

## BALB/c에서 *Herpes simplex* 1형 바이러스의 항원 발현 양상에 따른 분석

고승석 · 조명환\*

건국대학교 이과대학 생명과학과

**Analysis of the Antigenic Expression Patterns of *Herpes Simplex* Virus Type 1 in BALB/c.** Ko, Seung Seok and Myung-Hwan Cho\*. Department of Biological Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea - This study was performed to investigate antigenic expression patterns in the course of HSV-1 infection. In SDS-PAGE analysis, HSV-1 antigens were detected, and among them, antigens in the sizes of 39, 47, 63, 86, 101, 115, 135, 159 and 181 kDa appear to be expressed in the most dominant forms. BALB/c mice were infected with HSV-1 for 29 days and antigenic expression from HSV-1 was investigated by Western blot analysis using anti-HSV-1 sera collected every two days from BALB/c mice infected with HSV-1. Most of HSV-1 antigens appeared sporadically as the infection progressed. However, antigens in the sizes of 63 kDa and 135 kDa were expressed from day 1 and 3, respectively, and existed continuously during the course of infection for 29 days, suggesting that they are the most dominant antigens inducing immune response during HSV-1 infection, and they could be the target antigens for the development of vaccines. The isotype levels of IgA, IgG1, and IgM increased till the 17th day of infection and then started to decrease. During this course, IgG1 was the most dominant isotype. In an indirect immunofluorescent assay, antibodies exhibited surface binding to the Vero cell infected with HSV-1, demonstrating that HSV-1 antigens are expressed on the surface of Vero cells.

**Key words:** HSV-1 infection, antigenic expression, dominant antigen

*Herpes simplex* 바이러스 1형(HSV-1)은 주로 사람의 구강이나 생식기 주위에 병변을 일으키며 잠복감염과 비교적 증식주기가 짧아 세포 배양 시 빠르게 전이하고 감염세포를 피사시키는 특징을 지니며 일반적으로 점막을 통해 국소적인 증식이 일어나고, 신경 조직 내에서 복제되어 주변 감각신경을 통해 다른 점액질이나 피부 표면에 퍼지게 된다 [12]. HSV-1 증식 시  $\alpha$ -단백질이 최초로 만들어지는 단백질이며 이들 유전자의 전사는 전 단계에서 합성된 단백질을 필요로 하지 않고[7],  $\beta$ -단백질의 합성은 초기 단백질들에 의해서 유도되며,  $\gamma$ -단백질은 초기, 중기의 단백질 합성과 DNA 복제이후에 합성되는데 [6], 이들 후기 단백질들은 주로 구조 단백질로서 progeny virion의 조립에 이용되는 주요 캡시드 단백질을 포함하면, 많은 연구가 진행되어 유전학적으로 변형시킨 바이러스 생백신으로 비 활동성 재조합 저단위 백신의 높은 면역성에 대한 연구나 바이러스 표면의 다양한 당 단백질을 비롯한 감염세포의 특정부위에 대한 항체 반응 등이 백신 연구에 사용되었다[3]. 최근 백신 개발의 초점은 세포내의 분자수준에서 감염경로의 이해와 바이러스가 감염의 목표로 삼는 세포반응의 이해 등이 연구되고 있어 지속적으로 발현하는 항원 단백질을 찾는 것

이 필수적이다.

따라서 본 연구는 BALB/c 마우스에 *Herpes simplex* 바이러스 1형 바이러스를 감염하여 날짜별로 그 항원 발현 양상을 분석하고 *in vitro* 에 치중되어 있던 백신 연구를 *in vivo*에서 진행함으로써 백신 개발의 기초가 되도록 하였다.

### 재료 및 방법

#### 세포 및 세포 배양

Vero 세포주(African green monkey kidney cell, ATCC CCL 81)는 KTCC(Korean Type Culture Collection)에서 분양 받았다. 기본배지는 Eagle's minimum essential medium (EMEM)을 사용하고 fetal bovine serum(FBS)을 5% 첨가하여 37°C에서 배양하고 antibiotic solution을 첨가하였다.

