大韓微生物學會誌：第18卷 第1號 1983
J. Kor. Soc. Microbiol., Vol. 18, No. 1, 1983

T-cell subset 定量을 위한 抗牛赤血球 IgM 抗體의 分離 精製(Ⅱ)

慶熙大學校 醫科大學 微生物學敎室

夏 潤 文·胡 淳 太

=Abstract=

Purification of Anti-Ox Red Blood Cell IgM Antibody for T-cell Subset Assay

Youn-Mun Ha, Ph.D. and Soon-Tae Ho, M.D.

Department of Microbiology, School of Medicine, Kyung Hee University
Seoul, Korea

Antisera to ox red blood cells were prepared by injection of ox red blood cell stroma without adjuvant in outbred white rabbits. Purified IgM fraction for T-cell subset assay was obtained from these rabbit anti-ox red blood cell stroma antisera by precipitation with 50% saturated ammonium sulphate followed by DEAE-Cellulose chromatography and Sephadex G-200 gel filtration.

The serological identification of purified IgM fraction was achieved by immunoelectrophoresis with guinea pig antiserum against rabbit anti-ox red blood cell IgM antibody.

緖 論

Cooper에 의해 末梢血內에는 T-임파구와 B-임파구가 各各 獨自的으로 또는 相互協力에 의해 免疫學的 機能을 遂行하고 있다는 것이 알려진 것은 周知의 事實이며[1] 最近 Herzenberg 等은 mouse에 있어서 T細胞中에 γFc 受容體를 가진 細胞가 suppressor 내지는 killer의 機能을 가진 것으로 시사했고[2] Moretta 等은 사람의 T細胞中에는 γFc受容體를 가진 것과 IgM의 Fc部分에 對한 受容體(μFc受容體)를 가진 것이 있어 各各 別個의 集團으로, γFc受容體를 가진 T細胞를 suppressor, μFc受容體를 가진 T細胞를 helper機能을 가진 것으로 報告하여[3,4] Fc受容體가 사람 T-임파구의 subset를 區分하는 marker로서 利用될 수 있다는 可能性을 시사한 후 많은 사람에 의해 T-subset定量 區分에 對한 報告가 있었다[5,6].

著者들은 T-subset定量을 위한 抗牛赤血球 IgM抗體의 分離 精製에 對한 一次報告에[7] 이어 牛赤血球 stroma를 토끼에 免疫하여 얻은 抗體分劃으로 사람 末梢血液內 T-subset集團인 μFc 受容體를 가진 Tμ 細胞를 얻을 目的으로 토끼免疫血淸으로 부터 IgM分劃을 分離 精製하였기에 이에 報告하는 바이다.

實驗 材料 및 方法

材料 및 實驗動物

無菌的으로 채혈한 牛血液 500ml을 38% sodium citrate 용액 125ml와 혼합하여 다시 生理的 食鹽水 3,000ml을 넣어 pH를 7.5로 조정한 血球부유액과 건강한 2.0kg 前後의 토끼를 市中에서 구입하여 실험실에서 약 1주일간 사육한 후 免疫에 使用하였다.

方 法

(1) 牛赤血球 stroma 抗原 준비[8]

Sodium citrate 용액을 加한 牛血液을 gauze에 通過시켜 4°C에서 2,000rpm, 20分間 遠心하여 上淸을 버리고 沈澱한 血球에 약 1,000ml의 生理食鹽水를 加해, 같은 方法으로 遠心을 2回 되풀이하여 血球를 세정하였다. 세정된 血球에 빙초산 2ml을 加한 증류수 5,000ml을 magnetic stirrer로 徐徐히 교반하면서 넣은 후 약 10分間 실온에서 다시 교반하였다. 이 血球부유액을 4°C에서 血球가 溶血되게끔 정치상태에서 16~18時間을 overnight 시켰다. 上淸을 吸引하여 除去하고 低溫에서 2,000rpm, 15分間 遠心하여 stroma를 얻었다. 沈澱 stroma에 pH 5.0의 0.01 M 초산완충액

