

Pseudorabies virus의 gp50과 gp63 유전자 클로닝에 관한 연구

권창희 · 송재영 · 김병한 · 이중복 · 이재진 · 안수환 · 이영순* · Susumu Maeda**

농촌진흥청 가축위생연구소

서울대학교 수의과대학*

미국 캘리포니아 데이비스 주립대학교**

(1991. 4. 23 접수)

Studies on the cloning gp 50 and gp63 genes of Pseudorabies virus(Shope strain)

Chang-hee Kweon, Soo-hwan An, Jae-young Song, Byoung-han Kim, Jung-bok Lee,

Jae-chin Lee, Yong-soon Lee*, Susumu Maeda**

Veterinary Research Institute

*Seoul National University**

*University of California, Davis, U.S.A.***

(Received Apr 23)

Abstract: The DNA fragment representing for Pseudorabies gp50 and gp60(Shope) was cloned by recombinant techniques. The viral DNA was extracted from the infected cells and digested with Bam HI. The 6.8 Kb of Bam HI fragment was isolated from agarose gel and further digested with Nde I followed by Klenow treatment. The blunt ended 4.9Kb fragment was cloned into pTZ18R plasmid vector. The upstream region of gp50 was further manipulated to remove its 5' promoter region and create EcoRI site for possible eukaryotic expression system. The result of partial sequencing of cloned DNA indicated that Shope strain showed 95% homology with gp50 of Rice strain.

Key Words: Pseudorabies virus, Shope strain, gp50 and gp63.

서 론

Pseudorabies(PrV), 일명 오제스키병은 1902년 헝가리의 Aujeszky씨에 의해서 공식 보고된 이후 세계의 각국에서 이 질병의 발생이 확인되었다.¹⁻³

PrV는 허피스바이러스(herpesvirus)의 일종으로서 한쌍의 DNA 유전인자로 구성된 핵산구조를 갖고 있으며 그 크기는 약 150Kb이고, 비중은 1.278g/cm³로 보고되어 있다.⁴⁻⁷

PrV의 genome은 비교적 짧은 반복되는 유전자(inverted complementary repeats)에 의하여 둘러싸인 상대적으로 짧은 특이 유전자(short unique component)

와 비교적 큰 특이 유전자(long unique component)로 구성되어 있다.⁸

현재까지 PrV의 당단백질에 대한 유전인자의 연구는 당단백질에 대응하는 유전자의 클로닝 및 이의 실험실내 발현에 주력하였으며 Rea 등⁹은 gX에 해당하는 유전자를, Mettendeiter 등¹⁰은 gII 복합체, Petrovskis 등¹¹은 gp50, gp63 및 gI, Robbins 등¹²은 gB, Wathen 등¹³은 gIII에 대응하는 유전자의 클로닝을 자기 보고하였다.

PrV 유전자 중 gp50, gp63 및 gI에 대응하는 유전자는 두 반복되는 반전유전인자(inverted repeat) 사이에 위치하는 6.8Kb에 해당하는 BamHI fragment에 존재하는 것으로 규명되어 있다.¹⁴

재료 및 방법

PrV의 당단백질의 제반 성상 및 기능은 아직도 활발한 연구의 대상으로서 Petrovskis 등¹⁴은 백신으로 사용되는 Bartha strain의 mast cell 연구결과 gp63과 gI 유전자가 자연적으로 일부분 소실되어 병원성이 저하되었음을 보고하였으며, Robbins 등¹⁵은 gIII의 유전자가 이 바이러스의 세포내 증식에 필수불가결하지는 않다고 하였다.

현재까지 PrV의 예방은 사독이나 혹은 순화 바이러스를 이용한 백신접종이 주가 되고 있으나 다른 herpesvirus와 같이 잠복성 감염이 가능한 까닭에 이 질병의 완전 퇴치에는 많은 어려움이 있다.^{16,17}

Mettenleiter 등¹⁸은 gI 및 gp63을 제거한 변이주의 경우 닭이나 자돈과 같은 실험동물에 접종시 병원성의 저하를 보고하였고, Petrovskis 등¹¹은 PrV의 gp50이 herpes simplex virus(HSV)의 당단백질인 gD와 유사함을 보고하였으며, Kost 등¹⁹ 이와함께 클로닝한 당단백질에 대한 유전자를 재조합한 후 이를 vaccinia virus에 삽입하여 발현시킨 다음 subunit백신으로서 활용한 바 그 방어능력을 보고한 바 있다.

