[별지 26 호]

최 종 보 고 서

(뒷면)		(앞면)
	106114 -03-3 -CG000	보안과제(　　), 일반과제(0)　과제번호 106114-03-3-CG000 5cm ↓
	뇨중 대사 산물 측정에 의한 돼지, 소(한우) 임신 진단을 위한 면역 분석법 개발과 이의 활용	뇨중 대사산물 측정에 의한 돼지, 소(한우) 임신진단을 위한 면역분석법 개발과 이의 활용 (Development of TR-FIA kit for pregnancy test of swine and cows by urinary steroid metabolites measurement and their Utilization)
주　　의 (편집순서 8)		한 동 대 학 교 ↑ 9cm ↓
(15 포인트 고딕계열) ↑ 6cm ↓	농림수산식품부 ↑ 3cm ↓	농 림 수 산 식 품 부 ↑ 4cm ↓

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “뇨중 대사산물 측정에 의한 돼지, 소(한우) 임신진단을 위한 면역분석법 개발과 이의 활용에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2009 년 04 월 24 일

주관연구기관명 : 한동대학교

주관연구책임자 : 김 종 배

연 구 원 : 박 용 수

연 구 원 : 정 회 윤

연 구 원 : 박 성 민

연 구 원 : 이 안 나

연 구 원 : 송 태 준

연 구 원 : 김 영 훈

연 구 원 : 김 태 섭

연 구 원 : 김 영 애

협동연구기관명 : 유한 대학

협동연구책임자 : 윤 택 준

요 약 문

Ⅰ. 제 목

뇨중 대사산물 측정에 의한 돼지, 소(한우) 임신진단을 위한 면역분석법 개발과 이의 활용

Ⅱ. 연구개발의 목표 및 필요성

1. 연구의 목표

가. 뇨중 PG와 E1S 및 E1G를 측정할 수 있는 TR-FIA법을 개발하여 돼지와 한우의 임신과 난소기능을 조기에 진단 서비스 할 수 있는 체제 구축하여 농가에서 활용할 수 있도록 하는 것.

나. 뇨중 PG와 E1S를 측정할 수 있는 ELISA법을 개발하고 이를 바탕으로 손쉽게 진단할 수 있는 키트를 개발하여 이를 사업화 하는 것.

2. 연구의 필요성

1) 경제적인 중요성

- 공태기를 줄여 년간 소득증가.
- 가축의 임시진단만으로도 년간 30억원 이상의 매출을 갖는 기업창출 가능.
- 한우의 생산성 증대방안의 시급성과 농가소득의 비중면에서 매우 중요.

2) 산업적인 중요성

- 본 과제에 적용하는 기술은 암진단등 각종 진단용 키트 생산에 적용되는 기술이기 때문에 산업적으로도 매우 중요.
- 사람의 임신진단의 경우 국내만 년 200억원이상의 시장이며 각종 암까지 포함시킬 경우 수천억원 이상의 시장이므로 본 연구를 통해 확보될 수 있는 기술은 매우 중요.

3) 학문적인 중요성

- 혈액내 호르몬에 대한 연구는 많이 되어 있으나 동물의 뇨중 호르몬 대사산물에 대한 연

구는 많지 않으며, 특히 임신진단에 있어 한우 및 젖소의 뇨중 PG의 농도변화에 대한 연구는 전무함. 또한 돼지의 임신진단을 위한 E1S측정은 외국에서 다소 수행되고 있으나 국내는 전무함.

4) 기술적인 중요성

- 면역분석법중 ELISA법은 어는 정도 보편화 되어 있으나 TR-FIA는 국내에서 전무할 정도로 첨단 기법임. 더욱이 암 진단등 임상병리와 CTL등 세포생물학 연구등 다양하게 응용될 수가 있어 기술확보차원에서 매우 중요.
- TR-FIA법의 필요성과 장점 : 비방사성 물질로 가장 널리 사용되며 그 효용성이 인정되는 방법임. 특히 비방사성이기 때문에 폐기물처리 건강 위해성 등의 문제가 없을 뿐만 아니라 민감도와 안정성이 가장 좋은 방법이라 사료됨.

5) 연구개발의 필요성

- **한우 사육의 중요성 :** 동물의 임신과 분만은 바로 생산을 의미하는 것으로 이는 동물의 경제성 평가에 기준이 되는 척도가 된다. 90년대만 하드라도 축산농가의 최대 수입원은 젖소로부터 우유를 생산하는 것이었다. 그러나 2000년대에 들어와서 WTO체제와 수입개방 압력으로 인해 축산농가의 생산 패턴(pattern)에도 변화가 일기 시작했다. 즉 젖소 중심에서 한우 중심으로 변하여 최근에는 젖소 두 수보다 오히려 한우 두수가 더 많아지고 송아지 가격에도 2배 이상의 차이가 나고 있어 축산농가에서의 한우의 중요성은 매우 커지고 있다. 그러나 **한우에 대한 내분비학적인 연구는 젖소에 비해 상대적으로 미약한 점이 사실이다.**
- **가축의 조기 임신/비임신진단 방법 개발의 중요성 :** 인공수정후 비임신/임신진단을 빨리 진단하면 할수록 임신과 다음 임신까지의 기간을 축소할 수가 있고 이는 농가의 소득과 직결되기 때문에 매우 중요하다. 1990년대 이전까지는 한우의 경우 임신 여부를 진단하기 위해 한우를 수정 또는 교배시킨 후, 50 내지 60일 경과한 상태에서 수의사가 직접 직장검사로 한우의 임신 감정을 판단하는 방법에 전적으로 의존하였다. 그러나 이 방법은 수정 후 50 내지 60일이 경과했을 때, 확실한 임신 여부를 판단할 수 있기 때문에, 만약 이때에 임신이 되지 않은 것으로 판정이 되면 다시 수정 절차를 거쳐야 하는 번거로움이 있을 뿐만 아니라 이런 공태기로 인해 막대한 손실을 입게 된다. 즉 만약 20일 경에 비임신/임신 진단을 할 수 있다면 30일 이상의 **공태기간**을 줄일 수가 있어 생산성을 증가시킬 수가 있다.

  이와 관련하여 1990년대 이후부터는 과학의 발달로 한우의 수정 적기, 조기임신 및 번

식장애를 감정할 수 있는 방법들이 속속들이 개발되고 있는바, 그 일례로 초음파진단기를 이용한 임신 진단법이 이용되고 있지만 고가의 장비를 필요로 한다는 점에서 사용에 제한이 있다. 여전히 보다 간편한 방법개발의 필요성이 요구된다.

이를 위한 방법으로 주로 ELISA법에 기반한 발색반응을 적용한 키트개발이 그 주를 이루고 있다. 시료는 혈액과 우유(젖소의 경우)가 대부분이다. 그러나 한우의 경우 우유가 어렵고 일반적으로 혈액채취에 번거로움이 있어 키트 자체개발의 어려움 보다는 어떤 시료를 사용하며 어떤 물질을 표적으로 하느냐가 더 중요한 연구 대상이 되었다.

대안으로 제시된 것 등의 하나가 오줌 속에 존재하는 steroids 호르몬의 대사산물 즉 PG와 E1S 또는 E1G를 측정하는 방법개발이었다. 돼지의 경우 E1S를 측정함으로서 조기에 임신을 진단할 수 있다는 근거가 제시되었지만(Stefanakis등, 2000) 아직 키트가 개발된 경우는 없었고 더욱이 소의 경우 오줌 내에 있는 PG와 E1G에 대한 연구는 거의 없다. Progesterone측정 대신에 PG측정으로도 가능할 것이라는 사실은 대부분 인정하면서도 근거 자료를 제시한 경우는 거의 없다. 이런 측면에서 본 연구의 의의는 크다고 사료된다.

돼지의 임신 또는 비임신을 조기에 진단하는 것은 생산성 증진에 중요한 요인이 된다. 돼지에 있어서 임신진단을 위한 가장 보편적인 기본은 교배 또는 수정 후 18-24일째 발정의 징후가 없는 경우를 바탕으로 하고 있다. 수퇘지로서 검사할 시 정확도는 98%까지 도달한다고 하지만 검사자에 따른 개별차가 많아 주관적 판단과 경험에 의존할 수밖에 없는 단점이 있다. 도플러(Doppler)방법 또는 A-mode의 초음파를 사용한 방법은 점차 그 이용도가 증가되고 있다. 그러나 그 정확도가 임신돈일 경우 97%까지 비임신일 경우 80-85%까지 정확도를 보이고 있지만 이들의 이용은 교배 후 최소한 35일 후가 되어야 한다는 단점이 있어 사용의 제한이 있다.(Meredith 1989, Pig News Inf. 10. 4770480). Real-time B-mode 초음파방법은 정확도도 더 높고 교배 후 16-20일경에 진단을 할 수 있어 모든 단점을 극복할 수 있지만 고가의 장비를 사용해야 한다는 문제점이 있어 널리 사용하기에는 문제점이 있다. 이런 문제점들을 극복하기 위하여 많은 연구자들은 혈액내 프로제스테론(progesterone)이나 에스트르원 설페이트(oestrone sulphate = E1S)를 측정하는 방법을 적용하였다. 그러나 혈액내 프로제스테론을 측정하는 방법의 단점은 발정주기가 짧아지거나 길어질 때 위양성(false positive)의 빈도가 많아지는 문제점이 있다. 이에 반하여 교배 후 23과 30일경에 혈액내 E1S측정하는 방법은 임신진단에 있어서 더 좋은 정확도를 나타내었다. 이에 기초하여 혈액 내 E1S측정은 돼지의 조기 임신진단이나 수태조절을 위한 한 방법법의 하나로 사용되어 왔다. 그러나 이 방법을 농가에서 상용적인 방법으로 사용하는 데는 많은 제한점이 있음이 지적되어 왔는데 가장 큰 요인은 혈액

채취가 용이하지 않다는 점이다.

따라서 본 연구에서는 오줌 내의 E1S를 측정함으로써 돼지의 임신을 진단할 수 있는 키트 개발이란 궁극적인 목적 달성을 위하여 먼저 E1S를 측정할 수 있는 면역분석법 즉 TR-FIA법과 ELISA법을 개발하고 이 방법으로 다양한 경우의 시료들을 분석하여 돼지의 임신진단을 위한 기준을 설정할 것이며 이를 바탕으로 돼지의 임신을 진단할 수 있는 간단한 키트를 개발하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 1차년도

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
항체의 특성조사	• 항체의 역가(titer), 특이성(specificity)등을 교차반응정도 및 ELISA 법으로 조사	1) Hatzseradish 등의 방법에 의거 면역원으로 oestrone-3-sulphate-6- hemisuccinate -BSA 을 합성 후 Kim의 방법에 따라 항체를 생산(Kim,1983) 2) 항체의 특성도 Kim의 방법에 따라 실시하였고 항체의 역가(titer), 특이성(specificity)등을 교차반응정도로 조사하였음
PG 측정을 위한 면역분석법 (TR-FIA)개발 및 평가	• solid-phase system을 적용한 경쟁성 반응원리에 의한 분석법 • Eu-conjugate는 영국 Cambridge 수의과학연구소의 Geoff. Barnard박사로부터 제공받아 개발	1) solid-phase system을 적용한 경쟁성 반응원리로서 상기의 방법으로 생산한 항체를 일정농도 피복한 후, Sigma로부터 PG 및 E1S, E1G를 구입하여 standard로 사용하고, 영국의 Geoff로부터 제공받은Eu-labelled된 conjugate와 경쟁을 유도하여 표준적정곡선을 정립하였음
E1G 측정을 위한 면역분석법(TR-FIA)개발 및 평가		
E1S 측정을 위한 면역분석법(TR-FIA)개발 및 평가		
한우 및 돼지뇨 확보	• 임신 및 비임신뇨 확보	1) 경북축산기술연구소로부터 한우 및 돼지의 뇨를 채취하여 실시함
수정후 한달간 매일의 오줌내 PG 및 E1G, E1S 측정 분석	• 개발된 TR-FIA에 의한 분석	1) 경북축산기술연구소에서 인공 수정을 한 후, 매일 오줌을 채취하여 수정 후 PG 및 E1G, E1S를 측정하였고, 비임신/임신진단을 위한 기준치 설정과 이에 의한 비임신/임신진단 정확도 조사하였음

2. 2차년도

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
Kit(키트) 개발 위한 ELISA 법 개발	• E1G, E1S-enzyme conjugate를 합성하여 E1G에 대한 항체를 이용한 경쟁성(competitive) solid-phase ELISA법 개발	1) E1G-enzyme conjugate 합성 2) E1G에 대한 항체를 이용한 경쟁성(competitive)solid-phase 법 개발 3) 개발된 방법에 대한 평가 (evaluation)
한우 임신/비임신 진단 기준치 설정 돼지 임신/비임신 진단 기준치 설정	• 개발된 TR-FIA법에 의한 500두 이상의 시료 분석	1) 발정 중 돼지 뇨에서의 E1S 농도 조사 2) 실제 농가의 임신/비임신뇨 판독과 이의 활용
키트 개발을 위한 실제뇨에서의 정량법 확립	• 실제 한우 및 돼지 비임신뇨를 이용한 TR-FIA법에 의한 분석 개발	1) 표준 적정 곡선을 이용한 임신/비임신뇨의 실제 E1S 농도 측정
수정 후 한달간 매일의 오줌 내 E1S측정	• 개발된 TR-FIA 법을 이용 한 시료 분석	1) 수정 후 23일부터 30일까지의 E1S 함량 조사

3. 3차년도

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법	구체적인 내용
E1S-BSA 합성과 피복조건 확립	•E1S-BSA 합성 조건 결정 •피복 가능 여부 조사 •피복 조건 확립	•기존 임신진단 키트를 이용한 조건 확립 •각각 다른 농도로 피복 후 검사
E1S에 대한 항체에 금입자(gold particle)를 표지시킨 conjugate합성과 이들의 특성 조사를 통한 첨가량 결정	•금입자를 표지시킨 conjugate 합성 조건 및 농도 결정 •키트 개발을 위한 금입자 표지 conjugate 첨가량 조사	•금입자 표지 conjugate 제조 및 키트 개발 •conjugate 첨가량 결정을 위한 titer 측정
키트제조를 위한 조건 확립	•실제 키트 제조 및 시험 테스트 •키트 길이 피복 조건 첨가 시료양 설정 및 평가	•돼지 임신 진단 키트 제조 •각기 다른 조건에서의 키트 정확도 조사
비임신/임신진단 정확도, 안정성 등 평가 조사	•실제 sample을 이용한 임상 테스트 •실제 농가 돼지 뇨를 이용한 임상 테스트	•보유하고 있는 샘플 500두 이상 분석 •실제 농가 돼지 500두 이상 분석
한우뇨 임신진단 방법 개발	•2D를 이용한 타겟 단백질 결정 •2D 조건을 다르게 하여 타겟 단백질 결정 •한우뇨의 다양한 호르몬 대사산물의 연구	1) 2D를 이용하여 타겟 단백질 채취 및 저장 2) 단백질 분리 조건, 2D 조건을 다르게하여 한우뇨의 단백질 패턴 분석 3) 한우뇨의 PG, E1S, E1G 수준 조사

Ⅳ. 연구개발 결과 및 성과 활용 계획

1. 연구개발 결과(성과)

가. 특허출원

(1) 키트에 대한 특허

- 현재 진행 중인 특허 (2009년 11월 중 출원 완료 가능)
- 대상국: 일차 국내 출원 후 자료 보완하여 국외도 출원할 계획임.
- 제목: 뇨 중 Estrone-1-Sulfate를 이용한 돼지 임신진단키트 개발 및 활용
- 내용: 이미 출원된 특허의 내용을 수정, 보완하여 출원할 계획임.

출원할 특허의 내용은 다음과 같다.

Anti-E1G antibody인 Clone 155가 E1S와 E1G 모두에 cross reactivity를 가지고 있음에 근거하여 임신과 비임신 돼지 뇨 내 E1S 농도를 정하고 이를 이용하여 키트를 개발, 활용할 경우 이전의 임신진단 방법에 비해 시간이 절약되어 산업적인 가치가 클 것으로 기대됨.

(2) 면역분석법에 대한 특허

- 현재 진행 중인 특허 (2009년 11월 중 출원 완료 가능)
- 대상국: 일차 국내 출원 후 자료 보완하여 국외도 출원할 계획임.
- 제목: 뇨 중 Estrone-1-Sulfate를 측정할 수 있는 ELISA 법을 이용한 돼지 임신진단법 개발
- 내용: 임신한 돼지 뇨 속의 E1S 최저 농도를 기준으로 다수의 실험실에서 쉽게 할 수 있는 ELISA 법을 이용하여 쉽고 빠르게 돼지의 임신 여부를 알 수 있어 산업적인 가치가 클 것으로 기대됨.

나. 논문발표

게재 연도	논문명	저자			학술지 명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주 저자	교신 저자	공동저자				
2007	Development and evaluation of time-resolved fluorescence immunoassay for Estrogen-1-sulfate in urine as a tool for diagnosis of early pregnancy in swine.	Seung Hoon Yang	Jong Bae Kim	Sung Min Park, Yong Su Park, Se Joong Kim, Hoe Yune Jung, An Na Lee	대한수의학회지	47(1)	국내	
2008	Development and evaluation of a time-resolved fluorescence immunoassay for estrone-1-sulfate in urine as a tool for diagnosis of early pregnancy in swine	Young Soo Park	Jong Bae Kim	Sung Min Park, Seung Hoon Yang, Se Joong Kim	Reproduction, Fertility and Development	20(1) 139-139 2008	국외	
2008	Development of TR-FIA for the measurement of urinary Estrone-1-sulfate (E1S) and its application to the early pregnancy test	Young Soo Park	Jong Bae Kim	Sung Min Park, Seung Hoon Yang, Se Joong Kim, Yoon Taek Joon	Journal of Reproduction and Development	등재 대기 중	국외	0

2. 최종 결과들을 토대로 발표할 주요 논문 제목

1) 한우 뇨의 단백질 패턴에 대한 논문

Define the protein patterns of bovine's urine

2) 한우뇨의 스테로이드계 호르몬 대사산물 연구

Investigation on metabolism products of steroid hormone in bovine's urine

3) 돼지뇨의 다양한 호르몬 대사산물에 대한 연구

Investigation on various metabolism products of hormone in swine's urine

4) TNF-a의 TR-FIA법 개발

Development of a time-resolved fluorescence immunoassay(TR-FIA) for the measurement of TNF-a

5) Insulin의 TR-FIA법 개발

Development of a time-resolved fluorescence immunoassay(TR-RIA) for the measurement of insulin

6) 한우뇨 PG 측정에 대한 논문

Development and evaluation of Pd-3-G urine for diagnosis of early pregnancy in bovine

7) 돼지 임신 진단 키트의 개발에 대한 논문

Development of the pregnancy test kit for swine to applicate on the early pregnancy test by measurement of urinary Estrone-1-sulfate (E1S)

2. 활용방안

가. 활용가능 분야

(1) 돼지 임신 진단 키트 개발

본 연구를 통해 돼지 뇨중의 PG와 E1S 및 E1G를 측정할 수 있는 TR-FIA법을 개발하였다. 이 성과를 바탕으로 돼지의 임신 진단 키트를 개발하는데 성공 하였다. 현재 돼지의 임신 진단 키트는 세계적으로도 아직 개발되었다는 보고가 없으며, 이 제품이 시판 될 경우 그 전망은 매우 밝을 것으로 사료된다. 더욱이 이 제품으로 인해 국내 진단 키트 개발 기술 및 노하우가 국제적 경쟁력을 갖출 것이며 또한 이 분야의 국제적인 경쟁에서 우위를 점할 수 있는 좋은 연구 성과라고 사료된다.

따라서 본 연구의 결과를 기반으로 하여 돼지 임신 진단 키트의 단점을 보완하여 2009년 내에 산업화 시키고 점차 이를 확대 하여 국내 농가에 돼지 임신진단용 키트를 보급함을 목표로 한다.

(2) 다른 스테로이드 대사산물을 이용한 한우 임신진단법 개발

본 연구과제의 수행에 있어서 가장 큰 애로 사항은 한우 오줌 속의 단백질 중 임신과 미 임신을 구분 할 수 있는 물질을 찾아 내지 못하였다는 점이다. 2-D전기영동을 이용하여 임신과 미 임신의 오줌 속 단백질의 차이점을 발견해 내지 못하였다는 점은 아쉬운 부분이다. 하지만 한우 뇨의 스테로이드 호르몬 대사산물의 연구와 여태까지 연구된 적이 없는 한우 뇨의 단백질 패턴의 분석은 비록 임신/비 임신을 구분 짓는 기준은 되지 못했지만 상당히 큰 의미가 있다고 사료된다.

현재 개발된 Proteomics분야의 신 기법들을 활용하여, 향후 소 임신 진단 개발을 위한 스테로이드 계열의 표적 호르몬 물질 연구가 현재 계획 중에 있다. 돼지 임신 진단 키트와 마찬가지로 소 임신 진단 키트 또한 표적 물질만 정해 질 시에, 본 연구기관의 기술과 노하우를 활용하여, 우수한 품질의 제품개발이 이루어 질 것이라고 사료된다.

(3) 각종 질병 및 암 의 진단 키트 개발

본 연구의 가장 큰 장점은 응용범위가 매우 넓다는 점이다. 본 연구의 결과를 활용 할 수 있는 분야는 특히 암 및 각종 질병을 진단하는 키트 생산이 있다. 삶의 질이 향상됨에 따라 건강에 대한 관심이 급증 하고 있다. 암 진단 및 각종 질병을 진단하는 키트 생산에 본 연구의 기술 적용이 가능하다. 간편하게 질병을 진단 할 수 있는 키트를 제작함으로써 질병을 초기에 진단 할 수 있으며, 이에 따른 소비는 꾸준히 발생 할 것 이라고 사료된다. 또한 암을 포함한 기타 질병의 예방 또는 치료약 개발 연구에 대한 자극 효과를 기대할 수 있다. 따라서 본 연구과제는 진단 시약 제조 분야 중에서도 매우 전망이 밝은 사업 중의 하나이며, 획기적인 사업이 될 수 있을 것으로 사료된다.

특히 2009년 말 본 연구 기간과 이스라엘 봐이즈만 연구소의 Kohen 교수 연구팀과 Zeff 교수 연구 팀과의 국제 공동 연구의 일환으로 광우병 진단법 개발을 계획 중에 있다. 본 연구가 향후 진행될 연구에 기술 및 경험의 측면에서 큰 도움을 줄 수 있을 것으로 사료 된다.

(4) 키트 외 ELISA법으로 실제 농가 서비스

본 연구 결과를 토대로 키트를 이미 제조한 (주)레피젠과 참여기업인 (주)미슬

바이오텍은 공동으로 키트 제조 연구에 착수하여 더욱 감도가 좋고 발색이 확실한 키트 개발을 하고, 이를 사업화하여 실제 농가에 서비스할 것이다. 먼저 엘라이자나 델피아 시스템으로 농가의 임신 진단 판별 서비스를 우선적으로 실시할 것이다. 다음해인 2010년에는 키트 개선 연구에 성공하여 사업화 할 수 있을 것으로 기대한다.

3. 산업화 계획 방안

- 돼지 임신 진단 키트

• 관련회사

(주)미슬바이오텍 : 본 과제 참여회사

(주) 레피젠 : 협력 업체로서 공동 개발하기로 협약을 체결하였음.

• 시기 : 현재 개발된 임신 진단 키트를 활용하여 실제 농가가 소유한 소의 임신 진단 여부를 실험 한 이후 2009년 후반부에 산업화가 될 수 있도록 추진할 계획임.

•제품내용 : 일차 돼지 임신에 대한 진단 키트를 산업화 하며, 추후 이 결과에 의거하여 다른 진단용 키트의 개발에 활용할 계획임.

- 한우 임신 진단 키트

확보된 시료를 이용해 다른 스테로이드 호르몬을 조사하여 임신/비임신 판별이 가능한 물질을 찾고 키트 개발에 착수 할 계획임.

• 돼지 임신 진단 키트 개발과 같은 내용으로 개발할 계획임.

• 관련회사

(주)미슬바이오텍

(주) 레피젠

이스라엘 Kohen교수 산하 연구 팀과도 협력할 계획임.

• 특히 스테로이드 계열의 호르몬류 를 표적 물질으로 연구하며, 이에 따른 기초적인 자료를 확보 할 시 획기적인 제품으로 활용될 수 있을 것으로 확인 되는 바 집중적으로 투자, 개발 할 것임.

4. 전망

본 연구에서 개발된 돼지의 임신 진단 키트는 산업적인 측면뿐만 아니라, 농가 소득에 절대적인 기여를 할 수 있는 제품으로 사료된다. 혈액 내 호르몬에 대한 연구는 많이 되어 있으나 동물의 뇨중 호르몬 대사산물에 대한 연구는 많지 않으며, 돼지의 임신진단을 위한 E1S측정은 외국에서 다소 수행되고 있으나 국내는 전무하다. 현재 돼지의 임신 진단 키트는 세계적으로도 아직 개발되었다는 보고는 없었다. 이 제품이 시판 될 경우 그 전망은 매우 밝을 것으로 사료된다. 더욱이 이 제품으로 인해 국내 진단 키트 개발 기술 및 노하우가 국제적 경쟁력을 갖출 것이며 또한 이 분야의 국제적인 경쟁에서 우위를 점할 수 있는 좋은 연구 성과라고 사료된다.

돼지 임신 진단 키트는 현재 돼지를 사육하는 농가의 소득에 절대적인 기여를 할 수 있을 것이라고 사료된다. 돼지의 공태기를 30일 단축함으로써 10마리당 년 1마리 이상의 산자를 얻는 효과를 기대 할 수 있으며, 성공 시 연간 30억 원 이상의 매출 효과를 기대 할 수 있다.

본 연구의 가장 큰 장점은 응용범위가 매우 넓다는 점이다. 본 연구의 결과를 활용 할 수 있는 분야는 특히 암 및 각종 질병을 진단하는 키트 생산이 있다. 삶의 질이 향상됨에 따라 건강에 대한 관심이 급증 하고 있다. 암 진단 및 각종 질병을 진단하는 키트 생산에 본 연구의 기술 적용이 가능하다. 간편하게 질병을 진단 할 수 있는 키트를 제작함으로써 질병을 초기에 진단 할 수 있으며, 이에 따른 소비는 꾸준히 발생 할 것 이라고 사료된다. 또한 암을 포함한 기타 질병의 예방 또는 치료약 개발 연구에 대한 자극 효과를 기대할 수 있다. 따라서 본 연구과제는 진단 시약 제조 분야 중에서도 매우 전망이 밝은 사업 중의 하나이며, 획기적인 사업이 될 수 있을 것으로 사료된다.

SUMMARY

1. **Title of project:** Development of TR-FIA kit for pregnancy test of swine and cows by urinary steroid metabolites measurement and their Utilization.

2. **Key words:** Monoclonal antibody, TR-FIA. Pregnancy test, urinary metabolite

3. **Institute:** Handong Global University

4. **Project Leader:** Kim Jong Bae

5. **Associated Company:** Mistlebiotec Ltd.

6. **Project period:** 2006.4 ~ 2009. 4

7. **Abstract:**

Early diagnoses of pregnancy for animal, which are swine and bovine, have an effect on an increase income of a farmhouse by stock of productivity. In addition, the technology relative to this diagnosis can apply to other diagnosis of disease or study of life science. We can analysis various hormones and trace elements by development and application of a new immunoassay, DELFIA. Measurement of urinary E1S concentration by the immune assay helps to make early diagnosis of pregnancy test kit and industrialization of them. Moreover we also can exam changes on metabolism of urine between pregnant and non-pregnant bovine then expect the technical development for an early diagnosis of bovine pregnancy. In particular a development of early diagnosis of pregnancy test kit for swine is the first time. By using kit, everyone can decide a probability of pregnancy is one of the main purposes of this investigation and have a plan to industrialization of kit in one to two years. We expect that by this result can make million dollars of income in a year.

CONTENTS

Chapter 1 : Summary of Project.....27

1. Purpose.....27

(1) Yearly planning : aims and research contents.....27

(2) Necessity of the project.....28

Chapter 2 : State-of the-art researches.....32

1. State and problems associated related techniques.....32

(1) Technology level and trends in domestic country.....32

(2) Research status in domestic country.....32

(3) Research status in foreign countries.....33

Chapter 3 : Research Contents and Results.....35

1. 1st project 35

(1) Aim, content and criteria of researches.....35

(2) Methods.....38

o 1st year 38

1) Purpose.....38

2) Antibody's specificity.....38
3) Development of a TR-FIA for the measurement of PG, E1G, E1S.....39
4) Secure urines of swine and bovine.....40
5) Measurement of PG, E1G and E1S in urine after insemination.....40

o 2nd year 41

1) Purpose 41
2) Development of ELISA to make the early pregnancy test kit 41
3) Set the standard level of bovine and swine to decide pregnancy 42
4) Development of quantitative analysis to make pregnancy test kit 43
5) Measurement of urinary E1S after insemination.....43
6) Development of bovine pregnancy test kit using 2D.....43

o 3rd year 44

1) Purpose.....44
2) Evaluation of developed TR-FIA.....44
3) E1S-BSA conjugation and set of adhesion condition.....46
4) Anti-E1S antibody tagged gold particle and specificity test.....47
5) Set the conditions to make pregnancy test kit.....47
6) Development of early diagnosis of pregnancy test kit in bovine.....48

(3) Results.....49

o 1st year results.....49

1) Investigation properties of antibody.....49
2) Development of TR-FIA to measurement of E1G.....59
3) Development of TR-FIA to measurement of E1S.....63
4) Development of TR-FIA to measurement of PG.....65
5) Application of TR-FIA in urine.....67

6) Secure urine of swine and bovine.....76
7) First decision of pregnancy using standard curve.....92

o 2nd year results.....96

1) Set a condition and a recovery test of new antibody and conjugate.....96
2) Development of quantitative analysis to make pregnancy test kit.....108
3) Measurement of E1S in swine's daily urine after insemination.....112
4) Set the standard level of bovine and swine to decide pregnancy.....113
5) Analysis of E1S concentration of sexual excited swine.....114
6) Measurement of PG in bovine's daily urine after insemination.....115
7) Development of early diagnosis of pregnancy test kit in bovine using 2D electrophoresis.....116

o 3rd year results.....121

1) Blind test on grouped samples.....121
2) Accuracy test depend on dilution rate.....132
3) Development and improvement of ELISA.....135
4) Differentiation between 0.45um filtered and unfiltered samples.....138
5) Measurement of E1G in pregnant swine.....140
6) E1G-BSA conjugation to make early diagnosis of pregnancy test kit.....143
7) E1G-CASEIN conjugation to make early diagnosis of pregnancy test kit.....146
8) Development of early diagnosis of pregnancy test kit.....149
9) Accuracy of diagnosis of pregnancy test.....160
10) Production of polyclonal anti-E1G antibody and establishment of the immunoassay.....173
11) Use a commercial monoclonal anti-E1G antibody to establishment of the immunoassay.....178
12) Re-investigation of 2D electrophoresis of bovine's urine.....184
13) Investigation of various hormones in bovine's urine.....187

* Application investigation.....195

(1) Development and evaluation of various immunoassay applied TR-FIA.....195

2. 2nd year project.....206

(1) Aim, content and criteria of researches.....206

(2) Methods.....206

1) Purpose: Development and evaluation of ELISA to make early pregnancy test kit.....206
2) Development of ELISA to measure urinary E1S.....206
3) Comparison between DELFIA and ELISA.....207
4) Set the standard curve by ELISA.....207
5) Differentiation of quantitative analysis results between ELISA and DELFIA.....207

(3) Results.....207

o 2nd year 207

1) Development of ELISA to measure urinary E1S.....207
2) Differentiation of quantitative analysis results between ELISA and DELFIA.....214
3) Standard curve from ELISA using urine.....215
4) Differentiation of quantitative analysis results in urine between ELISA and DELFIA....217

Chapter 4 : Rating of achievement and contribution to the related fields 220

1. Achievement based on the original aims of research and points of evaluation.....220

(1) 1st year.....220

(2) 2nd year.....221

(3) 3rd year.....222

2. Contribution to the related fields.....222

(1) Basic research field on diagnosis of pregnancy test.....222

(2) Contribution to the related technology.....224

Chapter 5 : What to do with results obtained through carrying out the project : planning of application for the industrilization.225

1. Necessity of further study.....225

2. Application to the other fields.....225

3. Direction of industrilization.....226

Chapter 6 : Technical information corrected from abroad during carrying out the project.....228

1. Measurement of urinary Estrone sulphate by immunoassay.....228

2. Development of Time-resolved fluoroimmunoassay using europium conjugation.....228

3. Information for development of early diagnosis of pregnancy test kit.....229

Chapter 7 : Reference.....230

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....27

제 1 절 연구목적.....27

1. 연차별 연구개발 목표와 내용.....27

가. 1차년도.....27
나. 2차년도.....27
다. 3차년도.....27

2. 연구개발의 필요성.....28

가. 경제적인 중요성.....28
나. 산업적인 중요성.....28
다. 학문적인 중요성.....28
라. 기술적인 중요성.....28
마. 연구개발의 필요성.....29

제 2 장 국내외 기술개발 현황.....32

제 1 절 국내, 외 관련기술의 현황과 문제점.....32

1. 국내의 기술동양 및 수준.....32

가. 세계적 수준.....32
나. 국내수준.....32

2. 국내의 연구현황.....32

가. 동물 임신진단 분야.....32
나. 면역분석법 분야.....33
다. Steroids 호르몬 대사산물(metabolites)에 관한 연구.....33

3. 국외의 연구현황.....33

가. 임신진단 분야.....33
나. 면역분석법 분야.....33
다. Steroids 호르몬 대사산물에 관한 연구.....34

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....35

제 1 절 제 1 세부과제.....35

1. 세부과제 목표 및 내용.....35

2. 연구개발 방법.....38

o 1차년도 (2006).....38
가. 목표.....38
나. 항체의 특성 조사.....38
다. PG, E1G, E1S 측정을 위한 면역 분석법(TR-FIA) 개발.....39
라. 한우 및 돼지뇨 확보.....40
마. 수정 후 한달간 매일의 오줌 내 PG 및 E1G, E1S 측정 분석.....40

o 2차년도 (2007).....41
가. 목표.....41
나. Kit(키트) 개발을 위한 ELISA 법 개발.....41
다. 한우 및 돼지 임신/비임신 기준치 설정.....42

라. 키트 개발을 위한 실제뇨에서의 정량법 확립.....43
마. 수정 후 한 달 간 매일의 오줌 내 E1S 측정.....43
바. 2D를 이용한 한우뇨 임신진단법 개발.....43

o 3차년도 (2008).....44
가. 목표.....44
나. 개발된 TR-FIA 법에 대한 평가.....44
다. E1S-BSA 합성과 피복조건 확립.....46
라. E1S에 대한 항체에 금입자를 표지시킨 conjugate 합성과 이들의 특성 조사를 통한 첨가량 결정.....47
마. 키트 제조를 위한 조건 확립.....47
바. 한우뇨 임신진단 방법 개발.....48

3. 연구개발 내용 및 결과.....49

o 1차년도 (2006).....49
가. 항체의 특성 조사.....49
나. E1G 측정을 위한 면역분석법 (TR-FIA)개발 및 평가.....59
다. E1S 측정을 위한 면역분석법 (TR-FIA)개발 및 평가.....63
라. PG 측정을 위한 면역분석법 (TR-FIA)개발 및 평가.....65
마. 실제뇨에서의 TR-FIA법 적용.....67
바. 한우 및 돼지뇨 시료 확보.....76
사. 표준적정곡선을 이용한 임신/비임신 판별 여부 1차.....92

o 2차년도 (2007).....96
가. 새로운 항체, 컨쥬게이트 조건 설정 및 Recovery Test.....96
나. 키트 개발을 위한 실제뇨에서의 정량법 확립.....108
다. 수정 후 매일의 돼지 오줌 시료 내의 E1S 측정.....112
라. 돼지 임신/비임신 진단 기준치 설정.....113
마. 발정 중 돼지뇨 샘플의 E1S 농도 분석.....114
바. 한우 수정 후 매일의 PG 농도 측정.....115
사. 2D를 이용한 한우뇨 임신진단법 개발.....116

o 3차년도 (2008)....121
가. 확보된 시료의 그룹별 블라인드 테스트....121
나. Dilution rate 차이에 따른임신 판별 정확도 테스트....132
다. ELISA법 개발 방법 개선....135
라. 0.45um 필터 전, 후 샘플 정량값 차이점 조사....138
마. 임신 돼지뇨에서 E1G 함량 조사....140
바. 임신진단 키트를 위한 E1G-BSA Conjugation....143
사. 임신진단 키트를 위한 E1G-CASEIN Conjugation....146
아. 임신진단 키트 개발....149
자. 임신/비임신 진단 정확도와 안정성 평가 조사....160
차. Polyclonal anti-E1G Antibody 생성 및 면역분석법 확립....173
카. Commercial Monoclonal Anti-E1G Antibody를 이용한 면역분석법 확립....178
타. 한우뇨 2D 실험 재실시 및 단백질 확인....184
파. 한우뇨의 다른 호르몬 대사산물(E1S) 조사....187

* 응용 연구....195
가. 델피아 법을 적용한 다양한 Immunoassay 법 개발 및 평가....195

제 2 절 제 2 세부과제....206

1. 세부과제 목표 및 내용....206

2. 연구개발 방법....206
가. 목표: 키트 개발을 위한 ELISA법 개발 및 평가....206
나. 시료내의 E1S 측정을 위한 ELISA법 개발....206
다. E1S 측정 가능한 두 정량 시스템 DELFIA와 ELISA법 비교....207
라. ELISA법의 실제뇨를 이용한 표준적정곡선 작성....207
마. ELISA법으로 실제뇨 샘플 정량 결과값과 DELFIA법과의 정량값 비교....207

3. 연구개발 내용 및 결과....207

o 2차년도 (2008)....207
가. 시료내의 E1S 측정을 위한 ELISA법 개발....207
나. E1S 정량법에서 DELFIA와 ELISA의 비교....214
다. ELISA법에서 실제뇨를 이용한 표준적정곡선....215
라. ELISA법으로 실제뇨 샘플 정량 결과값과 DELFIA법과의 정량값 비교....217

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도....220

제 1 절 연도별 연구 목표 및 달성도....220

가. 1차년도....220
나. 2차년도....221
다. 3차년도....222

제 2 절 관련분야 기술 발전에의 기여도....222

가. 임신 진단법에 관한 기초 연구 분야....222
나. 기술에의 기여도....224

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획....225

제 1 절 추가연구의 필요성....225

제 2 절 타 연구에의 응용....225

제 3 절 기업화 추진 방향....226

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보....228

제 1 절 면역분석법을 통한 돼지뇨 내의 Estrone sulphate의 정량....228

제 2 절 Europium conjugation을 이용한 Time-resolved fluoroimmunoassay법 개발.228

제 3 절 조기 임신 진단을 위한 키트 개발에 관한 정보.....229

제 7 장 참고문헌.....230

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구 목적

1. 연차별 연구개발 목표와 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
1차년도	2006	• 성공적 연구를 위한 연구기반 확립 • 면역분석법 (TR-FIA법)개발을 위한 적정조건 확립 • 한우 및 돼지 시료 수거 : 2차년도 연구 준비	1) 연구추진계획 확립, 2) 기기(DELFIA-1232M) 작동시험 3) 면역분석법(TR-FIA법) 개발을 위한 적정조건 확립 -표준곡선 작성 -sensitivity 조사 -조사반응 정도 조사	1) PG, E1G 단일클론 항체 특성 조사 2) PG측정을 위한 TR-FIA 법 개발 3) E1S측정을 위한 TR-FIA법 개발 4) E1G측정을 위한 TR-FIA법 개발
2차년도	2007	• 수정후 오줌내 PG (소)와 EiS(돼지)측정을 통해 수준변화 조사와 임신/비임신 진단 기준치 설정 • Kit(키트) 개발을 위한 ELISA 법 개발	1) 돼지 및 소(한우)에 있어서 난소기능별 PG, E1G 및 E1S 농도 결정 -발정중,비임신기간 중, 임신시 PG, E1G 및 E1S 측정 분석 -난소 질병시 PG, E1G 및 E1S 수준 변화 조사	1) 수정후 한달간 매일의 오줌내 PG, E1G 및 E1S 측정 2) 전체 자료 분석 : 한우 및 돼지 각각 최소한 500두 이상 분석,
3차년도	2008	• 비임신/임신진단 키트 개발과 평가 • 사업화를 위한 기반 조성	1) 키트제조를 위한 조건 확립 2) 비임신/임신진단 정확도, 안정성 등 평가 조사	1) PG-BSA 및 E1S-BSA합성과 피복 조건 확립 2) PG와 E1S에 대한 항체에 금입자(gold particle)를 표지시킨 conjugate 합성과 이들의 특성 조사를 통한 첨가량 결정

2. 연구개발의 필요성

가. 경제적인 중요성

- 공태기를 1개월만 줄일 수가 있다면 10마리당 1마리 이상의 산자를 얻는 효과를 가질 수 있기 때문에 가임소 100만두(한우80만두+젖소20만두)일 경우 연간 10만두가 더 생산되며 이로 인해 연간 2000 억 원 이상의 소득을 증가시킬 수 있다.
- 가축의 임시진단만으로도 연간 30억 원 이상의 매출을 갖는 기업을 창출할 수 있다.
- 한우의 생산성 증대방안의 시급성과 농가소득의 비중 면에서 매우 중요.

나. 산업적인 중요성

- 본 과제에 적용하는 기술은 암 진단 등 각종 진단용 키트 생산에 적용되는 기술이기 때문에 산업적으로도 매우 중요하다.
- 사람의 임신진단의 경우 국내만 년 200억 원 이상의 시장이며 각종 암까지 포함시킬 경우 수천억 원 이상의 시장이다. 따라서 본 연구를 통해 확보될 수 있는 기술은 매우 중요하다.

다. 학문적인 중요성

- 혈액 내 호르몬에 대한 연구는 많이 되어 있으나 동물의 뇨중 호르몬 대사산물에 대한 연구는 많지 않다. 특히 임신진단에 있어 한우 및 젖소의 뇨중 PG의 농도변화에 대한 연구는 전무하다. 또한 돼지의 임신진단을 위한 E1S측정은 외국에서 다소 수행되고 있으나 국내는 전무하다.

라. 기술적인 중요성

- 면역분석법중 ELISA법은 어는 정도 보편화 되어 있으나 TR-FIA는 국내에서 전무할 정도로 첨단기법임. 더욱이 암 진단등 임상병리와 CTL등 세포생물학 연구등 다양하게 응용될 수가 있어 기술확보차원에서 매우 중요하다.
- TR-FIA법의 필요성과 장점 : 비방사성 물질로 가장 널리 사용되며 그 효용성이 인정되는 방법임. 특히 비방사성이기 때문에 폐기물처리 건강위해성등의 문제가 없을 뿐만 아니라 민감도와 안정성이 가장 좋은 방법이다.

마. 연구개발의 필요성

– 한우 사육의 중요성

동물의 임신과 분만은 바로 생산을 의미하는 것으로 이는 동물의 경제성 평가에 기준이 되는 척도가 된다. 90년대만 하더라도 축산농가의 최대 수입원은 젖소로부터 우유를 생산하는 것이었다. 그러나 2000년대에 들어와서 WTO체제와 수입개방 압력으로 인해 축산농가의 생산 패턴(pattern)에도 변화가 일기 시작했다. 즉 젖소 중심에서 한우 중심으로 변하여 최근에는 젖소 두 수보다 오히려 한우 두수가 더 많아지고 송아지 가격에도 2배 이상의 차이가 나고 있어 축산농가에서의 한우의 중요성은 매우 커지고 있다. 그러나 한우에 대한 내분비학적인 연구는 젖소에 비해 상대적으로 미약한 점이 사실이다.

– 가축의 조기 임신/비임신 진단 방법 개발의 중요성

인공수정 후 임신/비임신 진단을 빨리 진단하면 할수록 임신과 다음 임신까지의 기간을 축소할 수가 있고 이는 농가의 소득과 직결되기 때문에 매우 중요하다. 1990년대 이전까지는 한우의 경우 임신 여부를 진단하기 위해 한우를 수정 또는 교배시킨 후, 50 내지 60일 경과한 상태에서 수의사가 직접 직장검사로 한우의 임신 감정을 판단하는 방법에 전적으로 의존하였다. 그러나 이 방법은 수정 후 50 내지 60일이 경과했을 때, 확실한 임신 여부를 판단할 수 있기 때문에, 만약 이때에 임신이 되지 않은 것으로 판정이 되면 다시 수정 절차를 거쳐야 하는 번거로움이 있을 뿐만 아니라 이런 공태기로 인해 막대한 손실을 입게 된다. 즉 만약 20일 경에 비임신/임신 진단을 할 수 있다면 30일 이상의 <u>공태기간</u>을 줄일 수가 있어 생산성을 증가시킬 수가 있다.

이와 관련하여 1990년대 이후부터는 과학의 발달로 한우의 수정 적기, 조기임신 및 번식장애를 감정할 수 있는 방법들이 속속들이 개발되고 있는바, 그 일례로 초음파진단기를 이용한 임신 진단법이 이용되고 있지만 고가의 장비를 필요로 한다는 점에서 사용에 제한이 있다. 여전히 보다 간편한 방법개발의 필요성이 요구된다.

이를 위한 방법으로 주로 ELISA법에 기반한 발색반응을 적용한 키트개발이 그 주를 이루고 있다. 시료는 혈액과 우유(젖소의 경우)가 대부분이다. 그러나 한우의 경우 우유가 어렵고 일반적으로 혈액채취에 번거로움이 있어 키트 자체개발의 어려움 보다는 어떤 시료를 사용하며 어떤 물질을 표적으로 하느냐가 더 중요한 연구 대상이 되었다.

<u>대안으로 제시된 것 둥의 하나가 오줌 속에 존재하는 steroids 호르몬의 대사산물 즉 PG와 E1S 또는 E1G를 측정하는 방법개발</u>이었다. 돼지의 경우 E1S를 측정함으로서 조기에 임신을 진단할 수 있다는 근거가 제시되었지만(Stefanakis등, 2000) 아직 키트가 개발된 경우는 없었고 더욱이 소의 경우 오줌 내에 있는 PG와 E1G에 대한 연구는

거의 없다. Progesterone측정 대신에 PG측정으로도 가능할 것이라는 사실은 대부분 인정하면서도 근거 자료를 제시한 경우는 거의 없다. 이런 측면에서 본 연구의 의의는 크다고 사료된다.

돼지의 임신 또는 비임신을 조기에 진단하는 것은 생산성 증진에 중요한 요인이 된다. 돼지에 있어서 임신진단을 위한 가장 보편적인 기본은 교배 또는 수정 후 18-24일째 발정의 징후가 없는 경우를 바탕으로 하고 있다. 수퇘지로서 검사할 시 정확도는 98%까지 도달한다고 하지만 검사자에 따른 개별차가 많아 주관적 판단과 경험에 의존할 수밖에 없는 단점이 있다. 도플러(Doppler)방법 또는 A-mode의 초음파를 사용한 방법은 점차 그 이용도가 증가되고 있다. 그러나 그 정확도가 임신돈일 경우 97%까지 비임신일 경우 80-85%까지 정확도를 보이고 있지만 이들의 이용은 교배 후 최소한 35일 후가 되어야 한다는 단점이 있어 사용의 제한이 있다.(Meredith 1989, Pig News Inf. 10. 4770480). Real-time B-mode 초음파방법은 정확도도 더 높고 교배 후 16-20일경에 진단을 할 수 있어 모든 단점을 극복할 수 있지만 고가의 장비를 사용해야 한다는 문제점이 있어 널리 사용하기에는 문제점이 있다. 이런 문제점들을 극복하기 위하여 많은 연구자들은 혈액내 프로제스테론(progesterone)이나 에스트르원 설페이트(oestrone sulphate = E1S)를 측정하는 방법을 적용하였다. 그러나 혈액내 프로제스테론을 측정하는 방법의 단점은 발정주기가 짧아지거나 길어질 때 위양성(false positive)의 빈도가 많아지는 문제점이 있다. 이에 반하여 교배 후 23과 30일경에 혈액내 E1S측정하는 방법은 임신진단에 있어서 더 좋은 정확도를 나타내었다. 이에 기초하여 혈액 내 E1S측정은 돼지의 조기 임신진단이나 수태조절을 위한 한 방법법의 하나로 사용되어 왔다. 그러나 이 방법을 농가에서 상용적인 방법으로 사용하는 데는 많은 제한점이 있음이 지적되어 왔는데 가장 큰 요인은 혈액 채취가 용이하지 않다는 점이다.

따라서 본 연구에서는 오줌 내의 E1S를 측정함으로써 돼지의 임신을 진단할 수 있는 키트 개발이란 궁극적인 목적 달성을 위하여 먼저 E1S를 측정할 수 있는 면역분석법 즉 TR-FIA법과 ELISA법을 개발하고 이 방법으로 다양한 경우의 시료들을 분석하여 돼지의 임신진단을 위한 기준을 설정할 것이며 이를 바탕으로 돼지의 임신을 진단할 수 있는 간단한 키트를 개발하고자 한다.

- 면역분석법 개발에 관한 연구

면역분석법이라면 Radioimmunoassay(RIA)가 대표적이지만 이는 방사성 물질을 사용해야 한다는 문제점이 있어 비방사성을 이용한 면역분석법이 많이 연구되어 활용되고 있다.(Kim, 박사학위논문, 1983, 김종배, 2002). 비방사성 물질을 이용한 면역분석법

(non-isotopic immunoassay)으로 현재 가장 널리 사용되고 있는 것으로는 효소를 이용한 ELISA, 본인이 개발한 화학발광체를 이용한 chemiluminescence immunoassay(CIA) 그리고 가장 최근에 유럽등지에서 널리 이용되고 있는 TR-FIA이다.

- TR-FIA법의 장점

*TR-FIA란?: FITC와 같은 일반적인 형광성 물질들은 시료내 형광성 물질들과 excitation 파장(wave length)과 emission 파장에 차이가 없어 signal에 많은 장해가 된다. 따라서 시료를 추출을 해야 하는 번거로움이 있다. 그러나 La, Eu, Sm, Tb, Lu와 같은 란탄족 원소(lanthanoid:일명 희토류로도 불린다)는 독특한 형광성을 갖는다.(Soini & Kojoia, 1983). 즉 다른 형광물질과는 전혀 다른 파장을 갖으며 Stokes' shift가 매우 커서 방해물질들과 확연히 구분될 뿐만 아니라 형광성을 발할 때 파장이 일반과는 매우 길어서 일정한 시간대를(time-resolved) 적분해서 반복적으로 측정이 가능해 signal이 증폭되어 감도가 증진될 수가 있는 장점이 있다. (그림1 참조)

*장점: 측정단위가 ELISA처럼 OD가가 2이하의 수로서 전체를 구분해야한다면 이 경우 백만단위 이상으로서 측정이 되기 때문에 농도간의 차이가 확연히 달라 정확도를 증가시킬 수가 있다, 특히 오줌을 시료로 할 경우 오줌내에 존재하는 반응을 방해하는 여러 이물질들의 영향으로부터 벗어날 수 있어 보다 정확한 측정이 가능하다는 장점이 있으나 아직 국내에서는 이 방법이 잘 알려져 있지 않아 사용에 제한되어 있지만 유럽등지에서는 매우 보편화 되어 있고 경우에 따라서는 ELISA보다 더 많이 이용되기도 한다.

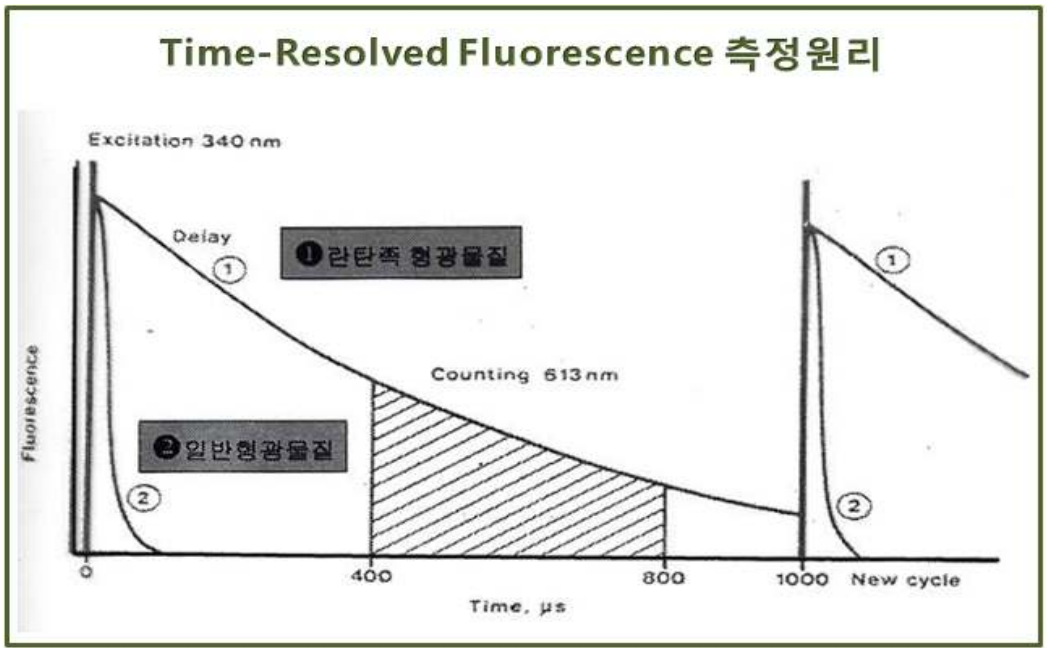


그림1. Time-resolved FIA측정 원리

제2장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내.외 관련기술의 현황

1. 국내외 기술동향 및 수준

가. 세계적 수준

개념정립 단계		기업화 단계	V	기술 안정화 단계	

나. 국내수준

- 소임신진단 : 젖소를 중심으로 한 연구는 본인(김종배)이 참여한 연구과제가 두산과의 공동연구로 장영실상을 수상한 바가 있고 (주)녹십자 상아사에서 진단용 키트까지 시판되었으나 현재는 중단된 상태임.

- 진단 키트 기술 : 사람 임신진단이 상용화 되고 있고 동물용도 시판된 사례가 있기 때문에 기술적으로는 문제가 없다고 사료됨.

- 뇨중 측정을 위한 기초 정립 : 국내에선 뇨중 대사산물에 대한 연구는 거의 미미한 실정임. 동물 번식학 차원에서 난소기능과 호르몬 대사산물과의 관련성 규명에 좋은 차료가 될 것임.

- 면역분석법 개발: 면역분석법중 ELISA법은 어는 정도 보편화 되어 있으나 TR-FIA는 국내에서 전무할 정도로 첨단 기법임. 더욱이 암 진단등 임상병리와 CTL등 세포생물하연구등 다양하게 응용될 수가 있어 기술 확보 차원에서 매우 중요하다.

2. 국내의 연구현황

가. 동물 임신진단 분야

85년-95년도 사이에는 건국대학교 동물자원 연구소 중심으로 임신진단에 관한 연구가 활발하게 이루어졌고 두산연구소에서 임신진단 키트를 개발하여 장영실 상까지 수상한

바가 있다. 그리고 그 후 녹십자 상아와 녹십자수의약품주식회사에서 “제네디아 프로 테스트”라는 소 비임신진단 키트를 개발 시판하여 오고 있으나 최근에는 거의 단절상태에 있다. 더욱이 돼지의 경우는 거의 전무한 실정이다.

나. 면역분석법(immunoassay) 분야

면역분석법을 전문적으로 연구하는 곳은 거의 전무하다. 사람의 임신진단 및 암 또는 간염진단 키트를 개발하는 일부 제약회사가 있지만 대부분 ELISA법을 적용하고 있으며 본 연구에서 추진하고자 하는 TR-FIA는 전무하다. 단 Wallac회사에서 TR-FIA를 적용한 DELFIA법을 종합병원 임상병리과에 보급하여 호르몬등 분석 목적으로 사용되고 있다. 임상에서의 TR-FIA이용의 수는 점차 증가될 것으로 예상된다.

다. Stroieds 호르몬 대사산물(metabolites)에 관한 연구

본 과제 책임연구자인 한동대학교의 김종배 교수가 박사학위 논문에서 화학발광체를 이용한 소위 ‘CIA'법을 세계 최초로 개발하여 적용한 경우 외에는 거의 전무한 실정이다.

3. 국외의 연구현황

가. 임신진단 분야

사람의 경우와 동물은 대상 물질이 전혀 다르기 때문에 방법론적인 측면에서도 다르다. 사람에 비해 동물용 진단용은 그 수요가 제한되어 있다. 특히 우리나라와는 달리 수요에 비해 공급이 충분하기 때문에 애써 가축 등에 적용하려고 하는 움직임이 크지가 않다. 그러나 소의 경우 독일등지에서는 상당히 이용을 하고 있으며 대부분 ELISA원리에 입각한 키트를 사용하고 있다. 그러나 오줌내에 있는 대사산물을 측정한 방법은 돼지의 E1S를 제외하고선 거의 전무하다.

나. 면역분석법 분야

면역분석법에 관한한 대부분 국외에서 이루어진 방법들이다. 국내 독자적인 개발은 거의 전무하다. 본 연구에서 적용하고자 하는 TR-FIA 경우 Finland(O. H. Meurman et al, 1982)에서 처음으로 개발을 하였고 본 연구의 중심인 steroids호르몬 및 대사산산물에 관한 연구는 이스라엘 와이즈만 연구소의 Fortune Kohen과 영국의 Geoff Barnard박사팀이 가장 활발히 수행하였다(첨부 참고문헌).

다. Steroids 호르몬 대사산물에 관한 연구

WHO지원으로 수행된 사람에 있어서 steroids호르몬의 측정함으로서 배란일정을 예측함으로서 임신조절을 할 수 있는 방법으로 활용하고자 시작이 되어 오줌 또는 침속에 있는 호르몬 특히 오줌 내에 있는 대사산물에 관한 연구가 수행이 된 것이 시발점이다. 이 연구를 가능하게 한 것은 대사산물에 대한 항체가 만들어지고 이것들을 이용하여 면역분석법이 개발된 것이 결정적인 계기였다. 그러나 사람에 비해 동물에 있어서는 돼지의 E1S측정 외에는 보고된 자료가 예상외로 미미하다. 따라서 본 연구의 결과가 이런 면에서 그 의미가 크다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 제 1 세부과제

1. 세부과제 목표 및 내용 (책임자: 김종배)

년도	목표	내용 및 범위	방법
1차년도 (2006)	항체의 특성조사	• 항체의 역가(titer), 특이성(specificity)등을 교차 반응정도 및 ELISA 법으로 조사	1) Hatzseradish 등의 방법에 의 거면역원으로 oestrone -3- sulphate -6- hemisuccinate -BSA 을 합성 후 Kim의 방법에 따라 항체를 생산(Kim,1983) 2) 항체의 특성도 Kim의 방법에 따라 실시하였고 항체의 역가(titer), 특이성(specificity)등을 교차반응정도로 조사하였음
	PG 측정을 위한 면역분석법 (TR-FIA) 개발 및 평가 E1G 측정을 위한 면역분석법 (TR-FIA)개발 및 평가 E1S 측정을 위한 면역분석법 (TR-FIA)개발 및 평가	• solid-phase system을 적용한 경쟁성 반응원리에 의한 분석법 • Eu-conjugate는 영국 Cambridge 수의과학연구소의 Geoff. Barnard박사로부터 제공받아 개발	1) solid-phase system을 적용한 경쟁성 반응원리로서 상기의 방법으로 생산한 항체를 일정농도 피복한 후, Sigma로부터 PG 및 E1S, E1G를 구입하여 standard로 사용하고, 영국의 Geoff로부터 제공받은 Eu-labelled된 conjugate와 경쟁을 유도하여 표준적정곡선을 정립하였음
	한우 및 돼지뇨 확보	• 임신 및 비임신뇨 확보	1) 경북축산기술연구소로부터 한우 및 돼지의 뇨를 채취하여 실시함
	수정후 한달간 매일의 오줌내 PG 및 E1G, E1S 측정 분석	• 개발된 TR-FIA에 의한 분석	1) 경북축산기술연구소에서 인공수정을 한 후, 매일 오줌을 채취하여 수정 후 PG 및 E1G, E1S를 측정하였고, 비임신/임신진단을 위한 기준치 설정과 이에 의한 비임신/임신진단 정확도 조사하였음

년도	목표	내용 및 범위	방법
2차년도 (2007)	Kit(키트) 개발 위한 ELISA 법 개발	• E1G, E1S-enzyme conjugate를 합성하여 E1G에 대한 항체를 이용한 경쟁성(competitive) solid-phase ELISA법 개발	1) E1G-enzyme conjugate 합성 2) E1G에 대한 항체를 이용한 경쟁성(competitive) solid-phase 법 개발 3) 개발된 방법에 대한 평가 (evaluation)
	한우 임신/비임신 진단 기준치 설정	• 개발된 TR-FIA법에 의한 500두 이상의 시료 분석	1) 발정 중 돼지 뇨에서의 E1S 농도 조사 2) 실제 농가의 임신/비임신뇨 판독과 이의 활용
	돼지 임신/비임신 진단 기준치 설정		
	키트 개발을 위한 실제뇨에서의 정량법 확립	• 개발된 TR-FIA 법을 이용한 시료 분석	1) 표준 적정 곡선을 이용한 임신/비임신뇨의 실제 E1S 농도 측정
	수정 후 한달간 매일의 오줌내 E1S측정	• 개발된 TR-FIA 법을 이용한 시료 분석	1) 수정 후 23일부터 30일까지의 E1S 함량 조사
	한우뇨 임신진단 방법 개발	• 2D를 이용한 한우뇨 임신진단법 개발	1) 2D를 이용한 임신/비임신뇨에서의 단백질 패턴 비교 조사

년도	목표	내용 및 범위	방법
3차년도 (2008)	키트 개발을 위한 실제뇨에서의 정량법 확립	• 개발된 TR-FIA 법에 대한 평가	1) 시료의 그룹별 블라인드 테스트 2) Dilution rate 차이에 따른임신 판별 정확도 테스트 3) ELISA법 개발 방법 개선 4) 0.45nm 필터 전, 후 샘플 정량값 차이점 조사 5) 임신 돼지뇨에서 E1G 함량 조사
	한우뇨 임신진단 방법 개발	•2D를 이용한 타겟 단백질 결정 •2D 조건을 다르게 하여 타겟 단백질 결정 •한우뇨의 다양한 호르몬 대사산물의 연구	1) 2D를 이용하여 타겟 단백질 채취 및 저장 2) 단백질 분리 조건, 2D 조건을 다르게하여 한우뇨의 단백질 패턴 분석 3) 한우뇨의 PG, E1S, E1G 수준 조사
	E1S-BSA 합성과 피복조건 확립	•E1S-BSA 합성 조건 결정 •피복 가능 여부 조사 •피복 조건 확립	1) 기존 임신진단 키트를 이용한 조건 확립 2) 각각 다른 농도로 피복 후 검사
	E1S에 대한 항체에 금입자 (gold particle)를 표지시킨 conjugate합성과 이들의 특성 조사를 통한 첨가량 결정	•금입자를 표지시킨 conjugate 합성 조건 및 농도 결정 •키트 개발을 위한 금입자 표지 conjugate 첨가량 조사	1) 금입자 표지 conjugate 제조 및 키트 개발 2) conjugate 첨가량 결정을 위한 titer 측정
	키트제조를 위한 조건 확립	•실제 키트 제조 및 시험 테스트 •키트 길이 피복 조건 첨가 시료양 설정 및 평가	1) 돼지 임신 진단 키트 제조 2) 각기 다른 조건에서의 키트 정확도 조사
	비임신/임신진단 정확도, 안정성 등 평가 조사	•실제 sample을 이용한 임상 테스트 •실제 농가 돼지 뇨를 이용한 임상 테스트	1) 보유하고 있는 샘플 500두 이상 분석 2) 실제 농가 돼지 500두 이상 분석

2. 연구개발 방법

o 1차년도 (2006)

가. 목표 ; 뇨 중 호르몬 대사산물 측정을 위한 면역분석법 개발 및 시료 확보

나. 항체의 특성 조사

1. 항체의 역가, 특이성등을 교차반응 정도 및 ELISA 법으로 조사

(1) Estrone및 Pregnanediol Glucuronide에 대한 항체 생산

Estrone및 Pregnanediol Glucuronide는 햅텐(hapten) 물질이기 때문에, 케리어(carrier)로 BSA를 컨쥬게이션시켜 Kim의 방법에 따라 항체를 생산한다(Kim,1983).

1) Polyclonal 항체 생산 방법

케리어를 컨쥬게이션 시킨 Immunogenic complex를 Freund's complete adjuvant에 유화시켜 렛트에 피하주사로 면역한다. 최초면역 14일 후에 booster면역을 하고, 약 10일 뒤 혈액을 채취하여 혈구와 혈청을 분리한 다음, protein-G affinity column(Phamacia, USA)을 이용해 IgG만 용출해내어 항체를 분리하여 사용한다.

2) Monoclonal 항체 생산 방법

앞의 polyclonal 항체를 생산하기 위해 estrone-3-glucuronide-BSA를 면역시킨 마우스와 렛트에서 비장세포를 채취하여, P3U1의 골수종을 PEG를 이용하여 융합한 다음, HAT 배지로 Hybridoma를 선별한다. 선별된 Hybridoma를 96 well plate에 well 당 1개의 Hybridoma가 되도록 분주(cloning)하고 37도, 5%의 CO2의 조건에서 Colony를 형성하며 성장할 때까지 배양한다. Colony를 형성하며 성장한 Hybridoma의 배양 상등액을 정량 실험 방법(ELISA 등)으로 측정하여 E1G에 대한 항체를 생산하는 Hybridoma를 선별(screening) 하며, BSA에 대한 Affinity가 있는 hybridoma는 골라내어 폐기시킨다. 이러한 coloning과 screening을 반복하여 E1G에 대한 높은 역가를 가지는 항체를 생산하는 Hybridoma를 선택하여 항체를 대량으로 생산하기 위해 pristane을 주입한 마우스 복강에 주입한다. 일정 시간이 지난 후 복강이 부풀어 오르면 복강에서 ascitic fluid를 빼내어, 항체의 정제를 위해 protein-G affinity

column(Phamacia, USA)에 적용하여 항체를 분리하고 사용한다.

(2) 항체 종류 및 특징

Pregnanediol Glucuronide에 대한 항체는 국내에선 전무하며, 해외 시장에서도 팔지 않은 것으로 조사되었다. 따라서 마우스(mouse)의 B 세포에서 생산된 monoclonal IgG2b type의 Pregnanediol Glucuronide에 대한 항체인 Clone 44를 이스라엘에서 받아와서 본 실험에 사용하도록 한다.

E1G에 대한 항체 또한 이스라엘에서 제공받으며 clone 8A3, clone 3F11, clone 155인 총 3종류이고, 각각 rat IgG2a, rat IgG1, mouse IgG2b subclass이다.

(3) 항체 역가 조사

각 항체별로 1:100부터 2배씩 코팅 완충용액에 희석하여 96 well immunoplate에 코팅한 후, 충분히 코팅될 수 있도록 2시간 동안 incubation하고, 이 후 non-specific binding을 제거하기 위해 2% BSA가 첨가된 생리식염수로 Blocking한다. 0.5%의 PBST(PBS+Tween20)로 washing 과정을 거친 뒤, 이 후 Eu-E1G를 첨가하여 코팅된 1차 항체와 반응하도록 한다. 이 후 Enhancement solution을 첨가한 후 DELFIA 1420으로 측정한다.

(4) 교차반응 조사

각 항체별로 E1G와 E1S에 대한 표준적정곡선(standard curve)을 작성하고, 이를 통하여 서로 간의 교차반응도를 조사한다. 1차 항체인 Clone 8A3, 3F11, 155를 코팅 완충 용액에 적정농도로 희석하여 96 well plate에 2시간 동안 37도에 반응시킨다. 그 후에 non specific binding을 최소화 하기위해 생리식염수에 2% BSA를 녹인 블락킹 솔루션을 사용하여 블락킹시키고, PBST를 사용하여 각 well을 washing시킨다. 이후 각 농도별로 희석된 E1G와 E1S와 일정농도의 Eu-E1G를 첨가하여 코팅된 1차 항체와 반응하도록 한다. 이 후 Enhancement solution을 첨가한 후 DELFIA 1420으로 측정한다.

다. PG, E1G, E1S 측정을 위한 면역 분석법(TR-FIA)개발

1. Solid-phase system을 적용한 경쟁성 반응원리에 의한 분석법

(1) Eu-conjugate 는 영국 Cambridge 수의과학연구소의 Geoff. Barnard박사로부터 제공받아 개발

(2) Conjugate 적정 농도 결정

Conjugate의 적정 농도 결정을 위하여 immunoplate에 conjugate를 1:100부터 5배씩 희석한 후, Enhancement solution을 첨가하여 DELFIA 1420으로 측정한다. 이를 통하여 1:100 희석배율 기준으로 total binding의 30%~50%의 카운트값을 적정 농도로 하는 method에 의거하여, Eu-E1G의 경우 1:2000의 희석배율로 적정 농도를 결정하여 사용한다.

(3) 항체들을 사용한 면역분석법 개발

시료속의 E1G, E1S 및 PG의 농도를 측정하기위해 각각의 1차 항체를 가지고 경쟁적 면역 분석법을 개발한다. 표준적정곡선을 그리기 위해 먼저, 코팅 완충 용액에 항체의 역가를 고려하여 적정농도로 희석하여 96 well plate에 2시간 동안 37도에 반응시킨다. 그 후에 non specific binding을 최소화 하기위해 생리식염수에 2% BSA를 녹인 블락킹 솔루션을 사용하여 블락킹시키고, PBST를 사용하여 각 well을 washing시킨다. 이후 각 농도별로 희석된 E1G, E1S 및 PG와 일정농도의 Eu-E1G를 첨가하여 코팅된 1차 항체와 반응하도록 한다. 이 후 Enhancement solution을 첨가한 후 10분 뒤 DELFIA 1420으로 측정한다.

라. 한우 및 돼지뇨 확보

1. 임신 및 비임신뇨 확보

(1) 한우뇨 시료 확보

경북축산연구소에서 소유하고 관리하는 한우를 인공 수정 시킨 뒤 그룹별로 수정 후 1일부터 300일까지 다양한 날짜의 시료와 비임신 시료를 확보한다.

(2) 돼지뇨 시료 확보

경북축산연구소가 소유하고 있는 돼지를 대량으로 인공 수정시킨 뒤 일수별로 하루에 두시간 씩 뇨를 배출하기를 기다리다가 뇨를 배출하면 50ml의 tube에 받아 -20도씨에 얼려 보관하거나 상온에 보관하여 확보한다. 또한 인터널 스텐다드 커브를 위하여 경북축산기술연구소에서 수퇘지뇨를 다량으로 받아 확보한다.

마. 수정후 한달간 매일의 오줌내 PG 및 E1G, E1S 측정 분석

1. 개발된 TR-FIA 에 의한 분석

(1) 돼지뇨에서 E1S 함량 조사

상기의 방법으로 작성되는 표준적정곡선을 이용하여 확보한 시료에 대해 임신/비임신의 여부를 판별한다. sample은 경북 축산기술연구소에서 돼지를 인공수정시킨 후 20일째부터 90일까지 날짜별로 채취한 뇨와 대조군으로 비임신뇨를 제공받아 사용한다.

먼저 96 plate에 코팅완충용액에 적당한 희석배율로 희석된 1차 항체를 코팅한다. 코팅을 잘 이루어지게 하기 위해 37도의 인큐베이터에서 2시간동안 반응시킨다. 2시간 후 plate를 직접 3번 워싱하고, non-specific binding을 최소화하기 위해 2%의 BSA로 37도에서 2시간동안 블락킹시킨다. 다시 plate를 워싱하고, 표준적정곡선을 그리기위해 다양한 농도로 일정비율로 희석된 E1S와 정량하고자 하는 시료들, 그리고 경쟁반응을 위해 conjugate인 Eu-E1G를 적정 농도로 희석하여 plate에 로딩한 후 1시간동안 상온에서 약하게 shaking 시킨다. 반응이 다 일어난 후, 다시 plate를 워싱하고 Enhancement Solution을 well당 200ul씩 넣고 상온에서 15분 동안 다시 shaking 후, 델피아 기계인 VICTOR 2D (DELFIA 1420)로 디텍션한다. 결과를 토대로 임신/비임신에 대한 기준치를 설정한다.

o 2차년도 (2007)

가. 목표 ; 수정후 오줌내 PG(소)와 EiS(돼지)측정을 통해 수준변화 조사와 임신/비임신진단 기준치 설정 및 Kit(키트) 개발을 위한 ELISA 법 개발

나. Kit(키트) 개발을 위한 ELISA법 개발

1. E1G,E1S-enzyme conjugate를 합성하여 E1G에 대한 항체를 이용한 경쟁성 solid-phase ELISA법 개발

(1) Eu-labelled conjugate(Eu-E1G)의 적정 농도 결정

영국의 Geoff Barnard 박사로부터 새로이 제공받은 conjugate의 적정 농도 결정을 위하여 immunoplate에 conjugate를 1:100부터 2배 또는 5배씩 8번의 Sserial dilution한 후, Enhancement solution을 첨가하여 DELFIA 1420으로 측정한다. Conjugate의 적정 농도 그래프를를 토대로 적정농도를 결정하여, 이 희석배율을 standard curve작성이나 시료분석에 적용한다.

(2) 새로받은 clone 155 항체의 역가 측정과 새로운 conjugate와의 반응성 확인

이스라엘로부터 많은 시료의 분석을 위해 대량으로 다시 제공받은 E1G에 대한 항체 Clone 155를 사용하여 항체의 역가 결정을 위하여 1:100부터 2배씩 코팅 완충용액에 희석하여 immunoplate에 코팅한 후, 충분히 코팅될 수 있도록 2시간 동안 incubation하고, 이 후 non-specific binding을 제거하기 위해 2% BSA가 첨가된 생리식염수로 Blocking한다. 이 후 새로운 Eu-E1G를 첨가하여 코팅된 1차 항체와 반응하도록 한다. 이 후 Enhancement solution을 첨가한 후 DELFIA 1420으로 측정하여, 얻은 그래프를 통해 conjugate와의 역가를 결정하여 실험에 적용한다.

(3) E1S, E1G, PG의 정량법에 대한 반복성 및 회수률(reproducibility) 조사

면역분석법에 있어서 반복성 및 회수률 조사인 리커버리 테스트는 이 면역분석법이 오류없이 잘 적용되고 있는가를 확인하는 실험이다.

델피아로 얻은 표준적정곡선의 정확도를 검증하기 위하여 E1S 정량분석의 재현성 실험을 실시한다. 재현성 실험은 이미 알고 있는 여러 농도의 E1S를 PBS 버퍼 및 임신이 확실하지 않은 돼지 뇨 샘플에 조제하여 경쟁적 델피아법을 실시한 후, 표준적정곡선 하에서 E1S 농도를 측정한 인트라 어세이와 동일한 농도를 시간을 달리하여 측정한 후 그 오차를 조사한 인터 어세이를 실시한다. 인트라어세이는 E1S 정량을 위한 범위인 0.15~20ng/ml에서 임의적으로 비교적 높은 농도인 20ng/ml, 중간농도인 10, 5ng/ml, 그리고 비교적 낮은 농도인 1ng/ml의 4가지 농도를 정하여 실시한다. 또한 PBS에서의 인트라 인터 어세이 뿐만 아니라 인터널 스텐다드 커브를 그려 정량실험을 진행하는 것을 감안하여 100배 희석된 비임뇨 버퍼에서도 인트라 인터 어세이를 똑같이 진행한다. 분석을 위한 각 농도별 시료는 각각 10개씩 측정하고, E1S 정량을 위한 표준적정곡선에 적용하여 나온 결과값을 C.V.와 BIAS를 계산하여 도출한다.

다. 한우및 돼지 임신/비임신 기준치 설정

1. 개발된 TR-FIA법에 의한 500두 이상의 시료분석

(1) 발정 중 돼지 뇨에서의 E1S농도 조사

돼지의 경우 발정시 행동패턴이나 체내의 많고 다양한 대사들이 달라진다고 연구되었다. 따라서 발정 중인 돼지는 체내 호르몬인 Estrone 계통의 변화가 나타나 조기의 임신을 진단하기 위한 체외로 배출하는 E1S의 농도에 변화를 일으킬 수 있기 때문에. 변화된 E1S의 농도에 따른 임신/비임신뇨 판단 오류를 줄이기 위해 발정 중인 돼지의 뇨 샘플을 채취

하여 E1S 정량을 실시한다.

라. 키트 개발을 위한 실제뇨에서의 정량법 확립

1. 개발된 TR-FIA법을 이용한 시료 분석

(1) 실제 돼지뇨를 이용한 표준적정곡선

본 연구는 실질적으로 한우와 돼지의 뇨를 이용하여 분석하는 연구이기 때문에 표준적정곡선 작성시 뇨의 여러 성분이 항원, 항체반응에 영향을 미칠 수 있으므로 뇨의 희석배율을 달리한 것과 PBS buffer로 작성한 것과를 비교한다. 1차년도에서 실제뇨에서 표준적정곡선을 그린 것보다 희석배율을 더 작게 하여 50배, 25배의 희석배율에서 표준적정곡선을 작성한다. 뇨중에는 다양한 성분이 들어 있어 그 영향이 개체에 따라 달라질 수가 있으므로 표준적정곡선 작성시 표준시료 E1S를 25배 또는 50배의 뇨를 buffer로 희석한 것을 사용한 즉 “internal standard"를 이용한다. 또한 실제 비임신뇨를 0.45㎛ filter를 사용해서 syringe filter를 실시한 후, 희석배율별로 E1S, E1G와 PG에 대한 표준적정곡선을 작성한다.

마. 수정후 한달간 매일의 오줌내 E1S 측정

1. 수정 후 매일의 돼지 오줌 시료 내의 E1S 측정

임신/비임신을 구분짓는 기준치 설정과 진단이 가능한 기간을 알기 위해 수정 후 일수별로 샘플을 충분히 확보한 다음 E1S의 농도를 상기의 인터널 스텐다드를 적용하여 측정한다. 수정 후 1일부터 한달 까지의 임신뇨와 비임신뇨를 사용하여, TR-FIA법으로 정량실험 진행한다.

2. 수정 후 매일의 한우 오줌 시료 내의 PG 농도 측정

한우뇨 시료를 받아 뇨 중 PG의 농도를 일수별로 측정한다. 50배의 비임신뇨를 희석한 인터널 스텐다드를 적용하여 PG를 정량하여, 임신/비임신 판별의 가능성을 조사한다.

바. 2D를 이용한 한우뇨 임신진단법 개발

1. Sample의 준비

임신 한우뇨와 미임신 한우뇨의 Sample을 70%의 황산 암모늄으로 단백질 부분을 침전 시킨 뒤, 원심분리하여 상등액을 걷어내고, 침전물을 얻는다. 이 침전물을 다시 PBS에 용해

시킨 뒤, 투석을 거쳐 염을 제거하고 0.45um membrane filter를 거쳐 최종적인 Sample을 준비한다. 임신 한우뇨와 미임신 한우뇨의 단백질 패턴의 차이를 분석하기 위해 PI값과 분자량으로 2회 분리하는 2 Dimensional Electrophoresis를 실시한 후, 동일 농도로 맞추기 위해 BCA 정량을 실시한다.

2. Strip Rehtdration, Focusing & Equilibrate 실시

굳어있는 strip의 gel을 불리는 과정으로서 두 개의 strip을 준비한다. 하나의 strip은 임신 한우뇨 sample을 로딩하고 다른 하나의 strip은 미임신 한우뇨 sample을 로딩한다. 흰판에 Sample + Sample buffer solution을 350ul 로딩해 준 뒤, Strip을 집게로 고정시키고 한쪽의 막을 벗겨 낸 뒤, Gel 방향을 buffer에 닿게 하여 한쪽 방향으로 슬며시 놓는다. 1h 안정화 시킨 후, mineral oil을 strip위에 2~3ml 깔아준다. mineral oil은 물과 섞이지 않아 수분의 증발을 방지해 준다. 이 후 R.T 50V 12h동안 Focusing을 해 주고 (단백질 PI별로 분리) 12시간 후에 strip의 oil을 닦아 낸 후 equilibration buffer 1과 2를 약 3ml 로딩하여(각 20min) 단백질을 고정 시켜 준다. 최종적으로 단백질 1차 분리 및 고정이 완료 되면 2차 분자량 별 분리를 위해 Gel을 준비한다.

