

돼지 콜레라 바이러스 E2 유전자의 클로닝 및 염기서열분석

이영기 · 강신웅 · 김선원 · 박성원 · 이종철 · 이침호

한국인삼연초연구원 원료연구부
(2001년 10월 8일 접수)

Cloning and Sequence Analysis of Hog Cholera Virus(HCV) E2 Gene

Yung Gi Lee*, Shin Woong Kang, Sun Won Kim, Seong Weon Park,
Jong Chul Lee, Cheong Ho Lee

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Daejeon 305-345, Korea
(Received October 8, 2001)

ABSTRACT : Hog cholera virus(HCV) was purified from virus infected Bovine kidney cells. From this virus, total protein was analyzed by SDS-PAGE gel electrophoresis and about 55 kDa band of E2 envelope protein was detected. The viral RNA was purified and E2 cDNA was amplified by RT-PCR. E2 cDNA fragment was cloned to PCRII-TOPO cloning vector and named pE2. The analysis of nucleotide sequence showed that this E2 cDNA fragment inserted into pE2 was 1191 nucleotides long and coded 397 amino acids.

Key words : cloning, Hog cholera virus, E2 envelope protein

최근 몇 년간 식물분자생물학의 눈부신 발전에 힘입어 다양한 식물체의 형질전환 기술이 개발되었으며, 식물체를 이용한 항원 생산과 전달을 위한 도구로 사용함으로써 새로운 경구용 백신을 생산할 수 있는 방법이 연구되고 있다. 이러한 식물체를 이용한 경구용 백신의 생산은 동물로부터 유래된 다른 병원체의 오염을 제거할 수 있고, 진핵생물의 단백질 발현 기구를 이용하며, 기존의 경구용 백신보다 저비용으로 생산이 가능하다는 장점을 지니고 있다. 현재까지 hepatitis B surface antigen (Mason 등, 1992), *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (Haq 등, 1995), rabies virus glycoprotein

(McGarvey 등, 1995) 등을 담배, 토마토, 감자 등의 식물체에 형질전환하여 발현시키고 있으나, 이들 항원단백질의 발현률이 기존의 recombinant 백신에 비해 상대적으로 낮은 것으로 보고되고 있어 고효율의 발현을 유도할 수 있는 새로운 방법이 요구되고 있다.

돼지 콜레라 바이러스(Hog cholera virus, HCV)는 Flaviviridae속의 Pestivirus과에 속하는 바이러스로서(Freed 등, 1991), 돼지에 감염하여 급성 또는 만성 고열과 출혈을 유발하는 전염성이 매우 높은 치명적인 질병이다. HCV는 직경 40~60 nm의 약 12.5 Kb의 enveloped positive-stranded RNA

*연락처 : 305-345 대전광역시 유성구 신성동 302 번지, 한국인삼연초연구원

*Corresponding author : Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, 302 Shinseong-Dong, Yusong-Gu, Daejeon 305-345, Korea

바이러스이며(Moormann 등, 1988), 하나의 polyprotein으로 발현한 후에 바이러스 자체 또는 숙주의 protease에 의해 각각의 기능성 단백질로 process 된다(Stark 등, 1993). 이 바이러스의 5'-terminal 부위는 capsid protein C와 3개의 envelope glycoprotein (E0, E1, and E2)을 coding하고 있으며, 특히 55 kDa의 E2 protein은 antigenicity가 매우 높고 이 단백질을 단일항원으로 돼지에 vaccination을 하였을 경우에도 HCV에 대한 면역력이 생성된다는 연구결과가 보고된 바 있다(Hulst 등, 1993).

