

SIV의 p27 재조합 단백질을 이용한 SIV 항체 검출을 위한 ELISA의 최적 조건

김은옥, 김은, 오윤이, 신광순, 김현수, 김철중*

충남대학교 수의과대학
(게재승인 : 2002년 1월 27일)

Optimization of ELISA using Recombinant p27 Protein of SIV for Detection of Anti-SIV

Eun-ok Kim, Eun Kim, Yoon-i Oh, Kwang-soon Shin, Hyun-soo Kim, and Chul-joong Kim*

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea

(Accepted : January 27, 2002)

국문초록 : SIVmac239 isolate의 p27유전자를 PCR로 증폭하여 pMAL-cri vector에 cloning하였다. 이를 *Escherichia coli*에서 발현시켜 정제하여 국내에 수입된 macaque 11마리와 marmoset 21마리의 혈청에서 SIV 항체를 immunoblot으로 검사한 결과 macaque 1마리가 SIV 감염이 의심되었다. 또한 정제된 재조합 단백질을 이용하여 check board system으로 ELISA 방법의 최적 조건을 확립하였다. 정제 p27 항원 200ng/well을 plate에 coating하기에 적합하였고 conjugate는 1:1000으로 희석하는 것이 가장 좋았으며 위의 32 마리의 혈청을 ELISA로 검사한 결과 모두 anti-SIV 음성이었다.

Abstract : The p27 coding region of the SIVmac239 isolate was amplified by PCR and cloned into an expression vector, pMAL-cri, which expressed high levels of the p27 protein from *Escherichia coli*. The purified p27 protein was used for detection of anti-SIV antibodies with the sera from 11 macaques and 21 marmosets by immunoblot assay of which one macaque was suspicious for the SIV infection. The optimum conditions of ELISA was studied by the check board system with the recombinant purified p27 protein. For the plate coating, 200ng/well of the purified p27 was satisfactory. The conjugate was diluted 1:1000. The sera from the 32 monkeys were negative for the anti-SIV by ELISA.

서 론

Simian immunodeficiency virus (SIV)는 retroviridae의 lentivirus에 속하는 바이러스로 동일한 두 가닥의 단일선상의 RNA 바이러스이다. 분리된 숙주에 따라 나뉘는데 sooty mangabeys (*Cercocebus torquatus atys*)¹, African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*)^{2,3}, sykes' monkeys(*Cercopithecus mitis*)⁴, Madrills (*Mandrillus sphinx*)⁵에 감염되어 있는 SIV는 각각 SIVsm, SIVagm, SIVsyk, SIVmnd라고 명명하며 침팬지(*Pan troglodytes*)^{6,7}에 감염된 SIV는 SIVcpz

로 red-capped mangabeys (*Cercocebus torquatus torquatus*)⁸에 감염된 SIV는 SIVrcm로 분리된다. 이 중 SIVmac나 SIVsm은 HIV-2에 가깝다고 한다. 서부 아프리카 사람들에서 분리된 HIV-2는 SIVsm에서 기원되었을 것이라는 보고도 있다^{9,10,11,12}. 실제로 sooty mangabeys 원숭이의 자연적인 서식지는 HIV-2의 역학과 동일하며 유전자적으로 거의 차이가 없다고 한다. SIV의 HIV와의 생물학적 유전자적 동일함은 HIV 연구에 SIV가 응용되어 연구의 범위를 넓히고 있는데 기여를 하고 있다. SIVmac은 붉은털원숭이나 돼지꼬리원숭이에 감염시키면 사람의 AIDS

* Corresponding author : phone +82-42-821-6781, email cjkim@cnu.ac.kr

본 연구는 과학기술부 국가지정연구실 (과제번호: 2000-N-NL-01-C-171) 지원금으로 수행되었습니다.

와 같은 면역결핍증을 일으킨다^{13,14,15}. SIVsm도 macaques 원숭이에서 면역결핍증을 일으키지만 HIV-2는 감염되더라도 AIDS증상은 일으키지 않는다^{16,17}. SIV는 자연숙주에서는 지속적인 바이러스 복제가 이루어지지만 질병을 발생시키지는 않는다^{18,19,20}. 그러나 보균자로 새로운 숙주에 감염되었을 때 면역상태에 따라 치명적인 질병을 일으킬수 있다는 보고가 있다^{21,22,23,24}.

SIV는 다른 retrovirus와 마찬가지로 gag, pol, env의 주된 유전자를 가지고 있으며 그 중에서도 gag 유전자에서는 55kDa의 전구체(Pr55gag)가 만들어지며 pol 유전자에서 기인하는 바이러스의 protease에 의해서 matrix(MA, p17), capsid(CA,p27), nucleocapsid(NC,p7)과 p6로 잘려져 성숙 Gag 단백질이 만들어지며²⁵ envelope와 결합함으로써 바이러스입자를 구성한다²⁶.

