

면역확산법을 이용한 페리친의 확인

심영훈* · 하광원 · 조정희 · 김도훈 · 김영림 · 김홍진¹

식품의약품안전청, ¹중앙대학교 약학대학

Identification of Ferritin Using Immunodiffusion Methods

Young Hun Shim*, Kwang Won Ha, Jung Hee Cho, Do Hoon Kim, Young Lim Kim, and Hong Jin Kim¹

Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

¹College of Pharmacy, Chung-Ang Univ., Seoul 156-756, Korea

Abstract – Each ferritin molecule consists of light subunit 19,000 dalton and heavy subunit 22,000 dalton. Twenty-four protein subunit about 440,000~500,000 dalton apoferritin which contained 20~30% Fe as ferric hydroxyphosphate polymer form. Horse spleen-derived ferritin consists of 90% light subunit. These genetic characteristics of ferritin preparations were able to determine by cellulose acetate electrophoresis, but these ferritin preparations contained other components to be disturbed during refining, extraction and making finish products and have difficulties in deciding to be just. So, this study was performed to establish the scientific method for determine the quality of ferritin preparations with immunodiffusion methods which has high specificity between heterogeneous proteins.

Key word – Ferritin, Cellulose acetate electrophoresis, Immunodiffusion

서 론

철의 부족은 사람에게 가장 잘 나타나는 영양학적인 질병이다. 근 300년 동안 철결핍성 빈혈의 치료에서 철화합물의 효능이 입증되어 왔다. 특히, 우리나라에서는 임신부의 여성이 복용하는 것으로 알려져있다. 철 결핍은 사람에서 영양결핍성 빈혈의 가장 흔한 원인이다. 철 결핍이 심해지면 hemoglobin 합성 저하에 따른 소혈구성, 저혈색소성 빈혈이 특징적으로 나타나게 된다. 태이는 모체로부터 철분을 공급받으나, 출생후에는 식사를 통하여 섭취하며 체내 철분의 대부분은 재순환하여 보존하게 된다. 그러나 여성은 월경 및 분만중의 출혈로써 철분을 상실하고 또한 임신중에는 태아에게 철분을 공급해야 하므로 여성은 남성보다 철분의 필요량이 많고 따라서 전세계적으로도 철 결핍성 빈혈(iron-deficiency anemia)은 여성에게서 흔히 볼 수 있다. 철분의 필요량은 적절한 식사만으로 충분하나, 부적당한 식사, 흡수장애, 출혈등으로 철분이 결핍될 경우 이를 보충하기 위하여 철분을 따로 투여하여야 한다. 1937년 Laufferger에 의해 말의 비장과 간에서 최초로 분리된 ferritin은 X-Ray와

전자현미경 검사에 의하면 분자중량의 철혼합물 주위에 24개의 유사한 단백질 소단위들이 둘러싸고 있다.¹⁻³⁾ 즉, ferritin은 평균 분자량 450,000 dalton 정도의 apoferritin이라는 구상단백질로 중양에는 20~38%의 철분이 ferric hydroxyphosphate 복합체의 형태로 함유되어 있는 저장철 형태의 유일한 생리활성형 철단백질이다.¹⁻³⁾ 철단백질추출물 제제의 확인시험법은 셀룰로오스 아세테이트 전기영동법으로 설정되어 있으나, 전기영동법의 결과물인 band의 양상에 따라 판독자가 서로 상이한 의견을 제시할 수 있는 문제점을 내포하고 있어 이러한 문제점을 보완하고자 이중단백질간의 고도의 특이성을 가지는 immunodiffusion법을 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에서 사용된 재료는 시중에 유통되는 철단백추출물 제제 및 원료를 사용하였으며, 표준품은 Sigma, Fluka, ICN사의 제품을 사용하였다.

시약 및 기기

① 셀룰로오스 아세테이트 전기영동법

본 실험 중 아세테이트 전기영동법을 실시하기 위하여

*교신저자(E-mail) : Justman@kfda.go.kr

Applicator (4 wells or 8 wells, Gelman sciences Co.), electrophoresis chamber (Gelman sciences Co.), Cellulose acetate electrophoresis strips (Sepraphore III, Gelman sciences Co.), high resolution buffer (pH 8.8 : Gelman sciences Co.), power supply (Bio-Rad PAC 1000), ferritin standard (horse spleen, Sigma Co., Fluka Co., ICN Co.), Ponceau S red, trifluoroacetic acid, potassium ferrocyanide, benzidine (Sigma Co.), 1N 염산, hydrogen peroxide, methanol, ethanol, glacial acetic acid (Sigma Co.), glass plate (3.5×3.5 cm, Gelman Sciences Co.) 등을 이용하였다.

