

## 소 바이러스성 설사병 바이러스 gp53 항원부위 유전자의 재조합 및 염기서열 연구

여상건 · H J Cho\* · S A Masri\*

경상대학교 수의과대학  
캐나다 농무성 동물질병연구소\*  
(1995년 1월 5일 접수)

### Molecular cloning and nucleotide sequencing of bovine viral diarrhea virus gp53 antigenic region

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

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University  
Animal Diseases Research Institute, Agriculture Canada\*

(Received Jan 5, 1995)

**Abstract :** Molecular cloning and nucleotide sequencing were undertaken for the RNA genome of gp53 antigenic region in cytopathic Singer strain of bovine viral diarrhea virus. The cloned cDNA was 939 nucleotides in length having a base composition of 31.0% A, 19.6% C, 25.5% G and 24.0% T.

The sequence was corresponded to approximately 77.8%(817 bases) of predicted gp53 region and 122 bases after 3' end of gp53 region in the Singer strain when compared with NADL strain of known sequence. A single open reading frame was found in the sequence of 2nd frame and was deduced as encoding 312 amino acids.

**Key words :** BVDV, Singer, gp53, cDNA, sequence

## 서 론

소의 바이러스성 설사병은 single-strand의 RNA를 핵산으로 가지며 togavirus에 속하는 bovine viral diarrhea virus(BVDV)가 원인체로서, 소화관점막의 궤양, 호흡기병변 등을 유발하여 폐사를 초래하거나 번식장애 등을 나타내어 경제적 피해가 큰 전염병이다<sup>1,2</sup>. BVDV는 배양세포에 대한 세포변성효과의 유무에 따라

세포변성독주와 비세포변성독주로 구분되며, 태아 감염 시에는 유·사산 또는 면역관용현상을 나타내며 소의 면역기능을 저하시킴으로써 합병증을 증가시킨다<sup>1,3</sup>. 이 병은 미국, 캐나다, 일본, 호주 및 유럽의 소에 만연되어 있으며<sup>4</sup>, 국내에서는 1987년에 석과 서<sup>5</sup>가 이 병으로 의심되는 한우, 육우, 유우로부터 BVDV를 분리함으로써 발생이 처음으로 확인되었다. 또한 석과 서<sup>6</sup>는 혈청중화 항체시험에서 검사대상 소의 41.6%가 BVDV에 대한 항

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

Address reprint requests to Dr Sang-geon Yeo, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Republic of Korea.

체를 보유하고 있었음을 밝혔던 바 이미 오래전부터 국내에서 이 병이 발생하였음을 추측할 수 있다. 최근에도 이 등<sup>7</sup>은 강원도 지역에서 소의 BVDV에 대한 항체보유율이 59%임을 보고하고 있어서 축산농가의 피해가 심할 것으로 예상된다.

이 병은 우역, 악성카타르열 등 수종의 전염병과 유사하여 진단에 어려움이 많으며, 특히 불현성감염개체 또는 보독동물의 진단은 불가능하다<sup>2,8,9</sup>. 그러므로 정확한 진단을 위하여 원인바이러스의 분리동정, 면역형광 항체법 및 혈청학적 검사법이 이용되고 있으나<sup>3,10-14</sup>, 많은 개체를 신속히 검사하기에는 난점이 많으며 비특이 반응으로 인하여 진단의 부정확성을 보이고 있다. 또한 면역관용 상태의 소는 일생동안 보독동물로 존재하면서 병을 확산시키는 반면 이 바이러스에 대한 항체를 보유하지 않거나 아주 낮은 수준을 유지한다<sup>8,9</sup>. 그러므로 주기적인 검사를 통하여 건강한 우군으로부터 제거되어야 하지만, 여러가지 한계성을 나타내는 바이러스 분리, 항원검출, 혈청항체검사 등의 방법으로는 감별이 어렵다<sup>15</sup>.

