

면양을 이용한 돼지 지방세포 원형질막 단백질 특이 항체의 생산

영남대학교 축산학과, 영남대학교 생명공학연구소*

최창본[†] · 이명진* · 권은진

국문초록: 본 연구는 돼지 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체를 면양에서 생산하고 생산된 항체의 역가 및 조직특이성을 조사하기 위하여 실시되었다. 지방세포, 뇌, 심장, 신장, 간장 및 비장으로부터 원형질막 단백질을 추출하였으며, 그중 지방세포로부터 분리한 원형질막 단백질을 면양(체중 40kg)에 3주 간격으로 3회 면역접종시켰다. 면역접종 전, 3차 면역접종 후 10일 (AS-1), 12일 (AS-2) 및 14일 (AS-3)째에 각각 면양의 경정맥으로부터 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 항체의 역가 및 기타 조직과의 교차반응성은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)로 측정하였다. 면양에서 생산된 돼지 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항혈청은 지방세포 원형질막 단백질과 강한 항원-항체 반응을 나타내었다. 항혈청의 교차반응성을 조사한 결과, 기타 조직의 원형질막 단백질과는 매우 미약한 반응을 나타낸 반면 지방세포 원형질막 단백질과는 강한 반응을 나타내었다. 이러한 항혈청의 지방세포 원형질막 단백질과의 조직특이적인 반응은 anti-sheep immunoglobulin G-horseradish peroxidase conjugate를 2차 항체로 이용한 immunoblot에 의해서도 재확인 되었다. 이상의 결과, 면양으로부터 생산된 돼지 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체는 높은 역가를 지니고 있었으며, 지방세포 원형질막 단백질에 특이적으로 작용함을 알 수 있었다.

서 론

육류 내 지방의 함량은 소비자들의 건강과 밀접한 관계를 지니고 있어 각종 성인병 (동맥경화증을 비롯한 대사성 질환)의 원인이 되고 있다. 우리나라의 경우, 불과 몇년 전만 하더라도 동물성 지방의 섭취에 대하여 무관심하였으나, 근래에 각종 성인병이 증가하면서 동물성 지방의 섭취에 대한 소비자들의 인식이 바뀌어져 가고 있다.

육 생산 동물의 체내 지방 함량을 감소시키기 위한 접근 방법들은 성장호르몬, β -adrenergic agents, 또는 somatostatin에 대한 항체의 이용 등 대부분이 호르몬에 초점을 맞추고 있다. 그러나 이들 방법은 비록 육류 내 지방감소 효과는 있으나 안정성에 대한 소비자들의 강한 의문으로 그 사

용이 매우 엄격히 제한되고 있으며, 유럽공동체 (EC) 국가들은 성장호르몬을 사용한 쇠고기의 수입을 전면 금지하고 있다. 이러한 상황에서 최근에 영국을 중심으로 새로운 연구가 진행중인 방법은 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체를 이용하는 것이다. 이 방법은 항체를 이용하여 육 생산동물의 지방세포를 직접 파괴시킴으로서 지방감소 효과를 얻는 것으로서, 쥐에서 최초로 연구가 시작되었다. 쥐의 지방세포 원형질막에 대한 항체를 이용한 *in vitro* 실험에서 이들 항체는 지방세포를 완전히 파괴시켰으며⁴⁾, *in vivo* 시험에서는 최대 75%까지 지방함량을 감소시켰다⁵⁾. Nassar와 HU¹⁰⁾는 이러한 면역요법을 면양에게 적용한 결과, 등 지방 두께를 24%, 신장 지방을 16% 감소시켰다고 하였으며, 돼지에게 이 항체를 피하 주사할 경우 전체 지방함량이 감소하였으며, 복강 내 주사할 경우 등 지방이 30% 감소한다고 하였다⁶⁾.

