

면역형광시험법

1 원리

면역형광 시험법 (immunofluorescence assay, IFA)은 항원이나 항체를 검증하기 위하여 항원-항체 반응의 고도의 특이성을 이용하는 진단법 중 하나이다. IFA는 빛 에너지를 받았을 때 형광을 발산하는 형광물질 (fluorescein 또는 auramine O)을 항체에 붙여 항원과 반응시킨 후 형광 빛을 발산하는 것을 감지하는 방법이다 (그림 1). 여기서 형광물질이란 현미경에 있는 수은등을 비출 경우 발생하는 자외선 같은 단파장의 빛에 반응하여 빛을 내는 물질을 말하며 항체분자가 손상되지 않도록 결합시켜 표지 항체를 만들어 사용한다. 반응에 있어 항체와 대응되는 항원이 존재할 경우 항원-항체 복합물이 형성되어 형광현미경의 단파장을 비추었을 때 형광 현미경으로 관찰하면 특이적인 형광 형태를 볼 수 있다. 이 방법은 세균, 바이러스, 원충, 리케치아의 감염에 의한 진단에 활용되고 있으며 진단 뿐만 아니라 특정 반응부위의 탐색에도 적용할 수 있다.

면역형광 시험법의 특징으로는 항체에 대한 특이성, 높은 감도, 실험의 신속성, 간편성 등을 들 수 있다. 항원-항체반응이 갖는 고도의 특이성을 이용함으로써 피검물 내에 포함된 많은 항원들 중에서 특정항원 만을 선택적으로 염색 (형광표지 항체 사용)할 수 있다. 그러나 실시방법에 따라 민감도에 다소 차이가 있으나 직접법의 경우 다른 혈청학적 방법들과 대등한 민감도를 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한 간접법 및 보체법의 경우는 매우 민감도가 높은 방법이라 하겠다.

면역형광 시험법은 단 시간 내 (직접법의 경우 1시간 내, 간접법의 경우 2시간 이내)에 시험을 완료할 수 있으므로 항원의 검출을 위하여 매우 민감도가 높은 방법이

라 하겠다.





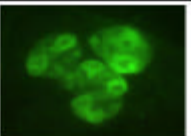

시약 슬라이드 고정액, 미지, 검체  Ag	양성 검체 (슬라이드 위에 항원 있음)	음성 검체 (슬라이드 위에 항원 없음)
시약 항원과 반응하는 FITC 라벨된 항체 항원-항체 복합체 제거		
형광 현미경으로 관찰  양성 : 초록색 음성 : 반응색 없음		

그림 1. 면역형광시험법 원리

또한 주어진 조직이나 배양환경에서 감염된 세포 수 뿐만 아니라 생산되는 특정 단백질의 종류도 확인이 가능하여 유세포 분석기가 없는 일반 검사실에서도 형광현미경만 있으면 반 정량적인 분석이 가능하여 실험의 간편성과 용이성이 특징이다.

1. 면역형광 시험법의 종류

1) 직접법

특정 항원에 대응하는 항체에 형광물질을 부착하여 피검재료와 직접 반응시켜 반응이 일어난 항원을 검출하는 방법이다. 매우 신속한 방법이지만 다른 항원에 대한 각종 표지항체를 준비해야 하는 어려움이 있다. 항체 검출을 위해서는 기지의 항원에 혈청과 표지항체를 혼합 반응시켜서 표지항체의 반응성의 저해강도를 측정함으로써 혈청내의 특이항체의 존재를 확인할 수 있다.

2) 간접법

주로 피검혈청내의 특이항체를 검출하기 위해서 사용된다. 즉 항원에 혈청을 반응시키면, 혈청 내에 항체가 존재할 경우에는 항원-항체 복합물이 형성되고 여기에 다시 혈청내의 항체 (anti-human IgG)에 형광 표지를 하여 반응시키면 항원-항체-형

광표지된 anti-human IgG의 결합이 일어나고 형광현미경으로 반응의 여부를 관찰할 수 있다. 1차 반응 (항체-항원 결합)에 이은 2차 반응 (항체-항원-anti-Human IgG 결합)의 증폭 작용으로 직접법 보다 민감도는 더욱 높으나 개입되는 반응인자가 많아지므로 비특이 반응의 빈도가 높다.

