

돼지 임신 진단을 위한 Heterologous ELISA 법 개발

박성민¹ · 이안나¹ · 윤택준² · 박용수³ · 송태준¹ · 김영훈¹ · 안효선¹ · 박원철⁴ · 김종배^{1,†}

¹한동대학교 생명과학부, ²유한대학 식품영양과, ³경북축산기술연구소, ⁴건국대학교 생명공학과

Development of Heterologous ELISA System for Diagnosis of Pregnancy in Swine

Sung Min Park¹, An Na Lee¹, Taek Joon Yoon², Yong Su Park³, Tae Jun Song¹,
Young Hoon Kim¹, Hyosun An¹, Won Choul Park⁴ and Jong Bae Kim^{1,†}

¹School of Life Science, Han-Dong University, Pohang 795-940, Korea

²Department of Food and Nutrition, Yuhan University, Bucheon 422-749, Korea

³Gyeongsangbuk-do Livestock Research Institute, Yeongju 750-871, Korea

⁴Department of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

ABSTRACT

Early diagnoses of pregnancy for animal such as swine and bovine is extremely important to increase income of a farmhouse and for the management of farm. For the development of immunoassay system of pregnancy in swine, we report a competitive heterologous enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the direct measurement of oestrone sulfate (E1S) in diluted urine using anti-E1G (glucuronide) monoclonal antibody which cross react with E1S. The principle of assay was based on the typical solid-phase competitive ELISA methods using E1G-HRP (horseradish peroxidase) as a tracer and E1S for standard. The method had a reasonable sensitivity for the detection of E1S with 0.15 ng/ml as a detection limit. The intra-assay and inter-assay precisions were ranging coefficient of from 8.50~9.67% and 8.50~9.87%, respectively, which were quite acceptable. In a field trial with a group 37 sows (18 non-pregnancy and 19 pregnancy sows) after day 29~30 post service, the concentration of E1S were determined to be below 30 ng/ml in all non-pregnancy group and over 48 ng/ml in pregnancy group except one sample. The method described here, heterologous ELISA for the measurement of E1S in urine is good enough for monitoring the early pregnancy test of swine.

(Key words : Oestrone sulfate, Oestrone-3-glucuronide, Pregnancy, Antigen, Heterologous, Competitive ELISA)

서 론

축산 동물의 임신과 분만은 바로 생산을 의미하는 것으로 동물의 임신 또는 비임신을 조기에 진단하는 것은 가축의 생산성 증진에 중요한 요인으로 인정되어왔다. 이는 농가에서 인공수정 후 직접 임신 진단을 빨리 진단하면 할수록 임신과 다음 임신까지의 기간, 즉 공태기를 단축시킬 수가 있어 생산성을 증대시킬 수가 있다(Stefanakis 등, 2000). 따라서 조기 임신 진단을 위한 여러 가지 방법들이 고안되고 개발되었다. 소의 경우, 주로 우유 또는 혈액 내 황체 호르몬인 프로제스테론(progesterone)을 ELISA법으로 측정함으로써 임신 조기 진단을 하고 있으나(Garmo 등, 2008), 돼지의 경우 젖소와는 달리 혈액 채취

외에 다른 방법이 없고 또한 프로제스테론 분석만으로는 임신 진단 분석에 어려움이 있다(Isobe 등, 2004). 따라서 돼지에 있어서 임신 진단을 위한 가장 보편적이고 일반적인 방법은 교배 또는 수정 후 18~24일째 발정의 징후가 없는 경우를 바탕으로 하고 있으나, 검사자의 주관적 판단과 경험에 의존할 수밖에 없어 개별차가 많은 단점이 있다(Almond와 Dial, 1986). 다른 방법으로는 임신된 일 경우 97%까지 비임신일 경우 80~85%까지 정확도를 보이고 있는 Doppler 방법 또는 A-mode의 초음파를 사용한 방법이 개발되었지만, 교배 후 최소한 35일 후가 되어야 한다는 단점이 있어 사용의 제한이 있다(Almond와 Dial, 1986). 그 외에 Real-time B-mode 초음파 방법은 정확도도 더 높고 교배 후 16~20일경에 진단을 할 수 있어 모든 단점을 극복할 수 있지만 고가의 장비를 사용해야

* 본 연구는 농림기술연구과제(106114-03-3-CG000) 지원에 의한 연구이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

