이식 면역학 연구 방법론
(Experimental methods for transplantation research)

서울대학교 의과대학 내과학교실

김 연 수

다양한 연구기법의 발전으로 RNA, DNA 수준의 연구부터 단백질 등의 발현, 기능연구, 전임상 실험 등이 가능하다. 본 논제에서는 다양한 면역학적 연구방법을 소개하고 이의 이용에 대해 논하고자 한다.

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

1971년 Peter Perlmann과 Eva Engvall에 의해 고안된 ELISA는 sample내의 항체나 수용성 항원의 농도 측정에 유용한 방법이다. 방법에 따라Sandwitch ELISA, Indirect ELISA, Direct ELISA, Competitive ELISA 등으로 세분된다. Sandwitch ELISA법으로 세포 배양 상층액, serum, urine, lysate등의sample내에 존재하는 수용성의 분석물질 (cytokine, inflammatory meditor, receptor 등)의 농도를 특이적으로 측정할 수 있다. 기본적으로 ELISA법은 순수 분리된, 항원 특이적인 capture항체를 사용하며, 이는 플라스틱 micro-well의 안쪽 면에 비공유 결합으로 흡착하는 특징을 가지고 있다.

ELISpot (Enzyme Linked Immunosorbent Spot)

ELISpot 방법은 면역에 관련하는 세포 (특히 T 세포)의 기능과 효능 등을 단일세포 수준에서 측정하기 위하여 행해지는 실험방법이다. 실험에 사용되는 각 세포들은 세포 외부의 항원에 의해서 자극이 일어나며, 이 자극에 의해서 세포는 무수히 많은 종류의 성분들을 각기 다른 양으로 세포 밖으로 분비를 하게 되는데, 분비된 물질을 정성, 정량적으로 분석하고자 항체, 효소, 발색제 및 각종 용액을 첨가하여 면역 화학적 반응을 유도하여 분비된 물질을 정량, 정성적으로 분석을 가능하게 하였다.

Multiplex assay

Bio-Plex protein array system은 96-well plate 각각의 well에서 100가지의 생물학적 분석체를 동시에 분석할 수 있는 multiplexed fluorescent microplate 분석 장비이다. 최소량의 시료로 최대의 data를 얻을 수 있는 장비로 fluorometer 원리와 luminex 원리가 접목되어 탄생한 차세대 분석 장비이다. 두 종류의 laser detector를 사용하여 실시간으로 신호전달을 진행시킴으로 100개의 다른 색깔군의 polystyrene bead를 구별하여 정량 한다. 결과적으로 최대 9,600 data를 30분 정도의 시간에 얻어내는 high throughput 장비이다. Bio-Plex protein array system에는 생물학적 물질이 고착되어 있는 형광 bead군 (최대 10×10 가지), 두개의 laser를 이용한 flow cytometer (bead identification용 635 nm red diode laser/assay측정용 532 nm green laser), 초고속 digital signal processor와 같은 3가지 주요 원리가 적용된다.

혼합림프구배양시험 Mixed Leukocyte Reaction (mixed lymphocyte reaction, MLR)

T cell activation의 실험실적 모델로서 사용한다. 서로 다른 두 개체의 (stimulator, responder) 림프구를 섞어서 배양하면 서로의 allogeneic MHC를 인식하여 (T세포가 이종주요표면항원을 인식) 활성화되므로 두 개체로부터 얻은 많은 수의 T cell이

증식하게 된다. class I과 class II MHC가 모두 다를 때, MLR 반응은 최적이다. 이러한 이종주요표면항원의 인식능을 측정하는 방법으로써 림프구를 채취한 개체간의 조직적합항원의 차이를 평가할 수 있어서 골수 및 조직 이식시 사용되는 중요한 시험법이다.

Flowcytometry

유세포분석기 (Flowcytometry)란 유액상태의 입자나 세포가 일정 감지 지역 (sensing point)을 통과할 때 각각의 입자나 세포를 신속하게 측정하여, 한 세포가 갖는 여러 특징을 동시에 측정하고 경우에 따라 특정한 부분을 선택하여 분리(sorting) 할 수 있는 장비이다. 유세포분석기는 측정하고자 하는 세포집단의 세포들을 각각 하나씩 측정하여 분석하는 특징을 가지고 있다. 빠른 시간 내에 각 세포들의 생리학 및 생화학적 분석 등의 다양한 연구들을 세포크기, 세포내부조성정도, 형광색소에 의한 세포기능인지 등의 기능을 이용하여 실행하고 있다. 형광염색소 (Fluorescent dye)와 단클론 항체 (Monoclonal antibodies)의 발전은 하나의 세포가 갖는 면역상태를 파악하고, 그에 따른 여러 면역질환에 관한 연구를 가능하게 했고, 염색체 연구, 망상혈구측정, 세포내 칼슘 측정, 미생물의 검사 등에도 이용되며, 그 적용범위가 더욱 넓어지고 있는 실정이다.

CFDA-SE (Carboxyfluoroscein diacetate succinimidyl ester)

CFDA-SE는 cell permeable dye로서 animal cell proliferation의 연구에 주로 사용한다. 확산에 의해 세포 내로 들어가 세포내의 esterase에 의해 분해되어 amine-reactive product를 형성한다. 이 product는 형광을 생성하고 세포내의 lysine-residue와 다른 amine resource에 covalent binding을 한다. 대부분의 세포는 염색 후 초기 24-48시간 동안 일정 분량을 배출한다. 따라서 분열하지 않는 세포에서는 dye level이 상대적으로 안정적이다. 염색된 세포가 분열하면, dye는 두 개의 daughter cell에 균등히 나누어져, mother cell의 약 50% 정도의 CFDA-SE농도를 가지는 새로운 세포가 된다. CFDA-SE로 염색된 세포는 수일간 배양하여 8번의 세포분열까지 형광이 관측 가능하다.