

광견병바이러스에 대한 단클론항체 생산 및 특성[‡]

이승철¹ · 윤영심 · 송윤경² · 우계형² · 진영화² · 강신영*

충북대학교 수의과대학, ¹중앙백신연구소, ²국립수의과학검역원

(접수 2010 4. 9, 게재승인 2010. 6. 11)

Production and characterization of monoclonal antibodies against rabies virus[‡]

Seung-Chul Lee¹, Young-Sim Yoon, Yun-Kyung Song²,
Gye-Hyeong Woo², Young-Hwa Jean², Shien-Young Kang*

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

¹Choongang Vaccine Laboratories, Daejeon 305-348, Korea

²National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea

(Received 9 April 2010, accepted in revised from 11 June 2010)

Abstract

Rabies virus which belongs to the genus *Lyssavirus* of the family *Rhabdoviridae* is known as a highly neurotropic virus and causes fatal encephalitis accompanied by severe neurological symptoms in almost all mammals, including humans. In this study, monoclonal antibodies (MAbs) against rabies virus were produced, characterized and applications of MAbs as diagnostic reagents were assessed. Spleen and inguinal lymph node cells from *Balb/c* mouse immunized with purified rabies virus were fused with SP2/O myeloma cells using polyethylene glycol (PEG) and hybridoma cells producing rabies virus-specific MAbs were screened by an indirect fluorescent antibody test. A total of ten MAbs were produced against rabies virus. The protein specificity and neutralizing activity of MAbs were determined by Western blot analysis and fluorescent antibody virus neutralization test, respectively. As a result, two MAbs, 5G3 and 6H4 had specificity for nucleoprotein (N protein) and two other MAbs, 5B1 and 5C1 had neutralizing activity for rabies virus. Some MAbs recognized the rabies virus-infected bovine brain stem cells by immunohistochemistry (IHC) assay. In conclusion, it was confirmed that MAbs produced in this study were rabies virus-specific and could be used as reliable diagnostic reagents for the detection of rabies virus.

Key words : Rabies virus, Monoclonal antibody, Immunohistochemistry

서 론

광견병은 대부분의 포유동물에 있어서 감염된 동물에 의한 교상을 통해 전파되는 인수공통전염병으로 보

통 2~3개월의 잠복기를 거쳐 발병하면 불안, 경련, 권태, 물린 부위의 림프절 종창 그리고 마비 등의 신경증상을 보이는 질병이다(Beran과 Steele, 1994; Blancou, 1988).

국내에서 광견병은 1907년에 처음 보고되었으며 1907~1945년 사이에는 연평균 500건 정도 그리고 1950~1984년 사이에는 연평균 30건 정도의 발생 보고가 있었으나 1985년 부터 개에 예방접종을 실시한

*Corresponding author: Shien-Young Kang, Tel. +82-43-261-2598, Fax. +82-43-267-3150, E-mail. sykang@cbu.ac.kr

[‡] 이 논문은 2008학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구 되었음.

후 거의 근절되었다. 그러나 1993년 강원도의 야생동물에서 광견병 발생이 보고된 이후 현재까지 강원도와 경기도에서 발생 보고가 이루어지고 있다. 1995년 이후, 매년 개와 소에 대한 예방접종 실시와 2002년 이후, 미끼예방약을 이용한 경구예방접종 실시 그리고 1999년 이후 강원도 및 경기도에서 가축에 대한 혈청학적 감시 등의 광견병 근절정책이 국가적으로 실시되면서 광견병의 발생은 현저히 감소된 상황이다(Lee 등, 2001; Hyun 등, 2005).

