

돼지 생식기호흡기증후군 바이러스의 Nucleocapsid 단백질 발현 및 진단적 응용

박효선, 한태욱¹, 김현수², 최강석³, 이은정⁴, 강신영*

충북대학교 수의과대학/동물의학연구소, ¹강원대학교 수의학과, ²충남대학교 수의과대학,

³국립수의과학검역원, ⁴충북가축위생시험소

(게재승인: 2003년 3월 6일)

Expression and diagnostic application of nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus

Hyo-Sun Park, Tae-Uook Hahn¹, Hyun-Soo Kim², Kang-Seuk Choi³, Eun-Jeong Lee⁴, Shien-Young Kang*

Research Institute of Veterinary Medicine/College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University

¹Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University

²College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

³National Veterinary Research and Quarantine Service

⁴Chungbuk Veterinary Service Laboratory

(Accepted: March 6, 2003)

Abstract: Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is characterized by reproductive failures in sows and respiratory problems in piglets. The nucleocapsid(N) protein, encoded by the open reading frame 7 (ORF7) gene, is known to be the most abundant and antigenic protein in PRRS virus. Therefore, it was suggested that the N protein could be a suitable candidate for the detection of PRRS virus-specific antibodies and diagnosis of PRRS.

In the present study, the ORF7 gene encoding the N protein was cloned and expressed as a fusion protein with the glutathione S-transferase (GST) in *Escherichia coli*. The resulting GST-N recombinant protein was used as an antigen for an indirect sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (i-ELISA). Expressed GST-N recombinant protein was migrated at 41 kDa and reacted with ORF7-specific monoclonal antibody by Western blotting. In order to increase the specificity of the ELISA for the detection of PRRS virus-specific antibodies, an i-ELISA was developed using an anti-GST antibody as a capture antibody. The sensitivity and specificity of developed i-ELISA were 92% and 96%, respectively. Based on these results, it was suggested that the i-ELISA is a simple and rapid test for screening a large number of swine sera for the anti-PRRS virus antibodies.

Key words: PRRS, nucleocapsid protein, *E. coli* expression, indirect sandwich enzyme-linked immunosorbent assay

서 론

돼지 생식기호흡기증후군(Porcine reproductive and res-

piratory syndrome: PRRS)은 모돈에서 번식장애 그리고 자돈에서는 간질성 폐렴과 관련된 호흡기 증상을 특징으로 하는 전염성 질병으로 원인체는 *Arteriviridae* 과에

이 논문은 2002년도 농림부 농림기술개발사업 (첨단기술개발과제) 연구비로 수행되었음.

* Corresponding author: Shien-Young Kang

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University

Tel: 043-261-2598, Fax: 043-267-3150, E-mail: sykang@chungbuk.ac.kr

속하는 바이러스로 피막을 가지고 있으며 유전자는 positive sense, single-stranded RNA로 되어 있다.¹² 바이러스의 유전자는 약 15 kb의 크기로 subgenomic mRNA가 서로 overlapping되어 있는 8개의 open reading frames (ORFs)으로 구성되어 있다.³ 주요 구조단백질로 nucleocapsid 단백질 (N: 14-15 kDa), nonglycosylated membrane 단백질 (M: 18-19 kDa), envelope 당단백질 (E: 25-26 kDa)이 있으며^{4,5} 이 중 N 단백질이 PRRS 바이러스가 감염된 세포에서 가장 많이 발현되는 단백질로 항원성이 우수하여 PRRS 바이러스 특이항체를 검출하거나 질병을 진단하는데 적합한 항원으로 알려져 있다.⁶

PRRS 감염을 확인하기 위한 진단법으로 전통적인 바이러스 분리 동정 외에 유전자 검색방법인 역전사중합효소연쇄반응 (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction: RT-PCR)법이 있으며⁷ 항체 검색방법으로 혈청중화시험 (Serum neutralization assay: SNA), 면역효소단층법 (Immunoperoxidase monolayer assay: IPMA), 간접형광항체법 (Indirect fluorescence assay: IFA), 효소연쇄반응 (Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) 등이 있다.⁸ 이러한 혈청학적 진단법 중 가장 일반적으로 사용되는 것이 IFA이며 이는 IPMA와 더불어 매우 민감한 진단법으로 알려져 있다.⁹ 그러나 이들 진단법 모두 조직배양을 통해 항원을 준비하여야 하고 이 진단법을 주로 사용하고 있는 유럽에서는 야외바이러스가 돼지 폐포 탐식세포에서만 증식하는 조직친화성을 가지고 있기 때문에 일반적인 진단법으로 사용하기에는 문제점이 있다. 또한 바이러스 전체를 항원으로 이용한 간접 ELISA는 IFA에 비해 민감도와 특이도가 높고 다량의 샘플을 처리할 수 있는 장점이 있지만 정제된 바이러스를 항원으로 사용하여야 하므로 정제된 바이러스로부터 추출된 바이러스 단백질의 양이 적고, 같은 genotype인 미국 분리주들 사이에도 항원적으로 매우 다르기 때문에 false-negative 판단의 위험이 있어 일반적인 진단법으로 사용하기에는 적합하지 않다.^{10,11} 이러한 문제점을 극복하기 위하여 최근에는 곤충 세포나 대장균 발현체계를 이용하여 생산된 재조합 단백질을 항원으로 사용하여 PRRS 바이러스 특이항체를 검출할 수 있는 간접 혹은 경쟁적 ELISA가 개발되고 있다. 이 진단법은 바이러스 전체를 항원으로 이용하고 있는 현 방법에 비하여 비교적 경제적이고 민감도가 높으며 간편하다는 이점을 가지고 있다.¹²

