

酵母樣真菌의 單크론 生成

廉 錕·金 承 哲·李 長 勳*

단국대학교 미생물학과

호서대학 환경공학과*

A Study on the production of Monoclonal Antibodies against *Rhodotorula rubra*

K. Ryeom, S.C. Kim, J.H. Lee

Dept. of Micro, Dan Kook University

*Dept. of Environ. Engin., Hoseo College**

Abstract

Having studied the production of monoclonal antibodies for developing a diagnosis medicine which shall be detected by a high-sensitivity test by using *Rhodotorula rubra* as a fungi-host which had been extracted through biochemical tests and follow-up examinations on Yeast-like fungi obtained from pulmonary tissues of pulmonary tuberculosis patients who had been in Kong ju National Tuberculosis Hospital from Jun. to Dec. in 1987,

I. have gained such results as follows:

1. The fusion rate was influenced by feeder cell layers, cell density and time required to the cell fusion with cells in myelona subculture.
2. The fusion rate did not show any significant difference when the cell was applied with two molecular weights, i.e., 1500 and 4000, of polyethylene glycol.
3. Fused cells after the addition of HAT selection media were bright and round, whereas unfused myelona cells and spleen cells were shrunk and granulated.

4. The cell fusion rate turned out to be about 57.2%(150 wells / 264 wells).
5. 10%(15 wells / 150 wells) of the positive reaction was detected in monoclonal antibody screening.
6. The titer which had reacted positively to *Rhodotorula rubra* fungal-host was 800 times in density after the gradual dilution of the produced monoclonal antibodies with Indirect ELISA method.
7. The Strongest specific reaction came out after the peroxidase labelled anti-human immunoglobulin had been applied to *Rhodotorula rubra* for activating its nature after making drift with Carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) and drying completely.

I. 序 論

Genes *Rhodotorula* (family Cryptococcaceae, Subfamily Rhodotoruloideae)는 成長率, colony topograph, 細胞의 크기 및 形態, 간혹 보이는 未發育 狀態의 Pseudomycelium, Capsule 存在, Urea를 分解하는 能力 그리고 醱酵 能力의 缺乏 등이 *Cryptococcus* 와 多分히 類似하였다.¹⁾⁹⁾

*Rhodotorula rubra*와 *Rhodotorula glutinis*는 드물기는 하지만 敗血症, 腦膜炎 그리고 慢性皮膚感染症이 發病된다고 報告되어 있다.¹⁵⁾

最近에는 *Rhodotorula pallida*와 *Rhodotorula marina*가 白血病 患者에게 侵入, 感染된다고 報告되어 있다.¹⁾

이 외에도 病院에서 靜脈注射할 때 汚染된 플라스틱 튜브로 부터 人體內 血管으로 侵入, 感染되어 眞菌症이 發病된다고 報告되어 있다.¹⁾

酵母樣 眞菌 *R.rubra* 感染에 對한 迅速 正確한 診斷方法 使用에 있어서 現在 實驗室 診斷方法으로 血球凝集抑制試驗(H.I. test)이 가장 많이 使用되며, 1次 및 2次의 血清에 關한 抗體價를 調査하여 一定 水準 以上の 抗體 確認으로서 陽性으로 診斷하는 方法을 使用하고 있다.⁶⁾

近來에는 感染 與否를 診斷하기 위해 血清中の Immunoglobulin M 特異 抗體價를 調査하는 方法

을 使用하며, 이에는 超高速遠心法, Mercaptoethanol 處理法, 크로마토그래프法 등이 使用되고 있다.^{16) 17) 18) 19)}

最近 研究에 依하면 上記한 方法보다 Antibody capture assay가 特異種에 對한 IgM 探知에 보다 感도가 높음을 報告하고 있다.¹⁴⁾

그러나 이러한 高感度 診斷方法을 위해서는 低濃度の 眞菌을 探知할 수 있는 標識抗體製作이 要求된다.^{22) 24)}

現在까지는 이를 爲해 Hyperimmune 動物血清을 使用하고 있으나 이러한 血清의 不必要한 反應에 對해 극히 留意해야 하며, 이러한 種類의 反應은 可能한대로 除去해 주어야 한다.