② Immunodiffusion method

면역확산법으로는 ferritin standard (from horse Spleen, Sigma Co., : Antigen), Anti-horse spleen ferritin (Sigma Co., : Antibody), Gelbond film(FMC, Pharmacia Co.), agarose (Agarose L for combined immunotechnique and agarose electrophoresis), coomassie stain solution (Bio-Rad Co.), destain solution (Bio-Rad Co.) 등의 실험 재료를 이용하였다.

실험방법

Cellulose Acetate Electrophoresis - 말비장 ferritin 표준액 (Sigma Co.) 0.1 ml에 물 1.4 ml을 넣어 표준액으로 사용하였다. 검액은 철단백추출물 300 mg에 해당량을 분액여 두에 넣고 에텔 20 ml에 물 50 ml을 가하여 1분간 진탕한 다음 수층 5 ml에 황산암모늄 3 g을 혼합하여 원심분리기에 3000 rpm으로 30분간 원심분리하였다. 이 때 얻어진 침전물에 물 10 ml을 첨가하여 이를 검액으로 사용하였다.

단백질의 확인시험 - 셀룰로오스 아세테이트(셀로겔)로 된 스트립 4×12 cm, 200 nm의 두께인 스트립을 미카엘리 스완층액속에 10분간 방치한 다음 두 장의 흡수지를 이용하여 건조시킨다. 이 스트립을 다시 브릿지 중앙 위치에 고정하고 전기영동 전개조에 넣는다. Applicator를 이용하여 스트립에 검액 및 표준액 2 μl를 점적한 다음 전개조를 닫고 180 V에서 20분간 전기영동을 실시한다. 전기영동이 끝난 스트립을 조심스럽게 단백질 착색용액 (5% 트리클로로 초산용액 100 ml + Ponceau S red 0.5 g)에 10분간 착색시키고, 다시 5% 초산용액으로 10분간 탈색시킨다. 이 때 전개된 band가 표준액과 동일한 위치에서 동일한 형태의 발색을 보여야 한다. 스트립은 다시 메탄올에 1분간 방치한다. 그리고 핀셋을 이용하여 스트립을 조심스럽게 취한 다음 투명액 (빙초산 14 ml + 메탄올 86 ml)으로 5분간 처리하여 유리판 위에 놓고 70°C 건조기에서 1시간 건조한다.

Ferritin의 확인시험 - 단백질의 확인시험법과 동일하게

전기영동을 실시한 다음 1 N 염산으로 10분간 착색하고 다시 철반응용액 (potassium ferrocyanide 0.5 g + 물 100 ml : 용시제조)으로 10분간 반응 시킨다. 핀셋을 이용하여 스트립을 조심스럽게 취하여 5% 초산으로 10분간 탈색한 다음 메탄올에 1분간 세척한다. 이 때 전개된 band가 표준액과 동일한 위치에서 동일한 형태의 발색을 보여야 한다. 이를 다시 투명액 (빙초산 14 ml + 메탄올 86 ml)으로 5분간 처리하여 유리판 위에 놓고 70°C 건조기에서 1시간 건조한다.

포르피린철의 확인 - ferritin의 확인시험을 끝낸 스트립을 벤지딘용액으로 10분간 반응시킨 다음 3% 과산화수소에 10분간 방치한 다음 메탄올에 1분간 세척한다. 이 때 전개된 band가 청색에서 암갈색으로 변하면 안된다. 이를 다시 투명액 (빙초산 14 ml + 메탄올 86 ml)으로 5분간 처리하여 유리판 위에 놓고 70°C 건조기에서 1시간 건조한다.

