

RT-PCR과 RFLP법을 이용한 국내 소 로타바이러스 VP4 및 VP7 유전자의 특성 규명

충북대학교 수의과대학, 수의과학연구소¹, 중앙대학교 의과대학²

전성진 · 장정호¹ · 정정원¹ · 김원용² · 강신영

=Abstract=

Studies on the VP4 and VP7 Genes of Bovine Rotaviruses from Field Samples Using RT-PCR and RFLP Analysis

Seong-Jin Jeon, Chung-Ho Chang¹, Chung-Won Chung¹,
Won-Yong Kim² and Shien-Young Kang

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University Cheongju 361-763,

¹*National Veterinary Research Institute, Anyang 430-016, ²College of Medicine,
Chungang University, Seoul 156-756, Korea*

Characterizations of the VP4 (P type) and VP7 (G type) genes of Korean isolates of bovine rotavirus were performed using RT-PCR/RFLP and nucleotide sequencing analysis. After RT-PCR amplification of partial length (1094bp) of the VP4 and full length (1062bp) of the VP7 genes, amplified PCR products were digested with restriction endonucleases and digestion patterns were compared with those of reference rotaviruses. With the VP4 genes, four RFLP (A-D) profiles were observed; three (A, B and C) were the same as those of bovine rotavirus NCDV (P[1]), IND (P[5]) and B223 (P[11]), respectively. Profile D was the same as that of porcine rotavirus OSU (P[7]). With the VP7 genes, five RFLP profiles (I-V) were observed; three of them (I, II and III) were the same as those of bovine rotavirus NCDV (G6), Cody I-801 (G8), and B223 (G10), respectively. Profile IV and V were atypical to those of reference bovine rotaviruses used in this study. These two profiles were identified as G6 and G5, respectively, after analyzing and comparing the nucleotide sequences.

The G typing analysis revealed that 61.9% (26/42) were G6, which included G6 subtype; 28.6% (12/42) were G5; 7.1% (3/42) were G10; 2.4% (1/42) were G8. The P typing analysis revealed that 54.8% (23/42) were P[5]; 28.6% (12/42) were P[7]; 11.8% (5/42) were P[11]; 4.8% (2/42) were P[1].

Our results showed that G6/P[5] were the most prevalent rotaviruses in diarrheic calves in Korea. Also, this is the first report that G5/P[7] rotaviruses were identified from cattle with diarrhea.

Key Words: Bovine rotaviruses, VP4/VP7, RT-PCR/RFLP, Sequencing

서 론

로타바이러스는 *Reoviridae* family에 속하는 바이러스로서 사람을 포함한 모든 포유동물 및 조류에서 장염을 유발시키는 원인체로 알려져 있다 [1~3]. 로타바이러스는 피막이 없고 직경 75nm의 정20면체 protein capsid를 가지며 11개의 분절된 핵산을 가지고 있는 double-stranded RNA (dsRNA) 바이러스로서 outer capsid proteins, inner capsid proteins 그리고 core로 구성되어 있다 [1, 2].

로타바이러스의 outer capsid protein에는 바이러스의 병원성, 면역원성 및 생물학적 특성을 나타내는 VP4 (viral protein 4, gene segment 4에 의해 encode됨)와 VP7 (viral protein 7, strain에 따라서 gene segment 7, 8 또는 9에 의해 encode됨)이 있으며, 이들은 각각 독립적으로 중화 항체의 생산을 유도한다 [4, 5]. 로타바이러스는 이들 단백질 항원의 특이성에 따라 각각 P (protease sensitive protein) type과 G (glycoprotein) type으로 분류되어진다 [6, 7]. G type 분류에 의하면 serogroup A에는 14개의 G 혈청형이 보고 되어져 있다.

소에서 분리되는 로타바이러스는 대부분 serogroup A에 속하나 serogroup C에 속하는 로타바이러스가 보고되어 있다 [8]. Serogroup A에 속하는 소 로타바이러스에는 G1, G2, G3, G6, G8, G10 및 G11 혈청형이 보고 되어졌으며, 이 중 G6와 G10 혈청형이 가장 많이 분포되어 있는 것으로 밝혀졌고, NCDV와 B223 strain이 각각 G6 와 G10 혈청형의 표준주로 알려져 있다 [9~11]. 또한 소 로타바이러스에는 3개의 P 혈청형 (P[1], P[5], P[11])이 존재하며 NCDV와 IND 그리고 B223 strain은 각각 P[1], P[5], P[11] 혈청형의 표준주로 알려져 있다 [9]. 따라서 로타바이러스의 NCDV strain과 IND 그리고 B223 strain은 각각 G6/P[1], G6/P[5], G10/P[11]으로 G type과 P type의 조합으로 표시될 수 있다 [9, 12].

현재 G와 P type을 구분하는 방법에는 plaque reduction, fluorescent focus neutralization (FFN), 혈청형에 특이적인 단크론항체를 이용한 ELISA, 혈청형에 특이적인 probe를 이용한 hybridization, RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction), RFLP (Restriction fragment length polymorphism) analysis 그리고 gene sequencing 등의 방법을 이용하고 있다 [6, 9, 13~17].

국내에서 김 등 [18]은 한우 송아지의 포유기간 중에 발생하는 설사분변을 조사한 결과 156개의 설사분변 중 108개 (69.2%) 분변에서 로타바이러스를 ELISA법으로 검출하였다. 또한 안 등은 국내 소 로타바이러스의 분리주와 표준주에 대한 단크론항체를 생산하여 특성을 조사하였고 단크론항체를 이용한 효소면역진단법을 개발하였다 [19].

