

개 트립신様 면역반응성 단클론 항체의 제작

김성수 · 강지훈 · 정광면* · 유재철* · 정점규* · 양만표¹

충북대학교 수의과대학
*바이오랜드

(게재승인: 2008년 9월2일)

Preparation of Monoclonal Antibodies for Canine Trypsin-Like Immunoreactivity

Sung-Soo Kim, Ji-Houn Kang, Kwang-Myun Cheong*, Jai-Cheol Yoo*,
Chom-Kyu Chong* and Mhan-Pyo Yang¹

Laboratory of Veterinary Internal Medicine, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University,
Cheongju 361-763, Republic of Korea

*Bioland, Ochang institute & factory, Ochang 368-883, Republic of Korea

Abstract : Canine trypsin-like immunoreactivity (cTLI), which is a mirror of the concentration of trypsin and trypsinogen, is a pancreas-specific enzyme and a suitable marker for canine pancreatitis and especially exocrine pancreatic insufficiency (EPI). To develop the immunochromatographic test kit, monoclonal antibodies that recognize cTLI were prepared. Anionic trypsin, cationic trypsin, and chymotrypsin from canine pancreas were successfully purified to homogeneity, using ammonium sulfate fractionation and benzamidine-affinity chromatography. The purification fold for anionic trypsin was 108 times when compared with that of the homogenation of pancreas. The molecular weights by SDS-PAGE analysis were approximately 23 kDa for chymotrypsin and approximately 20 kDa for cationic trypsin and anionic trypsin, respectively. Using the purified trypsin-like proteins, ten hybridomas which secrete canine trypsin-specific monoclonal antibody were prepared. Klotz plot indicated that hybridomas, 5G2H10G4 and 2F4A11, have high affinity constant (K_a) of 4.1×10^9 and 1.8×10^9 , respectively. Especially, 5F9H3 showed the cationic trypsin-specific binding pattern and its K_a was determined to 4.5×10^9 . The development of immunochromatographic test kit using these monoclonal antibodies against cTLI will be very useful in the diagnosis of canine EPI or canine pancreatitis.

Key words : dog, trypsin-like immunoreactivity (TLI), monoclonal antibodies, exocrine pancreatic insufficiency (EPI), pancreatitis.

서 론

음식물의 소화를 돕는 아밀라제(amylase), 리파제(lipase) 그리고 트립신(trypsin)을 포함하는 분해효소는 췌장에서 분비되며 이들 효소들은 비활성화된 효소원(zymogen) 형태로 합성·저장되고 소장으로 분비된 후 활성화되어 소화기능을 담당한다. 그러나 소화효소로부터 췌장을 보호하는 기전이 파괴될 때 자가 소화에 의해 췌장염이 발생하게 된다. 췌장의 자가 소화를 유발하는 인자들은 다양한 것으로 알려져 있다. 사람에서는 과음이나 담석으로 인한 경우가 많지만 개에서는 약물과 독소, 췌장의 산소공급과 관련이 있는 쇼크나 창상, 유전적 요인, 식이적 요인, 고지혈증, 종양 및 췌장 도

관내 기생충 등에 의해 발생한다. 그러나 췌장염의 발생 원인을 알 수 없는 특발성인 경우도 상당수 존재한다(6,16).

췌장염의 발생률을 정확히 알 수 없으나 탐색적 개복수술이나 부검에 의해 알려진 바에 의하면 대략 1% 정도를 차지한다(5). 이와 비슷하게 국내에서는 1998년 윤 등(20)에 의해 서울 및 경기 일원 동물병원에 내원한 개의 소화기 질병 및 췌장염의 발생 보고에서, 소화기 질병의 발생은 전체 내원한 개의 40.5%이었고 췌장염의 발생률은 소화기 질병을 나타낸 개의 1.5%로 나타났다.

또한 개의 외분비 췌장기능부전증(exocrine pancreatic insufficiency; EPI)은 외분비계 췌장 선방세포(acinar cells)의 진행성 기능상실시 췌장효소를 분비하지 못해 장내흡수부전을 나타내며, 췌장 분비능력이 85~90% 이상 상실되기까지는 임상증상을 나타내지 않는다. 어린 개에서의 EPI는 비염증성 췌장 선방세포의 위축으로 일어나며, 췌장 종양, 췌장 저형

¹Corresponding author.
E-mail : mpyang@chungbuk.ac.kr

성 또는 무형성, 심한 단백이영양증, 십이지장의 과산성시에도 발생한다(15,16,18).

