

제주도 Bovine Rotavirus의 분리와 그 특성

¹건국대학교 낙농학과 및 동물자원연구센터, ²수의학과, ³일본 미야기 암센터, ⁴일본 아키타대 의학부, ⁵일본 삿포로 의과대학, ⁶미국 Stanford대 의과대학

유제현¹, 이영건, 주지선, 김유성, 김순재², 海老名卓三郎³
中込治⁴, 浦澤正三⁵, 谷口孝喜⁵, Harry B. Greenberg⁶

=Abstract=

Isolation and Characterization of Jeju Island Bovine Rotavirus (JBR)

Jae-Hyeun Yu¹, Young-Kun Lee, Ji-Sun Ju, You-Seong Kim, Soon-Jae Kim², T Ebina³,
O Nakagomi⁴, S Urasawa⁵, K Taniguchi⁵ and Harry B Greenberg⁶

¹Department of Dairy Science, ²Department of Veterinary Medicine, Kon-Kuk University and ARRC, ³Miyagi Cancer Center, ⁴Japan, Faculty of Medicine, Akita University, School of Medicine, ⁵Sapporo Medical University, Japan, ⁶School of Medicine, Stanford University, U.S.A

Fecal samples of calf diarrhea were taken on farms in Jeju island, rotavirus was isolated and cytopathic effect (CPE) was determined after infection to MA104 cell. Morphological evaluation on electron microscopy proved it as rotavirus. Also, its infection to MA104 cell was reidentified using a fluorescence antibody method. Genotype of Jeju island bovine rotavirus (JBR) analyzed through PAGE was 4: 2: 3: 2 pattern, which was unique in bovine and that analyzed through general PAGE was somewhat different from NCDV, UK, KK3, A5-3A, 61A, B223 and similar to N stool-5, N culture-5 and Kawatabi (Japan). By titration after plaquing, the level was 1-3 x 10⁶ PFU/ml, which was lower than those of NCDV and UK. Electrophoresis analysis of RNA-RNA hybridization, ELISA, and first and second PCR products of VP7 and VP4 in 1% agarose (TAE+1μl EtBr) revealed that the rotavirus was a serotype of G6P11.

Key Words: Rotavirus, Serotypes, PCR, ELISA.

서 론

1973년 어린 아이의 소장 용모 상피 세포에서 처음 발견된 로타바이러스는 어린 아이와 어린 소, 쥐, 돼지, 말, 토끼, 사슴, 개, 어린 양, 원숭이, 면양에서도 설사 질환의 주요 원인이 되며 [1] 송아지 설사병 바이러스의 경우 전 세계적으로 산재된 설사병의 원인체로 설사에 의한 급성 폐사 외에도 임신우의 유산 또는 사산, 호흡장애, 백혈병과 유사한 증상을 일으키는 경우도 있다 [2,3].

로타바이러스는 다양한 혈청형으로 인해 증상의 경중이 있고 임상증상으로는 구토와 설사를 주로 하는 위장염 증상 이외에 발열과 호흡기도염의 증상도 있으며 때로는 탈수 증상을 일으키기 때문에 수혈이 필요하기도 하다 [3]. 로타바이러스가 선진국, 개발도상국, 후진국을 가리지 않고 세계적으로 위장염의 주된 바이러스임이 규명되면서 세계보건기구 (WHO)는 로타바이러스 감염의 보다 효율적인 억제 및 예방을 최우선 연구과제로 삼고 있다 [4].

이 연구는 1992년도 건국대학교 자체연구비와 1993년도 과학재단연구비에 의하여 수행되었음.

* corresponding author : Jae-Hyeun Yu, Department of Dairy Science and Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University, Mojdong, Kwangjin-Ku, Seoul 143-701, Korea.

*Reoviridae*과에 속하는 로타바이러스는 double-stranded (ds) RNA genome의 11개 segments를 가진 복잡한 이십면체 바이러스로서 2층의 capsid를 가지며 외층 capsid인 VP7과 VP4는 바이러스 중화항체를 생산하는데, VP4는 virion 표면층에서 12nm 정도 뿔어 있는 spikes의 형태로 뿔어 존재한다 [5]. 86.6-KDa VP4는 일반적으로 약한 trypsin에 의해 분해되며, 두개의 작은 polypeptides로 나누어져 각각 65-KDa VP5와 28-KDa VP8로 된다 [6].

소 로타바이러스의 VP7과 VP4가 특이적인 G serotype (glycoprotein에 대해)와 P serotype (protease-sensitive protein에 대해)에 관계되며, 대부분 bovine 로타바이러스는 serotype G6와 G10에 속하나 [5], G1, G7, G8을 갖는 경우도 있으며 G1, G2, G3, G11 bovine 로타바이러스는 설사하는 소에 의해서 보고된 바 있다 [6]. 반면에 로타바이러스의 P serotype은 immunoassay나 neutralization test에 의해 분별되는 것으로 P1, P5, P11은 bovine 로타바이러스 strain의 VP4에 의해 확립되었다. 로타바이러스에서 VP4와 VP7에 대한 monoclonal antibodies (MAbs)는 세포 배양시 로타바이러스의 replication을 효과적으로 막으며 실험동물의 바이러스의 수동감염 방이에 효과적으로 사용되어졌다 [7].

