

Polychlorinated Biphenyl에 의한 백서간 Cytochrome P-450_{LM11} 에 대한 Monoclonal Antibody 생성에 관한 연구

영남대학교 의과대학 생화학교실
김정희 · 김재룡 · 이기영

서 론

Cytochrome P₄₅₀은 여러가지 형을 가진 mixed function oxidase로서 포유동물에서 약제, carcinogen 및 steroids같은 endogenous substrate 등의 대사에 중요한 역할을 한다.¹⁻⁴⁾ 이러한 효소계는 carcinogen을 포함한 여러 환경화합물이나 개개의 organism 사이의 대사과정에 나타나며 대사 속도나 carcinogen에 대한 민감도 및 toxicity 등을 결정하는 중요 열쇠이다.¹⁾ 사람에게 있어 environmental carcinogen의 대표적인 것으로 polycyclic aromatic hydrocarbon으로 benzopyrene(BP)을 들 수 있으며 BP은 cytochrome P₄₅₀을 포함한 mixed-function oxidase, aryl hydrocarbon hydroxylase(AHH)에 의해 산화되어 몇종의 epoxides, phenols 및 quinones으로 되며 epoxide hydrolases 및 transferase 등의 효소에 의해 dihydrodiols, diol epoxides, glutathione, glucuronate 및 sulfate의 water-soluble conjugates 등 metabolites를 수화하거나 conjugate한다. BP의 oxygenated metabolites는 이외에도 40여 종 이상이 알려져 있다.^{1,5,6)} BP의 diol epoxides로 가는 metabolic pathway는 바로 carcinogen activation의 primary pathway이며 많은 다른 pathway는 conjugate를 형성하여 detoxification된다.⁶⁾

Liver microsomal enzyme system의 구성으로는 Cytochrome P₄₅₀, NADPH cytochrome P₄₅₀, NADPH cytochrome P₄₅₀ reductase 및 phospholipid 등이 알려져 있다.^{7,8)} 특히 cytochrome P₄₅₀은 그 구조상에 있어 여러 isozyme의 존재를 보고하였고 분리 및 그 특징이 알려져 졌으며,⁹⁻¹¹⁾ 각 isozyme의 양이나 activity등이 metabolic choice를 결정할지도 모르며 carcinogen 활성화

에 영향을 미쳐서 carcinogen form으로 되거나 해독작용 사이의 균형을 결정한다고 하며 이러한 balance는 개개의 carcinogen에 대한 민감도 및 drug metabolism의 rate의 차이에 관계가 있다고 한다. 아울러 화학적 carcinogen으로 야기되는 암에 대한 어떤 유전적 취약점 또는 다른 질환 등에 유전적 혹은 환경적 인자를 분자 level에서 살필 수 있다.^{2,3)}

한편 1975년 Koehler 및 Milstein¹²⁾은 세포배양 및 세포융합기술에 의해 어떤 항원에 의한 순수 항체 즉 monoclonal antibody를 분비하는 "hybridoma" technique을 개발 하였으며 세포생물학의 발전에 커다란 공헌을 하게 되었다. Methylcholanthrene이나 naphthoflavone 등의 몇몇 carcinogen에 의해 유도된 cytochrome P₄₅₀에 대한 monoclonal antibodies의 production이 보고 되었으며,^{2,13)} 이러한 monoclonal antibodies는 highly specific하며 cytochrome P₄₅₀의 몇몇 enzyme activity를 억제한다고 보고하고 있다.^{1,5,6)} 아울러 antibodies는 생물학적 material의 분석에 유용한 것으로 알려졌고 대개 affinity chromatography를 이용하여 분리 되었으며 그들 단백질의 antigenic structure의 특징등을 잘 나타내고 있다.^{14,15)}

본 실험은 carcinogenic activity를 가진 polychlorinated biphenyl에 의한 백서간 cytochrome P₄₅₀에 대한 monoclonal antibodies를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

Bovine serum albumin, hypoxanthine, thymi-

dine, polyethylene glycol(PEG 3,500), sodium dodecyl sulfate(SDS), 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-sulfonic acid) (ABTS) 등은 Sigma chem 사, pristane은 Aldrich, DMEM과 fetal bovine serum은 Gibco 사, Immunoglobulin-labeled peroxidase는 KPI(Kirkegaard & Perry Lab, Inc)에서 구입하였으며, NaI¹²⁵는 New England Nuclear에서 구입하였다.