개의 췌장염이나 췌장염에 의한 EPI 등은 특징적인 소견 없이 식욕부진, 구토 및 상복부 통증과 같은 임상증상을 나타낸다. 이러한 증상들은 다른 소화기 질병에서와 비슷한 증상이 많아 특히 감별진단이 요구된다. 췌장염이 췌장 효소의 비정상적인 활성화에 기인함으로 혈청 아밀라제나 리파제와 같은 효소의 활성을 측정하여 췌장기능 평가수단으로 이용하기도 하지만 이들 효소들은 췌장 이외의 다른 여러 조직에도 존재하고 다른 장기의 질병 시에도 효소활성이 영향을 받기 때문에 췌장 질병에 있어 이들 효소의 활성치 만으로는 진단가치가 떨어진다(11). 반면, 트립신과 트립시노겐(trypsinogen)이 췌장에서만 유일하게 생성·분비되는 점을 이용하여 혈청내 이들 농도를 방사면역분석법(radioimmunoassay)으로 측정하는 트립신(양) 면역반응성(trypsin-like immunoreactivity; TLI)을 소개하였으며 지금까지 이는 췌장염 및 EPI의 믿을 만한 진단지표로 이용되고 있다(19). 소장성 질병이 있는 개에서 TLI 농도가 정상이었지만 EPI의 경우 TLI 농도가 현저히 감소하기 때문에 이점이 EPI 감별진단에 중요하다. EPI 개에서 체중감소와 설사 등의 증상이 나타나기 이전에 TLI 농도의 현저한 감소가 나타나고(17), 췌장절제술을 받은 개에서 아밀라제, 아이소아밀라제(isoamylase), 리파제의 농도는 수술 전의 농도와 차이가 없었지만 TLI 농도는 현저히 감소하였다(8). 반대로, 급성 췌장염에 있어서는 췌장 효소 및 효소원의 분석시 아밀라제와 리파제의 증가와 함께 TLI의 상승을 나타낸다. 특히 TLI의 현저한 증가는 개와 고양이와 급성 췌장염의 좋은 지표가 될 수 있어 진단적 가치가 높다(10). 이상의 관찰에서 혈액중의 트립신과 트립시노겐의 농도를 측정하는 TLI 측정은 EPI 및 췌장염 진단에 매우 신뢰 있는 방법임을 보여준다.

개의 트립신은 약 20-24 kDa의 serine 단백분해효소로서 양이온 및 음이온 형태로 존재한다. 일반적으로 양이온성 트립신이 음이온성 트립신보다 2-10배 더 안정적이라고 알려져 있다(2). 개 췌장 질병의 효과적인 치료를 위해선 신속하고 정확한 진단이 필요하다. 이를 위해선 정확한 진단 기법의 개발이 꾸준히 요구되는데, 최근 분자생물학 및 면역학적 기법의 발달로 신속·정확한 진단과 더불어 보다 간편하고 저렴한 진단방법들이 많이 개발되고 있다. 본 연구에서는 개 췌장염 및 EPI의 진단법을 개발하기 위하여 개 트립신양 면역반응성 단클론 항체를 제작하였다.

재료 및 방법

개 췌장에서 트립신 분리

1) 췌장

개의 복강에서 췌장을 적출하여 -80°C 에서 트립신 분리 때까지 보관하였다(13). 췌장은 0.125 N H_2SO_4 용액에서 분쇄기로 균질액을 만들고 1,500 g에서 30 분 동안 원심분리

후 상층액을 모아두었다. 남은 침전물은 0.125 N H_2SO_4 용액에서 다시 한번 분쇄기로 균질액을 만들고 1,500 g에서 30 분 동안 원심분리 후 상층액을 실험에 이용하였다.

2) 황산암모늄(ammonium sulfate) 침전

췌장 상층액에 황산암모늄(0.8 M)을 첨가하여 완전히 용해한 후 24,000 g에서 30 분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다(9). 침전물은 다시 황산암모늄을 첨가하여 3.0 M으로 만든 후 24,000 g에서 30 분간 원심분리하여 상층액을 버리고 침전물을 회수하였다.

3) 겔 크로마토그래피(gel chromatography) 및 트립신 활성 확인

췌장 침전물은 완충용액(200 mM NaCl, 50 mM CaCl_2 , 0.1 g/l Nan)의 속도로 각 분획은 5 ml로 분주하였다. 각 분획에서 50 μl 를 채취하여 동량의 완충용액(1M Tris-HCl, pH 8.0)과 혼합하여, 샘플에 존재하는 불활성의 트립시노겐을 활성화시키기 위해 enterokinase 용액(1 mg/ml, Sigma-Aldrich Co, MO, USA)을 첨가한 후 37°C 에서 120 분간 배양하였다. 이어, Schwert와 Takenaka(7)에 의한 방법으로 모든 샘플에 존재하는 트립신의 활성을 확인하였다.

