

Isolation and Characterization of Single-Chain Fv Against Ductal Cells

Myung-Hoon Lee, Hye-Myung Ryu, Sun-Zoo Kim, Ji-Young Park, Ji-Hyun Uhm and Tae-In Park[†]

Department of Pathology, Kyungpook National University Hospital, Daegu 700-721, Korea

For discrimination of ductal and acinar cells, we isolated a single-chain variable domain fragment (scFv) antibody against ductal cells of salivary gland using phage display technique. From the spleen of a mouse immunized with ductal cell lysate, total RNA was prepared and used as a template for cDNA synthesis of antibody genes. The scFv genes were constructed with variable domain genes of heavy and light chain and were introduced into pCANTAB5E to construct phage scFv library. The phage particles specific for acinar cells were screened by subtraction using immunotubes coated with acinar and ductal cell lysate and enzyme-linked immunoabsorbance assay (ELISA). The characteristics of the scFv were determined by immunohistochemistry (IHC) and the result indicated that the isolated scFv has the specificity against ductal cells of salivary glands and tubules of kidney. And the scFv has an unique binding activity specific for Hashimoto's thyroiditis. The nucleotide sequence of isolated scFv gene was determined and revealed that V_H belongs to the mouse H-chain family subgroup IB and V_L to the mouse L-chain family subgroup III.

Key Words: ScFv, Phage display, Ductal cell, Hashimoto's thyroiditis

서 론

특정한 항원에 특이적인 단클론 항체를 얻기 위해서는 항원을 생쥐에 주사하여 면역화 시킨 다음 비장으로부터 B 세포를 획득하고 hybridoma를 만드는 과정을 거친다. 하지만, 이처럼 쉽지 않은 과정을 통해 얻은 단클론 항체가 다른 유사 항원과 교차반응을 보이는 경우가 많이 있어 실제로 유용한 항체를 확보하기란 쉽지가 않다. 그런데 항체 단편을 phage의 표면에 발현시키는 방법 (McCafferty et al., 1990)이 개발되면서부터, 원하는 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 선별해 내는 과정이 훨씬 쉽고 효율적으로 변했다. 동물세포를 배양해 항체를 생산하는 전통적인 방법에서는 분리된 항원을 반드시 필요로 하지만, 새로운 방법에서는 분리된 항원뿐만 아니라 종양 세포 자체 (Roovers et al., 2001)를 항원으로 사용할 수 있어 활용 범위가 더욱 넓다.

Phage display는 특정한 항원에 대한 특이성을 지닌 항체 단편을 선별할 수 있는 매우 유용한 방법이다 (Huston et al.,

2001; Gao et al., 2003). 간단한 분자생물학적 기법들을 이용해, 매우 다양한 항체군을 포함하는 phage library를 만들 수가 있다. 항원에 대한 특이성을 지닌 항체 단편을 발현하는 phage는 다양한 방법으로 선별할 수가 있는데, library를 구성하고 있는 재조합 phage가 얼마나 다양한지가 phage display의 성패를 결정하는 가장 중요한 요소이다. 그래서 많은 연구자들은 library의 다양성을 증가시키기 위해 노력해 왔고, 10¹¹ 정도의 DNA를 포함하는 library를 구축하기도 했다. 최근에는 library의 다양성 못지않게 항원에 특이적인 항체 단편을 선별하는 방법 또한 중요한 것으로 인식되고 있다. 그래서 많은 방법들이 시도되고 있는데, 비슷한 항원을 이용해 subtraction하는 방법 (Naoki et al., 2002), 파라핀 포매 조직을 이용한 선별 방법 (Jesper et al., 1997), 종양 조직을 항원으로 이용하는 방법 (Willem et al., 1997) 등이 대표적인 예들이다. 특히 종양 세포에 특이적으로 결합하는 재조합 phage를 선별한 다음 정상 세포에 결합하는 재조합 phage를 제거하는 subtraction 방법을 활용해 많은 유용한 항체를 성공적으로 선별해 내었다 (Hoogenboom et al., 1999; Naoki et al., 2002).