抗原 決定器에 對한 概念이 Landsteiner 等に 依해 確立되고 抗體 形成에 있어 Burnet의 Clonal selection theory가 提示되면서 特定 抗原에 對한 特異 抗體 生成을 明確히 說明할 수 있게 되었다.^{2) 3)}

本 研究은 製造한 단클론 抗體를 利用하여 IgM의 感도 높은 探索이 可能한 診斷製를 開發할 目的으로 優先 基礎 研究로서 細胞融合方法과 ELISA 法에 依한 *R. rubra* 診斷 方法에 關한 研究 結果를 다음과 같이 報告하고자 한다.

II. 材料 및 方法

1. 使用 培地 및 試藥

骨髓腫 細胞의 complete medium으로 DMEM (Sigma)에 15% FCS(Gibco), 3.5 g Glucose / l 2mM-Glutamin, 3.7 g NaHCO₃ / g, 100 μg / ml의 Penicillin 및 100 μg / ml Streptomycin을 加하여 使用하였다.

HT media는 complete medium에 13b μg / ml Hypoxanthine과 3.88 μg / ml Thymidine을 加하고, HAT media는 HT media에 0.19 μg / ml Aminopterin을 添加하였으며, 모든 培養液은 10mM HEPES를 加하여 使用하였다.

이는 Table 1.에 表示되어 있다.

2. 使用 菌珠

1987年 6月부터 12月까지 國立公州結核病院에서 入院하고 있는 肺結核 患者들의 肺組織으로부터 分離된 酵母樣真菌을 生化學的 試驗 및 諸般 試驗을 통해 R. rubra로 同定된 後 SDA(Difco)에 繼代하여 단코론 抗體 製造에 使用하였다.⁵⁾⁷⁾

3. 抗原 準備

酵母樣 真菌 R. rubra를 SDA plate에 37°C, 72 時間 培養한 後 0.5% Formalin 添可된 生理食염수 5ml을 넣고 10分間 放置한 後 Pasteur pipette을 使用하여 浮遊液으로 만든 後, 生理食鹽수로 遠心, 洗滌하여 上清液을 除去하고 沈澱된 細胞에 適當한 量의 生理食鹽수를 添加해서 抗原으로 使用하였다.^{12) 28)}

4. 血球凝集抑制試驗

試驗 方法을 原則적으로 Clark와 Casals을 따랐으나 全體적으로 Microplate system을 使用함에 따라 一部 修正하여 實驗을 實施하였다.

5. 免疫

抗體 生産 細胞를 얻기 爲해 20 g 程度의 Balb / c Mouse에 抗原을 0.4ml(1.0×10⁸ Cells / ml)씩 1週 間隔으로 3回 腹腔內에 注射하였고, 10日 後에 0.2ml(5.0×10⁸ Cells / ml)씩 꼬리 靜脈에 注射해서 4日 後에 脾臟 및 大食 細胞를 摘出하여 細胞 融合에 使用하였다.^{5) 17)}

6. Mouse 骨髓腫 細胞 培養

骨髓腫 細胞는 國立保健院에서 分讓받은 Balb / c Mouse 由來의 SP₂ / O-Ag 14를 細胞 融合에 使用하였다.¹²⁾

骨髓腫 細胞는 細胞 培養 Flask에 15% FCS가 含有되어 있는 DMEM(Sigma) 培養液을 使用하였고 5% CO₂가 含有된 培養欺에서 培養中 3~4日에 한 番씩 새로운 DMEM 培養液으로 바꾸어 주었다.²¹⁾

細胞 培養을 實施하는 當日에 骨髓腫 細胞는 2.0×10⁷ Cells / ml로 調整하여 使用하였다.⁹⁾

7. 細胞層의 準備

免疫시킨 Balb / c Mouse 腹腔內에 DMEM 20 ml을 注入시켜서 大食細胞(Peritoneal Macrophage)를 取한 後 HAT media로 添可하여 2.4×10⁶ Cell / ml로 調整하여 96 well microplate(Costar 3595)에

0.1ml씩 분주해서 5% CO₂, 37°C 培養器에서 培養시켜 使用하였다.⁸⁾

8. 細胞融合

細胞融合은 여러 研究者들의 實驗 方法을 參照하여^{9) 11) 16) 17) 18) 19) 25) 26) 28)} 다음과 같이 實施하였다.

