

돼지 전염성 위장염 바이러스(국내분리주)의 분자생물학적 특성 규명

권혁무·피재호

강원대학교 수의학과
(1997년 12월 12일 접수)

Molecular biological characterization of transmissible gastroenteritis viruses isolated in Korea

Hyuk-moo Kwon, Jae-ho Pi

Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University
(Received Dec 12, 1997)

Abstract : Sixteen Korean field transmissible gastroenteritis viruses (TGEVs) were isolated using swine testicular cell (STC) and the genomic diversity of them was analyzed. All TGEV isolates produced a typical cytopathic effect in STC and were confirmed as TGEV by immunofluorescence assay using monoclonal antibody against TGEV and PCR using TGEV specific primers. RNAs from TGEV field isolates and vaccine TGEV were extracted and amplified by RT and PCR. The RT-PCR products were digested with selected restriction enzymes and analyzed RFLP patterns. The N-terminal end region of S gene and ORF 3 and 3-1 genes of TGEV amplified by TGEV specific primer pairs seemed to be conserved. Most specific variations were detected in S gene amplified by TGEV 4/6 primer pairs which includes antigenic sites A and D. When the PCR products were treated with *Sau3AI* and *Ssp I*, Bvac(vaccine strain), field isolates 133 and 347 were differentiated from Miller and Purdue types. In the case of D5 field isolates, it was classified into Purdue type by *Sau3AI* but classified into independent TGEV by *Ssp I*. Two different TGEV strains from D2 sample were confirmed by plaque purification and RT-PCR-RFLP analysis. To investigate the change occurring in TGEV genome after serial passage, the TGEV P44 strain was passaged through STC. There were specific changes in S gene and a large deletion was observed in ORF 3 and 3-1 genes. These studies showed that a distinct difference in genome exists among TGEV field isolates.

Key words : TGEV, RT/PCR/RFLP, spike glycoprotein gene, ORF 3 & 3-1.

본 연구는 한국과학재단 핵심전문 연구비(961-0606-053-1) 지원으로 수행되었습니다.

Address reprint requests to Dr. Hyuk-moo Kwon, Department of Veterinary Medicine, Kangwon University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea.

서론

돼지 전염성 위장염 바이러스(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)는 구토, 심한 설사 그리고 2주령 미만의 신생자돈에서 높은 폐사율을 특징으로 하는 돼지 전염성 위장염(TGE)의 원인체이다¹.

Coronaviridae에 속하는 TGEV는 다형태성으로 envelope를 가지고 있으며, genome은 single-stranded RNA로 구성되어 있다. TGEV 증식과정에서 최소한 8개의 바이러스 특이 mRNA가 합성된다. TGEV는 3가지 주요 구조단백질 즉, spike(S) glycoprotein, integral membrane(M) glycoprotein 그리고 nucleocapsid(N) protein을 함유하고 있는데 이들은 mRNAs 2, 6 그리고 7로부터 각각 합성된다. mRNA 4로부터 바이러스의 membrane에 관련된 작은 structural polypeptide가 합성되고, 다른 mRNAs인 3, 5 그리고 8로부터는 nonstructural protein이 합성되는 것으로 알려져 있다. 그 중에서 S glycoprotein은 envelope에 곤봉모양의 표면돌기(peplomers)를 형성하여 TGEV의 주요 면역원 단백질로 작용해 바이러스 중화항체를 유도하는 것으로 알려져 있다²⁻⁵. 그러므로 S glycoprotein gene의 분석은 TGEV에서 인정되고 있는 항원의 다양성을 이해하는데 가장 중요한 부분이다. S glycoprotein gene과 M glycoprotein gene 사이에 존재하는 open reading frame (ORFs) 3, 3-1 그리고 4는 병원성이나 조직친화성과 깊은 관련이 있는 것으로 알려졌다⁶.

현재 TGE를 예방하기 위해 사용되는 TGEV 백신들은 불활화 또는 병원성을 약화시킨 바이러스를 사용하고 있다. 이들 백신은 다양한 방어효과를 보여주고 있는데 병원성 TGEV가 가장 우수한 면역효과를 나타내는 것으로 보인다. 현재 사용되고 있는 백신이 TGE에 의한 피해를 줄이는데 성공하지 못한 돈군에서는 자가백신이 효과적인 것으로 나타났다⁷. 이렇게 시판되고 있는 백신에 의하여 방어효과가 없는 돈군에서 자가백신의 성공은 TGEV 분리주들 사이에 다양한 항원성이 존재하고 있음을 암시하고 있다⁷. 바이러스 중화시험에 의하면 TGEV는 오직 한 종류의 혈청형만이 존재하는 것으로 알려져 있지만 단클론항체나 다양한 분자생물학적 방법을 이용한 분석결과에 의하면 항원성, genome 그리고 병원성에 있어서 다양성을 나타내고 있다^{6,8-13}. 그러므로 성공적인 TGEV 백신을 위해서는 이러한 차이점들을 인식하는 것

이 무엇보다도 중요하다.

현재 우리나라에서는 백신을 하고 있지만 TGEV에 의한 피해는 계속 증가하고 있다. 그러나 국내 TGEV 분리주에 대해서는 이러한 분석이 부분적으로 진행되어 오고 있다¹⁴⁻¹⁷. 그리고 대부분의 백신을 수입에 의존하고 있다. 그러므로 국내에서 분리되는 TGEV의 정확한 분석이 이루어진다면 올바른 백신선택을 할 수 있고, 국내 분리주를 백신주로 사용할 경우 좀더 효과적으로 백신주를 선택할 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 목적을 위하여 본 연구에서는 야외 감염돈으로부터 TGEV를 분리하였고, 분리된 바이러스의 gene을 PCR법으로 증폭시킨 다음, RFLP 방법으로 분석하였다.

