

Pseudorabies Virus의 Major Capsid Protein 유전자의 클로닝과 Baculovirus Vector System에 의한 발현

수의과학연구소, ¹충남대학교 수의과대학

안동준 · 전무형¹ · 송재영 · 박종현 · 현방훈 · 장경수¹ · 안수환

=Abstract=

Cloning of Major Capsid Protein Gene of Pseudorabies Virus and Expression by Baculovirus Vector System

Dong-jun An, Moo-hyung Jun¹, Jae-young Song, Jong-hyeon Park, Bang-hun Hyun, Kyung-soo Chang¹ and Soo-hwan An

Veterinary Research Institute, Anyang 430-016, Korea

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea

Pseudorabies is caused by Pseudorabies virus (PRV: Aujeszky's disease virus) of *Herpesviridae* that is characterized by 100 to 150nm in size with a linear double-stranded DNA molecule with of approximately 90×10^6 Da. This disease affects most of domestic animals such as swine, cattle, dog, sheep, cat, chicken, etc. causing high mortality and economic losses. In swine, young piglets show high mortality and pregnant sows, reproductive failures. However the adult swine reveals no clinical signs in general. But they become a carrier state and play an important role for propagation of the disease.

In this study, the nucleotide sequence of major capsid protein gene of PRV, Yangsan strain isolated from the diseased swine in Korea was analyzed, and the recombinant MCP was produced by expression of the MCP gene in Sf-9 cell using baculovirus transfer vector system.

As result, in *Bam*HI digestion, MCP gene locus of PRV YS strain showed different from that of Indiana S strain. The patterns of enzyme mapping were also found to be unidentical each other. The sequence of the MCP gene partially analyzed showed 98.09% identity to Indiana S strain. The expression of MCP in Sf-9 cell cotransfected by pVLMCP-44 baculovirus expression vector was characterized by Southern blot hybridization, immunofluorescent and immunocytochemical tests, SDS-PAGE and Western blotting. The rMCP with M.W. 142kDa was most effectively expressed in Sf-9 cells at the 3-4th days post inoculation of the recombinant baculovirus by 2 moi.

Key Words: Pseudorabies virus, Korean isolate, major capsid protein, MCP gene expression.

서 론

Pseudorabies (일명; Aujeszky's disease)는 돼지, 소, 개, 고양이, 토끼, 멧돼지, 마우스, 랫트, 기니피

그리고 조류를 포함한 광범위한 숙주 영역을 가지는 전염병으로 *Herpesviridae*의 Alpha herpesvirinae subfamily에 속하는 Pseudorabies virus (PRV)가 그 원인체이다. 이 바이러스는 분자량이 90×10^6 daltons이고, 핵산은 150kb 정도인

double stranded linear DNA 바이러스로서 102개의 capsomere로 구성된 capsid와 envelope를 가지며 크기는 150-186nm이다 [1, 2, 3].

Pseudorabies에 이환된 돼지는 다른 동물에서 나타나는 특징적인 가려움증은 없으나, 자돈의 높은 폐사율, 비육돈의 심한 호흡기 증상과 성장 저해 및 임신돈에서 유사산 등 번식장애를 수반하고 보독동물이 되기 때문에 본 병으로 기인된 양돈산업의 경제적 손실이 크다 [1, 2, 3].

PRV는 헝가리 과학자 Aujeszky가 1902년 개, 고양이 및 소에서 광견병과 유사한 임상소견의 환축을 처음 공식보고하였으며, 1933년에 Traub가 이 병원체의 인공배양에 성공한 후, 이 바이러스의 구조, 물리화학적 성상, 진단 및 예방법에 대해 많은 연구가 진행되었다 [1, 2].

특히 최근에는 PRV의 분자생물학적 성상에 대한 연구결과가 많은 학자들에 의해 보고되었다 [3, 4]. Ben-Porat와 Kaplan [4]은 PRV genome은 반복되는 염기서열을 가진 유전자에 의해 큰 특이유전자 (unique long: UL)부위와 상대적으로 짧은 특이유전자 (unique short: US)부위로 구별됨을 보고하였다.

또한, PRV의 virion이 함유하고 있는 총단백중에 약 40%는 major envelope glycoprotein이고, 나머지 약 60%는 nucleocapsid에 포함되어 있다고 보고하였다 [4]. 그러나 현재까지 envelope glycoprotein은 중화항체를 생산하며 방어에 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌으나, viral protein의 많은 부분을 차지하는 nucleocapsid의 protein 기능에 대해서는 일부 보고자료가 있으나 아직 밝혀지지 않은 부분이 많다 [3, 4].

Killington 등 [5]은 major capsid protein (MCP)이 3개가 존재하고 그 중 1개의 MCP는 virion protein mass의 약 10%를 차지하며 142kDa임을 보고하였다. Ladin 등 [6]은 temperature-sensitive (ts) mutant PRV를 사용하여 PRV MCP가 BamHI 4번째 분절안에 위치함을 보고하였고, 또한 capsid는 PRV에 감염된 세포와 virion으로부터 분리할 수 있으며, 3개의 MCP와 1개의 minor capsid protein으로 구성되어 있다고 보고하였다. Scherba 등 [7]은 PRV의 nucleocapsid를 돼지의 피내에 접종하였을 시 감염된 돼지는 지연형 과민반응을 일으킨다고 보고하였으며, PRV MCP는 세포성 면역에 관여할 것이라고 지적한 바 있다.

국내에서는 1987년 처음 본 병이 보고된 이래

경남, 경기 및 충청지역에서 수주의 바이러스를 분리하였고, 분리주의 병인기전에 대한 연구를 수행하였으며 [8, 9], 분리주 유전자에 대해 제한 효소분석을 시도하여 국내 분리주는 Taiwan의 TNL주와 거의 동일하다고 보고한 바 있다 [10]. 또한 표준 Shope주의 gIII 및 gP50 유전자를 클로닝하고 염기서열을 분석하였고 baculovirus를 이용하여 단백질을 발현시켰다. 그리고 발현된 gIII과 gP50에 대한 면역원성을 기니픽과 돼지에서 시험한 결과 면역원성이 있음이 보고되었다 [11, 12]. 한편 국내 분리주에서 gX gene을 제거하고 β -galactosidase 유전자 재조합백신을 개발하여 야외 감염돈과 백신접종돈을 감별 진단할 수 있는 기법 개발에 대해 연구된 바 있다.

그러나 국내 분리주의 MCP 유전자와 MCP의 분자생물학적 기능에 대한 연구는 전혀 수행한 바 없어 이에 대한 연구가 요망되는 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 국내 이환 자돈에서 분리한 PRV 양산주의 MCP 유전자를 클로닝하고 염기서열을 분석하였고, baculovirus transfer vector system과 곤충세포 Sf-9 세포를 이용하여 recombinant MCP를 생산하기 위한 시험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 세포

PRV는 국내 분리주인 Yangsan (YS)주를 사용하였으며, baculovirus는 캐나다의 Saskatchewan 대학에서 분양받은 *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV)를 공시하였다.

