

Herpes simplex 바이러스의 유전학적 특성에 관한 연구

강 봉주·최 환수·최 선미·신 현규·조 동욱·박갑주
한국한의학 연구소 기초연구부 기초이론연구실

=Abstract =

Study or The Genetic Characteration of *Herpes Simplex Virus*

Kang Bong Joo, Choi Whan Soo,
Choi Sun Mi, Shin Hyun Kyoo, Cho Dong Wuk, Park Kap Joo

In order to facilitate the molecular characterization of the *Herpes simplex* Virus types 1 and types 2 genome DNAs, a gene library of cloned restriction fragments have been produced.

The Vero cells were infected with HSV-1 and HSV-2. 48 hours after infection, the infected cells were lysed, and multinucleated giant cells were observed approximately at seventy-two hours postinfection. The multiplication of HSV-1 and HSV-2 was observed in Vero cells using electromicroscopy. The nucleocapsids in nuclei were observed, and the assembled virions were budded out through the vacuole, and the virions were released from the cells. HSV-1 and HSV-2 was analyzed by digestion of their genome DANs with restriction enzymes. HSV-1 and HSV-2 genome DNAs were digested with *Bam*HI, *Bgl*II respectively. The *Bam*HI restriction fragments of HSV-1 and HSV-2 genome DNAs were twenty-seven fragments and thair molecular sizes

corresponding Author : K.J.Park.

were ranging 0.70~15.08, 4.4~31.0 kilobases. The *Bgl*III restriction fragments of HSV-1 and HSV-2 genome DNAs were sixteen, eighteen fragments and thair molecular sizes were ranging 4.8~30.0, 1.2~25.0 kilobases. And then *Bgl*III restriction frgments were cloned in *Escherichia coli*(*E. coli*) using the plasmid vector pBacPAK9.

【Key words】 *Herpes simplex* Virus, gene library

I. 서 론

Herpes simplex virus(HSV)는 제1형(HSV-1)과 제2형(HSV-2)으로 구분된다. 이 바이러스는 인체에서 비교적 약한 병변으로부터 치명적인 병변을 일으키는 매우 광범위한 발병원이다. 제1형은 구강, 얼굴 등에 주로 피진 상태의 병변을 일으키고, 제2형은 성기 및 항문 등에 병변을 일으키는 바이러스로 널리 알려져 있다. HSV는 사람의 분비물, 이성간의 접촉 이외에 식생활 및 가재도구 등의 주변 환경으로부터 쉽게 전염될 수 있다. 주요 발병으로는 구내염, 치육염, 포진성 습진, 헤르페스성 각결막, 비균성 수막염, 급성 궤양식도염, 원발성 비정형 폐렴, 태아의 뇌막염 및 발육 저해, 신생아의 전신성 감염으로 인한 치명적 결과, 헤르페스성 외음절염 및 성병 등이다.

약 150Kb의 선형 이중 가닥의 DNA 재놈을 가지는(Becker, Y., 등, 1968) 이들 바이러스는 약 80가지의 바이러스 단백질을 코딩하고 있으며(McGeoch, D.J., and Davison, A.J. 1986; McGeoch, D.J., 등, 1985), 이 바이러스에 의해 유발되는 상 기 질병들을 치료하기 위한 여러가지 치료제의 개발이 행해지고 있고, 그 결과 acyclovir와 vidarabin등 몇 종류의 화학요법제들이 개발되었다. 그러나 신생아 HSV감염에 대한 acyclovir와 vidarabin 치료에도 불구하고 사망률과 유병율은 증가하고 있다. 재발성 genital herpes를 가진 환자에게 Acyclovir를 매일 3번 200mg을 투여했는데도 불구하고 바이러스의 재활성이 입증되었다. 더군다나 태아에서의 acyclovir의 약리기전과 대사는 현재 잘 알려져 있지 않고, 또한 Acyclovir는 신장에 치명적으로 독성을 나타내는등 여러가지 부작용을 일으켜 위험을 초래한다. 이에 본연구에서는 전통적인 생약, 한약제제를 이용하여 인체에

는 전혀 해를 미치지 않고 바이러스에만 확실한 효과를 나타낼 수 있는 항 HSV 제를 개발하기 위해 HSV의 생체 감염기작, HSV의 전자현미경적 관찰, HSV DNA의 제한효소 패턴, HSV의 단백질 양상등 Herpes simplex virus Type-1과 Type-2에 관한 유전학적인 기초연구를 실시하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1-1. 바이러스

본 연구에서 사용된 바이러스는 국립보건원 후천성 면역결핍과에서 분양받은 것으로 HSV 제1형은 HSV-1 strain F(ATCC VR-733)와 HSV 제2형은 HSV-2 strain G(ATCC VR-734)이고 플라크를 분리한 HSV 바이러스 클론을 각각 HSV-1 strain은 F-HL-1, HSV-2 strain 은G-HL-2로 명명하여 본 실험에 사용하였다.

1-2. 숙주세포와 세포배양액

본 실험에 사용된 HSV-1, 2형 바이러스에 대한 숙주세포는 한국 세포주 은행 으로부터 분양받은 Vero 세포주(African green monkey kidney cell, ATCC-CCL 81)와 국립보건원 후천성 면역결핍과에서 분양받은 BHK-21 세포주(Baby hamster kidney cell, ATCC-CCL 10)를 사용하였고 Vero와 BHK-21 세포배양액은 Eagle's minimum essential medium(EMEM)에 10% fetal calf serum(FCS, Gibco), 0.22% sodium bicarbonate(Sigma), 1ml당 50 μ g의 gentamicin(Gibco)을 첨가하여 사용하였고 세포가 완전히 자라 세포단층을 이루면 이를 유지하기 위하여서는 2% FCS가 함유된 것을 사용하였다.

