大韓바이러스學會誌: 第26卷 第1號 1996
J. of Kor. Soc. of Virology, Vol. 26, No. 1, 1996

마지바이러스 Nucleocapsid Protein 유전자의 발현과 신증후 출혈열 진단용 항원으로의 이용*

고려대학교 의과대학 미생물학교실, 고려대학교 바이러스병 연구소,
[1]보령제약 중앙연구소 생명공학센터

이평우 · 김윤철[1] · 백우현[1]

=Abstract=

Expression of Nucleocapsid Protein Gene of Maaji Virus and Use of the Protein as an Immunodiagnostic Antigen of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome

Pyung-Woo Lee, Yun-Cheol Kim[1]and Woo-Hyun Paik[1]

Department of Microbiology, College of Medicine, the Institute for Viral Diseases, Korea University, Seoul 136-705;[1]Central Research Center of Boryung Pharmaceutical Company, 689 Geumjung-dong, Gunpo-si 435-050, Gyunggi-do, Korea

Nucleocapsid protein (NP)which exists in the particle of hantavirus and surrounds the viral RNA genome is one of the major structural proteins and plays role of antigen to elicit the antibody detected predorminantly right after infection of the virus in the patients of hemorragic fever with renal syndrome (HFRS)or experimental animals. NP is important target antigen in serological diagnostic system of HFRS utilizing whole antigens from the native virus particle, such as IFA, ELISA and Western blotting. Therefore, the preparation of this protein in the level of higher quantiity and purity is desirasble for developed dianosis of the disease. The purpose of this study is the cloning of NP gene which exists in the S genome segment of Maaji (MAA) virus and expression of the gene to obtain qualified, genetically engineered NP to be utilized as an immunodiagnostic antigen.

First of all, for the purpose of amplifing the MAA-NP gene by PCR, the specific primers were built from the known nucleotide sequence of Hantaan viral NP gene. The viral cDNA of the NP gene was synthesized by using the primers and RNase H⁻ AMV reverse transcriptase. Thereafter, using this cDNA as a template, the NP gene was amplified specifically by Taq DNA polymrerase. The pT7blue (R)T-overhang vector systems were used for cloning of the amplified NP gene. The expression system was consisted of BL21 (DE3)pLysS and pET16b as a host and a plasmid repectively. Into NdeI site of pET16b, NP gene was ligated with cohesive end for the expression. Insertion of NP gene in the plasmid was confirmed by PCR and mini prep methods. For expression, IPTG was used and the expressed protein was characterized by Western blotting. The MAA-NP was expressed as the form of inclusion body (insoluble fraction)and the protein purified by affinity and metal chealating columns reacted specifically with the sera from patients of HFRS as to be tested by ELISA and Western blotting.

Key Word: Maaji virus, Nucleocapsid protein (NP), PCR, CIoning, Immunodiagnostic antigen

*이 논문은 1994년도 한국 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

서 론

한탄바이러스를 위시하여 항원적으로 유사한 일단의 바이러스들은 그 바이러스학적 제반 특징상 분야바이러스과 (family *Bunyaviridae*)의 독립된 속인 한타바이러스 속 (genus hantavirus)으로 분류하며, 나아가 네 종류 이상의 혈청형으로 구분된다 [1,2,3,4,]. 즉 대표적으로는 한탄 (Hantaan), 서울 (Seoul), 푸우말라 (Puumala), 및 프로스펙트힐 (Prospect Hill)바이러스들로서, 이들 중 중국, 만주 및 한국 등의 동아시아 지역에서 중증의 신증후 출혈열 (hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)의 병원체로 나타나는 혈청형은 한탄 바이러스이며, 서울 바이러스는 우리나라를 포함하는 세계의 도처에서 보다 경증의 신증후 출혈열을 일으킨다. 푸우말라 바이러스는 핀란드, 스웨덴 등 북유럽 지방에서 발생하는 보다 경증의 이 질병과 연관되어 있다. 그러나 북미주 [5]에서 발견되는 프로스펙트힐 바이러스는 병원성이 없는 것으로 알려져있다 [6]. 근래에 와서 이러한 대표적인 혈청형 이외에도 몇종의 새로운 바이러스들이 추가적인 혈청형으로 제시되고 있는데, 그 중에서 우리나라의 경기도 파주군 적성면 마지리에서 분리된 마지바이러스 (Maaji virus)는 특히 한탄 바이러스와 유사하지만 분명히 다른 항원적 및 바이러스학적 특징을 지님으로서 새로운 종류의 바이러스임이 밝혀지고 있다 [7,8,9,].

한타바이러스 (Hantavirus)입자는 직경 100nm의 구형으로 최외각부는 lipid 성 피막 (envelope)으로 둘러 싸여 있으며, 막 표면에는 두 종류의 바이러스성 당단백질 glycoprotein 1과 2 (G1, G2)가 삽입, 돌출되어있다. 또한 입자의 내부에는 segmented viral RNA genome들이 nucleo-protein의 homopolymer로 이루어진 nucleocapsid protein (NP)이란 내부 단백질로 피복되어 core part를 형성한다 [10]. 한타바이러스의 genomic RNA들은 세개의 분절로 나눠져 있는데, 그 크기에 따라 L, M, S 분절로 부르며 L 분절은 RNA transcriptase를 그리고 M은 피막에 삽입되어 neu-tralizing antibody를 형성함에 있어 epitopes로 작용하는 G1과 G2를, S는 NP를 coding 한다 [11,12,13]. 마지바이러스 역시 위와 동일한 한타바이러스로서의 특징을 지니나, 이들 L, M, S 분절의 염기서열이 기존의 한타바이러스속의 다른 바이러스와 차이가 있다는 것과 또 한탄 바이러스와는 달리 마지바이러스의 NP에 대한 항체가 프로스펙트힐 바이러스의 NP와 높은 교차반응을 일으킨다는 뚜렷한 특징이 알려져있다 [7].

NP는 사람이나 다른 동물숙주가 한타바이러스에 감염될 경우, 가장 먼저 형성되는 항체의 epitope으로 작용한다. 따라서 생체내 이 단백질에 대한 항체의 존재여부는 면역형광항체법 (IFA) 및 ELISA 등에 의한 신증후 출혈열 감염의 혈청학적 진단에 있어 중요한 지표가 된다 [14]. 현재까지 이 항체의 존재는 항원의 sources 로서 바이러스 감염 조직배양세포 그 자체나 또는 감염동물의 조직 또는 배양세포로 부터 추출한 전 바이러스 추출물을 가지고 면역형광항체법, ELISA, HDPA 그리고 면역블럿법 [14]등을 이용하여 검사할 수 있다. 그러나 이들 모든 검사법에서 주 항원이 되는 바이러스의 part는 NP로서 기존의 항원 제조법으로는 다량의 조직성분 등 불순물이 혼입되어 비특이 반응의 원인이 됨으로서 항체 검사의 정확한 판정을 어렵게 하고 나아가 항원의 quality 를 표준화하기에 어려움이 많았다. 따라서 NP만을 다량으로 순수하게 얻을 수 있으면 이를 이용하여 현재의 혈청학적 검사의 수준을 특이성 및 감도의 차원에서 월등히 개선할 수 있다. 이와같은 필요성에 부응하여 유전공학적인 방법으로 마지바이러스의 NP 유전자를 클로닝하고 이를 발현시키고자 하였으며, 나아가 발현된 단백질을 항원 특성화 및 분석 시험을 통해 그 적정성이 입증되면 장래의 신증후 출혈열의 혈청학적 진단을 위한 새로운 항원 source로서 이용하고자 한다.