이 연구는 유전자 재조합을 이용한 정제백신의 개발을 목적으로 PrV 항원 gp50 및 gp63에 대한 유전자를 클로닝하고 이를 분석하여 확인실험을 실시하였다.

PrV로 부터 DNA 추출 : PrV의 DNA 추출은 Nishimori 등²⁰의 방법을 이용하였으며 PrV가 감염된 세포를 수확하여 TBS (10mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.4)로 세척 원심한 후 0.6% SDS와 proteinase K (100 μ g/ml)를 첨가하여 37°C에서 2시간동안 방치하였다. 이후 동량의 phenol 및 chloroform을 사용하여 protein 성분을 제거하였으며, 0.3M sodium acetate와 2.5 volume의 ethanol을 이용 DNA 및 RNA 성분을 침전시켰다.²¹ 이와 같이 침전시킨 침전물에 RNase (10 μ g/ml)를 첨가하여 37°C에서 1시간 처리하여 RNA 성분을 제거시킨 후 건조하였던 바와 같이 ethanol과 sodium acetate를 첨가하여 -20°C에서 12~16시간 동안 방치한 후 원심하였다. 이후 침전된 DNA 성분을 건조시키고 TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)로 용해시킨 후 실험에 사용하였다.

PrV의 gp50 및 gp63에 대응하는 glycoprotein DNA의 클로닝 : Kost 등¹⁹, Petrovskis 등¹¹이 보고한 Indiana주와 Rice주에 대한 glycoprotein 유전자의 제한 효소지도를 참고로 하였다(Fig 1).

즉 PrV의 DNA를 Bam HI으로 절단한 후 0.6% agarose gel에서 전기영동하여 6.8Kb에 상당하는 DNA

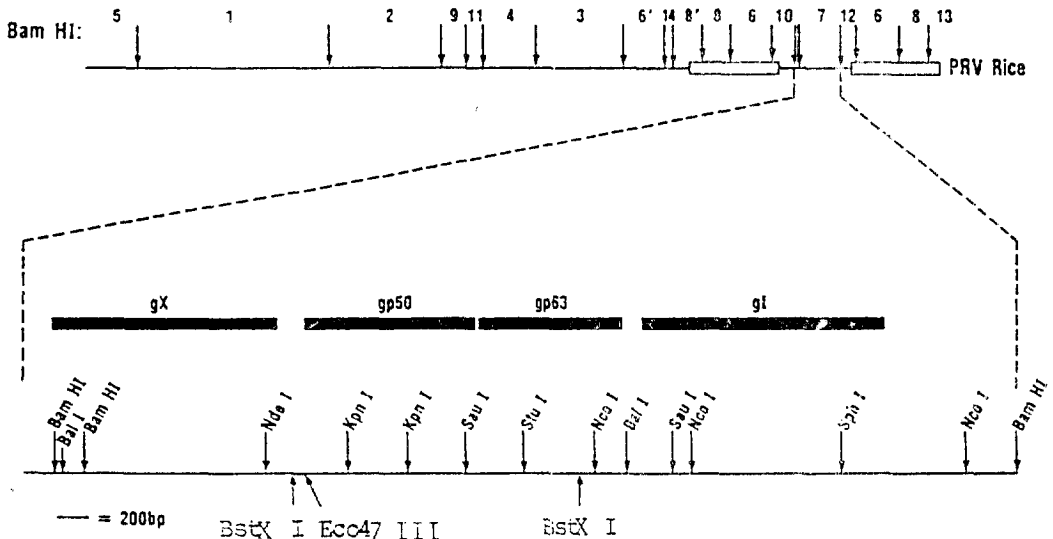


Fig 1. Restriction enzyme cleavage sites in the cluster of glycoprotein genes in the small unique part of the genome. At the top, the BamHI cleavage sites in PrV Rice are shown (Rea et al. 1985), with the inverted repeats of the genome indicated by boxes. The expanded map shows the position of the four glycoprotein genes relative to various restriction enzyme cleavage sites (Petrovskis et al. 1986; Kost et al. 1989). bp: Base pair.

