

## HIV-1 p24 단백질에 대한 단클론항체의 isotyping과 cross-reaction

임상병리과

전임강사 이 영 중

### I. 서 론

Human immunodeficiency virus-1(HIV-1)이 후천성면역결핍증(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)의 원인 병원체로 규명된<sup>1,2)</sup> 이래 세계적으로 무증상 감염자 및 AIDS 환자의 수가 급속히 증가하고 있고 국내에서도 그 수가 지속적으로 증가 추세에 있다. 따라서 HIV-1의 바이러스학적인 연구, 예방백신과 치료제의 개발, 그리고 진단방법 등 많은 연구가 이루어져 왔다. 이러한 바이러스학적인 연구를 바탕으로 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)<sup>3)</sup>, western blot(WB), particle agglutination(PA)<sup>4)</sup>, polymerase chain reaction(PCR)등 다양한 진단방법도 많이 개발되었다. 이 중 HIV 뿐만 아니라 대부분의 바이러스성 질병의 감염여부를 파악하기 위하여 주로 사용되는 방법이 ELISA와 WB이다. 그러나 이 방법들은 특이도(specificity)와 감도(sensitivity)가 계속 문제 시되고 있다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위하여 단세포항체를 개발하여 사용하는 방법이 개발되고 있다<sup>5)</sup>.

현재 국내에서 사용되고 있는 HIV-1 진단제제는 대부분 외국에서 고가로 수입되고 있는 실정이라서 진단제제의 국산화가 시급한 실정이다. 따라서 HIV-1의 p24 단백질, gp120 당단백질 등과 같은 특이항원에 대한 단세포항체의 제조는 필수적인 사항이며, 특이단세포항체가 개발되면 보다 감도가 높은 ELISA, WB과 HIV-1 Ag-capture ELISA 등과 같은 진단 kit가 계속 개발될 것으로 사료된다.

본 실험은 감도가 높은 진단제제의 개발과 HIV-1의 항원성 분석 그리고 HIV-1 표준주와 국내 분리주의 비교 등을 수행하기 위해 필수적인 특이단클론항체를 제조

하였고<sup>6)</sup>, 제조된 특이단클론항체의 isotyping과 교차반응성을 실험하여 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. Isotyping

생산된 anti-HIV-1 p24에 대한 단클론항체의 isotyping은 hyclone mouse monoclonal antibody sub-isotyping kit를 사용하여 시행하였다,

HIV-1 p24 protein에 대한 단클론항체를 subtyping하기 위한 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)는 Voller 등<sup>7)</sup>의 방법을 변형한 Lee<sup>6)</sup>의 방법을 사용하였다. Coating용 항원은 Scrips사의 정제된 HIV-1 항원을 사용하였고 항원액은 coating buffer(0.05 M carbonate buffer, pH 9.6)로 농도 10 ng/100  $\mu$ l in well 씩 polystyrene 96 well microplate에 분주하여 4°C에서 overnight하여 coating한 후 phosphate buffered saline-tween 20(PBS-tween 20)로 3 회 세척하였다. 1A-1H lane에 clone 1의, 2A-2H lane에 clone 2의 HIV-1 p24 protein에 대한 단클론항체 용액 100  $\mu$ l/well 씩 분주하여 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 PBS-tween 20으로 3 회 세척하였다. A-F lane에 각각 순서대로 rabbit anti-mouse IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>,  $\kappa$ ,  $\lambda$ 를, G, H lane에 세척액을 100  $\mu$ l/well 씩 분주하여 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 PBS-tween 20으로 3 회 세척하였다.

A-F lane에 peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG를, G lane에 peroxidase conjugated goat anti-mouse IgM을, 그리고 H lane에 peroxidase conjugated goat anti-mouse IgA를 diluent buffer(0.01 M PBS containing 0.5% BSA, pH 7.4)로 1,000 배 희석하여 각 well에 100  $\mu$ l 씩 분주하고 37°C에서 30 분간 반응시켰다. PBS-tween 20으로 3 회 세척 후 기질은 0.5 mg/ml의 농도로 각 well에 100  $\mu$ l 씩 넣고 실온의 암소에서 30 분간 반응시킨 후 각 well에 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 50  $\mu$ l 씩 첨가하여 반응을 정지시키고 ELISA autoreader (Dynatech MR-580)로 492 nm/620 nm에서 optical density(OD)를 측정하였다.

### 2. HBV와의 교차반응성

HIV-1 p24 단백질과만 반응하는 단클론항체가 다른 바이러스의 단백질과 교차반응을 하는가를 확인하기 위하여 hepatitis B virus(HBV)와 반응시켰다.