이러한 면역학적 방법에 대한 확실한 mechanism은 아직 구명되고 있지 않으나, 아마도 지방세

* 논문접수 : 1997년 12월 30일,

수정재접수 : 1998년 6월 30일

[†] 별책요청저자: 최창본, 영남대학교 축산학과, 경북 경산시 대동 214-1 712-749 Tel. 053-810-2932

포 (adipocyte)의 가장 큰 특징인 triacylglycerol을 저장하는데 있어서 수용체 (receptor)부위에 항체가 작용함으로써 직접 지방세포에 세포독성 (cytotoxicity)을 나타내기 때문이라는 이론이 가장 지배적이다^{6,11)}. 이와 아울러 Dulor 등³⁾은 토끼를 이용한 실험에서 항체가 지방조직 내 lipoprotein lipase (LPL)의 활성도를 현저히 떨어뜨리기 때문이라고 하였으며, 나아가서 항체를 처리한 지방세포는 tumor-necrosis factor (TNF)를 생산하고 이 TNF가 LPL의 활성도를 떨어뜨리기 때문이라는 보고도 있다. 한편 Moloney⁹⁾는 항체를 처리한 면양은 insulin-resistant state에 빠져들어 결국은 지방조직 내 지방이 축적되지 못한다고 하였다.

본 연구는 앞선 보고¹⁾에 이어 지방이 적은 돼지고기를 생산하고자 하는 궁극적인 목적과 함께 1차적으로 돼지의 지방세포 원형질막에 대한 항체를 생산하고 항체의 조직특이성을 ELISA 및 immunoblotting으로 조사하였다.

재료 및 방법

1. 원형질막 단백질의 분리

Landrace 교잡종 돼지를 도살한 후, 피하지방을 채취하여 collagenase를 함유한 Krebs Ringer Bicarbonate (KRB) buffer (3ml/g tissue, 37°C)에서 1시간동안 배양한 다음 25µm filter에 여과한 후 37°C waterbath에 2분간 정치하여 상등액 (mature adipocyte 부분)만 취하였다. KRB-HEPES buffer (37°C)로 3번 washing한 지방세포에 lysing medium (2.5mM ATP, 2.5mM MgCl₂ · 6H₂O, 0.1mM CaCl₂ · 2H₂O, 1.0mM KHCO₃, 2.0mM Tris-base)을 첨가하여 vortex-mixer를 이용하여 세포막을 파괴시켰다. 파괴된 지방세포 및 내용물을 37°C waterbath에 정치한 후 하층액 (cell debris)을 원심분리 (30,000×g, 30min, 4°C)하여 세포내용물과 세포막을 분리하였다.

이중 세포막 부분을 cold sucrose extraction medium에 완전히 용해시킨 후, Percoll gradient에 조심스럽게 올려 4°C, 10,000×g에서 15분동안 원심분리하였다. 상등액에 cold NaCl-based medium을 첨가하여 다시 원심분리 (30,000×g, 15min, 4°C)한 후, 원형질막 단백질부분을 얻었다. 이 원형질막 단백질을 NaCl-based medium으로 3회 세척한 다음 단백질 농도를 측정하였다. 이상의 순수 지방세포 원형질막 단백질 분리방법은 Belsham 등²⁾과

Vasilatos 등¹²⁾의 방법을 응용하였으며, 뇌, 심장, 간, 비장 및 신장의 원형질막 단백질 분리는 Lo 등⁸⁾의 방법을 이용하였다.

2. 면양으로부터 항체의 생산

면양으로부터 항체를 생산하기 위해 Corridale 종 숫면양 (체중 40kg)의 양쪽 서혜부 및 목덜미 중앙부위에 각각 한군데씩을 3차에 걸쳐 면역접종하였다. 면역접종 전에 면양의 경정맥으로부터 혈액을 채취한 후, 혈청을 분리하여 -20°C에 보관하였다 (non-immunized sera; NS).

