



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0077032

(43) 공개일자 2015년07월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*C07K 16/14* (2006.01) *C12N 5/18* (2006.01)

*G01N 33/569* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0165848

(22) 출원일자 2013년12월27일

심사청구일자 2013년12월27일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

박세호

서울 마포구 백범로 82, 103동 1501호 (대흥동, 동양엔파트)

민기식

인천광역시 연수구 송도과학로27번길 70, 103동 1704호 (송도동, 롯데캐슬)

(74) 대리인

이처영, 장제한

전체 청구항 수 : 총 12 항

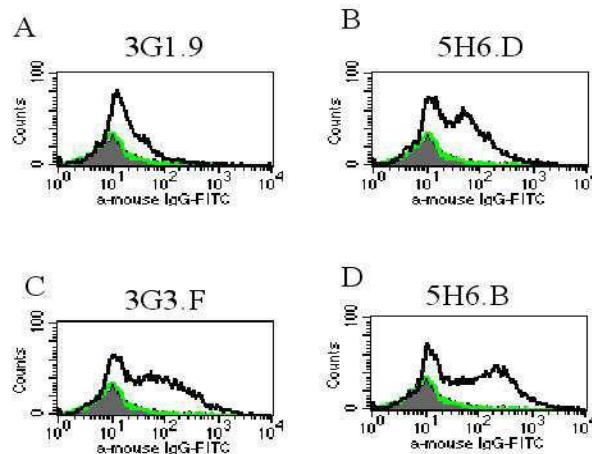
(54) 발명의 명칭 *Cochlodinium* 특이적인 단클론 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 *Cochlodinium* 특이적인 단클론 항체 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 적조생물인 *Cochlodinium* 특이적인 단클론 항체 생산용 하이브리도마 세포주에 의해서 생산되는 *Cochlodinium* 특이적인 단클론 항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 단클론 항체를 이용한 적조 검사 방법은 간단한 항체 염색만으로 검사가 가능함으로써, 기존의 육안 판별법에 비해 매우 효율적이며 정확하고 신속한 검사 방법으로 산업상 이용 가능성이 높다.

대표도 - 도1



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

*Cochlodinium*에 특이적으로 반응하는 단클론 항체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단클론항체는 기탁번호 KCLRF-BP-00298인 하이브리도마 세포에 의하여 생산되는 단클론항체.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단클론항체는 기탁번호 KCLRF-BP-00302인 하이브리도마 세포에 의하여 생산되는 단클론항체.

#### 청구항 4

*Cochlodinium*에 특이적으로 반응하는 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 하이브리도마 세포주는 기탁번호 KCLRF-BP-00298인 하이브리도마 세포주.

#### 청구항 6

제4항에 있어서, 상기 하이브리도마 세포주는 기탁번호 KCLRF-BP-00302인 하이브리도마 세포주.

#### 청구항 7

제1항 내지 제3항의 어느 한 항의 단클론 항체를 함유하는 적조생물 검출용 조성물.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 적조생물은 *Cochlodinium*인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 9

제1항 내지 제3항의 어느 한 항의 단클론 항체를 검체 시료와 접촉시켜 항원-항체 복합체 형성을 확인하는 것을 특징으로 하는 적조생물의 검출방법.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 단클론 항체는 형광물질로 표지된 것을 특징으로 하는 검출방법.

## 청구항 11

제9항에 있어서, 상기 항원-항체 복합체 형성을 확인하는 것은 형광현미경 검사법 및 유세포분석법을 이용하는 검출방법.

## 청구항 12

제9항의 적조생물 검출용 조성물을 포함하는 적조 진단용 키트.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 *Cochlodinium* 특이적인 단클론 항체 및 이를 이용한 적조 검출에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 적조 생물인 *Cochlodinium* 특이적인 단클론 항체 생산용 하이브리도마 세포주에 의해서 생산되는 *Cochlodinium* 특이적인 단클론 항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 인구 증가와 인간 활동 증가에 따른 담수 및 해역의 수질이 급속하게 악화되고 있고, 특히 최근에는 연안 수역에서 적조가 빈발하여 어패류 등에 막대한 피해를 입히고 있다. 이러한 수서 생태계의 종합적인 환경평가 및 환경관리를 위해서는 신속, 정확하고 간편한 모니터링 기술이 필요하며, 생물은 각 오염원에 대해 총체적이면서도 즉각적으로 반응함으로써 신속한 환경 모니터링의 가장 이상적인 수단이 될 수 있다(Fiossner *et al.*, 1992; Pratt and Balczon *et al.*, 1992; Azovsky *et al.*, 1996).

