

甲狀腺刺戟호르몬의 放射免疫測定法 確立에 관한 研究

韓國에너지研究所 同位元素室

金 載 祿 · 朴 敬 培 · 吳 玉 斗

=Abstract=

Studies on Setting up of Radioimmunoassay System of Thyroid Stimulating Hormone

Jae Rok Kim, Kyung Bae Park, and Ok Doo Aw

Isotope Division, Korea Advanced Energy Research Institute

Various TSH RIA kit components were prepared. Conditions for ¹²⁵I labelling of h-TSH were optimized by diminishing the amount of chloramine-T, extending reaction time and lowering reaction temperature. Yield, specific activity, and immunological activity could be maintained moderately under such mild reaction conditions.

The mixture of polyethyleneglycol(PEG) and second antibody worked effectively as a B/F separation agent. Even though the mixture was made with more diluted PEG and second antibody than those of using the sole component separately, the time required for the B/F separation was shorter in case of using the mixture.

The sequential saturation technique was efficient than those of applying ordinary equilibrium saturation technique in assay sensitivity and assay precision points of view.

序 論

甲狀腺機能은 內科的으로 매우 重要하고 甲狀腺호르몬類의 血中濃度는 甲狀腺疾患과 直結되기 때문에 여러가지 放射測定法이 알려져 있다. 甲狀腺刺戟호르몬(thyroid stimulating hormone, TSH)은 糖蛋白質로서 分子量이 約 28,000程度이고 아미노산의 構成, 配列, 그리고 炭水化物的 含有量이 서로 다른 α 와 β 의 두가지 subunit로 構成되어 있다¹⁾.

다른 RIA 에서와 마찬가지로 TSH RIA 에 있어서도 한 抗原에만 特異的으로 結合할 수 있는 力價높은 抗體의 生産, 抗原本來의 活性을 維持하면서 安定성이 높은 標識抗原인 追跡子의 製造 등이 중요하다. 또 이들 抗原 抗體가 効果的으로 反應할 수 있도록 反應混合物의 pH, 反應溫度, 反應時間 등 RIA 最適條件을 確立해야 한다. 抗原 抗體間의 免疫反應이 終結된 후 에 遊雜狀態의 抗原과 抗體와 結合한 抗原을 効果的으로

로 分離(B/F 分離)하는 문제도 또한 RIA 確立을 위한 必須要件이다. 특히 追跡子인 ¹²⁵I-hTSH 의 安定성과 그 免疫活性維持를 위해 標識反應條件이나 貯藏方法 등에 關係 많은 研究가 進行되어 왔다^{2,3)}.

이에 著者들은 TSH, RIA 를 實驗室內에서 自體的으로 確立하기 위하여 ¹²⁵I 標識反應 및 安定化, B/F 分離劑의 檢討, 抗體溶液 및 標準溶液의 調製 등 각 RIA 成分을 製造하고 그 成分을 使用하여 標準投與應答曲線 및 人血清 TSH 單位測定值 比較 등을 수행하고 그 結果를 報告하는 바이다.

資料 및 實驗方法

1. 材 料

- 1) Bovine serum albumin, Sodium azide, Barbituric acid sodium salt, Sephadex G-75 및 G-100 등 : Sigma 社製
- 2) Human thyroid stimulating hormone, hTSH

(7 IU/mg), Rabbit antibody to hTSH, Bovine TSH (bTSH), Goat antibody to rabbit γ -globulin, hTSH standard (Calstan II, 536 μ U/ml) 등 : Calbiochem-Behring 社製

3) TSH RIA 키트(Amerex-M), Na ¹²⁵I(IMS-300) 등 : Amersham Int. 社製

4) Micro sample tube: Pierce 社製

5) Polyethyleneglycol(MW, 6,000): Merck 社製

2. 實驗方法

1) ¹²⁵I 標識反感

1) bTSH의 ¹²⁵I 標識反感 : Greenwood 등⁴⁾의 Chloramine-T 法으로 실시하였으나 그 양을 1.8~80 μ g 까지 조절하여 실온(25°C)에서 반응시켰다. 즉, 끝이 뾰족한 폴리프로필렌시험관(micro sample tube)에 bTSH(100 μ g/100 μ l H₂O) 溶液 10 μ l, Na¹²⁵I 1mCi(10 μ l), Chloramine-T(CT) 1.8~80 μ g 을 0.5M 인산염 완충용액(pH 7.4) 10 μ l 에 녹인 용액 등을 차례로 가한 다음 실온에서 混合器로 잘 섞어주면서 0.5~15分間 反應시켰다. 단, 15分인 경우에는 1分間은 混合器로 교반하고 3分間은 그대로 放置해두는 操作을 몇번 되풀이 하였다. 反應混合物에 아황산수소나트륨 5~125 μ g 을 0.05M 인산염 완충용액(pH7.4) 10 μ l 에 녹인 용액을 가하여 反應을 終結시켰다.

