

## DDT 면역 분석법을 위한 헵텐 합성과 단일클론항체 생산 및 코팅리간드 구조에 따른 항체 친화력에 대한 연구

홍지연\* · 김종현\* · 박송자 · 최명자

한국과학기술연구원 생체대사연구센터

\*서울여자대학교 화학과

### Affinity Study of DDT Monoclonal Antibodies: Influence of Hapten Structure and Coating Ligand

Ji Youn Hong\*, Jong-Hyun Kim\*, Song-Ja Park and Myung Ja Choi

Bioanalysis & Biotransformation Research Center, Korea Institute of Science & Technology

Sungbuk-gu, Hawologok-dong 39-1, Seoul 136-791, Korea

\*Department of Chemistry, Seoul Women's University Nowon-gu, Kongnung 2 dong 126, Seoul, 139-774, Korea

For development of immunoassay of *p,p*-DDT (4,4-dichlorodiphenyl-2,2,2-trichloroethane), synthesized were five derivatives of DDT haptens (DDA, DDHP, DDCP, DDHH, DDHHAP) that had a similar structure with DDT but a different length of linkers. Among these hapten derivatives, DDA (2,2-Bis(4-chlorophenyl)acetic acid), DDHP (5,5-Bis(4-chlorophenyl)-5-hydroxypentanoic acid) and DDCP (5,5-Bis(4-chlorophenyl)-5-chloropentanoic acid) were conjugated with keyhole limpet hemocyanin for the use as immunogen. Fifteen clones of monoclonal antibodies were produced from hybridoma fused between mouse spleen cell and myeloma cell. DDHH (6,6-Bis(4-chlorophenyl)-6-hydroxyhexanoic acid) and DDHHAP (3-[6,6-Bis(4-chlorophenyl)-6-hydroxyhexanoylamino]propanoic acid) in addition to DDA, DDHP and DDCP were conjugated to ovalbumin and bovine serum albumin for the use of coating ligands. As a result of affinity screening for fifteen monoclonal antibodies to ten coating ligands, the affinities were greatly influenced by structural similarities between DDT and its haptens, and steric hindrance of carrier proteins. Therefore, antibody affinity should be considered as a dependent characteristics by various coating ligands which were a complex of hapten derivative and carrier protein. Also, a proper affinity between antibody and DDT coating ligand was required to obtain a good DDT dose-response curve.

**Key words:** ELISA, DDT, monoclonal antibody, hapten synthesis

### 1. 서 론

DDT(dichloro diphenyl trichloroethane)는 1974년에 실험실에서 최초로 만들어진 유기합성 살충제로서, 맛이나 냄새가 없으며 물에 녹지 않고 지질에 잘 녹는 백색 가루이다. DDT는 빛이나 산화에 강하여 자연계에서는 잘 분해되지 않으므로, 살포된 DDT는 땅이나 물, 공기 중에서 오랜 기간 잔존하며, 조류에서 대형 동물에 이르기까지 먹이연쇄를 거쳐 농축된다.<sup>1-3)</sup> 또한 지질에 용해되는 특성 때문에 인체에 들어오면 부신, 고환, 갑상선에 대량 축적되며, 신경계에 영향을 끼친다.<sup>4)</sup> 따

라서, 1970년대부터 미국을 비롯하여 개발국가에서 DDT의 사용이 금지되었다. 그러나, 아프리카에서는 말라리아로 연간 2억 7천만 명이 죽어가고 있으므로, 1940년대 이래 지금까지 말라리아 예방을 위한 모기 박멸을 위하여 저렴한 비용과 최고의 효과를 가지고 있는 살충제인 DDT의 사용이 불가피한 실정이다.<sup>5-7)</sup>

DDT는 포유류를 비롯하여 인체에 흡수된 후 체내에서 분해되어 dichlorodiphenyl acetic acid(DDA)로 전환되어 뇨시료에서 검출되며, 자연계에서는 DDE 및 DDD로 분해된다. DDT와 그 유도체를 분석하는 일반적인 방법은 GC/MS<sup>8,9)</sup>이나 이 방법은 시료를 정제해

야 하며, 기기조작의 복잡성이 있다. 이에 반하여, Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)는 시료의 정제 없이 소량의 시료로 높은 감도, 낮은 비용으로 신속하게 환경시료를 분석하기에 매우 적합하다.<sup>10)</sup>

이 논문은 DDT와 그 유도체를 검출하기 위한 competitive ELISA 방법에 관한 것이다. DDT와 유사 구조를 갖는 10종류의 코팅리간드를 합성하여 DDT 면역항체와의 친화력 연구를 통하여, 검출 감도와 코팅리간드 구조와의 상관관계를 연구하였다.

다섯 종류의 DDT 유도체인 헵텐을 합성한 후, 이 중 세 종류의 헵텐(DDA, DDHP, DDCP)에 KLH를 접합하여 mice에 각각 면역 주사하여 15종류의 단일클론항체를 얻었다. 또한 다섯 종류의 헵텐에 두 종류의 운반단백질(OVA, BSA)을 각각 결합시켜 만든 10종류의 코팅리간드에 대하여 각각의 면역항체의 친화력을 스크리닝하였다. Competitive ELISA에서 중요한 점은 우선 면역항체에 대한 친화력이 큰 코팅리간드를 선별한 후, 면역 항체<sup>11)</sup>에 대한 분석 시료와 코팅리간드 사이에 적당한 경쟁반응이 있는지 결정해야 한다. 즉, 헵텐 디자인<sup>12-14)</sup>시 분석 시료와 유사한 화학적 구조를 가지면서, 면역 항체의 접근이 용이할 수 있도록 3차원적인 입체구조를 고려해야 한다. 헵텐의 항원 결정기(epitope)와 운반단백질간의 결합 길이를 달리하여 면역항체를 스크리닝한 후, 헵텐의 구조와 결합길이와의 상관 관계에 대하여 연구하였다. 또한 DDT에 대한 좋은 반응성을 보이는 항체와 코팅리간드의 최적 결합쌍에서 코팅리간드의 항체에 대한 친화력과의 관계를 연구하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약 및 기기

