

의학 석사학위 논문

병원성 파울러자유아메바에서
클로닝된 Nfa1 단백질에 대한
단클론항체의 생산과 특성

아주대학교 대학원

의학과

이양진

병원성 파울러자유아메바에서
클로닝된 Nfa1 단백질에 대한
단클론항체의 생산과 특성

지도교수 신 호 준

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2005년 8월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

이 양 진

이양진의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 신 호 준 인

심사위원 박 선 인

심사위원 김 완 기 인

아주대학교대학원

2005년 6월 22일

병원성 파울러자유아메바에서 클로닝된 Nfa1 단백질에 대한 단클론항체의 생산과 특성

목적: 자유생활아메바는 담수와 토양에서 자유생활을 하는 아메바로서 자연 환경에서는 세균들을 포식하며, 자유아메바 (genus *Naegleria*) 중 파울러자유아메바 (*Naegleria fowleri*)는 사람, 마우스 및 다른 실험동물들에서 원발성 아메바성 뇌수막염 (primary amoebic meningoencephalitis; PAME)을 유발하는 것으로 알려져 있다. 본 연구자의 연구실에서는 파울러자유아메바의 cDNA library를 구축하여 파울러자유아메바에 대한 감염혈청 및 면역혈청으로 immunoscreening 과정을 통해 항원성과 관련이 있고, 특히 위족 (pseudopodia)에 특이성이 있는 유전자를 클로닝하여 *nfa1* (*Naegleria fowleri* antigen 1)이라 명명하였다. 본 연구의 목적은 병원성 파울러 자유아메바에서 클로닝된 Nfa1 단백질에 대한 단클론항체를 생산하고 그 특성을 검정하고자 하였다.

재료 및 방법: 파울러자유아메바에서 클로닝된 *nfa1* 유전자로부터 재조합 His-tag fusion Nfa1 단백질을 얻은 다음, 정제하여 생후 6주 된 BALB/c 마우스 암컷에 면역시키고, 마우스의 비장을 적출하여 형질 세포종 (myeloma) 세포주인 F0 세포와 세포융합기술을 이용하여 세포융합을 실행하였다. 재조합 His-tag fusion Nfa1 단백질에 대한 단클론항체를 생산하는지를 확인하기 위하여 면역효소흡착법 (ELISA)으로 항원과의 반응 정도를 측정하여, 항체를 분비하는 잡종세포를 선택 배양하였으며, 한계 희석법 (limiting dilution method)을 통하여 단클론항체를 얻을 수 있었다.

결과: 8개의 단클론항체 즉, A1F, A3C, A6D, A10F, C3A, C6F, C7F, B6B를 얻었다. 항원에 대한 항체의 반응을 확인하기 위해 western blotting을 수행하여 반

응대를 확인한 결과, 단클론항체 8개 (A1F, A3C, A6D, A10F, C3A, C6F, C7F, B6B)가 17 kDa 크기의 재조합 His-tag fusion Nfa1 단백질과 강하게 반응 하였다. 각각 항체의 종류를 조사하기 위해 *isotyping*을 실행한 결과, 단클론항체 8개 (A1F, A3C, A6D, A10F, C3A, C6F, C7F, B6B)가 모두 IgG2b였다. 또한, 형광현미경을 통하여 각각의 단클론항체 모두가 아메바의 위족 (*pseudopodia*)과 *food-cups*에서 특이성이 나타남에 따라 Nfa1 단백질의 위치를 확인할 수 있었다.

결론: Nfa1 단백질에 대한 8개의 단클론항체를 분비하는 세포주들을 얻을 수 있었으며, 단클론항체를 사용하여 파울러자유아메바의 위족과 *food-cups*에서 Nfa1 단백질의 위치를 특이적으로 관찰할 수 있었다. 따라서, 본 연구 결과에서 얻어진 Nfa1 단백질에 대한 단클론항체가 앞으로 *N. fowleri*의 다양한 면역학적 연구에 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

핵심되는 말: 파울러자유아메바 (*Naegleria fowleri*), 원발성 아메바성 수막뇌염, 유전자 클로닝, 재조합 His-tag fusion Nfa1 단백질, 세포융합기술, 단클론항체

차 례

국문요약	i
차례	iii
그림차례	v
표차례	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
A. 파울리자유아메바의 배양과 세포추출액 (<i>lysates</i>)의 제조	4
B. <i>Myeloma</i> 세포의 배양	4
C. 클로닝된 <i>nfal</i> 유전자의 발현 및 재조합 <i>His-tag fusion Nfa1</i> 단백질의 생산	4
D. 재조합 <i>His-tag fusion Nfa1</i> 단백질의 마우스 내 면역	5
E. 세포융합 (<i>cell fusion</i>)과 융합세포 (<i>hybridoma cell</i>)의 배양	6
1. 마우스의 비장세포 준비	6
2. 형질 세포종 세포 준비	6
3. 세포 융합	7
F. 면역효소 흡착법 (ELISA) 시행	7
G. 단클론항체를 생산하는 세포군 선택	8
H. 단클론항체의 대량 생산 및 정제	8
I. SDS-PAGE 와 <i>Western blot analysis</i>	9
J. 단클론항체의 <i>isotyping</i> 및 항원대 검정	10
K. <i>Immunofluorescent assay</i>	10
III. 결과	11
A. 재조합 <i>His-tag fusion Nfa1</i> 단백질의 발현과 정제	11
B. 재조합 <i>His-tag fusion Nfa1</i> 단백질로 면역된 마우스의 항체 역가 (<i>antibody titer</i>)	12

C. 단클론항체의 생산	13
D. 단클론항체의 <i>isotypes</i>	14
E. 단클론항체의 항원대 검정	15
F. 단클론항체를 이용한 파울러자유아메바의 Nfa1 단백질의 위치 확인 ...	17
IV. 고찰	19
V. 결론.....	21
참고문헌	22
영문요약	26

그림 차례

Fig. 1. SDS-PAGE band pattern of a recombinant His-tag fusion Nfa1 protein (Lane 1) expressed from an <i>nfa1</i> gene	11
Fig. 2. SDS-PAGE and western blotting band patterns	15
Fig. 3. Western blotting band patterns of a recombinant His-tag fusion Nfa1 proteins	16
Fig. 4. Immunostaining of <i>N. fowleri</i> trophozoites to observe the localization of the Nfa1 protein	18

표 차 례

Table 1. Antibody titers of immunized sera by <i>indirect</i> ELISA	12
Table 2. Antibody titers of monoclonal antibodies by <i>indirect</i> ELISA	13
Table 3. Isotypes of monoclonal antibodies	14

I. 서론

자유생활아메바 (free-living amoeba)란 자연 환경에서 세균들을 포식하며 담수와 토양에서 자유생활을 하는 아메바로서, 자유아메바 (genus *Naegleria*) 중 병원성 파울러자유아메바 (*Naegleria fowleri*)의 영양형은 크기가 7~20 μm 이고 운동성이 매우 활발하며, 포낭은 10~18 μm 로 원형이다. 그리고 핵은 중앙에 위치하며 크다. 핵막주위에 핵 염색질은 관찰되지 않는다. 또한, 파울러자유아메바는 사람, 마우스 및 다른 실험동물들에서 원발성 아메바성 뇌수막염 (primary amoebic meningoencephalitis; PAME)을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Carter, 1970; Culbertson, 1971; John, 1982; Marciano-Cabral, 1988).

