

시험관 내 면역 기술에 의한 항체 생산에 관한 연구

전태훈 · 서동상

성균관대학교 유전공학과

가장 효과적인 H-2^b 항원에 대한 시험관내 항체 생산 조건을 찾기 위하여 근교계 생쥐인 C57BL/6BySnJ의 비장세포를 UV로 불활성화 시킨 후 항원으로 사용하고, A/wySnJ × Sm/J(A_{Sm}JF1, hybrid)의 비장세포를 항원 수용자 계통으로 하여 5-7일동안 배양기에서 항체 생산을 유도하였다. 본 실험에서 T 임파구, 대식세포와 임파구 분화 촉진 인자인 Concanavalin A, Lipopolysaccharide, Pokeweed mitogen 등을 사용하여 20가지 조건으로 실험을 수행하여, 항체 생성 여부는 보체 의존성 세포 장애 실험과 면역 효소법에 의해 조사하였다. 그 결과 모든 조건에서 항체생성이 확인되었으며, 가장 좋은 시험관 내 항체 생산 조건으로는 T 임파구와 대식세포를 함께 사용하여 면역시킨 것이 가장 효과적이었다. 이 방법을 이용하여 항체 생산을 유도한 후 5일째 면역된 비장세포를 Sp2/O-Ag 14와 세포 융합시켜 H-2^b 마우스의 세포 표면 항원에 대한 단일항체 생산을 시도하였다. 또한 생체내 면역 방법과 비교하기 위해 6주간 C57BL/6BySnJ의 비장세포를 복강 내에 주사하여 같은 조건으로 세포융합을 시도하였다. 그 결과 H-2^b 세포의 표면 항원에 대한 항체 생산을 하는 세포군은 시험관내 면역 방법에서 3개, 생체내 면역 방법에서 4개가 확인되었다.

KEY WORDS: *in vitro* immunization, H-2 antigen, H-2 haplotype, hybridoma

시험관내 면역방법(*in vitro* immunization)은 생체내에 직접 항원을 주사하여 면역 반응을 일으키는 생체내 면역 방법과는 달리, 생체내에서 비장세포(splenocyte)를 적출하여 3-7일간 항원과 함께 CO₂ 배양기 내에서 비장세포를 배양하여 B 임파구를 항체 분비 세포(plasma cell)로 분화시켜 항체를 생산하는 것을 말한다(Borrebaeck and Carl, 1983). 이 방법은 1967년에 Mishell과 Dutton에 의해 처음 시도되었으며 그 이후 다양한 항원을 사용한 실험이 행해졌다(Luben and Mohler, 1980; Miner *et al.*, 1981; Dahmus *et al.*, 1988; Erich *et al.*, 1988; Boer *et al.*, 1987, 1988, 1989; Bazin *et al.*, 1987; Boldicke *et al.*, 1988; Borrebaeck and Moller, 1986; 1987,

1988; Mulbacher *et al.*, 1985; Ossendorp *et al.*, 1986; Pardue *et al.*, 1983; Van Ness *et al.*, 1984; Michael, 1988; Kronberg *et al.*, 1989). 시험관내 면역 반응에서 중요시 연구되는 것은 B 임파구를 자극하여 항체 분비 세포(plasma cell)로 분화시키는 B 임파구 활성화 인자(B cell activator)이다(Boldicke *et al.*, 1988). B 임파구 활성화 인자(B cell activator)는 대부분 IL-1, IL-2, BCGF(B Cell Growth Factor), BCDF(B Cell Differentiation Factor)와 같은 cytokine, lymphokine 으로서 이러한 물질들을 시험관내 면역 방법에서 생산하기 위해 다양한 조건으로 시험관내 면역 반응을 시도했다. 지금까지 사용되었던 대표적인 조건들로는 흉선 조건 배지(thymocyte conditioned medium) (Luben and Mohler, 1980; Ossendorp *et al.*, 1986; Van Ness *et al.*, 1984), 혼합 흉선

본 연구는 1992년도 교육부 학술연구조성비에 의해 수행된 연구의 일부임.

조건 배지(mixed thymocyte conditioned medium)(Miner *et al.*, 1981; Borrebaeck and Moller, 1986; Pardue *et al.*, 1983), phorbol myristate acetate activated EL-4 cells의 조건 배지(Borrebaeck and Moller, 1986)등이 있으며, 이밖에도 임파구 분화 촉진 인자(lymphocyte mitogen)를 사용한 시험관내 면역 반응이 시도되었다(Gansbacher and Zier, 1988; Maurice and Oger, 1989; Ilfeld *et al.*, 1981; Anderson *et al.*, 1979; Gupta *et al.*, 1988; Cohen and Rothstein, 1989). 지금까지 약 200종의 임파구 분화 촉진 인자(lymphocyte mitogen)가 밝혀졌고 그 중 LPS(Ilfeld *et al.*, 1981), PWM(Maurice and Oger, 1989), PHA(Gansbacher and Zier, 1988)등이 항체 형성에 도움(polyclonal activator)을 주는 것으로 알려져 있다. 최근에는 임파구 분화 촉진 인자(lymphocyte mitogen)를 이용한 면역 반응의 신호 전달 경로(signal transduction pathway)가 연구되고 있다(Gupta *et al.*, 1988; Cohen and Rothstein, 1989).

시험관내 면역 방법은 생체내 면역 방법과 비교하여 볼 때 여러가지 장점이 있다. 첫째로 사람의 항원과 같이 실험 대상으로 할 수 없는 경우에도 단일균항체를 만들 수 있으며(Kronberg *et al.*, 1989), 둘째로 시간과 투여되는 양이 생체내 면역 방법보다 훨씬 짧고 적으며(Borrebaeck and Moller, 1986), 셋째로 생체내 면역이 위험하거나, 생체내 면역이 불가능한 항원을 면역시킬 수 있다는 장점이 있다(Erich *et al.*, 1988). 또한 생체내 면역 방법에서 일어나는 생체내 내성이나, 과도한 면역 반응에 의한 부작용을 피할 수 있다(Borrebaeck and Carl, 1983). 그 반면에 억제 T 임파구(suppressor T cell)에 의한 면역 억제 작용(Mishell and Dutton, 1967), 어린 송아지 혈청(FBS, FCS)에 의한 다른 불필요한 항체 생산(Van Ness *et al.*, 1984), 과도한 IgM(Boer *et al.*, 1987)의 생성 등이 문제가 되고 있다. 따라서 시험관내 면역 반응에서 사용되는

FCS(FBS)대신 불필요한 항체 생성을 막기 위해 토끼의 혈청(rabbit serum)(Borrebaeck and Moller, 1986; Pardue *et al.*, 1983)이나 생쥐의 혈청(mouse serum)(Mulbacher *et al.*, 1985) 또는 무혈청 배지(serum free media)를 사용하고 있다(Boer *et al.*, 1989).