또한 5 μ g 의 lactoperoxidase(LPO)가 固定된 시험관에⁵⁾ bTSH 15 μ g 을 0.05M 인산염 완충용액(pH 7.4) 10 μ l 에 녹인 용액을 가한 다음 Na ¹²⁵I 水溶液 10 μ l(1 mCi)와 0.003% H₂O₂ 水溶液 10 μ l 를 차례로 가하고 混合器로 2分間 잘 섞어준 후 0.25% NaN₃ 水溶液 100 μ l 를 가하거나 NaN₃ 대신 反應混合物를 다른 시험관으로 옮기는 조작만으로 反應을 終結시켰다.

2) hTSH의 標識反感 : bTSH의 경우와 같은 방법으로 실시하였으며 hTSH 5 μ g, Na¹²⁵I 500 μ Ci, CT 1.8 μ g 을 각각 사용하여 4~28°에서 15分間 反應시켰다.

分離 및 收得率測定

1. ¹²⁵I-bTSH

Sephadex G-75 또는 G-100을 넣은 유리대롱(1 \times 50 cm)을 2% BSA 水溶液으로 平衡시킨 후 0.05M 인산염 완충용액(pH7.4)으로 세척하였다. 4°C에서 反應混合物를 Sephadex 대롱에 가한 다음 同완충용액으로 流出시키고 2% BSA 水溶液 0.1ml 씩을 含有하고 있는 플라스틱시험관에 0.7ml 씩 받았다. 각 시험관의 放射

能을 計測하고 먼저 流出된 두 피크에 해당하는 분획들의 放射能을 全放射能으로 나누어 標識收得率을 구하였다. 또한 대롱크로마토그래피 대신 방사종이 크로마토그래피(Whatman 1호 종이, 85%에탄올 전개용매)를 실시하여 收得率을 구하였다.

2. ¹²⁵I-hTSH

¹²⁵I-bTSH의 경우와 마찬가지로 分離하고 그 收得率을 測定하였으며 첫번째 피크를 나타내는 시험관중 放射能이 높은 3개(F-1)와 두번째 피크중 4개 시험관(F-2)의 流出液을 각각 따로 모아 0.076M 바르비탈 완충용액(pH8.6)으로 35,000~40,000 cpm/0.1ml 되게 稀釋한 다음 2ml 씩 vial 에 少分하여 -20°C에서 保管하거나 冷凍乾燥하여 4°C에서 保管하였다.

放射免疫測定(RIA)

1. ¹²⁵I-hTSH의 安定度 檢定

Amersham Int. 社의 hTSH RIA 키트成分中 ¹²⁵I-hTSH 追跡子를 F-2로 代替使用하여 Bo/T(%)값을 구하였다. 標準投與量 零인 溶液(zero standard solution) 200 μ l, hTSH 抗體溶液 100 μ l, ¹²⁵I-hTSH(또는 F-2) 100 μ l 를 시험관에 넣고 37°C에서 2時間 定溫維持한 다음 沈澱劑 1ml 를 가하고 실온에서 15分間 放置하였다. 反應混合物를 15~30分間 遠心分離(1,500g 以上)한 다음 上澄液을 탈아내고 沈澱層의 放射能(Bo)을 計測하여 全放射能(T)에 대한 Bo/T(%)를 계산하였다.

2. 標準投與應答曲線

¹²⁵I-hTSH의 安定度 檢定時와 同一한 方法으로 hTSH 標準投與量(0~51 μ U/ml)을 使用하여 B/T(%)값을 구하였다. BT(%)값을 y 축에 標準投與量을 x 축에 잡아 標準投與應答曲線을 얻거나 B/Bo(%)값을 y 축(Logit)에 標準投與量을 x 축(Log)에 잡아 標準投與應答直線을 얻었다.

hTSH RIA 用 키트成分의 製造

아래와 같은 키트成分 溶液들을 製造하였다.

1. 稀釋 및 RIA 用 變衡溶液

0.076M 바르비탈 완충용액(pH8.6)에 0.9% NaCl, 0.5% BSA, 0.1% NaN₃가 含有된 溶液

2. hTSH 標準溶液

標準試藥(Calstan II)에 증류수 4ml를 가해 녹인 용액(536 μ U hTSH/ml)을 희석용 완충용액으로 희석하여 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50 μ U hTSH/ml의 濃도가 되게 만든 용액

3. hTSH 抗體溶液(제 1 抗體)

구해진 RIA 用 抗體를 토끼血清이 含有된 희석용완충용액으로 1 : 700되게 희석한 용액

4. 結合抗原의 分離劑

0.05M 인산염완충용액(pH7.4)에 0.1%의 NaN_3 가 含有된 5% 폴리에틸렌글리콜(PEG) 용액(0.9ml)과 제 2 抗體를 同완충용액 12.5ml로 녹인 용액0.1ml씩을 混合한 용액

結果 및 考察

bTSH와 hTSH의 ^{125}I 標識反應 및 分離

Chloramine-T 法²⁾에 의하여 bTSH 10 μ g과 Na^{125}I 1mCi를 Chloramine-T(CT) 80 μ g 存在下에서 30초간 反應시키고 그 標識收得率을 방사중이크로마토그래피(RPC)법으로 구한 結果 38.3%였다(Table 1) bTSH를 15 μ g으로 증가시키고 CT를 25 μ g으로 감소시켰을 때 그 標識收得率은 34.2%로 조금 감소하였다. 또한 CT를 1.8 μ g으로 大幅 감소시킨 대신 反應時間을 15分으로 연장하였더니 그 標識收得率은 57.6%로 증가하였다.