따라서 본 실험에서는 고효율의 식물발현벡터를 이용하여 돼지콜레라 바이러스의 항원 유전자를 식물체내에서 발현시킴으로써 식물발현 시스템을 이용한 경구용 동물백신을 개발하는데 그 목적이 있는 바, 먼저 HCV vaccine strain이 감염된 세포주로부터 바이러스를 순수분리하고 E2 protein을 coding하는 유전자를 클로닝하였으며, 클로닝된 유전자의 분자적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

바이러스의 분리 및 정제

HCV (Hog Cholera Virus) ROM strain을 배양하기 위하여 monolayer로 자라는 BK(Bovine Kidney) 세포주를 2% FBS (Fetal Bovine Serum)가 첨가된 MEM (Modified Eagle's Medium) 배지에 접종하였고, 37°C에서 10%의 CO₂ 농도를 유지하면서 배양하였다. 세포주를 증식 및 유지하기 위하여 계대배양을 3일간격으로 수행하였고, 계대비율은 1 : 2.5로 하였다. 계대배양을 시작할 때, 배지에 약 10^{4.0-5.0} TCID₅₀의 seed virus를 첨가함으로써 바이러스의 감염을 유도하였으며, FBS의 양도 5%로 증가시켰다. 바이러스 분리를 위하여 배양 후 5일이 경과한 다음 세포를 harvest하였으며, 5일 간격으로 3~4회 더 세포를 harvest하였다. 바이러스가 감염된 세포 배양액을 4°C에서 10,000 rpm으로 40분간 원심분리한 후 상층액을 취한 다음 이를 다시 4°C에서 40,000 rpm으로 3시간동안 원심분리하고, 침전된 바이러스를 200μl의 TE용액(10mM Tris-HCl,

1mM EDTA, pH 8.0)에 녹임으로써 바이러스를 분리하였다.

정상 BK 세포주와 감염된 BK 세포주는 배양용액을 4°C에서 3,500 rpm으로 30분간 원심분리한 후 세포를 침전시키고, 이를 다시 1ml의 D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)에 부유시킨 다음 상온에서 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 사용하였다.

SDS-PAGE gel electrophoresis

정상 BK 세포주와 HCV가 감염된 BK 세포주가 침전되어 있는 1.5ml tube에 200μl의 8M urea를 첨가한 후 세포를 부유시킨 다음 200μl의 2X sample buffer(1.25M Tris-HCl, 10% SDS, 10g Glycerol, 10% 2-Mercaptoethanol, 50μg/ml Bromophenol blue)를 첨가하고 끓는 물에 10분동안 처리하였고, 순수 분리된 HCV 바이러스 용액에는 직접 200μl의 2X sample buffer를 첨가하고 끓는 물에 10분동안 처리하였으며, 이를 13% SDS-PAGE gel 전기영동에 사용하였다

전기영동이 끝난 후 단백질 band는 50% Methanol, 0.05% Coomassie blue R-250 그리고 10% acetic acid로 staining 하여 관찰하였다.

바이러스 total RNA 분리

약 100μg의 순화된 각각의 바이러스 100μl에 동일 부피의 acid phenol을 첨가하고 잘 섞은 다음, 다시 100μl의 24:1 chloroform/isoamyl alcohol을 첨가한 후 흔들어 섞어주고 이를 얼음에서 15분 동안 정치하였다. 이 시료를 4°C, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취한 뒤 동일 부피의 isopropyl alcohol을 첨가한 다음 -20°C에서 2시간 동안 방치하였다. 이를 4°C, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 침전물을 취한 다음 80% ethyl alcohol로 다시 부유시킨 후 이를 원심분리하여 상층액을 제거하고 speed vacuum에서 말린 다음 약 5μg의 viral RNA를 50μl의 RNase inhibitor(0.1% diethyl pyrocarbonate)가 처리된 증류수에 녹여서 다음 실험에 사용하였다(Chomczynski and Sacchi, 1987).

E2 유전자 재조합 및 염기서열분석

E2 envelope 단백질을 coding하는 유전자를 재조합하기 위하여 1st strand synthesis kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 reverse transcription 반응을 하였으며(Sambrook 등, 1989), 이때 antisense primer로 E2AS4 primer (5' TACTGCAGCTAAAA TATACTACGACCTCGATGT 3') 를 사용하였다.

