

## HIV-1에 대한 단세포항체의 제조와 특성에 관하여

임상병리과  
전임강사 이 영 중

### I. 서 론

1983년 Sinoussi 등<sup>1)</sup>에 의해 AIDS(acquired immunodeficiency syndrome)의 원인병원체가 HIV-1(human immunodeficiency virus-1)으로 규명된 이래 HIV에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다. 특히 HIV의 감염여부를 밝히기 위해 여러가지 진단방법이 개발되었으며 그 중 보편적으로 널리 사용되는 방법이 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)이다. ELISA 실험방법은 비교적 높은 감도(sensitivity)를 나타내고 있으나 특이도(specificity)가 낮은 것으로 나타나고 있다<sup>2)</sup>. 기타 각종 항체 실험방법도 어느 정도의 비특이 양성 반응이 나타나는 것으로 실험되고 있다. 따라서 근래에 감도와 특이도를 높이기 위하여 단세포항체를 사용하는 방법이 개발되고 있다<sup>3)</sup>.

1975년 단세포항체의 제조 기법이 개발된 후<sup>4)</sup> 이 기법은 measles virus에 대한 단세포항체의 생산<sup>5)</sup>, rotavirus 진단에의 응용<sup>6, 7)</sup> 그리고 feline leukemia virus의 연구<sup>8)</sup> 등 다수의 질병 진단에 광범위하게 사용되고 있다.

HIV-1에 대한 단세포항체 또한 HIV-1의 감염여부를 진단하기 위해 제조되었다<sup>9)</sup>. HIV-1의 p24 등과 같은 특이항원들에 대한 단세포항체는 감도가 뛰어난 진단에 이용될 뿐 아니라 중화실험<sup>3)</sup>과 HIV-1 특이항원의 생화학적, 면역학적 특성 규명<sup>10, 11)</sup> 등 여러 분야에 응용되고 있다.

현재 국내에서 사용되고 있는 HIV-1 진단제제는 대부분 외국에서 고가로 수입되고 있는 실정이어서 진단제제의 국산화가 시급한 실정이다. 따라서 HIV-1의 p24 단백질, gp120 당단백질 등과 같은 특이항원에 대한 단세포항체의 제조는 필수적인 사항이며, 특이단세포항체가 개발되면 보다 감도가 높은 ELISA, western

blot과 HIV-1 Ag-capture ELISA 등과 같은 진단 kit가 계속 개발될 것으로 사료된다.

본 실험은 감도가 높은 진단제제의 개발과 HIV-1의 항원성 분석 그리고 HIV-1 표준주와 국내 분리주의 비교등을 수행하기 위해 필수적인 특이단클론항체를 제조하였기에 보고하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세포 및 바이러스

BALB/c의 변역을 위한 항원을 제조하기 위하여 H9/HTLV-III를, 세포융합을 위한 myeloma 세포주는 BALB/c가 기원인 SP2-0/Ag 14를 사용하였다.

### 2. 항원용 HIV-1 표준주의 배양 및 농축

H9/HTLV-III 세포주를 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 RPMI-1640 배양액을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 대량배양하여 56°C에서 30 분간 불활성화시킨 다음 -70°C에 보관하였다. 용해와 동결과정을 거쳐 4°C에서 7,000 rpm으로 20 분간 원심분리하여 상층액을 취해 4°C에서 ultrafiltration(Amicon DIAFLO PM10)을 하여 농축한 다음 초고속원심분리기(Beckman SW28 rotor)를 사용하여 45,000 Xg로 150분 동안 원심시켜 침전물을 0.01 M Tris-NaCl(pH 7.2)로 현탁시켰다. 이 현탁액을 10-5% sucrose-density gradient에 적하시켜 Beckman SW41 rotor를 사용하여 200,000 Xg로 150분 동안 초고속원심분리하였다. 형성된 fraction을 tube puncture로 취하여 4°C에서 4 일간 신선한 phosphate buffered saline(PBS)로 교체하면서 투석하였다. 투석이 끝난 후 동결건조하였으며 이 분말을 PBS에 녹여 1 ml로 분주하여 보관하였으며 Dupont사의 HIV p24 Ag-capture ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) kit를 사용하여 p24 항원의 양을 정량하였다.