1-3. 사용한 플라스미드 벡터

제놈 library를 위한 클로닝 벡터로 pBacPAK-9 Vector를 건국대학교 생화학 과로부터 분양받아 사용하였다.

2. 실험방법

2-1. 세포배양

Vero세포의 세포증식을 위해서는 조직배양용 플라스크(25cm²)에 2% sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum, gentamicin(100μg/ml)을 첨가한 MEM을 넣어 37℃, 5% CO₂ 항온기에서 세포단층(monolayer)이 될 때까지 배양하였다. Vero세포를 계대배양 하기 위해서는 조직배양용 플라스크(75cm²)에 배양한 세포를 Phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 세척한 다음 0.05% 되게 트립신을 넣어 세포를 플라스크 바닥으로 분리시켜 조직배양용 플라스크(75cm²)에 1:3으로 분주하여 10% MEM 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 항온기에 배양하였다.

2-2. HSV-1, 2의 감염및 증식

HSV-1, 2의 바이러스 stock을 얻기 위해 액체질소에 보관중인 HSV-1 strain F와 HSV-2 strain G 바이러스를 37℃ 수조에 녹여 완전히 자란 단층 Vero세포가 든 25cm² 플라스크에 0.01~0.1 M.O.I 되도록 접종시킨 후 37℃에서 1시간동안 흡착시킨 후 2% 유지배지로 갈아주고, 7~8일 후 -70℃에 얼린 뒤 37℃에 녹여 초음파로 파쇄함으로써 바이러스를 수확하였다. 이렇게 얻은 바이러스 stock을 1 또는 2ml씩 나누어 -70℃에 보관하고 바이러스가 필요할 때마다 37℃에서 녹여 1분정도 초음파 처리하여 사용하였다.

HSV-1 바이러스의 증식을 위해서는 세포단층을 이룬 조직배양용 플라스크(75cm²)에 0.1-0.01 M.O.I(multiplication of infection)되게 바이러스를 감염하여 37℃, 5% CO₂ 항온기에서 한 시간동안 흡착시켜 2% MEM 배지를 첨가한 후 3-5일동안 37℃, 5% CO₂ 항온기에서 배양하면서 세포변성을 도립 현미경으로 관찰하고 바이러스의 증식에 의해 세포가 완전히 플라스크로부터 박리되어 나온 것을 확인하였다.

2-3. HSV-1,2의 플라크 결정법에 의한 바이러스의 역가측정 및 클론의 분리

세포단층을 이룬 플라스크(25cm²)에 바이러스를 0.1 M.O.I되게 감염시켜 37℃, 5% CO₂ 항온기에서 한 시간동안 흡착시켜 10% MEM 배지 5ml를 첨가한 후 37℃, 5% CO₂ 항온기에서 72시간동안 배양시킨 배양액을 8,000 x g에서 10분간 원

심분리하여 상층액을 플라크 분리에 사용하였다. 플라크 분리 방법은 Vero세포를 60 x 15 mm세포 배양용 접시에 2.0×10^6 cells/ml되게 분주하여 세포가 confluent가 될 때까지 배양한 후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 다음 원심분리하여 얻은 상층액을 10배 희석하여 각각 $100\mu\text{l}$ 씩 세포가 배양된 접시에 감염시켜 37°C , 5% CO_2 항온기에서 한 시간동안 흡착시켰다. 흡착되지 않은 바이러스를 PBS로 세척한 후 0.5% 아가로우스가 포함된 10% MEM을 넣어 37°C , 5% CO_2 항온기에서 3일동안 배양하였다. 3일후 0.01% neutral red가 첨가된 배지 3 ml을 부어 37°C , 5% CO_2 항온기에서 4시간동안 염색시킨 후 나타난 플라크 수를 계산하였다. 잘 분리된 플라크를 파스퇴르 파이펫으로 떼어내 다시 플라크를 분리하여 클론 바이러스를 분리하였다. 재분리된 클론 바이러스를 -70°C 에 보관하여 바이러스 stock으로 사용하였다.

2-4. HSV-1, 2의 증식과정의 도립현미경에 의한 관찰

세포단층을 이룬 플라스크(25cm²)에 HSV-1, 2의 바이러스를 0.1 M.O.I되게 감염시켜 37°C , 5% CO_2 항온기에서 한 시간동안 흡착시켜 10% MEM 배지 5ml를 첨가한 후 37°C , 5% CO_2 항온기에서 12, 24, 48, 60, 72시간동안 배양시킨 배양액에 존재하는 세포변화를 도립현미경으로 관찰하여 현미경에 부착된 카메라로 사진을 촬영하였다.

