

효소-항체의 결합 및 효소면역측정 방법의 연구

장선일*

서정대학교 피부미용과

Study on Antibody-enzyme Coupling and Enzyme Immunoassay Methods

Seon Il Jang*

Department of Skin & Beauty, Seojeong College, Yangju 482-777

Alkaline phosphatase (ALP)- or horseradish peroxidase (HRP)-antibody conjugate was used frequently on the immunological detection methods such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunoblot, immunohistochemistry. The classical enzyme-antibody coupling method by one-step (direction) injection of glutaraldehyde bring into being disadvantage such as low sensitivity of antigen detection because of homopolymers. This study was modified with the dialysis glutaraldehyde method to provide simple coupling through ε-amino residues present in most protein. The dialysis glutaraldehyde coupling effects were better than the classical one-step glutaraldehyde injection in antigen detection of ELISA and immunoblot. Optimal dose of the dialysis glutaraldehyde solution was 0.10-0.25 %. This results suggest that the dialysis glutaraldehyde coupling method can readily applied to antigen detection of *in vitro* and *in vivo*.

Key words : Alkaline phosphatase, horseradish peroxidase, dialysis, glutaraldehyde, antibody, coupling method

서 론

효소가 결합된 항체는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)와 immunoblot 및 immunohistochemistry 등 antigen의 양적 분석에 있어서 매우 가치 있는 물질인 것으로 알려졌다¹⁻³⁾.

본 연구에서 사용된 효소는 alkaline phosphatase(ALP)와 horseradish peroxidase(HRP)로 면역학적 분석에 빈번히 이용되는 중요한 단백질로 각각의 효소가 특이한 기질과 만나면, 반응산물의 결과를 가지적으로 볼 수 있다는 장점이 있다⁴⁾. 또한 항체는 항원에 대해서 매우 특이적 결합을 하기 때문에 생물분자의 검사에 널리 이용되고 있다. 이와 같이 기능이 서로 다른 물질을 결합하여 새로운 물질을 생성하여 연구용 및 진단용 시약으로 개발되어 왔다⁵⁾. 효소에 직접 glutaraldehyde를 주입하여 아미노기를 활성화시키거나, meta-maleimidoester 또는 periodate와 같은 상호 연결물질을 이용하여 효소와 항체의 결합을 유도한다⁶⁾.

Glutaraldehyde는 자체의 amino group를 통하여 기능적으로

다른 물질을 연결해주는 교차연결물질인 것으로 알려졌다⁶⁾. 그러나 이 방법은 one-step으로 효소에 직접 glutaraldehyde를 소량씩 주입하는 방법으로 고 농도의 glutaraldehyde가 효소에 직접 접촉하게 되면 순간적으로 효소와 효소의 이중결합 또는 다중결합이 형성되기 때문에 효소의 효율적 항체 결합을 유도하는데 문제점이 발생되고⁷⁾, 효소와 반응을 하지 않은 잔여 glutaraldehyde는 항체에 노출될 때 항체의 생명부위라 할 수 있는 항원결정부위를 손상시켜 항원특이결합에 큰 지장을 초래한다⁷⁾. 그러므로 지금까지 개발된 이러한 glutaraldehyde 직접주입 방법은 필연적으로 효소와 항체의 낮은 역가를 초래했다. 한편 면역 반응성을 이용한 생물분자의 확인에 있어서 HRP와 항체의 결합체를 가시화하기 위해서는 효소와 그 효소에 대한 기질 (substrate) 및 발색기질(chromogen-substrate)이 필요하다. 지금까지 HRP에 대한 발색기질은 diaminobenzidine (DAB)⁸⁾, 4-chloronaphthol (4-CN)⁹⁾, 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC)¹⁰⁾ 등 여러 가지 발색기질이 이용되고 있고, 이들의 민감도를 높이기 위하여 금속 이온을 첨가하여 이용하고 있다¹¹⁾.

본 연구는 이러한 glutaraldehyde의 직접 주입방법을 극복하기 위해서 셀룰로오스막을 투과시키는 점진적 투석방법을 연

* 교신저자 : 장선일, 경기도 양주시 은현면 용암리 681-1, 서정대학 피부미용과

· E-mail : sonjiang@seojeong.ac.kr, · Tel : 031-860-5085

· 접수 : 2004/03/26 · 수정 : 2004/04/30 · 채택 : 2004/05/28

구하였으며, 그 결과 효소와 효소의 결합 즉, 이중결합 또는 다중 결합을 최소화하고 항체의 항원 결정부위의 손상없이 결합시켜 매우 높은 효소-항체의 역가를 얻을 수 있음을 발견하였고 HRP 발색기질에 4CN-DAB을 동량 혼합하여 효소발색을 유도한 결과 매우 민감도가 높은 결과를 얻었다. 동시에 ELISA와 면역블롯 방법을 이용하여 그 역가를 측정한 결과 흥미로운 진단 결과를 얻었기에 보고하는 바이다. 또한 한약재로 빈번히 활용되고 있는 황금 추출물 중 baicalin을 이용하여 streptozotocine으로 유도된 당뇨병 랫트에 효과가 있는지 진단하기 위해서, 본 연구에서 고안된 방법을 적용한 결과 ELISA법으로 신속하고 정확하게 측정할 수 있었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