로타바이러스의 구조와 복합체 항원의 관점에서 로타바이러스 표면의 각기 다른 부분에 대한 항체가 여러 가지 다른 mechanism에 의해 감염을 중화 또는 무력화 시키는데 작용할 것으로 본다. 로타바이러스의 첫 감염에서는 주로 VP7 (G Type)에 대한 중화항체가 생산된다고 하며 [7,8] VP7과 VP4의 양쪽에 대해서 면역을 획득한 송아지나 어린이가 로타바이러스 감염으로 인한 설사에 대해 저항성을 갖게 된다고 한다 [9].

최근 몇 년 동안 많은 연구로 면역학적인 감염 뿐만 아니라 로타바이러스의 항원적 특성등이 많이 알려짐에 따라 효과적인 백신개발의 기틀을 마련하도록 되고 있다 [16].

따라서 본 연구는 로타바이러스 백신개발에 있어서 P type의 주요한 기능을 염두하여 두고 우선적으로 제주도 송아지 설사변을 수집하여 세포변성효과와 형광항체법, 전자현미경법에 의한 관찰과 더불어 전기영동에 의한 RNA pattern 확인으로 로타바이러스임을 밝힌 후 PCR에 의한 증폭을 하여 serotype결정으로 다른 표준 로타바이러스 strain들과 비교, 조사하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스

제주도 목장에서 송아지 설사변을 채취하여 -20℃에 보관, 사용하였으며, 대조구로는 UK, NCDV, B223, A5-37, 61A, Ns-5, Nc-5, Kawatabi virus를 사용하였다. 모든 실험은 바이러스를 MA104 세포에 6-7일 배양한 후, 세포를 회수하여 바이러스원으로 사용하였다 [13].

2. 배양 세포

제주도 로타바이러스의 증식과 계대에 사용된 세포는 MA104 세포로서, 미국 Stanford University 의과대학의 Greenberg Lab.에서 분양받아 사용하였다. 세포의 증식과 유지 [10,15]에는 Medium 199 (M199) (Irvine scientific, Santa Anna, CA.)를 0.22 μ m millipore (Bedford, Massachusetts 01730)로 여과 분주하여 냉장 보관하면서 사용하였다. M199는 7% fetal calf serum (FCS) (Hyclone Lab. Inc, Logan, Utah, 56℃, 20min 불 활성화된)과 1% L-glutamine pen-strep (L-GPS) (Irvine scientific, Santa Anna, CA.)를 첨가하여 조직 배양용 T-flask에서 3-4일 후에 단층이 형성된 세포를 계대 배양하여 사용하였다.

3. 바이러스 분리

제주도 송아지 설사변에서 로타바이러스 분리는 M199를 이용하여 설사변을 약 10%의 현탁액으로 만들었고 3분간 초음파 처리하여 2000rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상층액을 뽑아 0.45 μ m filter로 여과된 것을 trypsin (Type IX, Sigma Chemical Co., St, Louis, MO.) 0.5 μ l/ml을 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 활성화 시켰다. 무혈청 M199로 T-flask를 2번 세척하였고 바이러스를 각 well에 감염시켜 37℃에서 1시간 흡착시켰다. M199 (trypsin 0.5 μ l/ml)를 넣고 37℃, 5% CO₂에서 배양하며 현미경으로 CPE를 관찰하여 로타바이러스 감염 정도를 확인하였다. 3-4일 후 CPE가 완전히 일어난 것은 3번의 동결과 해동을 반복하여 vial에 담아 -70℃에서 보관, 사용하였다 [5,32].

4. 회전 배양

Roux bottle에서 단층이 형성된 세포는 무혈청 M199로 2번 세척하였고 37℃, 30분 동안 0.1%

acetylated trypsin (10 μ g/ml)으로 바이러스를 활성화 시켜서 37 $^{\circ}$ C, 1시간 흡착시켰다. Trypsin (1 μ g/ml)이 첨가된 무혈청 M199를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 회전 배양하면서 CPE가 완전히 일어나면 3번의 동결과 해동을 반복하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관, 사용하였다 [18].

5. 바이러스의 역가

로타바이러스는 trypsin 0.5 μ l/ml을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 활성화 시켜서 1% L-GPS가 첨가된 무혈청 M199로 10¹-10⁷까지 희석하였다. 6 well plate는 무혈청 M199로 2번 세척하였고 바이러스를 각 well에 0.5ml넣어 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 1시간 흡착한 후 agarose (Seakem, FMC Bioproducts, Rockland, ME)를 3차 멸균 증류수 100ml에 1.1g (0.55%)을 넣어 전자레인지에서 4분간 녹였다. 이것은 2X L-GPS가 첨가된 2XM199와 같이 1:1로 섞고 trypsin 0.5 μ l를 넣은 다음 37 $^{\circ}$ C 온도가 되었을 때 각 well에 4ml씩 넣어 굳힌 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 3-4일간 배양하였다. Neutral red는 M199와 1: 20으로 희석하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 하룻밤 배양하였고 well의 neutral red 액을 모두 제거 후 fluorescent light box위에서 결과를 확인하였다 [15].