3. 전기영동

전기영동을 위해 acrlyamide gel 10%, 최종 38ml로 용액을 만든 뒤, Gel 카셋트에 로딩하여 Gel을 만들어 준다. 준비 해 둔 Strip을 Gel이 바깥쪽 방향으로 오게 유리판에 설치 한 뒤, 양 끝을 잘라내고 조심스럼게 Gel위에 끼운다. 그 위에 Low melting agarose 0.5g과 Bromophenol blue가 0.001% 섞인 용액으로 조심스럽게 로딩해 준다. (Silling의 효과) 그 다음, tank buffer를 채워주고 60V overnight으로 Gel을 내린 후, Coomasi brilliant blue 염색약으로 Gel을 4h 염색한 뒤, Destaining solution(10% methanol, 10% Acetic acid)으로 염색약을 제거한 뒤 Spot으로 나타난 Sample 별 단백질 발현의 차이를 관찰한다.

o 3차년도 (2008)

가. 목표 ; 비임신/임신진단 키트 개발과 평가

나. 개발된 TR-FIA 법에 대한 평가

1. 시료의 그룹별 블라인드 테스트

2차년도에서 설정된 임신/비임신을 나누는 기준으로 얼마나 정확히 임신판별이 이루어지는지 확인하기 위해 경북축산연구소에서 그룹별로 임신 초기의 돼지뇨 샘플을 지원받아 임신/비임신을 판별하고 나중에 초음파 검사로 임신을 확인하여 비교해보는 블라인드 테스트를 진행한다. 정량결과와 임신판별은 공문으로 주고 받고, 모든 샘플은 모두 델피아법으로 E1S를 정량하여 판별한다.

2. Dilution rate 차이에 따른임신 판별 정확도 테스트

기존의 델피아와 엘라이자의 정량 시스템에서 기준 희석배율은 50배 희석인데, 임신뇨와 달리 비임신뇨에서 정량범위를 벗어나 정량값을 계산할 수 없었다. 따라서 비임신뇨의 정확한 농도를 확인하기 위해서 25배의 희석배율에서 E1S의 농도를 구한다. 또한 25배, 50배 뿐만아니라 더 희석된 샘플에서도 E1S의 정량이 가능한지 알아보기 위해서 100배, 500배, 1000배의 희석배율에서도 정량값을 구한다.

3. ELISA법 개발 방법 개선

기존의 2차년도에 개발한 E1S 엘라이자 정량시스템은 컨쥬게이트 희석배율이 1:50으로 매우 높아 비효율적이라 판단되어 다시 E1G와 HRP를 컨쥬게이션 시킨다. 먼저, 스테로이드의 용해도가 높지 않기 때문에 중성의 pH를 가진 HEPES 버퍼 대신에 DMSO를 사용하여 적정양(10uM)의 스테로이드와 EDC, NHS를 용해시켜 상온에서 2시간 E1G를 활성화시킨다. 2-ME 용액으로 활성화를 정지시킨 다음, Sodium azide가 포함되지 않고 pH가 8.6이 되는 버퍼를 제조하여 (코팅완충용액과 생리식염수를 혼합하여 제조하였다) HRP 프로틴을 녹이고, 앞서 제조한 활성화된 스테로이드가 있는 용약과 혼합하여 하루동안 4도씨에서 Overnight으로 교반시킨다. 그 다음, Quenching buffer로 모든 반응을 정시시킨 후, Sephacryl S-400 High Resolution의 gel-filteration 컬럼을 이용하여 컨쥬게이션 된 프로틴과 프리상태의 E1G를 분리한다.

분리해낸 샘플로 HRP의 활성을 확인하고, (그림 3) Clone 155와 활성을 동시에 확인 후 활성이 큰 fraction만 모아 BSA 소량과 99% Glycerol을 전체 양만큼 넣어 안정화시킨다. 상기의 방법으로 제조된 컨쥬게이트를 사용하여 표준적정곡선을 작성하고 이를 2차년도에 제조된 컨쥬게이트와 비교한다.

4. 0.45nm 필터 전, 후 샘플 정량값 차이점 조사

기존의 시스템에서는 샘플을 필터한 후 정량을 하였는데, 필터를 거치면 정량시스템의 단가가 올라가고, 소요시간도 증가되기 때문에 필터 유무에 따른 결과를 확인한다. 경북축산과학기술연구소에서 제공받은 샘플을, 필터한 샘플과 하지 않은 샘플의 정량값의 차이를 비교한다. 50배 희석된 비임신 스텐다드를 사용한 인터널 스텐다드 커브를 적용하고, 정량값에 50배의 희석배율을 곱해준다. 그 결과값을 토

대로 필터의 필요성을 확인한다.

5. 임신 돼지뇨에서 E1G 함량 조사

E1S의 농도를 측정하는데 E1G의 농도가 어느 정도의 영향이 있는지 알아보기 위하여 E1S와 cross-reactivity가 거의 없는 E1G에 대한 항체(Clone 8A3, Clone 3F11)를 이용하여 정량실험을 델피아로 진행하고, 그 값을 Clone 155에서 샘플을 정량한 값과 비교한다.

다. E1S-BSA 합성과 피복조건 확립

1. 임신진단키트를 위한 E1S-BSA 컨쥬게이션

키트의 제조를 위해 E1G에 단백질 Bovine Serum Albumin(BSA)를 conjugation시키는 것은 A.Stefanakis(Animal Reproduction Science, Greece, 2000)의 방법을 수정하여 실시한다. 극성과 무극성 물질 모두를 녹일 수 있는 Dimethyl sulfoxide (DMSO 78.13 MW) 700 ul에 10uM의 E1-3-glucuronide 3 mg에 2 mg의 ECD (12uM) (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride)를 혼합 후, 바로 12uM의 Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) 2 mg을 첨가하여 상온에서 1시간 약하게 교반한다. 그 후, ECD를 불활성화 하기 위하여 1ul의 2-mercaptoethanol을 첨가함으로 Semi-stable amine-reactive NHS este를 제조한다. 그 후, 700ul의 Carbonate-Bicarbonate Buffer(pH 8.6)에 용해된 21mg의 BSA에 Semi-stable amine-reactive NHS ester를 첨가하여 2시간 동안 약하게 교반한다. 원심분리를 통하여 염을 제거 후, quenching buffer 15ul을 넣어 줌으로 E1G-BSA의 결합력을 높여 준다. 바르게 결합하지 않은 BSA와 E1G 제거를 위하여 gel filtration을 실시한다. 용출 buffer로는 PBS를 이용하며 용출 된 각 분획은 단백질정량(BCA assay)을 통하여 BSA를 포함하는 분획을 수집한다.

분획하여 얻은 E1G-BSA conjugate가 clone 155와 반응을 하는지 알아보기 위한 실험으로, 가장 먼저 Clone 155 항체를 coating buffer (0.1 M sodium carbonate buffer, pH 9.5)에 1:1000의 비율로 희석하여 96 microwell plate에 200 µl 씩 분주 후 37℃에서 2시간 반응 시킨다. 각 well은 washing buffer (PBS-0.05% Tween20; PBS-T)로 3회 세척 후 2% Bovine serum albumin(BSA)를 이용하여 37℃에서 2시간 blocking 시킨다. 각 well을 washing buffer로 3회 세척 후 분획하여 얻은 E1G-BSA를 여러 농도(10 - 10000배 희석)로 각 well에 처리 후 coating buffer에 1:1000의 비율로 희석된 E1G-Eu*를 같은 양 함께 넣어 준다. 37℃에서 1시간 반응시킨 후 세척하고 Enhancement Solution을 200ul 넣어 상온에서 10분간 반응 시킨 후 TR-FIA reader를 Eu* 값을 측정하여 결과를 분석한다.

2. 임신진단 키트를 위한 E1G-CASEIN Conjugation

A.Stefanakis(Animal Reproduction Science, Greece, 2000)의 방법을 수정하여 실시, 위의 E1G-BSA conjugation 시키는 방법과 동일하다.

라. E1S에 대한 항체에 금입자(gold particle)를 표지시킨 conjugate 합성과 이들의 특성 조사를 통한 첨가량 결정

1. 금입자를 표지시킨 conjugate 합성 조건 및 농도 결정

E1G-Casein을 0.1mg/ml으로 증류수와 혼합하여 희석하고, 희석한 용액 3-10ul와 ㈜래피젠에서 제작한 Gold colloid 100ul를 conjugation한 뒤 Blocker를 1시간 반응시킨다. 반응 시킨 E1G-Casein Gold conjugate와 안정액 (Cotrol Line Gold conjugate 포함)을 혼합하여 1ml 되도록 Gold pad용 용액을 만들고 5-10mm유리섬유 패드에 분주한 뒤 냉동 건조한 후 37℃ incubator에서 최소 2시간이상 건조한다. 1개의 test당 10-25ul E1G-Casein gold conjugate를 사용한다.

마. 카트 제조를 위한 조건 확립

1. 실제 키트 제조 및 시험 테스트

Clone 155 항체에 금입자를 표지시키고 E1G와 BSA를 컨쥬게이션 시킨다. 다음으로 맴브레인에 E1G-BSA를 컨트롤 라인에 흡착시키고, 그 뒤에 테스트 라인에는 Clone 155에 대한 항체인 anti-mouse IgG Ab를 흡착시킨다. 건조된 멤브레인에 건조된 Gold pad와 샘플 패드, 흡수 패드를 제작한 뒤 40-50mm으로 잘라서 Rapid test kit device에 넣어 제작한다. 1개의 test kit에 샘플 120ul를 떨어뜨리고 10분 후에 결과를 판독한다.

2. Polyclonal anti-E1G Antibody 생성 및 면역분석법 확립

(1) Polychronal anti-E1G antibody 생성을 위한 E1G-KLH conjugate 합성

상기의 키트 개발을 위한 E1G-BSA 컨쥬게이트 방법과 동일.

(2) Polychronal anti-KLH-E1G antibody 생성을 위한 실험

E1G-KLH conjugate를 40ug/head가 되도록 만든 뒤 1ml syringe을 이용하여 Freund's

complete adjuvant(FCA)와 같은 비율로 섞어 200ul/head의 양으로 마우스(Balb/c male 7w)에 복강주사(injection peritoneal) 방법으로 1차 injection시킨다. 1차 injection 10일 후 2차 injection 때에는 1차와 같은 FCA가 아닌 Freund's incomplete adjuvant(FIC)를 40ug/head 농도의 E1G-KLH conjugate와 같은 양을 혼합한 후 200ul/head씩 마우스에 IP로 실행함으로 항체의 생산량을 증가시킨다. 2차 injection을 하고 2주 후 eye bleeding으로 마우스의 serum을 얻어 생성된 항체의 titration을 측정한다.

3. Commercial Monoclonal Anti-E1G Antibody를 이용한 면역분석법 확립

Anti-E1G antibody를 1:100부터 2배씩 희석해서 DELFIA법으로 역가를 측정한다. 그 후 이 antibody와 E1S와의 교차반응정도와 E1S에 대한 표준적정곡선을 작성한후, Clone 155 항체에 대한 결과와 비교분석한다.

바. 한우뇨 임신진단 방법 개발

1. 단백질 Sample의 확보

경북축산기술연구소로부터 받은 임신 한우뇨와 미임신 한우뇨를 각각 메스실린더에 모은 후, 0.45um의 membrane filtration과정을 거친다. 정확한 부피를 계산하고 황산암모늄 80%를 처리하여 단백질을 침전 시킨다. Over night 반응 후, 8000rpm, 4°C 30min으로 원심분리하여 다량의 황산암모늄이 포함된 상등액을 제거 한 뒤, Pellet을 PBS에 Resuspension시켜서 단백질 용액을 만든다. 이 과정을 약 20번 반복하여 실험 가능한 sample양을 확보한다.

2. 단백질 분리 조건을 다르게, 2d 실험조건 다르게 다시 실험

단백질 침전 yield값을 더욱 높이기 위해 황산암모늄 처리 비율을 **2차 년도**에 실시했던 기존의 70% 비율에서 3차 년도에는 80%로 증가시킨다. 증가된 황산암모늄을 효율적으로 제거 하기 위해, 2차 년도에 사용했던 투석 방법을 다른 방법으로 대체한다. 즉, 3차 년도에는 대표적인 desalting method로 사용되는 PD 10 Column(Gel chromatography, Sephadex G-25 medium을 이용)을 이용하여 Sample내에 고농도로 존재하는 황산암모늄의 제거를 시도한다. 이 후 Auto clave된 PBS를 이용하여 column을 충분히 안정화 시킨 뒤, 8000rpm 4°C 30min으로 침전시킨 단백질 sample을 로딩하여 분자량 별로 분리를 시도한다.

3. 연구개발 내용 및 결과

o 1차년도 (2006)

연 구 기 관	연 구 책 임 자	소요예산 (천원)
한동대학교 산학협력단, 경북 축산 기술 연구소	김 종 배	120,000

가. 항체의 특성 조사

(1) Estrone에 대한 항체 종류 및 특징

(가) Estrone에 대한 항체 종류

Estrone-3-Sulfate와 Estrone-3-Glucuronide는 항체가 바인딩 할 수 있는 에피톱(epitope)이 하나밖에 없는 햅텐(hapten) 물질이기 때문에, 항체가 잘 생성되는(Immunogenesis) 다른 물질, 케리어(carrier)를 컨쥬게이션시켜 항체를 생산한다.

① Clone 8A3

렛트(rat)의 B 세포에서 생산된 monoclonal IgG2a type의 Estrone-3-Glucuronide에 대한 항체이다.

② Clone 3F11

렛트(rat)의 B 세포에서 생산된 monoclonal IgG1 type의 Estrone-3-Glucuronide에 대한 항체이다.

③ Clone 155

마우스(mouse)의 B 세포에서 생산된 monoclonal IgG2b type의 Estrone-3-Glucuronide에 대한 항체이다.

④ Polychronal anti-KLH-E1G antibody from mice

마우스(mouse)에 KLH-E1G Conjugate를 주입하여 생산한 polyclonal IgG type의 Estrone-3-Glucuronide에 대한 항체이다.

⑤ Commercial (Genway biotech.) monoclonal anti-E1G Antibody

마우스(mouse)의 B 세포에서 생산된 monoclonal IgG2a type의 항체이다.

(나) Estrone에 대한 항체 생산 방법

① Estrone 계열의 호르몬에 BSA 케리어를 컨쥬게이션

- Sodium salt 에서 free acid 제조

최저양의 삼차수로 희석한 glucuronide에 sodium salt를 녹인 뒤, 1M의 hydrochloric acid (pH 1)을 넣어 줌으로 3-glucuronides의 세가지 free acid인 Oestrone와 17β Oestradiol, Oestriol을 만든다.

이 혼합물을 waterbath에 넣어 느린 속도로 데운 다음 맑은 용액부분만 식힌다. Cooling 으로 생긴 crystalline material을 분리한 뒤 증발시켜 녹는점을 알아낸다. 세가지 종류의 glucuronides는 cilical gel을 넣은 thin layer chromatography (t.l.c.)을 이용하여 homogeneous compound라는 것을 알 수 있다. (그림 1)

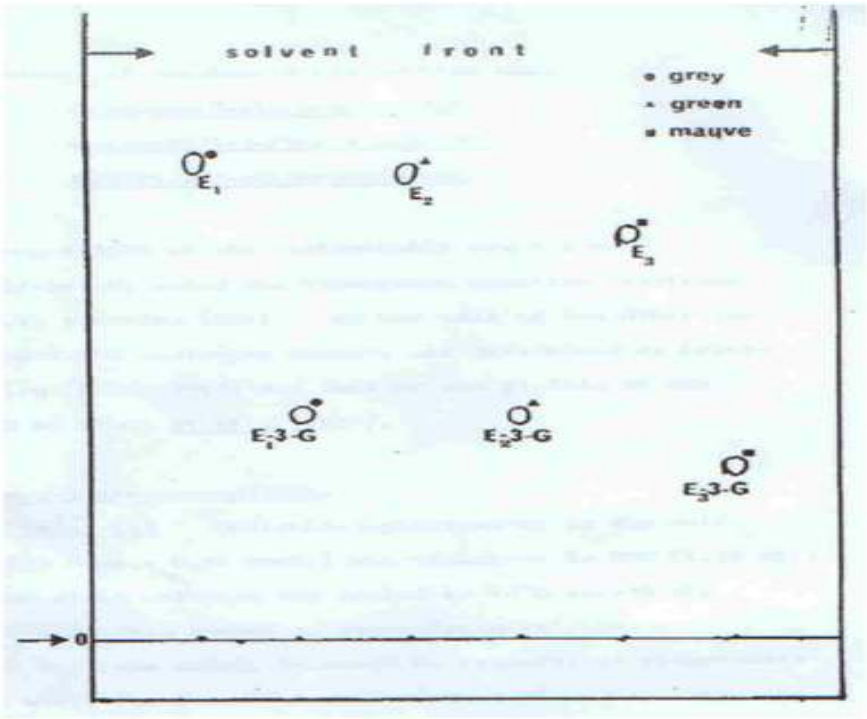


그림 1. Free oestrogen과 oestrogen-3-glucuronide의 Thin layer chromatography (t.l.c.) 결과 (silica gel plates 20X20 cm, Merck Art. 5715; System-ethyl acetate : acetic acid : ethanol (6:2:2); Spray- Anisaldehyde : sulphuric acid : acetic acid (0.1:0.2:10))

② Oestrone-3-glucuronide-BSA 제조

Oestrone-BSA complex의 구성은 Zimmermann reaction (oestrone) 과 U.V. scanning (BSA)으로 확인하였다. 다른 두 개의 complex에서 oestrogen 함유는 Kober reaction (Nocke 1961)으로 단백질의 함유는 method of Lowry (1951)으로 확인하였다.

- Oestrone-3-glucuronide-BSA의 합성 순서

㉮ Stage 1

산성상태 (35.7mg : 0.08 mmol.)의 Oestrone-3-glucuronide를 DMF(1.28 ml.)에 녹인 뒤 10℃에서 10분 동안 식힌다 (pH 4). 차가워진 용액에 tri-n-butylamine (0.018 ml.)을 넣어 준 뒤 isobutylchlorocarbonate (0.01ml)을 더 첨가하여 준다. 약간의 열이 발생하며 이때 magnetic stirrer를 이용하여 4℃에서 20분 동안 섞어준다. Mixed anhydride가 완성된다.

BSA (128mg; 0.005 mmol)을 3.3ml의 물에 녹여준 뒤 같은 양의 DMF를 첨가하여 준다. DMF를 많이 넣었을 경우 생기는 혼탁함은 1M의 NaOH (0.13ml)을 넣어주면 다시 맑은 용액 (pH 8.0)으로 만들 수 있다. 이때 -10℃까지 온도가 내려간다.

㉯ Stage 2

차가운 BSA 용액을 차가운 mixed anhydride에 넣은 뒤 빠르게 섞으면 혼탁해짐을 볼 수 있다 (pH 7.5). 이 혼합물을 -10℃에서 4시간 동안 계속 섞어준다. 혼합시작 30분과 1시간 후에 pH 값을 측정한다. 혼합물이 pH 6.5로 약산성이 되면 1M의 NaOH (0.05 ml)를 pH 7.5가 될 때까지 넣어준다. 모든 과정은 혼합시키는 4시간 동안 이루어진다.

③ Gel filtration을 이용한 산출물 정제

위의 과정을 통해 생산된 oestrone-3-glucuronide-BSA complex가 함유된 혼합물을 물로 채워져 있는 G-25 Sephadex column (50 cm X 2 cm int. diam.)에 넣는다. 물과 혼합물이 들어간 column을 같은 양을 유지하며 용출시킨다. 용출되어 나온 fraction들 (10ml)을 모은 뒤 남아있는 시약과 DMF를 gel-filtration을 통해 제거시켜준다. 혼합물은 5, 6, 7번 분획에서 용출되었다. (표 1)

표 1. Sephadex G-25 column에 Oestrone-3-glucuronide-BSA complex를 통과시켜 얻은 용출액의 성분

Fraction No.	Protein mg (Calc.)	Oestrone-3-glucuronide mg (Calc.)	Protein/St Conjugate ratio	Protein/St, Conjugate Molar ratio
5	46.5	3.51	13.2	11
6	60.5	4.33	13.9	11
7	22.0	1.89	11.6	13

④ Immunogenic complex의 구성을 알아내기 위한 방법

㉮ Oestrone-3-glucuronide-BSA

- U.V.-measurements 위의 실험을 통해 얻은 분획들을 희석시켜 recording spectrometer (Pye-Unicam S.P. 800B)로 U.V.를 이용하여 측정하였으며 세 개 분획 안의 BSA 양은 U.V. 흡광도 λ max 278 nm에서 측정하였다.

- Zimmermann reaction 단백질과 결합하지 않은 Oestrone-3-glucuronide의 양은 Zimmermann reaction으로 측정하였다. method of cooker를 따라 각 분획에서 4ml 의 양을 따로 얻어 steam oven에서 하룻동안 건조시킨다. 건조되고 남은 잔여물을 0.1ml의 0.5% dinitro-benzene (에탄올)에 녹인다. 이 용액에 2.5M의 benzyl-trimethylammonium hydroxide solution (0/05ml)을 넣고 섞어 준 뒤 25℃의 암실에서 1시간 동안 반응시킨다. 2.5ml의 에탄올을 넣어 준 뒤 spectrophotometer (Pye Unicam S.P. 600)을 이용하여 440, 520, 600 nm의 흡광도에서 값을 측정한다. 이를 통해 얻은 값은 Allen correction $\triangle = d_{520} - \frac{1}{2}(d_{440} + d_{600})$을 이용하여 계산한 뒤 기준 oestrone-3-glucuronide 값(10㎍; 20㎍)과 비교한다.

㉯ Oestradiol-3-glucuronide-BSA 와 Oestriol-3-glucuronide-BSA

이 두 immunogenic complex 안에 포함되어 있는 BSA의 양은 method of Lowry의 방법을 이용하여 단백질의 양을 측정하였고 method of Kober 방법을 이용하여 스테로이드 성분을 측정하였다.

⑤ monoclonal, polyclonal Anti-E1G antibody 생성

㉮ Polyclonal 항체 생산 방법

앞서 생산한 Oestrone-3-glucuronide-BSA와 estrone-3-glucuronide -KLH 20㎍을

PBS 용액에 희석을 시키고, 동량의 Complete Freund's Adjuvant에 유화시켜 마우스 또는 렛트의 복강에 면역 주사한다. 14일 후 다시 동량의 항원을 Incomplete Freund's Adjuvant에 유화시켜 1회 더 면역시키고, 10일 후에 혈액을 소량 채취하여 정량 실험 방법(ELISA 등)으로 항체 역가를 확인한 후, Adjuvant 없이 항원만을 복강내에 booster injection한다. 약 10일 뒤 혈액을 채취하여 혈구와 혈청을 분리한 다음, protein-G affinity column(Phamacia, USA)을 이용해 IgG만 용출해내어 항체를 분리하여 사용한다.

㉯ Monoclonal 항체 생산 방법

앞의 polyclonal 항체를 생산하기 위해 estrone-3-glucuronide-BSA를 면역시킨 마우스와 렛트에서 비장세포를 채취하여, P3U1의 골수종을 PEG를 이용하여 융합한 다음, HAT 배지로 Hybridoma를 선별한다. 선별된 Hybridoma를 96 well plate에 well 당 1개의 Hybridoma가 되도록 분주(cloning)하고 37도, 5%의 CO2의 조건에서 Colony를 형성하며 성장할 때까지 배양한다. Colony를 형성하며 성장한 Hybridoma의 배양 상등액을 정량 실험 방법(ELISA 등)으로 측정하여 E1G에 대한 항체를 생산하는 Hybridoma를 선별(screening) 하며, BSA에 대한 Affinity가 있는 hybridoma는 골라내어 폐기시킨다. 이러한 coloning과 screening을 반복하여 E1G에 대한 높은 역가를 가지는 항체를 생산하는 Hybridoma를 선택하여 항체를 대량으로 생산하기 위해 pristane을 주입한 마우스 복강에 주입한다. 일정 시간이 지난 후 복강이 부풀어 오르면 복강에서 ascitic fluid를 빼내어, 항체의 정제를 위해 protein-G affinity column(Phamacia, USA)에 적용하여 항체를 분리하고 사용한다.

(2) Pregnanediol Glucuronide에 대한 항체 종류 및 특징

Pregnanediol Glucuronide에 대한 항체도 Estrone과 마찬가지로 항체가 인식하기에는 매우 작은 물질이기 때문에 BSA 또는 KLH 등의 케리어를 컨쥬게이션시켜 마우스에 주입하는 방법으로 항체를 생산하였다. 항체의 제조방법은 앞의 Estrone 계열의 항체를 만드는 방법과 동일하여 생략하였다.

(가). Pregnanediol Glucuronide에 대한 항체 종류

Pregnanediol Glucuronide에 대한 항체는 국내에선 전무하며, 해외 시장에서도 팔지 않은 것으로 조사되었다. 또한 항체를 만드는 것이 까다로워 많은 종류의 항체를 만드는 것이 불가하며, 불필요하다. 따라서 이스라엘에서 받아온 항체는 한종류 밖에 없었으며, 그 양이 매우 작았지만 실험을 진행하기에는 무리가 없었다.

① Clone 44

마우스(mouse)의 B 세포에서 생산된 monoclonal IgG2b type의 Pregnanediol Glucuronide에 대한 항체이다.

(나) Pregnanediol Glucuronide에 대한 항체생성 방법

Pregnanediol Glucuronide도 호르몬이 변형되어 체외로 배출되는 형태이기 때문에 Estrone에 대한 항체생성 방법과 동일하므로 생략한다.

(3) 항체의 역가 측정

진단 키트의 제조와 면역분석법의 개발 차원에서 보면 항체의 역가 측정은 매우 중요하다. 이스라엘에서 만들어 배송해온 항체의 양을 고려했을 때 최소한의 양으로 항체가 작용하는 농도를 알아 항체의 사용양을 최대한으로 줄여야 한다. 표준적정곡선의 조건을 잡을 때, 뿐만 아니라 많은 샘플을 분석할 때, 키트를 만들 때 등의 많은 부분에서 항체를 소비해야 하기 때문에 역가 측정의 실험 결과는 매우 중요한 의미를 가진다고 할 수 있다.

(가) Estrone에 대한 항체의 역가 측정

이스라엘로부터 제공받은 E1G에 대한 항체는 clone 8A3, clone 3F11, clone 155인 총 3종류였으며, 각각 rat IgG2a, rat IgG1, mouse IgG2b subclass이다. 1차 항체의 역가 측정을 위하여 각 항체별로 1:100부터 2배씩 코팅 완충용액에 희석하여 96 well immunoplate에 코팅한 후, 충분히 코팅될 수 있도록 2시간 동안 incubation하였고, 이 후 non-specific binding을 제거하기 위해 2% BSA가 첨가된 생리식염수로 Blocking하였다. 0.5%의 PBST(PBS+Tween20)로 washing 과정을 거친 뒤, 이 후 Eu-E1G를 첨가하여 코팅된 1차 항체와 반응하도록 하였다. 이 후 Enhancement solution을 첨가한 후 DELFIA 1420으로 측정하였다.

① clone 8A3에 대한 Titration curve

clone 8A3 항체와 E1G-Eu와의 결합이 1:1600의 희석배율부터 급격히 떨어지는 것을 알 수 있다(그림 2). 따라서 1:800, 1:1600, 1:3200의 3가지 희석배율의 평균인 1:1600의 희석배율이 clone 8A3의 역가임을 확인할 수 있었다.

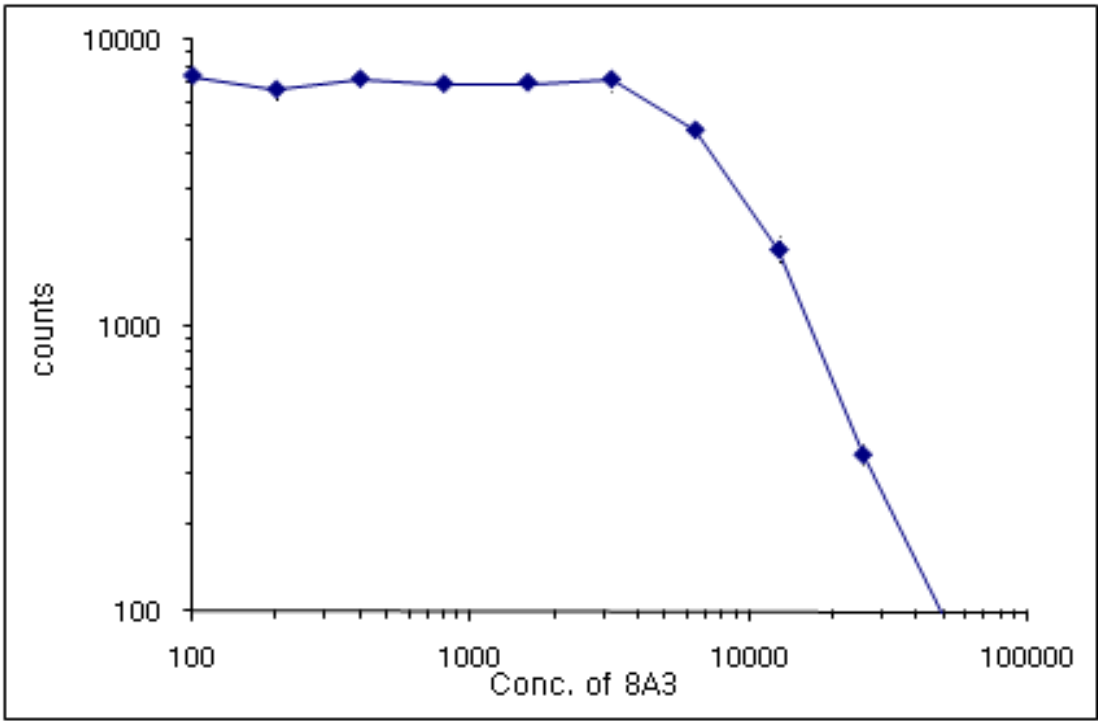


그림 2. Estrone-3-glucuronide에 대한 항체인 clone 8A3에 대한 titration curve

② clone 3F11에 대한 Titration curve

clone 3F11은 clone 8A3와는 다르게 1:800의 희석배율부터 급격히 항체와conjugate의 결합이 감소하는 경향을 보였다(그림 3). 따라서 clone 3F11의 역가는 1:800으로 조사되었다.

③ clone 155에 대한 Titration curve

clone 8A3와 마찬가지로 clone 155 항체는 E1G-Eu와의 결합이 1:1600의 희석배율부터 급격히 떨어지는 것을 알 수 있다(그림 4). 따라서 1:1600의 희석배율이 clone 155의 역가로 조사되었다.

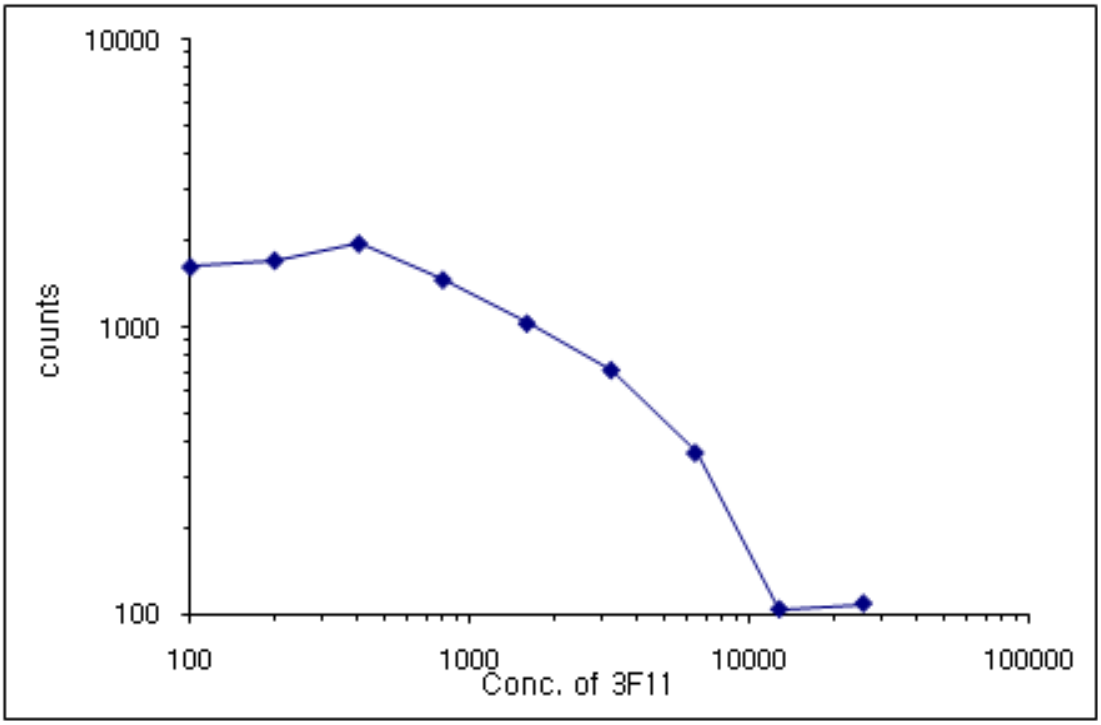


그림 3. Estrone-3-glucuronide에 대한 항체인 clone 3F11에 대한 titration curve

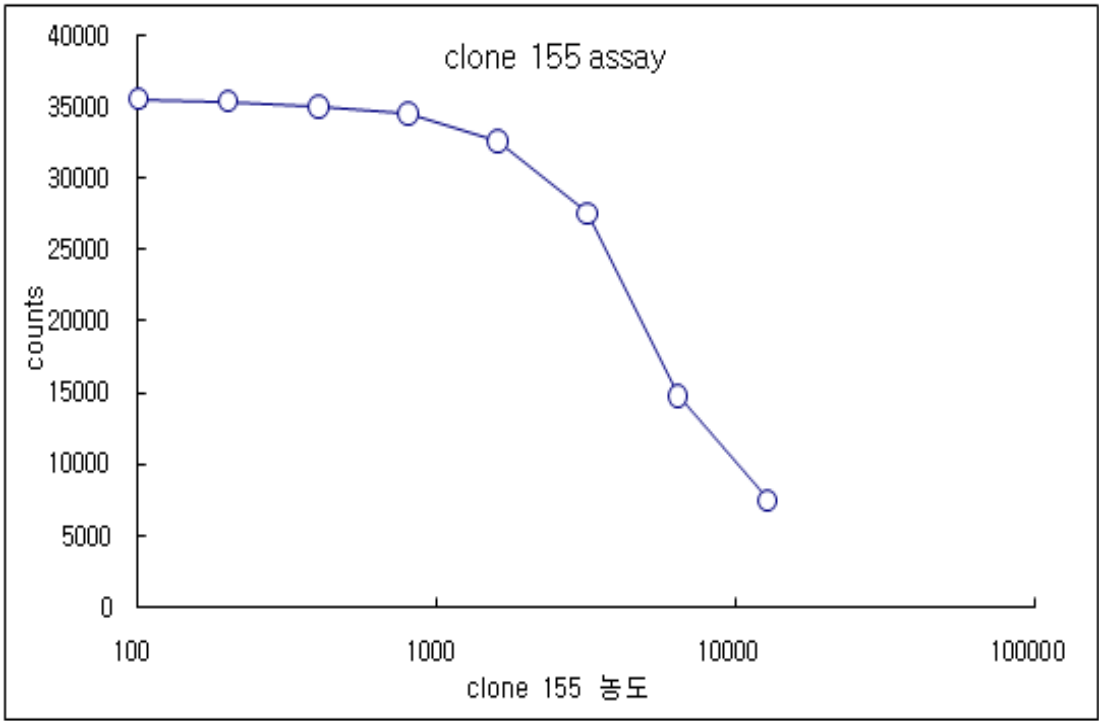


그림 4. Estrone-3-glucuronide에 대한 항체인 clone 155에 대한 titration curve

(나) Pregnanediol에 대한 항체의 역가 측정

Estrone에 대한 항체의 역가 측정하는 방법과 마찬가지로 Pregnanediol Glucuronide에 대한 항체인 clone 44의 역가를 측정하였다.

1) clone 44에 대한 titration

Pregnanediol Glucuronide에 대한 항체인 clone 44와 Pregnanediol Glucuronide-Eu에 대한 결합이 1:3200의 희석배율부터 급격히 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. (그림 5) 따라서 clone 44의 항체 역가는 1:3200으로 결정하였다.

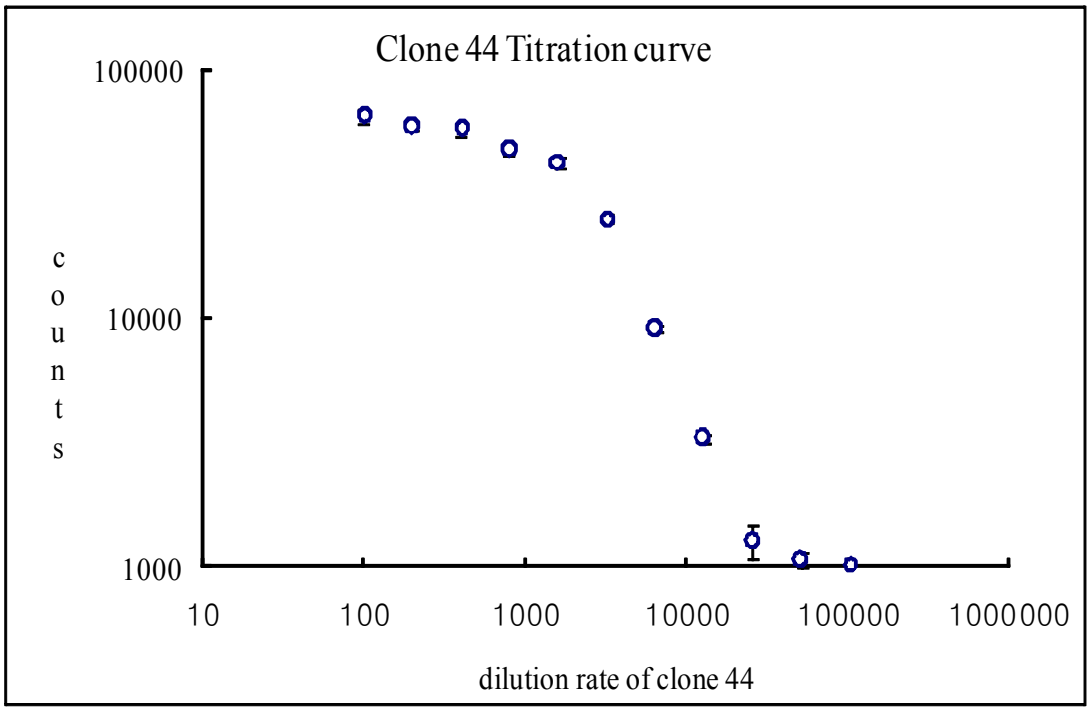


그림 5. Estrone-3-glucuronide에 대한 항체인 clone 155에 대한 titration curve

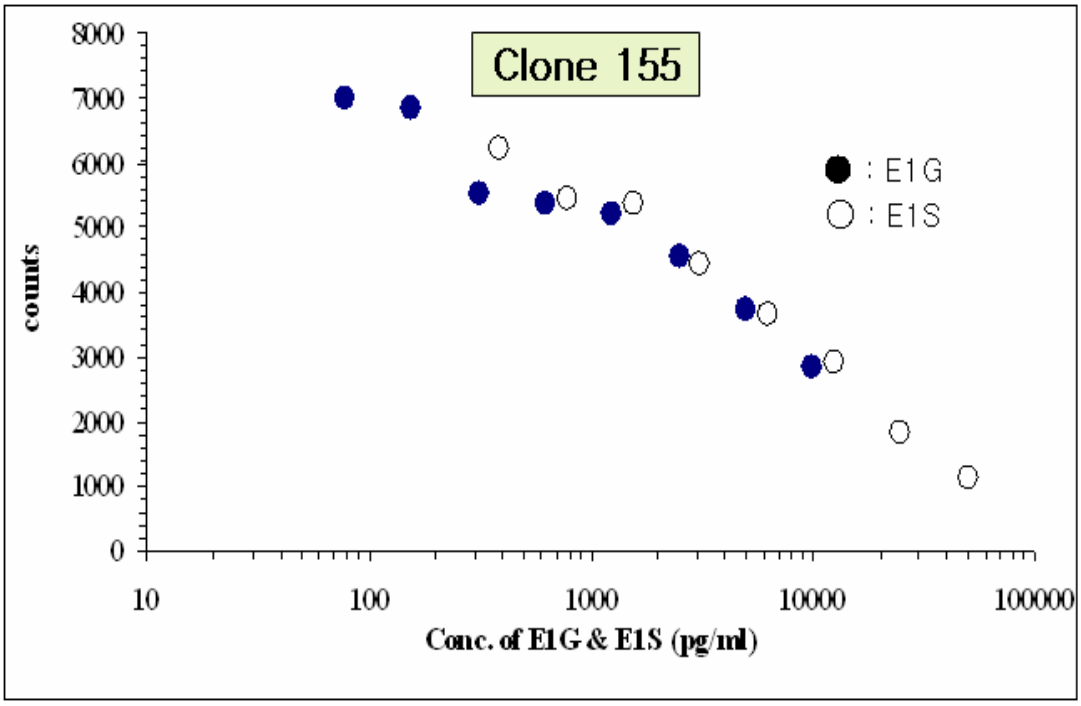
(5) 교차반응 (Cross reactivity) 정도 확인

- E1S와의 cross-reactivity 조사

돼지의 경우 뇨의 estrone 계열의 호르몬 대사산물은 E1G와 E1S가 있는데, 이 중여러편의 논문에 의거하면 임신이 되었을 경우 뇨를 통해 많이 배출되는 대사산물은 E1S이다. 그러므로 우리가 측정해야 하는 대사산물은 E1S인데 반해 이스라엘에서 제공받은 항체들(clone 8A3, 3F11, 155)은 E1S에 대한

항체이므로 E1S와 교차반응 여부가 매우 중요하다. 이를 확인하기 위하여 각 항체별로 E1G와 E1S에 대한 표준적정곡선(standard curve)을 작성하였고, 이를 통하여 서로 간의 교차반응도를 조사하였다. 1차 항체인 Clone 8A3, 3F11, 155를 코팅 완충 용액에 적정농도로 희석하여 96 well plate에 2시간 동안 37도에 반응시킨다. 그 후에 non specific binding을 최소화 하기위해 생리식염수에 2% BSA를 녹인 블락킹 솔루션을 사용하여 블락킹시키고, PBST를 사용하여 각 well을 washing시켰다. 이후 각 농도별로 희석된 E1G와 E1S와 일정농도의 Eu-E1G를 첨가하여 코팅된 1차 항체와 반응하도록 하였다. 이 후 Enhancement solution을 첨가한 후 DELFIA 1420으로 측정하였다.

그 결과 clone 8A3와 clone 3F11의 경우는 E1S와의 교차반응도가 거의 없음을 나타내었고(그림 12, 13), clone 155만이 E1S와의 반응에 있어서 약 90%이상의 높은 교차반응도를 나타내었다. (그림 6) 이는 clone 155가 E1G에 대한 항체이지만 E1S와도 반응할 수 있음을 알려주며, 이 항체를 이용해 E1G에 대한 표준적정곡선 뿐만 아니라 E1S에 대한 표준적정곡선을 작성할 수 있고, 정량 시스템 정립이 가능하다는 것을 나타낸다. 이에 따라 clone 155를 E1S 측정을 위한 1차 코팅 항체를 사용하였고, 이로 인한 E1S의 표준적정곡선을 작성하였다. (그림 7)



s

그림 6. 1차 코팅 항체 clone 155의 E1S와의 교차반응 그래프

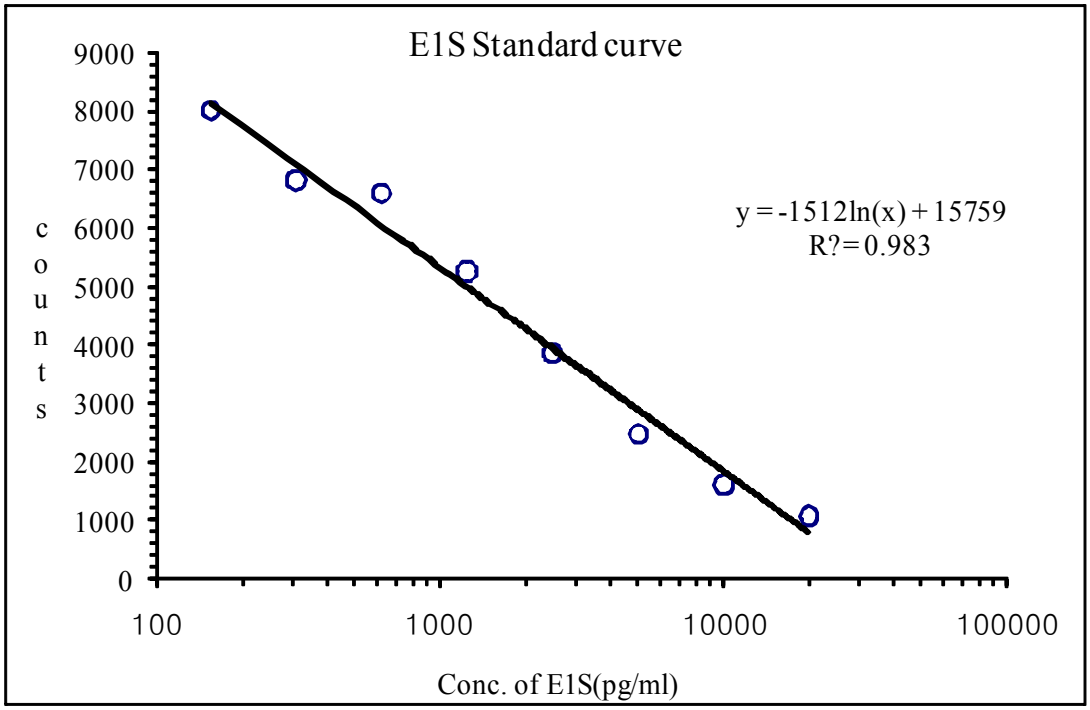


그림 7. clone 155으로 코팅한 E1S의 표준적정곡선

나. E1G 측정을 위한 면역분석법 (TR-FIA)개발 및 평가

(1) Conjugate 적정 농도 결정

TR-FIA개발에 필요한 conjugate(Eu-E1G)는 영국 Cambridge 수의과학연구소의 Geoff. Barnard박사로부터 제공받았다. 영국의 Geoff Barnard 박사로부터 제공받은 conjugate의 적정 농도 결정을 위하여 immunoplate에 conjugate를 1:100부터 5배씩 희석한 후, Enhancement solution을 첨가하여 DELFIA 1420으로 측정하였다. 이를 통하여 1:100 희석배율 기준으로 total binding의 30%~50%의 카운트값을 적정 농도로 하는 method에 의거하여, Eu-E1G의 경우 1:2000의 희석배율로 적정 농도를 결정하였다.(그림 8)

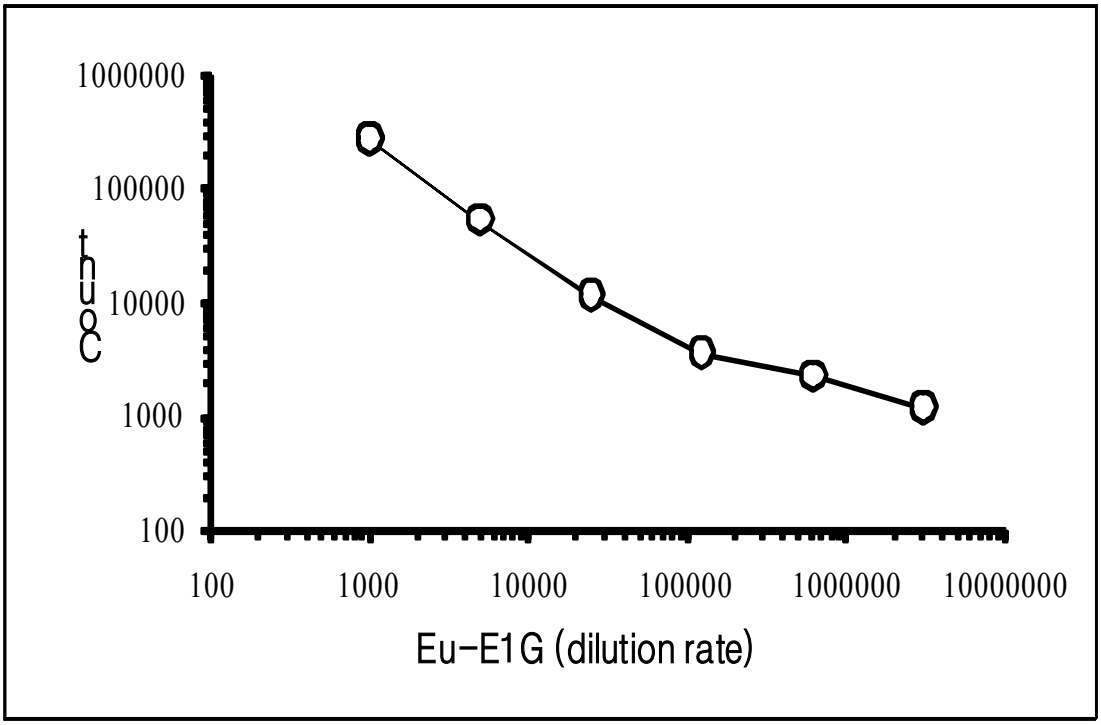


그림 8. Eu-E1G의 적정 농도 그래프

(2) Estrone 항체들을 사용한 면역분석법 개발

시료속의 E1G의 농도를 측정하기위해 1차 항체인 Clone 8A3, 3F11, 155를 가지고 E1G에 대한 경쟁적 면역 분석법을 개발하였다. 표준적정곡선을 그리기 위해 먼저, 코팅 완충 용액에 항체를 앞서 말한 항체의 역가를 고려하여 적정농도로 희석하여 96 well plate에 2시간 동안 37도에 반응시킨다. 그 후에 non specific binding을 최소화 하기위해 생리식염수에 2% BSA를 녹인 블락킹 솔루션을 사용하여 블락킹시키고, PBST를 사용하여 각 well을 washing시켰다. 이후 각 농도별로 희석된 E1G와 일정농도의 Eu-E1G를 첨가하여 코팅된 1차 항체와 반응하도록 하였다. 이 후 Enhancement solution을 첨가한 후 10분 뒤 DELFIA 1420으로 측정하였다.

(가) Clone 8A3를 이용한 E1G에 대한 표준적정곡선

Clone 8A3 항체의 코팅 농도는 1:2000이며, PBS 버퍼를 사용하여 E1G에 대한 표준적정곡선을 작성하였다.(그림 9)

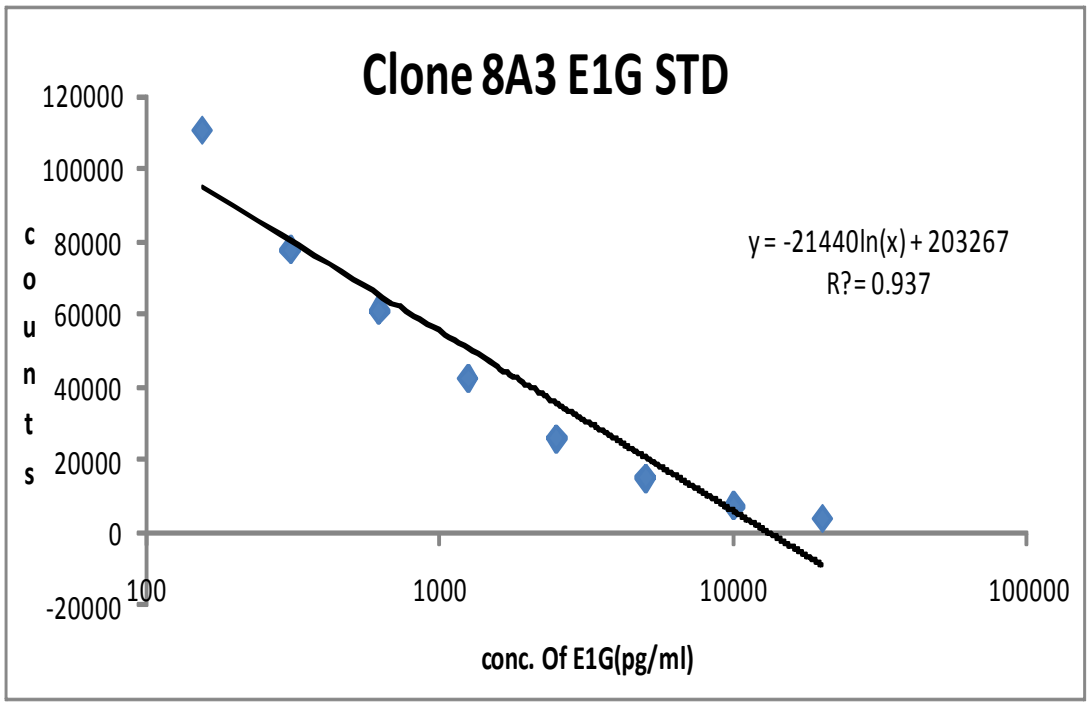


그림 9. Clone 8A3를 사용한 E1G에 대한 표준 적정 곡선

(나) Clone 3F11를 이용한 E1G에 대한 표준적정곡선

Clone 3F11 항체의 코팅 농도는 1:500이며, PBS 버퍼를 사용하여 E1G에 대한 표준적정 곡선을 작성하였다. (그림 10)

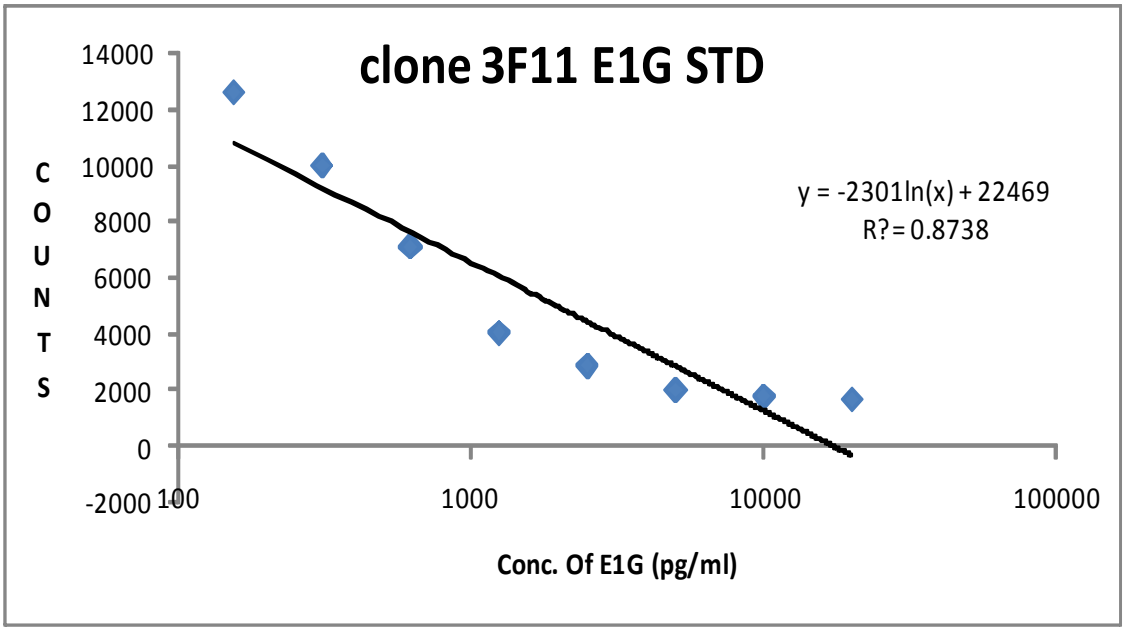


그림 10. Clone 3F11을 사용한 E1G에 대한 표준 적정 곡선

(다) Clone 155를 이용한 E1G에 대한 표준적정곡선

Clone 155 항체의 코팅 농도는 1:1000이며, PBS 버퍼를 사용하여 E1G에 대한 표준적정 곡선을 작성하였다. (그림 11)

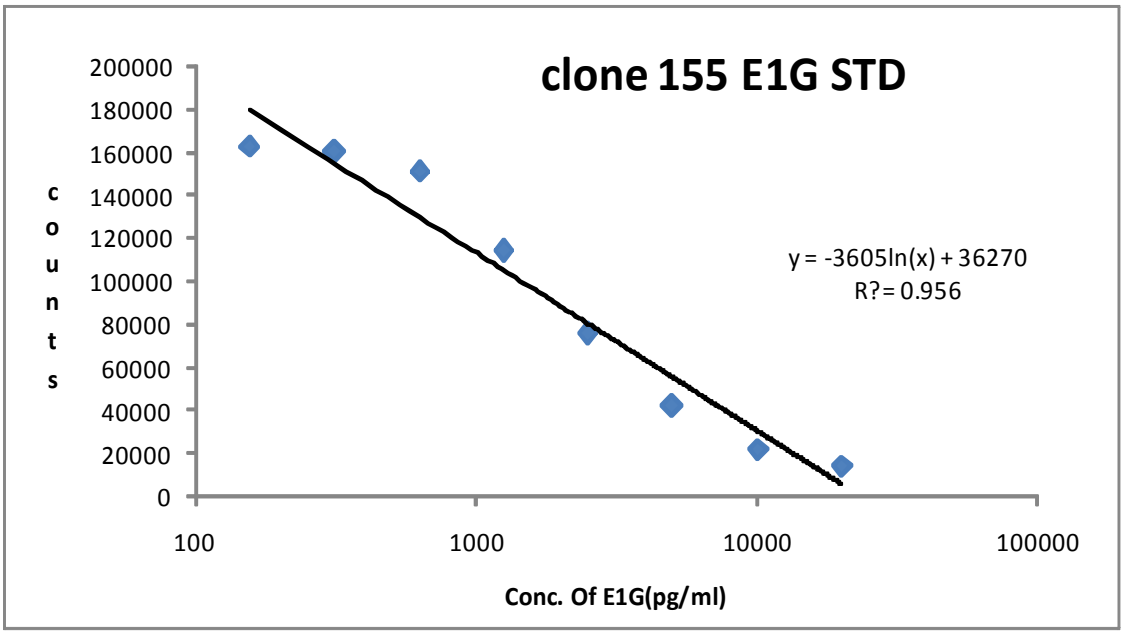


그림 11. Clone 155를 사용한 E1G에 대한 표준 적정 곡선

다. E1S 측정을 위한 면역분석법 (TR-FIA)개발 및 평가

(1) Estrone 항체들을 사용한 면역분석법

E1S에 대한 표준적정곡선을 작성하는 실험 방법은 E1G에 대한 표준적정곡선을 그리는 실험방법이랑 동일하며, 스텐다드 물질로 E1G 대신 E1S를 각 농도별로 첨가하였다. 그 결과 clone 8A3와 clone 3F11은 E1S에 대한 표준적정곡선이 E1G에 대한 표준적정곡선에 비해 불안정하고 작성이 잘 되지 않으나, clone 155의 경우에는 E1G, E1S 두 호르몬 대사물 모두에 대한 표준적정곡선이 작성이 잘되는 결과를 얻었다. (그림 12, 13, 14)

(가) Clone 8A3를 이용한 E1S에 대한 표준적정곡선

Clone 8A3 항체의 코팅 농도는 1:2000이며, 스텐다드 물질로 E1S와 PBS 버퍼를 사용하여 표준적정곡선을 작성하였다.(그림 12)

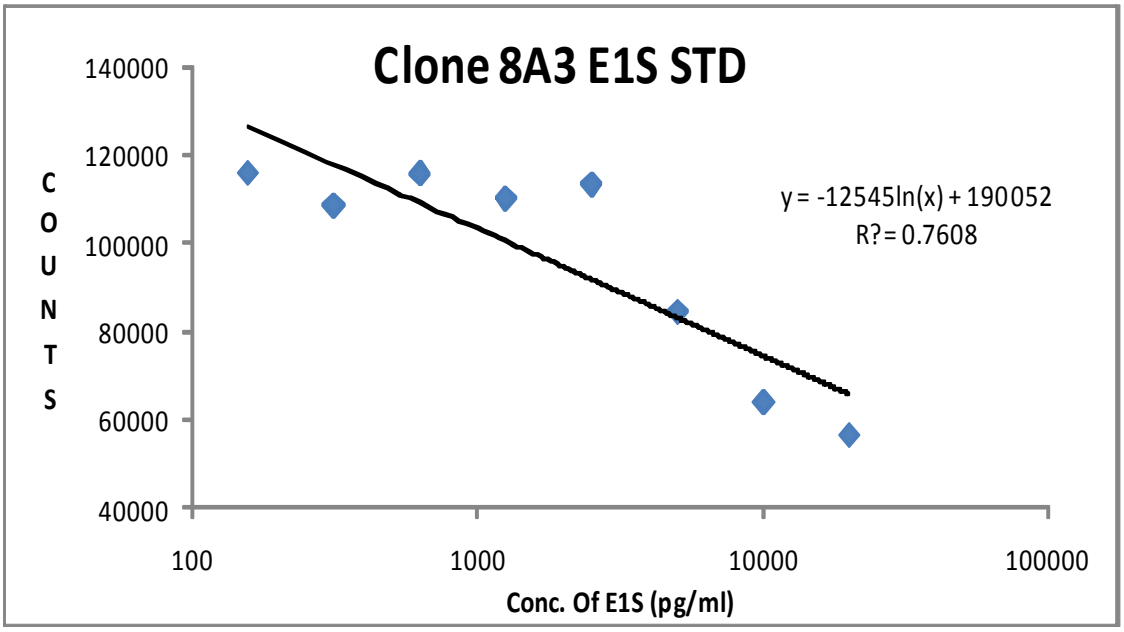


그림 12. Clone 8A3를 사용한 E1S에 대한 표준 적정 곡선

(나) Clone 3F11를 이용한 E1S에 대한 표준적정곡선

Clone 3F11 항체의 코팅 농도는 1:500이며, 스텐다드 물질로 E1S와 PBS 버퍼를 사용하

여 표준적정곡선을 작성하였다.(그림 13)

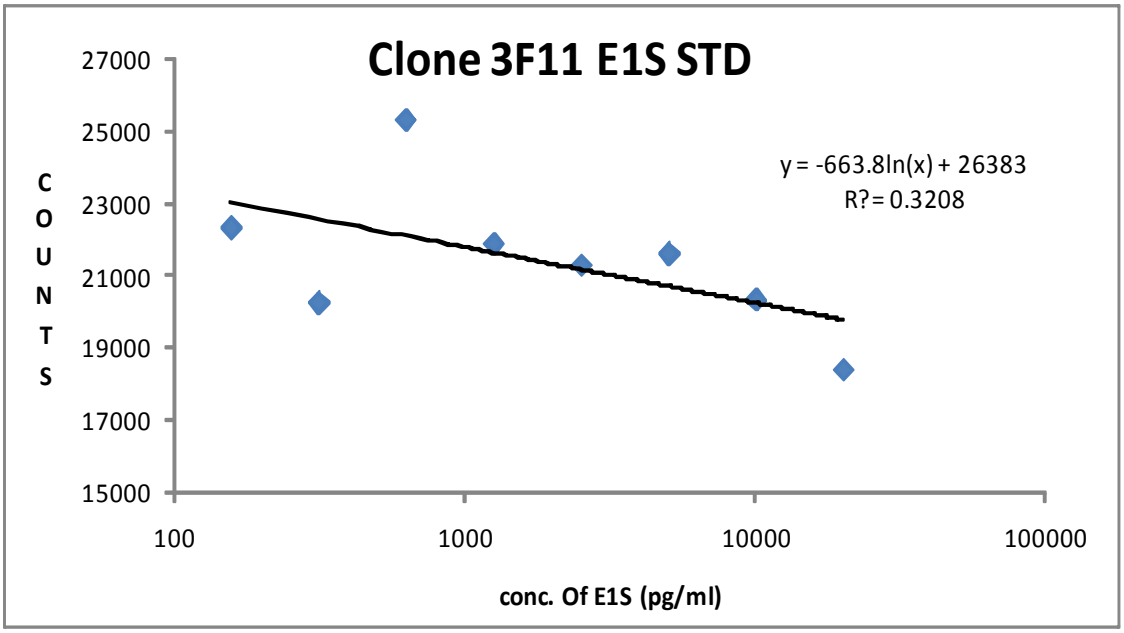


그림 13. Clone 3F11를 사용한 E1S에 대한 표준 적정 곡선

(다) Clone 155를 이용한 E1S에 대한 표준적정곡선

Clone 155 항체의 코팅 농도는 1:1000이며, 스텐다드 물질로 E1S와 PBS 버퍼를 사용하여 표준적정곡선을 작성하였다.(그림 14)

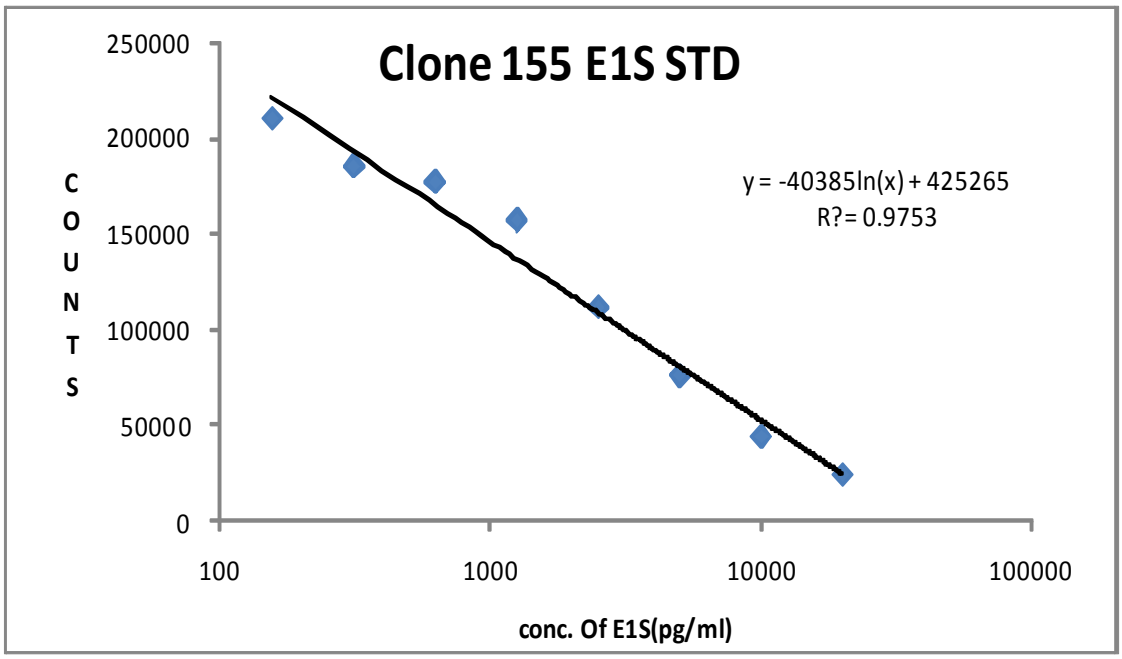


그림 14. Clone 155를 사용한 E1S에 대한 표준 적정 곡선

라. PG 측정을 위한 면역분석법 (TR-FIA)개발 및 평가

(1) Conjugate (Eu-Preg)의 적정 농도 결정

Eu-E1G의 적정 농도를 결정한 실험과 마찬가지로 Eu-Preg의 적정농도를 구하기 위해 1:100부터 5배씩 희석한 후, Enhancement solution을 첨가하여 DELFIA 1420으로 측정하였다. Eu-Preg의 경우에는 1:8000의 희석배율로 적정 농도를 정하였다.(그림 15)

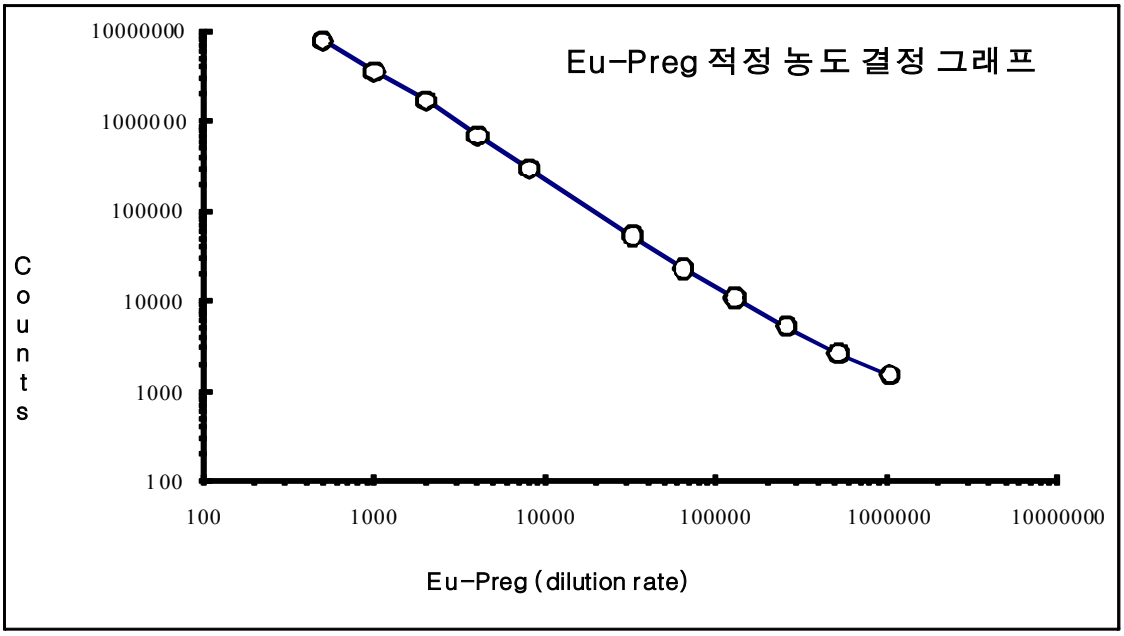


그림 15. Eu-Preg의 적정 농도 그래프

(2) Pregnanediol Glucuronide 항체를 사용한 면역분석법

Pregnanediol Glucuronide에 대한 표준적정곡선을 그리기 위해 먼저, 코팅 완충 용액에 항체를 앞서 말한 항체의 역가를 고려하여 적정농도로 희석하여 96 well plate에 2시간 동안 37도에 반응시킨다. 그 후에 non specific binding을 최소화 하기위해 생리식염수에 2% BSA를 녹인 블락킹 솔루션을 사용하여 블락킹시키고, PBST를 사용하여 각 well을 washing시켰다. 이후 각 농도별로 희석된 E1G와 일정농도의 Eu-E1G를 첨가하여 코팅된 1차 항체와 반응하도록 하였다. 이 후 Enhancement solution을 첨가한 후 10분 뒤 DELFIA 1420으로 측정하였다.

(가) Clone 44를 이용한 PG에 대한 표준적정 곡선

Clone 44 항체의 코팅 농도는 1:5000이며, PBS 버퍼를 사용하여 표준적정곡선을 작성하였다. (그림 16)

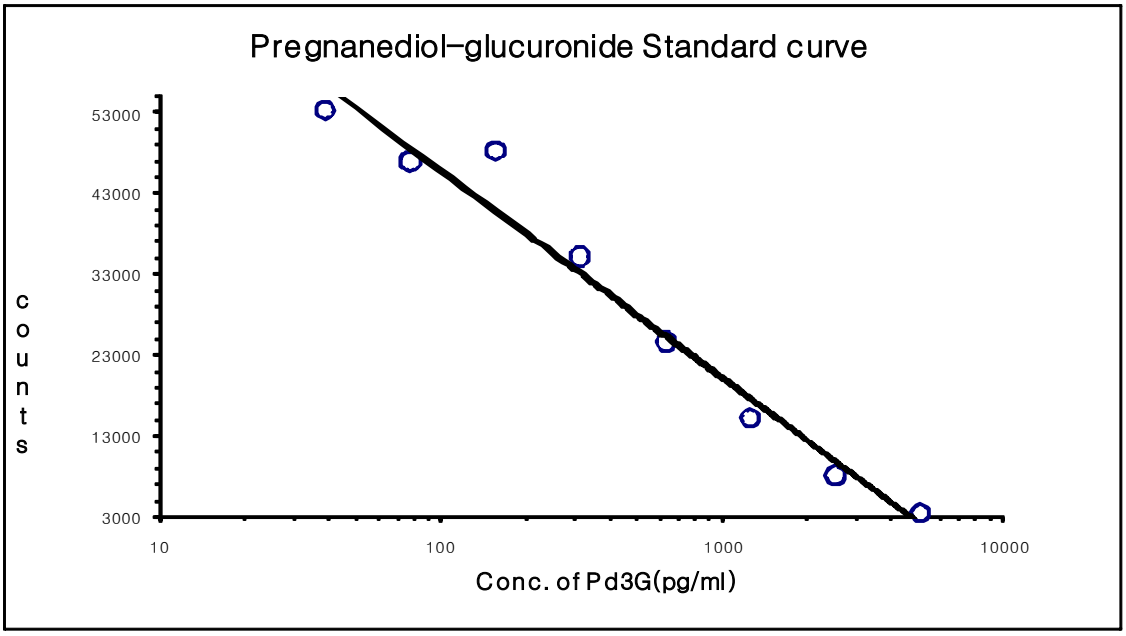


그림 16. Clone 44를 사용한 PG에 대한 표준 적정 곡선

마. 실제뇨에서의 TR-FIA법 적용

(1) 실제 한우 및 돼지뇨에서 적용한 표준적정곡선

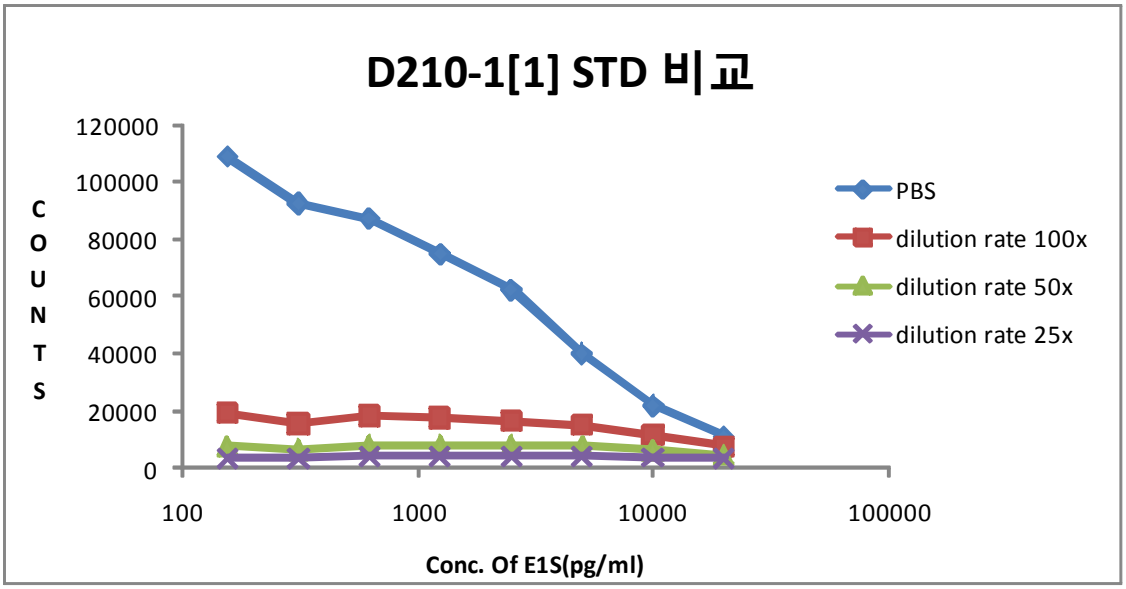
실제로 뇨에서 E1S, E1G, 그리고 PG를 측정할 때에는 PBS 버퍼에서 작성한 표준적정곡선에 적용하기보다 뇨에서 작성한 표준적정곡선이 오줌의 여러 interfere 한 물질들의 영향 등을 정량값에 잘 반영된다고 할 수 있다. 따라서 비임신이 확실한 돼지와 한우의 비임신 뇨 및 수퇘지뇨를 0.45nm의 syringe filter를 실시한 후, 실험에 적용하여 표준적정곡선을 작성하고 그 표준적정곡선에 비교하여 정량실험을 진행하였다.