파울러자유아메바의 침투 경로는 먼저 비강에 도달하여 부착된 후 코의 점막과 후각신경에 침입하여 뇌로 감염이 된다. 파울러자유아메바의 영양형이 조직을 뚫고 침입함에 따라 광범위한 조직 파괴가 일어나는데, 비인후 점막에 궤양, 후각신경의 염증과 괴사가 발생하고, 후엽과 뇌기저부에서는 출혈성 괴사가 일어난다. 이렇게 신경계로 침투한 아메바는 감염된 뇌조직의 절편 또는 배양에서 관찰되는 것처럼 효과적인 세포용해 (cytolysis)와 포식작용 (phagocytosis)에 의하여 신경원 세포 조직과 다른 포유동물의 세포를 파괴한다 (Marciano-Cabral, 1988; Marciano-Cabral, 1990). 이것은 매우 빨리 진행되고 치명적이다. 초기 증상으로는 두통과 발열 등을 보이나 급진전하여 고열, 경부경직, 정신착란 등을 보이고 혼수상태에 빠져 결국 3~7일 이내에 사망하기도 한다.

PAME는 급성 화농성 뇌수막염 또는 세균성 뇌수막염과 구별되는 어떠한 병리학적 특징이 없기 때문에 PAME의 최종적인 진단을 위해선 척수액으로부터 파울러자유아메바를 배양하고 동정하는 것을 기본으로 하거나, 뇌 조직을 생검하여 아메바의 영양형의 존재를 보여주는 것이다 (Ma 등, 1990). 또한 주요 감염 부위가 중추신경계이고, PAME이 빠르게 진행되기 때문에 초기에 진단하는 것이 어렵다 (Ma 등, 1990).

최근에는 충체에서 분비되는 단백분해 효소가 숙주 내로의 침투 및 감염 유

발에 직접적인 관련이 있으며, 숙주에 대한 충체 자체의 방어, 영양공급, 생활사에도 영향을 주는 것으로 인식되었다 (North, 1982). 여러 종류의 단백질 분해효소 중에서 시스테인계 단백분해효소 (cysteine proteinase)는 기생성 원충류에서 특이할 만한 것으로 기생충이 숙주 내로 침범 시 숙주단백질을 소화시켜 기생충이 쉽게 숙주 내로 침범할 수 있도록 도와주며, 숙주의 면역글로블린을 소화하는 능력이 있어서 숙주의 면역반응에 크게 관여 한다고 보고하였다 (McKerrow, 1989).

또한, 아메바를 액체 배지 내에서 무균적으로 오랫동안 배양하면 병원성이 약화 되는데, 이것을 다시 마우스에 감염 시키고 난 후, 뇌 조직으로부터 분리 배양을 반복적으로 실행하거나, 세균 (bacteria)과 혼합 배양하면 병원성이 회복 (또는 증가)된다고 보고되었는데, Hu (1991)등은 2차원 전기영동법 (two-dimensional electrophoresis)으로 병원성이 회복된 아메바와 병원성이 계대 배양으로 약화된 아메바간의 단백질 합성 양상 (protein synthesis patterns)을 분석하여 그 차이를 확인하였다. 다른 한편으로는 병원성이 강한 아메바와 병원성이 약한 아메바에서 상이하게 발현되는 mRNA를 찾아내어 유전자를 밝혔으며, 세린 (serine)계열의 단백질이라고 보고하였다 (Hu 등, 1992).

다른 한편으로는, 병원성 자유생활아메바의 감염환자에서 항체의 검출은 응집 반응 (agglutination test)과 형광항체법 (immunofluorescence test), EITB (enzyme-linked immunoelectrotransfer blot technique) 같은 다양한 방법을 사용하였다 (Cursons 등, 1980; Reilly 등, 1983; Tsang 등, 1983; Dubray 등, 1997). 또한, 파울러자유아메바에 대한 단클론항체 (monoclonal antibody)를 만들어 PAME 환자의 뇌 절편에서 파울러 자유아메바를 동정하거나, 다른 여러 *Naegleria* 중에서 병원성 파울러자유아메바를 구별하기 위한 탐침자 (probe)로 사용하였다 (Visesvara 등, 1987; Ryu 등, 1992). 파울러자유아메바에 대한 단클론항체의 발견은 야생 동물과 사람, 실험동물에서 진단 목적으로 연구되었다 (Marciano-Cabral, 1987; John 등, 1993; Kollars 등, 1996). 그리고, 면역침강반응과 EITB로 병원성 파울러자유아메바의 항원능이 관찰되어졌으며, 몇몇 단백질

씨는 아메바의 감염과 면역에 중요하다고 보고되었다 (Malik 등, 1984; Shin 등, 1992). 하지만, 분자수준에서 항원과 관련된 유전자의 조사에 대한 연구는 많이 실행되지 못 하였다.

한편, 본 연구자의 연구실에서는 파울러자유아메바의 cDNA library를 구축하여 파울러자유아메바에 대한 감염혈청 및 면역혈청으로 immunoscreening과정을 통해 항원성과 관련이 있고 특히, 위쪽에 특이성이 있는 유전자를 클로닝하여 *nfa1*이라 명명하였다 (Shin 등, 2001). 이 유전자는 357개의 염기로 구성되어 있으며, myohemerythrin의 유전자와 43%의 상동성을 가지고 있었고, 119개의 아미노산 잔기로 전사되어 13.1 kDa의 분자량을 가지는 단백질을 발현한다.

