

누에의 濃核病바이러스(山梨株)에 대한 단클론항체의 제작

최 홍 규

名古屋大學 農學部

Preparation Monoclonal Antibodies against *Bombyx* Densonucleosis Virus Type II (Yamanashi isolate)

Hong Kyu Choi

Faculty of Agriculture, Nagoya University.

Summary

Monoclonal antibodies were prepared against *Bombyx* densonucleosis virus type-II(Yamanashi isolate). Four hybridoma clones, named C4, F1, H2, M9 were only reacted with the DNV-II, but those were not reacted with *Bombyx* densonucleosis virus type-I(Ina isolate) and infectious flacherie virus(IFV) by double diffusion test in 0.8% agarose gel. C4, F1 and M9 of them were reacted with 53KDa polypeptide of DNV-II, and H2 was reacted with 46.5KDa polypeptide of the virus.

序 言

最近 分子生物學 및 遺傳工學에 관한 연구가 활발해 짐에 따라 特定の 遺傳子를 클로닝하는 手段中の 하나로서 抗體의 중요성이 매우 높아지고 있다. 그 중에서도 Kohler & Milstein(1975)에 의해 創出된, 세포융합법에 의한 단클론항체는 化學的으로 單一的 항체분자에서 만들어지기 때문에 고도의 均일성 및 反應特異性을 가지고 있어 유전자클로닝의 성공율을 매우 높여 주므로 특히 중요시 되고 있다. 또한 단클론항체는 항원의 精製가 불충분 해도 항체제작에 큰 어려움이 없으므로 精製가 어려운 항원의 경우에도 특이성이 높은 항체제작이 가능하며, 抗體를 생산하는 融合細胞만 보존하여 두면 언제든지 同一한 항체를 대량 공급할 수 있는 등 여러가지 長點으로써 현대의 醫學, 生物學 등의 연구에 있어서 그 실용가치가 점점 높아지고 있다. 本研究에서는 누에에 軟化病을 일으키는 바이러스중의 하나인 山梨株 濃核病바이러스(densonucleosis virus; DNV-II)의 유전자구조의 해석 및 增殖過程에 관한 연구를 수행할 목적으로 DNA에 특이성이 높은 단클론항

체를, 細胞融合法으로 제작하여 얻어진 항체의 反應特異性을 검토하였다.

材料 및 方法

1. 바이러스

供試 바이러스로는 日本 山梨縣에서 처음 발견되어 名古屋大學, 農學部, 養蠶學室에서 계대보존하고 있는 누에의 濃核病바이러스(DNV-II)를 사용했으며, 姜 등(1978)의 방법에 의해 純化하였다.

2. 免 疫

實驗에 사용한 마우스는 生後 6週된 BALB/c 였으며, 1마리당 앞의 방법으로 純化한 바이러스를 100 μ g 씩 Freund's complete adjuvant와 섞어 腹腔內에 1회 주사하였다. 4주후, 항체의 존재를 확인한 뒤 抗體價를 높이기 위해 10 μ g의 바이러스를 PBS(phosphated-buffered saline)에 녹여, 꼬리정맥에 주사하였고 3일 지난 뒤 脾臟을 채취하여 細胞融合에 사용하였다.

3. 細胞培養

마우스의 myeloma 세포로는 BALB/c 由來의 P3-NS-1/1-Ag4-1(NS-1) 세포를 사용했으며 NS-1 및 融

합세포는 RPMI 1640 배지(GIBCO社, NaHCO_3 2.0g/l, pyruvic acid 0.1g/l, L-Glutamine 0.3g/l 및 penicillin 100U/ml, streptomycin 100 μg /ml, 2-mercaptoethanol $5 \times 10^{-3}\text{M}$ 液 1ml/l를 넣어 잘 섞은 후 1N HCl로 pH를 6.7로 조정後, 濾過滅菌함)에 fetal calf serum(FCS; Boehringer Mannheim, Lot426709)을 NS-1세포인 경우에는 15%, 融合細胞인 경우에는 20%가 되도록 첨가하여 37°C, 5%CO₂의 조건하에서 배양했다. 融合細胞를 클로닝할 때 사용한 feeder cell로는, 生後 5週된 BALB/c 마우스에, 사용 일주전에 200 μl 의 pristane(2,6,10,14-tetramethylpentadecane, Aldrich)을 주사한 뒤 腹腔에서 채취한 macrophage를 사용했다.

