

DEAE-Trisacryl 크로마토그래피법에 의한 IgG1 Type 쥐 단일클론 항체의 분리정제

최태부*·정용근

한국과학기술원 유전공학센터 생물화학공정실

Purification of IgG1 Type Mouse Monoclonal Antibodies with DEAE-Trisacryl Chromatography

Choe, Tae-Boo* and Young-Kun Jung

Biochemical Process Laboratory, Genetic Engineering Center, The Korea Advanced Institute of
Science and Technology P.O. Box 131, Seoul 130-650 Korea

An anion exchange chromatography was employed for the purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluid and *in vitro* cultivation media. After cultivation of hybridomas, Alps 25-3, HCGK, A4W, and KW, producing IgG1, the culture supernatants were harvested by centrifugation, precipitated with 50-60% ammonium sulfate, and dialyzed against 0.025 M Tris-HCl buffer (pH 8.2). Then the dialyzed samples were loaded into a DEAE-Trisacryl M anion exchange column. Monoclonal antibodies bound to the DEAE-Trisacryl M were eluted with 0.025 M Tris-HCl buffer (pH 8.2) containing 30-40 mM NaCl. In ammonium sulfate precipitation, the recovery of the monoclonal antibody was shown to be 90% and 84% from *in vitro* culture media containing 10% and 2% fetal bovine serum, respectively. On the other hand, the pretreatment by ultrafiltration enhanced the yield up to 91% whereas the purity was lower than that by ammonium sulfate treatment. Subsequently, in the DEAE-Trisacryl M chromatographic separation, the purities and recoveries of all the monoclonal antibodies from both the *in vitro* culture supernatants and ascitic fluids were 70-80% and 65% respectively. The monoclonal antibody, Alps 25-3 could be further purified with a purity of 95% through an immunoabsorbent chromatography.

1975년 Köhler와 Milstein에 의해 소개된 하이브리도마 기술은 단일클론 항체를 반영구적으로 생산할 수 있게 하였고, 그후 10여년간 이들을 이용한 응용 기술분야가 빠른속도로 발전하여 왔다. 현재 단일클론 항체는 특정한 세포 line을 검색하거나 혈액내 미량의 물질을 검정하는 등 혈청학적 검사가 빈번히 요구되는 분야에 많이 이용되고 있으며, 앞으로는 체내진단 시약의 제조 혹은 암치료제와 같은 면역학적 치료제 제조에 이용될 가능성이 높아지면서 그 수요량도 연간 수 g 단위에서부터 수 kg단위로 증가하는 추세에 있다(1). 따라서 단일클론 항체를 종래의 쥐의 복강이나 roller bottle을 이용하여 생산하던

실험실적 방법에서 벗어나 대형 세포배양기를 이용한 새로운 대량생산 체계가 요구되고 있으며, 생산된 항체의 정제 방법도 large scale에 적합한 정제 기술이 개발되어야 할 것이다.

단일클론 항체를 쥐의 복수로부터 소량 분리 정제할 경우 지금까지는 ammonium sulfate 침전법에 의해 농축시킨 후 항원(2)이나 protein-A(3) 혹은 Blue dye(4)와 같은 ligand를 가진 친화성 크로마토그래피를 이용하여 왔으나, 이들은 많은 양의 단일클론 항체를 빠른시간 내에 처리하는 방법으로는 적합치 못하다고 할 수 있다. Preparative HPLC(5, 6)를 이용하는 방법은 시간적인 문제점을 해결할 수

Key words: Monoclonal antibody, ion-exchange chromatography, purification

*Corresponding author

있으나 우선 고가의 장비를 구입해야 하고 유지비가 많이 들어가는 단점이 있다. 반면에 이온교환 크로마토그래피법은 비교적 손쉽게 장치를 구입할 수 있고 그 이용이 널리 알려져 있으므로, 사용하는 gel matrix를 잘 선택하면 scale-up에 큰 어려움이 따르지 않는다. 다만 이온교환 크로마토그래피법 만으로는 정제에 한계가 있으므로(순도 70-80%의 단일클론 항체를 얻을 수 있다.) 한단계 더 정제 과정이 필요한 경우에는 이 과정의 부담을 덜어주고 장치를 소형화 할 수 있는 잇점을 줄 수 있다.

본 연구에서는 단일클론 항체 대량생산 기술개발의 일환으로 음이온교환 크로마토그래피를 이용하여 단일클론 항체의 분리 정제를 시도하여 보았다.