Rabbit anti-mouse IgG, goat anti-rabbit IgG, mouse IgG, rabbit IgG, goat IgG, alkaline phosphatase(ALP, type VII-T), horseradish peroxidase(HRP), glutaraldehyde, glycine, ethanolamine, sephaclyl 200, trisa-base, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline- 6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), sodium dodecyle sulfate, p-nitrophenyl phosphate (p-NPP), sucrose, cellulose membrane sac(CMS), 4-chloro-1-naphthol(4-CN), diaminobenzidine(DAB), 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC), imidazole, polyethylene glycol, dextran 등은 Sigma-Aldrich사(USA)로부터 구입했다. Nitro cellulose membrane (NCM)은 Armersham사(USA), 10X phosphate buffered saline (PBS), carbonate-bicarbonate buffered saline은 Gibco BRL사(USA)로부터 구입했다.

2. 효소 및 항체의 첨가제 제거

효소의 안정제로 첨가되어 있는 화학물질을 제거하기 위해서 냉각(4 °C) 10 mM PBS(pH 7.4) 1 ml에 ALP 2.0 mg 또는 HRP 1.0 mg를 각각 microtube(Sasted, USA)에 용해한 다음 cellulose membrane sac에 주입하고 PBS 2,000 ml에 대하여 4 °C가 유지되는 항온실에서 자석교반기(EYELA, RCN-7D, USA)를 이용하여 200 rpm으로 6-12시간 동안 500 ml씩 4회에 걸쳐 교환하면서 투석하였다. Rabbit anti-mouse IgG, rabbit anti-rabbit IgG, goat anti-rabbit IgG의 투석은 효소의 투석방법과 동일하게 실시하여 첨가제를 제거하였다.

3. Glutaraldehyde activation

투석에 의해 효소의 활성화를 유도하는데 있어서, glutaraldehyde의 최적농도를 결정하기 위하여, 10 mM 인산완충식염수에 glutaraldehyde의 농도를 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 %되게 하여 효소활성용액을 준비한 다음 인산완충식염수에 투석된 효소를 CMS에 주입하고 밀봉하여 각각 다른 농도의 glutaraldehyde 용액에 주입한 다음 4 °C가 유지되는 항온실에서 자석교반기를 이용하여 100 rpm으로 18시간 동안 투석하여 효

소활성용액을 제조하였다. 반응하지 않은 잔여 glutaraldehyde를 제거하기 위해서 상기와 같은 방법으로 4시간 동안 PBS 500 ml씩 교환하면서 총 2,000 ml를 자석교반기를 이용하여 200 rpm으로 투석하였다.

4. 활성 ALP와 항체의 결합

첨가제가 제거된 활성 ALP를 갈색병(Pierce, USA)에 옮기고, 1 mg의 Rabbit Anti-Mouse IgG, Rabbit Anti-Goat IgG 또는 Goat Anti-Rabbit IgG를 주입하여 균등히 교반하고 4 °C가 유지되는 항온실에서 18시간 동안 반응시켰다. 활성효소와 항체의 결합 반응을 정지시키기 위해서 10 mM 인산완충식염수에 0.2 M glycine 용액 100 µl를 반응용액에 주입한 다음 균등하게 혼합되도록 교반하고 2시간 동안 상온에서 방치하여 더 이상의 활성효소와 항체의 결합을 정지시켰다.

5. 활성 HRP와 항체의 결합

첨가제가 제거된 활성 HRP를 NCM에 주입하고 25% sucrose가 포함된 0.15 M sodium carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.5) 2,000 ml을 3시간 동안 500 ml씩 교환하면서 자석교반기를 이용하여 200 rpm으로 투석하여 잔여 glutaraldehyde를 제거한 다음 활성 HRP를 회수하고 갈색병(Pierce, USA)에 옮기고 2 mg의 rabbit anti-mouse IgG, rabbit anti-goat IgG 또는 goat anti-rabbit IgG를 주입하여 균등히 교반하고 4 °C가 유지되는 항온실에서 18시간 동안 반응시켰다. 활성효소와 항체의 결합 반응을 정지시키기 위해서 0.2 M 에탄올아민 100 µl를 주입하고 1시간동안 4 °C에서 방치한 다음 PBS에 0.2 M glycine 용액 100 µl를 첨가한 후 균등하게 혼합되도록 교반하고 2시간 동안 상온에서 방치하여 더 이상의 활성효소와 항체의 결합을 정지시켰다.

