

평에서 분리된 Newcastle Disease Virus 내열성주 (CBP)의 Fusion(F) 유전자 클로닝과 염기서열 분석

충남대학교 수의과대학, 전북대학교 수의과대학¹, 국립수의과학검역원 바이러스과²

장경수 · 전무형* · 송희종¹ · 김귀현 · 박종현²

=Abstract=

Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the Gene Encoding Fusion(F) Protein of the Thermostable Newcastle Disease Virus Isolated from a Diseased Pheasant

Kyung-Soo Chang, Moo-Hyung Jun*, Hee-Jong Song¹, Kui-Hyun Kim
and Jong-Hyeon Park²

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea,

¹*College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea,*

²*Virology Division, National Veterinary Research and Quarantine Services,
Anyang 430-016, Korea*

The gene encoding F protein of CBP-1 strain, a heat-stable Newcastle disease virus (NDV) isolated from the diseased pheasants in Korea, was characterized by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), nucleotide and amino acid sequences. Virus RNA was prepared from the chorioallantoic fluid infected with NDV CBP-1 virus and cDNA was amplified by RT-PCR, cloned and sequenced to analyze. The PCR was sensitive as to detect the virus titer above 2⁵ hemagglutination unit. 1.7kb (1,707bp) size of the cDNA was amplified and cloned into *Bam*HI site of pVL1393 Baculo transfer vector. The nucleotide sequences for F protein were determined by dye terminator cyclic sequencing using four pairs of primers, and 553 amino acid sequences were predicted. In comparison of the nucleotide sequence of F gene of CBP-1 with those of other NDV strains, the homology revealed 88.8%, 98.5% and 98.7% with Kyojungwon (KJW), Texas GB and Beaudette C strains, respectively. As the deduced 553 amino acid sequences of F protein of CBP-1 were compared with those of other NDV strains, the homology appeared 89.9%, 98.7% and 98.9% with KJW, Texas GB and Beaudette C strains, respectively. The putative protease cleavage site (112-116) was R-R-Q-K-R, indicating that CBP-1 strain is velogenic type. The amino acid sequences include 6 sites of N-asparagine-linked glycosylation and 13 cysteine residues. These data indicate that the genotype of CBP-1 strain is more closely associated with the strains of Texas GB and Beaudette C than KJW strain.

Key Words: Nucleotide sequence analysis, F protein gene, Thermostable Newcastle disease virus, NDV isolate from pheasant

접수 : 1998년 8월 20일

*Corresponding author: Moo-Hyung Jun, Microbiology Lab, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, 220 Kung-dong, Yusong-ku, Taejon 305-764, Korea, Tel 042-821-6753, Fax 042-821-6753, e-mail <http://www.mhjun@hanbat.chungnam.ac.kr>

이 연구는 1997년도 한국과학재단 특정연구과제 연구비(과제번호: 97-0402-0801-2)에 의해 수행되었음.

서 론

Newcastle disease virus (NDV)는 paramyxoviridae의 paramyxovirus-1에 속하며 negative-sense, non-segmented 및 single-stranded RNA 핵산을 가지며 100~150nm 크기의 envelope를 가진 바이러스이다 [2,3,7,8,17]. NDV는 hemagglutinin-neuraminidase (HN), fusion (F), matrix (M), nucleocapsid protein (NP), large protein (L) 및 phosphoprotein (P)의 6가지 주요 단백질을 가지고 있으며, 이중 F protein은 NDV의 증식과정 중 바이러스와 세포의 membrane을 융합시키고 세포내로 nucleocapsid가 침입하는데 관여하며, 병인기전과 면역방어기전에 주요한 기능을 한다 [1,2,7,17,25]. NDV는 조류와 사람에게 감염하는 인수공통전염병이며, 특히 닭, 꿩, 메추리 등 가금류에 감염되면 소화기, 호흡기 및 신경증상을 나타내고 산란계에서는 산란저하증을 유발하며, 어린병아리에서는 폐사율이 높아 세계적으로 양계산업에 중요한 급성 전염병으로 간주되고 있다 [1,2,3,8,15,16]. 우리나라에서는 1927년 닭에 처음 발병보고된 이래 현재까지 계속 발생되어 제1종 가축전염병으로 규정하고 있으며, 백신접종, 검역 및 도태방법에 의한 방역 대책을 쓰고 있으나 근절시키지 못하고 있어 새로운 항원물질과 진단방법의 개발이 요구되고 있다 [4,7,14,15,20,25].

1991~1995년에 Park 등 [16,17,18,18,20]은 충청지역에 사육중인 꿩에서 발생한 뉴캐슬병 가검물로부터 수주의 NDV를 분리하였고 그 중 CBP-1, CBP-2, CBP-3, CBP-4 및 CBP-5 분리주가 열처리에 대해 내열성이 있으며, 세포내 증식성상 등 phenotype이 기존 NDV 분리주와 상이한 점이 있으며 특성상 환경요인에 저항성이 있는 백신 바이러스로 개발 가능성이 높은 것으로 보고하였다 [12].

본 연구에서는 Park 등 [16,17,18,19,20]이 분리 동정한 NDV CBP-1주의 envelope glycoprotein 중 병인기전상 중요한 기능을 하는 fusion (F) protein을 coding하는 유전자를 RT-PCR로 증폭, vector plasmid에 클론닝하고 염기서열을 분석하여 내열성 NDV CBP-1주의 분자유전학적 성상과 역학적 배경을 규명하기 위한 일련의 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 증식

뉴캐슬병에 이환된 꿩으로부터 분리한 다음 SPF 부화계란에서 3~5대 계대증식된 내열성 NDV CBP-1, CBP-2, CBP-3, CBP-4 및 CBP-5주 [16,17,18,19,20]와 생독백신 생산독주로 이용되는 NDV LaSota주와 Hitchner B1주 및 1950년대 국내에서 분리된 백신검정용 표준강독주인 교정원 (KJW)주 [7]를 대성미생물연구소로부터 분양받아 공시하였다. 바이러스는 9~10일령된 SPF 부화계란의 요막강내 접종방법에 의해 증식하였다 [16].

2. NDV F gene에 대한 primer 작성

GeneBank에서 검색하여 얻은 NDV의 F gene의 염기서열과 Bournsnel 등 [4]의 방법을 참고하여 MacDNAsis ver 3.0 (Hitachi software engineering America Ltd.)을 이용해 작성하였다 (Fig. 1). F1 S와 F4 AS primer는 F gene (1.7kb)의 RT-PCR에 사용하였고, F1 S와 AS, F2 S와 AS, F3 S와 AS, F4 S와 AS primer 쌍들은 F gene의 염기서열 분석에 사용하였다.

