

포도알균 Toxic Shock Syndrome Toxin-1에 대한 단클론항체의 제조와 이의 성상에 대한 연구

박정수¹ · 김재석² · 이종윤³ · 김의중¹

서울대학교 의과대학 검사의학교실¹, 한림대학교 의과대학 진단검사의학교실², 항공우주의료원³

Production and Characterization of Anti-Staphylococcal Toxic Shock Syndrome Toxin-1 Monoclonal Antibody

Jeong-Su Park, M.D.¹, Jae-Seok Kim, M.D.², Jongyoun Yi, M.D.³, and Eui-Chong Kim, M.D.¹

Department of Laboratory Medicine¹, Seoul National University College of Medicine, Seoul; Department of Laboratory Medicine², Hallym University College of Medicine, Seoul; Aerospace Medical Center³, Cheongju, Korea

Background : Recently the association between the virulence factors of *Staphylococcus aureus* and the outcome of the patients infected with the organism appears to be the subject of active investigation. Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) is thought to be a clinically more significant virulence factor than other staphylococcal toxins. We attempted to produce and characterize monoclonal antibodies to staphylococcal TSST-1.

Methods : An important epitope of TSST-1, amino acids 1-15 region, was synthesized into a peptide antigen, and Balb/c mice were immunized by intraperitoneal injection of the synthetic antigen. Hybridomas were produced by fusing immunized murine splenocytes with immortal myeloma cells. Hybridomas were cloned through a limiting dilution method. Stable cultured hybridoma was injected into the peritoneal cavity of Balb/c mice, and peritoneal fluid containing the monoclonal antibody was produced.

Results : One IgG_{2b} type monoclonal antibody and two IgM type monoclonal antibodies were obtained. The IgG_{2b} type monoclonal antibody was able to detect 5 µg of TSST-1 with Western blot analysis and showed a strong reactivity to TSST-1 with ELISA.

Conclusions : Highly immunoreactive anti-TSST-1 monoclonal antibody was produced by the use of synthesized peptide antigen. Diagnostic and protective capacity of this monoclonal antibody should be evaluated in the future. (*Korean J Lab Med* 2008;28:449-56)

Key Words : Monoclonal antibody, Toxic shock syndrome toxin-1, *Staphylococcus aureus*

서 론

Received : July 21, 2008

Manuscript No : KJLM2149

Revision received : September 25, 2008

Accepted : September 25, 2008

Corresponding author : Eui-Chong Kim, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Seoul National University
College of Medicine, 28 Yeongeon-dong, Jongno-gu, Seoul
110-744, Korea
Tel : +82-2-2072-3500, Fax : +82-2-747-0359
E-mail : euichong@snu.ac.kr

*본 연구는 보건복지부의 보건의료기술진흥사업(A050537)의 지원에 의한 결과임.

항색포도알균은 주요 병원균으로서, 균혈증, 폐렴, 심내막염, 창상감염 등을 일으킨다. 특히 균혈증의 경우 적절한 치료에도 불구하고 감염환자의 사망률이 높다. 특히 우리나라 환자에서 분리되는 항색포도알균의 70% 정도가 메티실린 내성이다[1-3]. 또한 최근에는 반코마이신 내성 항색포도알균도 세계적으로 발견되고 있어 향후 항색포도알균 감염에 대한 항생제 치료에 심

각한 문제가 야기될 것으로 예상된다. 이에 구미에서는 황색포도알균 감염치료를 위한 치료용 항체 개발이 활발하게 진행되고 있다[4].

메티실린 내성 황색포도알균은 감염환자의 불량한 예후와 연관되며, 국내 균주의 경우, 포도알균 장독소 C와 toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) 유전자 보유율이 비교적 높은 것으로 보고되었다[5-8]. 특히, TSST-1은 전통적으로 독성쇼크증후군을 일으키는 독소로서, 탐폰에 의한 예처럼 다른 초항원과 달리 접막에서 잘 흡수되어 전신 증상을 신속하게 유발하므로 임상적인 중요성이 다른 병독성 인자에 비해 높다고 판단된다.

TSST-1은 구조적으로 두 영역으로 구분되는데, A 영역은 T 림프구 수용체의 V β 2 부위와 결합하고, B 영역은 항원전달세포의 주요조직적합성복합체 2형 분자와 결합한다[9-11]. 그 결과, T 림프구의 대량 증식과 종양괴사인자알파, 인터루킨-1, 인터루킨-6 같은 염증유발사이토카인의 대량 분비가 유발된다[12-14]. TSST-1이 T 림프구 수용체와 결합하는 두 부위는 α 1-나선구조를 이루는 13-15번 아미노산 부위와 α 2-나선구조를 이루는 132-144번 아미노산 부위이며, 주요조직적합성복합체 2형 분자와 결합하는 부위는 β 1/ β 2 루프구조를 이루는 G31/S32 아미노산 부위이다[15-21]. 이런 결합부위에 돌연변이가 생기면 TSST-1의 T 림프구 증식작용과 세포독성은 감소한다[15-19]. 따라서 이런 결합부위들에 대한 항체는 TSST-1 관련질환의 치료목적으로 활용될 것으로 기대된다. 최근 Gampfer 등[22]은 TSST-1으로 면역한 토끼의 혈청이 TSST-1의 다른 부위에 비해 1-15번 아미노산 부위와 높은 면역반응성을 보이며, 이 부위가 초항원작용에도 관여한다고 보고했다. 따라서 이 부위에 대한 단클론항체는 TSST-1 관련질환의 진단뿐 아니라 치료에도 유용할 것으로 기대된다.

