

## 돼지 썬코바이러스에 대한 단클론항체 생산 및 진단적 응용

김경미 · 정지혜 · 민홍기 · 이승철 · 노인순<sup>1</sup> · 강신영\*

충북대학교 수의과대학/동물의학연구소

<sup>1</sup>국립수의과학검역원

(게재승인: 2004년 5월 18일)

### Production and diagnostic applications of monoclonal antibodies against porcine circovirus

Kyung-Mi Kim, Ji-Hye Jeong, Hong-Ki Min, Seung-Chul Lee,  
In-Soon Roh<sup>1</sup>, and Shien-Young Kang\*

Research Institute of Veterinary Medicine/College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University,  
Cheongju 361-763, Korea

<sup>1</sup>National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-016, Korea

(Accepted: May 18, 2004)

**Abstract :** Porcine circovirus type 2 (PCV-2) has been associated with various disease in pigs worldwide including postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS). In this study, monoclonal antibodies (MAbs) against PCV were produced, characterized and applications of MAbs as diagnostic reagents were described. Spleen or lymph node cells from BALB/c mouse immunized respectively with PCV-1, PCV-2 or expressed PCV-2/ORF2 proteins in baculovirus were fused with SP2/0 myeloma cells using polyethylene glycol (PEG) and hybridoma cells producing PCV-1 or PCV-2-specific antibody were screened by an indirect immunofluorescence (IIF) test. A total of fifteen MAbs were produced against PCV. Six MAbs were PCV-1-specific and nine were PCV-2-specific. All PCV-1-specific MAbs reacted with only PCV-1 and all PCV-2-specific MAbs were reactive with only PCV-2 by IIF test. None of the MAbs was reactive with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), porcine parvovirus (PPV), porcine rotavirus (PRV), and transmissible gastroenteritis virus (TGEV). Some PCV-2-specific MAbs recognized the PCV-2 infected porcine tissues by IIF or immunohistochemistry (IHC) assay. From this experiment, it was confirmed that MAbs produced in this study were PCV-specific and could be used as reliable diagnostic reagents for PCV-1/PCV-2 detection and differentiation.

**Key words :** porcine circovirus, monoclonal antibody, IIF, IHC

### 서 론

Porcine circovirus(PCV)는 single-stranded circular DNA 바이러스로 돼지 신장세포주(porcine kidney cell line: PK-15)에서 세포변형효과를 나타내지 않는 오염된 바이러스로 처음 확인되었다 [31]. PCV는 형태학적으로 icosahedral symmetry를 가지고 피막이 없으며 크기는 직경이 15-17 nm 정도이다. PCV는 chicken anemia virus,

psittacine의 beak-and-feather disease virus와 함께 새로운 동물 바이러스 과인 *Circoviridae*로 분류되었으며 이들 바이러스 사이에는 염기서열 및 항원성에 있어서 서로 관계가 없는 것으로 보고되었다 [5, 21, 32].

과거에 전 세계적으로 돼지 혈청에서 PCV에 대한 항체가 확인되었으며 PCV와 교차반응을 하는 항체가 사람을 비롯한 쥐, 소 등에서도 확인되었다 [29, 30]. PCV는 돼지에 있어서 특정한 질병을 유발하지 못하였으며 실

이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단(KRF-2001-041-G00086)의 지원에 의하여 연구되었음.

\*Corresponding author: Shien-Young Kang

Research Institute of Veterinary Medicine/College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea  
[Tel: +82-43-261-2598, Fax: +82-43-267-3150, E-mail: sykang@chungbuk.ac.kr]

험적으로 PCV를 감염시킨 돼지에서도 특이한 임상증상이나 병리학적 소견이 관찰되지 않았다 [2, 32]. 하지만 최근에 이유자돈에서 소모성 증상을 특징으로 하는 이유자돈전신성소모성증후군(postweaning multisystemic wasting syndrome: PMWS)이 캐나다에서 처음으로 확인된 이후 미국, 유럽, 그리고 한국을 비롯한 아시아 여러 나라에서도 보고되었다 [7, 10, 17, 18, 20]. 이 질병은 점진적인 체중감소, 호흡곤란, 빈혈, 설사 그리고 황달 등의 임상증상을 특징으로 하며 급성 발생의 경우 폐사율이 10% 정도이나 심한 경우에는 50%까지 이른다. 이 질병에 감염된 돼지의 육안 병변으로는 림프절 종대, 육이중성 감염, 신장염, 간질성 폐렴 등이 관찰된다. 최근에 PMWS 증상을 나타내는 돼지의 조직에서 PK-15 세포주에서 유래한 PCV와 유전학적 그리고 항원적으로 서로 다른 circovirus가 지속적으로 분리되고 확인됨으로써 새로운 PCV 혹은 PCV 변이종이 이 질병에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다 [4]. PMWS 증상을 나타내는 돼지로부터 분리된 PCV들 간에는 96% 이상의 염기서열 상동성을 보여 하나의 genotype을 형성하는 반면, PK-15 세포주에서 유래한 PCV와는 80% 이하의 염기서열 상동성을 보여 서로 다른 바이러스임이 확인되었다 [13, 24]. 이러한 유전자 구조와 항원성의 차이를 바탕으로 PMWS 증상을 나타내는 돼지로부터 분리된 새로운 PCV 분리주는 PCV-2, 그리고 PK-15 세포주에서 유래한 PCV는 PCV-1으로 명명되었다 [13, 24].

PCV-2를 확인하기 위해서 간접형광항체법(indirect immunofluorescence test: IIF) [3, 4], 면역조직화학염색법(immunohistochemistry assay: IHC) [22, 27], 조직내교잡법(*in situ* hybridization: ISH) [22, 27], 그리고 중합효소법(polymerase chain reaction: PCR) [12, 14] 등의 여러 가지 진단 방법이 개발되어 사용되고 있다. 특히 PMWS 관련 PCV strain에 의한 질병 발생 및 분포에 대한 연구를 수행하기 위해서는 PCV-1과 PCV-2를 감별할 수 있는 type-specific한 혈청학적 진단법 개발이 필수적으로 요구되고 있다.

