大韓바이러스學會誌 : 第 26 卷 第 2 號 1996
J. Korean Soc. Virology, Vol. 26, No. 2, 1996

소 허피스바이러스 gⅢ 유전자 크론닝 및 발현

수의과학연구소, 테네시대학 미생물학교실

권 창 희 · 민 부 기

=Abstract=

Cloning and Expression of Bovine Herpesvirus-1 gIII of Korean Isolate PQ Strain

Chang-Hee Kweon and Boo-Ki Min

National Veterinary Research Institute, Anyang, Korea
Department of Microbiology, University of Tennese, Knoxville, USA

The gene encoding gIII of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) PQ strain was cloned and expressed in baculovirus. Although the gIII gene is located in *Hind* III I fragment as the case of the other BHV-1 strains, differences in size and restriction endonuclease site within the fragment were identified.

The gIII expression was predominantly detected on the surface on insect cells by indirect immunofluoresecnce assay using monoclonal antibody. The western blotting analysis also revealed the presence of expressed protein of a similar molecular size to the original gIII protein.

The immunogenicity of expressed protein were tested in guinea pigs. The immunized guinea pigs with expressed protein developed the neutralizing antibodies against BHV-1.

Key Words: BHV-1, PQ strain, gIII gene, Expression, Immunogenicity.

서 론

소 허피스바이러스 (Bovine herpesvirus-1, BHV-1) 또는 소 전염성 비기관지염 바이러스 (infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV) 는 전 세계적으로 발생되는 호흡기 질환의 원인체 이다 [1]. 그러나 소 허피스바이러스에의한 감염은 호흡기 증상이외에도 임신우의 유산, 송아지의 뇌염이나 각막염등 다양한 증상을 일으키며 우리나라의 경우 20%이상의 감염율을 나타내는 경제적으로 매우 중요한 전염병의 하나이다 [2, 3, 4].

소 허피스바이러스는 alphaherpesvirus로서 140 kb가량되는 크기의 DNA를 유전인자로 갖고 있다 [5]. 우리나라의 경우 이 질병의 예방에는 허피스바이러스에 의한 잠복감염 (latent infection)의 가능성으로 인하여 사독예방백신이 현재 생산되고있다 [6]. 또한 최근의 연구들은 소 허피스바이러스 (BHV-1)의 세포내 감염 및 예방에 관여하는 주요 구조 당단백질 (glycoprotein) 유전자에 대한 mapping 및 발현을 시도하고 있으며 이중 gIV 와 gⅢ 유전자는 유전자의 시험관내 발현 후 또는 클론된 유전자를 이용 실험동물에 접종시 바이러스에 대한 중화능이 형성되는 것으로 보고되어있다[7, 8, 9, 10, 11].

본 연구는 소 허피스바이러스 (BHV-1)국내 분리 PQ주의 gⅢ단백질 유전자의 cloning 및 Baculovirus를 이용한 발현결과를 보고하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 소 허피스바이러스 PQ 주 gⅢ 단백질 유전자크론닝

