

대장균에서 발현된 한탄바이러스 뉴클레오캡시드 단백질의 분리 정제

†노갑수·김종원·하석훈·정근택·문상범·¹최차용
제일제당 종합연구소, ¹서울대학교 공업화학과
(접수 1998. 7. 29., 게재승인 : 1998. 11. 2.)

Isolation and Purification of Hantaan Viral Nucleocapsid Protein Expressed in *Escherichia coli*

Kap Soo Noh†, Jong Wan Kim, Suk Hoon Ha, Keun Taik Chung, Sang Bum Moon, and Cha Yong Choi¹
R&D Center of Cheiljedang, Corp., 522-1, Dokpyong-Rt. Majang-Myon, Ichon-Si, Kyonggi-Do, 467-810, Korea
¹Dept. of Chemical Technology, College of Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea.
(Received : 1998. 7. 29., Accepted : 1998. 11. 2.)

Hantaan virus belonging to the genus *Hantavirus* and family *Bunyaviridae* causes an acute severe illness of human. Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS). It is a rodent host-borne pathogen and distributed in Asia and Eastern Europe. Hantaviruses have three major antigens, i.e., G1, G2 glycoproteins and nucleocapsid protein (N). Among them, nucleocapsid protein was reported to be the most invaluable antigen as for diagnosis. We have cloned and expressed Hantaan viral nucleocapsid gene in *E. coli* BL21(DE3). In this study, we have tried to purify the nucleocapsid protein produced by recombinant *E. coli* and could attained a purity of >90% by anti-N monoclonal antibody-coupled immunoaffinity chromatography or phenyl sepharose hydrophobic interaction chromatography.

Key Words : Hantaan virus, Nucleocapsid protein, Expression, Purification

서론

유행성출혈열 또는 신증후출혈열(Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome ; HFRS)의 원인 병원체로 알려진 한탄바이러스 속(*Hantavirus* genus)의 바이러스들은 유라시아(Eurasia) 전역에 걸쳐 보고되고 있는데 지역에 따라서 그 병의 명칭도 각각 달리 명명되었다. 한국에서는 한국출혈열 (Korean Haemorrhagic Fever ; KHF), 구소련 지역에서는 출혈성신우염 (Haemorrhagic nephrosonephritis ; HN) 또는 신증후출혈열 (Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome ; HFRS)이란 이름으로 1913년이래 매년 수천건 씩 보고되고 있으며, 스칸디나비아 반도 지역에서는 유행성신염(Nephropathia Epidemica , NE)이란 이름으로 1934년이래 매년 수백 건씩, 중국에서는 1913년 발견된 이레 송고열(Songo Fever) 또는 유행성출혈열 (Epidemic haemorrhagic fever ; EHF)로 불리고 있으며 1981년에는 32,000건 이상의 보고가 있었다. 동유럽에서는 1934년이래 유행성신염(Epidemic nephritis) 또는 유행성출혈열 (Epid-

emic haemorrhagic fever)란 이름으로, 한국에서는 1951년 이후 한국출혈열 (Korean haemorrhagic fever ; KHF)로, 일본에서는 1960년 이후 유행성출혈열(Epidemic haemorrhagic fever)로 불려졌다. 한국전 중 3,000명 이상의 UN군이 비무장 지대에서 지금까지 잘 알려지지 않은 증상을 보임으로써 세계 의사들의 관심을 불러일으켰다. 이 병은 쇼크와 신부전 (renal failure)을 동반하고 치사율이 10~15%에 이르는 신증후출혈열로 밝혀졌다. 이 원인 균은 1976년 한국 동두천에서 채집한 등줄쥐(*Apodemus agrarius corea*)로부터 최초 분리되었으며(1) 한탄강의 이름을 따서 한탄바이러스 (Hantaan virus)로 명명되었다. 1987년에는 환자로부터 최초 분리되었다. 이후 혈청학적인 연구를 통해 이 병이 구소련 지역의 HFRS, 스칸디나비아 지역의 NE, 그리고 중국, 일본 지역의 EHF와 연관됨이 밝혀졌다. 1982년 2월 일본 동경에서 열린 세계보건기구 (WHO)의 HFRS 관련 모임에서 이러한 질병들의 명칭을 "신증후출혈열(Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome , HFRS)"로 통일하여 부르기로 하였다.

