

후천성 면역결핍증 (AIDS) 환자의 진단시약 개발 연구

Development of AIDS Diagnostic Kits

연구기관
한국과학기술연구원
부설 유전공학센터

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 “후천성 면역결핍증(AIDS) 환자의 진단시약 개발 연구”사업의 최종 보고서로 제출합니다.

1990년 5월

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원 부설유전공학센터

총괄연구책임자 : 이영익 (유전공학센터 책임연구원)

남상욱 (" 선임연구원)

임선영 (" ")

조서희 (" 연구원)

장지은 (" ")

손미진 (" ")

요 약 문

I. 제 목

후천성 면역 결핍증 (AIDS) 환자의 진단시약 개발연구

II. 연구의 목적 및 중요성

본 연구에서는 최근 세계적으로 보건 문제화 되고 있는 AIDS의 확산을 막기 위하여 유전공학적 방법으로 간단하고 빠르고 특이하게 항체의 존재유무를 확인할수 있는 진단시약 개발을 목표로 한다.

본 실험에서는 서론에서 밝힌 바와 같이 HIV(Human Immunodeficiency virus)의 유전인자중 env 유전인자를 비롯하여 몇 개의 구조 유전인자를 *E. coli* 내에서 발현시켜서 정제한 다음 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론 항체에 화학적으로 결합(cross-link)시켜 합성체(conjugate)를 만든후 1~2방울의 환자혈액을 첨가하였을때 이미 항원에 대한 항체가 형성된 환자라면 환자자신의 적혈구와 특이하게 응집을 일으킨다. 이 반응은 매우 빠르게 일어나며 쉽게 육안으로 판독할수 있어서 종래에 사용되어 온 효소면역법이나 western blot, RIA의 방법보다 간단하고 빨라서 진단과정에서 생길수 있는 여러가지 위험을 줄일수 있는 큰 이점이 있다고 생각된다.

이러한 진단시약의 개발은 전세계적으로 만연되고 있는 AIDS의 국내전파를 막아, 국민보건 향상에 기여할 것이다.

Ⅲ. 연구내용 및 범위

본 연구에서는 AIDS의 진단시약개발을 위하여 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론 항체를 만들고 이를 정제하였다.

Ⅳ. 연구결과 및 활용에 관한 건의

본 연구에서는 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론 항체를 만들어 정제하였으며 이를 이미 본 연구실에서 발현시킨 *E. coli* HIV 표면항원 (env) 유전인자 및 core protein(gag)과 chemical linker를 이용하여 결합시키는 실험을 현재 진행 중에 있다. 이렇게 만든 진단시약은 AIDS의 확산을 막아 국민보건 문제로 대두되고 있는 AIDS를 조기에 방하는데 기여하게 될 것이다.

SUMMARY

Development of AIDS diagnostic Kits.

AIDS, which is caused by HIV, become big social problems in all over the world. Ever since the cause of the AIDS has been identified by Robert C. Gallo and Luc Montagnier, lots of efforts were put onto the development of vaccins and therapeutic agents, though there were not much progress in these fields. So, it is our urgent problem to develop the diagnostic kits in order to prevent the diffusion of AIDS in this society which has become one of the big social health problems in these days.

The diagnostic tests already developed to detect HIV antibodies in infected patients include enzyme-linked immuno-assay, Western blotting method, radioimmune precipitation assays. Such procedures are relatively slow and time consuming that it usally takes 3-5 hours. In many urgent cases, we need to diagnize within few minutes, to check whether the patient have been infected with HIV or not. For these reasons, we developed a simple qualitative procedure using small volumes of whole blood that would take 2 min or less.

We generated nonagglutinating monoclonal antibody to human

red blood cells in order to make simple and rapid AIDS diagnostic kits using one or two drops of human whole blood. After complete purification of immunodominant region of HIV-gp120, 41, gag, we will use above mentioned nonagglutinating monoclonal antibody in order to cross-link with purified HIV-epitopes. These diagnostic reagent will be used for quick and mass screening of bloods in order to check wethere the blood is HIV positive or not.

CONTENTS

I.	Introduction	11
II.	Materials & Methods	13
	1. Immunization and cell fusion	13
	2. HAT selection and cloning	13
	3. Isotype determination	14
	4. Purification of nonagglutinating monoclonal antibody against human red blood cells	14
	5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis	15
	6. Immunodiffusion	15
III.	Results and Discussion	16
	1. Hybridoma production and isotype determination of nonagglutinating monoclonal antibody against human red blood cells	16
	2. Purification and immunodiffusion of nonagglutinating monoclonal antibody against human red blood cells	17
IV.	Conclusions and Recommendations	19

