

Estrone-3-Glucuronide에 대한 단일클론항체를 이용한 Estrone-3-Sulfate 측정을 위한 화학발광면역분석법

김윤규 · 민형식* · 김춘원* · 김창규** · 김선호*** · 김종배***

건국대학교 동물자원연구센터

Chemiluminescence Immunoassay for Measurement of Estrone-3-Sulfate Using Monoclonal Antibody to Estrone-3-Glucuronide

Kim, Y. K., H. S. Min*, C. W. Kim*, C. K. Kim**, S. H. Kim*** and J. B. Kim***

Animal Resource Research Center, Kon-Kuk University

SUMMARY

This study was carried out to develop an immunoassay for the diagnosis of the pregnancy and ovarian function of domestic animals. Using 2E92C10 monoclonal antibody(McAb) generated against estrone-3-glucuronide(E₁-3-G) and appeared a high cross-reactivity with estrone-3-sulfate(E₁-3-S), chemiluminescence immunoassay (CIA) to detect E₁-3-S was developed. 2E92C10 McAb cross-reacted with E₁-3-S (30%) was purified from ascites fluid using protein G sepharose gel column. The purity of purified antibody fraction was monitored by SDS-PAGE and was better compared to that of crude ascite fluid.

The solid and liquid phase CIA for E₁-3-S were established utilizing 2E92C10 antibody and E₁-3-G-ABEI conjugate used as a tracer. As the results, the titer of 2E92C10 antibody was 5 g/ml in solid phase and 1:2000 in liquid phase. The sensitivity on solid and solid phase CIA were about 200 pg/ml.

These results indicate that CIA for measurement of E₁-3-S was successfully developed by using ant-E₁-3-G McAb cross-reacted with E₁-3-S and could be usefully used to research this area.

Key words : Monoclonal antibody, estrone-3-sulfate, chemiluminescence immunoassay.

I. 서 론

사람을 비롯한 모든 동물의 내분비 기능연구에 있어서 특히 난소기능과 관련된 연구는 난포 발달의 측정,

수정가능 개시일의 산정, 배란일의 예측과 확인, 수정가능기간의 종료일 산정, 황체기능 측정 등을 들 수 있다(Collins 등, 1981). 난포·황체기의 난소기능 연구나 임신진단을 위해 혈액으로 분비되는 progesterone 이나 estradiol-17 β (E₂)의 양을 측정해 왔는데(이,

* 한양대학병원 임상병리과

** (주) 종근당 연구소

*** 한동대학교 생의학연구소(Institute for Biomedical Research, Han-Dong University)

1990; 김 등, 1992), 혈중의 호르몬 분석은 혈중 농도가 매우 낮은 데 따른 미량분석상의 어려움이 있으며, 대부분의 스테로이드 호르몬들이 steroid-binding 단백질과 결합되어 있어서 직접적인 측정에 많은 난점이 있다. 이 때문에 최근에는 사람의 경우 E_2 의 주된 대사산물인 estrone-3-glucuronide (E_1 -3-G)를 뇨중에서 측정하므로써 난포·황체기의 기능측정이나 임신진단을 위해 이용코자 하는 연구가 진행되어 왔으며, 이미 진단용 시약으로까지 개발 실용화 단계에 와 있으나 (Linder 등, 1981; Stanazyk 등, 1980), 가축에 있어서 호르몬의 대사물질들과 난소기능에 관한 연구는 돼지의 임신진단을 위해 estrone-3-sulfate (E_1 -3-S)를 혈중에서 측정할 연구를 포함한 몇몇 보고만이 있을 뿐이며 국내외적으로 미비한 실정이다 (Robertson 등, 1978; Hattersley 등, 1980; Challis와 Greenblatt, 1980; Saba와 Hattersley, 1981).

