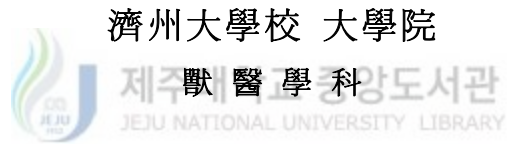


碩士學位論文

Immuno-chromatography에 의한 우유 중
체세포 간편검사법 개발



金 珍 英

2004年 2月

Immuno-chromatography에 의한 우유 중
체세포 간편검사법 개발

指導教授 林 允 圭

金 珍 英

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함.



金珍英의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함.

審査委員長

委 員

委 員

濟州大學校 大學院

2004年 2月

초 록

Immunochromatography에 의한 우유 중 체세포 간편검사법 개발

(지도교수 : 임 윤 규)

김 진 영

제주대학교 대학원

수의학과

원유 중의 체세포와 면역단백질의 상관관계를 조사하여 체세포수를 추정할 수 있는 면역학적 분석법의 가능성을 조사하였다. 이를 위하여 bovine IgG에 특이적인 단클론항체를 개발하고 sandwich ELISA 및 immunochromatography법에 응용하여 혈청 및 우유 중의 IgG 함량을 측정하였다.

ELISA법으로 측정한 표준곡선은 bovine IgG 농도 0.1부터 100 $\mu\text{g/ml}$ 구간에서 용량에 비례하는 상관관계를 보였다. 원유 중의 체세포수와 IgG 농도는 $y=0.0126\text{Log}(x)-0.0065$ ($R^2=0.5656$)인 추세를 보였으므로, 원유 중의 IgG 농도는 체세포수에 비례하여 증가하는 경향을 보였다.

Immunochromatography법으로 측정하였을 때 혈청 IgG의 대조 농도인 100, 10, 1, 및 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 에 대하여 반정량이 가능하였으며, 원유의 경우 체세포수 1,000,000 이상의 경우와 200,000 미만의 경우를 구분할 수 있었다.

주요어 : Milk, Somatic cell count, Bovine IgG, Monoclonal antibody, Sandwich ELISA, Immunochromatography

목 차

I. 서	론	1
II. 재료 및 방법	5
III. 결	과	19
IV. 고	찰	29
V. 결	론	32
VI. 참고문헌	33
영문초록	38



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

I. 서 론

우유는 완전한 식품으로서의 영양적 가치는 물론 건강식품으로서의 그 가치가 널리 인정되고 있다. 우유의 품질에는 가공하지 않은 원유의 위생이 큰 영향을 미치기 때문에 원유의 위생 정도를 평가하는 다양한 방법들이 연구되어 왔다. 정상적인 원유에는 케이션, 지방, 비타민 등의 영양분은 물론 면역단백질과 체세포와 같은 생체면역성분들이 포함되어 있다. 이러한 성분들은 젖소의 건강상태에 따라 변화하며 (Kitchen, 1981; Harmon, 1994), 특히 체세포의 변화는 원유의 위생정도를 평가하는 척도가 되고 있다.

원유의 체세포 증가에 영향을 미치는 것은 병원성 미생물의 감염에 의하여 발생하는 유방염이며 이는 감염된 유선 조직을 정상으로 회복하려는 생체반응이다 (손, 1997). 젖소의 유방염의 원인으로 Abildgaard (1967)는 방목시 곤충에 물려 발생하는 것이라 보고하였으나, 인공감염을 통한 유방염을 유도하고 유즙으로부터 세균검출에 성공한 Fank와 Glage (1967)에 의하여 유방염이 감염병임을 확인하였다. Bramley 등 (1992)에 의하면 ‘많은 현장 지도자들은 우유위생 문제의 약 50%는 유방염 발생 병원균과 관계가 있다’고 지적하였다. 한편, 유방염은 우유 중 사람에게 유익한 성분은 감소시키고 유해한 성분을 증가시킨다고 알려져 있다 (Philpot, 1978; 손 등, 1997).

유방염은 일반적으로 준임상형, 임상형 (아급성임상형, 급성전신성형), 만성형, 비특이성형으로 구분된다 (손, 1997). 임상형은 증상이 보이는데 반해 준임상형은 육안적으로 증상을 발견하기가 거의 불가능하다. 실제로 준임상형이 중요한 이유는, 임상유방염보다 발생율이 15-40배 높으며, 결국 임상형으로 발전되기 때문이다. 또한, 감염기간도 길고, 우유생산량이 감소되며, 우유의 질을 저하시키므로 낙농가의 생산성을 저하시킨다. 한편, 유방염의 원인균은 목장내 감염의 주된 원인으로 작용하기 때문에 유방염을 관리하기 위한 노력

은 준임상형에 기본을 두어야 한다 (손, 1997). 한국가축위생학회에서 3년간 ('91-93) 전국을 대상으로 실시한 유방염 감염률을 보면 개체별 감염률은 38.3% (준임상형 32.8%, 임상형 5.2%)이었고, 분방별 감염률은 20.3% (준임상형 18%, 임상형 2.3%)로 조사되었다 (손 1994).

유방염은 원인균을 분리동정함으로써 확진할 수 있으나 시간이 많이 소요되고, 유선 내 정상적으로 존재하는 정상세균총으로 인한 판단의 오류나 바이러스와 같이 분리가 까다로운 미생물에 의한 유방염의 경우 진단에 많은 어려움이 있다. 따라서 보다 간편하면서도 신속한 진단법으로 활용되는 방법들은 세포내 화학성분의 변화나 체세포수의 변화를 측정하는 데 그 기초를 두고 있다.

특히, 체세포는 우유를 생산하는 정상 유선상피세포와 외부로부터 들어온 미생물을 제거하여 젖소의 건강을 유지해 주는 백혈구를 통칭한 것으로서 유방염이 발생할 경우에 증가한다.

정상원유에는 체세포가 mL 당 25만개 이하이며 대식세포가 60%로 가장 많고 호중구와 림프구는 약 30% 전후이며 상피세포가 2% 정도를 차지한다. 그러나 유방염에 걸린 젖소의 원유에는 mL 당 50만개 이상으로 체세포가 증가하며 그 중 95%가 호중구로 구성된다 (손, 1997). 따라서 원유에 있는 체세포수를 측정함으로써 원유의 위생정도를 확인할 수 있을 뿐만 아니라 유질개선, 유량증가 그리고 농가의 경제성 분석에 도움을 주기 때문에 체세포수의 분석은 낙농장 관리의 지침으로 활용하는 한편 우리나라를 포함한 선진 낙농국에서는 유대의 산출과 유방염예방을 위한 기초자료로 이용되고 있다.

체세포수의 측정법으로는 직접현미경법, Fossomatic기 측정법으로 형광물질 (ethidium bromide)로 코팅하여 일정량을 디스크에 도포시켜 순간적으로 통과되는 체세포를 할로겐 램프로 측정하는 방법이 이루어지고 있지만, 유방염의 관리를 위한 간이법으로 농장에서 직접 적용할 수 있는 California Mastitis Test (CMT)가 국내 외를 막론하고 가장 많이 이용되고 있다 (Forster 등, 1967; Bodoh

등, 1976; Jones 등, 1984; Reneau, 1986). 그러나, 허 등 (1998)의 조사에 의하면 74농가 중 35농가 (47%)가 CMT를 실시하지 않는다고 답하였으며, 그 이유로 귀찮아서라고 답한 농가가 80%, 검사방법을 몰라서라고 답한 농가가 18%나 되었다. 즉 유방감염여부와 유즙상태를 파악하는데 착유 전 CMT 검사가 가장 중요하고 기본적인 방법으로 요구하고 있으나 1주에 1-2회 이상 실시하는 농가가 29%에 불과한 것에 감안한다면 대다수의 농가가 유방염 관리를 소홀히 하고 있음을 볼 수 있다. 이러한 원인은 CMT 진단법은 검사자의 숙련도에 따라 결과해석이 다양하게 나오므로 반복적인 검사를 통해서 눈에 익숙해질 때까지 지속적으로 실시해야 하는 단점에 기인하는 것으로 생각된다.