References 21

Figures and Table 23

목 차

제 1 장 서 론	11
제 2 장 실험재료 및 방법	13
1. 사람 적혈구로 면역한 비장세포와 SP 2/0 myeloma 세포의 융합	13
2. 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론항체를 생산하는 융합세포의 선별	13
3. 사람 적혈구 비응집 표면 항원에 대한 단일클론항체의 isotype 결정	14
4. 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론항체의 대량 생산 및 이의 정제	14
5. 정제된 단일클론 항체의 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis	15
6. 정제된 단일클론 항체의 immunodiffusion	15
제 3 장 결과 및 고찰	16
1. 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론항체를 생성하는 융합세포의 선별 및 Isotype 결정	16
2. 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론항체의 정제 및 immunodiffusion	17

제 4 장 결론 및 건의사항	19
참 고 문 헌	21
그림 및 도표	23

제 1 장 서 론

AIDS 환자를 진단하는 데는 무엇보다도 먼저 바이러스의 확산을 막고 환자의 혈액이 오염되지 않도록 해야 하며 이들 환자를 치료하는 의료진들을 보호할 수 있도록 간단하고 빠르게 그리고 특이하게 항체의 존재유무를 확인할 수 있어야 한다.

지금까지 알려진 항체의 존재유무를 확인하는 방법은 주로 효소면역법 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)¹⁾, Radio Immuno Assay²⁾, Western blot³⁾ 등이 있으나 시간이 오래 걸리고 환자의 혈액으로 부터 혈청을 분리 사용하여야 하는 단점이 있다. 이외에도 gelatin이나 latex 입자^{4,5)}를 이용하여 항체의 존재유무를 확인하는 방법도 이용되고 있으나 이 방법 역시 쉽고 빠르기는 하나 혈청을 분리 사용하여야 한다.

본 과제에서는 이미 오래전부터 널리 사용되어온 적혈구응집반응 (Haemagglutination)^{6,7)}, 즉 적혈구 표면에 여러가지 항원이나 항체를 부착시켜 항체나 항원의 존재 유무를 확인하는 방법을 수정하여 간단하고 빠르게 환자자신의 혈액을 직접 이용하여 항체를 확인하는 방법을 고안하였다. 즉 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론항체를 만들어 여기에 합성 peptide 항원이나 이미 본 연구실에서 subcloning 한 표면항원 (env) 유전인자와 core protein(gag) 등을 화학적으로 결합시켜 (cross-link) 합성체 (conjugate) 를 만든후 (제 1 도, A) 소량

의 혈액을 첨가하였을때 (제 1 도, B 혹은 C) 이미 항원에 대한 항체가 형성된 환자라면 환자자신의 적혈구와 특이하게 응집 (제 1 도, C)을 일으키는 원리이다. 이 반응은 매우 빠르게 일어나며 (약 2 분이내) 쉽게 육안으로 판독할 수 있어서 종래에 사용되어 온 어느 방법보다도 진단과정에서 생길 수 있는 여러가지 위험을 줄일 수 있는 큰 이점이 있다고 생각된다.

제 2 장 실험재료 및 방법

1. 사람 적혈구로 면역한 비장세포와 SP 2/0 myeloma 세포의 융합

건강한 정상인으로 부터 채혈한 혈액을 PBS 로 2 배 희석하여 Ficoll Paque(Pharmacia,Uppsala, Sweden) gradient 원심 분리한 후 림파구를 제거시키고 enriched 적혈구를 PBS 로 3 회 원심 세척하여 2×10^7 적혈구 세포를 Balb/c 생쥐에 3 주 간격으로 2 회 복강면역하였다. 그 후 4 일에 시험채혈하여 하등⁷⁾의 방법에 따라 적혈구 응집반응으로 항체를 확인한 후 동량의 적혈구로 최종 면역하였다. 최종면역후 3일에 비장세포와 SP2/0 myeloma 세포를 Galfre, Milstein⁸⁾의 방법에 따라 PEG 를 이용하여 세포융합을 시도하였으며 융합세포는 HAT(hypoxanthine, 10^{-4} M : aminopterin, 4×10^{-7} M : thymidine, 1.6×10^{-5} M) 배양액에서 선별하였다.

2. 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론 항체를 생산하는 융합세포의 선별

HAT 배양액에서 자라는 융합세포군중 비응집 표면항원에 대한 항체를 생산하는 세포의 선별은 제 2 도의 모식도에서와 같이 간접 적혈구 응집반응으로 적혈구와 직접 반응시켰을 경우에는 응집을 일으키지 않으나 (제 2 도, A) anti-mouse immunoglobu-

lin 을 함께 첨가하였을때 응집을 일으키는 (제 2 도 , B) 융합세포 군을 선별하여 96- well plate 에 limit dilution 방법으로 2 회 cloning 하였다. 이때 4 주된 Balb/c 생쥐의 흉선세포 (10^5 세포 / well) 를 feeder 세포로 사용하였다.

3. 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론항체의 isotype 결정

융합세포로부터 얻어진 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론 항체의 isotype 결정은 간접 적혈구 응집반응으로 실시하였으며 이때 사용한 2 차 항체는 anti-mouse IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgM heavy chain 과 κ, λ light chain (Böehringer Mannheim Indianapolis) 이었다.