Bovine serum albumin(BSA), ovalbumin(OVA), keyhole limpet hemocyanide(KLH)는 Pierce Chemical Co.(Rockford, IL., USA)에서 구입하였고, Silica gel 및 TLC plate(Art. 13895, PSC-Fertigplatten Kieselgel 60 F254)는 Merk (Darmstadt, Germany) 제품을 사용하였다. Column chromatography용 용매는 A.C.S급을 사용하였고, 반응 유기용매 및 모든 chemical은 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis, MO., U.S.A.)의 제품을 사용하였으며, peroxidase conjugated anti-mouse IgG는 Organon Teknika-Capel(Durham, NC., U.S.A)에서 구입하였다. 모든 완충용액은 Milli-Q water system

**Table 1.** Chemical structures of DDT analytes and the haptens prepared

	X	R
DDT	H	CCl <sub>3</sub>
DDA	H	COOH
DDHP	OH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH
DDCP	Cl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH
DDHH	OH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH
DDHHAP	OH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CONHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH

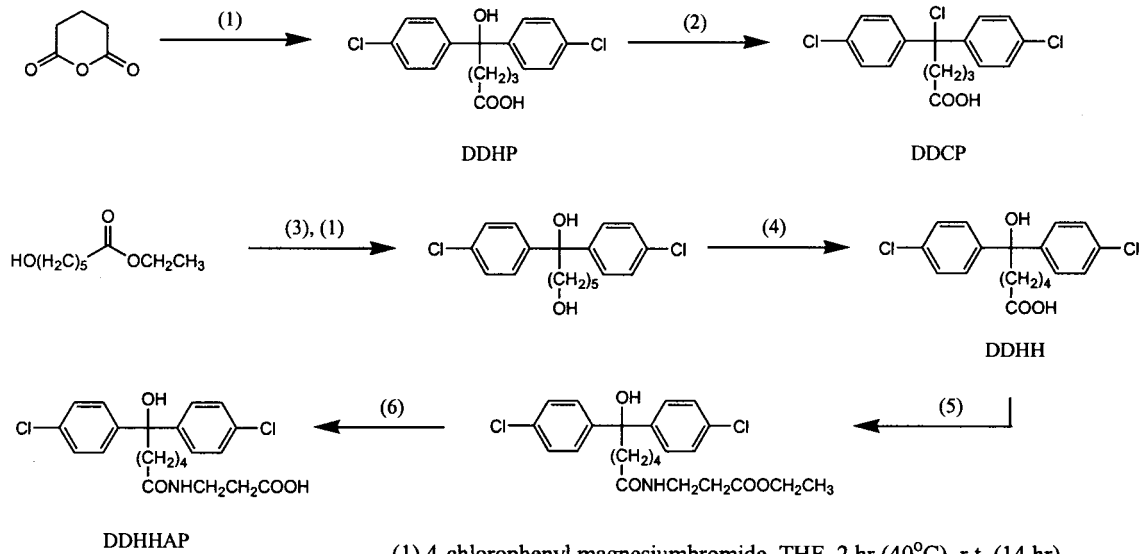
(Millipore Inc., MA, USA)을 사용하여 정제된 탈이온수를 사용하였다. Microwell module(maxisorp)는 Nunc (Denmark) 제품을 사용하였으며, ELISA 실험의 세척 조 작은 Microplate washer(8441 02, Tri-Continent Inc., UK)를 사용하였고, 흡광도는 Kinetic Microplate reader(molecular devices, Inc., CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

### 2.2. 헵텐의 제조

DDT 및 헵텐의 구조는 Table 1.에, 그 제조방법은 Scheme 1.에 나타내었으며 실험 방법은 아래와 같다.

2,2-Bis(4-chlorophenyl)acetic acid(DDA: DDA는 *p,p*-DDT로부터 Grummitt *et al.*(1946)<sup>15)</sup>의 방법에 의하여 제조하였다. <sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.31(d, J=8.58Hz, 4H, ArH) 7.23(d, J=8.52Hz, 4H, ArH) 4.99(s, 1H, ArCH)

5,5-Bis(4-chlorophenyl)-5-hydroxypentanoic acid (DDHP): DDHP는 Abad *et al.*(1997)<sup>13)</sup>의 방법에 기초하여 제조하였다. 요약하면, Glutaric anhydride(2 g, 17.5 mmol)를 질소하에서 무수 THF에 완전히 녹을 때까지 40°C에서 교반하였다. 이 용액에 4-chlorophenylmagnesium bromide(70.0 mmol of a 1 M ether solution)를 천천히 첨가하여 40°C에서 3시간 동안 교반한 후 실온으로 냉각하여 14시간동안 교반하였다. 이 반응 혼합물에 ammonium chloride 포화용액(30 mL)을 붓고, 수용액 층을 ether로 씻어준 후 1 M HCl로 산성화하였다. 불용성 물질을 여과한 후 수용액 층을 ether(2×30 mL)로 추출하였다. 유기층을 증류수로 씻어 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조하였다. 용매를 증류한 후 column chromatography(Ethyl acetate:n-Hexane, 1:5)에 의하여 노란색의 오일 생성물 DDHP(0.41 g, 14%)를 얻었다. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.31(m, 8H, ArH) 2.40(t, J=6.93, 2H, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H) 2.28(m, 2H,



- (1) 4-chlorophenyl magnesiumbromide, THF, 2 hr (40°C), r.t. (14 hr)
- (2) Acethyl chloride, 20 hr, reflux
- (3) *t*-buthyldimethylsilylchloride, imidazole, DMF, 6 hr, r.t.
- (4) PDC, DMF, 20 hr, r.t.
- (5)  $\beta$ -alanine ethylester hydrochloride, EDC, Et<sub>3</sub>N, THF, 12 hr, 50 °C
- (6) LiOH, THF/H<sub>2</sub>O 12 hr, r.t.