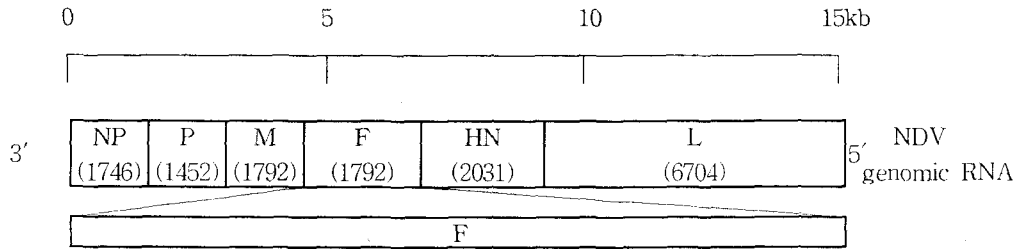
3. RNA 추출

(1) RNase 불활화

RNA와 접촉하는 모든 실험기구는 0.2N NaOH에 침지하였으며, 모든 용액은 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC, Sigma)로 37°C에서 12시간 이상 처리하고 고압멸균하여 RNase 활성을 정지시킨 후 사용하였다 [6,7].

(2) 장노막강액으로부터 바이러스 RNA의 추출

RNA는 acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform을 이용한 Chomczynski와 Sacchi의 방법 [6]으로 추출하였다. 먼저 400 μ l의 장노막강액에 500 μ l의 denaturing solution (Sol D; 4M guanidium isothiocyanate (ultra pure, BRL), 25mM sodium citrate (pH 7.0, Sigma), 0.5% N-lauryl sarcosine (Sigma), 0.1M 2- β -mercaptoethanol (Sigma))을 넣고 잘 흔들어 준 후 37°C에서 1시간 정지한 후 50 μ l 2M sodium acetate (pH 4.5)와 500 μ l의 phenol/chloroform/isoamylalcohol (P/C/I 25:24:1, Sigma)를 넣은 후 10분간 교반하고 실온에서 5분간 정지한 후 15,000g로 10분간 원심하여 상층액의 75%를 새 시험관



Primers	Sequences	Location
F1 S	GATTCTGGATCCCCTTGGCGCTTTCTAGG	10nt-40nt
F1 AS	AAGTCGGAGGATGTTGGCAGC	488nt-508nt
F2 S	AAAGAGAGCATTGCCGCAACC	509nt-529nt
F2 AS	CGCGGATCCAGAACCGACCTGTGTCACCAC	1010nt-1030nt
F3 S	CGCGGATCCGTGGTGACACAGGTCGGTTCT	1010nt-1030nt
F3 AS	TGCATCGAATTCCTCCACTGAG	1352nt-1372nt
F4 S	CTCAGTGGGGAATTCGATGCA	1352nt-1372nt
F4 AS	CGCGGATCCCATCTGTGTTACATTTTGT	1687nt-1717nt

Fig. 1. Gene map of NDV and sequences of 4 pairs of primers for NDV F gene.

에 옮겼다. 여기에 동량의 isopropanol (Sigma)을 넣어 10분간 침전시킨 후 15,000g로 20분간 원심하여 RNA 침전물을 만든 후 300 μ l Sol D로 다시 녹여 300 μ l isopropanol을 첨가하고 15,000g로 20분간 원심하여 RNA 침전물을 만든 후 75% ethanol로 두 번 수세하고 진공건조한 다음 0.1% DEPC 용액 10 μ l에 녹였다.

4. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

(1) cDNA의 합성

0.2ml PCR-tube에 RNA 시료 10 μ l와 sense와 antisense primer 한쌍씩을 각각 1 μ l (200ng)씩 넣고 70 $^{\circ}$ C에 30분간 denaturation시킨 후 얼음위에 5분동안 정치하였다. 여기에 5 \times reaction buffer [100mM Tris-HCl (pH 8.3, at room temperature), 375mM KCl, 15mM MgCl₂, Gibco BRL] 6 μ l, 0.1M dithiothreitol (DTT) 2 μ l, 2.5mM dNTPs (Takara) 4 μ l, 12.5units RNasin (Promega) 0.5 μ l, 0.1% DEPC-treated H₂O 5 μ l와 100units의 RNase H-minus superscript II RT (Gibco BRL) 0.5 μ l를 첨가하고 automated thermal

cycler (DNA thermal cycler 2400, Perkin Elmer Cetus Co.)로 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 그리고 42 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응하여 cDNA를 합성하였다 [23].

(2) 중합효소연쇄반응 (PCR)

합성한 cDNA 10 μ l에 10 \times reaction buffer [100mM Tris-HCl (pH 8.3), 500mM KCl, 0.1% gelatin (w/v)] 5 μ l, 25mM MgCl₂ 10 μ l, 2.5mM dNTPs 8 μ l, sense와 antisense primer를 각 1 μ l와 멸균증류수 14 μ l를 첨가하여 Automated thermal cycler (DNA thermal cycler 2400, Perkin Elmer Cetus Co.)로 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 단백질효소를 불활화시킨 후 Taq polymerase (Takara) 1 μ l (3units)를 넣어 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 46 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 반응하는 일련의 과정을 30회 반복하면서 annealing time과 extension time을 매 cycle마다 2초와 5초씩 추가하였으며 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다 [23].

전기영동분석은 주로 1% ethidium bromide agarose gel을 이용하였고 image analyzer (Pharmacia)로 판독 분석하였다 [23].

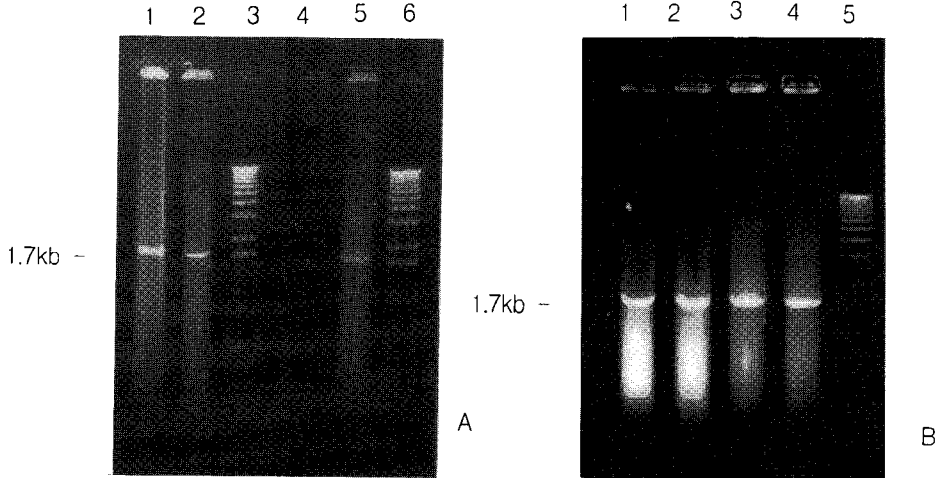


Fig. 2. Construction of the clone of F gene of NDV CBP-1 strain with pVL1393.

5. cDNA cloning

(1) PCR products의 정제

겔에서 잘라낸 PCR products를 1.5ml 시험관에 넣고 gene clean II kit를 이용하여 용출하였다. 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 1분간 강하게 교반하여 부유시킨 glassmilk을 10 μ l 첨가해 넣고 섞어 준 다음 1~2분마다 섞어 주며 얼음위나 실온에서 10분간 정치시켜 DNA 절편이 glassmilk에 붙도록 해준 후 15,000rpm에서 5초간 원심하여 침전물을 만들었다. 침전물은 냉각된 세척용액으로 3번 씻어 준 다음 시험관에 있는 용액들을 완전히 제거하고 멸균증류수 10 μ l을 넣고 45~55 $^{\circ}$ C에서 2~3분간 두어 glassmilk에서 DNA를 용출한 후 15,000rpm으로 1분간 원심하여 5 μ l의 DNA가 녹아 있는 멸균증류수를 회수하고 다시 5 μ l의 멸균증류수를 더 첨가하여 한 번 더 용출하여 UV spectrophotometer로 260nm에서 측정하여 정량하였다.

