

잡종세포종기법을 이용한 대장균의 장독소 측정법 개발*

서울대학교 의과대학 미생물학교실·생화학교실¹ 및 암연구소

김문교·조명제·박경희·이우곤·김윤원·최명식
박중수·차창용·장우현·정홍근¹

= Abstract =

Development of Assay Methods for Enterotoxin of *Escherichia coli* Employing the Hybridoma Technology

Moon-Kyo Kim, Myung-Je Cho, Kyung-Hee Park, Woo-Kon Lee, Yoon-Won Kim, Myung-Sik Choi,
Joong-Soo Park, Chang-Yong Cha, Woo-Hyun Chang and Hong-Keun Chung¹

Department of Microbiology, Biochemistry¹, and Cancer Research Institutes, College of Medicine,
Seoul National University, Seoul, Korea

In order to develop sensitive and specific assay methods for *E. coli* heat labile enterotoxin (LT), hybridoma cell lines secreting LT specific monoclonal antibody were obtained.

LT was purified from cell lysate of *E. coli* O15H11. The steps included disruption of bacteria by French pressure, DEAE Sephacel ion exchange chromatography, Sephadex G200 gel filtration, and second DEAE Sephacel ion exchange chromatography, successively.

Spleen cells from Balb/c mice immunized with the purified LT and HGPRT⁻¹ plasmacytomas, P3x63Ag8.V653 were mixed and fused by 50% (w/v) PEG.

Hybrid cells were grown in 308 wells out of 360 wells, and 13 wells out of them secreted antibodies reacting to LT. Among these hybridoma cell 1G8-1D1 cell line was selected since it had produced high-titered monoclonal antibody continuously. By using culture supernatant and ascites from 1G8-1D1 cells the monoclonal antibody was characterized, and an assay system for detecting enterotoxigenic *E. coli* was established by double sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The following results were obtained.

1. Antibody titers of culture supernatant and ascites from 1G8-1D1 hybridoma cells were 512, and 102, 400, respectively by GM1-ELISA and its immunoglobulin class was IgM.
2. The maximum absorption ratio of 1G8-1D1 cell culture supernatant to LT was 90% at 300 µg/ml of LT concentration. LT concentration shown at 50% absorption ratio was 103.45 µg and the absorption ratio was decreased with the reduction of LT concentration. This result suggests that monoclonal antibody from 1G8-1D1 hybridoma cell bound with LT specifically.
3. The reactivities of 1G8-1D1 cell culture supernatant to LT and *V. cholerae* enterotoxin(CT) were 0.886 and 0.142 (O.D. at 492nm) measured by the GM1-ELISA, indicating 1G8-1D1 monoclonal antibody reacted specifically with LT but not with CT.
4. The addition of 0.1ml of ascites to 0.6mg and 0.12mg of LT decreased the vascular permeability factor to 41% and 44% respectively, but it did not completely neutralize LT.
5. By double sandwich ELISA using monoclonal antibody, as little as 75ng of the purified LT per ml could be detected.
6. The results by assay of detecting LT in culture supernatants of 14 wild strains *E. coli* isolated from diarrhea patients by the double sandwich ELISA were almost the same level as those by reverse passive latex agglutination.

*본 연구는 1983년도 한국과학재단연구비 및 1983년도 서울대학교병원 임상연구비의 보조로 이루어졌음.

서 론

소아설사나 여행자설사를 일으키는 중요한 원인균중의 하나인 장독성 대장균¹⁾의 이열성장독소(heat-labile toxin, LT)를 검색하기 위한 방법이 1970년대 이후로 계속 개발되어 왔다. 그중 가토회장시험(rabbit ileal loop test)²⁾, 혈관투과성 인자시험(vascular permeability factor test)³⁾ 등 동물을 이용한 방법과 Y-1 adrenal cells⁴⁾, Chinese hamster ovary cells(CHO)⁵⁾, African green monkey kidney(Vero cells)⁶⁾ 등 배양세포를 이용한 생물학적 방법등이 소개되어 있으나 이들은 시간이 많이 걸리며, 번거롭고, 다른 균의 장독소와 교차반응이 일어난다는 단점을 지니고 있다.

면역학적 방법으로는 reverse passive latex agglutination, 수동면역용혈법(passive immune hemolysis)⁷⁾ 방사면역측정법(radioimmunoassay, RIA)⁸⁾ 그리고 효소면역측정법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)⁹⁾이 있으며 최근에 DNA probes를 이용한 filter hybridization¹⁰⁾ 방법등이 개발되고 있다. 이들중 효소면역 측정법은 과정이 간편하여 LT의 검색에 적용하기 위한 실험방법으로 많

이 보고되고 있다.

LT와 *V. cholerae*의 장독소(cholera enterotoxin, CT)의 수용체가 ganglioside이며 이중 GM1 ganglioside가 이들 독소와 가장 잘 결합한다고^{11,12,13)} 밝혀짐으로 여러 연구자들이^{14,15,16)} GM1 ganglioside를 이용한 효소면역측정법으로 LT를 검색한 실험을 보고하였다. Yolken¹⁷⁾ 등 및 Merson¹⁸⁾ 등은 LT와 CT의 항원구조가 유사하다는 점을 이용하여 anti-LT 혈청이나 anti-CT 혈청을 사용한 LT 검색방법을 보고하였다. 그러나 이러한 방법으로는 LT와 CT를 구분할 수 없기 때문에 임상검체에서 LT를 검색하는데 효용성이 적다.

최근 Gilligan¹⁹⁾ 등이 LT와 CT는 각기 특이항원 결정기를 가지고 있다고 보고하고 있어 저자는 세포융합기법을 이용하여 LT에 특이하게 반응하는 단세포균항체를 얻어 그 항체의 특성을 구명하고 검체에서 LT를 검색할 수 있는지를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 균 주

WHO collaborating center for phage typing and resistance of enteric bacteria, division of enteric

Table 1. Frequency of hybrids secreting antibodies to heat-labile enterotoxin selected by HAT medium after cell hybridization

Total Number of wells for cell mixture	Wells with growing hybrid in HAT medium	Wells with hybrid secreting antibodies in the medium*
360	308 (85.6%)	13

* Determined by indirect ELISA
(positive; > 0.200 in O.D. at 492 nm)

Table 2. Cross reactivities of LT and CT* with monoclonal and polyclonal antibody to *E. coli* enterotoxin demonstrated by indirect GM1-ELISA

Toxin	Antibody			Normal	
	Culture Supernatant 1G8-1D1	Mouse sera (1:400)	Rabbit sera (1:100)	Mouse sera (1:400)	Rabbit sera (1:400)
LT	0.886	0.689	0.932	0.016	0.015
CT	0.142	0.414	0.341	0.034	0.040

*CT: *V. cholera* toxin.