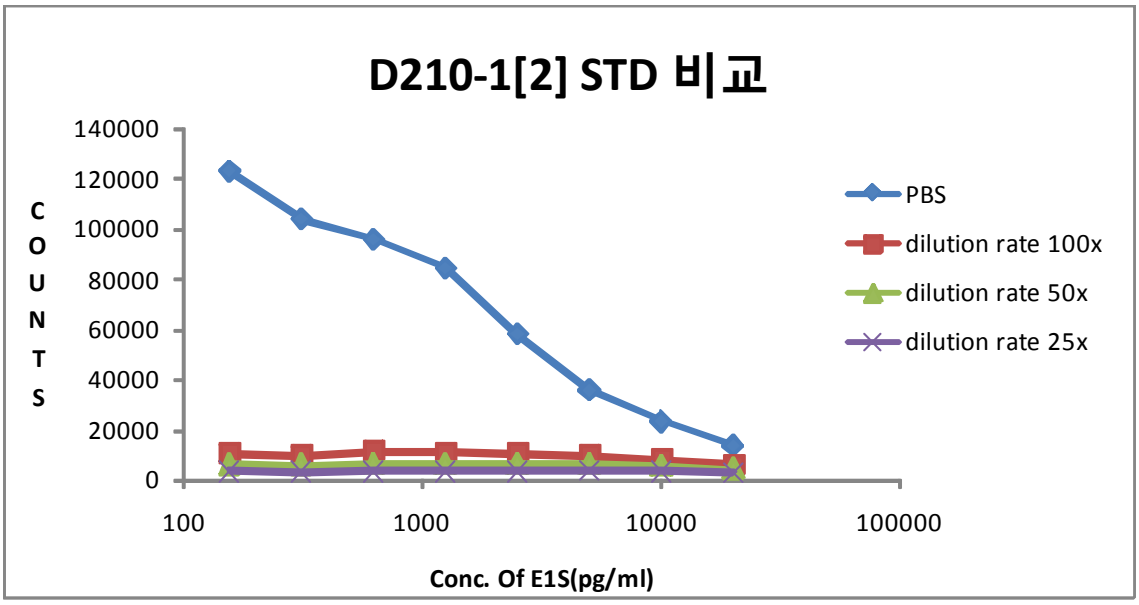
(가) 실제뇨에서 E1S, E1G 측정을 위한 표준적정곡선

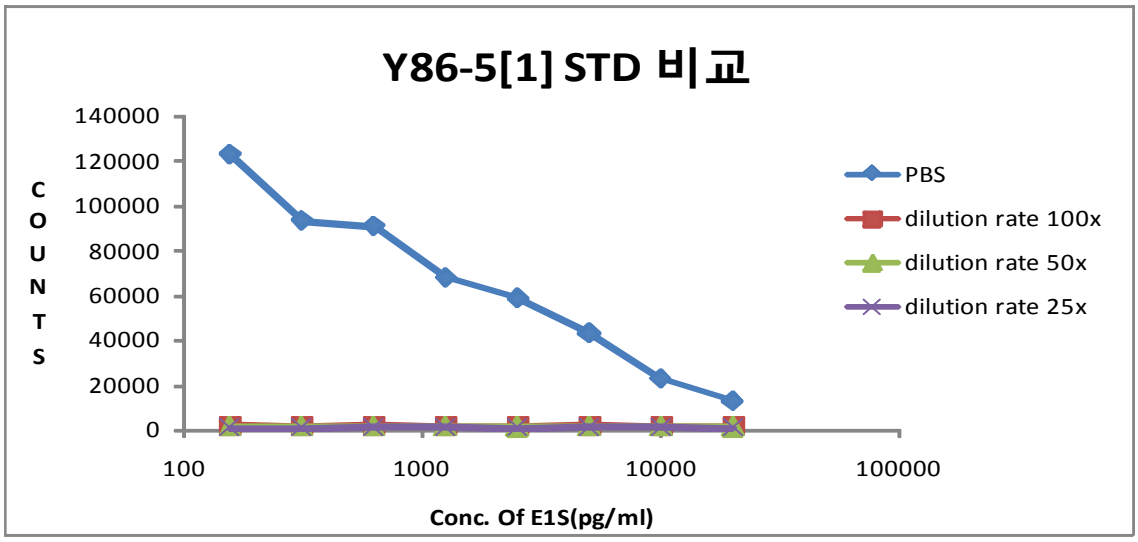
① 수퇘지뇨를 이용한 표준적정곡선

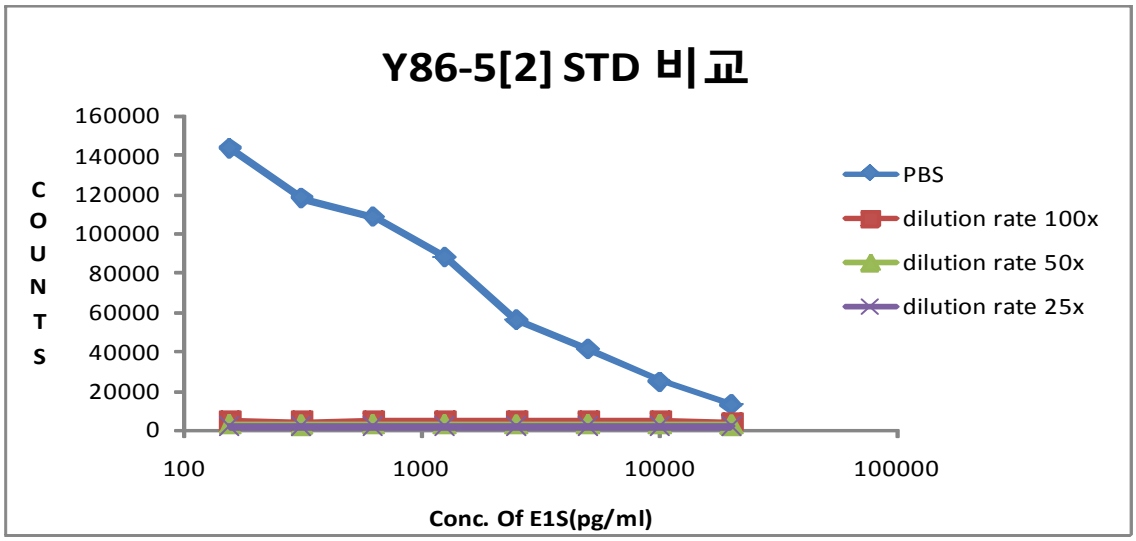
수퇘지뇨를 다양한 희석배율(100배, 50배, 25배)로 희석하여 표준적정곡선을 작성하였다. 수퇘지뇨는 경북축산기술연구소에서 17두(D210-1[1], D210-1[2], Y86-5[1], Y86-5[2], D38-4[1], D38-4[2], D253-1, D253-2, D252-2, D249-2, D8-6, D16-3, L198-7, L436-1, L493-4, Y80-1, Y129-8 ; 같은 번호의 뇨들은 다른 날에 받은 수퇘지뇨임)의 뇨를 받아와서 사용하였다. 각 수퇘지뇨를 이용하여 희석배율별로 표준적정곡선을 작성하고 PBS 버퍼에서 작성한 표준적정곡선과 비교, 분석하였다. 수퇘지뇨를 시린지

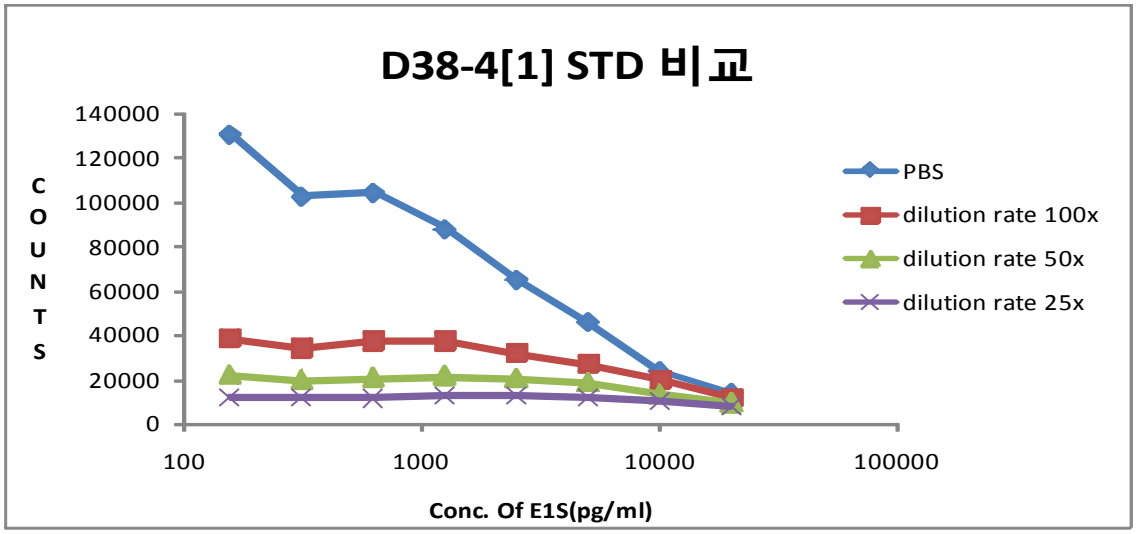
필터의 실시하였음에도 불구하고 PBS 버퍼에서 표준적정곡선을 작성한 것과 많은 차이를 보였다.(그림 17, 18) 이것은 수태지뇨를 수정을 위한 정액을 받을 때 같이 받고, 그 보관이 어려워 뇨에 다양한 다른 물질과 분뇨가 섞여 들어가 차이를 나타난 것으로 사료된다. E1S와 E1G를 측정하는 정량법이 경쟁적 면역 분석법이기 때문에 2 SITES SANDWICH 정량법과는 달리 항원 항체 반응이 방해를 받으면 정량한 결과 값이 높게 나오는 오류를 초래하므로 수태지뇨로서는 실제뇨에서의 정량법을 진행할 수 없다는 결론을 얻었다.

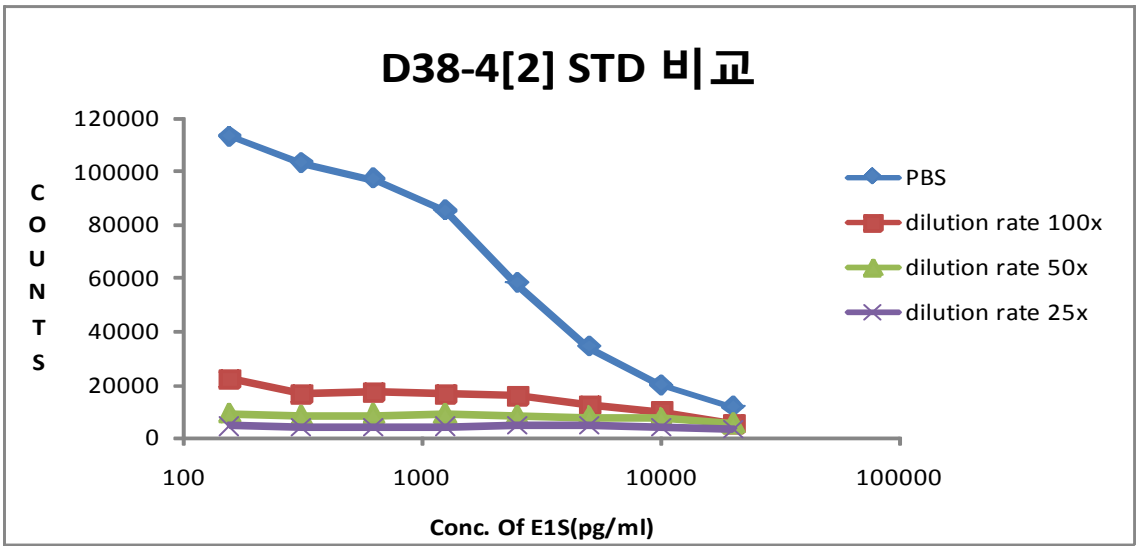


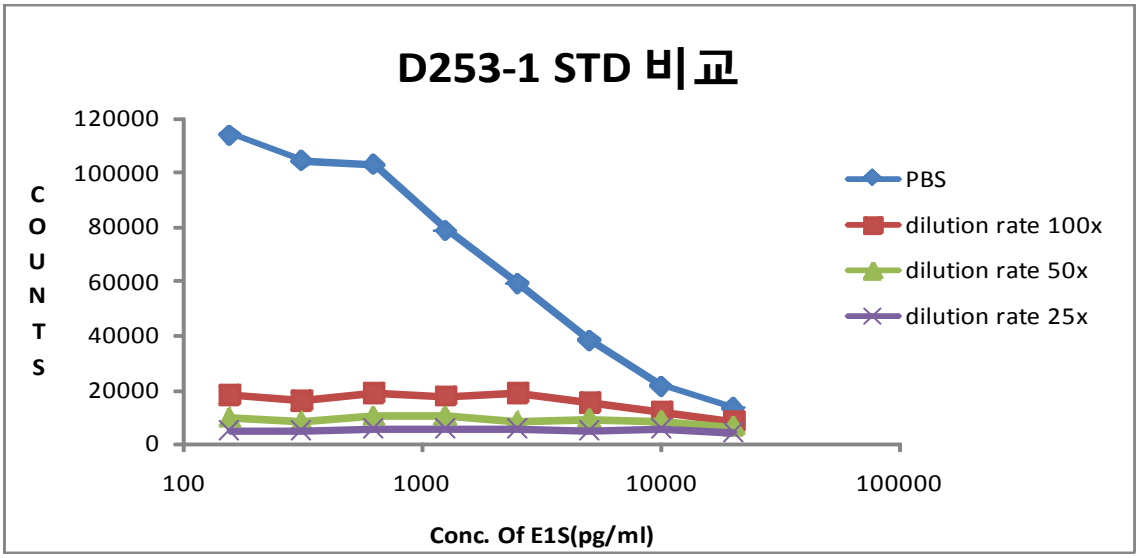


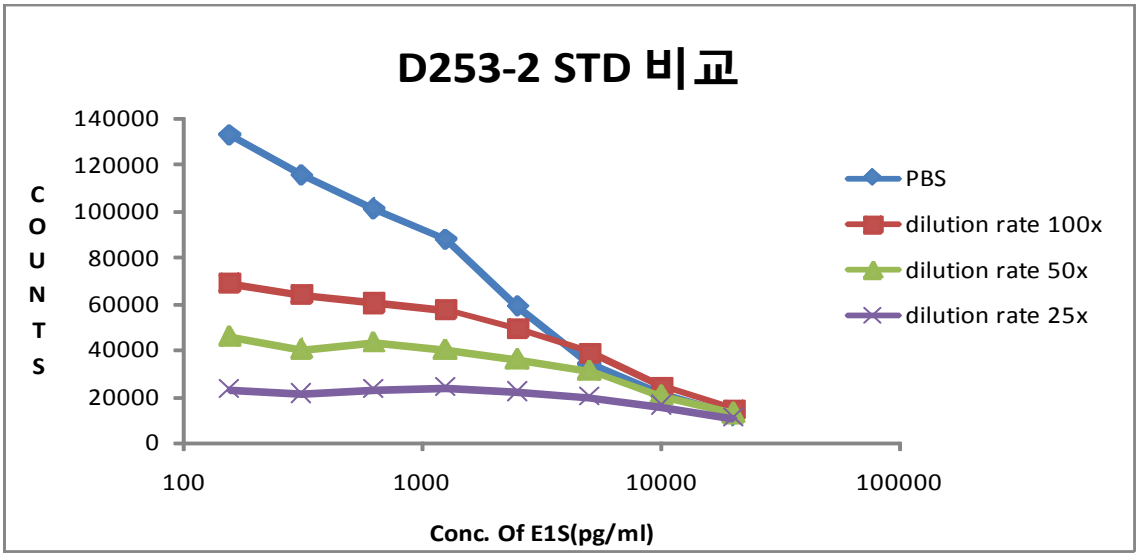

Y86-5[1] STD 비교
COUNTS
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
100
1000
10000
100000
Conc. Of E1S(pg/ml)
PBS
dilution rate 100x
dilution rate 50x
dilution rate 25x

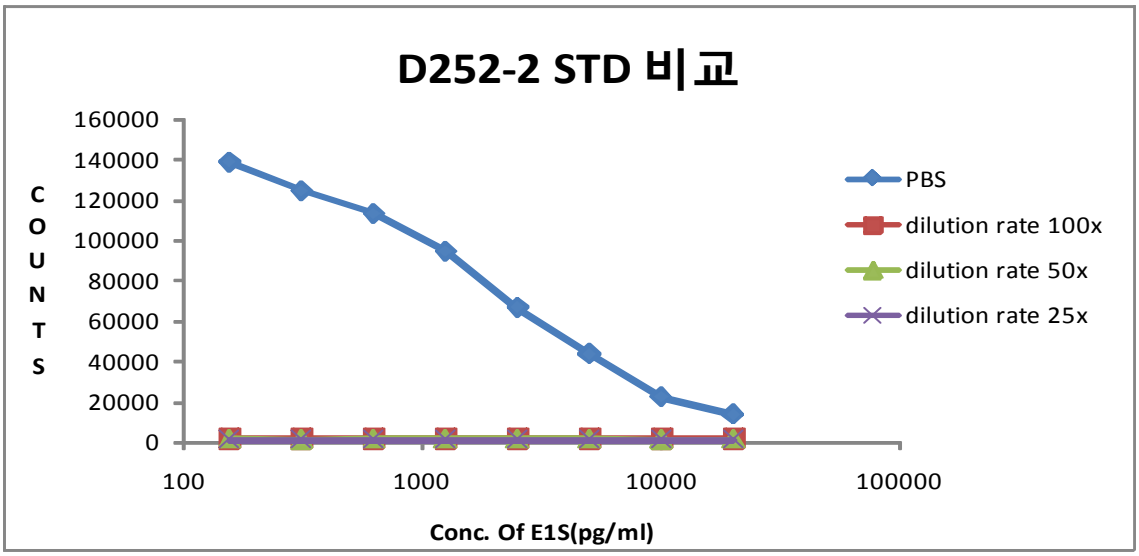

Y86-5[2] STD 비교
COUNTS
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
100
1000
10000
100000
Conc. Of E1S(pg/ml)
PBS
dilution rate 100x
dilution rate 50x
dilution rate 25x

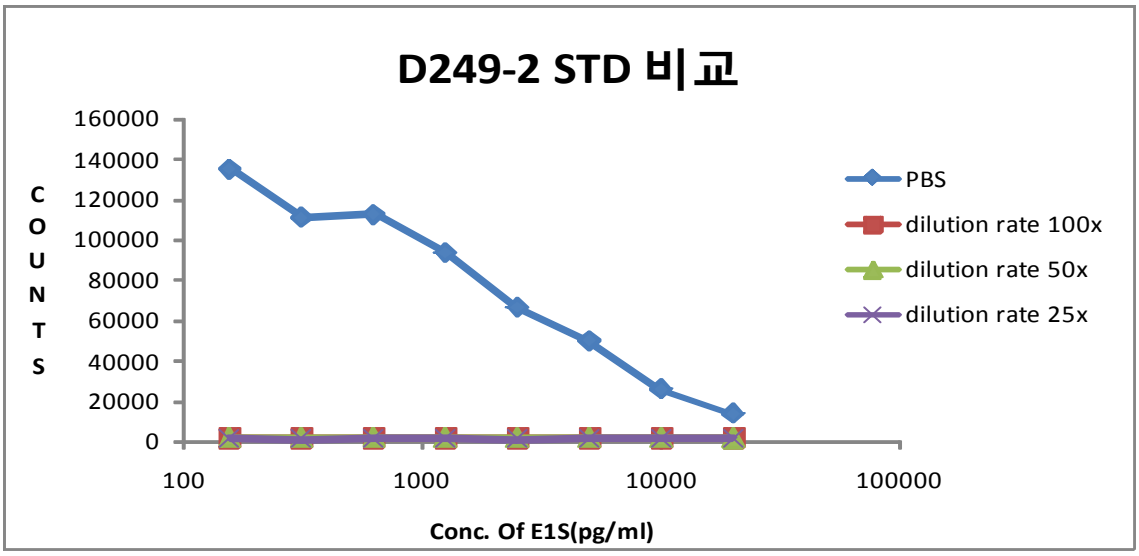

D38-4[1] STD 비교
COUNTS
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
100
1000
10000
100000
Conc. Of E1S(pg/ml)
PBS
dilution rate 100x
dilution rate 50x
dilution rate 25x

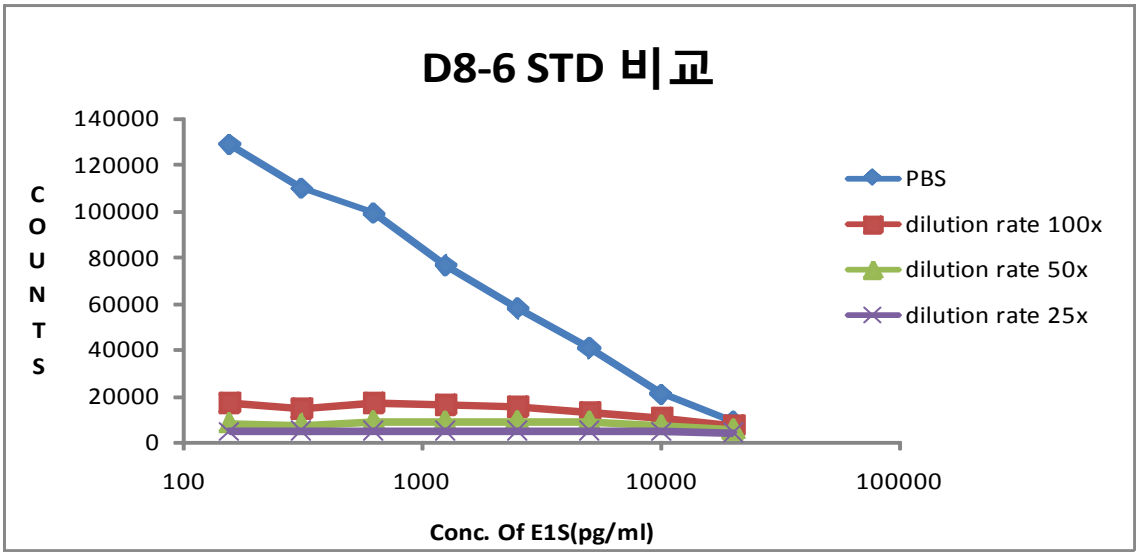

D38-4[2] STD 비교
COUNTS
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
100
1000
10000
100000
Conc. Of E1S(pg/ml)
PBS
dilution rate 100x
dilution rate 50x
dilution rate 25x

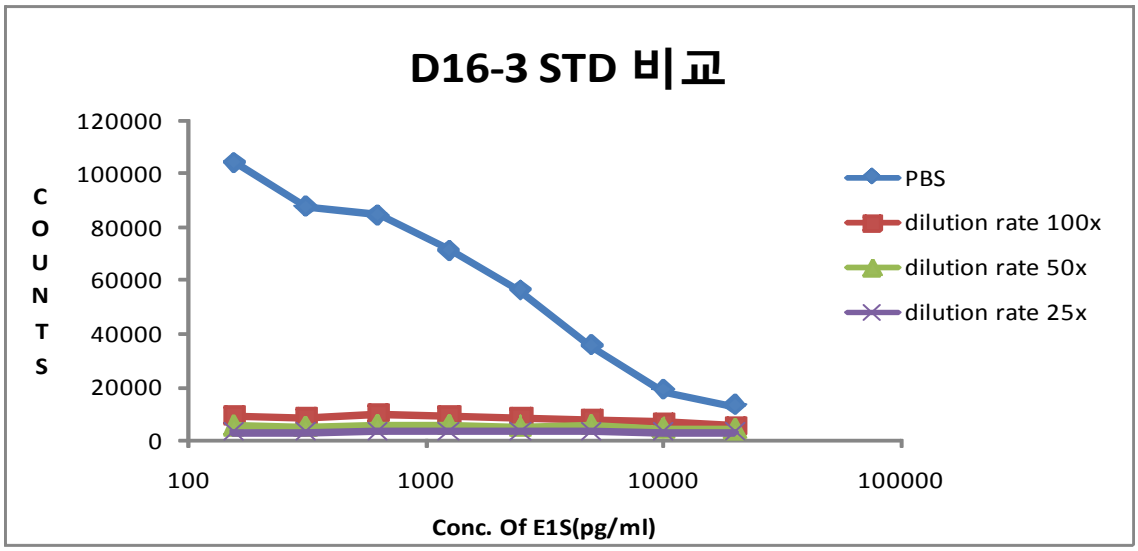

D253-1 STD 비교
COUNTS
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
100
1000
10000
100000
Conc. Of E1S(pg/ml)
PBS
dilution rate 100x
dilution rate 50x
dilution rate 25x

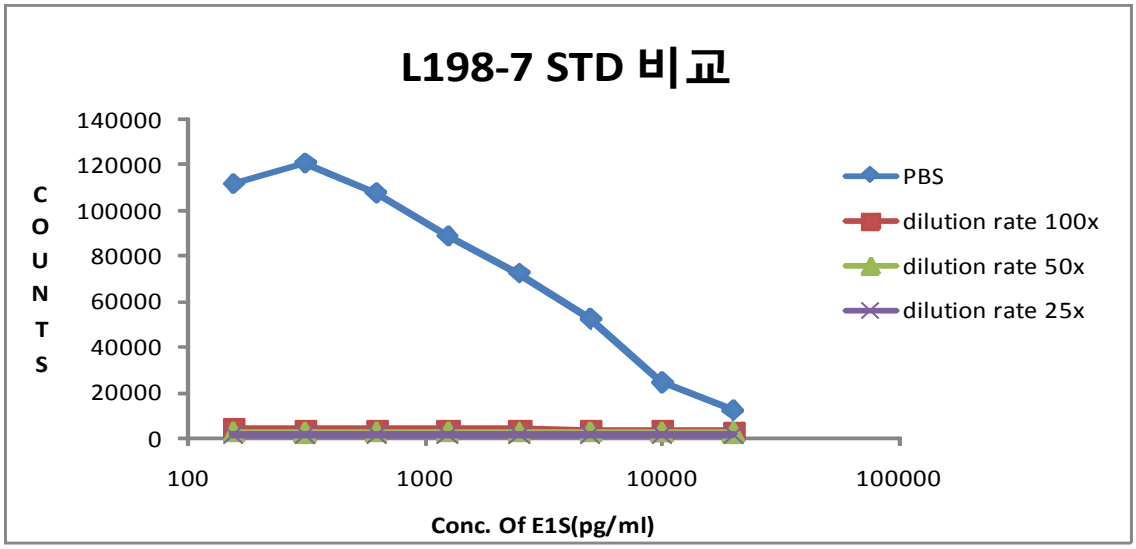

D253-2 STD 비교
COUNTS
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
100
1000
10000
100000
Conc. Of E1S(pg/ml)
PBS
dilution rate 100x
dilution rate 50x
dilution rate 25x

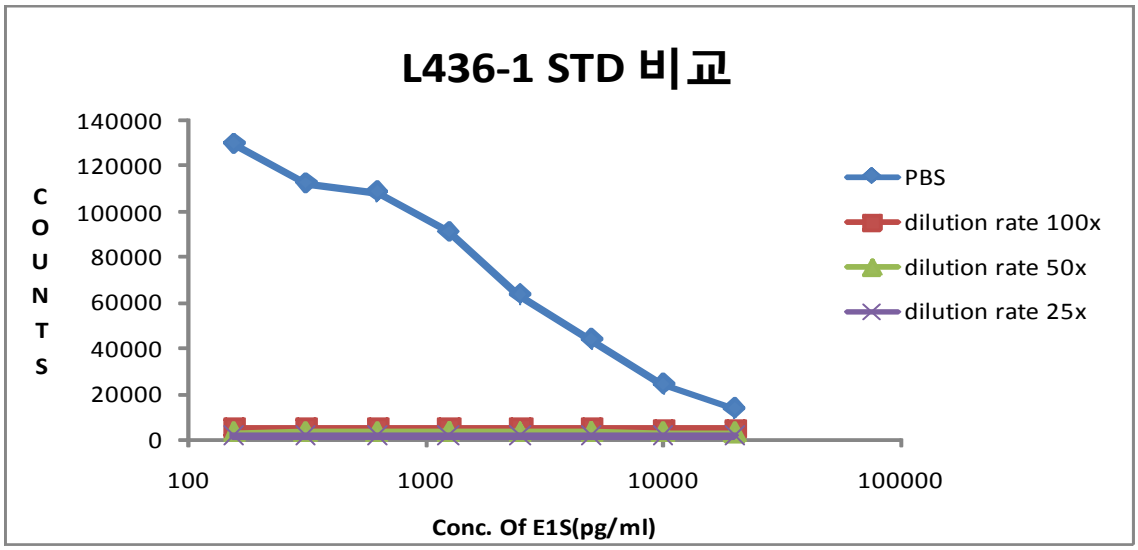

D252-2 STD 비교
COUNTS
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
100
1000
10000
100000
Conc. Of E1S(pg/ml)
PBS
dilution rate 100x
dilution rate 50x
dilution rate 25x

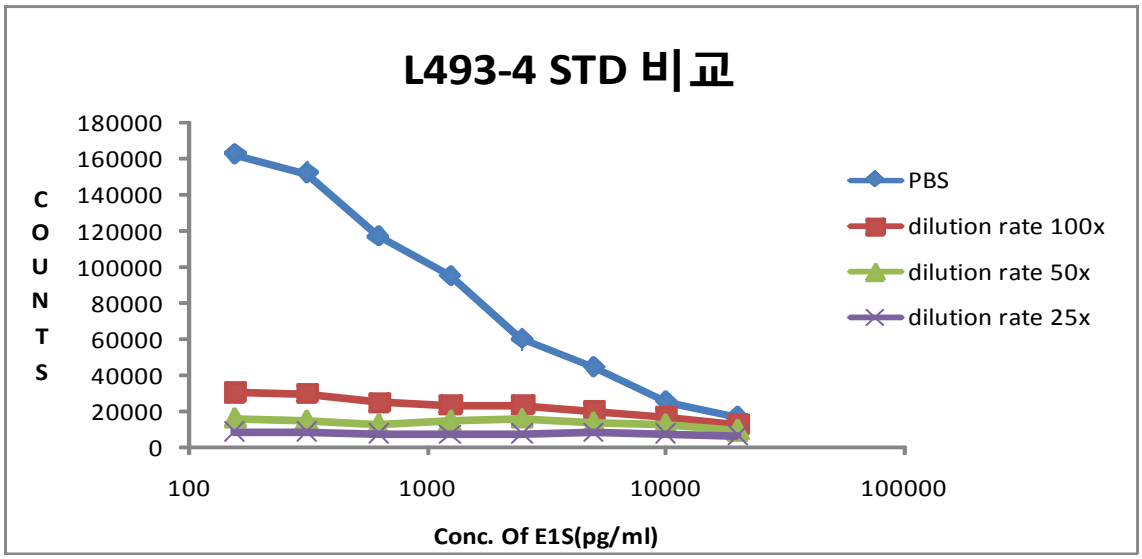

D249-2 STD 비교
COUNTS
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
100
1000
10000
100000
Conc. Of E1S(pg/ml)
PBS
dilution rate 100x
dilution rate 50x
dilution rate 25x

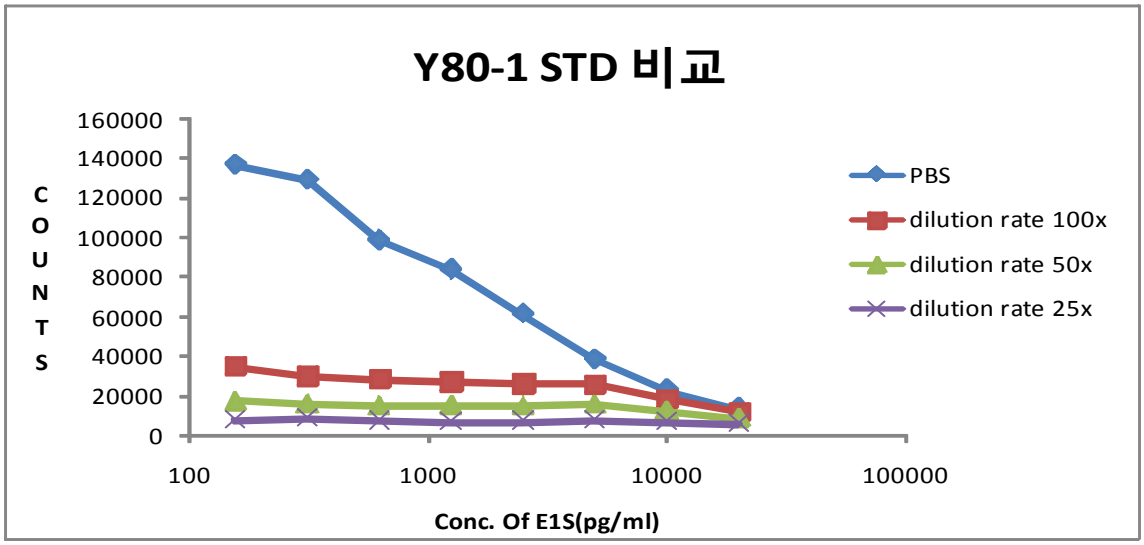

D8-6 STD 비교
COUNTS
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
100
1000
10000
100000
Conc. Of E1S(pg/ml)
PBS
dilution rate 100x
dilution rate 50x
dilution rate 25x


D16-3 STD 비교
COUNTS
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
100
1000
10000
100000
Conc. Of E1S(pg/ml)
PBS
dilution rate 100x
dilution rate 50x
dilution rate 25x


L198-7 STD 비교
COUNTS
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
100
1000
10000
100000
Conc. Of E1S(pg/ml)
PBS
dilution rate 100x
dilution rate 50x
dilution rate 25x


L436-1 STD 비교
COUNTS
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
100
1000
10000
100000
Conc. Of E1S(pg/ml)
PBS
dilution rate 100x
dilution rate 50x
dilution rate 25x





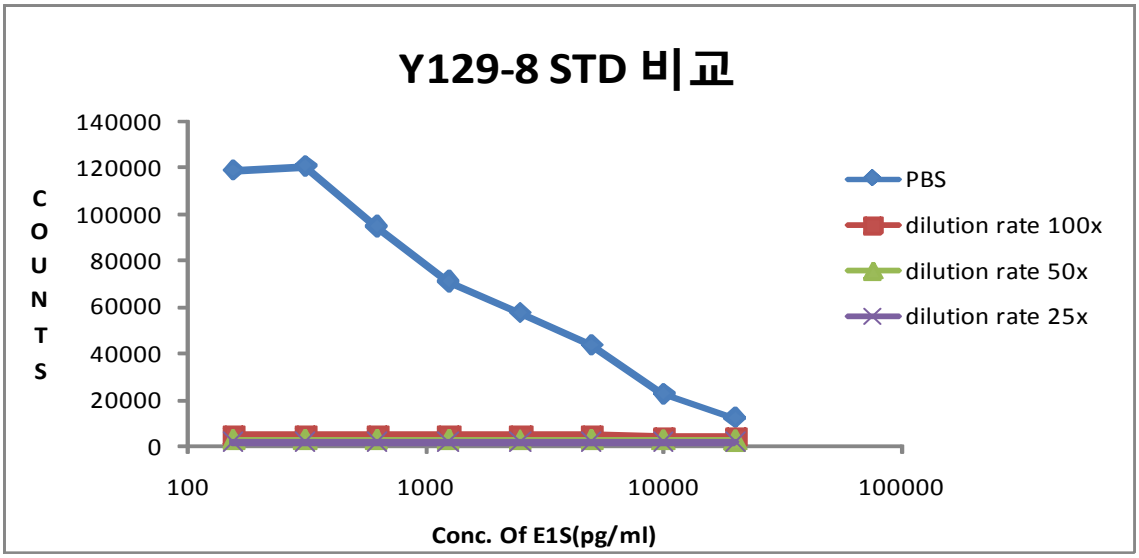


그림 17. 각 수퇘지뇨를 이용한 희석배율별 E1S 표준적정곡선

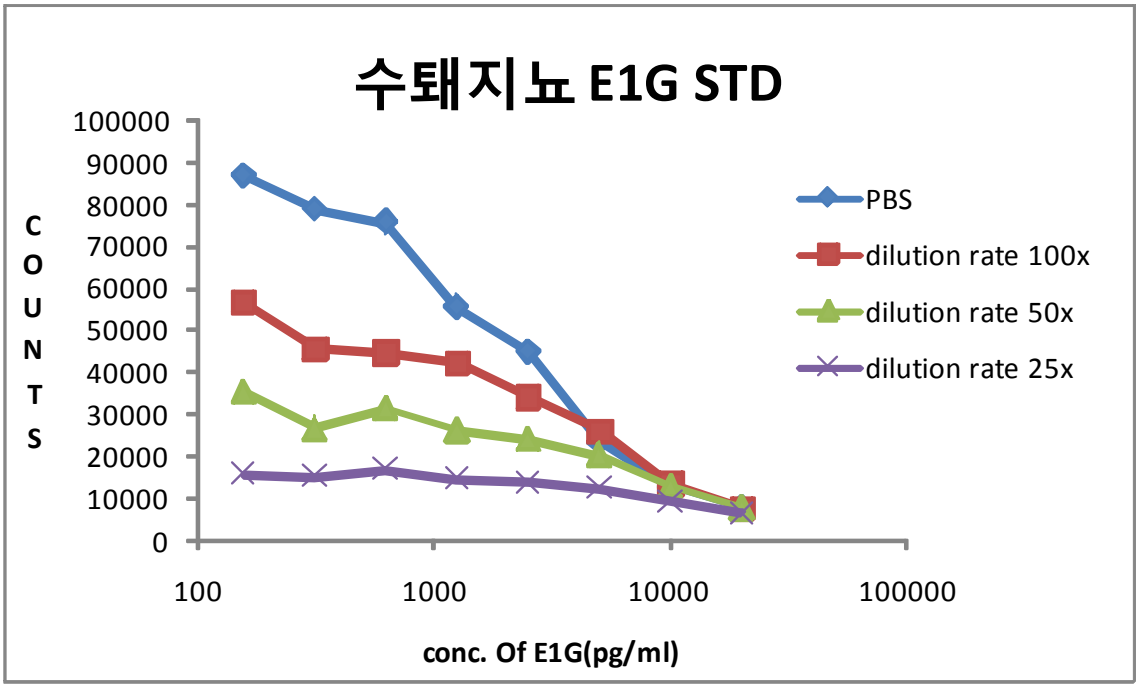


그림 18. 각 수퇘지뇨를 이용한 희석배율별 E1G 표준적정곡선

② 돼지 비임신뇨를 이용한 표준적정곡선

돼지 뇨의 방해물질의 작용을 표준적정곡선에 적용하기 위해 임신이 확실하지 않은 비 임신뇨를 이용하여 다양한 희석배율로 표준적정곡선을 작성하였다. 비임신뇨를 이용한 표준적정곡선은 PBS버퍼를 사용하여 작성한 표준적정곡선과 100배 희석배율까지 차이가 거의 없었다.(그림 19, 20) 이는 암퇘지의 뇨를 받으면 보관이 용이하고, 다른 이물질이 섞여 들어가지 않아 뇨 상태가 양호하여 차이를 보이지 않은 것으로 사료된다. 따라서, 인터널 스텐다드로 사용할 비임신뇨를 하나 정하고 그것을 기준으로 하여 실제뇨에서 E1S, E1G를 측정하였다. 앞으로 샘플을 측정하는 정량실험을 진행할 때 비임신뇨를 이용하여 표준적정곡선을 작성하고 샘플의 E1G, E1S를 측정하는 것으로 결정하였다.

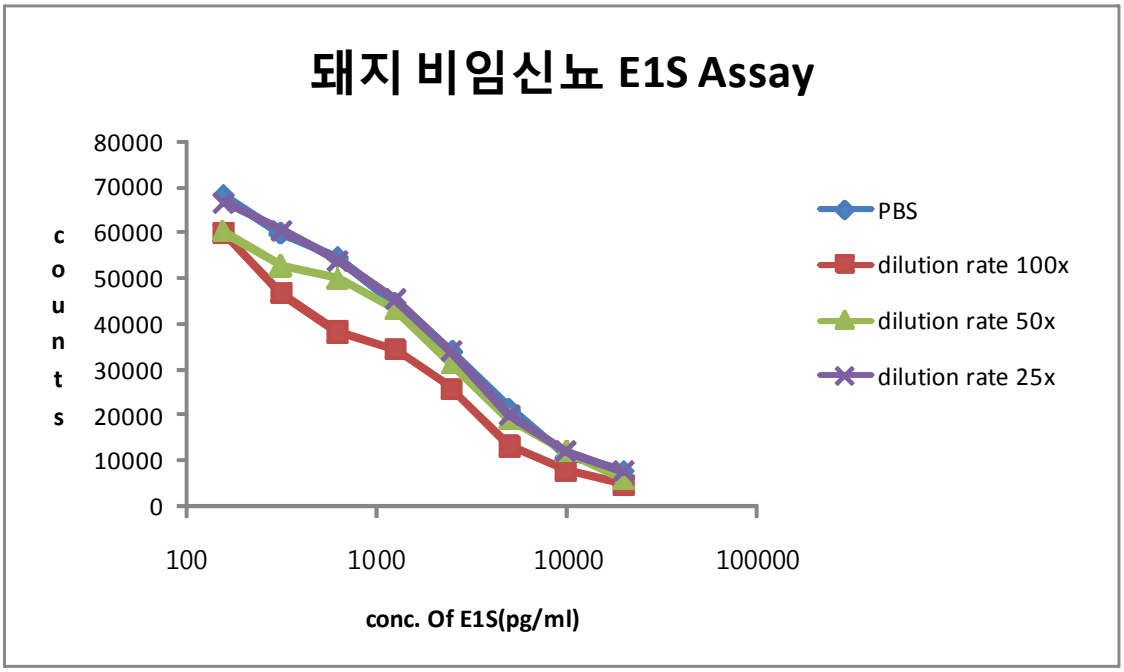


그림 19. 돼지 비임신뇨를 이용한 E1S 표준적정곡선

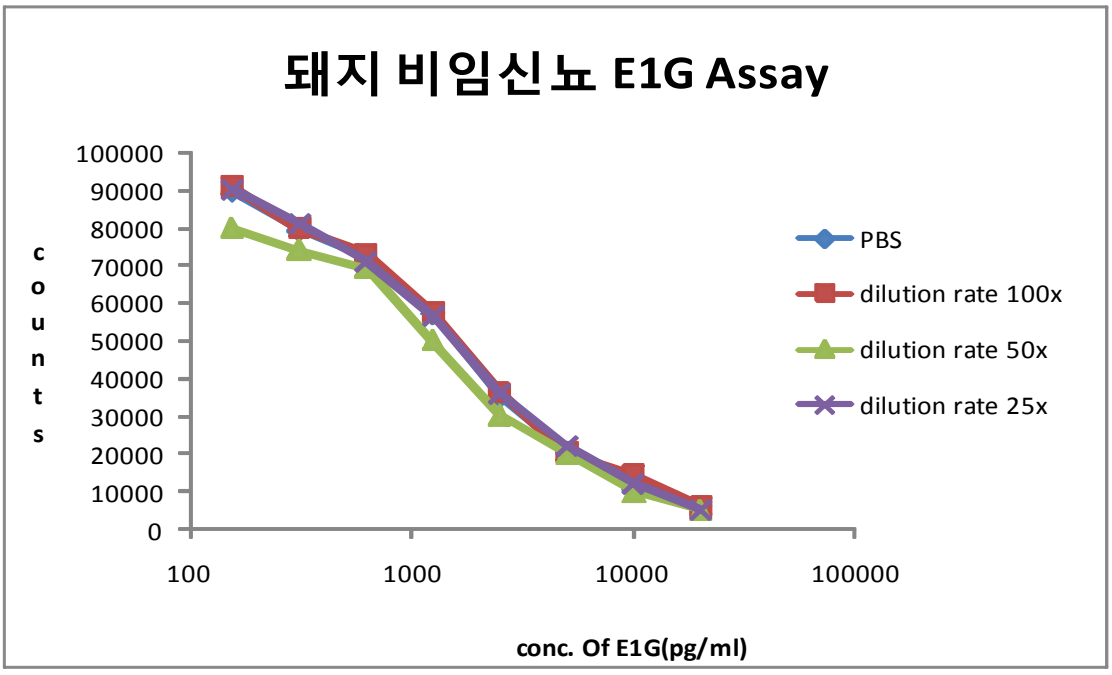


그림 20. 비임신뇨를 이용한 E1G 표준적정곡선

(나) 실제뇨에서 PG 측정을 위한 표준적정곡선

한우의 경우, 경북축산기술연구소에서도 수컷의 뇨를 확보하는 것이 여의치 않아, 한우의 비임신

뇨를 사용하여 표준적정곡선을 작성하였다. 작성한 방법은 상기의 돼지뇨를 이용하여 작성한 방법과 동일하다.

① 한우 비임신뇨를 이용한 표준적정곡선

임신이 되지 않은게 확실한 한우 비임신뇨를 이용하여 다양한 희석배율로 표준적정곡선을 작성하였다. 한우 비임신뇨를 이용한 표준적정곡선은 PBS버퍼를 사용하여 작성한 표준적정곡선과 50배의 희석배율까지 차이가 거의 없었다.(그림 21) 따라서, 인터널 스텐다드로 사용할 한우 비임신뇨를 하나 정하고 그것을 기준으로 하여 실제뇨에서 PG를 측정하였다.

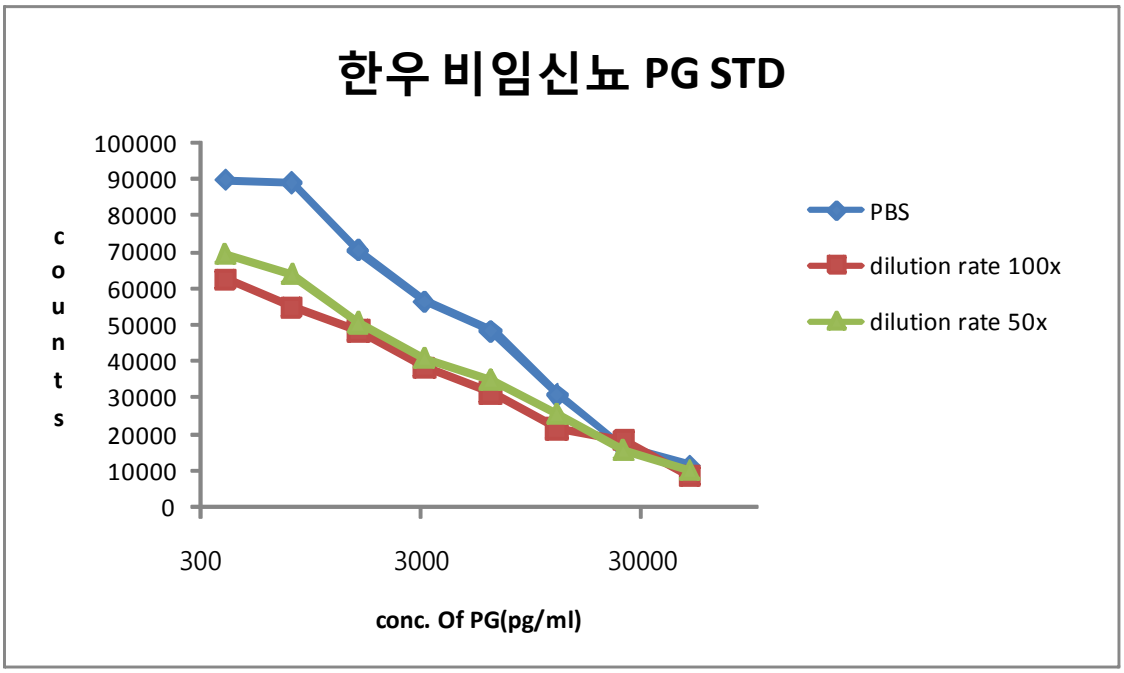


그림 21. 한우 비임신뇨를 이용한 PG 표준적정곡선

바. 한우 및 돼지뇨 시료 확보

(1) 한우뇨 시료 확보

경북축산연구소에서 소유하고 관리하는 한우를 인공수정시킨 뒤 매일 2시간 씩 뇨를 받기위해 대기하다가 뇨를 받아 확보하였다.

(가) PG 정량을 위한 시료 확보

한우뇨 내에 PG의 농도를 정량하기 위하여 그룹별로 수정 후 1일부터 300일까지 다양한 날짜의 시료와 비임신 시료를 경북축산과학기술연구소로부터 확보하였다. (표 2)

표 2. PG 정량 실험을 위한 한우뇨 샘플 목록

한우뇨 group 1		한우뇨 group 2		한우뇨 group 3	
샘플 날자	축번	샘플 날자	축번	샘플 날자	축번
12월 18일	228	12월 12일	06-58	12월 08일	188
12월 09일	78	12월 11일	구-157	12월 18일	223
12월 09일	104	12월 01일	06-81	12월 18일	166
12월 18일	86	12월 11일	구-159	12월 08일	149
12월 09일	196	12월 11일	05-90	12월 08일	212
12월 09일	135	12월 11일	06-75	12월 08일	153
12월 18일	112	12월 04일	9-149	12월 08일	181
12월 09일	101	12월 11일	9-163	12월 08일	21
12월 09일	236	12월 11일	06-83	12월 08일	18
12월 09일	22	12월 11일	06-74	12월 08일	183
12월 09일	236	12월 11일	06-74	12월 08일	111
12월 09일	89	12월 11일	05-68	12월 08일	79
12월 09일	243	12월 11일	06-62	12월 08일	141
12월 09일	69	12월 11일	9-150	12월 08일	216
12월 09일	24	12월 11일	06-80	12월 08일	18
12월 09일	23	12월 11일	9-153	12월 08일	215
12월 09일	235	12월 11일	06-77	12월 08일	199
12월 09일	130	12월 11일	9-150	12월 08일	132
12월 09일	92	12월 11일	05-46	12월 08일	213
12월 09일	187	12월 18일	236	12월 08일	183
12월 09일	190	12월 11일	06-51	12월 08일	115
12월 09일	99	12월 11일	9-152	12월 08일	31
12월 09일	20	12월 11일	9-156	12월 08일	182
12월 09일	32	12월 11일	9-158	12월 08일	170
12월 09일	126	12월 11일	9-162	12월 08일	5

한우뇨 group 4		한우뇨 group 5		한우뇨 group 6	
샘플 날자	축번	샘플 날자	축번	샘플 날자	축번
12월 18일	179	날짜지워짐	140	12월 17일	142
12월 18일	231	날짜지워짐	255	12월 17일	187
12월 10일	239	12월 15일	231	12월 17일	33
12월 18일	254	12월 18일	224	12월 17일	20
12월 10일	9번	12월 18일	140	12월 17일	22
12월 18일	70	12월 12일	189	12월 17일	222
12월 10일	225	12월 15일	228	12월 17일	186
12월 10일	227	12월 15일	54	12월 17일	135
12월 10일	241	12월 15일	254	12월 17일	72
12월 10일	77	12월 12일	33	12월 17일	23
12월 10일	255	12월 15일	129	12월 17일	37
12월 10일	143	12월 15일	253	12월 17일	37
12월 10일	112	날짜지워짐	112	12월 17일	116
12월 10일	178	12월 15일	226	12월 17일	190
12월 10일	186	12월 15일	152	12월 17일	81
12월 10일	237	12월 15일	70	12월 12일	237
12월 10일	232	12월 15일	86	12월 17일	236
12월 18일	243	12월 15일	223	12월 17일	255
12월 10일	248	12월 15일	221	12월 17일	237
12월 10일	200	12월 15일	244	12월 12일	248
12월 10일	40	12월 15일	3	12월 12일	241
12월 10일	239	12월 15일	43	12월 12일	9번
12월 10일	140	12월 15일	152	12월 12일	225
12월 10일	40	12월 15일	74	12월 12일	81번
12월 10일	81	12월 15일	252	12월 12일	200

한우뇨 group 7		12월 17일	241	12월 17일	69
샘플 날자	축번	12월 17일	89	12월 17일	78
12월 17일	34	12월 17일	93	12월 17일	77
12월 17일	248	12월 17일	107	12월 17일	179

(나) 2D Electrophoresis를 위한 시료 확보

2D 전기영동을 하기 위해서는 일정 수준 농도의 단백질이 필요하여, 그것의 분리를 위해서는 대량의 한우뇨가 필요하였다. 경북푹산과학기술연구소에서 임신/ 비임신이 구분된 한우의 뇨를 2L 씩 받아 대량으로 확보하고, 다양한 수정 후 날짜의 뇨를 섞어서 시료를 제조하였다. (샘플 별도 표기 없음)

(2) 돼지뇨 시료 확보

경북축산연구소가 소유하고 있는 돼지를 대량으로 인공 수정시킨 뒤 일수별로 하루에 두시간 씩 뇨를 배출하기를 기다리다가 뇨를 배출하면 50ml의 tube에 받아 -20도씨에 얼려 보관하거나 상온에 보관하여 확보하였다.

(가) 수퇘지뇨 시료 확보

인터널 스텐다드 커브를 위하여 경북축산기술연구소에서 수퇘지뇨를 다량으로 받아 관리하였다. 수퇘지뇨 시료는 일정 기간을 두고 정액을 받을 때 뇨 샘플도 같이 받아 보관하였다.(표 3)

표 3. 표준적정곡선의 조건을 위한 수퇘지뇨 샘플 목록

축번	채취 날짜	비고
D210-1[1]	2006/07/26	정액 채취시 뇨 받음
D210-1[2]	2007/05/09	〃
Y86-5[1]	2006/07/25	〃
Y86-5[2]	2007/05/10	〃
D38-4[1]	2006/07/26	〃
D38-4[2]	2006/05/10	〃
D253-1	2007/11/12	〃
D253-2	2007/11/12	〃
D252-2	2007/11/13	〃
D249-2	2007/11/13	〃
D8-6	2007/12/22	〃
D16-3	2007/12/22	〃
L198-7	2008/02/06	〃
L436-1	2008/02/06	〃
L493-4	2008/02/08	〃
Y80-1	2008/02/08	〃
Y129-8	2008/02/08	〃

(나) 돼지 비임신뇨, 임신뇨 시료 확보

약 10여 차례에 걸쳐서 돼지뇨의 샘플을 경북축산기술연구소로부터 제공받았다. 1차년도에는 적은 수의 특정 날짜별 임신뇨와 더불어 소량의 비임신 시료를 확보하였고, 2차년도에는 수정 후 20~30일 사이의 임신뇨 시료와 발정 돼지뇨, 난소 기능 장애 돼지의 뇨를 확보하였다. 3차년도에는 수정 후 10~30일 사이의 임신뇨 시료와 다량의 비임신 시료, 수정 후 100일이내의 시료를 그룹별로 다량으로 받아서 관리하였다.

표 4. E1S 정량을 위한 임신/ 비임신 돼지뇨 샘플 목록

Group 1		Group 2		Group 3	
순번	축번, 날짜	순번	축번, 날짜	순번	축번, 날짜
1	11-001 11/6	1	6-041 5.1 7/7	1	6-715 6.15 8/7
2	6-571 5.17 7-17	2	11-001 5.1 6/22	2	5-181 4.25 7/4
3	5-693 5.24 7-16	3	2734 4.26 6/26	3	6-770 6.16 8/7
4	6-777 7.8 7/17	4	3010 5.1 7/5	4	2693 7.10 7/28
5	10-304, 9.1, 7/17	5	5-503 4.1 6/21	5	10-304 7/29
6	5-503 11.11 11/16	6	8-307 5.18 7/7	6	2-005 4.11 7/4
7	3099, 8/28	7	6-770 6.16 8/20	7	6-041 5.1 7/28
8	2-005, 4.4, 7/20	8	5-693 5.24 7/7	8	6-770 6.16 8/1
9	11-003,4.20,7/22	9	6-711 5.25 6/24	9	11-003 4.20 7/28
10	6-050, 7/17	10	6-770 6.16 6/30	10	6-056 6.10 8/7
11	11-003, 4.20, 7/12	11	5-488 5.23 8/20	11	11-003 4.20 7/7
12	11-001, 5.1, 7/1	12	3010 5.1 6/24	12	6-041 5.1 8/1
13	2687, 5.1 7/1	13	6-711 6.25 6/21	13	6-715 6.15 7/28
14	2687 5.1 7/17	14	3010 5.1 7/7	14	5-181 4.25 7/29
15	6-770 6.17 7/1	15	5-680 9.18 11/20	15	11-003 5.1 7/28
16	6-766 9.1 11/6	16	5-503 4.3 6/26	16	3010 5.1 7/29
17	6-770 6.16 7/13	17	5-503 4.3 6/22	17	11-001 5.1 7/2
18	6-770 6.16 7/17	18	6-711 6.25 6/21	18	6-051 5.4 7/4
19	5-503 4.3 7/12	19	6-041 5.1 6/22	19	5-502 6.18 8/7
20	2687 5.1 7/22	20	11-001 7/7	20	5-503 4.3 7/5
21	5-488 5.23 7/12	21	6-051 5.21 6/30	21	6-088 6.11 7/29
22	6-710 6.15 7/12	22	6-711 5.25 6/24	22	3010 5.1 8/1
23	11-003 4.28 7/20	23	5-680 9.18 12/3	23	6-770 6.16 87
24	6-042 5.21 7/13	24	11-001 5.1 6/24	24	8-307 5.18 7/5
25	2734 4.26 7/13				
26	6-050 7/22				
27	6-056 6.10 8/28				

Group 4		Group 5		Group 6	
순번	축번, 날짜	순번	축번, 날짜	순번	축번, 날짜
1	11-003 4.20 7/26	1	6-041 10.4 11/17	1	6-056 6.10 8/26
2	5-673 8.23 8/29	2	2734 10.3 11/7	2	5-686 8.18 11/4
3	11-001 5.1 7/25	3	2686 1.3 10/12	3	6-710 6.15 8/6
4	2-005 4.11 7/26	4	6-849 7.7 10/9	4	5-673 11.5 11/19
5	11-001 5.1 8/3	5	2685 9.5 10/12	5	6-770 6.16 8/26
6	6-777 7/8 8/29	6	6-051 10.18 11/9	6	6-715 6.15 9/18
7	2686, 8/29	7	5-673 11.5 11/7	7	6-088 6.11 9/18
8	2734 10.3 10/19	8	2694, 7/16	8	6-056 11.13 11/21
9	2695 7.10 9/7	9	2695 7.10 9/4	9	6-106 9/18
10	6-060 7.3 8/29	10	2695, 7/10	10	11-003 4.20 8/6
11	6-041 5.1 7/25	11	2695 7.10 9/11	11	6-041 5.1 8/6
12	6-051 10/12	12	11-001 11.23.11.30	12	2695 7.10 9/17
13	6-770 6.16 8/22	13	6-770 6.16 9/4	13	6-114 7.20 8/25
14	2687 10.3 10/23	14	6-041 10.4 11/30	14	6-060 7.3 8/25
15	2698 7.16 9/7	15	2-005 9.12 11/9	15	5-680 4.26 8/6
16	6-770 6.16 8/3	16	6-715 6.15 9/11	16	6-114 7.20 8/23
17	2686 10.3 10/23	17	2693 7.10 9/8	17	6-710 6.15 8/25
18	9-401 8.15 10/23	18	2701 9.17 11/30	18	6-770 6.16 9/18
19	6-51 5.21 8/3	19	5-502 5.18 9/11	19	5-181 9.18 11/21
20	5-503 4.3 8/29	20	2734 10.3 11/30	20	6-571 10.18 11/21
21	10-303 4.17 7/26	21	11-003 9.18 11/30	21	10-304 10.3 11/21
22	5-506 6.13 8/22	22	5-502 6.18 9/4	22	6-088 6.11 8/23
23	6-770 6.16 9/7			23	2734 4.26 8/6
24	5-502 6.18 9/8			24	6-088 6.11 8/6

Group 7		Group 8		Group 9	
순번	축번, 날짜	순번	축번, 날짜	순번	축번, 날짜
1	6-056, 11.13 11/27	1	11-003, 9.18 12/5	1	10-304/5.1/6.8
2	6-715, 6.15, 9/5	2	6-571, 10.18, 12/5	2	5-680/9.18/11.2
3	6766, 9.1 11/27	3	6-711, 10.18, 12/5	3	5-673/5.21/6.8
4	6-571, 10.15 11/27	4	6-710,11.12,11/28	4	5-181/4.25/5.16
5	5-502, 6.16, 9/5	5	6-715,6.15,9/19	5	6-106/10.23/11.2
6	6-770, 6.16, 9/5	6	5-181,9.18,12/5	6	9-405/1.11/5.16
7	2693, 7.10, 9/5	7	6-571,10.18,11/23	7	2734/4.26/5.18
8	5-680, 9.18, 11/27	8	5-506,7.16,9/19	8	2691/3.25/5.18
9	2701, 9.17, 11/15	9	6-042,10.19,11/1	9	9-405/1.11/5.16
10	11-003, 9.18 11/15	10	6-571,10.18,11/28	10	5-181/4.25/5.16
11	5-680, 9.18, 11/14	11	2698,10.23,12/5	11	5-673/10.4/11.2
12	2686, 10.3, 11/15	12	5-680,9.18,11/19	12	2734/4.26/5.25
13	2698, 10.23, 11/13	13	6-766,9.1,9/19	13	11-003/4.20/6.8
14	6-041, 10.4, 11/16	14	5-181, 9.18 ,11/28	14	5-673/5.21/6.8
15	6-041, 10.4, 11/14	15	2688,8.17,11/1	15	10-304/5.1/6.8
16	2734, 10.3, 11/16	16	5-680,9.18,11/23	16	11-001/5.1/6.8
17	6-041, 10.4, 11/14	17	11-003,9.18,11/23	17	11-003/4.20/6.8
18	2698, 10.29, 11/16	18	6-766,9.1,10/25	18	2691/3.25/5.18
19	6-711, 10.18 11/15	19	5-680,9.18,11/28	19	6-571/5.25
20	10-304, 10.3 11/15	20	6-106,10.23,10/25	20	10-307/7.29/11.2
21	6-777, 9.28, 11/16	21	6-115,10.27,11/28	21	2734/4.26/5.18
22	5-680, 9.18, 11/16	22	6-849,7.3,9/5	22	11-001/5.1/6.8
23	6-571, 10.18 11/14	23	5-673, 10.04 10/25	23	2734/4.26/5.25
24	5-680, 9.18, 11/15			24	6-088 6.11 8/6

Group 10		Group 11		Group 12	
순번	축번, 날짜	순번	축번, 날짜	순번	축번, 날짜
1	16/07.5.23	1	3010/5.1/6.10	1	189/07.5.15
2	5-686/5.3/6.1	2	5-503/4.3/5.23	2	3010/5.1/6.11
3	11-003/4.20/5.28	3	10-304/5.1/5.23	3	92/07.5.15
4	9-702/2.21/5.19	4	5-503/4.3/5.23	4	190/07.5.5/5.15
5	11-003/4.20/6.1	5	8-307/5.18/5.23/(1)	5	3010/5.1/6.4
6	9-702/2.21/5.19	6	8-307/5.18/5.23(2)	6	11-003/4.20/6.4
7	3010/5.1/5.14	7	3010/5.1/6.10	7	24/07.05.15
8	6-571/5.25	8	11-003/4.20/6.10	8	54/07.05.15
9	5-686/5.3/6.1	9	5-673/5.21/5.30	9	11-003/4.20/6.4
10	33/07.5.23	10	11-003/4.20/6.10	10	106/07.05.15
11	5-503/4.3/5.14	11	11-003/4.20/5.21	11	10-303/4.17/5.29
12	156/07.5.23	12	2734/4.26/6.10	12	11-001/5.1/5.29
13	11-001/5.1/6.1	13	5-503/4.3/5.26	13	11-001/5.1/6.11
14	3010/5.1/5.19	14	11-003/4.20/5.23	14	156/07.05.15/LCL2
15	2687/5.1/5.19	15	5-503/4.3/5.26	15	164/07.05.19/ (no-preg)
16	2691/3.25/5.14	16	11-003/4.20/5.26	16	11-003/4.20/5.29
17	104/07.5.23	17	11-003/4.20/5.30	17	11-001/5.1/5.29
18	188/07.5.23	18	3010/5.1/5.23	18	179/07.05.15/LCL2
19	179/07.5.23	19	10-304/5.1/5.23	19	11-003/4.20/6.4
20	54/07.5.23	20	11-003/4.20/6.30	20	3010/5.1/6.4
21	5-503/4.7/5.14	21	11-003/4.21/5.21	21	170/07.5.15
22	11-003/4.26/5.25	22	2734/4.26/6.10	22	11-001/5.1/6.8
23	11-001/5.1/6.1	23	11-003/4.20/5.26	23	2734/4.26/5.25
24	3010/5.1/5.14	24	11-003/4.20/6.1	24	6-088 6.11 8/6

Group 13		Group 14		Group 15	
순번	축번, 날짜	순번	축번, 날짜	순번	축번, 날짜
1	4-003/4.20/6.20	1	3010(1)/5.1/6.18	1	6-060/8.12/11.5
2	6-088/6.11/6.19	2	3010(2)/5.1/6.18	2	Y11-001/10.29/11.5
3	5693/5.24/5.31	3	3010/5.1/6.19	3	D6-571/9.11/11.12
4	5-503/4.3/5.31	4	5-504(1)/6.19	4	Y11-001/10.29/11.12
5	2734/4.26/6.15	5	5-504(2)/6.19	5	L7-428/10.15/11.13
6	3010/5.1/6.15	6	6-770/6.16/6.18	6	D7-508/9.17/11.12
7	2734/4.26/6.20	7	2688/3.25/6.19	7	Y7-296/8.30/11.10
8	2734/4.26/6.15			8	Y7-473/9.3/11.10
9	2701/4.3/6.15			9	D7-409/8.6/11.9
10	3010/5.1/6.20			10	L7-428/10.15/11.9
11	2683/6.19			11	Y2734/8.20/11.9
12	2688/3.25/6.19			12	재 6-060/8.12/11.10
13	6-770/6.16/6.20			13	Y11-001/11.27/12.3
14	11-003/4.20/5.31			14	Y11-001/11.27/12.3
15	2683/6.19			15	L10-307/11.25/12.3
16	2683/3.18/6.20			16	L10-307/11.25/12.3
17	5-693/5.24/5.31			17	D7-508/9.17/11.3
18	2701/4.3/6.15			18	Y11-001/10.29/11.3
19	5-503/4.3/5.31			19	D6-571/9.11/11.3
20	11-003/4.20/5.31			20	D7-409/8.6/11.3
21	2734/4.26/6.20			21	L7-428/10.15/11.3
22	11-003/4.26/5.25			22	재 6-041/9.1/11.3
23	11-001/5.1/6.1			23	D7-508/9.17/11.3
24	3010/5.1/5.14			24	D6-571/9.11/11.3
				25	재 6-060/8.12/11.17

Group 16		Group 17		Group 18	
순번	축번, 날짜	순번	축번, 날짜	순번	축번, 날짜
1	Y11-001/10.29/11.17	1	D7-508/9.17/11.6	1	D7-508/9.17/10.25
2	L7-428/10.15/11.17	2	재 7-029/10.26/11.18	2	재 6-042/8.27/10.25
3	재 6-060/8012/11.4	3	L7-428/10.15/11.26	3	재 6-041/9.1/10.25
4	Y7-296/8.10/11.4	4	Y11-001/10.29/11.25	4	Y2734/8.26/10.24
5	D7-508/9.17/11.4	5	L10-307/11.25/12.5	5	Y7-162/7.21/10.24
6	L7-195/8.7/11.4	6	Y11-001/11.27/12.5	6	Y2734/8.26/10.24
7	L7-428/10.15/11.4	7	L10-307/11.25/12.5	7	재 6-041/9.1/10.24
8	D7-409/8.6/11.4	8	Y7-253/11.11/12.8	8	Y7-162/7.21/10.24
9	L7-428/10.15/11.18	9	Y11-001/11.27/12.8	9	Y2697/7.22/10.24
10	재 6-056/9.17/11.18	10	Y11-001/11.27/12.8	10	재 6-041/9.1/10.26
11	D6-770/9.11/11.18	11	Y7-253/11.11/12.8	11	D7-434//10.26
12	Y7-253/11.11/12.1			12	Y2734/8.26/10.26
13	Y7-253/11.11/12.1			13	Y7-473/9.3/10.28
14	Y11-001/10.29/11.24			14	D7-409/8.6/10.28
15	재 6-056/9.17/11.24			15	Y11-001/7.22/10.28
16	L7-428/10.15/11.24			16	D6-571/9.11/10.29
17	L7-428/10.15/11.20			17	Y2734/8.26/10.27
18	Y11-001/11.27/12.4			18	재 6-041/9.1/10.27
19	L10-307/11.25/12.4			19	Y7-296/8.30/10.27
20	L7-427/11.4/12.4			20	D7-508/9.17/10.27
21	L10-307/11.25/12.4			21	D6-571/9.11/10.30
22	Y11-001/11.27/12.4			22	Y2734/8.26/10.30
23	D6-571/9.11/11.6			23	D7-508/9.17/10.30
24	재 6-041/9.1/11.6			24	재 6-041/9.1/10.30
25	Y2734/8.26/11.6			25	D6-571/9.11/11.11
				26	Y2734/8.26/11.11
				27	D7-508/9.17/11.11
				28	Y7-493/9.3/11.11
				29	재 6-060/8.12/11.11
				30	재 6-041/9.1/11.11

Group 19		Group 20		Group 21	
순번	축번, 날짜	순번	축번, 날짜	순번	축번, 날짜
1	Y8-257//2.3	1	Y8-129/1.16/2.6	1	Y8-208//1.7
2	D5-673/11.28/12.11	2	Y8-140/1.6/1.22	2	Y8-257//2.5
3	D8-194//2.3	3	Y11-001/11.27/12.12	3	L7-484/1.29/2.5
4	L10-307/11.25/12.17	4	D8-193//2.10	4	Y7-217/1.22/2.5
5	Y8-208//2.3	5	Y8-129/1.16/2.9	5	L8-118/12.30/2.5
6	Y11-001/10.27/12.11	6	Y8-130/1.1/1.22	6	Y8-130/1.1/1.23
7	Y11-001/11.27/12.17	7	L8-118/12.30/2.18	7	D7-434/12.16/12.19
8	D8-194//1.9	8	D8-194/1.15/2.2	8	D8-194/1.15/1.23
9	D7-409/12.30/1.9	9	D8-193//2.9	9	Y8-208//1.23
10	D7-434/12.16/12.22	10	D8-194/1.15/2.6	10	Y11-001/1.22/1.23
11	Y11-001/11.27/12.24	11	Y8-246//2.10	11	L8-156//1.28
12	L8-118/12.30/2.3	12	Y8-246//2.6	12	Y8-267//1.7
13	Y8-208//1.9	13	Y8-119//2.10	13	L8-119/1.16/1.7
14	L7-427/11.4/12.18	14	L7-484/1.29/2.10	14	D8-195//1.28
15	Y11-001/11.27/12.24	15	L8-208//2.9	15	D8-194//1.7
16	Y8-186//1.9	16	Y8-156//2.6	16	L8-119/1.16/1.7
17	L10-307/11.25/12.17	17	L8-257//2.2	17	L7-195//1.7
18	Y8-267//1.9	18	L10-307/11.25/12.15	18	L7-195//1.7
19	D5-673/11.28/12.11	19	Y8-208//2.2	19	Y8-208//1.28
20	D7-434/12.16/12.18	20	Y8-129/1.16/2.10	20	L8-158/12.23/1.23
21	Y8-140/1.6/1.9	21	Y11-001/11.27/12.15	21	재래 6-106/12.15/12.19
22	Y11-001/10.27/12.11	22	재래6-106/1.30/2.9	22	재래 6-106/12.15/12.19
23	Y8-130/1.1/1.9	23	Y11-001/1.22/2.9	23	Y7-217/1.22/1.28
24	L8-156//2.3	24	Y8-257//2.9	24	재래 6-106/12.15/1.7
25	Y11-001/11.27/12.18	25	D8-193//1.22	25	Y11-001/1.22/1.28
26	D5-673/11.28/12.24	26	Y11-001/1.22/2.2	26	Y11-001/11.27/1.7
27	D7-434/12.16/12.24	27	Y7-217/1.22/2.6	27	D8-196//2.5
28	Y11-001/1.22/2.3	28	D8-194/1.15/2.10	28	D8-194//1.28
29	L7-427/11.4/12.18	29	Y11-001/11.27/12.15	29	Y8-246//2.5
30	D5-673/11.28/12.24	30	L8-118/12.30/1.22	30	Y8-208//2.5

Group 22		Group 23		Group 24	
순번	축번, 날짜	순번	축번, 날짜	순번	축번, 날짜
1	Y2695/12.10/12.26	1	D8-194/1.15/1.21	1	D8-193//1.8
2	Y11-001/11.27/12.31	2	D5-673/11.28/12.26	2	Y8-208//1.8
3	Y2695/12.10/12.30	3	Y2734/1.20/2.4	3	Y8-140/1.6/1.13
4	D8-146/12.30/1.13	4	Y11-001/11.27/12.19	4	Y8-267//1.7
5	Y2695/12.10/12.31	5	L8-118/12.30/1.21	5	Y8-208//1.14
6	D8-196//1.13	6	D8-196//1.21	6	D8-148/12.25/1.8
7	Y2695/12.10/12.22	7	D8-195//2.4	7	D8-195//1.14
8	D5-673/11.28/12.22	8	재래 6-106/12.15/1.21	8	Y8-257//1.29
9	Y2701/12.10/12.22	9	D7-409/12.30/1.21	9	Y8-130/1.1/1.14
10	Y11-001/11.27/1.12	10	Y7-217/1.6/1.21	10	D7-490/12.30/1.14
11	Y2701/12.10/12.22	11	Y2701/12.10/12.29	11	L8-156//1.29
12	D8-196//1.12	12	D8-194/1.15/2.4	12	L8-118/12.30/1.19
13	L8-118/12.30/1.13	13	Y11-001/11.27/12.16	13	Y8-130/1.1/1.8
14	L10-307/11.25/12.30	14	Y11-001/11.27/12.16	14	L8-158/12.23/1.8
15	Y2701/12.10/12.26	15	D8-193//1.6	15	D8-196//1.8
16	Y2701/12.10/12.26	16	L10-307/11.25/12.16	16	Y8-208//1.19
17	Y11-001/11.27/12.26	17	Y8-257//2.4	17	L8-118/12.30/1.14
18	Y2695/12.10/12.26	18	L10-307/11.25/12.26	18	Y8-129/1.16/1.29
19	Y2695/12.10/12.31	19	Y8-208//1.21	19	L8-158/12.23/1.19
20	D5-673/11.28/12.16	20	L8-118/12.30/1.4	20	D8-194/1.15/1.29
21	L8-119/1.6/1.13	21	D7-434/12.16/12.16	21	L8-156//1.19
22	L8-158/12.23/1.13	22	Y11-001/11.27/1.6	22	D8-148/12.25/1.14
23	Y7-253/11.11/12.9	23	D8-194//1.6	23	Y11-001/11.27/1.8
24	Y2695/12.10/12.22	24	Y11-001/11.27/1.6	24	D8-196//1.29
25	D8-193//1.12	25	L8-158/12.23/12.29	25	Y8-208//1.29
26	Y8-208//1.12	26	D8-193//1.6	26	재래 6-106/12.15/1.19
27	L8-156//1.12	27	Y2701/12.10/12.29	27	D8-194/1.15/1.19
28	Y8-140/1.6/1.12	28	Y11-001/11.27/12.29	28	Y11-001/11.27/1.19
29	Y7-253/11.11/12.9	29	Y11-001/11.27/12.29	29	Y8-140/1.6/1.19
30	Y8-267//1.12			30	재 6-041/9.1/11.11

Group 25		Group 26		Group 27	
순번	축번, 날짜	순번	축번, 날짜	순번	축번, 날짜
1	Y8-267//1.20	1	D8-193/2.26/3.17	1	D8-193//2.16
2	D8-195//1.16	2	L7-484/1.29/2.12	2	D8-196//2.11
3	Y8-208//1.15	3	Y11-001/1.22/2.20	3	L8-118/2.15/3.9
4	D8-194/1.15/1.30	4	Y7-463/3.10/3.19	4	D6-776//3.9
5	D8-193//1.14	5	D6-571/2.11/2.12	5	L7-484/1.29/3.4
6	재래 6-106/12.15/1.6	6	Y8-208//2.20	6	Y8-208//3.9
7	Y8-208//1.6	7	Y11-001/1.22/2.12	7	Y11-001/1.22/2.16
8	Y8-257//1.30	8	L8-118/2.15/3.17	8	D6-766//3.9
9	L8-158/12.23/1.15	9	D6-571/2.11/2.13	9	재래 6-056/2.17/3.13
10	Y7-130/1.1/1.16	10	D8-193//2.20	10	D8-196/2.17/3.13
11	Y8-257//1.20	11	D6-571/2.11/2.20	11	L7-484/1.29/3.9
12	D8-194/1.15/1.20	12	YD-186/1.31/2.13	12	D6-571/2.11/2.16
13	D8-193//1.30	13	Y2734/1.20/2.13	13	L8-118/2.15/3.13
14	Y8-208//1.30	14	재래 6-056/2.17/3.19	14	재래6-106/1.30/3.9
15	Y7-217/1.6/1.15	15	L8-118/2.15/3.19	15	Y8-246//2.11
16	L8-119/1.6/1.15	16	Y8-208//2.12	16	D8-213/3.10/3.13
17	Y7-217/1.6/1.16	17	Y7-463/3.10/3.17	17	L8-156//2.11
18	L8-158/12.23/1.16	18	D8-184/1.15/2.12	18	Y2734/1.20/2.11
19	Y8-257//1.15	19	D8-193//2.12	19	D6-770/2.11/3.9
20	L8-118/12.30/1.20	20	D8-213/3.10/3.19	20	L8-156//2.16
21	L8-118/12.30/1.30	21	D6-770/2.10/2.20	21	Y8-208//2.11
22	D8-146/12.30/1.20	22	D6-766//3.17	22	재래6-042/2.6/3.13
23	Y8-208//1.20	23	재래 6-106/1.30/2.20	23	Y8-208//2.16/
24	L8-118/12.30/1.15	24	L6-849/2.21/3.19	24	Y11-001/1.22/2.11
				25	Y8-138/2.15/3.13

Group 28		Group 29	
순번	축번, 날짜	순번	축번, 날짜
1	Y8-257//3.4	1	재6-041/2.9/3.5
2	Y8-208//3.4	2	L6-849/2.21/3.5
3	Y8-186/1.31/2.17	3	L8-156//3.5
4	D8-193//2.17	4	D6-571/2.11/3.5
5	Y8-257//3.12	5	D8-193/2.26/3.11
6	L8-118/2.15/2.17	6	재6-106/1.30/3.5
7	D8-213/3.10/3.16	7	Y8-208//3.5
8	Y7-463/3.10/3.16	8	Y7-296/2.5/3.5
9	L8-118/2.15/3.13	9	L8-118/2.15/3.11
10	Y8-246//3.12		
11	Y8-186/1.31/3.4		
12	D8-196/2.17/3.11		
13	D8-196/2.17/3.12		
14	재래6-042/2.6/3.12		
15	재래6-041/2.9/2.17		
16	L8-118/2.15/2.17		
17	재래6-402/2.6/2.17		
18	Y8-208//3.11		
19	Y8-208//2.17		
20	L8-118/2.15/3.4		
21	D8-196/2.17/3.16		
22	D6-571/2.11/2.17		
23	Y7-296/2.5/3.4		
24	Y11-001/1.22/2.17		

(다) 난소 기능에 이상이 암퇘지뇨 시료 확보

2차년도에 집중적으로 초음파 검사, 수정의 여부의 방법으로 확인된 난소기능에 이상이 있는 암퇘지뇨 시료를 확보하였다. (별도 샘플 표기 없음)

사. 표준적정곡선을 이용한 임신/비임신 판별 여부 1차

(1) 돼지뇨에서 E1S 함량 조사

상기의 방법으로 작성한 표준적정곡선을 이용하여 일차적으로 확보된 시료에 대하 임신/비임신의 여부를 판별하였다. sample은 경북 축산기술연구소에서 돼지를 인공수정시킨 후 20일째부터 90일까지 날짜별로 채취한 뇨와 대조군으로 비임신뇨를 제공받아 사용하였다. 그 결과, 돼지의 경우 비임신뇨에서는 E1S의 함량이 약 5ng/ml정도를 나타내었고, 임신뇨에서는 평균 약 70ng/ml의 E1S 함량을 나타내었다. 많은 시료가 아직 확보되지 않았고 적은 시료를 분석한 이 결과가 정확한 임신/비임신을 구분짓는 기준치라고 결론을 내리기 어려우나 가능성을 보여주기 때문에 충분한 연구가치가 있다고 사료되며, 결과에서 나타난 E1S의 현격한 함량 차이는 임신/비임신의 기준치를 설정하는데 긍정적인 가능성을 보여준다고 할 수 있다.

(가) 표준적정곡선 (비임신뇨를 사용한 인터널 스텐다드)

E1S에 대한 표준적정곡선은 E1G에 대한 항체이지만 E1G와 cross-reactivity가 있는 clone 155 항체로 경쟁적 면역 분석법의 방법으로 작성하였다. 먼저 96 plate에 코팅완충용액에 적당한 희석배율로 희석된 clone 155를 코팅한다. 코팅을 잘 이루어지게 하기 위해 37도의 인큐베이터에서 2시간동안 반응시킨다. 2시간 후 plate를 직접 3번 워싱하고, non-specific binding을 최소화하기 위해 2%의 BSA로 37도에서 2시간동안 블락킹시킨다. 다시 plate를 워싱하고, 표준적정곡선을 그리기위해 다양한 농도로 일정비율로 희석된 E1S와 정량하고자 하는 시료들, 그리고 경쟁반응을 위해 conjugate인 Eu-E1G를 적정 농도로 희석하여 plate에 로딩한 후 1시간동안 상온에서 약하게 shaking 시킨다. 반응이 다 일어난 후, 다시 plate를 워싱하고 Enhancement Solution을 well당 200ul씩 넣고 상온에서 15분 동안 다시 shaking 후, 델피아 기계인 VICTOR 2D (DELFIA 1420)로 디텍션한다. 결과로 나타난 E1S에 대한 표준적정곡선은 100배의 비임신뇨를 희석한 버퍼에서 작성된 인터널 스텐다드이며, 샘플도 마찬가지로 100배 희석하여 E1S의 농도를 측정하고 마지막에 100배를 하는 방법으로 정량 실험을 진행하였다. 결과로 나온 표준적정곡선은 정량을 하기에 문제가 없는 것으로 사료되었으며, 이를 이용하여 여러 시료들의 E1S 정량값을 구하였다. (그림 22)

E1S에 대한 표준적정곡선은 경쟁적 면역 분석법이기 때문에 직선함수로 나타나지 않고 로그함수로 나타낸다. 또한 엑셀에 나타나는 로그함수식은 소수점 둘째 자리까지 밖에 계산이 안되는 한계가 있기 때문에 EViews 4.1이라는 프로그램을 써서 정량 값을 계산하였다. 이 프로그램은 소수 셋째 자리까지 로그함수가 계산되는 프로그램이기 때문에 엑셀보다는 정량값 계산이 월등히 정확하나 그래프에 비추어 볼 때, 오차가 많이 나는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 E1S 및 E1G, PG 정량법에 있어서 정량값의 계산 방법은 직접적인 카운트값을 그래프에 대조하여 농도를 계산하는 것이 더욱 정확하고 신빙성이

있는 것으로 확인되었다.