돼지에서 분리한 지방세포 원형질막 단백질 250µg을 complete Freund's adjuvant와 혼합하여 1차 면역접종을 하고, 3주 후 동일한 단백질 125µg을 incomplete Freund's adjuvant에 섞어 동일한 개체에 2차 면역접종을 하고, 다시 3주 후에 2차와 동일하게 3차 면역접종을 실시하였다.

3차 면역접종 후 10일 (AS-1), 12일 (AS-2), 14일 (AS-3)째에 면양의 경정맥에 채혈용 cannula를 삽입한 다음, 약 500ml의 혈액을 채취하여 3,000rpm에서 5분간 원심분리로 항혈청을 분리하여 -20°C에 보관하였다.

3. ELISA에 의한 항체의 역가 측정 및 조직특이성 확인

면양으로부터 생성된 돼지 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항혈청의 역가는 ELISA를 이용해 측정하였다⁹⁾. 지방세포 원형질막 단백질 농도가 10µg/ml되게 tris-buffered saline (TBS)으로 희석하여 96-well plate에 well당 100µl의 단백질을 4°C에서 12시간 coating시킨 후, TTBS (TBS + 0.1% Tween 20)로 3번 세척하였다. 비면역혈청 (NS) 및 항혈청을 각각 1:3,000, 1:9,000, 1:27,000, 1:81,000으로 희석한 후 well당 100µl씩 점적하여 지방세포 원형질막 단백질과 2시간 반응시킨 후, TTBS로 3번 세척하였다. Secondary antibody로는 anti-sheep immunoglobulin G-alkaline phosphatase conjugate (Sigma Chemical, San Diego, USA)를 사용하여 2시간 반응시킨 후, 4-Nitrophenyl (4-NP)을 첨가한 alkaline phosphatase substrate buffer와 반응시켜 발색정도를 405nm의 microplate reader에서 측정하였다. 그리고 항혈청 중 역가가 가장 높은 AS-3을 사용하여 뇌, 심장, 신장, 간장 및 비장에서 분리한 원형질막 단백질과의 교차반응성을 같은 방법으로 측정하였다.

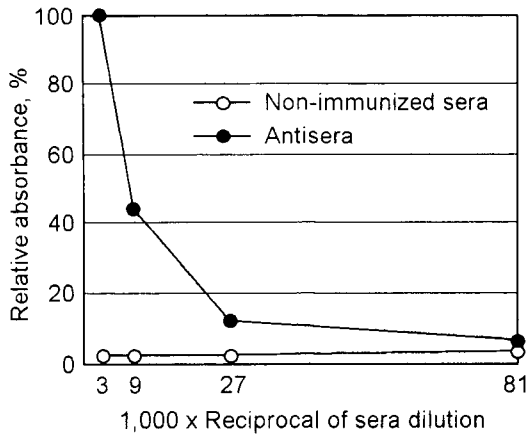


Fig. 1. Reactivity of non-immunized sera (NS) and antisera (AS) against adipocyte plasma membrane proteins. The relative reactivity was expressed as a percentage of the maximum optical density of antisera bled at 14 days after the third immunization (AS-3; 1:3,000). Optical density was determined at 450nm using microplate reader.

4. Immunoblotting에 의한 항체의 조직특이성 확인

분리한 지방세포, 뇌, 심장, 신장, 간장 및 비장의 원형질막 단백질 (10 μ g)을 동일한 조건에서 SDS-PAGE를 실시한 후⁷⁾, 하나의 gel은 Coomassie Blue R-250으로 염색하여 단백질 분리상 및 단백질의 양을 확인하는데 사용하였고, 다른 하나의 gel은 Genie electrophoretic blotter (Genie Co., Minneapolis, USA)를 이용하여 nitrocellulose membrane (Hybond C-Pure, Amersham, USA)에 transfer한 다음 immunoblotting에 이용하였다. Nitrocellulose membrane은 5% casein/TTBS로 용액에서 nonspecific binding을 막아준 후, TTBS로 세척하였다. Primary antibody로는 3차 면역접종 후 14일째에 채취한 AS-3을 5,000배 희석하여 사용하였으며, 2시간 반응시킨 후 TTBS로 씻어주었다. Secondary antibody로는 anti-sheep immunoglobulin G-horseradish peroxidase conjugate (Sigma Chemical, San Diego USA)를 사용하여 1시간 반응시킨 후 peroxidase substrate solution과 반응, 발색시켰다.