따라서, 본 연구의 목적은 파울러자유아메바의 항원성과 관련이 있고, 특히 위쪽에 특이성이 있는 유전자인 *nfa1* 유전자와 재조합 *Nfa1* 단백질에 대한 추후에 있을 폭넓은 면역학적 연구들을 위해 재조합 *Nfa1* 단백질에 대한 단클론항체를 세포융합기술 (cell fusion technique)을 이용하여 생산하고자 하였다. 이렇게 얻어진 단클론항체의 분자량과 항원대 및 isotype을 결정하고 단클론항체를 사용하여 파울러자유아메바 내에서의 *Nfa1* 단백질의 위치를 관찰하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

A. 파울러자유아메바의 배양과 세포추출액 (lysates)의 제조

병원성이 강한 것으로 알려진 파울러자유아메바 (Carter NF69 균주; ATCC No.30215)를 Nelson's 배지 (Willaert, 1971)를 이용하여 무균적으로 37°C 항원기에서 배양하였다. 배양된 영양형들 (trophozoites)을 3분간 1,500 × g로 원심분리하고 침사액을 PBS로 세 번 세척한 뒤, 다시 원심분리 하였다. 모아진 침사액을 PBS로 부유시켜 3번 얼림-녹임 (freezing-thawing)과정을 통해 세포벽을 파괴하고 4°C에서 20,000 × g로 2시간 동안 원심분리 하였다. 수용성 세포추출액 (soluble lysates)만을 모은 후 Bradford assay (Bradford, 1976)를 이용하여 단백질 농도를 측정 후 냉동고에 보관하여 실험에 이용하였다.

B. Myeloma 세포의 배양

Myeloma F0 세포 (ATCC No.CRL-1646)를 complete RPMI 1640 배지 (10% 우태아 혈청 함유)를 이용하여 습기가 포화된 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 무균적으로 배양하였다.

C. 클로닝된 *nfa1* 유전자의 발현 및 재조합 His-tag fusion *Nfa1* 단백질의 생산

파울러자유아메바로부터 확보한 클로닝된 유전자 (*nfa1*)를 PCR-T7/NT TOPO 발현 벡터 (expression vector, Invitrogen, Grohinger, Netherlands)를 이용하여 *E. coli* BL21 균주에 형질도입 (transformation)시켰다. 이 균주를 100 μg/μl ampicillin과 34 μg/μl chloramphenicol을 함유하는 LB (Luria-Bertani)배지에 37°C, 250 rpm 조건으로 배양하여 600 nm에서 흡광도가 0.5~0.8에 도달하게 한

후, 1 mM IPTG를 첨가하였다. 그 후 4시간 동안 배양한 후 4°C에서 10,000 rpm으로 5분 동안 원심분리 하여 세포들을 수확하였다. 수확한 세포들을 native binding 용액으로 부유시켜 얼림-녹임 (freezing-thawing)방법과 초음파 분해 (sonication)를 병행하여 세포벽을 분해하고, 다시 원심분리 (12,000 rpm, 20분, 4°C)하여 비수용성 잔해를 제거하고 상층액을 0.2 μm -pore-size 주사기 필터를 사용하여 걸러냈다. 그리고 immobilized Ni^{2+} absorption chromatography를 사용하여 imidazole의 농도를 점차 증가 (50~500 mM)시키면서 재조합 His-tag fusion Nfa1 단백질을 걸러냈다. 걸러낸 재조합 His-tag fusion Nfa1 단백질을 PBS로 투석(dialysis)하고 농축한 후 Bradford assay (1976)를 이용하여 단백질의 농도를 측정하고 냉동고에 보관하였다. 이 정제된 재조합 His-tag fusion Nfa1 단백질의 크기는 SDS-PAGE로 확인하였다.

D. 재조합 His-tag fusion Nfa1 단백질의 마우스 내 면역

생후 6주된 BALB/c 마우스 암컷 (샘타코에서 구입)을 각 3마리씩 그룹을 만들어 50 μg 의 재조합 His-tag fusion Nfa1 단백질을 항원을 PBS에 녹여 100 μl 를 만들고 동량의 Freund's complete adjuvant와 잘 혼합하여 마우스 복강 내로 주사하였다. 두 번째부터는 2주일 간격으로 전의 항원량의 절반을 Freund's incomplete adjuvant와 혼합하여 복강 내로 주사하였다. 이와 같이 면역을 3번 시행하였다. 마지막으로 3차 면역시키고 2주일 뒤 면역효소흡착법 (ELISA)을 사용하여 항원과의 반응 정도를 측정하여 면역성이 높은 것이 확인된 것은 5 μg 의 재조합 His-tag fusion Nfa1 단백질을 항원을 PBS에 녹여 100 μl 를 만든 후 마우스 꼬리의 정맥에 주사하였다. 그 후 4~6일이 지나 마우스의 비장세포를 적출하였다.

E. 세포융합 (cell fusion)과 융합세포 (hybridoma cell)의 배양

1. 마우스의 비장세포 준비

마우스의 비장세포를 적출하기 바로 전에 마우스로부터 혈액을 뽑아 4℃에서 4시간 보관한 후, 원심분리 (12,000 rpm, 5분, 4℃)하여 분리되어 나온 혈청을 융합세포를 검색할 때 양성대조로 사용하였다. 마우스의 비장은 상처를 내지 않고 적출하여 5 ml의 incomplete RPMI 1640 배지 (Gibco Laboratories)에 넣고, 작은 가위로 잘게 자른 후 1 ml syringe를 이용하여 갈아주었다. 이것을 50 ml 시험관 (Greiner)에 옮긴 후 1,500 rpm으로 3분 동안 원심분리하여 상층액을 버렸다. 여기에 RBC lysis buffer 5 ml을 넣고 침전물을 풀어주었다. 이것을 5분 동안 실온에 놓아두어 적혈구가 용해되도록 하였다. 여기에 incomplete RPMI 1640 배지를 15 ml 더 넣은 후 원심분리 (1,500 rpm, 3분)하고 상층액을 버렸다. 같은 방법으로 3번 더 비장세포를 세척하였다. 마지막으로 상층액을 버리고, 침전된 비장세포에 incomplete RPMI 1640 배지 5 ml을 넣고 잘 섞은 후 이를 20배로 희석하여 hemocytometer로 세포수를 세었다.