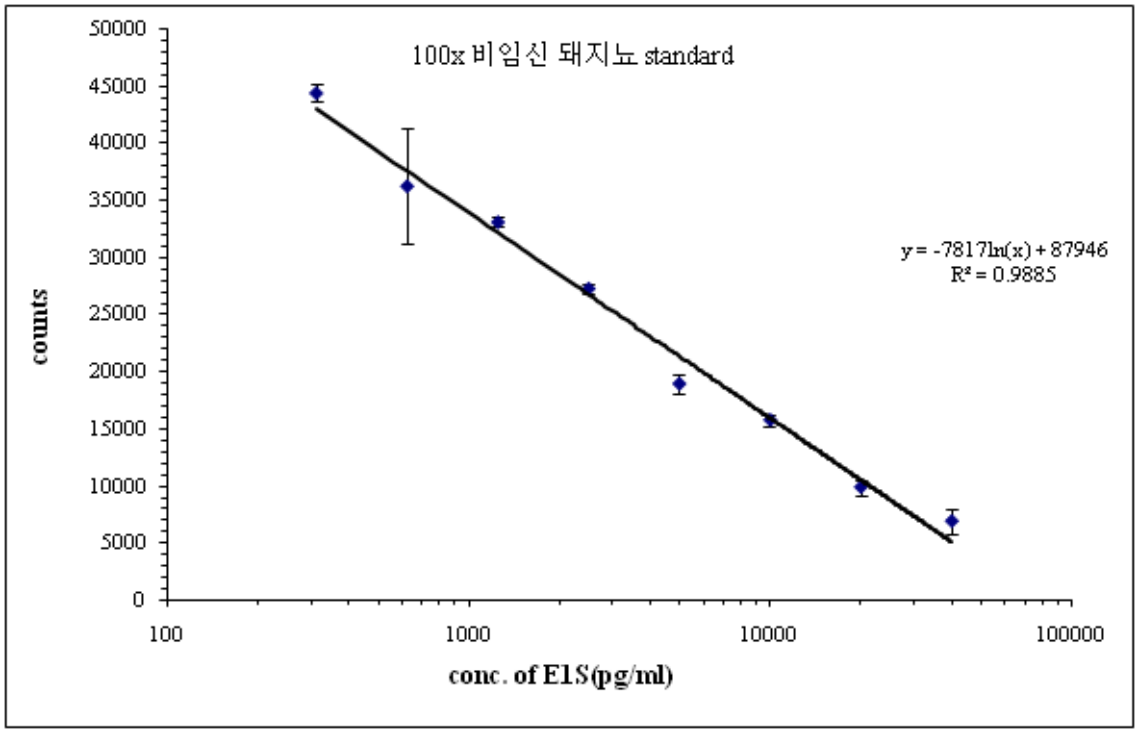


그림 22. 100배 희석된 비임신뇨 버퍼를 이용하여 작성한 E1S 표준적정곡선

(나) 임신/비임신 돼지뇨 시료 정량값

돼지뇨 임신/ 비임신이 확실한 시료를 제공받아 델피아법으로 카운트값을 구하고, 상기의 표준적정곡선과 비교하여 시료속의 E1S 농도를 구하였다. (표 5) 임신과 비임신의 시료속의 E1S의 농도 차이가 확연히 나는 결과가 나와 연구의 가능성이 있는 것으로 사료되었다.

표 5. 돼지뇨 임신/ 비임신 시료의 E1S 정량값

	농도 평균 (ng/ml)	분석 두수	비고
돼지 임신 시료	77±2.7	21 samples	수정 후 20-30일
돼지 비임신 시료	5.15±0.01	23 samples	

(2) 한우뇨에서 PG 함량 조사

한우뇨 분석도 돼지뇨 분석과 마찬가지로 우선 일차적으로 확보된 한우뇨 임신/ 비임신 시료에 대해 시료의 PG 농도를 확인하였다. 시료는 경북축산과학기술연구소에서 한우를 인공수정시킨 후 4일부터 42일까지 날짜별로 채취한 뇨와 대조군으로 비임신뇨를 받아 사용하였다. 그 결과 돼지에서의 E1S와는 다르게 한우뇨에서 PG의 경우 임신과 비임신뇨의 PG의 농도 차이가 거의 없는 것으로 판별되었다. 따라서 PG의 정량으로는 한우의 임신/비임신의 구별이 힘들 것으로 사료되었으며, 그 대안으로 한우뇨 속의 단백질의 패턴과 종류를 분석하여 임신/ 비임신이 구분이 가는 타겟 단백질을 설정하여 그것을 정량하는 시스템을 만들어 임신진단 실험을 계속 이어 나가기로 결정하였다.

(가) 표준적정곡선 (비임신뇨를 사용한 인터널 스텐다드)

PG에 대한 표준적정곡선을 그리는 방법은 상기의 E1S의 표준적정곡선을 그리는 방법과 동일하여 생략한다. PG에 대한 항체인 clone 44를 사용하고, 100배의 희석한 한우 비임신뇨 버퍼를 사용하여 인터널 스텐다드 커브를 작성하였다.(그림 23)

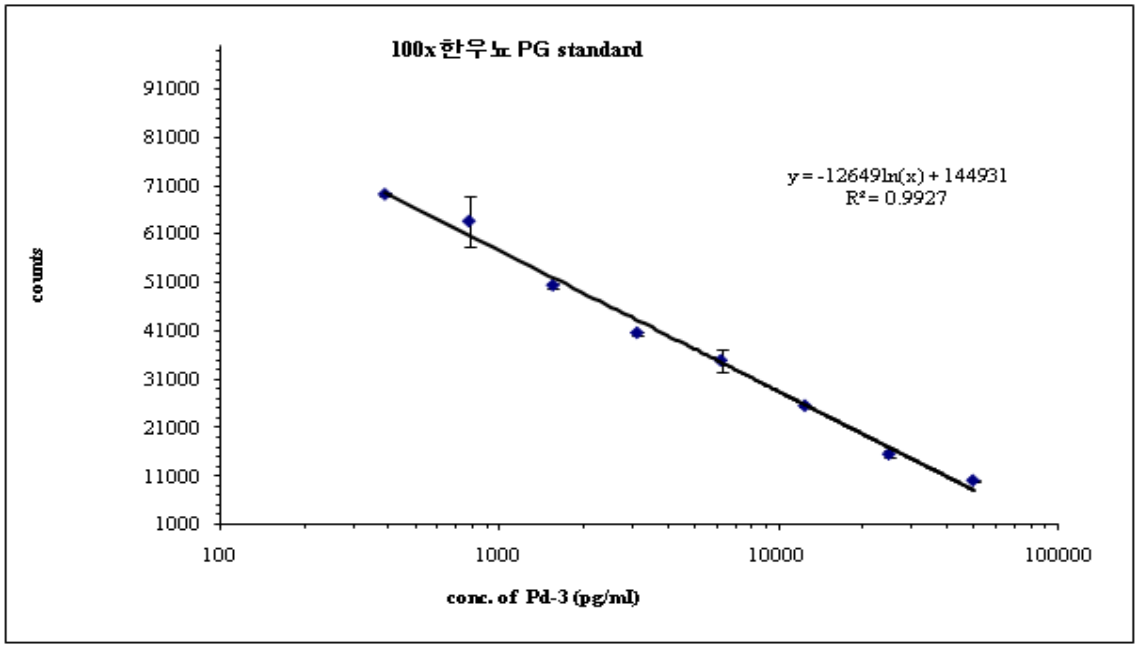


그림 23. 100배 희석된 한우 비임신뇨를 이용하여 작성한 PG 표준적정곡선

(나) 임신/비임신 한우뇨 시료 정량값

한우뇨 임신/ 비임신이 확실한 시료를 제공받아 델피아법으로 카운트값을 구하고, 상기의 표준적정곡선과 비교하여 시료속의 PG의 농도를 구하였다. (표 6)

표 6. 한우뇨 임신/ 비임신 시료의 PG의 정량값

Samples	농도 평균 (ng/ml)	분석 두수	비고
미임신1	39.7	4	인공수정하였으나 임신이 안된 샘플
미임신2	21.9	7	
미임신3	19.4	12	
임신4	4.7	2	
임신11	5.5	3	
임신19	10.0	2	
임신26	30.9	2	
임신27	36.6	3	
임신한달	2.9	1	
임신35	30.6	3	
임신38	17.6	2	
임신41	11.9	2	
임신42	38.1	3	

o 2차년도 (2007)

연 구 기 관	연 구 책 임 자	소요예산 (천원)
한동대학교 생명과학연구소, 경북 축산 기술 연구소	김종배	130,000

가. 새로운 항체, 컨쥬게이트 조건 설정 및 Recovery Test

(1) 새로운 Conjugate(Eu-E1G) 구입

TR-FIA 적용에 계속 필요한 Eu-E1G conjugate는 영국 Cambridge 수의과학연구소의 Geoff. Barnard박사로부터 2007년 4월 28일, 2008년 2월 27일) 두 번에 걸쳐 다시 제공받았다.

(가) Eu-labelled conjugate(Eu-E1G)의 적정 농도 결정; 2007년 4월 28일

영국의 Geoff Barnard 박사로부터 새로이 제공받은 conjugate의 적정 농도 결정을 위하여 immunoplate에 conjugate를 1:100부터 2배 또는 5배씩 8번의 Sserial dilution한 후, Enhancement solution을 첨가하여 DELFIA 1420으로 측정하였다. 아래와 같이 conjugate의 적정 농도 그래프를 얻을 수 있었으며, 위 그래프의 결과를 토대로 2007년 4월 28일에 구입한 conjugate는 1:250000 희석배율로 적정 농도를 결정하였으며 이 희석배율을 standard curve 작성이나 시료분석에 적용하였다. (그림 1)

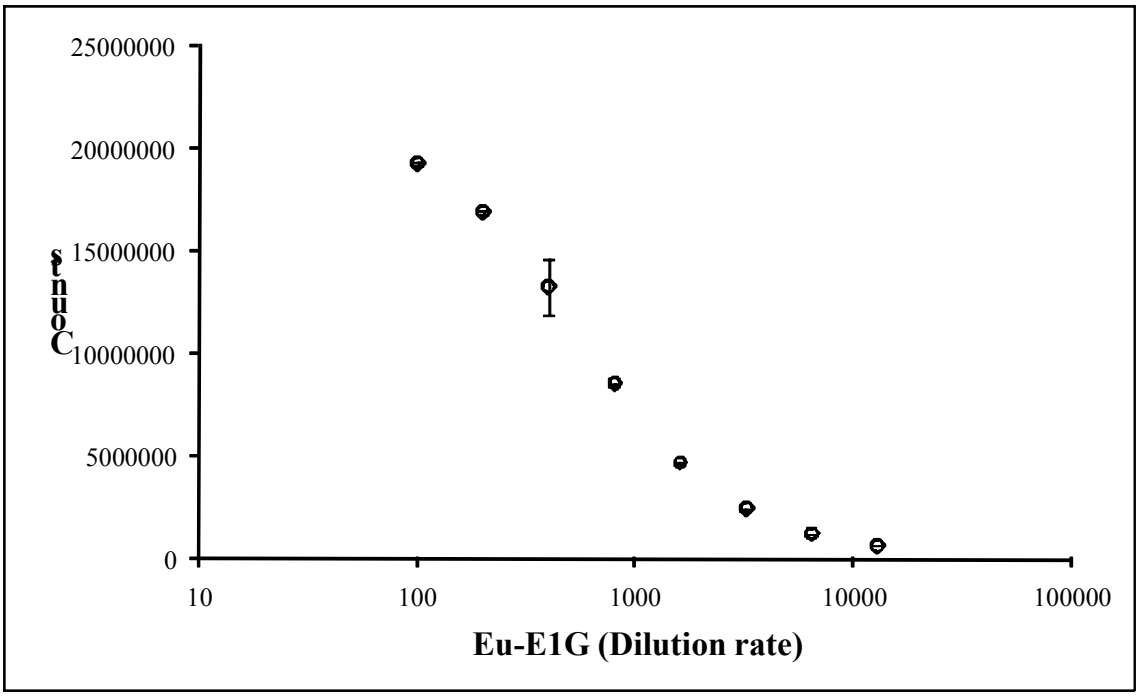


그림 1. Eu-E1G 적정 농도 그래프 (2007년 4월 28일)

(나) Eu-labelled conjugate(Eu-E1G)의 적정 농도 결정; 2008년 2월 27일

상기와 같은 방법으로 2008년 2월 27일에 도착한 conjugate의 적정 농도를 구하기 위해 적정 농도 그래프를 작성하였다. (그림 2) 2008년 2월 27에 도착한 conjugate는 1:2000으로 적정 농도를 결정하였으며 구해진 희석배율로 다른 실험들에 적용하였다.

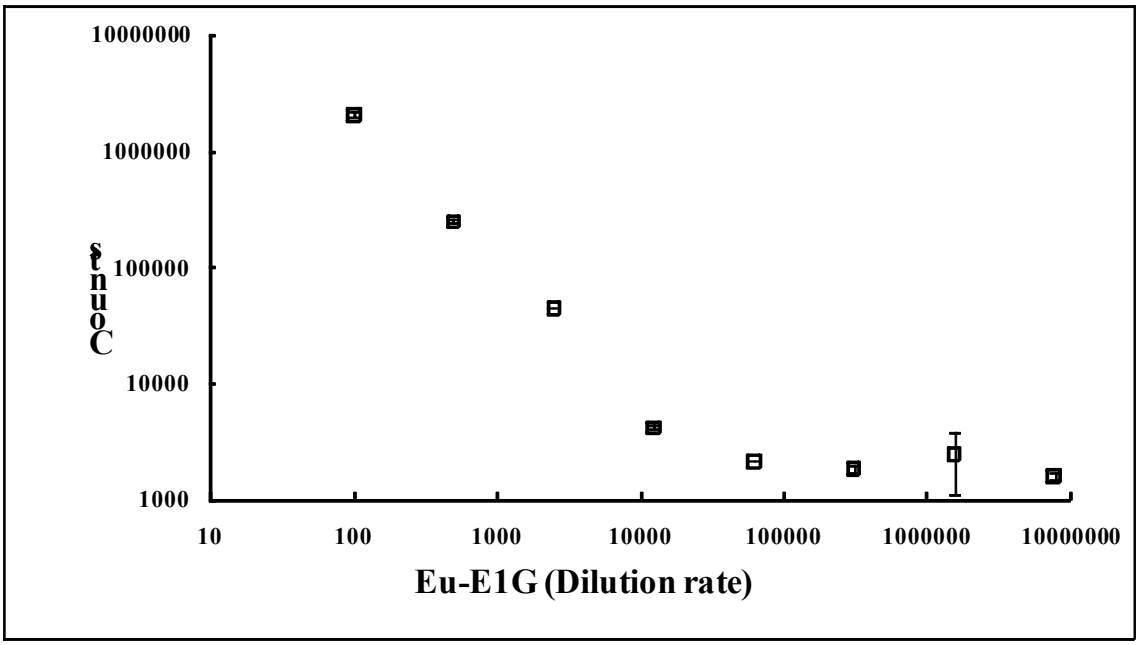
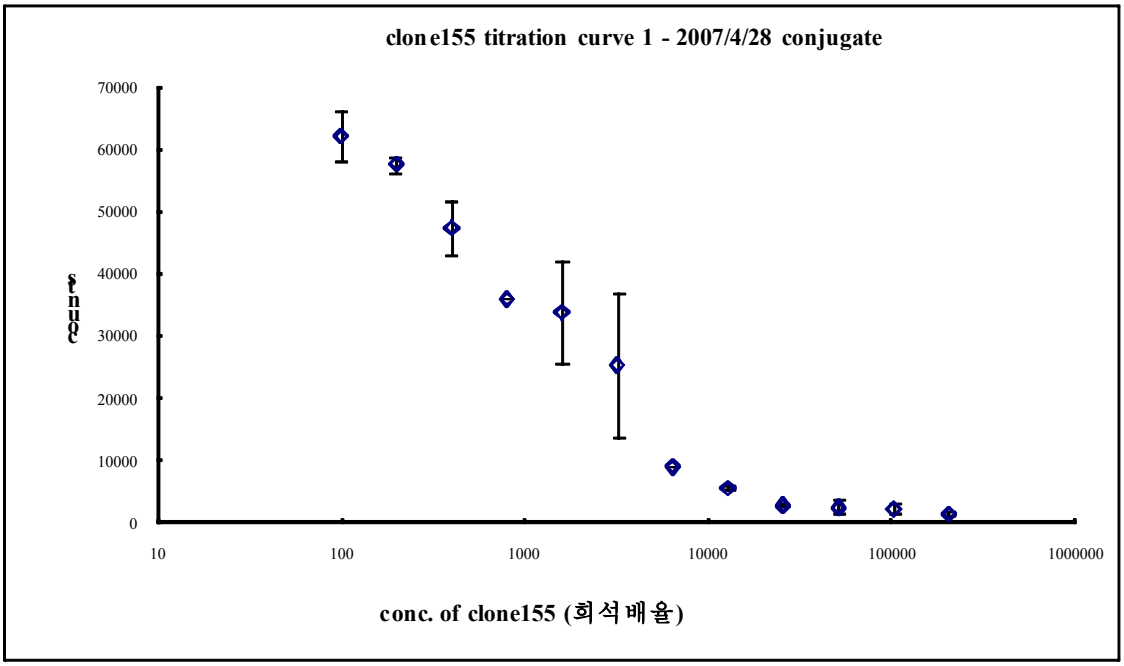


그림 2. Eu-E1G 적정 농도 그래프 (2008년 2월 27일)

(다) 새로받은 clone 155 항체의 역가 측정과 새로운 conjugate와의 반응성 확인

이스라엘로부터 많은 시료의 분석을 위해 대량으로 다시 제공받은 E1G에 대한 항체 Clone 155를 사용하여 항체의 역가 결정을 위하여 1:100부터 2배씩 코팅 완충용액에 희석하여 immunoplate에 코팅한 후, 충분히 코팅될 수 있도록 2시간 동안 incubation하였고, 이 후 non-specific binding을 제거하기 위해 2% BSA가 첨가된 생리식염수로 Blocking하였다. 이 후 새로운 Eu-E1G를 첨가하여 코팅된 1차 항체와 반응하도록 하였다. 이 후 Enhancement solution을 첨가한 후 DELFIA 1420으로 측정하였다. 아래의 그림과 같이 1차 항체 clone 155의 역가 그래프를 얻을 수 있었고, 이를 통하여 새로운 두 conjugate와의 역가를 1:2000으로 결정하고 정량법에 적용하였다. (그림 3)



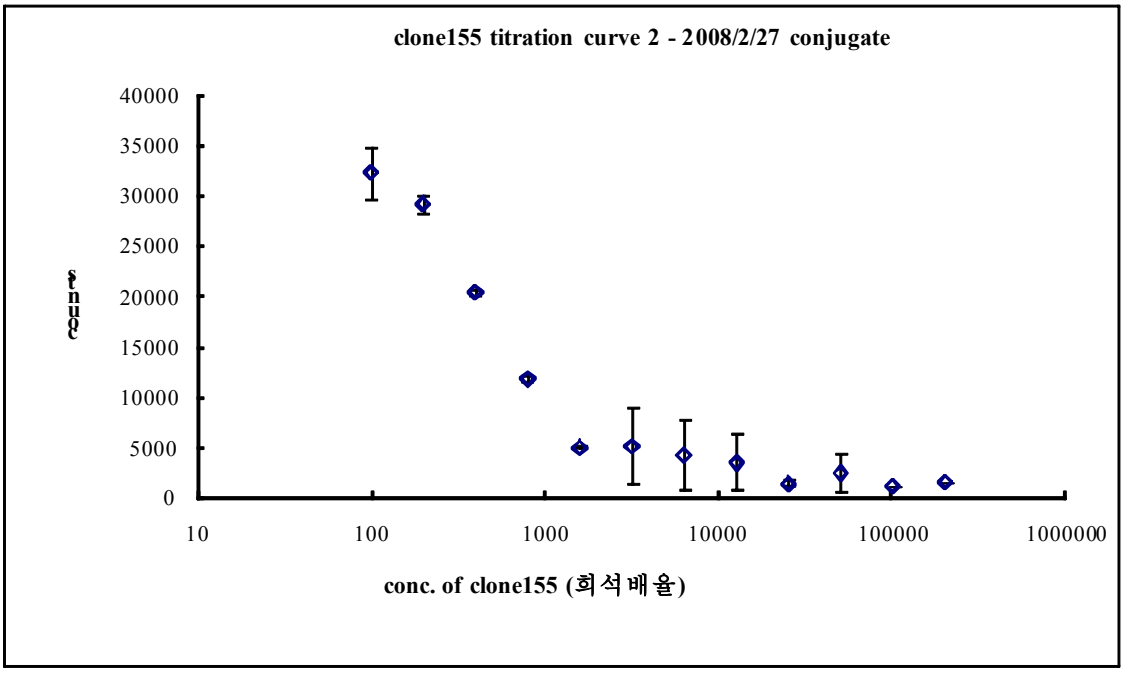


그림 3. 두가지 conjugate에 대한 clone 155의 항체 역가 그래프

(2) E1S, E1G, PG의 정량법에 대한 반복성 및 회수률(reproducibility) 조사

면역분석법에 있어서 반복성 및 회수률 조사인 리커버리 테스트는 이 면역분석법이 오류없이 잘 적용되고 있는가를 확인하는 실험이므로 그 의미는 매우 중요하다고 할 수 있다. E1S, E1G 및 PG를 정량하는 면역분석법은 항체를 하나만 사용하는 경쟁적 면역분석법이며, 작은 물질인 호르몬을 분석하는

실험 방법이라 리커버리 테스트는 반드시 필요한 결과라고 사료된다. 그렇기 때문에 가지고 있는 모든 항체에 대한 Intra-, Inter-assay를 실시하였고, 그 결과를 분석하였다.

(가) E1S의 정량법에 따른 Clone 155의 intra, inter-assay

델피아로 얻은 표준적정곡선의 정확도를 검증하기 위하여 E1S 정량분석의 재현성 실험을 실시하였다. 재현성 실험은 이미 알고 있는 여러 농도의 E1S를 PBS 버퍼 및 임신이 확실하지 않은 돼지 뇨 샘플에 조제하여 경쟁적 델피아법을 실시한 후, 표준적정곡선 하에서 E1S 농도를 측정한 인트라 어세이와 동일한 농도를 시간을 달리하여 측정한 후 그 오차를 조사한 인터 어세이를 실시하였다. 인트라어세이는 E1S 정량을 위한 범위인 0.15~20ng/ml에서 임의적으로 비교적 높은 농도인 20ng/ml, 중간농도인 10, 5ng/ml, 그리고 비교적 낮은 농도인 1ng/ml의 4가지 농도를 정하였다. 또한 PBS에서의 인트라 인터 어세이 뿐만 아니라 인터널 스텐다드 커브를 그려 정량실험을 진행하는 것을 감안하여 100배 희석된 비임뇨 버퍼에서도 인트라 인터 어세이를 똑같이 진행하였다. 분석을 위한 각 농도별 시료는 각각 10개씩 측정하였고, E1S 정량을 위한 표준적정곡선에 적용하여 나온 결과값을 C.V.와 BIAS를 계산하여 도출하였다.

① Clone 155에 대한 E1S 정량법의 Recovery Test

PBS 버퍼에서 Clone 155를 사용한 네가지 농도의 E1S에 대한 인트라어세이의 결과에서 C.V. 값은 모든 농도에서 10% 이내에 들었고, BIAS도 평균를 보임으로서 비교적 우수한 결과를 나타냈다. 또한 인터 어세이는 총 20회에 걸쳐서 측정하였으며 실험에 적용한 E1S의 측정농도는 인트라 어세이와 동일한 농도로 조사하였다. 그 결과 C.V.값은 1ng/ml의 농도를 제외하고 모두 10%이내에 들어왔으며, bias 또한 모두 10% 이내로 들어오는 안정적인 결과를 도출할 수 있었다. 1ng/ml의 농도에서 CV값이 높게 나온 이유는 비교적 낮은 농도값에서는 약간 불안한 시스템이기 때문에 편차가 크게 나온 것일 수 있으며, 또는 실험자의 희석문제인 것으로 사료된다. 위의 결과들로 인해 E1S 측정을 위한 PBS 버퍼에서의 경쟁적 델피아 방법은 비교적 안정된 방법으로 판단되어 졌다. (표 1)

표 1. Clone 155를 사용한 PBS 버퍼에서의 E1S 정량법의 Recovery Test

PBS Group (E1S)	Expected value (ng/ml)	Observed value Mean ± SD	CV (%)	Recovery (%)	Bias (%)
Intra-assay	20	20.01 ± 0.03	6.67	100.05	0.05
	10	9.83 ± 0.76	7.73	98.3	-1.7
	5	5.16 ± 0.29	5.62	103.2	3.2
	1	0.94 ± 0.01	1.06	94	-6
Inter-assay	20	18.84 ± 1.65	8.76	94.2	-5.8
	10	10.28 ± 0.77	7.49	102.8	2.8
	5	5.16 ± 0.01	0.19	103.2	3.2
	1	1.10 ± 0.36	32.73	110	10

100배 희석된 비임신뇨 버퍼에서 측정한 인트라 어세이의 결과는 1ng/ml의 농도를 제외한 모든 농도에서 C.V. 값이 10%이내에 들었고, BIAS도 10% 이내에 들어 안정적인 결과를 보여 주었다. 동일 조건에서의 인터 어세이에서는 20ng/ml의 농도에서만 제외하고 나머지 농도에서의 C.V. 값은 10% 밖으로 벗어 난 반면, BIAS 값은 모두 10%이내에 들었다. 이는 PBS 버퍼를 사용하여 E1S 정량을 진행하는 면역분석 시스템보다 인터널 스텐다드를 설정한 100배 희석된 비임신뇨를 사용하여 E1S의 정량법이 약간의 차이로 불안정한 것으로 평가된다. 하지만 그 편차나 오류가 우려했던 만큼 심하지 않고 각각의 농도를 측정한 평균치는 임의로 설정한 농도와 비슷하게 나오는 것으로 보아 정량하는 데에는 문제가 없는 것으로 판별되었다. (표 2)

표 2. Clone 155를 사용한 100배 희석 비임신뇨 버퍼에서의 E1S 정량법의 Recovery Test

100X Group (E1S)	Expected value (ng/ml)	Observed value Mean ± SD	CV (%)	Recovery (%)	Bias (%)
Intra-assay	20	19.43 ± 0.40	2.06	97.15	-2.85
	10	11.03 ± 0.95	8.61	110.3	10.3
	5	5.40 ± 0.40	7.41	108	8
	1	1.07 ± 0.15	14.02	107	7
Inter-assay	20	19.63 ± 0.28	1.43	98.15	-1.85
	10	9.15 ± 1.74	19.02	91.5	-8.5
	5	4.69 ± 0.99	21.11	93.8	-6.2
	1	1.05 ± 0.13	12.38	105	5

(나) E1G의 정량법에 따른 다양한 항체의 intra, inter-assay

상기의 E1S에 대한 실험 방법과 마찬가지로 표준적정곡선의 정확도를 검증하기 위해 E1G 정량분석의 재현성 실험을 실시하였다. Clone 155 뿐만아니라 나머지의 E1G에 대한 항체를 가지고도 리커버리 테스트를 진행하였다. E1G에 대한 정량법도 마찬가지로 4가지의 농도를 임의적으로 설정하여 인트라 인터 어세이에 적용하였으며, PBS 버퍼에서 뿐만아니라 100배 희석된 비임신뇨 버퍼에서도 실험을 동일하게 진행하였다. E1G를 이용하여 표준적정곡선을 작성하고 임의로 설정한 농도의 결과값을 표준적정곡선에 대입하여 농도값을 구한 뒤, 각 데이터를 비교하여 C.V. 값과 BIAS 값을 구하였다.

① Clone 155에 대한 E1G 정량법의 Recovery Test

PBS 버퍼에서 Clone 155를 사용한 네가지 농도의 E1G에 대한 인트라어세이의 결과에서 C.V. 값이 20ng/ml, 1ng/ml 두 농도에서는 10%이내에 들었지만 나머지 10ng/ml, 5ng/ml의 두 농도에서는 12%로 약간 불안한 면을 보였다. BIAS는 모든 농도에서 10%이내에 들어가서 비교적 우수한 결과를 나타냈다. 인터 어세이는 총 20회에 걸쳐서 측정하였으며 실험에 적용한 E1G의 측정농도는 인트라 어세이와 동일한 농도로 조사하였다. 그 결과 C.V.값은 1ng/ml의 농도를 제외하고 모두 10%이내에 들어왔으며, bias 또한 모두 10% 이내로 들어오는 안정적인 결과를 도출할 수 있었다. E1S 정량법과 마찬가지로 1ng/ml의 농도에서는 약간 불안한 면을 보였지만 PBS 버퍼에서 E1G를 정량하는데 있어서는 무리가 없다고 사료되었다. (표 3)

표 3. Clone 155를 사용한 PBS 버퍼에서의 E1G 정량법의 Recovery Test

PBS Group (E1G)	Expected value (ng/ml)	Observed value Mean ± SD	CV (%)	Recovery (%)	Bias (%)
Intra-assay	20	19.27 ± 1.10	5.71	99.15	-0.85
	10	10.50 ± 1.30	12.38	105.00	5.00
	5	4.77 ± 0.58	12.16	95.40	-4.60
	1	1.04 ± 0.05	4.81	104.00	4.00
Inter-assay	20	18.47 ± 1.13	6.12	92.35	-7.65
	10	9.15 ± 0.95	10.45	91.5	-8.50
	5	4.47 ± 0.43	9.62	89.4	-10.60
	1	0.90 ± 0.20	22.22	90	-10.00

100배 희석된 비임신뇨 버퍼에서 측정한 E1G에 대한 인트라 어세이의 결과는 1ng/ml의 농도를 제외한 모든 농도에서 C.V. 값이 10%이내에 들었고, BIAS도 10% 이내에 들어 안정적인 결과를 보여 주었다. 동일 조건에서의 인터 어세이에서는 5ng/ml의 농도에서만 제외하고 나머지 농도에서의 C.V. 값은 10% 이내도 들었고, BIAS 값은 5ng/ml, 1ng/ml 두 농도에서 10% 밖으로 벗어나 낮은 농도에서의 정량이 약간 불안한 면을 나타내었다. (표 4) Clone 155의 E1G 정량법과 E1S 정량법을 비교해보면 원래 Clone 155 항체가 E1G에 대한 항체인 점을 감안할 때, 교차반응을 이용하여 E1S를 정량하는 데에도 전혀 문제가 없음을 시사하였고, 두 정량법이 낮은 농도에서는 약간의 불안한 면을 나타내었지만 정량을 진행하는데 있어서는 큰 문제가 없다고 판단되어졌다.

표 4. Clone 155를 사용한 100배 희석된 비임신뇨 버퍼에서의 E1G 정량법의 Recovery Test

100X Group (E1G)	Expected value (ng/ml)	Observed value Mean ± SD	CV (%)	Recovery (%)	Bias (%)
Intra-assay	20	18.50 ± 0.50	2.70	92.5	-7.5
	10	9.80 ± 0.72	8.18	98	-2
	5	4.80 ± 0.26	5.42	96	-4
	1	1.06 ± 0.23	21.70	106	6
Inter-assay	20	19.17 ± 0.94	4.90	95.85	-4.15
	10	9.27 ± 0.17	1.83	92.7	-7.3
	5	5.29 ± 0.58	13.52	113.8	13.8
	1	1.19 ± 0.11	9.24	119	19

② Clone 8A3에 대한 E1G 정량법의 Recovery Test

Clone 155 뿐만아니라 나머지의 E1G에 대한 항체인 Clone 8A3에서도 리커버리 테스트를 진행하였다. 상기의 실험 방법과는 다르게 4가지 농도가 아닌 3가지 농도를 임의로 설정하여 실험을 진행하였는데, Clone 8A3를 사용한 E1G의 정량범위인 0.3 ~ 80ng/ml에서 비교적 높은 농도인 50ng/ml, 중간 농도인 10ng/ml, 비교적 낮은 농도인 1ng/ml의 3가지 농도를 임의로 정해 그 결과값인 C.V. 값과 BIAS 값을 산출하였다.

먼저, PBS 버퍼에서 Clone 8A3를 사용한 E1G 정량법의 인트라 어세이에서 C.V. 값은 모든 농도에서 10% 이내로 들어가 안정적인 결과를 보여주었다. 하지만 BIAS 결과에서는 비교적 높은 농도인 50ng/ml에서 10% 밖으로 벗어났지만 우려할 만큼 많이 벗어나지않아 안정된 정량법이라고 할 수 있다. 또한 인터 어세이에서는 C.V. 값 뿐만아니라 BIAS test에서도 모두 범위가 10% 이내로 들어 Clone 8A3를 사용한 PBS 버퍼에서의 E1G 정량법은 안정적인 정량법으로 사료되었다. (표 5)

표 5. Clone 8A3를 사용한 PBS 버퍼에서의 E1G 정량법의 Recovery Test

PBS Group (E1G)	Expected value (ng/ml)	Observed value Mean ± SD	CV (%)	Recovery (%)	Bias (%)
Intra-assay	50	44.25 ± 2.5	5.65	88.5	-11.5
	10	10.6 ± 0.65	6.13	106	6
	1	0.99 ± 0.05	5.05	99	-1
Inter-assay	50	51.11 ± 1.15	2.25	102.22	2.22
	10	9.3 ± 0.67	7.20	93	-7
	1	1.1 ± 0.09	8.18	110	10

Clone 8A3를 사용한 100배 희석된 비임신뇨 버퍼에서의 E1G 정량법의 인트라 어세이에서 C.V. 값은 10ng/ml의 농도를 제외하고 모두 10%이내에 들어가는 안정적인 결과를 나타냈지만, BIAS 결과값은 10ng/ml, 1ng/ml 모두 10%를 벗어나는 불안정한 결과를 나타내었다. EH한 인터 어세이에서는 C.V. 값, BIAS 값에서 모두 1ng/ml의 농도를 제외하고 안정적이었으며, 낮은 농도에서 정량실험이 불안정하다는 결과를 나타내었다. Clone 8A3는 Clone 155보다 E1S 뿐만 아니라 E1G 정량법에서도 불안정한 결과가 나타났으며, 이는 경쟁적 면역분석법을 개발하는데 Clone 8A3보다 Clone 155의 항체가 더욱 안정적이며, 정확한 결과를 기대할 수 있다고 사료된다. (표 6)

표 6. Clone 8A3를 사용한 100배 희석된 비임신뇨 버퍼에서의 E1G 정량법의 Recovery Test

100X Group (E1G)	Expected value (ng/ml)	Observed value Mean ± SD	CV (%)	Recovery (%)	Bias (%)
Intra-assay	50	48.3 ± 1.44	2.98	96.6	-3.4
	10	8.33 ± 0.96	11.52	83.3	-16.7
	1	0.85 ± 0.05	5.88	85	-15
Inter-assay	50	46.5 ± 2.03	4.37	93	-7
	10	9.04 ± 0.87	9.62	90.4	-9.6
	1	0.8 ± 0.12	15.00	80	-20

③ Clone 3F11에 대한 E1G 정량법의 Recovery Test

E1G에 대한 마지막 항체인 Clone 3F11을 사용하여 PBS 버퍼에서 E1G 정량실험의 정확성과 안

정성을 확인하기 위해 리커버리 테스트를 실시하였다. 먼저 인트라 어세이에서 C.V. 값은 모두 10% 이내로 안정된 정량 실험임을 보여주었지만, BIAS 값에서 비교적 낮은 농도인 1ng/ml에서 정량이 불안정한 결과를 나타내었다. 다음 인터 어세이에서 C.V. 값은 모두 10%이내에 들었지만 BIAS 결과에서 역시 1ng/ml의 농도에서 10% 밖으로 벗어나는 결과를 도출해 낮은 농도에서는 정량 실험이 불안정하다는 결론을 얻을 수 있었다. (표 7)

표 7. Clone 3F11를 사용한 PBS 버퍼에서의 E1G 정량법의 Recovery Test

PBS Group (E1G)	Expected value (ng/ml)	Observed value Mean ± SD	CV (%)	Recovery (%)	Bias (%)
Intra-assay	50	48.5± 0.70	1.44	97	-3
	10	10.77 ± 0.63	5.85	107.7	7.7
	1	0.69 ± 0.06	8.70	69	-31
Inter-assay	50	49.01 ± 1.17	2.39	98.02	-1.98
	10	9.11 ± 0.48	5.27	91.1	-8.9
	1	0.89 ± 0.04	4.49	89	-11

Clone 3F11을 사용한 100배 희석된 비임신뇨 버퍼에서의 E1G 정량법의 Recovery Test를 실시하였다. 100배 희석된 비임신뇨에서도 마찬가지로 인트라 인터어세이에서 비교적낮은 농도인 1ng/ml에서 C.V. 값과 BIAS 값 모두 불안정한 결과를 볼 수 있었다. 마찬가지로 Clone 155 항체보다 E1S나 E1G 모두에서 면역분석법 개발 측면에서 불안정하다는 결론을 내릴 수 있었다. (표 8)

표 8. Clone 3F11를 사용한 100배 희석된 비임신뇨 버퍼에서의 E1G 정량법의 Recovery Test

100X Group (E1G)	Expected value (ng/ml)	Observed value Mean ± SD	CV (%)	Recovery (%)	Bias (%)
Intra-assay	50	50.5 ± 6.75	13.37	101	1
	10	10.29 ± 0.65	6.32	102.9	2.9
	1	0.69 ± 0.09	13.04	69	-31
Inter-assay	50	46 ± 2.15	4.67	92	-8
	10	11.12 ± 1.6	14.39	111.2	11.2
	1	1.28± 0.22	17.19	128	28

(다) PG의 정량법에 따른 clone 44의 intra, inter-assay

상기의 인트라, 인터 어세이에 대한 실험 방법과 마찬가지로 표준적정곡선의 정확도를 검증하기 위해 PG 정량분석의 재현성 실험을 실시하였다. PG에 대한 인트라 인터 어세이는 E1S, E1G와 감도가 다르기 때문에 설정 농도를 다르게 적용하였다. PG 정량을 위한 범위인 0.4 ~ 50ng/ml에서 비교적 높은 농도인 50ng/ml, 중간 농도인 20, 10ng/ml, 비교적 낮은 농도인 1ng/ml의 4가지 농도를 정하고, 표준적정곡선의 희석과는 따로 희석하여 측정하였다. PG도 마찬가지로 PBS에서의 인트라 인터 어세이 뿐만 아니라 인터널 스텐다드 커브를 그려 정량실험을 진행하는 것을 감안하여 100배 희석된 한우 비임뇨 버퍼에서도 인트라 인터 어세이를 똑같이 진행하였다. 마찬가지로 나온 결과를 C.V.와 BIAS로 계산하여 도출하였다.

① Clone 44에 대한 PG 정량법의 Recovery Test

PG의 정량을 위해 Clone 44를 이용하여 개발한 면역분석법의 안정성을 테스트 하기 위해 PBS 버퍼에서 인트라 인터어세이를 진행하였다. 인트라 어세이에서 C.V. 값은 모두 10% 내로 들어가 표준편차가 안정적인 것으로 확인되었고 BIAS Test 역시 모든 농도에서 10% 이내로 들어가 평균치도 안정적인 정량 실험으로 확인되었다. 인터 어세이에서는 비교적 낮은 농도인 1ng/ml에서의 결과를 제외하고 나머지 농도에서는 C.V. 뿐만아니라 BIAS 결과에서 안정적인 정량 실험이라는 것을 나타내었으며, 낮은 농도에서는 편차가 심해 PG 정량 실험은 약간 불안정한 정량법이라고 사료되었다.

표 9. Clone 44를 사용한 PBS 버퍼에서의 PG 정량법의 Recovery Test

PBS Group (PG)	Expected value (ng/ml)	Observed value Mean ± SD	CV (%)	Recovery (%)	Bias (%)
Intra-assay	50	49.23 ± 1.06	2.15	100.05	0.05
	20	9.83 ± 0.76	7.73	98.3	-1.7
	10	5.16 ± 0.29	5.62	103.2	3.2
	1	0.94 ± 0.01	1.06	94	-6
Inter-assay	50	54.20 ± 7.02	12.95	108.4	8.4
	20	10.28 ± 0.77	7.49	102.8	2.8
	10	5.16 ± 0.01	0.19	103.2	3.2
	1	1.10 ± 0.36	32.73	110	10

100배 희석된 비임신뇨 버퍼에서 PG 정량법의 안정성을 확인하기 위해서 인트라 인터어세이를 실시하였다. PG의 정량은 E1S나 E1G와 마찬가지로 인터널 스텐다드를 사용하여 정량하기 때문에 100배 희석된 비임신뇨 버퍼에서 리커버리 테스트의 결과가 매우 중요한 의미를 가진다고 할 수 있다. 하지만 인트라 인터 어세이의 결과들을 비추어 볼 때 C.V.값이 거의 모든 농도에서 10% 밖으로 벗어나는 결과가 나와 특정 농도를 정량하는데 있어서 편차가 심하다는 것을 알 수 있었다. 반면, BIAS 결과는 모두 10% 이내로 들어가 정량값의 평균치는 안정적임을 확인 할 수 있었다. 100배 희석된 비임신뇨에서 측정한 인트라 인터 어세이의 결과로 미루어 볼 때, PG 정량법은 편차부분에서는 불안정하나 평균치의 결과값은 비교적 정확하여 인터널 스텐다드를 사용하여 정량값을 구하는 데 있어서 큰 문제가 없다고 사료된다. (표 10)

표 10. Clone 44를 사용한 100배 희석된 비임신뇨 버퍼에서의 PG 정량법의 Recovery Test

100X Group (PG)	Expected value (ng/ml)	Observed value Mean ± SD	CV (%)	Recovery (%)	Bias (%)
Intra-assay	50	49.03 ± 6.56	13.38	98.06	-1.94
	20	21.43 ± 1.32	6.16	107.15	7.15
	10	5.40 ± 0.40	7.41	108	8
	1	1.07 ± 0.15	14.02	107	7
Inter-assay	50	48.1 ± 4.34	9.02	96.2	-3.8
	20	9.15 ± 1.74	19.02	91.5	-8.5
	10	4.69 ± 0.99	21.11	106.6	6.6
	1	1.05 ± 0.13	12.38	105	5

나. 키트 개발을 위한 실제뇨에서의 정량법 확립

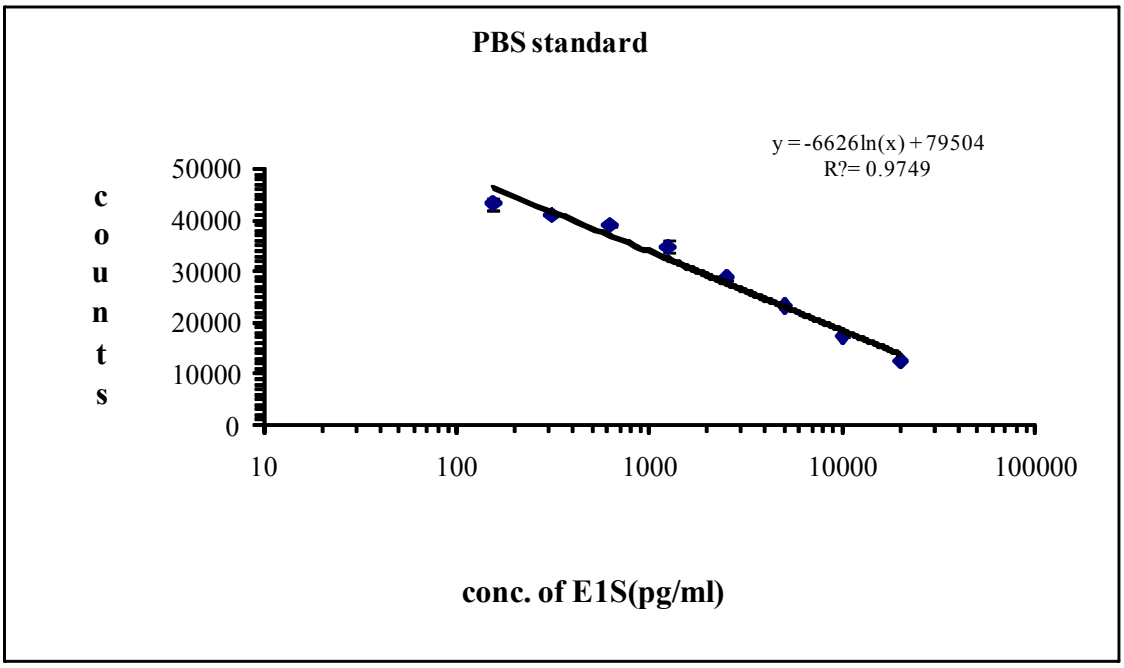
(1) 실제 돼지뇨를 이용한 표준적정곡선

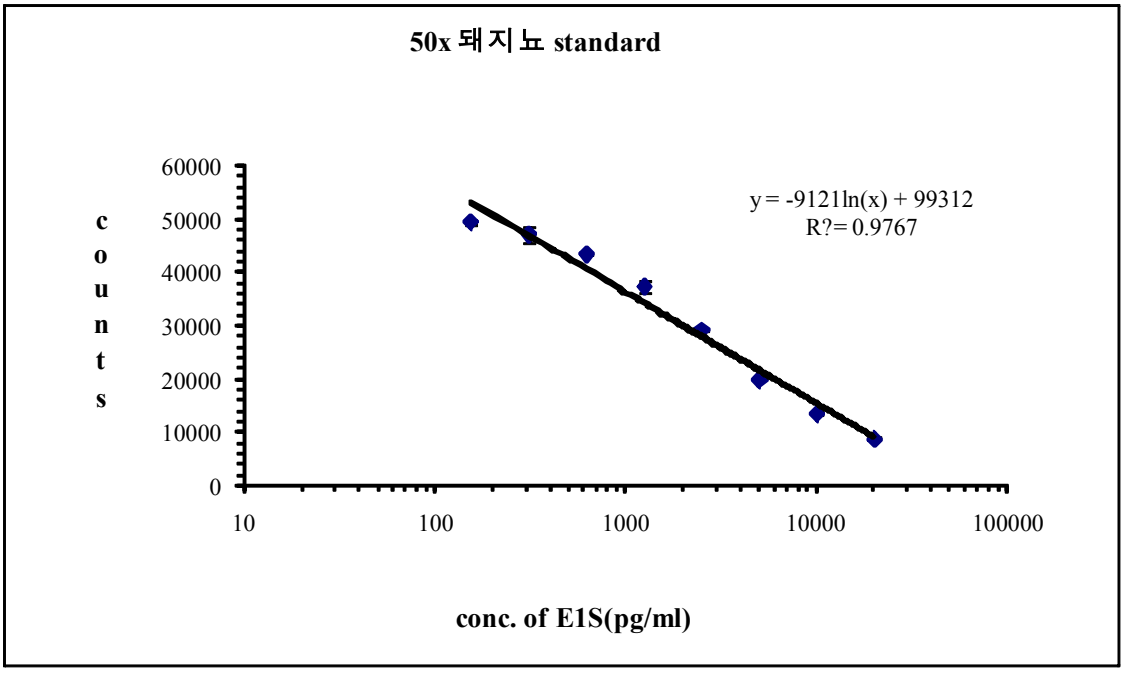
본 연구는 실질적으로 한우와 돼지의 뇨를 이용하여 분석하는 연구이기 때문에 표준적정곡선 작성시 뇨의 여러 성분이 항원, 항체반응에 영향을 미칠 수 있으므로 뇨의 희석배율을 달리한 것과 PBS buffer로 작성한 것과를 비교하였다(그림). 앞서 1차년도에서 실제뇨에서 표준적정곡선을 그린 것보다 희석배율을 더 작게 하여 50배, 25배의 희석배율에서도 표준적정곡선이 작성되게 여러 가지 실험 방법을 연구하여 표준적정곡선 작성에 성공하였다. 그림에 나타난 바와 같이 뇨를 50배, 25배 이상 희석하였을 시 PBS buffer로 한 것과 큰 차이를 나타내지 않았다. 이 결과는 뇨를 가지고 분석할 시 최소한 25배 또는 50배 희석을 해도 error가 최소화 될 수 있음을 보여준다. 그러나 뇨중에는 다양한 성분이 들어 있어 그 영향이 개체에 따라 달라질 수가 있으므로 표준적정곡선 작성시 표준시료 E1S를 25배 또는 50배의 뇨를 buffer로 희석한 것을 사용한 즉 “internal standard"를 이용하였다. 실제 비임신뇨를 0.45㎛ filter를 사용해서 syringe filter를 실시한 후, 희석배율별로 E1S, E1G와 PG에 대한 표준적정곡선을 작성하였다

(가) 여러 농도의 실제뇨를 이용하여 작성한 E1S 표준적정곡선

clone 155를 이용하여 PBS buffer에서 작성한 표준적정곡선과 실제뇨를 25배, 50배 희석하여 작성한 E1S 표준적정곡선에 별다른 차이를 보이지 않음을 확인할 수 있다. 이는 뇨 샘플을 측정 시 25배까지 희석해서 측정해도 인터페어한 물질에 의해 정량값에 오류를 최소

화 할 수 있다는 것을 보여준다. (그림 4)





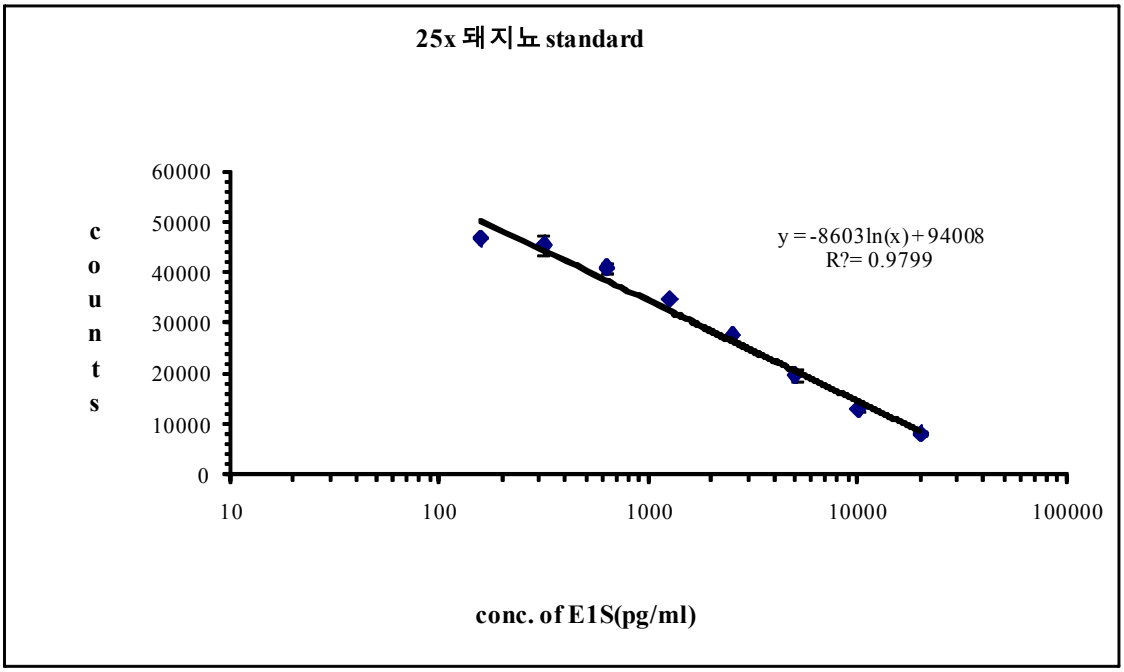
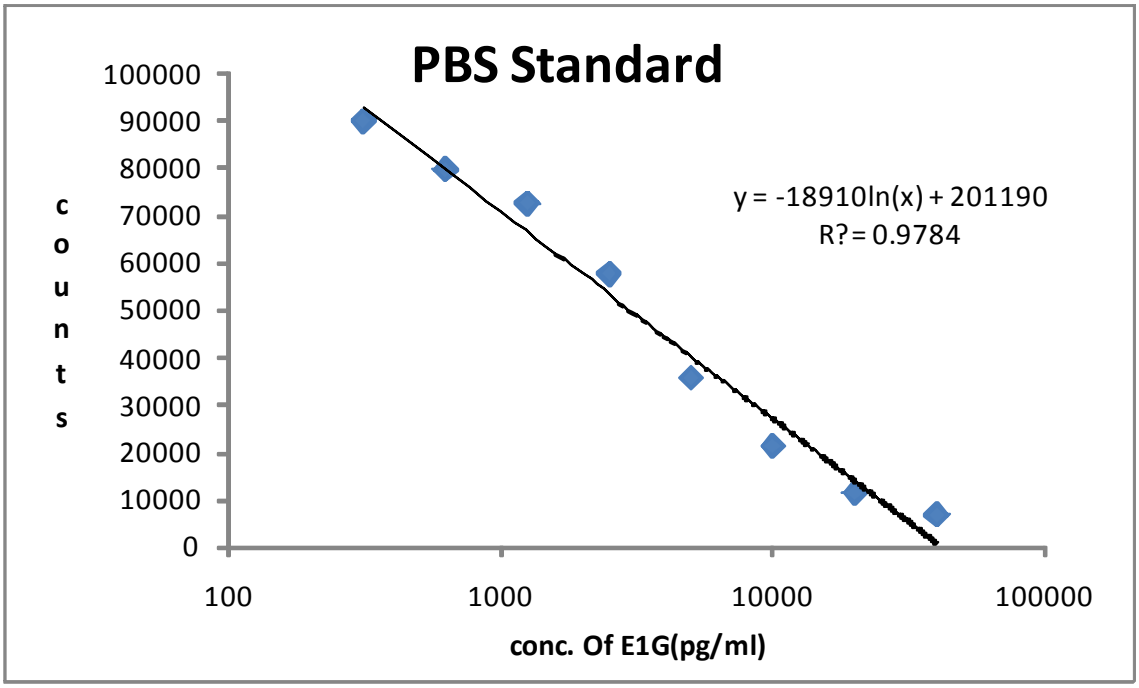
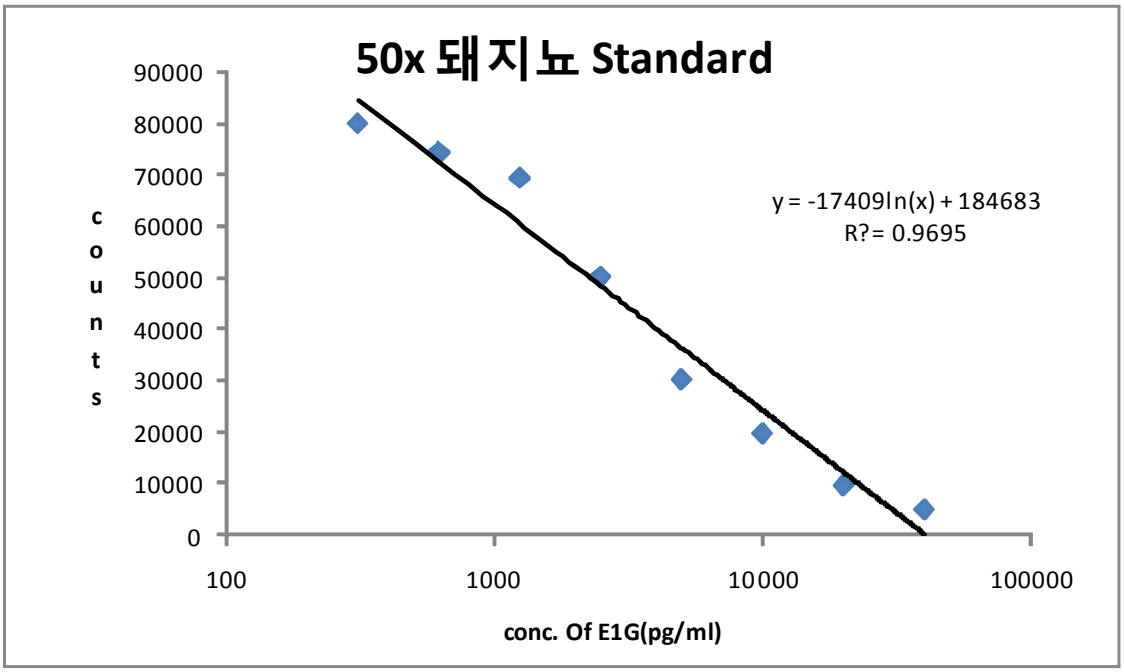


그림 4. 실제 뇨에서의 E1S 정량을 위한 표준 적정 곡선

(나) 여러 농도의 실제뇨를 이용하여 작성한 E1G 표준적정곡선

E1S에 교차반응성이 없는 clone 8A3를 이용하여 샘플 속의 E1G만 정량할 수 있는 실험을 진행하기 위해 다양한 농도로 희석된 비임신뇨에서 표준적정곡선을 작성하여 정량 실험의 가능 여부를 조사하였다. 그 결과 PBS buffer에서 작성한 표준적정곡선과 실제뇨를 25배, 50배 희석하여 작성한 E1G 표준적정곡선에 별다른 차이를 보이지 않음을 확인할 수 있었다. 이는 뇨 샘플을 측정 시 25배까지 희석해서 측정해도 인터페어한 물질에 의해 정량값에 오류를 최소화 할 수 있다는 것을 보여준다. (그림 5)


PBS Standard
100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
counts
y = -18910ln(x) + 201190
R? = 0.9784
100
1000
10000
100000
conc. Of E1G(pg/ml)


50x 돼지뇨 Standard
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
counts
y = -17409ln(x) + 184683
R? = 0.9695
100
1000
10000
100000
conc. Of E1G(pg/ml)

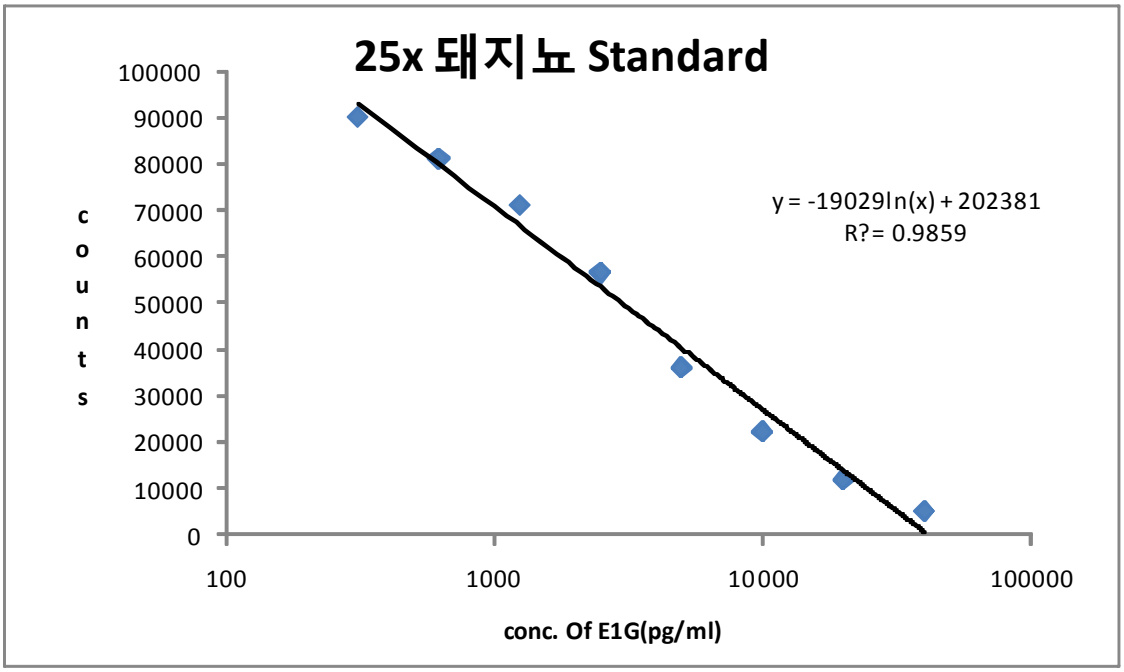


그림 5. 실제 뇨에서의 E1G 정량을 위한 표준 적정 곡선

다. 수정 후 매일의 돼지 오줌 시료 내의 E1S 측정

임신/비임신을 구분짓는 기준치 설정과 진단이 가능한 기간을 알기 위해 수정 후 일수별로 샘플을 충분히 확보한 다음 E1S의 농도를 상기의 인터널 스텐다드를 적용하여 측정하였다. 총 분석 샘플 수는 422마리의 수정 후 1일부터 120일까지의 임신뇨와 127마리의 비임신뇨를 사용하였으며, 델피아법으로 정량실험을 진행하였다. 중복되는 일수의 샘플 정량값은 평균치를 적용하였고 미임신의 평균치는 그래프 왼쪽의 빨간색 점으로 표시하였다. (그림 6) 그 결과, 비임신인 샘플의 E1S의 농도를 웃돌며 E1S의 농도가 급격히 상회하는 임신기간은 20-30일, 65-70일, 80-90일사이의 기간으로 조사되었다. 현재 돼지의 임신여부를 판단하는 데 널리 사용되는 초음파 검사법의 적용기간은 임신 50-60일 사이이다. 따라서 E1S의 농도에 따라 조기의 임신진단법 확립을 위해서는 수정 후 60-70일, 80-90일 사이의 E1S 농도의 급격한 상승은 의미가 없으며, 20-30일 사이의 E1S 농도의 상승은 매우 중요한 의미를 지닌다고 할 수 있다. 또한 대량으로 돼지를 사육하는 실제 농가에 적용할 수 있는 임신 진단을 위해서는 특정 임신 일수가 아닌 10일 내외의 장기간의 E1S 농도의 상승도 큰 의미를 지닌다고 할 수 있다.

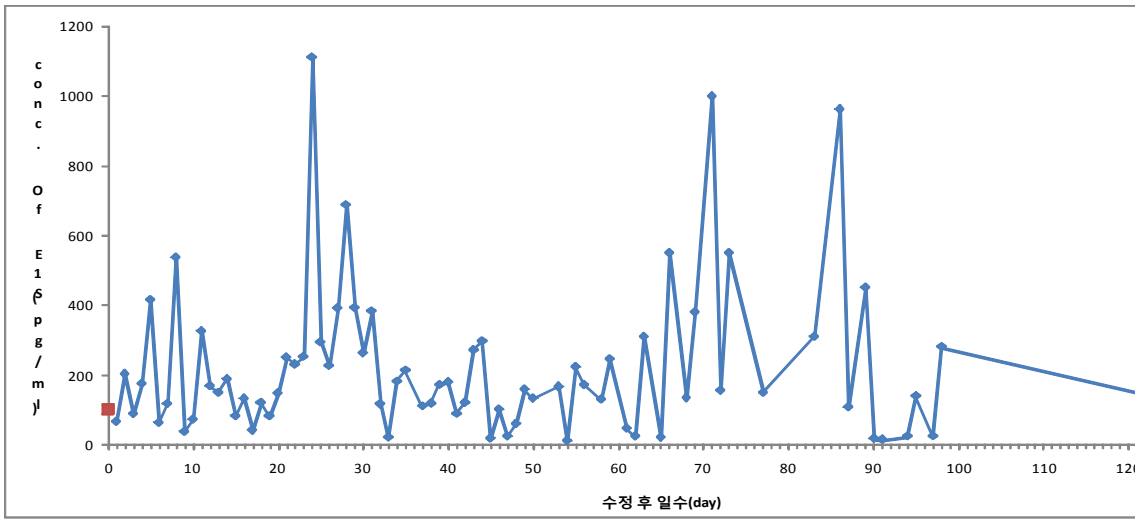


그림 6. 수정 후 임신 일수별 E1S 농도 그래프

라. 돼지 임신/비임신 진단 기준치 설정

3차년도의 임신 진단 키트의 제조를 위해서는 임신/비임신을 나눌 수 있는 기준치는 매우 중요하다. 앞서 20-30일 사이의 E1S의 농도가 급격히 증가하는 것을 확인하고, 다시 그 기간의 샘플을 모아 정확한 기준 농도를 결정하기 위해 비임신뇨와 같이 정량을 실시하였다. 임신 샘플은 10-30일 사이의 107개 샘플을 사용하였으며, 비임신뇨는 상기와 마찬가지로 127개의 샘플을 사용하였다. (그림 7) 그 결과, 거의 모든 임신 샘플은 E1S의 농도가 40ng/ml을 상회하였으며 비임신 샘플은 5ng/ml을 넘지 못하였다. 20-30일 사이의 샘플 중 E1S의 농도가 40ng/ml을 넘지 못한 샘플은 2개였으며, 10-20일 사이의 샘플 중에서는 7개가 40ng/ml을 넘지 못하였다. 만약 10-20일 사이의 샘플의 E1S 농도가 모두 기준선을 상회하면 더욱 임신진단을 조기에 할 수 있는 이점이 있겠지만, 샘플간의 편차가 심하여 20-30일 사이의 기간으로 임신진단의 기간을 정하였으며, E1S 농도의 기준치는 30ng/ml로 정하였다. 이 결과로 임신진단의 정확도를 대략적으로 파악하게 되면 약 95%의 높은 진단 성공률을 도출할 수 있었다. 차후 블라인드 테스트를 통해 진단의 정확성을 자세히 파악하겠지만, 이는 키트의 성공 가능성을 높이는 결과라 할 수 있다.

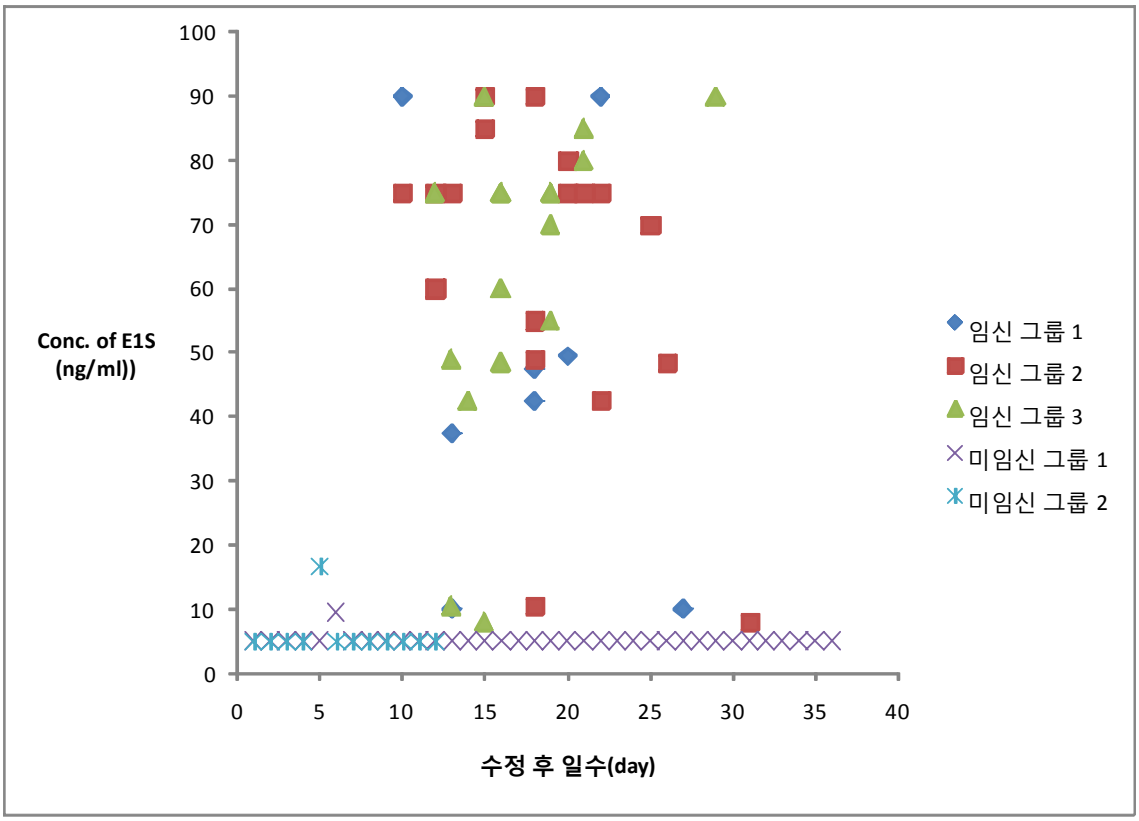


그림 7. 수정 후 일수 10-30일 샘플과 비임신 샘플의 E1S 농도 그래프

마. 발정 중 돼지뇨 샘플의 E1S 농도 분석

동물마다 호르몬 체계가 다르지만 발정시에는 체내의 호르몬 농도가 변한다는 것은 이미 알려진 사실이다. 돼지의 경우도 발정시 행동패턴이나 체내의 많고 다양한 대사들이 달라진다고 연구되었다. 따라서 발정 중인 돼지는 체내 호르몬인 Estrone 계통의 변화가 나타나 조기의 임신을 진단하기 위한 체외로 배출하는 E1S의 농도에 변화를 일으킬 수 있다. 따라서 변화된 E1S의 농도에 따른 임신/비임신뇨 판단 오류를 줄이기 위해 발정 중인 돼지의 뇨 샘플을 채취하여 E1S 정량을 실시하였다. (표 11) 임신이 아닌 발정 중인 돼지의 뇨의 E1S의 농도는 평균 7.57ng/ml로 임신한 돼지의 뇨 샘플의 E1S 농도와는 10배 이상의 확연한 차이가 있어 조기 임신 진단에 영향을 끼칠 수 있는 농도가 아님이 판별되었다.

표 11. 여러 조건에 따른 돼지 오줌내 E1S의 농도

조 건	평균 ± 표준편차 (ng/mL)	분석 마리 수	비고
발 정 중 돼 지 뇨	7.57 ± 2.05	34	인공 수정 후 바로 받은 돼지뇨 샘플
비 임 신 돼 지 뇨	5.15 ± 0.08	55	비임신이 확실한 돼지뇨 샘플
임 신 돼 지 뇨	71.3 ± 21.73	39	임신이 확실한 수정 후 20-30일 사이의 돼지뇨 샘플

바. 한우 수정 후 매일의 PG 농도 측정

PG의 농도가 한우의 임신뇨와 비임신의 차이가 없다하더라도 배출되는 호르몬 대사산물의 분석은 매우 중요한 의미를 가진다. 프로제스테론 계열의 호르몬의 분석은 거의 대부분의 연구가 혈액내의 PG를 분석한 정도였으며, 오줌속의 PG를 분석한 시도는 전무하였다. 따라서 임신진단키트 제조를 위한 분석을 떠나서 한우뇨 시료를 받아 뇨 중 PG의 농도를 일수별로 측정하고 PG 농도를 그래프로 정리하였다. (그림 8) 50배의 비임신뇨를 희석한 인터널 스텐다드를 적용하여 PG를 정량하였다. 그 결과, 20-30일 기간에 PG의 농도가 급격히 상승한다는 것을 알 수 있었으나, 임신이 되지 않는 비임신뇨와 PG의 농도와 별다른 차이가 없어 진단키트의 적용에는 무리가 있다고 판단되었다. 따라서 PG의 정량을 통한 임신/비임신의 판별은 불가능한 것으로 사료되었으며, 이에 대한 대안으로 한우뇨의 단백질의 분석을 통하여 임신/비임신뇨 중 다르게 배출이 되는 단백질을 찾아 그 물질을 타겟으로 하여 임신 판별의 방법을 개발하려 한다.

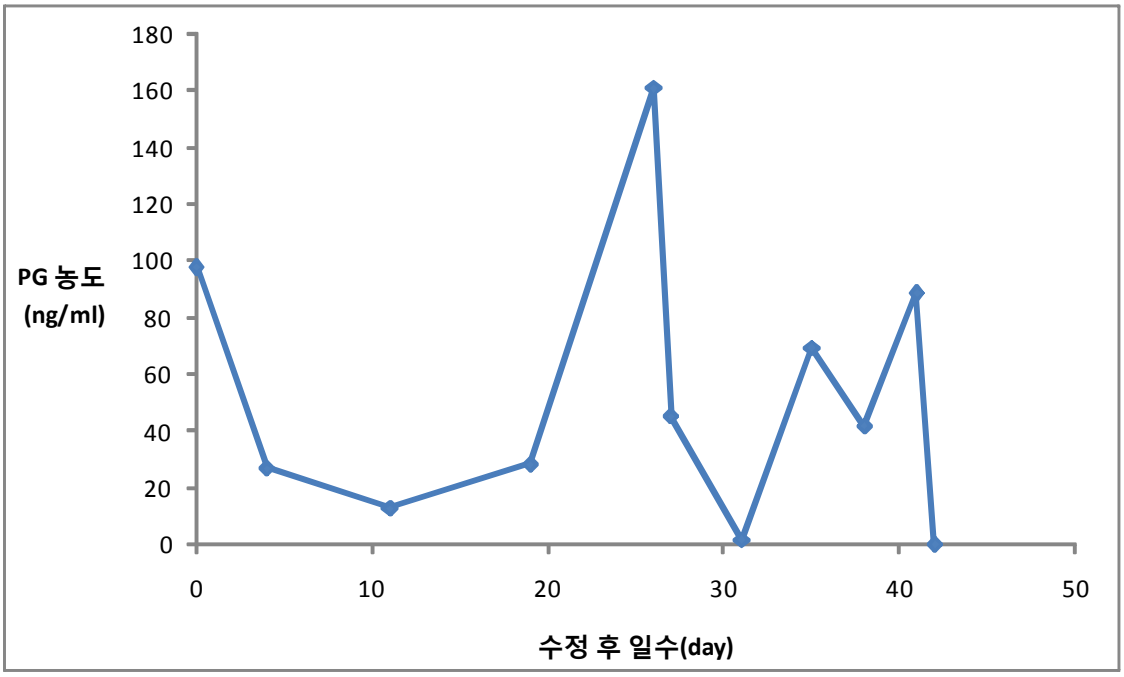


그림 8. 한우뇨 일수별 PG 농도 그래프

사. 2D를 이용한 한우뇨 임신진단법 개발

(1) 2-demensional electrophoresis의 장점 및 적용

2D 법은 기존의 단백질의 분자량으로만 분류되던 1 demensional 방식과는 달리 단백질 고유의 특성인 PI별로 1차 분리 후 다시 분자량에 따라 분리하기 때문에, 세포 내에서 발현되는 단백질의 차이를 분석함에 있어서 유용한 방법으로 널리 사용되고 있다. 이를 이용하여 임신 한우뇨와 미임신 한우뇨 간에 발현되는 단백질 중 서로간에 다르게 발현되는 특정 단백질을 잡아내기 위하여 2D 법을 도입하여 실험하였다.

(2)Sample의 준비

: 임신 한우뇨와 미임신 한우뇨의 Sample을 받아 70%의 황산 암모늄으로 단백질 부분을 침전시킨 뒤, 원심분리하여 상등액을 걷어내고, 침전물을 얻었다. 이 침전물을 다시 PBS에 용해 시킨 뒤, 투석을 거쳐 염을 제거하고 0.45um membrane filter를 거쳐 최종적인 Sample을 준비하였다. 단백질 샘플을 분리하는데 분리한 뇨의 양에 비해 단백질의 양이 많이 나오지 않아 샘플을 준비하는데 상당한 시간과 인력이 소모되었다. 임신 한우뇨와 미임신 한우뇨의 단백질 패턴의 차이를 분석하기 위해 PI값과 분자량으로 2회 분리하는 2 Dimensional Electrophoresis를 실시하였다.

(3) Bradford 정량법을 통한 단백질 농도

: Gel 상에 걸리는 단백질의 패턴 및 양을 비교함에 있어서, 동일양의 단백질이 로딩 되어야 하기 때문에 준비된 Sample을(임신뇨 단백질, 미임신뇨 단백질) 동일 농도로 맞추기 위해 BCA 정량을 실시하였다. 하지만 BCA 정량 결과, 구리 이온이 뇨 내의 urea성분과 결합하는 성질로 인해 정확한 단백질의 양이 정량되지 않아서 Bradford법을 이용하여 임신뇨와 미임신뇨의 정량을 실시하였다. (그림 9) Bradford법은 염색약이 아미노산과 반응하는 원리이기 때문에 임신뇨와 미임신뇨 내의 단백질을 정량함에 있어서 urea의 함유가 큰 문제가 되지 않았다.

표 12. Bradford법의 표준적정곡선을 위한 정량값

Con. (ug/ml)	OD1	OD2	average
1000	0.9140	0.8950	0.9045
500	0.5480	0.5400	0.5440
250	0.3320	0.3300	0.3310
125	0.2270	0.2090	0.2180
62.5	0.1580	0.1530	0.1555
31.25	0.1190	0.1100	0.1145
15.625	0.0980	0.0980	0.0980
7.813	0.0810	0.0800	0.0805

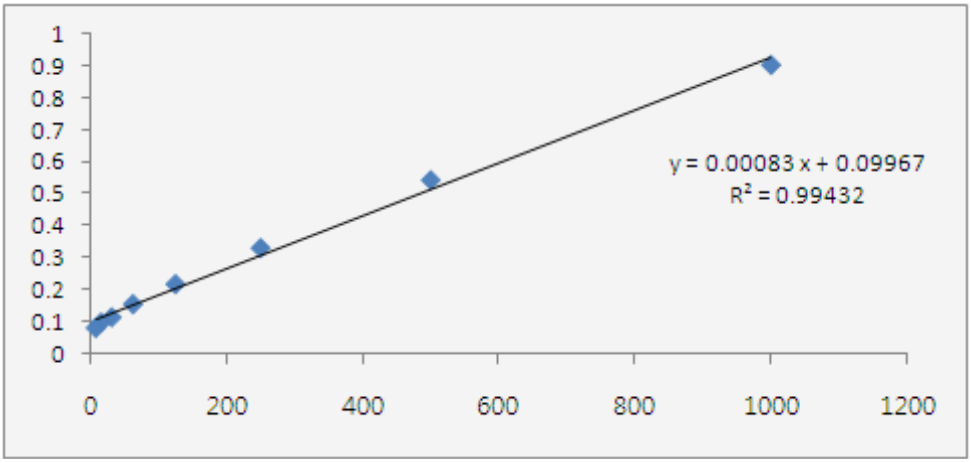


그림 9. Bradford 정량법의 표준적정곡선 그래프

표 13. 한우뇨 임신/비임신뇨의 단백질 농도

임신	OD1	OD2	average	결과 농도	평균값
원액	0.1980	0.1990	0.1985	119.0723	83ug/ml
2배	0.1350	0.1350	0.1350	85.13253	
4배	0.1110	0.1070	0.1090	44.96386	

미임신	OD1	OD2	average	결과 농도	평균값
원액	0.3520	0.3530	0.3525	304.6145	296ug/ml
2배	0.2200	0.2330	0.2265	305.6145	
4배	0.1570	0.1580	0.1575	278.6988	

두 Sample내의 단백질의 양을 정량한 결과로 임신뇨의 경우 약 83ug/ml의 정량값을 보였고 미임신뇨의 경우 약 296ug/ml 의 농도를 보였다. 이 결과를 바탕으로 2D에 이용할 Sample 350ul에 동일한 단백질의 농도로 맞추어 준비하였다.

(4) Strip Rehtdration, Focusing & Equilibrate

굳어있는 strip의 gel을 불리는 과정으로서 두 개의 strip을 준비한다. 하나의 strip은 임신 한우뇨 sample을 로딩하고 다른 하나의 strip은 미임신 한우뇨 sample을 로딩한다. 흰판에 Sample + Sample buffer solution을 350ul 로딩해 준 뒤, Strip을 집게로 고정시키고 한쪽의 막을 벗겨 낸 뒤, Gel 방향을 buffer에 닿게 하여 한쪽 방향으로 슬며시 놓는다. 이 과정에서 기포는 반드시 제거 되어야 한다. 1h 안정화 시킨 후, mineral oil을 strip위에 2~3ml 깔아준다. mineral oil은 물과 섞이지 않아 수분의 증발을 방지해 준다. 이 후 R.T 50V 12h동안 Focusing을 해 주고 (단백질 PI별로 분리) 12시간 후에 strip의 oil을 닦아 낸 후 equilibration buffer 1과 2를 약 3ml 로딩하여(각 20min) 단백질을 고정 시켜 준다.
최종적으로 단백질 1차 분리 및 고정이 완료 되면 2차 분자량 별 분리를 위해 Gel을 준비한다.

(5) Electrophoresis

전기영동을 위해 acrlyamide gel 10%, 최종 38ml로 용액을 만든 뒤, Gel 카셋트에 로딩하여 Gel을 만들어 준다. 준비 해 둔 Strip을 Gel이 바깥쪽 방향으로 오게 유리판에 설치 한 뒤, 양 끝을 잘라내고 조심스럽게 Gel위에 끼운다. 그 위에 Low melting agarose 0.5g과 Bromophenol blue가 0.001% 섞인 용액으로 조심스럽게 로딩해 준다. (Silling의 효과) 그 다음, tank buffer를 채워주고 60V overnight으로 Gel을 내린다.