(2) Vector 및 insert DNA

pVL1393 Baculo transfer plasmid를 대량생산하여 정제한 후 *Bam*HI로 소화시켜 linear vector로 만들고 이를 다시 정제하였으며 자가융합을 억제시키기 위하여 56 $^{\circ}$ C에서 1시간 calf intestine alkaline phosphatase (CIAP, Takara)로 처리한 후 CIAP를 불활화하기 위해 65 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰으며 P/C/I로 처리하고 에타놀로 침전하여 vector를 준비하였다.

또한 용출된 PCR product를 30 $^{\circ}$ C에서 1시간 *Bam*HI로 소화시킨 후 P/C/I로 처리하고 에타놀로 침전하여 insert DNA를 준비하였다 (Fig. 2).

(3) Ligation

클로닝할 *Bam*HI로 처리된 PCR products 6 μ l (0.6 μ g)와 10 \times ligation buffer [660mM Tris-Cl (pH 7.5), 50mM MgCl₂, 50mM DTT]1 μ l, 10mM ATP 1 μ l, T4 DNA ligase (Takara) 1 μ l (10units) 및 *Bam*HI로 처리된 pVL1393 vector 1 μ l (0.2 μ g)를 넣고 16 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 반응시켰다 (Fig. 2).

(4) Competent cell 준비

Competent cell은 CaCl₂ 용액 처리방법으로 작제하였다. Buffer는 0.1M CaCl₂ 용액을 membrane filter (0, 45 μ m)로 여과하여 4 $^{\circ}$ C에 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 0.22 μ m 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 DH5 α cell을 LB agar plate에 펴고 37 $^{\circ}$ C에서 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 $^{\circ}$ C에서 강하게 교반 (200~250rpm)하며 배양하였다. 배양이 끝나면 배양액을 10분간 냉각시킨 후 500ml 원심병에 옮기고

1,600g (3,000rpm)로 4℃에서 10분 동안 원심하여 침전물을 만들고 이를 40ml의 차가운 0.1M CaCl₂ 용액에 재부유하여 30분간 냉장정치하고 이를 다시 1,100g (2,500rpm)로 4℃에서 5분간 원심분리 후 침전물을 만든 후 8ml CaCl₂ 용액에 부드럽게 재부유하고 glycerol를 최종 농도 14%가 되도록 넣고 부드럽게 섞어 준 후에 얼음위에서 10분 동안 정치하고 0.2ml씩 냉동시험관에 분주하여 -70℃에서 40일까지 보관하면서 사용하였다.

(5) Transformation

Competent cell 200μl를 얼음위에서 녹이고 냉각된 1.5ml polypropylene tube에 넣고 10μl의 ligation mixture plasmid solution을 첨가해서 잘 섞어 주고 30분 동안 얼음위에 정치시킨 다음 42℃에서 90초간 열로 충격을 가해 plasmid가 세포안으로 들어가도록 해준 다음 얼음위에서 2분간 정치하였다. 여기에 0.8ml SOC 배지를 넣어 37℃에서 강하게 교반 (225cycles/min)하며 1시간 동안 배양하여 plasmid에 있는 앰피실린 내성 유전자가 발현되도록 하였다. 이시간 동안 앰피실린 (50μg/ml)이 들어 있는 LB agar plate에 transformation된 세포가 들어있는 200μl의 SOC 배지를 구부러진 유리봉으로 잘퍼주고 37℃에서 하룻밤 동안 배양하여 백색 집락 10개를 선택하여 앰피실린 (50μg/ml)이 첨가된 LB broth에 접종하였다.

(6) Plasmid DNA 추출

LB broth에 접종된 균은 37℃에서 18시간 진탕 배양하였다. 배양액 1.5ml를 새 시험관에 옮기고 4,000rpm에서 10분간 원심하여 상층액을 버리고 침전물을 냉장된 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 다음 얼음에서 5분간 용해시킨 후 냉장된 Sol III (3M potassium acetate, 11.5% glacial acetic acid) 300μl를 넣어 혼합하고 5분간 정치하여 중화시킨 다음 12,000g에서 10분간 원심하고 상층액을 1점의 여과지로 여과한 후 1 volume의 isopropanol을 첨가하여 -70℃에서 30분 침전시킨 후 12,000g에서 20분간 원심하였다. 이후 상층액을 제거하고 70% 에타놀로 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. 클로닝된 것이 확실한 것은 순

수배양을 위해 앰피실린 (50μg/ml)이 들어간 LB agar plate에서 다시 배양하였다.

6. Dye terminator cycle sequencing

염기서열 분석은 Dye terminator cycle sequencing법으로 실시하였다. 약술하면 Dye terminator ready reaction mix (Perkin-Elmer, USA)는 A-dye terminator, C-dye terminator, G-dye terminator, T-dye terminator, dITP, dATP, dCTP, dTTP, Tris-HCl, MgCl₂, thermal stable pyrophosphatase와 amplitaq DNA polymerase-FS로 구성되어 있으며 두 개의 분리된 dye terminator cycle reaction으로 수행하고, forward primer는 positive sequence를 위해 reverse primer는 complement sequence를 위해 사용하였다.

0.2ml PCR tube에 8.0μl dye terminator ready mix (Perkin-Elmer), 2μl DNA template, 3.2pmole forward primer와 3.2pmole reverse primer를 섞어 총량을 20μl로 만든 후 DNA thermal cycler (DNA thermal cycler 2400, Perkin Elmer Cetus Co.)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 15,000g (4℃)로 30분간 원심한 후 70% 에타놀로 수세한 후 진공건조 하였다. 건조된 시료는 25μl template suppression reagent (Perkin-Elmer, USA)로 재용해한 후 95℃에서 2분간 denature시킨 후 분석하기 전까지 얼음에 정치하였다.

Sequence data는 ABI prism 310 genetic analyzer (Perkin Elmer Cetus Co.)로 수집한 후 collection, analysis 및 seqEd soft ware (Perkin-Elmer, USA)가 설치된 Macintosh로 분석하였으며 raw sequencing data는 collection soft ware로 수집하였으며 analysis soft ware로 nucleotide sequences로 전환하였다.

7. Data analysis

SeqED software를 이용하여 핵염기서열로부터 아미노산서열을 결정하였으며, NDV CBP-1주와 NDV 참조주인 교정원주 [7], Texas GB 및 Beaudette C주와의 핵염기서열 비교는 seqED software를 이용하여 multialign에 의해 분석하였다.

