Human Cardiac Troponin I 면역분석을 위한 단일클론 항체의 특성화

오홍일, 양진아, 백의환, 백세환*
고려대학교 생명공학원, 바이오센서 시스템공학 연구실
전화 (02) 3290-3438, FAX (02) 923-9923

Abstract

Six monoclonal antibodies to human cardiac troponin I (hcTnI) were produced to eventually develop an immunosensor for acute myocardial infarction (AMI). For the characterization of these antibodies, a set of 11 different peptides covering selected ranges of the complete amino acid sequence of hcTnI was prepared and used for epitope mapping. Such analysis allowed to select an appropriate pair of antibodies that can form a sandwich type of immune complexes and was consequently used for an immunoassay.

서론

급성 심근경색이란 관상동맥의 한쪽 또는 양쪽이 막혀 불충분한 혈액공급으로 심근의 허혈상태가 20분 이상 지속되어 심근이 괴사되는 것을 말한다. 북미와 서유럽의 경우 성인의 사망원인 1위를 차지하고 있으며 우리나라의 경우도 최근 10년 간 심근경색으로 인한 사망률이 103% 증가하는 등 주요 성인병중의 하나로 부각되고 있다. 급성 심근경색을 진단하는 방법들 중에서 혈청학적 방법의 대표적 표지인자는 cardiac troponin I (cTnI) 이다.[1] cTnI는 209개의 아미노산으로 구성되어 있으며 심근에만 특이적으로 존재하는 단백질로 심근이 손상되면 혈중으로 방출된다.[2] 본 연구에서는 급성 심근경색 진단용 면역센서의 개발목적으로 생산한 항 cTnI 단일클론 항체의 최적 sandwich pair를 찾기 위해 이들 항체의 항원에 대한 인지부위를 확인하였다. 이를 위해 cTnI의 아미노산 서열을 기초로 하여 11개의 주요 펩타이드를 합성하였으며 이를 dot-blotting 방법을 이용한 epitope 분석에 사용하였다.[3] 아울러 membrane 면역크로마토그래피 방법을 병행하여 생산된 항체들 간에 sandwich pair 형성 여부를 확인하였다.

재료 및 방법

항체생산. 면역원으로 hcTnI 30 μg을 3주 간격으로 총 5회 BALB/c mice에 주사하였다. Splenocyte를 분리하여 myeloma cell line sp2/0와 세포융합 시킨 후 양성클론을 limiting dilution 방법에 의해 cloning 하였다. 얻어진 단일클론을 다시 mice에 주사하여 ascites를 생산하였고 이를 Protein G 젤 칼럼을 사용하여 정제하였다.

펩타이드 합성. 서로 다른 아미노산 서열로 구성된 펩타이드의 합성은 Fmoc-AA-OH를 사용하여 C말단부터 시작하며 일정한 시간 간격으로 아미노산을 하나씩 붙여 가는 continuous flow 방법을 사용하여 수행하였다.

Immuno-blotting. 0.45 ㎛의 세공크기를 갖는 nitrocelulose membrane에 합성된 펩타이드를 고정화 한 후 dot-blotter에 장착하였다. 여기에 생산된 6종류의 단일클론 항체를 가하여 반응시킨 후 미반응 항체를 제거하였다. Horseradish peroxidase가 중합된 제2항체를 가하였고 위에서 동일한 방법에 의해 미반응 항체를 제거하였다. Dot-blotter에서 NC membrane을 꺼내어 diaminobenzidine 기질용액에 담가 발색시킨 후 발색된 부위를 scanning photometry를 이용하여 색조밀도를 측정하였다.

면역 크로마토그래피 분석. 생산된 6종류의 항체를 각각 포획항체 (고정화 항체) 및 탐지항체 (신호발생원으로 colloidal gold와 중합)로 사용하여 총 30가지의 조합에 대해 membrane 면역 크로마토그래피 분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

Immuno-blotting 방법을 이용하여 생산된 항체에 대한 epitope mapping을 수행한 결과 clone No. 6는 나머지 항체와는 구분되는 독특한 항원부위를 인지하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과를 확인하기 위해 cTnI와 일반 골격근 단백질인 skeletal TnI (sTnI)에 대한 부착실험을 수행하였다. cTnI는 sTnI의 N-말단에 30개의 아미노산이 추가된 형태이며 상호간의 아미노산 서열 유사성은 약 60%이다. 생산된 항체들에 대해 cTnI와 sTnI에 대한 반응성을 확인하기 위해 ELISA를 수행한 결과 5개의 항체는 cTnI와 sTnI에 대한 면역반응성이 거의 동일한 것으로 나타났으나 나머지 1개의 항체 (clone No. 6)는 sTnI에는 반응하지 않고 cTnI에만 특이적으로 반응하는 것으로 확인되었다. 생산된 항체 중 한 항원분자에 동시에 반응하는 한 짝의 항체 (포획/탐지항체)를 선별하기 위해 membrane strip 면역 크로마토그래피 시스템을 이용하여 체계적 시험을 수행하였다. 분석수행결과 cTnI에만 특이적으로 반응하는 항체 (clone No. 6)를 포획항체로 사용하고 탐지항체로는 sTnI와 교차반응을 나타내기는 하지만 면역반응성이 높은 clone No. 2를 사용한 것이 가장 우수한 sandwich pair를 형성하는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 생산된 항체를 이용한 면역분석시스템은 cTnI에 대한 특이 분석을 수행할 수 있는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Border, G. S., Cardiac troponin I: a highly specific biochemical marker for myocardial infarction (1994), *J. Clin. Immunoassay*, 17:40-44.
2. Cummins, B., Auckland, M. L., and Cummins, P., Cardiac-specific troponin I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. (1987), *Am. Heart J.*, 113:1333-1344.
3. Frank, R., Spot-Synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support (1992), *Tetrahedron*, 48:9217-9232.