2. 형질 세포종 세포 준비

BALB/c 마우스의 형질 세포주인 F0 세포를 complete RPMI 1640 배지 (10% 우태아 혈청 함유)에서 배양하고 세포의 confluence가 80%일 때 파스퇴르 파이펫을 이용하여 세포들을 떼어 50 ml 시험관에 모은 후 원심분리 (1,500 rpm, 3분)하여 수확하였다. 그 다음 incomplete RPMI 1640 배지 20 ml을 넣고 잘 섞은 후 원심분리 (1,500 rpm, 3분)하고 상층액을 버렸다. 같은 방법으로 3번 더 F0 세포를 세척하였다. 마지막으로 상층액을 버리고 침전된 F0 세포에 incomplete RPMI 1640 배지 10 ml을 넣고 잘 섞은 후 이를 20배로 희석하여 hemocytometer로 세포수를 세었다.

3. 세포 융합

세포융합기술 (cell fusion technique)은 Köhler와 Milstein (1975)이 개발한 방법에 기초를 하였다. F0 형질 세포종 세포와 비장세포를 50 ml 시험관에 옮기고 원심분리 (1,500 rpm, 3분) 하였다. 상층액을 제거하고, 여기에 미리 37°C로 맞춰둔 50% polyethylene glycol 1450 (Sigma) 용액 1 ml을 1분 동안 한 방울씩 넣어주고 1분 동안 37°C에 놓아두었다. 그 후 incomplete RPMI 1640 배지 1 ml을 1분 동안 한 방울씩 가하고 계속해서 incomplete RPMI 1640 배지 2 ml, 3 ml, 5 ml, 8 ml 각각을 1분 동안 넣어 주고 조심스럽게 섞은 후 원심분리 (1,000 rpm, 5분) 하였다. 상층액을 버린 후 complete RPMI 1640 배지 (20% 우태아 혈청 포함) 40 ml을 넣고 침전물을 풀어주었다. 그 후 96-well plate의 각 well당 100 μ l 씩 분주한 후 습기가 포화된 37°C, 5% CO₂ 항온기에 넣어 두었다. 다음날 96-well plate를 꺼내어 well당 70 μ l를 덜어내고 1 x HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine, 10% 우태아 혈청이 포함된 complete RPMI 1640) 배지를 well당 100 μ l 씩 넣어 주었다. 위와 같이 2번 더 실행하였다. 그 후 1 x HT (hypoxanthine, thymidine, 10% 우태아 혈청이 포함된 complete RPMI 1640) 배지를 well이 가득 차게 넣어 주고 습기가 포화된 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 무균적으로 배양하였다.

F. 면역효소 흡착법 (ELISA) 시행

면역된 마우스의 역가와 세포융합 세포들의 항체생산을 확인하기 위해서 면역효소 흡착법 (ELISA)을 시행하였다. 항원을 단백질 농도가 1 μ g/ml이 되도록 0.05 M carbonate-bicarbonate 완충용액 (pH 9.6)에 희석하여 polystyrene ELISA판 (immunoplate, Nunc)에 well당 100 μ l 씩 분주한 후 4°C에서 12시간 이상 항원을 부착시켰다. 항원이 부착된 ELISA plate를 PBST (0.05% Tween 20 이 포함된 인산 완충 용액, pH 7.4)로 5분씩 3회 세척한 후 3% BSA를 각 well

당 100 μl 씩 넣고, 4°C에서 1시간 동안 반응시켜 비 특이적 반응을 차단하였다. 테스트할 혈청을 PBS (pH 7.4)에 1:500으로 희석하여 37°C에서 2시간 이상 반응시켰다. 다시 PBST로 5분씩 3회 세척 후 PBS에 1:5,000으로 희석한 goat anti-mouse IgG conjugated alkaline phosphatase (Sigma)을 각 well당 100 μl 씩 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 PBST로 5분씩 3회 세척 후 substrate 완충용액 10 ml에 p-NPP tablet (*p*-nitrophenyl phosphate 20 mg, Sigma) 1개를 녹인 후 이것을 각 well당 100 μl 씩 넣고 빛을 차단하고 실온에서 15분 동안 반응시키고 ELISA Reader로 405 nm의 파장에서 각 well의 흡광도를 측정하였다.

G. 단클론항체를 생산하는 세포군 선택

단클론항체를 생산하는 단세포군의 선택은 한계희석법 (limiting dilution)을 이용하였다. 즉, 배양중인 융합세포 중에서 항체를 생산하는 세포를 선택하기 위해 96-well plate를 ELISA로 검사하여 항체를 생산하는 well만 24-well plate로 옮겨서 배양하였다. 자란 숫자를 계산하여 96-well plate의 well당 0.25개씩 되도록 희석하여 96-well plate에 넣고 배양하였다. 그 후 세포가 자란 well을 선택하여 24-well plate로 옮겨서 배양하였다. 이런 방법을 3회 반복하여 단클론 세포주를 선택하였다.

H. 단클론항체의 대량 생산 및 정제

재조합 His-tag fusion Nfa1 단백질에 대한 단클론항체의 대량 생산을 위하여 마우스 복수 채취법 (ascites collection)을 이용하였다. 12주 정도의 암컷 BALB/c 마우스에 복강액의 생성을 높이기 위하여 Freund's incomplete adjuvant 200 μl 를 복강 내에 주사하였다. 7~10일 후 PBS로 씻은 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 개의 융합세포(hybridoma cell)를 마우스의 복강 내에 주사하였다. 1~2주일

이 지나고 마우스의 복강에 복수가 차기 시작하면 19G 바늘을 이용하여 복수를 모았다. 복수를 4℃에서 1시간이상 둔 뒤에 5,000 g에서 15분간 원심분리하고 난 후 상층액을 조심스럽게 모았다. 그리고 Protein A column을 이용하여 affinity purification을 시행하였고, 이것을 냉동고에 보관하여 실험에 이용하였다.

I. SDS-PAGE 와 Western blot analysis

과울리자유아메바의 전체 세포 추출액 (lysates)과 정제된 재조합 His-tag fusion *Nfa1*의 분자량을 확인하기 위해서 Laemmli (1970)의 방법에 따라 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였는데, resolving gel의 acrylamide 농도는 15%로 stacking gel의 농도는 5%로 하였고 두께는 0.5 cm의 판상 gel을 사용하였다. 이렇게 SDS-PAGE 한 후 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore, Bedford, MA)을 100% 메탄올에 미리 적신 뒤 250 mA로 90분 동안 blot 하였다. Blotting을 한 다음 비특이적인 반응이 일어나는 것을 방지하기 위해서 3% BSA용액에 PVDF membrane을 실온에서 2시간 동안 담가 두었다. PBST로 PVDF membrane을 5분씩 3회 세척한 후 각각의 단클론항체를 마우스에 찔러 생성된 복수 (PBS에 1:100으로 희석)를 실온에서 3시간 동안 반응시켰다. 다시 PBST로 PVDF membrane을 5분씩 3회 세척한 후 goat anti-mouse IgG conjugated alkaline phosphatase (Sigma)용액을 PBS에 1:2,500으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 후 PBST로 PVDF membrane을 5분씩 3회 세척하고, substrate 완충용액 10 ml에 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/ nitro blue tetrazolium tablet (BCIP/NBT) 1개를 녹인 후 이 용액을 가하고 실온에서 15분간 발색시켰다.