그의 시약은 시판 특급시약을 사용하였다. 실험 동물로는 Spray-Dawley rat 및 Balb/c mouse를 사용하였고 cell line은 SP₂ myeloma cell을 사용하였다.

2. 방 법

(1) 면역주사

생후 10~12주된 암 Balb/C mouse에 우리가 정제한 polychlorinated biphenyl(Aroclor 1254)에 유도된 rat liver cytochrome P₄₅₀LMII(CP₄₅₀LMII)을 20 mg씩 Freund's adjuvant에 혼합하여 1주간격으로 4번 복강내에 주사하고 죽이기 4일전에 booster로 tail vein에 주사 하였다.^{1,2)}

(2) 세포융합 및 세포배양

면역된 mouse의 spleen을 분리하여 60 mesh의 stainless steel을 통과시키면서 spleen cell을 얻었으며 SP₂ myeloma cell과 혼합 후 polyethylene glycol 3,500을 dropwise하면서 세포융합을 시켰다. 이러한 cell들을 HAT 배지(DMEM-15% fetal bovine serum-50mg/ml PCN-SM-100mM hypoxanthine, 0.4mM aminopterin 및 16mM thymidine)에 녹여 96 well plate에 분지하였으며 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 이러한 배지에서 2주간 배양후 HT배지(HAT에서 aminopterin만 제외)로 바꾸어 주었다.

(3) ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)

HAT medium에서 살아 남은 융합된 세포의 항체 생성여부를 알기 위하여 microtiter plate의 well에 carbonate buffer(pH 9.6)에 녹인 5mg/ml의 cytochrome P₄₅₀항원을 도표하여 4°C에서 하룻밤 지난 다음 washing buffer(phosphate buffered saline-1% BSA-0.05% sodium azide-0.05% tween 20)로 3번 씻은 후 표면을 포화시키기 위해 100ul의 3% BSA를 각 well에 가하여 37°C에서 3시간 방치후 다시 washing후 융합된 세포배양액(항체)를 50ul씩 well에 가한 후 37°C

에서 2시간 둔 후 다시 wash 하여 Peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulin solution (50ul)을 각 well에 가하고 50ul의 substrate 용액(3mg ABTS-105mg/10ml citrate buffer(pH 4.0)-10ml 30% H₂O₂)을 가하고 2시간 정도 방치 시 항원에 대한 specific 항체가 있는 well에선 청록색이 나타난다.

(4) Cloning

단일 항체를 생성하는 세포를 분리하기 위하여 HT배지에서 자란 SP₂ myeloma cell의 배양 상층액을 모아 conditioned medium을 만들고 cloning medium은 conditioned medium과 fresh HT medium을 동량 혼합한 것을 사용하였다. ELISA 반응에서 양성인 well의 hybrid cell을 mid log phase까지 배양하여 2.5 cells/ml 되게 cloning meclium으로 희석하여 96well plate에 20ul씩 분지하였다. 약 2주정도 배지를 갈아 주면서 세포가 자라는 것을 관찰하면서 상층액을 역시 ELISA로 항체 생성여부를 확인하였다.

(5) Ascitic fluid의 생산

단일 항체를 생성하는 clone을 얻은후 대량의 항체를 얻기 위하여 pristane으로 처리된 Balb/c mouse의 복강내에 cloned cells(x10⁷ cell)을 주사하였다. 주사 10일 후 ascitic fluid를 뽑아 -20°C에 보관하였다.

(6) Monoclonal antibody의 정제

Ascitic fluid에 동량의 saturated ammonium sulfate 용액을 가하여 4°C에서 1시간 방치후 20,000×g에서 30분간 원침하여 침전물을 0.02 M phosphate buffer(pH 8.0)에 용해 시키고 투석하여 ion exchange chromatography로 정제한다.

Column은 DEAE-cellulose로 0.02M phosphate buffer(pH 8.0)로 평형을 유지시키고 각 fractions 들을 collect하였고 UV monitor를 거쳐 흡광도가 기록 되었으며 각 fraction 들은 ELISA 및 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 cytochrome P₄₅₀LMII에 대한 monoclonal antibodies를 확인하였다.