재료 및 방법

TGEV의 분리 및 배양 : TGEV의 Miller주(Virulent M 6), Purdue주(attenuated P115)와 국내분리주인 P44 strain을 표준바이러스로 사용하였다. 이들 바이러스는 돼지 고환세포(swine testicular cell, STC)를 이용하여 증식시킨 다음 실험에 사용하였다. 세포배양액은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 실험목적에 따라 우혈청을 3~10% 되게 가하고 항생제를 첨가하여 사용하였다. TGEV 야외분리주는 TGE로 의심되는 돼지로부터 다음과 같은 방법으로 분리하였다. TGE로 의심되는 돼지의 소장을 바이러스 분리재료로 사용하였는데, 바이러스 분리전에 형광항체법으로 TGEV를 확인하였다. 소장을 0.05M PBS(pH 7.4)에 10% 유제로 만든 다음 10,000rpm에서 10분동안 원심분리하였다. 상층액을 0.22 μ m filter로 여과한 후, 여과액을 바이러스를 분리할 때까지 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

STC를 이용한 TGEV 분리과정을 요약하면 준비한 소장 여과액을 접종하기 전에 단층이 형성된 STC를 diethyl-aminoethyl-dextran(DEAE-DEXTRAN, 50 μ g/ml)이 첨가된 DMEM으로 처리한 후, 소장 여과액 1ml을 접종하였다. 접종후 60분간 37 $^{\circ}$ C에서 흡착시킨 후 3% 우혈청과 항생제가 첨가된 DMEM을 더하였다. 접종한 STC는 37 $^{\circ}$ C에서 48시간동안 배양하면서 세포병성(cytopathic effect, CPE) 여부를 관찰하였다. CPE 여부에 관계없이 접종된 모든 STC는 48시간후 세번 얼렸다 녹인후 1,500rpm에서 원심분리한 다음 상층액을 계대배양에 이용하였다.

모든 TGEV 분리주는 세번 plaque purification 되었다.

Plaque purification된 분리주를 이용하여 stock virus를 준비하였고, -70℃에 보관하며 실험에 사용하였다. 이들 분리주는 PCR과 간접형광항체법으로 TGEV로 확인하였다.

국내분리주인 P44는 계대배양하였을 때의 변이를 살펴보기 위하여 STC에서 계대배양을 실시하였다.

Indirect immunofluorescence assay : TGEV로 의심되는 바이러스를 단층배양된 STC에 접종하여, 12시간 배양한 후 4℃의 acetone에 5~10분간 고정하였고, 증류수와 PBS(pH 7.2)로 세척과정을 거친 후 세포를 건조시켰다. 건조된 세포는 37℃ 습윤 배양기에서 충북대학교 수의학과에서 분양받은 TGEV 단클론항체를 충분히 도포한 후 30분간 반응시킨 다음 PBS(pH 8.5)로 5분간 세정하였다. 그 후 anti- mouse IgG FITC conjugate(Sigma)를 1 : 64로 희석하여 충분히 도포한 후 37℃ 습윤 배양기에서 30분간 반응시켰고, PBS(pH 7.2)로 3회 세정한 다음 glycerin buffer로 coverglass를 덮은 후 형광현미경 (Carl Zeiss, West Germany)으로 관찰하였다.

TGEV RNA추출과 정제 : 바이러스를 감염시킨 STC가 세포변성을 보일 때 세포를 세번 얼렸다 녹인 후 1, 500rpm에서 원심분리하였다. 깨끗하게 분리된 세포배양 상층액을 바이러스 RNA 추출을 위한 재료로 사용했다. 국내에서 생산 사용하고 있는 백신인 Dvac과 Bvac은 STC에서 증식없이 백신으로부터 직접 RNA를 추출하였다. RNA는 Kwon *et al*¹⁸의 방법에 따라 추출하였다. 간단히 설명하면 sodium dodecyl sulfate(최종농도 2%)와 proteinase K(최종농도 250µg/ml)를 세포배양 상층액에 더하고 55℃에서 5분간 유지시킨 후, acid phenol(pH 4.0)과 chloroform/isoamyl alcohol(49 : 1)로 추출하였다. 추출된 RNA는 RNaid kit (Bio 101)를 사용하여 정제하였다. 마지막으로 RNA는 diethyl-pyrocabonate(DEPC)로 처리된 멸균증류수에 부유한 후 -70℃에 보관하면서 reverse transcriptase(RT) 반응에 이용하였다.

Oligonucleotide primers : Oligonucleotide primer의 염기서열은 이미 발표된 TGEV 염기서열을 참고로 선택하였다¹⁹⁻²¹. 이 primer들은 S gene의 amino terminal쪽 반과 ORFs 3과 3-1을 증폭시키기 위하여 사용하였다(Fig 1).

RT-PCR : RT 반응은 위에서 설명한 대로 준비된 TGEV의 RNA 3~5µl에 2µl의 10X PCR buffer(500mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 9.0, 1.0% Triton X-100)와 2µl의 10mM dNTPs, 250ng antisense primer, 40units RNasin 그리고 1.5µl의 60mM MgCl₂를 첨가했다. 최종 20µl 반응액은

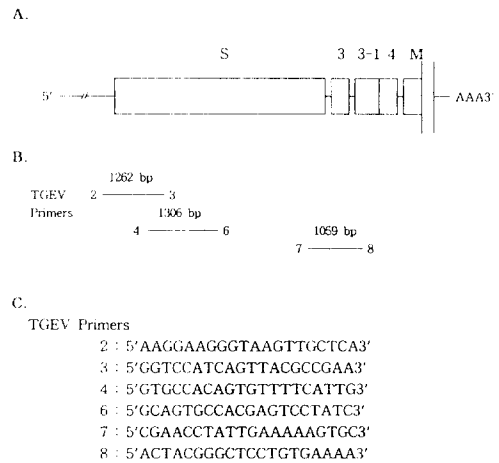


Fig 1. Schematic representation of A) the RNA genome of TGV Miller strain, showing the location of spike (S) glycoprotein gene, open reading frames 3, 3-1 and 4, and the N-terminal M glycoprotein gene; B) the location of primers used in PCR and the expected sizes of the PCR products from the TGEV; and C) the sequence of the primers.