J. 단클론항체의 isotyping 및 항원대 검정

분비되는 단클론항체의 isotypes을 확인하고자 Immunity mouse monoclonal antibody isotyping kit (Sigma laboratories)를 제조자의 지침서에 따라 사용하였다. 또한, 파울러자유아메바의 전체 세포 추출액 (lysates)과 정제된 재조합 His-tag fusion *Nfa1* 단백질을 항원으로하여 생산된 단클론항체 분비주들의 분자량과 항원대를 검정하기 위하여 SDS-PAGE와 western blot analysis를 시행하였다.

K. Immunofluorescent assay

얻어진 단클론항체가 immunocytochemistry 실험에 이용 가능한가를 알아보기 위하여 간접형광항체법 (indirect fluorescent antibody test)을 시행하였다. 배양한 아메바 영양형들 (trophozoites)을 10% formaldehyde로 실온에서 30분 동안 고정시킨 후 PBS로 2회 세척하고 1% ammonium hydroxide를 가하고 실온에서 5분 동안 놓아두었다. 다시 PBS로 2회 세척하고 3% Tween 20 (0.82% saline)을 가하고 실온에서 5분 동안 놓아둔 후 PBS로 2회 세척하고 비 특이적인 반응이 일어나는 것을 방지하기 위해서 3% BSA용액을 가하고 4°C에서 2시간 동안 놓아두었다. 그 후 각각의 단클론항체를 마우스에 짚어서 생성된 복수 (PBS에 1:50 희석)를 가하고 4°C에서 18시간 동안 놓아두었다. 다시 PBS로 2회 세척하고 fluorescein isothiocyanate (FITC) - conjugated anti-mouse antibody (Sigma)를 (PBS에 1:200 희석)가한 후 4°C에서 2시간 동안 놓아두었다. 이것을 표본으로 만든 후 형광현미경 (Olympus)으로 관찰하였다.

III. 결 과

A. 재조합 His-tag fusion Nfa1 단백질의 발현과 정제

병원성 파울러자유아메바로부터 클로닝된 *nfa1* 유전자를 *E. coli* 발현 시스템을 이용하여 17 kDa의 재조합 His-tag fusion Nfa1 단백질을 발현시켰다. 그리고 Probond resin column (Invitrogen)을 사용하여 재조합 His-tag fusion Nfa1 단백질을 정제한 후 SDS-PAGE를 통하여 17 kDa의 재조합 His-tag fusion Nfa1 단백질을 확인하였다 (Fig. 1).

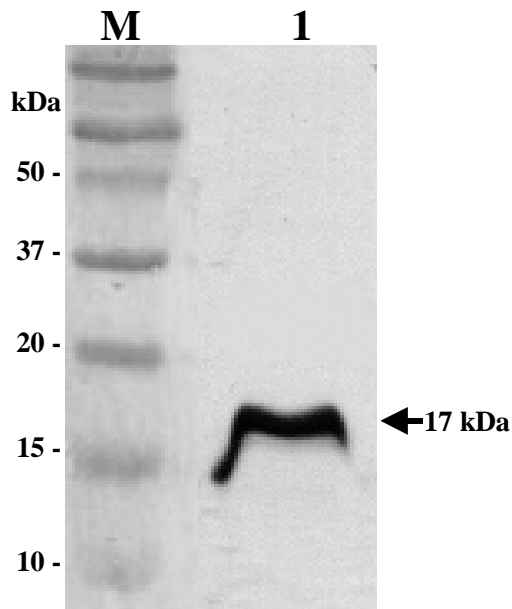


Fig. 1. SDS-PAGE band pattern of a recombinant His-tag fusion Nfa1 protein (lane 1) expressed from an *nfa1* gene. M, precision plus protein marker.

B. 재조합 His-tag fusion Nfal 단백질로 면역된 마우스의 항체 역가 (antibody titer)

재조합 His-tag fusion Nfal 단백질로 면역된 마우스로부터 생산된 다클론 항체의 항원과의 반응 정도를 측정하기 위하여 ELISA를 시행하였다. 마우스의 2번째 면역과 3번째 면역 후 항원 반응 정도의 범위는 0.68~1.08 이었다. 또한, 정맥 주사 후 항원 반응 정도의 범위는 1.10~1.16 이었다. PBS를 음성 대조군으로 사용하였고 범위는 0.05~0.09였다 (Table 1).

Table 1. Antibody titers of immunized sera by indirect ELISA

immunization	mouse1	mouse2	mouse3
2nd I.P.	0.68*	0.87	0.82
3rd I.P.	0.99	1.02	1.08
4th I.V.	1.10	1.14	1.16
Control group	0.05	0.09	0.07

*A₄₀₅ nm of sera obtained from immunized mice were determined by indirect ELISA. Control group was PBS. I.P.: intraperitoneally injection I.V.: intravenous injection.

C. 단클론항체의 생산

세 번의 한계희석법 (limiting dilution)을 통하여 항체 역가가 높은 8개의 단클론항체를 선별하였다. 이 단클론항체들을 A1F, A3C, A6D, A10F, C3A, C6F, C7F, B6B로 명명하였고 음성 대조군으로 F0 세포를 배양한 배지를 사용하였으며, ELISA를 시행하여 항원과의 반응 정도를 측정하였다 (Table 2).

Table 2. Antibody titers of monoclonal antibodies by indirect ELISA

	Cell lines							
	A1F	A3C	A6D	A10F	C3A	C6F	C7F	B6B
McAbs	0.890*	0.935	0.870	0.810	0.848	0.827	0.827	0.842
control	0.060	0.060	0.060	0.060	0.060	0.060	0.083	0.083

*A₄₀₅ nm of culture supernatant obtained from monoclonal antibodies were determined by indirect ELISA. Control was culture supernatant of F0 cells.

D. 단클론항체의 isotypes

각각의 단클론항체들의 isotype을 확인하기 위하여 Immunity mouse monoclonal antibody isotyping kit (Sigma)를 사용하였다. 8개의 단클론항체 (A1F, A3C, A6D, A10F, C3A, C6F, C7F, B6B) 모두 IgG2b였다. (Table. 3).