6. 바이러스 RNA 분리

설사변은 1% L-GPS가 첨가된 무혈청 M199로 약 10% 현탁액을 만들었고 -70 $^{\circ}$ C에서 1시간 동결 후 상온에서 해동하였다. Tube에서 해동된 분변 현탁액 150 μ l와 M199 150 μ l를 동량넣고 disruption buffer (6% SDS, 0.6% 2-mercaptoethanol, 0.36M EDTA) 60 μ l를 eppendorf tube에 넣어 mix하였다. 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 30분 두었다가 포화 phenol과 chloroform을 360 μ l로 동량넣어 5분간 강하게 mix하였고 10,000rpm에서 2분간 원심분리하였다. 300 μ l의 상층액을 새로운 eppendorf tube에 옮겨 5N NaCl 5 μ l와 ethylalcohol 600 μ l를 넣어 -70 $^{\circ}$ C에서 1시간 동결하였다. 그 후 12,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 모두 제거한 다음 1시간 동안 진공 건조시켰고 loading buffer (2차 증류수 31.5ml, glycerol 4ml, 1M Tris pH6.8 2.5ml, bromophenol blue 7mg, EDTA 1mM되게 넣음)를 50 μ l 넣어 사용할 때까지 -20 $^{\circ}$ C에 보관, 사용하였다 [12,18].

7. Polyacrylamide gel electrophoresis에 의한 RNA pattern의 비교

dsRNA pattern은 30% (w/v) acrylamide과 0.8% (w/v) bis-acrylamide (acrylamide 13.3ml과 0.75M Tris-Hcl buffer (pH8.8) 20ml, 100mM EDTA (pH 8.0) 0.4ml, 2차 증류수 4.7ml, 3% ammonium persulfate 1.6ml, TEMED 70 μ l)를 이용하였고, 전기영동 (모델명:AE-6200, ATTO Co., Japan)은 running buffer (Tris Base 6g, glycine 28.9g, 0.1M EDTA 10ml)를 만들어 부은 후 sample을 각각의 well에 20 μ l씩 넣었다. 상온에서 20mM, 17시간 동안 전기 영동하여 silver nitrate (0.38g/250ml 2차 증류수)로 1시간 염색하였고 증류수로 2번 세척 후 37% formaldehyde 2ml이 첨가된 NaOH (7.5g/250ml 2차 증류수)로 발색하여 5% acetic acid로 중지시켰다. RNA pattern을 관찰 후 사진 촬영하였다 [15,18].

8. RNA-RNA hybridization에 대한 serotyping

NCDV, 0510 strain에 대한 ³²P-labelled ssRNA probe는 bovine strain에서 유래한 변성된 genomic RNA에 교잡하였다. dsRNA의 변성 (약 1 μ g)은 100 $^{\circ}$ C에서 2분간 배양하였고 얼음으로 2분간 급냉한 다음 P-labelled probe를 첨가 (각각의 변성된 dsRNA에 대해 10,000 cpm)하였다. 변성은 buffer (5mM Tris acetate, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% Sodium dodecyl sulphate, pH 7.5)로 65 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 실행하였다. 변성 후 RNA는 ethanol로 침전시키고 sample buffer (62.5mM Tris HCl pH 6.8, 5% w/v 2-mercaptoethanol, 10% w/v glycerol, 2% w/v SDS, 0.001% w/v bromophenol blue)로 용해시켰다. Negative-strand genomic RNA와 positive-strand probe로 구성된 hybrid는 10% polyacrylamide gel과 4% stacking gel에 의해 분리하여 ethidium bromide (EtBr)로 염색하였고, autoradiograph로 촬영하였다 [21,22].

9. Enzyme-Linked Immunosorbent assay에 의한 Serotyping

항체는 10mM PBS (pH 7.4)로 1:10,000이 되도록 희석하여 well당 100 μ l씩 96 well plate에 분주하였고 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 두었다가 1% BSA (PBS-Tween 0.05%에 녹인)로 4시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 blocking시켜 PBS-T로 3회 세척하였다. 송아지

설사변에서 분리된 로타바이러스는 10% skim milk (PBS-T에 녹인)로 3:1 희석하였고 세포에 감염 배양된 로타바이러스는 PBS-T로 1:1 희석하여 100 μ l/well 분주하고 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 두었다. Plate를 PBS-T로 3회 세척 후 anti-HRV hyperimmune rabbit serum을 PBS로 100배 희석하여 50 μ l/well 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 1시간 반응시켰다. PBS-T로 3회 세척 후 peroxidase conjugated anti-rabbit IgG 는 1000배 희석하여 50 μ l/well 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 1시간 반응 후 4회 세척하여 OPD (orthophenylene diamine)로 발색하여 20% H₂SO₄로 중지하고 표준과 비교하여 serotype을 결정하였다. ELISA reader로 490nm에서 optical density치를 측정하였다 [17,18,28].