DEPC로 처리한 멸균증류수를 더하여 얻었다. 이렇게 준비된 RT 반응을 위한 혼합액을 65℃에서 10분간 반응시킨 후 200units의 Molony murine leukemia virus RT(GIBCO/BRL)를 더하고 45℃에서 1.5시간 반응시켰다.

PCR을 위해 RT 반응물에 8µl의 10X PCR buffer, 250ng의 sense primer, 3.5µl의 60mM MgCl₂, 그리고 2.5units의 Tag DNA polymerase(Promega)를 더하고 최종반응액 100µl는 멸균증류수를 더하여 얻었다. PCR은 94℃에서 1분동안의 denaturation, 45℃에서 2분동안의 annealing 그리고 74℃에서 5분을 한 cycle로 35 cycles 실행하였다. 증폭된 PCR 생성물은 ethidium bromide를 함유한 1% agarose gel에서 전기영동하여 분석하였다.

Restriction fragment length polymorphism(RFLP) 분석 : 증폭된 S glycoprotein gene과 ORFs 3 그리고 3-1 genes의 PCR 생성물은 표준주로 사용한 Miller주와 Purdue주의 염기서열을 참고로 하여 선택한 제한효소들로 소화시켰다¹⁹⁻²¹. 만약 비특이적인 PCR 생성물들이 제한효소에 의한 profile의 분석에 장애가 될 경우에는 제한효소로 소화시키기 전에 Geneclean Kit(BIO 101)를 사용하여 정제한 다음 소화시켰다. 소화된 PCR 생성물의 RELP pattern은 2% agarose gel에서 전기영동후 관찰하였다.

결 과

TGEV 분리 : 형광항체법으로 TGEV 양성으로 확인된 돼지의 소장을 대상으로 바이러스 분리를 시도하여 16주의 TGEV를 분리하였다. 분리된 TGEV는 STC에서 표준주인 Miller주와 비슷한 CPE를 나타내어 STC상에서는 구별이 불가능하였다. 분리된 바이러스는 간접형광항체법과 TGEV 특이 primer로 TGEV임을 확인하였다 (Fig 2-5). 이러한 바이러스들은 STC에서 세 번 plaque purification 후에 증식시킨 다음 실험에 사용하였다.

TGEV S gene과 ORF 3와 3-1 gene의 증폭 : TGEV 표준주, 백신주 그리고 국내분리주의 S glycoprotein gene을 TGEV 2/3과 4/6 primer pairs를 이용하여 증폭한 후, PCR 생성물을 1% agarose gel에서 전기영동한 결과 각각

1262bp와 1306bp의 특이 band를 확인할 수 있었다(Fig 3, 4). TGEV Miller주는 TGEV 2/3과 4/6 primer pairs에 의하여 증폭된 지역에서 P115 보다 각각 7과 6 base 긴 것으로 알려져 있으나 1% 전기영동상에서는 구별하기 어려웠고 야외분리주들 사이에서도 그 차이점을 인지하기 어려웠다. 이러한 결과는 증폭된 region에 1% 전기영동상에서 인지할 정도의 nucleotide의 addition이나 deletion이 없는 것을 나타낸다. TGEV 7/8 primer pairs로 증폭하였을 때 TGEV M6와 P115는 각각 1059bp와 1102bp의 PCR product를 생성했는데, 백신주를 포함한 국내 야외 분리주는 모두 P115형인 1102bp의 PCR product를 생성하였다(Fig 5). 이들 PCR product의 identity는 conserved region을 인지하는 제한효소로 확인하였다.

Restriction fragment length polymorphism 분석 : TGEV 표준주, 백신주 그리고 백신분리주의 S gene과

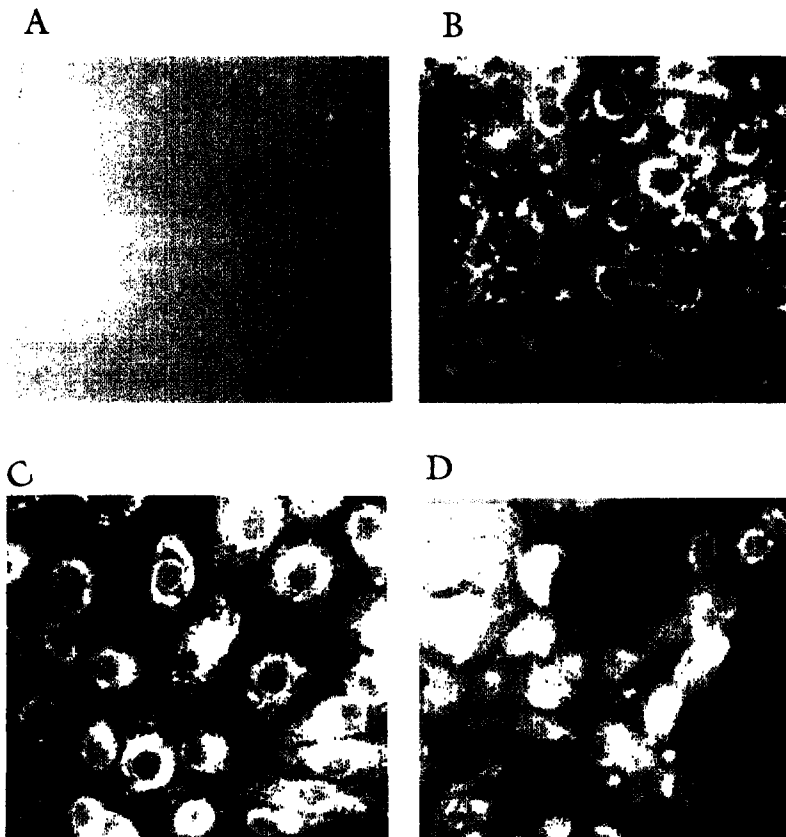


Fig 2. Indirect immunofluorescence assay of TGEV Korea isolates in swine testicular cell. (A) normal ST cell, (B) VRI-48, (C) DAE 5, and (D) 133.