소 허피스바이러스 PQ주 의 유전자 추출및 제

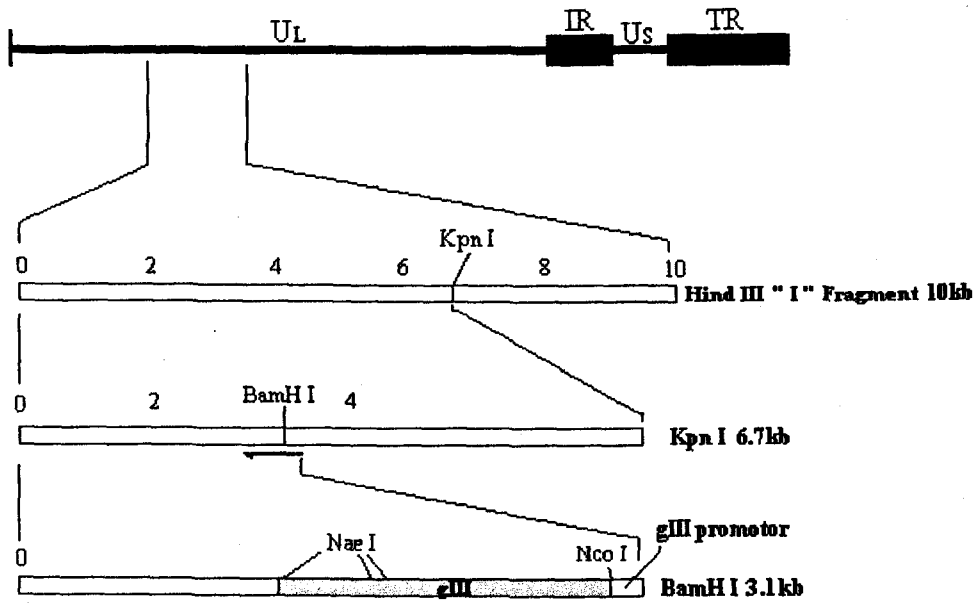

Fig. 1. Cloning procedures of gIII gene of BHV-1 PQ strain. The physical map of BHV-1 viral genome is based on the information by Mayfield et al. [1983]. The *Hind* III I fragment was cloned within pUC19 and sequentially subcloned using each restriction endonuclease site within *Hind* III I fragment. The region for sequence analysis was indicated as bar under the DNA fragment.

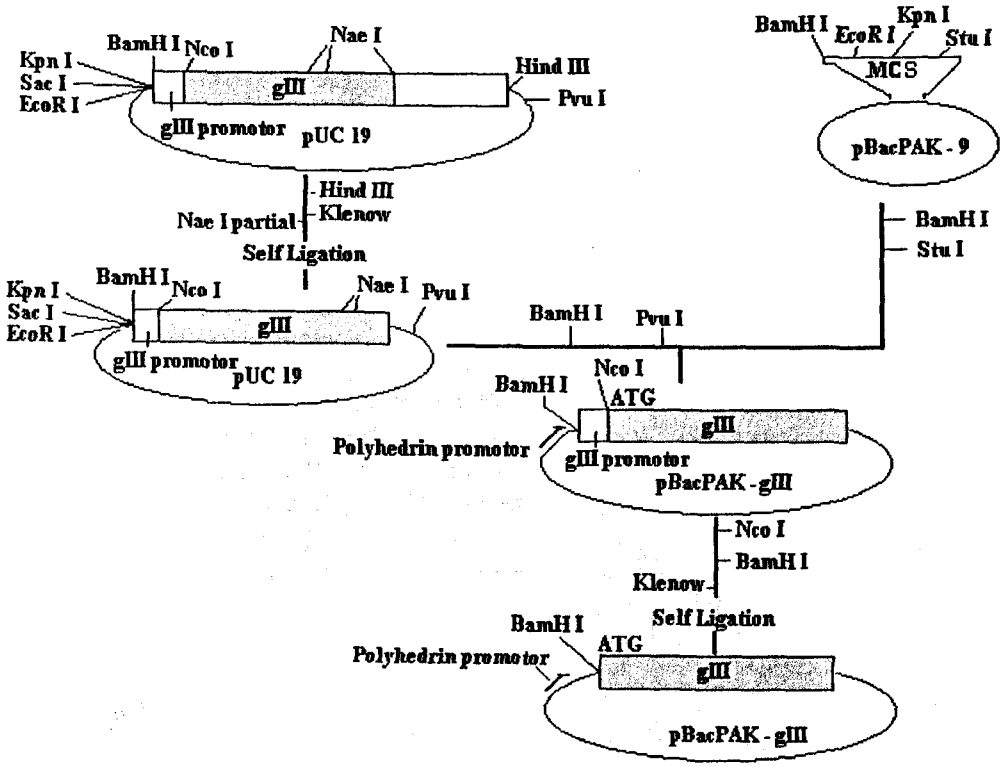

Fig. 2. Construction of transfer vector for gIII expression. Line represent the pUC19(left) and pBacPAK9 (right) plasmid backbone, respectively. The gIII DNA is drawn as rectangles with grayish color. Procedures for construction of transfer vector is sequentially drawn above the line with restriction endonuclease sites.