호르몬과 같은 미량물질 분석에 있어 면역분석법은 좋은 감도를 인정받아 널리 이용되어 왔는데, 그 중 방사성 면역분석법 (radioimmunoassay)이 일반적으로 널리 이용되고 있지만, 방사성 동위원소를 취급하는데서 오는 여러가지 난점때문에 국내외에서 그 사용이 극히 제한되고 있다. 이러한 문제를 극복하기 위해 효소를 이용하는 효소 면역분석법 (enzyme immunoassay : Kuo 등, 1989), 형광물질을 이용하는 형광 면역분석법 (fluoroimmunoassay : Barnard, 1990; 김 등, 1992)과 화학발광체를 이용하는 화학발광 면역분석법 (chemiluminescence immunoassay : Kim 등, 1990) 등의 비방사성 면역분석법들이 개발되어 왔는데, 특히 화학발광 면역분석법은 최근에 개발된 방법으로 tracer로 사용되는 화학발광체의 안정성과 측정감도가 우수함 등의 여러가지 장점을 갖고 있어 방사성 면역분석법을 대체할 수 있는 면역분석법으로 각광받고 있다 (Kohen 등, 1986; Kim 등, 1983).

한편, Köhler와 Milstein(1975)이 세포융합기술에 의해 개발한 단일클론항체 (monoclonal antibody)는 결합력과 특이성이 좋은 동일한 특성을 갖는 항체를 대량 생산할 수 있게 함으로써 생명과학 연구 분야에 일대 혁신을 가져다 주었으며, 특히 복합항체 (polyclonal antibody)가 갖는 문제점들을 해결해 줄 수 있게 되어 면역분석법 개발과 이를 이용하는 진단용 시약개발 분야에 널리 그 이용이 확대되고 있다 (Fantl

등, 1981; White, 1983).

이에 본 연구에서는 E_1 -3-S에 대한 교차반응성이 매우 높은 E_1 -3-G에 대한 단일클론항체를 이용하여 E_1 -3-S 측정을 위한 화학발광면역분석법을 개발하므로써 가축의 임신진단과 난소기능 측정을 위한 방법을 확립시키고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

항체를 생산하는 세포주로부터 항체를 대량 생산하기 위하여 사용된 복수생산용 생쥐는 한국 화학연구소로부터 분양받은 6주령의 Balb/C 생쥐 수컷을 사용하였다.

본 연구에 사용된 항체는 이미 이(1989)에 의해 생산되어 보고된 estrone-3-glucuronide (E_1 -3-G)에 대한 단일클론항체로써, 여러가지 항체 클론 중 특히 estrone-3-sulfate (E_1 -3-S)에 대해 교차반응성 (cross-reactivity)이 30%로 가장 높았던 2E92C10 클론을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 항체의 생산

E_1 -3-G에 대한 단일클론항체를 생산하는 세포주인 2E92C10 클론으로부터 항체를 대량 생산하기 위하여 생쥐 복강내에서 *in vivo* 배양을 통해 복수 생성을 유도하였다. 10% FBS와 NCTC-135, HT supplement (Gibco사, USA)가 포함된 DMEM 배지에서 배양된 2E92C10 세포를 pristane (Sigma사, USA)으로 감작시킨 생쥐 복강에 10^7 개씩 Freund's incomplete adjuvant (Gibco사, USA)와 함께 주사하였다. 복강주사 10일 후에 10ml 주사기로 생쥐 복강으로부터 복수를 취하여 2,000rpm에서 원심분리하여 부유물들을 제거시킨 후 상층액을 모아 -20°C 에 보관하며 사용하였다.

2) 항체의 정제

준비된 복수로 부터 항체를 정제하기 위해, 먼저 복수에 황산암모늄용액을 50% 농도로 처리하여 항체를 포함한 단백질 부분만을 분리하였다. 4°C 에서 포화시

킨 황산암모늄 용액을 천천히 5ml의 복수용액에 동일 부피로 첨가하고, 약 1시간 동안 4℃에서 교반시킨 후 3,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액은 제거하고 얻어진 침전액을 5ml의 pH 7.4의 10mM phosphate buffered-saline(PBS)에 용해시켜 2일간 투석하여 용액속에 포함된 황산암모늄용액을 제거하였다.

투석하여 준비된 단백질 용액으로 부터 protein G affinity chromatography에 의해 항체를 정제하였다. 6ml의 protein G sepharose gel 컬럼을 5배 컬럼 부피의 20mM PBS (pH 7.0)로 평형화시킨 뒤, 5ml의 복수용액을 결합시키고 10배 컬럼부피의 PBS로 0.2ml/min 속도로 컬럼을 세척하였다. 컬럼의 gel에 결합된 항체는 0.1M glycine-HCl buffer (pH 2.7)를 사용하여 0.1ml/min의 속도로 용출되었으며, fraction collector (LKB사)에 의해 0.9ml/tube씩 모아졌다. 용출된 항체의 활성을 보존하기 위해 항체를 용출시키기 위해 앞서 fraction collector의 각 tube에 0.1ml의 1M tris-HCl buffer (pH 9.0)을 넣어서 낮은 pH로 용출된 항체용액을 중화시켰다. 얻어진 각 분획을 모아 20mM PBS로 2일간 투석시킨 뒤, amicon 농축 kit (Amicon사, USA)로 농축하여 BCA 단백질 정량 kit (Pierce사)로 농도를 결정하였다.