PRV를 증식시키기 위하여 돼지콩팥세포주 PK-15를 사용하였고, 세포배양액은 α -minimal essential medium (α -MEM, Gibco, Grand Island, NY)에 fetal calf serum (FCS, hybriserum)을 10%되게 첨가하고, non-essential amino acid (0.01mM, Gibco) 및 gentamycin (50 μ g/ml)을 첨가하여 사용하였다. 또한 AcNPV 증식을 위해서 Sf-9 세포 (*Spodoptera frugiperda*: ATCC CRL 1711)를 공시하였고, Sf-9 세포는 Grace's medium (Gibco)에 yeastolate (200g/l: 50 \times , JRH)와 lactalbumin hydrolylate (200g/l: 50 \times , JRH)를 첨가하고 FCS를 10%되게 첨가하였으며, 최종 pH를 6.2로 조정하여 27 $^{\circ}$ C에서 배양하였다.

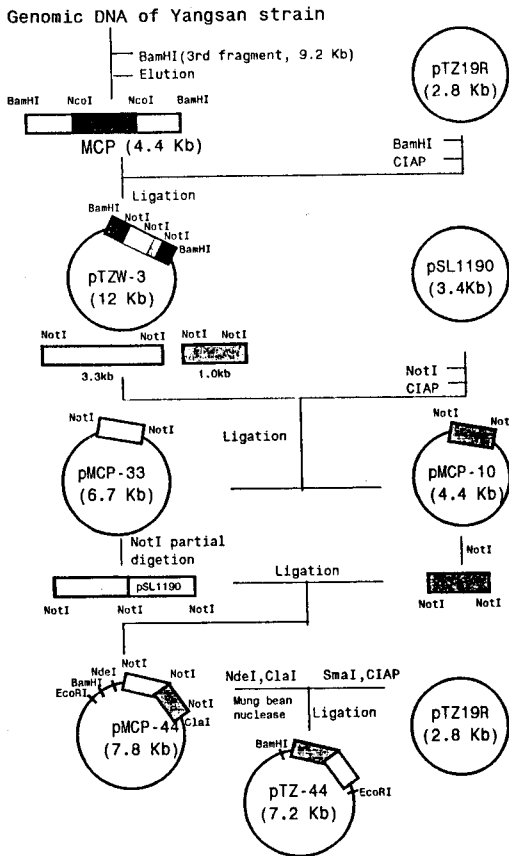


Fig. 1. Strategy for construction of the cloning vector containing the MCP gene of Yangsan strain.

2. PRV DNA 추출

Nishimori와 Jestin 등 [13]의 방법을 응용하였다. PK-15 세포를 증식시켜 단층세포가 형성된 후 $100\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 의 YS주를 접종하여 배양하였으며, 세포변성효과 (cytopathic effect, CPE)가 80-90% 관찰될 때 세포를 수확하여 $10,000\times g$ 에서 20분간 원심분리한 다음 상층액을 다시 $120,000\times g$ 에 2시간 동안 초원심한 후 상층액을 제거하였다.

3. MCP gene의 제한효소지도 작성

가. Agarose gel로 부터 DNA 추출

YS주의 BamHI 3번째 분절을 전기영동한 agarose gel로부터 잘라낸 후 DNA를 추출하기 위해 Maniatis 등 [14]의 방법을 응용하였다.

나. Plasmid vector 작성 및 클로닝

Cloning vector로 pSL1190과 pTZ19R(Pharmacia

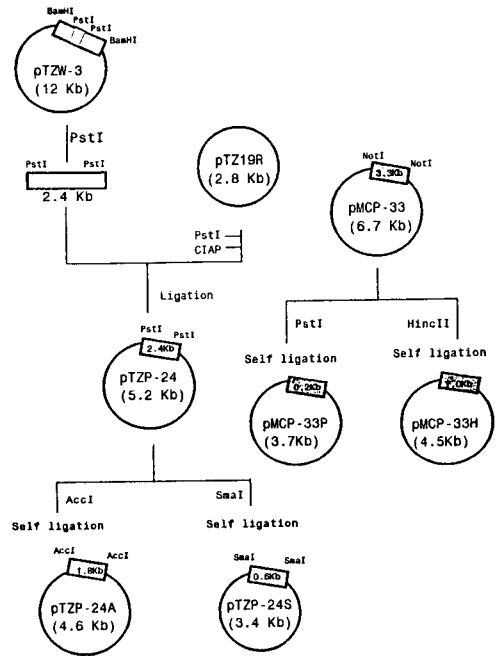


Fig. 2. Construction of the subclones of the MCP gene of Yangsan strain; pTZP-24A, pTZP-24S, pMCP-32P and pMCP-32H.

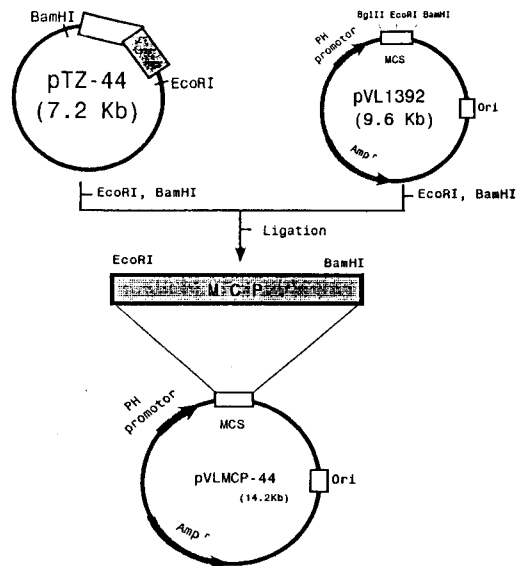


Fig. 3. Construction of the pVLMCP-44 baculovirus expression vector.

LKB, Discataway, NJ)를 공시 하였으며 (Fig. 1), ligation은 Maniatis 등 [14]의 방법을 참고하여

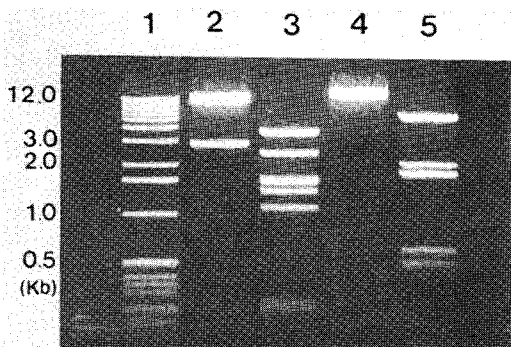


Fig. 4. Cleavage patterns of pTZW-3 with various restriction endonucleases, Lane 1: 1kbDAA ladder marker, Lane 2: *Bam*HI, Lane 3: *Pst*I, Lane 4: *Bgl*II, Lane 5: *Nco*I.