이 병의 예방을 위하여 약독화 생독백신이 사용되고 있으나 설사, 폐렴, 유산, 면역기능 저하 및 점막병으로의 발병 등 접종부작용이 나타나고 있다<sup>16-23</sup>. 더우기 접종시에 동물체내에 복제능력을 가진 백신주의 유전자가 축적될 수 있으며, 면역기능이 결손된 개체에서는 급성감염으로의 가역적 전환이 이루어질 수 있다. 또한 불활화 사독백신은 안전성이 인정되는 반면 면역지속 기간이 짧은 단점이 있다<sup>1</sup>. 그러므로 이 병의 방역을 위한 특이진단법 및 면역원성과 안전성이 우수한 예방약의 개발이 요구되고 있다. BVDV의 항원물질중 gp53은 중화항체생산을 유도하는 항원일 뿐만 아니라 병원성을 나타내는 주요 부위인 것으로 알려져 있으며<sup>15,24,25</sup>, 바이러스 항원유전자를 이용하기 위한 분자생물학적 연구가 이루어지고 있다. Renard et al<sup>26</sup>은 Osloss주의 전 염기서열이 12,492 base로 구성되어 있음을 보고하였으며, Collett et al<sup>27</sup>은 NADL주에서의 gp53 항원부위를 포함한 유전자의 전 염기서열을 12,573 base로 구명한 바 있다. 한편 Dale et al<sup>28</sup>은 Singer주의 유전자 중 1149 base를 cloning 하였던 바 이것은 gp25 및 gp53 항원부위 유전자의 각각 88% 및 58%에 해당하였다. 따라서 현재까지 Singer주의 전 염기서열은 밝혀지지 않고 있으며, gp53 항원부위를 포함한 유전자의 염기서열이 구명되어야 할 것으로 생각된다.

이 연구에서는 소의 바이러스성 설사병의 특이진단법 및 면역원성과 안전성이 우수한 정제항원 백신에 관

한 분자생물학적 기초로서, 세포변성독주인 Singer주의 gp53 항원부위 유전자를 cloning하고 염기서열을 조사코자 하였다.

## 재료 및 방법

이 실험을 위하여 다음과 같이 Cho et al<sup>29</sup>의 방법에 따라 바이러스를 배양하였으며, Maniatis et al<sup>30</sup>과 Collett et al<sup>27</sup>의 유전자 조작기법에 의하여 Singer주의 gp53항원 유전자를 cloning하였다. 또한 Sanger et al<sup>31</sup>의 dideoxy chain termination법으로 재조합 유전자의 염기서열을 조사하였다.

BVDV-Singer주의 배양 및 분리 : 바이러스의 배양을 위하여 BVDV에 감염되지 않은 Madin-Darby bovine kidney(MDBK) 세포를 말혈청이 5% 첨가된 minimal essential medium(MEM, Gibco)으로 배양시켰다. MDBK 세포의 발육이 양호한 상태에서 배지를 제거한 다음, Singer주를 MEM에 혼합하여 MDBK 세포에 접종한 후 37°C에서 4시간 동안 감염시켰다. 바이러스 접종액을 제거한 후 말혈청이 5% 첨가된 MEM 20ml를 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 배양하였다. 바이러스의 증식에 따른 세포변성 효과가 최고에 달할 즈음 배양상청액을 수확한 후 동결음해를 몇회 실시하여 세포내의 바이러스를 유출시켰으며, 이것을 5,000rpm에서 20분간 원심분리하여 세포를 침전시키고 상층의 바이러스액만 취하여 45,000rpm에서 4시간 동안 초원심분리하여 바이러스를 분리하였다.

바이러스 RNA의 추출정제 : 바이러스 RNA를 guanidium/phenol-chloroform법에 따라 추출하였다. 즉, 순수분리된 바이러스를 guanidium thiocyanate 용액과 혼합하여 단백질을 변성시킨 후, 여기에 3M sodium acetate(pH 4.0) 용액과 phenol-chloroform(1:1) 용액을 첨가하여 얼음에서 정치하였다. 이것을 4°C, 10,000g에서 원심분리하고 상청액을 취하여 동량의 isopropanol과 혼합하여 4°C에서 철야 정치시킨 후 원심분리하여 RNA 침전물을 얻었다.

cDNA의 생산 : 순수분리된 Singer주의 RNA에 대하여 cDNA 생산 키트(Boehringer Mannheim)의 random primer, dNTPs(dATP, dCTP, dGTP, dTTP), RNase inhibitor 및 반응완충액을 혼합하고 reverse transcriptase를 가하여 42°C에서 1시간 반응시켜 cDNA의 1st-strand를 만들었다. 여기에 sense primer, antisense primer와 polymerase chain reaction(PCR) 키

트(Perkin Elmer)의 dNTPs 및 반응완충액을 혼합한 후 Taq DNA polymerase를 가지고 PCR 반응을 실시하여 Singer주의 gp53 항원부위 RNA에 대한 두가닥 사슬의 cDNA를 생산하였다. 이때 사용하였던 sense 및 antisense primer는 NAD1주의 gp53 항원부위 유전자의 염기서열<sup>27,32</sup>을 참고로 하여 각각 21 mer의 oligonucleotide를 생산하였으며 그 염기서열은 다음과 같다.