Scheme 1. Synthesis of Haptens.

C(OH)CH<sub>2</sub>) 1.61(m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)

5,5-Bis(4-chlorophenyl)-5-chloropentanoic acid (DDCP): Acetyl chloride(3 mL)에 5,5-Bis(4-chlorophenyl)-5-hydroxypentanoic acid(0.1 g, 0.29 mmol)를 녹인 용액을 20시간동안 환류 교반 한 후 용매를 증류하였다. Plate thin layer chromatography(Ethyl acetate:n-Hexane, 1:5)에 의하여 흡습성 고체 DDCP (0.069 g, 66%)를 얻었다. <sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.31(m, 8H, ArH) 2.40(t, J=6.93, 2H, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H) 2.35(m, 2H, C(Cl)CH<sub>2</sub>) 1.61(m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); GC/MS (m/z): 358 (M+2)

Ethyl 6-(1,1,2,2-tetramethyl-1-silapropoxy) hexanoate (1): Ethyl-6-hydroxyhexanoate(1.0 g, 6.05 mmol)과 Imidazole(0.5 g, 7.27 mmol)을 DMF(10 mL)에 녹인 용액을 20분 동안 실온에서 교반한 후, 0°C로 냉각하여 DMF에 *tert*-buthyldimethylsilyl chloride(1.0 g, 6.44 mmol)를 녹인 용액을 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 6 시간 동안 실온에서 교반한 후 증류수(1 mL)를 첨가하여 반응을 종결하였다. 용매를 감압증류한 후 ethyl acetate (3 × 50 mL)와 증류수(100 mL)로 추출한 유기

층을 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조하고, 용매를 증류하여 무색의 오일 생성물 1(1.3 g, 76%)을 얻었다. <sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 4.21(q, J=7.14, 2H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) 3.60(t, J=6.41, 2H, SiOCH<sub>2</sub>) 2.30(t, J=7.52, 2H, COCH<sub>2</sub>) 1.60(m, 2H, SiOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) 1.51(m, 2H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) 1.36(m, 2H, SiOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) 1.26(t, J=7.11, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) 0.90(s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) 0.05(s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

1,1-Bis(4-chlorophenyl)-6-(1,1,2,2-tetramethyl-1-silapropoxy)hexan-1-ol(2): 무수 THF(40 mL)에 1 (1.0 g, 3.64 mmol)을 녹이고 40°C로 온도를 올린 후 4-chlorophenylmagnesium bromide(10.9 mmol of a 1 M ether solution)를 30-40분 동안 천천히 첨가하면서 2시간 동안 교반하였다. 이 반응 혼합물을 실온으로 냉각하여 15시간 동안 교반한 후 ammonium chloride (20 mL) 포화 용액을 가하여 반응을 종결하였다. DDHP와 같은 방법으로 처리하고, column chromatography (Ethyl acetate:n-Hexane, 1:10)에 의하여 정제하여 노란색 시럽 생성물 2(0.95 g, 49%)를 얻었다. <sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.33(d, J=9.03, 4H,

ArH) 7.27(d, J=8.94, ArH) 3.56(t, J=6.30, 2H, SiOCH<sub>2</sub>) 2.22(m, 2H, C(OH)CH<sub>2</sub>) 1.47(m, 2H, SiOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) 1.36(m, 2H, HOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) 1.26(m, 2H, SiOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) 0.88(s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) 0.03(s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

1,1-Bis(4-chlorophenyl)hexane-1,6-diol(3): Methanol (3 mL)에 (2) (0.50 g, 1.10 mmol)를 녹인 용액에 2% HCl을 가하여 2시간 동안 실온에서 교반하였다. 이 반응 혼합물을 chloroform(3 × 10 mL)으로 추출한 유기층을 증류수로 세척하고 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조한 후 용매를 증류하여 흰색 고체 생성물 3(0.75 g, 100%)을 얻었다. <sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 7.38(d, J=8.67, 4H, ArH) 7.26(d, J=8.67, ArH) 3.49(t, J=6.49, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) 2.24(m, 2H, HOCCH<sub>2</sub>) 1.47(m, 2H, HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) 1.32(m, 4H, HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)

6,6-Bis(4-chlorophenyl)-6-hydroxyhexanoic acid (DDHH): (3) (0.5 g, 1.47 mmol)과 PDC(1.70 g, 4.43 mmol)를 DMF(12 mL)에 녹인 용액을 15시간 동안 실온에서 교반한 후 용매를 감압 증류하였다. 이 혼합물을 과량의 dichloromethane에 녹이고 불용성 고체를 여과하여 제거하였다. 여액의 용매를 증류하고 column chromatography(chloroform:methanol, 15:1)에 의하여 정제하여 흰색 고체 생성물 DDHH(0.42 g, 63%)를 얻었다. <sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 7.39(d, J=8.61, 4H, ArH) 7.26(d, J=8.58, ArH) 2.24(m, 2H, HOCCH<sub>2</sub>) 1.61(m, 2H, COCH<sub>2</sub>) 1.30(m, 4H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)

