

국내에서 분리된 소 로타바이러스의 VP7 유전자 크로닝 및 염기서열 분석

강신영 · 전성진 · 장경옥* · 박용하** · 김원용***

충북대학교 수의과대학 · 오하이오주립대학교 수의과대학*
한국과학기술연구원 생명공학연구소** · 중앙대학교 의과대학***
(1997년 2월 6일 접수)

Cloning and nucleotide sequence analysis of VP7 genes of bovine rotaviruses isolated in Korea

Shien-young Kang, Seong-jin Jeon, Kyeong-ok Chang*
Yong-ha Park **, Won-yong Kim***

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University
*College of Veterinary Medicine, Ohio State University**
*Korea Institute of Science and Technology, Genetic Engineering Research Institute***
*College of Medicine, Chungang University****
(Received Feb 6, 1997)

Abstract : Bovine rotaviruses(A, 288, 55086 strains) isolated from fecal samples in Korea were propagated onto MA104 cells and were confirmed tentatively as G6, G8, and G10, respectively, by RFLP analysis. Full-length VP7 gene of these isolates was amplified by reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR) using VP7 specific primers and cloned into TA vector. Nucleotide and deduced amino acid sequences of VP7 genes of the isolates were determined and compared with those of bovine rotavirus reference strains(NCDV ; G6, UK ; G6, Cody I-801 ; G8 and B223 ; G10).

A, 288 and 55086 isolates showed high degree of nucleotide sequence homology with NCDV and UK(93% and 94%), Cody I-801(86%) and B223(97%), respectively. However, they showed 71~74% of nucleotide sequence homology with bovine rotavirus reference strains which belong to different serotypes. From the results of deduced amino acid sequence homology analysis, three isolates showed 94~96% of homology with the same serotype reference strains but 80~84% of homology with the different serotype reference strains.

Three bovine rotavirus isolates, A, 288 and 55086 strains, were confirmed as G6, G8, and G10, respectively, by nucleotide and deduced amino acid sequence analysis.

Key words : Bovine rotaviruses, RFLP, G type, VP7 gene sequencing.

이 논문은 1995년도 과학재단 핵심전문연구비(과제번호: 951-0612-015-1)에 의하여 수행되었음.

Address reprint request to Dr. Shien-young Kang, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Republic of Korea.

서론

로타바이러스는 *Reoviridae* family에 속하는 RNA 바이러스로서 사람을 포함한 모든 포유동물 및 조류에서 설사를 일으키는 중요한 바이러스로서 피막이 없고 정 20면체의 형태를 가지며 11개의 double stranded RNA로서 구성된 유전자를 가지고 있다^{1,2}.

로타바이러스는 항원성에 따라 serogroup, subgroup 그리고 serotype(혈청형)으로 분류되고 있는데 현재까지 7개의 serogroup(A-G)이 보고되어 있으며, 소 로타바이러스의 경우 3개의 serogroup(A, B, C)이 보고되어 있다¹. Group A 로타바이러스는 두개의 outer capsid protein(VP4 및 VP7)을 가지고 있으며 이들 VP4 및 VP7 단백질이 독립적으로 중화항체형성에 관여하는 것으로 밝혀졌다. VP4 단백질에 의하여 유도되는 혈청형은 P 혈청형(P type) 그리고 VP7 단백질에 의한 혈청형은 G 혈청형(G type)이라고 불려지고 있으며 현재까지 적어도 14개의 G혈청형 및 12개의 P 혈청형이 사람을 포함한 거의 모든 포유동물에서 전세계적으로 보고되었다^{1,3,4}. 소 로타바이러스에는 적어도 4개의 G 혈청형(G1, G6, G8 및 G10)이 존재하고 있는 것으로 보고되고 있다^{1,5,6}. G6과 G10은 야외에서 대부분(90% 이상)을 차지하고 있는 것으로 보고되었으며 NCDV strain과 B223 strain이 각각 G6 및 G10의 prototype으로 알려져 있다⁷. 또한 소 로타바이러스에는 3개의 P 혈청형(P[1], P[5] 및 P[11])이 존재하며 NCDV strain과 B223 strain은 각각 P[1] 및 P[11]에 속한다. 따라서 NCDV strain은 G6/P[1], B223 strain은 G10/P[11]의 조합으로 표시될 수 있다. G 또는 P 혈청형이 서로 다른 바이러스 사이에는 공통항원(VP6 단백질)이 존재하여 형광항체법 및 효소면역측정법에 의하여 서로 교차반응을 하지만 이들 공통항원은 중화항체형성에는 무관하여 교차감염시험에 의해서 서로 방어가 되지 않는다. 따라서 로타바이러스에서 이들 G 또는 P 혈청형을 결정하는 것은 이 바이러스에 의한 질병을 이해하고 예방하는데 필수적이다.