SIV에 감염된 원숭이의 혈청으로 immunoblot 분석을 한 결과 p27 단백질과 결합하였다²⁷. 이것은 p27단백질이 감염된 원숭이에서 강력한 면역반응 일으키는 중요한 바이러스의 항원이라는 것을 말해준다. 정제된 재조합 p27 단백질을 이용하여 ELISA kit를 만든 보고들도 있다⁴⁸. 이외에 immunoblot test나 radioimmunoprecipitation assay²⁹가 SIV 감염을 진단하는데 이용되고 있다. 이제 우리 나라도 원숭이를 수입하여 연구용으로써 영장류자원을 체계적으로 확보하고, 관련연구분야에 대한 국가적 활용체계를 구축하고 활성화하는 것이 요구되고 있는 시점에서 자체 SOP(standard operation procedure)에 따라 검역을 실시하고 품질검정기술에 대한 SOP확립이 시급한 실정이다. 그리므로, 본 연구에서는 SIVmac239 isolate의 p27 유전자를 *Escherichia coli*에서 발현시켜 정제하였으며 이를 이용하여 국내로 수입된 영장류 33개체의 혈청을 분리하여 면역 반응을 통한 SIV감염 여부를 진단하였고 SIV항체 검정을 위한 ELISA 기술의 검정기술을 확립하였다.

재료 및 방법

SIV capsid gene의 증폭과 recombinant plasmid 제작

SIVmac239 isolate 유전자를 주형으로 p27(capsid) 유전자 증폭을 위해 primer를 작성하였다. sense primer는 *Sal* I 제한효소 site를 포함한 5' ATTGTCGACATGCACCTGC CATTAAAGCCCTG3' 로 antisense primer는 *Hind* III 제한효소 site를 포함하여 5' CCCAAGCTTTTAACAAGCCG TCAGCATTTC3' 로 디자인하여 97°C에서 5분후 Taq polymerase 1 μ l를 첨가한 뒤 94°C에서 1분, 52°C에서 1분, 72°C에서 30초로 유지시키는 일련의 반응을 40회 반복

하였다. 이 때 증폭된 유전자 p27를 pMAL-cri vector에 cloning하는 것은 primer 양 말단에 장착한 제한효소 site를 이용하여 삽입하였다.

*E. coli*에서 protein 발현

pMAL-cri vector에 cloning된 plasmid의 single colony를 ampicillin(100 μ g/ml)를 함유한 LB(Luria Bertani)배지에 37°C, 15시간 배양하였으며 대조군으로 *E. coli* host인 XL1-blue MRF와 pMAL-cri vector를 transform한 XL1-blue MRF도 같이 배양하였다. 이후 50ml의 새 배지에 1%로 접종하여 600nm에서 0.5의 absorbance를 얻을 때까지 37°C에서 배양한 뒤 1mM IPTG(isoprophlthio- β -D-galactoside)로 induction하였다. Induction 후에는 37°C에서 3시간, 5시간 배양 후에 6000rpm에서 10분간 원심 분리하여 얻은 세포 pellet을 -70°C에 보관하였다. MBP fusion 단백질의 발현시에는 1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 0.5% NaCl에 0.2% glucose를 첨가한 배지를 사용하였다.

SDS-PAGE와 Western Blot

SDS-PAGE는 Lammlie의 방법을 기초로 하여 수행되었다. 각각의 세포 pellet을 1mM PMSF, PBS 10ml에 부유한 후에 sonication으로 세포를 파괴하였다. 이 세포 lysate에 SDS sample buffer를 섞어서 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동한 후 Coomassie brilliant blue로 염색하여 발현된 단백질의 크기를 확인하였고 PVDF membrane으로 transfer 한 후 5% skim milk로 blocking하고 SIVmac239 항체를 이용하여 immunoblot을 실시하였다.

