

계배 발생에 따른 닭 alpha-Fetoprotein의 분석

박대규 · 유정아 · 정대영 · 강신성

경북대학교 자연대 생물학과

배의 발생과 분화에 따른 혈청 alpha-fetoprotein (AFP)의 생리적 기능 규명을 위한 기초 실험의 일환으로, 모체와는 완전히 독립된 상태에서 발생과 분화가 이루어지는 계배의 혈청을 재료로 하여 CM-Sephadex C-50, hydroxyapatite 및 DEAE-Sepharose A-25 등의 크로마토그래피 방법에 의해 닭 혈청 AFP를 분리하였다. 닭 AFP는 분자량이 약 60 Kd로 사람 및 다른 포유동물 AFP의 분자량 (64-74 Kd)보다 작았다. 닭 AFP, 계배혈청 및 닭 혈청 등을 토끼에 면역하여 항체를 제조하였고, 이를 이용하여 닭의 배발생 단계에 따른 혈청 AFP 함량의 변화를 전기영동 및 면역학적 방법으로 정성 및 정량 분석을 실시하였다. 혈청 AFP 함량은 발생 7일-배 (AFP 농도 : 0.81 mg/ml)부터 점차 증가하여 13일-배에서 최고치인 2.46 mg/ml로 나타났으며 그 이후 급격히 감소되어 부화 직후에는 매우 낮은 농도 (0.22 mg/ml)였고 부화 4일에 거의 없어 졌으며, 이와 같은 AFP 함량의 변화는 혈청 알부민 함량의 변화와 거의 반비례 함을 알았다.

KEY WORDS: Alpha-Fetoprotein, Chick embryo, Ontogeny

Alpha-Fetoprotein (AFP)은 사람을 비롯한 척추동물에서 배 발생시 혈장에 다량 존재하다가 성체 시기에서는 농도가 거의 떨어지거나 없어지는 특성을 갖는 당단백질이다(Ruoslahti and Seppala, 1979). 그러나 성인에서도 세포성 간암이나 난황낭암과 같은 생식세포 종양환자의 경우, AFP의 농도가 급격히 증가됨이 보고됨으로서 AFP는 이들 암과 연관된 암-연관 항원으로 주목받게 되었으며, 이어서 다른 암과도 상당히 연관되어 있음이 확인되었다. (Hirai, 1982; Uriel *et al.*, 1984). 따라서 임상적으로는 AFP에 대한 항혈청을 사용하여 혈청 내 AFP 농도 변화를 측정함으로써 이와 연관된 각종 암(특히 간암)을 진단하는데 이용하고 있다. (Ruoslahti *et al.*, 1982; Chen *et al.*, 1985).

현재까지 AFP에 대한 연구는 주로 사람을 위시한 포유동물에 대한 것으로서 사람의 AFP는 590개의 아미노산으로 이루어진 단일 폴리펩티

드로서 분자량이 약 70 Kd임이 알려져 있으며, 태아 간이나 난황낭에서 합성됨이 보고되고 있다(Gitlin, 1975; Sell and Skelly, 1976; Morinaga *et al.*, 1983; Kang *et al.*, 1986). AFP는 태아 체액내 삼투 조절 작용이나 물질운반자로서의 기능을 가지며, 태아에서의 면역조절기능, 모체 에스트로겐의 차단효과 및 성장 조절인자로서의 기능을 갖는 것으로 보고되고 있으나 이 단백질의 태아 및 성체에서의 정확한 생물학적 기능에 대해서는 명확히 규명되어 있지 않다(review by Sell and Beker, 1978). 한편, 이러한 기능 해석에 있어서 지금까지는 주로 포유동물을 대상으로 한 것이므로 대부분 모체와의 상관관계를 가지고 설명하고 있다. 그러나, 조류는 배 발생시 모체와는 완전히 독립되어 일어나고, 또 정확한 배 발생단계 결정이 용이하므로 발생과정에 따른 배 자체에서의 AFP의 생물학적 기능과 AFP작용에 의한 생체물질의 변화 및 그 조절기구 등을 추구하는데 있어서 좋은 실험 모델이 된다고 볼 수 있다. 현재까지 조류의 AFP에 대한 연구는 많지 않다. Gitlin과 Kitzes

본 연구는 1986년도 후반기 한국 과학재단 연구비(862-0405-0201)로 수행된 것임.

(1967)는 계배에서의 AFP합성 부위가 포유동물에서의 것과 달리 난황낭이라고 보고하였고, Ruoslahti와 Pihko (1975)가 닭 AFP도 포유동물 AFP와 물리화학적 성질이 유사하다는 보고를 하였다. Ido와 Matsuno (1982)는 닭 AFP의 아미노산 조성이 포유동물 AFP와 유사하며 단일 분자중의 동질 단백질이라고 보고한 반면에, Martin등(1985)은 닭 AFP가 등전점이 조금씩 다른 4종류의 isoform을 갖는 이질 단백질이라고 기술하는 등 서로 다른 주장을 하고 있어서 논란이 되고 있다.