국내에서는 장 등⁸은 1994년 송아지 설사분변으로부터 20주의 로타바이러스를 분리하여 이에 대한 G 혈청형을 혈청중화시험법으로 조사한 결과 G6와 G10 혈청형이 존재함을 보고하였다. 본 연구에서는 국내에서 분리된 소 로타바이러스(혈청형 6, 8, 10으로 추정)의 VP7

유전자를 크로닝하고 염기서열을 분석하여 이를 prototype 혈청형 소 로타바이러스들과 비교 분석하였다.

재료 및 방법

바이러스 및 세포배양 : Group A에 속하는 소 로타바이러스 표준주로서 NCDV strain(G6), Cody 1-801 strain(G8) 그리고 B223 strain(G10)을 사용하였다.

소 로타바이러스(A, 288, 55086 strain)는 국내에서 송아지 설사분변으로부터 분리된 바이러스로서 plaque법으로 3회 순수분리하였으며 이들 바이러스는 단크론 항체를 이용한 중화시험법에 의하여 G6, G8, G10으로 각각 잠정 추정하였다. 소 로타바이러스는 MA104 세포에 감염시켜 증식시키고⁹ 조직배양으로부터 핵산을 추출하였다.

바이러스 RNA 추출 : 바이러스 dsRNA는 소 로타바이러스에 감염된 조직배양액을 사용하여 추출하였다. 즉, 로타바이러스에 감염된 조직배양액을 3회 얼렸다 녹인 후 3,000 rpm에서 30분간 원심하여 상층액을 분리하고 다시 상층액을 40% sucrose cushion을 이용하여 25,000 rpm에서 2시간동안 원심하여 바이러스를 침전시켰다. 침전된 바이러스는 RNA 추출용액(0.1M sodium acetate, 1.0% SDS; pH 5.0)으로 용해시킨 후 동량의 phenol/chloroform을 넣고 잘 섞어준 다음, 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 조심스럽게 상층액을 취하여 새로운 tube에 넣고, 4M sodium acetate(0.1 volume)와 100% ethanol(3 volumes)을 첨가하여 -70℃에서 4시간 반응시킨 후 15,000 rpm에서 20분 동안 원심하여 RNA를 침전시켰다. 70% ethanol로 세척한 다음, pellet을 건조시킨 후 DEPC(Diethyl pyrocarbonate, Sigma)로 처리된 증류수에 재부유시켜 사용하기 전까지 -20℃에 보관하였다.

전기영동 : 추출된 로타바이러스의 RNA 존재 유무를 RNA를 전기영동함으로써 확인하였다. 전기영동은 10% polyacrylamide gel 상에서 12mA로 14~16시간 적용시킨 후 ethidium bromide 혹은 silver 염색하여 분리된 RNA의 유무를 확인하였다. Agarose gel 전기영동은 TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA)을 사용하여 1.5% agarose 상에서 분리한 뒤 ethidium bromide로 염색하여 UV illuminator로 관찰하였다.

Primer 및 cDNA 합성 : VP7 cDNA 합성에 사용될 primer는 VP7 유전자의 5' 및 3' 부위중에서 conserve되어

있는 부위의 유전자를 합성하여 사용하였으며^{10,11} 5' 말단(+ sense) 부위의 염기서열은 5' CCC GGG ATC CAT GGC CGG CTT TAA AAG CGA GAA TTT 3', 그리고 3' 말단(- sense) 부위의 염기서열은 5' CGA TCG CGA ATT CTG CGG CAG GTC ACA TCA TAC AAC TCT A 3'이었다.