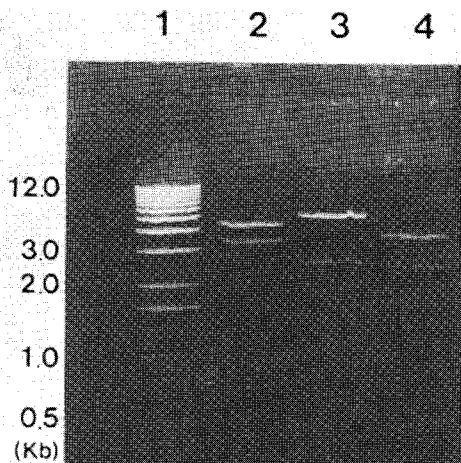


Fig. 5. Cleavage patterns of PMCP-44 with various restriction endonucleases, Lane 1: 1kbDNA ladder marker, Lane 2: *Cla*I, *Noe*I, Lane 3: *Bgl*II, Lane 4: *Pst*I.

추출된 0.6 μ g 정도의 *Bam*HI 3번째 DNA와 작성된 pTZ19R vector DNA 0.2 μ g에 1mM ATP 1 μ l, 10 \times T4 DNA ligase buffer [0.5M Tris-HCl (pH 7.6), 0.1M MgCl₂, 0.1M dithiothreitol, 0.5mg/ml bovine serum albumin] 2 μ l과 2-4 units의 T4 DNA ligase (10U/ μ l, Kosco) 1 μ l을 각각 첨가하고 20 μ l 되게 증류수를 첨가한 후 16 $^{\circ}$ C에서 18시간 반응하였다.

또한 *Bam*HI 3번째 분절내에 MCP 유전자를 포함하고 있으므로 MCP 유전자만을 클로닝하기 위하여 *Bam*HI 3번째 분절 (9.2Kb)를 *Not*I으로 처리하여 MCP 유전자 앞 부분인 3.3Kb (602nt-



Fig. 6. Cleavage patterns of MCP 4.4kb DNA fragment with various restriction endonucleases, Lane 1: 1kb DNA ladder marker, Lane 2: *Acc*I, Lane 3: *Bgl*II, Lane 4: *Bst*EII, Lane 5: *Fsp*I, Lane 6: *Hinc*II, Lane 7: *Nco*I, Lane 8: *Not*I, Lane 9: *pfl*MI, Lane 10: *Pst*I, Lane 11: *Sma*I, Lane 12: *Xho*I, Lane 13: *Bam*HI, Lane 14: *Cla*I, Lane 15: *Eco*RI, Lane 16: *Eco*RV, Lane 17: *Hind*III, Lane 18: *Kpn*I, Lane 19: *Nde*I, Lane 20: *Sph*I.

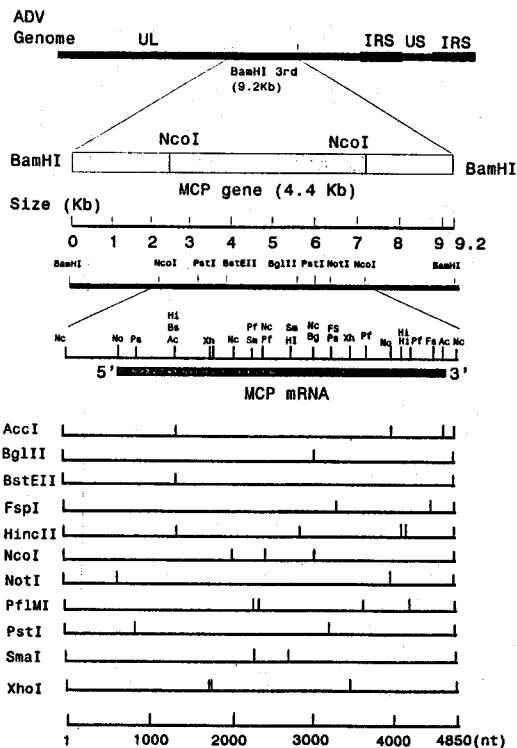


Fig. 7. Restriction enzyme cleavage sites in the cluster of MCP genes in the unique long (UL) par of Yangsan strain.

3925nt)와 뒷부분인 1.0Kb (3925nt -4930nt)로 절단하였다. Cloning vector인 pSL1190을 *Not*I으로 처리하고 CIAP를 처리하여 만든 pSL1190 *Not*I site에 3.3Kb와 1.0Kb를 각각 ligation하여 pMCP-33와

```

Y. S. MCP : 5'-GGCGGCCGGACGGGCCCGGCCATTCTTCCCCCGCCGCCCCAGCGACCGCGCACACGG
Indiana S. MCP : 3'-GGCGGCCGGCGCGCCCGGCCACTC-TCCCCC-CTGTCTCCCCAGCGACCGCGCACACGG
Y. S. MCP : GCCCGTCCGGGTCGTGCGCCACAGATGGAGCGCCCGGCCATCCTGCGCGTCCGGGCAGAT
Indiana S. MCP : GCCCGCACGGGTCGTGCTACAGATGGAGCGCCCGGCCATCCTGCGCGTCCGGGCAGAT
Y. S. MCP : CCTGTCCAACATCGAGGTGCACTCGACCCGCGCGCTGTTGACATCTTCAAGCGCTTCCG
Indiana S. MCP : CCTGTCCAACATCGAGGTGCACTCGACCCGCGCGCTGTTGACATCTTCAAGCGCTTCCG
Y. S. MCP : CTCGGACGACAACAACCTCTACGGTGCCGAGTTCGACGCGCTGCTCGGCACCTACTGCAG-3'
Indiana S. MCP : CTCGGACGACAACAACCTCTACGGTGCCGAGTTCGACGCGCTGCTCGGCACCTACTGCAG-5'
Y. S. MCP : 5'-AGCGGCTCCTGCACCACGTGCTGACCCTGGCGGACACGCACGCGGACGTGCCCGTGACCTA
Indiana S. MCP : 3'-AGCGGCTCCTGCACCACGTGCTGACGCTGGCGGACACGCACGCGGACGTGCCCGTGACCTA
Y. S. MCP : CGGCGAGATGGTGATCGCCAACACCAACCT-3'
Indiana S. MCP : CGGCGAGATGGTGATCGCCAACACCAACCT-5'
Y. S. MCP : 5'-GGCAACCAGCCCCAGGAGGAGCTCAACCACGCGCTGGCGGACGCCACGCTGCTGCCCCCGC
Indiana S. MCP : 3'-GGCAACCAGCCCCAGGAGGAGCTCAACCACGCGCTGGCGGACGCCACGCTGCTGCCCCCGC
Y. S. MCP : TCATCTGGGACTGCGACCCCATCTGTACCCGACGGGCTCGCCGAGCGCTGCCGGAGCT-3'
Indiana S. MCP : TCATCTGGGACTGCGACCCCATCTGTACCCGACGGGCTCGCCGAGCGCTGCCGGAGCT-5'
Y. S. MCP : 5'-CCCCCCCCCTACCCCGACTCTGTACCCGCCCCCACCCTCCCGCGCGGCGCCGCGGTGT
Indiana S. MCP : 3'-CCCCCCCCCTACCCCGACTCTGTACCCGCCCCCACCCTCCCGCGCGGCGCCGCGGTGT
Y. S. MCP : ATATAAACTGTGTACACGGCACCCGCCCGGTCACTGTCTTCTTTCGCTCGCGCCGCATGG-3'
Indiana S. MCP : ATATAAACTGTGTACACGGCACCCGCCCGGTCACTGTCTTCTTTCGCTCGCGCCGCATGG-5'

```

Fig. 8. Comparison of MCP gene sequences of Yangsan (YS) strain and Indiana S strain. Arrows indicate the sites showing different sequences.

pMCP-10를 작성하였다 (Fig. 1). 그리고 pMCP-10 clone을 *NotI*으로 처리하여 MCP 유전자의 뒷부분인 1.0Kb (3925nt-4930nt)를 추출한 후 partial digestion하여 작성한 6.7Kb pMCP-33 clone과 ligation하여 pMCP와 pTZ-44를 작성하였다 (Fig. 1).