재료 및 방법

1. 한타바이러스

경기도 파주군 마지리의 한국산 등줄쥐 (*Apodemus agrarius coreae*)에서 분리된 마지 바이러스 (Maaji virus)MAA-1 strain을 이용하였으며, 본 교실 바이러스 실험실에서 분리, 동정하여 -70℃ 에 보관 중이던 strain을 사용하여 실험을 수행하였다. 모든 실험은 이 바이러스를 Vero E-6 cell 에 7~10일 배양한 후, 세포를 회수하여 바이러스 source로 사용 하였다 [7,8,9,].

2. 배양세포

마지바이러스의 증식과 계대에 사용된 세포는 Vero-E6 cell (CRL 158) (ATCC, Rockville, Md)로서, 세포의 증식과 유지에는 10% fetal bovine serum (Hyclone, Utas, USA)이 함유된 DMEM (Dulbeccos modified Eagle medium) (Sigma, St.Louis, MO)으로 5% CO_2가 공급되는 water-jacketed 37℃ incubator (Cell Star)에서 단층배양하였으며, passage 5~15 사이의 양호한 상태의 90% confluent 세포를 사용하여 실험을 실시하였다.

3. Cloning 및 expression host

Cloning host로서는 NovaBlue competent cell (Novagen)을 사용하였으며 pT7 blue (R)vector의 cloning에 사용하였다. Expression host는 T7 expression system [15]의 E.coli로서 bacteriophage DE3 strain의 RNA polymerase gene을 지니며, T7 Lysozyme gene을 episome형태로 지니고 있는 BL21 (DE3)pLysS를 F.W. Studier [15]로 부터 분양받아 사용하였다. 이 host는 T7 Lysozyme을 coding하고 있는 plasmid인 pLysS를 지니며, 여기에 coding된 T7 Lysozyme은 T7 RNA polymerase의 inhibitor로 작용하여 T7 RNA polymerase의 basal activity를 억제한다. 위 균주의 genotype은 *bsdS gal (l cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7gene 1)*이며 lon protease 와 outer membrane protease (OMP)의 activity를 지니지 않는다.

4. Plasmid

Cloning plasmid는 pT7blue (R)T-overhang vector (Novagen)를 사용하였으며, 이 plasmid는 thymidine을 한 residue가지고 있어서 PCR pro-duct를 직접적으로 cloning할 수 있다. 또한 이plasmid는 ampicillin resistant gene을 지니고있다.

Expression에 사용된 plasmid는 pBR322의 derivative이며, expression용 plasmid인 pET-16b (Novagen)[15]로서 ampicillin resistant gene을 지니며, expression될 target protein 앞에 10개의 histidine residue가 함께 붙어서 발현될 단백질의 분리가 용이하도록 합성되어진 plasmid이다. 또 Ndel site를 지니고 있어서 nonfusion expression에 사용될 수 있는 vector이다.

5. RT-PCR

1)바이러스 **RNA**의 분리

마지바이러스를 vero-E6 cell이 단층배양된 T-25 flask (Corning)에 바이러스 용액 0.1ml을 첨가하여 감염시킨 후 10일 동안 바이러스를 증식시켰다. 그 후 상층의 cell medium은 버리고 바이러스가 감염된 단층세포를 trypsini (Gibco, BRL)으로 떼어내어 800rpm으로 원시분리하고 전체 부피가 150μl 되게 증류수를 첨가한 다음, 300μl의 6M GIT buffer (guanidine isthiocyanate)를 가하고 잘 섞어 세포를 용해시켰다. 여기에 50μl의 2M sodium acetate (pH4.5)와 500μl의 phenol: chloroform: isoamylalcohol (25:24:1) (Gibco, BRL)을 가하고 잘 흔들어 얼음속에 10분간 넣어둔 뒤 15,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취했다. 다시 이 상층액에 동일부피의 100% isopropanol을 가해 -70℃ 에서 2시간 방치한 뒤 4℃에서 15,000rpm으로 20분간 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 이 pellet을 70% ethanol로 한 번 washing한 후 vacuum dryer로 건조시키고 20μl의 DEPC (diethyl-pyrocarbonate, Sigma)가 처리된 H_2O로 resuspend 시켰다 [16,17].

2)cDNA의 합성

위에서 분리한 RNA 용액에 PCR에 사용될 primer pair를 각 20pmol 씩, 10mM dNTP 2μl (New England Biolab), 10X buffer 3μl를 첨가하고 DEPC water로 전체 부피를 29μl되게 맞춘 뒤, 72℃에서 3분간 heating 시켜 존재할지 모르는 secondary structure를 제거하였다. 그 후 얼음에 꽂아 급격히 온도를 낮추고, RNase H AMV reverse transcriptase (RTase) (Gibco BRL)1μl를 첨가하여 42℃에서 1시간 30분동안 반응시켰다. 이 후 94℃에서 5분간 가열하여 RTase를 불활화시켰으며, phenol: chloroform: isoamylalcohol (25:24:1) (Gibco BRL)을 동량 처리하고 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취해 RTase를 제거하였다 [18].

3)Primers

RT-PCR에 사용된 primer는 한국생공에 주문, 제조하였으며 이 두 primer는 한탄바이러스와 마지바이러스의 nucleocapsid protein (NP)이 매우 유사한 면역학적 특성을 지닌다는 사실을 바탕으로, 이미 S segment의 염기서열이 알려진 한탄바이러스 76-118 strain의 염기서열을 이용하여 설계하였으며, NP 유전자를 모두 증폭시킬 수 있게 유전자의 3'말단과 5'말단의 23~26개의 염

Table 1. PCR primers built for amprification of the ORF of Maaji viral nucleocapsid protein(MAA/NP)

Designation	Location	Sequence(5'→3')
YC3	37～72	ATGGCAACTATGGAGGAATTACAGAGGGAAATCAAT
YC4	37～60	TTCATATGATGGCAACTATGGAGGAATTACAG
YC5	1291～1326	TTAGAGTTTCAAAGGCTCTTGGTTGGAGATTTCCTT
YC8	1303～1326	TTCATATGTTAGAGTTTCAAAGGCTCTTGGTT

기서열을 선택하였다. 이 두 primer의 melting tempera-ture는 각기 65℃이었으며, 한탄 바이러스의 S segment 내에서의 위치는 37～72 (cDNA의 5'말단에서 부터 측정하였을 경우)와 1291～1326의 위치를 차지한다 (Table 1)[18]. 또 차후의 subcloning을 위하여 NdeI restriction enzyme site를 primer의 양쪽 말단에 위치시켜 합성하였다.

4)Taq polymerase에 의한 RT-PCR

마지바이러스의 NP 유전자 cDNA를 PCR로 증폭시키기 위하여 1㎕의 cDNA, 2㎕의 dNTP (New England Biolab), 10㎕의 10X Taq polymerase buffer (500mM KCl; 1M Tri, pH9.0; 1% Triton X-100) (Promega), 12㎕의 25mM $MgCl_2$, 0.5㎕의 Taq polymerase (Promega), 4㎕의 10pmol primers를 가하고 DEPC-water로 전체 부피를 100㎕로 되게하였다. 그 후 PCR의 특정 온도 즉, denaturation temperature (94℃), annealing temperature (48℃), exten-sion temperature (72℃)를 입력하여 Thermocycler (Eric Comp Inc. Twin power block™ system)에서 35cycle 반응 시켰다 [19].