2-5. HSV-1, 2의 증식과정의 전자현미경에 의한 관찰

전자현미경 관찰을 위해서는 Vero세포가 플라스크에서 단층을 이루면 배지를 제거하고 바이러스를 0.1 M.O.I. 되게 감염시켜 37°C , 5% CO_2 항온기에서 48시간동안 배양한 후 배지를 제거하고 PBS를 넣어 부착되어 있는 세포를 3회 세척하여 원심분리하여 세포체를 모으고 2.5% glutaraldehyde-2% paraaldehyde 용액에 고정한 다음 PBS로 24시간동안 세포체를 충분히 수세하고 2차 고정을 1% osmium tetroxide(OsO_4)로 1시간 처리하고 고정된 세포체를 60% 에탄올부터 순수 에탄올까지 단계탈수를 하여 propylene oxide로 치환시킨 후 에폭시 수지(Epoxin resin)로 포매하고 60°C oven에서 열중합반응을 하였다. 세포체가 있는 Block을 $1\mu\text{m}$ 두께의 절편을 만들어 톨루이딘 블루 염색을 하여 HSV-1에 감염된 원하는 부위를 택하

여 Sorvall MT-6000 초박절편기로 60-80nm 두께의 절편을 만들고 uranyl acetate와 lead citrate로 각각 30분과 2분동안 이중염색하였다. 관찰은 투과형 전자현미경(Hitachi H-600, Japan)으로 가속전압 75 KV에서 60,000-150,000배로 관찰하였다.

2-6. HSV-1, 2의 Cell-associated virus(CAV)와 Cell-released virus(CRV)의 분리

바이러스와 제놈 DNA의 분리하기 위하여 Vero세포에 0.1 M.O.I.되게 바이러스를 감염시켜 3-5일이 지난 후에 배양액을 모은 후 3,500 x g에서 15분간 원심분리하여 HSV-1의 Cell-associated virus(CAV)을 얻었다. 이어서 상층액을 다시 Sorvall-28 SW(Beckman) rotor에 100,000 x g로 2시간동안 원심분리하여 Cell-released virus(CRV)를 분리하여 사용하였다. CAV는 초음파로 파쇄하여 바이러스 stock으로 사용하였고, CRV는 HSV-1, 2 제놈 DNA 클로닝에 사용하였다.

2-7. HSV-1, 2 제놈 DNA의 순수분리 및 정제

HSV-1, 2 제놈 DNA 분리와 정제는 De Luca 등(1984)과 Sandri-Goldin(1981)의 방법을 병행하여 실시하였다. HSV-1, 2 제놈 DNA 분리방법은 먼저 분리된 CRV 침전물을 TE 완충액으로 현탁한 후 1% SDS, 0.5% N-lauryl sarcosyl과 RNase(500 µg/ml)을 첨가한 후 2시간동안 37°C 온수조에서 반응시켰다. 이어서 proteinase K(2 mg/ml)을 첨가한 후 37°C에 12-18시간 반응시켜 phenol, phenol/chloroform, chloroform/isoamylalcohol순으로 단백질을 추출하고 3 M Na-acetate 완충액 1/10과 2배의 냉각된 95% ethanol을 가하여 -20°C 냉동고에 18시간 방치한 후 15,000 x g에서 20분 원심분리하였다. DNA 침전물을 70% ethanol로 처리하여 evaporator로 말린 다음 TE 완충액에 녹였다.

분리되어진 바이러스의 순수정제를 위해서는 바이러스 용출액 25ml에 cesium chloride(CsCl) 32.5g을 넣어 녹인 후 20°C에서 Beckman VTi 50 rotor에 100,000 x g로 20시간동안 원심분리하여 생긴 정제된 바이러스 제놈 DNA층을 22 gage 주사기로 회수하여 n-butanol로 Ethidium bromide(EtBr)를 제거하고 TE 완충액으로 24시간동안 투석하였다. 3M Na-acetate 완충액 1/10과 2배의 냉각된 95% ethanol을 가하여 -20°C 냉동고에 18시간 방치한 후 20,000 x g에서 60분 원심분

리하였다. DNA 침전물을 70% ethanol로 처리하여 TE 완충액 500 μ l에 녹여 UV 분광광도계(Shimadzu Co.)로 O.D. 260에서 흡광도를 측정하여 사용하였다.

전기영동은 0.6% agarose gel에 40% Sucrose가 첨가된 0.25% bromophenol-blue 염색액 5 μ l(pH 8.0)와 완충액에 부유된 HSV-1 재능 DNA 20 μ l를 혼합한 것을 loading한 후 20 volt에서 18시간 전개시킨 후 EtBr용액(0.53 μ g/ml)으로 30분간 염색하여 Short wave transilluminator(Ultraviolet product Co.)로 HSV-1, 2 재능 DNA밴드를 확인하였고 filter가 부착된 Polaroid UV 55mm(Universal Maniya)로 촬영하였다.

2-8. 재조합 플라스미드 DNA와 플라스미드 벡터의 분리 정제 및 회수

HSV-1, 2 재능 library을 만들기 위한 플라스미드 DNA분리는 Alkaline 분해에 의한 추출법을 수정하여 사용하였다(Birmboim 등., 1979). *E.coli*에 형질전환시킨 재조합 플라스미드를 선별하기 위해 ampicillin이 첨가된 LB 평판배지에서 흰 집락을 형성한 것을 3ml LB broth에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 100 r.p.m으로 진탕 배양하였다. 그후 3,000 x g로 15분간 원심분리하여 균체를 모으고 100 μ l의 GET 완충액으로 현탁한 다음 200 μ l의 lysis buffer(0.2N NaOH, 1.5% SDS)를 첨가하고 이어서 150 μ l의 5M K-acetate(pH4.5)를 넣고 phenol로 단백질을 추출하였다. 여기에 3M Na-acetate완충액 1/10과 2배의 냉각된 95% ethanol을 가하여 -20 $^{\circ}$ C 냉동고에 18시간 방치한 후 15,000 x g에서 15분 원심분리하여 TE 완충액 30 μ l에 녹여 제한효소에 의한 절단등에 사용하였다.