10. PCR에 의한 P typing

VP7의 1차 증폭은 10% 분변 희석액 300 μ l와 fluorocarbon 300 μ l를 동량넣어 강하게 vortex시킨

후 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 상층액 250 μ l에 320 μ l의 6M guanidine thiocyanate 와 10 μ l의 RNaid matrix를 넣고 혼합액을 10분 동안 세게 흔든 후 4,000rpm에서 1분 동안 원심분리하였다. 상층액은 제거하고 400 μ l의 washing buffer를 넣고 혼합액을 6,000rpm에서 1분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거한 다음 400 μ l의 washing buffer를 가하여 혼합 후 원심분리 (8000rpm/1분) 하여 상층액을 제거하였다. 침전물은 5분동안 진공상태로 건조시키고 50 μ l의 증류수에 녹인 후 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열하였다. 다시 12,000 rpm에서 1분동안 원심분리 후 사용할 때까지 상층액을 -20 $^{\circ}$ C에서 저장하였다. 2차 증폭은 reaction solution (IX)을 PCR기기 (program 97-5)에서 97 $^{\circ}$ C, 5분간 가열하여 얼음으로 냉각시켰다. 냉각한 혼합액에 reverse transcriptase 0.3 μ l와 Taq DNA polymerase (Bokusui Brown) 0.3 μ l를 넣고 vortex하여 P typing을 위한 oligonucleotide primers를 만들었

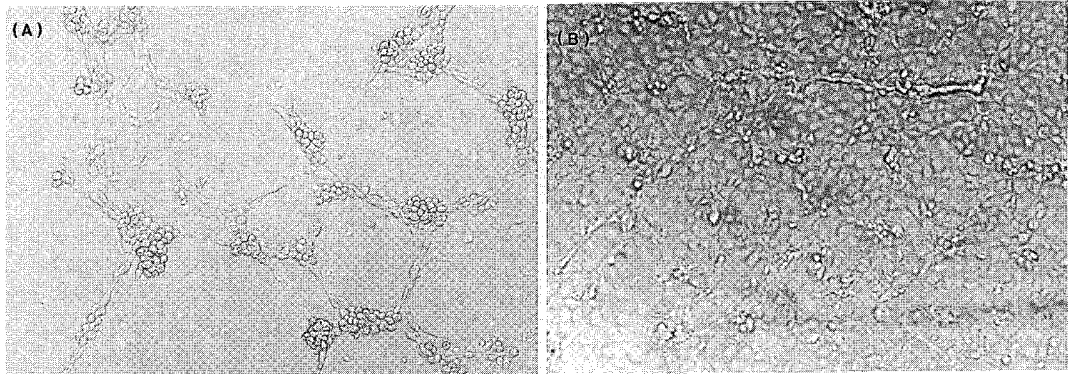


Fig. 1. CPE of JBR in MA104 Cells 72 hour after infection (A) and in the uninfected control (B).



Fig. 2. Fluorescein isothiocyanate photographs of MA104 cells infected JBR.

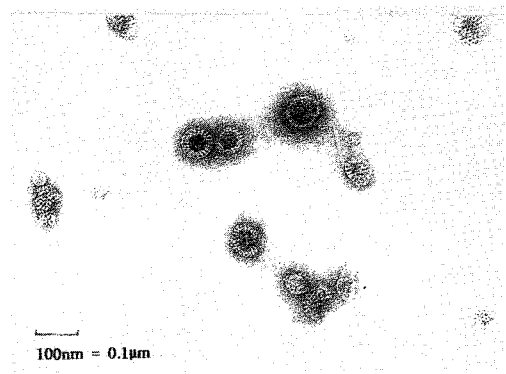


Fig. 3. Electron micrographs of JBR particles examined by electron microscopy. Bar. 100nm.

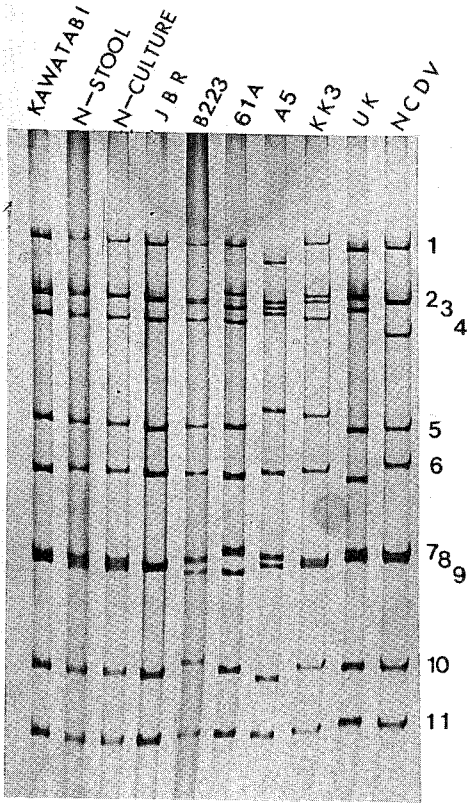


Fig. 4. Electrophoresis analysis of viral genomic RNAs from bovine rotavirus strains Kawatabi, Ns-5, Nc-5, JBR, B223, 61A, A5-37, KK3, UK, NCDV in polyacrylamide gels stained with silver nitrate (20mM, 17hour).