상피세포기원의 악성종양을 암종이라 일컫는데 이들에는 선암종, 편평세포암종, 이행세포암종 등이 있다. 이들 중 선암종은 분비와 전도 기능을 수행하는 acinar cell과 ductal cell에서 기원하게 되는데 그 기원에 따라 종양의 악성도 및 예후에 차이가 발생하게 된다. 대부분의 선암종은 ductal cell에서

*논문 접수: 2004년 8월 18일

수정재접수: 2004년 9월 17일

[†]교신저자: 박태인, (우) 700-721 대구광역시 중구 삼덕동2가 50 경북대학교병원 병리과

Tel: 053-420-5253, Fax: 053-426-1525

e-mail: tipark@knu.ac.kr

기원하는 것으로 보고되고 있으나 선암종의 분화가 나쁜 경우에는 종양의 기원세포를 알기 어려운 경우가 많다. Ductal cell과 acinar cell은 정상일 경우에 형태학적인 구별이 비교적 용이하지만, 종양으로 진행된 경우 특히 분화가 나쁜 악성종양의 경우에는 그 원발성 세포를 형태학적으로 구분하기란 매우 어렵다 (Kabat et al., 1991). 하지만 종양으로 형질전환이 일어나더라도 원발성 세포의 특성을 지니고 있기 때문에 ductal cell과 acinar cell을 구별할 수 있는 항체가 있다면 종양으로 진행된 세포의 원발성 세포를 구별할 수 있어 정확한 진단이 가능하고 종양의 악성도와 예후판정에 큰 도움을 받을 수 있으므로 phage display를 이용한 항체 단편 (scFv)의 선별을 시행하였다.

본 연구에서는 미세 절제술을 이용해 분리한 ductal cell 용해액과 acinar cell 용해액으로 scFv가 표면에 발현된 재조합 phage를 subtraction함으로써 ductal cell에만 특이적으로 결합하는 scFv phage를 선별해 내고자 하였으며, ELISA, 면역조직화학 염색, 염기서열 분석 등으로 선별한 scFv의 특성을 규명하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

Phage library의 구축을 위해 Amersham에서 구매한 kit을 사용하였다. ScFv 유전자를 cloning하기 위한 vector는 pCANT-AB5E가 사용되었으며, 숙주로는 대장균 TG1과 HB2151이 사용되었다. 그 외 실험에 사용한 시약은 Sigma 및 Takara 등에서 구매하였다.

2. 쥐의 면역화 및 scFv library의 구축

1) 쥐의 면역화

4개월 된 Balb/c에 ductal cell 용해액 (50 µg/ml)을 Freund's complete adjuvant와 섞어 유화시킨 다음 피하 주사하였다. 4주가 경과하였을 때, ductal cell 용해액 (50 µg/ml)을 Freund's incomplete adjuvant와 섞어 주사하였다. 다시 10일이 경과하였을 때, ELISA로 항체가 생성된 걸 확인한 다음 library 구축에 이용하였다.

2) ScFv library의 준비

ScFv library는 Pharmacia에서 Recombinant phage antibody kit을 구매하여 구축하였다. 면역화한 Balb/c로부터 비장을 채취하여 mRNA를 추출하였으며, MMV 역전사효소와 random hexamer를 이용한 cDNA의 합성에 사용하였다. cDNA 합성은 두 개의 tube에 나누어 진행하였으며 하나는 중사슬의 가변부위 유전자 증폭에, 또 다른 하나는 경사슬의 가변부위 유전자 증폭에 사용하였다. 각각 증폭된 V_H와 V_L cDNA를 동일한 몰 비율로 섞어 PCR을 수행함으로써 두 cDNA가 linker에 의해

연결되어 V_H-linker-V_L의 구조를 이루도록 하였다. PCR 산물을 gel에서 추출하여 *Sfi*I과 *Not*I을 처리한 다음, 같은 제한효소로 절단된 phagemid pCNATAB5E에 삽입하였다. Ligation 산물로 TG1을 형질전환 하였으며, 2% glucose와 100 mg/ml ampicillin을 포함하는 SOBAG plate에서 선별하였다. Plate 위에 5 ml의 2×YT 배지를 더하여 자라난 clone을 모아 다음 실험에 이용하였다.