플라스미드 DNA 벡터의 분리는 Maniatis법(1989)을 수정하여 분리하였다. 실험 균주를 500ml LB broth에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 100 r.p.m으로 진탕 배양한 후 3,000 x g로 15분간 원심분리(Centricon H401)하여 균체를 모으고 GET 완충액으로 현탁하였다. 이 균체를 GET완충액 15ml에 부유시킨 후 1ml당 20mg되게 lysozyme을 가하고 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 1시간 반응시켰다. 이어서 0.2 N NaOH와 1% SDS 혼합액 20mg을 흔들어 섞은 후 얼음속에서 30분간 반응시키고 5M K-acetate완충액을 15ml 첨가하고 얼음에 30분간 방치한 다음 3,000 x g로 20분간 원심분리하였다. 이어서 상층액을 회수한 다음 0.6배의 isopropanol을 첨가하여 12,000 x g로 15분간 원심분리하였다. 원심분리후 생긴 DNA 침전물을 70%

ethanol로 처리한 다음 3ml의 TE 완충액에 현탁시켰다. Polyethylene glycol(PEG) 침전법에 의한 재조합 플라스미드 DNA의 정제는 TE 완충액 3ml에 녹인 DNA에 5M Lithium Chloride(LiCl) 3ml을 첨가한 후 12,000 x g로 10분간 원심분리하여 회수한 다음 동량의 isopropanol을 첨가하여 12,000 x g로 10분간 원심분리하였다. DNA 침전물을 70% ethanol로 처리한 다음 500 μ l의 TE 완충액에 녹이고 RNase를 1ml당 20 μ g을 가한 후 37°C에서 30분간 온수조반응하였다. 13% PEG 8.000을 함유한 1.6 M NaCl 500 μ l를 가하여 5,000 x g로 5분동안 원심분리하여 생긴 DNA 침전물을 TE 완충액 400 μ l에 녹인 후 phenol, phenol/chloroform, chloroform/isoamylalcohol순으로 단백질을 추출하고, 3M Na-acetate 완충액 1/10과 2배의 냉각된 95% ethanol을 가하여 -20°C 냉동고에 18시간 방치한 후 12,000 x g에서 20분 원심분리하였다. DNA 침전물을 70% ethanol로 처리하여 TE 완충액 500 μ l에 녹여 UV 분광광도계(Shimadzu Co.)로 O.D. 260에서 흡광도를 측정하여 사용하였다.

클로닝에 사용한 벡터 DNA 정제를 위해서는 CsCl 밀도구배 초원심 분리법(Maniatis법, 1989)을 사용하였다. TE 완충액에 녹인 DNA 용액 3ml에 3g의 CsCl과 EtBr을 첨가하여 40,000 x g로 36시간 초원심분리하여 플라스미드 DNA층을 22 gage 주사기로 회수하여 *n*-butanol로 EtBr을 제거하고 TE 완충액으로 24시간 동안 투석하였다. 전기영동은 1% agarose gel에 40% Sucrose가 첨가된 0.25% bromophenol-blue 염색액 1 μ l(pH 8.0)와 완충액에 부유된 플라스미드 DNA 6 μ l를 혼합한 것을 loading한 후 50 volt에서 4시간 전개시킨 후 EtBr용액(0.53 μ g/ml)으로 30분간 염색하여 Short wave transilluminator(Ultraviolet product Co.)로 플라스미드 DNA밴드를 확인하였고, filter가 부착된 Polaroid UV 55mm(Universal Maniya)로 촬영하였다. DNA의 회수는 Electroelution과 Low melting agarose방법에 의해 회수한 다음 phenol, phenol/chloroform, chloroform/isoamylalcohol순으로 추출한 다음 Etanol로 DNA를 침전시켜 사용하였다.

2-9. 사용한 제한효소의 반응 조건 및 전기영동

제한효소는 Boehringer Mannheim(BM)사와 New England Biolab(NEB)에서 구입한 *Bam*HI, *Bgl*III 제한효소를 사용하였다. 반응액, 온도 및 기타 조건 등은 제조원의 방법에 의하여 사용하였고, 각 단편들의 분자크기는 λ 파지 DNA/*Hind*III(Sigma)단

편, λ 과지 DNA/*Bst*EII(Sigma)단편을 표지 DNA로 사용하였고, HSV-1 제놈 DNA의 전기영동을 위해서는 0.6% agarose gel에서 1volt/cm로 16시간 전개시킨 후 분자 크기를 구하였다. 재조합체 플라스미드 DNA의 전기영동을 위해서는 1% 또는 0.8% agarose gel에서 5 volt/cm로 2시간 전개시킨 후 분자 크기를 구하였다.

