

한국산 겨우살이 렉틴 (KML-C) 에 대한 단일크론항체의 생산과 특성

윤택준**** · 유영춘** · 강태봉* · 김성훈*** · 김갑수**** · 김종배#*

*한동대학교 생의학연구소

**건양대학교 의과대학 미생물학 교실

***경희대학교 동서의학대학원 종양연구팀

****카프로바이오텍 주식회사

(Received January 19, 2001; Revised March 23, 2001)

Production of Monoclonal Antibodies Specific to Korean Mistletoe Lectin (KML-C) and Their Characterization

T. J. Yoon****, Y. C. Yoo**, T. B. Kang*, S-H Kim***, K. S. Kim**** and J. B. Kim**

*Institute of Biomedical Research Center, Handong University

**Department of Microbiology School of Medicine, Konyang University

***Department of Oncology, Graduate School of East-West Medicine, Kyung Hee University

****Capro Biotech Co. Ltd, 406 Biotechnology Innovation Center, Chuncheon, Kangwon-Do

Abstract – We have reported that water-extracted Korean mistletoe (KM-110) had various biological activities such as antitumor and immunomodulatory activity, and the lectin fraction (KML-C) of the extract was one of major factors related to its biological functions. In this paper, we produced murine monoclonal antibody (mAb) against KML-C. The mAbs obtained were largely classified into two groups according to specificity to KML-C and ML-I, a lectin from European mistletoe. One group mAbs (9H7-D10 and 3C2-1H4) strongly reacted with KML-C, but not ML-I. In contrast, another group mAbs (8B11-2C5, 8E12-3E9 and 5E10-F1) reacted with both KML-C and ML-I. The subisotypes of these mAbs were shown to be IgG1 (9H7-1D10, 3C2-1H4 and 8B11-2C5) or IgM (8E12-3E9 and 5E10-F1). To develop an assay system for determination of the amount of KML-C, we established the sandwich ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) method using these mAbs and horse radish peroxidase (HRP)-labelled mAbs. In various combinations of the mAbs for coated antibody and detection antibody, the sandwich ELISA quantitatively detected KML-C, showing the detection limit ranging from 7-5,000 ng/ml. Especially, reproducibility (C.V) of the sandwich ELISA, in which 8E12-3E9 was used for coating antibody and 8B11-2C5-HRP for detection antibody, was 4.59-5.83 in intra assay, and 3.9-9.4 in inter assay.

Keywords □ *Viscum album*; Lectin; monoclonal antibody; ELISA

현대의 과학적인 체계하에서 식물체를 비롯한 여러가지 한약재들의 활성이 과학적으로 인정되며 그 사용이 증가되면서 한방약재에 대한 관심이 날로 증가되고 있다. 현재까지 이러한 약재들은 다양한 추출방법과 단일

성분이 아닌 여러 복합성분을 가지는 추출물로 구성되어 어지기에 동일한 활성이 나타나지 않음으로 임상에서 잘 받아들여지지 않는 실정에 있다. 또한 약재의 활성 성분은 물질의 채취시기나 지역에 따른 구성물질의 차이도 보고된 바,¹⁾ 이러한 천연 약재를 과학적으로 인정받기 위하여는 물질의 표준화가 선행되어야 할 것이다. 물질의 표준화 차원에서 가장 높은 활성을 나타내

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 054-260-1350 (팩스) 054-261-6705

는 지표물질의 선정과 분리 및 그의 정량법 개발은 가장 우선적으로 고려되어야 할 사항으로 사료된다.²⁾

한방에서 사용되어온 약재들 중에서 겨우살이는 우리나라 및 유럽에서도 오래전부터 여러가지 병증에 대하여 사용하여 왔다.³⁻⁵⁾ 특히, 겨우살이 물추출액은 유럽에서 종양에 대하여 임상적으로 사용하여 왔고,^{3,4)} lectin 성분은 가장 중요한 활성성분으로 보고되고 있다.^{6,7)} 겨우살이 lectin 성분은 숙주나무, 채취시기, 추출방법에 따라 그 함량차이가 있는 것으로 보고되고 있고, 따라서 겨우살이 추출물의 임상적 이용에 관하여 일부 다른 문헌에서는 그 적용에 대하여 의문을 제기하기도 하였다.⁸⁾ 한국산 겨우살이에 대한 연구도 최근에 활발히 진행되어 본 연구실에서는 한국산 겨우살이 추출물의 항종양, 면역증강 활성을 보고하였고,^{9,10)} 그 주요 활성물질로서의 한국산 특이성을 가지는 lectin 성분(KML-C)을 분리하였다.¹¹⁾ 유럽산 겨우살이로부터의 lectin에 대한 연구결과를 고찰하면 이들은 3개의 isoform을 가지는 당단백질로서 각 lectin은 두개의 subchain이 disulfide 결합을 한 형태로서 각각의 chain은 완전히 다른 기능을 가지는 것으로 보고되고 있다.¹²⁾ 분자량이 큰 B-chain은 N-acethylgalactoseamine 혹은 galactose binding site를 가지며 A-chain은 세포질로 들어가 60S의 ribosome을 불활성화 시킴으로서 단백질 합성을 저해하는 toxic protein으로 알려져 있다.¹²⁾ 이러한 세포독성 활성을 가지는 겨우살이 lectin은 ricin, abrin등과 함께 ribosome-inactivating type II protein으로 불리는데 이들의 독성 작용은 1) 세포 표면의 receptors에 binding하는 단계 2) receptor-매개로 유도되는 endocytosis에 의한 세포 내로의 투과과정 3) cytosol vesicle membrane의 내부로 A-chain이 들어가는 과정 4) ribosomes의 불활화 과정에 의하여 유도되는 것으로 설명하고 있으나 정확한 설명은 아직 확립되지 않은 상태이다.^{12,13)} 유럽에서 lectin은 당 특이성에 의하여 ML-I, -II, III의 크게 3가지로 분류하고 있는데¹²⁾ 활성 및 구조에 대하여는 주로 ML-1에 대한 연구를 주로 진행하였다.^{7,8,12)} ML-1은 일부에서 그 활성에 대한 이견이 일부 있으나 유럽산 겨우살이 추출물의 면역증강 활성을 유도하는 가장 중요한 활성 물질로 인정되고 있고,^{6,13)} crude extract의 표준화 확립을 위한 연구의 일환으로 lectin의 정량법에 관한 논문이 수편 보고되고 있다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 국내산 겨우살이의 lectin 성분에 대한 연구도 최근에 국내에서