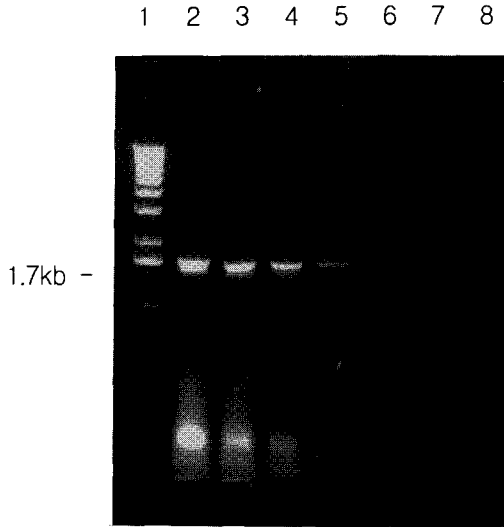


Fig. 3. Amplification patterns of NDV F genes by RT-PCR using F1 sense and F4 antisense primers for fusion genes. A) Lane 1: LaSota, Lane 2: Hitchner B1, Lane 3: 1kb DNA ladder marker, Lane 4: SPF egg (negative control), Lane 5: CBP-1, Lane 6: 1kb DNA ladder marker. B) Lane 1: CBP-2, Lane 2: CBP-3, Lane 3: CBP-4, Lane 4: CBP-5, Lane 5: 1kb DNA ladder marker.

결 과

1. RT-PCR에 의한 F 유전자 증폭

F1 sense primer와 F4 antisense primer를 이용하여 SPF 발육계란의 장노액강에서 증식된 NDV LaSota, Hitchner B1, CBP-1, CBP-2, CBP-3, CBP-4 및 CBP-5주에 대해 기확립된 RT-PCR법으로 1.707kb의 F 유전자를 증폭시켰던 바 Fig. 3에서 나타낸 바와 같이 모두 PCR product가 인정되었다. NDV CBP-1의 혈구응집에 의한 바이러스 농도별 PCR product의 생성능을 비교한 바 혈구응집역가가 2⁵ HAU 이상일 때 특이적인 밴드가 관찰되었고, 2⁴ HAU 이하일 때는 밴드의 구분이 불명확하였다 (Fig. 4).

4쌍의 primer 즉 F1, F2, F3 및 F4 primer pairs를 이용하여 NDV CBP-1주에 대해 RT-PCR를 실시한 바 Fig. 4에서 나타낸 바와 같이 498, 521, 362 및 365bp의 F1, F2, F3 및 F4 분절을 증폭시킬 수 있었다 (Fig. 5).

2. F gene 클론닝

F1 sense primer와 F4 antisense primer를 이용하여

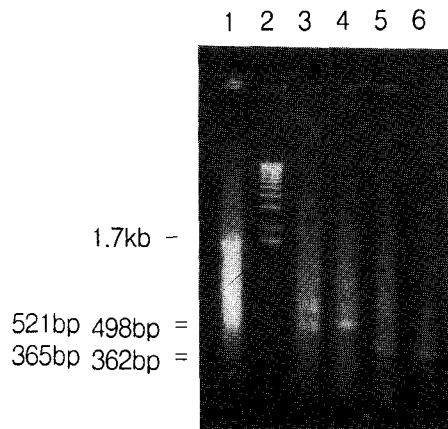


Fig. 4. Amplification patterns of NDV F genes by RT-PCR for the virus with various hemagglutination unit (HAU). A) Lane 1: 1kb DNA ladder marker, Lane 2: 2¹⁰ HAU, Lane 3: 2⁹ HAU, Lane 4: 2⁸ HAU, Lane 5: 2⁷ HAU, Lane 6: 2⁶ HAU, Lane 7: 2⁵ HAU, Lane 8: 2⁴ HAU.

RT-PCR로 증폭된 CBP-1주의 F gene을 *Bam*HI로 처리하여 얻어진 분절과 *Bam*HI로 처리된 pVL1393 Baculo transfer vector와 융합한 다음 (이후 이 plasmid를 pVL-NDF라 칭함), DH5 α competent cell에 transformation시키고 앰피실린이 첨가된 LB agar를 이용하여 스크리닝하고, 선택된 집락은 LB broth에 배양하고 miniprep으로 plasmid DNA를 추출한 다음 *Bam*HI로 처리하고 1% agarose gel에 전기영동한 결과, *Bam*HI로 절단시 1.7kb의 insert DNA와 9.7kb의 vector DNA를 확인할 수 있었다 (Fig. 6). Insert DNA를 확인 후 plasmid를 *Xho*I로 처리하여 linear DNA로 만든 후 Centri-spin column (Takara)을 이용하여 정제한 후 DNA 염기분석용 template로 사용하였다.

3. NDV CBP-1주의 F 유전자 염기서열

Dye terminator cycle sequencing법에 의해 NDV CBP-1주의 F gene의 ATG codon의 upstream 46bp로부터 1662번째 TGA termination codon의 downstream 87bp까지 위치하는 1792bp 중 11bp부터 1717bp까지 1707bp의 염기서열을 결정하고 교정원주, Texas GB주 및 Beaudette C주와 비교하였던 바 (Fig. 7) 교정원주와는 192개 부위의 염기가 달라서 88.8%의 homology를 보였고 Texas GB주와는 25개의 염기가 차이가 나 98.5% 그리고 Beaudette C주와는 23개 부위에서 차이가 나서

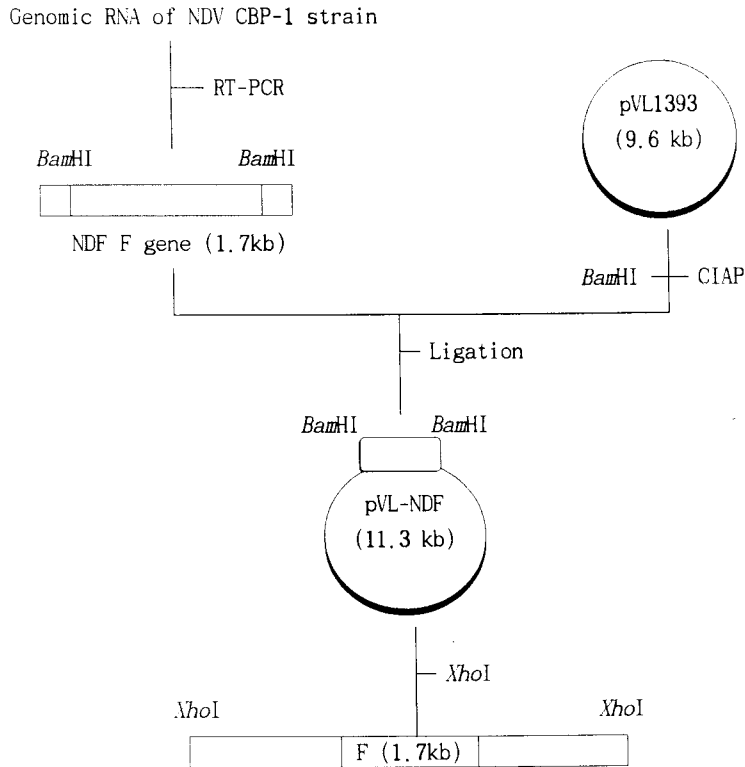


Fig. 5. Amplification patterns of F gene of NDV CBP-1 strain by RT-PCR using four pairs of primers. Lane 1: F1 sense primer and F4 antisense primer, Lane 2: 1kb DNA ladder marker, Lane 3: F1 primer pairs, Lane 4: F2 primer pairs, Lane 5: F3 primer pairs, Lane 6: F4 primer pairs.