반응이 끝난 후 5pmole의 E2 유전자를 증폭하도록 design한 E588S1 primer(5' GTCGGATCCATG CTAGCCTGCAAGGAAGAT 3')와 E2AS4 primer, 각각 10 μ M의 dNTP, 1 μ l의 Taq polymerase (2unit/ μ l) 그리고 reaction buffer를 첨가한 후 증류수로 최종 부피가 50 μ l가 되게 한 다음 45 cycle의 PCR반응을 수행하였다. 이때 반응시간은 95 $^{\circ}$ C 30초, 45 $^{\circ}$ C 1분 그리고 72 $^{\circ}$ C 1분 30초였다. 반응이 완료된 후 증폭된 E2 cDNA 유전자 가닥을 PCRII-TOPO cloning kit(Invitrogen, USA)를 사용하여 PCRII-TOPO vector에 재조합하였으며, 제한 효소 반응을 이용하여 유전자의 삽입을 확인하였다. 재조합된 E2 cDNA의 염기서열은 "ABI prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit"(PE Applied Biosystems)를 이용하여 분석하였다

결과 및 고찰

돼지콜레라 바이러스의 배양 및 전단백질 분석

국내에 유통되고 있는 HCV vaccine strain인 ROM strain을 bovine kidney 세포에 감염시킴으로써 바이러스를 배양하였다. Bovine kidney 세포는 adherent 세포로서 바닥에 밀착하여 성장하는 특성을 보여주고 있으며(Fig 1, A), HCV가 감염된 후 1주일이 경과된 후에는 바이러스의 증폭에 의해 세포가 상당부분 파괴되어 배지용액에서 부유함을 볼 수 있었다(Fig 1, B). 또한 bovine kidney 세포에서 배양된 HCV ROM strain virus를 순수 분리하였으며, 이 바이러스와 정상 bovine kidney 세포주 그리고 바이러스가 감염된 세포주로부터 전단백질을 순수 분리하였다. 각 바이러스 및 세포주에서 분리한 전단백질을 SDS-PAGE gel electrophoresis에 의하여 전단백질 pattern을 분석하였다(Fig 2). 바이러스가 감염된 세포주와 순수 분리된 바이러스에서는 E2 envelope 단백질로 추정되는 약 55 kDa 크기의 band를 발견할 수 있었으며, 감염이 되지 않은 정상 bovine kidney 세포주에서는 E2 envelope 단백질이 존재하지 않음을 알 수 있었다. 따라서 본 실험에 사용된 ROM strain은 병

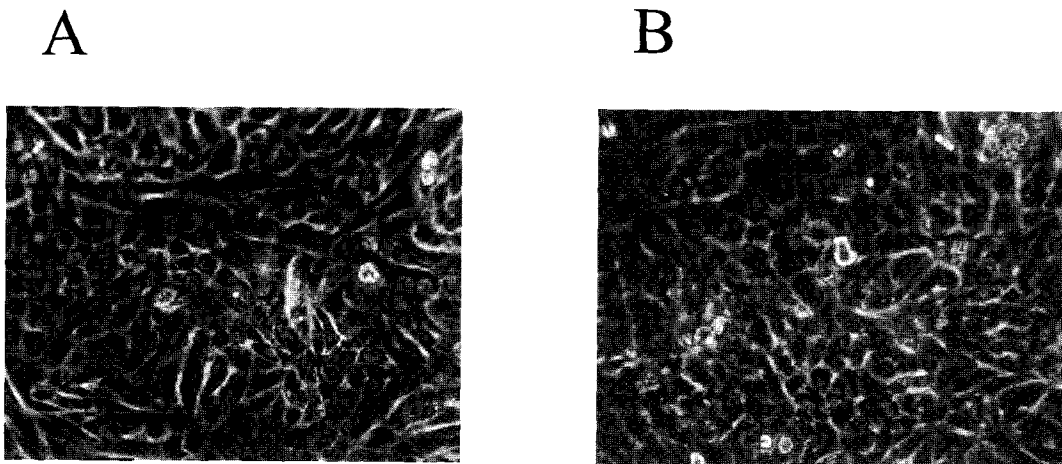


Fig. 1. Photos of the cultured bovine kidney cells
Photo A: Normal bovine kidney cell.
Photo B: Virus infected cell (after 7 days).