(6) 한우뇨 단백질 2D 결과 분석

아래 사진은 임신 한우뇨와 미임신 한우뇨의 단백질 분획을 추출하여 최종적으로 2D electrophoresis를 실시한 결과 사진이다. Coomasi brilliant blue 염색약으로 Gel을 4h 염색한 뒤, Destaining solution(10% methanol, 10% Acetic acid)으로 염색약을 제거 한 뒤 Spot으로 나타난 Sample 별 단백질 발현의 차이를 관찰하였다. 그 결과 두 Sample간의 단백질 발현 패턴에 있어서 차이를 보이지 않고 동일한 위치에 Spot이 나타난 것을 확인할 수 있었다. 이를 반복하여 약 40여 두수의 한우뇨 샘플을 비교분석하였지만 한우의 임신과 비임신의 뇨에서 검출되는 단백질 패턴의 차이를 찾을 수 없었으며, 임신/비임신과는 관계없이 일정한 단백질이 체외로 배출되는 것을 알 수 있었다. (그림 10, 11)

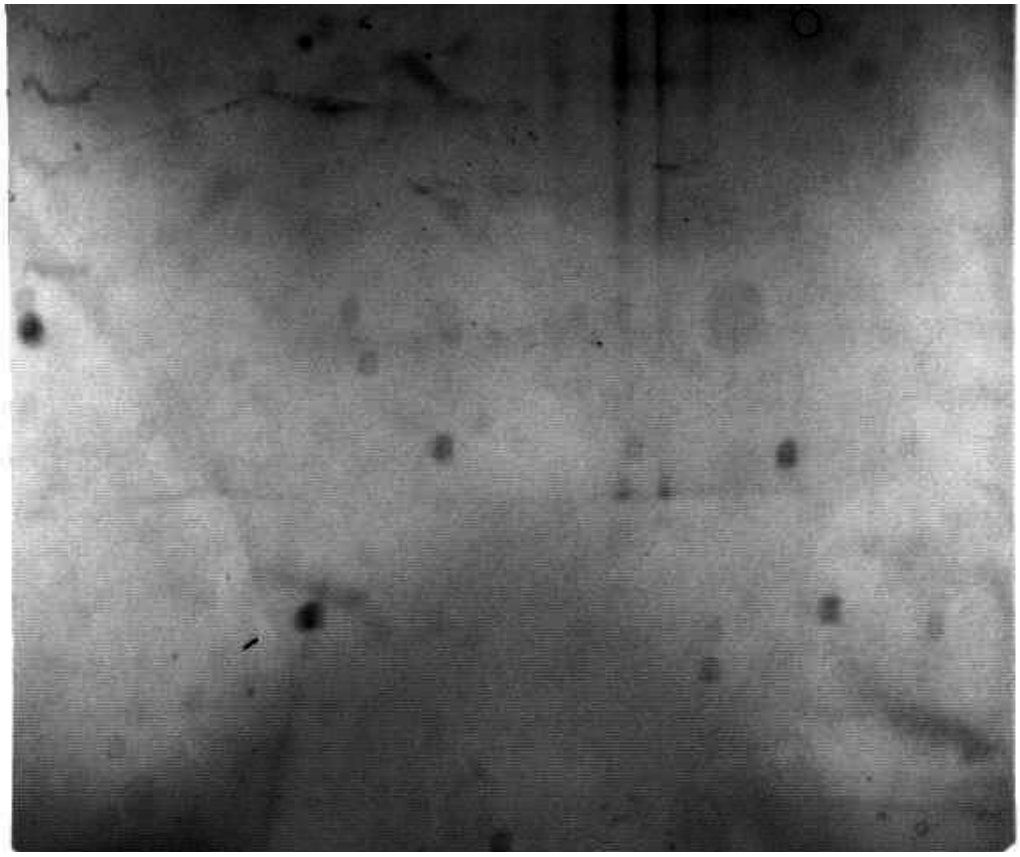


그림 10. 한우 비임신뇨 샘플의 2D 결과 사진

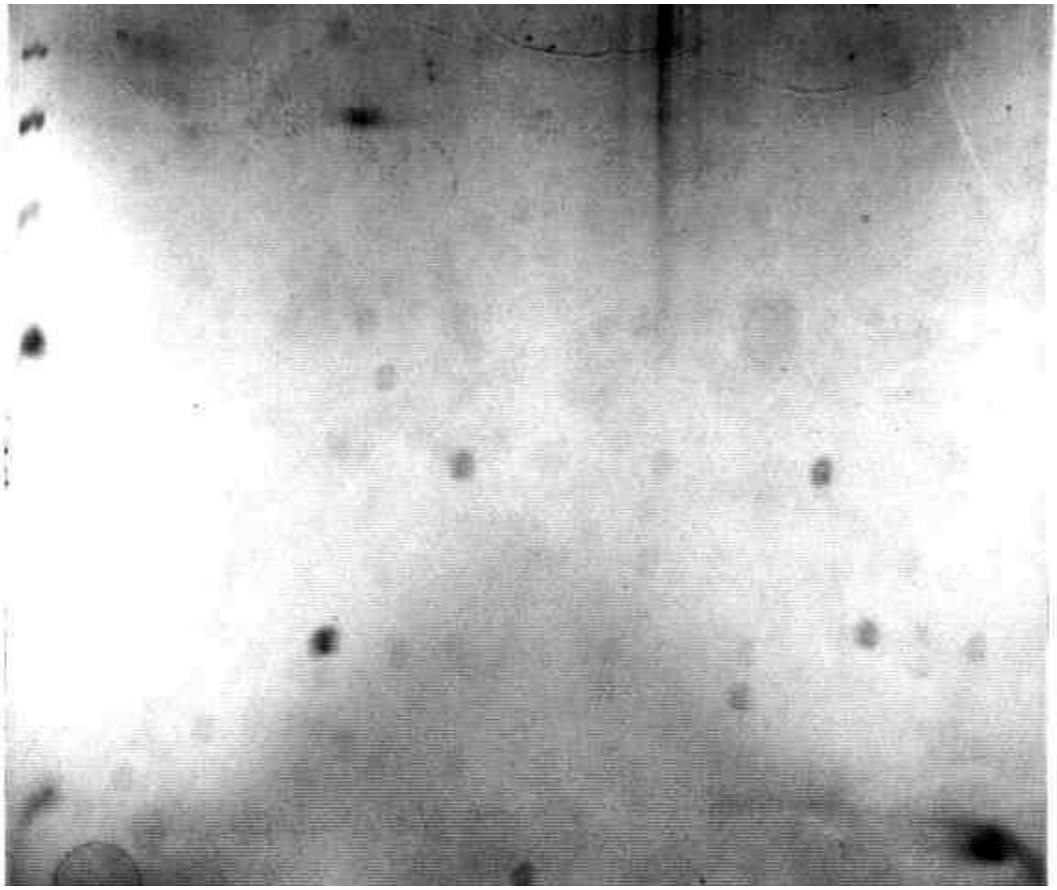


그림 11. 한우 비임신뇨 샘플의 2D 결과 사진

o 3차년도 (2008)

연 구 기 관	연 구 책 임 자	소요예산 (천원)
한동대학교 생명과학연구소, 경북 축산 기술 연구소	김 종 배	140,000

가. 확보된 시료의 그룹별 블라인드 테스트

2차년도에서 30ng/ml로 설정된 임신/비임신을 나누는 기준으로 얼마나 정확히 임신판별이 이루어지는지 확인하기 위해 경북축산연구소에서 그룹별로 임신 초기의 돼지뇨 샘플을 지원받아 임신/비임신을 판별하고 나중에 초음파 검사로 임신을 확인하여 비교해보는 블라인드 테스트를 진행하였다. 총 3번에 걸쳐 정량 결과와 임신 판별을 공문으로 주고 받았으며, 총 분석 샘플 수는 689개, E1S 농도가 올라가는 시점인 10일부터 30일 사이의 샘플 수는 284개, 비임신 샘플 수는 87개로 모두 델피아법으로 E1S를 정량하였다. (표 1) 임신 일수와 상관없이 전체적인 임신/비임신 판별의 정확도는 37.12%이며, 임신 20일부터 30일 사이의 샘플에서 임신/비임신의 판별의 정확도는 80.52%로 나타났다. 사람의 임신진단키트와 비교하였을 때 사람의 임신진단키트의 경우 정확도가 95%를 상회하는 반면, 돼지의 임신진단키트는 지금의 시스템으로 키트를 제조할 경우 80.52%의 정확도로는 사업화와 제품화의 가치가 없다. 따라서 돼지뇨의 샘플의 상태를 정확히 파악하고 경북축산기술연구소와 상의한 결과, 샘플의 보관 상태에 따라 정량값에 많은 차이를 나타난다는 것을 알 수 있었다. 즉, E1S는 앞서 연구된바와 같이 불안정한 물질이므로, 샘플을 상온 보관하였을 시 뇨의 부패가 진행되어 뇨 중 E1S가 분해되고 다른 인터페어한 물질, 고분자 물질이 많이 생성되어 0.45nm의 필터를 할 때에도 적은 양만 필터되고, 정량했을 때에는 E1S의 양이 아닌 인터페어한 물질 때문에 정량값이 높게 나온다는 결론을 내릴 수 있었다. 따라서 그룹 19번부터는 뇨 샘플을 채취한 즉시 -50도의 냉동고에 보관하고 그 상태로 택배를 보내어 한동대학교에서 필터를 거친 후 정량실험을 실시하였다. 그룹 1부터 18까지의 샘플에 비해 샘플을 받은 뒤 바로 얼려서 보관한 샘플들은 필터를 할 필요가 없을 정도로 필터가 잘 되었다. 필터된 샘플을 델피아법으로 뇨 중 E1S를 정량하였다. 뇨 샘플을 상온에 방치하여 부패가 진행된 그룹 1부터 18까지의 임신 판별 정확도는 68.75%이며, 그룹 19부터 29까지의 임신 판별 정확도는 92.3%라는 결과를 얻을 수 있었다. 이는 임신 판별의 정확도가 달라질 만큼 뇨 샘플의 보관 상태가 중요하다는 것을 알려주며, 델피아법이나 엘라이자법으로 실제농가에 서비스를 실행할 때에도 샘플의 보관이 매우 중요하다는 것을 시사해준다.

표1. 그룹 1부터 29까지 E1S 정량 결과 (50배 희석 비임신뇨 인터널 스텐다드)

그룹 9				그룹 10			
순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부	순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부
1	10-304/5.1/6.8	130	임신	1	16/07.5.23	130	임신
2	5-680/9.18/11.2	18	미임신	2	5-686/5.3/6.1	250	임신
3	5-673/5.21/6.8	18	미임신	3	11-003/4.20/5.28	20	미임신
4	5-181/4.25/5.16	110	임신	4	9-702/2.21/5.19	130	임신
5	6-106/10.23/11.2	11	미임신	5	11-003/4.20/6.1	13	미임신
6	9-405/1.11/5.16	80	미임신	6	9-702/2.21/5.19	130	임신
7	2734/4.26/5.18	143	임신	7	3010/5.1/5.14	33	미임신
8	2691/3.25/5.18	7	미임신	8	6-571/5.25	20	미임신
9	9-405/1.11/5.16	180	임신	9	5-686/5.3/6.1	280	임신
10	5-181/4.25/5.16	109	임신	10	33/07.5.23	25	미임신
11	5-673/10.4/11.2	104	임신	11	5-503/4.3/5.14	11	미임신
12	2734/4.26/5.25	1400	임신	12	156/07.5.23	15	미임신
13	11-003/4.20/6.8	20	미임신	13	11-001/5.1/6.1	29	미임신
14	5-673/5.21/6.8	87	미임신	14	3010/5.1/5.19	16	미임신
15	10-304/5.1/6.8	26	미임신	15	2687/5.1/5.19	16	미임신
16	11-001/5.1/6.8	260	임신	16	2691/3.25/5.14	24	미임신
17	11-003/4.20/6.8	11	미임신	17	104/07.5.23	58	미임신
18	2691/3.25/5.18	13	미임신	18	188/07.5.23	18	미임신
19	6-571/5.25	23	미임신	19	179/07.5.23	31	미임신
20	10-307/7.29/11.2	2561	임신	20	54/07.5.23	25	미임신
21	2734/4.26/5.18	280	임신	21	5-503/4.7/5.14	52	미임신
22	11-001/5.1/6.8	23	미임신	22	11-003/4.26/5.25	59	미임신
23	2734/4.26/5.25	1100	임신	23	11-001/5.1/6.1	130	임신
24				24	3010/5.1/5.14	23	미임신
25				25	2687/5.1/5.19	290	임신
26				26	2691/3.25/5.14	44	미임신

그룹 11				그룹 12			
순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부	순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부
1	3010/5.1/6.10	23	미임신	1	189/07.5.15	40	미임신
2	5-503/4.3/5.23	22	미임신	2	3010/5.1/6.11	18	미임신
3	10-304/5.1/5.23	170	임신	3	92/07.5.15	36	미임신
4	5-503/4.3/5.23	18	미임신	4	190/07.5.5/5.15	26	미임신
5	8-307/5.18/5.23/(1)	24	미임신	5	3010/5.1/6.4	13	미임신
6	8-307/5.18/5.23(2)	26	미임신	6	11-003/4.20/6.4	14	미임신
7	3010/5.1/6.10	18	미임신	7	24/07.05.15	120	임신
8	11-003/4.20/6.10	3193	임신	8	54/07.05.15	2811	임신
9	5-673/5.21/5.30	12	미임신	9	11-003/4.20/6.4	16	미임신
10	11-003/4.20/6.10	13	미임신	10	106/07.05.15	21	미임신
11	11-003/4.20/5.21	12	미임신	11	10-303/4.17/5.29	120	임신
12	2734/4.26/6.10	12	미임신	12	11-001/5.1/5.29	280	임신
13	5-503/4.3/5.26	17	미임신	13	11-001/5.1/6.11	35	미임신
14	11-003/4.20/5.23	12	미임신	14	156/07.05.15/LCL2	25	미임신
15	5-503/4.3/5.26	5	미임신	15	164/07.05.19/no-preg	21	미임신
16	11-003/4.20/5.26	5	미임신	16	11-003/4.20/5.29	16	미임신
17	11-003/4.20/5.30	7	미임신	17	11-001/5.1/5.29	250	임신
18	3010/5.1/5.23	170	임신	18	179/07.05.15/LCL2	25	미임신
19	10-304/5.1/5.23	260	임신	19	11-003/4.20/6.4	22	미임신
20	11-003/4.20/6.30	12	미임신	20	3010/5.1/6.4	20	미임신
21	11-003/4.21/5.21	17	미임신	21	170/07.5.15	22	미임신
22	2734/4.26/6.10	20	미임신	22			
23	11-003/4.20/5.26	16	미임신	23			
24	11-003/4.20/6.1	11	미임신	24			
25	3010/5.1/5.19	23	미임신	25			
26	5-673/5.21/5.30	32	미임신	26			

그룹 13				그룹 14			
순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부	순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부
1	4-003/4.20/6.20	25	미임신	1	3010(1)/5.1/6.18	25	미임신
2	6-088/6.11/6.19	1000	임신	2	3010(2)/5.1/6.18	88	미임신
3	5693/5.24/5.31	7	미임신	3	3010/5.1/6.19	96	미임신
4	5-503/4.3/5.31	14	미임신	4	5-504(1)/6.19	9	미임신
5	2734/4.26/6.15	95	미임신	5	5-504(2)/6.19	13	미임신
6	3010/5.1/6.15	18	미임신	6	6-770/6.16/6.18	100	임신
7	2734/4.26/6.20	180	임신	7	2688/3.25/6.19	2453	임신
8	2734/4.26/6.15	2506	임신	8			
9	2701/4.3/6.15	500	임신	9			
10	3010/5.1/6.20	10	미임신	10			
11	2683/6.19	7	미임신	11			
12	2688/3.25/6.19	1900	임신	12			
13	6-770/6.16/6.20	49	미임신	13			
14	11-003/4.20/5.31	8	미임신	14			
15	2683/6.19	5	미임신	15			
16	2683/3.18/6.20	23	미임신	16			
17	5-693/5.24/5.31	8	미임신	17			
18	2701/4.3/6.15	600	임신	18			
19	5-503/4.3/5.31	10	미임신	19			
20	11-003/4.20/5.31	11	미임신	20			
21	2734/4.26/6.20	150	임신	21			

그룹 15				그룹 16			
순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부	순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부
1	6-060/8.12/11.5	60	임신	1	Y11-001/10.29/11.17	90	임신
2	Y11-001/10.29/11.5	28	미임신	2	L7-428/10.15/11.17	20	미임신
3	D6-571/9.11/11.12	11	미임신	3	재 6-060/8012/11.4	12	미임신
4	Y11-001/10.29/11.12	21	미임신	4	Y7-296/8.10/11.4	26	미임신
5	L7-428/10.15/11.13	21	미임신	5	D7-508/9.17/11.4	95	임신
6	D7-508/9.17/11.12	250	임신	6	L7-195/8.7/11.4	550	임신
7	Y7-296/8.30/11.10	90	임신	7	L7-428/10.15/11.4	17	미임신
8	Y7-473/9.3/11.10	180	임신	8	D7-409/8.6/11.4	16	미임신
9	D7-409/8.6/11.9	140	임신	9	L7-428/10.15/11.18	7	미임신
10	L7-428/10.15/11.9	28	미임신	10	재 6-056/9.17/11.18	25	미임신
11	Y2734/8.20/11.9	13	미임신	11	D6-770/9.11/11.18	90	임신
12	재 6-060/8.12/11.10	17	미임신	12	Y7-253/11.11/12.1	18	미임신
13	Y11-001/11.27/12.3	24	미임신	13	Y7-253/11.11/12.1	130	임신
14	Y11-001/11.27/12.3	12	미임신	14	Y11-001/10.29/11.24	19	미임신
15	L10-307/11.25/12.3	9	미임신	15	재 6-056/9.17/11.24	17	미임신
16	L10-307/11.25/12.3	11	미임신	16	L7-428/10.15/11.24	7	미임신
17	D7-508/9.17/11.3	18	미임신	17	L7-428/10.15/11.20	10	미임신
18	Y11-001/10.29/11.3	22	미임신	18	Y11-001/11.27/12.4	13	미임신
19	D6-571/9.11/11.3	25	미임신	19	L10-307/11.25/12.4	20	미임신
20	D7-409/8.6/11.3	350	임신	20	L7-427/11.4/12.4	590	임신
21	L7-428/10.15/11.3	21	미임신	21	L10-307/11.25/12.4	50	임신
22	재 6-041/9.1/11.3	310	임신	22	Y11-001/11.27/12.4	21	미임신
23	D7-508/9.17/11.3	29	미임신	23	D6-571/9.11/11.6	19	미임신
24	D6-571/9.11/11.3	20	미임신	24	재 6-041/9.1/11.6	550	임신
25	재 6-060/8.12/11.17	25	미임신	25	Y2734/8.26/11.6	220	임신

그룹 17				그룹 18			
순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부	순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부
1	D7-508/9.17/11.6	170	임신	1	D7-508/9.17/10.25	40	임신
2	재7-029/10.26/11.18	18	미임신	2	재6-042/8.27/10.25	100	임신
3	L7-428/10.15/11.26	90	임신	3	재6-041/9.1/10.25	11	미임신
4	Y11-001/10.29/11.25	170	임신	4	Y2734/8.26/10.24	8	미임신
5	L10-307/11.25/12.5	94	임신	5	Y7-162/7.21/10.24	1990	임신
6	Y11-001/11.27/12.5	19	미임신	6	Y2734/8.26/10.24	10	미임신
7	L10-307/11.25/12.5	28	미임신	7	재6-041/9.1/10.24	280	임신
8	Y7-253/11.11/12.8	2455	임신	8	Y7-162/7.21/10.24	2481	임신
9	Y11-001/11.27/12.8	590	임신	9	Y2697/7.22/10.24	1982	임신
10	Y11-001/11.27/12.8	490	임신	10	재6-041/9.1/10.26	290	임신
11	Y7-253/11.11/12.8	1000	임신	11	D7-434//10.26	7	미임신
				12	Y2734/8.26/10.26	7	미임신
				13	Y7-473/9.3/10.28	230	임신
				14	D7-409/8.6/10.28	310	임신
				15	Y11-001/7.22/10.28	280	임신
				16	D6-571/9.11/10.29	11	미임신
				17	Y2734/8.26/10.27	10	미임신
				18	재6-041/9.1/10.27	95	임신
				19	Y7-296/8.30/10.27	130	임신
				20	D7-508/9.17/10.27	180	임신
				21	D6-571/9.11/10.30	13	미임신
				22	Y2734/8.26/10.30	20	미임신
				23	D7-508/9.17/10.30	21	미임신
				24	재6-041/9.1/10.30	390	임신
				25	D6-571/9.11/11.11	69	임신
				26	Y2734/8.26/11.11	150	임신
				27	D7-508/9.17/11.11	260	임신
				28	Y7-493/9.3/11.11	380	임신
				29	재6-060/8.12/11.11	15	미임신
				30	재6-041/9.1/11.11	1000	임신

그룹 19				그룹 20			
순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부	순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부
1	Y8-257//2.3	19	미임신	1	Y8-129/1.16/2.6	19	미임신
2	D5-673/11.28/12.11	135	임신	2	Y8-140/1.6/1.22	80	임신
3	D8-194//2.3	3	미임신	3	Y11-001/11.27/12.12	83	임신
4	L10-307/11.25/12.17	175	임신	4	D8-193//2.10	1	미임신
5	Y8-208//2.3	101	임신	5	Y8-129/1.16/2.9	160	임신
6	Y11-001/10.27/12.11	6	미임신	6	Y8-130/1.1/1.22	110	임신
7	Y11-001/11.27/12.17	110	임신	7	L8-118/12.30/2.18	96	임신
8	D8-194//1.9	115	임신	8	D8-194/1.15/2.2	85	임신
9	D7-409/12.30/1.9	130	임신	9	D8-193//2.9	1	미임신
10	D7-434/12.16/12.22	1100	임신	10	D8-194/1.15/2.6	100	임신
11	Y11-001/11.27/12.24	7	미임신	11	Y8-246//2.10	1	미임신
12	L8-118/12.30/2.3	3	미임신	12	Y8-246//2.6	0	미임신
13	Y8-208//1.9	4	미임신	13	Y8-119//2.10	250	임신
14	L7-427/11.4/12.18	296	임신	14	L7-484/1.29/2.10	145	임신
15	Y11-001/11.27/12.24	18.5	미임신	15	L8-208//2.9	1	미임신
16	Y8-186//1.9	110	임신	16	Y8-156//2.6	170	임신
17	L10-307/11.25/12.17	90	임신	17	L8-257//2.2	1	미임신
18	Y8-267//1.9	1	미임신	18	L10-307/11.25/12.15	298	임신
19	D5-673/11.28/12.11	94	임신	19	Y8-208//2.2	1	미임신
20	D7-434/12.16/12.18	2	미임신	20	Y8-129/1.16/2.10	400	임신
21	Y8-140/1.6/1.9	2	미임신	21	Y11-001/11.27/12.15	65	임신
22	Y11-001/10.27/12.11	100.5	임신	22	재래6-106/1.30/2.9	120	임신
23	Y8-130/1.1/1.9	2	미임신	23	Y11-001/1.22/2.9	95	임신
24	L8-156//2.3	91.5	임신	24	Y8-257//2.9	0	미임신
25	Y11-001/11.27/12.18	6	미임신	25	D8-193//1.22	0	미임신
26	D5-673/11.28/12.24	600	임신	26	Y11-001/1.22/2.2	61	임신
27	D7-434/12.16/12.24	17	미임신	27	Y7-217/1.22/2.6	0	미임신
28	Y11-001/1.22/2.3	5	미임신	28	D8-194/1.15/2.10	658	임신
29	L7-427/11.4/12.18	121	임신	29	Y11-001/11.27/12.15	145	임신
30	D5-673/11.28/12.24	532	임신	30	L8-118/12.30/1.22	305	임신

그룹 21				그룹 22			
순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부	순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부
1	Y8-208//1.7	101	임신	1	Y2695/12.10/12.26	160	임신
2	Y8-257//2.5	100	임신	2	Y11-001/11.27/12.31	170	임신
3	L7-484/1.29/2.5	182	임신	3	Y2695/12.10/12.30	348	임신
4	Y7-217/1.22/2.5	94	임신	4	D8-146/12.30/1.13	101	임신
5	L8-118/12.30/2.5	72	임신	5	Y2695/12.10/12.31	325	임신
6	Y8-130/1.1/1.23	150	임신	6	D8-196//1.13	0	미임신
7	D7-434/12.16/12.19	99	임신	7	Y2695/12.10/12.22	150	임신
8	D8-194/1.15/1.23	0	미임신	8	D5-673/11.28/12.22	905	임신
9	Y8-208//1.23	90	임신	9	Y2701/12.10/12.22	208	임신
10	Y11-001/1.22/1.23	91	임신	10	Y11-001/11.27/1.12	100	임신
11	L8-156//1.28	125	임신	11	Y2701/12.10/12.22	145	임신
12	Y8-267//1.7	0	미임신	12	D8-196//1.12	0	미임신
13	L8-119/1.16/1.7	83	임신	13	L8-118/12.30/1.13	399	임신
14	D8-195//1.28	90	임신	14	L10-307/11.25/12.30	65	임신
15	D8-194//1.7	70	임신	15	Y2701/12.10/12.26	145	임신
16	L8-119/1.16/1.7	80	임신	16	Y2701/12.10/12.26	140	임신
17	L7-195//1.7	120	임신	17	Y11-001/11.27/12.26	130	임신
18	L7-195//1.7	101	임신	18	Y2695/12.10/12.26	86	임신
19	Y8-208//1.28	80	임신	19	Y2695/12.10/12.31	308	임신
20	L8-158/12.23/1.23	168	임신	20	D5-673/11.28/12.16	590	임신
21	재래6-106/12.15/12.19	170	임신	21	L8-119/1.6/1.13	0	미임신
22	재래6-106/12.15/12.19	180	임신	22	L8-158/12.23/1.13	135	임신
23	Y7-217/1.22/1.28	70	임신	23	Y7-253/11.11/12.9	1250	임신
24	재래6-106/12.15/1.7	235	임신	24	Y2695/12.10/12.22	1	미임신
25	Y11-001/1.22/1.28	86	임신	25	D8-193//1.12	132	임신
26	Y11-001/11.27/1.7	89	임신	26	Y8-208//1.12	0	미임신
27	D8-196//2.5	101	임신	27	L8-156//1.12	250	임신
28	D8-194//1.28	120	임신	28	Y8-140/1.6/1.12	82	임신
29	Y8-246//2.5	65	임신	29	Y7-253/11.11/12.9	1120	임신
30	Y8-208//2.5	0	미임신	30	Y8-267//1.12	0	미임신

그룹 23				그룹 24			
순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부	순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부
1	D8-194/1.15/1.21	68	임신	1	D8-193//1.8	120	임신
2	D5-673/11.28/12.26	540	임신	2	Y8-208//1.8	180	임신
3	Y2734/1.20/2.4	0	미임신	3	Y8-140/1.6/1.13	235	임신
4	Y11-001/11.27/12.19	89	임신	4	Y8-267//1.7	71	임신
5	L8-118/12.30/1.21	0	미임신	5	Y8-208//1.14	0	미임신
6	D8-196//1.21	0	미임신	6	D8-148/12.25/1.8	0	미임신
7	D8-195//2.4	84	임신	7	D8-195//1.14	140	임신
8	재래6-106/12.15/1.21	110	임신	8	Y8-257//1.29	80	임신
9	D7-409/12.30/1.21	935	임신	9	Y8-130/1.1/1.14	81	임신
10	Y7-217/1.6/1.21	75	임신	10	D7-490/12.30/1.14	70	임신
11	Y2701/12.10/12.29	115	임신	11	L8-156//1.29	120	임신
12	D8-194/1.15/2.4	170	임신	12	L8-118/12.30/1.19	260	임신
13	Y11-001/11.27/12.16	98	임신	13	Y8-130/1.1/1.8	80	임신
14	Y11-001/11.27/12.16	100	임신	14	L8-158/12.23/1.8	149	임신
15	D8-193//1.6	89	임신	15	D8-196//1.8	0	미임신
16	L10-307/11.25/12.16	0	미임신	16	Y8-208//1.19	0	미임신
17	Y8-257//2.4	0	미임신	17	L8-118/12.30/1.14	130	임신
18	L10-307/11.25/12.26	0	미임신	18	Y8-129/1.16/1.29	290	임신
19	Y8-208//1.21	0	미임신	19	L8-158/12.23/1.19	703	임신
20	L8-118/12.30/1.4	72	임신	20	D8-194/1.15/1.29	160	임신
21	D7-434/12.16/12.16	0	미임신	21	L8-156//1.19	390	임신
22	Y11-001/11.27/1.6	0	미임신	22	D8-148/12.25/1.14	95	임신
23	D8-194//1.6	0	미임신	23	Y11-001/11.27/1.8	0	미임신
24	Y11-001/11.27/1.6	0	미임신	24	D8-196//1.29	140	임신
25	L8-158/12.23/12.29	80	임신	25	Y8-208//1.29	0	미임신
26	D8-193//1.6	86	임신	26	재래6-106/12.15/1.19	200	임신
27	Y2701/12.10/12.29	122	임신	27	D8-194/1.15/1.19	0	미임신
28	Y11-001/11.27/12.29	118	임신	28	Y11-001/11.27/1.19	340	임신
29	Y11-001/11.27/12.29	72	임신	29	Y8-140/1.6/1.19	84	임신

그룹 25				그룹 26			
순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부	순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부
1	Y8-267//1.20	76	임신	1	D8-193/2.26/3.17	115	임신
2	D8-195//1.16	19	임신	2	L7-484/1.29/2.12	800	임신
3	Y8-208//1.15	0	미임신	3	Y11-001/1.22/2.20	98	임신
4	D8-194/1.15/1.30	78	임신	4	Y7-463/3.10/3.19	10	미임신
5	D8-193//1.14	70	임신	5	D6-571/2.11/2.12	10	미임신
6	재래6-106/12.15/1.6	175	임신	6	Y8-208//2.20	273	임신
7	Y8-208//1.6	79	임신	7	Y11-001/1.22/2.12	294	임신
8	Y8-257//1.30	15	미임신	8	L8-118/2.15/3.17	9	미임신
9	L8-158/12.23/1.15	450	임신	9	D6-571/2.11/2.13	283	임신
10	Y7-130/1.1/1.16	80	임신	10	D8-193//2.20	44	임신
11	Y8-257//1.20	0	미임신	11	D6-571/2.11/2.20	85	임신
12	D8-194/1.15/1.20	0	미임신	12	YD-186/1.31/2.13	411	임신
13	D8-193//1.30	81	임신	13	Y2734/1.20/2.13	229	임신
14	Y8-208//1.30	20	미임신	14	재래6-056/2.17/3.19	190	임신
15	Y7-217/1.6/1.15	60	임신	15	L8-118/2.15/3.19	12	미임신
16	L8-119/1.6/1.15	20	미임신	16	Y8-208//2.12	17	미임신
17	Y7-217/1.6/1.16	0	미임신	17	Y7-463/3.10/3.17	979	임신
18	L8-158/12.23/1.16	645	임신	18	D8-184/1.15/2.12	15	미임신
19	Y8-257//1.15	76	임신	19	D8-193//2.12	14	미임신
20	L8-118/12.30/1.20	240	임신	20	D8-213/3.10/3.19	58	임신
21	L8-118/12.30/1.30	850	임신	21	D6-770/2.10/2.20	85	임신
22	D8-146/12.30/1.20	200	임신	22	D6-766//3.17	480	임신
23	Y8-208//1.20	0	미임신	23	재래6-106/1.30/2.20	900	임신
24	L8-118/12.30/1.15	601	임신	24	L6-849/2.21/3.19	0	미임신

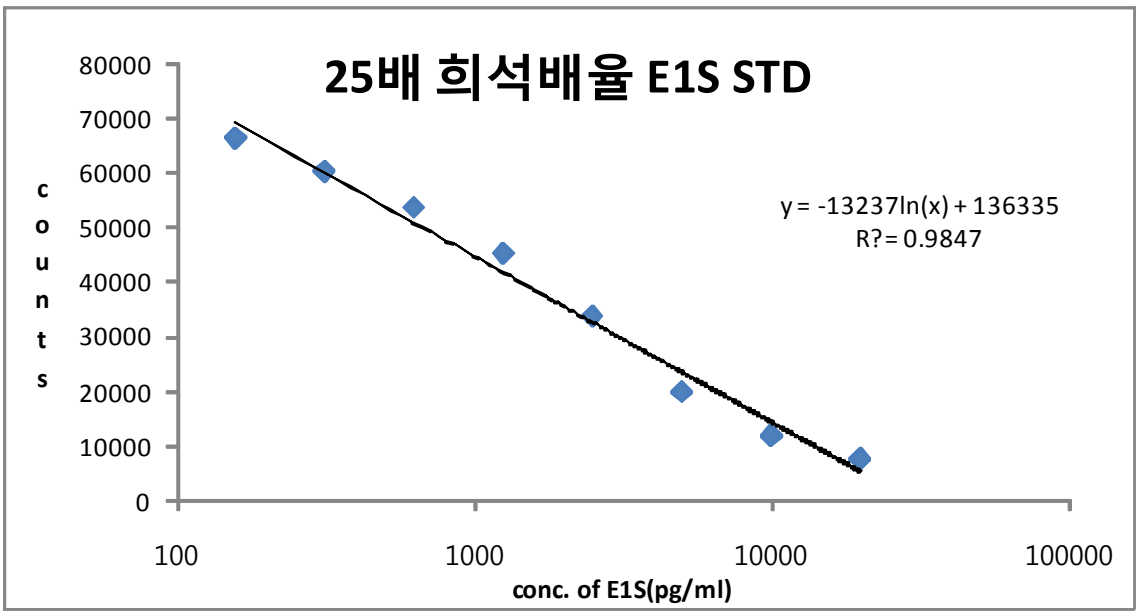
그룹 27				그룹 28			
순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부	순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부
1	D8-193//2.16	73	임신	1	Y8-257//3.4	69	임신
2	D8-196//2.11	36	임신	2	Y8-208//3.4	54	임신
3	L8-118/2.15/3.9	63	임신	3	Y8-186/1.31/2.17	50	임신
4	D6-776//3.9	88	임신	4	D8-193//2.17	110	임신
5	L7-484/1.29/3.4	160	임신	5	Y8-257//3.12	178	임신
6	Y8-208//3.9	15	미임신	6	L8-118/2.15/2.17	50	임신
7	Y11-001/1.22/2.16	455	임신	7	D8-213/3.10/3.16	0	미임신
8	D6-766//3.9	80	임신	8	Y7-463/3.10/3.16	0	미임신
9	재래6-056/2.17/3.13	600	임신	9	L8-118/2.15/3.13	94	임신
10	D8-196/2.17/3.13	892	임신	10	Y8-246//3.12	65	임신
11	L7-484/1.29/3.9	173	임신	11	Y8-186/1.31/3.4	230	임신
12	D6-571/2.11/2.16	31	임신	12	D8-196/2.17/3.11	497	임신
13	L8-118/2.15/3.13	451	임신	13	D8-196/2.17/3.12	399	임신
14	재래6-106/1.30/3.9	230	임신	14	재래6-042/2.6/3.12	300	임신
15	Y8-246//2.11	12	미임신	15	재래6-041/2.9/2.17	31	임신
16	D8-213/3.10/3.13	76	임신	16	L8-118/2.15/2.17	275	임신
17	L8-156//2.11	60	임신	17	재래6-402/2.6/2.17	165	임신
18	Y2734/1.20/2.11	329	임신	18	Y8-208//3.11	0	미임신
19	D6-770/2.11/3.9	93	임신	19	Y8-208//2.17	45	임신
20	L8-156//2.16	80	임신	20	L8-118/2.15/3.4	33	임신
21	Y8-208//2.11	13	미임신	21	D8-196/2.17/3.16	545	임신
22	재래6-042/2.6/3.13	375	임신	22	D6-571/2.11/2.17	30	미임신
23	Y8-208//2.16/	14	미임신	23	Y7-296/2.5/3.4	192	임신
24	Y11-001/1.22/2.11	28	미임신	24	Y11-001/1.22/2.17	377	임신

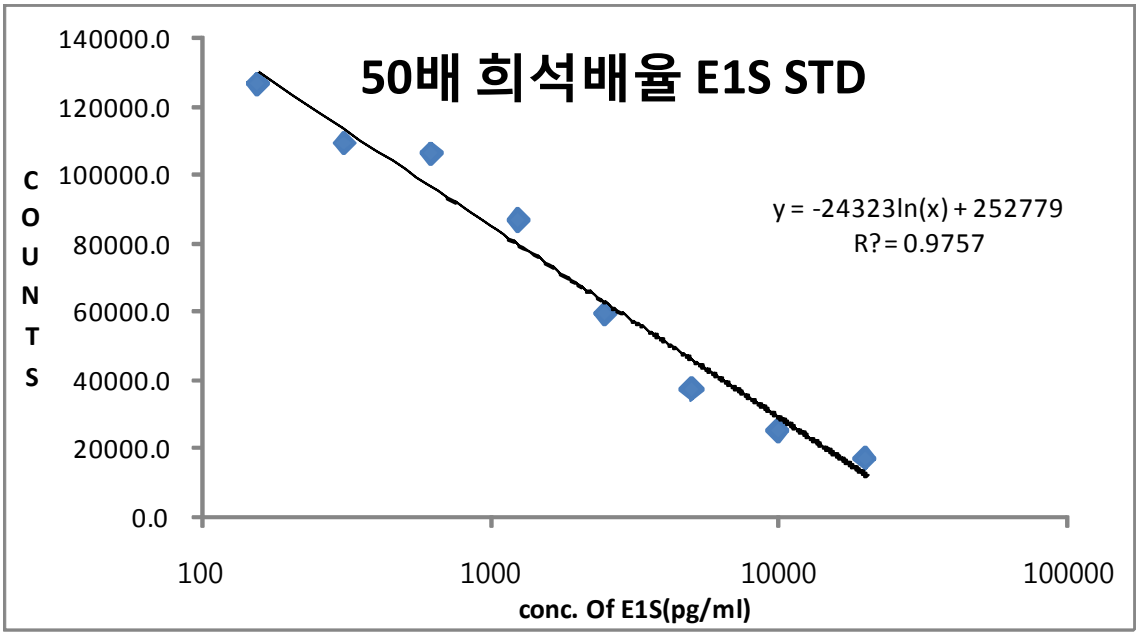
그룹 29			
순번	축번, 날짜	정량값 (ng/ml)	임신 여부
1	재6-041/2.9/3.5	175	임신
2	L6-849/2.21/3.5	193	임신
3	L8-156//3.5	36	임신
4	D6-571/2.11/3.5	155	임신
5	D8-193/2.26/3.11	90	임신
6	재6-106/1.30/3.5	98	임신
7	Y8-208//3.5	200	임신
8	Y7-296/2.5/3.5	149	임신
9	L8-118/2.15/3.11	730	임신

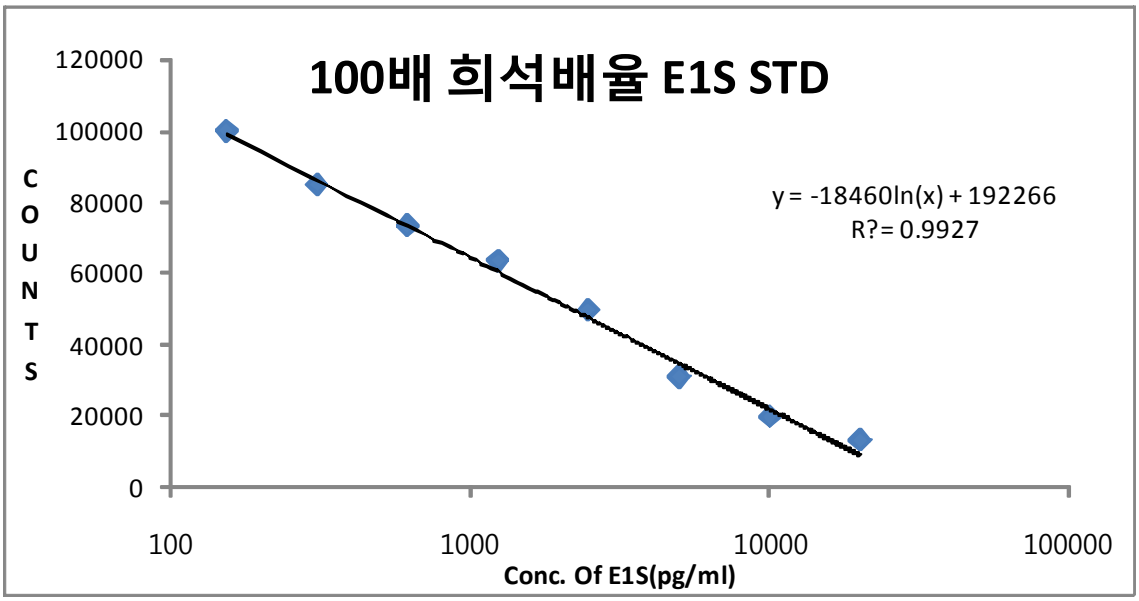
나. Dilution rate 차이에 따른임신 판별 정확도 테스트

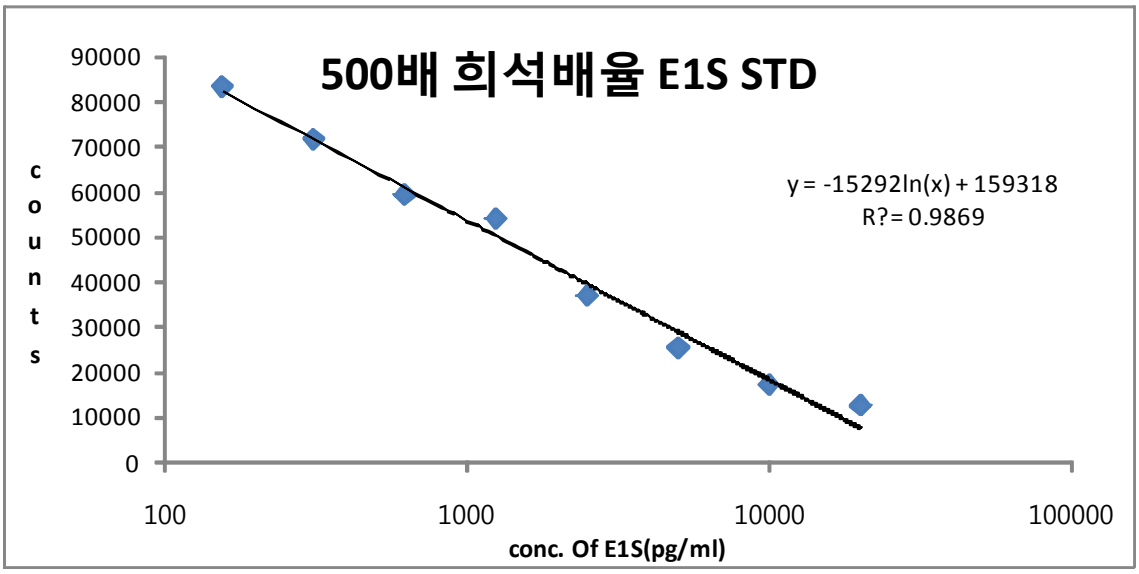
현재 델피아와 엘라이자의 정량시스템에서 기준 희석배율은 50배 희석이다. 50배의 희석배율로 샘플을 희석하여 정량했을 경우, 임신뇨의 대부분은 정량범위 내의 카운트 값이 나와 농도를 알 수 있다. 하지만 비임신뇨의 경우에는 50배 희석하였을 때 카운트값이 모두 정량범위를 벗어나 정량값을 계산할 수 없었다. 즉, 비임신뇨의 경우 뇨 샘플속에 어느 정도의 E1S가 들어있지만 50배 희석했을 때 150pg/ml의 농도보다 더 낮게 나와 농도계산을 할 수 없어 비임신으로 표시하는 것이다. 비임신뇨의 정확한 농도를 확인하기 위해서 25배의 희석배율에서 E1S의 농도를 구하였다. 또한 25배, 50배 뿐만아니라 더 희석된 샘플에서도 E1S의 정량이 가능한지 알아보기 위해서 100배, 500배, 1000배의 희석배율에서도 정량값을 구하였다. (그림 1) 샘플별로 구한 정량값을 임신/비임신을 판별하고 정확도를 희석배율 별로 비교하였다. (표 2) 먼저 50배의 희석배율의 경우, 비임신은 대부분 150pg/ml보다 낮게 나와 정량범위에서 아웃되는 반면, 임신뇨는 모두 정량범위안에 들어와 농도를 계산할 수 있었고, 그 계산값을 그래프로 표시하여 기준치를 정한 결과 30~40ng/ml의 농도에서 임신과 비임신이 판별되는 것을 알수 있었으며, 그 정확도는 92.59%로 높은 정확도를 보였다. 100배 희석배율의 경우, 비임신뇨는 50배와 마찬가지로 거의 모두 정량이 불가능하였지만 희석배율이 높아지면서 미미하게 정량값이 나오는 샘플이 희석배율의 곱을 거치면서 비정상적으로 정량값이 높게 나와 false positive가 오히려 증가하는 결과가 나왔다. 하지만, 임신뇨의 경우에는 50배 희석배율에서 정량범위안에 들어와 임신으로 판별된 샘플들 중 일부가 150pg/ml의 농도보다 낮게 정량되어 정량범위 밖으로 벗어나는 결과를 나타냈으며 false negative의 샘플이 증가하게 되었다. 100배 희석배율일 때의 샘플의 임신 판별 정확도는 76.85%이며, 50배 희석배율보다 정확도가 낮게나와 100배 희석배율보다는 50배의 희석배율이 더욱 임신/비임신을 판별하기에는 좋은 희석배율로 사

료되었다. 500배와 1000배의 희석배율의 경우, 임신뇨는 많은 부분에서 샘플의 정량이 불가능하였으며, 정량이 가능하더라도 희석배율을 곱해서 나온 정량값이 비정상적으로 높은 농도가 도출되었다. 미임신의 경우에도 임신뇨와 마찬가지로 샘플들 중 일부는 정량이 불가능하였으나 정량이 되는 샘플에서는 비정상적으로 높은 농도가 나와 false positive 샘플이 증가하였다. 25배의 희석배율의 경우, 임신뇨는 더 많은 시료가 정량범위 안으로 정량되어 false negative 샘플은 비교적 줄어들었으나 50배 희석배율일때의 정량범위를 벗어난 샘플들이 25배의 희석배율일 때에는 정량이 가능해지면서 false positive 샘플이 증가하게 되었다. 위의 결과들을 종합하여 결론을 도출하면 가장 아이디얼한 희석배율은 50배인 것으로 사료되었으며, 나머지 희석배율로 정량실험을 진행할 경우 임신 판별 정확도가 그리 높지않아 판별이 불가능할 것으로 사료되었다.









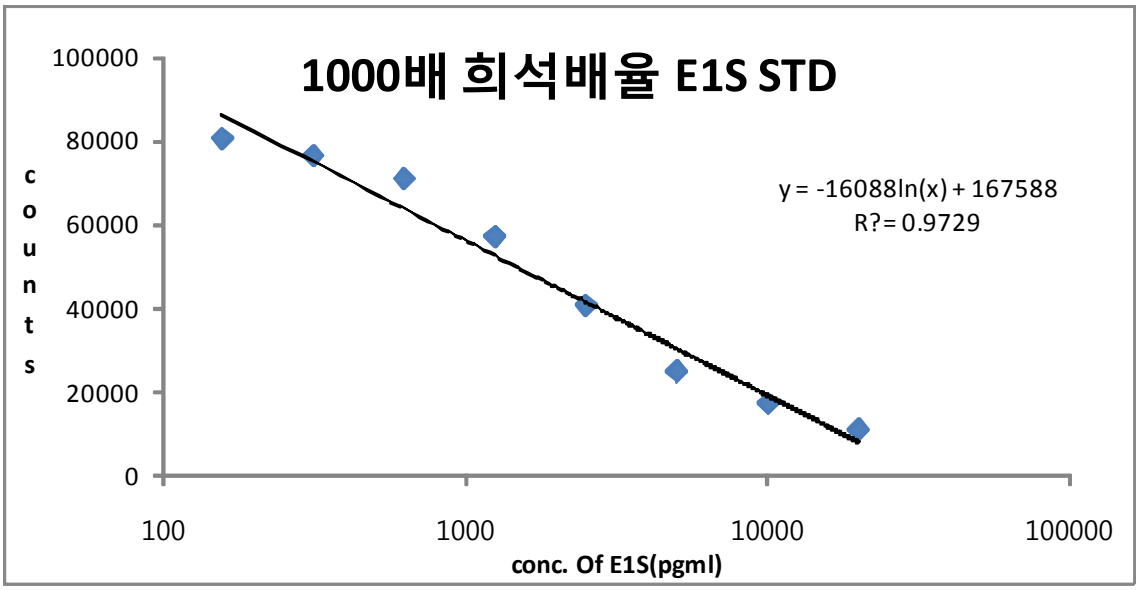


그림 1. 다일루션별 스텐다드 커브

표 2. Dilution 별 임신/비임신 판별 정확도 비교 표

희 석 배 율	임신 샘플 정확도(%)	미임신 샘플 정확도(%)
25X	94.10%	72.50%
50X	92.59%	100%
100X	76.85%	91%
500X	58.33%	74%
1000X	36.11%	83%

다. ELISA법 개발 방법 개선

2차년도에 개발한 E1S의 엘라이자 정량시스템을 3차년도에 실제 뇨의 E1S의 농도를 측정할 때 적용하였으나, 컨쥬게이트의 활성이 우려할만큼 낮아 컨쥬게이트 합성을 개선하여 엘라이자 시스템을 확립하였다. 기존의 2차년도에 개발한 E1S 엘라이자 정량시스템은 컨쥬게이트 희석배율이 1:50으로 매우 높았다. 한번 E1G와 HRP를 합성할 때, 필요한 다른 시약의 가격이나 효율을 고려할 때, 높은 희석배율은 실제 농가 서비스나 다른 실험실에서 적용하기에는 비효율적이며, 이를 개선할 방안을 마련해야 했다. 프로틴에 스테로이드를 컨쥬게이션 시킬 때에는 스테로이드의 양이 중요하며, 컨쥬게이션 자체에서는 버퍼의 pH, 컨쥬게이션 시키는 물질의 용해도, 반응 시간, 컬럼등이 컨쥬게이션 성공률에 매우 중요하게 작용한다. 따라서 모든 조건으로 실험을 하여 가장 아이디얼한 컨쥬게이션의 조건을 설정하였으며, 이를 이용하여 E1G와 HRP를 컨쥬게이션 시켰다. 먼저, 스테로이드의 용해도가 높지 않기 때문에 중성의 pH를 가진 HEPES 버퍼 대신에 DMSO를 사용하여 적정양(10uM)의 스테로이드와 EDC, NHS를 용해시켜 상온에서 2시간 E1G를 활성화시켰다. 2-ME 용액으로 활성화를 정지시킨 다음, Sodium azide가 포함되지 않고 pH가 8.6이 되는 버퍼를 제조하여 (코팅완충용액과 생리식염수를 혼합하여 제조하였다) HRP 프로틴을 녹이고, 앞서 제조한 활성화된 스테로이드가 있는 용약과 혼합하여 하루동안 4도씨에서 Overnight으로 교반시킨다. 그 다음, Quenching buffer로 모든 반응을 정시시킨 후, Sephacryl S-400 High Resolution의 gel-filteration 컬럼을 이용하여 컨쥬게이션 된 프로틴과 프리상태의 E1G를 분리해낸다. (그림 2)

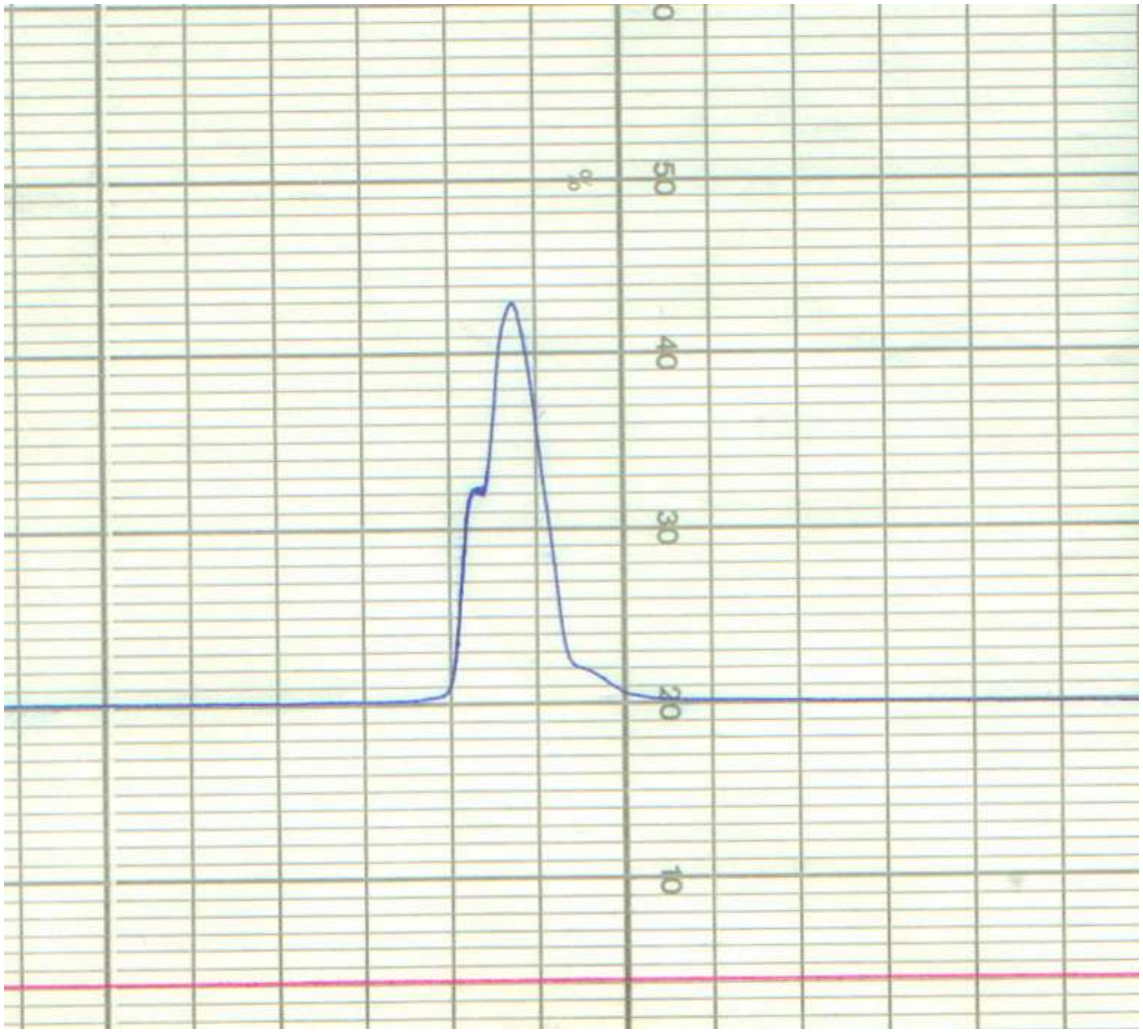


그림 2. E1G-HRP의 Sephacryl S-400 High Resolution의 gel-filteration한 elution 그래프

분리해낸 샘플로 HRP의 활성을 확인하고, (그림 3) Clone 155와 활성을 동시에 확인 후 활성이 큰 fraction만 모아 BSA 소량과 99% Glycerol을 전체 양만큼 넣어 안정화시킨다. 상기의 방법으로 제조된 컨쥬게이트를 사용하여 표준적정곡선을 작성하고 이를 2차년도에 제조된 컨쥬게이트와 비교하였다. (그림 4) 새로운 방법으로 제작한 컨쥬게이트의 희석배율은 1:200으로 2차년도에 제작된 컨쥬게이트에 비해 4배가 높아진 것을 알 수 있었다. 이는 2차년도 컨쥬게이트가 3개월 이상이 되면 정량이 불가능해지는 것과 한번 컨쥬게이션 할 때 나오는 E1G-HRP 컨쥬게이트의 양이 5ml인 점을 감안하였을 때, 2차년도보다 더욱 경제적이고, 안정적이라고 할 수 있으며, E1S 엘라이자 정량 시스템의 측면에서도 획기적인 진보인 것으로 사료된다.

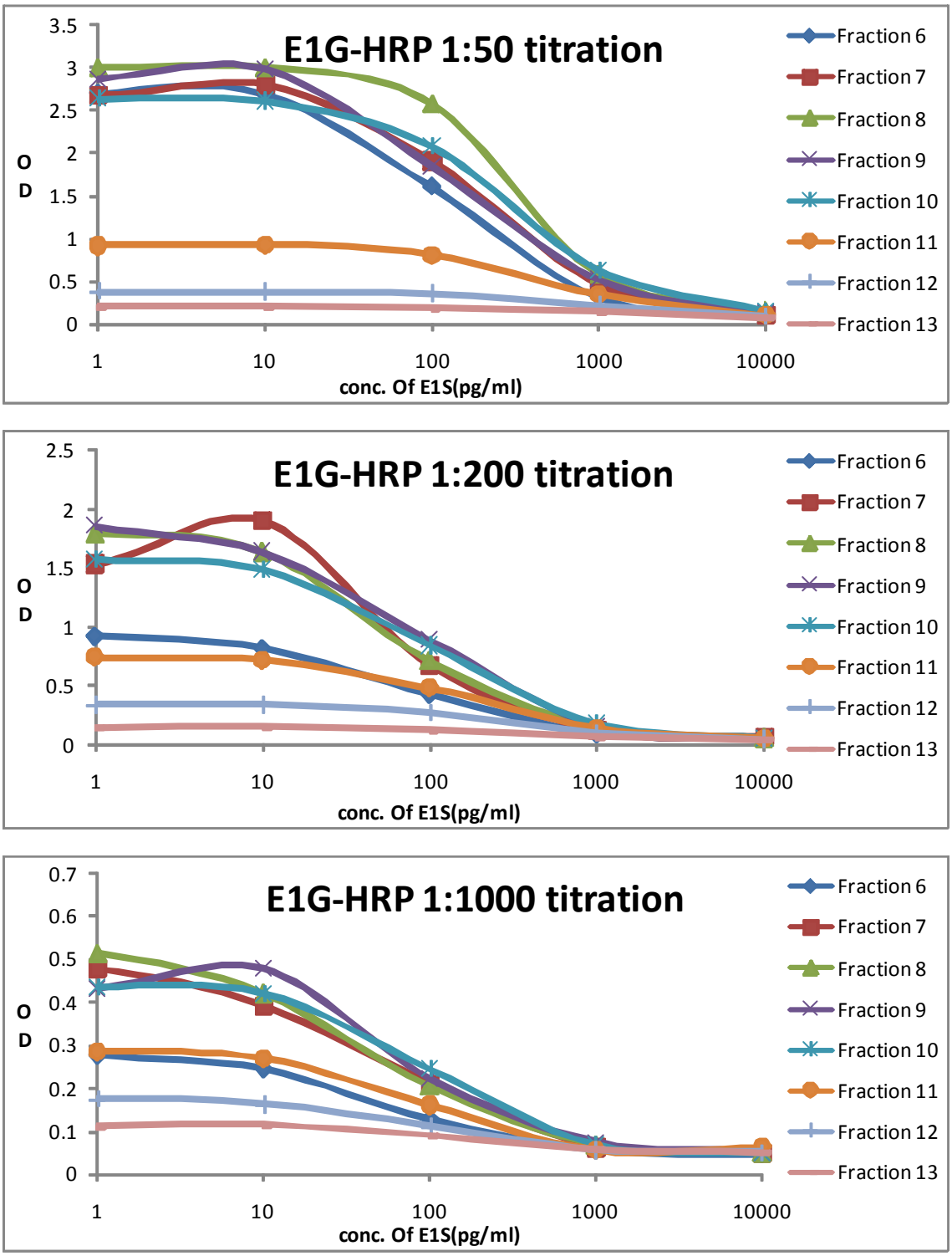


그림 3. Clone 155에 대한 E1G-HRP와 E1S의 경쟁성 확인 및 Titration

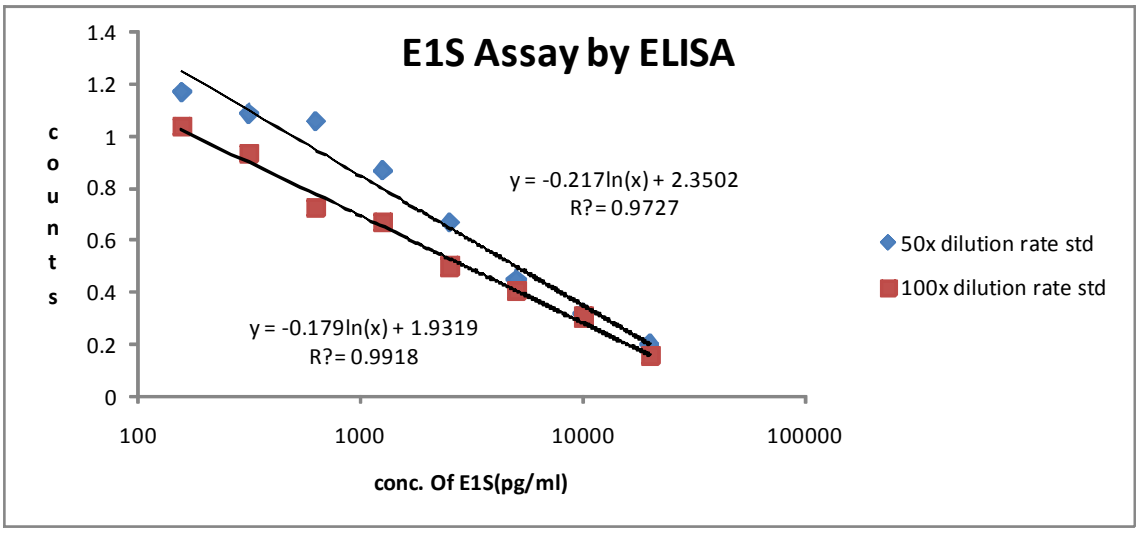


그림 4. 새로운 컨쥬게이트로 작성한 엘라이자 표준적정곡선

라. 0.45nm 필터 전, 후 샘플 정량값 차이점 조사

경북축산과학기술연구소에서 뇨 샘플을 제공받았을 때, 샘플에 펠렛이 존재하여 그것을 걸러내기 위해 필터를 하였었다. 필터를 하지 않으면 인터널 스텐다드 커브도 작성이 되지 않았을 정도로 펠렛의 정량시스템에 미치는 인터페어의 영향이 상당하였다. 따라서 초기의 샘플들은 모두 필터를 하여 정량하는 시스템을 셋업 하였다. 하지만 필터를 실시해서 정량을 해도 임신/비임신의 유의성이 나타나지 않는 샘플도 존재하여 필터를 거치지 않고 샘플을 돼지에서 처음 받았을 때부터 보관을 확실히 하는 방법으로 선회하였다. 하지만 기존의 정량시스템이 필터를 거치는 과정이기 때문에 필터를 계속 해오다 새로이 받은 깨끗한 샘플은 필터가 필요없을 정도로 매우 잘되었으며, 이를 고려하여 필터한 샘플과 하지 않은 샘플의 정량값의 차이를 비교하였다. 실험을 50배 희석된 비임신 스텐다드를 사용한 인터널 스텐다드 커브를 적용하였으며, 정량값에 50배의 희석배율을 곱해주었다. (표 3) 필터를 거치게 되면 정량 시스템의 단가가 올라가고, 필터의 스텝이 늘어나게 되면서 상당한 시간까지 필요로 하게 되므로 만약 필터과정이 깨끗한 샘플에서 불필요하다면 할 이유가 없다. 아래 표에서 필터 전후의 정량값을 비교해보면, 새로 받은 깨끗한 샘플에서는 정량값이 필터의 여부과 관계없이 비슷한걸 알 수 있다. 하지만 비임신뇨에서는 필터를 하지 않은 샘플의 정량값이 높게 나오는 경우가 많았다. 하지만 임신과 비임신의 판별에 영향을 끼칠만한 농도의 차이가 나오지 않아 필터의 영향이 조금은 있지만 판별에 영향을 줄 만큼의 차이는 보이지 않았다. 개별의 샘플마다 필터한 것과 하지 않은 것의 정량값에 차이가 나는 정도가 각기 다르지만 필터의 영향을 걱정할 정도는 아니다고 사료되었다. 이는 정량 시스템의 단가를 줄일 수 있는 긍정적인 결과를 나타내며, 또한 키트 시스템의 적용에서도 필터를 거치지 않아도 충분히 임신 판별이 가능하다는 것을 보여준다. 따라서, 샘플의 보관상태만 양호하다면 다른 공정을 거치지 않고 희석만 하여

정량이 가능하다는 것으로 사료되었다.

표 3. 필터를 거친 샘플과, 거치지 않은 샘플의 정량값 비교

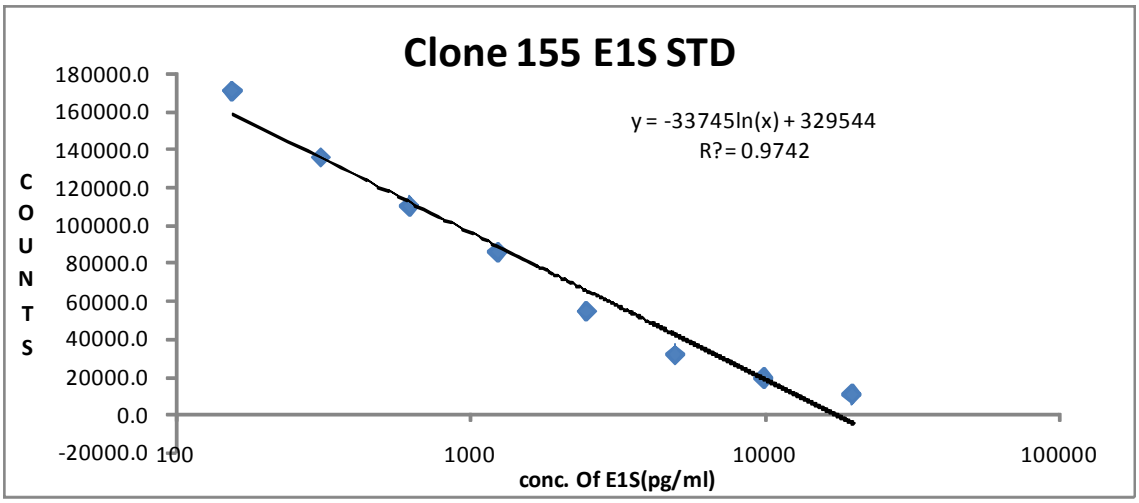
임 신 뇨				
샘 플 번 호	임 신 일 수	filter 정량값(ng/ml)	non-filter 정량값(ng/ml)	표 준 편 차
D5-673	13	80	75.5	3.18
L10-307	22	100	122.5	15.91
Y11-001	15	45	99.5	38.54
Y11-001	20	75	59.5	10.96
D5-673	13	75	74.75	0.18
Y11-001	15	90	70	14.14
Y11-001	12	75	95	14.14
D5-673	26	750	610	98.99
Y11-001	15	42.5	90	33.59
Y8-129	24	75	80	3.54
Y8-130	21	50	59	6.36
L7-484	12	120	157.5	26.52
L10-307	20	395	499.5	73.89
재래6-106	10	155	194.5	27.93
Y11-001	11	95	125	21.21
L8-118	23	145	199.5	38.54
Y7-217	14	34	45	7.78
L8-158	31	155	154	0.71
재래6-106	23	450	457.5	5.30
Y2695	16	75	87.5	8.84
Y2701	12	125	147.5	15.91
L8-118	14	210	250	28.28
Y2701	16	75	70	3.54
Y11-001	29	90	80	7.07
Y2701	19	75	60	10.61
L8-158	23	190	170	14.14
			편차 평균	20.38

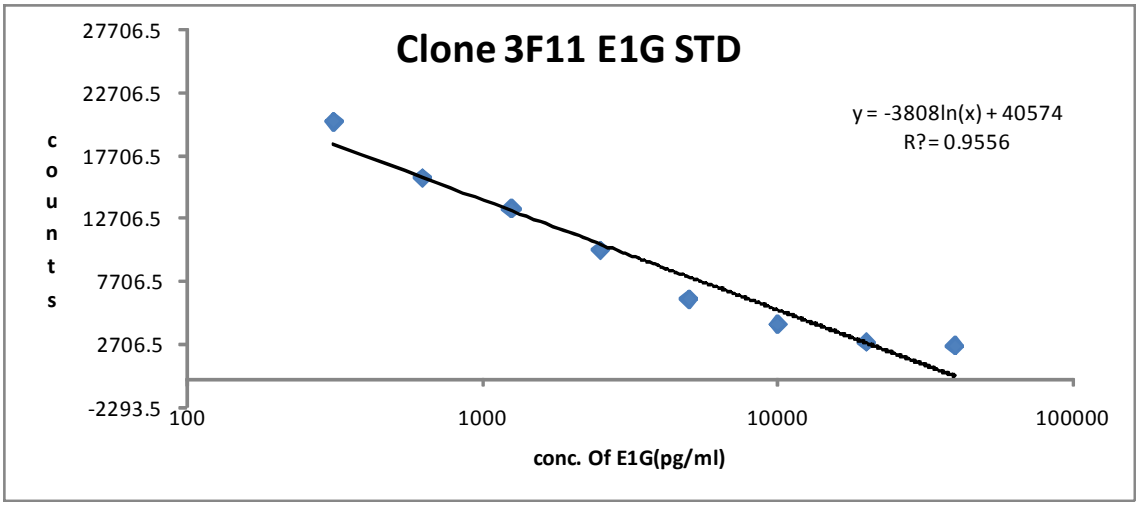
비 임 신 뇨				
샘플번호	임신일수	filter 정량값(ng/ml)	non-filter 정량값(ng/ml)	표준편차
D8-196	비임신	out	14.9	-
D8-196	비임신	out	out	-
Y8-208	비임신	out	out	-
Y8-267	비임신	out	24.9	-
D8-196	비임신	out	out	-
Y8-257	비임신	out	9.95	-
Y8-208	비임신	out	19.5	-
D8-194	비임신	out	14.75	-
Y8-267	비임신	out	12.25	-
Y8-208	비임신	out	23	-
Y8-257	비임신	out	15	-
D8-196	비임신	out	16	-
Y8-208	비임신	out	out	-
Y8-208	비임신	out	out	-
Y8-267	비임신	out	out	-
D8-195	비임신	out	out	-
D8-193	비임신	15.5	out	-
Y8-208	비임신	out	out	-
Y8-257	비임신	out	out	-
Y8-257	비임신	out	out	-
Y8-208	비임신	out	out	-
Y8-257	비임신	out	out	-
Y8-208	비임신	out	out	-
Y8-208	비임신	out	out	-
Y8-246	비임신	out	out	-
Y8-208	비임신	out	21.5	-
			편차 평균	-

마. 임신 돼지뇨에서 E1G 함량 조사

현재 샘플을 정량하고 있는 시스템은 Clone 155 항체가 가진 E1S에 대한 cross-reactivity를 이용하여 E1S를 정량하는 시스템이다. 원래는 clone 155가 E1G에 대한 항체이므로 실제뇨의 정량 실험을 진행했을 시 E1S 뿐만 아니라 E1G도 분명하게 측정이 될 것이고, 이는 순수한 E1S 농도로 산출되는 결

과를 얻는 것이 아니라 E1S와 E1G의 농도의 합을 구하는 것과 마찬가지일 것이다. 따라서 E1S의 농도를 측정하는데 E1G의 농도가 어느 정도의 영향이 있는지 알아보기 위하여 E1S와 cross-reactivity가 거의 없는 E1G에 대한 항체(Clone 8A3, Clone 3F11)를 이용하여 정량실험을 델피아로 진행하였으며 그 값을 Clone 155에서 샘플을 정량한 값과 비교하였다. (그림 5, 표 4) 비교한 결과 임신뇨에서 E1S의 정량은 가능했지만 E1G의 정량은 거의 모두 정량범위를 벗어나 정량이 불가능했다. 따라서 임신뇨에 E1G는 거의 없는 것으로 조사되었으며, 이는 E1S를 정량함에 있어서 E1G의 영향이 거의 없음을 나타내는 결과이고, E1G의 양이 급격히 증가하여 E1S의 측정 결과값에 영향을 주는 일이 없음을 나타낸다.





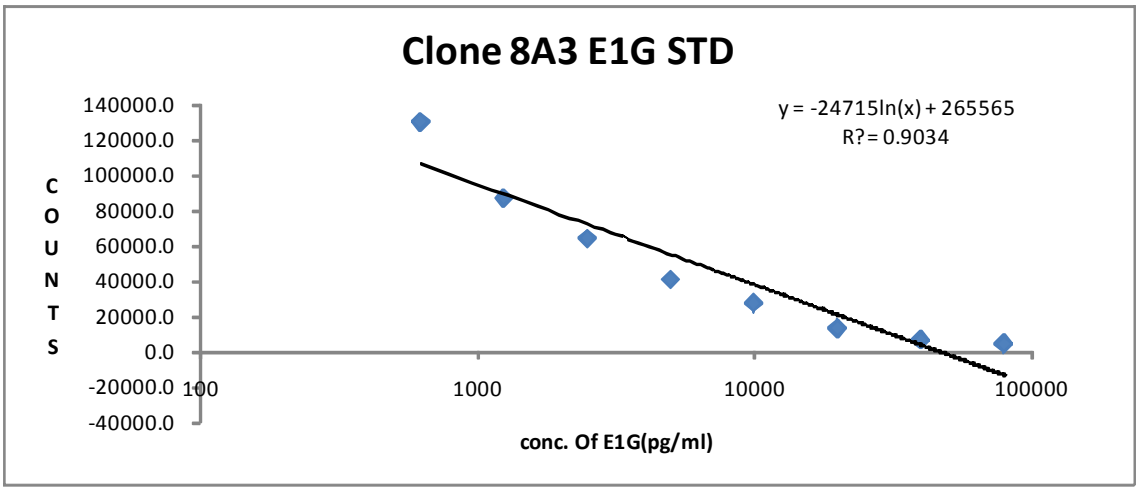


그림 5. E1S, E1G 측정을 위한 표준적정곡선

표 4. 임신 샘플 내의 E1S, E1G 양 비교

sample number	수정후일수	clone 3F11 E1G(ng/ml)	clone 8A3 E1G(ng/ml)	clone 155 E1S(ng/ml)
11-001 11/6	-17	OUT	OUT	24.000
3099, 8/28	-20	OUT	OUT	22.500
6-710 6.15 7/12	27	OUT	OUT	161.000
6-711 5.25 6/24	30	OUT	OUT	43.000
6-711 6.25 6/21	27	OUT	OUT	30.000
6-711 6.25 6/21	27	OUT	OUT	36.800
6-711 5.25 6/24	30	OUT	OUT	40.900
2685 9.5 10/12	27	OUT	OUT	29.000
6-056, 11.13 11/27	14	OUT	OUT	17.500
6-710,11.12,11/28	16	OUT	OUT	24.000
6-042,10.19,11/1	13	OUT	OUT	16.000
6-766,9.1,9/19	41	OUT	OUT	19.800
5-673, 10.04, 10/25	63	OUT	OUT	19.500

바. 임신진단 키트를 위한 E1G-BSA Conjugation

키트의 제조를 위해 Clone 155 항체가 뇨 중 E1S와 경쟁할 수 있는 물질, 즉 E1G-BSA를 컨쥬게이션하는 실험을 실시하였다. E1G에 단백질 Bovine Serum Albumin(BSA)를 conjugation시키는 것은 A.Stefanakis(Animal Reproduction Science, Greece, 2000)의 방법을 수정하여 실시하였다.

실험방법을 약술하면 다음과 같다. 극성과 무극성 물질 모두를 녹일 수 있는 Dimethyl sulfoxide (DMSO 78.13 MW) 700 ul에 10uM의 E1-3-glucuronide 3 mg에 2 mg의 ECD (12uM) (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride)를 혼합 후, 바로 12uM의 Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) 2 mg을 첨가하여 상온에서 1시간 약하게 교반하면서 urea가 생성되는 것을 관찰하였다. 그 후, ECD를 불활성화 하기 위하여 1ul의 2-mercaptoethanol을 첨가함으로 Semi-stable amine-reactive NHS este의 제조를 완성하였다.