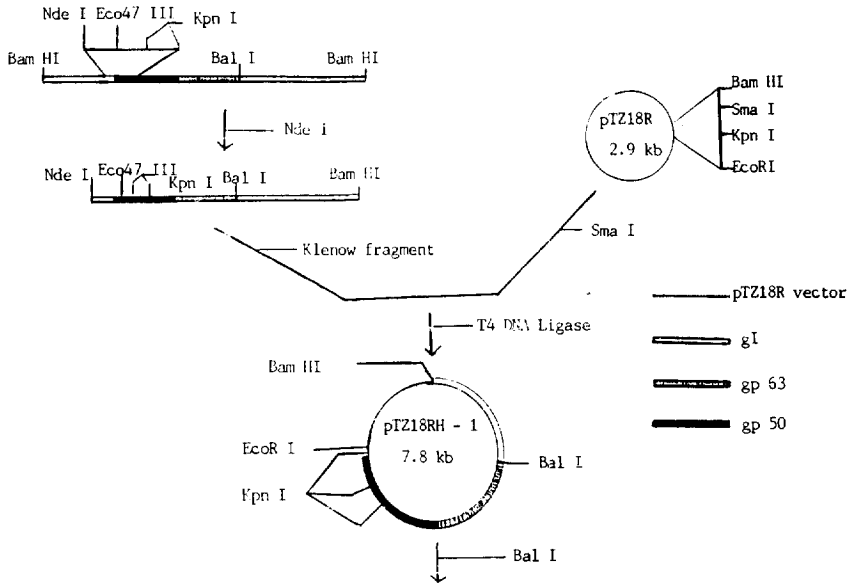


Fig 2. Cloning procedures of gp50 and gp63 DNA from Pseudorabies virus (continued).

fragment를 분리하여 Fig 2에서와 같은 과정을 거쳐 gp50 및 gp63 유전자의 재조합 clone을 작성하였다. 즉 6.8Kb에 해당하는 Bam HI DNA fragment를 다시 Nde I 효소로 처리하였으며, 처리된 뒤에 나타나는 4.9Kb 상당의 DNA fragment를 Klenow 효소와 Sma I 효소로 처리하여 pTZ 18R vector와 T4 DNA ligase 로 재조합 하였다. 이후 transformant로부터 Maniatis 등²¹의 miniprepARATION 방법에 준하여 재조합 plasmid를 확인하였다.

재조합 plasmid내에 존재하는 Bal I 제한 효소 부위의 DNA를 BamH I과 Bal I으로 처리한 후 다시 재결합 시켰다. 이와같이 재조합된 DNA를 다시 Eco47 III와 EcoR I으로 처리한 후 합성 oligonucleotide를 이용하여 재조합된 plasmid를 작성하였다. 시험에 사용된 제한효소 및 Klenow fragment, DNA ligase 등의 모든 시약은 BRL 제품을 사용하였으며, cloning vector 로서는 pTZ 18R(Pharmacia 제품)를 사용하였다. 또한 oligonucleotide는 Protein Structure Lab (UC. Davis)에서 구입하였으며 transformation은 E. coli JM 101주를 host cells로서 사용하였다.

PrV DNA의 sequencing: DNA sequencing은 Sanger 등²²이 보고한 dideoxynucleotide를 이용한 chain termination 방법에 준하였으며 template로서는 pTZ 18R에 삽입된 double strand DNA를 이용하였다. 즉 Maniatis 등²¹의 방법에 의하여 분리된 plasmid에 0.2M 의 NaOH를 첨가하여 80°C에서 5분간 denaturing 시

킨뒤에 0.4배의 5M ammonium acetate (pH 7.5)를 첨가하여 중화시킨 후 2배의 ethanol을 이용 침전하였다. 침전한 DNA는 sequencing primer와 1:1로 배합하여 65°C에서 37°C로 방치한 후 [α -³⁵S]d ATP와 DNA sequencing kit를 이용하였다. labeling이 끝난 합성 template는 90°C에서 2분 동안 배양하여 denaturing시킨 후 5% sequencing gel에서 2,200V로 6~12시간 동안 전기영동하여 염기서열을 판독하였다. DNA sequencing에서 사용되는 제한 시약 및 과정은 USB의 sequencing kit 및 방법에 준하여 실시하였으며, DNA sequence의 분석은 DNASIS program (Hitachi)을 이용하였다.