6. 효소와 항체 결합체의 분리

효소와 항체 결합체와 반응하지 않은 항체 및 효소의 분리를 하기 위하여 Sephaclyl 200(S-200-HR, Sigma-aldrich) 칼럼 (150 x 900 mm) 을 이용하여 상기와 동일한 인산완충식염수를 통과시켜 분리하였다.

7. ELISA

코팅완충액(carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6) 100 µl에 Rabbit IgG, Goat IgG 또는 Mouse IgG 5 µg을 바닥이 평편한 96-well plate에 주입하여 37 °C에서 2시간 동안 코팅시킨 다음 10 mM tris-buffered saline(TBS)에 3 % skim milk 200 µl를 주입하여 30분간 블로킹을 하였다. 그 후 10 mM TBS에 0.2 % tween 20을 첨가하여 3회 세척한 다음 Rabbit IgG가 코팅된 plate에는 0.05-0.5 %까지 glutaraldehyde로 효소를 활성화 시킨 후 항체와 결합한 ALP- 또는 HRP-Goat Anti-Rabbit IgG를, 2배 계열희석하여 30 °C에서 1시간 동안 유지하였다. Mouse IgG가 코팅된 plate에는 ALP- 또는 HRP- Rabbit Anti-Mouse IgG를 2배 계열희석하여 30 °C에서 1시간 유지하였다. ALP가 결합된 항체에는

p-NPP 5 mg을 TBS 10 ml에 용해하여 각 well 당 100 µl씩 주입하였고, HRP가 결합된 항체에는 ABTS 1 mg을 50 mM phosphate-citrate buffer(pH 5.0) 10 ml에 용해하여 H₂O₂ 4 µl를 첨가하고 각 well 당 100 µl씩 각각 주입하여 30분간 발색시켰다. p-NPP처리 후 발색이 완료된 각 well에는 2 N NaOH 50 µl를 첨가하여 반응을 중지시켰으며, ABTS가 처리된 각 well 당 2.5 % sodium dodecyl sulfate 50 µl를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 발색된 plate는 다용도 분광광도계(Molecular Device, Spectra Max plus)을 이용하여 410 nm에서 각각의 흡광도를 측정하여 1.0 이상을 반응 역가로 결정하였다. 역가의 표현은 효소-항체 대 TBS 희석비율로 나타내었다.

8. Immunoblot

NCM(0.5×0.7 mm)에 mouse IgG 또는 rabbit IgG를 50 ng를 흡착시켜 3 % skim milk로 블로킹을 한 다음 tris-tween buffered saline(TTBS, pH 7.4)로 5회 세척하고 24-well plate에 NCM을 옮기고, mouse IgG가 흡착된 NCM에는 1:1,000-100,000 까지 희석된 ALP- 또는 HRP-rabbit anti-mouse IgG를 주입하고 30 °C에서 1시간 동안 유지하였다. Rabbit IgG가 흡착된 NCM에는 ALP- 또는 HRP-Goat Anti-Rabbit IgG를 각각 주입하고 30 °C에서 1시간 동안 유지하였다. 효소-항체가 처리된 NCM은 TTBS로 5회 세척하고 발색에 사용했다. ALP가 결합된 항체 NCM에는 One-Step BCIP/NBT(ABI, Korea)을 첨가하고 30분간 유지한 후 증류수를 가하여 반응을 중지시켰다. HRP가 결합된 항체 NCM에는 One-Step 4CN(ABI, Korea)을 주입하여 30분간 유지한 후 증류수를 가하여 반응을 중지하였다. 역가의 표현은 효소-항체 대 TBS 희석비율로 나타내었고, 육안으로 뚜렷히 발색된 다트에 한해서 반응 역가로 정하였다.

