

## 넙치 혈청의 보존 조건이 ELISA 결과에 미치는 영향

김위식 · 장민석 · 김종오 · 김두운 · 정성주 · 김석렬\* · 박명애\* · 오명주†  
전남대학교 식품 · 수산생명의학부, \*국립수산과학원 병리연구과

### Effect of storage conditions of olive flounder *Paralichthys olivaceus* serum on enzyme-linked immunosorbent assay

Wi-Sik Kim, Min-Seok Jang, Jong-Oh Kim, Duwoon Kim, Sung-Ju Jung,  
Seok-Ryel Kim\*, Myoung-Ae Park\* and Myung-Joo Oh†

Division of Food Science and Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea  
\*Pathology division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

Antibody-detection enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to determine whether the absorbance value of ELISA is influenced by the different serum storage conditions of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Flounder antiserum to bovine serum albumin was stored at -80, -20, 4 and 20°C for 1, 30, 69 and 124 days, respectively. In addition, the flounder antisera were frozen at -80 and -20°C, respectively and then repeated 1, 5 and 10 thaw-freeze cycles. No significant difference was shown in ELISA optical density (O.D.) values of sera, which were stored at the above mentioned storage conditions during 124 days. ELISA O.D. values of unfrozen serum samples, which were previously stored at 4°C, were almost similar to those of sera undergoing 1, 5, and 10 freeze-thaw cycles after stored at -80 or -20°C. In conclusion, the ELISA O.D. values of flounder sera were not affected by various storage conditions: different temperatures (-80, -20, 4 and 20°C), durations of storage (1, 30, 69 and 124 days), and repeated thaw-freeze cycles (1, 5, and 10 times).

**Key words** : Antibody detection, Enzyme-linked immunosorbent assay, Anti-sera, Olive flounder, Storage

항체 검출 ELISA법 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)은 혈중에 존재하는 특이 항체를 검출하는 방법으로 저렴한 비용으로 다수의 샘플 처리가 가능하고 검출 감도가 높기 때문에 사람이나 가축에서는 병원체의 감염 이력의 파악 및 건강상태의 모니터링을 목적으로 널리 이용되고 있다 (Crowther, 1995; Renzullo *et al.*, 2001; De Marco *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2003). 어류에 있어서도 항체 검출 ELISA법이 30년 전부터 어류 병원체 및 다양한 항원을 대상으로 연구가 수행되어 항원에 노출된 어류에서 뚜렷

한 항체 반응이 생성된다는 사실이 증명되었다 (Corbel, 1975; Wilson and Warr, 1992; LaPatra, 1996). 최근에는 항체 검출 ELISA법이 양식 현장에 적용되어 specific pathogen-free 친어 선별 및 양식장에서의 병원체에 대한 감염이력 등을 조사하는데 유용하게 사용되고 있다 (Watanabe *et al.*, 1998; 2000; Kim, 2008).

어류에서 항체 검출 ELISA법을 적용하는데 있어, 샘플 (어류 혈청)의 보존 조건은 ELISA 결과에 영향을 미치므로 중요하게 인식되고 있다. 어류 혈청을 오랜 기간 보존한 후 항체 검출

†Corresponding Author : Myung-Joo Oh, Tel : 061-659-3173  
Fax : 061-659-3173, E-mail : ohmj@chonnam.ac.kr

ELISA를 실시하면, 보존 전의 결과와 비교해 ELISA 흡광도값이 현저히 저하되는 현상이 확인되어 왔고, 어류 혈청의 보존 온도에 따라서도 ELISA 흡광도값이 달리 나타나는 현상이 확인되어 왔다. 실제로 Nitzan *et al.* (2003)의 연구 보고에 따르면 hybrid bass (*Morone saxatilis* × *M. chrysops*) 혈청을 -73°C 및 -20°C에서 냉동 보존할 경우 또는 혈청의 보존기간이 길어질 경우 ELISA 흡광도값이 현저하게 저하되었다고 한다.

본 연구에서는 넙치, *Paralichthys olivaceus*를 대상으로 항체검출 ELISA를 적용함에 있어 혈청의 보존 조건이 ELISA 검출 결과에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 넙치 혈청을 이용해 보존 온도, 보존 기간 및 해동 횟수에 따른 ELISA 값을 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어

실험어는 전라남도 완도 소재의 양어장에서 사육중인 넙치 (전장: 30 cm, 체중: 300 g)를 분양받아 1톤 용량의 수조에 1주일간 순치시킨 후 실험에 사용하였다. 실험기간 동안 사육 수온은 20~22°C를 유지하였다.

