

## 페디스토마에 대한 Monoclonal Antibody 생산 세포주개발에 대한 연구

고광삼 · 이숙영 · 이근배  
(조선대학교 의과대학 생화학교실)

## Characterization of Mouse Hybridoma Producing Monoclonal Antibody to *Paragonimus westermani*

Koh, Kwang-Sam, Sook-Young Lee and Keun-Bai Lee

Department of Biochemistry, College of Medicine, Chosun University, Kwang Ju, Korea

In this study, hybridoma techniques were applied to produce monoclonal antibodies to *Paragonimus westermani*, commonly known as lung distoma. Balb/c mice were immunized intraperitoneally every week with increasing doses of purified protein of *Paragonimus westermani* adult worms beginning with 0.3/mg/mouse/7 days and ending with 0.5mg at 28th day. Spleen cells from these immunized mice were hybridized with myeloma cells (NS-1) and the hybridized cells were selected in HAT media. The antibody secreting cells among the hybrid cells were initially selected by ELISA. Those initially selected cells were further screened by the criteria of antibody producing activity, and several cell lines among them were further tested with immunodiffusion method. One hybridoma clone produced IgM and another clone produced IgG1. The supernatant of the hybridoma clone producing IgM had titer 1:64 and the hybridoma clone producing IgG1 had titer 1:256 measured by immunofluorescence technique.

Hybridoma란 특이항체를 생산하는 형질세포와 영구히 세포배양할 수 있는 형질세포종간의 세포융합으로 생긴 잡종세포로서 쌍방의 유전자를 공유하며 형질세포가 지니고 있는 특이항체를 생산하는 성질과 형질세포종의 영구히 분열증식하는 성질을 동시에 나타내는 세포를 말하는데, 체세포유전학의 연구에 주로 이용되던 세포융합법이 면역학연구에 도입되므로서 hybridoma의 개념이 생겨나게 되었다(Ringertz, et al.). 이 개념은 Köhler and Milstein(1975)이 sheep RBC로 면역시킨 Balb/c mouse의 spleen cell을 myeloma cell과 융합시켜 잡종세포를 만들었는데, 이 잡종세포가 특이하게 sheep RBC에 결합하는 항체를 생산할 뿐만 아니라 세포배양에서 영구히 살 수 있다고 보고함으로써 탄생되었다. Hybridoma technique을

기생충성질환에 응용하면 항원성이 복잡한 기생충에 대한 monoclonal antibody를 생산하여 흔히 나타나는 교차반응을 피할 수 있기 때문에 면역진단의 특이성을 높일 수 있고, 생산된 monoclonal antibody는 각종 기생충의 variants의 동정이나 기생충 strains를 typing하는데 이용할 수 있으며, 기생충항원을 정제하는데 이용할 수 있고, monoclonal antibody를 이용하여 기생충 감염때 면역체의 생성에 관계되는 항원성 결정구조를 찾아낼 수도 있을 것으로 생각된다. 페디스토마증은 주로 극동 아시아 특히 우리나라의 전남지방에서 유행되는 풍토병으로서 감염후 3개월 이내에는 sputum microscopy나 skin test로 진단기 어려우며 치료후에도 치료확진이 어려운 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 hybridoma technique을 이용하여 항원

성이 복잡한 페디스토마에 대한 monoclonal antibody를 생산하여, 보통방법으로 자주 나타나는 교차반응을 피하여 면역진단의 특이성을 높이고 페디스토마 variants의 동정이나 strains을 typing 하는데 이용하고, 페디스토마 감염체의 면역체 생성에 관계되는 항원성 결정구조를 찾아내고, 이 항원을 정제하는데도 이용할 뿐만 아니라 페디스토마의 조기진단과 치료에 응용코져 페디스토마를 항원으로 하여 hybridoma를 만들고, 이 세포가 생산하는 monoclonal antibody의 특이성을 연구 검토코져 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

본 실험에 사용한 mouse는 생후 5~6주 된 Balb/c mouse로서 페디스토마 항원을 복강내에 주입하여 면역시켰다.