[0003] 현재 미생물이나 생태분류가 용이한 대형 동식물이 환경 모니터링에 주로 이용되고 있는데, 대형 동식물의 경우에는 환경 적응 범위가 넓어 정확한 환경 평가에 부적합한 면이 많고 미생물의 경우에는 종류가 너무 다양하고 미세하여 배양 등 2차적인 작업을 통해 간접적인 데이터만을 활용할 수밖에 없어 신속 정확한 환경 평가에는 부적합한 면이 많다. 따라서 지금까지는 환경 평가의 중요한 영향 요인인 생물요인에 대한 정보가 미비하여 지금까지의 환경평가는 화학 인자에 대한 평가 위주로 이루어져 정확한 환경 평가에 한계가 있었다. 종다양성, 생물량, 환경 민감성 등을 고려할 때 원생생물과 같은 미소생물 지표종을 이용할 경우 정교한 환경 모니터링이 가능할 것으로 예상되지만(Parker *et al.*, 1983), 일반적으로 미소생물은 동정이 어렵고 시간이 많이 소요되기에 제한적으로만 정성 분석에 이용되고 있는데(Becker *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001), 많은 개체를 이용해야하는 정량 분석은 현재의 기술로는 거의 불가능하여 환경 생태 분석에 거의 이용되고 있지 않다. 단클론 항체를 이용한 원생동물의 정성, 정량 분석 방법은 최근에 병리학 분야에서 감염원 조사에 이용되어 그 효용성이 입증되었으나, 현재까지는 환경 분야에서는 시도된 바가 없었던 것으로 조사되었다.

[0004] 이에, 본 발명자들은 수서 생태계에 대한 종합적인 통계 분석이 가능한 새로운 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 원생동물에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 제작하였고, 간단한 항체 염색만으로도 수서 생태계에 대한 분석이 가능하다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 *Cochlodinium* 에 특이적으로 반응하는 단클론 항체 및 상기 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 제공하는데 있다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 단클론 항체를 함유하는 적조생물 검출용 조성물 및 상기 단클론 항체를 검체 시료

와 접촉시켜 항원-항체 복합체 형성을 확인하는 것을 특징으로 적조생물의 검출 방법을 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 적조생물 검출용 조성물을 포함하는 적조 진단용 키트를 제공하는데 있다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *Cochlodinium* 에 특이적으로 반응하는 단클론 항체를 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한, *Cochlodinium* 에 특이적으로 반응하는 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, 상기 단클론 항체를 함유하는 적조생물 검출용 조성물 을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, 상기 단클론 항체를 검체 시료와 접촉시켜 항원-항체 복합체 형성을 확인하는 것을 특징으로 하는 적조생물의 검출 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 상기 적조생물 검출용 조성물을 포함하는 적조 진단용 키트를 제공한다.

### 발명의 효과

[0013] 본 발명에 따르면, 단클론 항체를 이용한 적조 검사 방법은 간단한 항체 염색만으로 검사가 가능함으로써, 기존의 육안 판별법에 비해 매우 효율적이며 정확하고 신속한 검사 방법으로 산업상 이용 가능성이 높다.

### 도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 세포들 중 양성으로 선택된 클론의 유세포분석 결과를 확인한 것이다. 100개의 양성 클론은 모두 각기 다른 4가지 타입의 항체를 생산하였다. (A: 3G1.9, B: 5H6.D, C: 3G3.F, D: 5H6.B)

도 2는 본 발명의 100개의 양성 클론 중 *Cochlodinium*에만 특이적으로 반응하는 클론을 다시 선별하는 것과 동시에 실제 적조가 형성된 경남 거제 지역의 해수 시료를 이용하여 유세포분석 결과를 확인한 것이다. 100개의 양성 클론 중 7개의 클론이 각각 4가지 타입의 양성 클론으로 선별되었다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0016] 본 발명은 일 관점에서, *Cochlodinium* 에 특이적으로 반응하는 단클론 항체에 관한 것이다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 단클론 항체는 기탁번호 KCLRF-BP-00298 또는 기탁번호 KCLRF-BP-00302인 하이브리도마 세포에 의하여 생산되는 단클론 항체인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0018] 본 발명은 다른 관점에서, *Cochlodinium* 에 특이적으로 반응하는 단클론 항체를 생산하는 기탁번호 KCLRF-BP-00298 및 기탁번호 KCLRF-BP-00302인 하이브리도마 세포주에 관한 것이다.

[0019] 본 발명에서 "단클론 항체"는 당해 분야에 공지된 용어이며, 당해 기술분야에서 공지된 세포융합법에 의해 생성된 하이브리도마 세포로부터 얻을 수 있다.