2 실험방법

1. 재료 및 기구

	신증후군출혈열	리케치아	레지오넬라	
세포	Vero E6	L929	-	
균주	Hantaan 76-118	<i>O. tsutsugamushi</i> (Gilliam, Karp, Kato, 보령)	Pool I	<i>L. pneumophila</i> sg1 (ATCC 33152) <i>L. pneumophila</i> sg2 (ATCC 33154) <i>L. pneumophila</i> sg3 (ATCC 66155)
			Pool II	<i>L. pneumophila</i> sg4 (ATCC 33156) <i>L. pneumophila</i> sg5 (ATCC 33216) <i>L. pneumophila</i> sg6 (ATCC 33215)
			Pool III	<i>L. bozemanii</i> (ATCC 33217) <i>L. gormannii</i> (ATCC 33297) <i>L. micdadei</i> (ATCC 33218)
			Pool IV	<i>L. longbeachae</i> (ATCC 33462) <i>L. feeleii</i> (ATCC 33849) <i>L. dumoffi</i> (ATCC 33279)
시약	PBS, 멸균수, 고정용 아세톤, FA mounting medium			
1차항체	회석된 환자 혈청			
2차 항체	FITC-conjugated anti human IgG, FITC-conjugated anti human IgM			
기구 및 장비	Teflon-coated slide, 커버 슬립, 37℃ 항온 배양기, 항습 상자, 형광현미경			

2. 실험 과정

1) 항원 제조

1-1) 신증후군출혈열

- ① 75cm² 세포배양 플라스크에 5% FBS가 포함된 EMEM (Eagle's modified essential medium) 배지를 이용하여 VeroE6 세포를 단층 배양 (70~80%) 시킨다.
- ② Hantaan 76-118 주를 1.0 M.O.I로 접종하고 1~1시간 30분간 감염시킨다.
- ③ 바이러스 용액을 제거하고 10% FBS 함유 EMEM을 첨가하여 약 7일간 37°C CO₂ 배양기에서 배양한다.
- ④ 배양 7일째 배지를 제거하고 적정량의 PBS로 세척한 다음 0.25% 트립신으로 처리하여 세포를 플라스크에서 떨어뜨린다.
- ⑤ 5% FBS 함유 EMEM에 부유한 후 같은 배양액으로 2회 세척하고 다시 PBS로 3회 세척한다.
- ⑥ $3-4 \times 10^6$ cells/ml 이 되도록 PBS를 첨가 (약 1~1.5 ml)하여 세포를 부유시킨 후 얼음에 준비한다.

1-2) 리케치아

(1) 세포 배양을 이용한 리케치아 항원

- ① 75cm² 세포배양 플라스크에 5% FBS가 포함된 DMEM 배지를 이용하여 L929세포를 단층 배양(70~80%)시킨다.
- ② 배지를 버리고, 표준 균주 2 ml을 접종 한 후 15~20분 간격으로 플라스크를 흔들어 리케치아가 세포 표면에 골고루 퍼지도록 하면서 34°C에서 2시간 동안 흡착시킨 후 PBS로 세척하고 2% FBS가 포함된 DMEM 배지를 넣어 34°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한다.
- ③ 매일 세포병변을 관찰하고 3일 마다 배지를 교환해 준다.
- ④ 세포병변이 관찰되면 팁으로 세포를 일부 떼어 슬라이드에 도말하여 Giemsa 또는 Giemenez 염색과 IFA로 균을 확인한다.
- ⑤ 균이 많이 (80% 이상) 자란 것이 확인되면 배지를 버리고, PBS를 5 ml 넣고 cell scraper로 세포를 긁어 원심관에 모은다.

- ⑥ 최종 농도 0.1%가 되도록 포르말린을 가해 잘 혼합한 후 1시간 방치하여 균을 불활성화시킨다.
- ⑦ 4°C, 3,000 rpm, 20분간 원심하여 상층액을 제거한다.
- ⑧ 1 ml의 PBS를 넣어 세포를 부유시킨 후 항원으로 사용한다.

