알레르기 및 호흡기, 제5권 제2호, pp50 - 60, 1995

58kDa *Mycobacterium tuberculosis* 항원에 대한 단세포군항체의 제조 및 분석에 관한 연구

연세대학교 의과대학 소아과학교실

한부현 · 강혜영 · 김동수 · 이기영

서 론

결핵균은 매우 복잡한 항원구조를 가지고 있고 항원 결정기도 다양하다. 최근 면역학의 발달로 항산균내의 항원을 추출하여 인체내의 면역계에서의 각 항원의 역할 및 상호작용을 연구하는데 급속한 발전을 이루었고 어떤 종류의 항원은 그 분자구조를 밝혀 항체 및 세포 매개성 면역반응에 어떻게 관여하는지 연구되고 있다[1,2]. 이중 인체 내에서 항체반응을 일으키는 결핵 항원에 대해 그에 대한 항체 검사를 이용해 결핵을 진단하려는 시도가 계속되어 왔다. 그 방법으로 보체 결합법(complement fixation test)[3], 적혈구 응집법(hemagglutination test)[4], 침강 및 젤 확산법(precipitation and gel diffusion)[5], 형광항체법(fluorescent antibodies test)[6] 등이 있었고 최근에는 Nassau 등[7], Thoen 등[8] 및 Grange 등[9]은 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)을, Winters와 Cox[10]는 방사면역측정법(RIA, radioimmunoassay)을, Zeiss 등[11]은 방사면역측정법 및 효소표식 면역검사법(ELISA)을 동시에 비교 적용하였다. 효소표식 면역검사법으로 항체 검사를 할 경우 항원으로 이용된 것으로는 배양 여액(culture filtrate)[7], 음파처리 세포(cell sonicates)[9], 전세포(whole cell)[10], 세포벽(cell wall)[10] 외에 PPD[10,11], antigen 5[12,13], antigen 6[15] 등이 알려져 있으며 잘 정제된 항원을 사용해야 더 좋은 진단 효과가 있다고 하여 결핵 환자에서 특이하게 반응을 일으키는 항원을 찾으려는 연구가 지속되고 있다.

이와 같이 결핵의 진단에 관한 여러 가지 방법들이 연구되어 왔으나 실제적으로 임상에서 결핵의 진단은 임상적인 양상, 방사선소견 및

* 본 연구는 1994년도 연세대학교 의과대학 강사연구비와 김재송연구비에 의하여 이루어 졌음.

결핵반응검사 등에 의존하고 있는 실정이다. 물론 결핵이라는 질환은 감염성 질환이기 때문에 가장 정확한 진단 방법은 결핵균을 검체에서 동정해내는 것이다. 그러난 결핵균의 동정은 직접도말검사로 확인이 될 경우에는 문제가 되지 않지만 배양검사를 통해서 진단하려면 많은 시간이 필요하고 환자의 치료는 이러한 배양 결과를 기다릴 수가 없는 실정이다.

이미 1993년에 저자[16]는 결핵특이항원을 찾고자 *M. tuberculosis*에서 perchloric acid로 항원을 추출하였으나 다양한 항원을 가지고 있어서 그 의미가 불확실하였다. 그리하여 저자는 이번에는 *M. tuberculosis*에서 perchloric acid로 항원을 추출한 것에 가열과 ethanol을 처리하여 항원을 더 정제하고 이 항원에 대해 단세포군항체를 제조하고 이 항체의 특성을 조사하며 진단적인 가치를 알아보고자 본 연구를 시도하는 바이다.

연구 방법

1. 항원의 준비

연세대학교 의과대학 임상병리학교실에서 배양하고 있는 *Mycobacterium tuberculosis* 균 600mg에 증류수를 넣어 전체가 20ml가 되게 부유액(suspension)을 만든 뒤 perchloric acid (PCA) 2.6ml와 증류수 17.4ml의 20ml와 섞어 30분 동안 휘저어 섞었다. 이것을 4℃ 4,000-5,000rpm 에서 15분간 원심분리하고 상층액을 취하여 흐르는 물에 16시간 투석하였다. 투석이 끝나면 17,000 rpm으로 30분 동안 4℃에서 원심분리한 후 상층액을 취하여 증류수로 2일 동안 투석하고 냉동건조하였다. 여기서 얻은 냉동건조 항원은 TB-P로 명명하였다. 이항원을 다시 75% ethanol로 처리하고 autoclave하여 얻은 항원을 TB-PBE로 명명하였다.

