

항체 만들기

1. 항체 제작의 주의점

단백질의 기능을 밝혀내는 수단 중 하나로써 항체를 이용한 실험은 오래 전부터 행하여 왔다. ① 단백질 레벨의 발현 체크, ② 생체내 (세포내)에서 일어나는 단백질의 국소적 위치 해석, ③ 면역침강법을 이용한 단백질 간 상호작용의 해석 또는 단백질의 번역 후 변화 (protein kinase에 의한 인산화, protease에 의한 분해 등)의 해석, ④ 중화활성항체 (효소활성을 억제하는 항체 등)를 이용한 단백질의 생리기능 해석 등, 그 이용범위는 폭넓다. 항체를 제작함에 있어서 다음 사항에 주의해야 한다.

(1) 항원의 동물종과 면역동물의 관계

면역하는 동물은 대부분 포유류 또는 조류이기 때문에 일반적으로는 고등동물 유래의 단백질은 항체가 제작이 어려운 경우가 많다 (항원의 동물종과 면역동물이 유사하거나 동일한 경우는 이러한 경향이 강하다). 따라서 목적 단백질의 일차구조를 알고 있는 경우는 그 서열과 다를 확률이 큰 단백질을 가지는 동물을 면역하여 항체를 제작하는 것이 좋다.

(2) 항원의 설계

대부분의 단백질은 생합성 후 processing, 당쇄 부가, 인산화, 각 종 번역 후 수식을 받는 가능성이 있다. 또한, 단백질은 입체구조 등으로 인하여 항원이 되기 쉬운 부분과 되기 어려운 부분이 있다. 특히, 단백질의 전장을 이용하지 않고 (Peptide 등을 항원으로 하여) 항체를 제작하는 경우, 이러한 점을 염두에 두고 항원을 설계할 필요가 있다.

(3) 제작 항체의 종류 (Polyclonal antibody / Monoclonal antibody)

Polyclonal 항체와 Monoclonal 항체 중 어느 쪽을 제작할지는, 실험 목적 등에 따라 다르므로 한마디로 어느 쪽이 좋다고 말할 수는 없다. 다음에 각각의 항체의 일반적인 특징을 기술한다.

● Polyclonal Antibody

- | | |
|----|---|
| 장점 | <ul style="list-style-type: none"> · Monoclonal antibody보다 빠르고, 간편하게 제작할 수 있다. · 항원 중의 여러 가지 epitope에 대한 항체를 포함하고 있기 때문에 western blotting, 면역세포염색 등에 사용할 수 있는 항체를 얻기에 용이하다. · 면역동물로써 여러가지 동물을 선택 할 수 있다. |
| 단점 | <ul style="list-style-type: none"> · Monoclonal antibody에 비해 특이성이 떨어진다. · 특이적인 항체를 얻고 싶은 경우에는 정제 과정을 필요로 하는 경우가 많다. · 대량으로 일정 역가를 필요로 하는 경우에는 적합하지 않다. |

● Monoclonal Antibody

- | | |
|----|--|
| 장점 | <ul style="list-style-type: none"> · 배양 상층을 대량으로 얻을 수 있기 때문에 장기간, 대량으로 균일한 성질의 항체를 실험에 이용 할 수 있다. · 목적에 따라 다르나 대부분의 경우 hybridoma 중의 배양 상층 또는 복수를 그대로 이용 할 수 있다. · 항원 중의 1개의 epitope를 인식하므로 특이성이 뛰어나다. |
| 단점 | <ul style="list-style-type: none"> · Polyclonal antibody에 비해 제작기간이 길고 숙련된 기술을 필요로 한다. · 면역세포염색 등에도 사용할 수 있는 항체가 polyclonal antibody의 경우와 비교하여 얻기 어려운 경향이 있다. · 면역 동물은 mouse, rat 등으로 한정된다. |

일반적으로 단시간에 실험결과를 얻고 싶은 경우에는 polyclonal antibody가 적당하며 장기간에 걸쳐 균일한 lot로 실험한 결과를 얻고 싶은 경우에는 monoclonal antibody가 유용하다.보편적으로 Polyclonal antibody 제작을 우선적으로 하고, 그 후 monoclonal antibody를 제작하는 것이 일반적으로 추천하는 순서이다.