4. 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론항체의 대량 생산 및 이의 정제

사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론항체를 대량 생산하기 위하여 0.5 ml의 pristan 을 1 주 간격으로 2 회 복강주사하여 ascites 가 쉽게 생기도록 자극하고 3 일에 1×10^6 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론성 세포를 Balb/c 생쥐에 복강주사하여 ascites tumor 를 유도한후 복수액을 채취 하였다.

복수액으로 부터 사람 적혈구 비응집표면항원에 대한 단일 클론항체의 정제는 Bruck 등의 방법⁹⁾에 따라 DEAE-Affi-gel

blue chromatography 로 실시하였다. 즉, 복수액을 15,000 rpm 으로 30 분간 원심하여 세포피 등을 제거하고 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) 완충액에 24시간 투석한 후 DEAE-Affi-gel blue (Bio-Rad Lab, Richmond, CA) column 에 가하고 0-100 mM NaCl gradient 완충액으로 유출시켰다.

5. 정제된 단일클론항체의 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis

Laemmli¹⁰⁾ 의 방법에 따라 14% acrylamide gel 를 이용하여 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론항체를 전기영동하였다.

6. 정제된 단일클론항체의 immunodiffusion

Ouchterlony¹¹⁾ 의 방법에 따라 1% agarose gel 을 이용하여 중앙 well 에는 1:20 으로 희석한 anti-mouse IgG (Bio-Yeda, Israel) 를 가하고 바깥 wells 에는 정제한 단일클론항체를 가하여 다습한 실온에서 24시간 방치한 후 coomassie blue 로 염색하여 침전대 (precipitation band) 를 확인하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

1. 사람 적혈구 비응집 표면 항원에 대한 단일클론 항체를 생성하는 융합세포의 선별 및 isotype 결정

사람 적혈구 비응집 표면 항원에 대한 단일클론항체를 생성하는 융합세포를 얻기 위하여 건강인의 적혈구로 면역한 Balb/c 생쥐로부터 시험채혈한 혈청을 1 : 20 으로 희석한후 2-fold serial dilution 하여 직접 적혈구 응집반응을 실시한 결과 제 3 도에서와 같이 항체가 (A ; 면역하지 않는 정상, B ; 1 : 2560, C ; 1 : 640)를 확인한후 항체가 높은 생쥐의 비장세포와 SP2/0 myeloma 세포를 PEG 를 이용하여 융합시키고 HAT 배양액에서 선별한 결과 288개의 well 중 123개의 well 에서 융합세포군이 증식하는 것을 확인하였으며 이중 비응집 표면항원에 대한 항체를 생산하는 세포의 선별은 제 2 도의 모식도에서와 같이 직접 혹은 간접 적혈구 응집 반응으로 실시하였다. 즉, HAT 배양액에서 자라는 123개의 융합세포군의 배양 상층액을 제 2 도, A에서와 같이 적혈구와 직접 반응시켜 응집을 일으키는 24개의 융합세포군을 제외시키고 99 개의 응집을 일으키지 않은 융합세포군 중 제 2 도, B에서와 같이 anti - mouse immunoglobulin 을 함께 첨가하였을때 응집을 일으키는 18개의 융합세포군을 선별하였다. 이중 역가가 높은 8개의 융합세포군을 limit dilution 방법으로 cloning 하였으며 isotype 결정은 제 4 도 및 표

1 에서와 같이 6 개의 clones 은 IgG heavy, kappa light chain 이었으며 2 개의 clones 은 IgG_{2b} heavy, kappa light chain 이었다.

2. 사람 적혈구 비용집 표면항원에 대한 단일클론항체의 정제 및 immunodiffusion

사람 적혈구 비용집 표면항원에 대한 단일클론항체의 정제는 DEAE-Affi-gel blue chromatography 로 실시하였는데 1×10^6 단일클론성세포 (NA-6, 표 1 참고) Balb/c 생쥐에 복강주사하여 ascites tumor 를 유도하여 얻은 복수액을 DEAE-Affi-gel blue column 에 가하고 0-100 mM NaCl gradient 완충액으로 유출시킨 280 nm 에서의 profile 은 제 5 도에서와 같이 75-95 시험관 부근에서 IgG peak 를 관찰할 수 있었으며 항체가 순수하게 정제되었는지의 여부를 확인하기 위하여 SDS-PAGE 를 실시한 바 제 6 도의 lane 4,5,6 (제 5 도의 Fraction No. 80,85,90) 에서와 같이 IgG heavy chain 과 light chain band 를 확인할 수 있었다. 이때 lane 2 (제 5 도의 Fraction No. 55) 는 transferrin이며 lane 9 (제 5 도의 Fraction No. 150) mouse albumin 으로 생각된다. 제 5 도의 Fraction No. 75-95 의 peak가 IgG 인지 재 확인하기 위하여 immunodiffusion 을 실시한 바 제 7 도에서와 같이 1 well 의 transferrin (제 5 도의 Fraction No. 45-60) 과 3,5 wells 의 albumin peak (제 5 도의 Fraction No. 140-160) 는 중앙 well 의 anti-mouse IgG 와 침전대를 형성치 않으나

2, 4, 6 wells 의 IgG peak 분획 (제 5 도의 Fraction No. 75-95) 과는 강한 침전대를 형성하였다.