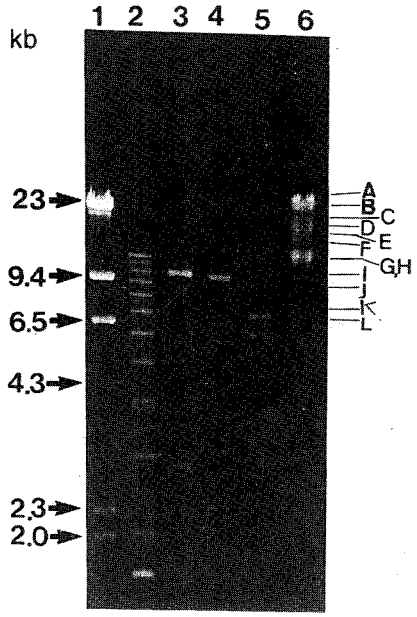

Fig. 3. Restriction analysis of *Hind* III I fragment of PQ strain.
Lane 1 and 2: DNA size marker.
Lane 3: Cloned I fragment (*Hind* III digested).
Lane 4: *Bam* HI digested I fragment.
Lane 5: *Kpn* I digested I fragment.
Lane 6: *Hind* III digested viral DNA.
DNA size in Kb(left) is indicated.

한효소 분석방법은 저자등이 보고한 바 있다 [12]. 소 허피스바이러스 gⅢ 유전자의 map 및 크론닝은 Fitzpatrick 등및 Simard 등의 BHV-1에 대한 mapping 보고를 토대로 실시하였다 [5, 7, 10]. 즉 추출된 바이러스 DNA를 *Hind*Ⅲ 제한효소로 처리한 후 시료를 0.6% agarose gel에 전기영동한 다음 agarose gel에서 추출된 DNA를 pUC19 vector에 크론닝하였다. 클론 된 유전자는 Fig.1에서와 같이 gIII유전자외부에 위치한 제한효소 부위를 이용 pUC19 vector에서 다시 subcloning한 다음 유전자염기서열을 분석하였다.

2. PQ주 gⅢ 유전자 발현

PQ주 gⅢ 유전자발현은 Baculovirus 발현매체인 *Autographa california* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) 발현 vector인 pBacPAK9 (Clontech, USA)를 이용하였다. gⅢ 유전자를 pBacPAK9에 삽입하는 제반조작 과정은 Fig. 2에 나타난 순서로 조작하였다. 작성된 gIII 삽입transfer vector는 AcNPV 유전자와 함께 Lipofectin (Gibco-BRL, Grand Island, NY)을 이용 Spodoptera frugiperda (Sf21) 세포에 cotransfection시켰다. Transfection된 세포는 4-5일 후 상층액을 채취하였으며 채취한 상층액으로부터 재조합 Baculovirus를 크론닝 하였다.

재조합 Baculovirus를 Rockland, ME은 Sf21 세포에 상층액을 접종하여 0.8 % Sea Plaque agarose (FMC)이용 plaque assay를 실시한 다음 0.03%의 Neutral red 염색을 통하여 형성된 단독 plaque를 채취하였다. 재조합 Baculovirus에 의한 PQ주의 gⅢ 단백질 발현분석은 gⅢ에 대응하는 단크론 항체 (monoclonal antibody, MAb)를 이용 간접형광항체방법 (Indirect fluorescence assay, IFA) 및 Western blotting을 이용하였다. PQ주의 gⅢ단백질에 대응하는 단크론항체의 작성은 Jun등이 보고한 바 있으며 단크론항체나 면역혈청을 이용한 Western blotting의 실험절차및 방법은 권등의 보고방법에 준하였다 [13, 14, 15].

3. Baculovirus 발현 gⅢ 단백질의 면역원성

발현단백질의 면역원성은 Sf-21세포에 재조합 Baculovirus를 0.1-1.0의 감염가 (Multiplicity of infection, M.O.I)로 감염시킨 다음 48-72시간 후에 상층액을 제거한 후 감염세포를 이용하였다.

