

능성어(*Epinephelus septemfasciatus*) immunoglobulin M에 대한 단클론 항체 생산

김시우^{1,3} · 김종오² · 공경희¹ · 오명주¹ · 김위식^{1†}

¹전남대학교 수산생명의학과, ²부경대학교 해양생명과학연구소, ³경상북도 어업기술센터

Production of monoclonal antibodies to immunoglobulin M of sevenband grouper (*Epinephelus septemfasciatus*)

Si-Woo Kim^{1,3}, Jong-Oh Kim², Kyoung-Hui Kong¹, Myung-Joo Oh¹ and Wi-Sik Kim^{1†}

¹Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea

²Institute of Marine Life Science, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

³Gyengsangbuk-do Fishery Technology center, Pohang 37556, Republic of Korea

Immunoglobulin M (IgM) of sevenband grouper (*Epinephelus septemfasciatus*) was purified by mannan-binding protein (MBP) affinity column. The purified IgM had an apparent molecular weights of 76 (heavy chain) and 28 (light chain) kDa in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Eight hybridoma clones secreting monoclonal antibodies (mAbs) against sevenband grouper IgM were established. Antibody detection enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with bovine serum albumin (BSA, antigen) and the 8 mAbs revealed that optical density (OD) values were clearly different between sera from BSA-immunization and non-immunization of sevenband grouper. These results suggest that the produced mAbs in this study are specifically reacted with IgM of sevenband grouper.

Key words: Immunoglobulin M, sevenband grouper, monoclonal antibody, mannan-binding protein affinity column

능성어 (*Epinephelus septemfasciatus*)는 농어목 바리과 능성어속에 속하는 고급 해산 양식 품종으로 알려져 있다. 우리나라에서 능성어 양식은 약 25년 전부터 실시되어 2017년 443톤, 2018년 292톤을 생산하였다 (KOSIS, 2020). 하지만 양식 과정에서 발생하는 바이러스성신경괴사증 (viral nervous necrosis, VNN)으로 인해 매년 고수온기 (사육

수온: 24-26°C)에 대량 폐사가 발생하고 있다 (Kim *et al.*, 2012; Kim and Kim, 2015).

경골어류의 항체는 포유류의 항체 [구성: immunoglobulin A (IgA), IgD, IgE, IgG 및 IgM]와 달리 주로 IgM, IgD 및 IgT/IgZ로 구성되어 있으며, 이중 IgM은 어류의 혈청과 점액에서 가장 많이 존재하며 병원체의 불활화, 보체 경로의 활성화 등의 기능을 하는 것으로 보고되어 있다 (Wilson and Warr, 1992; Crowther, 1995; Kaattari and Piganelli, 1996; Pilstrom and Bengtén, 1996; Tort *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2013; Peter, 2014). 어류의

†Corresponding author: Wi-Sik Kim
Tel. and Fax: +82-61-659-7177
E-mail: whisky@jnu.ac.kr

혈액으로부터 IgM을 검출할 수 있다면 백신의 효능을 평가할 수 있을 뿐만 아니라 병원체에 감염되지 않은 어류를 선별하거나 병원체에 대한 감염이력 등을 확인할 수 있다 (LaPatra, 1996; Watanabe *et al.*, 1998; 2000; Kim *et al.*, 2008; Kole *et al.*, 2019). 하지만 혈액에 존재하는 IgM을 검출하기 위해서는 IgM을 인식하는 항체가 필요하다. 현재까지 능성어 IgM에 대한 항체는 보급되어 있지 않아 본 연구에서는 능성어 IgM에 대한 단클론 항체 (monoclonal antibody, mAb)를 생산하고자 하였다.

능성어의 혈청은 전남대학교 수산생명의학과에서 사육중인 건강한 능성어 (체중: 700-900 g)의 미부정맥에서 채혈하여 분리하였다. 채혈한 혈액은 상온에서 30분간 방치한 후, 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후 IgM 정제에 사용하였다. 또한 제작된 mAb의 특이성을 조사하기 위하여 건강한 능성어 2마리 (평균 체중: 약 800 g)에 bovine serum albumin (BSA)을 각각 1 mg/200 μ L씩 복강에 주사한 후 300 L 수조 (사육 수온: 20-22°C)에 사육하면서 1, 17, 25, 38일째 미부정맥에서 채혈하여 혈청을 분리하였다. 대조구의 혈청은 능성어 1마리 (체중: 750 g)에 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.5)를 200 μ L로 복강에 주사한 후 위와 동일한 방법으로 분리하였다.