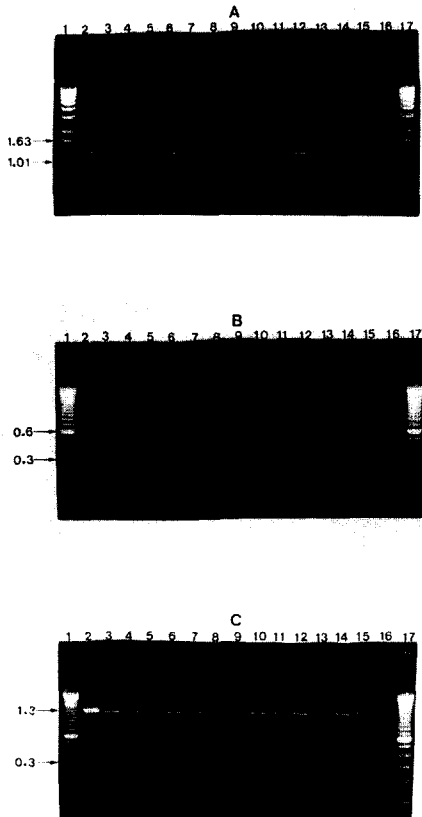


Fig 3. Agarose gel electrophoresis of PCR products of several TGEV isolates amplified by the TGEV 2/3 primer pairs (A) and RFLP patterns of the PCR products digested with *MnlI* (B) and *BstE II* (C). Lanes 1 and 17=molecular weight marker 100bp ladder; lane 2=M6; lane 3=P115; lane 4=Dvac; lane 5=Bvac; lane 6=133; lane 7=347; lane 8=D5; lane 9=K-1; lane 10=K-2; lane 11=K-3; lane 12=K-5; lane 13=96066; lane 14=150; lane 15=176; lane 16=187. Numbers at left and right are molecular weight markers in kilobase pairs.

ORF 3 그리고 3-1 gene의 PCR 생성물을 기존의 염기서열을 참고로 하여 선택한 제한효소로 처리하였을 때 다양한 RFLP pattern을 얻을 수 있었다(Fig 3-5).

가장 특이적인 변이는 TGEV 4/6 primer pairs로 증폭된 S gene에서 관찰되었다(Fig 4-B, C). *Sau3 AI*으로 처리하였을 때 TGEV는 세가지 type으로 분류할 수 있었는데, 첫번째 type은 M6, 두번째 type은 *Sau3 AI*의 recognition site를 가지고 있지 않는 Bvac, 133 그리고 347, 세번째 type은 P115와 같은 RFLP pattern을 갖는 Dvac 백신주와 그 외의 야외분리주들이 속하였다. *Ssp I*에 의한 RFLP

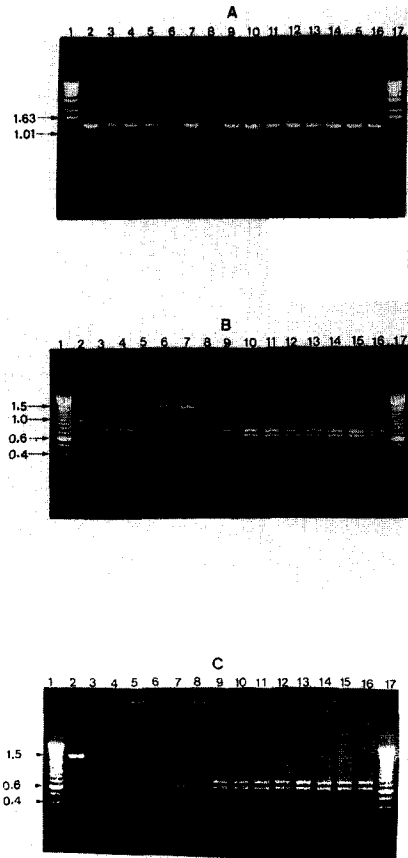


Fig 4. Agarose gel electrophoresis of PCR products of several TGEV isolates amplified by the TGEV 4/6 primer pairs (A) and RFLP patterns of the PCR products digested with *Sau3 AI* (B) and *Ssp I* (C). Lanes 1 and 17=molecular weight marker 100bp ladder; lane 2=M6; lane 3=P115; lane 4=Dvac; lane 5=Bvac; lane 6=133; lane 7=347; lane 8=D5; lane 9=K-1; lane 10=K-2; lane 11=K-3; lane 12=K-5; lane 13=96066; lane 14=150; lane 15=176; lane 16=187. Numbers at left and right are molecular weight markers in kilobase pairs.

pattern은 *Sau3 AI*에 의한 RFLP pattern과 비슷한 양상을 나타내었는데, 예외적으로 *Sau3 AI*에 의한 분류에서 세번째 type으로 분류되었던 D5가 *Ssp I*에 의하여 독립 type을 형성하였다. 특이적으로 D2 소장 sample에서는 두가지 다른 type의 TGEV가 확인되었다(Fig 6-A). D2 소장 sample에서 분리된 TGEV D2는 *Sau3 AI*에 의한 분류에서는 P115와 같은 세번째 type에 속하였으나, *Ssp I*에 의한 분류에서는 세번째 type과 독립적인 type을 형성하는 TGEV가 plaque purification후에 확인되었다. TGEV 2/3 primer pairs로 증폭시킨 S gene의 N-terminal end region