2-10. HSV-1, 2형 바이러스 DNA의 클로닝 및 재조합 DNA의 형질전환

형질전환은 Samsbrook(1989)의 방법에 의하였으며 형질전환 허용세포를 만들기 위해서 LB broth에 전배양시킨 형질전환용 균주를 100:1 비율로 50ml의 LB broth에 접종하여 O.D 600에서 0.3이 되도록 배양한 다음 3,000 x *g* 15분간 원심분리하여 생긴 세포를 0.5배의 차가운 CaCl_2 로 현탁하고 얼음위에서 30분간 정치시켜 형질전환 허용세포를 만들었다. 이어서 4°C에서 3,000 x *g* 15분간 원심분리하여 세포를 모으고 5ml의 차가운 calcium chloride(CaCl_2)와 15% glycerol 혼합액으로 현탁시켜 에펜도르프 튜브에 200 μ l씩 분주한 다음 -70°C에서 24시간 방치시킨 후 실험에 사용하였다.

분리된 HSV-2 제놈 DNA를 *Bam*HI과 *Bg*III 제한효소로 절단하고 클로닝 벡터로 사용한 pBacPAK 9 벡터를 *Bg*III 제한효소로 절단하였다. 벡터 DNA는 carf intestine phosphatase(CIP)를 처리하였으며 HSV-2 제놈 DNA 0.5 pmol, 플라스미드 벡터 DNA 0.15 pmol, T4 ligase와 Ligase 완충액(60 mM Tris-HCl, pH 7.0, 6 mM MgCl_2 , 10 mM dithiothreitol, 0.4 mM ATP)을 넣어 18°C에서 4~20시간 반응시킨 다음 이 반응액을 형질전환용 세포주에 넣고 얼음위에서 40분간 방치한후 42°C 온수조에서 90초동안 반응시켜 LB-AP-X-gal 평판배지에 접종하여 37°C에서 18~24시간동안 배양시켰다.

2-11. SDS-PAGE에 의한 단백질패턴 조사

Laemmli(1970)의 방법을 이용하였다. 단백질 정량을 위해서는 시료의 단백질 농도가 10ml당 25mg 되도록 하였고 10% acrylamide 겔과 4% stacking 겔을 만든 후에 각 well에 10 μ l씩 항원시료를 넣어 표준분자량 marker(BIO-RAD)와 함께 20 mA에서 4시간 동안 전기영동을 하였다. 폴리펩티드 밴드를 관찰하기 위해서는 0.05% coomassie blue로 염색을 한 후 10% acetic acid와 30% methanol이 함유된 용액으로 탈색하였다.

III. 결 과

1. HSV-1의 증식과 클론의 분리

조직 배양용 플라스크에서 배양된 Vero 단층 배양세포를 0.05% 트립신을 사용하여 1:3 으로 분주하여 37°C 5% CO₂ 항온기에서 2~3일 후에 배양하면 다시 세포단층이 형성되었다. HSV-1, 2에 감염된 Vero세포를 도립현미경으로 관찰하였을 때 감염후 6시간에서는 거의 세포변성을 관찰할 수가 없었고 전형적인 섬유아세포의 형태를 나타내었으며 12시간 이후부터 약간의 세포 변성이 관찰 되었으며 24시간후의 세포의 형태는 굴절성의 원형형태를 형성하고 있었고 일부 세포는 플라스크로부터 박리되어 세포배양액 위에 부유되어 전형적인 세포변성을 나타내고 있었다. 36시간후부터 세포는 플라스크로부터 박리되어 세포배양액 위에 부유되어 전형적인 세포변성을 나타내고 있었다(Fig. 1).

플라스크형성은 24시간일때는 관찰할 수가 없었고 48시간후에는 완전한 플라스크가 형성되었다. HSV-1의 플라스크 모양은 원형으로 작은 크기였고 직경이 약 2.0-2.5 mm이었다(Fig. 2). 플라스크중에 크기가 크고 형성이 신속한 플라스크를 선별하여 클론을 분리하여 사용하였다. 클론중 플라스크에 다시 재감염시켜 감염정도가 다른 것보다 높은 것을 선택(HSV type 1-HL1, HSV type 2-HL2)하여 사용하였다.

2. Vero 세포에 감염된 HSV-1, 2의 전자현미경적 관찰

세포단층을 이룬 Vero세포에 0.1 M.O.I.되게 바이러스를 감염하여 48시간후에 투과 전자현미경으로 관찰한 결과 많은 수의 바이러스 입자가 핵 뿐만 아니라 세포질에서 흔히 관찰되었고 세포질막을 통과하여 세포밖으로 나가는 모습도 관찰되었다(Fig 3, 4, 5, 6). 핵내에 있는 HSV-1, 2는 비교적 세포의 형태가 잘 보존된 상태에서 약 100~110nm 두께의 망상구조나 작은 핵소체와 같은 구상구조를 이루는 염색질에 인접하여 관찰되었으며 HSV-1, 2는 염색질이 많이 모여 있는 곳(heterochromatin)의 주위에 집중해 있으나 핵내의 HSV-1, 2숫자가 점차 증가하면서 전자밀도가 높은 염색질이 없어지고 HSV-1, 2도 고르게 분포하였다. 핵내의 HSV-1, 2의 복제는 염색질이 다 소모될 때까지 진행되었다.