### 3. 변역

BALB/c를 이용한 변역은 Lutz 등<sup>8)</sup>과 Higgins 등<sup>9)</sup>의 방법을 변형하여 사용하였다.

첫번째 변역은 호주의 CSL사에서 정제된 HIV-1 항원 20 µg에 PBS를 섞어

0.1 ml로 만든 다음 동량의 Freund's complete adjuvant와 잘 혼합하여 복강내에 접종하였다. 계속되는 면역은 같은 양의 농축항원과 Freund's incomplete adjuvant를 혼합하여 복강내에 3 주 간격으로 4-5 회 접종하였다. 마지막 면역은 adjuvant없이 꼬리정맥에 농축항원(10 µg/0.1 ml in PBS)을 접종하였으며 3 일 후 세포융합에 사용하였다.

#### 4. BALB/c의 비장세포와 myeloma 세포의 융합

**BALB/c 비장세포의 준비 :** HIV-1 항원으로 면역된 BALB/c의 경동맥에서 혈액을 채취하고 비장을 무균적으로 적출하여 serum-free DMEM(SF DMEM)으로 3 번 세척하면서 비장에 붙어 있는 조직들을 제거한 후 SF DMEM 내에서 비장세포를 취하였다. 50 ml 원심관내에서 5 분간 방치하여 세포부유상층액을 다른 원심관으로 옮겨 1,000 rpm에서 10 분간 원심하였다. 상층액을 제거하고 원심관내의 세포침사를 잘 흔들어 준 다음 적혈구를 제거하기 위하여 0.83%의 차가운 NH<sub>4</sub>Cl 용액을 첨가하여 2 분간 방치하였다. 여기에 2 ml의 FBS를 첨가한 후 SF DMEM을 40 ml 첨가하여 위와 같은 조건으로 원심분리하였다. 이어서 2 번 더 SF DMEM으로 원심하여 잔여의 0.83% NH<sub>4</sub>Cl 용액을 완전히 제거하였다. 이 때 hemacytometer를 이용하여 비장세포의 수를 측정하여  $1.5 \times 10^8$ 이었다.

**BALB/c myeloma 세포 :** 융합에 사용될 SP2-0/Ag 14 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 계대배양하였으며 세포융합 실시 7 일 전에  $6.6 \times 10^{-5}$  M 8-azaguanine을 첨가하여 배양하였다. 세포융합시에 SF DMEM으로 원심분리하여 FBS를 제거하고 hemacytometer를 이용하여  $1.5 \times 10^7$  개의 세포만 사용하였다.

**융합실험 :** 세포융합과정은 Köhler와 Milstein<sup>4)</sup>의 방법을 사용하였다. BALB/c 비장세포와 myeloma 세포를 각각 2:1( $1.5 \times 10^8$ : $1.5 \times 10^7$ )로 섞어 SF DMEM으로 3 회 원심 세척 후 최종 침전세포에 50% polyethyleneglycol(PEG) 1,300-1,600(Sigma) 1 ml을 1 분간에 걸쳐 천천히 첨가하고 여기에 SF DMEM 1 ml와 20 ml를 각각 1 분과 4 분간 천천히 흔들면서 첨가한 다음 원심분리하였다. 상층액을 버리고 융합세포들을 20% FBS가 첨가된 DMEM 80 ml에 조심스럽게 부유시켜 96 well tissue culture plate에 200 µl/well 씩 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

#### 5. 융합된 세포의 선택 및 cloning

**융합된 세포의 선택 :** 융합된 세포만을 선택배양하기 위하여 HAT( $5 \times 10^{-5}$  M

hypoxanthin;  $2 \times 10^{-7}$  M aminopterin;  $8 \times 10^{-4}$  M thymidine)가 포함된 20% FBS DMEM 100  $\mu$ l/well 씩을 융합 1 일, 2 일, 3 일, 5 일, 6 일 까지 같아주고 7 일부터 HT( $5 \times 10^{-5}$  M hypoxanthin;  $8 \times 10^{-4}$  M thymidine)가 포함된 20% FBS DMEM 100  $\mu$ l/well 씩 같아주면서 융합세포의 증식여부를 현미경 관찰하였다.