능성어 IgM의 정제와 mAb의 생산은 Kim *et al.* (2017)의 방법에 따라 실시하였다. 능성어의 IgM은 immunopure IgM purification kit (Pierce, USA)에 들어 있는 mannan binding protein (MBP) affinity column을 사용하여 매뉴얼에 따라 정제하였다 (Kim *et al.*, 2017). mAb의 생산은 정제된 능성어의 IgM (100 μ g)을 BALB/c 마우스에 면역시킨 후, 비장 조직을 취해 polyethylene glycol (Roche, Germany)을 사용하여 SP2/0 myeloma 세포와 융합시킨 후 HAT 배지 (0.1 mM hypoxanthine, 4×10^{-4} mM aminoprotein, 1.6×10^{-2} mM thymidine, 10% fetal bovine serum in Dulbecco's modified eagle medium)에서 배양하였다 (Kim *et al.*, 2017). 양성 hybridoma는 정제된 능성어 IgM을 사용하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)로 선별하였고, 3회 이상 제한 희석법으로 클로닝하였다. 선별된 mAb의 isotyping은 pierce™ rapid ELISA mouse mAb

isotyping kit (Thermo, USA)를 사용하여 결정하였다.

능성어 IgM의 정제 여부를 확인하기 위하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시하였다 (Laemmli, 1970). 정제한 능성어 IgM을 12% polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동한 후 coomassie brilliant blue (Wako, Japan)로 염색하였다. 능성어 IgM에 대한 mAb를 생산하는 hybridoma의 선별과 제작된 mAb가 능성어 IgM을 인식하는지를 조사하기 위하여 Kim *et al.* (2017)의 방법에 따라 ELISA를 실시하였다. 능성어 IgM을 인식하는 hybridoma를 선별하기 위해 정제한 능성어 IgM (250 ng/50 μ L/well)을 ELISA plate (Nunc, Denmark)에 coating한 후, 1차 항체로는 본 연구에서 제작한 hybridoma의 배양액을 50 μ L/well 씩 분주하였고, 2차 항체로서 5% skim milk로 1,000배 희석된 horseradish peroxidase (HRP) conjugated 항 마우스 IgG 염소 혈청 (Younginfrontier, Korea)을 50 μ L/well 씩 분주하였다. 각각의 항체는 25°C에서 1시간 동안 반응하였다. Tween-20 포함된 PBS (T-PBS)로 5번 수세하였고, ELISA 발색액 (100 mM Na₂HPO₄, 50 mM citric acid, 1 mg/mL *o*-phenylenediamine, 0.03% H₂O₂)을 50 μ L/well 씩 분주한 후 25°C에서 15분 동안 발색하였다. 2N H₂SO₄를 50 μ L/well 씩 넣어 발색 반응을

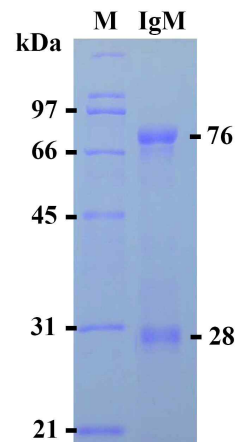


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of sevenband grouper IgM purified with mannan-binding protein (MBP) affinity column. Lanes are M: molecular marker; IgM: purified IgM.