광견병의 원인체는 *Rhabdoviridae* family, *Lyssavirus* genus에 속하는 피막이 있는 바이러스로 단일 가닥의 negative sense RNA를 핵산으로 가지고 있다. 광견병 바이러스 핵산은 N, P, M, G 그리고 L 유전자로 이루어져 있으며 각각의 유전자는 nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), matrix (M) protein, glycoprotein (G) 그리고 RNA-dependent RNA polymerase (L)의 단백질을 encoding한다(Wunner 등, 1988). 광견병 바이러스는 N, P 그리고 L protein이 바이러스의 genomic RNA와 함께 coiled helical 형태의 nucleocapsid를 형성하며 M protein과 연관되어 있고, G protein이 trans-membrane spike protein으로 피막을 형성하여 nucleocapsid를 둘러싸고 있다. N protein은 genomic RNA의 encapsidation에 참여하여 genomic RNA가 바이러스 유전자 복제와 L protein에 의한 mRNA 전사를 위한 주형으로 사용될 수 있도록 도와주는 기능을 한다. P protein은 L protein이 N protein-RNA 주형에 부착하게 하면서 RNA 합성과 관련된 보조인자로 작용한다. G protein은 숙주세포의 receptor에 부착, 침투, 항원성, 그리고 숙주 적응 등과 연관되어 있다(Lahaye 등, 2009; Badrane와 Tordo, 2001). 또한, G protein은 중화항체를 유도하는 항원으로 야생동물의 광견병 예방을 위한 미끼예방약에 사용되기도 한다(Cox 등, 1977; Brochier 등, 1991).

동물에서 광견병 진단은 항원검사 및 항체검사를 통해 이루어진다. 항원검사는 개, 가축 및 야생동물에서 광견병 감염여부 확인을 위해 실시하며 주로 죽은 동물의 뇌에서 간접형광항체법, 면역조직화학법 그리고 유전자 검사 등을 이용해 광견병 감염여부를 확인한다. 항체검사는 주로 백신의 효능확인을 위해 실시하며 *in vivo* 또는 *in vitro* 시험을 통해 백신이 유도하는 중화항체를 정량한다. WHO에서 *in vivo* 시험법으로 mouse를 이용한 virus neutralization test (VNT) 그리고 *in vitro* 시험법으로 rapid fluorescence focus inhibition test (RFFIT)를 권장하고 있다. 현재 사용하고 있는 항

체검사를 위해서 바이러스, 세포 그리고 실험동물을 유지해야 하는 단점이 있어 중화능력을 가진 단클론항체를 이용한 ELISA 방법과 면역크로마토그래피법에 대한 연구가 진행되고 있다.

이 연구에서는 광견병바이러스에 대한 특이 단클론항체를 생산하여 특성을 규명하고 광견병의 진단에 있어서 이들 단클론항체의 활용성을 확인하기 위해 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

바이러스와 세포

실험에 사용된 광견병바이러스인 Pasteur strain은 (주)중앙백신연구소에서 분양받아 사용하였다. 광견병 바이러스는 baby hamster kidney 21 (BHK-21) 세포를 이용하여 증식시켰으며 BHK-21 세포는 5% 소태아혈청(fetal calf serum, FCS)과 항생제(200 IU penicillin, 0.4mg streptomycin/ml)가 함유된 alpha minimum essential medium (α -MEM, Sigma, USA)을 사용하여 37°C에서 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 세포융합에 사용된 myeloma 세포는 SP2/0 세포를 이용하였으며 10% FCS가 함유된 RPMI 1640 (Invitrogen, USA) 배지를 이용하여 37°C에서 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다.

바이러스의 배양 및 정제

단층 배양된 BHK-21 세포는 trypsin을 이용하여 소화시킨 후 5% FCS가 포함된 α -MEM에 부유시키고 광견병바이러스를 m.o.i가 1.0이 되도록 접종하여 48 시간 동안 배양하였다. Mouse 면역에 사용된 항원은 광견병바이러스가 감염된 배양 상층액을 Aaslestad와 Wiktor (1972)의 ammonium sulfate 방법을 이용하여 농축하고 정제하였다.

Mouse 면역

세포융합에 사용할 mouse는 4~5주령의 BALB/c strain을 사용하였으며 면역에 사용할 항원은 β -ethylencimine으로 불활화하여 정제된 바이러스를 사용하여 다음과 같이 접종하였다. 즉, 정제된 항원(50 μ g/ml)을 Coyle 등(1992)과 Orlik와 Altaner(1988)의 방법을 수정하여 mouse의 foot-pad에 3일 간격으로 4회 접종하였으며 1차는 Freund's complete adjuvant와

2차부터는 Freund's incomplete adjuvant와 혼합한 항원을 사용하였다.