결 과

PrV Shope 주의 gp50 및 gp63 유전자 클론링 : PrV의 Shope주가 감염증식한 세포로부터 PrV의 DNA를 분리정제한 다음 Bam HI site에서 절단하여 6.8Kb 크기의 유전자를 추출정제 하였다. 추출한 6.8Kb DNA를 다시 Nde I으로 절단한 뒤 4.9Kb의 DNA를 Klenow fragment로 처리하여 blunt end로 유도한 다음 pTZ 18R (Vector 2.9Kb)에 재결합시켜 transformation한 결과 1주의 transformant (pTZ 18RH-1)를 얻었다. 추출된 plasmid vector내 gp50의 유전자 삽입방향을 확인하기 위하여 Kpn I으로 절단하였던 바 6.0Kb, 600bp 및 400bp의 DNA fragment가 관찰되었고 EcoR

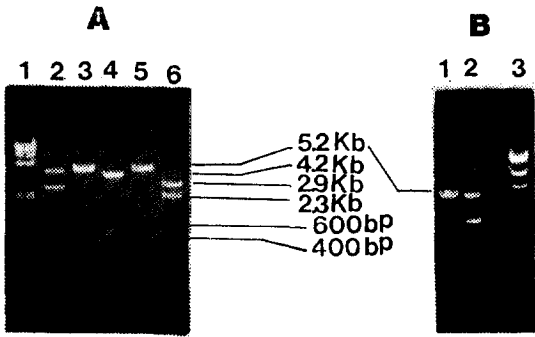


Fig 5. Cleavage patterns of patterns of plasmids in pTZ 18RH-2 digested with restriction endonucleases by agarose gel electrophoresis.
 A Lane 1: λ DNA/Hind III.
 Lane 2: pTZ 18RH-2 plasmid.
 Lane 3: pTZ 18RH-2 plasmid/EcoR I.
 Lane 4: pTZ 18RH-2 plasmid/Kpn I.
 Lane 5: pTZ 18RH-2 plasmid/Bam HI.
 Lane 6: pTZ 18RH-2 plasmid/Bst XI.
 B Lane 1: pTZ 18RH-2 plasmid/Eco 47 III.
 Lane 2: pTZ 18RH-2 plasmid.
 Lane 3: λ DNA/Hind III.

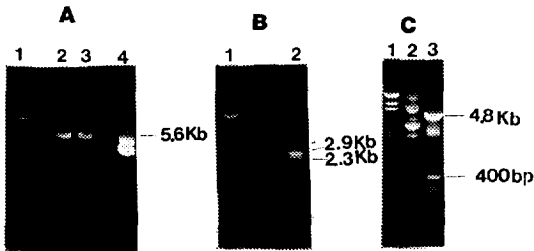


Fig 6. Cleavage pattern of plasmids in subcloned pTZ HP-1 digested with restriction endonucleases by agarose gel electrophoresis.
 A Lane 1: λ DNA/Hind III.
 Lane 2: Subcloned pTZ HP-1 plasmid/EcoR I.
 Lane 3: Subcloned pTZ HP-1 plasmid/Eco 47 III.
 Lane 4: Subcloned pTZ HP-1 plasmid (undigested).
 B Lane 1: λ DNA/Hind III.
 Lane 2: Subcloned pTZ H-1 plasmid/EcoR I+Bam HI.
 C Lane 1: λ DNA/Hind III.
 Lane 2: Subcloned pTZ H-1(undrgested).
 Lane 3: Subcloned pTZ H-1/Kpn I.

DNA fragments를 관찰할 수 있었으나 Bst XI으로 처리했을 때는 2.9Kb와 2.3Kb에 해당하는 두개의 DNA

fragment를 나타내어 Kost 등¹⁰의 gp50 및 gp63에 대한 제한 효소 지도와 일치하였다.

또한 작성된 pTZ 18RH-2 plasmid내 EcoR I site부터 Eco 47 III site까지 약 200bp에 해당하는 gp50의 비합성 5' prime 염기배열과 gp50의 첫합성 부위에서부터 14번째에 해당되는 염기배열 부위까지를 EcoR I과 Eco 47 III로 처리하여 제거하고, 다시 gp50당 단백질항원의 첫발현부위인 ATG로부터 Eco47 III 부위까지의 염기서열을 인공적으로 합성한 oligonucleotide (5'AATTCATGCTGCTCGCAGC3')를 연결시켜 재조합 plasmid pTZ HP-1의 transformant를 작성하였다.

