

소 바이러스성 설사병 바이러스의 유전자 재조합 DNA clone의 작성에 관한 연구

여상건·H.J.Cho*·S.A.Masri*

경상대학교 수의과대학

Animal Diseases Research Institute, Agriculture Canada*

(1992년 3월 26일 접수)

Construction of recombinant DNA clone for bovine viral diarrhea virus

Sang-geon Yeo, H.J.Cho*, S.A.Masri*

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

Animal Diseases Research Institute, Agriculture Canada*

(Received Mar 26, 1992)

Abstract : Molecular cloning was carried out on the Danish strain of bovine viral diarrhea virus(BVDV) to construct strategy for the diagnostic tools and effective vaccine of BVD afterwards. A recombinant DNA clone(No. 29) was established successfully from cDNA for viral RNA tailed with adenine homopolymer at 3' end.

³²P-labeled DNA probes of 300~1, 800bp fragments, originating from the clone 29, directed specific DNA-RNA hybridization results with BVDV RNA. Recombinant DNA of the clone 29 was about 5,200bp representing 41.6% of the full length of Danish strain's RNA, and restriction sites were recognized for *Eco*R I, *Sst* I, *Hind* III and *Pst* I restriction enzymes in the DNA fragment.

Key words : BVDV, gene cloning, DNA probe, DNA-RNA hybridization

서 론

소의 바이러스성 설사병은 유우, 육우에서 발생하며 심한 설사, 소화관점막의 궤양, 호흡기병변 등을 나타내어 폐사를 초래함으로써 경제적 피해가 큰 전염병이다. 이 병의 원인체는 Togavirus로서 RNA를 핵산으로 가지는 bovine viral diarrhea virus(BVDV)이며, 배양세포에 대한 세포변성 효과의 유무에 따라 세포변성 독주와 비세포변성 독주로 분류된다.^{1,2}

BVDV의 비세포변성 독주가 어미소의 태반을 통하여 임신초기에 면역체계가 형성되기 전인 태아에게 감염할 경우 태아는 유·사산 되거나, 정상분만되어도 면역관용 현상을 나타낸다.^{3,4} 면역관용상태의 송아지는 출생후

지속적으로 바이러스를 체외로 배출하는 보독동물이 될 뿐만 아니라 세포변성 독주에 재감염될 때 증상이 더욱 심하고 폐사율이 높은 점막염에 이환된은 주지의 사실이다.^{1,5-8} 또한 BVDV는 동물의 면역기능을 저하시킴으로써 타 병원체의 감염을 용이하게 하여 합병증을 증가시킨다.^{1,9} 따라서 제 외국에서는 이 병의 방역에 최선을 다하고 있으나 우역, 악성카타르열, 구제역, 블루텡병, 수포성구내염, 아까바네병, 가성결핵병 등과 같은 유사전염병과의 구별이 어렵다. 그러므로 정확한 진단을 위하여 원인 바이러스의 분리동정, 혈청중화항체 시험이 이용되지만 조직배양에 따른 장시간의 소요로 인해 많은 개체를 신속히 검사하기에는 난점이 많다. 또한 형광항체시험, immunoperoxidase 시험 등이 조직

* 이 논문은 1989년도 교육부 해외과건 연구비 지원에 의한 연구의 결과임.

내 BVDV 항원검출에 이용되고 있지만 비특이 반응이 많이 나타나고 있으며, 혈청항체검사를 위한 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 역시 비특이 반응 때문에 진단의 부정확성을 보이고 있다.^{1,9-14}

우리나라에서는 1987년에 석과 서¹⁵가 이 병으로 의심되는 한우, 유우, 육우로부터 BVDV를 분리함으로써 그 발생이 확인되었으며 또한 석과 서¹⁶가 혈청중화항체시험에서 검사대상 소의 41.6%가 BVDV에 대한 항체를 보유하고 있음을 밝힘으로써 이미 오래전부터 발생하였음을 추측할 수 있다. 따라서 이 병의 만연을 예방하고 퇴치하기 위한 연구가 요청되고 있으며 특히 진단방법상 대두되고 있는 여러가지 부정확성과 문제점이 개선되어야 할 것으로 생각된다.

근년 유전자 조작기법을 BVDV의 분자생물학적 특성 조사와 BVDV 감염증의 진단에 이용하기 위한 연구가 이루어지고 있다. 1985년에 Renard et al¹⁷이 BVDV 중 Osloss 독주의 RNA 염기서열을 구명하고 그 길이가 약 12.5 Kilobases(Kb) 임을 보고한 이래, Collett et al¹⁸은 NADL 독주의 RNA 역시 약 12.6Kb 임을 밝혔다. 한편 BVDV RNA에 대한 DNA probe로써 DNA-RNA hybridization 시험을 하였을 때 BVDV 감염상태의 진단효과가 뛰어남을 보고하고 있다.¹⁹⁻²¹ 이와같이 핵산검출에 근거를 둔 항원확인방법은 전염병의 진단에 획기적인 방법으로 제시되고 있다.²²

본 연구에서는 소 바이러스성 설사병의 특이적 진단법 및 면역원성과 안전성이 높은 유전자 재조합 DNA 백신에 관한 연구의 기초로서 BVDV의 세포변성 독주인 Danish 독주에 대한 유전자 재조합 DNA clone을 작성하고자 시도하였다.

