

Herpes simplex 2형 바이러스에 대한 단클론항체 생산과 항원 분석

최경은 · 이형환 · 조명환*

건국대학교 이과대학 생물학과

인간을 비롯하여 여러 동물의 생식기와 구강·안구 접촉에 수포성, 괴양성 병변을 일으키는 Herpes simplex 2형 바이러스(HSV-2)에 대한 단클론항체를 하이브리도마 기술을 이용해 생산하였다. 생산된 단클론항체 C-2는 western blotting에서 134, 86 그리고 43 kDa의 분자량을 갖는 항원을 인식하였다. C-2의 isotype은 IgM이었다. SDS-PAGE를 이용하여 HSV-2 단백질 항원을 분리한 결과 25개의 밴드가 분리되었다. 간접 면역 형광항체법에서 단클론항체 C-2가 HSV-2에 감염되어 원형의 다핵 거세포를 형성한 Vero 세포주를 인식하였으며, 이는 HSV-2 항원이 숙주세포에서 발현되고 있음을 알 수 있다. 이 결과는 HSV-2 백신개발의 목표항원이 되는 항원검출과 HSV-2 감염 진단법 개발에 기초가 될 수 있을 것이다.

KEY WORDS □ Herpes simplex virus type 2, monoclonal antibody, antigen analysis

Herpes simplex virus(HSV)는 Herpes simplex 1형 바이러스(HSV-1)와 Herpes simplex 2형 바이러스(HSV-2)로 나뉘며, 이들 두 바이러스들은 형태학적으로 동일하고 대략 50%의 DNA 유사성을 지니고 있긴 하지만, 생물학적, 생화학적, 유전적, 임상적인 면에서 차이점을 지니고 있다(22). HSV-1은 얼굴과 상체부위 감염에 연관이 있고, HSV-2는 생식기 감염과 하체부위 감염에 연관이 있으며(6), 수포성, 괴양성 병변을 일으킨다(19, 29, 30). 초기 감염 후에 HSV-2는 중추신경계와 다른 기관으로 확산되며 신경절내에 있던 잠재성 바이러스가 재활성함으로써 재발된다(8).

초기 생식기 감염의 85%와 재발성 생식기 감염의 95% 이상이 HSV-2에 의한 것으로 나타났고, 생식기 감염의 주요 원인 바이러스가 HSV-2라는 보고가 있으며(7), 2천 5백 만명 이상의 미국 국민이 HSV-2에 감염되어 있어 신생아나 성관계시 바이러스를 확산할 위험을 안고 있다(2, 21). 또한 미국 인구의 16%가 HSV-2에 혈청학적 양성을 나타내며, 최근 조사에 따르면 HSV-2는 인체면역결핍바이러스(HIV)의 전파에 관여하는 공동인자로서 억제해야 할 중요 바이러스성 질병 중의 하나로 보고하고 있다(16).

HSV는 선형의 이중가닥 DNA를 지닌 core와 캡소미어로 이루어진 캡시드와 당단백질 스파이크로 이루어진 외부막 바이러스이다(10, 23, 31). 당단백질은 DNA를 함유한 캡시드가 숙주세포의 핵막을 빠져나올 때 생긴구조로(28) 총 11개의 당단백질-gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL 그리고 gM-들이 외부막의 지질이중막에 위치하고 있다(1, 17). 이들 당단백질들 중 gB, gC 그리고, gD는 HSV에 감염된 세포에서 표현되는 주요 바이러스성 항원으로, 감염 숙주세포의 체액성 면역반응, 보체계 매개 면역반응 그리고 세포

매개성 면역반응들을 일으키기 때문에 HSV의 백신개발을 위한 항원의 연구는 주로 이들 당단백질들이 목표가 되어 왔다(11, 25, 26). 특히 gD는 HSV-1과 HSV-2 사이에서 86% 이상의 동질성을 나타내는 항원단백질(5, 20, 34)로 다양한 형태의 백신연구가 진행되고 있다. HSV-2 gB와 gD의 혼합 백신을 이용한 HSV-2의 방어(3), HSV-2 recombinant gD 소단위 백신을 이용한 genital herpes의 면역반응 유도(4, 9, 33) 등 소단위 백신에 대한 연구와 재조합 백신 바이러스를 이용한 백신연구(13)가 진행되어 왔으며, 재조합 gD에 interleukin-2 융합 단백질을 연결한 형태의 백신(24) 등 다양한 형태의 HSV-2에 대한 백신연구가 보고되고 있다.

이렇게 HSV-2에 대한 백신생산에 많은 노력이 있어 왔으며, 이런 백신개발에 있어 먼저 선행되어야 할 과제는 백신의 목표가 되는 항원 단백질의 연구이다. 따라서 본 연구는 재발 빈도와 심각성이 높은 HSV-2에 대한 단클론항체를 생산하여 항원 분석을 통해 가장 면역성이 높은 항원 단백질을 찾아 백신개발을 위한 항원 분석은 물론 단클론항체를 이용한 HSV-2 감염 진단법 개발연구의 기초자료를 제공하고자 하였다

재료 및 방법

숙주세포배양과 Herpes simplex 2형 바이러스의 증식

숙주 세포 배양에 사용된 기본배지는 Minimum Essential Medium(MEM: Gibco, Inc., Grand Island, N.Y., U.S.A.)에 0.2% sodium bicarbonate를 첨가하여 사용하였으며, 세포 유지를 위한 완전 배지는 기본 배지에 5%의 fetal bovine serum(Gibco, Inc., Grand Island, N.Y., U.S.A.)과 50 µg/ml의 gentamycin reagent solution(Gibco, Inc., Grand Island, N.Y., U.S.A.)을 혼합하여 사용하였고, 바이러스 증식을 위한 완전

*To whom correspondence should be addressed

배지는 기본배지에 2%의 fetal bovine serum과 50 µg/ml의 gentamycin reagent solution을 혼합하여 사용하였다.