시험관내 면역 방법을 이용한 항체 생산에 있어서 수용성 항원에 대해서는 별다른 문제없이 실험이 이루어졌으나, 불용성 항원의 경우에는 세포에 독성이 있기 때문에 사용되지 않아야 할 용매에 의해 녹여져야 되거나 침전물 상태로 면역되어야 한다(Van Ness *et al.*, 1984). 또한 약한 항원성(immunogenicity)을 가진 항원의 경우에는 합성 adjuvant를 사용해야 되는 제약이 있다(Boer *et al.*, 1989). 본 연구는 세포 표면 항원이며 불용성 항원인 생쥐의 MHC 항원인 H-2 항원을 용매에 녹이지 않고, Mixed Lymphocyte Culture를 응용하여 서로 다른 H-2 haplotype의 세포를 이용하여 H-2 항원에 대한 시험관내 항체 생산을 시도하여 이를 바탕으로 단일균항체 생산을 시도하였다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 항원으로 사용한 근교계 생쥐(Inbred mouse)는 C57BL/6BySnJ로 H-2^b haplotype이고, 항원 수용자 계통은 A/WySnJ(H-2^a haplotype)와 SM/J(H-2^v haplotype)를 본 실험실에서 교배시킨 잡종 1세대(hybrid, ASmJF1)를 사용하였다. 세포 융합에 사용한 생쥐 종양(mouse myeloma) 세포주는 SP2/0-Ag 14(Balb/c 유래)를 사용하였다.

시험관내 면역 방법

본 실험의 전반적인 방법을 Figure 1에 나타내었다. C57BL/6BySnJ 생쥐(6 주령-10 주령)를 도살 후, 무균 상태로 비장을 적출하여 세척 배지(wash medium, 조성: 10.2 gm/l RPMI 1640, 2 gm/l Sodium Bicarbonate

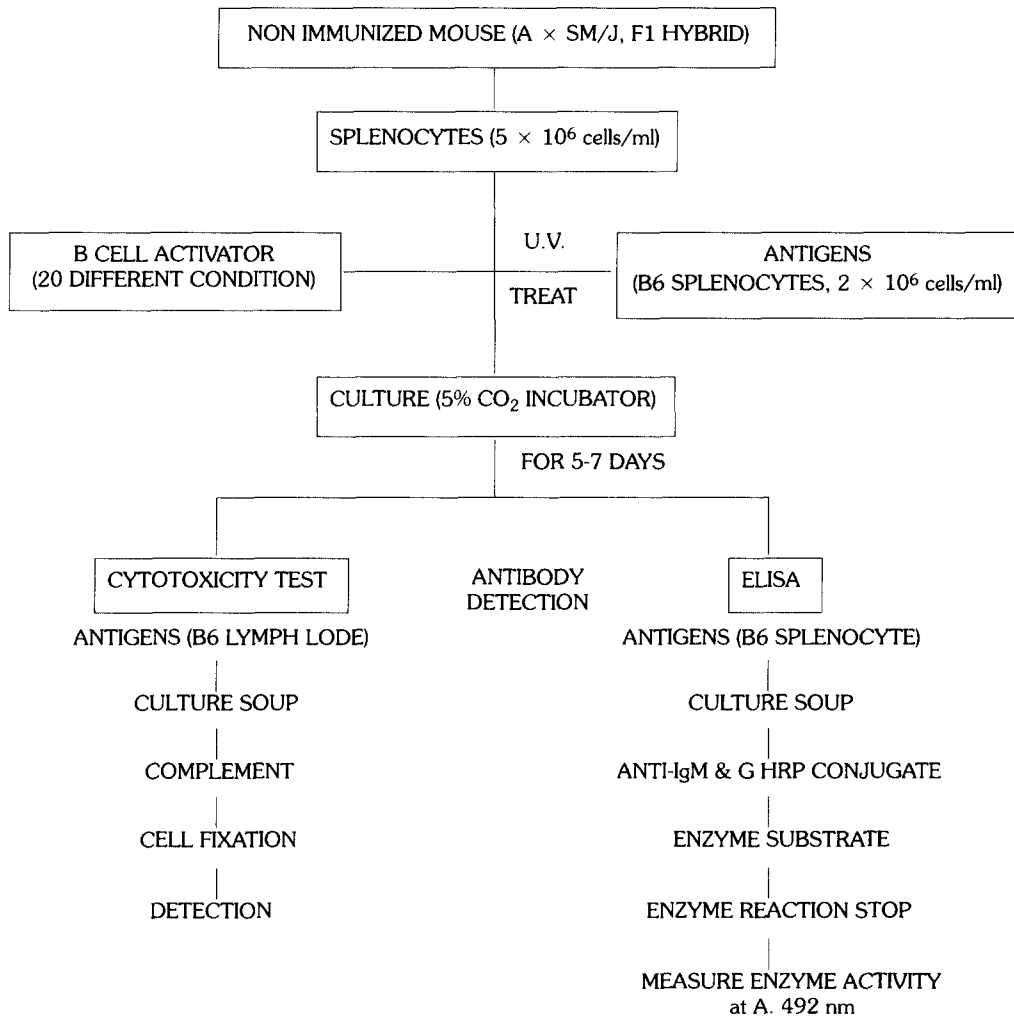


Fig. 1. Experimental scheme of *in vitro* immunization under various conditions.

(NaHCO₃)로 현탁 했다. 그 후 400 g에서 5 분간 원심 분리하는 과정을 3 번 반복하여 비장 세포 침전물을 2 × 10⁶ cells/ml 세포로 준비 하고 하룻밤 U.V. (20 erg/mm)로 처리하여 비 장세포를 불활성화 시켰다. U.V.로 처리한 항 원을 8 ml 의 20% FBS를 포함하는 세포 성장 배지(growth medium, 조성: 10.2 gm/l RPMI 1640, 20% FBS, 5 × 10⁻⁵ M 2-mercaptoethanol, 2 mM glutamine, 50 mM HEPES, 24 mM Sodium Bicarbonate (NaHCO₃), 1 μg/ml penicillin, 1 μg/ml

streptomycin)에 접종시켰다. 항체 공여자로 사용할 A/WySnJ 와 SM/J의 1대 잡종 (ASmJF1 hybrid, 6 주령-10주령)의 비장세포 는 항원과 같은 방법으로 처리하여 5 × 10⁶ cells/ml 세포로 배지에 접종 한 후 다양한 시험 관내 항체 생산 조건(20가지)으로 CO₂ 배양기에 CO₂ 가스 5% 농도로 5일에서 7일간 37°C에서 배양했다.

조건 배지(conditioned medium)

흉선 세포 조건 배지(thymocyte conditioned medium)

수용자와 같은 계통의 2 주령 생쥐를 도살 후, 무균 상태로 흉선을 적출하여 세척 배지로 현탁한 후 400 g에서 5분간 원심 분리하는 과정을 3번 반복했다. 흉선세포 침전물을 5×10^6 cells/ml 세포로 준비하고 8ml의 20% FBS를 포함하는 세포 성장 배지에서 4일간 키웠다. 이때 항원을 2×10^6 cells/ml 세포로 넣어준 경우와, 그냥 키운 경우, T 임파구의 성장 촉진 물질로 알려진 Con A를 100 μ g/ml로 넣어준 경우, 생체내에서 1주일간 면역시킨 수용자와 같은 계통의 생쥐의 흉선세포를 쓴 경우 등의 4가지 조건으로 수행하였다. 4일 후 세포를 400 g에서 5분간 원심 분리하여 버리고 상층액만을 취하여 시험관내 면역시 전체 8 ml의 배지중 20% FBS를 포함하는 세포 성장 배지와 1:1로 혼합하여 사용했다.

