

자성 미세입자에의 항체 고정화 방법이 면역결합반응에 미치는 영향

최효진** · 황상연 · 장대호 · 조형민 · 강정혜 · 성기훈* · 주재범* · 이은규†

한양대학교 화학공학과 생물공정연구실, *응용화학과

425-791 경기도 안산시 상록구 사 1동 1271

(2005년 12월 5일 접수, 2006년 2월 3일 채택)

Effect of Antibody Immobilization Method to Magnetic Micro Beads on its Immunobinding Characteristics

Hyo Jin Choi**, Sang Youn Hwang, Dae Ho Jang, Hyung Min Cho, Jung Hye Kang, Gi Hun Seong*,
Jae Bum Choo* and Eun Kyu Lee†

Bioprocessing Research Laboratory, Department of Chemical Engineering,

*Department of Applied Chemistry, Hanyang University, 1271, Sa 1-dong, Sangnok-gu, Ansan 426-791, Korea

(Received 5 December 2005; accepted 3 February 2006)

요 약

자력을 이용한 분리기술의 장점을 이용하여 여러 가지 불순물들이 섞여 있는 현탁 용액으로부터 자성입자를 이용하여 목적 단백질만을 얻어낼 수 있는 기술의 가능성에 대하여 알아보고자 하였다. 자성입자를 이용하는 경우에는 (1) 자성입자 표면에 리간드 고정화, (2) ligand(리간드)와 목적 물질과의 특이적 결합, (3) 자력을 이용한 자성입자의 분리, (4) 목적 물질의 탈착 그리고 (5) 자성입자의 재사용 순서로 진행되어 여러 단계의 공정을 단순화시킬 수 있다. 이러한 자성입자를 이용한 방법은 효율성, 단순성, 까다롭지 않은 조건, 자동화의 용이성, 비용의 저렴함으로 인해 관심이 증대되고 있다. 본 연구에서는 표면이 카르복실기로 처리된 자성입자에 IgG 항체를 고정화시킨 후 IgG를 목적 단백질로 하여 이를 분리해내고자 하였다. 이를 위하여 자성입자 표면에 다른 물질과의 비특이적 결합이 일어나지 않을 조건에 대하여 확인해 보았으며, IgG 항체를 배향성 고정화시켜 자성입자가 목적 단백질과 보다 효과적으로 결합하여 목적 단백질을 IgG만을 선택적으로 분리해 낼 수 있는지에 대하여 알아보았다. 높은 pH를 사용할 경우 비특이적 흡착을 줄일 수 있었으며, IgG 항체 고정화된 자성입자를 사용할 경우 목적 단백질인 IgG와 선택적으로 반응함을 알 수 있었다. IgG 항체의 고정화에서 Fc지역 C-terminus에 인접해 있는 탄수화물 부분을 이용하여 배향성을 준 경우, IgG 항체 내의 아민기와 고정화시키는 비배향성 고정화 방법보다 항원과의 결합능력이 약 2배 높았다.

Abstract – Recent technical advances in the biorecognition engineering and the microparticle fabrication may enable us to develop the single step purification using magnetic particle, because of its simplicity, efficacy, ease of automation, and process economics. In this study, we used commercial magnetic particles from Seradyn, Inc. (Indianapolis, USA). It was ca. 2.8 micron in diameter, consisted of polystyrene core and magnetite coating, and its surface had carboxyl groups. The model, capture protein was IgG and anti-IgG was used as the ligand molecule. We studied the different surfaces ('nude', ester-activated, and anti-IgG coated) for their biorecognition of IgG. At a high pH condition, we could reduce non-specific binding. Also anti-IgG immobilized magnetic particle could capture IgG more selectively. We attempted 'oriented immobilization' of anti-IgG in which the polysaccharides moiety near the C-terminus was selectively oxidized and linked to the hydrazine-coated MP, to improve the efficacy of biorecognitive binding. Using this method, the IgG capturing ability was improved by ca. 2 fold. From the binary mixture of the IgG-insulin, IgG could be more selectively captured. In summary, the oriented immobilization of oxidized anti-IgG proved to be as effective as the streptavidin-biotin system and yet simpler and cost-effective. This immobilization method can find its applications in protein biochips and biotargeting.

Key words: Magnetic Particles, Biorecognition of IgG, Oriented Immobilization, Surface Modification

† To whom correspondence should be addressed.

E-mail: eklee@hanyang.ac.kr

**Current address: Celltrion Quality Control Group, Incheon, Korea.

1. 서 론

생물분리공정의 여러 단계의 공정을 단순화시키기 위한 접근 방법 가운데 하나는 자력을 이용한 자기분리(magnetic separation) 기술이다. 자기분리기술의 주요 이점 가운데 하나는 점성 용액이나 현탁액에서 직접 목적 물질의 분리작업이 가능하다는 것이다. 자기분리 기술은 고체 입자를 포함한 여러 가지 생물 물질들이 섞인 현탁액 내에서 온화한 조건으로 목적 물질을 분리해낼 수 있다는 장점을 가지고 있다[1]. 이외에도 스케일업 가능성(scalability), 효율성, 단순성, 자동화의 용이성, 비용의 저렴함 등으로 연구가 증가하고 있다. 미세 자성 입자는 단백질, 펩타이드, 효소의 고정화, 생물분리기술, immunoassay, 약물 전달, 바이오 센서 등에 폭넓게 사용되고 있다.

자성입자를 이용한 생물 물질의 선택적 분리는 다음의 과정에 따라 진행된다. (1) 목적 물질과의 결합력이 강한 리간드 물질을 자성입자 표면에 위치시키고, (2) 혼합 용액상에서 리간드 물질이 목적 물질만을 인식하여 결합하고, (3) 자력을 이용하여 자성입자만을 분리해낸 뒤, (4) 분리해낸 자성입자에서 목적 하는 물질을 리간드 물질로부터 탈착시키게 된다. 이때, 목적 물질만을 특이적(specific)으로 분리해 내기 위하여 목적 물질과 특이적으로 반응할 수 있는 리간드 물질을 자성입자 표면에 부착시키는데, 자성입자 표면의 기능기를 활성화한 뒤 리간드를 결합시키고 반응하지 않은 활성 잔기를 막아줌으로써 리간드 물질을 자성입자 표면에 위치시킬 수 있다(Fig. 1).