항체 생산 및 양성 hybridoma 선별

광견병바이러스에 특이적인 항체생산을 위한 세포융합 방법은 다음과 같이 실험하였다. 광견병바이러스를 접종하여 면역된 mouse의 비장과 서혜림프절로부터 준비한 세포와 SP2/0 세포를 polyethylene glycol (PEG) 1500 (Roche Diagnostics GmbH, Germany)을 사용하여 일반적인 세포융합 방법(Kang 등, 1989; Kohler와 Milstein, 1975)에 따라 실험하였다. 세포융합이 끝난 혼합세포액은 20% FCS와 HAT (50µM hypoxanthine, 0.4µM aminopterin, 16µM thymidine)가 함유된 RPMI 1640 배지에 부유시킨 다음 96-well plate에 well당 100µl씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하고, 배양 후 3, 5, 7 및 9일에 새로운 배지로 교환하였다. 배지 교환 후 hybridoma 세포가 well의 30% 이상 증식하였을 때 간접형광항체법(IFA)을 이용하여 광견병바이러스 특이 hybridoma를 선별하였다.

단클론항체 특성규명

단클론항체의 isotype 확인

단클론항체의 isotype을 확인하기 위해 monoclonal antibody isotyping kit (Sigma)를 이용하여 제조사의 수식에 따라 실험하였다.

단백특이성 확인

생산된 단클론항체의 광견병바이러스 단백질특이성을 확인하기 위하여 Towbin 등(1985)의 방법에 따라 Western blotting법을 적용하였다.

단클론항체의 조직 내에서의 반응성 조사

생산된 단클론항체의 조직 내에서 반응성을 확인하

기 위해 광견병바이러스에 감염된 소의 뇌 조직을 이용하여 면역조직화학염색법(immunohistochemistry assay: IHC)을 다음과 같이 실시하였다. 즉, 감염된 조직을 10% neutral buffered formalin 용액으로 48시간 동안 고정시킨 후 일반적인 조직 처리과정을 거쳐 조직절편을 준비하였다. 조직절편은 0.5% 과산화수소가 함유된 methanol로 30분간 처리하여 조직 내의 peroxidase의 활성을 제거하고 5% normal goat serum으로 30분 간 처리하여 항체의 비특이적 결합을 제거하였다. 위와 같이 처리된 조직표본에 광견병 특이 단클론항체를 실온에서 30분 간 반응시킨 후 washing buffer로 5회 세척하였다. Biotinylated goat anti-mouse antibody (Vector laboratories, USA)로 30분간 반응시키고 5회 세척한 후 ABC reagent (Avidin DH-biotinylated horseradish peroxidase complex, Vector laboratories)를 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응시킨 표본은 5회 세척하고 발색액(0.6mg/ml DAB, 0.03% H₂O₂, 0.01M PBS, pH 7.2)으로 5~10분간 반응시킨 후 증류수로 세척하고 haematoxylin으로 대조 염색하였다.

Indirect fluorescent antibody (IFA) test

광견병바이러스 특이 단클론항체를 생산하는 양성 hybridoma 선별을 위해 다음과 같이 실험하였다. 광견병바이러스에 민감한 세포인 BHK-21 세포에 바이러스를 감염시켜 48시간 배양 후 80% 아세톤으로 고정시킨 plate에 hybridoma 배양 상층액 100µl를 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 반응 후, PBS로 3회 세척하고 fluorescein labeled goat anti-mouse IgG (H+L)(Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA)을 첨가하여 다시 30분 동안 같은 온도에서 반응시켰다. 30분 후 세포를 PBS로 세척하고 형광현미경으로 관찰하여 형광을 나타내는 well의 hybridoma를 광견병바이러스 특이 단클론항체 양성으로 판정하였다.