그 후, 700ul의 Carbonate-Bicarbonate Buffer(pH 8.6)에 용해된 21mg의 BSA에 Semi-stable amine-reactive NHS ester를 첨가하여 2시간 동안 약하게 교반하였다. 교반하면서 열과 urea가 생성되는 것을 관찰였고 원심분리를 통하여 염을 제하였다. 염 제거 후, quenching buffer 15ul을 넣어 줌으로 E1G-BSA의 결합력을 높여 주었다. 바르게 결합하지 않은 BSA와 E1G 제거를 위하여 gel filtration을 실시하였다. (그림 6) 용출 buffer로는 PBS를 이용하였으며 용출 된 각 분획은 단백질정량(BCA assay)을 통하여 BSA를 포함하는 분획을 수집하였다. (그림 7)

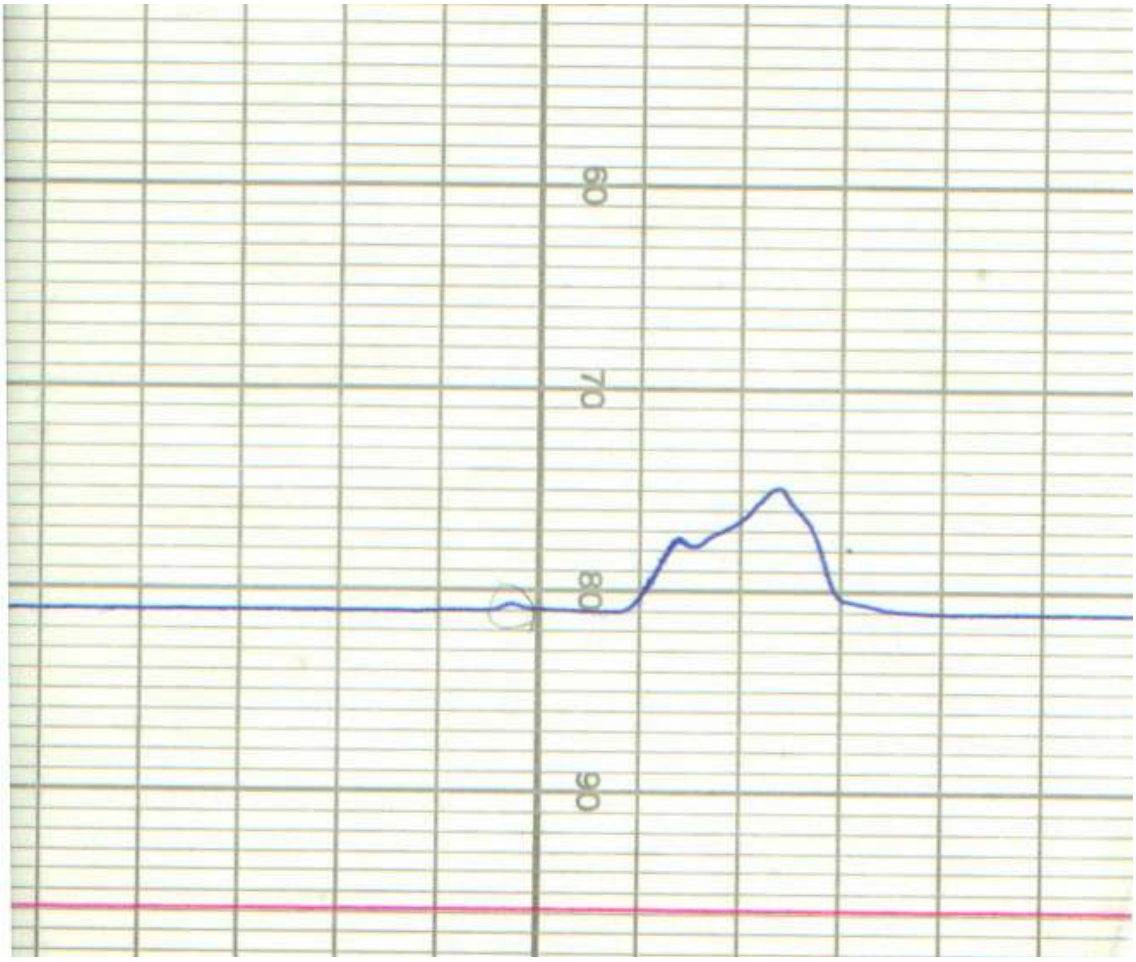


그림 6. E1G-BSA를 Gel-filteration 컬럼을 사용하여 elution 한 그래프

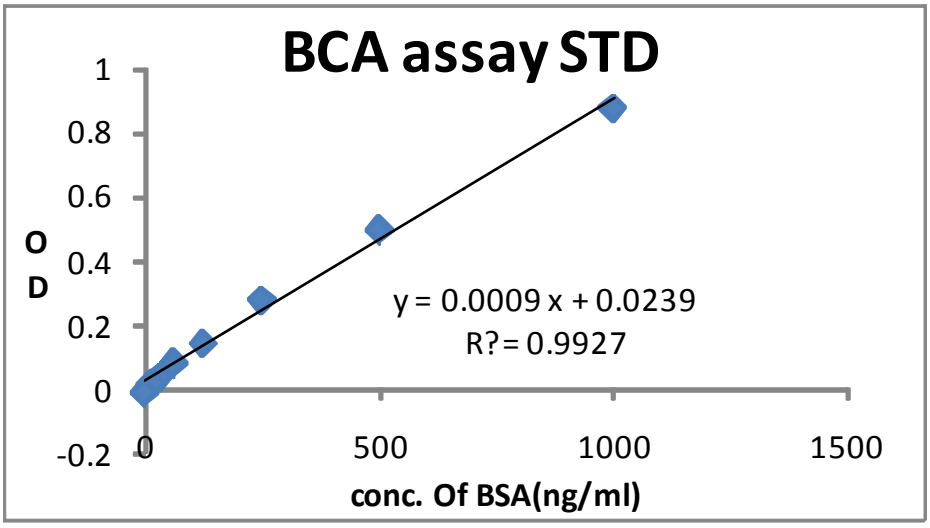


그림 7. E1G-BSA 정량을 위한 BCA 스텐다드 커브

표 5. E1G-BSA 분획별 단백질 함유량

Fraction number	conc. of protein (mg/ml)	Fraction number	conc. of protein (mg/ml)
1	0.189	19	0.369
2	0.253	20	0.369
3	0.319	21	0.372
4	0.409	22	0.376
5	0.482	23	0.391
6	0.539	24	0.397
7	0.618	25	0.405
8	0.687	26	0.4
9	0.692	27	0.37
10	0.597	28	0.359
11	0.49	29	0.339
12	0.42	30	0.325
13	0.392	31	0.299
14	0.385	32	0.252
15	0.368	33	0.205
16	0.366	34	0.178
17	0.375	35	0.154
18	0.376	36	0.134

분획하여 얻은 E1G-BSA conjugate가 clone 155와 반응을 하는지 알아보기 위한 실험을 하였다. 가장 먼저 Clone 155 항체를 coating buffer (0.1 M sodium carbonate buffer, pH 9.5)에 1:1000의 비율로 희석하여 96 microwell plate에 200 µl 씩 분주 후 37℃에서 2시간 반응 시켰다. 각 well은 washing buffer (PBS-0.05% Tween20; PBS-T)로 3회 세척 후 2% Bovine serum albumin(BSA)를 이용하여 37℃에서 2시간 blocking 시켰다. 각 well을 washing buffer로 3회 세척 후 분획하여 얻은 E1G-BSA를 여러 농도(10 - 10000배 희석)로 각 well에 처리 후 coating buffer에 1:1000의 비율로 희석된 E1G-Eu*를 같은 양 함께 넣어 준다. 37℃에서 1시간 반응시킨 후 세척하고 Enhancement Solution을 200ul 넣어 상온에서 10분간 반응 시킨 후 TR-FIA reader를 Eu* 값을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다. (그림 8)

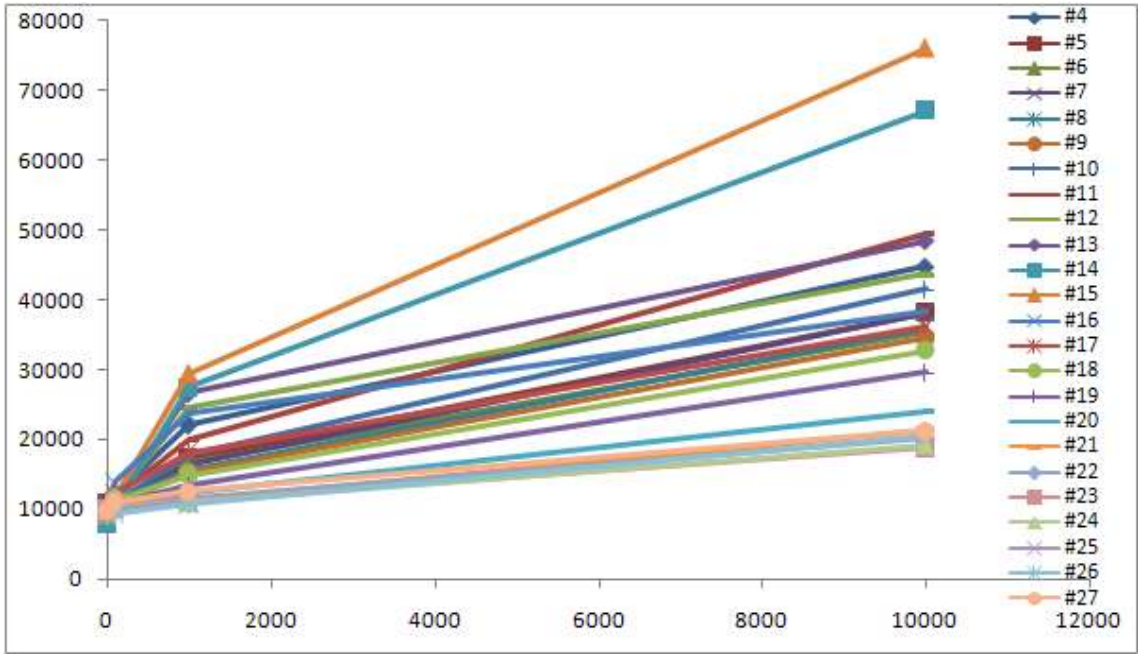


그림 8. Clone 155를 이용한 E1G-BSA와 Eu-E1G의 경쟁성 확인

실험결과, 6번부터 10번까지의 단백질 농도가 제일 높고, 20부터 27번까지의 분획에서 clone 155에 대해 E1G-Eu*와 경쟁반응이 다른 분회에서 보다 크게 나타나 앞으로 있을 실험에서 분획 6-10과 20- 27번을 사용하기로 결정하였다.

사. 임신진단 키트를 위한 E1G-CASEIN Conjugation

키트의 제조 과정 중 나이트로 셀룰로즈 판에 흡착시키는 물질인 BSA-E1G가 실험결과 용이하지 않아 Casein과 E1G를 컨쥬게이션하여 흡착시켜 키트를 제조하기로 하였다. E1G에 단백질 Casein을 conjugation시키는 것은 A.Stefanakis(Animal Reproduction Science, Greece, 2000)의 방법을 수정하여 실시하였다.

실험방법을 약술하면 다음과 같다. 극성과 무극성 물질 모두를 녹일 수 있는 Dimethyl sulfoxide (DMSO 78.13 MW) 700 ul에 E1-3-glucuronide 3.7 mg에 2.3 mg의 ECD (12uM) (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride)를 혼합 후, 바로 Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) 2.6 mg을 첨가하여 상온에서 1시간 약하게 교반하면서 urea가 생성되는 것을 관찰하였다. 그 후, ECD를 불활성화 하기 위하여 2ul의 2-mercaptoethanol을 첨가함으로 Semi-stable amine-reactive NHS este의 제조를 완성하였다.

그 후, 700ul의 Carbonate-Bicarbonate Buffer(pH 8.6)에 용해된 10mg의 Casein에 Semi-stable amine-reactive NHS ester를 첨가하여 2시간 동안 약하게 교반하였다. 교반하면서 열과 urea가 생성되는 것을 관찰하였고 원심분리를 통하여 염을 제하였다. 염 제거 후,

quenching buffer 15ul을 넣어 줌으로 E1G-Casein의 결합력을 높여 주었다. 바르게 결합하지 않은 Casein와 E1G 제거를 위하여 gel filtration을 실시하였다. (그림 9) 용출 buffer로는 PBS를 이용하였으며 용출 된 각 분획은 단백질정량(BCA Assay)을 통하여 Casein를 포함하는 분획을 수집하였다. (그림 10)

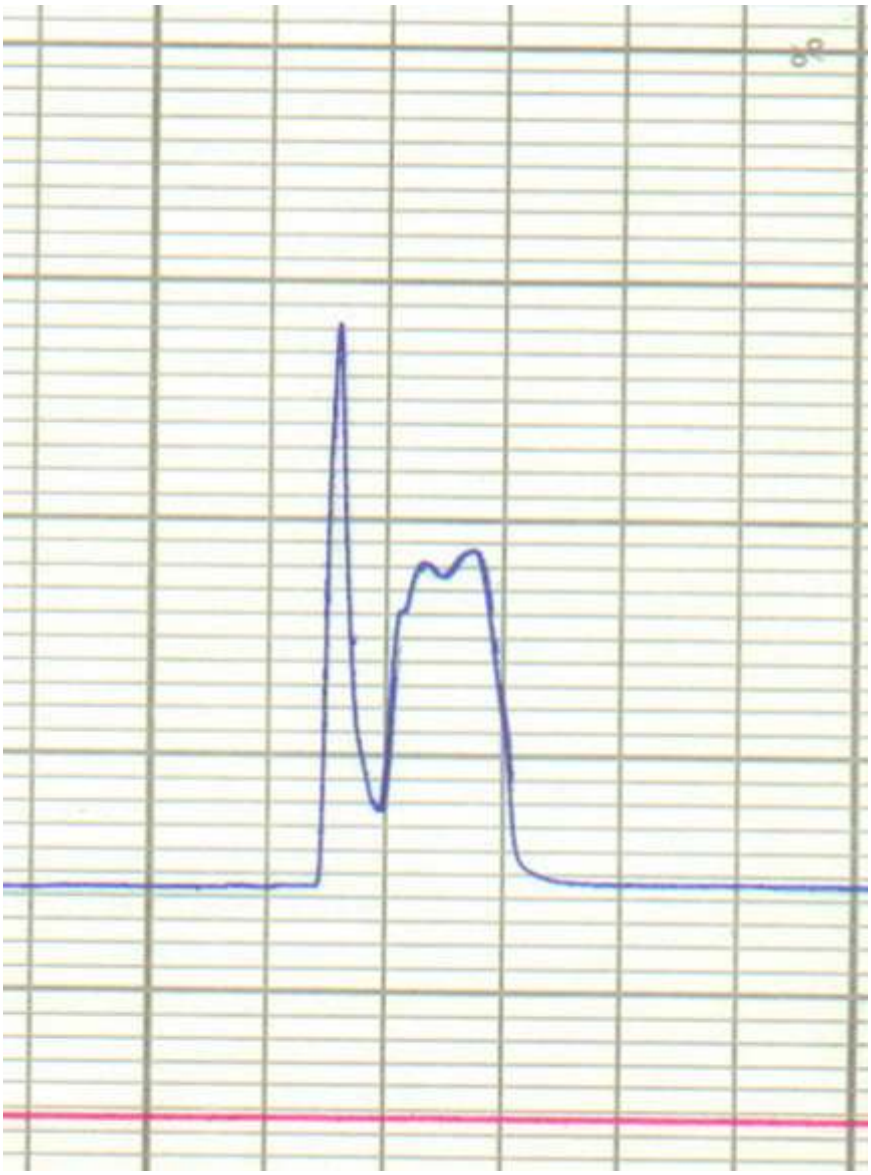


그림 9. E1G-Casein의 gel-filteration 컬럼을 이용한 elution 그래프

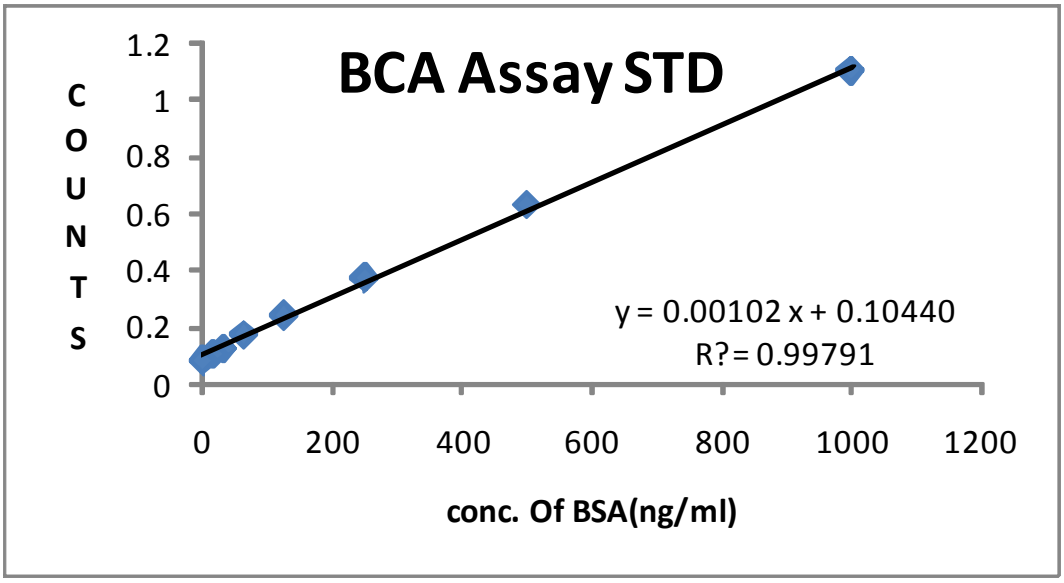


그림 10. E1G-Casein의 정량을 위한 BCA 표준적정곡선

표 6. E1G-Casein 분획별 단백질 함유량

Fraction number	conc. of protein (ng/ml)	Fraction number	conc. of protein (ng/ml)
1	14	25	399
2	150	26	382
3	282	27	369
4	367	28	360
5	444	29	364
6	408	30	385
7	325	31	418
8	246	32	458
9	212	33	461
10	178	34	463
11	167	35	455
12	155	36	398
13	142	37	375
14	133	38	319
15	144	39	272
16	168	40	251
17	182	41	155
18	233	42	59
19	279	43	24
20	302	44	-5
21	337	45	9
22	355	46	-17
23	353	47	-10
24	382	48	-21

분획하여 얻은 E1G-Casein conjugate가 clone 155와 반응을 하는지 알아보기 위한 실험을 하였다. 가장 먼저 Clone 155 항체를 coating buffer (0.1 M sodium carbonate buffer, pH 9.5)에 1:1000의 비율로 희석하여 96 microwell plate에 200 µl 씩 분주 후 37℃에서 2시간 반응 시켰다. 각 well은 washing buffer (PBS-0.05% Tween20; PBS-T)로 3회 세척 후 2% Bovine serum albumin(BSA)를 이용하여 37℃에서 2시간 blocking 시켰다. 각 well을 washing buffer로 3회 세척 후 분획하여 얻은 E1G-BSA를 여러 농도(1000 - 1000000배 희석)로 각 well에 처리 후 coating buffer에 1:1000의 비율로 희석된 E1G-Eu*를 같은 양 함께 넣어 준다. 37℃에서 1시간 반응시킨 후 세척하고 Enhancement Solution을 200ul 넣어 상온에서 10분간 반응 시킨 후 TR-FIA reader를 Eu* 값을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다. (그림 11)

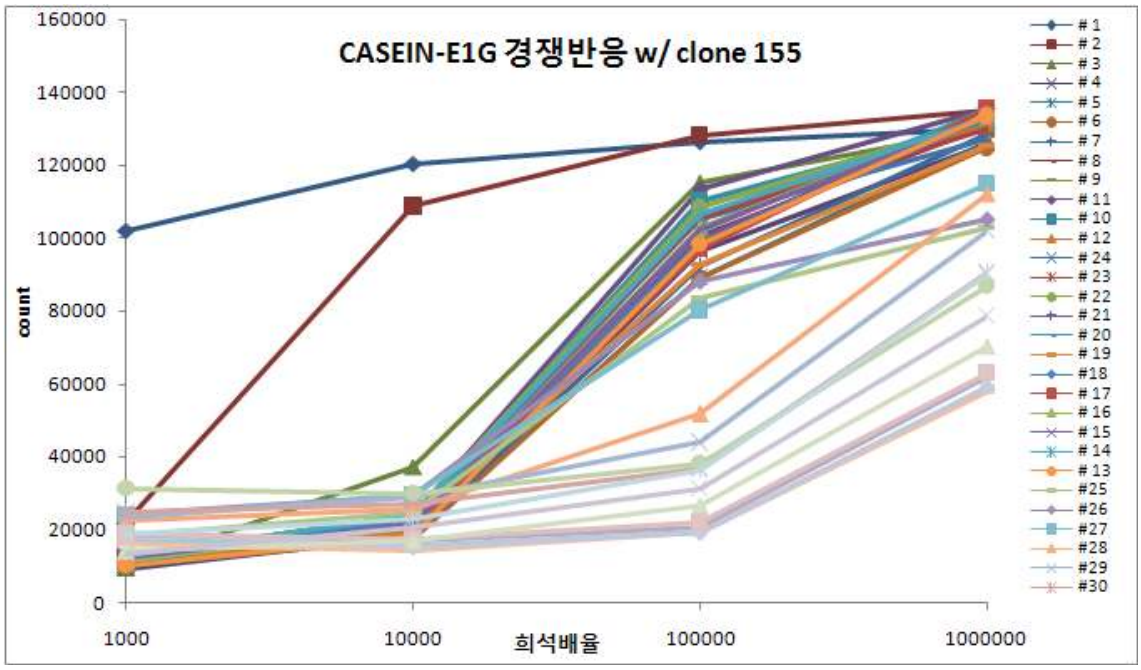


그림 11. Clone 155를 이용한 E1G-BSA와 Eu-E1G의 경쟁성 확인

실험결과, 27부터 33번까지의 분획에서 clone 155에 대해 E1G-Eu*와 경쟁반응이 다른 분획에서 보다 크게 나타나 앞으로 있을 실험에서 분획 27 - 33번을 사용하기로 결정하였다.

아. 임신진단 키트 개발

앞서 연구된 모든 결과를 바탕으로 하여 돼지의 임신 진단 호르몬 대사산물인 E1S와

그와 교차반응이 있는 항체인 Clone 155를 이용하여 돼지 임신 진단 Rapid test kit를 개발하였다. 임신진단키트의 개발은 진단키트를 전문적으로 제조하고 상품화하여 판매하는 업체인 (주)레피젠에서 실시하였다. 한동대학교 연구진과 (주)레피젠, 경북축산기술연구소는 주기적으로 결과를 주고 받으며 진단 키트의 개발에 착수하였으며, 다량으로 확보된 임신/비임신 샘플을 통해 그 가능성을 입증하였다.

(1) 임신 진단 키트의 개발 원리

임신진단키트의 개발은 면역크로마토그래피 법 (immunochromato graphic assay)을 응용하여 실시하였다. 기존의 특허와 계획서에 나와있는 임신진단의 원리는 다음과 같다. Clone 155 항체에 금입자를 표지시키고 E1G와 BSA를 컨쥬게이션 시킨다. 다음으로 맴브레인에 E1G-BSA를 컨트롤 라인에 흡착시키고, 그 뒤에 테스트 라인에는 Clone 155에 대한 항체인 anti-mouse IgG Ab를 흡착시킨다. 개발할 임신진단키트를 도식화하여 원리를 설명하면 다음과 같다.

그림 12는 임신 진단키트를 구성하는 분석스트립의 예를 도시한 것으로서, 도시 된 바와 같이 분석스트립은 분석시료가 모세관 현상에 의거 한 쪽 말단으로부터 다른 쪽 말단으로 이동할 수 있는 박막형 종이(1)와 상기 박막형 종이(1)를 통과한 액상 시료를 흡수하면서 역류를 방지하는 기능을 갖는 검체 흡수지(6)로 이루어져 있으며 스트립 형태를 가지고 있다. 이때 사용되는 박막형 종이는 나이트로셀룰로즈 멤브레인(nitrocellulose membrane)을 주로 사용하며 검체 흡수지(6)는 셀룰로즈가 될 것이다.

그림 13과 14는 임신 진단 키트의 발색원리를 설명하기 위한 도면으로서 그림 13에 도시한 바와 같이 분석스펙트럼의 박막형 종이(1)의 상부 일면 대조선에는 E1G- BSA 결합체층(2)이 형성되어 있으며 상기 항 E1S IgG(Clone 155)-금 입자 접합체(10)를 포함하는 진단시약이 상기 결합체층(2)을 통과하면서 상기 항체-금입자 접합체(10)가 상기 E1S- BSA 결합체층(2)과 반응, 결합하게 되어 발색을 하게 된다. 그리고 임신의 경우 대조선을 통과한 추적자와 결합한 시료내의 E1S(20)는 검사선에서 이차항체와 결합하여 발색을 하게 된다.

분석차례는 먼저, 돼지 뇨를 분석스트립 끝부분에 투여하면 미리 샘플패드에 들어있는 E1G에 대한 항체 Clone 155-금입자 접합체와 분석용 시료를 포함하는 용액이 모세관 현상에 의하여 분석스트립을 따라 상부로 이동하게 되고, 대조선인 E1S-BSA 결합체층을 통과하면서 Clone 155-금입자 접합체를 두고 시료내의 E1S가 E1G-BSA와 경쟁성 반응을 하게 된다. 즉 임신인 경우 E1S의 농도가 높아 대조선에 이미 피복되어 있는 E1G-BSA의 반응 확률은 줄어

들게 된다. 즉 시료내의 E1S와 Clone 155-금입자가 결합을 하여 이 대조선을 통과하게 된다. 이렇게 통과된 E1S와 결합한 Clone 155-금입자 접합체는 검사선에 피복되어 있는 이차항체와 결합을 하여 발색을 하게 된다. 반대로 비임신 일 경우 경쟁할 수 있는 시료내의 E1S가 없기 때문에 금입자로 표지된 Clone 155 항체는 대조선에 피복되어 있는 E1G-BSA하고만 반응을 하게 되어 대조선에만 발색을 하게 된다. 즉 일정한 양의 금입자로 표지된 Clone 155 항체가 대조선에 있는 E1G-BSA와 결합을 하여 발색현상을 나타내느냐 아니면 이곳을 통과한 금입자 접합체가 검사선에 피복된 이차항체에 의해 잡혀 발색을 하느냐에 따라 전자의 경우 비임신으로 판정 후자의 경우 임신으로 판정을 하게 된다. 따라서 도5에 예시된 것처럼 대조선에만 발색 할 경우 비임신(음성)으로 대조선과 검사선 모두, 또는 검사선에서 발색 할 경우는 임신(양성)으로 판정을 하게 된다.

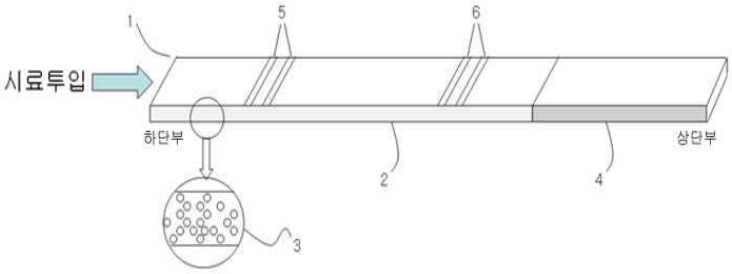


그림 12. 임신진단 키트를 구성하는 분석스트립의 평면도

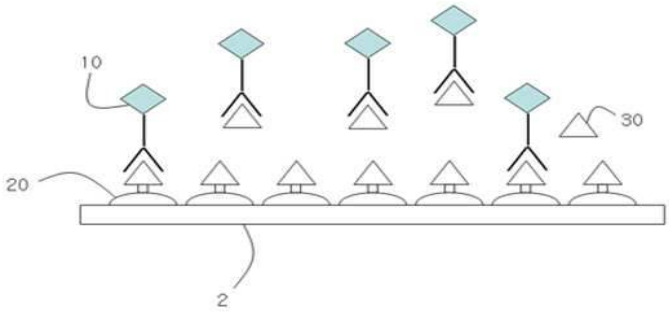


그림 13. 임신 진단 키트의 발색 원리를 설명하는 도면의 하나로서 E1G-BSA 결합체가 피복된 대조선에서 일어나는 반응을 예시하는 도면이다

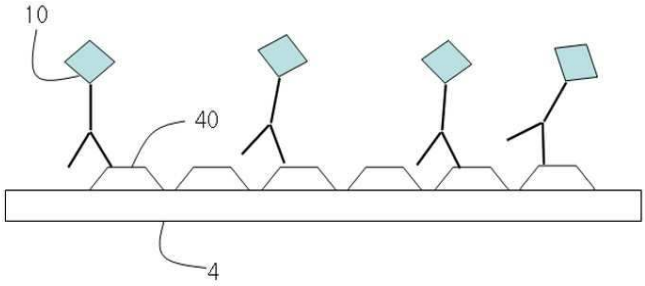


그림 14. 임신 진단 키트의 검사선에서 발색하는 원리를 설명하는 도면으로서 E1S에 대한 항체를 인식하는 이차항체(Anti-mouse IgG Ab)가 피복된 검사선에서 일어나는 반응을 예시하는 도면

상기의 계획서와 특허에 나와있는 원리를 적용하려 하였으나 (주)레피젠에서 주로 키트를 만드는 방법과 특허에 나와있는 원리 두가지 중 레피젠에서 주로 생산하는 원리를 선택하여 돼지 임신 진단 키트 개발에 착수하였다. E1G에 대한 항체인 Clone 155에 금입자를 표지시키는 방법이 아니라 E1G-BSA에 금입자를 표지시키고 항체를 키트에 흡착시키는 방법으로 키트를 제조하였다. 하지만 E1G-BSA에 금입자를 표지시키는 조건이 까다롭고, 그 발색 또한 개선이 되지 않아 최종적으로 E1G에 Casein을 컨쥬게이션시켜 그 컨쥬게이트에 금입자를 표지시키는 방법을 적용하여 경쟁적으로 발색이 되게 하여 임신일 경우 발색이 나타나지 않고 비임신일 경우 발색이 되는 방법으로 최종 선택하게 되었다.

그 원리는 먼저 E1G와 Casein을 컨쥬게이션시킨 컨쥬게이트에 금입자를 표지시키고 나이트로셀룰로즈 맴브레인에 E1G와 E1S에 대한 항체인 Clone 155를 고정화시켜, 만약 돼지 뇨 내의 E1S의 농도가 낮으면 (비임신의 경우) 금입자에 결합된 E1G가 맴브레인 상에 고정된 Clone 155에 결합하여 색띠는 발색하게 되고, 돼지 뇨 내의 E1S의 농도가 높으면 (임신일 경우) 금입자에 결합된 E1G와 오줌내의 E1S, E1G가 경쟁하여 맴브레인 상에 고정된 Clone 155 항체에 금입자로 표지된 E1G-Casein 컨쥬게이트가 결합하지 못하게 되고 이에 색띠가 발색이 되지 않는 원리이다. (그림 15) 키트는 제일 앞부분에 샘플을 흡수하여 맴브레인으로 흡수되게 하는 샘플 패드로 제작하고, 그 뒤에 금입자가 표지된 컨쥬게이트가 있는 패드를 부착시켜 샘플이 흡수될 때 같이 흡수되게 한다. 그 다음 나이트로셀룰로즈에 테스트라인과 컨트롤라인에 항체를 흡착시키고 마지막에 흡수 패드를 부착시켜 키트를 제조한다. (그림 16) 컨트롤 라인의 발색은 임신진단물질과 전혀 상관없는 다른 물질을 샘플 패드에 같이 주입하여 컨트롤 라인에는 그에 대한 항체를 흡착시켜 테스트가 정확한 테스트인지를 판별하게 하였다. 상기의 원리와 키트의 모형을 그림으로 나타내면 다음과 같다.

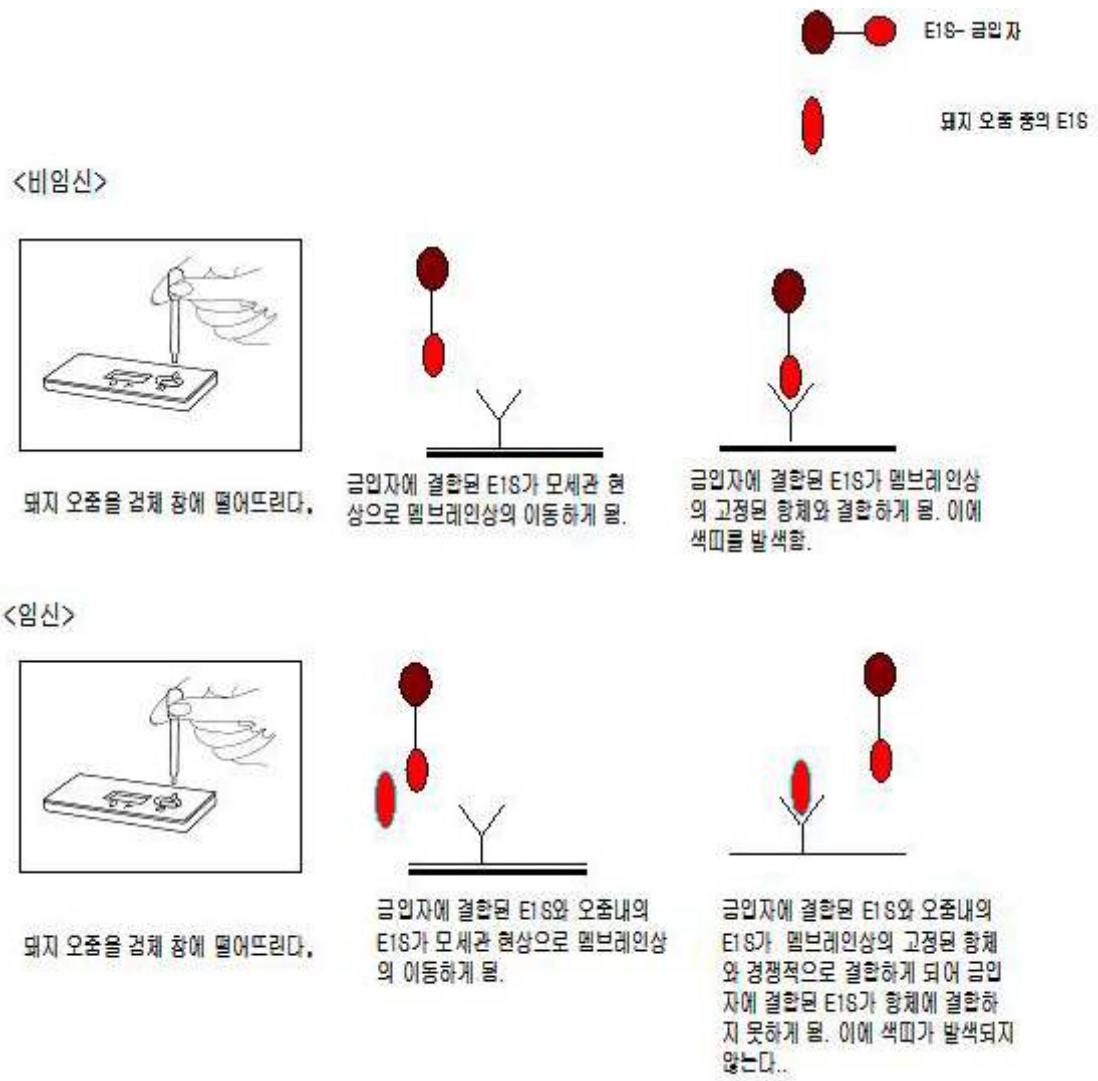


그림 15. 돼지 임신 진단 키트의 원리

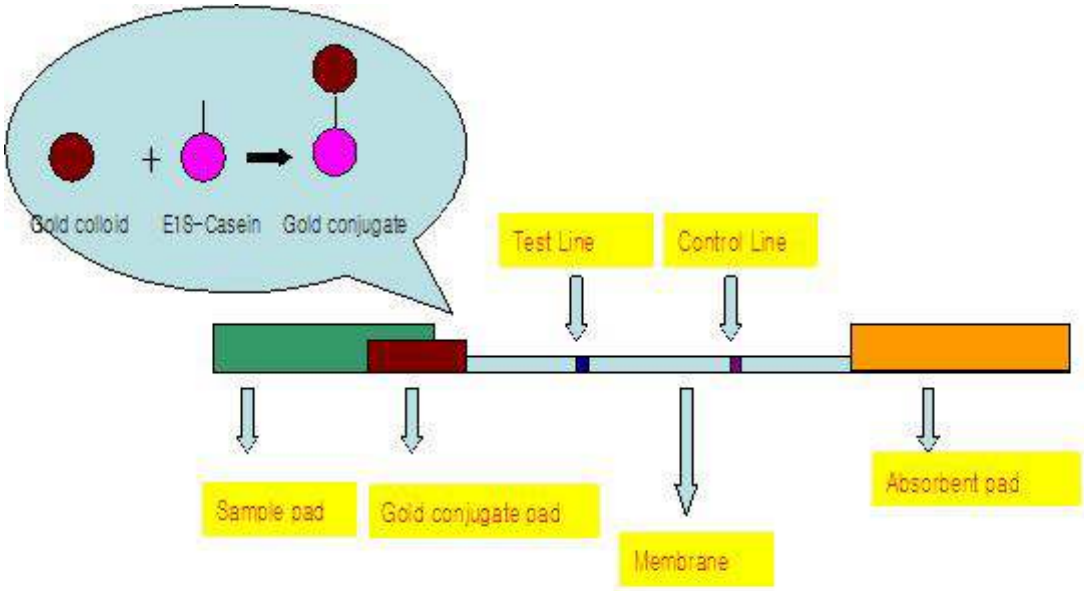


그림 16. 돼지 임신 진단 Rapid test kit 모식도

(2) 키트 제조의 재료 및 시험 방법

(가) E1G 및 E1G antibody

한동대학교 연구진에서 제공한 시그마사의 E1G와 E1S, 이스라엘에서 제공받은 항체인 Clone 155를 사용하였다.

① E1G-BSA conjugate

상기의 키트 개발을 위한 E1G-BSA 컨쥬게이트 방법과 동일.

② E1G-Casein conjugate

상기의 키트 개발을 위한 E1G-Casein 컨쥬게이트 방법과 동일.

(나) E1S Gold Conjugation

제공받은 E1G-Casein을 0.1mg/ml으로 증류수와 혼합하여 희석하고, 희석한 용액 3-10ul와 ㈜래피젠에서 제작한 Gold colloid 100ul를 conjugation한 뒤 Blocker를 1시간 반응시킨다. 반응 시킨 E1G-Casein Gold conjugate와 안정액 (Cotrol Line Gold conjugate 포함)을

혼합하여 1ml 되도록 Gold pad용 용액을 만들고 5-10mm유리섬유 패드에 분주한 뒤 냉동 건조한 후 37℃ incubator에서 최소 2시간이상 건조하였다. 1개의 test당 10-25ul E1G-Casein gold conjugate를 사용하였다.

(다) NC membrane line Dispense.

① Test Line 용 용액 제조

E1G antibody(Clone 155), E1G를 안정액과 혼합하여 0.5-2.0mg/ml로 희석하였다.

② Control Line용 용액 제조

Control Line 용 Antibody를 안정액과 혼합하여 0.5mg/ml로 희석하였다.

③ Line Dispense

희석한 Test Line용 용액과 control line용 용액을 ㈜래피젠이 보유하고 있는 Bio Dot 사(미국) line dispencer를 이용하여 1개의 test당 0.43ul가 되도록 각각 분주한 뒤 37℃ incubator에 최소 2시간 이상 건조하였다.

(라) Rapid test kit 시험 방법

① Rapid test kit 제작

건조된 멤브레인에 건조된 Gold pad와 샘플 패드, 흡수 패드를 그림1과 같은 형태로 제작한 뒤 40-50mm으로 잘라서 Rapid test kit device에 넣어 제작하였다.

② Rapid test kit 시험 방법

1개의 test kit에 샘플 120ul를 떨어뜨리고 10분 후에 결과를 판독하였다.

(3) 키트 제조 시험 결과

(가) Gold conjugation

제공받는 E1G(E1G, E1G-BSA conjugate, E1G-Casein conjugate)와 E1G antibody(Clone 155)를 0.1mg/ml로 희석한 뒤 3-10ul로 Gold colloid와 conjugation 시킨 뒤 E1G (E1G-BSA conjugate), Clone 155를 분주한 membrane에 반응시켰다. 그 결과 표 7과 같

은 결과를 보였다. 따라서 감도가 제일 우수한 E1G-Casein을 사용하여 키트를 제조하였다.

표 7. 각 조건별 감도값

		Gold conjugate			
		Clone 155	E1G*	E1G-BSA	E1G-Casein
line	Clone 155	-	0	2	2.5
	E1S-BSA conjugate	1	-	-	-

* E1G는 Gold Colloid와 결합하지 못하였음

(나) E1G-Casein conjugate Fraction 별 Gold Conjugation

E1G-Casein conjugate Fraction들의 단백질을 정량한 뒤 ELISA법으로 Clone 155에 대한 반응성을 측정하였다. (그림 17) 이 결과를 바탕으로 가장 경쟁성이 좋고 단백질 정량이 많이된 Fraction들을 다양하게 선별하여 Gold colloid와 conjugation한 뒤 감도를 측정하여 표2와 같은 결과를 도출하였다. 따라서 가장 감도가 좋은 5번, 6번 fraction을 선별하여 키트를 제작하였다.

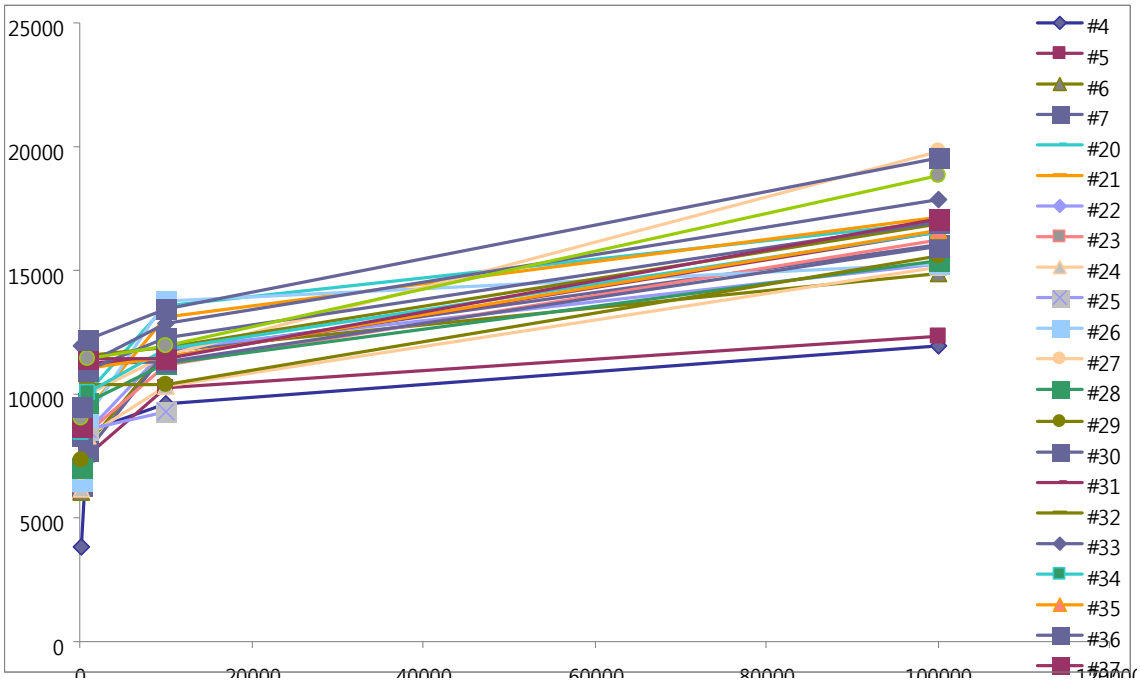


그림 17. Fraction별 Clone 155와 경쟁성 확인 ELISA 결과

표 8. Fraction 별 Gold conjugate 감도

Fraction No.	감도 값	Fraction No.	감도 값
4	2	28	0
5	3	29	0
6	3	30	0
7	2	31	0
20	0	32	0
21	0	33	0
23	0	34	0
25	0	35	0
26	0	36	0
27	0	37	0

(4) 임신 진단 키트

(주)레피젠에서 상기의 결과들을 바탕으로 1차적으로 제작한 돼지 임신진단 키트는 아래의 그림과 같다. (그림 17)

그림 17. (주)레피젠에서 제작한 돼지 임신진단 키트

겉 포장에 대한 디자인과 키트에 대한 설명 등은 차후 사업화를 실시하고 제품을 대량으로 생산하면서 실제 판매되는 디자인으로 수정하고 설명도 속지로 첨부하고 겉 포장에도 일부 삽입할 계획이다. 1차적으로 제조한 키트의 내부는 하나씩 낱개로 포장이 되어있는 키트 (그림 18) 와 시료를 로딩할 수 있는 플라스틱제 스포이드가 들어가 있으며, 포장지를 뜯어보면 키트가 들어있는데 시료를 로딩하는 부분인 S, 테스트 결과가 나오는 T, 키트의 컨트롤인 C부분으로 나누어져 있다. (그림 19)

그림 18. 낱개로 포장되어있는 임신진단 키트

그림 19. 돼지 임신 진단 테스트기랑 플라스틱제 스포이드

2차적으로 제작된 돼지 임신진단 키트는 멀티 테스트용으로 한 포장지에 축소된 진단키트가 10개가 들어가 있다. (그림 20) 이는 농가에서 한꺼번에 여러개의 시료를 동시에 진단할 수 있게 만든 것으로서 개별 포장보다 사업화에 용이한 포항이라 할 수 있다.

그림 20. 2차로 제작된 멀티 테스트용 돼지 임신 진단 키트

자. 임신/비임신 진단 정확도와 안정성 평가 조사

제작된 키트를 가지고 확보한 돼지 뇨를 이용하여 키트의 정확도 조사와 안정성 조사를 실시하였다. (주)레피젠에서 제작할 당시 테스트 선의 발색 기준 농도는 E1S 30ng/ml이었으나, 안정성 조사를 위해 생리식염수에 E1S를 희석하여 키트의 기준 농도를 다시 설정하였고, 대조군으로 생리식염수만을 로딩하여 발색정도를 확인하고 이것과 뇨 샘플을 키트에 로딩한 결과를 비교하였다. 키트로 임신/비임신을 나누는 기준을 델피아와 엘라이자법과 마찬가지로 키트 역시 적정 희석농도를 구하여 기준 희석농도로 판별하였다. 즉, 델피아와 엘라이자법으로 측정한 시료내의 E1S의 농도는 그 정량시스템에서의 절대농도가 아니라 상대농도이다. 키트의 분석 시스템 역시 면역분석법의 시스템과 달라졌기 때문에 임신/비임신을 판별하는 절대 농도가 아닌 상대 농도를 고려하여 희석배율을 조정해야하므로 다양한 희석농도의 임신/비임신 샘플을 키트에 로딩하여 발색정도를 확인하였다.

(1) 돼지 임신 진단 키트의 안정성 조사

돼지 임신 진단 키트의 안정성 조사를 위해 생리식염수에 시스마사에서 구입하고 정량 시스템에서 사용하는 E1S를 다양한 농도(1ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml, 20ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 200ng/ml, 2ug/ml)로 희석하여 120ul를 키트에 로딩하여 키트의 발색 정도를 확인하였다. 또한 음성 대조군으로 생리식염수만을 로딩하여 키트의 발색 정도를 확인해 임신/비임신 판별에 비교가 가능하도록 하였다. (그림 21, 22) 1차로 제작된 키트에서는 각 농도별로 희석된 E1S를 로딩하여 50ng/ml까지는 발색이 확인이 되

었으며, 100ng/ml의 농도에서는 발색이 없어졌다. 이는 키트의 발색기준이 50-100ng/ml이라는 것을 알려주며, 제작 당시에는 30ng/ml의 기준이 1차 제작 후 실리카젤등의 흡습제처리를 하지 않고 많은 시간이 지나 그 감도가 떨어진 것으로 예상되었다. 또한 생리식염수만을 로딩한 키트에서는 그 발색이 컨트롤선과 비교해서 매우 미미한 것을 확인할 수 있다. 이는 발색을 더욱 좋게 하기 위해 금입자가 표지된 E1G-Casein 컨쥬게이션을 많이 넣게 되면 경쟁적 반응이므로 시료에 E1S가 높은 농도로 있을 경우에도 (임신인 경우) 발색이 나타나게 되어 진단 키트의 의미가 없어진다. 따라서 이를 극복하기 위해서는 더욱 활성이 좋은 항체를 사용하여 키트를 제조하거나 컨쥬게이션 실험인 E1G-Casein 컨쥬게이트와 여기에 Gold paticle을 컨쥬게이션하는 부분에서 여러 가지 문제점이 있었을 것으로 사료되므로 컨쥬게이션 부분에서 개선이 이루어 져야 한다. 이런 이유로 시중에 판매되고 있는 항체를 구입하여 E1S에 대한 교차반응 정도를 조사하였으며, 마우스에 항원을 주입하여 Polyclonal Ab를 생산하는 방법을 강구하였고, 또한 컨쥬게이션하는 실험에 대해서 컨쥬게이트의 일드를 높이는 방법, 금입자를 더욱 많이 컨쥬게이션할 수 있는 방법등에 대해서 실험을 진행하고 있다.

2차적으로 제작된 키트는 상기에 설명한 것과 같이 멀티 테스터로 제작되었다. 새로이 컨쥬게이션 시킨 E1G-Casein의 용출된 5번, 6번 fraction을 사용하여 키트를 제작하였는데, 1차로 제작된 키트보다 발색과 감도면에서 더욱 우수하였다. 음성 대조군으로 PBS 버퍼를 키트에 넣었을 때를 1차 제작한 키트와 비교해보면 그 발색이 더 뛰어나다는 것을 알 수 있으며, 여러 가지 농도로 제작된 E1S 희석버퍼도 50ng/ml의 120ul를 로딩하였을 때 발색이 되지 않아 발색 농도가 25-50ng/ml 사이로 감도도 우수한 것으로 사료되었다. (그림 23) 따라서 키트에 쓰일 다양한 컨쥬게이션 부분에 대해 연구하고 개선한다면 키트의 발색과 감도부분에서 현재와 같이 부족한 부분은 개선되어 더욱 좋은 키트를 제작할 수 있다는 가능성을 보여주었다.

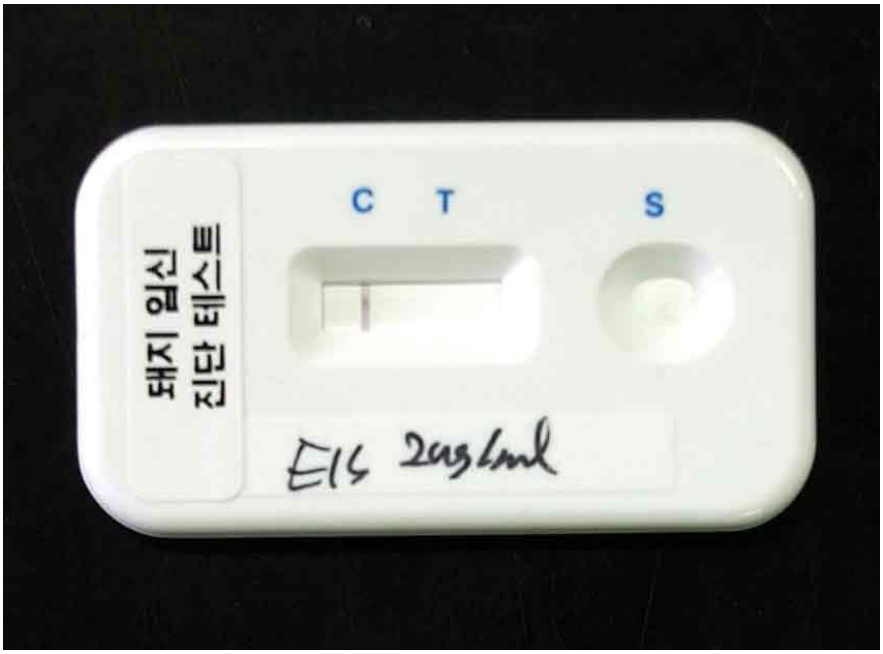


그림 21. 2ug/ml의 E1S를 120ul 로딩시 1차 제작 키트의 발색 정도

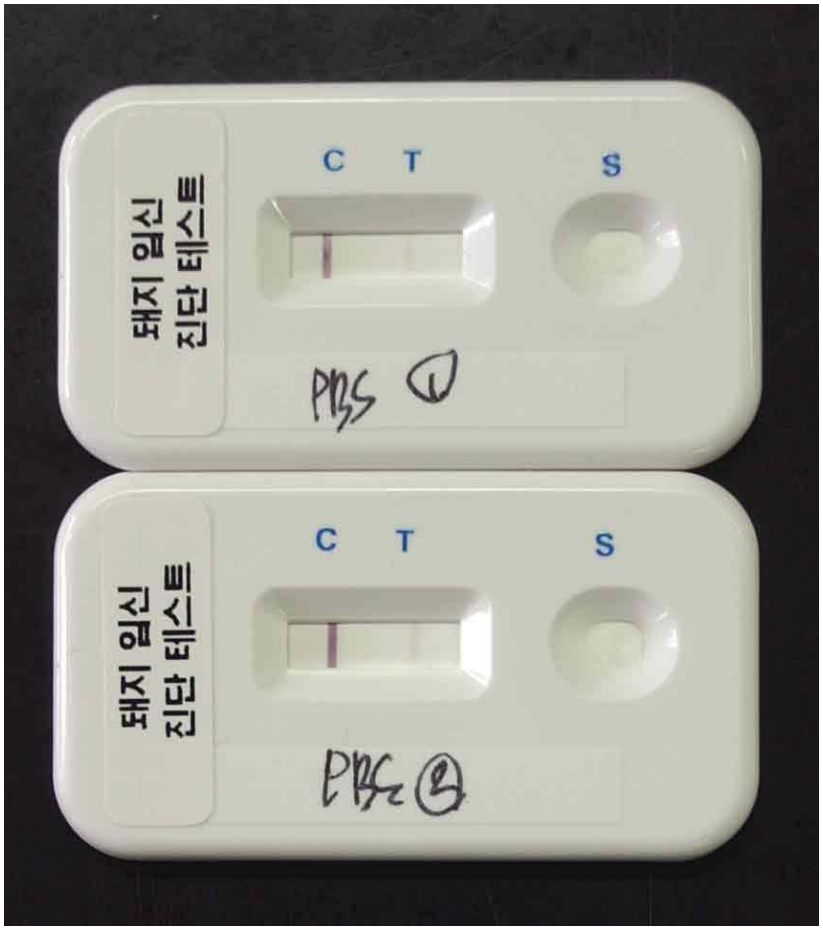


그림 22. 생리식염수 로딩 시 1차 제작 키트 발색 정도

그림 23. 2차 제작 멀티테스터 E1S 농도별, 음성 대조군 발색 정도

(2) 돼지 임신 진단 키트를 사용한 임신/비임신 판별

1차로 제작된 키트를 다양한 농도로 희석된 임신/비임신 샘플을 키트에 120ul씩 로딩하여 발색 정도를 확인해 임신/비임신을 판별하였다. 원액과 함께 희석농도는 가장 낮은 희석농도인 5배부터 높은 희석농도인 50배까지 5배, 10배, 25배, 50배로 실시하였으며, 각 희석배율별로 50개의 샘플의 임신/비임신 판별을 하여 분석하였다. (그림 24, 25, 표 9) 1차로 제작된 키트에서는 발색 상태가 음성 대조군인 PBS 버퍼를 로딩한 키트에서도 좋지 않아 임신/비임신을 판별하기에는 어려움이 있었다. 하지만 자세히 보면 선이 있고 없음은 구분할 수 있었다. 50배의 희석한 임신뇨에서는 테스트 샘플 일부가 발색이 되어 키트가 측정할 수 있는 감도내에 들어오지 않는 것을 알 수 있었다. 즉, 델피아법이나 엘라이자법에서는 50배 희석했을 때에도 E1S의 농도를 측정할 수 있는 감도가 되었으나, 키트는 50배 희석배율에서는 E1S의 농도차이를 인식하기에는 감도가 낮아 적당한 희석배율이 아님이 확인되었다. 25배와 10배의 희석배율에서도 50배와 마찬가지로 희석배율이 높아 임신/비임신의 판별이 불가능하였다. 하지만 5배의 희석배율에서는 임신/비임신의 판별이 어느정도 가능하였다. 5배의 희석배율에서는 95%의 우수한 임신/비임신 판별 정확도를 나타내었으며, 원액에서도 90%의 비교적 높은 임신/비임신 판별 정확도를 보여주었다. 하지만 발색정도가 매우 좋지 않아 정확한 판별은 힘들 것으로 사료된다.

그림 24. 다양한 희석 배율로 임신뇨를 로딩한 진단 키트

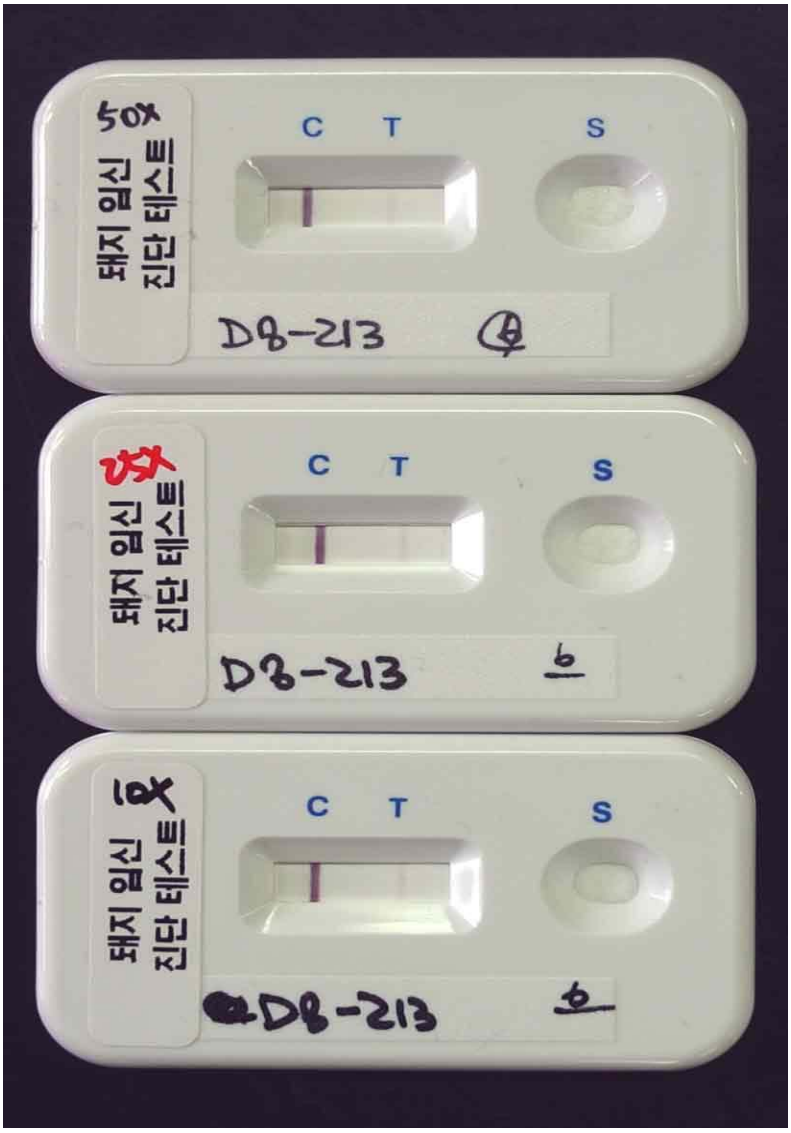


그림 25. 다양한 희석 배율로 비임신뇨를 로딩한 진단 키트

표 9. 1차 제작 키트의 각 희석배율별 임신진단

희석배율	임신뇨(갯수)	비임신뇨(갯수)	판별율 (%)
원액	50/50	40/50	90
5배	45/50	50/50	95
10배	35/50	41/50	76
25배	26/50	45/50	71
50배	29/50	50/50	79

2차로 제작한 멀티테스터 키트는 1500키트 정도 만들어져 많은 샘플의 정량이 가능하였다. 100개의 샘플을 원액부터 50배의 희석배율로 샘플을 희석하여 임신/비임신 판별을 실시하였다. 1차 키트와는 달리 발색정도가 우수하여 비교적 판별하기 쉬웠으며, 감도 또한 1차 키트보다 우수하여 비임신의 경우 원액에서도 판별 성공률 100%를 나타내었다. 임신의 경우에는 원액에서 91%의 가장 높은 정확도를 나타내었다. 2차로 제작한 키트가 1차로 제작한 키트보다 임신/비임신 판별 정확도는 떨어지지만 발색정도가 1차 키트보다 우수하여 판별하는데 더욱 용이하였다. 이는 키트에 들어가는 금입자의 양을 늘려서 더욱 발색이 좋게 만들어 이런 결과가 나왔지만, 샘플 속의 E1S가 많아도 경쟁반응에서 금입자를 표지한 E1G-Casein이 더 많아 발색이 되어 판별의 정확도가 떨어지는 것으로 사료된다. 이를 해결하기 위해서는 Clone 155보다 활성이 뛰어난 다른 항체를 사용하여 키트를 제작하거나 컨쥬게이션하는 물질을 Casein 이외의 다른 단백질을 사용하여 컨쥬게이션이 잘되게 하는 방법을 모색하였다. 이를 고려하여 발색의 정도와 감도를 개선하게 되면 임신/비임신의 판별의 정확도를 더욱 높일 수 있을 것이라 사료된다.

원액

2배 희석

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

5배 희석

10배 희석

10x
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
10x
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
10x
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
10x
31

25배 희석

25X
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

50배 희석

그림 27. 멀티 테스터로 실시한 각 희석배율별(위에서부터 원액, 2배, 5배, 10배, 25배, 50배) 블라인드 임신 진단 테스트 (1-31번까지)

표 10. 2차 제작 키트의 각 희석배율별 임신진단

희석배율	임신 (갯수)	비임신 (갯수)	정확도 (%)
원액	82/100	100/100	91
2배	76/100	100/100	88
5배	69/100	100/100	84.5
10배	52/100	100/100	76
25배	27/100	100/100	63.5
50배	0/100	100/100	50

차. Polyclonal anti-E1G Antibody 생성 및 면역분석법 확립

(1) Polychronal anti-E1G antibody 생성을 위한 E1G-KLH conjugate 합성

Estrone-3-Glucuronide의 경우 분자량이 작은 호르몬으로써 힝원 그 자체를 마우스(mouse)에 injection을 하여도 E1G에 대한 항체가 생성이 되지 않는다. 따라서 분자량이 크고 immunization이 우수한 Steroid와 같이 항체가 인식할 수 있는 epitope이 하나 뿐인 항원(hapten)의 항체 생성에 도움을 주는 carrier protein인 KLH를 E1G에 conjugation 시켰다. E1G에 단백질 Keyhole limpet hemocyanin(KLH)을 conjugation시키는 방법은 A. Stefanakis(Animal Reproduction Science, Greece, 2000)의 방법을 수정하여 실시하였다.

실험방법을 약술하면 다음과 같다. 극성과 무극성 물질 모두를 녹일 수 있는 Dimethyl sulfoxide (DMSO 78.13 MW) 700 ul에 E1-3-glucuronide 3.7 mg에 2.3 mg의 ECD (12uM) (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride)를 혼합 후, 바로 Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) 2.6 mg을 첨가하여 상온에서 2시간 약하게 교반하면서 urea가 생성되는 것을 관찰하였다. 그 후, ECD를 불활성화 하기 위하여 2ul의 2-mercaptoethanol을 첨가함으로 Semi-stable amine-reactive NHS este의 제조를 완성하였다.

그 후, 700ul의 Carbonate-Bicarbonate Buffer(pH 8.6)에 용해된 20mg의 KLH에 Semi-stable amine-reactive NHS ester를 첨가하여 4℃에서 약하게 교반하며 overnight 시켰다. 교반하면서 열과 urea가 생성되는 것을 관찰하였고 원심분리를 통하여 염을 제하였다. 염 제거 후, quenching buffer 15ul을 넣어 줌으로 E1G-KLH의 결합력을 높여 주었다. 바르

게 결합하지 않은 KLH와 E1G 제거를 위하여 gel filtration을 실시하였다. (그림 28) 용출 buffer로는 PBS를 이용하였으며 용출 된 각 분획은 단백질정량을 통하여 KLH를 포함하는 분획을 수집하였다. (그림 29)

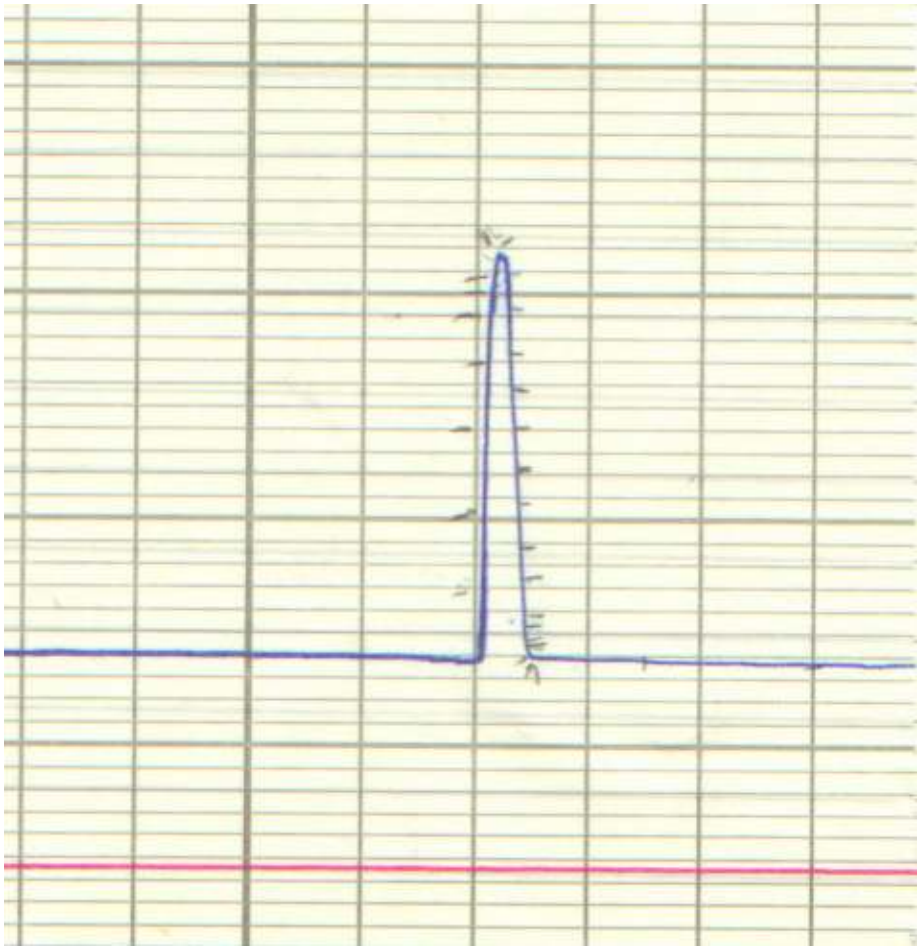


그림 28. E1G-KLH를 Gel-filteration 컬럼을 사용하여 elution 한 그래프

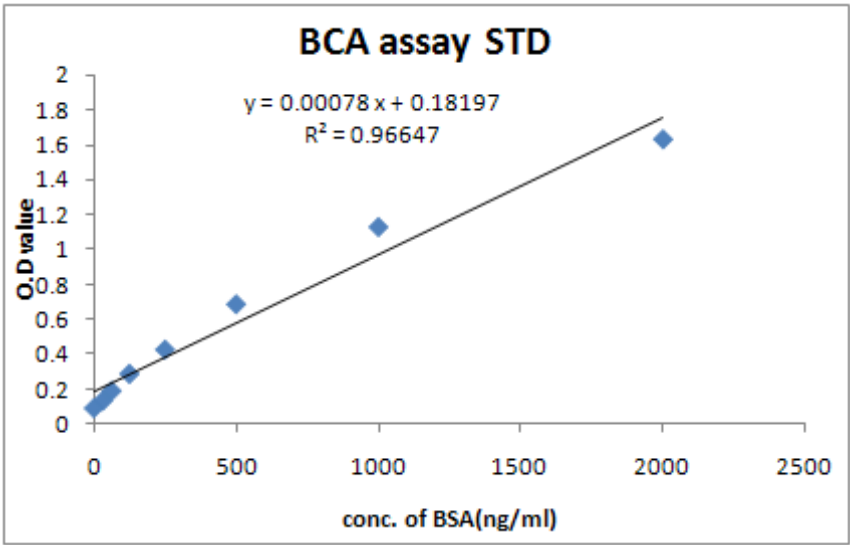


그림 29. E1G-KLH 정량을 위한 BCA 스텐다드 커브

표 11. E1G-KLH 분획별 단백질 함유량

Fraction number	conc. of protein (ng/ml)	Fraction number	conc. of protein (ng/ml)
1	-79.449	15	717.346
2	-64.705	16	634.013
3	-0.603	17	492.346
4	114.141	18	403.244
5	282.731	19	312.859
6	436.577	20	254.526
7	561.577	21	108.372
8	610.295	22	13.500
9	650.679	23	-52.526
10	653.244	24	-96.115
11	693.628	25	-92.910
12	704.526	26	-109.577
13	704.526	27	-96.756
14	745.551		

분획하여 얻은 E1G-KLH conjugate가 clone 155와 반응을 하는지 알아보기 위한 실험을 실시하였다. 가장 먼저 Clone 155 항체를 coating buffer (0.1 M sodium carbonate buffer, pH 9.5)에 1:1000의 비율로 희석하여 96 microwell plate에 200 μl 씩 분주 후 37℃에서 2시간

반응 시켰다. 각 well은 washing buffer (PBS-0.05% Tween20; PBS-T)로 3회 세척 후 2% Bovine serum albumin(BSA)를 이용하여 37℃에서 2시간 blocking 시켰다. 각 well을 washing buffer로 3회 세척 후 분획하여 얻은 E1G-KLH를 여러 농도(1000 - 1000000배 희석)로 각 well에 처리 후 coating buffer에 1:1000의 비율로 희석된 E1G-Eu*를 같은 양 함께 넣어 준다. 37℃에서 1시간 반응시킨 후 세척하고 Enhancement Solution을 200ul 넣어 상온에서 10분간 반응 시킨 후 TR-FIA reader를 Eu* 값을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다. (그림 30)

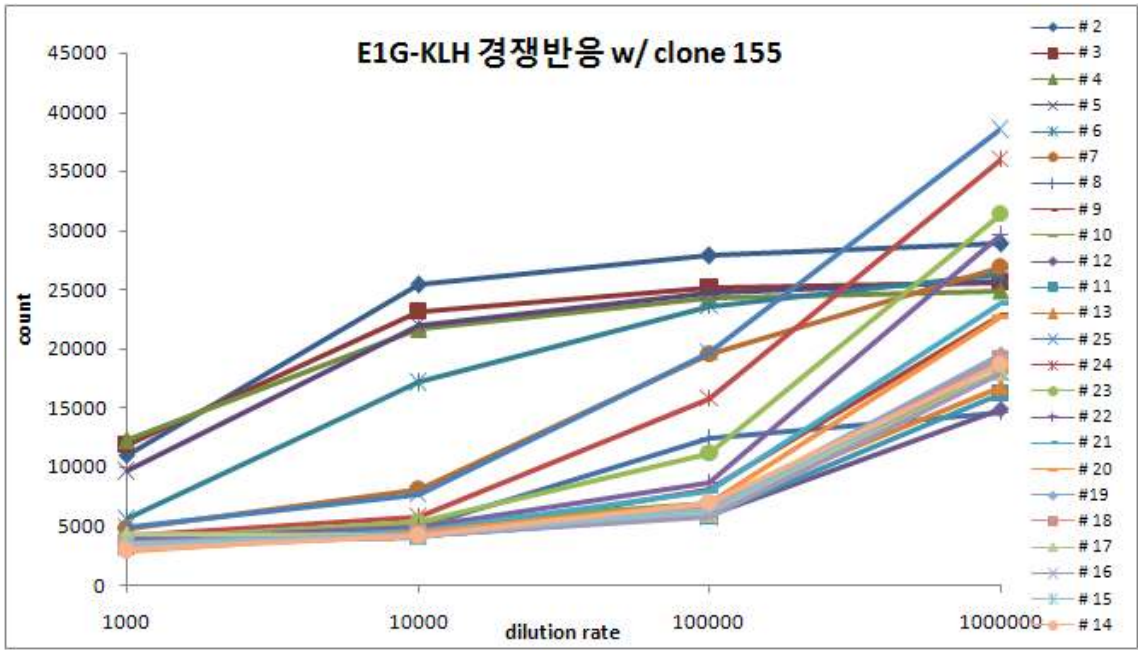


그림 30. Clone 155를 이용한 E1G-KLH와 E1G-Eu의 경쟁성 확인

실험결과, 27부터 33번까지의 분획에서 clone 155에 대해 E1G-Eu*와 경쟁반응이 다른 분획에서 보다 크게 나타나 앞으로 있을 실험에서 분획 10 - 17번을 사용하기로 결정하였다.

(2) Polychronal anti-KLH-E1G antibody 생성을 위한 실험

Polychronal anti-KLH-E1G antibody는 마우스(mouse)에 KLH-E1G Conjugate를 주입하여 생산한 polyclonal IgG type의 Estrone-3-Glucuronide에 대한 항체이다.

처음으로 전에 침입한 적이 없는 항원이 체내에 들어오게 되면 항체가 생성되어 항원에 대하 방어를 하게 된다. 생성된 항체에 의해 항원의 독성이나 그 존재가 제거되며, 항체 또한 시간이 지남에 따라 사라지게 되지만 한번 침입했던 항원에 대한 정보는 메모리 B Cell에 기억되어 있다. 따라서 전에 침

입했던 항원이 다시 체내에 들어오게 되면 항원의 정보를 기억하고 있으므로 처음보다 더욱 빠르고 많은 양의 항체가 생성되어 생성된 항체가 항원을 제거하게 된다. 이를 적용하여 Polychronal anti-KLH-E1G antibody의 생성을 위해 마우스에 항원의 주입을 두 번에 걸쳐 실시하여 항체를 생산하였다.

미리 합성해 놓은 E1G-KLH conjugate를 40ug/head가 되도록 만든 뒤 1ml syringe을 이용하여 Freund's complete adjuvant(FCA)와 같은 비율로 섞어 200ul/head의 양으로 마우스(Balb/c male 7w)에 복강주사(injection peritoneal) 방법으로 1차 injection시켰다. 1차 injection 10일 후 2차 injection 때에는 1차와 같은 FCA가 아닌 Freund's incomplete adjuvant(FIC)를 40ug/head 농도의 E1G-KLH conjugate와 같은 양을 혼합한 후 200ul/head씩 마우스에 IP로 실행함으로 항체의 생산량을 증가시켰다. 2차 injection을 하고 2주 후 eye bleeding으로 마우스의 serum을 얻어 생성된 항체와 항원의 반응 정도를 확인하였다.

(3) 생성된 Polychronal anti-KLH-E1G antibody의 항원에 대한 titration 측정

Eye bleeding으로 얻은 serum의 중의 E1G에 대한 항체의 titer를 측정하기 위해 먼저 마우스로부터 얻은 serum을 coating buffer (0.1 M sodium carbonate buffer, pH 9.5)에 1:200부터 2배씩 희석하여 총 8개의 희석된 Serum을 96 microwell plate에 100㎕ 씩 분주 후 37℃에서 2시간 반응 시켰다. 각 well은 washing buffer (PBS-0.05% Tween20; PBS-T)로 3회 세척 후 2% Bovine serum albumin(BSA)를 이용하여 37℃에서 2시간 blocking 시켰다. 각 well을 washing buffer로 3회 세척 후 coating buffer에 1:1000의 비율로 희석된 E1G-Eu*를 100ul 넣어 준다. 37℃에서 1시간 반응시킨 후 세척하고 Enhancement Solution을 200ul 넣어 상온에서 10분간 반응 시킨 후 DELFIA 1420으로 Eu 값을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다. (그림 31) E1G에 대한 항체가 생성되었다면 E1G-Eu와의 반응성이 존재하여야 하지만 실험결과에서는 그 반응성이 존재하지 않아 마우스의 체내에서 E1G에 대한 항체가 생성되지 않았다는 것을 예상할 수 있다. 이는 컬럼으로 필터를 실시한 결과나 Clone 155와의 반응성 실험 결과를 통해서 E1G와 KLH의 컨쥬게이션에는 문제가 없다고 판단되나 항체가 생성되지 않은 이유는 아래의 5가지로 요약할 수 있다. 1) E1G 자체의 항원력 부족, 2) KLH의 항원력이 매우 강하여 상대적으로 E1G에 대한 항원인식 부족, 3) 2번의 Injection으로는 컨쥬게이션된 E1G의 항체 생성 불가능, 4) polyclonal Ab 자체의 항원에 대한 affinity가 떨어지고, 프로틴 G 컬럼으로 필터하지 않고 혈청을 그대로 사용, 5) 다른 E1G에 대한 항체들은 B cell을 분리하여 monoclonal로 항체를 생성하여 그 반응성이 좋음, 6) 항체를 생성하기 위한 케리어 컨쥬게이션 방식이 다름. 하지만 항체가 생성되었다면 다른 이유에서 항체의 역가 측정 결과가 안나왔을 가능성이 있다. 역가 측정 실험 방법이 혈청을 코팅하고 E1G-Eu를 반응시켜 측정을 하였지만 결과가 오히려 혈청의 농도가 낮을수록 카운팅값이 올라가는 것을 고려했을 때 혈청의 코팅의

실험 방법이 역가측정 실험에 문제가 된다고 판단된다. 따라서 혈청을 Protein-G 컬럼으로 정제하여 코팅하고 역가측정을 다시 시도하는 방법과 쥐에게 주사한 항원을 코팅하여 역가측정을 하는 방법으로 실험을 진행한다면 폴리크로날 항체의 역가 측정이 가능할 것이라 사료되었다.

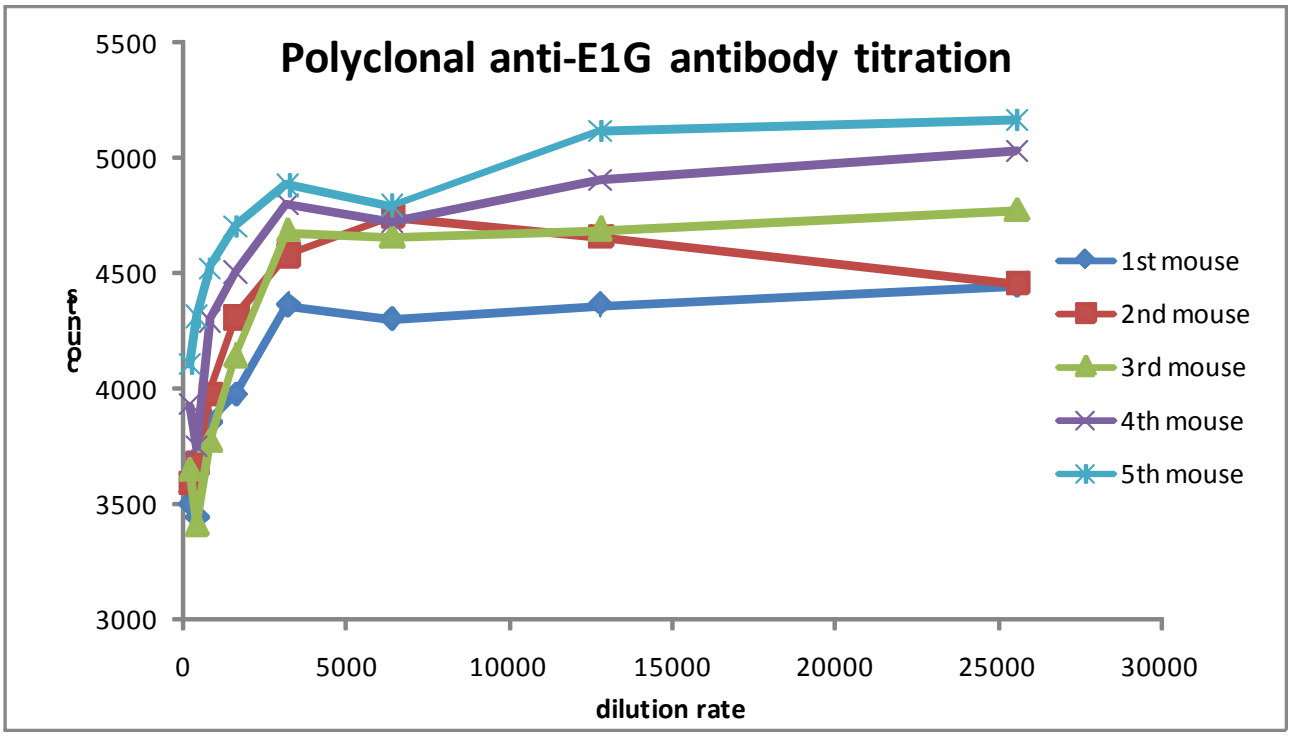


그림 31. E1G-KLH를 주입한 마우스에서 뽑은 혈청을 이용한 E1G에 대한 Titration curve

카. Commercial Monoclonal Anti-E1G Antibody를 이용한 면역분석법 확립

그 동안의 면역분석법의 확립과 키트의 제조는 E1S와 E1G 두 가지 모두에 대해 cross reactivity를 가진 Anti-E1G antibody인 Clone 155를 사용하였다. 하지만 Clone 155 항체는 국내에서 구할 수 없으며, 제작하는 방법 또한 매우 까다로워 그 분야에서 권위자인 이스라엘의 코헨 박사로부터 공급을 받아 왔다. 이는 해외에서 들여와야 하는 번거로움과 얻을 수 있는 항체의 양이 한정되어 있어앞으로의 연구에 있어서도 여러움이 있을 것으로 예상되었다. 또한 임신진단 키트를 제작함에 있어서 Clone 155 항체의 한계로 발색의 감도가 좋지 않기 때문에 판매하는 anti-E1G antibody를 이용하여 E1S에 대한 교차반응성이 존재하면 키트의 제조에서 사용할 수 있을 것으로 예상된다. 따라서 E1S와 교차반응을 하는지 알아보기 위해 항체의 역가를 먼저 측정하고 E1S, E1G를 이용하여 표준적정곡선을 작성하였다.

(1) Estrone에 대한 Anti-E1G antibody의 역가 측정

1차 항체인 Anti-E1G antibody의 역가 측정을 위하여 1:100부터 2배씩 coating buffer (0.1 M sodium carbonate buffer, pH 9.5)를 이용하여 희석한 뒤 200ul씩 96 well immunoplate에 코팅한 후, 충분히 코팅될 수 있도록 동안 반응시켰다. 이 후 non-specific binding을 제거하기 위해 2% BSA가 첨가된 PBS를 200ul 넣어 준 뒤 37℃에서 2시간동안 blocking 시켰다. 이후 1:2000으로 희석된 E1G-Eu를 100ul 넣어 주고 37℃에서 2시간동안 반응시켰다. 모든 반응 전에 각 well은 washing buffer (PBS-0.05% Tween20; PBS-T)로 3회 세척 하였다. 마지막으로 200ul의 Enhancement solution을 첨가하고 10분 뒤 DELFIA 1420으로 측정하였다.

Anti-E1G antibody와 E1G-Eu 결합이 1:1600에서 떨어지는 것을 알 수 있다. (그림 32) 따라서 1:800, 1:1600, 1:3200의 3가지 희석 배율의 평균인 1:1600의 희석배율이 anti-E1G antibody의 역가임을 확인할 수 있었다.