免疫시킨 Balb / c Mouse의 脾臟을 無菌的으로 採取하여 DMEM 溶液으로 3回 洗滌한 後 Petridish 에 옮겨 담은 다음, 脾臟 細胞의 安定化를 爲해 FBS로 1回 洗滌하고, 0.83% NH₄Cl (10mM HEPES)로 赤血球를 摘出し킨 다음 FBS로 1會 洗滌하고 DMEM 溶液으로 1回 洗滌한 後 適當量의 DMEM 溶液을 添可해서 脾臟 細胞의 濃度を 8.6×10⁷ Cels / ml로 調整하여 細胞融合에 使用하였다.

脾臟 細胞와 骨髓腫 細胞를 各各 10ml씩 取해 50ml Corex tube에 合친 (脾臟細胞 = 8.6×10⁷ Cell / ml + 骨髓腫細胞 = 2.0×10⁷ Cells / ml, Cell fusion ratio 4.3 = 1) 後 200×g, 10分(Beckman, TJ-6)間 遠心한 後에 上清液을 除去하고 45% PEG(Sigma, M.W. 1500. 4000) 1ml을 1分間에 걸쳐서 積河한 다음에 5% DMSO 1ml을 1分間에 걸쳐 積河하였다.

뒤이어 37°C로 加温된 5% DMSO 20ml을 4分間에 걸쳐서 積河하여 細胞 沈澱物을 浮遊시켰다.

이 細胞 浮遊物을 500×g, 10分間 遠心한 後에 上清液을 除去하고 HAT media 30ml을 添可하여 浮遊시켜서 96 well microplate에 0.1ml씩 分注하였고 週 2回씩 HAT media를 各 well 當 0.1ml씩 交換하면서 融合 細胞群 形成을 觀察하고 14日 以後에는 HT media로 交換하였다.

9. 抗體 Screening

細胞 培養液內에 包含된 抗體價를 測定하기 爲해 Chequer board ELISA method^{23) 28)}을 다음과 같이 實施하였다.^{12) 27)}

R. rubra 抗原을 coating시킨 Microplate에 融合된 細胞가 자라고 있는 well의 培養 上清液을 0.1ml씩 加해 5% CO₂, 37°C 培養器에서 90分間 加温한 다음에 PBS-T ween 20으로 3回 洗滌한 Peroxidase conjugated anti-mouse IgG를 well 當 0.1ml씩 加하여 5% CO₂, 37°C 培養器에서 90分間 加温한 다음에 Substrate(O-Parapheny-line diamine) 溶液을 各 well 當 0.1ml씩 分注하여 Enzyme-Substrate 反應을 誘導하였다.

그 後 2M H₂SO₄ 溶液을 50μl / well 씩 添可하여 Enzyme-Substrate 反應을 靜止시키고 Automatic ELISA reader로 492nm에서 吸光度를 測定하여 抗體價를 調査하였다.²⁵⁾

10. Cloning

抗體 Screening에서 陽性 反應을 well 中 가장 強하게 反應을 나타낸 3個의 Clone을 Limiting dilution(1 cell / 1 well) 方法에 依한 Cloning 하였다.²⁸⁾

11. Indirect ELISA test.

Formalin으로 處理한 R. rubra를 菌體 抗原으로 하여 細胞 濃度を 5.0×10⁷ Cells / ml로 調整한 다음 Indirect ELISA test를 實施하여 抗體價의 變動을 調査하였다.²¹⁾

Ⅲ. 結 果

1. 骨髓腫 細胞의 增殖樣相

使用하는 骨髓腫 細胞의 正確한 增殖樣相을 把握하는 것은 細胞 融合의 成敗에 大端히 重要하므로 細胞 繼代後의 細胞의 增殖狀態를 調査하였다.

一定數의 細胞를 注入하여 繼代하고 經過된 時間에 따라 細胞數를 計算한 結果는 Fig. 4에서 보는 바와 같다.

새로운 培養液으로 繼代하여 24~48 時間까지는 別다른 細胞數의 增加가 없었으나 48時間 以後에 急激한 細胞數의 增加가 있었으며, 이 時期가 對數 增殖期로 보였다.