9. HRP의 발색 signal 증폭

DAB 15 mg과 CN 30 mg을 각각 메탄올 2.5 ml에 용해한 다음 이들 2가지 용액을 잘 혼합한 후 imidazole 완충액 (pH 6.0) 45 ml에 주입하여 잘 교반하였다. Imidazole 완충액은 50 mM imidazole, 7 mM polyethylene glycol, 10 mM dextran 등으로 조성하였다. 4CN-DAB의 반응 민감도를 조사하기 위하여 NCM (0.5×0.7 mm)에 Mouse IgG, Rabbit IgG 또는 Goat IgG를 9.8-5,000 pg를 흡착시켜 3 % skim milk로 블로킹을 한 다음 TTBS로 5회 세척하고 24-well 플라스크에 NCM을 옮기고, Mouse IgG가 흡착된 NCM에는 Rabbit Anti-Mouse IgG-HRP, Rabbit IgG가 흡착된 NCM에는 Goat Anti-Rabbit IgG-HRP 또는 Goat IgG가 흡착된 NCM에는 Rabbit Anti-Goat IgG-HRP를 각각 1:10,000 희석 비율로 주입하여 잘 교반한 다음 4 °C에서 1 시간 동안 유지한 후 TTBS로 3회 세척하였다. 그 후 4CN-DAB와 지금까지 알려진 4CN, DAB, DAB-Ni+Co, AEC와 같은 여러 가지 발색기질과 0.01 % 과산화수소 용액을 신선하게 준비하여 세척된 NCM에 0.5 ml을 주입한 후 30 °C에서 30분간 반응시키고 증류수를 가하여 반응을 중지한 다음 육안으로 선명하게 관명된 다트를 효소의 최종 역가(++)로 정하였다.

10. 당뇨병 유발 및 ELISA법에 의한 insulin 측정

Sprague Dawley 랫트(200-250 g)를 12시간 절식한 다음 체중 kg 당 55 mg의 streptozotocine을 주입하고 6일 후에 황금(Scutellaria baicalensis)유래 baicalin을 kg 당 10-200 mg을 6일 동안 경구 투여한 다음 심장으로 부터 혈액을 얻어 혈청을 분리하였다. 먼저 ELISA plate에 plasma를 carbonate-bicarbonate buffered saline으로 희석하여 피복시킨 후 anti-insulin(rabbit IgG) 항체를 주입하고 37 °C에서 2시간 방치한 후 TBS로 충분히 세척한 다음 goat anti-IgG antibody-HRP를 주입하여 37 °C에서 1시간 동안 방치한 후 TTBS로 5회 이상 충분히 세척하고 4CN-DAB chromogen-substrate를 주입하고 실온에서 20분간 발색하여 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 혈청내 insulin의 양의 측정은 insulin을 1-50,000 pg까지 농도를 피복하여 계산하였다.

결 과

1. 효소와 항체의 화학첨가제 제거 효과

본 연구에서 사용된 효소는 type VII-T의 alkaline phosphatase (ALP, Sigma P-6774)와 horseradish peroxidase (HRP, Sigma p-8375) 등 2가지였고, 항체는 rabbit anti-mouse IgG와 goat anti-rabbit IgG 등으로 이들은 제조회사에서 효소의 활성을 유지하기 위해서 화학안정제를 첨가하여 시판된다. 효소와 항체의 결합 반응을 증진시키기 위해서 먼저 화학안정제의 제거가 필수적이다. 그러므로 본 연구에서는 효소의 활성과 항체의 변형을 최소화하면서 효과적으로 화학첨가제를 제거하기 위해서 CMS를 이용하여 투석하였다. 항체의 화학안정제 제거는 PBS를 투석재료로 고정하였다. 투석재료의 평가는 기존에 알려진 glutaraldehyde 직접주입에 의한 항체의 역가 중 흡광도가 1.0이상을 기준으로 분석하였다. 그 결과 Table 1과 같이 ALP는 PBS가 투석 재료로 가장 적당하였고, 투석방법은 2시간동안 4회로 1회당 PBS 500 ml이 적당하였다. HRP는 PBS보다는 증류수가 투석재료로 적당하였고, 투석방법은 ALP와 같았다.

Table 1. Effects of dialysis materials on antibody-enzyme titer by ELISA

Dialysis materials	Enzymes	
	Alkaline phosphatase	Horsradish peroxidase
PBS	1:1,000-1:2,000	1:250-500
TBS	1:250-1:500	1:250-1,000
D.W.	1:250-1:500	1:1,000-1:2,000

2. Glutaraldehyde 농도에 따른 효소-항체결합의 ELISA 역가

효소-항체 결합유도에 있어서, glutaraldehyde의 직접주입방법과 CMS를 이용한 투석방법과의 signal 증폭의 차이점을 알아보기 위해서 기존에 알려진 glutaraldehyde 농도 0.25 %을 기준으로 0.05-0.5 %까지 투석 농도를 다르게 하여 항체의 역가 ELISA를 이용하여 측정하였다. 먼저 carbonate/bicarbonate buffer(pH 9.6)를 이용하여 mouse IgG 또는 rabbit IgG를 용해한 후 96 well plate에 피복시키고, 재료 및 방법에서와 같이 항체와

