

H-Y 항원의 정제 및 특성규명에 관한 연구

건국대학교 동물자원연구센터

정미경 · 백정미 · 이정열 · 허용수 · 김창규 · 김종배

Studies on the Purification and Characterization of H-Y Antigen

M.K. Chung, J.M. Paik, J.L. Lee, Y.S. Heo, C.K. Kim and J.B. Kim

Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University

= Abstract =

These studies were carried out to investigate the properties of H-Y antigen purified by immunoaffinity chromatography using monoclonal H-Y antibody. Immunoaffinity column was prepared by the coupling of monoclonal antibody to the Aminolink Coupling Gel. Murine testis supernatant was applied onto the column and eluted by 0.1M glycine-HCl buffer and 31 μ g of H-Y Ag was eluted from one testis. Purified H-Y Ag strongly reacted with Con A and lentil from 6 different kinds of lectins tested, which may indicate that sugar moiety of H-Y Ag is composed of glucose, mannose and their derivatives. Con A-sepharose affinity column was used to purify H-Y Ag based on that H-Y Ag is glycoprotein. The fraction eluted by 0.2M Me- α -D-mannoside from the column loaded with murine testis supernatant was identified to be H-Y Ag by dot blot test. Molecular weight of the purified H-Y Ag was estimated by Sepharose G-75 gel filtration and SDS-PAGE, and showing that it was about 67,000 dalton. In fluorescence test, the ratio of XY embryos and XX embryos was 1:1.

서 론

웅성 특이 항원(MSA; Male Specific Antigen)은 1955년 Eichwald와 Silmser가 동종의 생쥐간에 상호 조직이식 실험을 하였을 때 자성에 웅성의 조직을 이식했을 경우에만 거부반응이 일어나는데서 최초로 발견되었고, 이는 Y 염색체에 있는 유전자에 의해 발현되는 것으로 확인되어 1960년 Billingham 등에 의해 처음으로 H-Y 항원(Histocompatibility Y-chromosomal antigen)이라 명명되었다. Daudi세포를 이용하여 실험관내에서 성전환실험을 실시한 결과 H-Y 항원의 기능은 포유류의 미분화 성선을 정소로 분화시키는, 즉 일차적으로 성의 결정에 관여하고 있음이 연구되었다(Zenes et al., 1978; Muller et al., 1978; Nagai et al.,

1979; Wachtel et al., 1979). H-Y 항원은 포유류의 경우 정소의 sertoli 세포에서 고도로 생성분비되며 정자세포(Goldberg et al., 1971)와 8세포기 이후의 수정란(Kroc et al., 1976; White et al., 1983; Shelton et al., 1984)에서도 그 세포막 표면에 존재함을 알 수 있었다. 이외에도 웅성포유류의 비성선세포들에서도 발현(Tokuda et al., 1977; Farber et al., 1984; Koo et al., 1981a)되며 H-Y 항원 자체는 minor histocompatibility antigen(Billingham et al., 1981)으로써 분자량이 45Kd 가량의 MHC(Major histocompatibility) 항원과 세포막에 함께 존재하며 이들 분자량 12Kd 가량의 β -macroglobin에 의해 세포막에 정박되어 있는 것으로 알려져 있다(Casanova et al., 1981; Ohno et al., 1978; Fellous et al., 1978). 이렇게 면역학적 및 생화학적인 면에서 H-Y 항원의 특성을 조사하려는 연구가 여러사람에 의해 진행되어 왔음에도 불구하고 H-Y 항원을 직접

본 연구는 1993년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 연구되었음.

정제하여 연구한 경우가 거의 없이 대부분의 항체와 결합시킨 immunoprecipitation이나 western blotting에 의한 분자량의 조사에 관한 정도였다(Hall et al., 1981; Nagai et al., 1979; Koo et al., 1981b; Wachtel et al., 1979; Bradly et al., 1985). 이에 본 연구에서는 웅성 생쥐의 정소세포배양액을 자성 생쥐에 주사하여 생산된 단클론성 항체를 이용하여 immunoaffinity column을 제조하고 이를 이용하여 조악한 정소배양 상층액으로부터 순수한 H-Y 항원을 정제하여 H-Y항원의 탄수화물 부분을 확인하는 실험을 실시하였다. 또한 이렇게 분리된 물질이 H-Y항원인지 재확인하기 위하여 생쥐의 8세포기 수정란부터 XY 성염색체를 보유한 경우 그 세포막 표면에 H-Y 항원이 발현되기 시작한다는 많은 연구결과들(Kroc & Goldberg, 1976; White et al., 1983; Shelton et al., 1984; Wachtel et al., 1984)을 토대로, 앞서 기술한 바와 같이 순수하게 정제된 H-Y 항원을 면역원으로 하여 역가 높은 항혈청을 생산한 후 생쥐수정란과 간접면역형광측정법을 이용한 반응을 시켜보는 방법과 이 항체를 이용하여 H-Y 항원의 존재여부가 알려진 Daudi 세포나 Raji세포들의 상층액을 dot blot test로 비교하는 방법들로 H-Y 항원에 대한 기본적인 특성과 아울러 이에 대한 항체의 특성을 조사하고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1-1. 실험동물 및 실험세포