본 연구에서는 PCV-1과 PCV-2를 감별할 수 있는 각각의 type에 대한 특이 단클론항체를 생산하여 특성을 규명하고, PCV-2에 의한 질병의 진단에 있어서 이들 단클론항체의 활용성을 확인하고자 본 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 바이러스와 세포

본 실험에 사용된 PCV-1 (PCV-1이 감염된 PK-15 세포주; ATCC-CCL33)과 PCV-2 (ISU-31 strain)는 각각 국립수의과학검역원에서 분양받아 표준주로 사용하였다.

ISU-31 strain은 PCV-1이 오염되어 있지 않은 돼지 신장 세포주(PCV-1 free PK-15 cell line)를 사용하여 증식시켰으며 PK-15 세포는 10% 소태아혈청(fetal calf serum: FCS, Invitrogen, Carlsbad, USA)과 항생제가 함유된 alpha minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM, Invitrogen)를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 포화습도 하에서 배양하였다. 단클론항체 생산을 위하여 세포융합에 사용된 myeloma 세포는 BALB/c mouse 유래 암세포인 SP2/0 세포를 이용하였으며 10~20% FCS가 함유되어 있는 RPMI 1640 배지를 사용하여 바이러스 배양세포와 같은 조건 하에서 배양하였다.

### 바이러스의 배양 및 순수분리

단클 배양된 PK-15 세포를 trypsin을 이용하여 소화시킨 후 10% FCS이 함유된  $\alpha$ -MEM에 부유시키고 PCV-2를 1.0 m.o.i가 되도록 접종하였다. 1시간 흡착 후 PCV-2가 감염된 PK-15 세포를 5×10<sup>4</sup> cells/ml의 농도로 조절하여 세포배양용 flask에 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 배양기에서 18시간 동안 배양하였다. 18시간 배양 후, 배양액을 제거하고 300 mM D-glucosamine을 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 D-glucosamine을 제거하고  $\alpha$ -MEM으로 세척한 다음 10% FCS가 함유되어 있는  $\alpha$ -MEM을 넣고 같은 조건하에서 48시간 동안 배양하였다. Mouse 면역에 사용할 PCV는 감염된 조직배양액을 사용하여 Tischer 등의 방법 [32]에 따라 순수 분리하였다. 간접형광항체법(indirect immunofluorescence test: IIF)에 사용할 plate는 0.1 m.o.i로 PCV-2가 감염된 PK-15 세포를 well 당 5×10<sup>4</sup> cells 첨가한 후 위와 같은 방법으로 D-glucosamine 처리하여 배양하고 아세톤으로 고정된 후 -20°C에 보관하면서 필요시 사용하였다.

### Mouse 면역

세포융합에 사용할 mouse는 4-6 주령의 BALB/c strain을 사용하였으며 면역에 사용할 항원은 순수 분리한 PCV-1, PCV-2 그리고 baculovirus에서 발현된 PCV-2의 ORF2 단백질 [1]을 사용하였다. 각각의 항원 (50  $\mu$ g/ml)을 동량의 Freund's complete adjuvant와 잘 혼합한 뒤 mouse 복강 내로 1차 접종하고, 2주 후 같은 항원을 Freund's incomplete adjuvant와 잘 혼합하여 같은 경로로 2차 접종하였다. 2주 후, 2차 접종과 같은 방법으로 3차 접종하고, 2주 후 미정맥으로부터 채혈하여 각각의 바이러스에 대한 항체역가를 IIF법으로 측정하였다. 항체역가가 세포융합하기에 충분할 경우에는 정제된 항원만을 미정맥으로 접종하고 3일 후 비장세포 등을 취하여 세포융합을 실시하였다. 항체역가가 낮을 경우에는 3차

접종과 같은 방법으로 추가 접종하였다. 위와 같이 복강 내로 면역시키는 방법과 병행하여 mouse 면역기간을 단축하기 위하여 Coyle 등 [9]과 Orlik와 Altaner [26]의 방법을 수정하여 같은 일령의 BALB/c mouse의 foot-pad에 3일 간격으로 4회 접종하였으며 1차는 Freund's complete adjuvant와 2차부터는 Freund's incomplete adjuvant와 혼합한 항원을 사용하였다.

#### 단클론항체 생산 및 양성 hybridoma 선별

세포융합은 각각의 항원으로 면역된 mouse의 비장세포 또는 서혜립표피로부터 준비한 세포와 SP2/0 세포를 polyethylene glycol (PEG) 1500을 사용하여 일반적인 세포융합 방법에 따라 시행하였다 [16, 19]. 세포융합이 끝난 혼합 세포액은 20% FCS와 HAT (50  $\mu$ M hypoxanthine, 0.4  $\mu$ M aminopterin, 16  $\mu$ M thymidine)가 함유된 세포배양액에 부유시킨 다음 96-well 조직배양 plate에 well 당 100  $\mu$ l 씩 분주하여 37°C, 5% 이산화탄소 조건 하에서 배양하고, 배양 후 3, 5, 7 및 9일에 새로운 배지로 교환하였다. Hybridoma가 well의 30% 이상 증식하였을 때 (세포융합 후 10-15일) PCV-1과 PCV-2에 대하여 특이적으로 반응하는 양성 hybridoma를 선별하였다. PCV-1과 PCV-2에 특이적으로 반응하는 항체를 생산하는 양성 hybridoma는 IIF법으로 다음과 같이 선별하였다. 즉, PCV-1과 PCV-2로 각각 감염시킨 96-well plate를 바이러스 감염 후 48시간에 80% acetone으로 10분간 고정시키고 건조한 후 검색할 hybridoma 배양 상층액 100  $\mu$ l를 각각의 바이러스로 감염시킨 well에 넣어 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 반응 후, PBS로 3회 세척하고 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG+IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA)을 첨가하여 다시 30분 동안 같은 온도에서 반응시켰다. 30분 후 plate를 PBS로 3회 세척하고 형광현미경으로 관찰하여 형광을 나타내는 well의 hybridoma를 PCV 특이 단클론항체 산생세포주로 판정하였다. 각각의 PCV에 대하여 항체를 생산하는 것으로 확인된 hybridoma는 limiting dilution법으로 2회 이상 크로닝하고 단일 크론으로 확인된 hybridoma의 일부는 액체질소에 저장하고 일부는 증식시켜 pristane으로 미리 감각된 BALB/c mouse에 복강 내로 접종하고 충분한 양의 복수가 형성되었을 때 복수를 채취하여 -20°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

#### 단클론항체 특성 규명

##### (1) Isotype 확인

생산된 단클론항체의 isotype은 Ig isotyping kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 이용하여 제조사의 사용 술

식에 따라 hybridoma 배양 상층액을 사용하여 효소면역법으로 확인하였다.