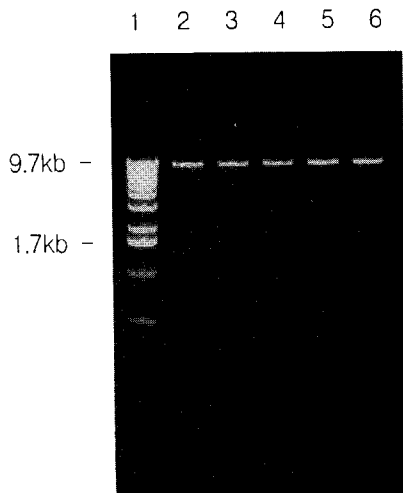


Fig. 6. Cleavage patterns of pVL-NDF digested with *Bam*HI. Lane 1: 1kb DNA ladder marker, Lane 2-6: pVL-NDF/*Bam*HI.

98.7%의 homology를 보여 CBP-1주의 F gene은 교정원주보다는 Texas GB주 및 Beaudette C주와 보다 높은 homology를 나타내었다 (Table 1).

4. F protein의 아미노산 서열 비교

F 유전자 염기서열 분석에서 얻어진 결과 (Fig. 7)를 기초로 하여 F protein에 대한 아미노산서열을 추정하였던 바 Fig. 8과 같이 553개의 아미노산을 결정하였다. 이 결과를 교정원주, Texas GB주 및 Beaudette C주와 비교하였던 바 F protein의 아미노산은 교정원주와는 89.9% (497/553), Texas GB주와는 98.7% (546/553) 그리고 Beaudette C주와는 98.9% (547/553)의 homology를 각각 보여, NDV CBP-1주는 교정원주에 비해 Beaudette C주 및 Texas GB주와 높은 homology를 나타내었다 (Table 1). 또한 F protein의 protease에 대한 cleavage site로 알려진 112~116부위는 R-R-Q-K-R로 구성되어 있었고, 6개의 N-asparagine-linked gly-

Table 1. Comparison of nucleotide and amino acid sequence homology of F gene among four strains of Newcastle disease virus

F gene	KJW/CBP-1	Texas GB/CBP-1	Beaudette C/CBP-1
Nucleotide sequence (homology)	1515/1707 (88.8%)	1682/1707 (98.5%)	1684/1707 (98.7%)
Amino acid sequence (homology)	497/553 (89.9%)	546/553 (98.7%)	547/553 (98.9%)

KJW = NDV Kyojungwon strain, a vologenic type isolated in Korea

cosylation site가 관찰되었으며, 13개의 cysteine 잔기가 인정되었다.

고찰

뉴캐슬병은 우리나라 양계산업에 가장 고질적인 전염병 중의 하나로 간주되고 있으며 최근에는 집단사육하고 있는 평과 메추리에서도 유행성으로 발병하며 사육농가에 많은 경제적 피해를 주고 있다 [7,14,15,16,17]. 본 병은 인수공통전염병으로 사람에게 감염하여 인플루엔자양 발열과 결막염 그리고 인두염을 유발하기도 하여 공중보건학적으로도 중요시되고 있다 [10,16,17]. 본 병의 원인체인 NDV의 생물학적, 물리학적 및 분자유전학적 특성에 관한 연구는 새로운 항원물질 개발과 보다 간편한 진단기법 개발을 목적으로 활발히 수행되고 있다 [2,4,8,12,25].

또한 최근 NDV의 특성을 분자유전학적으로 구명하기 위해 NDV 구조 유전자 염기서열 분석에 관한 연구결과가 많이 보고되고 있으며, 아직 full genome의 염기서열은 규명되지 않았으나, Australia-Victoria strain, Queensland/66 strain, LaSota, B1, 교정원 (KJW)주, D26주 등의 F, HN, NP, P, M 및 L gene 등에 대한 염기서열이 보고된 바 있으며 [5,7,11,24,25], 이를 바탕으로 F 및 HN protein gene을 Baculovirus, fowl poxvirus, Salmonella 균, 계태아세포 등 다양한 expression vector를 이용하여 recombinant subunit vaccine 생산에 대한 연구가 추진중에 있다 [4,9].

본 연구진은 1991~1995년 사이에 충청지역 평사육농가에서 발생된 뉴캐슬병 가검체로부터 수주의 NDV를 분리하여 성상을 시험하였던 바, 분리주는 기존 닭 뉴캐슬병에서 분리된 바이러스에 비해 열처리에 대해 높은 내성을 나타낸다는 사실을 발견하였고, CBP 분리주의 병인기전과 면역원성 그리고 이를 이용한 새로운 형태

의 ND 백신 개발 가능성에 대해 연구를 추진중에 있다 [16,17,18,19,20].

NDV의 병원성과 tissue tropism은 553개의 아미노산으로 구성되고 하나의 open reading frame으로 구성된 fusion protein에 의해서 주로 결정되며 [5,7,11,24,25], 처음에는 67Kd의 비기능적 전구체인 F₀ protein으로 발현되었다가 post-translational cleavage에 의해서 55Kd의 F₁ protein과 12Kd의 F₂ protein으로 나뉘어진다고 보고된 바 있다 [4,9,11,13,22,24,25,26]. F₀ protein의 절단부위로 알려진 아미노산말단으로부터 112~116부위의 아미노산 배열은 병원성주는 Arg-Arg-Gln-Arg/Lys-Arg, 비병원성주는 Gly-Lys/Arg-Gln-Gly/Ser-Arg의 배열을 보여 병원성주는 염기성 아미노산 (Arg 또는 Lys)이 많아 여러 종류의 protease에 용이하게 절단될 수 있는 차이점을 갖고 있으며, 병원성주는 생체내와 시험관내 증식에서 다양하게 절단되거나 비병원성주는 chicken embryo나 endodermal cell같은 한정된 세포에서만 절단되고 [9,11,13,24,26], Fusion activity는 F₁의 N-terminus에 존재하기 때문에 절단되지 않은 F₀ protein을 갖은 virion은 침투와 용혈반응 등을 일으키지 못한다고 보고된 바 있다 [9,11,13,24].

