

한국인 영아에서 분리된 G1 로타바이러스의 VP7 단백질 유전자 염기서열 및 발현

중앙대학교 의과대학 미생물학교실, 소아과학교실¹

김원용* · 송미옥 · 박철민 · 임성준 · 김기정 · 정상인 · 최철순 · 임인석¹

=Abstract=

Sequence Analysis and Expression of the VP7 Gene of G1 Rotavirus Isolated from an Infant in Korean

Won Yong Kim*, Mi Ok Song, Chul Min Park, Sung Joon Im, Ki Jung Kim,
Sang In Chung, Chul Soon Choi and In Seok Lim¹

Department of Microbiology, ¹Department of Pediatrics, Chung-Ang University
College of Medicine, Seoul 156-756, Korea

To determine the sequence and expression of the VP7 gene of Korean isolates (CAU-9), viral RNA was purified and used for cDNA amplification by RT-PCR. The VP7 cDNA was cloned, sequenced, and expressed using baculovirus expression system. The result showed that the sequence homologies CAU-9 compared with foreign isolated strains Wa, 417, TMC-II, 95B and SA11 were ranged from 74.0% to 95.1% of nucleotide sequence and 35% to 43% of amino acid sequence, respectively. High homology of CAU-9 was observed in Japanese isolates 417 (nucleotide sequence homology was 95.1% and amino acid sequence homology was 43%). To express VP7 gene, the VP7 cDNA was cloned into pCR-Bac vector and inserted into the genome of baculovirus adjacent to the polyhedrin promoter by cotransfection of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells with wild type baculovirus DNA. In antigenic analysis of Sf9 cells inoculated with the recombinant VP7, immunofluorescence assay revealed positive for viral antigens. In metabolic labeling of Sf9 cell lysates infected with recombinant baculoviruses, it was revealed that the protein of 34 kDa was expressed. The limited study of expressed VP7 protein inoculated with guinea pigs failed to elicit neutralizing antibody. As a results, the sequence analysis and expression of VP7 protein of rotavirus CAU-9 isolated from an infant in Korea could permit the conformation and development of virus like particles which may be useful in designing vaccine strategy.

Key Words: Human rotavirus, VP7, RT-PCR, Nucleotide sequence, Baculovirus expression

서 론

로타바이러스는 탈수증을 유발하여 생명을 위

협하는 영유아 장염의 가장 중요한 원인체로서
의료체계가 미비한 중남미를 비롯한 개발도상국
에서는 연간 약 100만명의 영유아 사망을 초래한
다 [12]. 국내에서는 가성콜레라로 불리우는 가장

접수 : 1998년 9월 10일

Corresponding Author: Won Yong Kim, Department of Microbiology, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul 156-756, Korea. Tel: +82-2-860-5685, Fax: +82-2-812-5495, e-mail: kimwy@dragonar.nm.cau.ac.kr

흔한 소아 설사유발 원인체로서 사망율은 낮으나 급성장염으로 중합병원에 입원하는 소아군의 70%에서 감염 원인체이다 [3, 43, 44].

로타바이러스는 레오비리데과에 속하는 이중 나선 RNA 바이러스로서 11개의 이중 RNA 절편을 지놈으로 가지고 있다 [52]. 이중 캡시드라고 불리는 3겹의 단백질막 중 바깥쪽 피막은 당단백인 VP7 단백질과 VP4 단백질로 구성되어 있으며 바이러스의 중요한 면역원성과 관계한다 [59, 82]. 중간피막은 전체 비리온의 약 51%를 차지하며 균 및 아군의 공통항원을 소유하는 VP6 단백질이며, 핵내에는 RNA결합 구조단백인 VP1, VP2, VP3와 11개의 RNA 절편들이 들어 있다 [45, 48, 76].

로타바이러스는 VP6 단백질의 항원형에 따라 현재까지 A에서 G까지의 7개의 혈청군으로 분류된다. A 혈청군은 다시 VP7과 VP4에 의하여 각각 G와 P 혈청형으로 분류되고 있으며, 각 단백질은 중화화체를 생산하여 바이러스의 중요한 면역원성에 관여한다 [26]. Group A 로타바이러스는 현재까지 14종류의 G형 [15, 16]과 18종류의 P형 [67, 73]이 사람을 포함하는 동물계에 분포되어 있는데, 사람에서는 G1-G4, P8, P4가 흔히 분리된다 [26].

사람 로타바이러스와 동물 로타바이러스 사이에서는 RNA 단편들의 빈번한 교환으로 유전자 재조합과 유전자 재배열이 발생하여 변이형 로타바이러스가 생성된다 [26, 71]. 따라서 이러한 항원적 변이는 백신개발이 어려운 이유가 되며 각 국가와 지역에서 지속적인 바이러스 유전자의 규명이 요구되는 원인이 된다. 또한 로타바이러스에서 각 혈청형간은 서로 교차방어가 되지 않으므로 한 혈청형의 로타바이러스에 감염되었다 회복되더라도 다른 혈청형의 감염에 대한 방어능이 형성되지 않기 때문에 현재까지 효과적인 백신이 없는 실정이다. 최근에는 국소 장점막면역의 형성이 가능한 경구용 생백신의 개발에 초점이 모아지고 있으나 경구용 생백신 또는 동물-사람 재조합백신은 아직까지 다른 혈청형의 감염에 대하여 충분한 방어능을 보여주지 못하고 있다 [18, 42]. 현재 미국에서 개발되어 효능시험 중인 생백신은 14종의 G혈청형 중 세계적으로 가장 높은 발생율을 보이고 있는 동물/사람 G1-G4를 혼합한 4가 재조합백신이다 [9, 61]. 그러나 최근에 동물에서만 분리된다고 믿어졌던 G5, G6 및 G10형이 사람 신생아에서 질병을 유발하였으며 [22, 34, 35],

P형도 개와 고양이의 로타바이러스인 P13이 이스라엘, 미국, 브라질의 유아들에서 검출된 바 있다 [46, 55, 74]. 또한 소 로타바이러스의 유전자형인 P11 (B223)이 인도의 신생아에서 분리 보고되었다 [69].

최근에는 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 로타바이러스의 여러 혈청형을 동시에 공유하며 생백신과 동등한 면역원성을 지니나 안전하고 손쉽게 대량생산 할 수 있다는 장점이 있는 아단위백신의 개발에 박차를 가하고 있다. 그리하여 현재 세계 각국에서는 백신개발을 위한 기초연구로서 자국에서 분리되는 로타바이러스의 유전자 염기서열 분석 및 발현연구를 수행하고 있으며 [20, 27] 이를 기초로 하여 유전공학기법을 이용하여 baculovirus에서 면역원성 단백을 발현하고 자국에서 만연하는 혈청형의 혼합백신을 생산하여 질병을 예방하려는 노력을 경주하고 있다 [54, 60]. 국내에서의 로타바이러스에 대한 분자생물학적 연구는 국내에서 분리된 바이러스의 혈청형 조사 및 지놈의 전기영동 형태에 관한 기초연구가 수행되어 G1 혈청형이 가장 널리 존재하나 새로운 전기영동 형태를 나타내는 변이주가 빈번히 출현됨이 보고되었다 [1, 2]. 그러나 아직까지 백신개발을 위한 체계적인 유전자 분석과 면역원성 단백질의 발현에 대한 연구는 아직까지 수행된 바 없다.

본 연구에서는 국내 환자로부터 분리한 G1 혈청형 로타바이러스를 대상으로 로타바이러스에서 가장 주요한 면역원성 인자인 VP7 외피 단백질 유전자를 중합효소연쇄반응으로 증폭하고 염기서열 규명을 통한 한국 분리주와 외국 분리주간의 유전적 유연성을 규명하며, 백신과 진단키트를 개발하기 위한 기초연구로서 baculovirus 발현 시스템을 이용하여 곤충유래 세포인 Sf9 세포에서 VP7 단백을 발현하고 면역형광검정법 및 대사표지법으로 발현 유무를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 분변재료

로타바이러스는 중앙대학교 용산병원 소아과에 설사증으로 내원한 8개월령 여자영아 환자의 분변으로부터 VP6 단세포균향체를 이용한 효소 면역측정법으로 항원을 확인한 후 바이러스를 분리하여 CAU-9주로 명명하고 실험에 사용하였다. 로타바이러스의 분리 및 정제는 Nakagomi등 [55]

Table 1. RT-PCR primer sequences for VP7 amplification

Gene	Primer sequences (5'-3')	
	Sense	Antisense
VP7	AAATGATAACCATCTCGC	GTCCAAGTTTCCCTG

의 방법에 따라 분변재료를 5배의 PBS에 현탁하고 0.22 μ m의 filter를 사용하여 여과한 다음 0.5% pancreatin이 첨가된 MA104 cell (continuous monkey kidney derived cell line)에 감염하여 5% CO₂ 배양기에서 세포병변효과가 나타날 때까지 회전 배양하였다. 증식된 바이러스는 2~3회 계대한 다음 40% sucrose 완충액에서 25K로 SW28 rotar (Beckman, USA)를 이용하여 2시간 동안 초원침하여 정제하였다. 대조 바이러스로는 G1 혈청형의 사람 로타바이러스인 10주와 G4 혈청형의 돼지 로타바이러스인 Gottfried주를 충북대학교 수의과대학 미생물학교실로부터 분양받아 사용하였다.