酸化劑인 CT와 還元劑인 아황산수소나트륨을 가능한 한 적게 使用함으로써 標識化合物의 化學的 損傷을 어느 정도 막을 수 있었다. 이와 같은 사실은 CT를 적게 사용하는, 즉 溫和한 標識條件으로 放射免疫測定用 追跡자를 製造하는 것이 효과적임을 지지해 주는 것이다. Caro 등⁶⁾은 rTSH, hTSH, hLH, 인슈린 등을 ^{125}I 로 標識할 때 CT 3.6 μ g, 아황산수소나트륨 9.6 μ g을 사용하여 rTSH의 경우 37~59%의 標識收得率을 얻었다. 또한 徐 등⁷⁾은 CT 1.8 μ g 아황산수소나트륨 5 μ g을 사용하여 ^{125}I -hTSH를 제조하고 이를 hTSH RIA用 追跡자로 이용하였다.

CT와 아황산수소나트륨을 각각 1.8 μ g, 5 μ g 등으로 사용하는 溫和한 條件이 CT 25 μ g을 사용했을 때보다 Fig. 1에 나타난 바와 같이 bTSH의 標識反應中 損傷이나 凝集에 기인하는 것으로 推定되는 F-1분획이 減少되고 ^{125}I -bTSH인 F-2분획이 增加된다는 사실을 본 研究를 통하여 確認하였다.

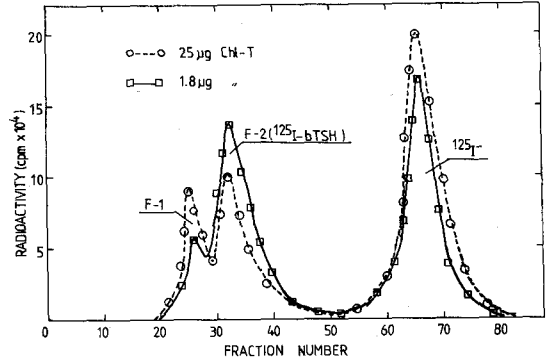


Fig. 1. A typical separation pattern observed in the purification of ^{125}I -labelled b-TSH by a Sephadex gel(G-75) filtration.

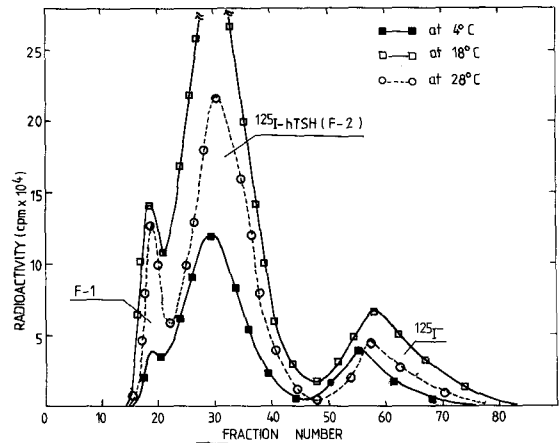


Fig. 2. A typical separation pattern observed in the purification of ^{125}I -labelled h-TSH by a Sephadex gel(G-100) filtration.

CT보다 더 溫和한 酸化劑인 lactoperoxidase(LPO)를 플라스틱시험관에 固定하여 인슈린을 ^{125}I -로 標識하는 LPO 固相法을 本著者들은 개발하여 報告한 바 있다⁵⁾. 이 固相法에 의한 標識收得率은 43.7%였으며 Sephadex 대용크로마토그램 상에 나타난 분리모양으로 보아 CT 25 μ g을 사용했을 때와 거의 비슷한 F-1분획을 確認할 수 있었다. LPO 固相法에서는 酵素抑制劑(enzyme inhibitor)인 NaN_3 를 가하는 대신 反應混合物를 다른 시험관으로 옮기는 조작만으로도 反應을 終結시킬 수 있었다. 따라서 CT法과 LPO 固相法の 結果로 보아 F-1분획이 生成되는 것은 CT法에서는 還元劑보다는 주로 酸化劑인 CT에 의한 bTSH의 損傷 또는 凝集에 의한 것이라할 수 있다.

bTSH의 標識反應結果를 토대로 CT 1.8 μ g, 아황산수소나트륨 5 μ g을 使用한 溫和한 條件下에서 hTSH

Table 1. Radioiodination of b-TSH^a

b-TSH(μ g)	Chloramine-T(μ g)	Na ₂ S ₂ O ₅ (μ g)	Rxn. Time(min.)	Labelling (yield) ^b (%)
10	80	125	0.5	38.3
15	25	125	0.5	34.2
15	1.8	5	15	57.6
15	(5) ^c	—	2	43.7

