일반원고

생물공학적 기법을 이용한 전염병의 진단과 백신개발

JR Gorham, DP Knowles
강 문 일 譯

이 총설은 미국 워싱턴 주립대학교 수의과대학의 교수이자 이 대학내에 들어서 있는 미농무성산하 농업연구소 가축질병분야 연구책임자인 Gorham 박사와 아나플라즈마증 및 염소의 관절염과 뇌염 바이러스의 연구로 저명한 Knowles 박사가 최근에 미농무성 주관의 수의사를 위한 기술자료의 일부로 발간예정인 것을 저자들의 양해를 얻어 전역한 것임을 밝혀 둔다(역자 주)

최근 분자생물학적 기법은 전염병 진단과 백신개발 부분에 그 활용범위가 빠른 속도로 확대되어 가고 있다. 이 방법들이 앞으로 광범위하게 사용되기 위해서는 지금보다도 더욱 편리하고, 안전하며, 재현성이 높을 뿐만 아니라 궁극적으로 다량의 검사재료를 처리하는데 쉽도록 모든 처리과정이 자동화되어가야 할 것으로 보인다.

새로운 진단법은 대개 현재의 검사법을 개량하거나 또는 아직 유용한 검사법이 없을 때 이를 위해 개발되고 있다. 어떤 새로운 진단법을 개발하여 기존의 진단법을 바꾸려할 경우 새로 개발된 진단법은 기존방법에 비해 상대적인 정확성과 우월한 검사능력 즉, 민감성(sensitivity)과 특이성(specifity)이 검증되어야 한다. 이를 위해 쓸 수 있는 아주 흔한 측정방법 중의 하나는 새로운 기법과 현재 사용중인 방법에 의한 검사결과를 단순 비교하는 것이다. 하지만 이러한 비교는 두 방법사이의 양적인 일치율(concordance)은 알 수 있지만 무엇보다도 궁금한 민감성이나 특이성에 대한 차이를 확인할 수 없다.

특정방법의 "민감성"이란 어떤 동물집단중 검사대상인 병원체에 감염된 동물만을 찾아낼 수 능력을 말하는데 공식으로 표현하자면(검사결과 양성인 수 × 100) ÷ (검사결과 양성인 수 + 의음성(疑陰性, 실제 양성인 동물이나 검사결과 음성으로 나타난 경우)로 정의할 수 있고, "특이성"은 어떤 동물집단중 검사대상인 병원체에 감염되지 않은 동물만 찾아낼 수 있는 능력으로 그 공식은 (검사결과 음성인 수 × 100) ÷ (검사결과 음성인 수 + 의양성(疑陽性, 실제 감염이 안된 동물이나 검사결과 양성으로 판정된 경우)로서 표현할 수 있다. 결국 이들 공식은 민감성이란 의음성 결과를 측정하는 것이고, 특이성이란 의양성 결과를 양적으로 나타낸다고 볼 수 있다.[24]

한편 검사능력에 대한 정확한 자료를 얻는데 상당한 어려움은 앞서 언급한 민감성과 특이성의 공식을 적용하여 과연 감염이나 질병을 정의하는 황금률(gold standard)을 찾을 수 있느냐는 문제에 있다. 황금률로 받아들일 수 있는 한 예는 검사결과 양성이었던 동물에서 검사결과 음성이었던 동물로 특정질병이 전파되는 경우를 들 수 있으나, 실제 대부분 실험계획을 세울 때, 이러한 전파에 대한 자료를 각 실험동물로부터 얻어낸다는 것은 거의 불가능하다는 현실적 어려움이 있다. 새로운 진단법을 개발했을 때, 일치율에 대한 자료만으로 검사법 측정하는데 충분할 때가 있

※전남대학교 수의과대학

다. 예컨대 새로운 방법이 기존 방법보다 단지 검사시간에 있어 더욱 신속하다는 장점밖에 없다면 일치율 자료만 가지고도 새 검사법의 효과를 확인할 수 있다. 하지만 검사능력이 개선된 방법이라면 새 방법과 기존법간의 비교를 위한 최선의 황금률은 새 방법에 대한 유효성을 확실히 가려낼 수 있어야만 한다. 따라서 어떤 진단법을 특정질병의 확진을 위해 첫 검사수단으로 지정하려면 그 검사의 유용성이 검증될 기준(황금률)이 확실해야 하는 건 당연하다.

이미 생명공학과 동물질병의 진단에 대한 자세한 두편의 세계수역기구의 기술보고서[1,2]가 나와 있으나 이 글에서는 이 분야의 어렵고 난해하다고 보이는 기술적인 특정지식보다는 이 시대를 사는 수의사들이 생명과학분야의 전문인으로서 기본적으로 알아두어도 할 평범한 관련정보를 제공한다는 의미에서 다음 순서에 따라 간략히 소개하고자 한다.

1. DNA의 검출
 가. 제한효소분석법(Restriction Endonuclease Analysis, REA)
 나. 중합연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)
 다. DNA 탐색자(Probe)
2. 단백질의 검출
 가. 면역조직화학법(Immunohistochemistry)
 나. 웨스턴 막흡수법(Immunoblotting)
 다. 항원검출을 위한 ELISA(단크론 항체를 이용한 ELISA)
3. 항체검출
 가. 경쟁억제 ELISA(차단 ELISA)
 나. 재조합 DNA 기법에 의한 항원생산
4. 백신
 가. 유전자 삭제
 나. 백시니아(Vaccinia)에 실은 바이러스 백신

1 DNA의 검출

가. 제한효소 분석법

오늘날 흔히 바이러스를 동정해내기 위해 사용되는 여러가지 혈청학적 검사법들이 밀접히 연관되어 있는 혈청형들까지 감별해낼 만큼 충분히 특이적이지 못한 게 사실이다. 그러나 제한효소(이 효소는 특정한 DNA의 염기배열로 된 각 부위를 끊어 가수분해시키는 작용을 함) 분석(핵산 지문찾기, nucleci acid fringerprinting)은 바이러스 혈청형들이 같는 유전자들간의 차이를 가려낼 수 있다. 만약에 어떤 DNA 바이러스의 유전자에 대한 구성(이를 흔히 지도를 그린다고 함)을 알아내려고 한다면, 해당 DNA를 추출해내어 특정한 뉴클레오타이드(배열중 특별한 절편에 표시를 한다. 이로 인해 만들어진 DNA 절편은 한천겔을 이용한 전기영동을 ethidium bormide와 섞어 걸어보면 눈으로 확인할 수 있다. 나중에 이 절편은 유전자들간의 차이나 유사성을 결정하기 위해 ^{32}P 같은 동위원소로서 대상성(complementary) DNA(cDNA라 함)에 표지를 붙이기도 한다.