다. Plasmid DNA 추출

MCP 유전자를 ligation하여 transformation된 *E. coli*로부터 클로닝이 된 것을 확인하기 위하여 Maniatis 등 [14]의 plasmid 소량추출 (mini-preparation)을 사용하였다.

한편 소량추출법으로 확인된 MCP 클론을 대량 확보하기 위해서 plasmid maxi kit (Qiagen Hilden, Germany)을 사용한 대량추출법 (maxi-preparation)을 응용하였다.

라. MCP gene의 제한효소 처리 및 분석

pTZ-44 clone을 *BamHI*과 *EcoRI*으로 double digestion하여 MCP 유전자 (602nt-4930nt)를 추출한 후 Kammermeyer 및 Clark [15] 등의 방법을 응용하여 *AccI*, *BamHI*, *BglIII*, *BstEII*, *ClaI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *FspI*, *HindIII*, *HincII*, *KpnI*, *NcoI*, *NdeI*, *NotI*, *PflMI*, *PstI*, *SmaI*, *SphI* 및 *XhoI* (NEB) 등 모두 19종의 제한효소로 처리하여 enzyme mapping하였다.

4. MCP 유전자 염기서열 분석

가. Subclon 작성

Yamada 등 [16]이 보고한 PRV Indiana S주와의 염기서열을 비교하기 위해 subclone; pTZP-24

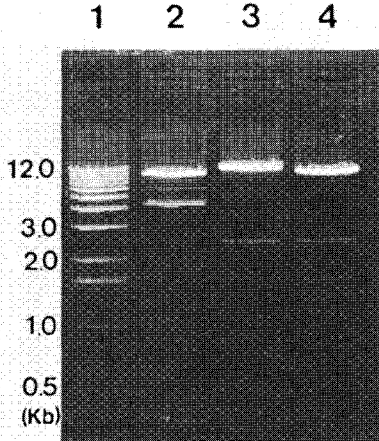


Fig. 9. Cleavage patterns of pVLMC-44 DNA with various restriction endonuclease, Lane 1: 1kb DNA ladder marker, Lane 2: *Bam*HI and *Eco*RI, Lane 3: *Bgl*III, Lane 4: *Pst*I.

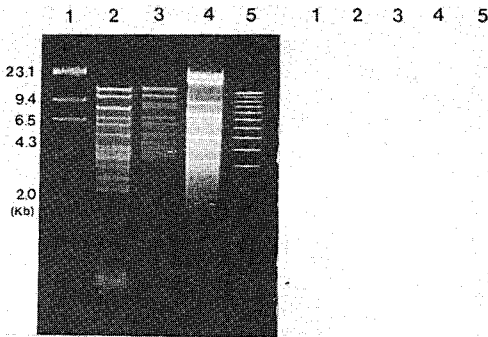


Fig. 11. Cleavage patterns of Yangsan strain DNA, AcNPV DNA and MCP recombinant virus DNA with restriction endonuclease (A), and Southern blot hybridization (B), Lane 1: λ -*Hind*III, marker, Lane 2: AcNPV/*Bam*HI and *Eco*RI, Lane 3: Recombinant virus/*Bam*HI and *Eco*RI, Lane 4: Yangsan/*Bam*HI, Lane 5: 1kb DNA ladder markjer.

(837nt-3274nt), pTZP-24A (1465nt-3274nt), pTZP-24S (2741nt-3274nt), pMCP-33 (602nt-3925nt), pMCP-33P (602nt-837nt), pMCP-33 (2882nt-3925nt)를 작성하였다 (Fig. 2).

나. 염기서열분석

MCP gene이 클론닝된 pTZ-44 (602nt-4930nt)와 pMCP-10 (3925nt-4930nt) 그리고 pTZP-24 (837nt-3274nt)로 부터 작성된 subclone pTZP-24A (1465nt-3274nt), pTZP-24S (2741nt-3274nt)와 pMCP-33 (602nt-3925nt)로 부터 작성된 subclone pMCP-33P (602nt-837nt), pMCP-33 (2882nt-3925nt)의 염기서열을 분석은 Sanger 등 [17]이 보

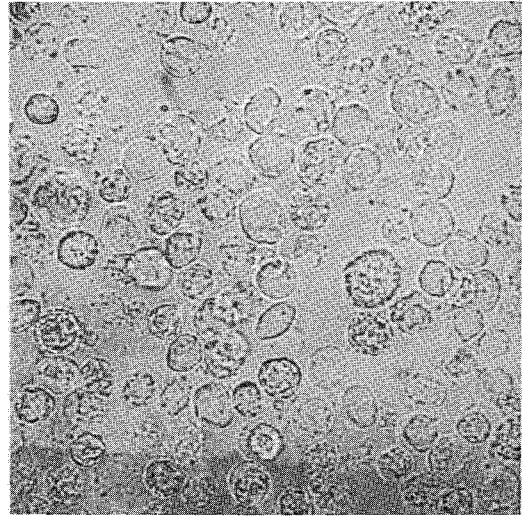


Fig. 10. Sf-9 cells infected with recombinant baculovirus. Most of cells show baculovirus specific cytopathic effects.

고한 chain termination 방법을 응용하였다. 건조된 gel은 X-ray film (Kodak, Rochester, NY)과 intensifying screen에 밀착시켜 실온에서 2-3일간 autoradiography를 실시한 후 현상하고 염기서열을 판독하였다. 한편, DNA 염기서열 분석은 DNASIS program (Hitachi)를 사용하였다.

5. Baculovirus expression system을 이용한 PRV MCP유전자의 발현

가. MCP유전자 expression vector cloning

MCP유전자의 발현 vector로는 baculovirus expression system중에 pVL1392 baculovirus transfer vector (Invitrogen, San Diego, CA)를 사용하였다.

pTZ-44 clone을 *Bam*HI과 *Eco*RI으로 절단하여 MCP유전자인 4.4Kb분절을 추출해 내었고, *Bam*HI과 *Eco*RI으로 절단하여 만들어진 pVL 1392 vector와 ligation시킨 후 일련의 transformation과 소량추출 과정을 거쳐 선발된 클론을 대량추출법으로 대량 확보하였다 (Fig. 3).

나. MCP유전자가 함유된 재조합 baculovirus의 작성과 역가측정

MCP유전자를 baculovirus expression system에서 발현시키기 위해 Sf-9 (ATCC CRL 1711)세포와 linear baculovirus DNA로 구성된 BaculoGold Transfection Kit (Pharmingen)을 사용하여, expression을 위한 co-transfection을 실시하였다.

