

Electroblotting 을 이용한 단일클론항체의 NH₂-말단 아미노산 배열분석

남경수 · 장현욱 · 정규찬

영남대학교 약학대학

(Received November 24, 1989)

NH₂-terminal Amino acid Sequence Analysis of Monoclonal Antibody by Electroblotting Method

Kyung Soo Nam, Hyeun Wook Chang, and Kyu Charn Chung

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 713-749, Korea

Abstract—NH₂-terminal amino acid sequence analysis of monoclonal antibody is very important to identify gene family and diversities of antigen-antibody recognition. When we used the PVDF (Polyvinylidene difluoride) membrane blotting method, we could easily analyze NH₂-terminal sequence of monoclonal-antibody which specifically binds to phosphatidylinositol 4,5-biphosphate. PVDF membrane is an ideal solid-phase support for sequence analysis, especially when used with electroblotting method. This method is superior to continual method and will be applied to the sequence analysis of picomole quantities of proteins by gel electrophoresis.

Keywords □ Monoclonal antibody, PVDF membrane, Electroblotting

단일클론항체의 NH₂말단 아미노산 잔기의 결정은 항체의 다양성을 연구하는데 중요한 정보를 제공한다.¹⁾ 지금까지 많은 단일클론항체의 NH₂말단의 아미노산 배열은 각종 크로마토그래피에 의해 결정되어져 왔으나 복잡한 정제과정을 거치는 동안 많은 시간적, 경제적 낭비를 감수해야만 했다. 또한 정제한 후에도 켈여과에 의한 heavy chain 과 light chain 의 분리를 해야만 하는 번거로움이 따랐다.

1985년 Vandekerckhove 등²⁾이 SDS 켈전기영동 등에 의해 단백질을 분리하여 이를 polybrene 처리한 섬유여지에 electroblotting 하여 이를 직접 아미노산 배열분석기에 도입하는 새로운 방법을 고안하였다. 본 실험에서는 PVDF 막(polyvinylene difluoride)을 이용한 electroblotting 방법으로 단일클론항체의 NH₂말단의 아미노산 배열을 손쉽게 결정하였기에 보고하고자 한다.

실험방법

재료 및 시약—PVDF 막은 0.45 μm 크기의 Millipore 사 제품을 사용하였으며, 그의 전기영동 및 blotting 에 사용한 모든 시약은 Sigma 사(U.S. A.) 및 Wako 사(일본) 특급시약을 사용하였다. 그리고 아미노산 배열분석기에 사용한 용매 및 glass fiber 는 모두 Applied Biosystems 사 제품을 사용하였다.

기구—아미노산 배열분석기는 Applied Biosystems 사의 Protein-peptide Sequencing system 477A 를 사용하였으며 Blotting 장치는 Bio-Rad 사(Model No.1703910), SDS-PAGE 및 Electroblotting³⁾을 사용하였다.

방법—시료(단일클론항체 AM-2, 10~20 μg)를 2-mercaptoethanol(2-ME)로 처리한 뒤, 12.5%

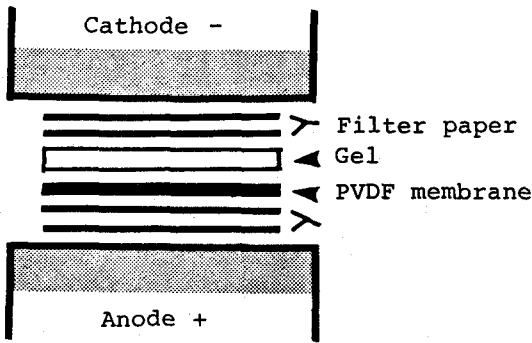


Fig. 1—A schematic representation of electroblotting apparatus.