본 연구결과 (Fig. 6)에서 NDV CBP-1주의 F protein gene의 구조는 강독주인 교정원주 [7]보다 Texas GB주 [25] 및 Beaudette C주 [5,11]와 더 높은 homology (98.5%~98.7%)를 보였으며 또한 F protein의 아미노산서열 비교 (Table 1)에서도 CBP-1주는 Texas GB [25]와 Beaudette C주 [5,11]와 각각 98.7% 및 98.9%의 높은 일치율을 나타낸 것은 Park 등 [16,17,20]이 보고한 CBP-1주의 발육계란 치사시간, 1일령 병아리의 뇌내 병원성지수, 6주령 닭에서 정맥내 병원성 지수 및 총배설강 접종 시 평균치사시간 등을 통한 병원성시험 결과와 일치하는 경향을 보였다. 그리고 얻어진 아미노산서열 중 F₀ protein의 절단부위인 112~116서열을

Kyung-Soo Chang, *et al.*: Nucleotide Sequence of HDV F Gene

```

ACGGGTAGAA GAT TCT GGA TCC CGG TTG GCG CTT TCT AGG TGC AAG
--G -T- --- --- -C --- --- -AC -A --- --- ---
1          11                               46
ATG GGC CCC AGA CCT TCT ACC AAG AAC CCA ACA CCT ATG ATG CTG ACT GTC CGG GTC GCG CTG
--- --- T-- --- T-- --- --- --- -T- --- --- G-- --- --- --- -C- --- A-A --- --- ---
47                                     109
GTA CTG AGT TGC ATC TGT CCG GCA AAC TCC ATT GAT GGC AGG CCT CTT GCG GCT GCA GGA ATT
-C- --- --- -T G-- -A- --- --- -TC -G- -T- C-- --- --- --- --- G-- -A --- -T --- -G -C
--- T-- --- --- --- --- --- --- --- -T --- --- --- --- --- --- -A --- --- ---
110                                     172
GTG GTA ACA GGA GAC AAA GCA GTC AAC ATA TAC ACC TCA TCC CAG ACA GGA TCA ATC ATA GTT
--- --- --- -G --- -G ---G --- --- --- --- --- --- --- -T --- --- ---G --- -T --- --- -C
173                                     235
AAG CTC CTC CCA AAC CTG CCC AAG GAT AAG GAG GCA TGT GCG AAA GCC CCC TTG GAT GCA TAC
--- T-A --- --- --- -T A-- --- --- --- --- --- -A --- -G --- --- --- -A --- -G --- ---
236                                     298
AAC AGG ACA TTG ACC ACT TTG CTC ACC CCC CTT GGT GAC TCT ATC CGT AGG ATA CAA GAG TCT
--- -A- --- --- C-- --- A- G-- --- --- --- --- --- -T --- --- ---C --- --- --- ---
299                                     361
GTA ACT ACA TCT GGA GGG AGG AGA CAG AAA CGC TTT ATA GGC GCC ATT ATT GGC GGT GTG GCT
-G --- --- --- -C --- A-- -A --- --- --- -G --- --- -C G-- -T- -T- --- --- -C --- A-- -A ---
362                                     424
CTT GGG GTT GCA ACT GCT GCA CAA ATA ACA GCG GCC GCA GCT CTG ATA CAA GCC AAA CAA AAT
-C --- --- --- --- -A --- --- --- -G --- --- -A --- --- T-G -C --- --- --- ---C --- -G ---
425                                     487
GCT GCC AAC ATC CTC CGA CTT AAA GAG AGC ATT GCC GCA ACC AAT GAG GCC GTG CAT GAG GTC
--- --- --- --- -G --- --- --- --- --- -G --- --- --- -A --- --- -A --- --- --- ---
488                                     550
ACT GAC GGA TTA TCG CAA CTA GCA GTG GCA GTT GGG AAG ATG CAG CAG TTT GTT AAT GAC CAA
-C --- --- --- -A --- --- --- --- --- --- --- --- --- -A --- --- --- --- -G ---
551                                     613
TTT AAT AAA ACA GCT CAG GAA TCA GGC TGC ATC AGA ATT GCA CAG CAA GTT GGT GTA GAG CTC
--- --- -C --- --- --- -TG -A- --- --- G-A -A- --- -C A-- --- --- -G --- --- --- -A ---
614                                     676
AAT CTG TAC CTA ACC GAA TTG ACT ACA GTA TTC GGA CCA CAA ATC ACT TCA CCT GCC TTA AAC
-C --- --- --- -T --- --- --- --- --- --- -G --- --- -A --- -T --- --- --- --- -CT ---
678                                     739
AAG CTG ACT ATT CAG GCA CTT TAC AAT CTA GCT GGT GGG AAT ATG GAT TAC TTG TTG ACT AAG
C-- --- --- -C --- --- --- --- -C --- --- --- -C T-T --- --- --- --- --- --- --- ---
740                                     802
TTA GGT GTA GGG AAC AAT CAA CTC AGC TCA TTA ATC GGT AGC GGC TTA ATC ACC GGC AAC CCT
--- --- --- --- -C --- --- --- --- --- --- C-- -T- --- --- --- -G --- --- --- --- ---
803                                     865
ATT CTG TAC GAC TCA CAG ACT CAA CTC TTG GGT ATA CAG GTA ACT CTA CCT TCA GTC GGG AAC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- T-- -C --- --- -T --- --- ---
866                                     928
CTA AAT AAT ATG CGT GCC ACC TAC TTG GAA ACC TTA TCC GTA AGC ACA ACC AGG GGA TTT GCC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -G --- -T- --- --- --- -A --- --- --- ---
929                                     991
TCG GCA CTT GTC CCA AAA GTG GTG ACA CAG GTC GGT TCT GTG ATA GAA GAA CTT GAC ACC TCA
-A --- --- --- --- --- -A -G --- --- --- --- --- --- -G --- --- --- -T --- --- -T
992                                     1054

```

장경수 등: HDV F 유전자 염기서열 분석

TAT	TGT	ATA	GAA	ACC	GAC	TTG	GAT	TTA	TAT	TGT	ACA	AGA	ATA	GTA	ACA	TTC	CCT	ATG	TCC	CCT
--C	---	---	--G	---	--T	---	---	--G	---	---	-A-	---	---	--G	---	---	---	---	---	--T
1055																				1117
GGT	ATT	TAT	TCC	TGC	TTG	AGC	GGC	AAT	ACA	TCG	GCC	TGT	ATG	TAC	TCA	AAG	ACC	GAA	GGC	GCA
---	---	---	---	--T	C--	-A-	--T	---	G--	---	--T	---	---	--T	---	---	--T	---	---	---
1118																				1180
								*	*	*										
CTC	ACT	ACG	CCA	TAC	ATG	ACT	ATC	AAA	GGC	TCA	GTC	ATC	GCT	AAC	TGC	AAG	ATG	ACA	ACA	TGT
--T	---	---	---	--T	---	---	C--	---	---	---	--T	--T	--C	--T	---	---	---	---	---	---
1181																				1243
AGA	TGT	GTA	AAC	CCC	CCG	GGT	ATC	ATA	TCG	CAA	AAC	TAT	GGA	GAA	GCC	GTG	TCT	CTA	ATA	GAT
---	--C	---	G--	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	--T	---	---	---	---	---
1244																				1306
AAG	CAA	TCA	TGC	AAT	GTT	TTA	TCC	TTA	GAC	GGG	ATA	ACT	TTA	AGG	CTC	AGT	GGG	GAA	TTC	GAT
-G-	--C	---	---	---	--C	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	--C	---	---	---	--T
1307																				1369
GCA	ACT	TAT	CAG	AAG	AAT	ATC	TCA	ATA	CAA	GAT	TCT	CAA	GTA	ATA	ATA	ACA	GGC	AAT	CTT	GAT
---	---	---	--A	---	---	---	---	---	T-	---	---	---	---	---	G-G	---	---	---	---	--C
1370					*	*	*													1432
ATC	TCA	ACT	GAG	CTT	GGG	AAT	GTC	AAC	AAC	TCG	ATC	AGT	AAT	GCT	TTG	AAT	AAG	TTA	GAG	GAA
---	---	---	---	--C	---	---	--T	---	---	---	---	--A	---	---	---	--A	GT-	---	--G	---
1433								*	*	*										1495
AGC	AAC	AGC	AAA	CTA	GAC	AAA	GTC	AAT	GTC	AAA	CTG	ACC	AGC	ACA	TCT	GCT	CTC	ATT	ACC	TAT
---	-G-	---	---	T--	---	---	--T	---	---	---	--A	---	---	---	--T	---	---	---	--T	---
1496																				1558
ATC	GTT	TTG	ACT	ATC	ATA	TCT	CTT	GTT	TTT	GGT	ATA	CTT	AGC	CTG	GTT	CTA	GCA	TGC	TAC	CTA
---	-C-	--A	---	---	---	---	---	--C	--C	---	---	---	---	--T	---	--C	---	---	---	--G
1559																				1621
ATG	TAC	AAG	CAA	AAG	GCG	CAA	CAA	AAG	ACC	TTA	TTA	TGG	CTT	GGG	AAT	AAT	ACC	CTA	GAT	CAG
--A	---	---	---	---	--A	---	--T	---	---	--G	---	---	---	---	---	---	---	--G	GG-	---
1622																				1684
																*	*	*		
ATG	AGA	GCC	ACT	ACA	AAA	ATG	AGA	ACA	CAG	ATG	AGG	AAC	GAA	GGT	ATC	CCT	AAT	AGT	AAT	TTG
---	---	--T	--C	---	C--	T--	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1685																				1747
TGT	GAA	AGT	TCT	GGT	AGT	CTG	TCA	GTT	CGG	AGA	GTT	TAG	AAA	AAA						
1748																				1792

