

## 국내에서 분리된 canine parvovirus의 구조유전자 cloning과 염기서열 분석

박종현·송재영·이중복·현방훈·안수환·전무형\*

가축위생연구소

충남대학교 수의과대학\*

(1992년 6월 8일 접수)

### Cloning and sequencing of the gene encoding structural protein of canine parvovirus isolated in Korea

Jong-hyeon Park, Jae-young Song, Jung-bok Lee, Bang-hun Hyun,  
Soo-hwan An, Moo-hyung Jun\*

Veterinary Research Institute, Anyang, Korea

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University Taejeon, Korea\*

(Received July 8, 1992)

**Abstract** : In this study gene encoding structural proteins of a CPV isolate was cloned and sequenced to elucidate the molecular genetical properties of the canine parvoviruses isolated from the field. Six recombinant plasmids of pEP3, p1471, p2070, pEP069, pEP338 and p14711p were constructed from the map positions 22 to 98 of RF DNA to clone the VP1 and VP2 genes of CPV-V20. Sequentially the gene comprising 3780 nucleotides were sequenced by dideoxy chain termination method. When nucleotide sequence of gene encoding the structural proteins of CPV-V20 was compared with those of other strains, CPV-N, CPV-d and CPV-780929 published previously, DNA homologies to CPV-V20 were 99.87% with CPV-N, 99.73% with CPV-d, 96.85% with CPV-780929 and 98.4% with FPLV-Carl, respectively. The DNA sequence data of CPV-V20 showed seven point mutations and also deletion of 135 nucleotides from the nucleotide position 4745 to 4879 located in the 3'-noncoding region of CPV-N.

**Key words** : canine parvovirus, cloning, sequence, viral protein 1, viral protein 2.

## 서 론

Canine parvovirus (CPV)는 Parvoviridae에 속하는 single stranded linear DNA를 함유하는 바이러스로 자연에서 출혈성 장염과 때로 심근염을 유발하는 개의 중요한 급성 전염병의 원인체이다.<sup>1-6</sup>

CPV DNA는 약 5300 nucleotides로 구성되어 있으며 바이러스 특이단백질 즉 capsid protein과 non-structural protein (NS1)을 포함하고 있다.<sup>7</sup>

Parvoviridae에 대한 염기서열 분석은 Srivastava 등<sup>8</sup>이 adeno associated virus 2, Astell 등<sup>9</sup>이 minute virus of mice (MVM), Rhode와 Paradiso 등<sup>10</sup>이 H-1, Carlson 등<sup>11</sup>이 feline panleukopenia virus, Chen 등<sup>12</sup>이 bovine parvovirus 그리고 Shade 등<sup>13</sup>이 human parvovirus B19 등에 대해 각각 보고하였다. 이들 연구에서 공통적인 결과는 parvovirus 유전자에는 큰 2개의 open reading frame (ORF)를 가지는데 왼쪽 ORF는 바이러스 DNA의 증식에 필요한 non-capsid protein을 암호화하며 오른쪽 ORF

는 바이러스의 주요 capsid protein을 암호한다.

Canine parvovirus의 염기서열 분석은 Rhode 등<sup>14</sup>이 coat protein 유전자의 nucleotide sequence를 최초로 보고하였고 그 이후 Parrish 등<sup>15</sup>이 FPLV, MEV, RPV와 CPV의 capsid protein 유전자에 있어서의 염기서열 차이에 관련한 epitope map과 숙주영역에 대해 보고하였으며, Reed 등<sup>7</sup>은 5' 말단의 hair-pin 구조를 제외한 3' 말단까지의 염기서열을 발표하였다.

국내분리 CPV주에 대한 연구는 발생<sup>16</sup>, 임상병리학적 소견<sup>17</sup>, 혈청학적 연구<sup>18</sup>, 물리화학적 성상<sup>19,20</sup> 그리고 병원성 실험<sup>21</sup>을 보고한 적이 있으나 아직까지 유전자의 분자생물학적인 구조분석을 시도한 바는 없었다.

CPV는 높은 m.o.i(multiplicity of infection)를 집중하거나 시험관 내에서 계대를 많이 하였을 때 defective-interfering(DI) particle을 생산하며 이 DI particle은 genome deletion을 야기하므로 그에 상응하는 유전적인 변이가 일어날 수 있으며 이런 변이는 독주간에도 존재할 가능성이 있는 것으로 추정된다. 그러므로 저자 등은 국내분리 CPV주의 viral protein 1(VP1)과 viral protein 2(VP2) 유전자를 cloning하여 염기서열을 결정하고 외국에서 분리된 CPV의 DNA 염기서열과 비교분석함으로써 국내 개 파보바이러스 감염증의 구조단백질상에 대한 기초자료를 획득하기 위해 일련의 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

**바이러스의 증식 :** CPV를 증식시키기 위해서 Crandell feline kidney(CRFK) cell를 사용하였다. 세포배양액은 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco, USA)에 calf serum(Hyclone, USA)을 5% 되게 가하고 nonessential amino acid(0.01mM, Gibco, USA) 및 gentamycin(100 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다. 유전자 cloning과 염기서열을 결정하기 위한 strain은 CPV-V20주를 시험에 사용하였다.

**바이러스 RF DNA의 추출 :** McMaster<sup>22</sup>, Tratschin<sup>23</sup>, Goto<sup>24</sup>, Thomas<sup>25</sup>, Shinagawa<sup>26</sup>, Hirt<sup>27</sup> 및 Paradiso 등<sup>28</sup>의 방법을 응용하여 세포로부터 RF DNA를 추출하였다.

**RF DNA의 전기영동 :** Brown<sup>29</sup>, Kammermeyer<sup>30</sup>, Ohman 등<sup>31</sup>의 방법을 응용하였다. 요약하면 제한효소를 37°C에서 2시간 반응하였으며, 반응후 0.1 volume loading buffer(0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol, 1% SDS, 10 mM EDTA, pH 8.0)를 가하여 1~2% agarose를 gel plate(12×10×0.3cm)에 주입하고, 5v/cm로 2~3시간 전기 영동하였다. 전기 영동

buffer는 Tris-borate EDTA buffer(0.089M Tris borate, 0.089M boric acid, 0.002M EDTA, pH 8.0)를 사용하였다. Molecular size marker로는 Hind III로 절단한 lambda phage DNA를 사용하였으며 전기영동후 gel을 ethidium bromide(EtBr, 0.5 µg/ml)에서 20분간 염색하여 UV illuminator(Spectroline, USA)에서 전기영동 pattern을 관찰하였다.