한탄바이러스는 한탄바이러스 과에 속하며 현재까지 보고된 12종 이상의 혈청형(2,3) 중의 1종이며 negative-sense RNA 바이러스이다. 주요 항원으로는 외피 당단백질인 G1, G2와 RNA genome을 싸고 있는 뉴클레오캡시드 단백질(nucleocapsid protein ; N protein) 을 들 수 있다. 이중 뉴클레오캡시드 단백질은 바이러스 감염시 1-2주 이내에 높은 항체 역가를

† Corresponding Author R&D Center of Cheiljedang, Corp., 522-1, Dokpyong-Rt, Majang-Myon, Ichon-Si, Kyonggi-Do, 467-810, Korea
Tel . 0336-639-4337, Fax : 0336-632-2784
e-mail : ksnoh@cheiljedang.com

보임으로써 높은 항원성을 지닌 단백질로 알려져 있으며 실제 바이러스를 Vero 세포에서 배양 정제해 보면 G1, G2 단백질보다 뉴클레오텍시드 단백질이 월등히 많음을 관찰할 수 있다. 따라서 뉴클레오텍시드 단백질은 진단용 항원으로서의 유용성이 매우 높다고 할 수 있다.

백신 또는 진단의 목적으로 바이러스 항원을 생산하고자하는 많은 연구가 이루어졌는데 대부분 세포배양을 통해 이루어졌으며 일부 유전자 재조합 방법으로 푸말라바이러스나 한탄바이러스의 뉴클레오텍시드 단백질 발현 정제하고자하는 시도가 있었다. Vapalathi 등(4)은 baculovirus 벡터를 이용하여 곤충세포에서 발현된 푸말라바이러스의 뉴클레오텍시드 단백질을 gel filtration과 이온교환수지를 이용하여 정제를 시도한 바 있고 Zoller 등은 한탄바이러스의 뉴클레오텍시드 단백질에 histidine이 tailing된 용합 단백질 형태로 발현한 후 nickel-nitrotri-acetic acid resin을 이용하여 95% 이상의 순도로 정제됨을 보고하였다(5). 그러나 이러한 경우는 모두 inclusion body 형태로 발현된 단백질의 분리 정제에 국한되었다. 본 연구에서는 이미 뉴클레오텍시드 유전자의 발현이 확인된 유전자재조합 대장균으로부터 세포 내에서 soluble 한 형태로 존재하는 한탄바이러스의 뉴클레오텍시드 단백질의 정제를 위해 면역친화 칼럼, 소수반용 칼럼 등을 사용하여 정제를 수행하였다 여기서 사용한 대장균은 플라스미드 pET-3a(6)에 한탄바이러스 뉴클레오텍시드 유전자가 클로닝된 재조합 플라스미드 pET-NP를 함유한 BL21 (DE3)을 사용하였다

재료 및 방법

균주, 시약 및 재료

한탄바이러스의 뉴클레오텍시드 유전자의 발현은 플라스미드 pET-3a(6)의 *EcoR* I과 *BamH* I 부위에 유전자가 클로닝된 재조합 플라스미드 pET-NP (Figure 1)를 함유하는 대장균 BL21 (DE3)(6)을 사용하였다. Immunoblot을 위한 1차 항체로는 자체에서 제작한 hybridoma로부터 생산된 한탄바이러스의 뉴클레오텍시드 단백질에 대한 단일군 항체 ht90-40을 사용하였으며 2차 항체로는 horse radish peroxidase가 conjugation된 anti-mouse IgG를 Accurate Chemicals and Scientific사 (Westbury, New York, USA)로부터 구입하여 사용하였다. SDS-PAGE는 Novex사의 (San Diego, California, USA) Xcell II Mini-Cell