##### (2) 단백질특이성 확인

단클론항체와 PCV-2 단백질과의 반응성을 확인하기 위하여 Towbin [34]의 방법으로 western blot을 다음과 같이 실시하였다. 즉, PCV-2/ORF2 유전자 재조합 baculovirus로 감염된 Sf9 cell lysate를 sample buffer (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 25% glycerol, 1.44 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)와 1.5의 비율로 섞어 100°C에서 5분간 끓여 denaturation시켰다. 이를 10% SDS-polyacrylamide gel에서 2시간 동안 80V로 전기영동을 한 다음 gel을 분리하여 transfer buffer (15.6 mM Tris base, 120 mM glycine, pH 8.1-8.4)에 30분간 침지시켰다. 미리 transfer buffer에 침지시켜 놓은 filter paper와 nitrocellulose membrane (NEN™ Life Science Products, Boston, USA) 사이에 gel을 넣어 semi-trans-blot (Bio-Rad laboratories, Hercules, USA)를 이용하여 13V에서 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 blocking시킨 후 TBS로 강하게 흔들며 3회 세척하였다. Blocking이 끝난 membrane은 긴 strip 형태로 절단한 후 검사하고자 하는 단클론항체의 배양 상층액은 희석하지 않고, 그리고 복수는 1:500-1:2,000으로 희석하여 1시간 동안 실온에서 흔들며 반응시키고 TBS로 3회 세척하였다. 2차 항체로 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, USA)을 1:2,000으로 희석하여 1시간 반응시킨 뒤 TBS로 3회 세척하였다. 발색제로 NBT/BCIP stock solution (Kirkegaard & Perry Laboratories) 200  $\mu$ l을 alkaline phosphatase buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 9.5, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) 10 ml에 섞어 blotting된 단백질의 발색에 사용하였다.

##### (3) 다른 돼지 바이러스들과의 반응패턴 조사

생산된 단클론항체와 다른 돼지 바이러스 즉, 돼지 생식기호흡기증후군바이러스, 돼지파코바이러스, 돼지 로타바이러스 그리고 돼지 전염성위장염바이러스와의 교차반응 패턴은 간접형광항체법으로 확인하였다.

##### (4) 단클론항체의 조직 내에서의 반응성 조사

생산된 단클론항체의 조직 내에서의 반응성을 조사하기 위하여 임상증상 및 PCR법으로 PCV-2 감염이 확인된 돼지의 조직을 이용하여 간접형광항체법과 면역조직화학염색법(immunohistochemistry assay: IHC)을 실시하

었다. 간접형광항체법은 PCV-2 감염 돼지의 조직을 채취하여 동결조직포매제(TBS™; Triangle Biomedical Sciences, Durham, USA)로 포매한 후 -20°C에서 동결시켜 6 μm 두께로 동결절편을 만들고 PBST(0.05% Tween 20, 0.01M phosphate buffered saline, pH 7.2)로 세척하여 동결포매액을 제거한 후 항체의 비 특이적 결합을 배제하기 위하여 3% BSA-PBS로 30분간 blocking 처리하였다. 1차 항체로 PCV-2 특이 단클론항체를 30분간 반응시켰으며, 2차 항체로 FITC-conjugated anti-mouse IgG+IgM을 반응시켰다. IHC를 위하여 PCR법으로 PCV-2 감염이 확인된 돼지의 조직은 10% neutral buffered formalin 용액으로 48시간 동안 고정시킨 후 일반적인 방법에 의하여 조직표본을 준비하였다. 염색 전에 조직절편은 xylene을 사용하여 wax를 제거하였으며 0.5% 과산화수소가 함유되어 있는 methanol로 30분간 처리하여 조직 내의 peroxidase의 활성을 제거하고 5% normal goat serum으로 30분간 처리하여 항체의 비 특이적 결합을 배제하였다. 여기에 1차 항체로 PCV-2 특이 단클론항체를 실온에서 30분간 반응시킨 후 2차 항체로 biotinylated goat anti-mouse antibody (Vector laboratories, Burlingame, USA)로 30분간 반응시킨 후 위에서와 같은 방법으로 세척하고 ABC reagent(avidin DH-biotinylated horseradish peroxidase complex, Vector laboratories)를 실온에서 30분간 반응시킨 후 발색액 (0.6 mg/ml DAB, 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.01M PBS, pH 7.2)으로 5-10분간 반응시킨 후 증류수로 세척하고 haematoxylin으로 대조 염색하였다.

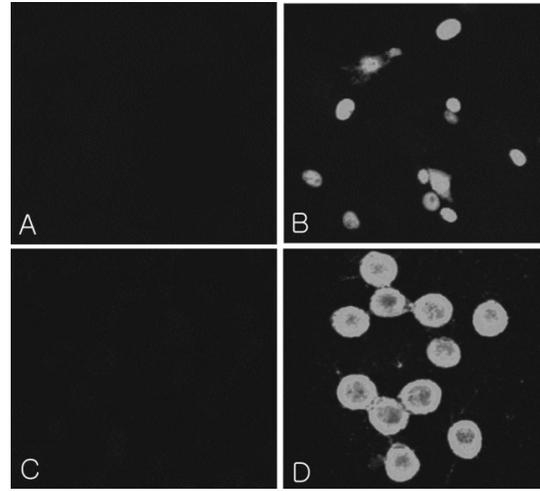
## 결 과

### 단클론항체의 생산

순수 분리한 PCV-1으로 면역시킨 mouse를 사용하여 세포융합을 수행하여 6개의 PCV-1 특이 단클론항체를 생산하였다. 또한 9개의 PCV-2 특이 단클론항체 중 4개의 단클론항체는 순수 분리한 PCV-2를 면역원으로, 그리고 5개의 단클론항체는 baculovirus에서 발현된 PCV-2의 ORF2 유전자 산물을 면역원으로 사용한 것이었다. PCV-1 특이 단클론항체는 IIF법으로 PCV-1 감염 PK-15 세포에서만 형광이 나타났지만 PCV-2 특이 단클론항체는 PCV-2 감염 PK-15 세포와 PCV-2/ORF2 유전자 재조합 baculovirus가 감염된 Sf9 세포에서만 형광이 나타났다(Fig. 1).

