

Classical Swine Fever (Hog Cholera) Virus 약독순화주 (Suri 주)의 gp55 Gene 염기서열 분석

충남대학교 수의과대학, 대성미생물연구소¹, 국립수의과학검역원²

김귀현 · 장경수 · 강경임 · 이병형¹ · 박종현² · 안수환² · 전무형*

=Abstract=

Sequence Analysis of the Gene Encoding gp55 Protein of Suri Strain, an Attenuated Classical Swine Fever (Hog Cholera) Virus

Kui-Hyun Kim, Kyung-Soo Chang, Kyong-Im Kang, Byung-Hyung Lee¹,
Jong-Hyeon Park², Soo-Hwan An² and Moo-Hyung Jun*

College of Veterinary Medicine Chungnam National University, Taejon 305-764
Dae Sung Microbiological Labs Co, Ltd¹. Seoul 135-080, National Veterinary
Research and Quarantine Services², Anyang 430-016, Korea

An attenuated classical swine fever virus (CSFV), Suri strain, is a variant derived from a vaccine virus, LOM strain. This study was performed to elucidate the molecular biological properties of CSFV Suri strain, and to obtain the basic data for molecular epidemiological approaches for the disease. The truncated form of gp55 gene without the C-terminal transmembrane domain, in size of 1,023bp, was amplified by RT-PCR and sequenced by dye terminator cyclic sequencing method, and inserted into *Bam*HI site of pAcGP67B baculovirus vector, establishing a cloned pAcHEG plasmid. By the nucleotide sequences determined, 341 amino acid sequences were predicted. As compared the nucleotide and amino acid sequences of gp55 of Suri with the various CSFV, Suri strain showed the high homology over 99.1% with ALD and LOM strains, but comparably the lower homology with Alfort and Brescia. In comparison of amino acid sequence in variable domain of gp55 protein, the similar tendency of homology was observed. In hydrophobicity analysis, all of four CSFV strains revealed the analogous patterns of hydrophobicity. The numbers and locations of N-glycosylation site and cysteine residues in gp55 were analyzed, those of Suri strain being coincident with ALD and LOM strains. The results suggest that gp55 in Suri strain has the high similarity to those in ALD and LOM strains in terms of the nucleotide and amino acid sequences and the functional properties of gp55 protein.

Key Words: A classical swine fever vaccine virus, Suri strain, gp55 nucleotide and amino acid sequence, Analysis of gp55 gene

접수 : 1998년 10월 19일

*Corresponding author: Moo-Hyung Jun, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea. Phone and Fax: (042)821-6753, e-mail: mhjun@hanbat.chungnam.ac.kr

본 연구는 1997년 한국학술진흥재단 공모과제 (과제번호: 1997-001-G00163) 연구비에 의해 수행되었음.

서 론

Classical swine fever virus (CSFV, 일명 hog cholera virus)는 돼지에서 급성 열성 전염병으로 전염성이 강하고 치사율도 매우 높아 국내 양돈산업에 많은 경제적 피해를 주고 있는 돼지콜레라의 원인체이며 [6,7,26], 본 병은 가축전염병예방법에서 제 1종 전염병으로 규정되어 있다.

CSFV는 Flaviviridae의 Pestivirus에 속하며 virion의 크기는 40~50nm, nucleocapsid는 약 29nm, 표면돌기는 6~8nm이며 비교적 열에 안정하고, 같은 Genus에 속하는 bovine viral diarrhea virus와 양의 Border disease virus간에 광범위한 overlapping antigenic variation이 있기 때문에 구조적 또는 혈청학적으로 유사한 점이 많다 [6,7,25,26].

CSFV의 viral genome은 감염성이 있는 positive single-stranded RNA로 구성되어 있으며, 핵산의 크기는 약 12Kb이며 3,898 amino acid (438kD)를 coding하는 한 개의 open reading frame으로 구성되어 있다 [15,16,18,27]. CSFV는 enveloped virus로 구조단백질은 genome의 5'쪽에 위치한 유전자에서 번역된 nucleocapsid protein과 3종의 glycoprotein; gp44/48 (E2), gp33 (E3) 및 gp55 (E1)으로 구성되어 있으며 [18,24], 이 중 gp55는 중화항체 형성을 자극하는 주된 항원단백으로 알려져 있다 [7,17].

국내에서는 1947년 서울 근교 양돈장에서 본 병이 처음 발생하여 피해가 확산됨에 따라 포르말린 불활화백신을 개발하여 사용하였고, 그 뒤 크리스탈-바이올렛 불활화백신을 보급하였다 [9~11]. 1951년에는 가토화 생독백신을 개발하여 보급함으로써 돼지콜레라 예방에 좋은 효과를 거두었으나 포유자돈과 임신모돈에 접종시 접종 부작용이 있고 면역결핍현상이 나타나는 결점이 지적되었다 [9,11]. 그 후 1964년에 Sato et al [22]이 continuous cell-virus propagation법에 의해 추출한 LOM-850주를 Kang 등 [9~11]이 도입하여 다시 연속계대 및 클론닝기법을 활용하여 END (exaltation of Newcastle disease virus)법으로 검출되는 LOM-BK⁺ (LOM E⁺)주를 개발하여 1974년부터 돼지콜레라 생독백신주로 사용하고 있다 [1,2,9,12].

한편 Choi 등 [1~2]은 1988~1989년에 LOM-BK⁺주를 소콩팔배양세포에 10대 이상 계대할 때 돼지고환세포와 Newcastle disease virus (Miyadera

주)를 이용한 END법에서 세포변성효과가 억제되고 Western equine encephalitis virus증식에 대해 간섭현상을 나타내는 변이주가 존재한다는 사실을 발견하고 END 음성변이주를 클론닝하고 증식하여 수리주 (Suri strain)라 명명하였다. END 음성 변이주 즉 CSFV Suri주를 이용하여 만든 시험백신은 LOM백신과 비슷한 수준의 면역원성이 있고 접종스트레스가 적고, 야외 강독주와 CPE 패턴에 차이가 있어 진단시 감별이 가능하다는 장점이 있어서 1992년부터 백신주로 이용하여 단미 또는 돼지단독 혼합백신으로 국내에서 생산 보급되고 있다.

본 연구에서는 CSFV Suri주의 분자유전학적 특성을 구명하고 야외에서 문제되는 CSFV의 분자역학적 분석에 기초자료로 얻기 위해 CSFV Suri주의 구조단백질 유전자 가운데 중화항체 형성에 중요한 역할을 하는 gp55 유전자를 RT-PCR 법으로 증폭 클론닝하고, 염기서열과 아미노산서열을 구명하였으며 얻어진 결과를 CSFV ALD주, Alfort주, Brescia주 그리고 LOM주와 비교하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스

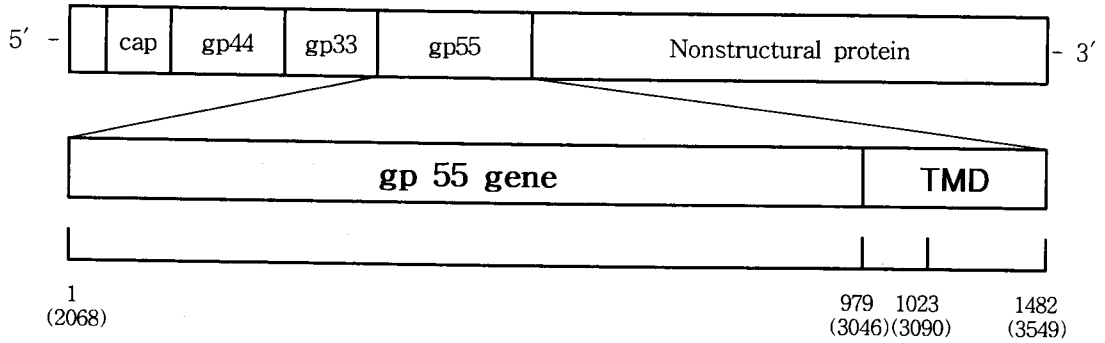
약독순화 CSFV백신주 Suri주와 LOM주 그리고 강독주인 ALD주는 primary bovine kidney cell 또는 PK-15 세포에서 증식된 것을 대성미생물연구소 (주)에서 분양받아 공시하였다.

