



# 항원을 이용한 AIDS 진단시약 개발

Development of AIDS Antigen Diagnostic Kits

1994.

연구기관  
한국과학기술연구원  
부설 유전공학연구소

과 학 기 술 처

## 제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “항원을 이용한 AIDS 진단시약 개발”의 최종보고서로 제출합니다.

1994.

주관기관명 : 한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소  
총괄연구책임자 : 이 영 익 (유전공학연구소 책임연구원)  
연 구 원 : 손 미 진 (유전공학연구소 연구원)  
          이 기 순 (유전공학연구소 연구원)  
          현 상 원 (유전공학연구소 연구원)

# 요 약 문

## I. 제 목

항원을 이용한 AIDS 진단시약 개발

## II. 연구의 목적 및 중요성

본 연구에서는 최근 국내외적으로 크게 보건문제화 되고 있는 AIDS의 조기진단 및 감염의 방지를 위하여 유전공학적, 면역학적 기법으로 만들어진 HIVI-p24의 단일항체를 이용하여 seroconversion이 일어나기전 감염초기의 항체의 존재유무와 항바이러스 치료효과의 단계별 확인 및 초기단계 진단시약으로의 개발을 목적으로 한다.

Human immunodeficiency virus type I (HIV-I)은 AIDS (Barre-Sinoussi et al., 1983 ; Popovic et al., 1984)을 일으키는 retrovirus로 동정되었다. HIV-I의 감염은 보통 채혈자의 serum이나 plasma에서의 특이한 항체 검정으로 진단되어 왔다. 그러나 HIV-I 항원의 검정은 seroconversion이 일어나기전의 환자, (Allain et al., 1986 ; Goudsmit et al., 1986 ; von Sydow et al., 1988), 감염된 모체에서 태어난 아이의 진단이나 (Furlini et al., 1989), 항바이러스 치료의 효과를 감지하는 표지 (Lange et al., 1986)로서 진단에 중요성을 더해 왔다. 이러한 항원진단의 또다른 방법으로 HIVI DNA (Ou et al., 1988)을 직접 확인하는 방법인 polymerase chain reaction (PCR)을 이용해 혈액 세포내에 바이러스 DNA의 존재를 확인

하는 방법을 사용해 왔으나 이는 위험한 방사선 동위원소의 사용뿐만 아니라 경제적으로도 많은 단점을 가지고 있다. 그러나 본 연구에서 개발된 HIV-1의 단일클론항체를 이용한 항원 EIA 방법은 기존의 PCR이나 reverse transcriptase (RT) assay에 비해 특이도나 민감도 측면에서도 훨씬 우수한 것으로 판명되어 앞으로 전세계적으로 확장 추세에 있는 AIDS의 치료 및 진단에 크게 기여할 것이다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구에서는 AIDS의 진단시약 개발을 위하여 AIDS의 병원 virus인 HIV-1의 Gag 항원인 p24를 *E. coli* 내에서 cloning, 발현시켰으며 발현된 항원만을 분리 정제하여 mouse를 이용해 단일클론 항체를 만든 후 이 항체들의 epitopes를 mapping 하여 서로 다른 epitope를 가진 p24에 대한 단일클론 항체를 이용하여 one-step ELISA의 방법으로 항원의 존재 유무를 검사하는 진단시약의 개발에 역점을 두었다.

### IV. 연구결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서는 *E. coli* 에서 HIV-1 유전인자를 발현시킨 후, 발현된 단백질을 정제하였고, 정제된 단백질 p24를 이용하여 mouse 단일클론 항체를 만든 후, 그 epitopes를 결정하였다. 이러한 단일클론 항체는 각각 다른 epitope를 인지하는 각각의 다른 mouse 단일클론 항체를 이용해 one-step ELISA의 방법으로 항원진단 시약을 만들었으며 이를 이용해 초기 진단 뿐만 아니라 AIDS 환자의 항virus 치료의 확인 방법으로 쓰이게 될 것이며, 궁극적으로는 AIDS 확산 및 치료에도 크게 기여하게 될 것이다.

## Summary

### Development of AIDS Antigen Diagnostic Kits.

The human immunodeficiency virus type I (HIV-I) has been identified as the etiologic agent of the acquired immunodeficiency syndrom, AIDS (Barre et al., 1983 ; Popovic et al., 1984). HIV-I infection was diagnosed (Thomas et al., 1988 ; Gallo et al., 1986) by determination of specific antibodies against HIV-I in patient's sera or plasma. The detection of HIV-I antigen has a diagnostic significance in several situations, such as in the early stges of infection (Von Sydow et al., 1988), in babies born from infected mothers (Furlini et al., 1989) and in monitoring the effect of antivial theraphy (Chaisson et al., 1986 ; Kontio, 1991). Also polymerase chain reactions and ELISA systems have been used to diagnose HIV-I antigen in routine clinical analysis. In particular, the ELISA system detects mainly the core protein in the HIV-I virus (Kontio, 1991).

This paper describes production and characterization of murine monoclonal antibodies (MAb) to Gag p24, a major core protein of HIV-I, and the relative epitope mapping of Gag p24 recombinant protein using its antibodies for developing an HIV-I antigen assay system. Monoclonal antibodies (MAb) against HIV-I Gag p24 were produced by hybridomas

fused with spleen cells of mice immunized with purified Gag and Sp2/0-Ag 14 myeloma. Fifteen hybridomas producing anti-Gag MAb were isolated. Of them, seven MAbs reacting with p24 in Western blot analysis were used for epitope mapping of Gag. Four MAb (4C9, 4E5, 5E4 and 2A11) of them were biotinylated and incubated with diluted MAb in microtiter plate wells coated with Gag. The results of competitive inhibition were detected by avidin-horse radish peroxidase ELISA system. Our results showed that 4C9, 4C8 and 4E5 recognize the same epitope, while 5E4 and 1B2 recognize distinctly different epitopes. Sandwich one-step ELISA for detecting HIV-I Gag p24, a major core antigen, was established utilizing 1B2 as capture antibody and 4C9 as biotinylated antibody. Sensitivity of our assay system was 150pg/ml when HIV-1 lysate was used as an antigen, while it showed 40pg/ml with HIV-I Gag p24 as an antigen.

# Contents

I.	Introduction .....	8
II.	Materials & Methods .....	10
	1. Materials .....	10
	2. Experimental Methods .....	12
III.	Results & Discussion .....	16
	1. Cloning, expression & purification of HIV-I Gag p24 ....	16
	(1) Expression of core protein p24 .....	16
	(2) Purification of core protein p24 .....	16
	2. Characterization of MAb .....	19
	3. Epitope analysis .....	20
	4. One-step ELISA .....	21
IV.	Conclusion an Recommendations .....	22
V.	Reference .....	24
	Figure and Table .....	26

# 목 차

제 1 장	서론	8
제 2 장	실험재료 및 방법	10
	1. 실험재료 및 기기	10
	2. 실험방법	12
제 3 장	결과 및 고찰	16
제 1 절	HIV-I gag 유전자 (p24) 의 cloning, 발현, 정제	16
	(1) Core protein p24 단백질의 발현	16
	(2) Core protein p24 단백질의 정제	18
제 2 절	Core protein p24 단백질에 대한 단일클론항체의 검정	19
제 3 절	단일클론항체의 epitope 분석	20
제 4 절	p24 단백질에 대한 단일클론항체를 이용한 one-step ELISA	21
제 4 장	결론 및 건의사항	22
제 5 장	참고문헌	24
그림 및 도표		26