2. 바이러스 RNA 분리

로타바이러스 RNA는 Gentsch 등 [32, 33]의 방법에 따라 추출한 다음 RNaid kit (Bio101, USA)를 사용하여 정제하였다. 정제한 RNA는 DEPC water에 용해하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

3. Primer 제작

로타바이러스 VP7 전체 유전자를 지배하는 oligonucleotide primer는 미국 GenBank에 등록된 Gottfried (Genbank Assesion No. M33515)를 기초로 하여 제작하였으며 서열은 Table 1과 같다.

4. RT-PCR에 의한 cDNA 합성

로타바이러스 VP7 단백을 지배하는 cDNA의 합성은 Gouvea 등 [35]의 방법에 따라 수행하였다. 먼저 추출한 바이러스 이중나선 RNA 5 μ l에 2 μ l의 DMSO (Sigma, USA)를 가하고 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하여 변성하였다. 여기에 반응액으로 10X Taq buffer 10 μ l, 2.5mM dNTPs 8 μ l, 1.25mM MgCl 10 μ l, D.W. 62 μ l, 10 μ M Sense primer 1 μ l, 10 μ M Antisense primer 1 μ l 및 AMV reverse transcriptase (Promega, USA)와 Taq polymerase (Promega, USA)를 각 0.5 μ l씩 가하고 42 $^{\circ}$ C에서 30분

간 반응하여 first strand cDNA를 합성하고 94 $^{\circ}$ C 1분, 42 $^{\circ}$ C 1분30초, 72 $^{\circ}$ C 3.5분간 반응을 30회 반복한 다음 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응하여 VP7 유전자를 증폭하였다. 증폭한 PCR product는 1% LE agarose gel (FMC, USA)을 이용하여 0.5 x TAE buffer (45mM Tris-acetate, pH 8.3, 1.0mM EDTA)하에서 100V로 1시간 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 다음 자외선하에서 증폭 유무를 관찰하였다.

5. Baculovirus 발현 vector로의 클로닝

로타바이러스 VP7 유전자의 염기서열의 분석 및 baculovirus에서의 발현을 위하여 RT-PCR로 증폭한 VP7 유전자를 Fig. 1에서와 같이 Baculovirus TA clonig kit (Invitrogen, USA)를 사용하여 pCR-Bac vector로 클로닝하고 *E. coli* TOF' competent cell로 형질전환하였다. *E. coli* 배양액은 37 $^{\circ}$ C에서 220rpm으로 1시간 동안 진탕배양한 다음 ampicillin (50 μ g/ml)을 함유하는 LB plate (Sigma, USA)에 도말하고 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 배양하였다. 성장한 집락은 5ml의 LB broth (Sigma, USA)에 접종하고 37 $^{\circ}$ C에서 220rpm으로 16시간 진탕배양한 다음 클로닝 유무를 조사하기 위하여 Birnboim과 Doly [10]의 alkaline lysis method로 plasmid를 분리하고 30 μ l의 TE buffer (pH 8.0)에 용해하였다. 분리한 DNA는 제한효소 *EcoRI*과 *BamHI*을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 절단하고 1.0% LE agarose gel (FMC, USA)에서 1시간 동안 전기영동하여 클로닝 유무를 관찰하였다.

6. DNA 염기서열 결정

로타바이러스 CAU-9주의 VP7 cDNA 염기서열 분석은 Sanger 등 [66]의 dideoxy nucleotide chain termination method를 이용하여 Sequenase Version 2.0 (Amersham, UK)으로 수행하였으며 primer로는 polyhedrin forward primer (5'-AAATGATAACCATCTCGC-3') 및 polyhedrin reverse primer (5'-GTCCAAGTTTCCCTG-3')를 사용하였다. VP7 유

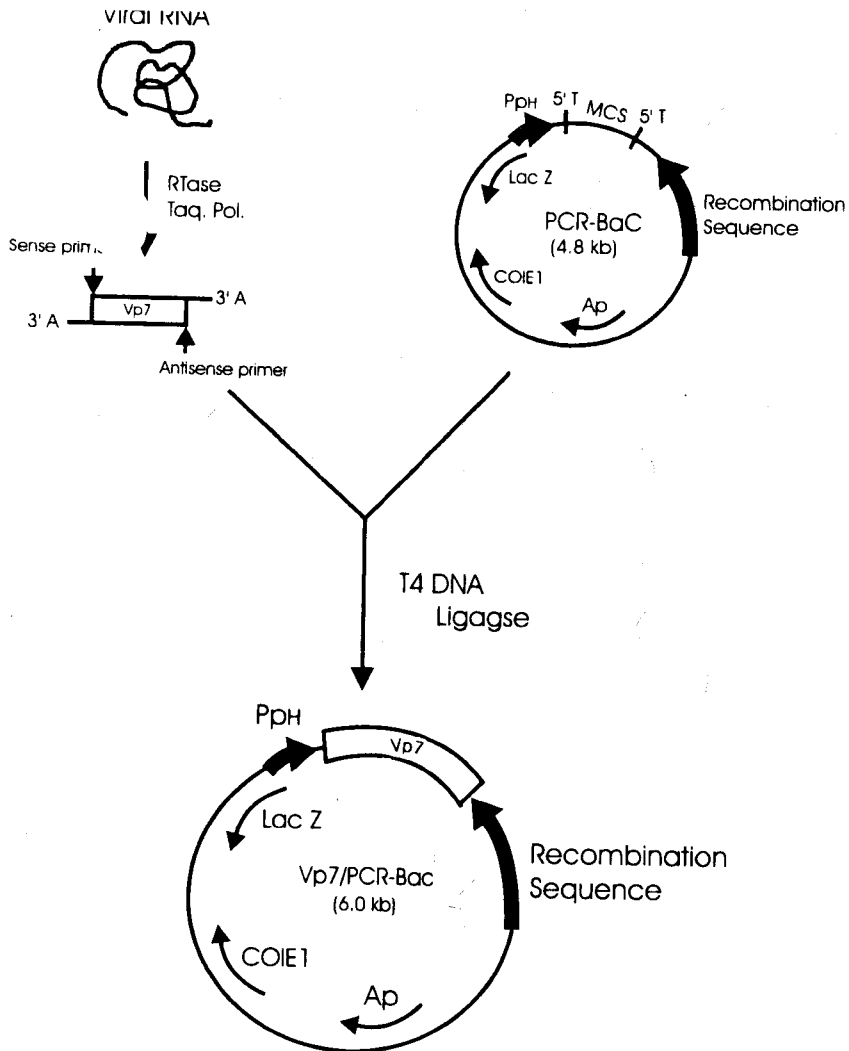


Fig. 1. Construction of the recombinant transfer plasmid VP7-pCR Bac. The full length PCR product (1,062bp) was amplified using ssRNA as the starting template. The CAU-9 VP7 cDNA was cloned into the transfer vector pCR-Bac. In the resulting recombinant plasmid, VP7-pCR Bac, the CAU-9 VP7 cDNA was placed under the transcriptional control of the baculovirus polyhedrin promoter (P_{PH}).

전자의 염기서열은 LAZERGEM program (DNA-STAR, USA) 및 Clustal W (1.7) program을 이용하여 외국에서 Genbank에 보고된 사람 로타바이러스로서 G1 혈청형의 Wa [62] (Genbank Accession No. K02033), 417 (Genbank Accession No. D16328), G2 혈청형의 TMC-II [79] (Genbank Accession No. D50127), 95B [58] (Genbank Accession No. U73956) 및 원숭이 로타바이러스인 G3 혈청형의 SA11 [14] (Genbank Accession No. V01190)주들의 VP7 유전자와의 상동성, 분자진화도 및 계통수를 작

성하였다.

7. Sf9 세포의 상호 유전자감염

발현을 위한 baculovirus 및 Sf9 세포는 미국 Invitrogen사에서 구입하였으며 Summers와 Smith [70]의 방법에 따라 사용하였다. 재조합 baculovirus transfer vector는 Bac-N-blue Transfection kit (Invitrogen, USA)를 사용하여 Bac-N-blue wild type DNA와 함께 Sf9 cell로 cotransfection하였다. 먼저 4µg의 재조합 plasmid DNA에 Bac-N-blue wild type

DNA 10 μ l, Grace's insect media (w/o FBS) 1ml, Insect liposome 20 μ l를 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 15분간 반응하였다. 여기에 2ml의 Grace's insect media (w/o FBS)를 가하고 60mm 세포배양접시에서 배양한 Sf9 세포에 한방울씩 떨어뜨린 다음 4시간 동안 혼합하고 Grace's insect media (w/FBS) 1ml을 가하고 27 $^{\circ}$ C에서 72시간 동안 배양하였다.