3. Ductal cell에 특이적인 scFv phage의 선별

1) 재조합 phage의 증폭

SOBAG plate에 자라난 세포들을 모은 용액에 M13K07 helper phage를 감염시킴으로써 재조합 phage가 정상적으로 조합을 형성해 나올 수 있도록 하였다. 간단히 설명하면, bacteria를 ampicillin과 glucose를 포함하는 2×YT배지에 키워 OD₆₀₀이 0.5에 이르렀을 때 M13K07 helper phage를 20:1 MOI (multiplicity of infection)로 더해 주었다. 약 30분 동안 배양하여 bacteria를 원심분리로 침전시킨 후 ampicillin과 kanamycin을 포함하는 2×YT배지에 현탁하였으며 30°C에서 밤새 배양하였다. 원심분리로 박테리아를 제거한 상층액에 4% PEG와 0.5 M NaCl을 첨가해 phagemid를 침전하였으며, 원심분리하여 얻어진 pellet에 1 ml의 PBS를 더해 농축된 phagemid 농축액을 얻었다.

2) Ductal cell에 특이적인 재조합 phage의 선별

Ductal cell의 용해액 (100 µg/ml)을 immunotube에 첨가하여 4°C에서 밤새 반응하였다. 용해액을 제거한 다음 3% BSA를 포함하는 PBS를 첨가하여 30분 동안 실온에서 반응하였으며, 10¹³ phage가 되도록 3% BSA 차단액으로 희석한 phage 농축액을 첨가하였다. Immunotube를 1시간 동안 천천히 흔들어 주어 결합반응이 전체적으로 일어나도록 하였다. 반응 후, 0.1% Tween-20이 포함된 PBS로 최소 5회 이상의 세척과정을 연속적으로 거쳤다. 항원에 결합한 phage는 0.1 M glycine (pH 3.0)을 더하여 용출하였으며, 용출 즉시 1 M Tris-HCl (pH 8.0)을 첨가하여 중성화함으로써 항체 역가의 손실을 최소화하고자 하였다. 용출된 phage용액을 acinar cell 용해액으로 코팅된 immunotube에 첨가하고 흔들면서 1시간 동안 반응함으로써 acinar cell 용해물에 특이적인 phage를 제거하였다. 이렇게 얻은 phage용액으로 TG1 세포를 감염하였으며 이 때 얻어진 colony로부터 phagemid를 추출하였다.

3) ELISA

Ductal cell 용해액 (50 µg/ml)을 각 well에 100 µg씩 첨가한 다음 4°C에 밤새 두어 coating하였다. 상층액을 버린 다음 차단액을 넣어 실온에서 30분간 두었으며, phage particle을 첨가해 항원항체 결합을 유도하였다. 실온에서 1시간이 경과한 다음, PBST로 세척과정을 거쳤고, Anti-M13 IgG를 첨가하여 실온에서 1시간 반응하였다. 세척과정을 거친 후, HRP가 결

합된 mouse IgG에 대한 2차 항체를 더하였으며, 기질을 첨가함으로써 발색반응을 진행하였다. 적절한 시간이 경과한 다음 2N H₂SO₄를 첨가하여 반응을 중단시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 선별된 scFv phage의 특성 분석

1) 염기서열 분석

선별과정으로 확보한 phage로부터 plasmid를 추출하여 염기서열의 분석에 이용하였다. Amersham의 염기서열 분석용 primer pCANTAB5-S1과 pCANTAB5-S6을 사용하였으며 자동염기서열반응으로 염기서열을 분석하였다.

2) 면역 조직화학 염색을 통한 특성 분석

선별된 재조합 phage의 scFv가 acinar cell에 특이적인 결합력을 지니고 있는지 확인하기 위해 면역조직화학 염색을 실시하였다. 포르말린에 고정하여 파라핀에 포매 한 조직을 5 μm 두께로 박절하여 poly-L-lysine으로 처리한 슬라이드에 부착하여 60°C oven에 밤새 둔 후 파라핀 제거와 흡수 과정을 거쳤다. 3% 과산화수소수에 15분간 뚫으로써 내인성 과산화효소의 활성을 억제하였으며, 증류수로 세척하였다. 조직을 citrate 완충액 (pH 6.0)에 넣은 채 전자레인지에서 처리하는 과정을 통해 항원회귀를 실시하였다. 조직을 차단액에 두어 비특이적 결합을 배제하였으며 적정농도로 희석한 재조합 phage를 조직에 첨가해 항원항체 반응을 유도하였다. 실온에서 1시간이 경과한 다음, PBST로 세척한 뒤 anti-M13 antibody를 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 반응한 다음, 세척과정을 거치고 다시 biotinylated polyvalent와 HRP-conjugated streptavidin을 더해 실온에서 30분간 반응시켰다.