# 제 1 장 서 론

최근 국민보건문제로 크게 사회문제를 일으키고 있는 AIDS의 원인이 되는 바이러스인 HIV의 발견은 극히 최근의 일이며 1984년 블란서의 몽타니어박사에 의해서 AIDS의 원인체임이 밝혀졌다. 이러한 AIDS 환자를 진단하는 데는 무엇보다도 먼저 바이러스의 확산을 막고 환자의 혈액에 오염되지 않도록 해야하며 간단하고 빠르게 또한 특이하게 항체나 항원의 존재 유무를 확인할 수 있어야 한다. 지금까지 알려진 진단방법은 크게 두가지로 첫째, 혈액내 HIV-I에 대한 특이한 항체의 존재유무를 확인하는 방법과 두번째로는 혈액내에서 직접 바이러스의 존재유무를 확인하는 방법이다. 이중 항체의 존재유무를 확인하는 방법으로는 주로 효소면역법 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), Radio Immuno Assay, Western blot 같은 방법이 있으며, 환자의 혈액으로 부터 혈청을 분리하여 그속에서 정제된 항원을 이용하여 특이한 항원에 대한 항체의 존재유무를 밝히는 방법이었다. 그러나 이것은 먼저 seroconversion 이 일어나 일단은 항체가 생겨야만 확인이 가능한 방법으로 바이러스 감염초기의 seroconversion이 일어나기전 단계에서는 확인이 불가능한 단점이 있다. 본 연구에서는 이러한 단점을 보완하기 위하여 두번째 방법인 혈액내에서 직접 바이러스의 존재유무를 확인하는 방법의 개발을 시도하였는데, 이는 HIV의 면역특이성이 높은 부분을 대장균내에서 발현시켜, 정제한후 이 항원에 대한 단일클로항체를 만들어 one-step ELISA의 방법으로 혈액내에서 바이러스의 존재유무를 밝히는 방법의 개발이다. 이로써 환자의 seroconversion이 일어나기전인 초기단계의 진단 및 항

바이러스 치료시에 치료의 정도를 감지할 수 있게 됨으로 AIDS의 진단 및 치료에 크게 기여하게 될 것이다.

## 제 2 장 실험재료 및 방법

### 제 1 절 실험재료 및 기기

#### 1. 균주

사용균주는 *Escherichia coli* HB101을 immunogen 생산을 위한 균체내의 형질전환과 발현에 사용하였다.

#### 2. 배지 및 완충용액

##### (1) 배지

Mq 배지는 1 liter당 6g의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.5g의  $\text{NaCl}$ , 그리고 1g의  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 을 넣어 멸균하고, 따로 멸균한 1M  $\text{MgSO}_4$  2ml와 20% glucose 10ml에 1M  $\text{CaCl}_2$  0.1ml을 넣어 사용하였다.

##### (2) 완충용액

Agarose gel의 loading buffer는 0.25% bromophenol blue, 0.25%

Xylene cyanol FF, 15% Ficol 1 type 400의 조성으로, running buffer는 0.04M Tris-acetate, 0.001M EDTA의 조성으로 사용하였다. SDS-PAGE의 loading buffer는 2% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.002% bromophenol blue, 0.1M Tris-HCl (pH6.8)의 조성으로, running buffer는 25mM Tris, 250mM glycine, 0.1% SDS의 조성으로 만들어 사용하였다. 제한 효소와 유전자 조작효소의 반응 완충용액은 사용하는 효소와 함께 효소 제조회사에서 공급하는 용액을 사용하거나 효소의 특성에 맞도록, 조절하여 사용하였다. 기타의 용액은 Maniatis의 "Molecular Cloning, A Laboratory Manual"에 기술된 방법으로 제조 사용하였다.

### (3) 기기

DNA 절편들의 크기확인과 회수를 위하여 Agarose gel 전기영동을 Mupid-2 (Losmo Bio Co., Ltd)를 사용하였으며 단백질 발현을 확인하기 위하여 SE600 vertical slab gel unit와 SE250 Mightly small II Dual 7cm slab unit (Moeffer Scientific Instruments, CA, U.S.A.)를 사용하여 polyacrylamide 전기영동을 실시하였다. 그 이외에도 highspeed centrifuger, Du-7 spectrophotometer (Beckmann Instruments, Inc., U.S.A.), RH 20-12 speed Vac Concentrator (Savant Instrument, Ins., U.S.A.)등을 사용하였다.

## 제 2 절 실험방법

### 1. Immunogen

HIV-1의 core 유전자 (p17'-p24-p15')는 trp promotor하에서 trpE와 융합된 단백질로 cloning 되었고, M9+Amp 배지하에서 600nm에서의 O.D 값이 0.6일때 최종 10mM 농도의 IAA를 첨가한뒤 다시 overnight 배양하여 융합 단백질의 발현을 유도하였다.

### 2. Immunization

Female BALB/c mice에 정제되어진 Gag protein 30 $\mu$ g과 complete Freund's adjuvant를 1 : 1로 섞어 immunize한후 2주일 간격으로 Gag protein 30 $\mu$ g과 incomplete Freund's adjuvant을 섞은것을 2차례 immunize하였다. 3차례의 주사후 쥐로부터 혈액을 채취한후 serum을 분리하여 indirect ELISA의 방법으로 Gag에 대한 항체의 존재유무 및 titer를 측정하였으며, 일주일후 30 $\mu$ g의 Gag protein을 주사하여 boost하였다.

### 3. Fusion 및 Cloning

상기의 방법으로 면역된 쥐들의 비장세포들을 fusion하기위해 boost한후 3일동안 harvest하였으며, 이 비장세포들은 50% PEG4000을 이용하여 Sp2/0-Ag 14 murine myeloma와 융합시켰다. 이렇게 융합된 세포들은

HAT media를 이용해 선택되어지며, 선택된 hybridoma들은 indirect ELISA 방법으로 Gag에 대한 항체존재유무로써 screening하였다. Screening된 positive 세포들은 limiting dilution method로써 cloning하였다. 이렇게 cloning된 세포는 항체의 대량 생산을 시도하였다. 쥐에서 복수를 만들기 위해 pristane-treated BALB/C mice에 HIV-I의 항원인 정제된 Gag 단백질을 주사하여 그 단백질에 대한 항체를 포함하는 복수를 만들어 모았다.

#### 4. 복수에서의 단일클론항체의 정제

쥐의 복수내에 있는 단일클론 항체의 정제를 위해 모아진 복수를 Saturated ammonium sulfate 40%로 침전시킨후 침전물만을 원심분리하여 모아 25mM Tris-HCl (pH7.5) buffer에 녹인후 DEAE Affi-gel blue chromatography (Bio Rad)를 이용하여 항체만을 순수분리하였다 (Fig. 5)

#### 5. Indirect ELISA

Indirect ELISA는 Engvall and Perlmann, 1971에 의해 발표된 방법에 따라 수행하였으며 96-well ELISA plate에  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 Gag protein을 coating buffer (0.05M sodium carbonate buffer, pH9.6에 희석하여) 0.1ml씩 coating한후 4°C에서 하룻밤 동안 incubation하였다. 그후 3% skin milk 0.3ml씩으로 상온에서 1시간 동안 blocking하고 항체가 만들어진 배양 상등액이나 복수를 well당 0.1ml씩을 분주하여 37°C에서 2h 동안 반응시켰다. 그후 plate를 PBS (0.05% tween 20)로 3~4번 씻은후 horse radish peroxidase (HRP) conjugated anti-mouse goat antibodies를 0.1ml (1000 : 1 dilution)씩

well당 분주하여 37°C에서 2h동안 다시 반응시킨다. 반응이 끝나면 효소의 기질인 1, 2', phenylene diamine (OPD)을 3mg/ml의 농도로 0.1ml씩 첨가하고 색의 변화를 ELISA reader를 이용하여 492nm의 파장에서 측정한다.