### 페디스토마 항원의 제조

페디스토마 항원은 Yogore et al. (1965)의 방법을 약간 수정하여 시행하였다. 즉 체중이 10kg 정도되는 실험개(犬)의 폐에서 *Paragonimus Westermani* 성충을 꺼내어 4°C 냉생리식염수로 세차레 즉시 세척하고, 여과지위에서 수분을 제거한 다음 0.85% 생리식염수 20ml를 가하여 4°C에서 Teflon coated homogenizer를 이용하여 30분간 homogenize시켰다. 이를 4°C에서 2시간 동안 shake한 다음 4°C에서 overnight시켜 단백질을 추출하고, 9,500rpm에서 30분간 냉동원심분리하여 상층액 135ml (Fraction I)을 모아 75% ammonium sulfate를 가하여 혼합물을 16,000rpm에서 30분간 냉동원심분리하여 얻은 pellet을 0.05M Tris/HCl buffer, pH 7.2에 용해시켜 얻은 18ml (Fraction II)를 12시간동안 dialyze하여 DEAE-cellulose chromatography를 행하였다. DEAE-cellulose column (2.8cm × 25cm)에 시료를 넣고 0.05M Tris/HCl buffer, pH 7.2를 이용하여 30ml (Fraction III)의 농축된 시료를 얻었으며, 이를 0.05M Tris/HCl-0.1M NaCl buffer, pH 7.2에서 12시간동안 dialyze시킨 후 Sephadex G-200gel tiltration을 행하였다. Sephadex G

-200column (1.7cm × 85cm)에 시료를 넣어 12 ml/h의 flow rate에서 0.05M Tris/HCl-0.1M NaCl buffer, pH 7.2를 이용하여 행하였으며, 여기에서 얻은 Fraction IV (130ml)는 Minicon-B15을 이용하여 농축시킨 다음 0.05M Tris/HCl-1.0mM CaCl<sub>2</sub>-1.0mM MnCl<sub>2</sub>-0.5M NaCl, pH 7.2에서 12시간동안 dialyze하여 15ml (Fraction V)의 정제된 단백질 용액을 얻었으며, 이를 항원으로 사용하였고, 단백질함량은 Lowry et al. (1953)의 방법을 이용하여 측정하였다.

### Myeloma cell

Myeloma cell은 mouse myeloma cell인 P3 × 63Ag8 (NS-1)을 10% horse serum, 10% fetal bovine serum, 1% glutamine, 0.5% 8-azaguanine과 0.5% penicillin/streptomycin을 함유한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 중에서 T-75 flask를 사용하여 37°C의 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하여 사용하였다.

### 실험동물의 면역

생후 5~6주의 Balb/c mice에 정제된 페디스토마단백질 0.3mg/mouse의 용량을 1주간격으로 5회 복강내에 주입하여 면역시키고, 세포융합하기 3일전 boost하기 위해 0.5mg/mouse의 용량을 복강내 주입하여 면역시켰다.

### Spleen cell의 제조

면역된 Balb/c mouse에서 spleen을 무균적으로 분리하여 spleen tissue를 10% fetal bovine serum이 함유된 DMEM 중에서 세편으로 나누어 100μ크기의 stainless steel mesh를 통과시켜 spleen cell을 얻고, cell debris는 50ml conical glass centrifuge tube를 사용하여 4°C에서 15분동안 방치하여 침전시켜서 제거하였으며, 상층액은 15ml plastic conical tube에 옮겨 fetal bovine serum 2ml를 가한 다음, 냉동원심분리기 (Beckman Model J2-21, Fixed angle rotor)에서 원심분리하여 cell pellet을 얻었다. 이 cell pellet에 0.8% NH<sub>4</sub>Cl을 함유하고 있는 10mM HEPES buffer 2ml를 가하여 37°C에서 2분간 반응시키고, 2ml의 fetal bovine serum이 들어 있는 15ml conical plastic centrifuge tube에 상층

액을 옮겨 반응을 정지시킨 다음, 1, 200rpm에서 15분간 원심분리하여 RBC층인 상층액을 버렸다. 이를 1% glutamine, 0.5% penicillin / streptomycin과 0.7% 1M-HEPES buffer가 함유된 spleen cell washing media로 현탁시키고, 1, 200rpm에서 5분간 원심분리한 다음, 상기의 방법으로 다시 cell debris를 제거하고 spleen cell washing media로 재현탁시켜, 세포수를 측정하고 viability를 조사하였는데, 총 용량을 10ml로 만들었을 때 세포수는  $1.2 \times 10^7$  cells/ml 이었고, viability는 97%이었다.