중지시킨 후 microplate photometer (Multiskan, USA) 로 492 nm에서 흡광도 (optical density, OD) 값을 측정하였다. 제작된 mAb가 능성어의 IgM을 인식 하는지를 조사하기 위하여 BSA에 대한 특이 항체

를 검출하는 ELISA를 실시하였다. ELISA plate에 BSA (5 µg/50 µL/well)를 분주한 후, 37°C에서 overnight하여 항원을 coating 하였다. 1차 항체로는 능 성어 혈청 (BSA 면역 및 비면역 능성어로부터 분

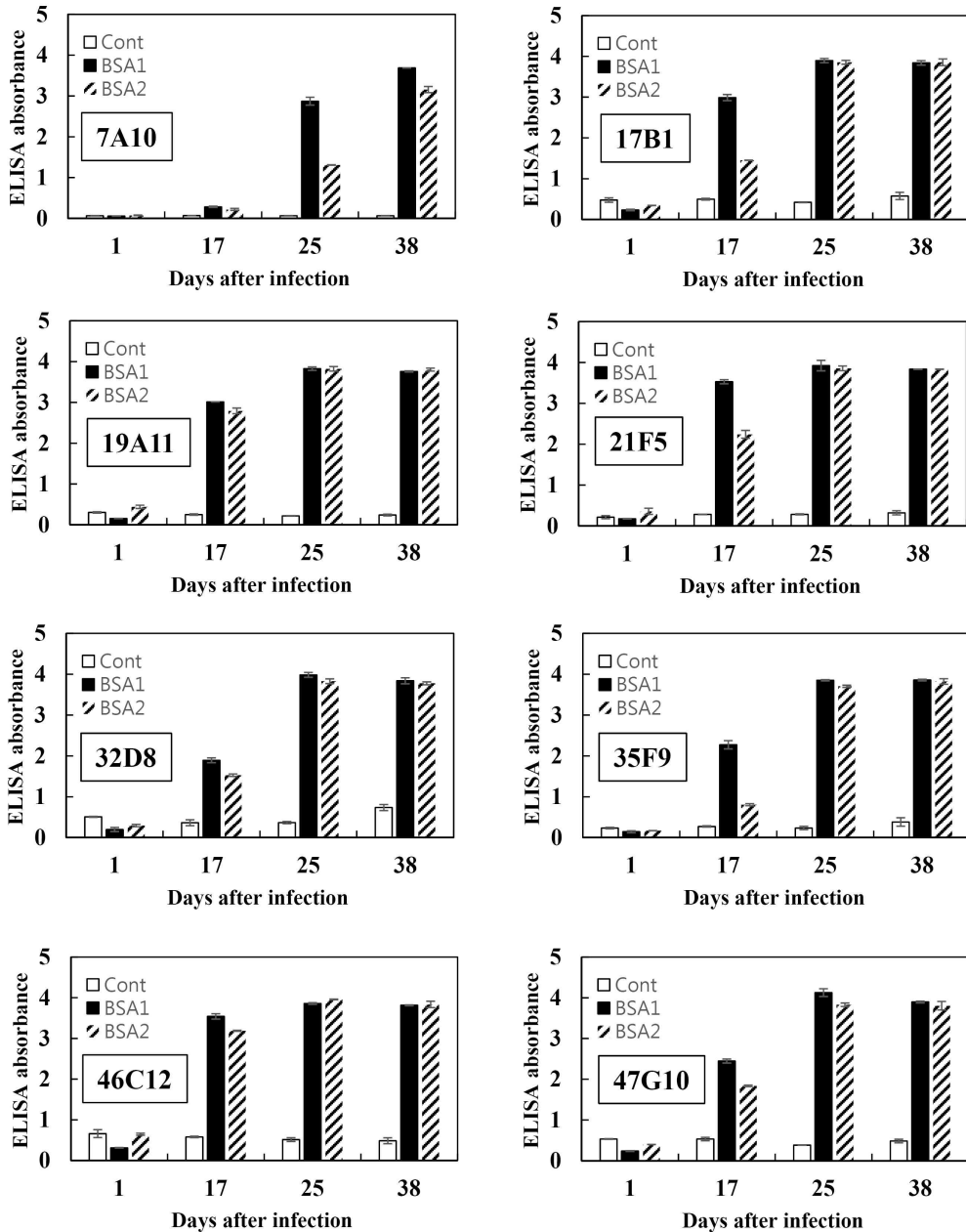


Fig. 2. Antibody detection enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) with bovine serum albumin (BSA, antigen) and 8 monoclonal antibodies (7A10, 17B1, 19A11, 21F5, 32D8, 35F9, 46C12, and 47G10). BSA1 and BSA2: sera from BSA immunization of sevenband grouper. Cont: serum from non-immunization of sevenband grouper.