다. Mineral oil로 PCR장치를 setting하였다. Mineral oil을 제거 후 증폭한 10 μ l를 EtBr 1 μ l/ml, TAE의 1% agarose에서 30분 동안 전기영동한 후, 검정하여 UV위에서 촬영하였다. 2차 PCR 산물 10 μ l를 TAE+EtBr (1 μ g/ml) 혼합액상에서 1% agarose gel을 30분간 전기영동한 후 UV위에서 촬영하여 판독하였다 [17,18].

결 과

1. 로타바이러스의 MA104세포에 감염 확인

제주도 송아지에서 분리한 로타바이러스는 세포 배양용 T-flask에서 단층을 형성한 MA104 세포에 감염되어 passage 6에 걸쳐 CPE를 관찰할 수 있었다. Polyacrylamide 전기영동에 따른 결과를 보았을 때 띠가 나타나지 않는 경우도 있었으므로 로타바이러스임을 확인하기 위한 형광항체

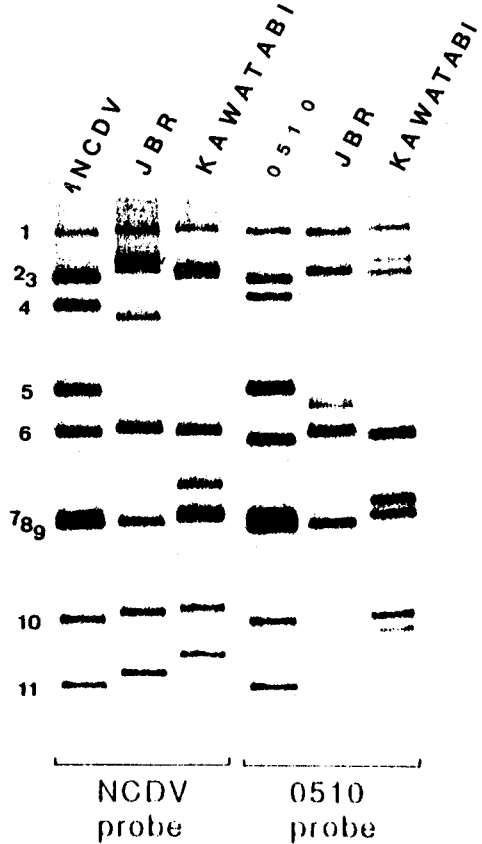


Fig. 5. Hybridization patterns obtained between the NCDV probe (lane 1, 2, 3) and 0510 probe (lane 4, 5, 6) genomic RNA from the rotavirus strains indicated.

Lane: 1. NCDV (serotype, G6 P1), 2. JBR (serotype, G6 P11), 3. Kawatabi (serotype, G6 P5), 4. 0510 (serotype, G6 P5), JBR (serotype, G6 P11), Kawatabi (serotype, G6 P5).

법과 전자현미경법을 이용하여 로타바이러스 감염 사실을 확인하였다 (Fig. 1, 2, 3). 분리된 JBR의 titer는 $1-3 \times 10^6$ PFU/ml 이었고 로타바이러스는 감염 후 72 시간 만에 관찰할 수 있었다 (Fig. 1-B). 형광항체법 [4]은 MA104 세포에 로타바이러스를 감염시켜 증화과정을 거치고 -20 $^{\circ}$ C MeOH로 고정하여 항원과 항체를 반응시켜 항원에 결합한 항체를 형광 표식한 염색법으로 제주도 송아지 설사 바이러스가 로타바이러스임을 증명하였다 (Fig. 2).