cDNA 는 조직배양액으로부터 추출한 double-stranded RNA(dsRNA)를 이용하여 역전사효소-중합효소연쇄반응법(Reverse transcriptase-polymerase chain reaction : RT-PCR)으로 합성하였다. 즉, RNA sample에 DMSO(Dimethylsulfoxide, Sigma)를 넣고 100℃에서 5분간 denaturation시킨 후 얼음에 보관하였다. 증류수 70µl, 10X PCR reaction buffer 10µl, 25mM MgCl₂ 5µl, dNTP(each 1.25mM), 4µl, primer(+ sense 및 - sense) 200ng, template 6µl, RNAsin(Boehringer Mannheim Biochemicals) 6.25 units, avian myeloblastosis virus reverse transcriptase(Boehringer Mannheim Biochemicals) 5 units, Taq polymerase(Boehringer Mannheim Biochemicals) 2.5 units를 넣고 37℃에서 90분(cDNA 합성), 95℃에서 5분(reverse transcriptase 불활성) 반응시킨 후 94℃에서 1분(denaturation), 55℃에서 1분(annealing), 72℃에서 2분(extension)의 과정을 35회 반복한 후 94℃에서 2분, 55℃에서 1분, 72℃에서 10분 반응시켰다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동한 뒤 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

Restriction fragment length polymorphism(RFLP) 분석 : 증폭된 PCR 사물의 G 혈청형을 확인하기 위해서 RFLP 분석을 하였다¹⁰. 증폭된 VP7 PCR 산물을 3가지의 제한효소(BamHI, HpaII 그리고 XbaI, Promega)를 사용하여 37℃에서 1시간 소화시킨 후 agarose gel상에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 자외선 하에서 반응유형을 확인하였다. RFLP 분석을 소 로타바이러스 표준주와 함께 수행하여 그 유형을 비교 분석하였다.

cDNA cloning 및 염기서열 분석 : RT-PCR법으로 증폭된 VP7 유전자는 일반적인 분자생물학적 방법¹²에 따라 TA vector(pCRII, Invitrogen)에 직접 cloning하였다. Ampicilline과 X-gal이 들어있는 배지에서 증식한 colony 중에서 흰색의 colony를 선별하여 plasmid를 분리한 후 제한효소로 소화시켜 삽입된 유전자의 크기를 확인하였다. 최종적으로 크로닝된 cDNA의 염기서열 분석은 Sanger의 dideoxy chain termination 방법에 의하여 실시하였다¹³. 즉, 증류수 20µl에 용해된 1µg의 DNA를 2µl의

2M NaOH/2mM EDTA를 첨가하여 실온에서 denature시킨 뒤 0.6M ammonium acetate(pH 4.9) 10µl를 첨가하여 중화시켰다. denature된 DNA는 ethanol을 첨가하여 침전, 세척한 뒤 증류수에 용해한 후 primer 1µl와 reaction buffer 2µl를 첨가한 뒤 65℃에 2분간 배양하고 다시 30분간의 시간에 걸쳐서 실온까지 서서히 cooling 시켰다. Template-primer 혼합액에 1µl 0.1M DTT, 5µCi [³⁵S]dATP, 2.0µl labelling mixture(1.5µM dGTP, 1.5µM dCTP, 1.5µM dTTP), Sequenase 3 units를 첨가하고 실온에서 5분간 적용시켰다. 미리 37℃로 되어있는 ddNTP 용액 2.5µl에 각각의 labelling reaction 용액 3.5µl를 첨가하여 37℃에서 5분간 방치한 후 반응정지용액(95% formamide, 20mM EDTA, bromophenol blue, xylene cyanol) 4µl를 첨가하여 반응을 중지시키고 95~100℃에서 3분간 가열한 뒤 5% acrylamide-7M urea gel에 load하여 분석하였다.

염기서열 및 추정 아미노산은 DNASTAR 프로그램을 이용하여 분석하였다.

결 과

RT-PCR : Group A에 속하는 소 로타바이러스 표준주와 국내에서 분리한 3개의 로타바이러스(A, 288, 55086 strains)의 VP7 유전자를 RT-PCR법으로 증폭한 결과 모든 바이러스에서 1062bp 크기의 VP7 gene이 증폭되었다.

RFLP 분석 : 제한효소 BamHI에 의해서 NCDV와 A strain의 VP7 유전자는 소화되지 않고 1062bp 크기의 산물을 보였으며, Cody I-801 및 288 strain의 VP7 유전자는 868bp와 196bp 크기의 산물이 그리고 B223와 55086 strain의 VP7 유전자는 627, 435 bp 크기의 산물을 보였다. 제한효소 HpaII에 의해서는 NCDV, A, Cody I-801 및 288 strain의 VP7 유전자는 소화되지 않고 1062bp 크기의 산물이 그리고 B223와 55086 strain의 VP7 유전자는 835, 227 bp 크기의 산물을 보였다. 제한효소 XbaI에 의해서는 NCDV와 A strain의 VP7 유전자는 998, 74 bp 크기의 산물을 보였으며 Cody I-801, 288, B223 및 55086 strain의 VP7 유전자는 소화되지 않고 1062bp 크기의 산물을 보였다(Fig 1). 따라서 A strain은 G6, 288 strain은 G8 그리고 55086 strain은 G10으로 판정하였다.