적극적인 연구가 진행되어^{11,18)} 그의 세포독성 기전이 apoptosis에 기인됨이 수편 보고되고 있다.^{11,17)} 또한 KML-C에 의한 종양전이 억제작용이 보고되는 바 국내산 겨우살이의 경우도 lectin 성분이 주 활성물질로 사료되고 있다.¹⁹⁾ 그러나 국내산 겨우살이의 lectin 함량에 대한 연구는 전혀 없는 실정이고, 특히 단일크론 항체를 이용한 면역분석법에 의한 정량법은 시도된 바가 없다.

따라서 본 연구는 한국산 겨우살이 추출물의 임상적 응용 가능성을 전제로 lectin에 정량적 분석법의 개발을 확립하고자 KML-C에 대한 단일크론 항체를 생산하고, 항체의 특성연구를 일부 실시하였으며, 그 결과에 근거하여 KML-C의 정량을 위한 sandwich ELISA 방법을 확립하고자 실시하였다.

실험방법

실험재료 - Bovine Serum albumin(BSA)과 유럽산 겨우살이 lectin-1(ML-1)은 Sigma(USA)사에서, Freund's complete adjuvant(FCA)와 Freund's incomplete adjuvant(FIA)는 Difco(USA)에서, RPMI-1640 medium과 fetal bovine serum(FBS)는 Gibco(Grand Island NY)에서, Horse radish peroxidase(HRP) conjugated goat 혹은 rabbit anti-mouse IgG+A+M, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM은 Zymed Lab(USA)에서 구입하였다.

겨우살이로부터 lectin의 분리 - KM-110으로부터 lectin성분의 분리는 유럽산 겨우살이로부터 lectin을 분리한 hydrolyzed sepharose-4B column을 이용하는 chromatography 방법을 일부 수정하여 실시하였다. 약술하면, 수용액상의 한국산 겨우살이 추출물(KM-110)에 ammonium sulphate(70%)를 가하여 단백질 분획을 침전시킨 후 PBS 용액에 대하여 투석하였다. 이 용액을 hydrolyzed sepharose 4B column(1.5×11 cm)에 통과시켰고, PBS로서 column을 세척하고, 0.1 M lactose가 포함된 PBS를 용출하였다. 용출 물질은 PBS로 투석하고, 단백질 정량 kit(Boehringer Mannheim)를 이용하여 농도를 결정 후, 1 mg/ml의 농도로 분주하여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

겨우살이 lectin의 면역 - (주)대한 바이오링크에서 구입한 6주령의 자성 Balb/c 마우스에 PBS에 용해된 20 ng/100 μ l의 KML-C에 동량의 FCA를 유화시켜

복강에 면역시켰다. 14일 후에 동량의 항원을 FIA에 유화시켜 1회 더 면역시켰다. 최종 면역 10일 후에 마우스로부터 혈액을 채취하여 혈청을 얻은 후, ELISA로 항체의 역가를 확인하였다. 항체의 역가 확인 후에 adjuvant 없이 20 ng의 항원만으로 복강내에 booster injection하였으며, 최종면역 1주일 후에 마우스를 희생시켜 단일클론 항체의 생산을 위하여 비장을 취하였다.

단일클론 항체의 생산 - 기 발표된 방법¹⁹⁾에 준하여 생산하였다. 약술하면, KML-C를 면역한 Balb/c마우스의 비장세포와 P3U1 골수종을 PEG를 이용하여 융합 후, HAT 배지로 배양하면서 hybridoma를 선별하고, KML-C에 대한 항체를 생산하는 hybridoma 세포를 선택 후, 96 well plate에서 well 당 1개의 hybridoma가 되도록 분주(cloning)하고 colony를 형성하며 성장할 때까지 배양하였다. Colony를 형성한 hybridoma의 배양상등액을 ELISA로 측정하여 KML-C에 대한 항체를 생산하는 hybridoma를 선별(screening) 하였으며, 이러한 cloning과 screening을 1회 더 반복하여 KML-C에 대한 단일클론 항체를 생산하는 hybridoma 세포를 선택하였다.

항체역가의 측정 - 항체의 역가 측정은 위하여 direct ELISA법에 의하여 수행하였다. ELISA plate의 각 well에 2 µg/ml의 농도로 조정된 KML-C를 100 µl씩 coating하고 양성반응을 나타내는 hybridoma의 복수를 넣고 반응 후, 마우스 면역글로부린의 각 isotype에 대하여 특이적인 2차항체(peroxidase-conjugated goat anti mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 혹은 IgM)를 이용하는 ELISA 법으로 항체의 sub-isotype을 결정하였다. 발색을 위하여 기질로서 ABTS(0.2 mM of 2,2-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, Kirkegaard and Perry Laboratory, Inc., Gaithersburg, MD)를 이용하였고, 414 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 단일클론 항체의 역가는 흡광도 값이 0.5가 되는 지점의 희석비로 결정하였다.