- a. One mCi Na ¹²⁵I was reacted with b-TSH at r.t.(25°C)
 b. Calculated applying a radio PC technique
 c. Immobilized LPO on plastic tube was used instead of using Chloramine-T

Table 2. Radioiodination of h-TSH^a

Runs	Na ¹²⁵ I(μ Ci)	Reaction temperature(°C)	Labelling yield ^b (%)	Specific activity(μ Ci/ μ g)
1	1,000	28	83.2	166
2	1,000	18	80.3	160
3	500	4	77.7	77.7

- a. Five μ g of h-TSH was radioiodinated for 15 minutes in the presence of 1.8 μ g of chloramine-T followed by 5 μ g of sodium metabisulfite
 b. Calculated applying a radio PC technique

5 μ g 을 15분間 標識反應시킨 結果 28°, 18°, 4°C 등으로 反應溫度를 變化시킴에 따라 그 標識收得率은 각각 83.2%, 80.3%, 77.7%로서 약간 감소하는 경향은 있지만 큰 차이는 없었다(Table 2).

Fig. 2에서 보는 바와 같이 Sephadex G-100대롱크로마토그래피를 실시하여 얻은 분리모양에서 hTSH가 標識反應中 損傷 또는 凝集에 의하여 生成된 것으로 推定되는 F-1분획과 本來의 hTSH(intact hTSH)가 標識된 F-2분획, ¹²⁵I-분획들이 있음을 확인하였다. 그러나 反應溫度를 28°에서 4°로 낮춤에 따라서 F-1분획은 점차 감소하는 반면에 F-2분획은 증가하였다. 4°인 경우 F-1분획은 거의 무시할 정도로 감소하여 大部分이 F-2분획임을 알 수 있었다.

徐등⁵⁾이 Greenwood의 CT法 그대로 CT 88 μ g, 아황산수소나트륨 240 μ g 을 사용하여 hTSH 15 μ g 을 Na ¹²⁵I 1mCi 로 4°에서 30초간 반응시킨 다음 Sephadex G-75 대롱크로마토그래피로 분리한 결과에 의하면 첫 번째 피크가 주피크로 나타났고 이어서 작은 피크들이 나타났다. 또한 CT 1.8 μ g, 아황산수소나트륨 5 μ g 을 사용하여 hTSH 1~15 μ g 을 Na¹²⁵I 0.1~0.7mCi 로 25°에서 12~15분간 반응시키는 등 溫和한 反應條件下에서는 두 번째 피크는 나타나지 않기 때문에 標識反應中 hTSH의 損傷이 最少化된다고 하였다.

Golaire등⁷⁾은 Greenwood의 方法을 使用하여 hTSH 2.5 μ g 을 Na¹²⁵I 2mCi 로 반응시킨 다음 Sephadex G-100 대롱크로마토그래피로 분리한 결과 分子量이 200,000으로 추정되는 첫 번째 피크(42%)와 本來의 hTSH가 標識된 두 번째 피크(58%, 分子量28,000)가 나타났으며 첫 번째 피크가 損傷된 ¹²⁵I-hTSH라고 하였다. 이러한 분리모양은 Pekary 등²⁾의 결과와 도一致한다. 따라서 徐등이 報告한 분리모양은 이들의 研究結果와도 큰 차이가 있다.

¹²⁵I-hTSH의 安定度

hTSH 5 μ g 을 Na¹²⁵I 1mCi 로 반응시킨(Run 1) 다음 Sephadex G-100 대롱크로마토그래피를 실시하여 분리한 F-2분획 중 放射能이 높은 4개 시험관의 流出液을 混合하고 0.076M 巴比탈완충용액(pH 8.6)으로 35,000~40,000cpm/0.1ml 되게 稀釋한 다음 2ml 씩 少分하여 -20°에서 保管하거나 冷凍乾燥하여 4°에서 保管하면서 免疫活性的 安定度를 測定하였다.

Amersham Int.社, hTSH RIA 키트成分中 ¹²⁵I-hTSH 만 F-2분획(KAERI's ¹²⁵I-hTSH)으로 代替하여 RIA 標準投與應答曲線을 작성해봄으로써 標識反應시킨 날로부터 1주, 2주, 4주 등의 간격으로 그 安定度를 測定하였다. KAERI의 ¹²⁵I-hTSH는 製造된지 1주, 2주, 4주, 6주 등으로 경과됨에 따라 不安定하여 그 相

Table 3. Stability of ^{125}I -hTSH on the Basis of Retaining Immunological Activity

Elapsed time after labelling (weeks)	KAERI's ^a		Amersham's ^b	
	Bo/T(%)	Relative stability(%)	Bo/T(%)	Relative stability(%)
0	48.5	100.0	31.2	100.0
1	40.2	82.8	29.7	95.2
2	34.	70.9	25.6	82.1
3	29.7	61.2	23.6	75.6
4	26.4	54.4	22.1	70.8
5	24.7	50.9	21.7	69.5
6	23.1	47.6	21.6	69.2
7	19.1	39.4	20.8	66.6

