

분자량측정을 위한 Reference Plasmid 보유균주의 이용

경북대학교 의과대학 미생물학교실

방성혁 · 이유철 · 설성용 · 조동택

=Abstract=

The Use of the Strain Containing Multiple Plasmids as Size Reference Plasmids

Sung Hyuk Bang, Yoo Chul Lee, Sung Yong Seol and Dong Taek Cho

Department of Microbiology, Kyungpook National University School of Medicine, Taegu, Korea

In the analysis of plasmid profile obtained by agarose gel electrophoresis, the strain harboring multiple reference plasmids of known molecular weight were needed to estimate the size of unknown molecular weight plasmids.

Six strains of *E. coli* isolated from clinical specimens carried multiple plasmids and these strains could be available as a reference plasmids harboring strain. These *E. coli* strains showed 4 to 9 plasmids of various size ranging 2.5 to 94.3 megadalton(Mdal). The correlation coefficients of linear regression between the relative mobility and molecular weight were 0.99966 to 1.00000.

Among them, *E. coli* KE327 from throat which contained 7 plasmids as follows: 79 Mdal, 46 Mdal, 33 Mdal(pKY 3027 C), 4.9 Mdal, 3.8 Mdal(pKY3027 E), 3.5 Mdal, and 2.7 Mdal. Relative amount of the pKY3027 C was the smallest(7.09%) and that of the pKY3027 E was the largest (24.24%) among the plasmid fractions of *E. coli* KE327.

Key Words: Plasmid, Molecular size standard.

서 론

항생제 내성균의 만연실태를 조사하기 위해 개발된 분자생물학적역학(Molecular Epidemiology)에 있어서 내성을 발현하는 유전물질인 R plasmid DNA의 분자적 특성을 규명하는 것은 가장 필수적인 단계이다^{1,2}. 주로 agarose를 이용한 전기영동법에 의해서 이들 plasmid의 profile을 얻을 수 있는데 이때 plasmid의 분자량을 측정하려면 기지의 분자량을 가진 다수의 표준 plasmid와 함께 영동시켜서 상대적인 이동거리를 비교하여 linear regression에 의해 미지 분자량의 plasmid 분자량을 산출한다^{3,13}. 이때 이용되는 plasmid는 F'kan(63; megadalton), R 1033(45 Mdal), RP4(34 Mdal), R 6 K(26 Mdal), Ap 201(8.7 Mdal), pSC 101(5.8 Mdal) 및 pBR 322(2.6 Mdal) 등이 널리 이용된다. 이들 plasmid를 1개씩 보유한 각각의 균을 별도로 용균 추출하는 데는 ultracentrifuge를 이용하여 cesium chloride density gradient centrifugation을 하여서 dialysis시켜 재정

제하여야 되므로 막대한 경비와 시간이 필요하다. 그 이유는 chromosomal DNA의 혼입을 최소화시키고 순수 plasmid DNA만이 고농도로 존재하는 용액을 만들어서 매번의 실험시 6~7종을 혼합해서 사용하기 때문이다.

본 연구의 목적은 단 한개의 균주가 원래 보유하고 있는 다수의 plasmid들이 다양한 분자량의 것들로서 linear regression coefficient에 충실한 종류들이므로 이 균의 plasmid DNA의 분자량을 측정시켜 놓으면 이것이 미지 분자량 측정의 기준이 되는 reference plasmid로서 이용될 수 있으므로 전술한 7종의 표준 plasmid 용액을 별도 제작할 필요가 없다. 실험목적의 균주들과 이 reference plasmid 보유균주를 함께 용균시켜 영동하면 막대한 경비와 노력을 절약할 수가 있다. 이 목적에 적합한 대장균주는 8~10개의 서로 다른 크기의 plasmid가 적당한 크기로 분포되는 것으로서 그 분자량이 불변이어야 함은 물론이고 자연소실도 없어야 한다. 더욱 중요한 것은 분자량 산출에 기준이 되려면 linear regression의 correlation coefficient가 이상치에

근접해야 한다. 본 연구는 이러한 여러가지 조건들에 적합한 plasmid를 검색하여 그 분자량을 확정하였다.