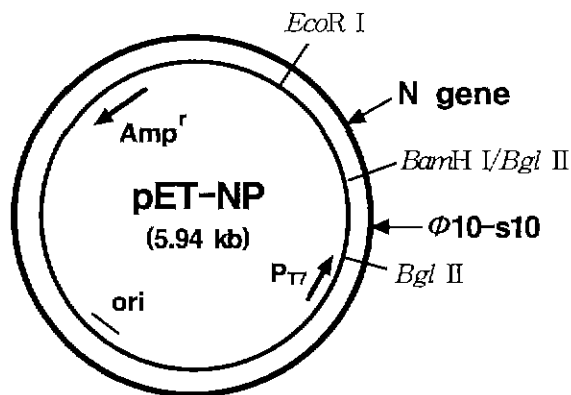


Figure 1. Structure of recombinant plasmid pET-NP for the expression of Hantaan viral nucleocapsid gene.

과 precast gel을 사용하였는데 겔 type은 Laemmli Tris-Glycine type gel로서 acrylamide 조성은 8~16% gradient 또는 12%인 것을 사용하였으며 denaturing, reducing 조건에서 전기영동을 수행하였다. Western blot은 Novex사의 XCell II Mini-Cell과 Blot module을 이용하여 Tris-Glycine transfer 버퍼 (12 mM Tris, 96 mM glycine, 10% methanol, pH 8.3)를 사용하여 수행하였으며 방법은 Sambrook 등의 방법(7)을 따랐다.

균체의 배양 및 파쇄

대장균의 배양을 위해서는 LG-ampicillin broth (NaCl 10 g, tryptone 10 g, yeast extract 5 g, glucose 2 g, ampicillin 50 mg/L, pH 7.0)를 사용하였으며 밤새 배양한 종균액을 새로운 배지 1 L에 5%되게 접종하여 37°C에서 200 rpm으로 진탕 배양하였다 배양액의 흡광도(A₆₀₀)가 0.5~0.8에 도달했을 때 IPTG를 0.5 mM되게 첨가하여 4~8시간 더 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 균체를 회수하고 0.8% NaCl 용액으로 1회 세척하였다.

회수된 균체를 50 mL의 Tris 완충용액(50 mM, pH 8.0)에 현탁하여 초음파기(Fisher Dismembrator Model 300)와 American Instrument Co. (Urbana, Illinois, USA)의 French pressure cell press 또는 Microfluidics Corp. (Newton, Massachusetts, USA)의 Microfluidizer M-110EH를 사용하여 균체를 파쇄하였는데 파쇄의 정도는 Bradford assay(8) 방법을 써서 파쇄액의 단백질 농도가 더 이상 증가하지 않을 때까지 수행하였다

단일군 항체를 이용한 면역친화 컬럼의 제작

한탄바이러스의 뉴클레오텍시드 단백질에 대한 단일군 항체 ht90-40는 자체에서 제작한 hybridoma를 DMEM 매지 또는 쥐의 복강에서 배양한 것을 protein-A-Sepharose CL-4B column을 사용하여 Sambrook 등의 방법(9)에 따라 정제하였다. 항체 농도는 흡광도계를 사용하여 A₂₈₀ 값이 1일 때 0.75 mg/mL로 계산하거나 Bradford assay(8)로 측정하였다.

단일군 항체를 이용하여 대장균에서 발현된 뉴클레오텍시드 단백질을 정제하기 위해 Pharmacia사의 CNBr-activated Sepharose 4B에 단일군 항체를 커플링시켰다. 방법은 매뉴얼에 따라 수행하였다. 먼저 정제된 단일군 항체를 커플링 버퍼 (0.1 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.3)로 투석한 후 Amicon사의 cut-off value 100,000인 centricon 또는 centriprep를 사용하여 원하는 농도(약 10 mg/mL)로 농축하였다

0.286g (1 mL)의 CNBr-activated Sepharose 4B를 1 mM HCl로 swelling시킨 뒤 sintered glass filter가 장착된 컬럼에서 60 mL의 1 mM HCl로 세척하였다. 겔을 1.5 mL의 커플링 버퍼로 세척한 후 커플링 버퍼에 용해된 1.6~2 mL의 항체(2.5~5.0 mg/mL)와 섞은 후 상온에서 2시간 동안 end-over-end 형태로 혼합하였다. 원심분리로 커플링 버퍼를 제거하고 blocking 버퍼 (0.2 M glycine, pH 8.0)를 넣은 후 상온에서 2시간 방치하였다. 이 것을 컬럼에 넣고 커플링 버퍼, 0.1 M acetate(pH 4.0), 0.5 M NaCl, 커플링 버퍼의 순으로 세척하여 4°C에 보관하였다.