대식 세포 조건 배지(macrophage conditioned medium)

수용자와 같은 계통의 6 주령-10주령 생쥐를 도살 후, 무균 상태로 0.34 M sucrose 용액 4 ml을 복강내 주사하여 복강내 대식 세포를 적출하여 세척 배지로 현탁한 후 400 g에서 5분간 원심 분리하는 과정을 3번 반복 후 2×10^5 cells/ml 세포로 준비하고 8ml의 20% FBS를 포함하는 세포 성장 배지에서 4일간 키운다. 이때 항원을 5×10^4 cells/ml 세포로 넣어준 경우와, 그냥 키운 경우, 생체내에서 1주일간 면역시킨 수용자와 같은 계통의 생쥐의 대식 세포를 쓴 경우 등의 3가지 조건으로 수행하였다. 4일 후 세포를 400 g에서 5분간 원심 분리하여 버리고 상층액만을 취하여 시험관내 면역시 전체 8 ml의 배지중 20% FBS를 포함하는 세포 성장 배지와 1:1로 혼합하여 사용했다.

두가지 세포 조건 배지(co-conditioned medium)

흉선 세포 조건 배지(thymocyte conditioned medium)와 대식 세포 조건 배지(macrophage conditioned medium)중 각각의 조건에서 가장 항원, 항체 반응이 잘 된 것들을 1:1로 섞어 시험관내 면역시 전체 8 ml의 배지중 20% FBS를 포함하는 세포 성장 배지와 1:1로 혼합하여 사용했다. 또한 생체내에서 1주일간 면역시킨 수용자와 같은 계통의 생쥐의 대식 세포와 흉선세포를 배양한 것을 같은 조건으로 넣어 주었다.

혼합 배지(mixed cultured medium)

흉선세포 혼합 배지(mixed thymocyte cultured medium)

수용자와 같은 계통의 2 주령 생쥐를 도살 후, 무균 상태로 흉선을 적출하여 흉선세포 조건 배지와 같은 방법으로 처리하여 5×10^6 cells/ml 세포로 준비하고 시험관내 면역시 넣어 주었다. 또한 생체내에서 1주일간 면역시킨 수용자와 같은 계통의 생쥐의 흉선세포를 같은 조건으로 넣어 주었다.

대식 세포 혼합 배지(mixed macrophage cultured medium)

수용자와 같은 계통의 6 주령-10주령 생쥐를 도살 후, 무균 상태로 0.34 M sucrose 용액 4 ml을 복강내 주사하여 복강내 대식 세포를 적출하여 대식 세포 조건 배지와 같은 방법으로 처리하여 2×10^5 cells/ml 세포로 준비하고 시험관내 면역시 넣어주었다. 또한 생체내에서 1주일간 면역시킨 수용자와 같은 계통의 생쥐의 대식 세포를 같은 조건으로 넣어 주었다.

두가지 혼합 배지(mixed co-cultured medium)

흉선세포와 대식 세포를 각각 적출하여 세척 배지로 현탁한 후 400 g에서 5분간 원심 분리하는 과정을 3번 반복 후 각각 5×10^6 cells/ml, 2×10^5 cells/ml 세포로 준비하고

시험관내 면역시 넣어주었다. 또한 생체내에서 1주일간 면역시킨 수용자와 같은 계통의 생쥐의 대식 세포와 흉선세포를 위와 같은 조건으로 함께 넣어 주었다.

임파구 촉진 인자 포함 배지(lymphocyte mitogen contained medium)

T 임파구에 대한 촉진 인자로 알려진 Concanavalin A를 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 조건으로 시험관내 면역시 각각 넣어주었다. 또한 B 임파구에 대한 촉진 인자로 알려진 Lipopolysaccharide를 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 조건으로 시험관내 면역시 각각 넣어주었다. Pokeweed mitogen은 T, B 임파구 양쪽의 분화 촉진 인자로 알려졌는데 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 조건으로 시험관내 면역시 넣어 주었다.

생체내 면역

C57BL/6ByJ 생쥐를 도살 후, 무균 상태로 비장을 적출하여 세척 배지로 헹구 한 후 400 g에서 5분간 원심 분리하는 과정을 3번 반복 후 비장세포 침전물을 생리 식염수(0.8% saline)에 $1.6 \times 10^7/\text{ml}$ 세포로 준비하여 복강내 주사하여 생체내 면역하였다. 이 방법으로 6주간 계속하여 항체 분석시 대조구로 사용했다.

항체 분석

항체의 농축은 ammonium sulfate precipitation 방법으로 수행하였다. 우선 배양액을 400g, 5분간 원심 분리하여 세포를 침전시킨 후, 상층액을 10 ml beaker에 담고 교반시키면서 ammonium sulfate(4 gm)를 완전히 녹여 포화되게 한 후(50% saturation), 4°C에서 하룻밤 동안 보관하였다. 다음날, 3000g에서 30분간 원심 분리하여 0.8 ml PBS(조성: 8.0 gm NaCl, 0.2 gm KH_2PO_4 , 0.2 gm KCl, 2.9 gm $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)로 침전물을 녹인 후, PBS하에서 투석시켜 ammonium sulfate를 완전히 제거시켰다.

보체 의존성 세포 장애 시험(complement mediated cytotoxicity test)

항원으로 사용한 C57BL/6BySnJ의 임과절(lymph node)에서 임과구를 적출하여, 농축된 항체액과 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 그 후에 보체를 첨가시키고, 1시간 동안 37°C에서 보관후, 고정액(glutaraldehyde: 0.2%, glycerine:2%)으로 세포들을 고정시킨 후 위상차 현미경하에서 관찰했다. 이 방법으로 항체 형성은 물론 상대적인 항체의 양도 측정할 수 있다.

면역 효소법: ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

전체 항체양의 검출은 anti-IgG와 IgM HRP conjugate를 사용하였다. H-2 항원이 세포표면 항원이므로 세포(세포 농도: $5 \times 10^6/\text{ml}$)를 항원으로 사용하여 ELISA를 수행하였다(Campbell, 1984). 우선 ELISA 판(Plate)을 세포 coating 용액(10% Poly-L-Lysine solution)으로 1시간 동안 처리한 후, 세척 용액(PBS-Tween(0.05%), 조성: 8.0 gm NaCl, 0.2 gm KH_2PO_4 , 0.2 gm KCl, 2.9 gm $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.5 ml Tween 20)으로 3번 씻은 후 항원으로 사용된 C57BL/6의 비장 세포를 ELISA 판(Plate)에 깔고 하룻밤 보관한 후 0.25% glutaraldehyde을 3분간 가한 후 세척 용액으로 3번 씻는다. 그 후 blocking 용액(1% Bovine Serum Albumin(BSA))으로 2시간 동안 처리하여 세척 용액으로 3번 씻고 세포 부유액(또는 항혈청)을 ELISA 판(plate)에 깔고 1시간 동안 항원-항체 반응이 충분히 일어나도록 한 후 wash 용액으로 3번 씻은 후, HRP-conjugated anti-mouse IgG & IgM (1000배 희석)를 50 μl 씩 ELISA 판(Plate)에 깔고 1시간동안 놓아둔다. 그 후 세척 용액으로 3번 씻은 후, enzyme substrate 용액(조성: 0.04% o-phenylenediamine dihydrochloride(OPD), 0.012% H_2O_2 in phosphate-

citrate buffer, pH 5.0(25.7 ml 0.2 M dibasic sodium phosphate, 24.3 ml 0.1 M citric acid, 50 ml deionized H₂O)을 처리하고 충분히 발색하도록 하였다. 그 후 세척 용액으로 ELISA 판(plate)을 씻지 않고 2.5 M H₂SO₄ 50 μ l stop 용액을 ELISA 판(plate)에 간 후, ELISA reader로 흡광도 492 nm에서 값을 구하였다.

