

바이오틴 표지 다클론 항체를 이용한 적혈구생성인자 효소면역측정시스템 개발

김기홍¹ · 심정현¹ · 조민철¹ · 강정우¹ · 윤효은¹ · 윤도영¹ · 김종완² · 손동주³ · 이재웅³ · 정은숙³ · 홍진태³ · 문동철³

건국대학교 응용생명공학과, 단국대학교 의과대학 진단검사의학과교실², 충북대학교 약학대학³

Development of Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Erythropoietin

Ki-Hong Kim¹, Jung-Hyun Shim, Ph.D.¹, Min-Chul Cho, Ph.D.¹, Jeong-Woo Kang¹, Hyo-Eun Yoon¹, Do-Young Yoon, Ph.D.¹, Jong-Wan Kim, M.D.², Dong Ju Son, Ph.D.³, Jae Woong Lee³, Eun Sook Jeong³, Jin-Tae Hong, Ph.D.³, and Dong-Cheul Moon, Ph.D.³

Department of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University¹, Seoul; Department of Laboratory Medicine, Dankook University College of Medicine², Cheon-An; College of Pharmacy, Chungbuk University³, Cheong-Ju, Korea

Background : The aim of our study was to optimize and establish erythropoietin (EPO) enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) system.

Methods : We prepared several monoclonal and polyclonal antibodies specific to human-EPO. The best combinations of antibodies for coating and detecting antibodies were selected for the establishment of ELISA. We tested several methods such as a competitive EIA and a sandwich ELISA.

Results : The best sandwich ELISA was optimized compared to competitive EIA when purified polyclonal antibody (PoAb) was used as a coating antibody and biotinylated PoAb as a detecting antibody. This sandwich ELISA easily detected EPO when PoAb pairs were used compared to the ELISA using monoclonal antibody and PoAb. There were no significant differences between the effects of various blocking solutions on the performance of sandwich ELISA using biotinylated antibody. The ELISA system using PBST containing 3% BSA as a blocking solution can sensitively detect EPO (10 mU/mL) in a broad range of EPO concentrations (10-2,000 mU/mL) and there were cross-reactions with other cytokines).

Conclusions : EPO can be easily determined by using biotinylated PoAb as a detecting antibody and another PoAb as a coating antibody. (*Korean J Lab Med* 2006;26:185-91)

Key Words : EPO, ELISA, HRP, Biotinylated Ab, Streptavidin-HRP

서 론

일반적으로 생체시료 중 펩티드의 분석은 방사면역측정법(radioimmunoassay)과 효소면역 측정법(enzyme immunoassay, EIA)이 광범하게 이용되고 있다. 환자의 혈중이나 뇨중에서 적혈구생성인자(erythropoietin, EPO)의 동태를 측정하는 데에도

방사성 동위원소를 사용하지 않고 효소를 사용, 간편하게 측정할 수 있는 효소결합면역측정법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)이 효율적으로 이용되고 있다. 특히 항체를 이용한 특이적인 면역분석법(immunoassay)은 혈중이나 뇨중의 수 많은 방해물질에 상관없이, 특이적으로 극미량의 EPO를 정량적으로, 복잡한 실험절차를 거치지 않아도 누구나 숙련도에 크게 좌우되지 않고 측정할 수 있는 장점이 있다. 또한 측정 키트의 개발로 표준화된 분석법으로의 이용할 수 있다. 이에 비해 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)는 면역학적 측정법보다 정확도, 선택성에 유리하지만 혈청중의 수 많은 당단백 유사물질 등에 의한 방해 혹은 간섭 등에 의해 재현성이 불리하며, 고성능액체 크로마토그래피를 다

접 수 : 2005년 8월 30일 접수번호 : KJLM1881

게재승인일 : 2006년 5월 26일

교 신 저 자 : 문 동 철

우 361-763 충북 청주시 흥덕구 개신동 48

충북대학교 약학대학

전화 : 043-261-2819, Fax : 043-275-6131

E-mail : dcmoon@chungbuk.ac.kr

*본 연구는 학술진흥재단으로부터 지원받아 이루어졌음(KRF-2003-E00016).

를 수 있는 숙련된 전문인력과 고가의 장비 등이 필요하다[1-4]. 효소결합면역측정법의 경우, 한 번에 수 많은 시료들을 동시에 측정가능하며, pg-ng 정도의 극미량의 물질을 검출할 수 있는 감도를 갖고 있는데 비해 고성능 액체 크로마토그래피의 경우는 민감도가 낮으며 한 번에 한 가지 시료만을 측정할 수 있기 때문에 많은 시료를 측정할 경우 반복 실험이 요구되는 등 불편한 점이 많다. 또한 방사선면역측정법의 경우 방사성 동위원소 사용 후의 폐기물 처리, 환경 오염 등의 문제점이 있다. 전기화학적 물질을 측정 신호에 사용하는 전기화학적 면역측정법(electrochemical immunoassay)은 다양한 전기화학 신호 측정법을 이용할 수 있다는 점과 함께 분석의 신속성, 정확도 및 정밀도를 들 수 있다[5]. 이 방법들은 전기화학적 생성물을 생성하기 위하여 효소표지(enzyme label)를 사용하기도 한다[6-8]. 그러나, 이러한 전기화학적 생성물을 측정하기 위한 별도의 측정기기가 필요하다.