Number means O.D. at 492 nm measured by indirect GM1-ELISA.

pathogens, Central Public Health Laboratory, London, U.K.에서 분양받은 *E. coli* O15 H11(LT⁺ ST⁻)와 국립보건연구원에서 분양받은 *V. cholerae* Inaba를 사용하였다.

2. LT와 CT의 정제

LT의 정제는 Clements와 Finkelstein⁹⁾의 방법을 변형하여 아래와 같이 균체 파쇄추출액을 이용하여 실시하였으며 LT를 유도 생산하기 위하여 최¹⁰⁾ 등이 개발한 배지를 사용하였다. 즉, 90 μ g/ml의 lincomycin이 포함된 CYES-2배지(Casamino Acid Yeast Extract Salt Media)에 *E. coli* O15H11을 18시간동안 37°C에서 진탕배양한 후 5,000xg에서 20분간 원심분리하여 상청액을 따라 버리고, 침전된 세포만을 0.02M Tris-HCl buffer(pH8.0)로 부유시켰다.

이 세포부유액을 French Pressure로 약 20,000psi에서 균체를 파쇄시켰다. 그후 10,000xg로 1시간동안 원심분리하여 상청액을 모아 60%(NH₄)₂SO₄로 염색하여 단백질 성분만 모은 후 0.02M Tris-HCl buffer에 투석하였다.

이들을 다시 0.5%(v/v) Triton-X100이 함유된

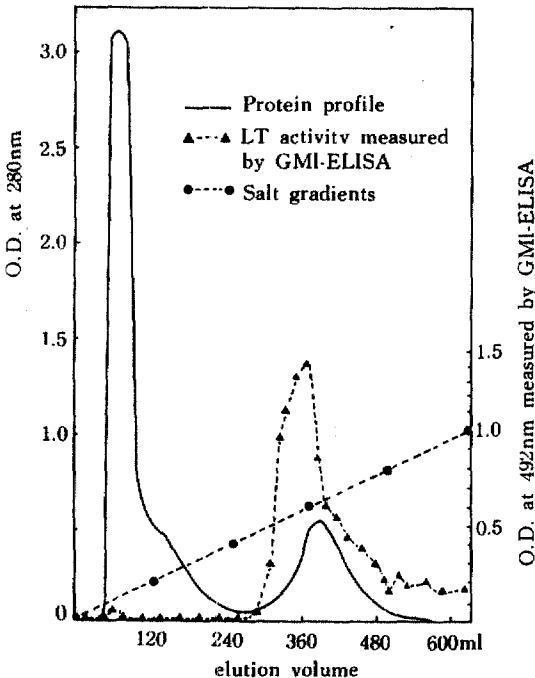


Fig. 1. Elution pattern of second DEAE-Sephacel chromatography (2.5x45cm). The eluate (10ml) from the DEAE Sephacel column was applied and eluted with a linear gradient of 0 to 0.5M NaCl in 0.02M Tris buffer, PH 8.0.

0.02M Tris-HCl buffer(pH8.0)에 투석한 후, 0-0.5 M NaCl gradient를 주면서 DEAE-Sephacel chromatography를 시행하여 LT분획을 모으고, 다시 이를 Sephadex G-200 gel-filtration을 실시하였다. 여기서 얻은 LT분획을 다시 DEAE-Sephacel chromatography를 시행하여 Fig. 1과 같이 LT분획을 모아서 사용하였다. 여기서 사용된 LT분획의 검색 방법은 GMI-ELISA로 실시하였다.

CT는 Smith와 Sack¹¹⁾의 방법대로 *V. cholerae* (Inaba)를 CYES-2배지에 37°C에서 18시간동안 진탕배양한 후 5,000xg에서 20분간 원심분리, 상청액을 모아 90%(NH₄)₂SO₄로 염색하여 그 침전물을 모으고 다시 이들을 0.02M Tris-HCl buffer(pH8.0)로 투석하여 CT로 사용하였다.

3. 가토함 LT혈청

균체파쇄추출액에서 LT를 정제할 때 LT분획을 확인하기 위하여 가토함 LT혈청이 필요하였다. 가토함 LT혈청은 Smith와 Sack¹¹⁾의 방법을 변형하여 아래와 같이 배양상청액의 단백질성분을 사용하여 얻었다.

lincomycin이 첨가된 CYES-2배지에 *E. coli* O15 H11을 37°C에서 18시간동안 진탕배양한 후 배양상청액을 모아서 57%(NH₄)₂SO₄로 염색하였다. 이것을 원침시켜 얻은 침전물을 0.02M Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 투석하여 면역에 사용하였다.

위에서 준비한 배양상청액의 단백질성분 65 μ g을 Freund complete adjuvant에 섞어 근육내에 주사하고 20일 후에 동량의 단백질성분을 Freund incomplete adjuvant에 섞어서 같은 방법으로 면역하였다. 다시 2주 간격으로 생리식염수에 동량의 단백질성분을 희석하여 2회 면역하고 6주후에 같은 방법으로 단백질성분 100 μ g을 추가면역하였다. 마지막 추가면역 1주일후에 혈액을 채취하여 혈청을 분리, 냉동시켜 실험에 사용하였다.

4. 면역조작

마우스의 항체생산세포를 얻기 위하여 정제한 LT를 Freund complete adjuvant에 섞어서 Balb/c 마우스(♀)에 10 μ g/마우스씩 복강내 주사하고, 그 후 약 2주간격으로 4회에 걸쳐 PBS(pH 7.2)에 녹인 LT를 10 μ g/마우스씩 추가 접종하였다.

5. 혈질세포종 세포주(Plasmacytoma Cell Line)

미국국립보건원에서 분양받은 P3x63Ag8.V653을 서울대학교 의과대학 미생물학교실에서 제대배양하면서 사용하였다.

6. 세포융합조직과 융합세포의 선택

세포융합은 Köhler 및 Milstein¹⁴⁾, 그리고 차¹⁵⁾ 등의 방법으로 실시하였다. LT로 면역한 Balb/c 마우스의 비장세포 10^6 cell과 형질세포종세포인 P3x63Ag8.V653 세포 10^7 cell을 혼합한 다음 50%(w/v) polyethylene glycol 1000(PEG 1000, Sigma P-3515)를 첨가하면서 융합시켰다.