재료 및 방법

균 주

Fig. 1. Plasmid profile of *Escherichia coli* (0.7 % horizontal agarose gel electrophoresis, 25 mA, and 240 min. electrophoresis). A. F[']kan (63 Mdal) and R 1033 (45 Mdal). B. RP 4 (34 Mdal) and R 6 K (26 Mdal). C. Ap 201 (8.7 Mdal) and pSC 101 (5.8 Mdal). D. pBR 322 (2.6 Mdal). 1. *E. coli* KE 309. 2. *E. coli* KE 327. 3. *E. coli* KE 332. 4. *E. coli* KE 337. 5. *E. coli* KE 363. 6. *E. coli* KE 367.

각종의 임상가검물에서 분리한 대장균으로 이들의 분리 및 동정은 Lennette 등⁶⁾의 방법과 기준을 근거로 결정하였다.

항균제 및 항균제 감수성 검사

항균제는 ampicillin (Ap), streptomycin (Sm), kanamycin (Km), gentamicin (Gm), amikacin (Ak), sulfoximidine (Su), trimethoprim (Tp), chloramphenicol (Cm), tetracycline (Tc), nalidixic acid (Na) 및 rifampin (Rf) 등 11종을 사용하였다. 한천회석법¹⁷⁾으로 최소발육억제농도 (MIC)를 결정하였다.

공시균의 plasmid DNA 분리

Kado 및 Liu⁸⁾의 방법을 다소 변경하여 실시하였다. 1 주야 진탕배양한 균액을 원심후 TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 부유시키고 lysis mixture (3 % sodium dodecyl sulfate, 50 mM Tris, pH 12.6)를 가하여 용균시켰다. 이 용액에 phenol-chloroform 혼합액을 가하여 단백을 제거한 후 원심하여 상층을 회수하였다. 이 상층액을 0.07 % bromphenol blue를 함유하는 buffer와 혼합하여 전기영동에 이용하였다.

표준 plasmid DNA의 분리

표준 plasmid를 보유한 균을 대량 (2,000 ml) 배양하여 수확한다⁸⁾. 이들을 표준 Tris EDTA 완충용액에 녹인 후 sucrose, lysozyme을 차례로 처리한 다음 Triton-X 100 혼합액으로 용균을 마무리하여 DNA만을 수거한다. 5 M NaCl에 DNA를 용해시킨 후 polyethylene glycol과 CsCl을 이용하여 density gradient centrifugation을 실시한 다음 plasmid DNA만을 분리한다. Isopropanol로 ethidium bromide (EtBr)를 세척한 후 투석을 하여 DNA를 정제한 후 전기영동에 이용하였다.

Plasmid DNA의 전기영동

Table 1. Source and MIC of *Escherichia coli*

Source	Strain No.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)						
		Cm ^a	Tc	Sm	Su	Ap	Km	Tp
Urine	KE 332	256	256	512	>2048	>512	128	>512
Urine	KE 363	>512	512	256	>2048	>512	256	256
Urine	KE 337	256	256	256	>2048	>512	>512	64
Throat	KE 327	16	256	256	>2048	>512	128	>512
Throat	KE 367	4	1	8	>2048	128	4	>512
Pus	KE 309	4	1	2	≤ 32	256	2	≤ 0.25

^a Abbreviation: see text.