제 4 장 결론 및 건의사항

본 연구는 최근 전 세계적으로 보건 문제화 되고 있는 AIDS 의 확산을 막기 위하여 유전공학적 방법으로 간단하고 빠르게 그리고 특이하게 항체의 존재 유무를 확인할 수 있는 진단 시약을 개발하는데 그 목적을 두고 있으며 본 연구기간 동안의 연구결과는 다음과 같다.

1. 정상인의 적혈구로 면역한 Balb/c 마우스의 비장세포와 Sp 2/0 myeloma 세포를 융합시켜 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론항체를 생성하는 18개의 clones 을 얻었다.
2. 이들 단일클론항체의 isotype 은 IgG₁ heavy, kappa light chain 그리고 IgG_{2b} heavy, kappa light chain 의 두 종류이었다.
3. Balb/c 생쥐의 ascites fluid 로부터 얻은 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론항체는 DEAE-Affi-gel blue chromatography 로 정제하였으며 SDS-PAGE 및 immunodiffusion test 로 IgG heavy chain 과 light chain 을 확인하였다.

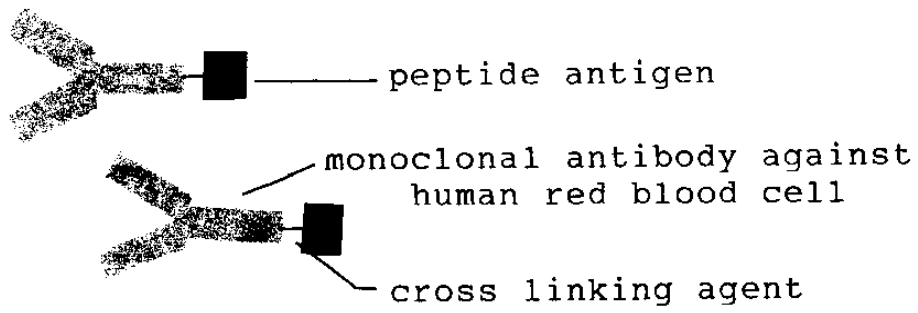
이렇게 정제된 단일클론항체에 이미 본 연구실에서 발현시킨 *E. coli* HIV 표면항원 (env) 유전인자 및 core protein(gag)

을 chemical linker 를 이용하여 결합시키는 실험을 진행중에
있으며 이와같이 간단하고 빠른 진단시약의 개발은 국민보건문제
로 대두되고 있는 AIDS 의 확산을 막고 조기에 예방하는데 기여할
것으로 기대된다.