2. 세포융합

가. 실험동물의 면역

TB-PBE(100 ug/100 ul)를 생후 6-8주된 BALB/c 마우스의 복강에 1차 면역하였다. 1차 감작 후 매 1주 마다 전과 동량의 항원으로 총 4회에 걸쳐 면역하였다. 4차 면역 후 1주 후에 TB-PBE를 꼬리정맥에 100 μg/100ul 주사하였다. 면역한 마우스의 혈청내 항체가는 효소표식 면역검사법(ELISA)으로 확인하였다.

나. 세포융합과 융합된 세포의 선택

Kohler 및 Milstein[17]의 방법을 변형하여 형질세포종(plasmacytoma)세포와 면역한 마우스의 비장림프구를 융합하였다. 형질세포종 세포는 연세대학교 의과대학 미생물학교실에서 계대배양하여 유지하고 있는 hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase(HGPRT) 음성인 P3-X 63-Ag 8. V653(이하 V653라 약함)을 사용하였다.

이 세포주는 우태아혈청 10%, penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100 μg/ml을 넣은 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM, Hazleton, St lexena, KS)배지에 $5x10^5$ 세포/ml가 넘지않도록 1주일에 2-3회 새로운 배지로 갈아주면서 $1x10^5$세포/ml로 세포수를 조정하여 배양하였다. 그 후 융합 조작하기 전에 혈청성분이 없는 DMEM 배지에 세포를 부유시켜 1,200 rpm에서 5분간 원심분리하는 방법으로 3회 세척하여 최종적으로 $1x10^7$세포/㎖를 준비한다.

면역된 비장 림프구를 준비하기 위하여 마지막으로 항원을 정맥주사하여 감작한 3일 후에

마우스를 희생시켜 복강을 개복하고 혈액을 채취한 후 비장을 적출하였다. 적출한 비장을 DMEM 내에서 비장세포를 유출하였다. 유출된 비장세포를 부유시켜 실온에서 5분간 정치한 후 부유된 세포성분만을 회수하였다. 이 세포들을 증류수에 약 5초간 처리하여 적혈구를 제거하고 주로 림프구 성분을 분리하였다. 이 비장림프구를 DMEM으로 3회 세척하고 trypan blue 색소 배제 시험(dye exclusion test)으로 생존세포수를 계산하였다. 최종적으로 $1x10^8$세포의 면역된 비장 림프구를 준비하였다.

준비된 V653세포와 비장 림프구를 같이 섞고 다시 한차례 세척한후 얻어진 원침세포에 37℃ 를 유지하면서 DMEM 배지에 희석된 1ml의 50% polyethylene glycol 4,000(PEG 4,000: Merck)를 한방울씩 1분간에 걸쳐 떨어뜨렸다. 계속해서 1ml의 DMEM을 1분간에 걸쳐 한방울씩 첨가하였다. 이어 5분간에 걸쳐 15ml의 DMEM을 첨가하여 PEG 4,000을 희석하면서 융합반응을 지속시켰다. 1,200 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 15%의 우태아혈청이 함유된 30ml의 DMEM에 융합된 세포만을 선택하기 위하여 HAT 배지(hypoxanthine 13.6㎍/ml, aminopterin 0.174㎍/ml, thymidine 3.87㎍/ml, 우태아 혈청 15%를 첨가한 DMEM 배지)를 100 ul씩 각 well에 첨가하였다. 세포융합 조작 후 제3일, 제5일, 제7일 및 제10일에는 각 well의 배양층액을 100㎕씩 제거하고 동량의 새로운 HAT 배지를 첨가하면서 10-14일간 배양하였다. 융합된 세포의 증식여부를 도립위상차 현미경으로 관찰하여 표시하였다.

다. 항체의 검색

HAT 배지에서 선택배양을 시작한지 10-14일 사이에 배양상층액을 거두어 융합세포가 증식하는 well 중에 TB-PBE 항원에 대한 항체를 분비하는 well이 있는지 효소표식 면역검사법으로 검색하였다.

효소표식 면역검사법의 조건은 우선 TB-PBE를 단백질 농도 4.7㎍/ml이 되도록 pH 9.6, 0.05M carbonate 완충용액(pH 9.6)에 희석하여 polystyrene 효소표식 면역검사판(Immunoplate, Nunc. Denmark)에 100㎕/well씩 분주한 후 37℃에서 18시간 방치하였다. 항원이 부착된 효소표식 면역검사판을 세척액 PTN (0.01M 인산완충용액; 0.05% Tween 20)으로 3회 세척한 후 PTNB (0.01M 인산완충용액, 0.05% Tween 20, 1% bovine serum albumin)로 37℃에서 1시간 반응시켜 여백을 차단하였다. 다시 PTN으로 세척한 후 세포배양액을 100㎕/well씩 넣고 37℃에서 1시간 반응시켰다. PTN으로 3회 세척 후 PTNB 1:1000으로 희석한 peroxidase conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins(Cappel, Malvern, PA)를 100㎕/well씩 넣고 37℃에서 1시간 반응시켰다. PTN으로 3회 세척 후 기질용액(0.4mg/ml O-phenylenediamine hydrochloride in phosphate-citrate buffer, pH 5.0)을 100㎕씩 넣고 실온에서 20분간 반응시켰다. 그후 정지용액(2N H_2SO_4)을 50㎕씩 첨가하여 반응을 정지시키고 효소표식 면역검사 판독기(Dynatech MR 300, Alexandria, VA) 파장 490nm에서 각 well의 흡광도를 측정하였다.