재료 및 방법

세포주와 배양액

β -HCG와 W-HCG로 면역시킨 Balb/c 쥐의 비장 세포와 SP 2/0-Ag14 mouse myeloma를 융합하여 각각 Alps 25-3, A4W, KW 및 HCGK라는 하이브리도마를 얻었다. 배지로는 sodium bicarbonate(44 mM, Sigma), HEPES(10 mM, Sigma), antibiotics(penicillin 100 unit/ml, streptomycin 100 ug/ml, Sigma)와 fetal bovine serum(Gibco) 10%를 첨가한 DMEM(4.5g/l glucose, Gibco), 혹은 IMDM과 Ham's F12(Gibco)를 1:1로 혼합한 배지에 sodium bicarbonate(2.5 mM)와 2% fetal bovine serum(Gibco) 및 1% Nutridoma(Boehringer-Manheim)를 첨가한 것을 사용하였다.

계대배양과 세포배양

세포주의 계대배양은 조직 배양 플라스크(25 cm² or 75 cm², Costa)를 이용하여 CO₂ incubator(5% CO₂, 95% air at 37°C, Lunaire)속에서 행하였다. 대량배양은 세포배양시스템(2L, SET-2CV, SGI)을 이용하였으며 온도, 용존산소는 각각 37°C, 30±10% 포화가 되게 조절하고, pH는 CO₂ gas를 이용하여 7.0±0.05가 되게 조절하였다. 접종규모는 대개 5×10⁴ cells/ml이었다.

항체의 역가측정

ELISA법: 항체 농도가 10 µg/ml 미만인 경우 항체 농도는 ELISA법에 의하여 측정하였다(8). Polystyrene plate(96 wells, Nunc)를 항원(β -HCG, W-HCG; 1 µg protein/ml) 200 µl 용액으로 coating하고 2배씩 희석한 배양액들을 첨가한 후 씻어내고, alkaline phosphate-conjugated goat

anti-mouse IgG(Bio-Yeda)로 반응시킨 후 FNPP(prarnitrophenyl phosphate disodium, Sigma)용액으로 항체의 역가를 측정한다.

SRID법: 항체 농도가 10 µg/ml 이상인 경우 SRID(single radial immunodiffusion)법을 이용하여 항체 역가를 측정할 수 있었다(9). 항체 농도(5-100 µg/ml)에 따라 goat antimouse IgG-antiserum이 0.5-3% 첨가된 agarose gel(1% w/v)에 배양액 5 µl씩을 첨가한 후 24-48시간 상온에서 방치하면 항원-항체의 침전 형태인 'halo'가 형성이 된다. 이 'halo'의 직경을 측정하여 항체의 농도를 계산하였다.

Double immunodiffusion

생성된 항체의 subclass를 결정하기 위하여 Ouchterlony precipitation test법에 의한 Double Immunodiffusion을 행하였다(9). 사용된 antiserum은 goat anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgE 그리고 IgM이었다.

배양액을 1% agarose gel의 중앙 well에 주입하고 차례로 희석된 antiserum을 주위의 well에 주입한 뒤 12-48시간 후 well 주위에 생긴 precipitin을 관찰하였다.

이온교환 크로마토그래피

세포배양이 끝난 배지를 회수하여 원심분리 한 후(8000 rpm, 1시간)상등액을 ammonium sulfate(50% 포화)로 처리하여 침전물을 얻었다. 이를 다시 원심분리(8000 rpm, 1시간)하고 pellet을 0.025 M Tris-HCl buffer(pH 8.2)에 녹인 후 동일한 buffer를 이용하여 투석하였다. 사용된 이온교환 수지는 DEAE-Trisacryl M(IBF)이며 column의 크기는 2.5 cm×25 cm(120 ml), 2.5 cm×6.5 cm(30 ml)의 두 종류를 이용하였다. 수지에 결합된 protein은 0.025 M Tris-HCl buffer에 10-50 mM NaCl이 첨가된 용액으로 step gradient 방법을 이용하여 용출하였다.

친화성 크로마토그래피

이온교환 크로마토그래피법에 의해 정제된 단일클론 항체는 필요에 따라 친화성 크로마토그래피법으로 한단계 더 정제할 수 있었다. 이온교환 크로마토그래피법에서 얻은 anti- β -HCG antibody를 0.5 M sodium chloride가 포함된 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 7.3에 투석한 후 β -HCG가 부착된 Sepharose 4B column(5 ml)에 부하하였다. 동일한 phosphate buffer로 column을 씻어낸 후 0.5 M ammonium hydroxide가 함유된 3 M potassium

thiocyanate용액을 통과시켜 결합된 항체를 용출하였다.

SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)

정제된 항체의 순도를 측정하기 위하여 Laemmli 방법에 따라 SDS-PAGE를 시행하였다. 1.5% SDS 와 2% 2-mercaptoethanol이 포함된 sample solution을 100°C에서 3분간 끓인 후 이 용액 50 μl를 3% stacking gel과 10% running gel로 이루어진 1.5 mm의 slab gel 위에 주입하였다.

전기영동은 15mA에서 bromophenol blue dye가 gel의 바닥에 내려올 때까지 계속하였다. Coomassie brilliant blue R-250 혹은 silver staining kit을 이용하여 protein band를 염색하였다.

결과 및 고찰

단일클론 항체의 생산

Fig. 1은 Hybridoma Alps 25-3의 전형적인 배양 결과를 보여주고 있다. 최고 세포농도는 1×10⁶ cells/ml 전후이고 대수성장기에서 doubling time은 14시간, 총배양시간은 120시간 정도였다. 생성된 항체의 최종농도는 20-25 μg/ml에 달했다. 고농도 배양법을 이용할 경우 최고 세포농도는 4×10⁶ cells/ml까지 증식시킬 수 있으며 생성 항체농도는 80 μg/ml까지 올릴 수 있었다. 생성된 항체의 양은 배

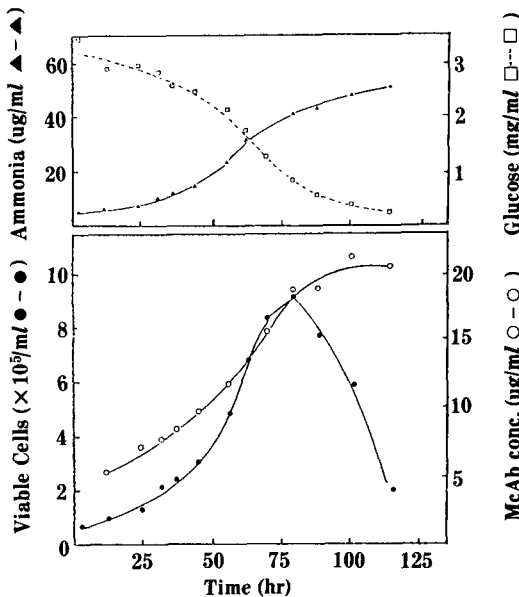


Fig. 1. Production of monoclonal antibody through the *in vitro* culture of hybridoma Alps 25-3 (I/F+2% FBS+1% Nutridoma)

지내의 전체 단백질량의 약 1-3%에 해당하는 수치이다. Double Immunodiffusion 결과에 따르면 Alps 25-3와 HCGK가 생산하는 β-HCG 특이 항체와 w-HCG 특이 단일클론 항체는 모두 subclass IgG1에 해당하는 것으로 확인되었다. (결과생략)

DEAE-Trisacryl M 크로마토그래피

분리를 위한 조건 결정: Corthier(10) 등에 의하면 DEAE-Trisacryl을 이용한 쥐 단일클론 항체의 분리, 정제는 돼지 혹은 소 항체의 그것보다 그 효율이 매우 떨어지는 것으로 보고되었다.

본 실험에서는 쥐 항체와 불순물로 섞여 나오는 Transferrin을 IgG elution 이전에 미리 제거하기 위하여 elution buffer의 pH 및 이온강도를 여러가지로 바꾸어 최적조건을 조사하였다. Fig. 2와 3에 따르면 pH는 8.2에서, NaCl 농도는 30 mM 정도에서 가장 순수한 IgG가 분리되는 것으로 나타났다. 따라서 이

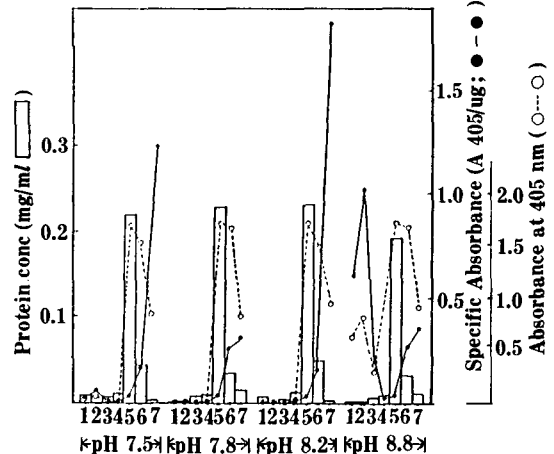


Fig. 2. pH effect on the elution of monoclonal antibody Alps 25-3 from DEAE-Trisacryl M gel matrix