8. 재조합 baculovirus 선별 및 고역가액 제조

상호유전자 감염용액에서 재조합 baculovirus를 선별하기 위하여 O'Reilly 등 [57]의 방법에 따라 플라크 검정을 실시하였다. 먼저 십진희석한 상호유전자 감염용액을 미리 100mm 세포배양접시에서 배양한 Sf9 세포에 감염하고 30분간 배양한 다음 배양액을 제거하고 여기에 47 $^{\circ}$ C의 2.5% agarose (Seaplaque, FMC) 5ml, TNM-FH media 5ml 및 15 μ l의 X-gal (50mg/ml)을 가하고 실온에서 굳힌 다음 27 $^{\circ}$ C에서 8일간 배양한 다음 형성된 plaque 중 푸른색의 플라크만을 선별하였다. 선별한 plaque은 Sf9 세포에 0.1-1 m.o.i로 감염한 다음 27 $^{\circ}$ C에서 7~8일간 정지 배양하고 세포 및 배양액을 회수한 다음 1,500g에서 15분간 원침하여 얻은 상청액을 고역가 재조합 baculovirus액으로 하여 4 $^{\circ}$ C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

9. 면역형광검정

Sf9 세포에서 로타바이러스 CAU-9주의 VP7 단백질의 발현을 조사할 목적으로 재조합 baculovirus pVP7을 감염한 Sf9 세포를 acetone과 metanol로 고정시킨 후 Wa 로타바이러스에 대한 고도면역 항혈청 (미국 오하이오주립대 Dr. Linda J. Saif로부터 입수)과 형광물질 표지 가토항 기니픽 혈청을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 배양하고 형광물질이 표지된 세포를 형광현미경으로 관찰하였다.

10. 재조합 단백질의 대사표지

전기영동을 이용하여 Sf9 세포에서 발현된 로타바이러스 CAU-9주의 VP7 단백질 fraction을 조사할 목적으로 Harlow와 Lane [39]의 방법에 따라 발현된 단백을 대사표지 하였다. 먼저 methionine이 결핍된 Grace media (GIBCO, USA)에서 Sf9 세포를 배양하여 단층을 형성하고 재조합 baculovirus pVP7를 5-10 m.o.i로 접종하였다. 접종 후 27 $^{\circ}$ C에서 6시간 동안 배양하고 [35 S]-methionine

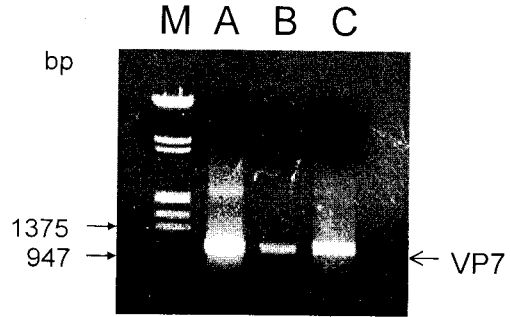


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of representative 1,062bp of PCR amplification products with oligonucleotide primers. M indicates molecular weight marker III (Boehringer Mannheim, USA). Lane A to C represent CAU-9, 10 and Gotfried strain, respectively.

(Amersham, UK)을 가하여 48시간 동안 더 배양한 후 1,500g에서 15분간 원침하여 세포를 회수하고 회수한 세포는 PBS로 3회 세척하였다. 발현된 단백질의 분석을 위하여 세포에 RIPA buffer (150mM NaCl, 1% Sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 7.2)를 가하고 SDS-PAGE하였다. Gel은 Whatman 3MM paper로 옮겨 gel dryer (Hoefer, USA)에서 2시간 건조하고 BioMax X-ray film (Kodak, USA)과 intensifying screen (Kodak, USA)을 사용하여 -70 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 자가방사한 다음 X-ray film 현상기 (Konica, Japan)에서 현상하였다.

결 과

1. VP7 유전자 증폭

국내 환자로부터 분리한 로타바이러스 CAU-9주의 RNA로부터 VP7 단백질 유전자를 RT-PCR을 이용하여 증폭하고 agarose gel에서 전기영동한 결과 Fig. 2에서와 같이 1,062bp 크기의 PCR product가 증폭되었다. 대조 로타바이러스로 사용한 10주 및 Gotfried주에서도 같은 크기의 VP7 유전자가 증폭되어 증폭된 PCR product가 VP7 유전자임을 확인할 수 있었다.

2. 뉴클레오타이드 및 아미노산분석

국내의 영아로부터 분리한 로타바이러스 CAU-9주의 VP7 단백질 유전자의 변이를 조사할 목적으로 클로닝한 CAU-9주의 VP7 유전자의 염기서열을 분석한 결과 CAU-9의 VP7 유전자 크기는 1,062bp

김원용 등: 로타바이러스 VP7 단백질의 유전자 분석과 발현

```

0                                     60
417  GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGGCTAACGGTTAGCTCCTTTTGATGATGGTATT
CAU-9  -----A-----
WA     -----A-----
SA11   -----T-----G-----A-----
TMC-II -----AC-----G-----T-----A-----
95B    -----AC-----G-----T-----A-----

241                                     300
417  GAATATAACCACAATTCTAATCTTTCTGATATCAATCATTCTACTCAACTATATATAAAA
CAU-9  -----
WA     -----T-----
SA11   -----G-----C-----G-----T-----A-----T-----C-----C-----T-----
TMC-II -----G-----C-----A-----T-----T-----AT-----T-----A-----T-----
95B    -----G-----C-----A-----T-----T-----AT-----T-----G-----T-----

61                                     120
417  TCAGTGACCCGAATAATGGACTACATTATATATAGATTTTTATTAATTTCTGTAGCATTAA
CAU-9  ---A---T-----G-----
WA     ---T-----G---G---A-----
SA11   ---T---A---TA-----GT---A---T-----GC---T---T---AAT---GAT---G
TMC-II A-TA-A-TAAT-CG-----A-T-TC-----C-C-CAT-CTCTGA--
95B    A---A-TAAT-C-----A-C-----C-G-CA---CTTGA--

181                                     240
417  TTTGCCTTAACTAAAGCTCAGAACT-ATGGACTTAATATACCAATAACAGGATCAATGGA
CAU-9  -----A-G-----A-T-----AT-----
WA     ---T---G---A-G-----T-----CT-----
SA11   -CAC-A-TCTC-G---A-A-T---TA---C-T---C---C-C---
TMC-II -CAC-A-GTA-GGA-A-CA-T---CA-ATG-T-----G---C-A--
95B    -CAC-A-TG---G-A-A-A-T---CA-ATA-T-----G---C-A--

241                                     300
417  CACTGTATACTCCAACCTCTACTCAAGAAGGAATATTTCTAACATCCACATTATGTTTGTA
CAU-9  -G-A---TA-T-----G-G-----T-T-G---C---
WA     -G---TA-T-----G-G-----T-T-G---C---
SA11   ---C---G-T-T-A-G-----AC---C-C-T-T-AC-T-CC-A--
TMC-II -G---TA-G-T-A---AGT-G---TC-----T---GC-A---A--
95B    -G---TA-G-T-A---AGT-G---AC-----T---AC-A---A--

```

```

301                                     360
417   TTATCCAAGTGAAGCAAGTACTCAAATCAGTGATGGTGAATGGAAAGACTCATTATCACA
CAU-9   -----A-----
WA      -----A-----C-----G--
SA11    -----G-----G--TGCG--G---A-AC---AA-TC-----A-C-----
TMC-II  C-----A-----T-AA-A-G-G--TTCA---A-----G--A-TA-TC-A----
95B     C-----G-A-----T-AA-A-G-G--TTCA---A-----G--A-TA-TC-A----

361                                     420
417   AATGTTTCTTACAAAAGGTTGGCCAACAGGATCAGTCTATTTTAAAGAGTACTCAAATAT
CAU-9   -----
WA      -----G-----T-T-C-----
SA11    -C-A-----G-----G-----T---C-A-----A-TA-T-C--
TMC-II  -T-A-----A-T-----A-----G-T-----T-----C--AATG---
95B     -T-A---T-A-T---A-----A-----T-----C--AATG-C--

421                                     480
417   TGTGATTTTTCCGTTGATCCACAATTATATTGTGATTATAACTTAGTACTAATGAAGTA
CAU-9   -----C-----
WA      -----T---C-----GC-G-----C---T-----T---A--
SA11    --CATCG---T-----G-G-G-----G-----A--
TMC-II  -AC-ACA---TA-GA-----AC-G-----TG-----G---GA--
95B     -AC-ACA---A-GA-----AC-G-----TG---T---GA--

481                                     540
417   TGATCAAAATCTGAACTAGATATGTCAGAATTAGCTGATTTGATATTGAATGAATGGTT
CAU-9   -----C-----N-----
WA      --C---G-----T-----G-----A-----
SA11    ---CGCG-CGT-GC-T-G-----C-T-G---C-A---A-C-----
TMC-II  ---A-T-CATC---T---GCA-G-G---A---C-T-----C-
95B     ---A-T-CGTC---T---GCA-G-A---A---C-T-----C-

541                                     600
417   ATGTAATCCAATGGATATAACATTATATTATTATCAACAATCGGGAGAATCAGATAAGTG
CAU-9   -----G-----A-----
WA      -----C-----G-----C-----A-----
SA11    G-----T---TC-G-----G---A---AC---G-GA---A--
TMC-II  G-----T-----T-C-C-C-----G---AG-A-C---A---A--
95B     G---C-T---G-T-C---C-----G---AG-A-C---A---A--