† Corresponding author : Phone: +82-54-260-1350, E-mail: jbkim@handong.edu

한다는 문제점이 있어 보편적으로 널리 사용하기에는 문제점이 많다(Rovert 등, 1999). 이런 문제점들을 극복하기 위하여 많은 연구자들은 임신과 관련하여 생산되는 혈중 호르몬인 프로제스테론이나 oestrone sulphate(E1S)를 측정하는 방법을 시도하였다(Kohen 등, 1981; Honjo 등, 1986). 대표적 임신 호르몬으로 알려진 프로제스테론의 혈중 혹은 우유 분석법은 비임신일 경우 95~100%의 높은 정확성을 인정받았으나, 임신 초기 진단을 위하여 수태 후 23일 경에 진단할 경우 75~85%의 정확성을 보였으며, 임신 50일 이후에 안정된 결과를 얻어 조기 임신 진단법으로는 다소 부적절한 방법으로 평가되었다(Gowan 등, 1982). 이에 반하여 교배 후 23일과 30일 경에 혈액 내 E1S 측정하는 방법은 임신 진단에 있어서 더 좋은 정확도를 나타내었기에 혈액 내 E1S 측정은 돼지의 조기 임신 진단이나 수태 조절을 위한 한 방법의 하나로 제시되었다(Hatzidakis 등, 1993; Stefanakis 등, 2000). E1S는 임신한 암퇘지의 배아 단위(embryonic units)가 생산한 oestrone을 자궁내막(endometrium)에서 sulphate와 결합된 형태의 호르몬으로 임신 17일째부터 증가하여 28~30일에 최고 농도로 되며, 그 이후 감소하는 호르몬으로 알려져 있다(Gaustad-Aas 등, 2002). 그러나 혈중 E1S의 측정 방법은 농가에서 상용적인 방법으로 사용하기에는 혈액 채취가 용이하지 않다는 단점이 있었다(Stefanakis 등, 2000). 그 후 혈장의 E1S 농도보다 오줌의 농도가 20~100배 많은 것이 알려짐으로써 임신 암퇘지의 조기 임신 진단에 유용하게 사용될 수 있는 지표 물질로 인정되어 E1S 분석법에 대한 연구가 많이 진행되었다(Atkinson와 Williamson, 1987). 지금까지 보고된 방법들 중에서 가장 많이 개발된 것은 돼지의 오줌 속에 존재하는 E1S를 ELISA 법으로 측정함으로써 임신을 조기에 진단하고자 하는 것이었다(Choi 등, 1987; Stefanakis 등, 2000). 그러나 E1S 측정을 위한 면역분석법 개발에 있어서 가장 어려운 문제점의 하나는 E1S의 안정성(stability)이 매우 낮아서 실질적으로 E1S에 대한 항체 생산이 매우 어려운 문제가 있었다(Seren 등, 1983). 이러한 난제를 극복하기 위하여 항체가 여러 관련 물질들과 교차 반응을 하는 원리를 이용하는 소위 'heterologous immunoassay system'이 고안되었다(Tagawa 등, 2000). 그러나 국내에서는 hormone 분석을 통한 가축의 임신 진단에 대한 보고가 외국에 비해 상대적으로 적고, 젖소의 경우, 혈중 또는 우유 내 progesterone을 ELISA 법으로 측정할 보고는 되어 있으나(Kim 등, 2008), 돼지의 조기 임신 진단에 대한 뇨중 호르몬 대사산물에 대한 연구는 국내에서는 전무한 실정이었다. 따라서 본 연구에서는 돼지의 조기 임신 진단법을 개발하기 위한 방법으로 E1S와 교차 반응을 나타내는 E1G(glucuronide)에 대한 항체를 이용한 'heterologous ELISA'법을 개발하여 임신 및 비임신 돼지로부터 채취한 오줌 시료 내 E1S 농도를 측정, 분석함으로써 돼지의 임신 진단을 위한 기준을 설정하고 이후 돼지 임신 진단에 적용할 수 있는 kit 개발이나 새로운 분석 방법 개발을 위한 기초 자료로 활용하고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

재료

E1S, E1G, bovine serum albumin(BSA), horseradish-peroxidase(HRP), dimethyl sulfoxide(DMSO 78.13 MW)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, USA)에서 구입하였고, 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride(ECD), N-hydroxy-sulfosuccinimide(NHS), 2-mercaptoethanol 및 단백질 정량을 위한 BCA kit는 Thermo Scientific(Fair Lawn, NJ, USA)에서 구입하였다. Sephacryl S-400 High Resolution의 gel-filtration column은 GE Healthcare(Piscataway, NJ, USA)에서 구입하였다.

돼지노 시료 확보

경북축산연구소 내의 비임신 돼지 혹은 수태지 및 인공 수정 후 23~29일된 임신 돼지의 오줌을 수집하여 분석시까지 -20°C 에서 보관하였다.

E1G에 대한 항체

E1G에 대한 항체는 이스라엘 와이즈만 연구소의 Dr. Kohen으로부터 기증 받은 단일 클론 항체를 사용하였다. 기증 받은 항체의 종류는 clone 8A3(rat IgG2), clone 3-F11(rat IgG1) 및 clone 155(mouse IgG2b)였다(Barnard 등, 1989).

E1G-HRP Conjugate 합성

E1S와 경쟁적 반응을 하는 tracer는 E1G에 효소 HRP를 붙인 E1G-HRP conjugate를 Stefanakis 등(2000)의 방법을 일부 수정하여 실시하였다. 약술하면, 5 mg의 E1G, 4 mg의 ECD 및 5 mg의 NHS를 300 μl 의 DMSO에 첨가하고 상온에서 2시간 동안 교반시킴으로 semi-stable amine-reactive NHS ester를 제조하였다. 그 후, pH 8.6의 carbonate-bicarbonate buffer(300 μl)에 1 mg의 HRP를 용해시킨 후, 앞서 제조된 semi-stable amine-reactive NHS ester를 첨가하고 4°C 에서 16시간 교반시켰다. 반응 완료 즉시, quenching buffer(Thermo Scientific)로 모든 반응을 정지시킨 후, Sephacryl S-400 High Resolution의 gel-filtration 컬럼을 이용하여 합성된 E1G-HRP와 반응하지 않은 E1G를 분리하였다. 용출 buffer로는 PBS를 이용하였으며 용출된 각 분획은 단백질정량(BCA assay)을 통하여 정량하였다.

