J. Fd Hyg. Safety 18(1), 25–29 (2003)

Listeria spp. p60 단백질에 대한 단일클론항체의 생산

임희영[1] · 오연경[1] · 김종수[1] · 이영순[2] · 임윤규[3] · 윤병수[†1]
[1]경기대학교 자연과학부 생물학과 유전학실험실
[2]서울대학교 수의과대학 공중보건학실험실
[3]제주대학교 수의과대학 공중보건학실험실

Production of Monoclonal Antibody for *Listeria* spp. p60 Protein Based on *iap* Gene

Hee-Young Lim[1], Youn-Kyoung Oh[1], Jong-Soo Kim[1], Yong-Soon Lee[2], Yoon-Kyu Lim[3], and Byoung-Su Yoon[†1]
[1]*Department of Biology, College of Natural Sciences, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea*
[2]*College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea*
[3]*College of Veterinary Medicine, Cheju National University, Chejudo 690-756, Korea*

ABSTRACT – The p60 protein of *Listeria* spp. is a *Listeria*-Genus-specific, major extra-cellular protein, which is used as an indicator protein for the detection of these bacteria from contaminated foods. In this study, p60 protein were recombinantly produced in *E. coli* and were purified using amylose resin based column chromatography. Purified recombinant-p60 was used to generate monoclonal antibody against native p60. Antibody from hybridoma cell line, 1H4, specificically reacted with native p60 protein isolated from pathogenic *Listeria* spp. such as *L. monocytogenes, L. ivanovii, L. welshimeri* II, but did not or relatively weakly reacted with non-pathogenic *Listeia* species, *L. innocua* or other bacterial proteins. Antibody from 1H4 was produced using ascites fluid method and it may be useful to develop the *Listeria*-detection kits based on immunological method.

Key words: *Listeria* spp., p60 protein. hybridoma cell, pathogenic

리스테리아증은 매년 미국에서만 2500건이 보고되고 있으며 500명 이상의 사망자를 야기시키는 매우 위험한 식품유래전염병으로 그람 양성, 비아포형성의 통성혐기성 간균인 *Listeria monocytogenes*에 의하여 전염된다(Finlay, B., 2001). 분류학적으로 리스테리아속에는 6개 이상의 종이 포함되어 있으며, 이중 병원성 세균은 인수공통병원균인 *L. monocytogenes*, 주로 가축의 낙태를 야기시키는 *L. ivanovii* 2개 종이며, 근래 비병원성 세균인 *L. welshimeri*와 가장 유사하나 병원성세균인 *L. welshimeri* II가 보고되었다(Bubert *et al.*, 1999).

*Listeria*속 고유의 단백질인 p60 단백질은 iap(invasion associated protein) 유전자에 암호화되어 있으며(Köeler *et al.*, 1991), 세균의 성장 중 배지로 분비되는 체외 단백질이다. 이 *Listeria* 6종의 *iap* 유전자의 염기서열은 종마다 서로 다르며, 일반적으로 속 공통의 반복서열이 있으며, 또한 종 특이의 서열부위를 가지고 있다(Bubert *et al.*, 1992). p60단백질은 세균의 세포벽을 분해하는 murein hydrolase의 기능이 알려져 있었으며, 근래 host-membrane binding protein의 기능도 있음이 밝혀졌다(Park *et al.*, 2000).

리스테리아의 식품검사에서 p60단백질이 주목되는 이유는, 이 단백질이 체외에 분비되는 리스테리아 고유의 단백질이라는 점과 단백질내의 종 특이 아미노산서열에 따라 세균의 종동정(species-identification), 특히 인체에 대한 강력한 병원균인 *L. monocytogenes*의 오염여부를 쉽게 판단할 수 있을 것이라는 기대 때문이다. 국내에서도 식품에서 *L. monocytogenes*의 발견은 그 오염된 식품의 전량폐기를 의미하기에, 우리의 환경에서 가장 많이 발견되는 리스테리아균인 *L. innocua*와의 구분은 경제적으로도 매우 중요한 의미를 가진다. 현재 *Listeria*의 검사에서 *L. monocytogenes*의 오염여부를 확실히 할 수 있는 종동정은 *iap* 유전자의 염기서열에 근거한 PCR방법이 가장 유력하며(Bubert *et al.*, 1999; Yoon *et al.*, 1995; 석주명 등, 1998), 면역학적 방법을 이용하는 기타 상용화된 키트들은 종동정의 정확성이 상대적으로 매우 낮은 것으로 조사되고 있다. 면역학적 방법에 의

[†]Author to whom correspondence should be addressed.