이들 세포를 20% 우태아혈청이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Flow Lab., Cat. No. 10-331-26)으로 부유시키고 융합세포부유액을 $50\mu\text{l/well}$ 씩 96well 배양판에 분주하여 5~10% CO_2 , 37°C에서 배양하였다.

융합된 세포만을 선택하기 위하여 Littlefield¹⁶⁾가 고안한 HAT($50\mu\text{M}$ hypoxanthin, $0.4\mu\text{M}$ aminopterin, $16\mu\text{M}$ thymidine) 배지를 첨가 또는 교환하여 10~14일간 배양하면서 융합세포의 증식 여부를 역위상차 현미경으로 관찰하였다.

융합된 세포에서 LT에 대한 항체가 생산되는지를 GM1-ELISA로 검색하여 항체의 역가가 높고 세포상태가 좋은 well을 선택하여 24well 배양판에 옮겨 증식시켰다.

다음, Mckearn의 방법¹⁷⁾을 이용하여 무한대 희석방법으로 96well 배양판에 well당 0.1~1 cell이 들어가도록 희석하여 분주하였다. 그리고 나서 6일간 배양한 다음 역위상차 현미경으로 관찰하여 하나의 세포집락이 형성된 well을 표시하고 10일 내지 14일경에 다시 GM1-ELISA를 이용하여 항체 생성여부를 검색하였다.

7. 마우스 생체내 단세포군 항체생산

Pristane(2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecane, Aldrich Chemical Co, Lot. #1314KH)을 0.5ml씩 Balb/c 마우스의 복강내 주사하여 종양세포가 쉽게 증식할 수 있도록 전처리하였다.

1주일 후 마우스당 이열성장독소 항체를 생산하는 림프잡종세포 1×10^7 cell을 주사하였고 복강이 부풀게 되는 9일후에 복수를 채취하여 이를 마우스 항LT 항체로 사용하였다.

8. GM1-ELISA

세포 배양액내에 포함된 항체를 측정기 위하여 Gustafsson 및 Mollby¹⁸⁾ 등 그리고 Böck¹⁹⁾ 등의 방법을 변형하여 GM1-ELISA를 사용하였다. 96well polyvinylchloride(PVC) microplate (dynatech Lab, Inc, cat No. 1-220-29, Lot No. 6)에 monosialoganglioside(GM1; Supelco, Cat. No. 4-6033, Lot No.

LHO 10732)를 $0.5\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)에 용해시켜 $100\mu\text{l/well}$ 씩 넣고 37°C에서 하루밤동안 부착하였다. 그런 다음 PBS로 3회 세척하였다. 1% bovine serum albumin(BSA)-PBS용액을 $150\mu\text{l/well}$ 씩 첨가하여 30분간 37°C에서 반응시켜 GM1이 붙지않은 부위를 차단하였다. 그후 PBS-Tween 20용액으로 3회 세척하고, LT를 $220\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 $50\mu\text{l/well}$ 씩 넣고 1시간 30분동안 실온에 방치하였다. 그후 PBS-Tween 20용액으로 3회 세척한 후 융합세포배양 상청액 또는 1:1,000으로 희석된 마우스항 LT 혈청을 $50\mu\text{l/well}$ 씩 첨가하고, 실온에서 1시간 항원-항체 반응을 진행시켰다. 마찬가지로 PBS-Tween 20용액으로 3회 세척한 후 1:1,000으로 희석한 peroxidase conjugated rabbit antimouse IgG heavy and light chains(Cappel Lab. Lot No. 14013)을 $50\mu\text{l/ml}$ 씩 넣어 실온에서 1시간동안 반응시킨후 PBS-Tween 20용액으로 5회 세척하였다. 10ml의 phosphate citrate buffer(pH 5.0)에 발색제로 orthophenylenediamine(OPD, Sigma, P-3888) 4mg을 완전히 녹인후 30% H_2O_2 , $20\mu\text{l}$ 를 첨가한 기질용액을 만들어 $50\mu\text{l}$ 씩 각 well에 첨가하고, 실온에서 20분간 효소기질반응을 진행시켰다.

그후 2M H_2SO_4 용액을 $50\mu\text{l/well}$ 씩 첨가하여 효소기질반응을 정지시키고 automatic ELISA reader (Titertek Multican, Flow Lab.)로 파장 492nm에서 흡광도를 측정하여 O. D. 0.15 이상을 양성반응으로 항체역가를 측정하였다.

LT 분획을 확인하기 위한 GM1-ELISA는 다음과 같다.

GM1을 부착시킨 PVC microplate에 LT분획 용액을 $50\mu\text{l/well}$ 씩 넣고 실온에서 1시간 30분동안 정치시킨다. 그후에 1:250으로 희석된 가토항LT 혈청을 $50\mu\text{l/well}$ 씩 넣어 실온에서 1시간 항원-항체반응을 진행시킨다.

다음에 peroxidase conjugated goat antirabbit IgG, M, A(Cappel Lab. Lot No. 14216)를 $50\mu\text{l/well}$ 씩 넣어 실온에서 1시간 반응시킨다. 그다음은 위의 방법과 동일한 방법으로 시행하였다.

CT에 대한 반응을 검사하기 위해서 Holmes와 Twiddy²⁰⁾의 방법을 이용하여 CT를 PVC plate에 부착시켰다. 즉, 앞에서 준비한 CT를 1mg/ml의 농도로 조정하여 미리 GM1 ganglioside가 부착된 PVC plate에 $50\mu\text{l/well}$ 씩 넣고 실온에서 18시간 부착하였다. 그외의 과정은 LT를 부착시킨 GM1-ELISA와 같이 시행하였다.

9. GM1-ELISA 에 의한 항체 흡착율

LT에 대한 항체의 흡착을 실험은 국¹¹ 등의 방법대로 아래와 같이 실시하였다.

융합세포의 배양액과 PBS-Tween 20 용액으로 농도별로 희석한 정제 LT를 동량 섞어 37°C에서 2시간 반응시킨후에 11,500xg로 5분간 원심분리하여 상청액을 거두어 위에서 기술한 방법대로 GM1-ELISA를 실시하여 상청액의 잔존항체가를 측정하였다.