## 6. Western blot analysis

Immunogen p24에 대한 항체특이성은 Western blot analysis를 통해 확인하였다. HIV-1 바이러스 파쇄액을 12.5% SDS-PAGE (SDS polyacrylamide gel)상에서 running한후 nitrocellulose paper로 transfer하고 이렇게 단백질이 전이된 strip들을 3% skin milk로 blocking하였다. 그후 각각의 정제된 p24에 대한 단일클론항체와 반응시키고 PBS (0.05% tween 20)로 씻은후 HRP conjugated anti-mouse goat antibody (1000 : 1 dilution)와 반응시키고 기질로써는 4-chloro-naphtol (3mg/ml)을 사용하여 발색반응으로 확인하였다 (Fig. 6).

## 7. 단일클론항체의 Biotinylation

분리된 단일클론항체 중 4개의 MAb, 2A11, 4C9, 4E5 와 5E4를 biotin으로 label하였다. 2mg/ml의 농도로 각 항체를 0.1M sodium bicarbonate (pH8.0) buffer로 4°C에서 하룻밤동안 투석한 다음 dimethylformamide에 녹인 biotin-NHS 500 $\mu$ g을 투석시킨 각 항체용액에 첨가하여 상온에서 2h동안 교반하면서 반응시켰다. 반응후 반응용액을 phosphate buffered saline solution (PBS)에서 투석하고 biotinylated된 단일클론항체들을 Sephadex G25 gel chromatography를 이용하여 정제하였다.

## 8. Competitive ELISA

각각 분리정제된 단일클론항체의 epitope mapping은 competitive ELISA method를 이용해 결정하였다. ELISA plate wells에 정제된 Gag-p24 단백질을  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로  $0.1\text{ml}$  씩 coating하고 난후 5% skin milk로 blocking하였다. 이렇게 blocking된 plate를 PBS로 씻은후 well당 biotinylated되어진 단일클론항체 각  $50\mu\text{l}$ 와 순차적으로 희석된 label되지않은 단일클론항체  $50\mu\text{l}$  씩을 분주하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 2h동안 반응시켰다. 반응이 끝난후 PBS로 각 plate를 씻은후 avidin HRP conjugate (Pierce Ltd. Product)를 희석하여 분주후  $37^\circ\text{C}$ 에서 1h 동안 반응시켜 씻은후 각 well로 기질인 OPD ( $3\text{mg}/\text{ml}$ )  $0.1\text{ml}$ 씩을 넣고 그 결과를 ELISA reader 을 이용해  $492\text{nm}$ 의 파장에서 확인하였다 (Fig. 7).

## 9. One-step sandwich ELISA

ELISA plates 에 단일클론항체중 하나인 1B2를  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 well당  $0.1\text{ml}$ 씩 coating하여 상온에서 18시간 반응시킨후 5% skin milk  $0.3\text{ml}$ 로 blocking하였다. Blocking이 끝난후 PBS로 씻고, 항원으로 각 배율로 희석된 바이러스 파쇄액이나 Gag-p24 단백질 각  $100\mu\text{l}$ 와 biotinylated 단일클론항체인 4C9  $25\mu\text{l}$ 을 섞어서 상온에서 하룻밤동안 반응시킨후 PBS로 plate을 씻고 avidin-HRP conjugate을  $100\mu\text{l}$ 씩 넣어  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간동안 반응한후 다시 PBS로 씻고 기질로 OPD를  $100\mu\text{l}$ 씩 넣어  $37^\circ\text{C}$ 에서 20min 반응후 발색을  $492\text{nm}$  파장에서 측정하였다.



## 제 3 장 결과 및 고찰

### 제 1 절 HIV-I Gag3 (p15'-24-17')의 cloning, 정제 및 immunobloting

#### 1. Core protein Gag3 단백질의 발현

##### (1) pYHC-gag3 발현벡터의 제조 및 발현

Fig. 1에서 보는것처럼 발현벡터 pYEM-Gag/Env2에서 BamII ~ ClaI DNA fragment를 잘라 제거시킴으로서 pYHC-Gag3 발현벡터를 제조하였다. 이 plasmid는 trp promotor의 조절을 받아 p17의 카르복실 말단의 12aa와 p24 (major core protein)와 아미노말단의 p15가 합쳐진 약 70kd의 trpE-Gag3의 융합단백질이 만들어지게 된다. 이 발현벡터 pYHC-Gag3를 *E. coli* HB101에서 10mM IAA로 발현 유도시킨 결과 다량의 단백질이 합성되었으며 이를 10% SDS PAGE로 확인한 결과 Fig. 2와 같이 세포내에서 68kd 정도의 분자량을 가진 발현 단백질에서 total cell protein의 약 40% 이상으로 합성되었다 (Fig. 2).

#### 2. Gag3 융합단백질의 정제

### (1) Gag3 융합단백질의 발현 유도

발현벡터인 PATHIII를 갖고 있는 *E. coli* HB101 배양액의 세포농도가 OD<sub>600</sub>=0.6이 되었을 때 IAA (3-Indole acetic acid)를 최종농도가 10mM이 되도록 첨가하여 *trpE* 융합단백질의 발현을 유도하고 계속해서 37°C에서 overnight culture하여 4000 xg에서 10분간 원심분리하여 cell을 모았으며 발현의 정도를 10% SDS-PAGE로 확인한 결과 유도하기 전에 비해 유도후 6.8kd의 위치에 융합단백질의 진한 band가 보임으로 다량의 융합단백질이 유도합성되었음을 확인하였음 (Fig. 3).

### (2) 융합단백질의 분리

융합단백질 (inclusion body)의 분리를 위해 1ℓ M9 배양액으로부터 모은 *E. coli*를 TE buffer (50mM Tris, 1mM EDTA, pH7.8)에 녹인후 초음파 파쇄기로 30분간 파쇄한다. 이것을 5000 xg에서 10분간 원심분리하여 모아진 침전물을 융합단백질의 불용성을 이용하여 1~2M urea buffer로 두 번정도 씻어준후 8M urea buffer에 녹여 12000 xg에서 30분간 원심분리하였으며 상등액 (crude inclusion body)만을 취하여 이들의 정제 정도를 10% SDS-PAGE로 확인한 결과 68,000 dalton에서 거의 순수한 융합단백질을 얻었다 (Fig. 3).

### (3) Hydroxylamine에 의한 융합단백질의 절단

분리된 융합단백질을 8M urea buffer에 녹여 2M 하이드록실 아민

과 45°C에서 4시간 반응시켜 trp E와 gag3 사이에 있는 Asp-Gly 잔기 사이를 절단한 뒤 증류수로 하룻밤동안 투석한후 생긴 침전물을 12000 xg 에서 15분간 원심분리하여 모은후 이 침전물을 SDS-PAGE로 확인한 결과 31,000 dalton의 gag3 band를 확인할 수 있었으며 절단 효율 또한 60~70% 이상으로 높은 효율을 보였다 (Fig. 3).