리간드의 고정화 단계는 고체상에 기초한 생물분석기술이나 바이오센서 연구에 결정적인 부분이다. 항체 고정화의 경우 공유결합에 의한 고정화 반응 이후 종종 항원과의 결합 능력이 감소하는 경우가 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 항체를 배향성 고정화시킨다. 배향성 고정화는 단백질의 활성 부위에서 떨어져 있는 잘

알려진 부위를 통하여 고정화시키는 방법이다. 항체의 배향성 고정화 방법 가운데 하나는 당 단백질의 탄수화물 부분을 이용하여 고정화시키는 것이다. 항체의 경우 그들의 H-chain(Heavy chain)에 적어도 하나 이상의 N-linked 탄수화물을 가지고 있으며 IgG의 경우 CH2 domain의 Asn297 지역에 하나의 N-glycosylation 부분을 가지고 있다[2]. 항체의 탄수화물 부분을 이용하여 고정화시킬 경우 단백질 구조의 안정성뿐 아니라 활성 부위로의 접근성도 용이함을 알 수 있다[3, 4].

본 연구에서는 자성입자를 이용하여 목적 단백질의 분리정제공정을 단순화하고자 하였다. 목적 물질인 IgG를 선택적으로 분리해내기 위하여 자성입자에 IgG 항체를 고정화시키고, 고정화 과정에서 일반적으로 사용되고 있는 아민을 이용한 고정화 방법과 탄수화물 부분을 이용한 방법을 이용하여 각각의 경우 IgG와의 결합능력을 비교해 보았다. Surface plasmon resonance biosensor(SPR)를 이용하여 비배향성 고정화와 배향성 고정화에 의한 결합능력 차이를 확인하였다. 또한, IgG 항체를 고정화시킨 자성입자를 사용하여 IgG만을 선택적으로 분리해 내기 위한 조건을 찾았으며 자성입자를 이용하여 분리공정의 단계를 줄일 수 있는 가능성에 대하여 확인하였다.

2. 실 험

2-1. 실험재료

본 실험에서 사용된 자성입자는 CM-MP(carboxyl modified magnetic particle)로서 Seradyn, Inc.(Indianapolis, USA)에서 구입하였다. 지름이 2.8 μm 이며, 폴리스티렌 코어에 자철석을 코팅시킴으로써 자성을 나타내며 표면은 카르복실기를 기능기로 가지고 있다. 모델물질로 사용한 mouse IgG polyclonal 항체와 mouse IgG, BSA(Bovine

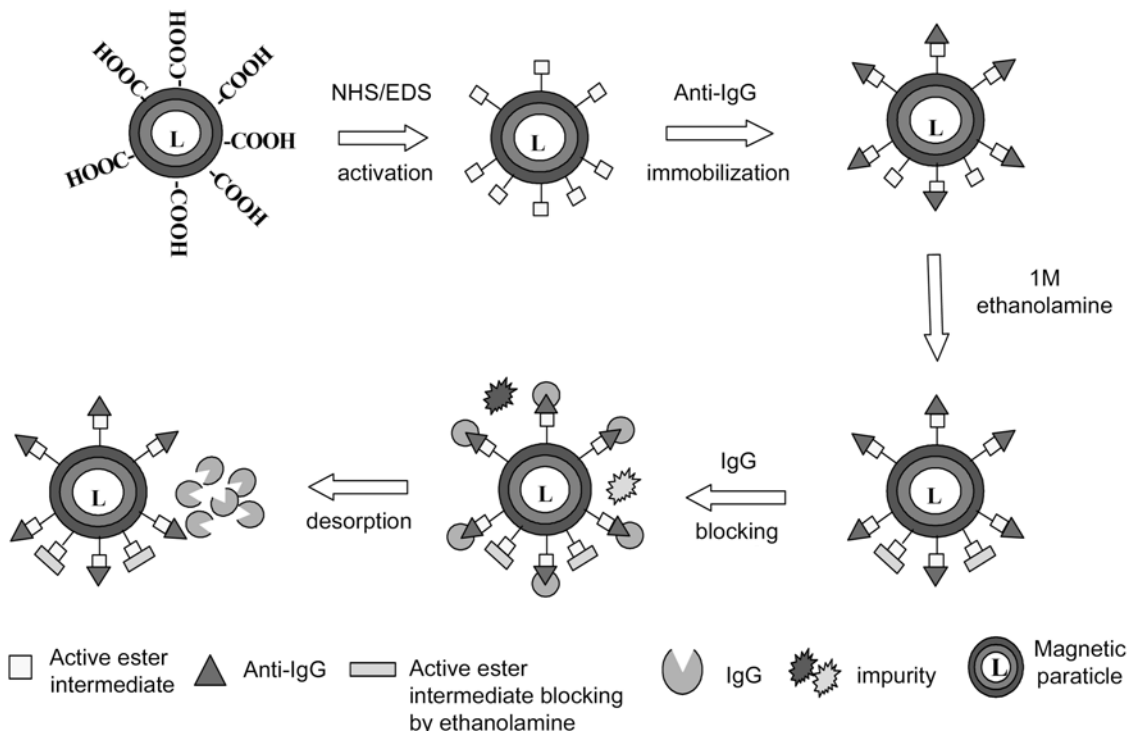


Fig. 1. Schematics of IgG purification by using anti-IgG coated magnetic particles.

serum albumin)는 Sigma-Aldrich(St. Lois, USA)사에서 구입하였다. 단백정량을 위한 Bradford dye와 SDS-PAGE 시약은 Bio-Rad (Hercules, USA)사에서 구입하였다. 배양성 고정화를 위하여 사용된 streptavidin과 biotin은 Pierce(Rockford, USA)사에서 구입하였으며 이 두 가지 모두 hydrazide 기를 가지고 있다. 인간 인슐린은 (주)종근당바이오에서 공급 받았다.

