

**Pepper mild mottle virus에 대한 난황항체의 생산과 혈청학적 진단에의 활용**한정현<sup>1\*</sup> · 이철호<sup>3</sup> · 김영호<sup>1,2</sup> · 나용준<sup>1</sup><sup>1</sup>서울대학교 농생명공학부, <sup>2</sup>서울대학교 식물분자유전육종연구센터, <sup>3</sup>서경대학교 이공대학 생물공학과**Production of Egg Yolk Immunoglobulin and Its Application for Pepper mild mottle virus in Serological Tests**Jung-Heon Han<sup>1</sup>, Cheol-Ho Lee<sup>3</sup>, Young-Ho Kim<sup>1,2</sup> and Yong-Joon La<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Agricultural Biotechnology and <sup>2</sup>Center for Plant Molecular Genetics and Breeding Research, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea<sup>3</sup>Department of Biological Engineering, College of Natural Sciences and Technology, Seokyoung University, Seoul 136-704, Korea

(Received on April 27, 2006)

Egg yolk immunoglobulin (IgY) is much widely used in medical fields, but its use in serology of plant viruses is much limited. We produced an IgY against *pepper mild mottle virus* (PMMoV) and applied it to several serological tests. Polyclonal antibodies were obtained from the egg yolk of chicken immunized with a total of 2mg of purified PMMoV over 2 months. The titers of antibodies were measured with the ring-test over six months after the first injection. The highest titers of IgY was 1/2,560 at 2 months after the first injection. Approximately 60-80 mg of IgY were obtained from one egg yolk. Using the IgY, 1 ng/ml of purified PMMoV was detected with the indirect ELISA. Gelrite gel double diffusion test, ELISA and tissue immuno-binding assay employing IgY gave similar sensitivity and specificity to those of IgG developed in rabbit. Therefore, the IgY which can be obtained in large quantities from a chicken, might be useful for the antibody production and the serology of plant viruses.

**Keywords :** Egg yolk immunoglobulin (IgY), Antibody, Pepper, *Pepper mild mottle virus* (PMMoV)

식물바이러스의 항혈청 생산에 주로 이용되는 동물은 생쥐, 쥐, 닭, 토끼, 돼지, 염소, 소, 말 등이다(Van Regenmortel, 1982a). 이 중에서 닭은 소량의 항원으로 양질의 항체 생산이 가능하며 어미 닭에서 생성된 항체는 난황에도 전달이 된다(Patterson 등, 1962). 난황에서 분리한 항체는 egg yolk immunoglobulin(IgY) 혹은 r-livetin으로 불린다(Leslie와 Clem, 1969). IgY는 효소면역항체법이나 조직자국면역반응법과 같은 혈청학적 진단법에서 식물바이러스의 외피단백질 표면에 존재하는 항원기에 직접 결합하는 1차 항체로 이용되어 왔다(Kounounguisa 등, 1989; Salomone과 Roggero, 2002). 일반적으로 토끼의 혈액 1 ml에서 얻을 수 있는 항체의 양이 8~12 mg인데 반하여 달걀 1개에서 얻을 수 있는 항체

의 양은 60~200 mg이며 이 중에서 특이항체는 10~20% 정도 존재한다고 알려져 있다(Hatta 등, 1993).

이와 같이 닭을 이용하면 소량의 항원을 사용하여 고품질의 항체를 다량으로 얻을 수 있다는 장점이 있으나 국내에서는 IgY 생산과 이용에 관한 연구가 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 토끼에 비하여 항체생산 비용이 적고, 양질의 항체를 대량으로 생산할 수 있는 닭에서의 항체생산과 식물바이러스의 혈청학적 진단에 사용되어온 다양한 진단기법에 난황에서 분리한 IgY의 활용성을 조사하였다.