MBP fusion protein의 정제

발현이 확인된 세포를 200ml rich broth에 ampicillin을 100 μ g/ml로 첨가하여 15시간 배양한 세포를 1%로 접종하여 600nm에서 0.5의 OD value를 얻을 때까지 배양한 후 1mM IPTG로 induction하여 5hr 동안 37°C에서 배양하였다. 배양 후 6000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 pellet을 PBS 10ml로 재부유한 후에 1mM PMSF를 가한 후 sonication을 하였다. Sonication후 1500rpm에서 15분간 원심 분리하여 세포 lysate를 얻었다. 단백질 결합할 amylose resin(New England Biolab)을 미리 꺼내어 1ml을 원심한 뒤 column wash buffer(20mM Tris-Cl, 200mM NaCl, 1mM EDTA)를 8 \times volume을 넣고 pre-equilibration을 하였고 이렇게 준비된 resin에 세포 lysate를 넣고 4°C에서 24시간동안 진탕하며 결합시켰다. 결합시킨 후에 column wash buffer를 12 \times volume으로 3회 세척하고 Elution buffer(10mM Maltose in column buffer) 1ml로 5회 용출하여 -20°C에 보관하였다.

ELISA와 Cut-off value의 결정

정제된 재조합 단백질을 Bradford method (Biorad)에 따라 Biorad Protein assay reagent를 이용하여 우선 BSA (1mg)가 0, 3, 6, 9, 및 12 μ g/ml의 농도를 standard로 잡은 후 정제된 단백질을 5, 10, 15, 및 20 μ l를 넣어 단백질의 양을 측정하였다. 이 단백질을 항원으로 하여 생명공학 연구소 유전자원 센터에 입수한 marmoset 혈청 21개와 crab-eating macaque 혈청 11개를 6개의 group으로 나누어 immunoblot을 실시하였다. 혈청은 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 불활화한 후에 1 : 500으로 희석하여 사용하였다. ELISA에 사용된 항원, 혈청, conjugate의 농도는 check board titration(antigen의 농도는 100, 200, 300, 400, 500, 1000ng으로 serum dilution은 1:100, 1:200, 1:300으로 conjugate의 dilution은 1:2000, 1:3000, 1:5000으로 단계별 희석)으로 결정되었다. 96-well ELISA plate에 항원을 0.1M sodium bicarbonate buffer(pH 9.6)로 단계별 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 coating을 한 후 1% gelatin(Merck, Germany)을 함유하는 PBS를 사용하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 blocking을 하였다. 이후 PBST(0.05% Tween 20과 0.1% BSA가 함유된)로 3회의 세척을 하였다. PBS로 희석한 marmoset과 macaque serum sample을 양성 및 음성 대조가 포함된 각각의 well에 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후에

PBST로 3회 세척한 후 PBS로 희석한 anti-monkey IgG peroxidase conjugate(SIGMA, USA)를 각각의 well에 첨가한다. 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응한 후에 PBST로 3회 세척하고 OPD(o-Phenylenediamine Dihydrochloride, SIGMA, USA) 용액으로 실온에서 20분간 반응시켰다. 반응은 3N HCl로 중단시키고 absorbance는 ELISA autoreader (Molecular Devices, USA)를 사용하여 wavelength 405nm로 측정하였다. 결과 판정의 cut-off value는 negative라 할 수 있는 safety zone을 넓히기 위해 SIV-negative serum으로 측정된 absorbance의 mean absorbance와 SD(Standard Deviation)을 구한 다음 mean absorbance에 4배의 SD값을 더한 값으로 결정하였다.

결 과

E. coli에서의 protein 발현

pMAL-cri에 cloning된 plasmid를 E. coli XL1-blue MRF를 숙주로 발현하였다. 600nm에서 OD value가 0.5일 때 1mM IPTG로 induction후 3시간, 5시간 배양하여 발현된 재조합 단백질의 확인을 위해 SDS-PAGE와 Western Blot을 실시하였다. 대조군으로 E. coli 숙주인 XL1-blue MRF와 vector인 pMAL-cri를 transform한 세포 lysate도