(7) Autoradiography

정제된 단일클론항체(monoclonal antibody) 20 mg을 PBS에 투석한 후 500uCi의 Na¹²⁵I및 10ul 0.3M chloramin T(pH 7.3)을 가하여 혼합후 25 ul의 saturated tyrosine 용액을 가하여 10분 정도 둔 후 50ul의 10% BSA를 가한 후 PBS에 24

시간이상 투석하여 ¹²⁵I을 항체에 label 시켰다.

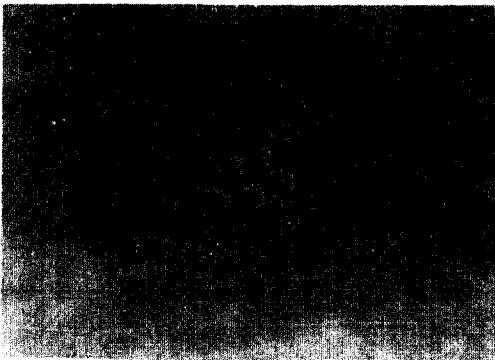
nitrocellulose membrane상에 항원물질을 점적한 후 ¹²⁵I-labeled antibody를 점적하여 혼든다음 washing 및 dry후 X-ray film이든 cassette에 노출시켜 -70°C에서 1시간 autoradiography 함으로 항원 항체 결합을 확인하였다.

성 적

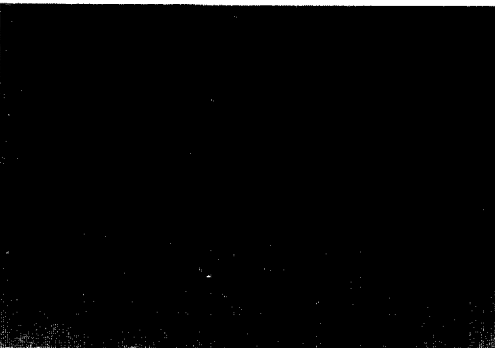
SP₂ myeloma cell과 polychlorinated biphenyl induced cytochrome P_{450LMII}(CP_{450LMII})에 감작된 spleen cell을 세포융합시켜 얻은 세포를 계속 배양하여 단일클론항체를 생산하는 cloned cell을 얻기 위하여 cloning을 시행한 결과를 관찰하였다. Phot. 1.에서 cloning후 9일째에 (a) 여섯 개의 cloned cell이 자란것을 관찰하였으며 13일째(b)는 밀집된 형태의 더 많은 세포가 모여 있었으며 (c)는 15일째로 굉장히 많은 cloned cell이 자랐으며 상당한 증식을 관찰하였다.

단클론항체생성을 확인하기 위하여 peroxidase-labeled mouse immunoglobulin으로 immunosorbent assay(ELISA)에서 양성인 세포만을

(a)



(b)



(c)

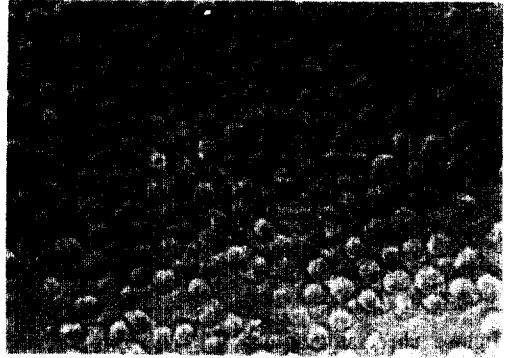


Photo. 1. Observation of cloned cell between SP₂ myeloma cell and mouse spleen immunized by PCB-induced cytochrome P-450 in HAT medium. After cloning, we observed viable cell on the 9th day(a), 13th day(b) and 15th day(c) (200x).

대량으로 증식시켜 mouse 복강내에 주사하여 ascitic fluid를 얻었으며 ion exchange chromatography로 monoclonal antibody를 얻었다. Fig. 1.에서 sodium phosphate(pH 8.0) buffer로 linear gradient를 걸어서 0.06M에서 곡선이 크게 나타났으며 첫번째의 큰 곡선에서 ELISA에 양성반응을 나타내었으며 각 fraction을 모아 항체 확인을 하였다.