### BSA (bovine serum albumin)에 대한 넙치의 항혈청 제작

항 BSA 넙치 혈청은 넙치에 BSA를 2 mg/200  $\mu$ l 농도로 조정하여 복강에 주사한 후 34일째 미부정맥에서 채혈하여 분리하였다. 채혈된 혈액은 상온에서 30분간 방치한 후, 6000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 0.45  $\mu$ m syringe filter로 여과하여 실험에 사용하였다. 대조구의 넙치 혈청은 넙치에 PBS 200  $\mu$ l를 복강에 주사한 후, 위와 동일한 방법으로 혈청을 분리하였다.

### 넙치혈청의 보존조건에 따른 항체가의 영향

#### (1) 보존 온도 및 기간의 영향

항 BSA 넙치 혈청 및 대조구의 넙치 혈청을 각각 1.5 ml tube에 20  $\mu$ l씩 분주하여 -80, -20, 4 및 20°C에 각 10개씩 보존한 후, 1, 30, 69 및 124일째 혈청을 취해 항체 검출 ELISA를 실시하였다.

#### (2) 해동 횟수의 영향

항 BSA 넙치 혈청 및 대조구의 넙치 혈청을 각각 1.5 ml tube에 20  $\mu$ l씩 분주하여 -80°C 및 -20°C에 각 10개씩 보존한 후, 해동 횟수를 1, 5 및 10회 반복한 후 항체 검출 ELISA를 실시하여 미동결 혈청 (4°C에 보존한 혈청)의 흡광도값 (O.D.)과 비교하였다. 해동 방법은 -80°C 및 -20°C에 1시간동안 보존된 혈청을 흐르는 물을 사용하여 5분간 반응시켜 해동하였고, 혈청의 동결과 해동은 위의 방법으로 반복되었다.

### BSA에 대한 항체 검출 ELISA

항체 검출 ELISA는 Kim *et al.* (2007)의 방법에 준해 실시하였다. ELISA plate (Nunc, Denmark)에 5  $\mu$ g/50  $\mu$ l BSA를 각 well에 분주한 후, 37°C에서 overnight하여 항원을 coating 하였다. 0.05% Tween-20이 포함된 PBS (T-PBS)로 3번 세척하였고 5% skim milk를 380  $\mu$ l씩 넣어 20°C에서 1시간 동안 배양하였다. 1차 항체로서는 5% skim milk로 희석된 항 BSA 넙치 혈청 및 대조구의 넙치 혈청 (80~10,240배 희석된 혈청)을 각각 2개의 well에 50  $\mu$ l씩 분주하였고, 2차 항체로서는 5% skim milk로 10배 희석된 항 넙치 immunoglobulin M (IgM) monoclonal antibody를 50  $\mu$ l씩 분주하였으며, 3차 항체로서는 5% skim milk로 1000배 희석된 peroxidase conjugated 항 마우스 IgG 돼지 혈청 (DakoCytomation, Denmark)을 50  $\mu$ l씩 분주하였다. 각각의 항체 반응은 20°C에서 1시간 동안 반응하였다. T-PBS로 5번 수세하였고 ELISA 발색액 (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM citric acid, 1 mg/1 ml o-phenylenediamine, 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)을 각 well에

50  $\mu$ l씩 분주한 후 20°C에서 15분 동안 발색하였다. 각 well에 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 50  $\mu$ l씩 넣은 후 ELISA plate reader (Spectra max 340, USA)로 492 nm에서 O.D.값을 측정하였다.

## 결 과

### 혈청의 보존 온도 및 기간에 따른 항체가의 영향

항 BSA 넙치 혈청의 보존 온도 및 기간에 따른 항체가의 영향을 검토한 결과, 보존 온도 및 기간에 따른 O.D.값의 뚜렷한 차이는 확인되지 않았다 (Fig. 1). 모든 시료에서 80배로 희석된 혈청의 O.D.값은 3.71~3.78 범위였으며, 희석 배율이 높아짐에 따라 O.D.값은 동일한 패턴으로 감소되었고 10,240배의 희석배율에서는 0.17~0.27의 O.D.값이 관찰되었다. 대조구의 넙치 혈

청에서는 O.D.값이 관찰되지 않았다.