#### 바이러스와 바이러스 증식

*Herpes simplex* 바이러스 1형(HSV-1) strain F(ATCC VR-733, Rockville, MD, U.S.A.)는 국립보건원(KNIH)에서 분양 받았다[5]. 바이러스는 EMEM 배지에 2% FBS [13]를 첨가후 Vero 세포를 이용 증식하여 (TCID<sub>50</sub>)에 의해 역가를 측정하였다[11]. 모든 바이러스는 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다.

\*Corresponding author

Tel. 02-450-3427, Fax. 02-454-7997

E-mail: mcho@konkuk.ac.kr

### 실험 동물 및 면역 처리

건국대학교 생명과학과 면역학 연구실에서 사육 중인 6주된 BALB/c 마우스를 이용하였고 한 그룹 당 3마리씩, 각각  $1 \times 10^6$  virus/ml 가 되도록 PBS로 희석하여 *Herpes simplex* 1형 바이러스를 복강으로 주사하였으며 음성 대조군으로는 PBS를 복강 주사하여 면역처리 하였다.

### *Herpes simplex* 1형 바이러스 항혈청 수거

면역처리 후 1일부터 29일 까지 일정시간을 정하여 지정된 날짜에 마우스를 해부하고 심장에서 채혈했으며, 실험상 오차를 줄이기 위해 각 채혈액을 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 정치시킨 후  $6,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 항혈청을 얻었고, 이를 -20°C에 보관하였다.

### 간접면역 형광항체법

*Herpes simplex* 1형 바이러스에 대한 항체가 감염된 숙주세포에 표현된 바이러스 항원을 인식하는지를 확인하기 위하여 간접 면역 형광항체법을 시행하였다[10]. *Herpes simplex* 1형 바이러스에 감염된 후 3일이 되어 원형의 inclusion body를 형성한 Vero cell을 슬라이드 글라스 위에 도말하고 37°C에서 약 30분간 건조시킨 다음 10°C acetone에서 15분 동안 고정하였다. 37°C 항온기에서 약 40분 정도 반응시킨 다음 PBS로 3분씩 3회 세척하여 FITC(fluorescein-isothiocyanate)가 붙어 있는 goat anti-mouse IgG + IgM + IgA 2차 항체를 PBS에 1:1,000 (v/v)으로 희석하여 슬라이드 글라스 위에 분주하고 37°C 항온기에서 약 20분 정도 반응시켰다. PBS로 3분씩 3회 세척한 후에 mounting buffer (PBS:glycerol = 5:1)를 도말부위에 1방울씩 떨어뜨리고 커버 글라스를 덮은 후에 기포를 완전히 제거하여 Axioplan-2 Universal Microscope(Carl ZEISS, Germany)에서 검정하였다.

### 항원단백질 분석

항원분석을 위한 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 실시하였다[9]. 단충세포로 자란 HSV-1에 의해 감염된 Vero 세포를 cytopathic effect (CPE)가 완전히 끝날 때까지 배양했으며, 냉동과 해동을 3회 반복한 후  $1,400 \times g$ 에서 20분간 원심 분리하여 가라앉은 pellet을 PBS 16  $\mu$ l로 희석한 후 샘플을 만든 다음 5  $\times$  sample buffer를 1:4 (v/v) 비율로 희석하여 100°C에서 약 5분간 증탕한 후 SDS-PAGE를 위한 시료로 사용하였다. SDS-PAGE는 12%의 separating gel과 5%의 stacking gel로 구성된 불연속 전기영동 시스템을 이용하여 120 volt에서 전개하였다. 분자량 결정을 위해 사용된 standard marker는 rabbit skeletal muscle myocin (200 kDa), *E. coli*  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), rabbit muscle phosphorylase B (97.4 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), hen egg

white ovalbumin (45 kDa), bovine carbonic anhydrase (31 kDa), soybean trypsin inhibitor (21 kDa), hen egg white lysozyme (14.4 kDa) 그리고, bovine pancreas apotinin (6.5 kDa)으로 총 9개의 단백질로 구성되어 있다. 전개 후 겔은 Coomassie brilliant blue R-250(Sigma Chemical Co., U.S.A.)으로 30분간 염색하고 탈색 용액(methanol 100 ml, glacial acetic acid 100 ml, distilled water 800 ml)으로 24시간 동안 탈색하여 *Herpes simplex* 1형 바이러스 단백질의 위치와 분자량을 확인하였다.

