

## 코카인의 주대사물인 벤조일레코닌에 대한 단일클론 항체의 제작

남경수 · 김재화 · 오은숙 · 최명자\* · 최인성# · 정태화

KIST 유전공학연구소, 면역화학연구소

\*KIST 도핑콘트롤 센터

(Received March 19, 1992)

### Production of Monoclonal Antibody against the Principal Metabolite of Cocaine, Benzoyllecgonine

Kyung Soo Nam, Jae Wha Kim, Eun Suk Oh, Myung Ja Choi\*,  
In Seong Choe# and Tai Wha Chung

Laboratory of Immunochemistry, Genetic Engineering Research Institute, KIST,  
Daeduck Science Town, Taejeon 305-606, Korea

\*Dopping Control Center, KIST, Cheongryang, Seoul 130-650, Korea

**Abstract**—Two clones of monconal antibodies(Co-1 and Co-2) against BSA-benzoyllecgonine(BSA-BE) were produced. Both monoclonal antibodies showed high binding affinity to BSA-BE. Observing from ELISA inhibition assay, Co-1 reacted only weakly with soluble benzoyllecgonine, while Co-2 showed considerable reactivity with soluble benzoyllecgonine.

**Keywords** □ Cocaine, benzoyllecgonine, metabolite, monoclonal antibody.

최근들어 마약류의 사회적인 문제점을 생각해볼때 복용자들의 빠른 검색법 및 그에 상응하는 치료법의 개발이 절실히 요구되고 있다. 혈중 그리고 소변속에서의 화학 물질을 검출하기 위해서는 각종 크로마토그래프법이 지금까지 응용되어 왔으나,<sup>1-3)</sup> 시료의 조제 및 농축 등 여러 번거로움을 감수하지 않으면 안되었다.

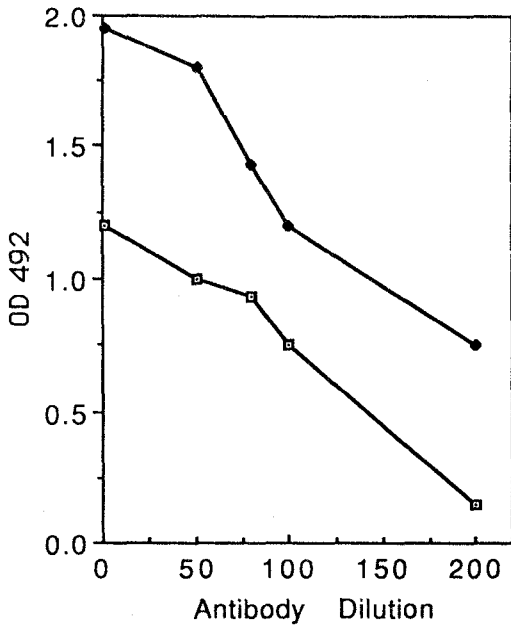
본 연구는 단일클론 항체를 이용한 생물학적 방법으로 보다 효율좋은 검사법을 개발하기 위한 기초 실험의 일환으로 시작되었다. Cocaine은 체내에 흡수된 뒤로는 빠른 속도로 처리되어 benzoyllecgonine으로 대사되어진다. 그러므로 본 실험에서는 benzoyllecgonine을 항원으로 하여 bovine serum albumin(BSA)과 conjugate 시킨뒤 Balb/c 생쥐에 면역하여 단일클론 항체를 얻었기에 보고자한다.

#### 실험방법

**Benzoyllecgonine과 BSA와의 Conjugate조제<sup>4)</sup>**—80 mg의 benzoyllecgonine을 100 mg의 BSA를 녹인 증류수와 혼합한뒤 완전히 녹인다. 이때, 녹인 혼합물의 pH는 산성쪽이다. 그뒤 80 mg의 1-ethyl-3(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide-HCl을 가한뒤 실온에서 밤새 배양한뒤 1주일동안 buffer를 교환해 가면서 투석했다. 내용물의 양을 정한 다음 lyophilization하였다. 그뒤 생리 식염수에 녹여 면역원으로 사용하였다.

**항체의 제작**—화학 연구소에서 사육하고 있는 Balb/c 생쥐(6 wk·♂)를 사용하였으며, BSA-benzoyllecgonine(20 µg/mouse)를 complete Freund's adjuvant와 충분히 혼합한뒤 복강내로 주사하였다. 추가 면역(20 µg/mouse)은 incomplete Freund's adjuvant로 2주 간격으로 2번 행한뒤 세포 융합 3일전

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.



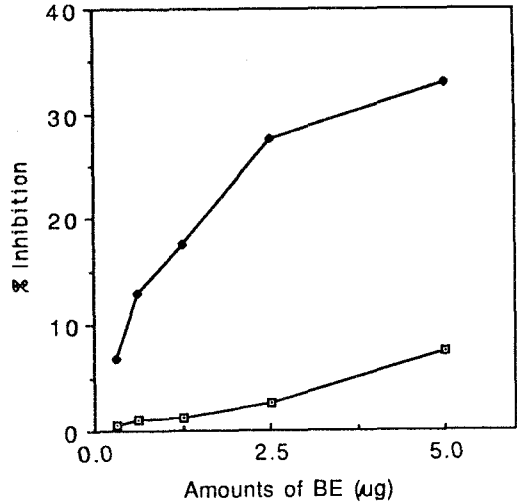
**Fig. 1**—Reactivities of anti-BSA-benzoyllecgonine(BE) monoclonal antibodies, Co-1 and Co-2, with BSA-BE. Microtiter plates were coated with 2 µg/ml of BSA-BE. Co-1(□) and Co-2(■) were detected with biotinylated with anti-mouse Igs and streptavidin-conjugated peroxidase.

