

## 돼지 전염성 위장염 바이러스에 대한 단클론항체 생산 및 특성

장영은 · 조선희 · 김병한\* · 안재문\*\* · 강신영

충북대학교 수의과대학 · 수의과학연구소\*

충청북도 농축산사업소 북부지소\*\*

(1998년 1월 28일 접수)

### Production and characterization of monoclonal antibodies against porcine transmissible gastroenteritis virus

Young-en Jang, Sun-hee Cho, Byung-han Kim\*, Jae-moon Ahn\*\*, Shien-young Kang

*College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University*

*National Veterinary Research Institute\**

*Northern Branch of Chungbuk Office of Agriculture and Livestock\*\**

(Received Jan 28, 1998)

**Abstract** : Eight monoclonal antibodies(MAbs) against the transmissible gastroenteritis virus (TGEV) were produced and characterized. Four of the MAbs were produced against a reference TGEV, Purdue strain(P115) and the others were produced against the Korean vaccine virus, Pyungtaek strain. Only one MAb(5C8) produced against P115 had neutralizing activity and was found to be E2 protein-specific. The other seven MAbs(4E2, 4G8, 5H6, 1F8, 2C6, 5H5, and 3A 6) had specificity of nucleocapsid protein and no neutralizing activity. All MAbs reacted with different strains of TGEV, but none of the MAbs was reactive with porcine enteropathogenic viruses such as rotavirus, epidemic diarrhea virus and enterovirus by fluorescence antibody(FA) test.

**Key words** : transmissible gastroenteritis virus, monoclonal antibody.

### 서 론

돼지 전염성 위장염(Transmissible gastroenteritis: TGE)

은 Coronaviridae에 속하는 TGE 바이러스(TGEV)에 의하여 발병되는 소화기성 전염병으로 구토와 심한 수양성 황색설사 그리고 탈수증상이 특징적으로 나타난다. 본 질병이 1946년 처음 보고된 이후 TGE는 양돈산업에 있

본 연구는 1995년도 농촌진흥청 농업특정연구개발사업 연구비로 수행되었음.

Address reprint requests to Dr. Shien-young Kang, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea.

어서 경제적으로 커다란 손실을 일으키는 원인으로 되어 왔다<sup>1</sup>. 신생자돈에 TGEV가 감염되면 소장, 특히 공장 과 회장의 villi 파괴 및 위축을 나타내어 장염을 일으키며 구토, 설사 및 탈수 등의 임상증상을 나타내고, TGEV에 대한 항체를 가지고 있지 않은 어린 돼지는 100% 가까이 폐사하게 된다<sup>2</sup>. 우리나라에서는 1950년 박<sup>3</sup>에 의하여 본 병의 발생이 추정 보고된 이후 전국적으로 발생하고 있으며, 1970년 이후 양돈산업의 대형화 및 집단화로 본 병에 의한 피해도 심각한 것으로 알려져 있다.

돼지 전염성 위장염의 원인체인 TGEV는 single-strand RNA genome을 가지고 단층의 피막으로 구성되어 있으며, spike protein은 club 형태로 되어 있다<sup>4</sup>. 바이러스의 전체 모양은 형태와 크기가 일정치 않은 부정형으로 크기는 평균 60~160nm로 3개의 구조단백질인 spike glycoprotein(S or E2, 220kDa), nucleocapsid phosphoprotein(N, 48kDa) 그리고 transmembrane protein(M or E1, 29kDa)이 중요한 바이러스의 구성성분으로 되어 있다<sup>5,6</sup>. S glycoprotein은 중화항체의 생산에 관여하며 4개의 항원인식부위(A-D)가 밝혀져 있는데, 대부분의 중화항체 determinant는 S glycoprotein의 A-B domain에 존재하며 domain D에 대한 단클론항체는 중화력이 없고 group 1에 속하는 다른 바이러스와 교차반응을 일으키지 않아 porcine respiratory coronavirus(PRCV)와의 구별에 이용되고 있다<sup>7,9</sup>. Domain C는 linear epitope로 구성되어 있어 TGEV strain간에 항원적인 차이를 나타낸다<sup>8</sup>. N protein은 바이러스의 RNA에 결합하여 helical nucleocapsid의 구조적 기초가 되며 세포성 면역에서 중요한 역할을 한다<sup>10</sup>. M protein은 보체의 존재하에 바이러스를 중화시키는 항체의 생산에 관여하며  $\alpha$ -interferon( $\alpha$ IFN)의 유도에 직접적인 역할을 하는 것으로 알려졌다<sup>11,12</sup>. 또한 M protein은 carboxy terminal이 외부에 노출되어 있으며 높은 면역원성을 가지고 TGEV에 감염된 세포를 보체의 도움으로 용해를 일으킨다<sup>8</sup>. TGEV는 PRCV, canine coronavirus(CCV), feline infectious peritonitis virus(FIPV)와 함께 공통항원을 가짐으로서 코로나바이러스 group 1에 속하며 단일 혈청형으로 구성되어 있다<sup>10</sup>.