단일클론 항체의 분리 및 HRP의 conjugation 및 적용 농도의 결정 - 항체의 대량 생산은 pristane을 주입한 마우스의 복강에 9H7-D10 8B11-2C5 hybridoma 세포를 주사하여 ascitic fluid(복수)를 얻었으며, 항체의 정제를 위하여 복수를 protein-G affinity column (Pharmacia, USA)에 적용하여 항체를 분리하였다. 분리

된 항체에 HRP의 결합은 상법(Periodate coupling method)에 의하여 수행하였다. ELISA를 위한 HRP-conjugate의 농도를 결정하기 위하여 KML-C를 2 µg/well이 되도록 coating하고 여러농도로 조정된 HRP-conjugate를 반응 후 OD치를 측정하였다.

ELISA - KML-C의 표준곡선을 얻기위한 ELISA는 sandwich법으로 수행하였다. 약술하면, KML-C에 대한 단일클론 항체를 coating(10 µg/ml)하고 위와 동일한 방법에 의하여 washing하였다. 그 후 여러 농도로 조정된 KML-C를 첨가하여 2시간 반응 후, 단일클론 항체-HRP 용액(×8000)을 첨가하여 반응시켰다. 반응 완료 후 각 well을 세척하고 발색을 위한 기질로서 TMB(Sigma, USA)를 사용하였고 450 nm에서 흡광도를 측정 후 KML-C에 대한 표준곡선을 완성하였다.

반복성 및 회수를 조사 - 본 assay system의 반복성 정도(reproducibility)를 평가하기 위하여 시료중 KML-C의 농도가 높은것, 중간것 및 낮은것의 3개로 구분하여 한 시료당 20회씩 반복측정하여 intra assay를 실시하였고, 7회의 다른 시간에 동일한 실험을 실시하여 inter assay를 실시하였다. 반복실험 후 본 assay system의 반복성 정도는각 농도에 대한 실험결과에 대한 C.V(coefficient variation)을 산출함으로 결정하였다. 회수율 조사는 PBS에 각각 40, 200, 1000 ng/ml로 KML-C를 첨가 후 assay 결과 얻은 KML-C의 함량을 조사 후, 첨가 농도에 대한 bias(%)로 표시하였다.

실험결과

KML-C에 대한 mAb의 생산 - 융합세포 9H7, 8B11, 5E10, 8E11 등이 분비하는 상등액은 ELISA에 의한 항체생성여부의 조사 결과, KML-C와 높은 반응성을 보였기에 단일클론 항체의 생산을 위한 2차 cloning을 실시하였다. 그중 양성반응을 나타내는 subclones의 배양상등액을 이용하여 항체의 특성을 조사하였다(Table I). 결과에 나타난 바와 같이 9H7 subclones는 KML-C와 특이적인 반응성을 나타내었고, 8B11, 5E10, 8E12 subclones는 EML-1과의 교차반응을 나타내었으며 항체의 sub-isotype을 조사한 바, 9H7 및 8B11 등의 subclones는 IgG1 class 였고, 5E10 및 8E12는 IgM을 나타내었다.

ELISA에 의한 단일클론 항체의 특성 및 역가의 조

Table I – Characterization of monoclonal antibodies to KML-C produced by various hybridomas

hybridoma	Cross-reactivity ^{a)}		Sub-iso type
	KML-C	ML-I	
polyclonal Ab	1.524	0.660	
5E10 subclones F1	1.184	1.237	M
8B11 subclones 2C5	0.775	0.495	G1
8E12 subclones 3E9	0.568	0.701	M
9H7 subclones D10	1.196	0.004	G1

^{a)}Cross-reactivity with KML-1 and ML-1 was expressed by optical density in ELISA.

사-KML-C에 대한 단일클론 항체의 대량생산을 위하여 KML-C와 높은 반응성을 나타내는 융합세포를 마우스복강에 주사하여 얻은 복수의 titer 및 항체의 교차반응에 대한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 항체의 역가 측정을 위한 ELISA법은 direct법으로서 KML-C

혹은 ML-1을 plate의 각 well에 coating하고 2배희석법으로 희석된 항체와 반응후 나타난 O.D.값을 이용하여 결정하였다. 결과에 나타난 바와 같이 9H7-D10은 KML-C 특이적으로 반응하는 항체로 판명되었고, 8B11-2C5의 경우는 유럽산 겨우살이 lectin인 ML-1과 높은 교차반응성을 나타내었다. KML-C에 대한 각 복수의 항체역가는 ELISA에서 OD값이 NSB(non-specific binding)보다 현저히 높은 OD값, 즉 0.5이상 을 나타내는 복수의 희석치를 역가(titer)로 나타낼 때, IgG1 type의 항체인 9H7-D10은 KML-C에 대하여 약 20만, ML-1과는 교차반응이 전혀 인정되지 않았고, 8B11-2C5의 경우는 각각 약 15만 및 21만 정도로 나타났다. 반면 IgM type의 항체인 8E12-3E9 및 5E10-F1은 ML-1에 대한 반응성이 KML-C에 비하여 약간 높은 경향을 보였으며 항체 역가는 각각 약 4000 및 7000 정도를 나타냈다.