(2) 유정란을 이용한 리케치아 항원

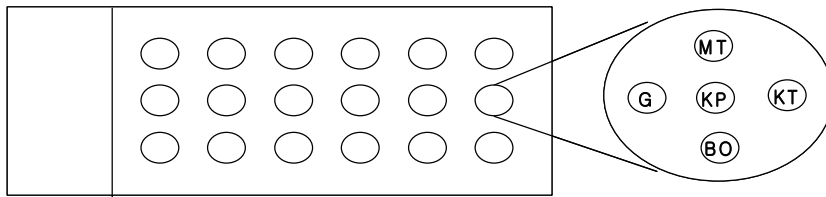
균이 배양 (유정란 시험법 참고)된 유정란에서 수거한 난황막은 IFA용 PBS에 20~50%로 희석한 후 혼합기로 갈아서 600g에서 10분간 원심분리한 후 중간층만 취해 0.25% 포르말린으로 하룻 밤 처리하여 항원으로 사용한다.

1-3) 레지오넬라

- ① -20°C (또는 -70°C)에 보관중인 12종의 레지오넬라균을 BCYEa (buffered charcoal yeast extract α-ketoglutarate) 한천배지 접종하고 35 ± 1°C, 2.5~5% CO₂ 배양기에서 2~3일간 배양하여 단일 집락을 분리하여 L-cysteine이 첨가되지 않은 BCYEa 한천배지에서 균이 자라지 않음을 확인하고, 표준 항 혈청을 이용한 슬라이드 응집반응이나 형광항체법으로 각 균주를 확인한다.
- ② 확인된 균을 각각 BCYEa 한천배지 2장에 전체적으로 도말하여 35 ± 1°C, 2.5 ~ 5% CO₂ 배양기에서 2~3일간 배양한다.
- ③ 적당량의 멸균수나 PBS (pH 7.6)을 균이 자란 배지에 첨가하여 백금이로 균을 부유하고 prefilter (1~1.5 μm)한 후 4°C, 3,000 rpm으로 30분간 원심하여 균을 회수한다.
- ④ 균체를 멸균수나 PBS (pH 7.6)로 2회 세척한 후 5 ml의 멸균수나 PBS (pH 7.6)에 재부유한다.
- ⑤ 균 부유액을 100°C에서 15분간 끓이고 식힌 후 O.D. 값을 측정 (O.D.₅₉₅ = 0.45 = 1 × 10⁹ CFU/ml)하여 균액의 농도를 결정한다.
- ⑥ ⑤에서 준비된 항원을 멸균수나 PBS (pH 7.6)로 균 부유액이 1~5×10⁷ CFU/ml의 농도가 되도록 조정 한 후, *pool I, *pool II, *pool III, *pool IV로 혼합한다.

2) 슬라이드 제조

- ① 제조된 항원을 예비 검사를 통해 세포수 및 균수가 적절히 맞추어지도록 PBS로 희석한다.
- ② Teflon-coated slide에 세포 및 균체 부유액 5~25 μl (웰의 크기에 따라 다름)를 각 웰에 떨어뜨린다 (단, *O. tsutsugamushi*의 4가지 원형 균주 및 *R. typhi* 등의 항원 슬라이드는 균액을 펜촉 또는 주사침 끝을 수평으로 자른 1 ml 주사기를 이용하여 그림 2와 같이 점을 찍는다).



MT : *R. typhi*, G : Gilliam, KP : Karp, KT : Kato, BO : 보령

그림 2. *O. tsutsugamushi* 슬라이드 제조법

- ③ 항원액을 떨균 슬라이드는 안전 캐비닛에서 건조시킨다.
- ④ 사용 전까지 -70°C 에 보관한다.

3) 간접형광항체법

- ① -70°C 에 보관 중인 항원 슬라이드를 공기 중에서 건조시킨다
- ② -20°C 에 보관했던 아세톤에 슬라이드를 넣어 10분간 고정시킨다.
- ③ 환자 혈청에서의 IgG 검출을 위해서는 1 : 32부터 2배 단계 희석하여 항원 슬라이드에 25 μl 씩 각 웰에 떨어뜨리고 항습상자에 넣어 37°C 항온 배양기에서 30분간 반응시킨다. IgM 검출을 위해서는 1 : 10부터 2배 단계 희석하여 항원 슬라이드에 25 μl 씩 떨어뜨리고 항습 상자에 넣어 37°C 항온 배양기에서 30분간 반응시킨다. 희석은 다음과 같이 실시한다.