3. 단세포군 항체의 특성관찰

가. 항체의 특이성에 대한 검정

TB-PBE에 대한 단세포군 항체를 분비하는 well의 융합 세포는 24 well 배양판에 옮겨

HAT 배지에서 배양하면서 세포수를 늘렸다.

24 well에서 증식되는 융합세포가 생산하는 항체의 특이성을 알아보고자 각 well의 배양액을 취하여 TB-PBE 항원에 대한 반응 양상을 효소표식 면역검사로 분석하였다.

나. 세포 클론닝(cell cloning)

TB-PBE에 대해서 높은 흡광도를 보이는 수개의 well 내 융합세포는 무한대 희석법(limiting dilution)으로 클로닝하였다. 즉 well 당 0.1-0.3개의 세포가 들어가도록 희석, 분주하여 배양하였다. 한 well에서 증식하는 세포가 하나의 세포에서 분열하여 증식하는지 관찰하면서 약 2-3주간 배양한 후 다시 항체생성유무를 검색하였다.

다. Isotype 의 결정

Isotyping Kit (Hyclon, Kiding, Oxford)를 이용하였다. 먼저 goat anti-mouse immunoglobulins을 ELISA 판에 넣고 4℃에서 18시간 방치하였다. 이를 세척액으로 3회 세척한 후 subclass specific rabbit anti-mouse immunoglobulin(IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgA)을 각각 희석하여 넣었다. 그후 다시 peroxidase conjugated goat anti-rabbit Ig G(heavy and light chain specific)를 넣어 1시간 반응시키고 3회 세척한 후 기질용액을 반응시킨다. 그 후 1N HCl을 50㎕씩 첨가하여 반응을 정지시키고 490nm에서 각 well의 흡광도를 측정하였다. 흡광도가 0.2 이상인 것을 양성으로 판정하였다.

4. 항원의 분석

가. SDS-PAGE

TB-PBE의 SDS-PAGE를 이용한 항원 분석을 하였다. 이를 요약하면 겔의 농도는 15%를 사용하였고 stacking gel은 4% 농도로 하였다. TB-P를 2%(wt/vol) SDS, 5%(vol/vol) 2-mercaptoethanol, 0.02%(wt/vol) bromophenol blue가 함유된 0.06M/L Tris HCl(pH 6.8)에 녹여 100℃에 3분간 처리하여 34mA로 전기영동을 시행하였다. 4시간 전기영동을 한 후에 Coomassie brilliant blue staining을 하였고 분자량은 저분자량의 표준단백(Bio Rad. Lab., Richmond, CA)에 의거하여 계산하였다.

나. 단백질의 전기영동법에 의한 이행과 항원의 면역검출(enzyme-immunoelectrotransfer blot pattern, Western blotting)

Towbin 등[18]의 방법에 의하여 전기영동이 끝난 TB-P 및 BCG 단백질을 0.45 ㎛ 니트로셀루로스막(Millipore, Bedford, MA)에 70 Volt, 5시간 동안 이행시켰다. 전이가 끝난 후 표준분자 단백질이 있는 곳은 잘라 염색액(0.01% india ink in 0.3% PBS-Tween)으로 비특이 염색하였다. 항원이 전이된 니트로셀루로스막은 10% 메탄올이 함유된 PBS에 1시간 동안 세척한 후 3% bovine serum albumin(Sigma, St. Louis, Mo.)이 함유된 10 mM Tris buffer에 2시간 동안 담구었다. 이것을 다시 0.9% NaCl로 세척한 후 실온에서 건조시켰다. 단세포군 배양상청액에 16시간 동안 담근 후에 0.1% Tween 20이 함유된 PBS로 3시간 세척하였다. 위와 같은 방법으로 세척하고 1:1000으로 희석된 peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG(Cappel, Malvern, PA)를 다시 2시간 반응시켰다. 다시 세척한 후 기질 용액(pH 7.2 인산완충용액 100 ml에 diaminobenzidine 50mg, 30% H_2O_2 10㎕를 넣음)에 반응시켜 10분 이내 발생되는 정도를 보아 증류수로 반응을 끝냈다. 반응이 나타난 띠부위는 표준단백질과 비교하

여 분자량을 결정하였다.