Sense primer: 5' TGG AAC GCT GCA ACA ACT ACT GC 3'

Antisense primer: 5' GTT AGC AAG TTG CCC ATC ATC AC 3'

BVDN-cDNA의 cloning : Singer주의 gp53 항원부위의 유전자를 재조합 하기 위하여 cloning vector인 pUC 13 plasmid의 DNA를 *Sma*I 제한효소로 절단하여 blunt-end 상태로 만든 후 calf intestinal alkaline phosphatase로 처리하여 자가결합을 방지하였으며, 이 plasmid DNA를 gp53 항원부위 유전자에 대하여 생산된 cDNA와 결합시켰다. 즉 cDNA 용액 5 $\mu$ l에 pUC 13 plasmid DNA, ATP, T4 DNA ligase 및 반응완충액을 혼합하고 14 $^{\circ}$ C에서 철야 반응시켰다. 이 결합체를 competent *E coli* DH5a 세포와 혼합하여 얼음에서 30분간 정치하였고, 42 $^{\circ}$ C에서 45초 동안 열자극을 주고 S.O.C.를 가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 진탕배양하여 형질전환 하였다.

유전자 재조합 DNA clone의 선별 : 형질전환된 *E coli*를 ampicillin(50 $\mu$ g/ml)과 X-gal(40 $\mu$ g/ml)이 첨가된 LB agar에서 37 $^{\circ}$ C, 18~24시간 배양하였으며, 발육한 백색의 집락으로부터 plasmid DNA를 추출하여 제한효소로 절단하였다. 이것을 1% agarose-gel 전기영동상에서 분석하여 gp53 항원부위 유전자에 대한 cDNA를 insert로 가지는 유전자 재조합 DNA clone을 선별하였다.

유전자 재조합 DNA의 특이성 조사 : 유전자 재조합 DNA의 특이성을 조사하기 위하여 Nick translation법으로 재조합 DNA에 방사능 물질을 표지시켜 probe를 만들었다. 즉 gp53-cDNA insert를 가지는 clone으로부터 DNA를 추출, 전조시킨 다음 여기에 dGTP와 dTTP, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP와 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP, DNA polymerase I/DNase를 혼합하고, 15 $^{\circ}$ C에서 90분간 반응시킨 후 알코올 침전법으로 방사능물질이 표지된 DNA를 수확하였다. 이 방사능 표지 DNA probe를 이용하여 nitrocellulose membrane상에서 Singer주 RNA와의 hybridization 실험을 실시하여 유전자 재조합 DNA의 바

이러스 RNA에 대한 특이성을 조사하였다.

염기서열 조사 : Dideoxy chain termination법으로 gp53 항원부위 유전자에 대한 cDNA의 염기서열을 조사하였다. 즉, gp53-cDNA를 NaOH 용액으로 변성시킨 후 이 DNA에 forward 및 reverse primer를 가하여 annealing 시키고, labeling mix(dCTP, dGTP, dTTP), DTT, [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP 및 T7 DNA polymerase를 가하여 실온에서 2~5분간 sequencing 반응을 하였다. 이것을 dideoxy NTPs(ddATP, ddCTP, ddGTP 또는 ddTTP)가 분주되어 있는 각 microfuge tube에 주입한 후 37 $^{\circ}$ C에서 3~5분간 반응시켜 sequencing 반응을 중단하였다. 이어서 8% acrylamide/bis-acrylamide gel에서 전기영동한 다음 autoradiography 하여 염기서열을 조사하였다.

## 결 과

Singer주의 RNA에 대한 cDNA의 생산 : MDBK세포 배양계에서 증식시켜 순수분리된 Singer주로부터 추출하였던 RNA에 대하여 reverse transcriptase 반응을 하여 cDNA의 1st-strand를 만들었다. 이 1st-strand의 cDNA를 template로 하여 gp53 항원부위 유전자에 대한 sense 및 antisense primer로서 PCR 반응을 하였던 결과 Fig 1과 같이 gp53 항원부위의 유전자에 대한 약 0.9 kilobases(Kb) 크기의 double-strand cDNA를 생산할 수 있었다.

BVDV-cDNA의 cloning 및 유전자 재조합 DNA clone의 선별 : Singer주의 gp53 항원부위 유전자에 대

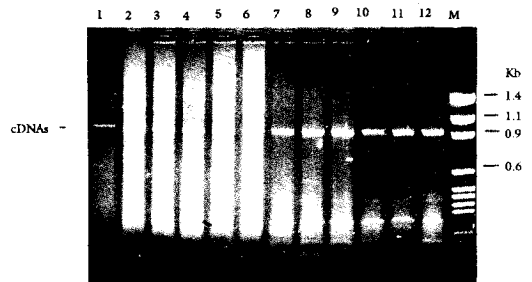


Fig1. The cDNA synthesized for gp53 antigenic gene of BVDV Singer strain by polymerase chain reaction: 1~12, cDNAs; M,  $\phi$ X174 DNA marker for molecular weight.