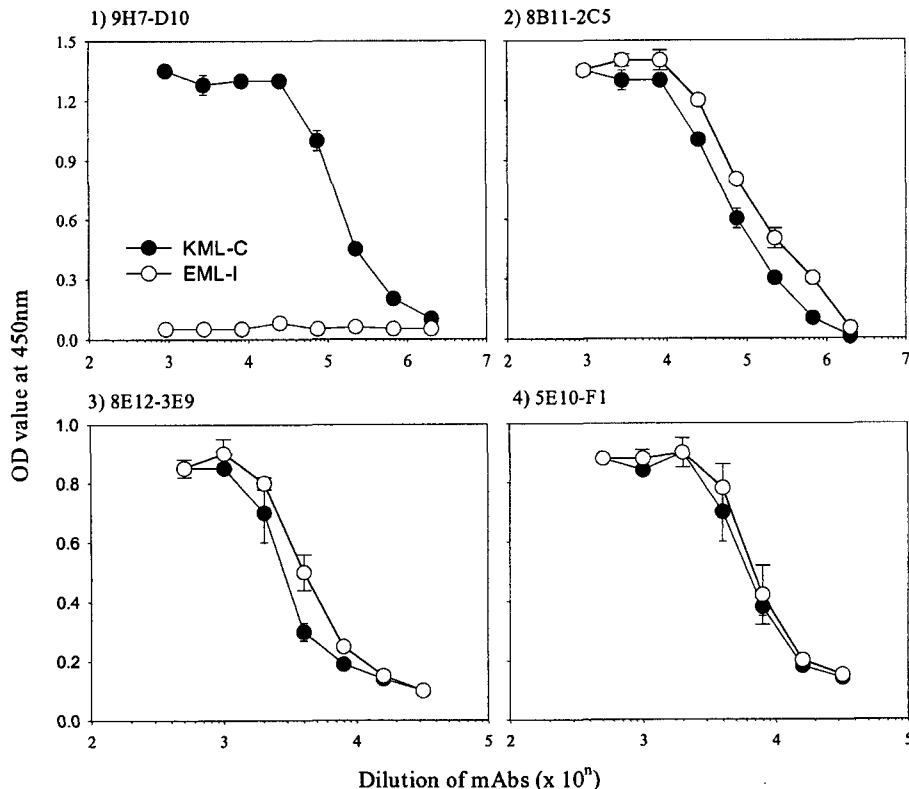


Fig. 1 – Cross reactions of various mAbs with KML-C and ML-I. Microplate were coated with 2 µg/well of KML-C or ML-I in coating buffer. After blocking with 3% BSA, the wells were incubated with serial diluted each mAb. After washing with PBS-Tween, the wells were added 2nd-Ab-HRP. Washed 3 times, the wells added TMB solution as a substrate and the optical density was measured at 450 nm.

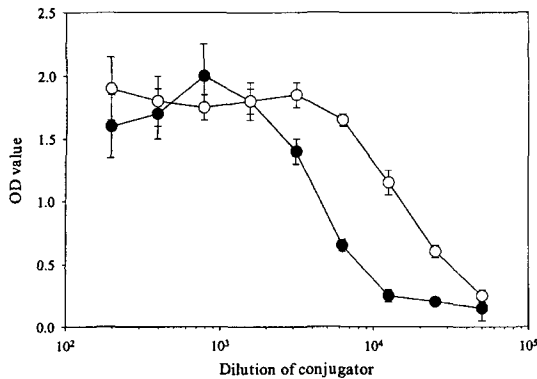


Fig. 2 – Determination of concentration of mAb-HRP by assayed direct ELISA. Serial diluted each mAb in PBS was added to the wells coated with KML-C. After incubation, the well were washed with PBS-Tween and added substrate solution. The OD value of well was measured at 450 nm.

mAb-HRP의 농도결정 – 본 실험의 ELISA에 적용하기 위한 HRP를 접합시킨 항체(HRP-conjugate)는 한국산 겨우살이 lectin에만 특이적으로 반응하는 9H7-D10과 유럽산 겨우살이 lectin과 교차반응을 나타내는 8B11-2C5 항체였다. Sandwich ELISA를 위한 HRP-conjugate의 농도를 결정하기 위하여 우선

ELISA plate의 각 well에 KML-C를 coating하고 HRP-conjugate를 여러농도로 조정하여 반응시킨 후 OD 값을 측정하여 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 그 결과 9H7-D10-HRP의 경우는 약 2000배 희석액부터, 8B11-2C5-HRP의 경우는 약 5000배부터 OD 값이 떨어지기 시작하였다. 이 결과는 충분한 양의 항원 존재시 항원에 대한 HRP-conjugate의 최고 반응성이 위에 제시한 농도까지는 최소한 유지되는 것을 의미하므로 표준곡선 작성을 위한 9H7-D10-HRP 및 8B11-2C5-HRP의 희석 농도는 각각 2000배 및 5000배로 결정하였다.

Lectin 정량을 위한 Two-site sandwich ELISA – KML-C에 대한 표준곡선을 작성하기 위하여 우선 coating Ab와 HRP-conjugate의 조합관계를 조사하였다. 이 실험을 위하여 우선 IgM type의 두가지 항체(8E12-3E9, 5E10-F1)를 coating 한 후, 여러농도의 KML-C를 넣고, 9H7-D10-HRP 및 8B11-2C5-HRP를 반응시킨 후 얻어진 표준곡선을 Fig. 3에 제시하였다. 그 결과 IgM type의 항체는 두 HRP-conjugate와 좋은 조합관계를 나타냈다. 한국산 겨우살이 특이성을 가지는 9H7-D10항체에 의한 KML-C의 한계 측정범위는 5E10-F1의 coating 결과 70 ng/ml이었고,