세척과정을 거친 다음 발색제인 DMB (3, 3-diaminobenzidine)을 첨가해 상온에서 발색시켰으며 hematoxylin으로 대조염색을 하였다. 투명화 과정과 봉입과정을 거친 슬라이드는 광학현미경 하에서 검경하였다.

결 과

1. ScFv phage library의 구축

Library의 구축에 사용한 pCANTAB5E vector는 Amersham Pharmacia에서 구매해 사용하였다. 쥐의 면역화 과정이 끝난 다음, 비장으로부터 RNA를 추출하여 항체의 가변부위에 대한 cDNA를 합성하기 위한 template로 사용하였다. 약 340 bp의 중사슬과 325 bp의 경사슬의 가변부위에 대한 유전자 단편을 PCR로 얻었으며, 두 유전자 단편을 PCR을 통해 하나의 scFv 유전자 (V_H-linker-V_L)로 만들었으며 전기영동으로 약 750 bp의 산물을 확인할 수 있었다. ScFv 유전자를 pCANTAB5E vector에 삽입하였으며, TG1 세포를 형질전환함으로써 library를 구축하였다. ScFv antibody fragment library의 크기는 8.3 × 10⁶으로 측정되었다.

2. Ductal cell에 특이적인 scFv phage의 선별

Ductal cell에 특이적인 항체 단편을 선별하기 위해, 형태적으로 유사성을 가진 acinar cell에 결합성을 지닌 재조합 phage를 제거하는 subtraction 방법을 이용하였다. 먼저 ductal cell 용해액으로 코팅된 immunotube에 특이적인 결합을 하는 재조합 phage를 선별한 뒤 acinar cell 용해액으로 코팅된 immunotube에 반응시킴으로써 acinar cell에 결합력을 지닌 재조

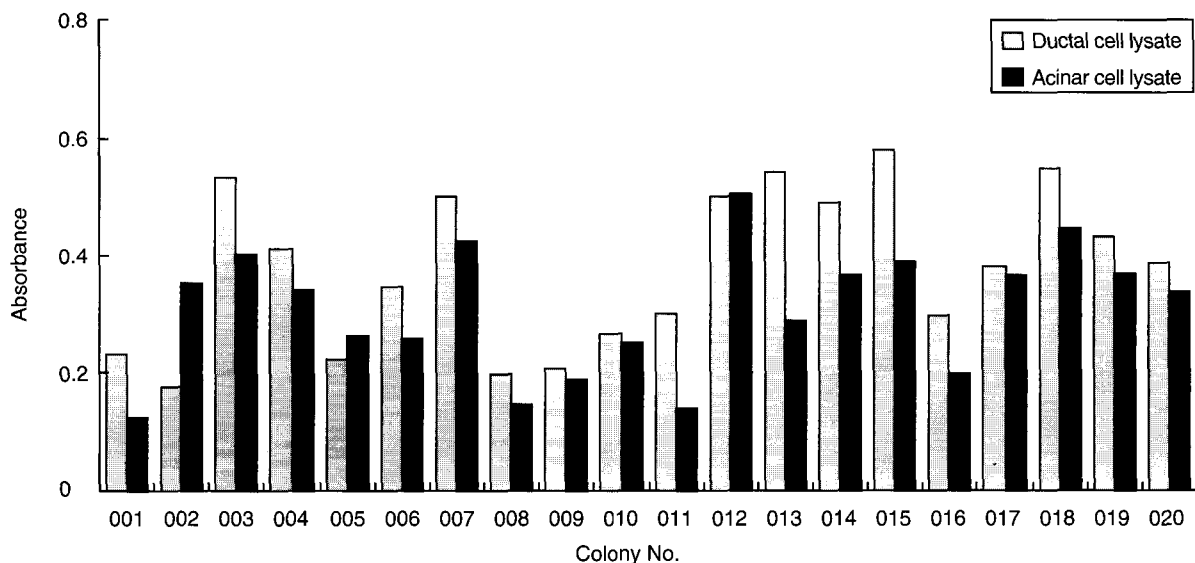


Fig. 1. Specificity of anti-ductal cell scFv. The colonies that has a high affinity against ductal cell lysate and a low affinity against acinar cell lysate were selected and the specificities of selected scFv phage colonies were confirmed by immunohistochemistry staining.