6. Cloning

1)Vector 와 insert의 준비

NdeI site를 가지고 증폭된 PCR products를 ultrafiltration method (Amicon, cenricon)로 농축한 후, phenol: chloroform: isoamylalcohol (25:24:1) (Gibco, BRL)을 처리하여 Taq polymerase를 제거하고 이를 microspin column (Pharmacia Sephacryl S-200)에 loading하고 원심분리하여 PCR에 사용된 여러 salt들을 제거하였다. 이와같이 정제된 sample을 agarose gel (FMC)로 전기영동하여 purity를 check하고 그 purity의 여부에 따라 그대로 사용하거나 gene clean kit (Bio 101)로 agarose gel 상의 DNA band를 잘라 좀 더 분리하여 사용하였다.

Expression vector DNA의 준비는 pET-16b를 지니고 있는 HMS 174주를 ampicillin (100mg/ml) (Sigma)이 포함된 NZCYM (1l 당 10g NZ amine, 5g NaCl, 5g bacto-yeast extract, 1g casamino acid, 2g $MgSO_4.7H_2O$)배지에서 O.D 0.7～0.9까지 배양한 후 chloramphenicol (Sigma)를 30㎍/ml되게 첨가하고 12시간 더 배양하여 8,000rpm, 20분간 원침하여 세포를 harvest하였다. 이 균주로부터 alkali lysis method와 PEG (Mw 8,000) (Sigma), precipitation method로 plasmid를 순수하게 분리하였으며, 이와같이 준비된 plasmid를 NdeI restriction enzyme (Boehringer Mannheim)으로 처리한 후 calf intestinal alkaliphospatase (Promega)로 dephosphorylation시켜 self ligation을 방지시켰다 [20].

2)Cloning 및 expression strategy

Cloning vector는 앞서 기술한 바와 같이 pT 7blue (R)T-overhang vector이다. pT7 blue (R)T-overhang vector는 PCR products를 바로 cloning할 수 있다는 편리함 때문에 선택되었다. 일단 cloning된 vector를 분리하여 NdeI을 처리한 후 plasmid와 분리된 insert를 gene clean kit (Bio 101)로 정제하였다. 이렇게 얻어진 insert를 위의 과정으로 얻어진 expression vector와 ligation시켜 transformant를 얻고자 하였다. 이처럼 마지바이러스의 NP gene을 클로닝하고 발현시키기 위한 strategy는 Fig. 1에 도시하였다.

3)Ligation

위의 과정을 통해 얻어진 DNA를 사용하여 ligation을 수행하였으며, 모든 ligation의 procedure는 molecular cloning (Maniatis)[21]을 참조하였다. Cloning step을 거쳐서 형성된 NdeI digested (cohesive ended)insert를 사용하여 expression vector와의 ligation을 유도하였다. Ligation mixture는 pET-16b vector DNA 50ng 과 insert DNA 200ng를 섞고 2㎕의 5X buffer (Gibco BRL),1㎕의 ligase (Gibco BRL)를 포함하도록 만들었으며, 이를 16℃에서 12시간 incubation 하였다. 이러한 과정을 거친 ligation mixture를 *E.coli*에 transformation 하였다.

4)Transformation

pT7blue (R)에 대한 transformation은 Nova-Blue competent cell (Novagen)을 사용하였으며,

pET-16b에 대한 transformation은 host *E.coli*인 BL21 (DE3)pLysS를 37℃에서 O.D 0.4~0.6될때까지 incubation 시킨 후 바로 얼음에 방치하여 성장을 정지시켰다. 그 후 4℃에서 4,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 세포를 harvest한 후, 상층액을 버리고 침전된 세포에 원래 부피의 1/10의 0.1M $CaCl_2$을 가하고 잘섞은 뒤 다시 얼음속에 10분간 넣어두어 온도가 0℃가 되게 하였다. 다시 원심분리하여 세포를 원래 배양액에 대해 1/100부피의 0.1M $Cacl_2$로 resuspend하고, 이렇게 얻어진 competent cell 200㎕에 ligation mixture 10㎕를 첨가하여 얼음에 30분 넣어두어 DNA의 adhesion을 유도하였다. 그 후 42℃에서 2분 동안 heat shock 을 가한뒤 다시 800㎕의 SOC medium을 첨가하여 37℃에서 1시간동안 배양하고 다시 ampicillin이 첨가된 SOB agar plate에 spreading하여 12시간 후에 colony를 확인하였다 [15,21].

5)Recombinant clone의 screening

우선 microtip으로 각기의 clone을 picking하여 50㎕의 DW에 resuspend하고 이 용액을 PCR master mix (1㎕의 dNTP, 2.5㎕의 10X Taq polymerase buffer, 3㎕의 25mM $MgCl_2$, 0.13㎕의Taq polymerase, 1㎕의 10mol primers in DEPC-water)에 5㎕ 첨가하여 PCR을 수행하고 agarose gel 전기영동으로 products를 확인함으로써 trans-formant를 선별할 수 있었다. 이러한 PCR screening method를 사용하여 transformant로 밝혀진 clone은 다시 하나의 vector primer와 insert의 PCR에 사용된 하나의 primer를 이용하여 PCR함으로써 orientation을 확인하였다. 이러한 screen-ing방법을 통하여 trans-formant로 밝혀진 clone은 다시 mini prep method로 insert의 존재를 재확인하였다 [22].

7. 마지바이러스 NP의 발현과 특성화

1)Recombinant 마지 바이러스 NP (MAA/NP)의 발현

Transformant로 밝혀지고 orientation이 right frame 상태로 cloning된 clone은 5ml의 LB medium에 접종하여 37℃에서 12시간 배양한 후 4℃에서 2시간 방치하였다. 그 뒤 이를 원심분리하여 세포만을 얻고 이를 다시 본배양할 LB medium에 접종하였다. 이 본배양의 O.D가 0.6~1일 때 100mM IPTG (Sigma)를 1mM되게 첨가하여 마지 바이러스 NP의 발현을 유도 (induction)하였다. Induction이 되고 2~3시간 후에 이를 다시 얼음에 10분간 넣어둔 뒤, 8,000rpm에서 10분동안 원심분리하여 세포만을 얻었고 이 세포를 이용하여 이후의 실험을 수행하였다 [23].

2)Soluble 및 insoluble fraction의 분리

위의 과정을 통해 얻어진 세포를 TEN (10mM Tris-HCl; 20mM EDTA; 100mM NaCl, pH 8.0) buffer에 resuspend시키고 여기에 lysozyme (Sigma)을 첨가하고 실온에서 5분간 놓아둔 뒤 Triton X-100 (Sigma)를 1%되게 첨가하여 세포를 완전히 용해시켰다. 이 후 sonication하여 genomic DNA를 깨고 20,000rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액과 침전물을 얻어 각각에 대하여 NP의 존재유무를 확인하였다 [23].