이에 본 연구에서는 TSST-1의 1-15번 아미노산 서열을 가진 펩티드항원을 합성하여 Balb/c 마우스를 면역함으로써, TSST-1에 대한 단클론항체를 제조하고 이의 성상을 분석했다.

재료 및 방법

1. Toxic shock syndrome toxin-1의 펩티드항원 제조

TSST-1의 1-15번 아미노산 부위를 펩티드항원으로 제조했다[22]. 아미노산 서열은 다음과 같다: 1-STNDN IKDLL DW-YSS-15. Thermo Electron Corporation (Bonn, Germany)에서 제조했다. 제조한 항원과 다른 단백질 간의 상동성을 확인하기 위해 National Center for Biotechnology Information

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)의 데이터베이스를 검색했다. Cn3D 프로그램(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D>)으로 TSST-1의 3차원 구조에서 제조한 펩티드항원의 위치를 확인했고 ProtScale 프로그램(<http://kr.expasy.org>)으로 항원의 친수성을 확인했다.

2. 단클론항체를 생산하는 융합세포의 확립

1) 면역

제조한 펩티드항원의 농도가 0.25 mg/mL가 되도록 complete Freund's adjuvant (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 혼합하여 생후 6주의 Balb/c 마우스 암컷 5마리(A, B, C, D, E로 구분)의 복강에 0.4 mL씩 주사했다. 최초 면역화 2주 후 incomplete Freund's adjuvant (Sigma Chemical Co.)와 펩티드항원을 동일한 방법으로 1차 추가면역을 실시하고, 다시 2주 후 2차 추가면역을 하였다. 면역 전과 각 면역 1주 후에 채혈하여 생성된 항체의 역가를 ELISA법으로 측정했다. 제조한 펩티드항원 1 μ g/100 μ L를 96 well 평판의 각 well에 도포한 후 PBS-T (0.05% Tween-20 in PBS)로 세척했다. 면역 전후에 채혈한 혈청을 1:10으로 단계적으로 희석하고 각각의 희석액을 각각의 well에 첨가한 후 실온에서 2시간 반응시키고 PBS-T로 세척했다. Alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG를 2시간 동안 실온에서 반응시키고 인산-P-니트로페닐 기질(50 μ g/50 μ L)을 부가한 후 실온에서 30분간 반응시키고 405 nm에서 흡광도를 측정했다. 면역전 혈청을 세 번 반복 측정하여 평균값에 표준편차의 4배를 더한 값을 항체 양성의 기준으로 삼았다.

2) 세포융합 및 융합세포생성

항체의 역가가 1:1,000 이상인 마우스를 선택하여 2달 후에 최종 면역하고 3일 후 비장을 무균적으로 적출했다. 5 mL Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)이 담긴 페트리 접시에 비장을 넣고 주사기 바늘로 잘게 찢고 철제 채로 곱게 간 후 세척하고 1×10^8 개의 세포를 15 mL 원심분리관에 옮겼다[23]. 형질세포종세포 Sp2/0-Ag14 (ATCC strain # CRL-1581)를 배양하고 세척한 후 1×10^8 개의 세포를 15 mL 원심분리관에 옮겼다. 비장세포와 형질세포종세포 부유액을 50 mL 원심분리관에서 합치고 미리 37°C로 보온한 50% polyethylene glycol 1500 (Sigma Chemical Co.) 500 μ L를 1분에 걸쳐 천천히 가했다. 100 g에서 2분 동안 원심분리한 후, 세척하고 35 mL의 hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) 배지(DMEM, 20%

소태아혈청, 100 μ M hypoxanthine, 400 nM aminopterin, 16 μ M thymidine)를 가한 후 30분 동안 37°C, 8% CO₂에서 배양했다[24]. HAT배지가 융합세포를 선별하는 원리는 배지 내의 aminopterin이 퓨린의 신생합성을 차단하여 비장세포와 융합하지 못한 형질세포종세포는 사멸하는 것이다[25]. 배양한 세포를 6개의 96 well 평판에 100 μ L씩 분주하고 37°C, 8% CO₂에서 배양했다. 바닥에 세포집락이 보이기 시작하면 2일에 한 번 HAT배지를 100 μ L씩 갈아주었다. 집락이 바닥의 1/3을 덮을 때, 상층액을 취하여 ELISA법으로 항체 생성 여부를 확인했다. PBS-T를 세 번 반복 측정하여 평균값에 표준편차의 4배를 더한 값을 항체 양성의 기준으로 삼았다.