4) 친화 크로마토그래피

트립신 활성을 지닌 분획을 모두 혼합한 후 pH 8.0으로 맞추고 enterokinase 용액(1 mg/ml, Sigma-Aldrich Co)을 첨가하여 트립시노겐을 활성화시켰다(9). 이 용액은 트립신을 포함하는 serine proteases와 친화성을 지니는 HiTrap Benzamidin FF (GE Healthcare) column에 loading시켰다. 벤자미딘(benzamidin)에 결합되지 않은 단백질 분획들은 세척용액(0.5 M NaCl)으로 제거하였다. 트립신의 용출은 세척용액을 pH 3.25까지 낮춤으로 분획을 모으고 모든 분획으로부터 트립신 활성을 상기의 방법으로 확인하였다.

5) 분리된 트립신 순도 확인

트립신 활성을 지닌 분획은 sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 트립신의 분자량 및 순도를 검사하였다. 전기영동 후 겔은 은염색으로 단백질 밴드를 확인하여 트립신의 분리 및 순도를 분석하였다.

단클론 항체 생산

1) 마우스 면역화

분리·정제된 트립신 50 μg 을 Freund's complete adjuvant와 1:1로 섞은 후 Balb/c 마우스의 복강 내에 주사하였다. 2 주 후에는 동량의 트립신과 Freund's incomplete adjuvant와 1:1로 섞은 후 마우스의 복강 내에 주사하고, 2 주 후에 다시 마우스의 꼬리 정맥에 한번 더 주사하였다. 마지막 접종 2 일 후 꼬리에서 채혈하여 항체를 확인하기 위해 인산염 완충액에 희석하여(1/1000) ELISA 방법으로 항체의 역가를 결정하였다. 만약 역가가 낮게 나오면 2 주 후에 다시 면역시켰다.

2) 비장세포(splenocyte)와 골수종(myeloma)세포의 융합

골수종 세포는 인공 배양시 계속적 배양을 가능하게 하는 기능을, 비장세포는 면역글로블린의 발현기능을 각각 분담하게 하였다. 골수종 세포(Sp2/0-Ag14)를 세포배양용 배지에서 배양하였으며 1회 세포융합에 필요한 세포수는 1×10^7 개로 조정하였다. 트립신을 면역시킨 마우스에서 비장을 제거하여 혈청을 첨가하지 않은 세포배양용 배지 RPMI 1640 (Gibco, Island, NY, USA)에 비장을 넣어 으갠 후 세포 혼탁액을 용기에 담고 세포 잔해를 침전시켰다. 골수종 세포는 세포배양용 플라스크에서 회수하여 10 ml의 RPMI 1640에 현탁하고 세포수를 계산하였다. 1×10^7 의 골수종 세포와 1×10^8 의 비장세포를 50 ml 용기에 옮겨 RPMI 1640을 적당량 첨가 후 200 g로 5분간 원심분리하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 37°C의 물이 담긴 비커에 담고 2분간 방치한 후 37°C의 물이 담긴 비커에서 천천히 흔들며 주면서 1 ml의 polyethylene glycol (PEG; Sigma-Aldrich Co) 용액을 1분 동안 주입하였다. 그리고 100 g로 2분간 원심분리한 후 5 ml의 RPMI 1640을 3분에 걸쳐 넣고 또 다시 5 ml의 RPMI 1640을 2분간 걸쳐 첨가하였다. 세포가 들어 있는 용기에 10% fetal bovine serum (FBS)(Gibco) 첨가 RPMI 1640을 충분히 첨가하였다. 200 g로 2.5분간 원심분리한 후 배지는 버리고 30 ml의 hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HAT; Sigma-Aldrich Co)에 조심스럽게 현탁한 후 37°C, CO₂ 배양기에서 30분간 방치하였다. 마우스의 복강 대식세포(macrophage)를 feeder 세포로 하여 96 well 세포배양용 용기에 100 µl/well씩 융합된 세포 즉 하이브리도마(hybridoma)를 배양하였다.

3) 하이브리도마 세포주의 클로닝(cloning)

하이브리도마가 자라고 있는 96 well 세포배양용 용기에서 배지를 조금 취하여 ELISA 방법으로 항체를 생산하는 well을 확인하고, 그 well의 세포를 회수하여 24 well 세포배양용 용기로 옮겨 하루 동안 배양한 후 세포를 회수하여 세포수를 계산하였다. 그리고 RPMI 1640으로 제한희석하여 80 세포/ml이 되게 만든 후 feeder세포(마우스 흉선세포)가 깔린 96 well 배양용기에 100 µl씩 첨가하여(0.8 세포/well) 37°C, CO₂ 부란기에서 배양하였다. 안정된 단클론 세포주가 얻어질 때까지 클로닝을 계속하여 클로닝이 완료되면 대량 배양하여 얼린 후 액체 질소 통에 보관하였다.