**SDS-PAGE**(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) :

Laemmli<sup>8)</sup>의 방법을 변형한 Lee<sup>6)</sup>의 방법으로 하였다. 정제된 HBV를 시료완충용액(1% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue, 2.5% sucrose, 1.25 M Tris-HCl, pH 6.8)을 1:1 비율로 섞은 후 3 분간 중탕하여 50  $\mu$ l 씩을 시료로 사용하였다. 전기영동은 7.5-12.5%의 gradient gel을 사용하여 15-20 mA로 5 시간 동안 실행하였으며 완충용액은 tris-glycine buffer(pH 8.3)를 사용하였다. 전기영동이 끝난 gel은 0.125% coomassie brilliant blue R-250을 가한 탈색용액(methylalcohol:glacial acetic acid:distilled water=5:1:4)에서 2 시간 이상 염색시키고 탈색용액에 넣어 단백질 이외의 부분을 탈색시킨 후 7% acetic acid에 고정하였다. 사용한 표준단백질은  $\alpha$ -lactalbumin(M.W. 14,400), trypsin inhibitor(M.W. 20,100), carbonic anhydrase(M.W. 30,100), ovalbumin(M.W. 43,000), albumin(M.W. 67,000), phosphorylase b(M.W. 94,000)(Pharmacia)를 사용하였다.

**EITB(Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot technique)** : Tsang 등<sup>9)</sup>의 방법을 변형한 Lee<sup>6)</sup>의 방법으로 다음과 같이 실시하였다. SDS-PAGE로 분리된 HBV 단백질 분획을 이적용기내에서 70 V로 5 시간 동안 nitrocellulose membrane(0.45  $\mu$ m, Bio-Rad)으로 이적시킨 후 blocking buffer(0.01 M PBS containing 3% skim milk, pH 7.2)에 넣고 4°C에서 overnight하였다. PBS-Tween 20으로 3 회 세척한 후 strip 별로 100 배 희석한 mouse anti-HIV-1 p24 IgG<sub>2b/k</sub> 단클론항체와 동일 희석배수인 normal mouse 혈청을 넣고 37°C에서 2 시간 동안 반응시켰다. 반응 후 PBS-Tween 20으로 3 회 세척하고 1,000 배로 희석된 peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG(Cappel)를 각각 넣어 1 시간 반응시켜 PBS-Tween 20으로 세척한 후 3-3'-diamino benzidine(Sigma)에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 반응을 관찰하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. Isotyping

HIV-1 p24 protein과만 반응하는 단클론항체 2 종을 isotyping한 결과 실험한 96 well plate에서 C와 E lane에서만 발색이 나타나 2 종 모두 heavy chain(H chain)은  $\gamma_{2b}$  chain을 갖고 light chain(L chain)은  $\kappa$  chain을 갖는 IgG<sub>2b/k</sub>로 동일한 subtype과 특이성을 갖는 것으로 판명되었다. 단일의 B 세포 clone은 단일 특이성을 갖는 즉, 동일한 항체를 분비한다. 따라서 생산된 2 종의 항체는 동일한 B 세포의 clone일 것이라는 추정이 가능하다. 그러나 HIV-1 p24 protein의 분자량

이 25,000~500 dalton으로 나타났고<sup>(6)</sup> 이러한 분자량이면 수개의 항원결정기를 포함하고 있을 것으로 사료된다. 따라서 IgG<sub>2b/k</sub>로 밝혀진 이 단클론항체는 HIV-1 p24 protein과는 공통적으로 반응하지만 서로 다른 항원결정기에 특이적(specific)인 친화도(affinity)를 가질 수 있다. 이러한 이유로 생산된 2 종의 항체가 동일한 B 세포의 clone일 것이라는 추정이 가능할 뿐 서로 다른 B 세포의 clone일 가능성도 배제할 수는 없다.

## 2. HBV와의 교차반응성

HBV를 전기영동한 결과 표준단백질을 기준으로(S lane) 20.1K과 30.1K 사이에 2개, 그리고 43K과 67K 사이에 4개의 단백질 분획(H lane)이 나타났다(Fig. 1).



Fig. 1. SDS-PAGE(7.5-12.5%) patterns of purified HBV. Proteins were visualized by starting with coomassie brilliant blue R-250. S : standard marker, H : purified HBV.

각 단백질 분획별로 relative mobility는 측정하지 않았다. 그것은 HBV의 구성 단백질의 분자량이 중요한 것이 아니고 HBV와 생산된 HIV-1 p24 단백질에 대한 단클론항체의 반응여부가 중요하기 때문이다.

SDS-PAGE한 HBV를 nitrocellulose membrane에 이적시켜 생산된 HIV-1 p24 단백질에 대한 단클론항체를 반응시킨 결과 Fig. 2에서와 같이 전혀 반응하지 않음을 확인하였다. N lane은 normal mouse serum, P lane은 정제된 mouse anti-HIV-1 p24 IgG<sub>2b/k</sub>를 각각 HBV 단백질이 이적된 strip에 반응시킨 것이다. 따라서 생산된 단클론항체는 HBV와는 교차반응을 하지 않고 HIV-1 p24 단백질에 대해 특이적으로 반응하는 것으로 나타났다. 정제된 mouse anti-HIV-1 p24 IgG<sub>2b/k</sub>의 교차반응성을 확인하기 위해 HBV를 사용한 것은 HIV-1과 HBV의 바이러스학적 연관성보다는 사람에게 많이 감염되는 바이러스 중에 하나가 HBV이기 때문이다.