polyacrylamide를 포함한 minigel (10×10 cm, 두께 0.5 mm)에 주입하여 20 W에서 전기영동을 하였다. 영동 후 젤을 주의하여 유리판에서 분리하여 transfer buffer에 5분 정도 담근다. 젤과 같은 크기로 절단한 PVDF 막을 100% methanol에 잠시 넣은 후 다시 transfer buffer에 보관하였다. Fig.1과 같이 transfer buffer에 적신 여지 위에 젤을 얹고 그 위에 PVDF막을 얹은 다음 그 위에 transfer buffer에 적신 여지를 조심스럽게 얹었다. 이 때 기포가 들어가지 않도록 특히 주의를 하였다. 그 다음에 음극쪽으로 젤이 향하도록 blotting 장피에 주입하여 4°C의 transfer buffer 속에서 blotting 행하였다(80 V, 2 hr). 2시간 동안 blotting을 한 후에 염색액으로 PVDF막을 1~2분 염색하고, 다시 수차례 증류수로 씻은 후, 탈색액으로 탈색시켰다. 그 뒤 PVDF막을 다시 한번 증류수로 씻고 청결한 곳에서 자연건조시켰다. 보관은 -20°C에서 차광한 상태로 하였다.

Transfer buffer, 염색액 및 탈색액의 조성 실험에 사용한 transfer buffer는 10 mM 3-cyclohexylamino-1-propane sulfonic acid, 10% methanol 및 0.5mM dithiothreitol를 혼합한 후 pH 11.0으로 조절하여 사용하였다.

염색액은 0.1% Coomassie Brilliant Blue, 50% methanol의 조성의 용액을 사용하였으며, 탈색액은 50% methanol, 10% Acetic acid의 조성의 용액을 사용하였다.

아미노산 배열기에 의한 분석—PVDF막에서 필요한 단백질부분 즉, 단일클론항체(IgM, κ chain)의 heavy chain(약 72 kd)을 깨끗한 칼로 도려내

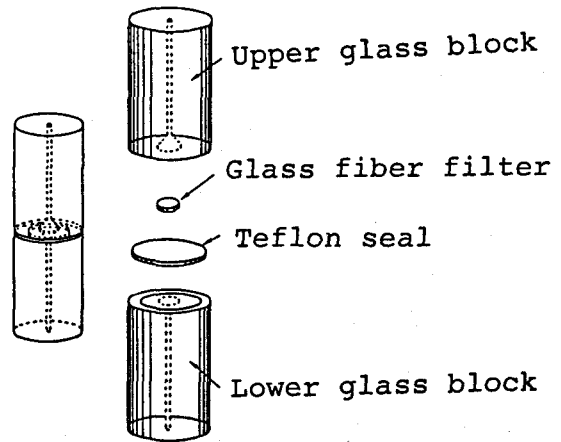


Fig. 2—Apparatus of sequencing cartridge.

어, 분석기의 sequencing cartridge의 상층 glass block의 홈안에 설치하였다(Fig.2). 이 때 2~3배의 PVDF막이 약간씩 겹쳐져도 무방하였다. 그 외에 glass fiber 및 teflon seal을 순서대로 얹고, 다시 하층 glass block을 얹은데로, 거꾸로 아미노산 배열기의 cartridge부에 설치하였다. 그 다음은 기계분석프로그램에 의하여 아미노산의 배열을 결정하였다.

결과 및 고찰

본 실험에 사용한 단일클론항체는 세포내의 정보 전달과정에 있어서 중요한 역할을 담당하는 인지질인 phosphatidylinositol 4,5-biphosphate에 대한 항체로서⁵⁾ 본 연구실에서는 인지질의 생리활성 및 질병에 있어서 그 의의를 규명하고자 단일클론항체를 제작하여 연구를 행하고 있다.^{6,7)} PVDF막은 teflon상의 강한 소수성 fiber로써 단백질과 소수 결합 혹은 정전기적인 결합에 의해 강하게 결합한다.