4. 細胞融合 및 融合細胞의 選拔

항체를 생산하는 脾臟細胞와 NS-1세포와의 融合過程은 富山·安東(1987) 및 三毛 등(1984)의 방법을 참고로 하였다(Fig. 1). 즉 높은 항체가 갖는 마우스의 脾臟을 摘出하여, 금속 mesh를 통과시켜 얻은 脾細胞 5×10^7 개와 NS-1세포 1×10^7 개를 혼합하여 FCS를 넣지 않은 RPMI 1640 배지로 가볍게 세정한 뒤, 50% immunization of mice

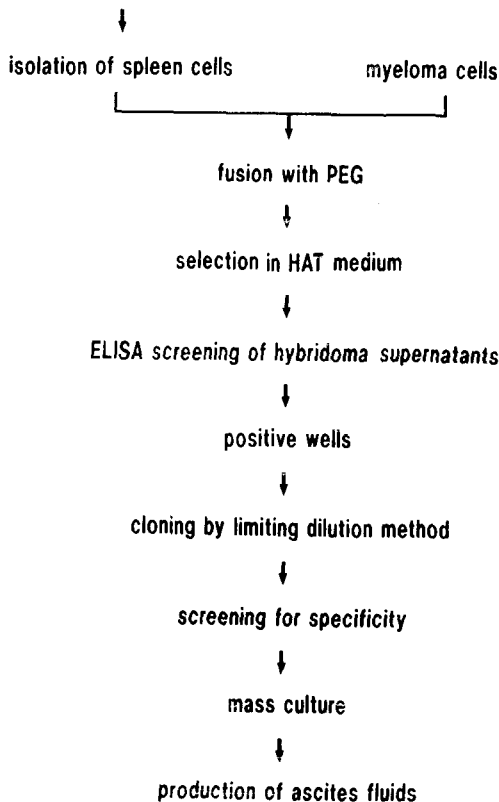


Fig. 1. Flowchart for preparation of monoclonal antibodies.

polyethylenglycol 4000(PEG, Merck)의 존재하에서 融合시켰다. 배지 첨가후 遠心에 의해 PEG를 제거한 후 세포를 20% FCS가 든 HAT 배지(aminopterin 0.4 μM , thymidine 16 μM , hypoxanthine 100 μM 을 넣은 RPMI 1640 배지) 200ml에 浮遊시켜, 96穴의 배양 플레이트(NUNC社)에 1穴당 100 μl 씩 분주, 37°C, 5% CO₂의 조건하에서 배양하여 融合細胞를 선별했다. 融合細胞를 선별했다. 融合細胞의 증식이 관찰된 배양 플레이트中의 抗體活性은 간접 ELISA법으로 검정했으며 抗體活性이 認定된 融合細胞는 限界希釋法으로 3회 클로닝하여 일부는 단클론항체 제작에, 일부는 액체질스에 넣어 동결보존했다.

5. 단클론항체

역가가 높은 단클론항체를 제작하기 위하여 BALB/c 마우스에 pristane을 주사한 지 약 30일 후에, 앞의 방법으로 클로닝한 각각의 融合細胞를 약 8×10^6 개씩 腹腔내에 주사하였다. 融合細胞 주사후, 8~11일 후에 融合細胞의 증식으로 腹部가 膨大해진 마우스에서 腹水を 채취하여 2,000rpm, 5분간 원심한 후, 上清液을 滅菌濃縮法으로 약 3배 농축하여 냉동보존했다.

6. ELISA

融合細胞의 培養上清液中的 항체활성은 Payment *et al.*(1982)의 방법에 의거, 간접 ELISA법으로 검정했다. 즉 DNA를 10mM Carbonate-bicarbonate buffer (pH9.5)에 10 μg /ml로 희석하여 96穴의 Pro-bind assay plate(Becton Dickinson)에 1穴당 50 μl 씩 분주하여 실온에서 3시간동안 靜置시켜 plate에 항원을 결합시켰다. 이어 항원액을 제거한 후 非特異的反應을 억제하기 위해 blocking solution(10% rabbit serum in PBS)을 1穴당 100 μl 씩 넣어 실온에서 2시간 반응시킨 후 PBS로 1회 세정했다. 단클론항체를 blocking solution에 500배로 희석하여 1穴당 50 μl 씩 넣어 실온에서 1시간 반응시킨 후, 앞에서와 같은 방법으로 4회 세정했다. 2次 抗體인 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Cappel)를 blocking solution에 1,000배 희석하여 1穴당 50 μl 씩 넣어, 실온에서 30분간 반응시켰으며 PBS로 4회 세정한 후 *o*-phenylene diamine(0.5mg/ml)과 0.01%의 과산화수소수를 함유하는 0.1M citrate-phosphate buffer(pH5.0)에서 發色시켰으며 4N H₂SO₄로 반응을 정지시켰다.