1,000ml을 加해 다시 2,000rpm, 15分間 遠心을 6回 되풀이하여 될 수 있는한 血色素를 除去하여 stroma를 얻었다. stroma에 等量의 生理食鹽水를 加해 低溫에서 1,000rpm, 30分間 遠心을 3回 되풀이하여 세정하고, 다시 上淸을 버리고 침전 stroma에 200ml의 生理食鹽水를 넣어 균일한 stoma가 될때까지 magnetic stirrer로 교반하였다. stroma 부유액을 100°C에서 60分間 加熱하면서 가끔 흔들어 주었다. 냉각시킨 후 다시 均一한 부유액이 될때까지 magnetic stirrer로 교반하여 最終的인 牛赤血球 stroma를 얻었다. Micro-kjeldahl 法에 의하여 질소량을 側定하여 질소량이 1mgN/ml이 되게끔 滅菌生理食鹽水로 농도를 조정하였다. 1% masonine을 $\frac{1}{100}$量 加해 냉장고에 보관하면서 免疫에 使用하였다.

(2) 免疫日程

以上과 같이 준비된 stroma 抗原液을 健康한 體重 2.0kg 以上의 成熟 토끼에 다음과 같은 日程에 의해 주사하였다.

免疫日程	注射抗原	注 射 量	注射部位
1	0.2mgN/ml	0.5ml	腹 腔 內
3	0.2mgN/ml	0.5ml	耳靜脈內
5	0.2mgN/ml	1.0ml	〃
7	0.2mgN/ml	2.0ml	〃
9	0.2mgN/ml	3.0ml	〃
12	0.5mgN/ml	1.0ml	腹 腔 內
14	部 分 採 血		
16	0.5mgN/ml	2.0ml	耳靜脈內
19	0.5mgN/ml	3.0ml	腹 腔 內
21	0.5mgN/ml	3.0ml	耳靜脈內
23	0.5mgN/ml	3.0ml	〃
25	0.5mgN/ml	5.0ml	腹 腔 內
32	採 血		

(3) IgM 抗體의 分離

a) Crude Immunoglobulin fraction의 分離

4마리의 토끼로부터 各各 얻은 血淸을 증류수로 2倍 희석하여 等量의 100% 포화 ammonium sulphate용액과 혼합하여 最終的으로 50% 포화 용액상태에서 ammonia 水 原液으로 하여 pH가 6.0~6.8이 되도록 조정하였다. pH를 조정한 후 ice bath에서 magnetic stirrer로 3時間 동안 교반한 후 8,000 rpm에서 30分間 遠心하여 생긴 沈澱物을 溶解될 수 있는 最小量의 증류수에 溶解시켜 3日 동안 증류수에서 透析하여 잔류 ammonium sulphate가 없는지를 Nessler's reagent로 확인한 후 最終的으로 6PBS에 再透析하여 crude immunoglobulin fraction을 얻었다. 4日 동안 증류수 및 6 PBS로 透析하는 동안 每日 2回 透析外液을 바꾸어 주었다.

b) DEAE-cellulose chromatography에 의한 anti-ox RBC Immunoglobulin 分劃의 一次 分離

50% 포화 ammonium sulphate에서 얻은 crude immunoglobulin fraction을 常法에 의해 DEAE-cellulose column(2.5×12cm)에서 chromatography 하였다. column의 포화완충액과 용출액은 0.0175 M Na-PB, pH 6.3의 용액을 使用하였다. main fraction을 얻은 다음 salt 成分을 除去後 ultrafiltration에 의해 농축하였다.

c) Sephadex G-200에서의 Gel-filtration에 의한 抗牛赤血球 IgM 抗體의 最終精製

50% 포화 ammonium sulphate 용액으로 부터 얻은 immunoglobulin의 salt fraction에서 DEAE-cellulose chromatography를 거친 一次 immunoglobulin fraction을 0.1 M Tris-0.2 M NaCl, pH 8.0 완충용액으로 포화시킨 Sephadex G-200 column(2.5×68cm)에서 역시 같은 Tris-NaCl 완충용액으로 용출하였다.

d) 免疫電氣泳動에 의한 IgM 分劃의 확인

一般的으로 실시되는 免疫電氣泳動法[9,10]을 使用하였으며 한천농도는 veronal 염산 완충액 ion 강도 0.05, pH 8.2에서 0.8%로 하였으며 泳動은 上記 완충액에서 定電壓 5 volts/cm의 電壓이 걸리게 하여 1時間 실시하였다. 電氣泳動에 적용한 protein의 농도는 약 1.0 mg/ml이었다. 泳動이 끝난 후 常法에 준하여 gel上의 홈에 抗牛赤血球 IgM 抗體 토끼血淸에 對한 Guinea pig 抗血淸을 적용하여 습기가 유지된 상자에 넣어 37°C incubator 내에서 16時間 反應시켰다.