다. Southern blot hybridization

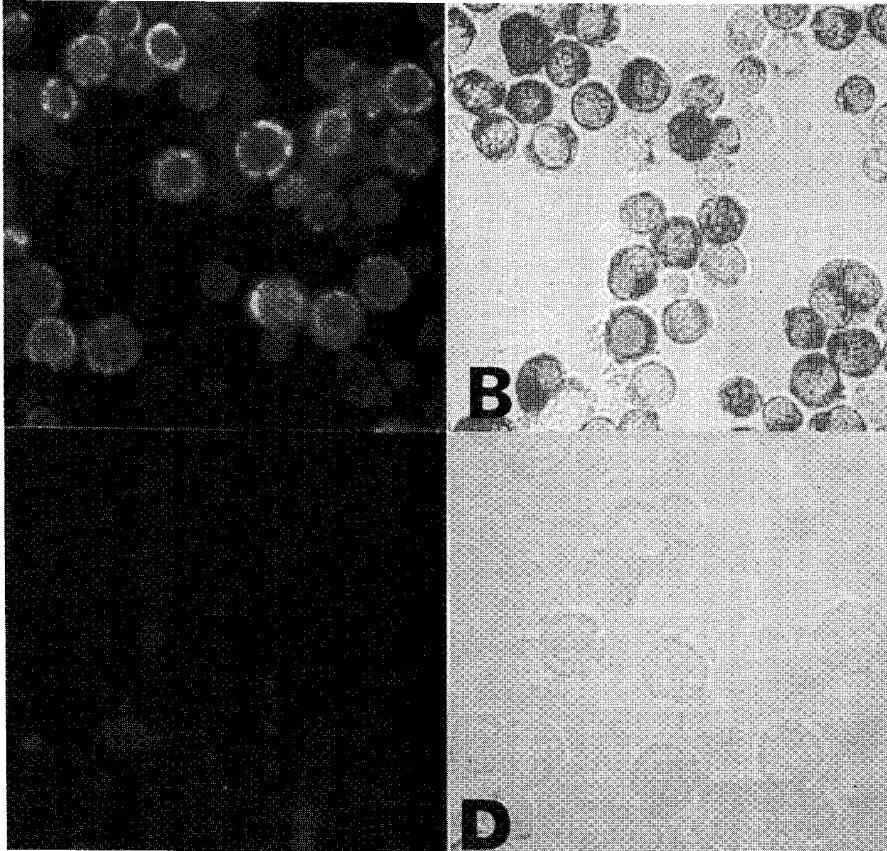


Fig. 12. Features of indirect fluorescent assay (A and C) and immunocytochemical staining (B and D) of Sf-9 cells infected with recombinant baculovirus (A and C) and Sf-9 cells infected with AcNPV (C and D), $\times 200$.

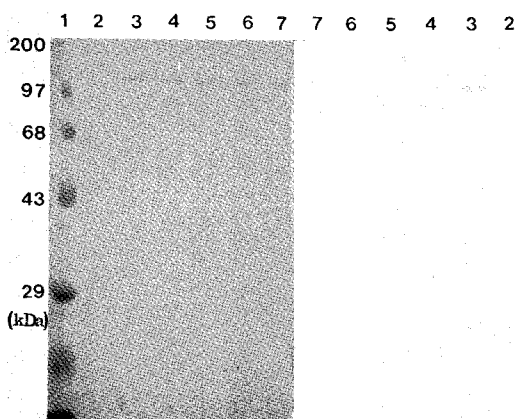


Fig. 13. SDS-PAGE (A) and Western blot analysis (B) of MCP expressed in SF-9 cell infected with various MOI of MCP recombinant baculovirus at 3th day post infection Lane 1: prestained protein molecular weight marker, Lane 2: Sf-9 cell with AcNPV, Lane 3: Sf-9 cell with 2 moi, Lane 4: Sf-9 cel with 1 moi, Lane 5: Sf-9 cell with 0.5 moi, Lane 6: Sf-9 cell with 0.25 moi, Lane 7: Sf-9 cell with 0.125 moi.

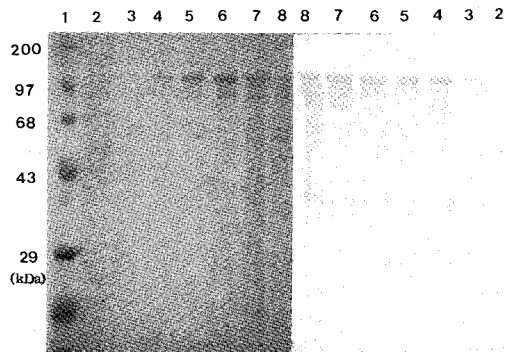


Fig. 14. SDS-PAGE (A) and Western blot analysis (B) of MCP expressed in SF-9 cell infected with various MOI of MCP recombinant baculovirus at 3th day post infection Lane 1: prestained protein molecular weight marker, Lane 2: Sf-9 day pi, Lane 3: Sf-9 cell with 2 day pi, Lane 4: Sf-9 cel with on 3 day pi, Lane 5: Sf-9 cell on 4 day pi, Lane 6: Sf-9 cell on 5 day pi, Lane 7: Sf-9 cell on day pi, Lane 8: Sf-9 cell on 7 day pi.

Table 1. Expression of rMCP in Sf-9 cells infected with various moi of MCP recombinant baculovirus

Inoculation m.o.i	IFA/IPA						
	1	2	3	4	5	6	7days
0.5	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	2/2	2/2
1.0	0/0	1/1	1/1	2/2	2/2	2/3	3/3
1.5	0/0	1/2	1/2	2/2	3/2	3/3	3/3
2.0	2/2	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
2.5	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
3.0	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Control	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

IFA = indirect immunofluorescence test, IPA = immunoperoxidase assay, Control = Sf-9 cells infected with AcNPV, 0 = negative, 1 = weak positive, 2 = moderate positive, 3 = strong positive

Southern blot hybridization은 DIG (Digoxigenin) DNA Labeling and Detection kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)를 사용하였다.

1) DNA labeling

변성된 DNA 1 μ g에 2 μ l hexa-nucleotide mixture, 2 μ l dNTP labeling mixture (1mM dCTP, 1mM dGTP, 1mM dATP, 0.65mM dTTP, 0.35mM DIG-dUTP, pH 7.5) 및 1 μ l Klenow enzyme (2 unit/ μ l)을 가하고 증류수로 20 μ l되게 한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1-20시간까지 표지하였으며, EDTA (0.2M, pH 8.0) 2 μ l를 첨가하여 반응을 중지시켰다.

2) Hybridization

준비된 PRV YS주, AcNPV 및 MCP recombinant virus로 부터 DNA를 추출하여 제한효소로 처리한 후 0.7% agarose gel을 사용하여 2시간 동안 3-5V/Cm로 전기영동하고, 이어서 VacuGene Pump와 blotter (Pharmacia LKB)를 이용하여 blotting을 실시하였다. Hybridization 과정이 끝난 nylon paper를 30분동안 blocking한 후, 50ml buffer 2에 10 μ l anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate를 혼합하여 첨가한 후 30분간 반응하였다. 기질로는 buffer 3에 45 μ l NBT (nitroblue tetrazolium)와 35 μ l X-phosphate solution (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)을 혼합한 것을 사용하였고, 암실에서 10분간 발색하였다.