이 방법에 대한 예를 그림 1에 나타내었다. 이 그림은 작년 7월 워싱턴포스트지에 실림 심슨사건*을 설명하는데 나타난 표를 좀 바꿔 인용한 것이다.

이 그림을 보면 이 방법으로 세 개의 바이러스 분리주들간의 유전자들이 어떠한 차이와 유사성을 갖는지 결정할 수 있도록 되어 있다. 이런 식으로 어떤 질병이 발생시 특정한 바이러스 분리주의 관련여부를 알아낼 수 있고 만약 바이러스가 개입되어 있는 발생이라면 역학적으로 어떻게 이 바이러스가 발생지역 혹은 동물집단내 들어왔는지 그 추적경로까지 파헤칠 수 있다. 헝가리의 경우 REA를 오제스키병 바이러스의 분리주 연구에 활용하여 이들 바이러스 야외주들의 직간접인 배설원이 무엇인지 가려낸 바 있다.[16] 또한 REA는 Holmberg 등[9]은 동물유래의 항생제 저항성이 있는 *Salmonella newport*가 항생제 치료를 받아야 할 심한 환자들에게 어떻게 옮겨지는가 알아내는데 사용한 바 있다. 이외에 캐나다내 광견병 바이러스의 지역적 변이주들이 분리된 지역에 따라 지속적인 차이를 보이고 있다는 사실도 REA도 알아낸 바 있다.[1]

역학조사를 위한 활용외에 REA를 다른 부분의 진단수단으로서 응용가치는 확실치 않다. 향후 수의진단의들에게 대두될 수 있는 문제로는 바이러스나 세균분리주들 사이에 어떤 수준의 차이가 과연 진단상 의미가 있느냐를 생각해볼 수 있다. REA는 제한효소 작용 부위의 소실(loss)이나 획득(aquisition) 여부에 따라 DNA내 단 하나의 염기쌍(base pair)만 바꾸어졌을지라도 찾아낼 수 있다. 그러나 이 제한효소가 작용하

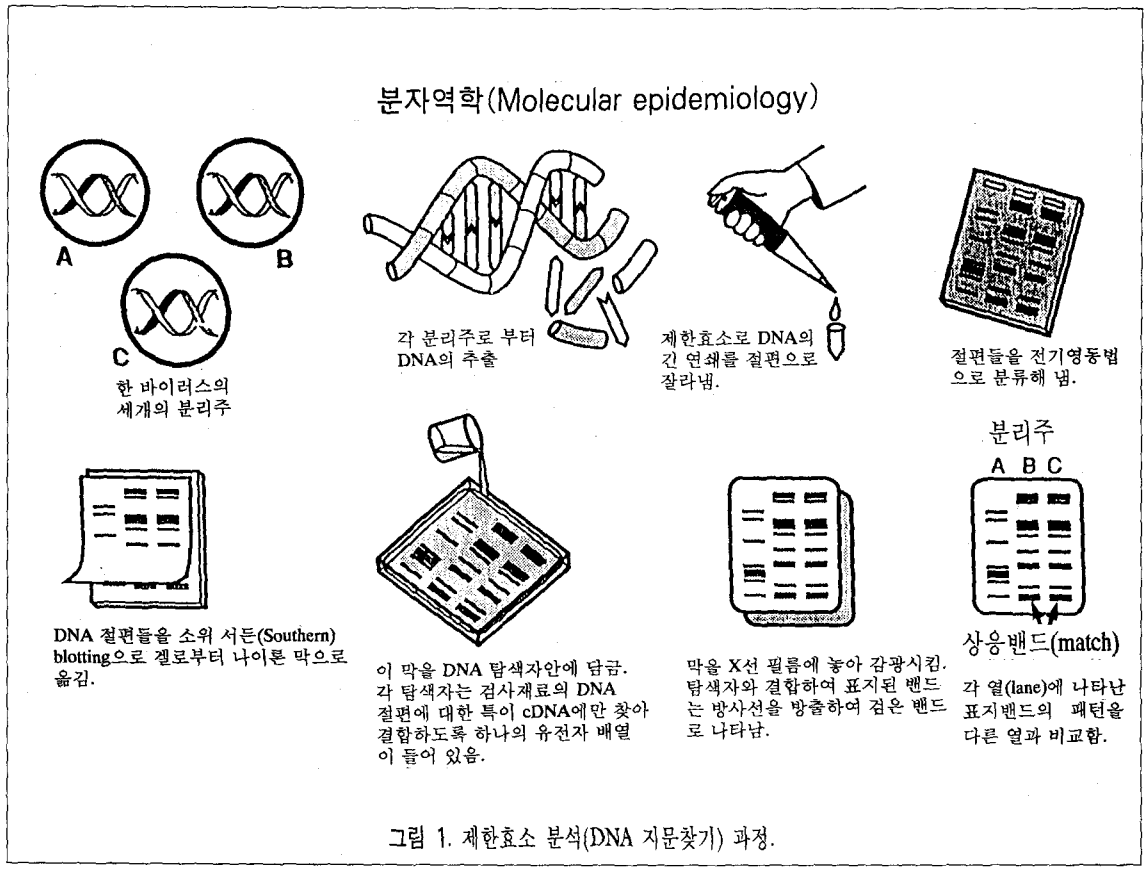


그림 1. 제한효소 분석(DNA 지문찾기) 과정.

는 부위의 소실이나 획득이 과연 질병을 일으키는 바이러스나 세균의 능력 특히 병원성의 차이로 나타나지 않는다면 REA에 의한 검사는 의미가 없다고 할 수 있다. REA가 분명히 유용하게 쓰일 수 있는 경우는 혈청학적으로 분리주(株)들의 병원성을 구별할 수 없을 때 바이러스나 세균의 병원균이 있는 주(株) 찾아낼 때이다. 대체로 REA의 양상(pattern)이 다르다는 것은 곧 병원성의 차이를 뜻할 수 있기 때문이다.