細胞 繼代後 4日째에 最大 數에 達했으며 그 細胞數는 注入時의 細胞 數 $0.4 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^5$ Cells / ml에 非해 $12.2 \times 10^5 \sim 12.7 \times 10^7$ Cells / ml에 達했으며 하루 程度 그 數가 維持된 以後에 細胞數는 急激히 減小되었다. 그 以上の 時間이 經過됨에 따라 大部分의 生細胞는 死滅되었다.⁹⁾

2. 細胞融合率

細胞融合 操作이 끝난 後 264 wells 中에서 Hybridoma 를 나타낸 well 數는 150個이었다.

融合率은 57.2%이었고, 150個의 well 中 抗體 Screening에서 陽性 反應을 보인 well 數는 15個 ($15/150 = 10.0\%$)이었다. 이 中 3個의 well의 細胞를 Limiting dilution법에 依해 Cloning 하였고 Cloning된 細胞는 安定的이고 持續的으로 增殖하는 것을 確認하였다.

3. Indirect ELISA test.

R. rubra를 Formalin 處理하여 5.0×10^7 Cells / ml 抗體를 段階的으로 稀釋하여 Indirect ELISA test 를 實施하였을 때 R. rubra 菌株에서 陽性 反應 (O.D. 0.35 以上)으로 보인 titer는 800倍이었다.

Ⅳ. 考 察

단크론 抗體를 利用한 早期 診斷은 適切한 患者 管理 및 傳染病의 正確한 流行 樣相을 把握하는데 極히 重要하다. 最近 Mortimer 等¹⁶⁾은 Rubella에서 IgM探索을 爲해 IgM-Antibody Capture Immuno Assay方法을 使用한 結果 感도가 높고 特異성이 있었으며, 別다른 非特異성이 없었음을 報告하였다.

또한 Tedder 및 Yao 등¹⁹⁾은 Antibody Capture Test에 있어 在來의 血清을 使用하는 것보다 단크론 抗體를 使用하는 것이 보다 優秀함을 Rubella 早期 診斷에서 證明하였다.

車等⁹⁾은 단크론 抗體를 應用 方法을 摸索하였으며, 朴¹²⁾은 단크론 生成에 關한 理論을 發表한 바 있다.

Yoshimura와 Takaka等²⁰⁾은 酵母樣 眞菌인 *Candida albicans*의 단크론 抗體의 特異성과 反應을 報告한 바 있다.

Kurp와 Ting等²²⁾은 抗原 製造에 있어 活性이 가장 強한 對數 增殖期의 初期段階의 菌體를 抗原으로 使用한다고 主張하고 있다.

또한 朴¹²⁾은 脾臟 細胞와 骨髓腫 細胞를 融合시키면 細胞 融合이 일어나는데, 이 때 脾臟 細胞와 脾臟 細胞, 脾臟 細胞와 骨髓腫 細胞, 骨髓腫 細胞와 骨髓腫 細胞間에 融合이 生成한다고 報告하였다.

金⁹⁾은 細胞 融合된 것을 選擇 培地인 HAT media 에 培養時 HAT 培地內에 있는 Amiopterine

에 의해 內在의 DNA合成 經路가 遮斷되고 HAT 培地에 있는 Hypoxanthine과 Thymidine을 利用하여 DNA를 合成하여야 하는데 HPRT酵素가 必要하게 된다고 報告되었다.

骨髓腫 細胞(HPRT⁻)間에 融合된 細胞는 HAT 培地에서 數日內에 죽게 되고, 脾臟 細胞(HTRT⁺)間에 融合된 細胞는 HAT培地에서 몇일 동안은 生存하게 되지만 繼續 增殖할 수 있는 性質이 없으므로 死滅한다고 報告되었다.²⁷⁾

骨髓腫 細胞와 脾臟 細胞의 融合 細胞는 脾臟 細胞가 갖는 HPRT酵素에 의해 生存하게 되고, 死滅하지 않고 繼續增殖할 수 있는 骨髓腫 細胞의 性質에 의해 特續적으로 增殖한다고 Miyakawa와 Kagaya等²⁸⁾은 報告한 바 있다.