재료 및 방법

BVDV-Danish 독주의 배양 및 분리 : 본 실험을 위하여 Cho et al²³의 방법에 따라 다음과 같이 BVDV-Danish 독주를 배양하였다. BVDV에 감염되지 않은 Madin-Darby bovine kidney (MDBK) 세포를 세포배양용 플라스크(150cm²)에서 말혈청이 5% 첨가된 minimal essential medium(MEM, Gibco)으로 배양시켰다. MDBK 세포의 발육이 양호한 상태에서 배지를 제거한 다음, 0.03ml (10⁷ TCID₅₀/ml)의 Danish 독주를 5ml의 MEM에 혼합하여 MDBK 세포에 접종한후 37°C에서 2시간동안 흡착시켜 감염되도록 하였다. 바이러스 접종액을 제거한후 말혈청이 5% 첨가된 MEM 20ml를 가하여 37°C의 CO₂ 배양기에서 증식시켰다.

배양 3일경 바이러스 증식에 따른 세포변성 효과가 최고에 달할 즈음 배양 상청액을 수확한 후 5,000rpm에

서 20분간 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 상청액을 다시 45,000rpm에서 2시간동안 초원심분리하여 바이러스를 순수분리 하였으며 이것을 4ml의 TE 완충액 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)에 용해하였다.

바이러스 RNA의 추출정제 : 바이러스 RNA를 Chomczynski와 Sacchi²⁴의 guanidium thiocyanate-phenol-chloroform법에 따라 추출하였다. 즉, 바이러스액 4ml를 10ml의 guanidium thiocyanate 용액과 혼합하여 단백질을 변성시킨 후 여기에 3M sodium acetate (pH 4.0) 용액 1.5ml와 phenol-chloroform (1 : 1) 용액 15ml를 첨가하여 얼음에서 5분간 정치하였다. 이것을 4°C, 10,000xg에서 20분간 원심분리하여 상청액을 취한후 동량의 isopropanol과 혼합하여 4°C에서 철야 정치시켰고, 재원심분리 하여 RNA 침전물을 얻었다.

RNA 침전물을 다시 TE 완충액에 용해한후 CE 11 cellulose(Whatman) column을 통과시켜 가능한 RNA를 정제하였고, RNA의 정량을 위하여 ultraspectrophotometer (LKB, ultrospec 4054)로 흡광도를 측정하였다.

cDNA의 생산 : Gubler와 Hoffman²⁵의 방법에 따라 cDNA의 생산 kit(Boeinger-Mannheim)와 oligo(dT) primer를 이용하여 Fig 1과 같이 BVDV-Danish 독주의 RNA에 대한 cDNA를 생산하였다. 먼저 BVDV RNA에 ATP를 포함한 반응액을 가하고 poly(A) polymerase 효소반응을 하여 RNA의 3' 말단부위에 adenine polymer를 tailing 하였다. 이 RNA template에 oligo(dT) primer를 부착하고 AMV reverse transcriptase 효소반응을 하여 cDNA의 1st-strand를 만들었다. RNase H 효소로서 template RNA를 nick 시켜 nick된 분절을 primer로 하여 *E. coli* DNA polymerase I 및 T₄ DNA polymerase 효소반응을 하여 두 가닥의 cDNA를 생산하였다.

BVDV-cDNA의 cloning : Maniatis et al²⁶과 Collett et al¹⁶의 유전자 조작기법에 준하여 다음과 같은 cDNA의

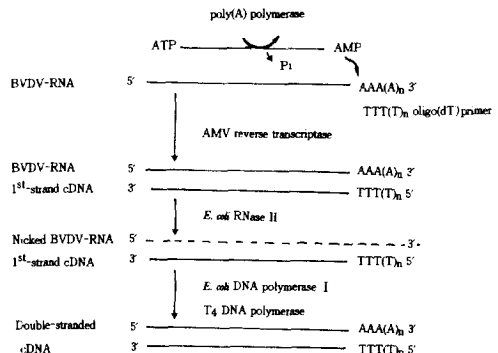


Fig 1. Scheme of cDNA synthesis for BVDV RNA.

cloning, 유전자 재조합 DNA clone의 선별 및 특이성을 조사하였다. 먼저 cloning vector인 pUC 13 plasmid의 DNA를 *Sma* I 제한효소로 절단하여 blunt-end 상태로 만들고, calf intestinal alkaline phosphatase로 처리하여 자가결합을 방지한 다음 이 plasmid DNA를 BVDV-cDNA와 결합시켰다. 즉, cDNA 용액 5 μ l에 pUC 13 plasmid DNA 3 μ l, 10mM ATP 2 μ l, T_4 DNA ligase 1 μ l 및 반응완충용액(10X) 2 μ l를 혼합하고 증류수로 총량이 20 μ l 되게 하여 14°C에서 철야 반응시켰다.

이 결합체 3~5 μ l를 competent *E. coli* HD5 α 세포 100 μ l와 혼합하여 얼음에서 30분간 정치하였다. 이어서 42°C에서 45초동안 열자극을 주고 S.O.C. 900 μ l를 가한후 37°C에서 1시간 진탕하여 형질전환 시켰다.

유전자 재조합 DNA clone의 선별 : 형질전환된 *E. coli*를 ampicillin (50 μ g/ml)과 X-gal (40 μ g/ml)이 첨가된 LB agar에 37°C, 18~24시간 배양하였으며 발육한 백색의 집락을 다시 LB broth에 배양한후 alkaline lysis법에 의한 mini preparation으로 plasmid DNA를 추출하여 각종 제한효소로 절단하였다. 이것을 1% agarose-gel 전기영동상에서 분석하여 BVDV-cDNA insert를 가지는 유전자 재조합 DNA clone을 선별하였다. 또한 각 제한효소의 처리에 따른 DNA band의 유무, 크기 및 수를 조사하여 insert DNA내의 제한효소 부위를 파악하였다.