나. 중합연쇄반응

중합연쇄반응(PGR) 과정은 이종성(heterogenous) 배열을 가진 복합물로부터 원하는 DNA의 배열 즉, 원래의 DNA 복제를 다량 시험관내에서 만들어 낼 수 있다.[9] 즉, PCR은 100에서 400개 까지의 염기쌍으로 된 작은 부위를 수백만번 복사해낼 수 있다.

PCR에 의한 DNA의 증폭은 각기 다른 온도의 처리단계를 연속적으로 적용하여 이룰 수 있다(그림 2). 처음 증폭하려는 DNA를 두 가닥의 대상성 끈(complementary strands)으로 분리하기 위해 높은 열로서 변성시킨다. 다음, 특수한 프라이머(primer, 뇌관; DNA의 양쪽 끈쪽을 대상할 DNA의 짧은 끈)들이 자리를 잡도록 낮은 온도까지 서서히 식힌(annelaing) 후 중간정도의 온도에서 DNA 중합효소(polymerase)와 더불어 뜰본 즉, 주형(template)으로서 증폭할 DNA가 확장된다. 이 세단계를 한 회전(cycle)이라 하는데 이 회전은 목표로 하는 DNA배열의 증폭을 위해 20내지 40회 정도 반복한다. PCR로 증폭시키려는 DNA 배열의 기하학적인 증폭의 열쇠는 쌍으로 된 프라이머의 선택에 달려 있는데 그것은 확장시 계속되는 회전마다 프라이머 확장을 위해 또다른 역관계의 프라이머 연결(annealing) 부위를 만들어 내야 한다.

PCR은 숙주조직이나 매개체내 병원체를 찾아내는데 매우 민감한 검사법중 하나이다. 아주 적은 수의 숙주세포내에 어떤 병원체가 감염을 일으켰을 지라도 PCR은 숙주세포의 DNA내로 중합된 하나의 유전자 배열만을 목표로 하여 증폭시킬 수 있다. 따라서 PCR

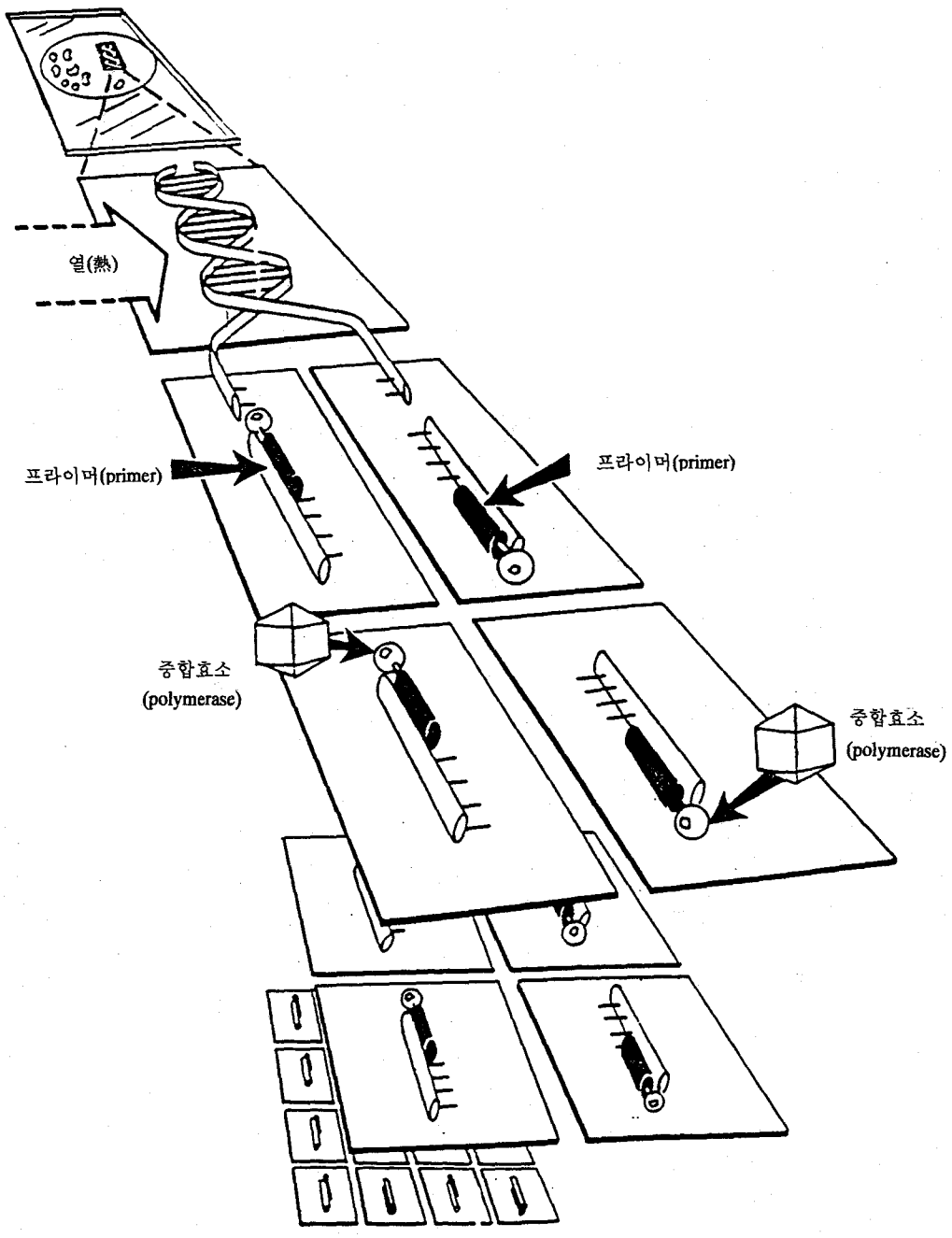


그림 2. 중합 연쇄 반응.
이 기법은 검출하기에 매우 적은 미량의 특이 핵산배열을 증포시킨다(Sloand, E.M. 등이 발표한 미국 수의사회지(1991;263:2865)에서 인용).

은 백신내 오염을 막기 위한 검사로서도 활용할 수가 있다.