본 연구에서는 TGEV의 항원구조를 규명하고 TGEV 진단에 이용할 목적으로 TGEV에 대한 단클론항체를 생산하여 그 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

**바이러스 및 배양세포** : 표준주로서 병원성이 약한 Purdue주(P115) 및 병원성이 강한 Miller주 그리고 국내에서 TGE 백신 바이러스로 사용되고 있는 평택주를 중앙가축전염병연구소에서 분양받아 사용하였으며 야외에서 분리된 TGEV 48 및 93주는 수의과학연구소에서 분양받아 실험에 사용하였다. 모든 TGEV는 돼지고환주 화세포(Swine testicle cell line: ST)에서 증식시켰다<sup>13</sup>.

본 실험에 사용된 세포는 ST 세포와 원숭이신장세포 유래인 MA104 세포, 녹색원숭이신장세포 유래인 Vero 세포 그리고 개신장세포 유래인 A72 세포를 사용하였는데 이들은 10% 소태아혈청(Fetal calf serum: FCS)이 포함된 Eagle's minimum essential medium(EMEM)에 NaHCO<sub>3</sub>와 항생제를 첨가하여 배양하였으며, 모든 세포는 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 37℃의 포화습도하에서 배양하였다. 단클론항체 생산을 위하여 세포융합에 사용된 myeloma 세포는 BALB/c 마우스 유래 골수종세포인 SP2/0를 이용하였으며 10~20% FCS가 함유되어 있는 Dulbecco's modified EMEM(DMEM)에 NaHCO<sub>3</sub>와 항생제를 첨가하였고 바이러스 배양세포와 같은 조건하에서 배양하였다.

**바이러스 정제** : 세포융합을 위하여 마우스 면역에 사용할 TGEV는 Welch와 Saif의 방법<sup>14</sup>을 수정하여 순수분리하였다. 즉, 국내 백신주인 평택주와 표준주인 Purdue주를 ST 세포에 접종하여 증식시킨 뒤 배양액을 5,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 수집하였다. 이 상층액에 polyethylene glycol(PEG, MW 6,000, Sigma)과 NaCl을 각각 8% 및 0.5M이 되도록 첨가한 후 4℃에서 24시간 교반시켰다. 24시간 교반후 8,000rpm에서 30분간 원심분리하여 침전물을 인산완충용액(Phosphate buffered saline: PBS, pH 7.4)으로 부유시켰다. 이와같이 농축된 TGEV를 20~50%의 sucrose density gradient를 이용하여 25,000rpm에서 4시간 동안 원심분리한 후 부력밀도가 1.17~1.20g/cm<sup>3</sup>에 해당하는 분획을 수거하여 PBS로 투석시킨 후 -20℃에 보관하며 사용하였다.

**단클론항체 생산** : 세포융합과 복수생산을 위하여 6~8주령의 BALB/c 마우스를 수의과학연구소에서 분양받아 사용하였다. 순수분리된 TGEV 항원을 Freund's complete adjuvant(Sigma)와 동량으로 섞어 유제한 후 마우스의 복강내로 0.4ml를 1차 접종하였다. 2주후에 Freund's incomplete adjuvant(Sigma)와 동량의 TGEV 항원을 유제화시켜 복강내로 0.4ml를 2차 접종하였고, 2주후에 2차 접종과 같은 방법으로 3차 접종하였다. 3차 접종후 10일

에 마우스의 미정맥으로부터 혈액을 채취하여 효소면역 측정법(Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)<sup>15</sup>와 형광항체법(Fluorescence antibody: FA)법<sup>14</sup>으로 TGEV에 대한 항체역가를 조사하여 항체의 역가가 세포융합하기에 충분하지 않을 경우 3차 접종과 같은 방법으로 추가 접종하였다. 세포융합은 TGEV 항원을 미정맥으로 접종한 후 3일 후에 실시하였다.

세포융합은 TGEV로 면역된 BALB/c 마우스의 비장을 적출하여 cell collector(Pore size, 280µm: Belco)를 이용하여 비장세포를 분리시킨 후 준비된 myeloma 세포를 PEG(MW 1,500: Sigma)를 이용하여 융합시켰다. 융합된 세포는 hypoxanthine-aminopterin-thymidine(HAT: Sigma) 배지를 이용하여 부유시킨 후 feeder cell이 배양된 96-well microplate에 well당 100µl씩 분주한 뒤 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 37℃에 배양하였다. 세포융합후 TGEV에 대한 특이항체를 생산하는 hybridoma는 형광항체법, 형광중화 시험법(Fluorescence focus neutralization test: FFN)<sup>14</sup> 그리고 효소면역측정법을 이용하여 확인하였다. TGEV 양성으로 확인된 hybridoma 세포는 limiting dilution법으로 3회 이상 cloning 하여 단일 clone을 얻었다. Clone 된 hybridoma 세포는 pristane(2, 6, 10, 14-tetra-methyl-pentadecane: Sigma)으로 미리 감각시킨 마우스 복강내로 접종하여 복수를 생산하였다.