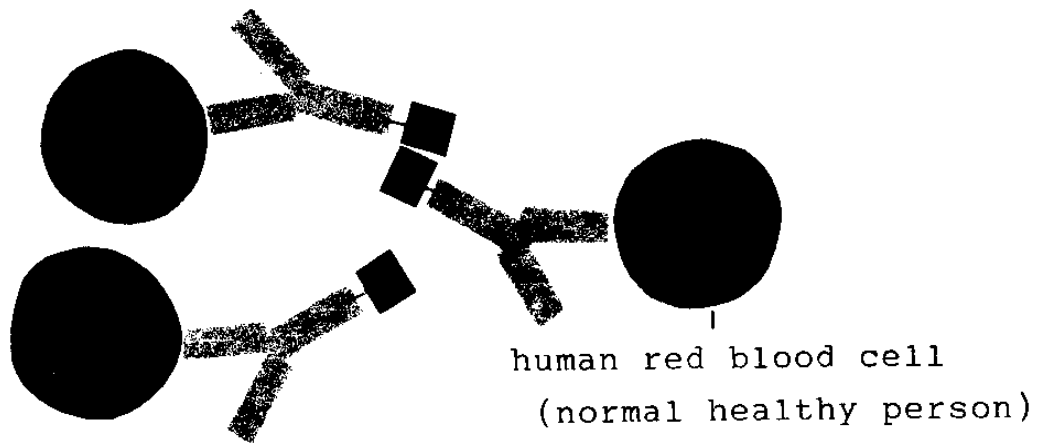
참 고 문 헌

- (1) Eva Engvall, Peter Perlmann (1971)
Immunochemistry 8, 871
- (2) M.G. Satngadharan et al (1984), Science 224, 506
- (3) D.S. Burke et al (1987), J. Clin, Microbiol, 25, 81
- (4) James M. Meegan, Brigitte K. Evans, and Dorothy
M. Horstmann (1982), J. Clin. Microbiol. 16, 644
- (5) Sheila Freeman, Lucille Clark, and Nellie Dumas (1983),
J. Clin. Microbiol. 18, 197
- (6) Noel R. Ling and David Catty (1988)
Antibodies Vol. I, pp.169-188
- (7) 하대유, 김형일, 임선영 : 대한면역학회지 9:1, 1987.
- (8) Kohler, G., and Milstein, C. (1975), Nature 256, 495
- (9) C. Bruck, D. Portetella, C. Glineur and A. Bollen (1982),
J. Immunological Methods, 53, 313
- (10) Laemmli, U.K. (1970), Nature 227, 680
- (11) Ouchterlong, Ö. (1958), In progress in Allergy. Kallos,
P. and Wasksman, B.H. (eds), Karger, Basel, Vol.VI, p.30

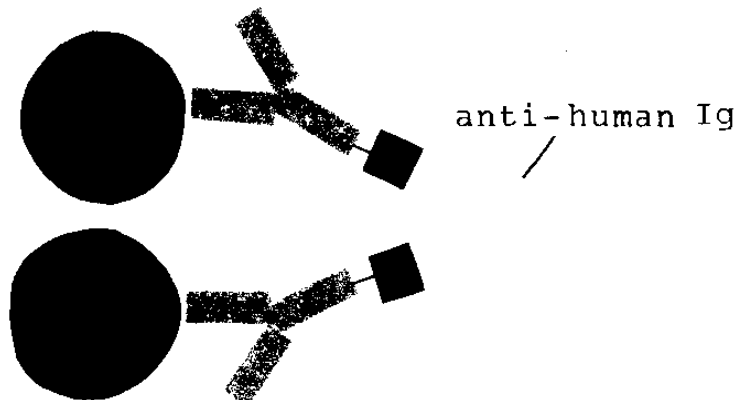
그림 및 도표



A. Conjugate



B. Normal healthy person

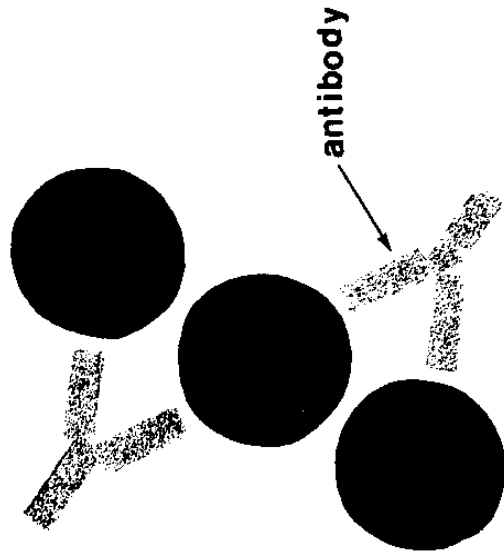


c. patient

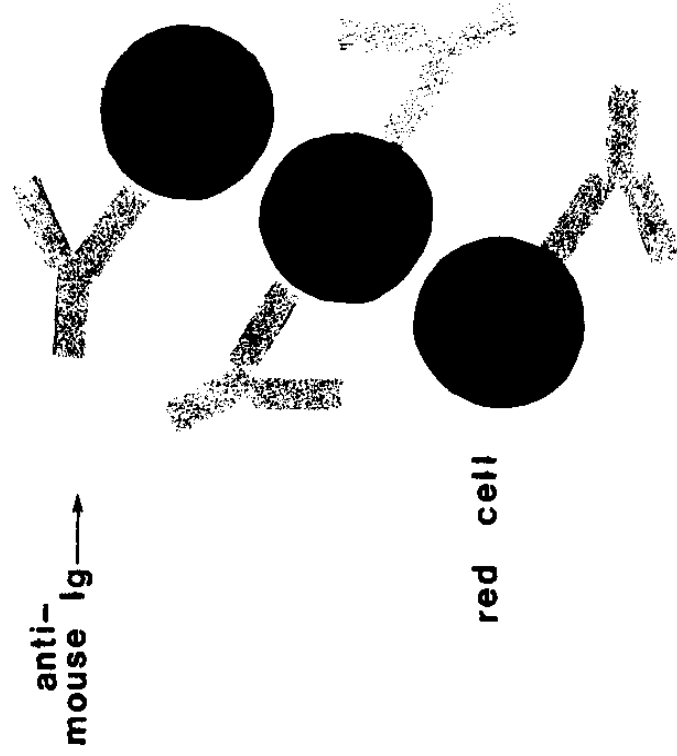
제 1 도 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론 항체를 이용하여 환자의 혈액으로 부터 직접 항체생성여부를 확인할 수 있는 진단시약 개발 모식도