단일균형체 생산

시험관내 면역 방법에 의해 H-2^b haplotype에 대한 단일균형체 생산을 시도하였다. 또한 생체내 면역 방법에 의한 단일균형체 생산을 시도하여 이 두가지 방법을 서로 비교하려 하였다.

H-2^b 세포의 표면 항원에 대한 면역 방법

시험관내 면역 방법은 두가지 혼합 배지(mixed co-cultured medium) 조건으로 수행하는 것이 가장 효과적이기 때문에 이 방법으로 5일간 배양한 것을 사용하였다. 생체내 면역은 C57BL/6BySnJ 생쥐를 도살 후, 비장세포 침전물을 생리 식염수(0.8% saline)에 1.6×10^7 /ml 세포로 준비하여 복강내 주사하였다. 이 방법으로 6주간 계속하여 세포 융합 4일 전 마지막 면역을 실행하였다.

세포 융합

융합 전 날 생쥐 종양 세포의 상태가 좋은지 확인하고, 각종 배지(세포 성장 배지, HAT 배지(HAT medium, 조성: 500 ml 성장 배지(20% FCS), 5 ml \times 100 aminopterin: 4×10^{-5} M aminopterin 용액, 5 ml \times 100 hypoxanthine: 1×10^{-2} M hypoxanthine 용액, 5 ml \times 100 thymidine: 1.6×10^{-3} M thymidine 용액))를 멸균 한 후 미리 37°C로 온도를 맞춘 성장 배지를 각 well에 넣은 후 융합할 비장세포와 같은 계통의 생쥐(6 주령-10 주령)를 도살 후, 무균 상태로 대식 세포를 적출하여 5×10^6 세포로 96 well plate에 feeder로 깔아주고 5% CO₂ 배양기에 넣었다. 융합하는 날, 생체내 면역시켰던 생쥐에서 비장세포(4

$\times 10^7$ cells/ml)를 분리하여 미리 준비해 두었던 생쥐 종양 세포(1×10^7 cells/ml)와 50% PEG (Mw. 1300-1600) 용액에서 세포 융합시킨 후 5개의 96 well plate에 깔았다. 또한 시험관 내 면역시켰던 비장세포(4×10^7 cells/ml)를 모은 후 생쥐 종양 세포(1×10^7 cells/ml)와 같은 방법으로 세포 융합시킨 후 5개의 96 well plate에 깔았다. 융합 다음날 부터 HAT 배지로 선별하였다. 세포 융합 3주 후 보체 의존성 세포 장애 실험을 수행하여 positive well을 선별하였다. 선별된 단일군 세포들을 다시 HT 배지(HT mdium, 조성: 500 ml 성장 배지(20% FCS), 5 ml \times 100 hypoxanthine: 1×10^{-2} M hypoxanthine 용액, 5 ml \times 100 thymidine: 1.6×10^{-3} M thymidine 용액)에 well당 3-10 세포/ml로 희석한 후 feeder를 96 well plate에 깔고 subcloning하였다. 1개월후 보체 의존성 세포 장애 실험으로 2차 선별하였다.

항체 분석

선별된 단일균형체들을 serum free media에서 2일 간 배양한 후 배양액을 27까지 희석하여 보체 의존성 세포 장애 실험을 수행하여 분석하였다.

결 과

H-2^b 세포의 표면 항원에 대한 시험관 내 면역 방법 최적화

H-2^b 세포표면 항원에 대한 시험관 내 면역 방법의 최적화를 위해서 여러 가지 조건으로 연구를 수행하였다. 이들 조건들은 흉선세포나, 대식 세포 같은 세포들과 Concanavalin A, Lipopolysaccharide, Pokeweed mitogen 같은 임파구 촉진 인자(lymphocyte mitogen)들로 나뉜다(Table 1). 이때 항원으로는 C57BL/6BySnJ(H-2^b haplotype)의 비장세포를 U.V.로 불활성화 하여 사용하였고, 항원 수용자 계통은 A/WySnJ와 Sm/J를 교배시킨 잡

Table 1. Various conditions using *in vitro* immunization. To optimize a method of the antibody production against cell surface antigen of H-2^b mice using *in vitro* immunization, there were 20 different conditions which were practiced under various cultured media containing thymocyte and/or macrophage, or various lymphocyte mitogen such as Concanavalin A, Lipopolysaccharide, Pokeweed mitogen.

Type of conditions using <i>in vitro</i> immunization		Name of different conditions using <i>in vitro</i> immunization	Abbreviation
Cell	Thymocyte	mixed thymocyte cultured medium	T
		mixed immunized thymocyte cultured medium	IT
		thymocyte conditioned medium	TCM
		immunized thymocyte conditioned medium	ITCM
		thymocyte conditioned medium with antigen	ATCM
		thymocyte conditioned medium with mitogen	MTCM
	Macrophage	mixed macrophage cultured medium	M
		mixed immunized macrophage cultured medium	IM
		macrophage conditioned medium	MCM
		immunized macrophage conditioned medium	IMCM
		macrophage conditioned medium with antigen	AMCM
	Thymocyte and Macrophage	mixed both cell cultured medium	BC
		mixed both immunized cell cultured medium	BIC
		both conditioned medium	BCM
		both immunized conditioned medium	BICM
Lymphocyte mitogen	Concanavalin A 50 µg/ml	Con 50	
	Concanavalin A 100 µg/ml	Con 100	
	Lipopolysaccharide 100 µg/ml	LPS 100	
	Lipopolysaccharide 200 µg/ml	LPS 200	
	Pokeweed mitogen 10 µg/ml	PWM 10	

종 1세대 (ASmJF1, hybrid)의 비장세포를 사용하였다.

조건 배지의 효과

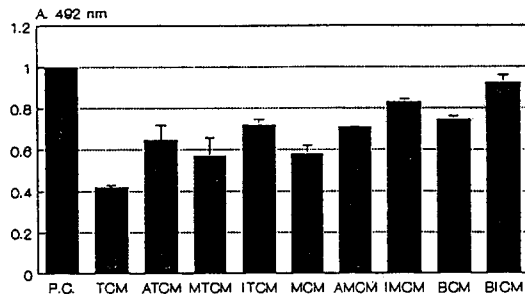
조건 배지들로 시험관내 면역을 수행했을 때 전체 항체양을 측정하기 위해 시험관내 면역 7일째 면역 효소법을 수행하였다. 그 결과 음성 대조구보다 훨씬 높은 항체가 모든 조건에서 확인되었다. 그중 가장 많은 항체가 검출된 방법은 1주 동안 생체내에서 면역시킨 흉선세포와 대식세포를 4일 동안 배양하여 면역시 같이 넣어 준 방법이었다. 시험관 내 면역시 일반적으로 사용되어져 왔던 방법인 흉선 세포 조건 배지의 경우가 제일 적은 값을 나타내었고, 오히려 대식 세포 조건 배지가 더 많은 양의 항체가 검출되었다. 또 흉선세포 조건 배지를 변형시킨 방법인 Con A와 항원을 넣어준 방법이 일반적인 흉선세포

조건 배지보다 더 높은 양의 항체가 검출되었다. 특히 관심 있는 것은 면역시킨 세포들을 사용했을 경우 항체의 증가가 발견되었다. (Figure 2)

H-2^b 세포표면 항원에 반응하는 항체양을 측정하기 위해 5일과 7일에 보체 의존성 세포 장애 실험을 수행한 결과 항체양에서는 큰 차이를 보이지 않았지만 가장 높은 항체 값을 나타낸 것은 면역 효소법의 결과와 마찬가지로 흉선세포와 대식세포를 4일 동안 배양하여 면역시 같이 넣어 준 방법이었다. 또 가장 낮은 항체 값을 나타낸 것은 흉선세포 조건 배지였다.