Cloning, 염기서열 및 예상 아미노산 분석 : 국내에서 분리한 3개의 로타바이러스(A, 288, 55086 strains)의 VP7 유전자를 크로닝하여 염기서열 및 추정 아미노산서열을

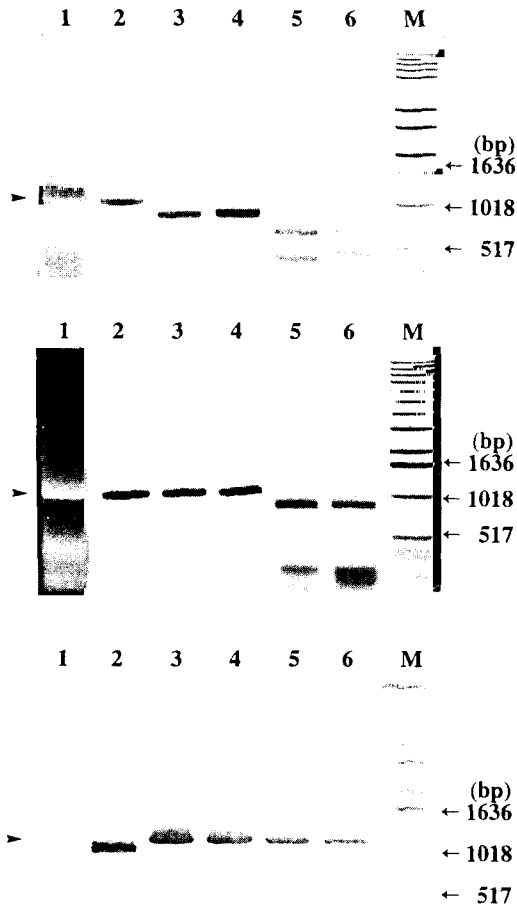


Fig 1. Restriction endonuclease fragment length polymorphism (RFLP) analysis of bovine rotavirus Korean isolates(A, 288, 55086).

VP7 gene products amplified by RT-PCR were digested with each restriction endonuclease(BamHI:Top, HpaII:Middle, and XbaI:Bottom) for 1hr at 37°C and separated on 1.5% agarose gel. Lane 1, 3, and 5 represents Korean isolate A, 288, and 55086 strain, respectively, and lane 2, 4, 6 represents reference bovine rotavirus NCDV(G6), Cody I-801(G8), and B223(G10) strain, respectively. Arrow head indicates undigested VP7 gene product(1062 bp). M:marker.

확인하여 그들을 소 로타바이러스 표준주와 비교하였다. 각 strain에서 3 clone을 선택하여 염기서열을 확인하여 표준주 로타바이러스와 비교한 결과 A strain은 NCDV 및 UK strain과 높은 염기서열 일치성을 보였으며 (93% 및 94%) Cody I-801과는 71% 그리고 B223 strain과는 73%의 일치성을 보였다. 288 strain은 Cody I-801

strain과 높은 염기서열 일치성(86%)을, NCDV 및 UK와 71% 및 72% 그리고 B223 strain과는 73%의 일치성을 보였다. 55086 strain은 B223 strain과 높은 염기서열 일치성 (97%)을 보였으나 NCDV, UK 그리고 Cody I-801 strain과는 각각 74%의 일치성을 보였다(Table 1).

Table 1. Comparison of nucleotide sequence homology of VP7 gene from bovine rotavirus Korean isolates(A, 288, 55086) and reference strains(NCDV, UK, Cody I-801, B223)

	Percent similarity						
	A	288	55086	NCDV	UK	Cody I-801	B223
A	■	70.3	73.5	93.4	93.9	70.5	72.9
288		■	73.4	71.2	71.8	85.5	72.7
55086			■	73.6	73.6	73.7	97.3
NCDV				■	96.0	72.3	73.0
UK					■	73.1	72.5
Cody I-801						■	73.0
B223							■

Table 2. Comparison of deduced amino acid sequence homology of VP7 gene from bovine rotavirus Korean isolates(A, 288, 55086) and reference strains(NCDV, UK, Cody I-801, B223)

