

혈청 HCG 섬광근접측정법(Scintillation Proximity Assay)의 기초연구

최태현, 최창운, 임상무, 우광선, 정위섭, 임수정, 이수진
원자력병원

요약

방사성 동위원소를 이용한 체외진단 측정법으로 RIA가 가장 널리 쓰여져 왔으나, 결합분획과 유리분획의 분리과정에서 오는 번거로운 단점을 개선하기 힘들었다. 1979년 Hart와 Greenwald에 의해 소개된 섬광근접측정법(Scintillation Proximity Assay, SPA)을 이용하여 RIA의 단점을 극복하고자 하는 연구가 시작되었다. 주로 사용되는 방사성동위원소로 ^3H , ^{125}I 이 추천되는 핵종이며, 이 중에서 ^{125}I 을 이용한 hCG(human chorionic gonadotropin) 체외진단법으로서 SPA의 기초연구를 수행하였다. SPA bead와 방사능 크기에 따라 측정되는 자연계수치의 증가와 hCG 표준물질을 농도별로 회석하여 유의성을 가지고 있는지 확인하였고, hCG 농도가 높은 것으로 판명된 환자의 혈청을 측정하여 임상적용의 가능성을 확인하였다.

서론

방사면역측정법(RIA)은 1968년 Berson과 Yalow에 의해 소개되면서, 생물학 연구에서 가장 널리 쓰이는 분석방법으로 사용되게 되었다 1). 그러나 RIA방법은 결합분획과 유리분획의 분리과정이 필요하고, 비특이 결합의 증가와 작업단계의 자동화가 어렵다. 특히 수용체 연구와 같은 저농도 측정시에 민감도가 떨어지는 단점이 있다.

1979년 Hart와 Greenwald에 의해 소개된 scintillation proximity assay(SPA)는 독특한 RIA의 검사법으로, 항체 또는 수용체들이 코팅된 fluomicrospheres를 사용하여 RIA가 가지는 문제점들을 해결할 수 있게 되었다 2)3). 이 방법은 민감도가 높고, 분리과정이 필요없는 특징을 가지고 있다. 사용되는 핵종으로는 전자를 방출하는 방사성핵종들로 ^3H , ^{125}I 있다. ^3H 은 6 keV의 베타입자를 방출하고 그 비정(非正)은 4 μm 이다. ^{125}I 은 35 keV의 auger전자를 방출하고 비정(非正)은 35 μm 이다. 이 두 방사성동위원소가 SPA에 적당한 핵종으로 널리 사용되고 있다 3). 그 외에 ^{14}C , ^{35}S 등은 전자를 방출하는 핵종이나 물속에서 비정(非正)이 80~90 μm 로 SPA법에 사용하기에는 자연계수치가 지나치게 높아 부적당하다 1). 섬광체를 포함하는 fluomicrospheres에 특정항원에 대한 항체나 수용체를 코팅하여, 방사성동위원소 표지항원이 fluomicrospheres의 항체에 결합하여 비정거리내 fluomicrospheres의 섬광체를 여기시켜 광자를 방출하게 된다 2). 이러한 원리를 이용하여 저농도의 시료나 membrane receptor에 대한 연구를 수행할 수 있게 되었으며, 측정시간의 단축과 삼중수소와 같은 β -ray 핵종의 측

정에 사용되는 섬광액의 폐기 문제를 해결할 수 있게 되었고, B/F 분리과정이 필요없어 시간 경과에 따른 항체와 항원의 결합 정도의 변화를 연속적으로 관찰할 수 있는 장점이 있다(4)5)6).

이러한 SPA법의 장점을 활용하여, 본 연구는 임신한 여성의 소변이나 중앙항원으로 혈청에서 측정 가능한 hCG(human Chorionic Gonadotropin) 홀몬 측정을 통해 기초연구를 수행하였다.

방법

1. 항체의 biotinylation

항체에 biotin을 붙이기 위하여 50mM sodium bicarbonate buffer pH 8.1로 Goat anti- α hCG IgG(100 μ g/ml, 녹십자사) 1ml을 준비하였다. 10mg/ml의 농도로 sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce Co, USA)을 D.W.에 녹인 뒤 20 μ l를 넣고, 4 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 반응시켰다. 반응하지 못한 biotin을 제거하기 위하여, Centricon-30(Amicon Co, USA)을 사용하여 5,000 \times g에서 30분동안 원심분리를 2회 반복하여 10mM phosphate buffered saline(PBS)으로 교체하였고, 항체는 100 μ g/ml의 농도로 10mM PBS에 보관하였다.