3) 융합세포의 클론화

항체 양성인 well의 세포를 HAT배지가 들어 있는 24 well 평판에 옮기고 37°C, 8% CO₂에서 하루 배양했다. HT배지(DMEM, 20% 소 태아혈청, 100 μ M hypoxanthine, 16 μ M thymidine)를 가해서 세포 수가 8개/mL가 되도록 했다. 이 중 100 μ L를 HAT배지가 100 μ L씩 들어있는 96 well 평판의 각 well에 가하고 배양했다. 집락이 바닥의 1/3을 덮을 때, ELISA법으로 항체 생성 여부를 확인했다. 항체 양성인 well의 세포는 클론화 과정을 반복했다. 클론화를 2회 이상하여 집락이 보이는 well의 90% 이상에서 항체 양성일 때, 안정된 단일클론으로 간주했다[26].

4) 단클론항체의 isotype 결정

IgA, IgM, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃를 구분할 수 있는 Amersham Mouse Monoclonal Antibody Isotyping kit (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA)를 사용했다. TBS-T (0.1% Tween-20 in tris buffered saline)로 배양 상층액을 10배 희석한 후 typing strip을 넣고 실온에서 15분 반응한 후, 세척했다. TBS-T로 1:500으로 희석한 horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG를 가하고 30분 반응한 후 세척하고, 4-chloro-1-naphthol 기질을 가하여 30분 반응하고 세척한 후 결과를 판독했다.

5) 단클론항체의 생산 및 정제

ELISA법에서 배양상층액의 흡광도가 가장 높은 단클론항체 생성세포주를 배양하여 생후 6주의 암컷 Balb/c 마우스 20마리에 마우스당 2-3 \times 10⁵개의 세포를 복강에 주사했다. 1주일 간격으로 육안상 배가 부풀어 오른 마우스의 복부에 18게이지 주사바늘을 찔러 복수를 모았다. ProPur Midi G kit (Nunc, Copenhagen, Denmark)를 사용하여 채취한 복수에서 항체를 정제했다.

3. Western blot을 이용한 단클론항체의 TSST-1에 대한 면역반응성 평가

TSST-1 (Sigma Chemical Co.)을 완충액(0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% Glycerol, 1% β -mercaptoethanol)으로 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.025 mg/mL가 되도록 희석하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide (SDS-PAGE) 겔 전기영동한 후 마우스 복강에 융합세포를 주사하고 7일 후 채취한 복수를 이용하여 Western blot 분석을 실시했다[27, 28].

4. ELISA법을 이용한 단클론항체와 비특이적 IgG 대조항체의 TSST-1과 소의 혈청 알부민에 대한 면역반응성 비교

TSST-1 1 μ g/100 μ L를 96 well 평판의 각 well에 도포한 후 PBS-T로 세척했다. 2% 소의 혈청알부민 용액을 동일한 방법으로 다른 96 well 평판에 도포했다. 1:10으로 단계적으로 희석한 300 μ g/mL의 단클론항체와 비특이적 IgG 대조항체에 대해서 ELISA법으로 흡광도를 측정했다. 단클론항체와 비특이적 IgG 대조항체의 TSST-1에 대한 반응성을 비교할 때, 50%의 TSST-1과 결합하는데 소요되는 항체의 양을 상대적 친화력으로 정의하여 비교했다[29].

결 과

1. Toxic shock syndrome toxin-1의 펩티드항원 제조

데이터베이스 검색을 통해 제조한 펩티드항원의 아미노산 서열과 95% 이상 상동성을 보이는 단백질은 TSST-1뿐임을 확인했다. Cn3D 프로그램과 ProtScale 프로그램으로 확인한 결과, 제조한 펩티드항원이 TSST-1의 3차원 구조에서 표면에 위치하고 있으며 친수성임을 확인했다.

2. 펩티드항원에 대한 항체 형성 여부 조사

5마리 중 D와 E 마우스는 채혈 과정에서 폐사했다. 2차 면역 1주일 후 항체역가는 A와 B가 1:100, C가 1:10,000이었다. 3차 면역 1주일 후 항체역가는 A가 1:1,000, B가 <1:100, C가 1:10,000이었다. A와 C 마우스의 비장 세포를 세포 융합에 사용했다(Fig. 1).