3) Recombinant 마지바이러스 NP (MAA/NP)의 정제 및 특성화

(1) 항원의 제조

위의 과정을 통하여 *E.coli*의 cell lysate를 얻고 이를 20,000rpm에서 20분 간 centrifugation하여 상등액을 취하였으며, 침전물은 7M urea로 추출하

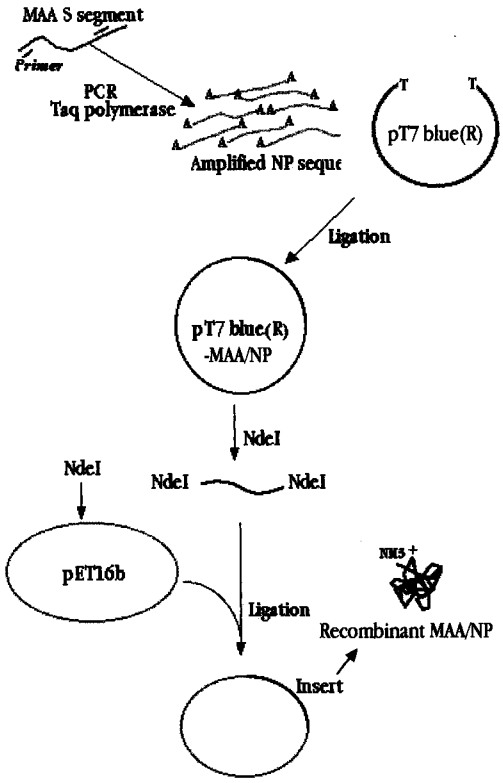

Fig. 1. Strategy of cloning and expression of Maaji (MAA) viral nucleocapsid protein (NP) (MAA/NP) gene.

고 dialysis시켜 refolding을 유도하였다 [24]. 위의 refold-ing과정 후 생성된 침전물을 원심분리로 제거하여 상등액을 취하고 이 상등액에 saturated ammo-nium sulfate를 2배 가하고 침전물을 얻었다. 이 침전물을 5mM EDTA (pH 8.0)가 첨가된 PBS (pH 8.0)으로 resuspend하여 다시 원심분리하고 상층액을 취하여 affinity column에 starting sample로 사용하였다.

(2)Affinity chromatography

한탄 바이러스 (76-118 strain)의 NP에 대한 monoclonal antibody를 protein A를 이용하여 순수분리한 후 이를 CNBr activated sepharose CL4B (Pharmacia)에 binding시켜 affinity column을 제조하였다. 이 bead를 column에 packing 시키고 TSA buffer (2mM Tris, pH8.0; 0.14M NaCl; 0.025% NaN_3)로 equillibrating시킨 후 위에서 준비한 항원을 통과시키고 10 column volume의 wash buffer (10mM Tris, pH 8.0; 0.14M NaCl; 0.025% NaN_3; 0.5% Triton X-100; 0.5% sodium deoxycholate)로 unbound protein을 씻어내렸다. 그 후 5 column volume의 sodium phosphate buffer (50mM sodium phosphate, pH 6.3; 0.1% Triton X-100; 0.5M NaCl)로 다시 washing한 뒤 5 column volume의 glycine buffer (50mM glycine, pH2.5; 0.1% Triton X-100; 0.15M NaCl)로 bead에 binding된 항원을 elution시켰다 [25].

(3)Immunoblotting

위 의 과정을 통해 얻어진 inclusion body와 soluble fraction를 2x SDS sample buffer (100mM Tris, pH6.8; 200mM DTT; 4% SDS; 0.2% BPB; 20% glycerol)에 모두 녹이고 10% SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동한 뒤 이를 nitrocellu-lose membrane으로 transfer 시켜서 immuno-blotting을 수행하였다 (Novex, gel electrophoresis kit and blotter). 이로써 NP 발현 유무와 NP의 존재위치를 파악하였다. 또 affinity column으로 정제 분리된 NP를 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 transfer 시켜 strip 형태로 잘라 여러 환자혈청과 정상인의 혈청으로 반응시킴으로서 발현된 단백질이 NP임을 증명하고자 하였다. 또한 mouse brain 유래 NP로 동일실험을 수행하여 immuno-diagnostic antigen으로서 두 단백질을 비교하였다. 이러한 immunoassay시 사용한 conjugate sys-tem은 biotin labelled anti-human Ig (Kpl, USA)와 streptavidine labelled anti biotin (KPL)이며, BCIP/NTP (Kpl, USA)을 기질로 사용하여 발색시켰다 [26].

(4)ELISA

위 에서 분리된 NP를 mouse brain유래 NP 와 double sandwitch ELISA로 동시에 titration하고 일정 titer의 NP solution을 각각 ELISA plate에 coating하였다. 이를 PBS (0.1% Tween20 함유)로 3번 washing한 뒤 다시 peroxidase labelled goat antihuman IgG 를 1:10,000으로 희석하여 가하고 37℃ 에서 30분동안 반응시켰으며, 그 후 이를 다시 wash buffer로 3번 wash하고 여기에 ABTS peroxidase substrate를 100㎕씩 첨가하여 발색시켜 그 결과를 관찰하였다 [27].

결 과

1. Taq polymerase에 의한 PCR

Taq polymerase에 의해 증폭된 DNA를 ethi-dium bromide (Sigma)가 포함된 1% agarose (FMC)전기영동으로 Maaji virus cDNA의 band를 확인하였다. 이 Taq Polymerase (Promega)에 의한 증폭은 47℃부터 50℃까지 annealing온도를 달리해 가며 $MgCl_2$ 농도 2, 3, 4, 5mM에서 DNA의 증폭 여부를 관찰하였다. 그 결과 Taq polymerase에 의한 DNA의 증폭은 48℃ 에서 가장 좋았으며, 3mM $MgCl_2$ 농도에서의 증폭이 더 specific하였고 크기로 비추어 마지바이러스 NP의 ORF임을 확인할 수 있었다 (Fig.2).

2. Cloning

1)pT7blue (R)cloning vector 내

앞서 기술한 바와같이 순수분리된 PCR pro-duct는 바로 pT7blue (R) cloning vector와의 ligation에 사용하였으며, 순수분리된 insert DNA를 pT 7blue (R) cloning vector와 ligation 시키고 trans-formation하여 마지바이러스 NP의 ORF가 삽입된 pT7blue (R)즉, pT7blue (R)-MAA/NP를 얻었다. 그 후 PCR screening으로 transformant를 골라내고 이 transformants는 다시 miniprep method로 재확인하였다. pT7blue (R)로의 cloning에서 전체 clone의 약 40% 정도가 insert가 포함된 clone이었다 (Fig.3).

2) pET-16b expression vector내

pT7blue (R)-MAA/NP vector에 있는 insert를 NdeI restriction enzyme으로 잘라내고 이를 전기영동 gel로부터 분리하여 pET-16b와의 ligation에

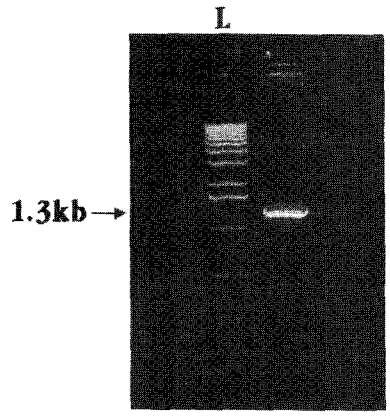

Fig. 2. The PCR amplification by Taq polymerase. This picture represents specificity of PCR and PCR product at optimal condition (lane 1). According to the size, the product represents ORF of Maaji viral NP. No PCR product found from normal cell prep (lane 2).