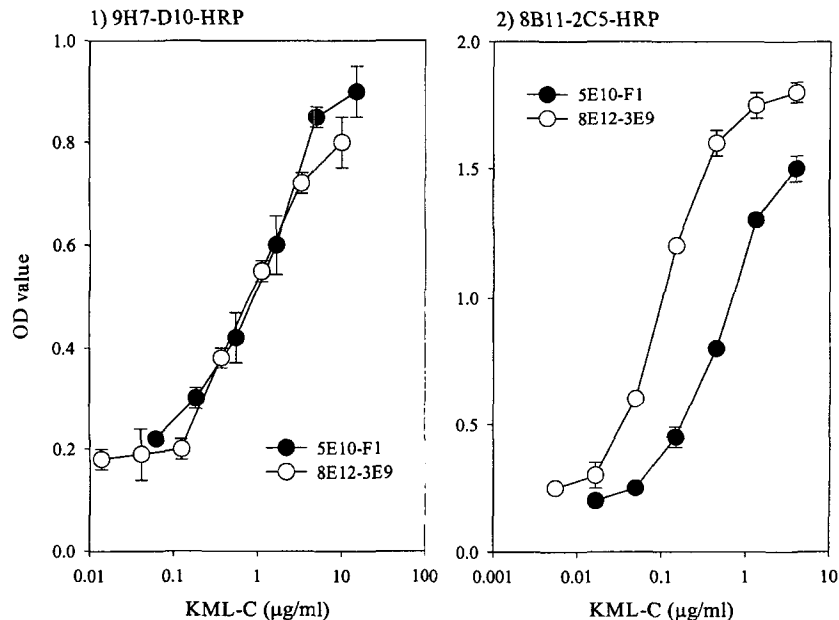


Fig. 3 – Comparison on dose response curve of KML-C measured by sandwich ELISA coated with IgM type mAbs. The wells were coated with 5E10-F1 or 8E12-3E9. After incubation with KML-C, two types of conjugates, 9H7-D10-HRP or 8B11-2C5-HRP, were added each well. The error bars indicate standard deviation.

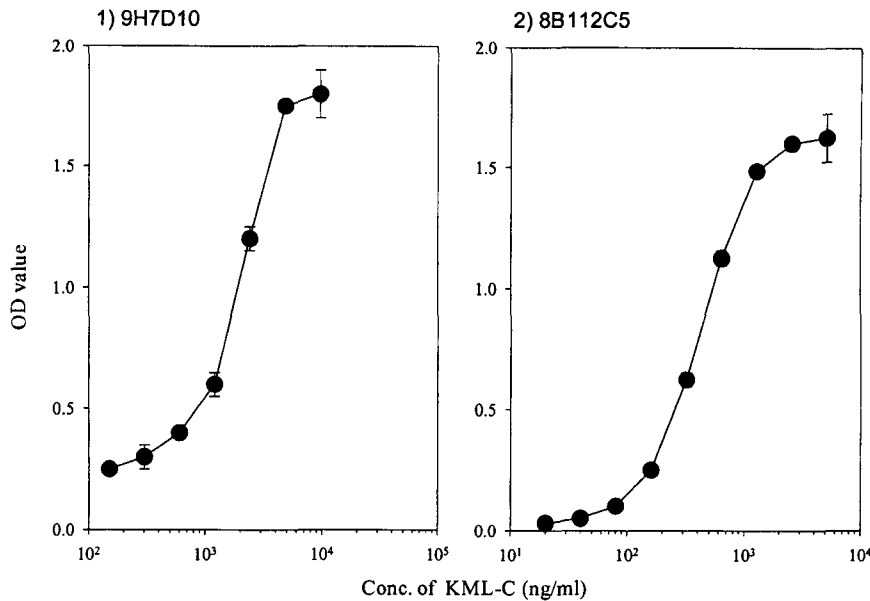


Fig. 4 – Comparison on standard curve of KML-C assayed by sandwich ELISA coated with IgG1 type mAbs. 1) Coated with 8B11-2C5 and detected with 9H7-D10-HRP, 2) Coated with 9H7-D10 and detected with 8B11-2C5-HRP. The error bars indicate standard deviation.

8E12-3E9 항체의 coating 결과 40 ng/ml까지의 감도를 보였다. 한편, 8B11-2C5-HRP에 의한 표준곡선의 작성결과 5E10-F1의 coating 결과 20 ng/ml이었고, 8E12-3E9 항체의 coating 결과 7 ng/ml의 감도를 나타냄으로, 두 경우 모두 8E12-3E9 항체 coating 결과가 감도면에서 우수한 결과를 나타냈다.

KML-C에 대한 표준곡선 작성을 위한 두번째 방법으로 IgG1 type 항체간의 조합을 위한 실험을 실시하였다. 9H10-D1 항체를 coating 후 8B11-2C5-HRP로 검색한 결과 KML-C의 한계 검출농도는 약 150 ng/ml이었고, 8B11-2C5 항체를 coating 후 9H7-D10-HRP에 의한 assay결과 KML-C의 한계 검출농도는 약 40 ng/ml로 나타났다(Fig. 4).

반복성 및 회수율(Reproducibility) 조사 – Coating Ab와 detection Ab의 여러 조합에 의하여 KML-C에 대한 표준곡선을 작성한 결과 IgM type의 8E12-3E9

를 coating하고 IgG1 type의 8B11-2C5-HRP로 검사한 sandwich ELISA assay가 가장 우수한 감도를 나타냈다. 따라서 이 표준곡선에 이용하여 KML-C의 분석을 위한 재현성 실험을 실시하였다. 재현성 실험은 동일한 표준곡선 하에서 미리 지정한 농도의 KML-C를 적용 후 표준곡선 하에서의 KML-C 농도를 측정 한 intra assay와 동일한 농도를 시간을 달리하여 측정 후 그 오차를 조사한 inter assay의 두가지를 실시하였다(Table II, III). Intra assay는 KML-C 정량을 위한 범위인 2000 ng에서 20 ng/ml에서 임의적으로 비교적 높은 농도인 1000 ng/ml, 중간농도인 200 ng/ml, 그리고 비교적 낮은 농도인 40 ng/ml의 3가지 농도를 정하였다. 분석을 위한 각 농도별시료는 각각 20개씩 측정하였고 KML-C 정량을 위한 표준곡선에 적용하여 나온 결과를 Table II에 제시하였다. 세가지 농도의 KML-C에 대한 intra assay 결과 CV 값은