**Screening** : 선택배양액으로 배양을 시작한지 7-10 일 사이의 배양상층액을 거두어 HIV-1 항원에 대한 항체를 분비하는 well을 ELISA로 검색하였다.

**Cloning** : ELISA 검색 결과 항체분비가 확인된 well은 20% FBS DMEM으로 limiting dilution하여 0.5 cell/well되게 분주한 다음 7-10 일간 배양하면서 융합세포의 증식여부를 관찰하고 항체분비여부를 ELISA로 다시 확인하였다.

## 6. 단클론항체의 복수 생산

단클론항체를 분비하는 융합세포를 배양하여 pristane(Sigma) 0.5 ml로 10 일 전에 미리 감작시킨 BALB/c의 복강내에  $1 \times 10^6$  개씩 접종하였다. 복강 접종 후 7-10 일 후에 복수액을 채취하고 원심분리하여 상층액을  $-70^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.

## 7. 복수내의 단클론항체 정제

실험에 사용된 affinity chromatography gel은 protein G sepharose 4 fast flow(Pharmacia)로 이 gel을 50 ml/h의 유속으로 starting buffer인 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형시킨 후 복수를 starting buffer와 동량 섞어 흘려보내 IgG를 부착시켰으며, 부착 후 다시 starting buffer로 affinity gel을 세척하였다. elution buffer로는 0.1 M acetic acid(pH 3.0)를 사용하여 IgG를 회수하였다(absorbance: 280 nm, absorbance range: 1, fraction mode: drop, No of drop: 40, flow rate: 50 ml/h, record chart speed: 1 mm/min).

이와 같이 정제한 단클론항체의 분획은 분리 즉시 pooling하여 starting buffer로 투석하고 냉동건조하여 사용할 때까지  $-70^\circ\text{C}$ 에 보관하였고 일부는 ELISA로 역가를 측정하였다.

## 8. Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

SDS-PAGE는 Laemmli<sup>12)</sup>의 방법을 변형하여 사용하였다. HIV-1 농축항원과 CSL사, Scrips사의 정제된 HIV-1을 각각 시료완충용액(1% SDS, 5%  $\beta$

-mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue, 2.5% sucrose, 1.25 M Tris-HCl, pH 6.8)을 1:1 비율로 섞은 후 3 분간 증탕하여 50  $\mu$ l 씩을 시료로 사용하였다.

전기영동은 7.5-12.5%의 gradient gel을 사용하여 15 에서 20 mA로 5 시간 동안 실행하였으며 완충용액은 tris-glycine buffer(pH 8.3)를 사용하였다. 전기영동이 끝난 gel은 0.125% coomassie brilliant blue R-250을 가한 탈색용액(methyl alcohol:glacial acetic acid:distilled water=5:1:4)에서 2 시간 이상 염색시키고 탈색용액에 넣어 단백질 이외의 부분을 탈색시킨 후 7% acetic acid에 고정하였다.

표준단백질로는  $\alpha$ -lactalbumin(M.W. 14,400), trypsin inhibitor(M.W. 20,100), carbonic anhydrase(M.W. 30,100), ovalbumin(M.W. 43,000), albumin(M.W. 67,000), phosphorylase b(M.W. 94,000)(Pharmacia)를 사용하였다.

## 9. ELISA

HIV-1 항원에 대한 항체를 분비하는 well을 screening하기 위하여 Voller 등<sup>13)</sup>의 방법을 변형하여 사용하였다. coating용 항원은 Scrips사의 정제된 HIV-1 항원을 사용하였고 항원액은 coating buffer(0.05 M carbonate buffer, pH 9.6)로 농도 10 ng/100  $\mu$ l in well 씩 polystyrene microplate에 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight한 후 세척액으로 3 회 세척하였다. 여기에 배양상층액 100  $\mu$ l/well 씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 30 분간 반응시킨 후 3 회 세척하였다.

Peroxidase conjugated goat anti-mouse IgS(Cappel)를 diluent buffer(0.01 M PBS containing 0.5% BSA, pH 7.4)로 1,000 배 희석하여 각 well에 100  $\mu$ l 씩 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 30 분간 반응시켰다. 3 회 세척 후 기질은 0.5 mg/ml의 농도로 각 well에 100  $\mu$ l 씩 넣고 실온의 암소에서 30 분간 반응시킨 후 ELISA autoreader(Dynatech MR-580)로 492 nm/620 nm에서 optical density(OD)를 측정하였다.