骨髓腫 細胞에 있어서 最近 Köhler와 Milstein¹⁾이 使用한 Myeloma cell line은 P₃-X63-Ag8로서 細胞 融合을 하여 얻은 Hybridoma는 目的으로 하는 抗體 이 외에 骨髓腫 細胞 自體가 生産하는 抗體 그들의 Kimera molecule을 分泌하고, 그 後 이 骨髓腫 細胞(P₃-X63-Ag8) 變異形으로서 얻은 P₃/X63-Ag8-U₁, X63-Ag8·6·5·3 등의 Myeloma cell line은 骨髓腫 細胞 由來의 抗體를 分泌하지 않은 Nonsecretor로 報告²²⁾되어 있으며, 이 Nonsecretor와의 사이에 된 Hybridoma는 目的으로 하는 단크론 抗體만을 分泌한다고 報告되어 있다.

따라서 最近에는 Non secretor cell line이 細胞 融合에 利用되고 있다.

本 實驗에서도 Non secretor cell line 中の 하나인 SP₂/O-Ag14를 細胞 融合에 利用했으며, 細胞 融合時 脾臟 細胞와 骨髓腫 細胞의 比率를 8.6×10⁷cells/ml 對 2.0×10⁷cells/ml 即, 4.3:1로 分注하여 96well microplate에서 細胞 融合率이 57.2% (150wells/264wells)에 達했다.

단크론 抗體 Screening에서는 陽性 反應이 10%(15wells/150wells)에 이르렀다. 또한 Indirect ELISA test에 있어서 陽性反應을 보인 titer는 800배이었다.

融合 細胞의 上層液에 對한 抗體 生成 與否에 對한 調査를 爲하여 血球凝集抑制試驗을 使用하였으며, Aceton 處理하지 않은 境遇 多數가 1:20~1:40까지의 非特異反應을 보였으며, 다른 研究者들의 報告¹⁶⁾ 19)와 같이 初期의 境遇 血球凝集抑制試驗으로는 단크론 抗體의 效果的인 探知의 어려움을 認識하게 되었으며, ELISA test를 使用하여 定立하고자 하였다.

低濃度の 血清 稀釋에서 나타내는 非特異 反應은 間接方法의 不利한 點으로 推測된다.

血清凝集抑制試驗보다 感도가 높은 ELISA test를 使用하여 抗體 探知에 利用하고자 하나 相當한 水準의 非特異反應이 問題가 된다.²⁶⁾

어떻든 1975年 Köhler와 Milstein이 처음으로 단크론 抗體를 開發한 以來 真菌學 分野에서는 病原性을 가진 抗原의 微細分類⁶⁾와 아울러 보다 效果的인 早期 診斷¹⁷⁾²⁰⁾²⁴⁾의 可能性을 提示해주고 있으며 기회성 진균증을 誘發시키는 R.rubra의 早期 診斷 및 治療의 實用化를 爲한 特續적인 研究가 要求된다.

參 考 文 獻

1. Billy H. Cooper, and Margarita Silvia Hunter, 1985. Yeasts of Medical Importance. Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Burnet, F.M. 1957. A Modification of Jerne's Theory of Antibody Production using the concept of Clonal Selection. Aust. J. Sci. 20: 67.

