

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2008-0008802 (43) 공개일자 2008년01월24일
(51) Int. Cl. <i>C07K 16/18</i> (2006.01) <i>C07K 16/00</i> (2006.01)	(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 가좌동 900	
(21) 출원번호 10-2006-0068539	(72) 발명자 정태성 경남 진주시 신안동 평거현대아파트 201동 106호 김영림 경남 진주시 칠암동 526-6 신기욱 경남 진주시 평거동 788-3 502호	
(22) 출원일자 2006년07월21일 심사청구일자 없음	(74) 대리인 이건철, 정영수, 김순웅	

전체 청구항 수 : 총 8 항

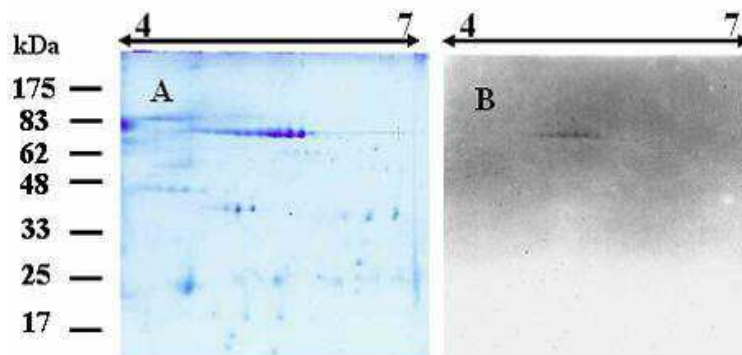
(54) 우럭으로부터 정제된 면역글로불린에 대한 단클론항체 및 그의 생성방법

(57) 요약

본 발명은 우럭 (*Sebastes schlegeli*)으로부터 분리/정제된 면역글로불린 (Ig) 및 그의 생성방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 우럭 (*Sebastes schlegeli*)으로부터 분리/정제된 면역글로불린에 대한 단클론항체 및 그의 생성방법에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 우럭으로부터 정제된 면역글로불린에 대한 단클론항체의 감별키트를 제공하며, 백신 개발에 필요한 유용한 정보를 제공한다.

대표도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

우럭 (*Sebastes schegeli*)을 동물의 면역글로불린으로 면역한 후 우럭의 혈청을 분리하는 제 1단계; 단백질A, 만난 결합 단백질 (Mannan Binding Protein; MBP) 또는 면역친화 컬럼을 사용하여 면역글로불린 (Igs)을 정제하는 제 2단계; 면역된 마우스로부터 비장을 수집하여 골수종세포(myeloma cell)와 융합하고 배양하여 우럭 면역글로불린에 대한 단클론항체를 제조하는 제 3단계;를 포함하는 우럭 면역글로불린에 대한 단클론항체 제조방법

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 정제된 면역글로불린은 70 kDa의 분자량의 중쇄 및 25 kDa의 경쇄로 구성됨을 특징으로 하는 단클론항체 제조방법

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 제 1단계의 동물이 염소 (goat)인 것을 특징으로 하는 단클론항체 제조방법

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 제 2단계 이후에 면역글로불린 (Igs)을 마우스에 주사하여 면역증강 (booster)시키는 단계를 더 포함함을 특징으로 하는 단클론항체. 제조방법

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 의 제조방법에 의해 제조된 단클론항체

청구항 6

i) 우럭의 면역글로불린에 대한 단클론항체가 공유 결합 또는 물리적 흡착에 의해 고정화되어 있는 고체 지지체, ii) 감지 가능한 발색 시약을 포함하는 하나 이상의 용액 및 iii) 완충된 세척 용액 및 품질 관리에 요구되는 시료를 포함하는 우럭의 면역글로불린 검출키트

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 단클론항체는 제 5항의 단클론항체임을 특징으로 하는 검출키트

청구항 8

제 6항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 따른 검출키트를 사용함을 특징으로 하는 병원체에 대한 우럭의 체액성 면역 진단 방법

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<7> 본 발명은 우럭 (*Sebastes schegeli*)으로부터 분리/정제된 면역글로불린 (Ig) 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 면역글로불린에 대한 단클론 항체 및 이의 생산방법에 관한 것이다.

<8> 즉, 본 발명의 발명자들은 단백질 A (Protein A), 만난 결합 단백질 (MBP) 및 면역친화 컬럼을 이용하여 우럭 (black rockfish) 혈청으로부터 면역글로불린을 정제하는데 성공하고 본 발명에 이르게 되었다.

<9> 우럭 (*Sebastes schegeli*) 은 양볼락과(Scorpaenidae)에 속하고, 한국, 중국 및 일본에서 중요한 양식 물고기 종이다. 2002년 한국의 우럭 생산량은 16,548 메트릭톤에 이르렀다. 하지만, 이 종의 집약적인 양식으로 인해 심각한 경제적 손실을 가져오는 다양한 기생충, 박테리아 및 바이러스성 질병의 갑작스런 발명을 가져

오게 하고 있다. 다양한 질병에 대한 물고기의 방어 기전을 좀 더 철저히 이해하는 것이 적절한 질병 관리 전략 및 지속 가능한 양어 생산을 발달시키는 데 더 없이 필요할 것이다.