```

김원용 등: 로타바이러스 VP7 단백질의 유전자 분석과 발현

	601	660
417	GATATCAATGGGATCATCATGTACTGTGAAAGTGTGTCCACTGAATACACAAGCGTTAGG	
CAU-9	-----G-----A-G-----GT-----T-A-----	
WA	-----G-----C-----G-A-----A-----	
SA11	-----C-----AA-T---A---T-----A-TC-T--	
TMC-II	-----A-GAC-C-G-A---T-C-G-C-----G-A-T---	
95B	--T-----A-TGAT-C-A-A---T-C-A-T-----A-----	
	661	720
417	AATAGGTTGTCTAACAACGAATGTAGACTCATTGAAACGGTTGCTGAAAATGAAAAATT	
CAU-9	-----A-----A-----N--	
WA	G-----A---A-C-----T-A---G---G---	
SA11	---T--A-CT-G---TG--C--C-A-T---GAA---C--C-GC---G--	
TMC-II	---T--A-CAA---T-AG---GA-TA---G-TT---GTCGTC-----	
95B	---T--A-CAA---T--G---GAGTA---G-TA---GTCGTC-----	
	721	780
417	AGCTATAGTGGATGTCGTTGATGGGATAAATCATAAAATAAATTTGACAACACTACGACATG	
CAU-9	G-----A-----	
WA	-----A-----	
SA11	G-TA--TACT--C-G-----CG-T-----GC-GG-G-C---AGCA-G--	
TMC-II	G-TA--TACT--C--T-AA---TG-T-----G-----A-TT---TA-GT-G--	
95B	--TA--TACT--C--T-AA---TG-T-----G-----A-TT-----G--	
	781	840
417	TACCATTCTAAATTGTAAGAAGTTAGGTCCAAGAGAGAATGTAGCTATCATACAAGTTGG	
CAU-9	---T---G-N-----G-----	
WA	---T---G-----A-----A-----G-A-----	
SA11	---T---AG--C-----A-G-A-----A-C---CG-T-----	
TMC-II	---T--A-GT--C--C--T-AC---A--C---A---T---A-T-----	
95B	---T--A-GT--C---C-A---A--C---A---T---A-T-----	
	841	900
417	TGGCTCTAATATATTAGACATAACAGCGGATCCAACGACTAATCCACAAATTGAGAGAAT	
CAU-9	-----	
WA	---T-----G-G-----A-----A-----C-----	
SA11	---T---G-C--CC-C-T---T-T-----T--GCA---G-CA--AC-G--	
TMC-II	---AA-CG-ACG-----T-T-T-T-----A-AGT---GGTTC-A-----	
95B	C--AC-GA--GC-----T-C-T-T-----A-AGT-----C-A-----	

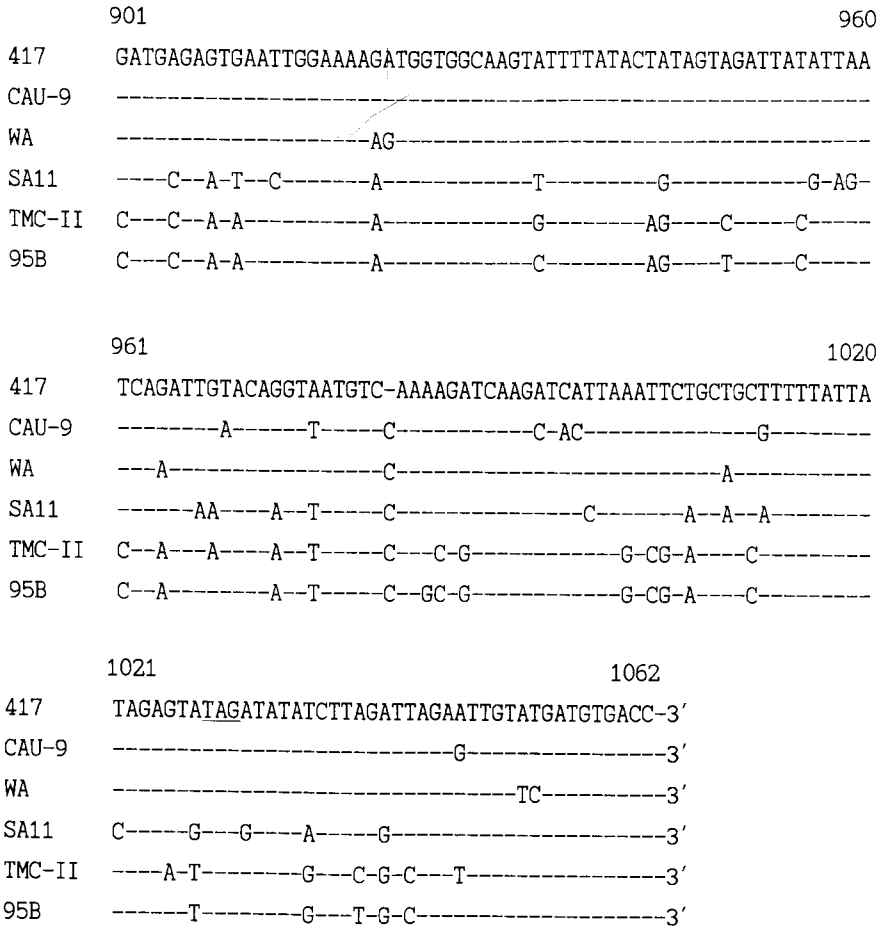


Fig. 3. Complete nucleotide sequence multialignment of the VP7 gene of CAU-9, Wa, 417, TMC-II, 95B and SA11 strains using CLUSTAL W (1.7). The initiation and termination codons were underlined.

Table 2. Homology percentage of rotavirus VP7 gene nucleic acid sequences among CAU-9, Wa, 417, TMC-II, 95B and SA11 strains

	CAU-9	Wa	417	TMC-II	95B
CAU-9					
Wa	93.1				
417	95.1	92.2			
TMC-II	74.0	74.7	73.6		
95B	74.9	75.2	75.0	95.2	
SA11	76.2	76.3	76.5	75.2	75.8

로서 Genbank에 보고된 외국의 Wa, 417, TMC-II, 95B 및 SA11주의 크기와 일치하였다. CAU-9 VP7 유전자는 염기서열의 5'말단으로부터 49-51과 136-138의 부위에서 시작되는 2개의 open reading fr-

ame를 가지고 있었으며 종결코돈은 1027-1029에 위치하였다. 49-51에 위치하는 처음 개시코돈인 ATG (TTAATGT)와 136-138의 2차 개시코돈인 ATG (ATAATGG)는 다른 외국 유래 로타바이러스 모두에서 불변부위이었다 (Fig. 3). CAU-9주 VP7 유전자의 염기서열을 Wa, 417, TMC-II, 95B 및 SA11주의 VP7 유전자 서열과 multialign하여 각 바이러스주간의 유전자 상동성을 비교한 결과 CAU-9주 VP7 유전자의 상동성은 417, Wa, TMC-II, 95B, SA11주과 각각 95.1%, 93.1%, 76.2%, 74.9%, 74.0%까지로 나타났다. 이중 상동성이 가장 높은 것은 417주로서 95.1%이었으며 가장 낮은 것은 TMC-II주로서 74.0%이었다. 상동성의 순서는 높은 순으로 417, Wa, SA11, 95B 및 TMC-II 순으로 나타났다 (Table 2).

김원용 등: 로타바이러스 VP7 단백질의 유전자 분석과 발현

	0	60
417	MYGIEYTTTITIFTMSIITTNMYLKSIVTRMMDYIMYRFL LISVALFALTKAQNYGTNMPMT	
CAU-9	-----M-----R--KLW-ITNNR	
WA	-----L-----T-----R-----L---	
SA11	-----V-T-----T--L----CMI--LTFMI-M-SPF-R-----I-T-I-	
TMC-II	-----TIL---MLL-----TM-NT---MIF---TTIATMSPFVRTP---MYL---	
95B	-----TIL---MLL-----M-NT---MI----TVI-TMSPFVRT---MYL---	
	61	120
417	GSMDTVVSNSTQEGMFTTSTLCLYYPT EASTQISDGEWKDSL SQMFTTKGWPTG SVYFKE	
CAU-9	INGRYM-TY-RRS***VSNFYVMSVLSNW-KYSNQWW-MERTIIITNVS YKRLANRISTFR	
WA	----A-T----EV-----T-----N-D-----	
SA11	----A-A----ET----T-T-----A-EMN-NS---TT--T-----	
TMC-II	--T-A--T---SGES-----T-----KNE---D--ENTT--L-----D	
95B	--T-A--TN--SGET-----T-----A--KNE---D--ENTT--L-L-----D	
	121	180
417	YSNIVDFSVDPQLYCDYNLVTMKYDQNTETETDMSELADLMLNEWLCNPMDMTLYYYQGSGE	
CAU-9	VTKYCW-FRW-*TIMLWLTS-NEVWSKSW-RYVRISRFDID-----V-----	
WA	-----T-----S-L-----V-----	
SA11	-T--AS-----V-----ATLQL---T--T-----I-T---TD-	
TMC-II	-ND-TT--MN--T---V--R--NTS-L-A---T---T---ST---S-	
95B	-ND-TT--MN--T---V-L-R--NTS-L-A---T---T---VST---S-	
	181	240
417	SDKWMSMGSSCTVKVCPTNTQALGMGCTTTNVD SFETVAENEK LAMVDVVDGMNHKMN*L	
CAU-9	-N-----L--*T---Q-----NWTWMSLMEI-KIWQTRH	
WA	-N-----T---Q-----MI-----*-	
SA11	AN-----I-----TTGI--L--DATT--E--TA---VIT---V---TD*V	
TMC-II	-N-----TD-----RT--I--K--D-NT--I--SS--FT-RN*CNKTGPRE-*V	
95B	-N--I---TD-----T--I--K--D-ST--M--SS---VIT---N-V-----*I	