이외에 PCR은 만성의 지속성(persistent) 감염증 즉, 소 백혈병 바이러스, 염소의 관절염-뇌염 바이러스 등이 속한 레트로바이러스와 말과 소의 바베시아증 등과 같은 진드기에 의한 혈액 원충병들을 진단하는데 아주 유용하다는 것이 증명되고 있다. 이들 질병들은 감염동물에서 질병결과가 상당히 진행될 때까지 흔히 임상증상을 확인하기 어렵기도 하거니와 일단 감염된 동물은 지속적인 전파원이 되기 때문에 진단과 예방에 심각한 문제를 일으키고 있다. 몇몇 혈청학적 검사는 특정한 병원체에 대한 지속적 감염여부를 정확히 감별해 내기는 하나 개체동물에서 원인 병원체가 과연 얼마정도 감염되어 있는 지를 알아낼 수 없다는 약점이 있다.

PCR을 진단에 활용할 경우, 검사재료의 채취와 과정처리시 오염이 안되도록 매우 각별한 주의가 필요한데 그 이유는 이 검사법이 지닌 매우 정교한 민감성 때문에 아주 쉽게 의양성을 만들어낼 수 있기 때문이다.

다. DNA 탐색자에 의한 진단

PCR과 함께 DNA의 잡종(hybridization) 기법을 이용했을 때 비록 매우 보존성이 강한 DNA 배열을 사용해야 하지만 세균성 및 바이러스성 질병을 진단하는데 DNA 탐색자가 굉장히 특이성이 높아서 강력한 수단이 되고 있다.[19] 두가지 예를 들어보자. 소 아나플라즈마증의 병원체중 하나인 *Anaplasma marginalle*를 클론화하여 만든 DNA 탐색자를 이용하여 이 질병의 매개체인 감염진드기를 검색해낼 수 있고[7], 말의 바베시아증의 병원체인 *Babesia equi*를 실험적으

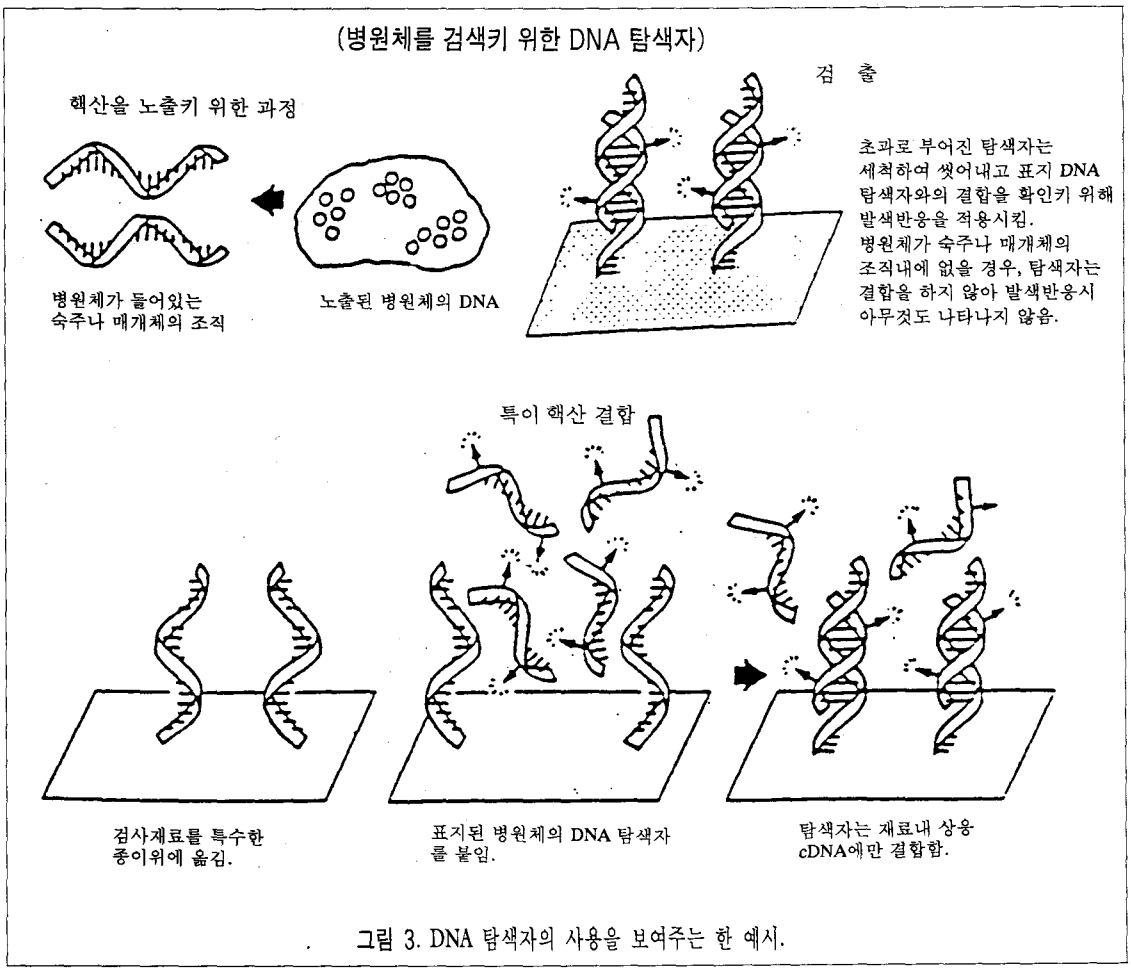


그림 3. DNA 탐색자의 사용을 보여주는 한 예시.

로 감염시킨 말의 적혈구내에서 이 잡종기법으로 문제의 원충성 병원체를 찾아낼 수 있다.[18]

그림 3은 DNA의 탐색자가 사용하는 과정을 알기 쉽게 그려 놓은 것이다. 탐색자를 만들기 위해서는 DNA의 두가닥 끈이 분리되도록 가열하거나 화학적으로 처리한다. 분리된 각 DNA 가닥은 대상성 뉴클레오타이드 염기들을 갖는 DNA의 다른 한 가닥을 찾아내 결합한다. 즉, DNA 탐색자를 특정 병원체의 nucleotide 배열에 표지를 붙여 만들어 감염이 의심스런 동물이나 매개체 곤충의 조직내에 적용시켜 감염여부를 검색해낼 수 있다. 보통 DNA 탐색자의 결합(즉, 잡종) 여부를 확인하기 위해 NA 탐색자의 한 가닥을 ^{32}P 같은 방사선 동위원소로 표지하여 사용한다.