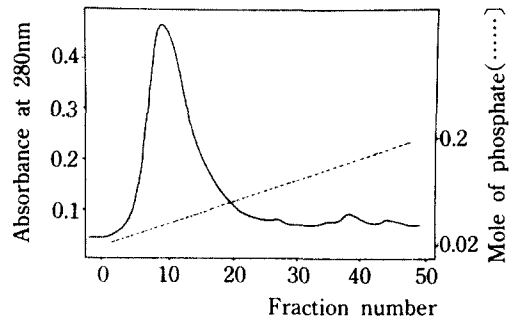


Fig. 1. DEAE cellulose column chromatography: The ascitic fluids were collected from the mice inoculated with the hybrid cell. After salting out and dialysis, it was performed chromatography. Monoclonal antibody was eluted with a linear gradient(---) from 0.02M to 0.2M sodium phosphate, pH 8.0, detected at 280nm(—).

Peak fraction(No. 10)의 monoclonal anticytochrome P_{450LM11} antibodies를 ¹²⁵I로 labeling 시키고 nitrocellulose filter에서 cytochrome P_{450LM11} 항원과 binding 후 X-ray film에 노출시켜 hybridization 시켰다. Fig. 2.에서 distilled water(D.W), human serum(HS) 및 mouse serum(MS)도 함께 binding시켜 보았으나 아무런 반응이 나타나지 않았으며 CP_{450LM11} mouse liver homogenate에선 아주 약한 binding activity가 관찰되었으며 CP_{450LM11}의 정제과정에서의 DEAE cellulose chromatography에서의 일부 정제된 DFrII와 CM sephadex chromatography한 정제된 CP_{450LM11}(CM CP2)에서는 강한 antigen-antibody binding이 관찰되었다.

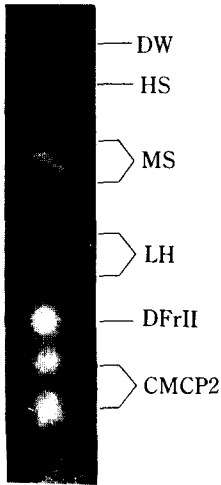


Fig. 2. Hybridization ¹²⁵I-labeled monoclonal anticytochrome P-450_{LM11} antibody. DW : distilled water, HS : human serum, MS : mouse serum, LH : CP-450_{LM11} immunized mouse liver homogenate, DFrI : partial purified CP0-450_{LM11}, CMCP₂ : purified CP-450_{LM11}.

정제된 monoclonal antibody의 관찰을 위하여 sodium dodecyl sulfate가 든 7.5% poly-acrylamide gel electrophoresis을 시행하여 Fig. 3.에서 관찰하였다. Marker lane는 molecular weight marker이며 IgG+M(H+L)는 commercial한 peroxidase lakeled immunoglobulin G+M(H+C chain)을 함께 비교하였으며 MabFr4C및 Fr5에서 정제된 monoclonal antibody가 관찰되었으며 Ascites은 정제되지 않은 ascitic fluid이다. Lane

은 정제된 fraction No. 4 및 5이며 각각 2개의 sharp band를 관찰 하였으며 분자량은 약 55,000 및 110,000으로 측정되었다.

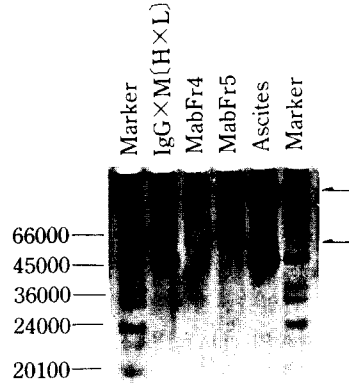


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (10%) of purified monoclonal antibody (Mab) from ascitic fluid. IgG+M(H+L) : immunoglobulin standard, Mab Fr4 and Fr5 : purified Mab of fraction No. 4 and 5 (MW : 55,000 and 110,000).

고 찰

Mixed function oxidase system은 여러 carcinogen과 같은 substrates에 의해 유도되며 각각의 specificity를 가진 liver microsomal cytochrome P₄₅₀(CP₄₅₀)의 multiple form이 존재한다. (1~3, 8~11)

Haugen 및 Coon¹⁵⁾은 phenobarbital(PB)에 의해 유도된 rabbit liver microsomes의 CP_{450LM2}가 normal 및 β-naphthoflavone에 의해서는 CP_{450LM4}가 predominant form이라 했으며 Guengerich¹⁶⁾은 PB에 의한 CP-450은 methylcholanthrene에 의해 유도된 CP₄₅₀과는 다르다고 하였다. 그후 여러형의 cytochrome P₄₅₀의 isozyme들이 여러 다른 조직등에서 보고 되었으며 사람에게 있어서 drug 및 carcinogen대사는 개개인에 따라 차이가 있으며 특히 aryl hydrocarbon hydroxylase(AHH) inducibility가 조직이나 species에 따라 다름으로서 대상정도가 개개에 따라 다르며 CP₄₅₀의 isozyme의 기능 및 활성도 등에 차이가 있다고 보고 하였다.^{1~3, 6, 17)}