또 내인성이 우수하며, 아미노산 분석기에 사용되는 모든 시약에 대하여 내성을 가지므로 nitrocellulose 대용으로 널리 사용되고 있다.

전기영동 결과와 전기영동한 후의 젤을 PVDF막에 blotting한 결과는 Fig.3과 같다. 거의 대부분의 단백질이 젤에서 PVDF막으로 전이됨을 알 수 있었다.

면역글로부린은 2개의 heavy chain과 2개의

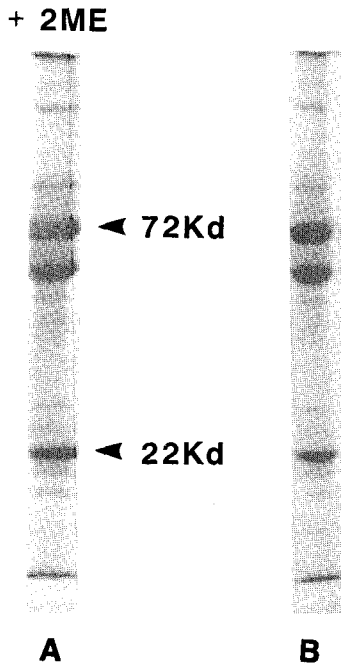


Fig. 3— Patterns of SDS-PAGE and electroblotted onto PVDF membrane. A: SDS-PAGE of monoclonal antibody (saturated (NH₄)₂SO₄ precipitated) treated with 2-ME (2-mercaptoethanol). 72 Kd; heavy chain 22 Kd; light chain; B: The bands were electroblotted onto PVDF membrane and stained with Coomassie Blue. Heavy chain was excised from the membrane and sequenced directly.

Table I— Comparison of NH₂-terminal sequence of electroblotted method with that of continual method

Cycle number	1	5	10	15	20
Blotted method	E V O L V E S G G G L V K P G G S L K E				
Continual method	E V O L V E S G G - L V K P G G S L K E				

NH₄-terminal amino acid sequences are displayed in 1-letter code

light chain으로 구성되어져 있으며, 각 chain은 disulfide 결합을 하고 있으므로, 전기영동을 할 때는 2-ME를 처리하여 2개의 chain (heavy chain; 72 kd, light chain; 22 kd)으로 분리되어 나타나게 하였다. 그리고 heavy chain은 항체의 종류에 따라 그 분자량이 다르므로, 전기영동을 한 후 PVDF막에 blotting한 결과 단백질밴드의 위치가 조금씩 차이가 있으나, 분자량 표준물질과 분자량이 일치하는 부분을 잘 오려낸다. 오려낸 부분은 아미노산 배열분석기의 상층 glass block에 얹고 아미노산 잔기 분석을 하였다. Fig.4는 PVDF막에서 heavy chain의 부분을 취하여 NH₂말단 아미노산 잔기를 분석하는 Edman 방법으로 아미노산 배열을