합 phage를 제거하였다. 이러한 과정을 3~4회 반복하여 ductal cell에만 결합하는 재조합 phage의 비율을 증가시켰다.

3. 선별된 anti-(ductal cell) scFv의 특성 분석

위 선별과정을 거쳐 얻어진 여러 clone으로부터 재조합 phage particle을 얻어 형태학적으로 유사한 ductal cell 용해물과 acinar cell 용해물에 대한 결합 특이성을 ELISA로 각각 확인하였다 (Fig. 1). Ductal cell 용해물에 대한 특이성이 높게 나타나면서도 acinar cell에 대한 특이성이 비교적 낮게 나타난 clone을 선택하였으며 면역조직화학 염색으로 그 특이성을 확

인하였다. 본 연구결과에서는 clone 15번이 ductal cell에 대한 결합력이 가장 높은 것으로 나타났으며 clone 3번, 13번, 18번 등이 비교적 높은 결합력을 보여 주었다. Acinar cell에 대한 결합력을 ELISA로 분석한 결과, 위 clone 중 13번과 15번이 ductal cell에 대한 결합력에 비해 상대적으로 낮은 결합력을 나타내었다. Ductal cell에 대한 높은 결합력을 보이면서도 acinar cell에 대해서는 낮은 결합력을 나타내는 clone 13번을 선별하여 면역조직화학염색을 실시함으로써 그 특이성을 확인하였다.

Clone 13번으로 면역조직화학 염색을 실시한 결과, 대장, 폐,

Table 1. The reactivity of scFv against variable tissues was determined by immunohistochemistry staining

Tissues	Diagnosis	Immunoreactivity (intensity)	Staining type
Colon	Normal epithelium	-	
	Hyperplastic polyp	-	
	Tubular adenoma	-	
	Adenocarcinoma	-	
Lung	Normal epithelium	-	
	Peritumor area	-	
	Bronchioloalveolar carcinoma	-	
	Adenocarcinoma	-	
Thyroid	Normal epithelium	-	
	Hashimoto's thyroiditis	+	Cytoplasm, granular
	Follicular adenoma	-	
	Papillary adenocarcinoma	-	
	Follicular carcinoma	-	
	Poorly differentiated carcinoma	-	
	Undifferentiated carcinoma	-	
Medullary carcinoma	-		
Prostate	Normal epithelium	-	
	Benign prostate hyperplasia	-	
	Adenocarcinoma	-	
Liver	Normal	-	
	Carcinoma	-	
Breast	Normal	-	
	Fibroadenoma	-	
	Ductal carcinoma in situ	-	
	Invasive ductal carcinoma	-	
	Invasive lobular carcinoma	-	
Salivary gland	Acinar cell	-	
	Ductal cell (large)	+/-	Cytoplasm, granular
	Ductal cell (small)	++	Cytoplasm, granular
	Pleomorphic adenoma	-	
	Adenoid cystic carcinoma	-	
	Basal cell adenoma	-	
Kidney	Glomerulus	-	
	Tubule, proximal	+	Cytoplasm, granular
	Tubule, distal	++	Cytoplasm, granular
	Interstitium	-	

전립선, 간, 유방의 정상상피조직과 종양을 포함한 증식성 병변에는 결합성을 보이지 않았으며, 하시모토 갑상선염증에서 관찰되는 호산세포, 침샘의 관상피 세포 그리고 신장의 세관상피세포에 특이적인 결합을 하였다 (Table 1). 염색된 세포를 살펴보면, 세포질에는 염색이 되었지만 세포막에는 염색이 되지 않았으며 과립형으로 염색되었음을 알 수 있었다 (Fig. 2).