한 ELISA 및 immunochromatography방법으로 리스테리아의 종동정이 부정확한 주된 이유는 사용되고 있는 항체가 종동정을 가능하게 할 정도의 특이성을 갖추지 못한 것이며, 이는 p60단백질의 종특이성을 이용함으로써 극복될 수 있을 것으로 기대되고 있다.

따라서, 본 연구는 병원성 *Listeria* spp.의 iap 유전자에 근거하여 재조합 DNA 방법으로 생산된 recombinant-p60단백질을 항원으로 정제하여 병원성 *Listeria* spp.에서 분비되는 p60단백질을 검출할 수 있는 고 특이성의 단클론항체를 개발하고 이를 식품검사에서 종동정이 가능한 면역학적 방법에 이용하고자 하였다.

실험재료 및 방법

실험 재료

병원성 *Listeria* spp.인 *L. monocytogenes, L. ivanovii, L. welshimeri* II 균주와 그 외의 비병원성 리스테리아 표준균주들은 독일 Wuerzburg university에서 분양받아 사용하였으며, cloning vector pGEM 3zf(+)와 PCR 반응에 사용한 모든 시약들은 Promega(Madison, WI,USA)에서 구입하였다. PCR 반응은 Perkin Elmer GeneAmp PCR system 9600에서 이루어졌으며, MBP-p60 융합단백질의 정제를 위한 amlyose resin은 New England Biolabs(Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. Western blot시 사용한 membrane과 관련 시약들은 Nalgene brand product(USA)와 Millipore (USA), Roche Molecular Biochemicals(Mannheim, Germany)에서 구입하였다. 항체제작을 위한 모든 세포배양 배지와 기구들은 GIBCO BRL(U.S.A.), Roche Molecular BioChemicals (Germany)에서 구입하였다.

Affinity chromatography를 이용한 MBP-p60 융합단백질의 정제

재조합 DNA의 제작 및 항원단백질의 생산은 Choi 등(2001) 및 Lim 등(2002) 의 방법을 따랐으며, 이를 간략히 기술하면: 병원성 균주인 *L. welshimeri* II의 chromosomal DNA를 주형으로 PCR을 수행하여 동 균주 유래의 *iap* 유전자를 확보하였으며, 이를 pMAL-c2 vector에 삽입하여 *E. coli* DH5α에 형질전환시켰다. 0.5 mM IPTG에 의해 유도, 생산된 recombinant p60은 MBP(Maltose binding protein)과 융합단백질인 MBP-p60의 형태로 생산되었으며, cell lysate로부터 amylose resin based affinity chromatography의 방법으로 정제하였다. 최적의 발현유도 및 배양조건에서 500 ml의 배양액 당 2 mg의 정제된 MBP-p60 융합단백질을 얻었다. 정제된 단백질은 SDS-PAGE로 확인하였다.

MBP-p60 융합단백질의 immunization

정제된 MBP-p60 단백질과 Freund's adjuvant mixture를 혼합하여 1회, 1 mouse당 10~20 μg을 항원단백질을 함유한 250 μl emulsion를 복강주사하였다. 생후 6~8주령의 Balb/C (♀)의 mouse를 총 6주간 immunization하였으며, 주사는 2주 간격으로, 채혈은 antigen 주입후 3~4일 후에 mouse의 꼬리에서 취하였으며, 얻은 혈청으로 antibody titer를 측정하였다. 약 6주 후, antibody titer가 최고치를 나타낸 것을 확인하고, mouse의 꼬리에 3일간의 booster 주사를 수행하였다.

Hybridoma cell 제작을 위한 세포융합

Booster가 끝난 mouse의 spleen을 Washing media(0.01 M HEPES in DMEM)에서 세척하고 mesh로 조직을 갈아 FBS를 이용한 gradient로 조직과 cell들을 분리하였다. B cell과 myeloma cell(SP2/0)을 Washing media로 각각 4회 washing하였으며, Washing이 끝난 두 세포는 PEG(Polyethylene Glycerol) 1500를 이용하여 5분 30초간 세포융합을 실시하였다. 융합 후 한번의 세척을 수행하고, 1×HAT (Hypoxanthin-Aminopterine-Thymidine) media에 부유하였고, 96-well flat bottom plate에 200 μl씩 분주하였다.