본 연구는 송아지 설사분변 및 MA104 세포에 순화된 국내 분리주에서 로타바이러스의 핵산을 추출하여 RT-PCR과 RFLP 방법으로 G와 P type을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 분변재료

소 로타바이러스 표준주로 NCDV (G6/P[1]), IND (G6/P[5]), Cody I-801 (G8/P[1]), B223 (G10/P[11]) 그리고 돼지 로타바이러스 표준주로 OSU (G5/P[7])를 사용하였으며 이들 바이러스는 MA104 cell에서 증식하였다 [9, 12]. 국내에서 분리된 소 로타바이러스 및 로타바이러스 양성인 분변 재료는 Table 1에 표시되어 있다.

2. 바이러스의 RNA 추출

로타바이러스 표준주와 국내 분리주의 핵산 추출은 바이러스에 감염된 세포 배양액을 얻고 녹이는 과정을 3회 실시한 후 배양액 600 μ l에 동량의 phenol-chloroform를 넣고 잘 섞은 다음 원심분리하였다. 상층액에 4M sodium acetate (0.1 volumes)와 100% 에탄올 (3 volumes)을 넣고 -20 $^{\circ}$ C에서 10시간 동안 침전시킨 다음 원심분리하여 상층액을 버리고 70% 에탄올로 2회 세척하였다. Pellet을 건조시킨 후 DEPC (diethyl pyrocarbonate, Sigma) 처리된 증류수로 재부유시켜 사용할 때까지 -20 $^{\circ}$ C에 저장하였다. 설사분변으로 부터 바이러스 핵산 추출은 Rosen *et al*의 방법을 이용하였다 [20]. 간략하게 기술하면, Tris-CaCl₂ buffer (0.1M Tris, 10mM CaCl₂, pH 7.4)에 분변재료를 1:10이 되도록 희석한 다음 원심분리하여 상층액을 조심스럽게 취하였다. 상층액에 10% SDS (sodium dodecyl sulfate, 0.1 volumes)와 3M sodium acetate (0.1 volumes, pH 5.2)를 첨가하고 나서 동량의 phenol-chloroform를 넣고 잘 섞은 다음 원심분리하였다. 상층액에 4M sodium acetate (0.1

volumes)와 100% 에탄올 (3 volumes)을 넣고 -20℃에서 10시간 동안 침전시킨 후 원심분리하여 상층액을 버리고 70% 에탄올로 2회 세척한 후 pellet을 건조시켰다. DEPC 처리된 증류수로 pellet을 재부유 시킨 다음 사용할 때까지 -20℃에 저장하였다.

Table 1. Sources of bovine rotavirus Korea isolates and fecal samples used in this study

Korea isolates ^a		Fecal samples ^b	
Names	Source	Names	Source
A	충북 (음성)	4	충북 음성
C (P1)	충북 청주 (종축장)	5	충북 음성
E (P1)	충북 청주 (종축장)	6	충북 충주
M4	충남 성환	10	충북 충주
VMRI	미상	18	충북 충주
VRI-2	미상	19	충북 음성
VRI-3	미상	20	충북 음성
경기-1	경기도	21	충북 충주
0221-7	충남 서산	22	충북 충주
04771-1	충남 서산	23	충북 단양
1 (6)	강원도 대관령	29	충북 충주
101	미상	34	충북 음성
2 (9)	강원도 대관령	38	충북 충주
28	충남 성환	43	충북 충주
288	충남 성환	44	충북 충주
32	충남 성환	59	충북 충주
48	충남 성환	61	충북 충주
55086	전남	70	충북 충주
55602	전남		
592	충남 서산		
598	충남 서산		
678	충남 서산		
90065	미상		
91181	미상		

^a Tissue culture adapted bovin rotaviruses isolated from samples

^b Rotavirus positive fecal samples by electron microscopy and SDS-PAGE analysis

3. 전기영동 (Polyacrylamide gel electrophoresis: PAGE)

추출된 dsRNA는 7.5% polyacrylamide gel 상에서 12mA로 14~16시간 전기영동한 후 ethidium bromide (0.5 µg/ml)로 염색하여 UV illuminator로 분리된 RNA의 유무를 확인하였다 [15, 26].

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

RNA 샘플에 DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma)를 넣고 100℃에서 5분간 변성시킨 후 얼음에 보관하였다. 증류수 66 µl, 10× PCR reaction buffer 10 µl, 25 mM MgCl₂ 5 µl, dNTP (각각 2.0 mM, Amersham) 8 µl, primer (+ sense 및 - sense, 20 pmol) 2 µl, RNA template 6 µl, RNase inhibitor (Gibco BRL) 6.25 units, RT (Reverse transcriptase, Gibco BRL) 50 units, *Taq* DNA polymerase (Perkin-Elmer) 2.5 units를 넣었다. Primer는 Table 2에서와 같이 VP7은 유전자 (1062bp) 전체, VP4는 일부분 (1094bp)만을 증폭할 수 있도록 제작하였다. cDNA 합성 (37℃, 90 min), RT 불활화 및 pre PCR (95℃, 5 min), PCR (denaturation 94℃, 1 min, annealing 55℃, 1 min, extension 72℃, 2 min, 30 cycles) 그리고 post PCR (72℃, 7 min)은 GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer)에서 실시하였다. 반응산물은 1% agarose gel상에서 전기영동한 뒤 ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였다.

5. RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

G type 결정은 VP7 PCR 반응산물을 제한효소 *EcoRV*, *BamHI*, *HpaII* 그리고 *NlaIV*로 37℃에서 1시간 동안 소화시킨 후 1.5% agarose gel상에서 전기영동하여 표준주와 비교 분석함으로써 결정하였다. P type 결정은 G type과 마찬가지로 반응산물을 효소 *EcoRV*, *HpaII* 그리고 *NlaIV*로 소화

Table 2. Oligonucleotide primers for RT-PCR

Genes	Sequence ^a (5'→3')	Position
VP7 (full gene)	+ senses : GGC TTT AAA AGC GAG AAT TT	1-20
	- senses : GGT CAC ATC ATA CAA CTC TA	1043-1062
VP4 (partial gene)	+ senses : GGC TTT AAA AGC GAG AAT TT	1-20
	- senses : AAT GCC TGT GAA TCG TCC CA	1075-1094

^a The nucleotide sequences were obtained from GenBank (National Center for Biotechnology Information)

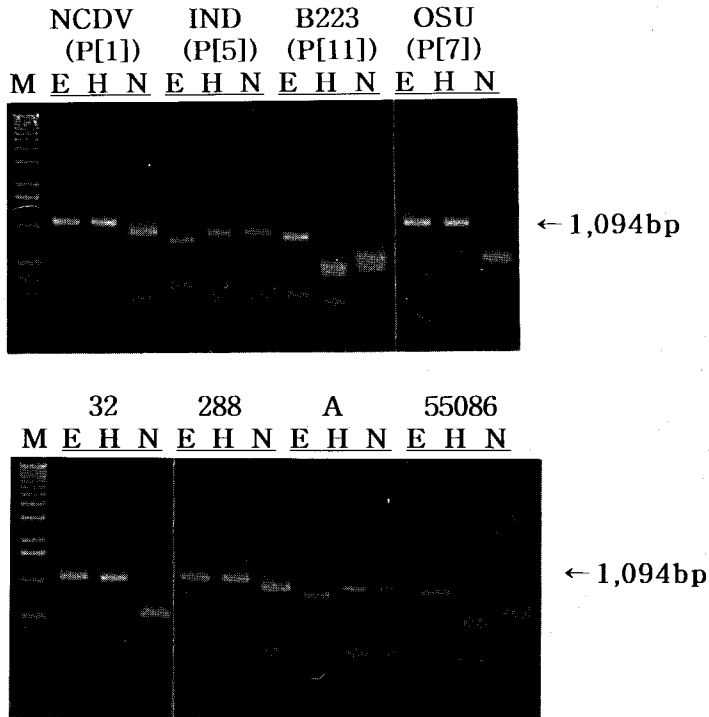


Fig. 1. Restriction endonuclease cleavage patterns of VP4 genes of reference rotaviruses (NCDV, IND, B223 and OSU strain: Top) and Korea isolates of bovine rotavirus (32, 288, A and 55086: Bottom). M: Marker, E: *EcoRV*, H: *HpaII*, N: *NlaIV*.

Table 3. RFLP analysis of VP4 genes of bovine rotavirus Korea isolates with restriction enzymes

Profiles	Enzymes			Types
	<i>EcoRV</i>	<i>HpaII</i>	<i>NlaIV</i>	
A	• ^a	•	935, 159	P[1]
B	817 ^b , 277	860, 234	935, 159	P[5]
C	885, 209	589, 505	591, 503	P[11]
D	•	•	542, 520	P[7]

^a Uncleaved (1094bp)

^b The size of the bands (bp) obtained after enzyme digestion were calculated on basis of nucleotide sequence data

시킨 후 표준주와 비교 분석하여 결정하였다.

6. cDNA 크로닝과 염기서열 분석

정제된 반응산물은 TA vector (pCRII, Invitrogen)에 ligation한 후 *E. coli*에 형질전환하였다. Ampicillin (50 µg/ml, Sigma)이 첨가된 LB 배지에 IPTG (Isopropylthio-β-D-galactoside, 200 mg/ml, Sigma)와 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside, 20 mg/ml in dimethylformamide, Sig-

ma)를 끌고루 퍼지게 한 후 *E. coli*를 도말하여 37°C에서 배양한 다음 백색 집락만을 골라내어 플라스미드를 추출하였다. 추출한 플라스미드는 제한효소로 처리하여 벡터와 insert로 조겐 후 1% agarose gel상에 전기영동하여 크기를 확인하였다.

cDNA의 염기서열 결정은 Sanger의 dideoxy chain termination을 원리로 하여 ALFexpress™ DNA Sequencer (Pharmacia Biotech)에서 실시하였으며 염기서열 분석은 clustal w와 DNASIS 프로그램을 이용하였다.