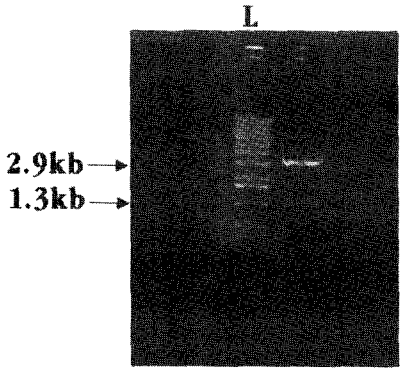

Fig. 3. The cloning of Maaji viral nucleocapsid protein (NP) gene into pT7blue (R). The DNA band represents the presence of insert in recombinant pT 7blue (R) vector digested by NdeI.

사용하였다. 이렇게 얻어진 colony를 PCR screening으로 transformant를 골라내고 그 transfor-mant를 다시 miniprep method로 재확인하였다. Cloning을 거치지않고 PCR product를 직접 NdeI으로 digestion시켜 실험했을 경우에는 얻을 수 없었던 transformants를 용이하게 얻어낼 수 있었다 (Fig, 4).

3. Transformants의 screening [22]

이 방법으로 200개의 colony를 screening한 결과 false-positive나 false-negative는 발견할 수없었으며, 100%의 정확성을 지녔다. 그리고 PCR에 의한 orientation의 규명 역시 매우 정확하였으며

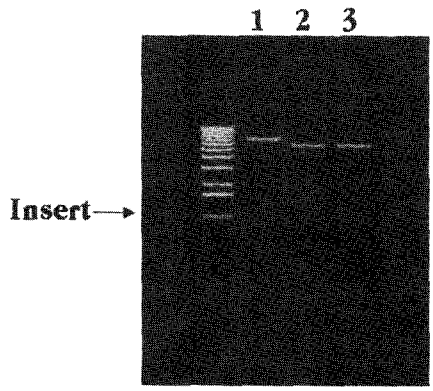

Fig. 4. The cloning of Maaji viral nucleocapsid protein(NP) gene into pET-16b vector. The recombinant pET-16b vector were digested with EcoRI(1), NdeI(2) and BamHI(3). The digested DNA bands represent the presence of inserts in pET 7-16b.

증류수에 resuspend된 미생물을 LB medium에 접종하여 배양한 뒤에 균주의 glycerol stock을 만들었으며, 또 이렇게 배양된 균주를 이용하여 miniprep method로 PCR screening의 결과를 재확인 하였다 (Fig. 5).

4. Recombinant MAA/NP의 발현 및 특성화

Transformant를 5ml의 LB medium에서 5시간 배양시켜 O.D가 0.6~1일때 100mM IPTG (Sigma)를 1mM되게 첨가하여 마지바이러스 NP의 발현을 유도하였다. Induction시킨 2~3시간 후에 10분동안 원심분이하여 세포만을 얻었고, 이 세포전체를 2X SDS sample buffer (100mM Tris, pH 6.8; 200mM DTT; 4% SDS; 0.2% BPB; 20% glycerol)에 resuspend한 후 sonication 하여 genomic DNA를 분쇄하였다. 그 후 이를 10% SDS-PAGE gel에 loading하여 전기영동한 뒤 nitrocellulose membrane으로 transfer시켜 Western blotting을 수행하였다 (Novex, gel electrophoresis kit and blotter). 이와같이 transfer된 nitrocellulose membrane을 strip 형태로 잘라 7명의 환자혈청과 7명의 정상인의 혈청을 반응시킨 결과는 환자혈청의 strip에서 모두 약 52KD의 band가 관찰되었으나, 정상인의 혈청과 반응한 strip에는 band가 나타나지 않음으로 보아 발현된 단백질이 NP임을 알 수 있었다 (Fig. 6).

또 IPTG로 induce시키지 않은 것과 induce시킨 것을 환자의 혈청과 반응시켜서 induce시키지 않

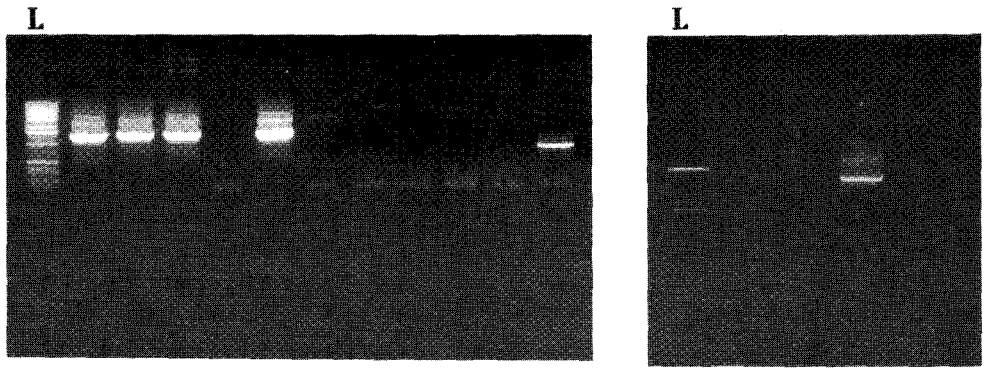

Fig. 5. PCR screening and orientation of the transformants. 5 clones contain the Maaji virus insert and a clone is something different one (A). One of the clones has the insert in right orientation (B).

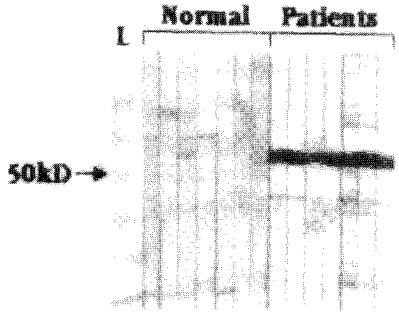

Fig. 6. Characterization of recombinant Maaji viral NP with patients and normal human sera by immunoblotting. The 52KD NP bands were visible from all of the right 7 strips reacted with HFRS patient sera. The left 7 strips reacted with nolmal human sera showed no specific bands.

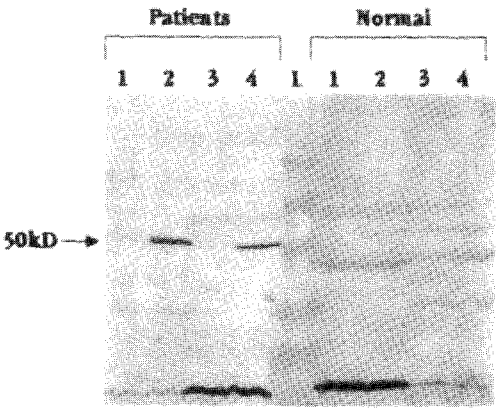

Fig. 7. The presence of recombinant MAA/NP at induced and non-induced condition. Left panel is the result of reaction with patient serum and right panel is the result of reaction with normal human serum. 1: Non- induced insouluble fraction; 2: induced insoluble fraction; 3: Non-induced soluble fraction; 4: induced soluble fraction.

은 것에서는 band가 나타나지 않고 induce된 것은 band가 형성되었음으로 보아 이 NP는 IPTG에 의해 발현이 유도된다는 것을 알수 있었으며 또한 발현되지 않은 미생물의 단백질과 환자혈청이 반응하지 않음을 보아 발현된 단백질이 NP임을 알 수 있었다 (Fig.7).