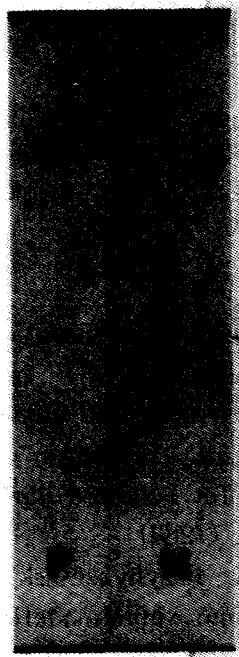


Fig. 2. Profiles of the purified mouse anti-HIV-1 p24 IgG<sub>2b/k</sub> cross-reacted with HBV proteins. The monoclonal antibody against HIV-1 p24 protein has not react with HBV proteins. N : normal mouse serum, P : mouse anti-HIV-1 p24 IgG<sub>2b/k</sub>.

이러한 결과로 볼 때 정제된 mouse anti-HIV-1 p24 IgG<sub>2b/k</sub>는 다른 바이러스의 단백질과는 반응하지 않고 HIV-1 p24 protein과만 반응하는 것으로 나타나 특이성(specificity)이 매우 우수한 것으로 사료된다.

## IV. 결 론

AIDS의 원인병원체인 HIV-1의 구성 단백질의 일종인 p24와만 반응하는 제조된 단클론항체를 isotyping하고 HBV와의 교차반응성을 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

HIV-1 p24 단백질에 대한 특이단클론항체를 isotyping하여 2 종 모두 H chain은  $\gamma_{2b}$  chain을 갖고 L chain은  $\kappa$  chain을 갖는 IgG<sub>2b/ $\kappa$</sub> 임을 확인하였다.

다른 바이러스의 단백질과의 교차반응성을 확인하기 위하여 HBV 구성단백질과 반응(EITB)시켰을 때 mouse anti-HIV-1 p24 IgG<sub>2b/ $\kappa$</sub> 와 HBV 구성단백질은 전혀 반응하지 않았다. 따라서 제조된 그 단클론항체는 HIV-1 p24 단백질과만 반응하는 것으로 확인되었다.

## 참고문헌

1. M. Popovic, *et al.* : Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses(HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*, **224**, 497~500 (1984)
2. F. Barre-Sinoussi, *et al.* : Isolation of a T-lymphotrophic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome(AIDS). *Science*, **220**, 868~871 (1983)
3. R.N. Taylor and V.A. Przybyszewski : Summary of the Center for Disease Control human immunodeficiency virus(HIV) performance evaluation surveys for 1985 and 1986. *A. J. C. P.*, **89**(1), 1~13 (1986)
4. H.L. Francis, *et al.* : Comparison of sensitivities and specificities of latex agglutination and an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to the human immunodeficiency virus in Africa sera. *J. Clin. Microbiol.*, **26**(11), 2462~2464 (1988)
5. M.C. Carlo, *et al.* : Production of human hybridomas secreting antibodies to measles virus. *Nature*, **256**(7), 495~497 (1975)
6. Y.J. Lee : Production and characterization of monoclonal antibody to HIV-1. *J. Kwangju Health college*, **19**, 187~201 (1994)
7. A. Voller, *et al.* : Enzyme immuno-assays in diagnostic medicine-theory and practice. *Bull. WHO*, **53**, 55-65(1976)
8. U.K. Laemmli : Cleavage of structural proteins during the assembly of

the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680~685 (1970)

9. V.C. Tsang, *et al.* : Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods Enzymol.*, **92**, 377~391 (1983)

---

## Isotyping and Cross-reaction of mouse anti-HIV-1 p24 Monoclonal Antibodies

Lee, Young-jong  
*Dept. of Clinical Pathology*  
*Kwangju Health College*

### > Abstract <

In order to improve the reliability immunodiagnostic techniques being used in the diagnostic of HIV-1, mouse anti-HIV-1 p24 monoclonal antibodies were isotyped and cross-reacted.

When monoclonal antibodies against HIV-1 p24 protein were isotyped, they were confirmed IgG<sub>2b/κ</sub> which H and L chain were γ<sub>2b</sub> and κ chain, respectively.

To confirm the cross-reaction for another viral proteins, mouse anti-HIV-1 p24 IgG<sub>2b/κ</sub> was reacted with HBV proteins. However, the reaction did not occur. Thus, it was confirmed that mouse anti-HIV-1 p24 IgG<sub>2b/κ</sub> only bound to HIV-1 p24 protein.