변성된 DNA는 혈액, 타액, 뇨, 삼출물 같은 임상적인 검사재료들 안에 포함되어 있으므로 나이론이나 나이트로셀룰로스(nitrocellulose)로 만든 막(膜)에다 붙일 수가 있다. 따라서 임상 검사재료내 찾으려는 DNA 배열과 DAN 탐색자가 서로 대상성으로 맞아 떨어지도록 잡종화(결합)시킨다. 다음에 결합이 안된 탐색자를 제거하기 위해 세척한 후 그 막을 X-선에 감작되는 필름에 노출시킨 후, ^{32}P가 붙은 탐색자의 존재 유무를 확인하면 된다. 검사재료가 특정 병원체에 양성이라면 방사선 동위원소의 표지가 나타난다. 그러나 음성일 경우 동위원소로 표지된 탐색자가 검사재료내 어떤 DNA와 결합하지 않았을 것이므로 세척과정에서 모두 씻겨나가 아무런 표지도 보이지 않는다. 방사선 동위원소를 붙인 DNA 탐색자가 민감성이 매우 뛰어나다고 하나 여기엔 다소의 단점이 있다. 즉, 동위원소인 ^{32}P의 반감기가 짧다는 점과 실험과정중 적은 양이나마 방사선에 사람이 피폭되어 해로울 수 있다는 것을 들 수 있다.

DNA 탐색자의 실제적인 활용을 쉽게 하기 위해서는 방사선 표지물이 민감성이 우수하면서도 저장기간이 긴 비방사선 물질로 대체될 필요가 있다. 최근 달걀의 난백에서 추출한 아비딘(avidin)과 바이오틴(biotin)간의 단단한 결합력을 이용한 탐색자들이 소개되고 있다. 이 경우, DNA 탐색자를 바이오틴으로 표지를 붙인 다음, 마지막에 이 결합반응이 horseradish peroxidase나 alkaline phosphotase같은 발색물질과 결합되어 있는 strepavidin으로 처리하여 찾아내고자 하는 탐색자와 목표 병원체를 가려낼 수 있다. 물론 streptoavidin은 다른 형광염색물질과도 결합시킬 수 있다. 바이오틴에 결합한 탐색자는 저장기간이 길 뿐만아니라 방사선 표지 탐색자로 처리시 보통 하루이상 걸리는 소요시간을 불과 몇시간으로 단축할 수가 있다. 하지만 가끔 바이오틴으로 표지한 탐색자를 사용시 민감성에 문제가 있을 수 있다.

2. 단백질의 검출

가. 면역조직화학법

조직으로부터 병원체를 감별해내는 방법중 하나인 면역조직화학법은 바이러스 세균 및 원충성 병원체인 항원을 동정하기 위한 표준진단법으로서 많은 진단실험실에서 빠르게 자리잡아가고 있다. 이미 고정액으로 처리된 조직내 항원은 검출법을 다른 진단기법과 비교하여 많은 이점을 주고 있다. 첫째는 표본을 진단실로 송부하는데 편리하고, 둘째로 포르말린 등으로 고정할 수 있어 검사재료가 가질 수 있는 인수공통병원체로부터 안정한 취급이 가능하며, 셋째로 보관중인 조직재료로부터 과거 추적연구를 할 수 있는가 하면, 넷째로 검사소요시간이 짧고, 다섯째로 이미 조직내 죽어있는 병원체의 검출도 할 수 있다.[8] 많은 종류의 정제된 항원에 대한 단크론 항체가 상업적으로 생산되고 있는 오늘날 주요한 전염성 병원체는 물론 자동면역과 종양의 특이 표지(marker)에 대한 동정에 이르기까지 이 기법의 활용은 확대되고 있다. 이 진단법의 처리과정중 주의할 점은 포르말린으로 고정된 조직에서 결합할 수 있는 단크론 항체와 항원간의 결합을 잘 구분해내는 일이다.

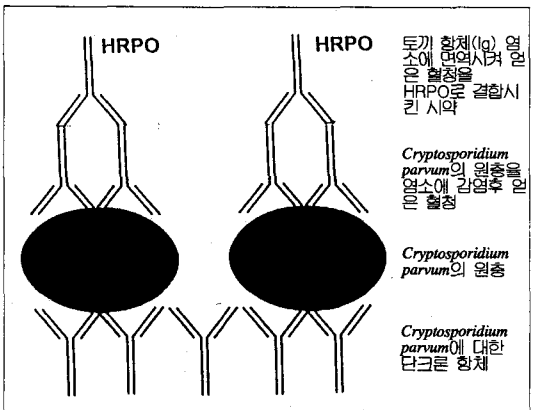
나. 웨스턴 막흡수법(blotting)

이 방법은 웨스턴(Western)씨가 개발한 기법으로 오늘날 단백질 검출과 확인연구에 가장 많이 활용되고 있는 수단중 하나이다. 흔히 이 방법은 감염동물로 부터 채취한 혈청을 가지고 찾아낼 수 있는 면역 우성(immunodominant: 유발된 항체의 특이성에 가장 크게 영향을 미치는 항원결정군의 세부단위를 말함) 단백질을 구별하는데 부터 시작된다. 감별할 단백질(항원)을 SDS polyacrylamide 전기영동법으로 분리한 후 나이트로셀룰로오스 종이로 옮긴 항원에 상응하는 다

(多)크론(면역혈청) 항체나 단크론 항체로 반응시켜 검출한다. 항원과 항체를 반응시킨 후, 면역복합체인 단백질 밴드(band)를 peroxidase와 같은 발색시약이 붙은 시약으로 처리하면 육안적으로 볼 수 있다. 이때 발색한 밴드(帶)가 항원과 항체가 결합한 곳이다. 웨스턴 막흡수법은 주로 진단실험실일 경우 면역복합체에서 바라는 단백질 항원을 구분해내기 위해 사용하고 있다. 다른 혈청학적 진단법으로 검사시 의양성과 의음성으로 구분키 어려울 경우 이 방법으로 그 진위를 판가름할 수 있다.[16]