단크론항체의 isotyping : 생산된 단크론항체의 isotyping은 monoclonal antibody isotyping kit(Sigma)를 이용하여 제조회사의 술식대로 수행하였다. 즉, TGEV 양성 hybridoma 세포배양액이 들어있는 시험관에 isotyping strip을 넣어 37℃에서 30분간 반응시킨 후 PBS-tween 20으로 5분간 3회 세척하였다. 세척후 biotin이 label 된 anti-mouse immunoglobulin 항체를 넣고 37℃에서 30분간 반응시킨 후 세척액으로 5분간 3회 세척하였다. Extravidin-peroxidase를 넣어 37℃에서 15분간 반응시킨 후 세척액으로 5분간 3회 세척하고 시험관에 substrate buffer(2.5M acetate buffer, pH 5.0)에 발색제(3-amino-9-ethylcarbazole in N,N-dimethylformamide)와 2% hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 혼합하여 넣어준 후 반응을 확인하였다.

단크론항체의 단백질특이성 확인 : 단크론항체의 TGEV 단백질특이성을 조사하기 위하여 Towbin *et al*<sup>16</sup>의 방법에 따라 Western blotting을 실시하였다. TGEV 항원과 동량의 sample buffer(2% sodium dodecyl sulfate, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 1M Tris-base, 0.025% bro-

mophenol blue)를 혼합하여 100℃에서 5분간 가열한 뒤 10% SDS-polyacrylamide gel(4% stacking gel과 10% separating gel)에서 TGEV 단백질을 분리한 후 transfer system을 이용하여 단백질 분질을 nitrocellulose membrane으로 4℃에서 24시간동안 전이시켰다. TGEV 단백질이 전이된 nitrocellulose membrane을 3% bovine serum albumin(BSA)으로 37℃에서 3시간 이상 blocking시킨 후 tween20이 0.05% 포함되어 있는 PBS(PBS-tween)로 5분씩 3회 세척하였다. Nitrocellulose membrane을 절단하여 각각의 monoclonal antibody가 함유되어 있는 배양 상층액과 24시간동안 실온에서 반응시켰다. 세척액으로 3회 세척한 후 1:100으로 희석한 phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgA+IgG+IgM(H+L)을 1시간 반응시킨 후 3회 세척하였다. 3회 세척후, nitrocellulose membrane을 0.1M Tris 완충 용액에 BCIP/NBT(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitroblue tetrazolium) 용액이 혼합된 염색용액에 넣고 반응시켰다. 10~20분후 반응이 나타나기 시작하면 PBS-tween과 증류수로 각각 1회씩 세척하여 반응을 중지시킨 후 blotting paper 위에서 건조시켰다.

단크론항체와 다른 바이러스와의 반응성 : 다른 장내 바이러스와 단크론항체의 반응패턴은 형광항체법과 형광중화시험법으로 조사하였다.

## 결 과

단크론항체의 생산 : 단크론항체 생산을 위한 세포융합에서 세포 융합률은 70% 정도였으며 TGEV에 특이적으로 반응하는 단크론항체는 모두 8개를 생산하여 비율이 매우 낮았다. Purdue주(P115)에 대하여 4개(5C8, 4E2, 4G8, 5H6)의 단크론항체와 평택주에 대하여 4개의 단크론항체(1F8, 2C6, 5H5, 3A6)를 각각 생산하였다.

### 단크론항체의 특성

(1) 단크론항체의 isotype : Purdue주에 대한 단크론항체중 4E2와 4G8, 평택주에 대한 단크론항체 1F8, 2C6 그리고 5H5는 isotype이 IgG1이었으며 나머지 3개의 단크론항체(5C8, 5H6, 3A6)는 isotype이 IgG2a로 나타났다 (Table 1).

(2) 단크론항체의 역가 : 단크론항체의 역가를 ELISA법으로 조사한 결과 1,280~5,120으로 나타났으며 FA법으로 조사한 결과 Purdue주에 대한 단크론항체의 역가는 2,560~10,240 그리고 평택주에 대한 단크론항체의 역

Table 1. Characterization of monoclonal antibodies(MABs) to transmissible gastroenteritis virus(TGEV) by isotype, protein specificity and antibody titer

MAbs	Immunogen <sup>1</sup>	Isotype	Protein specificity <sup>2</sup>	antibody titer <sup>3</sup>		
				FA	FFN	ELISA
5C8	P115	IgG2a	E2	10,240	10,240	5,120
4E2	P115	IgG1	N	10,240	< 10	5,120
4G8	P115	IgG1	N	2,560	< 10	1,280
5H6	P115	IgG2a	N	5,120	< 10	2,560
1F8	Pyungtaek	IgG1	N	10,240	< 10	1,280
2C6	Pyungtaek	IgG1	N	5,120	< 10	2,560
5H5	Pyungtaek	IgG1	N	10,240	< 10	5,120
3A6	Pyungtaek	IgG2a	N	5,120	< 10	1,280

<sup>1</sup>: Viruses used for mouse immunization for fusion, P115 : reference TGEV Purdue strain, Pyungtaek : Korean TGEV vaccine strain

<sup>2</sup>: E2 : peplomer protein, N : nucleocapsid protein.