**Egg yolk antibody 생산.** IgY 생산을 위해 정제된 *Pepper mild mottle virus* (PMMoV, T-6)를 항원으로 사용하였다(Han 등, 2001). 0.5 mg의 항원을 연령이 약 100일 정도되는 3마리의 닭(whiteleg horn)에 2주 간격으로 4회에 걸쳐 허벅지 근육과 앞가슴 부위에 소량씩 여러 번 주사하였다. 1회 주사에서는 Freund's complete adjuvant를

\*Corresponding author

Phone) +82-2-880-4930, Fax) +82-2-873-5410

E-mail) jungheon1@hanmail.net

항원액과 동량 섞어 사용하였고 나머지 주사에는 Freund's incomplete adjuvant를 사용하였다(French 등, 1970). 1주일 간격으로 닭의 날개 정맥에서 채혈한 후 ring-test(Van Regenmortel, 1982b)로 항체의 역가 변화를 조사하였다. 첫 번째 주사일부터 3번째 주사일까지는 3~4일 간격으로 알을 수거하였고 3번째 주사일부터 매일 알을 수거하여 Ring-test법으로 항체의 역가를 검사하였다. IgY는 EGGSract™ IgY Purification Kit(Promega)를 사용하여 분리하고 PD-10 column으로 투석하였으며, 280 nm에서의 흡광치가 1.33일 때 1 mg/ml의 농도로 정량하여 사용하였다.

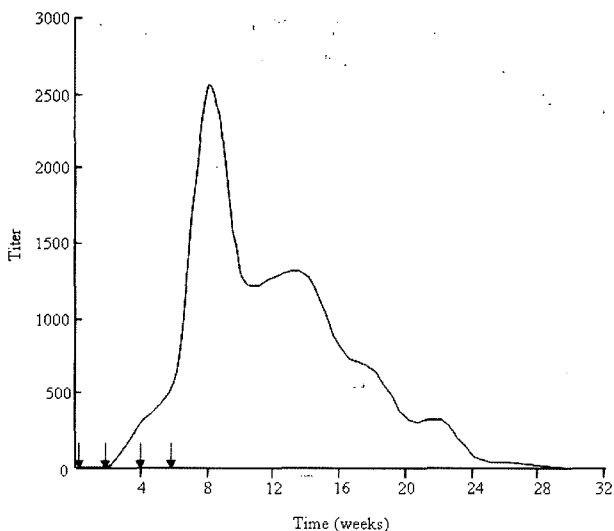
실험에 이용한 세 마리 닭 가운데 두 마리는 다른 병에 감염되었거나 혈액내 지방의 함량이 많아 순도 높은 항체를 얻을 수 없었기 때문에 IgG와 IgY 역가 실험에서는 제외하였다. 따라서 면역이 잘된 한 마리의 닭을 대상으로 IgY의 역가를 조사한 결과, 두 번째 면역 후 일주일 경부터 IgY의 역가는 증가하기 시작했으며, 마지막 주사 3~4일 후에는 최고치를 나타내었다. 이후 역가는 다소 감소하였으며 약 45일간의 지속기를 거쳐 완만하게 감소하는 경향을 보였다(Fig. 1).

또한 달걀 1개의 난황에서 얻을 수 있었던 IgY의 평균량은 60~80 mg 정도였다. 닭의 혈액에서 항체의 형성속도는 Patterson 등(1962)의 보고와 마찬가지로 토끼에 비하여 일주일 정도 빨랐으며, 역가는 토끼와 비슷한 경향으로 증·감하였다. 본 실험에서는 혈액에서의 최고 역가를 기술하지 않았으나 이는 닭이 채혈과정에서 받은 스트레스로 인하여 약 1주일 혹은 산발적으로 알을 낳지 못