	241	300
417	TTTTCTITN***CKKLGPRENVAIMQVGGSNMLDMTADPTTNPQIERMMRVNWKRWQVF	
CAU-9	V-FELEVRSKRE-SCHTSWWTYIRHNS-SNDSTNWEN-ES***EL-K-VAS**ILYYSRL	
WA	-----R-***-----V-----V-----T-----K-----	
SA11	--A---R-***-----V-----DIT-----A--T---I---K-----	
TMC-II	AMIQVGVITDV*VNGVNHKM-ISMSTC-*P-A--I-----V--VQ-I--M---K-----	
95B	SMS---MR-***-N-----MI---P-A--I-----V---Q-I--M---K-----	
	301	330
417	YTMVDYINQIVQVMSK*DQDHITTTTFIME*	
CAU-9	-S***-WTGYVQKIKTTKFCVLLS*****	
WA	-----RSRSLNSAA-YYRV	
SA11	--V---VD-MM-----RSRSTNSAA-YYRV	
TMC-II	--V-----M-----RSRSLDAAA-YYRI	
95B	--V-----RSRSLDAAA-YYRV	

Fig 4. Complete amino acid sequence multialignment of the VP7 gene of CAU-9, Wa, 417, TMC-II, 95B and SA11 strains using CLUSTAL W (1.7).

VP7 유전자를 open reading frame을 기초로 하여 번역한 결과 5'말단의 49번째 뉴클레오티드로부터 개시되는 ATG 개시코돈으로부터 332개의 아미노산이 합성됨을 추정할 수 있었다 (Fig. 4). 아미노산 서열의 상동성을 417, Wa, TMC-II, 95B, SA11주와 비교한 결과, 각각 43%, 42%, 35%, 35%, 37%로 나타났다 (Fig 4). 이 중 상동성이 가장 높은 것은 417주로서 43%이었으며, 가장 낮은 것은 TMC-II 및 95B주로서 35%이었다. 상동성의 순서는 높은 순으로 417, Wa, SA11, 95B 및 TMC-II 순으로 나타났다 (Table 3).

5. 계통수 분석

CAU-9주의 VP7 유전자의 분자진화도를 조사할 목적으로 VP7 유전자의 염기서열을 기초로 하여 417, Wa, SA11, 95B 및 TMC-II주와의 분자진화도를 Clustal W (1.7) program으로 분석한 결과 3개의 군으로 분류되었다 (Fig. 5). 국내에서 분리한 G1 혈청형의 로타바이러스 CAU-9주는 외국 G1 혈청형의 로타바이러스와 가장 밀접한 유연

Table 3. Homology percentage of rotavirus VP7 gene amino acid sequences among CAU-9, Wa, 417, TMC-II, 95B and SA11 strains

	CAU-9	Wa	417	TMC-II	95B
CAU-9					
Wa	42				
417	43	88			
TMC-II	35	63	58		
95B	35	71	65	83	
SA11	37	75	69	61	69

적 상관관계를 보였다. CAU-9주는 외국 유래 G1 혈청형과의 비교에서 미국유래 WA주보다 일본 유래 417주와 밀접함을 알 수 있었다. 다음으로는 원숭이 유래 로타바이러스인 G3 혈청형의 SA11와 밀접한 상관관계를 나타내었으며 G2 혈청형의 95B 및 TMC-II주와는 가장 떨어진 유전적 상관관계를 나타내었다.

6. 면역형광검정법에 의한 발현 VP7 단백질의 확인

Sf9 세포에서 로타바이러스 CAU-9주의 VP7 단백질의 발현을 조사할 목적으로 재조합 baculovirus 고역가액을 Sf9 세포에 5-10 m.o.i로 감염시키고

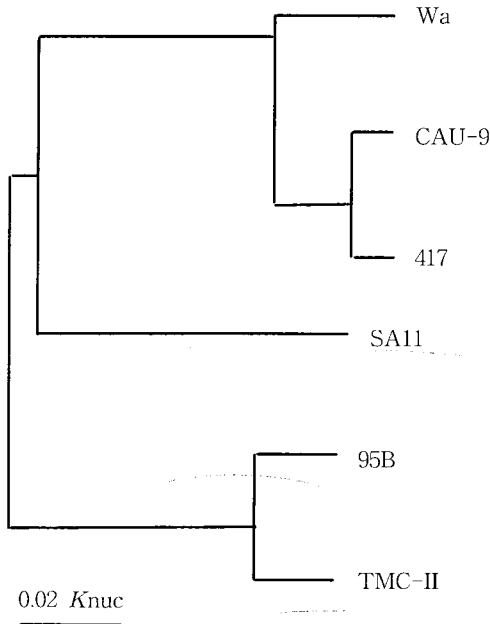


Fig. 5. Relatedness of the VP7 gene of CAU-9, Wa, 417, TMC-II, 95B, SA11 strains using clustal method.

25℃에서 48시간 동안 배양한 후 소량의 세포를 취하여 형광표지 항A군 로타바이러스 항혈청을 가하고 형광현미경으로 형광물질 염색유무를 관찰하였다. Baculovirus 고역가액을 감염시킨 Sf9 세포에서는 형광을 발하는 양성세포를 관찰할 수 있었다. 반면 음성대조로 사용한 정상세포에서는 형광을 관찰할 수 없어 VP7 단백질이 발현되었음을 알 수 있었다 (Fig. 6).

7. 대사표지에 의한 발현 VP7 단백질의 확인

재조합 baculovirus 고역가액 및 wild type baculovirus를 Sf9 세포에 감염시키고 [³⁵S]-methionine을 가하여 배양한 다음 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하고 autoradiography하였다. 재조합 baculovirus를 감염시킨 세포에서는 34kDa의 VP7 단백질 band가 관찰되었다. 반면 wild type baculovirus를 감염시킨 세포에서는 28kDa의 polyhedrin 단백질 band만 관찰되었으며 아무것도 감염시키지 않은 음성대조 mock에서는 이 두 band가 모두 나타나지 않아 VP7 단백질이 발현되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 7).

고찰

본 연구에서는 국내에서 세포배양법을 이용하여 영아 설사분변으로부터 분리한 사람 로타바이러스의 중화항체 형성에 관여하는 VP7 유전자의 염기서열을 결정하여 외국 유래 로타바이러스와의 염기서열 상동성 및 추정 아미노산 서열을 비

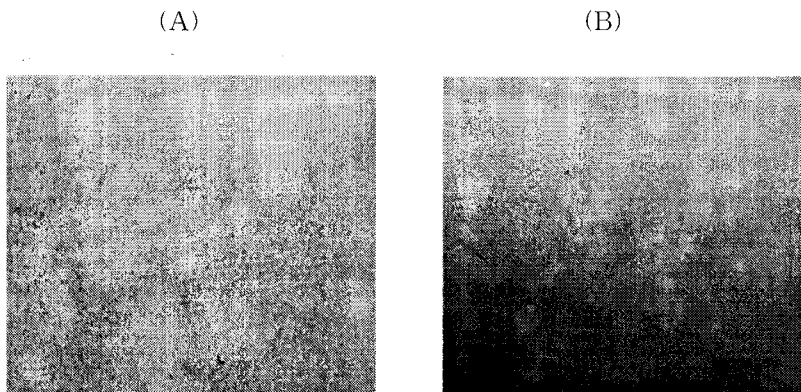


Fig. 6. Immunofluorescence microscopy of mock (A) and recombinant baculovirus infected pVP7-K7 (B). The infected *S. frugiperda* (Sf9) cells were fixed with acetone and methanol 48 hr. post inoculation and stained with hyperimmune antiserum to WA human rotavirus and fluorescein-labeled rabbit anti-guinea pig serum.

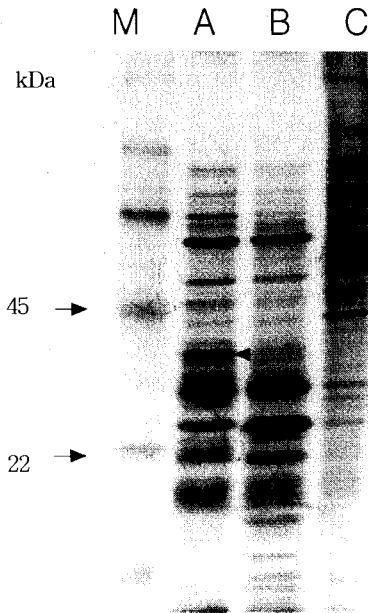


Fig. 7. Metabolic labeling analysis of proteins expressed by recombinant baculovirus. Sf9 cells were infected with recombinant viruses, wild type AcNPV or mock. Lanes: M, ³⁵S-labeled molecular weight standard; 1, recombinant CAU-9 VP7 lysate; 2, wild type infected lysate; 3, mock infected cell lysate. Proteins were labeled 48 h p.i. for 3hr. with [³⁵S]-methionine and resolved using SDS-PAGE and autoradiography.

교 분석하였으며 백신개발을 위한 기초 연구로서 baculovirus 발현 시스템을 이용하여 바이러스의 면역원성에 중요한 역할을 하는 VP7 단백을 발현하였다.