**Agarose gel에서 DNA의 추출 :** Agarose gel로부터 목적하는 DNA band의 추출은 전기영동 추출장치(electroeluter : IBI Model UEA 46000)를 사용하였다. 전기영동은 120~150 volt에서 1~2시간 실시하였고, V-shaped channel의 핵산침전용 시약으로는 7.5M ammonium acetate 120 µl를 사용하였다. DNA에 삽입된 EtBr의 제거는 증류수에 포화시킨 1 volume n-butanol을 가하여 진탕한후 15,000 rpm에서 1분간 원심후 분리된 상층액을 제거하고 하층액을 취하여 2.5 volume의 ethanol을 가해 -20°C에서 12~18시간 DNA를 침전시켰다.

**Cloning vector 작성 :** Cloning vector로는 pTZ 18R과 pTZ 19R(Pharmacia, USA)를 공시하였으며 외부 유전자가 결합될 수 있도록 제한효소를 처리한후 calf intestinal alkaline phosphatase(CIAP, Pharmacia, USA)를 37°C, 30분간 처리하고 phenol로 추출하여 상층액을 ethanol로 침전시켜 TE buffer(1 mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA)에 용해하여 -20°C에서 보관 사용하였다.

**Ligation과 E coli 형질전환 :** Ligation은 Maniatis<sup>32</sup>와 Old<sup>33</sup>의 방법을 응용하였으며 DNA를 적절한 제한효소로 처리하여 전기영동한 다음 gel에서 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 ligation하기 위해 증류수에 용해하여 6 µl를 분주하고, vector 1 µl, 1mM ATP 1 µl, 10x ligation buffer(0.5M Tris-Cl「pH 7.6」, 100mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM dithiothreitol, 500 µg/ml bovine serum albumin) 1 µl 및 T<sub>4</sub> DNA ligase(10U/µl, Kosco, USA) 1 µl를 각각 넣어서 15°C에서 18시간 반응하였다.

형질전환을 위한 competent cell로는 E coli DH5 α주를 공시하였다. 이 균주를 5ml의 Luria-Bertani broth(L-B broth : Bacto tryptone 10g, Bacto yeast extract 5g, NaCl 10g, 1N NaOH 1ml/H<sub>2</sub>O 950ml)에 접종하고 37°C에서 18시간 배양후 LB broth 500ml에 계대접종하여 흡광도 0.6이 되도록 2시간 배양하고 얼음에서 30분동안 처리후 3000rpm에서 5분간 원심하여 집균한 세균체를 PIPES buffer(10mM piperazine「pH 7.0」, 0.60mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glycerol) 50ml에서 부유시키고 30분간 얼음에서 처리한후 3000 rpm에서 3분간 원심, PIPES buffer 25ml에 부유시켜 얼음에서 500 µl씩 분주하여 액체질소에서 5분간 급속냉동한후 -70°C에서 보관하면서 사용하였다.

Competent cell을 얼음중에서 녹여 100  $\mu$ l 를 ligation된 DNA와 혼합하여 얼음에서 1시간 반응시킨후 42°C에서 90초간 heat shock를 주었다. 여기에 LB broth 0.5ml을 넣어 1시간 배양후 X-gal(125  $\mu$ g/ml in dimethylformamide, IBI, USA), Isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG, 100  $\mu$ M, BRL, USA) 그리고 ampicillin(50  $\mu$ g/ml)을 포함한 Luria-Bertani agar(Bacto tryptone 10g, Bacto yeast extract 5g, NaCl, 10g, 1N NaOH 1ml, Bacto-agar 15g/H<sub>2</sub>O 950ml)에 100  $\mu$ l 씩 접종후 18시간 배양하여 백색집락을 선별하였다.

**Plasmid DNA의 추출** : Plasmid DNA의 추출은 Maniatis<sup>32</sup>의 방법을 이용하였다. 형질전환된 *E. coli*로부터의 plasmid DNA의 소량추출은 boiling method을 응용하여 다음과 같이 실시하였다. Ampicillin(50  $\mu$ g/ml)이 포함된 LB broth에 배양된 세균 1ml을 3000rpm에 1분간 원심후 침전균체에 STET용액(8% Sucrose, 1M Tris-HCl [pH 8.0] 50ml, 0.5M EDTA 100ml, 5% Triton-X100, /H<sub>2</sub>O 1000ml) 300  $\mu$ l 와 lysozyme(10mg/ml) 25  $\mu$ l 을 넣어 실온에서 10분간 방치후 100°C에서 2분간 처리하고 15000rpm에서 10분간 원심하여 세균체를 멸균된 목침으로 제거후 Isopropanol 200  $\mu$ l 을 가하고 -70°C에서 10분간 처리 15000rpm에서 10분 원심시켜 얻어진 건조 plasmid를 TE buffer에 용해시켰다.

Plasmid DNA의 대량추출은 alkaline lysis method로 다음과 같이 실시하였다. 250ml의 LB broth에 형질전환된 *E. coli*를 18시간, 37°C에서 배양한후 5000rpm에서 5분간 원심하여 pellet를 수확하였다. 여기에 solution I (25mM Tris-HCl [pH 8.0], 10mM EDTA, 50mM glucose) 5ml을 넣어 부유시킨후 solution II (0.2N NaOH, 1% SDS) 10ml을 넣어 10분간 얼음에서 처리한 다음 solution III (glacial acetic acid 11.5ml, 5M potassium acetate 60ml, H<sub>2</sub>O) 28.5ml)를 7.5ml 넣어 중화시키고서 15,000rpm에서 20분간 원심한후 상층액에 0.6volume의 isopropanol을 가하고 실온에서 15분 방치후 12,000rpm에서 30분간 원심하였다. 그리고 pellet을 수확하여 건조시킨후 TE buffer 9ml에 용해하고, cesium chloride를 1.1g/ml 되도록 넣고 완전히 용해한후 EtBr(10mg/ml)을 0.8ml 가한 다음 15,000rpm에서 20분간 원심시켜서 protein을 제거하고 상층액을 quick sealing tube(Beckman, USA)에 약 1.5ml씩 넣어 100,000rpm에서 3시간 30분 원심(TL 100 ultracentrifuge, Beckman, USA)하여 plasmid층을 분리하였다. 증류수로 포화시킨 n-butanol로 EtBr을 제거하고, 2 volume의 증류수로 희석하여 ethanol로 침전시켰다. 이를 15,000rpm에서, 30분 원심후 pellet를 증류수에 용해하여 재침전하기 위해 2.5 volume

ethanol, 0.1 volume의 3M sodium acetate를 넣고 -70°C에서 1시간후 원심하여 수확된 pellet를 TE buffer에 용해하여 -20°C에 저장하면서 시험에 공하였다.