Western과 ELISA를 통한 Anti-MBP/p60 IgG를 생산하는 hybridoma cell의 선별

세포융합된 세포들은 약 24시간 간격으로 10일간 HAT media를 교환하여 주었으며, 10일 후 HT(Hypoxanthin-Thymidine) media로 바꿔주었다. colony가 형성된 well의 상등액을 희석하여 재조합 p60단백질을 항원으로한 1차 선별 ELISA를 수행하였다. 선별된 hybridoma cell들은 24-well plate에 옮겨져 배양하였으며, 이차 선별은 병원성균주를 포함한 각 *Listeria* spp.의 배양 상등액을 사용하였다. ELISA방법을 간략히 기술하면; 96-well plate에 coating Buffer(Carbonate-bicarbonate, pH 9.6)로 희석시킨 항원단백질 용액을 50 μl/well씩 가하고 4°C에서 16시간 배양, 또는 37°C에서 4시간 배양 후, 용액을 흡입 제거하고 blocking solution(0.1% BSA-PBS) 100 μl를 각 well에 가하여 1시간, 4°C 배양하였다. blocking solution을 제거하고, PBS(Phosphate-Buffer Saline, pH 7.2) 용액으로 3번 세척한 후, Hybridoma 배양 상등액 또는 mouse 혈청을 PBST(PBS-0.05% Tween20)로 희석하여 50 μl를 한 well에 가하고 상온에서 30분간 정치하고, 제거하였으며, PBS용액으로 3회 세척하였다. HRPO(Horse-Radish-Peroxidase) conjugated anti-mouse IgG를 PBST로 1/10,000희석한 용액 50 μl를 각 well에 가한 후, 이를 상온에서 30분간 반응시켰으며, 용액을 제거후, PBS용액으로 3회 세척하였다. 0.04% OPD(o-

Phenylenediamine) 기질용액을 well 당 50 μl를 넣고 상온에서 15~30분 반응시켰으며, 2.5N H_2SO_4 50 μl로 반응을 정지시키었다. 발색된 정도는 492 nm에서 흡광도로 측정하였다. 최종 선별 후, 병원성 *Listeria* 균주들과 강한 항체반응을 보인 세포주는 마우스 복강에 주사하여 ascites fluid생산에 사용되었다.

Western blotting은 SDS-PAGE를 통해 분리된 재조합 p60 단백질을 PVDF membrane에 blotting하여 3% Skim-milk로 blocking하고 MBP-p60/welII에 대한 항체를 생성하는 hybridoma의 상청액을 희석하여 가하고 상온에서 30분간 약하게 진탕하여 반응시켰다. Secondary antibody 반응은 anti-mouse IgG를 희석하여 사용하였으며, DAB solution을 사용하여 발색하였다.

결과 및 고찰

iap 유전자의 expression 및 MBP-p60 단백질의 purification

PCR을 통해 증폭된 *L. welshimeri* II의 *iap* 유전자는 1.57 kbp의 크기였으며, pMAL-c2 vector에 삽입되었다. 지수성장기에 이른 대장균 배양액에 0.3 mM IPTG를 첨가하여 4시간 추가 배양함으로 재조합 MBP-p60 단백질의 발현을 유도하였다. 발현된 MBP-p60 단백질은 12% SDS-PAGE에서 확인하였으며, amylose resin을 사용한 affinity chromatography를 통해 MBP-p60 단백질만을 정제하였다(Fig. 1).