2. 항체의 조제

좋은 항체를 얻기 위해서는 면역원으로써 어떤 것을 선택하느냐 하는 것이 중요하다. 통상, 정제 단백질 또는 recombinant protein을 입수하거나, cDNA 염기서열로부터 추정되는 단백질의 일차 구조에 기초하여 면역원이 되는 peptide를 합성하여 항원을 조제하는 경우가 많다. 다음에 각각의 면역원에 대한 특징을 소개한다.

(1) 정제 단백질 또는 recombinant protein

- ① 어느 단백질에 대한 항체를 얻고자 하는 경우 가장 확실한 면역원이다.
- ② 면역에 필요한 단백질을 정제하거나, 클론화한 cDNA를 발현 벡터에 도입하여 recombinant protein을 얻어야 한다.
- ③ 번역 후 수식 (인산화, protease 분해 등)을 특이적으로 인식하는 항체를 얻고자 하는 경우에는 부적합하다.

(2) 합성 peptide

- ① cDNA 염기서열로부터 추정되는 일차 구조를 기초로 면역원이 되는 peptide를 자유자재로 합성할 수 있다. 따라서 면역에 필요한 양의 단백질을 정제할 수 없는 경우 또는 DNA 염기서열을 극히 일부밖에 알지 못하는 경우에도 응용 가능하다.
- ② 합성 peptide에 대한 충분한 연구를 통하여 번역 후 수식 (인산화, protease 분해 등)을 특이적으로 인식하는 항체를 제작할 수 있다.
- ③ 단백질의 어느 부분에 대한 peptide를 합성한 경우에도 목적 단백질에 반응하는 항체를 얻었다고는 할 수 없다. 현재, 적당한 면역원을 얻기 위한 아미노산 서열에 관한 일반 규칙은 없다. 따라서 합성 peptide를 항원으로 하는 경우에는 항체 제작이 가능해 보이는 몇 곳을 선별하여 시행착오를 반복하며 항체를 제작할 수밖에 없다.

여기에서는 합성 peptide를 면역원으로 한 경우의 항원조제법을 중심으로 서술한다. 또한, polyclonal antibody, monoclonal antibody에서 항원의 조제법은 크게 다르지는 않다.

2-1. Peptide 합성 (시간 ★ ★, 경제성 ★ ★, 난이도 ★ ★)

- | | |
|----|--|
| 적용 | 면역에 필요한 양의 단백질을 정제할 수 없는 경우와 목적 단백질의 일차구조 서열을 일부밖에 알고 있지 못한 경우 · 번역 후 수식 (인산화, protease 분해 등)을 특이적으로 인식하는 항체를 얻고 싶은 경우 |
| 주의 | 대부분의 단백질은 생합성 후 processing을 받다가, 각종 번역 후 수식 (인산화, protease 분해 등)을 받을 가능성이 있다. 또한, 보통의 단백질은 항원으로 되기 쉬운 부분과 어려운 부분이 있다. 이 때문에 cDNA 서열로부터 추정되는 일차구조에 근거하여 면역원이 되는 peptide를 합성하는 경우 이러한 점에 주의하여 항원으로 사용할 peptide를 선택할 필요가 있다. 또한, 예측 |

되는 단백질의 이차구조도 peptide를 선택할 때 참고가 된다 (이차구조의 예측법으로 Chou & Fasman법이 유명하고, 시판되는 프로그램에도 포함되어 있다).

2-2. 담체와의 결합 (시간 ★, 경제성 ★, 난이도 ★)

- | | |
|----|---|
| 적용 | 합성한 peptide 등을 면역하는 경우 |
| 방법 | Carrier protein (알부민, 미오글로빈, 헤모시아닌 등)에 결합시킨다. |
| 주의 | Carrier protein의 선택도 중요하다. 즉, Carrier protein 자신의 항원성이 높으면 목적 항원과 함께 Carrier protein에 대한 항체가 생성한 확률이 높아지기 때문이다. Carrier protein로서는 항원성이 낮은 KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)를 자주 이용하고 있다. |

3. Polyclonal Antibody 제작

Polyclonal Antibody의 경우, 면역동물을 다양하게 선택할 수 있다. 본 고에서는 자주 사용하는 토끼를 사용한 면역방법을 중심으로 서술하고자 한다.