2-2. NHS-EDC를 이용한 자성입자에 mouse-IgG 항체의 고정화

표면이 카르복실기를 갖는 자성 입자의 표면에 IgG 항체를 고정화시켰다. 자성입자 1mg을 50 mM MES(2-(N-morpholino ethanesulfonic acid, pH 6.1) 버퍼로 3번 세척하고, 230 mL의 50 mg/mL의 NHS (N-hydroxysuccinimide)와 같은 부피의 10 mg/mL EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide)를 넣어 30분 동안 반응시켜줌으로써 표면을 NHS로 활성화시켰다. IgG 항체 결합에 대한 pH 영향을 연구하기 위하여 1 mg/mL의 IgG 항체를 10 mM sodium acetate(pH 3.5, 4.5, 5.5) 버퍼, 10 mM MES(pH 6.5) 버퍼, 10 mM PBS(phosphate buffered saline, pH 7.5) 버퍼를 이용하여 IgG 항체를 100 µg/mL로 희석한 뒤 각각 1 mL을 취하였다. 자성입자가 들어있는 마이크로튜브에 희석시킨 IgG 항체를 넣고 교반시키면서 상온에서 반응시켰다. 반응 후 원심분리를 이용하여 상등액만을 취하고 남아있는 IgG 항체의 양을 UV로 측정하여 고정화된 IgG 항체의 양을 결정하였다. 자성입자에 남아있는 활성기인 ester 중간체를 막아주기 위하여 1 M의 ethanolamine(pH 8.0)을 넣고 15분 동안 반응시킨 후 각각의 버퍼로 세척하였다.

2-3. IgG 항체의 탄수화물 부분을 이용한 고정화

자성입자 1mg을 취하여 0.1 M MES(pH 4.8) 버퍼를 이용하여 3번 세척하였다. 0.1 M MES(pH 4.8)에 0.5 M acipic dihydrazide를 넣고 교반하며 반응시킨 뒤 자성입자가 들어있는 마이크로튜브에 1 mL을 넣어준다. 그 뒤 3 mg의 EDC를 넣고 3시간 동안 교반시키며 반응시킨 후 3차 증류수, 1 M NaCl, 3차 증류수 순으로 세척하였다. IgG 항체의 탄수화물 부분을 산화시키기 위하여 1 mL의 0.1 M sodium phosphate(pH 7.0) 버퍼에 1 mg의 IgG 항체를 용해시킨 후 10 mg의 sodium m-periodate를 넣고 30분간 상온에서 반응시켰다[5]. 반응 후 desalting column(Sephadex G-25)를 이용하여 남아있는 sodium m-periodate와 산화된 IgG 항체를 분리해냈다[6]. 최종적으로 0.1 M sodium phosphate(pH 7.0) 버퍼를 이용하여 자성입자를 세척한 후 산화시킨 IgG 항체 50 µg 첨가하여 상온에서 하루 동안 가볍게 교반하였다. 반응 후 0.1 M sodium phosphate(pH 7.0) 버퍼, 3차 증류수, 1 M NaCl, 3차 증류수 순으로 세척하였다.

2-4. Biotin-streptavidin을 이용한 IgG 항체 고정화

자성입자에 streptavidin을 고정화시키기 위하여 1 mg의 자성입자를 50 mM MES(pH 6.1) 버퍼로 3번 세척한 후 2 mg/mL의 streptavidin hydrazide 용액 200 µl와 10 mg의 EDC를 넣어 하루 동안 반응시켰다[7]. Biotin 수식 공정은 1 mg/mL의 IgG 항체를 산화시킨 뒤 1 mg/mL의 biotin hydrazide 용액을 넣고 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응을 멈추기 위하여 0.01 M sodium phosphate(pH 7.4) 버퍼를 이용하여 4 °C에서 하루 동안 투석시켰다[7].

2-5. 고정화된 IgG 항체와 IgG의 결합반응

고정화시킨 IgG 항체와 IgG 간의 결합을 확인하기 위하여 IgG 항체가 고정되어 있는 1 mg의 자성입자에 100 µg의 IgG를 넣어 교반시키면서 상온에서 반응시켰다. 반응 뒤 30분, 60분, 1시간 후, anti- IgG와 IgG 간의 결합반응을 분석하였다.

2-6. IgG 탈착을 위한 최적조건

고정화된 IgG 항체와 결합한 IgG를 분리하기 위하여 탈착 조건을 찾아 보았다. 고정화된 IgG 항체와 결합한 IgG에 각각의 탈착 버퍼를 1 mL씩 넣고 2분 동안 반응시켰다. 탈착을 위해 사용한 버퍼는 1 M sodium chloride, 200 mM sodium carbonate(pH 11.5), 100 mM sodium bicarbonate(pH 9.2), alkaline SDS(0.2 M Tris base/1.0 % SDS), 100 mM sodium citrate(pH 3.0), 100 mM glycine(pH 2.0), 250 mM sodium hydroxide, 100 mM hydrochloric acid, 100 mM glycine(pH 2.3)+1% DMSO 이다. 원심분리를 이용하여 상등액만을 취하여 탈착된 IgG양을 확인하였다.

2-7. pH에 따른 비특이적 흡착

(1) 표면에 아무런 처리하지 않은 카르복실기 표면('nude')과 (2) NHS/EDC를 이용하여 표면을 활성화시킨 후 1 M의 ethanolamine (pH 8.0)을 이용하여 blocking시켜 하이드록실기를 나타내는 표면에 비특이적 결합으로 흡착되는 IgG와 BSA의 양을 확인해 보았다. 1 mg의 자성입자에 25, 50, 100, 200, 400 µg의 IgG와 같은 양의 BSA를 1 mL의 부피가 되도록 각각 버퍼와 혼합하였다. pH의 영향을 확인하기 위하여 50 mM sodium acetate(pH 3.5, pH 5.5) 버퍼, 50 mM sodium phosphate(pH 7.5) 버퍼, 50 mM sodium bicarbonate(pH 9.5) 버퍼를 이용하였다. 1시간 동안 교반시키며 반응시킨 후 상등액을 취하여 전체의 양에서 UV로 측정한 상등액에 남아있는 IgG와 BSA의 양을 감하여 흡착된 IgG와 BSA의 양을 측정하였다.