한편 hybridoma 기법에 의한 monoclonal antibody(Mab)를 생산하여 cytochrome의 genetic control이나 대사기전의 연구들이 보고되고 있으며⁴⁻⁶⁾ hybridoma로부터 얻은 monoclonal antibody에 의한 효소활성도는 benzopyrene ring이나 7-ethoxyceumarin deethylation에서의 enzyme inhibiting activity가 있으며 다른 position에서 hydroxylation 되고 있다고 한다.^{2,3)} Fujino 등⁵⁾은 여러 인체조직-placenta, lymphocytes, 약간의 liver조직-등에서 methylcholanthrene(MC)-CP₄₅₀에 대한 Mab의 AHH(aryl hydrocarbon hydroxylase) 및 ECDE(ethoxycoumarin deethoxylase) 효소작용 및 carcinogenic metabolite의 생산 억제 정도를 관찰 하였으며 Mab는 benzopyrene carcinogenic activation 되어 diol로 대사되는 것을 placenta에서는 20~80%의 억제를 보였고 hydroxyberzopyrene대사 중에는 65~85%의 억제 정도를 보였다 한다. 그외에도 CP₄₅₀에 대한 Mab는 smoker와 nonsmoker의 활성이 서로 다르며 AHH나 ECDE의 작용 역시 다르게 보고하였다.³⁾ MC-induced CP₄₅₀의 Mab는 7-ethoxycoumarin의 deethoxylation과 함께 BP의 hydroxylation을 억제하며 이 두 효소활성의 억제는 동일 antigenic site에 의한 것이라 하였으며 BP 대사의 연구에 CP₄₅₀ system에 CP₄₅₀-Mab의 첨가로 carcinogenic metabolites의 형성을 완전히 억제하는 걸 관찰하였으며²⁾ 이러한 연구는 liver microsome과 함께 Mab의 inhibition연구에서 quinone metabolites가 BP metabolites와는 다른 기전에 의해 유도되었다는 것을 말해주며 CP₄₅₀이 multiple형으로 존재한다는 것을 보여주고 있다.^{3,18,19)}

Cytochrome P₄₅₀의 substrate specificity 및 isozyme 존재등에 관련하여 우리는 polychlorinated biphenyl(PCB)에 유도된 rat liver microsome을 분리하고 cytochrome P₄₅₀ isozyme을 정제하였으며²⁰⁾ 이 중 CP_{450LMII}을 Balb/c mouse에 주사하여 Mab생산을 시도하였다. Immunized mouse spleen cells 과 SP₂myeloma cell을 융합하여 HAT(hypoxanthin-aminopterin-thymidine) 배지에 키워 살아남은 세포에서 ELISA 양성인 cell을 다시 cloning을 거듭하여 단클론항체생산 세포는 얻었으며 처음 viable cell이 9일째에 6 clone으로 관찰되었으며 계속 증식상태를 관찰하였다. Hybridoma cell에서 Mab를 얻기 위하여

mouse복강내에 hybridoma cell을 주사하고 대량의 복수를 얻어 ion exchange chromatography로 Mab를 정제하였다. 정제된 Mab를 ¹²⁵I과 label시키고 antigen(Ag)과 hybridization시켜 binding을 관찰하였고 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 immunoglobulin(Ig)의 분자량을 관찰 하였으며 분자량 55,000와 110,000 크기의 band가 관찰되었고 이것은 marker Ig와 같은 위치에서 관찰되었다. Buchegger 등²¹⁾은 carcino-embryonic antigen에 대한 Mab 35와 202을 얻어 IgG의 subclass를 digest하여 SDS-polyacrylamide 전기영동에서 intact Mab 분자량 150,000을 관찰했고 F(ab)²F(ab) fragment는 105,000 및 50,000을 각각 얻었다 한다.