본 연구에서는 혈청 등과 같은 시료에 대한 분리, 농축 등 전처리 방법이 필요 없는 간단한 효소결합면역측정법을 확립하고자 하였다. 이러한 간이 효소결합면역측정법의 개발로 환자의 혈중이나 뇨중에서 EPO의 동태를 측정하는 데 효율적으로 이용할 수 있을 것이다. 이를 위해 특이적인 항체의 제조 및 확보, 면역분석법의 확립 등을 수행하였다. 이러한 방법을 활용, 혈중이나 뇨중의 수많은 관련 당 단백질 등과 같은 방해물질에 상관없이, 특이적으로 극미량의 EPO를 정량적으로, 복잡한 실험절차를 거치지 않고 측정할 수 있도록 하고자 하였다. 이를 바탕으로 신부전 보조치료제인 EPO와 같은 당단백질의 특성분석법을 개발하여 EPO 제제 개발에서의 개량화와 생물학적 제제의 품질관리법 확립에 기여하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험재료 및 사용기기

토끼는 무게 2.5-3 kg의 수컷으로서 뉴질랜드 화이트(Newzealand White)종을 사용하였고, 마우스는 Balb/c종으로 오리엔트사(성남, 한국)에서 분양 받았다. 세포배양용 배지로서 RPMI-1640 (Hyclone, Logan, UT, USA)와 항생물질 등은 Gibco (Grand Island, NY, USA)의 제품을 사용하였고, hypoxanthine-aminopterin thymidine (HAT), polyethylene glycol 1500 (PEG 1500), 우혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA) 등은 시그마(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 항혈청의 역가를 높이기 위해 사용된 시약으로는 TiterMax Gold (TiterMax Gold, CytRx, Norcross, GA, USA)가 사용되었다. 송아지 혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone (Logan, UT, USA)사의 제품을 사용하였다. ELISA용 플레이트는 Nunc-Immuno Modules (NUNC, Roskilde, Denmark)를 사용하였다. 재조합 인체 EPO 단백질은 엘지생명과학연구소(익산, 한국)와 제일제당 연구소(이

천, 한국)에서 기증 받았다. 그 이외에 전기영동에 필요한 시약 등은 시그마 케미컬에서 구입하였다.

2. 항혈청의 제조 및 분리 · 정제

EPO 단백질을 토끼의 경우 200 μ g, 마우스의 경우 50 μ g과 동일 부피의 TiterMax Gold로 혼합한 유탁액을 토끼는 피하에 마우스는 발바닥에 주사하여 실험동물의 면역화를 하였다. 추가 주사는 5주 마다 항혈청을 채취하여 그 역가를 측정하여 계속 주사하였다. 항혈청 중의 항체 역가는 직접효소면역측정법으로 조사하였다. ELISA용 플레이트에 EPO 항원을 50 mM 탄산염-중탄산염 완충액(pH 9.6)에 1 μ g/mL로 혼합 후 각 well에 100 μ L씩 코팅하여, 4°C에서 18시간 반응 시킨 후 PBST (0.05% Tween-20 in PBS)로 3회 세척하였다. 역가를 측정하기 위해 채취한 혈액을 PBST로 10배씩 희석한 항혈청 희석액을 100 μ L씩 가하고 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBST로 세척하였다. Anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Co., Santa Cruz, CA, USA)를 PBST에 1:1,000으로 희석하여 100 μ L씩을 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST로 다시 세척한 후 각 well에 Sure-Blue™ TMB Microwell Peroxidase Substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA)용액 100 μ L씩을 가해서 실온에서 반응하면서 그 발색 정도를 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다. EPO에 면역화된 토끼로부터 채취한 혈액을 2,950 \times g에서 10분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. Protein A/G-Sepharose 칼럼(Santa Cruz Co.) [9, 10]에 혈청을 PBS와 1:1로 희석하여 칼럼에 결합되도록 통과시켰고, PBS로 세척하여 칼럼에 결합되지 않는 단백질을 제거하고, 칼럼에 결합된 항체 단백질을 0.1 M 염산-아미노아세트산(Glycine · HCl)용액으로 분리 · 용출시켰다. 용출된 항체용액은 4°C에서 PBS로 충분히 투석하여 기타 염류를 제거한 후, -80°C에서 보관하였다[11, 12]. 마우스의 경우 2번 감작 후 융합 실험시행 3일 전에 50 μ g의 항원을 항원보강제(adjuvant) 없이 꼬리정맥에 주사하였다.