7. 電氣泳動 및 Western blot 분석

앞에서 純化한 DNV의 순도를 더욱 높이기 위해 선택액에 의한 密度勾配遠心を 다시 한 번 행하였다. 그 결과 얻어진, 고도로 純化된 DNV를 증류수에 녹인 후 (4.6mg/ml), 同量의 SDS-PAGE用 sample buffer와 혼

합, 98°C에서 5분간 熱處理하여 SDS-PAGE用 sample 로 했다. 電氣泳動은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 행했으며 常法에 따라 Coomassie brilliant blue R-250 에 의한 염색을 한 후 탈색했다. Western blot 분석을 할 경우에는 겔을 염색하지 않고 nitrocellulose막에 걸쳐서 HORIZBLOT장치(ATTO)를 이용, 200mA로 1 시간 泳動하여 겔상의 단백질을 nitrocellulose막에 轉寫시켰다. 非特異的反應을 억제하기 위해 轉寫後의 nitrocellulose막을 5% calf serum을 함유하는 PBS(以下, I液로 略함)에 넣어 30분간 振盪反應시켰다. 그 뒤, I液으로 500배 희석한 단클론항체와 실온에서 90 분간 振盪反應시킨 후 2% skim milk를 함유하는 PBS(以下, II液으로 略함)로 20분씩 3회 세정했다. 그 다음 I液으로 1,500배 희석한 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG(Cappel)에 넣어, 실온에서 90분간 振盪反應시킨 후, II液으로 20분씩 3회, PBS 및 10mM Tris-HCl buffer(pH7.4)로 각각 5분씩 세정한 뒤, o-dianisidine(25μg/ml)과 0.01%의 과산화수소수를 함유하는 10mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)에서 發色시켰다.

8. Double diffusion test

단클론항체의 反應特異性은 double diffusion test에 의해 생기는 沈降線의 유무로 조사하였다. 즉 고도로 정제된 누에의 전염성인화병바이러스(IFV) 및 伊那株 DNV(DNV-I), 그리고 本實驗에서 사용한 DNV-II를 항원으로 하여 Ouchterlony(1968)의 방법에 의거, 0.8%의 agarose gel 上에서 抗原·抗體反應을 시켰다.

結果 및 考察

1. DNV의 講成단백질

高度로 純化한 山梨株 DNV를 SDS-PAGE로 분석한 결과, DNV의 講成단백질로는 120K(120,000Da), 118K, 53K, 51K, 49K 그리고 46.5K의 6종류가 존재하며, 주요구성단백질은 50K 前後의 4종임을 알 수 있다(Fig. 2). 특히 그 중에서 53K와 46.5K가 구성단백질의 대부분을 차지하고 있다. 이 결과는 川瀨 등(1984)에 의해 보고된 결과와 분자량면에서는 거의 일치하고 있으나 120K와 118K의 量의인 面에서 약간의 차이를 나타내고 있다. 즉 本 실험결과에서는 120K와 118K는 극히 적은 양 만이 검출되었으나, 川瀨 등의 결과에서는 51K 및 49K의 단백질과 거의 비슷한 정도로 많은 양이 검출되었다. 이러한 차이가 어떤 점에서 기인된 것 인지는 알 수 없으나 繼代保存中 DNV의 특성이 변화하였다고는 생각하기 어렵고, DNV의 純化度에

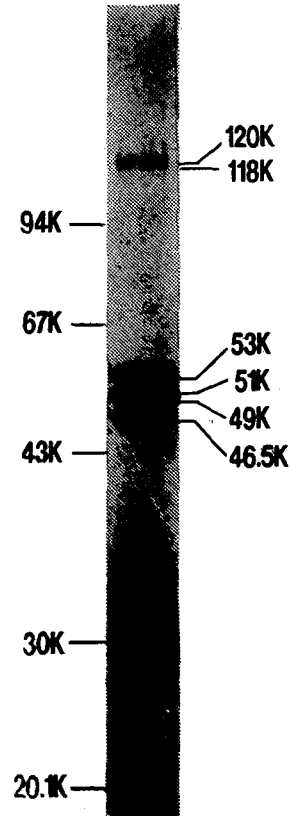


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of DNV proteins. DNV was electrophoresed on 11% SDS-polyacrylamide gel and stained with Coomassie brilliant blue.

서의 차이 및 SDS-PAGE用 sample 준비과정에서의 차이에서 起因되지 않았나 생각된다.