	Percent similarity						
	A	288	55086	NCDV	UK	Cody I-801	B223
A	■	78.9	81.7	94.2	93.6	79.5	81.0
288		■	81.7	81.7	82.0	96.0	81.0
55086			■	83.8	83.5	81.7	96.1
NCDV				■	96.6	82.3	82.6
UK					■	82.9	82.6
Cody I-801						■	81.0
B223							■

추정 아미노산을 확인하여 표준주 로타바이러스와 비교분석한 결과 A strain은 NCDV 및 UK strain과 94%의 일치성을 보였으며 Cody I-801과는 80% 그리고 B223 strain과는 81%의 일치성을 보였다. 288 strain은 Cody I-801 strain과 높은 추정 아미노산서열 일치성(96%)을 보였으나 NCDV 및 UK와 82%, B223 strain과는 81%의 일치성을 보였다. 55086 strain의 경우 B223 strain과 높은 일치성(96%)을 보였으나 NCDV 및 UK strain과는 각각 84% 그리고 Cody I-801 strain과는 82%의 일치성을 보였다(Table 2). 특히 로타바이러스의 중화항체형성에 관여

```

A      (G6)  MYGIEYTTIL IFLTSTILN YLAKSITRPM DYIYRFLLI VTLIATIINA QNVGNLPIIT GSDMTAVANS TQREPFLLST FCLYYQPEAS
NCDV  (G6)  *****
288   (G8)  *****T* T*ILLV***** I*****V* *L*****F* V*V*TPFV*V* S*P***** L*****E
CODY  (G8)  *****T* T*ILLV***** I*****I* *L*****F* V*V*TPFV*V* S*P***** L*****E
55086 (G10) *****P* Y*Y*Y*Y*Y*Y* I*****K***** *T*SIIV*V* *****S*V*V*A *KD***** L*****T*
B223  (G10) *****A*F* Y*Y*Y*Y*Y*Y* I*****K***** *T*SIIV*V* *****S*V*V*A *KD***** L*****T*
      100      110      120      130      140      150      160      170      180
A      (G6)  NEIADTEMKD TLSQLFLFKG WPTLYVYFKE YAEIYAFSVE PHLFCDYNTLV LMYSDSTQKLD DMSQLADLIL NEMWLCNPMIDI TLYYYQCTDE
NCDV  (G6)  *****
288   (G8)  T*****S***** *G*****T***** Q*Y***** *E*****
CODY  (G8)  T*****S***** *G*****T***** Q*Y***** *E*****
55086 (G10) T**N**N**T*S* *G***** *D**T**+D* Q*Y***** I* *R**N**N**D**E* *E**N**N** *E**N** *E**N**
B223  (G10) T**N**N**T*S* *G***** *D**T**+D* Q*Y***** I* *R**N**N**D**E* *E**N** *E**N** *E**N**
      190      200      210      220      230      240      250      260      270
A      (G6)  ANKWTSMGSS CTVRKVCPLMT QTLGIQLIT IPSTFETVAT TEKLVITDYY DGVNHKLANVT TGTCTIRNCK KLGPRRENAV IQVGANVLD
NCDV  (G6)  *****
288   (G8)  *****D* *I***** *S*DT*TL*E*** N**A***** *Y*Y*Y*Y*Y*Y* *T**S***** *T**S***** *T**S*****
CODY  (G8)  *****D* *I***** *S*DT*TL*E*** N**A***** *Y*Y*Y*Y*Y*Y* *T**S***** *T**S***** *T**S*****
55086 (G10) *****A*Q* *I***** *Q* T*NG**E*** N*****D** *A***** *A***** *D**I**
B223  (G10) *****A*Q* *I***** *Q* T*NG**E*** N*****D** *A***** *A***** *D**I**
      280      290      300      310      320
A      (G6)  ITADPTTTPQ TERMRIRINMK KMWQVYTYV DYVNGIIOQM SKRSRLNSS AFYYRV
NCDV  (G6)  *****
288   (G8)  *****A*****
CODY  (G8)  *****A*****
55086 (G10) *****A*****
B223  (G10) *****N** *T***** *A**I* *****V*V*A *****

```

Fig 2. Comparison of the deduced amino acid sequence of VP7 gene of bovine rotavirus Korean isolates(A, 288, 55086) and reference strains(NCDV, Cody I-801, B223). Variable regions A, B, and C(amino acids 87-101, 141-152, 208-224, respectively) are shown in boxes.