HSV-1, 2이 핵내에서 증식된 이후 비교적 세포의 상태가 유지되었을 때도 세포질내에서는 외부의 새로운 HSV-2에 대한 식세포작용이 진행되는 모습도 관찰되었다. HSV-1은 세포에 감염된 후 핵내에서 복제 증식한 후 세포질내로 이동할 때 핵막을 통과하면서 외투막을 갖고 세포질로 이동하여 세포밖으로 나가는 것을 관찰할 수 있었다. 그 외의 세포내 변화는 감염된 세포의 조면 소포체의 얇은 층상구조가 점차 팽창하여 원형으로 되며 층상구조에 붙어있던 리보솜은 없어지고 나중에는 공포(vacuole)형태로 관찰되며 때로는 그안에 많은 수의 HSV-1이 관찰되었다.

HSV-1을 감염시킨 가장 특징적인 세포 형태학적 변화는 세포변성에 따른 다핵세포의 출현이다. 감염세포에 따라서는 1개의 세포에 2개의 핵이 관찰 되거나 3개의 핵이 세포의 많은 부분을 차지하고 있었다. 다핵세포의 전형적인 전자현미경상으로서 세포질 부분보다 핵이 대부분을 차지하고 있으며 3개의 핵막 여러 부위에 전자밀도가 높은 2중막의 관상구조가 형성됨을 관찰할 수가 있었다.

3. HSV-1 분리 및 제놈 DNA의 정제

Vero세포에서 증식시킨 바이러스를 분리하여 제놈 DNA를 분리한 다음 cesium chloride(CsCl) 밀도구배에서 초원심분리를 하였을 때 바이러스 밴드가 1.4005와 1.4010사이에서 형성되었다. 바이러스를 proteinase K(2mg/ml)로 처리하고 phenol로 정제하여 제놈 DNA를 0.6% agarose gel에서 전기영동한 결과 한개의 두꺼운 밴드가 나타나는 것을 확인 할 수 있었다.

4. HSV-1, 2 제놈 DNA의 제한효소 패턴분석 및 비교

HSV-1, 2 제놈 DNA를 *Bam*HI, *Bgl*III 제한 효소로 절단한 결과는 다음과 같다(Fig. 7). *Bam*HI 제한효소로 절단했을 경우 같은 27개의 단편으로 분리되었고 이들 분자크기의 범위는 15~0.9, 31~4.4 kb이었다. *Bgl*III 제한효소로 절단했을 경우 각각 16, 18개의 단편으로 분리되었고 이들 분자크기의 범위는 30~4.8, 25~1.2 kb이었다.

5. HSV-2 재능 DNA의 *Bgl*III 단편의 클로닝 및 단백질 양상

HSV-2 재능 library를 위한 클로닝은 재능 DNA를 *Bgl*III제한효소로 절단하여 생긴 단편을 벡터인 pBacPAK 9의 *Bgl*III의 MCS(multi cloning site)에 형질전환에 의해 클로닝하여 LB-Ap 평판 배지에 생긴 흰 집락을 나타내는 클론체들을 선별하여 재조합 플라스미드를 분리하고 *Bgl*III제한효소로 절단하여 전기영동하였다. 절단된 단편들의 분자크기는 λ 파지DNA/*Hind*III와 *Bst*EII단편들을 표지 DNA로 사용하여 측정하였다.

*Bgl*III의 각 클론들은 재조합 플라스미드 DNA의 외래단편에 따라 각각 pHLB-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15로 명명하였으며 각각의 크기는 1.2, 1.9, 3.34, 3.52, 4.3, 4.43, 6.4, 7.1, 8.05, 8.32, 9.34, 11.2, 14, 15.9, 16.92 kb이었고 HSV-1/*Bgl*III 제한효소 패턴과 비교하여 94%의 재능 library를 얻었다 (Fig. 8). Vero cell 과 vero cell에 HSV-1과 HSV-2를 각각 감염시켜 얻은 발현 단백질 양상은 Fig. 9에 나타나 있다.

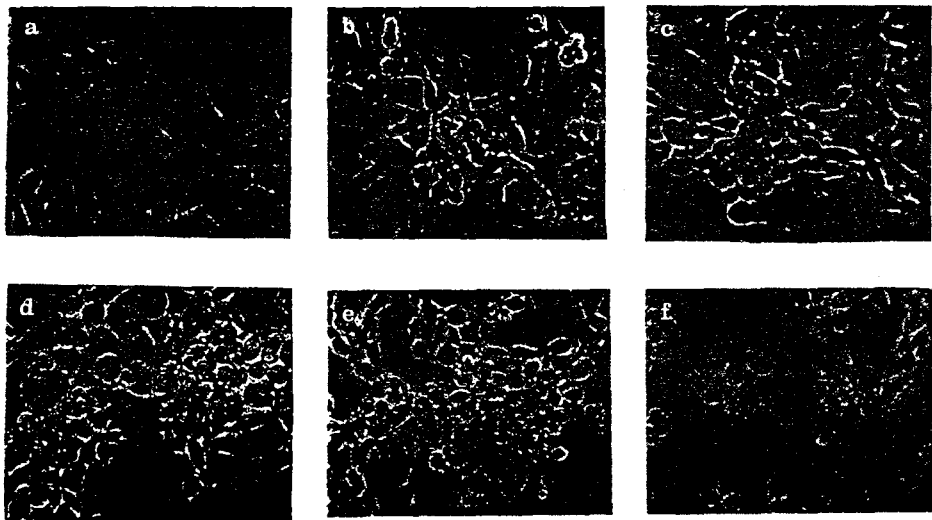


Fig.1. Vero cells infected with *H. simplex* virus type 2. Photos a: normal vero cells culture observed with a light microscope(x200), b: the cells infected with HSV-2 12h pi(x200), c: cells at 36 h pi(x200), d: cells at 48 h pi(x200), the cells were lysed, e: cells at 69 h pi(x200), cells were detached from the flasks, f: cells at 72 h pi(x300), cells were dead and lysed.