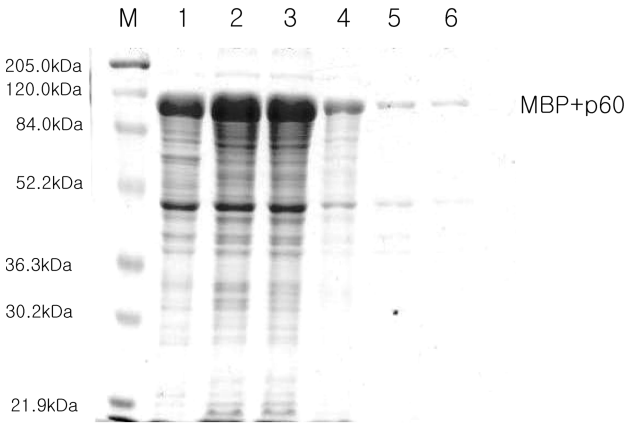

Fig. 1. Purification of recombinant MBP-p60 protein by affinity chromatography.
The 12% SDS-polyacrylamide gel shows the result of the purification using amylose resins. Lane M is molecular weight markers of protein, Lane 1 is total lysate pMAL-iap/wellI. Lane 2 is supernatant of total lysate pMAL-iap/wellI. Lane 3 is MBP-p60/wellI protein after first washing. Lane 4 is purified MBP-p60/wellI protein. MBP+p60 indicate the position of the induced recombinant protein

ELISA 방법에 의한 Anti-MBP/p60 IgG를 생산하는 hybridoma cell의 선별

세포융합시킨 세포들은 HAT배지에 의하여 hybridoma를 선별하였으며, 각 클론의 배양상등액을 recombinant p60단백질을 항원으로 한 ELISA결과로써 일차선발을 수행하였다. 또한 선별된 클론을 대상으로 병원성 균주인 *Listeria monocytogene*의 배지 상등액을 항원으로한 ELISA결과로써 클론의 2차선발을 수행하였으며 항체역가를 검사하여 유용한 hybridoma를 3차선발하였다. 2차선발된 7개의 hybridoma cells중 1H4, 1E9, 1G7 세 종류의 hybridoma cells이 재조합 p60 단백질에 대해 가장 높은 항체역가를 보였으며, 최종 선발된 1H4는 ascites fluid 생산에 사용되었다(Fig. 2). 1H4의 ascites fluid는 1/10,000의 희석에서도 *Listeria monocytogenes* 배양액의 검출을 수행할 수 있었다.

Hybridoma 상등액을 이용한 재조합 p60 단백질의 Western detection

iap 유전자를 각 *Listeria*균주에서 확보한 후, 각기 제작한 재조합체 pMAL-iap/mono, pMAL-iap/welII, pMAL-iap/wel, pMAL-iap/iva, pMAL-iap/ino는 각기 *L. monocytogenes, L. welshimeri* II, *L. weshimeri, L. ivanovii, L. innocua*에서 얻어진 *iap* 유전자를 융합단백질 발현벡터인 pMAL-c2에 재조합시킨 것이다. 이들을 가진 대장균에서 각기 발현 및 정제한 각 recombinant p60들을 1H4 hybridoma cell line의 항체와 western blot하여 denaturted p60단백질과의 반응성을 조사하였다(Fig. 3). 결과로 pMAL-c2를 발현시킨 MBP-β-gal-α에 대하여 항체 1H4는 전혀 반응하지 않았으며,

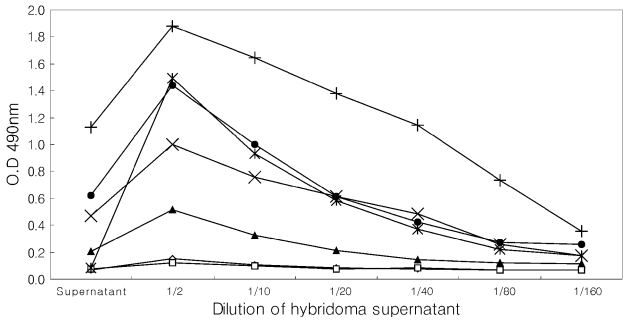

Fig. 2. Comparison of selected hybridomas using ELISA titration of hybridoma supernatant.
In order to evaluate the intensity of monoclonal antibody,