본 연구에서는 국내에서 분리된 PRRS 바이러스 N 단백질의 분자생물학적 특성을 규명하기 위하여 대장균 발현체계를 이용하여 ORF7 유전자를 발현시켰으며, 발현된 N 단백질을 항원으로 이용한 ELISA를 개발하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 세포

본 실험에서 사용한 PRRS 바이러스는 충남대학교 수의과대학에서 분양 받은 CNV 주로 원숭이 신장세포 유래인 MA104 세포로부터 크로닝한 MARC-145 세포에 배양하였다. MARC-145 세포는 10% 소 태아혈청 (Fetal bovine serum: FBS, GIBCO Invitrogen, USA)이 함유된 alpha minimum essential medium (α -MEM, GIBCO Invitrogen)으로 배양하였다.

2. 바이러스 핵산 추출

CNV 조직배양액으로부터 바이러스 RNA는 Chomczynski와 Sacchi¹³의 방법을 응용하여 추출하였으며, DEPC (Diethyl pyrocarbonate, Sigma, USA) 처리된 증류수로 용해시켜 -20°C에 보관하였다.

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

ORF7 유전자는 ORF7 특이 primer를 사용하여 RT-PCR법으로 증폭시켰다. ORF7 특이 primer는 GenBank의 자료를 기초로 Table 1에서와 같이 ORF7 유전자 전체 (372 bp)를 증폭할 수 있도록 제작하였으며 크로닝을 위하여 5' 방향에 2개의 제한효소 절단부위인 Bam H I (Sense primer)과 Eco R I (Antisense primer)를 추가하여 작성하였다. 추출한 RNA 샘플 10 μ l에 1 μ l의 reverse primer를 넣고 95°C에서 5분간 변성시킨 후 얼음에 옮겨 5분간 방치하였다. 10,000 rpm에서 5~10초간 원심한 후 DEPC 처리된 증류수 20 μ l, 5 \times first strand buffer 10 μ l, 0.1M DTT 5 μ l, 10 mM dNTP 2 μ l, RNase inhibitor 1 μ l, reverse transcriptase (200 U/ μ l, GIBCO Invitrogen) 1 μ l를 순서대로 넣어 반응용량 50 μ l를 37°C에서 60분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA template 10 μ l에 DEPC 처리된 증류수 63 μ l, 10 \times PCR buffer 10 μ l, 25 mM MgCl₂ 12 μ l, 10 mM dNTP 2 μ l, forward primer 1 μ l, reverse primer 1 μ l, Taq DNA polymerase (5 U/ μ l, Takara, Japan) 1 μ l를 넣어 전체 반응용량 100 μ l를 pre-PCR (95°C/5 min), PCR (denaturation 94°C/10 sec, annealing 50°C/30 sec, extension 72°C/30 sec, 25 cycles) 그리고 post-PCR (72°C/7 min)을 핵산증폭기 (GeneAmp PCR system 2400, Perkin-Elmer, USA)를 사용하여 실시하였다. 반응산물은 1% agarose gel 상에서 전기영동한 뒤 ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였으며 증폭된 ORF7 유전자 크기는 1 kb DNA ladder (GIBCO Invitrogen)를 같이 전기영동함으로써 확인하였다.

Table 1. Oligonucleotide primers used for RT-PCR

Genes	Sequences (5'→3')	Positions
ORF7	+sense : <u>TTGGATCC</u> ATGCCAAATAACAACGGC	1-17
	-sense : TTGAAT <u>TCTC</u> ATGCTGAGGGTGATGC	372-355

(Underline : Restriction endonuclease site)

4. ORF7 유전자 발현

ORF7 유전자 발현은 대장균 발현체계를 이용하여 다음과 같이 수행하였다. 즉, 대장균 발현벡터인 pGEX-4T-1[®] (Amersham Pharmacia Biotech, USA) vector에 *Bam* H I 과 *Eco* R I 부위에 크로닝한 ORF7 유전자를 삽입하여 recombinant를 작성하였다. 이것을 대장균 competent cell (BL21)로 형질 전환한 후 ampicillin (50 ug/ml, Amresco, USA)이 첨가된 2× YT broth에서 배양하였다. Glutathione S-transferase (GST) 단백질과 융합된 GST-N 재조합 단백질의 발현을 유도하기 위하여 37°C에서 18시간 배양하여 형질 전환된 *E. coli*를 2× YT broth에 1:10이 되도록 희석한 후 배양액이 흡광도가 A₆₀₀에서 0.6~1.0이 되었을 때 0.1 mM IPTG를 첨가하였다. 실온에서 4시간 동안 배양한 후 cell을 3,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 상층액을 제거한 후 protease inhibitor cocktail[®] (Roche Diagnostics GmbH, Germany)이 함유되어 있는 0.01 M ice-cold PBS (Phosphate buffered saline)로 처음 양의 1:25 가 되도록 부유시켰다. 부유시킨 상층액을 초음파분쇄기 (Branson, USA)를 이용하여 cell을 용해시킨 후 상층액을 추출하였다.