<sup>3</sup>: FA : fluorescence antibody test, FFN : fluorescence focus neutralization test, ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay.

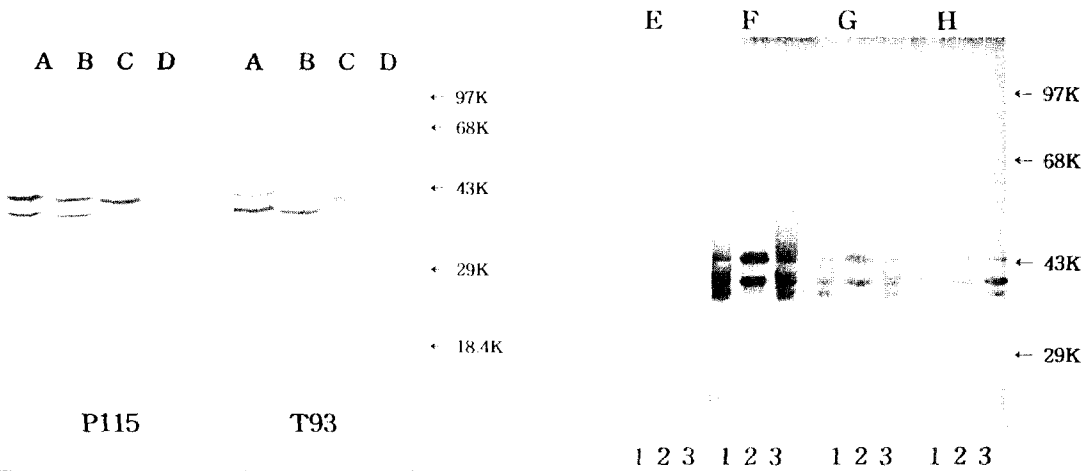


Fig 1. Western blotting analysis of monoclonal antibodies against transmissible gastroenteritis virus(TGEV), Purdue strain.

P115 : attenuated TGEV, T93 : TGEV field isolate

A : MAb 4E2, B : MAb 4G8, C : MAb 5H6, D : MAb 5C8.

Fig 2. Western blotting analysis of monoclonal antibodies against transmissible gastroenteritis virus(TGEV), Pyungtaek strain.

1 : TGEV field isolate(T93), 2 : Pyungtaek strain, 3 : P115 strain

E : MAb 1F8, F : MAb 2C6, G : MAb 5H5, H : MAb 3A6.



Fig 3. Immunofluorescence of ST(A), A72(B) and MA104(C) cells infected with transmissible gastroenteritis virus, canine coronavirus and porcine rotavirus, respectively, by monoclonal antibody, 5C8.

가는 5,120~10,240으로 나타났다(Table 1).

(3) 단크론항체의 중화능력 : FFN법 실험결과 Purdue주에 대한 단크론항체중 5C8은 중화능력이 있는 것으로 밝혀졌으며 중화역가는 10,240으로 나타났다(Table 1).

(4) 단크론항체의 단백질특이성 : TGEV에 대한 단크론항체의 단백질특이성을 확인하기 위하여 Western blotting를 실시한 결과 Purdue주에 대한 단크론항체인 5C8은

Western blotting에서 band가 나타나지 않았지만 중화력을 가지는 것과 개코로나바이러스(Canine coronavirus: CCV)와 FA법과 FFN법에서 반응한 것으로 보아 S(E2) glycoprotein에 특이적인 것으로 추정되며, 3개의 단크론항체(4E2, 4G8, 5H6)는 분자량 43~48KDa에 반응대를 나타냄으로 nucleocapsid(N) protein에 대해 특이적인 항체로 확인되었다(Table 1, Fig 1). 또한 국내 백신 바이러스

Table 2. Reactivity patterns of monoclonal antibodies(MAbs) with other enteric viruses by FA test

MAbs	Rotaviruses <sup>1</sup>		TGE virus			Enterovirus	CCV <sup>2</sup>	PEDV <sup>3</sup>
	Gott.(G4)	OSU(G5)	P115	Miller	Pyungtaek			
5C8	-	-	+	+	+	-	+	-
4E2	-	-	+	+	+	-	+	-
4G8	-	-	+	+	+	-	+	-
5H6	-	-	+	+	+	-	+	-
1F8	-	-	+	+	+	-	+	-
2C6	-	-	+	+	+	-	+	-
5H5	-	-	+	+	+	-	+	-
3A6	-	-	+	+	+	-	+	-
5A10 <sup>4</sup>	+	+	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>:Gott.(G4) : porcine rotavirus Gottfried strain(serotype 4), OSU(G5) : porcine rotavirus OSU strain(serotype 5), <sup>2</sup>: Canine coronavirus(ATCC VR-809 strain)

<sup>3</sup>: Porcine epidemic diarrhea virus(CV777 strain), <sup>4</sup>: Rotavirus VP6-specific MAB.