로타바이러스의 G 혈청형은 오래전부터 혈청 중화시험으로 확인되었다 [41, 80]. 그러나 이 방법은 결과를 얻는데 오랜 시간이 소요되고 특히 조직배양으로 증식되는 바이러스에만 적용될 수 있는 단점이 있다. 이러한 이유로 분변재료로부터 로타바이러스의 로타바이러스의 G 혈청형을 직접 확인할 수 있는 새로운 방법이 최근 개발되었다 [49, 64]. 이들 방법은 분변재료로부터 G 혈청형을 신속, 민감하게 확인할 수 있으나 특이성에 문제점이 있다. 또한 사람 로타바이러스는 자연계에서 계속하여 변이한다고 보고하였으며 그리하여 이들 방법으로는 다른주와의 감별이 불가능하다 [63, 81]. VP7은 비리온의 30%를 차지하는 가장 중요한 외피단백이며 당질화형태이다 [47]. 이것은 주요한 중화항체 형성 항원이며 혈청형은

특이적인 단클론 항체에 의하여 결정된다 [11, 19, 68, 72, 75].

국내에서 환자로부터 분리한 CAU-9주의 RNA로부터 RT-PCR을 이용하여 VP7 유전자를 증폭하고 전체 염기서열을 분석한 결과, 1,062bp 크기로서 2개의 open reading frame을 가지고 있었으며 332개의 아미노산이 합성됨을 추정할 수 있었다. 이중 5'말단의 49-51에 위치하는 처음 개시코돈인 ATG (TTAATGT)보다 136-138 2차 개시코돈 ATG (ATAATGG)이 Kozak의 강한 개시코돈 sequence인 (AXXATGG)임을 미루어 생각할 때 더욱 효과적인 번역코돈임을 알 수 있었다. CAU-9주 VP7 유전자의 전체 염기서열을 외국에서 보고된 Wa, 417, TMC-II, 95B 및 SA11주의 염기서열과 상동성을 비교한 결과 CAU-9주의 유전자 상동성은 95.1%부터 74.0%로 나타났으며 이중 417주와는 95.1%로서 가장 높았고 TMC-II주와 74.0%로서 가장 낮았다. 이는 국내에서 분리 G1 혈청형의 로타바이러스가 같은 G1 혈청형이라도 미국 유래주인 Wa주보다도 일본 유래주인 417주와 더 유사함을 알 수 있어 국내 로타바이러스가 일본 로타바이러스와 밀접한 연관성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 다음으로는 특이하게도 사람 유래 로타바이러스인 G2 혈청형의 TMC-II 및 95B주보다도 원숭이 로타바이러스인 G3 혈청형의 SA11주와 상동성이 높게 나타났다. 반면 사람 로타바이러스이지만 G2 혈청형의 TMC-II 및 95B주는 CAU-9주와 가장 낮은 상동성을 보였다. G3 혈청형인 simian rotavirus SA11주는 VP7의 항원 수용기를 공유하는 항원적 특이성이 사람 로타바이러스와 매우 유사한 rhesus rotavirus (RRV)와 비슷하다. 그러나 Dennehy 등 [24]은 G1에서 G4까지 혈청형의 RRV를 재료로 하여 동물 사람 재조합 4가백신 (tetraivalent vaccine)을 제조하고 24주 이내의 영아에 투여하여 면역효과를 시험하였으나 백신으로서의 효과가 거의 없음을 보고하였다. 그러므로 국내 로타바이러스 감염증에 대한 효과적인 백신개발을 위하여는 같은 혈청형의 국내분리주를 사용하거나 계통적으로 가장 근접한 외국 유래주를 사용하여야 할 것으로 생각된다.

로타바이러스는 달수증을 유발하여 생명을 위협하는 영유아 장염의 가장 중요한 원인체로서 [42], 백신개발은 세계보건기구 (WHO)와 미 국립보건원 (NIH)에서 지정한 최우선 연구과제이다 [31]. 가장 많이 연구되어진 방법은 약독화 동물

로타바이러스를 이용하여 경구용 생백신을 제조하고 병원성 사람 로타바이러스에 대한 면역효과를 나타내게 하는 것이었다 [4, 17, 29, 77, 78]. 그러나 위의 백신들은 로타바이러스 감염증에 대하여 지속적인 면역효과를 보이지 않았다 [23, 36, 38]. 더욱이 미국립보건원 (NIH)에서 개발한 rhesus rotavirus (RRV) 백신은 투여군에서 25%의 발열반응을 보였으며 14~31%의 미약한 seroconversion을, 50%정도의 방어효과밖에는 나타나지 못하였다 [9, 61]. 현재 로타바이러스 백신개발의 연구동향은 주로 로타바이러스의 바이러스 이중화화 방화에 관여하는 외피단백인 VP4와 VP7의 dual serotyping에 초점을 맞추어 유전공학적인 기법을 이용하여 재조합 VP4와 VP7 항원을 제조하고 각 단백질의 동물에서 면역방어반응 및 다른 혈청형에 대한 cross-reactive 면역반응에 대한 연구가 많이 수행되어 왔다 [37, 40, 56]. Baculovirus에서 발현된 RRV VP4는 같은 바이러스에 대하여는 중등도의 중화항체를 형성하였으나 다른 바이러스에 대하여는 매우 낮은 정도의 중화항체만을 형성하였다. 더욱이 마우스 모델에서 수동면역에 의하여 방어능을 보여주었다 [50, 51]. VP7 단백질은 *E. coli* [8, 30, 53], herpes virus [5, 25] 및 baculovirus [27, 54, 60] 등에서 발현되어 시험관내에서 다가항체 및 VP7 특이 단클론항체에 대하여 반응하였지만 동물시험에서는 중화항체를 나타내지 않았다. 그러나 마우스에서 수동면역시험을 통하여 항원성과 면역원성 모두를 나타내었다 [6, 7, 13].

최근에 Crawford 등 [21]은 내피 단백질인 VP2와 VP6를 이용하여 면역원성 외피단백인 VP6와 VP7을 서로 folding시킴으로써 핵산은 보유하지는 않으나 바이러스와 같은 형태와 면역원성을 가지는 바이러스양 입자 (VLP: virus-like particle)을 제조하였다. 이 바이러스양 입자는 임신한 실험동물 (마우스, 돼지, 소)의 모체에 접종하였을 때 얻은 초유에서 단독 접종시보다 매우 높은 VP4 및 VP7 항체가 (>2,000)를 나타내었으며 이를 신생동물에 경구 투여하여 장관내 능동면역을 유도하였을 때 높은 seroconversion율과 항체가를 형성하였다 [28, 65].

본 연구에서 baculovirus에서 VP7 단백을 발현하고 면역형광검정법에 의한 발현 유무를 확인한 결과 형광물질이 염색된 양성 감염세포를 관찰할 수 있었다. 또한 대사표지에 의하여 37Kd 크기의

VP7 단백질 band가 관찰되어 VP7 단백질이 세포내에서 발현되었음을 확인할 수 있었다. 그러나 본 연구에서 발현된 VP7 단백질은 기니픽을 이용한 접종 시험에서 다른 외국 연구자들의 보고와 마찬가지로 중화항체를 형성하지 않았다. 그러므로 앞으로는 국내에서 분리한 로타바이러스의 다른 면역원성 단백질인 VP4와 바이러스양 입자를 제조하는데 carrier로서 필수적인 VP2와 VP6를 각각 발현하고 이를 이용하여 바이러스양 입자를 제조하여 한국실정에 맞는 로타바이러스 백신개발을 위한 연구가 수행되어야 된다고 사료된다.

결 론

본 연구에서는 한국 설사증 영아로부터 분리한 G1 혈청형의 로타바이러스 CAU-9주를 대상으로 VP7 외피 단백질 유전자의 염기서열을 규명하여 외국 로타바이러스와의 유전적 상관성을 조사하고 효율적인 백신과 진단키트를 개발하는데 기초연구로서 baculovirus에서의 VP7 단백질의 발현 여부를 추구하고 있다.

1. 한국에서 분리한 로타바이러스 CAU-9주는 MA104 단층세포에서 감염 4일 후에 세포변성효과를 나타내었으며 바이러스 RNA로부터 VP7 유전자를 RT-PCR을 이용하여 증폭한 결과 1,062bp의 VP7 유전자를 지배하는 PCR product가 증폭되었다.

2. VP7 cDNA를 pCR-Bac vector에 클로닝하고 염기서열을 분석한 결과 유전자의 크기는 1,062bp로서 외국에서 보고된 Wa, 417, TMC-II, 95B 및 SA11주의 크기와 일치하였다. CAU-9주 VP7 유전자를 Wa, 417, TMC-II, 95B 및 SA11주와 비교한 결과 뉴클레오티드 상동성은 95.1%부터 74.0%로 나타났으며 417주와는 95.1%로서 가장 높았고 TMC-II주와는 74.0%로서 가장 낮았다. 유전자가 번역하는 아미노산의 상동성을 Wa, 417, TMC-II, 95B 및 SA11주와 비교한 결과 아미노산 상동성은 43%부터 35%로 나타났으며 417주가 43%로서 가장 높았고 TMC-II 및 95B주는 35%로서 가장 낮았다. 상동성의 순서는 뉴클레오티드와 아미노산 모두 417, Wa, SA11, 95B 및 TMC-II주 순이었다.