2-8. IgG 항체 자성입자의 재사용

자성입자에 고정화된 IgG 항체와 결합한 IgG를 탈착시켜 회수한 뒤, 100 µg/mL의 IgG를 1 mL 넣어주어 가볍게 교반시키며 반응시켰다. 반응 후 원심분리를 통하여 상등액을 취하여 남아있는 IgG의 양을 측정함으로써 반응한 IgG 양을 정하였다. 탈착과정과 결합과정을 반복하여 진행하면서 재사용된 자성입자 표면의 IgG 항체와 반응하는 IgG의 양의 변화를 관찰하였다.

2-9. 이상혼합물(binary mixture)에서의 선택적 결합

Amine-coupling을 이용한 비배향성 고정화, 배향성 고정화, biotin-streptavidin을 이용하여 30~35 µg의 IgG 항체가 고정된 자성입자가 들어 있는 마이크로튜브에 50 mM sodium bicarbonate(pH 9.5) 버퍼에 녹아있는 60 µg의 IgG와 인슐린을 넣고 1시간 동안 상온에서 교반시키며 반응시켰다. 원심분리 후 자성입자를 동일한 버퍼를 이용하여 세척하였다. 고정된 IgG 항체와 반응한 샘플들은 non-denaturing SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다. 이때, 20% acrylamide gel을 사용하였으며 gel은 coomassie brilliant blue 염색법을 이용하였다. SDS-PAGE 이미지 정량분석을 위해서 densitometer(Total Lab, Durham, USA)를 이용하였다.

2-10. Surface plasmon resonance를 이용한 IgG 항체 비배향성 고정화

SPR biosensor는 Biacore AB사(Uppsala, Sweden)의 Biacore 3000 시스템을 이용하였다. 센서 칩으로는 CM5 칩을 이용하였다. 이 칩 표면은 carboxymethyl dextran 층으로 도포되어 있으며 4개의 flow cell이 있다. 음전하를 띠고 있는 dextran 층에 리간드의 고정화 효율을 향상시키기 위해 양전하의 coupling buffer를 이용하여 정전기력을 유도한다(preconcentration test). pH 3.5, 4.5, 5.5의 10 mM sodium acetate를 리간드와 혼합하여 주입하여 최대로 결합하는 최적의 pH 조건을 결정하였다. Dextran 층의 carboxyl기를 활성화시켜 항체 표면의 amine기와 공유결합을 촉진시키기 위하여, 0.2 M EDC(N-ethyl-N'-dimethylaminopropyl carbodiimide)와 0.05 M NHS(N-hydroxysuccinimide)를 7분 동안 흘려주어 반응성이 좋은 NHS ester로 활성화 시켰다. Preconcentration test를 통해 결정된 pH의 10 mM sodium acetate에 리간드(IgG 항체 항체) 최종농도 20 µg/ml이 되도록 첨가한 후에 활성화된 flow cell 2(fc 2) 위로 5 µL/min의 유속으로 고정화하였다. IgG 항체가 결합하지 않은 NHS ester를 1 M ethanolamine을 7분 동안 흘려주어 blocking 시켰다.

2-11. Surface plasmon resonance를 이용한 IgG 항체 배향성 고정화

CM5칩의 카르복실기를 0.2 M EDC와 0.05 M NHS를 5 µL/min으로 3분 동안 흘려주어 NHS ester기로 활성화시켰다. 그 후 아민기로 수식하기 위하여 5 mM adipic acid hydrazide를 5 µL/min으로 7분간 흘려주었다. 그 후 아민기로 바뀌지 않은 NHS ester기를 1 M ethanolamine으로 5 µL/min의 유속으로 7분간 흘려주어 blocking시켰다. 그 후 자성입자에 쓰인 산화된 IgG 항체와 동일한 방법으로 산화시킨 항체를 최종농도가 20 µg/mL가 되도록 10 mM sodium acetate(pH 3.5)에 녹여 5 µL/min으로 비배향성 항체와 동일한 양을 flow cell 4에 고정화하였다. 그 후 항체의 결합(Schiff base)을 안정화하기 위하여 0.1 M sodium cyanoborohydride를 2 µL/min로 20분간 흘려주었다.

2-12. SPR을 이용한 IgG 항체의 고정화농도에 따른 결합력 비교

10.8 mg/mL IgG를 최종농도가 321.3, 160.7, 80.3, 40.2, 20.1, 10.0, 5.0, 2.5 µg/mL이 되도록 0.01 M PBS(pH 7.2)에 녹여 30 µL/min의 속도로 fc(flow cell)1에서부터 4까지 흘려주었다. 각 실험은 2분 결합구간(association time), 3분 해리구간(dissociation time)을 주어 5번 반복 실험하였다. 시료마다 다음 시료를 주입하기 위해 250 mM NaCl+12.5 mM NaOH를 2분간 30 µL/min으로 흘려주어 재생(regeneration)하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. IgG 항체 고정화에 효과적인 pH 선정

카르복실기를 갖는 자성입자를 NHS와 EDC를 이용하여 활성화시킨 표면에 IgG 항체 고정화를 위한 최적 pH를 찾기 위하여 pH 3.5부터 7.5까지 시험해 보았다. pH 4.5부터 6.5까지는 IgG 항체와 자성입자 간의 고정화가 무리 없이 진행되는 것으로 보이나 pH 3.5의 경우에는 거의 반응이 일어나지 않았다. 따라서 이 연구에서 진행되는 IgG 항체의 amine-coupling 고정화는 pH 4.5에서 진행하였다.

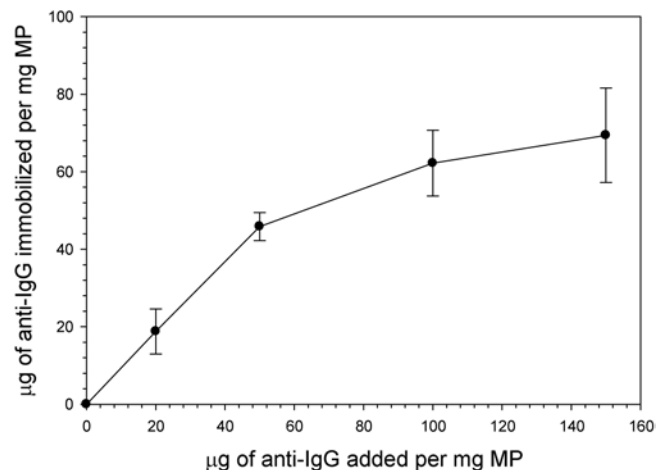


Fig. 2. Adsorption isotherm of anti-IgG immobilized on magnetic particle (N=3).