### 단클론항체의 특성

생산된 단클론항체의 특성은 Table 1과 같다. PCV-1에 대한 단클론항체 6개 중 4개의 isotype은 IgM이었으며 IgG1과 IgG2a가 각각 1개씩 이었다. PCV-2 특이 단



**Fig. 1.** Reactivity patterns of PCV-2 specific monoclonal antibody, 4H10 by indirect immunofluorescence (IIF) test. PCV-2 specific monoclonal antibody, 4H10 was reacted with: A; PCV-1 infected PK-15 cells, B; PCV-2 infected PK-15 cells, C; mock infected Sf9 cells, D; PCV-2/ORF2 recombinant baculovirus infected Sf9 cells.

클론항체 중 IgA, IgG2a, IgG2b가 각각 1개, 2개 및 1개로 나타났고 5개는 IgM으로 나타났다.

PCV-1에 특이적인 6개의 단클론항체는 모두 PCV-1으로 감염시킨 PK-15 세포에서는 IIF법으로 양성반응이 나타났으나 PCV-2로 감염시킨 PK-15 세포와 PCV-2의 ORF2 유전자 재조합 baculovirus로 감염시킨 Sf9 세포에서는 음성반응으로 나타났다. 또한 이들 모두 PCV-2 감염이 확인된 돼지 조직에서도 간접형광항체법 및 면역조직화학염색법으로는 모두 음성반응으로 나타났다. 반면에 PCV-2 특이 단클론항체는 PCV-1으로 감염된 PK-15 세포에서는 음성으로 나타났으나 PCV-2로 감염시킨 PK-15 세포와 PCV-2의 ORF2 유전자 재조합 baculovirus로 감염시킨 Sf9 세포에서는 양성반응으로 나타났다.

생산된 단클론항체와 PCV-2 단백질과의 반응성을 확인하기 위하여 PCV-2/ORF2 유전자 재조합 baculovirus를 사용하여 western blotting를 실시한 결과, PCV-1 특이 단클론항체는 모두 음성으로 나타났으며 PCV-2 특이 단클론항체의 일부는 양성으로 나타났다(Table 1, Fig. 2).

생산된 단클론항체와 다른 돼지 바이러스와의 반응성을 IIF법으로 조사한 결과는 Table 2와 같다. PCV-1 특이 단클론항체는 PCV-1 이외의 다른 바이러스와는 반응을 하지 않았으며 PCV-2 특이 단클론항체 또한 PCV-2 이외의 다른 돼지 바이러스와는 반응을 하지 않았다.

**Table 1.** Characterization of monoclonal antibodies (MAbs) against porcine circovirus (PCV)

MAb	Immunogen <sup>1</sup>	Route <sup>2</sup>	Isotype	Reactivity by the following tests					
				IIF <sup>3</sup>				WB <sup>4</sup>	IHC <sup>5</sup>
				PCV-1	PCV-2	Sf9 cell	Cryo		
4E2	PCV-1	IP	IgG2a	+ <sup>6</sup>	-	-	-	-	-
7A10		IP	IgM	+	-	-	-	-	-
7E9		IP	IgG1	+	-	-	-	-	-
10E8		FP	IgM	+	-	-	-	-	-
14F11		FP	IgM	+	-	-	-	-	-
15C9		FP	IgM	+	-	-	-	-	-
1A11	PCV-2	IP	IgA	-	+	+	NT	-	NT <sup>7</sup>
1B5		IP	IgG2b	-	+	+	NT	-	NT
3C2		IP	IgG2a	-	+	+	NT	+	NT
4C7		FP	IgM	-	+	++	++	++	±
4F2	PCV-2/ORF2	FP	IgM	-	+	+	+	++	±
4H10		FP	IgG2a	-	+	++	++	-	±
6C6		FP	IgM	-	+	+	+	++	++
7B4		FP	IgM	-	+	++	NT	-	NT
7G2		FP	IgM	-	+	+	++	+	++

<sup>1</sup>PCV-1: porcine circovirus type 1, PCV-2: porcine circovirus type 2, PCV-2/ORF2: recombinant baculovirus-expressed ORF2 protein of PCV-2.

<sup>2</sup>IP: intraperitoneal inoculation, FP: foot-pad inoculation.

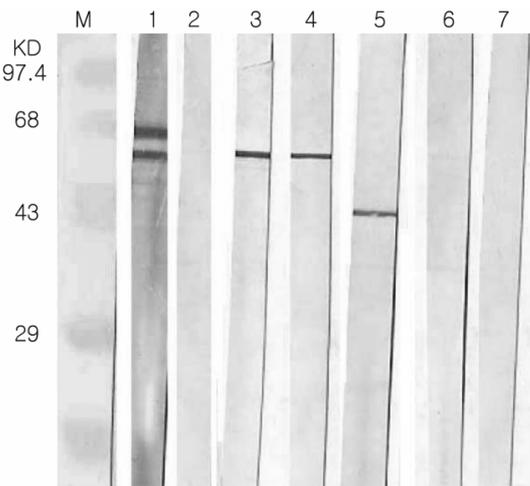
<sup>3</sup>IIF: indirect immunofluorescence test using PK-15 cells infected with PCV-1 or PCV-2, Sf9 cells infected with PCV-2/ORF2 recombinant baculovirus (Sf9 cell), cryosection from PCV-2 positive porcine lymphoid tissue (Cryo).

