

전자현미경 기법을 이용한 *Herpes simplex* 2형 바이러스 항원의 면역학적 분석

김천식¹ · 조명환^{2*}

서울아산병원 신경과, ²건국대학교 생명과학과

단순포진 바이러스 감염을 유발하는 *Herpes simplex* 2형 바이러스의 감염에 관여하는 항원들과 중화항체 생산을 유발하는 주요 항원들의 위치를 확인하였다. Vero cell에 감염하였을 때 48시간 동안 31, 43, 59, 69 kDa 바이러스 항원들이 지속적으로 발견되었으며, 감염된 쥐에서 생산한 항체와의 반응에서는 51 kDa 항원이 가장 강한 반응을 보였다. 면역전자현미경으로 위치를 확인한 결과 colloidal gold가 바이러스 표면에 발견되는 것으로 보아 이 항원이 바이러스 표면에 존재하고 있는 것으로 확인되었다. 형광현미경 분석은 이 항원들이 감염된 세포 내에서 전반적으로 발견되었고 특히 세포 표면에서 많이 발견되고 있었다.

Key words □ *Herpes simplex virus type 2*, immunodominant antigen, immunofluorescence, immunogold labelling, localization

*Herpes simplex virus type 2*는 α -herpesviridae에 속하며, α -herpesviridae는 β , γ -herpesviridae와는 달리 광범위하게 숙주 내에 감염되어 빠른 복제와 강력한 세포 파괴 능력을 가지고 전파되며, 흔히 발견할 수 있는 바이러스 감염 중 하나인 단순 포진 바이러스 감염을 일으킨다(22). HSV의 표면에는 여러 개의 당단백질이 존재하는데 이들은 숙주세포의 핵막에서 기원한다. 여기에는 gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM 등 11개의 당단백질이 있으며(8, 21, 27), 이 당단백질은 바이러스와 숙주세포의 흡착을 매개하여 바이러스가 세포막을 투과하도록 하고, 바이러스가 한 세포에서 다른 세포로 확산하는데 관여한다(3, 32). 그리고, 감염된 숙주세포 표면에 Fc와 보체계 수용체를 표현하도록 하여 체액성 면역반응, 보체계 매개 면역 반응, cytolytic T cell과 nature killer cell에 의한 세포매개 반응을 유도하기 때문에 HSV에 대한 면역반응이나 백신 개발에 있어서 주요 목표가 된다(4, 6). 이들 glycoprotein 중 몇 가지는 생물학적 특성이 알려졌다. gB, gH, gD는 바이러스 감염성에 있어서 주요 역할을 하며 gB는 바이러스의 감염력에 필요하며 HSV 감염시 항체를 강하게 중화하고(11, 14) 비리온의 외투막과 세포막을 융합하는 기능을 하는 것으로 보고되었다(11, 23). gD는 CD4⁺T 세포의 작용에 좋은 유도체이며 중화항체 생산을 유도하는 신경절에서 잠재 감염의 구축을 막으며 HSV의 gD에 대한 단클론 항체가 바이러스가 세포 안으로 투과되는 것을 막는다고 보고하고 있다(5, 15, 19, 24). gG의 경우 혈청학적으로 특이성을 가지고 있어 임상적으로 HSV-1과 HSV-2 사이에 항체 반응의 차이를 갖게 하며 HSV type 1과 HSV type 2를 구별하는 진단법에 사용되고

있다(29). gC는 보체의 C3b와 결합하고, gI와 gE는 IgC의 Fc receptor와 반응을 한다(1, 7).

HSV가 숙주세포에 감염하기 위해서는 gC에 의해서 숙주세포에 결합하여 숙주세포 표면에 바이러스 단편을 부착하고 gB, gD, gH, gL 등 4개의 당단백질에 의하여 바이러스의 nucleocapsid가 숙주세포의 세포질 안으로 들어가는 투과가 일어난다(14, 20). 이어서 바이러스의 DNA가 uncoating 되어 들어가게 된 후 HSV의 DNA의 합성이 일어난다(12, 25). HSV 표면에 있는 glycoprotein은 감염되어진 세포 표면의 주요 목표 항원들과 관계되어 있다(16). HSV의 1차 감염시 HSV의 증식과 유포를 제한하는 효과적인 면역 반응을 위해 요구되는 것은 바이러스 자손(viral progeny)에게 감염시키는 중요한 단계의 생산 과정 이전에 HSV에 감염되어진 세포를 인식하여 제거하는 것이다. 이러한 이유로 화학적 cross-linkers를 이용하여 HSV 당단백질의 중합체(oligomerization)가 연구되고, HSV 표면의 당단백질의 형태학적 특징을 나타내는 연구가 많은 전자 현미경을 통해서 광범위하게 실행되어지고 있다(13, 34, 35, 36).