3-1. 동물의 취급방법 (시간 ★, 경제성 ★, 난이도 ★)

1종류의 항원에 대하여 2마리 이상의 면역동물을 준비하도록 한다. 토끼를 예로 들면, 뉴질랜드화이트, 암컷, 체중 2 kg 전후의 것을 사용하고 있다. 구입 후 2주 정도는 상태를 체크하면서 환경에 적응시켜, 건강상태(설사 등의 이상은 없는지)를 확인한 후 면역을 시작하도록 한다.

●면역법

- | | |
|----|---|
| 방법 | 동물종에 따라 필요한 항원량 등은 다르지만, 다른 동물종에 있어서도 기본적인 면역법은 토끼와 동일하다. |
|----|---|
- ① 면역 전에 채혈 (5~10 ml)을 하고 혈청을 분리하여 4℃ 또는 -80℃에 보존한다.
 - ② 항원용액 (peptide 항원의 경우, carrier protein과 conjugate 한 것)을 1 mg/ml가 되도록 PBS로 희석한다.
 - ③ 항원과 adjuvant의 emulsion을 조제한다.
 - i) Freund adjuvant의 경우, 유리 주사기 한쪽에 첫회 면역의 경우 FCA (Freund Complete Adjuvant), 그 이후는 FIA (Freund Incomplete Adjuvant)를, 또 다른 한쪽에는 항원용액을 넣은 주사기를 연결한다. 항원용액이 들어있는 주사기 쪽을 누르고 (water in oil), 다음에 다른 쪽을 누르는 동작을 수백회 반복한다. 주사기의 왕복이 곤란할 정도로 굳어지면 emulsion이 완성되었다는 증거이다. 또한, sonication에 의한 adjuvant 조제법도 있다.
 - ii) RIBI adjuvant의 경우, 항원용액과 adjuvant를 tube에 넣고, 30분 정도 vortex 한다.
 - ④ 토끼 등의 털을 깎아 70% 에탄올로 소독한 후 면역을 실시한다. Freund adjuvant는 피하에 십수곳 정도 주사한다. RIBI adjuvant의 경우, 0.05 ml씩 피하에 6곳, 0.3 ml씩 양 다리 근육에, 0.1 ml씩 머리의 피하에 주사한다.
 - ⑤ 면역는 4주 간격으로 실시한다.

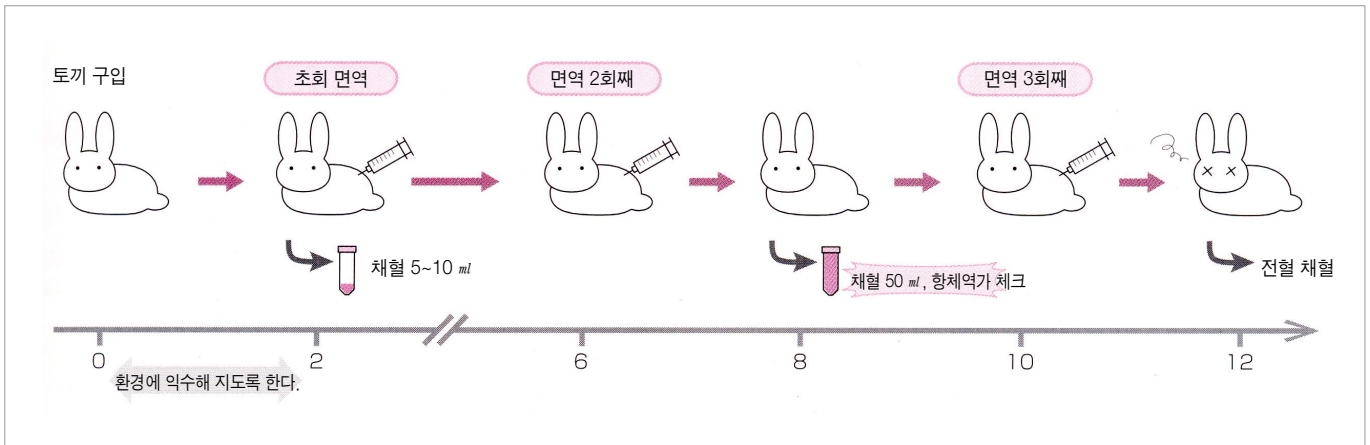


그림 1 Polyclonal antibody 제작

● 채혈법 (시간 ★, 경제성 ★, 난이도 ★★)

적용 2회째 또는 3회째의 추가면역을 한 면역동물로부터 항체가 높은 항체를 포함한 혈청을 얻는다.