5. 단크론항체 생산

PRRS 바이러스 특이 단크론항체는 PRRS 바이러스로 면역시킨 BALB/c 마우스의 비장세포와 SP2/O myeloma 세포를 Kang¹⁴ 등과 Kohler와 Milstein¹⁵의 방법에 따라 세포융합을 실시하여 생산하였다.

6. Western blotting

대장균에서 ORF7 단백질의 발현유무는 Western blotting 방법으로 anti-GST 항체와 ORF7 특이 단크론항체를 이용하여 확인하였다. 즉, 대장균에서 발현된 GST 발현단백질과 GST-N 발현단백질의 상층액 및 cell pellet을 sample buffer (60 mM Tris-HCl, pH6.8, 2% SDS, 25% glycerol, 1.44 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)와 1:5의 비율로 섞어 100°C에서 5분간 끓여 변성시켰다. 이를 12.5% SDS-polyacrylamide gel에서 2시간동안 80 volt로 전기영동을 한 다음 gel을 꺼내어 transfer buffer

(15.6 mM Tris base, 120 mM glycine, pH 8.1~8.4)에 30 분간 담구어 두었다. 미리 transfer buffer에 담가 놓은 filter paper와 nitrocellulose membrane (NENTM, Life Science Products, USA) 사이에 gel을 넣어 semi trans-blot (Bio-rad, USA)를 이용하여 13 volt에서 20분간 전이시켰다. Nitrocellulose membrane을 5% non-fat dry milk/tris buffered saline (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5 : TBS)에서 하룻밤 동안 blocking 시킨 후 TBS로 강하게 흔들며 3회 세척하였다. 1차 항체로 anti-GST 항체와 ORF7에 특이적인 단크론항체를 사용하여 1시간 동안 실온에서 흔들며 반응시켰다. TBS로 3회 세척한 후 2차 항체로 alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-goat IgG (Kirkegaard Perry Laboratory, USA)와 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG (Kirkegaard Perry Laboratory)를 1:2,000으로 희석하여 1시간 반응시킨 뒤 이를 TBS로 3회 세척하였다. 발색제로 NBT/BCIP stock solution (Promega, USA)을 alkaline phosphatase buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 9.5, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂) 10 ml에 섞어 사용하였다.

7. 효소면역흡착법 (ELISA)

PRRS 바이러스에 특이적인 항체를 검색하기 위하여 indirect sandwich ELISA (i-ELISA)을 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

(1) ELISA 반응조건 설정

1) 발현단백질 농도 결정

Anti-GST 항체 (5 µg/ml)를 pH 7.4로 적정된 0.01 M PBS에 희석하여 ELISA plate (Nunc, Denmark)에 well당 50 µl씩 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 교반을 통해 흡착시킨 후 세척용 완충액 (0.01 M PBS, 0.05% tween 20)으로 3회 세척하였다. 이 후 blocking buffer (5% skim milk in 0.01 M PBS)에 1:100부터 시작하여 2진법으로 단계 희석한 GST-N 발현단백질과 대조군으로 GST 발현단백질을 각 well당 50 µl씩 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척용 완충액으로 3회 세척한 후 1차 항체로 ORF7 특이 단크론항체를 1:1,000과 1:10,000으로 각각 희석한 후 well당 50 µl씩 첨가하였다. 37°C에서 1

시간 동안 반응시킨 후 세척용 완충액으로 3회 세척하였다. 3회 세척 후 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Kirkegaard Perry Laboratory)를 1:2,000으로 희석하여 1시간 반응시켰다. 세척용 완충액으로 3회 세척한 후 기질용액 (ortho-phenylenediamine dihydrochloride in citrate phosphate buffer, pH5.2)에 과산화수소가 0.015% 되도록 가하여 즉시 각 well당 50 μ l씩 첨가하고 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 이 후 1.0 M H₂SO₄ 용액을 well당 50 μ l씩 첨가하여 반응을 정지시킨 후 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 혈청 희석농도 결정

Anti-GST 항체를 앞에서 설명한 방법과 동일하게 흡착시킨 후 세척용 완충액으로 3회 세척하였다. 이 후 blocking buffer에 동일한 농도로 희석한 발현단백질을 각 well당 50 μ l씩 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척용 완충액으로 3회 세척한 후 1% bacterial cell lysates로 30분 동안 흡착시킨 PRRS 바이러스 양성 돼지혈청과 음성 돼지혈청을 각각 blocking buffer에 1:10부터 시작하여 단계 희석하였으며 well당 50 μ l씩 첨가하였다. 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 세척용 완충액으로 3회 세척하였다. 이 후의 과정은 앞에서 설명한 방법과 동일하게 수행하였다.

3) 대조혈청 panel 결정

혈청 희석농도 결정시와 동일한 방법으로 실시하되 1차 항체인 고역가의 양성 돼지혈청을 음성 돼지혈청으로 1:2부터 시작하여 2진법으로 단계 희석한 후 blocking buffer로 동일하게 희석하여 수행하였다.