본 연구의 목적은 HSV-2의 표면 항원들 중에서 체액성 면역 반응을 가장 강하게 일으킨 항원이 바이러스 어느 위치에 어떻게 분포하는지를 immunogold를 붙여서 투과 전자현미경 기법으로 관찰하여 가장 강하게 유발하는 항원의 위치를 규명하고 분석, 연구하는데 있다. 이 연구는 결과적으로 HSV-2의 백신 개발과 중화항체를 개발하는 기초가 되고자 한다.

재료 및 방법

세포 및 세포 배양

Vero 세포주(African green monkey kidney cell, ATCC CCL

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-450-3427, Fax: 02-3436-5432;
E-mail: mcho@konkuk.ac.kr

81)는 KCTC (Korean Collection for Type Cultures)에서 분양 받았다. 숙주세포 배양에 사용된 기본 배지는 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)을 사용하고 fetal bovine serum (FBS)를 5%를 첨가하여 37°C에서 배양하고 항생물질 용액을 첨가하였다.

바이러스의 증식 및 역가 측정

실험에 사용된 바이러스는 건국대학교 유전공학연구소에서 분양 받은 *Herpes simplex virus type 2 strain G* (ATCCVR-734, Rockvill, MD)을 사용하였다. 바이러스는 EMEM 배지에 2% FBS를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 증식 후 50% Tissue Culture Infection Dose (TCID₅₀)에 의해 바이러스의 역가를 측정하였다(18).

실험 동물 및 면역처리

6-8주 된 BALB/c 마우스를 암·수 구별 없이 한 그룹당 3마리씩 3 그룹에 각각 1 × 10⁷ virus/ml이 되도록 PBS(pH 7.4)로 희석하여 HSV-2형 바이러스 0.5 ml을 복강으로 주사하였고, 음성 대조군으로 PBS(pH 7.4) 0.5 ml을 복강 주사하여 면역 처리하였다.

SDS-PAGE를 이용한 항원 분석

SDS-PAGE는 Laemmli(9)의 방법을 따라 실시하였다. 단층으로 자란 Vero 세포를 PBS로 세척한 다음 5 ml의 PBS에 0.1~0.01 M.O.I (Multiplicity of Infection)가 되게 바이러스를 감염하여 HSV-2에 의해 감염된 Vero 세포를 cytopathic effect (CPE)가 완전히 끝날 때까지 배양하였으며, -70°C deep freezer에서 냉동과 해동을 3회 반복한 후 1,400 × g에서 20분간 원심 분리하여 가라앉은 pellet을 PBS 16 μl로 희석한 후 샘플을 만든 다음 5 × sample buffer를 1:4 (v/v) 비율로 희석하여 100°C에서 약 5분간 증탕한 후 SDS-PAGE를 위한 시료로 사용하였다. SDS-PAGE는 12%의 Separating gel과 5% stacking gel로 구성된 불연속 전기영동 시스템을 이용하여 120 Volt에서 전개하였다. 분자량 결정을 위해 사용된 standard marker (Bio-Rad, U.S.A.)는 rabbit skeletal muscle myosin (207 kDa), *E. coli* β-galactosidase (120 kDa), bovine serum albumin (92 kDa), ovalbumin (55 kDa), bovine carbonic anhydrase (35 kDa), soybean trypsin inhibitor (29 kDa), hen egg white lysozyme (21.7 kDa) 그리고 bovine pancreas apotinin (7.3 kDa)로 총 8개의 단백질로 구성되어 있다. 전개 후 gel을 Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma-Chemical Co., U.S.A.)로 30분간 염색하고 탈색용액 (methanol 100 ml, glacial acetic acid 100 ml, H₂O 800 ml)으로 30분씩 2번 탈색하여 Vero 세포에 감염된 HSV-2의 단백질 밴드와 위치를 확인하였다.

Western blotting에 의한 항원 분석

Immunoblot은 Towin(31)의 방법에 따라 Western blotting kit (NOVEX, Japan)를 사용하여 전기영동한 gel을 transfer buffer