Table 3. Reactivity patterns of monoclonal antibodies(MAbs) with other enteric viruses by FFN test

MAbs	Rotaviruses <sup>1</sup>		TGE virus			Enterovirus	CCV <sup>2</sup>	PEDV <sup>3</sup>
	Gott.(G4)	OSU(G5)	P115	Miller	Pyungtaek			
5C8	-	-	+	+	+	-	+	-
4E2	-	-	-	-	-	-	-	-
4G8	-	-	-	-	-	-	-	-
5H6	-	-	-	-	-	-	-	-
1F8	-	-	-	-	-	-	-	-
2C6	-	-	-	-	-	-	-	-
5H5	-	-	-	-	-	-	-	-
3A6	-	-	-	-	-	-	-	-
4B9 <sup>4</sup>	+	-	-	-	-	-	-	-
1G1 <sup>5</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-
5A10 <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>:Gott.(G4) : porcine rotavirus Gottfried strain(serotype 4), OSU(G5) : porcine rotavirus OSU strain(serotype 5), <sup>2</sup>: Canine coronavirus(ATCC VR-809 strain)

<sup>3</sup>: Porcine epidemic diarrhea virus(CV777 strain), <sup>4</sup>: Rotavirus serotype 4(G4) VP4-specific neutralizing monoclonal antibody(N-MAB)

<sup>5</sup>: Rotavirus serotype 5(G7) VP7-specific N-MAB, <sup>6</sup>: Rotavirus serotype 4(G4) VP6-specific MAB.

인 평택주에 대한 4개의 단크론항체(1F8, 2C6, 5H5, 3A6)는 모두 N protein에 대해 특이적인 것으로 나타났다 (Table 1, Fig 2).

(5) 단크론항체와 다른 장내 바이러스와의 반응성 : 생산된 단크론항체와 다른 장내 병원성 바이러스와의 반응을 FA법으로 조사한 결과 어느 단크론항체도 본 실험에 사용된 돼지 로타바이러스, 돼지 엔테로바이러스 및 돼지 유행성 설사바이러스와 반응하지 않았다. 하지만 모든 단크론항체는 TGEV 표준주인 Purdue주(P115), Miller주 및 평택주에 대해서는 서로 교차반응을 하였으며 CCV와도 반응을 하였다(Table 2, 3). 생산된 단크론항체와 다른 enteric virus와의 반응성을 FFN법으로 조사한 결과 Purdue주에 대한 단크론항체중 5C8만이 모든 TGEV와 CCV를 중화시켰으나 다른 enteric virus는 중화시키지 못하였다(Table 3). 생산한 단크론항체와 다른 분리주의 TGEV와의 반응성을 조사하기 위하여 ST 세포에 각각의 TGEV를 감염시킨 후 각각의 단크론항체를 반응시켜 형광현미경으로 관찰한 결과 모든 분리주에 대하여 형광을 관찰할 수 있어 서로 교차반응성이 있음을 확인할 수 있었다. 또한 이들 단크론항체는 CCV에 반응하여 형광을 나타냄으로 TGEV와 같은 coronavirus group 1에 속하는 CCV와 반응성이 있음을 확인할 수 있었다 (Table 2, Fig 3).

## 고 찰

TGEV는 peplomer protein(S or E2, 220KDa), transmembrane protein(M or E1, 29KDa) 그리고 nucleocapsid protein(phosphoprotein or N, 48KDa)이 중요한 바이러스의 구성 성분으로 되어 있다<sup>5,6</sup>. Laude *et al*<sup>12</sup>과 Simkins *et al*<sup>17</sup>은 TGEV의 단크론항체에 대한 S glycoprotein의 epitope중 A부위는 TGEV와 PRCV에 대하여 conserve 되어 있으며 immunodominant 하여 높은 역가의 중화항체를 생산한다고 하였다. 또한 S glycoprotein의 epitope중 바이러스 중화에 관계되지 않는 B와 D부위에 대한 단크론항체는 PRCV와 결합하지 않았으나 TGEV 분리주와는 결합하였다<sup>17,18</sup>. Kamogawa *et al*<sup>19</sup>은 polyclonal antibody를 사용한 중화시험법으로 TGEV 야외분리주와 PRCV를 구별하지 못하였으나 단크론항체를 사용한 중화시험법으로 구별할 수 있었다고 하였다. Honda *et al*<sup>20</sup>은 TGEV의 TO-163주의 S glycoprotein에 대한 5개의 중화력을 가진