2. CSFV gp55 gene에 대한 primer 작성

GenBank에서 검색하여 얻은 CSFV의 gp55 gene의 염기서열과 Song 등 [24]이 보고한 ALD strain의 염기서열을 참고하여 MacDNAsis ver 3.0 (Hitachi software engineering America, Ltd)을 이용해 작성하였다 (Figure 1). BamHI 인식부위가 삽입된 HC1 S와 HC2 AS primer는 gp55 gene 증폭을 위하여 사용하였고, HC1 및 HC2 primer pairs는 gp55의 염기서열을 분석하기 위하여 공시하였다.

3. 바이러스 RNA 추출

CSFV의 RNA는 acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform을 이용하여 추출하였다 [3]. 먼저 CSFV Suri주를 primary bovine kidney cell에 접종하여 48시간 배양한 후 채취한 400 μ l의 세포배양액에 500 μ l의 denaturing solution (Sol D; 4M guan-



Primers	Sequences	size (mer)	Nucleotide position
HC1 S	CGCGGATCCCGGCTAGCCTGCAAGGAAGAT	30	2068~2088
HC1 AS	TTTCACACATGTCCAGTTGCC	21	2617~2637
HC2 S	GGTGAACCAGTGGTCTACACG	21	2638~2658
HC2 AS	CGCGGATCCTTCTGCGAAGTAATCTGAGTG	30	3070~3090

Figure 1. Gene map of classical swine fever virus and the locations and the sequences of two pairs of primers of gp55 gene.

idium isothiocyanate (ultra pure, BRL), 25mM sodium citrate (pH 7.0, Fisher Scientific), 0.5% N-lauryl sarcosine (Sigma), 0.1M 2-β-mercaptoethanol (Sigma) 을 넣고 혼합한 후 37℃에서 1시간 정치하고 50μl 2M sodium acetate (pH 4.5)와 500μl의 phenol/chloroform/isoamylalcohol (P/C/I 25:24:1, Sigma)를 넣고 10분간 교반하고 실온에서 12,000×g로 10분간 원심하여 상층액의 75%를 새 시험관에 옮겼다. 여기에 동량의 isopropanol (Sigma)을 넣어 10분간 침전시킨 후 12,000×g로 10분간 원심하여 RNA 침전물을 만들고 300μl Sol D로 다시 녹여 300μl isopropanol을 첨가하고 12,000×g로 10분간 원심하여 얻은 RNA를 침전시킨 후 75% ethanol로 두 번 세척하고 진공건조한 다음 0.1% DEPC 용액 10μl에 녹였다.

4. 역전사효소-중합효소연쇄반응 (RT-PCR)

(1) cDNA의 합성

추출된 viral RNA template 10μl와 antisense primer 1μl (200ng)를 넣고 70℃에 30분간 denaturation 시킨 후 얼음위에 5분 동안 정치하여 template에 primer를 annealing하였다. 여기에 5× reaction buffer [Tris-HCl (pH 8.3, at room temperature), 375mM

KCl, 15mM MgCl₂, Gibco BRL] 6μl, 0.1M dithiothreitol (DTT) 2μl, 2.5mM dNTP (Takara) 4μl, 12.5units RNasin (Promega) 0.5μl, 0.1% DEPC-treated H₂O 5μl와 100units의 RNase H-minus superscript II RT (Gibco BRL) 0.5μl를 첨가하고 잘 혼합한 후 automated thermal cycler (DNA thermal cycler 2400, Perkin Elmer Cetus Co.)로 37℃에서 60분간 그리고 42℃에서 60분간 반응하여 cDNA를 합성하였다 [21].

(2) 중합효소연쇄반응 (PCR)

합성한 cDNA 10μl에 10× reaction buffer [100mM Tris-HCl (pH 8.3), 500mM KCl, 0.1% gelatin (w/v)] 5μl, 25mM MgCl₂ 10μl, 2.5mM dNTP 8μl, sense와 antisense primer 각 1μl와 멸균증류수 14μl를 첨가하여 automated thermal cycler (DNA thermal cycler 2400, Perkin Elmer Cetus Co.)로 94℃에서 5분간 반응시킨 후 Taq polymerase (Takara) 1μl (3units)를 가하여 총 50μl가 되도록 한 뒤 잘 혼합하여 94℃에서 30초, 46℃에서 30초, 72℃에서 5분 동안 반응하는 일련의 과정을 30회 반복하면서 annealing time과 extension time을 매 cycle마다 2초와 5초씩 추가하였으며 마지막으로 72℃에서 10분간 반응시켰다. 전기영동분석은 주로 1%

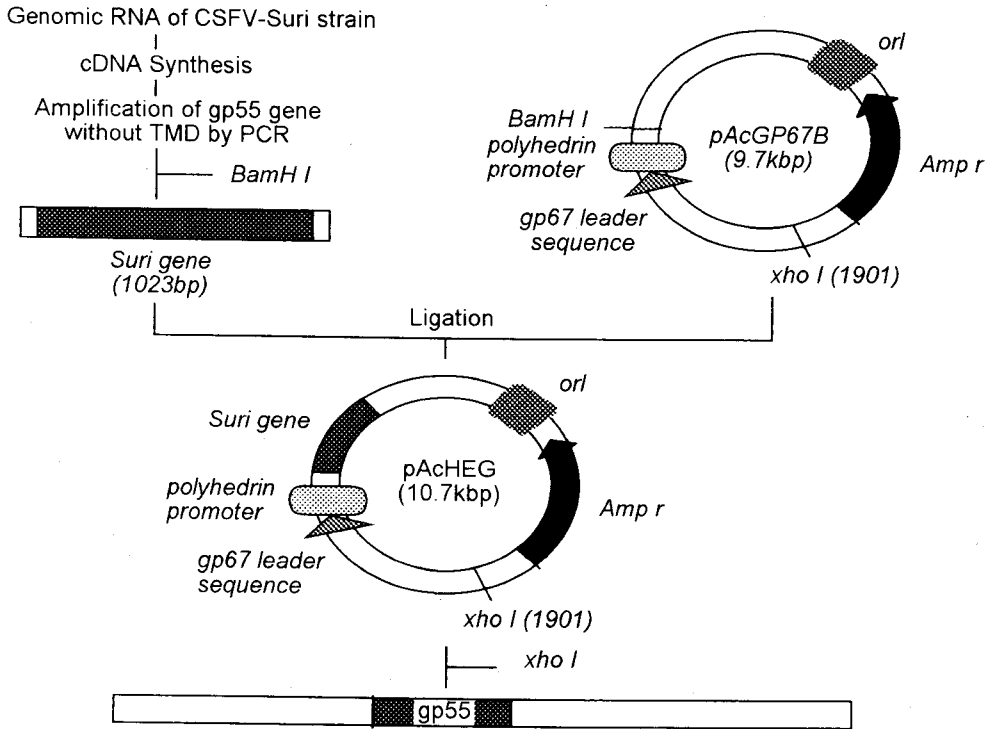


Figure 2. Strategy for construction of pAcHEG inserted with the gp55 gene of CSFV Suri strain.

ethidium bromide agarose gel을 이용하였고 image analyzer (Pharmacia)로 판독 분석하였다.