E1G-HRP 및 항체의 적정 농도 결정

민감도가 좋은 ELISA 법을 개발하기 위한 E1G-HRP conjugate의 적정 첨가 농도를 결정하기 위하여 clone 155 항체를 coating buffer(0.1 M sodium carbonate buffer, pH 9.5)를 이용하여 96 micro well plate에 5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 씩 분주 후 4°C 에서 overnight하여 coating을 시켰다. 각 well은 washing buffer (PBS-0.05% Tween 20; PBS-T)로 3회 세척 후 3% bovine serum albumin (BSA)으로 blocking 시켰다. 그 후, 여러 농도의 E1G-HRP를 첨가하고 상온에서 2시간 반응시킨 후 세척하고 기질 용액(TMB; Sigma-Aldrich)을 넣고 30분 반응시킨 후 2 M H_2SO_4 로 반응을 정지시킨 후, ELISA reader(ELX800; Bio-tek instrument)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 합성한 E1G-HRP의 농도는 anti-E1G와 최대 반응성을 나타내면서 적정한 O.D.를 보여주는 최대 희석비로 결정하였다. 경쟁적 ELISA를 위한 항체가의 측정은 여러 농도

로 조정된 anti-E1G 항체를 coating 후에 E1G-HRP($\times 200$) conjugate 단독 혹은 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 E1S를 첨가한 후 그 반응성과 경쟁성을 함께 고려하여 결정하였다.

항체의 선정

Heterologous ELISA법 개발에 있어서 가장 중요한 것은 사용하는 항체가 측정하고자 하는 E1S와 교차 반응을 하는 것이다. 따라서 E1S와 교차 반응성이 있는 항체의 선정을 위하여 clone 8A3, clone 3F11 및 clone 155를 각각 5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l/well}$ 로 coating 후, E1G-HRP와 여러 농도의 E1S 및 E1G를 각각 첨가하여 경쟁 반응 정도로써 교차 반응 정도를 결정하였다(Barnard 등, 1989).

E1S에 대한 표준곡선의 작성

결정된 적정한 양의 항체(anti-E1G인 clone 155 항체)를 ELISA plate에 coating 시키고 난 후, 3% BSA로 blocking하고 결정된 적정량의 E1G-HRP와 표준물질(625 pg~10 ng/ml 농도로 조정된 E1S)을 각 0.1 ml를 동시에 첨가하고, 상온에서 2시간 경쟁 반응시켰다. 반응 완료 후 각 well을 PBS-T로 3회 세척하고 TMB 기질을 첨가한 후 ELISA reader로 450 nm에서 O.D.를 측정하였다.

반복성 및 회수를 조사

본 분석방법의 정확성을 평가하기 위하여 E1S 표준곡선을 기초로 정량 범위인 0.15~20 ng/ μl 에서 4개의 서로 다른 농도의 표준물질을 동일한 시간에 10회씩 반복 측정하는 intra-assay와 다른 시간에 동일한 실험을 행한 inter-assay를 실시하였다. 실험에 적용한 E1S의 농도는 표준곡선의 정량을 위한 범위에서 임의적으로 비교적 높은 농도인 20 ng/ml, 중간농도인 10 ng/ μl 및 5 ng/ μl , 그리고 비교적 낮은 농도인 1 ng/ μl 의 4가지 농도를 정하여 실시하였다. 반복 실험 후 본 assay system의 재현성은 각 농도에 대한 실험 결과를 토대로 coefficient variation(C.V.) 값은 표준편차를 평균치로 나눈 백분율(%)로 결정하였고, 회수율은 이미 지정되어 알고 있는 표준물질(기대치)에 대한 실제 측정치를 백분율로 그 차이(bias %)로 표시하였다(Kim 등, 1982).

돼지 뇨 중의 E1S의 함량 측정

돼지 뇨 중의 E1S의 함량 분석을 위한 표준물질의 제조는 PBS 완충 용액으로 50배 희석된 수태지 오줌을 이용하는 internal standard를 사용하였다. 임신 돼지 및 비임신 돼지의 오줌은 각각 PBS로 50배 희석하여 분석하였다.

결 과

E1G-HRP Conjugate의 분리 및 농도 결정

경쟁적 반응 원리에 의한 ELISA법 개발에 있어서 표준곡선 작성을 위한 E1G-HRP conjugate의 농도는 매우 중요하다. 따라서 합성한 E1G-HRP의 적정 농도를 결정하기 위하여 항체가 coating(5 $\mu\text{g/well}$)된 ELISA plate에 여러 농도의 E1G-HRP conjugate를 첨가하여 반응시켰다. 그

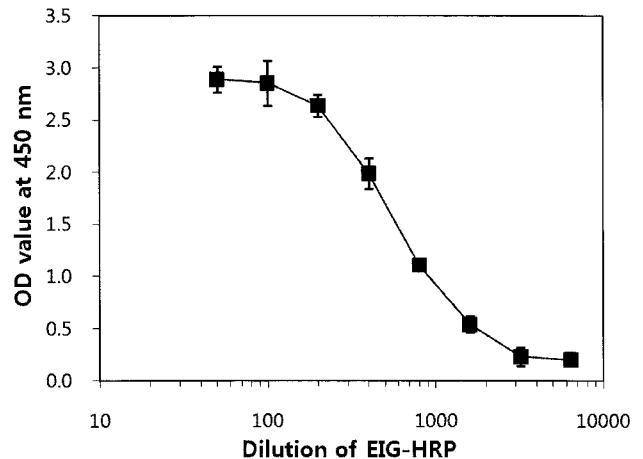


Fig. 1. Determination of the concentration of E1G-HRP conjugate. Anti-E1S antibody (5 $\mu\text{g/well}$) were coated in ELISA plate by overnight incubation at 4°C. After blocking with 3% BSA solution, the wells were washed and added serial diluted E1G-HRP conjugate from 50~6400-fold in assay buffer. The other procedures were followed as described in material and methods.