리한 혈청)을 5% skim milk로 40배 희석하여 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 씩 분주하였고, 2차 항체로는 본 연구에서 제작한 8종의 mAb를 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 씩 분주하였으며, 3차 항체는 5% skim milk로 1,000배 희석된 HRP-conjugated 항 마우스 IgG 염소 혈청을 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 씩 분주하였다. 항체 반응과 발색 조건은 위와 동일하게 실시하였다.

MBP affinity column을 사용하여 능성어의 IgM을 정제한 후 SDS-PAGE를 실시한 결과, 약 76과 28 kDa의 분자량에서 밴드가 관찰되었다 (Fig. 1). 경골어류의 IgM은 일반적으로 SDS-PAGE 상에서 heavy (H) chain과 light (L) chain이 각각 71.5-78 kDa과 22-26.5 kDa 범위에서 관찰된다고 보고되어 있다 (Wilson and Warr, 1992; Magnadóttir, 1998; Pucci *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2017). 바리과에 속하는 갈색등근 바리 (*E. coioides*) IgM의 분자량은 H chain과 L chain이 각각 78 kDa과 27 kDa으로 보고되어 있다 (Cheng *et al.*, 2006). 본 연구에서 정제한 능성어의 Ig는 기존에 보고된 갈색등근바리를 비롯한 경골어류 IgM의 분자량과 유사하므로 정제된 Ig는 IgM으로 사료된다. 본 연구를 통해 MBP affinity column을 사용하여 능성어의 IgM을 정제할 수 있음을 확인하였다.

정제된 능성어의 IgM을 마우스에 면역시킨 후 마우스의 비장 조직과 SP2/0 myeloma 세포를 융합시켜 hybridoma를 제작하였다. Hybridoma로부터 생성되는 항체를 ELISA법으로 선별한 후, 제한 희석법으로 클로닝하여 최종적으로 8개의 mAb를 선별하였다 (7A10, 17B1, 19A11, 21F5, 32D8, 35F9, 46C12 및 47G10). 8개의 mAb에 대한 isotyping을 실시한 결과, 7A10 (H-chain: IgG2a, L-chain: kappa)을 제외한 7개의 mAb 모두 H-chain은 IgG1, L-chain은 kappa로 확인되었다.

제작된 mAb가 능성어 혈액 내에 존재하는 IgM을 인식하는지를 조사하기 위해, 능성어에 BSA를 면역시킨 후 1, 17, 25, 38일째 혈청을 분리하여 BSA에 대한 항체가를 측정하였다 (Fig. 2). 8개의 mAb 모두 BSA 면역 능성어 혈청에 대해 17일째부터 BSA에 대한 특이 항체가가 관찰되었고, 시간이 경과됨에 따라 항체가는 증가하는 것으로 나타났

다. 이에 반해 대조구의 혈청 (BSA 비면역 혈청)에서는 항체가의 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았다. Kim *et al.* (2009)에 연구에 따르면 능성어에 BSA를 면역시킨 후 20°C에서 사육하면서 BSA에 대한 항체가를 측정한 결과, 14일째부터 BSA에 대한 특이 항체가 검출되기 시작하였고, 21-28일에 높은 항체가가 검출된다고 보고하였다. 본 연구의 결과는 Kim *et al.* (2009)의 연구 결과와 유사하기 때문에 BSA 면역 능성어의 혈청에서 보인 높은 OD값은 BSA에 대한 특이 항체 (IgM)를 인식하는 것으로 사료된다. 이상의 결과, 제작된 8종의 mAb는 능성어 IgM을 특이적으로 인식하는 것으로 사료되어, 향후 능성어 혈액내 존재하는 병원체에 대한 특이 항체를 검출하는데 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 ‘수산동물 바이러스 전염병 진단용 항체 생산(20150259)’ 연구임.