Table 1. Characteristics of monoclonal antibodies (MAbs) against rabies virus

MAb	Isotype	Protein specificity*	Western blot	FA	Neutralizing activity
2B9	G2a	?	-	+	-
3B4	G1	?	-	+	-
3F5	G2b	?	-	+	-
5B1	M	G	-	±	+
5C1	G1	G	-	±	+
5E7	G2b	?	-	+	-
5G3	G1	N	+	+	-
6H4	G1	N	+	+	-
7A9	G2b	?	-	+	-
7F7	G2b	?	-	+	-

*?: Not determined, G: Glycoprotein, N: Nucleoprotein

Fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) test

생산된 단클론항체의 중화반응성을 확인하기 위하여 FAVN 검사를 다음과 같이 실시하였다. 1:100으로 희석한 각각의 단클론항체에 동량의 광견병바이러스 (10^2 FFU/ml)를 섞어 37°C에서 1시간 반응 시킨 후 BHK-21 세포가 단층 배양되어 있는 96-well plate에 접종하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 80% acetone을 이용하여 배양세포를 고정하고 광견병바이러스에 특이적인 단클론항체와 fluorescein labeled goat anti-mouse IgG (H+L)을 이용하여 형광염색한 후 결과를 확인하였다.

결 과

단클론항체 생산

광견병바이러스로 면역시킨 mouse를 사용하여 세포 융합을 수행하여 10개의 광견병바이러스 특이 단클론항체를 생산하였다.

단클론항체 특성

생산된 단클론항체의 특성은 Table 1과 같다. 10개의 단클론항체 중 1개(5B1)의 isotype은 IgM, 4개(3B4, 5C1, 5G3, 6H4)는 IgG1, 1개(2B9)는 IgG2a 그리고 4개(3F5, 5E7, 7A9, 7F7)는 IgG2b로 확인되었다.

IFA 결과, 10개의 단클론항체 중 5B1과 5C1을 제외한 8개는 밝은 형광을 보이는 양성을 나타냈으나, 5B1

과 5C1은 다른 단클론항체와 비교하였을 때 약한 형광을 보였다(Fig. 1).

광견병바이러스 단백질과의 반응성을 확인하기 위하여 Western blotting 실험 결과, 5B1과 5C1은 단백질 특이성을 보이지 않은 반면, 5G3와 6H4는 N protein과 반응하여 50kDa 위치에서 특이적인 band를 보였다(Fig. 2).

광견병바이러스에 대한 중화능을 검사한 결과, 10개의 단클론항체 중 5B1과 5C1 2개에 대해 바이러스 중화능을 확인하였다.

단클론항체의 진단 활용성

생산된 단클론항체의 진단활용 가능성을 조사하기 위하여 광견병으로 진단된 소의 뇌간조직을 이용하여 면역조직화학염색법을 실시한 결과, 혈관주위에 림프구의 침윤부위가 관찰되었으며 연수(medulla oblongata)에 있는 신경세포의 세포질과 neutrophil에서 갈색의 양성반응이 나타나 단클론항체 6H4가 감염세포를 특이적으로 검출하는 것을 확인하였다(Fig. 3).

고 찰

광견병은 신경친화성 바이러스에 의해 발생하는 인수공통전염병으로 효과가 입증된 예방약이 있지만 예방 및 감염 후 치료에 대한 비용이 높아 매년 수많은 인명피해를 일으키고 있다(WHO, 1998). 국내에서는 감염 위험성이 있는 동물에 대한 광견병 예방접종 실시, 미끼예방약을 이용한 야생동물에 대한 예방접종 실시, 감염 위험지역의 혈청학적 감시를 통해 국가적