HSV-2의 증식을 위해서 75 cm² 조직 배양 용기에 단층으로 자란 세포를 phosphate buffered saline(PBS: pH 7.4)으로 세척한 다음 약 3 ml의 PBS에 0.1-0.01 Multiplicity of Infection(M.O.I)가 되게 바이러스를 감염하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 한 시간 동안 흡착시킨 후 2% MEM을 첨가하여 3-5일 동안 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 세포 파괴현상(cytopathic effect)이 나타날 때까지 배양하였다. 세포파괴현상을 확인한 후 -70°C deep freezer(Ultra-low Temperature Freezer, Operon, Seoul, Korea)에서 한 시간 정도 얼린 다음 상온에서 완전히 녹인 후에 50 ml conical tube에 수집하여 1,700×g에 약 15분 정도 원심분리하였다. 원심분리 후 pellet으로 남아 있는 세포를 제거한 나머지 상층액만을 모아서 만든 HSV-2을 4°C에 사용할 때까지 냉장보관하였다.

Plaque assay에 의한 바이러스의 역가 결정

면역처리를 위한 바이러스의 양을 결정하기 위해 plaque assay를 통해 바이러스의 역가를 결정하였다. 75 cm² 조직 배양 용기에 단층으로 자란 세포를 회수하여 60 mm 패트리 디쉬 각각에 약 1×10⁶의 세포가 들어갈 수 있도록 5% MEM으로 희석한 다음 각 패트리 디쉬에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다. 이를 후 세포가 단층으로 자라면 PBS(pH 7.4)로 단계 희석한 각 바이러스 100 µl씩을 한 시간 동안 감염시킨 후 1-1.5% low melting point agarose(Sigma Chemical Co., St. Louis, M.O., U.S.A.)가 함유된 2% MEM 5 ml를 분주하여 완전히 굳힌 다음 패트리 디쉬를 역상상태로 대략 2-3일 동안 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 plaque이 형성될 때까지 배양하였다. Plaque이 확인이 되면 0.01% neutral red(Gibco, Inc., Grand Island, N.Y., U.S.A.)가 함유된 2% MEM을 분주하여 2시간에서 4시간 정도 염색한 후 plaque의 개수를 세어 바이러스의 역가를 결정하였다.

HSV-2의 농축

Polyallomer ultra-tube에 sucrose cushion 용액(5 mM NaCl, 10 mM EDTA, 25% sucrose) 3 ml를 분주한 다음 4°C에 보관되어 있는 33 ml의 HSV-2를 조심스럽게 분주한다. 바이러스가 분주된 ultra-tube를 SW28 rotor에 넣고 4°C, 100,000×g에서 2시간 동안 초고속 원심분리기(Kontron Instruments, Italy)에서 원심분리한 후 배지상층액과 sucrose cushion 용액을 조심스럽게 버린 다음 바이러스의 농도가 1 ml당 10⁷-10⁸개가 되도록 PBS(pH 7.4)로 희석하였다.

단클론항체 생산을 위한 마우스의 면역처리

면역 처리를 위한 동물은 6주된 암컷 Balb/c 마우스를 이용하였다. 초유과분쇄한 HSV-2(1×10⁸ virus/ml) 0.25 ml과 Complete Freund's Adjuvant(GIBCO, Inc., Grand Island, N.Y., U.S.A.)를 동량 섞어 복강으로 1차 주사하고 3주 후에 1차 때와 같은 수의 바이러스에 동량의 Incomplete Freund's Adjuvant(GIBCO, Inc., Grand Island, N.Y., U.S.A.)를 섞어 다시 복강으로 2차 주사하여 면역처리하였다. 마지막 면역 처리 후 10-14일째 마우스의 꼬리에서 채혈하여 혈청을 얻

은 후 효소흡착면역분석법(ELISA)를 이용하여 면역반응 정도를 확인하였다. 면역처리된 마우스 중에서 가장 좋은 면역반응을 나타내는 마우스를 선택하여 세포 융합하기 3일 전에 100 µl의 HSV-2(1×10⁸ virus/ml)을 마우스 꼬리에 있는 정맥내에 주사하였다.

Thymocyte-conditioned media의 제조

2-3주된 Balb/c 마우스의 흉선을 무균적으로 적출하여 10 ml의 HAT 배지(10% DMEM 배지, HAT supplement: GIBCO, Inc., Grand Island, N.Y., U.S.A.)가 있는 패트리 디쉬내 wire mesh screen 위에 흉선을 놓고 주사기의 끝으로 곱게 갈아서 배지내로 흉선세포가 잘 현탁되도록 하였다. HAT 배지에 잘 현탁된 흉선세포를 50 ml conical tube에 옮겨 400×g에 10분간 원심분리(Brushless D.C. Motor Centrifuge VS-6000, Vision scientific Co., Seoul, Korea)하고 기본 배지로 2회 세척 후 HAT 배지내에 2×10⁶ cells/ml이 들어가도록 현탁시켜 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 48시간 배양한 후 0.22 µm의 미세공여과지로 여과하여 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다.

골수종 세포와 비장 세포

골수종 세포(myeloma cell)를 세포 융합 1주일 전부터 75 cm² 조직배양용기(GIBCO, Inc., Grand Island, N.Y., U.S.A.)에 대량 배양해 두었다가 세포 융합 1일 전에는 완전 배지로 교환하였으며, 세포 융합시 400×g에서 10분간 기본 배지로 2회 세척하여 사용하였다. 비장세포(splenocytes)는 꼬리정맥 주사 후 3일째 되는 날에 마우스를 무균적으로 해부하여 10 ml의 기본 배지가 있는 패트리 디쉬내 wire mesh screen 위에 비장을 놓고 해부가위로 잘게 자른 후 주사기의 끝으로 곱게 갈아서 기본 배지내로 비장 세포를 준비하였다. 50 ml conical tube에 현탁된 세포를 옮겨 400×g에서 10분간 원심분리하고 다시 기본 배지로 2회 세척하여 사용하였다.

세포 융합

준비된 비장 세포와 골수종 세포는 전체 세포수를 측정한다. 다음 50 ml conical tube에 1×10⁷:1×10⁸(골수종세포:비장세포=1:10)의 세포수 비율로 혼합하여 400×g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 완전히 제거한 후 Polyethylene Glycol 1500(Boehringer Mannheim GmbH, Germany) 1 ml을 1분간 한 방울씩 천천히 가한 후 1분간 정치하고 다시 기본 배지 20 ml을 4분간 한 방울씩 천천히 첨가하여 세포 융합을 시행한 후, 300×g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 thymocyte-conditioned media로 현탁시킨 후 24 well 조직배양판에 1 ml씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다.