다. 항원 포획 ELISA

항원 포획 ELISA(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, 효소결합 면역흡수법)의 일차적인 이점은 임상질병의 발현전 혹은 과정중에 감염동물로부터 직접 병원체인 항원을 검출해낼 수 있는 검사법이란 점이다. 항원 포획 ELISA의 중요한 성분은 그림 4에서 보는 바처럼 특이적 단크론 항체라 할 수 있다. 처음 검사재료로 부터 항원을 특이 단크론 항테로서 잡아낸 후 이들의 존재유무를 방사선 동위원소나 효소로 표지한 두번째의 다크론 혹은 단크론 항체로서 반응시켜 확인하다. 포획성 단크론 항체가 지녀야할 바람직한 특징으로는 첫째 병원체에 대한 강력한 결합력과 둘째 반응력의 소실없이 반응시키는 판(microplate)에 대한 부착력이 있어야 한다. 이외에 ELISA 판에 결합되어 있는 포획성 단크론 항체가 인지한 여러개의 항원결정부위(epitope)중 하나에만 반응할 수 있는 이차성 단



HRPO : horseradish peroxidase(색소의 일종).
Ig : 면역글로부린(Immunoglobulin)

그림 4. *Cryptosporidium parvum*의 원충을 사용한 항원 포획 ELISA의 예시.

크론 항체가 필요하다. 최근에 수행된 항원 포획 ELISA에 의한 예들로는 임상증상의 발현전 소의 혈액으로부터 *Anaplasma marginale*의 검출[23], 송아지의 분변내 *Crytosporidium parvum* 원충의 검출[4] 그리고 임상검사 표본으로부터 우역(rinderpest)과 반추수의 peste des petis(모빌리바이러스에 의해 중서부 아프리카와 중동내 양과 염소에 발생하는 매우 치명적인 질병) 바이러스 항원의 신속한 검출[14] 등을 들 수 있다.

3. 항체 검출

가. 경쟁억제 ELISA(CI-ELISA)

경쟁억제 ELISA(차폐 ELISA)는 처음 블루텅 바이러스의 항체를 검출하는데 사용되었다[3]. 경쟁 ELISA법은 우역의 백신접종에 따른 혈청학적 연구를 위해 사용하였던 간접 ELISA법과 바이러스 중화법 대신 광범위하게 사용되고 있다.[22] 이 기법은 돼지 콜레라 바이러스의 항체를 검색하기 위해 다량의 돼지 혈청을 검사하는데도 이용되고 있다.[25] 최근 경쟁억제 ELISA법으로 악성 카탈열(malignent catarrhal fever)에 불현성 감염된 양, 사슴 및 들소에서 이 바이러스의 항체를 찾아냈는가 하면[13], 바베시아증에 지속감염을 일으키고 있는 말에서 항*Babesia equi* 항체를 검출한 바 있다.[12]

경쟁 ELISA의 성분으로는 단크론 항체와 이에 상응하는 epitope을 들 수 있다(그림 5). 이 단크론 항체는 경쟁반응시 다크로 항체가 지니는 항원 결합력을 대체할 수 있는 적절한 항원 친화력을 가지고 있어야 한다. 바람직한 epitope는 선상(線上)의 펩티드 성분일 것과 면역우성(immunodorminance) 및 분리주들 사이에 보존성(conservation) 등이 특징적이어야 한다. 이 보존성(conservation)은 분자수준의 클로닝이나 표현(expression)으로 epitope의 생산을 할 경우 아주 중요한 특징이랄 수 있다. 경쟁 ELISA의 특이성은 전적으로 사용된 단크론 항체에 달렸기 때문에 이 기법을 활용시 재조합(recombinant) 항원과 사용한다면 아주 잘 어울리는 방법이 될 것이다. 세균성 lysate(감염세포를 용해시켜 만든 재료)로서 만든 ELISA 반응판을 써서 재조합 항원이 충분한 양만큼 표현(expression)되다면, 재조합 항원의 추가정제는 필요치 않다.

