

抗體의 特異的精製方法的 免疫吸着體에 依한 抗體의 精製法

夏 潤 文

慶熙大學校 醫科大學 微生物學教室

緒 論

現代免疫學에서 抗體의 精製는 필요불가결할뿐 아니라 免疫化學의 進步에 큰 功헌을 하고 있다. 예를 들면 免疫 globulin의 作用을 比較하고 抗體의 結合定數를 測定하며 또한 subunit의 活性을 조사할 경우 순수하게 精製된 抗體가 필요하게 된다. 그리고 免疫 globulin의 構造研究에도 精製抗體가 필요한 것은 말할 것도 없다. 抗體를 精製하는 데는 非特異法과 特異法으로 나눌 수 있다. 特異의 精製法中에서도 分離하고자 하는 抗體에 對應하는 抗原을 加하여 沈殿物을 分離하는 방법과, 不溶性狀態로 만든 抗原 즉 免疫吸着體에 抗體를 吸着시켜 단계별로 抗體를 分離하는 實驗法 등이 있다.

目 的

어느 特定의 抗原에 對한 抗體만을 分離하고자 할때, 抗原-抗體反應의 特異性을 利用하여 抗體를 精製하는 方法이다. 즉 다음과 같은 4단계를 거쳐 特異抗體를 분리하게 된다.

1. 抗原-抗體複合물을 만든다.
2. 抗原-抗體結合物의 分離
3. 抗原과 抗體의 解離
4. 抗原과 抗體의 分離

이 4단계 중 1과 2 그리고 4단계에서 抗原이 不溶性인 경우 용이하게 이루어질 수 있다.

그러나 可溶性의 抗原을 不溶性으로 만들기 위해서 抗原을 항상 不溶性의 carrier에 結合시킨다. 不溶性 carrier로서는 寒天 gel cellulose誘導體, polystyrene 樹脂, 蛋白質의 不溶性 polymer 등이 使用된다.

一般的으로 非特異的 吸着이 적고 抗體吸着容量이 높은 것으로는 寒天 gel 및 蛋白質의 不溶性 polymer를 carrier로 한 吸着體를 使用한다. 著者는 hen egg-white lysozyme, 과 그의 fragment 즉 단백질 抗原을 利用해

서 좋은 吸着率을 보여준 寒天 gel을 carrier로한 免疫 吸着體를 使用해서 必要로 하는 特異抗體를 分離하고자 하는 抗體精製法을 記述한다.

材料 및 方法

寒天 Gel: Sepharose 4B 또는 6B (Pharmacia製), xg (wet weight)이 Buchner 유두상에서 증류수로 3회洗淨, gel의 重量과 容量의 관계는 물기를 가볍게 除去한 상태에서 보통 Sepharose 4B의 경우 약 0.85g이 1ml에 相當한다. gel의 重量과 抗原 濃度의 관계는 0.8~1.0g/10mg의 抗原이 적당하다.

抗原溶液(蛋白質抗原) (例 hen egg-white lysozyme 또는 lysozyme으로부터 분리한 peptide): 抗原을 pH 6.0~7.0 PBS 완충액에 10~20mg/ml되도록 용해한다. 抗原은 分離하고자 하는 抗體에 對한 것이면 임의대로 사용되며 溶解度는 蛋白質에 따라 多少 차이가 있으나 著者가 사용한 lysozyme과 peptide의 경우 10mg/ml가 가장 적당하였다.

NBr: 30~50mg/ml의 농도로 사용직전에 증류수에 용해시킨다.

使用되는 완충액: 0.1M NaHCO₃ buffer pH 9.0, 1N glacial acetic acid, 0.05M aminoethanol, 0.1M NaHCO₃ buffer pH 9.0, 0.17M glycine-HCl buffer pH 2.5, 또는 0.1M sodium citrate buffer pH 2.5, 0.1M EDTA, 0.135M NaCl buffer pH 7.4 (SEDTA), 0.1M EDTA, 4~5 N NaOH (이상 열거한 試藥은 特級을 사용하여야 하며 사용시 반드시 1~4°C로 유지되어야 한다).

器具類 및 시설: Buchner 유두, magnetic stirrer, column(1.5~2.0×12cm전후), pH meter, milipore filter(pore size 0.45μm), spectrophotometer, 吸引裝置(空氣가 밖으로 내뿜을수 있도록 한 hood가 설치된 곳)

Sepharose 4B 또는 6B의 活性化: CNBr 300mg을

10ml의 증류수에 溶解시켜 magnetic stirrer로 교반하면서 pH meter 電極을 CNBr 溶液에 설치한 후 증류수로 먼저 3회 洗淨한 Sepharose 4B 8g을 CNBr 용액에 넣어 균일한 현탁액을 만든 뒤 pH 10.8~11.3이 되게끔 5N NaOH 溶液으로 조정한다. 이때 反應中 용액의 pH는 급속히 酸性으로 떨어지므로 5N NaOH 용액을 소량씩 첨가하여 pH 10.8~11.3사이를 유지시킨다. 8분간 반응시킨 후 gel 현탁액을 Buchner 유두상에서 흡인여과한 다음 미리 氷冷한 0.1M NaHCO₃ pH 9.0 완충액으로 수회(3~4회) 洗淨한다. 洗淨에 필요한 완충액의 용량은 gel의 약 20배 정도로 하여 될수 있는 대로 빨리 끝낸다. 洗淨이 끝나면 gel이 굵이 날 정도로 吸引시켜 물기를 除去하는 것으로 寒天 gel의 活性化 段階가 끝난다.