4) 복수(ascites)에서 항체의 생산

생후 6-8 주 된 마우스(BALB/C) 복강에 pristane(0.5-1 ml) 처리 후 1주일째 되는 날 항체를 생산하는 하이브리도마를 인산염 완충액에 현탁하고 계수하여 마우스 한 마리당 1.5×10^6 세포를 0.5 ml 인산염 완충액에 현탁하여 복강에 주사하였다. 1-2 주 후 복수를 채취하여 -70°C 냉동고에서 보관하였다.

5) 항 트립신 단클론 항체의 분리정제 및 확인

채취한 복수에 황산암모늄을 10%의 농도로 첨가한 후 30분간 혼합하고 12,000 g에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 취하고 다시 이 상층액에 황산암모늄을 50%의 농도로 첨가한 후 4°C에서 30분간 방치하였다. 다시 12,000 g에서 30분간 원심 분리하여 상층액은 버리고 침전물을 20 mM 인산화 칼륨(potassium phosphate)에 현탁시켜 이 현탁액을 20 mM 인산화 칼륨용액에서 18 시간 이상 투석하였다. 그 후 Protein G-coupled column을 20 mM 인산화 칼륨 용액으로 column을 평형화시키고, 투석된 복수를 0.22 µm 필터로 여과후 Protein G-coupled column에 주입하였다. 모두 주입한 후 다시 20 mM 인산화 칼륨 용액을 흘려주고 100 mM Glycine (pH 2.8) 용액으로 용출시켰다. 이 때 1 M Tris (pH 9.0) 용액을 용출액의 1/10 부피로 첨가해 주어 pH를 보정했으며 용출된 항체액을 농축한 후 150 mM 인산염 완충액에서 투석하였다. 투석이 끝나면 Bradford assay (iNtron Biotechnology)로 단백질의 양을 결정한 후 사용하였다.

6) SDS-PAGE

개 체장으로부터 분리정제한 트립신항 면역활성 단백질과 상층액 또는 복수로부터 정제한 단클론 항체를 Bradford assay를 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 동일한 양의 단백질을 sample buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 25% glycerol, 1,44 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)와 1:5로 혼합하여 100°C에서 5분간 끓여 변성시켰다(1). 그 후, 변성시킨 시료를 10% 아크릴아마이드(acrylamide) 겔에 주입하고 1시간 동안 100 volt 전기로 전기 영동하였다. 전기영동이 종료된 후, 겔은 Comassie Blue 염색액으로 염색하였다.

7) 단클론 항체의 아형(isotype) 결정

제작된 단클론 항체의 아형은 isotyping kit (Sigma-Aldrich Co)를 구매하여 이의 용법 및 용량에 따라 시험을 수행하였다

정제한 단클론 항체의 항원 친화성

제작된 단클론 항체들(SG2H10G4와 2F4A11)의 항원 친화성(antigenic affinity)을 알아보기 위해서 항원에 대한 친화상수(affinity constant; K_a)를 구하였다. K_a 값은 해리상수(dissociation constant; K_d)의 역수로서, 즉, $K_a = \frac{1}{K_d}$ 이며 이들 K_d 값은 Friquet 등(3) 고안한 간접적 경쟁 ELISA (Indirect competitive ELISA)을 수행한 후, Klotz plot을 통해서 구하였다. K_a 값을 구하기 위해서 2배수로 희석된 단클론 항체 용액을 0.05 ml준비하여 free cationic trypsin 용액(0.5 µg/ml) 0.05 ml과 혼합하였다. 상온에서 1시간 반응시킨 후 이 반응 용액을 ELISA plate에 넣어 다시 37°C에서 1시간 반응시켰다. ELISA Reader로 A_{450} 을 측정하여 값을 구하였다. 다음, ELISA 결과를 바탕으로 아래 식을 이용하

여, Klotz plot을 실시하였다.

$$\frac{A_0}{A_0 - A} = 1 + \frac{K_d}{a_0}(y = b + ax)$$

여기서, A_0 는 항원이 존재하지 않을 때의 A_{450} 이며, A 는 항원이 존재할 경우의 A_{450} 이다. a_0 는 항원의 농도 (ng/ml)이며, K_d 는 해리상수이다. Plotting을 한 후, 기울기를 구하여 이로부터 K_d 를 구하였다.