만일, 체세포 이외에 유방염시 변화할 수 있는 다른 성분들을 대상으로 육안적으로 간편하게 관찰할 수 있는 방법이 개발된다면 농장에서 직접 유방염의 유무를 판정하기가 용이할 것이다. 실제로 유방염 원유에서는 체세포만이 아니라 조직세포로부터 분비되는 우유 성분에도 주요한 변화가 나타난다 (Kitchen, 1981). Anderson 과 Andrews (1977)의 연구에 의하면 균감염 또는 균독소에 의해 α -lactalbumin, β -lactoglobulin은 미세한 농도로 감소함을 보였으며, 혈청 알부민과 IgG의 농도는 현저하게 증가하였다고 하였다. 면역글로블린 중 IgG는 세균, 바이러스 등의 항원에 대한 면역반응에 비교적 활발한 변화를 보인다. 이와 같이 가축질병의 발생에 관여하는 제반 면역생리적 요인들 중 혈중 IgG class (IgG1, IgG2)의 농도변화는 질병 이환의 여부 및 그 상태를 예시하는 중요한 척도가 되고 있음이 많은 연구자들에 의하여 보고되었다 (Butler 등, 1972; Williams 등, 1975; 김 등, 1986).

이상에서와 같이 유방염시 체세포수는 물론 혈청성분들도 증가한다는 것은 주지의 사실이지만, 두 종류의 양적 상관관계에 대하여 비교 분석한 연구보고는 찾아보기 어렵다. 원유 중의 혈청 성분의 농도와 유방염에 의한 체세포수의 변화 사이에 상관관계가 성립한다면, ELISA 등의 면역분석법을 이용하여 원유 중의 혈청성분을 정

량하고 이를 통하여 체세포의 수를 추정할 수 있을 것이다. 또한 immunochromatography법과 같이 초고속 진단법을 응용할 경우, 간단한 키트의 형태로 현장에서 우유 중의 혈청성분을 측정할 수도 있을 것이다.

이러한 가능성을 확인하기 위하여, 우유 성분 중 염증반응에 관련 높은 혈청성분인 immunoglobulin (IgG)의 농도를 측정하는 간편한 ELISA 및 immunochromatography법을 개발하고자 본 연구를 수행하였다. 이를 위하여 bovine IgG를 정제하고 이에 대한 단클론항체를 개발하여 원유 중의 IgG 함량과 체세포수 간의 상관관계를 조사하였으며 현장적용이 가능한 간편진단법으로서의 적용이 가능할 것인가 여부를 조사하였다.



II. 재료 및 방법

1. 면역원 준비

1-1. 재료

제주축협공판장의 도축장에서 채혈한 교잡우의 전혈 2ℓ로부터 혈청 400 ml를 분리하여 bovine IgG의 분리에 사용하였다.

1-2. Bovine IgG의 정제

Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden)을 이용한 affinity chromatography를 실시하여 bovine IgG를 분리하였다. 즉, gel에 접합된 protein G와 혈청 중의 IgG가 결합되도록 하였다. Sepharose gel을 syringe column (16 × 80 mm)에 충전시킨 후, 20mM phosphate buffer, pH 7.2 (PB)로 2배 희석한 소혈청 100 ml을 가하였다 (flow rate : 0.5 ml/min). Protein G와 결합하지 않은 혈청의 기타 성분들은 약 30 ml의 PB로 세척하여 제거하였다. 결합된 bovine IgG는 3M NaSCN을 가하여 용출시켰다. 분획은 2 ml씩 나누어 회수하고, protein assay kit (Bio-Rad, USA)을 이용해서 단백질량을 측정하였다. 단백질량이 높은 분획은 합한 후 20mM PB에 투석하고 제균여과하여 냉장보관하며 마우스의 면역과 단클론항체의 정제를 위한 실험에 사용하였다.

1-3. SDS-PAGE

1) SDS-PAGE 관련 시약 제조

SDS-PAGE를 위한 시약을 table 1 및 table 2와 같이 준비하였다.

Table 1. Compositions of reagents for SDS-PAGE.

Medium	Contents	Quantity
40% Acrylamide stock	Acrylamide	38.67g
	Bis-acrylamide	1.33g
		in 100ml DDW
Lower gel buffer (4×LGB)	Tris	90.855g
	0.4% SDS	10ml of 20% SDS
	pH 8.8 adjusted with HCl	total 500ml
Upper gel buffer (4×UGB)	Tris	30.77g
	0.4% SDS	10ml of 20% SDS
	pH 6.8 adjusted with HCl	total 500ml
10% APS	Ammonium persulfate	100mg/ml
4× Loading dye	100% glycerol	5ml
	4× UGB	4.4ml
	0.5% bromophenol	0.4ml
Running Buffer	DGB	200ml
	20% SDS	5ml
	DDW	total 1 ℓ
Coomassie gel staining solution	Coomassie blue	1g
	Methanol	450ml
	Acetic acid	100ml
Coomassie gel destaining solution	DDW	450ml
	Methanol	100ml
	Acetic acid	100ml
	DDW	800ml

2) SDS-PAGE Gel 제조

Table 2. solutions for SDS-PAGE Gel

	12.5% Separating	15% Separating	4% Stacking
40% Acrylamide	9.35ml	9.38ml	500 μ l
4×LGB	6.25ml	6.25ml	
4×UGB			1.25ml
DDW	9.07ml	9.04ml	3.18ml
10% APS	300 μ l	300 μ l	60 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	3 μ l

Separating gel은 12.5%를 사용하였으며, stacking gel은 4%의 gel을 사용하였다.

전기영동을 위하여 separating gel은 table 2와 같이 조제하여 gel plate에 분주하기 직전에 10% APS와 TEMED를 가하고 잘 혼합한 후 사용하였다. 기포가 생기지 않도록 분주하고 well의 끝에서 1 cm 정도의 stacking gel을 위한 공간을 남겨두고 증류수를 채워 gel이 수평이 되도록 하여 30분 정도 굳혔다. Stacking gel을 table 2와 같이 조성하고 그 혼합액을 분주 전 10% APS와 TEMED를 가하여 잘 교반한 후 gel plate 상단까지 분주하고 comb를 장착하여 완전히 굳힌 후 사용하였다. Gel이 굳은 것을 확인하고 comb를 조심스럽게 뽑아 well내를 증류수로 3회 세척하고 gel caster를 떼어 내었다. Gel 밖에 묻어 있는 acrylamide를 완전히 제거하고 gel running tank에 장착한 후 upper tank와 lower tank에 running buffer를 채웠다.

3) 전기영동 sample 처리

정제한 bovine IgG sample에 sample buffer를 가하여 3분 동안 100°C에서 중탕하였다. 뚜껑에 증발된 수증기를 모으기 위해 원심분리하여 사용하였다. Standard size marker는 7 μ l를, 정제된 bovine IgG는 5 μ l씩 loading하였다.

4) 전기영동

전기영동의 조건은 10mA로 영동장치에 전원을 40V로 조정하고 bromophenol blue dye가 stacking gel을 벗어날 때까지 약 20-30분 간 영동하였다. 이후에는 100V으로 승압시켜 bromophenol blue dye가 바닥에 도달할 때까지 전기영동을 실시하였다.

5) 염색

Coomassie gel staining solution으로 1시간동안 염색하였고 염색시 74 rpm으로 교반하였다. 탈색은 Coomassie gel destaining solution 으로 1-2시간 정도 교반하며 탈색하였다.



2. BALB/c mouse 면역

6 주령의 암컷 BALB/c mouse 2마리에 매 접종시 bovine IgG 항원 130 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 씩 투여하였다.

Fig. 1과 같이 1차 접종 시 Freund's complete adjuvant와 면역용 항원을 동량으로 섞어 emulsion 상태로 조제하여 마우스 복강 내에 접종하였다. 2차와 3차 추가접종은 Freund's incomplete adjuvant와 섞어 emulsion 상태로 조제하여 접종하였다. 4, 5, 6차 면역은 24시간 간격으로 항원만 3회 접종하며 마지막 접종 24시간 후에 세포융합을 실시하였다.



Fig. 1. Immunization schedule for the cloning of hybridoma.

BALB/c mouse, female, 6 w.o. Dose: 130 $\mu\text{g}/\text{head}$.