방법 토끼의 채혈법에 대해 해설하도록 한다.

2회째의 면역 후 2주 후에 시험적으로 50 ml 정도 채혈을 한다. 귀정맥 채혈의 경우, 원통형 고정기에 토끼를 넣어 보정하여 채혈을 실시한다. 혈관이 파열되었을 경우, 토끼의 귀에 온풍을 불어주는 것도 한 가지 방법이다. 통상 늦어도 3회째의 면역 후 2주 뒤에는 충분한 항체 역가를 가진 혈청을 얻을 수 있으므로 그 시점에서 전혈 채혈을 한다.

4. Monoclonal Antibody 제작

Monoclonal Antibody 제작에는 mouse 또는 rat을 실험동물로 이용한다. 이들 동물에 항원을 주사 후 비장세포 또는 임파절세포를 적출하여 mouse myeloma와 세포융합을 한다. Mouse myeloma와 rat B세포의 융합세포는 mouse myeloma와 mouse B세포의 융합세포와 증식능력은 변하지 않는다.

세포융합에 이용하는 Mouse myeloma는 HGPRT (Hypoxanthine-Guanidine-Phosphoribosyl-Transferase)를 가지고 있지 않기 때문에 HAT 배지에서는 생존할 수 없다. 이 세포는 비장세포 또는 임파절세포와 융합하므로써 HAT 배지에서 생존할 수 있다. 이 성질을 이용하면 hybridoma만을 증식시킬 수 있기 때문에 통상 hybridoma를 확립시킬 때까지 HAT 배지에서 증식시킨다.

Hybridoma 중에는 목적의 항체를 생산하는 것만을 선택하는 방법으로 한계희석법이 이용되고 있다. 이 방법은 96 well의 well 당 1세포 이하가 되도록 하여, 1개의 세포로부터 증식된 클론을 선별하는 방법이다. 이 조작을 최소 2회 반복하면 목적하는 항체를 생산하는 세포에 있어서 경합상대가 되는 불필요한 세포를 완전히 제거하는 것 뿐 아니라, 증식능력이 뛰어나고, 항체 생산능력이 높은 클론을 선별할 수 있다.

4-1. 동물의 취급방법

Mouse 항체를 만들 것인가, rat 항체를 만들 것인가 따라 면역방법은 거의 결정된다. Mouse 항체의 경우는 비장을 B세포의 source로 이용하는 것이 일반적이다. Rat 항체의 경우는 임파절을 source로 하는 것이 좋다.

면역에 이용하는 mouse와 rat의 성은 암컷이 좋다. 동물은 8~10주령 정도 된 것을 사용한다.

다음에 각각의 방법에 대한 면역법 또는 적출법에 대하여 설명한다.

● Mouse 비장법 (시간 ★★, 경제성 ★★, 난이도 ★★)

적용 현재, mouse의 monoclonal antibody 제작에서 가장 보편적으로 사용되고 있는 방법

방법 ① 면역법

Freund complete adjuvant와 가용성 항원으로 emulsion을 만들고, 이 emulsion을 mouse 복강내에 100~200 μ l 주사한다. 2주에서 1개월 후 Freund incomplete adjuvant와 항원으로 emulsion을 만들어 추가면역을 실시한다. 2주 이상의 기간을 두고 세포융합 3~4일 전에 항원용액을 정맥주사하여 추가면역을 실시한다.

② 비장 적출법

Mouse를 마취 후 경추를 탈골시켜 치사시킨다. Mouse를 70% 에탄올에 담구어 멸균시킨 후 clean bench 내에서 개봉하여 비장을 적출한다. 종기가 확실하게 보이는 비장을 사용하는 것이 좋은 결과를 얻을 수 있다.