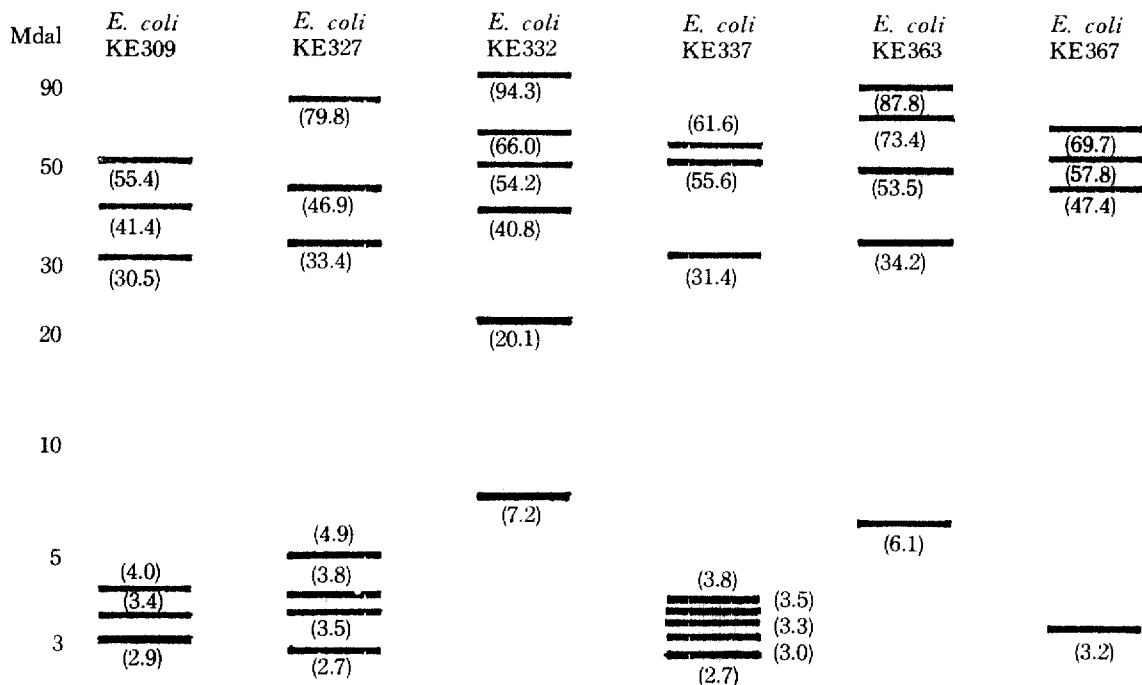


Fig. 2. Schematic drawing from agarose gel electrophoresis of *Escherichia coli* (0.7% agarose, horizontal, 25 mA, and 240 min. electrophoresis). Numbers in parenthesis and left margin are molecular weights in megadalton (Mdal).

0.7% agarose gel을 이용하였으며, buffer는 89 mM Tris, 89mM boric acid, 2mM EDTA를 함유하는 TBE butter를 이용하였다. 수평형 영동장치를 이용하였으며, 매 영동마다 plasmid 분자량을 측정하기 위해 F⁺kan, R1033, RP4, R6K, Ap201, pSC101 및 pBR322 등의 표준 plasmid DNA를 함께 영동시켰다. Polaroid camera를 써서 0.5μg/ml의 Et-Br 용액에 염색된 gel을 UV transilluminator 상에서 촬영하였다. Plasmid의 분자량은 band의 이동거리를 사진상에서 Vernier caliper로 측정 한 후 분자량이 알려져 있는 plasmid와 공시균이 지닌 plasmid 간의 상대적인 이동거리를 molecular weight 계산 program인 TI-59를 Apple II 컴퓨터에 입력하여 공시균의 plasmid 분자량을 산출하였다.

Plasmid 분획의 상대적인 양

Densitometer(Gelman ACD-18)를 이용하였으며 파장 550 nm로 negative film의 각 분획의 백분율을 계산하였다.

성 적

다수의 plasmid를 보유한 6주의 대장균의 유래 및 MIC를 Table 1에 나타내었다. 노에서 분리된

KE 332, KE 363 및 KE 337은 Cm, Tc, Sm, Su, Ap, Km, Tp의 7가지 항생제에 모두 내성이었으나, 이후에서 분리된 KE 327과 KE 367은 각각 Tc, Sm, Su, Ap, Km 및 Tp, Su, Ap 및 Tp에 내성이었고, 농에서 분리된 KE 309는 Ap에만 내성이었다. Ap에는 3주 모두 MIC가 128μg/ml 이상이었으며, Su에 대해서는 KE309를 제외한 6주가 2048μg/ml보다 큰 MIC를 나타내었다. 내성균주들은 Cm, Tc, Sm에 대해서는 256μg/ml 이상의 MIC를, Km에 대해서는 128μg/ml 이상의 MIC를 나타내었으나 Tp에는 64μg/ml의 낮은 MIC를 나타낸 내성주가 있었다.

Agarose 전기영동을 시행한 결과를 Fig. 1에 나타내었으며, 도식으로 Fig. 2에 다시 정리하였다.