agglutination

A. direct



B. indirect



제 2 도 사람 적혈구에 대한 응집 (agglutinin) 및 비응집 (non-agglutinin) 표면항원과의 항체반응 모식도



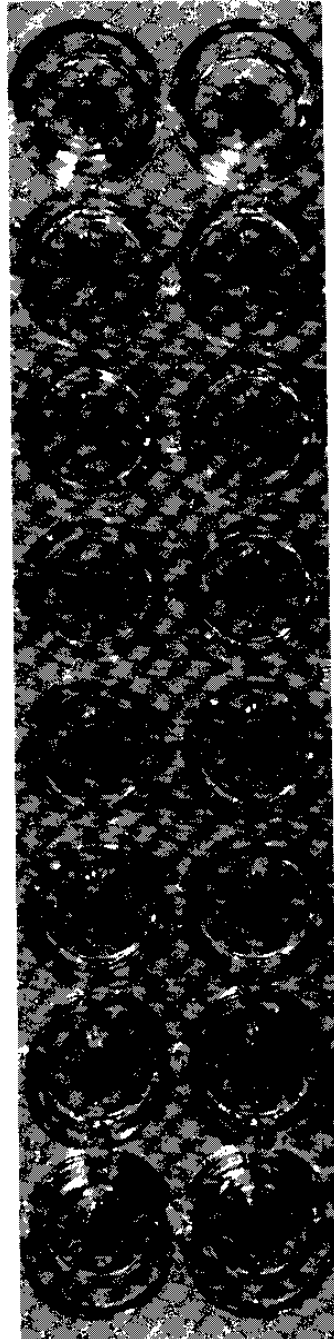
제 3 도 사람 적혈구로 면역한 Balb/c 생쥐의 혈청과 사람 적혈구와의 응집 반응 (Haemagglutination)

A, Normal mouse serum :