결과 및 성적

1. 로타바이러스 RNA 추출 및 전기영동

국내 소 로타바이러스 분리주와 송아지 설사 분변으로부터 핵산을 추출하여 전기영동한 결과 42개의 샘플에서 로타바이러스 특유의 band를 관찰할 수 있었다. 소 로타바이러스의 전기영동상은 모두 serogroup A에 속하는 long genome electropherotype을 가지고 있었으며 nongroup A의

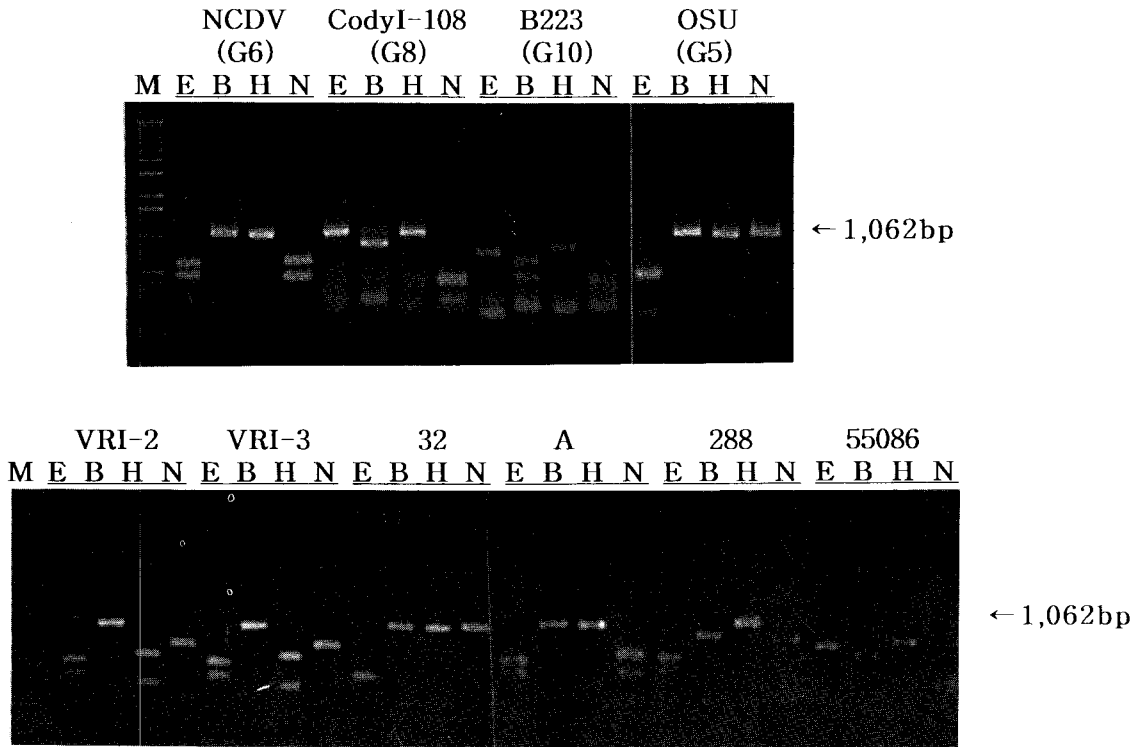


Fig. 2. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of VP7 genes of reference rotaviruses (NCDV, Cody I-801, B223 and OSU strain: Top) and Korea isolates of bovine rotavirus (VRI-2, VRI-3, 32, A, 288 and 55086: Bottom). M: Marker, E: *EcoRV*, B: *BamHI*, H: *HpaII*, N: *NlaIV*.

electropherotype은 관찰되지 않았다.

2. RT-PCR

소 로타바이러스 표준주 (NCDV, IND, Cody I-801, B223) 및 돼지 로타바이러스 표준주 (OSU) 그리고 전기영동 결과 로타바이러스 양성으로 판명된 42개 샘플로부터 추출된 RNA를 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과 VP4 (partial genes)는 1094bp, VP7 (full genes)은 1062bp에서 증폭되었다.

3. RFLP analysis

증폭된 표준주 (NCDV, IND, B223, OSU)의 VP4 유전자를 제한효소 *EcoRV*, *HpaII* 그리고 *NlaIV*로 소화시킨 후 전기영동하여 RFLP를 분석한 결과 Fig. 1과 같이 4가지 형태로 나타났으며 profile A, B, C, D로 명명하였다. NCDV는 *NlaIV*에서만 cleavage site가 존재하여 935bp, 159bp의 band를 형성하였고, *EcoRV*와 *HpaII*에서는 소화되지 않았다. IND는 3개 효소 *EcoRV*, *HpaII*, *NlaIV*에 cleavage site가 존재하여 *EcoRV*는 817bp,

277bp, *HpaII*는 860bp, 234bp, 그리고 *NlaIV*는 935bp, 159bp의 band를 형성하였다. B223 또한 3개 효소 *EcoRV*, *HpaII*, *NlaIV*에 cleavage site가 존재하여 *EcoRV*는 885bp, 209bp, *HpaII*는 589bp, 505bp, 그리고 *NlaIV*는 591bp, 503bp의 band를 형성하였다. OSU는 *NlaIV*에서만 cleavage site가 존재하여 542bp, 520bp의 band를 형성하였다 (Fig. 1, Table 3). 분변샘플의 PCR산물을 제한효소로 소화시킨 후 전기영동을 실시한 결과 국내 분리주인 288, A, 55086, 그리고 32는 각각 NCDV, IND, B223, 그리고 OSU와 동일한 형태를 나타내었다 (Fig. 1).