결과, 약 200배까지의 E1S-HRP의 첨가는 최고의 흡광도를 유지하였고, 400배 이하의 희석 비율부터 흡광도가 감소하는 농도 의존적인 경향을 보였다. 따라서 E1S에 대한 경쟁적 ELISA를 위한 E1S-HRP conjugate의 희석농도는 표준 곡선의 감도 및 비 특이성 반응(non-specific binding; NSB) 등을 고려하여 200배로 결정하였다(Fig. 1).

ELISA 표준곡선 작성을 위한 항체의 적정 농도 결정

E1S에 대한 표준곡선을 얻기 위한 항체 역가를 결정하기 위하여 E1G에 대한 각 단일 클론 항체를 여러 농도(50 μg ~190 ng/ml)로 조정하여 ELISA plate의 각 well에 100 $\mu\text{g/well}$ 로 coating하고, 200배로 희석된 E1S-HRP conjugate 단독 혹은 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 E1S를 첨가하여 경쟁 정도도 함께 조사하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 항체의

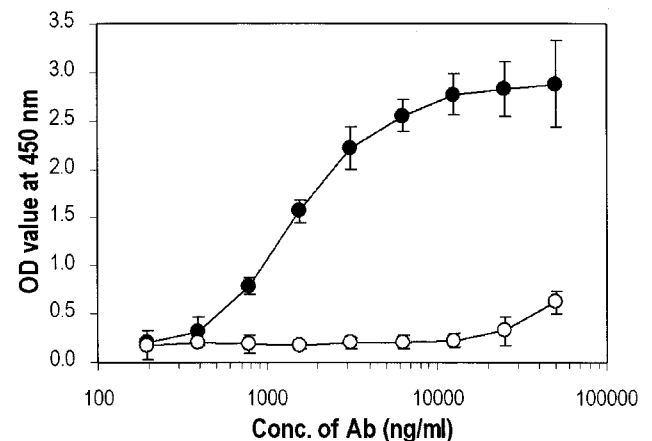


Fig. 2. Titration curve of anti-E1G monoclonal antibody(clone-155). Serial diluted anti-E1G antibody coated plate was added to E1S-HRP conjugate with(○) or without(●) 1 $\mu\text{g/ml}$ of E1S. After washing the plate with PBS-Tween20, TMB substrate solution was added and measured the O.D. values at 450 nm.

농도가 증가함에 따라 E1S가 없을 시는 반응 정도도 비례하여 증가하였으나, E1S 존재 하에서는 거의 반응을 나타내지 않아 좋은 경쟁성 반응을 나타내었다. 그러나 항체와의 반응 정도와 경쟁성 반응 정도를 모두 고려할 때 1.25 µg/ml부터 625 ng/ml의 항체농도 조건이 가장 적절한 것으로 판단되었으나, 향후 본 실험에서는 coating하는 항체의 적정 농도는 1.25 µg/ml로 결정하였다(Park 등, 1996).

E1S 측정을 위한 표준곡선 작성

돼지의 경우, 뇨의 estrone 계열의 호르몬 대사 산물은 E1G와 E1S가 있으나, 임신이 되었을 경우 뇨를 통해 가장 많이 배출되는 대사 산물은 E1S인 것으로 보고되고 있다(Atkinson와 Williamson, 1987). 본 연구에서 개발하는 경쟁적 heterologous ELISA 분석법은 항체의 교차 반응을 이용한 방법이기 때문에 분석법에 사용하는 E1G에 대한 항체(clone 8A3, 3F11, 155)가 E1S와 높은 교차 반응을 보여야 한다. 따라서 각 항체별로 E1G와 E1S에 대한 경쟁 반응을 보기 위하여, anti-E1G 항체가 coating된 plate의 각 well에 E1S-HRP 및 625 pg~10 ng/ml 농도로 조정된 E1S 및 E1G를 첨가하여 경쟁반응을 시켜 보았다. 그 결과, clone 3F11과 clone 8A3의 경우는 E1S와의 교차 반응도가 각각 1.8% 및 18.6%인 결과를 보였으며, clone 155의 경우는 E1S와의 교차 반응이 약 91.3%인 결과를 보였다(Fig. 3). 이 결과는 clone 155 항체가 E1S의 정량을 위한 heterologous ELISA 분석법에 이용할 수 있는 가장 적절한 항체임을 보여 주었고(Tagawa 등, 2000) 이 항체를 이용하여 E1S 측정을 위한 ELISA 표준 적정 곡선을 작성하였다. Fig. 4의 결과에 나타난 바와 같이, 본 표준곡선에서 E1S의 측정 범위는 312 pg/ml~20 ng/ml로써 측정 감도는 312 pg/ml를 나타냈다.