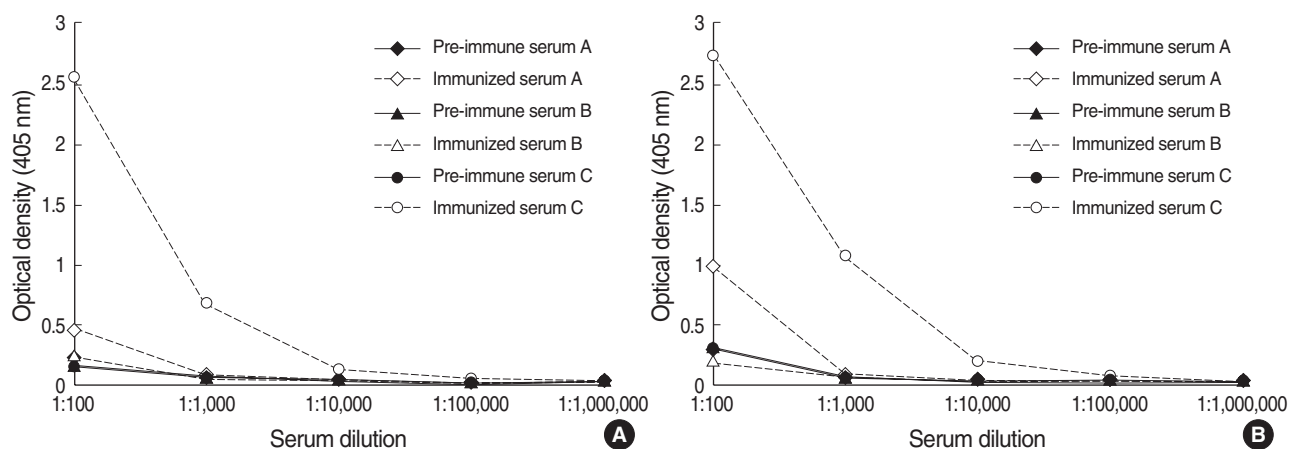


Fig. 1. Titration of sera from 3 mice immunized with 15mer synthetic peptide by ELISA method. (A) Results of 1 week after 2nd immunization. (B) Results of 1 week after 3rd immunization.

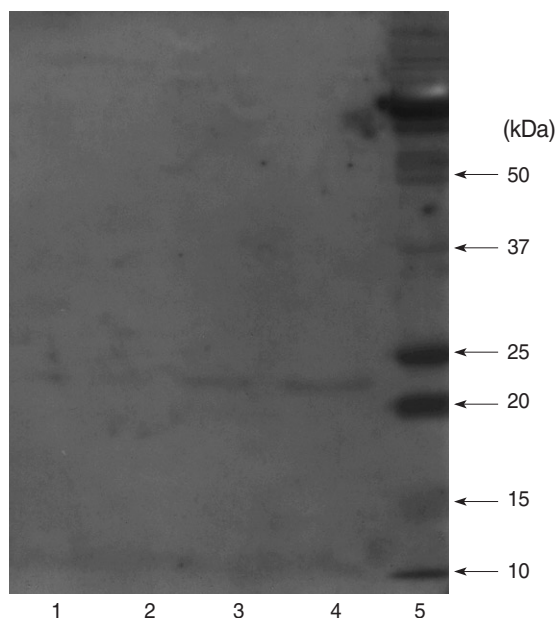


Fig. 2. Western blot analysis of anti-toxic shock syndrome toxin-1 reactivity of the ascites of Balb/c mouse at 7 days after intraperitoneal injection of 1E9 hybridoma. Quantities of purified toxic shock syndrome toxin-1: (0.5, 1, 5, and 10 μ g in lanes 1-4, respectively); Lane 5: molecular weight marker (Precision Plus Protein Standards; Bio-Rad).

3. 세포융합 및 항체를 분비하는 융합세포의 선택

A 마우스 비장세포를 이용한 세포융합에서는 15개 well에서 융합세포 집락을 관찰했다. 그 중 2개 well의 배양상층액에서 항체 양성이어서 클론화를 시도했다. 그러나 2개 well의 세포 모두 클론화 과정에서 배양이 되지 않아서 폐기했다. C 마우스 비장세포를 이용한 세포융합에서는 8개 well에서 융합세포 집

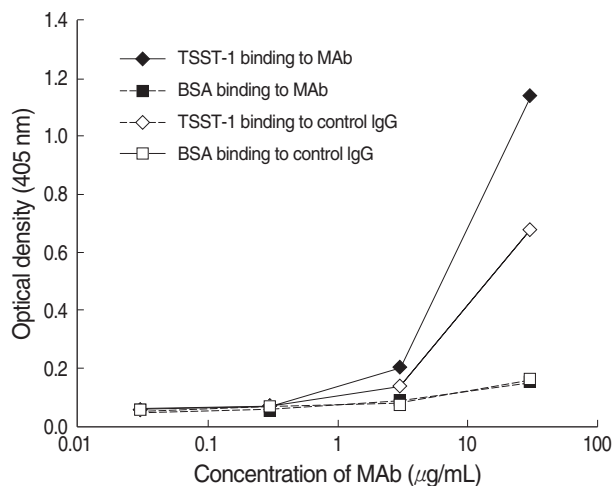


Fig. 3. Relative binding affinity of 1E9 monoclonal antibody and control IgG for toxic shock syndrome toxin-1 and bovine serum albumin by ELISA.