0.1 ml of DEAE-Trisacryl M gel was mixed with dialyzed sample (0.3 ml, 300 μg protein) and a chosen buffer solution (pH 7.5-8.8, 3.7 ml) using rotor torque during 1 hour. Bounded protein was eluted with same buffer solution but containing 0.5 M NaCl. Specific absorbance corresponds to the antibody activity per μg of protein eluted.

- fraction 1; DEAE-Trisacryl M (0.1 ml) + sample & buffer (4 ml) → centrifuge → supernatant → ELISA
- fraction 2; 1st washing with buffer solution → centrifuge → ELISA
- fraction 3; 2nd washing
- fraction 4; 3rd washing
- fraction 5; 1st elution with buffer solution containing 0.5 M NaCl (1 ml)
- fraction 6; 2nd elution
- fraction 7; 3rd elution

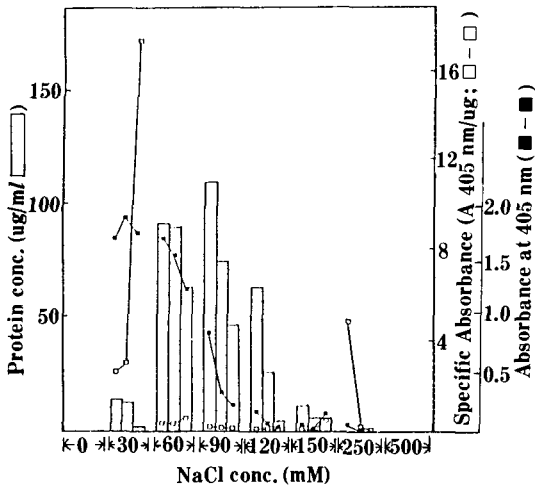


Fig. 3. Salt concentration effect on the elution of monoclonal antibody Alps 25-3 from DEAE-Trisacryl M gel matrix

0.1 ml of DEAE-Trisacryl M gel was mixed with dialyzed sample (0.3 ml) and buffer solution (pH 8.2, 3.7 ml). Bounded protein was eluted three times with a buffer solution containing a given salt concentration. Repeated the same step increasing salt concentration. Specific absorbance corresponds to the antibody activity per μg of protein eluted.

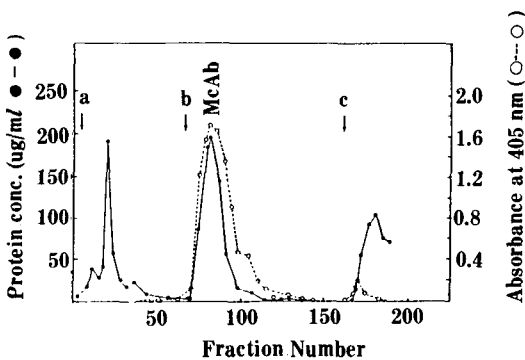


Fig. 4. DEAE-Trisacryl M Chromatography of McAb (β -HCG) from Alps 25-3 culture media (1.2L).

Column size; 2.5×25 cm, Fraction 75 to 95 were pooled.
 a: 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2) containing 20 mM NaCl
 b: 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2) containing 30 mM NaCl
 c: 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2) containing 30 mM NaCl

후의 실험은 이 조건에서 행하였다.

배양조건 및 세포주: 동일한 세포의 배양조건을 바꾸거나 cell line을 바꾸어서 생산된 항체에 대한 분리 조건들을 조사하여 보았다.

우태아 혈청 2%를 포함하는 I/F (IMDM/F12) 배

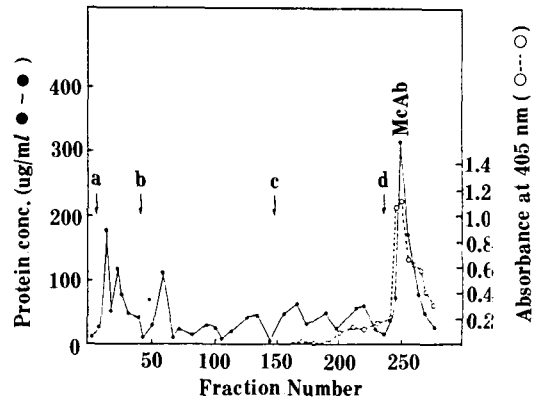


Fig. 5. DEAE-Trisacryl M chromatography of McAb(w-HCG) from HCGK culture media (0.6 L). Column size; 2.5×25 cm Fraction 245 to 265 were pooled.