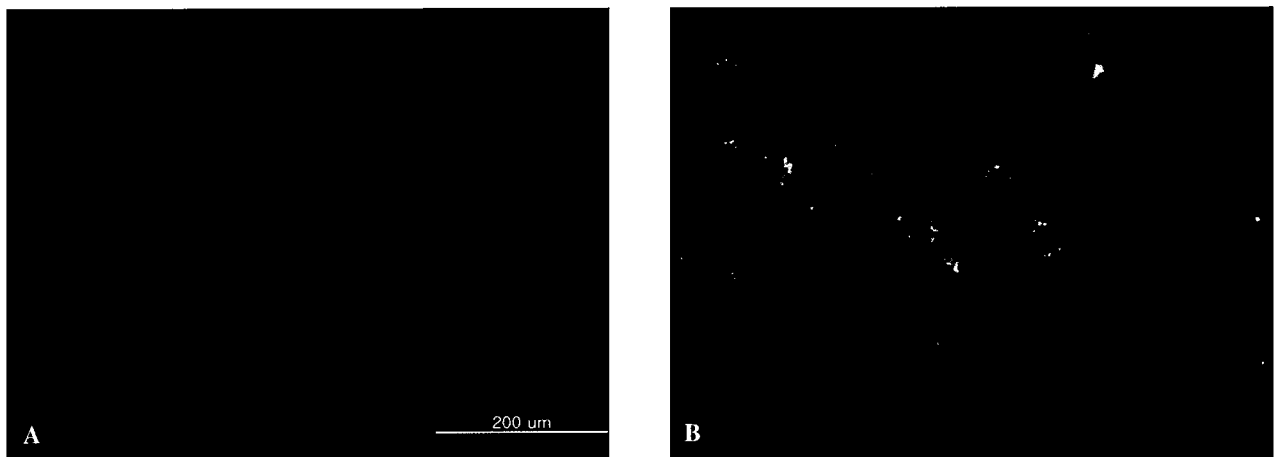


Fig. 1. Immunofluorescence of rabies virus-specific monoclonal anti-bodies (6H4). Mock-infected (A) and rabies virus-infected baby hamster kidney (BHK-21) cells were reacted with monoclonal antibodies (6H4).

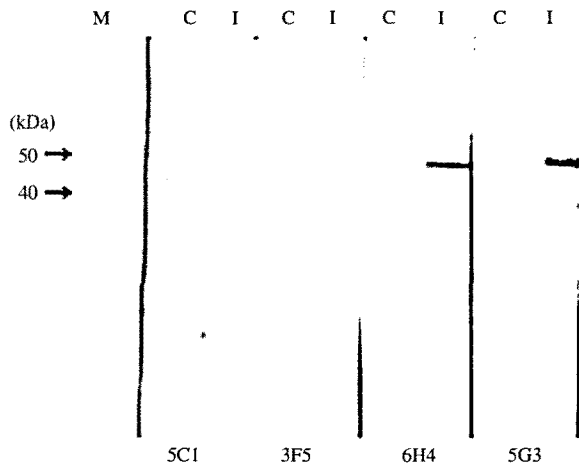


Fig. 2. Western blotting analysis of rabies virus-specific monoclonal antibodies. M: molecular weight marker, C: mock-infected cell lysates, I: rabies virus-infected cell lysates.

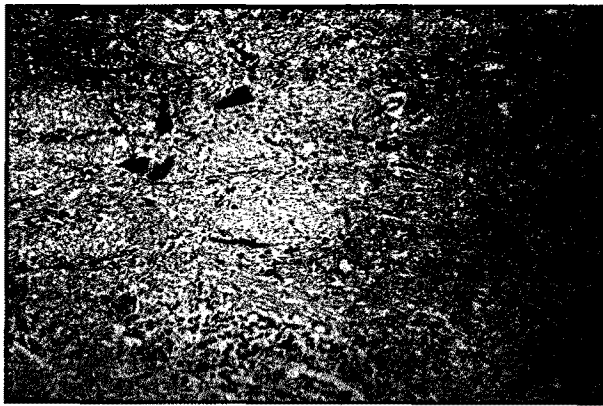


Fig. 3. Immunohistochemical staining of bovine brain infected with rabies virus. Bovine brain stem cells were reacted with rabies virus-specific monoclonal antibodies (6H4).

으로 광견병에 대한 방역을 실시하여 광견병의 발생빈도가 현저히 줄었지만, 그럼에도 불구하고 발생이 지속되고 있다. 광견병으로 인한 피해를 최소화하기 위해서 지속적인 방역정책의 실시가 필요할 것이다.

광견병 진단은 동물의 광견병 감염여부 확인을 위한 항원진단 또는 예방접종의 효능을 확인하기 위한 혈청학적인 항체진단을 통해 이루어진다. 이 과정을 위해 이용되는 간접형광항체법, 면역조직화학법 그리고 혈청학적 방법을 실시하기 위해서는 바이러스에 대한 단클론항체가 필수적이다. 이 연구에서는 광견병바이러스에 대한 특이적인 단클론항체를 생산하여 특성을 규명하고, 광견병의 진단에 있어서 이들 단클론항체의 활용성을 확인하였다.