대장균 KE 309는 55 Mdal, 41 Mdal, 30 Mdal, 40 Mdal, 3.4 Mdal 및 2.9 Mdal 등 6개의 plasmid를 보유하고 있었으며, KE 327은 79 Mdal, 46 Mdal, 33 Mdal, 4.9 Mdal, 3.8 Mdal, 3.5 Mdal 및 2.7 Mdal 등 7개의 plasmid를, KE 332는 94 Mdal, 66 Mdal, 54 Mdal, 40 Mdal, 20 Mdal 및 7.2 Mdal 등 6개의 plasmid를, KE 337은 61 Mdal, 55 Mdal, 31 Mdal, 3.8 Mdal, 3.5 Mdal, 3.3 Mdal, 3.0 Mdal 및 2.7 Mdal 등 9개의 plasmid를, KE 363은 87 Mdal, 73 Mdal, 53 Mdal, 34 Mdal 및 6.1 Mdal의 5개의 plasmid를,

Table 2. Molecular weight linear regression of plasmids from *E. coli*^a

	Strain No.					
	KE 309	KE 327	KE 332	KE 337	KE 363	KE 367
Large plasmids ^b :						
Number	3	3	5	3	4	3
Linear regression ^c						
b	0.17586	0.15417	0.13172	0.16802	0.14686	0.15798
m	0.27093	0.26733	0.27941	0.27089	0.26865	0.27209
R	0.99999	0.99997	0.99998	0.99999	0.99990	1.00000
Small plasmids :						
Number	3	4	1	5	1	1
Linear regression						
b	0.18171	0.14663	— ^d	0.17217	—	—
m	0.25743	0.28156	—	0.26163	—	—
R	0.98731	0.99953	—	0.99819	—	—
Total :						
Number	6	7	6	8	5	4
Linear regression						
b	0.17727	0.14946	0.14076	0.16959	0.14529	0.15797
m	0.26958	0.27224	0.26900	0.26938	0.27026	0.27210
R	0.99998	0.99997	0.99966	0.99998	0.99998	1.00000

^aMolecular weight calculation program (T1-59) put into Apple computer.

^bLarger than 20 megadalton.

^cLog (1/Y * 10) = b + (m) Log X, R: correlation coefficient.

^dNot applicable to linear regression.

KE 367 은 69 Mdal, 57 Mdal, 47 Mdal 및 3.2 Mdal 등 4 개의 plasmid 를 보유하고 있었다.

분자량 계산 program 인 T1-59 의 공식인 $\log(1/Y \times 10) = b + (m) \log X$ 를 이용하여 linear regression 을 한 결과를 plasmid 의 분자량의 크기에 따라 큰 것과 작은 것 및 합친 것으로 구분 Table 2 에

나타내었다.

큰 분자량의 plasmid 들의 linear regression 의 상관계수(R) 는 0.99990 에서 1.00000 이었으며, 직선의 기울기(m) 는 0.26~0.27 이었다. KE 332, KE 363 및 KE 367 은 작은 분자량의 plasmid 가 1 개로 linear regression 을 할 수 없었고, 작은 분자량의 plasmid

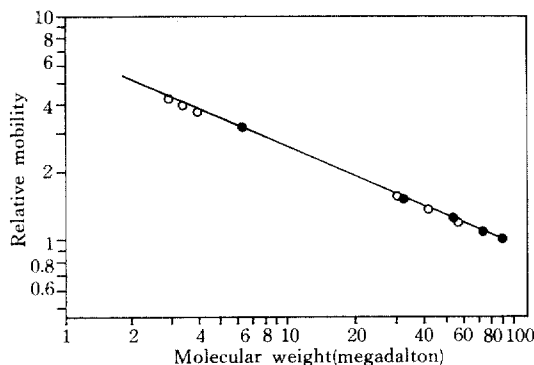


Fig. 3. Molecular weight versus relative mobility of plasmid DNA from *E. coli* KE 309 and KE 363. The mobility of 87 megadalton plasmid was set arbitrarily at 1. Symbols: ○, plasmids from K E309; ●, from KE363.