3. 면역형광법으로 VP7 단백질의 Sf9 세포에서의 발현을 확인한 결과 재조합 baculovirus pVP7-K7를 감염시킨 세포에서 형광물질이 염색된 양성세포를 관찰할 수 있었다. 또한 [³⁵S]-methionine

으로 대사표지한 결과 감염세포에서는 37Kd의 VP7 단백질 band가 관찰되어 VP7 단백질이 발현되었음을 알 수 있었으나 기니픽을 이용한 동물시험에서 중화항체를 형성하지는 않았다.

이상의 결과로 한국 설사증 영아로부터 분리한 로타바이러스 CAU-9주의 VP7 유전자 염기서열 규명 및 단백질의 발현은 효율적인 한국형 로타바이러스 백신과 진단키트를 개발하는데 기초연구로서 기여할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 1997학년도 중앙대학교 교내 학술연구비에 의하여 수행되었음.

참 고 문 헌

1. 김경희: A군 Rotavirus (국내분리주)의 Gene 4 형별. 대한바이러스학회지 **22**: 61-67, 1992.
2. 김경희: 역전사 중합효소연쇄반응법을 이용한 Rotavirus A군의 VP7형별. 대한바이러스학회지 **23**: 39-45, 1993.
3. 이재석, 박장환, 김경희, 이건희, Glass R, Moe C, Humphery C, 윤혜선, 조양자: A형 Rotavirus, Adenovirus 40/41 및 Astrovirus에 의한 신생아실에서의 유행성장염. 한양의대학술지 **14**: 29-45, 1994.
4. Anderson EL, Belshe KB, Bartram J, Crookshanks-Newman F, Chanock RM, Kapikian AZ: Evaluation of rhesus rotavirus vaccine (MMU18006) in infants and young children. *J Infect Dis* **153**: 823-831, 1986.
5. Andrew ME, Boyle DB, Coupar BE, Whitfield PL, Both GW, Bellamy AR: Vaccinia virus recombinants expressing the SA11 rotavirus VP7 glycoprotein gene induce serotype-specific neutralizing antibodies. *J Virol* **61**: 1054-1060, 1987.
6. Andrew ME, Boyle DB, Whitfield PL, Lockett LJ, Anthony ID, Bellamy AR, Both GW: The immunogenicity of VP7, a rotavirus antigen resident in the endoplasmic reticulum, is enhanced by cell surface expression. *J Virol* **64**: 4776-4783, 1990.
7. Andrew ME, Boyle DB, Compar BEH, Reddy ABO, Bellamy AR, Both GW: Vaccinia rotavirus VP7 recombinants protect mice against

- rotavirus-induced diarrhoea. *Vaccine* **10**: 211-219, 1992.
8. Arias CF, Ballado T, Plebaski M: Synthesis of the outer-capsid glycoprotein of the simian rotavirus SA11 in *Escherichia coli*. *Gene* **47**: 211-219, 1986.
9. Bernstein DI, Glass RI, Rodgers G, Davidson BL, Sack DA: Evaluation of rhesus rotavirus monovalent and tetravalent reassortant vaccines in US children. *JAMA* **273**: 1191-1196, 1995.
10. Birnboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523, 1979.
11. Birch CJ, Heath RL, Gust ID: Use of serotype specific monoclonal antibodies to study the epidemiology of rotavirus infection. *J Med Virol* **24**: 45-53, 1988.
12. Blacklow NR, Greenberg HB: Viral gastroenteritis. *N Engl J Med* **325**: 252-264, 1991.
13. Both GW, Lockett LJ, Janardhana V, Edwards SJ, Bellamy AR, Graham FL, Prevee L, Andrew ME: Protective immunity to rotavirus induced diarrhoea is passively transferred to newborn mice from naive dams vaccinated with a single dose of a recombinant adenovirus expressing rotavirus VP7. *Virology* **163**: 940-950, 1993.
14. Both GW, Mattick JS, Bellamy AR: Serotype-specific glycoprotein of simian 11 rotavirus: coding assignment and gene sequence. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **80**: 3091-3095, 1983.
15. Browning GF, Chalmers RM, Fitzgerald TA, Snodgrass DR: Serological and genomic characterization of L-338, a novel equine group A rotavirus G serotype. *J Gen Virol* **72**: 1059-1064, 1991a.
16. Browning GF, Fitzgerald TA, Chalmers RM, Snodgrass DR: A novel group a rotavirus G serotype: serological and genomic characterization of equine isolate F123. *J Clin Microbiol* **29**: 2043-2046, 1991b.
17. Clakr HF, Furukawa T, Bell LM, Offit PA, Perrella PA, Plotkin SA: Immune response of infants and children to low passage bovine ro-

- tavirus strain (strain WC3). *Am J Dis Child* **140**: 350-356, 1986.
18. **Conner ME, Madson DO, Estes ME**: Rotavirus vaccines and vaccination potential. *Curr Top Microbial Immunol* **105**: 253, 1994.
 19. **Coulson BS, Fowler KJ, White JR, Cotton RGH**: Non-neutralizing monoclonal antibodies to a trypsin sensitive site on the major glycoprotein of rotavirus which discriminate between virus serotypes. *Arch Virol* **93**: 199-211, 1987.
 20. **Crawford SE, Labbe M, Cohen J, Burroughs MH, Zhou YJ, Estes MK**: Characterization of rotavirus subunit vaccine produced in insect cells. Fourth International dsRNA Virus Meeting, Scottsdale, AZ, p.57, 1992.
 21. **Crawford SE, Labbe M, Cohen J, Burroughs MH, Zhou YJ, Estes MK**: Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J Virol* **68**: 5945-5952, 1994.
 22. **Das M, Dunn J, Woode GN, Greenberg HB, Rao CA**: Both surface protein (Vp-4 and Vp-7) of an asymptomatic neonatal rotavirus strain (I131) have high levels of sequence identity with the homologous of a serotype 10 bovine rotavirus. *Virology* **194**: 374-379, 1993.
 23. **De MOL P, Zissis G, Butzler JP, Mutwewing-babo A, Andre FE**: Failure of live, attenuated oral rotavirus vaccine. *Lancet* **II**: 108, 1986.
 24. **Dennehy PH, Rodger Jr GC, Ward RL, Markwick AJ, Mack M, Zito ET**: *Pediatr Infect Dis J* **15**: 1012-1018, 1996.
 25. **Dormitzer PR, Dora YH, Mackow ER, Mocariski ES, Greenberg HB**: Neutralizing epitopes on herpes simplex virus-1 expressed rotavirus VP7 are dependent on coexpression of other rotavirus proteins. *Virology* **187**: 18-32, 1992.
 26. **Estes MK, Cohen J**: Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* **53**: 410-449, 1989.
 27. **Estes MK, Crawford SE, Penaranda ME, Petri BL, Burns JW, Chan WK, Erickson B, Smith GE, Summers MD**: Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system. *J Virol* **61**: 1448-1494, 1987.
 28. **Fernandez FM, Todhunter D, Smith KL, Parwani AV, Estes MK, Crawford SE, Conner ME, Saif LJ**: Antibody isotype responses in cows vaccinated with inactivated rotavirus or recombinant SA11 rotavirus-like particle (VLP) vaccines. International Conference on Veterinary Immunology, San Diego, California, 1995.
 29. **Flores J, Perez-Schael I, Blanco M, White L, Garcia D, Vilar M, Cunto W, Gonzales R, Urbina C, Boher J, Mendez J, Kapikan AZ**: Reactogenicity and antigenicity of two human rhesus-rotavirus reassortant vaccine candidates of serotypes 1 and 2 in Venezuelan children. *J Clin Microbiol* **27**: 512-518, 1988.
 30. **Francavilla M, Miranda P, Dimatteo A, Sarasini A, Gerna G, Milanesi G**: Expression of bovine rotavirus neutralization antigen in *Escherichia coli*. *J Gen Virol* **68**: 2975-2980, 1989.
 31. **Galss RI, Gentsch J, Smith J**: Rotavirus vaccines: success by reassortment? *Science* **265**: 1389-1391, 1994.
 32. **Gentsch JR, Das K, Jiang B, Bhan MK, Glass RL**: Similarity of the VP-4 protein of human rotavirus strain 116E to that of the bovine B 223 strain. *Virology* **194**: 424-430, 1993.
 33. **Gentsch JR, Glass RL, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK**: Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **30**: 1365-1373, 1992.
 34. **Gerna G, Sarasini A, Parea M, Arista S, Miranda P, Brussow H, Hoshino Y, Flores J**: Isolation and characterization of two distinct human rotavirus strains with G6 specificity. *J Clin Microbiol* **30**: 9-16, 1990.
 35. **Gouvea V, Castro LD, Timenestsky MDC, Greenberg H, Santos N**: Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J Clin Microbiol* **32**: 1408-1409, 1994.
 36. **Green KY, Taniguchi K, Mackow ER, Kapikan AZ**: Homotypic epitope-specific antibody responses in adult and infants rotavirus vaccines; implication for vaccine development. *J Infect Dis* **161**: 667-679, 1990.