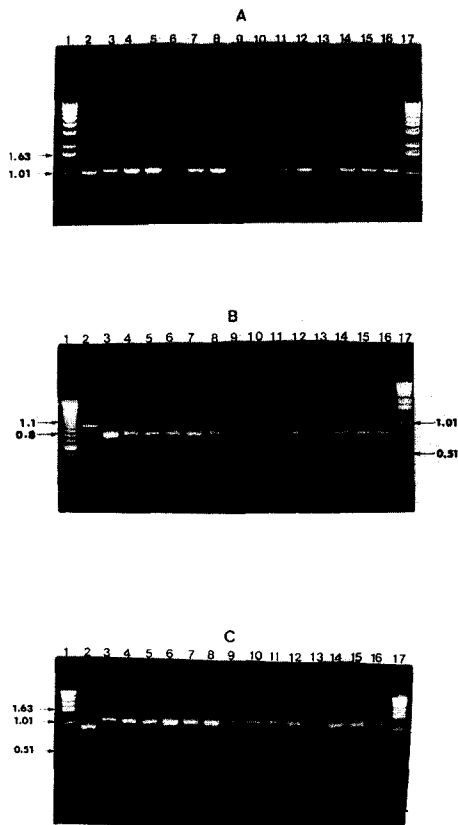


Fig 5. Agarose gel electrophoresis of PCR products of several TGEV isolates amplified by the TGEV 2/3 primer pairs (A) and RFLP patterns of the PCR products digested with *Mnl*I (B) and *BstE* II (C). Lanes 1 and 17=molecular weight marker 100bp ladder; lane 2=M6; lane 3=P115; lane 4=Dvac; lane 5=Bvac; lane 6=133; lane 7=347; lane 8=D5; lane 9=K-1; lane 10=K-2; lane 11=K-3; lane 12=K-5; lane 13=96066; lane 14=150; lane 15=176; lane 16=187. Numbers at left and right are molecular weight markers in kilobase pairs.

은 두가지 type으로 나타났는데, M6 type과 백신주와 모든 야외분리주들이 속하는 P115 type으로 분류되었다 (Fig 3-B, C). TGEV 7/8 primer pairs로 증폭시킨 ORF 3과 3-1 gene을 제한효소 *Acc*I과 *Ase*I으로 처리한 결과는 TGEV 2/3 primer pairs로 증폭시킨 PCR 생성물의 RFLP pattern과 동일하게 M6 type과 모든 백신주와 야외분리주가 속하는 P115 type으로 분류되었다(Fig 5-B, C).

연속 계대배양 후 TGEV의 변이 : STC를 이용하여 TGEV를 실험실에서 계대배양하였을 때 일어나는 변이를 확인하기 위하여 P44 strain을 연속 계대배양하였다.

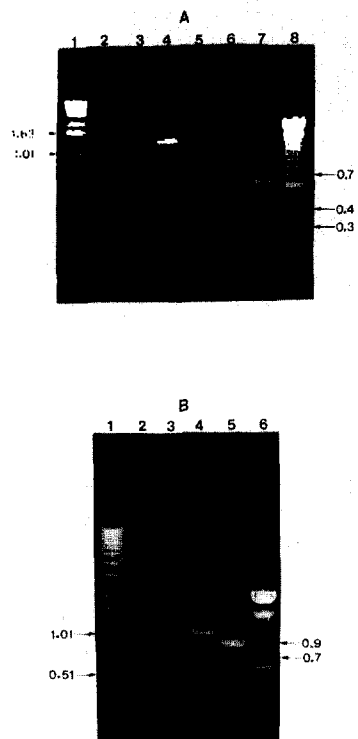


Fig 6. Agarose gel electrophoresis of PCR products of TGEV field isolate D2 amplified by the TGEV 4/6 primer pairs and RFLP patterns of the PCR products digested with *Ssp*I (A) and PCR-amplified products of P44 by the TGEV 7/8 primer pairs(B). (A) Lanes 1 and 8=molecular weight marker 1kb and 100bp ladders; lane 2=PCR product before cloning by plaque purification; lane 3 and 4=PCR products after cloning by plaque purification; lane 5=RFLP pattern of the PCR product digested with *Ssp*I before cloning by plaque purification; lane 6 and 7=RFLP patterns of the PCR products digested with *Ssp*I after cloning by plaque purification. (B) Lane 1 and 6=molecular weight marker 1kb and 100bp ladders; lane 2=P44-PCR product after low passage; lane 3=P44-PCR product after high passages; lane 4 and 5=P44-PCR products after cloning by plaque purification. Numbers at left and right are molecular weight markers in kilobase pairs.

계대배양된 P44의 S gene을 PCR로 증폭시킨 다음 RFLP 분석법에 의하여 분석하였을 때 *Sau*3 AI과 *Ssp*I에 의한 인지부위의 변화가 확인되었다. 그리고 TGEV 7/8 primer pairs에 의하여 증폭된 ORF 3과 3-1 gene에서는 계대배양 후 커다란 deletion이 확인되었다(Fig 6-B). 이러한 deletion mutant는 계대배양후 이 region을 TGEV 7/8 prim-

er pairs로 증폭하였을 때 두종류의 PCR 생성물을 나타내는 band들로 확인되었는데 plaque purification 후에는 각각 하나의 특이 band만이 확인되었다.

고 찰

STC를 이용하여 TGE 증상을 보이는 자돈으로부터 TGEV를 분리하였고, 분리된 TGEV를 PCR로 증폭시킨 다음, 제한효소로 처리하여 RFLP pattern을 분석하였다.

바이러스 분리재료를 접종하기 전에 DAEA-DEXTRAN으로 STC를 처리하였는데 처리하지 않은 STC에 비하여 TGEV 야외분리주를 분리하는데 매우 효과적이었다²². 이는 DEAE-DEXTRAN이 STC에 charge 등의 변화를 유도하여 TGEV 야외주들의 흡착을 용이하게 하는 것으로 보인다. Vaughn과 Paul²²은 TGE 증상을 보이는 돼지로부터 TGEV의 분리를 시도하였는데 24%의 분리율을 나타내었다. 이렇게 낮은 분리율은 TGEV의 생물학적인 다양성, TGEV의 불안정성, enterovirus와 같은 다른 바이러스의 존재 그리고 분리주의 STC에 대한 adaptation의 결여 등이 이유로 지적되었다²². 또한 간접형광항체법에 의하여 TGEV의 존재가 확인된 경우에도 STC에 연속 계대배양했을 때 CPE가 나타나지 않는 경우가 관찰되어 STC에 배양되지 않는 TGEV의 생물학적 type이 존재하는 것으로 추측하였다. 본 실험에서는 간접형광항체법에 의하여 TGEV의 존재가 확인된 경우 거의 대부분이 STC에서 CPE를 관찰할 수 있었다. 특히 TGEV에 특이한 primer를 사용하여 PCR을 하였을 경우에는 CPE가 일어나기 전에도 TGEV의 존재를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 조기에 TGEV의 존재를 확인하는데 PCR이 매우 유용함을 보여준다.