증폭된 표준주 (NCDV, Cody I-801, B223, OSU)의 VP7 유전자를 제한 효소 *EcoRV*, *BamHI*, *HpaII* 그리고 *NlaIV*로 소화시킨 후 전기영동하여 RFLP를 분석한 결과 Fig. 2와 같이 5가지 형태로 나타났으며 profile I, II, III, IV, V로 명명하였다. NCDV는 *EcoRV*와 *NlaIV*에 cleavage site가 존재하여 각각 600bp, 462bp와 627bp, 435bp의 band를 형성하였고, *BamHI*과 *HpaII*에서는 소화

Table 4. RFLP analysis of VP7 genes with restriction enzymes

Profiles	Enzymes				Types
	<i>EcoRV</i>	<i>BamHI</i>	<i>HpaII</i>	<i>NlaIV</i>	
I	600, 462	• ^a	•	627, 435	G6
II	•	867 ^b , 195	•	416, 388, 195	G8
III	760, 215, 87	627, 435	835, 227	435, 369, 258, 63	G10
IV	600, 462	•	682, 258	804, 258	G6 subtype
V	513, 462, 87	• •	•	•	G5

^a Uncleaved (1062bp)

^b The size of the bands (bp) obtained after enzyme digestion were calculated on basis of nucleotide sequence data

Table 5. Comparison of nucleotide sequence homology of VP7 genes from Korea isolates of bovine rotavirus (A, VRI-2, 288, 55086, and 32) and reference strains (NCDV, Cody I-801, B223, and OSU)

Strains	Similarity (%)								
	NCDV	Cody I-801	B223	OSU	A	VRI-2 ^b	288	55086	32 ^c
NCDV (G6)	• ^a	76	75	76	93	83	76	76	77
Cody I-801 (G8)		•	75	75	76	77	87	77	76
B223 (G10)			•	75	75	76	75	96	76
OSU (G5)				•	74	76	77	75	98
A					•	83	75	77	76
VRI-2						•	75	78	78
288							•	77	78
55086								•	77
32									•

^a 100% homology

^{b, c} Partial sequence data

되지 않았다. Cody I-801은 *BamHI*과 *NlaIV*에서 만 cleavage site가 존재하여 각각 867bp, 195bp와 416bp, 388bp, 195bp의 band를 형성하였다. B223는 4개 효소 모두에 cleavage site가 존재하여 *EcoRV*는 760bp, 215bp, 87bp, *BamHI*은 627bp, 435bp, *HpaII*는 835bp, 227bp, *NlaIV*는 435bp, 369bp, 258bp, 63bp의 band를 형성하였다. OSU는 *EcoRV*에만 cleavage site가 존재하여 513bp, 462bp, 87bp의 band를 형성하였다 (Fig. 2, Table 4). 분변샘플의 PCR산물을 효소로 소화시킨 후 전기영동을 실시한 결과 국내 분리주인 A, 55086, 그리고 32는 각각 NCDV, B223, 그리고 OSU와 동일한 형태를 나타내었고, 288은 *EcoRV*, *BamHI* 그리고 *NlaIV*에 cleavage site가 존재하여 *EcoRV*는 600bp, 462bp, *BamHI*은 867bp, 195bp, *NlaIV*는 804bp, 195bp, 53bp의 band를 형성하였다. VRI-2와 VRI-3의 RFLP 결과는 NCDV의 *EcoRV*와 *BamHI* pattern과는 동일하였지만 *HpaII*와 *NlaIV* pattern에서는 각각 682bp, 258bp와 804bp, 258bp로 다소 차

이가 있었다 (Fig. 2).

4. 염기서열 분석

RFLP analysis에 의해 결정된 국내 소 로타바이러스의 G와 P type을 확인하고 표준주와 국내 분리주 유전자의 유사성을 알아보기 위해 유전자의 염기서열을 분석하였다.

국내 분리주 (A, VRI-2, 288, 55086, 32)와 표준주의 염기서열을 비교한 결과 Table 5와 같이 A는 NCDV와 93%의 높은 염기서열 일치성을 보였으나 Cody I-801과는 76%, B223와는 75% 그리고 OSU와는 74%의 일치성을 보였다. G6 subtype인 VRI-2는 NCDV와 83%의 일치성을 보였고 Cody I-801, B223, OSU와는 각각 77%, 76%, 76%의 일치성을 보였다. 288은 Cody I-801과는 87%, NCDV와는 76%, B223와는 75%, 그리고 OSU와는 77%의 일치성을 보였다. 55086은 B223와 96%의 염기서열 일치성을 보였고 NCDV와는 76%, Cody I-801과는 77%, OSU와는 75%의 일치

Table 6. Prevalence of G and P types of bovine rotavirus isolates by RT-PCR and RFLP analysis

G/P types	No. of samples (%)				
	P[1]	P[5]	P[11]	P[7]	Total
G6	1 (2.4)	23 (54.8)	-	-	24 (57.1)
G6 subtype	-	-	2 (4.8)	-	2 (4.8)
G8	1 (2.4)	-	-	-	1 (2.4)
G10	-	-	3 (7.1)	-	3 (7.1)
G5	-	-	-	12 (28.6)	12 (28.6)
Total	2 (4.8)	23 (54.8)	5 (11.8)	12 (28.6)	42 (100)

성을 보였다. 32는 OSU와 98%의 높은 일치성을 보였고, NCDV와는 77%, Cody I-801과 B223는 각각 76%의 일치성을 보였다.

5. G와 P type의 분포

국내 소 로타바이러스의 RFLP analysis 및 sequencing 결과 G type은 G6 subtype을 포함한 G6 type이 61.9% (26/42)로 가장 일반적인 혈청형으로 밝혀졌고 G5 type이 28.6% (12/42), G10 type이 7.1% (3/42) 그리고 G8 type이 2.4% (1/42)의 순으로 나타났다. P type은 P[5] type이 54.8% (23/42)로 가장 일반적인 혈청형으로 밝혀졌고 P[7] type이 28.6% (12/42), P[11] type이 11.8% (5/42) 그리고 P[1] type이 4.8% (2/42)의 순으로 나타났다. 특히, 돼지 로타바이러스 혈청형으로 알려졌던 G5 type과 P[7] type이 국내 소 로타바이러스 분리주에서 각각 28.6% (12/42)로 나타났다 (Table 6).