Abbreviations: MAb, monoclonal antibody; TSST-1, toxic shock syndrome toxin-1; BSA, bovine serum albumin.

락을 관찰했다. 그 중 항체 양성인 3개 well의 융합세포를 클론화하여 1E8, 1E9, 4D5 단클론항체생성세포주를 얻었다.

4. 단클론항체의 이형 결정

1E9 단클론항체생성세포주는 IgG_{2b}형이었고, 1E8과 4D5 단클론항체생성세포주는 IgM형이었다.

5. 단클론항체의 대량생산 및 정제

3개의 단클론항체생성세포주 중에서 ELISA법에서 세포배양

액의 흡광도가 제일 높았던 1E9 세포주를 배양하여 20마리의 Balb/c 마우스의 복강에 주사한 결과, 마우스당 4-15 mL, 총 149 mL의 복수를 채취했다. 복수를 정제하여 1 mL당 50 μ g의 항체를 얻었다.

6. 단클론항체의 toxic shock syndrome toxin-1에 대한 면역 반응성 평가

1E9 단클론항체생성세포주 Balb/c 마우스의 복강에 주입한지 1주일 후에 채취한 복수로 Western blot 분석을 시행한 결과, 5 μ g의 TSST-1 수준까지 22 kDa 부위에서 밴드를 형성하였다(Fig. 2). 1E9 단클론항체의 TSST-1에 대한 상대적 친화력은 약 8 μ g/mL 정도이고, 비특이적 IgG 대조 항체의 상대적 친화력은 약 20 μ g/mL 정도이다. 1E9 단클론항체는 소의 혈청 알부민에 대한 교차 반응을 보이지 않았다(Fig. 3).

고 찰

지금까지 이루어진 TSST-1에 대한 단클론항체 연구를 살펴보면, 1987년에 Wells 등[30]이 TSST-1에 대한 단클론항체를 생산하는 융합세포주를 생산하여 기존 검사법보다 빠르고, 민감하며, 간단하게 TSST-1을 검출할 수 있는 효소면역측정법을 개발했다. 이후 Best 등[31]과 Scott 등[32]이 토끼의 독성쇼크증후군 모델에서 TSST-1에 대한 단클론항체가 사망률을 감소시킨다고 보고함으로써 TSST-1 단클론항체가 치료 목적으로 이용될 수 있는 가능성을 보여주었다. Blanco 등[15]은 TSST-1에 대한 단클론항체가 TSST-1의 특정 부위에 결합할 때, T 림프구 증식효과가 감소함을 밝혔다. 이후 Pang 등[33]과 Kum과 Chow[34]는 각각 TSST-1에 대한 단클론항체를 제조하고 TSST-1 뿐 아니라 포도알균 장독소 A와 B의 초항원 작용도 억제함을 밝혔다. 이런 연구 결과들을 통해 TSST-1에 대한 단클론항체가 TSST-1이 T 림프구나 항원전달세포와 결합하는 부위에 부착함으로써 초항원작용을 억제할 것으로 생각된다. 따라서 TSST-1에 대한 단클론항체는 TSST-1 관련질환의 진단뿐 아니라 치료 목적으로도 활용될 것으로 기대된다. 최근에 Gampfer 등[22]이 TSST-1의 다른 부위보다 1-15번 아미노산 부위가 높은 면역원성을 가지며, 초항원작용과도 연관된다고 보고했다. 따라서 이 부위에 대한 단클론항체는 다른 부위에 대한 단클론항체보다 TSST-1에 대한 높은 면역반응성과 초항원 중화능력을 가질 가능성이 크다. 이에 본 연구에서는 TSST-1의 특정 부위인 1-15번 아미노산서열을 가진 펩티드항원으로 Balb/c 마우스를 면

역하여 단클론항체를 제조하고 그 성상을 분석하였다. TSST-1의 일부 펩티드항원을 이용한 TSST-1 단클론항체 제조는 이전에 시도된 적이 없었다. 펩티드항원을 이용한 단클론항체 제조의 장점은 펩티드항원이 전체 항원물질보다 얻기 쉽고, 독성이 없어서 안전하게 다룰 수 있으며, 면역대상 동물에도 독성작용을 일으키지 않는 것이다[35]. 따라서 면역 실패 시에 같은 개체에 재시도가 가능하여 제한된 자원에서 경제적이다. 또한 면역원성이 높은 부위를 선택적으로 이용하므로써 일정한 특이성을 가지고 면역반응성이 강한 항체를 생산할 수 있다.

제조한 펩티드항원으로 3마리의 Balb/c 마우스를 3차 면역한 결과, 두 마리의 혈청에서 1:1,000 이상의 항체역가를 얻을 수 있었다. 일반적으로 1:1,000 이상의 항체역가를 가져야, 면역학적 목적으로 사용될 수 있다. 3마리 모두 동일한 방법으로 면역을 시행했으나, 개체 간 항체역가에 차이가 발생한 기전을 명확히 알 수는 없었다. 그러나 동일한 양의 항원으로 면역을 시행했지만, 미세한 수준에서 각 개체에 일정한 항원노출이 이루어졌다고 단정할 수 없으며, 일정한 항원노출에도 각 개체의 면역반응이 동일하지 않을 수 있으므로, 각 개체에서 형성된 항체의 항원에 대한 반응성에 차이가 있을 것으로 추정된다. 이런 개체 간 면역반응의 차이는 이미 알려져 있다[36, 37].