4) ELISA 음성기준치 설정

PRRS 바이러스 특이항체 검색용으로 상용화된 진단 키트인 HerdCheck PRRS Virus Antibody Test Kit (IDEXX[®])에 의해 PRRS 항체 음성으로 판정된 혈청 144개를 대상으로 위의 방법과 동일하게 ELISA를 실시하여 95%의 특이성을 보일 수 있는 반응조건을 설정하였으며 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$95\% \text{ specificity (cut off)} = s/p \text{ ratio}^a \text{ mean} + 2 \text{ SD}^b$$

$$a : s/p \text{ ratio (sample)} = \frac{\delta OD \text{ (sample)} - \delta OD \text{ (negative control)}}{\delta OD \text{ (positive control)} - \delta OD \text{ (negative control)}}$$

b : standard deviation

(2) ELISA evaluation

국내에서 사용되고 있는 돼지 혈청 315개를 위에서 개발한 i-ELISA로 검사하였으며 검사혈청에서 얻어진 값은 s/p ratio로 나타내었다.

결 과

1. RT-PCR

PRRS 바이러스에서 추출한 RNA를 ORF7 특이 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과 372 bp 크기의 유전자 산물이 증폭되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

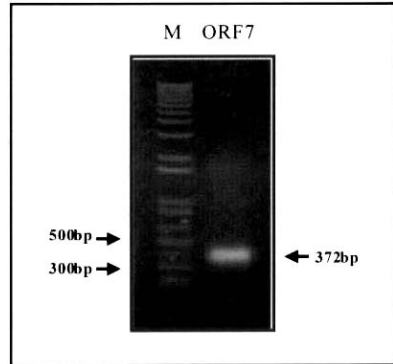


Fig. 1. RT-PCR products of porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORF7 gene

2. ORF7 유전자 발현

PRRS 바이러스에 특이적인 항체를 검색할 수 있는 ELISA를 개발하기 위하여 ORF7 유전자를 대장균 발현 체계를 이용하여 발현하였으며 발현된 ORF7의 특성을 SDS-PAGE (Fig. 2A, 2C)와 Western blotting (Fig. 2B, 2D) 방법으로 분석한 결과 SDS-PAGE에서 41 kDa의 ORF7 band를 확인할 수 있었다. 또한 anti-GST 항체 (Fig. 2B)와 PRRS 바이러스 ORF7에 특이적인 단클론항체 (Fig. 2D)를 사용하여 Western blotting을 실시한 결과 뚜렷한 ORF7을 확인할 수 있었으며 41 kDa의 크기에서 특이적인 band가 형성됨을 확인하였다.

3. PRRS 바이러스 특이항체 진단용 효소면역흡착법 (ELISA) 개발

(1) ELISA 반응조건 설정

1) 발현단백질과 혈청 희석농도 결정

PRRS 바이러스 특이항체 검출을 위한 ELISA는 anti-GST 항체를 이용한 간접 sandwich ELISA (i-ELISA) 방법을 도입하였다. 우선 anti-GST 항체를 5 μ g/ml 농도로 ELISA plate에 부착시켰으며 발현단백질 항원의 적정 농도를 측정기 위하여 1차 항체로 ORF7에 특이적인 단클론항체를 사용하였다. 1차 항체와 발현단백질의 반응성을 조사한 결과, 대조군인 GST 발현단백질과는 반응성이 거의 없는 반면에 GST-N 발현단백질과는 높은 반응

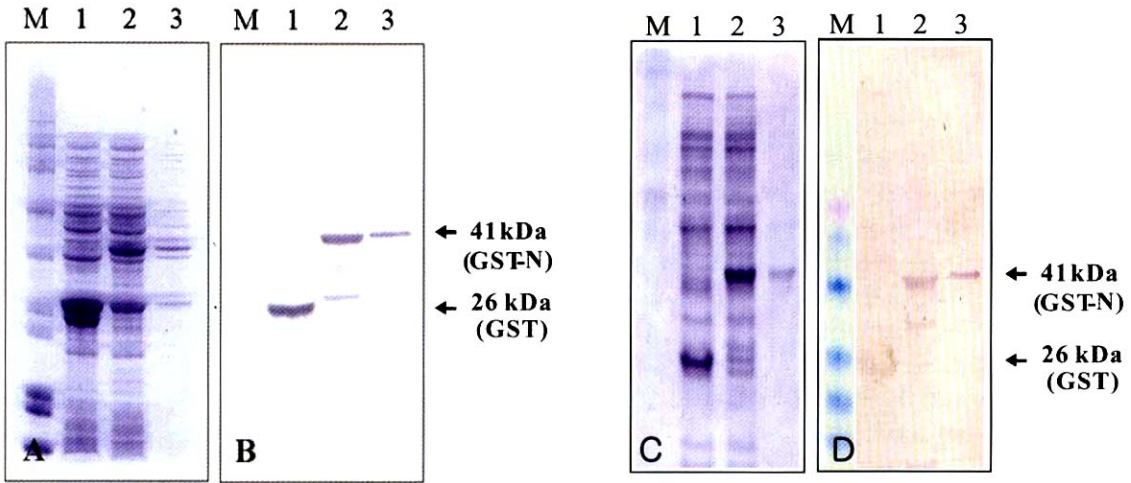


Fig. 2. Expressed PRRSV ORF7 protein (41 kDa) with GST protein in *E. coli* confirmed by SDS-PAGE (A, C) and Western blotting (B, D) using anti-GST (B) and PRRSV virus N-specific monoclonal antibody (D). M: molecular weight marker; lane 1, supernatant of sonicated bacterial cells containing GST protein; lane 2, supernatant of sonicated bacterial cells containing GST-N recombinant fusion protein; lane 3, cell pellet of sonicated bacterial cells containing GST-N recombinant fusion protein.