유전자 재조합 DNA의 특이성 조사 : 유전자 재조합 DNA의 특이성을 조사하기 위하여 nick translation법으로 유전자 재조합 DNA에 방사능 물질을 표시시켜 probe를 만들었다. 즉, BVDV-cDNA insert를 가지는 clone으로부터 DNA를 추출, 건조시킨 다음 여기에 10mM dGTP와 dTTP를 각각 2.5 μ l, [α - 32 P]dCTP와 [α - 32 P]dATP(Amersham)를 각 2 μ l, DNA polymerase I /DNase I 3 μ l를 혼합하고 증류수를 가하여 50 μ l가 되게 하였으며, 15°C에서 90분간 반응시킨후 알콜침전법으로 방사능이 표시된 DNA를 수확하였다. 또한 BVDV-Danish 독주의 RNA와 정상 RNA로서 송아지 고환 RNA를 각각 200ng과 20ng 농도씩 nitrocellulose membrane(Amersham)에 dot-blotting 시켰다. 방사능 표시 DNA probe로써 BVDV RNA 및 송아지 고환 RNA와 hybridization 실험을 실시한후 -70°C에서 철야 autoradiography 하여 유전자 재조합 DNA의 BVDV RNA에 대한 특이성을 조사하였다. 또한 pUC 13 plasmid DNA를 방사능 표시 probe로 만들어 대조군으로 사용하였다.

결 과

MDBK 세포에서 증식시킨 BVDV-Danish 독주로부터 RNA를 추출, 정제하여 흡광도를 측정하였을 때 Fig

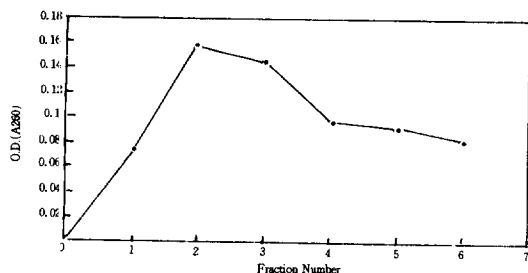


Fig 2. Absorbance of BVDV RNA(1 : 5 dilution) after CF 11-cellulose column chromatography.

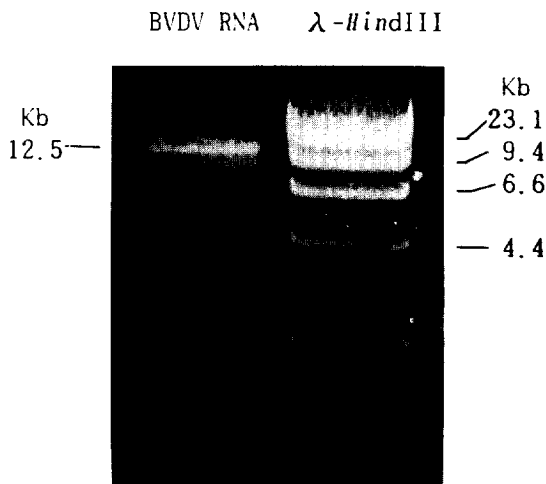


Fig 3. RNA of BVDV-Danish strain on 1% agarose-gel electrophoresis.

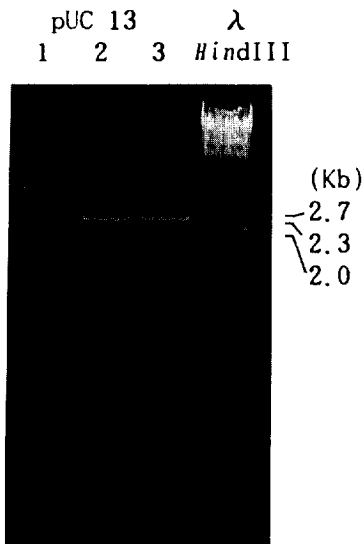


Fig 4. pUC 13 plasmid digested with *Sma* I restriction enzyme and dephosphorylated by calf intestinal alkaline phosphatase : lane 1, undigested; lane 2 and 3, digested; λ -Hind III, marker DNA.

2에서와 같이 분획 2와 3에서 각각 O.D.(A²⁶⁰) 0.157과 0.145로서 이들을 합하였을 때 약 4 μg의 RNA를 구할 수 있었으며 이 RNA의 길이는 약 12.5kb로 관찰되었다 (Fig 3).

한편 pUC 13 plasmid를 *Sma* I로 절단하고 dephosphorylation시킨 결과 Fig 4에서와 같이 linear form의 크기가 약 2.7kb인 band를 확인하였다.

BVDV-Danish 독주의 RNA에 대하여 생산된 cDNA를 Fig 5와 같이 pUC 13 plasmid의 *Sma* I 부위에 결합시켜 유전자 재조합된 plasmid를 만들었으며 대장균 세포내로 형질전환후 배양하여 다수의 백색 집락을 확보하였다.

형질전환된 집락들을 LB broth로 배양한후 plasmid DNA를 추출하여 *Bam* HI과 *Eco* RI 제한효소로 절단하고 agarose-gel에서 전기영동하였던 결과 BVDV-cDNA insert를 가지는 clone을 선별할 수 있었다. 이와같은 선별시험을 계속하여 다수의 insert-positive clone을 얻었으며 이들 clone으로 cDNA library를 만들었다. cDNA library clone들을 *Eco* RI과 *Hind* III 및 *Pst* I과 *Sst* I 효소로써 각각 이중절단 하였을때 clone 29, 38, 58, 59, 61, 62, 68, 4, 10, 13 등이 insert-positive로 확인되었다(Fig 6).