단클론항체 생산세포 선별

세포 융합 24시간 경과 후 HAT 배지를 각 well당 1 ml씩 첨가하였고, 융합 7일째, 9일째와 11일째는 각 well의 배지를 1 ml씩 제거하고 HAT 배지 1 ml로 교환해 주었으며, 13일째는 각 well의 배지를 모두 제거하고 HT 배지(10%

DMEM 배지, HT supplement: GIBCO, Inc., Grand Island, N.Y., U.S.A.) 2 ml을 넣어주었다. 그 후 2일 간격으로 HT 배지를 1 ml씩 갈아주고, 세포상태를 관찰하여 하이브리도마의 성장을 확인하였다. 색깔변화를 보이는 well의 배지상층액을 건어 ELISA에 의해 항체 형성을 확인하고 양성으로 확인된 well은 한계희석법(limiting dilution)에 의해 클로닝을 실시하였다.

융합세포의 클로닝

스크리닝을 통해 원하는 항체의 생성이 확인된 하이브리도마를 96 well 조직배양판에 한계희석법으로 2차례에 걸쳐 클로닝을 실시하였다. 클로닝할 well의 세포를 모아 기본 배지로 세척한 후 완전 배지로 최종농도가 $1-1.2 \times 10^4$ cells/ml이 되게 조정하였다. 세포현탁액 0.1 ml(10^3 cells/ml)과 완전 배지 4.5 ml을 첨가하여 96 well 조직배양판 첫 세 열에 100 μ l씩 분주하여 well당 22개의 세포가 들어가게 하고 남은 1 ml에 다시 완전 배지 4 ml을 더하여 다음 세 열에 100 μ l씩 분주하여 well당 4.4개의 세포가 들어가게 하였다. 남은 1.4 ml에 다시 완전 배지 1.5 ml을 더하여 96 well 조직배양판의 남은 두 열에 100 μ l씩 분주하여 well당 1-2개의 세포가 들어가게 하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다. 색깔변화를 보이는 well의 세포 상층액으로 ELISA를 시행하여 항체의 분비가 확인이 되면 24 well 조직배양판으로 옮겨 세포를 배양하였다.

효소흡착면역분석법(ELISA)

하이브리도마가 HSV-2에 대한 항체를 생산하는지 확인하기 위하여 ELISA를 시행하였다. 항원은 1 ml당 10^7-10^8 개가 되도록 coating buffer(Na₂CO₃ 1.59 g, NaHCO₃ 2.93 g, NaN₃ 0.2 g, 2차 증류수 1 L, pH 9.6)로 희석한 바이러스를 200 watt에 약 30초간 초음파분쇄하여 96 well EIA plate에 100 μ l씩 분주하여 4°C에서 18시간 동안 정치시켰다. 1% BSA/PBS Tween 20 용액으로 37°C에서 2시간 동안 정치시킨 후 PBS Tween 용액으로 3회 세척한 후 하이브리도마 배양상층액으로 항원-항체반응을 하였으며, 양성 대조군으로는 HSV-2에 면역된 마우스의 항혈청을, 음성 대조군으로는 정상 마우스의 항혈청을 사용하였다. HRP(horse-radish peroxidase)-goat antimouse IgG+IgM+IgA(Sigma Chemical Co., St. Louis, M.O., U.S.A.)가 표지된 2차 항체를 0.5% BSA/PBS Tween 용액에 1:4,000으로 희석하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 PBS Tween 용액으로 3회 세척하여 기질용액(0.1 M citric acid 2.43 ml, 0.2 M Na₂HPO₄ 2.57 ml, 2차 증류수 5 ml, o-phenylenediamine 50 mg, 30% H₂O₂ 5 μ l)을 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 2.5 M H₂SO₄ 용액을 첨가하여 반응을 정지시키고 ELISA Reader(Molecular Devices Co., Menlo Park, California, U.S.A.)를 사용하여 파장 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

하이브리도마의 동결보존

두 차례에 걸친 클로닝을 통해 원하는 항체생성이 확인된 하이브리도마를 동결보존하기 위해 대량 배양시킨 다음, 50 ml conical tube에 세포를 넣어 기본 배지로 400×g에서

10분간 원심분리하여 세척한 다음 상층액을 제거하고 동결용 배지로 1 ml당 1×10^7 개의 세포가 되도록 현탁하여 cryogenic vial(2 ml RB/SS Cryogenic vial, Corning, N.Y., CANADA)에 1-1.5 ml씩 분주하였다. 동결용 배지는 기본 배지에 10% DMSO(Sigma Chemical Co., St. Louis, M.O., U.S.A.)와 40% FBS를 넣어 만들었다. Cryogenic vial을 styrofoam freezing box에 넣고 잘 포장한 다음 -70°C deep freezer에 24시간 보관한 후에 -185°C 액체 질소 탱크(Locator, JR., ThermoLyne, Dubuque, Iowa, U.S.A.)에 옮겨 보관하였다.

단클론항체의 isotype 결정

하이브리도마가 생산하는 단클론항체의 isotype은 mouse monoclonal antibodies subtyping kits(American Qualex, San Clemente, California, U.S.A.)를 사용하여 결정하였다. Plate coating solution 10 ml에 goat anti-mouse immunoglobulin 100 μ l를 잘 섞어 96 well EIA plate의 각 well에 100 μ l씩 분주하여 4°C에서 24시간 동안 정치시켰고 PBS-surfactant로 plate를 세척하였다. Blocking serum을 PBS로 1:4 희석하여 각 well에 200 μ l씩 분주하고 실온에서 1시간 동안 정치시킨 후 다시 PBS-surfactant로 plate를 세척하였다. 8 well column의 각 well에 각각의 하이브리도마 배양상층액 50 μ l를 추가하여 각 column에 각기 다른 하이브리도마 배양상층액이 들어가도록 하였으며 양성 대조군으로서 1:500으로 희석한 정상 마우스 혈청을 이용하여 비교하였다. Plate를 실온에서 1시간 동안 정치시킨 후 PBS로 3회 세척하였고 plate의 각 줄에 rabbit anti-mouse IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM를 두 방울씩 첨가하여 실온에서 한 시간 동안 반응시켰다. 이때 음성 대조군으로서 하이브리도마 배양상층액이 들어있지 않은 well에 PBS-surfactant 100 μ l를 넣어 비교하였다. Isotyping antisera를 넣고 반응시킨 plate를 PBS로 세 번 세척한 후 peroxidase가 표지된 goat anti-rabbit IgG를 PBS로 1:4,000 희석하여 각 well에 100 μ l씩 분주한 후에 실온에서 한 시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 plate를 PBS로 세 번 세척하여 각 well에 TMB 기질용액 100 μ l씩을 넣어 5-10분 동안 발색반응이 진행될 때까지 정치시켰다. 양성 대조군 well이 청색으로 변하면 반응을 중지시키고 Microplate Reader(Molecular Devices Co., Menlo Park, California, U.S.A.)로 655 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