**CPV 구조 유전자의 염기서열 분석** : DNA 염기서열 분석은 Sanger 등<sup>31</sup>이 보고한 chain termination 방법<sup>35</sup>에 준하였으며 시약은 DNA sequencing kit(USB)를 공시하였고, 술식을 요약기술하면 다음과 같다. 준비된 recombinant plasmid DNA에 0.2N 되도록 NaOH를 첨가하여 30분간 37°C에서 denaturation 시키고 0.4 vol. 5M ammonium acetate(pH 7.5)를 첨가하여 중화시키고 2 vol.의 ethanol을 가하여 침전시켰다. 침전된 3~5  $\mu$ g DNA를 7  $\mu$ l 의 증류수에 용해하여 sequencing primer(-40 primer, 5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3', 3ng/ml) 1  $\mu$ l 그리고 reaction buffer (5 $\times$ , 200mM Tris-HCl [pH 7.5], 100mM MgCl<sub>2</sub>, 250mM NaCl)를 가하여 2  $\mu$ l 로 되게 혼합한 다음 65°C에서 2분간 그리고 실온에서 30분간 방치하였다. 이 시험관에 labeling mix(dGTP-5 $\times$ , 7.5  $\mu$ M dCTP, 7.5  $\mu$ M dTTP)를 증류수에 5배 희석한 것 2  $\mu$ l, Sequenase<sup>®</sup> (Version 2.0)를 enzyme dilution buffer(10mM Tris-HCl [pH 7.5], 5mM DTT, 0.5mg/ml BSA)에 1:8로 희석한 것 2  $\mu$ l, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>S] dATP 또는 [ $\alpha$ -<sup>35</sup>P] dATP를 10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l 의 역가로 조정된 것 0.5  $\mu$ l, 0.1 M DTT(dithrethiol) 1  $\mu$ l 를 혼합물에 가하고 잘 혼합하여 실온에서 2~5분간 반응시켰다. 그리고 termination mix(ddG, ddA, ddT, ddC)를 각각 2.5  $\mu$ l 씩 분주하여 37°C에서 5~30분간 반응후 stop solution(95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromphenol blue, 0.05% xylene cyanol FF) 4  $\mu$ l 를 각각 분주하였다. Labeling이 끝난 시료는 80°C에서 2분동안 denaturation 시킨후에 8% sequencing gel, 40~50 V/cm로 4~12시간 전기영동하였다. 전기영동후 10% methanol, 10% acetic acid로 30분 고정하여 30분동안 유수에 세척, gel을 2~18시간동안 37°C에서 건조하였다. 그리고 X-ray film(Kodak)에 밀착시켜 -70°C에서 2~72시간 반응시킨후 현상하고 염기서열을 판독하였다. DNA sequence분석은 DNASIS program(Hitachi software engineering co. Ltd. 3rd version, PC-DOS DNASIS)를 사용하였다.

## 결 과

**CPV 구조유전자의 Cloning 설계** : McMaster<sup>36</sup>, Tratschinn 등<sup>24</sup>의 제한효소 지도를 참고하여 구조유전자 cloning을 설계하였다. 바이러스는 CPV-V20주를 공시하였고, 구조유전자 cloning을 위해 RF DNA를 분리하고 Fig 2, 3, 4에서 나타낸 바와 같이 제한효소인 EcoRI, Pst I, Hae III, Hing III (Kosco)등을 사용하여 다

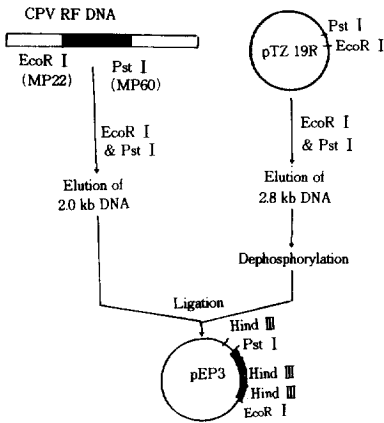


Fig 1. Construction of pEP3 clone.

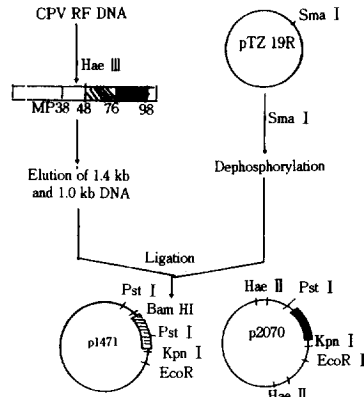


Fig 2. Construction of p1471 and p2070 clone.

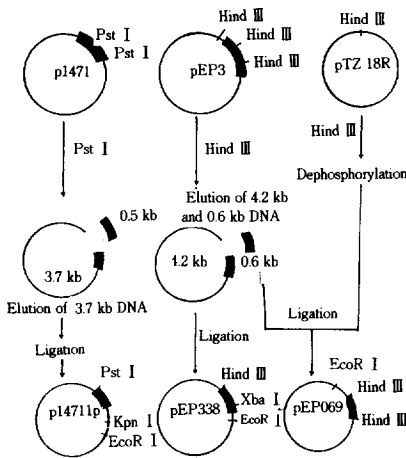


Fig 3. Construction of p1471p, pEP338 and pEP069 clone.

음과 같이 수행하였다.

pEP3 clone은 CPV RF DNA를 EcoR I /Pst I 을 동시에 처리하여 약 2.0kb의 DNA분절을 추출했으며, ligation을 위한 vector도 Pst I/EcoR I 을 동시에 처리한후 약 2.8kb의 DNA분절을 추출해 T<sub>4</sub> DNA ligase(Kosco)로 ligation하였다(Fig 1).

p1471과 p2070 clone (Fig 2)은 CPV RF DNA를 Hae III 처리하여 약 1.4kb와 1.0kb의 DNA분절을 추출하였고, vector는 pTZ 19R을 Sma I 으로 소화시켜 T<sub>4</sub> DN-A ligase로 처리하여 각각 ligation 하였다. 형질전환 후에 CPV DNA의 삽입의 확인은 plasmid 추출방법인 boiling method로 실시하였다.

염기서열을 분석하기 위해 pEP3, p1471 및 p2070을 제한효소 Hind III, Pst I 처리하여 subcloning을 실시

하였다. pEP069를 작성하기 위하여 pEP3를 Hind III 처리하여 0.6kb DNA 분절을 추출하여 Hind III 처리한 pTZ 18R에 ligation하였으며 pEP338은 pEP3을 Hind III 처리후 4.2kb DNA를 추출한후 ligation을 실시하였으며 p1471p를 위해서는 p1471을 Pst I 처리하여 3.7kb DNA를 추출한후 역시 ligation하였다(Fig 3).