### Western blotting에 의한 항체 검출

Western-blot은 Towbin(1979)의 방법에 따라 Western-blot kit(NOVEL, Japan)를 사용하여, 전기영동한 겔을 nitrocellulose membrane으로 250 mA에서 1시간 30분 동안 transfer buffer(Trizma base 1.93 g, Glycine 9 g, 1 l distilled water)에서 전이시켰다. 이때 nitrocellulose membrane은 각 시간별로 반응을 하기 위해 전기 영동한 겔의 sample line에 맞춰 절단하였다. Standard marker가 전이된 nitrocellulose membrane을 amido black 염색액 (Sigma Chemical Co., U.S.A.)으로 1분간 염색한 후 탈색용액 (isopropanol 25 ml, acetic acid 10 ml, D.W. 65 ml)으로 탈색하여 단백질 전이를 확인한 다음 Western-blot을 진행하였다. 전이된 nitrocellulose membrane을 3% BSA/TBS (Tris-buffered saline, 2 M Tris-HCl 5 ml, 4 M NaCl 37.5 ml, distilled water 957.5 ml)용액이 들어있는 용기에 넣어 상온에서 24시간 동안 교반시킨 후 TBS로 3회 세척하고 각 시간별 1차 항체를 37°C에서 2시간 동안 교반시키면서 반응시킨 후 TBS로 3회 세척하였다. 각 1차 항체는 0.5% BSA/TBS로 1:100 희석하여 사용하였다. 0.5% BSA/TBS로 1:2,000 희석한 horse-radish peroxidase conjugated anti-goat mouse IgG + IgM + IgA가 표지된 2차 항체를 37°C에서 2시간 동안 반응시키고 TBS로 3회 세척한 뒤 발색시약 4-chloro-1-naphtol (Sigma Chemical Co., U.S.A.), 10  $\mu$ l 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 넣어 발색과정을 계속 관찰하면서 발색이 나타나기 시작하면 증류수로 세척하여 반응을 종결시켰다.

### 항체의 isotype 결정

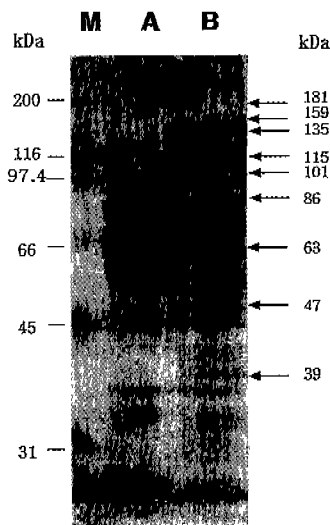
BALB/c 마우스가 생산하는 항체의 isotype은 mouse monoclonal antibodies subtyping kits (American Qualex, U.S.A.)를 사용하여 결정하였다. Plate coating solution 10 ml에 goat anti-mouse immunoglobulin 100  $\mu$ l를 잘 섞어 96 well EIA plate의 각 well에 100  $\mu$ l씩 분주하여 4°C에서 18~24시간 동안 정치시켰고 PBS-surfactant로 plate를 세척하였다. Blocking serum을 PBS로 1:4 희석하여 각 well에 200  $\mu$ l씩 분주하고 실온에서 1시간 동안 정치시킨 후 다시 PBS-surfactant로 plate를 세척하였다. 8 well column의 각 well에 각각의 상층액 50  $\mu$ l를 추가하여 각 column에 각각