2. ^3H , ^{125}I 의 방사능 차이에 따른 자연계수치 측정

^3H , ^{125}I (Amersham Co, UK)들의 방사능 변화에 따른 SPA bead(Amersham Co, UK)의 비특이적 결합에 의한 자연계수치를 확인하기 위하여 tritium(^3H)을 약 $1 \times 10^5 \sim 10$ Bq로 희석하였고 Na^{125}I 을 약 $7 \times 10^5 \sim 70$ Bq별로 희석하여 각 핵종의 방사능에 따라 액체섬광계수기(Packard Co)의 배후방사능값이 변하는지 관찰하였다.

3. hCG 표준농도 측정

측정과정을 통하여 측정되는 SPA법의 기본 원리는 Fig 1의 그림과 같다. 이러한 원리를 통해 hCG 표준물질을 측정하여 이 실험이 측정방법으로 사용이 가능한지를 확인하였다.

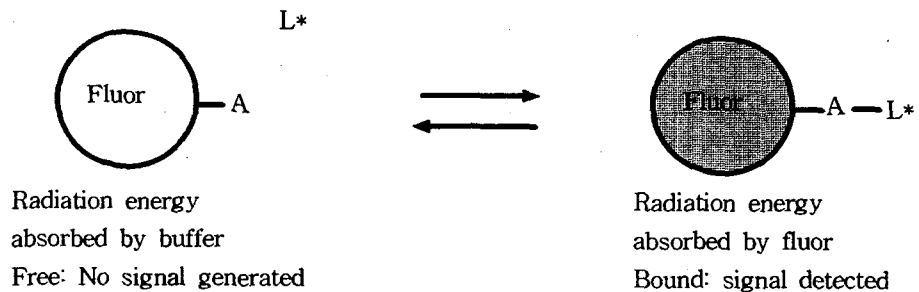


Fig. 1. The principle of scintillation proximity assay (labelled ligand;L*, acceptor molecule;A, fluomicrosphere;Fluor).

hCG의 표준물질과 [¹²⁵I]hCG는 Incstar Co. 것을 사용하였다. 먼저 항체-biotin을 1 μ/ml로 희석하였다. 측정방법은 다음과 같다.

- i 바이알에 표준물질(검체)을 200 μl를 넣는다.
- ii [¹²⁵I]hCG(tracer)를 100 μl 첨가한다.
- iii 항체-biotin(1 μg/ml)을 100 μl 추가하여 넣고, 실온에서 20분동안 방치한다.
- iv streptavidin이 코팅된 SPA bead를 20 μl 첨가한 후, 실온에서 10분 방치한다.
- v 액체섬광계수기의 에너지 창을 tritium 측정에 맞춘 후, 측정한다.

hCG 표준물질을 200mIU/ml에서 12.5mIU/ml의 농도별로 희석하여 위의 측정방법으로 처리하여 액체섬광계수기를 사용하여 측정하였다. 그리고 임상검체중 hCG titer가 높은 혈청을 연속희석하여 SPA법으로 측정해 보았다.

결과

1. ³H, ¹²⁵I의 방사능 차이에 따른 자연계수치 측정

³H은 방사능을 10~10⁵ Bq에 따라 섬광액을 넣고, 측정한 것과 SPA bead와 넣은 자연계수치를 각각 측정하였고, ¹²⁵I은 69~6.9×10⁵ Bq에 따르는 감마계측기와 SPA bead와 넣은 자연계수치를 측정한 결과 Table 1과 같이 나타났다.

Table.1. Background counts of varying the radioactivity of radionuclide.

H-3				I-125			
방사능 (Bq)	방사능계측값 (CPM)	SPA의 배후방사능 (CPM)	cpm/bkg ratio(%)	방사능 (Bq)	방사능계측값 (CPM)	SPA의 배후방사능 (CPM)	cpm/bkg ratio(%)
10	281	38	13.5	69	358	92	25
10 ²	2522	21	0.83	6.9×10 ²	3319	70	2.1
10 ³	23798	31	0.13	6.9×10 ³	32888	134	0.4
10 ⁴	224185	86	0.038	6.9×10 ⁴	322374	1075	0.33
10 ⁵	2130422	635	0.03	6.9×10 ⁵	3123521	9792	0.28

2. hCG 농도 측정

결과 Fig 2와 같이 농도결정을 위한 표준곡선 농도변화에 따라 일정한 측정값을 가지는 것을 확인하였다. 또한 혈청 검체 중 RIA방법으로 측정한 hCG 농도가 높게 나타난 것을 10 배로 연속희석하여, 농도에 따라 측정 값이 일정하게 변하여, 혈청검체가 임상적으로 사용이 가능함을 알 수 있었다(Fig 3).