<sup>4</sup>WB: western blot analysis using PCV-2/ORF2 recombinant baculovirus infected Sf9 cell lysates.

<sup>5</sup>IHC: immunohistochemistry assay using PCV-2 positive porcine lymph node and lung tissues.

<sup>6</sup>-: negative, ±: weak positive, +: positive, ++: strong positive.

<sup>7</sup>NT: not tested.



**Fig. 2.** Western blot analysis of PCV-2 specific monoclonal antibodies. M: molecular weight marker, 1: PCV-2 positive serum, 2: PCV-2 negative serum, 3: MAb 4C7, 4: MAb 6C6, 5: MAb 3C2, 6: MAb 1A11, 7: MAb 1B5.

### 단클론항체의 진단 활용성

생산된 단클론항체의 PCV-2 진단에 있어서 활용 가능성을 조사하기 위하여 PMWS 임상증상 및 PCR법으로 PCV-2 감염이 확인된 돼지의 조직을 이용하여 IIF와 면역조직화학염색법을 실시한 결과, 2개의 단클론항체 6C6과 7G2는 양성 표준혈청으로 사용한 polyclonal anti-PCV-2 혈청과 동일하게 면역조직화학염색법으로 PCV-2 감염세포를 특이적으로 검출하였다(Fig. 3). 또한 3개의 단클론항체 4C7, 4H10, 그리고 7G2는 IIF법으로 PCV-2 감염 폐조직 세포를 확실하게 검출하였다(Fig. 4).

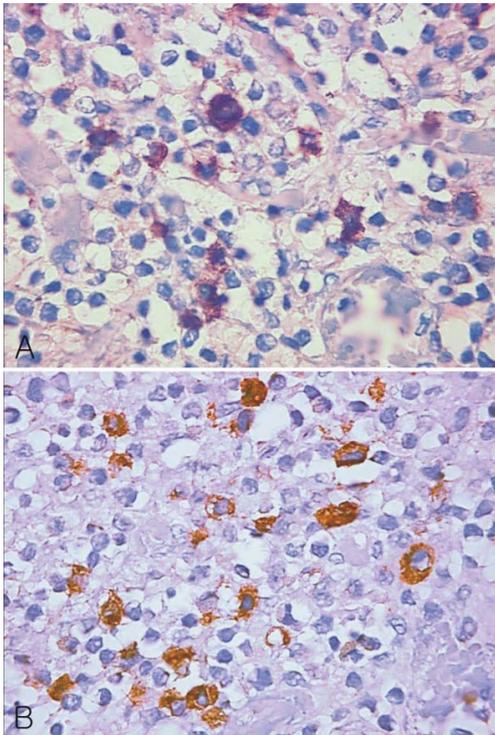
### 고 찰

Porcine circovirus 2 (PCV-2)는 이유자돈전신성소모성 증후군(postweaning multisystemic wasting syndrome: PMWS)을 나타내는 돼지로부터 공통적으로 확인되어 PMWS를 유발하는 1차적 원인체로 알려져 있으며, 최근에는 PMWS 이 외에도 돼지피부염신증후군(porcine dermatitis and nephropathy syndrome: PDNS), 증식성괴

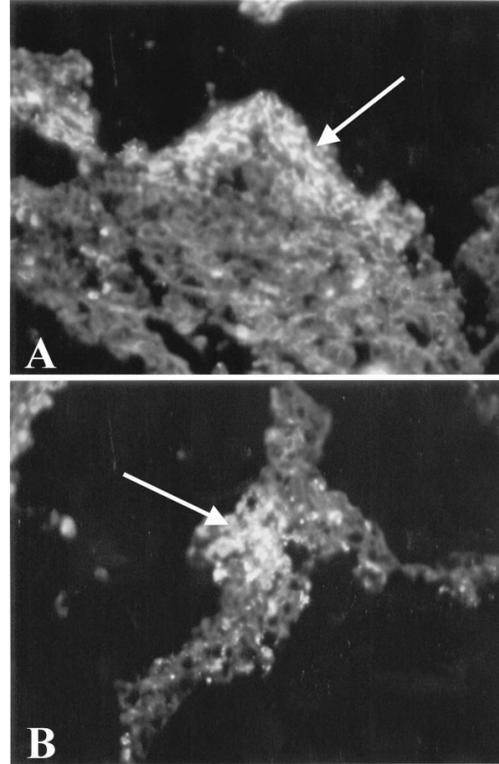
**Table 2.** Reactivity patterns of monoclonal antibodies (MAbs) with other porcine viruses by indirect immunofluorescence (IIF) test

MAb	Reactivity with the following viruses by IIF <sup>1</sup>					
	PCV-1	PCV-2	PRRSV	PPV	PRV	TGEV
4E2	+	-	-	-	-	-
7A10	+	-	-	-	-	-
7E9	+	-	-	-	-	-
10E8	+	-	-	-	-	-
14F11	+	-	-	-	-	-
15C9	+	-	-	-	-	-
1A11	-	+	-	-	-	-
1B5	-	+	-	-	-	-
3C2	-	+	-	-	-	-
4C7	-	+	-	-	-	-
4F2	-	+	-	-	-	-
4H10	-	+	-	-	-	-
6C6	-	+	-	-	-	-
7B4	-	+	-	-	-	-
7G2	-	+	-	-	-	-

<sup>1</sup>Reactivity patterns of MAbs were confirmed by IIF test using cultured cells infected with porcine circovirus type 1 (PCV-1), porcine circovirus type 2 (PCV-2), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), porcine parvovirus (PPV), porcine rotavirus (PRV) and transmissible gastroenteritis virus (TGEV).



**Fig. 3.** Immunohistochemical staining of porcine lymph node infected with PCV-2. Lymph node infected with PCV-2 was reacted with PCV-2-specific monoclonal antibody 6C6(A) and 7G2(B).



**Fig. 4.** Confirmation of PCV-2 infection by indirect immunofluorescence (IIF) test using PCV-2 specific monoclonal antibodies. Lung tissues infected with PCV-2 were reacted with PCV-2-specific monoclonal antibody 4C7(A) and 7G2(B). Arrow indicates PCV-2 infected cells by IIF test.