● Rat 비장법 (시간 ★★, 경제성 ★★, 난이도 ★★)

적용 RIBI Ajuvant 등에 의한 면역에서 rat monoclonal antibody를 얻고 싶을 경우

방법 Mouse 비장법과 동일하다.

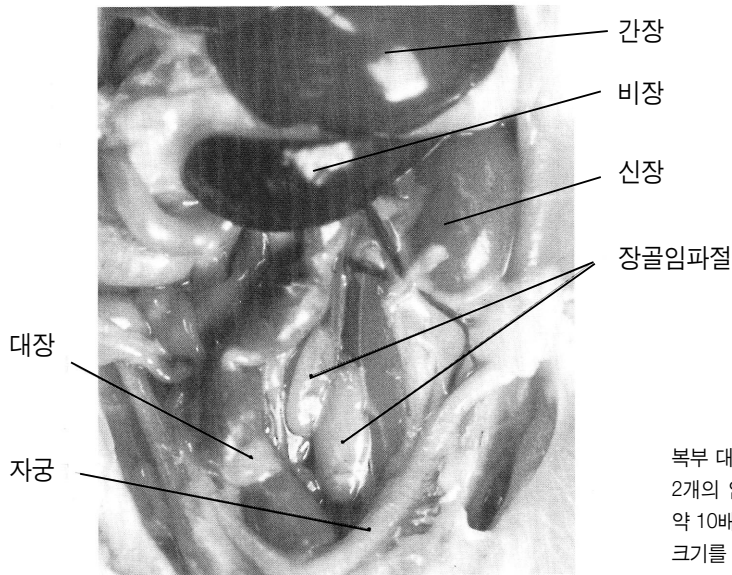
주의 Rat의 경우는 mouse와 달리 비장의 종기가 확인되지 않는 경우가 많다.

● Mouse 임파절법 (시간 ★★ 경제성 ★★ 난이도 ★★)

적용 일부에서 이용되고 있는 방법이다. Mouse monoclonal antibody의 경우, 비장을 이용하는 것이 일반적이다.

방법 ① 면역법

Freund complete adjuvant와 가용성의 항원으로 emulsion을 만들어 mouse 뒷다리 발바닥에 각각 50 μ l씩 합계 100 μ l의 emulsion을 주사한다. 이 주사에 의해 무릎 임파절의 종기가 커



복부 대동맥이 좌우의 총장골동맥으로 분리되는 부근에 존재하는 2개의 임파절이 장골 임파절이다. 뒷 다리 발바닥주사로 통상의 약 10배 종기가 커진다. 대장내에 있는 쥐똥의 크기와 비교하면 그 크기를 알 수 있다.

그림 2 Rat 임파절법에 의한 rat 장골임파절의 위치와 크기

진다. 이 임파절을 세포융합에 이용한다. 세포융합의 시기는 항원주사 후 10~14일이다.

② 무릎 임파절의 적출법

Mouse의 무릎 임파절을 적출한다. 임파절은 종기가 커져 있어도 작기 때문에 발견하는 것은 쉽지 않다.

장점 목적 hybridoma의 출현율은 비장법보다 높다.

결점 임파절 내의 세포수가 적으므로, 이것을 보완하기 위하여 고효율의 세포융합법 전기적 세포융합법 등을 이용하는 것이 필요하다. Mouse 뒷다리 발바닥에 50 μ l를 주사하는 일은 상당히 어렵다 (20 μ l까지는 쉬움).

② 장골임파절의 적출법

1마리의 rat로부터 1회의 세포융합에 충분한 임파절 세포를 얻을 수 있다. 장골 임파절을 찾아 적출하는 것은 어렵지 않다.

장점 종래의 mouse 비장법과 비교하면 목적으로 하는 hybridoma의 출현이 약 10배 높다. 주사가 1회로 좋으므로 항원의 절약, 시간의 절약, 노력의 절약도 된다.

● Rat 임파절법 (시간 ★★, 경제성 ★, 난이도 ★★)

적용 이 방법은 1995년에 발표된 방법이다.