3-[6,6-Bis(4-chlorophenyl)-6-hydroxyhexanoylamino]propanoic acid(DDHHAP): THF(3 mL)에 β-Alanine ethyl ester hydrochloride(0.043 g, 0.28 mmol)를 녹인 용액에 Et<sub>3</sub>N (0.1 mL)를 첨가하여 실온에서 10분간 교반하여 중성화하였다. 이 용액을 0°C로 냉각한 후 EDC(0.065 g, 0.33 mmol)와 6,6-Bis(4-chlorophenyl)-6-hydroxyhexanoic acid(0.1 g, 0.28 mmol)를 첨가한 후 온도를 50°C로 올린 후 10시간 동안 교반하였다. 용매를 증류하고 남은 고체를 CHCl<sub>3</sub>에 녹여 0.5 N HCl과 증류수로 세척한 후 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조 하였다. 용매를 증류한 후 column chromatography(Ethyl acetate:n-Hexane, 1:10)에 의하여 정제하여 얻은 노란색 시럽 생성물 ester 4(0.095 g, 74%)를 얻었다. 이 ester 4(0.050 g, 0.11 mmol)와 LiOH를 THF/H<sub>2</sub>O (3 mL)에 녹여 실온에서 12시간 동안 교반한 후<sup>16)</sup> 산성화하고, 10% CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub>(5 × 5 mL)로 추출하였다.

무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조한 후 용매를 증류하여 노란색 시럽 생성물 DDHHAP (0.034 g, 72%)를 얻었다. <sup>1</sup>H NMR(300MHz, CD<sub>3</sub>OD) 9.32(brt, 1H, CONH) 7.32(d, J=8.73, 4H, ArH) 7.25(d, J=8.52, 4H, ArH) 3.27(m, 2H, CONHCH<sub>2</sub>) 2.57(t, J=7.24, 2H, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) 2.24(m, 4H, CH<sub>2</sub>CONH, C(OH)CH<sub>2</sub>) 1.72(m, 4H, C(OH)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, C(OH)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)

### 2.3. 검출 표준용액의 제조

PBS (10 mM, pH 7.2)는 모든 ELISA 실험의 완충 용액으로 사용하였다. DDT 1 mg/mL을 DMSO에 녹인 stock 용액으로부터 PBS로 단계적으로 0.1 pg/mL까지 희석하였다. 같은 방법으로 교차 반응 표준용액을 0.1, 1, 10, 100, 1000, 10000, 100000 pg/mL의 농도로 희석하여 4°C에서 보관하여 사용하였다.

### 2.4. 면역원의 제조

DDT 항혈청을 생산하기 위하여 면역원을 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 1 mL의 DMF에 2,2-Bis(4-chlorophenyl)acetic acid(DDA) 2.0 mg(7.12 μmol)과 EDC 1.6 mg(8.18 μmol)을 녹이고 실온에서 30분 동안 교반하였다. 이 반응 혼합물에 50 mM carbonate buffer(pH 9.6, containing 0.15 M KCl) 4 mL에 KLH(10 mg)을 녹인 용액을 30분 동안 천천히 첨가한 후 실온에서 6시간 동안 교반한 후 4°C에서 6시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물의 불용성 고체를 원심분리하여 제거하였다. DDA-KLH 접합체를 4°C에서 PBS로 추석하고 UV-vis 스펙트럼으로 확인하였다. 운반단백질과 헵튼에 접합된 운반단백질의 최대 흡수 특성 영역의 스펙트럼의 변화로 DDA-KLH의 접합체가 제조되었다는 것을 알 수 있었다. 접합체의 헵튼과 운반단백질간의 몰비는 헵튼, 운반단백질과 접합체의 스펙트럼 자료로부터 평가할 수 있었다.

DDHP-KLH와 DDCP-KLH도 DDA 대신 DDHP와 DDCP를 사용하여 DDA-KLH와 같은 방법으로 제조하였다.

### 2.5. 코팅리간드의 제조

다섯 종류의 헵튼(DDA, DDHP, DDCP, DDHH, DDHHAP)과 두 종류의 운반단백질(BSA, OVA)을 조합하여 10종류의 코팅리간드를 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 헵튼과 운반단백질과의 결합은 active ester 방법(Langone and Van Vunakis, 1982)<sup>17)</sup>을 활

**Table 2.** Effect of coating ligand for the affinity of monoclonal antibodies immunized by three immunogens

Immunogen	MAb cell line	Affinity score and coating ligand									
		DDA -BSA	DDHP -BSA	DDCP -BSA	DDHH -BSA	DDHHAP -BSA	DDA -OVA	DDHP -OVA	DDCP -OVA	DDHH -OVA	DDHHAP -OVA
DDA-KLH	1A1	+++	++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
	1A2	+	+	+	++	+	++	++++	++	++	++
	1A3	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+
	1A4	-	-	-	-	-	+	++	+	+	+
	1B6	-	-	-	-	-	+	++	+	+	+
DDHP-KLH	2A1	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	2A2	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
	2A6	-	-	-	+++	-	+	+	++	-	-
	2B1	-	-	-	-	-	+	+	-	++	+
	2B3	-	-	-	+	+	-	-	-	++	++
DDCP-KLH	3A1	++++	+++	++++	++	++	++++	++++	++++	++++	++++
	3A2	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++
	3A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3A4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3A5	+	+	+	++	-	+	+	-	-	-

\*The affinity of monoclonal antibody to coating ligand was graded on an arbitrary 5-point scale - no affinity; + poor affinity; ++ good affinity; +++ high affinity; ++++ the highest affinity

용하였다. DDA 3.14 mg(11.2 μmol), NHS(2mg, 16.9 μmol)과 EDC(3.3 mg, 16.9 μmol)를 0.5 mL의 DMF에 녹이고 2시간 동안 교반하였다. 0.15 M KCl를 포함하는 50 mM carbonate buffer, pH 9.64 mL에 BSA 10 mg을 녹인 용액에 이 active ester 용액을 천천히 첨가하고, 실온에서 4시간동안 교반한 후 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 불용성 고체를 원심 분리하여 제거하고, 4°C에서 PBS로 투석하여 반응하지 않고 남은 DDA 및 부산물들을 제거하고 UV-vis 스펙트럼으로 운반단백질의 특성 파장 A280에 의하여 면역원과 같은 방법으로 DDA-BSA를 확인하였다.