B, C, Immunized mice serum

Haemagglutination

direct indirect



anti - mouse
IgG₁

IgG_{2a}

IgG_{2b}

IgG₃

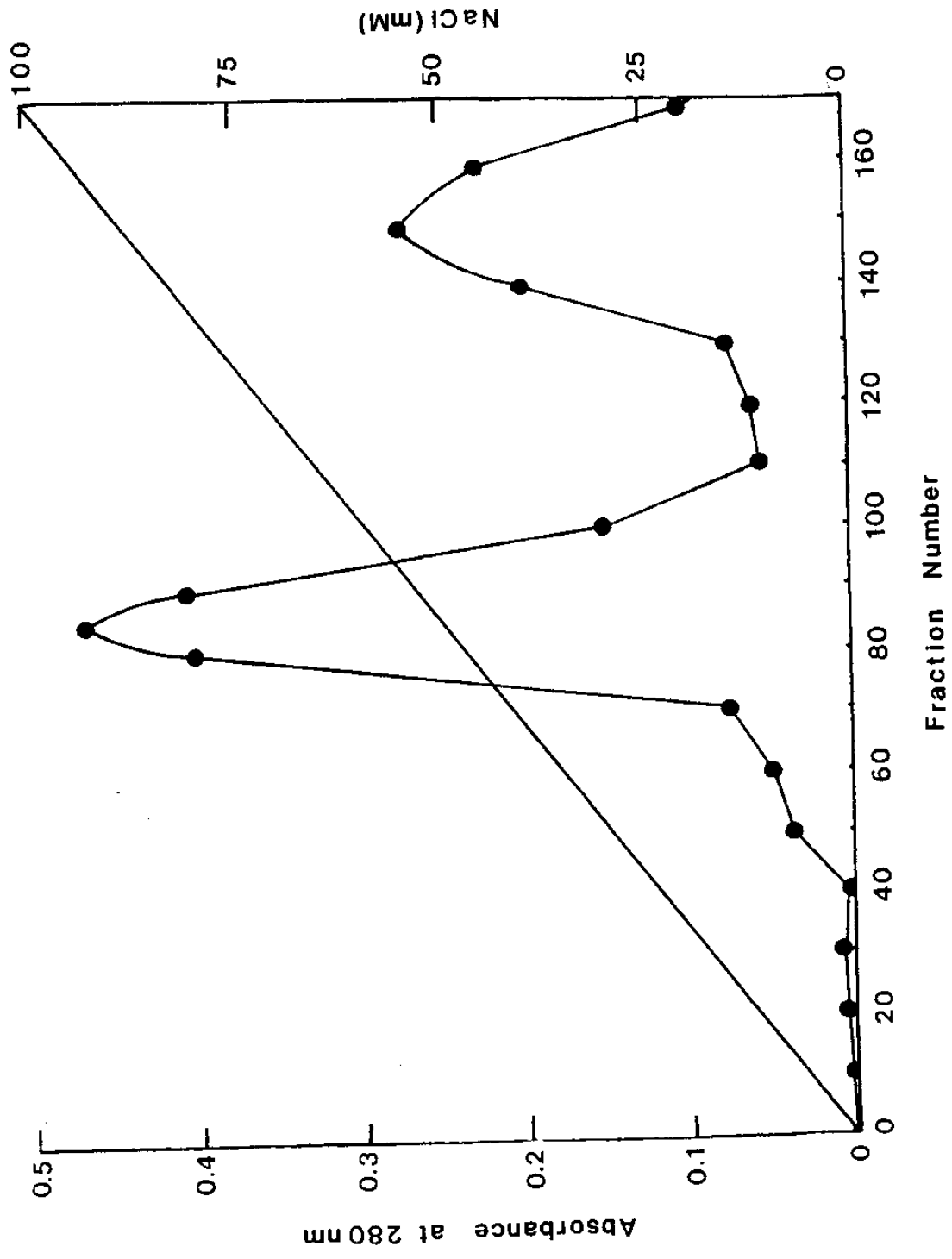
IgM

k

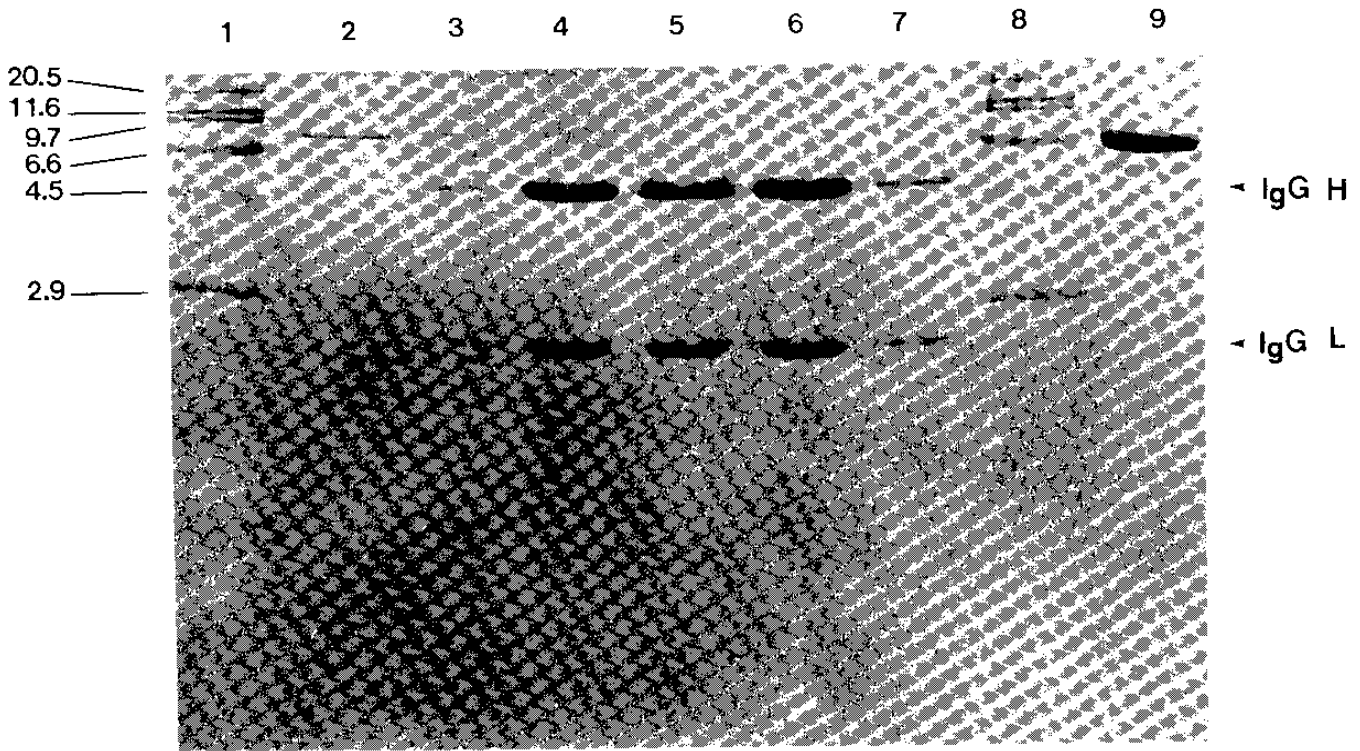
λ

N

제 4 도 적혈구 응집반응 (Haemagglutination) 을 이용한 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론항체의 Isotype 결정