하는 부위로 알려진 3개의 variable region(A: amino acid 87-101, B: amino acid 141-152, C: amino acid 208-224)에서 추정 아미노산서열은 서로 다른 혈청형 간에는 현저한 차이가 있으나 같은 혈청형간에는 거의 동일한 것으로 나타났다(Fig 2).

고 찰

본 연구에서는 국내에서 세포배양법을 이용하여 송아지 설사분변으로부터 분리한 소 로타바이러스의 G 혈청형을 RT-PCR 및 RFLP 분석을 통하여 확인하고 중화항체형성에 관여하는 VP7 유전자의 염기서열을 결정하여 소 로타바이러스 표준주의 염기서열 homology 및 추정 아미노산서열을 비교 분석하였다.

로타바이러스의 G 혈청형은 오래전부터 혈청중화시험법으로 확인되었다¹⁴. 그러나 이 방법은 결과를 얻는데 오랜 시간이 소요되고 특히 조직배양으로 증식되는 바이러스에만 적용될 수 있는 단점이 있다. 이러한 이유로 분변재료로부터 로타바이러스의 G 혈청형을 직접 확인할 수 있는 새로운 방법이 최근에 개발되었다^{11,15}. 즉, VP7 단백질에 특이적으로 반응하는 단크로 항체를 이용한 효소면역측정법과 각 혈청형에 특이적으로 존재하는 VP7 유전자를 probe로 이용한 nucleic acid hybridization법이 개발되었다. 이들 방법은 분변재료로부터 G 혈청형을 직접 그리고 신속, 민감하게 확인할 수 있으나 특이성에 문제점이 제기되었다. 본 연구에서 응용된 RT-PCR 및 RFLP 분석은 바이러스의 혈청형 및 subtype 분석에 응용되었으며 Chang 등¹⁰은 이 방법을 이용하여 소 로타바이러스의 G 및 P 혈청형을 효과적으로 확인할 수 있다고 보고하였다. 국내에서 분리된 소 로타바이러스 A, 288 그리고 55086 strain은 로타바이러스 VP7 단백질에 특이적으로 반응하는 단크로 항체를 이용한 혈청중화시험법에 의하여 각각 G6, G8 및 G10 혈청형으로 잠정 확인되었다¹⁶. 본 연구에서 이 바이러스들은 RT-PCR 및 RFLP 분석법에 의하여 마찬가지로 G6, G8 및 G10 혈청형으로 확인되어 이 방법이 로타바이러스 혈청형 확인에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

소 로타바이러스는 주로 3가지 G 혈청형(G6, G8, G10)으로 구성되어 있으며 같은 혈청형끼리는 85% 이상의 염기서열 일치성을 그리고 90%이상의 아미노산서열 일치성을 보인다. 또한 최근에는 주로 사람에게 분포한 G

1이 아르헨티나에서 분리보고되었으며 G2, G3, G11 혈청형 역시 검색되었다는 보고가 있었다¹⁷. 소 로타바이러스 혈청형 중에서 G6 혈청형은 야외에서 가장 높은 분포를 보이며, 미국에서는 NCDV, IND strain이, 영국에서는 UK strain이 알려져 있다¹⁸. 최근에는 G6 subtype이 일본에서 보고되었으며, 이 strain은 표준 G6 strain들과 약 85%의 염기서열 일치성을 그리고 약 90%의 아미노산서열 일치성을 보이나 G6 혈청형에 특이적으로 반응하는 단크로항체와 반응하지 않는 것으로 알려졌다^{19,20}. 또한 사람에서도 G6 strains이 보고되었으며 이들 역시 표준 G6 strain들과 약 85%의 염기서열 일치성을 그리고 약 90%의 아미노산서열 일치성을 보였다²¹. 국내 분리 A strain은 NCDV 및 UK strains과 거의 동일한 염기서열 및 아미노산서열을 보였으며 전형적인 G6 strain으로 보여진다.

G8 혈청형은 제일 처음 사람에게서 보고가 되었으며 (69M strain) 이어 소에서도 보고가 되었다^{21,23}. 이들 사람 및 소 G8 strains 간에는 낮은 염기서열 일치성을 보이는 subtype들이 여러가지 존재하는 것으로 알려져 있으며 유전자 염기서열은 85-90% 그리고 아미노산서열은 90-95%의 일치성을 보이는 것으로 보고되었다^{21,23}. 국내에서 분리된 288 strain은 cody I-801 strain과 86%의 염기서열 일치성을 보였으나 추정 아미노산서열을 96%의 일치성을 보였다. 이것은 비록 유전자 염기서열에 있어서 14%의 상이성을 보이지만 주로 silent mutation의 결과로 사료된다.