Table 3. Isotypes of monoclonal antibodies

	A1F	A3C	A6D	A10F	C3A	C6F	C7F	B6B
Isotype	IgG2b	IgG2b	IgG2b	IgG2b	IgG2b	IgG2b	IgG2b	IgG2b

E. 단클론항체의 항원대 검정

파울러자유아메바의 전체 세포추출액 (lysates)과 정제된 재조합 His-tag fusion Nfa1 단백질의 분자량을 알아보기 위해서 SDS-PAGE를 시행하였으며, 이들 항원에 대한 단클론항체의 반응을 확인하기 위하여 western blot analysis를 수행하여 반응대를 확인하였다 (Fig. 2). 그 결과 각각의 단클론항체 A1F, A3C, A6D, A10F, C3A, C6F, C7F, B6B 모두가 재조합 His-tag fusion Nfa1 단백질의 분자량인 17 kDa에서 강하게 반응하는 것을 확인하였다 (Fig. 3).

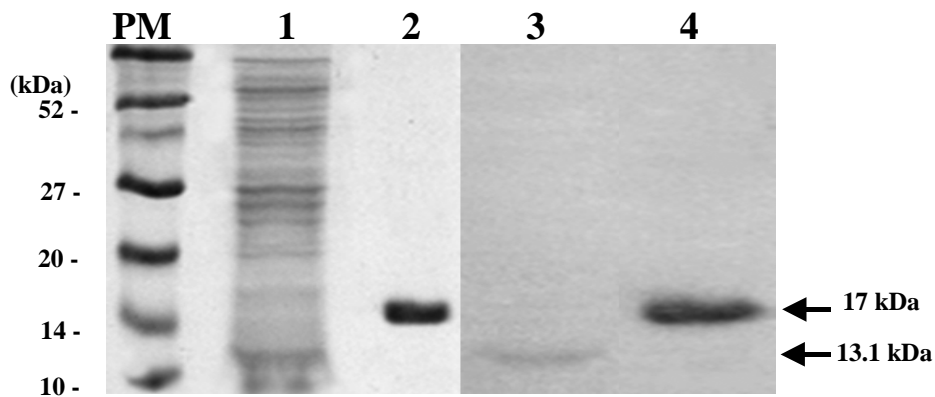


Fig. 2. SDS-PAGE and western blotting band patterns. Lane 1 and 2 show a *N. fowleri* lysate and a recombinant His-tag fusion Nfa1 protein by SDS-PAGE, respectively. Lane 3 and 4 show a *N. fowleri* lysate and a recombinant His-tag fusion Nfa1 protein from each sample above detected by western blotting using an anti-Nfa1 monoclonal antibody. PM, prestained marker.

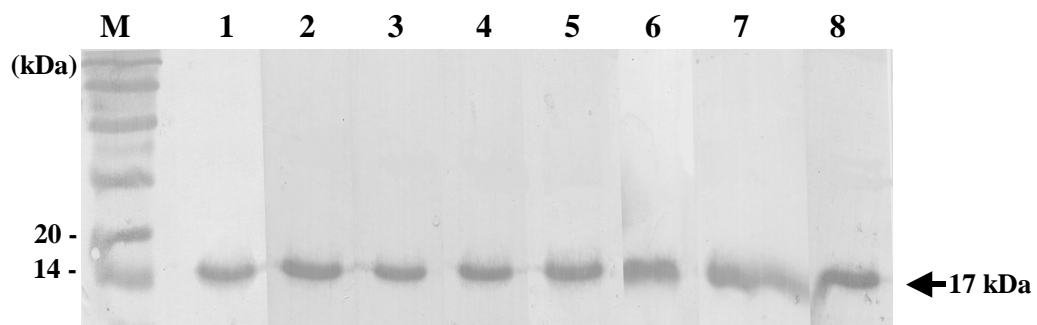


Fig. 3. Western blotting band patterns of eight monoclonal antibodies reacted with His-tag fusion Nfa1 proteins. Lane 1, A1F; Lane 2, A3C; Lane 3, A6D; Lane 4, A10F; Lane 5, C3A; Lane 6, C6F; Lane 7, C7F; Lane 8, B6B; M, precision plus protein marker.

F. 단클론항체를 이용한 파울러자유아메바의 *Nfa1* 단백질의 위치 확인

각각의 단클론항체 A1F, A3C, A6D, A10F, C3A, C6F, C7F, B6B을 사용하여 파울러자유아메바의 영양형에서 *Nfa1* 단백질의 분포를 확인하기 위해서 Immunofluorescent assay를 시행한 결과, 아메바의 위족과 food-cups에서 뚜렷한 형광이 나타났다 (Fig. 4). 따라서 파울러자유아메바의 *Nfa1* 단백질이 아메바의 위족과 food-cups에 특이적으로 존재한다는 것을 확인할 수 있었다.

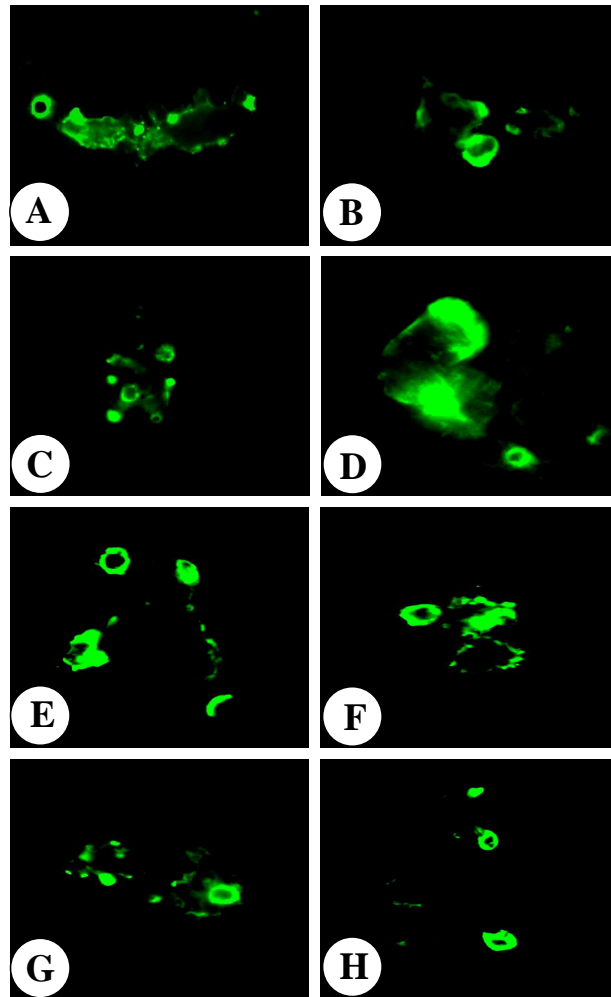


Fig. 4. Immunostaining of *N. fowleri* trophozoites to observe the localization of the Nfa1 protein. *N. fowleri* trophozoites were reacted with eight anti-Nfa1 monoclonal antibodies and stained with FITC (green), respectively. (A: A1F, B: A3C, C: A6D, D: A10F, E: C3A, F: C6F, G: C7F, H: B6B). The Nfa1 protein showed on pseudopodia and food-cups by a fluorescent microscope.