- a. All components except for ^{125}I -h TSH were those of Amersham. The specific activity of KAERI's ^{125}I -h TSH was about $166 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ h-TSH
 b. All components including ^{125}I -h TSH were those of Amersham. The exact specific activity and labelling date of the Amersham's ^{125}I -h TSH is not known

Table 4. Stability of ^{125}I -h TSH on the Basis of Retaining Immunological Activity^a

Elapsed time after labelling (weeks)	Bo/T(%) ^b	Relative stability (%)
0	35.9	100
1	35.8	99.7
2	35.6	99.2
3	35.5(35.7)	98.8(99.4)
4	32.3	89.9
5	31.5	87.7
6	30.7(31.4)	85.4(87.5)
7	29.6	82.5
8	28.4(28.5)	79.1(79.4)

- a. All components were KAERI's
 b. Specific activity was about $80 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ h-TSH
 c. Figures in parentheses are Bo/T of freeze dried ^{125}I -h TSH

對的 安定度(Bo/T(%))는 82.8, 70.9, 54.4, 47.6 등으로 급격히 감소하였다. 반면에 Amersham Int. 社의 ^{125}I -hTSH는 輸入하여 入手한 날로부터 同一한 기간이 경과함에 따라 Bo/T(%)가 5.2, 82.1, 70.8, 69.2로 비교적 완만하게 감소하였다(Table 3). KAERI 제품의 不安定要因은 무엇보다도 비교적 높은 比放射能($166 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)에 起因할 가능성이 있었기 때문에 比放射能이 약 $77.7 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 인 ^{125}I -hTSH(Run 3)를 제조하여 再檢定하였다. 後述하겠지만 hTSH RIA 最適條件을 著者들

이 確立한 다음 KAERI 製品의 全成分을 使用하여 그 安定度를 測定하였더니 제조후 1주, 2주, 4주, 6주, 8주 등으로 경과함에 따라서 그 相對的 安定度는 99.7, 99.2, 89.9, 85.4, 79.1%로 매우 완만하게 감소하였다. 이러한 現象은 冷凍乾燥한 ^{125}I -TSH에 대해서도 똑 같이 관찰되었다. 이와 같은 결과는 Amersham Int. 社 ^{125}I -hTSH의 경우 6週後(輸入期間을 감안하면 제조후 약 8週에 해당)의 69.8%와 비교해도 9.3% 만큼 더 높다.

또한 ^{125}I -hTSH를 精製한 溶液($2,500,000\text{cpm}/0.1\text{ml}$)을 그대로 -20° 에서 8週間 保管해 두었다가 50배로 희석하여 그 安定度를 測定하였더니 76%였다. 따라서 比放射能이 약 $80 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 인 경우에는 희석하지 않아도 放射線分解에 의한 免疫活性減少는 거의 없는 것으로 생각된다.

比放射能이 약 $166 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 인 경우는 hTSH 分子當 ^{125}I 원자가 2개, $80 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 인 경우는 1개의 ^{125}I 원자가 標識되어 後자가 前者보다 放射線分解에 의한 hTSH의 免疫活性低下나 遊離되는 ^{125}I 양이 減少되어 더욱 安定化된다고 생각된다.

徐 등³⁾도 Daiichi hTSH RIA 키트를 사용하여 hTSH 分子當 ^{125}I 가 1~2개 標識된 경우 Bo/T(%)값이 50이고 1개미만이거나 3개이상이면 Bo/T(%)값이 감소하는 현상을 보였다. -20° 에서 保管하면 6~7週까지는 RIA 用으로 使用可能하다고 하였지만 ^{125}I 원자가 2개 標識된 경우에 대해서는 本 研究結果로 미루어 보아 그것은 不安定해야 할 것이다.

Table 5. Standard Dose Response in h-TSH RIA Obtained by Using F-1 and F-2 ^{125}I -h TSH^a

Standards ($\mu\text{U/ml}$)	^{125}I -h TSH			
	F-2		F-2	
	B/T(%)	Bo(%)	BT(%)	B/Bo(%)
0	49.5	100	48.5	100
0.7	44.9	90.7	44.4	91.5
2.8	38.2	77.2	37.1	76.5
5.3	33.2	67.1	29.2	60.2
10.0	25.5	51.5	21.7	44.7
24	16.9	34.1	10.9	22.5
48	11.9	24.0	6.2	12.8

a. RIA was carried out in accordance with a sequential saturation method and all components except for ^{125}I -h TSH were those of Amersham.

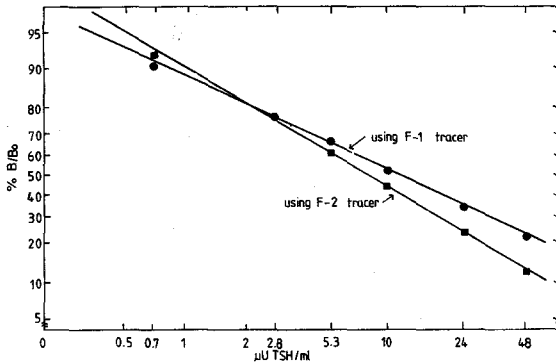


Fig. 3. h-TSH RIA standard dose response line (Logit-log).