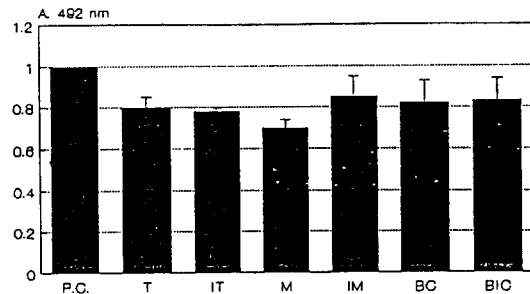
혼합 배지의 효과

혼합 배지들로 시험관 내 면역을 수행했을 때 전체 항체양을 측정하기 위해 시험관 내 면역 7일째 면역 효소법을 수행하였다. 그 결과 조건 배지보다 많은 항체가 모든 조건에서 확인되었



P.C.: POSITIVE CONTROL

Fig. 2. ELISA for antibodies against cell surface antigen of H-2^b mice using *in vitro* immunization under various conditioned media. Splenocytes from non immunized mice were cultured *in vitro* for 7 days as described in the materials and methods section in the presence of various conditioned media as indicated in the figure. After 7 days in culture the supernatant was collected and assayed for polyclonal IgM, and IgG. Values given are means \pm SE from two different experiments. (P.C.: Positive Control, TCM: Thymocyte Conditioned Medium, ATCM: TCM with Antigen, MTM: TCM with Mitogen, ITCM: Immunized TCM, MCM: Macrophage Conditioned Medium, AMCM: MCM with Antigen, IMCM: Immunized MCM, BCM: Both cell Conditioned Medium, BICM: Immunized BCM).

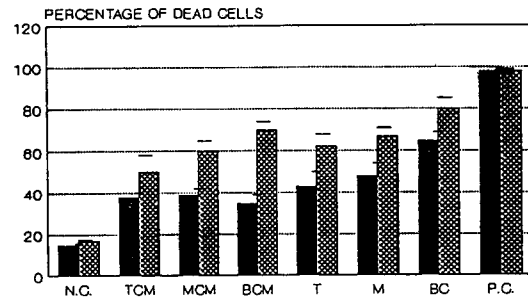


P.C.: POSITIVE CONTROL

Fig. 3. ELISA for antibodies against cell surface antigen of H-2^b mice using *in vitro* immunization under various mixed cultured media. Splenocytes from non immunized mice were cultured *in vitro* for 7 days as described in the materials and methods section in the presence of various mixed cultured media as indicated in the figure. After 7 days in culture the supernatant was collected and assayed for polyclonal IgM, and IgG. Values given are means \pm SE from two different experiments. (P.C.: Positive Control, T: mixed thymocyte cultured medium, IT: mixed immunized thymocyte cultured medium, M: mixed macrophage cultured medium, IM: mixed immunized macrophage cultured medium, BC: mixed both cell cultured medium, BIC: mixed both immunized cell cultured medium).

다. 전체 항체양은 각 조건마다 거의 비슷하였는데 그중 가장 많은 항체가 검출된 방법은 1 주 동안 생체내에서 면역시킨 흉선세포와 대식세포를 면역시 같이 넣어 준 방법이었다. 특히 관심 있는 것은 면역시킨 세포들을 사용했을 경우 조건 배지의 효과에 대한 결과와는 반대로 대식세포의 경우를 제외하고는 항체의 증가가 거의 없었다. (Figure 3)

H-2^b 마우스의 세포 표면 항원에 반응하는 항체양을 측정하기 위해 5일과 7일에 보체 의존성 세포 장애 실험을 수행한 결과 조건 배지보다 많은 항체가 검출되었다. 항체양에서는 큰 차이를 보이지 않았지만 가장 높은 항체 값을 나타낸 것은 면역 효소법의 결과와 마찬가지로 흉선세포와 대식세포를 면역시 같이 넣어 준 방법이었다. 또 가장 낮은 항체 값을 나타낸 것은 흉선세포 혼합 배지였다. (Figure 4)



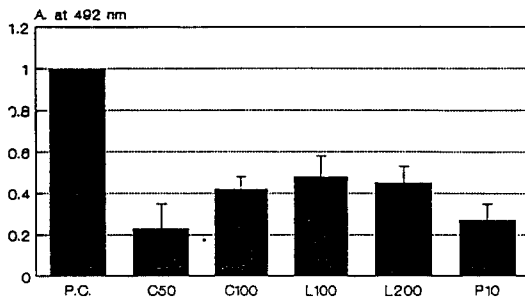
N.C.: NEGATIVE CONTROL
P.C.: POSITIVE CONTROL

Fig. 4. Complement mediated cytotoxicity test for antibodies against cell surface antigen of H-2^b mice using *in vitro* immunization under various cultured conditions. Splenocytes from non immunized mice were cultured *in vitro* for 7 days as described in the materials and methods section in the presence of various cultured conditions as indicated in the figure. After 7 days in culture the supernatant was collected and assayed for complement mediated cytotoxicity test. Values given are means \pm SE from two different experiments. (N.C.: Negative control, TCM: Thymocyte Conditioned Medium, MCM: Macrophage Conditioned Medium, BCM: Both cell Conditioned Medium, T: mixed thymocyte cultured medium, M: mixed macrophage cultured medium, BC: mixed both cell cultured medium, P.C.: Positive Control: mouse antiserum).

임파구 촉진 인자의 효과

임파구 촉진 인자(lymphocyte mitogen)들로 시험관 내 면역을 수행했을 때 전체 항체양을 측정하기 위해 시험관 내 면역 7일째 면역 효소법을 수행하였다. 그 결과 조건 배지나 혼합 배지보다 적은 양의 항체가 확인되었다. 가장 많은 항체가 발견된 LPS의 경우 조건 배지에서 가장 낮은 항체양이 발견된 흉선세포 조건 배지의 경우와 비슷한 수준의 항체 양이 검출되었다. Con A의 경우 투여한 양이 증가할수록 항체 양이 증가한 반면 LPS의 경우에는 반대로 투여된 양이 높아졌을 때 오히려 항체의 양이 약간 감소하였다. PWM의 경우 T, B 임파구 모두 세포 분열을 촉진 시키는 것으로 알려져 항체의 양이 가장 많이 검출될 것으로 생각 되었지만 의외로 항체의 양이 낮게 나타났다. (Figure 5)

H-2^b 마우스의 세포 표면 항원에 반응하는 항체양을 측정하기 위해 5일과 7일에 보체 의존성 세포 장애 실험을 수행한 결과 조건 배지나 혼합 배지보다 적은 양의 항체가 확인되었다. 가장 많