5. 간접면역형광법(Indirect immunofluorescence)

선택된 단세포군 항체와 반응하는 항원의 *M. tuberculosis* 균내 존재를 확인하기 위해 균을 슬라이드 위에 아세톤으로 고정시키고 0.01 M 인산완충용액 및 증류수로 각각 10분간 세척한 후 단군 항체가 들어있는 융합세포 배양상청액을 원액 그대로 37℃ 배양기에서 1시간 반응시켰다. 음성 대조군(negative control)으로 인산완충용액과도 반응시켰다. 반응후 다시 인산완충용액 및 증류수로 세척하고 여기에 우혈청알부민이 0.5%가 포함된 인산완충용액으로 희석한 FITC conjugated anti-mouse Ig (1:40)을 넣어 37℃에서 1시간 반응시켰다. 그 후 다시 세척하고 비특이적 반응을 줄이고자 0.5% Evans blue에 5분간 넣어두었다. 세척한 후 대기 중에서 완전히 말리고 여기에 glycerine을 적하한 후 Leitz Dialux 20 형광현미경으로 관찰하였다. 같은 방법으로 결핵균 이외에도 *M. bovis* BCG, *M. scroflaceum*, *M. gordonei*와 음성대조군으로 *Staphylococcus aureus*와 *E. coli*도 염색하였다.

결 과

1. 세포융합성적

TB-PBE로 면역하여 세포융합에 사용된 5마리 BALB/c 마우스의 혈청내 항체가를 ELISA로 측정한 결과 항체역가가 0.8 OD가 넘어서, 이 마우스들은 TB-PBE항원에 면역이 되었음을 확인할 수 있었다.

총 5차례 세포융합을 하였으며 매 융합시 세포부유액을 3개의 96 well 세포배양판에 분주하고 HAT 배지에 선택배양하였다. 융합률은 분주된 well의 10%에서 61%까지 융합시마다 차이가 많았다. 융합된 세포의 증식이 확인된 경우는 총 211 well에서 관찰되었다. 융합된 세포가 TB-PBE에 대한 항체를 분비하는지 알아보고자 융합세포가 증식하고 있는 76 well의 배양상청액을 ELISA로 측정하였다. 면역한 마우스의 혈청을 1:200으로 희석하여 측정한 흡광도 1.0을 기준으로 하였을 때 0.3 이상의 양성으로 판정된 well은 모두 12개로, 융합세포가 관찰된 well의 5.7%에 해당되었다.

2. 단세포군 항체의 특성관찰

1) 항체의 특이성

일차검색결과 TB-PBE에 대한 항체를 분비하는 12 well의 세포를 24 well의 배양판으로 옮겨 HAT 배지로 배양하면서 TB-PBE 항원에 대해 반응을 계속 나타내는지 검색하고 다시 25ml 배양 플라스크에 옮겨 세포수를 증식시켰다.

2) 클로닝 결과 및 isotype

위 과정에서 선택된 후 클로닝에 성공한 융합세포군의 수는 6개였으며 이들의 isotype는 모두 IgM이었다(Table 1).

Table 1. Isotypes of Anti-TB-PBE Monoclonal Antibodies Assayed by ELISA

Hybridoma clones	IgM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA
Tb Hyb HK-2	0.385	0.074	0.032	0.035	0.045	0.151
Tb Hyb HK-4	0.342	0.065	0.043	0.053	0.041	0.095
Tb Hyb HK-5	0.331	0.059	0.081	0.045	0.055	0.101
Tb Hyb HK-7	0.322	0.088	0.071	0.056	0.054	0.098
Tb Hyb HK-8	0.333	0.075	0.083	0.055	0.062	0.102
Tb Hyb HK-12	0.351	0.091	0.075	0.070	0.079	0.111

3. 항원의 분석

1) SDS-PAGE

TB-P와 TB-PBE의 SDS-PAGE 양상은 Fig.1과 같았다. TB-P는 58kDa 위치에 큰 띠를 보이고 이 항원 이외에 10개 정도의 항원을 보이고 있으며, TB-P를 ethanol과 열처리한 TB-PBE는 58kDa의 단일 띠를 보이고 있었다.