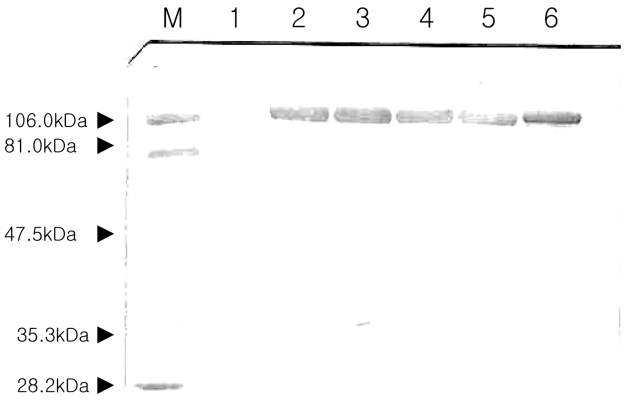

Fig. 3. Western blot analysis of recombinant p60s expressed in *E. coli* using hybridoma cell line 1H4.
Total cell lysate were separated in a 12% SDS-PAGE and stained Coomassie Brilliant Blue. Equal amount of sample corresponding to 10 μl of the original culture were loaded in all the lanes. Total cell lysate of MBP-p60 protein for *Listeria* spp. was immunoblotted using monoclonal antibody (1H4). Lane M is molecular weight marker , Lane 1 is total lysate of induced pMAL-c2 cells; Lane 2, total lysate of pMAL-iap/mono; Lane 3, pMAL-iap/wellI; Lane 4, pMAL-iap/iva; Lane 5, pMAL-iap/wel; Lane 6, pMAL-iap/ino.

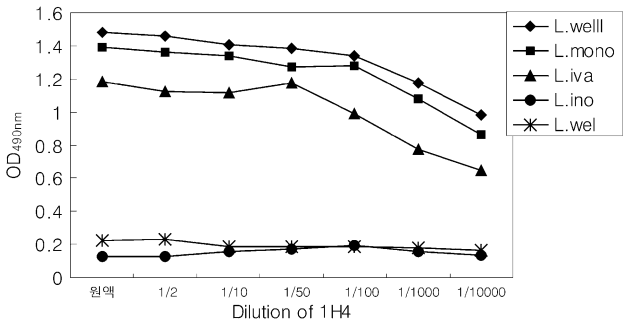

Fig. 4. ELISA using antibody from 1H4 clone with different native p60 proteins.
The reagents used for ELISA titration were as follows : antigen, p60 protein of *Listeria* spp.), were diluted 1/20 with carbonate-bicarbonate (pH 9.6), hybridoma serum (1H4) was diluted with PBST (original, 1/2, 1/10, 1/50, 1/100, 1/1000, 1/10000), secondary antibody, anti-mouse IgG-HPRO, was diluted 1: 10000 with PBST, substrate was 0.04% OPD+0.012% hydrogen peroxide. – ◆ –, *L. welshimeri* II; – ■ –, *L. monocytogenes*; – ▲ –, *L. ivanovii*; –*–, *L. innocua* sv6b; – ● –, *L. welshimeri*.

Listeria spp. 4개의 clone에서 과발현된 MBP-p60 단백질에 대하여는 특이한 항체반응을 보였다. 또한 대장균의 모든 단백질에 대하여 특이한 반응성이 발견되지 못하였다. 각 재조합 리스테리아 p60 단백질 항원에 대하여 1H4 항체의 항체 결합반응의 강도는 약간 차이만이 관찰되었다.

1H4 항체의 각 *Listeria* spp.에서 분리된 p60단백질들에 대한 반응특이성

Hybridoma cell line 1H4의 acsites fluid를 이용하여 각 *Listeria* spp.(*L. monocytogenes, L. ivanovii, L. innocua sv6b, L. welshimeri II, L. welshimeri*)의 p60단백질에 대한 반응특이성을 조사하였다. 각 균주를 BHI배지에서 배양한 후, 그 상등액을 ELISA plate에 coating하고, 1H4 clone에서 얻어진 acsites fluid로 ELISA를 수행하였다. 각 균주의 native p60에 대한 항체반응은 Western blot의 결과(Fig. 3)과는 상이하게 병원성 *Listeria* species인 *L. monocytogenes, L. welshimeri II, L. ivanovii*의 p60 단백질과 강한 반응성을 보였으며, 비병원성 균주인 *L. innocua*에 대하여 상대적으로 가장 낮은 반응성을 나타내었다(Fig. 4).

이 결과는 본 연구에 의해 생산된 1H4 항체가 저농도의 비율로 병원성/비병원성 *Listeria* spp.를 구분하여 검출할 수 있으리라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림기술개발사업과제(MAF-SGRP 198043-3)의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 저자들은 연구비 지원에 감사드리는 바이다.