2. 融合細胞의 製作

마우스에 DNA를 주사한 뒤 4週째에 眼靜脈에서 血液을 하여, 항체가를 間接 ELISA법으로 조사해 본 결과, 抗體希釋으로 1.5×10^6 배 이상의 높은 항체가를 나타내었다. 그러나 融合細胞의 형성율을 높이기 위해서는 항체를 생산하는 B 임파세포가 충분히 면역되어 있어야 하며, 또한 增殖期에 있어야 하기 때문에, 다시 10μg의 DNV를 주사한 뒤 3일째 되는 마우스의 脾臟을 細胞融合에 사용하였다.

細胞融合後, 培養을 개시한 뒤 5일째부터 融合細胞의 증식이 관찰되기 시작하여 14일째까지 전체의 배양플레이트 20매에서 198개의 融合細胞가 관찰되었다. 이 결과는 全培養穴中의 약 10.3%(198/1920)에서 融合細胞가 形成된 것으로 融合세포의 形成율은 그다지 높지 않았다. 그 원인으로는 실험에 사용한 PEG의 품

질, PEG의 농도와 융합반응시간과의 관계, 세포의 혼합비율 등 여러조건에서의 不適合性을 생각할 수 있으나, 정확한 원인은 알 수 없다. 다만 본 실험의 細胞融合에서 사용한 細胞數가 보통의 細胞融合에서 사용하는 세포수의 약 10% 정도로 적었다는 데에 그 원인이 있지 않으나 생각된다.

형성된 融合細胞中 약 44.9%(89/198)에서 항체활성이 인정되었으며, 이 결과는 三毛 등(1988) 및 Yelton *et al.*(1980)의 결과와 비교하여 볼 때 약 5%정도 높은 결과였다.

3. 단클론항체의 반응특이성

배양액중에서 항체활성이 인정된 89개의 融合細胞中 ELISA법에 의거 抗體價가 높은 5개의 融合細胞를 선발하여, 限界希釋法으로 3회 클로닝하여, 최종적으로 5개의 클론(C4, F1, H2, J18, M9)을 선발했다. 이들 5개의 클론을 증식시켜, pristane을 미리 주사하여 둔 마우스에 주사, 얻어진 단클론항체를 가지고 DNA-I, II 및 IFA에 대한 반응성을 Ouchterlony법에 의해 조사했다(data생략). DNV-I 및 IFV와의 반응성을 조사해본 이유는, IFV는 DNV의 정제단계중 설탕액에 의한 密度勾配遠心時에 DNV 보다 조금 밀에 band를 형성하기 때문에, 정제 DNV에 IFV가 섞여 있을 가능성이 있기 때문이며, DNV-I은 DNV-II와 同屬의 바이러스이기 때문에 단클론항체의 반응특이성을 조사하는데 사용하였다.

그 결과, 5개의 항체가 모두 DNV-I 및 IFV와는 전혀 반응하지 않았으나, DNV-II와는 모두 반응하여 침강선을 형성하였다. 흔히, 단클론항체는 double diffusion test에 의해서는 침강선을 형성하기 어렵다고 연구자들 사이에 알려져 있다. 그러나 본 실험에서는 침강선이 형성되었다. 다만, 조건을 바꿔 여러번 시도해봤으나 침강선이 뚜렷하지 않고 조금 넓게 형성되어, 사진촬영에는 성공하지 못했다.

4. 단클론항체의 性狀

얻어진 단클론항체가 모두, 항원으로 사용한 DNV-II에만 반응하여 특이성이 높은 것은 認定되었으나 DNV의 구성단백질중 어느 것에 반응하는 항체인지를 조사하기 위해 Western blot 분석을 했다(Fig. 3).

그 결과 C4, F1, M9는 53K 단백질과, H2는 46.5K 단백질과 반응하였으나, J18은 DNV 구성단백질의 어느 것보다도 반응하지 않는 항체였다. 즉 얻어진 단클론항체는, Western blot 분석법에 의해서는 DNV 구성단백질과 반응하지 않는 J18을 제외하고는, 모두 DNV의 주요구성단백질중 특히 많은 비율을 차지하고 있는 53K와 46.5K와 반응하는 것들 뿐이었다. 그러나 이