농축한 HSV-2를 sample buffer(1 M Tris-HCl 3.1 ml; pH 6.8, 50% glycerol 5 ml, 10% SDS 2 ml, 2-mercaptoethanol 0.5 ml, 1% bromophenol blue 1 ml, 2차 증류수 0.9 ml)에 희석하여 100°C에서 약 5분간 중탕하여 SDS-PAGE를 위한 시료로 사용하였다. SDS-PAGE는 10%의 separating gel과 5%의 stacking gel로 구성된 불연속 전기영동 시스템을 이용하여 100 volt에서 약 3시간 30분 정도 전개하였다. 분자량 결정을 위해 사용된 standard marker(Bio-Rad, Hercules, California, U.S.A.)는 broad range를 사용하였다. 전개 후 젤은 Coomassie brilliant blue R-250으로 30분간 교반하면서 염색하고 탈색 용액(methanol 100 ml, glacial acetic acid 100 ml,

2차 증류수 800 ml)에 24시간 동안 교반하면서 탈색한 후 HSV-2 항원의 위치와 분자량을 확인하였다.

Western Blotting

Western blotting kit(NOVEX, Japan)를 사용하여, 전기영동한 젤을 nitrocellulose membrane(Hybridization transfer membranes, HybondTM-C, Amersham Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, U.K.)으로 250 mA에서 1시간 동안 transfer buffer(Trizma base 1.93 g, Glycine 9 g, 2차 증류수 1 L)에서 전이시켰다. Standard marker가 전이된 nitrocellulose membrane를 amido black 염색액으로 1분간 염색한 다음 탈색용액(isopropanol 25 ml, acetic acid 10 ml, 2차 증류수 65 ml)으로 탈색하여 단백질 전이를 확인한 다음 western-blot을 진행하였다. 전이된 nitrocellulose membrane를 3% BSA/TBS(Tris-Buffered Saline, 2 M Tris-HCl 5 ml, 4 M NaCl 37.5 ml, 2차 증류수 957.5 ml) 용액이 들어있는 용기에 넣어 상온에서 24시간 동안 교반시킨 후 TBS로 3회 세척하고 하이브리도마 배양상층액을 3시간 동안 교반시키면서 반응시킨 후 TBS로 3회 세척하였다. 0.5% BSA/TBS로 1:2,000 희석한 horse-radish peroxidase conjugated anti-goat mouse IgG+IgM+IgA가 표지된 2차 항체를 37°C에서 1시간 동안 반응시키고 TBS로 3회 세척한 뒤 발색시약(100 ml PBS, 50 mg diaminobenzidine, 10 µl 30% H₂O₂)을 넣어 발색과정을 계속 관찰하면서 발색이 나타나기 시작하면 증류수로 세척하여 반응을 종결시켰다. 다클론항체의 western blotting은 하이브리도마 배양상층액으로 1차 반응을 하는 대신에 마우스의 심장에서부터 채취한 혈청을 0.5% BSA/TBS로 1:100 희석하여 사용하였으며, 그 이후의 과정은 단클론항체의 western blotting 과정과 동일하다.

간접 면역형광항체법(Indirect Immunofluorescent Assay)

HSV-2에 감염된 후 3일이 되어 원형의 다핵 거세포(multinuclear giant cells) 형태를 형성한 Vero cells을 슬라이드 글라스 위에 도말하고 37°C에서 약 30분간 건조시킨 다음 10°C 정도의 acetone으로 15분 동안 고정하였다. 37°C 항온기에서 약 40분 정도 단클론항체로 반응시킨 다음 PBS로 3분씩 3회 세척하여 FITC(fluorescein-isothiocyanate)가 붙어 있는 goat anti-mouse IgG+IgM+IgA(Sigma Chemical CO., St. Louis, U.S.A.) 2차 항체를 PBS에 1:1,000으로 희석하여 슬라이드 글라스 위에 분주하고 37°C 항온기에서 약 20분 정도 반응시켰다. PBS로 3분씩 3회 세척한 후에 mounting buffer(PBS:glycerol=5:1)를 도말부위에 1방울씩 떨어뜨리고 커버 글라스를 덮은 후에 기포를 완전히 제거하여 형광 현미경(Olympus BH-2, Japan)으로 검경하였다. 양성 대조군으로 HSV-2으로 면역처리한 마우스의 항혈청을, 음성 대조군으로 감염되지 않은 Vero 세포를 사용하였다.