#### (4) Gag3의 분리 및 정제

Buffer A (50mM Tris-HCl, 10mM DTT, 1mM EDTA, pH7.8)로 미리 equilibrated 시킨 DEAE-Sepharose-CL-68 column (12 x 2.8)에 상기의 과정에서 모은 침전물을 동일 buffer에 녹여 column에 loading 하여 통과시킨 후 흡착부분을 50mM NaCl이 포함된 동일 buffer의 elution 부위에서 gag3 만이 추출되었다. 280nm에서 각 분획들의 흡광도를 조사하여 단백질 피이크 부분의 각 분획들을 10% SDS-PAGE로 확인한 결과 순수한 gag3만을 정제할 수 있었다 (Fig. 4).

### 제 2 절 단일클론 항체의 characterization

앞의 실험방법에 따라 fusion한후 gag3에 대해 15개의 clones이 선택되었다. 이들중 7개인 4C9, 4C8, 4E5, 2A11, 3E1, 1B2 와 5E4을 characterization 하였다. 이들 각 단일클론 항체의 titer는 indirect ELISA에 의해 결정되었으며 이 클론들의 isotypes들도 결정되었다 (Table 1). p24에 대한 단일클론 항체들의 특이도는 Western blot analysis에 의해 결정되었으며

(Fig. 6) 그 결과 이들 7개의 characterization된 단일클론 항체들은 p24와 매우 특이적이고 민감하게 반응함을 알수 있었다.

### 제 3 절 단일클론항체들의 Epitopes 분석

항원 감지 진단시약의 단일클론항체의 선별을 위해서 competitive ELISA의 방법으로 단일클론항체들중 4개의 클론의 epitope를 분석하였다 (Fig. 7). Microtiter plate well을 gag protein으로 coating하고 각각의 감소되는 농도로 희석된 unlabeled 된 7개의 단일클론 항체와 biotinylation된 4C9, 4E5, 2A11과 5E4를 함께 incubation하였다. 그결과 단일클론항체 4C9는 2A11에 의해 부분적으로 inhibition되고 4C8에 의해서는 완전히 inhibition 되었으며, 단일클론항체 5E4는 2A11과 1B2에 의해서 부분적으로 저해되나 5E4와 1B2는 4C9, 4C8과 4E5에 의해서 전혀 inhibition을 받지 않았다. 이러한 결과들로 이루어질때 단일클론 항체인 4C9, 4E5와 4C8은 같은 epitope를 인지하는 반면, 5E4와 1B2는 이들과 매우 다른 epitopes을 인지하는 것으로 알려졌다. 이와같이 7개의 단일클론항체와 4개의 biotinylation된 단일클론항체 사이의 경쟁력 반응의 결과는 Table 2에서 보여 주었다.

## 제 4 절 One-step ELISA에 의한 항원진단시약의 개발

위의 여러가지 실험을 통해 혈액내에서 항원 p24을 detection하는 방법으로 서로 다른 epitopes을 인지하는 단일클론 항체인 1B2와 4C9을 이용하여 one-step ELISA를 구축하였다. 먼저 ELISA plate의 well에 capture 항체로 1B2를 coating하고 coating된 wells 을 순차적 배율로 희석된 각각의 HIV-I 항원과 biotinylation된 다른 단일클론 항체인 4C9를 함께 넣어 incubation 하였다. 그 결과 바이러스 파쇄액과 gag3의 one-step ELISA의 민감도는 각각 150pg/ml과 40pg/ml로 나타났으며 그 standard curve는 Fig. 8과 같다.

## 제 4 장 결론 및 건의사항

본 연구는 전 세계적으로 크게 문제화되고 있는 일명 현대의 흑사병이라고 불리는 후천성면역결핍증 (AIDS)을 감염초기에 진단하고, 항바이러스 치료의 정도를 감지할 수 있는 특이성과 민감도가 높은 진단시약의 개발을 목표로 하였다. 일반적으로 HIV-I의 역학적 혈액검색은 항원의 존재유무를 확인하는것에 의존해 왔다. 그러나 초기 감염후 seroconversion은 몇달이 지나면서 진행이 되므로 이는 항체 검정의 불완전한 sensitivity와 true seronegativity (Ranki et al., 1987 ; Courouce, 1987)의 우려를 낳게 된다. 반면, HIV-I antigenemia는 감염직후 즉시 나타나게 되며 (Goudsmit et l., 1986 ; Neumann et al., 1987 ; Allain et al., 1986) 이러한 현상은 HIV-1 항원진단시약의 개발의 필요성을 유도하게 된다. 그러므로 HIV-I 항원의 존재 유무의 확인은 많은 혈액들을 검색하는 혈액 은행등의 혈액 검색에 중요하게 되었다 (Backer et al., 1987). 그러나 기존의 항원 검색법들은 그 특이도나 민감도가 떨어져 그 결과만으로 HIV-I의 감염정도를 결정할 수가 없었다. 이러한 이유들로 인하여 HIV-I 항원을 검색하는 특이도와 민감도가 아주 높은 새로운 방법이 요구되었다. 그러므로 본 연구에서는 HIV-I의 주요 core particle인 p24에 대한 단일클론항체를 만들어 서로 다른 epitope site를 인식하는 단일클론 항체를 선별하였고 이렇게 characterization된 단일클론 항체중 p24에 대해 가장 특이도와 민감도가 높은 7개의 단일클론 항체를 분리하여 그 epitope mapping을 한 결과 최종적으로 epitopes site가 가장 멀리 떨어져 인식하는 1B2와 4C9 두개의 단일클론 항체를 선택한 다음 이것을

HIV-I 항원 진단을 위한 one-step ELISA system에 사용하였다. 이 결과 이 assay system의 sensitivities는 HIV-I 바이러스 파쇄액에 대해서는 150pg/ml의 농도로, gag 단백질에 대해서는 40pg/ml의 농도까지 detection이 가능하였다. 이러한 결과는 기존의 항원진단시약과 비교해 볼때 훨씬 특이도나 민감도가 뛰어나며, 그 system 또한 간단하여 바이러스 진단시약 개발에 큰 이정표를 제시하였다고 할 수 있겠다.

## 참 고 문 헌

1. Allain,J.P., Laurian,Y., and Paul,D.A. (1986) Lancet II, 1233-1236.
2. Backer,U., Weinauer,F., Gathof,G., and Eberle,J. (1987) Lancet II, 1213.
3. Barre-Sinoussi,F., Chermann,J.C., Rey,F., Nugeyre,M.T., Chamaret,S., Gruest,J., Dauguest,C., Axlerblin,C., Vezinet-Brun,F., Rozenbaun,W., and Montagnier,L. (1983) Science 220, 868-869.
4. Chaisson,R.E., Allain,J.D., Leuther,M., and Volberdig,P.A. (1986) N. Engl. J. Med. 315, 1610-1615.
5. Courouce,A.M. (1987) Lancet II, 1025-1028.
6. Engvall,E., and Perlmann,P. (1971) Immunochemistry 8, 871.
7. Furlini,G., Re,M.C., Ferranti,G., Dalla Casa,P., and La Placa,M. (1989) J. Med. Virol. 28, 129-131.
8. Gallo,D., Diggs,J.L., and Shall,G.R. (1986) J. Clin. Microbiol. 23, 1049-1051.
9. Goudsmit,J., Paul,D.A., and Lange,M.A. (1986) Lancet II, 177-180.
10. Healey,D.S., Maskill,W.J., Neate,E.V., Beaton,F. and Gust,I.D. (1988) J. Virol. Methods 20, 115.
11. Ishikwa,E., Imagawa,M., Hashida,S., Yoshitake,S., Hamaguchi,Y. and Ueno,T. (1983) J. Immunoassay 4. 209.
12. Kontio,S. (1991) J. Immunol. Methods 139, 257-260.
13. Nyberg,M., Suni,J. and Haltia,M. (1990) J. Clin. Pathol. 94, 422.
14. Popovic,M., Sarugardharan,M.G., Read,E., and Gallo,R.C. (1984) Science



224, 497-499.