3) SDS-PAGE에 의한 항체의 순도 조사

Protein G sepharose gel로 부터 분리·정제된 항체의 순도(purity)를 확인하기 위하여 15% SDS-PAGE를 실시하였다. 일정부피로 농축되어 준비된 항체용액을 2-β-mercaptoethanol(2-ME)이 포함된 2X reducing sample buffer에 1:1(v/v)로 혼합하여 100℃에서 3분간 heating시킨 후, gel에 loading 하였다. Gel은 120V에서 2시간 동안 전개되었으며, coomassie blue가 포함된 staining 용액에서 30분 동안 착색된 후, 다시 destaining 용액으로 2시간 동안 destaining되었다.

4) E₁-3-G-ABEI 접합체의 합성

E₁-3-S 정량을 위한 chemiluminescence immunoassay(CIA)의 tracer로 이용하기 위하여 Eshhar 등(1981)과 이(1989)의 방법을 변형하여 E₁-3-G와 aminobuthylethyl isoluminol(ABEI)를 접합시켜 E₁-3-G-ABEI 접합체를 합성하였다. 0.5 ml의 dime-

thylformamide(DMF)에 각각 5mg의 N'-dicyclohexyl carbodiimide(DCC), N-hydroxysuccinimide(N-HS), 그리고 E₁-3-G를 넣어 녹인 후 상온에서 24시간 반응시켜 활성 ester를 만들었다. 3mg의 ABEI를 0.15 M sodium bicarbonate buffer (pH 8.0) 1 ml에 녹여 준비한 후, 이 용액에 활성 ester 150μl를 첨가하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 1M HCl을 첨가하여 pH를 6으로 낮추어 산화(acidification)시킴으로써 더 이상의 반응을 중지시킨 후, chloroform:methanol(60:40)의 전개용매를 이용하여 thin-layer chromatography(TLC)로 ABEI와 결합된 E₁-3-G-ABEI conjugate를 정제하였다.

5) Chemiluminescence immunoassay(CIA)

정제된 2E92C10 단일클론항체와 E₁-3-G-ABEI 접합체를 사용하여 Fig. 1과 같은 방법으로 E₁-3-S 측정을 위한 CIA를 실시하였다. 나타난 바와 같이 liquid와 solid phase의 두가지로 실시하였으며, liquid phase에서는 dextran-coated charcoal을 이용하여 항체와 결합하지 않은 저분자 물질 즉, free tracer (E₁-3-G-ABEI)와 free E₁-3-S를 제거하였으며, solid phase에서는 polyethylene tube(Nunc, Denmark)에 흡착된 항체와 결합하지 않은 저분자 물질들을 0.01 M PBS(pH 7.4)에 0.05 % tween 20#을 첨가하여 제조한 washing buffer를 사용하여 제거하였다. 먼저 2E91C10 항체의 적정농도를 결정하기 위하여 일정배수로 희석된 항체를 tracer(E₁-3-G-ABEI)와 반응시킨 적정곡선을 작성하고, 같은 조건하에 일정한 농도로 표준물질을 봉히 첨가시킨 경쟁곡선을 작성하여 두 곡선을 비교하므로써 가장 높은 경쟁 반응을 나타내는 때의 항체농도를 적정농도로 정하였다. 상기에서 결정된 일정농도의 항체에 0.1ng/ml에서 200 ng/ml로 희석된 E₁-3-S 표준용액과 tracer를 첨가하여 함께 반응시키고, 반응이 끝난 후 Berthold Clinlumet luminometer (Germany)를 사용하여 0.3 ml의 microperoxidase와 H₂O₂ 용액이 자동 주입되는 조건하에서 항체와 결합한 tracer의 ABEI로 부터 발생하는 빛의 양을 10초간 측정하므로써 E₁-3-S 측정을 위한 정량곡선을 작성하였다. CIA의 tracer로 사용된 E₁-3-G-ABEI 접합체는 luminometer로 측정시 10,000 cpm을 나타내는 농도로 희석하여 사용하였다.