Table II – Intra assay for the measurement of KML-C by sandwich ELISA

Group	Expected value (ng/ml)	Observed value Mean ± SD	CV (%)	Recovery (%)	Bias (%)
High	1000	1010.5 ± 58.9	5.83	101.1	+1.1
Medium	200	197.2 ± 10.3	5.22	98.6	-1.4
Low	40	39.2 ± 1.8	4.59	98.0	+2.0
Mean				99.2	+0.8

Table III - Inter assay for the measurement of KML-C by sandwich ELISA

Group	Expected value (ng/ml)	Observed value Mean \pm SD	CV (%)	Recovery (%)	Bias (%)
High	1000	1016.5 \pm 95.6	9.4	101.7	+1.7
Medium	200	203.6 \pm 7.9	3.9	101.8	+1.8
Low	40	38.5 \pm 2.7	7.0	96.3	-3.7

4.59에서 5.83%로 10%이내에 들었고, bias도 평균 0.8%를 보임으로서 비교적 우수한 결과를 나타냈다. KML-C에 대한 재현성 실험으로서 동일한 농도에 대하여 시간을 달리하여 측정된 inter assay는 총 7회에 걸쳐서 측정하였다. 실험에 적용한 KML-C의 측정농도는 intra assay와 동일한 농도로 조사하였다. 그 결과 CV값은 실험에 적용한 농도인 1000, 200, 40 ng/ml 모두에서 10%이내로 나타났고, bias의 경우 1000 ng/ml 및 200 ng/ml의 경우에는 +bias를 40 ng/ml의 농도에서는 -bias를 나타냈으나 평균 +0.1의 bias를 나타냄으로서 반복성 실험에서 양호한 결과를 얻었다(Table III).

고 찰

주성분 즉 지표물질질을 정량할 수 있는 방법의 확립은 제약개발에 있어서 중요한 과정중의 하나이다.¹⁾ 겨우살이에 대한 동서양의 여러 문헌에서 활성을 나타내는 가장 유효한 주 성분은 lectin 성분임을 증명하고 있다.^{7,8,11)} 따라서 이미 보고된 바와같이 한국산 겨우살이 추출물에서 지표물질로서 선정 가능성이 높은 lectin 성분인 KML-C의 정량법 개발은 앞으로의 연구진행 방향과 더불어 중요한 의의를 가지는 것으로 사료되는 바이다. 본 연구는 정량법 개발을 위하여 KML-C에 대한 단일클론 항체를 생산하고, 생산된 항체의 특성조사를 실시 후, KML-C에 특이적인 혹은 유럽산 겨우살이 lectin인 ML-I과 교차반응을 나타내는 항체를 이용하여 한국산 겨우살이 추출물중의 lectin 함량을 측정하기 위한 sandwich ELISA법을 개발에 관한 것이다.

KML-C에 대한 여러 단일클론 항체중 IgG1 type의 9H7-D10은 KML-C에 특이적으로 반응하였고, 8B11-2C5 항체는 유럽산의 ML-I과도 높은 교차반응을 나타냈다. 반면 IgM type의 5E10-F1과 8E12-3E9 등의 항체는 KML-C과 ML-I과 높은 교차반응을 나타냈

다. 따라서 본 실험에서 생산한 항체의 특성을 요약하면 첫째, 한국산 겨우살이에만 특이적으로 반응하는 항체, 둘째, 유럽산 겨우살이 lectin과 교차반응을 나타내는 항체로 크게 두가지 종류로 나눌 수가 있었다. 9H7-D10 항체가 KML-C에만 특이적으로 반응한다는 것은 KML-C는 유럽산 lectin인 ML-I과는 완전히 다른 항원결정기(epitope)를 가진다는 것을 의미하였다. 또한 8B11-2C5 항체의 경우 ML-I 및 KML-C와의 반응성이 유사하였는데 이는 KML-C는 동시에 ML-I이 가지는 동일한 항원결정기가 존재한다는 것을 증명하는 결과로 생각되었다. 이전의 연구에서 KML-C는 유럽산 겨우살이 lectin 중의 하나인 ML-I과의 당특이성, 분자량 및 등전점에서 차이가 있는 다른 물질임이 밝혀졌다.¹¹⁾ KML-C는 서로 다른 두개의 lectin이 혼합된 성분으로 확인된 바, KML-C를 구성하는 각각의 lectin 성분은 당특이성 면에서는 ML-II 같은 특성을 가지는 것으로 인정되고 있다.^{11,17,18)} 그러나 KML-C를 구성하는 두개의 lectin 모두 ML-II와는 분자량의 차이가 있어 현재까지의 연구결과 KML-C 성분과 ML-II는 동일한 lectin이란 증거는 없는 상태였다.¹¹⁾ 따라서 9H7-D10 혹은 3C2-H4 항체의 KML-C 특이성 결과는 KML-C와 ML-I의 구조적인 차이를 명백하게 규명하는 결과로 생각된다. 이 사실을 근거로 각 단일클론 항체를 이용한 sandwich ELISA의 개발은 9H7-D10을 detector 항체로 사용하여 한국산 특이적인 lectin 성분만을 정량하는 방법, 그리고 8B11-2C5 항체를 이용하는 KML-C 이외에 존재 가능한 isoform lectin(ML-I 및 유사 lectin 성분)을 정량하는 두가지 방법에 대한 sandwich ELISA법의 개발이 가능할 것으로 사료되었다. IgM type의 항체를 capture antibody로 사용할 경우, capture 항체와 9H7-D10-HRP의 조합에 의한 KML-C의 검출한계가 약 40 ng/ml이었고, 8B11-2C5-HRP와의 조합은 약 7 ng/ml로서 한국산 특이성을 가지는 분석법이 isoform lectin까지 정량하는 방법보다 약 6배가량 낮