본 실험은 앞으로 계배의 발생과 분화에 따른 이 단백질의 구조 및 그 기능에 대한 것을 규명해 나갈 연구목적의 일환으로, 모체와는 완전히 분리된 상태에서 발생과 분화가 이루어지는 계배를 재료로 하여 개체 발생에 따른 AFP 합성량의 변화 및 이행에 대한 것을 면역학적으로 분석하고, 계배 혈청으로부터 여러 단계의 분리와 정을 거쳐 닭 AFP를 분리하여 몇가지 특성을 분석해 본 것이다.

재료 및 방법

재료

백색 Leghorn종의 수정란을 온도 $38 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 상대습도 60 %의 부란기에 부란시킨 배를 실험 재료로 사용하였으며, 계배의 각 발생 단계는 Hamburger와 Hamilton (1951)의 방법을 기준으로 하여 확인하였다. 혈청 시료는 계배의 난황동맥으로부터, 성체는 심장정맥출로 채혈한 혈액으로부터 분리 수집하여 실험에 사용하였다 (Yoo and Park, 1985).

시약 중 bovine serum albumin (BSA), chicken albumin, Coomassie brilliant blue R & G, Tris (hydroxy methyl) aminomethane, CM-Sephadex C-50, hydroxyapatite, DEAE-Sephadex A-25는 Sigma사에서, goat anti-human AFP는 Cappel Lab에서, acrylamide, N, N-methylene bis-acrylamide는 Kodak-Eastmann사에서 구입하여 사용하였으며, 본 실험에서 사용한 기타 시약은 특급 또는

일급품을 사용하였다.

닭 α -Fetoprotein의 분리

계배(13일배) 혈청으로부터의 AFP분리는 Ido와 Matsuno (1980) 및 Kang등(1986)이 실시한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 계배 혈청시료를 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 6.0)에 충분히 투석시킨 다음, $12,000 \times g$ 로 30분간 원심분리하여 불용성 물질을 제거시키고, 동일 완충액으로 평형시킨 CM-Sephadex C-50 column (3×60 cm)에 올려 흡착시켰다. 같은 완충액으로 충분히 흘려 흡착되지 않은 단백질을 씻어 낸 다음, 흡착된 단백질은 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 용출시켰다. 이어서 AFP-함유 분획을 모아 동결건조 후 0.01 M potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 녹여 동일 buffer로 투석시킨 다음, hydroxyapatite column (2.5×10 cm)에 올렸다. 동일 buffer로 충분히 흘려낸 후 흡착된 단백질은 0.01 M에서 0.4 M까지의 동일 buffer의 농도구배로 용출시켜 분리하였다. 앞의 크로마토그래피 분획 중 AFP-함유 분획은 다시 농축하여 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 투석시킨 후 DEAE-25 column (1×20 cm)에 올려 흡착시켰으며, 흡착된 단백질은 0.01 M에서 0.3 M NaCl을 함유한 Tris buffer의 농도구배에 의해 3 ml씩 분획하였다.

각 분리단계별 AFP의 검출과 시료의 순도 분석은 double gel immunodiffusion (Ouchterlony, 1958), alkaline polyacrylamide gel electrophoresis (Davis, 1964) 및 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Laemmli, 1970)등의 방법으로 검정하였다. 단백질 농도의 측정을 BSA를 표준 단백질로 하여 Bradford (1977)의 방법으로 실시하였다.

항 혈청의 제조

계배의 혈청(13일배), 성체의 혈청과 닭 AFP에 대한 항혈청을 Bang등 (1988)의 방법에 의하여 제조하였다. 즉, 혈청 0.3 ml에 0.15 M NaCl 0.3 ml 및 0.6 ml의 complete Freund's adjuvant를 섞은 현탁액을 4주 동안 1주 간격으

로 토끼에 주사하고 추가 접종은 2주 간격으로 2회 실시하였다. 면역 3주째부터는 정맥에서 채혈하여 면역전기영동법으로 항체형성 정도를 조사하였으며 최종주사 후 1주일 뒤에 심장 적출로 개혈하였다. IgG 분획은 50% (NH₄)₂SO₄ precipitation과 DEAE-cellulose chromatography에 의하여 분리하였다(Tung *et al.*, 1983). 항-AFP 항체는 500 μg의 정제된 AFP를 항원으로 사용하여 동일 방법으로 제조하였고, anti-chick embryo serum을 정체의 혈청으로 흡수시켜 제조하기도 하였다. 즉 rabbit anti-chick embryo serum을 정체혈청과 10:4의 비율로 혼합하여 24시간 동안 상온에서 반응시킨 후 800 × g에서 10분간 원심분리 한 상층액을 항-AFP 항체로 사용하는 것이다.