<10> 척추동물의 방어 기전은 일반적으로 선천적인 면역반응 및 후천적인 면역반응으로 나뉘어진다. 후천적 면역반응은 항원의 자극에 의해 숙주가 특이적인 면역글로불린 (Igs)을 생산하는 것을 포함한다. 생산된 면역글로불린은 병원체를 제거하거나 혈액 또는 기관으로 병원성 인자가 유입되는 것을 막는다. 포유류는 IgM, IgG, IgA, IgE 및 IgD의 5 클래스로 나뉘어진다 (Tizard, 1996). 한편, 어류는 게노믹 연구로부터 Ig 중쇄 (heavy chain)의 4 종류의 이소타입을 가지는 것으로 보고되고 있다. 즉, IgM (Lee *et al.*, 2001; Hordvik *et al.*, 2002), IgD (Hordvik *et al.*, 1999; Hirono *et al.*, 2003; Srisapoome *et al.*, 2004), IgZ (Savan *et al.*, 2005) 및 IgT (Hansen *et al.*, 2005).

<11> 이들 면역글로불린들 (Igs) 중 단지 IgM 만이 어류의 체액성 면역반응에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다 (Iwama and Nakanishi, 1996; Tizard, 1996). 어류 및 포유류 IgM이 구조적 유사성을 일부 가지고 있음에도 불구하고, 경골어류 (teleost)의 IgM는 주요 중합 형태가 테트라머인 (~800 kDa) 특성을 가지는 것으로 특징지어 진다. (George I, Teruyki N. ; 1996)

<12> 한편, 어류의 혈청으로부터 면역글로불린을 정제하기 위해, 포화 황산암모늄에서의 침전, 겔 거르기, 이온 교환 크로마토그래피 및 친화 크로마토그래피를 포함하는 다양한 방법들이 사용되고 있다. 단백질 A, 만난 결합 단백질 (MBP) 및 특정 단백질과 같은 특정 리간드와 결합된 친화 컬럼은 방법상의 간편함과 IgM에 대한 특이성으로 인해 어류 혈청으로부터 IgM을 정제하는데 널리 사용되고 있다 (Suzuki *et al.*, 1990; Al-Harbi *et al.*, 2000; Watts *et al.*, 2001; Crosbie and Nowak, 2002; Bromage *et al.*, 2004). *Staphylococcus aureus*의 세포 벽 성분인 단백질 A는 IgG의 중쇄 내 그리고 포유류 IgM의 Fab 영역의 VH III 구조 내의 CH2-CH3 도메인에 결합한다. 포유류 혈청에 존재하는 렉틴 (lectin)인 MBP는 만노즈 및 *N*-acetylglucosamine에 특이적이며, 면역글로불린 (Ig) 상의 특이적인 탄수화물 성분에 결합할 수 있다 (Koppel *et al.*, 1994). 다른 한편으로, 특이적 단백질은 이에 대한 면역글로불린을 정제하는 항원으로 사용된다 (Grove *et al.*, 2006; Palenzuela *et al.*, 1996; Watts *et al.*, 2001). 하지만, 지금까지 단백질 A (Protein A), MBP (Mannan Binding Protein) 및 염소 IgG를 이용하여 정제된 우럭 (black rockfish) 면역글로불린 및 이의 특성에 대하여 보고 된 바 없다.

<13> 본 발명의 발명자들은 우럭의 면역성에 대한 이해를 향상시키기 위해 단백질 A, 만난 결합 단백질 (MBP) 및 염소 (goat) IgG와 같은 3개의 다른 친화 컬럼으로 우럭 혈청으로부터 Igs를 정제하는 능력에 대하여 측정하였으며, 분리된 면역글로불린들의 특성을 검증하였으며, 단일형태의 면역글로불린에 대한 단클론항체 (MAbs)를 생산하였고, 2-DE 프로파일 및 면역블랏 프로파일로 이를 확인하면서 본 발명에 이르렀다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<14> 이에 본 발명은 우럭 (*Sebastes schlegeli*)의 혈청으로부터 분리/정제된 면역글로불린 (Ig)에 대한 단클론항체 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

<15> 또한, 본 발명은 본 발명의 우럭으로부터 정제된 면역글로불린에 대한 단클론항체를 포함하는 검출키트를 제공함으로써 병원체에 대한 우럭의 체액성 면역 반응의 연구, 진단 마커 및 백신 개발에 필요한 유용한 정보를 제공하고자 한다.

발명의 구성 및 작용

<16> 본 발명은 우럭 (*Sebastes schlegeli*)의 혈청으로부터 분리/정제된 면역글로불린 (Ig)에 대한 단클론항체 및 이의 제조방법을 제공한다.

<17> 본 발명은 우럭 (*Sebastes schlegeli*)을 동물의 면역글로불린으로 면역한 후 우럭의 혈청을 분리하는 제 1단계; 단백질A, 만난 결합 단백질 (Mannan Binding Protein; MBP) 또는 면역친화 컬럼을 사용하여 면역글로불린 (Igs)을 정제하는 제 2단계; 면역된 마우스로부터 비장을 수집하여 골수종세포 (myeloma cell)와 융합하고 배양하여 우럭 면역글로불린에 대한 단클론항체를 제조하는 제 3단계를 포함하는 우럭 면역글로불린에 대한 단클론항체 제조방법을 제공한다.

<18> 상기 정제된 면역글로불린은 70 kDa의 분자량의 중쇄 및 25 kDa의 경쇄로 구성됨을 특징으로 하며, 상기 동물이 염소 (goat)인 것을 특징으로 한다.

<19> 상기 제 1단계의 동물이 염소 (goat)인 것을 특징으로 한다.

<20> 상기 제 2단계 이후에 면역글로불린 (Igs)을 마우스에 주사하여 면역증강 (booster) 시키는 단계를 더 포함함을 특징으로 한다.