### 혈청의 해동횟수에 따른 항체가의 영향

항 BSA 넙치 혈청의 해동횟수에 따른 항체가의 영향을 검토하기위해 -80°C 및 -20°C에 보존된 혈청을 1, 5 및 10회 반복 해동시킨 후 BSA에 대한 항체 검출 ELISA를 실시해 미동결 혈청 (4°C에 보존한 혈청)의 O.D.값과 비교하였다 (Fig. 2). 해동횟수를 1, 5 및 10회 반복한 혈청 및 미동결 혈청의 O.D.값 (80배 희석)은 3.73~3.79 범위였으며, 희석 배율이 높아짐에 따라 O.D.값은 동일한 패턴으로 감소되었고, 10,240배의 희석배율에서는 0.18~0.23의 O.D.값이 관찰되어 해동횟수에 따른 O.D.값의 뚜렷한 차이는 확인되지 않았다. 대조구의 넙치 혈청에서는 O.D.값이 관찰되지 않았다.

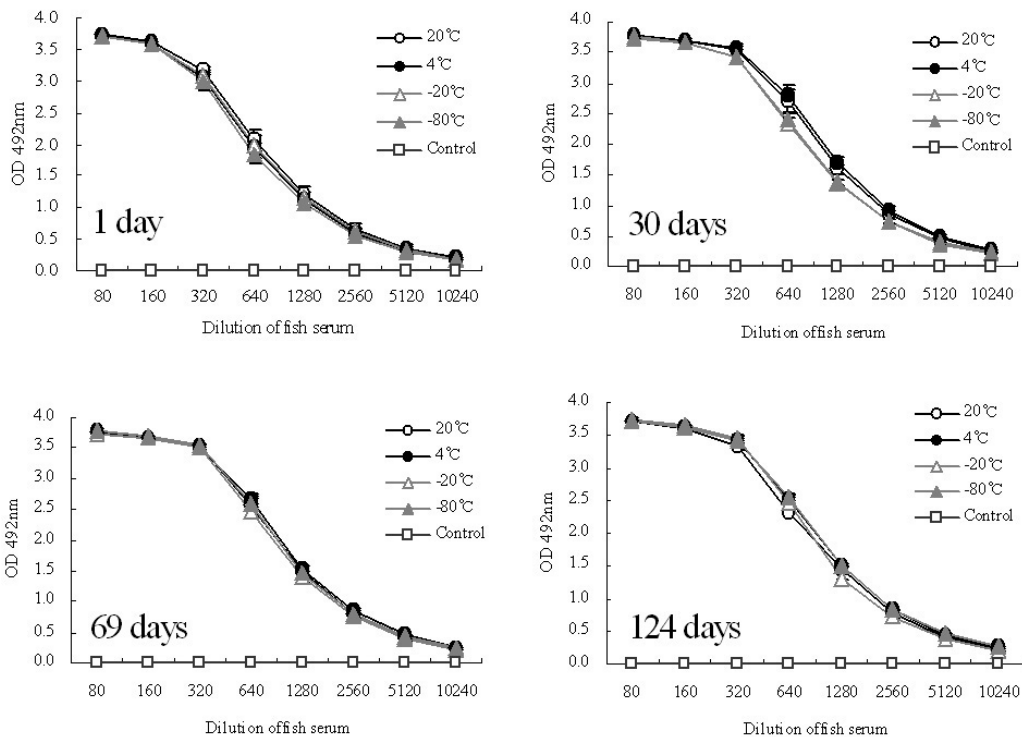


Fig. 1. Comparison of ELISA absorbance values (OD<sub>492</sub>) for anti-BSA flounder serum, which was stored at -80, -20, 4 and 20°C for 1, 30, 69 and 124 days.