반복성 및 회수율(Recovery) 조사

본 분석법의 정확성(accuracy)을 평가하기 위하여 시료 중 E1S의 농도가 높은 것, 중간 그리고 낮은 것의 3개로 구분하여 한 시료 당 10회씩 반복 측정하는 'intra-assay'와 표준곡선을 달리하여 농도가 다른 3가지의 시료를 6

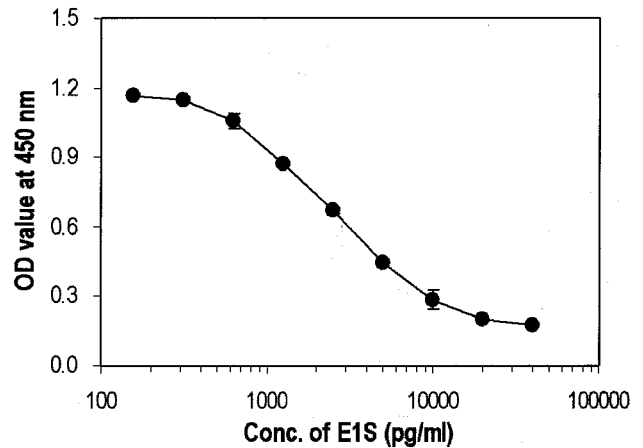


Fig. 4. Typical standard curve of E1S in heterologous competitive ELISA. Anti-E1G Ab(clone155) coated ELISA plate was added E1S-HRP conjugate as a tracer with serial diluted E1S as a standard. After incubation, the plate was washed with PBS-Tween 20 and added TMB substrate solution. The O.D. value of each well was measured at 450 nm.

회 반복 측정하는 소위 'inter-assay'를 실시하여 반복성을 조사하였다(Kim 등, 1982). 반복 실험 후 본 assay system의 재현성은 각 농도에 대한 실험 결과를 토대로 변이계수(coefficient variation: C.V)를 산출함으로 결정하였다. 회수율 조사는 PBS에 각각 200, 800 pg 및 3000 ng/well로 E1S를 첨가 후 assay 결과 얻은 E1S의 함량을 측정하여 기대치와 측정치에 대한 bias(%)으로 표시하였다(Table 2). Intra-assay에 대한 실험 결과 E1S 정량을 위한 범위인 156.3 pg~20 ng/ml에서 임의적으로 비교적 높은 함량의 3 ng, 중간인 800 pg, 그리고 비교적 낮은 함량인 200 pg/ml의 3가지로 함량을 정하였다. 분석을 위한 각 함량별 시료는 각각 10개씩 측정하였고, E1-3 정량을 위한 표준곡선에 적용하여 나온 결과를 Table 2에 제시하였다. 세 가지 농도의 E1S에 대한 intra-assay의 결과에서 CV 값은 8.50~9.67%로 모두 10% 이내에 들었고, bias도 -4.5 %, +5.6% 그리고 +7.2%를 보임으로써 비교

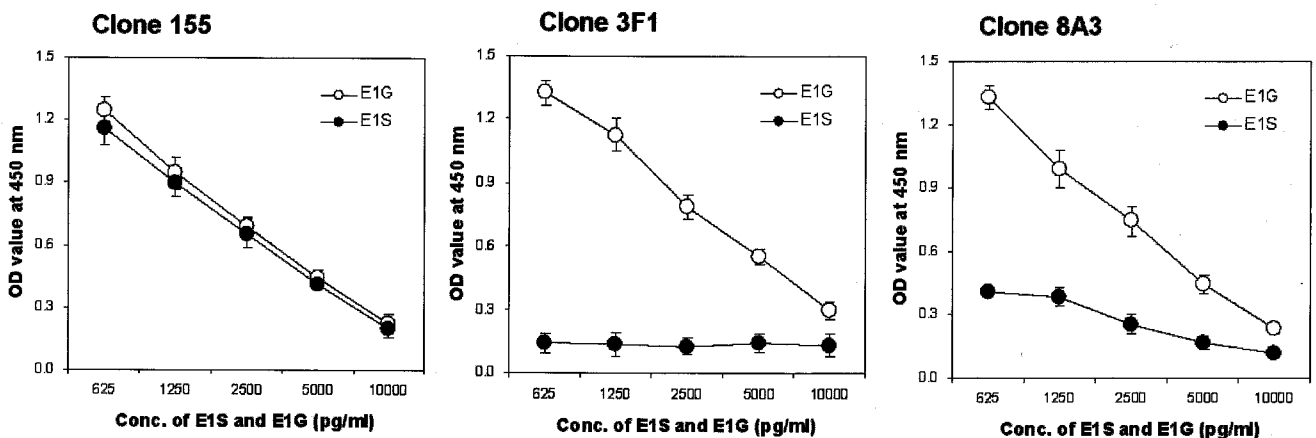


Fig. 3. Cross reaction of anti-E1G monoclonal Ab with E1G and E1S. Anti-E1G monoclonal Abs of each clone coated plate were added E1S-HRP conjugate as a tracer with serial diluted E1G and E1S. After incubation, the plate was washed with PBS-Tween and added TMB substrate solution. The O.D. value of each well was measured at 450 nm.