6. PRV MCP유전자의 발현확인

가. Indirect fluorescent assay (IFA)

Petridish (60mm)에 coverslide와 Sf-9 세포 (2 \times 10⁶cells/ml)를 넣고, recombinant virus를 1 moi되게 접종하여 4일간 배양 후 상층액을 제거하고 PBS로 1회 세척한 다음 80% 아세톤으로 5분간 고정하고 형광현미경으로 관찰하였다.

나. Immunocytochemical stain (ICS)

Immunocytochemical staining은 recombinant virus를 10배 단계 희석하고 Sf-9 세포가 배양된 petridish (60mm)에 접종하고 1.5% low melting point agarose를 overlay시켜 굳인 후 80-100%의 습도를 유지하면서 27 $^{\circ}$ C에서 3-5일간 배양하였다. 배양후에 gel을 제거하고 PBS로 1회 세척하여 80% acetone에 5분간 고정 후 완전히 건조시켰다.

다. SDS-PAGE 및 Western blot

증식일수에 따른 MCP발현상태와 recombinant virus접종량에 따른 발현 상태를 SDS-PAGE 및 Western blot에서 관찰하였다.

SDS-PAGE는 Laemli [18]의 방법을 응용하였으며 바이러스 접종량과 증식일수에 따른 MCP 발현상태를 관찰 하고자 Sf-9 세포가 배양된 petridish (60mm)에 recombinant virus를 3.0 moi, 2.5 moi, 2.0 moi, 1.5 moi, 1.0 moi, 0.5 moi, 0.25 moi 및 0.125 moi 별로 접종하고 대조로는 AcNPV를 접종하여 7일간 시험하였다.

Western blot은 Blake 등 [19]의 electroblotting방법을 응용하여 Hofer blot system (Hofer, San Francisco, CA)을 사용하였고, enzyme immunoassay는 vectastain ABC Kit (Vector, USA)를 이용하였다.

결 과

1. MCP유전자 클로닝 및 제한효소지도 작성

MCP에 대한 유전자를 클로닝하기 위해 YS주 DNA를 BamHI으로 처리한 바 Yamada 등 [16]이 Indiana S주에 대해 보고한 9.2Kb에 해당되는 MCP band는 3번째 분절에서 관찰되었다. 이 분절을 추출해 pTZ19R BamHI site에 ligation시켜

pTZW-3을 작성하였다 (Figs. 4 및 Fig. 5).

각종 제한효소를 처리하여 MCP 제한효소지도를 작성하기 위해 MCP유전자인 4.4Kb (602nt-4930nt)만을 19종의 *AccI*, *BamHI*, *BglIII*, *BstEII*, *ClaI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *FspI*, *HindIII*, *HincII*, *KpnI*, *NcoI*, *NdeI*, *NotI*, *PfMI*, *PstI*, *SmaI*, *SphI* 및 *XhoI* 제한효소로 처리한 결과 *BamHI*, *ClaI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *KpnI*, *NdeI* 등은 절단부위가 없었으며, *BglIII*는 2개 분절 (2.4Kb 및 1.9Kb), *FspI*은 3개 분절 (2.8Kb, 1.2Kb 및 0.3Kb), *NcoI*은 4개 분절 (1.8Kb, 1.4Kb, 0.6Kb 및 0.5Kb), *SmaI*은 3개 분절 (2.2Kb, 1.7Kb 및 0.4Kb), *XhoI*은 4개 분절 (1.5Kb, 1.3Kb, 1.2Kb 및 0.4Kb)로 각각 나타나 Indiana S주의 제한효소 pattern과 일치하였다.

반면에 *AccI*처리시에는 4개 분절 (2.0Kb, 0.9Kb, 0.8Kb 및 0.7Kb), *HincII*처리시에는 1.1Kb, 0.8Kb, 0.7Kb, 0.6Kb 및 0.5Kb 등 수개의 작은 분절로 절단되었으며, *NotI*처리시 2개 분절 (3.3Kb 및 1.0Kb), *PfMI*처리시에는 5개 분절 (1.7Kb, 0.9Kb, 0.7Kb, 0.6Kb, 0.5Kb), *PstI*처리시 3개 분절 (2.4Kb, 1.7Kb 및 0.2Kb)이 각각 절단되었고, *SphI*처리시 절단분절이 없어 Indiana S주와는 완전히 다른 cleavage pattern을 나타내었다 (Figs. 6, 7).

2. MCP DNA sequence 분석

MCP gene이 클로닝된 pTZ-44 (602nt-4930nt)와 pMCP-10 (3925nt-4930nt) 그리고 pTZP-24 (837nt-3274nt)로부터 작성된 subclone pTZP-24A (1465nt-3274nt), pTZP-24S (2741nt-3274nt)와 pMCP-33 (602nt-3925nt)로부터 작성된 subclone pMCP-33P (602nt-837nt), pMCP-33H (2882nt-3925nt)의 염기서열을 분석하고 Indiana S주의 MCP유전자 염기서열과 비교한 결과는 Fig. 8과 같다.

즉 MCP에 해당하는 682번째 ATG codon의 upstream 83bp로부터 4673번째 TGA termination codon의 downstream 177bp까지 위치하는 4850bp 중 염기서열이 분석된 577bp에 대해 Indiana S주의 sequence와 비교한 바 98.09%의 일치율을 나타내었으며, GC 및 AT함량을 분석한 바 70.88% : 29.12%로 나타났다.

3. MCP recombinant baculovirus 작성

pVL1392 vector의 *BamHI-EcoRI* site에 MCP유전자를 삽입하여 작성된 pVLMCP-44는 Fig.3과

같다. 작성된 clone을 확인하기 위하여 pVLMCP-44를 *BamHI*과 *EcoRI*으로 동시 처리한 바 pVL vector size인 9.8Kb와 MCP유전자인 4.4Kb로 절단되었다. 또한 *PstI*으로 처리한 결과 예상했던 대로 10.1Kb, 2.4Kb 및 1.7Kb로 절단되었으며, *BglII*로 처리시 11.8Kb 및 2.4Kb로 절단됨이 관찰되어 MCP유전자의 5'쪽이 polyheadrin promoter (PH) 방향으로 삽입되었음이 확인되었다 (Figs. 9, 10)

4. Southern blot hybridization

MCP linear DNA의 3.3Kb (602nt-3925nt) 분절 (3 μ g)을 labeling하였다. YS주 DNA, AcNPV 및 MCP recombinant virus DNA를 감염세포로부터 각각 추출하여 YS주의 DNA는 *BamHI*으로 single digestion하였고, AcNPV와 MCP recombinant virus의 DNA는 *BamHI* 및 *EcoRI*으로 double digestion하여 labeling된 MCP probe와 hybridization을 실시하였다.