3. 하이브리도마 제조 및 단클론항체 생산

NS-1 마우스 골수종 세포(ATCC TIB 18, Rockville, MD, USA)는 10%의 FBS를 함유하는 RPMI에 배양하였다. 면역화된 마우스의 눈에서 채혈하여 항체의 역가 측정시 역가가 높은 마우스의 비장을 적출하여 60 메쉬의 철망을 갖춘 조직분쇄기에서 하나의 세포로 분리 시키고, NS-1 세포수를 세어서 비장 세포와 골수종 세포의 비율이 7:1이 되도록 혼합한 후, PEG 1500으로 세포 융합하여 HAT 선택 배지에 배양하였다. 배양 세포를 선별하기 위하여 EIA에 의하여 항체의 역가를 측정하였고, 측정 결과 양성으로 판정된 세포를 최소 희석방법에 의하여 활성이 안정하게 유지되는 세포 군을 얻을 때까지 선별작업을 계속하였다. 선별된 하이브리도마를 대량으로 배양하여 배양 상등액으로부터 단클론

항체를 얻었으며, Balb/c 마우스의 복강에 incomplete Freund's Adjuvant (Freund's Adjuvant, Sigma) 0.1 mL씩을 주사한 후 1주일 지났을 때 선별된 하이브리도마세포를 마우스 1마리당 5×10^6 씩 주사하여 마우스의 복수액으로부터 단클론항체를 확보하였다.

4. 여러 가지 EIA법을 이용한 EPO 분석

본 연구에서 개발한 특이적인 항체들 중에서 시료 중에 존재하는 EPO 단백질에 특이적으로 측정할 수 있는 항체들을 이용, 항체들의 특성에 따라 경쟁적 효소 면역측정법 또는 샌드위치 효소 결합면역측정법을 확립하고자 기존의 확립된 바이오틴과 서양 고추냉이 과산화효소(horse radish peroxidase, HRP) 표지 방법을 이용[12, 13], 항체 혹은 EPO를 바이오틴과 HRP로 접합시켜 이용하였다. 항체 또는 EPO에 바이오틴과 HRP를 표지시키기 위하여 바이오틴과 HRP 표지키트(Dojindo Co., Kumamoto, Japan)를 사용하였다. 간단히 설명하면 바이오틴과 HRP 표지키트 모두 항체 또는 항원(농도 50-200 μ g)을 필터에 결합시켰다. 바이오틴 표지키트는 NH_2 -Reactive Biotin을 HRP 표지키트는 NH_2 -Reactive peroxidase를 항체와 항원이 첨가된 필터튜브에 혼합하여 37 $^\circ\text{C}$ 반응 후 세척하였다. 바이오틴과 HRP로 표지된 항원과 항체를 수거하여 4 $^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.

경쟁적 효소면역을 측정하기 위하여 본 연구에서 제조한 단클론 항체들 중에서 샌드위치 형태로 EPO와 특이적으로 반응하는 항체들이 없어서, 본 연구팀에서 제조한 다클론항체를 well에 코팅한 후 바이오틴 표지 EPO (또는 HRP 표지 EPO)와 EPO 간의 경쟁반응을 이용한 경쟁 효소면역측정을 하였다.

샌드위치 효소결합면역을 측정하기 위하여 EPO 다클론항체를 마이크로 플레이트에 코팅한 후 EPO를 반응시킨 후 바이오틴 표지 항체 또는 HRP 표지 항체로 측정하였다. 바이오틴 표지 항체를 이용한 샌드위치 효소결합면역측정법에 미치는 여러가지 형태

의 차단(blocking) 용액의 효과(skimmed milk, BSA), 기질의 효과(PBST, 1%BSA/PBST, 3%BSA/PBST)와 특이성 검증(여러 가지 당단백질 생리활성인자와의 반응 특이성) 등을 하였다.

5. EPO 샌드위치 효소결합 면역 측정법의 평가

효소결합 면역측정법의 민감도를 알아 보고자 10개의 zero standard를 분석하여 얻은 값의 95% 신뢰구간으로 계산하여 분석 감도를 결정하였다. 분석법의 재현성을 측정하기 위해 3종의 control EPO 시료(30, 200, 2,000 mU/mL)를 사용하여 10번씩 측정하여 검사 내 변이를 조사하여 보았고, 고농도의 EPO (2,000 mU/mL) 용액을 100%, 75%, 50%, 25%의 여러 가지 농도(2,000, 1,500, 1,000, 500 mU/mL)로 만들어, 희석배수에 따른 측정 농도의 직선성(linearity) 조사를 하였다.