Fig. 7. Nucleotide sequences of F protein gene of NDV CBP-1 strain contained in pVL-NDF, compared with those of various NDV strains. Numberings in the left- and right- hand margins pertain to nucleic acid sequences. The consensus mRNA start site and polyadenylation signal are underlined. The cleavage site is indicated by the arrow. Line 1, 2, 3 and 4 show nucleotide sequences of the F protein of CBP-1, KJW, Texas GB and Beaudette C strains, respectively. A dash indicates an identical residue.

비교하면 CBP-1주는 절단부위가 R-R-Q-K-R로 나타나 velogenic type이며 비교적 병원성지수가 낮은 Texas GB와 mesogenic type인 Beaudette C주 (R-R-Q-K-R)와 일치하였다. 그리고 R-R-Q-R-R의 서열을 나타내고 velogenic type으로 분류되는 교정원주, Australian-Victoria, Hert, Edit 및 Italian주, G-R-Q-G-R의 서열을 가진 lentogenic type인 Lasota와

Hitchner B1주 그리고 무병원성이며 절단부위가 G-K-Q-G-R인 Queensland (V4), D26 및 Ulster주와는 각각 다른 성상을 나타내었다 [9,13,24,25,26].

NDV CBP-1주의 F protein gene의 염기서열과 아미노산서열을 다른 표준주와 비교한 결과를 종합해 볼 때 핑에서 분리된 후 SPF 부화계란에 3~5대 계대배양한 내열성 CBP-1주의 분자유전

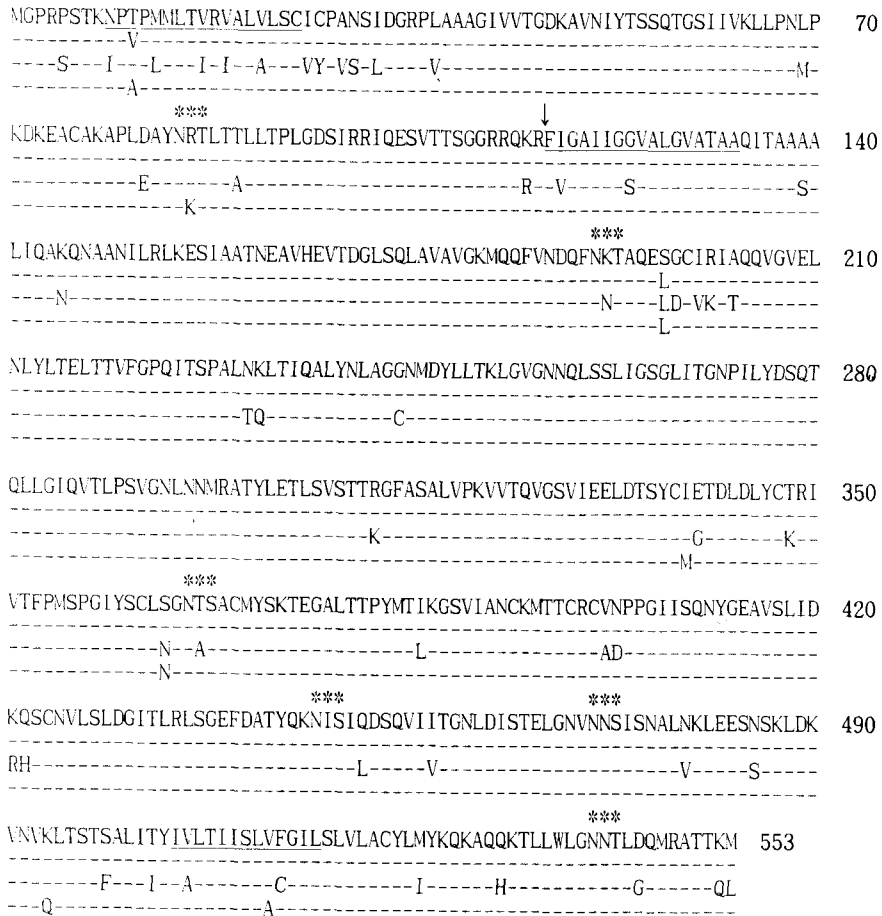


Fig. 8. A comparison of the deduced amino acid sequence of F protein of NDV CBP-1 with various NDV strains. Amino acid in the signal peptide, the N-terminal portion of the F1 protein, and the membrane-spanning region are underlined. The cleavage site is indicated by the arrow. The six potential asparagine-linked glycosylation sites where the consensus sequence (N-X-S/T) is used are denoted by asterisks. Line 1, 2, 3 and 4 represent the sequences of CBP-1, KJW, Texas GB and Beaudette C strains, respectively. A dash indicates an identical residue.

학적 특성은 *velogenic type* 중 비교적 병원성지수가 낮은 Texas GB [25] 및 *mesogenic type*인 Beaudette C주 [5,11]와 유사하다고 사료되었다.

한편 F protein gene의 아미노산서열을 분석한 바, N-asparagine-linked glycosylation site는 CBP-1주에서 6개로 나타나 국내에서 분리된 NDV주와 교정원주 [7], 그리고 LaSota 및 Hitchner B1주 [11]에서도 각각 6개가 인정되었다는 성적과 일치하였다. 또한 단백질구조에 중요한 역할을 하는 cysteine residues는 CBP-1주에서 13개가 관찰되어 아미노산서열 27에 cysteine이 없고 244와 514에 cysteine이 있어 14개의 cysteine을 나타낸 교정원

주 [7]와는 다르게 나타났으나 여타 국내분리주와는 일치되는 결과를 보였다 [7].