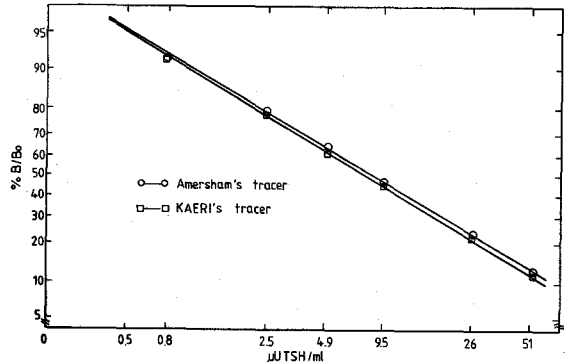


Fig. 4. h-TSH RIA standard dose response line (Logit-Log).

F-1 및 F-2분획의 抗體親和性 比較

Amersham Int. 社의 ^{125}I -hTSH를 本 研究에서 제조한 F-1, F-2분획(Run 3)으로 代替하여 抗體와 結合시켜 봄으로써 그 性能을 比較하였다. Table 5에 나타난 바와 같이 F-1과 F-2의 Bo/T(%)값이 각각 49.5, 48.5로 거의 同一하였다. Pekary 등²⁾은 F-1분획이 標識反應中凝集 또는 損傷에 의하여 生成되고 그 免疫活性이 低下되어 Bo/T(%)값도 감소된다고 보고하였으나 本 研究結果로는 두 분획의 免疫活性이 거의 同一하다고 할 수 있다. 반면에 免疫活性이 감소되었지만 F-1분획의 分子量이 크기 때문에 結合抗原을 分離할 때 未反應의 F-1분획이 一部 共沈된 結果로 非特異性結合이 添加되어 Bo/T(%)값이 거의 同一하다고 추측된다.

hTSH 標準投與量 0.7~48 $\mu\text{U/ml}$ 區間에서 F-1분획의 B/T(%)값이 F-2경우보다 조금씩 높은 경향을 보

여 주고 있다. 그 원인은 前述한 바와 같이 非特異性結合이 添加되어 일어나는 현상이라 생각된다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 標準投與應答直線에서 모두 좋은 直線성을 보여 주었으나 F-2분획에서 직선의 기울기가 F-1분획보다 더 크게 나타나서 測定銳敏度面에서 優秀하다고 할 수 있다.

^{125}I -hTSH의 性能比較

最適條件으로 製造한(Run 3) ^{125}I -hTSH(F-2분획)의 製造直後의 性能을 Amersham Int. 社 追跡자와 比較하였다. Table 6에 나타난 바와 같이 KAERI 제품의 Bo/T(%)값이 48.4로서 Amersham Int. 社의 31.3%보다 무려 17.1%나 더 높았다. 이와 같은 사실은 Amersham Int. 社 제품이 보다 苛酷한 조건에서 제조되어 그 免疫活性이 低下되었거나 輸入도중 일부 變性되었음을 의미한다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 標準投

Table 6. Performance Test of the KAERI's ¹²⁵I-h TSH Comparing with Those of Amersham^a

Standards(μ U/ml)	KAERI's		Amersham's	
	B/T(%)	B/Bo(%)	B/T(%)	B/Bo(%)
NSB	1.2	—	1.2	—
0	48.4	100	31.3	100
0.8	44.1	91.1	28.3	90.3
2.5	37.4	77.3	25.1	80.3
4.9	30.3	62.5	20.8	66.4
9.5	22.2	46.0	14.9	47.6
26.0	10.9	22.5	7.4	23.7
51.0	5.8	12.0	3.8	12.3

a. All components except for ¹²⁵I-h TSH(F-2) were those of Amersham and the specific activity of KAERI's ¹²⁵I-h TSH was 77.7 μ Ci/ μ g h-TSH

Table 7. Effect of Polyethyleneglycol Concentration on h-TSH RIA^a

PEG concentration(%)	NSB(%)	Bo/T(%)
2	0.75	1.5
5	1.2	34.5
8	1.2	34.5
10	1.3	34.5
15	1.8	34.5

a. Nine-hundred μ l PEG solution and 100 μ l 2nd antiserum solution were used for the 3rd incubation at room temperature for 20 minutes.

與應答直線의 直線性은 모두 좋으나 그 기울기는 KA-ERI 쪽이 약간 크게 나타났다. 따라서 本 研究로 얻은 ¹²⁵I-hTSH 는 우수한 RIA 用 追跡子임을 알 수 있다.

hTSH RIA 키트成分의 製造

Calstan II 標準試藥을 hTSH 除去血清으로 희석하는 代身 희석용완충용액으로 희석하여 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50 μ U/ml 등의 標準溶液을 만들어 사용함으로써 매우 간편하였다.

hTSH 抗體溶液은 自體生産이 가능하지만 hTSH 自體가 高價이기 때문에 Calbiochem 社의 RIA 用 抗體를 1 : 700배 희석하여 사용하였다.