G와 P type을 조합한 결과 G6/P[5]가 54.8% (23/42), G5/P[7]이 28.6% (12/42), G10/P[11]이 7% (3/42), G6 subtype/P[11]이 4.8% (2/42) 그리고 G6/P[1]과 G8/[1]이 각각 2.4% (1/42)로 나타났다.

고 찰

본 연구에서는 국내 소 로타바이러스의 G와 P 혈청형을 RT-PCR과 RFLP analysis로 확인하였고 중화항체형성에 관여하는 VP7 유전자의 염기서열을 결정하여 표준주와의 유사성을 비교 분석하였다.

국내 소 로타바이러스에 대한 VP4 유전자의 RFLP analysis 결과 국내 분리주인 288, A, 55086은 각각 소 로타바이러스의 표준주인 NCDV (P[1]), IND (P[5]), B223 (P[11])와 동일한 cleavage patterns을 형성하였으나 국내 분리주 32는 소 로타바이러스 표준주의 cleavage patterns과는 차이를

보였다. 국내 분리주 32와 같이 상이한 patterns을 형성한 분리주의 혈청형을 조사하기 위해 다른 표준주 (OSU, Gottfried strain)의 RFLP analysis를 실시하였다. 그 결과 돼지 로타바이러스인 OSU strain과 동일한 cleavage patterns을 확인하였다. 그리고 VP7 유전자의 RFLP 분석 결과 국내 분리주인 A와 55086은 각각 NCDV (G6)와 B223 (G10)의 cleavage patterns과 동일한 결과를 나타냈으나 288, VRI-2, VRI-3 그리고 32 분리주는 소 로타바이러스 표준주의 cleavage patterns과는 차이를 보였다. 국내 분리주 288, VRI-2, VRI-3 그리고 32의 혈청형을 결정하기 위하여 다른 표준주 (OSU, Gottfried strain)의 RFLP 분석과 nucleotide sequencing을 실시하였다. 국내 분리주 288은 Cody I-801과는 차이를 보였으나 일반적인 G8 type의 RFLP pattern과는 동일한 결과 (*EcoRV*-600bp, 462bp, *Bam*HI-867bp, 195bp, *Hpa*II-1062bp, *Nla*IV-804bp, 195bp, 53bp)를 나타내었다. Chang *et al* [9]에 의한 결과에서도 G8 type인 69M과 Cody I-801은 다른 RFLP pattern을 보였다고 보고하였다. VRI-2와 VRI-3는 G6 type인 NCDV와 83%의 nucleotide homology를 보였으나 KN-4 (G6 subtype) [12]와는 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 결과 90% 이상의 유사성을 보였기에 VRI-2와 VRI-3를 G6 subtype으로 분류 하였다. 32는 돼지 로타바이러스인 OSU strain과 동일한 cleavage patterns을 보였고 90% 이상의 nucleotide homology로 G5 type임을 확정하였다.

Suzuki *et al* [12]은 세포배양으로 분리된 일본 소 로타바이러스의 G와 P 혈청형을 nested PCR 기법으로 조사한 결과 G6가 75%, G10이 20% 그리고 혈청형을 구별할 수 없는 샘플이 5% 존재한다고 보고하였고 P type은 P[5]가 55%, P[11]이 27.5%, P[1]이 10%, 그리고 7.5%는 혈청형을 구별할 수 없다고 보고하였다. G와 P type을 조합

한 결과 G6/P[5]가 42.5%로 가장 일반적인 혈청형으로 나타났고 G6/P[11]과 G6/P[1]은 10%, G10/P[11]은 7.5%로 분리되었다고 보고하였다. Chang *et al* [9]은 RT-PCR과 RFLP analysis를 이용하여 86 BRV (Bovine rotaviruses) fecal samples의 G type을 조사한 결과 G6는 60.5%, G10은 19.8%, G8은 7%, 그리고 혼합 감염인 G6+G10은 10.4%로 존재하였다고 보고하였다. P type을 조사한 결과에서 P[5]는 64%, P[11]은 28%, P[1]은 1.2%로 존재하였다고 보고하였으며, G6/P[5] type이 46.7%로 가장 일반적인 혈청형이라고 보고하였다.

국내 소 로타바이러스의 G와 P type 및 G와 P type을 조합한 결과는 미국과 일본에서 조사한 결과와 마찬가지로 G6, P[5], 그리고 G6/P[5] type이 가장 우세하게 존재하였다. 이와 같은 결과로 미국 [9, 10], 일본 [12], 그리고 국내 소 로타바이러스의 가장 일반적인 혈청형이 G6/P[5] type임을 알 수 있었다. 그러나 소 로타바이러스에서 돼지 로타바이러스의 혈청형인 G5와 P[7]이 조사된 것은 소와 돼지사이에서 로타바이러스의 interspecies transmission 또는 natural reassortments가 발생했기 때문이라고 사료된다.