**CPV RF DNA의 cloning과 subcloning :** CPV-V20주에 감염된 CRFK 세포주에서 RF DNA를 추출한 다음 clone을 얻기 위하여 EcoR I, Pst I, Hae III 등으로 처리한후 gel 전기영동을 실시하여 얻어진 단편을 추출하여 vector에 ligation하고 형질전환하여 목적하는 pEP3(Fig 1), p1471(Fig 2) 그리고 p2070 clone (Fig 2)을 얻었다. Clone된 *E. coli* 균주를 재배양하여 plasmid를 획득한 후 그 plasmid의 삽입상태를 확인하기 위하여 gel 전기영동상에서 pEP3 clone을 EcoR I 과 Pst I 으로 동시에 처리하여 2.8kb의 vector와 2.0kb의 CPV RF DNA를 확인할 수 있었다. 그리고 Hind III를 처리하여 삽입된 DNA내 0.6kb의 Hind III 단편과 또한 EcoR I 처리에서 삽입 DNA내에 절단부위가 없는 것을 확인하여 pEP3 clone(Fig 1)의 작제를 최종 확인하였다(Fig 4-1). p1471 clone은 Kpn I 과 Bam HI을 동시에 처리하여 1.4kb의 CPV RF DNA가 삽입된 것을 확인하였고, 그리고 Pst I 과 EcoR I 을 각각 처리하여 CPV RF DNA 단편의 삽입을 최종확인하였다(Fig 4-2). 그리고 p2070 clone은 Kpn I 과 Pst I 을 동시에 처리하여 1.0kb의 CPB RF DNA가 삽입된 것을 Hae II와 EcoR I 각각 처리하여 삽입된 DNA내에 절단부위가 없는 것을 확인하여 clone의 작제를 최종확인하였다(Fig 4-3).

pEP3, p1471과 p2070를 subcloning하여 Fig 4에서 나타낸 pEP338, pEP069 그리고 p1471p를 확인하기 위하여, pEP338은 Xba I 과 EcoR I 을 동시처리 하여

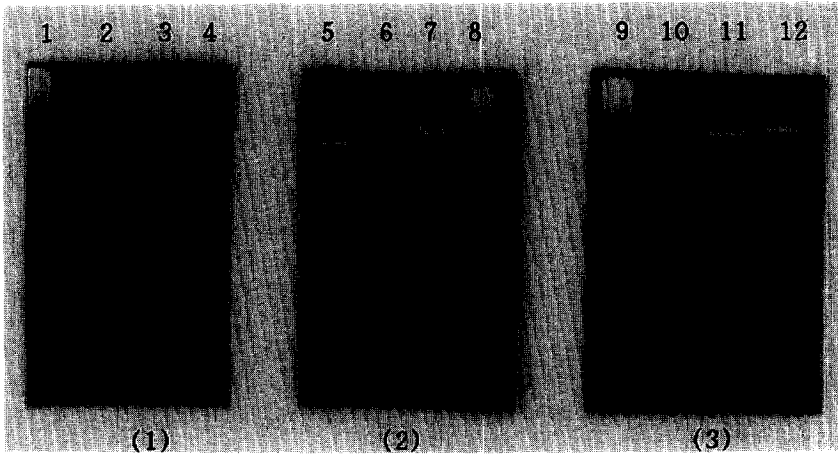


Fig 4. Gel electrophoresis patterns of the plasmids in pEP3, p1471 and p2070 clones cleaved with various restriction endonucleases.

- (1) pEP3 : lane 1.  $\lambda$  DNA digested with Hind III, lane 2. EcoR I and Pst I, lane 3. Hind III lane 4. EcoR I  
 (2) p1471 : lane 5. Kpn I and Bam HI, lane 6. Pst I, lane 7. EcoR I lane 8.  $\lambda$  DNA digested with Hind III  
 (3) p2070 : lane 9.  $\lambda$  DNA digested with Hind III lane 10. Kpn I and Pst I, lane 11. Hae II lane 12. EcoR I

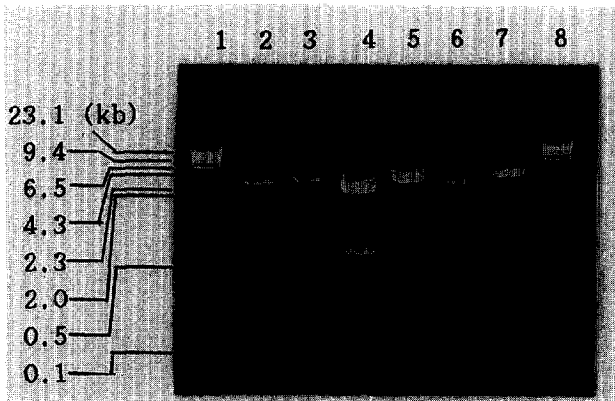


Fig 5. Gel electrophoresis patterns of the plasmids in pEP338, pEP069 and p14711p clones cleaved with various restriction endonucleases.

- lane 1.  $\lambda$  DNA digested with Hind III lane 2. pEP338/Xba I and EcoR I, lane 3. pEP338/EcoR I, lane 4. pEP069/Hind III, lane 5. pEP069/EcoR I, lane 6. p14711p/Pst I and Kpn I, lane 7. p14711p/Pst I

삽입 DNA에 Xba I 절단부위가 있고, EcoR I 처리로는 절단부위가 없는 것을 확인하여 pEP338의 작제를 최종확인하였다(Figs 5-2, 3). pEP069는 Hind III와 EcoR I를 각각 처리하여 전자는 0.6kb의 삽입된 단편을, 후자는 삽입된 DNA내에 절단 부위가 없는 것을 확인하여 clone의 작제를 최종확인하였다(Fig 5-4, 5). p14711p는 Pst I과 Kpn I을 동시에 처리하여 삽입된 0.9kb의 DNA를, Pst I 처리로 절단부위가 없음을 각각 확인하여 clone의 작제를 최종확인하였다(Figs 5-5, 6).

CPV의 구조유전자의 염기서열 분석 : pEP3, p1471,

Table 1. Nucleotide and amino acid homology of VP1 and VP2 between CPV-V20 and other parvoviruses

Virus strains *	Homology with CPV-V20(%)	
	Nucleotide	Amino acid
CPV-N	99.87	99.60
CPV-780929	96.85	94.13
CPV-d	99.73	99.33
FPLV-Carl	98.40	96.67

\* Data referred : CPV-N, Reed et al (1988) : CPV-780929, Rhade et al (1985) : CPV-d, Parrish et al (1988) : FPLV-Carl, Carlson et al (1985).