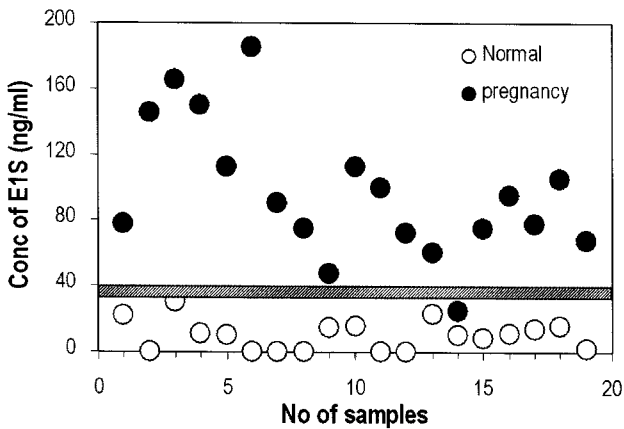


Fig. 5. Determination of the E1S concentration in the pregnancy or non-pregnancy urine of swines. The 50-fold diluted urine was added to the well of anti-E1S Ab coated plate with E1G-HRP conjugate. Finally measured O.D. value was applied to the E1S standard curve for the calculation of E1S concentrations.

적 우수한 결과를 나타냈다. 또한 inter-assay는 총 6회에 걸쳐서 측정하였으며, 실험에 적용한 E1S의 측정농도는 intra assay와 동일한 농도로 조사하였다. 그 결과 CV값은 실험에 적용한 함량인 3 ng/ml, 800 및 200 pg/ml의 모든 경우에서 10% 이내로 나타났다. 따라서 본 방법의 반복성 및 회수율에서 매우 우수한 결과를 나타내어 정확도에서 충분히 E1S의 정량을 위한 가능한 분석법으로 평가되었다(Kim 등, 1982; Kohen 등, 1981).

실제노를 이용한 임신과 비임신노 측정

E1S를 정량할 수 있는 경쟁적 ELISA법의 정량 범위는 약 0.15~20 ng/ml이고, 반복성 및 회수율 조사를 통한 정확도 실험에서도 bias가 10%를 넘기는 경우가 거의 없을 만큼 표준 적정 곡선과 그 정량법이 안정되어 있다는 것을 알 수 있었다. 따라서 작성된 표준곡선에 대입하여 비임신노 및 임신노를 이용한 E1S의 양을 정량하였고, 그 결과를 Fig. 5에 제시하였다. 조사한 결과, 비임신노의 경우 6개의 시료는 표준 곡선의 검출 한계인 156 pg/ml 이하의 결과를 보였고, 13개의 시료는 8.4~30 ng/ml인 결과를 보였다. 한편, 임신노의 경우, 9개의 시료는 48 ng~100 ng/ml 사이를, 8개의 시료는 100 ng/ml~180 ng/ml 사이인 결과를 보였으며, 1개의 시료에서는 25 ng/ml인 결과를 보여 비임신노와의 구별이 어려웠다. 따라서 돼지에서 임신과 비임신을 구별할 수 있는 노의 E1S 농도는 약 40 ng/ml인 결과를 보였고, 이 결과는 본 ELISA 방법이 약 95%의 정확성을 가지고 임신 및 비임신을 진단할 수 있는 결과로 사료되었다(Wellenberg 등, 1989; Almond 등, 1985).

고 찰

물질의 정량법 개발과 관련하여 항원에 대한 항체를 이용한 면역분석법은 개발 초기엔 주로 방사선 동위원소를 이용하는 radio immunoassay(RIA)법이 개발되었다. 그

러나 RIA법은 특이성과 측정 감도가 우수한 것으로 인정되고 있으나(Fohen 등, 1981; Kim 등, 1982), 방사선 동위원소에 의한 유해성, 폐기물의 문제, 짧은 반감기 및 고가의 유지 비용의 난점이 있어 그 이용이 제한되어 있다. 이에 비하여 RIA의 특성을 가지면서 그의 단점을 보완 내지 해결할 수 있는 방법이 비방사선 물질을 이용한 면역분석법이다(Kim 등, 1982). 현재까지 개발된 비방사선 동위원소를 이용한 면역분석법은 효소 면역 분석법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA), 화학 발광 면역 분석법(chemiluminescence immunoassay; CIA), 형광 면역 분석법(fluoroimmunoassay; FIA) 등이 있다(Kim 등, 1981; Diamandis 등, 1988). 그중 효소를 지표물질로 이용하는 ELISA법은 RIA에 대한 대체방법으로 현재 가장 널리 이용되고 있다.

본 연구는 돼지의 조기 임신 진단을 위한 방법으로 임신 돼지 오줌 내에 존재하는 E1S를 측정하는 ELISA법에 관한 것이다. 임신한 돼지의 오줌에 존재하는 E1S는 다른 대사산물에 비하여 높은 농도가 생산되는 것으로 알려져 있어 조기 임신 진단 방법으로 개발이 시도되었다(Almond와 Dial, 1986; Atkinson 등, 1987). E1S의 면역 분석법 개발을 위하여 첫 번째로 E1S에 대한 항체의 생산이 요구되는데 E1S의 안정성 문제로 항체 생산이 극히 어려운 문제가 있어 개발에 어려움이 있었다(Seren 등, 1983; Almond 등, 1985). 이에 본 연구에선 이 점을 극복하기 위한 방법으로 E1S와 교차 반응을 하는 항체를 이용한 소위 'heterologous system immunoassay(Tagawa 등, 2000)법'을 개발하게 되었고 성공적으로 확립하였다. 성공적인 heterologous ELISA 분석을 위한 방법으로 가장 중요한 것은 항체의 교차 반응이 가장 중요한 요인이 된다(Tagawa 등, 2000). 본 연구에서 사용한 세 가지 항체 즉, anti-E1G에 대한 단일 클론 항체인 clone 8A3, 3F11, 155를 이용하여 E1S와 교차 반응을 조사한 결과 clone 155의 경우 우수한 교차 반응을 보여 E1S의 분석에 가장 적합한 항체로 조사되었다. 이 결과에 따라 단일 클론 clone 155 항체를 이용하여 경쟁적 heterologous ELISA법에 의한 E1S의 표준 곡선을 작성하였고, 분석법의 정확성을 조사하기 위하여 반복성 및 회수율을 조사하였다. 그 결과, 본 방법은 반복성 및 회수율에서 모두 10% 이내의 안정된 결과를 보이므로써(Table 1, 2) 매우 안정된 방법임을 확