P.C.: POSITIVE CONTROL

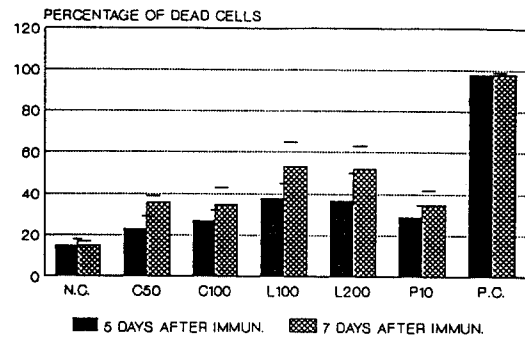
Fig. 5. ELISA for antibodies against cell surface antigen of H-2^b mice using *in vitro* immunization under various mitogens. Splenocytes from non immunized mice were cultured *in vitro* for 7 days as described in the materials and methods section in the presence of various mixed cultured media as indicated in the figure. After 7 days in culture the supernatant was collected and assayed for polyclonal IgM, and IgG. Values given are means \pm SE from two different experiments. (P.C.: Positive Control, C50: Concanavalin A 50 μ g/ml, C100: Concanavalin A 100 μ g/ml, L100: Lipopolysaccharide 100 μ g/ml, L200: Lipopolysaccharide 200 μ g/ml, P10: Pokeweed mitogen 10 μ g/ml).

은 항체가 발견된 LPS 100 μ g/ml의 경우 조건 배지에서 가장 낮은 항체양이 발견된 흉선세포 조건 배지의 경우와 비슷한 수준의 항체 양이 검출 되었다. Con A나 LPS의 경우 투여한 양이 증가 하여도 항체 양이 증가하지 않고 오히려 약간 낮아졌다. PWM의 경우는 전체 항체양의 경우와 마찬가지로 항체의 양이 낮게 나타났다. (Figure 6)

단일균항체 생산

세포 융합된 세포군

H-2^b 마우스의 세포표면 항원에 대한 시험관 내 면역 조건을 흉선세포와 대식세포를 같이 넣어 주었을 때로 하여 5일간 항원과 공여자 계통의 비장 세포를 배양 후 생쥐 종양 세포(mouse myeloma)의 일종인 Sp2/0-Ag 14와 세포 융합시켜 HAT 배지에서 15일간 선별하여 세포군



N.C.: NEGATIVE CONTROL
P.C.: POSITIVE CONTROL

Fig. 6. Complement mediated cytotoxicity test for antibodies against cell surface antigen of H-2^b mice using *in vitro* immunization under various mitogens. Splenocytes from non immunized mice were cultured *in vitro* for 7 days as described in the materials and methods section in the presence of various mitogens as indicated in the figure. After 7 days in culture the supernatant was collected and assayed for complement mediated cytotoxicity test. Values given are means \pm SE from two different experiments. (N.C.: Negative Control, C50: Concanavalin A 50 μ g/ml, C100: Concanavalin A 100 μ g/ml, L100: Lipopolysaccharide 100 μ g/ml, L200: Lipopolysaccharide 200 μ g/ml, P10: Pokeweed mitogen 10 μ g/ml, P.C.: Positive Control: mouse antiserum).

Table 2. Comparison of *in vitro* and *in vivo* immunization on the generation of antigen-specific hybridomas. Splenocytes (4×10^7 cells) from non immunized mice were cultured with C57BL/6 splenocytes *in vitro* for 5 days in the presence of thymocyte and macrophage co-cultured medium and were immunized *in vivo* for 6 weeks before fusion with Sp2/0-Ag14 murine myeloma (1×10^7 cells)

IMMUNIZATION METHOD	NO. OF CELLS AT CELL FUSION	FREQUENCY OF WELLS CONTAINING HYBRIDOMAS	FREQUENCY OF WELLS PRODUCTION H-2 ^b ANTIBODY
<i>IN VITRO</i>	4×10^7	24% (117/480)	2.5% (3/117)
<i>IN VIVO</i>	4×10^7	28% (135/480)	3.0% (4/135)

이 형성된 well을 측정된 결과 생체내 면역 방법에서는 전체 480 well중에 135개, 시험관내 면역 방법에서는 117개에서 항체의 생산이 확인되었다. (Table 2)

단일균항체 검출

H-2^b 마우스의 세포표면 항원에 대한 시험관내 면역 조건을 흉선세포와 대식세포를 같이 넣어 주었을 때로 하여 5일간 항원과 공여자 계통의 비장 세포를 배양 후 생쥐 종양 세포(mouse myeloma)의 일종인 Sp2/0-Ag 14와 세포 융합시켜 HAT 배지에서 15일간 선별하여 세포군이 형성된 well의 배양액을 보체 의존성 세포장애 실험을 수행한 결과 생체내 면역 방법에서 4개의 positive well이 검출되었고, 시험관내 면역 방법에서 3개의 positive well이 검출되었다. 이 well에서 세포군들을 1개월간 HT 배지에서 선별 한 결과 H-2^b마우스의 세포 표면 항원에 대한 단일균항체는 생체내 면역 방법, 시험관내 면역 방법에서 각각 2개 well씩 선별되었다. 이 단일균항체들을 OPI(Oxaloacetate Pyruvate Insulin), 15% FBS를 포함하는 배지에서 유지시키고 있다.

항체 분석

선별되어진 단일균항체들을 분석하기 위해 같은 세포 농도(1×10^3 /ml)로 96 well plate에 2일간 세척 배지(serum free medium)에 배양하여 배양한 배지를 보체 의존성 세포 장애 실험을 수행하였다. 대조구로는 항혈청을 사용하였다. 항혈청은 8배 희석 하였을때 죽은 세포 비율

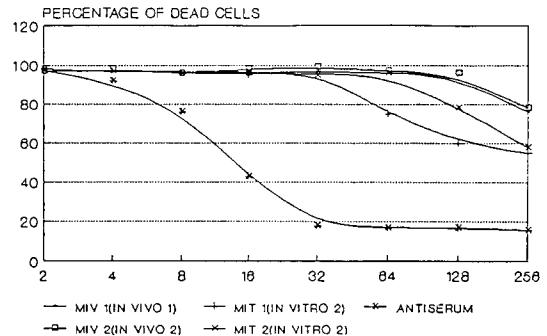


Fig. 7. Titration curve of monoclonal antibody using *in vitro* and *in vivo* immunization by complement mediated cytotoxicity test. The positive wells screened were subcloned by HT media for one month. We screened and assayed antibodies against cell surface antigen of H-2^b mice by complement mediated cytotoxicity test and finally obtained four positive clones.

이 77%로 떨어지기 시작하여 32배 희석시 거의 항체가 검출 되지 않은 반면 시험관내 면역 방법에 의한 단일균항체들은 각각 32배, 64배 희석시에도 희석시키지 않은 항혈청과 같은 양의 항체가 검출되었다. 생체내 면역 방법에 의한 단일균 항체들은 128배 희석시에도 희석시키지 않은 항혈청과 같은 양의 항체가 검출되었는데, 이는 시험관내 면역 방법에 의한 단일균항체보다 2-4 배 많은 항체 양이다. (Figure 7)

고 찰

H-2^b 마우스의 세포 표면 항원에 대한 시험관내 면역 방법을 최적화 하기 위해 서로 다른 20

가지 조건에서 실험을 수행하였다. 그 결과 흉선 세포와 대식세포를 함께 넣어 세포 배양한 조건이 가장 많은 항체가 검출되었다. 이 방법으로 H-2^b 마우스의 세포 표면 항원에 대한 단일군항체를 시험관 내 면역 방법에 의해 생산 하였고, H-2^b 마우스의 세포 표면 항원에 대한 다른 생쥐 계통간의 면역 응답성을 측정 하였다.