## 10. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot technique(EITB)

EITB 방법은 Tsang 등<sup>14)</sup>의 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다.

SDS-PAGE로 분리된 단백질 분획을 이적용기내에서 70 V로 5 시간 동안 nitrocellulose membrane(0.45  $\mu$ m, Bio-Rad)으로 이적시킨 후 blocking buffer(0.01 M PBS containing 3% skim milk, pH 7.2)에 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 overnight하였다. PBS-Tween 20으로 3 회 세척한 후 100 배 희석한 단클론항체를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 2 시간 반응시켰다. 반응 후 3 회 세척하고 1,000 배로 희석된

peroxidase conjugated anti-mouse IgG(Cappel)를 넣어 1 시간 반응시켜 세척한 후 3-3'-diamino benzidine(Sigma)에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 반응을 관찰하였다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 농축항원에서의 p24 단백질 정량

Dupont사의 HIV-1 p24 protein-capture ELISA kit를 이용하여 농축한 HIV-1 항원에서 p24 단백질의 양을 정량한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이  $3.2 \times 10^{-4}$  희석에서 58 pg/ml로 농축 원액은 1.86  $\mu$ g/ml로 측정되었다. 그러나 이는 HIV-1의 전체 단백질량에 비해 매우 적은 양이었다. 따라서 p17과 p24 단백질의 정제를 위한 high performance liquid chromatography(HPLC)<sup>10, 15)</sup>, gp120과 같은 표면당단백질의 정제를 위한 immunoaffinity column의 이용<sup>3, 11, 16)</sup> 등의 방법으로 농축된 HIV-1 특이단백항원의 정제가 필요하다고 사료된다.

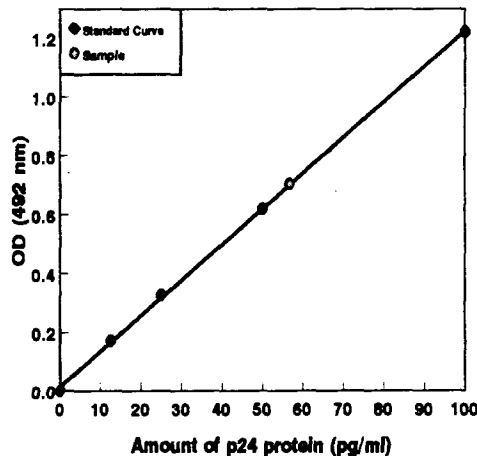


Fig. 1. Quantification of p24 protein from concentrated HIV-1 culture supernatant using Ag-capture ELISA (Dupont).

#### 2. 세포융합 및 cloning

면역된 BALB/c의 항체가 측정 : HIV-1항원으로 면역된 BALB/c의 비장을 적출하기 전 혈청내 항체를 ELISA로 측정한 결과 항체의 개체별 큰 차이는 보이지 않았고 Fig. 2에서와 같이 6,400 배 희석에서 0.85의 흡광도를 얻었다.

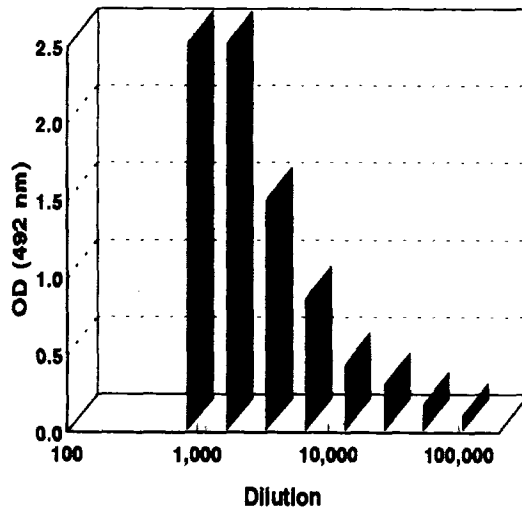


Fig. 2. Titration of serum from immunized BALB/c mice for HIV-1 specific antibody by ELISA.