5. Recombinant MAA/NP의 solubility

앞서 기술한 바와 같이 induction된 세포를 파괴하여 soluble과 insoluble part를 분리할 수 있었다. 그 fraction을 각각 따로 전기영동하고 western blotting하여 환자혈청과 반응시킴으로써 발현되는 NP는 insoluble part인 inclusion body와 soluble part에 모두 존재함을 알 수 있었으며, 많은양의 NP가 inclusion body 에 존재하고 있음을 알 수 있었고 또한 purity역시 inclusion body를 분리할 경우가 보다 양호함을 알 수 있었다 (Fig.8).

6. Recombinant MAA/NP의 purification

Inclusion body를 분리한 후 refolding시키고 affinity column에 loading하여 분리를 시도하였다. Monoclonal antibody를 ascitic fluid나 serum이 함유된 hybridoma cell 배양액을 이용하여 제조한 affinity column으로는 완벽한 분리가 이루어지지 않았다. 그러나 serum free hybridoma 세포 배양액으로부터 분리한 monoclonal antibody를 사용하여 affinity column을 제조하면 매우 완벽한 분리가 이루어졌다 (Fig.9). 이렇게하여 분리된 단백질 항원은 99%이상의 purity를 보였으며, HFRS 환

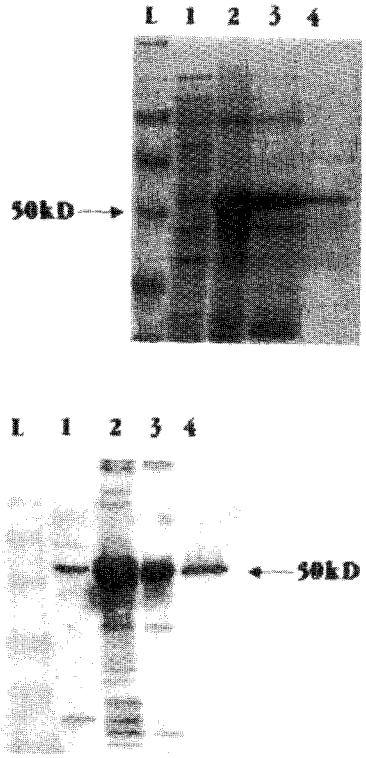

Fig. 8. The existance of expressed recombinant MAA/NP in soluble or insoluble fraction were visualized by immunoblotting (lower panel) and Coomassie blue staining (upper panel). 1: Soluble fraction; 2: Insoluble fraction; 3: Insoluble fraction washed with Triton X-100; 4: NP purified by affinity column using monoclonal antibody against NP.

자의 혈청과 특이적으로 반응하였다.

7. Immunodiagnostic atigen으로서 recombinant NP 및 mouse brain 유래 NP의 비교

1)Immunoblotting

Mouse brain 유래 NP와 recombinant MAA/NP를 각각 10% SDS-PAGE로 전기영동한 후 이를 nitrocellulose filter에 transfer시킨 다음 이를 strip으로 잘라내어 각각 7명의 환자와 건강인 혈청으로 반응시켰다. 이러한 과정을 통해 종래의 mouse 유래 NP의 경우, 분리된 recombinant NP strip에서는 볼 수 없는 background와 extra band를 관찰할 수 있었으며 이로써 mouse 유래 NP는 그 순도에 있어서 정상인 혈청과 반응하는 extra

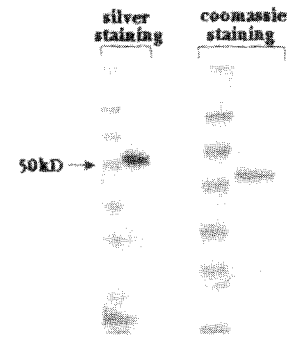

Fig. 9. Purification of recombinant MAA/NP by affinity chromatography. The only band was observed after chromatography followed by straining with silver nitrate(left panel) and Coomassie blue (right panel).

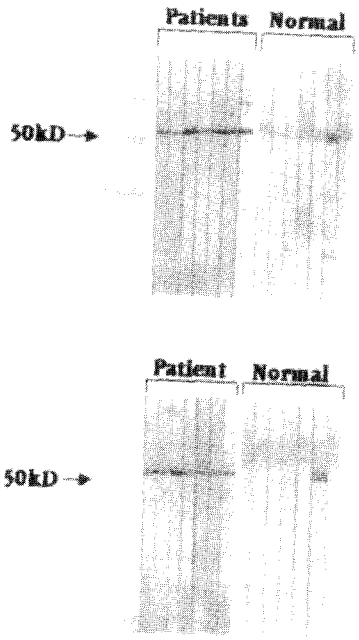

Fig. 10. Characterization of recombinant MAA/NP and NP from mouse brain infected with Maaji virus by immunoblotting. The recombinant(lower panel) and conventional mouse brain (upper panel) NP strips were reacted with the sera from HFRS patients and normal humans. The typical bands were observed only on the strips reacted with the patient's sera. (Among the normal sera, the serum shows the visible band has been proved as a positive serum by other serologic test such as IFA.)

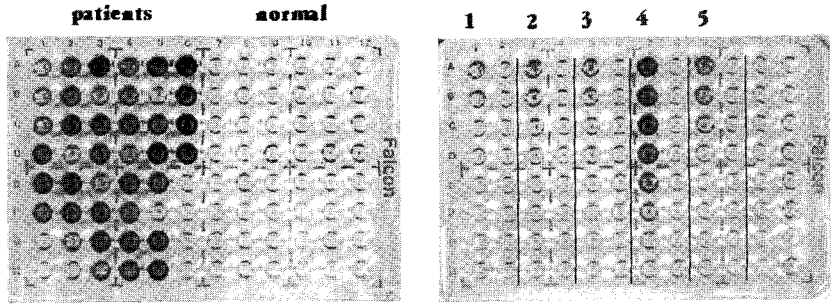

Fig. 11. The serologic test of HFRS patients by ELISA using recombinant MAA/NP. Many of the patient's sera showed strong reaction whereas there were no positive reactions with 44 nomal sera (panel A). Panel B represents the results of 6 patient's sera.

Table 2. Comparison of specificity between ELISA systems utilizing recombinant MAA/NP and mouse brain NP as an immunodiagnostic reagent

NP sources	IFA positive 44sera			IFA negative 44 sera		
	ELISA result		Specificity	ELISA result		Specificity
	Positive	Negative		Positive	Negative	
Recombinant	44	0	100%	0	44	100%
Mouse brain	44	0	100%	8	36	81.8%

Table 3. Comparison of specificity between ELISA system utilizing recombinant MAA/NP and mouse brain NP as an immunodiagnostic reagent

Serum No.	Titers	
	Recombinant NP	Mouse brain NP
1	2,000	2,000
2	12,000	12,000
3	8,000	8,000
4	6,000	6,000
5	6,000	12,000

protein을 포함하므로써 그 순도가 떨어짐을 알 수 있었다. 그 반면 순수 분리된 recombinant NP의 strip에서는 정상인 혈청이나 환자혈청의 모두에서 extra band를 관찰할 수 없었다 (Fig.10).