H-2^b 마우스의 세포 표면 항원에 대한 시험관 내 면역 방법 최적화

H-2^b 마우스 세포 표면 항원에 대한 시험관 내 면역 방법의 최적화를 위해서 여러 가지 조건에서 연구를 수행하였는데 본 실험에 사용된 조건들은 흉선세포, 대식세포같은 세포들과 Con A, LPS, PWM같은 임파구 촉진 인자들을 사용하여 항체 형성을 분석하였다.

임파구 촉진 인자(lymphocyte mitogen)의 효과

임파구 촉진 인자(lymphocyte mitogen)들을 넣어 시험관내 면역을 수행했을 때 H-2^b 세포표면 항원에 대한 항체 생성이 확인되었으나 그 양은 미약했다. 그 이유는 2가지로 생각 되 어지는데, 첫째는 임파구 촉진 인자 자체의 항원성(antigenicity)에 의해 임파구 촉진 인자 자체의 항체가 만들어져 H-2^b 세포표면 항원에 대한 항체 생성을 방해 했기 때문일 것이다. 둘째로 LPS의 경우 투여된 임파구 촉진인자의 양이 많아지면서 항체의 양이 약간 감소하였는데 임파구 촉진인자의 양이 너무 많아져 오히려 항체 분비 세포의 활성을 저해할지도 모른다고 생각 되어진다.

흉선세포와 대식세포의 효과

흉선세포와 대식세포를 사용한 여러 가지 조건에서 면역을 수행했을 때 항체 생성이 모두 확인되었고, 조건 배지와 혼합 배지를 비교하여 볼 때 혼합 배지가 더 많은 항체가 생성되었다. 이 결과로 볼 때 기존의 시험관내 면역 방법에서 많이 사용된 조건 배지의 경우 흉선 세포나 대식 세포에서 분비되는 cytokine이나 lymphokine

에 의존하였으나, 항원을 세포 자체로 사용하였기 때문에 지속적으로 이런 물질들을 분비하며, 세포 자체가 직접적으로 접촉하는 것이 H-2^b 마우스 세포 표면 항원에 대한 항체 생산에 유리한 것으로 생각 되어진다. 지금까지 알려진 임파구들이 활성을 띠어 물질들을 낼 수 있는 시간은 약 2-3일경으로 본 실험에서는 5-7일간 세포 배양을 하였기 때문에 혼합 배지내에서도 이 물질들을 낼 수 있는 충분한 시간이 된다고 생각되어진다. 흉선 세포 조건 배지를 만들 때 항원이나 T 임파구 촉진 인자를 같이 넣어준 경우 항체가 더 많이 생겼는데 이것은 흉선 세포가 항원이나 T 임파구 촉진인자에 의해 활성이 높아졌기 때문이라 생각 되어진다. 가장 많은 H-2^b 세포표면 항원에 대한 항체가 검출된 방법은 흉선 세포와 대식세포 배양액을 같이 넣어 줄 때였다. 이 결과는 흉선 세포 단독으로 넣어 주었을 때보다 대식 세포를 같이 넣어 주었을 때 APC (antigen presenting cell)로서의 대식 세포의 영향이 흉선 세포의 영향보다 더욱 크다는 것을 암시한다.

면역시킨 세포들을 사용했을 때 조건 배지의 경우에는 전체 항체의 양이 증가하였으나, 혼합 배지의 경우에는 흉선 세포 혼합 배지의 경우는 별다른 차이가 없었다. 이 결과는 조건 배지의 경우 생체 내에서 이미 한 번 활성화된 임파구들이 cytokine이나 lymphokine을 더 많이 내어 면역 반응을 더욱 활발히 진행시킬 수 있다는 것으로 해석이 된다. 이미 생체 내 면역후에 시험관내 면역을 하면 IgG의 양이 증가된다는 보고가 있다. 혼합 배지의 경우 흉선 세포 혼합 배지의 경우 이러한 현상이 발견되지 않았는데 그 이유는 흉선 세포의 경우 아직 분화과정을 거치지 않았기 때문에 별로 큰 효과를 보여 주지 못했던 것 같다.

시험관내 면역 방법에 의한 단일군 항체 생산

시험관내 면역 방법을 흉선 세포와 대식 세포를 같이 넣어 주었을 때로 하여 5일간 항원과 공여자 계통의 비장 세포를 배양 후 생쥐 종양 세포의 일종인 Sp2/0-Ag 14와 세포 융합시켜

HAT 배지에서 15일간 선별하여 세포군이 형성된 well을 측정할 결과 생체내 면역 방법에서는 전체 480 well중에 135개가 형성되었고, 시험관내 면역 방법에서는 117개가 측정되어 별 차이가 없었다. 최종적으로 세포군이 형성된 well의 배양액을 보체 의존성 세포 장애 실험을 수행한 결과 생체내 면역조건에서 4개의 positive well이 검출되었고, 시험관내 면역조건에서 3개의 positive well이 검출되었다. 이 결과를 보아 시험관내 면역 방법에 의한 단일군항체 형성과 생체내 면역 방법에 의한 단일군항체 생산율이 별 차이 없다는 것으로 관찰되었다. 본 실험에서 실시한 시험관내 면역 방법에 의한 단일군항체 형성이 다른 시험관내 면역 방법에 의한 수용성 단백질에 대한 단일군항체 형성을 (Pardue *et al.*, 1983; Michael *et al.*, 1988)보다 떨어지는 것으로 나타났는데, 그 이유는 아마도 세포 자체로는 효과적인 항원성을 가지기 힘들기 때문일 것이고, 또 한가지 이유는 흉선 세포 또는 대식 세포가 세포 융합시 같이 융합되었기 때문이라고 생각 되어 진다. 선별되어진 단일군 항체들을 분석하기 위해 같은 세포 농도로 96 well plate에 2일간 세척 배지 (serum free media)에 배양한 배지를 보체 의존성 세포 장애 실험을 수행하였는데, 그 결과 시험관내 면역에 의한 단일군 항체가 생체내 면역에 의한 단일군 항체보다 2-4배 가량 활성이 떨어지는 것으로 생각 되어지지만 항혈청에 비해 많은 양의 항체를 가지고 있음이 확인 되었다. 일반적으로 시험관내 면역 방법에 의한 항체가 생체내 면역 방법에 의한 항체보다 활성이 떨어진다고 하는데(Harlow and Lane, 1988) 그 이유는 시험관내 면역 방법이 단 1회의 면역을 의하기 때문으로 생각 되어진다.