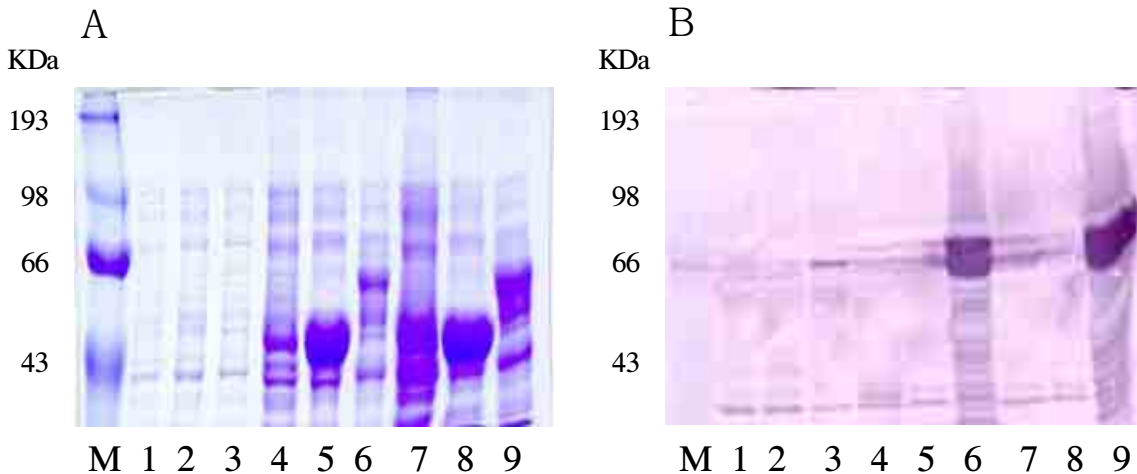


Fig. 1. 10% SDS-PAGE(A) and Western blot(B) analysis of E. coli XL1-blue MRF harboring plasmid pMAL/SIVp27
lane M: Broad range molecular marker
lanes 1, 4 and ,7: XL1-blue MRF
lanes 2, 5, and 8: XL1-blue MRF transformed pMAL-cri vector
lanes 3, 6, and 9: XL1-blue MRF transformed pMAL/SIVp27
lanes 1 ,2, and 3: zero time
lanes 4, 5, and 6: 3hr after 1mM IPTG induction,
lanes 7, 8, and 9: 5hr after 1mM IPTG induction

비교하였다. Control MBP size는 40KDa 정도이고 fusion 된 단백질의 크기는 67KDa 정도로 젤염색이나 Western Blot에서 확인이 잘 되었다(Fig.1). 또한 maltose fusion protein의 발현이 IPTG에 의해 확연히 induction된 것을 알 수 있었고 induction 시간에 따라 발현되는 protein의 양이 점점 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

Purification of MBP fusion protein

발현된 단백을 amylose resin을 이용하여 정제한 후 α -SIVmac239 antibody를 사용하여 Western Blot으로 확인하였다. fusion protein의 크기인 67KDa 정도에서 확인이 되는 것을 볼 수 있었다(Fig.2). 또한 elution 순서에 따라 양이 점점 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

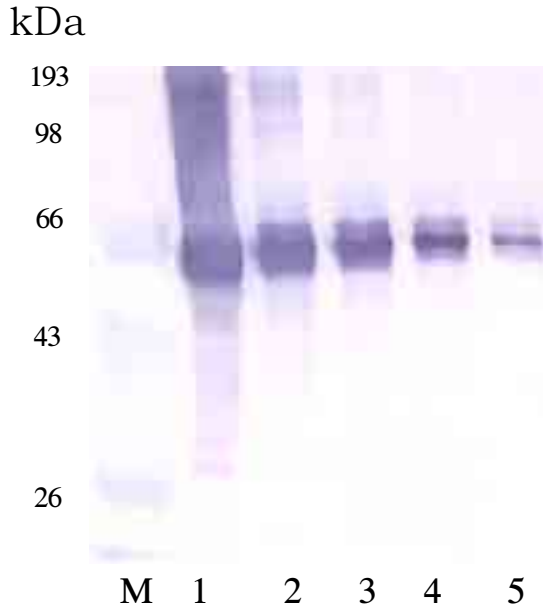


Fig. 2. Western blot analysis of maltose binding purified p27 protein
lane M: Broad range molecular marker
lane 1: whole cell lysate, lane 2: 1st elution,
lane 3: 2nd elution, lane 4: 3rd elution, lane 5: 4th elution

SDS-PAGE와 Western Blot

정제된 fusion p27 단백질을 항원으로 하여 marmoset과 crab-eating macaque 원숭이의 serum sample 32개를 6개 group으로 나누어 Western blot을 한 결과 marmoset sample인 1-4 group에서는 p27 항체가 정제된 항원과 반응하지 않았으나 macaque group인 5-6 group에서는 p27 항체가 정제된 p27 항원과 미약하게 반응하였다

(Fig.3,A). p27에 대한 항체의 존재가 의심되는 5-6 group을 개체별로 나누어 다시 Western blot을 실시하였다. 그 결과 SIV가 감염된 원숭이 혈청과는 확실히 구분이 되었지만 11002-1 sample의 p27에 대한 항체 존재가 의심되었다(Fig.3,B).