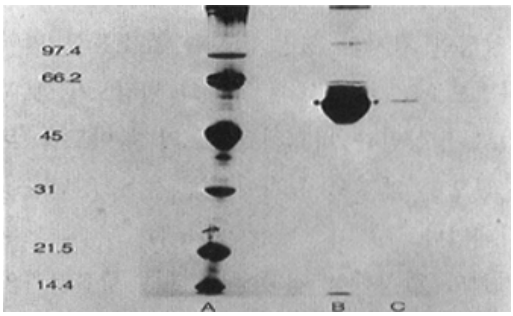

Fig. 1. SDS-PAGE analysis of TB-P and TB-PBE. Lane A : standard molecular weight, Lane B : TB-P, Lane C : TB-PBE

2) 단백질의 전기영동법에 의한 이행과 항원의 면역검출(Western blotting)

TB-PBE를 전기영동 시킨 후 다시 nitrocellulose 종이 위에 옮겨 TB-PBE 추출항원에 대하여 생성된 단세포군 항체중에서 가장 역가가 높은 항체와 반응시킨 결과 58kDa에 얇은 띠를 관찰할 수 있었다(Fig.2).

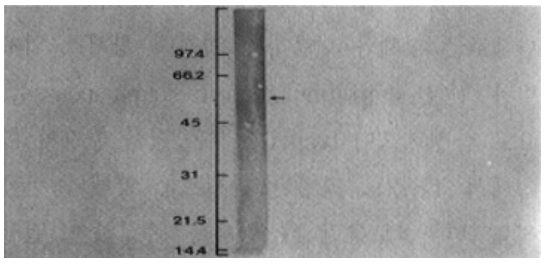

Fig. 2. Western blotting pattern of TB-PBE against monoclonal antibody Tb Hyb HK-2

4. 간접면역형광법

간접면역형광법을 이용하여 단세포군 항체에 반응하는 항원 결정기의 균내 존재를 관찰한 결과 *M. tuberculosis*는 단세포군 항체와 반응함을 확인할 수 있었고(Fig.3) 그 외 *M. bovis* BCG와도 반응하는 것을 알 수 있었다(Fig.4). 또한 *M. scroflaceum*이나 *M. gordonei*와도 교차 반응함을 알 수 있었으나 *Staphylococcus aureus*와 *E. coli*와는 반응하지 않았다(Fig.5).

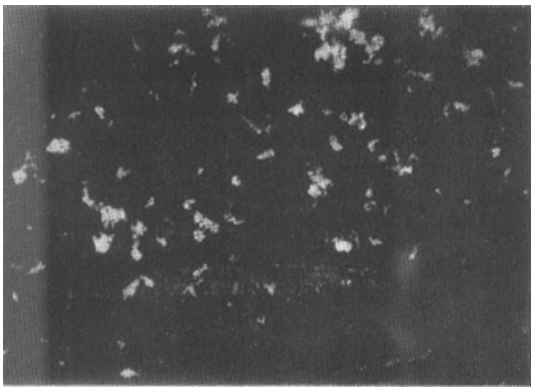

Fig. 3. Immunofluorescence staining of *M. tuberculosis* by a monoclonal antibody Tb Hyb HK-2

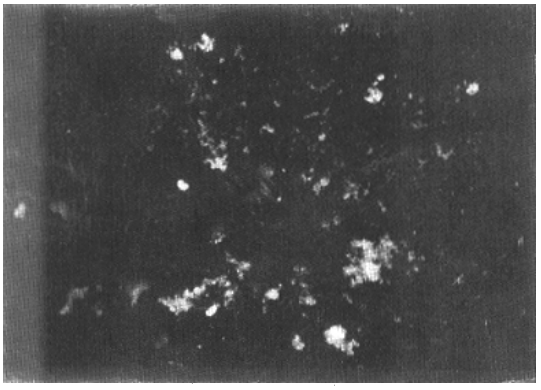

Fig. 4. Immunofluorescence staining of *M. bovis* BCG by a monoclonal antibody Tb Hyb HK-2

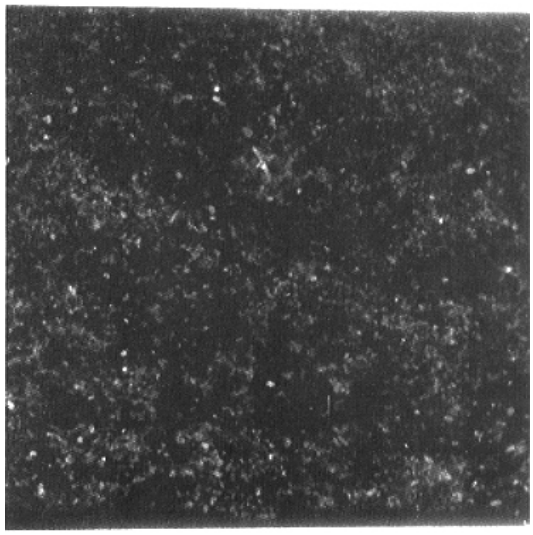

Fig. 5. Immunofluorescence staining of *Staphylococcus aureus* by a monoclonal antibody Tb Hyb HK-2