이들 clone에 대한 DNA-RNA hybridization 실험에서 clone 29는 BVDV-Danish 독주의 RNA 200ng 및 20ng과 강한 양성반응을 보였으나 송아지 고환 RNA와는 반응하지 않아 BVDV RNA에 대한 유전자 재조합 DNA clone으로 인정되었다(Fig 7). 반면에 다른 clone들은 BVDV RNA에 반응을 보이지 않거나 고환 RNA에 양성반응을 나타냄으로써 BVDV RNA에 대한 clone으로 인정할 수 없었다. 한편 대조군으로 사용된 pUC 13 plasmid는 이들 RNA와 hybridization 되지 않았다.

Clone 29를 *Pst* I과 *Sst* I 효소로 이중절단 절단하였을 때 (Fig 8) 총 7개의 DNA band가 관찰되었다. 이들중 2,700 base pairs(bp) 크기의 band는 pUC 13 plasmid로 확인되었고, insert DNA는 1,800, 1,100, 900, 700, 400, 300bp 크기의 6개의 분절로 구성되어 있었다. 이 6개의 insert DNA 분절을 각각 방사능 표지 probe로 만들어 DNA-RNA hybridization을 하였을 때, Fig 9와 같이 모두 BVDV-Danish 독주의 RNA에 대한 특이적인 양성반응을 나타내었으며 clone 29가 유전자 재조합 DNA clone이 확실함을 알 수 있었다.

Clone 29의 restriction map을 조사하기 위하여 *Eco* RI, *Bam* HI, *Hind* III, *Pst* I, *Sal* I 및 *Sst* I 제한효소로 단일 혹은 이중절단 하였을 때 DNA band가 다양하게 출현하였다(Fig 10). 각 제한효소의 처리에 따른 DNA band의

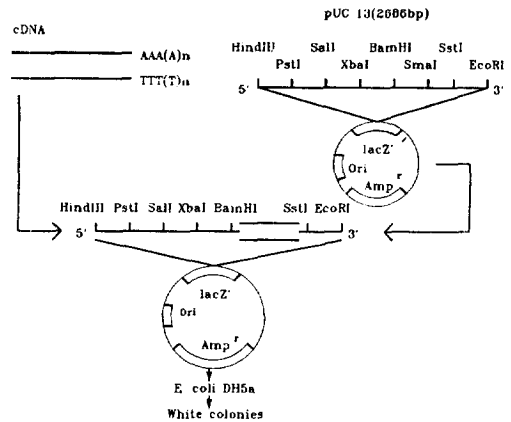


Fig 5. Ligation of BVDV-cDNA with pUC 13 plasmid and transformation into *E. coli*.

수와 크기 및 insert DNA에서 제한효소들의 internal site는 Table 1과 같다. *Eco* RI로 절단하였을 때 3,100, 2,900, 1,900bp의 3 band가 출현하였고 따라서 insert DNA에서 *Eco* RI의 internal site는 2개 이었다. *Bam* HI 및 *Sal* I 처리시에는 각각 7,900bp의 band가 1개씩 관찰되었다. 이 band는 pUC 13 plasmid의 multiple cloning site인 *Bam* HI 또는 *Sal* I 부위가 절단된 결과 insert DNA를 포함하는 plasmid가 linear form을 나타낸 것이며 따라서 이들 효소의 internal site는 없었다. *Hind* III 처리시에는 3개의 band(5,000, 2,300, 600bp)와 2개의 internal site가, *Pst* I 처리시에는 2개의band(4,500, 3,400bp)와 1개의 internal site가 인정되었다. 또한 이들 효소로 이중절단 하였을 때 다양한 크기의 band가 관찰되었으며 clone 29의 크기는 *Sst* I과 *Bam* HI 효소에 의한 절단시(6,900bp)를 제외하고는 약 2,700bp인 pUC 13 plasmid를 포함하여 7,900bp이었다.

한편 *Sst* I 처리시에는 3,100, 1,800, 1,100, 900bp 크기의 4 band가 관찰되었으나 internal site를 명확히 밝힐 수 없었다. 그렇지만 pUC 13 plasmid의 3' 말단부위의 multiple cloning site인 *Sst* I 부위가 절단된 것으로 가정할 때 3,100bp 크기의 band는 2,700bp인 pUC 13 plasmid에 insert DNA의 일부인 400bp 크기의 분절이 합해진 것으로 생각되었다. 따라서 multiple cloning site 중에서 insert DNA가 존재하는 *Sma* I 부위를 기준으로 할 때 pUC 13 plasmid의 5' 방향에 위치하며 이미 internal site가 없음이 확인된 *Bam* HI과 함께 *Sst* I 효소로 이중절단하였던 결과 3,100bp의 band가 2,700 및 400bp 크기의 2 band로 분리되었다. 그러므로 2,700bp의 band는 pUC 13 plasmid로 확인되었으며, insert DNA의 5' 시점으로부터 400bp 지점에서 *Sst* I 효소의 internal site 1개가 인