a: 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2) containing 10 mM NaCl
 b: 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2) containing 20 mM NaCl
 c: 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2) containing 30 mM NaCl
 d: 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2) containing 40 mM NaCl

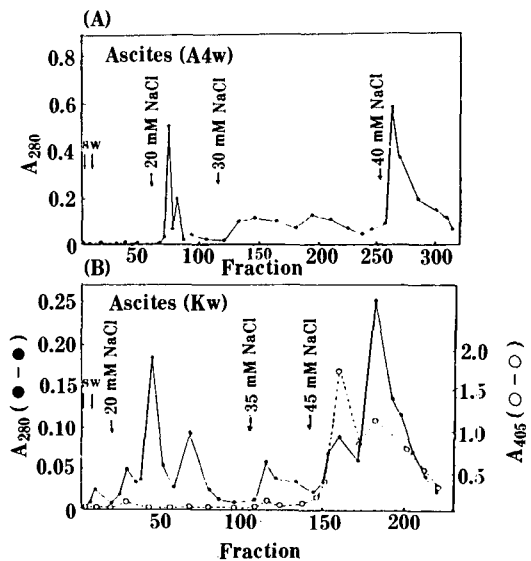


Fig. 6. DEAE-Trisacryl M Chromatography of McAb(α -HCG) from mouse ascite fluid.

Column size; 2.5×25 cm

s: sample loading

w: washing

지에서 Alps 25-3를 회분식으로 배양한 뒤 생산된 β -HCG 특이항체를 포함하는 배지 1.2L를 회수하여 본문의 "재료 및 방법"에서 기술된 바와 같이 처리하

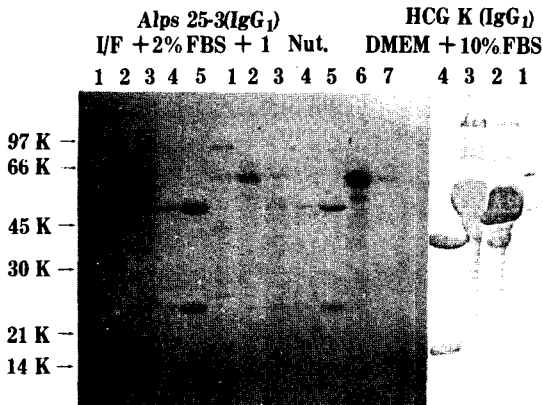


Fig. 8. Electrophoresis pattern.

- Lane 1: Protein marker
- 2: Hybridoma culture media
- 3: Ammonium sulfate fraction
- 4: DEAE-Chromatography
- 5: Sepharose 4B chromatography
- 6: Ultrosor
- 7: Nutridoma

이 항체를 한단계 더 정제할 수 있다. DEAE-Trisacryl M으로 정제된 β -HCG 특이항체 5mg을 본문의 "재료 및 방법"대로 투석한 후 β -HCG sepharose 4B column(5ml)에 부하하고 phosphate buffer로 씻었다. 마지막으로 3M potassium thiocyanate를 포함한 0.5M ammonium hydroxide 용액을 이용하여 항체를 회수하였다(Fig.7 참조). Fig.8은 이온교환 크로마토그래피와 친화성 크로마토그래피로 정제한 IgG를 전기영동하여 본 결과이다. 이온교환 수지로 정제된 항체를 4번 lane에 나타내었고 친화성 크로마토그래피로 정제된 항체를 5번 lane에 나타내었다. 두 가지 경우 모두 IgG의 heavy chain(51 K)과 light chain(25 K)만이 나타나고 있을