**융합결과 및 cloning :** 세포융합 후 HAT 배양액으로 배양하여 7-10 일 경과한 다음 융합여부를 확인한 결과 총 384 well 중 347 well(90.4%)에서 융합된 세포의 증식을 확인하였다. 곧 이어 이들 347 well의 배양액에서 HIV-1에 대한 Ig poly 항체생산을 ELISA로 검색한 결과 흡광도 0.2 이상을 기준으로 하여 모두 124 well(35.7%)에서 항체생산을 확인하였다. 융합비율은 융합시의 조건 즉, PEG의 분자량 및 농도, 적합한 온도유지, 배양액 중 FBS의 농도 등에 의해 큰차이를 보였다. 또한 융합된 세포들의 성장속도는 well마다 각각 많은 차이를 보였다.

항체를 분비하는 well의 융합세포가 충분히 자라도록 하기 위하여 24 well culture plate로 옮겨 배양한 다음 cloning(0.5 cell/well)하여 HIV-1에 대한 항체를 분비하는 hybridoma 24 주를 얻었으며(Table 1) 이 중 역가가 높은 5 주의 배양상층액을 HIV-1 western blot kit(Dupont사)로 분비되는 단세포항체의 특성을 실험하였다(Fig. 3).

Table 1. Number of hybridomas showing secreting monoclonal antibodies to HIV-1 in 96 well culture plates after cloning

Test No.	No. of wells showing clone	No. of wells showing Ab secretion
1	33	14
2	26	10
Total	59	24

Fig. 3에서 보는 바와 같이 모든 lane에서 p24 단백질 분획과 반응하는 항체를 분비하는 것으로 나타났지만 lane 1, 3, 5는 다른 단백질 분획과도 교차반응이 있고 lane 2와 4만이 교차반응없이 p24 단백질 분획에서 반응하였다.



Fig. 3. Profiles of the antibodies secreting 5 hybridomas reacted by HIV-1 western blot kit(Dupont). Lane 1-5 : culture supernatant of hybridomas; Lane 6 : negative control(normal serum of BALB/c); Lane 7 : positive control(immunized serum of BALB/c).

### 3. 단세포항체의 복수 생산 및 정제

p24 단백질 분획과만 반응하는 단세포항체를 분비하는 세포들은 복수액 생산을 위해 계속 배양하여 BALB/c 복강내에 접종하였고 10 일 후에 복수액을 채취하였다. 채취된 복수액은 protein G sepharose 4 fast flow affinity gel(Pharmacia)을 사용하여 IgG를 분획하였다(Fig. 4). 이 때 affinity gel에 결합하지 않은 단백질 분획은 버리고 결합한 IgG 분획을 얻었다. 얻어진 IgG는 낮은 pH로 인한 역가의 손상을 방지하기 위하여 바로 투석, 냉동건조하여 농축하고 역가를 측정 한 후  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였으며 일부는 12% SDS-PAGE로 정제정도를 확인하였다(Fig. 5, 6). Lane S는 표준단백질, lane A는 복수액, 그리고 lane G는 순수정제된 IgG를



나타내며 lane G에서 H는 IgG heavy chain, L은 IgG light chain을 표시하고 있다. IgG 한 분자가 두 개의 분획으로 나타나는 이유는 IgG의 heavy chain과 light chain이 disulfide bond로 서로 연결되어 있어  $\beta$ -mercaptoethanol의 처리로 disulfide bond가 끊어지고 두 chain의 분자량 차이로 두 분획으로 나뉘기 때문이다.

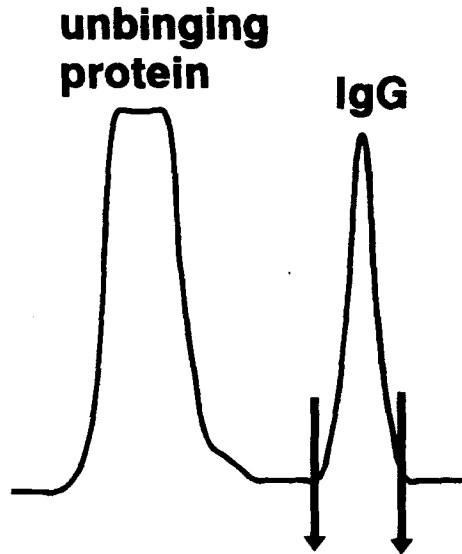


Fig. 4. Purification of monoclonal antibody(anti-p24 IgG) from ascitic fluid using protein G sepharose 4 FF.