3. C.Y.Cha, 1985. Application of the Monoclonal Antibodies to diagnosis and the treatment of the cancer. *J. Korean Med. Assoc.* 28 : 10.
4. C.Y.Cha., M.J.Cho. and E.S.Hwang, 1984. Production and Application of Monoclonal Antibodies. *Tuberculosis and Respiratory Diseases.* 31 : 141—147.
5. Diane L. Brawner, and Jim.E. Culter, 1984. Variability in Expression of cell surface Determinant on *Candida albicans* as Evidenced by an Agglutinating Monoclonal Antibody. *Infect. Immun.* 43 : 966—972.
6. Hasenclever, H.F., W.O.Mitchell, 1961. Antigenic studies of *Candida*. I. Observation of two Antigenic Groups in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 82 : 570—573.
7. J.A. Barnett., R.W. Payne, and D. Yarrow, 1983. *Yeasts : Characteristics and Identification.* Cambridge University Press.
8. Jim.E. Cutler and Anne H. Poor, 1981. Effect of Mouse Phagocytes on *Candida albicans* in vivo Chambers. 31 : 1110—1116.
9. J.S. Kim, 1986. Monoclonal Antibody Theory. *K.J.C.P.* 6 : 499—503.
10. Köhler G. and Milstein C. 1975. Continuous Cultures of Fused cells secreting Antibody of predefined specificity. *Nature* 256 : 495—497.
11. K.S. Park., Y.W.Lee., H.B.Oh., M.Y.Park. M. S.Lee., W.K.Seong., Q.J.Hwang., Y.M.Ha and J.K.Park, 1986. Study on Monoclonal Antibody Production against *Salmonella typhi* Vi Antigen. Report of NIH. Korea. 23 : 229—240.
12. M.H. Park, 1986. Production of Monoclonal Antibody. *K.J. C.P.* 6 : 505—509.
13. Michael J. Buchmeir., Hanna A. Lewicki., Oyewale Tomori, and Karl M. Johnson, 1980. Monoclonal Antibodies to Lymphocytic Choriomeningitis virus react with Pathogenic Arenaviruses. *Nature.* 288 : 486—489.
14. Landsteiner K. 1945. *The Specificity of Serological Reactions.* Cambridge, Massachusetts, Havard University Press, 2nd Edition.
15. Pore, R.S. and J. Chem, 1976. Meningitis caused by *Rhodotorula, Sabouraudia.* 14 : 331—335.
16. P.P.Mortimer., R.S. Tedder., M.H. Hambling., M.S. Sharfi., F.Burkhardt, and U.Schilt, 1981. Antibody Capture Radioimmunoassay for Anti—Rubella Ig M. *J. Hyg., Camb.* 86 : 139—153.
17. Richard F.Hector., Judith E. Domer, and Emily W. Carrow, 1982. Immune responses to *Candida albicans* in Genetically Distinct Mice. *Infect. Immun.* 38 : 1020—1028.
18. Richard J. Massey, and Gerald Schochetman, 1981. Topographical Analysis of viral Epitopes using Monoclonal Antibodies. : Mechanism of virus Neutralization *Virology.* 115 : 20—32.
19. R.S. Tedder., J.L. Yao, and M.J. Anderson, 1982. The production of Monoclonal Antibodies to Rubella Haemaagglutinin and their use in Antibody—Capture Assays for Rubella—Specific Ig M.
20. S.J.Kim., S.O.Kim., S.H.Lee., Y.S.Chong, and J.S.Suck, 1986. A Study of on the Mating Types and Serotypes of Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* and Production of Serodiagnostic Antigen and Antiserum for *Cryptococcus*. *J.Korea Soc. Microbiol.* 21 : 127—131.
21. Uffe Lø vborg, 1982. *Monoclonal Antibody, Production and Maintenance.* William Heinemann Medical Books. London.

22. Viswanath P. Kurup., Eve Y. Ting. and Jordan N. Fink. 1983. Immunochemical Characterization of *Aspergillus fumigatus* Antigens. *Infect. Immun.* 41 : 698-701.
23. Y.H. Kook., M.J.Cho., E.S.Hwang., I.S.Kim., C.Y.Cha., W.H.Chang., S.H.Lee., S.J.Kim. and Y.C. Han. 1984. Production and study on the Specificity of Monoclonal Antibodies to Pressate Extract a Antigen of *Mycobacterium Tuberculosis*. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*. 31 : 83-90.
24. Yoshimura Fukazawa., Takako Shinoda. and Takeshi Tsuchiya. 1968. Response and Specifity of Antibodies for *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 95 : 754-763.
25. Y.O.Shin., S.B. Paik., Y.H.Yoon., K.Y.Park., and S.D.Suh. 1983. Basic study on Monoclonal Antibody for the use of Japanese Encephalitis diagnostic Regents. *Report of NIH. Korea.* 20 : 147-156.
26. Yozo Miyakawa., Keiko kagaya., Yoshimura Fukazawa. and Gilbu Soe. 1986. Production and Characterization of Agglutinating Monoclonal Antibodies against Prdorninant Antigenic Factors for *Candida albicans*. *J.Clinic., Microbiol.* 23 : 881-886.
27. Y.S.Shim., M.J.Cho., C.Y.Cha. and Y.C.Han. 1987. Production and Characterzation of Monoclonal Antibodies Reactive to PPD of *Mycobacterium Tuber-culosis*. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*. 34 : 13-25.
28. Y.T.Lee., W.I.Jung. 1983. *Genetic Engineering*. Jib Moon Dang. Seoul.

Table 1. Ingredients of complete medium, washing medium, HAT medium and HT medium used in cell culture and fusions.