결 과

돼지의 지방세포로부터 추출한 원형질막 단백질을 면양에 면역접종하여 얻은 항혈청의 항체

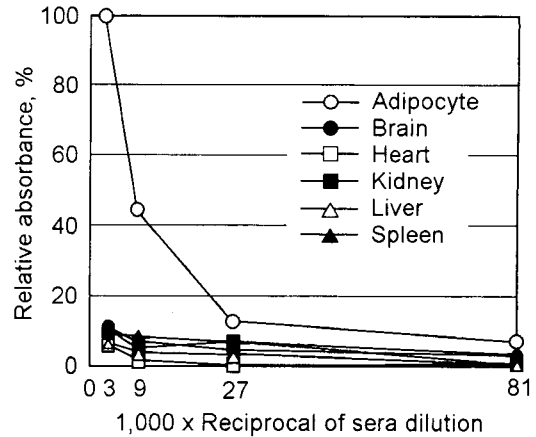


Fig. 2. Cross-reactivity of anti-adipocyte antisera with plasma membrane proteins isolated from adipocyte, brain, heart, kidney, liver and spleen. The relative reactivity was expressed as a percentage of the maximum optical density of antisera against adipocyte plasma membrane proteins bled at 14 days after the third immunization (AS-3; 1:3,000). Optical density was determined at 405nm using microplate reader.

역가를 ELISA로 측정 한 결과는 Fig. 1과 같다.

Fig. 1은 항체 역가 실험을 통하여 역가가 가장 높게 나타난 AS-3을 3,000배 희석시의 흡광도를 100%로 했을 때 비면역혈청 (NS) 및 면역혈청의 희석배율에 따른 흡광도를 상대적 흡광도로 나타낸 것이다. Fig. 1에서 알 수 있듯이 면양의 비면역혈청은 돼지 지방세포 원형질막 단백질에 대해 항원-항체 반응을 거의 나타내지 않았으며, 지방세포 원형질막 단백질을 항원으로 면역접종한 항혈청은 높은 항원-항체 반응을 나타내었다.

다음 단계로 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체의 조직특이성을 조사하였다. 본 실험에서도 항체 역가가 가장 높은 AS-3을 이용하였으며, 먼저 ELISA로 지방세포, 뇌, 심장, 신장, 간장 및 비장에 대한 교차반응성을 조사하였다. 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체는 다른 조직으로부터 추출한 원형질막 단백질에 대해서는 거의 항원-항체 반응을 나타내지 않고, 지방세포 원형질막 단백질에 특이적으로 반응을 나타내었다 (Fig. 2).

Fig. 3은 immunoblot을 실시하기 전에 지방세포 및 각 장기에서 추출한 원형질막 단백질의 양을 확인하기 위한 SDS-PAGE로서, 동일한 양으로 계산해서 loading한 다른 장기의 원형질막 단백질에 비해서 지방세포 원형질막 단백질의 농도가 다

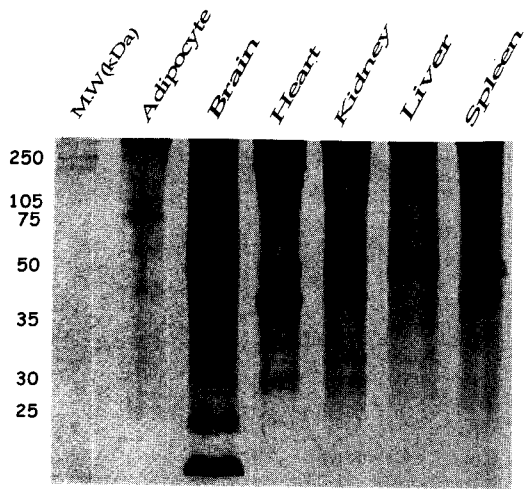


Fig. 3. Coomassie Blue R-250 stained SDS-PAGE of adipocyte, brain, heart, kidney, liver, and spleen plasma membrane (10 μ g/lane) run on a 4% stacking, 12% separating gel at 100V, 4 $^{\circ}$ C for 90min.