3. Hybridoma cloning

3-1. Fusion

1) Fusion 관련 시약

SP/2 세포와 fusion 및 hybridoma 배양을 위한 배지는 table 3과 같이 조제하였다.

Table 3. Compositions of culture media for cloning.

Medium	Contents	Quantity
Culture medium (pH 7.0)	DMEM(GIBCO BRL NO12100-046)	500ml
	FBS	100ml
	7.5% Sodium bicarbonate	14.5ml
	gentamycin	2ml
	10% L-glucose	5ml
	Antibiotic mycotic	5ml
Washing Medium (pH 7.2)	DMEM	500ml
	1M HEPES	5ml
HAT medium	DMEM	100ml
	100×HAT	1ml
HT medium	DMEM	100ml
	100×HT	1ml
Cloning Medium	DMEM	100ml
	conditioning Medium	100ml
Freezing Medium	DMSO(dimethyl sulfoxide)	5ml
	culture medium	50ml

2) Fusion

면역된 BALB/c 마우스의 비장을 취하여 세포융합에 사용하였다. 심장을 통하여 전 채혈하고, 경추탈구법으로 안락사 시킨 후, 70% ethanol로 소독하였다. 가위와 포셉을 사용하여 clean bench내에서 비장을 적출한 후, 70% ethanol에 1회, washing medium에 2회 침적하였다. 세포융합에 사용되는 모든 용액은 37℃로 미리 가온하여 사용하였다.

비장세포의 적출을 위하여 50 ml tube 위에 불에 달군 stainless steel mesh (400목)을 놓았다. 그 위에 분리된 비장을 놓고 2 ml 주사기를 이용하여 비장 내에 washing medium을 주입시켜 부풀린 후 비장세포를 분리한 후 washing medium 20 ml를 첨가하였다. 이후 3회 원심분리 (1500 rpm, 3분, RT)하여 세척하였다. 비장세포의 2회 세척시 지수분열기 상태로 배양된 SP/2 myeloma cell을 50 ml tube에 넣고 동시에 원심분리 (1500 rpm, 3분, RT)하여 2회 세척하였다. 원심분리 후 침전된 세포량 (packed cell volume)이 동일하게 (SP/2 : 비장세포 = 1 : 5-6) 되도록 세포량을 조절하고 비장세포와 SP/2 cell을 혼합하였다. 이후 3회 더 원심분리를 실시하여 혈청성분을 완전히 제거하였다. 마지막 세척 후 washing medium을 완전히 제거한 상태에서 침전된 세포들을 부드럽게 tapping하여 tube바닥에 골고루 얇게 퍼지게 한 후, PEG-1500 (Roche, Germany)를 가하여 세포융합이 이루어지게 하였다.

PEG 처리는 다음과 같다. 즉, 1분에 걸쳐 PEG를 1 ml를 천천히 첨가한 후, 30초 정치하였다. 그 다음 washing medium를 1분 동안 1 ml를 가하고 30초 정치한 후 washing medium를 1분간 2 ml 가하고 이어 washing medium을 30초간 가하였다. 30초 정치 후 washing medium 10 ml를 30초간 가한 후 pipette을 이용하여 세포를 풀어 주었다.

융합이 완료된 세포들은 washing medium으로 2회 원심분리 (1,000 rpm, 5분, RT)하여 세척하였다. DMEM 100 ml에 침전된 세포를 부유시켜 96 well flat bottom plate에 100 μ l씩 분주하였다. 24시간 경과 후 HAT medium (Gibco, USA)를 각 well 당 100 μ l씩 가하여 융합된 hybridoma를 배양하였다. 약 5일간 HAT medium을 가하며 세포융합이 되지 않은 SP/2 세포를 사멸시켰다. 이후 3일간 HT medium을 분주하였다. 세포의 증식정도에 따라 배양액 교환주기를 조절하였다.

3-2. 특이항체를 분비하는 hybridoma screening을 위한 ELISA

1) ELISA 관련 시약 제조

면역시킨 항원에 대한 면역성 여부와 hybridoma 세포의 선별에 사용하기 위해 table 4와 같이 시약을 조제하였다.

Table 4. Chemical composition of reagents for ELISA.

Solution	Contents	Quantity
Coating buffer (carbonate-bicarbonate pH9.6)	Na ₂ CO ₃	1.59g
	NaHCO ₃	2.93g
	Distilled water	adjusted to 1 ℓ
Phosphate- buffered saline (PBS) (pH7.2)	NaCl	8g
	KH ₂ PO ₄	0.2g
	Na ₂ HPO ₄	1.15g
	KCl	0.2g
PBS- T	Distilled water	adjusted to 1 ℓ
	PBS	100ml
Sample buffer	Tween 20	50μℓ
	PBS-T	100ml
Chromogen buffer pH 5.0	10% NaN ₃	500μℓ
	0.1M Citric acid	24.3ml
	0.2M Phosphate	25.7ml
Substrate buffer	Distilled water	50ml
	chromogen buffer	10ml
	H ₂ O ₂ (30%)	4μℓ
	ABTS	0.01g

2) ELISA

특이항체를 분비하는 hybridoma 세포를 선별하기 위하여 세포가 well 바닥의 1/3 정도 분열하였을때 배양 상층액을 100 μℓ씩 취하여 ELISA를 실시하였다. 즉, 면역원으로 사용한 정제된 bovine IgG를 coating buffer로 5 μg/ml 희석한 후 microplate에 분주하여 4℃에서 16시간동안 흡착시켰다. 상층액을 제거하고 PBS로 3회 세척 후, 비 특이적인 항원의 결합을 억제하기 위하여 0.2%의 BSA blocking 용액 200 μℓ를 각 well에 분주하여 4℃에서 2시간 정치하였다. 상층액

을 제거한 후 PBS로 3회 세척하여 bovine IgG가 흡착된 ELISA plate를 준비하였다. Hybridoma 세포 상층액을 100 μ l씩 ELISA plate의 well에 가한 후 실온에서 30분 반응시킨 후 PBS로 3회 세척하고 goat anti-mouse IgG-HRP (BioDom, Korea) conjugate buffer로 희석하여 100 μ l씩 가하고, 실온에서 30분 반응시켰다. PBS로 3회 세척하고 chromogen buffer에 0.1% ABTS (Sigma, USA)와 0.02%의 과산화 수소를 함유한 액을 각 well에 100 μ l씩 첨가하고 실온에 30분간 반응시킨 후 405nm (reference 파장 492nm)에서 흡광도를 측정하였다 (Spectra III, Austria). 특이항체를 생산하는 hybridoma 세포를 24 well plate에 옮겨 배양하고 2개의 well 당 세포가 1개씩 들어가도록 한계희석하여 분주한 후 위와 같은 선별 과정을 수행하였다.

3-3. Hybridoma 세포의 동결보존

특이항체를 분비하는 hybridoma 세포를 동결보존하기 위하여 세포가 지수분열기 상태로 자란 세포배양액을 멸균된 conical tube에 모아 1,600 rpm에서 10분간 원심하여 상층은 제거하고 침전물을 냉동보관용 배지 (freezing medium) 5 ml을 추가하여 이를 부드럽게 흔들어서 충분히 부유시킨 후, 이를 각각 1.8 ml cryogenic vials (Costar, USA)에 1.5 ml씩 나누어 분주하고 4°C에서 30분간 보관 후에 -70°C, 24시간 보관하였다가 다음날 액체질소에 동결 보존하였다.

4. 단클론항체 생산

4-1. 복수 생산

선정된 clone은 고역가의 단클론항체를 생산하기 위하여 pristane (2, 6, 10, 14-tetra-methyl-pentadecane: Sigma, USA)으로 일주일 전에 감각시킨 BALB/C 마우스 (8주령, 암컷)의 복강내로 $10^6 \sim 10^7$ 개씩 접종하여 10일~15일 후, 생성된 복수를 채취하여 단클론항체를 정제하였다.