국문요약

리스테리아의 p60 단백질은 *Listeria*속 고유의 단백질로써, 주요 세포외 단백질이기에, 식품에서 이 세균의 존재를 밝혀주는 중요한 지시단백질로 사용된다. 본 연구는 재조합 DNA 방법으로 재조합-p60 단백질을 대장균에서 생산하였으며, 아밀로오스 컬럼 크로마토그라피의 방법으로 정제하여, *Listeria* spp.의 p60에 특이적 항체를 생산하는

단일클론을 선별하였다. 생산된 항p60항체 1H4는 병원성 *Listeria* 균주인 *L. monocytogenes, L. ivanovii, L. welshi meri* II에 특이적으로 강한 항체반응을 보였으며, *Listeria*속의 비병원성균인 *L. innocua* 등과는 상대적으로 매우 약한 항체반응을 보였으며, 타 세균의 단백질과는 거의 반응하지 않았다. 1H4항체는 복수생산법에 의해 대량생산되었으며, 이 항체의 특이성은 면역학적 방법에 의한 리스테리아 검출키트의 개발에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Ju-Myoung Suk, Ho-Jo Kang, and Won-Geun Son: Direct Detection of *Listeria monocytogenes* in Chickens by Polymerase Chain Reaction. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth*., **22**, 207-214 (1998).
2. Yoon, B. S., Bubert, A. and Goebel, W.: Rapid detection and application of the *Listeria* species by polymerase chain reaction (PCR) tools. *Federation meeting of Korean basic medical scientists*. **3**, 409-412 (1995).
3. Bubert, A., Kohler, S. and Goebel, W.: The Homologous and Heterologous Regions within the *iap* Gene Allow Genus and Species-Specific Identification of *Listeria* spp. by Polymerase Chain Reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2625-2632 (1992).
4. Bubert, A., Hein, I., Rauch, M., Lehner, A., Yoon, B. S., Goebel, W., and Wagner, M.: Detection and differentiation of Listeria spp. by a single reaction based on multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4688-4692 (1999).
5. Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. and Cimi, G.: A PCR-microplate capture hybridization method to detect *Listeria monocytogenes* in blood. *Molecular and Cellular Probes*, **11**, 453-455 (1997).
6. Choi, Y. H., Han, S. H., Lee, Y. S., Lim, Y. K., Lim, I. K., and Yoon, B. S.: Expression and purification of *Listeria innocua* Sv6b p60 invasion associated protein. *Biotechnology letters*. **23**, 1669-1673 (2001).
7. Finlay, B. B.: Cracking Listeria's password. *Science*. **292**, 1666-1667 (2001).
8. Hering, T. M., Kollar, J., Huynh, T. D. and Varelas, J. B.: Purification and characterization of decorin core protein expressed in *Escherichia coli* as a maltose--binding protein fusion. *Analyt. Biochem*., **240**, 98-108 (1996).
9. Maina, C. V., Riggs, P. D., Grandea, A. G, Slatko, B. E., Moran, L. S., Tagliamonte, J. A., McReynolds, L. A. and di Guan, C.: An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to, and separation from maltose binding protein. *Gene*, **74**, 365-373 (1988).
10. Park, J. H., Choi, E. A., Cho, E. W., Hahm, K. S. and Kim, K. L.: Maltoes binding protein (MBP) fusion proteins with low or no affinity to amylose resins can be single-step purified using a novel anti-MBP monoclonal antibody. *Mol. cells*, **8**, 709-716 (1998).
11. Rijpens, N. P., Jannes, G., Asbroeck, M. V., Herman, L. M. F. and Rossau, R.: Simultaneous detection of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* by reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Molecular and Cellular Probes*, **9**, 423-432 (1995).
12. Park, J. H., Lee, Y. S., Lim, Y. K., Kwon, S. H., Lee, C. U. and Yoon, B. S.: Specific binding of recombinant *Listeria monocytogenes* p60 protein to Caco-2 cells. *FEMS Microbiology Letters* **186**, 35-40 (2000).
13. Lim, H. Y., Lee, Y. S., Lim, Y. K., Kang, K. S. and Yoon, B. S.: Molecular cloning and Expression of MBP-p60 proteins of pathogenic *Listeria* species. *Biotechnology letters* (Submitted) (2002).