5. cDNA 클로닝

(1) PCR products의 정제

PCR products를 겔에서 잘라내어 1.5ml 에펜들 프관에 넣고 Gene Clean[®] II Kit를 이용하여 elution하였다. 즉, 잘라낸 겔 양의 4.5배 (900 μ l)의 NaI stack solution과 0.5배 (100 μ l)의 TBE modifier solution을 넣고 45~55 $^{\circ}$ C에서 가끔씩 흔들어 주며 10분간 두어 녹여낸 다음 Glassmilk을 10 μ l 첨가해 넣고 섞어 준 다음 1~2분마다 섞어 실온에서 10분간 정치시켜 DNA 절편이 Glassmilk에 붙도록 해준 후 12,000rpm에서 5초간 원심하여 침전물을 만들었다. 침전물은 냉각된 New wash solution (NEW WASH concentrate, H₂O 280ml, 310ml absolute ethanol, BIO 101)으로 3번 씻어 준 다음 시험관에 있는 용액들을 완전히 제거하고 멸균 증류수 10 μ l을 넣고 45~55 $^{\circ}$ C에서 2~3분간 두어 Glassmilk에서 DNA를 용출한 후 12,000rpm으로 1분간 원심하여 5 μ l의 DNA가 녹아 있는 멸균 증류수를 회수하고 다시 5 μ l의 멸균 증류수를 더 첨

가하여 한 번 더 용출하여 UV spectrophotometer로 260nm에서 측정하여 정량하였다.

(2) Vector 및 insert DNA

클로닝 벡터로는 Baculovirus gp67 단백질의 signal peptide sequence가 포함되어 있는 pAcGP67B baculovirus transfer vector (PharMingen)를 사용하였으며 (Figure 2), 이 pAcGP67B plasmid를 대량 생산하여 정제한 후, PCR로 증폭한 DNA를 클로닝하기 위해 BamHI으로 처리하고 agarose gel상에 전개시켜 vector plasmid의 size를 확인하였다. 단일제한효소로 처리된 plasmid의 자가융합을 방지하기 위하여 56 $^{\circ}$ C에서 1시간 calf intestine phosphatase (CIP, Takara)로 처리한 후 CIP를 불활화하기 위해 65 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰으며 P/C/I로 처리하고 에탄올로 침전하여 vector를 준비하였다. 또한 용출된 PCR product를 30 $^{\circ}$ C에서 1시간 BamHI으로 처리한 후 전기영동하여 1023bp DNA fragment를 분리하여 insert DNA를 준비하였다 (Figure 2).

(3) 융합

BamHI으로 처리된 클로닝할 PCR products 6 μ l (약 2 μ g)와 10 \times ligation buffer [660mM Tris-Cl

(pH 7.5), 50mM MgCl₂, 50mM DTT] 1μl, 10mM ATP 1μl, T4 DNA ligase (Pharmacia, Sweden) 1μl (5units), BamHI으로 처리된 pAcGP67B 1μl (100ng)을 넣고 멸균증류수로 총량을 20μl이 되도록 한 뒤 16℃에서 12시간 동안 반응하였으며 얻어진 plasmid를 pAcHEG라 하였다 (Figure 2).

(4) Competent cell 준비

형질전환에 이용할 competent cell은 CaCl₂ 처리 방법으로 작제하였다 [21]. Buffer는 0.1M CaCl₂ solution을 membrane filter (0, 45μm)로 여과하여 4℃에 보관하면서 사용하였고, 배지는 SOB 배지 (1 l 당 250mM KCl 10ml, Bacto-tryptone 20g, Bacto-yeast extract 5g, NaCl 0.5g, pH 7.0로 만든 후 5ml의 멸균된 2M MgCl₂ 첨가), SOC 배지 (SOB 배지 1 l 에 20ml의 0.22μm membrane filter로 여과한 1M glucose solution 첨가), LB agar (1 l 당 Bacto-tryptone 10g, Bacto-agar 15g, Bacto-yeast extract 5g, NaCl 10g, pH 7.0)를 사용하였다. Competent cell은 DH5α cell을 LB agar plate에 도말하고 37℃에서 하룻밤 동안 배양한 후 2~3mm 크기의 집락 10~12개 정도를 250ml SOB 배지에 접종하고 UV spectrophotometer (흡광도 590nm)에서 0.375가 될 때까지 37℃에서 강하게 교반 (200~250rpm) 하며 배양하였다. 배양이 끝나면 배양액을 10분간 냉각시킨 후 500ml 원심병에 옮기고 1,600×g로 4℃에서 10분 동안 원심하여 침전물을 만들고 이를 40ml의 차가운 0.1M CaCl₂ solution에 재부유하여 30분간 냉장정치하고 이를 다시 1,100×g로 4℃에서 5분간 원심분리하여 침전물을 만든 후 8ml CaCl₂ solution에 재부유하고 glycerol를 최종 농도 14%가 되도록 넣고 부드럽게 섞어 준 후에 얼음위에서 10분 동안 정치하고 0.2ml씩 냉동시험관에 분주하여 -70℃에서 40일까지 보관하여 사용하였다.

(5) 형질전환

Competent cell 200μl를 얼음위에서 녹이고 냉각된 1.5ml polypropylene tube (Greiner, F.R.G)에 넣고 10μl의 ligation mixture plasmid solution을 첨가해서 잘 섞어 주고 30분 동안 얼음위에 정치시키고, 42℃에서 90초간 열로 충격을 가해 plasmid가 세포안으로 들어가도록 해준 다음 얼음위에서 2분간 정치하였다. 여기에 0.8ml SOC 배지를 넣어 37℃에서 강하게 교반하며 1시간 동안 배양하였다. 이 시간 동안 앰피실린 (50μg/ml)이 들어 있는 LB agar plate에 형질전환된 세포가 들어있

는 200μl의 SOC 배지를 도말하고 37℃에서 하룻밤 동안 배양하여 형성된 집락 중 10개를 선택하여 앰피실린 (50μg/ml)이 첨가된 LB broth에 접종하였다.

(6) Plasmid DNA 추출

Alkaline lysis method를 응용하였다 [21]. 약술하면, LB agar plate에 도말된 세균의 백색집락을 선발하여 앰피실린이 포함된 3ml의 LB broth에 접종하고 37℃에서 18시간 진탕배양하였다. 배양액 1.5ml를 새 시험관에 옮기고 4,000rpm에서 10분간 원심하여 상층액을 버리고 침전물을 냉각된 Sol I (50mM glucose, 25mM Tris · Cl, 10mM EDTA) 200μl에 부유시켜 실온에서 5분간 정치하였다. 여기에 Sol II (0.2N NaOH, 1% SDS) 400μl을 첨가하여 조심스럽게 혼합한 후 다음 얼음에서 5분간 용해시킨 후 냉각된 Sol III (3M potassium acetate, 11.5% glacial acetic acid) 300μl를 넣어 혼합하고 얼음에서 10분간 정치하여 중화시킨 다음 4℃, 12,000×g에서 10분간 원심하고 상층액을 1점의 여과지로 여과한 후 1 vol.의 isopropanol을 첨가하여 10분 침전시킨 후 12,000×g에서 10분간 원심하였다. 이후 상층액을 제거하고 70% 에탄올로 세척하여 진공건조한 다음 30μl TER (Tris-EDTA, pH 8.0, 20μg/ml RNase)을 넣어 용해하였다. Insert가 있는 것으로 의심되는 plasmid는 BamHI (10units, Takara)으로 처리하여 insert의 유무를 확인하였다 (Figure 5). 클론닝된 것이 확실한 것은 순수배양을 위해 앰피실린 (50μg/ml)이 들어간 LB agar plate에서 다시 배양하였다.