혈청 alpha-Fetoprotein 함량의 분석

발생단계별로 채취한 계배 혈청, 계배 간 및 난황낭 주출물내의 AFP와 그밖의 배 혈청단계별 함량의 변화양상을 polyacrylamide gel electrophoresis 및 immunoelectrophoresis (Scheidegger, 1955)로 분석하였다. 또한 각 발생단계 별 혈청 AFP함량의 정량을 정제된 AFP를 면역하여 만든 rabbit anti-chick AFP를 사용한 single radial immunodiffusion (Mancini *et al.*, 1965) 또는 crossed immunoelectrophoresis (Luarell, 1965)에 의하여 분석하였다.

결과

수정란을 부란시키면서 7일-배 부터 2일간격으로 계배의 혈청을 취하여 7.5% alkaline polyacrylamide gel electrophoresis를 실시한 결과, Fig. 1과 같이 배혈청에는 성체혈청에 존재하지 않는 AFP 밴드가 나타났으며, 배혈청 내 AFP의 함량은 13일-배에서 가장 높음을 알 수 있었다. 따라서 부란 13일-배 100개체에서 수집한 혈청을 토끼에 면역하여 항혈청을 제조하였으며, 배혈청에 대한 항혈청도 토끼에 면역하여 생산하였다. 이렇게 만든 항-계배 혈청을 닭혈

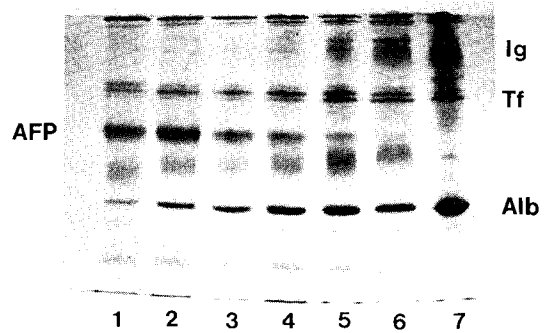


Fig. 1. Polyacrylamide slab gel electrophoresis of chick embryonal and adult serum. Electrophoresis was carried out on 7.5% polyacrylamide gel of 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.8 at 200 v for 3-4 hrs. Migration downward, and Coomassie blue G in 2% perchloric acid stained. Lane 1, 2, 3, 4 and 5: 11-, 13-, 15-, 17- and 19-day embryo serum, respectively; lane 6: 1-day post-hatch serum; lane 7: adult chick serum. Ig: immunoglobulin; Tf: transferrin; Alb: serum albumin. Note that the AFP band appeared only in chick embryo serum.

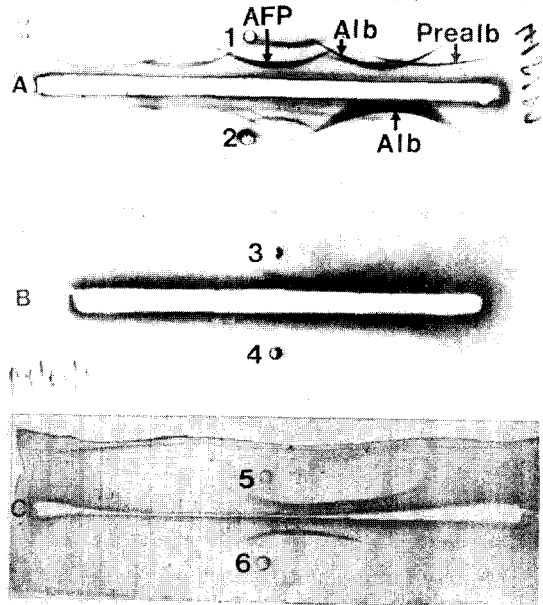


Fig. 2. Immunoelectrophoretic pattern of rabbit antisera. Throughs, A: rabbit anti-chick embryo serum; B: rabbit anti-chick embryo serum absorbed with adult chick serum; C: rabbit anti-chick AFP. Antigen holes, 1, 3 and 6: chick embryo serum; 2 and 6: adult chick serum; 5: purified AFP.

청에는 존재하지 않고 배혈청에만 특이한 AFP 에 반응하는 침전 arc를 뚜렷히 보였다. (Fig. 2A). 한편, 항-계배혈청에 성체 닭의 혈청을 흡수시켜 만든 항혈청은 면역전기영동에서 흡수시킨 항혈청에 대해서만 단일 침전 arc를 보인 반면, 성체혈청에 대해서는 반응을 나타내지 않았으므로 anti-AFP 항체임을 확인하였다(Fig. 2B).