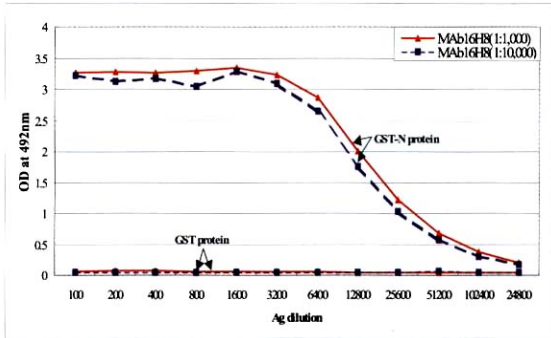


Fig. 3. Determination of optimal concentration of recombinant GST-N protein used for indirect sandwich ELISA.

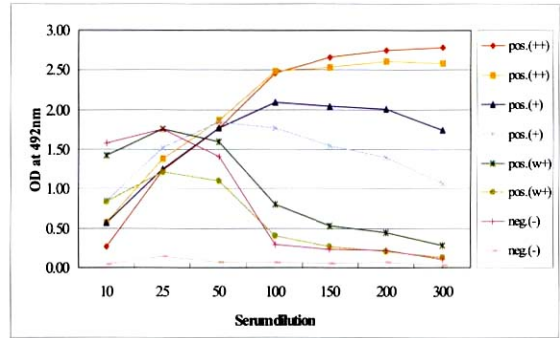


Fig. 4. Determination of optimal dilution of test serum used for indirect sandwich ELISA.

성을 보였으며 발현단백질의 적정농도를 조사한 결과 1:3,200 이하의 희석농도에서 흡광도가 저하되어 발현단백질의 희석농도는 1:3,200으로 결정하였다 (Fig. 3). 동일한 방법으로 i-ELISA에 적용할 검사혈청의 적정 희석농도를 조사한 결과, 혈청 희석농도 1:100에서 양성혈청과 음성혈청간의 OD값의 차이가 뚜렷하여 검사혈청의 적정 희석농도는 1:100으로 결정하였다 (Fig. 4).

2) 대조혈청 panel 결정

대조혈청의 선별을 위하여 ELISA titration을 실시한 결과, Fig. 5에서 보는 바와 같이 강한 양성혈청 희석배수는 upper limit와 central point의 중간 OD 값을 보이는 1:4를 희석배수로, 약한 양성혈청 희석배수는 central point와 lower limit의 중간 OD 값을 보이는 1:32를 희석

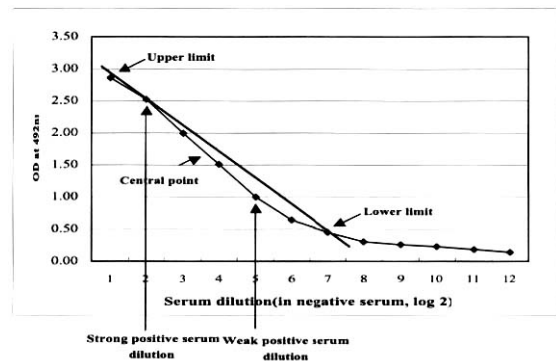


Fig. 5. Establishment of control serum panel used for indirect sandwich ELISA.

배수로 결정하였다. 위의 결과들을 종합하여 PRRS 바이러스에 특이적인 항체를 진단할 수 있는 i-ELISA를 Table 2과 같이 표준화하였다.

3) ELISA 음성기준치 설정

PRRS 바이러스의 특이항체 검색용으로 상용화된 진단 키트인 HerdCheck PRRS Virus Antibody Test Kit (IDEXX[®])에서 PRRS 항체 음성으로 판정된 혈청 144개를 대상으로 i-ELISA를 실시하였다. 이들 혈청에 대한 반응성을 분석한 결과, 혈청 144개의 평균 s/p ratio는 0.1, 표준편차는 0.16이었으며 95% 신뢰도 기준 [cut off = 평균 s/p ratio (0.1) + 2×표준편차 (0.16)]을 보이기 위한 조건으로 양성 판정치 s/p ratio (검사혈청 흡광도/대조양성혈청 흡광도)는 0.42이었다.

(2) ELISA evaluation

본 실험에서 개발된 i-ELISA의 진단효율성을 조사하기 위하여 315개의 야외 혈청을 대상으로 상용 진단 키트와 i-ELISA를 비교 분석한 결과, 상용 진단 키트에서 양성혈청으로 판정된 178개의 혈청 시료 중 i-ELISA는 164개를 양성으로, 14개를 음성으로 판정하였다. 또한

상용 진단 키트에서 음성혈청으로 판정된 137개의 혈청 시료 중 i-ELISA는 131개를 음성으로, 6개를 양성으로 판정하였다 (Table 3). 위의 결과로 본 연구에서 개발된 i-ELISA의 민감도와 특이성을 조사한 결과, 양성 검출의 민감도는 92%이었으며 음성 검출의 특이성은 96%로 나타났다 (Table 4).