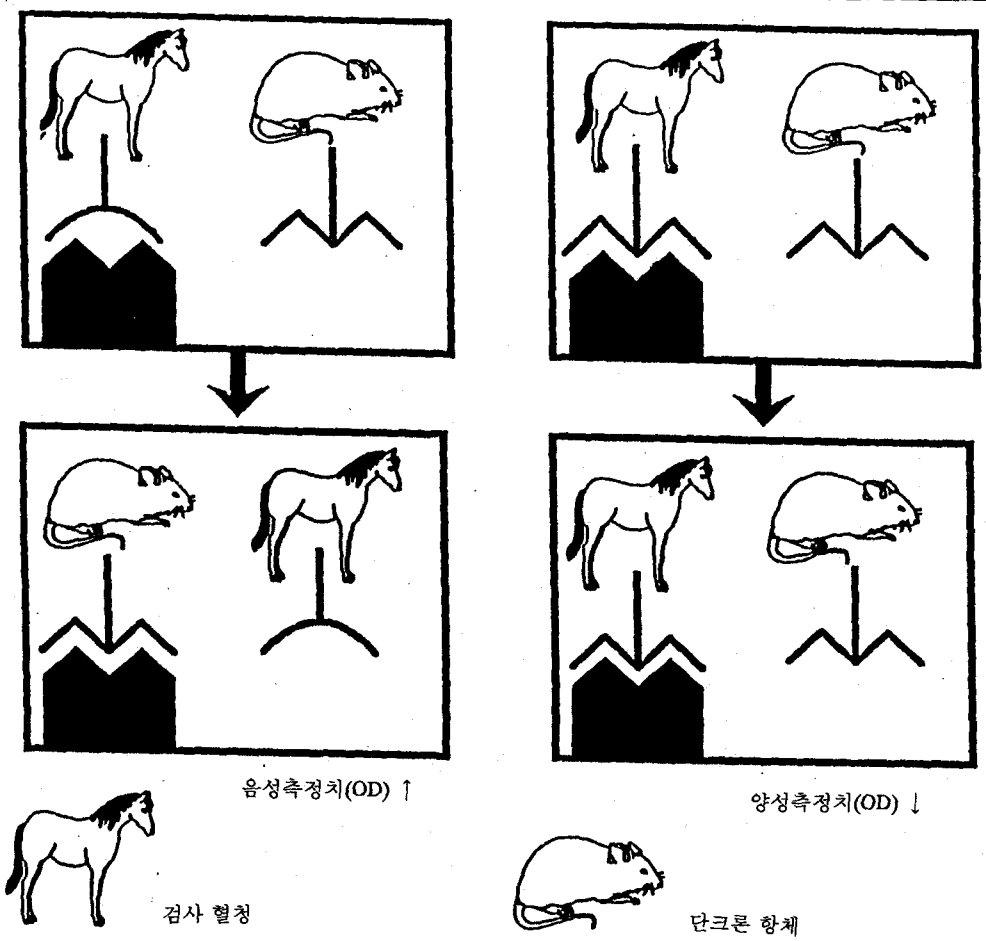


그림 5. 한 예로 *Babesia equi*에 대한 단크론 항체를 사용한 경쟁 억제 ELISA의 예시.
검사할 말의 혈청이 특이항체를 가지고 있을 때, 이 특이 말 혈청은 마우스에서 생산하며 색소로 표지한 단크론 항체와 결합반응시 경쟁을 한다. 따라서 검사시 놓은 음성 표준 대조혈청의 측정수준보다도 훨씬 더 측정치(광학밀도 : optical density)가 낮을 경우 이 말 혈청은 양성으로 본다. 검사한 말 혈청이 특이항체를 가지고 있지 않다면 마우스 단크론 항체는 epitope와 결합할 것이므로 그 측정치(OD)는 음성 표준 대조혈청의 측정치에 비해 증가하여 나타날 것이고, 따라서 이 말의 혈청은 음성으로 판정한다.

요약해 보면 단크론 항체를 사용한 ELISA 기법들은 기생충성 질병의 진단활용에 매우 큰 가능성이 있다. 항원 포획 ELISA는 직접적으로 기생충의 존재를 치료가 매우 효과적인 질병의 임상경과 동안에 검색해낼 수 있고, 경쟁 ELISA로는 지속감염중들의 운반자(carrier)들을 찾아내는데 사용할 수 있다. 경쟁 ELISA의 궁극적이고도 중요한 공헌은 재조합 항원과 함께 사용하는 것이 쉬워졌다는 점이다. 이것은 특히 진단항원을 세포배양으로 아직 생산할 수 없는 기생충성 질병의 경우 중요한 의미가 있다. 더구나 대장균의 재조합 항원이 생산됨에 따라 어떤 병원체의 시험과내 배양기법이 알려져 있지 않을 때 항원생산을 위해 동물을 감염시켜야 하는 필요가 없게 되었다.

나. 재조합 DNA 기법에 의한 항원의 생산

현재의 몇가지 진단기법을 사용하는데 한가지 문제는 찾아내야할 항원을 늘 세포배양으로 부터 생산하여야 하거나 감염된 동물로부터 얻어야만 한다는 점이다. 이렇게 항원을 만들려면 비용이 많이 들고, 흔히 저장기간이 짧으며, 새로 만들 때마다 사용기준에 맞도록 표준화시켜야 하는 단점을 지니고 있다. 이밖

에도 세포배양장치로 만든 백신으로 동물을 면역시킬 경우 백신내 항원을 유발시킬 면역항원의 다른 항원물질이 들어가 있을 수 있어 결국 검사시 의양성을 나타낼 수 있는 가능성이 있다. 그러나 분자학적 크로닝에 의해 진단검사에 쓸 항원을 생사하면 이러한 문제들을 극복할 수 있다. 더구나 재조합 항원을 경쟁 ELISA법과 함께 사용할 경우 세균성 lysate로부터 재조합 항원의 순수분리는 경쟁 ELISA의 특이성이 사용할 단크론 항체에 달려 있으므로 반드시 필요치 않다.

재조합 DNA 기법에 의한 항원 준비의 일반적 과정은 다음과 같다. 진단에 사용할 가능성이 있는 항원인지 아닌지는 찾으려 하는 병원체의 단백질에 대한 숙주의 항체반응을 조사해 봄으로써 알아낼 수 있다. 예컨대 면역 우성항원(단백질)이란 숙주가 가장 높은 항체가를 보이는 병원체의 단백질이라고 정의할 수 있다. 따라서 진단적 의의가 있는 단백질 여부를 가린 다음, 이 단백질을 이용하여 단크론 항체 혹은 단특이성 다결합가(polyvalent) 혈청같은 특이 시약들을 이용하여 관심있는 재조합 단백질들을 검색하는데 사용하기도 한다. 재조합 단백질들은 미생물의 유전자 DNA나 주형(鑄型)으로서 미생물의 전달자 RNA(mRNA)를 사용한 cDNA합성에 의해 생산할 수 있다. 크로닝을 위한 유전자 DNA의 작성은 특정한 제한효소로서 특별한 부위에 삽입 혹은 부분적 소화(消化)를 시켜 임의적으로 가위질 하듯이 만들 수 있다. 어느 경우에나 유전자 DNA는 분자학적으로 핵이 있거나 없는 표현세포들을 써서 클로닝하고, 이 단백질들이 바람직한 표현을 하는지 확인해야 한다. 진단기법으로 재조합 항원들의 사용과 응용에 관해 자세히 설명한 보고가 있다.[6]

4. 백 신

분자생물학적 기법은 수의학 분야의 백신을 만드는데 아주 커다란 영향을 미칠 것으로 보인다. 재조합기술로 만든 백신은 특이 표지를 가지고 있기 때문에 보다 쉽게 폼질관리를 할 수 있을 것이다.

유전학적 정보가 흔히 살아있는(live) 재조합 백신내에서 조작되긴 하지만 필요한 안전성과 효능이 다른 생독(생균 혹은 생충) 백신들처럼 일정해야만 한다.

가. 유전자 삭제

독성을 조절하는 바이러스 유전자가 어느 부위인지 알게 되면 이를 삭제시킬 수 있는데 이렇듯 삭제시킨 비리온(virion)은 독성이 감소된 생독백신을 만드는데 쓸 수 있다. 돼지 오제스키병의 BUK 백신주의 독성은 thymidine kinase(TK)의 변환을 유전공학적으로 조작함으로써 약화시킬 수 있다. 이 TK가 없이는 오제스키병 바이러스는 돼지의 중주신경계통에서 증식을 하지 않은채 잠복상태로 남아있는다. 이와같은 TK의 삭제외에 또다른 삭제를 당단백질에 대하여 생산될 수 있는 항체를 미연에 막기 위해 바이러스의 당단백질의 해당 유전자 부위를 제거하기도 한다.[11] 이렇게 두번째 삭제를 함으로써 오제스키병에 자연감염된 돼지와 재조합 백신을 접종돼지간의 구분을 ELISA로 가능케 한다.