결 과

Herpes simplex 2형 바이러스의 감염성

단층으로 배양된 Vero 세포(Fig. 1A)에 HSV-2를 감염시켜 시간별로 관찰한 결과 감염 후 12시간 이후부터 세포변

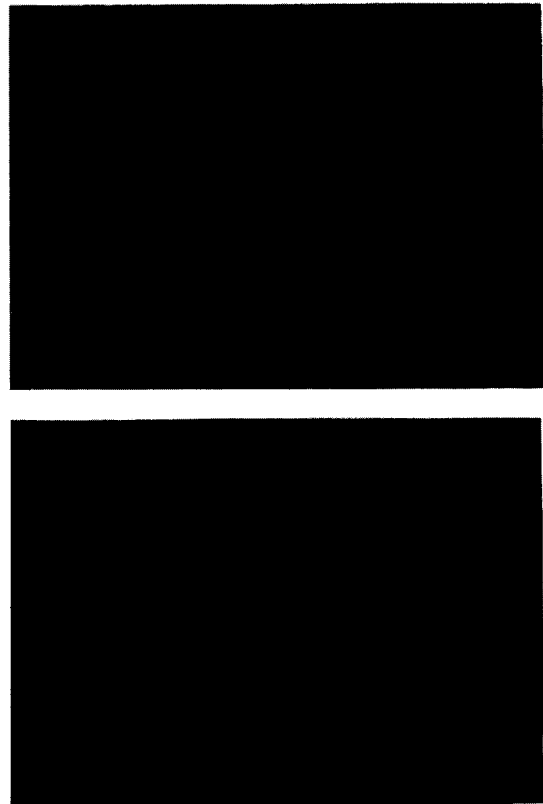


Fig. 1. Intact and infected Vero cells with Herpes simplex virus type 2 under a light microscope ($\times 100$). Intact Vero cells were cultivated with 5% MEM in 5% CO₂ incubator at 37°C (A). After 72 hours of infection with 1×10^8 HSV-2, Vero cells were found dead and formed multinuclear giant Vero cells (B).

성이 관찰되어 감염 24시간이 되어서는 세포 변성이 점차로 확대되어 세포의 형태는 길게 늘어진 섬유아세포들이 원형 형태의 다핵 거세포로 변성하였다. 감염 36시간이 지나서는 세포피(cytopathy)의 형성이 두드러지게 관찰되었으며, 48시간이 되어서는 이런 세포피의 형성이 산발적으로 일어나고 일부 세포는 조직 배양용기로부터 박리되어 세포 배양액에 부유하여 전형적인 세포 변성을 나타내고 있었다. 60시간이 지나면서 거의 모든 세포들의 세포피 형성이 진행되었고, 세포 용해현상을 보이면서 조직 배양용기로부터 떨어져 나와 세포 배양액에 부유하였다. 감염 72시간이 되어서는 모든 세포들이 형태를 알아볼 수 없게 되었으며, 살아있는 세포를 관찰할 수 없었다(Fig. 1B).

단클론항체 생산

선택배지인 HAT 배지의 작용으로 인하여 융합에 실패한 세포들은 수축되면서 형태가 변하였고, 융합에 성공한 세포들은 융합 7일 후부터 밝은 윤기를 내는 콜로니를 형성하면서 성장하였다. 24 well 조직배양판에 170개 well에 분주한 세포들 중에서 159개의 well에서 하이브리도마가 성장을 나타내어 94%의 융합률을 보였다. 하이브리도마가 자라는 well의 배지 상층액으로 ELISA를 시행하여 면역처리한 HSV-2 항원에 대한 항체를 생성하는 하이브리도마를 대량배양하

여 단클론항체를 생산하였다.

단클론항체의 isotype

ELISA 방법을 이용하여 하이브리도마가 생산한 단클론항체의 subisotype을 결정하였다. Mouse monoclonal antibody subtyping kit를 이용하여 ELISA를 시행한 결과 양성대조구인 다클론항체에서는 IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM이 골고루 혼합되어 있는 것으로 나타났으며, IgG1이 가장 많은 비율로 존재하였다. 그리고 단클론항체 C-2는 IgM인 것으로 나타났다.

SDS-PAGE에 의한 항원분석

HSV-2를 10% polyacrylamide gel에서 전기영동한 결과 다양한 항원패턴을 관찰할 수 있었다. 30 Kilodalton(kDa)와 159 kDa 사이에서 25개의 밴드들이 분리되었으며, 분자량은 각각 159, 112, 109, 96, 88, 81, 72, 69, 64, 62, 60, 59, 57, 55, 54, 51, 47, 46, 43, 38, 36, 35, 34, 32, 30 kDa이었다. 이 중 159, 112, 109, 96, 81, 69, 47, 46, 43, 36 kDa의 분자량을 지닌 항원이 주요밴드로 나타났다(Fig. 2).

Western Blotting에 의한 인식항원의 분석

HSV-2로 면역처리한 마우스로부터 얻은 항혈청으로 western blotting한 결과 5개의 항원부위에 항체가 결합하였다.

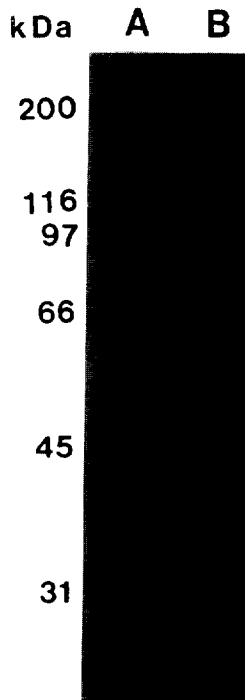


Fig. 2. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of Herpes simplex virus type 2 antigens. The 15 μ l concentrated viruses were subjected to electrophoresis on 10% polyacrylamide slab gel in the presence of 0.1% sodium dodecyl sulfate. The protein bands were stained with Coomassie Blue. The proteins of HSV-2 were separated into about 25 bands between 30 kDa and 159 kDa. Lane A: Standard molecular markers. Lane B: Herpes simplex virus type 2 Strain G (ATTCCVR 734, Rockville, MD).

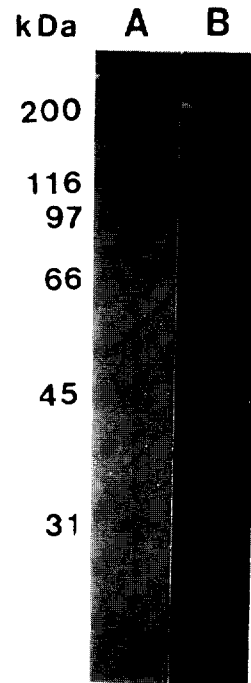


Fig. 3. Western blot analysis of Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) antigens using polyclonal antibody. Viruses were prepared from HSV-2-infected Vero cells and were concentrated by ultracentrifugation. Viruses were then electrophoresed under denaturing conditions, transferred to nitrocellulose membrane, reacted with polyclonal HSV-2 antiserum, and then reacted with horseradish peroxidase conjugated anti-goat mouse IgG+IgM+IgA. Lane A: Standard molecular markers. Lane B: Herpes simplex virus type 2 Strain G(ATTCCVR 734, Rockville, MD).