Ingredients	complete medium	washing medium	HAT medium	HT medium
Dulbecco's Modified Eagle's medium,	1,000ml	1,000ml	1,000ml	1,000ml
D-Glucose	3.5 g	3.5 g	3.5 g	3.5 g
L-Glutamin	2mM / ml	2mM / ml	2mM / ml	2mM / ml
Sodium bicarbonate	3.7 g	3.7 g	3.7 g	3.7 g
Foetal bovine serum	15%	15%	15%	15%
Penicillin	100ug / ml	100ug / ml	100ug / ml	100ug / ml
Streptomycin	100ug / ml	100ug / ml	100ug / ml	100ug / ml
HEPES	10mM	10mM	10mM	10mM
IN Hcl	5ml	5ml	5ml	5ml
Hypoxanthine	.	.	136ug / ml	136ug / ml
Aminopterin	.	.	0.19ug / ml	.
Thymidine	.	.	3.88ug / ml	3.88ug / ml

Table 2. General properties of isolated clinical *Rhodotorula rubra*.

<i>Rhodotorula rubra</i>	Isolated cultures.	Results.	Tests.
+	Growth at 37°C		
-	Pericle broth		
-	Hyphae present		
-	Chlamyospore		
-	Germ tube		
-	KNO ₃ utilization		
+	Dextrose		Assimilation of
+	Maltose		
+	Sucrose		
-	Lactose		
+	Galactose		
-	Mellobiose		
-	Cellobiose		
-	Inositol		
-	Xylose		
+	Raffinose		
+	Trehalose		
-	Dulcitol		
-	Glucose		Fermentation of
-	Maltose		
-	Sucrose		
-	Lactose		
-	Galactose		
-	Trehalose		
-	Cellobiose		
+	Urease		

- + , Growth or presence of structure.
- , Neither growth over control nor fermentation.
- * Characteristic description of *Rhodotorula rubra*
 Pink colony
 Vegetative reproduction by budding.
 No sexual reproduction
 No filaments

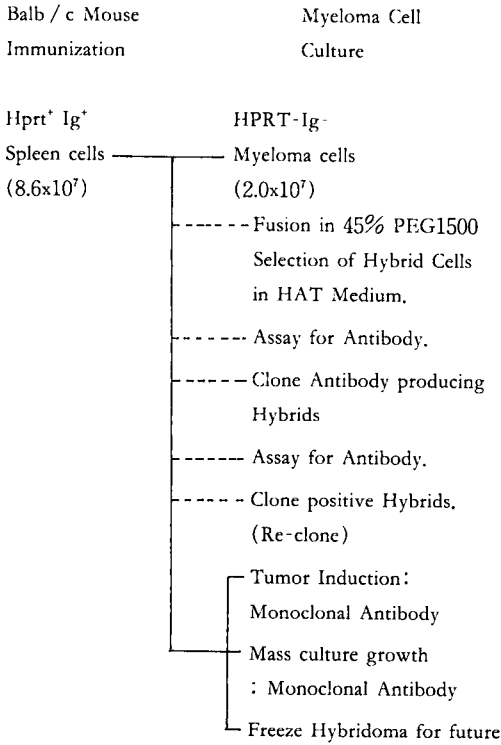


Fig. 1. Production of Monoclonal Antibody

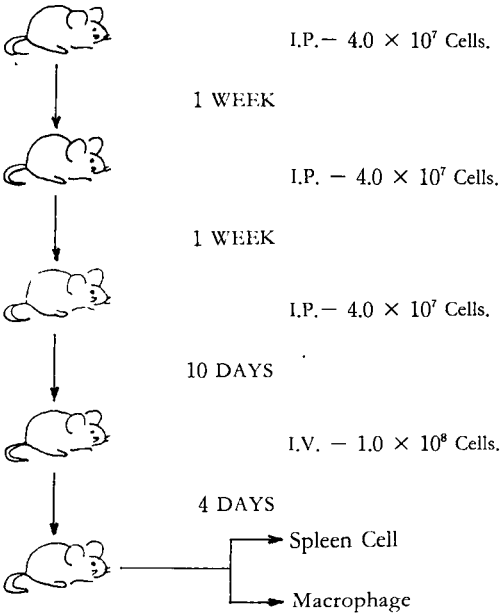


Fig. 2. Immunization Schedule of Antigen.