이와 같은 방법으로 다섯 종류의 DDT 유도체 (DDA, DDHP, DDCP, DDHH, DDHHAP)에 각각 다섯 종류의 BSA, OVA가 접합된 코팅리간드를 조제하였다.

### 2.6. DDT 단일클론항체 생산

DDT 단일클론항체는 세 종류의 면역원(DDA-KLH, DDHP-KLH과 DDCP-KLH)을 사용하여 BALB/c mice의 spleen cell과 myeloma cell을 fusion하여 단일클론항체(MAb)를 생산하는 hybridoma cell line을 screening하였다. 각각의 면역원으로 사용한 DDT 유도체의 BSA conjugate를 coating ligand로서 사용하여 스크리닝하여 15종류의 단일클론항체를 얻었다.

### 2.7. ELISA에 의한 단일클론항체의 역가 측정

DDA-BSA 코팅리간드를 50 mM carbonate buffer (pH 9.6)에 녹여 microtiter plate에 각각 50 μl(10 μg/ml)씩 가하여 4°C에서 12시간 동안 코팅한 후 PBST로 세척하였다. 1% BSA/PBS 용액을 150 μl씩 넣고 실온에서 2시간 동안 blocking한 후 PBST로 세척하였다. PBS로 희석한 MAb culture supernatant를 well에 50 μl씩 가하고 천천히 shaking하면서 실온에서 2시간 동안 반응한 후 well을 PBST로 세척하였다. 세척은 PBST 200 μl를 사용하여 각 단계마다 3회씩 시행하였다. PBS로 1000배 희석한 HRP-anti-mouse IgG를 200 μl씩 가하고 천천히 shaking하면서 실온에서 2시간 동안 반응한 후 well을 PBST로 5회 세척하였다. OPD substrate를 well당 100 μl씩 가하고, 10분 후 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 50 μl씩 첨가하여 반응을 종결하였다. Kinetic microplate reader(Molecular Devices)를 사용하여 490 nm에서 OD value를 측정한 결과는 Table 2에 나타내었다. 또한 10종류의 코팅리간드에 대하여 15종의 단일클론항체의 희석배수에 대한 역가곡선 작성하였다. 실험은 duplicate로 시행하여 평균처리하였다.

### 2.8. ELISA에 의한 DDT 검정곡선

Table 2.와 Fig. 1.에서 좋은 항체 친화력과 역가곡선

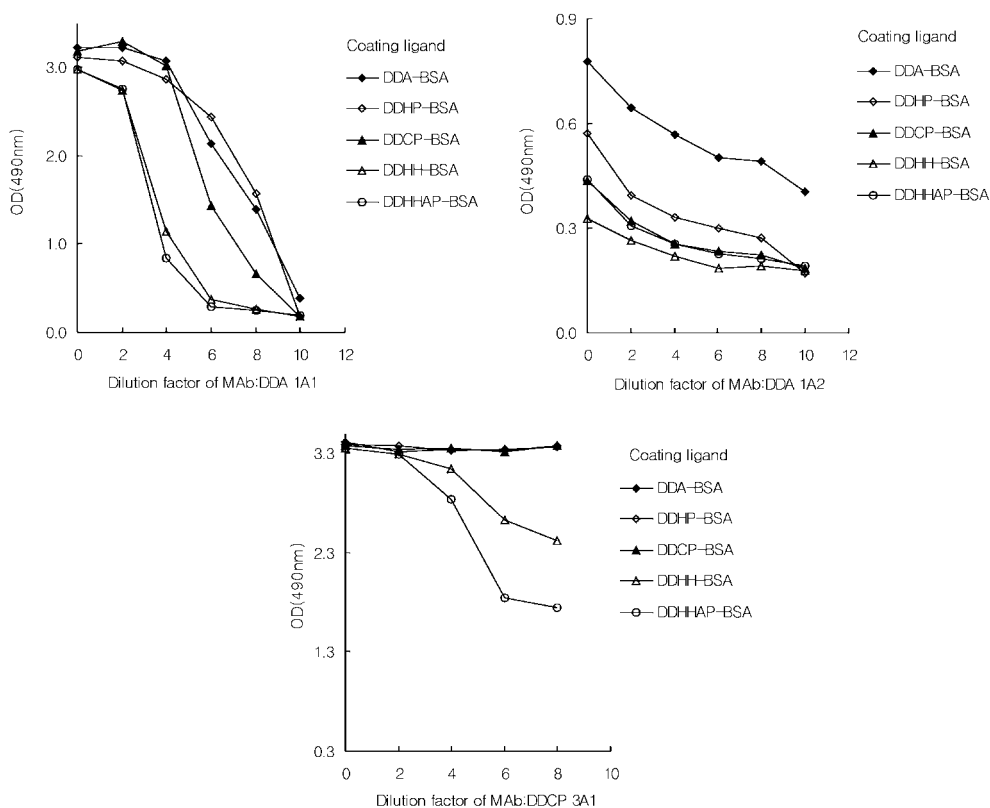


Fig. 1. Titration curve for MAb clones by ELISA with BSA-coating ligand.