3-2. 자성입자에 고정화되는 최대 IgG 항체 양

NHS와 EDC로 표면을 활성화시킨 1 mg의 자성입자에 10 mM sodium acetate(pH 4.5) 버퍼에 녹아있는 IgG 항체의 양을 증가시키며 넣어줌으로써 고정화되는 최대량을 확인해 보았다. Fig. 2에서 나타나듯이 1 mg의 자성입자에 약 70 µg의 IgG 항체가 붙는다. 이 결과는 Langmuir model에 적용할 수 있다.

$$q/q_m = (K_d \times C_s) / (1 + K_d \times C_s)$$

여기서 q 는 반응한 단백질의 양(g/mg-MP), q_m 는 최대 단백질 반응량(µg/mg-MP), C_s 는 용액상의 단백질의 농도(µg/mL) 그리고 K_d 는 평형상수(mL/µg)이다[8]. 위의 식에 의하여 q_m 는 105 µg/mg, 그리고 K_d 는 0.014 mL/µg로 나타났다.

3-3. IgG항체의 고정화를 위한 반응시간

자성입자 표면에 IgG 항체를 고정화시키는데 필요한 시간을 확인해보았다. NHS와 EDC를 이용하여 활성화시킨 자성입자에 10 mM sodium acetate(pH 4.5) 버퍼에 들어있는 IgG 항체 80 µg을 넣어 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간 후 자성입자에 고정되는 IgG 항체의 양을 확인하였다. 1시간까지 거의 모든 반응이 일어났고 그 이후로는 반응이 거의 일어나지 않았다.

3-4. 비특이적 반응을 줄이기 위한 pH 설정

자성입자 표면에 비특이적으로 흡착하는 단백질의 양을 줄이기 위하여 반응에 적합한 pH 조건을 확인해 보았다. 목적물질인 IgG와 불순물질인 BSA의 혼합물을 50 mM sodium bicarbonate(pH 3.5~9.5)의 버퍼에 용해시킨 뒤 입자표면에 흡착하는 양을 분석하였다. 사용한 자성입자는 (1) 표면을 아무런 처리하지 않아 카르복실기를 나타내는 표면과 (2) NHS와 EDC를 이용하여 표면을 활성화시킨 후 잔여 카르복실기를 1 M ethanolamine(pH 8.0)을 이용하여 blocking시켜 하이드록실기를 나타내는 표면을 이용하여 실험하였다. Fig. 3에서 나타나듯이 pH가 높아질수록 자성입자 표면에 흡착되는 IgG와 BSA의 양이 줄어드는 것을 확인할 수 있다. 이러한 pH의 영향은 자성입자 표면과 단백질 표면의 전하에 의한 영향이라고 설명할 수 있다. pH가 IgG의 pI값인 7.4 범위보다 높아지면서 IgG의 표면이 음

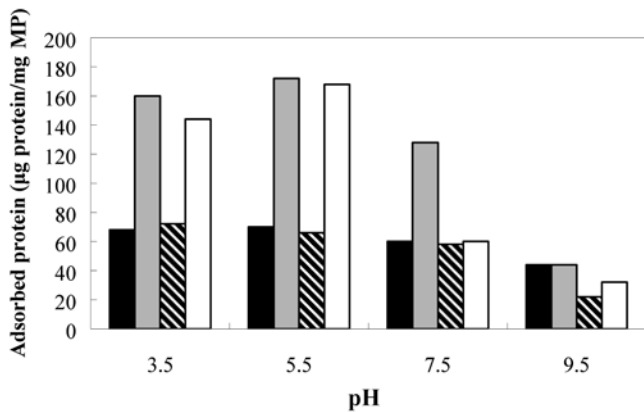


Fig. 3. Amount of protein adsorbed on magnetic particle surfaces. ■: nude MP with BSA, ■: nude MP with IgG, ▨: NHS-activated (after ethanolamine blocking) MP with BSA, □: NHS-activated (after ethanolamine blocking) MP with IgG.

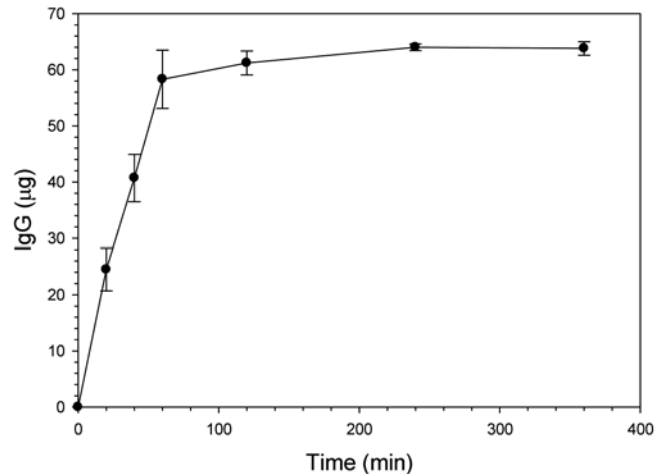


Fig. 4. Time course of IgG adsorption to anti-IgG-coated magnetic particle. k is 0.014 min^{-1} ($N=3$).

성부하를 나타내어 역시 음성부하를 나타내는 자성입자와의 정전기적 반발력이 생김으로써 흡착되는 양이 줄어들게 되고, 같은 이유로 pI 값이 4.7인 BSA도 pH가 4.7보다 높아짐으로써 자성입자 표면에 흡착되는 양이 줄어들게 된다. 이러한 결과는 단백질의 흡착에서 정전기적 반발력이 중요한 요소라는 보고와 일치하는 것을 알 수 있다[9].