6. 염기서열 결정

염기서열은 ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer, USA)를 이용한 dye terminator cycle sequencing법을 제조사의 추천방법에 따라 실시하였다. 약술하면, 0.2ml PCR tube에 8.0μl dye terminator ready mix (Perkin-Elmer, USA), 2μl DNA template, 3.2pmole forward primer와 3.2pmole reverse primer를 섞어 총량을 20μl로 만든 후 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer, USA)에서 96℃에서 30초, 50℃에서 5초, 60℃에서 4분 동안 denaturation, annealing과 polymerization 과정을 25 cycles을 수행하였다. 초과된 dye terminator를 제거하기 위해 2μl 3M sodium acetate, 50μl 95% ethanol를 첨가하여 -70℃에서 10분간 정치한 후 12,000×g (4℃)로 30분간 원심한 후 70% 에탄올로 수세한

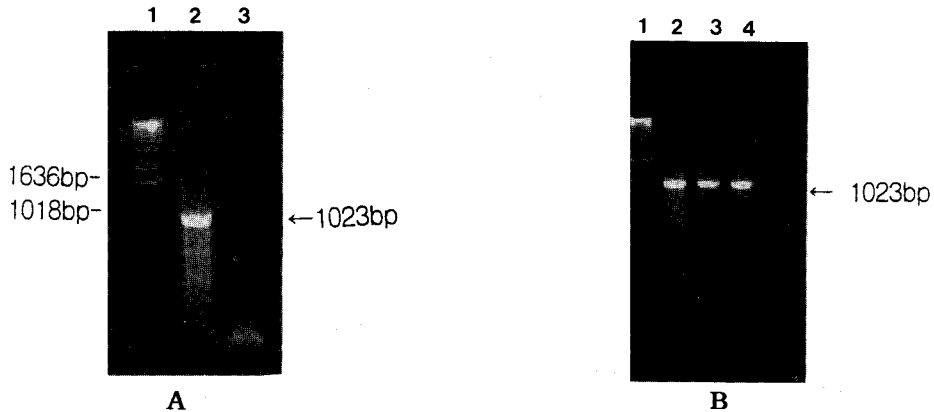


Figure 3. Amplification patterns of the gp55 gene of various CSFV strains by RT-PCR using HC1 sense and HC2 antisense primers. **A)** Lane 1: 1kb DNA ladder marker, Lane 2: Suri, Lane 3: normal bovine kidney cell (negative control), **B)** Lane 1: 1kb DNA ladder marker, Lane 2: Suri, Lane 3: LOM, Lane 4: ALD.

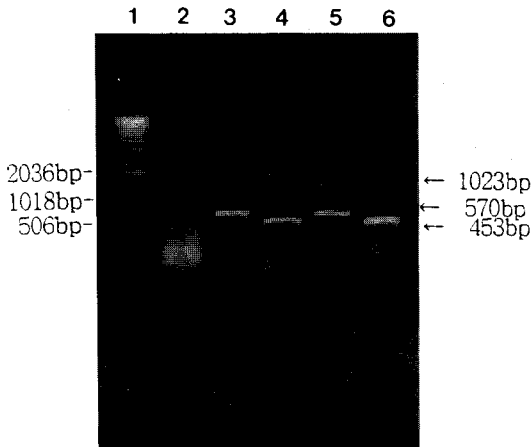


Figure 4. Amplification patterns of CSFV gp55 gene by RT-PCR. Lane 1: 1kb DNA ladder marker, Lane 2: Suri strain with HC1 sense and HC2 antisense primers, Lane 3: Suri strain by HC1 primers pair, Lane 4: Suri strain by HC2 primers pair, Lane 5: LOM strain by HC1 primers pair, Lane 6: LOM strain by HC2 primers pair.

후 진공 건조하였다. 건조된 시료는 25 μ l template suppression reagent (Perkin-Elmer, USA)로 재용해한 후 95 $^{\circ}$ C에서 2분간 denature 시킨 후 분석하기 전까지 얼음에 정치하였다. 준비된 시료를 ABI Prism 310 Genetic Analyzer에 자동주입한 후 collection software로 raw sequencing data를 수집하고, analysis software에 의해 핵염기서열로 전환하였다.

7. 자료 분석

SeqED software (Perkin-Elmer, USA)를 이용하여 핵염기서열로부터 아미노산서열을 결정하였으며, CSFV Suri주의 결과를 ALD주 [24], Alfort주 [15], Brescia주 [17] 그리고 LOM주 [28]와 비교하기 위해 SeqED software를 이용하여 multialign에 의해 분석하였다. 또한 Hydrophobicity plot은 Version 7.0 Hitachi DNAsis program을 이용하였다.

결 과

1. RT-PCR에 의한 gp55 유전자 증폭

HC1 sense primer와 HC2 antisense primer를 이용하여 CSFV Suri주, ALD주 및 LOM주에 대해 RT-PCR을 수행한 바 1,023bp의 gp55 유전자가 모든 시료에서 증폭되었으며 (Figure 3), 2쌍의 primer 즉, HC1과 HC2 primer pairs를 이용하여 RT-PCR를 실시한 결과 CSFV Suri주와 LOM주에서 570bp의 HC1과 453bp의 HC2분절이 각각 증폭되었다 (Figure 4).

2. gp55 유전자 클로닝

HC1 sense primer와 HC2 antisense primer를 이용하여 RT-PCR로 증폭된 CSFV Suri주의 gp55 gene을 agarose gel상에서 전기영동하여 Gene clean II kit을 이용하여 추출한 뒤 BamHI으로 처리하여 얻어진 분절과 BamHI으로 처리된 pAcGP67B Baculovirus transfer vector와 융합하여 pAcHEG

plasmid를 확립하였다. 이것을 DH5 α competent cell에 형질전환시킨 후 앰피실린이 첨가된 LB agar를 이용하여 스크리닝하고, 선택된 집락은 LB broth에 배양한 다음 miniprep으로 plasmid DNA를 추출한 다음 *Bam*HI로 처리하고 1% agarose gel에 전기영동한 결과 *Bam*HI로 절단시 약 1.0kb의 insert DNA와 9.7kb의 vector DNA를 확인할 수 있었다 (Figure 5). Insert DNA를 확인후 plasmid를 *Xho*I로 처리하여 linear DNA로 만든 후 CENTRI · SPIN column (Takara)을 이용하여 정제한 후 DNA sequencing용 template로 사용하였다.

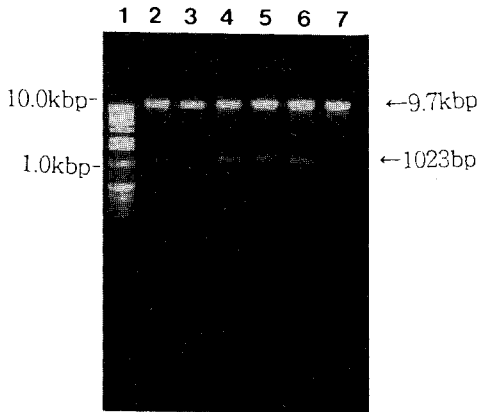


Figure 5. Cleavage patterns of pACHEG plasmid digested with *Bam*HI (Lane 2-7). Lane 1 represents 1kb DNA ladder marker.

3. CSFV Suri주의 gp55 유전자 염기서열

CSFV Suri주의 gp55 protein을 암호하는 유전자 중 hydrophobic한 transmembrane domain (TMD) sequence를 제외한 1,023bp의 염기서열을 Dye terminator cycle sequencing 법에 의해 결정하였다 (Figure 6). 이 결과를 CSFV ALD주, Alfort주, Brescia주 그리고 LOM주와 각각 비교하였던 바 (Figure 6, Table 1), ALD주와는 99.4 (1,017/1,023), Alfort주와는 84.1% (861/1,023), Brescia주와는 92.7% (949/1,023) 그리고 LOM주와는 99.5% (1,018/1,023)의 동질성을 보였다. 이 결과 CSFV Suri주는 ALD주 및 LOM주와 높은 동질성을 나타내었고, Alfort주 및 Brescia주와는 상대적으로 낮은 일치율을 나타낸다는 사실을 알 수 있었다 (Table 1).