작성된 transformant로 부터 추출된 pTZ HP-1 plasmid를 EcoR I이나 Eco47 III 또는 EcoR I과 Bam HI으로 double digestion한 결과 Fig 6A·B에서 보는 바와 같이 EcoR I이나 Eco 47 III로 절단하였을 경우는 5.2Kb에 해당하는 하나의 DNA fragment가 확인되었으며, EcoR I과 Bam HI으로 double digestion한 경우는 2.9Kb에 해당되는 vector와 약 2.3Kb에 해당되는 삽입 유전자를 확인할 수 있었다. 또한 Kpn I으로 처리시에는 약 4.8Kb와 400bp에 해당하는 DNA fragment를 관찰할 수 있었으므로 클로닝 vector로 사용되었던 pTZ 18R vector내에 존재하였던 Kpn I site가 제거되었음을 확인할 수 있었으며 pTZ HP-1 plasmid는 EcoR I부위로부터 Bam HI site에 이르는 gp50 및 gp63의 유전자를 포함하고 있는 것으로 판명되었다(Fig 6. C).

PrV DNA의 partial sequencing: 작성된 pTZ HP-1 plasmid 중 삽입유전자의 일부를 sequencing한 결과 Fig 7에서 볼 수 있는 바와 같이 CCGCCGCG TACCCGTACACCGAGTCGTGGCAGCTGACGCT GACGACGGTCCCCCTCGCCCTTCGTGGCCCCGCGGACGTCTACCACA.....CCGACCCGCAGT GGA의 염기배열을 얻었으며 이것을 Petrovskis 등¹¹의 gp50의 유전자 염기배열과 비교하였던 바 제87번째부터 230번째의 염기배열과 95%의 homology를 나타내어 작성된 pTZ HP-1 plasmid 중에는 gp50의 glyco protein을 합성할 수 있는 유전자가 삽입되었음을 입증하였다.

고 찰

현재 돼지 PrV 예방을 위해서 사용되고 있는 백신은 McFerran과 Dow가²³ Bartha주로 개발한 것이 널리 사용되고 있으나 이들 백신을 접종 받은 돼지는 야의 PrV 감염돼지와 감염진단상의 문제점이 있으므로 최

```

pTZ HP-1      : .....CCGCCCGGTACCCGTACACCGACTC
                .....

Rice strain : GGACGTGGACGCCGCGCCCGC3CCCGACCTTCCCCCGCCCGGTACCCGCACACCGAGTC
                ↑                ↑                ↑
                51                80                110

pTZ HP-1      : GTGGCAGCTGACGCTGACGACGGTCCCTCGCCCTTCGTGGCCCCGCGGACGTCTACCA
                .....

Rice strain : GTGGCAGCTGACGCTGACGACGGTCCCTCGCCCTTCGTGGCCCCGCGGACGTCTACCA
                ↑                ↑                ↑
                111                140                170

pTZ HP-1      : CACNCNCCCGCTGGAGGACCCCGTGGCGGGTGGTGGCGCTGATCTCCGACCCGCAGTGGGA
                .....

Rice strain : CACGCGCCCGCTGGAGGACCCCGTGGCGGGTGGTGGCGCTGATCTCCGACCCGCAGGTGGA
                ↑                ↑                ↑
                171                200                230

```

Fig 7. Comparisons of partial sequences of gp50 gene in pTZ HP-1 and pseudorabies virus.

근 유전공학기법에 의한 subunit 백신개발이 시도되고 있다^{24,25}. 또한 종래의 subunit 백신은 바이러스의 감염 세포로부터 바이러스 특이 항원의 분리, 정제에 의존하였으며 특수분획을 이용하였을 시 야의 바이러스와의 감별진단이 가능하다고 하였다.²⁶ 일반적으로 subunit 백신의 생산은 생독 백신이나 사독백신생산에 미하여 다량의 재료, 생산공정상의 복잡성 및 많은 경비가 소요된다.

그러나 herpesvirus의 경우 생독백신 접종으로 인한 잠복감염이나 임신돈의 유사산 유발 가능성을 배제할 수 없어 subunit 백신을 개발적용하면 생독백신의 결점을 보완할 수 있고 특히 안전성, 자연감염돈과 백신 접종 돈과의 감별진단이 가능하므로 선진국의 경우 유전자 조작을 통한 방어항원 성분의 발현에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.^{19,27}

PrV의 subunit 백신 개발을 위한 특이방어항원인 glycoprotein은 약 5~6종으로 되어 있으며, Wathen 등²⁸은 PrV의 gp50에 대한 단클론항체의 중화력 및 mice에 있어서의 방어능력을 보고한 바 있으며, Kost 등¹⁹은 Indiana-Funkhauser주의 gp50과 gp63의 유전자를 vaccinia virus에 삽입하여 mice에 접종한 다음 PrV의 강독주를 공격접종하였을 때 방어능력을 가지

고 있다고 보고하였다.