하여 생산된 cDNA를 pUC13 plasmid와 결합시킨 후 *E. coli* DH5a 세포내로 형질전환하여 gene cloning을 수행하였다. 이 형질전환된 clone으로 부터 plasmid DNA를 추출하여 *Bam*HI과 *Eco*RI 제한효소로 절단하였던 결과 Fig 2와 같이 clone들 중 일부가 0.3~1Kb 크기의 insert DNA를 가지는 유전자 재조합 DNA clone임을 알 수 있었다.

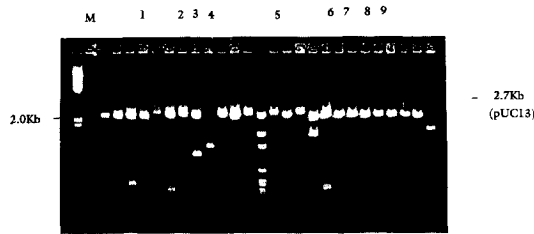


Fig 2. Recombinant DNA clones observed by digestion of recombinant plasmid DNAs with *Bam*HI and *Eco*RI restriction endonucleases: 1-9, recombinant DNA clones; M,  $\lambda$ -DNA marker for molecular weight.

이들 유전자 재조합 clone의 DNA를 probe로 만들어 Singer주의 RNA와 hybridization을 하였을 때 대부분의 clone들이 Fig 3과 같이 바이러스 RNA에 대한 특이적인 상보성을 나타내었다.

염기서열 조사 : Singer주의 gp53 항원부위 유전자의 염기서열을 조사하기 위하여, 유전자 재조합 clone 중 PCR 반응으로 생산되었던 cDNA의 크기인 0.9Kb 이상의 insert를 가진 clone의 DNA를 추출한 후 sequencing 반응을 하였으며 작성된 염기서열은 Fig 4와 같다.

Clone number

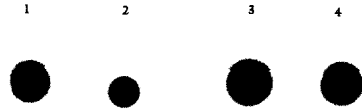


Fig 3. DNA-RNA hybridization between recombinant DNAs and RNA of BVDV Singer strain.

총 939 base가 cloning 되었으며 이 DNA는 adenine 291개(31.0%), cytosine 184개(19.6%), guanine 239개(25.5%) 및 thymine 225개(24.0%)로 구성되어 있었다. 이 염기서열을 NADL주에서 gp53 항원부위로 추측되는 제 2570번 염기에서 3506번 염기까지의 약 1,050 base<sup>27,32</sup>와 비교할 때, 본 실험에서 cloning된 Singer주의 유전자는 NADL주 유전자의 2689번 염기에서 3628번 염기까지에 해당하였다. 이와 같은 사실로 보면 Singer주의 gp53 항원부위 유전자 중 5' 부위의 염기 약 119개는 cloning 되지 않은 것으로 생각되었으며, 염기서열 중 282번에서 NADL주의 제 2971번 염기인 cytosine 1개가 결손되어 있었으나 3' 말단부 이후의 약 122 base가 추가되어 있었다. 따라서 cloning 되었던 939 base 중 추가되었던 122 base를 제외한 817 base가 순수하게 Singer주의 gp53 항원유전자일 것으로 추정되었다. 이것은 NADL주의 gp53 항원부의 유전자 1050 base에 비교하면 singer주 gp53 항원유전자의 약 77.8%에 해당하였다. 한편 cloning된 Singer주의 유전자 939 base를 이 부위에 해당하는 NADL주의 유전자와 비교할 때는 Table 1과 같이 94.5%의 동질성이 인정되었다.

이 염기서열로부터의 아미노산 가장 번역상을 보면 Fig 5와 같이 2nd frame에서 한개의 open reading frame이 관찰되었으며, 이로부터 총 20종 312개의 아미노산 번역이 예상되었다. 또한 NADL주와 비교할 때 Table 2와 같이 아미노산의 동질성은 93.3%이었다.