AcNPV와 MCP recombinant virus를 *BamHI* 및 *EcoRI*으로 double digestion한 결과 절단된 부위 중 MCP recombinant virus의 8번째 분절인 4.4Kb DNA와 hybridization되었으며, AcNPV DNA 분절과는 상이한 pattern을 보였다 (Fig. 11). 또한 이 probe는 YS주의 *BamHI* 3번째 분절인 9.2Kb의 DNA와 MCP recombinant virus에 8번째 분절인 4.4Kb의 DNA에 hybridization되었다.

5. 바이러스 접종량과 증식일수에 따른 MCP 발현

가. 형광항체법과 Immunocytochemical stain법을 이용한 MCP 발현 관찰

MCP recombinant virus를 Sf-9 세포에 3.0 moi, 2.5 moi, 2.0 moi, 1.5 moi, 1.0 moi 및 0.5 moi를 접종하여 형광항체법과 immunocytochemical stain으로 MCP 발현상태를 관찰한 바 (Table 1 및 Fig. 12) 1.0 moi 접종군은 3일째, 1.5 moi 접종군은 2일째부터 양성반응이 각각 관찰되었고, 2.0 moi 접종시는 3-4일에 매우 강한 특이 양성반응이 인정되었다.

나. SDS-PAGE와 Western blot에 의한 발현 확인

Recombinant virus의 접종량과 MCP의 생산량의 상관관계를 SDS-PAGE와 Western blot으로 비교하였다. recombinant virus를 2.0 moi, 1.0 moi, 0.5 moi, 0.25 moi 및 0.125 moi별로 접종하고, 3일

간 배양한 후 세포를 수확하여 SDS-PAGE법으로 분석한 결과 recombinant virus 접종세포에서는 MCP에 해당하는 142kDa의 단백질이 발현되었으며 AcNPV 접종세포는 음성이었다. 또한 2.0 moi 접종군에서 142kDa의 MCP protein이 가장 많이 검출되었고, 0.125 moi 접종군에서는 소량으로 검출되었으며, 대조군에서는 전혀 인정되지 않았다. 이러한 사실은 Western blot법에 의해서도 입증되었다 (Fig. 13). 한편 1.0 moi의 recombinant virus를 Sf-9 세포에 접종하여 7일간 매일 발현상태를 관찰하였다. 7일간 수확한 시료를 SDS-PAGE로 분석한 결과를 보면 recombinant virus는 접종 1일째 부터 MCP를 생산하여 접종 후 3-5일에 급증하였으며, 6일째 부터 감소하는 양상을 보였다. 이와같은 사실은 Western blot법에 의해서도 입증되었다 (Fig. 14).

고 찰

국내에서 분리한 YS주의 MCP에 대한 유전자 클로닝은 Yamada 등 [16]이 보고한 PRV Indiana S주의 염기서열과 제한효소 지도를 주로 참고하여 설계하였다. YS주에 대한 MCP 제한효소 지도는 Fig. 7에 나타낸 바와 같이 Indiana S주와는 약간의 차이를 보였다. Indiana S주 DNA를 추출해 BamHI로 처리한 결과 4번째 분절, 즉 MCP map unit상 약 0.45-0.52 사이에 MCP 유전자가 존재한다는 사실이 보고된 바 있었으나, 본 실험결과 YS주에서는 특이하게 BamHI 3번째 분절에 MCP유전자가 존재한다는 것을 확인하였다. 이러한 현상은 이 YS주의 gP50 유전자를 클로닝한 바, 표준주인 Shope주의 gP50유전자는 BamHI처리시 7번째 분절에 존재한다는 Ben-porat 등 [4]의 보고와는 다르게 BamHI 6번째 분절에 gP50유전자가 있다고 보고한 자료 [12]와도 연관성이 있다고 사료된다.

또한 염기서열 분석결과 YS주의 gX염기서열 중 ATG codon에서 213번째에 존재하는 BamHI site가 없어졌음이 확인되었으며 이로 인해 BamHI 6번째 크기가 약 200bp 증가하여 Shope주와 다른 결과를 나타냈을 것이라고 지적된 바 있다 [12]. 본 실험에서 BamHI 분절이 Indiana S주와 상이한 형태를 나타낸 이유도 이와 유사한 사유 때문이라 사료된다.

또한, YS주의 BamHI 3번째 분절을 pTZ19R에

ligation시켜 작성된 pTZW-3 클론을 확인하기 위하여 BglIII 및 NcoI으로 처리시 Indiana S주와 일치하나 PstI처리시에는 cleavage pattern이 다소 차이가 있었고, 직접 비교하기가 어려운 부분도 인정되었다. 그 이유는 Yamada 등 [16]이 보고한 PRV Indiana S주의 4번째 BamHI 분절인 9.2Kb내에 MCP유전자 4.85Kb에 대한 제한효소분석 결과는 알려져있으나 그 이외의 유전자에 대한 PstI cleavage site에 대한 시험 결과가 없기 때문이었다. YS주의 BamHI 3번째 분절내에 있는 MCP유전자의 전체를 클로닝하기 위해 pMCP-44를 작성하는 과정중에 기술적인 어려움이 있었다. pMCP-33을 NotI로 partial digestion하여 single site로 될 경우 602nt 및 3925nt 두위치에 절단부위가 생기므로 확율은 1/2이었고, 또한 원하는 절단부위인 3925nt에 정확히 뒷부분인 1.1Kb (3925nt-4930nt)가 ligation되기 위해서는 삽입된 방향에 따라 forward와 reverse의 2가지 가능성이 있기 때문에 전체적인 ligation의 성공 확율은 1/4로써 비교적 낮았기 때문이다.

한편 YS주의 MCP유전자 (4.4Kb)를 19종의 제한효소로 처리시 AccI, HincII, NotI, PflMI, PstI 및 SphI이 Indiana S주와는 완전히 다른 cleavage pattern을 나타내었다. 이것은 김 등 [10]이 YS주와 표준주인 Shope주의 제한효소 분절 pattern이 상이하다고 보고한 것과 같이 본 실험결과에서도 YS주는 Indiana S주와 다른 cleavage pattern을 확인할 수 있었다.

MCP DNA sequence 분석에서는 MCP유전자 전체염기 4850bp중 11.9%에 해당하는 577bp를 분석하여 얻어진 결과로서 전체를 비교하기는 어려우나 Yamada 등 [16]이 보고한 Indiana S주의 MCP gene과 비교한 바 homology가 매우 높았으며 Indiana S주에 비해 683번째 염기를 절단하는 PflMI site가 소실되었다는 것을 확인할 수 있었다.