단크론항체가 TGEV에 의한 IB-RS-2 세포의 융합을 억제하였으나 중화력을 가지지 않은 S-specific한 단크론항체는 세포의 융합을 억제하지 못하였다고 하여 이들 중화 epitope가 융합활성부위와 동일하거나 매우 가까이 있다고 하였다. 본 실험에서 생산된 8개의 단크론항체를 이용하여 western blotting을 실시한 결과 8개중 7개가 분자량이 모두 48KDa에서 반응대를 나타내어 이들 모두 N protein에 특이적으로 반응하는 단크론항체임을 확인할 수 있었으며 Purdue주(P115)에 대한 단크론항체중 하나인 5C8은 48KDa, 29KDa 모두에서 반응대를 형성하지 않으며 중화능력이 있어 E2 protein에 특이적인 단크론항체로 추정되며 이것이 반응하는 항원부위의 확인은 현재 실험중에 있다.

TGEV에 대한 단크론항체를 이용하여 TGEV 분리주 간 혹은 TGEV와 PRCV 사이에 항원적 차이가 있다는 것이 많은 연구자들에 의하여 보고되었다. Simkins *et al*<sup>17</sup>은 TGEV Miller주의 S glycoprotein에 대한 5개의 중화능력이 없는 단크론항체중 2개는 새로운 항원부위(V)에 대한 것으로 형광항체법으로 Miller주 하고만 반응하였고, 2개는 D부위와 반응하는 것으로 TGEV하고만 반응하였으나 PRCV와는 반응하지 않아 이들을 구별할 수 있는 competitive ELISA법을 개발하는데 유용하게 사용될 수 있을 것이라고 하였다. Jackwood *et al*<sup>21</sup>은 TGEV의 S gene중 5' 부위에 대한 restriction fragment length polymorphism(RFLP) 분석에서 TGEV의 S gene을 4개의 group으로 나눌 수 있었으며 이것은 단크론항체로 구분되는 group과 일치하였고 이와같은 방법으로 Miller와 Purdue type을 구분할 수 있다고 하였다. Zhu *et al*<sup>22</sup>은 TGEV의 Miller주에 대한 11개의 단크론항체를 만들었는데, 4개는 중화능력이 있었으며, 7개는 중화능력이 없었다. 이들중 4개의 중화능력이 있는 것과 2개의 중화능력이 없는 것은 S glycoprotein(E2)와 반응하였으며, 나머지 5개는 M protein(E1)과 반응하였다. 중화능력을 가진 단크론항체는 시험에 사용된 13개의 야외분리주와 Miller, Purdue, Illinois주와 형광항체법으로 반응하였다. 반면에 Miller주와 반응한 중화력이 없는 단크론항체는 TGEV 분리주와의 반응에 많은 차이를 나타냈다. 중화력이 있는 4개의 단크론항체는 plaque 중화시험에서 Miller, Purdue, Illinois주 모두를 중화시켰는데 중화역가는 동종의 Miller주가 이종의 분리주보다 4~16배 높았다. Welch *et al*<sup>14</sup>은 TGEV의 Miller주에 대한 단크론항체를 만들어 형

광향체법으로 시험을 한 결과 S glycoprotein(E2)에 대한 3개의 단크론항체는 핵 주위에 형광을 나타내었고 4개의 분류되지 않은 단크론항체는 세포막에 형광을 나타내었다. 이들 단크론항체 7개중 6개는 TGEV를 중화시켰다. 세포막에 결합하는 2개의 단크론항체는 중화역가가 8~72로 낮았으나 TGEV중 병원성이 있는 것과 없는 것을 구별할 수 있었고, N protein에 대한 5개의 단크론항체는 형광을 나타내었으나 TGEV를 중화시키지는 못하였다. Hodatsu *et al*<sup>23</sup>은 TGEV TO-163주로 21개의 단크론항체를 만들어 7개의 TGEV 분리주와 중화시험을 한 결과 이들 분리주간에 밀접한 항원적 연관성이 있지만 또한 분명한 항원적 차이점도 발견하였으며 TO-163주에는 중화와 관련된 최소한 6개의 다른 epitope가 존재한다고 하였다. Jimenez *et al*<sup>24</sup>도 TGEV에 대한 단크론항체를 만들어 중화시험을 한 결과 10<sup>2</sup>에서 10<sup>9</sup>까지 바이러스의 역가를 떨어뜨렸으며, 중화와 관련된 6개의 epitope가 conformation 하다고 하였으며, 이들은 매우 conserve되어 있다고 하였다. 본 실험에서 생산된 단크론항체중 5C8은 S glycoprotein에 대한 중화력이 있는 단크론항체로서 시험에 사용된 모든 TGEV(Purdue, Miller, 평택주)와 형광중화시험에 반응하였지만 다른 장내 병원성이 있는 바이러스와 반응하지 않아 Zhu *et al*<sup>22</sup>의 결과와 비슷하였다. 그리고 이 단크론항체가 TGEV와 PRCV를 구별할 수 있는지에 대한 실험이 필요할 것으로 생각된다.