고 찰

MA104 세포로부터 유래된 permissive cell (MARC 145)에서 PRRS 바이러스가 성공적으로 증식되면서 PRRS의 혈청학적 진단으로 간접형광항체법 (Indirect fluorescence assay: IFA)과 면역효소단층법 (Immunoperoxidase monolayer assay: IPMA)이 많은 실험실에서 이용되고 있으며^{16,9} 이들 방법 모두 PRRS 바이러스의 혈청학적 진단에 매우 민감한 것으로 알려져 있다. 그러나 돼지 폐포 탐식세포를 이용하여야 하는 IPMA의 경우 탐식세포의 모든 batch가 PRRS 바이러스 감염에 균일하게 민감한 것이 아니며, 일부 돼지 혈청이 감염되지 않은 대조군의 탐식세포에 반응하는 비특이반응이 나타난다는 단점이

Table 2. Standardization of indirect sandwich ELISA

Dilution factor	Diluted concentration	Dilution buffer	Incubation period
Capture antibody	5 µg/ml	0.01 M PBS	37°C, 1hr
Antigen	1:3,200	Blocking buffer ^a	37°C, 1hr
Serum	1:100	Blocking buffer	37°C, 1hr
Conjugate (HRP conjugated anti-swine IgG)	1:2,000	Blocking buffer	37°C, 1hr
Color development (OPD)		Citrate-phosphate buffer	25°C, 10min
Stop solution (1 M H ₂ SO ₄)			
Reading	492 nm		

^aBlocking buffer: 5% skim milk in PBS

Table 3. Efficacy of i-ELISA for the detection of PRRSV- specific antibodies compared with commercial kit

	i-ELISA			
	Positive	Negative	Total	
IDEXX ^a	Positive	164	14	168
	Negative	6	131	137
	Total	160	145	315

(95% confidence level, cut-off: 0.42, mean+2×SD^b)

^aHerdCheck PRRS virus antibody test kit (IDEXX[®])

^bSD : Standard deviation

Table 4. Sensitivity and specificity of i-ELISA for the detection of PRRSV-specific antibodies compared with commercial kit

Test X	Reference test			
	IDEXX ^a		i-ELISA	
	Sensitivity ^b	Specificity ^c	Sensitivity	Specificity
IDEXX	-	-	96%	92%
i-ELISA	92%	96%	-	-

^aHerdCheck PRRS virus antibody test kit (IDEXX[®])

$$^b\text{Sensitivity (test X)} = 100 \times \frac{\text{Number of positive in both X and reference test}}{\text{Total number of positive in the reference test}}$$

$$^c\text{Specificity (test X)} = 100 \times \frac{\text{Number of negative in both X and reference test}}{\text{Total number of negative in the reference test}}$$

있다.¹⁷ IFA 역시 감염된 세포 상층액으로부터 회수되는 바이러스의 감염 역가가 낮고¹ 미국 분리주와 유럽 분리주가 항원적으로 다르기 때문에 false-negative의 위험이 뒤따른다는 단점이 있다. 비록 ELISA가 IFA에 비해 민감도와 특이성이 높지만 이 검사법 역시 항원으로서는 바이러스 전체를 사용하고 있어¹⁸ 이로부터 얻어진 바이러스 단백질의 양이 적으므로 다량의 혈청시료를 진단하는 방법으로 적합하지 않다. 최근에는 이러한 문제점을 극복하기 위해 단백질 발현체계를 이용하여 생산된 재조합 단백질을 항원으로 이용한 ELISA가 개발되고 있는 추세이다.

PRRS 바이러스에 대한 숙주의 체액성 면역에 관한 연구가 수행되고 있는 가운데 돼지에서 PRRS 바이러스 감염동안 생산되는 대부분의 항체가 N 단백질에 특이적이라는 것과 감염된 세포에서 대량으로 발현된다는 것이 보고 되었다.^{16,19,20} N 단백질은 같은 genotype의 다른 분리주들에 있어 비교적 conserved region이라고 알려져 있으나^{21,22} 미국 분리주와 유럽 분리주 사이의 N 단백질은 아미노산서열에 있어 59%의 낮은 상동성을 보이고 있다.²¹ 그럼에도 불구하고 N 단백질에 특이적인 단클론 항체를 이용한 실험에서 두 분리주 사이에 공통의 epitope가 존재하며 N 단백질 내에 존재하는 5개의 antigenic domain 중에서 단백질의 central region (Amino acid 50~66)에 두 분리주가 공통적으로 인지하는 conformational epitope가 있음이 Meulenberg 등²³에 의해 밝혀졌다. 이러한 결과를 근거로 N 단백질이 바이러스 특이항체를 검출하거나 질병진단에 적합한 항원으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 N 단백질을 ELISA의 항원으로 이용하고자 대장균 발현체계를 이용하여 ORF7 유전자를 발현시키고 분자생물학적 특성을 규명하였다. 대장균에서 발현된 ORF7 유전자는 SDS-PAGE와 ORF7 특이 단