이 연구에서 생산된 광견병바이러스에 특이적인 10개의 단클론항체(2B9, 3B4, 3F5, 5B1, 5C1, 5E7, 5G3, 6H4, 7A9, 7F7)는 형광의 밝음에서 약간의 차이는 있었으나 모두 광견병바이러스에 감염된 세포에서 양성으로 나타났다. 그러나 단백질특이성을 확인한 결과, 5G3와 6H4만이 N protein에 특이성을 보이고 나머지는 반응성을 보이지 않았다. 이는 이들 단클론항체에 의해 인지되는 epitope이 Western blotting을 위하여 바이러스 시료를 처리할 때 구조상의 변화를 초래하여 더 이상 단클론항체에 의하여 인지되지 못하기 때문으로 추정할 수 있다. 또한, 생산된 단클론항체의 바이러스에 대한 중화능을 조사한 결과, 5B1과 5C1이 광견병바이러스를 중화시킴을 확인하였다. 이것으로부터 5B1과 5C1은 광견병바이러스의 단백질 중 중화항체 생산을 유도하는 G protein에 대한 단클론항체인 것으로 추측할 수 있다(Cox 등, 1977). 그러나 몇몇 보고에 의하면 ribonucleoprotein (RNP)은 바이러스에 대한 특이항체를 유도하는 주요 항원으로 작용하여 RNP에 대한 항체가 감염에 대한 protection을 유도한다고 한다. 또한, N protein에 대한 항혈청을 처리한 동물이 광견병바이러스로 공격 접종하였을 때 감염되지 않았으며 *in vitro* 상에서 N protein에 대한 항혈청은 항바이러스 효과를 나타내었다고 보고되었다(Dietzschold 등, 1987; Lodmell 등, 1993). 이러한 연구에 따르면 5B1과 5C1은 N protein에 대한 단클론항체일 가능성도 있다. Western blotting 실험결과 음성으로 나타난 8개의 단클론항체(2B9, 3B4, 3F5, 5B1, 5C1, 5E7, 7A9, 7F7)는 본 연구에서 광견병바이러스 단백질특이성을 확인하지 못하였는데 중화능력이 없는 6개의 단클론항체(2B9, 3B4, 3F5, 5E7, 7A9, 7F7)는 광견병바이러스의 N protein이나 M protein에 특이적이거나 G protein에서 중화항체형성과 관계가 없는 epitope에 대한 항체로 추정할 수 있다. 이들 단클론항체의 단백질특이성을 보다 확실하게 확인하기 위하여 감염된 세포를 [³⁵S] cysteine이나 [³⁵S] methionine으로 표지한 후 immunoprecipitation 방법을 실시하면 어느 정도 확인이 가능할 것으로 사료된다.

이 연구에서 생산된 단클론항체의 진단활용 가능성을 알아보기 위하여 면역조직화학염색법을 적용하였다. 광견병에 감염이 확인된 생체조직이 있으면 이들을 동결절편으로 처리한 후 본 연구에서 생산한 단클론항체를 이용하여 간접형광항체법으로 확인할 계획이었으나 생체조직의 확보가 불가능하여 광견병으로

진단되어 포르말린으로 처리된 소의 뇌간 조직을 이용하여 면역조직화학염색법을 적용하였다. 면역조직화학염색 결과, 생산된 일부 단클론항체가 광견병바이러스 감염세포를 특이적으로 검출할 수 있었다. 이로써 생산된 단클론항체의 진단활용 가능성이 확인되었다. 또한, 생산된 두개의 단클론항체 5G3와 6H4는 N protein에 단백특이성을 보이고 5B1과 5C1은 G protein에 대한 단백특이성이 추정되어 이들 단클론항체들을 이용하여 특이 epitope과 중화관련 epitope의 규명을 실시하여 광견병바이러스의 항원구조분석에 이용이 가능할 것으로 보인다.

단클론항체를 이용한 광견병의 진단법을 실용화하고 민감도와 특이도를 높이기 위하여 국내에서 분리된 여러 가지 광견병바이러스와의 교차반응성 확인과 가검물에 대한 추가 적용실험이 필요할 것으로 사료된다.