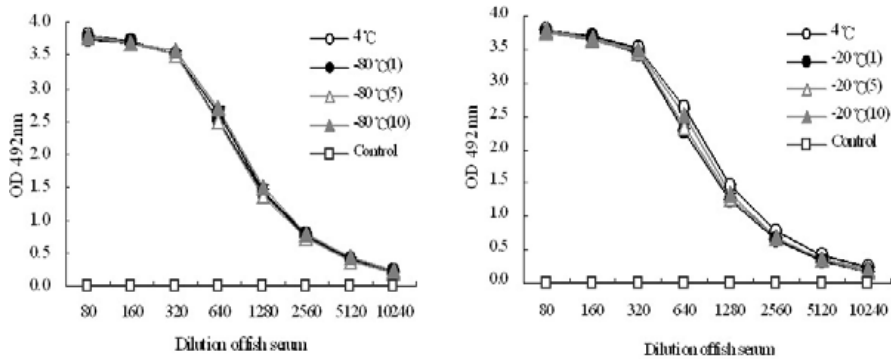


Fig. 2. Comparison of ELISA absorbance values ( $OD_{492}$ ) for anti-BSA flounder serum, which was repeated 1, 5 and 10 thaw-freeze cycles after storage at  $-80$  and  $-20^{\circ}\text{C}$ , respectively.

## 고찰

어류 혈청의 보존 기간 및 온도는 항체 검출 ELISA 결과에 영향을 끼친다고 보고되어 있다 (Nitzan *et al.*, 2003). 본 연구에서는 국내 주요 양식 어종인 넙치를 대상으로 항체검출 ELISA를 적용함에 있어 혈청의 보존 조건이 검출 결과에 영향을 주는지를 확인하기 위하여, 넙치 혈청의 보존 온도, 보존 기간 및 해동횟수에 따른 항체가의 영향을 검토하였다.

항 BSA 넙치 혈청을 사용하여 보존 온도 및 기간에 따른 ELISA O.D.값을 비교한 결과,  $-80$ ,  $-20$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  및  $20^{\circ}\text{C}$ 에서 124일간 보존하여도 보존 1일째의 혈청과 뚜렷한 차이를 보이지않아 넙치 IgM의 안정성은 확인되었다. 유사한 결과로서 粉川 (2006)는 잉어, *Cyprinus carpio*의 혈청을  $-80$ ,  $-20$  및  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 30일간 보존하여도 ELISA 결과에 영향을 미치지 않는다고 보고하였고, 奥田 (2007)의 연구에서도 연어, *Oncorhynchus keta*의 혈청을  $-20^{\circ}\text{C}$ 와  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 30일간 보존하여도 ELISA 결과에 차이는 확인되지 않았다고 보고하였다. 이에 반해 Nitzan *et al.* (2003)의 연구에서는 hybrid bass의 혈청을  $-73^{\circ}\text{C}$ 와  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 30일 및 60일간 보존한 후 ELISA를 실시한 결과, 보존 온도가 낮아지거나 보존 기간이 길어짐에 따라 ELISA O.D.값이 현저하게 저하된다고 보고하였고, 그 원인은 동결 기간 중에 fibrinogen

과 IgM이 복합체를 형성하여 침전됨으로써 O.D.값을 감소시키는 것으로 추정 되었다. 본 연구에서는 넙치 혈청이 hybrid bass의 혈청과는 달리 동결 보존에 영향을 미치지 않는 원인에 대해서는 밝히지 못했으나, 혈청의 보존 조건에 따른 어류 IgM의 안정성은 어종에 따라 다르다는 것으로 사료된다.

혈청의 해동횟수에 따른 항체가의 영향을 조사한 결과,  $-80^{\circ}\text{C}$  및  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보존된 항 BSA 넙치 혈청을 1, 5 및 10회 반복 해동시켜도 미동결 혈청의 O.D.값과 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 잉어 및 연어 혈청을 사용한 粉川 (2006)와 奥田 (2007)의 연구 결과와 일치하여, 넙치, 잉어 및 연어의 혈청은 10회 이내로 반복 해동시켜도 항체검출 ELISA에 유용하게 사용될 수 있음이 시사되었다.