### Hybridoma의 제조

Hybridoma의 제조는 Galfre et al. (1977), Köhler et al. (1976) 및 Littlefield (1964)의 방법을 이용하였다. 즉  $1.0 \times 10^7$  cells/ml의 P<sub>3</sub> × 63Ag8 myeloma cell과  $1.0 \times 10^8$  cells/ml의 spleen cell을 50ml conical plastic centrifuge tube에서 혼합시킨 다음 1, 200rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 버리고, cell pellet tube의 밑부분을 가볍게 두드려 고른 후 50% (w/v) polyethylene glycol 1,000 (PEG 1,000) 1ml를 가하여 30초 내지 60초동안 반응시킨 다음, 2ml의 DMEM을 방울로 떨어뜨려 가하고, 다시 2분동안에 4ml의 DMEM을 가한 후 20% fetal bovine serum이 함유된 DMEM 8ml를 가하여 2,000rpm에서 5분간 원심분리하였다. Cell pellet을 50ml conical plastic centrifuge tube에서 20ml의 HAT medium으로 현탁시켜, 이 cell suspension을 0.2ml씩 96 wells의 microtiter plate에 넣고, 10% CO<sub>2</sub>, 37°C의 incubator에서 배양하였으며, 다음날 20% fetal bovine serum이 함유된 HAT medium을 1ml씩 가하여 배양하였다. 융합한 후 5일째 부터 잡종세포의 출현을 조사하였고, 1주일에 한번씩 medium을 제거하고, 37°C에서 새로운 medium을 공급하여 주었으며, 잡종세포가 나타나면 각 well의 colony수를 기록하고, 잡종세포의 수가 수만에 이르러 medium이 황색을 띄어 산성이 되었을 때 medium을 모아 ELISA와 Immunofluorescence법을 이용하여 항체의 존재를 확인하였으며, 항체가 존재하는 경우에는 세포를 T-25 Falcon flask에 옮겨

HAT medium으로 배양하였다.

### Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA에 의한 항체의 측정은 Voller et al. (1976)의 방법과 Scherrer et al. (1977)의 방법을 이용하였다. 즉 희석한 100 $\mu$ l의 시료를 각 well에 넣고 실온에서 2시간 방치시킨 후 PBS-Tween용액 (Tween 20 0.25ml와 Sodium azide 100 $\mu$ l를 PBS에 용해시켜 100ml로 만든 것)으로 세차례 씻어내고 각 well에 1:500으로 희석한 peroxidase-conjugated anti-mouse IgG 100 $\mu$ l를 가하고, 실온에서 2시간 방치하였다. 이를 다시 PBS-Tween 용액으로 세차례 씻어내고 각 well에 substrate (o-phenylenediamine용액) 100 $\mu$ l씩을 넣고 30분동안 반응시키고 4 N HCl 50 $\mu$ l를 가하여 반응을 중지시킨 다음에 황색이 갈색으로 변화되는지를 관찰하고 비색계로 흡광도를 측정하였다.

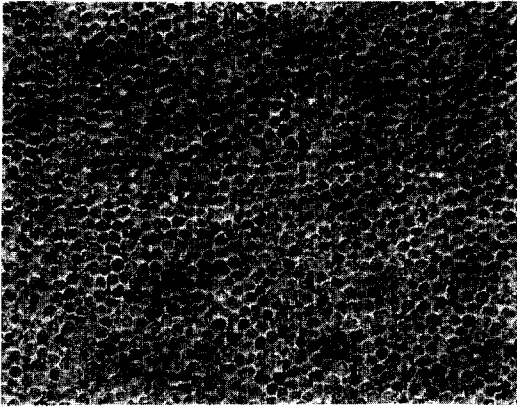
### Immunofluorescence법

일정량의 시료를 slide glass에 PBS와 3.7% formaldehyde의 혼합액으로 고정시킨 다음 실온에서 20분간 방치하였다. 이를 PBS로 세차례 씻어낸 후 건조시키고, monoclonal antibody가 함유되어 있는 hybridoma clone의 농축한 supernate를 여러가지 농도로 희석한 다음 0.5ml를 떨어뜨려 실온에서 60분간 반응시켰다. 이를 PBS로 다시 세차례 씻어낸 다음 0.04mg/ml의 rabbit anti-mouse IgG를 0.5ml 가하고 PBS로 씻어낸 다음 희석한 FITC-labelled anti-mouse IgG (Microbiological Associate, Bethesda, MD) 0.5ml를 가하여 60분동안 37°C에서 incubate하였다. 이를 PBS로 씻어내고 10% glycerol/PBS로 mount한 다음 fluorescence microscope로 조사하였다 (Kawamura, A., Jr., 1977, Greenberg, et al., 1983).