방법 ① 면역법

Freund complete adjuvant와 가용성의 항원으로 emulsion을 만들어 rat 뒷다리 발바닥에 각각 100 μ l씩 합계 200 μ l의 emulsion을 주사한다. 이 주사에 의해 무릎, 장골 임파절의 종기가 커진다. 이 가운데 장골임파절이 세포융합에 적합하다.

주사는 1회로 충분하다. 추가면역은 목적으로 하는 hybridoma의 출현율을 반대로 저하시킨다. 임파절은 주사 2주 후로부터 1개월 이상에 걸쳐 사용 가능하다.

Start

항체 제작의 주의점 [A]

항체의 조제 [B]

고순도의 정제 단백질이 충분히 있다

정제는 곤란하나 cDNA는 있다

일부 아미노산 서열을 알고 있다

단백질의 일차구조해석

Recombinant Protein의 대량 발현

Peptide 합성

직접발현계
융합발현계

Recombinant Protein의 디자인과 정제

담체와 결합

항원

Polyclonal antibody 제작 [C]

Monoclonal antibody 제작 [D]

동물의 취급방법 [C-1]

- 면역법
- 채혈법

동물의 취급방법 [D-1]

- Mouse 비장법
- Rat 비장법
- Mouse 임파절법
- Rat 임파절법

세포 Cloning [D-2]

- 임파구 부유액의 조제법
- Myeloma 세포의 입수와 배양
- 세포 융합법
- Cloning

항체역가 체크

항체를 이용한 검출

- EIA (ELISA)법
- RIA법
- 형광항체법
- Western Blotting법

활성을 이용한 검출

- 흡착법

항체의 정제

단백질의 정제

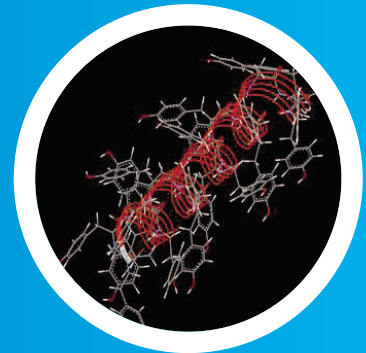
단백질의 존재 탐색

단백질의 조절기구 탐색

함부로 비교하지마! 100% 만족 다카라 Peptide, Antibody

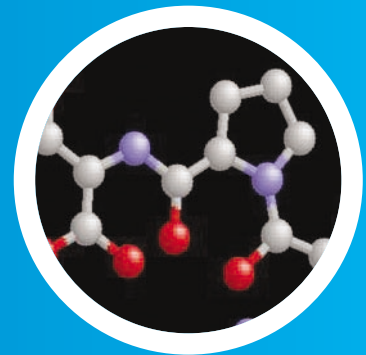
Peptide

- :: 고품격 Peptide
최고의 합성서비스
- :: 최고의 노하우
일본에서 인정받은 앞선기술
- :: 빠른 납기
2~3 주 내의 빠른 납기
- :: 고객 맞춤 서비스
Epitope search부터 항체제작까지 모든 서비스 제공
- :: 초고순도 제작
98 % 이상의 순도 제공

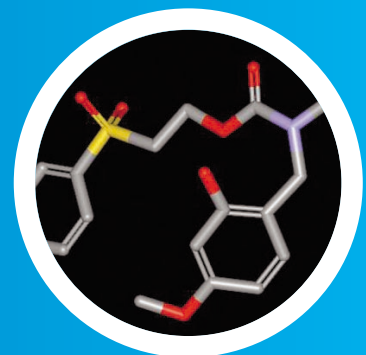


Antibody

- :: 최고의 품질
최고의 노하우로 최고의 항체 제공
- :: 다양한 종류의 항체 제작
Rabbit, mouse, rat, 기니아피그, 염소 등 다양한 종류
- :: 빠른 납기
2~3개월의 빠른 납기
- :: 고객 맞춤 서비스
고객중심의 total 서비스



- TaKaRa를 선택하는 순간, 합성하기 어려운 서열은 사라집니다
- 고객중심의 Total 서비스가 다가옵니다



문의처 <다카라코리아 연구지원사업부>

Tel. 02-575-7409 · Fax. 02-577-3691 · e-mail : support@takara.co.kr · 담당자: 김주경