寒天 Gel-抗原結合體의 製作: 活性化가 끝난 gel을 즉시 미리 ice bath에 준비한 抗原溶液이 든 20ml 용비커에 옮겨 천천히 교반한다. 이때 주의할점은 반응중 교반에 의해서 gel이 破壞되기 쉬우므로 될수 있는 대로 천천히 교반한다. ice bath에서 4°C로 옮겨 보통 一晝夜 정도 교반한다(16~20 시간). 이튿날 반응이 끝나면 milipor filter (pore size, 0.45 μ m)로 옮겨 또는 직접 column에 충전시켜 몇차례 洗淨에 의해서 非結合 抗原을 분리시킨다. 寒天 gel과 抗原과의 共有結合은 蛋白質인 경우 아미노산이 관여함으로써 結合이 이루어지는 pH, 완충액의 조성, 溫度 등의 最適條件은 個個의 ligand에 의해 多少 다르다.

非結合抗原의 洗淨: gel과 抗原의 結合體로부터 結合하지 않는 유리 抗原을 除去하기 위하여 milipore filter로 옮겨 4~5회 洗淨하거나 Column에 직접 충전시켜 다음과 같이 실시한다. 제 1회는 0.1M NaHCO₃ 용액 내에 0.05M aminoethanol이 함유된 용액 50ml, 나머지 3~4회는 0.1M NaHCO₃ 완충액 pH 9.0 또는 IN 초산용액 50ml로 洗淨하고 最終적으로 0.135M NaCl 용액 내에 0.1M EDTA SEDTA, pH, 7.4가 함유된 용액으로 洗淨한후 上記 완충액에 현탁시킨다. 以上에서 말한 洗淨 및 현탁과정은 4°C로 차게 만든 용액을 使用하여야 한다. 共有結合된 抗原의 算定은 總洗淨液으로부터 非結合遊離抗原을 산출함으로써 結合抗原을 쉽게 알수 있다.

抗體의 精製法(이하의 全過程은 4°C에서 실시): 寒天 gel-抗原結合體를 column에 충전시켜 SEDTA pH 7.4 완충액으로 포화시킨다. 다음은 必要한 抗血清(antilysozyme antiserum)을 0.01M이 되게끔 EDTA 용액을 첨가한후 column으로 通過시킨다. 抗體가 吸着함에 따라 gel의 上層부터 徐徐히 血清 색깔을 띄면서 불투

명하게 된다. 精確한 血清量을 포화시키기 위해서는 抗原抗體結合比率를 알아두면 통과시키는 血清量을 알 수 있다. 그러나 gel에 흡착한 飽和抗體 以外는 column을 그대로 통과하므로 회수 가능할 뿐 아니라 gel에 吸着, 포화되는 양상을 관찰할수 있으므로 적용시키려고 하는 抗血清의 最大量을 대략 판정할 수 있다. 抗血清의 吸着이 끝나면 SEDTA pH 7.4로 OD 280nm의 測定值가 나타나지 않을 때까지 洗淨한다(보통 0.05 內外面 충분하다) 다음은 免疫吸着體에 結合한 抗體를 解離시킨다. 抗蛋白抗體의 解離는 pH 2.5 정도로 낮추어줌으로써 쉽게 이루어진다. 즉 0.1M glycine-HCl 또는 0.1M sodium citrate 완충액 pH 2.5에 의해서 解離, 溶출시켜 일정량씩 시험관에 받아 中和시킴으로써 最終分離 段階가 끝난다. 농축은 Visking tube를 이용한 ultrafiltration에 의해서 4°C에서 실시하여 최종적으로 완충화 식염수(pH 7.0~8.0)에 투석함으로써 抗體의 活性을 되찾을 수 있다. lysozyme에서 유래된 Peptide를 免疫吸着體로 사용했을때 용출액을 glycine-HCl 또는 sodium citrate pH 2.5 대신 特異的인 방법을 이용한 native protein 즉 lysozyme 용액(3.5mM, 5ml)을 22ml/h 流速을 유지하면서 column을 통과시킨후 역시 SEDTA pH 7.4 완충액으로 충분히 洗淨한 후 0.1M sodium citrate pH 2.5 완충액으로 용출시키면 lysozyme 抗原은 免疫吸着體에 結合한 peptide에 대한 抗體와 재결합하여 복합물을 이루면서 용출된다. 中和와 동시에 농축하여 抗原과 抗體를 分離시킨다.