15. Ranki,S., Krohn,M., and Allain,J.P. (1987) *Lancet* II, 589-593.
16. Siitari,H., Hemmila,I., Soni.E., Lougren,T. and Koistinen,V. (1983)  
*Nature* 301, 258.
17. Thomas,C.Q., Charles,H.R., and Richard,L.K. (1988) *JAMA* 260, 510-513.
18. Towbin,H., Staehelin,T. and Gordon,J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350.
19. Von Sydow,M., Gaines,H., Sonnerborg,A., Forsgren,M., Pehrson,P.O., and Strannegard,O. (1988) *Br. Med. J.* 296, 238-241.

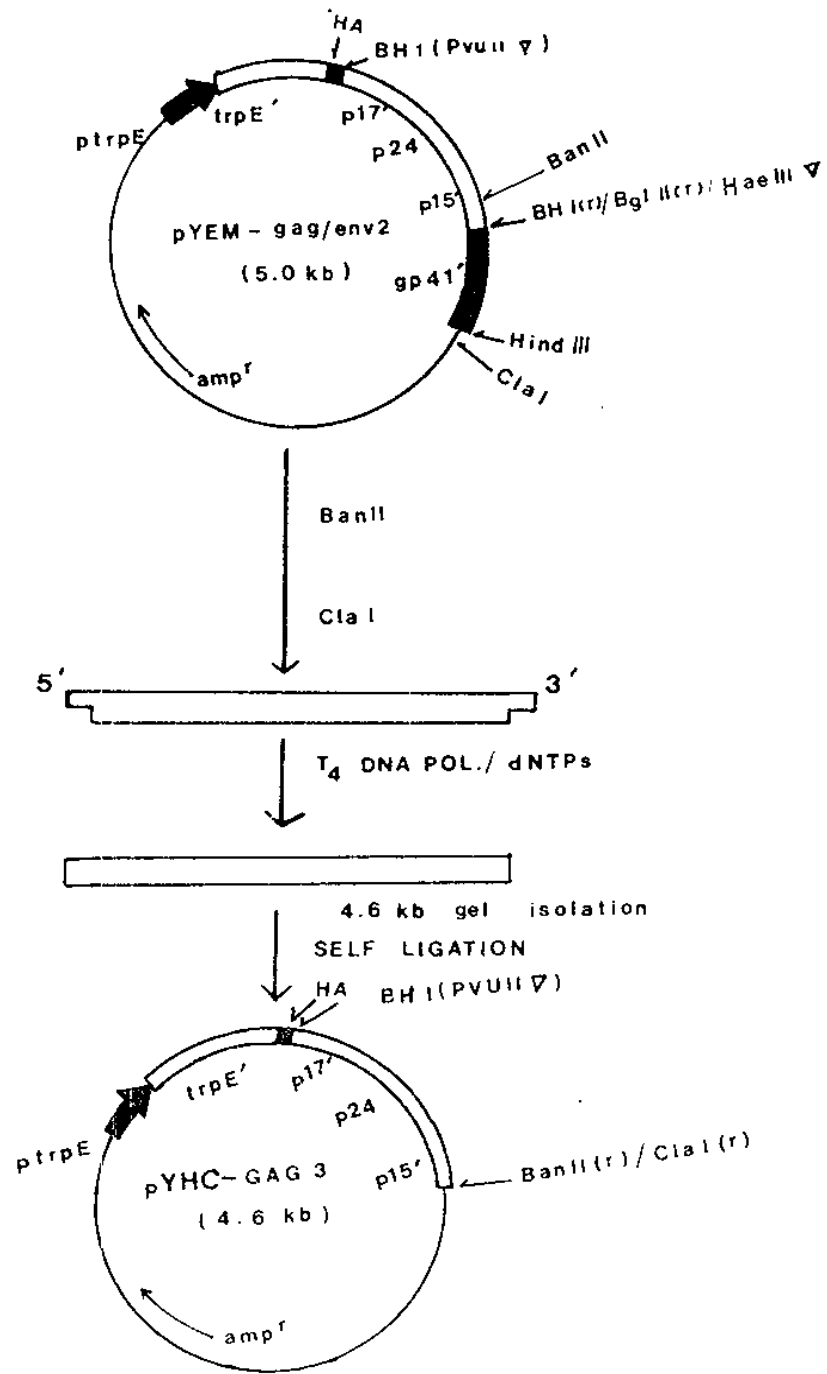


Fig. 1. The scheme of the expression plasmid pYHCgag3 construction. To overexpress a part (gag AA 121-398) of gag gene as a fusion protein, pYHC gag3 was constructed by deleting out BanII-ClaI fragment from the plasmid pYEM gag env2.