배 혈청을 CM-Sephadex C-50 크로마토그래피한 후의 AFP-함유분획은 혈청 알부민을 비롯한 다른 단백질들이 상당히 제거되었다(Fig. 3). 이 분획을 다시 hydroxyapatite column 크로마토그래피를 실시한 후의 AFP-함유 분획에서는 거의 모든 배혈청 단백질들이 제거되었으나, 아직도 transferrin을 다량 함유하고 있었다(Fig. 5A). 따라서 이 transferrin 단백질을 제거하기 위하여 실시한 DEAE-Sephadex A-25 크로마토그래피 결과는 Fig. 4와 같았다. 흡착한

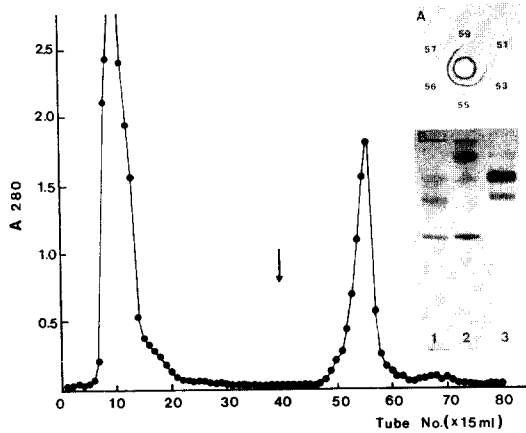


Fig. 3. CM-Sephadex C-50 chromatography of chick embryo serum. After applying the chick serum on the column (3 × 60 cm) the non-adsorbed material was washed off with 0.01 M sodium phosphate buffer of pH 7.4 (arrow). The adsorbed fractions were appeared to contain AFP as checked by immunodiffusion (Insert A, center well: anti chick AFP; peripheral wells: 15 μ l of each eluted fraction indicated). The adsorbed fractions (51-59) were also found to contain AFP and transferrin with minor contaminations of the serum proteins as shown in polyacrylamide gel electrophoresis (Insert B, 1: chick embryo serum; 2: non-adsorbed fraction after CM-Sephadex; 3: adsorbed fraction after CM-Sephadex).

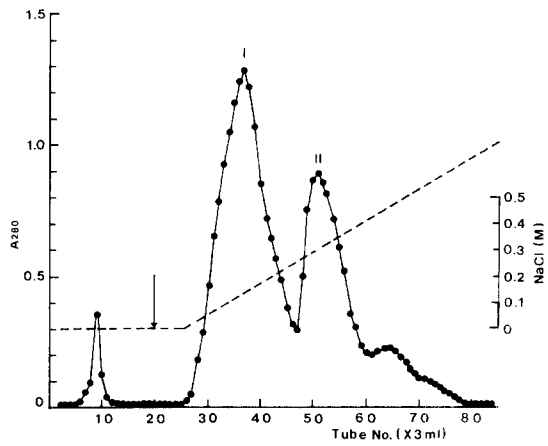


Fig. 4. DEAE-Sephadex A-25 column (1 × 20 cm) chromatography of AFP-preparation after hydroxyapatite chromatography. The non-adsorbed materials were washed off with 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, followed by a linear gradient elution of 0.1 to 0.3 M NaCl in the same buffer (arrow). Peak II was found to be AFP as shown in Fig. 5.

단백질을 0.1 M에서 0.3 M까지의 NaCl을 함유한 Tris-HCl buffer (pH 8.0)의 농도 구배로 용출시킨 결과, 2개의 단백질 peak로 분리되었으며, peak I이 transferrin, peak II가 AFP임을 확인하였다(Fig. 5A). 이 peak II 분획을 모아서 동일 column에 재크로마토그래피하여 AFP를 얻었다. 정제된 최종 AFP-분획은 7.5% alkaline polyacrylamide gel electrophoresis와 SDS-PAGE에서 단일 밴드를 보였을 뿐 아니라, rabbit anti-chick embryo serum을 사용한 면역전기영동에서도 단일 침전 arc로 나타났으므로 순수 분리되었다 하겠다(Fig. 5A, B & C). 또한 정제된 닭 AFP를 토끼에 면역하여 만든 항-AFP가 AFP와 배혈청에 대해 단일 침전 arc로 나타났으므로 이를 더 확실히 해준다 하겠다(Fig. 2C).