3-5. IgG의 선택적 결합 확인

IgG 항체를 리간드로 고정화시킨 자성입자에 IgG만이 선택적으로 결합할 수 있는지에 대하여 확인해 보았다. 비특이적 반응을 줄이기 위하여 50 mM sodium bicarbonate(pH 9.5) 버퍼를 이용하였다. 자성입자표면에 (1) 아무런 처리하지 않은 경우, (2) NHS와 EDC를 이용하여 활성화시킨 후 1 M ethanolamine(pH 8.0)을 이용하여 blocking시킨 경우, (3) IgG 항체를 amine-coupling 방법으로 비배향성 고정화시킨 경우에 IgG와 BSA의 흡착률을 확인해 보았다. Table 1에서 나타나듯이 IgG 항체를 고정화시킨 자성입자를 이용한 경우가 카르복실기, 하이드록실기만 있는 경우보다 목적 단백질인 IgG와의 선택적 결합력이 6~8배 높아진 것을 확인할 수 있었다. 즉 IgG 항체를 표면에 고정화시킨 경우 IgG와의 선택적 반응을 높일 수 있는 것을 확인하였다.

3-6. 고정화된 IgG 항체와 IgG 간의 반응속도

IgG 항체가 amine-coupling 방법으로 고정화된 자성입자에 IgG가 결합하는데 필요한 시간을 측정하였다. IgG 항체가 amine-coupling 방법으로 고정화되어 있는 자성입자에 100 µg의 IgG를 넣어준 뒤 20분부터 360분까지 결합한 IgG의 양을 확인한 결과, IgG

Table 2. Buffers used for elution of IgG adsorbed on anti-IgG-coated magnetic particle

No.	Elution buffer	Elution yield (%)
1	1 M sodium chloride	0.8
2	200 mM sodium carbonate (pH 11.5)	10.0
3	100 mM sodium bicarbonate (pH 9.2)	1.3
4	Alkaline SDS (0.2 M Tris base/1.0% SDS)	31.3
5	100 mM sodium citrate (pH 3.0)	0.8
6	100 mM glycine (pH 2.0)	77.1
7	250 mM sodium hydroxide	21.7
8	100 mM hydrochloric acid	35.8
9	100 mM glycine (pH 2.3)+1% DMSO	86.0

항체와 IgG 사이의 결합은 1시간이면 끝나는 것을 확인하였다 (Fig. 4).

3-7. IgG 탈착조건

고정화된 IgG 항체와 결합한 IgG의 효율적 탈착을 위하여 Table 2에 제시된 것과 같이 pH, 버퍼염의 종류 및 농도의 영향을 살펴 보았다. 이 버퍼들 중에 100 mM glycine(pH 2.0)과 100 mM glycine (pH 2.3)+1% DMSO 버퍼를 이용한 경우 회수율이 86%로 가장 높았다. 이것으로 IgG 항체와 결합한 IgG의 탈착에서 염기성 조건보다 산성조건이 더욱 효과적인 것을 알 수 있었다. 또한, glycine만을 사용하는 경우보다 DMSO를 혼합하여 사용하는 경우 높은 효과를 나타내었는데 이는 acetonitrile이나 DMSO와 같은 유기물질들이 탈착효율을 높여준다는 보고와 일치하였다[10].

Table 1. Effect of surface on adsorption capacity of BSA and IgG

	Relative adsorption capacity	
	BSA	IgG *
Surface with carboxyl group(nude)	1.0	0.4
Surface with hydroxyl group(NHS-activated and ethanolamine-blocked)	1.0	0.6
Anti-IgG immobilized surface(ligand-coated)	1.0	3.5

(*) Relative adsorption capacity of IgG as compound to BSA's (1.0).

3-8. 고정화된 IgG 항체의 재사용 가능성

목적단백질인 IgG의 효과적인 탈착과 자성입자에 고정화된 IgG 항체의 재사용은 자성입자를 이용한 생물분리 기술의 산업화에서 중요한 부분이다. 가장 좋은 탈착수율을 보이는 100 mM glycine (pH 2.3)+1% DMSO 버퍼를 이용하여 IgG를 탈착시킨 뒤, 기사용한 자성입자를 이용하여 IgG의 결합과 탈착을 반복하였다. 자성입자를 8번 반복해서 사용한 후, 활성은 초기 결합력의 70% 정도가 유지되는 것을 알 수 있었다. Kandimalla 등[10]은 Sepharose에 고정화된 EP(ethyl parathion) 항체를 이용하여 고정화된 항체의 재사용 가능성을 실험하였다. 100 mM glycine(pH 2.3)+1% DMSO 버퍼를 이용하였을 때 14~15회까지는 초기 결합력의 70% 이상을 유지하였다. 이것으로 보아 자성입자에 고정화된 항체의 재사용 횟수의 향상이 필요하다.

3-9. 배향성 고정화 수율 비교

자성입자 표면에 항체의 아민기가 배향성 없이 고정화되는 방법과 항체의 탄수화물 부분을 산화시켜 알데하이드로 변화시킨 후 입자표면의 아민기와 고정화시키는 방법, streptavidin을 고정화시킨 자성입자에 biotinylation시킨 항체를 고정화시키는 방법을 각각 이용하였다. 이론적으로 하나의 항체에 반응할 수 있는 항원의 수는 2개인데, Table 3으로부터 알 수 있듯이 비배향성 고정화 방법을 이용하는 경우, 항체 하나에 대하여 반응할 수 있는 항원의 수는 약 0.9개이고 항체의 탄수화물 부분을 이용하여 배향성 고정화를 시킨 경우에는 항체 하나에 대해 약 1.5개로 항원과의 결합력이 약 1.6배 향상되는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 비배향성 고정화 방법의 경우에는 항체 내 라이신의 ϵ -amine을 이용하게 되는데 항체에는 라이신이 많이 존재하기 때문에 다중 결합으로 고정화되는 것은 피할 수 없고, 또 고정화 후 항체의 비배향성에 의해 리간드 항체의 결합력이 감소하게 된다는 연구 결과와 일치하였다[4]. 항체의 탄수화물 부분을 산화시켜서 고정화시키는 경우에는 항체가 비교적 방향성 있게 고정화되기 때문에 활성부위가 바깥 방향으로 노출될 확률이 높아진다. 또, 항체의 탄수화물 부위가 일종의 spacer arm으로 작용하여 입자표면으로부터의 거리를 만들어 주어 항원과의 접근을 용이하게 한다고 유추할 수 있다[11]. 또 다른 방법인 streptavidin과 biotin을 이용하는 방법은 카복실기를 갖는 자성입자 표면에 streptavidin을 공유결합 시킨 뒤, IgG 항체의 탄수화물 부분을 산화

시켜 biotinylation시키고 두 가지를 반응시키는 것이다. 이때 IgG 항체에 결합한 IgG의 수는 항체 하나에 대해 약 1.5개로 항체를 산화시켜 고정화시키는 방법을 이용하는 경우와 거의 같았다 (Table 3). 따라서 항원과의 결합력 측면에서 볼 때, 항체를 산화시켜 고정화시키는 방법과 biotin-streptavidin을 이용한 방법은 비슷한 결과를 나타냈다.