클론항체를 사용한 Western blotting으로 확인할 수 있었다. 본 실험에서 발현된 재조합 단백질은 inclusion body 형성이 일어나는 불용해성 형태를 가지고 있다. 이런 inclusion body는 생물학적 활성이 없어진 aggregate 형태로 축적되므로 이런 문제를 해결하기 위해 숙주 세포 자체의 발현 조건을 최적화시켜서 inclusion body의 형성을 억제하거나 이미 inclusion body 형태로 생산된 단백질을 in vitro에서 refolding시켜 활성을 갖는 단백질로 만들어야 한다.²⁴ 그러나 후자의 경우 guanidine hydrochloride 이나 urea 등을 이용하여 완전히 unfolding 시킨 후 다시 활성화시키기 위한 refolding 과정이 필수적으로 수행되어야 하는데 이 과정에서 발현단백질이 aggregation되기 때문에 회수율이 떨어진다는 점²⁵과 refolding 과정에서 원래의 native form으로 회복되지 않을 경우 항원성에 문제가 있을 수 있다는 단점이 있다. 따라서 본 실험에서는 inclusion body 형성 억제를 위해 전자의 과정을 선택하였다. 이 과정에서는 첫째로 재조합 단백질 발현시 promoter를 induction 시키기 위하여 사용되는 chemical inducer (IPTG) 사용량을 최적치보다 더 낮은 농도인 0.1 mM를 사용하였으며 둘째로 저온상태를 유지하면 전반적인 세포대사가 저하됨으로써 재조합 단백질의 발현률이 늦어져 결과적으로 inclusion body 형성을 줄일 수 있다는 원리²⁶를 이용하여 배양조건을 37°C가 아닌 실온으로 결정하였다. 이 외에도 growth media의 조성을 변화시키거나 aeration을 조절, pH 변화 및 저효율의 host 주를 선택하는 방법 등이 있으며²⁶ 본 실험에서는 배양온도와 IPTG 농도, aeration을 조절하여 발현단백질이 포함되어 있는 대장균을 배양하였다. 그 결과 상층액에서 26 kDa에서 관찰되는 GST 발현단백질과 달리 GST-N 발현 단백질을 41 kDa의 크기에서 확인할 수 있었는데 이는 15 kDa의 N 단백질과 26 kDa의 GST 단백질이 크로닝

과정에서 융합되어 재조합 단백질이 발현될 때 41 kDa의 분자량을 가지기 때문이다. 그러나 cell pellet에 Triton X-100을 처리하여 용해시킨 상층액에서는 발현단백질의 회수율이 매우 낮았으며 이는 발현단백질이 inclusion body의 형태로 축적되어 낮은 용해성과 발현율을 가지기 때문이라고 추측된다.

간접 ELISA에 항원으로 사용되는 N 재조합 단백질은 *E. coli* 보다 baculovirus 발현체계를 이용하여 많이 발현되어 왔는데 그 이유는 baculovirus에서 발현된 N 단백질이 native virus에서와 거의 유사한 구조를 유지하기 때문에 *E. coli*에서 발현된 N 단백질보다 ELISA의 민감도와 특이성을 증진시키기 때문이다.^{6,27} 그러나 baculovirus expression system은 항원을 생산하기 위해 곤충 세포를 배양해야 하는 번거로움과 세포를 배양하는데 소 혈청이나 소 태아혈청이 사용되기 때문에 돼지 혈청과 반응하는데 있어 비특이 반응이 나타날 수 있다는 단점이 있다.⁹ 따라서 본 연구에서는 대장균 발현체계를 통해 N 재조합 단백질을 발현시켜 ELISA에 항원으로 이용하였다.

본 실험에서 개발된 i-ELISA의 평가는 PRRS 바이러스 특이항체 검색용으로 상용화된 HerdChek PRRS virus antibody test kit (IDEXX[®])로 하였으며 진단효율성을 평가하기 위해 315개의 야외혈청을 이용하여 비교하였다. 상용 진단키트는 현재 사용되어지고 있는 진단법 중 민감도와 특이성이 높아 최근에 많이 이용되고 있는 방법 중의 하나이다.²⁸ 본 실험의 진단효율성은 315개의 야외혈청을 사용하여 판단한 결과, i-ELISA의 민감도는 92%, 특이성은 96%로 나타났다. 이는 i-ELISA가 혈청 14개를 false-negative로, 6개를 false-positive로 판단한 것을 바탕으로 얻어진 결과이다. 그러나 이것은 상용 진단키트 단독검사에만 의존하여 비교되어진 결과이므로 기존의 진단법인 IFA 또는 IPMA와 병행되어 진행된다면 본 연구에서 개발된 i-ELISA의 민감도와 특이성이 보다 증가될 것으로 생각된다.

PRRS 바이러스는 현재 양돈산업이 성행하는 모든 나라에 이미 상재되어 있으며 국내에서도 PRRS의 발생이 보고된 이후 지속적으로 전파되고 있고 지금도 계속 진행되고 있는 실정이다. 따라서 PRRS 발생에 따른 효과적인 진단법이 필요하다고 생각되며 본 연구에서 개발된 i-ELISA가 국내 PRRS 바이러스의 혈청학적 진단을 하는데 효과적으로 사용될 것으로 사료된다.