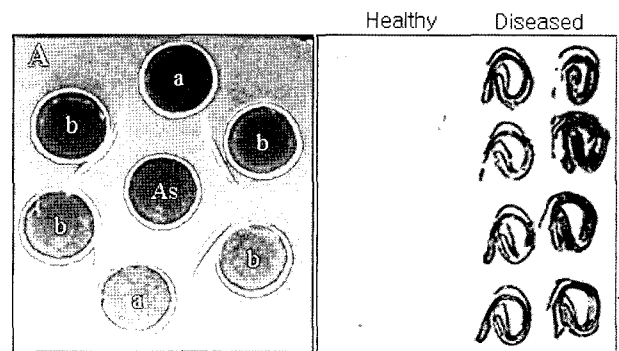
했기 때문이다. 이러한 현상은 스트레스가 닭의 산란에 많은 영향을 준다고 보고한 French 등(1970)의 연구내용과 유사하였다. 따라서 닭에 안정적으로 IgY를 생산하기 위해서는 기생충 감염에 주의하고 고지방 성분의 사료 섭취를 줄이며, 스트레스로 작용할 수 있는 심한 소음, 잦은 채혈, 혈관보다 큰 주사바늘의 사용 등은 삼가야 할 것으로 생각한다.

**혈청학적 진단에의 활용.** PMMoV 검출을 위한 IgY의 활용성을 조사하고자 생산된 항PMMoV-IgY로 Gelrite gel 이중확산법(Ohki와 Inouye, 1987), 조직자국면역반응법(La 등, 1999), 효소면역항체법(Han 등, 2001)을 수행하였다. Gelrite gel 이중확산법의 경우 2 mg/ml의 정제된 PMMoV-T6과 Ring-test에서 1:2560의 역가를 보인 항 PMMoV-IgY를 가지고 수행하였다. 항 PMMoV-IgY는 건전즙액과는 침강대를 형성하지 않았고 정제한 PMMoV-T6과 강한 침강대를 형성하였다(Fig. 2-A).

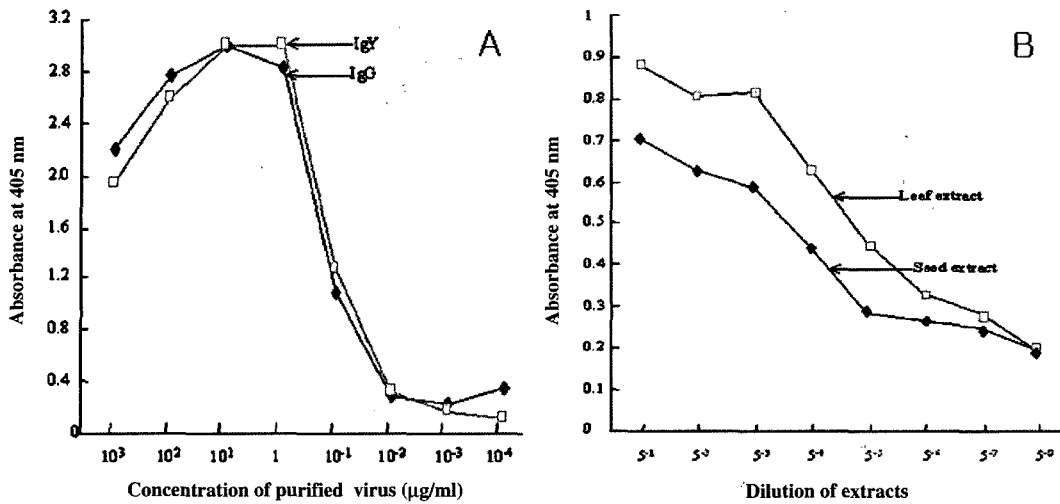
조직자국면역반응법의 경우 PMMoV 감염주와 무감염 고추의 잎을 잎 끝에서 엽병쪽으로 단단히 말고 면도칼로 절단한 종단면을 PVDF(polyvinylidene difluoride) 막(Millipore) 위에 5~10초간 눌러 조직자국을 만들었다. PVDF 막을 Blocking 용액, 1차 항체액(3 µg/ml의 항PMMoV-IgY)와 2차 항체액(1 µg/ml의 Anti-chicken IgG alkaline phosphatase conjugate, Sigma)에 반응시키고 발색시킨 결과, 바이러스 감염주에서는 진한 보라색 발색반응이 나타났으며(Fig. 2-B), IgG를 사용할 때 조직자국 이외의 막



**Fig. 1.** Changes in the titer of IgY following immunization of a pepper mottle virus isolate (T-6). A hen received four intramuscular injections of T-6 (0.5 mg) in adjuvant. Arrows indicate immunization time. The titer of IgY was determined by Ring-test.