결합한 ALP- 또는 HRP-goat anti-rabbit IgG를, 2배 계열희석하여 30 °C에서 1시간 동안 유지하였다. ALP가 결합된 항체에는 p-NPP를 TBS에 용해하여 각 well에 주입하였고, HRP가 결합된 항체에는 ABTS를 PBS(pH 5.0)에 용해하여 H₂O₂를 첨가하고 각 well에 주입하여 30분간 발색시킨 후 고정하여 410 nm에서 각각의 흡광도를 측정하여 1.0 이상을 반응 역가로 결정하였다. 역가의 표현은 효소-항체 대 TBS 희석비율로 나타내었다. 그 결과 Table 2와 같이 glutaraldehyde 직접 주입법에 의한 ALP-rabbit anti-mouse IgG, ALP-goat anti-rabbit IgG, HRP-rabbit anti-mouse IgG 또는 HRP-goat anti-rabbit IgG의 경우 모두 ELISA검사에서 1:1,000-1:3,000 이하로 나타난 반면, glutaraldehyde 투석법에 의한 효소-항체결합 역가는 사용된 모든 농도에서 명백히 높게 나타났다. 또한 glutaraldehyde 저농도와 고농도에서는 역가가 낮은 반면, 0.1 %과 0.25 %에서는 그 역가가 매우 높게 나타났다. 따라서 ALP와 HRP의 항체의 역가를 1:10,000 이상 유지하려면 glutaraldehyde의 농도는 0.1이상 0.25 %가 바람직하였다.

3. Glutaraldehyde 농도에 따른 효소-항체결합의 immunoblot 역가

효소-항체 결합유도에 있어서, glutaraldehyde의 직접주입방법과 CMS을 이용한 투석방법과의 signal 증폭의 차이점을 알아보기 위해서 기존에 알려진 glutaraldehyde 농도 0.25 %을 기준으로 0.05-0.5 %까지 투석 농도를 다르게 하여 항체의 역가 면역블롯 방법을 이용하여 측정하였다. Nitro cellulose membrane (NCM)에 Mouse IgG 또는 Rabbit IgG 50 ng를 흡착시켜 skim milk로 블로킹을 한 다음 TTBS로 충분히 1:1,000-100,000까지 희석된 ALP- 또는 HRP-Rabbit Anti-Mouse IgG를 주입하고 30 °C에서 1시간 동안 유지한 다음 ALP가 결합된 항체 NCM에는 One-Step BCIP/NBT를 첨가하고 30분간 발색하였고, HRP가 결합된 항체 NCM에는 One-Step 4CN을 주입하여 30분간 발색한 후 증류수를 가하여 반응을 중지하였다. 역가의 표현은 효소-항체 대 TBS의 희석비율로 나타내었고, 육안으로 뚜렷히 발색된 다트에 한해서 반응 역가로 정하였다. 그 결과 Table 2와 같이 glutaraldehyde 직접 주입법에 의한 ALP-rabbit anti-mouse IgG, ALP-goat anti-rabbit IgG, HRP-rabbit anti-mouse IgG 또는 HRP-goat anti-rabbit IgG의 경우 모두 ELISA검사에서 1:1,000-1:2,000 이하로 나타난 반면, glutaraldehyde 투석법에 의한 효소-항체결합 역가는 사용된 모든 농도에서 명백히 높게 나타났다. 또한 glutaraldehyde 저농도와 고농도에서는 역가가 낮은 반면, 0.1 %과 0.25 %에서는 그 역가가 매우 높게 나타났다. 따라서 ALP와 HRP의 항체의 역가를 1:10,000 이상 유지하려면 glutaraldehyde의 농도는 0.1이상 0.25 %가 바람직하였으며, ELISA 분석 결과와 일치되었다.

4. Horsradish peroxidase 발색 기질에 따른 효소-항체결합의 immunoblot 역가

HRP의 발색 기질인 4-CN과 DAB를 이용해 각각 사용되는

경우에 비해 이들 기질을 동시에 산화시켜 발색 민감도를 높일 수 있는 방법을 개발하기 위해서, NCM에 mouse IgG, rabbit IgG 또는 goat IgG를 9.8-5,000 pg를 흡착시켜 skim milk로 블로킹을 한 다음 TTBS로 충분히 세척하고, Mouse IgG가 흡착된 NCM에는 rabbit anti-mouse IgG-HRP, rabbit IgG가 흡착된 NCM에는 goat anti-rabbit IgG-HRP 또는 goat IgG가 흡착된 NCM에는 rabbit anti-goat IgG-HRP를 각각 1:10,000 희석 비율로 주입하여 잘 교반한 후 4 °C에서 다시 TTBS로 충분히 세척하였다. 그 후 4CN-DAB와 지금까지 알려진 4CN, DAB, DAB-Ni+Co, AEC와 같은 여러 가지 발색기질과 0.01 % 과산화수소 용액을 신선하게 준비하여 세척된 NCM에 0.5 ml을 주입한 후 30 °C에서 30분간 반응시키고 증류수를 가하여 반응을 중지한 다음 육안으로 선명하게 판명된 다트를 효소의 최종 역가로 정하였다. 그 결과 Table 3과 같이 4CN-DAB는 40 pg이상의 항원을 인식할 수 있어 다른 어떠한 발색기질보다 우수하였다.