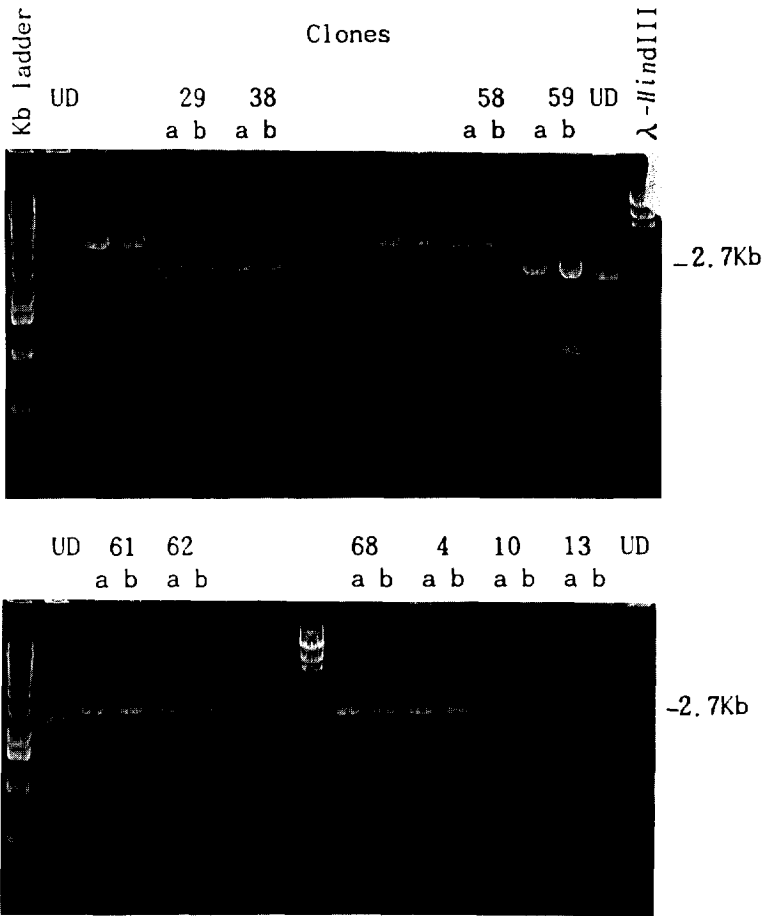


Fig 6. Double digestion of insert-positive clones with restriction enzymes : lane a, *EcoR* I and *Hind* III ; lane b, *Pst* I and *Sst* I ; UD, undigested.

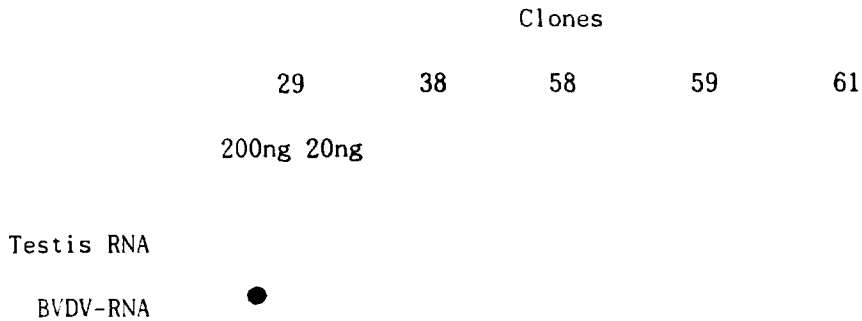


Fig 7. DNA-RNA hybridization between ³²P-labeled DNA probes from insert-positive clones and RNA of 200ng and 20ng concentration from BVDV and normal calf testis.

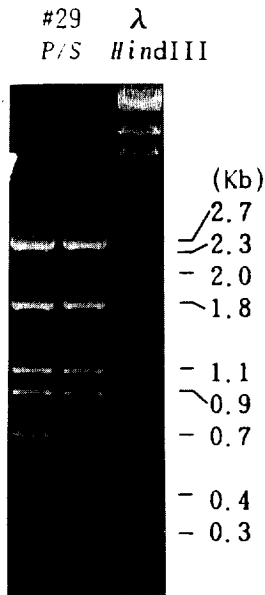


Fig 8. Digestion of clone 29 with *Pst* I and *Sst* I (P/S) restriction enzymes.

정되었다.

이 성적을 토대로 insert DNA에서의 부분적인 restriction map을 작성하였을 때 Fig 11과 같이 5' 시점으로부터 *EcoR* I, *Sst* I, *Hind* III, *Hind* III, *EcoR* I, *Pst* I의 순서로 제한효소 부위가 일부 인정되었다. 또한 이들 효소로 절단시에 200, 200, 200, 2,300, 400, 1,200, 700bp 크기의 DNA 분절로 나누어지며, insert DNA의 크기는 약 5,200bp로서 약 12,500bp인 BVDV-Danish 독주 RNA의 41.6%에 상당하였다.

고 찰

BVDV의 RNA는 positive-strand로서 길이가 Osloss 독주에서 약 12.5Kb, NADL 독주에서 약 12.6Kb로 알려져 있다.^{17,18} 본 연구에서도 BVDV에 대한 gene cloning을 위하여 Danish 독주의 RNA를 분리하였을 때 약 12.5Kb이었던 바 BVDV RNA는 독주에 따라 다소 차이는 있으나 대체로 12.5~12.6Kb인 것으로 추정된다. 한편 BVDV RNA의 3' 말단부위에 adenine polymer를 부착시킨후 cDNA를 생산하여 cloning 하였을 때 insert DNA를 가지는 다수의 clone을 확보할 수 있었다. 즉, homopolymer tailing 방법^{19,26}에 의하여 형성된 poly(A)⁺ RNA template에 상보적인 oligo(dT) primer가 잘 부착됨으로써 cDNA의 생산효율이 높았던 것으로 생각된다.