ELISA와 Cut-off value의 결정

정제된 단백질을 항원으로 이용하여 ELISA의 최적조건을 확립하였다. SIV-positive serum이 없는 관계로 SIV-negative serum을 사용하여 재조합 단백질에 대한 각각의 reagent를 standardization을 하였다. 이에 사용된 항원, 혈청, conjugate의 최적조건은 check board system에 의해 결정된 것이다. 다양한 항원의 농도에 따라 OD value가 별로 영향을 받지 않은 것을 볼 수 있었고 혈청의 희석배율이나 특히 conjugate의 희석배율에 따라 OD value가 많은 영향을 받는 것을 확인하였다. Marmoset serum을 사용한 standardization결과 적절한 항원 농도는 200ng/well, conjugate의 희석배율은 1:1000이었다. 이와 비슷하게 Crab-eating Macaque serum을 사용한 standardization 결과에서도 적절한 antigen 농도는 200ng, conjugate dilution은 1:1000이었다. 항원 농도가 200ng/well로 하고 conjugate dilution이 1:1000로 하여 marmoset과 crab-eating macaque 혈청을 희석하여 OD value를 측정하였을 때 mean absorbance는 marmoset에서는 0.13 O.D unit, Crab-eating Macaque 에서는 0.18 O.D unit이고 4SD(Standard Deviation) 값은 두 sample 모두 0.04 O.D unit이었다(Fig. 4). 여기서 얻어진 cut-off value는 marmoset에서는 0.17 O.D unit이며 crab-eating macaque 에서는 0.22 O.D unit이다.

고 찰

미국이나 일본, 유럽 등의 생명공학 분야가 발달된 국가에서는 영장류를 이용하는 실험이 이루어지고 있다. 영장류는 사람과 가장 가까운 동물로서 신약개발이나 HIV, HCV 등의 사람에게 감염되는 바이러스나 cancer 치료 연구에 최종 동물로써 중요한 역할을 한다. 그래서 국내에서는 이들 실험동물의 수입이 추진되어지고 있다. 이들을 검역하기 위한 ELISA 진단법을 개발하기 위해 본 실험에서는 SIVmac239의 p27, capsid protein을 발현시켰다. SIV의 group간의 cross-reaction에 대해서는 아직 확실히 알려져 있지 않지만 SIVsm은 자연숙주인 sooty mangabeys보다 rhesus macaques에서 바이러스 진화가 많이 일어났다고 한다. 이는 자연숙주가 이들 바이러스에 좀더 안정적이라는 사실을 말해준다³⁰. 반면 SIVmac을 mangabeys에 감염시켰을 때 rhesus macaques보다 더