3-10. 이상 혼합물(Binary mixture)에서의 선택적 결합

비배향성 고정화를 이용한 경우와 IgG 항체의 탄수화물 부분을 산화시켜 배향성 고정화시킨 경우, 그리고 streptavidin과 biotin 고정화 방법을 이용하여 IgG 항체를 고정화시킨 자성입자를 IgG와 인슐린의 혼합액에 첨가하였다. Table 4와 같이 비배향성 고정화 경우는 IgG의 약 30%가 결합한 것으로 판단되고, 배향성 고정화와 biotin-streptavidin을 이용한 경우에는 각각 94%, 97%의 IgG가 결합한 것을 알 수 있다. 또한, 고정화된 IgG 항체에 대하여 확인해 보면 배향성을 준 경우와 biotin-streptavidin을 이용한 경우 하나의 항체에 약 1.7개의 항원이 결합하였다. 이는 Table 3에서 제시한 결과와 유사함을 알 수 있다. 불순물인 인슐린이 존재함에도 특이적 결합력은 유지되는 것으로 미루어 볼 때 여러 불순물이 존재하는 용액에서 목적 단백질을 선택적으로 결합 분리해내는데 유용할 것으로 기대된다. 또한, 이러한 결과는 단백질의 배향성 고정화가 비배향성 고정화보다 활성부위와의 접근성이 향상됨으로 인하여 높은 활성을 보여준다는 기존의 연구결과와 일치하는 것을 알 수 있다 [3]. 불순물로 넣어 준 인슐린의 양은 반응 전후의 양에 거의 차이가 없는 것으로 보아, 고정화된 IgG 항체와 IgG만 선택적으로 결합한다는 것을 확인하였다(Fig. 5). 그러나 biotin-streptavidin을 이용한 경우 비특이적 결합을 나타낸다는 보고를 감안할 때 IgG 항체의 탄수화물 부분을 산화시켜 이용한 배향성 고정화 방법이 더욱 효과적이라고 판단된다.

3-11. SPR을 이용한 배향성과 비배향성 IgG 항체 고정화에 따른 결합력 확인

CM5 칩에 amine coupling으로 비배향성 고정화된 IgG 항체는 1,076 RU(428 nM)이 fc 2에, 탄수화물기를 알데하이드기로 산화시켜 CM 5 칩의 아민기와 반응시켜 배향성을 준 경우 1,047 RU (418 nM) 고정화 되었다[12]. 이와 같이 고정화된 IgG 항체에 321.3,

Table 3. Comparison of IgG binding affinity by ligand coupling methods (N=3)

Immobilization Methods	Anti-IgG Immobilization ($\mu\text{g}/\text{mg MP}$)	IgG adsorbed ($\mu\text{g}/\text{mg MP}$)	Binding affinity (the number of IgG/the number of anti-IgG)
Random(amine-coupling)	31.9 \pm 6.9	28.2 \pm 9.5	0.9
Oriented(oxidized carbohydrate coupling)	35.7 \pm 2.9	56.3 \pm 5.8	1.5
Biotin-streptavidin	43.8 \pm 2.7	60.3 \pm 1.7	1.4

Table 4. Comparison of IgG binding affinity from IgG-insulin mixture by ligand coupling methods (N=3)

	Immobilized anti-IgG (μg)	Adsorbed IgG		Ratio of immobilized antibody to bound antigen
		Percentage (%)	Mass (μg)	
Random(amine-coupling)	31.3	29.6	17.8	0.6
Oriented(oxidized carbohydrate coupling)	32.9	94.2	56.5	1.7
Biotin-streptavidin	35.2	96.8	58.1	1.7

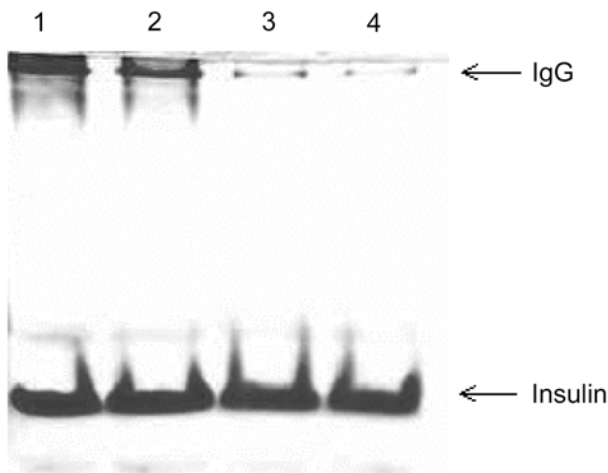


Fig. 5. SDS-PAGE (20% acrylamide gel) analysis. Lane 1: binary mixture sample (0.6 mg/ml IgG and 0.6 mg/ml insulin), lane 2: after reaction by random immobilized anti-IgG, lane 3: after reaction by oriented immobilized anti-IgG, lane 4: after reaction by biotinylated anti-IgG.

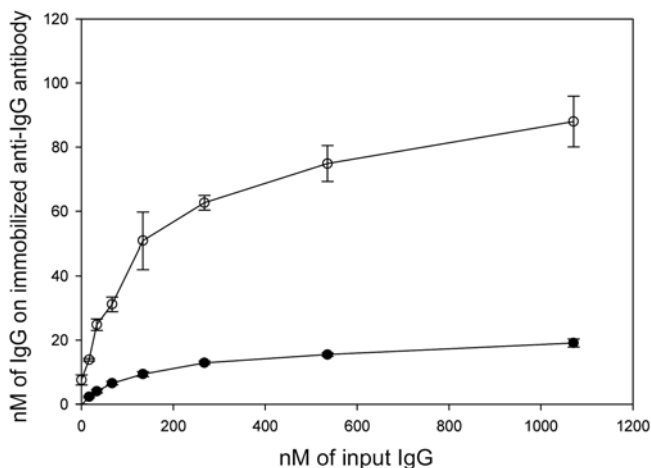


Fig. 6. IgG isotherm to immobilized anti-IgG antibody. Open circle: orientedly immobilized anti-IgG antibody, closed circle: randomly immobilized anti-IgG antibody.