Table 1. Nucleotide sequence homology of DNA cloned from gp53 antigenic region of singer strain compared with NADL strain

Virus strain	Nucleotide No in strain	Length of DNA	Homolgy/Length(%)			Reference
			Matched	Mismatched	Unmatched	
Singer	1-939	939	888/940(94.5)	51/940(5.4)	1/940(0.1)	-
NADL	2689-3628	940	-	-	-	Collett et al <sup>27</sup>

1 2689	CAGTGTGGTAATCAAAAAACTTTTTGATGGCGAAACGAGAGGATGTAGTCGAAATGGA T C GC A	60 2748
61 2749	CGACAACCTTTGAATTTGGACTCTGCCCATGTGATGCCAAACCCATAGTAAGAGGGAAATT G	120 2808
121 2809	CAATACAACGCTGCTGAACGGATCGGCCTTCCAGATGGTATGCCCCATAGGATGGACAGG C	180 2868
181 2869	GACTGTAAGCTGTATGTCATTCAATATGGACACCTTAGCCACAACCGTGATACGGACATA C T G	240 2928
241 2929	TAGAAGGTCCAAACTATTTCCCTCATAGGCAAGGCTGTATCA*CCAAAAGACTCTGGGGGA T C C C A	299 2988
300 2989	GGATCTCCATAACTGCATCCTTGGAGGAAATTGGACTTGTGTGCCTGGAGACATGCTATT CAA C	359 3048
360 3049	ATACAAAGGGGGCTCTATTGAATCCTGCAAGTGGTGTGGTTATCAATTTAAAGAGAGCGA T C T	419 3108
420 3109	GGGACTACCACACTACCCCATTTGGCAAGTGTAGATTAGAGAATGAGACTGGTTACAGACT A G C G	479 3168
480 3169	AGTAGACGATACCTCTTGTGATAGAGAAGGTGTGGCCATAGTACCACAAGGGACATTACG AG CA AA	540 3228
541 3229	GTGCAAGATAGGAAAACTACTATACAGGTCATAGCTATGGATACCAAACCTCGGGCCTAT A G A	599 3288
600 3289	GCCTTGCAGACCATATGAAATAATCAAGTGAAGGGCCCTGTAGAAAGGACAGCGTGTAC C A	659 3348
660 3349	CTTCAACTACACTGAAACATTAATAAATAAGTATTTGAGCCCAGAGACAGCTACTTCCA T A G T	719 3408
720 3409	GCAATACATGCTAAAAGGAGAGTATCAATACTGGTTTGACCTGGAGGTAACCGACCATCA G T	779 3468
780 3469	CCGGGATTACTTTGCCGAGTCCATATTAGTGGTGGTGGTAGCCCTCTGGGTGGCAGATA C T A = T	839 3528
840 3529	TGACTTTGGTTACTAGTTACATACATGGTCTTATCAGAACAGAAGGCCCTCAGGGACTCA G T T	899 3588
900 3589	GTATGGAGCAGGGGAAGTAGTGATGATGGGCAACTTGCTA T G	939 3628

Fig 4. Nucleotide sequence in DNA cloned from gp53 antigenic region of Singer strain: mismatched nucleotides in NADL strain(Collett et al<sup>27</sup>) were compared in low phase; \*, unmatched site of a nucleotide in Singer strain; nucleotide which is double-underlined is considered as the 3' end of gp53 antigenic region in NADL.

Table 2. Homology of deduced amino acid sequence in DNA cloned from gp53 antigenic region of Singer strain compared with NADL strain

Virus strain	Length of DNA	Length of amino acids	Homology/Length(%)			Reference
			Matched	Mismatched	Unmatched	
Singer	939	312	292/313(93.3)	20/313(6.4)	1/313(0.3)	-
NADL	940	313	-	-	-	Collett et al <sup>27</sup>