각 실험에서 대조군의 흡광도(OD_c)와 실험군의 흡광도(OD_n)에서 음성대조군의 흡광도(OD_n)을 제외한 남은 절대흡광도의 차이를 대조군의 절대흡광도로 나누후 백분율로 계산, 항원에 대한 흡착율을 계산하였다.

$$\frac{[(OD_c - OD_n) - (OD_s - OD_n)]}{(OD_c - OD_n)} \times 100 = \%$$

10. 단세포균항체의 중화력시험

LT에 대한 단세포균항체의 중화력여부를 검사하기 위하여 Evans¹⁰⁾ 등의 방법에 따라 투과성인자 측정법을 실시하였다. 즉 일정한 농도의 LT에 마우스복수항체를 동량 섞어 상온에서 1시간 반응시키고 11,500xg에서 원심시켜 그 상청액을 토끼등에 0.1ml씩 피내주사하고 18시간이 경과한 후 Evans blue dye를 토끼 kg당 20mg씩 토끼 귀정맥에 주사하고 2시간 후 청색착색부위의 장경 및 단경을 mm로 측정하여 이 둘을 곱한 수치를 투과성인자치 즉 PF(permeability factor)치로 정하였다.

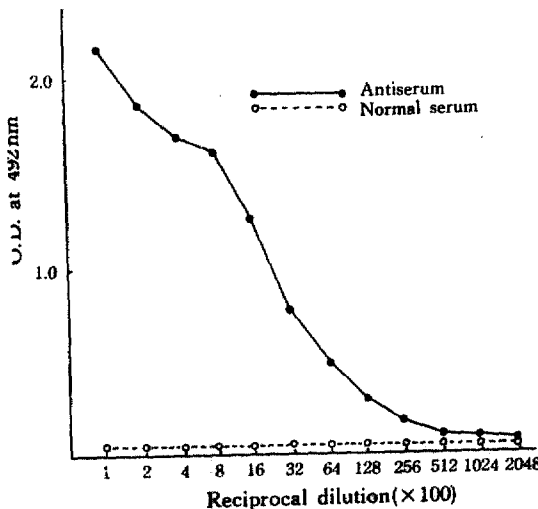


Fig. 2. Titration curves of anti-LT antibody in the sera from the immunized and normal Balb/c mice determined by GM1-ELISA.

11. 단세포균항체의 항체 class 검색

단세포균항체의 class를 구분하기 위해 peroxidase conjugated IgG fraction goat antimouse IgM μ chain specific(Cappel Lab. Lot No. 16018)을 이용한 GM1-ELISA와 IgG subclass를 결정하기 위하여 rabbit antimouse IgG1(Miles Lab. Inc. Lot No. 27), rabbit antimouse IgG2a(Miles Lab. Inc. Lot No. 27), rabbit antimouse IgG2b(Miles Lab. Inc. Lot No. 23) 및 rabbit antimouse IgG3(Miles Lab. Inc. Lot No. 24)를 이용한 double sandwich ELISA를 실시하여 heavy chain의 종류를 검색하였다.

12. 단세포균항체를 이용한 이중효소면역측정법 (Double Sandwich ELISA)

단세포균항체를 이용하여 LT를 검출하기 위하여 Morrow¹¹⁾의 방법을 변형하여 이중면역측정법을 시행하였다.

앞에서 채취한 복수를 0.04M borate buffer로 1:100으로 희석하여 96well polystyrene microplate (Costar Seroccluster 96well ELISA plate flat bottom; Cat. No. 3590, Lot No. 2101)에 100 μ l/ml씩 분주하여 4°C에서 하루밤 정치시켰다.

그후 증류수로 세척하고 비특이적 반응을 막기 위해 100mM glycine 3% BSA PBS-Tween 20 용액을 150 μ l/well씩 가하여 37°C에서 3시간 정치시켰다. 그후에 PBS-Tween 20 용액으로 3회 세척시키고, LT 혹은 *E. coil* 배양액을 적당히 희석하여 100 μ l/well씩 첨가하고 실온에서 1시간 반응시켰

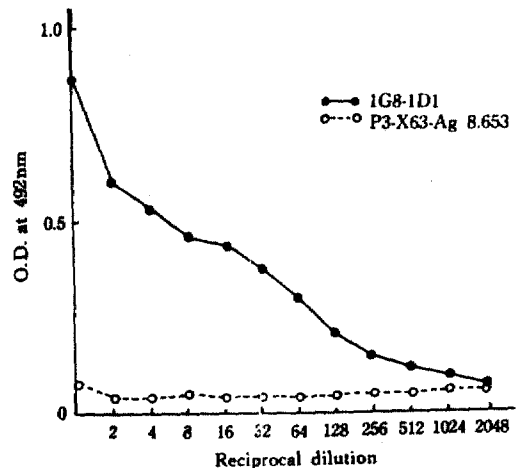


Fig. 3. Titration curves of anti-LT antibodies in the supernatant from the cultured hybridoma clone 1G8-1D1, determined by GM1-ELISA.

다. PBS-Tween 20 용액으로 3회 세척한 후 가토 항LT 혈청을 1:250으로 희석하여 1시간 반응시켰으며 다시 PBS-Tween 20 용액으로 3회 세척한 후 1:4,000으로 희석한 peroxidase conjugated goat antirabbit IgA, G, M(Cappel Lab. Lot No. 14216)을 100 μ l/well씩 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨후 PBS-Tween 20 용액으로 5번 세척하였다.

그다음 GM1-ELISA에서와 같은 성분의 기질용액을 100 μ l/ml씩 첨가하여 실온에서 30분 반응시키고 2M H₂SO₄ 용액을 100 μ l/well씩 넣어 효소반응을 정지시킨 다음 automatic ELISA reader(Titertek Multiscan, Flow Lab.)로 492nm에서 흡광도를 측정하였다. 2well의 평균값을 실험치로 사용하였다.

13. Reverse passive latex agglutination(RPLA) 방법으로 E. coli 배양상침액에서 LT 검색

소아 설사환자의 대변에서 분리한 E. coli가 LT를 생성하는가를 검색하기 위하여 항CT 혈청을 부착한 RPLA kit(Denka Seiken Co., Ltd. Lot. No. 25804)를 사용하였다. 먼저 분리된 E. coli를 CYE S-2배지에서 18시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 진탕배양한 다음 세포를 원침시키고 그 상침액을 모아 V형 microtiter plate에 25 μ l/well씩 첨가하여 잘 혼든후 wet chamber에서 24시간 정치하여 침강된 모양에 따라 판독하였다. 이렇게 하여 양성판정이 난 9개의 wild strain과 음성판정이 난 5개의 wild strain으로 단세포균항체를 이용한 double sandwich ELISA의 LT 검색 실험성여부를 조사하였다.