H-Y 항원에 대한 monoclonal antibody를 분리하는 hybridoma 세포는 이미 생산된 그 특성이 조사된 2D45D4 세포(Shim, 1987)를 사용하였고 이 항체를 대량생산하기 위해 4-6주령 BALB/c계 생쥐를 사용하였다. Dot blot test를 위해 사용한 Daudi cell line(ATCC CCL 213)은 경희대학교 병원 면역학 연구실에서 제공 받았으며 Raji cell line(ATCC CCL 86)은 본 동물자원연구센터의 김 창한 교수님 연구실로부터 각각 분양받아 사용하였다. 신생생쥐의 정소세포는 생후 3일된 웅성 BALB/c계 생쥐를 사용하였다. 8세포기 이후단계의 수정란을 얻기 위해서는 3-4주령의 ICR계 생쥐를 사용하였고 역가높은 polyclonal antibody를 얻기 위해 New Zealand White계 자성토끼를

사용하였다.

2-1. Monoclonal antibody의 생산 및 정제

1987년 심등에 의하여 본 실험실에서 제조된, H-Y항원에 대한 monoclonal antibody를 분리하는 hybridoma세포군들 중에서 가장 역가가 높은 2D45D4을 선택하여 다음과 같이 그 항체를 대량생산하였다. Pristane과 incomplete Freund's Adjuvant로 7일전에 감작시킨 동종의 생쥐의 복강내에 5×10^6 에서 1×10^7 개의 세포를 주사하고 10-15일 이후 복강에 생선된 복수를 채취하였다. 이를 $1,000 \times g$ 에서 30분간 원심분리하여 그 상층액을 수거한 뒤 동량의 포화된 ammonium sulfate용액을 한방울씩 천천히 떨어뜨려 단백질을 염석시켰다. 염석된 단백질 용액을 $1,000 \times g$ 에서 20분간 다시 원심분리하여 그 침전물을 0.05M phosphate buffer(pH 7.4)에서 24시간 이상 투석하였다. 투석된 단백질 용액의 IgG는 protein A column을 이용하여 분리하였다.

2.2 Immunoaffinity column의 제조

Aminolink coupling gel(Pierce Co. Ltd)과 2.1에서 정제된 단클론성 항체 2D45D4를 젤 1ml에 2mg/ml의 비율로 선택하였다. 세척된 젤을 항체와 혼합한 후 1.0M NaCNBH₃를 젤 1ml당 50 μ l씩 서서히 첨가한 후 2시간 동안 혼합하여 4시간 동안 방치하였다. 결합된 젤을 컬럼에 고정시킨 후 1M Tris-HCl(pH 7.4)로 세척한다. 다시 1.0M NaCNBH₃를 젤 1ml당 500 μ l의 비율로 첨가한 후 30분간 혼합하여 항체가 결합되지 않은 젤의 반응기를 불활성화시켰다. 준비된 immunoaffinity column을 1M NaCl로 세척한 후 0.05% NaN₃에서 보관하였다.

2-3. H-Y 항원의 정제

Wachtel등(1979)의 방법에 따라 BALB/c계 4주령 생쥐의 정소를 세절하여 FBS가 첨가되지 않은 RPMI 1640 배양액에서 16시간 배양(37°C, 5% CO₂, 95% air)하여 이를 $800 \times g$ 에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 filter membrane(0.25 μ m, GELMAN Science)으로 여과하고 항원으로 사용하기 위해 -70°C에서 보관하였다. 본 실험에서 생산한 mouse monoclonal antibody(2D45D4)를 Aminolink Coupling gel에 coupling시킨 젤 4ml당 정소

Table 1. The lectins and their specific bound carbohydrate

Lectine	Specific carbohydrate
Goarse(<i>ulex europaeus</i>)	N,N'-diacetylchitobiose α -L-(-)-fucose
Soybean(<i>glycine max</i>)	D-(+)-galactose N-acetyl-D-galactosamine
Asparas pea(<i>tetragonolobus purpureas</i>)	α -L-fucose
Lentil(<i>Lens culinaris</i>)	sucrose D-(+)-glucose D-(+)-mannose methyl- α -D-mannopyranoside
Wheat germ(<i>triticum vulgaris</i>)	N-acetyl-D-glucoseamine
Conconavaline A(Jack bean)	α -D-glucose sucrose N-acetyl-D-glucoseamine β -D-fructose