4-2. 단클론항체 정제

마우스에서 얻은 복수를 affinity chromatography를 이용하여 bovine IgG에 대한 특이항체를 정제하였다. 동결건조된 CNBr-activated sepharose 4B 2g을 1mM HCl 20 ml에 현탁시킨 후 15분간 팽윤시켰다. 팽윤시킨 gel은 sintered glass funnel을 사용하여 세척하였다. 세척은 400 ml의 1mM HCl을 coupling 용액 (0.5M NaCl을 포함한 0.1M NaHCO₃ buffer (pH 8.3)) 20 ml에 bovine IgG 30 mg을 가한 후 즉시 gel과 혼합하여 2시간동안 실온에서 저어주었다. Blocking agent인 0.2M glycine을 400 μ l 넣고 4°C에서 overnight한 다음 column에 충전시켰다. 충전된 column에 0.5M NaCl을 포함하는 0.1M NaHCO₃ buffer (pH 8.3)와 0.5M NaCl을 포함하는 sodium acetate buffer 0.1M (pH 4)를 교대로 4-5차례 흘려주었다. PBS로 repacking하기 위해 60 ml 흘려주면서 기포를 제거하였다. 다시 PB (20mM phosphate buffer with 0.02% NaN₃)로 세척하고 3M NaSCN을 20 ml 정도 흘려주었다. 이 과정을 2번 반복한 다음 20mM PB로 세척하고 각 clone에 대한 복수를 흘려주었다. 그리고 다시 20mM PB로 세척하였다. 3M NaSCN을 흘려주어 컬럼에 부착되어있는 단클론항체를 분리하였다. Bio-Rad 단백정량 시약으로 단백량을 체크하면서 2 ml씩 분취하였다. 단백량이 높게 나온 분획은 즉시 20mM PB에 투석하였다.

4-3. 단클론항체의 Isotype

단클론항체의 isotype을 확인하기 위하여 Sigma ImmunoType Mouse Monoclonal Antibody Isotyping kit (Sigma, USA)를 사용하였다. Strip을 12 × 75 mm test tube에 삽입하고 단클론항체를 생산하는 hybridoma 세포배양액 2 ml을 분주하였다. 실온에서 30분간 반응시킨 후 배양액을 제거하고 PBS-T-BSA (세척액) 4 ml에 5분동안 침적하여 strip을 세척하였다. 세척액을 완전히 제거한 후 준비된 biotinylated second antibody을 분주하여 5분동안 반응시키고, antibody를 제거한 후 세척액으로 strip을 5분간 세척하였다. 세척액을 완전히 제거한 후 준비된 Avidin-Peroxidase을 tube에 가한 후 5분간 반응시켰다. 반응액을 제거하고 4 ml 세척액에 strip을 세척하고 마지막으로 PBS에 5분 세척하였다. 세척액을 완전히 제거하고 substrate solution을 test tube에 넣고 insoluble signal이 붉고 선명할 때까지 반응시켰다. Isotype signal이 보이면 tube에서 즉시 꺼내 여과지에 놓고 건조하였다.



5. 유 중 혈청 IgG 측정용 ELISA

5-1. 단클론항체 흡착 plate 준비

정제된 단클론항체들을 coating buffer로 희석하고, 이를 ELISA plate (Polysorp, Nunc, USA)에 100 μ l씩 분주하여 37°C의 항온기에 2시간 정치한 후에 4°C에서 16시간동안 흡착시켰다.

5-2. HRP labeled conjugate 제조

Two-step glutaraldehyde법을 실시하였다 (Wilson, 1978).

Peroxidase (Sigma, USA, RZ=3) 10 mg을 0.1M phosphate buffer (pH 6.8) 0.2 ml에 용해하고 1.25% glutaraldehyde (Sigma, USA)를 함유하여 실온에서 18시간 정치하였다. 0.15M NaCl로 PD10 column

(Pharmasia, Sweden)을 평형시키고 활성화시킨 peroxidase를 가하여 glutaraldehyde를 제거하였다. 이 후 단클론항체 (5 mg in saline)를 가한 후 sodium carbonate-bicarbonate buffer를 이용하여 pH를 9.5까지 올려주었다. 4°C에서 24시간 정치한 후 0.2M glycine 0.1 ml을 가하고 2시간동안 4°C에 정치한 후 PBS로 투석하였다

5-3. Antibody pair 결정

준비된 plate를 DDW로 3회 세척하고 bovine IgG 농도를 100, 10, 1, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 되게 PBS-T에 희석하여 well당 100 μl 씩 분주하고 실온에서 30분간 다시 정치한 후 PBS로 3회 세척하였다. 이후 enzyme 표지된 항체를 PBS-T에 희석하고 각 well에 100 μl 씩 분주하고 실온에서 30분간 방치 한 후에 PBS로 3회 세척하였다. 여기에 substrate buffer를 100 μl 씩 분주하고 30분 후에 파장 405nm와 reference 492nm에서 OD값을 측정하였다. OD값이 큰 pair를 ELISA 및 immunochromatography를 위한 antibody pair로 선정하였다.

5-4. Assay

정제된 단클론항체 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 되게 PBS에 희석하고, 이를 ELISA plate (Polysorp, Nunc, USA)에 100 μl 씩 분주하며 37°C의 항온기에 1시간 흡착시켰다. PBS로 3회 세척하고 standard curve로 bovine IgG를 PBS-T에 100, 10, 1, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 되게 희석하여 well당 100 μl 씩 분주하고 실온에 30분 정치하였다. 또한 Fossmatic 300 (Foss Electric, Denmark)기기로 체세포수를 측정 한 원유를 20배 희석하여 100 μl 씩 분주하고 실온에 30분 정치하였다. 다시 PBS로 3회 세척하였다. 이 후 enzyme 표지된 항체를 PBS-T에 희석하고 각 well에 100 μl 씩 분주하고 실온에서 30분간 방치한 후에 PBS로 3회 세척하였다. Substrate buffer를 100 μl 씩 분주하고 30분 후에 이를 파장 405nm와 reference 492nm에서 OD 값을 측정하였다

6. Immunochromatography

6-1. Colloidal gold 접합체 제조

1) 20nm colloidal gold (100 ml)의 제조

3차 증류수 89 ml를 60°C로 가열하면서, 1% gold chloride 1 ml을 가한 후 0.4% sodium citrate 10 ml를 가열된 gold chloride의 증양에 첨가하였다. 용액이 적색으로 변할 때까지 약 50분간 가열하였다가 5분간 끓인 후 실온에 정치하였다.

2) 40nm colloidal gold (100 ml)의 제조

20nm gold 25 ml에 증류수 153 ml을 가한 다음 끓였다. 1% sodium citrate 2 ml을 가하여 0.01%가 되게 하였다. 1% gold chloride 2 ml을 물 18 ml과 섞은 후 1 ml/min 속도로 점적하였다. 이후 온도를 유지하며 20분간 끓인 후 gold 접합체 제조에 사용하였다.

3) Gold 접합체 제조

Gold 접합체를 만들기 위하여 시작 조건은 plain gold의 OD₅₁₄값이 1.0이 되게 하고 단백질농도는 0.1 mg/ml이 되게 하였다. 접합체 제조를 위하여 pH 7.5로 조정된 plain gold 50 ml에 단클론항체를 점적한 후 30분간 정치한 후 1.0N NaOH로 pH를 9까지 올린 후, 2 ml의 정상 마혈청을 가하였다. 10분간 반응시킨 후 pH 7.5로 조정하고, 이를 원심분리 (10,000g 30분, 4°C, Kontron Centrikon T-324, Italy)하여 맑은 상층액을 걷어내고 2 ml의 gold 접합체 희석액에 재부유하였다. 이렇게 준비한 농축 gold 접합체는 gold 접합체 희석액 (2% T-20, 10% 마혈청, 5% sucrose, 0.05% NaN₃, 100 mM PB)으로 적당한 조건이 되도록 희석하여 분석에 사용하였다.

6-2. Immunochromatography

Nitrocellulose transfer membrane (SP 003, Whatman, USA)을 3 mm폭으로 절단하고, 정제된 항체 2.5 mg/ml을 1.0 μ l씩 점적하여 실온에서 건조시킨 후 immunochromatography를 실시하였다.

96 well plate의 각 well 당 농축된 gold 집합체는 5 μ l, gold 집합체 희석액 10 μ l, bovine IgG 농도를 0.1에서 100 μ g/ml까지 달리 하여 각 농도별 희석액 8 μ l씩 가하였다. 이후 단클론항체가 흡착된 strip을 삽입하여 혼합액이 스며들며 흡착된 항체와 항원 및 gold conjugate가 반응되어 적색으로 변색되는 현상을 관찰하였다. 이와 같은 조건으로 원유, 소혈청도 각 8 μ l씩 well에 분주하여 분석하였다.