p2070, pEP069, pEP338과 p14711p clone을 이용하여 CPV-V20주의 구조유전자 염기서열을 분석하였다. 그

TTCAA	AAAGGAAGTG	TCAATCAAAT	GTACTTTGCG	GGACTTGGTT	AGTAAAAGAG	60
TAACATCACC	TGAAGACTGG	ATGATGTTAC	AACCAGATAG	TTATATTGAA	ATGATGGCAC	120
AACCAGGAGG	TGAAAATCTT	TTAAAAAATA	CACTTGAAAT	TTGTA	ACTTTAGCAA	180
GAACAAAAAC	AGCATTTGAA	TTAATACTTG	AAAAAGCAGA	TAATACTAAA	CTAACTA	240
TTGATCTTGC	AAATTCTAGA	ACATGTCAAA	TTTTTAGAAT	GCACGGATGG	AATTGGATTA	300
AAGTTTGTCA	CGCTATAGCA	TGTGTTTTAA	ATAGACAAGG	TGGTAAAAGA	AATACAGTTC	360
TTTTTCATGG	ACCAGCAAGT	ACAGGAAAAT	CTATCATTGC	TCAAGCCATA	GCACAAGCTG	420
TGGGTAATGT	TGGTTGTTAT	AATGCAGCAA	ATGTAAATTT	TCCATTTAAT	GACTGTACCA	480
ATAAAAATTT	AATTTGGATT	GAAGAAGCTG	GTA	TCAACAAGTT	AATCAATTTA	540
AAGCAATTTG	TTCTGGACAA	AGAATTAGAA	TTGATCAAAA	AGGTAAAGGA	AGTAAGCAAA	600
TTGAACCAAC	TCCAGTAATT	ATGACA	ATGAAAATAT	AACAATTGTG	AGAATTGGAT	660
GTGAAGAAAG	ACCTGAACAT	ACACAACCAA	TAAGAGACAG	AATGTTGAAC	ATTAAGTTAG	720
TATGTAAGCT	TCCAGGAGAC	TTTGGTTTGG	TTGATAAAGA	AGAATGGCCT	TTAATATGTG	780
Hind III				Hae III		840
CATGGTTAGT	TAAACATGGT	TATGAATCAA	CCATGGCTAA	CTATACACAT	CATTGGGGAA	900
AAGTACCAGA	ATGGGATGAA	AACTGGGCGG	AGCCTAAAAT	ACAAGAAGGT	ATAAATTCAC	960
CAGGTTGCAA	AGACTTAGAG	ACACAAGCGG	CAAGCAATCC	TCAGCGTCAA	GACCAAGTTC	1020
TA	GACTCCGGAC	GTAGTGGAGC	TTGCACTGGA	ACCGTGGAGT	ACTCCAGATA	1080
CGCCTATTGC	AGAAACTGCA	AATCAACAAT	CAAACCAACT	TGGCGTTACT	CACAAAGACG	1140
TGCAAGCGAG	TCCGACGTGG	TCCGAAATAG	AGGCAGACCT	GAGAGCCATC	TTTACTTCTG	1200
AA	AGAAGATTTT	CGAGACGACT	TGGATTAAGG	TACGATGGCA	CCTCCGGCAA	1260
AGAGAGCCAG	GAGAGGTAAG	GGTGTGTTAG	TAAAGTGGGG	GGAGGGGAAA	GATTTAATAA	1320
CTTA	TATGTGTTTT	TTTATAGGAC	TTGTGCCTCC	AGGTATAAAA	TATCTTGGGC	1380
CTGGGAACAG	TCTTGACCAA	GGAGAACCAA	CTAACCCTTC	TGACGCCGCT	GCAAAAAGAAC	1440
ACGACGAAGC	TTACGCTGCT	TATCTTCGCT	CTGGTAAAAA	CCCATACTTA	TATTTCTCGC	1500
Hind III						1560
CAGCAGATCA	ACGCTTATA	GATCAA	AGGACGCTAA	AGATTGGGGG	GGGAAAATAG	1620

GACATTATTT	TTTTAGAGCT	AAAAAGGCAA	TTGCTCCAGT	ATTAACGTAT	ACACCAGATC	1560
ATCCATCAAC	ATCAAGACCA	ACAAAACCAA	CTAAAAGAAG	TAAACCACCA	CCTCATATTT	1620
TCATCAATCT	TGCAAAAAAA	AAAAAAGCCG	GTGCAGGACA	AGTAAAAAGA	GACAATCTTG	1680
VP2 ↓ CACCAATGAG	TGATGGAGCA	GTTCAACCAG	ACGGTGGTCA	ACCTGCTGTC	AGAAATGAAA	1740
GAGCTACAGG	ATCTGGGAAC	GGGTCTGGAG	GCGGGGGTGG	TGGTGGTTCT	GGGGGTGTGG	1800
GGATTTCTAC	GGGTACTTTC	AATAATCAGA	CGGAATTTAA	ATTTTTGGAA	AACGGATGGG	1860
TGGAAATCAC	AGCAAACCTA	AGCAGACTTG	TACATTTAAA	TATGCCAGAA	AGTGAAAAAT	1920
ATAGAAGAGT	GGTTGTAAAT	AATATGGATA	AAACTGCAGT	TAACGGAAAC	ATGGCTTTAG	1980
			Pst I			
ATGATATTCA	TGTACAAATT	GTAACACCTT	GGTCATTGGT	TGATGCAAAT	GTTTGGGGAG	2040
TTTGGTTTAA	TCCAGGAGAT	TGGCAACTAA	TTGTTAATAC	TATGAGTGAG	TTGCATTTAG	2100
TTAGTTTGA	ACAAGAAATT	TTTAATGTTG	TTTTAAAGAC	TGTTTCAGAA	TCTGCTACTC	2160
AGCCACCAAC	TAAAGTTTAT	AATAATGATT	TAACTGCATC	ATTGATGGTT	GCATTAGATA	2220
GTAATAATAC	TATGCCATTT	ACTCCAGCAG	CTATGAGATC	TGAGACATTG	GGTTTTTATC	2280
			Bgl II			
CATGGAAACC	AACCATACCA	ACTCCATGGA	GATATTATTT	TCAATGGGAT	AGAACATTAA	2340
TACCATCTCA	TACTGGAACT	AGTGGCACAC	CAACAAATAT	ATACCATGGT	ACAGATCCAG	2400
ATGATGTTCA	ATTTTATACT	ATTGAAAATT	CTGTGCCAGT	ACACTTACTA	AGAACAGGTG	2460
ATGAATTTGC	TACAGGAACA	TTTTTTTTTG	ATTGTAAACC	ATGTAGACTA	ACACATACAT	2520
GGCAAACAAA	TAGAGCATTG	GGCTTACCAC	CATTTCTAAA	TTCTTGCCCT	CAATCTGAAG	2580
GAGCTACTAA	CTTTGGTGAT	ATAGGAGTTC	AACAAGATAA	AAGACGTGGT	GTAACCTAAA	2640
TGGGAAATAC	AAACTATATT	ACTGAAGCTA	CTATTATGAG	ACCAGCTGAG	GTTGGTTATA	2700
GTGCACCATA	TTATTCTTTT	GAGGCGTCTA	CACAAGGGCC	ATTTAAAACA	CCTATTGCAG	2760
			Hae III			
CAGGACGGGG	GGGAGCGCAA	ACAGATGAAA	ATCAAGCAGC	AGATGGTGAT	CCAAGATATG	2820
CATTTGGTAG	ACAACATGGT	CAAAAACTA	CCACAACAGG	AGAAACACCT	GAGAGATTTA	2880
CATATATAGC	ACATCAAGAT	ACAGGAAGAT	ATCCAGAAGG	AGATTGGATT	GAAAAATATTA	2940
ACTTTAACCT	TCCTGTAACG	AATGATAATG	TATTGCTACC	AACAGATCCA	ATTGGAGGTA	3000