이들 clone에 대한 *Bam*H I과 *Eco*R I 제한효소 처리에서 잠정적으로 선별되었던 insert-positive clone들을 *Eco*R I과 *Hind* III 및 *Pst* I과 *Sst* I으로 이중절단 하였을 때 수개의 clone들이 insert를 가지는 것으로 인정되었다. 이들중 clone 29는 BVDV-Danish 독주의 RNA 및 송아지 고환 RNA에 대한 DNA-RNA hybridization 실험에서 BVDV RNA에 대해서만 양성반응을 나타내어 BVDV RNA에 대한 DNA clone으로 확인되었다. 또한 이 clone은 *Pst* I과 *Sst* I 제한효소 절단상에서 관찰되었던 6개의 insert DNA 분절들이 모두 BVDV RNA와 특이적인 hybridization 양성반응을 나타냄으로서 BVDV-Danish 독주에 대한 유전자 재조합 DNA clone임을 재확인할 수 있었다. 그렇지만 나머지 clone들은 BVDV RNA와 hybridization 되지 않거나 송아지 고환 RNA와 hybridization 되었다. 그러므로 이들 clone은 BVDV의 배양시에 사용되었던 MDBK 세포 또는 소의 체세포 유래 RNA에 대한 clone일 것으로 생각되었으나 이와같은 현상의 원인을 명확히 구명할 수 없었다.

BVDV 감염증의 진단에는 바이러스 분리, 바이러스 항원 검출, 혈청중화항체 검사 등이 사용되고 있으나 흔히 부정확성이 초래되고 있으며 이들 방법으로는 BVDV의 불현성 감염체 또는 보독동물의 진단이 거의 불가능한 실정이다.^{4,27-29} 따라서 이와같은 진단상의 문제점을 개선하기 위한 노력의 일환으로 DNA probe에 관한 연구가 이루어지고 있다.

Brock et al¹⁹, Jensen et al²⁰ 및 Potgieter와 Brock²¹은 BVDV-cDNA를 방사능 표지 probe로 하여 배양세포내에 감염된 BVDV 또는 만성보독우의 백혈구내 BVDV와의 hybridization을 통하여 바이러스항원 검출을 시도하였던 결과 반응성이 우수함은 물론 BVDV와 공통항원성이 있는 타 바이러스의 감별에도 효과가 뛰어남을 보고하였다. 이와같은 사실로 볼때 본 연구에서 작성된 clone 29에서 유래되는 6개의 DNA 분절들이 BVDV 항원유전자의 진단을 위한 DNA probe로 사용될 경우 특이성 및 반응도가 우수할 것으로 사료된다.

한편 유전자 재조합 DNA는 적당한 vector내에서 발현될 때 BVDV 감염증의 진단과 효과적인 백신의 개발을 위한 항원단백질의 생산원으로 제시되고 있다.³⁰ Le-comte et al⁵은 BVDV-Osloss 독주로부터 재조합되어 대장균 세포내에서 발현된 p80 항원유전자 유래의 단백질을 ELISA용 항원으로 사용함으로써 BVDV에 대한 항체검출 효과가 우수하였음을 보고하였다. 또한 Renard et al³¹은 Osloss 독주의 RNA에 대하여 작성된 재조합 DNA에서 단백질 생산의 종료 codon이 없는 2개의 open reading frame(ORF)를 보고하였다. Collett et al^{18,32}은

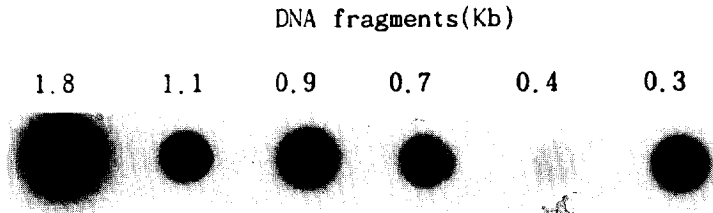


Fig 9. DNA-RNA hybridization between 6 DNA fragments from clone 29 digested with *Pst* I and *Sst* I restriction enzymes and BVDV RNA.

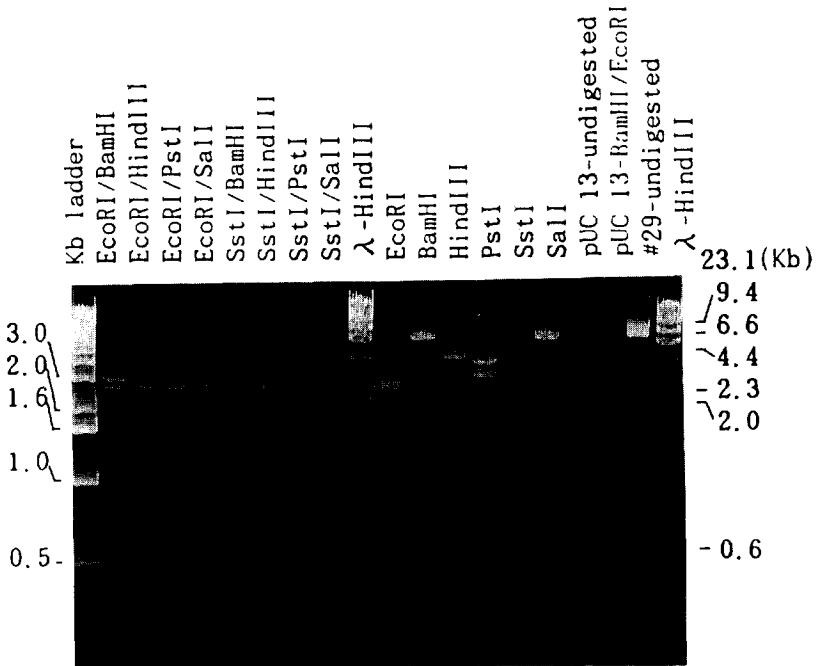


Fig 10. DNA fragments from clone 29 after single or double digestions with *Eco*R I, *Bam* H I, *Hind* III, *Pst* I, *Sal* I and *Sst* I restriction enzymes.