사성폐렴(proliferative and necrotizing pneumonia: PNP), 선천성진전증(congenital tremors) 및 번식장애 등 다양한 형태의 질병과 관련이 있는 것으로 추정되고 있다 [11, 15]. 또한 PCV-2에 감염되어 있어도 PMWS의 증상을 나타내지 않는 준임상형 형태의 감염이 존재하기 때문에 임상검사 또는 PCV-2의 확인만으로는 PMWS의 진단이 충분하지 않은 것으로 알려져 있다. 따라서 본 질병을 진단하는 데에는 위축과 같은 PMWS의 전형적인 임상증상을 확인하고 임상증상이 확인된 감염 폐지의 장기에서 특이병변을 확인하며 그 병변에서 PCV-2를 확인하는 것을 필수적으로 요구하고 있다 [28]. PCV-2를 확인하는 방법으로 PCV-2 핵산의 존재를 증명하는 중합효소연쇄반응법과 조직 내 hybridization법 그리고 조직 내 PCV-2 항원의 존재를 증명하는 면역조직화학염색법과 간접형광항체법이 개발되어 사용되고 있다 [3, 4, 12, 14, 22, 27]. 특히 조직 내 PCV-2 항원을 확인하기 위하여 면역조직화학염색법과 간접형광항체법에 사

용되는 항체는 PCV-1과 서로 교차반응을 하지 않고 PCV-2와 특이적으로 그리고 높은 affinity로 반응할 수 있는 특성을 지니고 있어야 한다. 따라서, 본 실험에서는 PCV-1과 PCV-2의 감별 및 검색법을 개발하기 위하여 PCV-1과 PCV-2에 특이적으로 반응하는 단크론항체를 생산하여 이들의 특성을 규명하고 진단에 활용 가능성을 조사하였다.

단크론항체를 생산하기 위하여 mouse를 면역시키기 위하여 순수 분리한 PCV-1과 PCV-2를 Milstein과 Kohler의 방법 [19]에 준하여 intraperitoneal route로 각각 접종시키는 방법과 Coyle 등 [9]과 Orlik와 Altaner [26]의 방법을 수정하여 같은 항원을 foot-pad로 접종시키는 방법을 병행하여 면역세포와 myeloma의 융합을 실시한 결과, 2가지 면역방법에 있어서 PCV-1과 PCV-2에 특이적인 단크론항체 생산세포의 생성비율에는 커다란 차이가 없었으나 foot-pad로 접종시킨 mouse를 사용하여 세포 융합을 한 경우 생성된 단크론항체의 isotype은 대부분이 IgM type으로 나타났다. 이는 항체 생성과정에서 초기에는 IgM type이 주로 분비되나 후에 다른 형태의 isotype으로 변환하는데 foot-pad로 접종시킨 mouse의 경우, 면역시킨 후 12-14일에 세포융합을 실시하여 이 시기에는 아직 많은 세포에서 class switching이 일어나지 않은 이유로 주로 IgM type이 생성된 것으로 사료된다. 또한 intraperitoneal route로 접종할 경우, mouse 면역에 적어도 6주의 기간이 소요되는 반면 foot-pad로 접종할 경우에는 세포융합 시까지 2주면 충분하여 4주의 기간을 단축할 수 있었다. 생산된 단크론항체를 순수분리하여 정제된 항체로 사용할 때 IgG type은 주로 protein A column을 이용하여 순수 정제하였는데 최근에는 IgM type도 IgG type과 마찬가지로 순수하게 정제할 수 있는 간단한 방법 [25]이 개발되어 단크론항체를 생산하는데 mouse를 foot-pad로 접종시켜 면역시키는 방법이 복잡 내로 면역시키는 방법보다 효과적인 것으로 생각된다.

본 연구에서 생산된 6개의 PCV-1에 대한 단크론항체 (4E2, 7A10, 7E9, 10E8, 14F11, 15C9)는 모두 PCV-1으로 감염된 세포에서는 양성으로 나타났다. 하지만 PCV-2로 감염된 세포, PCV-2/ORF2 유전자 재조합 baculovirus로 감염된 Sf9 세포 그리고 PCV-2/ORF2 유전자 재조합 baculovirus로 감염된 Sf9 cell lysate를 이용한 western blot에서 모두 음성으로 나타났고 또한, PCV-2 감염이 확인된 돼지의 조직에서 간접형광항체법과 면역조직화학염색법으로 모두 음성으로 나타나 이들 단크론항체가 모두 PCV-1에 특이적인 것을 확인할 수 있었다. 반면에 PCV-2에 대한 9개의 단크론항체는 PCV-2에 감염된 세포와 PCV-2/ORF2 재조합 baculovirus에 감염된 Sf9 세포에서 양성으로 나타난 반면 다른 돼지 바이러스 및

PCV-1에 감염된 세포에서는 반응이 나타나지 않아 이들 모두 PCV-2에 특이적인 것으로 확인되었다. 따라서 이들 단크론항체는 PCV-1과 PCV-2를 감별하고 이들을 검출하는데 유용하게 사용될 것이다. 9개의 PCV-2 특이 단크론항체 중 5개(3C2, 4C7, 4F2, 6C6, 7G2)는 PCV-2/ORF2 유전자 재조합 baculovirus로 감염된 Sf9 cell lysate를 이용한 western blot에서 명확한 band를 확인할 수 있었으나 4개(1A11, 1B5, 4H10, 7B4)의 단크론항체에서는 어떠한 band도 확인할 수 없었다. 특히 2개의 단크론항체(4H10, 7B4)의 경우 PCV-2/ORF2 유전자 재조합 baculovirus로 감염된 Sf9 세포에서 매우 강한 양성반응을 나타냈으나 western blot에서는 음성으로 나타난 것은 예상하지 못한 결과이었다. 이는 이들 단크론항체에 의하여 인지되는 epitope가 western blot을 위하여 sample를 처리할 때 구조상의 변화를 초래하여 더 이상 단크론항체에 의하여 인지되지 못하기 때문으로 추정할 수 있다. 이와 유사한 결과는 우역바이러스 nucleocapsid 단백질에 대한 단크론항체를 이용한 항원구조분석 실험에서 보고된 적이 있다 [6]. 이러한 conformational epitope에 따른 변화는 감염된 세포를 [<sup>35</sup>S]cysteine이나 [<sup>35</sup>S]methionine으로 표지한 후 immunoprecipitation 방법을 사용하면 어느 정도 해결될 수 있을 것으로 사료된다.