1 --C AGT GTG GTA ATC AAA AAA CTT TTT GAT GGG CGA AAC GAA GAG GAT GTA GTC GAA ATG GAC 61  
S V V I K F K L F D G R N E E K R D V V E M D N  
62 GAC AAC TTT GAA TTT GGA CTC TGC CCA TGT GAT GGC AAA CCC ATA GTA AGA GGG AAA TTC AAT 124  
D N F E F G L C P C D A K P I V R G K F N  
125 ACA ACG CTG CTG AAC GGA TCG GCC TTC CAG ATG GTA TGC CCC ATA GGA TGG ACA GGG ACT GTA 187  
T T L L N G S P A F Q M V C P I G W T G T V  
188 AGC TGT ATG TCA TTC AAT ATG GAC ACC TTA GCC ACA ACC GTG ATA CGG ACA TAT AGA AGG TCC 250  
S C M S F N M D T L A T T V I V R T Y R R S  
251 AAA CTA TTT CCT CAT AGG CAA GGC TGT ATC A?C CAA AAG ACT CTG GGG GAG GAT CTC CAT AAC 312  
K L P F P H R Q G C I ? T Q K T N L G E D L H N  
MboI  
313 TGC ATC CTT GGA GGA AAT TGG ACT TGT GTG CCT GGA GAC ATG CTA TTA TAC AAA GGG GGC TCT 375  
C I L G G N W T C V P G D M Q L L Y K G G S  
376 ATT GAA TCC TGC AAG TGG TGT GGT TAT CAA TTT AAA GAG AGC GAG GGA CTA CCA CAC TAC CCC 438  
I E S C K W C G Y Q F K E S E G L P H Y P  
439 ATT GGC AAG TGT AGA TTA GAG AAT GAG ACT GGT TAC AGA CTA GTA GAC GAT ACC TCT TGT GAT 501  
I G K C R L E N E T G Y R L V D S T S C D N  
502 AGA GAA GGT GTG GCC ATA GTA CCA CAA GGG ACA TTA CGG TGC AAG ATA GGA AAA ACT ACT ATA 564  
R E G V A I V P Q G T L R C K I G K T T I V  
565 CAG GTC ATA GCT ATG GAT ACC AAA CTC GGG CCT ATG CCT TGC AGA CCA TAT GAA ATA ATA TCA 627  
Q V I A M D T K L G P M P C R P Y E I I S  
628 AGT GAG GGG CCT GTA GAA AGG ACA GCG TGT ACC TTC AAC TAC ACT GAA ACA TTA AAA AAT AAG 690  
S E G P V E R T A C T F N Y T E T L K N K  
691 TAT TTT GAG CCC AGA GAC AGC TAC TTC CAG CAA TAC ATG CTA AAA GGA GAG TAT CAA TAC TGG 753  
Y F E P R D S Y F Q Q Y M L K G E Y Q Y W  
754 TTT GAC CTG GAG GTA ACC GAC CAT CAC CGG GAT TAC TTT GCC GAG TCC ATA TTA GTG GTG GTG 816  
F D L E V T D H H R D Y F A E S I L V V V  
817 GTA GCC CTC CTG GGT GGC AGA TAT GTA CTT TGG TTA CTA GTT ACA TAC ATG GTC TTA TCA GAA 879  
V A L L G G R Y V L W L L V T Y M V L S E  
880 CAG AAG GCC TCA GGG ACT CAG TAT GGA GCA GGG GAA GTA GTG ATG ATG GGC AAC TTG CTA 939  
Q K A S L G T I Q Y G A S G E V V M M G N L L

Fig 5. Deduced amino acid sequence from DNA of gp53 antigenic region in Singer strain: amino acids from 2nd reading frame were shown and mismatched amino acids in NADL strain(Collett et al<sup>27</sup>) were compared;

\*, unmatched site of an amino acid in Singer strain.

## 고 찰

BVDV는 표면항원 물질로서 glycoprotein인 gp25, gp48, gp53, gp62 및 protein인 p20, p80, p125 등을 소유하고 있다<sup>9</sup>. 이들중 gp53 항원은 바이러스의 병원성과 관계가 있을 뿐 아니라 중화항체 생산을 자극함으로써 감염동물의 면역반응을 유도하는 주된 항원인 것으로 밝혀져 있다<sup>15,24,25</sup>.

본 연구에서는 Singer주의 gp53 항원부위 유전자를 cloning 하고자, Collett et al<sup>32</sup> 및 Collett et al<sup>27</sup>이 제시 하였던 NADL주의 유전자 구조와 염기서열 중 gp53 항원유전자의 위치를 참고로 sense 및 antisense primer를 제작하였다. 이들 primer를 이용한 PCR 반응에 의하여 약 0.9Kb의 cDNA를 얻었으며, 이 cDNA는 hybridization 실험에서 Singer주 RNA와의 상보성을 나타냄으로서 이 바이러스의 유전자 임이 인정되었다. 현재까지 BVDV의 gp53 항원유전자 부위는 정확하지는 않으나, Collett et al<sup>27</sup>에 의하면 NADL주에서는 제 2570번 염기에서 3506번 염기까지로 크기가 약 1,050 base로 추정되고 있다. 그러므로 본 실험에서 Singer주의 gp53 항원유전자에 대하여 생산된 cDNA는 크기로 고려할 때 PCR 및 cloning 과정에서 gp53 항원유전자의 일부가 결손되었던 것으로 추측된다.

즉, 염기서열로 볼 때 이 cDNA는 총 939 base로서 NADL주의 2689번 염기에서 3628번 염기까지에 해당하였으며 이 부위에서 염기서열의 동질성은 94.5% 이었다. 하지만 이 cDNA는 NADL주의 gp53 항원유전자와 대조할 때 5' 부위에 해당하는 약 119개 및 제 2971번에서 1개의 염기결손이 인정되었으며, 반면에 3' 말단부위 이후의 약 122 base가 추가되어 있었다. 따라서 939 base 중 준수한 gp53 항원부위 유전자는 122 base를 제외한 817 base로 추정되었으며, NADL주의 gp53 항원유전자로 추측되는 1,050 base에 비교하면 약 77.8%에 해당하였다. 이와 같은 사실로 볼 때 본 연구에서 얻어진 cDNA로부터는 온전한 gp53 항원 단백질 정제생산할 수가 없는 것으로 판정되었다. 한편 Dale et al<sup>28</sup>은 Singer주의 gp53 항원부위 유전자의 58%를 cloning 하였던 바, 이것은 본 연구에서 밝혀진 염기서열 중 제 423번 염기까지에 해당하였다. 그러므로 밝혀지지 않았던 gp53 항원유전자의 3' 부위 약 394 base 및 그 이후의 약 122 base에 해당하는 염기서열을 밝힐 수가 있었다.