고 찰

결핵 항원은 그 존재위치에 따라 구분하기도 하는데 항원 단백질이 세포질구성체인지 혹은 능동적으로 분비(active secretion)되는지에 따라 구분하며 음파처리된 균자체(washed sonicated bacilli)와 배양액(culture fluid) 내의 각 항원 단백의 동시 비교로 위치 지표(localization index)를 삼아 항원의 성질을 특성 짓기도 한다. 그러므로 예방 접종시 살아있는 균이 죽은 결핵균보다 방어 면역(protective immunity)에 더 효과적이라고 했는데 이러한 차이는 아마도 살아있는 균에서 능동적으로 분비되는 단백질이 이 면역 과정에 특히 관여하기 때문이라고 추측하기도 한다.

결핵을 진단하는데 혈청학적 방법을 적용하기는 1898년 Arloing[19]에 의해 처음 시도되었고 Nassau 등[7]에 의해 효소표식 면역검사법이 적용되면서 그 절정을 이루었다. Kalish 등[20]에 의한 보고에 의하면 Antigen 5와 PPD를 항원으로 이용해 혈청 검사를 하여 비슷한 결과를 얻었고 Ma 등[6]에 의해 이용된 Antigen 5에 대한 혈청검사도 역시 놀라운 민감도와 특이도를 보여주었다.

Sada 등[21]은 *M. tuberculosis*에서 30kDa의 항원을 추출, 이를 이용해 객담 검사에서 항상균 양성인 환자의 혈청 검사를 효소표식 면역검사법으로 시행한 결과 70%의 민감도를 보여주었고 정상인과 비교해 100%의 특이도를 보여주었으며 폐결핵 환자에서는 높은 진단율을 나타내었다.

결핵의 혈청학적 검사에서 다른 항산균과의 교차 반응을 줄이고 검사의 특이도를 높이기 위해서는 항원의 선택이 중요한 요인이 된다. 효소표식 면역검사시 잘 정제된 항원을 사용할 경우 더 좋은 진단효과를 얻을 수 있다고 하였으며[22] 정제된 항원을 얻기 위한 여러 면역학적 방법과 친화 크로마토그라피(affinity chromatography)외에 이러한 특이 항원을 선택하기 위해 최근에는 단세포군항체를 이용해 항체와 반응하는 항원 결정기를 선택하였는데 38kDa와 14kDa 단백질이 항산균에 특이하게 반응하는 항원 결정기를 가졌다고 보고 되었다[23]. 또한 항원을 따로 정제하지 않고 Hewitt 등[24]은 단세포군 항체와 반응하는 혈청내 항체를 억제방사 면역 측정법(inhibition radioimmunoassay)으로 측정했으며 Ivanyi 등[25]은 결핵 환자의 혈청에서 TB72로 명명된 단세포군 항체와 반응하는 면역글로블린 G 항체를 측정하여 결핵 환자 47명 중 25명에서 양성 결과를 얻었고 42명의 대조군에서는 1명에서만 양성이 나오는 좋은 결과를 얻었다. 현재 이 TB72 단세포군

항체에 의해 인식되는 항원은 Antigen 5와 동일한 것으로 생각되고 있다. 또한 유전자 재조합 방법은 결핵균에서 단백질 항원의 생산을 가능하게 했으며 이 항원에 대한 항체 측정도 혈청학적 진단에 활발히 응용되고 있다.

Daniel[26]은 핵산교잡검사법(nucleic acid hybridization probes), 면역검사법(immunoassay)을 이용한 항원 검사 등과 함께 효소표식 면역검사법을 이용한 혈청학적 진단 방법을 결핵의 유병율이 높고 검사 장비가 제한되어 있는 나라에서 이용하는 것이 가장 바람직하다고 추천하였고 특히 효소표식 면역검사법은 그 방법이 간단하고 검사 비용이 적게 들므로 쉽게 이용될 수 있다고 하였다. 현재 많은 연구자들에 의해 이용되는 항원과 진단을 위한 혈청학적 방법 중 어느 특정 항원이나 방법이 가장 우수한 것인지는 아직 명확하지 않다. 또한 진행된 성인 결핵에서 뿐 아니라 초기 결핵, 폐외 결핵, PPD 양성자, 및 소아 결핵에의 혈청학적 진단 방법의 응용은 완전히 정립되지 않은 상태이다. 그러므로 앞으로는 결핵의 혈청학적 진단을 위해서는 더 나은 항원의 추출 및 쉽게 이용 가능하며 특이도가 높은 방법의 선택이 필요하며 적합한 방법으로 다양한 결핵 임상양상에 적용시키는 것이 절실히 요구되는 바이다.