즉 감염후 수확된 10^7 상당의 감염세포를 생리식염수 (PBS)로 3회 세척시킨 후 세포부피에 10배 상당의 Lysis buffer (50ml Tris-Cl pH 8.5, 0.2% sodium deoxycholate, 2% Mega 10, 1mM PMSF)에 혼합하여 sonicator로 처리하였다. 이후 시료를 12,000 rpm에서 10분간 원심한시킨 후 상층액을 채취하였다. 수확된 상층액은 20%의 aluminium hydroxide gel에서 혼합 진탕하여 흡착시킨 다음 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

면역시험은 4-5주령 guinea pig 에서 실시하였으며 0.5ml씩 2주 간격으로 근육내 접종하였다. 채혈은 2차접종이후 2주만에 실시하였으며 56℃에 30분 처리후 바이러스에 대한 시험관내 중화능 (neutralizing activity)을 측정하였다. 중화항체가는 기니아픽혈청을 2단계로 희석한 다음 200세포감염가 (tissue culture infective dose: $TCID_{50}$) 에 해당하는 소 허피스바이러스 (PQ 주)를 동량 혼합하여 37℃에서 1시간동안 반응시킨 다음 소 신장세포주 인 MDBK (Madin-Darby bovine kidney)세포에 접종한후 세포변성효과 (cytopathic effect, CPE)를 억제하는 혈청의 최대 희

```
PQ. seq          CCAAGGCCCTGAACGCCCCGCTGGTGCTTCTGCGTCGGAGCCTGCTGGGTCTGCGCCAAC 60
Cooper. seq      ............................................................

PQ. seq          GAATGAACGGCCTGCAGCCGACGGTAACGCCCCCGCAGCCCCGCGTGTGCCCAAGCCCGG 120
Cooper. seq      ..........................CGCGCCTGCAGCCGCGCGTGTGCTCAATCCCGG

PQ. seq          ACCACGAAAGCACAAAACGGACGCCCTTAAAAATGTAGCCCGCGCCGCCGTCGCGGCCAT 180
Cooper. seq      ACCACGAAAGCACAAAACGGACGCCCTTAAAAATGTAGCCCGCGCCGCGGTCGCGGCCAT

                    BamHI
PQ. seq          CTTGGATCCACCCGCGGGCACGACGGCCGAGAGACCGCCAGCCCGAGACCTCGCCGCGCG 240
Cooper. seq      CTTGGATCCACCCGCGGGCACGACGGCCGAGAGACCGCCAGCCCGAGACCTCGCCGCGCG

                    NcoI
PQ. seq          TCCGCCATGGGCCCGCTGGGGCGAGGGTGGCTGATCGCAGCTATTTTCGCCTGGGCGCTC 300
Cooper. seq      TCCGCCATGGGCCCGCTGGGGCGAGGGTGGCTGATCGCAGCTATTTTCGCCTGGGCGCTC  18

PQ. seq          CTGTCTGCCCGGCGGGGGCTCGCCGAGGAGGCGGAAGCCTCGCCCTCGCCTCCGCCCTCC 360
Cooper. seq      CTGTCTGCCCGGCGGGGGCTCGCCGAGGAGGCGGAAGCCTCGCCCTCGCCTCCGCCCTCC  38

PQ. seq          CCGTCCCCAACCGAGACGGAAAGCTTCGCCGGGACCACCGGCGCAACG 408
Cooper. seq      CCGTGCCCAACCGAGACGGAAAGCTCCGCTGGGACCACCGGCGCAACG  54
```

Fig. 4. Sequence comparison of N-terminal region of gIII gene. Two endonuclease cleavage sites, first starting ATG codon and amino acid sequence are indicated.

석배수를 관찰하여 측정하였다.

결 과

1. 소 허피스바이러스 (BHV-1) 국내분리 PQ주 gⅢ 단백질 유전자 Cloning

소 허피스바이러스 국내분리 PQ주의 gⅢ유전자 cloning을 시도하였던바 그 결과는 Fig. 1과 3에서 나타난 바와 같다. 즉 *Hind* III 제한효소절단시 I fragment의 DNA크기는 약 10kb였으며 fragment내 *EcoR* I 제한효소 부위는 발견되지 않았다. 그러나 *Bam* HI 및 *Bam* HI 상단에 *Kpn* I 제한효소 부위를 발견할 수 있었으며, 이두 제한효소 절단부위는 각 한 부위로 한정되었다. 또한 크론닝된 10kb의 I fragment 부위를 *Kpn* I 과 *Bam* HI 를 이용 subcloning한 다음 유전자 염기서열을 분석 하였던바 gⅢ 유전자 전반에 위치한 promotor유전자 및 gⅢ N-terminal전반부의 유전자 염기서열이 Fitzpatrick등이 보고하였던 Cooper주의 gIII 단백질 염기서열과 거의일치하여 gⅢ유전자가 크로닝되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