Table 1. Comparison of nucleotide and amino acid sequences homology of gp55 protein of Suri strain with four CSFV strains

Strains	Homology (%)	
	Nucleotide sequence	Amino acid sequence
CSFV-ALD	99.4%	99.1%
CSFV-Alfort	84.1%	90.0%
CSFV-Brescia	92.7%	93.2%
CSFV-LOM	99.5%	99.1%

Table 2. Composition of the amino acids in gp55 protein of CSFV Suri strain deduced from the 1,023 nucleotide sequences

Amino acids	Number in sequence		Amino acids	Number in sequence	
	Number	%		Number	%
Alanine	14	4.1	Methionine	4	1.17
Cysteine	14	4.1	Asparagine	15	4.39
Aspartic acid	21	6.15	Proline	17	4.98
Glutamic acid	22	6.45	Glutamine	4	1.17
Phenylalanine	16	4.69	Arginine	16	4.69
Glycine	29	8.50	Serine	19	5.57
Histidine	6	1.75	Threonine	34	9.97
Isoleucine	13	3.81	Valine	26	7.62
Lysine	21	6.15	Tryptophan	5	1.46
Leucine	27	7.91	Tyrosine	18	5.27

김귀현 등: CSFV gp55 Gene 염기서열 분석

Strain	2068	2128	2188	2248	2308	2368	2428	2488	2548	2608	2668	2728	2788	2848	2908	2968	3028				
Suri	CGG	CTA	GCC	TGC	AAG	GAA	GAT	TAC	AGG	TAC	GCA	ATA	TCA	TCA	ACC	AAT	GAG	ATA	GGG	CTA	
ALD	---	---	---	T	---	---	C	---	---	T	G	C	---	---	---	---	---	---	---	G	
Alfort	---	---	---	---	---	---	---	C	---	---	T	---	---	A	---	---	---	---	---	---	
Brescia	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
LOM	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
(61)	CTC	GGG	GCC	GGA	GGT	CTC	ACC	ACC	ACC	TGG	AAA	GAA	TAC	AAC	CAC	GAT	TTG	CAA	CTG	AAT	
(121)	G	C	T	A	---	---	---	T	---	---	---	---	---	G	---	G	---	G	---	G	
(188)	GAC	GGG	ACC	GTT	AAG	GCC	ATT	TGC	GTG	GCA	GGT	TCC	TTT	AAA	ATC	ACA	GCA	CTT	AAT	GTG	
(2248)	T	A	---	C	---	G	C	---	ACT	---	G	---	---	---	G	---	---	---	C	---	
(241)	GTC	AGT	AGG	AGG	TAT	TTG	GCA	TCA	TTG	CAT	AAG	GAG	GCT	TTA	CCC	ACT	TCC	GTG	ACA	TTC	
(2308)	T	---	---	---	C	A	---	---	A	C	---	AG	C	---	C	---	C	A	---	T	
(241)	GAG	CTC	CTG	TTC	GAC	GGG	ACC	AAC	CCA	TCA	ACT	GAG	GAA	ATG	GGA	GAT	GAC	TTC	GGG	TTC	
(2308)	---	---	A	T	---	---	---	G	---	G	T	---	G	---	A	---	---	---	A	T	
(301)	GGG	CTG	TGC	CCG	TTT	GAT	ACG	AGT	CCT	GTT	GTC	AAG	GGA	AAG	TAC	AAT	ACA	ACC	TTG	TTG	
(2368)	A	---	T	A	A	C	---	C	---	A	A	A	G	---	A	---	C	C	T	A	
(361)	AAC	GGT	AGT	GCT	TTC	TAT	CTT	GTC	TGT	CCA	ATA	GGG	TGG	ACG	GGT	GTT	ATA	GAG	TGC	ACA	
(2428)	T	C	---	---	---	A	T	C	---	---	---	A	T	---	C	G	---	---	---	G	
(421)	GCA	GTG	AGC	CCA	ACA	ACT	CTG	AGA	ACA	GAA	GTG	GTA	AAG	ACC	TTC	AGG	AGG	GAC	AAG	CCC	
(2488)	---	---	---	G	---	C	T	---	---	---	---	G	A	---	---	A	A	T	A	T	
(481)	TTT	CCG	CAC	AGA	ATG	GAT	TGT	GTG	ACC	ACA	ACA	GTG	GAA	AAT	GAA	GAT	TTA	TTC	TAC	TGT	
(2548)	---	A	T	G	A	C	---	---	---	C	T	A	---	A	---	C	C	C	T	C	
(541)	AAG	TTG	GGG	GGC	AAC	TGG	ACA	TGT	GTG	AAA	GGT	GAA	CCA	GTG	GTC	TAC	ACG	GGG	GGG	CTA	
(2608)	A	G	---	T	T	---	---	A	---	C	C	---	---	ACT	T	A	---	---	A	C	
(601)	GTA	AAA	CAA	TGC	AGA	TGG	TGT	GGC	TTT	GAC	TTC	AAT	GAG	CCT	GAC	GGA	CTC	CCA	CAC	TAC	
(2668)	---	G	G	---	G	---	T	C	---	G	T	A	---	C	T	G	---	---	---	---	
(661)	CCC	ATA	GGT	AAG	TGC	ATT	TTG	GCA	AAT	GAG	ACA	GGT	TAC	AGA	ATA	GTG	GAT	TCA	ACA	GAC	
(2728)	T	---	C	---	C	C	A	A	---	---	---	---	---	G	G	A	---	C	---	G	
(721)	TGT	AAC	AGA	GAT	GGT	GTT	GTA	ATC	AGC	ACA	GAG	GGG	AGT	CAT	GAG	TGC	TTG	ATC	GGT	AAC	
(2788)	C	---	---	C	C	T	T	---	T	A	---	GAA	---	---	---	---	---	T	C	---	
(781)	ACA	ACC	GTC	AAG	GTG	CAT	GCA	TCA	GAT	GAA	AGA	CTG	GGC	CCC	ATG	CCA	TGC	AGA	CCT	AAA	
(2848)	T	T	---	---	---	---	---	CTG	---	---	---	T	---	T	---	G	---	---	C	---	
(841)	GAG	ACC	GTC	TCT	AGT	GAA	GGA	CCT	GTA	AGG	AAA	ACT	TCC	TGT	ACA	TTC	AAC	TAC	GCA	AAA	
(2908)	A	T	---	---	C	G	---	---	G	---	---	---	T	---	---	---	---	A	---	G	
(901)	ACT	TTG	AAG	AAC	AAG	TAC	TAT	GAG	CCC	AGG	GAC	AGC	TAC	TTC	CAG	CAA	TAT	ATG	CTT	AAG	
(2968)	---	C	A	G	---	G	T	---	---	A	---	T	---	T	---	A	---	---	C	---	
(961)	GGC	GAG	TAT	CAG	TAC	TGG	TTT	GAC	CTG	GAC	GTG	ACT	GAC	CGC	CAC	TCA	GAT	TAC	TTC	GCA	GAA
(3028)	---	---	---	A	---	---	A	T	---	T	---	C	---	A	---	A	C	---	T	C	G

Figure 6. Nucleotide sequences of gp55 gene of CSFV Suri strain compared with those of various CSFV strains. Numbering in the left- and right- hand margins pertains to the nucleic acid sequences.