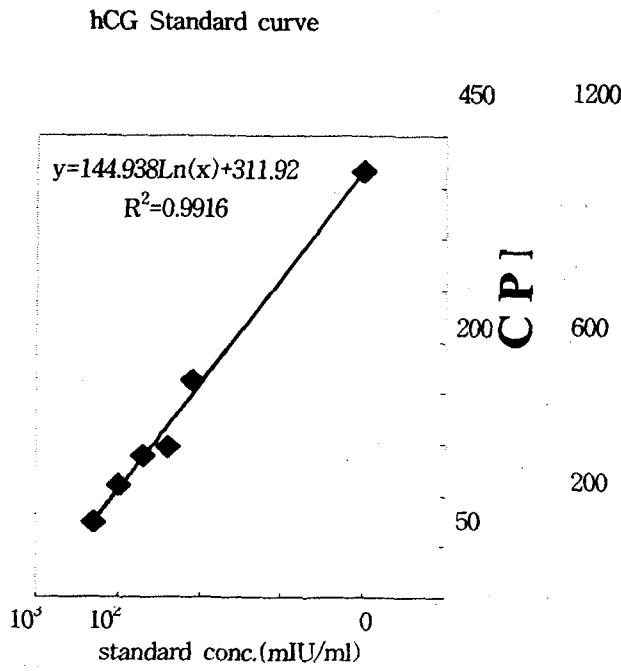


Fig.2. Standard curve of hCG standard assay.

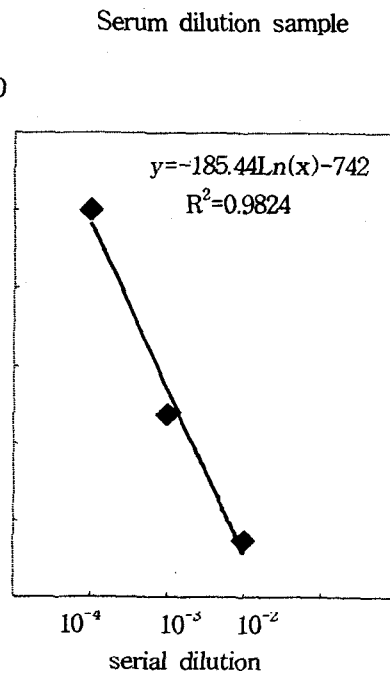


Fig.3. Concentration dependence for serum hCG.

결론

방사면역측정법 중 조작의 간편성과 시간경과에 따라 역학적 변화를 관찰하기에 편리한 SPA법의 기초연구를 확립하기 위하여 biotin이 합성된 항체를 효과적으로 제조하였고, 측정 방법으로서의 유효성을 확인하기 위하여 표준곡선을 작성하여 사용 가능성을 확인하였다. 자연계수값 측정에서 RIA법에서 사용되는 표지항원의 방사능은 대개 한 검체당 2000~3000 Bq을 사용하는데 비해 SPA법은 더 적거나 많아도 계측값의 차이가 나지않음을 알 수 있다. SPA법은 순수 베타선 방출 핵종을 섬광액 첨가없이 측정이 가능하며, 종양항원이나 세포막 수용체연구에 유용할 것이다.

참고문헌

1. S. Udenfriend, L. Gerber, N. Nelson. Scintillation Proximity Assay: A Sensitive and Continuous Isotopic Method for Monitoring Ligand/Receptor and Antigen/Antibody Interactions. Analytical biochemistry 161: 494-500, 1987
2. H. Hart, E. Greenwald. Scintillation-Proximity Assay of Antigen-Antibody Binding Kinetics: Concise Communication. J Nucl Med 20: 1062-1065, 1979

3. N. Bosworth, P. Towers. Scintillation proximity assay. *Nature* 341: 167-168, 1989
4. N. Nelson. A Novel Method for the Detection of Receptors and Membrane Proteins by Scintillation Proximity Radioassay. *Analytical biochemistry* 165: 287-293, 1987
5. L. Sonatore, D. Wisniewski, L. Frank, P. Cameron. The Utility of FK506-Binding Protein as a Fusion Partner in Scintillation Proximity Assays: Application to SH2 Domains. *Analytical biochemistry* 240: 289-297, 1996
6. C. Baker, R. Poorman, F. Kezdy, D. Staples, C. Smith, A. Elhammer. A Scintillation Proximity Assay for UDP-GalNAc:Polypeptide, N-Acetylgalactosaminyltransferase. *Analytical biochemistry* 239: 20-24, 1996
7. S. Udenfriend, L. Gerber, L. Brink, S. Spector. Scintillation proximity radioimmunoassay utilizing ¹²⁵I-labeled ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8672-8676, 1985
8. T. Carrick, B. Bingham, C. Eppler, W. Baumbach, J. zysk. A Rapid and Sensitive Binding Assay for Growth Hormone Releasing Facktor. *Endocrinology* 136: 4701-4704, 1995