2. gⅢ 유전자의 Baculovirus발현

PQ주 gⅢ 유전자의 Baculovirus내 발현을 시도하였던바 Plaque assay를 통하여 1주의 재조합 Baculovirus를 선발하였다. 재조합 Baculovirus의 gⅢ단백질의 발현 상태를 파악하기 위하여 gⅢ

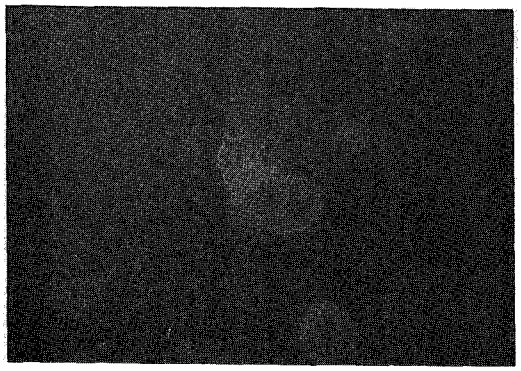

Fig. 5. Detection of gIII in insect cells by indirect immunofluorescence using monoclonal antibody.

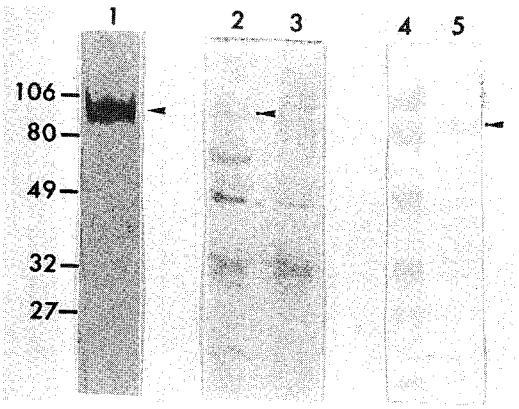

Fig. 6. Western blotting analysis of gⅢ expression. Lane 1: Purified BHV-1 reacted with monoclonal antibody against gⅢ. Lane 2: gⅢ expressed inset cells. Lane 3: Control insect cells. Lane 4: Purified virus reacted with gⅢ immunized guinea pig sera. Molecular weight in Kda is indicated at left.

단백질에 대한 단크론항체를 이용 감염 Sf21 세포를 간접형광항체법 (IFA)로 검사하였던 바 Fig. 4에서 보는 바와 같이 세포막에서 강한양성반응을 관찰할 수 있었다.

또한 감염세포를 전기영동 (SDS-PAGE)시킨 다음 단크론항체를 이용 Western blotting으로 분석하였던바 미약하나마 89-90 Kdal (Molecular weight: M.W)에 해당되는 단백질을 검출할 수 있었다. 한편 발현 gⅢ 단백질을 면역시킨 guinea pig혈청을이용 동일한조건에서 바이러스와 반응시킨 시험 역시 gIII 단백질을 검출할 수 있었다 (Fig. 5).

Table 1. Immunogenicity of expressed gIII in guinea pig

Immunized with	Route	No. inoculation	SN titer
Control	I.M*	2**	<2***
Infected cells	I.M.	2	32-64

*: Intramuscular injection.
**: Injected twice at two week interval.
***: 200 $TCID_{50}$ of BHV-1(PQ strain).

3. Baculovirus발현 PQ주 gⅢ단백질의 면역원성

Baculovirus 발현 gⅢ 단백질의 면역원성을 파악하고자 바이러스감염 세포에서 추출한 수용성 단백질을 aluminium hydroxide gel에 흡착시킨 다음 guinea pig에 접종 하였던바 접종기간 동안 아무런 이상증상도 관찰돼지 않았다. 2차 면역 2주후 채취한 guinea pig혈청을 이용 소 허피스바이러스 PQ주에 대한 중화항체가를 검사한 결과 32-64배에 달하는 바이러스 중화능이 검출 되었다. 그러나 비감염 Sf21세포를 동일한 조건으로 처리하여 접종한 대조군에서는 중화능력은 인정되지 않았다(Table 1).