AAACAGGAAT	TAACTATACT	AATATATTTA	ATACTTATGG	TCCTTAACT	GCATTAAATA	3060
ATGTACCACC	AGTTTATCCA	AATGGTCAAA	TTTGGGATAA	AGAATTTGAT	ACTGACTTAA	3120
AACCAAGACT	TCATGTAAAT	GCACCATTTG	TTTGTCAAAA	TAATTGTCCT	GGTCAATTAT	3180
TTGTA AAAAGT	TGCGCCTAAT	TTAACAAATG	AATATGATCC	TGATGCATCT	GCTAATATGT	3240
CAAGAATTGT	AACTTACTCA	GATTTTTGGT	GGAAAGGTAA	ATTAGTATTT	AAAGCTAAAC	3300
TAAGAGCCTC	TCATACTTGG	AATCCAATTC	AACAAATCAG	TATTAATGTA	GATAACCAAT	3360
TTAACTATGT	ACCAAGTAAT	ATTGGAGGTA	TGAAAATTGT	ATATGAAAAA	TCTCAACTAG	3420
	STOP					
	↓					3480
CACCTAGAAA	ATTATATTAA	CATACTTACT	ATGGTTTTA	TGTTTATTAC	ATATCAACTA	3540
GCACCTAGAA	AAATTATATT	AATATACTTA	CTATGGTTTT	TATGTTTATT	ACATATTATT	3600
TTAAGATTAA	TTAAATACAG	CATAGAAATA	TTGTACTTGT	ATTTGATATA	GGATTTAGAA	3660
GGTTTGTAT	ATGGTATACA	ATAACTGTAA	GAAATAGAAG	AACATTTAGT	AGTTTGTFTT	3720
ATAAAATGTA	TTGTAAACTA	TTAATGTATG	TTGTTATGGT	GTGGGTGGTT	GGTTGGTTTG	3780
CCCTTAGAAT	ATGTTAAGGA	CCAAAAA AAA	TCAATAAAAAG	ACATTTAAAA	CTAAATGGCC	Hae III

Fig 6. Sequence of gene encoding structure protein of canine parvovirus V20 strain isolated in Korea. The chain termination method using dideoxynucleotide was applied(Sanger, 1977).

결과 Fig 6에서 나타낸 바와 같이 3780 bp의 염기서열을 결정하였다.

CPV의 구조유전자 및 구조단백질의 homology 분석 : 국내분리주 CPV-V20주의 3780 bp의 염기서열중 VP1과 VP2를 coding하는 nucleotide와 DNA sequence로부터 산출한 amino acid sequence를 기 보고된 Parvoviridae와 homology를 비교한 바 Table 1와 같은 결과를 얻었다. CPV-V20주와 CPV-N주와의 nucleotide homology 및 amino acid homology는 각각 99.89% 및 99.60%이었으며 CPV-780929와는 96.85% 및 94.13%, CPV-d와는 99.73% 및 99.33% 그리고 FPLV-Carl과는 98.40% 및 96.67%를 보였다. CPV-V20주의 VP1과 VP2에 해당되는 amino acid sequence를 CPV-N, CPV-780929, CPV-d 및 FPLV-Carl주와 비교분석한 바 Fig 7에서와 나타낸 바와 같이 CPV-N과는 750개의 amino acid 조성중 3개가 차이가 있었으며 CPV-780929와는 44개, CPV-d와는 5개, FPLV-Carl과는 25개의

차이가 있었다.

## 고 찰

국내분리주 CPV-V20은 Reed 등<sup>7</sup>이 보고한 CPV-N주를 기준할 때 pEP3 clone은 EcoR I 절단부위인 nucleotide position(NP)1108에서 Pst I 절단부위인 NP 3056까지의 RF 단편이 pTZ 19R에 삽입되었고 이 부분은 promotor로서 작용하는 TATA box와 VP1, VP2 유전자의 시작부분의 염기서열이 포함됨을 증명할 수 있었다(Fig 6). 염기서열 분석에서 p1471 clone은 pEP3 clone과 약 590bp가 겹치는 NP 2490-3837에 해당되는 유전자를 지닌 clone이며 또한 p2070 clone은 NP 3838-5011의 유전자를 지닌 clone인 것으로 확인되었다.

본 시험에서 결정된 CPV-V20의 염기서열을 Reed 등<sup>7</sup>이 보고한 CPV-N주의 염기서열과 비교할 때 promotor인 TATA box는 NP 890에 위치하며 VP1은 NP 1185에



CPV-V20 MAPPAKRARR GKGVLVKWGE GKDLIT\*LSM CFFIGLVPPG YKYLGPNGSL  
 CPV-N .....  
 CPV-780929 ..... K...  
 CPV-d .....  
 FPLV-Carl ..... N.....

100

CPV-V20 DQGEPTNPSD AAAKEHDEAY AAYLESKGNP YLYFSPADQR FIDQTKDAKD  
 CPV-N .....  
 CPV-780929 ..... P.....  
 CPV-d .....  
 FPLV-Carl ..... T.....

150

CPV-V20 WGGKIGHYFF RAKKAIAPVL TDDPHPSTS RPTKPTKRSK PPPHIFINLA  
 CPV-N .....  
 CPV-780929 ..... P..  
 CPV-d .....  
 FPLV-Carl .....

200

CPV-V20 KKKKAGAGQV KRDNLAPMSD GAVQFDGGQP AVRNERATGS GNGSGGGGGG  
 CPV-N .....  
 CPV-780929 ..... A.....  
 CPV-d .....  
 FPLV-Carl ..... Q.....

250

CPV-V20 GSGGVGISTG TFNNQTEFKF LENGWVEITA NSSRLVHLNM PESENYRRVV  
 CPV-N .....  
 CPV-780929 ..... KD.....  
 CPV-d .....  
 FPLV-Carl ..... Q .. KT...

300

CPV-V20 VNNMDKTAVN GNMALDDIHV QIVTPWSLVD ANVWGVWFNP GDWQLIVNTM  
 CPV-N ..... A..... A.....  
 CPV-780929 ..... A..... A D S.....  
 CPV-d ..... A.....  
 FPLV-Carl ..... K..... P .. T..... A.....

350

CPV-V20 SELHLVSFEQ EIFNVVLKTV SESATQPPTK VYNNDLTASL MVALDSNNTM  
 CPV-N ..... I.....  
 CPV-780929 ..... P.....  
 CPV-d .....  
 FPLV-Carl ..... I.....

400

CPV-V20 PFTPAAMRSE TLGFYPWKPT IPTPWRYYFQ WDRTLIPSHT GTSGTPTNIY  
 CPV-N .....  
 CPV-780929 ..... C.....  
 CPV-d .....  
 FPLV-Carl ..... HT.....

450

CPV-V20 HGTDPDDVQF YTIENSVPVH LLRTGDEFAT GTFFFDCKPC RLTHTWQTNR  
 CPV-N .....  
 CPV-780929 .....  
 CPV-d .....  
 FPLV-Carl ..... R..... A L.....