백신주를 포함한 모든 TGEV 야외분리주들은 표준주의 염기서열을 바탕으로 하여 선택한 TGEV에 특이한 primer pairs에 의하여 모두 증폭되었다(Fig 3-5). 이러한 결과로 보아 이 실험에서 사용한 세가지 primer pairs가 인지하는 부위는 모두 conserved region으로 보여 이들 primer는 TGEV를 진단할 때 유용하게 사용될 수 있을 것으로 보인다. TGEV 2/3과 4/6 primer pairs로 증폭된 PCR product는 거의 동일한 크기를 나타내어 증폭된 부위에 커다란 deletion이나 insertion은 없는 것으로 보인다. TGEV 7/8 primer pairs로 증폭하였을 때 백신주를 비롯하여 모든 야외분리주들은 Purdue type으로 나타났다. 염기

서열 분석에 의하면 Miller strain은 S glycoprotein gene과 nonstructural protein gene의 ORF 3-1 사이에 커다란 deletion이 있어 P115에 존재하는 45 nucleotide가 결여되어 있다^{6,19}. 이 부위는 TGEV와 porcine respiratory coronavirus에서 다양한 크기의 deletion이 일어나는 부위로 알려져 있다^{20,22,23}.

RFLP 분석에 의하여 TGEV 야외분리주들은 다양한 type으로 구별할 수 있었다. S glycoprotein gene의 N-terminal end 부위를 TGEV 2/3 primer pairs로 증폭시킨 PCR product를 제한효소 *Mnl*I과 *Bst* EIII로 처리하였을 때, TGEV 야외분리주는 Miller type과 백신주를 포함한 모든 분리주들이 속하는 Purdue type 등 두가지 형으로만 분류되어, 이 부위는 특이한 변이가 일어나지 않는 것으로 나타났다.

TGEV 4/6 primer pairs로 증폭된 PCR product의 분석은 TGEV 야외분리주들 유전자들 사이에 다양한 변이가 일어나고 있음을 보여주었다. 백신주인 Bvac, 야외분리주인 133, 347 등은 Miller와 Purdue type과는 다르게 *Sau*3 AI 인지부위를 가지고 있지 않았다. 이들은 또한 *Ssp*I에 의해서도 Miller와 Purdue type과는 전혀 다른 RFLP pattern을 나타내었다. D5는 *Sau*3 AI에 의해서는 Purdue type으로 분류되었으나 *Ssp*I에 의해서는 전혀 다른 RFLP pattern을 나타내었다. D2는 한 sample 내에 두가지 다른 type의 바이러스가 존재하는 경우인데, plaque purification 후에 Purdue type과 D5 type의 바이러스가 각각 확인되었다(Fig 6-A). D5와 D2는 개체가 다른 한 농장의 sample인데 이 실험결과는 한 돈군내에서도 유전자 변이가 일어나고 있음을 보여주었다. Bvac, 133 그리고 347은 기존 분리주인 VRI-48과 동일한 RFLP pattern을 나타내어 서로 연관성이 있는 것으로 보인다²⁷. 현재 국내에서는 TGEV live 백신을 사용하고 있어 133과 347 같은 야외분리주들이 백신주로부터 유래했는지는 명확하지 않다. 백신주와 야외분리주들의 염기서열이 이루어진다면 상호연관성을 좀더 자세히 알 수 있을 것이다. Register와 Wesley¹⁵는 TGEV의 attenuated vaccine strain을 분석하여, P115 strain의 S gene에서 발견되는 6 base의 deletion이 존재하는 것을 확인하였다. 이러한 deletion은 지금까지 특성이 규명되어온 TGEV의 주요 antigenic epitope를 구성하는 부분은 아닌 것으로 보이며, 병원성의 약화와 직접 관련성이 있지 않는 것으로 보고하였다. 현재 TGEV는 한가지 혈청형만이 인정되고 있지만²⁴ 야외에서 항원적 변이

가 일어나고 있음을 보여주는 연구가 많이 보고되고 있다.^{8,11,12,25} TGEV의 항원적 변이는 주로 단클론항체를 이용하여 수행되어오고 있는데, 대부분의 중화관련 항원 결정기는 S protein에 집중되어 있고 TGEV strain에서 잘 보존되어온 것으로 보인다.^{8,11,12,25,26} 그러나 *Zhu et al*²⁷은 S 또는 M protein으로부터 생성된 중화능력이 없는 단클론항체에 의하여 인지되는 epitope는 TGEV 분리주들 사이에서 광범위한 항원적 변이가 존재함을 밝혔다. 이러한 변이는 특정 epitope와 관련있는 바이러스 유전자 부위의 특정염기가 결여되거나 변화하였음을 암시한다. *Sanchez et al*¹⁰은 다수의 TGEV와 PRCV의 S gene의 염기서열을 분석하여 매년 특정부위에 $7 \pm 2 \times 10^4$ nucleotide substitution의 변이가 point mutation과 recombination에 의해 일어난다고 보고하였다. 이러한 결과들은 TGEV 내에서도 다른 coronavirus인 infectious bronchitis virus¹⁸, feline infectious peritonitis virus²⁸, bovine coronavirus²⁹ et al과 같이 다양한 항원적 변이가 일어나고 있는 것으로 추정된다. 앞으로 백신주를 비롯한 국내 TGEV 분리주를 단클론항체로 검사하면 항원적 변이에 대한 좀더 자세한 정보를 얻을 수 있을 것으로 추정된다.

TGEV 7/8 primer pairs에 의하여 증폭된 PCR product를 선택된 제한효소로 처리하였을 때 나타난 RFLP pattern은 Miller와 Purdue type으로 크게 구별되는 것 이외에 특별한 변이가 관찰되지는 않았다. 이 부위는 TGEV 2/3 primer pairs에 의하여 증폭되는 부위와 마찬가지로 TGEV 내에서 잘 보존되어온 지역으로 보인다.