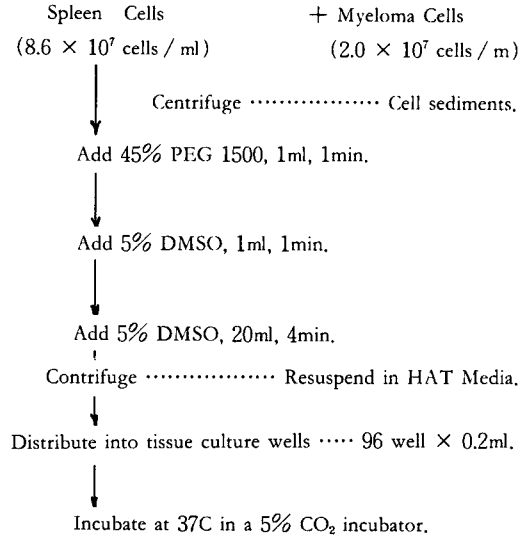


Fig. 3. Cell Fusion Process.

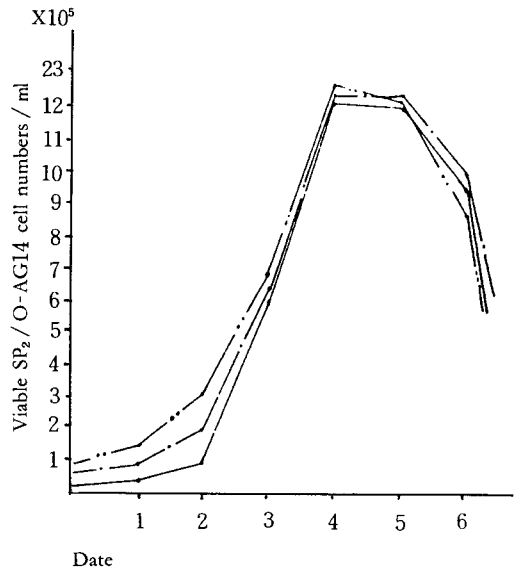


Fig. 4. Comparative growth curve of SP2 / O-AG14 cells after cell passages.

1st Experiment : _____
 2nd Experiment : _____
 3rd Experiment : _____



Fig. 5. Cells in 96 well microplate at 8 days after fusion · Feeder cells and cell debris are also present.



Fig. 7. From this point the quantity of cells and their secreted makes ELISA testing possible.

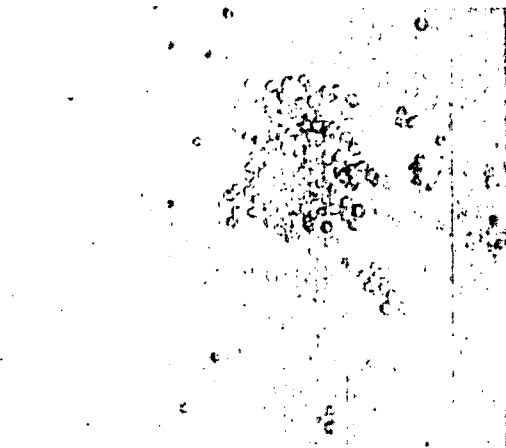


Fig. 6. Cells from cloning in limiting dilution
Cells a few days older.

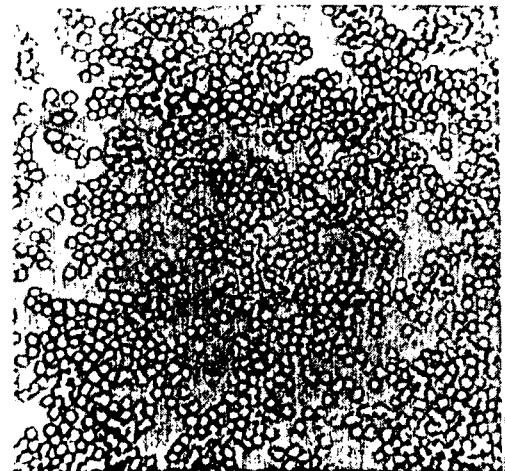


Fig. 8. 60 – 80% Confluent cell structure.
This represents the upper limit of optimal cell concentration.