Immunodiffusion method - Anti-horse spleen ferritin 1 ml을 물 9 ml로 희석(5.4 mg/ml)하여 이를 항체로 이용하였다. 제조사에서는 항원과 항체의 titer비를 1 : 32의 비율로 반응시키도록 제시하고 있다. 표준액은 ferritin standard를 증류수를 이용하여 200 μg/ml의 농도로 희석하여 사용하였으며 검액은 ferritin으로서 400 μg/ml의 농도가 되게 희석하여 이를 다시 2배 (200, 100, 50 μg/ml)로 희석하여 본 실험의 시험액으로 사용하였다.

Immunoassay - Gelbond 필름에 1% 아가로스 겔 (1% agar in high resolution buffer)을 붓는다. 이를 실온에서 40분간 방치하여 아가로스 겔을 완전히 굳힌 다음 항체 및 항원 주입용 구멍을 만든다(중앙에 항체 주입용 구멍을 기준으로 5각형 모양의 5개의 구멍을 형성). 항체(Anti-horse spleen ferritin) 및 항원(ferritin 표준액, 검액) 20 ul를 구멍에 주입(항체는 중앙 구멍, blank 또는 표준액은 1번 구멍, 검액은 2~5번 구멍)하고 10시간 동안 반응 시킨다. 이를 다시 1% 식염수로 1시간 동안 세척하고 여과지를 밀착시킨 다음 agarose 표면에 부드러운 여과지를 덮고 무게를 가하여 2시간 동안 방치한다. Gelbond 필름을 드라이기를 이용하여 Gelbond 필름이 완전히 투명해 질 때 까지 건조시킨다. Gelbond 필름을 Coomassie stain solution으로 10분간 염색하고 destain solution으로 30분간 탈색시킨 다음 실온에서 건조시킨다.

결과 및 고찰

Cellulose acetate electrophoresis - 전기영동 확인시험방법은 특정물질의 전개(이동)거리로 그 물질의 분자량을 확인하는 시험법으로서 철단백추출물 함유제제 뿐만아니라 DNA, RNA 및 아미노산 등, 대부분의 단백질성분의 확인

시험에 응용되어지고 있으며, 그 물질의 특성에 따라 다양한 시험방법이 설정되어 있다. 그러나 셀룰로오스 아세테이트법에 의한 전기영동법은 전기영동법 중에서도 가장 고전적인 방법이지만, 철단백추출물 함유제제에 있어서 셀룰로오스 아세테이트법은 과학적이고 적합한 확인시험법으로 알려져 있다. 철단백추출물에 대한 셀룰로오스 아세테이트법은 1차적으로 단백질을 확인하는 단백질 확인시험(Fig. 1), 2차적으로 말비장에서 유래한 ferritin을 확인하는 ferritin 확인시험(Fig. 2), 마지막 단계로 말비장 유래 ferritin 이외의 다른 장기(혈액, 심장, 간장, 등) 유래의 ferritin 혼입 여부를 확인하는 포르피린철 확인시험(Fig. 3)등으로 세분화 되어있다. 따라서 철단백추출물 함유제제는 3가지 시

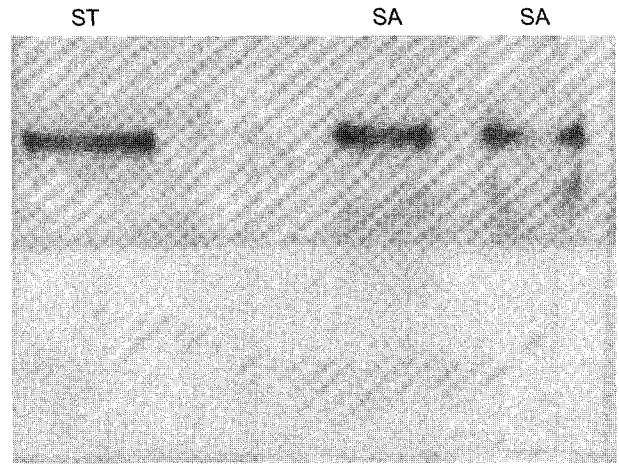


Fig. 3. Results of identification of porphyrin using electrophoresis (ST : horse spleen ferritin standard, SA : samples).