우리는 PCB유도 CP_{450LMII}에 대한 Mab를 생산하고 확인함으로써 Mab를 이용하여 CP₄₅₀을 immunoprecipitation 방법으로 더욱 정제 가능할 뿐 아니라^{22,23)} sensitive하고 specific한 radioimmunoassay법이 개발되고,^{24,25)} 각 carcinogen에 의한 Mab는 그 carcinogen의 catalytic activity, 구조 및 기능적인면에서 CP₄₅₀과의 관계를 관찰하며 특정 효소의 활성을 억제할 뿐 아니라 여러 조직 및 species, individuality의 연구, CP₄₅₀의 genetic regulation 및 carcinogen에 대한 민감도, drug metabolism을 밝히는데 유용할 것으로 기대되며 아울러 Mab생산 기술을 이용하여 특정 암에 specific Mab를 만들고 여기에 cytotoxic drug을 conjugate시켜 ant-idiotypic antibody를 만들어 암환자에 적용 가능하리라 기대된다.

요 약

Polychlorinated biphenyl(PCB)에 유도된 rat liver cytochrome P_{450LMII}을 Balb/c mouse에 주사하여 면역된 spleen cells과 SP₂ myeloma cell을 polyethylene glycol(PEG 3500)으로 세포융합시켜 얻은 fused cell을 계속 배양하여 cloning을 반복하고 ELISA로 확인하여 monoclonal antibody(Mab)를 생산하는 hybrid cell을 얻었으며 mouse 복강내에 hybrid cell(x10⁷)을 주사하여 ascites를 모아 cellulose ion exchange chromatography로 Mab을 정제 하였으며 ¹²⁵I로 label 시킨 Mab는 CP_{450LMII} 항원과 hybridization시켜 binding을 관찰하였으며 SDS-polyacrylamide 전기영동에서 분자량 55,000 및 110,000인 두개의

band를 관찰하였다.

참 고 문 헌

1. Park, S.S., Cha, S.J., Miller, H., Persson, A. V., Coon, M.J. and Gelboin, H.V. : Monoclonal antibodies to rabbit liver cytochrome P-450_{LM2} and cytochrome P-450_{LM4}. *Mol. Pharmacol.*, 21 : 248-258, 1981.
2. Park, S.S., Fujino, T., West, D., Guengerich, F.P. and Gelboin, H.V. : Monoclonal antibodies that inhibit enzyme activity of 3-methylcholanthrene-induced cytochrome P-450. *Cancer Res.*, 42 : 1798-1818, 1982.
3. Fujino, T., Gottlieb, K., Manchester, D.K., Park, S.S., West, D., Gurtoo, H.L., Tarone, R.E. and Gelboin, H.V. : Monoclonal antibody phenotyping of interindividual differences in cytochrome P-450-dependent reactions of single and twin human placenta. *Cancer Res.*, 44 : 3916-3923, 1984.
4. Gelboin, H.V. : Carcinogens, drugs and cytochromes P-450. *N. Engl. J. Med.*, 309 : 105-107, 1983.
5. Fujino, T., Park, S.S., West, D. and Gelboin, H.V. : Phenotyping of cytochromes P-450 in human tissues with monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79 : 3682-3686, 1982.
6. Nebert D.W. and Gelboin, H.V. : Substrate-inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. *J. Biol. Chem.*, 243 : 6242-6249, 1968.
7. Guengerich, F.P. and Martin, M.V. : Purification of cytochrome P-450, NADPH-cytochrome P-450 reductase, and epoxide hydratase from a single preparation of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 205 : 365-379, 1980.
8. van der Hoeven, T.A. and Coon, M.J. : Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 249 : 6302-6310, 1974.
9. Koop, D.R., Persson, A.V. and Coon, M.J. : Properties of electrophoretically homogeneous constitutive forms of liver microsomal cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 256 : 10704-10711, 1981.
10. Koop, D.R., Morgan, E.T., Tarr, G.E. and Coon, M.J. : Purification and characterization of a unique isozyme of cytochrome P-450 from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. *J. Biol. Chem.* 257 : 8472-8480, 1982.
11. Haugen, D.A. and Coon, M.J. : Properties of electrophoretically homogenous phenobarbital-inducible and beta-naphthoflavone-inducible form of liver microsomal cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.*, 251 : 7929-7939, 1976.
12. Kohler, G. and Milstein, C. : Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256 : 495-497, 1975.
13. Fujino, T., West, D., Park, S.S. and Gelboin, H.V. : Monoclonal antibody-directed phenotyping of cytochrome P-450-dependent aryl hydrocarbon hydroxylase and 7-ethoxycoumarin deethylase in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.*, 259 : 2370-2378, 1984.
14. Juarez-Salinas, H., Engelhorn, S.c., Bigbee, W.L., Lowry, M.A. and Stanker, L.H. : Ultrapurification of monoclonal antibodies by high-performance hydroxyapatite(HPHT) chromatography. *Bio Techniques*, May/June, 1984.
15. Jansson, I., Mole, J. and Schenkman, B. : Purification and characterization of a new form(RLM2) of liver microsomal cytochrome P-450 from untreated rat. *J. Biol. Chem.*, 260 : 7084-7093, 1985.
16. Guengerich, F.P. : Separation and purification of multiple forms of microsomal cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.*, 253 : 7931-7939, 1978.
17. Okuda, T., Vesell, E.S., Plotkin, V., Tarone, R., Bast, R.C. and Gelboin, H.V. : Interindi-