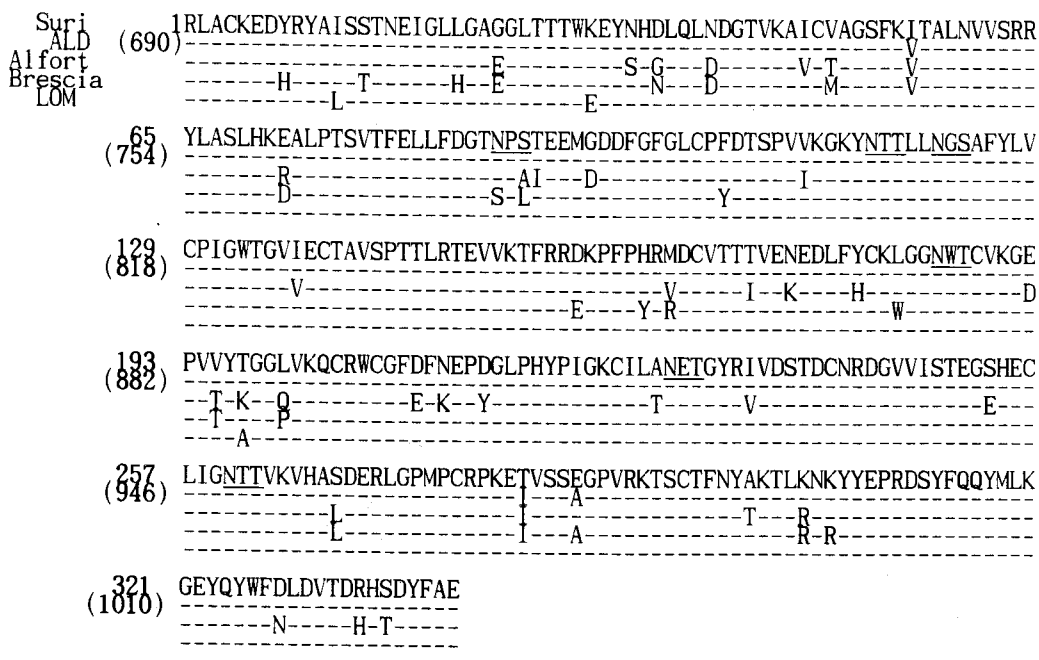


Figure 7. A comparison of the deduced amino acid sequences of the gp55 protein of various CSFV strains. A dash indicates an identical residue. The deduced N-glycosylation sites are underlined.



Figure 8. Comparison of the predicted amino acid sequence of CSFV Suri strain with various CSFV strains in two variable domains and one conserved domain within gp55 protein.

4. gp55 protein의 아미노산서열 비교

CSFV Suri주의 gp55 유전자 염기서열 분석에서 얻어진 결과를 기초로 하여 gp55 protein에 대한 아미노산서열을 추정하여 Figure 7과 같이 341개의 아미노산서열을 결정하였으며, ALD주, Alfort주, Brescia주 그리고 LOM주의 아미노산서열

과 비교하였던 바, Suri주는 ALD주와 99.1% (338/341), Alfort주와는 90.0% (307/341), Brescia주와는 93.2% (318/341) 그리고 LOM주와는 99.1% (338/341)의 동질성을 나타내었다. 이 결과 Suri주는 ALD주와 LOM주와는 높은 동질성을 보였으나 Alfort주와 Brescia주와는 상대적으로 낮은 동질성을 보였다 (Table 1).

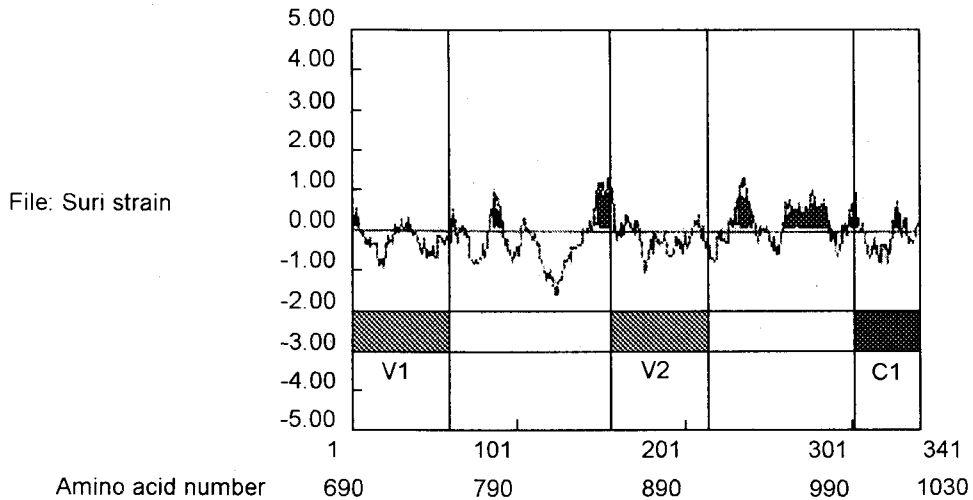


Figure 9. Location and hydrophobicity of two variable domains and one conserved domain identified in the region of gp55 protein of CSFV Suri strain. The shadow box and symbol V indicate the variable domain. The black box and symbol C indicate the conserved domain. The hydrophobicity plot in the region is proportionally given above the viral protein. The amino acid number is given at the bottom.

한편 pestivirus의 gp55 structural protein의 variable domain으로 알려진 [4] 아미노산서열 690~752 (V1 영역)과 829~903 (V2 영역)을 동시에 비교한 바 (Figure 8), Suri주에 대해 ALD주와 LOM주는 99.2% (137/138) 및 97.6% (135/138)의 높은 일치율을 각각 나타내었고, Alfort주 및 Brescia주는 87.6% (121/138) 및 89.8% (124/138)의 비교적 낮은 일치율을 나타내었다. 또한 conserved domain (아미노산서열: 980~1030)를 비교한 바, Suri주에 대해 ALD주와 LOM주는 100% (51/51)의 homology를 나타내었고, Alfort주와 Brescia주는 90.1% (46/51) 및 96.0% (49/51)의 homology를 각각 나타내었다. 또한 Suri주 gp55의 341개 아미노산의 hydrophobicity를 분석한 바, 2개의 V 영역은 hydrophilic하고, 1개의 C 영역은 hydrophobic 하였으며 (Figure 9), 위에서 언급한 4개의 CSFV strain과 비교시 동일한 패턴이 인정되었다. 또한 HCV Suri주의 아미노산서열에서 6개의 N-glycosylation site (N-X-S/T)가 관찰되었으며, ALD주와 LOM주와 비교한 바 그 위치와 수가 서로 동일하였다. 그러나 Alfort주의 경우 88번째 아미노산 대신 297번째 아미노산에서 N-glycosylation site가 있었으며, Brescia주에는 87, 89 아미노산서열이 바뀌어 다른 주들 보다 하나 작은 5개의 N-glycosylation site가 인정되었다. 그리고 Suri주의 gp55 아미노산

조성을 분석한 결과 (Table 2) 총 14개의 cystein 잔기가 관찰되었다.

고 찰

Flaviviridae에는 arthropod-borne virus (과거 Group B arbovirus)로 구성된 Genus Flavivirus와 non-arthropod-borne virus지만 물리화학적 분자생물학적 특성이 Flavivirus와 유사한 바이러스 즉 bovine viral diarrhea virus, classical swine fever (hog cholera) virus 및 border disease virus로 구성된 Genus Pestivirus, 그리고 사람의 Hepatitis C viruses를 포함하는 속명이 정해지지 않은 군으로 분류된다 [6,7,26].

Pestivirus의 genome은 12.0~12.5kb의 크기의 감염성이 있는 single-stranded plus sense RNA로 구성되어 있으며, BVDV와 CSFV에 대한 연구결과 이 유전자는 하나의 큰 open reading frame으로 구성되어 438.3kDa의 polyprotein을 암호화하고 있음이 밝혀졌으며 [4], 전체 genom 중 5' end쪽 약 3분의 1은 virion protein으로 nucleocapsid protein과 membrane glycoprotein인 gp44, gp33 및 gp55를 암호화하고 있으며 나머지 약 3분의 2는 non-structural protein으로 virus합성과 성숙에 관련된 protease, helicase, RNA polymerase 등을 암호화하고 있

으며, 3' end에는 짧은 polyC구조가 있는 것으로 알려져 있다 [6,7,18,27]. 이중 gp44와 gp55는 생체 내에서 바이러스의 감염성을 중화시키고 방어진역을 유도하는 중요한 항원단백으로 알려져 있다 [7,17,23]. 본 연구에서는 CSFV Suri주의 gp55 유전자를 클론닝하고 염기서열과 아미노산서열을 밝히고 얻어진 결과를 ALD주, LOM주, Alfort주 및 Brescia주의 유전자 구조와 비교하여 성상을 구명하고 Baculovirus expression system을 이용하여 gp55 subunit protein을 발현하기 위한 기초자료를 획득하고자 실험을 수행하였다.