Hydrophobic Interaction Chromatography

황산암모늄을 이용한 salting-out의 침전물을 40 mM KH₂PO₄/

Na₂PO₄ (pH 8.0)의 용액에 재현탁하고 이것을 페닐 세파로즈 (phenyl sepharose) CL-4B 수지를 사용하여 정제를 수행하였다. 여기서 샘플의 로딩은 40 mM KH₂PO₄/Na₂PO₄ (pH 8.0)의 용액에 황산암모늄을 0.6 M이 되도록 첨가하여 사용하였고 용출은 40 mM KH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 8.0)의 용액을 사용하였다

결과 및 고찰

단일군 항체의 생산

한타바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질에 대한 단일군 항체를 생산하는 hybridoma 세포를 제작하기 위해 Vero E6 세포에서 배양한 후 분리한 Hantaan virus를 Balb/c에 접종하고 채취한 지라 세포와 mouse 형질 골수종세포와 융합하였다. 방법은 Köhler와 Milstein의 방법(10,11)을 일부 변형하여 사용하였다. 최종적으로 뉴클레오캡시드 단백질에 대한 항체를 생산하는 2종의 hybridoma cell lines를 선별하였는데 각각 ht90-40과 ht90-49로 명명하였다. Vero 세포에서 증식한 한타바이러스와 단일군 항체와의 항원-항체 반응을 western blot를 통하여 확인하였는데 Figure 2에서 보는 바와 같이 2종의 항체 모두가 뉴클레오캡시드 단백질 분자량 50 kDa의 위치에서 반응이 일어남을 관찰할 수 있다.

면역친화 크로마토그래피를 통해 대장균에서 발현된 뉴클레오캡시드 단백질을 정제하고 발현된 뉴클레오캡시드 단백질의 분석 목적으로 뉴클레오캡시드 단백질에 대한 단일군 항체 ht90-40을 다량 확보코자하였다. Hybridoma cell ht90-40을 DMEM 배지에서 spinner flask를 사용하여 배양하거나 또는 Balb/c의 복강에서 배양하여 protein-A Sepharose CL-4B 컬럼을 사용하여 정제하였다. 복강액은 약 5배 정도로 희석하여 0.4 μm pore size의 membrane filter를 사용하여 lipid를 제거한 후 컬럼 작업을 수행하였다. 정제는 Sambrook 등(7)의 방법에 따라 수행하였다. 로딩은 50 mM Tris 버퍼 (pH 8.0)를 0.1 M

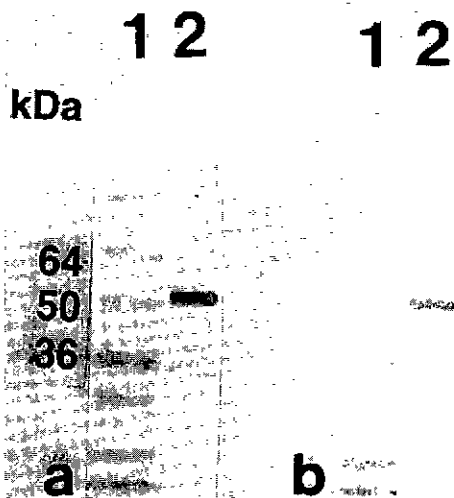


Figure 2. Western blot analyses of mouse anti-N protein monoclonal antibodies. Purified Hantaan virus propagated in Vero E6 cells was used as an antigen. Mouse anti-N protein mAbs, ht90-40(a) and ht90-49(b), were used as primary antibodies. lane 1; size marker, lane 2; Hantaan virus