2)ELISA

Mouse 유래 NP와 recombinant MAA/NP를 ELISA plate에 overnight하여 각각 coating하고 여기에 44명의 환자혈청과 44명의 정상인 혈청을 가지고 그 특이성을 조사하였으며, 또한 환자혈청을 2 fold dilution 하여 역가 분석을 통해 감도를 측정하였다.그 결과는 mouse brain 유래 NP는 강한 background를 나타내었으며, 그 특이성에서도 IFA의 결과와 비교할 때 81.8%의 특이성을 나타내었다. 그러나 recombinant MAA/NP는 background 발색을 거의 관찰할 수 없었으며 IFA의 결과와 비교할 때 100%의 특이성을 보여 IFA와는 동일한 특이성을 나타내었다 (Table 2, Fig.11). 감도 측정을 위한 역가 분석의 결과는 recombinant MAA/NP나 mouse brain 유래 NP모두 비슷한 결과를 보임으로서 두 다른 항원을 사용하는 ELISA 시험계의 감도는 모두 유사하였다 (Table 3, Fig.11).

8. Recombinant MAA/NP사용 immunoblotting 및 ELISA의 감도 및 특이성 비교

Recombinant MAA/NP를 사용하여 immunoblotting strip을 제조하고, 동시에 ELISA plate에 coating 하였다. 그 후 immunoblotting과 ELISA의 방법으로 40개의 환자혈청과 40개의 정상인 혈청을 가하여 각 방법이 지니는 감도와 특이성을 측정하였다. 이 실험을 통하여 특이성은 immunoblotting과 ELISA가 모두 동일한 결과를 나타내었으 (Table4)감도의 측면에서는 immuno-blotting 시험에서 약간 더 높았다 (Table 5).

Table 4. Comparison of specificity between ELISA system utilizing recombinant MAA/NP and mouse brain NP as an immunodiagnostic reagent

Serologic methods	IFA positive 40 sera			IFA negative 40 sera		
	result		specificity	result		Specificity
	Positive	Negative		Positive	Negative	
Immuno -blotting	40	0	100%	0	40	100%
ELISA	40	0	100%	0	40	100%

Table 5. Comparison of specificity between immunoblotting and ELISA system using recombinant MAA/NP

Patient's sera	Titers		Semsitivity
	ELISA	Immunoblotting	Immunoblotting/ELISA
1	2,000	6,000	3
2	12,000	48,000	4
3	8,000	24,000	3
4	6,000	12,000	2
5	6,000	12,000	2

고 찰

현재 신증후 출혈열의 혈청학적 진단법으로 가장 널리 이용되고 있는 방법은 면역형광항체법 (immunofluorescence antibody test, IFA)으로서 이 방법은 한탄 바이러스가 발견된 이후 본 질환의 혈청학적 진단법으로 가장 먼저 확립된 방법이며 이로써 임상 증상에 의해서가 아닌 혈청학적 진단을 통한 신증후 출혈열의 정확한 진단이 가능한 시대가 비로소 도래하였다 [28].

그러나 본 법은 높은 특이성이나 감도에도 불구하고 바이러스와 세포배양 기술 및 시설과 형광현미경과 같은 특수 장비를 필요로하며, 나아가 결과의 판독에 있어서 주관적 판독에 기인하는 오독의 가능성으로 해서 관찰자의 많은 경험이 요구되므로 일반 실험실에서는 용이하게 실시할 수 없다는 단점이 있다. 따라서 일반 실험실 및 검사실에서도 용이하게 신증후 출혈열의 혈청학적 진단을 실시할 수 있는 몇가지 추가적 방법들이 이용되고 있는바, ELISA 법, hemagglutination 법 [29]과 HDPA법 그리고 immunoblotting 이 그것이다. 이 모든 방법들에서 공히 이용되는 바이러스 항원의 source 는 한타바이러스 감염 조직배양 세포 및 mouse brain조직으로 부터 만들어진 전 바이러스 항원으로서 조직성분의 혼입 등 항원 자체의 순도 면에서 문제점을 지니고 있다. 따라서 반응 결과 종종 비특이적 반응의 문제를 야기시킨다. 그러므로 이를 해결하기 위한 당면 문제는 어떤 시험계이든지 이용 표적 항원을 단일화하고 그것의 순도를 높이는 일이 가장 중요한 문제로 대두되고 있다. 따라서 이같은 문제를 해결하기 위해서는 유전공학적 기법을 이용하여 어떤 특정 유전자를 클로닝하고 이를 적절한 발현계에서 발현시켜 특정 표적 단백질만을 순수하게 대량으로 생산할 수 있다면 소기의 목표를 달성할 수 있다. 이와같은 목적으로 본 연구에서는 표적 단백질로서 마지바이러스의 nucleocapsid protein (NP)를 선정하여 NP 유전자를 클로닝하고 in vitro 에서 발현시켜 정제과정을 통해 이 recombinant NP의 진단용 항원으로서의 적합성 및 나아가 기존 항원에 대체될 수 있는 우월성 여부를 확인코자 하였다.

마지바이러스의 3개의 분절 RNA가닥 중에서 가장 짧은 S 분절에 존재하는 NP유전자는 전술한 바와 같이 마지바이러스의 NP를 coding하며, 이 NP는 바이러스에 감염된 환자나 동물에서 감염 초기부터 매우 predominant하게 IFA antibody를 형성케하는 epitopes로서 작용한다. 따라서 이 유전자의 분리와 클로닝은 본 연구에서 중요한

의의를 갖는다.

본 실험에서 PCR을 이용한 유전자의 클로닝은 insert의 양을 다량 얻을 수 있어 간편한 방법으로 여겨지나 그 최적 조건의 검색과 blunted end 형성 단계의 필요성 때문에 PCR을 이용한 클로닝의 편이성이 반감된다. 따라서 이를 수정하기위해 primer에 NdeI restriction enzyme 인식염기서열을 첨가함으로써 PCR products의 분리후, 바로 이 products를 NdeI restriction enzyme으로 잘라내어 cohesive end를 형성시키고 이를 expression vector에 연결시키고자 하였으나, NdeI restriction enzyme의 특성상 37℃에서 매우 불안정하고 DNA의 digestion을 완벽하게 유도하지 못하여 불가피하게 추가적인 cloning step을 거친 후에 NdeI restriction enzyme으로 insert를 잘라내어야 했다. 이렇게 자른 insert는 양쪽에 NdeI cohesive end를 지니게 되므로 cloning에 바로 사용할 수 있었다. 이 때 사용한 cloning vector는 T-overhang vector이며, cohesive end로 expression vector에 효과적으로 ligation할 수 있었다. 본 실험을 통해 경험적으로 바이러스의 RNA로부터 cDNA의 합성과 PCR에 의한 특정 유전자의 증폭은 바이러스가 감염된 조직배양 세포의 배양액보다는 감염세포 자체를 이용하는 것이 더욱 효과적이라는 결론을 얻을 수 있었는데, 그 이유는 cDNA형성의 단계와 PCR 증폭의 단계가 어느 정도 initial template의 양에 좌우된 결과인 것으로 생각된다.

또한 기존의 miniprep method에 의한 screening은 시간이 많이 소요되고 여러 단계를 거쳐야하는 번거로움 때문에 많은 clone을 한꺼번에 screening하지 못하는 한계를 지니고 있다. 이러한 miniprep의 단점을 극복하고자 PCR을 이용한 colony screening을 수행하였다. 이 PCR screening 방법은 한번에 많은 clone (최대 96개)을 단 몇시간 내에 screening할 수 있고 간편하다는 특징이 있다. 또 orientation을 알아볼 수 있는 PCR을 수행하여 하루에 약 100개의 clone에 대하여 insert의 존재여부와 그의 orientation 역시 알 수 있다는 장점을 지닌다 [22]. 결론적으로 매우 낮은 확률의 transformant를 기존의 miniprep method로는 선별해내지 못함으로서 상당히 여러번 ligation과 transformant을 반복해야 했으며, 많은 양의 miniprep을 하여야 했는데 이러한 PCR screening 방법으로 짧은 시간에 많은 양의 clone을 screening함으로써 낮은 확률의 transformant를 선별해 낼 수 있기에 해소될 수 있었다. 본 실험의 결과, 클로닝된 균주는 마지바이러스의 NP 유전자를 pET-16b vector에 지니며 이 유전자의 발현도 가능하였고 affinity chromatography 를 통하여 순수한 NP의 분리도 가능하였다.