결 과

1. EPO 경쟁적 면역효소측정법

EPO를 검출하기 위한 시스템으로 경쟁적 효소면역측정법을 시도하여 보았으나 코팅된 다클론항체에 대한 결합이 약해 흡광도 값이 낮게 나왔으며, 고농도의 EPO를 함께 처리하여도 항체와 결합된 HRP 표지 EPO (EPO-HRP)의 치환이 잘 일어나지 않아 민감도가 떨어짐을 알 수 있었다(Fig. 1A). 바이오틴 표지 EPO (EPO-B)를 사용하면 EPO-HRP의 결합에 비해 흡광도 값이 약간 높게 나왔으며, 고농도의 EPO를 함께 처리하였을 때, 항체에 결합된 EPO-B의 치환이 EPO-HRP의 경우 보다는 더 잘 일어남을 알 수 있었다(Fig. 1B).

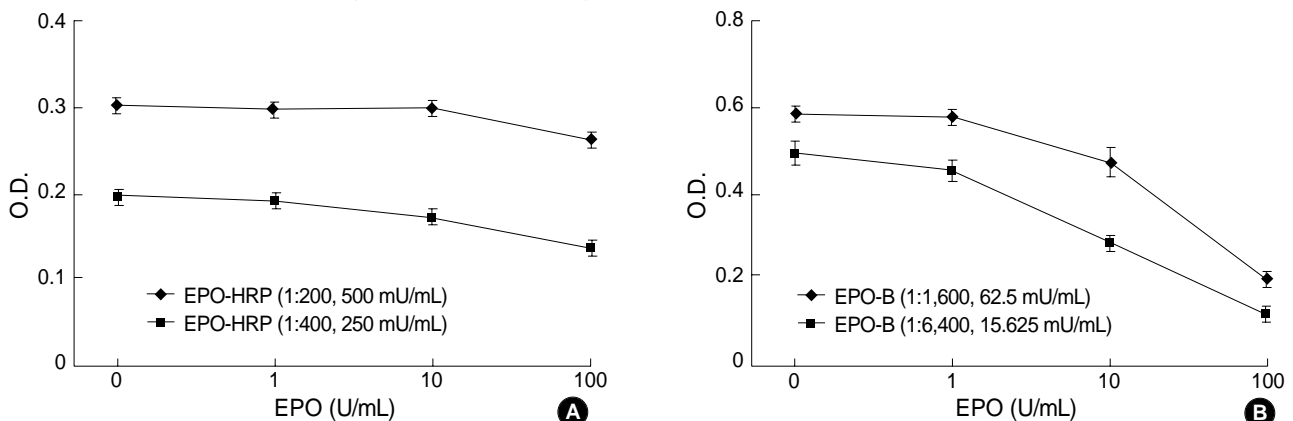


Fig. 1. Competitive enzyme immunoassay for EPO by coincubating EPO with HRP-labelled EPO (A) or biotin labelled EPO (B) onto the coated polyclonal antibody. Polyclonal antibody (PoAb) was coated onto the wells and then blocked with blocking solution. Then biotin-labelled EPO (or HRP-labelled EPO) and free EPO were coincubated in the PoAb coated wells in order to perform a competitive enzyme immunoassay. The wells treated with biotinylated PoAb was further incubated with streptavidin-HRP and washed with PBST. The HRP activity was then detected with TMB substrate as described in "Materials and Methods" section. Error bars display the mean \pm standard deviation of three determinations.

2. 샌드위치 효소결합 면역측정법

샌드위치 효소결합 면역측정법을 위한 최적의 항체 쌍의 선정하기 위해, EPO를 코팅한 후 일정 농도의 HRP 표지 다클론항체(PoAb-HRP) (1:400, 2.5 $\mu\text{g/mL}$) 또는 HRP 표지 단클론항체(mAb-HRP) (1:400, 2.5 $\mu\text{g/mL}$)를 여러 농도의 다클론항체(PoAb)와 동량으로 1시간 반응시킨 후 코팅된 EPO에 대한 PoAb-HRP, 또는 mAb-HRP의 결합정도를 비교하였을 때, 고농도(10 $\mu\text{g/mL}$)의 PoAb에 의해서 두가지 HRP 표지 항체 모두