CPV-V20 ALGLPPFLNS LPQSEGATNT GDIGVQQDKR RGVTVQMGNTN YITEATIMRP  
 CPV-N .....  
 CPV-780929 ..... P ..... K .....  
 CPV-d .....  
 FPLV-Carl ..... H ..... D .....

CPV-V20 AEVGYSPYY SFEASTQGPE KTIPIAAGRGG AQTDENQAAD GDPRYAFGRQ  
 CPV-N ..... Y .....  
 CPV-780929 ..... LPI AGP ..... GAQTDENQ A ..... DGN .....  
 PV-d ..... N .....  
 FPLV-Carl ..... I .....

CPV-V20 HGQKTTTGTGE TPERFTYIAH QDTGRYPEGD WIENINFNLP VTNDNVLLPT  
 CPV-N .....  
 CPV-780929 ..... K ..... Q ..... R ..... I .....  
 CPV-d ..... Q .....  
 FPLV-Carl ..... A ..... Q .....

CPV-V20 DPIGGKTGIN YTNIFNTYGP LTALNNVPPV YPNGQIWDKE FDTDLKPRLH  
 CPV-N .....  
 CPV-780929 ..... S .....  
 CPV-d .....  
 FPLV-Carl .....

CPV-V20 VNAPFVCQNN CPGQLFVKVA PNLTNEYDPD ASANMSRIVT YSDFWWKGL  
 CPV-N .....  
 CPV-780929 ..... L ..... Q .....  
 CPV-d .....  
 FPLV-Carl .....

CPV-V20 VFKAKLRASH TWNPIQQISI NVDNQFNYPV SNIGGMKIVY EKSQ LAPRKL  
 CPV-N .....  
 CPV-780929 ..... M ..... Q ..... G .....  
 CPV-d ..... M .....  
 FPLV-Carl ..... M ..... L ..... N ..... A .....

**Fig 7.** Comparison of capsid protein sequence of CPV-V20 with CPV-N, CPV-780929, CPV-d and FPLV. The amino acid sequence of CPV-V20 were translated from the DNA sequence of CPV-V20 by using DNASIS program.

Data referred : CPV-N, Reed et al (1988) ; CPV-780929, Rhade et al (1985) ; CPV-d, Parrish et al (1988) ; FPLV-Carl, Carlson et al (1985).

서 NP 3437에 coding 되어 있고, VP2는 NP 1686에서 3437에 coding 되어 있음을 확인하였다(Fig 6). 또한 CPV-N주의 염기서열은 CPV-N의 NP3093에서 C가 T로, NP 3132에서 C가 T로, NP 3884에서 T가 G로 대치되어 있었고, NP 4701에서 A뒤에 G가 삽입되어 있었으며 NP 4709에서 G가 T로 대치되어 있었다. 그리고 CPV-N주와 CPV-V20주와의 비교시 특이하게 다른 점은 CPV-V20주에서 CPV-N주의 NP 4745에서 NP 4879의 135bp가 결손되었다는 것이다. 또한 NP 4913에서 G

가 T로, NP 4983에서 A 다음 A 한 염기가 추가되어 있음이 관찰되었다.

또한 CPV-V20을 Rhode 등<sup>14</sup>이 보고한 CPV-780929주와 염기서열을 비교한 바 VP1과 VP2유전자에서 더욱 많은 염기의 차이가 있었다. 또한 CPV-780929주도 CPV-V20주와 같이 3'말단부위에 135bp의 결손이 인정되었다. 이 3'말단의 결손은 Parrish 등<sup>37</sup>이 보고한 CPV-d, CPV-15와 CPV-31, Carlson 등<sup>11</sup>이 보고한 FPLV-Carl, Parrish 등<sup>38,39</sup>이 보고한 MEV-a 그리고 Nettle-

s 등<sup>40</sup>이 보고한 RPV-a 등에서도 인정되었다. 이 염기 부위는 구조유전자가 아닌 3'-noncoding region에서 반복구조로 구성되어 결손, 삽입, 부가 또는 대체되어도 바이러스의 병원성이나 생존에는 큰 영향을 주지 않을 것이라 사료된다. CPV-V20주와 CPV-N주는 VP1과 VP2 유전자에서 3개의 염기밖에 차이가 없어 구조유전자의 관점에서 가장 유사한 주로 생각되었으나 3'-noncoding region에서 CPV-V20주가 135bp의 결손을 보여 큰 차이가 나타났다. CPV-d주는 3'noncoding region에서 역시 CPV-V20주와 같이 135bp의 결손이 있었으나 capsid protein의 homology 비교에서는 N주보다는 다소 낮은 비율을 보였다. 또한 FPLV-Carl과는 CPV주들과 비교시 nucleotide나 amino acid sequence에서 높은 homology를 나타내 Reed 등<sup>7</sup>의 결과와 일치하였으며 CPV-V-2가 FPLV의 변이주일 가능성이 높고, 이러한 1~2%의 차이가 Parvoviridae의 항원성과 숙주영역을 결정한다는 사실을 Parish 등<sup>37</sup>의 보고가 뒷받침 해주고 있다고 사료된다.

## 결 론

국내에서 분리된 canine parvovirus주의 구조유전자를 cloning하고 염기서열을 결정하기 위한 일련의 시험을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 국내분리주인 CPV-V20주의 구조유전자를 cloning하여 map position 22에서 98의 CPV DNA를 포함하는 6개의 recombinant plasmid clone (pEP3, p1471, p2070 pEP069, pEP338 및 p14711p)을 작제하였다.

2. CPV-V20주의 바이러스 단백질 VP1과 VP2에 대한 구조유전자를 포함한 3780bp의 염기서열을 결정하였으며 VP1과 VP2 유전자의 염기서열을 기 보고된 국외분리주 CPV-N, CPV-d 및 CPV-780929와 비교한 바 CPV-N주에 대해 99.87%, CPV-d에 대해 99.73%, CPV-780929에 대해 96.85% 그리고 고양이 파보바이러스주인 FPLV-Carl에 대해서는 98.40%의 일치를 각각 보였다.

3. CPV-V20주의 VP1과 VP2 유전자의 염기서열을 아미노산으로 번역하여 비교한 바 CPV-N주에 대해 99.60%, CPV-d에 대해 99.33%, CPV-780929에 대해 94.13% 그리고 FPLV-Carl에 대해서는 96.67%의 일치를 각각 보였다.

4. CPV-V20주를 CPV-N주와 염기를 비교할 때 7부분의 point mutation이 인정되었고 CPV-N주에 존재하는 3'-noncoding region의 nucleotide position 4745에서 4879에 해당되는 135 nucleotides가 결손되어 있었다.