의 시간대 별로 생성된 항체가 들어가도록 하였으며 음성 대조구로서 1:100으로 희석한 control 마우스 혈청을 이용하여 비교하였다. Plate를 실온에서 1시간 동안 정치시킨 후에 saline이나 PBS로 3번 세척하였고 plate의 각 줄에 rabbit anti-mouse IgA, IgG1, IgM을 2방울씩 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이때 음성 대조구로서 PBS-surfactant 100 µl를 넣어 비교하였다. Isotyping antisera를 넣고 반응시킨 plate를 saline이나 PBS로 세 번 세척한 후 peroxidase가 표지된 goat anti-rabbit IgG-HRPO를 PBS로 1:4,000 희석하여 각 well에 100 µl씩 분주한 후에 실온에서 한 시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 plate를 saline이나 PBS로 세 번 세척하여 각 well에 TMB substrate reagent 100 µl씩을 넣어 5~10분 동안 발색반응이 진행될 때까지 정치시켰다. 이때 well이 청색으로 변하면 1 M phosphoric acid 50 µl를 넣어 반응을 중지시키고 micro plate reader (Molecular Devices Co., U.S.A.)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**HSV-1 항원의 SDS-PAGE 분석**

감염을 시키지 않은 Vero cell을 대조군으로 관찰한 결과 Fig. 1과 같이 분자량이 15 kDa에서 251 kDa까지 총 26개의 밴드 중 주요 10개의 밴드는 분자량이 각각 35, 37, 45, 55, 57, 61, 71, 75, 97, 251 kDa 이었고 가장 진한 밴드는 45, 71, 75, 97 kDa 의 분자량을 지닌 밴드였다. 바이러스가 감염된 Vero cell은 분자량이 14 kDa에서 181 kDa까지 총 35개의 밴드 중 주요 15개의 밴드는 각각 37, 39, 45,



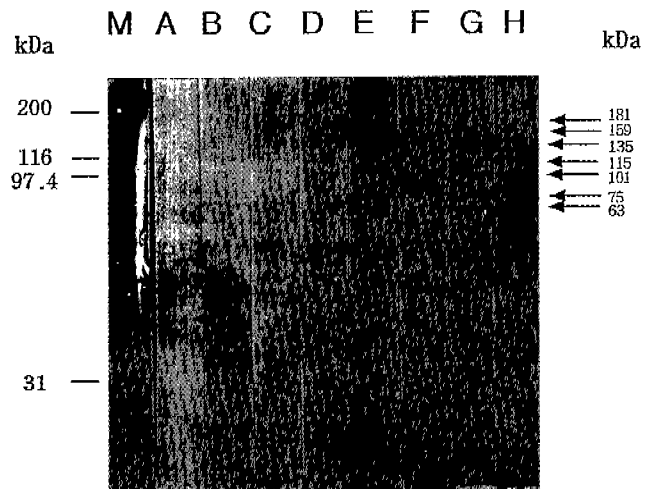
**Fig. 1. SDS-PAGE analysis of proteins produced by Vero cells infected with HSV-1.**

Lane A, intact Vero cell antigens; Lane B, HSV-1 infected Vero cell antigens. Arrows indicate major bands of HSV-1 antigens.

47, 55, 57, 61, 63, 75, 86, 101, 115, 135, 159, 181 kDa 이었다. Vero세포와 공통적으로 나타난 밴드 20개를 제외하면 15개의 HSV-1 밴드가 나타났고 이 중 39, 47, 63, 86, 101, 115, 135, 159, 181 kDa 밴드가 진하게 나타났다.