동물 coronavirus의 숙주특이성과 항원성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. Sanchez *et al*<sup>25</sup>은 TGEV에 대한 단크론항체로 26개의 TGEV 분리주를 구분하였는데 2개의 group 특이성 단크론항체는 TGEV와 PRCV를 구분하였다. 또한 중화와 관련된 항원 subsite는 돼지, 개, 고양이 코로나바이러스에서는 conserve 되어 있었다. 따라서 이번 시험에서 만들어진 중화력을 가진 단크론항체 5C8은 이러한 group 특이성 항체로서 TGEV 분리주와 CCV에 반응을 나타낸 것으로 생각된다. Siddell *et al*<sup>26</sup>은 동물의 coronavirus를 항원성상에 따라 4개의 group으로 분류하였는데 특히 group 1에 속하는 CCV, feline infectious peritonitis virus(FIPV)와 TGEV와의 항원성과 숙주특이성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 개는 TGEV에 감염될 수 있으나 돼지는 CCV에 감수성이 없는 것으로 알려져 있다<sup>27</sup>. 특히 TGEV 항혈청은 CCV와 FIPV를 중화시키고 FIPV 항혈청은 CCV와 TGEV를 중화시키는 것으로 알려져 있다. 또한 CCV 항혈청은 TGEV

를 중화시키나 FIPV를 중화시키지 못하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 생산한 TGEV 특이적인 단크론항체는 FA법 및 FFN법으로 CCV와 반응하여 TGEV 항혈청이 CCV를 중화시킨다는 사실을 확인할 수 있었다.

현재 TGEV에 대한 진단법으로 counterimmunoelectrophoresis, 전자현미경에 의한 바이러스입자 관찰, 형광항체법, 효소면역진단법, 유전자 탐식자를 이용한 hybridization법 등이 있으나<sup>28-32</sup> 일반적으로 실험실에서는 TGEV를 비교적 간편하고 쉽게 진단할 수 있는 간접형광항체법이 가장 널리 사용되고 있다. 본 실험에서 생산된 8개의 단크론항체는 돼지에서 TGEV와 임상적으로 유사한 설사를 일으키는 원인체인 rotavirus 및 PED virus와 FA 및 FFN법으로 서로 반응을 하지 않아 TGEV에 특이적인 것으로 확인되었다. 또한 다른 TGEV와는 교차 반응을 하여 이들 단크론항체들이 rotavirus 및 PED virus에 의한 설사증을 감별진단하는데 유용하게 사용될 것으로 생각된다.

## 결 론

돼지 전염성 위장염 바이러스(TGEV)에 대한 단크론항체를 생산하고 특성을 조사한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. Purdue 주(P115)에 대하여 4개(4E2, 4G8, 5C8, 5H6), 국내 분리 백신바이러스인 평택주에 대하여 4개(1F8, 2C6, 5H5, 3A6)의 단크론항체를 각각 생산하였다.
2. P115에 대한 단크론항체중 1개(5C8)는 피막의 peplomer(E2) protein에 대하여 특이적으로 반응하여 중화력을 나타냈으며, 나머지 7개의 단크론항체는 중화력이 없었고 nucleocapsid(N) protein에 대하여 특이적으로 반응하는 것으로 확인되었다.
3. 생산된 단크론항체를 돼지에 병원성을 가지는 바이러스와의 반응성을 조사하기 위하여 간접형광항체법으로 조사한 결과 단크론항체는 모두 TGEV에만 특이적으로 반응하는 것으로 나타났다.

## 참 고 문 헌

1. Saif LJ, van Cott JL, Brim TA. Immunity to transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus infections in swine. *Vet Immunol Immunol*