세절배양액 1ml비율로 혼합하여 상온에서 30분간 방치하면서 5분마다 천천히 흔들어 주었다. 겔에 부착된 항체와 정소세절 상층액의 H-Y항원이 잘 반응하도록한 후 겔을 2×15cm column에 충전하였다. 만들어진 Immunoaffinity column을 반응되지 않고 남은 단백질 부분들을 제거하기 위해 세척용액(2mM Tris-HCl, pH 7.4)으로 충분히 세척하였다. 세척용액의 흡광도(280nm) '0'을 확인한 후 0.1M glycine-HCl(pH 2.8)로 분당 2.6ml씩 분획하여 항원을 분리하여 단백질의 농도를 측정하였다. 분리된 단백질을 0.05M phosphate buffer sol'n.(PBS, pH 7.4)에서 48시간 투석하였다.

2-4. SDS-PAGE를 통한 H-Y 항원 분자량 측정

Laemmli(1970)의 방법을 수정하여 실시하였다. 분리된 생쥐 H-Y 항원을 0.05M PBS buffer에 1mg/ml로 준비하여 10 μ l를 sample buffer (2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 10mM glycerol, 0.06M Tris-HCl, pH6.8)와 1:1로 섞어 100°C에서 3-5분 동안 가열한 후 3%적재젤과 10%전개젤에서 12V/gel cm로 7시간 전개시켰다. 사용된 표준단백질은 β -galac tosidase (*E. coli*, 116kD), phosphorylase b(rabbit muscle, 97.4kD), serum albumin(bovine, 66kD), carbonic anhydrase(bovine erythrocyte, 29kD)이었다. 전개된 단백질은 Commassie brilliant R-250을 이용하여 염색하였으며 단백질양상의 분석은 Ferguson(1964)의 방법에 따라 분자량을 측정하였다.

2-5. 각종 lectin과의 반응성

H-Y항원이 당단백질이라면 그 당성분이 어떠한 당류로 구성되었는지를 알아보기 위하여 표 1에서처럼 각각 몇가지 당류와 특이적으로 강하게 결합하는 6종의 lectin을 선정하여 dot blot test를 실시하였다. H-Y항원의 source로는 정소조직 배양상층액과 Daudi 세포배양 상층액의 두가지로 부터 면역 친화성 크로마토그래프로 정제한것을 각각 사용하여 서로 비교하였다.

2-6. Polyclonal antibody의 생산과 역가 확인

Immunoaffinity chromatography에 의해 정제된 응성특이항원의 단백질 농도를 BCA 방법(Smith등, 1985)을 이용하여 측정하고 그 농도가 60 μ g/ml이 되게 농축한 다음 동량의 complete Freund's Adjuvant와 교반시켜 유화상태로 만들어 자성토끼에 피내주사 하였다. 이후 10일 간격으로 3회 보조주사(booster injection)을 할 때에는 incomplete Freund's Adjuvant와 섞어서 주사하였다. 마지막 주사 전에 토끼 귀의 정맥에서 채혈하여 ELISA로 항체의 역가를 확인하였고 주사한 이틀 후에 heat puncture를 실시하여 혈액을 채취하였다. 이를 30분간 상온에서 방치한 후 4°C에서 1,000×g로 20분간 원심분리하여 혈청을 수거한 뒤 일부는 소량씩 분주하여 -70°C에 저장하였다가 다음 실험에 사용하였다.

Indirect ELISA를 이용하여 정제된 H-Y 항

원에 대해 생성된 polyclonal antibody titration 곡선을 작성하였다. 먼저 checkboard assay를 통해 충분한 양의 항체가 반응할 수 있을 정도의 H-Y항원 농도(0.63 $\mu\text{g}/\text{well}$)를 산출하였고, coating buffer(0.1M bicarbonate buffer, pH 9.6)에 H-Y항원을 0.63 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 희석한 다음 150 μl 씩 96 well plate에 놓고 4°C에서 overnight으로 반응시켜 고정하였다. PBST(phosphate buffered saline, 0.05% Tween 20, pH 7.4)로 3번 세척한 뒤 1% gelatin이 포함된 0.05M PBS(pH 7.4)를 150 μl 씩 넣고 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 다시 PBST가 결합된 이차항체(goat-anti-rabbit-IgG-HRP)를 0.05M PBS로 2000배 희석한 용액을 well에 다시 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이를 다시 세척한 후 HRP 효소의 기질용액인 0.05% H₂O₂와 0.04% OPD(ortho-phenylene diamine)를 함유한 0.15M citrate-phosphate buffer에서 20분간 반응시키고 50 μl 씩의 2.5M H₂SO₄를 사용하여 반응을 정지시킨 후 492nm의 파장에서 ELISA reader (Bio-Tek automatic ELISA reader, Pharmacia, U.S.A. Dynatech, USA)로 각 well의 흡광도를 읽었다.