마지막으로 추가 면역화를 하였다(20 µg/mouse). 그후, Balb/c 생쥐에서 비장을 적출한 다음 생쥐 myeloma cell(Sp2/0-Ag-14)과 융합하였다. 이하 자세한 방법은 Milstein 및 Köhler의 원법을 비교적 온화한 방법으로 변조한 Nam<sup>5)</sup> 등의 방법에 따라 행하였다.

**항체의 Screening**—항체의 검출은 먼저 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)<sup>6)</sup>법으로 행하였다.

항원(BSA-benzoyllecgonine, 2 µg/ml)을 96 well plate(Nunc. Inter Med.사)에 4°C에서 O/N으로 흡착시키고 3% BSA-PBS로 2시간 blocking하였다. plate를 세척한뒤 배양상등액을 넣어 2시간 실온에서 배양하고 다시 biotin화된 anti-mouse Igs(ZYMED Lab.)로 2 hr 및 HRP-streptavidin(ZYMED Lab.)으로 1시간 반응시킨 다음 o-phenyldiamine을 기질로 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 세척용으로는 PBS-Tween(0.05%)을 사용하였다.

**ELISA저해 시험(Inhibition Assay of ELISA)**—



**Fig. 2**—Inhibition assay of ELISA of Co-1 and Co-2 by benzoyllecgonine. Co-1(□) or Co-2(■) was preincubated with soluble benzoyllecgonine and the mixture was transferred to the microtiter wells coated with BSA-BE. After incubation, the monoclonal antibody bound was detected with biotinylated anti-mouse Igs and streptavidin-conjugated peroxidase.

기본적인 방법은 ELISA와 동일하나 미리 실온에서 항체와 수용액 상태의 benzoyllecgonine을 농도별로 2시간 반응시킨다. 반응후 이 반응액을 BSA-benzoyllecgonine(2 µg/ml)를 흡착시켜 놓은 96 well plate에 넣어서 ELISA법과 동일한 방법으로 행한다. 이때 동일 농도로 희석시킨 항체만을 넣은 well의 흡광도를 0%으로하여 각 well의 흡광도를 %inhibition으로 계산하여 나타내었다.

**결과 및 고찰**

ELISA결과 항원으로 사용한 BSA-benzoyllecgonine과 반응하는 2 clone(Co-1, Co-2)을 얻었다.(Fig. 1) 이들 clone 모두다 비교적 BSA-benzoyllecgonine과 높은 친화성을 가짐을 알 수 있었다. 이들 clone중 cocaine의 주대사체인 benzoyllecgonine과도 교차 반응성을 나타내는 clone을 찾기 위해 항원(BSA-benzoyllecgonine)과 항체와의 반응을 soluble benzoyllecgonine이 어느정도 저해하는가를 알아보기 위해 ELISA 억제 실험을 행하였다. 그 결과 2 clone 중

1 clone(Co-2)이 soluble benzoylecgonine의 농도에 의존해서 plate에 흡착된 항원과의 결합이 억제됨을 알았다.(Fig.2) 이는 Co-2가 benzoylecgonine을 인식하는 항체임을 시사하고 있다. 앞으로, Co-2의 항원 결합부위를 탐색할 목적으로 cocaine 및 이들 유도체(ecgonine, cocaine, benzoynorecgonine 및 norcocaine)와의 반응성도 검토할 예정이다.

## 문 헌

- 1) Jain, N.C.: Mass screening and conformation of seven sympathomimetic amine drugs by EMIT-gas chromatography. *J. Anal. Toxicol.*, **1**, 133-235 (1977).
- 2) Takami, Y., Fukuda, M., Kishida, T. and Takahashi, N.: Solidphase MicroELISA for methamphetamine. *Jpn. J. Legal Med.*, **37**, 417-420 (1983).
- 3) Iwasaki, M.: Forensic immunochemical studies of methamphetamine. *Jpn. J. Legal Med.*, **41**, 217-223 (1987).
- 4) Kaul, B., Millian, S. J. and Davidow, B.: The development of a radioimmunoassay for detection of cocaine metabolites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **199**, 171-178 (1976).
- 5) Nam, K.S., Igarashi, K., Umeda, M. and Inoue, K.: Production and characterization of monoclonal antibodies that specifically bind to phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* **1046**, 89-96 (1990).
- 6) Umeda, M., Igarashi, K., Nam, K.S. and Inoue, K.: Effective production of monoclonal antibodies against phosphatidylserine: stereo-specific recognition of phosphatidylserine by monoclonal antibody. *J. Immunol.*, **143**, 2273-2279 (1989).