IV. 고찰

병원성 파울러자유아메바는 토양과 담수에서 자유생활을 하는 아메바로서 사람, 마우스 그리고 실험동물들에서 원발성 아메바성 수막뇌염 (PAME)을 유발하는 것으로 보고되었다 (Carter, 1970; Culbertson, 1971; John, 1982; Marciano-Cabral, 1988).

본 연구자의 연구실에서는 병원성 파울러자유아메바의 cDNA library를 구축하여 파울러자유아메바에 대한 감염혈청 및 면역혈청으로 immunoscreening과정을 통해 항원성과 관련이 있고 특히, 위축에 특이성이 있는 유전자를 클로닝하여 *nfa1*이라 명명하였다 (Shin 등, 2001). 이 유전자는 357개의 염기로 구성되어 있으며, myohemerythrin의 유전자와 43%의 상동성을 가지고 있었고, 119개의 아미노산 잔기로 전사되어 13.1 kDa의 분자량을 가지는 단백질을 발현한다. 그리고 항-Nfa1 단클론항체 (anti-Nfa1 polyclonal antibody)를 이용하여 western blotting을 수행한 결과 13.1 kDa에서 반응대를 관찰할 수 있었다 (Shin 등, 2001).

본 실험에서도 *E. coli* 유전자 발현 시스템을 이용하여, His-tag이 결합되어 있는 17 kDa의 재조합 Nfa1 단백질을 얻을 수 있었다. 또한, 이렇게 얻은 재조합 His-tag fusion Nfa1 단백질을 6주령이 된 BALB/c 마우스 암컷에 면역시키고 세포융합기술을 사용하여 (Köhler와 Milstein, 1975; Ryu와 Im, 1992) 8개의 항-Nfa1 단클론항체 (anti-Nfa1 monoclonal antibody: A1F, A3C, A6D, A10F, C3A, C6F, C7F, B6B)들을 생산하는 세포주들을 얻었으며, 면역효소흡착법 (ELISA)으로 항원과의 반응 정도를 측정하였다. 그리고 western blotting을 시행하여 17 kDa에서 강한 반응대를 확인할 수 있었으며, isotyping을 확인한 결과 8개의 단클론 항체 A1F, A3C, A6D, A10F, C3A, C6F, C7F, B6B 모두 IgG2b임을 알았다. 얻어진 8개의 단클론항체의 유용성을 검정할 목적으로 파울러자유아메바의 Nfa1 단백질의 위치를 immunofluorescent assay를 시행하여 알아보았다. 형광현미경으로 각각의 단클론항체 A1F, A3C, A6D, A10F, C3A, C6F, C7F,

B6B를 이용하여 염색한 검체를 관찰한 결과 모든 검체에서 아메바의 위족과 식세포 작용을 하는 구조체인 food-cups에서 강한 형광이 나타났으며, 이는 앞서 다클론항체 (polyclonal antibody)를 이용하여 얻은 결과들과 같은 양상을 보여주었다 (Cho 등, 2003; Kang 등, 2005). 이것으로 Nfa1 단백질이 아메바의 위족과 food-cups에 특이적으로 존재한다는 것을 확인할 수 있었고 생산한 단클론항체가 유용함을 확인하였다.

앞으로 파울러자유아메바와 면역세포들의 상호작용 즉, 세포독성 및 세포변성 효과 등의 변화를 알아보는 연구를 시행할 때, 본 연구 결과에서 얻어진 Nfa1 단백질에 대한 단클론항체 (anti-Nfa1 monoclonal antibody)가 유용하게 사용될 것으로 기대된다. 더불어 마우스 모델을 이용하여 파울러자유아메바에 대한 방어면역 (protective immunity)에 관한 연구를 시행할 수 있을 것이다. 또한, 다량의 제조합 항원과 단클론항체를 가지고 여러 생화학적 및 생리적인 실험을 통하여 파울러자유아메바의 병인을 규명하는데 보다 쉽게 접근할 수 있을 것이며, 이러한 연구는 향후 지속될 새로운 약제와 백신의 개발 등을 위한 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

V. 결 론

본 연구에서는 파울러자유아메바의 위족 운동과 관련이 있는 *nfa1* 유전자로부터 발현된 재조합 His-tag fusion *Nfa1* 단백질을 얻어서 마우스에 면역시켰으며, 비장세포와 myeloma 세포들을 세포융합기술 (cell fusion technique)을 통해 단클론항체를 분비하는 세포주들을 생산하였고 제 특성을 밝히고자 하였다. 또한, 얻어진 단클론항체들을 이용하여 아메바에서 *Nfa1* 단백질의 위치를 관찰하고자 하였다.

8개의 단클론항체 A1F, A3C, A6D, A10F, C3A, C6F, C7F, B6B를 생산하는 세포주들을 만들었으며, 이들이 분비하는 각각의 단클론항체 모두는 재조합 His-tag fusion *Nfa1* 단백질의 분자량인 17 kDa에서 강하게 반응하는 것을 확인하였다. 그리고 isotyping 결과 모두 IgG2b였다. 또한, 각각의 단클론항체 모두가 아메바의 위족과 food-cups에서 특이성이 나타났다.