## 결과 및 고찰

### Hybridoma clone의 형성

페디스토마 성충의 정제한 단백질로 면역시킨 mouse의 spleen cell과 myeloma cell을 융합시킨 결과, 융합율 (fusion efficiency)은 56%



**Fig. 1.** Hybridoma clone of confluent stage of clone-differentiation(400 x).

이었으며, 이를 cloning 하였을때 96 wells 중에서 15wells이 항체를 생산하여 항체생산율은 18%이었고, 세번째 cloning 하였을 때 96wells 중에서 85wells가 항체를 생산하여 항체생산율은 89%이었다.

**항체의 Immunodiffusion 시험**

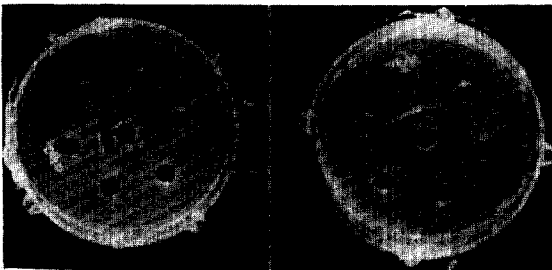
Hybridoma 세포가 생산하는 항체가 monoclonal antibody 인지를 확인하기 위하여 antibody-secreting clone의 supernate를 모아 Minicon B-15로 농축시켜 anti-mouse IgM, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>1</sub> 등을 이용하여 immunodiffusion 시험을 행한 결과 한 hybridoma clone은 IgM을, 또 다른 hybridoma clone은 IgG<sub>1</sub>을 생산함을 알 수 있었다.

**Antibody titer 측정**

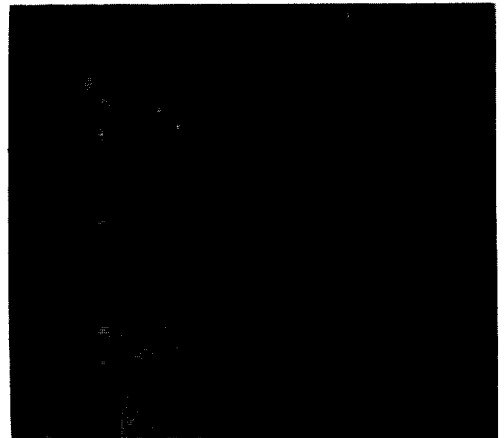
일정량의 정제한 페디스토마 성층이 단백질을 slide glass에 고정시키고, 실온에서 20분간 방치한 후 PBS로 세척하고 건조시킨 다음, 희석한 hybridoma clone의 supernate를 가하여 실온에서 60분간 반응시키고, PBS로 다시 세척

하였다. 여기에 rabbit anti-mouse IgG를 가하여 반응시킨 후 PBS로 세척하고, FITC-labelled anti-mouse IgG를 가하여 60분간 37°C에서 incubate한 다음 PBS로 세척하고, mount 한 후 형광현미경으로 antibody titer를 조사하였다(Akigoshi, Kawamura, Jr., 1977, Greenberg, et al., 1983, Mitchell, et al., 1979, Craig, et al., 1980). 그 결과 IgM을 생산하는 hybridoma clone의 supernate는 희석농도 1:64, IgG<sub>1</sub>을 생산하는 hybridoma clone의 supernate는 1:256까지 양성이었다.

체세포유전학을 연구하는데 기본이 되는 연구 기법의 하나인 세포융합원리를 이용하여 hybridoma 기술이 개발되었으며, 이 기술에 의해 만들어진 hybridoma cell이 세포배양에서 연구히 살아남아 계속적으로 monoclonal antibody를 생산하며, 이 항체는 immunoglobulin의 Fab부분이 동일하여 항원과의 결합력이 일정하고, 특이성이 높아서 특정화학군의 규명, 분리 및 정제등에 이용할 수 있으며, 질병의 임상검사를 위한 검사등에 이용할 수 있고, 또 tissue typing시약으로도 이용이 가능하며, 암의 진단과 치료 그리고 독물질과 약물의 무독화와 면역계의 연구수단으로 중요하다. 이 기술은 기생충질환의 연구, 즉 진단과 치료에도 이용할 수 있는데, 항원성이 복잡한 기생충에 대한 monoclonal antibody를 생산하여 보통의 방법으로 자주 나타나는 교차반응을 피할 수 있어 면역진단의 특



**Fig. 2.** Immunodiffusion test with the antibody produced by the hybridoma clone. One hybridoma clone produced IgM and another clone produced IgG<sub>1</sub>.