을 나타내는 항체와 코팅 리간드에 대하여, 항체 역가 곡선의 70% OD 값을 항체의 분석농도로 하여 DDT 검출 표준용액에 대한 검정곡선을 작성하였다. 모든 실험 방법은 2.7과 동일하며, 항체 코팅단계에서 항체 180  $\mu$ L와 각각의 농도로 희석한 DDT 표준용액 180  $\mu$ L를 실온에서 2시간동안 먼저 반응시킨 후, 코팅 리간드가 코팅되어있는 well에 100  $\mu$ L씩 취하여 반응하였다. 검정곡선은 triplicate로 시행하여 평균처리하였다.

### 3. 결과 및 고찰

DDT와 그 분해물들을 ELISA 방법을 이용하여 검출하기 위하여 DDT 구조와 유사하고 운반단백질의 아민기와 결합할 수 있는 작용기인 카르보실기를 포함하는 헵튼을 디자인하였다. 운반단백질과 헵튼의 항원 결정기(epitope)와의 결합 길이와 분석감도 및 친화력과의 상관관계를 연구하기 위하여, DDT의 CCl<sub>3</sub> 그룹 대신 C-0, C-3, C-4 카르보실 그룹으로 치환된 DDA, DDHP, DDHH를 합성하였고, DDHP의 -OH대신 -Cl

로 치환하여 DDCP를 합성하였고, DDHP에  $\beta$ -alanine을 아미드 결합시켜 긴 사슬을 갖는 DDHHAP를 합성하였다. 5종류의 헵튼의 합성은 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼으로 확인하였다.

DDT 구조와 가장 유사한 DDA, DDHP와 DDCP에 KLH 운반단백질을 결합시켜 면역원으로 사용하였고, 합성한 5종류(DDA, DDHP, DDCP, DDHH, DDHHAP)의 헵튼에 BSA 및 OVA 운반단백질을 결합시켜 코팅리간드로 사용하여 운반단백질의 종류에 따른 친화력의 변화도 조사하였다. 헵튼과 단백질간의 결합은 280 nm에서 UV 스펙트럼의 변화로 결정하였다.

Mice에 면역주사하여 얻은 15종류의 모노클론항체를 분비하는 세포주를 스크리닝한 결과, 같은 헵튼이라도 결합된 운반단백질의 종류에 따라서 친화력이 다르게 나타났으며 그 결과는 Table 2와 같다. DDA-KLH를 면역원으로 사용하여 얻은 5종류의 항체는 5종류의 헵튼에 BSA를 결합한 코팅리간드에서 항체 1A1은 매우 좋은 친화력을 나타내었으며, 항체 1A2는 DDHH-BSA 코팅리간드일 때 좋은 친화력을 나타내었다. OVA를 결

합한 코팅리간드에서는 대체적으로 좋은 친화력을 보였다. DDHP-KLH를 면역원으로 사용하여 얻은 5종류의 항체는 DDHH-BSA 코팅리간드에서만 좋은 친화력을 보였으며, DDCP-KLH를 면역원으로 사용하여 얻은 5종류의 항체 중 3A1은 BSA, OVA 코팅리간드 모두에서, 항체 3A2는 OVA 코팅리간드에서만 좋은 친화력을 나타내었다.

항체와 코팅리간드와 결합에서는 항체와 코팅리간드

와의 구조적 유사성과 코팅리간드의 결합 위치에 항체가 접근할 때 입체장애가 고려되어야 한다. 항체와 코팅리간드와의 친화력은 BSA의 경우에는 OVA에 비하여 분자량이 약 1.5배 큰 단백질이므로 헵튼과 결합되어 있을 때 입체 효과가 더 큰 영향을 미칠 것이며, OVA는 입체 효과보다는 헵튼의 구조가 더 큰 영향을 미칠 것이다. DDA, DDHP, DDCP가 DDHH와 DDHPAP보다 운반단백질과 결합된 결합 길이가 더 짧으므로 운반