결론

뉴캐슬병에 이환된 병으로부터 분리한 Newcastle disease virus 내열성주 CBP-1의 envelope glycoproteins의 일종인 fusion (F) protein을 암호하는 유전자의 성상을 구명하기 위해, F 유전자를 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)으로 증폭, 클로닝하여 핵염기 및 아미노산서열을 분석하였으며 얻어진 결과는 다음과 같다.

RT-PCR 시험에서 결과 1707bp (1.7kb) 크기의 NDV F gene에 대한 cDNA를 증폭할 수 있었으며, NDV 농도별 PCR의 감수성을 비교한 바 혈구응집역가 2⁴HAU 이상일 때 특이 밴드가 나타났고, 2⁴HAU 이하에서는 관찰되지 않았다. 증폭된 F gene을 pVL1393 Baculo transfer vector의 BamHI site에 삽입하여 클론닝하여 확인하였다.

네 개의 primers 쌍을 이용하여 dye terminator cyclic sequencing법으로 1707bp의 F 유전자의 염기서열을 밝혔으며 이 결과를 교정원주, Texas GB주 및 Beaudette C주의 염기서열과 비교분석한 바 교정원주와는 88.8%, Texas GB주와는 98.5% 그리고 Beaudette C주와는 98.7%의 homology를 나타내었다. 또한 결정된 염기서열에서 추정하여 얻어진 553개의 F 단백질 아미노산서열을 교정원주, Texas GB주 및 Beaudette C주와 비교한 바 교정원주와는 89.9%, Texas GB주와는 98.7%, Beaudette C주와는 98.9%의 homology를 나타냈다. 그리고 protease에 대한 절단부위인 112-116 부위는 R-R-Q-K-R로 구성되어 있었고, 6개의 N-asparagine-linked glycosylation site와 13개의 cysteine 잔기가 인정되었다.

이 시험의 결과 NDV 내열성 CBP-1주의 F protein의 핵염기 및 아미노산서열은 교정원주보다 Texas GB주 및 Beaudette C주와 매우 유사한 것으로 인정되었다.

참 고 문 헌

1. Alexander DJ, Collins MS: The structural polypeptides of avian paramyxo-viruses. *Arch Virol* 67: 309-323, 1981.
2. Alexander DJ: Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In Calnek BW (Ed.) Diseases of poultry. 9th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 496-519, 1991.
3. Beard CW, Hanson RP: Newcastle disease. 452-470. In Hofstad (Ed.), Diseases of poultry, 8th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1984.
4. Boursnell MEG, Green PF, Campbell JIA, Deuter A, Peters RW, Tomley FM, Samson ACR, Chambers P, Emmerson PT, Binns MM: Insertion of the fusion gene from Newcastle disease virus into a non-essential region in the terminal repeats of fowlpox virus and demonstration of protective immunity induced by the recombinant. *J Gen Virol* 71: 621-628, 1990.
5. Chambers P, Millor NS, Emmerson PT: Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus. *J Gen Virol* 67: 2685-2694, 1986.
6. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.
7. Cho Sun H: Nucleotide sequences of fusion proteins of Korean isolates of Newcastle disease virus and photyping by reverse transcription-polymerase chain reaction. A thesis for MSc, Seoul Nat'l Univ, 1996.
8. Fenner FJ, Gibbs EP, Murphy FA, Rott R, Studdert MJ, White DO: Paramyxoviridae. 471-488. Veterinary virology. 2nd ed. Academic press Inc, SanDiego, 1993.
9. Glickman RL, Syddall RJ, Iorio RM, Sheehan JP, Bratt MA: Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. *J Virol* 62: 354-356, 1988.
10. Jacotot H, Vallee A, Le Priol A: Human conjunctivitis caused by laboratory infection with the virus of Newcastle disease. *Bull Acad Med* 134: 106-185, 1950.
11. Le L, Brasseur R, Wemers C, Meulemans G, Burny A: Fusion (F) protein gene of Newcastle disease virus: sequence and hydrophobicity comparative analysis between virulent and avirulent strains. *Virus Genes* 1: 333-350, 1988.
12. Lomniczi B: Thermostability of NDV strains of different virulence. *Arch Virol* 47: 247-255, 1975.
13. Morrison T, McQuain C, Sergel T, McGinnes L, Reitter J: The role of the amino terminus of F1 of the newcastle disease virus fusion protein in cleavage and fusion. *Virology* 193: 997-1000, 1993.
14. Ochi S, Hashimoto K: A new poultry disease in Korea. *Rep of Gun Inst Vet Res* 9-16, 1929.

15. **Park Keun S, Kim Sun J, Kim Soon J:** Bio-physical characters and antigenic relationship with special reference to the Korean strains of Newcastle disease virus. *Res Rept RDA* **30**: 56-65, 1988.
16. **Park Jeong W, Chang Kyung S, Jun Moo H:** Studies on incidence and isolation of Newcastle disease virus in pheasant flocks. *Kor J Vet Publ Hlth* **19**: 215-224, 1995.
17. **Park Jeong W, Chang Kyung S, Jun Moo H:** Studies on physicochemical and biological properties of Newcastle disease virus isolated from pheasants. *Kor J Vet Publ Hlth* **19**: 225-236, 1995.
18. **Park Jeong W, Chang Kyung S, Cho Sung W, Jun Moo H:** Pathogenicity and antigenic differences of Newcastle disease virus isolated from pheasants. *Kor J Vet Publ Hlth* **21**: 299-308, 1997.
19. **Park Jeong W, Chang Kyung S, Park Jong H, Kang Shien Y, Jun Moo H:** Production and characterization of monoclonal antibodies (MAbs) against a heat-stable Newcastle disease virus isolated from pheasants. *Kor J Vet Publ Hlth* **21**: 289-298, 1997.
20. **Park Jeong W, Chang Kyung S, Jong Yong S, Kim Kui H, Song Hee J, Jun Moo H:** Attenuation of a heat-stable Newcastle disease virus isolate (CBP-1) from pheasants by serial passages in chick-embryo. *J Vet Sci CNU* **5**: 53-61, 1997.
21. **Pennington TH:** Antigenic differences between strains of Newcastle disease virus. *Arch Virol* **56**: 345-351, 1978.
22. **Reitter JN, Sergel T, Morrison TG:** Mutational analysis of the leucine zipper motif in the new-castle disease virus fusion protein. *Virology* **69**: 5995-6004, 1995.
23. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T:** Molecular cloning, A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
24. **Schaper, UM, Fuller FJ, Ward MD, Mehrotra Y, Stone HO, Stripp BR, DeBuyscher EV:** Nucleotide sequence of the envelope protein genes of a highly virulent, neurotropic strain of Newcastle disease virus. *Virology* **165**: 291-295, 1988.
25. **Taylor J, Edbauer C, Rey-senelonge A, Bouquet JF, Norton E, Goebel S, Desmettre P, Paoletti E:** Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowlpox virus recombinant confers protection in chickens. *J Virol* **64**: 1441-1450, 1990.
26. **Toyoda T, Sakaguchi T, Imai K, Mendoza N, Inocencio B, Gotoh M, Hamaguchi, Nagai Y:** Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus. *Virology* **158**: 242-247, 1987.