Collett et al<sup>27</sup>에 의하면 NADL주의 유전자는 총 12,573 base이며, 2nd frame에서 제 386-388번 염기인

ATG codon으로부터 제 12,349번 염기까지의 1개의 open reading frame이 관찰되고 있다. 본 실험에서 획득한 Singer주의 gp53 항원부위 유전자는 결손부위가 인정되지만 NADL주와의 해당부위 만을 비교하면, 역시 2nd frame에서 1개의 open reading frame이 관찰되었으며 아미노산의 동질성이 93.3%이었다. 그러므로 특정 제한효소로 처리하여 이 cDNA의 결손부위를 제거하게 되면 Singer주의 gp53 항원유전자의 일부로서 NADL주의 제 2970번 염기 이후에 해당하는 유전자의 발현이 가능할 것으로 생각되었다. 즉, 이 cDNA는 pUC13 plasmid의 *Sma*I 부위에 cloning되어 있으므로, *Sma*I 부위 전방에 위치하는 염기배열 "GGATCC"의 G와 G 사이를 절단하는 *Bam*HI 및 염기배열 "GATC"의 G 전방을 절단하는 *Mbo*I 또는 *Sau*3A I 효소로 처리하면 결손부위인 제 282번 염기 뒤 부분인 301번 염기까지의 분절을 제거할 수 있다(Fig 5). 또한 이들 효소에 의하여 절단되는 각 단면의 염기배열은 상보성을 가짐으로 그 자체를 다시 결합시킬 때 reading frame에는 변화를 일으키지 않는다. 그러므로 639 base에 해당하는 유전자의 발현이 가능할 것으로 예상되지만, 생산되는 단백질의 gp53 항원으로서의 능력 등에 관하여는 추시를 통한 검정이 필요한 것으로 생각된다.

한편 Potgieter와 Brock<sup>33</sup>, Brock et al<sup>34</sup> 및 Jensen et al<sup>35</sup>은 BVDV의 RNA에 대한 cDNA를 probe로 사용하여 RNA-DNA hybridization 시험을 하였던 결과, 감염 조직내 BVDV의 검출 또는 만성보독우의 백혈구내 BVDV 검출효과가 우수하였으며 이 바이러스와 공통 항원성이 있는 다른 바이러스의 감별효과도 뛰어난을 보고하였다. 이와같이 핵산검출에 근거를 둔 감염 바이러스의 확인방법은 전염병의 진단에 획기적인 방법으로 제시되고 있으며<sup>36</sup>, 본 연구에서 얻어진 Singer주의 gp53 항원부위 유전자는 BVDV 핵산검출을 통한 진단에는 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 결 론

소의 바이러스성 설사병의 방역을 위한 분자생물학적 기초자료를 얻고자, 세포변성독주인 Singer주의 gp53 항원부위 유전자에 대한 cloning을 수행 하였으며 획득한 유전자의 특이성 및 염기서열을 조사하였다.

작성된 cDNA 유전자는 Singer주의 RNA에 대한 특이적인 상보성을 나타내었으며, 염기수는 총 939 base로서 adenine 31.0%, cytosine 19.6%, guanine 25.5% 및

thymine 24.0%로 구성되어 있었다. 이 cDNA는 기존의 밝혀진 NADL주의 염기서열과 비교할 때 Singer주의 gp53 항원부위 유전자의 약 77.8%(817 base)와 gp53 항원부위 3' 말단부 이후의 약 122 base를 포함하는 것으로 판정되었다. 이 cDNA의 염기서열의 2nd frame에서 1개의 open reading frame이 인정되었으며, 이로부터의 가상적인 아미노산 번역상을 조사하였을 때 총 20종 312개의 아미노산 번역이 예상되었다.