[0020] 본 발명에서 "하이브리도마"는 당해 분야에 공지되어 있으며, 항체 생산 세포와 불멸 세포와의 융합에 의해 형성된 세포를 의미한다. 일반적으로 하이브리도마 세포는 항원 단백질을 주사한 마우스와 같은 면역학적으로 적합한 숙주 동물로부터의 면역세포와 골수종 세포를 융합함으로써 만들어지며, 단클론 항체를 지속적으로 공급할 수 있다.

[0021] 본 발명은 다른 관점에서, *Cochlodinium* 에 특이적으로 반응하는 단클론 항체를 함유하는 적조생물 검출용 조성

물에 관한 것이다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 검출용 조성물에는 *Cochlodinium* 에 특이적으로 반응하는 단클론 항체 외에 면역학적 분석에 사용되는 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 검출 표지체 및 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 시약을 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체로는 이에 한정되지는 않으나 가용성 담체, 예를 들어 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액(예를 들어 PBS) 또는 불용성 담체 및 이들의 조합일 수 있으며, 상기 검출 표지체 및 검출 표지의 활성 측정용 시약은 반응에 의해 발색, 형광, 발광 특성 중 어느 하나를 나타내어 이를 측정하기 위함으로 일반적인 면역측정법에 사용되는 각종 검출표지와 각 검출표지에 따른 활성 측정용 시약을 사용할 수 있다.

[0023] 본 발명은 또 다른 관점에서, *Cochlodinium* 에 특이적으로 반응하는 단클론 항체를 검체 시료와 접촉시켜 항원-항체 복합체 형성을 확인하는 것을 특징으로 적조생물 검출 방법에 관한 것이다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 검출 방법은 항원-항체 결합을 측정할 수 있는 방법이라면 모두 포함될 수 있다. 이러한 방법들은 당 분야에 공지되어 있으며 예를 들어, 면역세포화학 및 면역조직화학법, 방사선 면역 분석법, 효소결합면역법(ELISA), 면역블롯(immunoblot), 면역침강법 및 면역형광법 등이 사용될 수 있다.

[0025] 한편, 검출에 사용되는 표지체는 효소, 형광물, 발광물, 미소입자, 방사성 동위원소 등의 표지를 사용할 수 있지만, 다른 표지 역시 사용될 수 있다. 구체적으로, 검출 표지로 사용가능한 효소로는 아세틸콜린에스테라제, 알칼라인 포스파타제, 퍼옥시다아제 등을 포함하며, 형광물로는 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민 등을 포함하며, 발광물로는 루미놀, 이소루미놀 등을 포함하고, 방사성 동위원소로는  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$  등을 포함한다.

[0026] 본 발명은 또 다른 관점에서, *Cochlodinium* 에 특이적으로 반응하는 단클론 항체를 포함하는 적조 진단용 키트에 관한 것이다.

[0027] [실시예]

[0028] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명 할 것이다.

#### [0029] 실시예 1: 적조 생물의 분리

[0030] 국내에서 가장 중요한 적조 생물인 *Cochlodinium polykrikoides*와 *Skeletonema costatum*의 단배양종을 분리하고, 원심분리기를 이용하여 농축한 후 PBS로 세척하였다. 대상생물은 살아있는 상태로 실험용 생쥐에  $10^5$ - $10^6$  개체/주/injection의 농도로 주입하였다.

#### [0031] 실시예 2: *Cochlodinium* 면역화 유도

[0032] 6~8 주령 되는 C57BL/6 계열의 실험용 암컷 쥐 3마리를 면역화를 위해 사용하였으며, 이들은 특이적인 병원균으로부터 완전히 차단된 환경의 사육실에서 관리되었다.

[0033] 3마리의 C57BL/6 실험용 암컷 쥐에 미리 배양한 실시예 1의 *Cochlodinium*을 PBS 완충액으로 잘 세척하여 마리당  $2 \times 10^6$  미생물을 복강으로 주사하고, 이 주사는 14일을 주기로 3회에 걸쳐 시행하였다.

#### [0034] 실시예 3: 항체 생산 B 세포의 하이브리도마 제조

[0035] 본 실시예에서는 *Cochlodinium*에 특이적으로 반응하는 항체생산 B세포의 하이브리도마(5H2.7: 기탁번호 CLRF-BP-00298, 3C4.E: 기탁번호 KCLRF-BP-00302)를 제조하였다.