結合抗原의 分離法(B/F 分離)으로서는 제 2의 抗體(Ab₂)를 가하여 沈澱을 透發케하는 二重抗體法²⁾과 沈澱法의 일종인 PEG 法³⁾을 混用(PEG+Ab₂)하여 兩者의 단점을 보완하는데 주력하였다. 먼저 標識抗原(¹²⁵I-hTSH)과 제 1 抗體(Ab₁)간의 免疫反應이 終結된 다음에 제 2 抗體(Ab₂ 1 : 20) 0.1ml 와 PEG 0.9ml 를 가한

후 실온에서 20分間 두었다가 沈澱을 遠心分離하였다.

Table 7에서 보는 바와 같이 2% PEG 를 사용하였을 때 非特異性結合(NSB)은 0.7%, Bo/T 값은 1.5%였다. 그러나 PEG 의 농도가 5%로 증가함에 따라 NSB 는 1.2%, Bo/T 값은 34.5%로 현저히 증가하였고 그 이상의 농도에서는 거의 변하지 않았다. 從來의 二重抗體法만으로는 定溫維持時間이 長時間(실온에서 적어도 10時間以上²⁾) 所要되는 단점이 있지만 本 PEG+Ab₂法은 이런 단점을 해결할 뿐만 아니라 실제로 PEG 농도가 단독으로 사용할 때보다 묽어 粘性이 작고 NSB 도 작기 때문에 assay error 를 줄일 수 있었다.

Amersham Int. 社의 h-TSH RIA 키트도 種類未詳의 沈澱補助劑가 含有된 二重抗體法을 사용하고 있는데 Ab₂는 磁化된 폴리머粒子에 固定되어 磁力로 分離하거나 遠心分離할 수도 있다. Travenol Laboratories Inc. 의 키트도 水溶性폴리머가 含有되어 있는 二重抗體를 사용하고 37°에서 5分間 定溫維持한 다음 遠心分離한다. 따라서 本 研究結果의 PEG+Ab₂法은 定溫維持時間面이나 NSB 측면에서 遜色이 없음을 알 수 있다.

hTSH RIA

Zettner 등⁹⁾이 報告한 非平衡放射免疫測定(non-equilibrium 또는 sequential saturation RIA)法에 의하면 제 1 단계에서 hTSH 標準抗原과 hTSH 抗體間 錯物形成을 위해 平衡에 도달할 수 있도록 定溫維持한다. 제 2 단계에서는 ¹²⁵I-hTSH 를 添加하고 이것이 hTSH 抗體의 未結合자리 (free binding site)와 반응하여 平衡에 충분히 近接할 수 있도록 定溫維持한다. 제 3 단

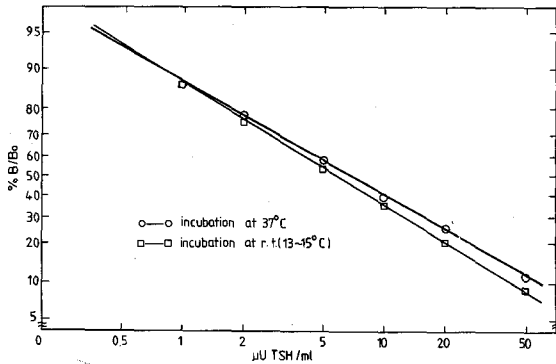


Fig. 5. h-TSH RIA standard dose response line (Logit-Log).

Table 8. Serum TSH Levels in Patients^a

Patients	Using KAERI's components	Using Amersham's components
A	4.77	5.02
B	1.42	1.54
C	1.93	2.71
D	0.97	0.85
E	1.05	0.67
F	1.01	1.17
G	0.66	0.72
H	2.03	1.97
I	1.03	1.07
J	1.34	2.02

a. Normal Range 0.5~5.0 μU/ml

계에서는 未反應의 抗原을 雜物로부터 分離하는 과정이며 제 2 단계의 반응을 終結시킨다.

실제로 hTSH 標準投與量 1~50 μU/ml 에서 37°에서 1.5시간 一次定溫維持하고 ¹²⁵I-hTSH 를 가한 다음 같은溫度에서 2時間 二次定溫維持하고 나서 PEG+Ab₂ 法으로 分離하였다(short protocol). Fig. 5에서 보는 바와 같이 標準投與量에 대한 勾配가 있음을 알 수 있고 좋은 直線性을 나타내었다. 또한 一次定溫維持를 室溫(13~15°)에서 9時間, 二次定溫維持를 室溫에서 20時間 실시한 경우에는 (overnight protocol) 前者보다 약간 큰 勾配가 있고 直線性도 좋기 때문에 RIA 測定 敏感度面에서 더 우수하다고 할 수 있다.