<21> 또한, 본 발명은 상기의 제조방법에 의해 제조된 단클론항체를 제공한다.

<22> 또한, 본 발명은 i) 우럭의 면역글로불린에 대한 단클론항체가 공유 결합 또는 물리적 흡착에 의해 고정화되어 있는 고체 지지체, ii) 감지 가능한 발색 시약을 포함하는 하나 이상의 용액 및 iii) 완충된 세척 용액 및 품질 관리에 요구되는 시료를 포함하는 우럭의 면역글로불린 검출키트를 제공한다.

<23> 상기 키트에 사용된 단클론항체는 상기의 제조방법에 의해 제조된 단클론항체임을 특징으로 한다.

<24> 또한, 본 발명은 상기의 제조방법에 의해 제조된 검출키트를 사용하여 병원체에 대한 우럭의 체액성 면역을 진단하는 방법을 제공한다.

<26> 이하, 본 발명의 우럭의 면역글로불린 (Igs)에 대한 단클론항체를 수득하는 방법을 상세히 설명한다.

<27> 제 1단계: 우럭의 혈청 분리

<28> 우럭에 FCA (Freund's Complete Adjuvant)와 염소 IgG를 적절한 비율로 혼합하여 복강 내 주사하여 면역화 한 후, 일정한 간격으로 동일한 양의 부스터 (booster)를 투여한 다음, 미정맥 (caudal vein)으로부터 방혈하여 혈청을 수집하고 70℃에서 보관한다.

<29> 제 2단계: 면역글로불린 (Igs)의 정제

<30> 여러가지 컬럼, 바람직하게는 단백질 A, 만난 결합 단백질 및 면역친화 컬럼을 사용하여 1.2±0.08 mg/ml, 0.9±0.1 mg/ml 및 0.7±0.1 mg/ml 농도의 Ig-유사 단백질을 각각 정제할 수 있다.

<31> 제 3단계: 우럭 면역글로불린에 대한 단클론항체 제조

<32> 면역혈청으로부터 단백질 A, MBP 및 면역친화 컬럼으로 정제된 Ig으로 마우스를 면역하고, 면역증강 (booster)한 후, 면역된 마우스로부터 비장을 수집하여 골수종 세포 (myeloma cells)와 융합시키고, 융합세포를 마우스 혈액 세포로 된 배양층 위에서 배양하고 ELISA 및 면역블랏팅 분석을 통해 단클론항체를 수득할 수 있다.

<33> 본 발명에서, 2-차원 겔 전기영동 (2-DE), 면역블랏팅 및 MALDI-TOF MS를 사용하는 펩타이드 질량 핑거프린팅 (PMF)과 같은 면역반응을 연구하기 위한 단백질학 도구들이 단백질/항원의 분리 및 이들을 세포, 조직, 체액 또는 조직 용해체로부터 확인하는데 사용될 수 있다. 2-DE는 어류 면역학에서 다양한 방법들에 의해 정제된 Igs의 특성을 분석하기 위해 널리 사용되고 있다 (Shin *et al.*, 1996;2006). 다른 한편으로, 병원체의 2-DE 면역블랏 분석법은 *S. pyogenes* (Lei *et al.*, 2000), *Staphylococcus aureus* (Vytvytska *et al.*, 2002), *Aeromonas hydrophila* (Chen *et al.*, 2004), *Edwardsiella ictaruli* (Moore *et al.*, 2002), *E. tarda* (Kawai *et al.*, 2004) 및 *Lactococcus garvieae* (Kang *et al.*, 2006). 다양한 방법에서, 프로테오믹 도구들은 병원체를 연구하고, 진단을 위한 마커를 발굴하고 백신을 개발하는데 아주 유용한 것으로 확인되고 있다.

<34> 또한, 본 발명의 어류의 혈청으로부터 면역글로불린을 정제하기 위해, 포화 황산암모늄에서의 침전, 겔 거르기, 이온 교환 크로마토그래피 및 친화 크로마토그래피를 포함하는 다양한 방법들이 사용될 수 있다. 또한, 단백질 A, 만난 결합 단백질 (MBP) 및 특정 단백질과 같은 특정 리간드와 결합된 친화 컬럼은 방법상의 간편함과 IgM에 대한 특이성으로 인해 어류 혈청으로부터 IgM을 정제하는데 사용될 수 있다 (Suzuki *et al.*, 1990; Al-Harbi *et al.*, 2000; Watts *et al.*, 2001; Crosbie and Nowak, 2002; Bromage *et al.*, 2004).

<35> *Staphylococcus aureus*의 세포 벽 성분인 단백질 A는 IgG의 중쇄 내 그리고 포유류 IgM의 Fab 영역의 VH III 구조 내의 CH2-CH3 도메인에 결합한다. 포유류 혈청에 존재하는 렉틴 (lectin)인 만난 결합 단백질 (MBP)은 만노즈 및 N-acetylglucosamine에 특이적이며, 면역글로불린 (Ig)상의 특이적인 탄수화물 성분에 결합할 수 있다 (Koppel *et al.*, 1994). 또한, 특이 단백질이 본 발명의 면역글로불린을 정제하는 항원으로 사용될 수 있다 (Grove *et al.*, 2006; Palenzuela *et al.*, 1996; Watts *et al.*, 2001).