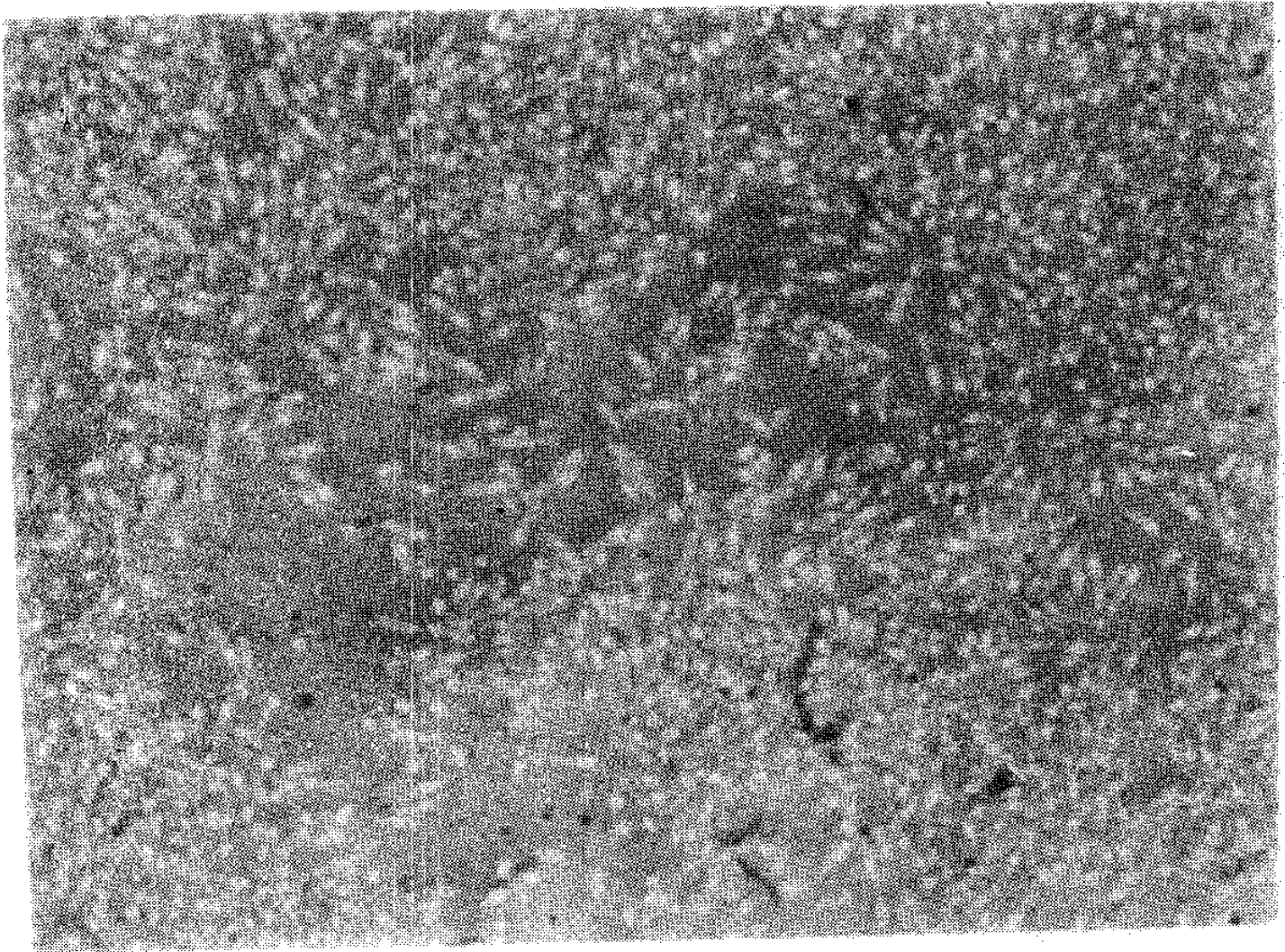


Fig. 2. The formation of inclusion bodies in *E. coli* (HB101 strain) containing the expression plasmid pYHC gag3 upon induction with IAA.

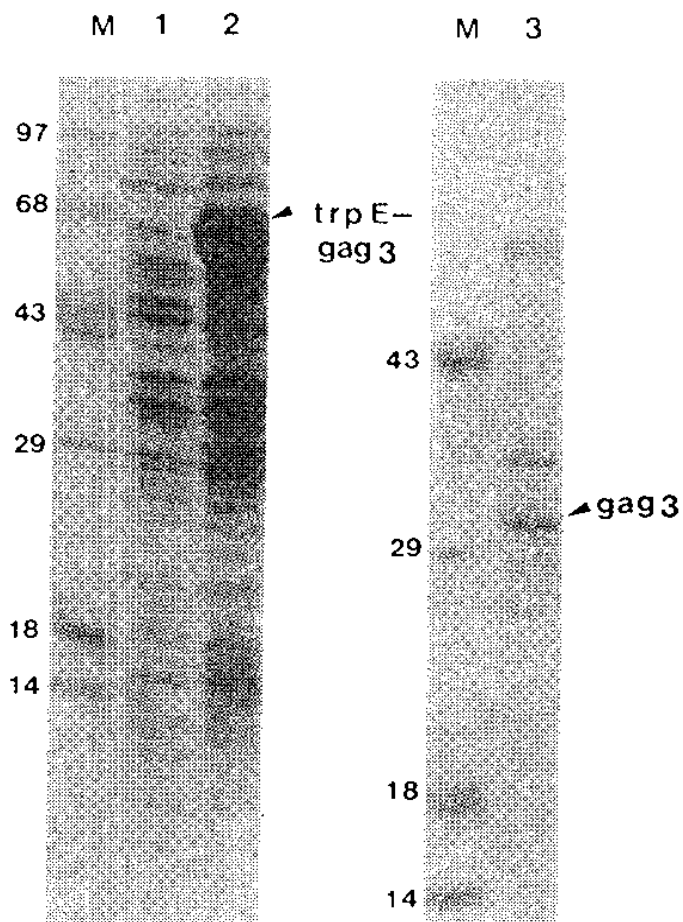


Fig. 3. SDS-PAGE of HIV-1 gag gene products.

Various samples prepared by the method described in Materials and Methods were subjected to 10% polyacrylamide gel electrophoresis and stained with Coomassie blue.

Lane 1: uninduced HB101 cells; Lane 2 : induced with  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  IAA;

Lane 3: hydroxylamine-cleaved fusion protein.

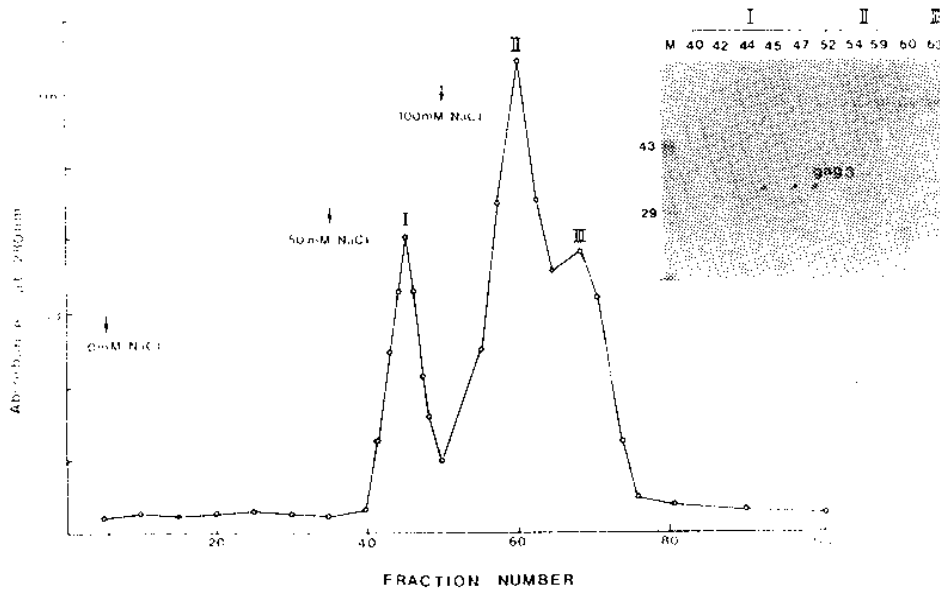


Fig. 4. Elution profile of gag3 protein from a DEAE-Sepharose column.

Hydroxylamine-cleaved gene products were precipitated and then dissolved in buffer A. After dialysis with buffer A, protein samples were eluted from DEAE-Sepharose column. The 0.1ml samples from each tube were analyzed to determine the presence gag3. I : proteins eluted by 50mM NaCl in buffer A; II : proteins eluted by 100mM NaCl in buffer A; III : proteins eluted by 500mM NaCl in buffer A.