최근에 돼지 분변에서 소와 사람 로타바이러스의 혈청형으로 알려진 G6와 G8 type의 분리가 보고되었다 [21]. 소 로타바이러스의 일반적인 혈청형은 G6 type으로 알려져 있었으나, Gerna *et al* [22]에 의해 사람에게서도 보고되었다. 또한 G8 혈청형은 제일 처음 사람에게서 보고가 되었으나 소에서도 보고되었다 [10]. Pongsuwanna *et al* [16]은 ELISA와 PCR법으로 돼지 로타바이러스의 혈청형을 조사하여 G10 type의 존재를 확인하였고 이러한 결과를 소와 돼지사이에 로타바이러스의 interspecies transmission 때문이라고 생각하였다. 또한 소 로타바이러스 분리주의 G/P 혈청형 조합이 다양하게 존재하고 동물과 사람에서 유래한 strains이 같은 serotypes에 존재하는 이유를 Parwani *et al* [7, 10]과 Suzuki *et al* [12]은 종간의 transmission, 조상으로부터의 진화, 그리고 다른 G와 P type을 가진 바이러스주의 natural reassortments로 설명하였다.

국내에서 분리된 A strain은 NCDV 및 UK strain과 거의 동일한 염기서열과 아미노산 서열을 나타냈기 때문에 전형적인 G6 type으로 보여진다. 최근 일본에서 보고된 G6 subtype은 G6

type의 표준주와 약 85%의 염기서열 일치성과 약 90%의 아미노산서열 일치성을 보였다 [23]. G6 subtype으로 분리된 국내 분리주 VRI-2도 NCDV와 83%의 염기서열 일치성을 보였고 G6 subtype인 KN-4와는 BLAST 결과 95% 이상의 일치성을 보였다. 국내에서 분리된 288은 Cody I-801과 87%의 염기서열 일치성을 보였으나 추정 아미노산서열은 96%의 일치성을 보였다. 두 strain간의 염기서열은 다소 상이성을 보이거나 아미노산서열의 높은 일치성을 보인 것으로 항원성의 차이는 없을 것으로 사료된다. 국내에서 분리된 55086 strain은 B223와 96%, 96%로 거의 동일한 염기서열과 아미노산서열을 나타냈기 때문에 전형적인 G10 혈청형으로 보여졌다 [24].

본 연구에서 국내 소 로타바이러스의 G와 P 혈청형 및 G/P 조합에 대한 조사와 VP7 유전자의 염기서열을 분석한 결과는 국내 소 로타바이러스 감염에 대한 이해와 VP7 유전자의 분자생물학적 특성을 이해하는데 도움이 될 것으로 사료된다. 또한 국내 소 로타바이러스의 일반적인 혈청형인 G6의 VP7 유전자와 P[5]의 VP4 유전자를 재조합 백신에 응용한다면 소 로타바이러스 감염에 대한 방어 효과를 증대시킬 수 있을 것이다. 차후 능동면역에 중요한 역할을 하는 VP4 유전자의 염기서열과 아미노산서열을 분석하여 국내 소 로타바이러스의 특성을 조사해야 할 것이고 또한 단백질 차원에서의 연구도 진행되어야 할 것이다.

결 론

24개의 국내 소 로타바이러스 분리주와 18개의 송아지 설사분변을 이용하여 RT-PCR 및 RFLP analysis로 G와 P type을 조사하였고, 또한 국내 분리주 (A, 288, 55086, 32, VRI-2)의 VP7 유전자를 크로닝하여 염기서열을 결정함으로써 표준주와 염기서열 유사성을 분석하였다.

1. 국내 소 로타바이러스는 RT-PCR과 RFLP 분석법으로 G와 P type을 구분할 수 있었다.

2. 국내 소 로타바이러스의 G type은 G6 subtype을 포함한 G6 type이 61.9% (26/42)로 가장 일반적인 혈청형으로 밝혀졌고, G5 type이 28.6% (12/42), G10 type이 7.1% (3/42) 그리고 G8 type이 2.4% (1/42)의 순으로 나타났다. P type은 P[5] type이 54.8% (23/42)로 가장 일반적인 혈청형으

로 밝혀졌고, P[7] type이 28.6% (12/42), P[11] type이 11.8% (5/42), P[1] type이 4.8% (2/42)의 순으로 나타났다.

3. G와 P type을 조합한 결과 G6/P[5]가 54.8% (23/42), G5/P[7]이 28.6% (12/42), G10/P[11]이 7% (3/42), G6 subtype/P[11]이 4.8% (2/42) 그리고 G6/P[1]과 G8/[1]이 각각 2.4% (1/42)로 국내 소 로타바이러스의 가장 일반적인 혈청형은 G6/P[5] type으로 밝혀졌다.

4. 돼지 로타바이러스의 혈청형으로 알려졌던 G5/P[7] type이 국내에서 28.6% (12/42)로 나타났다.

5. 염기서열 분석 결과 A는 NCDV와 93%의 높은 염기서열 일치성을 보였으나 Cody I-801과는 76%, B223와는 75%, 그리고 OSU와는 74%의 일치성을 보였다. G6 subtype인 VRI-2는 NCDV와 83%의 일치성을 보였고 Cody I-801, B223, OSU와는 각각 77%, 76%, 76%의 일치성을 보였다. 288은 Cody I-801과는 87%, NDCV와는 76%, B223와는 75% 그리고 OSU와는 77%의 일치성을 보였다. 55086은 B223와 96%의 염기서열 일치성을 보였고, NCDV와는 76%, Cody I-801과는 77%, OSU와는 75%의 일치성을 보였다. 32는 OSU와 98%의 높은 일치성을 보였고 NCDV와는 77%, Cody I-801과 B223는 각각 76%의 일치성을 보였다. 따라서 A와 VRI-2는 G6, 288은 G8, 55086은 G10, 32는 G5 type으로 확정하였다.