참고문헌

- Anderson, J.A. Coutinho, and F. Melchers, 1979. Mitogen activated B cell blasts reactive to more than one mitogen. *J. Exp. Med.* **149**: 553-564.
- Bazin, R., and R. Lemieux, 1987. Role of the macrophage derived hybridoma growth factor in the *in vitro* and *in vivo* proliferation of newly formed B cell hybridomas. *J. Immunol.* **139**, 780.
- Boer, M.D., F.A. Ossendorp, P.F. Bruning, and J.M. Tager, 1987. Direct evidence for a primary immune response of murine B-lymphocytes after *in vitro* immunization of dissociated splenocytes. *Hybridoma* **6**: 253.
- Boer, M.D., T.G.H.J. Voorde, F.A. Ossendorp, and J.M. Tager, 1988. Requirements for the generation of memory B cells *in vivo* and their subsequent activation *in vitro* for the production of antigen-specific hybridoma. *J. Immunol. Methods* **113**: 143.
- Boer, M.D., F.A. Ossendorp, G.V. Duijn, G.H.J. Ten Voorde, and J.M. Tager, 1989. Optimal conditions for the generation of monoclonal antibodies using primary immunization of mouse splenocytes *in vitro* under serum-free conditions. *Journal of immunological methods* **121**: 253-260.
- Boldicke, T., S. Kindt, F. Maywald, G. Fitzlaff, M. Bocher, R. Frank, and J. Collins, 1988. Production of specific monoclonal antibodies against the active sites of human pancreatic secretory trypsin inhibitor variants by *in vitro* immunization with synthetic peptides. *Eur. J. Biochem.* **175**: 259.
- Borrebaeck, and R.K. Carl, 1983. *In vitro* immunization of mouse spleen cells and the production of monoclonal antibodies. *Acta Chemica Scandinavica*, 647-648.
- Borrebaeck, C.A.K., 1986. *In vitro* immunization for production of murine and human monoclonal antibodies. *Trends Biotechnol.* **4**, 147.
- Borrebaeck, C.A.K., and S.A. Moller, 1986. *In vitro* immunization. Effect of growth and differentiation factors on antigen specific B cell activation and production of monoclonal antibodies to autologous antigens and weak immunogens. *J. Immunology* **139**: 4116.
- Campbell, A.M., 1984. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology **13**: 94-100.
- Cohen, D.P., and T.L. Rothstein, 1989. Adenosine 3',5'-Cyclic monophosphates modulates the mitogenic responses of murine B lymphocytes. *Cellular Immunology.* **121**: 113-124.
- Dahmus, M.E., P. Laybourn, and C.A. Borrebaeck, 1988. Production of monoclonal antibody against electrophoretically purified RNA polymerase II subunits using *in vitro* immunization. *Molecular immunology* **25**: 997-1003.
- England, S., and S. Seifter, 1990. Precipitation techniques, *Methods in Enzymology.* **182**: 290-299.
- Erich, T., B. Dekker, M.D. Beer, R. Torensma, and J. Verhoef, 1988. *In vitro* stimulation of immune spleen cells enhances the number of anti-lipid A-producing hybridomas. *Journal of immunological methods* **118**:

- 17-24.
- Gansbacher, B., and K.S. Zier, 1988. Regulation of HLA-DR, DP, and DQ Expression in activated T cells. *Cellular Immunology* **117**: 22-34.
- Gupta, S., S. Gollapudi, and B. Vayuvegula, 1988. Short communication LPS-induced murine B cell proliferation: A role of protein kinase C. *Cellular Immunology* **117**: 425-429.
- Harlow, E., and D. Lane, 1988. Antibodies a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory.
- Heusser, C.H., J.W. Stocker, and R.H. Gilster, 1981. Attachment of antigen on the ELISA plate. *Methods in enzymology* **73**: 406.
- Ilfeld, D.N., M.K. Cathcart, R.S. Krakauer, and M. Blaese, 1981. Human splenic and peripheral Blood Lymphocyte response to LPS. *Cellular Immunology* **57**: 400-407.
- Kronborg, G., A. Fomsgaard, G.H. Shand, and N. Hoiby, 1989. Determination of the components of immune complexes made *in vitro* with antigens derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Immun. Methods*. **122**: 51-57.
- Luben, R.A., and M.A. Mohler, 1980. *In vitro* immunization as an adjuvant to the production of hybridomas producing antibodies against the lymphokine osteoclast activating factor. *Molecular Immunology* **17**: 635-639.
- Maurice, R.G., and J.J. Oger, 1989. Regulation of *in vitro* PWM-induced IgG secretion in humans. *Cellular Immunology* **118**: 435-447.
- Michael, E.D., P. Laybourn, and C.A.K. Borrebaeck, 1988. Production of monoclonal antibodies against electrophoretically purified RNA polymerase II subunits using *in vitro* immunization. *Molecular Immunology* **25**: 10, 991-1003.
- Miner, K.M., C.L. Reading, and G.L. Nicolson, 1981. *In vivo* and *In vitro* production and detection of monoclonal antibodies to surface components on metastatic variants of murine tumor cells. *Invasion Metastasis*: **1**, 158.
- Mishell, R.I., and R.W. Dutton, 1967. Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. *J. Exp. Med.* **126**: 413-442.
- Mullbacher, A., C.E. Woodhams, L.D. Tomaska, R.A. Pereira, R.B. Ashman, and R.V. Blanden, 1985. Mouse serum as a medium supplement for murine immune responses *in vitro*. *J. Immun. method* **76**: 17.
- Ossendorp, F.A., M.D. Boer, E.J.M. Hilgers, P.F. Bruning, and J.M. Tager, 1986. Production of murine monoclonal antibodies against human thyroglobulin using an *in vitro* immunization procedure in serum free medium. *J. Immun. Method* **91**: 257.
- Pardue, R.L., R.C. Brady, G.W. Perry, and J.R. Dedman, 1983. Production of monoclonal antibodies against calmodulin by *in vitro* immunization of spleen cells. *J. Cell Biol.* **96**: 1149.
- Shiroishi, T., T. Sagai, and K. Moriwaki, 1981. A simplified micro-method for cytotoxicity testing using a flat-type titration plate for the detection of H-2 antigens. *Microbiol. Immunol.* **25**: 12, 1327-1334.
- Van Ness, J., U.K. Laemmli, and D.E. Pettijohn, 1984. Immunization *in vitro* and production of monoclonal antibodies specific to insoluble and weakly immunogenic proteins. *P. N. A. S.* **81**: 7897.

(Accepted November 10, 1993)

Studies on the Antibody Production Using *in vitro* Immunization

Tae Hoon Juhn and Dong Sang Suh (Dept. of Genetic Engineering, Sung Kyun Kwan University, Suwon, 440-746, Korea)

To search for the most effective method for the production of antibody against cell surface antigen of H-2^b mice using *in vitro* immunization, the splenocytes from A/Wy × Sm/J (ASmJF1) were cultured with UV treated C57BL/6 (H-2^b haplotype)splenocytes for 5-7 days under 20 different conditions including T lymphocytes, macrophage, lymphocyte mitogens (Concanavalin A, Lipopolysaccharide, Pokeweed Mitogen). The titer of anti-H-2^b antibody was measured by complement mediated cytotoxicity test and ELISA. Antibody production was detected in every condition and the highest production was obtained in the medium containing thymocyte together with macrophage. Five days after the induction of antibody in the above medium, the immunized ASmJF1 splenocytes were fused *in vitro* with Sp2/O-Ag14 to produce the monoclonal antibody against H-2^b. To compare the *in vitro* and *in vivo* immunization efficiency, C57BL/6 splenocytes were injected into B6 peritonium and incubated for 6 weeks for the *in vivo* immunization. Three positive clones under *in vitro* condition and four clones under *in vivo* condition were obtained.