따라서 본 실험의 결과로 얻어진 8개의 단클론항체들은 병원성 파울러자유아메바의 면역학적 연구에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Barnett ND, Kaplan AM, Hopkin RJ, Saubolle MA, Rudinsky MF: Primary amoebic meningoencephalitis with *Naegleria fowleri*. *Pediatric Neurol* 15:230~234, 1996
2. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantitation of protein the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248~254, 1976
3. Carter RF: Primary amoebic meningoencephalitis: clinical, pathological and epidemiological features of six fatal cases. *J Pathol Bacteriol* 96:1~25, 1968
4. Carter RF: Primary amoebic meningoencephalitis: clinical, pathological and epidemiological features of six fatal cases, *J Pathol Bacteriol* 100:217~244, 1970
5. Carter RF: Primary amoebic meningo-encephalitis. An appraisal of present knowledge. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 66:193~213, 1972
6. Cho MS, Jeong SY, Park S, Kim KH, Kim HI, Sohn S, Kim HJ, Im KI, Shin HJ: Immunological characterizations of a cloned 13.1 kilodalton protein from pathogenic *Naegleria fowleri*. *Clin Diagn Lab Immunol* 10:954~959, 2003
7. Cline M, Carchman R, Marciano-Cabral F: Movement of *Naegleria fowleri* stimulated by mammalian cells in vitro. *J Protozool* 33:10~13, 1986
8. Culbertson CG: The pathogenicity of soil amebas. *Annu Rev Microbiol* 25:231~254, 1971

9. Cursons RTM, Brown TS, Keys EA, Moriarty KM, Till D: Immunity to pathogenic free-living amoebae. *Infect Immun* 29:401~407, 1980
10. Dubray B, Nussbaum SL: *Naegleria lovaniensis* in a hospital survey. *J Protozool* 34:322~327, 1997
11. Dunnebacke TH, Dixon JS: NACM, a cytopathogenic from *Naegleria gruber*, EGs: purification of monoclonal antibody, and immunoidentification of a product that develops in NACM-treated vertebrate cell cultures. *J Protozool* 37(4):11S~16S, 1990
12. Hu WN, Kopachik W, Band N: Virulence-related protein synthesis in *Naegleria fowleri*. *Infect Immune* 59:4278~4282, 1991
13. Hu WN, Kopachik W, Band N: Cloning and characterization of transcripts showing virulence-related gene expression in *Naegleria*. *Infect Immun* 60:2418~2424, 1992
14. John DT: Primary amoebic meningoencephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*. *Annu Rev Microbiol* 36:101~123, 1982
15. John DT, Nussbaum SL: *Naegleria fowleri* infection acquired by mice through swimming in amoebae-contaminated water. *J Parasitol* 69:871~874, 1993
16. Kang SY, Song KJ, Jeong SR, Kim JH, Park S, Kim K, Kwon MH, Shin HS: Role of the Nfal protein in pathogenic *Naegleria fowleri* co-cultured with CHO target cells. *Clin Diagn Lab Immunol* 12:00~00, 2005 (in press)
17. Kollars TM, Wilhelm WE: The occurrence of antibodies to *Naegleria* species in wild mammals. *J Parasitol* 82:73~77, 1996
18. Köhler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256(5517):495~497, 1975

19. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680~685, 1970
20. Ma P, Visvesvara GS, Martinez AJ, Theodore FH, Daggett PM, Sawyer TK: *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections. Review. *Rev Inf Dis* 12:490~513, 1990
21. Marciano-Cabral F: Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol Rev* 52:114~133, 1988
22. McKerrow JH: Minireviews: Parasite protease. *Exp Parasitol* 68:111~115, 1989
23. North MJ: Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganism. *Microbiol Rev* 46:308~340, 1982
24. Raner GM, Martins LJ, Ellis WR Jr: Functional role of leucine-103 in myohemerythrin. *Biochemistry* 36:7037~7043, 1997
25. Shin HJ, Im KI: Analysis of antigenic specificities of *Naegleria fowleri* using EITB. *Yonsei R Trop Med* 23:9~13, 1992
26. Shin HJ, Cho MS, Jung SY, Kim HI, Park S, Im KI: Molecular cloning and characterization of a gene encoding a 13.1 kDa antigenic protein of *Naegleria fowleri*. *J Euk Microbiol* 48:713~717, 2001
27. Shin HJ, Im KI: Pathogenic free-living amoeba in Korea. *Korean J Parasitol* 42:93~119, 2004
28. Soh EY, Shin HJ, Im KI: The protective effects of monoclonal antibodies in mice *Naegleria fowleri* infection. *Korean J Parasitol* 30:113~123, 1992
29. Toney DJ, Maricano-Carbral F: Alternations in protein expression and complement resistance of pathogenic *Naegleria* amoebae. *Infec Immun*

60:2784~2790, 1992

30. Visvesvara GS, Stehr-Green JK: Epidemiology of free-living amoeba infections. *J Protozool* 37(suppl)25~33, 1990

- ABSTRACT-

**Production and Characterization of Monoclonal Antibodies
against a Recombinant Nfa1 Protein Cloned from
Pathogenic *Naegleria fowleri***

Yang-Jin Lee

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Associate Professor Ho-Joon Shin)

OBJECTIVE: In order to use in the immunopathological studies of pathogenic *Naegleria fowleri*, monoclonal antibodies against a recombinant His-tag fusion Nfa1 protein cloned from pathogenic *N. fowleri* were produced, and its characterization was elucidated. In addition, to observe the usage in immunological studies, the localization of the Nfa1 protein in *N. fowleri* was observed by immunofluorescent assay using monoclonal antibodies.

METHODS: Six-week-old female BALB/c mice were immunized with a purified recombinant His-tag fusion Nfa1 protein. Cell lines producing McAbs against the recombinant His-tag fusion Nfa1 protein were produced according to the protocol of hybridoma technique using myeloma cells (F0 cell). The McAbs were characterized by isotyping and Western blot analysis.

RESULTS: Eight McAbs (A1F, A3C, A6D, A10F, C3A, C6F, C7F, B6B) against the rNfa1 protein were obtained. Eight McAbs isotypes were all IgG2b. The McAbs had high affinity against the recombinant His-tag fusion Nfa1 protein, which was

resulted by indirect ELISA. They recognize 17 kDa protein which was defined with the recombinant His-tag fusion Nfa1 protein by Western blot analysis. Also, The Nfa1 protein reacted with eight McAbs showed on pseudopodia and food-cups by a fluorescent microscope.

CONCLUSION: Eight hybridoma cell lines (A1F, A3C, A6D, A10F, C3A, C6F, C7F, B6B) secreting high titer of McAbs against the recombinant His-tag fusion Nfa1 protein were established. Also, the localization of the Nfa1 protein reacted with eight McAbs was observed on pseudopodia and food-cups of *N. fowleri* trophozoites by a fluorescent microscope. Therefore, the anti-Nfa1 monoclonal McAbs will be efficiently used in immunological study of PAME by *N. fowleri*.

Key words: Monoclonal antibody, recombinant His-tag fusion Nfa1 protein, *Naegleria fowleri*, hybridoma technique