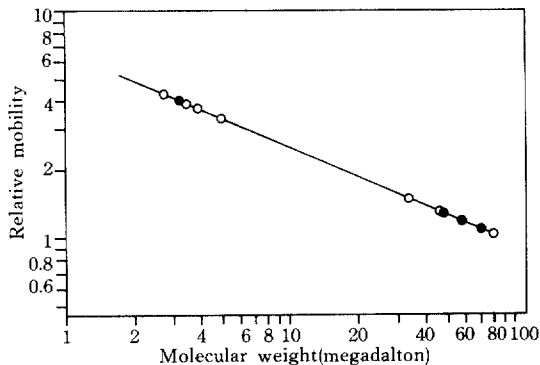


Fig. 4. Molecular weight versus relative mobility of plasmid DNA from *E. coli* KE 327 and KE 367. The mobility of 79 megadalton plasmid was set arbitrarily at 1. Symbols: ○, plasmids from K E327; ●, from KE 367.

들의 linear regression이 가능한 KE 309, KE 327 및 KE 332의 상관계수는 0.997~0.999였으며, m은 0.25~0.28로 큰 분자량의 plasmid들의 linear regression 직선의 기울기와 다소 차이가 있었다. 4~8개의 plasmid를 모두 합쳤을 때의 R가 KE367에서는 1.00000이었으며 나머지 균주들도 0.99966~0.99998로 이상치인 1에 근접하는 상관계수를 나타내었다.

Plasmid의 분자량과 전기영동상의 상대적인 이동 거리를 log 그래프에 표시하여 Fig. 3, 4, 5에 나타내었으며, 직선은 linear regression 결과를 나타낸 표준직선이다.

Fig. 3은 KE 309와 KE 363이 보유한 plasmid를 나타내었는데 KE 363이 보유한 87 Mdal plasmid의 이동거리를 1로 표시하였으며, Fig. 4는 KE 327과 KE 367의 plasmid들을 나타내었으며 KE 327이 보유한 79 Mdal의 plasmid의 이동거리를 1로 표시하였다. Fig. 5는 KE 332와 KE 337의 plasmid들을

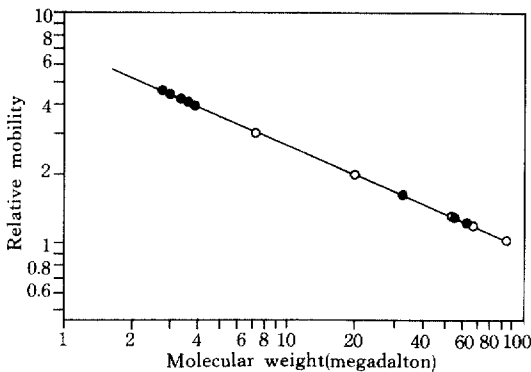


Fig. 5. Molecular weight versus relative mobility of plasmid DNA from *E. coli* KE 332 and KE 337. The mobility of 94 megadalton plasmid was set arbitrarily at 1. Symbols: ○, plasmids from KE 332; ●, from KE 337.

나타내었으며, KE 332가 보유한 94 Mdal의 plasmid의 이동거리를 1로 표시하였다. Fig. 3, 4, 5에 나타낸 각종의 plasmid들을 분자량 및 상대적인 이동거리와의 관계가 표준직선과 잘 일치하고 있었다.

다양한 크기의 plasmid를 보유한 KE 327의 plasmid의 크기를 정확히 측정하기 위하여 6회의 반복 실험으로 얻은 plasmid들의 크기 및 각 plasmid DNA의 상대적인 양을 Table 4에 정리하였다.

KE 327이 지닌 7개의 plasmid를 A~G로 명명하였는데 A는 79.80 Mdal, B는 46.97 Mdal, C는 33.49 Mdal, D는 4.92 Mdal, E는 3.89 Mdal, F는 3.51 Mdal, G는 2.77 Mdal이었으며 각 plasmid의 분자량의 표준편차는 6.33~0.03이었다. 각 plasmid 분획의 상대적인 양은 pKY 3027 E가 24.24%로 가장 많았으며, pKY 3027 D도 23.73%로 많았으나 접합에 의해 전달 가능하였던 33.49 Mdal의 pKY 3027 C는 7.09%로 가장 적었다.

고 찰

세균의 비염색체성 유전물질인 plasmid가 gram 음성세균 특히 장제세균들의 다약제내성 획득 및 전파에 중요한 역할을 하는 것이 알려진 후^{3,15)} gram 양성균에서도 이들 plasmid에 의한 많은 현상들이 밝혀졌다^{12,16)}. 또 진핵세포인 효모에도 plasmid가 존재한다⁵⁾.