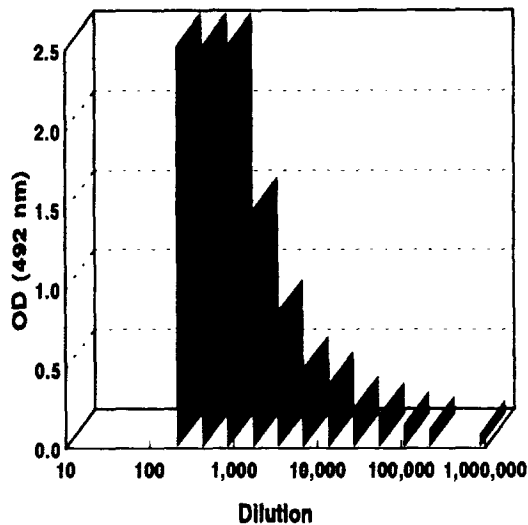


Fig. 5. Titration of purified anti-p24 IgG from ascitic fluid of BALB/c injecting hybridomas.

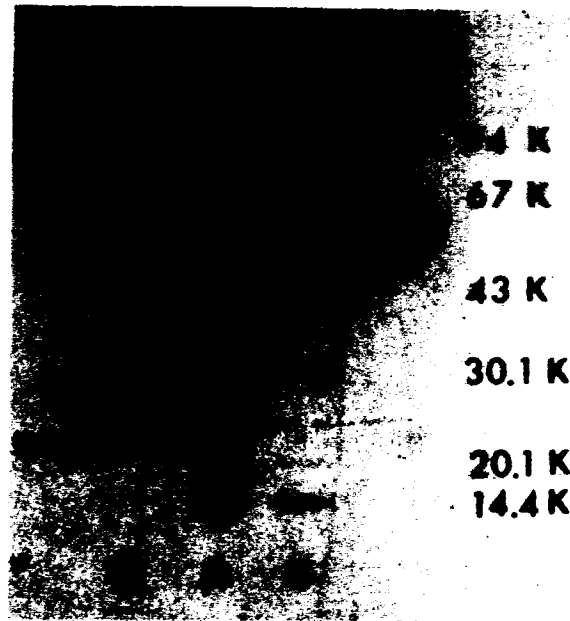


Fig. 6. SDS-PAGE (12% gel) patterns of purified anti-p24 igG.  
 Lane S : standard maker; Lane A : ascitic fluid;  
 Lane G : purified anti-p24 igG; H : heavy chain of IgG;  
 L : light chain of IgG.

#### 4. SDS-PAGE와 EITB

농축한 HIV-1 항원과 CSL사와 Scrips사에서 정제한 표준항원을 SDS-PAGE 로 전개하여 얻은 항원 단백질의 분획은 Fig. 7과 같다. 농축한 항원과 Scrips사의 항원은 p24 단백질의 양이 다른 단백질 양보다 현저히 적은 것으로 나타나 최초의 면역은 CSL사의 항원을 사용하였다. Lane SM은 표준단백질, lane N은 농축항원, lane C는 CSL사의 항원 그리고 lane S는 Scrips사의 항원을 보여주고 있다. 그러나 사진이 흐리고 단백질량과 정제정도가 낮아서 분획이 뚜렷하지 않다. HIV-1의 구성 단백질을 정제하는 것은 다른 바이러스의 경우보다 상당한 어려움이 있다. 그것은 HIV-1을 배양할 때 다른 바이러스와는 다르게 높은 비율의 FBS를 첨가해야만 하기 때문인 것으로 생각된다. 그래서 HIV-1의 특이항원별로 유전자 조작방법을 이용하여 대장균이나 다른 바이러스에서 HIV-1의 특이항원을 생산하는 방법도 사용되고 있다<sup>17, 18, 19, 20</sup>. HIV-1 p24 단백질 분획의 분자량을 구하기 위하여 relative mobility를 구한 결과 Fig. 8과 같이  $25,500 \pm 500$ 으로 측정되었다(Fig. 8).