저자는 이미 perchloric acid를 이용하여 결핵균에서 항원을 추출한 후 이 항원이 결핵특이 항원인지 아니면 이 항원에 대한 단세포군 항체가 결핵의 진단에 어떠한 의미를 가지는지를 조사해 보았으나 이 항원은 복합항원이었기 때문에 보다 정제된 단일 항원을 얻어낼 필요가 있었다. 그리하여 저자는 결핵균을 perchloric acid로 처리하여 항원을 얻고, 다시 이 항원을 알코올과 열처리하여 항원을 제조하고 이 항체의 특성을 조사해 보며 이 항원 결정기가 세균에 위치한 것을 확인하고 이 항원 자체와 항체가 실제로 진단에 있어서 유용성을 가지고 있는지 조사해 볼 목적으로 본 연구를 시도하였다.

그러나 이항원도 역시 기대했던 것과는 달리 결핵균에만 특이한 항원이 아니고 모든 mycobacteria에서 공통적으로 발견되는 항원임을 알수 있었다. 단지 우리가 이 실험에서 얻을 수있었던 것은 결핵균의 수많은 항원 중에서 58kDa의 단일 항원을 추출하는데 있어서 그리 어렵지 않은 방법으로 얻을 수 있었다는 점이다. 물론 이 항원이 결핵균 체내에 존재하는 항원 그 자체의 항원은 아닐 것으로 생각된다. 왜냐하면 perchloric acid와 ethanol 그리고 열처리를 거치면서 이 항원에 많은 변성을 초래하였을 것이기 때문이다. 그럼에도 불구하고 이 항원은 지연성 피부반응을 유도할 수 있는 항원으로 생각되어 변성된 항원임에도 생체내에서 그 항원성을 계속 지니고 있음을 확인할 수 있었다[27]. 또한 본 연구에서 생산된 단세포군 항체는 IgG형을 얻을 수 있기를 고대하고 본 연구를 시행하였으나 모두 IgM형만 생산되었다. IgG형의 단세포군 항체를 얻는다면 이 항체에 Fc 부위를 잘라내고 Fab 부위만 가지고 이것에 방사성 동위원소를 결합시킨다면 생체내 결핵균의 targetting 등을 시도할 수 있을 것이라는 생각에 본 연구를 시도하였던 것이다. 그러나 의외로 IgM 형태만 얻을 수 있었다. 그러므로 이 항원과 항체가 앞으로 결핵균의 연구 및 임상적의의를 조사하는 데 이용될 수 있는지에 대하여는 좀 더 많은 연구가 있어야 될 것으로 사료된다.

참고 문헌

1) Oftung F, Mustafa AS, Shinnick TM : Epitopes of Mycobacterium tuberculosis 65-kilodalton protein antigen as recognized by human T cells. *J Immunol* 141 : 2749-2754, 1988

2) Andersen AB, Hansen EB : Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 57 : 2481-2488, 1989

3) Nassau E, Parsons ER, Johnson GD : The detection of antibodies to Mycobacterium tuberculosis by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Tubercle* 57 : 67-70, 1976

4) Kalish SB, Radin RC, Phair JP, Levitz D, Aeiss CR, Metager E L : Use of an enzyme-linked immunosorbent assay technique in the differential diagnosis of active pulmonary tuberculosis in humans. *J Infect Dis* 147 : 523-530, 1983

5) Balestrino EA, Daniel TM, de Latini MDS, Latini OA, Ma Y, Scocozza JB : Serodiagnosis of pulmonary tuberculosis in Argentina by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) of IgG antibody to Mycobacterium tuberculosis antigen 5 and tuberculin purified protein derivative. *Bull WHO* 62 : 755-761, 1984

6) Ma Y, Wang YM, Daniel TM : Enzyme-linked immunosorbent assay using Mycobacterium tuberculosis antigen 5 for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in China. *Am Rev Respir* 134 : 1273-1275, 1986

7) Nassau E, Parsons ER, Johnson GD : The detection of antibodies to M. tuberculosis by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Tubercle Lond* 57 70, 1976

8) Theon CO, Armbrust AL, Hopkins MP : Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in swine infected with Mycobecterium avium. *Am J Vet Res* 40 : 1096-1099, 1978

9) Grange JM : The humoral immune response in tuberculosis : Its nature, biological role and diagnostic usefulness. *Adv Tuberc Res* 21 : 1-78, 1984