다클론항체는 227, 112, 53, 43, 40 kDa의 항원과 반응을 하였으며 특히 112 kDa의 단백질 항원을 가장 강하게 인식하였고 그 다음으로 53 kDa의 단백질 항원을 강하게 인식하였다(Fig. 3). 단클론항체 C-2를 사용하여 HSV-2 단백질 항원에 대한 항체반응을 실험한 결과 C-2는 134, 86, 43 kDa를 인식하였으며, 세 인식밴드 중 43 kDa이 가장 강한 항원-항체 반응을 보였다(Fig. 4).

간접 면역 형광항체법

HSV-2에 대한 단클론항체 C-2가 HSV-2에 감염된 숙주세포에 표현된 바이러스 항원을 인식할 수 있는지를 조사하기 위해서 간접 면역 형광항체법을 시행하였다. 감염 72시간 후 섬유아세포 모양의 Vero 세포가 원형의 다핵 거세포를 형성한 숙주 세포에 단클론항체를 반응시킨 결과 원형의 세포에 녹색의 형광을 나타내었으며(Fig. 5), 음성대조군으로 사용한 비감염 숙주세포는 형광을 나타내지 않았다.

고찰

본 연구에서는 HSV-2 감염시 인식되는 항원-항체 반응을 조사하기 위하여 HSV-2에 대한 단클론항체를 생산하여 SDS-PAGE와 western blotting에 의한 생산 항체의 인식부위를

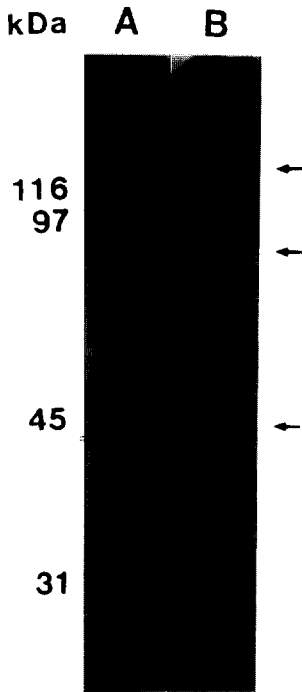


Fig. 4. Western blot analysis of Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) antigens using C-2 monoclonal antibody (mAb). Viruses were prepared from HSV-2-infected Vero cells and were concentrated by ultracentrifugation. Viruses were then electrophoresed under denaturing conditions, transferred to nitrocellulose membrane, reacted with the supernatant of hybridoma cell line secreting mAb against HSV-2 antigen, and then reacted with horse-radish peroxidase conjugated anti-goat mouse IgG+IgM+IgA. HSV-2 antigens of 134, 86, and 43 kDa were recognized by mAb C-2 as indicated by arrows. Lane A: Standard molecular markers. Lane B: Herpes simplex virus type 2 Strain G (ATCCVR 734, Rockville, MD).

결정하여 항원 분석을 실시하였다.

HSV-2 항원의 SDS-PAGE 분석을 통해 바이러스가 지니는 다양한 분자량의 단백질 양상을 관찰할 수 있었다. HSV-2는 100×10^6 분자량을 지닌 외투막 바이러스로 적어도 50개의 단백질 합성을 유도할 수 있는 DNA 바이러스이다(14, 27, 32). Dextran T-10 gradients 상에서 원심분리에 의해 정제된 HSV-2의 항원분석 결과 최소 24개의 단백질들이 존재하며, HSV-2에 의해 감염된 HEp-2 세포의 항원분석 결과 47개의 바이러스성 단백질들이 존재함이 밝혀졌다(32). 본 실험은 sucrose cushion에 의해 농축된 HSV-2를 전기영동하였으며, 그 결과 HSV-2는 30 kDa와 159 kDa 사이에서 25개의 항원들이 분류되었다. 이들 25개의 항원들 중 10개의 항원이 주요 항원으로 나타났으며 분자량은 각각 159, 112, 109, 96, 81, 69, 47, 46, 43, 36 kDa이었다. 주요 항원 10개 중에서도 47, 46, 43, 36 kDa의 분자량을 지닌 항원들이 가장 진하게 나타났으며, 이들 항원들은 HSV-2가 지니고 있는 다른 단백질들에 비해 좀더 효과적이고 훌륭한 면역반응을 유도할 수 있는 항원들이 될 수 있을 것이다. 실제로, 생산된 단클론항체 C-2의 western blotting 결과 43 kDa이 항원-항체결합을 보여주었으며(Fig. 4), 단클론항체도 43 kDa

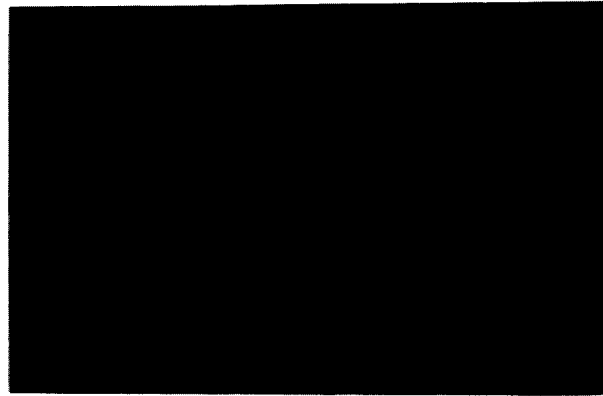


Fig. 5. Immunofluorescence of Vero cells infected with Herpes simplex virus type 2 (HSV-2); A multinuclear giant cell formed after infection of HSV-2 was stained with C-2 monoclonal antibodies specific to HSV-2 in a humid chamber at 37°C for 40 mins and then reacted with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG+IgM+IgA in a humid chamber at 37°C for 20 mins($\times 1000$).

의 단백질 항원을 인식하였다(Fig. 3). 따라서, 이 분자량을 지닌 항원이 HSV-2의 감염시 숙주세포의 면역반응에 관여하는 항원들 중의 하나일 것이다.