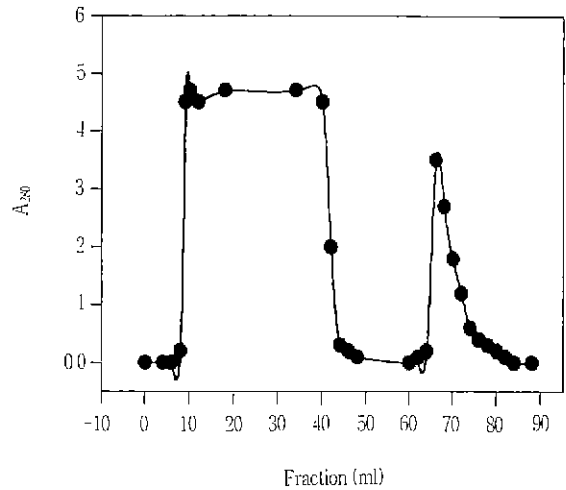


Figure 3. Purification profile of mouse anti-N protein monoclonal antibody from mouse ascites with protein-A-Sepharose column. Sample was loaded in 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) and eluted with 0.1 M glycine buffer (pH 3.0).

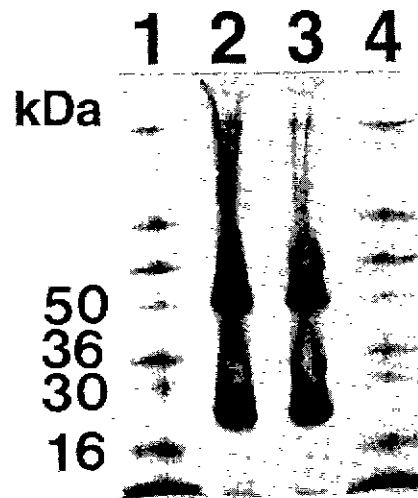


Figure 4 Phast gel electrophoresis of purified mouse anti-N protein monoclonal antibodies. lane 1, lane 4; size marker, lane 2; mouse anti-N protein mAb(ht90-40), lane 3 : mouse anti-N protein mAb (ht90-49)

되도록 첨가하여 수행하였고 용출은 0.1 M glycine 버퍼 (pH 3.0)를 사용하여 수행하였다. Balb/c 복강액으로부터 ht90-40을 정제한 profile을 Figure 3에 나타내었는데 여기서 보는 바와 같이 항체의 용출 피크는 매우 sharp하였으며 단시간 내에 용출이 이루어 졌다 정제된 항체를 phast gel에 걸어 확인한 결과를 Figure 4에 나타내었다. Figure 4에서 13 kDa의 위치에서는 항체의 light chain을 53 kDa의 위치에서는 항체의 heavy chain을 각각 관찰할 수 있다

황산암모늄을 이용한 salting-out

대장균에서 발현된 뉴클레오캡시드 단백질의 정제는 Figure 5에 나타난 과정을 기본으로 하여 수행하였다 초음파기와 French press나 Microfluidizer를 이용하여 균체를 파괴하여 파쇄된

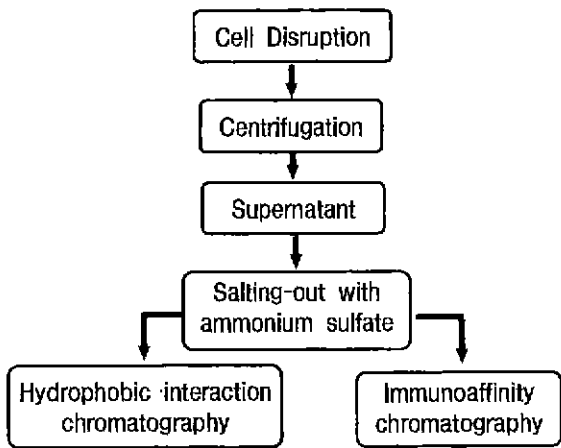


Figure 5 Scheme for purification of N protein expressed in *E. coli*.

lysate를 Beckman의 초고속 원심분리기 L7 (Rotar type 16)을 사용하여 8,000 rpm에서 40분간 원심분리하여 상등액과 pellet으로 나누었다. 상등액은 다시 황산암모늄으로 처리하여 침전시키고 침전물을 재현탁하여 면역친화 크로마토그래피나 소수반응 크로마토그래피로 정제를 수행하였으며 lysate의 pellet은 8 M urea로 녹인 후 이온교환 수지를 이용하여 정제를 시도하였다.