한편 平衡法에 의한 結果를 알아보기 위하여 hTSH, ¹²⁵I-hTSH, 그리고 hTSH 抗體溶液을 37°에서 2時間 定溫維持한 다음 PEG+Ab₂法으로 分離하여 標準投與

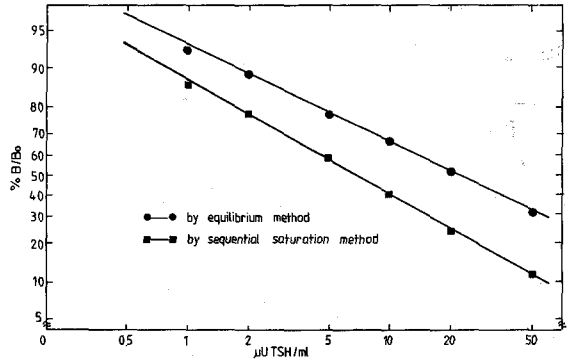


Fig. 6. h-TSH RIA standard dose response line (Logit-Log).

應答直線을 작성하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 그 직선의 기울기는 非平衡 RIA 보다 작음을 알 수 있어 測定敏感度面에서 非平衡 RIA 가 平衡 RIA 보다 우수함을 알 수 있었다.

人血清中の TSH 準位測定

10個의 人血清試料에 대한 血清 TSH 值를 Amersham Int.社 키트와 本 研究를 통하여 얻은 키트성분들(KAERI)을 사용하여 측정하였다. Table 8에서 보는 바와 같이 두 키트를 사용하여 얻은 측정결과는 거의 一致하였다.

結 論

hTSH RIA 確立을 위한 각종 RIA 成分을 製造하였으며 이 成分을 使用하여 sequential saturation RIA 法을 적용해서 標準投與應答直線의 作成 및 人血清中 TSH 準位測定值比較 등을 遂行한 結果 製造한 각 RIA 成分 및 그 方法이 hTSH RIA 에 適格함이 判明되었다. 그 主要內容은 아래와 같다.

1) hTSH 5μg 을 CT 1.8μg, 아황산수소나트륨 5μg 을 使用하여 Na¹²⁵I 500μCi 로 4°에서 15分間 反應시킨 다음 Sephadex G-100대롱크로마토그래피로 ¹²⁵I-hTSH 를 分離精製한 結果 標識反應中 hTSH 가 損傷 또는 凝集에 의하여 生成되는 것으로 推定되는 不純物은 거의 없었으며 방사종이크로마토그래피에 의한 標識收得率은 약 78%였다.

2) ¹²⁵I-hTSH 溶液을 -20°에서 保管하거나 冷凍乾燥하여 4°에서 保管하면 製造後 8週까지도 最初免疫活性의 79%를 維持하여 RIA 에 適格함을 알 수 있었고 Amersham Int. 社의 ¹²⁵I-hTSH 보다 安定성이 더 높았다.

3) 抗原 抗體間的 免疫反應이 終結된 後에 抗體와 結合된 抗原(B)과 遊離抗原(F)을 分離하는 分離劑로서는 5% PEG(0.9ml) 溶液과 0.1ml의 제 2 抗體(Ab_2 ; 1:20)를 混合한 PEG+ Ab_2 法을 使用함으로써 室溫에서 定溫維持時間을 20分으로 短縮시켰을 뿐만 아니라 非特異性結合도 1.2% 程度로 減少시켰다.

4) hTSH RIA 에서 sequential saturation RIA 가 equilibrium RIA 보다 敏感度 및 精密度面에서 優秀하였다.

5) Amersham Int. 社 hTSH RIA 키트와 本 研究를 통해 製造한 키트(KAERI)의 性能을 比較한 結果 標準 投與應答直線이 거의 一致되었으며 人血清中の TSH 測定值도 거의 一致하였다.

REFERENECS

- 1) Sairam MR, Li CH: *Human pituitary thyrotropin isolated and chemical characterization of its subunits. Biochem Biophys Res Commun* 51:336, 1973
- 2) Pekary AE, et al: *A sensitive and precise radioimmunoassay for human thyroid stimulating hormone. J Clin Endocrinol Metab* 41:676, 1975
- 3) Suh JH, et al: *A study on radiolabelling method in radioimmunoassay. Part 1, Kor J Nucl Med* 15:169, 1981
- 4) Hunter WM, Greenwood FG: *Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature* 194:495, 1962
- 5) Kim JR, Park KB, Awh OD: *^{125}I -labelling of protein using immobilized enzyme. Kor J Nucl Med* 18:55, 1984
- 6) Caro RA, et al: *Labelling of proteins with ^{125}I and experimental determination of its specific activity. Int J App Rad Isotop* 26:527, 1975
- 7) Golaire JG, Vanhaelst L: *Influence of the purification of ^{125}I -iodinated thyrotropin on the sensitivity of the radioimmunoassay. Int J App Rad Isot* 21:17, 1970
- 8) Sourgens H, et al: *The relative merits of polyethyleneglycol as a separating agent in the radioimmunoassay of thyroid hormone. Clin Chim Acta* 97:179, 1979
- 9) Zettner A, Duly PE: *Principle of competitive binding assay, saturation analysis. II sequential saturation. Clin Chem* 20:5, 1974