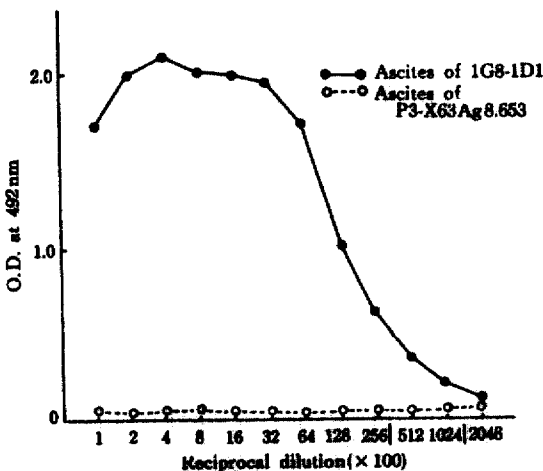


Fig. 4. Titrations curves of anti-LT antibodies in the ascites from the Balb/c mice inoculated with the hybridoma clone 1G8-1D1, determined by GM1-ELISA.

1. 항체를 분비하는 융합세포(hybride cells)의 선택

Balb/c 마우스를 LT로 마지막으로 면역한 후에 retro-orbital plexus를 통하여 혈액을 채취한후 혈청을 분리하여 항 LT 항체의 생성여부를 GM1-ELISA로 확인한 결과 항혈청의 역가는 Fig.2에서와 같이 25,600 정도에 달하여 LT에 면역이 되었음을 확인하였다. Hybridoma 제작 목적으로 비장세포와 형질세포종 세포를 융합한 후 세포부유액을 5 \times 10⁶ cell/well 정도로 360well에 분주하였는데 이중 융합된 세포가 증식하는 well은 Table 1과 같이 308 well로 전체 분주 well의 85.6%이었다. 이들중 LT에 대한 항체생산이 확인된 well은 13개이었으며 전체 분주 well의 3.6%로 나타났다. 이 중에서 항체의 역가가 가장 좋은 3개의 well을 골라서 cloning을 실시하였다. 하나의 세포집락을 형성한 well중 항체가 분리된 well을 GM1-ELISA로 선별한 결과 77개의 cloning된 융합세포주를 얻었다.

이중 12개의 융합세포주를 선택하여 5주이상 계

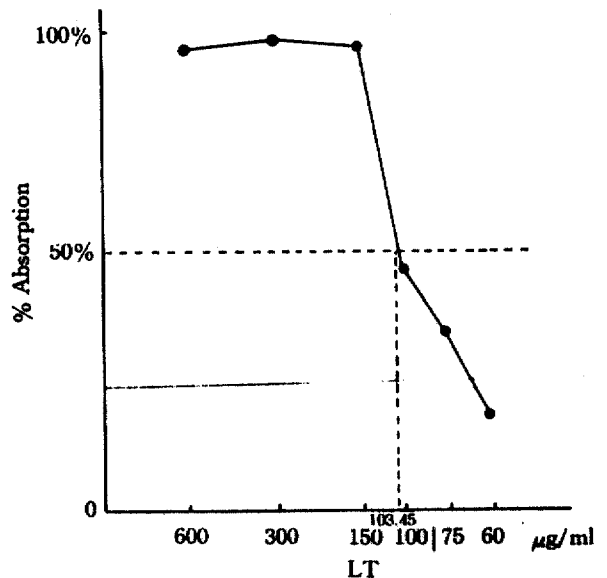


Fig. 5. Absorption of anti-LT monoclonal antibody with LT. To a limited volume of the culture supernatant of 1G8-1D1 hybrid, equal volumes of decreasing concentration of LT were added in a final volume of 1 ml of PBS-Tween 20 solution, pH7.2. After incubation, the suspension was assayed for unbound antibody by indirect GM1-ELISA. The calculation of absorption % of the antibody with LT is described in the text.

대배양한 결과 항체생성과 세포활성상태가 지속적으로 좋은 1G8-1D1 세포주를 선택하여 실험에 사용하였다.

2. 1G8-1D1 세포주가 분비하는 단세포균항체의 특성

1) 세포배양액과 복수내 항LT 항체역가

1G8-1D1 세포의 배양액을 채취하여 항LT 항체를 측정할 때 Fig. 3과 같이 512로 나타났다. 그리고 Balb/c 마우스 복수에 1G8-1D1 세포를 주사하여 채취한 복수의 항LT 항체가는 Fig. 4와 같이 102,400이다.

2) LT에 대한 1G8-1D1 단세포균항체의 흡착율

1G8-1D1 용합세포주가 분비하는 단세포균항체의 특성을 규명하기 위하여 먼저 LT의 농도변화에 따른 항체 흡착율의 변화를 알아보았다. 1G8-1D1 세포배양액과 단계별로 희석된 LT를 동량으로 혼합한 다음 잔존항체를 GM1-ELISA로 측정하여 대조군과 비교하여 흡착율을 구하였다.

Fig. 5에서와 같이 LT의 농도가 300 µg/ml 일때 98%로 최대흡착율을 보이고 있고 LT의 농도가 멀어짐에 따라 흡착율도 저하되고 있으며 50% 흡착율을 보이는 LT의 농도는 103.45 µg/ml이다.

3) LT와 CT에 대한 1G8-1D1 단세포균항체의 반응성

GM1-ELISA를 이용하여 LT와 CT에 대한 1G8-1D1 단세포균항체의 반응을 비교한 결과는 Table 2와 같다. 즉, LT에 대한 항체가는 492nm에서

흡광도로 0.886이나 CT에 대해서는 0.142로 LT에 대한 반응이 CT에 대하여 6.2배 이상의 반응성을 보이고 있다. 그 반면에 1:400으로 희석한 마우스항LT 혈청은 LT에 대한 항체가로 0.689이고 CT에 대한 항체가로 0.414로 LT에 대한 반응의 1.7배정도이며 동일 희석배수에서 가토항LT 혈청의 경우 LT에 대하여는 0.932, CT에 대한 반응은 0.351로 2.7배정도 반응이 높은 것으로 나타났다.

1G8-1D1 단세포균항체의 CT에 대한 반응은 0.142로 나타났는데 이 흡광도는 음성대조군의 흡광도범위에 속하기 때문에 이항체는 LT에 특이하게 반응하는 것으로 결론지을 수 있다.

4) LT에 대한 1G8-1D1 단세포균항체의 중화력 시험

1G8-1D1 단세포균항체가 LT를 중화시킬 수 있는가를 투과성인자 측정법으로 검색하였다. Table 3과 같이 LT의 양이 0.6mg/0.1ml일때 양성대조군의 투과성인자의 120±48이고 동량의 LT와 1:10으로 희석한 마우스항 LT혈청을 혼합한 것은 0으로 나타나 마우스항LT혈청은 LT를 중화하는 것으로 나타났다. 그리고 동량의 LT와 1:2로 희석된 1G8-1D1 복수를 혼합한 것은 49±3.5로 나타나 투과성인자는 LT만 주사한 대조군에 비하여 41% 줄어 들었다. LT의 농도가 0.12mg/0.1ml의 경우 1G8-1D1에 의한 투과성인자의 감소는 44%로 LT 농도에 따른 투과성인자의 감소율은 거의 변화가 없었다.