결 론

광견병은 신경친화성의 광견병바이러스에 의해 발생하는 인수공통전염병으로 대부분의 포유동물에 발생하는 질병이다. 본 연구에서는 광견병바이러스에 특이적으로 반응하는 단클론항체를 생산하여 이들의 특성을 규명하고 진단활용 가능성에 대하여 실험하였다.

정제한 광견병바이러스로 면역시킨 mouse를 사용하여 일반적인 단클론항체 생산방법을 이용하여 세포융합을 실시하고 광견병바이러스에 특이적인 항체를 생산하는 hybridoma를 간접형광항체법을 이용하여 선발하였다. 생산된 10개의 단클론항체는 형광의 정도에 차이는 있었으나 간접형광항체법에서 양성으로 나타났으며, 단백특이성을 확인한 결과, 2개의 단클론항체가 N protein에 특이적으로 나타났다. 단클론항체의 중화반응성을 확인한 결과, 2개의 단클론항체가 광견병바이러스를 중화시킴을 확인하였다. 광견병에 감염된 소의 뇌간 조직을 사용하여 일부 단클론항체로 면역조직화학염색법을 수행한 결과, 생산된 단클론항체는 광견병바이러스 감염세포를 특이적으로 검출하였다.

이상의 결과로부터 이 연구에서 생산된 단클론항체들은 광견병의 진단에 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Aaslestad HG, Wiktor TJ. 1972. Recovery of protective activity in rabies virus vaccines concentrated and purified by four different methods. *Appl Microbiol* 24: 37-43.
- Badrane H, Tordo N. 2001. Host switching in lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *J Virol* 75: 8096-8104.
- Beran GW, Steele JH. 1994. *Handbook of Zoonoses, Section B*. CRC Press. Boca Raton: 307-308.
- Blancou J. 1988. Ecology and epidemiology of fox rabies. *Rev Infect Dis* 10: 606-609.
- Brochier B, Kieny MP, Costy F, Coppens P, Bauduin B, Lecocq JP, Languet B, Chappuis G, Desmetre P, Afiademanyo K, Libois R, Pastoret PP. 1991. Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine. *Nature* 354: 520-522.
- Coyle PV, Wyatt D, McCaughey C, O'Neill HJ. 1992. A simple standardised protocol for the production of monoclonal antibodies against viral and bacterial antigens. *J Immunol Methods* 153: 81-84.
- Cox JH, Dietzschold B, Schneider LG. 1977. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infect Immun* 16: 754-759.
- Dietzschold B, Wang HH, Rupprecht CE, Celis E, Tollis M, Ertl H, Heber-Katz E, Koprowski H. 1987. Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9165-9169.
- Hyun BH, Lee KK, Kim IJ, Lee KW, Park HJ, Lee OS, An SH, Lee JB. 2005. Molecular epidemiology of rabies virus isolates from South Korea. *Virus Res* 114: 113-125.
- Kang SY, Saif LJ, Miller KL. 1989. Reactivity of VP4-specific monoclonal antibodies to a serotype 4 porcine rotavirus with distinct serotypes of human (symptomatic and asymptomatic) and animal rotaviruses. *J Clin Microbiol* 27: 2744-2750.
- Kohler G, Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
- Lahaye X, Vidy A, Pomier C, Obiang L, Harper F, Gaudin Y, Blondel D. 2009. Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: Evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. *J Virol* 83: 7948-7958.
- Lee JH, Lee MJ, Lee JB, Kim JS, Bae CS, Lee WC. 2001. Review of canine rabies prevalence under two different vaccination programmes in Korea. *Vet Rec* 148: 511-512.
- Lodmell DL, Esposito JJ, Ewalt LC. 1993. Rabies virus anti-nucleoprotein antibody protects against rabies virus challenge in vivo and inhibits rabies virus replication

- in vitro*. J Virol 67: 6080-6086.
- Orlik O, Altaner C. 1988. Modification of hybridoma technology which improve the yield of monoclonal antibody producing cells. J Immunol Methods 115: 55-59.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1985. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76: 4350-4354.
- World Health Organization. 1998. World survey of rabies no. 32 for the year 1996. WHO document EMC/ZDI/98.4. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wunner WH, Larson JK, Dietzschold B, Smith CL. 1988. The molecular biology of rabies viruses. Rev Infect Dis 10: S771-S784.