<36> 본 발명의 발명자들은 단백질 A (Protein A), 만난 결합 단백질 (MBP) 및 면역친화 컬럼을 이용하여 우럭 (black rockfish) 혈청으로부터 Ig-유사 단백질을 정제하는데 성공하였다. 단백질 A는 면역글로불린 (Ig)의 Fc 영역의 도메인에 결합하는 *Staphylococcus aureus*의 세포벽 성분이다 (Sasso *et al.*, 1991; Harada *et al.*,

1994). 한편, 만난 결합 단백질 (MBP)은 병원체 청소 작용을 하며 IgM의 만노즈 영역에 대한 높은 특이성을 가진 동물 렉틴 (lectin)이다 (Koppel *et al.*, 1994). 이들 2 분자들은 염소 IgG와 같이 (Palenzuela *et al.*, 1996; Watts *et al.*, 2001), 어류 혈청으로부터 친화 컬럼을 이용한 IgM 정제에 사용되어 오고 있다 (Suzuki *et al.*, 1990; Al-Harbi *et al.*, 2000; Watts *et al.*, 2001; Crosbie and Nowak, 2002; Bromage *et al.*, 2004).

<37> 한편, SDS-PAGE 분석을 통해 이전에 이미 경골어류의 IgM이 70-81 kDa의 중쇄 및 22-32 kDa의 경쇄로 구성되어 있음이 밝혀져 있다. 다른 한편으로, 이전의 2-DE 실험들은 사람 IgM의 중쇄에 해당하는 스팟이 5.6 ~ 6.4 범위의 pI, 80-82 kDa의 분자량 범위에서 발견되었음을 보여주었다 (Al-Harbi *et al.*, 2000; Watts *et al.*, 2001; Crosbie and Nowak, 2002; Bromage *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2006; Palenzuela *et al.*, 1996; Iwama and Nakanishi, 1996). 또한, IgM의 중쇄의 pI 범위 및 분자량은 emerald rockcod (*Ttrematomus bernacchii* pI range 4.0-6.0, MW 78 kDa) (Pucci *et al.*, 2003), rainbow trout (pI 4.8-6.0, MW 76 kDa) 및 Arctic char (*Salvelinus alpinus* pI 5.0-6.5, MW 76 kDa) (Hordvik *et al.*, 2002)에서 약간씩 달랐으며, 반면에 상기 3종들은 4-7의 pI 범위에 널리 분포하였다 (Hordvik *et al.*, 2002; Pucci *et al.*, 2003).

<38> 상기 내용과 유사하게, 본 발명의 우럭으로부터 정제된 면역글로불린 (Igs)들은 SDS-PAGE에서 70 kDa 및 25 kDa의 밴드를 나타내었으며, 주요 스팟 그룹은 정제된 Ig의 2-DE 프로파일 상에 pI 4.8-5.6 및 MW 70 kDa, MW 25 kDa의 범위로 나타났다. 특히, SDS-PAGE 및 2-DE의 결과에 기초하여, 70 kDa의 밴드 및 25 kDa의 스팟이 중쇄 및 경쇄를 각각 나타내는 것으로 여겨진다. 또한 PMF, NCBI 데이터베이스 검색결과 면역글로불린 단백질의 중쇄는 IgM 또는 IgM 전구체로 확인되었다. 즉, 본 발명에서 정제한 면역글로불린 단백질은 SDS-PAGE 2-DE 및 PMF 분석으로 우럭의 IgM인 것으로 확인된다.

<39> 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<40> <실시예 1> 어류 및 면역 혈청의 준비

<41> 우럭 (체중 300~400g)을 수산시장에서 구입하여 18 ~ 20℃로 유지된 재순환 바닷물이 채워진 섬유강화 플라스틱 (FRP) 탱크에서 유지하였다. 15 마리의 물고기에 Freund's Complete Adjuvant (FCA)와 1:1 (v/v)로 혼합한 염소 IgG (250 ug/100g 체중)를 복강 내 주사하여 면역화하였다. 2주 간격으로 동일한 양의 2번째 및 3번째 부스터 (booster)를 투여하였다. 3번째 주사 후 일주일에 미정맥 (caudal vein)으로부터 방혈하여 혈청을 수집하고, 사용 때까지 70℃에서 유지하였다.

<42> <실시예 2> 물고기 항체의 정제

<43> 면역된 혈청으로부터 면역글로불린 (Ig)을 정제하기 위해 단백질 A, 만난-결합 단백질 (MBP) 및 면역친화 컬럼을 사용하였다.

<44> A. 단백질 A 친화 컬럼

<45> 면역된 우럭으로부터 면역글로불린 (Igs)을 정제하기 위해 조금 변형된 Bollage *et al.* (1996) 방법에 따라 단백질 A (Protein A) 비드 (beads) (Sigma, USA)를 사용하였다. 간략히, 단백질 A 비드를 일회용의 폴리스틸렌 컬럼 (Bio-Rad, USA)으로 팩킹하고 결합완충액 (10 mM Tris, 1.25 M NaCl, 20 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃, pH 7.4)으로 세척하였다. 혈청 샘플들을 결합완충액과 혼합하여 (1:1) 컬럼에 적용하였다. 결합되지 아니한 물질들을 150 ml의 결합 완충액으로 제거하고, 0.1 ml의 0.1 M Tris buffer (pH 7.4)를 포함하는 마이크로튜브 내에 수집된 1 ml의 프랙션으로 용리완충액 (10 mM Tris, 1.25 M NaCl, 0.02% NaN₃, pH 7.4)을 사용하여 면역글로불린 (Igs)을 용리하였다.