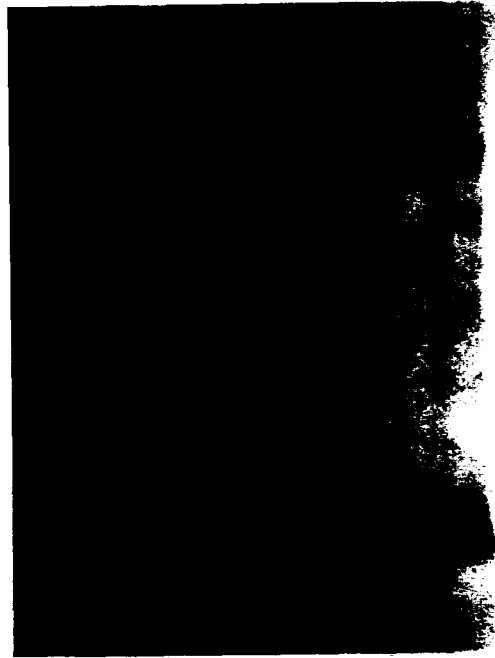


Fig. 7. SDS-PAGE(7.5-12.5% gradient) pattern of HIV-1. Proteins were visualized by starting with coomassie brilliant blue R-250. SM : standard maker; N : concentrated HIV-1; C : HIV-1 of CSL; S : HIV-1 of Scrips.

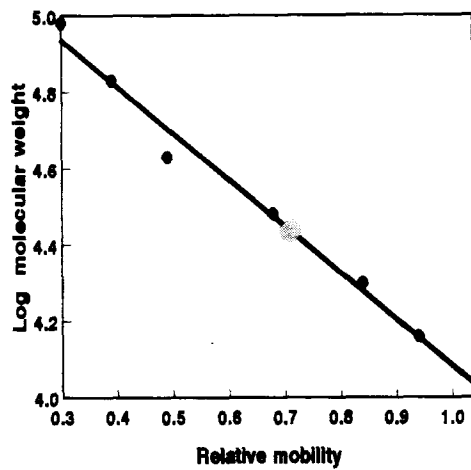


Fig. 8 Relative mobility of HIV-1 p24 protein using 7.5-12.5% gradient SDS-PAGE.



Fig. 9. Profiles of the purified monoclonal antibody reacted by EITB. Purified IgG was reacted with p24 of HIV-1 trans-blotted onto nitrocellulose membrane. Lane C : negative control serum; Lane N : concentrated HIV-1; Lane S : HIV-1 of Srips.

HIV-1을 SDS-PAGE를 실시하여 50% methyl alcohol에서 sodium dodecyl sulphate(SDS)를 제거하고 분리된 항원을 nitrocellulose membrane에 이적하였다. 여기에 정제한 IgG를 반응시켜 p24 단백질과만 반응하는 단일 band를 확인하고(Fig. 9) Dupont사의 HIV-1 western blot kit로 재차 확인하였다(Fig. 10).

따라서 추후의 실험은 제조된 단세포항체인 anti-p24 IgG의 subtyping과 다른 바이러스와의 교차반응 정도를 조사하고, 또한 진단 kit의 개발 전단계인 peroxidase의 conjugation과 biotinylation을 실행할 계획이다. 본 실험이 마무리 되면 Epstein-Barr virus를 이용하여 BALB/c가 아닌 사람의 B 세포에서 직접 단세포항체를 제조하는 기법<sup>21)</sup>의 사용도 바람직하다고 본다.

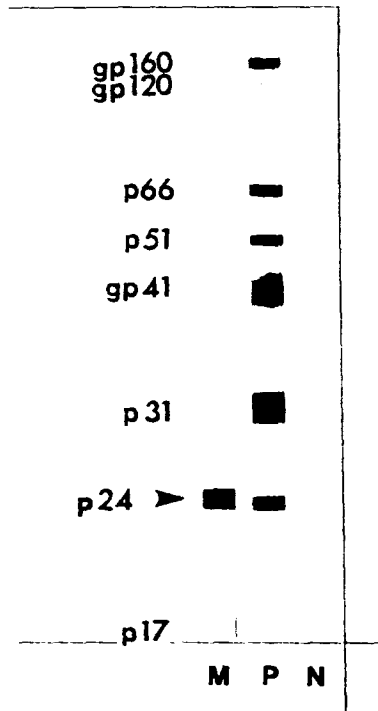


Fig. 10. Profiles of the purified monoclonal antibody reacted by HIV-1 western blot kit(Dupont). Purified IgG was reacted with p24 of HIV-1. Lane M : purified IgG; Lane P : positive control of kit; Lane N : negative control of kit, Lane 7 : positive control(immunized serum of BALB/c)

#### IV. 결 론

AIDS 원인 병원체인 HIV-1의 면역진단에 있어 HIV-1을 면역항원으로 하여 단세포항체를 제조하였고 특성을 본 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

HIV-1 능숙항원으로 면역시킨 BALB/c의 비장세포와 myeloma 세포인 SP2-0/Ag 14를 융합하여 총 384 개의 well에 분주하여 이 중 347 개의 융합세포를 확인하였으며 융합비율은 90.4%이었다.