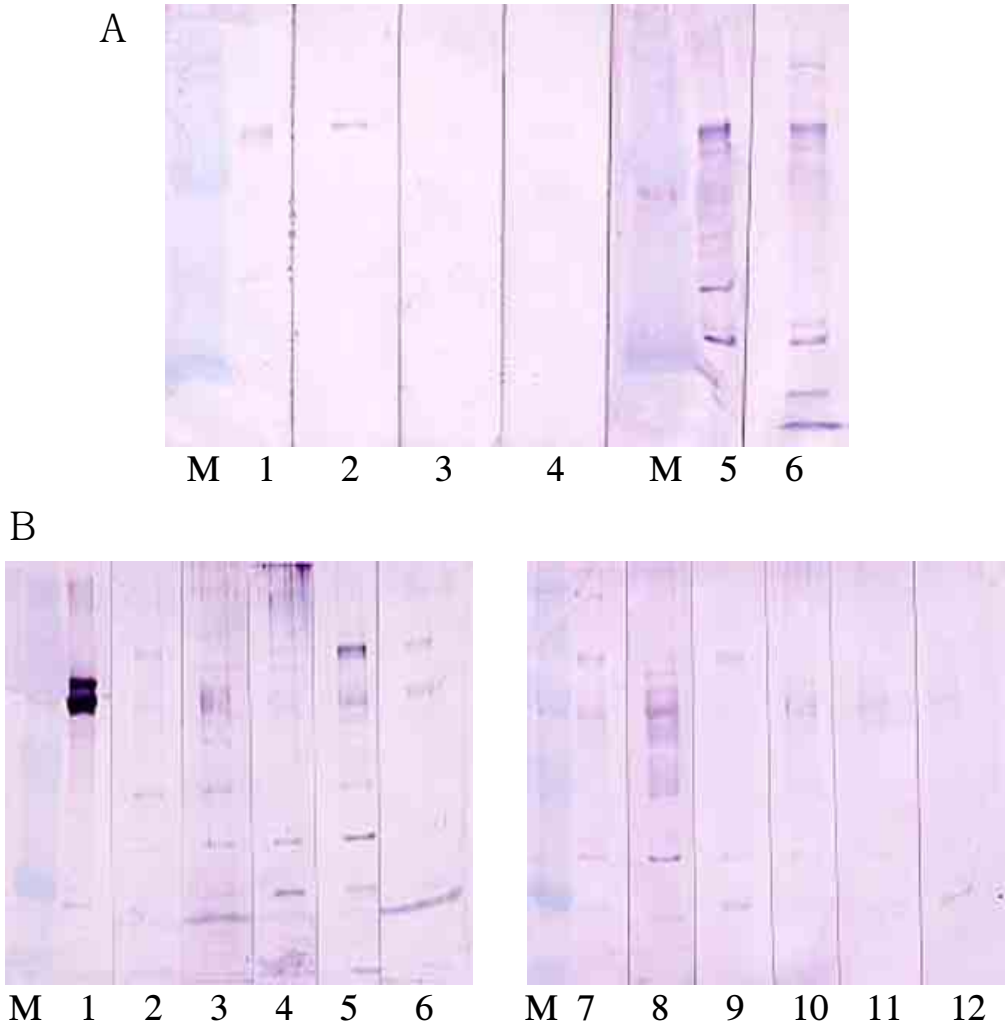


Fig. 3. Immunoblot assay of p27 antigen with sera from monkeys

Fig. 3A. lane M: Broad range molecular marker,
lane 1-4: marmoset(p201-p2021)

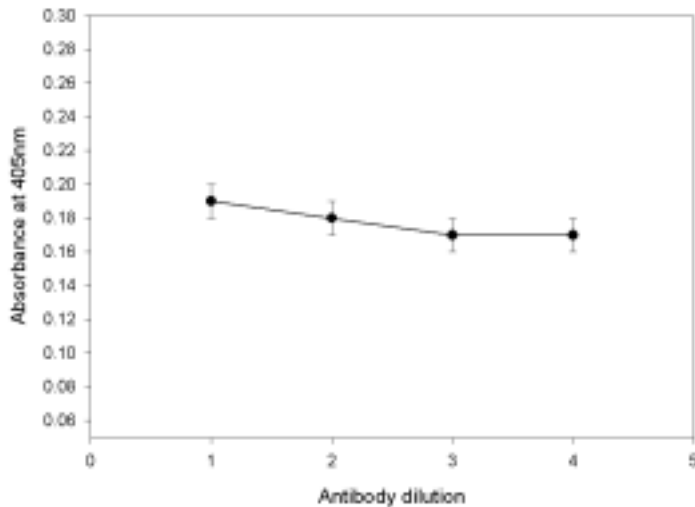
Fig. 3B. lane 1: SIVmac293 antibody, lane2-7: 11002-11007,
lane 8: 11001, lane 9-12: 11008-11011

지속적인 CTL 반응을 일으켰다고 한다³¹. 그러므로 본 실험에서 선택한 SIVmac의 p27 재조합 단백질은 다른 SIVs의 감염 여부를 진단하는데 있어 정확한 방법이라고 확신하기가 어렵다. 또한 국내 현황상 많은 수의 다양한 영장류 혈청을 적용해보지 못한 점이 있다. 그러나 외국에서 검역을 한 영장류를 수입하고 그 검역여부를 국내에서 확인할 수 있는 체계를 확립했다는데 그 의의가 있다.

ELISA 진단 kit를 개발하기 위해 본 실험에서는 재조

합 p27 gag 단백질을 사용하였는데 이외에 env 단백질을 항원으로 사용할 수도 있을 것이다. env 단백질은 바이러스가 숙주세포에 감염하는데 있어서 receptor와 반응하는 spike 단백질로 중화 항체를 유도하는 많은 epitope들이 있다. 그러므로 이 단백질을 함께 ELISA 항원으로 사용한다면 좀더 확실한 진단법이 될 것이다. 본 실험에서 재조합 단백질을 합성하는데 maltose-binding fusion protein 발현 시스템을 사용하였다. 다른 시스템과 발현량을 비교한 것은 아니지만 이 발현 시스템에서 많

A



B

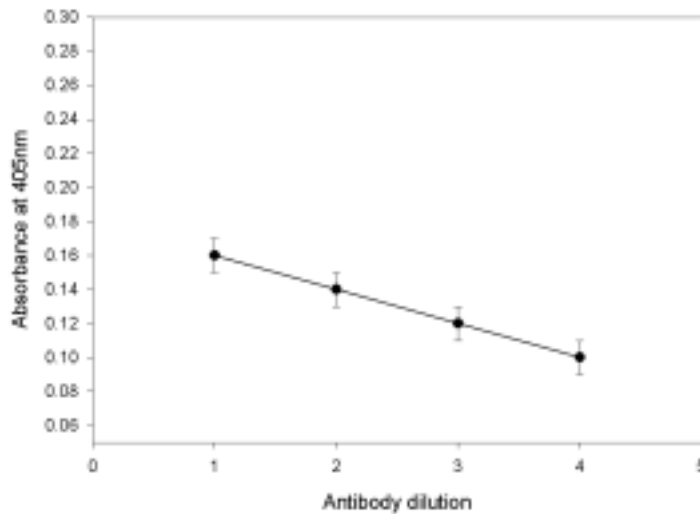


Fig. 4. Confirmation of the Cut-off value with Crab-eating Macaque serum(A) and Marmoset serum(B) (antigen 200ng, conjugate dilution 1;1000. 1-1:100, 2-1:200, 3-1:300, 4-1:400)