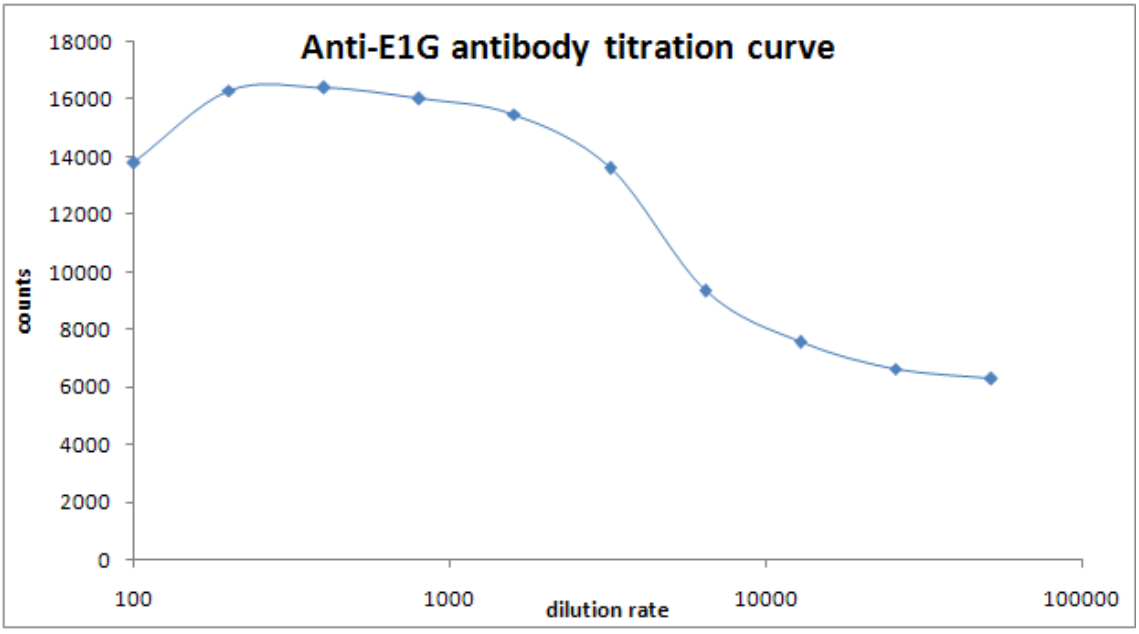


그림 32. Anti-E1G antibody에 대한 titration curve

(2) 교차반응 (Cross reactivity) 정도 확인

앞의 E1G 항체들에 대해서 교차반응조사를 한 것과 마찬가지로 Commercial anti-E1G Ab를 이용하여 E1S에 대한 교차반응을 조사하였다. 이를 위해서 E1S에 대한 표준적정곡선 (standard curve)를 작성하였고 Clone 155와 비교하여 보았다.

1차 항체인 anti-E1G antibody는 coating buffer에 1:1000과 1:2000으로 희석하여 96 well immunoplate에 200ul 씩 넣은 다음 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 후 non-specific

binding 값을 제거하기 위하여 PBS에 녹인 2% BSA 용액을 200ul씩 각 well에 넣어준 뒤 다시 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 이 후 E1G와 E1S를 여러 농도로 희석(20ng에서 2배씩 희석)하여 100ul씩 넣어준 뒤 1:500과 1:1000으로 희석시킨 E1G-Eu도 함께 100ul를 넣어주고 1시간 동안 37℃에서 반응시켰다. 한 시간 뒤 Enhancement solution 200ul를 넣어주고 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 DELFIA 1420으로 값을 측정하였다.

Anti-E1G antibody에서 E1G와 E1S의 교차반응도가 높았다. 이는 E1G에 대한 항체이지만 E1S와도 반응할 수 있음을 알려주며, 이 항체를 이용해 E1G에 대한 표준적정곡선 뿐만 아니라 E1S에 대한 표준적정곡선을 작성할 수 있고, 정량 시스템 정립이 가능하다는 것을 나타낸다. 이에 따라 anti-E1G antibody를 E1S 측정을 위한 1차 코팅 항체를 사용하였고, 이로 인한 E1S의 표준적정곡선을 작성 하였다(그림 33~38).

Anti-E1G antibody의 농도를 1:1000 으로 했을 때와 1:2000으로 했을 때의 차이가 거의 없어 coating농도는 1:2000으로 결정하였다.

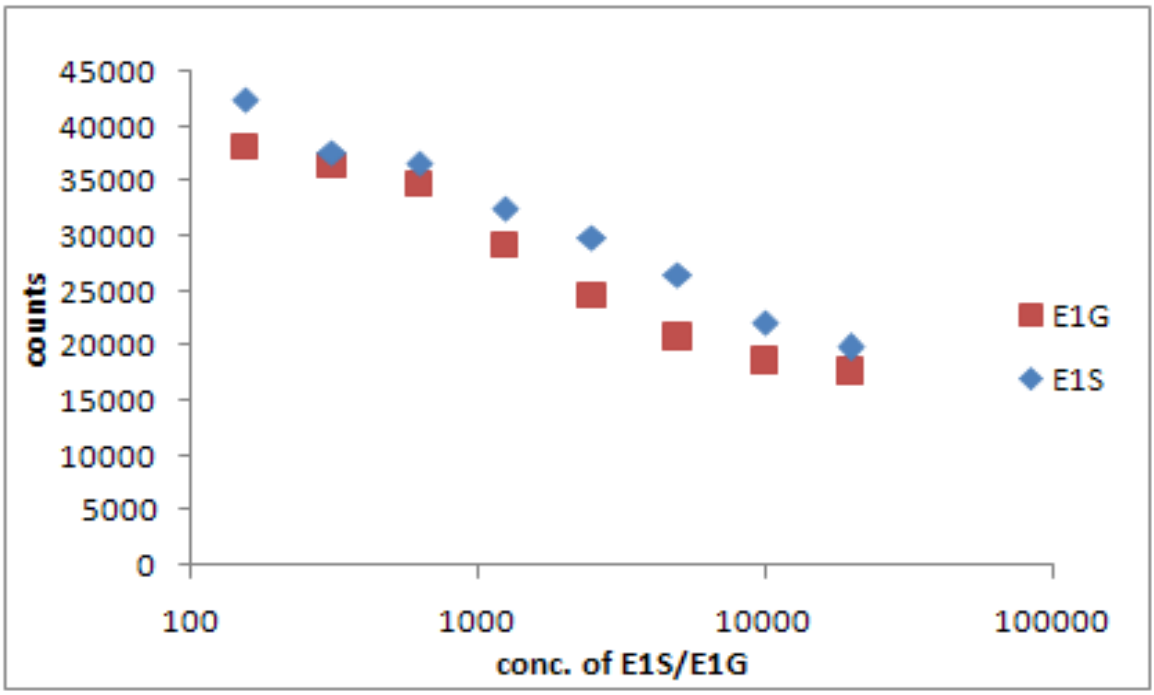


그림 33. 1차 코팅 항체 anti-E1G antibody에 대한 E1G와 E1S의 교차반응 그래프
coating 1:2000, E1G-Eu 1:500

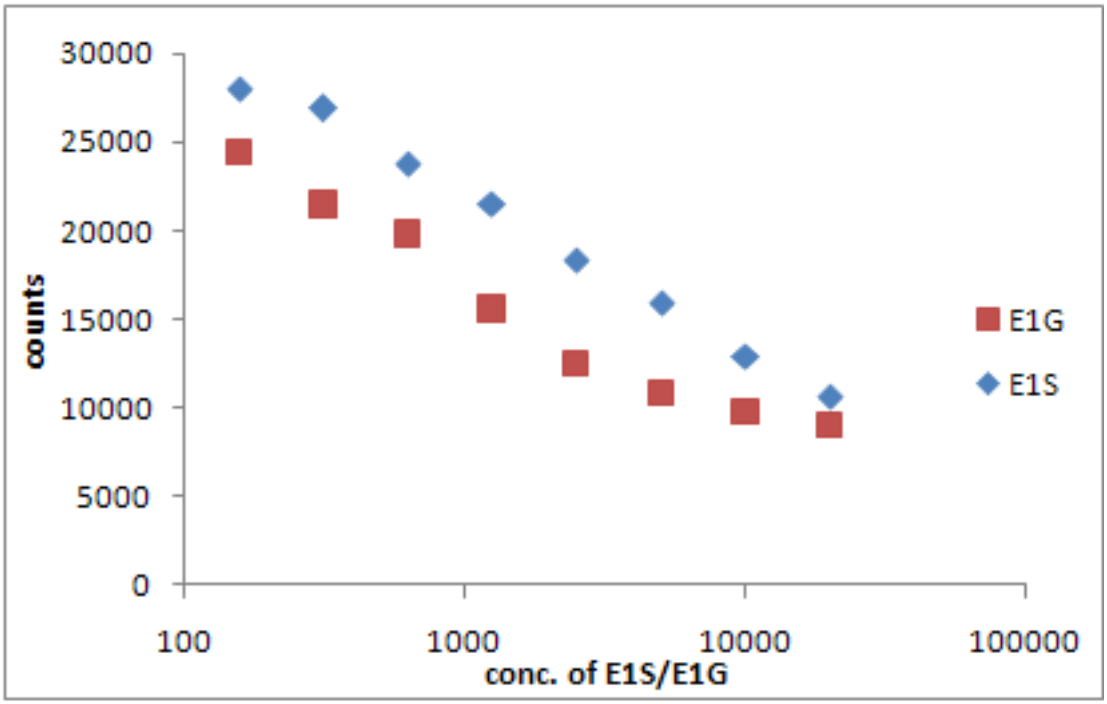


그림 34. 1차 코팅 항체 anti-E1G antibody에 대한 E1G와 E1S의 교차반응 그래프
coating 1:2000, E1G-Eu 1:1000

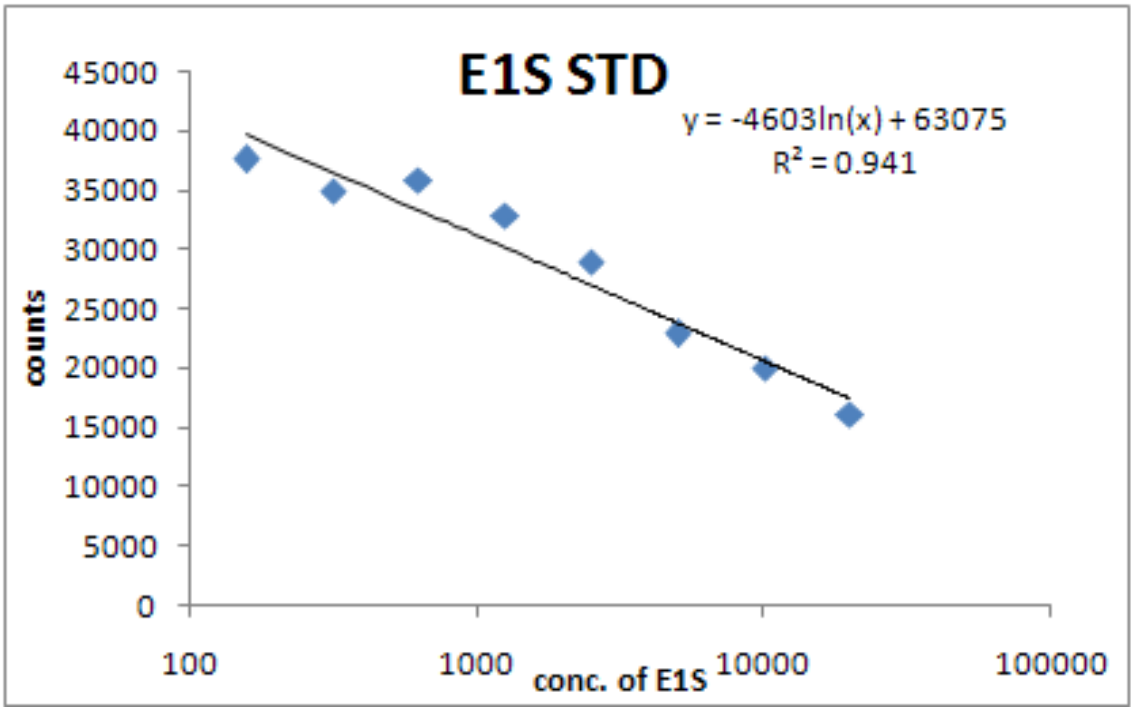


그림 35. Anti-E1G antibody로 코팅한 E1S의 표준적정곡선
1:1000 coating, 1:500 E1G-Eu

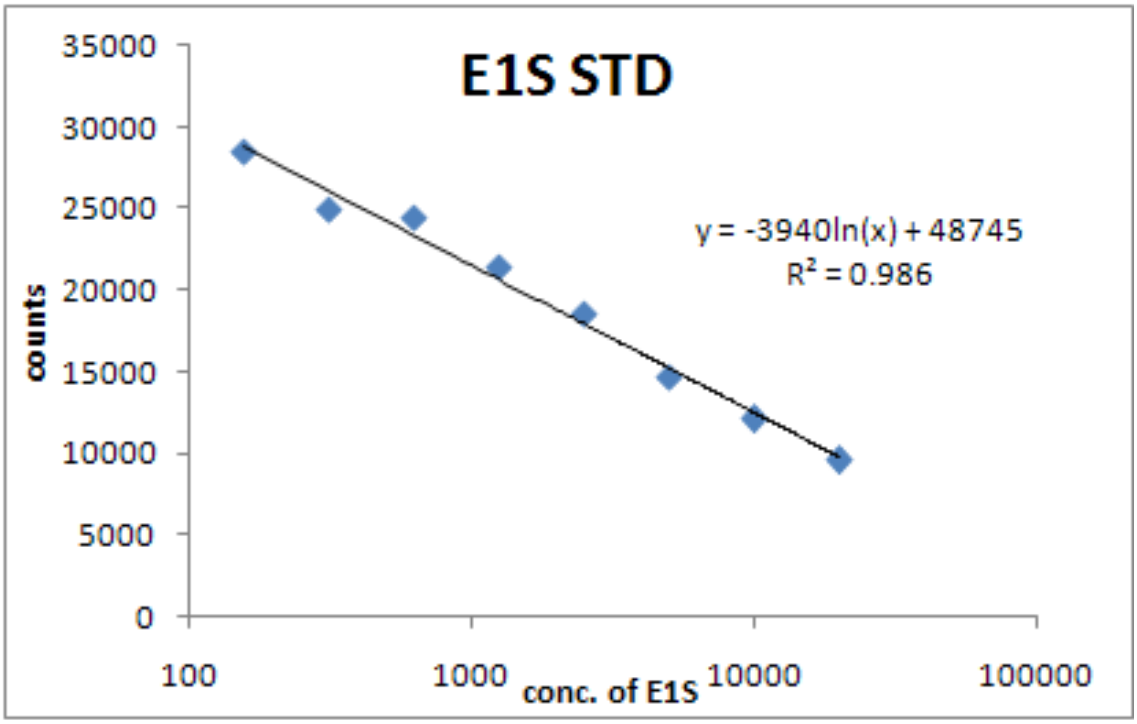


그림 36. Anti-E1G antibody로 코팅한 E1S의 표준적정곡선 1:1000 coating, 1:1000 E1G-Eu

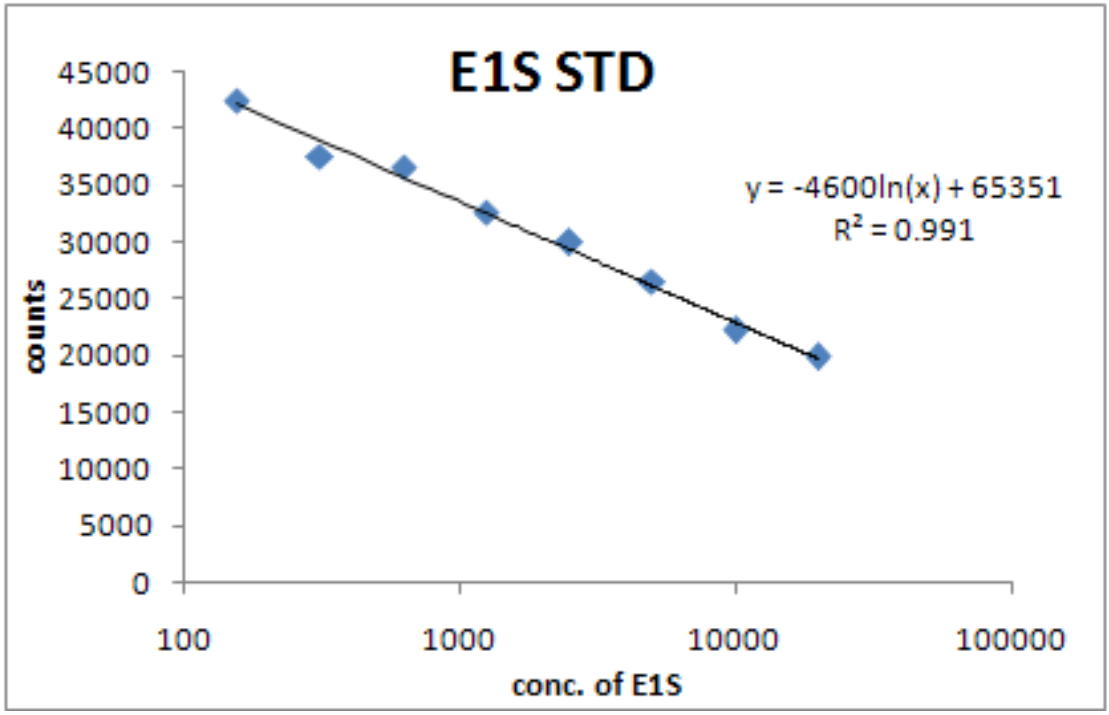


그림 37. Anti-E1G antibody로 코팅한 E1S의 표준적정곡선 1:2000 coating, 1:500 E1G-Eu

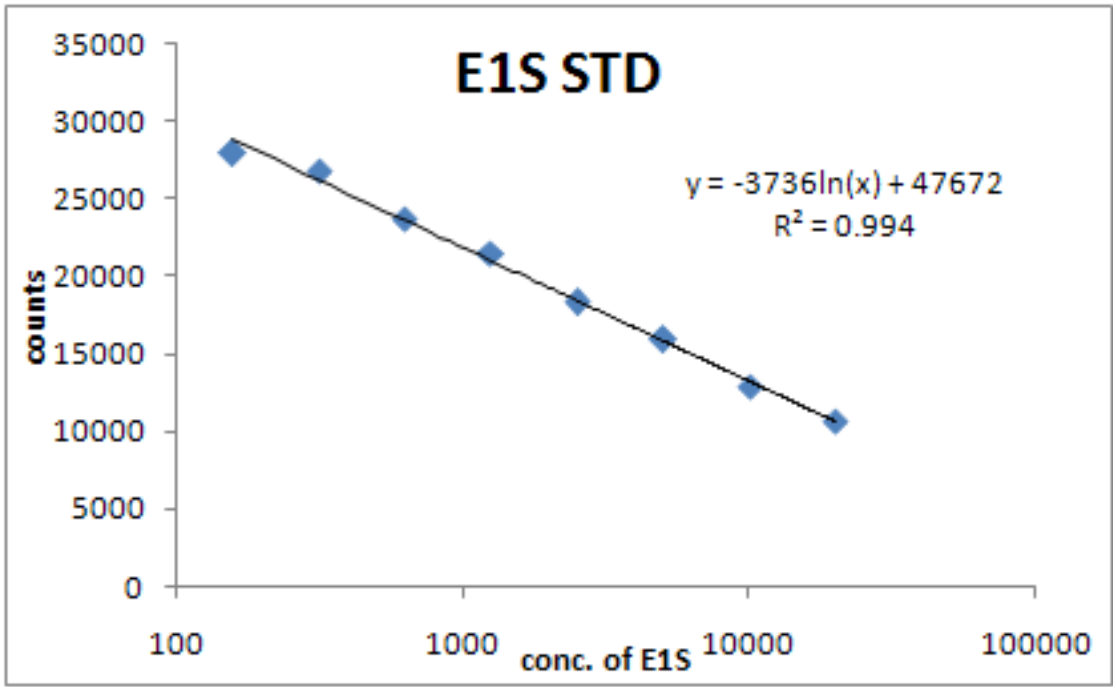


그림 38. Anti-E1G antibody로 코팅한 E1S의 표준적정곡선 1:2000 coating, 1:1000 E1G-Eu

(3) Clone 155와 anti-E1G antibody에서의 E1S에 대한 표준적정곡선 비교

Anti-E1G antibody역시 Clone 155와 마찬가지로 E1G와 E1S 모두에서 cross reactivity가 있다는 것을 알 수 있었으나 두 항체에 대한 표준적정곡선을 비교하는 그래프를 보았을 때 anti-E1G antibody가 Clone 155보다 E1S에 대한 반응성이 좋지 않다고 생각할 수 있으나, Clone 155의 경우 60mg/ml의 농도이므로 1:1000의 희석배율을 가질 때 코팅 농도는 60ng/well의 농도를 가지고 anti-E1G antibody의 경우 28.7mg/ml의 농도이므로 1:1000의 배율로 희석하면 28.7ng/well의 농도를 가지게 되므로 Anti-E1G antibody가 Clone 155보다 E1S에 대한 binding affinityr가 떨어진다고 말할 수 는 없다. (그림 39) 따라서 정확하게 농도를 맞추어 모든 조건을 동일하게 하여 Clone 155와 commercial anti-E1G Ab의 활성을 비교해야 할 것이다. 따라서 Clone 155뿐만 아니라 시약 회사에서 구입할 수 있는 E1G에 대한 항체에서도 E1S에 대한 교차반응이 있을 수 있으므로 그 항체들을 이용하여 키트를 제작하게 되면 기존의 제작한 Clone 155를 이용한 키트보다 더욱 감도가 좋고 반응성이 우수한 키트를 제작할 수 있을 것이다.

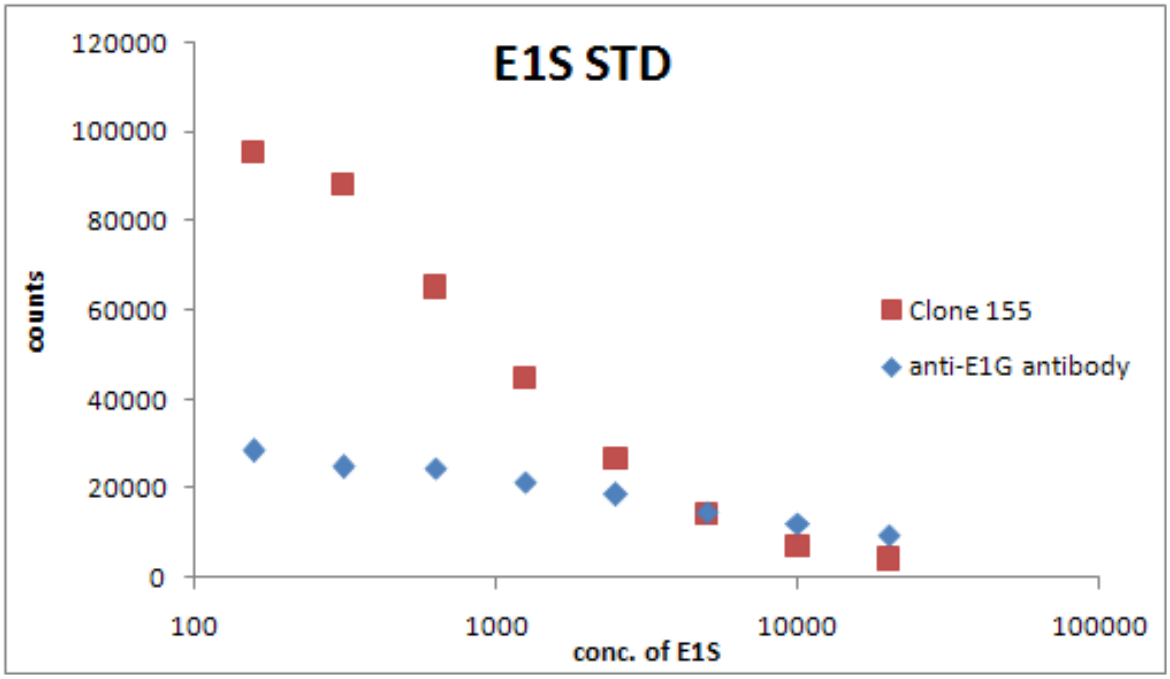


그림 39. Clone 155와 anti-E1G antibody에서의 E1S에 대한 표준적정곡선 비교

타. 한우뇨 2D 실험 재실시 및 단백질 확인

(1) 단백질 Sample의 확보

경북축산기술연구소로부터 받은 임신 한우뇨와 미임신 한우뇨를 각각 메스실린더에 모은 후, 0.45um의 membrane filtration과정을 거친다. 정확한 부피를 계산하고 황산암모늄 80%를 처리하여 단백질을 침전 시킨다. Over night 반응 후, 8000rpm, 4°C 30min으로 원심분리하여 다량의 황산암모늄이 포함된 상등액을 제거 한 뒤, Pellet을 PBS에 Resuspension시켜서 단백질 용액을 만든다. 이 과정을 약 20번 반복하게 되면 소량의 단백질을 추출할 수 있어 2D로 단백질을 확인하기에는 충분한 양이 된다.

(2) 2D 2차 실험

한우뇨 2D 분석 결과 임신 한우뇨와 미임신 한우뇨 간의 단백질 발현 패턴의 차이가 보이지 않아 대체적 방법을 간구 하여 실험을 설계하였다.

먼저 단백질 침전 yield값을 더욱 높이기 위해 황산암모늄 처리 비율을 **2차 년도에 실시했던 기존의 70% 비율에서 3차 년도에는 80%로 증가**시켰다. 증가된 황산암모늄을 효율적으로 제거 하기 위해, 2차 년도에 사용했던 투석 방법을 다른 방법으로 대체하였다. **즉, 3차 년도에는 대표적인 desalting method로 사용되는 PD 10 Column(Gel chromatography, Sephadex G-25 medium을 이용)**을 이용하여 Sample내에 고농도로 존재하는 황산암모늄의 제거를 시도

하였다. Gel filtration의 원리를 이용한 PD-10 column은 분자량이 큰 단백질 부분이 먼저 분리되어 나오고 분자량이 작은 황산암모늄 염은 단백질 부분이 모두 제거 된 뒤에 컬럼으로부터 늦게 빠져 나오게 되는 원리를 이용한 것이다. (그림 40)

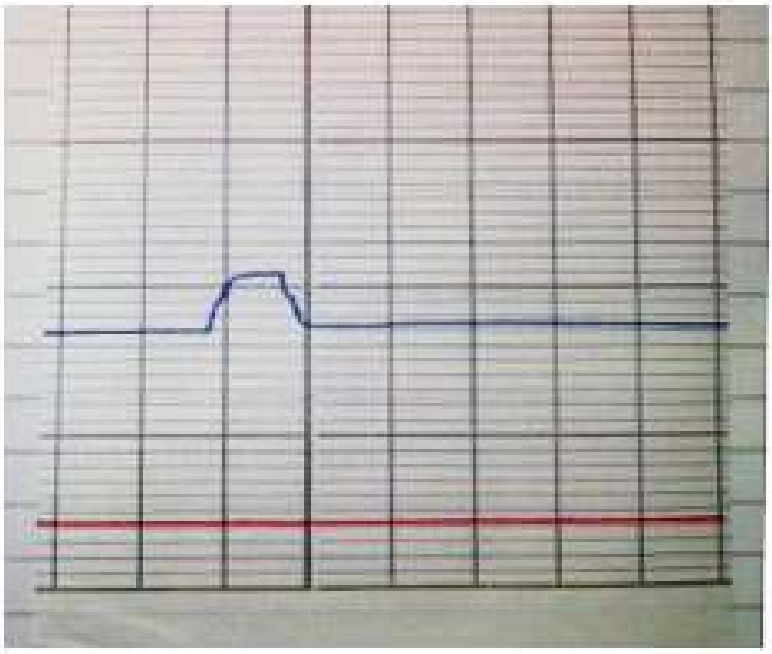


그림 40. PD 컬럼을 이용한 한우뇨 단백질의 desalting 과정

Auto clave된 PBS를 이용하여 column을 충분히 안정화 시킨 뒤, 8000rpm 4°C 30min으로 침전시킨 단백질 sample을 로딩하여 분자량 별로 분리를 시도하였다. 분자량이 큰 단백질 부분이 처음 피크로 나타나 크로마토그래피에 의해 염이 제거된 단백질 분획을 얻을 수 있었으며 황산암모늄은 아미노산의 형태가 아닌 염의 상태를 유지하기 때문에 크로마토그래피로부터 측정이 되지 않게 된다.

위와 같이 PD-10 column을 이용하여 임신 한우뇨와 미임신 한우뇨의 단백질 분획을 얻을 수 있었다. **기존의 2차 년도에는 Bradford Assay를 통해서 두 Sample간의 농도를 같은 농도로 통일 시켰다. 하지만 Bradford Assay가 표준곡선이 비교적 안정되지 못하고, Urea성분의 함유를 고려하여 좀 더 확실한 방법을 모색하여 3차 년도에는 동결건조 과정을 실시**하게 되었다. 한우뇨 원액 1L기준, 최종 얻게 되는 단백질 Powder의 양이 극히 적어, 같은 과정을 수십 차례 반복하여 임신 한우뇨와 미임신 한우뇨의 단백질 Powder를 확보 할 수 있었다. 확보된 powder를 이용하여 동일 농도로 다시 녹인 뒤, 2D 실험과정을 따라 2D electrophoresis를 시도하였다. (그림 41, 42)

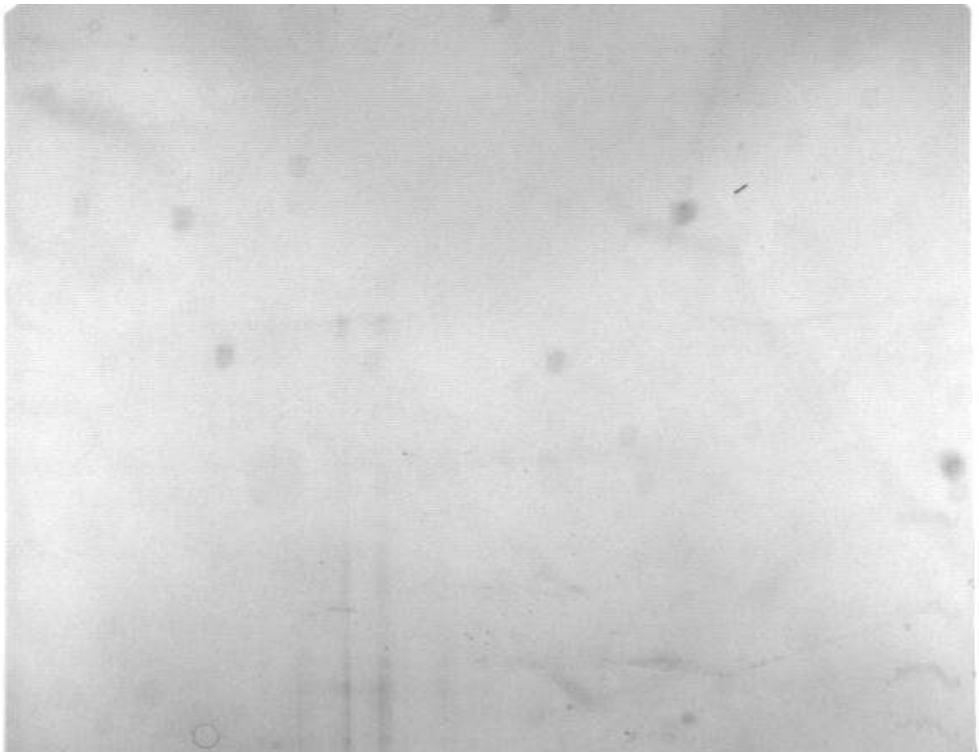


그림 41. 2D electrophoresis로 실시한 임신 한우뇨 프로틴 패턴 분석

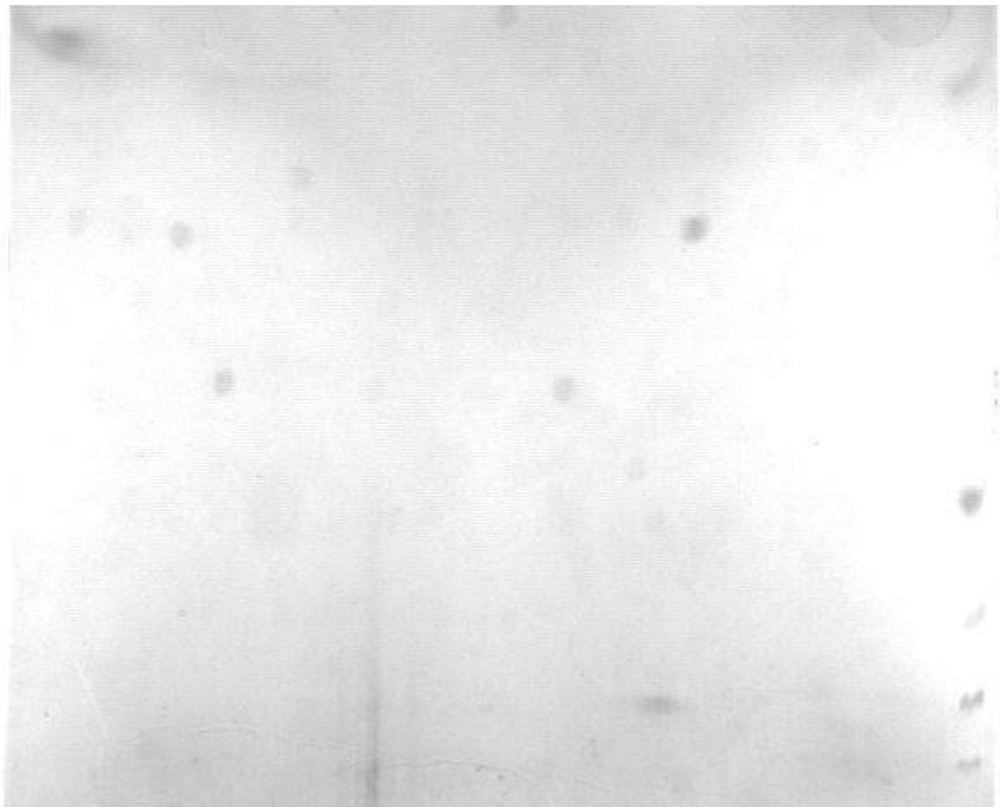


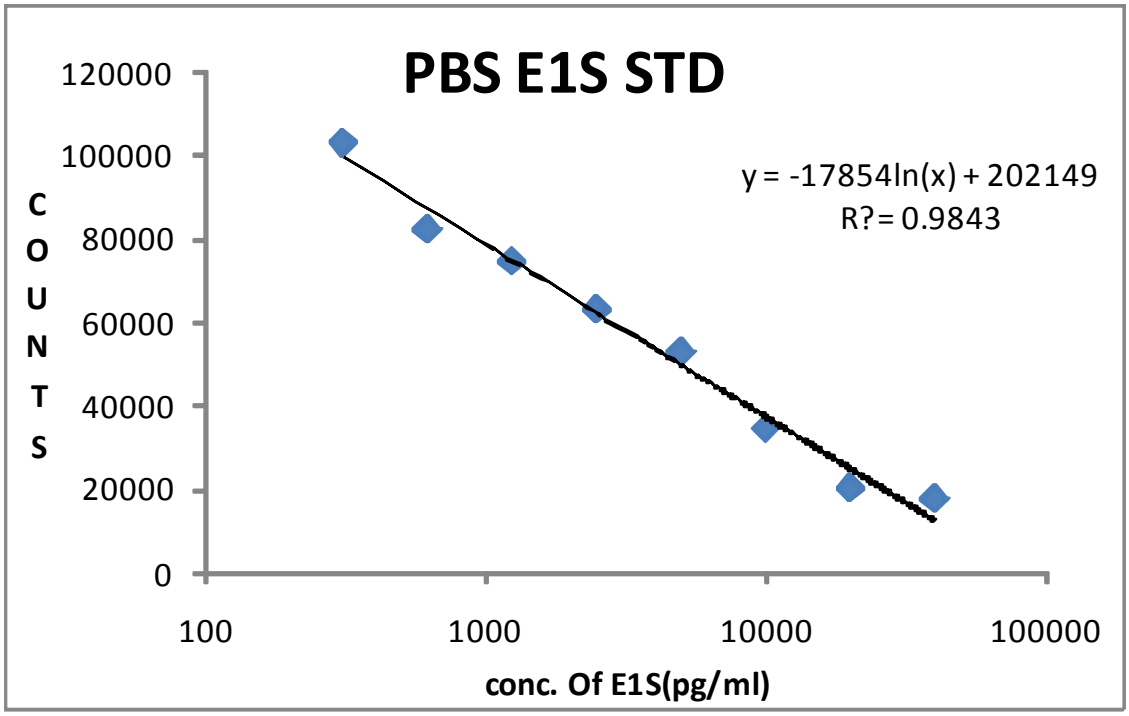
그림 42. 2D electrophoresis로 실시한 비임신 한우뇨 프로틴 패턴 분석

좌측의 사진이 임신 한우뇨의 2D 결과 사진이며 우측의 사진이 미임신 한우뇨의 2D 결과 사진이다. 데이터에서 보여지는 바와 같이 임신 한우뇨, 미임신 한우뇨의 두 sample간에 단백질 발현의 차이가 없음을 알 수 있다.

기존의 2D 법 개선책으로 침전을 위한 황산암모늄 비율을 조정하고, 염을 제거하기 위한 PD-10 column을 도입했으며, 동결건조 과정을 통해 단백질을 powder로 제작하여 정확히 농도를 맞추는 작업을 거쳤으나 두 sample간의 단백질 발현의 차이가 없다는 결론을 내릴 수 있었다.

파. 한우뇨의 다른 호르몬 대사산물(E1S) 조사

한우뇨에서 단백질을 추출하여 2D법을 통해 임신/비임신간의 프로틴 차이를 확인하였지만 차이를 보이지 않아 정량이 가능한 다른 스테로이드 호르몬 대사산물에서 임신/비임신의 판별이 가능한지 알아보기 위해 E1S 정량시스템을 한우뇨에 적용하여 비교하였다. 돼지뇨에서 E1S를 정량하는 방법과 마찬가지로 실험을 진행하였고, 100배 희석배율을 적용한 인터널 스텐다드를 적용하였다. (그림 43, 표 12) 정량값이 표시되지 않은 칸은 정량이 불가능한 샘플이었을 경우이며, 수정 후 일수가 적혀져 있지 않은 샘플은 비임신 샘플인 경우이다. 한우뇨에서는 돼지뇨와는 다르게 임신/비임신뇨의 E1S의 농도가 차이가 나지 않는 것으로 조사되었다. 이는 동물마다 임신 주기별로 분비되는 호르몬의 종류가 다르기 때문으로 예상되며, 또한 그 호르몬을 분비하는 시스템도 달라 뇨 중 대사산물이 일정하지 않아서 이런 결과가 나왔을 것으로 유추된다. PG와 E1S, E1G에 대한 한우뇨의 조사는 이번 연구를 통해 진행이 되었으나 다른 형태로 나오는 호르몬 대사산물을 통해 더욱 연구가 필요하다고 사료되며, 이러한 연구를 통하여 한우뇨에서도 임신/비임신을 판별할 수 있는 호르몬 대사산물을 찾을 수 있을 것으로 사료된다.



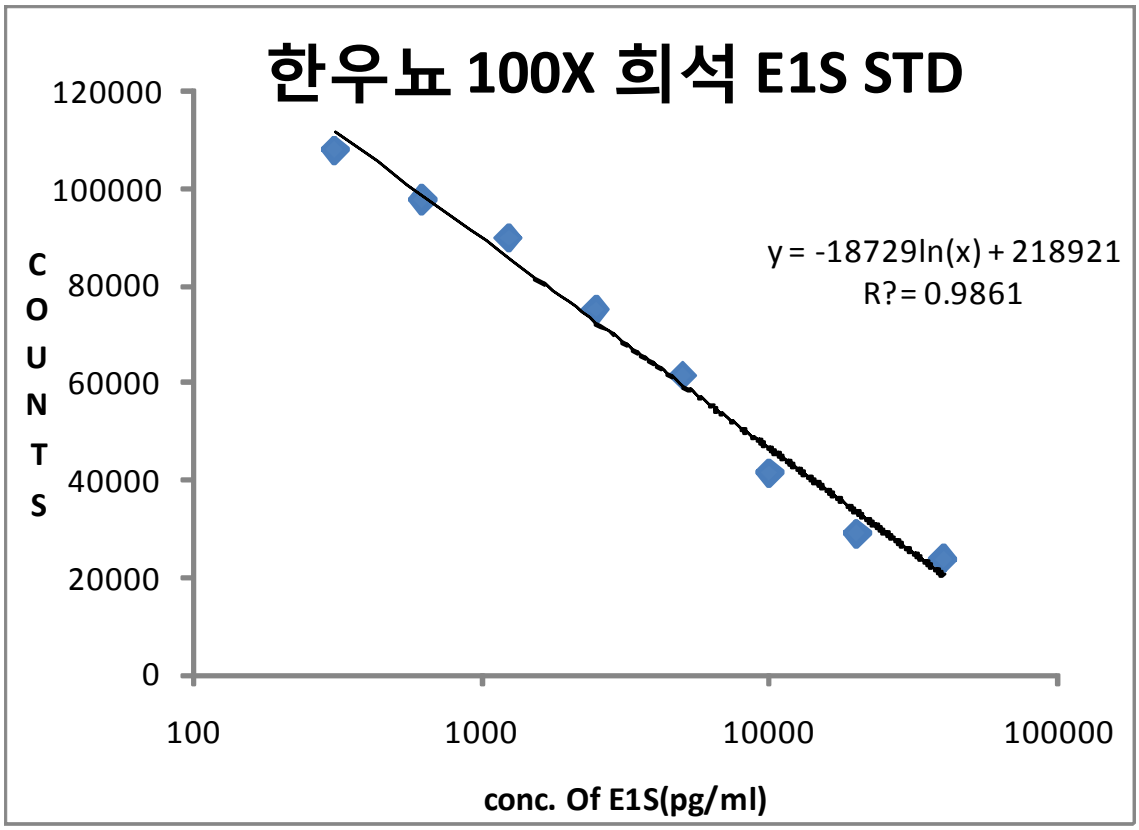


그림 43. 100배 희석된 한우 비임신뇨를 이용하여 작성한 E1S 정량을 위한 표준적정곡선

표 12. 그룹 1부터 7까지 한우뇨 샘플의 E1S 정량 결과 (100배 희석 인터널 스텐다드)

Group 1				
sample 채취일	축 번 호	수정 후 일수	임신 여부	정량값(pg/ml)
12월 18일	228	164	0	
12월 09일	78		–	
12월 09일	104	34	0	
12월 18일	86		–	
12월 09일	196	208	0	26000
12월 09일	135		–	
12월 18일	112		–	
12월 09일	101		–	
12월 09일	236	202	0	
12월 09일	22		–	
12월 09일	236	202	0	700000
12월 09일	89	215	0	190000
12월 09일	243	35	0	
12월 09일	69		–	
12월 09일	24	33	–	
12월 09일	23	213	0	35000
12월 09일	235		–	
12월 09일	130		–	
12월 09일	92		–	
12월 09일	187	210	0	45000
12월 09일	190	22	0	
12월 09일	99	222	0	260000
12월 09일	20		–	
12월 09일	32		–	
12월 09일	126	197	0	299500

Group 2				
sample 채취일	축 번 호	수정 후 일수	임신 여부	정량값(pg/ml)
12월 12일	06-58	216	0	
12월 11일	구-157	221	0	22000
12월 01일	06-81	204	0	560000
12월 11일	구-159	217	0	35000
12월 11일	05-90	216	0	
12월 11일	06-75	162	0	399800
12월 04일	9-149	584	0	
12월 11일	9-163	31	0	
12월 11일	06-83	34	0	
12월 11일	06-74	2	0	
12월 11일	06-74	2	0	
12월 11일	05-68		-	
12월 11일	06-62	2	0	
12월 11일	9-150	14	0	
12월 11일	06-80		-	
12월 11일	9-153		-	
12월 11일	06-77	208	0	
12월 11일	9-150	14	0	
12월 11일	05-46	7	0	
12월 18일	236	211	0	648000
12월 11일	06-51	208	0	190000
12월 11일	9-152	162	0	
12월 11일	9-156	27	0	
12월 11일	9-158	217	0	
12월 11일	9-162		-	

Group 3				
sample 채취일	축 번 호	수정 후 일수	임신 여부	정량값(pg/ml)
12월 08일	188	24	0	
12월 18일	223	32	0	
12월 18일	166	34	-	
12월 08일	149	20	0	
12월 08일	212	17	0	
12월 08일	153	32	0	
12월 08일	181	17	0	
12월 08일	21	11	0	51000
12월 08일	18	17	-	
12월 08일	183	-25	0	
12월 08일	111		-	
12월 08일	79		-	
12월 08일	141	34	0	
12월 08일	216		-	
12월 08일	18	17	-	
12월 08일	215		-	
12월 08일	199	19	0	
12월 08일	132	7	0	
12월 08일	213		-	
12월 08일	183	-25	0	
12월 08일	115		-	
12월 08일	31		-	
12월 08일	182	33	0	
12월 08일	170		-	
12월 08일	5	24	0	

Group 4				
sample 채취일	축 번 호	수정 후 일수	임신 여부	정량값(pg/ml)
12월 18일	179	38	0	
12월 18일	231	10	0	
12월 10일	239		–	
12월 18일	254	30	0	
12월 10일	9번	202	0	140000
12월 18일	70	1	0	
12월 10일	225	214	0	33500
12월 10일	227	13	0	
12월 10일	241		–	
12월 10일	77	202	0	260000
12월 10일	255	26	0	
12월 10일	143		–	
12월 10일	112		–	
12월 10일	178	220	0	211000
12월 10일	186	221	0	
12월 10일	237		–	
12월 10일	232		–	
12월 18일	243	44	0	
12월 10일	248	36	0	
12월 10일	200	30	0	
12월 10일	40	2	0	
12월 10일	239		–	
12월 10일	140		–	
12월 10일	40	2	0	
12월 10일	81	38	0	

Group 5				
sample 채취일	축 번 호	수정 후 일수	임신 여부	정량값(pg/ml)
날짜 지워짐	140		–	
날짜 지워짐	255		0	
12월 15일	231	7	0	
12월 18일	224		–	
12월 18일	140		–	
12월 12일	189	203	0	700000
12월 15일	228	101	0	
12월 15일	54	5	–	
12월 15일	254	27	0	
12월 12일	33	32	–	
12월 15일	129	207	0	
12월 15일	253		–	
날짜 지워짐	112		–	
12월 15일	226		–	
12월 15일	152		–	
12월 15일	70		–	
12월 15일	86		–	
12월 15일	223	29	0	
12월 15일	221		–	
12월 15일	244	181	0	800000
12월 15일	3		–	
12월 15일	43	208	0	460000
12월 15일	152		–	
12월 15일	74		–	
12월 15일	252		–	

Group 6				
sample 채취일	축 번 호	수정 후 일수	임신 여부	정량값(pg/ml)
12월 17일	142		–	
12월 17일	187	218	0	508000
12월 17일	33		–	
12월 17일	20		–	
12월 17일	22		–	
12월 17일	222	222	0	39800
12월 17일	186	228	0	49000
12월 17일	135		–	31500
12월 17일	72		–	
12월 17일	23	221	0	
12월 17일	37		–	600000
12월 17일	37		–	
12월 17일	116	213	0	700000
12월 17일	190	30	0	32000
12월 17일	81	45	0	
12월 12일	237		–	
12월 17일	236	210	0	600000
12월 17일	255	33	0	
12월 17일	237		–	
12월 12일	248	38	0	36000
12월 12일	241		–	37000
12월 12일	9번	204	0	600000
12월 12일	225	216	0	1500000
12월 12일	81번	40	0	35000
12월 12일	200	32	0	

Group 7				
sample 채취일	축 번 호	수정 후 일수	임신 여부	정량값(pg/ml)
12월 17일	34	229	0	54500
12월 17일	248	38	0	
12월 17일	241		-	
12월 17일	89	223	0	39500
12월 17일	93	223	0	51500
12월 17일	107		-	
12월 17일	69		-	30700
12월 17일	78		-	
12월 17일	77	209	0	22300
12월 17일	179	37	0	

* 응용 연구

가. 델피아 법을 적용한 다양한 Immunoassay 법 개발 및 평가

이번 "뇨중 대사산물 측정에 의한 돼지, 소(한우) 임신진단을 위한 면역분석법 개발과 이의 활용" 과제를 진행하면서 델피아법을 개발하고 실제 정량에 적용하는 데 많은 도움이 되었다. 과제를 수행하는 데 직접적인 E1S, E1G, PG 정량법 뿐만 아니라 TNF-α, Insulin 등에 대해서도 델피아법을 적용한 면역분석법을 개발하였으며, 이를 실제로 정량 실험에 적용하고 있다. 또한 한동대학교의 학부과정인 "면역학실습"의 수업에서도 E1S, PG 분석법과 TNF-α, Insulin의 분석법 역시 실습 실험으로 적용하고 있다. 따라서 과제를 수행하는 데에는 직접적인 영향이 없을지라도 본 과제를 수행하면서 여러 가지 상황들이 면역분석법을 개발하고 적용하는데 상당한 도움이 되었고, 앞으로도 다른 물질들에 대해서도 계속적인 면역분석법의 개발을 하고 적용할 것이므로 본 과제 보고서에 TNF-α, Insulin의 정량법 개발에 대한 결과를 넣고자 한다. PG, TNF-α, Insulin에 대한 정량법 개발 결과로 논문 발표를 준비 중에 있다.

(1) TNF-α 정량법의 개발 및 평가 (TR-FIA)

TNF-α와 같은 염증 유발 사이토카인과 관계된 혈관계통의 염증은 죽상동맥경화나 만

성심부전증을 유발하는데 중요한 역할을 한다. 염증 반응이 있으면 TNF-a, IL-6 등과 그 수용체들의 혈중 농도가 증가하기 때문에 농도 측정 자체가 진단적인 의미를 갖는다. 특히 TNF-a는 류마티스염, HIV 감염, 심부전증, 폐혈증, 백혈병 등이 있을 때 혈중 농도가 증가하는 것으로 보고되고 있어 이것을 진단하기 위한 TNF-a의 시간분해형광분석법(TR-FIA)의 개발은 매우 유용한 가치를 지는 것으로 볼 수 있다. 따라서 Perkinelmer사의 Eu-labeling kit를 이용하여 TNF-α의 정량법을 델피아법으로 개발하였으며, 이를 실험실의 정량실험에 적용하고 있다.

(가) Monoclonal anti-TNF-α antibody에 Eu complex를 Conjugation

monoclonal anti-human TNF-α antibody와 Eu3+의 결합은 DELFIA Eu-labeling kit를 이용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였다. 약술하면 먼저 컨쥬게이션 시킨 항체와 Eu chelate를 labeling buffer에 넣고 rotater를 이용하여 4도씨에 하루동안 반응시킨다. 반응이 끝난 후 컨쥬게이션된 Eu-antibody complex를 PD calumn를 이용하여 free 상태의 Eu와 컨쥬게이션 되지 않은 antibody를 걸러낸다. 단백질의 흡광도를 이용한 280nm에서 OD값을 fraction별로 측정하고 단백질 농도가 가장 높게 나온 fraction을 선별하여 소량의 BSA를 첨가시키고 정량 실험에 사용한다. (그림 1) 아래의 그림에서도 알 수 있듯이 4, 5번 Fraction과 8, 9번 Fraction에서 단백질의 흡광도가 가장 높았으며, 이 Fraction들을 혼합하여 2개의 컨쥬게이트로 사용하였다.

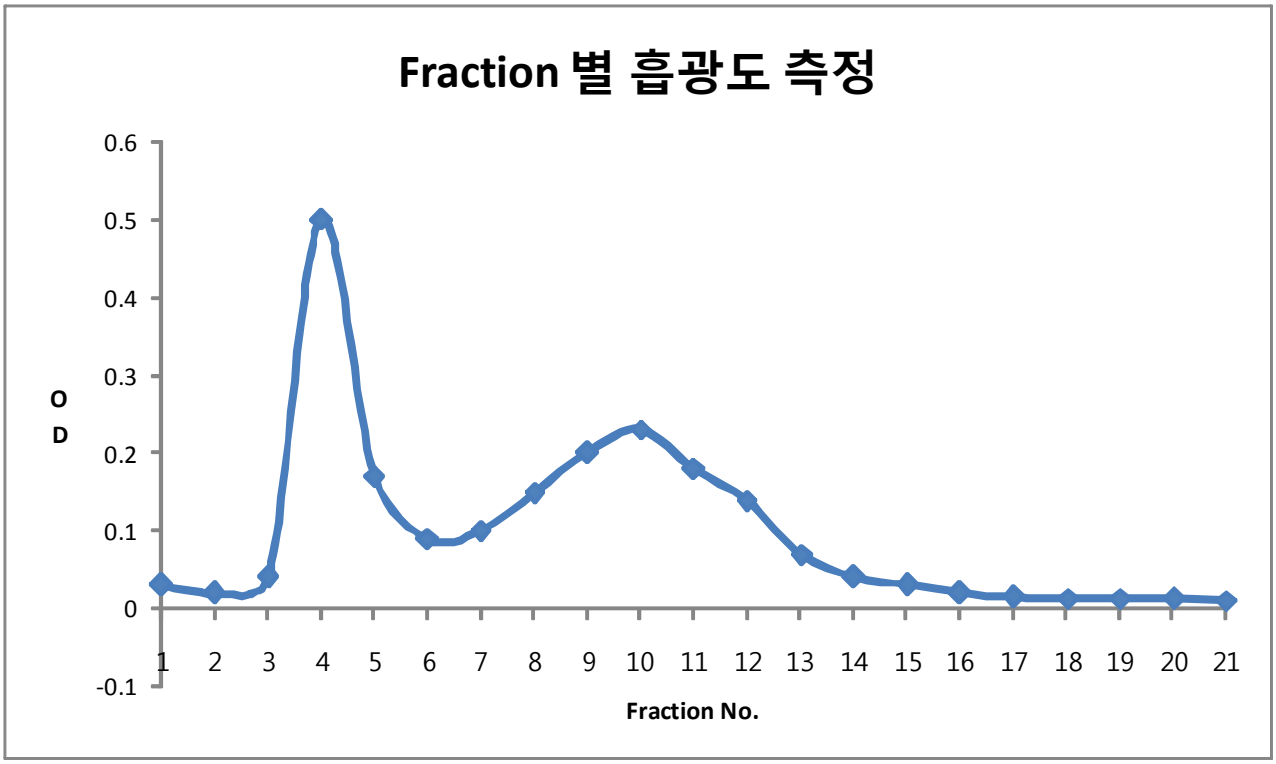


그림 1. PD 컬럼을 이용한 monoclonal anti-human TNF-α antibody-Eu의 분리

(나) Eu-Conjugate의 적정 농도 결정

컨쥬게이트의 적정 농도를 결정하기 위해서 1:500을 최상위농도로 하여 2배씩 희석하여 총 9개의 희석배율에서의 카운트 값을 victor 기계로 측정하였다. (그림 2) 일반적으로 TR-FIA법에서 컨쥬게이트 농도는 최상위 농도의 30~50%의 값이 나오는 희석배율로 사용하게 된다. 따라서 TNF-α의 정량법을 위한 컨쥬게이트의 적정 농도는 1:2000으로 결정하였다.

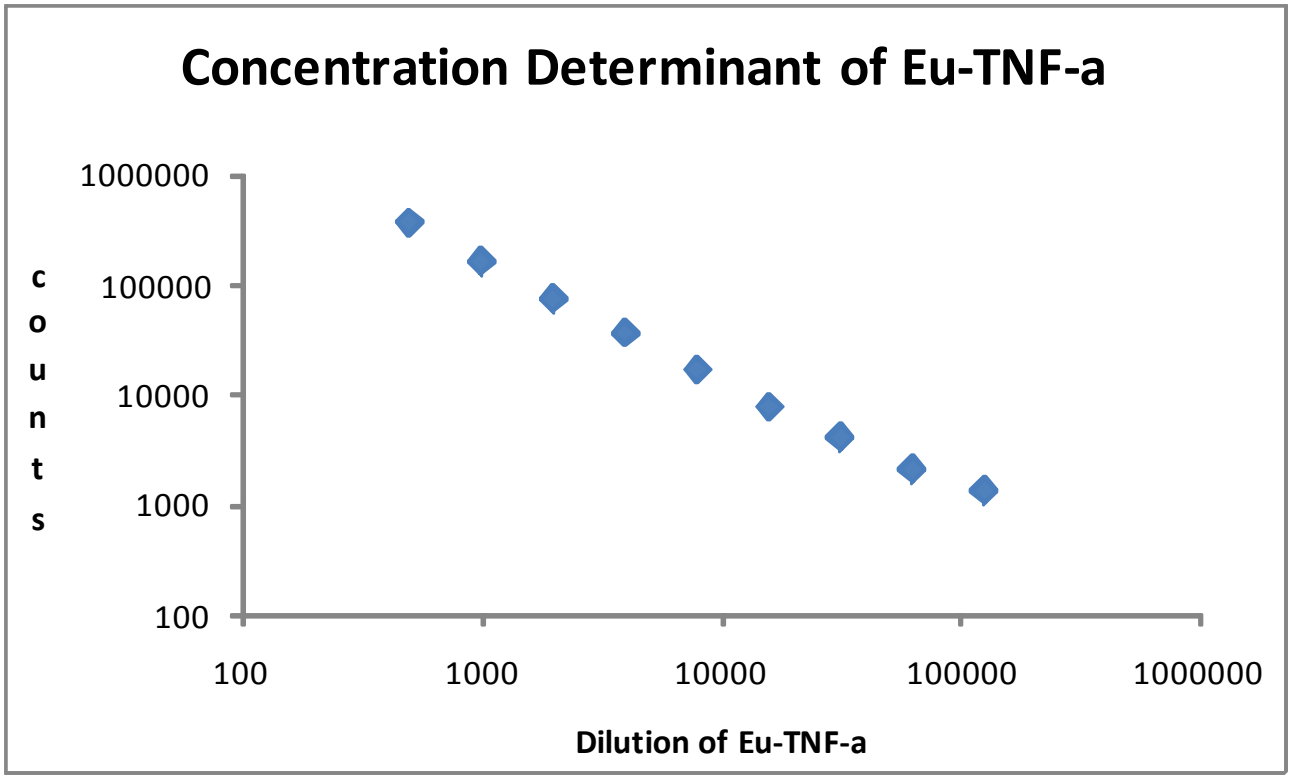


그림 2. Eu-TNF-a 농도 결정 그래프

(다) TNF-a의 정량법을 위한 코팅 농도 결정

비경쟁적 TR-FIA법을 위한 적정 polyclonal rabbit anti-human TNF-a antibody의 농도를 구하기 위해 coating buffer(버퍼구성 물질, 농도)에 다양한 농도로 희석하여 100ul씩 분주 후 37도에서 2시간 동안 코팅시켰다. 각 well은 washing buffer(PBS-0.05% Tween 20; PBS-T)를 이용하여 WALLAC사의 1296.026 DELFIA PLATE ASH Machine으로 3회 세척 후 2% Bovine serum albumin(BSA)으로 blocking 시켰다. 각 well에 human TNF-a를 100ng/ml부터 3.125ng/ml까지 다양한 농도로 처리하고 위와 같은 방법으로 PBS-T로 세척 후, 여기에 미리 준비한 2개의 다른 fracrtion의 Eu-labeled monoclonal anti-human TNF-a antibody를 PBS에 2000배 희석배율로 well 당 100ul씩 분주하여 37도씨에서 1시간 반응 시켰다. 각 well을 세척 후 Enhancement solution을 well 당 200ul씩 분주하여 10분 동안 반응 시킨 후 역시 Victor2D 기계로 조사하였다. (그림 3, 4) 먼저 2번 fraction의 실험결과를 보게되면 스텐다드 커브가 그려지는 1차 항체의 코팅 농도가 1:400까지로 그 농도가 매우 높음을 알 수 있다. 하지만 2번 fraction의 결과를 보면 1:1000에서도 스텐다드 커브가 그려지는 것을 확인할 수 있다. 따라서 2번 fraction의 컨쥬게이트를 사용하여 1:1000배의 희석배율로 항체를 코팅하는 시스템으로 설정하였다.

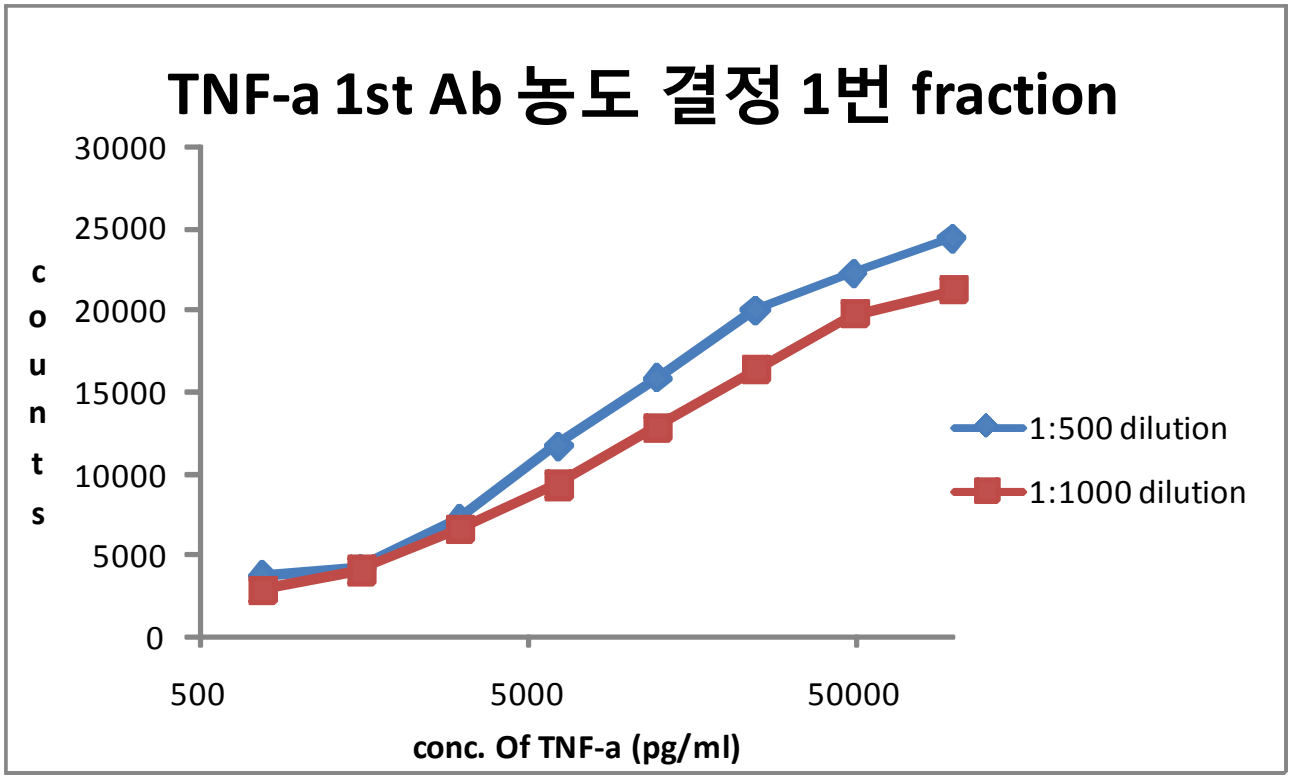


그림 3. 1번 fraction으로 실시한 코팅 농도 결정 실험 결과 그래프

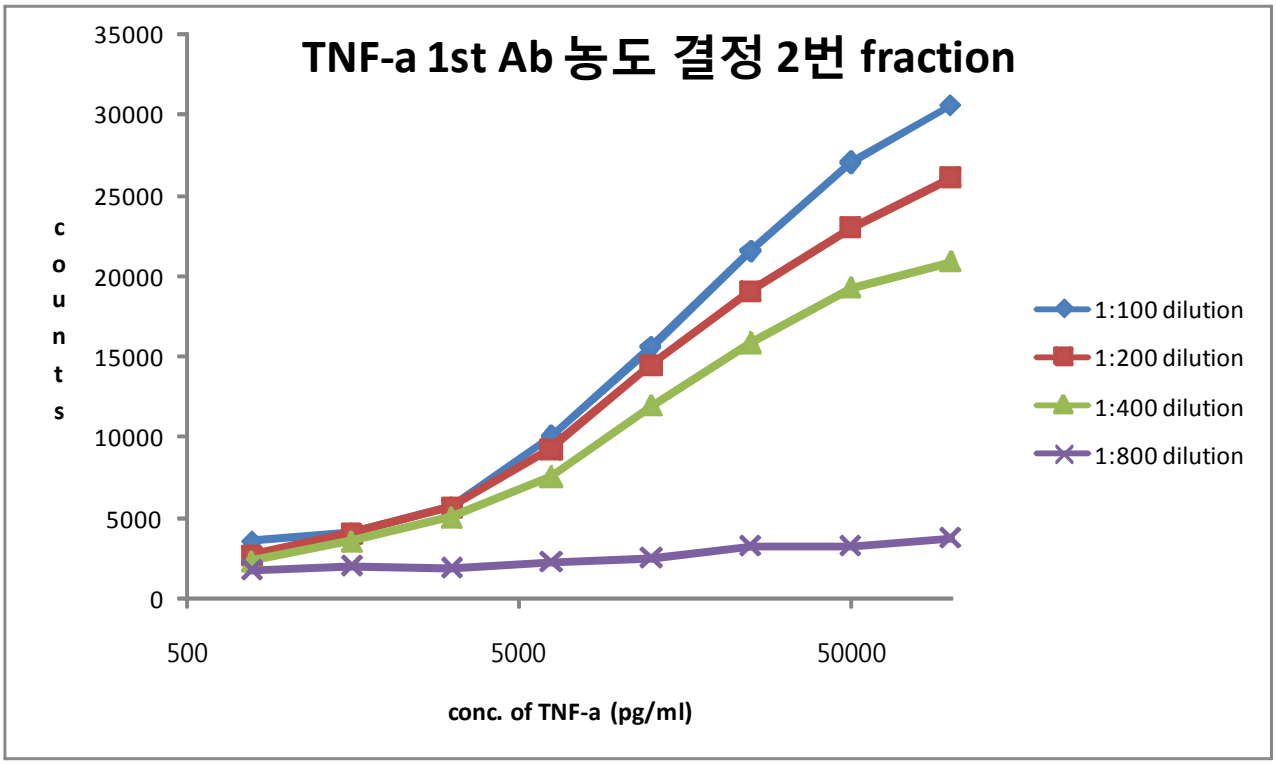


그림 4. 2번 fraction으로 실시한 코팅 농도 결정 실험 결과 그래프

(라) TNF-a 정량을 위한 표준적정곡선 작성

Eu labeled monoclonal anti-human TNF-a antibody를 사용하여 비경쟁적 TR-FIA법을 수행하였다. 약술하자면, 1:1000의 희석배율로 희석된 polyclonal rabbit anti-human TNF-a antibody가 흡착된 96 plate를 2% BSA로 blocking 후, 여러 농도로 조정된 human TNF-a를 첨가하고, 세척 후 1:2000배 희석된 Eu-labeled monoclonal anti-human TNF-a antibody를 첨가하여 37도씨에서 1시간 반응시켰다. 반응 완료 후 각 well을 세척하고 enhancement solution을 첨가하고 10분 동안 반응 시킨 후 Victor2D 기계로 조사 후 human TNF-a에 대한 표준적정곡선을 완성하였다. (그림 5) TNF-a에 대한 표준적정곡선의 감도는 0.7-100ng/ml로 비교적 감도가 다른 정량시스템에 비해 떨어지지만 델피아법으로 정량 시스템을 갖춘 것만으로도 충분히 그 가치가 있다고 할 수 있다. 감도 측면은 더 보완해야할 문제로 사료되며, 이를 이용해 실험 실습과 실험실의 정량 실험에 적용하여 사용되고 있다.

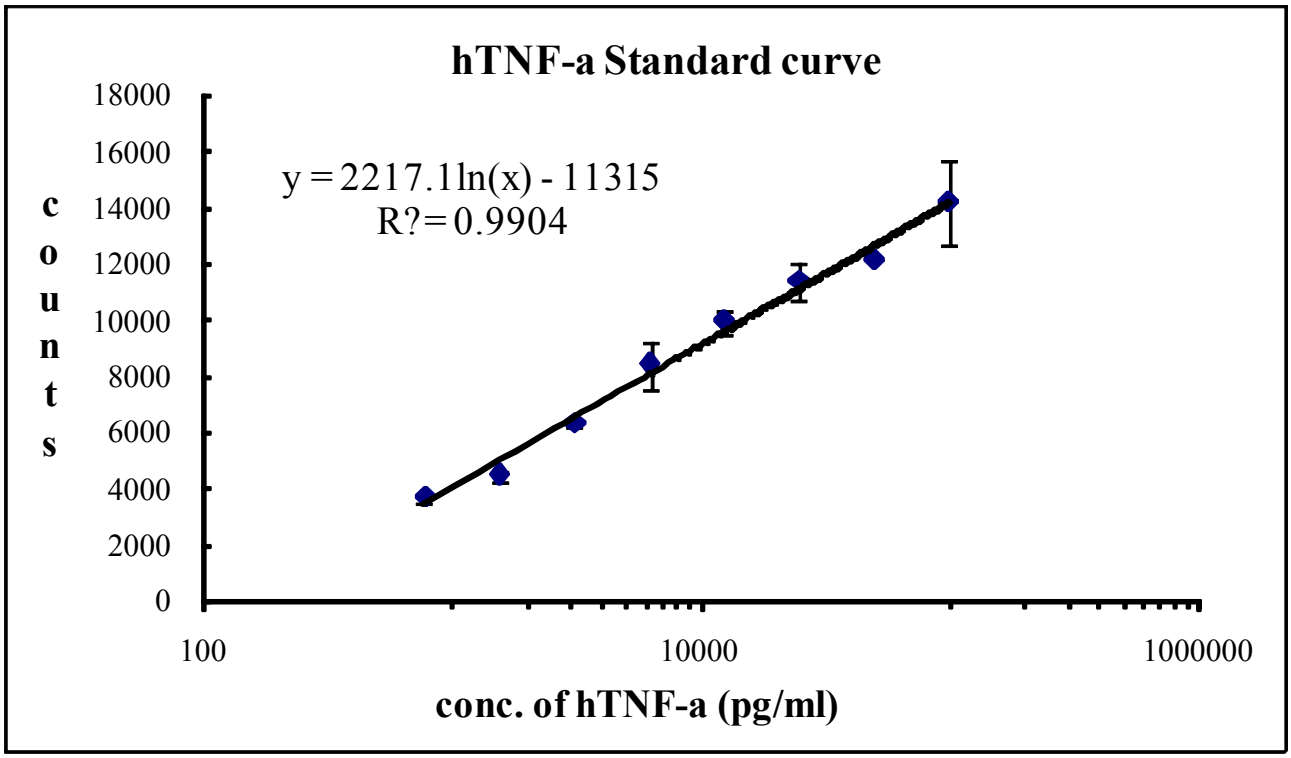


그림 5. TNF-a 정량을 위한 표준적정곡선

(2) Insulin 정량법의 개발 및 평가 (TR-FIA)

인슐린(Insulin)은 우리 몸의 신진대사 체계에 중요한 역할을 하는 호르몬 중 하나이다. 이자의 랑게르한스 섬 베타 세포에서 분비되며, 혈액 속의 포도당 수치인 혈당량을 일정하게 유지시키는 역할을 한다. 혈당량이 일정 이상으로 높아지면 인슐린이 분비되며, 혈액내의 포도당을 세포 내로 유입해 다시 다당류(글리코겐)의 형태로 저장하는 작용을 촉진시킨다. 이러한

인슐린의 분비에 이상이 있는 사람의 경우에는 포도당을 오줌으로 배출하는 당뇨병에 걸리기 쉽다. 따라서 인슐린을 정량하는 시스템은 매우 중요한 진단의 의미를 가진다. 현재 인슐린을 정량할 수 있는 기술은 ELISA로 개발되어 있으며, Kit의 형태로 시중에 판매되고 있다. 인슐린을 델피아법으로 정량할 수 있는 기술은 아직 국내엔 없으며, 이의 개발은 기술적, 실험적으로 중요한 의미를 가진다. 인슐린은 분자량이 작은 펩타이드 물질이기 때문에 항체가 인식할 수 있는 부위(epitope)이 하나 밖에 존재하지 않아 경쟁적 면역 분석법으로 개발하였으며, 이를 실험실의 인슐린 정량 실험뿐만 아니라 학부 실습의 실험에도 적용하였다.

(가) 경쟁적 면역분석법을 위한 Insulin에 Eu complex를 Conjugation

인슐린과 Eu3+의 결합은 DELFIA Eu-labeling kit를 이용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였다. 실험 방법은 상기의 TNF-a의 내용과 동일하므로 생략한다. 각 1ml씩 받은 fraction 중 5, 6번 fraction의 단백질 농도가 가장 높게 측정되어 그 fraction을 컨쥬게이트로 사용하였다.

(나) Eu-Conjugate의 적정 농도 결정

인슐린 컨쥬게이트의 적정 농도를 결정하기 위해서 1:100을 최상위농도로 하여 5배씩 희석하여 총 8개의 희석배율에서의 카운트 값을 victor 기계로 측정하였다. (그림 6) 일반적으로 TR-FIA법에서 컨쥬게이트 농도는 최상위 농도의 30~50%의 값이 나오는 희석배율로 사용하게 된다. 하지만 인슐린의 경우 컨쥬게이션이 매우 잘되어 카운트 값이 높기 때문에 Non specific binding을 최소화 할 수 있는 희석배율로 실험을 진행하였다. 따라서 인슐린의 정량법을 위한 컨쥬게이트의 적정 농도는 1:50000으로 결정하였다.

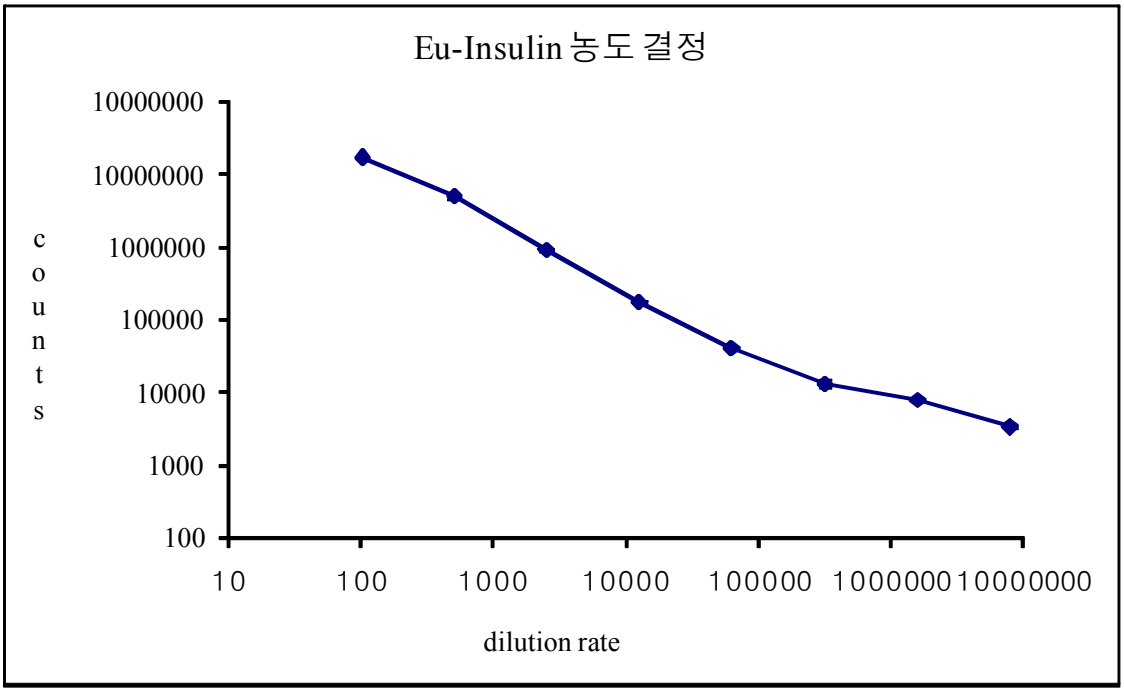
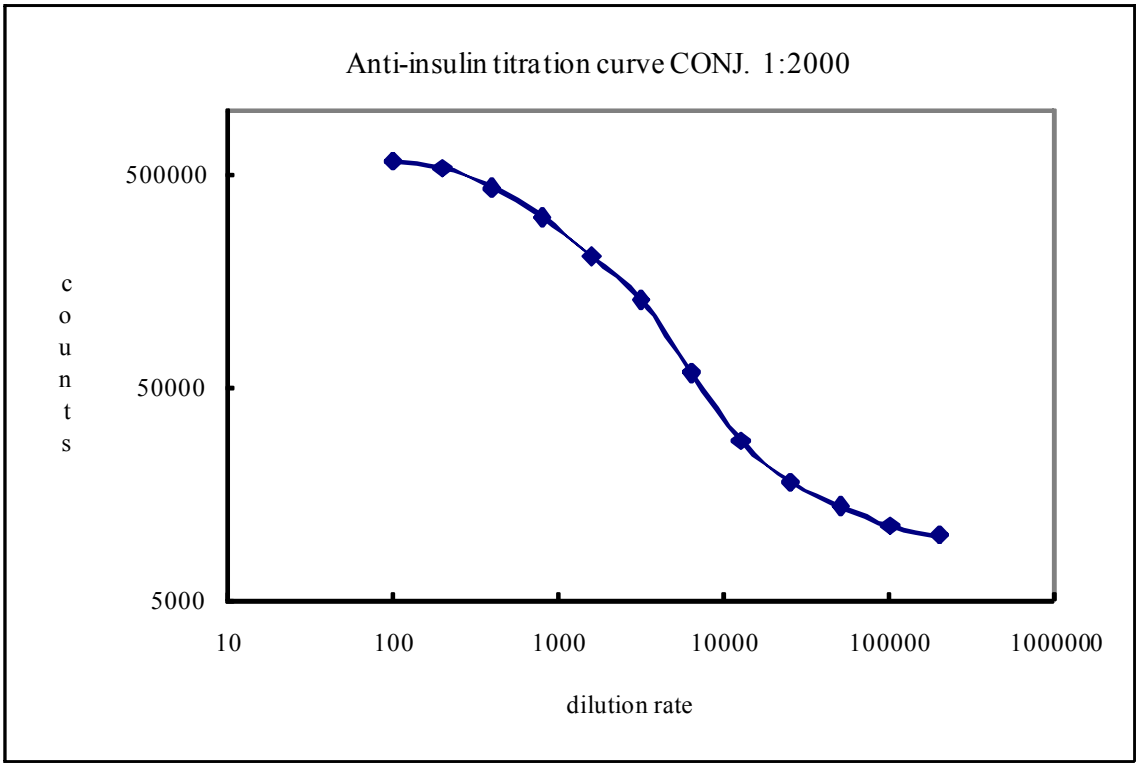
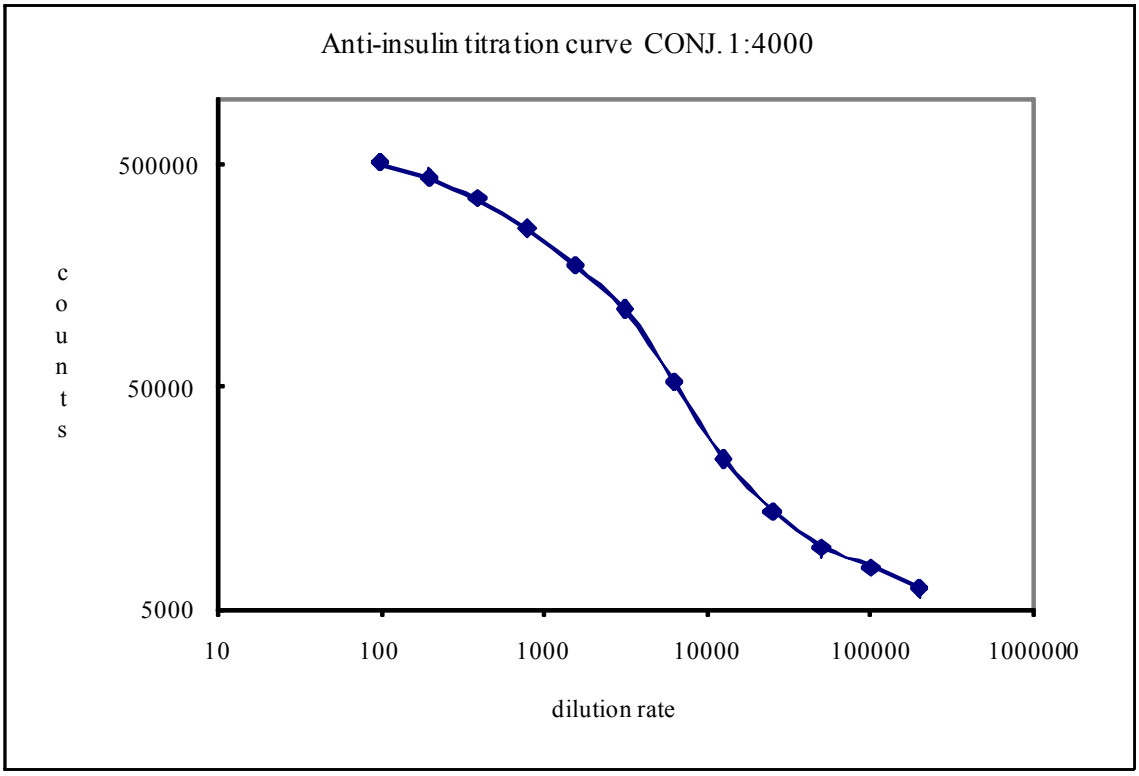


그림 6. Eu-Insulin 농도 결정 그래프

(다) Insulin의 정량법을 위한 코팅 농도 결정

경쟁적 TR-FIA법을 위한 적정 monoclonal anti-human insulin antibody의 농도를 구하기 위해 antibody titration 실험을 실시하였다. 컨쥬게이트를 3가지 농도로 실시하여 항체와 컨쥬게이트와의 반응성을 비교하였다. (그림 7) 3가지 실험결과에서 1차 항체의 코팅 농도는 1:3000으로 결정되었다.