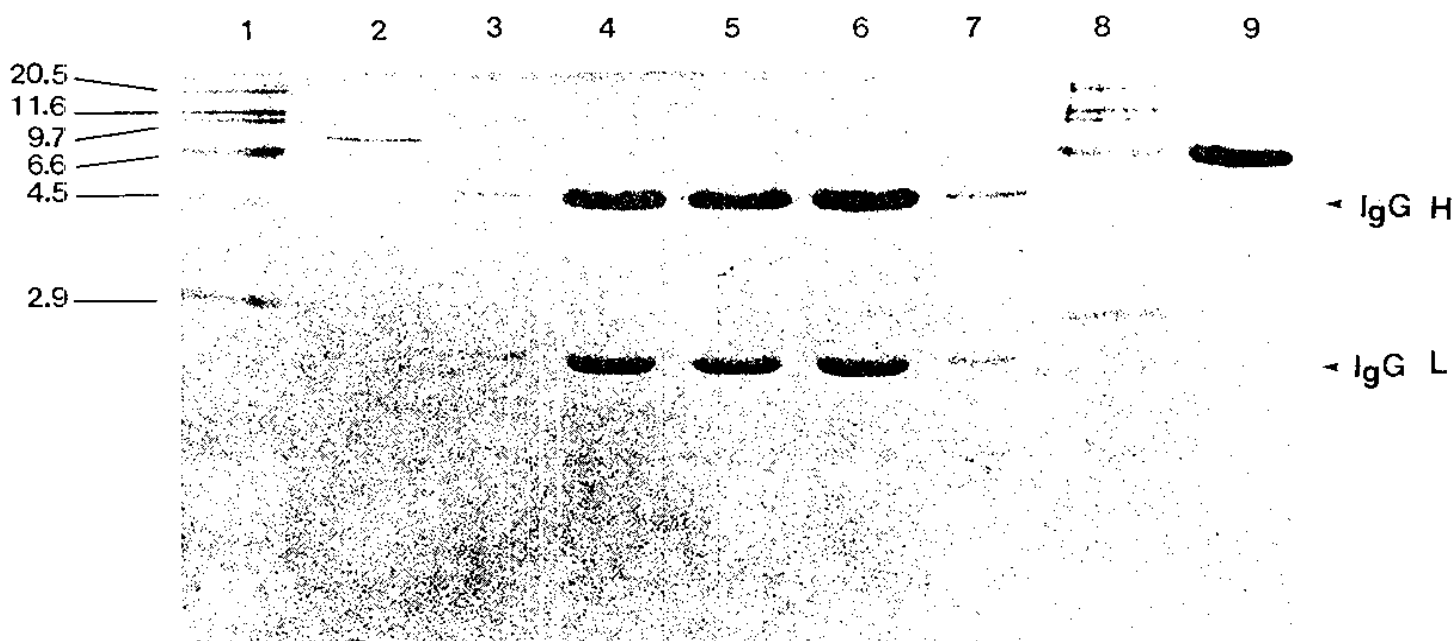
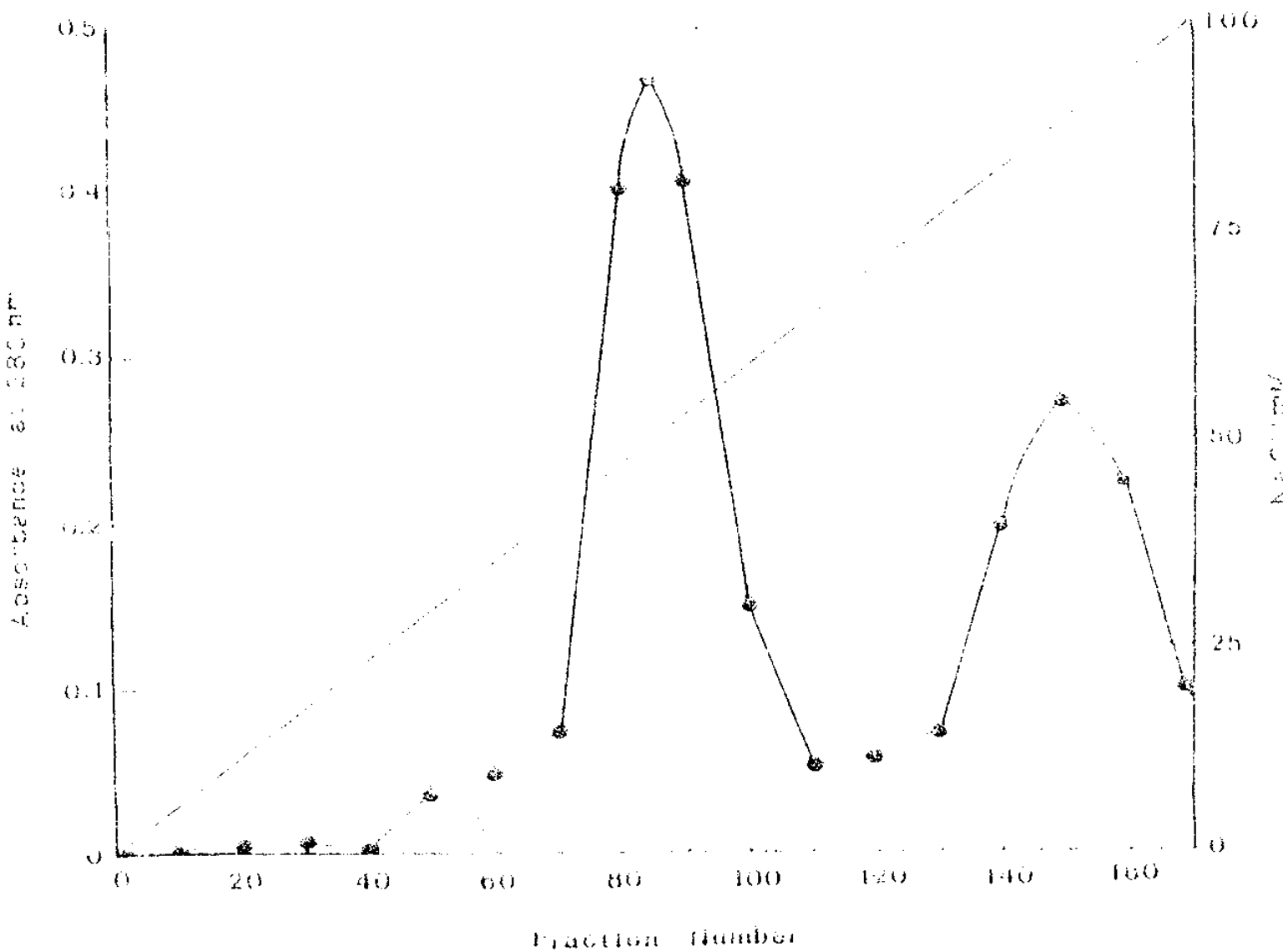


Fig. 5. Elution profile of Monoclonal Antibody to gag3 antigen.

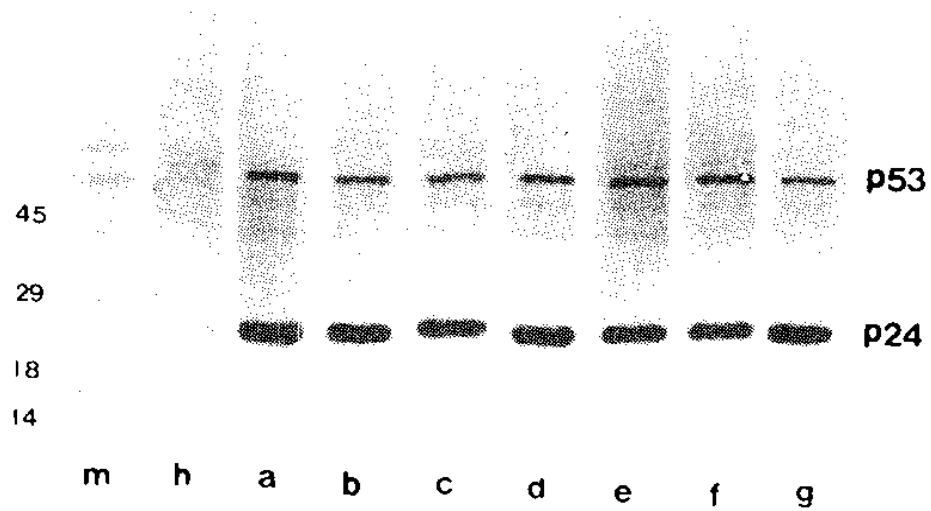


Fig. 6. Specificities of monoclonal antibodies by Wester-blot.

a ; 4C9McA,    b ; 5E4McA,    c ; 2A11McA,    d ; 3E1McA,  
 e ; 4E5McA,    f ; 4C9McA,    g ; 1B2McA,    h ; HIV-I lysate,  
 m ; molecular weight marker.