TGEV를 STC에서 계대배양하였을 때의 변이를 관찰하기 위하여 P44를 연속 계대배양 후에 S gene과 ORF 3과 3-1 부위를 분석하였다. 계대배양후 TGEV 2/3과 4/6 primer pairs를 이용하여 증폭한 S gene의 PCR product의 size는 차이점이 관찰되지 않았다. 그러나 4/6 primer pairs로 증폭시킨 PCR product를 *Sau3* AI과 *Ssp* I으로 처리하였을 때 RFLP pattern에서 차이점이 관찰되었다. 이러한 결과는 야외에서 TGEV가 숙주들 사이에서 계속 전파되며 감염이 이루어질 때 또는 STC에서 계속 배양시 TGEV의 genome에 변이가 일어날 수 있음을 보여준다. 또한 TGEV 7/8 primer pairs로 증폭시킨 ORF 3과 3-1 gene에서는 큰 deletion이 관찰되었다(Fig 6-B). 계대배양후 ORF 3과 3-1 gene을 증폭시킬 수 있는 TGEV 7/8 primer pairs로 PCR을 실시하였을 때 두개의 band가 관찰되었는데 large band는 original P44로 보이며, small band

는 deletion mutant로 추정되어 plaque purification 후에 다시 PCR을 실시하였다. 그 결과 다수의 original P44로 추정되는 clone이 plaque purification에 의하여 얻어졌고, deletion mutant로 보이는 clone이 확인되었다. 이 실험에서 cloning 된 deletion mutant로 추정되는 clone(Fig 6-B의 lane 5)은 cloning 전에 관찰되었던 deletion mutant(Fig 6-B의 lane 3) 보다 size가 큰 것으로 나타나 lane 5의 cloning된 mutant는 deletion 되는 과정에 있는 P44가 cloning된 것으로 추정된다. 이러한 결과는 TGEV를 STC에서 연속 계대배양하면 일시에 모든 바이러스에서 deletion이 일어나는 것이 아니라 부분적이고 선택적으로 deletion이 일어나기 때문인 것으로 보인다. 아직 ORF 3과 ORF 3-1 gene의 기능에 대해서는 확실하게 밝혀져 있지 않은데 이들 gene은 TGEV의 병원성을 결정하는데 중요한 것으로 보여진다.^{6,22} *Wesley et al*⁶은 병원성 TGEV인 Miller strain으로부터 유래한 비병원성의 small-plaque 변이주의 특성을 분석하였다. 이들 TGEV 변이주는 ORF 3과 3-1 부위를 encoding하는 RNA 3과 4에 462 nucleotide가 deletion 되어 RNA 3과 4의 transcriptional recognition sequence가 소실되었다. 이러한 결과로 보아 이들 gene의 생성물은 TGEV의 증식을 위하여 반드시 요구되지는 않지만 바이러스의 plaque 형태, 조직친화성, 병원성 그리고 돼지 백혈구 내에서의 지속성 등에 영향을 미치는 것으로 추정된다. *Britton et al*²³은 병원성 TGEV를 STC에서 18대 계대배양후 S gene과 ORF 3과 3-1 gene을 분석하였는데 S gene에서는 PRCV에서 보이는 deletion이 관찰되지 않았고, ORF 3과 3-1 gene에 약 250 nucleotide가 deletion 된 것을 확인하였다. 앞으로 P44 또는 다른 병원성 TGEV를 STC에서 연속 계대배양하면서 deletion 되는 위치를 정확하게 파악하고 deletion 된 변이주들의 유전적, 생물학적인 변화를 조사하는 것이 필요할 것으로 보인다. 이러한 특징을 정확히 파악한다면 이 부위가 deletion 된 TGEV를 cloning하여 백신재료로도 사용할 수 있을 것으로 추정되어 이 부위에 대한 좀더 자세한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각한다. 이 연구는 야외에서 분리되는 TGEV에 다양한 유전적 변이가 일어나고 있음을 보여주었다. 앞으로 특이한 RFLP pattern을 갖는 야외분리주의 염기서열 분석이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

국내에서 분리되는 TGEV의 유전학적 특성을 파악하기 위하여 TGE로 의심되는 돼지로부터 TGEV를 분리하여 그 특성을 규명하였다. 총 16주의 TGEV가 DEAE-DEXTRAN으로 처리한 STC를 이용하여 분리되었고, plaque purification 후에 증식시킨 바이러스의 S glycoprotein gene과 ORF 3과 3-1 gene을 RT와 PCR을 이용하여 증폭시킨 후 제한효소로 처리하여 RFLP pattern을 관찰하였다. 가장 특이적인 변이는 S gene에서 antigenic site A와 D를 포함하는 TGEV 4/6 primer pairs로 증폭시킨 부위에서 관찰되었다. PCR product를 *Sau3* AI으로 처리하였을 때 백신주인 Bvac과 야외분리주인 133 그리고 347은 기존의 Miller와 Purdue type과는 전혀 다른 RFLP pattern을 나타내었고, *Ssp* I으로 처리하였을 때에도 이들은 독립된 type을 형성하였다. D5 분리주는 *Sau3* AI에서 Purdue type에 속하였으나 *Ssp* I에 의해서는 다른 분리주들과는 전혀 다른 RFLP pattern을 나타내었다. D2는 한 sample내에 서로 다른 type의 TGEV가 존재하는 것이 plaque purification후에 증폭시킨 DNA를 *Ssp* I으로 처리한 RFLP pattern의 분석으로부터 확인되었다. TGEV 2/3과 7/8 primer pairs로 증폭시킨 S gene과 ORF 3과 3-1 gene은 잘 보존되어온 것으로 보인다. 계대배양후의 변화를 보기위하여 P44를 STC에서 계대배양한 후 S gene과 ORF 3과 3-1 gene을 분석하였는데 S gene에서 제한효소에 의한 인식부위의 변화가 관찰되었고, ORF 3과 3-1 gene에서는 커다란 deletion이 일어나고 있는 것이 확인되었다. 이상의 결과로 볼때 국내에서 유행하고 있는 TGEV내에서 다양한 유전적 변이가 일어나고 있는 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