(Trise base 1.93 g, glycine 9 g, H₂O 1l)로 250 mA에서 1시간 30분 동안 nitrocellulose paper (Hybridization transfer membranes, Hybond-C, Amersham, U.S.A.)에 전이시켰다. Standard marker가 전이된 nitrocellulose paper를 amido black 염색액 (Sigma Chemical Co., U.S.A.)으로 10분간 염색한 다음 탈색용액 (Isopropanol 25 ml, acetic acid 10 ml, H₂O 65 ml)으로 탈색하여 단백질 전이를 확인한 다음 Western blot을 진행하였다. 전이된 nitrocellulose paper를 3% BSA/TBS (Tris-Buffered Saline; 2 M Tris-HCL 5 ml, 4 M NaCl 37.5 ml, H₂O 957.5 ml) 용액이 들어 있는 용기에 넣어 상온에서 흔들면서 1시간 동안 반응시킨 후 TBS로 3회 세척하고 마우스에서 얻은 HSV-2에 대한 항체를 0.5% BSA/TBS에 1:200으로 희석하여 12시간 동안 흔들면서 반응시키고 다시 TBS로 3회 세척하였다. 0.5% BSA/TBS로 1:500으로 희석한 horse-radish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG+IgM+IgA (Jackson Immuno-Research Lab, Inc., West Grove, PA., U.S.A.) 2차 항체를 37°C에서 2시간 동안 흔들면서 반응시키고 TBS로 3회 세척한 뒤 발색시약 4-chloro-1-naphthol (Sigma Chemical Co., U.S.A.) 10 μl 30% H₂O₂를 넣어 발색과정을 계속 관찰하면서 발색이 나타나기 시작하면 증류수로 세척하여 반응을 종결시켰다.

간접면역형광현미경을 이용한 항원 관찰(Indirect Immunofluorescence Assay)

HSV-2형 바이러스에 감염시킨 Vero 세포가 봉입체를 형성하면 Trypsin-EDTA로 Vero 세포를 분리하여 2,000 × g 원심 분리하여 상층액은 버리고 가라앉은 pellet을 PBS로 희석하여 소독된 슬라이드 글라스 위에 도말 하고 37°C에서 30분 건조시킨 후 아세톤으로 15분 동안 고정하였다. 37°C 항온기에서 HSV-2에 대한 항체를 PBS에 1:100으로 희석하여 1시간 반응시킨 다음 PBS로 3분씩 3회 세척한 후 FITC (Fluorescein-Isothiocyanate)가 붙어 있는 goat anti-mouse IgG+IgM+IgA(Cappel, West Chester) 2차 항체를 PBS에 1:1,000으로 희석하여 슬라이드 글라스 위에 100 μl씩 분주하고 37°C 항온기에서 1시간 반응시켰다. PBS로 3분씩 3회 세척한 후 mounting buffer (PBS:glycerol=5:1)를 도말 부위에 1방울 떨어뜨리고 커버 글라스를 덮은 후에 기포를 완전히 제거하여 형광현미경(Olympus BH-2, Japan)으로 검경하였다.

면역전자현미경(Immunoelectron microscopy) 관찰을 위한 바이러스의 침전

냉동 보관된 HSV-2 감염 세포 부유물을 4°C에서 해동시킨 후 활성화시킨 Dialysis tube에 채운 후 PEG-6000(Shinyo Co., LTD. Japan)을 도포 하여 1/의 세포 배양 부유물이 5 ml이 될 때까지 농축시켰다. 탈수 반응이 끝난 후 튜브 외부에 H₂O로 세척한 후 한 쪽 조이개를 풀고 pipet으로 HSV-2 농축액을 수거하였다. TNE buffer (0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-HCL, 0.1 M EDTA)에 5%의 PEG (w/v)를 혼합한 후 음성 염색 (negative stain)을 위해서 탈수 (hydroextraction)를 통해서 농축시킨 HSV-2 바이러스를

혼합하여 4°C, 90분간 천천히 흔들어 준 후 2,700×g 원심 분리하였다. 상층액을 조심스럽게 버리고 가라앉은 pellet을 원 검체의 50배 가량의 TNF buffer로 부유시킨 후 -70°C에 보관하였다. Immunogold labelling을 위해서는 38 ml polyallomer ultra-tube에 HSV-2형 바이러스 stock 36 ml을 담고 Beckman SW28.1 rotor에 넣고 balance를 맞춘 다음 4°C, 20,000×g, 2시간 동안 ultracentrifuge (Kontron instrument, Italy)에서 원심 분리한 후 상층액을 조심스럽게 버린 다음 1 ml PBS를 이용하여 바이러스 침전물을 수거하였다.

음성 염색(Negative staining) 방법

음성 염색을 하기 위해서 준비해 둔 바이러스 검체를 drop-to-drop 방법으로 Grid film에 검체를 흡착시켰다(17). 탈수와 PEG 침전을 통해서 농축한 바이러스 10 μl을 parafilm 위에 한 방울 떨어뜨린 후, Formvar-Carbon coated 300-mesh nickle grid(Electron Microscopy Science, U.S.A.)를 바이러스 검체 위에 15분 동안 올려놓아 바이러스를 Grid에 흡착시켰다. Saline 1:PBS 1:1% acetate 1의 혼합액을 3% PTA (Phosphotungstic acid)와 동량 혼합하여 Grid 위에 한 방울 떨어뜨린 후 10분간 음성 염색을 실시하였다. 멸균증류수로 1분씩 5회 세척 후 건조시켰다. 건조된 검체 Grid를 transmission electron microscopy (Hitachi-7100, Japan)로 관찰하였다.