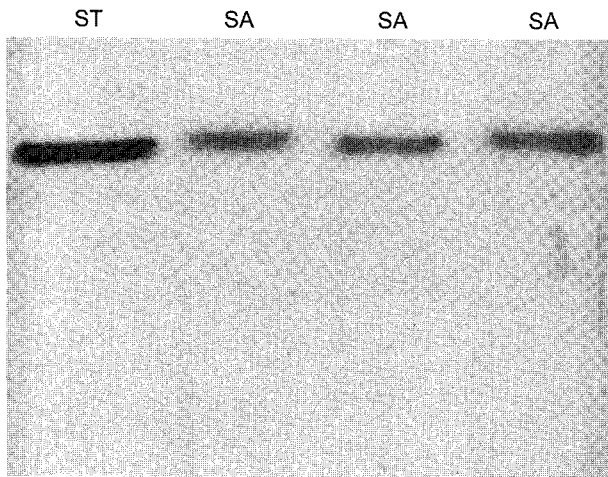


Fig. 1. Results of identification of protein using electrophoresis (ST : horse spleen ferritin standard, SA : samples).

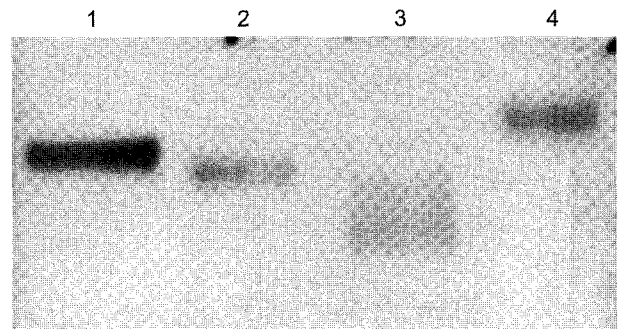


Fig. 4. Results of electrophoresis for ferritin standard per manufactory (lane 1~3 : standard of house ferritin, lane 4 : bovine ferritin).

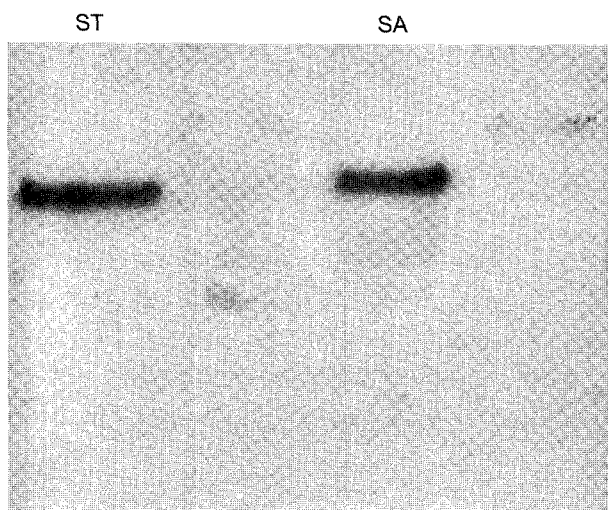


Fig. 2. Results of identification of ferritin using electrophoresis (ST : horse spleen ferritin standard, SA : sample).

험 모두 적합하여야 한다. 그러나 동일한 말비장 유래의 ferritin이라 할지라도 제품으로 생산되는 과정 중 정제 및 추출과정에서 ferritin의 손상과 타성분(ex. 감미제, 보존제, 착향제 및 포르피린철등의 타장기 유래의 ferritin)등의 혼입으로 band의 양상이 다양하게 변화한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 5). 특히, 같은 표준액이라 할지라도 제조사의 정제 방법에 의해 band의 전개거리가 차이가 있음을 알 수 있었다(Fig. 4). 이러한 결과는 철단백추출물제제가 완제품에서는 표준액과 다른 양상의 band를 보일 수 있는 요인을 가지고 있다는 가정을 뒷받침하고 있다.