Ⅲ. 결 과

1. Bovine IgG 항원 정제

Protein G sepharose gel을 이용하여 affinity chromatography법으로 bovine IgG를 정제하였다 (Fig. 2).

OD₂₈₀값이 2.0 이상을 보이는 분획을 취하여 이틀간 투석한 후 bovine IgG 단백질이 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 9 ml를 얻었다.

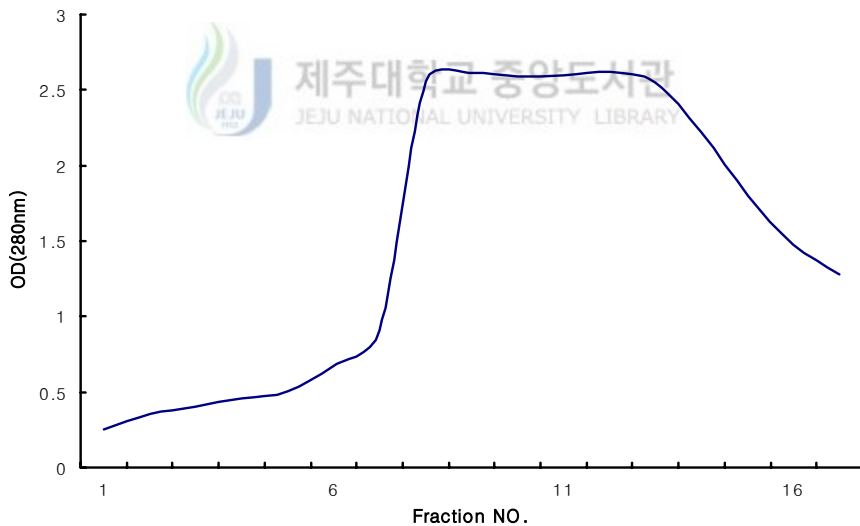


Fig. 2. Affinity purification of bovine IgG antigen. Bovine serum was applied on the gel coupled with protein G. The concentration of each bovine IgG fraction was measured in optic density at 280nm.

2. 면역원의 정제도

분리한 bovine IgG의 정제 정도를 확인하기 위하여 12.5% gel로 SDS-PAGE를 수행하였다. Heavy chain 과 light chain으로 여겨지는 2개의 분획은 각 55 kDa, 25 kDa으로 나타났다 (Fig 3).

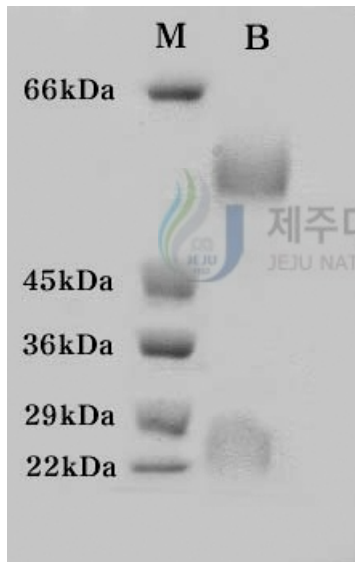


Fig. 3. SDS-PAGE profile of purified bovine IgG

M : Low range marker (Sigma)

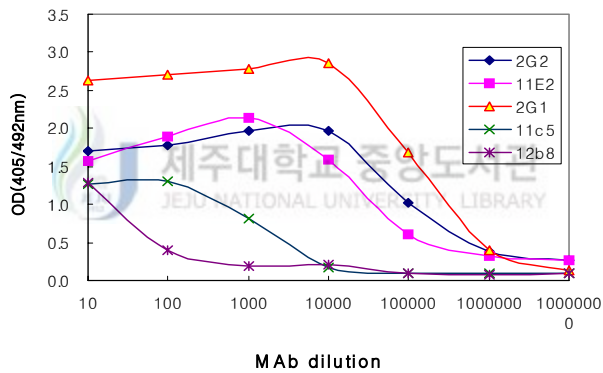
B : Purified bovine IgG

3. 단클론항체

3-1. 단클론항체 복수 역가

2 회 (A: 제 1차 fusion, B: 제 2차 fusion)에 걸쳐 얻어낸 hybridoma 세포를 마우스 복강내에 접종하여 수확한 복수의 항체 역가를 조사하였다 (Fig. 4). $\times 100,000$ 이상의 역가를 보이는 2G1, 2G2 및 11E2의 3종의 clone을 선정하여 이후의 면역분석에 사용하였다.

A



B

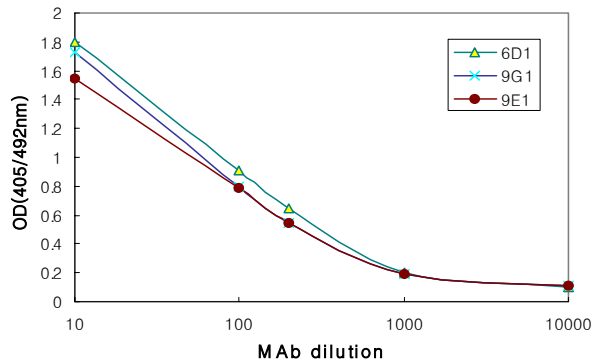


Fig. 4. Titer of monoclonal antibody against bovine IgG by ELISA

3-2. 단클론항체의 Isotype

Bovine IgG에 대한 단클론항체는 IgG1 type 5종 (2G2, 6D1, 9G1, 9E1, 11E2) 및 IgG2b type 3종 (2G1, 11C5, 12B8)이었다 (Table 5).

Table 5. Isotypes of cloned monoclonal antibodies against bovine IgG

Clone No.	Isotypes
2G1	IgG2b
2G2	IgG1
6D1	IgG1
9E1	IgG1
9G1	IgG1
11C5	IgG2b
11E2	IgG1
12B8	IgG2b

4. ELISA

4-1. Antibody pair 결정

복수의 역가가 높은 clone 2G1, 2G2, 11E2 복수를 정제하여 antibody pair 선정을 위한 조건을 조사하였다. 각각의 단클론항체의 HRP 접합체와 ELISA plate 흡착조건을 달리하여 최적의 조건을 조사하였다. 이 중 2G1 항체를 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 ELISA plate에 흡착시키고, 2G2 및 11E2의 HRP 접합체를 희석하여 bovine IgG를 측정할 반응 곡선은 fig. 5와 같았으며, 2G2-HRP 접합체 희석 배수 $\times 400$ 인 경우에 bovine IgG 농도 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 범위에서 용량에 비례하는 반응곡선이 표출되었다. 따라서 이후의 분석에서는 2G1 항체 흡착, 2G2-HRP 접합체의 조건을 이용하였다.

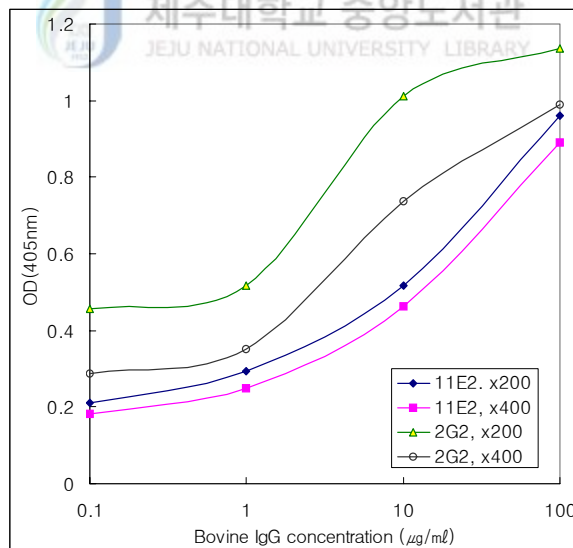


Fig. 5. Pairing of IgG coated plate and HRP-conjugated IgG in ELISA. In this pairing, as a anti-bovine IgG coated on plates, 2G1 was used. As HRP-conjugated anti-bovine IgG, 11E2 and 2G2 were added. The pair of $\times 400$ diluted HRP-conjugated 2G2 with 2G1 showed a concentration response curve with the highest sensitivity by bovine IgG.