Table 2. Dose-dependant effects of glutaraldehyde on the antibody-enzyme titer by ELISA

Glutaraldehyde (%)	ALP-antibodies		HRP-antibodies	
	Anti-Mouse IgG	Anti-Rabbit IgG	Anti-Mouse IgG	Anti-Rabbit IgG
0.05	1:5,000-1:10,000	1:3,500-1:7,000	1:3,000-1:5,000	1:2,500-1:7,000
0.10	1:10,000-1:20,000	1:10,000-1:20,000	1:10,000-1:20,000	1:10,000-1:20,000
0.25	1:20,000-1:40,000	1:14,000-1:28,000	1:20,000-1:40,000	1:15,000-1:30,000
0.50	1:5,000-1:10,000	1:5,000-1:10,000	1:1,000-1:4,000	1:5,000-1:10,000

Table 3. Dose-dependant effects of glutaraldehyde on the antibody-enzyme titer by immunoblot

Glutaraldehyde (%)	ALP-antibodies		HRP-antibodies	
	Anti-Mouse IgG	Anti-Rabbit IgG	Anti-Mouse IgG	Anti-Rabbit IgG
0.05	1:2,500-1:10,000	1:2,500-1:5,000	1:2,500-1:5,000	1:2,500-1:5,000
0.10	1:10,000-1:20,000	1:10,000-1:20,000	1:10,000-1:20,000	1:10,000-1:20,000
0.25	1:25,000-1:50,000	1:25,000-1:50,000	1:25,000-1:40,000	1:15,000-1:30,000
0.50	1:5,000-1:10,000	1:2,500-1:5,000	1:1,000-1:4,000	1:2,500-1:5,000

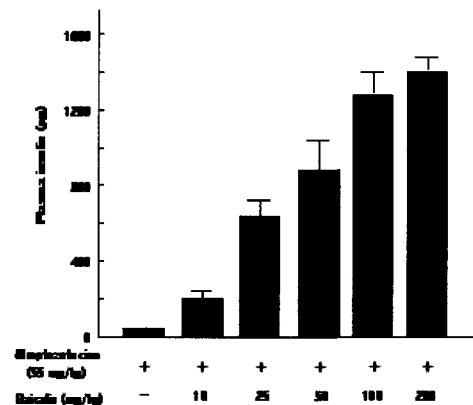


Fig.1. Dose dependent of baicalin on insulin secretion in streptozotocine-induced diabetic. Rat were injected streptozotocine (55 mg/kg), and maintained for 7 days. The streptozotocine-induced rats were administrated baicalin (10-200 mg/kg) for 6days. Plasma insulin was determined as described in material and methods. Each column represents the mean from n=5 rats.

5. 인슐린 생성 능력에 미치는 동과의 효과 진단

본 연구에서 고안된 방법이 생체의 물질을 효과적으로 진단할 수 있는지 여부를 알아보기 위해서, streptozotocine으로 유발된 당뇨병 백서에 한약재로 이용되고 있는 황금 유래 baicalin (10-200 mg/kg)를 6일간 투여하고 plasma를 분리한 후 96 well에 코팅하고 anti-insulin을 1차 항체로 하여 부착한 다음 본 연구에서 개발된 goat anti-rabbit IgG-HRP를 2차 항체로 부착하였다. 그 후 4CN-DAB chromogen-substrate를 주입하여 발색하여 분광광도계로 그 흡광도를 측정하여 결과 Fig. 1과 같이 뚜렷히 개선되는 효과를 진단하였다. 따라서 한약재를 비롯한 약물이 생체에 미치는 효과를 진단하는데 있어서 본 연구에서 개발된 방법이 많이 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

고찰

본 연구는 효소와 항체의 결합에 있어서, 상호연결물질인 glutaraldehyde의 투석에 의한 효소의 활성화를 유도한 다음 항체를 결합시키는 방법과 효소면역측정 방법에 관한 것으로 효소는 alkaline phosphatase(ALP와 horseradish peroxidase, HRP)로 면역조직화학, 면역블로트 및 효소면역흡착검사 등에 이용되는 물질이고, 항체는 면역글로불린과 같은 용어로 성숙한 B-세포에서 분비되는 면역 반응성 단백질이다. 이와 같이 기능이 서로 다른 물질을 상호결합시키는데 있어서, 기존에 사용된 방법은 glutaraldehyde를 직접주입에 의한 효소를 활성화하여 항체와 결합하여 항원의 분석에 사용되었지만, glutaraldehyde는 반응성이 높아 다중결합 또는 항체의 생명부위라 할 수 있는 hypervariable region에 결합하여 항체의 특이성을 저해하는 단점이 있다^{6,7)}. 따라서 본 연구는 이러한 단점을 극복하고 새로운 효소-항체결합방법을 개발하고자 CMS를 이용한 glutaraldehyde를 점진적으로 투석하여 효소의 활성을 유도하여 항체와 결합하여 항원을 인식하는 민감도를 최대한으로 높이는 방법을 고안하고 확립하였다.