Table 1. Intra- and inter-assay variation for the measurement of E1S by heterologous competitive ELISA

Group	Expected value (pg/ml)	Observed value Mean±SD	CV (%)
Intra-assay	3,000	3,216±290	9.67
	800	845±75	8.75
	200	191±17	8.50
Inter-assay	3,000	3,302±296	9.87
	800	789±69	8.63
	200	187±17	8.50

CV : coefficient of variation.

Table 2. Analytical recovery of E1S by heterologous ELISA added to swine urine

Expected value (pg/ml)	Observed value Mean±SD	Recovery (%)	Bias (%)
3,000	3,216	107.2	+7.2
800	845	105.6	+5.6
200	191	95.5	-4.5
Mean	-	-	+2.76

인하였다(Kim 등, 1982; Park 등, 1996).

돼지의 임신과 비임신을 결정하기 위해서는 돼지의 오줌 속에 있는 E1S를 측정해야 하기 때문에 오줌 속에 존재하는 여러 가지 성분들로 인한 항원-항체 반응 정도를 조사할 필요가 있다. 영향을 주는 방해요인이 있을 경우 일반적으로 표준 시료를 E1S가 없는 수태지의 오줌을 이용한 분석용 표준 시료 소위 'internal standard'를 사용하여야 한다(Kohen 등, 1980). 본 분석법의 감도와 임신 돼지의 E1S의 농도를 함께 고려할 때 50배 희석된 오줌이 가장 적합하다고 판단되어 표준 시료를 50배 희석된 수태지의 오줌을 사용하여 표준 적정 곡선을 작성하였다. 다행스럽게 50배 이상 희석하였을 시 PBS 완충 용액으로 작성한 것과 전혀 다른 차이를 보이지 않았다(결과 미 제시). 그러나 가급적 같은 조건을 사용하기 위하여 모든 임신 진단 조사에서는 50배 희석된 오줌을 사용하였다. PBS로 50배 희석된 실제 돼지 오줌에 표준물질인 E1S를 희석한 후 본 연구의 heterologous ELISA법에 의한 E1S의 표준곡선에서 검출 한계를 조사한 결과, 약 0.15 ng/ml인 결과를 보였다. 본 면역 분석 방법의 의한 E1S의 검출 한계 농도인 0.15 ng/ml은 이미 개발되어 실용화된 방사선 동위 원소법(Gaustad-Aas 등, 2002)의 0.01 ng/ml보다는 낮았으나, 앞서 보고된 E1S에 대한 rabbit-antiserum을 이용한 homogeneous EIA의 감도인 0.3 ng/ml(Stefanakis 등, 2000)보다 다소 우수한 감도를 보였다. E1S의 분석을 통하여 임신 진단법 개발에 대한 이전의 연구는 주로 혈청 E1S의 농도를 측정하는 것이었는데, Hattersley 등(1980)은 수태 후 26~29일된 임신 돼지 혈청의 E1S의 농도는 2.1~3.5 ng/ml이라 하였고, 이후에 Almond 등(1985)은 암태지의 혈청 내의 Estrone sulphate의 농도를 기준(0.5 ng/ml)으로 하여 임신과 비임신의 여부를 판단하였다. 따라서 0.15 ng/ml의 감도를 가진 본 연구 결과는 실질적으로 돼지 농가에서 임신 및 비임신을 판단함에 있어 충분히 적용될 수 있는 방법으로 판단된다. 본 연구 결과와 직접 비교할 수 있는 돼지 오줌 중의 E1S에 대한 기존 논문으로 Atkinson 등(1987)은 수태한 돼지의 오줌의 E1S의 농도는 혈장 농도의 20~100배 정도 높다는 보고를 하였고, Wellenberg 등(1989)이 radio immunoassay 방법으로 보고한 임신 돼지의 오줌 중의 E1S 농도는 50 ng/ml이라고 발표하였다. 따라서 이러한 기존 연구 결과는 본 연구의 heterologous ELISA 분석에 의한 결과인 40 ng/ml과 거의 일치하는 결과로 사료되었다. 결론적으로 본 연구에서 개발된 E1G와 교차 반응을 하는 항체를 이용한 heterologous ELISA 방법으로 돼지의 오줌 속에 존재하는 E1S를 측정함으로써 임신과 비임신을 구별할

수 있음을 확인하였다. 본 실험 결과는 아직 국내에서 이러한 방법으로 시도된 사례가 없는 처음 시도된 방법으로 향후 다른 비방사성 면역 분석법 개발이나 kit 개발에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