4-2. 우유 중 IgG 함량의 측정

원유는 sample buffer로 20배 희석하여 ELISA를 실시하였으며, 체세포수와 IgG 농도를 반영하는 흡광도 간에는 $y=0.0126\text{Log}(X)-0.0065$ 의 함수관계를 나타내었다. 비교적 OD 치가 낮았고 체세포수와 IgG의 반응성이 항상 일치하지는 않았으나, R^2 가 0.5656로 나타나 체세포수가 증가할수록 IgG 함량도 증가하는 것으로 판단되었다 (Fig. 6).

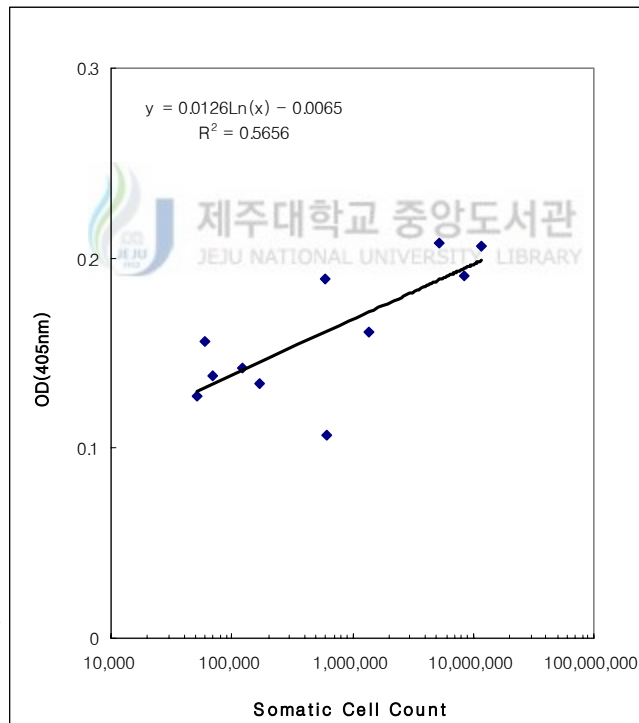


Fig. 6. Quantitative Relationship of bovine IgG concentration and the number of somatic cells in milk using 2G1 MAb as capture antibody and HRP-conjugated 2G2 MAb.

위의 조건과는 달리 2G1을 흡착시키고, conjugate를 HRP 표지한 11E2를 사용하여 우유 중 IgG의 농도와 체세포수와의 상관관계를 보면, $y=0.0046\text{Log}(X)+0.0871$ ($R^2=0.3962$)의 함수가 성립되었다 (Fig. 7).

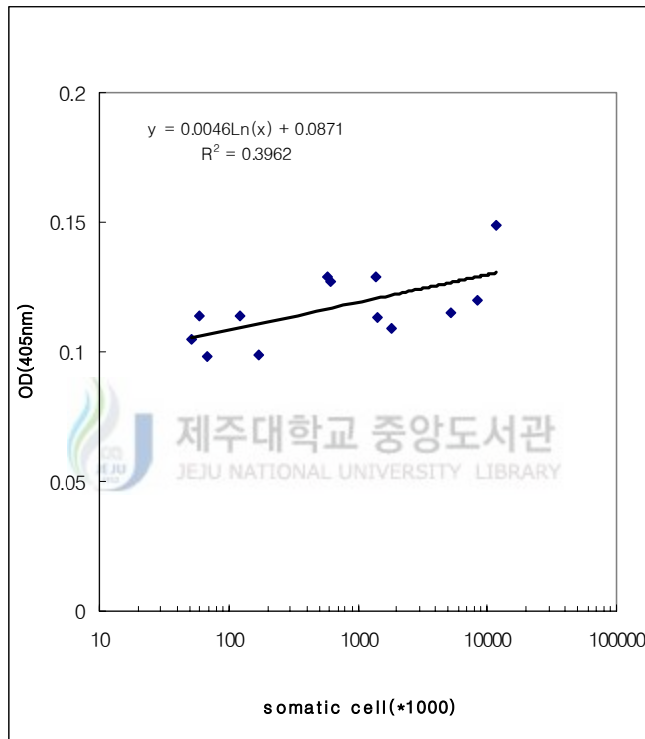


Fig. 7. Quantitative Relationship of bovine IgG concentration and the number of somatic cells in milk using 2G1 MAb as capture antibody and HRP-conjugated 11G2 MAb.

5. Dot blotting에 의한 Immunochromatography

Nitrocellulose transfer membrane (Whatman, SP 003, USA)에 2G1 단클론항체 (2.5 mg/ml) 1 μ l씩을 6 mm간격으로 4개소에 점적한 후, 11E2-gold conjugate (사진 A) 및 2G2-gold conjugate (사진 B) 를 사용하여 bovine IgG 농도 100, 10, 1 및 0.1 μ g/ml의 반응양상을 관찰하였다. 두가지 경우에서 각 농도별의 구분이 가능하였으나, 저농도 용액의 구분은 2G2-gold conjugate의 경우가 비교적 구분이 용이한 것으로 판단되어, 이후의 실험에는 2G1 coating에 2G2-gold conjugate pair를 선정하여 혈청 혹은 우유 중의 IgG 함량 측정에 사용하였다 (Fig. 8).

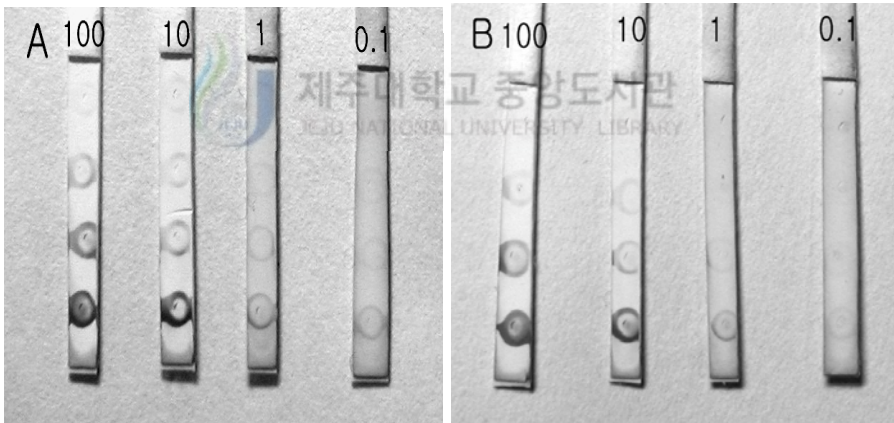


Fig 8. Immunochromatography by dot blotting to determine the detection limits of bovine IgG. MAb 2G1 was blotted at regular distance on 4 different sites of each NCM sheet, gold-conjugated MAb 11E2 (A) and 2G2 (B) used as secondary antibodies mixed with different concentrations (100, 10, 1 and 0.1 μ g/ml) of bovine IgG were absorbed from the below of sheet.

우유의 경우는 fig. 9와 같이 우유 내의 체세포 함량에 비례하는 양상을 보였다. 즉, 체세포수가 1,000,000 이상인 경우는 4번째 dot까지 반응을 보이는 반면, 200,000 미만인 경우는 2번째 dot까지 반응을 나타내었다.

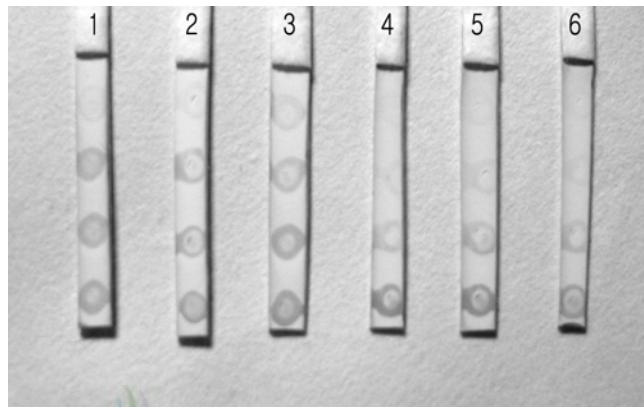


Fig. 9. Immunochromatography of milk using dot blotting. MAb 2G1(2.5 mg/ml) was blotted at regular distance on 4 different sites of each NCM sheet and gold-conjugated MAb 2G2 was mixed with milk. The milks containing various somatic cell counts (1: 8,295,000 cells, 2: 5,303,000 cells, 3: 1,379,000 cells 4. 172,000 cells, 5: 69,000 cells, 6: 51,000 cells.) were applied.