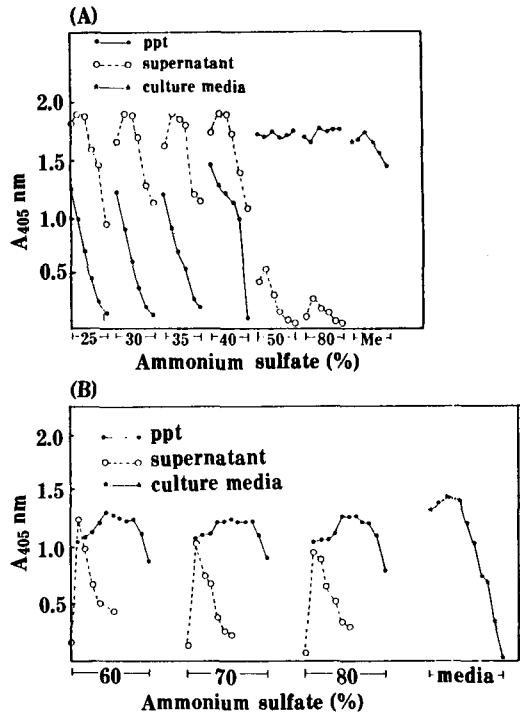


Fig. 9. Ammonium sulfate fractionation for the McAb-purification from cell culture media.

After culture media was treated with various concentrations of ammonium sulfate, activities of McAb of supernatant (---) and ppt (—) obtained from each fractionation were measured using ELISA method. (2 fold dilution)

- (A) Alps 25-3 (DMEM + 10% FBS)
- (B) Alps 25-3 (I/F + 2% FBS + 1% Nutridoma)

뿐 다른 band는 거의 보이지 않았으며, 친화성 크로마토그래피의 경우 IgG가 좀 더 농축된 것으로 나타났는데 실제 이 항체의 순도는 95% 선이었고 최종 회수율은 25%였다.

회수율과 순도 : Fig. 9는 혈청농도 10%의 DMEM

Table 2. Purification of monoclonal antibody from *in vitro* culture media of hybridoma Alps 25-3.

Fraction	Volume (ml)	protein		McAb		McAb/Protein (%)	Yield (%)	Purif. Factor	
		mg/ml	Total (mg)	ug/ml	Total (mg)				
Culture Media	a	392	0.81	318	24	9.4	2.9	100	1
	b	700	1.23	862	77	53.9	6.3	100	1
Ammonium Sulfate (60%)	a	23	5.25	12	342	7.9	6.9	84	2.2
Amicon (PM10)	b	65	4.83	313	760	49.4	15.7	91	2.5
DEAE-Trisacry	a	395	0.02	8.0	16	6.3	80	69	29
	b	980	0.07	68	35	34	50	63	8

*a,b: Alps 25-3 (I/F + 2% FBS + 1% Nutridana)

배지와 혈청농도 2%의 I/F 배지에서 키운 Alps 25-3의 항체를 ammonium sulfate로 처리하였을 때 상등액과 침전물에 존재하는 항체의 농도를 나타낸 것이다. 두 배지의 단백질 함량은 각각 1.16 mg/ml 과 2.11 mg/ml (Table 1 참조)로써 큰 차이를 보이지 않지만, Fig. 9에 의하면 고혈청 배지에서 생산된 항체는 50%의 ammonium sulfate 처리에서 90% 가량 회수되었고(A), 저혈청 배지의 경우에는 60% 이상의 ammonium sulfate 처리에도 상등액 내에 여전히 잔류항체가 있음을 볼 수 있다(B). 따라서 ammonium sulfate 처리에서 항체 회수율을 높이기

위해서는 고혈청 배지를 사용하는 것이 유리하지만 뒤에 크로마토그래피 과정에서 문제가 생기게 되므로 다른 방법에 의한 항체 회수율 증가를 시도해 보았다. 우선 ammonium sulfate의 농도를 증가시키는 방법으로, 저혈청 배지에서 생산된 항체를 60% ammonium sulfate로 침전시켜 보았을 때 항체 회수율은 약 84%까지 증가하였고 ammonium sulfate 농도를 더 증가시켜도 항체 회수율은 더 이상 변화하지 않았다. 이렇게 회수된 항체를 투석한 후 다시 DEAE-Trisacryl M으로 크로마토그래피하여 정제한 결과, 항체의 순도는 80%이고 전체적인 회수율은 67%로서 이는 50% ammonium sulfate로 처리한 경우와 비교해서 순도는 약간 낮아진 반면에 yield는 2배 가량 증가한 셈이다. Table 2는 이 실험결과를 정리한 것이다. 배양액 속의 항체를 ammonium sulfate로 침전시키는 대신 한외여과법(ultrafiltration)을 이용하여 농축하는 방법을 이용해 보았다. Amicon ultrafiltration kit과 membrane PM 10을 이용하여 고농도 배양법에 의해 생산된 700 ml의 배양액을 65 ml까지 10배 정도 농축시켰을 때 항체 회수율은 91%이고 투석이 끝난 sample을 크로마토그래