황산암모늄을 이용한 salting-out은 면역친화 크로마토그래피나, 소수반응 면역크로마토그래피를 위한 진처리 과정으로 이루어졌다. Cell lysate의 원심분리 후 희수한 상등액에 원하는 농도의 황산암모늄을 첨가하여 녹인 후 상온에서 1시간 방치하고 8,000 rpm에서 다시 40분간 원심분리하여 각각 상등액과 침전물을 분리하였다. 처음에는 포화 농도의 30%의 황산암모늄을 사용하여 salting-out을 수행하였는데 뉴클레오캡시드 단백질이 거의 대부분 침전된 것을 확인하였다. 따라서 2차로 포화농도의 15~30%의 황산암모늄을 사용하여 salting-out을 수행하여 각각의 농도에서의 침전물과 상등액에 대해 SDS-PAGE와 western blot을 통한 분석을 실시하였다. 결과를 Figure 6에 나타내었는데 황산암모늄 농도 20% 정도에서도 뉴클레오캡시드 단백질이 거의 salting-out 되는 것으로 나타났다. 따라서 당초 30% 보다 10% 낮은 20%의 황산암모늄 농도를 사용하므로써 그만큼 타 단백질이 더 많이 제거되었음을 관찰할 수 있었다. 황산암모늄 salting-out 만으로도 약 70% 정도의 타 단백질 제거 효과가 있는 것으로 판단되었다

Immunoaffinity Chromatography

균체 배양액 1 L를 기준으로 황산암모늄을 사용하여 희수된 침전을 20 mL의 PBS 버퍼 (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24g KH₂PO₄ /L, pH 8.0)에 재현탁하였다. 재현탁한 용액중의 황산암모늄을 제거하기 위해 2 L의 PBS 버퍼에 2 시간 씩 2회 투석을 수행하였다. 투석한 용액은 다시 Sorvall RC5C 원심분리기 (rotar type SS-34)를 사용하여 8000 rpm에서 1시간 원심분리하여 상등액을 취한 후 이것을 면역친화 크로마토그래피(immunoaffinity chromatography)에 걸어 뉴클레오캡시드 단백질을 정제하였다. 면역친화 크로마토그래피는 단일균 항체 ht90-40을 CNBr-activated Sepharose 4B에

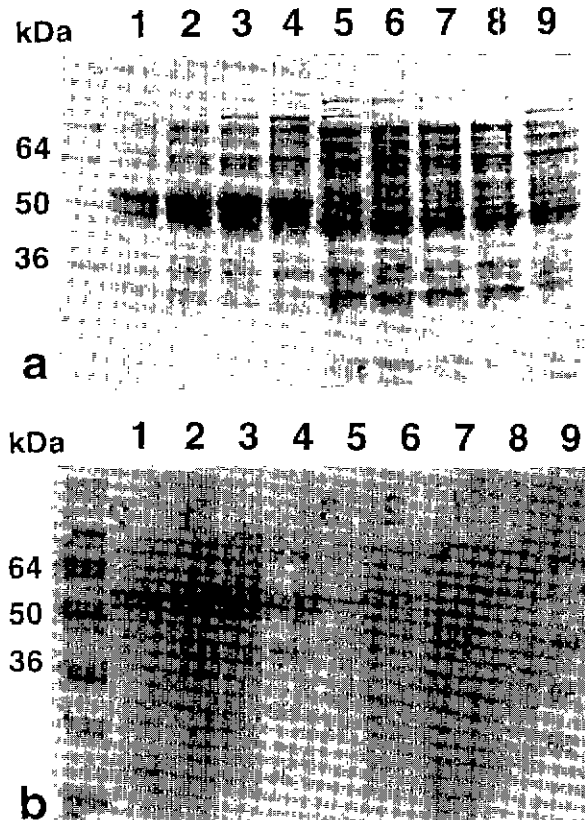


Figure 6. SDS-PAGE(a) and western blot(b) analyses of salting-out samples of N protein. Supernatant of disrupted cell lysate was treated with varying concentrations of ammonium sulfate. After centrifugation, precipitates and supernatants were taken and analyzed.