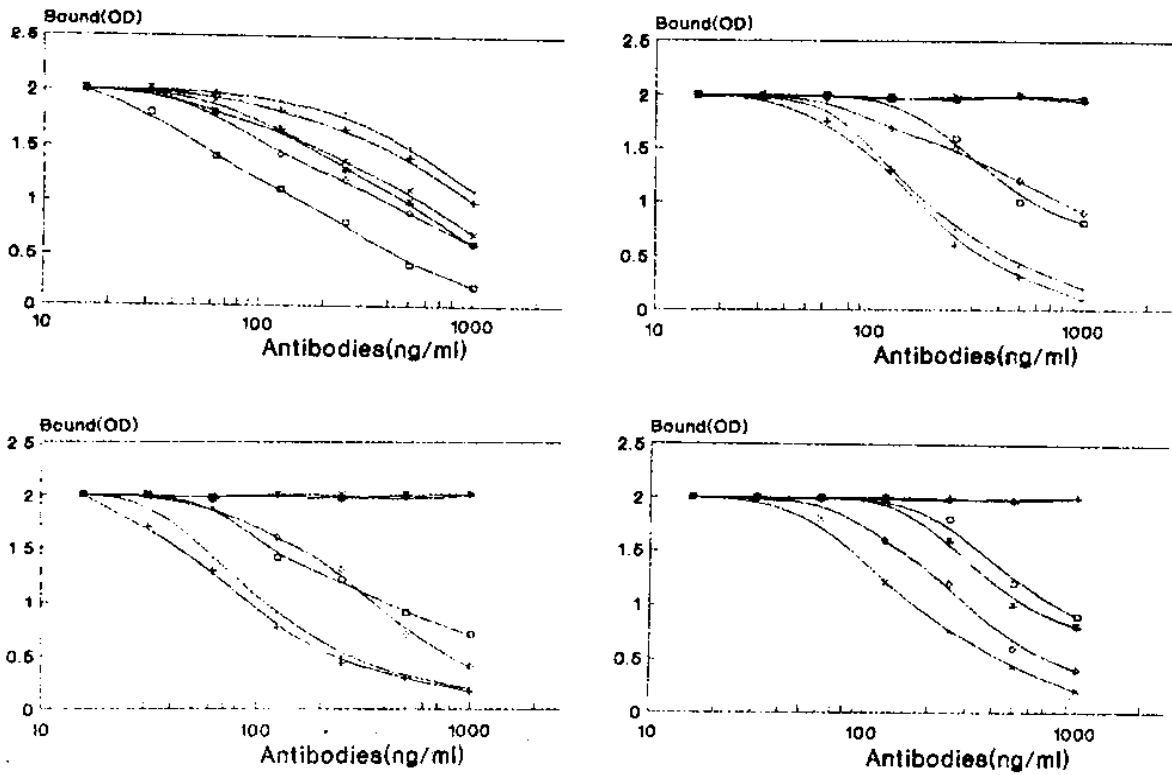


Fig. 7. Epitope analysis by competitive ELISA.

a, 2A11 biotinylated ; b, 4C9 biotinylated ; c, 4E5 biotinylated ;  
d, 5E4 biotinylated ; (-), 4C9 and 4C8 ; (+), 4E5 ; (-□-),  
2A11 ; (-◇-), 3E1 ; (- \* -), 1B2 ; (-X-), 5E4.



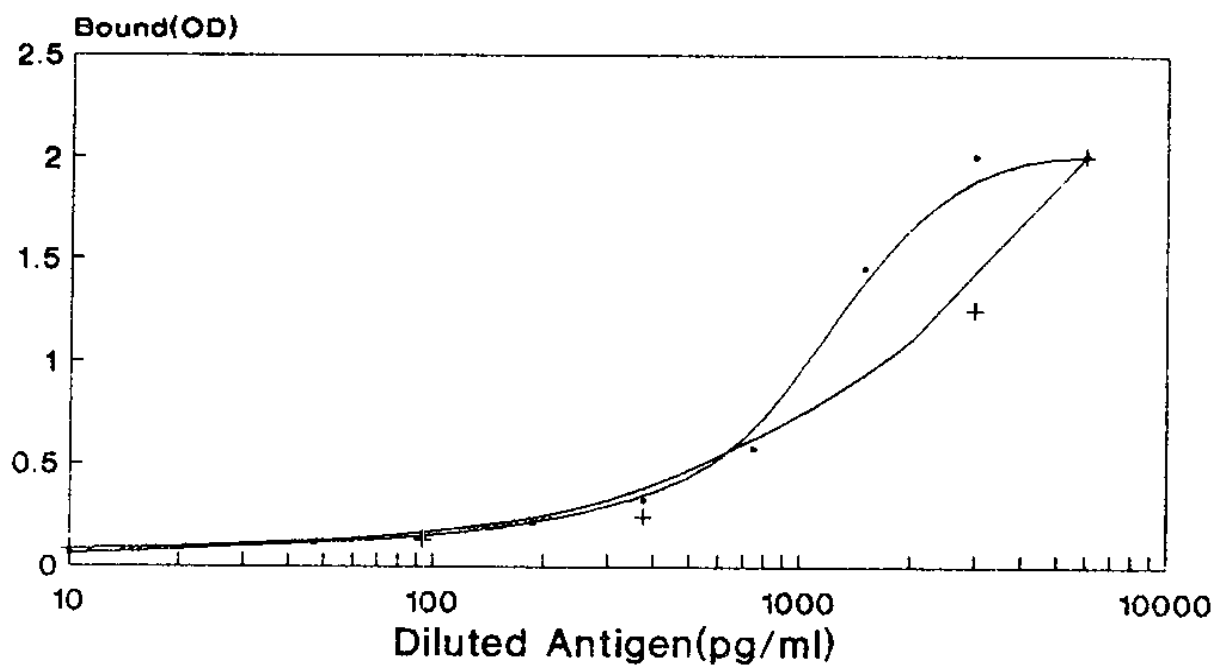


Fig. 8. Standard curve of one-step sandwich ELISA for determining HIV-1 lysate (+) and gag3 (-■-).

Table 1. Characteristics of monoclonal antibodies against Gag p24

MAb	Isotype	Titer <sup>a</sup>	p24 specificity <sup>b</sup>
1B2	G2a, k	2.5 x 10 <sup>5</sup>	+++
2A11	G1 , k	2.5 x 10 <sup>5</sup>	++
3E1	G1 , k	5.1 x 10 <sup>5</sup>	++
4C8	G1 , λ	1.25 x 10 <sup>6</sup>	+++
4C9	G2a, λ	1.25 x 10 <sup>6</sup>	+++
4E5	G1 , λ	1.25 x 10 <sup>6</sup>	+++
5E4	G1 , k	1.25 x 10 <sup>6</sup>	++

a: Titers of MAb were determined by indirect-ELISA.

b: Specificities of MAb were determined by Western blot analysis (+: intensity).

Table 2. Competitive ratio of seven monoclonal antibodies with four biotinylated monoclonal antibodies in competitive ELISA

MAb	2A11 <sup>a</sup>	4C9 <sup>a</sup>	4E5 <sup>a</sup>	5E4 <sup>a</sup>
1B2	++	-	-	+
2A11	+++	+	+	+
3E1	+	+	+	++
4C8	+	+++	+++	-
4C9	+	+++	+++	-
4E5	+	+++	+++	-
5E4	+	-	-	+++

a: Biotinylated MAb

+: Competition

-: Non competition