Fig.2. The plaques of *H. simplex* virus type 2 on vero cell monolayer.

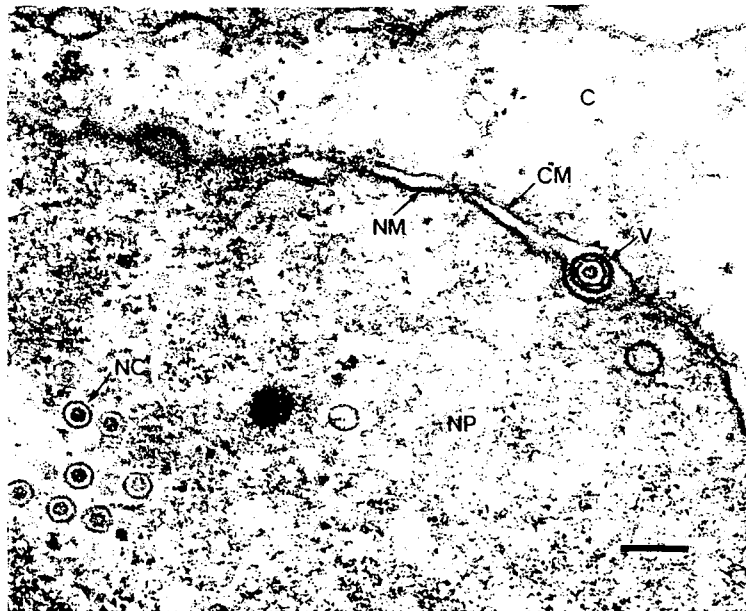


Fig.3. Electron microscope of cells infected with *H. simplex* virus type 2 at 48 h pi. Nucleocapsids were observed in nuclei. The black bar represents $1\mu\text{m}$.

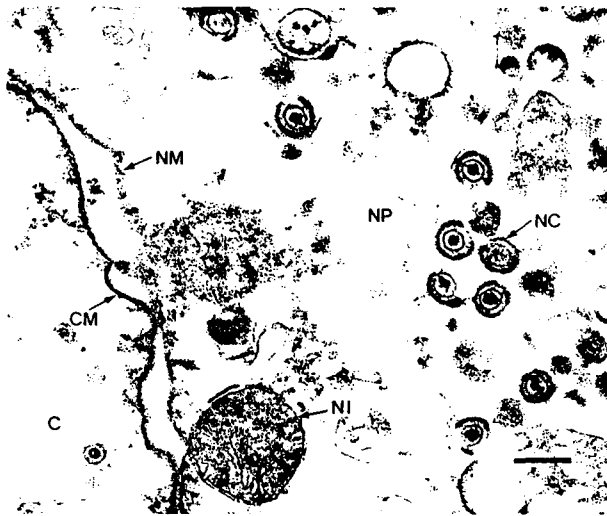


Fig.4. Electron microscope of cells infected with *H.simplex* virus type 2 at 48 h pi. Mature nuclear inclusions(NI) and branching fibrillar network(FN) were observed. The black bar represents 1 μ m.

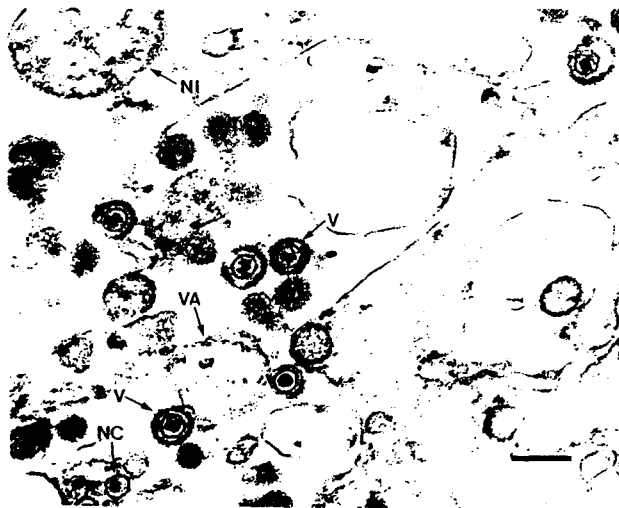


Fig.5. Electron micrograph of cells infected with *H.simplex* virus type 2 at 48 h pi. Assembled virions were budded out through the vacuole. The black bar represents 1 μ m.

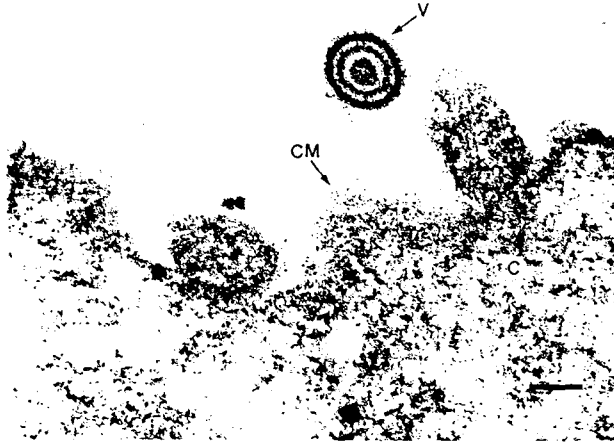


Fig.6. Electron micrograph of cells infected with *H.simplex* virus type 2 at 48 h pi. The virions were released from the cell. The black bar represents 1 μ m.