- vidual and intraindividual variations in arylhydrocarbon hydroxylase in monocytes from monozygotic twins. *Cancer Res.*, 37 : 3904-3911, 1977.
18. Thomas, P.E., Reik, L.M., Ryan, D.E. and Levin, W. : Regulation of three forms of cytochrome P-450 and epoxide hydrolase in rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 256, 1044-1052, 1981.
 19. Yang, C.S., Tu, Y.Y., Koop, D.R. and Coon, M.J. : Metabolism of nitrosamines by purified rabbit liver cytochrome P-450 isozymes. *Cancer Res.*, 45 : 1140-1145, 1985.
 20. Kamataki, T., Maeda, K., Yamazoe, Y., Matsuda, N., Ishii, K. and Kato, R. : A high-spin form of cytochrome P-450 highly purified from polychlorinated biphenyl-treated rats. *Mol. Pharmacol.*, 24 : 146-155, 1983.
 21. Buchegger, F., Haskell, C.M., Schreyer, M., Scazziga, B.R., Randin, S., Carrel, S. and Mach, J.P. : Radiolabeled fragments of monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen for localization of human colon carcinoma grafted into nude mice. *J. Exp. Med.*, 158 : 413-427, 1983.
 22. Kuo-Chi, C., Gelboin, H.V., Song, B.J., Park, S.S. and Friedman, F.K. : Detection and purification of cytochromes P-450 in animal tissues with monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.*, 259 : 12279-12284, 1984.
 23. Friedman, F.K., Robinson, R.C., Park, S.S. and Gelboin, H.V. : Monoclonal antibody-directed immunopurification and identification of cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 116 : 859-865, 1983.
 24. Song, B.J., Fujino, t., Park, S.S., Friedman, F.K. and Gelboin, H.V. : Monoclonal antibody-directed radioimmunoassay of specific cytochromes P-450. *J. Biol. Chem.*, 259 : 1394-1397, 1984.
 25. Song, B.J., Gelboin, H.V., Park, S.S. and Friedman, F.K. : Monoclonal antibody-directed radioimmunoassay detects cytochrome P-450 in human placenta and lymphocytes. *Science*, 228 : 490-492, 1985.

— Abstract —

Production of Monoclonal Antibody to Polychlorinated Biphenyl Induced Cytochrome P-450 LMII in Rat Liver

Jung Hye Kim, Jae Ryong Kim, and Ki Yung Lee

*Department of Biochemistry
College of Medicine, Yeungnam University
Taegu, Korea*

Cytochrome P-450(CP-450) is one of the three components of the liver microsomal enzyme system which hydroxylates fatty acids, hydrocarbons and a variety of drugs and other foreign compounds. Female Balb/c mice were immunized with purified polychlorinated biphenyl(PCB)-induced CP-450 LMII.

The spleen cells derived from immunized mice were fused with SP² myeloma cells using polyethylene glycol(PEG 3500). The hybrid cells were selected by hypoxanthine-aminopterin and thymidine(HAT) medium and the culture fluid were screened by enzyme-linked immunosorbent assay to CP450 LMII. The hybrid cells($\times 10^7$) were inoculated into intraperitoneal cavity of Balb/c mice for the purpose of production of ascitic fluids.

Monoclonal antibody(Mab) was purified from ascitic fluid by DEAE cellulose ion exchange chromatography and I¹²⁵-labeled Mab was also confirmed by autoradiography and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (MW : 55,000 and 110,000)