알의 polyacrylamide gel 전기영동상(Fig. 1)에서 나타난 바와 같이 계배의 혈청 AFP함량을 9일-배 부터 점차 증가하여 13일-배에서 최대치를 보이다가 차차 감소함을 보였다. 또 이등 각 혈청을 anti-chick embryo serum과 anti chick AFP antibody를 사용하여 면역전기영동한 결과에서도 같은 양상을 보였다(결과생략). 그러

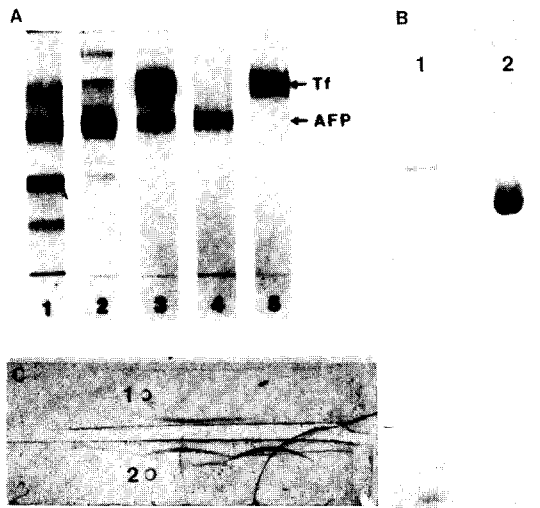


Fig. 5. (A) Alkaline polyacrylamide gel electrophoresis of AFP preparation after each purification step. The electrophoretic condition was the same as that in Fig. 1. Lane 1: chick embryo serum; 2: AFP-preparation after CM-Sephadex C-50; 3: AFP-preparation after hydroxyapatite; 4: purified AFP after DEAE-Sephadex A-25; 5: transferrin (peak I after EDAE-Sephadex A-25). (B) SDS-polyacrylamide gel (10%) electrophoresis of purified AFP (lane 2) with molecular weight marker proteins (lane 1, 14.3 Kd - 66 Kd). The molecular weight of chick AFP was calculated to be 60 Kd. (C) Immunoelectrophoresis of purified AFP against rabbit anti-chick embryo serum. Antigen holes, 1: purified AFP; 2: chick embryo serum.

나 계배의 간과 난황낭 추출물은 상당히 농축시켜서 면역전기영동을 실시하여도 반응 arc를 확인할 수가 없었다. 이상의 정성적인 AFP함량의 변화를 더 확실히 하기 위하여 발생단계별 혈청 AFP의 정량분석을 실시하였다. 표준 AFP와 rabbit anti-AFP를 사용하여 single radial immunodiffusion에 의해 18시간동안 반응 시킨 후 침전원의 직경을 측정 한 다음, 직경의 제곱에 대한 AFP의 농도를 plot한 표준곡선은 직선으로 나타났다(Fig. 6). 이어서 각 발생 단계별 배혈청을 5-10개씩 각각 single radial immunodiffusion을 실시한 다음 표준곡선에 의해 산출한 AFP농도의 변화는 Fig. 7과 같았다. 그림에서 알 수 있는 바와 같이 혈청 AFP의 농도는 7일-배 때의 0.81 mg/ml로부터 점차 증가하여 13일-배 때에 최고치인 2.46 mg/ml에 도달한

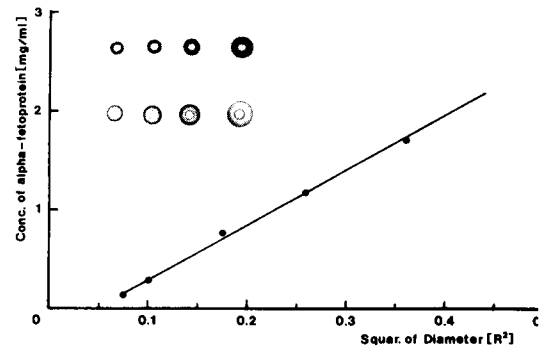


Fig. 6. Standard curve for the determination of AFP concentration by single radial immunodiffusion analyses. The abscissa represent the square diameter of the precipitated ring. Insert: single radial immunodiffusion pattern between standard AFP and rabbit anti-chick AFP.

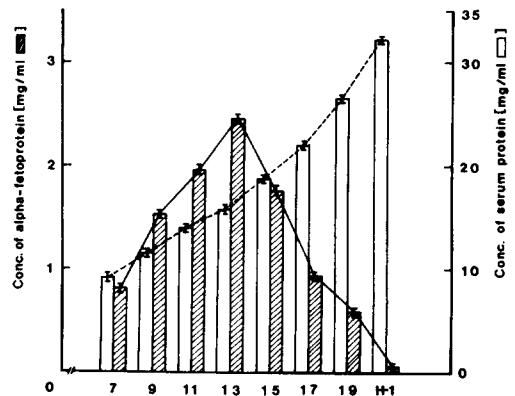


Fig. 7. Developmental change of AFP and protein concentrations in chick embryo serum. The concentrations of AFP were assayed by single radial immunodiffusion as shown in Fig. 6, and those of serum protein was determined by dye-binding method. The number indicates the developmental stage and H-1 indicates the day-1 posthatch chicken. Each value represents the mean of 5-10 individual.