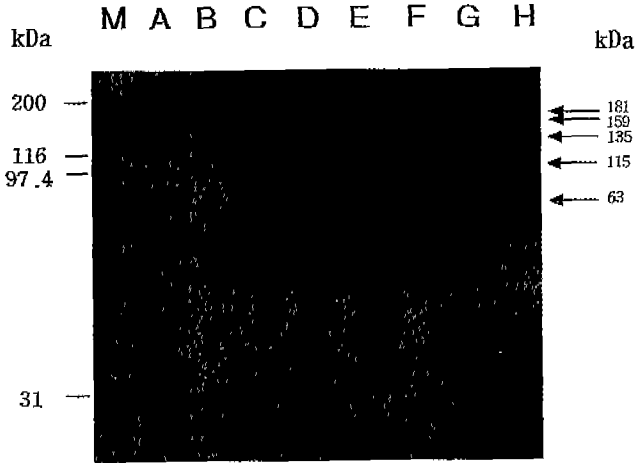
**HSV-1 감염 시간대별 항원 Western blotting 분석**

SDS-PAGE로 전기 영동한 후 단백질이 전이된 nitro-cellulose membrane을 Herpes simplex 1형 바이러스로 면역 처리한 각각의 감염시간이 경과한 마우스로부터 얻은 항 혈청으로 반응한 후 horse-radish peroxidase가 표지된 2차 항체와 4-chloro-1-naphtol의 효소-기질 반응으로 나타내어 항원-항체반응을 관찰하였다. 29일 동안 각각의 시간대별 항혈청으로 *Herpes simplex* 1형 바이러스 단백질에 대해 western-blot 한 결과 Fig. 2, 3과 같이 1일 후는 63, 75, 101, 115 kDa의 단백질 항원이 나타나기 시작하여 3일 후는 135 kDa 항원이 더 나타나고 5일 후는 159, 181 kDa 의 항원이 추가적으로 관찰되었다. 이후 15일 까지 지속적으로 유지되며 이때 135 kDa 의 분자량을 갖는 밴드가 가장 진하게 나타났다. 19일 후에 75, 101 kDa의 항원이 점차 사라지고, 29일까지 63, 115, 135, 159, 181 kDa 의 항원이 남게 되었다. 이들 항원 중 63 kDa 의 밴드는 1일부터 29일, 135 kDa 의 밴드는 3일부터 29일까지 지속적으로 진하게 나타나 HSV-1 감염에서 면역반응을 가장 강하게 일으키는 항원으로 밝혀졌다. 이 두 단백질, 63 kDa 은 glycoprotein C의 분자량, 135 kDa은 glycoprotein D의 분자량과 일치하며 전구체는 각각 105 kDa, 52 kDa 으로



**Fig. 2. Western blot analysis of HSV-1 strain F antigens during the course of infection using polyclonal BALB/c mouse antisera.**

Lane M, standard molecular markers; Lanes A, control mouse antigens; B, HSV-1 infected mouse antigens on day 1 after infection; C, on day 3; D, on day 5; E, on day 7; F, on day 9; G, on day 11; H, on day 13.



**Fig. 3. Western blot analysis of HSV-1 strain F antigens during the course of infection using polyclonal BALB/c mouse antisera.** Lane M, standard molecular markers; Lanes A, HSV-1 infected mouse antigens on day 15 after infection; B, on day 17; C, on day 19; D, on day 21; E, on day 23; F, on day 25; G, on day 27; H, on day 29.

[8], HSV-1에 대한 체액성 면역반응이나 세포성 면역반응에 주된 목표들이다[2]. 형태적으로 gC와 gD는 다른 glycoprotein과는 달리 표면에 짧은 spike 모양으로 분포하며, 기능적으로 gC는 세포 표면막의 heparan sulfate moieties를 경유하여 감염하는 바이러스 부착 기능을 나타내는 역할을 하고 gD는 바이러스의 캡시드가 숙주세포의 세포질로 들어가는 투과 과정에 관련하며 중화항체를 강력하게 촉진하고 자손 비리온에 의해 일어나는 super-infection을 막는 것으로 알려져 있다[1,4]. 이러한 결과로 보아 백신으로서 목표 단백질이 될 수 있는 주요 항원은 63 kDa, 135 kDa 이라 할 수 있다. 다시 말하면 각각의 항원이 감염기간동안 꾸준히 발현되는 것이 백신으로서 가치가 있는 것을 의미한다.