- pathol*, 43:89-97, 1994.
2. Doyle LP, Hutchings LM. A transmissible gastroenteritis in pigs. *J Am Vet Med Assoc*, 108:257-259, 1946.
  3. 박동권. 돈 주요질병의 예방과 진단 및 치료. 대한수의사회지, 13:169-184, 1977.
  4. Maes RK, Haelterman EO. A seroepizootiologic study of five viruses in a swine evaluation station. *Am J Vet Res*, 40:1642-1645, 1979.
  5. Wesley RD, Woods RD. Identification of a 17,000 molecular weight antigenic peptide in transmissible gastroenteritis virus. *J Gen Virol*, 67:1419-1425, 1986.
  6. Godet M, Grosclaude J, Delmas B, et al. Major receptor-binding and neutralization determinants are located within the same domain of the transmissible gastroenteritis virus(coronavirus) spike protein. *J Virol*, 65:8008-8016, 1994.
  7. Correa I, Gebaur F, Bullido MJ, et al. Localization of antigenic sites of the E2 glycoprotein of transmissible gastroenteritis coronavirus. *J Gen Virol*, 71:271-279, 1990.
  8. Correa I, Jimenez G, Sune C, et al. Antigenic structure of the E2 glycoprotein from transmissible gastroenteritis coronavirus. *Virus Res*, 10:77-93, 1988.
  9. Delmas B, Gelfi J, Laude H. Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. II. Domains in the peplomer glycoprotein. *J Gen Virol*, 67:1405-1418, 1986.
  10. Saif LJ. Coronavirus immunogens. *Vet Microbiol*, 37: 285-297, 1993.
  11. Woods RD. Humoral and cellular responses in swine exposed to transmissible gastroenteritis virus. *Am J Vet Res*, 40:108-110, 1979.
  12. Laude H, Rasschaert D, Delmas B, et al. Molecular biology of transmissible gastroenteritis virus. *Vet Microbiol*, 23:147-154, 1990.
  13. Kemeny LJ. Isolation of transmissible gastroenteritis virus from pharyngeal swabs obtained from sows at slaughter. *Am J Vet Res*, 39:703-705, 1978.
  14. Welch SK, Saif LJ. Monoclonal antibodies to a virulent strain of transmissible gastroenteritis virus: comparison of reactivity with virulent and attenuated virus. *Arch Virol*, 101:221-235, 1988.
  15. Wei Lu, Osorio FA, Rhodes MB. A capture-enzyme immunoassay for rapid diagnosis of transmissible gastroenteritis virus. *J Vet Diagn Invest*, 3:119-123, 1991.
  16. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 76:4350-4354, 1979.
  17. Simkins RA, Weilnau 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.
  18. Callebaut P, Pensaert MB, Hooyberghs J. A competitive inhibition ELISA for the differentiation of serum antibodies from pigs infected with transmissible gastroenteritis virus(TGEV) or with the TGEV-related porcine respiratory coronavirus. *Vet Microbiol*, 20:9-19, 1989.
  19. Kamogawa O, Tomita Y, Kaneko M, et al. Isolation of porcine respiratory coronavirus from pigs affected with porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Med Sci*, 58:385-388, 1996.
  20. Honda E, Okada J, Okazaki K, et al. Inhibition of appearance of pH-dependent virus-cell fusion by neutralizing monoclonal antibodies to transmissible gastroenteritis virus. *J Vet Med Sci*, 55:655-656, 1993.
  21. Jackwood DJ, Kwon HM, Saif LJ. Molecular differentiation of transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus strains. *Adv Exp Med Biol*, 380:35-41, 1995.
  22. 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*, 51:232-238, 1990.
  23. Hodatsu T, Eiguchi Y, Tsuchimoto M, et al. Antigenic variation of porcine transmissible gastroenteritis virus detected by monoclonal antibodies. *Vet Microbiol*, 14: 115-124, 1987.
  24. Jimenez G, Correa I, Melgosa MP, et al. Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutraliza-



- tion. *J Virol*, 60:131-139, 1986.
25. Sanchez CM, Jimenez G, Laviada MD, *et al.* Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus. *Viol*, 174:410-417, 1990.
  26. Siddell SH, Wege HD, Meulen VT. The biology of coronavirus : review article. *J Gen Virol*, 64:761-776, 1983.
  27. Larson DJ, Morehouse LG. Transmissible gastroenteritis in neonatal dogs : experimental intestinal infection with transmissible gastroenteritis virus. *Am J Vet Res*, 40:447-486, 1979.
  28. Bohac J, Derbyshire JB. The Demonstration of transmissible gastroenteritis viral antigens by immunoelectrophoresis and counterimmunoelectrophoresis. *Can J Microbiol*, 21:750-753, 1975.
  29. Saif LJ, Bohl EH, Kohler EM, *et al.* Immune electron microscopy of transmissible gastroenteritis virus and rotavirus(reovirus-like agent) of swine. *Am J Vet Res*, 38:13-20, 1977.
  30. Solorzano RF, Morin M, Morehouse LG. The use of immunofluorescence techniques for the laboratory diagnosis of TGE of swine. *Can J Comp Med*, 42:385-391, 1978.
  31. Bernard S, Lantier I, Laude H, *et al.* Detection of transmissible gastroenteritis coronavirus antigens by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay technique. *Am J Vet Res*, 47:2441-2444, 1986.
  32. Benfield DA, Jackwood DJ, Bae I, *et al.* Detection of transmissible gastroenteritis virus using cDNA probes. *Arch Virol*, 116:91-106, 1991.
-