**Fig. 3.** Hybridoma cells-producing monoclonal antibody stained by immunofluorescence technique.

이성을 높일 수 있고, 기생충의 variant의 동정이나 기생충 strains을 typing 하는데 이용할 수 있으며, 기생충항원의 정제, 기생충감염때 면역체생성에 관계되는 항원성 결정구조를 찾아내는데도 이용할 수 있을 것이다. 한편 hybridoma

cell은 과다한 염색체를 소유하게 되므로 배양이 계속되는 동안 염색체의 소실이 나타날 때 immunoglobulin 유전자의 소실을 수반하여 항체생산의 중단을 초래할 가능성이 있다고 생각되므로 안정성을 고려하여야 할 것이다.

## 적 요

페디스토마 성충의 단백질을 정제하여 이를 항원으로 면역시킨 mouse의 spleen cell과 myeloma cell을 세포융합시킨 결과 융합율은 56% 이었고, 3차 cloning한 후의 항체생산물은 89% 이었으며, 이들 융합세포로부터 IgM을 생산하는 hybridoma clone과 IgG을 생산하는 hybridoma clone을 얻었다. IgM을 생산하는 hybridoma clone의 supernate는 antibody titer가 희석농도 1:64까지 양성이었고, IgG을 생산하는 hybridoma clone의 supernate는 1:256까지 양성이었다.

## 감사의 말씀

본 연구는 과학기술처 특정과제개발비의 보조로 수행되었으며, 본 연구에 도움을 주신 분들에게 감사사를 드립니다. 특히 페디스토마 성충의 조단백질을 제공하여 주신 중앙대학교 의과대학 기생충학교실 조승열교수님께 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Craig, P.S., Mitchell, G.F., Cruise, K.N. and M.D. Richard, 1980. Hybridoma antibody immunoassays for the detection of parasitic infections: Attempts to produce and immunodiagnostic reagent for a Larval Taeniid Cestode infection. *AJEBAK* 58, 339-350.
2. Galfre, G., Howe, S.C., Milstein, C., Butcher, G.W. and J.C. Howard, 1977. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 266, 550-552.
3. Greenberg, M.E. and G.M. Edelman, 1983. Comparison of the 34,000-Da pp 60<sup>src</sup> substrate and a 38,000-Da phosphoprotein identified by monoclonal antibodies. *J.B.C.* 258, 8497-8502.
4. Akiyoshi Kawamura, Jr., 1977. Fluorescent antibody technique and their application. Second edition. University of Tokyo press, Tokyo.
5. Köhler, G., Howe, S.C. and C. Milstein, 1976. Fusion between immunoglobulin-secreting and non-secreting myeloma cell lines. 6, 292-297.
6. Köhler, G. and C. Milstein, 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. *Nature* 256, 495-497.
7. Littlefield, J.W., 1964. Selection of hybrids from mating of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science* 145, 709-710.
8. Lowry, C.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and R.J. Randall, 1953. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J.B.C.* 193, 256-277.
9. Mariano, G.Y., Jr., Robert, M.L. and D.M. Elosa, 1965. Immunodiffusion studies on Paragonimiasis. *Amer. J. Tropical Med. Hygiene* 14, 586-592.
10. Mitchell, G.F., Cruise, K.M., Chapman, C.B., Andres, R.F. and M.C. Howard, 1979. Hybridoma antibody immunoassays for the detection of parasitic infections: Attempts to produce an immunodiagnostic reagent for a Larval Taeniid Cestode infectin. *AJEBAK* 57, 287-302.
11. Ringertz, N.R. and R.E. Savage, 1976. Cell Hybrid. Academic Press, New York, San Francisco, London.
12. Scherrer, R. and S. Bernard, 1976. Application of enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) to the detection of calf rotavirus and rotavirus antibodies. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 128A.
13. Voller, A., Bidwell, D.E. and A. Bartlett, 1976. Microplate enzyme-immunoassays for the immunodiagnosis of virus infections. Manual of Microbiology (eds. N. Rose and H. Friedman), *Amer. Soc. Microbiol.*, p506-512.

(Received, March 1, 1985)