이와 같은 결과를 종합해 볼 때 PrV의 gp50이나 이에 상응하는 glycoprotein에 대한 유전자를 cloning하여 이들 특이 glycoprotein 항원을 발현시키는 연구는 돼지 PrV를 방제하기 위하여 방어효과가 우수한 subunit 백신개발의 가능성을 시사해 주는 것이므로 앞으로 연구를 활발히 진행시켜야 할 과제이다.

본 연구에서는 PrV의 Shope주를 이용하여 Kost 등¹⁹ 및 Petrovskis 등¹¹이 보고한 gp50 및 gp63에 대응하는 유전자를 cloning한 바 이들의 성적과 거의 동일한 제한효소 지도 및 5' prime region과 함께 gp50의 유전자 염기 배열결과를 얻을 수 있었다. 이와 같은 결과는 gp50에 대응하는 glycoprotein이 PrV에 증식 및 생물학적 기능에 필수 불가결한 물질로써 gp50의 염기 배열이 보존된 결과로서 생각된다. 일반적으로 외부유전자의 다른 expression vector내에서의 발현은 해당 vector의 promoter 기능에 의존하는 것으로서 알려져 있다.^{27,29,30,31} 그러므로 본 연구에서도 gp50의 5'prime region을 제거한 후 EcoR I과 Bam HI site에 gp50과 gp63 유전자를 삽입하여 재조합시킨 plasmid pTZ HP-1을 얻는데 성공하였으며, 이것을 이용하여 앞으로 gp50 및 gp63 glycoprotein의 발현 및 이들의 면역학

적 기능을 규명함과 동시에 현재 전세계적으로 널리 사용되고 있는 baculovirus나 vaccinia virus의 유전자로 개발되어 있는 expression vector를 이용한 유전자 발현시험을 실시하면 돼지 PrV 방제에 필요한 방어 효과가 우수한 순수경제 subunit백신개발이 가능할 것으로 기대된다.

결 론

Pseudorabies virus의 subunit백신개발을 위한 기초 연구의 일환으로서 PrV의 방어항원 물질인 glycoprotein 50 및 63을 생합성해주는 유전자를 클로닝하고자 하였던 바 다음의 결과를 얻었다. PrV Shope 주를 감염시킨 세포에서 정제된 바이러스의 DNA를 추출, Bam HI으로 처리하여 분리된 6.8Kb상당의 DNA를 이용하여 Nde I과 Klenow로 처리하여 4.9Kb 상당의 DNA fragment를 pTZ18R vector와 연결시켜 클로닝 한 뒤 gp50 및 gp63에 해당되는 유전자 부위만을 포함하는 DNA를 EcoR I과 Bam HI site에서 재조합된 plasmid(pTZ HP-1)를 작성하였다. 작성된 재조합 일부 sequence는 PrV Rice주의 gp50 유전자 sequence와 거의 동일함을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- Baskerville A, McFerran JB, Dow C. Aujeszky's disease in pigs. *Vet Bull* 1973;43:465~479.
- Mackay RR, Done JT, Burrows R. An outbreak of Aujeszky's disease in pigs in lincelnshire. *Vet Rec* 1962;74(24):669~672.
- Shope RE. An experimental study of "mad itch" with especial reference to its relationship to pseudorabies. *J Exp Med* 1931;54:233~248.
- Bush CE, Pritchett RF. A Comparison of the genomes of bovine herpesvirus type 1 and pseudorabies virus. *J Gen Virol* 1985;66:1811~1817.
- A]bert S. Transcription of the genome of pseudorabies virus (a Herpesvirus) is strictly controlled. *Virol* 1979;97:316~327.
- Kaplan AS, Ben-Porat T. Mode of replication of pseudorabies virus DNA. *Virol* 1964;23:90~95.
- Ben-Porat T, Kaplan AS. The chemical composition of herpes simplex and pseudorabies virus. *Virol* 1962;16:261~266.
- Ben-Porat T, Veach RA, Blankenship ML, et al. Differential association with cellular substructures of pseudorabies virus DNA during early and late phases of replication. *Virol* 1984;139:205~222.
- Rea TJ, Timmins JG, Long GW, et al. Mapping and sequence of the gene for the pseudorabies virus glycoprotein which accumulates in the medium of infected cells. *J Virol* 1985;54:21~29.
- Mettenleiter TC, Lukacs N, Thiel HJ, et al. Location of the structural gene of pseudorabies virus glycoprotein complex gII. *Virol* 1986;152:66~75.
- Petrovskis EA, Timmins JG, Armentrout MA, et al. DNA sequence of the gene for pseudorabies virus gp50 a glycoprotein without N-linked glycosylation. *J Virol* 1986b;59:216~223.
- Robbins AK, Dorney DJ, Wathen MW, et al. The pseudorabies virus gII gene in closely related to the gB glycoprotein gene of Herpes simplex virus. *J Virol* 1987;61(9):2691~2701.
- Wathen MW, Wathen LMK. Characterization and mapping of a nonessential pseudorabies virus glycoprotein. *J Virol* 1986;58(1):173~178.
- Petrovskis EA, Timmins JG, Gierman TM, et al. Deletions in vaccine strains of pseudorabies virus and their effect on synthesis of glycoprotein gp63. *J Virol* 1986c;60:1166~1169.
- Robbins AK, Whealy ME, Watson RJ, et al. Pseudorabies virus gene encoding glycoprotein gIII is not essential for growth in tissue culture. *J Virol* 1986;59(3):635~645.
- Donaldson AI, Wardley RC, Martin S, et al. Influence of vaccination on Aujeszky's disease virus and disease transmission. *Vet Rec* 1984;115:121~124.
- Kelling CL, Staudinger WL, Rhodes MB. Immune response of pigs inoculated with virulent pseudorabies virus and pigs inoculated with attenuated or inactivated pseudorabies virus vaccine before and after challenge exposure. *Am J Vet Res* 1982;43(12):2114~2120.
- Mettenleiter TC, Zsak L, Kaplan AS, et al. Role