成 績

14日째 部分採血하여 얻은 血淸과 1個月후 全採血하여 얻은 血淸을 혼합하여 一部는 保存하고 必要한 量을 가지고 50% 포화 ammonium sulphate에서 얻은 crude immunoglobulin 分劃을 DEAE-cellulose 上에서 Na-phosphate 완충액으로 chromatography한 pattern은 그림 1에서 보여주는 바와 같다.

DEAE-cellulose chromatography에서 얻은 一次 分離 immunoglobulin 分劃을 다시 0.1 M Tris-0.2 M NaCl 완충액에 포화된 Sephadex G-200에서 gel 포화완충액으로 gel filtration을 한 結果는 그림 2에서 보는 바와 같다.

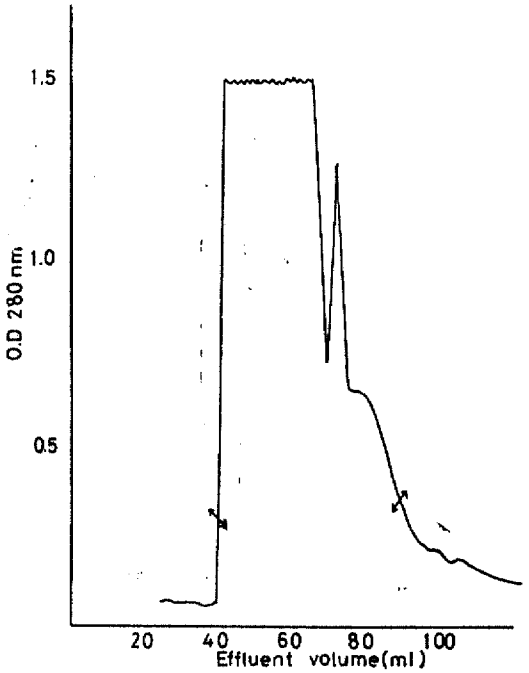

Fig. 1. Chromatography of rabbit anti Ox RBC crude immunoglobulin fraction on DEAE-cellulose (2.5×12cm) in 0.0175 M Na-PB buffer, pH 6.3. (from 34ml of rabbit antiserum) The salt fractions of immunoglobulin were applied and immunoglobulin fractions were eluted with the buffer. Arrows indicate the fraction collected.

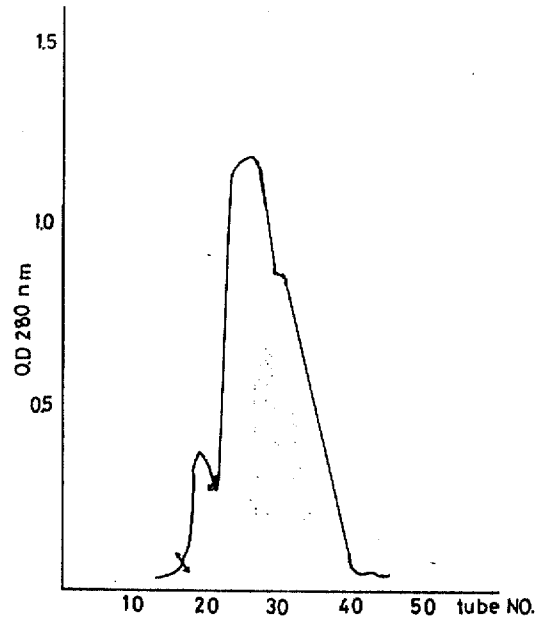

Fig. 2. purification of IgM fraction through a Sephadex G-200 column(2.5×78dm) in 0.1 M Tris-0.2 M Nacl buffer, pH 8.0 at room temperature. Immunoglobulin fraction obtained(from 8.5 ml of rabbit anti-serum) by chromatography on DEAE-cellulose were applied. Arrows indicate the fraction collected(3.5 ml/tube)