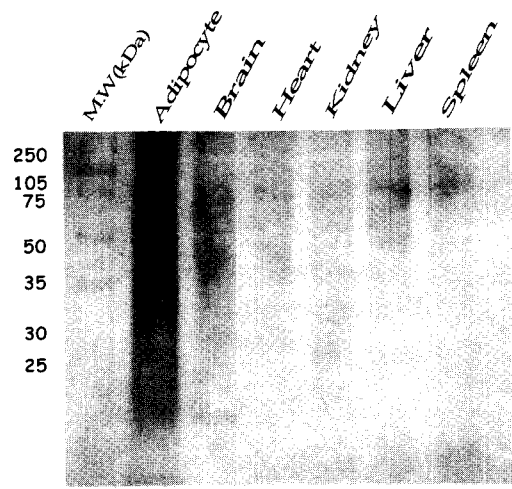


Fig. 4. Immunoblot using anti-adipocyte antisera bled at 14 days after the third immunization (AS-3). Equivalent amount (10 μ g) of membrane proteins isolated from adipocyte (A), brain (B), heart (H), kidney (K), liver (L) and spleen (S) were loaded at each lane. Anti-sheep immunoglobulin G-horseradish peroxidase conjugate (Sigma Chemical, San Diego, USA) was used as a secondary antibody.

소 희석되었음을 알 수 있었다.

Fig. 2로 확인한 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체의 조직특이성을 immunoblot으로 재확인하였다. Nitrocellulose membrane에 transfer한 protein에 secondary antibody로 anti-sheep IgG-peroxidase conjugate를 사용하여 반응시킨 immunoblot 결과는 Fig. 4에 나타나 있다. Fig. 4에서 나타난 바와 같이 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항혈청은 지방세포 원형질막 단백질에만 전적으로 특이적 반응을 나타내어, ELISA에서 확인된 항체의 조직특이성 결과와 일치하였다. 그리고 ELISA 결과에서 볼 수 있었던 뇌와 비장과의 미미한 교차반응성은 immunoblot에서는 확인할 수 없었고, 신장의 경우 고분자량 (97kDa 이상)의 단백질과 미약한 반응을 확인할 수 있었다.

고 찰

지방세포에 대한 항체의 개발은 주로 단위동물인 돼지와 쥐를 중심으로 연구가 되어왔다. 이는 이들 동물에 있어서 항체를 이용한 지방함량의 감소가 우선은 사람이 섭취하는 음식물 내 지방함량을 감소시킨다는 직접적인 효과와 함께 장기적으로는 이러한 면역기법을 인체에 직접 적용할 수 있다는 잠재성 때문일 것으로 생각된다.

Flint 등⁴⁾은 흰쥐의 지방세포 원형질막 단백질

을 면양에 면역주사한 결과 27,000배의 희석배율에서도 역가를 측정할 수 있었으며, Kestin 등⁶⁾은 돼지의 지방세포 원형질막 단백질을 면양에 주사하여 27,000배의 희석배율에서도 역가를 감지할 수 있는 높은 역가의 항체를 생산하였다고 보고하였다.

본 연구의 결과 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체가 Fig. 2에 나타난 바와 같이 비록 지방세포 원형질막 단백질과 거의 전적으로 항원-항체 반응을 나타내었지만, 뇌, 신장 및 비장 조직의 원형질막 단백질과도 미약하지만 교차반응성을 나타낸 것은 지방세포 원형질막과 이들 조직의 원형질막에 같이 존재하는 막 단백질이 있기 때문일 것으로 생각된다.