참 고 문 헌

1. Estes MK, Palmer EL, Obijeski JF: Rotaviruses: a review. *Curr Top Microbiol Immunol* 105: 123-184, 1983.
2. Estes MK, Cohen J: Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 53: 410-449, 1989.
3. Huang J, Nagesha HS, Snodgrass DR, Holmes IH: Molecular and serological analyses of two bovine rotaviruses (B-11 and B-60) causing calf scours in Australia. *J Clin Microbiol* 30: 85-92, 1992.
4. Caust J, Dyal-Smith ML, Lazdins I, Holmes IH: Glycosylation, an important modifier of rotavirus antigenicity. *Arch Virol* 96: 123-134, 1987.
5. Ruggeri FM, Greenberg HB: Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *J Virol* 65: 2211-2219, 1991.
6. Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC: VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. *J Clin Microbiol* 32: 1333-1337, 1994.
7. Parwani AV, Rosen BI, Flores J, McCrae MA, Gorziglia M, Saif LJ: Detection and differentiation of bovine group A rotavirus serotype using polymerase chain reaction-generated probes to the VP7 gene. *J Vet Diagn Invest* 4: 148-158, 1992.
8. Tsunemitsu H, Saif LJ, Jiang B, Shimizu M, Hiro M, Yamaguchi H, Ishiyama T, Hirai T: Isolation, characterization, and serial propagation of a bovine group C rotavirus in a monkey kidney cell line (MA104). *J Clin Microbiol* 29: 2609-2613, 1991.
9. Chang KO, Parwani AV, Saif LJ: The characterization of VP7 (G type) and VP4 (P type) genes of bovine group A rotaviruses from field samples using RT-PCR and RFLP analysis. *Arch Virol* 141: 1727-1739, 1996.
10. Parwani AV, Hussein HA, Rosen BI, Lucchelli A, Navarro L, Saif LJ: Characterization of field strains of group A bovine rotaviruses by using polymerase chain reaction-generated G and P type-specific cDNA probes. *J Clin Microbiol* 31: 2010-2015, 1993.
11. Snodgrass DR, Fitzgerald T, Campbell I, Scott FMM, Browning GF, Miller DL, Herring AJ, Greenberg HB: Rotavirus serotypes 6 and 10 predominate in cattle. *J Clin Microbiol* 28: 504-507, 1990.
12. Suzuki Y, Sanekata Y, Sato M, Tajima K, Matsuda Y, Nakagomi O: Relative frequencies of G (VP7) and P (VP4) serotypes determined by polymerase chain reaction assays among Japanese bovine rotaviruses isolated in cell culture. *J Clin Microbiol* 31: 3046-3049, 1993.
13. Bellinzoni RC, Blackhall JO, Mattion NM, Estes MK, Snodgrass DR, LaTorre JL, Scodeller EA: Serological characterization of bovine rotaviruses isolated from dairy and beef herds in Argentina. *J Clin Microbiol* 27: 2619-2623, 1989.
14. Flores J, Sears J, Perez-Schael I, White L,

- Garcia D, Lanata C, Kapikian AZ: Identification of human rotavirus serotype by hybridization to polymerase chain reaction-generated probes derived from a hyperdivergent region of the gene encoding outer capsid protein VP7. *J Virol* 64: 4021-4024, 1990.
15. Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forresyer B, Fang Z-Y: Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 28: 276-282, 1990.
 16. Pongsuwanna Y, Taniguchi K, Chiwakul M, Urasawa T, Wakasugi F, Jayavasu C, Urasawa S: Serological and genomic characterization of porcine rotaviruses in Thailand: detection of a G10 porcine rotavirus. *J Clin Microbiol* 34: 1050-1057, 1996.
 17. Santos N, Riepenhoff-Talty M, Clark HF, Offit P, Gouvea V: VP4 genotyping of human rotavirus in the United States. *J Clin Microbiol* 32: 205-208, 1994.
 18. Kim D, Lyoo YS, Lyoo HS, Yoon CK: Etiology and clinical aspects of diarrhea of Korean native calves during the suckling period. *Kor J Vet Res* 30: 255-260, 1990.
 19. Ahn JM, Cho SH, Kang SY: Studies on the production and characterization of monoclonal antibodies against bovine rotaviruses isolated in Korea. *Kor J Vet Res* 36: 395-403, 1996.
 20. Rosen BI, Parwani AV, Lopez S, Flores J, Saif LJ: Serotypic differentiation of rotaviruses in field samples from diarrheic pigs by using nucleic acid probes specific for porcine VP4 and human and porcine VP7 genes. *J Clin Microbiol* 32: 311-317, 1994.
 21. Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC: Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol* 32: 1338-1340, 1994.
 22. Gene 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, 1992.
 23. Matsuda Y, Isegawa Y, Woode GN, Zheng S, Kaga E, Nakagomi T, Ueda S, Nakagomi O: Two-way cross-neutralization mediated by a shared P (VP4) serotype between bovine rotavirus strains with distinct G (VP7) serotypes. *J Clin Microbiol* 31: 54-58, 1993.
 24. Kang SY, Jeon SJ, Chang KO, Park YH, Kim WY: Cloning and nucleotide sequence analysis of VP7 genes of bovine rotaviruses isolated in Korea. *Kor J Vet Res* 37: 367-374, 1997.