Gel filtration에서 얻어진 IgM분획을 ultrafiltration에 의해 농축하여 다시 regel filtration 하였다. 그림 3-(a)에서 나타난 바와 같이 상당량의 IgM 분획 이외에 다른 immunoglobulin 分劃이 함유되어 있음을 알 수 있었다. IgM分劃의 純度를 높이기 위해 다시 같은 gel上에서 recycling한 것이 그림 3-(b)에서 보여지고 있다. 상당량의 contaminants分이 除去되었음을 보여주고 있다. Sephadex G-200上에서 recycling한 IgM分劃을 역시 ultrafiltration方法에 의해 0.8 mg 前後까지 농축하였다. 그림 4에서 보는바와 같이 分離精製한 IgM分劃을 常法에 의해 면역전기영동후의 純度는 양호한 것으로 판단할 수 있었다.

考　　案

Tμ細胞, Tγ細胞 즉 helper T細胞와 suppressor T細胞의 機能을 알기 위해서는 T細胞의 分離가 우선되어야 하고 二次的으로 면역 globulin의 Fc部分과 結合시켜 간접적인 指示系를 利用하여 Tμ細胞와 Tγ細胞를 分離하는 方法이 開發되어 이들 細胞에 對한 硏究가 여러 각도에서 진행되고 있다. T細胞上의 Fc受容體를 檢出하기 위해서는 우선 適當한 赤血球에 對한 抗血淸을 만들어 이 抗血淸으로 부터 檢出하려고 하는 Fc受容體에 對應하는 class의 면역 globulin을 分離하여 이 globulin으로 感作된 赤血球와 末梢淋巴球를 反應시켜 感作赤血球가 淋巴球表面에 附着하여 rosette를 形成하느냐에 따라서 Fc受容體의 存在여부를 알게 된다. 다시 말해서 EA(Erythrocyte-Antibody) rosette 法을 利用하는 것이다. 現在까지 報告된 바에 의하면 抗赤血球抗體의 IgG Fc部分과 結合하는 T細胞가 면역수행에 있어서 suppressor機能을 가진 것으로 지적되었다[4]. 즉 앞에서 언급한 바와 같이 Moretta 등은 Tμ細胞는 B細胞分化時 helper로써 기능을 수행하지만 Tγ細胞는 반대로 Tμ細胞의 補助下에 B細胞의 分裂과 分化를 抑制하는 것으로 시사하였다.

著者들은 牛赤血球抗體 IgG의 分離 精製를 이미 報告한 데 이어 免疫機能을 硏究하는데 좋은 實驗材料가

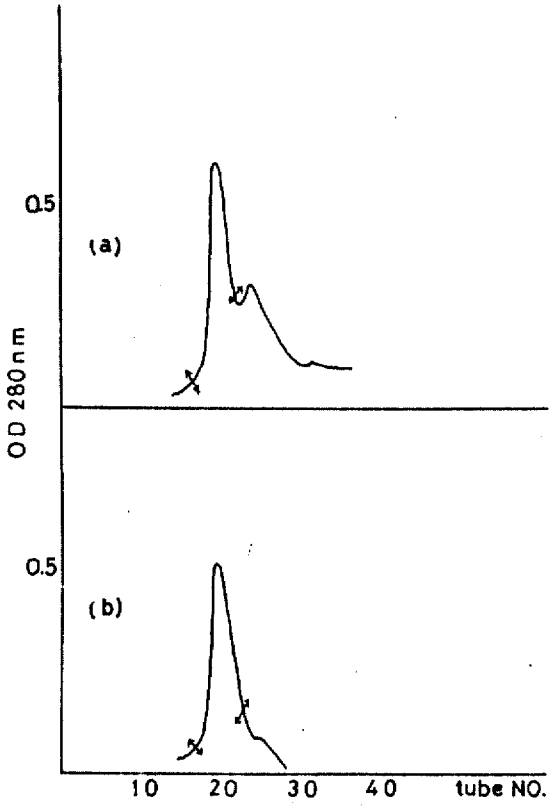

Fig. 3. purification of IgM fraction by regel filtration through a Sephadex G-200 column (2.5×68cm) in 0.1 M Tris-0.2M Nacl buffer, pH 8.0 at room temperature. IgM fraction obtained(from 17ml of rabbit serum) gel filtration on Sephadex G-200 column were applied. Arrows indicate the fraction collected (3.5ml/tube) (a) The regel filtration (b) The recycling gel filtration of (a)

되는 各種 subclass의 淋巴球 特히 Tμ細胞를 純粹하게 分離하는데 必要한 IgM을 分離 精製하였기에 報告하는 바이다.