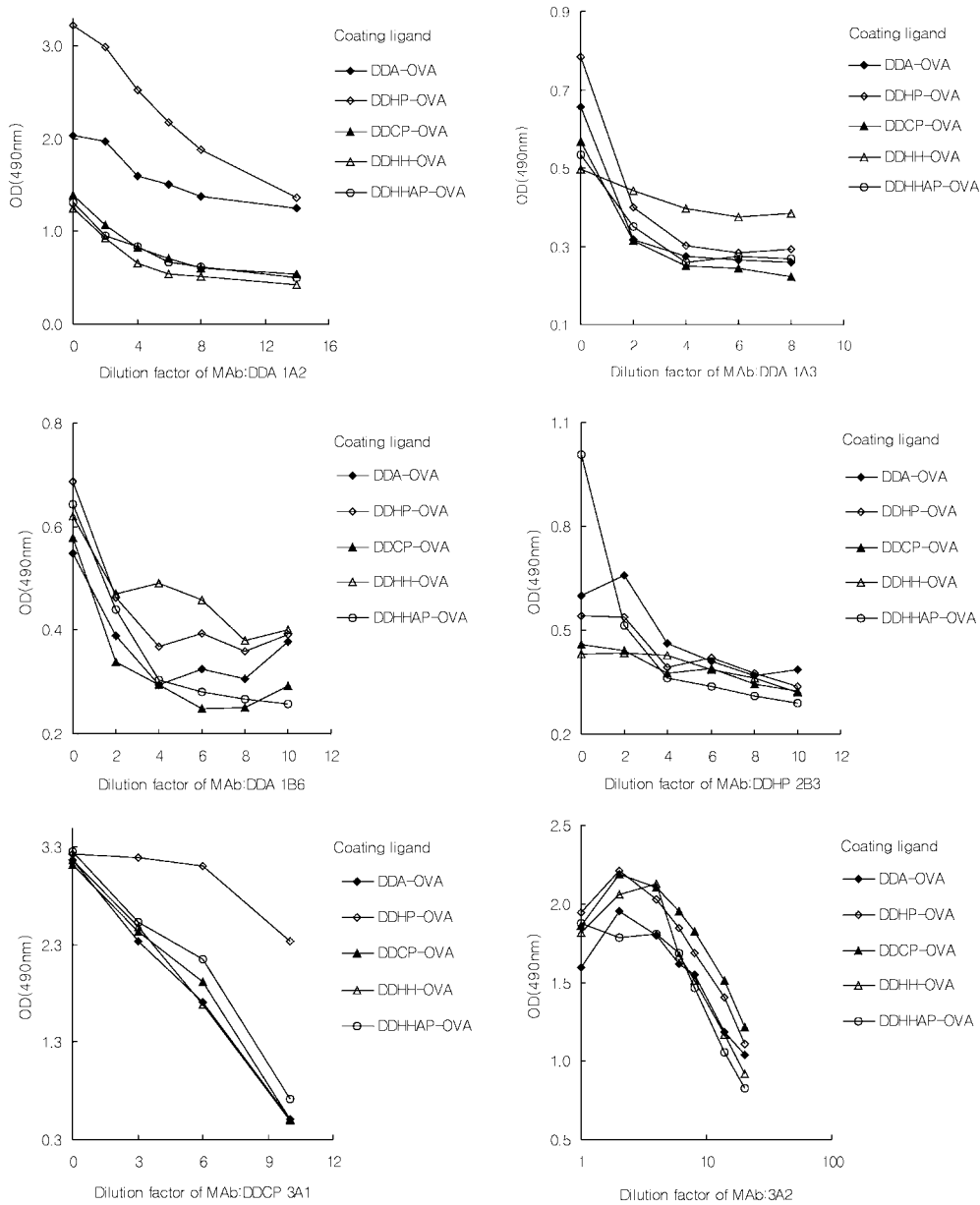


Fig. 2. Titration curve for MAb clones by ELISA with OVA-coating ligand.

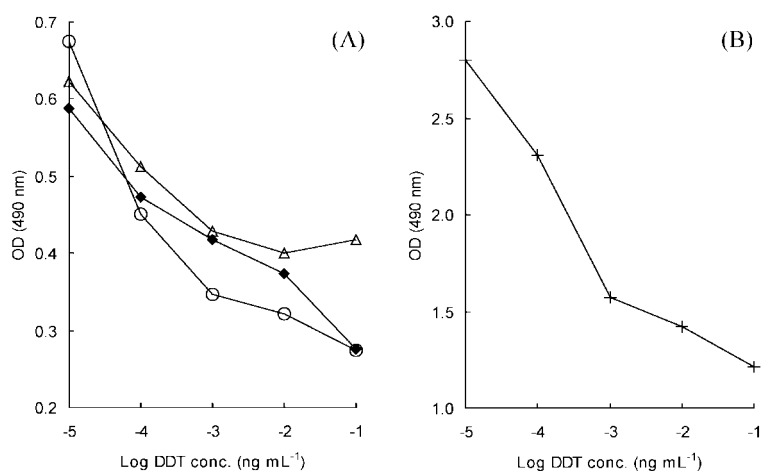


Fig. 3. Dose-response curves of DDA 1A3 antibody with DDHP-OVA coating ligand

△, DDA 1A3 antibody with DDA-OVA coating ligand

◆ and DDA 1A4 antibody with DDHP-OVA coating ligand

○ (A); DDA 1A1 antibody with DDHAP-BSA coating ligand + (B)

단백질의 입체 장애가 더 고려될 것이며, 상대적으로 결합길이가 긴 DDHH 및 DDHAP는 DDA, DDHP, DDCP에 비해 운반단백질에 대한 입체 장애보다는 DDT와의 구조적 유사성이 더 고려될 것이다.

1A1과 3A1 항체의 BSA 코팅리간드의 경우는 입체 장애에 거의 영향을 받지 않을 만큼 큰 친화력을 갖지만, 나머지 항체 중 반응성을 보이는 1A2, 2A1, 2A6, 2B3, 3A5의 경우를 살펴보면, 면역원의 종류와는 상관없이 사슬길이가 C-4인 DDHH-BSA에서 보다 좋은 친화력이 있음을 알 수 있었으며, 이것은 BSA 코팅리간드에서의 입체 장애로 설명 할 수 있을 것이다. 또한 DDHAP처럼 너무 긴 사슬은 구조적 유사성에서 벗어나 상대적으로 친화력이 좋지 않음을 의미한다.

비교적 입체 장애가 작을 것으로 예상되는 OVA 코팅리간드의 경우에서도 3A1과 3A2는 두 가지 조건 모두와 상관없이 모두 큰 친화력을 갖지만, DDA-KLH를 면역원으로 하여 얻은 5종류의 항체와 2A1, 2A2, 2A6와 3A5의 경우 DDA, DDHP 혹은 DDCP가 DDHH나 DDHAP의 경우 보다 더 좋은 친화력을 갖음을 알 수 있으며, 이로부터 OVA 코팅리간드는 입체 장애보다는 헵튼의 구조가 친화력에 더 큰 영향을 미친다는 것을 알 수 있다.