단 계	1	2	3	4	5	6	7	8
희석배율	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1,024	1 : 2,048	1 : 4,096
PBS	155 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
Serum	5 μ l	1단계 희석액 50 μ l씩을 시작으로 다음 희석단계로 넘기고 혼합하는 것을 반복한다						

* 희석 단계는 슬라이드 웰 개수에 따라 조정한다.

* 실험 단계에서 슬라이드에 있는 검체 혈청이 건조되지 않도록 한다.









- ④ PBS와 증류수로 각각 흔들어 세척하여 건조시킨다.
- ⑤ FITC-conjugated anti human IgG 및 IgM을 각각 25 μ l 씩 가하고 슬라이드를 항습상자에 넣어 37°C 항온 배양기에서 30분간 반응시킨다.
- ⑥ ④에서와 같이 세척한 후 슬라이드를 건조시킨다.
- ⑦ Mounting media (글리세린 : PBS=9 : 1, pH 9.0 상품화된 것도 있음)를 한 방울 떨어뜨리고 커버슬립를 올려 형광현미경으로 특이 형광을 관찰한다.

3 판정

1. 신증후군출혈열

- ① 양성대조와 음성대조 혈청의 정상반응 여부를 먼저 확인한다.
- ② 형광 spot을 관찰할 수 있는 희석 배율값을 항체가로 판독한다.
- ③ spot 모양 이외에 전체적으로 밝게 나타나는 것은 위양성일 가능성이 크다.

예) 항체가 1 : 128

1 : 32	1 : 64	1 : 128	음 성 대 조	
				
1 : 256	1 : 512	1 : 1024	양 성 대 조	
				

음성 대조 : 이전의 시험에서 음성으로 판정되었던 환자의 혈청

양성 대조 : 이전의 시험에서 1 : 512이상의 항체가를 보유한 환자의 혈청

2. 리케치아

1주 간격으로 채혈한 1차, 2차 혈청을 IFA법으로 4배 이상의 리케치아 항체 역가가 증가를 보이거나 1회 검사 시 IgG 1 : 128, IgM 1 : 10 이상의 항체가를 나타낼 때 양성으로 판독한다.

3. 레지오넬라

- ① 1 : 32에서 end point 3+이상일 경우, 1차 양성으로 판독한다.
- ② Pool에 해당되는 각 균주를 고정하고 혈청을 1 : 32, 1 : 64, 1 : 128, 1 : 256, 1 : 512, 1 : 1,024, 1 : 2,048 단계 희석하여 2차 실험을 실시한다.
- ③ 2차 실험은 1 : 128 이상에서 end point 3+이상일 경우, 양성으로 판독한다.

* 판독기준

4+ = 아주 밝은 노랑-초록으로 균이 염색된다.

3+ = 밝은 노랑-초록으로 균이 염색된다.

2+ = 전체적으로 일정하나 희미하게 균이 염색된다.

1+ = 거의 보일 정도로 균이 염색된다.

- = 염색이 안된다. 균이 희미하게 자가형광을 보이기도 하지만 노랑-초록색을 보이지는 않는다.

4. 주의점

면역형광 시험법의 경우 판정을 하는데 있어 매우 주관적일 수 있으므로 확실하게 양성과 음성을 판독하는데 많은 주의가 요구된다. 따라서 시험자는 양성과 의양성 또는 음성결과를 정확히 판독할 수 있도록 객관적인 기준을 정립할 수 있어야 한다. 또한 반복 실험 및 다른 시험자와 공동 시험을 실시하여 결과를 비교하는 것도 매우 중요하다.

참고문헌

- 1) Coligan E, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. Current protocols in immunology. Wiley Interscience, 1993.
- 2) Goldman M. Fluorescent antibody methods. Academic press, 1968.
- 3) Mary Osborn. Cell Biology, A laboratory handbook. 2nd ed. 1998, p.462-468.
- 4) Cherry WB, Goldman M, Carski TR. Fluorescent antibody techniques in the diagnosis of communicable diseases PHS Pub. No.729. Washington DC. Govt. Ptg. Off. 1960.