나. 백시니아(vaccinia) 바이러스에 삽입한 백신

가장 많이 거론되고 있는 백시니아(수두백신을 생산하는데 쓰는 바이러스)에 심은 바이러스로는 우역백신과 구강투여용 광견병 백신을 들 수 있다. 예컨대, 플라스미드(plasmid)에다가 공여자인 우역바이러스의 DNA를 넣는다. 플라스미드 안에 심어진 우역 DNA 절편들은 백시니아 바이러스 유전자의 thymidine kinase 좌위(locus)내로 삽입시킨다.[27] 우역의 H 유전자를 이 유전자가 불활화되는 혈액응집(hemagglutinin) 부위안으로 넣을 수 있다. 따라서 이로 인해 생산된 재조합 백신 유전자는 혈액응집 능력이 없기 때문에 이를 생물학적인 표지로서 사용할 수 있다. 세포배양에서 키운 이 재조합 백시니아 바이러스는 방어항원으로 작용하는 우역 바이러스 단백질을 생산케 된다.[26]

재조합 백시니아 광견병 백신은 백시니아의 thymidine kinase 좌위안에 광견병 당단백질 유전자의 cDNA 부위가 포함된 플라스미드를 삽입하여 만든다.[10] 여우, 라쿤(raccoon, 미국 너구리)나 스컹크에게 이 유전자 조작백신을 먹이면 높은 수준의 광견병 바이러스에 대한 중화항체가 생산되고 오랜기간동안 방어가 이루어진다.[5]

염소의 수두(capripox)용 재조합 백신은 우역과 덩어리 피부병(lumpy skin disease; 폭스바이러스에 의해 반추수 특히 소에 발생하는 질병)에 대한 소를 방어하

는데 효과적이었다.[20]

계두(flow pox) 바이러스는 미국내에서 최근에 인준된 뉴캐슬병과 수두의 혼합백신을 만드는 매개체(vector)로서 사용되어지고 있다.

참 고 문 헌

1. Gorham JR, Knowles DP.(1990): Biotechnology and Veterinary Scince, Scientific and Technical Review. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 9(3). 2. Gorham JR, Knowles DP.(1993) : Biotechnology applied to the diagnosis of animal diseases. Scientific and Technical Review. *Rev Sci Tch Off Int Epiz*, 12(2). 3. Anderson J.(1984) : Use of monoclonal antibody in a blocking ELISA to detect group specific antibodies to bluetongue virus. *J Immunol Meth*, 74, 139-149. 4. Anusz KZ, Mason PH, Riggs MW, Perryman LE.(1990) : Detection of Cryptosporidium parvum oocysts in bovine feces by monoclonal antibody capture emzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, 28, 2770-2774. 5. Blancou J, Kieny MP, Lathe R, Lecuco JP, Pastoret P, Soulebot JP, Desmottre P.(1986) ; Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature*, 332, 373-375. 6. Fox J, Klass M.(1989) : Antigens produced by recombinant DNA technology, *Clin Chem*, 35, 1838-1842. 7. Goff W, Barbet A, Stiller D, Palmer G, Knowles D, Kocan KM, Gorham JR, Mcguire TC.(1983) : Detection of *Anaplasma marginale* infected tick vectors by using cloned DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85, 919-923. 8. Haines DM, Clark EG.(1991) : Enzyme immunohistochemical staining of hormalin-fixed tissues for diagnosis in veterinary pathology, *Can Vet J*, 32, 295-302. 9. Holmberg SD, Osterholm MT, Senger KA.(1984) : Drug-resistant salmonella from animals fed antimocrobials. *N Eng J of Med*, 311, 617-622. 10. Kieny MP, Lathe R, Drillien R, Spehner D, Skory S, Schmitt D, Wiktor T, Koprowski H, Lecoco JP.(1984) : Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. Nature, 312, 163-166. 11. Kit S, Sheppard M, Ichimura H, Kit M.(1987) : Second generation pseudorabies vaccine with deletions in thymidine kinase and glycoprotein genes. *Am J Vet Res*, 48, 780-793. 12. Knowles DP, Kappmeyer LS, Stiller D, Hennager SG, Perryman LE.(1992) : Antibody to a Recombinant Merozoite Protein Epitope Identifies Horses Infected with *Babesia equi*, *J Clin Microbiol*, 30, 3122-3126. 13. Li H, Shen DT, Knowles DP, Gorham JR, Crawford TB.(1994) : Competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for antibody in sheep and toehr ruminants to a conserved epitope of malignant catarrhal fever virus. *J Clin Micorbiol*, 32, 1674-1679. 14. Libeau G, Diallo A, Colas F, Guerre L.(1994) : Rapid differentila diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants using and immunocapture ELISA *Vet Res*, 134, 300-304. 15. Lomniczi B, Nagy E, Kukedi A, Zsak L.(1988) : Molecular epidemiology of Aujeszky's disease virus in Hungary, *Curr Top Vet Med Anim Sci*, 30, 3~14. 16. Molina Caballero JM, Anguiano A, Ferrer O, Serroano E, Uceda A.(1993) : Use of an enzyme-liked immunosorbent assay for serodiagnosis of clinical prartuberculosis in goats. Study of Western blotting of false-positivie reactions *Rev Sci, Tech Off Int Epiz*, 12, 629-638. 17. Nadin-Davis SA, Casey GA, Wandeler A.(1993) : Identification of regional variants of the rabies virus within the Canadian province of Ontario. *J Gen Virology*, 74, 829-837. 18. Posnett ES, Ambrosio RE.(1989). Repetitive DNA probes for the detection of *Babesia equi. Molecular and Biochemical Parasitology*, 34, 75-78. 19. Rodriguez M, Schudel AA.(1993). Nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction in the diagnosis of infectious animal diseases. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 12, 405-423. 20. Romero CH, Barrett T, Evans SA, Kittching RP, Gershon PD, Boston C, Black DN.(1993) : Single capriposvirus recombinant vaccine for the protection of cattel against rinderpest and lumpy skin disease. Vaccine, 11, 737-742. 21. Saiki R, Gefland D, Stoffel S, Schanf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erlich H.(1998) : Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase, Science, 293, 487-491. 22. Taylor WP.(1992) Rinderpest. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Off Int Epiz* Second Edition, 28-38.