다클론항체로 항원인식부위를 관찰한 결과 227, 112, 53, 43, 40 kDa의 다양한 부위에서 항원-항체반응을 보였으며(Fig. 3), 특히 112 kDa 단백질 항원이 가장 강한 항원-항체결합을 보여주었으며, 그 다음으로 53 kDa의 단백질 항원이 강한 인식능을 보여주었다. 다클론항체에 의해 인식된 밴드 중 53 kDa와 40 kDa은 SDS-PAGE상에서는 주요 밴드가 아니었으나, western blotting 결과 아주 진한 밴드를 나타내어 이들 단백질들이 *in vivo*상에서는 강한 면역반응을 유도할 수 있음을 알 수 있다. 생산된 단클론항체 C-2는 134, 86, 43 kDa를 인식하였으며, 세 인식밴드 중 43 kDa이 가장 강하게 결합하는 항원으로 나타나(Fig. 4), 이 항원이 강한 항원-항체반응을 하는 것으로 나타났다. 단클론항체의 인식밴드들 중에서 SDS-PAGE상에서는 나타나지 않았던 134 kDa과 86 kDa들이 western blotting상에서 인식된 점으로 보아 이들 분자량의 단백질항원들은 적은 양으로도 *in vivo*상에서는 강한 항원-항체반응을 유도하여 체내 방어기작에 기여함을 알 수 있다. 단클론항체가 3개의 항원을 인식하는 것은 이들 항원들이 공통의 항원결정기를 갖고 있음을 알 수 있다.

HSV-2에 대해 생산된 단클론항체가 HSV-2에 감염된 숙주세포에 표현된 바이러스 항원을 인식하는지를 알아보기 위해 간접 면역 형광항체법을 시행한 결과 원형의 다핵 거세포를 형성한 감염 숙주 세포에 단클론항체가 결합하여 강한 항원-항체반응을 나타내었다(Fig. 5). 이는 감염세포의 원형질막에 감염 전과 후에도 모두 존재하는 숙주세포 단백질과 감염 후에만 존재하는 바이러스성 단백질들이 존재하기 때문이며(12), 또한 바이러스 감염 후 숙주 세포의 단백질 합성과 glycosylation이 멈추고 바이러스성 단백질의 합성과 glycosylation으로 대체되어(15) 숙주 세포표면에 다량의 바이러스성 단백질들이 표현되기 때문이다. 바이러스의 생활

사에서 알 수 있듯이 HSV-2로 감염되어 원형의 다핵거세포를 형성한 숙주세포를 HSV-2에 대한 단클론항체가 인식할 수 있었던 것은 숙주세포가 HSV-2에 감염이 되어 숙주세포의 원형질막에 많은 바이러스성 항원들이 표현되었기 때문이다(12).

따라서, 간접 면역 형광항체법의 결과에서 알 수 있듯이 생산된 단클론항체 C-2는 HSV-2 감염을 빠르고 정확하게 진단할 수 있는 진단 kit로서의 응용을 기대해 볼 수 있다. 그리고, HSV-2에 대한 항원 단백질의 분석과 생산된 단클론항체에 의한 항원 단백질의 면역성 조사는 HSV-2 백신개발의 목표항원이 되는 항원 검출에 기초가 될 수 있을 것으로 사려된다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 특정기초연구(96-0401-11-01-3) 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Baines, J.D. and B. Roizman. 1993. The UL10 gene of herpes simplex virus 1 encodes a novel viral glycoprotein, gM, which is present in the virion and the plasma membrane of infected cells. *J. Virol.* **67**, 1441-1452.
- Brown, Z.A., J. Benedetti, and R. Ashley. 1991. Neonatal herpes simplex virus infection in relation to asymptomatic maternal infection at the time of labor. *N. Engl. J. Med.* **324**, 1247-1253.
- Burke, R.L. 1991. Development of a herpes simplex virus subunit glycoprotein vaccine for prophylactic and therapeutic use. *Rev. Infec. Dis.* **13**(Suppl 11), S906-911.
- Burman, P.W., P.E. Vogt, T. Gregory, L.A. Lasky, and E.R. Kern. 1988. Efficacy of recombinant glycoprotein D subunit vaccines on the development of primary, recurrent, and latent genital infections with herpes simplex virus type 2 in guinea pig. *J. Infec. Dis.* **157**, 897-902.
- Campadelli-Fiume, G., S. Qi, E. Avitabile, L. Foa-Tomasi, R. Braquadimarti, and B. Roizman. 1990. Glycoprotein D of herpes simplex virus encodes a domain which precludes penetration of cells expressing the glycoprotein by superinfecting herpes simplex virus. *J. Virol.* **64**, 6070-6079.
- Chandler, R., M.D. Dawson, and T. Birgitta. 1976. Herpes simplex eye Infections: Clinical manifestations, pathogenesis and management. *Sur. Ophthalmol.* **21**, 121-135.
- Corey, L., H.G. Adams, Z.A. Brown, and K.K. Holms. 1983. Genital herpes simplex virus infections; clinical manifestations, course and complication. *Ann. Intern. Med.* **98**, 958-972.
- Corey, L. and P.G. Spear. 1986. Infections with herpes simplex viruses. *N. Engl. J. Med.* **314**, 686-691, 749-757.
- Fleck, M., J. Podlech, K. Weise and D. Falke. 1994. A vaccinia virus-herpes simplex virus glycoprotein B1 recombinant or an HSV vaccine overcome the HSV type 2 induced humoral immunosuppression and protect against vaginal challenge in BALB/c. *Med. Microbiol. Immunol.* **183**, 87-94.
- Furlong, D., H. Swift and B. Roizman. 1972. Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core. *J. Virol.* **10**, 1071-1074.
- Glorioso, J., M.S. Szezesiul, S.D. Marlin, and M. Levine. 1983. Inhibition of glycosylation of herpes simplex virus glycoproteins: Immunogenicity and antigenicity of partially glycosylated glycoproteins. *Virology* **126**, 1-18.
- Heine, J.W., P.G. Spear, and B. Roizman. 1972. Proteins specified by Herpes simplex virus. VI. viral proteins in the plasma membrane. *J. Virol.* **3**, 431-439.
- Heineman, T.C., B.L. Connelly, N. Bourne, L.R. Stanberry, and J. Cohen. 1995. Immunization with recombinant Varicella-Zoster virus expressing herpes simplex virus type 2 glycoprotein D reduces the severity of genital herpes in guinea pig. *J. Virol.* **69**, 8109-8113.
- Honess, R.W. and B. Roizman. 1973. Proteins specified by herpes simplex virus. XI. Identification and relative molar rates of synthesis of structural and nonstructural herpes virus polypeptides in the infected cell. *J. Virol.* **12**, 1347-1365.
- Honess, R.W. and B. Roizman. 1975. Proteins specified by Herpes simplex virus. XIII. Glycosylation of viral polypeptides. *J. Virol.* 1308-1326.
- Hook, E.W. III, R.O. Cannon, and A.J. Nahmias *et al.* 1992. Herpes simplex virus infection as a risk factor for human immunodeficiency virus infection in heterosexuals. *J. Infec. Dis.* **165**, 251-255.
- Hutchinson, L., K. Goldsmith, D. Snoddy, H. Ghosh, F. L. Graham, and D.C. Jonson. 1992. Identification and characterization of a novel herpes simplex virus glycoprotein, gK, involved in cell fusion. *J. Virol.* **66**, 5603-5609.
- Johnson, R.E. A.J. Nahmias, L.S. Magder, F.K. Lee, C. A. Brooks, and C.B. Snowden. 1989. A seroepidemiologic survey of the prevalence of herpes simplex virus type 2 infection in the United States. *N. Engl. J. Med.* **321**, 7-12.
- Kern, E.R. and L. Glasgow. 1984. Treatment of genital herpes simplex virus infections in guinea pigs. In Rapp, F., ed., Herpesvirus, New York, Alan R Liss, p. 617.
- Lasky, L.A. and D.J. Dowbenko. 1984. DNA sequence analysis of the type-common glycoprotein D genes of herpes simplex virus types 1 and 2 DNA. **3**, 23-29.
- Mertz, G.J., J. Benedetti, R. Ashley, S.A. Selke, and L. Corey. 1992. Risk factors for the sexual transmission of genital herpes. *Ann. Intern. Med.* **116**, 197-202.
- Mindel, A. 1989. The bloomsbury series in clinical science: Herpes simplex virus, Great Britain: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 1-4.
- Morgan, C., H.M. Rose, M. Holden, and E.P. Jones. 1959. Electron microscopic observation on the development of herpes simplex virus. *J. Exp. Med.* **110**, 1148-1150.
- Nakao, M., M. Hazama, A. Mayumi-Aono, S. Hinuma, and Y. Fujisawa. 1994. Immunotherapy of acute and recurrent herpes simplex virus type 2 infection with an adjuvant-free form of recombinant glycoprotein D-interleukin-2 fusion protein. *J. Infec. Dis.* **169**, 787-791.
- Norrild, B., S.L. Shore, and A.J. Nahmias. 1979. Herpes simplex virus glycoproteins: participation in immune cytolysis and their correlation with previously identified glycopeptides. *J. Virol.* **32**, 742-749.
- Norrild, B., S.L. Shore, T.L. Cromeans, and A.J. Nahmias. 1980. Participation of three major glycoprotein an-