Glutaraldehyde는 자체의 amino group를 통하여 기능적으로 다른 물질을 연결해주는 교차연결물질인 것으로 알려졌다⁶⁾. 그러나 이 방법은 효소에 직접 glutaraldehyde를 소량씩 주입하는 방법으로 고 농도의 glutaraldehyde가 효소에 직접 접촉하게 되면 순간적으로 효소와 효소의 이중결합 또는 다중결합이 형성되기 때문에 효소의 효율적 항체 결합을 유도하는데 문제점이 발생되고⁷⁾, 효소와 반응을 하지 않은 잔여 glutaraldehyde는 항체에 노출될 때 항체의 생명부위라 할 수 있는 항원결정부위를 손상시켜 항원특이결합에 큰 지장을 초래한다^{4,7)}. 따라서 지금까지 개발된 이러한 직접주입 글루타르알데하이드 방법에서 나타난 결과는 효소와 항체의 낮은 역할을 필연적으로 초래하는 단점이 있다. 본 연구에서도 이와 같이 glutaraldehyde를 직접투입하여 항체와 결합하여 항원을 ELISA와 면역블로트방법으로 조사한 결과 1:3,000이하로 나타났다. 따라서 보다 효과적인 결합방법을 개발하지 않고는 고가의 항체와 효소를 이용한 생물관련 분자의 정밀 검색에 이용하기에 부적당한 방법일 뿐만 아니라 경

제적 손실도 크게 따르게 된다. 그 예로, 단일클론 항체의 경우 500 µg에 300,000만원 이상이고, ALP의 경우 10 mg에 1,000,000 원이 초과하는 매우 고가의 생물물질이어서 효소와 항체의 결합체가 1:3,000이하이면 경제적 손실을 초래하게 된다. 이러한 이유로 보다 성공적인 효소와 항체결합방법의 제공이 요망되었다.

따라서 본 연구는 이러한 glutaraldehyde의 직접 주입방법을 개선하기 위해서 셀룰로오스막을 투과시키는 점진적 투석방법을 연구하였으며, 그 결과 효소와 효소의 결합 즉, 이중결합 또는 다중결합을 최소화하고 항체의 항원 결정부위의 손상없이 결합시켜 매우 높은 효소-항체의 역가를 얻을 수 있음을 발견하고, ELISA와 면역블로트 방법을 이용하여 그 역가를 측정하여 결과 glutaraldehyde의 농도가 0.1-0.25 %일 때 1: 10,000에서 1:50,000까지 매우 민감한 반응을 얻었다(Table 2와 3).

Table 4. Effects of 4CN-DAB mixed chromogen on the sensitivity of HRP-substrate reaction by immunoblot

Chromogen substrate	Concentration of mouse IgG, rabbit IgG or goat IgG (pg)				
	5,000	2,500	1,250	625	312
4CN-DAB	++++	++++	++++	++++	++++
DAB-Ni+Co	++++	++++	++++	++++	++++
DAB	++++	++++	++++	+++	++
AEC	++++	++++	++++	++++	++++
4CN	++++	++++	+++	++	±

Chromogen substrate	Concentration of mouse IgG, rabbit IgG or goat IgG (pg)				
	156	78	39	19	9.8
4CN-DAB	++++	+++	++	±	-
DAB-Ni+Co	+++	±	-	-	-
DAB	±	-	-	-	-
AEC	++	±	-	-	-
4CN	-	-	-	-	-

++++ : Very high reaction +++ : High reaction ++ : Middle reaction (cut-off value of HRP-chromogen reaction) ± : Slight reaction - : No reaction

한편 면역 반응성을 이용한 생체분자의 확인에 있어서 HRP와 항체의 결합체를 가시화하기 위해서는 효소와 그 효소에 대한 기질(substrate) 및 발색기질(chromogen-substrate)이 필요하다. 지금까지 HRP에 대한 발색기질은 DAB, 4-CN, AEC 등 여러 가지 발색기질이 이용되고 있고⁸⁻¹⁰⁾, 이들의 민감도를 높이기 위하여 금속 이온인 니켈(nickel), 코발트(cobalt), 구리 등을 첨가하여 이용하고 있다¹¹⁾. 본 연구에서는 기존의 chromogen-substrate의 발색 민감도를 높이기 위해서 4-CN과 DAB을 동시에 혼화하는 방법을 고안하여 비교·분석하였다.