2-7. Gel filtration chromatography에 의한 분리

준비된 정소세포 배양상층액에서 H-Y항원을 분리하고 그중에서 H-Y항원의 활성을 가지고 있는 분획을 확인하기 위해서 Sephadex G-75 chromatography를 실시하였다. 사용한 column의 높이는 27cm, 직경은 2.1cm이었고, buffer는 0.1M PBS(pH 7.4)를 사용하였다. 각 분획의 용량은 2.46ml이 되게 하였고 유속은 11.4ml/h로 고정시켰다. 먼저 0.5ml의 blue-dextran 2000을 column에 loading하고 void volume를 구하였고 이어 분자량의 표준곡선을 작성하기 위하여 Bio-rad사의 4가지 표준단백질(myoglobin 17,000, chymotrypsin 25,000, ovalbumin 44,000, blue dextran 2,000,000)이 들어있는 용액 0.25ml을 loading하였다. 마지막으로 정소세포배양액 0.5ml을 loading하였다. 각 분획을 복합항체를 이용한 dot blot test를 실시하여 H-Y항원이 함유되어있는 분획을 확인하였다.

3. H-Y항원 확인을 위한 실험

3-1. 신생생쥐의 정소세포 배양

신생 생쥐의 정소세포배양은 생후 3일된 BALB/c계의 웅성 생쥐의 정소를 적출하여 1X의 HBSS(Hank's balanced salt solution)에 담고 조직을 세절한 후 37°C에 15분간 방치하였다. 세절된 조직의 세포 사이로 trypsin이 충분히 스며들어 세포간이 느슨해진 상태에서 pasteur pipette으로 반복 pipetting하여 완전히 분리시켰다. 이를 15ml 용량의 conical tube에 담고 4°C에서 5분간 방치하여 채 분해되지 않고 바닥에 가라앉은 조직을 제외한 상층액을 회수하였다. 이를 800×g에서 10분간 원심 분리하여 trypsin은 제거하고 침전물에는 다시 10% FBS가 포함된 RPMI 1640배양액을 넣고 같은 속도로 한번 더 원침하여 침전물을 회수하였다. 이들 세포를 hemocytometer로 측정하여 그 농도가 약 4×10^4 세포/ml 가량 되도록 10% FBS RPMI 1640배양액으로 조정한 후 7일간 배양하였다.

3-2. Human burkitt lymphoma의 배양

웅성인 사람의 B임파구 암세포에서 각각 유래된 Daudi cell line과 Raji cell line은 모두 FBS가 10% 포함된 RPMI 1640배양액에서 항생제를 첨가하지 않고 배양시켰다. 초기의 세포농도가 $4 \times 10^4/\text{ml}$ 가량되도록 배양하여 3-4일 후 세포가 증식된 배양상층액을 dot blot test 용으로 사용하였다.

3-3. Dot blot test의 실시

신생생쥐의 정소세포 배양 상층액, Daudi세포의 배양상층액, 그리고 Raji세포의 배양상층액을 순수한 10% RPMI-1640배지를 대조조건으로하여 polyclonal antibody를 이용한 dot blot test를 다음과 같이 실시하였다. 먼저 nitrocellulose membrane에 위의 4가지 배양액을 5 μl 씩 떨어뜨리고 공기중에서 건조시켰다. 3% gelatin용액으로 37°C에서 30분간 방치하여 membrane을 blocking시켰다. 이를 PBST로 3회 세척하고 polyclonal antibody를 PBS로 100배 희석한 용액에 넣고 37°C에서 1시간 추가반응시켰다. 다시 PBST로 3회 세척하고 goat-anti rabbit IgG-HRP를 PBS로 1000배 희석한 용액에서 37°C에서 1시간 반응시킨 후 PBST로 3회 세척 하였다. 이를 ABTS 기질용액에서 37°C로 20분간 반응시킨 후

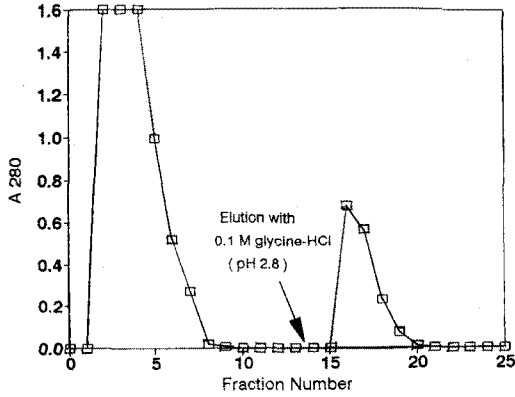


Fig. 1. Purification of H-Y Ag with immunoaffinity chromatography.