- 1) 15% ppt. 2) 20% ppt. 3) 25% ppt. 4) 30% ppt 5) 15% sup.
- 6) 20% sup. 7) 25% sup. 8) 30% sup. 9) lysate sup. before ammonium sulfate treatment (ppt.: precipitate, sup.: supernatant)

coupling한 것을 사용하였다. PBS 버퍼로 로딩과 1차 세척을 마치고 다시 비특이적으로 부착된 단백질을 제거하기 위해 0.5 M의 NaCl이 첨가된 PBS 버퍼로 세척하였다. 용출은 0.1 M glycine 버퍼 (pH 12)를 사용하여 수행하였다. 용출액은 A₂₈₀에서 흡광도 값의 변화를 관찰하면서 희수하였다. 용출액의 pH를 조정하기 위해서는 용출이 끝난 직후 2 M Tris 완충용액(pH 8.0)을 용출액 부피의 0.1배 첨가하였다. 정제 단계별 샘플과 최종 정제된 뉴클레오캡시드 단백질에 대한 SDS-PAGE와 western blot 결과를 Figure 7에 나타내었다. SDS-PAGE상에서 보면 정제된 뉴클레오캡시드 단백질의 순도는 90%이상 되는 것으로 판단되었다.

Hydrophobic Interaction Chromatography

면역친화 크로마토그래피를 통하여 90%의 순도로 정제가 가능한 하지만 이 방법은 단일균항체를 준비해야하고, 또한 준비된 단일균 항체의 커플링 과정을 거쳐야하는 번거로움 등으로 매우 높은 정제 비용이 예상된다. 따라서 면역친화 크로마토그

래피의 대체 방법으로 ultrafiltration, 이온 교환 크로마토그래피 및 소수반응 크로마토그래피의 사용 가능성을 조사하였다. Ultrafiltration의 경우 고분자 불순 단백질의 제거 효과를 기대하고 cut-off 값이 뉴클레오캡시드 단백질의 분자량인 50,000 dalton 보다 큰 80,000과 100,000인 것을 사용하였으나 분리 효과를 보지 못했다. 뉴클레오캡시드 단백질의 분자량이 50,000 이긴 했지만 cut-off 값이 80,000과 100,000 인 멤브레인을 전혀 통과하지 못했다. 이온교환 크로마토그래피의 경우도 음이온 교환 수지와 양이온 교환수지 모두에서 기대했던 큰 정제 효과는 거둘 수 없었다. 반면 페닐 세파로즈(phenyl sepharose) CL-4B 수지를 사용한 소수반응 크로마토그래피에서 뉴클레오캡시드 단백질이 타 단백질과 매우 효율적으로 분리되는 것을 관찰하였다. 이 경우 대부분의 뉴클레오캡시드 단백질은 프로쓰로우(flow through)로 빠져 나왔고 대부분의 대장균 유래의 타 단백

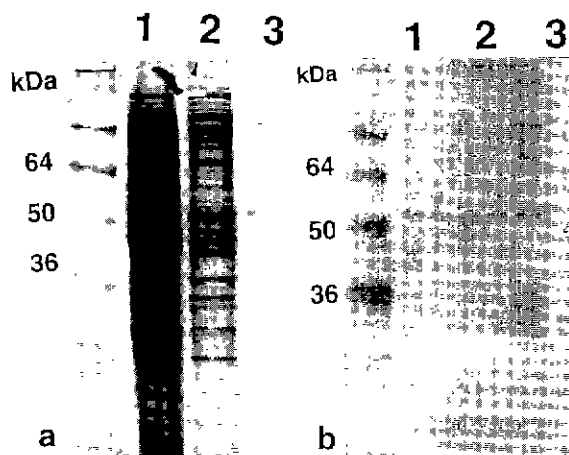


Figure 7. SDS-PAGE(a) and western blot(b) analyses of N proteins purified with immunoaffinity chromatography. After centrifugation of cell lysate, the supernatant (lane 1) was precipitated with ammonium sulfate. The resulting precipitate was re-dissolved with PBS, and dialyzed overnight against PBS (lane 2). The dialyzed sample was applied to anti-N protein mAb (ht90-40)-coupled column. After extensive washing, the sample was eluted with 0.1 M glycine buffer (pH 12) (lane 3). For the western blot, anti-N mAb ht90-40 was used as a primary antibody.