본 연구에서 넙치 혈청은 미생물 오염에 의한 항체가의 영향을 배제하기 위해 필터하여 실험에 사용하였다. 그러나 어류 혈청을 사용하여 항체 검출 ELISA를 실시할 경우, 시료를 필터하여 사용하는 것은 현실적으로 어려우므로, 본 연구에서 제시되지 않았으나 필터되지 않은 혈청을 사용하여 보존 기간 및 해동횟수에 따른 항체가의 영향을 검토하였다. 넙치 및 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss* 혈청을  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 60일간 보관한 후 20일 간격으로 보존된 혈청의 일부를 취해 ELISA를 실시한 결과, 보존 20일 (해동횟

수 1회), 40일 (해동횟수 2회) 및 60일 (해동횟수 3회)의 혈청에 대한 O.D.값은 보존 1일째의 혈청과 뚜렷한 차이를 보이지 않아 필터되지 않은 넙치 혈청은 -20°C에서 보존하여 실험에 사용하면 적어도 60일간은 ELISA 결과에 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다.

### 요 약

본 연구에서는 넙치 혈청의 보존 조건이 ELISA 결과에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 항 BSA 넙치 혈청을 이용해 보존 온도, 보존 기간 및 해동 횟수에 따른 ELISA값을 비교하였다. 넙치 혈청을 보존 온도 (-80, -20, 4 및 20°C) 및 기간 (1, 30, 69 및 124일)에 따른 ELISA OD값을 비교한 결과, 모든 시료에서 뚜렷한 OD값의 차이는 확인되지 않았다. -80°C 및 -20°C에 보존된 혈청을 사용하여 해동횟수 (1, 5, 10회)에 따른 ELISA OD값을 비교한 결과, 해동을 반복한 혈청 및 미동결 혈청의 OD값은 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 이상의 결과로 넙치 혈청은 -80, -20, 4 및 20°C에서 124일간 보존하거나 혈청을 10회 반복 해동하여도 ELISA 결과에 영향을 끼치지 않는 것이 확인되었다.

### 감사의 글

본 연구는 지식경제부 및 정보통신연구진흥원의 대학 IT연구센터 지원사의 연구결과로 수행되었습니다 (IITA-2009-C1090-0902-0001).

### 참 고 문 헌

Corbel, M.J.: The immune response in fish: a review. *J. Fish Biol.*, 7: 539-563, 1975.  
 Crowther, J.R.: ELISA: Theory and practice, Humana Press, New Jersey, pp. 1-223, 1995.  
 De Marco, M.A., Foni, E., Campitelli, L., Raffini, E., Delogu, M. and Donatelli, I.: Long-term

monitoring for avian influenza viruses in wild bird species in Italy. *Vet. Res. Commun.*, 27: 107-114, 2003.  
 Kim, W.S.: Establishment of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system to detect specific antibodies against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). Ph. D Thesis, Hokkaido University, Japan, 2008.  
 LaPatra, S.E.: The use of serological techniques for virus surveillance and certification of finfish. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 6: 15-28, 1996.  
 Nitzan, S., Shwartsburd, B. and Hellerb, E.D.: The effect of storing hybrid bass (*Morone saxatilis* × *M. chrysops*) sera at freezing temperatures on antibody titers. *Fish Shellfish Immunol.*, 15: 341-347, 2003.  
 Renzullo, P.O., Sateren, W.B., Garner, R.P., Milazzo, M.J., Bix, D.L. and McNeil, J.G. : HIV-1 seroconversion in united states army active duty personnel, 1985-1999. *AIDS*, 15: 1569-1574, 2001.  
 Shi, Y., Yi, Y., Li, P., Kuang, T., Li, L., Dong, M., Ma, Q. and Cao, C.: Diagnosis of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid antibodies in an antigen-capturing enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 5781-5782, 2003.  
 Watanabe, K., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M.: Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, 41: 219-223, 2000.  
 Watanabe, K., Suzuki, S., Nishizawa, T., Suzuki, K., Yoshimizu, M. and Ezura, Y.: Control strategy for viral nervous necrosis of barfin flounder. *Fish Pathol.*, 33: 445-446, 1998.  
 Wilson, M.R. and Warr, G.W.: Fish immunoglobu-

lins and the genes that encode them. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 201-221, 1992.

粉川愉記: 코이ヘルペスウイルス (KHV) に対する抗體を検出するためのELISA法に関する研究. 修士學位論文, 北海道大學, 日本, 2006.

奥田律子: サクラマスノスモルト生産における細

菌性腎臟病原菌の感染環の形成とその防除對策に関する研究. 博士學位論文, 北海道大學, 日本, 2007.

---

Manuscript Received : February 23, 2009

Revised : July 10, 2009

Accepted : July 30, 2009