현재 plasmid는 유전자 재결합 기술에서 각종의 유전자를 운반하는 매개체로 사용되며, 각종 물질의 대사에 관계하는 plasmid는 하수처리등에 이용되기도 한다¹⁰⁾. 그리고 의학적으로는 세균의 항생제 내성획득 및 독성의 연구에 중요할 뿐 아니라 원내 감염을 포함한 각종 질환의 역학적 조사에 중요한

Table 3. Size estimates and relative amount of plasmid DNA in *Escherichia coli* KE 327

Plasmid designation	Size (megadalton) ± S.D.	Amount (%) of total plasmid DNA
pKY 3027 A	79.80 ± 6.33 ^a	10.24 ^b
pKY 3027 B	46.97 ± 1.39	18.80
pKY 3027 C	33.49 ± 1.24	7.09
pKY 3027 D	4.92 ± 0.08	23.73
pKY 3027 E	3.89 ± 0.03	24.24
pKY 3027 F	3.51 ± 0.11	8.54
pKY 3027 G	2.77 ± 0.09	7.36

^aBased on the results of 6 independently performed analyses.

^bPlasmid amounts were estimated from tracing of photographic negatives of agarose gels made with a Gelman ACD-18 densitometer.

자료가 되는데^{2,4} 대부분의 장제세균들은 plasmid를 보유하고 있고 그들중 상당수가 접합에 의해 타균에 항생제내성을 전달할 수 있는 R plasmid이다^{1,14}.

이러한 plasmid의 특성에 대한 연구중에서 분자량을 측정하는 방법은 전자현미경하에서 길이를 측정하는 방법과 agarose나 polyacryl amide 등의 gel을 이용한 전기영동법등이 있는데 전기영동법으로 plasmid의 분자량을 측정하는 데는 기지의 분자량을 가진 plasmid를 기준으로 한다. 이때 불변의 기지의 분자량을 가진 6~7개의 reference plasmid들을 공시균과 함께 영동시켜서 이동거리를 상대적으로 비교하여 linear regression에 의해 미지의 분자량을 산출할 수 있다^{6,13}.

Reference plasmid로 널리 사용되는 것들은 F⁺kan (63 Mdal), R 1033 (45 Mdal), RP 4 (34 Mdal), R 6 K (26 Mdal), Ap 201 (8.7 Mdal), pSC 101 (5.8 Mdal) 및 pBR 322 (2.6 Mdal) 또는 R1 (62 Mdal), RP 4 (34 Mdal), Sa (23 Mdal), RSF 1010 (8.7 Mdal) RSF 1030 (5.5 Mdal) 및 MB 8 (1.8 Mdal) 등인데 이들 plasmid를 확보하는 어려움 뿐만 아니라 이들 plasmid들은 ultracentrifuge를 이용하여 density gradient centrifugation을 개별적으로 실시하여 고농도의 DNA 용액을 만들어 두었다가 매번의 실험에 사용하게 되어 있으므로 막대한 경비와 많은 시설이 요구된다. 따라서 여러가지 크기의 plasmid를 가지고 있는 균주를 확보한 후 이들의 분자량을 확인해서 번거로운 reference plasmid 시료를 제작할 필요성을 줄이기 위한 방법으로 Macrina 등¹¹은 임상검체에서 분리한 대장균중 32.24 Mdal, 5.14 Mdal, 3.48 Mdal, 3.03 Mdal, 2.24 Mdal, 1.69 Mdal, 1.51 Mdal 및 1.24 Mdal 등 8개의 plasmid를 보유한 균주의 사용을 보고한 바 있다.

본 실험에서 얻은 다수의 plasmid 보유균주는 2.7~94.3 Mdal의 다양한 크기의 plasmid를 4~8개 보유하고 있었으며, linear regression의 결과도 correlation coefficient가 0.99966에서 1.00000으로 이상치에 근접하였다. 그중 KE 327은 79 Mdal, 46 Mdal, 33 Mdal, 4.9 Mdal, 3.8 Mdal, 3.5 Mdal 및 2.7 Mdal 등 여러가지 크기의 plasmid를 7개 보유하고 있었으며, 그중 접합에 의해 전달가능한 33 Mdal의 pKY 3027 C는 7.09%로 상대적인 plasmid의 양이 가장 적었는데 일반적으로 큰 크기의 접합성 plasmid는 균체내의 염색체 복제에 대한 plasmid 복제 비율인 copy number ratio가 1에 가까운 것으로 알려져 있다⁷.