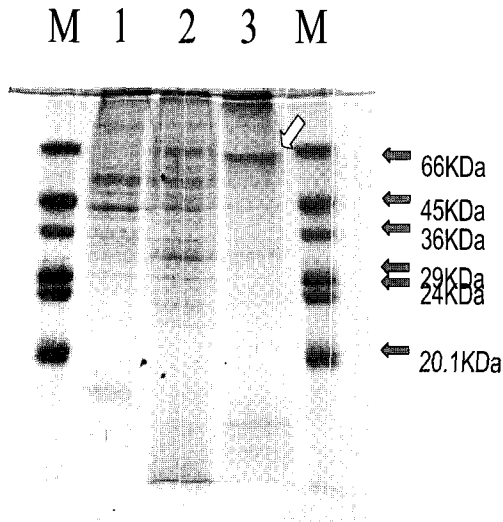


Fig. 2. SDS-PAGE gel patterns of total protein of normal, HCV infected BK cell and purified HCV. M : protein size marker, Lane 1: Normal bovine kidney cell, Lane 2: bovine kidney cell infected by HCV, Lane 3: purified HCV(13% SDS-PAGE, stained with Coomassie Blue R250).

원성의 HCV나 다른 vaccine strain과 거의 동일한 E2 envelope 단백질을 정상적으로 발현하고 있음을 확인할 수 있었다.

E2 유전자의 재조합

순화된 배양 바이러스로부터 E2 envelope 유전자를 클로닝하기 위하여 viral RNA를 순수 분리하였으며, design된 primer를 사용하여 RT-PCR을 수행한 결과 약 1.2 kbp에 해당되는 DNA band가 합성되었다(Fig 3, A). RT-PCR에 의해 증폭된 E2 cDNA가닥을 순수 분리한 후 이를 PCRII-TOPO cloning vector에 subcloning하였으며, 이 재조합 plasmid를 pE2라 명명하였다. pE2 plasmid를 제한 효소 *Bgl*III로 처리한 결과 재조합된 plasmid의 크기가 약 5.1 kbp였으며, 제한효소 *Eco*RI를 처리하였을 때 약 1.2 kbp의 DNA band가 분리되는 것으로 보아 E2 cDNA로 추정되는 유전자 단편이 재조합되었음을 알 수 있었다(Fig 3, B).

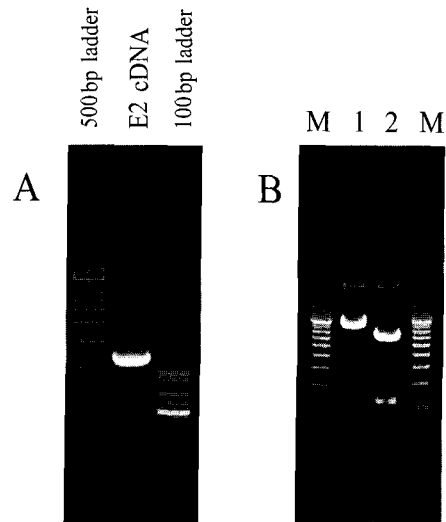


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product and cloned E2 cDNA.

Photo A: 1.2kbp of RT-PCR product (E2 cDNA encoding), Photo B: M: 500 bp ladder, Lane 1: E2 cDNA + pCRII-TOPO *Bgl*III cut, Lane 2: E2 cDNA + pCRII-TOPO *Eco*RI cut (E2 cDNA).

E2 유전자의 염기서열 분석

합성된 HCV E2 cDNA가닥을 Sp6 primer와 T7 primer를 이용하여 염기서열분석을 한 결과 E2 cDNA를 재조합 하기위해 사용한 primer 부위를 포함하여 총 1216 bp의 염기서열을 확인할 수 있었으며, 확인된 염기서열을 BLAST의 database를 이용하여 유사 염기서열 분석을 한 결과 이중 1191 bp가 HCV E2 유전자인 것으로 확인되었다(Fig 4). 본 실험에 사용된 HCV ROM strain의 염기서열은 virulent strain인 Alfort나(Ruggli 등, 1995) ALD strain(Ishikawa 등, 1995)에 대하여 97~99%의 homology를 보여주었으며, 이들과 다른 염기의 위치는 여러개 표기하였다. 이 유전자는 총 397개의 아미노산을 coding하며, virulent strain과의 아미노산 homology는 약 97~98%로 9개의 아미노산이 다름을 볼 수 있었고, 염기서열 분석에서 16개의 바뀐 염기중 7개가 3번째 codon에 위치함으로써 아미노산이 바뀌지 않았음을 알 수 있었으며,