은 것으로 조사되었다. 이러한 현상은 항체의 항원에 대한 affinity가 작용할 것으로 생각되나 9H7-D10와 HRP의 접합 후 9H7-D10-HRP의 분리시 HRP와 반응하지 않은 9H7-D10 항체가 존재하는 등의 conjugate 순도등의 문제점을 배제할 수는 없었다. 외국의 유사 실험으로서 Tonevitsky AG등¹⁴⁾에 의하여 보고된 sandwich ELISA법에 의한 ML-I의 검출한계인 3 ng/ml에 비하여는 약 2배 정도 낮은 감도를 나타내었다. 그러나 ML-I과 KML-C는 현재까지의 조사결과 일부 상이성이 있는 lectin물질로 생각되는 바,¹¹⁾ 직접적 비교의 의미는 없다고 사료된다. 앞으로 KML-C에 대한 단일크론 항체와 반응하는 각 chain의 동정은 중요한 의미를 가진다 하겠다. Tonevitsky AG등¹⁴⁾이 유럽산 겨우살이 lectin의 분석을 위하여 생산한 단일크론 항체는 ML-I의 A-chain 혹은 ML-III를 면역하여 얻은 것으로서 다음과 같이 ML-I 및 ML-II의 A-chain 특이적인 것, ML-II 및 ML-III의 A-chain 특이적인 것, ML-I, -II, -III의 A-chain 특이적인 것 등 3가지 형태의 항체로 분류하였다. 즉 ML-III의 A-chain은 ML-I 혹은 ML-II의 A-chain과 교차반응을 하고 ML-I과 ML-II의 A-chain 각각에 대하여는 특이성을 가지는 항체가 생산되었다는 것을 의미하는 것이다. 그러나 본 연구의 KML-C를 구성하는 lectin인 KML-IIU 및 KML-III는 유럽산의 ML-I, -II 및 -III와 현재까지의 연구결과로는 다른 것으로 보여 직접 비교는 불가능하지만 단지 8B11-2C5 항체가 ML-I과 반응함으로써 KML-C를 구성하는 두 lectin 성분중의 하나가 ML-I과 같거나 매우 유사한 구조의 항원결정기를 가지고 있음을 강하게 암시하였다. KML-C의 당특이성이 galactose 및 N-acetylgalactosamine으로 ML-II와 동일한 당특이성을 가진다 하더라도 현재까지의 연구결과로 KML-C중 9H7-D10과 반응하는 lectin 성분이 ML-II가 가지는 항원결정기와 같거나 매우 유사한 구조를 가진다는 것은 인정되나^{11,17,18)} 전체 구조적으로 동일한 물질이라고는 단정할 수 없었다. 결론적으로 KML-C를 구성하는 두 lectin 성분인 KML-IIU 혹은 KML-III이 당 특이성 면에서는 ML-II와 동일하나 이들이 ML-II와 어느정도의 유사성(homology)를 가지는 지에 대한 연구는 앞으로 규명해야할 숙제라 생각 한다.

본 실험에서의 sandwich ELISA에 의한 한국산 겨우살이 정량법의 정확성 및 반복성 실험으로 intra,

inter assay를 실시한 결과 CV값은 모두 10% 이내에 있고 bias도 intra assay의 경우 2.0% 이내로 나타났다. 그리고 inter assay의 경우 3.7%이내에 있는 결과를 나타냈다. 일반적으로 inter assay의 경우 CV값은 10% 이내, inter assay의 경우는 15% 이내의 경우는 수용할 수 있는 assay법으로 받아들여지는 바, 본 assay 결과는 실제 적용에 있어서의 문제는 없는 우수한 결과로 사료되었다.^{21,22)} 겨우살이 추출물 내의 lectin 성분은 지역별, 계절별, 숙주별 차이가 있음은 여러 보고에서 잘 알려진 바, 앞으로 본 assay system을 이용하여 자세한 검토를 할 예정이다.

결 론

한국산 겨우살이 추출물에서 면역증강 및 항중양 등 생리활성을 나타내는 주요 활성물질은 lectin(KML-C)으로 알려져 있다. 본 연구에서 KML-C의 면역분석법 확립을 위하여 단일크론 항체를 생산하였고, 항체의 특성을 조사하였다. ELISA법에 의한 단일크론 항체의 특성을 조사한 결과 특이성 면에서 크게 두가지의 특성을 나타내었다. 즉, 9H7-D10과 3C2-1H4 항체는 KML-C에만 특이적으로 반응하였고, 8B11-2C5, 8E12-3E9 및 5E10-F1 항체는 ML-I과도 강한 교차반응을 나타내었다. 각 항체의 subisotype을 조사한 결과 9H7-D10, 3C2-1H4 and 8B11-2C5는 IgG1 type이었고, 8E12-3E9과 5E10-F1는 IgM type이었다. Sandwich ELISA법에 기초한 KML-C의 정량법을 확립하기 위하여 항체의 coating 및 검출에서 여러 항체 간의 조합관계를 조사한 결과, 8E12-3E9 항체를 coating하고, 8B11-2C5-HRP 항체를 표지물질로 이용한 경우가 가장 높은 감도를 나타내었다. 이 방법에 의하여 KML-C에 대한 표준곡선을 작성한 결과 검출한계는 7 ng/ml이었고, 검출범위는 7-5,000 ng/ml 수준이었다. 확립한 ELISA의 반복성 및 정확성을 CV값으로 조사한 결과 inter assay의 경우는 3.9~9.3, intra assay의 경우는 4.59~5.83으로 높은 재연성을 보임으로서, 본 연구에 얻은 sandwich ELISA법은 우수한 정량법으로 인정되었다.

감사의 글

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 연구비에 의

하여 연구되었음.