PBST에 세척하고 나타난 blot을 관찰하였다.

3-4. 간접면역형광 측정법(Indirect immunofluorescence test)

다배란을 유기를 위하여 자성생쥐의 복강에 5IU의 PMSG를 주사하고 48시간 후 다시 5IU의 hCG를 주사한 직후 웅성생쥐와 1:1비로 하룻밤 합사시켰다. 다음날 오전 질전이 확인된 개체만을 분류해 두고 이날로부터 2-3일후 즉 수정란이 8세포기 단계 이후인 때에 난관과 자궁을 적출하고 Whitten배양액에 담아 난관팽대부를 절개하거나 자궁을 관류하는 방법으로 수정란을 회수하였다.

Polyclonal antibody를 Whitten배양액으로 50배 희석한 용액과 goat anti-rabbit IgG-FITC(Jackson, Israel)를 같은 배양액으로 80배 희석한 용액으로 50 μ l의 소적을 각각 준비하고 그 위에 paraffin oil을 덮어 5%의 CO₂가 공급되는 37 $^{\circ}$ C 배양기 내에서 2시간 이상 온도평형을 유지시켰다. 신선한 Whitten 배양액에서 세척한 8세포기 이후의 수정란들을 먼저 polyclonal 항체가 들어있는 drip에 넣고 30분간 반응시킨 후 Whitten 배양액으로 3회 세척하고 다시 goat anti-rabbit IgG-FITC의 drop에 넣고 30분간 반응시켰다. 이를 다시 배양액으로 세척한 후 형광현미경(Earnst Leitz Co., West Germany)으로 수정란에 나타나는 형광상태를 관찰하였다.

결 과

1. H-Y 항원의 정제

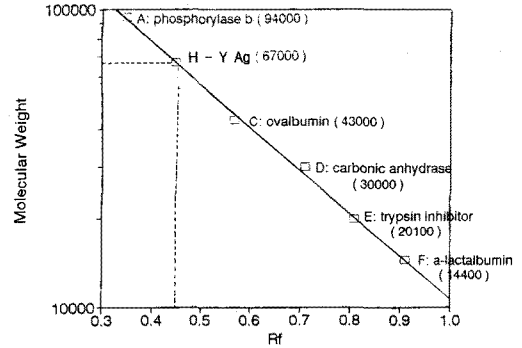


Fig. 2. Determination of the molecular weight of H-Y Ag by 10 SDS-PAGE.

4-6주령 생쥐정소 1개의 무게는 90-100mg이었으며 생쥐정소배양상등액에는 3.9mg의 단백질이 분비 또는 용출되었으며 생쥐의 monoclonal antibody(2D45D4)를 부착시킨 immunoaffinity column에서 용출한 H-Y 항원은 약 31 μ g/정소 100mg이 포함되어 있었다(그림 1).

2. SDS-PAGE를 통한 H-Y 항원 분자량

정제된 H-Y항원을 SDS-PAGE로 전기영동한 결과는 정제전의 생쥐 H-Y항원을 immunoaffinity column으로 정제한 후의 분자량의 차이로 비교할 수 있었다. 분리한 생쥐 H-Y항원의 주요 밴드는 분자량 67,000으로 나타났다(그림 2). 이 결과에서 주요밴드들중 분자량 67,000부분이 H-Y항원의 특성부분으로 생각된다.

3. 각종 lectin과의 반응성

각각 특정한 당류에 결합하는 6종의 lectin을 선택하여 정소조직 배양상층액과 dauid세포 배양상층액 내에 있는 H-Y 항원과의 반응성을 dot blot test로 확인하였던 바, 표 2에서 보는 바와 같이 두 경우 모두 Con A와 lentil에 가장 강하게 반응함을 알 수 있었다.

4. Polyclonal antibody의 생산과 역가조사

분리정제된 H-Y항원을 토끼에 주사하여 생산된 polyclonal antibody의 역가를 조사하기 위하여 H-Y항원으로 고정된(0.63 μ l/well) tube를 사용한 indirect ELISA법으로 실시하여 그림 3과 같은 적정곡선을 얻었다. 대조군으로 항체 대신 NRS(normal rabbit sera)를 같은 희석비율로 첨가하여 그 반응값을 상쇄

Table 2. The specific binding of H-Y with various lectins

Lectins	Source of H-Y Ag	
	Testis supernatant	Culture supernatant of Daudi cell
Gorase	-	-
Soybean	-	-
Asparagas pea	+	+
Lentil	* + + +	+ + +
Wheat germ	** -	-
Con A	+ + +	+ + +

* + : positive reaction, ** - : negative reaction.