抗原과 抗體의 分離(적용시킨 抗原과 재결합한 抗體의 경우): native protein에 의해서 解離, 分離코자 하는 抗體는 역시 native antigen과 면역흡착제 상에서 複合物을 이루어 分離되기 때문에 抗原으로부터 特異抗體를 分離하지 않으면 안된다. 濃縮된 複合物을 25°C에서 0.1N 氷초산 용액으로 포화된 Sephadex G-150 (3 \times 80cm)을 利用하여 역시 Column 포화용액과 같은 용액으로 용출시키면 7S 분획을 쉽게 얻을 수 있다. 제빨리 NaOH 용액에 의해서 中性으로 되돌려 줌으로써 抗體의 活性을 찾을 수 있다.

실험실시 중의 주의사항

CNBr을 취급시 손, 피부등에 닿지 않도록 주의하여야 하며 특히 흡입되지 않도록 吸引裝置가 비치된 곳에서 실험을 할것 .

CNBr 처리시 pH를 10.8~11.3으로 유지시키기 위하여 8분간 반응중 pH meter를 지켜보면서 Pasteur

pipett로 NaOH용액을 소량씩 가해 줌으로써 pH를 쉽게 유지시킬수 있다.

gel의 重量과 抗原量의 관계는 물기를 제거한 젖은상태의 Sepharose 4B 1g당 lysozyme과 lysozyme으로부터 분리한 peptide인 경우 10mg 内外가 적당하였다. 蛋白質에 따라 結合能이 다르다. Sepharose 4B의 젖은상태의 1g당 BSA (bovine serum albumin)의 경우 약 5mg IgG는 12mg인 것으로 나타나고 있다.

精製抗體의 純度檢定: 단계별 과정을 거쳐 精製된 抗體는 蛋白質로서의 純度, 抗體活性으로서의 純度を 곁하고 있어야 한다. 蛋白質純度を 조사하기 위해서는 電氣泳動 및 免疫電氣泳動 그리고 gel 여과법에 의해서 순도를 검정할 수 있다. 解離用 완충액으로 特異抗體를 分離했을 때는 抗體로서의 純도가 높아도 血清中에는 IgG, IgM 이외에 다른 class의 抗體가 들어 있을 可能性이 많으므로 gel 여과법에 의해 IgG와 다른 class의 immuno globulin을 分離시킨다. 蛋白質로서의 純度檢定과 더불어 抗體로서의 純度 즉 抗體의 活性 affinity를 조사한다. 이때 역시 免疫吸着體를 利用하는 것이 가장 확실하다. 즉 充分量의 adsorbent에 一定量의 抗體를 반응시켜 全蛋白質의 몇 %가 吸着되는가를 검정한다. 對照로서 正常 r-globulin을 利用하여 같은 실험을 행한다.

精製抗體의 性狀: 酸性解離溶液으로 解離를 시킨 후 中和시키는데 中和過程中 또는 中和完了後 沈殿이 形成된다. 이것은 變性抗體의 集合物으로서 원침에 의하여 제거할수 있다. 抗體의 活性을 조사하기 위하여 반드시 원침을 利用하거나 Sephadex G-200을 利用하여 變性集合物을 제거하지 않으면 안된다. 酸性處理로 인해 形成되는 變性集合物은 動物에 따라 多少 差異가 있다. 토끼가 가장 적고 염소에서 가장 많은 것으로 나타나고 있다.

免疫吸着體의 保存 및 安定性: column에 충전한 免疫吸着體는 4°C에서 몇개월간 保存可能하다. pH 2—11

까지 安定하며 尿素, guanidine-HCl. 등의 免疫吸着體로부터 結合分子를 溶출하는데 보통 이용되는 變性劑의 高濃度の 용액에도 내성이 있다.

參 考 文 獻

1. Axen, R., Porath, J. and Ernback, s. : Chemical coupling of peptides and Proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. Nature. (1967) 214 : 1302.
2. Cuatrecasas, p., Wilchek, M. and Anfinsen, C. B. : Selective enzyme purification by affinity chromatography. Proc. Natl Acad. sci. (U. S. A.). (1968) 61 : 636.
3. Omen. G. S., Ontjes, D. A. and Anfinsen, C. B. : Fractionation of antibodies against staphylococcus Nuclease on sepharose immunoabsorbent. Nature. (1970) 225 : 189.
4. Porath, J., Axen, R. and Ernback, s: chemical coupling of protein to agarose. Nature. (1967) 215 : 1491.
5. steven, C. M., Parikh, L. and cuatrecasas: A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. Analytical Biochemistry. (1974) 60 : 149
6. wilson, M. B. and Nakane, p. k. : The covalent coupling of protenis to periodate-oxidized sephadex: A new approach to immunoabsorbent preparation. J of immunological method. (1976) 12 : 171
7. Wofsy, L. and Burr, B. : use of affinity chromatography for the specific purification of antibodies and antigen J. Immunol. (1969) 103 : 380