문 헌

- 1) Dhmasi, Y., Fujii, H., Hayakawa, Y., Sakukawa, R., Yamarura, T., Sukamoto, T., Tsukada, K., Fujimaki, M., Numome, S., Komatsu, Y., Saiki, I. : Oral administration of Kampo (Japanes herbal) medicine Juzen-taito-to inhibits liver metastasis of colon 26-L5 carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **89**, 206 (1998).
- 2) Parhami-Seren, B., Bell, C., Margolies, M. N., Haupt, G. T. Jr. : Monoclonal antibodies that distinguish between two related digitails glycosides, Ouabain and Digoxin. *J. immunol.* **163**, 4360 (1999).
- 3) Rentea, R., Lyon, E. and Hunter, R. : Biologic properties of Iscador: A *Viscum album* preparation: I. Hyperplasia of thr thymic cortex and accelerated regeneration of hematopoietic cells following X-irradiation. *Lab Invest.* **44**, 43 (1981).
- 4) Mueller, E. A., Hamprecht, K. and Anderer, F. A. : Biochemical characterization of a component in extracts of *Viscum album* enhancing human NK cytotoxicity. *Immunopharmacology* **17**, 11 (1989).
- 5) Yoon, T. J., Yoo, Y. C., Hong, E. K., Cho, Y. H., Lee, S. W., Azuma, I., Yoo, B. L. and Kim, J. B. : Effect of Korean mistletoe extracts on the induction of IL-1 and TNF- α from mouse macrophages. *Kor. J. Pharmacogn.* **25**, 132 (1994).
- 6) Stein, G. M., Schietzel, M., and Bussing, A. : Mistletoe in immunology and the clinic (short review). *Anticancer Res.* **18**, 3247 (1998).
- 7) Beuth, J. : Clinical relevance of immunoactive mistletoe lectin-I. *Anticancer Drugs* **8** (Suppl 1), S53 (1997).
- 8) Bocci, V. : Mistletoe (*viscum album*) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy. A review. *J. Biol Regul Homeost Agents.* **7**, 1 (1993).
- 9) Yoon, T. J., Yoo, Y. C., Choi, O.B., Do, M. S., Kang, T. B., Lee, S. W., Azuma, I. and Kim, J. B. : Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumour angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumour cells in mice. *Cancer Lett.* **97**, 83 (1995).
- 10) Yoon, T. J., Yoo, Y. C., Kang, T. B., Baek, Y. J., Huh, C. S., Song, S. K., Lee, K. H., Azuma, I. and Kim, J. B. : Prophylactic effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor metastasis is mediated by enhancement of NK cell activity. *Int. J. Immunopharmacol.* **20**, 163 (1998).
- 11) Yoon, T. J., Yoo, Y. C., Kang, T. B., Shimzaki, K., Song, S. K., Lee, K. H., Kim, S. H., Park, C. H., Azuma, I. and Kim, J. B. : Lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) induce apoptosis in tumor cells. *Cancer Lett.* **136**, 33 (1999).
- 12) Franz, H. : Mistletoe lectins and their A and B chains. *Oncology* **43** (Suppl 1), 23 (1986).
- 13) Hajto, T., Hostanska, K., Fischer, J. and Saller, R. : Immunomodulatory effects of *Viscum album* agglutinin-I on natural immunity. *Anticancer Drugs* **8** (Suppl 1), S43 (1997).
- 14) Tonevitsky, A. G., Agapov, I., Temiakov, D., Moise-novich, M., Maluchenko, N., Solopova, O., Wurzner, G. and Pfueller, U. : Study of heterogeneity of lectins in mistletoe preparations by monoclonal antibodies to their A-subunits. *Arzneimittelforschung.* **49**, 970 (1999).
- 15) Jaggy, C., Musielski, H., Urech, K. and Schaller, G. : Quantitative determination of lectins in mistletoe preparations. *Arzneimittelforschung.* **45**, 905 (1995).
- 16) Tonevitsky, A. G., Shamshiev, A. T., Prokoph'ev, S. A., Agapov, II. and Toptygin, AYu. : Hybridoma cells producing antibodies against A-chain of mistletoe lectin I are resistant to this toxin. *Immunol Lett.* **46**, 5 (1995).
- 17) Pae, H. O., Seo, W. G., Shin, M., Lee, H. S., Lee, H. S., Kim, S. B. and Chung, H. T. : Protein kinase A or C modulates the apoptosis induced by lectin II isolated from Korean mistletoe, *Viscum album* var. *Coloratum*, in the human leukemic HL-60 cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* **22**, 279 (2000).
- 18) Park, W. B., Ju, Y. J. and Han, S. K. : Isolation and characterization of beta-galactoside specific lectin from Korean mistletoe (*Viscum album* var. *coloratum*) with lactose-BSA-sepharose 4B and changes of lectin conformation. *Arch Pharm Res.* **21**, 429 (1998).
- 19) Yoon, T. J., Yoo, Y.C., Kang, T.B., Kim, S-H., Azuma, I. and Kim, J. B. : Cellular and humoral adjuvant activity of lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album colaratum*). *Int. J. Immunopharm.* (in

- press). 2001.
- 20) Eshhar, Z., Kim, J. B., Barnard, G., Collins, W. P., Gilad, S., Lindner, H. R. and Kohen, F.: Use of monoclonal antibodies to pregnanediol-3 alpha-glucuronide for the development of a solid phase chemiluminescence immunoassay. *Steroids* **38**, 89 (1981).
- 21) Kim, J. B., Barnard, G. J., Collins, W. P., Kohen, F., Lindner, H. R and Eshhar, Z.: Measurement of plasma estradiol-17 beta by solid-phase chemiluminescence immunoassay. *Clin. Chem.* **28**, 112 (1982).
- 22) Kohen, F., De Boever, J. and Kim, J. B. Recent advances in chemiluminescence-based immunoassays for steroid hormones. *J. Steroid Biochem.* **27**, 71 (1987).