Table 3. The results of dot blot test

H-Y antigen sources	Blot concentration
Testis supernatant	* + + +
Culture supernatant of Daudi cell	+ + +
Culture supernatant of Raji cell	-
Culture supernatant of newborn testis cell	+ + +
RPMI-1640 (w/10% FBS)	** -

* + : positive reaction, ** - : negative reaction.

한 값으로 비교하여 명확히 구분될 수 있는 희석치를 역가로 할때 생산된 polyclonal antibody는 약 1:20,000의 높은 역가를 나타내었다.

5. Gel filtration에 분리

생쥐의 정소세포배양 상등액으로부터 H-Y 항원만을 분리함과 동시에 그 분자량을 확인하기 위해서 Sephadex G-75를 실시하였다(그림 4). 이들 분획의 H-Y항원성 확인을 위해서 dot blot test를 실시하였다. 이 결과를 토대로 하여 분석한 결과 분리된 단백질의 분자량은 67,000 dalton임을 확인할 수 있었다.

7. Dot blot test 에 의한 H-Y 반응성 조사

생산된 항체가 H-Y항원에 대한 항체임을 확인하기 위한 또 다른방법으로 H-Y항원을 분비하고 있는 것으로 알려진 Daudi세포와 분비하지 않는 Raji세포의 각 배양상층액을 사용하여 dot blot test를 실시한 바 표 3과 같

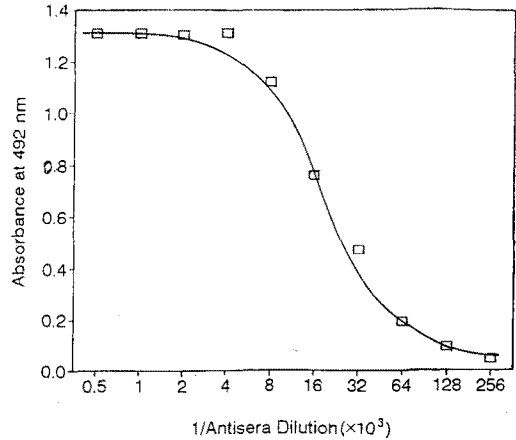


Fig. 3. Titration curve of polyclonal antibody to H-Y Ag.

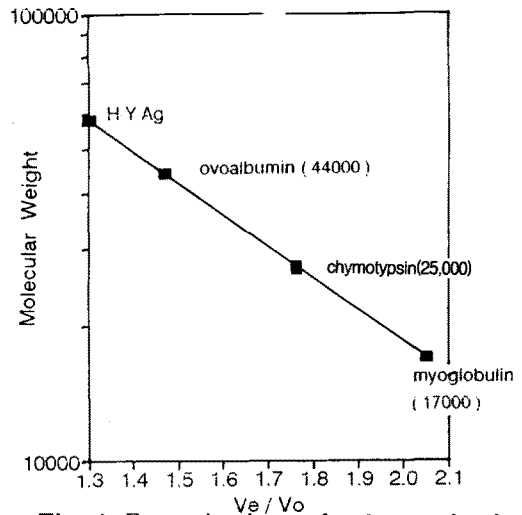


Fig. 4. Determination of the molecular weight of H-Y antigen by sephadex G-75 chromatography.

은 결과를 얻었다. 이때 positive control로는 항원정제의 source로 사용되었던 adult mouse의 정소세포 배양상층액을 negative control로는 FBS가 10% 포함된 RPMI 1640을 각각 사용하였다. 이 실험결과로 positive control과 Daudi의 경우에는 강한 blot이 나타났고, Raji의 경우는 아주 희미한 blot만 보였으며, negative control에서는 blot이 전혀 나타나지 않았다.

신생생쥐의 정소세포 배양상층액에 대해서도 이 실험을 실시한 결과 negative control (10% FBS, RPMI 1640)에서는 blot이 전혀 나타나지 않는데 반하여 이 경우에는 강한 blot이 나타났다(표 3).