고 찰

알파허피스바이러스 (Alphaherpesvirus)군에 속하는 Herpes simplex virus (HSV-1및 HSV-2), Varicella-Zoster virus(VZV), Marek's disease virus (MDV), Pseudorabies (PRV) 및 BHV-1 등의 구조단백질 (Major structural glycoprotein)간에는 유사한 구조가 보고되어 있다 [10, 16, 17, 18, 19, 20, 21]. 이중 BHV-1의 gⅢ 단백질은 HSV-1의 gC-1, HSV-2의 gC-2, PRV의 gⅢ에 유사한 당단백질로서 세포 감염시 부착기능 및 생체감염후 바이러스 중화항체를 유발시키는 것으로 규명되어 있다 [16, 18, 20].

본 시험은 국내분리 BHV-1 PQ주의 gⅢ유전자의 Cloning을 하였던 바 Cooper주의 경우와 같이 *Hind* Ⅲ의 제한효소 처리시 동일한 I fragment에서 gⅢ 단백질유전자가 위치한 것으로 확인되었다. 그러나 본 시험의 경우 I fragment의 유전자 규모는 10kb로서 Cooper주의 I fragment (11.7

Kb) 보다는 작은것으로 판명되었으며 또한 Cooper주 gⅢ 유전자후반에서 확인되었던 *EcoR* Ⅰ 제한효소 부위는 발견할 수 없었다.

실제 BHV-1의 gⅢ 단백질은 바이러스에 대한 중화항체를 유도한다는 점에서 유전자발현이나 또는 유전자 자체의 접종을 이용한 백신으로서의 가능성이 확인 되어 있으며 또 gⅢ 단백성분 자체가 바이러스 증식에는 필수 불가결하지는 않다는 점에서 유전자 조작을 통한 예방약생산시 진단 Marker로서 활용할 수 있다는 가능성을 내포하고 있다 [11, 22].

이러한 사실을 감안 본 연구에서도 gⅢ유전자의 발현을 시도하였으며 발현매개체로서 유전자 발현후 Glycosylation이 가능한 Baculovirus를 선택하였다 [23]. 실제 gIII 발현 Baculovirus를 Sf 21에 감염시킨후 감염세포의 soluble protein을 이용 실험동물에 접종하였던 바 바이러스에 대한 중화항체를 검출할 수 있었다. 그러므로 장래 gIII발현단백질을 이용한 Subunit 예방약이나 항체검사를 위한 진단항원 또는장래 클론된 gⅢ 유전자를 유전자 Vaccine으로서 사용할 수 있다는 가능성을 확인할 수 있었다.

결 론

소 허피스바이러스 (BHV-1) 국내 분리 PQ주의 gⅢ유전자 Cloning 및 Baculovirus를 이용한 발현결과 다음의 결론을 얻었다.

1. PQ주의 gⅢ 유전자는 *Hind* Ⅲ 제한효소 처리시 Ⅰ fragment에 삽입된 것으로 확인되었다. 그러나 *Hind* Ⅲ처리시 I fragment의 크기는 10kb로 판정되었으며 Cooper주와 비교하였을 때 gⅢ 유전자 후반부의 *EcoR* I 제한효소부위는 발견되지 않았다.

2. gⅢ유전자발현 재조합 Baculovirus작성한 다음 발현단백질의 면역원성을 분석하였던 바 소 허피스바이러스에 대한 중화 능력을 나타내었다.

3. 이상의 결과로서 gIII 발현항원을 이용 subunit 예방약 이나 진단시약 또는 유전자Vaccine으로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

감사의 말씀

본 실험과정의 일부를 도와주었던 수의과학연구소의 권병준, 기영진 선생님과 원고작성을 도와주신 정우석 선생님의 수고에 깊은 감사를 드립니다.