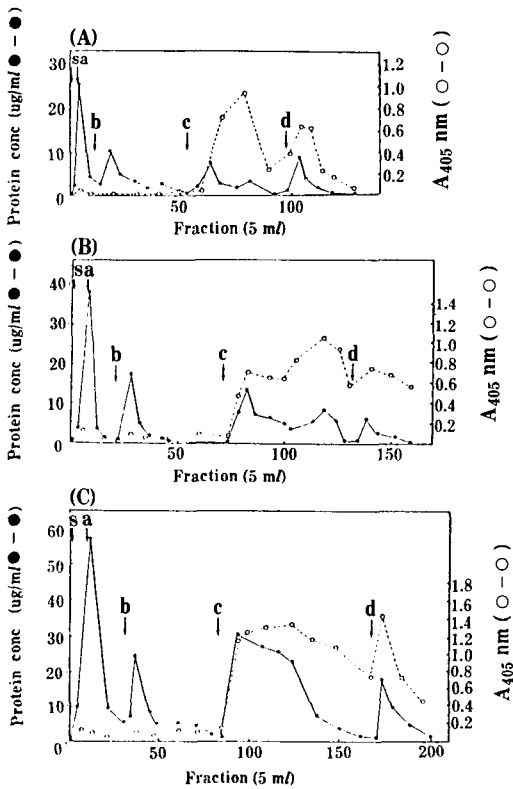


Fig. 10. DEAE-Trisacryl M chromatography patterns according to various loadings of proteins(mg) per DEAE-gel volume (ml) column size; 2.5 × 6.5 cm
 (A) DEAE-Trisacryl M for 2 mg protein/ml gel
 (B) DEAE-Trisacryl M for 4 mg protein/ml gel
 (C) DEAE-Trisacryl M for 8 mg protein/ml gel
 s: Sample
 a: 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2)
 b: 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2) containing 20 mM NaCl
 c: 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2) containing 30 mM NaCl
 d: 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2) containing 40 mM NaCl

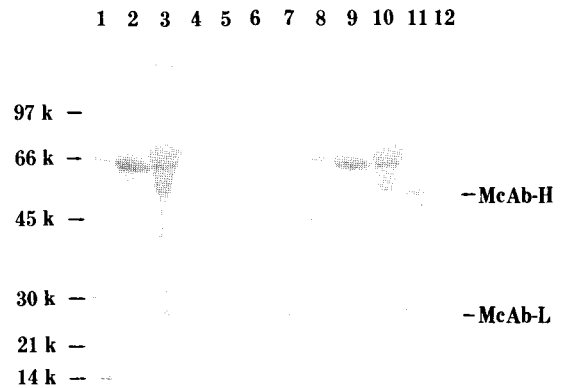


Fig. 11. Electrophoresis patterns
 Lane 1. 8.: protein size marker
 2. 9.: Culture Media
 3. 10.: Ammonium sulfate fractionation (60%)
 4. : DEAE-Trisacryl M Chromatography (2 mg/ml, 30 mM NaCl)
 5. : DEAE-Trisacryl M chromatography (2 mg/ml, 40 mM NaCl)
 6. : DEAE-Trisacryl M chromatography (4 mg/ml, 30 mM NaCl)
 7. : DEAE-Trisacryl M chromatography (4 mg/ml, 40 mM NaCl)
 8. : DEAE-Trisacryl M chromatography (8 mg/ml, 30 mM NaCl)
 11. : DEAE-Trisacryl M chromatography (8 mg/ml, 30 mM NaCl)
 12. : DEAE-Trisacryl M chromatography (8 mg/ml, 40 mM NaCl)

피 하였을 때 항체의 순도와 회수율은 Table 2에 표시한 대로 각각 50%와 63%였다. 정제된 항체를 전기영동 해본 결과 대부분의 불순물은 transferrin으로 밝혀졌다. 이상의 결과로 보아 한외여과법이 ammonium 침전법보다 항체를 농축시키는데 더 효과적이지만, ammonium sulfate 침전 침전법은 일차적인 fractionation 과정에 의해 transferrin과 같은 단백질이 많이 제거된다는 사실을 확인할 수 있었다.