<46> 단백질 A 컬럼은 우럭의 혈청으로부터 Ig-유사 단백질을 성공적으로 정제할 수 있었다. 단백질 A 컬럼을 사용하여 정제된 Ig-유사 단백질의 농도는 1.2± 0.08 mg/ml 이었다.

<47> B. 만난 결합 단백질 (MBP) 친화 컬럼

<48> ImmunoPure IgM Purification Kit (Pierce, USA)를 사용하여 면역된 우럭 (black rockfish)로부터 면역글로불린 (Igs)을 정제하였다. 간략히, 컬럼을 5 ml의 사용전 버퍼(preparation buffer)로 전-세척하고, 20 ml의 결합 완충액으로 평형화시켰다. 혈청 샘플들을 결합 완충액과 혼합 (1:1)하고, 컬럼에 적용한 후 4℃에서 30분간 배양하였다. 결합하지 않은 물질을 42 ml의 결합 완충액으로 제거하고 컬럼을 3 ml의 용리 완충액으로

로딩한 후 상온에서 1시간 동안 배양하고 용출액을 상기와 같이 분획화 하였다.

<49> 만난 결합 단백질 (MBP) 컬럼은 우력의 혈청으로부터 Ig-유사 단백질을 성공적으로 정제할 수 있었다. 만난 결합 단백질 (MBP) 컬럼을 사용하여 정제된 Ig-유사 단백질의 농도는 0.9 ± 0.1 mg/ml 이었다.

<50> C. 면역친화 컬럼

<51> 면역글로불린 (Igs)을 Smith's method (1992)에 따라 면역된 우력 혈청으로부터 면역친화 정제하였다. 간략히, 염소 IgG 아가로스 비드 (Sigma, USA)를 포함하는 컬럼을 150ml의 PBS (0.02M phosphate, 0.15 M NaCl)로 세척하고 PSB와 1:1로 혼합된 혈청 샘플들로 로딩 (loading)하였다. 컬럼을 150ml의 PBS로 세척하고, 면역글로불린을 용리완충액 (0.1 M glycine-NaOH, pH 11)으로 용리하고, 1ml의 프랙션 (fractions)을 0.1ml의 0.1 M 트리스 버퍼 (Tris buffer) (pH 7.4)를 포함하는 마이크로튜브 내에 수집하였다.

<52> 면역친화 컬럼은 우력의 혈청으로부터 Ig-유사 단백질을 성공적으로 정제할 수 있었다. 면역친화 컬럼을 사용하여 정제된 Ig-유사 단백질의 농도는 0.7 ± 0.1 mg/ml 이었다.

<53> D. 음이온 교환 컬럼 분석

<54> 상기에서 정제된 우력의 Ig를 음이온 교환 컬럼을 사용하여 분석하였다.

<55> 정제된 Igs는 음이온 교환 컬럼에서 0.46M의 NaCl 농도에서 단일 피크 (single peak)를 나타내었다.(도 1)

<56> <실시예 3> 친화컬럼을 사용한 정제된 단백질의 탈염

<57> 탈염을 위해, 정제된 면역글로불린 (Igs)을 PBS에서 3회 세척하고 $1,600 \times g$ (Centricon, Falcon, USA)에서 원심 분리하였다. 정제된 단백질의 농도는 595 nm에서 분광광도계로 브라드포드 시약 (Bradford reagent)(Bio-Rad, USA)를 사용하여 측정하였다.

<58> A. 정제된 면역글로불린의 SDS-PAGE 및 2-차원 겔 전기영동 (2-DE)

<59> 정제된 면역글로불린 (Igs)의 분자량을 확인하기 위해 환원 조건 하에서 SDS-PAGE를 수행하였다. 환원성 분위기를 위해, 정제된 면역글로불린 ($0.3 \mu g$)를 SDS-PAGE 샘플완충액 (60 mM Tris-HCl, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-머캅토에탄올 (mercaptoethanol), 0.1% 브로모페놀 블루 (bromophenol blue))과 혼합하고 100 °C에서 10분간 끓였다.

<60> 변성된 단백질들을 15분간 50V로, 그 이후 염색약이 겔이 바닥에 이르게 될 때까지 100V로 12.5% 겔 상에서 분석하였다. 2-DE는 Get *et al.* (2000)에 의해 설명된 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 친화 컬럼으로 정제된 면역글로불린들을 재수화 완충액 (9 M urea, 4% CHAPS, 20 mM DTT, 0.5% IPG buffer, pH 4-7 및 미량의 브로모페놀 블루 (bromophenol blue)로 1 mg/ml까지 희석한 후, 상온에서 $16,000 \times g$ 로 10분간 마이크로원심 분리하였다. 상층액을 IPGphor system (Amersham)을 사용하는 고정된 pH 경사 (IPG) 스트립 (strips)으로 등전-집속을 수행하였다. 자동화된 실행은 전체 56kVhr이 되도록 30V에서 6시간, 60V에서 6시간 및 4,500V까지 점차적으로 전압의 상승으로 구성하였다. 집중된 IPG 스트립을 0.5% (w/v) 아가로스 로딩된 12.5% SDS-PAGE 겔 상에 놓고 염색액이 겔의 바닥에 닿을 때까지 전기영동 하였다. SDS-PAGE 상의 밴드 및 2-DE 겔 상의 점들은 CBB G-250으로 시각화되었고, Agfa Arcus 1200™ 이미지 스캐너 (Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgium)로 디지털화하고, Phoretix™ 2D software (Ver. 5.01, NonLinear Dynamics Ltd., UK)를 사용하여 분석하였다.