Immunogold labelling 방법

마우스에서 채혈한 1차 항체는 particles 손상에 의한 proteases나 보체의 비특이적인 반응을 피하기 위해서 약 56°C, 30분간 가열한 후, 4°C, 12,000×g에서 원심 분리하였다(2). Immunogold labelling은 10 nm gold particles이 혼합되어진 goat anti-mouse IgG+IgM을 사용하였다(Electron Microscopy Science, U.S.A.). gold-conjugated secondary antibody는 incubator buffer (0.5% bovine serum albumin, 0.1% gelatine, 20 mM sodium azide in PBS)에 20-100배 정도 희석하여 사용하였다. 바이러스 검체는 Formvar-Carbon coated 300-mesh nickle grid (Electron Microscopy Science, U.S.A.) 표면에 15분 정도 흡착시켰다. 바이러스가 흡착된 grid는 protein blocking solution을 사용하여 10분씩 5회 세척하였고 세척 후 HSV-2를 감염시킨 BALB/c에서 채취한 1차 항체(primary antiserum)를 1:50배 희석하여 grid 위에 한 방울 떨어뜨린 후 37°C, CO₂ 항온기에서 항온 시켰고, 세척 후 4% uranyl acetate staining으로 염색 후 멸균증류수로 1분씩 15회 세척하였다. 완전히 건조 후에 2차 염색인 lead citrate로 3분간 염색 후 멸균증류수로 1분씩 15회 세척하였다. 건조 후 transmission electron microscopy (Hitachi -7100, Japan)로 관찰하였다.

결과 및 고찰

TCID₅₀에 의한 Herpes simplex 2형 바이러스 역가 측정

Vero 세포에 바이러스가 침투한 후 세포파괴 현상(cytopathic

effect)이 나타날 때까지 위상차 현미경으로 매일 관찰하였다. 위상차 현미경상에서 2일 후 세포파괴 현상이 관찰되었고, 8일 후에 바이러스 역가를 측정하였다. 세포 배양액을 polyethylene glycol을 이용한 탈수작용(hydroextraction)과 ultracentrifugation을 실시하여 바이러스의 50% endpoint 역가를 측정된 결과 1×10⁹ virus/ml를 얻을 수 있었다.

SDS-PAGE에 의한 항원 분석

HSV-2 G strain이 감염된 Vero 세포에서는 감염 후 24시간 후에 발현 단백질 분자량을 측정된 결과 19 kDa과 161 kDa 사이에서 총 12개의 밴드가 관찰되었고, 48시간 후에 단백질 분자량을 측정된 결과 21 kDa과 171 kDa 사이에서 총 17개의 밴드를 관찰할 수 있었다. 31, 43, 59, 69 kDa의 분자량을 가진 항원들이 공통으로 나타났으며, 감염 48시간 후에 측정된 43, 59 kDa의 두 항원이 가장 두드러진 발현을 보였다(Fig. 1). 감염 후 48시간에 측정된 SDS-PAGE에서 훨씬 선명하고 진한 밴드를 확인할 수 있었다.

HSV-2 항원형에 대한 인식 항원 분석

2주 동안 면역 처리한 HSV-2형 바이러스 단백질에 대한 Western-blot의 결과 24, 41, 51, 58, 71, 133 kDa의 단백질 항원이 항체와 반응하였다. 그 중 51 kDa항원이 가장 강한 반응을 보였다(Fig. 2). HSV의 표면에는 여러 개의 당단백질이 존재하는데 이들은 숙주세포의 핵막에서 기원한다. 각각의 당단백질의 종류는 적어도 두 형태의 전구체 pgC, pgD, pgE가 존재하고 성숙한 형태의 당단백질은 gC, gD, gE가 되며 미성숙 형태보다 성숙한 형태가 더 큰 분자량을 가진다. 성숙한 형태의 gB, gC,

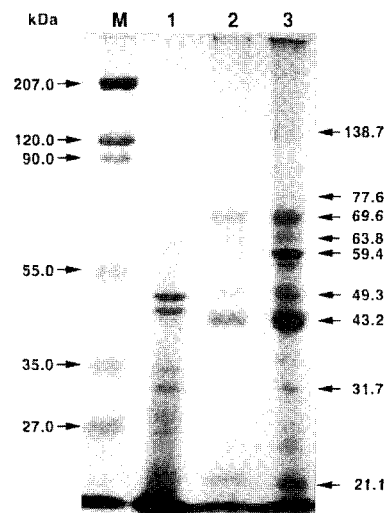


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of proteins produced by Vero cells infected with HSV-2. Coomassie brilliant blue R-250 stained 12.5% SDS-acrylamide gel slab shows antigens of Vero cell infected with HSV-2 and intact Vero cell. Lanes M, standard molecular markers; 1, intact Vero cell antigens; 2, HSV-2 infected Vero cell antigens at 24 hours post infection; 3, HSV-2 infected Vero cell antigens at 48 hours post infection.