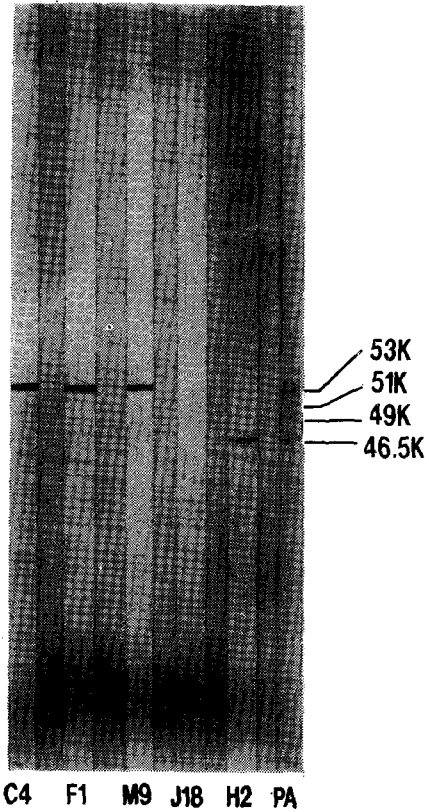


Fig. 3. Immunoblot analysis of DNV structural proteins with five monoclonal antibodies. Purified DNV particles were electrophoresed on 11% SDS-polyacrylamide gel. After the electrophoresis, the proteins on the gel were electroblotted onto a nitrocellulose sheet followed by the immunochemical staining using the five monoclonal antibodies(C4, F1, H2, J18 and M9) and peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG.

PA indicates polyclonal antibody raised in mice against purified DNV particles.

결과는 단클론항체가 다른 단백질에 대해서는 얻어지기 어렵다는 의미는 아니다. 다만 단백질이 많은 경우에 항체도 형성되기 쉬운 것이므로, 적은 클론중에 우연히 양적으로 풍부한 두 종류의 구성단백질에 대한 단클론항체만이 얻어졌을 뿐이라고 생각된다. 그리고 double diffusion test에서 DNV와 반응한 J18 단클론항체가 Western blot법에 의해서는, DNV 구성단백질과 반응하지 않은 것은, 아마도 이 단클론항체가 DNV의 구성단백질중 SDS-PAGE에 의해 抗原性이 없어진 부분을 인식하는 항체였던 때문이 아닌가 생각된다. 이렇듯 SDS-PAGE에 의해 단백질의 항원성이 없어지는

경우가 더러 있기 때문에(富山・安東, 1987), 단클론항체를 제작하여 Western blot 분석에 사용하고자 할 때에는 특히 注意가 필요하다고 생각된다,

본 실험에서 얻어진 항체들은 ELISA 및 Western blot 분석시에 사용한 2차항체가 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG이므로 당연히 전부가 IgG type였다.

본 실험에서는 DNV-II의 유전자 클로닝에 사용하고 자 단클론항체를 제작하였으므로 일반적으로 실험하기에 편리한 IgG type만을 클로닝하였다.

摘 要

단클론항체의 높은 반응특이성을 이용하여, DNV-II의 유전자클로닝에 사용할 목적으로 細胞融合法로 단클론항체를 만들었다. 그 결과 최종적으로 有用하다고 판정된 4개의 단클론항체(C4, F1, H2, M9)는 매우 높은 반응특이성을 가지고 있어, DNV-I 및 IFV와는 전혀 반응하지 않았으며, 항원으로 사용한 DNV-II와만 특이적으로 반응하였다. 또한 이들 단클론항체들 중 C4, F1, M9는 DNV의 53KDa 구조단백질과 반응하였고, H2는 46.5KDa 구조단백질과 반응하였다.

引 用 文 獻

姜錫權・中垣雅雄・清水孝夫・川瀬茂實(1978) 軟化病ウイルス(伊那株)의純化とウイルス核酸の性狀について. 日蠶雜 47(1):37-46.
川瀬茂實・蔡幼民・伴戸久徳・關 宏夫(1984) カイコ濃

核病ウイルス(山梨株)の化學的性狀について. 日蠶雜 53(4):341-347.

Köhler, G. and C. Milstein (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*(London) 256:495-497.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*(London) 227:680-685.

三毛明人・大脇 眞・深田哲夫・宮島茂壽(1984) 家蠶細胞質多角體病ウイルスに對する單クローン抗體の作製. 日蠶雜 53(1):59-63.

三毛明人・大脇 眞・深田哲夫(1988) 家蠶微孢子蟲類孢子に對する單クローン抗體の作製. 日蠶雜 57(3):189-195.

Ouchterlony, O.(1968) Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In *Handbook of experimental immunology*. (Wier, D.M. ed). Blackwell scientific publication, Oxford, pp.655-706.

Payment, P., D.J.S. Arora and S. Belloncik (1981) An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of cytoplasmic polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 40:55-60.

富山朔二・安東民衛(1987) 單クローン抗體實驗マニュアル. 講談社サイエンティフィック, 47-60.

Yelton, D.E., D.H., Margulies B. Diamond and M.D. Scharff (1980) In *monoclonal antibodies* (Kennett, R.H., T.J. Mckarn and K.B. Bechtol ed.), Plenum Press, New York and London, pp. 8-11.