Table 3. Comparison of the changes in vascular permeability factor(PF) by 1G8-1D1 ascites and mouse anti-LT sera

Amount of LT (mg)	PF (mm ²)*	Change in	
		PF(%)	
0.6	LT+PBS	120 ± 48	100
	LT+mouse normal sera	178 ± 47	
	LT+mouse anti-LT sera	0	0
	LT+normal ascites **	126 ± 39	
	LT+1G8-1D1 ascites	49 ± 3.5	41
0.12	LT+PBS	52 ± 12	100
	LT+1G8-1D1 ascites	23 ± 11	44
	PBS only	0	
	1G8-1D1 ascites + PBS	0	

* Rabbit was inoculated with a final volume of 0.1ml of LT mixtures containing the indicated amount of LT.

** P3x63Ag8.V653 ascites.

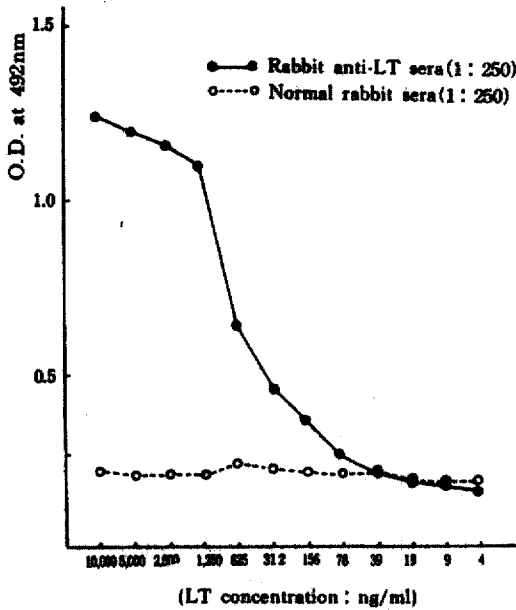


Fig. 6. Dose response curves for LT obtained by double sandwich ELISA.

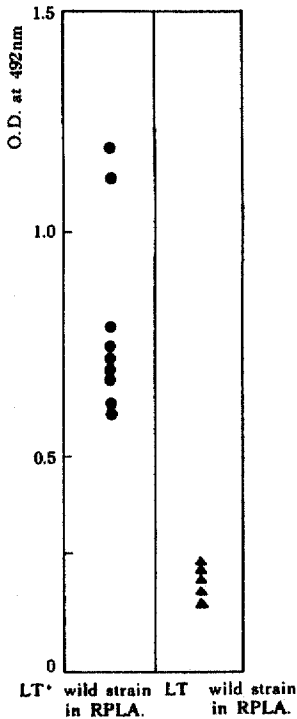


Fig. 7. Detection of LT in the culture supernatant of wild strain *E. coli* by double sandwich ELISA.

5) 1G8-1D1 단세포균항체의 항체 class 검색
 융합세포를 선별할 때 사용하는 GM1-ELISA에서
 는 peroxidase conjugated anti-mouse IgG (heavy

and light chain)을 이용하였기 때문에 선별된 단세포균항체의 class를 구분할 수가 없다. 그리하여 IgG heavy chain만 검색할 수 있는 peroxidase conjugated anti mouse IgM heavy chain을 이용한 GM1-ELISA와 IgG subclass를 결정하는 double sandwich ELISA를 실시함으로써 heavy chain의 종류를 검색하였다.

그결과 1G8-1D1 단세포균항체의 class는 IgM이었다.

3. 1G8-1D1 단세포균항체를 이용한 double sandwich ELISA로 LT의 검색

1G8-1D1 세포주로 얻은 복수를 0.04M borate buffer에 1:100으로 희석하여 부착한 PS plate로 LT를 측정할 결과는 Fig. 6과 같다.

이 방법을 이용하여 측정할 수 있는 LT의 최소량은 78ng/ml이다. 그리고 대장균 배양상청액에서 LT 검색이 가능한가를 조사하기 위하여 소아설사환자의 대변에서 분리된 대장균중 배양상청액에서 reverse passive latex agglutination test에서 LT 양성인 9개의 균주와 음성인 5개 균주의 배양상청액으로 검사하였다.

그 결과 Fig. 7에 도식되어 있듯이 reverse passive latex agglutination test에서 양성인 균주는 모두 LT농도 78ng/ml의 흡광도인 0.266 이상을 나타내었고 reverse passive latex agglutination test에서 음성인 균주의 배양상청액은 모두 0.266 이하이었다.

고 찰

면역학적으로 검체에서 이열성장독소를 검색할 수 있는 방법으로 reverse passive latex agglutination test, 수동면역용혈법(passive immune hemolysis)¹⁾, 효소면역측정법²⁾ 그리고 방사면역측정법³⁾ 등이 지금까지 개발 적용되고 있다. 이들중 효소면역측정법은 과정이 표준화되기 쉽고 특수한 시설이 필요하지 않기 때문에 여러 연구자들이 그 실용성을 보고하고 있다. 특히 Holmgren¹¹⁾이 CT와 LT의 수용체가 ganglioside인 것을 구명하였고 특히 이들 독소는 GM1 ganglioside에 대한 친화도가 가장 높다고 밝혀짐으로써¹²⁾ GM1 ganglioside를 이용한 double sandwich ELISA가 Gustafsson 및 Mölby¹⁴⁾ 등 및 Bäck¹⁵⁾ 등에 의해 개발 보고되었다.

그리고 Merson¹⁶⁾ 등은 CT와 LT가 공통항원결정기를 가지고 있다고 보고한 Smith¹⁷⁾ 등, Gyles¹⁸⁾, 그리고 Clements와 Finkelstein¹⁹⁾의 연구를 토대로

항CT 혈청을 이용한 double sandwich ELISA로 직접 대변에서 LT를 검색하여 보고하였다.