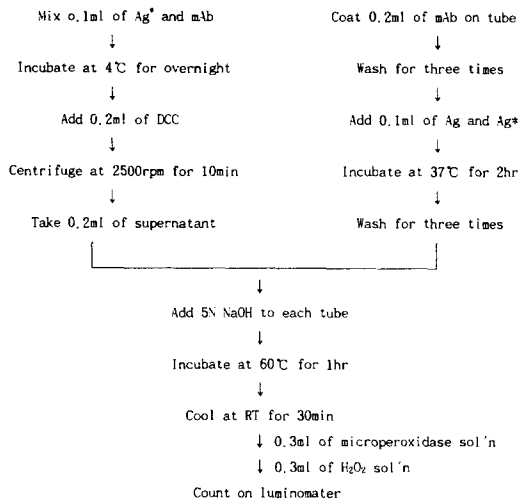


Fig. 1. Procedure for liquid and solid phase CIA. Ag, Estrone-3-sulfate(E₁-3-S); Ag*, E₁-3-G-ABEI; McAb, monoclonal antibody to E₁-3G; DCC, Dextran coated charcoal.

III. 결과 및 고찰

1. 항체생산 및 정제

E₁-3-G에 대한 항체를 분비하는 2E91C10 클론으로부터 항체를 생산하고 정제하기 위하여 생쥐 복강내에 복수생성을 유발시킨 결과 Balb/C 생쥐 1마리당 평균 7ml 정도의 복수를 얻을 수 있었다. 얻어진 복수는 protein G로 정제하기에 앞서 황산암모늄 용액으로 처리되었으며, 이때 복수내의 항체가 95% 이상 침전되는 것을 확인할 수 있었다. Protein G 컬럼으로 정제된 항체의 순도는 15% SDS-PAGE에 의해 확인되었으며, 그 결과가 Fig. 2와 같이 나타났다. 1번 lane은 항체의 분자량을 확인하기 위하여 high molecular weight marker를 loading하였으며, 2, 3, 4번 lane에 정제된 항체를 각각 2, 1, 0.5 μ g 씩 loading하였고 정제도의 비교를 위해 5와 6번 lane에 황산암모늄 처리된 복수 침전물과 처리되기 전의 복수원액을 각각 loading하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 2, 3, 4번 lane에서 약 52kda과 26kda의 각 항체의 heavy ch-

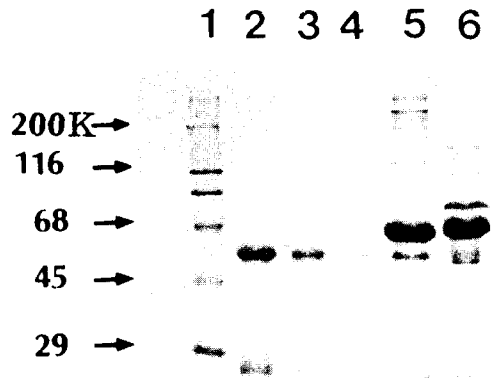


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of 2E92C10 mAb purified by protein G chromatography. lane 1, high molecular weight marker; lane 2, 2 μ g of purified McAb; lane 3, 1 μ g of purified McAb; lane 4, 0.5 μ g of purified McAb; lane 5, ammonium sulfate treated ascitic fluid; lane 6, Ascitic fluid.

ain과 light chain band를 확인할 수 있었으며, protein G로 정제된 항체가 5와 6번 lane의 crude한 복수용액으로 부터 매우 순수하게 정제되었음을 확인할 수 있었다.