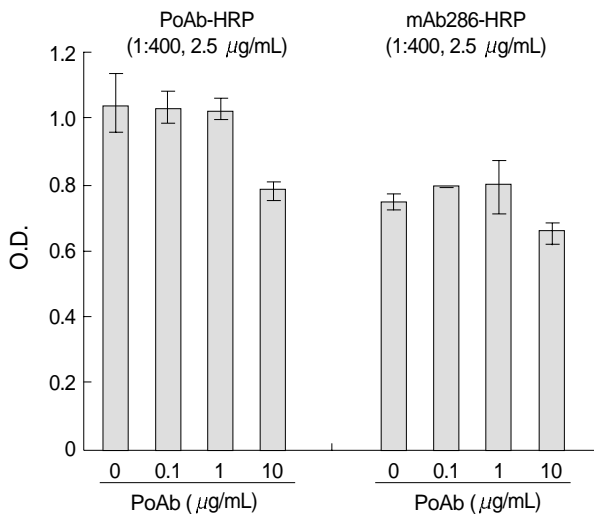
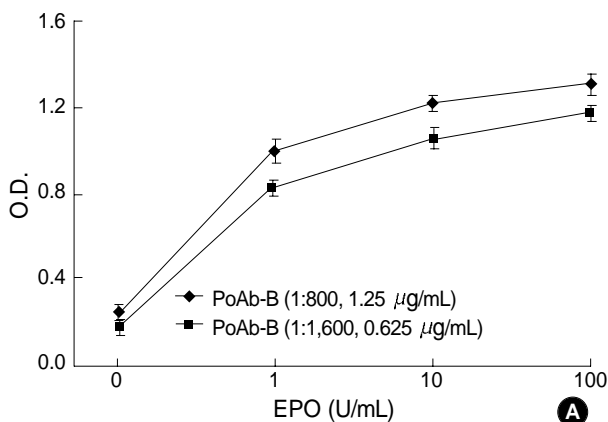


Fig. 2. Binding inhibition assay for selecting antibody pairs in the performance of EPO sandwich ELISA. EPO was coated onto the wells and then blocked with blocking solution. Then a constant amount of PoAb-HRP (1:400) or mAb-HRP (1:400) was coincubated with various concentrations of PoAb for 1 hr and washed with PBST. The wells treated with biotinylated PoAb was further incubated with Streptavidin-HRP and washed with PBST. The HRP activity was then detected with TMB substrate as described in the "Materials and Methods" section. Error bars display the mean \pm standard deviation of three determinations.



EPO에 대한 결합이 감소하는 경향을 보이지만 효소 결합 면역측정법에 보통 이용하는 항체의 농도 범위(1 $\mu\text{g/mL}$)에서는 결합 억제 반응이 나타나지 않음을 알 수 있었다. 또한 mAb-HRP 보다는 PoAb-HRP가 EPO에 대한 결합반응이 좋아 흡광도 값이 높게 나와 샌드위치 효소 결합 면역 측정법에서 PoAb-HRP를 이용하게 되었다(Fig. 2). 바이오틴으로 표지된 다클론항체(PoAb-B)로 검출하고 PoAb로 코팅하는 것이 가장 좋은 결과를 나타낼 것으로 사료되어 그와 같은 구성으로 샌드위치 효소결합면역 측정법 조건을 확립하였다. 바이오틴 표지 항체, HRP 표지 항체를 이용한 샌드위치 효소결합면역측정법을 확립하기 위해, PoAb를 마이크로 플레이트에 코팅한 후 시료 중의 EPO를 반응시킨 후 PoAb-B, 혹은 PoAb-HRP로 검출하였을 때, HRP 표지 항체(5 $\mu\text{g/mL}$, 2.5 $\mu\text{g/mL}$)보다는 바이오틴 표지 항체(1.25 $\mu\text{g/mL}$, 0.625 $\mu\text{g/mL}$)를 이용하였을 때가 농도가 낮음에도 흡광도 값이 약간 높게 나왔다(Fig. 3). 바이오틴 표지 항체를 이용한 샌드위치 효소결합 면역측정법에 미치는 여러 가지 형태의 차단 용액의 효과를 알아 본 결과, 각종 차단 용액을 각각 달리하여 실험한 결과, 유효성 있는 차이는 없으나 3% BSA가 들어있는 PBST으로 이용하였을 때, EPO에 대한 표준 곡선이 편차도 적고 낮은 농도의 EPO (10 mU/mL)를 측정할 수 있었으며, 넓은 범위(10-2,000 mU/mL)의 EPO를 측정가능하였다(Fig. 4). 바이오틴 표지 항체를 이용한 샌드위치 효소 결합 면역 측정법에 미치는 기질의 효과를 알아 보기 위해, EPO를 여러 가지 형태의 기질로 희석하여 실험한 결과 PBST에 비해 1% BSA가 들어있는 PBST와 3% BSA가 들어있는 PBST에서 비특이 반응이 낮게 나타났다(Fig. 5). 다른 사이토카인에 대한 특이성 검사를 위해 7종류(hGM-CSF, hIL-1 β , hIL-2, hIL-6, hIL-18, hIL-32 α , EPO)의 다른 사이토카인을 EPO와 같은 농도로 처리한 결과 특이적으로 반응하지 않았다(Fig. 6). 효소결합 면역측정법의 민감도를 알아 보고자 10개의 zero standard를 분석하여 얻은 값의 95% 신뢰구간으로 계산하여 분석 감도를 결정하여 보았을 때 10 mU/mL (0.1