1. Saif LJ, Wesley RD. Transmissible gastroenteritis. In "Disease of swine" (AD Leman, BE Straw, WL Mengeling eds.), pp.362-386. Iowa State University Press, Ames, IA., 1992.
2. Garwes DJ, Lauca MH, Higgings DA, et al. Antigenicity of structural components from porcine transmissible gastroenteritis virus. *Vet Microbiol*, 3: 179-190, 1987/1979.
3. Garwes DJ, Pocock DH. The polypeptide structure of transmissible gastroenteritis virus. *J Gen Virol*, 29:25-34, 1975.
4. Godet M, Passchaert D, Laude H. Processing and antigenicity of entire and anchor-free spike glycoprotein S of coronavirus TGEV expressed by recombinant baculovirus. *Virology*, 186:732-740, 1991.
5. Jimenez G, Correa I, Melgosa MP, et al. Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *J Virol*, 60:131-139, 1986.
6. Wesley RD, Woods RD, Cheung AK. Genetic basis for the pathogenesis of transmissible gastroenteritis virus. *J Virol*, 64:4761-4766, 1991.
7. Paul PS, Zhu XL, Vaughn EM. Current strategies for the development of efficacious vaccines for transmissible gastroenteritis in swine. *Proc U.S. Anim Hlth Assoc*, 92:429-443, 1988.
8. Hohdatsu T, Eiguchi Y, Tsuchimoto M, et al. Antigenic variation of porcine transmissible gastroenteritis virus detected by monoclonal antibodies. *Vet Microbiol*, 14:115-124, 1987.
9. Register KB, Wesley RD. Molecular characterization of attenuated vaccine strains of transmissible gastroenteritis virus. *J Vet Diagn Invest*, 6:16-22, 1994.
10. Sanchez CM, Gebauer F, Sune C, et al. Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses. *Virology*, 190:92-105, 1992.
11. Simkins RA, Weillnau PA, Bias J, et al. Antigenic variation among transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus strains detected with monoclonal antibodies to the S protein of TGEV. *Am J Vet Res*, 53:1253-1258, 1992.
12. Vaughn EM, Paul PS. Antigenic and biological diversity among transmissible gastroenteritis virus isolates of swine. *Vet Microbiol*, 36:333-347, 1993.
13. Wesley RD, Woods RD, Cheung AK. Genetic analysis of porcine respiratory coronavirus, an attenuated variant of transmissible gastroenteritis virus. *J Virol*, 65: 3369-3373, 1991.
14. 권혁무. PCR과 RFLP 분석을 이용한 transmissible gastroenteritis virus의 spike glycoprotein gene과 non-structural protein gene의 분석. 대한수의학회지, 36: 627-633, 1996.

15. 박지용, 김철중, 신광순 등. Transmissible gastroenteritis virus(TGEV)와 porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)의 nucleocapsid(N) 단백질 유전자에 대한 염기서열 분석과 cDNA probe hybridization. 대한수의학회지, 35:515-530, 1995.
16. 장연은, 조선희, 강신영. 돼지 전염성 위장염 바이러스에 대한 단클론항체 생산, 특성 및 이용. 대한수의학회지 부록, 35: 135, 1995.
17. 탁동섭, 권준현, 김병한 등. 국내 분리 돼지 전염성 위장염 바이러스(VRI-48)의 특성에 관한 연구. 대한수의학회지 부록, 36: 117, 1996.
18. Kwon HM, Jackwood MW, Gelb J Jr. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis*, 37:194-202, 1993.
19. Rasschaert D, Laude H. The predicated primary structure of the peplomer protein E2 of the porcine coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J Gen Virol*, 68:1883-1890, 1987.
20. Wesley RD. Nucleotide sequence of the E2-peplomer protein gene and partial nucleotide sequence of the upstream polymerase gene of transmissible gastroenteritis virus (Miller strain). In: Cavanagh D, Brown TDK, ed. *Coronaviruses and Their Diseases, Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York:Plenum, 301-306, 1990.
21. Wesley RD, Cheung AK, Michael DD, *et al*. Nucleotide sequence of coronavirus TGEV genomic RNA : evidence for 3 mRNA species between the peplomer and matrix protein genes. *Virus Res*, 13:87-100, 1989.
22. Vaughn EM, Halbur PG, Paul PS. Sequence comparison of porcine respiratory coronavirus isolates reveals heterogeneity in the S, 3, and 3-1 genes. *J Virol*, 69:3176-3184, 1995.
23. Britton P, Kottier S, Chen CM, *et al*. The use of PCR genome mapping for the characterisation of TGEV strains. In "Coronaviruses" (H Laude and J F Vautherot Eds). Plenum Press, New York, 1994.
24. Kemeny LJ. Antibody response in pigs inoculated with transmissible gastroenteritis virus and cross reaction among ten isolates. *Can J Comp Med*, 40:209-214, 1976.
25. Laude H, Chapsal JM, Gelfi J, *et al*. Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. I. Properties of monoclonal antibodies directed against virion proteins. *J Gen Virol*, 67:119-130, 1986.
26. Laude H, Gelfi J, Aynaud JM. In vitro properties of low- and high-passaged strains of transmissible gastroenteritis coronavirus of swine. *Am J Vet Res*, 42: 447-449, 1981.
27. Zhu XL, Paul PS, Vaughn E, *et al*. Characterization and reactivity of monoclonal antibodies to the Miller strain of transmissible gastroenteritis virus of swine. *Am J Vet Res*, 51:232-237, 1990.
28. Fiscus SA, Teramoto YA. Antigenic comparison of feline coronavirus isolates : evidence for markedly different peplomer glycoproteins. *J Virol*, 61:2607-2613, 1987.
29. El-Ghorr AA, Snodgrass DR, Scott FMM, *et al*. A serological comparison of bovine coronavirus strains. *Arch Virol*, 104:241-248, 1989.