[0036] 야생형 C57BL/6 실험용 쥐의 복강 내에서 대식세포를 분리하여 세포융합 후 형성되는 사세포의 제거를 위해 세

포배양 접시에 먼저 배양하였다. 미리 준비된  $2 \times 10^7$  P3X63Ag8.635 골수종과 실시예 2의 *Cochlodinium* 면역화된  $1 \times 10^8$  비장세포를 혼합하여 50% PEG1500을 넣고 세포융합을 시킨 후, 대식세포가 자라고 있는 배양접시에 넣고  $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$  상태에서 배양하였다. 이때 HAT이 포함된 배양액을 사용하여 융합되지 않은 세포는 제거하였다. 상기 선택된 세포들은 대량으로 배양된 후 1000개의 독립된 세포로 다시 분리배양하고, 이렇게 분리배양 한 독립세포를 유세포분석을 통해 양성 클론을 얻을 수 있었다.

[0037]

그 결과, 100개의 양성클론은 모두 각기 다른 4가지 타입의 항체를 생산하였으며, 각 타입마다 A 타입 38개, B 타입 18개, C 타입 24개, D 타입 20개의 양성 클론(표 1)을 선택할 수 있었다. 도 1은 양성으로 선택된 클론의 유세포분석 결과를 확인한 것이다.

표 1

[0038]

| Type          | A  | B  | C  | D  |
|---------------|----|----|----|----|
| No. of sample | 38 | 18 | 24 | 20 |

[0039]

#### 실시예 4: 항체 활용의 검증

[0040]

본 실시예에서는 100개의 양성 클론 중 *Cochlodinium*에만 특이적으로 반응하는 클론을 다시 선별하는 것과 동시에 실제 항체의 활용이 가능한가를 검증하기 위해 실제 적조가 형성된 경남 거제 지역의 해수 시료를 수집하여 검사하였다.

[0041]

그 결과, 100개의 클론 중 7개의 클론(3C4, 3E8, 3G1, 4E2, 5H2, 5H6, 5G8) 중 각각 4가지 타입의 양성 클론(3C4, 3E8, 5H2, 5H6)이 선별되었으며(도 2), 표 2와 같이 실제 육안으로 관찰한 *Cochlodinium*의 개체수와 일치하는 것으로 확인되었다. 그중 5H2.7 클론을 한국세포주연구재단 세포주은행에 2013년 10월 4일자로 KCLRF-BP-00298의 수탁번호로 기탁하였으며, 3C4.E 클론을 한국세포주연구재단 세포주은행에 2013년 10월 11일자로 KCLRF-BP-00302의 수탁번호로 기탁하였다.

표 2

[0042]

| (cell/ml)                      | <i>Cochlodinium</i> | <i>Diatom</i> | <i>Ciliates</i> | <i>Dinoflagellates</i> |
|--------------------------------|---------------------|---------------|-----------------|------------------------|
| 통영1                            | 2413 (79.4%)        | 288           | 337             | -                      |
| 통영2                            | 2375 (66.6%)        | 702           | 490             | -                      |
| 통영3                            | 2885 (55.7%)        | 1519          | 779             | -                      |
| 통영 광도면<br>중접리<br>(no red tide) | -(0%)               | 577           | 192             | 8058                   |

[0043]

이로부터 본 발명에 따른, 선별된 4가지 타입의 7개의 클론이 실제 적조 검색에 활용 가능한 항체 생산 클론이라는 것이 확인되었으며, 각 단클론 항체들을 이용하여 적조 발생 이전 먼 바다에서 낮은 농도의 적조가 형성되었을 때 실시간으로 이를 확인하고 예보할 수 있을 것으로 사료된다. 실시방법으로는 조사전에 유세포측정기를 장착하고 현장에서 직접 검사를 함으로써 기존의 육안 판별법에 비해 월등히 효율적이고 대규모의 검사가 가능할 것으로 기대할 수 있다.

[0044]

이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다. 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 이용될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

## 수탁번호

[0045]

기탁기관명 : 한국세포주연구재단

수탁번호 : KCLRF-BP-00298

수탁일자 : 20131004

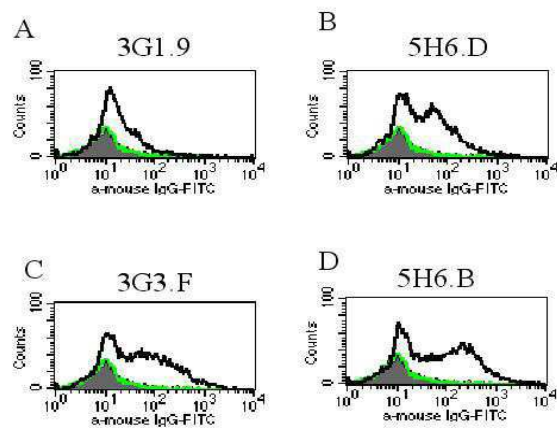
기탁기관명 : 한국세포주연구재단

수탁번호 : KCLRF-BP-00302

수탁일자 : 20131011

## 도면

### 도면1



도면2