또한 Shope주와 Indiana S주에 비해 GC함량이 높은 경향을 나타냄을 알 수 있었다. 특이할만한 현상은 682번째 ATG codon에서 부터 4673번째 TGA termination codon까지 염기서열은 거의 일치하는데 반해 682번째 ATG codon의 upstream 83bp를 Indiana S주와 비교한 바 6개의 염기가 point mutation되었고 2개의 염기가 더 생성되어 ATG upstream부위에 비해 MCP structure gene는 상대적으로 mutation빈도가 낮았다. 국내 분리 YS주

의 MCP유전자 분석실험을 더 수행해 보아야 하겠지만 본 시험에서 얻어진 결과로 볼때 MCP유전자구조는 비교적 안정할 것이라 사료된다. 또한 Southern blot hybridization에 의해 recombinant virus의 MCP유전자가 YS주의 MCP DNA와 동일한 것임을 확인한 다음 Sf-9 세포에서 rMCP 발현을 확인하기 위한 일련의 실험을 수행하였던 바, Davison과 Scott 등 [20]이 herpesviruses의 MCP분자량이 149kDa에서 160kDa사이라고 보고한 것과 1992년 Yamada 등 [16]이 PRV의 MCP 분자량이 142kDa이라고 보고한 성적과 일치하였다. 또한, 본 시험의 Western blot시험에서 MCP의 band가 미약하게 관찰된 사실은 (Figs. 13, 14) 1990년 Littler 등 [21]이 human herpesvirus 6 (HHV6) MCP 유전자를 E. coli에서 발현시켜 Western blot assay를 한 결과와 연관성이 있다고 사료되며 이에 대한 추가적인 시험이 요망된다.

그러나 본 시험에서 Sf-9 세포에서 발현된 MCP를 anti-PRV swine혈청을 이용하여 *in situ* 항원 검출법인 형광항체법과 immunocytochemical stain법으로 시험한 바 강한 항원성이 인정되었으므로 (Fig. 12) 본 연구에서 작제된 MCP recombinant virus는 Sf-9 세포에서 상당량의 MCP를 발현함이 확인되었다. 또한 PRV MCP는 동물체내에서 PRV envelope glycoprotein에 비해 세포성면역을 유발하는 항원으로 알려져있으므로, 본 실험을 통해 제조된 MCP의 생화학적 정상규명과 MCP monoclonal antibody를 이용한 항원성에 대한 추가시험이 요망된다.

결 론

Pseudorabies virus (PRV), Yangsan 주의 major capsid protein (MCP) gene의 성상을 구명하고 Baculovirus expression vector system과 Sf-9 세포를 이용하여 recombinant MCP (rMCP) protein을 생산하기 위해 일련의 실험을 수행한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. PRV Yangsan 주 DNA의 *Bam*HI 처리시 MCP gene의 위치는 PRV Indiana S 주와 차이가 있었고, MCP gene을 enzyme mapping한 바 *Acc*I, *Hinc*II, *Not*I, *Pf*IMI, *Pst*I 및 *Sph*I에서 Indiana S 주와 일치하지 않았다.

2. MCP gene 중 577개의 염기서열을 분석한 바 Indiana S 주와 98.09% 일치하였다.

3. MCP gene을 baculovirus expression vector system을 이용하여 pVLMCP-44를 작제하고 Sf-9 세포에 감염시켜 MCP를 발현시켰다.

4. Southern blot hybridization, 간접형광항체법, immunocytochemical staining법, SDS-PAGE 및 Western blot법에 의해 rMCP는 142kDa으로, 2 moi로 4일간 배양시 생산성이 가장 높았다.

감사의 글

이 연구는 1994년도 한국과학재단 연구비 지원에 의한 결과임. 과제번호: 941-0600-032-2.

참 고 문 헌

1. Baskerville A, Mcferran JB and Dow D: Aujeszky's disease in pigs. Vet Bulletin 43: 465-480, 1973.
2. Gillespie JH and Timony JF: The domestic animals. Cornell Univ Press, USA 8th ed: 615-622, 1988.
3. Wittmann G and Rziha HJ: Aujeszky's disease (pseudorabies) in pigs, Herpes diseases of cattle, horses and pigs. edited by Wittmann G, Klower Academic Publisher, 231-325, 1989.
4. Ben-Porat T and Kaplan AS: Molecular biology of pseudorabies virus. In "The Herpesviruses (B. Roizman, ed), Plenum. New York, pp 105-193, 1985.
5. Killington RA, Yeo J, Honess RW, Watson DH, Duncan BE, Halliburton IW and Munford J: Comparative analysis of the protein and antigen of five herpesviruses. J Gen Viral 37: 297-310, 1977.
6. Ladin BF, Ihara S, Hampl H and Ben-Porat T: Pathway of assembly of herpesvirus capsid, an analysis using DNA + temperature sensitive mutants of pseudorabies virus. Virology 116: 554-561, 1982.
7. Scherba G, Turek JJ and Gustafson DP: Pseudorabies virus nucleocapsid antigen for skin testing in swine. J Clin Microbiol 17:539-544, 1983.
8. 전무형, 조성환, 안수환, 박성국, 윤석민, 하용공: 이환자돈으로부터 오제스키 바이러스의 분리와 생물학적 성상. 대한 수의사회지 24:163-171, 1988.

9. 이중복, 안수환, 김병한, 송재영, 김용희, 설동섭: 돼지오제스키병에 관한 연구. I. 감염자돈으로부터 원인체 분리 및 동정. 대한수의학회지 28: 99-103, 1988.
10. 김병한, 이중복, 송영재, 김용희, 전무형, 안수환: 국내돼지에서 분리한 오제스키병에 관한 연구. II. 국내 돼지에서 분리한 오제스키바이러스의 DNA제한 효소 분석. 농사시험논문집 30: 37-41, 1988.
11. 송재영, 이중복, 현방훈, 박종현, 권창희, 안수환: 국내에서 분리된 돼지 오제스키 바이러스 gIII 유전자의 baculovirus에서 발현 및 이용. 대한수의학회지 31: 1991.
12. Jun MH and An SH: Characterization of recombinant gIII and gP50 proteins of Korean isolate of Aujeszky's disease virus. Proc of International Symposium on Aujeszky's disease virus, Hungary, 29-31 Aug. p53, 1993.
13. Nishimori T, Imada T, Sakuri M, Kitabayashi H, Kawamura H and Nakajima H: Restriction endonuclease analysis of Aujeszky's disease virus isolated in Japan. Jpn J Vet Sci 49: 365-367, 1987.
14. Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J: Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
15. Kaumermeyer K and Clark VL: Genetic engineering fundamentals. An introduction to principles and applications, Marcel Dekker, New York, 1989.
16. Yamada S, Imada T, Watanabe W, Honda Y, Nakajima I, Ijima S, Shinmizu Y and Sekikawa K: Nucleotide sequence and transcriptional mapping of major capsid protein gene of pseudorabies virus. Virology 185:56-65, 1991.
17. Sanger F, Nicklen S and Coulson AR: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467, 1977.
18. Laemmli UK and Favre M: Maturation of the head of bacteriophage T4, I. DNA parking events. J Med Biol 80:575-599, 1973.
19. Blake MS, Johnson KH, Russell-Jones GH and Gotschlich EC: A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated antibody on Western blots. Anal Biochem 136: 175-179, 1984.
20. Davison AJ and Scott JE: DNA sequence of major capsid protein gene of herpes simplex virus type I. J Gen Virol 67:2279-2286, 1986.
21. Littler E, Lawrence G, Lin MY, Barrell BG and Arrand JR: Identification, cloning and expression of the major capsid protein gene of human herpesviruses 6. J Virol 714-722, 1990.