A 마우스에서는 세포융합에 성공한 15개 well 중에서 2개(13.3%)에서 항체 양성이고, C 마우스에서는 8개 well 중에서 4개(50%)에서 항체 양성이었다. 일반적으로 융합세포 중에서 5-20% 정도가 항원특이적인 항체를 생산하고 30%는 항체를 생산하지 않으며, 그 외에는 비특이적인 항체를 생산한다. 따라서 C 마우스는 일반적인 경우보다 항원특이적인 항체를 생산하는 융합세포의 비율이 높은 것으로 보인다. 그러나 융합세포가 현미경상으로 관찰되지만 육안상 관찰되지 않는 well은 제외하고 전체 융합세포를 계수했기 때문에 상대적으로 항원특이적인 항체를 생산하는 융합세포의 비율이 높게 나왔을 가능성도 있다. 전체 융합세포 중에서 일부만 항원특이적인 항체를 생산하는 이유는 형질세포종세포 중 일부가 항체 생산 능력을 잃어버린 비장세포나 원하는 특이성을 가지지 않는 항체를 생산하는 비장세포와 융합했기 때문이다. 항원항체반응이 높은 well의 융합세포 중에도 이런 비특이적인 융합세포가 섞여있기 때문에, 이를 배제하고 원하는 한 종류의 항체만을 생산하는 순수한 단클론세포를 얻기 위해 클론화 과정을 시행했다. 이후 클론화 과정에서 A 마우스의 융합세포는 모두 배양이 되지 않았다. 그 이유를 명확히 알 수는 없으나, 클론화 과정을 시행하기 전에 융합세포가 충분히 배양되지 않았을 가능성이 있다[38].

클론화를 완료한 세 개의 융합세포 중 하나는 IgG_{2b}형 단클론

항체를 생산하고, 둘은 IgM형 단클론항체를 생산했다. ELISA 법에서 비교적 면역반응성이 좋은 IgG_{2b}형 단클론항체를 생산하는 1E9 융합세포를 20마리의 마우스 복강에 주입하여 일주일에 한번씩 복수를 얻었다. 복수 1 mL를 정제할 때, 50 µg의 항체를 얻을 수 있었다. 이는 문헌상 복수 1 mL당 0.1 mg에서 1 mg의 항체를 얻을 수 있다는 자료에 비해, 적은 양으로서 본 연구에서 제조한 융합세포의 항체 생산 능력이 다소 낮은 것으로 생각된다[23].

제조한 단클론항체는 ELISA법에서 차단제(blocking agent)로 사용한 소의 혈청 알부민과 교차 반응을 보이지 않았다. 따라서 ELISA법에서 단클론항체의 TSST-1에 대한 반응은 소의 혈청 알부민에 대한 반응이 아니라 순수하게 TSST-1에 대한 반응으로 생각된다. 대조군으로 사용한 비특이적 IgG가 TSST-1과 약한 반응을 보인 것은 비특이적 IgG가 혼주혈청으로 제조한 다클론항체이기 때문에 생기는 비특이적 반응으로 생각된다[39].

향후 과제는 본 연구에서 제조한 단클론항체의 시험관 내 TSST-1 중화능력과 생체내 TSST-1 관련 질환의 치료효과에 대한 연구이다. 또한, 다른 특이성을 가진 단클론항체와의 성능 비교도 이루어져야 될 것이다. 아직 국내에서 TSST-1에 대한 치료용 항체뿐 아니라 진단용 항체 개발도 이루어지지 않아 고가의 면역학적 검사키트를 전적으로 수입해서 쓰고 있는 실정에서 본 단클론항체가 향후 TSST-1에 대한 면역진단시약과 치료용 항체의 국내 개발에 이용되기를 기대한다.

요 약

배경 : 최근에 황색포도알균 감염 환자의 예후와 감염을 일으킨 균이 갖고 있는 병독성 인자 간의 연관성에 대한 연구가 활발하다. 특히, toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1)은 임상적인 중요성이 다른 병독성 인자에 비해 높다고 판단된다. 이에 본 연구에서는 포도알균 TSST-1에 대한 단클론항체를 제조하고 이의 성상을 분석했다.

방법 : TSST-1의 주요 항원 결정기인 1-15번 아미노산 부위를 펩티드항원으로 합성했다. 합성한 항원을 Balb/c 마우스의 복강에 주사하여 면역하고 그 비장세포를 채취하여 형질세포종 세포와 융합했다. 융합세포를 제한 희석법으로 클론화했다. 가장 안정적으로 분열하는 융합세포를 마우스 복강에 주입하여 단클론항체가 포함된 복수를 생산했다.