**면역 형광 항체법**

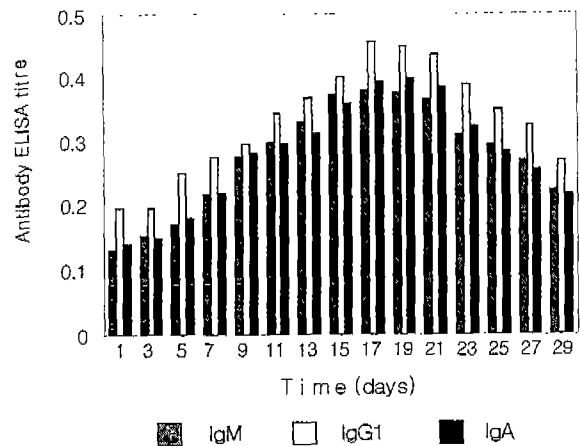
*Herpes simplex* 1형 바이러스에 대한 항혈청이 *Herpes simplex* 1형 바이러스에 감염된 숙주세포에 표현된 바이러스 항원을 인식할 수 있는지를 조사하기 위해서 면역 형광 항체법을 시행하였다. 감염 24시간 후 섬유아세포 모양의 Vero 세포가 원형의 inclusion body를 형성한 숙주 세포를 샘플로 하여 항체를 반응시킨 결과 원형의 세포표면에 형광 반응을 나타내어 Fig. 4 와 같이 HSV-1 항혈청이 인식하는 항원이 Vero cell의 표면에 발현하고 있음을 말해준다. Negative control로서 이차 항체만을 반응시켰으며 비 특이적인 형광 반응은 발견되지 않았다.

**감염 시간대별로 생산된 항체의 isotype 결정**

감염 시간대별로 생산된 항체의 isotype을 Mouse monoclonal antibodies subtyping kits (American Qualex, U.S.A.)



**Fig. 4. Immunofluorescence of HSV-1 infected Vero cells.** White arrowheads indicate the strong immunofluorescence on the periphery of the Vero cell membrane.



**Fig. 5. The isotyping of anti-HSV-1 antibodies during the course of infection.**

를 사용하여 조사한 결과 Fig. 5와 같이 IgA, IgG1, IgM 이 모두 항 혈청내에 골고루 포함되어 있음이 나타났고, 그 중 IgG1이 가장 높게 측정되었다. 1일 후부터 17일 까지 모든 항체의 역가가 지속적으로 증가하며 이후 감소하는 것으로 밝혀졌으며, 각 isotype의 역가는 IgG1 > IgA > IgM 순으로 나타났다.

**요 약**

*Herpes simplex* 1형 바이러스를 BALB/c 마우스에 감염시킨 후 29일간 시간대별로 HSV-1의 항원 발현 양상을 분석한 결과, HSV-1에 감염된 Vero 세포를 SDS-PAGE에 의한 항원 분석 결과 총 35개의 항원 중 15개의 주요 항원은 각각 37, 39, 45, 47, 55, 57, 61, 63, 75, 86, 101, 115, 135, 159, 181 kDa 이고 발현이 많이된 항원은 39, 47, 63, 86, 101, 115, 135, 159, 181 kDa의 분자량을 지닌 항원이 나타났다. HSV-1을 BALB/c 마우스에 감염시킨 후