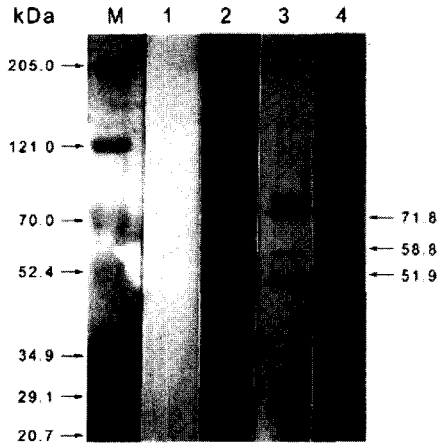


Fig. 2. Western blotting analysis of HSV-2 infected Vero cell antigens. After SDS-PAGE, antigens were transferred to nitrocellulose membrane, reacted with polyclonal HSV-2 antiserum diluted to 1:200 in 0.5% BSA/TBS solution and then reacted with horse-radish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG+IgM+IgA diluted to 1:500 in BSA/TBS solution. Lanes: M, standard molecular markers; 1, intact Vero cell antigens; 2, HSV-2 infected Vero cell antigens at 5 days post infection; 3, HSV-2 infected Vero cell antigens at 9 days post infection; 4, HSV-2 infected Vero cell antigens at 14 days post infection.

gD, gE의 분자량은 각각 120, 115-130, 59-65, 80 kDa의 분자량을 가지고 이들의 전구체는 110, 86-105, 51, 66 kDa의 분자량을 가진다(26, 28, 30, 33). 따라서 본 실험에서 SDS-PAGE 결과가 43 kDa와 59 kDa의 분자량을 가진 밴드가 진하게 반응하였으며, 성숙한 형태의 gD의 정상범위인 59-65 kDa 범위에 포함되는 것으로 보아 성숙한 gD 형태와 매우 밀접하게 나타났으며, HSV-2에 대한 항혈청으로 Western-blot에서는 51 kDa이 가장 진하게 발현하는 것으로 보아 이것은 비록 gD 범위보다는 약간 벗어난 분자량이지만, 그것은 면역반응을 가장 강하게 유발했으며 glycoprotein D와 관련이 있는 것으로 추정되어진다. SDS-PAGE 상에서는 43, 59 kDa의 단백질 분자량을 가진 밴드가 가장 진하게 발현되었으나 Western-blot에서는 51 kDa의 분자량을 가진 항원이 가장 강한 항체 반응을 보인것은, *in vivo* 상에서는 51 kDa의 분자량을 지닌 항원이 가장 강하게 항원 항체 결합을 하는 것을 보여 주었다. 이 분자량을 지닌 단백질이 HSV-2 백신 개발에 한 목표 단백질로 이용될 수 있을 것이다.

간접면역형광 항체법(Indirect Immunofluorescence Assay)

HSV-2형 바이러스에 대한 항체가 바이러스에 감염되어진 숙주 세포에 표현된 바이러스 항원을 인식하는지를 조사하기 위해서 간접 면역형광 항체 법을 시행하였다. HSV-2에 감염된 Vero 세포가 원형의 봉입체를 형성한 숙주세포를 검체로 하여 항체를 반응시킨 결과 Vero 세포의 표면에 원형의 형광 반응을 나타내었다(Fig. 3).

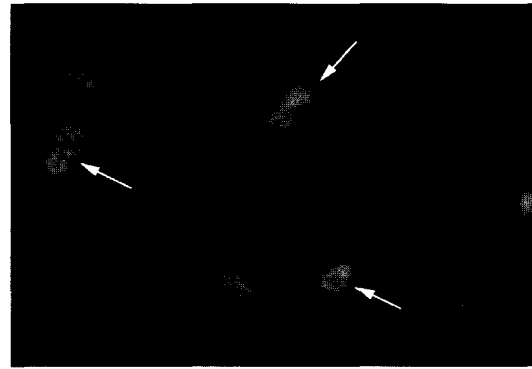


Fig. 3. Immunofluorescence of HSV-2 infected Vero cell. Vero cells infected with HSV-2 were placed on a slide and incubated for 1 hours. Infected cells were fixed with cold acetone, and then immunostained with mouse polyclonal HSV-2 antiserum and fluorescein isothiocyanate-conjugated goat IgG+IgA+IgM anti-mouse immuno-globulins. White arrows indicate the strong immunofluorescence on the periphery of the Vero cell membrane (× 400).