후 빠르게 감소하였으며 부화 1일에는 0.22 mg/ml의 농도를 보이다가 부화 5일째는 전혀 검출되지 않았다. 한편 같은 발생 기간별 계배혈청내 총단백질량은 7일배 때의 9.2 mg/ml로부터 거의 직선적으로 증가하여 19일 배에서는 26.5 mg/ml 였고 성체 닭의 혈청 단백질 함량을 43.2 mg/ml 이었다. 따라서 최고치를 보이는 13일-배의 AFP함량은 총 단백질의 약 15.7%에 해당하는 것이며 부화 1일에는 1% 이하로 감소됨을 보여주는 결과이었다.

고찰

alpha-Fetoprotein (AFP)은 성체혈청에는 존재하지 않으며 배혈청에만 다량 존재하는 배 특이 단백질임을 확인하였으며 (Fig. 1), 이는 닭 AFP에 대한 다른 연구 보고와 일치 한다 (Slade and Milne, 1978; Ido and Masuno, 1982; Martin *et al.*, 1985). Lindgreen 등(1974)은 면역전기영동 시 배혈청 단백질에 AFP 외에도 ovalbumin이 존재한다고 기술하였으나 이들은 부화 직후의 닭혈청을 항원으로하여 면역시켜 만든 항혈청을 사용한 때문인 것으로 생각되며, ovalbumin이 배에 특이한 단백질은 아닌 것으로 보인다. 본 실험에서는 13일 계배의 혈청을 항원으로 항혈청을 제조하였고 또한 이를 성체혈청으로 흡수시킨 항혈청이 계배혈청에 대해서만 단일 침전 arc를 보였으므로 AFP가 계배의 특이 단백질이라고 말할 수 있겠다 (Fig. 2A, B).

계배의 개체 발생과정에 따른 AFP 함량의 변화는 앞의 여러 실험결과에서 알 수 있는 바와 같이 (Figs. 1 and 6), 7일-배 때의 0.81 mg/ml로부터 점차 증가하여 13일-배 때에 최대치인 2.46 mg/ml로 나타났으며 그 이후 급격히 감소되어 부화 직후에는 매우 낮은 농도(0.22 mg/ml)로 나타났지만 부화 4일에는 전혀 검출되지 않았다. 7일-배 이전의 계배의 경우 혈관이 매우 가늘어서 순수한 혈액만을 채혈하기 어려워 AFP함량을 측정할 수가 없었다. 이와 같은 배혈청의 AFP의 개체발생적 함량변화의 양상은 정도 차이는 조금씩 있으나 Slade와 Milne (1978) 및 Martin 등(1985)의 결과와 유사하였다. 발생 경로에 따른 배혈청의 전기영동상에서 특징적인것은 AFP의 농도가 감소함에 따라 혈청 알부민의 함량이 증가하는 양상을 들 수 있겠다 (Figs. 1 and 6). 따라서 배시기의 AFP가 성체에서의 혈청 알부민의 역할을 담당할 것이라는 보고 (Sell and Becker, 1978)에 대한 간접적인 증거가 되리라 생각되지만 더 구체적인 것은 앞으로 추구해 보아야 할 문제로 사료된다.

이상의 실험결과는 현재까지 보고된 포유동물 혈청AFP의 개체발생적 함량변화와 비교해 볼

때 일반적인 양상은 유사하나 종간의 차이가 심함을 알 수 있다. 즉 사람에게서는 혈청 AFP함량이 3-4 개월의 태아 시에 최고치(3 mg/ml)를 보이는 반면, 쥐나 토끼에서는 발생 말기에 최대치(토끼 : 5 mg/ml, 쥐 : 8mg/ml)를 보인다 (Gitlin and Boesman, 1967; Branch and Wild, 1972). 또한 AFP의 함량이 감소되는 양상도 사람의 경우 최고치 이후에 급속히 감소되어 임신 말기에는 최고치의 1-2% 정도의 농도를 보인다. 토끼의 경우에는 최고치 이후에 점진적으로 감소되는 경향을 보이고, 갓 태어난 토끼의 경우도 혈청 AFP양이 최대치의 20% 정도는 유지하며, 쥐에서는 토끼의 경우보다 더 서서히 감소되어 갓 태어난 새끼 쥐의 혈청 AFP양이 최고치일 때의 50-60% 정도를 보인다. 이렇게 볼 때 계배의 개체발생적 AFP함량의 변화는 토끼와 사람의 중간 형태로 간주해야 할 것으로 생각된다. 본 실험결과 (Fig. 6)에서 나타난 바와 같이 계배에서는 토끼의 경우에서와 같이 비교적 발생 후기에 최고치에 도달하고 태아의 경우에서와 같이 빠르게 감소되어 부화 직후에는 최고치의 약 9%, 부화 3일째에는 최고치의 약 1.3%로 줄어듬을 보였다. 한편, 혈청 AFP함량의 최고치도 계배에서는 2.46 mg/ml로서 사람의 경우와 유사하였다.