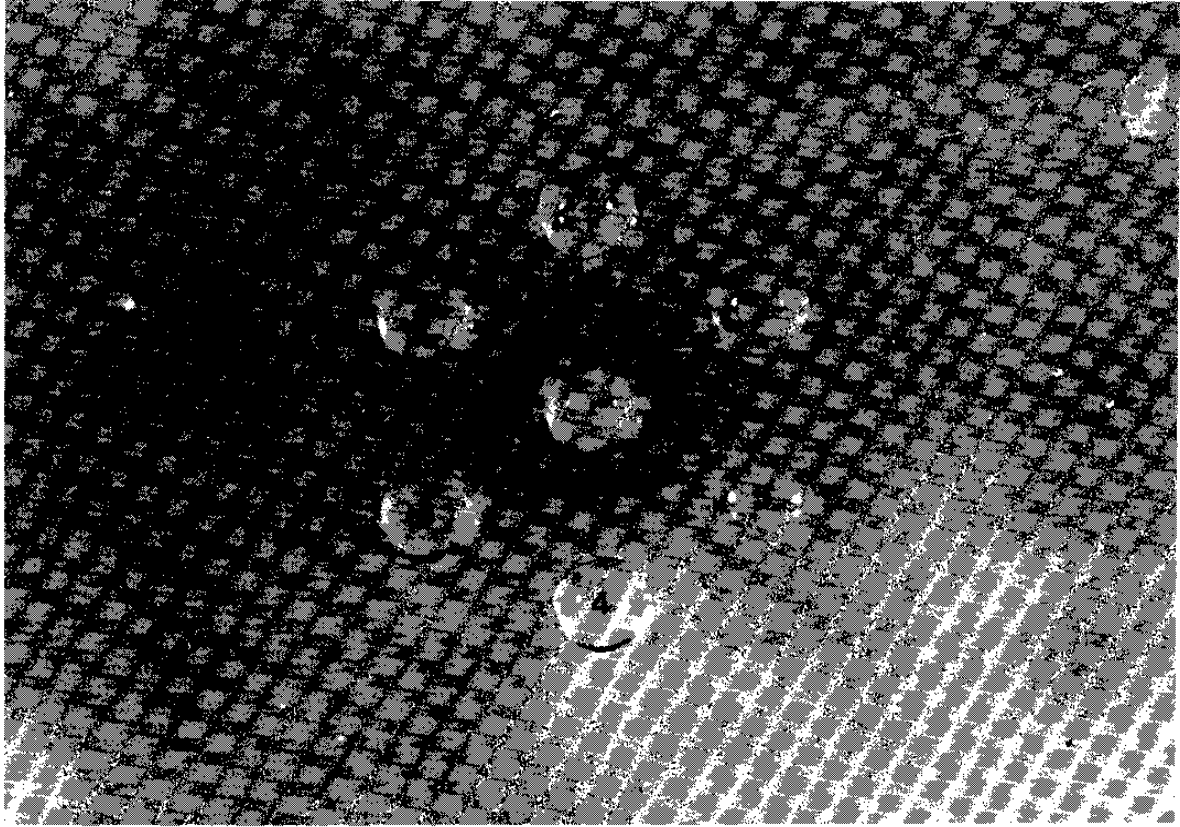


제 5 도 DEAE-Affi-gel blue column 을 이용한 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론 항체의 정제



제 6 도 정제된 사람 적혈구 비응집 표면 항원에 대한 단일 클론 항체의 전기영동

- Lane 1, 8, Molecular weight standards
- Lane 2, Fraction No. 55 (from Fig. 4)
- Lane 3, Fraction No. 72 (from Fig. 4)
- Lane 4, Fraction No. 80 (from Fig. 4)
- Lane 5, Fraction No. 85 (from Fig. 4)
- Lane 6, Fraction No. 90 (from Fig. 4)
- Lane 7, Fraction No. 105 (from Fig. 4)
- Lane 9, Fraction No. 150 (from Fig. 4)



제 7 도 정제된 사람 적혈구 비응집 표면 항원에 대한 단일클론항체의 immunodiffusion :

Center well contains goat anti-mouse IgG:

Well 1 contains pool of 1st peak

(fraction No. 45-60, from Fig.4)

Well 2, 4, 6 contains pool of Ig peak

(Fraction No. 75-95, from Fig. 4)

Well 3,5 contains pool of albumin peak

(Fraction No. 140-160, from Fig.4)

표 1. 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론항체의
Isatype 선별

		Haemagglutination test							
		direct		indirect					
				heavy chain			light chain		
		Whole [Ⓐ] IgG	IgG ₁ [Ⓑ]	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃	IgM	K	λ
1	NA-1	-	+						ND [Ⓒ]
2	NA-2	-	+						ND
3	NA-3	-	+						ND
4	NA-4	-	+	+	-	-	-	+	-
5	NA-5	-	+	+	-	-	-	+	-
6	NA-6	-	+	+	-	-	-	+	-
7	NA-7	-	+	+	-	-	-	+	-
8	NA-8	-	+	+	-	-	-	+	-
9	NA-9	-	+	-	-	+	-	+	-
10	NA-10	-	+						ND
11	NA-11	-	+						ND
12	NA-12	-	+	-	-	+	-	+	-
13	NA-13	-	+						ND
14	NA-14	-	+	+	-	-	-	+	-
15	NA-15	-	+						ND
16	NA-16	-	+						ND
17	NA-17	-	+						ND
18	NA-18	-	+						ND

Ⓐ Whole anti-mouse IgG

Ⓑ Anti-mouse

Ⓒ ND : not done

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.