**Fig. 2.** Gelrite gel double diffusion test (A) and tissue immunoblotting assay (B) using IgY against a pepper mottle virus isolate (T-6). In A, Center well was filled with anti-T-6 IgY (As). Peripheral wells were filled with leaf extract of healthy (a) and purified pepper T-6 tobamovirus (b). Photograph were taken at 2 days post-incubation. In B, Cross sections of rolled pepper leaf were blotted on polyvinylidene difluoride membrane. The membrane was reacted with primary antibodies (3 µg/ml of anti-T-6 IgY) and second antibodies (alkaline phosphatase-labeled rabbit anti-chicken immunoglobulin). The blot was incubated in substrate solution. Healthy leaf sample developed faint purple color. Diseased leaf sample developed dark purple color.



**Fig. 3.** Detection of pepper mottle virus by indirect (A) and indirect double-sandwich (B) enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using IgG (◆) and IgY (□). In A, a serial dilute of T-6 in 0.1 M carbonate buffer was incubated overnight at 4 C on plates. The conjugates were diluted 1/2,000. ELISA values were read 60 min after addition of substrate. In B, Five seeds and 1 g leaf were homogenized with 5 ml of 0.1 M carbonate buffer, respectively. Each supernants after centrifugation at 8,000 rpm was used as initial extract for dilutes. Plate was coated with IgY at a concentration of 3 µg/ml. The enzyme conjugate was diluted 1:2,000. ELISA values were was read 30 min after adding substrate.

표면에서 쉽게 관찰되는 비특이 발색반응이 IgY를 사용할 경우 현저히 줄어들거나 전혀 나타나지 않았다.

효소면역항체법(ELISA)의 경우 항PMMoV-IgY와 -IgG는 3 µg/ml 농도로 사용하였고 2차 항체(Anti-rabbit goat IgG alkaline phosphatase conjugate와 Anti-chicken IgG alkaline phosphatase conjugate, Sigma)는 1 µg/ml 농도로 사용하였다. 간접ELISA를 위한 항PMMoV-IgY와 -IgG의 최적 사용 농도는 3 µg/ml과 1 µg/ml이었고, 최적농도에서 수행한 PMMoV 검출감도는 1 ng/ml로 IgY와 IgG 모두 동일하였다. 그러나 음성대조구로 사용한 완충용액의 흡광값은 IgG 보다 IgY 처리구에서 보다 낮게 나타났다(Fig. 3-A). 고추 종자마쇄액과 잎즙액에서 PMMoV 검출 특이성을 조사하고자 간접샌드위치ELISA를 실시한 결과, IgY와 IgG를 사용했을 때 모두 종자마쇄액과 잎즙액의 5~8 희석액에서도 바이러스 검출이 가능하였고 IgG에 비해 IgY를 1차 항체로 사용했을 때 보다 완충액과 건전한 시료에 대하여 낮은 흡광도를 나타내었다(Fig. 3-B).

이상의 결과를 종합해보면 IgY와 IgG 둘 간의 바이러스 검출감도에는 차이가 없었고, 한천내 이중확산법에서 IgY 처리구에서는 비특이 침강대의 형성을 발견하기가 힘들었는데, 이는 혈장단백질과 함께 활용되는 IgG와는 달리 IgY는 정제 후 사용하기 때문인 항원과 결합할 수 있는 이물질이 어느 정도 제거되었기 때문이라고 생각된다. 또한 조직자국면역반응법과 ELISA에서 IgY는 조직자국이 없는 막표면이나 음성대조구에서 IgG 처리구에 비해

낮은 색변화나 흡광값을 보였다. 이는 IgY의 Fc chain이 IgG 보다 소수성이 작다고 보고한 Leslie(1969)의 연구결과에 미루어 볼 때 IgY와 IgG의 PVDF 막의 표면에 대한 결합력의 차이에 기인한 것으로 생각한다.