160.7, 80.3, 40.2, 20.1, 10.0, 5.0, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 IgG를 30 $\mu\text{L/min}$ 으로 흘려주어 결합력을 확인하였다. Fig. 6에서 보여주듯이 배향성 고정화된 IgG 항체의 경우 비배향성 고정화된 IgG 항체보다 약 6배 높은 IgG와 반응할 수 있는 것으로 나타났다. 이는 배향성이 있음으로 하여 항원 반응 부위가 비같이 많이 노출되어 더 많은 항원과 결합할 수 있다는 것을 알 수 있다. 또한, 고정화된 IgG 항체와 반응한 IgG의 몰비를 구해 보면, 비배향성의 경우 IgG 항체 하나당 0.04개의 IgG와 반응하는 반면, 배향성의 경우 0.27개의 항원과 반응하는 것을 알 수 있다. 이는 자성입자 실험과는 수치적으로는 많은 차이가 있다. 이는 dextran 층 내에 고정되어있는 항체들이 항원과 만나기 어려워 상대적으로 적은 양의 항원과 결합하는 것으로 사료된다. 하지만, 배향성 고정화시킨 IgG 항체의 경우 비배향성 고정화된 IgG 항체보다 6~7배 더 높은 결합친화력을 보인다는 것을 확인하였다.

4. 결 론

본 실험에서는 자성입자를 이용한 다단계 분리공정에 대한 타당성을 확인하였다. 리간드로 이용한 IgG 항체 고정화 경우 pH 4.5에서 고정화율이 가장 높아서 1 mg당 약 70 μg 의 IgG 항체가 고정화되었다. 단백질의 비배향성 amine-coupling 고정화 방법과 IgG 항체의 탄수화물 부분을 산화시킨 배향성 고정화 방법을 이용하여 비교해보면, 항원 결합 부위와 멀리 떨어져 있는 항체의 탄수화물 부분을 이용하여 고정화시킨 경우 IgG가 비배향성 고정화보다 항원 결합능력이 약 2배 높았다. 불순물인 인간 인슐린이 섞여있는 용액에 IgG 항체를 고정화시킨 자성입자를 넣어 반응시켰을 때 역시 배향성 있게 고정화시킨 경우 IgG와 더욱 높은 결합력을 보였다. 따라서 항체의 탄수화물 부분을 산화시켜 배향성 고정화를 시킨 경우 항원과의 결합능력, 공정의 단순성 측면에서 효과적이었다. 이 결과를 SPR을 이용하여 항원 항체 간 결합력을 비교하여 확인하였다. 간단한 산화반응에 의해 리간드 항체를 배향성 고정화시켜 항원 결합력을 향상시키는 방법은 고성능 생물분리공정으로의 응용가능성 뿐 아니라 약물 표적전달, 바이오칩 분야로의 응용에도 가능할 것으로 판단된다.

감 사

본 과제(결과물)는 교육인적자원부, 산업자원부, 노동부의 지원으로 수행중인 최우수실험실 지원사업(‘차세대 바이오의약 생산을 위한 생물인식공학 기술개발’)의 연구결과입니다. 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Hubbuck, J. J. and Owen, R. T. T., High-gradient magnetic Affinity Separation of Trypsin from Porcine Pancreatin, *Biotechnol. Bioeng.*, **79**, 301-313(2002).
- Yoo, E. M., Chintalacharuvu, K. R. and Penichet, M. L., “Myeloma Expression System,” *J. Immunol. Methods*, **261**, 1-20(2002).
- Turkova, J., “Orient Immobilization of Biologically Active Proteins as a Tool for Revealing Protein Interactions and Function,” *J. Chromatogra. B*, **722**, 11-31(1999).
- Wimalasena, R. L. and Wilson G. S., “Factor Affecting the Specific Activity of Immobilized Antibodies and Their Biological Active Fragments,” *J. Chromatogra.*, **572**, 85-102(1991).
- Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, pp.115, Academic press, New York, USA(1996).
- Bilkoà, Z., Mazurovã, J. C., Horãk, D. and Turkovã, J., “Oriented Immobilization of Chymotrypsin by Use for Suitable Antibodies Coupled to a Nonporous Solid Support,” *J. Chromatogra. A*, **852**, 141-149(1999).
- Babashak, J. V. and Phillips, T. M., “Use of Avidin-coated Glass Beads as a Support for High-performance Immunoaffinity Chromatography,” *J. Chromatogra.*, **444**, 21-28(1998).
- Abudiab, T. and Jr. Beitle, R. R., “Preparation of Magnetic Immobilized Metal Affinity Separation Media and its Use in the Isolation of Protein,” *J. Chromatogra. A*, **795**, 211-217(1998).
- Peng, Z. G., Hidajat, K. and Uddin, M. S., “Adsorption of Bovine Serum Albumin on Nanosized Magnetic particles,” *J. Colloid Interface Sci.*, **271**, 277-283(2004).

10. Kandimalla, V. B., Neeta, N. S., Karanth, N. G., Thakur, M. S., Roshini, K. R., Rani, B. E. A., Pasha, A. and Karanth, N. G. K., "Regeneration of Ethyl Parathion Antibodies for Repeated use in Immnosensor: a Study on Dissociatin of Antigens from Antibodies," *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 903-906(2004).
11. Orthner, C. L., Highsmith, F. A. and Tharakan, J., "Comparison of the Performance of Immunosorbents Prepared by Site-directed of Random Coupling of Monoclonal Antibodies," *J. Chromatogra.*, **558**, 55-70(1991).
12. Nelson, R. W., Nedelkov, D. and Tubbs, K. A., "BIACORE and Mass Spectrometry: Identification of Epitope-tagged Proteins in *E. coli* Lysates," *BIAjournal*, **7**, 25-26(2000).