<61> B. SDS-PAGE 및 2-DE 결과

<62> 3개의 다른 컬럼을 사용하여 정제한 Ig-유사 단백질을 SDS-PAGE 및 2-DE 분석을 수행하였다.

<63> 환원 조건 하에서 SDS-PAGE 분석은 경골어류의 IgM은 70-81 kDa의 중쇄와 22-32 kDa의 경쇄로 구성되어 있음이 이미 밝혀져 있다. 이와 일치하는 결과로서 본 실험에서 정제된 Ig-유사 단백질 모두는 70 및 25 kDa의 밴드로 구성되어 있었고, 따라서 70 kDa의 밴드는 중쇄로, 25 kDa의 밴드는 경쇄임을 확인하였다.(도 2)

<64> <실시예 4> 단클론항체의 제조

<65> A. 단클론항체의 제조

<66> 면역혈청으로부터 단백질 A, MBP 및 면역친화 컬럼으로 정제된 Ig으로 BALB/C 마우스 (Hyochang Science Inc., Korea)를 Al-Harbi *et al.* (2000)에 기술된 방법에 따라 면역하였다. 간략히, Freund's 완전 (제1) 또는 불완전 (제2 및 제3) 어쥬반트와 1:1로 혼합된, 50μg의 우력 면역글로불린 (Igs)을 6주에 걸쳐 매 2

주 마다 복강 내 (IP) 주사하였다.

<67> 세 번째 주사 1주일 후, 어쥬반트 없이 50 μ g의 면역글로불린을 미정맥 주사를 통하여 면역증강 (booster)하였다. 어쥬반트-없이 면역증강 한 3일 후, 면역된 마우스로부터 비장을 수집하여 폴리에틸렌글리콜을 사용하여 Sp2/o 골수종 세포 (myeloma cells) (CRL 1581; ATCC, USA)과 융합시켰다. 융합 세포를 96-웰 플레이트에서 마우스 혈액 세포로 된 배양층 위에서 배양하였다. ELISA 및 면역블랏팅 분석으로 단클론항체를 스크리닝하였다.

<68> B. 면역블랏 분석

<69> ELISA 스크리닝 후 SDS-PAGE 면역블랏 분석으로 Ig에 대한 21 개의 단클론항체 클론을 선택하였다. SDS-PAGE 는 10% 아크릴아미드 겔에서 수행되었고, 분리된 단백질을 니트로셀룰로오스 막으로 이동시키고 21 MAb 클론과 반응시켰다.

<70> Ig에 대한 단클론항체 중 R7B4-8 및 R7B4-9를 포함하는 19개의 클론들은 Ig의 중쇄 (heavy chain)에 특이적이었으며, 두개의 클론 (R11H4-1, R9C7-6)은 Ig의 경쇄 (light chain)에 특이적이었다.(도 3).

<71> 생성된 모든 MAbs는 이소타입(isotype) 클래스에 대한 분석에서 IgG2, IgG1 또는 IgM에 속하였다. 단백질 A 컬럼을 사용한 Ig 정제에서 오염물질 또는 불특정 단백질에 대한 보고가 있으나 본 실험에서의 면역블랏 프로파일에서는 어떠한 오염물질 또는 불특정 단백질이 관찰되지 않았다.

<72> 단백질 A-양성 Ig에 대한 MAbs 는 세 개의 친화 컬럼으로부터 분리된 모든 Ig와 비슷한 반응을 갖음을 확인할 수 있었다.(도 4)

<73> C. 2-DE 면역블랏 분석

<74> 우럭의 전체 혈청으로부터의 Ig의 중쇄를 동정하기 위하여 2-DE(two dimensional gel electrophoresis) 면역블랏 분석을 수행하였다. 2-DE는 IPG 건조 스트립(strip)(pH 4-7, 7cm)을 사용한 IEF (isoelectric focusing)에 의해 수행된 후 12.5% SDS-PAGE를 실시하였다. 2-DE 면역블랏 프로파일은 Ig 중쇄에 대한 MAb 분자량 70kDa 및 등전점 4.8-5.6의 범위에서 분리된 스팟들과 반응함을 확인할 수 있었다.(도 5)

발명의 효과

<75> 본 발명은 우럭 혈청으로부터 분리 및 정제한 면역글로불린 및 이의 제조방법, 더 나아가 상기 면역글로불린에 대한 단클론항체 및 이의 제조방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 우럭 면역글로불린에 대한 단클론항체를 포함하는 키트를 제공함으로써 면역글로불린의 검출을 용이하게 하여 병원체에 대한 우럭의 체액성 면역반응에 대한 연구, 진단 마커 및 백신 개발에 유용한 정보를 제공할 수 있다.

<76> 참고문헌

<77> Al-Harbi AH, Truax R, Thune, RL. Production and characterization of monoclonal antibodies against tilapia (*Oreochromis niloticus*) immuno globulin. Aquaculture 2000, **188**, 219-227.

<78> Bang JD, Kim JW, Lee SD, Park SI, Chun SG, Jeong CS, Park JW. Humoral immune response of flounder to *Edwardsiella tarda*: the presence of various sizes of immunoglobulins in flounder. Dis Aquat Org 1996, **26**, 197-203.

<79> Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. Protein methods. New York; wiley-Liss, John wiley and Sons Inc. 1996.

<80> Clem LW. Phylogeny of immuno globulin structure and function. IV. Immunoglobulins of the giant grouper, *Epinephelus itaira*. J biol chem 1971; **246**, 9-15.