결과 : 하나의 IgG_{2b}형 단클론항체와 2개의 IgM형 단클론항체를 얻었다. IgG_{2b}형 단클론항체는 Western blot법에서 정제된 TSST-1을 5 µg까지 검출할 수 있었으며, ELISA법에서

TSST-1과 강하게 반응했다.

결론 : 합성 펩티드항원을 이용해서 TSST-1과 강한 면역반응을 보이는 단클론항체를 제조했다. 향후 본 단클론항체의 진단적, 치료적 성능을 검증해야 한다.

참고문헌

1. Hong SG, Lee JW, Yong DE, Kim EC, Jeong SH, Park YJ, et al. Antimicrobial resistance of clinically important bacteria isolated from 12 hospitals in Korea. *Korean J Clin Microbiol* 2004;7:171-7. (홍성근, 이종욱, 용동은, 김의중, 정석훈, 박연준 등. 국내 12개 병원의 임상검체에서 분리된 주요 세균의 항균제 내성율. *대한임상미생물학회지* 2004;7: 171-7.)
2. Lee HM, Yong DE, Lee KW, Hong SG, Kim EC, Jeong SH, et al. Antimicrobial resistance of clinically important bacteria isolated from 12 hospitals in Korea in 2004. *Korean J Clin Microbiol* 2005;8: 66-73. (이혁민, 용동은, 이경원, 홍성근, 김의중, 정석훈 등. 2004년도 국내 12개 병원에서 분리된 주요 세균의 항균제 내성율. *대한임상미생물학회지* 2005; 8:66-73.)
3. Kim JS, Kim HS, Song WK, Cho HC, Lee KM, Kim EC. Antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus aureus* isolated in 13 Korean hospitals. *Korean J Lab Med* 2004;24:223-9. (김재석, 김한성, 송원근, 조현찬, 이규만, 김의중. 국내 13개 의료기관에서 수집된 *Staphylococcus aureus*의 항균제 감수성 양상. *대한진단검사의학회지* 2004;24: 223-9.)
4. Deresinski S. Antistaphylococcal vaccines and immunoglobulins: current status and future prospects. *Drugs* 2006;66:1797-806.
5. Shurland S, Zhan M, Bradham DD, Roghmann MC. Comparison of mortality risk associated with bacteremia due to methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007;28:273-9.
6. Reed SD, Friedman JY, Engemann JJ, Griffiths RI, Anstrom KJ, Kaye KS, et al. Costs and outcomes among hemodialysis-dependent patients with methicillin-resistant or methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005;26: 175-83.
7. Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005;26:166-74.
8. Kim JS, Kim HS, Song W, Cho HC, Lee KM, Kim EC. Molecular

- epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with toxic shock syndrome toxin and Staphylococcal enterotoxin C genes. Korean J Lab Med 2007;27:118-23. (김재석, 김한성, 송원근, 조현찬, 이규만, 김의중. Toxic Shock Syndrome Toxin과 Staphylococcal Enterotoxin C 유전자 양성인 메티실린 내성 *Staphylococcus aureus* 의 분자생물학적 유형 분석. 대한진단검사의학회지 2007;27:118-23.)
9. Marrack P and Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. Science 1990;248:1066.
 10. Acharya KR, Passalacqua EF, Jones EY, Harlos K, Stuart DI, Brehm RD, et al. Structural basis of superantigen action inferred from crystal structure of toxic-shock syndrome toxin-1. Nature 1994;367:94-7.
 11. Prasad GS, Earhart CA, Murray DL, Novick RP, Schlievert PM, Ohlendorf DH. Structure of toxic shock syndrome toxin 1. Biochemistry 1993;32:13761-6.
 12. Jupin C, Anderson S, Damais C, Alouf JE, Parant M. Toxic shock syndrome toxin 1 as an inducer of human tumor necrosis factors and gamma interferon. J Exp Med 1988;167:752-61.
 13. Kum WW, Laupland KB, See RH, Chow AW. Improved purification and biologic activities of staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1. J Clin Microbiol 1993;31:2654-60.
 14. Parsonnet J, Gillis ZA, Richter AG, Pier GB. A rabbit model of toxic shock syndrome that uses a constant, subcutaneous infusion of toxic shock syndrome toxin 1. Infect Immun 1987;55:1070-6.
 15. Blanco L, Choi EM, Connolly K, Thompson MR, Bonventre PF. Mutants of staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1: mitogenicity and recognition by a neutralizing monoclonal antibody. Infect Immun 1990;58:3020-8.
 16. Bonventre PF, Heeg H, Cullen C, Lian CJ. Toxicity of recombinant toxic shock syndrome toxin 1 and mutant toxins produced by *Staphylococcus aureus* in a rabbit infection model of toxic shock syndrome. Infect Immun 1993;61:793-9.
 17. Cullen CM, Blanco LR, Bonventre PF, Choi E. A toxic shock syndrome toxin 1 mutant that defines a functional site critical for T-cell activation. Infect Immun 1995;63:2141-6.
 18. Deresiewicz RL, Woo J, Chan M, Finberg RW, Kasper DL. Mutations affecting the activity of toxic shock syndrome toxin-1. Biochemistry 1994;33:12844-51.
 19. Earhart CA, Mitchell DT, Murray DL, Pinheiro DM, Matsumura M, Schlievert PM, et al. Structures of five mutants of toxic shock syndrome toxin-1 with reduced biological activity. Biochemistry 1998;37:7194-202.
 20. Hurley JM, Shimonkevitz R, Hanagan A, Enney K, Boen E, Malmstrom S, et al. Identification of class II major histocompatibility complex and T cell receptor binding sites in the superantigen toxic shock syndrome toxin 1. J Exp Med 1995;181:2229-35.
 21. Kum WW, Laupland KB, Chow AW. Defining a novel domain of staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1 critical for major histocompatibility complex class II binding, superantigenic activity and lethality. Can J Microbiol 1999;46:171-9.
 22. Gampfer JM, Samstag A, Waclavicek M, Wolf HM, Eibl MM, Gulle H. Epitope mapping of neutralizing TSST-1 specific antibodies induced by immunization with toxin or toxoids. Vaccine 2002;20:3675-84.
 23. Yokoyama WM, Christensen M, Santos GD, Miller D. Production of monoclonal antibodies. Curr Protoc Immunol 2006;Chapter 2: Unit 2.5.
 24. Köhler G and Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975;256:495-7.
 25. Littlefield JW. Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science 1964;145:709-10.
 26. McKearn TJ. Cloning of hybridoma cells by limiting dilution in fluid phase. In: Kennett RH, McKearn TJ, et al., eds. Monoclonal antibodies, Hybridomas: A new dimension in biological analysis. New York: Plenum Press, 1980:370.
 27. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-5.
 28. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. Proc Natl Acad Sci USA 1976;76:4350-4.
 29. Lokker NA, Strittmatter U, Steiner C, Fagg B, Graff P, Kocher HP, et al. Mapping the epitopes of neutralizing anti-human IL-3 monoclonal antibodies. Implications for structure-activity relationship. J Immunol 1991;146:893-8.
 30. Wells DE, Reeves MW, McKinney RM, Graves LM, Olsvik O, Bergan T, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to toxic shock syndrome toxin 1 and use of a monoclonal antibody in a rapid, one-step enzyme-linked immunosorbent assay for detection of picogram quantities of toxic shock syndrome toxin 1. J Clin Microbiol 1987;25:516-21.
 31. Best GK, Scott DF, Kling JM, Thompson MR, Adinolfi LE, Bonventre PF. Protection of rabbits in an infection model of toxic shock syndrome (TSS) by a TSS toxin-1-specific monoclonal antibody. Infect

- Immun 1988;56:998-9.
32. Scott DF, Best GK, Kling JM, Thompson MR, Adinolfi LE, Bonventre PF. Passive protection of rabbits infected with toxic shock syndrome-associated strains of *Staphylococcus aureus* by monoclonal antibody to toxic shock syndrome toxin 1. Rev Infect Dis 1989;11(S): S214-8.
 33. Pang LT, Kum WW, Chow AW. Inhibition of staphylococcal enterotoxin B-induced lymphocyte proliferation and tumor necrosis factor alpha secretion by MAb5, an anti-toxic shock syndrome toxin 1 monoclonal antibody. Infect Immun 2000;68:3261-8.
 34. Kum WW and Chow AW. Inhibition of staphylococcal enterotoxin A-induced superantigenic and lethal activities by a monoclonal antibody to toxic shock syndrome toxin-1. J Infect Dis 2001;183:1739-48.
 35. Gilleland HE Jr, Hughes EE, Gilleland LB, Matthews-Greer JM, Staczek J. Use of synthetic peptides to identify surface-exposed, linear B-cell epitopes within outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa*. Curr Microbiol 1995;31:279-86.
 36. Loh DY, Bothwell AL, White-Scharf ME, Imanishi-Kari T, Baltimore D. Molecular basis of a mouse strain-specific anti-hapten response. Cell 1983;33:85-93.
 37. Solin ML, Kaartinen M, Mäkelä O. The same few V genes account for a majority of oxazolone antibodies in most mouse strains. Mol Immunol 1992;29:1357-62.
 38. Mernaugh RL, Kaspar CW, Durand DP, Hill JH, Jones FE. A simple, efficient, standard-dilution method for cloning hybridomas. Biotechnol Tech 1987;1:31-3.
 39. Miyazawa H, Bannai H, Yanase T, Morita C, Satoh S, Sugiyama J, et al. A reverse-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for verocytotoxin 1 and 2 antibodies in human and bovine sera. Clin Diagn Lab Immunol 1999;6:701-4.