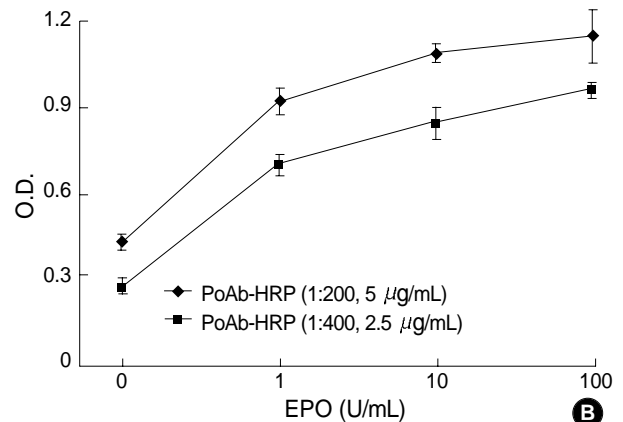


Fig. 3. Sandwich ELISA using a biotinylated antibody (A) and HRP-conjugated polyclonal antibody (B). PoAb was coated into a microtiter plate and incubated with EPO for 1 hr. Then biotinylated Ab, or PoAb-HRP was incubated for 1 hr. The wells treated with biotinylated PoAb was further incubated with streptavidin-HRP and washed with PBST. The HRP activity was then detected with TMB substrate as described in the "Materials and Methods" section. Error bars display the mean \pm standard deviation of three determinations.

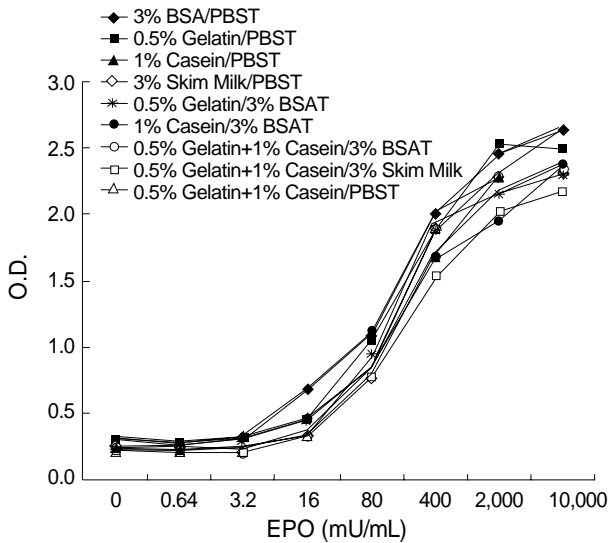


Fig. 4. The effect of various blocking solutions on the performance of sandwich ELISA using biotinylated antibody. PoAb was coated into microtiter plate, incubated with various blocking solutions, and incubated with EPO for 1 hr after washing. Then biotinylated PoAb was incubated for 1 hr followed by further incubation with streptavidin-HRP. After washing with PBST, the HRP activity was detected with TMB substrate as described in the "Materials and Methods" section. Error bars display the mean \pm standard deviation of three determinations.

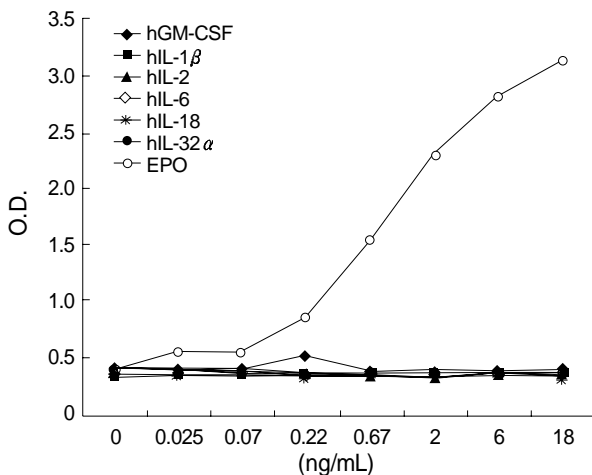


Fig. 6. The specificity of sandwich EPO ELISA. PoAb was coated into a microtiter plate and incubated with EPO or other glycoprotein cytokines for 1 hr. Then biotinylated PoAb was incubated for 1 hr followed by further incubation with streptavidin-HRP. After washing with PBST, the HRP activity was detected with TMB substrate as described in the "Materials and Methods" section. Error bars display the mean \pm standard deviation of three determinations.

ng/mL) 이상의 EPO를 측정할 수 있었다. 분석법의 재현성을 측정하기 위해 3종의 control EPO 시료(30, 200, 2,000 mU/mL)를 사용하여 10번 반복 실험하여 검사 내 변이를 조사하여 보았을 때, %CV가 10% 이하로 우수한 재현성을 나타내었다(Table 1). 고농도의 EPO (2,000 mU/mL) 시료를 희석시켜 100%, 75%,