Table 4. Presumptive H - Y phenotyoe in mouse embryos treated with polyclonal antibody and anti-rabbit -IgG-FITC

No. of Exp	No. of embryos	H-Y(+)	H-Y(-)
1	20	12	8
2	24	13	11
3	11	4	7
4	24	9	15
5	28	16	12
6	12	8	5
Total (%)	120(100)	62(51.7)	58(48.3)

*H-Y(+) : fluorescence, H-Y(-) : non-fluorescence

7. 간접면역형광측정법에 의한 수정란과의 반응성 조사

1976년 Kroc과 Goldberg에 의해 최초로 연구된 이래 많은 연구팀(White et al., 1983; Shelton et al., 1984; Wachtel, 1984)들이 생쥐 등 몇가지 포유류에서 실험한 결과 공통적으로 밝혀진 현상은 수정란의 8세기 시기부터 이미 그 세포막 표면에 H-Y항원이 발현된다는 것이었으므로, H-Y항체를 이용하여 간접면역형광측정법을 실시하였다. 표 4에서 보듯이와 같이 실험은 총 6회 실시하였으며 공시된 수정란의 수는 총 120개였다. 이때 형광을 발한 수정란의 수는 62개(51.7%)로써 H-Y항원을 세포막에 발현한 즉 XY성염색체를 가진 수정란이라 생각되었고 나머지 58개(48.3%)의 것은 XX성염색체를 가져 H-Y항원을 발현하지 못하므로 결국 자성으로 발달될 수정란으로 추측되었다. 일반적으로 다태동물의 산자의 성비는 거의 1:1이라는 경험적 사실에 근거하면 본 실험결과에서 수정란의 비가 이와 거의 같은 비율을 나타낸 것은 생산된 항체가 H-Y항원에 대한 항체임을 뒷받침해 주는 결과라 하겠다(그림 5).

고 찰

Anti-H-Y monoclonal antibody를 이용한 immunoaffinity chromatography를 수행하여 생쥐정소세포 배양상등액으로부터 얻은 생쥐 H-Y항원의 농도는 31 μ g/정소 100mg이었다. 이렇게 정제된 H-Y항원의 생물학적 활성을 확인하기 위하여 이를 면역원으로 한 항혈청

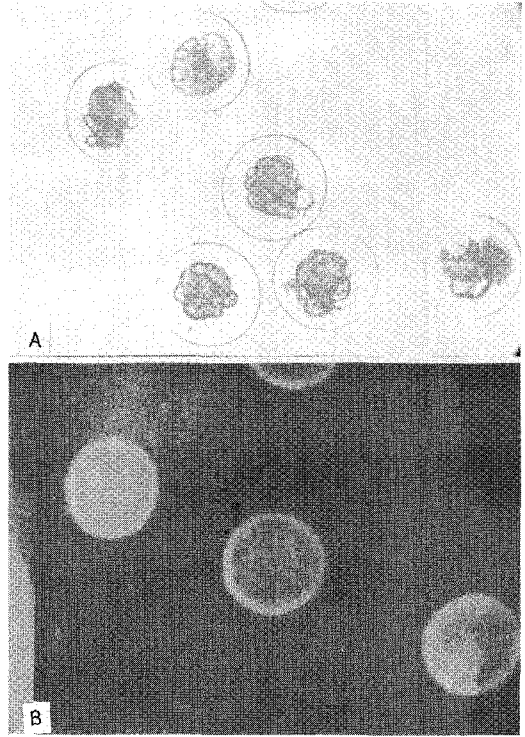


Fig. 5. Embryo sexing with polyclonal H-Y antibody by indirect immunofluorescence test. A : Observed under the phase contrast microscope. B : Observed under the fluorescence microscope.

을 생산하였다. 이 항체의 항원에 대한 반응성을 확인한 후 수정란의 성감별을 실시하였을 때 총 120개의 수정란에 대해서 68개는 형광성을 나타냄으로써 XY 수정란임을 알 수 있었다. 나머지 58개의 수정란은 형광성을 나타내지 않음으로써 XX 수정란임을 알 수 있었다. 위의 사실을 통하여 본 실험에 사용된 항원이 정제된 항원임을 간접적으로나마 알 수 있었다. 또한 정제항원을 면역원으로 생산된 항혈청을 이용하여 정소세포 배양상등액과 human burkitt lymphoma인 Daudi와 Raji의 각 배양상등액내의 H-Y항원 생성유무를 dot blot test법으로 확인하였던 바 정소세포 배양상등액과 Daudi의 경우는 반응을 나타내었으나 Raji의 경우는 반응을 거의 나타내지 않았으므로 이 결과 상기의 정제된 물질이 H-Y항원이었음을 간접적으로 추측할 수 있었다. 신생생쥐의 정소세포의 성장양상을 조사하였던 바 일반세포와는 달리 암세포와 같은 특성을 나타내었다. 이것은 세포자체에서 분비된 H-

Y 항원이 성장촉진인자로 작용했을 것이라는 추측을 가능하게 했다.