alpha-Fetoprotein의 생리적 기능에 대해서는 몇 가지 가설이 제시되고 있지만 이 단백질의 태아 및 성체에서의 정확한 생물학적 기능에 대해서는 아직도 명백히 규정되어 있지 않고 있다 (Sell and Becker, 1978). 생리적 기능을 밝히기 위해서는 AFP분자의 구조에 대한 연구가 선행되어야 하고 이를 위해서는 상당량의 AFP가 요구되며, AFP의 분석이나 검출에 필요한 정확하고 민감한 분석법이 정립되어야 한다. 이를 위하여 본 실험에서는 개체발생과정 중 AFP의 최대치를 나타내는 13일-배의 혈청으로부터 몇 가지 크로마토그래피 방법으로 AFP를 분리 정제하였다 (Figs. 4 and 5). 본 실험에서 실행한 AFP의 분리방법은 간단하지만 그 회수율(약 30%)이나 정제도(약 130배)는 매우 좋았다. 분리한 닭 AFP를 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis하여 산출한 분자량은 약 60,000

이었으며 이는 지금까지 보고된 포유동물의 AFP분자량(64,000-74,000)보다 약간 낮은 값이었다. 한편, rabbit anti-chick AFP와 rabbit anti-human AFP를 이용한 사람 AFP와의 면역학적 분석 결과(data 생략), 사람과 닭 AFP는 면역학적으로 연관되어 있지 않고, 각각 다른 항원성을 가짐을 알 수 있었다. 포유류에서는 난황낭과 간에 AFP의 합성부위로 보고되어 있으며 특히 사람의 경우 발생초기에는 난황에서 합성되었다가 태아 3개월 경부터 난황낭이 점차 퇴화되어 합성능이 저하되면서 간에 AFP합성을 주로 담당한다고 한다. 또 태아 3개월이후 부터는 혈청 AFP합량이 급속히 저하되는 것은 간에 의한 AFP의 합성속도가 감소된 때문으로 기술하고 있다(Gitlin, 1967; Gitlin and Gitlin, 1975). 그러나, 계배의 경우 일부 학자들은 난황낭이 주로 AFP를 합성하며 간에서는 미량을 합성한다고 보고했으며(Weller, 1976; Slade and Milne, 1977), 반면에 난황낭만이 AFP합성을 담당한다고 주장하는 보고도 있다(Gitlin and Kitzes, 1967; Iod & Matsuno, 1982). 본 연구실에서도 이를 증명하기 위하여 발생단계별로 이들 조직들의 추출물을 농축하여 면역전기영동을 실시해 보았으나 검출되지 않았다. 이것은 장기 내에서는 AFP합성량이 미량인 때문인 것으로 생각된다. 따라서 미세시료의 정량 및 정성 분석이 가능한 radioimmunoassay나 enzyme immunoassay (EIA) 방법 등 미세정량법이 요구된다 하겠다. 본 연구실에서는 앞에서 제조한 항-AFP항체에 peroxidase를 conjugate시켜 EIA용 면역제제를 준비하였으며 앞으로 이를 이용한 AFP의 합성 및 이행부위에 대해 추후에 보고자 한다.