세종류의 면역원에 대하여 좋은 반응성을 보이는 항체와 코팅리간드를 선정하여 항체의 농도에 따른 코팅리간드와의 역가를 측정할 결과는 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다. OVA 코팅리간드를 사용한 경우, DDA-

KLH로부터 얻은 항체에서는 1A2와 DDHP-OVA의 경우가 가장 좋은 역가곡선을 나타내었으며, DDHP-KLH로부터 얻은 항체는 모두 좋지 않았으며, DDCP-KLH를 사용하여 얻은 항체인 3A1과 3A2는 매우 좋은 역가곡선을 얻을 수 있었다. BSA 코팅리간드를 사용한 경우에는 DDA-KLH로부터 얻은 1A1 항체가 5종류의 코팅리간드에서 모두 좋은 역가곡선을 나타내었고, 1A2의 경우도 대체적으로 좋은 결과를 보였다. 그러나, DDCP-KLH로부터 얻은 3A1항체의 경우, 상대적으로 사슬 길이가 짧았던 헵틴인 DDA, DDHP, DDCP의 경우 항체에 대한 친화력이 DDHH, DDHAP 보다 좋았지만, 역가곡선을 살펴보면 오히려 좋지 않음을 알 수 있었다. 또한, 항체를 매우 낮은 농도로 희석하여도 OD value는 낮아지지 않았으며, DDT 검정곡선에서도 같은 결과를 얻었다. 이로부터 항체에 대한 코팅리간드의 친화력이 필요이상으로 좋은 경우는 항체가 DDT와 반응하지 못하므로 오히려 좋지 않음을 알 수 있었다.

Fig. 3에서 DDT에 대한 좋은 검정곡선을 나타낸 항체와 코팅리간드의 최적 쌍을 살펴보면, 항체는 DDT와 가장 유사한 구조를 갖고 있는 DDA-KLH를 면역원으로 사용하여 얻은 항체였으며, 각각의 항체에 대한 코팅리간드의 친화력은 Table 2에서 grade ++인 경우였다. 즉, 적당한 친화력을 갖는 코팅리간드의 사용은 항체가 analyte인 DDT와 코팅리간드 간에 경쟁반응을 통하여 좋은 검정곡선을 나타내는데 중요한 변수가 됨을 의미하였다.

#### 4. 결 론

이상의 연구 결과를 종합해 보면, DDT를 검출하기 위한 항체를 스크리닝시 코팅리간드의 종류에 따라 항체의 분석 감도를 증진시킬 수 있다는 것을 의미한다. 또한 동일한 항체에 동일한 헵튼을 사용하더라도 헵튼에 결합되어있는 단백질의 종류가 DDT검정곡선에 미치는 영향이 크다는 것을 알 수 있었다. 즉, 코팅리간드의 제조시 항체와 잘 결합할 수 있도록 헵튼의 구조와 운반단백질의 종류를 고려하여야 한다는 것을 알 수 있다. 따라서 ELISA에서 DDT에 대한 좋은 친화력을 갖는 항체를 스크리닝 하는 것 뿐만 아니라, 좋은 친화력을 갖는 코팅 리간드를 선정함으로써 보다 좋은 분석 결과를 얻을 수 있음을 보여주었다.

#### 참고 문헌

- 1) T. Colborn and M. J. Smolen, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **1996**, 146, 91-172.
- 2) A. Hussein, U. Maqbool and M. Asi, *J. Environ. Sci. and Health*, **1994**, 29, 1-15.
- 3) T. Samuel and M. K. K. Pillai, *Environ. Pollut.*, **1989**, 57, 63-77.
- 4) M. Ramachandran, S.S.A. Zaidi, B. D. Banerjee and Q. Z. Hussain, *Indian J. Med. Res.*, **1984b**, 80, 483-486.
- 5) L. Lopez-carrillo, L. Torres-Arreola, L. Torres-Sanchez, F. Espinosa-torres, C. Jimenez, M. Cebrian, S. Waliszewski and O. Saldade, *Environ. Health Perspect.*, **1996**, 44, 3703-3709.
- 6) S. M. Waliszewski, V. T. Pardio, K. N. Waliszewski, J. N. Chantiri and R. M. Infanzon, *J. AOAC Int.*, **1996**, 79, 784-786.
- 7) I. Mukherjee and M. Gopal, *J. AOAC Int.*, **1993**, 76, 283-286.
- 8) H. R. Buser and M. D. Muller, *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 2691-2698.
- 9) J. C. Chuang, K. Hart, J. S. Chang, L. E. Boman, J. M. Van Emon and A. W. Reed, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 444, 87-95.
- 10) A. Voller, D. E. Bidwell and A. Bartlett, *Bull. WHO.*, **1976**, 53, 55-65.
- 11) D. Burgisser, S. Frey, B. Gutte and S. Klauser, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1990**, 166(3), 1228-1236.
- 12) R. O. Harrison, M. H. Goodrow, S. J. Gee and B. D. Hammock, "ACS Symposium Series" **1990**, Vol. 451, 14-27.
- 13) A. Abad, J. J. Manclus, F. Mojarrad, J. V. Mercader, M. A. Miranda, J. Primo, V. Guardiola and A. Montoya, *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 3694-3702.
- 14) M. H. Goodrow, R. O. Harrison and B. D. Hammock, *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 990-995.
- 15) O. Grummitt, A. Buck and R. Egan, *Organic Synthesis*, **1946**, 26, 21-22.
- 16) R. V. Hoffman, N. K. Nayyar and W. Chen, *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 5700-5707.
- 17) J. J. Langon and H. Van Vunakis, *Methods Enzymol.* **1982**, 84, 628-640.