Clone 13번의 scFv를 구성하는 V_H 와 V_L 의 염기서열과 아미노산 서열을 Fig. 3에 나타내었다. ScFv는 약 750 bp로 (Gly₄Ser)₃의 linker와 hexahistidine를 포함하는 250개의 아미노산으로 구성되어 있다. 아미노산의 numbering은 Kabat (Kabat et al., 1991)의 방법에 따랐으며, V_H 와 V_L 의 CDR (complementary determining region) 부위의 결정은 ImMunoGeneTics

(IMGT) database (<http://www.ebi.ac.uk/imgt>)에 따랐다. 아미노산 서열의 유사성을 기존의 면역글로블린 database와 비교, 분석한 결과, V_H 는 subfamily Q52, D는 DSP2.8, J는 JH4에 속함을 각각 확인하였으며, V_H gene family subgroup IB에 속했음을 확인하였다. 또한 가장 유사한 염기서열을 지닌 V_H Ox2 (GenBank accession code M21165)와는 93%정도의 유사성을 나타내었다. 경사슬 가변부위의 아미노산 서열을 분석한 결과, V_L 은 V_{K4} 에, J는 J_{k4} 에 속했음을 확인하였다. 그리고, Igk aq4 유전자 (GenBank accession code AJ231222)와 염기서열을 비교했을 때 95% 유사성을 나타내었다. ScFv를 구성하는 V_H 와 V_L 의 염기서열 및 아미노산 서열을 Fig. 3에 표시하였으며, 골격부위와 CDR 등도 표시하였다.

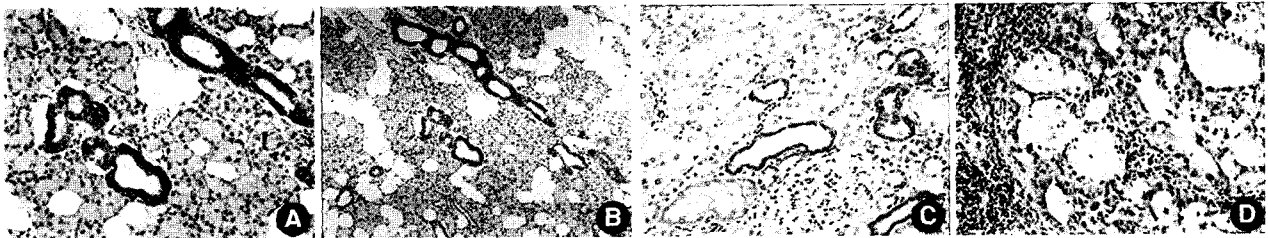


Fig. 2. Immunohistochemical staining of salivary gland (A, ×200; B, ×100), kidney (C, ×200), and Hashimoto's thyroiditis (D, ×200) with scFv of clone 13.