<81> Coll JM, Dominguez-JuncalApplications of monoclonal anti bodies in aquaculture. Biotechnol Adv 1995, **13**, 45-73.

<82> Crosbie PBB, Nowak BF. Production of polyclonal antisera against barramundi (*Lates calcarifer*Bloch) serum immunoglobulin derived from affinity columns containing mannan-binding protein or staphylococcal protein A. Aquaculture 2002, **211**, 49-63.

<83> Danilova N, Hohman VS, Kim EH, Steiner LA. Immunoglobulin variable-region diversity in the

zebrafish. Immunogenetics 2000, **52**, 8191.

<84> Elcombe BM, Chang RJ, Taves CJ, Winkelhake JL. Evolution of antibody structure and effector functions: comparative hemolytic activities of monomeric and tetrameric IgM from rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. Comp Biochem Physiol B 1985, **80**, 697-706.

<85> George I, Teruyki N. The Specific Immune System: Humoral Defence In The fish immune system. Academic Press; 1996.

<86> Hansen JD, Landis ED, Phillips RB. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. Proc Natl Acad Sci USA 2005, **102**, 6919-6924.

<87> Hordvik I, Thevarajan J, Samdal I, Bastani N, Krossoy B. Molecular cloning and phylogenetic analysis of the Atlantic salmon immunoglobulin D gene. Scand J Immunol 1999, **50**, 202-210.

<88> Hordvik I, Berven F, Solem S, Hatten F, Endresen C. Analysis of two IgM isotypes in Atlantic salmon and brown trout. Mol Immunol 2002, **39**, 313-321.

<89> Kang SH, Shin GW, Shin YS, J PK, Kim YR, Yang HH, Lee EY, Lee EG, Huh NE, Ju OM, Jung TS. Experimental evaluation of pathogenicity of *Lactococcus garvieae* in black rockfish (*Sebastes schlegeli*). J Vet Sci 2004, **5**, 387-390.

<90> Kang SH, Shin GW, Palaksha KJ, Shin YS, Kim YR, Lee EY, Suh EH, Huh NE, Oh MJ, Jung TS. Efficacy of protein A-HRP in an immunological study of black rockfish (*Sebastes schlegeli* Higendorf) humoral immune responses. Fish Shellfish Immunol 2006, **20**, 295-304.

<91> Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. J Immunol 2005, **174**, 2453-2455.

<92> Lobb CJ, Olson MO. Immuno-globulin heavy H chain isotypes in a teleost fish. J Immunol 1988, **141**, 1236-1245.

<93> Morrison RN, Nowak BF. Elution of snapper, *Pagrus auratus*(Bloch and Schneider) Ig from a protein A affinity chromatography column yields contamination from the binding ligand. Bull Eur Assoc Fish Pathol 2000, **20**, 174-179.

<94> Nevens JR, Mallia AK, Wendt MW, Smith PK. Affinity chromatographic purification of immunoglobulin M antibodies utilizing immobilized mannan binding protein. J Chromatogr 1992, **597**, 247-256.

<95> PalenzuelaO, Sitja-Bobadilla A, Alvarez-Pellitero P. Isolation and partial characterization of serum immunoglobulins from sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata L.*). Fish Shellfish Immunol 1996, **6**, 81-94.

<96> Park SW, Kim YG, Choi DL. *Vibrio ordalii*, the causative agent of massive mortality in cultured rockfish (*Sebastes schlegeli*) larvae. J fish pathol 1996, **9**, 137-145.

<97> Pucci B, Coscia MR, Oreste U. Characterization of serum immunoglobulin M of the Antarctic teleost (*Trematomus bernacchii*). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2003, **135**, 349-357.

<98> Rombout JH, Taverne N, van de Kamp M, Taverne-Thiele AJ. Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio L.*). Dev Comp Immunol 1993, **17**, 309-317.

<99> Sasso EH, Siverman GJ, Mannik M. Human IgA and IgG F(ab')₂ that bind to staphylococcal protein A belong to the V_H III subgroup. J Immunol 1991, **147**, 1877-1883.

<100> Seng LT, Colorni A. Infectious diseases of warmwater fish in marine and brackish water. In: Woo PTK, Bruno DW, Lim LHS. editors. Diseases and Disorders of Finfish in Cage Culture. CABI publishing; 2002.

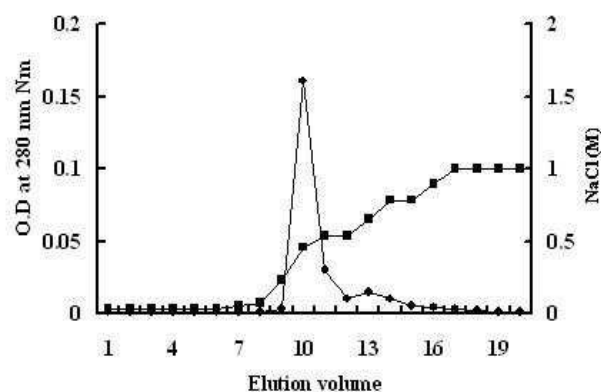
- <101> Smith SA. Affinity purification of serum immunoglobulin from fish techniques in fish. Immunol 1992, 125-30.
- <102> Suzuki Y, Tanaka M, Aida K, Hanyu I. Affinity of fish immunoglobulin to protein A. Nippon Suisan Gakkai Shi 1990, **56**, 831.
- <103> Tissot JD, Schifferli JA, Hochstrasser DF, Pasquali C, Spertini F, Clement F, Frutiger S, Paquet N, Hughes GJ, Schneider P. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis analysis of cryoglobulins and identification of an IgM-associated peptide. J Immunol Methods 1994, **12**, 63-75.
- <104> Tizard IR. An introduction In Veterinary immunology 5th ed., W.B Saunders Company; 1996.
- <105> Uchida D, Hirose H, Chang PK, Aranishi F, Hirayabu E, Mano N, Mitsuya T, Prayitno SB, Natori M. Characterization of Japanese eel immunoglobulin M and its level in serum. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2000, **127**, 525-532.
- <106> Watts M, Munday BL, Burke CM. Isolation and partial characterisation of immunoglobulin from southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii* Castelnau. Fish Shellfish Immunol 2001, **11**, 491-503.