## 참 고 문 헌

- Gillespie JH, Timony JF, et al. eds. The parvoviridae. In Hagan and Bruner's infectious diseases of domestic animals. 8th ed. Comstock Publishing Associates. Ithaca and London. 1989 ; pp 511~514.
- Buxton A, Fraser G, eds. In animal microbiology. Blackwell Scientific Publications LTD, Oxford and London. 1977 ; pp 711~716.
- Cotmore SF, Tattersall P. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res* 1987 ; 33 : 91~97.
- Chappuis G, Duret C. : Canine parvovirus infection. *Vet Dep Ina Fra* 1979 ; 1~16.
- Berns KI, Labow MA. Parvovirus gene regulation. *J Gen Virol* 1987 ; 68 : 601~614.
- McCandlish IAP, Thompson H, Fisher EW, et al. Canine parvovirus infection. *Am J Small Animal Clinic* 1981 ; 5~15.
- Reed AP, Jones EV, Miller TJ. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J Virol* 1988 ; 62 : 266~276.
- Sarivastava AA, Lubsky EW, Berns KI. Nucleotide sequence and organization of the adeno associated virus 2 genome. *J Virol* 1983 ; 45 : 555~564.
- Astell CR, Garadiner EM, Tattersall P. DNA sequence of the lymphotropic variant of minute virus of mice. MVM (i) and its comparison with the DNA sequence of the fibrotropic prototype strain. *J Virol* 1986 ; 57 : 656~659.
- Rhode SL, Parradiso PK. Parvovirus genome : nucleotide sequence of H-1 and mapping of its genes by hybrid-arrested translation. *J Virol* 1983 ; 45 : 173~184.
- Carlson JR, Rushlow K, Maxwell I, et al. Cloning and sequence of DNA encoding structural proteins of the autonomous parvovirus feline panleukopenia virus. *J Virol* 1985 ; 55 : 574~582.
- Chen KC, Shull BC, Moses EA, et al. Complete nucleotide sequence and genome organization of bovine parvovirus. *J Virol* 1986 ; 60 : 1085~1097.
- Shade RO, Blundell MC, Cotmore SF, et al. Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child

- during aplastic crisis. *J Virol* 1986 ; 58 : 921~936.
14. Rhode SL. III. Nucleotide sequence of the coat protein gene of canine parvovirus. *J Virol* 1985 ; 54 : 630~633.
  15. Parrish CR, Aquadro CF, Carmichael LE. Canine host range and a specific epitope map along with variant sequences in the capsid protein gene of canine parvovirus and related feline, mink and racoon parvovirus. *Virology* 1988 ; 166 : 293~307.
  16. 이영옥, 최대영, 박봉근 등. 개 파보바이러스성 장염의 국내 발생보고. *대한수의학회지* 1982 ; 22 : 171~174.
  17. 한홍울, 황의경, 유규연 등. 개의 바이러스성 장염의 국내 발생보고. *대한수의학회지* 1982 ; 22 : 167~170.
  18. 최대영, 류영수, 권창희 등. 개의 파보바이러스성 감염증의 발생과 항체율 조사. *농사시험연구논문집* 1986 ; 28(2) : 193~199.
  19. 김태종, 류영수. 개 파보바이러스의 조직배양 증식성 및 혈구응집능에 관한 연구. *건국대학교 축산과학연구 논문집* 1988 ; 13 : 1~7.
  20. 최해연, 전무형, 박성국. 설사증 이환견으로부터 분리한 canine parvovirus의 성상에 관한 연구. *대한수의학회지* 1991 ; 31(3) : 295~302.
  21. 최해연, 전무형, 박성국. 환견으로부터 분리한 canine parvovirus의 실험적 감염자견에 대한 바이러스학적 연구. *대한수의학회지* 1991 ; 31(3) : 303~309.
  22. McMaster GK, Beard P, Engers HD. Characterization of an immunosuppressive parvovirus related to the minute virus of mice. *J Virol* 1981a ; 38 : 317~326.
  23. Tratschin JD, McMaster GK, Kronauer G. et al. Canine parvovirus : relationship to wild type and vaccine strains of feline panleukopenia virus and mink enteritis virus. *J Gen Virol* 1982 ; 61 : 33~41.
  24. Goto H, Hirano T. Comparative studies of physicochemical and biological properties between canine parvovirus and feline panleukopenia virus. *Jpn Vet Sci* 1984 ; 46 : 519~526.
  25. Thomas WM, Han SJ, Marc SC. Porcine parvovirus DNA. Characterization of the genomic and replicative form DNA of two virus isolates. *Virology* 1984 ; 137 : 241~245.
  26. Shinagawa M, Matsuda A, Ishiyama T, et al. Rapid and simple method for preparation of adenovirus DNA from infected cells. *Microbiol Immunol* 1983 ; 27 (9) : 817~822.
  27. Hirt B. Selective extraction of polyoma virus DNA from infected cell cultures. *J Mol Biol* 1967 ; 36 : 365~369.
  28. Paradiso PR, Rhode SL. III, Singer II. Canine parvovirus : a biochemical and ultrastructural characterization. *J gen Virol* 1982 ; 62 : 113~125.
  29. Brown TA, eds. Gene cloning, an introduction. Van Nostrand Reinhold. Berkshire. 1986.
  30. Kaummermeyer K, Clark VL. Genetic engineering fundamentals, an introduction to principles and applications. Marcel Dekker. New York. 1989.
  31. Ohman DE. Experiments in gene manipulation. Prentice Hall. New Jersey. 1988.
  32. Maniatis T, Fritsh EF, Sambrook J. Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. New York 1982.
  33. Old RW, Primrose SB. Principles of gene manipulation. an introduction to genetic engineering. 4th ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 1989.
  34. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Pro Natl Acad Sci* 1977 ; 74 : 5463~5467.
  35. Hindley J. DNA sequencing, laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Elsevier biomedical press. Amsterdam and New York. 1983.
  36. McMaster GK, Tratschin JD, Siegl G. Comparison of canine parvovirus with mink enteritis virus by restriction site mapping. *J Virol* 1981b ; 38 : 368~371.
  37. Parrish CR, Leathers CW, Pearson R. et al. Comparisons of feline panleukopenia virus, canine parvovirus, racoon parvovirus and mink enteritis virus and the their pathogenicity for mink and ferrets. *Am J Vet Res* 1987 ; 48 : 1429~1435.
  38. Parrish CR, Carmicheal LE, Antczak DF. Antigenic relationships between canine parvovirus type 2, feline panleukopenia virus and mink enteritis virus using conventional antisera and monoclonal antibodies. *Arch Virol* 1982 ; 72 : 267~278.
  39. Parrish CR, Gorham JR, Schwarz TM. et al. Characterization of antigenic variation among mink en-

teritis virus isolates. *Am J Vet Res* 1984 : 45 : 2591~  
2599.

ovirus infection in translocated racoons. *J Am Vet  
Med Assoc* 1980 : 177 : 787~789.

40. Nettles VF, Pearson JE, Gustafson GA, et al. Parv-

---