은 양의 재조합 단백질이 세포질에서 발현된 것을 확인할 수 있었다(Fig.1). 결합되는 maltose 단백질의 크기가 비교적 크기 때문에 ELISA 항원으로 이용이 부적절할 수도 있다. 그러므로 크기가 작은 Histidine-binding fusion protein 발현 시스템에 이를 응용한다면 더 효과적인 ELISA 진단법을 개발할 수 있을 것이다.

합성된 재조합 단백질을 SIV에 감염된 positive 혈청과 국내로 수입된 macaque 11개체, marmoset 21개체의 혈청을 분리하여 면역 반응을 통한 항체유무검사를 실

시한 결과 macaque 1개체가 미약하기는 하나 이 단백질과 결합함으로써 SIV 감염이 의심되었다(Fig.2). 그러므로 이 개체는 바이러스의 복제가 진행되지 않는 잠복기 상태에 있다가 면역기능과 질병상태에 따라 바이러스가 활발히 복제되어 SIV를 전파시킬 수 있는 가능성을 지녔다고 판단되어진다. 이로써 SIV 항체 검출을 위한 ELISA의 국내 검정기술을 확립하고 검역체계를 구축하였다고 사려된다. 그러나 좀 더 정확성을 높이기 위하여 심도 깊은 진단기법 연구가 필요할 것이다.

참고문헌

- Hirsch VM, Olmsted RA, Murphey-Corb M, Purcell RH, Johnson PR. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 1989;339:389-392.
- Kanki PJ, Kurth R, Becker W, Dreesman G, McLane MF, Essex M. Antibodies to simian T-lymphotropic retrovirus type III in African green monkeys and recognition of STLIV-III viral proteins by AIDS and related sera. *Lancet* 1985;1:1330-1332.
- Kanki PJ, Alroy J, Essex M. Isolation of T-lymphotropic retrovirus related to HTLV-III/LAV from wild-caught African green monkeys. *Science* 1985;230:951-954.
- Emau P, McClure HM, Isahakia M, Else JG, Fultz PN. Isolation from African Sykes' monkeys (*Cercopithecus mitis*) of a lentivirus related to human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* 1991;65:2135-2140.
- Tsujimoto H, Cooper RW, Kodama T, Fukasawa M, Miura T, Ohta Y, Ishikawa K, Nakai M, Frost E, Roelants GE, et al. Isolation and characterization of simian immunodeficiency virus from mandrills in Africa and its relationship to other human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* 1988; 62:4044-4050.
- Peeters M, Honore C, Huet T, Bedjabaga L, Ossari S, Bussi P, Cooper RW, Delaporte E. Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS* 1989;3:625-630.
- Peeters M, Fransen K, Delaporte E, Van den Haevelde M, Gershy-Damet GM, Kestens L, van der Groen G, Piot P. Isolation and characterization of a new chimpanzee lentivirus (simian immunodeficiency virus isolate cpz-ant) from a wild-captured chimpanzee. *AIDS* 1992;6:447-451.
- Georges-Courbot MC, Lu CY, Makuwa M, Telfer P, Onanga R, Dubreuil G, Chen Z, Smith SM, Georges A, Gao F, Hahn BH, Marx PA. Natural infection of a household pet red-capped mangabey (*Cercocebus torquatus torquatus*) with a new simian immunodeficiency virus. *J Virol* 1998;72: 600-608.
- Chen Z, Luckay A, Sodora DL, et al. Human deficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a district HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J. Virol* 1997;71:3953-3960.
- Desrosiers RC. HIV-1 origin: A finger on the missing link. *Nature* 1990;345:288-289.
- Gao F, Yue L, White AT, et al. Human infection by genetically diverse SIVsm-related HIV-2 in west Africa. *Nature* 1992;358:495-499.
- Hirsch VM, Olmsted RA, Murphey-Corb M, et al. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 1989;339:389-392.
- Fultz PN, McClure HM, Anderson DC, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from naturally infected sooty mangabey monkeys (*Cercocebus atys*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:5286-5290.
- Hirsch VM, Dapolito G, Johnson PR, et al. Induction of AIDS by simian immunodeficiency virus from an African green monkey: Species-specific variation in pathogenicity correlates with the extent of in vivo replication. *J Virol* 1995;69:955-967.
- Murphey-Corb M, Martin LN, Rangan SRS, et al. Isolation of an HTLV-III-related retrovirus from macaques with simian AIDS and its possible origin in asymptomatic mangabeys. *Nature* 1986;321:435-437.
- Daniel M, Letvin N, Sehgal P, et al. Prevalence of antibodies to 3 retroviruses in a captive colony of macaque monkeys. *Int J Cancer* 1998;41:601-608.
- Mansfield KG, Lerch NW, Gardner MB, et al. Origin of simian immunodeficiency virus infection in macaques at the New England Regional Primate Reserch Center. *J Med Primatol* 1995;24:116-122
- Fultz PN, Stricker RB, McClure HM, Anderson DC, Switzer WM, Horaist C. Humoral response to SIV/SMM infection in macaque and mangabey monkeys. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 1990;3:319-329.
- Kurth R, Norley S. Why don't the natural hosts of SIV develop simian AIDS? *Journal of NIH Resarch* 1996;8:33-37.
- Rey-Cuille M, Berthier J-L, Bomsel-Demontoy M, Chaduc Y, Montagnier L, Hovanessian AG, Chakrabarti LA. Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in sooty mangabeys without inducing disease. *J Virol* 1998;72:3872- 3886.
- Hirsch VM, Dapolito G, Johnson PR, Elkins WR,