병성감정 가검물에서 여러 가지 세균 또는 바이러스 항원을 특이적이고 민감하게 검출하기 위한 진단법 개발에 단크론항체가 응용되면서 이를 이용한 효소면역법, 간접형광항체법 그리고 formalin 고정 조직을 이용한 면역조직화학염색법 등의 면역학적 진단방법이 여러 가지 세균성 및 바이러스성 질병 진단을 위하여 개발되었다 [8]. McNeilly 등 [22, 23]은 PCV-2에 특이적인 단크론항체를 생산하여 이들의 특성을 규명하고 단크론항체를 이용하여 PMWS를 진단할 수 있는 *in situ* hybridization법과 면역조직화학염색법을 비교 연구하였으며 PCV-2를 검출할 수 있는 ELISA법을 개발하였다. 본 연구에서도 생산된 단크론항체의 PCV-2 진단에 있어서 활용 가능성을 조사하기 위하여 임상증상 및 PCR법으로 PCV-2 감염이 확인된 돼지의 림프절과 폐조직을 이용하여 면역조직화학염색법을 실시한 결과, 2개의 단크론항체 6C6과 7G2는 약간의 비 특이반응을 나타냈으나 PCV-2 감염세포를 효과적으로 검출하였다. 이것은 양성 표준항체로 사용한 polyclonal anti-PCV-2 혈청과 거의 동일한 수준으로 PCV-2 감염세포를 검출하여 본 연구에서 생산된 단크론항체가 PCV-2 감염 진단제로 유용하게 사용될 수 있음을 제시하였다. 특히 PCV-2 진단에 양성 표준항체로 사용되고 있는 polyclonal anti-PCV-2 혈청을 만드는데 PCV-2의 증식은 필수적이다. 하지만 PCV-2를 증식시키는데 사용되는 PK15 세포의 대

부분이 PCV-1으로 오염이 되어 있어 PCV-2를 순수하게 증식시키는데 많은 문제점이 대두되고 있다. 이러한 이유로 본 연구에서 생산한 PCV-2 특이 단클론항체는 polyclonal anti-PCV-2 혈청을 대신할 수 있는데 커다란 의의를 가지고 있다. 반면에 3개의 단클론항체 (4C7, 4F2, 4H10)는 PCV-2 감염세포와 반응은 하였으나 염증 세포에서 비 특이적인 반응이 심하게 나타나 구별이 명확하지 않았다. 따라서 이들 단클론항체를 PCV-2 감염 진단제제로 사용하기 전에 비 특이적인 반응을 최소화할 수 있는 방법이 우선 고려되어야 할 것이다. 또한 같은 PCV-2 감염 폐조직을 이용하여 간접형광항체법으로 PCV-2 감염세포를 확인한 결과, 3개의 단클론항체 (4C7, 4H10, 7G2)는 약간의 비 특이반응에도 불구하고 PCV-2 감염세포를 확실하게 검출하여 PCV-2 감염 진단제제로 유용하게 사용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

단클론항체를 이용한 PCV-2 진단법을 실용화 하기 위해서는 보다 많은 약의 PCV-2 의심 가검물에 대하여 다른 진단법과의 민감도 및 특이성의 비교 연구가 필요하며, 이를 위하여 본 연구에서 생산된 단클론항체 7G2를 사용하여 면역조직화학염색법과 간접형광항체법으로 PCV-2를 확인하는 연구가 현재 진행중이다.

## 결 론

이유자돈진성소모성증후군의 원인체로 알려진 돼지 썩코바이러스 혈청형 2 (PCV-2)는 국내는 물론 전 세계적으로 돼지에 발생하여 양돈 산업에서 커다란 피해를 초래하고 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 PCV에 특이적으로 반응하는 단클론항체를 생산하여 이들의 특성을 규명하고, PCV-2 진단법 개발에 응용하였다.

돼지 썩코바이러스 혈청형 1 (PCV-1), PCV-2 또는 baculovirus에서 발현된 PCV-2의 ORF2 단백질로 면역시킨 mouse를 사용하여 일반적인 단클론항체 생산방법을 일부 수정하여 세포융합을 실시하고 PCV-1과 PCV-2에 각각 특이적인 항체를 생산하는 hybridoma는 간접형광항체법을 이용하여 선별하였다. 생산된 16개의 단클론항체 중, 6개는 PCV-1에 특이적인 것이었으며 9개는 PCV-2에 특이적인 것이었다. 또한 이들 단클론항체는 모두 시험에 사용한 다른 돼지 바이러스와도 반응하지 않아 각각 PCV-1과 PCV-2에 특이적인 항체임을 확인할 수 있었다. 일부 PCV-2 특이 단클론항체는 PCV-2로 감염된 돼지 조직에서 간접형광항체법 및 면역조직화학염색법으로 PCV-2와 특이적으로 반응하였다.