2. Migration patterns of viral dsRNA

30% (w/v) acrylamide와 0.8%(w/v) bis-acrylamide 로 만든 acrylamide gel을 이용하여 전기 영동

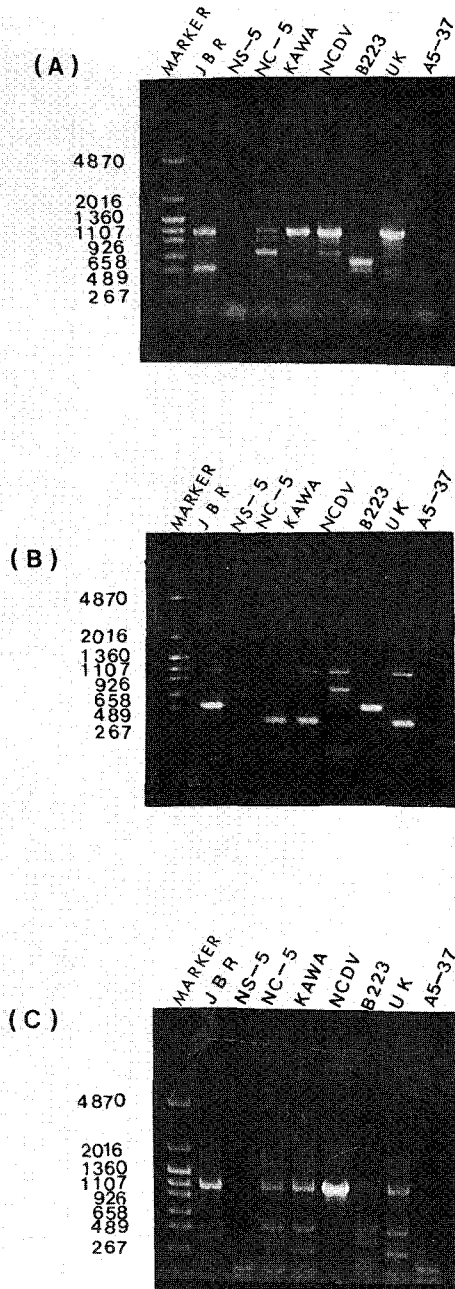


Fig. 6. Analysis of the polymerase chain reaction products by electrophoresis on 1% agarose gel in Tris-acetate EDTA buffer containing ethidium bromide (1 μ g/ml). A and B: A and B amplifications for P typing with reference strains (JBR, Ns-5, Nc-5, Kawatabi, NCDV, B223, UK, A5-37). C: Amplification for G typing with strain (JBR, Ns-5, Nc-5, Kawatabi, NCDV, B223, UK, A5-37).

으로 얻은 결과는 JBR이 로타바이러스 group A

의 전형적인 4: 2: 3: 2 pattern을 보였지만 JBR의 11분절이 Kawatabi, Ns-5, Nc-5, B223, 61A, A5-37, KK3, UK, NCDV strain의 11분절과는 약간의 다른 pattern으로 나타났음을 확인할 수 있었다.

3. ELISA에 의한 G typing

VP7에 대한 G type은 ELISA에 의해 결정하였으며 inner capsid VP6의 group A 항원 epitope와 반응하는 YO-156, VP6와 반응하여 subgroup I 과 II를 결정하는 S2-37, YO-5 MAbs를 사용하였다. VP4 serotype-specific MAbs로 group A 결정에 YQ-2C2, capture antibody로써 [18] VP7 serotype을 결정하는 G6, G10 MAbs를 사용하여 NCDV (G 6), UK (G6), B223 (G10), A5-37 (G8)와 비교하였을 때 JBR이 group A, subgroup I의 serotype G6로 결정되어 NCDV, UK와 비슷하였다.

4. PCR 에 의한 G와 P typing

제주도 송아지 설사변에서 로타바이러스와 표준 로타바이러스 strain으로 감염된 세포 배양액을 사용하여 로타바이러스의 G와 P type을 위한 PCR 결과 VP4 gene alleles의 각각에 대한 oligonucleotide primer를 가진 typing을 보였으며 (Fig. 5), 송아지 설사 로타바이러스의 표준 로타바이러스 strain Ns-5, Nc-5, Kawatabi, NCDV, B 223, UK, A5-37과 JBR를 비교한 것으로 full-length VP7 gene의 1차 증폭은 역전사의 형판으로 full-length VP7 gene의 primers와 copy를 이용하여 각 serotype에 대한 특이적 length로 DNA fragments의 2차 증폭에 걸쳐 결정되었다. 각각의 VP4에 대한 P typing의 oligonucleotide primer를 나타낸 것으로 NCDV (P1), UK (P5), B223 (P11)와 비교하였을 때 JBR은 B223 (P11)과 같이 P 11로 serotype이 결정되었다 (Fig. 6-A, B).

VP7에 대한 G typing을 결정한 것으로 표준 로타바이러스 strain인 NCDV (G6), UK (G6), B223 (G10)와 비교하였을 때 ELISA 결과와 같이 JBR은 serotype G6으로 밝혀졌다 (Fig. 6-C).

고 찰

제주도의 목장에서 분만된 송아지가 초 겨울과 초 봄에 설사와 합병증인 호흡기 질환으로 폐사되는 경우도 있으며 항생제로 치료가 잘 되지 않고 성장도 원만치 않아 분만 후 산유량에도 영