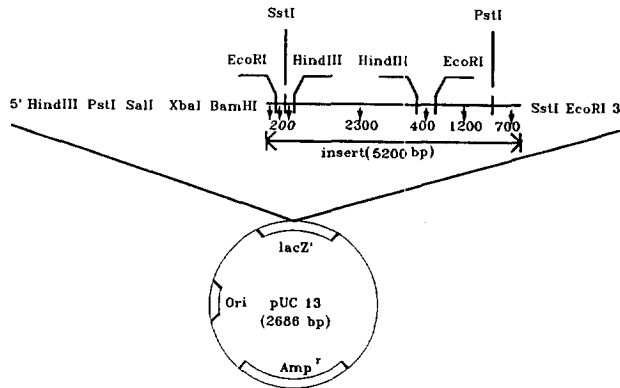


Fig 11. Restriction enzyme map in recombinant DNA clone.

Table 1. Restriction sites and DNA fragments of recombinant DNA clone 29 by single or double digestion with various enzymes

Enzymes	No. of DNA bands	No. of internal sites	DNA fragments (bp)				Size of clones (bp)		
<i>EcoR</i> I	3	2	3100*	2900	1900		7900		
<i>BamH</i> I	1	0	7900				7900		
<i>Hind</i> III	3	2	5000*	2300	600		7900		
<i>Pst</i> I	2	1	4500	3400*			7900		
<i>Sal</i> I	1	0	7900				7900		
<i>Sst</i> I	4	>1	3100*	1800	1100	900	6900		
<i>EcoR</i> I / <i>BamH</i> I	4	-	3100	2700**	1900	200	7900		
<i>EcoR</i> I / <i>Hind</i> III	6	-	2700**	2300	1900	400	400	200	7900
<i>EcoR</i> I / <i>Pst</i> I	5	-	3100	2700**	1200	700	200	7900	
<i>EcoR</i> I / <i>Sal</i> I	4	-	3100	2700**	1900	200		7900	
<i>Sst</i> I / <i>BamH</i> I	5	-	2700**	1800	1100	900	400	6900***	

* DNA band including pUC 13 plasmid(2686 bp) and insert DNA

** pUC 13 plasmid

*** DNA fragment of 1Kb in length supposed to be lost by *Sst* I and *BamH* I digestions

NADL 독주에 대한 clone에서 1개의 ORF를 밝혔으며 이것은 RNA의 거의 전 길이에 해당되었고 이 ORF의 5' 말단부위로부터 첫번째의 ATG codon에서 바이러스의 단백질 생산이 시작된다고 하였다. 이와같이 유전자의 발현을 위하여는 먼저 DNA의 염기서열을 조사하여 DNA 분절내에서 단백질 생산을 위한 ORF 및 initiation codon의 존재여부가 구명되어야 할 것이다. 또한 일반적으로 염기서열 분석을 위한 sequencing 실험에는 500bp 이하의 DNA 분절이 적합하다.

본 실험에서 작성된 유전자 재조합 DNA는 크기가 5, 200bp 정도로서 BVDV-Danish 독주 RNA의 41.6%에 상당하는 비교적 큰 DNA 분절이었다. 또한 cDNA 생산시에 바이러스 RNA의 3' 말단부위에 adenine homopolymer가 부착되었으므로 이 재조합 DNA의 염기서열은 RNA의 3' 말단부에 상응할 것⁸으로 추측되지만 sequencing을 통하여 밝혀져야 할 것이다. 따라서 sequencing에 적합한 분절로 절단코자 insert DNA에서의 제한효소 부위를 조사하였을 때 5' 시점으로 부터 *EcoR* I, *Sst* I, *Hind* III, *Hind* III, *EcoR* I, *Pst* I의 순서로 제한효소 부위의 일부가 확인되었다. 또한 이들 효소로 절단시에 재조합 DNA는 200, 200, 200, 400, 700, 1,200, 2,300bp 크기의 7개 분절로 나누어짐을 알 수 있었다. 그러므로 추후 이들 DNA 분절을 subcloning 및 sequencing하여 BVDV-Danish 독주 RNA에서의 해당부위, ORF, BVDV의 타 독주들과의 염기서열상의 동질성 등을 분석함으로써 유전자 발현을 위한 전략이 수립되어야 할 것이다.

결론

소의 바이러스성 설사병의 특이적인 진단법과 면역원성 및 안전성이 높은 예방백신에 관한 연구의 기초로서 BVDV-Danish 독주의 유전자를 cloning 하고자 시도하였다. 바이러스로부터 RNA를 추출정제하였을 때 Danish 독주의 RNA는 약 12.5Kb 이었다. 이 RNA에 대하여 cDNA를 생산하였으며 이로부터 Danish 독주에 대한 유전자 재조합 DNA clone(No. 29)이 작성되었다.

Clone 29 유래의 ³²P 표지 DNA probe는 BVDV RNA와의 DNA-RNA hybridization에서 특이적인 양성반응을 나타내었다. 유전자 재조합 DNA의 크기는 BVDV-Danish 독주 RNA의 41.6%인 약 5,200bp 이었으며 *EcoR* I, *Sst* I, *Hind* III, *Pst* I 등의 제한효소 부위가 인정되었다.