그의 Yolken¹⁰⁾ 등 여러 연구자들이 항CT 혈청 또는 항LT 혈청을 이용한 LT 검색방법의 유용성을 보고하고 있다. 그러나 GM1 ganglioside와 항CT 혈청 또는 항LT 혈청을 이용한 double sandwich ELISA는 CT와 LT를 구분할 수 없기 때문에 진단에 사용하기에 효용성이 적다는 문제점을 안고 있다. 그밖에 지금까지 개발된 여러 가지 면역학적인 방법, 즉 수동면역측정법(passive immune hemolysis), reverse passive latex agglutination, 그리고 방사선면역측정법도 LT와 CT가 항원을 공유하고 있기 때문에 이런 문제점을 배제하지 못하고 있다.

최근 Clements와 Finkelstein¹¹⁾이 LT는 CT에 없는 특이항원결정기를 가지고 있는 가능성을 제시하였고 Gilligan¹²⁾ 등은 affinity chromatography를 이용하여 CT 및 LT의 subunit A와 B에 대한 항혈청을 정제하여 이중 한천확산법과 competitive inhibition 방사면역측정법을 이용한 일련의 실험으로 CT와 LT가 각각 특이항원결정기를 가지고 있다는 근거를 강력히 제시하고 있다.

종래의 항혈청으로는 이러한 특이항원 결정기에 대한 항체를 얻을 수가 없으므로 본 실험에서는 이러한 난점을 타개하기 위하여 Köhler와 Milstein¹³⁾이 고안한 세포융합기법으로 LT에 특이하게 반응하는 단세포균항체를 분비하는 림프집종세포를 얻었다. 이들중 항체생산이 지속적인 IG8-1D1 세포주가 분비하는 단세포균항체의 특성을 규명하고 이것을 이용하여 LT를 검색할 수 있는지를 조사하였다.

본 실험에 사용한 LT는 Clements와 Finkelstein¹¹⁾ 및 Takeda¹⁴⁾ 등의 방법을 변형하여 부분정제하여 사용하였다. Yolken¹⁰⁾ 등, Bäck¹⁵⁾ 등, 그리고 Svennerholm 및 Wiklund¹⁶⁾ GM1-ELISA에서 GM1은 LT만을 결합한다는 실험결과를 보고하였기 때문에 부분정제된 LT를 사용하더라도 LT의 검색이나 융합세포의 선별에 있어 다른 세포성분에 의한 혼합을 배제할 수 있다고 사료된다.

LT에 대한 IG8-1D1 단세포균항체의 특이성은 Fig. 5에서 LT농도에 따른 흡착율의 변화와 Table 2에서 LT와 CT에 대한 반응성의 차이에서 잘 나타나고 있다. LT에 대한 반응이 흡광도로 0.886인 반면 CT에 대한 반응은 0.142로 일반적으로 효소면역측정법에 있어 음성영역으로 간주하는 흡광도를 나타내고 있다. 이러한 반응의 차이는 GM1-ELISA에서 GM1에 결합된 양이 LT에 비하여 CT가 현저하게 적기때문에 CT에 대한 흡광도가 낮았

다고 생각할 수 있으나 마우스 항LT 혈청과 가토항 LT 혈청의 CT에 대한 반응도가 각각 0.414, 0.341으로 나타난 것으로 보아 이런 가능성은 완전히 배제할 수 있다. 그리고 그러한 결과로보아 IG8-1D1 단세포균항체가 CT에는 거의 존재하지 않는 LT 특이항원결정기에 반응한다는 결론을 내릴 수 있다.

그리고 LT에 대한 IG8-1D1 단세포균항체의 중화력은 투과성인자의 억제시험으로 실시한 결과 Table 3에서와 같이 LT농도에 따라 투과성인자를 41~44% 정도로 억제는 하나 마우스 항LT 혈청처럼 완전한 중화력은 보유하고 있지 않은 것으로 나타났다.

이러한 현상은 이 실험에서 사용된 IG8-1D1 단세포균항체의 농도가 LT당량치보다 낮았기때문에 일어날 수 있다고 생각할 수 있으나 LT를 중화한 마우스 항LT 혈청과 IG8-1D1 복수의 LT에 대한 항체가가 비슷하며 또 Fig. 6에 나타나 있듯이 IG8-1D1의 세포배양액의 경우 50% 흡착율을 보이는 LT의 농도가 103.45 µg/ml이기 때문에 일반적으로 복수는 배양액의 1,000배의 항체를 보유하고 있다는 점에서 복수의 50% 흡착율을 보이는 LT의 농도는 103.45 mg/ml이 될 것이기 때문에 중화시험에 사용한 LT농도 6mg/ml과 1.2mg/ml의 당량치 이상의 항체가 사용되었다는 것을 알 수 있다. 그러므로 이 단세포균항체는 LT와 결합함으로써 투과성인자를 어느정도 감소시키지만 중화력은 없는 것으로 사료된다. 한편 Donta와 Viner¹⁷⁾ 그리고 Otnaess¹⁸⁾ 등은 GM1 ganglioside가 LT의 독성을 표현하는데 중요한 결정자와 결합함으로써 LT를 중화시킨다고 보고하였다.

본 실험에서 림프집종세포를 선별하는데 GM1-ELISA를 이용하였으므로 중화력을 갖고 있는 단세포균항체를 생성하는 림프집종세포는 선별될 수 없었다고 사료된다.

위에서 논의된 특징으로 보아 IG8-1D1 복수를 이용한 double sandwich ELISA는 특이성과 민감도가 높은 LT 검색방법이 될 것으로 사료된다. Fig. 6에 나타나 있듯이 이 방법을 이용하면 부분정제된 LT를 78ng/ml의 수준까지 검색할 수 있으며 이 LT는 부분정제되었기 때문에 실제로 순수 LT의 최저검색농도는 훨씬 낮은 수준일 것으로 사료된다.

IG8-1D1 단세포균항체가 LT에 특이하게 결합하는 것이 증명이 되었기때문에 immunosorbent affinity chromatography를 이용하여 LT를 완전히 정제하여 지금까지 순수정제의 어려움으로 인한 인형

LT의 불확실한 성상을 구명할 수 있고 순수하게 정제된 LT를 이용하면 이 실험에서 개발한 방법보다 특이성과 민감도가 높고 환자의 시료에서 LT를 정량할 수 있는 검색 kit를 개발할 수 있을 것이다.

결 론

대장균이열성장독소를 특이하게 측정할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 세포융합기법으로 LT에만 특이하게 반응하는 단세포균항체를 분비하는 림프잡종세포를 얻어 이 세포가 분비하는 단세포균항체의 특성을 구명하고 이것을 이용한 double sandwich ELISA를 개발하여 LT를 검색할 수 있는지를 검색하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 1G8-1D1 세포배양액과 복수의 LT에 대한 항체를 GM1-ELISA로 검색한 결과 각각 512와 102,400이고 면역글로블린 class는 IgM이다.