돼지 콜레라 바이러스 E2 유전자의 클로닝 및 염기서열분석

```

CTAGCCTGCAAGGAAGATTACAGGTACGCACTATCATCAACCAATGAGAT      50
AGGGCTACTCGGGGCCGGAGGTCTCACCACCACCTGGGAAGAATACAACC      100
ACGATTTGCAACTGAATGACGGGACCGTTAAGGCCATTTGCGTGGCAGGT      150
TCCTTTAAATCACAGCACTTAATGTGGTCAGTAGGAGGTATTTGGCATC      200
ATTGCATAAGGAGGCTTTACCCACTTCCGTGACATTCGAGCTCCTGTTCCG      250
ACGGGACCAACCCATCAACTGAGGAAATGGGAGATGACTTCGGGTTCCGGG      300
CTGTGCCGTTTGATACGAGTCCTGTTGTCAAGGGAAAGTACAATACAAC      350
CTTGTTGAACGGTAGTGCTTTCTATCTTGTCTGTCCAATAGGGTGGACGG      400
GTGTTATAGAGTGACAGCAGTGAGCCCAACAACCTGAGAACAGAAGTG      450
GTAAAGACCTTCAGGAGGGACAAGCCCTTCCGCACAGAATGGATTGTGT      500
GACCACAACAGTGGAAAATGAAGATTTATTCTACTGTAAGTTGGGGGGCA      550
ACTGGACATGTGTGAAAGGTGAACCAGTGGTCTACGCGGGGGGGCTAGTA      600
AAACAATGCAGATGGTGTGGCTTTGACTTCAATGAGCCTGACGGACTCCC      650
ACACTACCCCATAGGTAAGTGCATTTTGGCAAATGAGACAGGTTACAGAA      700
TAGTGGATTCAACAGACTGTAACAGAGATGGTGTGTAATCAGCACAAAG      750
GGGAGTCATGAGTGCTTGATCGGTAACACAACCGTCAAGGTGCATGCATC      800
AGATGAAAGACTGGGCCCATGCCATGCAGACCTAAAGAGACCGTCTCTA      850
GTGAAGGACCTGTAAGGAAAACCTTCTGTACATTCAACTACGCAAAAAC      900
TTGAAGAACAAGTACTATGAGCCCAGGGACAGCTACTTCCAGCAATATAT      950
GCTTAAGGGCGAGTATCAGTACTGGTTTGACCTGGACGTGACTGACCGCC      1000
ACTCAGATTACTTCGCAGAATTTGTTGTCTTGGTGGTGGTAGCACTGTTA      1050
GGAGGAAGATATGTCCTGTGTTAATAGTGACCTACATAGTTTTAACAGA      1100
ACAACCCGCCGCTGGTTTACCATTGAGCCAGGGTGAGGTAGTGTGATAG      1150
GGAACCTAATCACTCACACAGTCATCGAGGTCGTAGTATAT      1191
    
```