2. E₁-3-G에 대한 항체의 적정곡선

이(1989)에 의해 생산되어 보고된 E₁-3-G에 대한 단일클론항체의 클론들 중 E₁-3-S와 가장 높은 교차반응을 나타냈던 2E91C10 항체를 이용하여 E₁-3-S 측정을 위한 CIA를 실시하였다. Buffer상의 항체와 항원의 결합반응을 유도하는 liquid phase와 polyethylene tube에 흡착된 항체와 반응을 유도하는 solid phase의 두가지로 실시하였다. 먼저 항체의 적정농도를 결정하기 위해 E₁-3-S 표준물질을 첨가하지 않고 반응시켜 얻은 적정곡선과 liquid와 solid phase에서 각각 100과 20ng/ml을 첨가하여 얻은 경쟁곡선을 비교함으로써 가장 좋은 경쟁반응성을 나타내는 항체의 적정농도를 결정하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 liquid

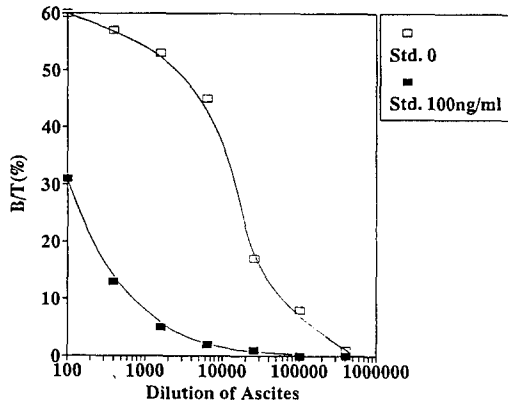


Fig. 3. Titration curve of 2E92C10 by liquid phase CIA. Std, E₁-3-S; B/T(%), Bound-to-total expressed as percentage.

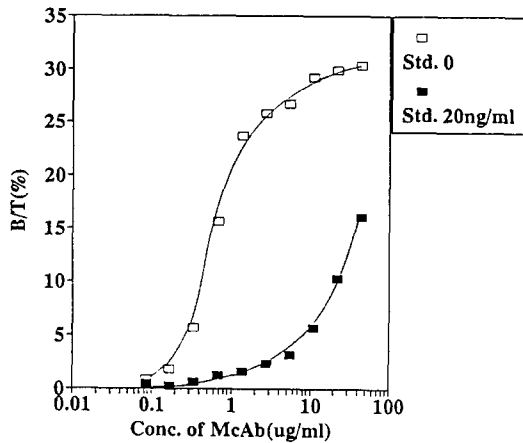


Fig. 4. Titration curve of 2E92C10 by solid phase CIA. Std, E₁-3-S; B/T(%), Bound-to-total expressed as percentage.

phase에서는 복수 1:2,000에서 가장 좋은 경쟁성을 나타내었으며, solid phase에서는 5 μ g/ml의 항체농도에서 가장 좋은 경쟁반응을 나타냈다(Fig. 4). 이 결과는 E₁-3-G 측정을 위한 CIA법 개발을 위해 2E91C10 항체를 이용하여 앞서 이(1989)가 보고한 결과인 liquid phase의 1:50,000과 solid phase의 0.5 μ g/ml과 비교해 볼 때, 항체 농도를 다소 높게 사용해야 했으나 대량생산의 장점을 가진 단일클론항체를

이용하는데 있어서 실제 시료측정상에 아무런 영향을 주지 않으며 일반적인 단일클론항체들의 역가와 비교해 볼 때도 결코 낮은 결과가 아닌 것으로 사료된다 (Kohen 등, 1987; Kohler와 Milstein, 1975).

3. E₁-3-S 측정을 위한 정량곡선(calibration curve)

결정된 항체농도하에서 E₁-3-S를 0.1에서 200ng/ml까지 일정배수로 희석하여 E₁-3-S 측정을 위한 정량곡선을 작성하였다. Fig. 5과 Fig. 6에 나타난 바와 같이 liquid와 solid에서 각각 200pg/ml과 500pg/ml의 측정감도를 나타냈는데, 이 결과는 Saba와 Hattersley (1981)가 보고한 돼지의 임신진단을 위한 RIA법의 측정감도인 200pg/ml과 비슷했으며, 돼지의 경우 대개 혈중 E₁-3-S농도가 0.5ng/ml 이상일 때 임신한 것으로 판단하고 있으므로 조기 임신진단을 위한 실제 시료 측정상에 문제가 없는 좋은 결과로 사료된다((Robertson 등, 1978; Hattersley 등, 1980; Saba와 Hattersley, 1981).