Bovine IgG 농도를 측정할 때 적절한 측정 범위의 설정이 필요한지 여부를 알아보기 위하여, 정상 소혈청을 $8 \mu\text{l}$, 및 $2 \mu\text{l}$ 씩 가하여 비교한 결과 혈청을 $2 \mu\text{l}$ 점적한 strip이 $8 \mu\text{l}$ 보다 오히려 뚜렷한 반응을 나타내었다 (Fig. 10).

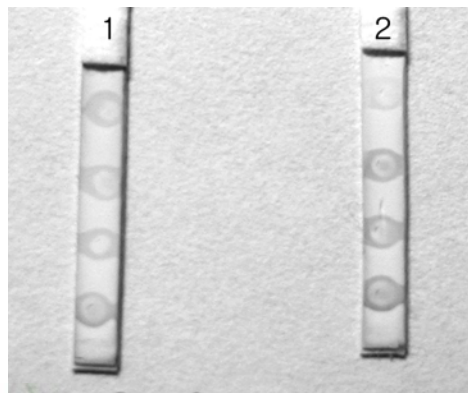


Fig. 10. Immunochromatography of bovine serum using dot blotting. MAb 2G1(2.5 mg/ml) was blotted at regular distance on 4 different sites of each NCM sheet, gold-conjugated MAb 2G2 was tested on the strip 1 or 2, 8 or $2 \mu\text{l}$ of bovine serum were applied, respectively.

IV. 고 찰

낙농가의 경제적 손실을 일으키는 주된 원인이 우유 중 체세포 함량임에도 불구하고 농가 현장에서 쉽게 체세포 함량을 관리하기에 어려움이 많다. 이는 체세포의 측정 방법이 고가의 분석장비나 전문가에 의한 현미경 검경을 필요로 할뿐만 아니라 현장검사법들도 숙달된 사람이 아니면 판정하기 어려운 경우가 많기 때문이다.

기존 연구자들의 보고에 따르면 야외에서의 체세포 측정은 국내 외를 막론하고 California Mastitis Test (CMT)를 많이 이용한다고 하지만 (Forster 등, 1967; Jones 등, 1984; Bodoh 등, 1976; Reneau, 1986), 우리나라의 경우 허 등(1998)에 따르면 74농가 중 35농가 (47%)가 CMT를 실시하지 않는다고 하였다. 즉 농가에서 직접 체세포수를 측정하는 간이검사법으로 활용되고 있는 최고의 방법이 CMT이지만 여전히 농가에서 직접 검사하기에는 이 방법에 문제점이 많다는 것을 암시한다고 할 것이다.

따라서 본 연구는 유방염 감염시 체세포 수치가 높아 질 뿐만 아니라 면역글로불린 수치도 높아진다는 보고(Kitchen, 1981)를 기초로 원유 중 면역글로불린을 간편하게 측정할수 있는 방법을 개발하여 낙농현장에서 효과적으로 유방염을 관리하는 데 도움을 주고자 하였다.

Affinity chromatography에 의하여 정제된 bovine IgG를 SDS-PAGE로 확인한 결과 두 개의 분획이 관찰되었다. 두 개의 분획은 각각 그 분자량이 55 kDa과 25 kDa으로 bovine IgG의 heavy chain과 light chain으로 판정되어 순수하게 정제되었음을 확인할 수 있었다.

Bovine IgG에 대한 단클론항체를 생산하는 잡종세포주는 2G1, 2G2, 6D1, 9G1, 9E1, 11C5, 11E2, 그리고 12B8으로 총 8종을 선별하

였다. 각 단클론항체는 IgG2b type의 클론이 3주, IgG1 type의 클론이 5주였다 (Table 5).

Bovine IgG에 대한 항체를 생성하는 hybridoma 세포들이 분비하는 항체 역가는 다양하였고 항체의 역가를 최고치로 만들기 위하여 잡종세포주를 마우스의 복강에 접종하여 복수를 채취한 결과 이들 세포주 중에서 복수에서의 역가가 높은 2G1, 2G2, 11E2, 3종류를 선택할 수 있었다. Sandwich ELISA를 위한 적합한 항체의 pair를 조사한 결과 2G1 흡착 및 2G2-HRP conjugate pair의 경우가 bovine IgG 농도에 따른 반응곡선이 이상적으로 표출되었으므로 ELISA 분석계의 응용에 이들 pair를 적용하였다.

본 실험에서는 체세포수 측정법 대신 면역글로불린의 양을 측정하는 것이 유방염의 진단과 원유의 위생도를 측정하는 데 응용될 수 있는지를 관찰하기 위하여 먼저 원유 중 IgG 농도와 체세포 수와의 상관관계를 조사하였다. 두 인자의 R^2 값이 0.5656을 보여 다소의 상관관계를 보였다. 한편, ELISA의 감도는 본 연구에서는 HRP와의 접합이 만족스럽지 않았던 것으로 사료되며, 추후 최적의 조건 조사가 필요할 것이다

이와 같은 상관관계를 토대로 immunochromatography에 의한 IgG의 검출한계를 측정하기 위하여 먼저 immunochromatography의 민감도를 관찰하였다. 2G1 단클론항체를 nitrocellulose transfer membrane (NCM)에 dot-blotting하고 각각 100, 10, 1 및 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 표준 bovine IgG와 gold 표지된 11E2 혹은 2G2 반응액이 NCM의 아래쪽부터 흡수되도록 고안하였다. 결과적으로 bovine IgG 항원과 gold conjugated 단클론항체 (anti-bovine IgG) 반응액이 처음 dot와 반응하고 남은 여분의 gold conjugated 단클론항체가 다음의 dot와 순차적으로 반응하여 항원과 항체의 반응성이 점차 약해지는 것을 확인할 수 있었다. 이는 시료 내에 있는 항원 즉 본 실험에서의 경우 bovine IgG의 양을 반정량적으로 측정할 수 있는 방법으로서는 표준 bovine IgG 용액을 100, 10, 1 및 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나누어 측정하였을 때 최소 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 측정이 가능한 것으로 관찰되었다.

Fig. 8에서 gold 표지된 11E2보다 2G2의 적용이 표준 bovine IgG 용액의 농도에 따른 반응정도가 더 뚜렷하기에 gold 표지된 2G2를 선택하였다.

측정이 가능한 bovine IgG 농도의 설정이 필요한가에 대한 조사를 하기 위하여 일반 정상혈청의 용량을 달리하여 실험한 결과, 혈청을 2 μ l 점적한 strip이 8 μ l보다 뚜렷하게 나타났다. 이는 정상혈청중의 IgG 농도가 약 10 mg/ml인 것을 감안하면, immunochromatography로 측정될 수 있는 적정 IgG의량은 20 μ g 전후의 값이 될것임을 의미하기 때문에 검사시료의 IgG량이 20 μ g정도가 되도록 조건을 설정하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

이를 위하여, 충분한 반응이 이루어질 수 있도록 flow가 낮은 NCM의 적용도 고려해야 할 것으로 생각된다. 또한 우유 중의 정상 IgG의 농도를 감안하여 흡착 단클론항체의 용량 및 gold conjugate의 단클론항체 접합 용량 등의 세부적인 조건조사가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

실험실적으로 개발한 immunochromatography에서 체세포 100만 이상과 20만 미만의 우유간에 구분이 가능한 차이를 보여주었는데, 이는 보다 세부적인 체세포수의 차이를 구분할 수 있도록 조건을 개선시킨다면 현장적용이 가능한 신속진단법으로서의 개발 가능성을 보여준 것으로 판단된다.



V. 결 론

Bovine IgG에 대한 단클론항체를 생산하고 이를 이용하여 우유 중의 체세포수와 IgG 농도간의 상관관계를 알아보기 위하여 sandwich ELISA를 실시하였다. 표준 bovine IgG 농도 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 구간에서 용량에 비례하는 표준곡선이 형성되었다. 원유 중의 체세포수와 IgG 농도는 $y=0.0126\text{Log}(x)-0.0065$ ($R^2=0.5656$) 인 경향을 보였다.