면역전자현미경을 이용한 HSV-2형 바이러스 항원 분석

면역전자 현미경상에서 HSV-2의 음성염색에서는 nucleocapsid와 외투막을 확실하게 구별할 수 있었고 외투막에서는 두·세 군데 돌출된 모양을 확인할 수 있었지만 spike는 확인할 수 없었다(Fig. 4). HSV-2형을 감염시킨 마우스로부터 채취한 polyclonal anti-HSV-2의 혈청을 37°C에서 1시간 항온 시킨 후 그 위에 anti-mouse IgG+IgM과 10 nm의 금 입자가 표지된 2차 항체를 1시간 항온 하여 전자 현미경으로 관찰한 결과 바이러스의 nucleocapsid와 2중막의 외투막이 뚜렷하게 구분되어 있는 것을 볼 수 있었다. 외투막 곳곳에 tegument을 확인할 수 있었고, colloidal gold 입자가 표면에 반응한 것으로 보아 항체 반응을 유발하는 항원들이 바이러스 표면에 위치하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 어떤 곳은 3-5개의 금이 모여 있는 것을 볼 수 있었고(Fig. 5a, 5b), Fig. 5c, 5d에서는 외투막이 터져서 출아 모양을

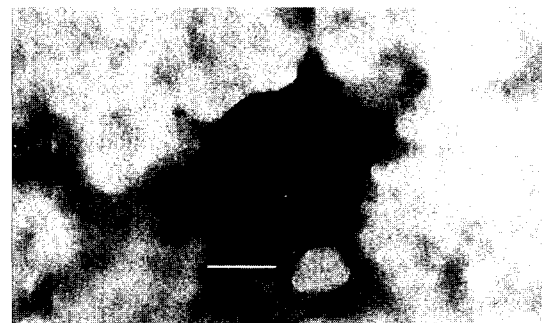


Fig. 4. Transmission Electron Microscopy of negatively stained HSV-2 virions. Double membranes enclose amorphous and capsid. Fused virions shared their envelopes and teguments. Samples were prepared by virus concentration, mounted on a Formvar-carbon coated nickel grid through drop-to-drop method, and then negatively stained with 3% phosphotungstic acid (× 70,000). Bar represents 150 nm.

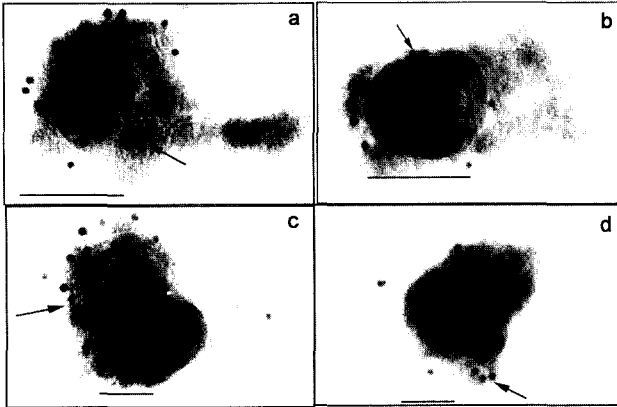


Fig. 5. Detection of immunodominant antigens on HSV-2 virions by immunogold labeling. Immunodominant antigens on HSV-2 virions were labelled with mouse derived anti-HSV-2 polyclonal antibodies which were subsequently labelled with anti-mouse IgG + IgM complexed with 10 nm gold particles. Primary antibodies were diluted 50-fold and secondary antibodies were diluted 20-fold with incubation buffer (Fig. a to d). Gold particles appear to bind to the surface, ascertaining that the immunodominant antigens are localized on the surface on the HSV-2. Black arrows indicate the clustered antigens of HSV-2 ($\times 70,000$). Bar represents 150 nm.

하는 바이러스를 관찰할 수 있었으며 이 곳에서도 외투막이 빠져 나온 부분에 금 입자가 붙어 있는 것을 볼 수 있었다. Colloidal gold가 HSV-2 외투막에서 많이 발견되는 것은 항체생산을 가장 강하게 유발하는 51 kDa 항원이 바이러스 표면에 위치하고 있는 것을 확인시켜 주었다.

이 연구는 면역전자현미경 기법으로 HSV-2 감염에서 항체생산을 유발하는 주요 항원의 위치를 확인해 주었으며, 향후 백신 개발을 위한 한 목표 항원을 제시하였다는데 의의가 있다고 사려된다.