### 요 약

닭을 이용한 egg yolk immunoglobulin (IgY)의 생산과 이용 가능성을 조사하기 위하여 *pepper mild mottle virus* (PMMoV)로 닭을 면역하였다. Ring-test로 달걀의 난황에서 분리·정제한 IgY의 역가를 조사한 결과 IgY의 최고 역가는 1:2,560이었고 달걀 1개에서 대략 60~80 mg의 IgY를 얻을 수 있었다. 최고역가를 갖는 IgY를 이용하여 Gelrite gel 이중확산법, 효소면역항체법(ELISA), 조직자국면역반응법을 실시한 결과 간접면역효소항체법의 PMMoV 검출감도는 1 ng/ml이었고, 검정법의 바이러스 검출감도와 특이도는 IgG와 비슷한 경향을 보였다. 그러므로 한 마리의 닭으로부터 대량으로 생산 가능한 IgY는 식물바이러스에 대한 항체생산과 혈청학적 검정에 유용할 것으로 생각한다.

### 감사의 글

닭의 면역을 허락해 주신 서울대학교 동물자원학과와 한재용 교수님께 감사드립니다.

## 참고문헌

- French, V. I., Stark, J. M. and White, R. G. 1970. The influence of adjuvants on the immunological response of the chicken. I. Effects of Freund's complete adjuvants on late antibody production after a single injection of immunogen. *Immunology* 18: 645-655.
- Han, J. H., Shon, S. H. and La, Y. J. 2001. Identification and characterization of tobamoviruses isolated from commercial pepper seeds. *Res. Plant Dis.* 7: 164-169.
- Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M. and Yamamoto, T. 1993. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 450-454.
- Hu, J. S., Rochow, W. F. and Dietert, R. R. 1985. Production and use of antibodies from hen eggs for the SGV isolate of barley yellow dwarf virus. *Phytopathology* 75: 914-919.
- Hsu, H. T. and Lawson, R. H. 1985. Comparison of mouse monoclonal antibodies and polyclonal antibodies of chicken egg yolk and rabbit for assay of carnation etched ring virus. *Phytopathology* 75: 778-783.
- Kounounguisa, B. R., Givord, L. and Walter, B. 1989. African cassava mosaic virus (ACMV): stability of purified virus and improved conditions for its detection in cassava leaves by ELISA. *J. Phytopathology* 127: 29-41.
- La, Y. J., Han, J. H., Sim, G. B., Kim, B. D. and Ahn, K. K. 1999. Detection of cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus in orchid plants by tissue-blot immunoassay. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 40: 481-484.
- Leslie, G. A. and Clem, L. W. 1969. Phylogeny of immunoglobulin structure and function; III. Immunoglobulins of the chicken. *J. Exp. Med.* 130: 1337-1352.
- Ohki, S. T. and Inouye, T. 1987. Use of gelrite as a gelling agent in immunodiffusion tests for identification of plant virus antigens. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 53: 557-561.
- Patterson, R., Youngner, J. S., Weigle, W. O. and Dixon, F. J. 1962. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J. Immunol.* 89: 272-278.
- Salomone, A. and Roggero, P. 2002. Host range, seed transmission and detection by ELISA and lateral flow of an Italian isolate of pepino mosaic virus. *J. Plant Pathol.* 84: 65-68.
- Steinberg, S. V., Munro, J. A., Fleming, W. A., French, V. I., Stark, J. M. and White, R. G. 1970. The influence of adjuvants on the immunological response of the chicken. I. Effects on primary and secondary responses of various adjuvants in the primary stimulus. *Immunology* 18: 635-644.
- Van Regenmortel, M. H. V. 1982a. Serology and immunochemistry of plant viruses. Academic Press, New York. p. 47-48.
- Van Regenmortel, M. H. V. 1982b. Serology and immunochemistry of plant viruses. Academic Press, New York. 80 p.