Immunodiffusion method - 면역확산법은 항원과 항체 사이의 특이적인 결합에 의해 생성되는 침강선의 유무로 ferritin을 확인하는 시험법이다. 따라서 시험방법이 셀룰로오스 아세테이트 전기영동법 보다는 단순하고 보다 정확한 시험법임을 알 수 있다. 면역확산법은 항체와 항원의 반응 농도가 가장 중요한 요소이다. 항체가 들어 있는 중앙 구멍

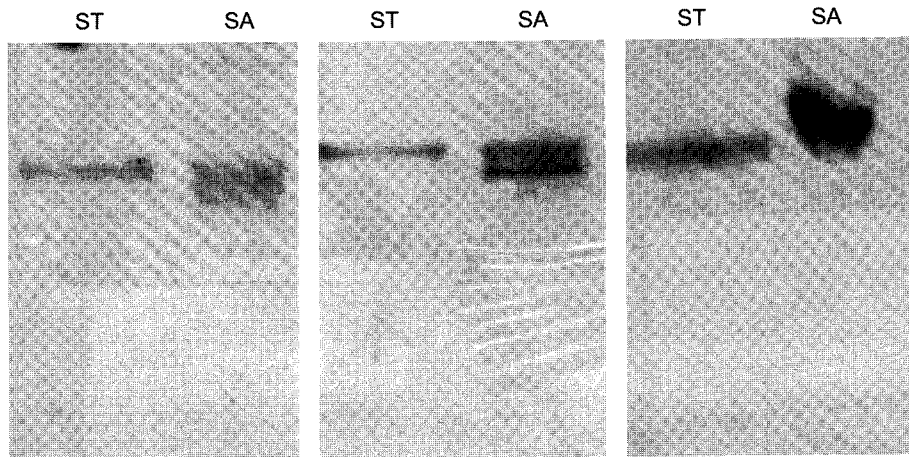


Fig. 5. Examples having difficulties to determine the results (ST : horse spleen ferritin standard, SA : samples).

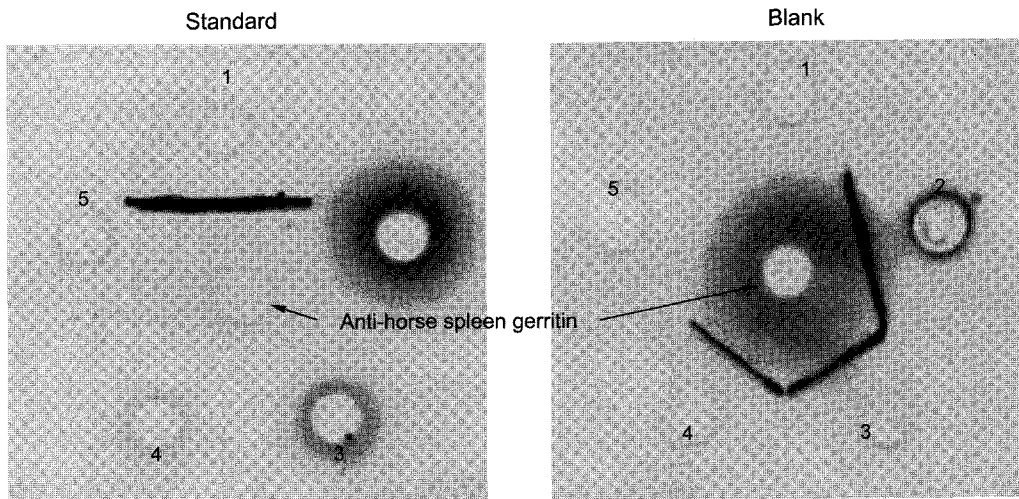


Fig. 6. Results of immunodiffusion methods (sample 구멍 2~5).

을 기준으로 1번 blank 구멍은 침강선이 나타나지 않는다. 1번 구멍에 ferritin standard를 주입한 경우 1번 구멍과 항체가 주입된 중앙 구멍 사이에 푸른색 침강선이 형성된다 (Fig. 6). 또한 2~5번 구멍의 주입된 검액이 말비장 유래의 ferritin으로 구성되어 있다면 검액과 항체 사이에 푸른색의 침강선이 형성된다(Fig. 6). 면역확산법에서는 희석액이 gel medium으로 확산에 의하여 얻어진다. 즉, 반응 물질의 하나 또는 두 개의 농도 기울기가 얻어지면 반응물질의 비율이 침전을 형성하는 곳에서 gel medium 내의 띠를 형성한다.⁴⁾ 본 실험에서 항체(13.5)와 항원(1)의 비율이 가장 적절한 농도비로 나타났다. 또한 항원과 항체의 농도비가 부적절하더라도, 예를 들어 항원의 농도가 반응농도 보다 높을 경우 침강선은 항원과 항체의 중간 지점에서 좀 더 항체쪽에 침강선이 형성됨을 알 수 있었다. 면역확산법은 완제품 상태의 ferritin이 정제 및 추출과정에서 손상되었다 하더라도 실