Affinity chromatography의 경우 antibody의 source가 최종 분리순도에 많은 영향을 미치는 것으로 파악이 되었으며 serum free hybridoma medium을 사용하면 99% 이상의 매우 순수한 NP를 얻을수 있었다.

또한 ELISA 와 면역블럿법을 이용하여 지금까지 사용해오던 마우스 유래 NP와 비교한 결과 recombinant NP가 보다 좋은 면역진단 항원으로서 사용이 가능하였으며, 높은 수율로 발현되기 때문에 번거로운 동물실험이나 마우스 뇌의 채취 등의 단계가 불필요하게 되었다. 마우스 뇌 유래 NP를 사용하여 ELISA 진단의 항원으로 사용할 때는 비특이 반응을 배재하기 위해 dsouble sandwitch 법을 사용하는데, 이는 여러 단계를 거쳐야하므로 시간도 많이 소요되고 번거로웠으나 recombinant NP를 사용할 경우 이를 직접 coating하는 직접법을 쓰면 이와같은 불편한 점을 극복할 수 있고 비특이반응도 나타나지 않았다. 또한 immunoblotting과 ELISA를 통하여 recombinant NP와 마우스 및 조직배양 세포 유래 NP와의 진단용 항원으로서 특이성과 감도를 비교한 결과, recombinant NP가 보다 우수한 것으로 나타나 향후 이러한 마지 바이러스의 recombinant NP를 이용하여 신증후 출혈열의 새로운 진단용 항원으로의 사용이 가능할 것으로 기대된다. 나아가 마지바이러스의 recombinant NP를 클로닝하고 발현시키는 기법이 확립됨으로서 새로운 한타바이러스에서의 NP의 특성과 기능을 연구함으로써 한타바이러스의 유전자 구조와 기능을 좀 더 깊게 이해할 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. World Health Organization: Hemorrhgic fever with renal syndrome. Memorendum from a WHO meeting. Bull. WHO. 61:269-275, 1983.
2. White JD, Shirey FG, French GR, Huggins JW, Brand OM, Lee HW: Hantaan virus, aetiologic agent of Korean haemorrhagic fever, has Bunya-

viridae-like morphology, Lancet i:768-771, 1982.
3. Lee HW and PW Lee: Korean hemorrhagic fever. Demonstration of causative antigen and antibodies. Kor J Intern Med 19:371-383, 1976.
4. Lee HW, PW Lee and Johnson KM: Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. J Infect Dis 137:298-308, 1978.
5. Lee PW, Amyx HL, Gajdusek DC, Yanagihara R, Goldgaber D, Gibbs CJ Jr:New hemorrhagic fever with renal syndrome-related virus in indigenous wild rodents in United States. Lancet ii: 1405, 1982.
6. Lee HW, Lee PW, Baek LJ, Chu YK: Geographical distribution of hemorrhagic fever with renal syndrome and Hantaviruses. Arch Virol (Suppl 1): 5-18, 1990.
7. Lee PW, DH Jeong and YC Kim: Maaji virus: I. Identification and antigenic characterization of a new hantavirus isolated from Apodemus mice *(Apodemus agrarius coreae)* in Korea. J Korea Soc Virol 22: 192-196, 1992.
8. Lee PW, DH Jeong, YC Kim and CY Kang: Maaji virus: II. Molecular characterization of a new hantavirus isolated from Apodemus mice *(Apodemus agrarius coreae)*in Korea. J Korean Soc Virol 22: 197-205, 1992.
9. Lee PW and DH Jeong: Nucleotide sequence analysis of Maaji viral cDNA amplified by Hantaan virus specific primers. J Korean Soc Virol 23: 57~67, 1993.
10. McComick JB, Sasso DR, Palmer EL, Kiley MP: Morpological identification of the agent of Korea hemorrhgic fever (Hantaan virus)as a member of the Bunyaviridae. Lancet.1:765-786, 1982.
11. Elliott LH, Kiley MP, McCormick JB: Hantaan virus: Identification of virion proteins. J Gen Virol 65:1285-1293, 1984.
12. Schmaljohn CS, Dalrymple JM: Analysis of Hantaan virus RNA: Evidence for a new genus of Bunyaviridae. Virology 131:482-491, 1983.
13. Schmaljohn CS, Hasty SE, Dalrymple JM, LeDuc JW, Lee HW, von Bonsdorff CH, Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Tsai TF, Regnery HL, Goldgaber D, Lee PW: Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever woth renal syndrome. Science 227:1041-1044, 1985.
14. Lee PW and Lee HW: Use of western blotting for detection of anti-hantavirus antibodies and differential diagnosis of HFRS, J.Kor.Soc.Virol., 19:2, 91-99, 1989.
15. F.William Studier, Alan H Rosenberg, John J Dunn and John W Dubendorff: Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned gene. Method In Enzymology, 185:60-89, 1990.
16. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal.Biochem. 162:156-159, 1987.
17. Xiao SY, Yanagihara R, Godec MS, Eldadah ZA,Johnson BK, Gajdusek DC, Asher DM: Detection of hantavirus RNA in tissues of experimentally infected mice using reverse transcriptase-directed polymerase chain reaction. J Med Virol 33:277-282, 1991.
18. Schmaljohn CS, Jennings G, Hay J, Dalrymple JM: Codung strategy of the Sgenome segment of Hantaan virus. Virology 155:633-643, 1986.
19. Eckert KA and Kunkel TA: PCR Method and Application 1, 17-24, 1991.
20. Lee PW: Molecular characterization of Maaji virus and serotypic differntiation of hantavirus using polymerase chain reaction (PCR). J Kor Soc Virol 20:2,213, 1990.
21. Sam Brook, Fritsch, Maniatis: Molecular cloning a laborayory manual 2nd ed.
22. Kim YC, Lee PW: The colony screening. J Korean Soc Microbiol 30 (5): 591~592, 1995.
23. Fiona A, Marston O: The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli.* Biochem J 240:1-12, 1986.
24. Olson et al: United States Patent. Patent number 4:511,503, 1985.
25. Harris ELV and Angel S (eds): Protein purification methods: A practical approach. IRL Press, Oxford, 1989.
26. Jung HS, Kim TG, Lee YK, Kim YC, Paik WH, Lee PW: Diagnosis of Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS)by immunoblot using

biotin/streptavidin amplification system. J Korean Soc Microbiol 30 (2):225~231, 1995.
27. Richman DD, Cleveland PH, Redfield DC, Oxman MB and Wahl GH: Rapid viral diagnosis. J Infect Dis 149 (3):298, 1984.
28. Lee HW: Hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea. Review Infect Dis 11 (Suppl 4):S846-S876, 1989.
29. Tsai TF, Tang YW, Ye KL, Chen GL, Xu ZY: Hemagglutination inhibition antibody in hemorrahgic fever with renal syndrome, J Infect Dis 150:895-898, 1984.