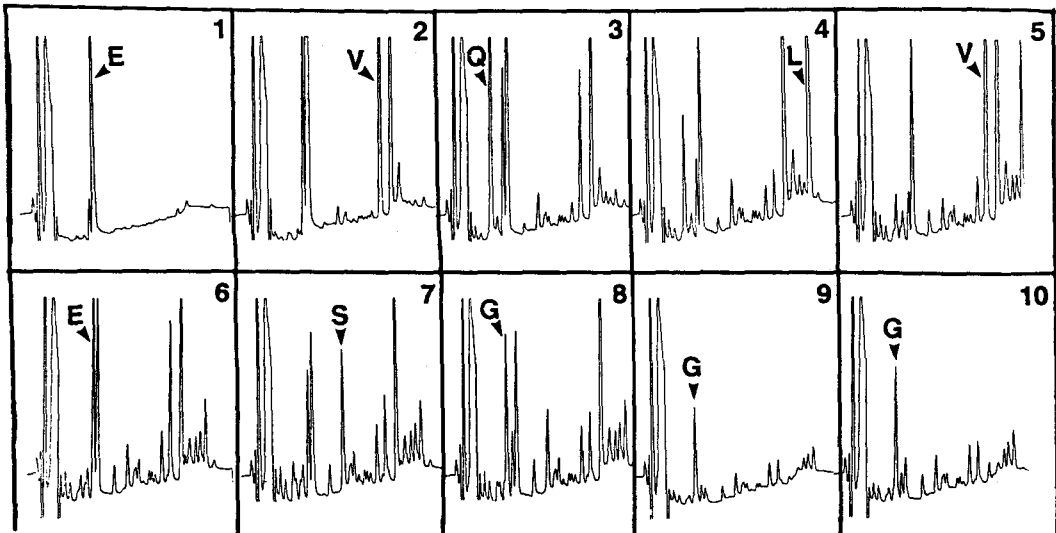


Fig. 4— Chromatograms of PTH-derivatives of monoclonal antibody by Edman degradation. The abscissa shows OD₂₇₀, the ordinate elution time (minutes).

분석한 결과를 10잔기까지 나타내었다. 그 결과 종래의 방법으로 결정된 NH_2 말단 아미노산 배열과 20잔기까지 완전히 일치함을 알 수 있었다(Table I). 특히 이 electroblotting 방법은 시료의 양이 극히 미량(수 pmole~10 pmole)에서도 고감도로 분리가 가능하나, 아미노산 말단이 수식되어 있는 단백질에 대해서는 종래의 방법과 마찬가지로 아미노산 배열을 결정할 수 없는 것이 한 가지 결점이기도 하다.

결 론

단일클론항체의 NH_2 말단 아미노산 잔기를 결정하기 위해, 전기영동을 이용한 electroblotting을 행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) Blotting 방법을 사용한 결과 전기영동한 젤의 단백질은 PVDF 막에 효율 좋게 전이되었다.

2) PVDF 막에서 오려낸 단일클론항체의 heavy chain 단편을 직접 아미노산 배열분석기를 이용해서 NH_2 말단의 아미노산 배열을 분석한 결과 손쉽게 종래의 방법으로 얻은 결과와 일치함을 알 수 있었다.

이상의 결과에서 electroblotting 방법을 미량의 검체를 사용하여도 아미노산의 배열을 신속히 결정할 수 있다는 점에서 경제적으로 그 이용이 기대된다고 하겠다.

문 헌

- 1) Dildrop, R.: A new classification of mouse VH sequences, *Immunol. Today*. 5, 85 (1984).
- 2) Vandekerckhove, J., Bauw, G., Puype, M., Damme, V.J., and Montagu, M.V.: Protein-blotting on polybrene-coated glass-fiber sheets. *Eur. J. Biochem.* 152, 9 (1985).
- 3) Matsudaira, P.: Sequence from picomole Quantities of Protein Electroblotted onto polycynylidene Difluoride membrane. *J. Biol. Chem.* 252, 10035 (1987).
- 4) Matsudaira, P.T. and Burgess, D.R.: SDS Microsloab Linear Gradient polyacrylamide Gel Electrophoresis.
- 5) 梅田眞郷, 宮澤敦夫, 南景珠, 吉岡享, 井土圭三: 生理活性リン脂質に對するモノクローナル抗體の製作とその性状解析, *脂質生化學研究* 31, 319(1989).
- 6) Umeda, M., Igarashi, K., Nam, K.S., and Inoue, K.: Effective production of monoclonal antibodies against phosphatidylserine: Stereo-specific recognition of phosphatidylserine by monoclonal antibody. *J. Immunol.* 143, 2273 (1989)
- 7) Nam, K.S., Umeda, M., Igarashi, G., Inoue, K.: Specificities of monoclonal antibodies that specifically bind to phosphatidylcholine, *J. Immunol.* (in press) 1989.