CSFV의 gp55 유전자의 크기는 1,482bp로 downstream 503bp는 hydrophobic한 transmembrane domain (TMD)으로 peptide의 C-terminal의 endoplasmic reticulum membrane에 부착하는 기능을 가진 부위로 알려져 있으며 [7,8,13,20], TMD가 있는 gp55 protein은 endoplasmic reticulum이나 cis-Golgi 부위로 지향하는 signal 기능이 있어 cellular membrane에 부착된다. 그러므로 Song 등 [23]과 Hulst et al [8]은 eukaryotic cell을 이용한 gp55 protein 발현시 TMD부위를 제거한 gp55 gene을 이용했을 때 TMD가 있는 gp55 gene에서 보다 약 10배 정도 많은 양의 gp55 subunit protein이 배지에서 회수되었으며, TMD가 제거된 gp55 subunit protein은 생체에 접종시 안전하고 면역원성이 높았다고 보고하였다. 본 실험은 추후 gp55 재조합 plasmid pAcHEG를 Sf9 곤충세포에서 발현하도록 계획하고 있으므로 TMD부위 염기 503bp에서 459bp (91.2%)를 제거한 1,023bp를 클론닝하고 염기서열을 분석하였다.

또한 gp55 protein은 다른 virus의 envelope glycoprotein 유전자에 흔히 존재하는 secretion signal peptide sequence가 없으므로 gp55 유전자만을 클론닝하여 eukaryotic gene expression system에 발현시 secretion signal sequence가 있는 벡터를 사용해야 한다 [14,19,23]는 연구결과에 따라 본 연구에서는 acidic glycoprotein gp67 유전자의 signal sequence를 포함하고 있는 pAcGP67B baculovirus transfer vector를 사용하였으며, BamHI 절단부위에 gp55 gene을 삽입하여 pAcHEG를 클론닝하였으며 BamHI 처리에 의해 삽입유전자를 확인하였다 (Figure 5).

HC1 primer pair 및 HC2 primer pair를 공시하고 dye terminator cyclic sequencing system을 이용하여 gp55 유전자의 1,023bp의 염기서열과 341개의 아

미노산서열을 결정하고, 이미 보고된 여러 CSFV strains과 구조를 비교한 결과, Suri주는 미국에서 분리된 강독 표준주 ALD 및 일본에서 약독순화시켜 백신주로 사용되고 있는 LOM주와 핵염기서열에서는 99.5%, 그리고 아미노산서열에서는 99.1%의 높은 상동성을 나타내었고, 독일에서 이용되고 있는 표준강독주인 Alfort주와 이탈리아에서 분리된 표준주 Brescia주와는 핵염기서열은 83.6% 및 92.3% 그리고 아미노산서열은 84.1% 및 92.7%의 상대적으로 낮은 동질성을 나타내어 Suri주는 ALD 및 LOM주와는 매우 높은 동질성을 보임을 확인할 수 있었다. 한편 Song 등 [23]은 ALD주의 5' region에 위치한 nonstructural protein p23과 capsid, gp44, gp33 및 gp55를 암호하는 3,549 nucleotide의 염기서열을 결정하고 다른 CSFV주와 비교한 바, ALD는 Brescia주와 94% 그리고 Alfort주와는 85% homology가 있었으며, 아미노산서열 비교에서도 유사한 동질성이 있었다고 보고한 바 있으며, Youn [28]은 LOM-850주의 gp55유전자 (1,482bp)를 결정하고 상호 비교한 바 ALD와는 98.4%, Alfort와는 84.2% 그리고 Brescia주와는 91%의 높은 일치율을 보였다고 발표한 바 있다. 이런 성적을 Suri주 gp55에 대해 얻어진 결과와 비교할 때 CSFV polyprotein gene에 대해 비교한 Song 등 [23]의 결과와 유사한 경향이 인정되었다 [28].

그리고 Suri주의 gp55 아미노산서열에서 6개의 N-linked glycosylation site (Asn-X-Ser, Asn-X-Thr)가 관찰되었으며, ALD주와 LOM주와는 동일한 위치와 수를 보여 높은 동질성을 보였다. 그러나 Alfort주는 그 수는 같으나 1개의 위치가 달랐으며, 5개의 glycosylation site가 있는 Brescia주와도 차이가 인정되어 염기서열 및 아미노산서열의 homology와 유사한 경향을 보였다. 이와같은 경향은 gp55 protein의 conserved domain 중 일부를 비교한 결과 (Figure 8)에서 Suri주에 대한 ALD 및 LOM주의 일치율이 100%로 높게 나타나 gp55 전체 아미노산서열 비교 결과와 유사하였다.

Moormann et al [18]은 혈청학적으로 CSFV와 공통항원성이 인정되고 있는 BVDV-NADL주 및 Osloss주의 open reading frame 염기서열 비교 연구에서 공시한 Pestivirus의 구조단백 중 gp55의 cysteine 잔기와 N-glycosylation site의 위치나 수는 거의 일치함을 보고하였으며, 이 결과는 gp55가 pestivirus strain 간에 존재하는 항원적 유사성을 결정하는 major envelope glycoprotein임을 입증하

는 것이라고 기술하였다. Suri주의 아미노산구성을 분석하여 14개의 cysteine 잔기가 인정되었으며, ALD주, Alfort주, Brescia주 및 LOM주와 비교할 때 동일한 위치와 수를 나타낸다는 결과는 Moorman et al [18]의 성적과 유사하였다. 또한 Rijn et al [27]은 Brescia주 gp55의 cysteine중 N-terminal 부분의 6개 cysteine (아미노산서열: 693, 737, 792, 818, 828, 856)은 gp55의 folding에 중요한 역할을 한다고 보고하였으며, 이것을 Suri주 gp55의 아미노산 분석결과와 비교한 바 동일한 위치와 패턴을 나타내고 있음을 알 수 있었다.

이상의 얻어진 결과를 종합해 볼 때 CSFV Suri주의 gp55 glycoprotein의 핵염기와 아미노산 구조는 ALD주와 LOM주에 매우 유사하다는 사실을 알 수 있었다. 이것은 Suri주는 LOM백신주에서 END 음성변이주를 클론닝하여 만든 것이며, LOM백신주는 Sato et al [22] 이 일본에서 분리된 CSFV를 약독순화시킨 것이기 때문에 Suri주, ALD주, LOM주간에 매우 높은 homology가 나타난 것이라 추정된다. 그러나 이런 사실을 더 확실히 입증하고 국내 돈군에 감염되고 있는 CSFV의 분자역학적 성상을 규명하기 위해서는 많은 폐의 야외 분리주에 대한 핵염기 구조에 대한 연구가 앞으로 수행되어야 할 것이며, 얻어진 결과는 야외 강독주와 백신주의 유전적 성상 감별에 응용되어 돼지콜레라 방역과 관련된 문제점을 해결하는데 기초자료가 될 것이라 생각된다.