향을 주어 육우나 젖소 사육 농가에서 손실이 적지 않다. 본 연구는 그 원인이 bovine 로타바이러스에 기인하는 것으로 가정하고 제주도 목장에서 설사 변을 채취하여 로타바이러스를 분리 [5, 32]하여 전자현미경하에서 관찰한 결과 로타바이러스라는 것이 밝혀졌고 MA104 세포에 감염하여 CPE와 형광항체법 [3]으로 역시 로타바이러스라는 것이 증명되었다. Plaquing에 의해 순수 분리 [16]하여 PAGE에 의한 RNA patten [11, 15]이 NCDV, UK, KK3, A5-37, 61A, B223와는 상이함을 알 수 있었고, Kawatabi (Japan)와 Ns-5, Nc-5 (육지)와는 비슷하였다. 또한 Jeju bovine 로타바이러스를 titration [15]한 결과 RRV나 NCDV, UK 보다 낮은 $1\sim 3 \times 10^6$ PFU/ml이었다. JBR의 titer를 높이기 위해서는 plaquing과 pass를 계속하여 선별할 필요가 있다고 사료되며 또한 plaquing 후 회전 배양에 의해 titer를 높이는 것도 더 효율적이라고 생각되었다. Bovine 유래의 로타바이러스 중에는 두개의 G serotype (G6와 G10)과 세개의 P serotype NCDV, UK, KK3의 VP4 항원 특이성에 따라 정해지는 P1, P5, P11이 있다. 이 G serotype과 P serotype을 결정하는 유전자들을 비교, 분석하는 것은 bovine 로타바이러스에서 일반적으로 쓰이는 G 와 P serotype를 구분할 수 있는데 RNA-RNA hybridization [21,22]과 ELISA [17]와 PCR [17,18]에 의해 실시하는 MAbs로는 YO-150 (Group A), S2-37 (Subgroup I, anti-VP6), YO-5 (subgroup II, anti-VP6), YO-2C2 (Group A, anti-VP4), G6 (G6-specific anti-VP4)를 사용하여 제주도 bovine 로타바이러스는 G6P11의 혈청형으로 판명되었고, 또 RNA-RNA hybridization에 의해서도 역시 G6P11 serotype이라는 결과를 얻었다. 더욱 확실한 serotype을 밝히기 위해 VP7의 first PCR (5' end 1-28, 3' end 1039-1062)과 second PCR (3' end 1-28, G1 314-335, G2 406-425, G3 481-498, G4 669-688, G8 178-198, G9 757-776) primers를 사용하였고 VP4의 first PCR (5' 11-32, 3' 1072-1094)과 second PCR (5' 11-32, P1 487-508, P2 325-348, P3 733-753, P4 900-921) primers를 사용 하였다. 증폭한 10 μ l의 산물을 EtBr 1 μ l/ml TAE의 1% agarose에서 전기영동 후 검정한 결과 JBR의 혈청형은 G6P11이라고 판명되어 NCDV (G6P1), UK (G6P5), KK3 (G10P11), B223 (G10P11)과 다르며 G6 serotype은 UK와 동일하고 P serotype은 B223와 동일함을 알 수 있었다.

앞으로 염기서열이 B223와 유사한지 연구할 필요가 있으며, 약독화 백신개발에도 유사한 방법을 적용하면 좋으리라 사료되며 제주도의 목장에서 송아지 사육에 큰 성과를 거두리라 기대된다.

결 론

제주도 목장에서 송아지 설사변을 채취하여 로타바이러스를 분리 후 MA104세포에 감염시켜 (CPE)를 확인하였고, 전자현미경에 의해 형태학적으로 로타바이러스임이 판명되었으며 형광항체법에 의해 MA104 세포에 감염된 것을 재 확인 하였다. 제주도 송아지 로타바이러스 (JBR) RNA를 PAGE에 의해 genotype를 분석한 결과 bovine 특유의 4: 2: 3: 2: pattern이지만 일반 PAGE로 분석한 결과는 NCDV, UK, KK3, A5-3A, 61A, B223와 차이가 있었으며, Ns-5, Nc-5, Kawatabi (Japan)주와는 비슷한 경향을 보였다. Plaquing 후 titer한 결과 NCDV, UK 보다는 낮은 $1\sim 3 \times 10^6$ PFU/ml이었다. RNA-RNA hybridization과 ELISA 및 VP7과 VP4의 1차, 2차 PCR 산물을 1% agarose (TAE+1 μ l EtBr)에서 전기영동한 결과 G6P11의 serotype이었다.

사 사

로타바이러스의 분리와 전자현미경 검증을 하도록 배려해 준 일본 동북대 의학부 菅材和夫교수, 형광 항체실험을 도와준 농학부 山口高弘교수와 미국 Iowa주립대 Prem S. Paul교수와 Young Soo Lyoo박사, 항체와 표준 bovine 로타바이러스, PCR용 primers를 분양해 준 일본 삿포로 의대 浦澤价子교수, plaquing에 의한 순수 분리와 titration를 하게 도와 준 미국 Stanford대 의과대학 Harry B. Greenberg Lab.여러분 (Feng, Vo, Ludert, Ishida, Tang, Gilbert)과 연구실의 백 승천박사, 김용휘박사, 신 제호, 김 응률, 차 광중, 연 제한, 카프 (주) 이 태협 사장께 심심한 감사를 드린다.

참 고 문 헌

1. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ: Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non bacterial