사람 T細胞를 分離하는 方法으로써 一般的으로 많이 行해지고 있는 것은 T細胞에 면양赤血球가 自然的으로 結合한 rosette 形成群을 比重遠心法으로 分離하는 것이다[7]. 赤血球는 淋巴球보다 比重이 높기 때문에 resette 形成細胞와 함께 遠心되어 pellet를 이룬다. 混在된 S-RBC는 溶血에 의해 除去된다[6]. T細胞이면서 또한 Fc受容體를 가진 細胞를 同時에 檢出하는 方法으로 S-RBC와의 rosette와 EA rosette를 同時에 이루어지게 하는 double rosette 法이 개발되어 T7 細胞分離가 보다 용이하게 되었다[11]. 純粹한 實驗動物을 대신해서 사람 末梢淋巴球의 利用이 널리 다루어지고 있는 추세에 따라 淋巴球分離에 必要한 指示系로써 Erythrocyte-Antibody가 必要하게 되고 여기에 맞추어 보급되고 있는 抗體는 抗體自身이 지니고 있는 고유의 性質을 保持시킨 상태로 운반 및 保存에 철저를 기하지 않으면 抗體의 諸般機能이 상실되어 소기의 성과를 얻을 수 없다. Monoclonal IgM 抗體는 Waldenström macroglobulin 血症患者 血淸中에 균일하면서도 多量의 IgM globulin이 함유되어 있어 分離 및 그 이외여러 각도에서의 연구가 많이 보고되고 있으나[12,13] 기지의 抗原을 利用한 特異抗體인 IgM의 生産은 쉬운 일이 아니다. IgM 抗體는 抗原分子의 形態, 抗原量의 關係, 抗原의 種類, 抗原接種時 투여양식등에 의해 左右되고 있으며 또한 얻어진 抗體라도 IgG 抗體와는 달리 여러 因子의 作用에 민감하여 IgM 抗體 固有의 性質을 잃기 쉽다. 그러므로 血淸分離에서 부터 IgM의 分離精製까지의 時間을 될 수 있는 한 단축시켜야 한다. 抗體는 −20°C~−70°C 사이의 범위에서 凍結保存을 원칙으로 하고 있으나 IgM 抗體는 凍結保存을 피해야만 活性을 유지시킬 수 있다. 採血, 血淸分離의 과정을 거쳐 crude immunoglobulin 分劃過程인 ammonium sulphate 침전법에서부터 非特異的 精製法인 DEAE-cellulose chromatography 法 즉 단백질의 表面荷電差에 의해 分劃하는 方法 그리고 단백질의 크기에 따라 分劃하는 方法인 sephadex를 通한 gel-filtration의 순서로 分離된 것을 免疫電氣泳動法에 의해 확인하는 것이 免疫 globulin을 分離精製하는데 있어서 필연적인 過程이라 할 수 있겠다[12]. 이런 過程들을 거치면서 使用되는 各種試藥, 만들어진 완충액 및 조건 特히 유산암모니움침전법을 利用한 최초의 단계

Fig. 4. Immunoelectrophoretic pattern of purified rabbit IgM against Ox RBC in 0.8% agarose. Running condition; ionic strength 0.05, veronal buffer pH 8.2, 5V/cm..

에서 IgG 뿐만 아니라 IgM immunoglobulin을 얻으려 할 때는 抗血淸과 等量의 포화유산암모니움액(方法 참조)을 첨가하는 方法이 권장되고 있다. 그리고 Sephadex G-200을 通한 gel filtration은 완충액이 들은 용기와 column 하단의 높이의 差를 조절하지 않으면 column에 충전된 gel이 壓力을 받아 分劃分離가 어려워지게 된다. 보통 2.5~3.0cm의 직경을 가진 column이면 30~60 ml/hr의 流速量이면 적당하다. 앞에서 지적된 모든 조건을 충분히 지키면서 實驗動物대용으로 널리 使用되고 있는 사람末梢淋巴球 特히 免疫의 helper 機能 및 suppressor 機能을 가진 細胞에 대한 연구를 수행하기 위해서는 우선 細胞分離에 必要한 指示系의 確保와 保存에 만전을 기해야만 좋은 성적이 얻어질 수 있을 것으로 믿어진다.