그 결과 지금까지 민감도가 가장 높은 nickel과 cobalt을 함유한 DAB와 AEC의 경우 156 pg까지 측정할 수 있었던 반면, 본 연구에 의해 고안된 4CN-DAB을 동시에 동량 혼합하여 항원을 분석한 결과 39 pg까지 측정할 수 있어 기존의 방법에 비해 약 5배의 높은 민감도를 얻을 수 있었다. 따라서 시험관내 세포 또는 생체내에 존재하는 극 미량의 호르몬 및 cytokine 등과 같은 물질을 분석하는데 대단히 중요하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

그러므로 본 연구에서 발견한 방법을 적용하여 당뇨약으로 빈번히 활용되고 있는 동과를 streptozotocine으로 당뇨병을 유

발한 백서에 투여하고 생체의 인슐린량을 ELISA법으로 측정할 결과 뚜렷한 인슐린 분비 개선효과를 진단 할 수 있었다. 참고로 지금까지 인슐린을 측정할 수 있는 방법은 방사선 동위원소가 부착된 항체를 이용하는 radioimmunoassay 방법과 biotin-streptavidin결합에 의한 ELISA법이 활용되고 있다. 그러나 이들은 방사동위원소라는 위험요소가 있고, biotin과 streptavidin의 결합이라는 1단계 추가된 복잡한 방법이다. 따라서 본 연구에서 개발된 효소-항체결합 방법과 chromogen-substrate 방법을 이용한 다면 기존의 방법보다 신속하고 정확한 물질을 검색 및 진단할 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

Alakaline phosphatase (ALP) 또는 horseradish peroxidase (HRP)와 항체 결합체는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunoblot, immunohistochemistry와 같은 면역학적 분석에 흔히 이용되어 왔다. Glutaraldehyde을 한 단계로 직접 주입하여 항체와 결합하는 고전적인 방법은 homopolymer의 형성 때문에 항원을 감지하는데 낮은 민감도를 보여주는 단점이 있다. 본 연구는 이러한 단점을 극복하기 위해서 대부분의 단백질에 존재하는 ε-amino 잔기를 활성화하여 homopolymer 형성을 최소화하는 glutaraldehyde를 투석하는 방법을 고안했다. Glutaraldehyde 투석방법은 직접주입에 의한 고전 방법보다 효소와 항체의 결합 효과가 매우 뛰어나 ELISA와 immunoblot 방법으로 항원을 인지하는 민감도가 매우 높았다. Glutaraldehyde 투석 최적 농도는 0.10-0.25 %였다. 이러한 결과는 glutaraldehyde 투석을 이용한 효소-항체 결합 방법이 시험관 및 생체의 항원을 분석하는데 있어서 신속하고 정확하게 활용될 수 있음을 제공했다.

참고문헌

1. Leong, M.M., Milstein, C., Pannell, R. Luminescent detection method for immunodot, Western, and Southern blots. *J Histochem Cytochem* 34, 1645-1650, 1986.
2. Van Gijlswijk, R.P., Van Gijlswijk-Janssen, D.J., Raap. A.K., Daha, M.R., Tanke, H.J. Enzyme-labelled antibody-avidin conjugates: new flexible and sensitive immunochemical reagents. *J Immunol Methods* 189, 117-127, 1996.
3. Heyderman, E. Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods, and controls. *J Clin Pathol* 32, 971-978, 1979.
4. Harlow, D.L. *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 128-134pp., 1988.
5. Van der Loos, C.M., Das, P.K., Van den Oord, J.J., Houthoff, H.J. Multiple immunoenzyme staining techniques. Use of fluoresceinated, biotinylated and unlabelled monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 117, 45-52, 1989.
6. Avrameas S, Ternynck T. The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbents. *Immunochemistry* 6: 53-66, 1969.
7. Boersma, W.J., Deen, C., Haaijman, J.J., Radl, J., Claassen, E. Antibodies to a short synthetic peptide related to the hinge segment of human IgG3 recognizes thermally or fixative induced conformational changes in the human IgG3 molecule. *Immunology*. 1989 Nov;68(3):427-430.
8. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4354, 1979.
9. Hawkes, R., Niday, E., Gordon, J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem* 119, 142-147, 1982.
10. Towbin, H., Gordon, J. Immunoblotting and dot immunobinding—current status and outlook. *J Immunol Methods*, 72, 313-340, 1984.
11. De Blas, A.L., Cherwinski, H.M. Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. *Anal Biochem* 133, 214-219, 1983.