- gastroenteritis. *Lancet* 2:1281-1283, 1973.
2. Estes MK, Cohen J: Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 53:410-449, 1989.
 3. Ebina T, Tsukada K: Protease inhibitors prevent the development of human rotavirus-induced diarrhea in suckling mice. *Microbiol Immunol* 35: 583-588, 1991.
 4. Galss RI, Gentsch J, Smith JCS: Rotavirus vaccines: success by reassortment?. *Science* 265: 1389-1391, 1994.
 5. Snodgrass DR, Fitzgerald T, Campbell I, Scott FMM, Browning G, Miller DL, Herring AJ, Greenberg HB: Rotavirus serotypes 6 and 10 predominate in cattle. *J Clin Microbiol* 28:504-507, 1990.
 6. Ruggeri FM, Greenberg HB: Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *J Virol* 65:2211-2219, 1991.
 7. Matsui SM, Offit PA, Vo PT, Mackow ER, Benfield DA, Shaw RD, Padilla-Noriega L, Greenberg HB: Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to the heterotypic neutralization domain of VP7 and the VP8 fragment of VP4. *J Clin Microbiol* 27:780-782, 1989.
 8. Clark SM, Spendlove RS, Barnett BB: Role of two particle types in bovine rotavirus morphogenesis. *J Virol* 34:272-276, 1980.
 9. Masui SM, Mackow ER, Greenberg HB: Molecular determinant of rotavirus neutralization and protection. *Adv Res* 36:181-214, 1989.
 10. Chiarini A, Arista S, Giammanco A, Sinatra A: Rotavirus persistence in cell cultures: selection of resistant cells in the presence of foetal calf serum. *J Gen Virol* 64:1101-1110, 1983.
 11. Dyall-smith ML, Holmes IH: Gene-coding assignments of rotavirus double-stranded RNA segments to and 11. *J Virol* 38:1099-1103, 1981.
 12. Flore L, Greenberg HB, Mackow ER: The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology* 181:553-563, 1991.
 13. Taniguchi K, Urasawa S: Diversity in rotavirus genomes. *Virology* 6:123-131, 1995.
 14. Elleman TC, Hoyne PA, Dyall-Smith ML, Holmes IH, Azad AA: Nucleotide sequence of the gene encoding the serotype-specific glycoprotein of UK bovine rotavirus. *Nucleic Acids Res* 11:4698-4701, 1983.
 15. Feng N, Burns JW, Brach L, Greenberg HB: Comparison of mucosal and systemic humoral immune responses and subsequent protection in mice orally inoculated with a homologous or a heterologous rotavirus. *J Virol* 68:7766-7773, 1994.
 16. Offit PA, Shaw RD, Greenberg HB: Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to surface proteins VP3 and VP7. *J Virol* 58:700-703, 1986.
 17. Ishizake H, Ohta C, Shirahata T, Goto H, Taniguchi K: Persistence of a single electropherotype and serotype (G6P5) of bovine rotavirus in calves on a closed dairy farm from 1990 to 1993. *Am J Vet Res* 56:1019-1024, 1995.
 18. Taniguchi K, Wakasugi F, Pongsuwanna Y, Urasawa T, Ukae S, Chiba S, Urasawa S: Identification of human and bovine rotavirus serotypes by polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* 109:303-312, 1992.
 19. Svensson L, Finlay BB, Bass D, Greenberg HB: Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Virol* 65:4190-4197, 1991.
 20. Ludert JE, Feng NG, Yu JH, Broome RL, Hoshino Y, Yasutaka H, Greenberg HB: Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein *in vitro* and *in Vivo*. *J Virol* 70:487-493, 1996.
 21. Matsuda Y, Nakagomi O: Antigenic and molecular characterization of bovine rotaviruses isolated in Japan. *Res Virol* 140:337-350, 1989.
 22. Midthun K, Valdesuso J, Hoshino Y, Flores J, Kapikian AZ, Chanock RM: Analysis by RNA-RNA hybridization assay of intertypic rotaviruses suggests that gene reassortment occurs *in vitro*. *J Clin Microbiol* 25:295-300, 1987.
 23. Greenberg HB, Valdesuso J, Wyke K, Midthun K, Walsh M, McAuliffe V, Wyatt RG, Kalica

- AR, Flores J, Hoshino Y: Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J Virol* 47 :267-275, 1983.
24. Greenberg HB, McAuliffe V, Valdesuso J, Wyatt R, Flores J, Kalica A, Hoshino Y, Singh N: Serological analysis of subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect Immun* 39:91-99, 1982.
 25. Sabara M, Barrington A, Babiuk LA: Immunogenicity of a bovine rotavirus glycoprotein fragment. *J Virol* 56:1037-1040, 1985.
 26. Broome RL, Vo PT, Ward RL, Clark HF, Greenberg HB: Murine rotavirus genes encoding outer capsid proteins VP4 and VP7 are not major determinants and virulence. *J Virol* 67:2448-2455, 1993.
 27. Greenberg HB, Vo PT, Ronald J: Cultivation and characterization of three strains of murine rotavirus. *J Virol* 57:585-590, 1986.
 28. Kassuba A, Saif LJ, Greenberg HB: Subgroup classification of porcine group-A rotaviruses, using monoclonal antibodies in an enzyme linked immunosorbent assay. *Am J Vet Res* 51:938-944, 1990.
 29. Kapikian AZ, Chanock RM: Rotavirus In B N Fields (*ed*) virol Raven press New York 863-906, 1985.
 30. Sabara M, Deregt D, Babiuk LA, Mispa V: Genetic heterogeneity within individual bovine rotavirus isolates. *J Virol* 44: 813-822, 1982.
 31. Kutsuzawa T, Konno T, Suzuki H, Kapikian AZ, Ebina T, Ishida N: Isolation of human rotavirus subgroups 1 and 2 in cell culture. *J Clin Microbiol* 16:727-730, 1982.
 32. Kaljot KT, Shaw RD, Rubin DH, Greenberg HB: Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J Virol* 62:1136-1144, 1988.