2. LT에 대한 세포배양액의 흡착율은 LT농도가 300 μ g/ml일때 최대 흡착율인 98%의 흡착율을 보이며 LT의 농도가 저하됨에 따라 흡착율도 떨어지는 것으로 보아 1G8-1D1 단세포균항체는 LT에 결합하는 항체이다.

3. 1G8-1D1 세포배양액의 LT에 대한 반응은 492nm 흡광도로 0.886이고 CT에 대한 반응도는 0.142로 CT와의 교차반응정도가 아주 낮아 LT에만 반응하였다.

4. 1G8-1D1 복수는 LT의 농도가 6mg/ml, 1.2mg/ml일때 투과성인자가 각각 41%, 44%정도 억제하지만 중화력은 보이지 않았다.

5. 1G8-1D1 단세포균항체를 이용한 double sandwich ELISA로 LT를 측정된 결과 LT의 농도 78ng/ml 수준까지 측정할 수 있었다.

6. RPLA kit로 판정한 환자실사 대변에서 분리한 LT⁺ 9개 균주와 LT⁻ 5개 균주를 대상으로 그 배양상청액으로 LT를 측정된 결과 RPLA kit와 동일한 결과를 얻었다.

참 고 문 헌

- 1) 국윤호, 조명계, 황용수, 김익상, 차창룡, 장우현, 이승훈, 김삼재, 한용철: *Mycobacterium tuberculosis* 파쇄추출 항원에 대한 단세포균항체의 생산 및 그 특성에 관한 연구. *결핵 및 호흡기질환* 31: 83-90, 1984.
- 2) 차창룡, 황용수, 조명계, 박명희, 안효섭, 김노경, 장우현, 이문호: 급성백혈병 세포항원에

반응하는 단세포균항체를 분비하는 림프잡종세포종(Hybridoma) 생산에 관한 연구. *대한외과학회지* 27: 253-263, 1984.

- 3) 최명식, 이광호, 장우현, 이승훈: 대장균의 이열성장독소 생산기전. *대한미생물학회지* 17: 35-41, 1982.
- 4) Bäch E, Svennerholm A M, Holmgren J and Möllby R: Evaluation of a ganglioside immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 10:791-795, 1979.
- 5) Clements J D and Finkelstein R A: Demonstration of shared and unique immunological determinants in enterotoxins from *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 22:709-713, 1978.
- 6) De S N, Bhattacharya K and Sarkar J K: A study of the pathogenicity of starins of *Bacterium coli*. *J. Pathol. Bacteriol.* 71:201-209, 1956.
- 7) Donta S T and Smith D M: Stimulation of steroidogenesis in tissue culture by enterotoxigenic *Escherichia coli* and its neutralization by specific antiserum. *Infect. Immun.* 9:500-505, 1974.
- 8) Donta S T and Viner J P: Inhibition of the steroidogenic effects of cholera and heat-labile *Escherichia coli* enterotoxins by GM1 ganglioside: Evidence for a similar receptor site for the two toxins. *Infect Immun.* 11:982-985, 1975.
- 9) Evans D J Jr and Evans D G: Direct serological assay for the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*, using passive immune hemolysis. *Infect. Immun.* 16:604-609, 1977.
- 10) Evans D J Jr, Evans D G and Gorbach S L: Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immun.* 8:725-730, 1973.
- 11) Gilligan P H, Brown J C and Robertson D C: Immunological relationships between cholerae toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* 42:683-691, 1983.
- 12) Greenberg, H B, sack D A, Rodriguez W, Sack R B, Wyatt R G, Kalica A R, Horswood R L, Chanock R M and Kapikian A Z: Microtiter solid-phase radioimmunoassay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* 17:541-545, 1977.
- 13) Guerrant R L, Brunton L L, Schnaitman T C, Rebbun L I and Gilman A G: Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell mor-

- phology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **10**:320-327, 1974.
- 14) Gustafsson B and Möllby R: GMI ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for detection of heat-labile enterotoxin produced by human and porcine *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* **15**:298-301, 1982.
 - 15) Gyles C L: Relationship among heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.* **129**:277-283, 1974.
 - 16) Holmes R K and Twiddy E M: Characterization of monoclonal antibodies that react with unique and crossreacting determinants of cholera enterotoxin and its subunits. *Infect. Immun.* **42**:914-923, 1983.
 - 17) Holmgren J.: Comparison of the tissue receptors for *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins by means of gangliosides and natural cholera toxoid. *Infect. Immun.* **8**:851-859, 1973.
 - 18) Köhler G and Milstein: Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature.* **256**:495, 1975.
 - 19) Littlefield J W: Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science* **145**:709, 1964.
 - 20) McKearn J J: Cloning of hybridoma cells by limiting dilution in fluid phase, p 374 in *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A new dimension in biological analysis*, edited by Kennett, R.H., McKearn, J.J. and Bechtel, K.B. Plenum press, New York and London, 1980.
 - 21) Merson M H, Yolken R H, Sack R B, Froehlich J L, Greenberg H B, Huq I and Black R W: Detection of *Escherichia coli* enterotoxins in stool. *Infect. Immun.* **29**:108-113, 1980.
 - 22) Morrow D L, Kline J B, Douglas S D and Polin R A: Rapid detection of group B streptococcal antigen by monoclonal antibody sandwich enzyme assay. *J. Clin. Microbiol.* **19**:457-459, 1984.
 - 23) Otnaess A B, Laegreid A and Ertersvag K: Inhibition of enterotoxin from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* by gangliosides from human milk. *Infect. Immun.* **40**:563-569, 1983.
 - 24) Sack R B: Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **29**:333-353, 1975.
 - 25) Smith N W and Sack R B: Immunologic cross-reactions of enterotoxins from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.* **127**:164-170, 1973.
 - 26) Speirs, J. I, Stavric S and Konowalchuk J: Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with Vero cells. *Infect. Immun.* **16**:617-622, 1977.
 - 27) Svennerholm A M, and Wiklund G: Rapid GMI-enzymelinked immunosorbent assay with visual reading for identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.* **17**:596-600, 1982.
 - 28) Takeda Y, Honda T, Taga S and Miwatani T: In vitro formation of hybrid toxins between subunits of *E. coli* heat-labile enterotoxin and those of cholerae enterotoxin. *Infect. Immun.* **34**:341-346, 1981.
 - 29) Yolken R H, Greenberg H B, Merson M H, Sack R B and Kapikian A Z: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.* **6**:439-444, 1977.