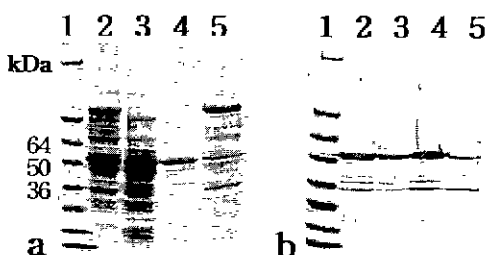


Figure 8. SDS-PAGE(a) and western blot(b) analyses of N protein purified with hydrophobic interaction chromatography. 1) size marker, 2) ammonium sulfate precipitate, 3) lysate sup. before ammonium sulfate treatment, 4) flow through fraction of chromatography, 5) eluate of chromatography

질이 수지에 부착되어 있었다. Cell lysate로부터 황산암모늄의 salting-out 과정과 소수반응 크로마토그래피를 거친 각 단계 별 단백질 샘플을 polyacrylamide 겔 전기영동 및 웨스턴 블롯을 통하여 확인하였는데 (Figure 8), 전기영동 상에서 보면 최종적으로 정제된 단백질의 순도는 면역친화 크로마토그래피의 정제 방법과 견줄만한 90% 이상인 것으로 판단되었다.

요약

한타바이러스 속의 속하는 한탄바이러스는 인간에게 신증후출혈열(Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome: HFRS)이라는 심한 질병을 유발하며 아시아와 동유럽에 설치류를 매개로 분포한다. 한타바이러스 속의 바이러스들은 G1, G2, 뉴클레오캡시드 단백질을 주요 항원으로 갖는데, 이중 뉴클레오캡시드 단백질은 진단용 항원으로 매우 유용한 것으로 알려져 있다. 플라스미드 pET-3a에 한탄바이러스의 뉴클레오캡시드 유전자가 클로닝된 제조용 플라스미드로 형질전환된 대장균 BL21(DE3)의 배양액으로부터 정제를 수행하였다. 면역친화 크로마토그래피나 소수반응 크로마토그래피 모두에서 90% 이상 순도의 뉴클레오캡시드 단백질을 얻을 수 있었다.

참고 문헌

1. Lee, H. W., P. W. Lee, and K. M. Johnson (1978), Isolation of the Hantaan virus, the etiological agent of Korean hemorrhagic fever, *J. Infect. Dis.*, **137**, 298-308.
2. Hjelle, B., S. A. Jenison, D. E. Goade, W. B. Green, R. M. Feddersen, and A. A. Scott (1995), Hantaviruses: Clinical, Microbiologic, and Epidemiologic Aspects, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*, **32**, 469-508.
3. 노갑수 (1997), 유행성출혈열과 한타바이러스 (Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome and Hantaviruses), *미생물과 산업*, **23**, 10-17.
4. Vapalathi, O., A. Lundkvist, H. Kalho-Kokko, K. Pauku, I. Julkunen, H. Lankunen, and A. Vaheri (1996), Antigenic properties and Diagnostic Potential of Puumala Virus Nucleocapsid Protein Expressed in Insect Cells, *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 119-125.
5. Zöller, L. G., S. Yang, P. Gött, E. K. F. Bautz, and G. Darai (1993), A Novel μ -Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Recombinant Proteins for Sensitive and Specific Diagnosis of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 1194-1199.
6. Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, and J. W. Dubendorff (1990), Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Meth. Enzymol.*, **185**, 60-89.
7. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989), *Molecular Cloning*, 2nd ed, pp 18.60-18.75. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
8. Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Bio-*

- chem.*, **72**, 248-254.
9. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989), *Molecular Cloning*, 2nd ed., pp 18.11-18.18, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 10. Köhler, G and C. Milstein (1975), Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, **256**, 495-497.
 11. Köhler, G. and C. Milstein (1976), Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion, *Eur. J. Immunol.*, **6**, 511-519.