10) Winters WD, Cox RA : Serodiagnosis of tuberculosis by radioimmunoassay. *Am Rev Respir Dis* 124 : 582-585, 1981

11) Zeiss CR, Radin RC, Williams JE, Levitz D, Phair JP : Detetion of immunoglobulin G antibody to purified protein derivative in patients with tuberculosis by radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 15 : 93-96, 1982

12) Daniel TM, Anderson PA : The isolation by immunoabsorbent affinity chromatography and physiochemical characterization of Mycobacterium tuberculosis antigen 5. *Am Rev Respir Dis* 117 : 533-539, 1978

13) Daniel TM : Tuberculin antigens : the need for purification. *Am Rev Respir Dis* 113 : 717-719, 1976

14) Daniel TM, Janicki BW : Mycobacterial antigens : a review of their isolation, chemistry, and immunological properties. *Microbiol Rev* 42 : 84-113, 1978

15) Stroebel AB, Daniel TM, Lau JHK, Leong JCY, Richardson H : Serological diagnosis of bone and joint tuberculosis by an ELISA assay. *J Infect Dis* 146 : 280-283, 1982

16) 김경효, 김동수 : Perchloric acid 분리 M. tuberculosis항원에 대한 단세포군 항체의 제조 및 분석(TB-II). 소아과 36:1116-1123, 1993

17) Kohler G, Milstein C : Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 : 495-498, 1975

18) Towbin H, Staehelin T, Gordon J : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheet: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 76 : 4350-4354, 1979

19) Arloing S : Agglutination du bacille de la tuberculose vraie. *Comptes Rendus de I' Academie de Sciences.* 126 : 1398-1400, 1898

20) Kalish SB. Radin RC, Phair JP, Levitz D, Zeiss CR, Metzger E : Use of an enzyme-linked immunosorbent assay technique in the differential diagnosis of active pulmonary tuberculosis of pulmonary tuberculosis in Argentina by enzyme-linked immunosorbent assay ELISA) of IgG antibody to Mycobacterium tuberculosis antigen 5 and tuberculin purified protein derivative. *Bull WHO* 62 : 755-761, 1984

21) Sada DE, Ferguson LE, Daniel TM : An ELISA for the serodiagnosis of tuberculosis using a 30,000-Da native antigen of Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis* 162 : 928-931, 1990

22) Daniel TM, Debanne SM : The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis* 135 : 1137-1151, 1987

23) Young d, Kent L, Rees A, Lamb J, Ivanyi J L : Immunological activity of a 38-KD protein purified from Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 54 : 177 1986

24) Hewitt J, Coates ARM, Mitchison DA, Ivanyi J : The use of monoclonal antibodies without purification of antigen in the serodiagnosis of tuberculosis. *J Immuno Meth* 55 : 205-211, 1982

25) Ivanyi J, Krambovitis E, Keen M : Evaluation of a monocloonal antibody (TB72) based serological test for tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 54 : 337-345, 1983

26) Daniel TM : Rapid diagnosis of tuberculosis : Laboratory techniques applicable in developing countries. *Rev Infect Dis 11*(suppl 2) : S471-478, 1989

27) 한부현, 김동수, 이기영 : Perchloric acid 가용성 Mycobacterium tuberculosis항원이 말초혈액 림프구 증식에 미치는 영향. 소아알레르기 및 호흡기학회지 4 : 71-83, 1994

- Abstract -

Production and Analysis of Monoclonal Antibody against 58kDa *Mycobacterial tuberculosis* Antigen.

Bu Hyun Han, Hye Young Kang, Dong Soo Kim, Ki Young Lee

Department of Pediatrics, Yonsei University College of Medicine, Seoul Korea

Mycobacteria continue to be responsible for diseases in human and domestic animals worldwide. Though the improved living standards have been accompanied by a progressive decline in cases of tuberculosis, the incidences of disease have remained high in most of the developing countries. A battery of monoclonal antibodies specific mycobacterial antigens would provide a useful tool for rapid diagnosis of mycobacterial diseases. Six monoclonal antibodies to perchloric acid soluble, ethanol extractable and heat stable antigen of *Mycobacterium tuberculosis* were produced. Immunoglobulin isotypes of monoclonal antibodies were all IgM type. By Western blotting, the monoclonal antibody showed a positive reaction with 58 kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein. Besides *Mycobacterium tuberculosis,* this monoclonal antibody was reacted with *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium gordonae, Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium scroflaceum,* but not with *Staphylococcus aureus* and *E.coli.*

Key Words : 58kDa mycobacterial antigen, *Mycobacterium tuberculosis*, Monoclonal antibody