결 과

개 췌장에서 트립신 분리

개 췌장으로부터 균질화하여 황산암모늄으로 분획한 후, 그리고 벤자미딘 친화성 column을 통과 한 후의 각각 정제 단계에서 단백활성화 정도는 Table 1과 같이 나타났다. 개 트립신 분리를 위해 개 췌장(18.4 g)을 균질한 후의 전체 단백질 활성 30.62/300 ml중에는 5,000 mg의 단백질 존재하여 0.006 정도의 특이 활성을 보였다. 황산암모늄으로 분획한 후에는 0.025의 활성을 나타내었으며, 벤자미딘 친화성 column을 통과 한 후의 키모트립신 활성은 0.65, 양이온성 트립신 활성은 0.77, 음이온성 트립신 활성은 0.65를 각각 나타내어 최초 췌장 균질화의 정제율에 비해 황산암모늄 분획단계에서는 4배 정제되었으며, 벤자미딘 친화 크로마토그래피를 수행한 이후에는 키모트립신은 108배, 양이온성 트립신은 128배, 음이온성 트립신은 108배로 각각 정제되었다. 다음은 정제된 트립신들을 SDS-PAGE를 실시하여 분자량을 확인하였다(Fig 1). 각 정제 단계에서 얻어진 단백을 전기 영동한 결과, 트립신에 해당하는 20 kDa의 밴드가 존재하였으며, 정제 키모트립신을 전기 영동한 6번 lane은 23 kDa을 나타내었다.

단클론 항체 생산

제작된 개 트립신에 특이적인 항체를 분비하는 하이브리도마는 Table 2에 나타내었다. 하이브리도마 5G2H10G4는 IgG₁ class를 보였으며 흡광도 450에서 단백질 mg당 음이온성 트립신 활성은 2.58, 양이온성 트립신 활성은 1.73을 나타내었으며 키모트립신 활성은 낮았다(0.38). 마찬가지로 2F4A11는 IgG₃였으며 음이온성 트립신 활성은 1.27, 양이온성 트립신 활성은 1.26을 나타내었으며 키모트립신 활성은 0.21로 낮았다. 그러나 5F9H3는 음이온성 트립신 활성이 0.02 및 키모트립신 활성이 0.01인 것에 비해 양이온성 트립신 활성

은 0.7로 매우 높은 활성을 나타내었다. 그 밖의 하이브리도마에서는 양이온성 및 음이온성 트립신 그리고 키모트립신 활성에 있어 큰 차이를 보이지 않았다.

또한 제작된 하이브리도마의 상층액을 이용하여 SDS-PAGE를 실시한 결과, Fig 2에서 처럼 모든 하이브리도마에서 22 kDa (light chain)과 45 kDa (heavy chain)을 나타내었다.

단클론 항체의 항원 친화력

간접 경쟁 ELISA를 이용하여 Klotz plot로 K_d 를 계산하

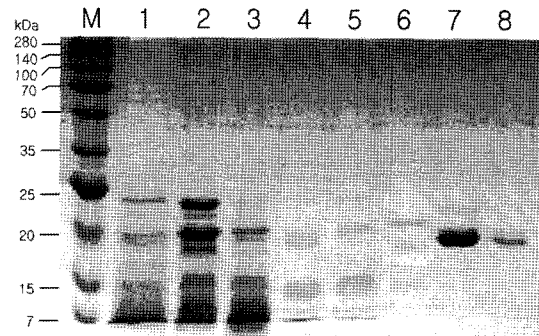


Fig 1. SDS-PAGE analysis of canine trypsin purification. M, size markers; lane 1, homogenate; lane 2, (NH₄)₂SO₄ fractionation; lane 3, dialysis 1 mM HCl; lane 4, trypsin activation; lane 5, flow-through of affinity chromatography; lane 6, purified chymotrypsin; lane 7, purified cationic trypsin; lane 8, purified anionic trypsin.

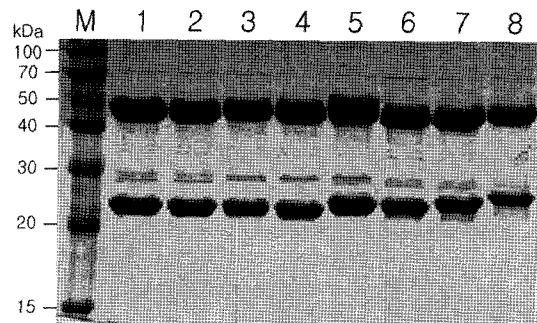


Fig 2. SDS-PAGE analysis of anti-canine trypsin monoclonal antibodies. M, size markers; lane 1, 5G2H10G4; lane 2, 7A10 C10; lane 3, 2F4A11; lane 4, 1D6D6B2; lane 5, 7F1A6D12; lane 6, 4F11D2; lane 7, 7A12C8G2; lane 8, 5F9H3.