결 론

국내에서 분리된 PRRS 바이러스의 nucleocapsid (N)

단백질을 효소면역법 (ELISA)에 항원으로 이용하기 위하여 ORF7 유전자를 RT-PCR로 증폭하였으며 대장균 발현체계를 이용하여 발현시킨 N 단백질의 특성을 규명하였다. 또한 발현된 N 단백질을 항원으로 이용하여 i-ELISA를 개발하였다.

대장균 발현체계에 의해 발현된 N 단백질을 SDS-PAGE와 Western blotting으로 확인한 결과, 발현된 GST-N 재조합 단백질은 41 kDa에서 확인할 수 있었다. 315개의 야외혈청을 대상으로 본 실험에서 개발된 i-ELISA의 진단 효율성을 HerdChek PRRS virus antibody test kit (IDEXX[®])와 비교 분석한 결과, 민감도는 92% 그리고 특이성은 96%로 확인되어 개발된 i-ELISA가 국내 PRRS 바이러스의 혈청학적 검사에 효과적으로 사용될 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Dea S, Gagnon CA, Mardassi H, et al. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol*, 145:659~688, 2000.
2. Gall AL, Legeay O, Bourhy H, et al. Molecular variation in the nucleoprotein gene (ORF7) of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Res*, 54:9~21, 1998.
3. Conzelmann KK, Visser N, Woensel PV, et al. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Virology*, 193:329~339, 1993.
4. Dea S, Pirzadeh B. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 79:989~999, 1998.
5. Snijder EJ, Meulenberg JJM. The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol*, 79: 961~979, 1998.
6. Meulenberg JJM, Bende RJ, Pol JMA, et al. Nucleocapsid protein N of Lelystad virus: expression by recombinant baculovirus, immunological properties, and suitability for detection of serum antibodies. *Clin Diag Lab Immunol*, 2:652~656, 1995.
7. Weaver MS, Walker IW, McNeilly F, et al. The reverse transcription polymerase chain reaction for diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome: comparison with virus isolation and serology. *Vet*

- Microbiol*, 62:207~215, 1998.
8. Rossow KD. Review article: porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Pathol*, 35:1~20, 1998.
 9. Yoon IJ, Joo HS, Christianson WT, et al. An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *J Vet Diagn Invest*, 4:144~147, 1992.
 10. Dea S, Wilson L, Therrien D, et al. Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant *E. coli*-expressed nucleocapsid protein as antigen. *J Virol Methods*, 87:109~122, 2000.
 11. Denac H, Moser C, Tratschin JD, et al. An indirect ELISA for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant nucleocapsid protein as antigen. *J Virol Methods*, 65:169~181, 1997.
 12. Wootton S, Koljesar G, Yang L, et al. Antigenic importance of the carboxy-terminal beta-strand of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein. *Clin Diag Lab Immunol*, 8:598~603, 2001.
 13. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162:156~159, 1987.
 14. Kang SY, Saif LJ, Miller KL, et al. Reactivity of VP4-specific monoclonal antibodies to a serotype 4 porcine rotavirus with distinct serotypes of human (symptomatic and asymptomatic) and animal rotaviruses. *J Clin Microbiol*, 27:2744~2750, 1989.
 15. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256:495~497, 1975.
 16. Loemba HD, Mounir S, Mardassi H, et al. Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol*, 141:751~761, 1996.
 17. Houben S, Callebaut P, Pensaert MB. Comparative study of blocking enzyme-linked immunosorbent assay and the immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. *J Virol Methods*, 51:125~128, 1995.
 18. Cho HJ, Dereg D, Joo HS. An ELISA for porcine reproductive and respiratory syndrome: production of antigen of high quality. *Can J Vet Res*, 60:89~93, 1996.
 19. Nelson EA, Christopher-Hennings JT, Benfield DA. Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J Vet Diagn Invest*, 6:410~415, 1994.
 20. Yoon KJ, Zimmerman JJ, Swenson SL, et al. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J Vet Diagn Invest*, 7:305~312, 1995.
 21. Meng XJ, Paul PS, Halbur PG, et al. Phylogenetic analyses of the putative M (ORF6) and N (ORF7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the USA and Europe. *Arch Virol*, 140:745~755, 1995.
 22. Suarez P, Zardoya R, Martin MI, et al. Phylogenetic relationships of European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes. *Virus Res*, 42:159~165, 1996.
 23. Meulenberg JJM, Nieuwstadt AP, Essen-Zandbergen A, et al. Localization and fine mapping of antigenic sites on the nucleocapsid protein N of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with monoclonal antibodies. *Virology*, 252:106~114, 1998.
 24. Jaenicke R. Folding and association of proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, 49:116~237, 1987.
 25. Dyr JE, Surtner J. Separation used for purification of recombinant proteins. *J Chromat*, 699:383~401, 1997.
 26. Lile H, Schwarz E, Rudolph R. Advanced in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 9:497~501, 1998.
 27. Kreutz LC, Mengeling WL. Baculovirus expression and immunological detection of the major structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol*, 59:1~13, 1997.
 28. Drew TW. Comparative serology of porcine reproductive and respiratory syndrome in eight European laboratories, using immunoperoxidase monolayer assay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Rev Sci Tech*, 14:761~775, 1995.