본 연구에서는 단일클론항체가 갖는 장점을 이용하여, 즉 E₁-3-S에 대한 항체를 직접 생산하지 않고

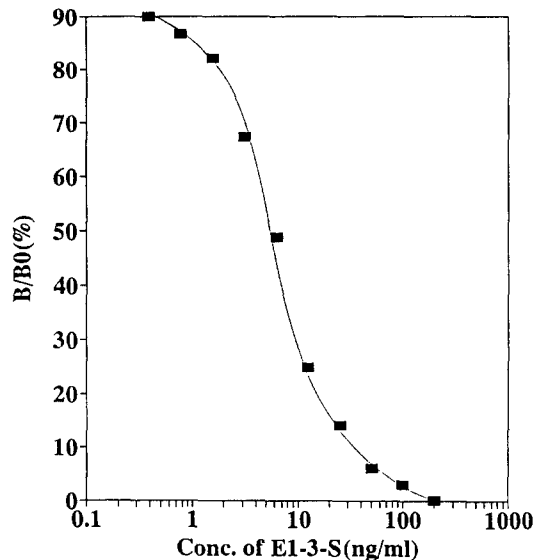


Fig. 5. Standard curve of E₁-3-S by liquid phase CIA. Std, E₁-3-S; B/B0(%), Bound-to-zero bound expressed as percentage.

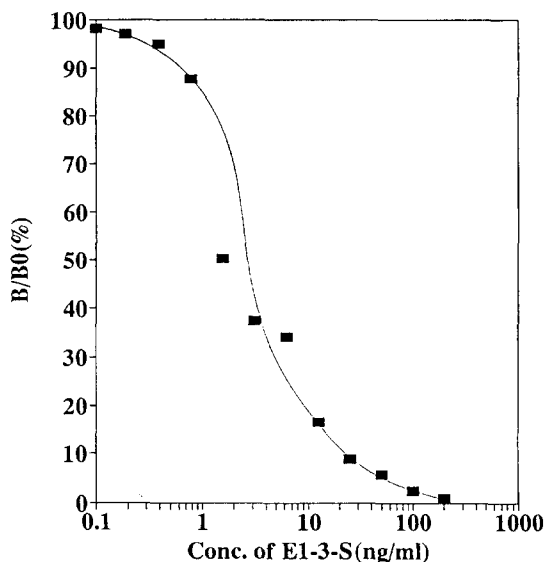


Fig. 6. Standard curve of E₁-3-S by solid phase CIA. Std, E₁-3-S; B/B₀(%), Bound-to-zero bound expressed as percentage.

E₁-3-G에 대해 얻어진 단일클론항체의 클론들 중 E₁-3-S와 가장 높은 교차반응성을 보인 2E93C10 클론의 항체를 이용하여 가축 임신진단을 위한 방법으로써 E₁-3-S의 측정법을 개발하였다. 이러한 다른 물질과의 높은 교차반응성을 갖는 항체를 이용한 연구로는 Holdsworth (1982)나 Harmon(1981)등의 여러 연구자들이 이미 보고한 바 있으나 국내에서는 거의 시도된 바가 없다. 본 연구를 통해 개발된 높은 감도를 가진 안정된 면역분석법으로 평가받고 있는 chemiluminescence immunoassay (CIA)법에 의한 E₁-3-S 측정방법을 실제 가축임신진단을 위해 널리 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

IV. 적 요

본 연구는 가축의 임신진단과 난소기능 측정을 위한 면역분석법 개발을 위해 수행되었다. Estrone-3-sulfate(E₁-3-S)에 대해 높은 교차반응성을 나타내는 estrone-3-glucuronide(E₁-3-G)에 대한 단일클론항체를 이용하여 E₁-3-S 측정을 위한 화학발광면역분석법

을 개발하였다. E₁-3-S에 대해 30%가량의 교차반응성을 나타내는 2E91C10 클론 항체를 protein G sepharose gel 컬럼을 이용하여 복수로부터 정제하였다. 정제된 항체의 순도는 15% SDS-PAGE에 의해 조사되었으며 crude한 복수용액과 비교한 결과 매우 우수하였다.

정제된 2E91C10 항체와 E₁-3-G-ABEI 접합체를 이용하여 E₁-3-S 측정을 위한 solid와 liquid phase 화학발광면역분석법을 실시하였다. 그 결과 2E91C10 항체의 적정농도는 solid와 liquid phase에서 각각 5μg/ml과 1:2,000으로 나타났으며, 측정감도는 solid와 liquid phase에서 각각 200 pg/ml과 500pg/ml로 나타났다.