시간대별로 수거한 항혈청으로 Western-blot 후 항원 발현 양상을 분석한 결과 1일 후는 63, 75, 101, 115 kDa 항원, 3일 후는 63, 75, 101, 115, 135 kDa, 5일 후는 63, 75, 101, 115, 135, 159, 181 kDa 항원이 관찰되었고 이후 15일 까지 지속적으로 유지되며 이때 135 kDa 의 분자량을 갖는 항원이 가장 진하게 나타났다. 19일 후에 75, 101 kDa의 항원이 점차 사라지고, 29일까지 63, 115, 135, 159, 181 kDa 의 항원이 남았다. 이 중 63 kDa 의 항원은 1일부터 29일, 135 kDa 의 항원은 3일부터 29일까지 지속적으로 가장 진하게 나타나 백신으로서 목표 단백질이 될 수 있음을 보여 준다. Indirect immunofluorescent assay에서 HSV-1에 대한 항체들은 HSV-1에 감염되어 inclusion body를 형성한 Vero 세포 표면을 인식하여 HSV-1 항원이 표면에 발현되고 있는 것이 확인되었다. 시간대별로 생산된 마우스 항체의 isotype 결정 실험에서 IgA, IgG1, IgM의 역가는 1일이 지나면서 17일 까지 증가하고 그후 29일까지 감소했으며, 각 역가는 IgG1 > IgA > IgM 순으로 나타났다.

### 감사의 글

이 논문은 1998년도 건국대학교 학술진흥연구비로 연구된 결과로 학교당국에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Anderson, D. B., S. Laquerre, W. F. Goins, J. B. Cohen, and J. C. Glorioso. 2000. Pseudotyping of glycoprotein D-Deficient Herpes Simplex Virus Type 1 with Vesicular Stomatitis Virus glycoprotein G enables mutant virus attachment and entry. *J. Virol.* **74**: 2481–2487.
- Baines, J. D., and B. Roizman. 1993. The UL10 gene of herpes simplex virus 1 encodes a novel viral glycoprotein, gM, which is present in the virion and in the plasma membrane of infected cells. *J. Virol.* **67**: 1441–1452.
- Banks, T. A., F. J. Jenkins, S. Kanangat, S. Nair, S. Dasgupta, C. M. Foster, and B. T. Rouse. 1994. Vaccination with the immediate-early protein ICP47 of herpes simplex virus type 1 induces virus-specific lymphoproliferation, but fails to protect against lethal challenge. *Virology* **200**: 236–245.
- Cocchi, F., M. Lopez, L. Menotti, M. Aoubala, P. Dubreuil, and G. Campadelli-Fiume. 1998. The V domain of herpesvirus Ig-like receptor (HIgR) contains a major functional region in herpes simplex virus-1 entry into cells and interacts physically with the viral glycoprotein D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 15700–15705.
- Ejercito, P. M., E. D. Kieff, and B. Roizman. 1968. Characterization of herpes simplex virus stains differing in their effects on social behaviour of infected cells. *J. Gen. Virol.* **2**: 357–364.
- Holland, T. C., S. D. Marlin, M. Levine, and J. Glorioso. 1983. Antigenic variants of herpes simplex virus selected with glycoprotein-specific monoclonal antibodies. *J. Virol.* **45**: 672.
- Honess, R. W. and D. H. Watson. 1974. Herpes simplex virus-specific polypeptides studied by polyacrylamide gel electrophoresis of immune precipitates. *J. Gen. Virol.* **22**: 171.
- J. Koga, S. Chatterjee, and R. J. Whitley. 1986. Studies on Herpes Simplex Virus Type 1 glycoproteins using monoclonal antibodies. *Virology* **151**: 385–389.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lecomte, J. 1993. Immunofluorescence, pp. 125–131. In Payment, P. and M. Trudel. (eds.), *Methods and Techniques in Virology*, New York, Marcel Dekker, Inc.
- Payment, P. and M. Trudel. 1993. *Methods and Techniques in Virology*, New York, Marcel Dekker, Inc.
- Roizman B. 1996. *Herpesviridae*, pp. 2221–2230. In Fields, B. N., Knipe, D. M. and Howley, P. M. (eds.), *Fields Virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, U.S.A.
- Stannard L. M., A. O. Fuller, and P. G. Spear. 1987. Herpes simplex virus glycoproteins associated with different morphological entities projecting from the virion envelope. *J. Gen. Virol.* **68**: 715–725.

(Received Feb. 12, 2001/Accepted Mar. 7, 2001)