Anti-insulin titration curve CONJ. 1:2000
500000
50000
5000
counts
10
100
1000
10000
100000
1000000
dilution rate


Anti-insulin titration curve CONJ. 1:4000
500000
50000
5000
counts
10
100
1000
10000
100000
1000000
dilution rate

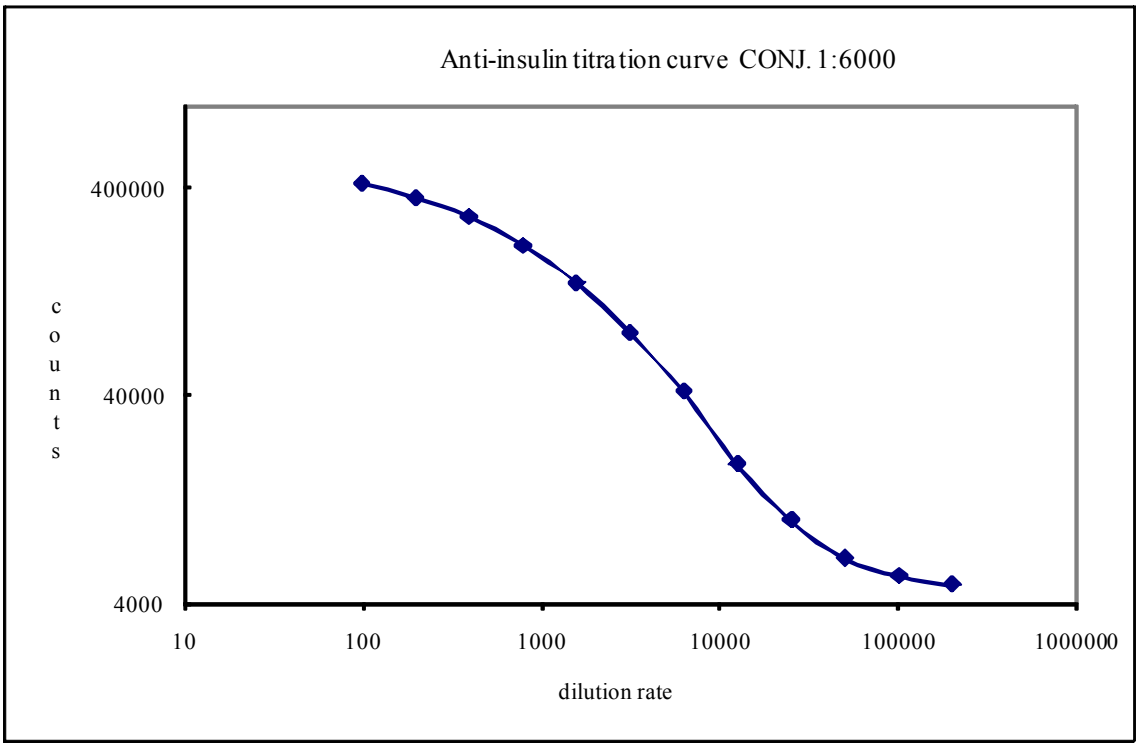


그림 7. monoclonal anti-insulin Ab와 conjugate의 titration curve

(라) Insulin 정량을 위한 표준적정곡선 작성

Eu labeled insulin을 사용하여 경쟁적 TR-FIA법을 수행하였다. 약술하자면, 1:3000의 희석배율로 희석된 monoclonal anti-insulin antibody가 흡착된 96 plate를 2% BSA로 blocking 후, 여러 농도로 조정된 human TNF-a를 첨가하고, 동시에 1:50000배 희석된 Eu-labeled insulin을 첨가하여 37도씨에서 1시간 반응시켰다. 반응 완료 후 각 well을 세척하고 enhancement solution을 첨가하고 10분 동안 반응 시킨 후 Victor2D 기계로 조사 후 insulin에 대한 표준적정곡선을 완성하였다. (그림 8) insulin에 대한 표준적정곡선의 감도는 TNF-a와 마찬가지로 0.7-100ng/ml로 비교적 감도가 다른 kit의 정량 시스템인 ELISA에 비해 떨어진다. 하지만 TNF-a와 마찬가지로 델피아로서의 인슐린의 정량 시스템은 그 자체로 가치가 있으며, 국내에선 전무한 실험 시스템이다. 이 정량시스템은 표준적정곡선을 보완하여 더욱 감도가 좋고 안정적인 정량 시스템을 갖추어야 할 것이라고 사료되었으며, 이를 이용하여 현재 실험실에서 정량 실험에 적용하여 실시하고 있다.

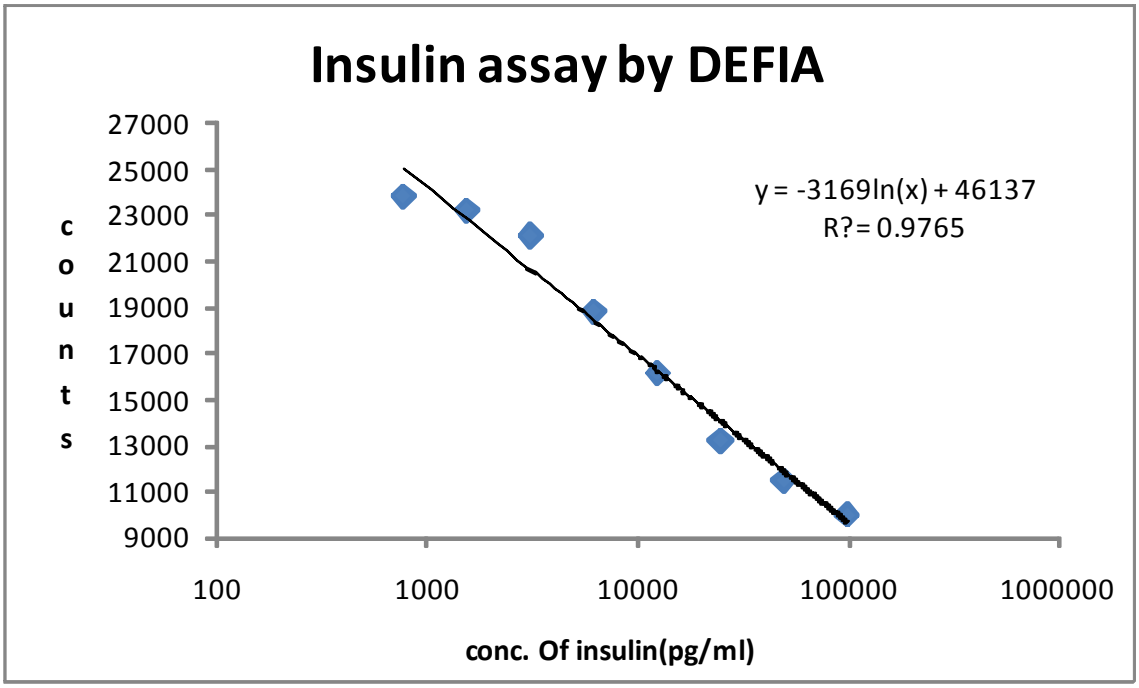


그림 8. 인슐린 정량을 위한 표준적정곡선

제 2 절 제 2 세부과제

1. 세부과제 목표 및 내용 (책임자: 윤택준)

목 표	내용 및 범위
- 키트 개발을 위한 E1S에 대한 ELISA법 개발 및 평가	1. 시료내의 E1S 측정을 위한 ELISA법 개발 1) E1G-enzyme conjugate 합성 2) E1S에 대한 항체를 이용한 경쟁성 (competitive) solid-phase법 개발 3) 개발된 방법에 대한 평가(evaluation) 2. E1S 정량법에서 DELFIA와 ELISA의 비교 1) Clone 155와 E1G-HRP와의 반응성 및 역가 확인 2) 정량 범위 및 표준적정곡선의 안정성 비교 3. ELISA법에서 실제뇨를 이용한 표준적정곡선 4. ELISA법으로 실제뇨 샘플 정량 결과값과 DELFIA법과의 정량값 비교

2. 연구개발 방법

가. 목표: 키트 개발을 위한 ELISA법 개발 및 평가

1차년도에 개발된 E1S를 정량할 수 있는 DELFIA 시스템과 비슷한 감도를 가진 ELISA 시스템을 개발하는 것을 목표로 한다. 현재 DELFIA법은 유럽 등지에는 많이 퍼져있는 흔한 면역분석법 중 하나이지만 국내에는 적용하는 곳이 손에 꼽을 정도로 널리 알려져 있지 않다. 물론 델피아법이 엘라이자법보다 많은 장점과 강점을 가지고 있지만 값비싼 장비가 필요한 델피아법보다는 많고 다양한 곳에서 디텍션을 할 수 있는 엘라이자법의 개발이 필요하다고 사료된다.

나. 시료내의 E1S 측정을 위한 ELISA법 개발

(1) E1G-enzyme conjugate 합성

경쟁적 E1S 정량에 필요한 conjugate를 제조하기 위해 HRP와 E1G를 합성한다. HRP와 E1G를 합성시키는 방법은 A.Stefanakis(Animal Reproduction Science, Greece, 2000)의 방법으로 하되, 합성하는 물질이 스테로이드 호르몬인 점을 감안하여 넣는 양과 인큐베이션 시간을 수정하여 합성하였다.

(2) E1S에 대한 항체를 이용한 경쟁성 (competitive) solid-phase법 개발

이스라엘에서 새로온 Clone 155 항체를 사용하여 합성된 HRP-E1G와 E1G가 경쟁하는 면역분석법을 개발한다. 먼저 Clone 155와 HRP-E1G와의 역가를 조사한 다음 코팅 농도와 conjugate의 희석배율을 결정한다. 결정된 조건으로 실험을 진행하는데 E1S을 일정비율의 농도로 희석하여 conjugate와 경쟁반응을 시키고 TMB Solution을 처리하여 발색시켜 디텍션하는 방법으로 ELISA 정량 시스템을 개발한다.

(3) 개발된 방법에 대한 평가(evaluation)

개발된 ELISA법의 정확성과 안정성을 평가하기 위하여 intra-, inter-assay를 여러 번, 여러 날에 걸쳐 실시한다. 비교적 높은 농도, 중간 농도, 비교적 낮은 농도의 3가지 농도를 결정하여 스텐다드와는 따로 희석을 거쳐 나온 결과값을 표준적정곡선에 비교하여 값을 산출한다.

다. E1S 측정 가능한 두 정량 시스템 DELFIA와 ELISA법 비교

(1) Clone 155와 E1G-HRP와의 반응성 및 역가 확인

기존의 DELFIA 시스템에서 사용하던 Clone 155와의 반응성을 알아보기 위해 항체 역가 측정 실험을 실시한다. 새로온 항체는 물에 잘 녹아 정량 시스템 확립이 용이하였으나, 기존에 있던 항체는 물에 잘 녹지 않아 정량시스템 설정 초기부터 많은 어려움을 겪었다. 따라서 conjugate의 반응성이 다를 수 있으므로 역가 확인 실험은 필요하다고 사료된다.

(2) 정량 범위 및 표준적정곡선의 안정성 비교

델피아 시스템과 엘라이자 시스템의 정량 범위인 감도와 표준적정곡선의 안정성을 비교하기 위해 두 시스템의 표준적정곡선을 다양한 조건으로 작성하여 비교한다. 표준적정곡선의 정량 범위를 위, 아래 농도로 2배씩 늘리거나, conjugate의 양을 다르게 하여 실험을 진행시켜 안정성을 검토하였다.

라. ELISA법의 실제뇨를 이용한 표준적정곡선 작성

델피아법과 마찬가지로 인터널 스텐다드 커브를 써서 정량 실험을 진행해야 하므로 실제 비임신뇨를 가지고 표준적정곡선을 작성하는 실험이 필요하다고 사료된다. 100배, 50배의 두가지 희석배율로 비임신뇨를 희석하여 표준적정곡선의 버퍼로 사용한다.

마. ELISA법으로 실제뇨 샘플 정량 결과값과 DELFIA법과의 정량값 비교

표준적정곡선이 작성되었으므로 실제뇨를 엘라이자 시스템에서 정량하는 실험을 실시한다. 돼지뇨속의 E1S의 농도를 측정하고 그 결과를 델피아 시스템에서 정량한 값이랑 비교하여 두 시스템의 차이점과 공통점을 분석한다.

3. 연구개발 내용 및 결과

o 2차년도 (2007)

연 구 기 관	연 구 책 임 자	소요예산 (천원)
유한대학	윤택준	20,000

가. 시료내의 E1S 측정을 위한 ELISA법 개발

(1) E1G-enzyme conjugate 합성

E1G에 효소 Horse radishperoxidase(HRP)를 conjugation시키는 것은 A.Stefanakis(Animal Reproduction Science, Greece, 2000)의 방법을 수정하여 실시하였다.

실험방법을 약술하면 다음과 같다. Conjugation Buffer인 0.1 M MES (2-[N-morpholino]ethane sulfonic acid) buffer 300 ul에 E1-3-glucuronide 5 mg에 4 mg의 ECD (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride)를 헌합 후, 바로 Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) 5 mg을 첨가하여 상온에서 1시간 약하게 교반하면서 urea가 생성되는 것을 관찰하였다. 그 후, ECD를 불활성화 하기 위하여 최종농도 20

mM이 되게 2-mercaptoethanol을 첨가하였다. 원심분리를 통하여 염을 제함으로서 Semi-stable amine-reactive NHS este의 제조를 완성하였다. (그림 1)

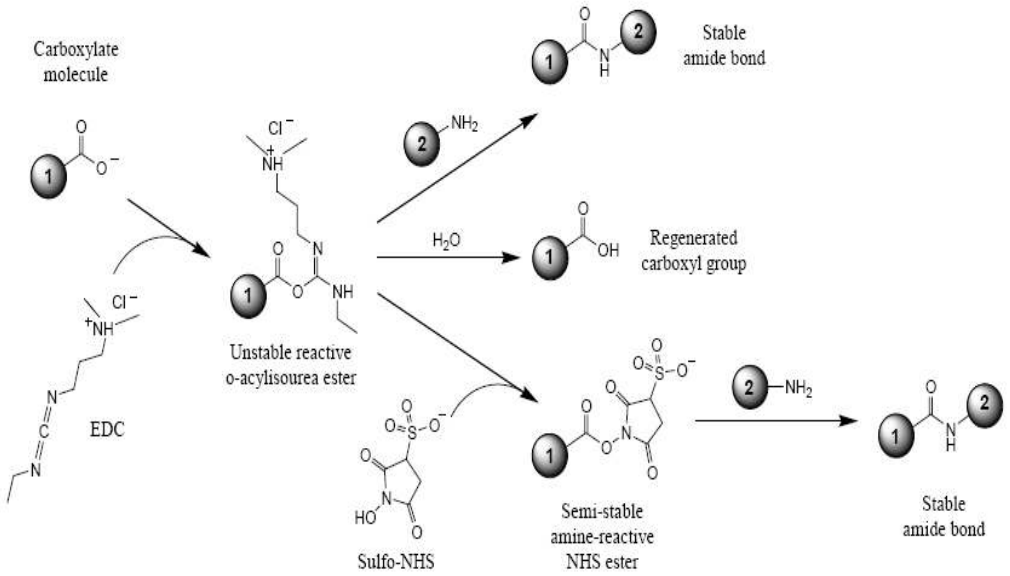


그림 1. Reactions involving EDC, including activation as an NHS ester

그 후, Carbonate-Bicarbonate Buffer(pH9.5)에 용해된 1 mg의 HRP에 Semi-stable amine-reactive NHS ester를 첨가하여 2시간 동안 약하게 교반하였다. 교반이 완료된 E1G-HRP를 PBS buffer (pH7.4)을 이용하여 투석하였다. 투석 완료 후, 반응하지 않은 E1G의 제거를 위하여 gel filtration을 실시하였다. 용출 buffer로는 PBS를 이용하였으며 용출 된 각 분획은 단백질정량을 통하여 HRP를 포함하는 분획을 수집하였다.

(2) E1S에 대한 항체를 이용한 경쟁성(competitive) solid-phase법 개발

(가) HRP-congugate의 농도 결정

성공적인 경쟁적 ELISA을 위하여 첫 번째로 실시한 실험은 위한 HRP-conjugate의 농도와 항체 coating 조건의 결정이었다. 즉, 10 ug/ml - 9.8 ng/ml까지 여러 농도로 조정된 anti-E1G Ab를 coating buffer (0.1 M sodium carbonate buffer, pH 9.5)에 희석하여 96 microwell plate에 100 µl 씩 분주 후 4℃에서 overnight coating 시켰다. 각 well은 washing buffer (PBS-0.05% Tween20; PBS-T)로 3회 세척 후 3% Skim milk를 이용하여 blocking 시켰다. 여기에 미리 준비한 HRP-conjugate를 여러 농도(100 - 12,800배)로 처리 후 상온에

서 1시간 반응시킨 후 세척하고 기질용액(TMB)을 넣고 30분 반응시킨 후 2 M H2SO4로 반응을 정지시키고, ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 표 1와 같은 결과를 얻었다.

표 1. 항체와 cojugate의 농도 결정

항체 HRP 희석	10 ug/ml	5 ug/ml	2.5 ug/ml	1.25 ug/ml	625 ng/ml	313 ng/ml	156 ng/ml	78 ng/ml	39 ng/ml	19 ng/ml	9.8 ng/ml	4.9 ng/ml
100	over	over	over	over	2.986	2.369	1.715	1.305	1.089	0.869	0.365	0.128
200	over	over	over	over	2.889	2.125	1.562	0.986	0.789	0.541	0.245	0.115
400	2.955	2.922	2.856	2.805	2.789	1.782	1.236	0.784	0.658	0.321	0.21	0.132
800	2.886	2.802	2.756	2.644	2.548	1.325	1.000	0.621	0.436	0.245	0.145	0.125
1600	2.756	2.568	2.459	2.335	2.221	1.105	0.789	0.522	0.331	0.174	0.125	0.124
3200	2.669	2.456	2.125	1.831	1.598	1.002	0.544	0.321	0.242	0.122	0.126	0.126
6400	2.387	2.006	1.756	1.423	1.002	0.899	0.322	0.221	0.133	0.128	0.130	0.102
12800	1.995	1.125	0.789	0.671	0.589	0.455	0.215	0.133	0.121	0.120	0.124	0.125

실험결과, 2.5-1.25 ug/ml의 항체를 100 ul coating하고 cojugate의 농도는 800-3200배 사이에서 가장 이상적인 항체와 conjugate의 반응성이 좋은 것으로 생각되었고, 따라서 잠정적으로 항체의 coating 조건은 2 ug/ml, conjugate의 농도는 2000배로 결정하였다.

(나) HRP-congugate와 standard의 경쟁성 확인

HRP-congugate와 standard인 E1S와의 경쟁성 반응을 조사하기 위하여 500 ug/ml부터 19 ng/ml의 항체를 coating 시킨 후, conjugate의 농도는 2000배로 고정하여 처리하였다. Conjugate와 경쟁하여 반응하는 E1S의 농도는 100 ng/ml로 하였으며 실험결과는 그림 2에 제시하였다.

그 결과, 1.25 ug/ml 농도까지의 항체 coating 조건까지는 최고 OD 값을 보였고, 표지물질로서 100 ng/ml의 E1S가 첨가된 경우에도 1.25 ug/ml 농도의 항체 조건에서 가장 높은 경쟁반응을 보였기에 항체의 적정농도는 1.25 ug/ml의 항체를 100 ul/well 각 well에 coating 하기로 결정하였다. (그림 2)

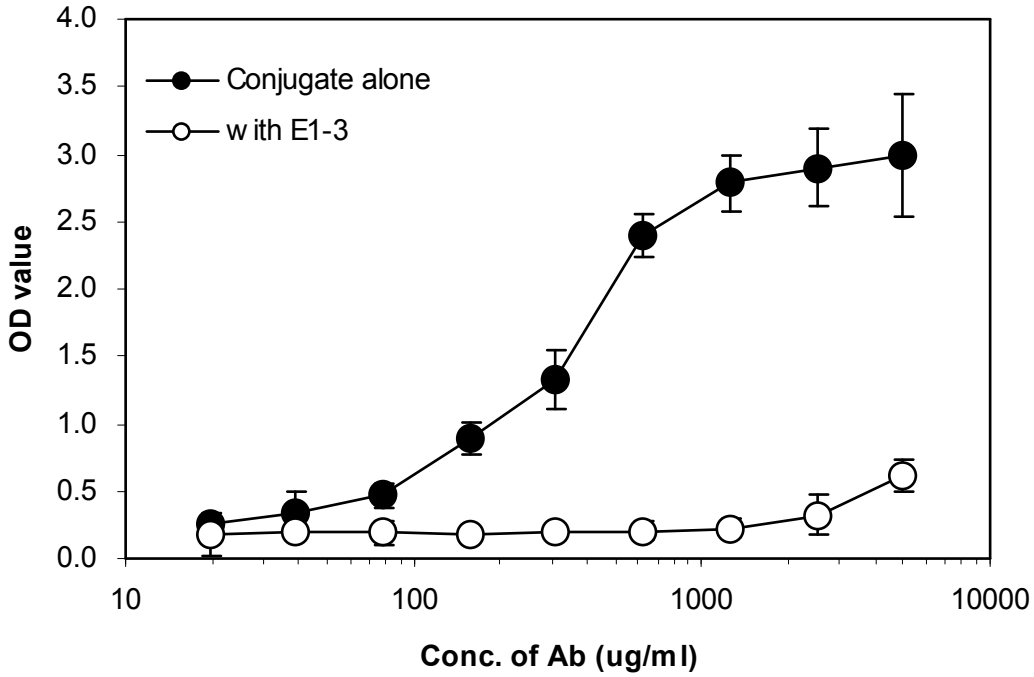


그림 2. Conjugate와 standard와의 경쟁반응 조사

(다) E1G에 대한 항체를 이용한 경쟁성(competitive) solid-phase법 개발

HRP를 표지시킨 E1G-HRP를 사용하여 경쟁적 ELISA법을 수행하였다.

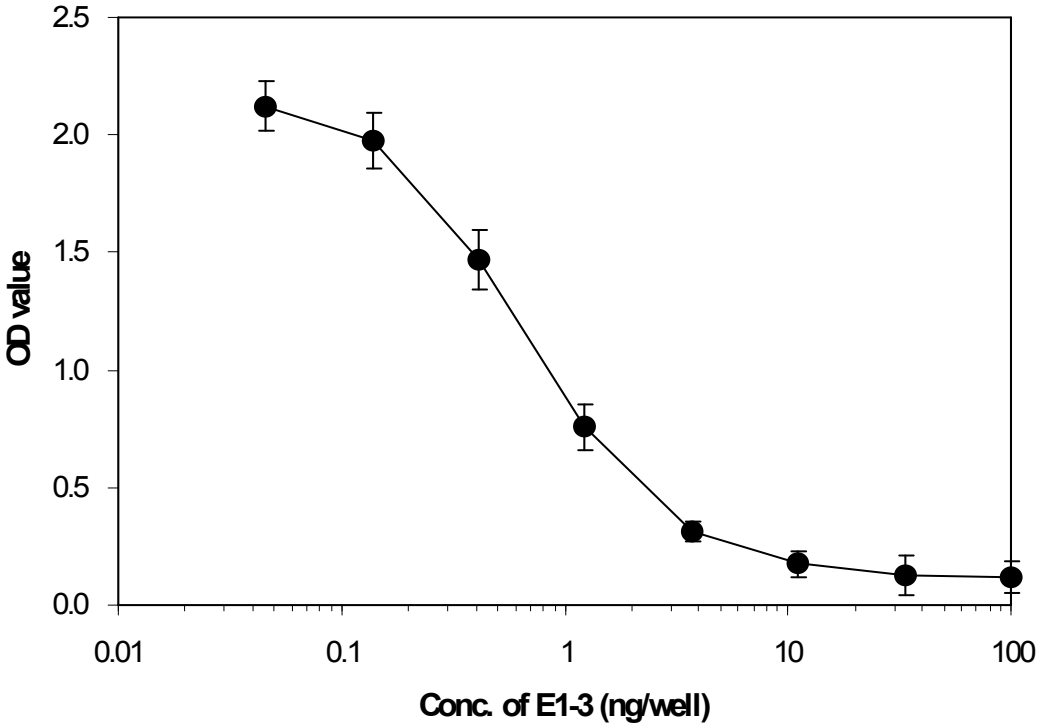


그림 3. 경쟁적 ELISA법에 의한 E1S의 표준곡선

약술하면, E1G에 대한 항체가 흡착된 ELISA plate를 3% skim milk로 blocking 후, 일정농도로 희석된 E1G-HRP와 표준물질로서 여러농도로 조정된 E1S를 동시에 첨가하여 경쟁적인 항원·항체반응을 상온에서 2시간 반응시켰다. 반응 완료 후 각 well을 세척하고 발색을 위한 기질로서 TMB를 사용하였고, H2SO4로 반응을 정지시킨 후, ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정 후 E1S에 대한 표준곡선을 완성하였다. (그림 3) 결과에 나타난 바와 같이 본 표준곡선에서 E1S의 측정범위는 0.1 - 10 ng/well이었다. 경쟁적 ELISA 혹은 sandwich ELISA에 의한 면역분석법에서 측정 감도는 항체의 특이성 혹은 affinity에 의하여 영향을 받는 것으로 알려져 있고, 실험결과의 경쟁적 ELISA에 의한 분석방법은 일반적으로 단일크론항체에 의한 sandwith ELISA법에 비하여는 낮은 감도를 보여주는 것으로 보고되고 있다. 비록 이 결과가 감도적인 측면에서 Europium을 이용한 형광분석법에 비하여 낮은 감도를 보여주고 있으나 E1G-HRP의 coupling법을 개선한다면, 즉, free한 E1G의 농도를 좀 더 제거한다면 더 좋은 감도를 가지는 표준곡선을 얻을 수 있을 것으로 생각한다.

(3) 개발된 방법에 대한 평가(evaluation)

(가) 반복성 및 회수율 조사

본 assay system의 정확성을 평가하기 위하여 시료 중 E1S의 농도가 높은 것, 중간 것 및 낮은 것의 3개로 구분하여 한 시료 당 10회씩 반복 측정하는 intra-assay와 6회의 다른 시간에 동일한 실험을 행한 inter-assay를 실시하였다. 반복 실험 후 본 assay system의 재현성은 각 농도에 대한 실험결과를 토대로 coefficient variation (C.V)을 산출함으로 결정하였다. 회수율 조사는 PBS에 각각 200, 800 pg 및 3000 ng/well로 E1-3를 첨가 후 assay 결과 얻은 EN-SP의 함량을 조사하여, 첨가 농도에 대한 bias(%)로 표시하였다.

Intra-assay에 대한 실험 결과 E1S 정량을 위한 범위인 0.15 - 20 ng/ml 에서 임의적으로 비교적 높은 함량의 3 ng, 중간인 800 pg, 그리고 비교적 낮은 함량인 200 pg/ml 의 3가지로 함량을 정하였다. 분석을 위한 각 함량별 시료는 각각 10개씩 측정하였고 E1-3 정량을 위한 표준곡선에 적용하여 나온 결과를 표 2에 제시하였다.

표 2. E1-3의 경쟁반응에 의한 Intra- and inter-assay 결과

Group	Expected value (pg/ml)	Observed value Mean ± SD	CV (%)	Recovery (%)	Bias (%)
Intra-assay	3000	3216 ± 290	9.67	107.2	+7.2
	800	845 ± 75	8.75	105.6	+5.6
	200	191 ± 17	8.50	95.5	-4.5
Inter-assay	3000	3302 ± 296	9.87	110.1	+10.1
	800	789 ± 69	8.63	98.6	-1.4
	200	187 ± 17	8.50	93.5	-6.5

세 가지 농도의 E1S에 대한 intra-assay의 결과에서 CV 값은 8.50 - 9.67%로 10%이내에 들었고, bias도 -4.5% - +7.2%를 보임으로서 비교적 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/ml 의 모든 경우에서 10%이내로 나타났으며 bias의 값도 3 ng/well의 경우 10.1%를 나타냈으나 800 및 200 pg/ml 의 경우는 10% 이내를 나타내었다. 따라서 E1S에 대한 경쟁적 ELISA 방법은 반복성 및 회수율에서 충분히 E1S의 정량이 가능한 분석법으로 사료되었다.

나. E1S 정량법에서 DELFIA와 ELISA의 비교

(1) Clone 155와 E1G-HRP와의 반응성 및 역가 확인

이스라엘로부터 제공받은 E1G에 대한 항체 Clone 155를 사용하여 immunoplate에 코팅한 후, 충분히 코팅될 수 있도록 2시간 동안 incubation하였고, 이 후 non-specific binding을 제거하기 위해 5% Slim milk가 첨가된 생리식염수로 Blocking하였다. 이 후 크기배제컬럼을 사용하여 분리 정제된 Conjugated HRP-E1G를 첨가하여 코팅된 1차 항체와 반응하도록 하였다. 이 후 TMB Solution과 Stop Solution을 첨가한 후 O.D Value reader기로 측정하였다. (그림 4)

유한대학에서 개발한 E1S의 정량의 ELISA법은 밑의 그래프에도 나와 있듯이 최대 50ug/ml부터 최소 50pg/ml의 농도까지 정량이 가능하다. 이는 TR-FIA법과 비교하여 Clone155와 Conjugate의 affinity binding과 기술의 이용면에서 그 작용이 전혀 부족하지 않는 것으로 사료되며, Clone 155의 ELISA 정량 실험에서의 코팅 농도를 1:1000으로 설정하였다.

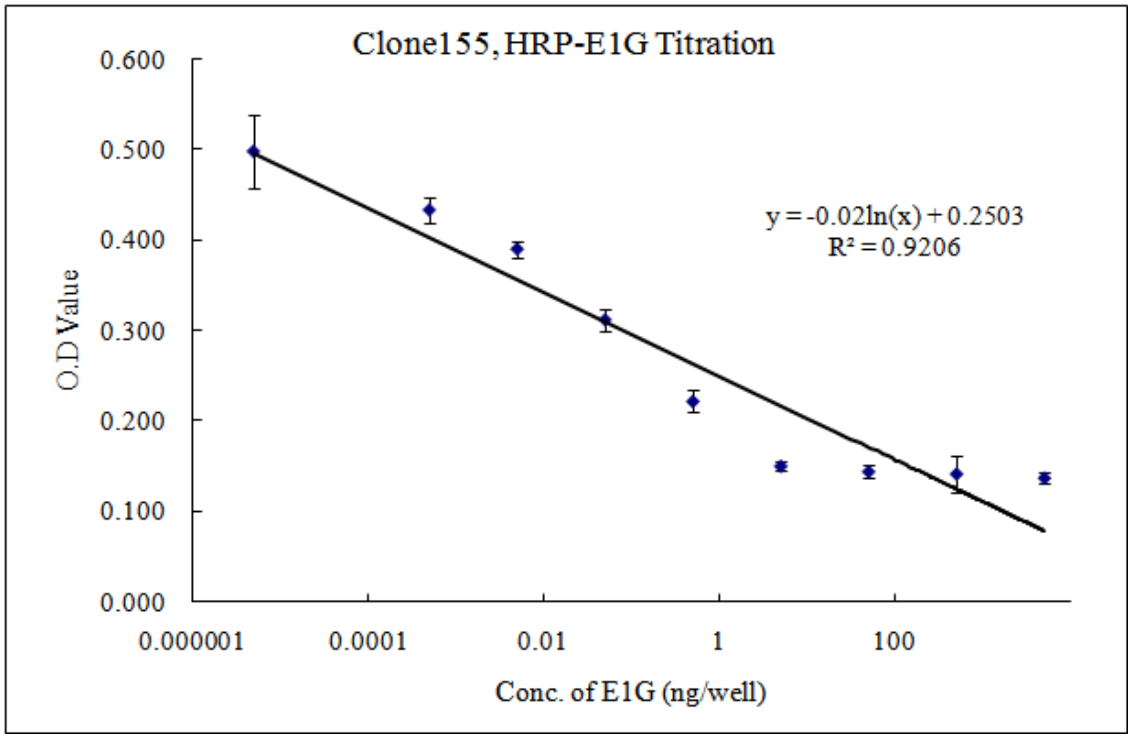


그림 4. 경쟁적 ELISA법에 의한 Titration 측정

(2) 정량 범위 및 표준적정곡선의 안정성 비교

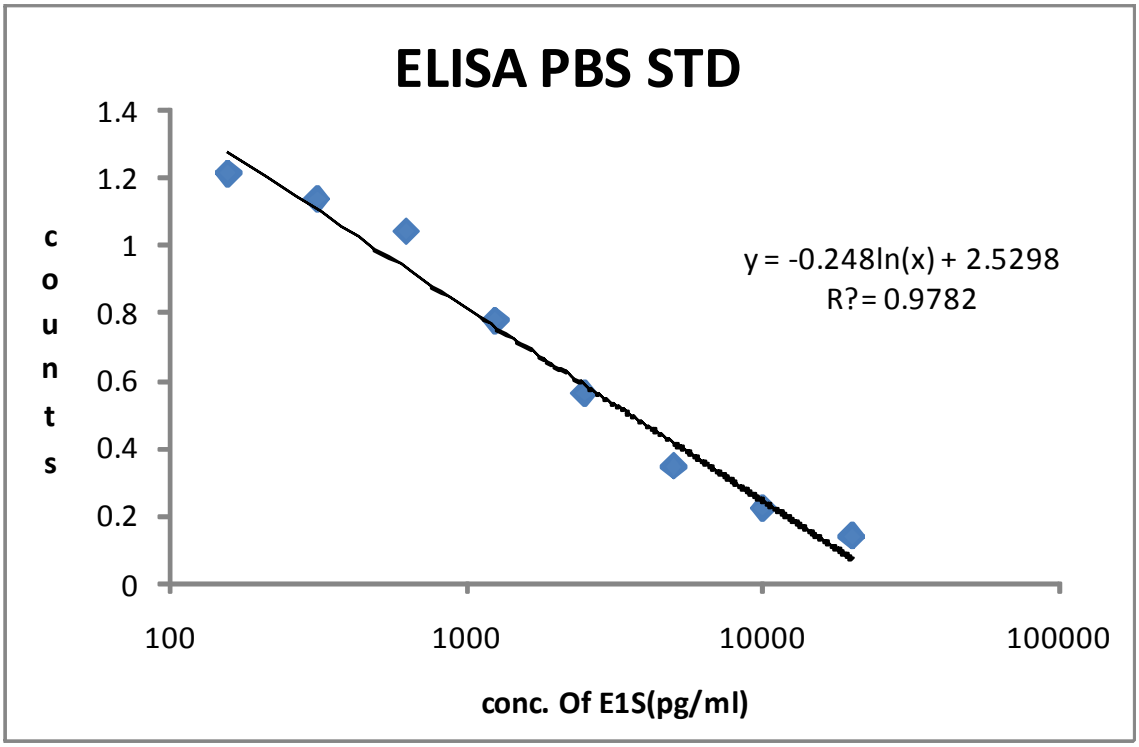
E1S를 정량할 수 있는 델피아법의 정량 범위와 개발된 엘라이자의 정량 범위의 비교는 실제 농가에 서비스 또는 다른 실험실에서의 응용 차원에서 매우 중요하다. 델피아 기계를 사용하는 TR-FIA법은 면역분석법의 원리상 ELISA법보다 그 감도나 안정성, 활용면에서 뛰어나지만, 기계 장비가 비싸고 국내에서는 아직까지 널리 알려지지 않은 점을 감안할 때 엘라이자법의 개발과 그 정량 범위, 표준적정곡선의 안정성의 확인은 국내 활용차원에서 의미가 있다고 할 수 있다. (표 3) E1S를 정량할 수 있는 델피아법의 정량 범위는 0.15 ~ 20ng/ml이고, 개발된 엘라이자법의 정량범위 또한 마찬가지로 0.15 ~ 20ng/ml로 엘라이자법이 감도면에서 델피아법보다 떨어지지 않는다. 또한 리커버리 테스트를 통한 안정성 실험에서도 bias가 10%를 넘기는 경우가 거의 없을 만큼 표준적정곡선과 그 정량법이 안정되어 있다는 것을 알 수 있다.

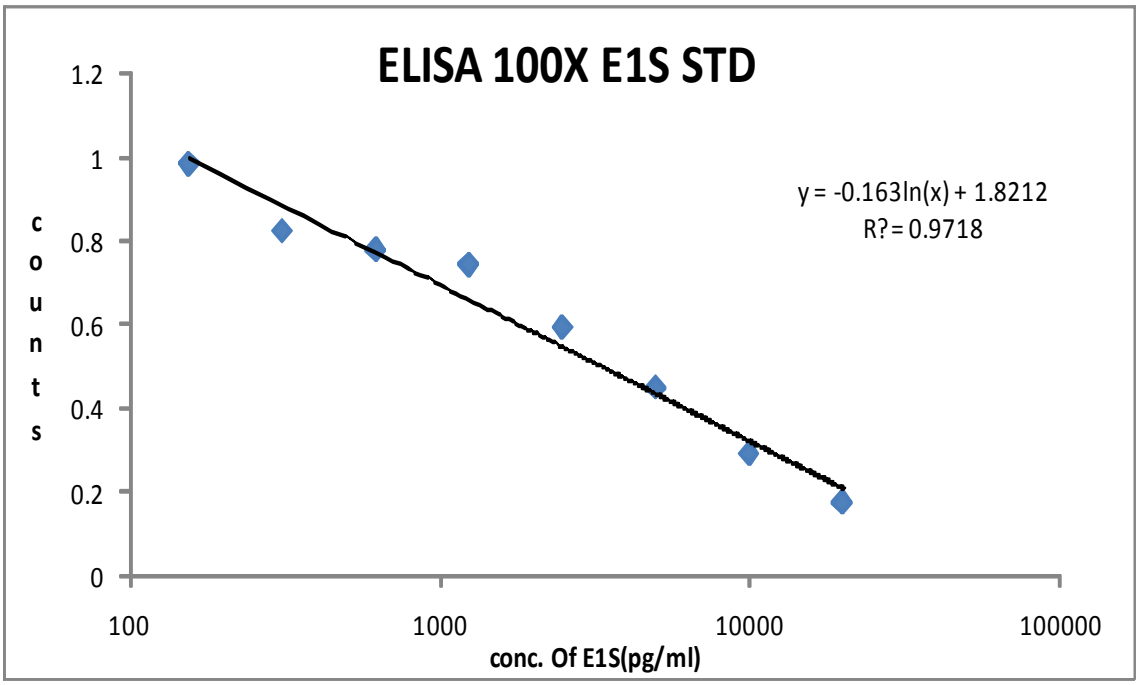
표 3. E1S 정량을 위한 DELFIA법과 ELISA법의 비교

E1S 정량법	감도(ng/ml)	실험 소요 시간	필요 장비	국내 사용 여부
DELFIA	0.15-20	6시간	VICTOR 2D	X
ELISA	0.15-20	7시간	OD reader	O

다. ELISA법에서 실제뇨를 이용한 표준적정곡선

엘라이자법도 델피아법과 마찬가지로 실제 샘플에서 E1S를 측정하기 위해서는 오줌의 여러 가지 영향을 주는 성분들도 함께 정량 값에서 고려를 해야 하기 때문에 인터널 스텐다드 커브를 작성해야 한다. 돼지의 비임신이 확실한 뇨를 가지로 50배, 100배의 희석배율로 표준적정곡선을 작성하였다. 표준적정곡선을 작성한 두 희석배율 모두 PBS 버퍼에서 작성한 표준적정곡선과 다른 차이를 보이지 않았다. 이는 E1S를 정량할 수 있는 ELISA법으로 실제뇨를 정량하는데 있어서 인터널 스텐다드 커브를 작성하여 정량값을 계산하는데 문제가 없는 것으로 사료된다.


ELISA PBS STD
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
counts
y = -0.248ln(x) + 2.5298
R? = 0.9782
100
1000
10000
100000
conc. Of E1S(pg/ml)


ELISA 100X E1S STD
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
counts
y = -0.163ln(x) + 1.8212
R? = 0.9718
100
1000
10000
100000
conc. Of E1S(pg/ml)

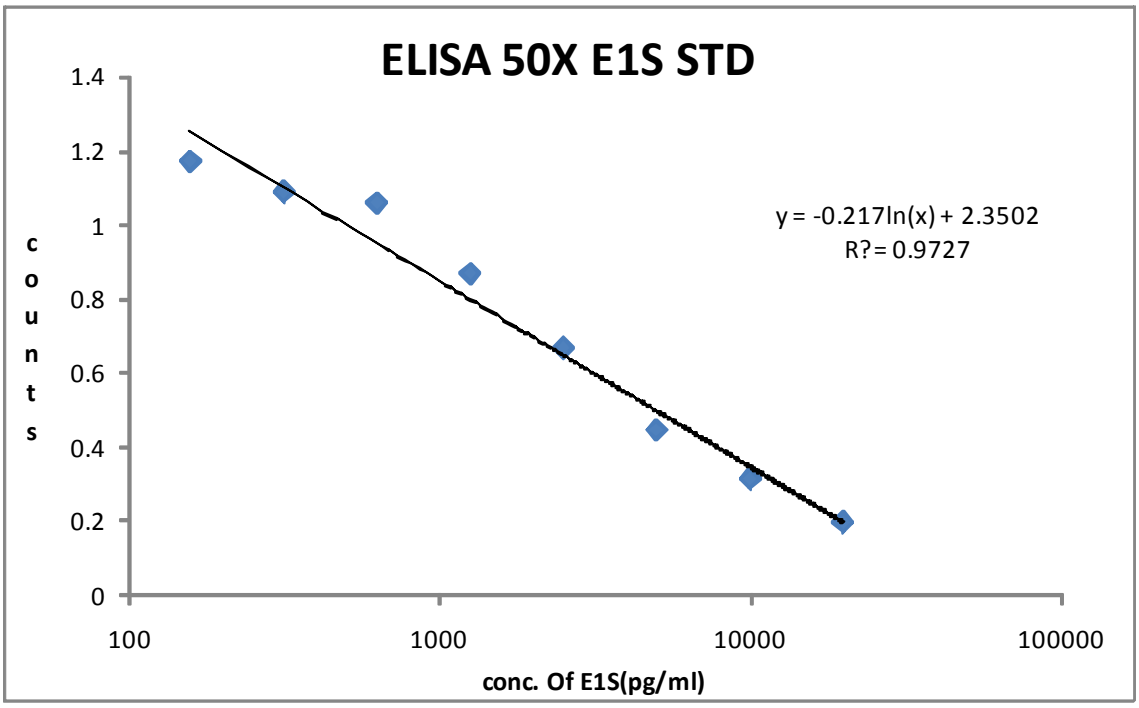


그림 5. 여러 가지 희석배율로 작성한 E1S에 대한 ELISA 표준적정곡선

라. ELISA법으로 실제뇨 샘플 정량 결과값과 DELFIA법과의 정량값 비교

상기의 인터널 스텐다드 커브를 적용하여 엘라이자 시스템으로 실제뇨의 E1S를 측정하였다. 희석배율은 델피아 시스템에서도 적용되는 50배 희석배율을 적용하였으며, Clone 155의 코팅 농도는 1:1000이고, Conjugate(HRP-E1G)는 1:200으로 희석해서 사용하였다. 비교적 깨끗하고 보관이 잘되어진 실제뇨 그룹 19부터 25까지의 샘플 중 임신뇨, 비임신뇨 몇가지를 선별하여 50배 희석된 비임신뇨 버퍼에서 인터널 스텐다드를 적용하여 E1S의 농도를 델피아법과 엘라이자법으로 각각 구했다. (표 4,5) 임신뇨를 정량한 결과값에서 엘라이자와 델피아 정량결과는 각 시스템에 따라 조금씩 차이는 있지만 각 샘플마다 비교적 비슷한 정량값을 나타내었다. 두 시스템으로 나온 E1S 정량 결과값 표준편차의 평균은 10.49ng/ml로 높은 농도의 E1S를 포함하고 있는 샘플을 정량했을 때의 차이 때문에 평균이 높게 나왔지만, 임신진단 기준선 농도에 근접할수록 두 시스템의 정량값에는 큰 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다. 비임신뇨를 정량한 결과도 마찬가지로 50배 희석하였을 때 OUT 카운트가 나온 결과는 두 시스템에서 모두 나왔으며, 결과값도 서로 비슷하게 나왔다. 표준편차의 평균은 1.65ng/ml로 임신뇨에서 정량한 것보다 낮게 나왔으며, 이는 낮은 농도를 정량하는데 있어서도 엘라이자 시스템이 델피아 시스템 못지않게 감도가 좋

다는 것으로 사료된다.

표 4. 엘라이자법과 델피아법으로 정량한 임신뇨 E1S 농도 비교

번호	축번 (그룹)	ELISA 정량값 (ng/ml)	DELFIA 정량값 (ng/ml)	표준 편차
1	D5-673(G19)	77.5	76	1.06
2	L10-307(G19)	145	125	14.14
3	D5-673(G19)	60	74	9.90
4	Y11-001(G19)	75	70	3.54
5	Y11-001(G19)	112.5	95	12.37
6	D5-673(G19)	550	600	35.36
7	Y8-140(G20)	47.25	60	9.02
8	Y11-001(G20)	75	90	10.61
9	D8-194(G20)	90	92.5	1.77
10	D8-194(G20)	112.5	120	5.30
11	Y11-001(G20)	100	125	17.68
12	Y11-001(G20)	72.5	72.5	0.00
13	L8-118(G20)	165	199.5	24.40
14	D8-194(G21)	25	31.75	4.77
15	L8-158(G21)	149.9	155	3.61
16	Y2701(G22)	95	114	13.44
17	Y2701(G22)	77.5	71.5	4.24
18	Y11-001(G22)	105	80	17.68

표 5. 엘라이자법과 델피아법으로 정량한 비임신뇨 E1S 농도 비교

번호	축번	ELISA 정량값 (ng/ml)	DELFIA 정량값 (ng/ml)	표준 편차
1	Y8-257//2.3(G19)	22	18.5	2.47
2	Y8-246//2.10(G20)	OUT	OUT	-
3	L8-208//2.9(G20)	30	27.5	1.77
4	Y8-208//2.2(G20)	11.25	15.5	3.01
5	Y8-257//2.9(G20)	10.35	16.5	4.35
6	Y8-257//2.5(G21)	OUT	OUT	-
7	Y8-246//2.5(G21)	OUT	OUT	-
8	Y8-208//2.5(G21)	OUT	OUT	-
9	D8-193//1.8(G24)	14.95	9.5	3.85
10	Y8-257//1.29(G24)	15.95	16.75	0.57
11	D8-196//1.29(G24)	OUT	OUT	-
12	Y8-208//1.29(G24)	OUT	OUT	-
13	D8-195//1.16(G25)	23.25	19.25	2.83
14	D8-193//1.14(G25)	10.15	14.5	3.08
15	Y8-208//1.6(G25)	8.4	12.5	2.90

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구 목표 및 달성도

가. 1차년도

목표	내용 및 범위	달성도(%)
항체의 특성조사	• 항체의 역가(titer), 특이성(specificity)등을 교차 반응정도 및 ELISA 법으로 조사	100
PG 측정을 위한 면역분석법 (TR-FIA)개발 및 평가	• solid-phase system을 적용한 경쟁성 반응원리에 의한 분석법 • Eu-conjugate는 영국 Cambridge 수의과학연구소의 Geoff.Barnard박사로부터 제공받아 개발	100
E1G 측정을 위한 면역분석법(TR-FIA)개발 및 평가		
E1S 측정을 위한 면역분석법(TR-FIA)개발 및 평가		100
한우 및 돼지뇨 확보	• 임신 및 비임신뇨 확보	100
수정후 한달간 매일의 오줌내 PG 및 E1G, E1S 측정 분석	• 개발된 TR-FIA에 의한 분석	100

나. 2차년도

목 표	내용 및 범위	달성도(%)
Kit(키트) 개발 위한 ELISA 법 개발	• E1G, E1S-enzyme conjugate를 합성하여 E1G에 대한 항체를 이용한 경쟁성(competitive) solid-phase ELISA법 개발	100
한우 임신/비임신 진단 기준치 설정	• 개발된 TR-FIA법에 의한 500두 이상의 시료 분석	70
돼지 임신/비임신 진단 기준치 설정		100
키트 개발을 위한 실제뇨에서의 정량법 확립	• 개발된 TR-FIA 법을 이용한 시료 분석	100
수정 후 한달간 매일의 오줌내 E1S 측정	• 개발된 TR-FIA 법을 이용한 시료 분석	100
한우뇨 임신진단 방법 개발	• 2D를 이용한 한우뇨 임신진단법 개발	80

다. 3차년도

목 표	내용 및 범위	달성도(%)
키트 개발을 위한 실제뇨에서의 정량법 확립	• 개발된 TR-FIA 법에 대한 평가	100
한우뇨 임신진단 방법 개발	•2D를 이용한 타겟 단백질 결정 •2D 조건을 다르게 하여 타겟 단백질 결정 •한우뇨의 다양한 호르몬 대사산물의 연구	70
E1S-BSA 합성과 피복조건 확립	•E1S-BSA 합성 조건 결정 •피복 가능 여부 조사 •피복 조건 확립	100
E1S에 대한 항체에 금입자(gold particle)를 표지시킨 conjugate합성과 이들의 특성 조사를 통한 첨가량 결정	•금입자를 표지시킨 conjugate 합성 조건 및 농도 결정 •키트 개발을 위한 금입자 표지 conjugate 첨가량 조사	100
키트제조를 위한 조건 확립	•실제 키트 제조 및 시험 테스트 •키트 길이 피복 조건 첨가 시료양 설정 및 평가	100
비임신/임신진단 정확도, 안정성 등 평가 조사	•실제 sample을 이용한 임상 테스트 •실제 농가 돼지 뇨를 이용한 임상 테스트	100

제 2 절 관련분야 기술 발전에의 기여도

가. 임신 진단법에 관한 기초 연구 분야

◇ 동물 임신진단 분야 : 국내의 경우 85년-95년도 사이에는 건국대학교 동물자원 연구소 중심으로 임신진단에 관한 연구가 활발하게 이루어졌고 두산연구소에서 임신진단

키트를 개발하여 장영실 상까지 수상한 바가 있다. 그리고 그 후 녹십자 상아와 녹십자수의약품주식회사에서 “제네디아 프로 테스트”라는 소 비임신진단 키트를 개발 시판하여 오고 있으나 최근에는 거의 단절상태에 있다. 더욱이 돼지의 경우는 거의 전무한 실정이다.

사람의 경우와 동물은 대상 물질이 전혀 다르기 때문에 방법론적인 측면에서도 다르다. 사람에 비해 동물용 진단용은 그 수요가 제한되어 있다. 특히 외국의 경우 우리나라와는 달리 수요에 비해 공급이 충분하기 때문에 애써 가축 등에 적용하려고 하는 움직임이 크지가 않다. 그러나 소의 경우 독일등지에서는 상당히 이용을 하고 있으며 대부분 ELISA원리에 입각한 키트를 사용하고 있다. 그러나 오줌내에 있는 대사산물을 측정한 방법은 돼지의 E1S를 제외하고선 거의 전무하다.

◇ 면역분석법(immunoassay)분야 : 면역분석법을 국내에서 전문적으로 연구하는 곳은 거의 전무하다. 사람의 임신진단 및 암 또는 간염진단 키트를 개발하는 일부 제약회사가 있지만 대부분 ELISA법을 적용하고 있으며 본 연구에서 추진하고자 하는 TR-FIA는 전무하다. 단 Wallac회사에서 TR-FIA를 적용한 DELFIA법을 종합병원 임상병리과에 보급하여 호르몬등 분석 목적으로 사용되고 있다. 임상에서의 TR-FIA이용의 수는 점차 증가될 것으로 예상된다.

면역분석법에 관한한 대부분 국외에서 이루어진 방법들이다. 국내 독자적인 개발은 거의 전무하다. 본 연구에서 적용하고자 하는 TR-FIA 경우 Finland(O. H. Meurman et al, 1982)에서 처음으로 개발을 하였고 본 연구의 중심인 steroids호르몬 및 대사산산물에 관한 연구는 이스라엘 와이즈만 연구소의 Fortune Kohen과 영국의 Geoff Barnard박사팀이 가장 활발히 수행하였다

◇ 호르몬 대사 산물에 관한 연구 : WHO지원으로 수행된 사람에 있어서 steroids호르몬의 측정함으로서 배란일정을 예측함으로서 임신조절을 할 수 있는 방법으로 활용하고자 시작이 되어 오줌 또는 침속에 있는 호르몬 특히 오줌 내에 있는 대사산물에 관한 연구가 수행이 된 것이 시발점이다. 이 연구를 가능하게 한 것은 대사산물에 대한 항체가 만들어지고 이것들을 이용하여 면역분석법이 개발된 것이 결정적인 계기였다. 그러나 사람에 비해 동물에 있어서는 돼지의 E1S측정 외에는 보고된 자료가 예상외로

미미하다. 따라서 본 연구의 결과가 이런 면에서 그 의미가 크다. 결론 적으로 가축에 있어서 뇨 중 steroids 대사산물의 생리학적 기능을 규명 하였다는 점과 이를 정량할 수 있는 정량 법을 개발 하였다는 것이 이 연구의 가장 주된 성과라고 사료된다.

나. 기술에의 기여도

◇뇨 중 steroid 대사산물의 생리학적 기능을 처음으로 밝힌바 향후 많은 연구가 기대된다. 특히 호르몬 대사에 관련된 물질의 정량 법 개발 및 미지 물질의 기능 판명에 본 연구의 노하우가 지대한 영향을 끼칠 것이라 사료된다.

◇본 연구로 인해 향후 개발 가능성이 있는 진단용 키트 개발에 더 나은 노하우를 제공 할 수 있다.

◇steroid대사산물의 정량 법을 정립함으로써 관련분야에 새로운 분야를 개척 하였다는 점에서 기여도가 매우 크다고 사료된다.

◇향후 각종 진단 시약이 개발될 경우 본 연구의 결과는 기초자료로써 매우 가치가 있다고 사료된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절. 추가연구의 필요성

본 연구과제의 수행에 있어서 가장 큰 애로 사항은 한우 오줌 속의 단백질 중 임신과 미 임신을 구분 할 수 있는 물질을 찾아 내지 못하였다는 점이다. 2-D전기영동을 이용하여 임신과 미 임신의 오줌 속 단백질의 차이점을 발견해 내지 못하였다는 점은 아쉬운 부분이다. 하지만 한우뇨의 스테로이드 호르몬 대사산물의 연구와 여태까지 연구된 적이 없는 한우뇨의 단백질 패턴의 분석은 비록 임신/비임신을 구분짓는 기준은 되지 못했지만 상당히 큰 의미가 있다고 사료된다. 본 연구의 장점은 샘플의 확보와 관리의 강점이었다. 경북 축산 연구소와 연계하여 키트 개발에 필요한 샘플을 쉽게 다량으로 구할 수가 있었으며, 그에 따른 연구는 어느 정도 성공을 거두었다고 평가된다. 현재 생산해낸 키트의 효율성으로 따져볼 때 이번 연구의 의의는 크다. 따라서 계속 지원이 된다면 기초연구를 보다 심층적으로 수행할 계획이다. 특히 소의 임신진단뿐만 아니라 이번 연구의 노하우를 통해 각종 질병의 진단법 확립을 더욱 용이하게 할 수 있으며, 앞으로의 연구가 세계적으로도 경쟁력 있는 연구가 될 것으로 믿는 바 추가 연구가 지속되기를 간절히 소망한다.

제 2 절. 타 연구에의 응용

본 연구를 통해 뇨 중 steroids 대사산물의 생리학적 기능을 규명함과 동시에 이를 이용하여 진단 키트로써의 개발이라는 두 가지 의미 있는 결과를 도출해 내었다. 본 연구 수행에서 얻은 결과가 응용될 수 있는 사항을 내용별로 요약 하면 :

1) 기초연구 분야

각종 진단에 필요한 저분자 물질을 동정하는데 본 연구의 성과가 기초 자료로써 활용 될 수 있다. 현재 세계적으로 각광받는 Proteomics분야에서 각종 질병에 관련

된 표지 물질이 많이 발견 되고 있다. 이러한 물질을 동정 하는 데에 본연구과제가 기초 자료로써 활용 될 수 있다. 또한 진단 시약 개발에서 가장 중요한 부분인 시료의 농도 설정 문제는 본 연구의 축적된 기술과 경험이 큰 도움이 될 수 있을 것이라 사료된다.

2) 응용분야

본 연구를 통해 생산된 진단 키트의 제작 과정이 향후 진행 가능성이 있는 진단 시약개발에 활용 될 수 있다. 특히 각종 질병의 진단 시약 개발 및 산업화 과정에서 본 연구의 결과가 물질을 제외한 나머지 개발 진행 과정에 큰 도움을 줄 수 있다.

3) 교육분야

본 연구를 통해 개발된 E1S, E1G, PG, TNF-a, Insulin 정량법들은 현재 한동대학교 면역학 실습 수업의 실습 과정으로 교육하고 있다. 최신 기법인 델피아 법과 가장 많이 사용하는 면역 분석법인 엘라이자법의 비교와 돼지 임신진단 테스트, 항체 titration 측정까지 면역분석법의 다양한 실험의 실습을 진행하고 있으며, 매년 80여 명의 학생들이 면역분석법을 교육받고 있다.

제 3 절. 기업화 추진 방향

1. 본 연구를 통해 생산된 돼지 임신 진단용 키트를 통해 돼지의 임신 유무를 정확히 파악할 수 있다. 돼지의 임신 유무의 판단이 조기에 이루어질수록 전체적인 농가의 소득 수준이 향상 될 수 있으므로, 본 연구의 결과물인 임신 진단 키트가 상용화 되어 대량 생산 될시, 기업과 정부의 적극적인 홍보 아래 국가적인 농가 소득 수준의 발전에 이바지함은 물론이며, 꾸준한 소비로 인해 국내 진단 시약 시장이 한층 더 커 질것이라 사료된다.

2. 경제적인 측면으로 돼지의 임신 유무를 판별해 낼 수 있는 본 연구의 결과물은 앞으로의 농가 소득 및 품종 관리에 도움을 제공 할 수 있다. 일례로 돼지의 공태기를

30일 단축할 시 10마리당 년 1마리 이상의 산자를 얻는 효과를 기대 할 수 있으며, 성공 시 연간 30억 원 이상의 매출 효과를 기대 할 수 있다.

3. 본 연구의 가장 큰 장점은 응용범위가 매우 넓다는 점이다. 본 연구의 결과를 활용할 수 있는 분야는 특히 암 및 각종 질병을 진단하는 키트 생산이 있다. 삶의 질이 향상됨에 따라 건강에 대한 관심이 급증 하고 있다. 암 진단 및 각종 질병을 진단하는 키트 생산에 본 연구의 기술 적용이 가능하다. 간편하게 질병을 진단 할 수 있는 키트를 제작함으로써 질병을 초기에 진단 할 수 있으며, 이에 따른 소비는 꾸준히 발생할 것 이라고 사료된다. 또한 암을 포함한 기타 질병의 예방 또는 치료약 개발 연구에 대한 자극 효과를 기대할 수 있다. 따라서 본 연구과제는 진단 시약 제조 분야 중에서도 매우 전망이 밝은 사업 중의 하나이며, 획기적인 사업이 될 수 있을 것으로 사료된다.

4. 본 연구과제의 노하우를 통해 진단 키트가 산업화 될 시 신기술 개발을 통해 산업재산권을 확보 할 수 있으며, 이를 통해 진단시약 시장의 국제적 우위를 선점 할 수 있으며, 신기술 창출에 의한 국가 경쟁력 제고에 막대한 영향을 미칠 수 있을 것이라 사료된다.

5. 본 연구는 외국기관과 공동연구 추진을 통한 기술협력 체제 구축을 기반으로 진행되었으며, 산학협력의 성공적 사례로써 활용 가능성이 있다. 또한 향후 진행 가능성이 있는 산업화적 측면을 고려해 볼 때 본 연구가 인력양성을 활용을 위한초석으로 활용될 수 있다고 사료된다.

6. 본 연구 결과를 토대로 키트를 이미 제조한 (주)레피젠과 참여기업인 (주)미슬바이오텍은 공동으로 키트 제조 연구에 착수하여 더욱 감도가 좋고 발색이 확실한 키트 개발을 하고, 이를 사업화하여 실제 농가에 서비스할 것이다. 먼저 엘라이자나 델피아 시스템으로 농가의 임신 진단 판별 서비스를 우선적으로 실시할 것이다. 다음해인 2010년에는 키트 개선 연구에 성공하여 사업화 할 수 있을 것으로 기대한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

뇨중 대사산물을 정량하고 이를 통해 소와 돼지의 조기 임신 진단 판별에 관한 정보를 중심으로 해외의 핵심적인 문헌을 참고로 하여 정리하였다.

‘

제 1 절 면역분석법을 통한 돼지뇨 내의 Estrone sulphate의 정량

Development and evaluation of a direct enzyme immunoassay for oestrone sulphate in urine as a tool for diagnosis of early pregnancy in swine.

Stefanakis A, Boscos C, Alexopoulos C, Krambovitis E.

Department of Applied Biochemistry and Immunology, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology-Hellas, 711 10 Heraklion, Crete, Greece.

- 1999년 그리스 아테네에 있는 Aristotle University에서 발표한 논문으로 돼지의 뇨 내에서 Estrone sulphate를 EIA법으로 정량한 논문임. 본 연구실에서도 돼지의 뇨 중 미량 성분인 Estrone sulphate의 양을 정량하고 있는 바, 본 연구의 의의를 더욱 제고 시켜 주는 정보라 평가됨.

‘

제 2 절 Europium conjugation을 이용한 Time-resolved fluoroimmunoassay법 개발

Homogeneous time-resolved fluoroimmunoassay of 3,5,3'-triiodo -l-thyronine in human serum by using europium fluorescence energy transfer.

Wang G, Yuan J, Hai X, Matsumoto K.

Department of Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China.

- 2005년 일본 Tokyo의 Waseda University에서 발표한 논문임. Human의 Serum으로 부터 갑상선 관련 호르몬을 정량함에 있어서 Europium을 접합시킨 항체를 사용하여 TR-FIA법에 적용하였음
  - 호르몬과 같은 미량 성분은 체내에서 micro mol이하의 매우 적은 농도로 존재하기에, 감도가 높은 정량법을 적용해야 함. 따라서 용해성이 높은 Estrone이나 Glucronide와 같은 미량성분을 정량함에 있어서 본 실험실에 적용할 수 있는 유용한 정보라 평감됨.

제 3 절 조기 임신 진단을 위한 키트 개발에 관한 정보

Pregnancy Diagnosis in Swine: A Comparison of Two Ultrasound Instruments.

G. W. Almond, W. T. K. Bosu, and G. J. King

Can Vet J. 1985 July; 26(7): 205-208.

- 캐나다의 University of Guelph에서 발표한 학술논문으로서 암퇘지의 혈청내의 Estrone sulphate의 농도를 기준(0.5ng/ml)으로 하여 임신과 미임신의 여부를 판단하는 자료이다.
- Estrone sulphate의 농도가 임신여부 판단의 기준이 된다는 의미에서 본 연구실에서 수행중인 연구의 기초 자료가 된다고 평가됨.

제 7장 참고문헌

1. A. Stefanakis, C. Boscos, C. Alexopoulos, E. Krambovitis
   Development and evaluation of a direst enzyme immunoassay for oestrone sulphate in urine as a tool for diagnosis of early pregnancy in swine. *Animal Reproduction Science 58(2000) 127-135*

2. Hatzidakis,G., Katrakili,K., Krambovitis, E.
   Development of a direct and specific enzyme-immunoassay for the measurement of oestrone sulphate in bovine milk. *J. Reprod. Fertil. 98(1993) 235-240*

3. Saba, N., Hattersley,J.P
   Direct estimation of oestrone sulphate in ssow serum for a rapid pregnancy diagnosis test. *J. Reprod. Fertil. 62(1981) 87-92*

4. Sren, E., Mattioli, M., Gaiani,R., Tamanini, C
   Direct estimation of urine oestrone conjugate for a rapid pregnancy diagnosis in sows *Theriogenology 19(1983) 817-822*

5. Sweeney, H. J., Sutherland, H. R
   Oestrone sulphate for pregnancy diagnosis in sows. *Vet. Rec 121(1987) 23-24*

6. C. Depierreux.,I. Graff., V. Lancelot., M. Denis., A. Vanderplasschen., C. S. Wysen
   Optimization of murine CD8+ Cytotoxic T - lymphocyte Responses to Pseudorabies virus. *J. Immunological Methods 203(1997) 77-88*

7. 김종배
   호르몬 분석
   제1회 Postgraduate Course of Cliniacal Endocrinology, 내분비학회, 2002, 32-59

8. Jong Bae Kim

Ph.D Thesis,1983
Development of Chemiluminescence Immunoassay For The Measurement Of Plasma Steroids and Urinary Steroid Metabolites,

9. E. Soini, H. Kojoia
Time-Resolved Fluorometer for Lanthanide Chelates-A New Generation of Non-isotopic Immunoassay. *Cli. Chem. 29(1983) 65-68*

10. Kohen F, Kim J B, Barnard G, Lindner H R
An assay for urinary estriol-16a-glucuronide based on antibody-enhanced chemiluminescence. *Steroids 36(1980) 405-419*

11. Barbard G J, Collins W P, Kohen F, Lindner H R
The measurement of urinary estriol-16a-glucuronide by a solid-phase chemiluninescence immunoassay. *Journal of Steroid Biochemistry 14(1981) 941-948*

12. Eshaar Z, Kim J B, Barbard G J, Collins W P, Gilad S, Lindner H R, Kohen F
Use of monoclonal antibodies to pregnanediol-3a-glucuronide for the development of solid-phase chemiluminescence immunoassay. *Steroids 38(1981) 89-109*

13. Weerasekera D A, Kim J B, Barnard G J, Collins W P, Kohen F, Lindner H R
Monitoring oarian function by a solid-phase chemiluminescence immunoassay.
Acta Endocrinologica(Kbh) 101(1982) 254-263

14. Barnard G J, Kohen F, Mikola H, Lovgren T
The measurement of estrone-3-glucuronide by a rapid non-separation time-resolved fluoroimmunoassay. *Clinical Chemistry 35(1989) 555-559*

15. Barnard G, O'Reilly C P, Dennis K, Collins W P
A nonseparation, time-resolved fluoroimmunoassay to monitor ovarian function and predict potential fertility in women. *Fertility and Sterility 52(1989) 60-65*

16. Altamirano-Bustamante A, Barnard G, Kohen F
Direct time-resolved fluorescence immunoassay for serum estradiol based on the idiotypic anti-idiotypic appreach. *Jounal of Immunological Method 138(1991) 95-101*

17. Barnard G, Karsilayan H, Kohen F
Idiometric assay: The third way: A non-competitive immunoassay for the measurement of small molecules. *American Journal of Obstetrics and Gynecology 165(1992) 1997-2000*

18. Kesner J S, Knecht E A, Krieg E F, Barnard G, Mikola H J, Kohen F, Gani M M, Colley J
Validations of time-resolved fluoroimmunoassays for urinary estrone 3-glucuronide and pregnanediol 3-glucuronide. *Steroids 59(1994) 205-211*

19. Barnard G, Amir-Zaltsman Y, Lichter S, Gayer B, Kohen F
The measurement of oestrone-3-glucuronide by non-competitive idiometric assay. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 55(1995) 107-114*

20. Barnard G, Osher J, Lichter S, Gayer B, De Boever J, Limor R, Ayalon D, Kohen F
The measurement of progesterone in serum by a non-competitive idiometric assay. *Steroids 60(1995) 824-829*

21. Barnard G, Kohen F
Monitoring ovarian function by the simultaneous time-resolved fluorescence immunoassays of two urinary steroid metabolites. *Clinical Chemistry 44(1998) 1520-1528*

22. MacGregor I, Hope J, Barnard G, Kirby L, Drummond O, Pepper Dm Hornsey V, Barclay R, Bessos H, Turner M, Prowse
Application of a time-resolved fluoroimmunoassay for the analysis of normal prion protein in human blood and its components. *Vox Sanguinis 77(1999) 88-96*

23. Prewse C V, Hornsey V S, Drummond O, MacGregor I R, Pepper D S, Barclay G R, Bethel H, Walker B, Barnard G, Kirby L, Hope J

Preliminary assessment of whole-blood, red-cell and platelet-leucodepleting filters for possible induction of prion release by leucocyte fragmentation during room temperature processing. *British Jounal of Haematology 106(1999) 240-247*

24. Barnard G, Helmick B J, Madden S, Gilbourne C, Patel R K
The measurement of prion protein in bovine brain tissue using differential extraction and DELFIA as a diagnostic test for BSE *Luminescence 15(2000) 357-362*

25. Barnard G, Hopkins L, Dabaghian R, Sy M-S, McConnell I
Urinary prion protein in sheep: Evaluation of the levels of N- and C-terminal fragments as diagnostic markers for scrapie. *Jounal of biological Chemistry(2005) submitted for publication*

26. Davies M, Hopkins L, Lyall J, Burke D, Sargan D, Sy M-S, Barnard G, McConnell I
A point mutation in the ovine PrP gene: consequences for prion detection and PrP^c structure. *Journal of General Virology(2005) submitted for publication*

27. Schiphorst L E M, Collins W P, Royston J R
An estrogen test to determine the times of potential fertility in women. *Gertil. Steril 44(1985) 328*

28. World Health Organizaion Task Force on Methods for the Determination of the Fertile Period
The measurement of urinary steroid glucuronides as indiceds of the fertile period in women. *J Steroid Biochem 17(1982) 695-702*

29. Collins W P,
Biochemical indeces of potential fertility. *Int J Gynec Obstet Suppl 1(1989) 35-43*

30. Barnard G, Kohen F, Mikila H, Lovgren T
Measurement of estrone-3-glucuronide in urine by rapid, homogeneous time-resolved fluoroimmunoassay. *Clinical Chemistry 35(1989) 555-559*

31. Bamberg E, Möstl E, Patzl M, King GJ.
Pregnancy diagnosis by enzyme immunoassay of estrogens in feces from nondomestic species. *J Zoo Wildl 1991; 22: 73-77.*

32. Berkey EV, Kirkpatrick JF, Schaffer NE, Bryant WM, Threlfall WR.
Serum and fecal steroid analysis of ovulation, pregnancy, and parturition in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Zoo Biol 1997; 16: 121-132.*

33. Czekala NM, Gallusser S, Meier JE, Lasley BL.
The development and application of an enzyme immunoasay for urinary estrone conjugates. *Zoo Biol 1986; 5: 1-6.*

34. Hama N, Qi HJ, Dong B, Yasuda S, Murata K, Xian WH, Gondo M.
Reproduction in a pair of Golden monkeys (*Pygathrix roxellana*) at Kobe Oji Zoo. *Int Zoo Yb 1997; 35:266-271.*

35. Hodges JK, Green DI.
The development of an enzyme-immunoassay for urinary pregnanediol-3-gluculonide and its application to reproductive assessment in exotic mammals. *J Zool 1989; 219: 89-99.*

36. Isobe N, Nakao T, Shimada M, Fukumoto Y, Watanabe H, Minami S, Noda A, Yoshimura Y.
Fecal progestagen and estrone during pregnancy in a giraffe: A case report. *J Reprod Dev 2007; 53: 159-164.*

37. Kusuda S, Morikaku K, Kawada K, Ishiwada K, Doi O.
Excretion patterns of fecal progestagens, androgen and estrogens during pregnancy, parturition and postpartum in Okapi (*Okapia johnstoni*). *J Reprod Dev 2007; 53: 143-150.*

38. Munro CJ, Stabenfeldt G.

Development of a microtiter plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J Endcrinol 1984; 101: 41-49.*

39. Munro CJ, Stabenfeldt GH, Cragun JR, Addiego LA, Overstreet JW, Lasley BL. Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. *Clin Chem 1991; 37: 838-844.*

40. French JA, Brewer KJ, Schaffner CM, Schalley J, Hightower-Merritt D, Smith TE, Bell SM.
Urinary steroid and gonadotropin excretion across the reproductive cycle in female Wied''s black tufted-ear marmosets (*Callithrix kuhli*). *Am J Primatol 1996; 40:231-245.*

41. MacGeehan L, Xuebing L, Lori J, Shiqiang H, Aiping W, Czekala NM.
Hormonal and behavioral correlates of estrus in captive giant pandas. *Zoo Biol 2002;21: 449-466.*

42. Daels PF, Ammon DC, Stabenfeldt GH, Liu IKM, Hughes JP, Lasley BL.
Urinary and plasma estrogen conjugates, estradiol and estrone concentrations in nonpregnant and early pregnant mares. *Theriogenology 1991; 35: 1001-1017.*

43. Cupps PT, Anderson LL, Cole HH. The estrous cycle. *In*: Cole HH, Cupps PT (eds.), Reproduction in Domestic Animals. *New York: Academic Press; 1969: 237-238.*

44. Meinecke B, Gips H, Meinecke- Tillmann S.
Progestagen, androgen and estrogen levels of the mare. *Anim Reprod Sci 1987; 12: 255-265.*

45. Rosa HJD, Bryant MJ.
The ''ram effect'' as a way of modifying the reproductive activity in the ewe. *Small Rum Res 2002; 45: 1-16.*

46. Murata K, Tanioka M, Murakami N.
The relationship between the pattern of urinary oestrogen and behavioural changes in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Int Zoo Yb 1986; 24/25: 274-279.*

47. Allen WR, Mathias S, Lennard SN, Greenwood RES.
Serial measurement of peripheral oestrogen and progesterone concentrations in oestrus mares to determine optimum mating time and diagnose ovulation. *Equine Vet J 1995; 27: 460--464.*

48. Hillman RB, Loy RG.
Oestrogen excretion in mares in relation to various reproductive states. *J Reprod Fert 1975; 23 (Suppl): 223--230.*

49. Makawiti DW, Allen WE, Kilpatrick MJ.
Changes in oestrone sulphate concentrations in peripheral plasma of pony mares associated with follicular growth, ovulation and early pregnancy. *J Reprod Fert 1983; 68: 481--487.*

50. Palmer E, Jousset B.
Urinary oestrogen and plasma progesterone levels in non-pregnant mares. *J Reprod Fert 1975; 23 (Suppl): 213-221.*

51. Palmer E, Terqui M.
The measurement of total plasma estrogens during the follicular phase of the mare''s estrous cycle. *Theriogenology 1977; 7: 331-338.*

52. M.H. Gelb, E. Valentin, F. Ghomashchi, M. Lazdunski, G. Lambeau,
Cloning and recombinant expression of a structurally novel human secreted phospholipase A2, *J. Biol. Chem. 275 (2000) 39823-39826.*

53. M. Rouault, J.G. Bollinger, M. Lazdunski, M.H. Gelb, G. Lambeau,
Novel mammalian group XII secreted phospholipase A2 lacking enzymatic activity,

Biochemistry 42 (2003) 11403-11494.

54. M.C. Seeds, D.L. Bowton, R.D. Hite, J.I. Gyves, D.A. Bass, Human eosinophil group IID secretory phospholipase A2 causes surfactant dysfunction, *Chest 123 (2003) 376S- 377S.*

55. J.U. Eskola, T.J. Nevalainen, T.N.-E. Lfvgren, Time-resolved fluoroimmunoassay of human pancreatic phospholipase A2, *Clin. Chem. 29 (1983) 1777-1780.*

56. Boudi A, Giton F, Galons H, Villette JM, Soliman H, Fiet J. Development of a plasma 17-hydroxyprogesterone time resolvedfluorescence immunoassay involving a new biotinylated tracer. *Steroids 2000;65:103-8.*

57. Fiet J, Boudi A, Giton F, Villette JM, Soliman H, Morineau G, et al. Plasma 21-deoxycortisol: comparison of a timeresolved fluoroimmunoassay using a biotinylated tracer with a radioimmunoassay using 125iodine. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000;72:55--60.

58. Fiet J, Giton F, Boudi A, Soliman H, Villette JM, Galons H. Plasma 17-OH pregnenolone: comparison of a time-resolved fluoroimmunoassay using a new tracer 17-OH pregnenolone-3- oxyacetyl-biotine with a radioimmunoassay using 125I 17-OH pregnenolone-3-hemisuccinate-histamine. *Steroids 2001;66:81-6.*

59. Fiet J, Giton F, Boudi A, Vexiau P, Galons H, Raynaud JP. Highly sensitive and specific time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) of cyproterone acetate and free cyproterone. *J Steroid Biochem Mol Biol 2001;75:315-22.*

60. Fiet J, Giton F, Boudou Ph JM, Villette JM, Soliman H, Morineau G, et al. A new specific and sensitive time-resolved fluoroimmunoassay of 11-deoxycortisol in serum. *J Steroid Biochem Mol Biol 2001;7:143-50.*

61. Fiet J, Giton F, Boudi A, Boudou Ph, Soliman H, Villette JM, Galons H. Development of a sensitive and specific new plasma 4-androstene-3,17-dione time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA). *Steroids 2001;66:609-14.*

62. Fiet J, Giton F, Auzerie J, Galons H. Development of a new sensitive and specific time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) of chlormadinone acetate in the serum of treated menopausal women. *Steroids 2002;67:1045-55.*

63. Ibrahim F, Giton F, Boudou P, Villette JM, Julien R, Galons H, et al. Plasma 11-hydroxy-4-androstene-3,17-dione: comparison of a time-resolved fluoroimmunoassay using a biotinylated tracer with a radioimmunoassay using a tritiated tracer. *J Steroid Biochem Mol Biol 2003;1874:1-6.*

64. Tschöp M, Behre HM, Nieschlag E, Dressendörfer A, Strasburger CJ. A time-resolved fluorescence immunoassay for the measurement of testosterone in saliva: monitoring of testosterone replacement therapy with testosterone busiclate. *Clin Chem Lab Med 1998;36:223-30.*

65. Fiet J, Gosling JP, Galons H, Boudou P, Aubin PH, Bélanger A, et al. Coordinated radioimmunoassays for eight plasma steroids relevant of the investigation of hirsutism and acne in women. *Clin Chem 1994;40:2296-305.*

66. Bérubé R, Gauvin D, Blais M, Noreau L, Bélanger A. Détermination of testosterone, 5-androstenediol-3,17-diol, dehydroepiandrosterone and androstenedione in human serum using high-resolution gas chromatography and electron impact mass spectrometry. In: Proceeding of the 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics. *Dallas, Texas; 1999 [Abstract].*

67. Fiet J, Villette JM, Galons H, Boudou PH, Burthier JM, Hardy N, et al. The application of a new, highly-sensitive radioimmunoassay for plasma 21-deoxycortisol to the detection of 21-hydroxylase deficiency. *Ann Clin Biochem*

1994;31:56-64.

68. Hauptmann H, Paulus B, Kaiser T, Herdtweck E, Huber E, Luppa PB. Concepts for the syntheses of biotinylated steroids. Part I. Testosterone derivatives as immunochemical probes. *Bioconjug Chem 2000;11:239-52.*

69. Mikola H, Sundell AC, Hänninen E. Labeling of estradiol and testosterone alkyloxime derivatives with a europium chelate for timeresolved fluoroimmunoassays. *Steroids 1993;58:330-4.*