본 실험에서 조사한 다양한 크기의 plasmid를 다

수 보유한 대장균들을 reference plasmid로 대체하면 많은 시간과 경비를 줄일 수 있어 이 분야의 연구를 더욱 활성화시킬 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

Agarose 전기영동에 의한 plasmid profile 분석에 있어서 미지의 분자량을 측정하는데 필요한 reference plasmid로서 이용할 수 있는 균주를 조사하였다.

임상가검물에서 분리된 대장균 가운데 6주가 4~8개의 plasmid를 보유하고 있었고, 그 크기는 2.7~94.3 megadalton (Mdal)이었다. 이들 plasmid의 전기영동상의 이동거리와 분자량간의 linear regression 상관계수는 0.99966-1.00000이었다.

그중 인후에서 분리된 KE 327 균주는 79 Mdal, 46 Mdal, 33 Mdal (pKY 3027 C), 4.9 Mdal, 3.8 Mdal (pKY 3027 E), 3.5 Mdal 및 2.7 Mdal의 7개의 크기가 다양한 plasmid를 가지고 있었고, plasmid 분석의 상대적인 양은 pKY 3027 C가 7.09%로 가장 적었으며, pKY 3027 E가 24.24%로 가장 많았다.

참 고 문 헌

- 1) 이유철, 조동택: N 비적합성균 Plasmid의 Beta-lactamase활성, 대한화학요법학회지, 1:255, 1983.
- 2) 조동택: Plasmid 분석에 의한 원내감염의 역학적 조사, 대한화학요법학회지, 2:76, 1984.
- 3) Akiba T, Koyama T, Ishiki T, Kimura S and Fukushima T: Studies on the mechanism of development of multiple drug-resistant *Shigella* strains, *Nihon Iji Shimpo.*, 1866:45, 1960.
- 4) Farrar WE Jr: Investigation of nosocomial infections by plasmid analysis, *Clin. Investigative Med.*, 6:213, 1983.
- 5) Freifelder D: Molecular biology, p.701, Science Books International, Boston, 1983.
- 6) Gerhardt P: Manual of methods for general bacteriology, p.266, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1981.
- 7) Jawetz E, Melnick JL and Adelberg EA: Review of medical microbiology, p.37, 16th ed., *Lange Med. Publ., Los Altos*, 1984.
- 8) Kado CI and Liu ST: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids, *J. Bacteriol.*, 145:1365, 1981.

- 9) Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Jr and Shadomy HJ: Manual of clinical microbiology, p.263, 4th ed., American Society for Microbiology, Washington, DC, 1985.
- 10) Levy SB, Clowes RC and Koenig EL: Molecular biology, p.449, pathogenicity and ecology of bacterial plasmids, Plenum Press, New York, 1981.
- 11) Macrina FL, Kopecko DJ, Jones KR, Ayers DJ and McCowen SM: A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: Convenient source of size reference plasmid molecules, *Plasmid*, 1:417, 1978.
- 12) McDonnell RW, Sweeney HM and Cohen S: Conjugal transfer of gentamicin resistance plasmids intra- and interspecifically in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 23:151, 1983.
- 13) Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP and Falkow S: Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid, *J. Bacteriol.*, 127:1529, 1976.
- 14) Mitsuhashi S: Review: The R factors, *J. Infect. Dis.*, 119:89, 1969.
- 15) Ochiai K, Yamanaka T, Kimura K and Sawada O: Studies on inheritance of drug-resistance between *Shigella* strains and *Escherichia coli* strains, *Nihon Iji Shimpo.*, 1861:34 1959.
- 16) Smith MD and Guild WR: Improved method for conjugative transfer by filter mating of *Streptococcus pneumoniae*, *J. Bacteriol.*, 144:457, 1980.
- 17) Thornsberry C: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, p.31, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, 1983.