참고 문헌

1. Baker JC. Bovine viral diarrhea virus : A review. *J Am Vet Med Assoc* 1987 ; 190 : 1449~1458.
2. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, et al. *Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals*. 8th ed. Ithaca : Cornell University Press, 1988 ; 740~749.
3. Barum RK, Osburn B I, Kendarich JW. Immunological response of bovine fetus to bovine viral diarrhea virus. *Am J Vet Res* 1973 ; 34 : 1127~1132.
4. Coria MF, McClurkin AW. Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently in-

- fectured with bovine viral diarrhoea virus. *J Am Vet Med Assoc* 1978 ; 172 : 449~454.
5. Lecomte C, Pin JJ, Moerlooze LD, et al. ELISA detection of bovine viral diarrhoea virus specific antibodies using recombinant antigen and monoclonal antibodies. *Vet Microbiol* 1990 ; 23 : 193~201.
 6. Bolin SR, McClurkin AW, Cutlip RC, et al. Response of cattle persistently infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus to vaccination for bovine viral diarrhoea and to subsequent challenge exposure with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res* 1985 ; 46 : 2467~2470.
 7. McClurkin AW, Bolin SR, Coria MF. Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhoea. *J Am Vet Med Assoc* 1986 ; 186 : 568~569.
 8. Steck F, Lazary S, Fey H, et al. Immune responsiveness in cattle fatally affected by bovine viral diarrhoea-mucosal disease. *Zbl Vet Med B* 1980 ; 27 : 429~445.
 9. Malmquist WA. Bovine viral diarrhoea-mucosal disease : Etiology, pathogenesis and applied immunology. *J Am Vet Med Assoc* 1968 ; 152 : 763~768.
 10. Elazhary MASY, Silim A, Dea S. Prevalence of antibodies to bovine respiratory syncytial virus, bovine viral diarrhoea virus, bovine herpesvirus-1 and bovine parainfluenza-3 virus in sheep and goat in Quebec. *Am J Vet Res* 1984 ; 45(8) : 1660~1662.
 11. Liess B, Landelius L, Lackmann PB. Bovine viral diarrhoea (BVD) -results of a serological long-term study under natural condition of infection in a medium-sized cattle herd. *Praktisch Tierarztl* 1982 ; 68 : 118~124.
 12. Ohmann HB, Jensen MH, Sorensen KJ, et al. Demonstration of bovine viral diarrhoea virus antigen in cryostat and paraffin sections of bovine tissue by the immunoperoxidase technique. *Acta Path Microbiol Scand C* 1981 ; 89 : 281~285.
 13. Ward ACS, Kaeberle M I. Use of an immunoperoxidase stain for the demonstration of bovine viral diarrhoea virus by light and electron microscopies. *Am J Vet Res* 1984 ; 45(1) : 165~170.
 14. Woernle H, Brunner A. Serological studies in cattle herds with respiratory diseases, diarrhoea, infertility, abortion and neonatal mortality to investigate the role of viral infection. *Tierarztliche Umschau* 1982 ; 37 : 100~109.
 15. 석호봉, 서익수. 한국에서 소 바이러스성 설사병 (BVD)에 관한 연구. 1. 발병우로부터 BVD 바이러스 분리 및 동정시험. 서울대학교 수의대 논문집 1987 ; 12 : 151~169.
 16. 석호봉, 서익수, 한국에서 소 바이러스성 설사병 (BVD)에 관한 연구. 2. 소, 돼지, 면양에서 BVD 바이러스 중화항체 분포조사. 서울대학교 수의대 논문집 1987 ; 12 : 63~81.
 17. Renard A, Guiot C, Schmetz D, et al. Molecular cloning of bovine viral diarrhoea virus sequences. *DNA* 1985 ; 4 : 429~438.
 18. Collett MS, Larson R, Gold P, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 1988 ; 165 : 191~199.
 19. Brock KV, Brian DA, Rouse BT, et al. Molecular cloning of complementary DNA from a pneumopathic strain of bovine viral diarrhoea virus and its diagnostic application. *Can J Vet Res* 1988 ; 52 : 451~457.
 20. Jensen J, Aiken J, Schultz RD. Detection of bovine viral diarrhoea virus genome in leukocytes from persistently infected cattle by RNA-cDNA hybridization. *Can J Vet Res* 1990 ; 54 : 256~259.
 21. Potgieter LND, Brock KV. Detection of bovine viral diarrhoea virus by spot hybridization with probes prepared from cloned cDNA sequences. *J Vet Diagn Invest* 1989 ; 1 : 29~33.
 22. Patterson U, Hyyppia T. Nucleic acid and hybridization : an alternative tool in diagnostic microbiology. *Immunol Today* 1985 ; 6 : 268~272.
 23. Cho HJ, Masri SA, Deregt D, et al. Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine viral diarrhoea virus antibody in cattle. *Can J Vet Res* 1991 ; 55 : 56~59.
 24. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidium-phenol-chloroform extract. *Anal Biochem* 1987 ; 162 : 156~159.
 25. Gubler U, Hoffman BJ. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 1983 ; 25 : 263~269.
 26. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning*

- : a *laboratory manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
27. Donis RO, Dubovi EJ. Molecular specificity of the antibody responses of cattle naturally and experimentally infected with cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus biotypes. *Am J Vet Res* 1987 ; 48 : 1549~1554.
 28. Coria MF, Schmer MJF, McClurkin AW, et al. Differentiation of cytopathic and noncytopathic isolates of bovine viral diarrhea virus by virus neutralization. *Am J Vet Res* 1984 ; 45 : 2129~2131.
 29. Howard CJ, Clarke MC, Brownlie J. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to bovine viral diarrhea virus (BVDV) in cattle sera. *Vet Microbiol* 1985 ; 10 : 359~369.
 30. Harkness JW. The control of bovine viral diarrhea virus infection. *Ann Rech Vet* 1987 ; 18 : 167~174.
 31. Renard A, Dino D, Martial J. Vaccines and diagnostics derived from bovine viral diarrhea virus. European Patent Application No. 86870095. 6. Publication No. 0208672, 14 January 1987.
 32. Collett MS, Moenning V, Horzinek MC. Recent advance in pestivirus research. *J Gen Virol* 1989 ; 70 : 253~266.
-