또한 Fig. 4의 immunoblotting의 결과에서도 신장과 일부 교차반응성을 나타내는 것도 동일한 맥락에서 설명이 될 수 있을 것이다. Fig. 4의 경우 ELISA 결과 나타났던 뇌와 비장과의 교차반응성은 확인할 수 없었다. 그러나, ELISA나 immunoblot에서 미약하지만 교차반응성 - 특히 뇌 조직과 - 을 나타낸다는 것은 본 연구의 결과 생산된 항체의 실용화를 위해서 반드시 고려가 되어야 할 부분이다. 이러한 교차반응성을 최소화

하기 위한 방법으로는 지방세포 원형질막에만 특이적으로 존재하는 단백질을 screening해서 항원으로 이용하는 방법도 검토해 볼 수 있겠지만, 궁극적으로는 monoclonal antibody를 개발함으로써 기타 조직과의 교차반응성 및 예상되는 항체의 부작용을 최소화 할 수 있을 것으로 생각된다.

Fig. 4에서 지방세포 원형질막 단백질과의 항원-항체 반응의 결과, 일반적으로 immunoblot에서 볼 수 있는 것과 같이 single band로 나타나지 않고 smearing band pattern으로 보이는 것은 본 연구에서 사용한 항원이 특정 단백질이 아니고 지방세포 원형질막 전체 단백질을 이용했기 때문으로 생각된다. Kestin 등⁶⁾이 돼지의 지방세포 원형질막 전체 단백질을 면양에 면역주사하여 얻은 항혈청을 이용하여 immunoblotting을 실시한 결과와 비교해보면, 지방세포 원형질막 단백질과의 항원-항체 반응은 본 연구와 유사한 band pattern을 나타내었다.

Nassar와 Hu¹⁰⁾는 면양의 지방세포 원형질막에 대한 항체의 교차반응성을 간장, 신장, 심장 및 적혈구의 원형질막 단백질을 이용하여 ELISA로 측정된 결과, 생산된 항체는 지방세포에 특이적으로 작용한다고 하였으며, 돼지의 지방세포에 대한 항체를 비장, 적혈구, 뇌, 폐, 간장, 신장 및 근육의 원형질막 단백질을 immunoblotting을 실시한 결과 항체는 지방세포 원형질막 단백질에 매우 특이적으로 작용한다고 보고하였다⁶⁾.

이상의 결과를 종합해 보면, 본 연구에서는 돼지의 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체를 면양에 면역접종한 결과 높은 역가를 지닌 항체가 생산되었으며, 이 항체는 지방세포 원형질막 단백질과 조직특이성을 나타내었다. 이러한 본 연구의 결과를 향후, 저지방 돼지고기 (lean pork)를 생산하기 위한 첫단계로서 매우 유용한 의미를 지니고 있다. 그러나, 본 연구의 결과에서 나타난 바와 같이 비록 미약하지만 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체와 기타 조직 원형질막 단백질과의 교차반응성은 본 연구의 결과가 실용화되기 전에 반드시 해결되어야 할 문제점으로 지적할 수 있으며, 현재 저자들은 돼지 지방세포 원형질막 특이 단백질을 검출하기 위한 일련의 실험을 수행 중에 있다.