References

- Cheng, C.A., Abraham, J., John, C., Wu, M.S., Lee, C.Y., Lin, C.H., Lin, C.H. and Chang, C.Y.: Characterization of serum immunoglobulin M of grouper and cDNA cloning of its heavy chain. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 109: 255-265, 2006.
- Crowther, J.R.: *ELISA theory and practice*. Humana Press Inc., New Jersey, USA. 1995.
- Kaattari, S.L. and Piganelli, J.D.: The specific immune system: humoral defense. In the fish immune system: organism, pathogen and environment. Iwama, G. and Nakanishi, T., eds. Academic Press, San Diego, USA. 207-254, 1996.
- Kim, C.S., Jang, M.S., Kim, W.S., Kim, J.O., Kim, D.W., Kim, D.H., Han, H.J., Jung, S.J. and Oh, M.J.: Evaluation of the stability of IgM and specific antibody response of sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* for application of antibody-detection ELISA. *J. Fish Pathol.*, 22: 335-342, 2009.
- Kim, C.S., Kim, W.S., Nishizawa, T. and Oh, M.J.: Prevalence of viral nervous necrosis (VNN) in sev-

- enband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* farms. J. Fish Pathol., 25: 111-116, 2012.
- Kim, W.S. and Kim, J.O.: Prevention strategies for viral nervous necrosis (VNN) in sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* aquaculture farms. Korean J. Fish Aquat. Sci., 48: 403-410, 2015.
- Kim, W.S., Kim, K.H., Kim, C.S. and Oh, M.J.: Production of monoclonal antibodies against the immunoglobulin M of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Korean J. Fish Aquat. Sci., 50: 169-174, 2017.
- Kim, W.S., Mochizuki, M., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M.: Detection of specific antibodies against infectious hematopoietic necrosis virus from rainbow trout sera by ELISA using two novirhabdoviruses. Fish Pathol., 43: 112-116, 2008.
- Kole, S., Qadiri, S.S.N., Shin, S.M., Kim, W.S., Lee, J.H. and Jung, S.J.: PLGA encapsulated inactivated-viral vaccine: Formulation and evaluation of its protective efficacy against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) infection in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) vaccinated by mucosal delivery routes. Vaccine, 37: 973-983, 2019.
- Korean statistical information service (KOSIS): Fish farm trends survey. 2020.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685, 1970.
- LaPatra, S.E.: The use of serological techniques for virus surveillance and certification of finfish. Annu. Rev. Fish Dis., 6: 15-28, 1996.
- Magnadóttir, B.: Comparison of immunoglobulin (IgM) from four fish species. Icel. Agr. Sci., 12: 47-59, 1998.
- Peter, P.: The immune system. Garland Science, Connecticut, USA. 2014.
- Pilström, L. and Bengtén, E.: Immunoglobulin in fish-genes, expression and structure. Fish Shellfish Immunol., 6: 243-262, 1996.
- Pucci, B., Coscia, M.R. and Oreste, U.: Characterization of serum immunoglobulin M of the Antarctic teleost *Trematomus bernacchii*. Comp. Biochem. Physiol., B: Biochem. Mol. Biol., 135: 349-357, 2003.
- Shin, G.W., Lee, H.J., Palaksha, K.J., Kim, Y.R., Lee, E.Y., Shin, Y.S., Lee, E.G., Park, K.D. and Jung, T.S.: Production of monoclonal antibodies against serum immunoglobulins of black rockfish (*Sebastes schlegelii* Higendorf). J. Vet. Sci., 7: 293-295, 2006.
- Tort, L., Balasch, J.C. and Mackenzie, S.: Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. Num., 22: 277-286, 2003.
- Watanabe, K., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M.: Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. Dis. Aquat. Org., 41: 219-223, 2000.
- Watanabe, K., Suzuki, S., Nishizawa, T., Suzuki, K., Yoshimizu, M. and Ezura, Y.: Control strategy for viral nervous necrosis of barfin flounder. Fish Pathol., 33: 445-446, 1998.
- Wilson, M.R. and Warr, G.W.: Fish immunoglobulins and the genes that encode them. Annu. Rev. Fish Dis., 2: 201-221, 1992.
- Ye, J., Kaattari, I.M., Ma, C. and Kaattari, S.: The teleost humoral immune response. Fish Shellfish Immunol., 35: 1719-1728, 2013.
- Zhang, Y.A., Salinas, I. and Sunyer, J.O.: Recent findings on the structure and function of teleost IgT. Fish Shellfish Immunol., 31: 627-634, 2011.

Manuscript Received : May 31, 2021

Revised : Jun 04, 2021

Accepted : Jun 08, 2021