References

- Bang, O. S., Y. J. Choi, and S. S. Kang, 1988. Purification and characterization of human alpha-1-proteinase inhibitor. *Kor. Biochem. J.* **21**: 485-490.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Branch W. R. and A. E. Wild, 1972. *Z. Zellforsch.* **136**: 501.
- Chen, D. S., J. D. Sung, J. C. Sheu, C. S. Lai, S. W. How, H. C. Hus, C. S. Lee, and T. C. Wei 1984. Serum α -fetoprotein in the early stage of human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **86**: 1410-1409.
- Davis, B. . and L. Orstein, 1964. Disc electrophoresis: Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**: 321-349.
- Gitlin, D. and J. Kitzes, 1967. Synthesis of serum albumin, embryo-specific alpha-globulin and conalbumin by the chick yolk sac. *Biochim. Biophys. Acta.* **147**: 334-430.
- Gitlin, D. and M. Boesman, 1967. Sites of serum α -fetoprotein synthesis in the human and in the rat. *J. Clin. Invest.* **46**: 1010-1016.
- Gitlin, D. 1975. Normal biology of α -fetoprotein. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **259**: 7-65.
- Gitlin, D. and J. D. Gitlin, 1975. Fetal and neonatal development of human plasma proteins. In : *The Plasma Proteins* (F. W. Putnam ed.) Acad. Press, New York, pp. 263-319.
- Hamburger, V. and H. Hamilton, 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**: 49-92.
- Hirai, H., 1982. Alpha-fetoprotein. In : *Biochemical Markers for Cancer* (T. Ming Chu ed.) Marcel Deker, New York, pp. 25-29.
- Ido, E. and T. Matsuno, 1982. Purification and physicochemical and immunochemical analysis of chicken alpha-fetoprotein. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* **35**: 87-96.
- Kang, S. S., O. S. Bang, and T. K. Park, 1986. Affinity purification of human alpha-fetoprotein. *Korean J. Zool.* **29**: 283-293.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laurell, C. B., 1965. Antigen-antibody crossed electrophoresis. *Anal. Biochem.* **10**: 358-363.
- Lindgreen, J., A. Vaheri, and E. Ruoslahti. 1974. Identification and isolation of alpha-fetoprotein in the chicken. *Differentiation* **2**:233-236.
- Mancini, G., A. O. Carbonara, and J. F. Heremans, 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* **2**:235-254.
- Martin, B., R. Vranckx, P. Denoulet, and E. E. Nunez, 1985. Alpha-fetoprotein expression in intra- and extraembryonic fluids of developing chick embryo. *Dev. Biol.* **3**:352-358.
- Morinaga, T., M. Sakai, T. G. Wegmann, and T.

- Tamaoki, 1983. Primary structures of human α -fetoprotein and its mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:4064-4608
- Ouchterlony, O. 1958. Diffusion-in-gel method of immunological analysis. *Pro. Allergy* **9**:1-78.
- Ruoslahti, E. and H. Pihko, 1975. Effect of chemical modification on the immunogenicity of homologous alpha-fetoprotein. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **259**:85-94.
- Ruoslahti, E. and M. Seppala, 1979. Alpha-fetoprotein in cancer and fetal development. *Adv. Cancer Res.* **29**:275-364.
- Ruoslahti, E., M. Votila, and e. Engavall, 1982. Radioimmunoassay of α -fetoprotein with polyclonal and monoclonal antibodies. *Meth. Enzymol* **84**:1-19.
- Scheidegger, J. J., 1955. Une micro-methode dei immunoelectrophorese. *Int. Arch. Allergy* **7**:103-115.
- Sell, S. and F. F. Becker, 1978. Alpha-fetoprotein. *J. Natl. Cancer Inst.* **60**:19-26.
- Sell, S. and H. Skelly, 1976. Tissue sites of synthesis of alpha-fetoprotein by the rat during pregnancy and hepatoma growth. *J. Natl. Cancer Inst.* **56**:645-648.
- Slade, B. and J. Milne, 1977. Localization and synthesis of α -fetoprotein in the chicken. *Cell Tiss. Res.* **180**:411-419.
- Tung, E., J. M. Goussst, W. Y. Chen, S. S. Kang, I. Y. Wang, and A. C. Wang, 1983. Cytotoxic effect of anti-idiotypic antibody-chlorambucil conjugates against human lymphoblastoid cells. *Immunology* **50**:57-64.
- Uriel, J., M. J. Villacampa, R. Moro, J. Naval, and C. Faily-Crepin, 1984. Uptake of radiolabelled alpha-fetoprotein by mouse mammary carcinomas and its usefulness in tumor scintigraphy. *Cancer Res.* **44**:5314-5319.
- Weller, E. M., 1976. Characterization of embryonic antigens in the plasma of developing chick embryos. *Cancer Res.* **36**:3415-3422.
- Yoo, J. A. and T. K. Park, 1985. Comparison of alkaline phosphatase isoenzymes from chick embryo and adult tissues. *Res. Rev. Kyunpook Natl. Univ.* **40**:135-146.

(Accepted July 10, 1989)

The Ontogenic Analysis of Chick α -Fetoprotein

Tae Kyu Park, Jeong Ah Yoo, Dae Young Jeong and Shin-Sung Kang
(Department of Biology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea)

For the preliminary step to investigate the site of AFP synthesis, the ontogenic characteristics and the physiological function of AFP, alpha-fetoprotein was isolated from chick embryo serum through the procedures of CM-Sephadex C-50, hydroxyapatite and DEAE-Sephadex A-50 chromatography. The isolated AFP was proved to be pure and its molecular weight was found to be about 60 Kd. With this purified AFP, rabbit anti-chick AFP was produced. The serum AFP level in chick embryo has been investigated by using polyacrylamide gel electrophoresis, immunoelectrophoresis and single radial immunodiffusion from 7 days of incubation until 4 days after hatching. It was found that the AFP level is increased from 0.81 mg/ml at day-7 embryo to maximum value of 2.46 mg/ml at day-13 embryo, followed by rapid decreases until hatching.