단백질 부하량 : Loading하는 단백질의 양이 크로마토그래피의 performance에 미치는 영향을 조사하기 위하여 protein loading 양을 2, 4, 8 mg/ml-gel로 변화시키며 크로마토그래피 실험을 행하였다. 60% ammonium sulfate로 침전시킨 protein을 회수하여 25 mM Tris buffer로 투석한 후 gel volume 30 ml의 크로마토그래피에 각각 60, 120, 240 mg씩 loading하였다. Fig. 10은 각각을 elution하여 얻은 protein profile이고 Fig. 11은 정제된 항체를 전기영동 해본 결과이다. 2 mg/ml-gel의 경우 protein 양이 작아 확실하지 않으나 다른 불순물 band가 거의 보이지 않았고 4 mg/ml-gel의 경우 순도 80%, 회수율 56%의 항체를 얻었으며, 8 mg/ml-gel의 경우 분리되지 않은 Albumin 등이 포함되어 있어 순도 50%, 회수율 55%의 항체를 얻었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 DEAE-Trisacryl M을 이용한 IgG1 type의 쥐 단일클론 항체의 분리정제는 ml gel당 4-6 mg의 protein을 loading하는 것이 적당할 것으로 보이며, 배양조건이나 cell line에 관계없이 순도 70-80%, 회수율 65%의 항체를 생산할 수 있으므로 100 ml의 gel을 이용할 경우 4-30 mg의 정제된 단일클론 항체를 회수할 수 있다. 더 높은 순도의 항체를 얻기 위해서는 친화성 크로마토그래피나 gel filtration과 같은 2차적인 정제방법을 사용해야 할 것이다.

요 약

하이브리도마를 쥐의 복강이나 *in-vitro*에서 배양한 뒤 생산된 IgG1 type의 쥐 단일클론 항체를 정제하기 위하여 음이온 교환 크로마토그래피를 이용하였다. 배양이 끝난 배지를 원심분리하여 세포를 제거하고 50-60% ammonium sulfate로 침전물을 만든 다음 0.025 M Tris-HCl(pH 8, 2) 용액으로 투석하여

salt가 제거된 sample을 DEAE-Trisacryl M에 부하하였다. Column에 결합된 항체는 30-40 mM NaCl을 포함하는 0.025 M Tris-HCl(pH 8, 2) 용액으로 용출하였다. 혈청농도가 높은 배지(10% FBS)에서는 50% ammonium sulfate 처리로 90% 이상의 항체가 회수되었으나 저혈청 배지(2% FBS)에서는 60% ammonium sulfate 처리에도 회수율이 84%에 그쳤다. 후자의 경우 한외여과법(ultrafiltration)을 이용하여 항체 회수율을 91%까지 증가시킬 수 있으나 농축된 항체를 크로마토그래피로 정제하였을 때 그 순도가 ammonium sulfate 침전법에 비해 낮아졌다. 하이브리도마 Alps 25-3, HCGK, A4W, KW를 여러가지 배양조건에서 배양한 뒤 생산된 항체를 DEAE-Trisacryl M chromatography를 이용하여 정제해 본 결과 대체로 순도 70-80%의 항체를 얻을 수 있었고 이때 항체 회수율은 65% 선이었다. 항체의 순도를 높이기 위해서는 affinity chromatography 혹은 gel filtration과 같은 2차적인 방법이 필요할 것으로 보이며 한 예로 affinity chromatography를 이용하여 순도 95%의 항체를 얻었다.

참고문헌

1. Clark T.J., *Biofutur.*, **44**, 121 (1986).
2. Bazin H. and J.M. Malache, *J. Immunol. Methods*, **88**, 19 (1986).
3. Goding J.W., *J. Immunol. Methods*, **39**, 285 (1980).
4. Bluck C., D. Portetele, C. Glineur and A. Bollen, *J. Immunol. Methods*, **53**, 313 (1982).
5. Juarez-Salinas H., S.C. Engelhorn, W.L. Bigbee, M.A. Lowry and L. Stanker, *Biotechniques*, **164** (1984).
6. Gemski M.J., B.P. Doctor, M.K. Gentry, M.G. Pluskal and M.P. Strickler *Biotechniques* **378** (1985).
7. Fazekas de st. Groth, S.D. Scheidegger D., *J. Immunol. Methods*, **35**, 1 (1980).
8. Butler J.E., Feldbush T.L., McGivern P.L. & Stewart N., *Immunochemistry*, **15**, 131 (1978).
9. Johnstor A. and Thorpe R. *Immunochemistry in practice*, Black well Scientific pub. London, p. 122.
10. Cortier G.E. Boschetti and J. Charley-Poulain, *J. Immunol Method*, **66**, 75 (1984).

(Received July 5, 1988)