37. **Greenberg HB, Mcauliffe V, Valdesuso J, Wyatt RG, Flores J, Kalica AA, Hoshino Y, Sing N:** Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus using monoclonal antibodies. *Infect Immun* **39**: 91-99, 1983.
38. **Hanlon P, Hanlon L, Marsh V, Byass P, Shepton F, Hassan-King M, Sillah H, M'boge BH, Greenwo BM:** Trial of an attenuated bovine rotavirus vaccine (RIT 4237) in Gambian infants. *Lancet* **I**: 1342-1345, 1987.
39. **Harlow E, Lane D:** Antibodies; A laboratory manual, Cold Spring Harber Laboratory, Cold Spring Harber, New York, 1988.
40. **Hoshino Y, Saif LJ, Sereno MM, Chanock RM, Kapikian AZ:** Infection immunity of piglets to either VP3 and VP7 outer capsid proteins confers resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen. *J Virol* **62**: 744-748, 1988.
41. **Hosino Y, Wyatt R, Greenburg HB, Flores J, Kapikian AZ:** Serotype similarity and diversity of rotavirus of mammalian and avian origin as studied by plaque reduction neutralization. *J Infect Dis* **149**: 694-702, 1984.
42. **Kapikian AZ, Flores J, Midthun K, Green KY, Gorgilia M, Nisikawa K, Chanock RM, Potash L, Perez-Schael I:** Strategies for the development of a rotavirus vaccine against infantile diarrhea with an update on clinical trials of rotavirus vaccines. *Adv Exp Med Biol* **257**: 67, 1990.
43. **Kim YB, Kim KH, Yang JM:** cDNA cloning and Nucleotide Sequence Determination for VP7 Coding RNA Segment. *Kor J Microbiol* **30**: 397-402, 1992.
44. **Kim K, Yang J, Loo S, Cho Y, Glass RI, Cho Y:** Importance of rotavirus and adenovirus type 41 and 41 acute gastroenteritis in Korea Children. *J Clin Microbiol* **28**: 2279-2284, 1990.
45. **Labbe M, Baudoux P, Charpilienne A, Poncet D, Cohen J:** Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein. *J Gen Virol* **75**: 3423-3430, 1994.
46. **Li B, Clak HF, Gouvea V:** Nucleotide sequence of the VP-4 encoding gene of an unusual human rotavirus (HCR03). *Virology* **196**: 825-830, 1993.
47. **Liu M, Offit PA, Estes MK:** Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product. *Virology* **163**: 26-32, 1988.
48. **Liu M, Mattion NM, Estes MK:** Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology* **188**: 77-84, 1992.
49. **Luchelli A, Kang SY, Jayasekera MK:** 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.
50. **Mackow ER, Barnett JW, Chan H, Greenberg HB:** The rhesus rotavirus outer capsid protein VP4 functions as a hemagglutinin and is antigenically conserved when expressed by a baculovirus recombinant. *J Virol* **63**: 1661-1668, 1989.
51. **Mackow ER, Vo PT, Broomer R, Bass DM, Greenberg HR:** Immunization with baculovirus-expressed VP4 protein passively protects against simian and murine rotavirus challenge. *J Virol* **64**: 1698-1703, 1990.
52. **Mattion NM:** The rotavirus proteins, In: Kapikian A.Z. ed. *Viral infections of the gastrointestinal tract*, New York: Marcel Dekker, Inc, 1994.
53. **McCrae MA, Corquodale JG:** Expression of a major bovine rotavirus neutralization antigen (VP7c) in *Escherichia coli*. *Gene* **55**: 9-18, 1987.
54. **McGonigal TP, Turan MC, Komar-Hartett K, Kister SE, Smith RE:** Expression of the gene coding for the major outer capsid protein SA11 rotavirus in a baculovirus system. *Virus Res* **23**: 135-150, 1992.
55. **Nakagomi O, Isegawa Y, Hoshino Y, Aboudy Y, Shif I, Silberstein I, Nakagomi T, Ueda S, Sears J, Flores J:** A new serotype of the outer capsid protein VP-4 shared by an unusual human rotavirus strain Ro-1845 and canine rotaviruses. *J Gen Virol* **74**: 2271-2274, 1993.
56. **Offit PA, Blavat G:** Identification of the two rotavirus genes determining neutralization specificities. *J Virol* **57**: 376-378, 1986.

57. **O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA:** Baculovirus expression vectors; A laboratory manual, Oxford University Press, Inc., 1994.
58. **Piec TL, Palombo EA, Bishop RF:** Sequences of VP7 genes of serotype G2/strain 95B human rotaviruses (Personal communication).
59. **Prasad BV, Wang GJ, Clerx JPM, Chiu W:** Three dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol* **199**: 269-275, 1988.
60. **Redmont MJ, Ijaz MK, Sabara MD, Dent D, Gibbons E, Babiuk LA:** Assembly of recombinant rotavirus proteins into virus-like particles and assessment of vaccine potential. *Vaccine* **11**: 273-281, 1993.
61. **Rennels MB, Glass RI, Dennehy PH:** Safety and efficacy of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccines: report of the national multicenter trial. *Pediatrics* **97**: 7-13, 1996.
62. **Richardson MA, Iwamoto A, Ikegami N, Nomoto A, Furuichi Y:** Nucleotide sequence of the gene encoding the serotype-specific antigen of human (Wa) rotavirus: Comparison with the homologous gene from simian SA11 and UK bovine rotaviruses. *J Virol* **51**: 860-862, 1984.
63. **Rodger SM, Bishop RF, Birch C, McLean B, Holmes IH:** Molecular epidemiology of human rotaviruses in Melbourne, Australia from 1973 to 1979 as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. *J Clin Microbiol* **13**: 272-278, 1981.
64. **Rogen BI, Parwani AV, Lopez S:** Serotype differentiation of rotaviruses in field samples from diarrheic pigs by using nucleic acid probes specific for porcine VP4 and human and porcine VP7 gene. *J Clin Microbiol* **32**: 311-317, 1994.
65. **Saif LJ, Todhunter D, Smith K, Gadfield K, Parwani A, Fernandez F, Estes M, Crawford S, Conner M:** Antibody responses to recombinant rotavirus-like particles (VLPs) used as a subunit vaccine in pregnant cow. Fifth International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses, Djerba, Tunisia, March 19-23, 1995.
66. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR:** DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **74**: 5463-5647, 1977.
67. **Sereno MM, Gorziglia MI:** The outer capsid protein Vp-4 of murine rotavirus strain Eb represents a tentative new P type. *Virology* **199**: 500-504, 1994.
68. **Shaw RD, Stoner-Ma DL, Estes MK, Greenburg HB:** Specific enzyme-linked immuniassay for rotavirus serotypes 1 and 3. *J Clin Microbiol* **22**: 286-291, 1985.
69. **Sieberstein I, Shulman LM, Mendelson E, Shif I:** Distribution of both rotavirus Vp4 genotypes and VP7 serotypes among hospitalized and nonhospitalized Israeli childrens. *J Clin Microbiol* **33**: 1421-1422, 1995.
70. **Summers MD, Smith GE:** A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedure. Department of Entomology, Texas A & M University, College Station, Texas, 1988.
71. **Taniguchi K, Urasawa S:** Diversity in rotavirus genomes. *Virology* **6**: 123-131, 1995.
72. **Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S:** Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. *J Gen Virol* **66**: 1045-1053, 1985.
73. **Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S:** Species specificity and interspecies relatedness in Vp-4 genotypes demonstrated by VP-4 sequence analysis of equine, feline and canine rotavirus strains. *Virology* **200**: 390-400, 1994.
74. **Timenetsky MDCST, Santos V, Guovea V:** Survey of rotavirus and P types associated with human gastroenteritis in Sao-Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. *J Clin Microbiol* **32**: 2622-2624, 1994.
75. **Unicomb LE, Coulson BS, Bishop RF:** Experience with an enzyme immunoassay for serotyping human group A rotavirus. *J Clin Microbiol* **27**: 586-588, 1989.
76. **Valenzuela S, Pizarro J, Sandino AM, Vasquez M, Fernandez J, Hernandez O, Patton J, Spencer E:** Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *J Virol* **65**: 3964-3967, 1991.

77. **Vesikari T:** Clinical trials of live oral rotavirus vaccine: the Finnish experience. *Vaccine* **11**: 255-261, 1993.
78. **Ward RL, Knowlton DR, Greenberg HB, Schiff GM, Bernstein DI:** Serum neutralizing antibody to VP4 and VP7 proteins in infants following vaccination with WC3 bovine rotavirus. *J Virol* **64**: 2687-2691, 1986.
79. **Wen L, Ushijima H, Kakizawa J, Fang ZY, Nishio O, Morikawa S, Motohiro T:** Genetic variation in VP7 gene of human rotavirus serotype 2 (G2 type) isolated in Japan, China, and Pakistan. *Microbiol Immunol* **39**: 911-915, 1995.
80. **Woode GN, Kelso NE, Simpson TF, Gaul SK, Evans LE, Babiuk LA:** Antigenic relationships among some rotaviruses: serum neutralization and cross-protection in gnotobiotic calves. *J Clin Microbiol* **18**: 358-364, 1983.
81. **Xin KQ, Morikawa S, Fang ZY, Mukoyama A, Okuda K, Ushijima H:** Genetic variation in VP7 gene of human rotavirus serotype 1 (G1 type) isolated in Japan and China. *Virology* **197**: 813-816, 1993.
82. **Yeager M, Dryden KA, Olson NH, Greenberg HB, Baker TS:** Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J Cell Biol* **110**: 2133-2144, 1990.