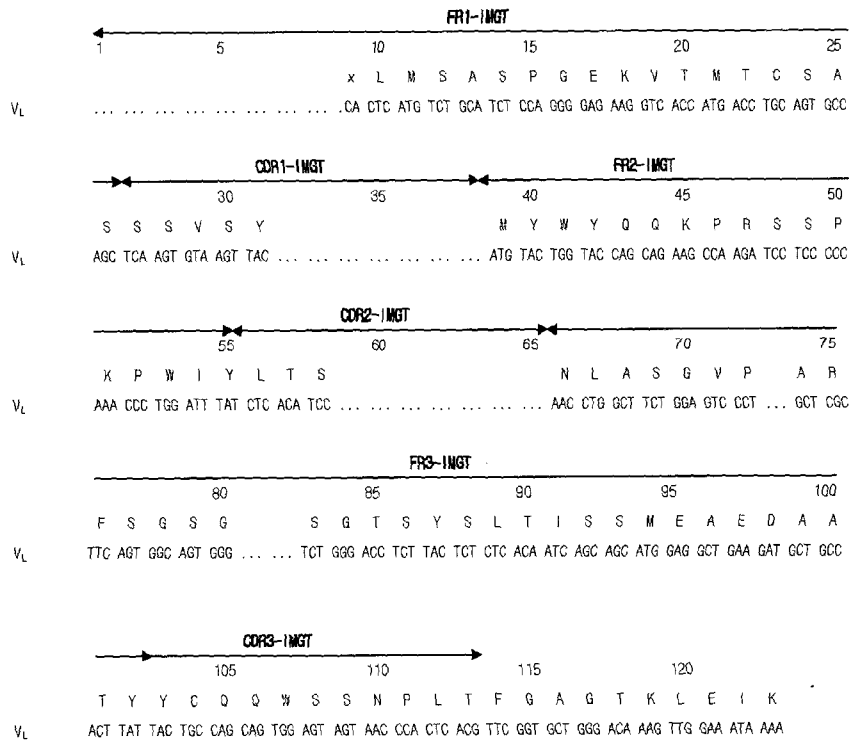


Fig. 3. The nucleotide and amino acid sequences of the scFv fragment of clone 13 specific for ductal cells. (A) The variable domain of heavy chain (V_H). (B) The variable domain of light chain (V_L). Amino acid numbering and complementary determining regions of the V_H and V_L domains were determined according to Kabat *et al.*

고 찰

세포의 표면에 다량으로 발현되는 항원이나 lineage에만 발현되는 특정 항원에 특이성이 있는 항체는 종양의 진단이나 치료제로의 활용이 가능하고 나아가 종양 발생과 관련된 항원을 발견하는 데 아주 유용하다 (Kabat et al., 1991; Einfeld et al., 1998). Ductal cell과 acinar cell은 정상일 경우에는 형태학적인 판별이 쉽게 가능하지만, 종양으로 진행될 경우 그 원발성 세포를 형태학적으로 구분하기란 매우 어렵다. 하지만 종양으로 형질전환이 일어나더라도 원발성 세포의 특성을 지니고 있기 때문에 ductal cell과 acinar cell을 구별할 수 있는 항체가 있다면 종양으로 진행된 세포의 원발성 세포를 구별할 수 있다. 이를 위해 항체단편인 scFv를 표면에 발현하는 phage display 기술을 이용하였으며, 본 연구를 통해 선별된 scFv를 면역조직화학 염색을 통해 다양한 조직에 대한 반응성을 점검해 보았다.

침샘의 정상 ductal cell에는 강한 반응성을 보였지만, pleomorphic adenoma, adenoid cystic carcinoma, basal cell adenoma 등에는 전혀 반응성을 나타내지 않았다. 그 외의 조직, 대장, 폐, 전립선, 간, 유방 등의 정상 상피조직과 종양을 포함한 증식성 병변에서는 반응성을 보이지 않았다. 하지만, 신장의 세관상피세포와 하시모토 갑상선염증에서 관찰되는 호산세포에는 강한 반응을 보였다. 이와 같은 결과들로 미루어 볼 때, scFv가 반응하는 항원은 ductal cell이 정상일 때는 많이 발현되지만 종양으로 진행되면서 발현이 되지 않는 것으로 생각된다. 또한 염색된 세포의 경향을 살펴보면, 세포질 내에 과립형으로 염색이 되어 있음을 알 수 있다. 이는 scFv가 결합하는 항원이 세포질 내에 존재하는 분비 과립이거나 분비에 관련된 소기관일 것이라고 추정할 수 있으며, 전자 현미경 등을 이용한 면역 염색이나 신전조직을 이용한 면역침전 실험을 실시한다면 scFv가 결합하는 항원을 정확히 파악할 수 있을 것이다.

하시모토갑상선염은 만성경과를 취하는 질환으로 갑상선 종대, 심한 림프구 침윤 등의 형태학적 변화와 단독 장기형 자가면역질환의 대표적인 예이다. 하시모토갑상선염에서 원발성 악성림프종, 유두암종, 휘르트레세포종양 및 수질암종 등의 발생 보고가 있다. 대개 임상 및 검사소견으로 확진이 되지만 때에 따라서는 종양의 가능성을 배제하기 위해 생검을 시행하기도 한다. 하시모토갑상선염의 조직학적 소견으로 갑상선실질은 형질세포, 면역모세포, 변형 림프구 및 대식세포 등을 포함하는 림프구들이 침윤하고 배중심을 포함하는 림프소포까지 형성한다. 이들 사이에 위축된 갑상선 소포가 있거나 부위에 따라 풍부한 세포질 내 많은 호산성 과립을 함유하고 있는 휘르크레세포도 보인다. 이러한 휘르크레세포는