이상의 결과로 미루어볼 때 본 연구에서 생산된 단클론항체들은 PCV-1과 PCV-2의 감별 및 병성감정에 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 김경미, 박효선, 김재훈, 강신영. 국내에서 분리된 돼지 썩코바이러스 2형의 유전자 염기서열 분석 및 발현. 대한바이러스학회지. 2003, **33**, 151-160.
2. Allan, G. M., McNeilly, F., Cassidy, J. P., Reilly, G. A., Adair, B., Ellis, W. A. and McNulty, M. S. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pigs fetal material. *Vet. Microbiol.* 1995, **44**, 49-64.
3. Allan, G. M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clarke, E. G., Ellis, J. A., Haines, D. M., Meehan, B. M. and Adair, B. M. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J. Vet. Diagn. Investig.* 1998, **10**, 3-10.
4. Allan, G. M., McNeilly, F., Meehan, B. M., Kennedy, S., Mackie, D. P., Ellis, J. A., Clark, E. G., Espuna, E., Saubi, N., Riera, P., Botner, A. and Charreyre, C. E. Isolation and characterization of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet. Microbiol.* 1999, **66**, 115-123.
5. Bassami, M. R., Berryman, D., Wilcox, G. E. and Raidal, S. R. Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anemia virus. *Virology.* 1998, **249**, 453-459.
6. Choi, K. S., Nah, J. J., Ko, Y. J., Choi, C. U., Kim, J. H., Kang, S. Y. and Joo, Y. S. Characterization of antigenic sites on the rinderpest virus N protein using monoclonal antibodies. *J. Vet. Sci.* 2003, **4**, 57-65.
7. Clark, E. G. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *In Proceed of the American Association of Swine Practitioners.* pp. 499-501. 1997.
8. Constantine, N. T. and Lana, D. P. Immunoassays for the diagnosis of infectious Diseases. *In Manual of clinical microbiology*, pp. 218-233, 8th ed. ASM press, Washington, DC, 2002.
9. Coyle, P. V., Wyatt, D., McCaughey, C. and O'Neill, H. J. A simple standardised protocol for the production of monoclonal antibodies against viral and bacterial antigens. *J. Immunol. Methods.* 1992, **153**, 81-84.
10. Daft, B., Nordhausen, R. W., Latimer, K. S. and Niagro, F. D. Interstitial pneumonia and lymphadenopathy associated with circoviral infection in a 6 week-old pig. *In 39th Meeting of the American Association Veterinary Laboratory Diagnosticians.* p.32. Little Rock, 1996.

11. Ellis, J., Clark, E., Haines, D., West, K., Krakowka, S., Kennedy, S. and Allan, G. M. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Vet. Microbiol.* 2004, **98**, 159-163.
12. Fenaux, M., Halbur, P. G., Gill, M., Toth, E. and Meng, X. J. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *J. Clin. Microbiol.* 2000, **38**, 2494-2503.
13. Hamel, A. L., Lin, L. L. and Nayar, G. P. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol.* 1998, **72**, 5262-5267.
14. Hamel, A. L., Lin, L. L., Sachvie, C., Grudeski, E. and Nayar, G. P. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can. J. Vet. Rec.* 2000, **64**, 44-52.
15. Harding, J. C. S. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet. Microbiol.* 2004, **98**, 131-135.
16. Kang, S. Y., Saif, L. J. and Miller, K. L. 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.* 1989, **27**, 2744-2750.
17. Kennedy, S., Allan, G. M., McNeilly, F., Adair, B. M., Hughes, A. and Spillane, P. Porcine circovirus infection in Northern Ireland. *Vet. Rec.* 1998, **142**, 495-496.
18. Kim, J., Chung, H. K., Jung, T., Cho, W. S., Choi, C. and Chae, C. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. *J. Vet. Med. Sci.* 2002, **64**, 57-62.
19. Kohler, G. and Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975, **256**, 495-497.
20. LeCann, P., Albina, E., Madec, E., Cariolet, R. and Jestin, A. Piglet wasting disease. *Vet. Rec.* 1997, **141**, 660.
21. Lukert, P., de Boer, G. F., Dale, J. L., Keese, P., McNulty, M. S., Randles, J. W. and Tischer, I. The Circoviridae. *In* Virus taxonomy: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. p. 166-168. Springer-Verlag, Vienna, Austria, 1995.
22. McNeilly, F., Kennedy, S., Moffett, D., Meehan, B. M., Foster, J. C., Clarke, E. G., Ellis, J. A., Haines, D. M., Adair, B. M. and Allan, G. M. A comparison of *in situ* hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J. Virol. Methods.* 1999, **80**, 2123-2128.
23. McNeilly, F., McNair, I., Mackie, D. P., Meehan, B. M., Kennedy, S., Moffett, D., Ellis, J., Krakowka, S. and Allan, G. M. Production, characterization and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2. *Arch. Virol.* 2001, **146**, 909-922.
24. Meehan, B. M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V. A., Ellis, J. A., Hassard, L. E., Clark, E. G., Haines, D. M. and Allan, G. M. Characterization of novel circoviruses associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.* 1998, **79**, 2171-2179.
25. Nethery, A., Raison, R. L. and Easterbrook-Smith S. B. Single-step purification of immunoglobulin M on C1q-Sepharose. *J. Immunol. Methods.* 1990, **126**, 57-60.
26. Orlik, O. and Altaner, C. Modification of hybridoma technology which improve the yield of monoclonal antibody producing cells. *J. Immunol. Methods.* 1988, **115**, 55-59.
27. Rosell, C., Segales, J., Plana-Duran, J., Balasch, M., Rodriguez-Arriola, G. M., Kennedy, S., Allan, G. M., McNeilly, F., Latimer, K. S. and Domingo, M. Pathological, immunohistochemical, and *in-situ* hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J. Comp. Pathol.* 1999, **120**, 59-78.
28. Sorden, S. D. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome. *Swine Health Prod.* 2000, **8**, 133-136.
29. Tischer, I., Bode, L., Apodaca, J., Timm, H., Peters, D., Rasch, R., Pociuli, S. and Gerike, E. Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle. *Arch. Virol.* 1995, **140**, 1427-1439.
30. Tischer, I., Bode, L., Peters, D., Pociuli, S. and Germann, B. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. *Arch. Virol.* 1995, **140**, 737-743.

31. **Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W. and Koch, M. A.** A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*. 1982, **295**, 64-66.
32. **Tischer, I., Miels, W., Wolff, D., Vagt, M. and Griem, W.** Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch. Virol.* 1986, **91**, 271-276.
33. **Todd, D., Creelan, J. L., Mackie, D. P., Rixon, F. and McNulty, M. S.** Purification and biochemical characterization of chicken anemia agent. *J. Gen. Virol.* 1990, **71**, 819-823.
34. **Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985, **76**, 4350-4354.