인용문헌

- Almond GW, Bosu WTK, King GJ (1985): Pregnancy diagnosis in swine: A comparison of two ultrasound instruments. *Can Vet J* 26:205-208.
- Almond GW, Dial GD (1986): Pregnancy diagnosis in swine: a comparison of the accuracies of mechanical and endocrine tests with return to oestrus. *J Am Vet Med Assoc* 189:1567-1571.
- Atkinson S, Williamson P (1987): Measurement of urinary and plasma estrone sulphate concentrations from pregnant sows. *Domest Anim Endocrinol.* 4:133-138.
- Barnard G, Amir-Zaltsman Y, Lichter S, Gayer B, Kohen F (1995): The measurement of oestrone-3-glucuronide in urine by non-competitive idiometric assay. *J Steroid Biochem Molec Biol* 55:107-114.
- Choi HS, Kiesenhofer E, Gantner H, Hois J, Bamberg E (1987): Pregnancy diagnosis in sows by estimation of oestrogens in blood, urine or faeces. *Animal Reproduction Science* 15:209-216.
- Diamandis EP, Bhayana V, Conway K, Reichstein E, Papanastasiou-Diamandis A (1988): Time-resolved fluoroimmunoassay of cortisol in serum with a europium chelate as label. *Clin Biochem* 21:291-296.
- Garmo RT, Refsdal AO, Karlberg K, Ropstad E, Waldmann A, Beckers JF, Reksen O (2008): Pregnancy incidence in Norwegian red cows using nonreturn to estrus, rectal palpation, pregnancy-associated glycoproteins, and progesterone. *J Dairy Sci* 91:3025-3033.
- Gaustad-Aas AH, Ropstad E, Karlberg K, Hofmo PO, Dahl E (2002): Oestrone sulphate measurements for the prediction of small or large litters in pigs. *Acta Vet Scand* 43:157-164.
- Gowan EW, Etches RJ, Bryden C, King GJ (1982): Factors affecting accuracy of pregnancy diagnosis in cattle. *J Dairy Sci* 65:1294-1302.
- Hattersley JP, Drane HM, Matthews JG, Wrathall AE, Saba N (1980): Estimation of oesterone sulfate in the serum of pregnancy sows. *J Reprod Fert* 58:7-12.
- Hatzidakis G, Katrakili K, Krambovitis E (1993): Development of a direct and specific enzymeimmunoassay for the measurement of oestrone sulfate in bovine milk. *J Reprod Fert* 98:235-240.
- Honjo H, Kitawaki J, Itoh M, Yasuda J, Yamamoto T, Yamamoto T, Okada H, Ohkubo T, Nambara T (1986): Serum and urinary oestrone sulphate in pregnancy and delivery measured by a direct radioi-

- mmunoassay. *Acta Endocrinol (Copenh)* 112:423-430.
13. Isobe N, Nakao T (2004): Pregnancy diagnosis in miniature pig by direct ELISA of oestrone derivatives in faeces. *Reprod Domest Anim* 39:48-51.
 14. Kim CH, Bhak JS, Shin JS, Kang CB (2008): A study on the early diagnosis by changing of plasma progesterone concentration and morphology of ovary in pregnancy and non-pregnancy cows. *Korean J Vet Sevr* 31:397-414.
 15. Kim JB, Barnard GJ, Collins WP, Kohen F, Lindner HR, Eshhar Z (1982): Measurement of plasma estradiol-17 beta by solid-phase chemiluminescence immunoassay. *Clin Chem* 28:1120-1124.
 16. Kohen F, Pazzagli M, Kim JB, Lindner HR (1980): An immunoassay for plasma cortisol based on chemiluminescence. *Steroids* 36:421-437.
 17. Kohen F, Kim JB, Lindner HR, Collins WP (1981): Development of a solid-phase chemiluminescence immunoassay for plasma progesterone. *Steroids* 38:73-88.
 18. Robert V, Knox RV, Althouse GC (1999): Visualizing the reproductive tract of the female pig using real-time ultrasonography. *Swine Health Prod* 7:207-215.
 19. Park ML, Kim YK, Kim CK, Kim JB (1996): Development of competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of total triiodothyronine in serum. *J Korean Society of Endocrinology* 447-454.
 20. Seren E, Mattioli M, Gaiani R, Tamanini C (1983): Direct estimation of urine estrone conjugate for a rapid pregnancy diagnosis in sows. *Theriogenology* 19: 817-822.
 21. Stefanakis A, Boscoc C, Alexopoulos C, Krambovitis E (2000): Development and evaluation of a direct enzyme immunoassay for oestrone sulphate in urine as a tool for diagnosis of early pregnancy in swine. *Anim Reprod Sci* 58:127-135.
 22. Tagawa N, Tamanaka J, Fujinami A, Kiguchi T, Naito T, Takano T, Amino N, Kobayashi Y (2000): Heterologous enzyme immunoassay for serum androstenediol. *Clin Chim Acta* 296:193-201.
 23. Wellenberg GJ, Borst GH, Bouwkamp FT (1989): Determination of estrone sulfate levels in the blood and urine of pigs. *Tijdschr Diergeneeskde(Dutch)* 114:14-16.
- (접수일자: 2010. 7. 22 / 채택일자: 2010. 9. 13)