E₁-3-S와 교차반응하는 anti-E₁-3-G 단일클론항체를 이용하여 E₁-3-S 측정을 위한 CIA법이 성공적으로 개발되었으며, 이 분야의 연구를 위해 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

V. 인용문헌

1. Barnard, G. and F. Kohen. 1990. Idiometric assay : noncompetitive immunoassay for small molecules typified by the measurement of estradiol in serum. Clin. Chem. 36 (11) : 1945.
2. Branch, C. M., P. O. Collins, M. J. Kilpatrick and W. P. Collins. 1980. The effect of conception on the concentration of urinary estrone-3-glucuronide, LH /HCG and pregnenediol-3-glucuronide. Acta. Endo. 93 : 228.
3. Collins, W. P., C. M. Branch, P. O. Collins and H. N. Sallam. 1981. Biochemical indices of the fertile period in woman. J. Fert. 26 : 196.
4. Eshhar, Z., J. B. Kim, G. Barnard and W. P. Collins. 1981. Use of monoclonal antibody to pregnenediol-3-glucuronide for the development of a solid phase chemiluminescence immunoassay. Steroid 38 : 89.
5. Fantl, V. E., D. Y. Wang and A. S. Whithead. 1981. Production and characteris-

- ation of monoclonal antibody to progesterone. *J. Steroid Biochem.* 14 : 405.
6. Kim, J. B., G. Barnard, W. P. Collins, F. Kohen and H. P. Linder. 1982. The measurement of plasma estradiol-17 β by solid phase. *Clin. Chem.* 28 : 1120.
 7. Kim, J. B. 1983. Development of chemiluminescence immunoassay for the measurement of plasma steroid and urinary metabolites. A thesis submitted for the degree of Ph. D in the University of London. 1983.
 8. Kohen, F., J. De Boever and J. B. Kim. 1986. An immunoassay for plasma cortisol based on chemiluminescence. *Steroid* 36 : 421.
 9. Kohen, F., J. De Boever and J. B. Kim. 1987. Recent advances in chemiluminescence based immunoassay for steroid hormones. *J. Steroid Biochem.* 27 : 71.
 10. Kohler, G. and C. Milstein. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 : 495.
 11. Kuo, C. Y., J. Fu, M. Y. Yeu, S. L. Su and C. Y. G. Lee. 1989. Generation of monoclonal antibodies to α -fetoprotein and application in solid-phase enzyme immunoassay. *Biochem. Appl. Biochem.* 11 : 96.
 12. Linder, H. R., F. Kohen, Z. Eshhar, J. B. Kim and G. Barnard. 1981. Novel assay procedure for assessing ovarian function in women. *J. Steroid Biochem.* 15 : 131.
 13. Saba, N. and J. P. Hattersley. 1981. Direct estimation of oestrone sulphate in sow serum for a rapid pregnancy diagnosis test. *J. Reprod. Fert.* 62 : 87.
 14. Stanazyk, F. Z., I. Miyakawa and U. Goebelmann. 1980. Direct radioimmunoassay of urinary estrogen and pregnadiol glucuronide during the menstrual cycle. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 137 : 443.
 15. Thorncroft, S., G. E. Tillson, R. J. Abraham and B. V. Scaramuzzi. 1970. Immunological methods in steroid determined. *Appleton-Century-Crofts*. New York. 63.
 16. White, A. 1983. Monoclonal antibodies for steroid immunoassay. In: Hunter, W. M. and J. E. T. Corrie (eds), *Immunoassay for clinical chemistry*. Churchill Livingstone Edinburgh. 495.
 17. 김윤규, 김창규, 박성민, 이치호, 이원창, 최영숙, 김종배. 1992. Anti-idiotypic 항체를 이용한 17 β -estradiol 측정을 위한 time-resolved fluoroimmunoassay. *한국가축번식학회지*. 16(4) : 325.
 18. 이경찬, 정태영, 정길생, 김종배. 1990. RIA 및 CIA에 의한 혈장과 우유내 progesterone 측정. *한국가축번식학회지*. 14(1):57-65.
 19. 이기순. 1989. Estrone-3-glucuronide에 대한 단일클론항체 생산과 그를 이용한 화학발광체 면역분석법 개발에 관한 연구. *건국대학교 대학원 석사학위 청구논문*.