- London WT, Montali RJ, Goldstein S, Brown C. Induction of AIDS by simian immunodeficiency virus in an African green monkey : species-specific variation in pathogenicity correlates with the extent of in vivo replication. *J Virol* 1995;69:955-967.
22. Lowenstine LJ, Pederson NC, Higgins J, Pallis KC, Uyeda A, Marx P, Lerche NW, Munn RJ, Gardner MB. Seroepidemiologic survey of captive Old World primates for antibodies to human and simian retroviruses, and isolation of a lentivirus from sooty mangabeys (*Cercocebus atys*). *International Journal of Cancer* 1986;38:563-574.
23. Murphey-Corb M, Martin LN, Rangan SR, Baskin GB, Gormus BJ, Wolf RH, Andes WA, West M, Montelaro RC. Isolation of an HTLV-III-related retrovirus from macaques with simian AIDS and its possible origin in asymptomatic mangabeys. *Nature* 1986;321:435-437.
24. Ohta Y, Masuda T, Tsujimoto H, Ishikawa K, Kodama T, Morikawa S, Nakai M, Honjo S, Hayami M. Isolation of simian immunodeficiency virus from African green monkeys and Seroepidemiologic survey of the virus in various non-human primates. *International Journal of Cancer* 1988;41:115-122.
25. Henderson, L. E., R. E. Benveniste, R. Sowder, T.D. Copeland, A. M. Schultz, and S. Oreoslan. Molecular characterization of gag proteins from simian immunodeficiency virus (SIV_{Mnc}) *J. Virol.* 1988;62:2587-2595.
26. Gonzalez, S. A., J. L. Affranchino, H. R. Gelderblom, and A. Burny. Assembly of the matrix protein of simian immunodeficiency virus-like particles. *Virology* 1993;194: 548-556.
27. Thouless ME, Wang Y, Welch MJ. Increased enzyme-linked immunosorbent assay specificity with solubilized simian retrovirus 2-infected 세포 membranes. *Lab Anim Sci* 1996;46:619-622.
28. Lohman BL, Higgins J, Marthas ML, Marx PA, Pedersen NC. Development of simian immunodeficiency virus isolation, titration, and neutralization assays which use whole blood from rhesus monkeys and an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1991;29:2187-2192.
29. Lairmore MD, Lerche NW, Schultz KT, Stone CM, Brown BG, Hermann LM, Yee JA, Jennings M. SIV, STLV-1 and type D retrovirus antibodies in captive rhesus macaques and immunoblot reactivity to SIVp27 in human and rhesus monkey sera. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1990;6:1233-1238.
30. Courgnaud V, Saurin W, Villingier F, Sonigo P. Different evolution of simian immunodeficiency virus in a natural host and a new host. *Virology* 1998; 247:41-50.
31. Kaur A, Grant RM, Means RE, McClure H, Feinberg M, Johnson RP. Diverse host responses and outcomes following simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection in sooty mangabeys and rhesus macaques. *J Virol* 1998;72:9597-9611.