Table 1. Purification of canine trypsin from pancreas

| Purification step | | Total activity | Total protein | Specific activity | Purification fold |
|---|------------------|----------------|---------------|-------------------|-------------------|
| Homogenation | | 30.62 (300 ml) | 5,000 mg | 0.006 | 1 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ Fractionation | | 24.99 (50 ml) | 1,000 mg | 0.025 | 4 |
| Benzamidine affinity chromatography | Chymotrypsin | 3.25 (5 ml) | 5 mg | 0.65 | 108 |
| | Cationic trypsin | 7.65 (5 ml) | 10 mg | 0.77 | 128 |
| | Anionic trypsin | 5.23 (5 ml) | 8 mg | 0.65 | 108 |

Table 2. List of hybridoma secreting canine trypsin-specific antibody

| Hybridoma | Isotypes | Relative activity(OD ₄₅₀ /mg of protein) | | |
|-----------|-------------------|---|------------------|--------------|
| | | Anionic trypsin | Cationic trypsin | Chymotrypsin |
| 5G2H10G4 | IgG ₁ | 2.58 | 1.73 | 0.38 |
| 7A10C10 | IgG _{2b} | 1.52 | 1.61 | 1.05 |
| 2F4A11 | IgG ₃ | 1.27 | 1.26 | 0.21 |
| 1D6D6B2 | IgG _{2b} | 0.81 | 0.85 | 0.89 |
| 7F1A6D12 | IgG ₁ | 1.00 | 1.02 | 0.97 |
| 4F11D2 | IgG ₁ | 0.31 | 0.47 | 0.64 |
| 7A12C8G2 | IgG ₁ | 1.03 | 1.23 | 1.11 |
| 5F9H3 | IgG ₁ | 0.02 | 0.70 | 0.01 |
| 6G6H3 | IgG ₁ | 0.55 | 0.65 | 0.55 |
| 3G6C8 | IgG ₁ | 0.57 | 0.68 | 0.55 |

Table 3. K_a value of each anti-canine trypsin monoclonal antibody calculated from Klotz plot

| Hybridoma | K _d value | K _a (1/K _d) value |
|-----------|---------------------------------|--|
| 5G2H10G4 | 24.4 ± 0.81 × 10 ⁻¹¹ | 4.1 × 10 ⁹ |
| 7A10C10 | 38.0 ± 0.52 × 10 ⁻¹⁰ | 2.6 × 10 ⁸ |
| 2F4A11 | 56.9 ± 3.79 × 10 ⁻¹¹ | 1.8 × 10 ⁹ |
| 7A12C8G2 | 16.7 ± 0.33 × 10 ⁻¹⁰ | 6.0 × 10 ⁸ |
| 5F9H3 | 22.0 ± 0.13 × 10 ⁻¹⁰ | 4.5 × 10 ⁹ |

였다. 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 5G2H10G4의 K_d는 24.4 ± 0.81 × 10⁻¹¹을, 2F4A11은 56.9 ± 3.79 × 10⁻¹¹을, 5F9H3은 22.0 ± 0.13 × 10⁻¹⁰을 나타내어, K_a는 5G2H10G4에서 4.1 × 10⁹, 2F4A11에서 1.8 × 10⁹, 5F9H3에서 4.5 × 10⁹를 보였다. Fig 3에는 5G2H10G4와 2F4A11의 Klotz plot을 나타내었다.

고 찰

트립신과 트립시노젠이 췌장에서만 유일하게 생성·분비 되는 것을 이용하여 혈청내 트립신 농도를 방사면역분석법으로 측정하는 TLI를 소개한 것을 토대로(19)하여 최근까지 Waritani 등(12, 14)에 의해 TLI 측정기법이 개발되었다. 본 연구 결과는 개 췌장으로부터 음이온성 트립신, 양이온성 트립신 및 키모트립신을 분리정제하여 이것을 항원으로 하여 고친화성을 가진 단클론 항체를 제작에 성공함으로써 개 췌장염과 EPI에 대한 진단 키트를 제작할 수 있는 길을 열고 있다.

본 연구에서 분리정제된 트립신 유사물질 중 양이온성 및 음이온성 트립신은 20 kDa의 밴드를 나타냈었으나 키모트립신은 23 kDa의 밴드를 보였다. 이것은 28 kDa의 키모트립신이 정제과정에서 자가활성화(autoactivation)에 의해 단백질 일부가 분해 되어 나간 것으로 추정된다. K_a 즉 친화상수는 해리상수(K_d)의 역수로서 K_a 값이 10⁹에서 10¹²까지는 고친화성을 나타내어서 면역반응에 적용이 가능하며, K_a 값이 10⁶