도면의 간단한 설명

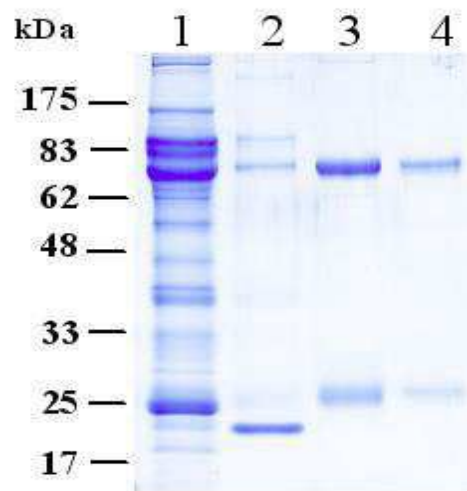
- <1> 도 1은 단백질 A, 만난 결합 단백질 (MBP) 및 염소 IgG 친화 컬럼을 사용하여 분리/정제된 우럭 Igs에 대한 음이온 교환 컬럼(HQ)의 크로마토그램을 나타낸 것이다.
- <2> 도 2는 단백질 A, 만난 결합 단백질 (MBP) 및 염소 IgG 친화 컬럼을 사용하여 분리/정제된 우럭의 SDS-PAGE 분석을 나타낸 사진으로 Lane 1은 우럭의 전체 혈청, Lane 2는 MBP-양성 Ig, Lane 3은 단백질 A-양성 Ig, Lane 4는 염소(goat) IgG로 면역화된 혈청으로부터의 염소(goat) IgG-양성 Ig를 나타낸 것이다.
- <3> 도 3은 단백질 A-양성 Ig에 대한 특이적 단클론 항체를 사용한 면역블랏 분석을 나타낸 것으로, Lane 1은 Ig 중쇄에 대한 특정 MAb의 대표(representive) 클론 (R7B4-8), Lane 2는 Ig 경쇄에 대한 특정 MAb의 대표(representive) 클론 (R11H4-1)을 나타낸 것이다.
- <4> 도 4는 MAb의 R7B4-8(panel A) 및 R7B4-9(panel B)의 세 개의 다른 친화 컬럼으로부터 분리/정제된 Igs에 대한 교차반응(cross-reaction)을 나타낸 것으로 Lane 1 및 Lane 5는 MBP 컬럼으로 정제된 Igs, Lane 2 및 Lane 6은 단백질 A 컬럼으로 정제된 Igs, Lane 3 및 Lane 4는 IgG 컬럼으로 정제된 Igs를 나타낸 것이다.
- <5> 도 5는 특정 MAb(R7B4-9)를 사용한 2-DE 면역블랏 프로파일에서 Ig 중쇄의 동정을 나타낸 도로써, (A)는 CBG로 염색된 하나의 겔을 나타내며, (B)는 면역블랏 분석에 사용된 또 다른 겔을 나타낸 것이다.
- <6>

도면

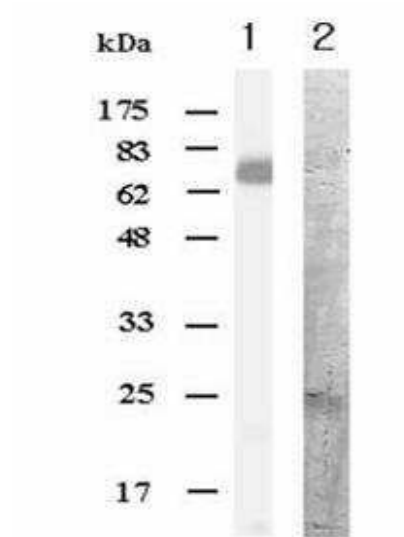
도면1



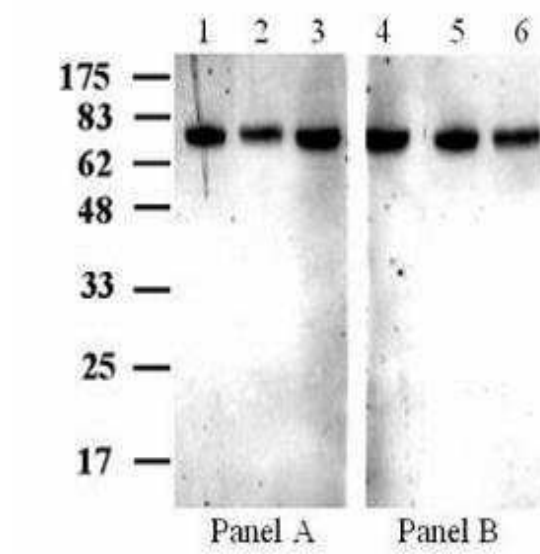
도면2



도면3



도면4



도면5