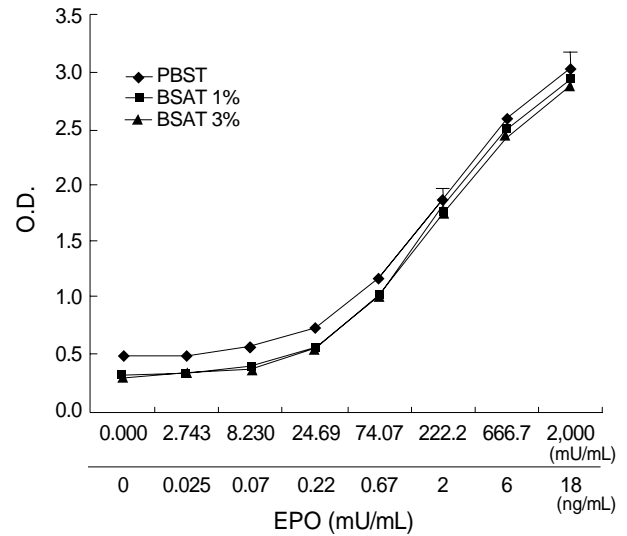


Fig. 5. The effect of various matrices on the performance of sandwich ELISA using biotinylated antibody. PoAb was coated into microtiter plate and incubated with EPO diluted with various matrices for 1 hr. Then biotinylated PoAb was incubated for 1 hr followed by further incubation with streptavidin-HRP. After washing with PBST, the HRP activity was then detected with TMB substrate as described in the "Materials and Methods" section. Error bars display the mean \pm standard deviation of three determinations.

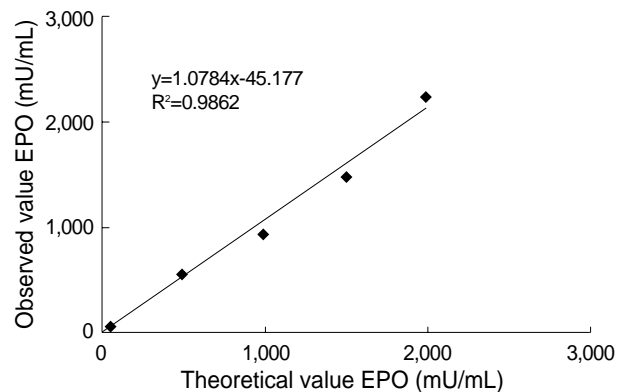


Fig. 7. Dilution linearity of EPO. A high concentration of EPO (2,000 mU/mL) was diluted and then determined EPO concentration according to the diluted samples by using sandwich EPO ELISA.

Table 1. Within run assay for EPO sandwich ELISA

	Control	N	X	SD	%CV
EPO (mU/mL)	L (30)	10	29.84	2.119	7.101
	M (200)	10	200.2	4.698	2.347
	H (2,000)	10	1,978.26	49.257	2.490

50%, 25%, 0%로 만들어 희석배수에 따른 측정 농도를 조사했을 때 직선성을 나타냈으며, 직선성의 변이계수(correlation coefficient)도 우수하였다(Fig. 7).

고 찰

현재 개발 중인 개량 신약의 하나인 EPO는 신부전 보조치료제로 사용되고 있으며 1998년 기준으로 전 세계 시장규모는 연 28억 달러에 달하고 국내 시장은 120억원에 달한다. 국내의 경우 몇몇 기업에서 EPO를 공급하고 있으며, 연구 그룹에서는 EPO의 지속형 약물제제기술을 개발 중에 있다.

EPO의 고감도 분석법을 확립하여 현재 EPO의 생물학적 활성은 실험동물을 이용한 측정법이 적용되고 있으나 여러가지 요인들(실험간의 편차, 동물개체 차에 의한 결과의 편차, 실험기간 및 비용의 문제, 동물애호론자에 의한 동물실험의 반대 등)에 의하여 생체내(*in vivo*)를 시험관내(*in vitro*) 방법으로 대체하여야 하며, 이를 위한 하나의 대안으로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 EPO를 측정하기 위한 특이항체 제조 및 확보를 완료하였으며, 특이적인 항체들을 이용한 EPO 측정을 위한 여러 가지 방안으로 경쟁적 효소 면역 측정법, 샌드위치 효소결합 면역 측정법 확립을 위한 여러 조건들을 조사해 본 바, 가장 적합한 샌드위치 효소결합 면역 측정법을 확립하였다.