- of a structural glycoprotein of pseudorabies in virus virulence. *J Virol* 1987;61(12):4030~4032.
19. Kost TA, Jones EV, Smith KM, et al. Biological evaluation of glycoproteins mapping to two distinct mRNAs within the Bam HI fragment 7 of pseudorabies virus: Expression of the coding regions by vaccinia virus. *Virology* 1989;171:365~376.
 20. Nishimori T, Imada T, Sakuri M, et al. Restriction endonuclease analysis of Aujeszky's disease virus isolated in Japan. *Jpn J Vet Sci* 1987;49(2):365~367.
 21. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. "Molecular cloning. A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. NY 1982.
 22. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463~5467.
 23. McFerran JB, Dow C. Studies on immunisation of pigs with the Bartha strain of Aujeszky's disease virus. *Res Vet Sci* 1975;19:17~22.
 24. Larryfeldman R, Frazer J, Jean JH, et al. The evaluation of a lectin-agarose based subunit vaccine and complementary diagnostic antigen for Aujeszky's disease(pseudorabies) in the pig. *Vet Microbiol* 1984;9:35~51.
 25. Maes RK, Schutz JC. Evaluation in swine of a subunit vaccine against pseudorabies. *Am J Vet Res* 1983;44(1):123~125.
 26. Platt KB. The porcine humoral response to detergent extracted Aujeszky's disease (pseudorabies) virus antigens. *Vet Microbiol* 1982;7:515~534.
 27. Marchioli CC, Yancey RJ, Petrovskis EA et al. Evaluation of pseudorabies virus gp50 as a vaccine for Aujeszky's disease in mice and swine: Expression by vaccinia virus and chinese hamster ovary cells. *J Virol* 1987;61:3977~3982.
 28. Wathen LMK, Platt KB, Wathen MW et al. Production and characterization of monoclonal antibodies directed against pseudorabies. *Virus Res* 1985;4:19~29.
 29. Matsuura Y, Possee RD, Overton H et al. Baculovirus expression vectors: The requirements for high level expression of proteins, including Glycoproteins. *J Gen Virol* 1987;68:1233~1250.
 30. Liu C-C, Yansura D, Levinson AD. Direct expression of Hepatitis B surface antigen in Monkey cells from an SV 40 vector. *DNA* 1982;1:213~221.
 31. Goeddel DV, Heyneker HL, Hozumi T et al. Direct expression in *Escherichia coli* of DNA sequence coding for human growth hormone *Nature* (London) 1979;281:544~548.