참고문헌

- Cai, W. H. and S. Person. 1988. Role of glycoprotein B of *Herpes simplex* virus type 1 in viral entry and cell fusion. *J. Virol.* 62, 2596-2604.
- Dopping-Hepenstal, P. J. and J. E. Beesley. 1993. Gold labelling in negative stain immune electron microscopy. pp.71-88. In Hyatt, A. D. and B. T. Eaton(eds.), *Immuno-gold electron microscopy in virus diagnosis and research.* Florida, CRC Press.
- Dubin, G., N. O. Fishman, R. J. Finsenber, G. H. Cohen, and M. Friedman. 1992. The role of *Herpes simplex* virus glycoproteins in immune evasion. In Rouse(ed), B. T. *Herpes simplex* virus. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 111-118.
- Forrester, B., H. Farrell, G. Wilkinson, J. Kaye, N. Davis-Poynter, and T. Minson. 1992. Construction and properties of a mutant *Herpes simplex* virus type 1 with glycoprotein gH coding sequences deleted. *J. Virol.* 66, 341-348.
- Geraghty, R. J., C. R. Jogger, and P. G. Spear. 2000. Cellular expression of alphaherpesvirus gD interferences with entry of homologous and heterologous alphaherpesviruses by blocking access to a shared gD receptor. *J. Virol.* 268, 147-158.
- Helle, L. J. and B. Norrild. 2000. The effects of cell passages on the cell morphology and the outcome of *Herpes simplex* virus type 1 infection. *J. Virol. Methods* 84, 139-152.
- Hung, S. L., C. Peng, H. M. Friedman, J. D. Lambris, R. J. Eisenberg, and G. H. Cohen. 1994. The interaction of gC of *Herpes simplex* virus types 1 and 2 with the alternative complement pathway. *J. Virol.* 203, 299-312.
- Hutchinson, L., H. Browne, V. Wargent, N. Davis-Poynter, S. Primorac, K. Goldsmith, A. Minson, and D. C. Johnson. 1992. A novel *Herpes simplex* virus glycoprotein, gL, form a complex with glycoprotein H (gH) and affects normal folding and surface expression of gH. *J. Virol.* 6, 2240-2250.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Langenberg, A. G., R. L. Burke, and S. F. Adair. 1995. A recombinant glycoprotein vaccine for *Herpes simplex* virus type 2: safety and immunogenicity. *Ann. Int. Med.* 123, 889-898.
- Little, S. P., J. T. Jofre, R. J. Courtney, and Schaffer. P. A. 1981. A virion-associated glycoprotein essential for infectivity of *Herpes simplex* virus type 1. *J. Virol.* 115, 149-158.
- Lycke, E., K. Kristensson, B. Svennerholm, A. Vahine, and R. Ziegler. 1984. Uptake and transport of *Herpes simplex* virus in neurites of rat dorsal root ganglia cells in culture. *J. Gen. Virol.* 65, 55-64.
- Morgan, C., H. M. Rose, M. Holden, and E. P. Jones. 1959. Electron microscopy observation on the development of *Herpes simplex* virus. *J. Exp. Med.* 110, 1148-1150.
- Muggeridge, M. 2000. Characterization of cell-cell fusion mediated by *Herpes simplex* virus 2 glycoproteins gB, gD, gH, and gL in transfected cells. *J. Gen. Virol.* 81, 2017-2027.
- Nicola, A. V., M. Pomce de Leon, R. Xu, W. Hou, J. C. Whitbeck, C. Krummenacher, R. I. Montgomery, P. G. Spear, R. J. Eisenberg, and G. H. Cohen. 1998. Monoclonal antibodies to distinct sites on *Herpes simplex* virus glycoprotein D block *Herpes simplex* virus binding to HVEM. *J. Virol.* 72, 3595-3601.
- Norrild, B. 1985. Humoral response to *Herpes simplex* virus infection. In Roizman, B. and C. Loupez, (eds.). *The Herpesviruses.* New York: Plenum Press P69-86.
- Palmer, E. L. and M. L. Martin. 1993. Immune complexing, pp.3-24. In Hyatt, A. D. and B. T. Eaton. (eds.). *Immunogold Electron Microscopy in virus Diagnosis and Research.* Florida, CRC Press.
- Payment, P. and M. Trudel. 1993. Methods and Techniques in Virology. Marcel Dekker, Inc. New York, U.S.A.
- Pertel, P. E. and P. G. Spear. 1997. Partial resistance to gD-mediated interference conferred by mutations affecting *Herpes simplex* virus type 1 gC and gK. *J. Virol.* 71, 8024-8028.
- Pertel, P. E., A. Fridberg, M. L. Parish, and P. G. Spear. 2001. Cell fusion induced by *Herpes simplex* virus Glycoproteins gB, gD, and gH-gL requires a gD receptor but not necessarily Heparan Sulfate. *J. Virol.* 279, 313-324.
- Ramaswamy, R., T. C. Holland. 1992. In vitro characterization of the HSV-1 UL53 gene product. *Virology* 186, 579-587.
- Roizman, B. 1990. Herpesviridae: A brief introduction. In Fields, B. N. and D. H. Kinipe. (eds.). *Virology 2nd, New York: Raven Press.* P1789-1791
- Sarmiento, M., M. Chaffey, and P. G. Spear. 1979. Membrane proteins specified by *Herpes simplex* viruses. III. Role of glycoprotein VP7(B₂) in virion infectivity. *J. Virol.* 29, 1149-1158.