### 참 고 문 헌

1. Baker JC. Bovine viral diarrhoea 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. Malmquist WA. Bovine viral diarrhoea-mucosal disease: Etiology, pathogenesis and applied immunology. *J Am Vet Med Assoc* 1968; 152: 763-768.
4. Office of International Epizootics, FAO: Animal health yearbook 1987.
5. 석호봉, 서익수. 한국에서 소 바이러스성 설사병 (BVD)에 관한 연구. 1. 발병우로부터 BVD 바이러스 분리 및 동정시험. 서울대학교 수의대 논문집 1987; 12: 151-169.
6. 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.
7. 이종오, 한영도, 육심룡 등. 강원 영동지역 우 바이러스성 설사병의 혈청학적 조사. 한국가축위생학회지 1991; 14(2): 148-153.
8. Coria MF, McClurkin AW. Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Am Vet Med Assoc* 1978; 172: 449-454.
9. Donis RO, Dubovi EJ. Molecular specificity of the antibody responses of cattle naturally and experimentally infected with cytopathic and non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus biotypes. *Am J Vet Res* 1987; 48: 1549-1554.

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 Tierarzt* 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 MI. 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. Bolin SR, Moennig V, Kelso NE, et al. Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhoea virus into groups. *Arch Virol* 1988; 99: 117-123.
16. Roth JA, Kaeberle ML. Suppression of neutrophil and lymphocyte function induced by a vaccinal strain of bovine viral diarrhoea virus with or without the administration of ACTH. *Am J Vet Res* 1983; 44: 2366-2372.
17. Martin SW, Meek AH, Davis DG, et al. Factors associated with mortality in feedlot cattle: the Bruce County beef project. *Can J Comp Med* 1980; 44: 1-10.
18. Martin SW, Meek AH, Davis DG, et al. Factors associated with morbidity and mortality in feedlot calves: the Bruce County beef project, year two. *Can J Comp Med* 1981; 45: 103-112.
19. Matrin SW, Meek AH, Davis DG, et al. Factors associated with mortality and treatment cost in



- feedlot calves: the Bruce County project, years 1978, 1979, 1980. *Can J Comp Med* 1982; 46: 341-349.
20. Chernetfatu PP, Taylor DE, Ramsey FK. Characteristics of a condition following vaccination with bovine viral diarrhea vaccine. *J Am Vet Med Assoc* 1967; 150: 46-52.
  21. Rosner SF. Complications following vaccination of cattle against bovine rhinotracheitis, bovine viral diarrhea-mucosal disease and parainfluenza type 3. *J Am Vet Med Assoc* 1968; 152: 898-902.
  22. Mckercher DG, Saito JK, Crenshaw GL, et al. Complication in cattle following vaccination with a combined bovine viral diarrhea-infectious bovine rhinotracheitis vaccine. *J Am Vet Med Assoc* 1968; 152: 1621-1624.
  23. Lambert G. Bovine viral diarrhea: prophylaxis and postvaccinal reactions. *J Am Vet Med Assoc* 1973; 163: 874-876.
  24. Magar R, Minocha HC, Leomet J. Bovine viral diarrhea virus protein; heterogeneity cytopathic and non-cytopathic strains and evidence of a 53K glycoprotein neutralization epitope. *Vet Microbiol* 1988; 16: 303-314.
  25. Weillend E, Stark R, Haas B, et al. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J Virol* 1990; 64(8): 3563-3569.
  26. Renard A, Guiot C, Schmetz D, et al. Molecular cloning of bovine viral diarrhea virus sequences. *DNA* 1985; 4: 429-438.
  27. Collett MS, Larson R, Gold P, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* 1988; 165: 191-199.
  28. Dale B, White RT, Cordell BL. Bovine virus diarrhea and hog cholera varcines. European patent application No.87103218. 1. publication No. 0236977, 16 September, 1987(cited form reference No.32).
  29. Cho HJ, Masri SA, Deregt D, et al. Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine viral diarrhea. *Can J Vet Res* 1991; 55: 56-59.
  30. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
  31. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467.
  32. Collett MS, Moenning V, Horzinek MC. Recent advances in pestivirus research. *J gen Virol* 1989; 70: 253-266.
  33. Potgieter LND, Brock KV. Detection of bovine viral diarrhea virus by spot hybridization with probes prepared from cloned cDNA sequences. *J Vet Diagn Invest* 1989; 1: 29-33.
  34. Brock KV, Brian DA, Rouse BT, et al. Molecular cloning of complementary DNA from a pneumopathic strain of bovine viral diarrhea virus and its diagnostic application. *Can J Vet Res* 1988; 52: 451-457.
  35. Jensen J, Aiken J, Schultz RD. Detection of bovine viral diarrhea virus genome in leukocytes from persistently infected cattle by RNA-cDNA hybridization. *Can J Vet Res* 1990; 54: 256-259.
  36. Patterson U, Hyypia T. Nucleic acid and hybridization: an alternative tool in diagnostic microbiology. *Immunol Today* 1985; 6: 268-272.