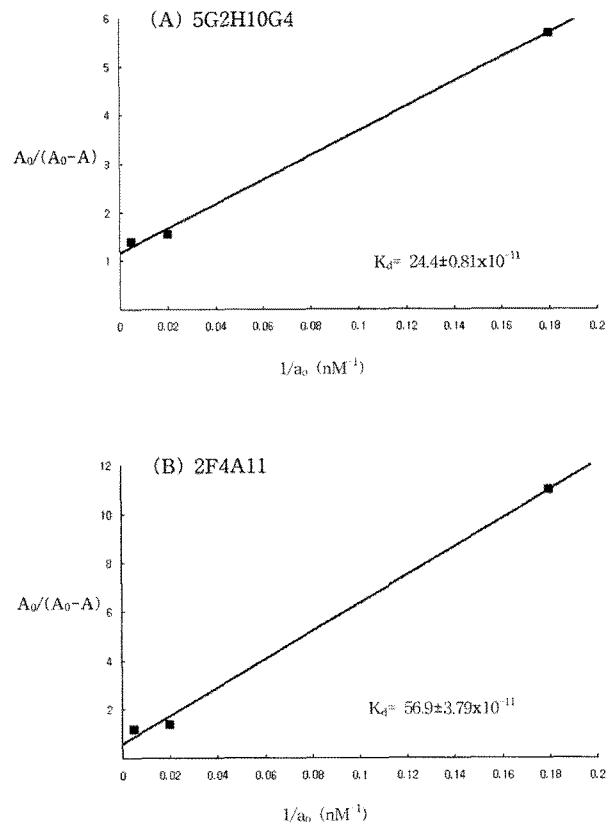


Fig 3. Klotz plot of anti-canine trypsin monoclonal antibodies, 5G2H10G4 (A) and 2F4A11 (B).

에서 10⁴사이가 되면 낮은 친화성을 나타내어서 면역정제에 적용이 가능하다. 본 연구에서의 하이브리도마 중 5G2H10 G4는 4.1 × 10⁹, 2F4A11은 1.8 × 10⁹의 K_a값을 나타내었으며 양이온성 및 음이온성 트립신 모두에 특이적이었다. 따라서 5G2H10G4 및 2F4A11은 신속 면역크로마토그래피 진단 키트 개발시 capture 용 또는 conjugate 용으로 사용할 수 있을 것으로 보인다. 특히 5F9H3은 개 양이온성 트립신에만

특이성이 높게 나타내어서 트립신의 양이온성 및 음이온성의 물리생화학적 분석에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 보인다. Williams와 Batt(19)는 TLI 키트를 개발할 때 양이온성 트립신을 이용하였다. 본 연구에서도 5F9H3로부터 양이온성 트립신을 분리정제하여 단클론 항체를 생산하였으며 이는 개 양이온성 트립신 진단 키트 개발에 활용할 수 있을 것으로 보인다. 사람에게 있어서는 요중에 검출되는 음이온성 트립신을 급성 췌장염의 지표로 활용하고 있기 때문에(4) 5G2H10G4 및 2F4A11의 단클론 항체를 이용하여 급성 췌장염 진단 키트 개발을 하면 개의 요중 TLI 측정도 췌장염 진단에 도움이 될 것으로 보인다.

한편, 효과적인 진단기법이 있다 하더라도 그것이 적정한 가격이 형성되지 못한다면 현실적으로 이용하는데 어려움이 있을 것이다. 외국에서 수입된 상품이 효과적이라 할지라도 국산화를 하지 못하면 국가 경제에도 별다른 도움이 되지 않을 수 있다. 본 항체들을 이용하여 개 급성 췌장염 또는 EPI의 진단 키트의 개발로 인한 기술 축적은 다른 질병의 진단 키트 개발에 직·간접적 응용이 가능하다.

결론적으로 혈액중의 트립신 농도를 측정하는 TLI 기법을 활용함은 개 췌장염 진단에 가장 좋은 진단방법이며, 고친화상수를 가지고 있는 5G2H10G4, 2F4A11 및 5F9H3 항체는 췌장염 진단 키트에 유용하게 응용될 수 있을 것으로 보이며 이들을 이용하여 신속 면역크로마토그래피법 개발에 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 본 연구에서 제작된 단클론 항체를 이용하여 진단 키트를 개발하려면 그것의 감수성과 정확성을 평가하는 것은 물론, 실제 췌장염 및 EPI 개에 임상적용을 실시하는 중요한 과제가 남아있다.

결 론

개의 혈중 트립신과 트립시노겐의 농도를 반영하는 cTLI 활성은 췌장에 특이하며 췌장염과 특히 EPI 진단에 신뢰성 있는 지표로 이용된다. 본 연구에서는 cTLI에 대한 신속 면역크로마토그래피 진단 키트를 개발하기 위하여 cTLI를 인식하는 단클론 항체를 제작하였다.