소포상피 세포의 변성으로 해석하고 있다. 하시모토갑상선염은 대개 조직학적으로 진단이 용이하나 위축된 갑상선 소포나 휘르크레세포가 심한 세포학적 비정형성을 가지면 고분화 갑상선암종, 특히 유두암종과의 감별이 어려운 경우가 있다 (Okayasu, 1997). 이러한 경우에 감별을 위해서 여러 면역조직화학 염색이 시행되고 있으나 현재까지 특이한 표식인자가 없는 실정이다. 본 연구를 통해 선별한 scFv 항체 단편이 하시모토갑상선염에서는 양성소견을 보이거나 정상 갑상선 상피세포와 갑상선유두암종세포에는 음성소견을 보였는데 이러한 발현양상의 차이가 진단적 가치를 지니는지 확인하기 위해서 다양한 형태의 암종과 많은 수의 층류에 대한 조사가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 ductal cell 용해액과 acinar cell 용해액을 이용한 subtraction 방법으로 ductal cell에 특이적인 결합력을 갖는 scFv를 선별하고자 하였다. 그 결과, 하시모토 갑상선염증에서 관찰되는 호산세포, 침샘의 관상피세포, 신장의 세관상피세포 등에 특이적인 결합을 하는 scFv를 분리하였으며, 염기 및 아미노산 서열을 분석한 결과 중사슬은 V_H gene family subgroup IB이며 경사슬은 subgroup III인 것을 확인하였다. 본 연구를 통해 얻어진 scFv 유전자를 박테리아에서 발현하고 *in vitro* refolding을 통해 대량으로 scFv 단백질을 확보함 (Lee et al., 2002)으로써, 면역침전 및 면역염색 등을 통한 보다 정확한 특성 파악에 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2000년도 경북대학교병원 의학연구소의 연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

REFERENCES

- Einfeld DA, Brow JP, Valentine MA, Clark EA, Ledbetter JA. Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains. *EMBO J*. 1998; 7: 711-717.
- Gao C, Mao S, Ronca F, Zhuang S, Quaranta V, Wirsching P, Janda KD. De novo identification of tumor-specific internalizing human antibody-receptor pairs by phage-display methods. *J Immunol Methods*. 2003; 274: 185-197.
- Hoogenboom HR, Lutgerink JT, Pelsers MMAL, Rousch MJMM, Coote J, van Neer N, de Bruine A, van Nieuwenhoven FA, Glatz JFC, Arends JW. Selection-dominant and nonaccessible epitopes on cell-surface receptors revealed by cell-panning with a large phage antibody library. *Eur J Biochem*. 1999; 260: 774-784.
- Huston JS, George AJT. Engineered antibodies take cancer stage.

- Hum Antib. 2001. 10: 127-142.
- Jesper T, Lars A, Terje K, Catherine L, Christian I, Thomas B. Efficient selection of scFv antibody phage by adsorption to in situ expressed antigens in tissue sections. *J Immunol Methods*. 1997. 210: 11-23.
- Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of proteins of immunological interests, 5th. 1991. US Department of Health and Human Services. NIH, Bethesda.
- Lee MH, Park TI, Park YB, Kwak JW. Bacterial expression and in vitro refolding of a single-chain Fv antibody specific for human plasma apolipoprotein B-100. *Protein Expr Purif*. 2002. 25: 166-173.
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: Filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. 1990. 348: 552-554.
- Naoki S, Hiroo F. Isolation of monoclonal antibodies recognizing rare and dominant epitopes in plant vascular cell walls by phage display subtraction. *J Immunol Methods*. 2002. 264: 187-194.
- Okayasu I. The relationship of lymphocytic thyroiditis to the development of thyroid carcinoma. *Endocr Pathol*. 1997. 8: 225-230.
- Roovers RC, van der Linden E, de Bruine AP, Arends JW, Hoogenboom HR. Identification of colon tumour-associated antigens by phage antibody selections on primary colorectal carcinoma. *Eur J Cancer*. 2001. 37: 542-549.
- Willem van E, John de K, Wilfred TVG, Paul B, Carsten R, Peter PP, Ton L. Subtractive isolation of phage-displayed single-chain antibodies to thymic stromal cells by using intact thymic fragments. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997. 94: 3903-3904.