Fig. 4. Nucleotide sequences of the synthesized HCV E2 cDNA fragment. Non identical nucleotides in alignment are noted by shade.

```

LACKEDYRYALSSTNEIGLLGAGGLTTWEEYNHDLQLNDGTVKAI CVAG      50
SFKITALNVVSRRYLASLHKEALPTSVTFELLFDGTFNPSTEEMGDDFGFG      100
LCPFDTSPVVKGYNTLLNGSAFYLVCPIGWTGVIECTAVSPTTLRTEV      150
VKTFRRDKPFPHRMDCVTTTVENEDLFYCKLGGNWTVCVKGEPVVYAGGLV      200
KQCRWCGDFNEPDGLPHYPIGKCILANETGYRIVDSTDCNRDGVVISTK      250
GSHECLIGNTTVKVHASDERLGPMPKPKETVSSEGPVRKTSCTFNKYAKT      300
LKNKYYEPRDSYFQQYMLKGEYQYWFDLVTDHRSDYFAEFVVLVVVALL      350
GGRYVLWLIVTYIVL TEQPAAGLPLSQGEVVLIGNLIHTVIEVVVY      397
    
```

Fig. 5. Amino acid sequences of E2 protein. Non identical amino acids in alignment are noted by shade and underlines indicate the membrane binding region.

바뀐 나머지 9개의 아미노산도 BLASTP의 단백질 2차구조 유추 program을 사용한 결과 아미노산 서열상에 membrane region의 위치와 단백질 folding 및 구조에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다 (fig. 5).

결 론

돼지 콜레라 바이러스(HCV)의 E2 유전자를 사료작물내에서 발현시킴으로써 식물 발현 시스템을 이용한 경구용 백신을 개발하고자 HCV vaccine strain인 ROM strain을 Bovine Kidney 세포에서 증식 시켰으며, 이를 순수 분리 하였다. 순수분리된 바이러스의 전단백질에 대한 SDS-PAGE 결과 약 55 kDa의 E2 단백질이 존재함을 확인하였다. 분리된 바이러스로부터 Total RNA를 순수 분리 정제한 후 RT-PCR을 이용하여 E2 유전자에 대한 cDNA 단편을 증폭한 다음 이를 PCRII-TOPO plasmid에 재조합하였다. 염기서열 분석 및 아미노산 서열분석을 한 결과 1191 bp의 염기로 구성되었으며, 397개의 아미노산으로 이루어졌음을 알 수 있었다. 다른 virulent strain들과의 homology는 97~99%였다.

참 고 문 헌

1. Chomczynski, P. and N. Sacchi(1987) Singlestep method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
2. Freed E. O., and R. Risser(1991) Identification of conserved residues in the human immunodeficiency virus type 1 principal neutralizing determinant that are involved in fusion. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991 7(10):807-11.
3. Haq T. A., H. S. Mason, J. D. Clements, and C. J. Arntzen(1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science.* 5:268(5211):714-6.
4. Hulst M. M., D. F. Westra, G. Wensvoort, and R. J. Moormann(1993) Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. *J Virol.* 67(9): 5435-42.
5. Ishikawa, K., H. Nagai, K. Katayama, M. Tsutsui, K. Tanabayashi, K. Takeuchi, M. Hishiyama, A. Saitoh, M. Takagi, K. Gotoh, M. Muramatsu, and A. Yamada(1995) Comparison of the entire nucleotide and deduced amino acid sequences of the attenuated hog cholera vaccine strain GPE- and the wild-type parental strain ALD. *Arch. Virol.* 140 (8):1385-1391.
6. Mason H. S., D. M. Lam, and C. J. Arntzen (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15:89(24):11745-9.
7. McGarvey P. B., J. Hammond M. M. Dienelt D. C. Hooper Z. F. Fu, B. Dietzschold, H. Koprowski, and F. H. Michaels(1995) Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology* (N Y). 13(13):1484-7.
8. Moormann R. J. and M. M. Hulst(1988) Hog cholera virus: identification and characterization of the viral RNA and the virus-specific RNA synthesized in infected swine kidney cells. *Virus Res.* 11(4):281-91.
9. Ruggli, N., C. Moser, D. Mitchell, M. Hofmann, and J. D. Tratschin(1995) Baculovirus expression and affinity purification of protein E2 of classical swine fever virus strain Alfort/187. *Virus Genes* 10(2):115-126.
10. Sambrook, F., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989) Molecular cloning : A Laboratory Manual, 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
11. Stark R., G. Meyers, T. Rumenapf, and H. J. Thiel(1993) Processing of pestivirus polyprotein : cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J Virol.* 67(12):7088-95.