참 고 문 헌

1. 최창본, 이상렬 (1996): 면역학적 방법에 의한 저지방 돼지고기의 생산에 관한 연구-돼지 지방세포 원형질막에 대한 항체의 개발. 한국축산학회지, **38**(4): 369-374.
2. Belsham GJ, Denton RM and Tanner MJA (1980): Use of a novel rapid preparation of fat-cell plasma membranes employing percoll to investigate the effect of insulin and adrenaline of membrane protein phosphorylation within intact fat-cells. *Biochem J*, **192**: 457-467.
3. Dulor JP, Reyne Y and Nougues J (1990): *In vivo* effects of a treatment with antibodies to adipocyte plasma membranes in the rabbit. *Reprod Nutr Dev*, **30**: 49-58.
4. Flint DJ, Coggrave H, Futter CE, Gardner MJ and Clarke TJ (1986): Stimulatory and cytotoxic effects of an antiserum to adipocyte plasma membranes on adipose tissue metabolism *in vitro* and *in vivo*. *Int J Obesity*, **10**: 69-77.
5. Futter CE and Flint DJ (1987): Long-term reduction of adiposity in rats after passive immunization with antibodies to rat fat cell plasma membranes. pp.181-185, *In Berry EM, Blondheim SH, Eliaho HE and Hafzir ES (ed.), "Recent Advances in obesity research", John Libbey and Company, London.*
6. Kestin S, Kenndy R, Tonner E, Kiemam M, Cryer A, Griffin H, Butterwith S, Rhind S and Flint DJ (1993): Decrease fat content and increased lean in pigs treated with antibodies to adipocyte plasma membranes. *J Anim Sci*, **71**: 1486-1494.
7. Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
8. Lo HF, August TR, Liberman UA and Edelman IS (1976): Dependence of renal (Na⁺ + K⁺)-adenosine triphosphatase activity on thyroid status. *J Biol Chem*, **251**: 7826-7833.
9. Moloney AP (1990): Immunizing against adipose tissue plasma membranes to reduce body fat: effects on plasma metabolites and insulin.

- Biochem Soc Trans*, **18**: 336-337.
10. Nassar AH and Hu CY (1991a): Growth and carcass characteristics of lambs passively immunized with antibodies developed against ovine adipocyte plasma membranes. *J Anim Sci*, **69**: 578-586.
 11. Nassar AH and Hu CY (1991b): Antibodies to ovine adipocyte plasma membranes recognize tissue and species specific plasma membrane components. *Comp Biochem Physiol*, **98B**(2/3): 361-367.
 12. Vasilatos R, Etherton TD and Wangness PJ (1983): Preparation of isolated bovine adipocytes: Validation of use for studies characterizing insulin sensitivity and binding. *Endocrinology*, **112**: 1667-1673.

=Abstract=

Production of Polyclonal Antibodies Specific to Porcine Adipocyte Plasma Membrane Proteins in Sheep

Chang-Bon Choi[†], Myoung-Jin Lee* and Eun-Jin Kwon

Department of Animal Science and Institute of Biotechnology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea*

The objectives of this study were to produce polyclonal antibody to adipocyte plasma membrane (APM) proteins isolated from pig, and to investigate its tissue specificity. Plasma membrane proteins from adipocyte, brain, heart, kidney, liver and spleen were isolated using a self-forming Percoll gradient. Sheep (40kg) was immunized three times at three week interval with the purified APM proteins. Blood was taken from non-immunized sheep (NS) and from immunized sheep at 10 (AS-1), 12 (AS-2), and 14 (AS-3) days after the third immunization. Antisera titers and cross-reactivity against other tissues were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Antisera reacted strongly to APM proteins showing detectable amounts of antibody at 1:81,000 dilution. And antisera showed much stronger reactivity to APM proteins than any other tissue plasma membrane proteins. Furthermore, tissue specificity of antisera against APM was reconfirmed by immunoblotting using anti-sheep immunoglobulin G-horseradish peroxidase conjugate as a secondary antibody. Antisera to APM proteins showed adipocyte specificity compared with other tissues. In conclusion, polyclonal antibody against APM proteins isolated from pig was developed successfully in our laboratory, and these antisera showed tissue specificity with APM.

Key Words: Adipocyte, Antisera, Immunoblotting, Enzyme-linked immunosorbent assay

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 4(1): 57-63, June, 1998]

[†]Corresponding author