- tigens of herpes simplex virus type 1 early in the infectious cycle as determined by antibody dependent cell-mediated cytotoxicity. *Infect. Immun.* **28**, 38-44.
27. **Powell, K.L. and R.J. Courtney.** 1975. Polypeptides synthesized in herpes simplex virus type 2 infected HEP-2 cells. *Virology* **66**, 217-228.
 28. **Roizman, B. and D. Furlong.** 1974. The replication of herpesviruses. In Fraenkel-Conrat, H., R.R. Wagner, eds., *Comprehensive virology* Vol. 3. New York, Plenum Press, p. 229-403.
 29. **Schlitt, M., A.P. Bucher, and W.G. Stroop et al.** 1988. Mortality in an experimental focal herpes encephalitis relationship to seizure. *Brain Res.* **440**, 293.
 30. **Sheridan, P.J. and E.C.J. Hermann.** 1971. Intraoral lesions of adults associated with herpes simplex virus. *Oral Surg. Med. Pathol.* **32**, 390.
 31. **Stannard, L.M., A.O. Fuller, and P.G. Spear.** 1987. Herpes simplex virus glycoproteins associated with different morphological entities projecting from the virion envelope. *J. Gen. Virol.* **68**, 715-725.
 32. **Strand, B.C. and L. Aurelian.** 1976. Proteins of Herpesvirus type 2: 1. virion, nonvirion, and antigenic polypeptides in infected cell. *Virology* **69**, 438-452.
 33. **Straus, S.E., B. Savarese, M. Tigges, A.G. Freifeld, P.R. Krause, D.M. Margolis, J.L. Meier, D.P. Paar, S.F. Adair, D. Dina, C. Dekker, and R.L. Burke.** 1993. Induction and enhancement of immune responses to herpes simplex virus type 2 in humans by use of a recombinant glycoprotein D vaccine. *J. Infect. Dis.* **167**, 1045-4052.
 34. **Wason, R.J.** 1983. DNA sequence of the herpes simplex virus type 2 glycoprotein D gene. *Gene* **26**, 307-312.

(Received April 30, 1997/Accepted June 15, 1997)

ABSTRACT: The Production and Characterization of a Monoclonal Antibody to Herpes simplex Virus Type 2

Kyoung Eun Choi, Hyung Hoan Lee and Myung Hwan Cho (Department of Biology, Kunkuk University, Seoul, Korea)

Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) infects the genital and oral mucosae of human and other animals. HSV-2 infection is a widespread health problem causing various clinical syndromes including oral, genital, and ocular lesions, viral encephalitis, and recurrent diseases. Hybridoma cell lines secreting a monoclonal antibody (mAb) against the HSV-2 were produced by fusing spleen cells of HSV-2-immunized mice with Sp2/O-Ag14 myeloma cells. One hybridoma cell line was established and its monoclonal C-2, IgM, recognized the antigens of 134, 86, and 43 kDa in western blot analysis. In SDS-PAGE analysis of HSV-2 antigens, 25 bands were separated between 30 kDa and 159 kDa. In indirect immunofluorescent assay, mAbs exhibited binding to the virus antigen expressed on Vero cell infected with HSV-2.