개 췌장으로부터 키모트립신에 해당하는 약 23 kDa의 밴드, 양이온성 트립신과 음이온성 트립신에 해당하는 약 20 kDa 단백을 분리정제하였다. 이 트립신 유사 단백을 항원으로 사용하여 트립신 특이적 단클론 항체를 분비하는 하이브리도마를 얻었다. 그 중에서 Klotz plot에 의해 하이브리도마 5G2H10G4와 2F4A11은 각각 4.1×10^9 및 1.8×10^9 로 높은 친화상수를 나타내었다. 특히 5F9H3 항체는 양이온성 트립신에 특이적으로 반응하였으며 친화상수는 4.5×10^9 이었다. 본 연구에서 제작한 cTLI에 특이적으로 반응하는 단클론 항체를 이용하여 신속면역크로마토그래피 진단 키트를 개발하게 된다면 개 췌장염과 EPI의 진단에 매우 유용하게 적용될 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Boollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. Gel electrophoresis under denaturing conditions. In: Protein Method. 2nd ed. New York: Wiley-Liss. 1996: 107-154.
2. Colomb E, Guy O, Deprez P, Michel R, Figarella C. The two human trypsinogens: catalytic properties of the corresponding trypsin. *Biochim Biophys Acta* 1978; 525: 186-193.
3. Friguet B, Chaffotte AF, Djavadi-Ohanian L, Goldberg ME. Measurement of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* 1985; 77: 305-319.
4. Hedstrom J, Sainio V, Kempainen E, Puolakkainen P, Haapiainen R, Kivilaako E, Schauman KO, Stenman UK. Urine trypsinogen-2 as marker of acute pancreatitis. *Clin Chem* 1996; 42: 685-690.
5. Murtaugh RJ, Jacobs RM. Serum antiprotease concentrations in dogs with spontaneous and experimentally induced acute pancreatitis. *Am J Vet Res* 1985; 46: 80-83.
6. Ruaux CG. Diseases of the exocrine pancreas. In: Handbook of small animal practice. 5th ed. Missouri: Saunders Elsevier. 2008:406-415.
7. Schwert GW, Takenaka Y. A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochim Biophys Acta* 1955; 16: 570-575.
8. Simpson KW, Simpson JW, Lake S, Morton DB, Batt RM. Effect of pancreatectomy on plasma activities of amylase, isoamylase, lipase and trypsin-like immunoreactivity in dogs. *Res Vet Sci* 1991; 51: 78-82.
9. Steiner JM, Medinger TL, Williams DA. Purification and partial characterization of feline trypsin. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1997; 116: 87-93.
10. Steiner JM, Rutz GM, Williams DA. Serum lipase activities and pancreatic lipase immunoreactivity concentrations in dogs with exocrine pancreatic insufficiency. *Am J Vet Res* 2006; 67: 84-87.
11. Strombeck DR, Farver T, Kaneko JJ. Serum amylase and lipase activities in the diagnosis of pancreatitis in dogs. *Am J Vet Res* 1981; 42: 1996-1970.
12. Waritani T, Okuno Y, Ashida Y, Hisasue M, Tsuchiya R, Kobayashi K, Yamada T. Development of a canine trypsin-like immunoreactivity assay system using monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 87: 41-49.
13. Waritani T, Okuno Y, Ashida Y, Tsuchiya R, Kobayashi K, Yamada T. Development and characterization of monoclonal antibodies against canine trypsin. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 80: 333-338.
14. Waritani T, Onda M, Okuno Y, Neo S, Furuichi M, Hisasue M, Tsuchiya R, Yamada T. One-step immunoreactivity assay for detection of high-level canine serum trypsin-like immunoreactivity. *J Vet Med Sci* 2007; 69: 669-671.
15. Westermarck E, Batt RM, Vaillant C, Wiberg M. Sequential study of pancreatic structure and function during development of pancreatic acinar atrophy in German shepherd dog. *Am J Vet Res* 1993; 54: 1088-1094.
16. Westermarck E, Wiberg M. Exocrine pancreatic insufficiency in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003; 33:

- 1165-1179.
17. Wiberg ME, Nurmi AK, Westermarck E. Serum trypsin-like immunoreactivity measurement for the diagnosis of subclinical exocrine pancreatic insufficiency. *J Vet Intern Med* 1999; 13: 426-432.
 18. Wiberg ME, Saari SAM, Westermarck E. Exocrine pancreatic atrophy in German shepherd dogs and rough-coated Collies: an end result of lymphocytic pancreatitis. *Vet Pathol* 1999; 36: 530-541.
 19. Williams DA, Batt RM. Diagnosis of canine exocrine pancreatic insufficiency by the assay of serum trypsin-like immunoreactivity. *J Small Anim Practice* 1983; 24: 582-588.
 20. Yun YM, Park SJ, Youn HY, Choi HI. The Studies on the normal values of pancreatic enzymes in healthy dogs and the survey pancreatitis in dogs of Seoul and Kyung-gi area. *Korean J Clin Med* 1998; 15: 228-233.