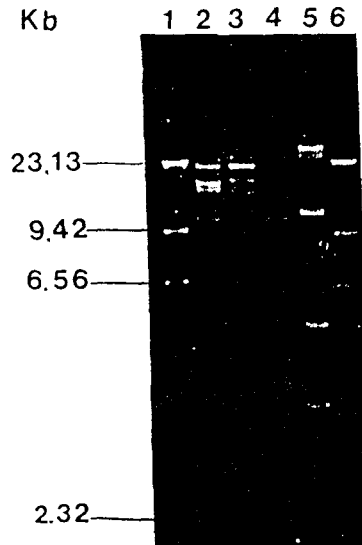


Fig.7. Restriction endonuclease fragment pattern of *H.simplex* virus type 1, type 2 genomic DNA. Lanes 1, λ phage DNA digested with *Hind*III; 2, type 1, *Bgl*II; 3, type 2, *Bgl*II; 4, type 1, *Bam*HI; 5, type 2, *Bam*HI; 6, λ phage DNA digested with *Hind*III.

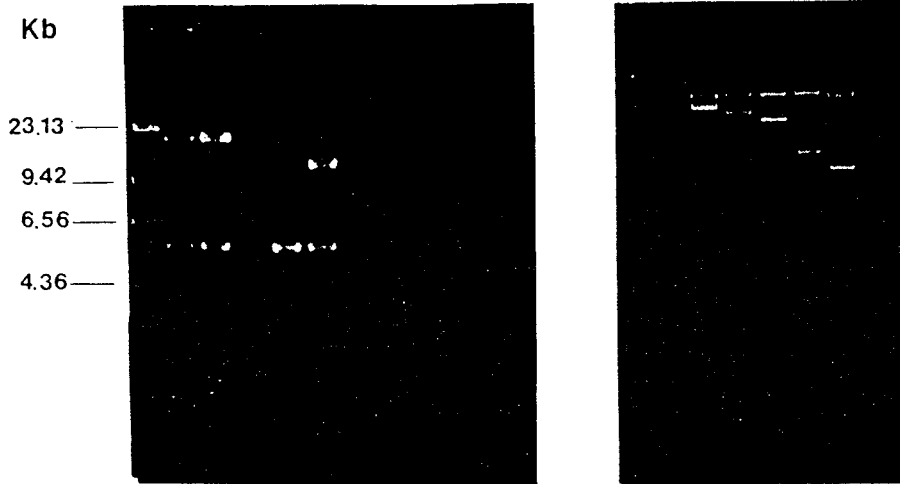


Fig.8. Identification of recombinant plasmids containing *H.simplex* virus type 2 DNA. fragments. The linear pBakPAK9 vector DNA bands are in the center. Each plasmid was isolated and redigested with *Bgl*II.

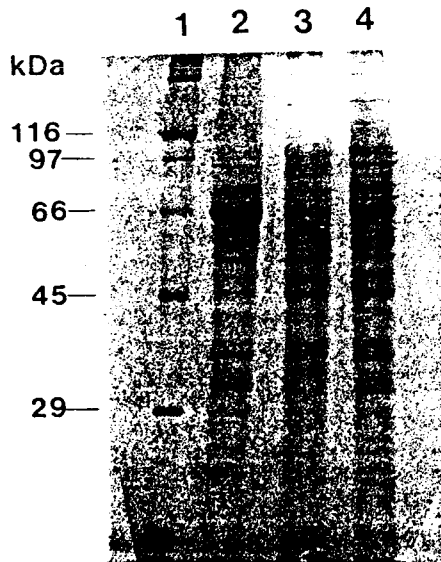


Fig.9. SDS-PAGE patterns of the *H.simplex* virus type 1, type 2. Lanes 1, molecular weight standards; 2, uninfected vero cells; 3, vero cells infected with HSV type 1; 4, vero cells infected with HSV type 2.

참 고 문 헌

1. Becker, Y., Dym, H., and Sarov, I. 1968. *Virology* 36: 184-192.
2. Birnboim, H. C., and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Reseach* 7:1513-1523.
3. De luca, N., Person, S., Bzik, D. J., and Snipes, W. 1984. Genome locations of temperature sensitive mutants in glycoprotein B of *herpes simplex virus* type 1. *Virology* 52:431-435.
4. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of a structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
5. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. 1989. Molecular cloning: A labortatry manual. Cold Spring Harbor. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory*.
6. McGeoch, D. J., and Davison, A. J. 1986. DNA sequence of the *herpes simplex virus* type 1 gene encoding glycoprotein gH, and the identification of homologues in the genomes of *varicella-zoster virus* and *Epstein-Barr virus*. *Nucleic Acids Reseach* 14:4281-4292.
7. Sambrook, J., Maniatis, T., and Fritsch, E. F. 1989. Molecular cloning: A labortatry manual. Cold Spring Harbor. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory*.
8. Sandri-Goldin, R. M., Goldin, A. L., Levin, M., and Gloriso, J. C. 1981. Cloning of *herpes sim plex virus* type 1 sequences representing the whole genome. *Journal of Viology* 38:50-58.