EPO 다클론항체에 대한 EPO와 HRP 표지 EPO (EPO-HRP)의 경쟁적 분석 결과 항체에 대한 EPO의 경쟁이 원하는 만큼 일어나지 않아, 샌드위치 효소결합 면역 측정법에 이용하고자 하는 항체들의 조합을 시도해 본 바, HRP보다 바이오틴으로 표지된 다클론항체와, 코팅 항체로 다클론항체를 이용함이 가장 우수한 조합으로 나타났다. 이들 조합의 항체를 이용한 sandwich ELISA에 미치는 여러 가지 차단 용액에 의한 효과(Fig. 4), EPO 표준 샘플 희석 시 기질효과(Fig. 5), EPO에만 특이적으로 작용하는지 알아보기 위한 다른 싸이토카인과의 교차 반응성(Fig. 6), 민감도, 분석법의 재현성 조사(Table 1), 희석배수에 따른 측정 농도를 조사했을 때의 직선성 조사 등을 실시해 본 바, 본 EPO 측정시스템을 이용, EPO의 양을 정밀하게 측정함으로써 생물학적 제제의 품질관리에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

배경 : 본 연구에서는 인형 적혈구생성인자(erythropoietin, EPO)에 대한 적정화된 새로운 효소결합면역측정법(ELISA, enzyme linked immunosorbent assay)을 확립하고자 하였다.

방법 : 인형 EPO에 대한 여러가지의 항체를 만든 후 항원결정기가 다른 항체를 찾아 바이오틴 혹은 서양고추냉이 과산화효소(horse radish peroxidase, HRP)로 표지한 후 차단 용액과 기질을 사용하여 EPO를 측정을 위한 다양한 조건의 실험을 시도하였다. 본 연구에서 수립한 sandwich ELISA 분석법의 평가를 위해, 분석감도, 재현성 조사, 직선성 평가, 교차반응성 평가 등을 수행하였다.

결과 : EPO 다클론항체에 대한 EPO와 HRP 표지 EPO

(EPO-HRP)의 경쟁적 분석 결과, 항체에 대한 EPO의 경쟁이 충분하지 않았다. 샌드위치 효소결합 면역 측정법에 이용하고자 하는 항체들의 조합에서 다클론항체로 코팅하고 바이오틴 표지 다클론항체로 검출하였을 때 가장 우수한 결과를 보였다. 여러 가지 차단 용액의 ELISA에 미치는 효과를 알아 본 결과 유의한 차이는 없었으나 3% 우혈청알부민(BSA)이 들어있는 PBST (PBST/3%BSA) 사용 시 비특이 반응이 가장 낮게 나왔다. 이 ELISA법은 PBST/3%BSA 이용 시, 10-2,000 mU/mL의 EPO 농도 범위에서 다른 사이토카인에 대한 교차 반응없이 분석이 가능하였다.

결론 : 바이오틴 표지 다클론 항체와 다클론 항체 코팅 플레이트로 EPO 측정이 가능하였다.

참고문헌

1. Abu-Qare AW and Abou-Donia MB. High performance liquid chromatographic determination of diazinon, permethrin, DEET (N, N-diethyl-m-toluamide), and their metabolites in rat plasma and urine. *Fresenius. J Anal Chem* 2001;70:403-7.
2. Chamkasem N, Hill KD, Sewell GW. High-performance liquid chromatographic column-switching technique for the determination of intermediates of anaerobic degradation of toluene in ground water microcosm. *J Chromatogr* 1991;587:185-91.
3. Cass QB, Oliveira RV, De Pietro AC. Determination of gossypol enantiomer ratio in cotton plants by chiral higher-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 2004;52:5822-7.
4. Klvanova J and Brtko J. Selected retinoids: determination by isocratic normal-phase HPLC. *Endocr Regul* 2002;36:133-41.
5. Cousino MA, Jarbawi TB, Halsall HB, Heineman WR. Pushing down the limits of detection: molecular needles in a haystack. *Anal Chem* 1997;69:544-9A.
6. Chen SF, Xu Y, Ip MP. Electrochemical enzyme immunoassay for serum prostate-specific antigen at low concentrations. *Clin Chem* 1997;43:1459-61.
7. Messina GA, Torriero AA, De Vito IE, Olsina RA, Raba J. Continuous-flow/stopped-flow system using an immunobiosensor for quantification of human serum immunoglobulin G (IgG) antibodies to *Helicobacter pylori*. *Anal Biochem* 2005;337:195-202.
8. Qu Y, Berghman LR, Vandesande F. An electrochemical enzyme immunoassay for chicken luteinizing hormone: extension of the detection limit by adequate control of the nonspecific adsorption. *Anal Biochem* 1998;259:167-75.
9. Wang X, Chen F, Wan PJ, Huang G. Development of monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for gossypol analysis in cottonseed meals. *J Agric Food Chem* 2004;52:7793-7.
10. Zola H. Monoclonal antibodies: Production, purification, analysis,

- quality control, storage, and distribution. In Zola H, ed. Monoclonal antibodies: A manual of techniques; Boca Raton: CRC Press, FL, 1987:70-6.
11. Wang X and Plhak LC. Monoclonal antibodies for the analysis of gossypol in cottonseed products. *J Agric Food Chem* 2004;52:709-12.
12. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
13. Conkerton EJ and Frampton VL. Reaction of gossypol with free epsilon-amino groups of lysine in proteins. *Arch Biochem Biophys* 1959;81:130-4.