이러한 결과를 바탕으로 농가현장적용이 가능한 신속측정법을 개발하기 위하여 실험실적인 immunochromatography법을 적용한 결과, 표준 bovine IgG 농도 100, 10, 1, 및 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 대하여 반정량이 가능하였다. 원유의 경우에 적용하였을 때, 체세포수 1,000,000 이상의 경우와 200,000 미만의 경우를 구분할 수 있었다.

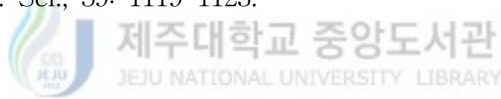
이러한 결과는 우유 중 혈청 IgG의 정상치 범위내에서 측정이 가능하도록 추가적인 조건이 보완될 경우 현장적용이 가능한 신속진단법으로서의 immunochromatography법 개발의 가능성을 보여준 것으로 판단된다.

VI. 참고 문헌

Abildgaard. 1967. The disease of the mammary gland of domestic animals. W.S. Saunders Co. Philadelphia and London, 113-118.

Bartlett, P.C., G.Y. Miller, C.R. Anderson and J.H. Kirk. 1990. Milk production and somatic cell count in Michigan dairy herd. J. Dai. Sci., 73: 2794-2800.

Bodoh, C.W., W.S. Battista, L.H. Schultz and R.P. Johnston. 1976. Variation in somatic cell counts in dairy herd improvement milk samples. J. Dai. Sci., 59: 1119-1123.



Butler, J.E. 1971. Review of the bovine immunoglobulins. J. Dai. Sci., 54: 1315-1316.

Butler, J.E. and C.F. Maxwell. 1972. Preparation of bovine immunoglobulin and free secretory component and their specific antisera. J. Dai. Sci., 5: 151-164.

Caffin, J.P., B. Poutrel and P. Rainard. 1983. Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G₁ concentration in milk. J. Dai. Sci., 66: 2161-2166.

Caffin, J.P. and B. Poutrel. 1988. Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G₂ concentration in milk. J. Dai. Sci., 71: 2035-2043.

Coffey, E.M., W.E. Vinson and R.E. Peason. 1986. Potential of somatic cell concentration in milk as a sire selection criterion to reduce mastitis in dairy cattle. J. Dai. Sci., 69: 2163-2172.

Doymaz, M.Z., L.M. Sordillo, S.P. Oliver and A.J. Guidry. 1988. Effects of *Staphylococcus aureus* mastitis on bovine mammary gland plasma cell populations and immunoglobulin concentrations in milk. Vet. Immunol. Immunopathol., 20: 87-93.

Forster, T.L., U.S. Ashworth and L.O. Luedecke. 1967. Relationship between california mastitis test reaction and production and composition of milk from opposite quarters. J. Dai. Sci., 50: 657-682.

Harmon, R.J. 1994. Symposium: Mastitis and genetic evaluation for somatic cell count. J. Dai. Sci. 77: 2103-2112

Infante, F. and G.H. Flores-Gutierrez. 2002. Improved immunobinding test using monoclonal antibodies for detection of *Mycoplasma bovis* in milk. Can. J. Vet. Res., Oct: 66(4): 282-284.

Jones, G.M., R.E. Pearson, G.A. Clabaugh and C.W. Heald. 1984. Relationships between somatic cell counts and milk production. J. Dai. Sci., 67: 1828-1831.

Kitchen, B.J. 1981. Review of the progress of dairy science : Bovine mastitis : milk compositional changes and related diagnostic tests. J. Dai. Res., 48: 167-188.

Naslund, K., M. Traven, B. Larsson, A. Silvanb and N. Linde. 2000. Capture ELISA system for the detection of bovine coronavirus -specific IgA and IgM antibodies in milk and serum. *Vet. Microbiology*, 72: 183-206.

Philipsson, J., G. Ral. and B. Berglund. 1995. Somatic cell count as a selection criterion for mastitis resistance in dairy cattle. *Livestock Production Science*, 41: 195-200.

Reneau, J.K. 1986. Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. *J. Dai. Sci.*, 69: 1708-1720.

Renee Riffon, Khampoune Sayasith, Hayssan Khalil, Pascal Dubreuil, Marc Drolet, and Jacqueline Lagace. 2001. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J. Cli. Microbiol.*, 39(7): 2584-2589

Scott, A.D., J.S. Mcdolnald, D. Hancock and T. Mcguire. 1988. *Staphylococcus aureus* antigens reactive with milk immunoglobulin G of naturally infected dairy cows. *J. Cli. Microbiol.*, 1175-1180.

Sordillom, L.M. and S.C. Nickerson. 1988. Quantification and immunoglobulin classification of plasma cell in nonlactating bovine mammary tissue. *J Dai. Sci.*, 71: 84-91.

Williams, M.R., D.A.G. Maxwell and R.L. Spooner. 1975. Quantitative studies on bovine immunoglobulins, normal plasma levels of IgG2, IgG1, IgM and IgA. *Res. Vet. Sci.*, 18: 314-321.

Wilson, M. R., J.R. Duncan., F. Heistand and P. Brown. 1972. The influence of preparturient intramammary vaccination on immunoglobulin levels in bovine mammary secretions. *Immunology*, 23: 313-320.

강희정. 2001. 제주지역 젖소의 유방염 원인균 분리 및 약제 감수성 검사. 제주대학교 대학원 석사논문.

金貞宇, 呂相建, 李孝宗. 1986. 소의 immunoglobulin G1에 대한 단 Clone성 항체의 생산에 관한 연구.(I. 소의 immunoglobulin G1의 순수분리). *Korean J. Anim. Sci.*, 28(12): 747-752.

金貞宇, 呂相建, 李孝宗. 1986. 소의 immunoglobulin G1에 대한 단 Clone성 항체의 생산에 관한 연구.(II. 소의 immunoglobulin G1에 대한 단 Clone 항체의 생산). *Korean J. Anim. Sci.*, 28(12): 753-758.



손봉환. 1994. 유방염감염 조사 및 예방대책에 관한 연구.[최근 3년간 (91~93) 유방염 발생 실태에 관한 최종 결과 보고서]. 한국가축위생학회 단행본.

손봉환, 최진영, 배도권, 정충일. 1997. 乳質改善을 통한 酪農家 所得增大. *Korean J. Vet. Serv.*, 20(3): 261-279.

손봉환. 1997. 유질과 유방염 관리. 도서출판 필방. p. 9-12, 105-108.

이정구, 손봉환, 이정길, 고흥범. 1993. 原乳內 體細胞數 測定을 위한 Fossomatic과 Coulter Counter 方法의 比較. *Korean J. Vet. Serv.*, 16(1): 1-10.

허정호, 정명호, 박영호, 조명희, 이주홍. 1998. 짓소 유방염 관리에 따른 세균 및 체세포수 등급 실태 조사 분석. Korean J. Vet. Serv., 21(3): 285-300.



(Supervised by Professor Lim Yoon-Kyu)

Department of Veterinary Medicine
Graduate School, Cheju National University
Jeju, Korea

This study was carried out to develop the immunoassay method for the estimating somatic cell counts in raw milk. For the purpose, bovine IgG was purified and monoclonal antibody was raised against bovine IgG. The concentration of bovine IgG was measured by sandwich ELISA based on the monoclonal anti-bovine IgG antibodies. The standard curve was marked linear between the range of bovine IgG concentration from $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ to $100\mu\text{g}/\text{ml}$. Between the concentration of bovine IgG and the somatic cell counts, the regression curve is marked as $Y=0.0126 \text{Log}(x)-0.0065$ ($R^2=0.5656$), hence there exist a trend of relationship between the two factors. Raw milk containing high level of somatic cells (more than 1,000,000 cells/ml) was distinguishable with that of low level (less than 200,000 cells/ml) with immunochromatography assay developed in this study. These results suggest the possibility of developing a rapid semi-quantitative immunochromatography kit of somatic cell counts in raw milk providing that additional optimization of assay system is performed.

Key words: Milk, Somatic cell count, Bovine IgG, Monoclonal antibody, Sandwich ELISA, Immunochromatography.