결 론

Classical swine fever virus (CSFV; hog cholera virus) 약독순화주 Suri주는 LOM백신주에서 유래된 변이 바이러스로써 END반응 음성이고, Western equine encephalitis virus를 이용한 간접시험에서 양성반응을 보이는 것으로 돼지콜레라 백신주로 이용되고 있다. 본 연구에서는 CSFV Suri주의 분자유전학적 성상과 CSFV의 분자역학적 접근에 필요한 기초자료를 얻기 위해 CSFV의 구조단백 가운데 중화항체 형성에 중요한 역할을 하는 gp55유전자를 RT-PCR법으로 증폭하고 클론닝하여 핵염기 및 아미노산서열을 결정하고, 여러 CSFV strains과 성상을 비교하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CSFV Suri주에 대한 RT-PCR시험에서 transmembrane domain이 제거된 1.02kb (1.023bp) 크기

의 gp55 protein에 대한 cDNA를 증폭하였고, 이를 pAcGP67B baculovirus transfer vector의 *Bam*HI site에 삽입하여 pAcHEG를 클론닝하고 삽입유전자를 확인하였으며, Dye terminator cyclic sequencing법에 의해 gp55를 암호하는 1,023bp의 염기서열을 규명하였고, 이를 근거로 341개의 아미노산서열을 추정하였다.

2. CSFV Suri주 gp55의 염기서열과 아미노산서열을 분석한 결과, 염기서열에서는 ALD주와 LOM주와는 99.4% 및 99.5%의 높은 동질성을 보였고, Alfort주 그리고 Brescia주와는 84.1% 및 92.7%의 상대적으로 낮은 일치율을 각각 나타내었다. 아미노산서열에서는 ALD주 및 LOM주와는 99.1%의 동질성을 나타내었고, Alfort주 및 Brescia주와는 90.0% 및 93.2%의 일치율을 각각 나타내었다.

3. gp55 protein의 variable 및 conserved domain의 구조를 비교한 바, Suri주는 ALD주 및 LOM주와 높은 동질성 (97.8%~100%)을 보였고, Alfort주 및 Brescia주에 대해서는 상대적으로 낮은 일치율 (87.6%~96.0%)을 보였으며, hydrophobicity 분석에서는 4개 CSFV strains 모두가 동일한 패턴을 나타내었다.

4. N-glycosylation site와 cysteine잔기의 수와 위치를 비교한 바, Suri주, ALD주 및 LOM주는 상호 일치하였다.

5. 이상의 연구 결과를 볼 때 CSFV Suri주 gp55의 핵염기서열과 아미노산서열은 ALD주와 LOM주와 높은 일치율을 나타내며, 유사한 성상을 가짐을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Choi, Cheong U, Lee, O S, Hwang, Eui K, Kim, Yong H, An, Soo H: Studies on the development of hog cholera live vaccine. 2. Safety and immunogenicity of newly cloned attenuated hog cholera virus, Suri strain. *Res Rept RDA* **31(1)**: 1-6, 1989.
2. Choi, Cheong U, Lee, O S, Kim, Yong H, An, Soo H, Hwang, Eui K: Studies on the development of hog cholera live vaccine. 1. Cloning and identification of a new attenuated hog cholera virus. *Res Rept RDA* **30(2)**: 42-48, 1988.
3. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method

- of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159, 1987.
4. **Collett MS, Larson R, Golk C, Strick D, Anderson DK, Purchio AF**: Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* **165**: 191-199, 1988.
 5. **Deng R, Brock KV**: Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1. *Virology* **191**: 867-879, 1992.
 6. **Fenner FJ, Gibbs EPJ, Murphy FA, Rott R, Studdert MJ, White DO**: Veterinary virology, 2nd ed., Academic Press, NY pp 441-456, 1993.
 7. **Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick J, Monath TP, Roizman B, Straus SE**: Fields Virology, Vol 1, 3rd ed. Lippincott-Raven Publ, Philadelphia, pp 931-1074, 1996.
 8. **Hulst MM, Westra KF, Wensvoort G, Moormann RJM**: Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. *J Virol* **67(9)**: 5435-5442, 1993.
 9. **Kang, Byoung J, Kwon, Hyuk J, Lee, Hyun S, Mun, Jae B, Kim, Sun J**: A field application of tissue culture attenuated hog cholera (LOM) vaccine. *Res Rept ORD* **14**: 27-33, 1971.
 10. **Kang, Byoung J, Kwon, Hyuk J, Lee, Hyun S, Park, Dong K**: Studies on the application of LOM hog cholera vaccine to domestic swine in Korea. *Res Rept ORD* **10(5)**: 85-93, 1967.
 11. **Kang, Byoung J, Kwon, Hyuk J, Lee, Hyun S, Park, Dong K**: Studies on the *in vitro* detection of multiplicity and stability of tissue culture attenuated hog cholera virus (LOM-850). *Res Rept ORD* **12**: 1-6, 1969.
 12. **Kwon, Hyuk J, Kang, Byoung J, Mun, Jae B, Kim, Sun J**: Studies on the antibody responses of pigs inoculated with tissue culture attenuated hog cholera virus (LOM-850). *Res Rept of ORD* **11(5)**: 53-57, 1968.
 13. **Maddy van Z, Wensvoort G, Eric de K, Nulst M, Hanneke van der G, Gielkens A, Berns A, Moormann RJM**: Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J Virol* **65(5)**: 2761-2765, 1991.
 14. **Matauura Y, Possee RD, Overton HA, Blahip KHL**: Baculovirus expression vector: the requirements for high level expression of proteins including glycoproteins. *J Gen Virol* **68**: 1233-1250, 1987.
 15. **Meyers G, Rumenapf T, Thiel HJ**: Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* **171**: 555-567, 1989.
 16. **Moormann RJM, Hulst MM**: Hog cholera virus. identification and characterization of the viral RNA and the virus specific RNA synthesized in infected swine kidney cells. *Virus Res* **11**: 281-291, 1988.
 17. **Moormann RJM, Warmardam PAM, Meer B, Schaaper WMM, Wensvoort G, Hulst MM**: Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. *Virology* **177**: 184-198, 1990.
 18. **Moormann RJM, Warmerdam PAM, Meer B, Hulst MM**: Nucleotide sequence of hog cholera virus RNA: properties of the polyprotein encoded by the open reading frame spanning the viral genomic RNA. *Vet Microb* **23**: 185-191, 1990.
 19. **Parker MD, Yoo D, Cox GJ, Babiuk LA**: Primary structure of the S peplomer gene of bovine coronavirus and surface expression in insect cells. *J Gen Virol* **71**: 263-270, 1990.
 20. **Rumenapf T, Unger G, Strauss JH, Thiel HJ**: Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J Virol* **67(6)**: 3288-3294, 1993.
 21. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T**: Molecular cloning, A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab Press, NY, 1989.
 22. **Sato U, Nishimura Y, Hanaki T, Nobuto K**: Attenuation of hog cholera virus by means of continuous cell virus propagation method and preparatory experiments on the attenuated strain (LOM) as a vaccine. *Bull Off Int Epiz* **61**: 15-

- 31, 1964.
23. **Song, Jae Y, Park, Jong H, An, Dong J, Hyun, Bang H, Kim, Byoung H, Kang, Young W, Kim, Soon J, An, Soo H:** Immunogenicity of the glycoprotein gp55 of hog cholera virus expressed by a recombinant baculovirus. *RDA J Agri Sci* **37(2)**: 628-636, 1995.
 24. **Song, Jae Y, Park, Jong H, Hyun, Bang H, An, Dong J, Lee, Jung B, Kim, Byoung H, An, Soo H:** Molecular cloning and nucleotide sequence encoding the structural proteins of ALD strain of hog cholera virus. *RDA J Agri Sci* **36(2)**: 570-581, 1994.
 25. **Thiel HJ, Stark R, Welland E, Rumenapf T, Meyers G:** Hog cholera virus: Molecular composition of virion from a pestivirus. *J Virology* **65**: 4705-4712, 1991.
 26. **Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE:** Hagan and Bruner's microbiology and infectious disease of domestic animals, 8th ed. Cornell University press, pp 729-774, 1988.
 27. **Van Rijn PA, Miedema GKW, Wensvoort G, Van Gennip HGP, Moormann RJM:** Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus. *J Virol* **68**: 3934-3942, 1994.
 28. **Youn, Soon J:** Molecular cloning and nucleotide sequence encoding gp55 protein of LOM strain of hog cholera virus. a thesis for master degree, Konkuk Univ, Feb 1996.