24. Schmidt, J., B. G. Klupp, A. Karger, and T. C. Mettenleiter. 1997. Adaptability in Herpes viruses: Glycoprotein D-independent infectivity of pseudorabies virus. *J. Virol.* 71, 17-24.
25. Schwartz, J. and Roizman, B. 1969. Similarities and differences in the development of laboratory strains of *Herpes simplex* virus in HEp-2 cells : electron microscopy. *J. Virol.* 4, 879-889.
26. Spear, P. G. 1976. Membrane proteins specified by *Herpes simplex* viruses. Identification of four glycoprotein precursors and their products in type 1 infected cells. *J. Virol.* 17, 991-1008.
27. Spear, P. G. 1985. Glycoproteins specified by *Herpes simplex* viruses. In Roizman, B. (ed.). The herpes viruses. Vol. 3. New York: Plenum Press. 315-356.
28. Stanley, P., C. S. Warner, D. J. Bzik, C. Debroy, and B. A. Fox. 1985. Expression in bacteria of gB-glycoprotein-coding sequences of *Herpes simplex* virus type 2. *Gene.* 35, 279-287.
29. Sullender, W. M., L. L. Yasukawa, and M. Schwartz. 1988. Type-specific antibodies to *Herpes simplex* virus type 2 (HSV-2) glycoprotein G in pregnant women, infants exposed to maternal HSV-2 infection at delivery and infants with neonatal herpes. *J. Infect. Dis.* 157, 164-171.
30. Tal-singer, R., C. Peng, D. L. Ponce, W. E. Abrams, B. W. Banfield, F. Tufaro, G. H. Cohen, and R. J. Eisenberg. 1995. Interaction of *Herpes simplex* virus glycoprotein gC with mammalian cell surface molecular. *J. Virol.* 69, 4471-4483.
31. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc. Natl. Accad. Sci. U.S.A.* 76, 4350-4354.
32. Warner, M. S., R. J. Geraghty, W. M. Martinez, R. I. Montgomery, J. C. Whitbeck, R. J. Eisenberg, G. H. Cohen, and P. G. Spear. 1998. A cell surface protein with herpesvirus entry activity (Hve B) confers susceptibility to infection by mutants of *Herpes simplex* virus type 1, *Herpes simplex* virus type 2 and pseudorabies virus. *Virology* 246, 179-189.
33. Whitbeck, J. C., S. A. Connolly, S. H. Willis, W. Hou, C. Krummenacher, M. P. de-Leon, H. Lou, I. Bariband, R. J. Eisenberg, and G. H. Cohen. 2001. Localization of the gD-binding region of the human *Herpes simplex* virus receptor HveA. *J. Virol.* 75, 171-180.
34. Wildy, P. and D. H. Watso. 1963. Electron microscopic studies on the architecture of animal viruses. *Cold Spring Harbar Symp. Quant. Biol.* 27, 25-47.
35. Yoshida, M., F. Uno, and S. Nii. 1986 High voltage electron microscopy of whole cells infected with *Herpes simplex* virus type 1. *J. Electron Microsc.* 35, 47-59.
36. Yust, C. S., C. S. Morgan, and H. R. Gaddis. 1969. Transmission electron microscopy of polycrystalline graphite. *Metals and Ceramics Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tenn, U. S. A.*

(Received February 10, 2004/Accepted March 10, 2004)

ABSTRACT : Immunoelectron Microscopic Localization and Analysis of *Herpes simplex* Virus Type 2 Antigens

Cheon-Sik Kim¹ and Myung-Hwan Cho^{2*} (¹Department of Clinical Neuroscience, Asan Medical Center, Seoul 138-736, Korea, ²Department of Life Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea)

Antigenic analysis of *Herpes simplex* type 2 virus was performed and its major antigen was localized using an immunoelectron microscopy. Antigens of 32, 43, 59, and 69 kDa were constantly expressed during the course of infection for 48 hr in the infected Vero cell. An antigen of 51 kDa was turned out to be the major one in inducing an immune response in Western-blot analysis. The 51 kDa antigen was localized on the surface of HSV-2 by immunoelectron microscopy using colloidal golds and anti-HSV 2 polyclonal antibody. Immunofluorescence assay indicated that viral antigens were found throughout the infected cell and, especially, on the surface of the cell.