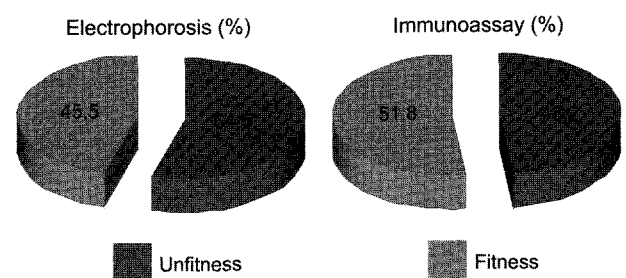


Fig. 7. Comparison of results by immunodiffusion method with results by electrophoresis.

험결과에는 전혀 지장이 없음을 확인할 수 있었다. 또한 면역확산법은 누구나 항체와 항원 사이에 나타난 침강선을 쉽게 육안으로 관찰할 수 있는 확실한 시험결과를 제시하였다.

결 론

셀룰로오스 아세테이트 전기영동법을 이용한 ferritin의 확인법도 3가지 단계로 구분하여 말비장 유래의 순수한 ferritin을 확인하는 한 논리적이고 과학적인 시험법임을 알 수 있었다. 말비장 ferritin 자체가 구상단백질로서 검액 대부분이 1차 단백질 시험에서 적합하게 반응하였으며, 말비장 이외의 타장기 ferritin 혼입 여부를 확인하는 3차 포르피린철 확인시험에서도 쉽게 결과를 분석할 수 있었다. 그러나 가장 중요한 2차 ferritin 확인시험에서 band의 양상이 판독하기에 어려운 형태가 많아 결과를 쉽게 판정할 수 없는 문제점이 있음을 확인 할 수 있었다(Fig. 5). 이러한 문제점을 가지는 셀룰로오스 아세테이트 전기영동법에 대해 면역확산법은 침강선의 유무로 시험결과를 판독하여 결과를 쉽게 판정 할 수 있는 장점이 있다. 또한 실험의 정확성을 위해 두 결과를 비교한 결과 셀룰로오스 아세테이트 전기영동법에서 표준액과 동일한 결과를 보인 시료는 모두 면역확산법에서도 항체와 반응하여 침강선을 나타내었다. 이러한 결과를 볼 때 ferritin 확인시험법은 셀룰로오스 아세테이트 전기영동법으로만 그 결과를 판정하기 보다는 면역확산법과 병행하여 확인시험을 실시한다면 보다 정확한 분석결과를 얻을 것으로 판단된다. 전기영동법에 의한 결과만으로 ferritin을 판정했을 때, 각각의 개인차는 있겠지만 분명 더 많은 부

적합 비율이 나타났다(Fig. 7). 그러나 면역확산법을 이용한 확인 시험에서는 침강선의 유무로 누구나 쉽게 판독을 할 수 있었으며, 이러한 이유로 적합 비율이 높게 나타났다(Fig. 7). 면역확산법을 응용한 실험을 할 때, immunochemical method의 결과들은 실험조건과 사용한 시약의 성질 및 품질에 좌우된다. Immunoassay 성분을 표준화 시키고 Immunoassay용 국제적 표준품을 규격화 하여 사용하는 것이 필수적이다. 또한 소비장 유래의 항체, 돼지비장 유래의 항체 등도 계속 개발된다면 면역확산법을 응용하여 이들 동물들의 혼입여부도 단시간에 확인할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Edelman, G. M. (1973) The Structure and Function of Antibodies, *Sci. Am.*, **223**: 34-42.
2. Dickerson, R. E. (1972) Structure and History of an Ancient Protein, *Sci. Am.*, **226**: 58-72.
3. Kitasato University (1997) Sequencing of cDNA Clones that encode bovine ferritin H and L chains, **118**(3): 667-73.
4. Eli B., Sidney L. (1991) Immunology A Short Course, Wiley-Liss.
5. European Pharmacopoea (1997), Biological assays-Immunochemical methods, pp. 103-104.

(2002년 8월 24일 접수)