이 융합세포들 중 HIV-1에 대한 항체를 분비하는 총 124개의 융합세포를 확인하였으며 이 중 한 well을 cloning하여 총 59 개의 clone을 얻었다. 이 clone들 중

24 clone들이 HIV-1에 대한 항체를 분비하였다. 이 24 개의 clone들 중 5 개의 clone을 HIV-1 western blot kit(Dupont)로 특성을 분석한 결과 2 개의 clone이 HIV-1의 p24 단백질과만 반응하였다.

p24 단백질과 특이하게 반응하는 이 특이단세포항체를 효소면역전기영동이적법을 이용하여 HIV-1과 반응시킨 결과 25,000±500 dalton의 p24 단백질과만 반응하였다.

## 참고문헌

1. Barre-Sinoussi, F., *et al. Science.* **220.** 868-871(1983)
2. Tribe, D. E., *et al. J Clin Microbiol.* **26.** 641-647(1988)
3. Dalgleish, A. G., *et al. Virol.* **185.** 209-215(1988)
4. Kohler, G. and Milstein, C. *Nature.* **256(7).** 495-497(1975)
5. Carlo, M. C., *et al. Nature.* **288(4).** 488-489(1980)
6. Barbara, S. C., *et al. J Clin Microbiol.* **25(3).** 509-515(1987)
7. Koki, T., *et al. J Virol.* **61(5).** 1726-1730(1987)
8. Lutz, H., *et al. J Immunol Methods.* **56.** 209-220(1983)
9. Higgins, J. R., *et al. J Clin Microbiol.* **24(3).** 424-430(1986)
10. Veronese, F. D. M., *et al. J Virol.* **62(3).** 795-801
11. Nara, P. L., *et al. J Virol.* **62(8).** 2622-2628(1988)
12. Laemmli, U. K. *Nature.* **227.** 680-685(1970)
13. Voller, A., *et al. Bull WHO.* **53.** 55-65(1976)
14. Tsang, V. C., *et al. Methods Enzymol.* **92.** 377-391(1983)
15. Henderson, L. E., *et al. J Virol.* **62(8).** 2587-2595(1988)
16. Pyle, S. W., *et al. J Virol.* **62(7).** 2258-2264(1988)
17. Charles, F., *et al. Virol.* **166.** 339-346(1988)
18. Scott, D. P., *et al. Science.* **234(12).** 1392-1395(1986)
19. Christine, D., *et al. Proc Natl Acad Sci USA.* **84.** 8903-8906(1987)
20. Graves, M. C., *et al. Proc Natl Acad Sci USA.* **85.** 2449-2453(1988)
21. Prigent, S., *et al. AIDS.* **4.** 11-19(1990)

## Production and characterization of monoclonal antibody to HIV-1

Lee, Young-jong  
*Dept. of Clinical Pathology*  
*Kwangju Health College*

### > Abstract <

In order to improve the reliability immunodiagnostic techniques being used in the diagnostic of HIV-1, monoclonal antibody was prepared and characterized. HIV-1 antigen was prepared and used as a immunizing antigen. Spleen cells of BALB/c mice immunized with HIV-1 were fused with myeloma cells.

Total number of fused cells obtained were 347 out of 384 seeded. A total of 124 fused cells were found to secrete antibodies to HIV-1 out of 347 fused cells. Among cells secreting antibodies, one well was performed limiting dilution. Total number of cloned cells obtained were 59 out of 196 seeded. A total of 24 cloned cells were founded to secrete antibodies to HIV-1 out of 59 cloned cells. Among 24 cloned cells, only 5 cloned cells were performed western blot using HIV-1 western blot kit(Dupont). 2 monoclonal antibodies were found to react exclusively with p24 protein of HIV-1. By SDS-PAGE and EITB, the monoclonal antibody reacted HIV-1 p24 protein of 25,500±500 dalton.