REFERENCES

1. Kahrs RF: Infectious bovine rhinotracheitis; a review and update. J Am Vet Med Assoc 171: 1055-1063, 1977.
2. d'Offay JM, Mock RE, Fulton RW: Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. Am J Vet Res 54: 534-539, 1993.
3. Metzler AE, Schudel AA, Engels M: Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. Arch Virol 87: 205-217, 1986.
4. Jun MH: Control of major infectious bovine diseases in Korea. Kor J Vet Publ Hlth 14(3): 199-221, 1990.
5. Mayfield JE, Good PJ, Vanoort HJ, Campbell AR, Reed DE: Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain). J Virol 47: 259-264, 1983.
6. Rock DL, Beam SL, Mayfield JE: Mapping bovine herpesvirus type 1 latency-related RNA in trigeminal ganglia of latently infected rabbits. J Virol 61: 3827-3831, 1987.
7. Simard C, Nadon F, Se'guin C, LaBoissie're S, Trudel M: Gene mapping of infectious bovine rhinotracheitis viral DNA genome. Arch Virol 110: 63-75, 1990.
8. Fitzpatrick DR, Zamb T, Parker MD, Hurk SDL, Babiuk LA, Lawman MJP: Expression of bovine herpesvirus 1 glycoproteins g Ⅰ and gⅢ in transfected murine cells. J Virol 62: 4239-4248, 1988.
9. Tikoo SK, Fitzpatrick DR, Babiuk LA, Zamb T: Molecular cloning, sequencing, and expression of functional bovine herpesvirus 1 glycoprotein gⅣ in transfected bovine cells. J Virol 64: 5132-5142, 1990.
10. Fitzpatrick DR, Babiuk LA, Zamb TJ: Nucleotide sequence of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gⅢ, a structual model for gⅢ as a new member of the immunoglobulin superfamily, and implications for the homologous

glycoproteins of other herpesviruses. Virol 173: 46-57, 1989.

11. Cox GJM, Zamb TJ, Babiuk LA: Bovine herpesvirus 1: Immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. J Virol 67: 5664-5667, 1993.
12. Kweon CH, Kee YJ, Kwon BJ, An SH: Cloning and map location of thymidine kinase(TK) gene of Korean isolate bovine herpesvirus PQ strain. J Kor Soc Virol, 23: 165-169, 1993.
13. Jun MH, Kweon CH, An SH, Kim YH, Sul DS: Production of monoclonal antibodies against infectious bovine rhinotracheitis vius: seminar on prodution and utilization of monoclonal for the control of animal disease. RDA & FFTC/ASPAC, 5-19, 1986.
14. Kweon CH, An SH, Song JY, Kim BH, Lee JJ, Kee YJ, Lee YS, Maeda S: Expression of neutralizing proteins of pseudorabies virus using recombinant baculovirus. J Kor Soc Virol 23: 45-51, 1993.
15. Kweon CH, Yoon YD, AN SH: Expression of bovine viral diarrhea viral envelope protein in prokaryotic vector. J Kor Soc Virol 24: 27-34, 1994.
16. Swain MA, Peet RW, Galloway DA: Characterization of the gene encoding herpes simplex virus type 2 glycoprotein C and comparison with the type 1 counterpart. J Virol 53: 561-569, 1985.
17. Eisenberg R J, Ponce LM, Friedman H M, Fries L F, FrankMM, Hastings JC, Cohen GH: Complement component C3b binds directly to purified glycoprotein C of herpes simplex virus types 1 and 2. Microb Pathogen 3: 423-435, 1987.
18. Kinchington PR, Remenick J, Ostrove JM, Straus SE, Ruyechan WT, Hay J: Putative glycoprotein gene of varicella-zoster virus with variable copy numbers of a 42-base-pair repeat sequence has homology to herpes simplex virus glycoprotein C. J Virol 59: 660-668, 1986.
19. Binns MM, Ross N L J: Nucleotide sequence of the Marek's disease virus(MDV)RB-1B A antigen gene and the identification of the MDV A antigen as the herpes simplex virus 1 glycoprotein C homologue. Virus Res 12: 371-382, 1989.
20. Robbins AK, Watson R J, Whealy ME, Hays WW, Enquist LW: Characterization of a pseudorabies virus glycoprotein gene with homology to herpes simplex virus type 1 and type 2 glycoprotein C. J Virol 58: 339-347, 1986.
21. Zijl M, Gulden H, Wind N, Gielken A, Berns A: Identification of two genes in the unique short region of pseudorabies virus ; comparison with herpes simplex virus and varicella-zoster virus. J Gen Virol 71: 1747-1755, 1990.
22. Kit S, Kit M, DiMarchi RD, Little SP, Gale C: Modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine expressing monomer and dimer forms of foot-and-mouth disease capsid protein epitopes on surface of hybrid virus particles. Arch Virol 120: 1-17, 1991.
23. Maeda S: Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. Ann Rev Entomol, 34: 351-372, 1989.