G10 혈청형은 소에서 G6 혈청형 다음으로 야외에 많이 분포하는 것으로 알려져 있으며 B233가 표준 strain으로 보고되고 있다¹⁸. 이 G10 역시 최근에 사람에게서 보고되었으며, 이 strain은 G6 혈청형과 마찬가지로 G10 subtype의 형태로서 표준 G10 strain들과 약 85%의 유전자 염기서열 일치성을 그리고 약 90%의 추정 아미노산서열 일치성을 보인 것으로 보고되었다²⁴. 국내에서 분리된 55086 strain은 B223 strain과 유전자 염기서열 및 추정 아미노산서열이 각각 95% 및 96%의 일치성을 보여 전형적인 G10 strain에 속하는 것으로 확인되었다. 사람과 소 사이의 G6, G8, G10 strains은 서로 subtype의 모습을 보이며 이것은 로타바이러스의 종(species)간 전파를 간접적으로 시사하며 이러한 종간 로타바이러스의 전파는 유전자 염기서열의 변화를 유도하여 subtype 그리고 크기는 다른 혈청형으로 분화되는 요인으로 작용하는

것으로 추정된다^{24,25}.

본 연구에서는 국내에서 분리한 소 로타바이러스(G6, G8, G10 혈청형)의 VP7 유전자 염기서열 및 추정 아미노산서열을 분석하여 이를 prototype 혈청형 소 로타바이러스들과 비교함으로써 이 바이러스들의 분자생물학적 위치를 확인하였으며 국내에는 적어도 3가지 이상의 소 로타바이러스 G혈청형이 존재하고 있음을 알 수 있다. 앞으로 국내에서 소 로타바이러스의 G혈청형 분포는 어떠한가? 3가지 G혈청형 외에 다른 G 혈청형이 존재하고 있는가? 소 로타바이러스의 P 혈청형의 종류와 분포는 어떠한가? 등의 연구가 수행되어져야 할 것이다. 이러한 연구결과는 국내에서 소 로타바이러스에 대한 질병을 이해하고 국내에서 사용되는 효과적인 예방약을 개발하는데 커다란 도움이 될 것으로 생각된다.

결 론

국내에서 분리된 소 로타바이러스(A, 288, 55086)의 VP7 유전자를 크로닝하고 염기서열을 분석하여 표준 소 로타바이러스의 VP7 유전자 염기서열 및 추정 아미노산서열과 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. A strain은 NCDV 및 UK strain과 높은 염기서열 일치성을 보였으며(93% 및 94%) Cody I-801 strain과는 71% 그리고 B223 strain과는 73%의 일치성을 보였다. A strain의 추정 아미노산서열은 NCDV 및 UK strain과 각각 94%의 일치성을 보였으나 Cody I-801 strain과는 80% 그리고 B223 strain과는 81%의 일치성을 보였다.

2. 288 strain은 Cody I-801 strain과 86%의 염기서열 일치성을 보였으며 NCDV, UK 및 B223 strain과는 71%, 72% 및 73%의 일치성을 보였다. 288 strain은 Cody I-801 strain과 높은 추정 아미노산서열 일치성(96%)을 보였으나 NCDV 및 UK strain과는 각각 82%, B223 strain과는 81%의 일치성을 보였다.

3. 55086 strain은 B223 strain과 높은 염기서열 일치성(97%)을 보인 반면 NCDV, UK 및 Cody I-801 strain과는 각각 74%의 일치성을 보였다. 55086 strain의 추정 아미노산서열은 B223 strain과 높은 일치성(96%)을 보였으나 NCDV 및 UK strain과는 각각 84% 그리고 Cody I-801 strain과는 82%의 일치성을 보였다.