H-Y항원의 특성을 알아보고자 실시한 SDS-PAGE에 의한 분자량 확인결과는 김 등 (1991)의 결과에서 HPLC를 이용하여 분리한 H-Y항원의 분자량과 동일한 67,000 dalton 이었다. 각종 lectin과의 반응성에 있어서는 Con A와 lentil과 가장 강한 반응을 나타내어 H-Y 항원을 구성하는 당의 일부는 glucose와 mannose 또는 그 유도체일 것으로 추측된다. 위와 같은 특성을 가지고 있는 본 물질의 계속적인 확인작업과 항원의 순수한 생물학적인 활성을 알아냄으로써 H-Y 항원의 역할, 발현 기작, 발생학적인 역할 이외의 기능, 성선분화 종료후의 H-Y 항원의 존재여부등을 밝혀낼 수 있으리라 사료된다.

인 용 문 헌

- Billigham RE, Silvers WK: Studies on the tolerance of Y chromosome antigen in mice. *J Immunol* 1960, 85, 14-26.
- Bradly MP, Herslop BF: A biochemical and immunological to the identification of H-Y antigenic proteins secreted from Daudi cells. *Hum Genet* 1985, 71, 117-121.
- Casanova M, Larton F, Jakob H, Fellous M: A quantitative immunoassay chromatography for membranous and soluble H-Y antigen typing. *Hum Genet* 1981, 58, 21-24.
- Eichwald EJ, Silmsler CR: Untitled communication. *Transplantation Bull* 1955, 2, 148-149.
- Farber CM, Liebenthal D, Wachtel SS, Charlotte CR: Detection of H-Y antigen in the immuno-linked immunosorbent assay. *Hum Genet* 1984, 65, 278-279.
- Fellous M, Gunter E, Kemler R, Welis J, Berger R, Guent R, Jakob H, Jacob F: Association of the H-Y male antigen with $\beta 2$ -microglobulin on human lymphoid and differentiated mouse tetracarcinoma cell lines. *J of Exp Med* 1978, 148, 50-76.
- Goldberg EH, Byse EA, Bennett D, Schied M, Carswell EA: Serological demonstration of H-Y antigen on mouse sperm. *Nature* 1971, 232, 478-480.
- Hall JL, Bushkin Y, Wachtel SS: Immunoprecipitation of human H-Y antigen. *Hum Genet* 1981, 34-36.
- Koo GC: Serology of H-Y antigen. *Hum Genet* 1981a, 58, 18-20.
- Koo GC, Tada N, Chaganti R, Hammerling U: Application of monoclonal anti-HY antibody for human H-Y typing. *Hum Genet* 1981b, 57, 64-67.
- Kroc CJ, Goldberg EH: H-Y (male) antigen; Detection on eight cell embryos. *Science* 1976, 193, 1134-1135.
- Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 1970, 227, 680-685.
- Muller U, Aschmoneit I, Zenzens MT, Wolf U: Binding study of H-Y antigen in the rat tissues. *Hum Genet* 1978, 43, 151-157.
- Nagai Y, Ciccarese S, Ohno S: The identification of human H-Y antigen and testicular transformation induced by its interaction with the receptor site of bovine fetal ovarian cells. *Differentiation* 1979, 13, 155-164.
- Ohno S, Nagai Y, Ciccarese S, Iwata H: Testis organising H-Y antigen and the primary sex determining mechanism of animals. *Recent Progress in Hormone Research* 1978, 35, 449-475.
- Pierce reference: Protocol of Aminolink coupling method.
- Shelton JA, Goldberg EH: Male-restricted expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Transplantation* 1984, 37, 7-8.
- Shim HS: Studies on interspecific cross reaction of H-Y antibody and production of monoclonal antibody to H-Y. Master's thesis. *Kon-Kuk Univ* 1987.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fugimoto EK, Goeke NM, Osion BJ, Klenk DC: Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* 1985, 150, 76-85.
- Tokuda S, Arrington, T, Goldberg EH, Richy J: Simpler technique for the detection of serological H-Y antigen on mouse lympho-

- cytes. *Nature* 1977, 267, 433-434.
- Wachtel SS,:Primary sex determination H-Y antigen and the development of the mammalian testis. *Arthritis and Rheumatism* 1979, 22, 1200-1210.
- Wachtel SS:H-Y antigen in the studies of sex determination and control of sex ratio. *Theriogenology* 1984, 21, 18-28.
- White KL, Linder GM, Anderson GB, BonDurant RH:Cytolytic and fluorescent detection of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Theriogenology* 1983, 19, 701-705.
- Zenzes MT, Wolf U, Engel W:Organization of in vitro ovarian cells into testicular structures. *Hum Genet* 1978, 44, 333-338.
- 김종배, 김재홍, 백정미, 김창규, 정길생 :H-Y 항원유전자의 크로닝에 관한 연구 :1. 친화성 크로마토그래피에 의한 H-Y항원의 분리정제 및 H-Y항원정량을 위한 화학발광면역 분석법. *가축번식학회지* 1991, 15(2), 149-155.
-