結　　論

最近 免疫學 및 免疫生物學的 活性物質을 얻는데 있어 生産 또는 實驗材料로써 淋巴球를 使用하는 경향이 높아가고 있을 뿐만 아니라 淋巴球自體가 immune response의 主軸을 이루고 있어 이의 機能 및 細胞形質의 差異等을 硏究하는 데 많이 利用되고 있다. 特히 사람 T細胞는 subset의 表面 marker의 相異點이 發見됨에 따라 helper와 suppressor T淋巴球의 役割에 對한 硏究가 활발해짐과 아울러 많은 의문점들이 풀려지고 있다. 이와 같은 T subset의 證明은 細胞表面에 存在하는 marker를 主로 間接的인 手段에 의해 發見하고 marker에 結合하는 生物學的 活性을 가진 factor를 利用함으로써 可能한 것이다.

著者들은 helper T細胞 分離에 利用되는 牛赤血球에 對한 IgG 抗體 分離에 이어 suppressor T細胞 同定에 使用되는 IgM 抗體를 50% 포화 ammonium sulphate, DEAE-cellulose chromatography와 gel filtration에 의해 分離하고 血淸學的 方法에 의한 最終的 同定에 의해 標品을 얻을 수 있었기에 T subset 分離와 그에 對한 實驗에 이바지할 수 있을 것으로 기대한다.

參 考 文 獻

1) Cooper, M.D., Peterson, R.D.A., Soutj, M.A. and Good, R.A.: *The function of the thymus and Bursa system in the chicken. J. Exp. Med., 123 : 75, 1966.*

2) Herzenberg, L.A., Okumura, K., Cantor, H., Sato, V.L., Shen, F.W., Boyse, E.A. and Herzenberg, L.A.: *J. Exp. Med., 144 : 330, 1976.*

3) Mingari, M.C., Moretta, L., Moretta, A., Ferrarini, M. and Prreud' Homme, J.L.: *Fc receptor for IgG and IgM Immunoglobulins on human T lymphocytes, Mode of reexpression after proteolysis or interaction with immune complex. J. Immunol., 121 : 767, 1978.*

4) Morretta, L., Webb, S.R., Grossi, C.E., Lydard, P.M. and Cooper, M.D.: *J. Exp. Med. 146 : 184, 1977.*

5) Gupta, S., and R.A. Good: *Subpopulations of human T lymphocytes. J. Immunol. 112 : 1214, 1979.*

6) 夏潤文, 金燦洙, 李武炯, 尹在一, 林壽德 : 韓國人 定常人의 *T lymphocytes*와 *T subsets*에 관한 硏究. 대한의학협회지, *23 : 703, 1980.*

7) 夏潤文, 李振鎬, 林壽德 : *T subsets* 定量을 위한 抗牛赤血球 *IgG* 抗體의 分離精製(I). 大韓微生物學會誌 *15 : 71, 1980.*

8) 西岡久壽彌 : 면양 적혈구에 대한 抗體 생산 방법. 免疫 生化學 *pp. 79.* 共立出版社 *Tokyo, 1974.*

9) Schultze, H.E. and Heremans, J.F.: *Molecular biology of human proteins with special reference to plasma proteins. Vol. 1(Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York, 1966).*

10) Axelsen, N.H., Kroll, J. and Weeke, B.: *"A manual of quantitative immunoelectrophoresis methods and applications" (Universitatsforlaget, Oslo-Bergen-Tromo, 1973)*

11) 林壽德, 夏潤文, 禹鍾設, 朴時龍, 尹在一 : 正常韓國人의 *double rosette* 方法에 의한 *T*-淋巴球 *subsets*의 定量分析. 대한의학협회지 *23 : 911, 1980.*

12) Williams, C.A., and Chase, M.W.: *Methods in Immunology and Immunochemistry. Academic Press, New York San Francisco London, 1967.*