4. 위의 결과로서 A strain은 전형적인 G6 혈청형, 55086 strain은 G10 혈청형 그리고 288 strain은 G8 혈청

형임을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev*, 53:410-499, 1989.
2. Theil KW. Group A rotaviruses. In viral diarrhea of man and animals, Saif LJ, Theil KW, pp35-72. CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.
3. Brussow H, Snodgrass D, Fitzgerald T, et al. Antigenic and biochemical characterization of bovine rotavirus V1005, a new member of rotavirus serotype 10. *J Gen Virol*, 71:2625-2630, 1990.
4. Taniguichi K, Urasawa T, Kobayashi N, et al. Nucleotide sequence of VP4 and VP7 genes of human rotaviruses with subgroup I specificity and long RNA pattern: implication for new G serotype specificity. *J Virol*, 65:5640-5644, 1990.
5. Bohl EH, Theil KW, Saif LJ. Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotavirus. *J Clin Microbiol*, 19:105-111, 1984.
6. Snodgrass DR, Ojeh CK, Campbell I, et al. Bovine rotavirus serotypes and their significance for immunization. *J Clin Microbiol*, 20:342-346, 1984.
7. Snodgrass DR, Fitzgerald T, Campbell I, et al. Rotavirus serotypes 6 and 10 predominate in cattle. *J Clin Microbiol*, 28:504-507, 1990.
8. 장정호, 정정원, 조재진 등. 소 로타바이러스 및 코로나바이러스 혼합생독백신 개발에 관한 연구. 농시논문집, 158-171, 1994.
9. Terrett LA, Saif LJ, Theil KW, et al. Physicochemical characterization of porcine pararotavirus and detection of virus and viral antibodies using cell culture immunofluorescence. *J Clin Microbiol*, 25:268-272, 1987.
10. Chang KO, Parwani AV, Saif LJ. Restriction fragment length polymorphism for characterization of the VP7 gene diversity of field strains of group A bovine rotavirus: identification of variant G6 strains. *Arch Virol*, 141:1727-1739, 1996.
11. Rosen BI, Parwani AV, Lopez S, et al. Serotype differentiation of rotaviruses in field samples from di-

- arrheic pigs by using nucleic acid probes specific for porcine VP4 and human and porcine VP7 genes. *J Clin Microbiol*, 32:311-317, 1994.
12. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a Laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 1989.
 13. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74:5463-5467, 1977.
 14. Hoshino Y, Wyatt R, Greenberg HB, *et al.* Serotype similarity and diversity of rotavirus of mammalian and avian origin as studied by plaque-reduction neutralization. *J Infect Dis*, 149:694-702, 1984.
 15. Lucchelli A, Kang SY, Jayasekera MK, *et al.* A survey of G6 and G10 serotypes of group A bovine rotaviruses from diarrheic beef and dairy calves using monoclonal antibodies in ELISA. *J Vet Diagn Invest*, 6:175-182, 1994.
 16. 안재문, 조선희, 강신영. 소 로타바이러스(국내분리주)에 대한 단크론항체 생산 및 특성에 관한 연구. *대한수의학회지*, 36:395-403, 1996.
 17. Hussein HA, Parwani AV, Rosen BI, *et al.* Detection of rotavirus serotypes G1, G2, G3 and G11 in feces of diarrheic calves by using polymerase chain reaction-derived cDNA probes. *J Clin Microbiol*, 31:2491-2496, 1993.
 18. Saif LJ, Rosen BI, Parwani AV. Animal rotavirus in *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*. Marcel Dekker, New York, NY 289-314, 1994.
 19. Matsuda Y, Isegawa Y, Woode GN, *et al.* Two-way cross-neutralization mediated by a shared P(VP4) serotype between bovine rotavirus strains with distinct G (VP7) serotypes. *J Clin Microbiol*, 31:354-358, 1993.
 20. Matsuda Y, Nakagomi O, Offit PA. Presence of three P types(VP4 types) and two G types(VP7 types) among bovine rotavirus strains. *Arch Virol*, 115:199-207, 1990.
 21. Gerna G, Steele AD, Hoshino Y, *et al.* A comparison of the VP7 gene sequences of human and bovine rotaviruses. *J Gen Virol*, 75:1781-1784, 1994.
 22. Albert MJ, Unicomb LE, Bishop RF. Cultivation and characterization of human rotaviruses with super-short RNA patterns. *J Clin Microbiol*, 25:183-185, 1987.
 23. Chang KO, Parwani AV, Saif LJ. Comparative nucleotide and deduced amino acid sequence analysis of VP7 gene of the Cody(I-801) strain. *Arch Virol*, 140:1279-1283, 1995.
 24. Beards G, Xu L, Ballard A, *et al.* A serotype 10 human rotavirus. *J Clin Microbiol*, 30:1432-1435, 1992.
 25. Hardy ME, Woode GN, Xu Z, *et al.* Comparative amino acid sequence analysis of VP4 for VP7 serotype 6 bovine rotavirus strains NCDV, B641 and UK. *J Virol*, 65:5535-5538, 1991.