

재조합 baculovirus에 의한 아프리카 돼지콜레라바이러스 p12 단백질의 발현과 진단적 적용

최강석* · 최정업 · 김용주

국립수의과학검역원

(게재승인: 2005년 2월 21일)

Expression and diagnostic application of p12 protein of African swine fever virus by recombinant baculovirus

Kang-Seuk Choi*, Cheong-up Choi, Yong-Joo Kim

National Veterinary Research and Quarantine Service, Ministry of Agriculture and Quarantine Service, Anyang 430-826, Korea

(Accepted: February 21, 2005)

Abstract : African swine fever (ASF) is an infectious disease of domestic and wild pigs for which there is no vaccine in the world. A proper surveillance of viral activity and a timely response to ASF outbreaks depend upon the rapid diagnosis of ASF viral infection. Internationally prescribed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is a fast, sensitive test routinely used in the diagnosis of the ASF. However, inactivated whole ASF virus antigen used in this test is a tedious to prepare and has a risk of outside exposure of infectious virus by laboratory accident during the preparation. An ASF virus noninfectious recombinant antigen is a safe and easily produced alternative antigen for use in diagnostic assay. We have cloned the ORF O61R gene of the ASF virus to generate a recombinant baculovirus producing the p12 protein in insect cells under control of the polyhedrin promoter as non-fusion protein. When used in an indirect ELISA, the p12 antigen showed reactivity with all known ASF positive pig sera but not with negative pig sera. Our results indicated that the p12 protein would be one of alternative antigens for diagnosis of the ASF.

Key words : African swine fever, p12, recombinant baculovirus, ELISA, diagnosis

서 론

아프리카돼지콜레라(African swine fever: ASF)는 돼지에서 높은 이환율과 치사율을 보이는 바이러스성 전염병이다. 이 전염병의 병원체는 *Asfarviridae*과의 *Asfivirus*에 속하는 아프리카돼지콜레라바이러스(African swine fever virus, ASFV)이다 [13]. 이 바이러스는 약 170 kb의 DNA genome과, 초기 mRNA 생산에 필요한 효소, 그리고 50여개의 구조단백질로 구성되어 있다 [10, 24].

ASF 감염 돼지에서의 임상 증상은 급성형에서 만성형까지 다양하며 돼지콜레라(classical swine fever: CSF)와 유사하다 [16, 20, 23]. 특히, 급성형 ASF의 경우 감염

돼지에서 최고 100%의 치사율을 나타낼 수 있다. 이 질병은 다양한 방법에 의하여 전파가 이루어 질수 있지만 대부분 돼지간 접촉 또는 연진드기(*Ornithodoros spp*)의 매개에 의하여 이루어진다 [20]. 현재 이 질병에 감염된 돼지에서 방어능과 관련된 중화항체가 생성되지 않으므로, 이를 예방할 백신이 개발되어 있지 아니한 실정이다 [12, 14, 15, 16]. 그러므로, 이 질병 발생에 의한 경제적 피해를 최소화하는 최선의 방법은 감염지역의 감수성 가축의 이동제한과 더불어 감염축의 신속 검출에 의한 도태 살처분을 실시하는 것이다. ASF는 최근에 아프리카 사하라사막 이남지역과 이탈리아, 스페인 등 지중해 연안지역에서 대부분 발생하였다 [20, 23]. 진단적 측면

*Corresponding author: Kang-Seuk Choi

National Veterinary Research and Quarantine Service, Ministry of Agriculture and Quarantine Service, Anyang 430-826, Korea
[Tel: +82-31-467-1860, Fax: +82-31-449-5882, E-mail: choiks@nvrqs.go.kr]

에서 ASFV 특이항원 검출은 임상증상이 발현되는 감염 축을 색출하는 데 있어 유용한 반면 ASFV 특이항체 검출 등 혈청검사는 발생지역에서의 바이러스보유동물 [9, 17, 23]의 색출이나 비발생 지역에서의 질병 예찰에서 필수적이다.

현재 질병의 진단에 가장 효율적인 항체검출 방법으로서 대부분 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)가 사용되고 있으며, ASF의 경우 불활화바이러스항원을 이용한 ELISA가 국제적으로 사용되고 있다 [7, 19]. 최근 불활화바이러스 항원 이외에 p73 [19], p72 [22], p54 [4, 18] 및 p30 [8, 18] 단백질이 진단 항원으로서 개발되어 사용되고 있다. 그러나, 아직까지 p12 단백질이 ASFV 항체검출을 위한 ELISA에 적용된 사례가 보고된 바가 없다.

ASFV 구조단백질 p12는 61개의 아미노산으로 구성되어 있으며 ORF O61R에 암호화되어 있으며, 이는 숙주세포에 부착하는 attachment protein으로 알려져 있다 [1, 2, 6, 10, 11]. 또한 p12 단백질은 자연 감염된 돼지에서 강한 면역원성을 유도하는 것으로 보고되었다 [3].

본 연구에서는 재조합 baculovirus를 이용하여 ASFV p12 단백질을 발현하여, 발현된 재조합 p12 단백질이 항체검출용 진단항원으로서의 유용성 여부를 ELISA로 평가하였다.

재료 및 방법

발현벡터 pBacPAK/ASFV.O61R의 작성

ASFV ORF O61R 유전자가 삽입된 발현 벡터

pBacPAK/ASFV.O61R을 작성하기 위해 사용된 viral DNA는 불활화된 ASFV Brasil-78주(미국 National Veterinary Service Laboratory의 Dr. A. House제공)로부터 추출하였다. 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction, PCR)에 의한 ORF O61R DNA의 증폭을 위하여 PCR primers O61R-F(5'-CGGGATCCAATACGCAAAAATGGCAC-3') 및 O61R-R(5'-GCTCTAGAGCGGACCATGTACTCTGAC-3')가 사용되었다. 이들 primer는 ORF O61R이 있는 *EcoRI-XbaI* 핵산절편 내 ORF O61R 유전자 전체를 포함하여 증폭되도록 디자인하여 합성되었다(Fig. 1). 또한 ORF O61R DNA의 효율적인 클로닝을 위하여 forward 및 reverse primer 5' 말단에 제한효소 *BamHI*과 *XbaI* 절단부위 염기서열을 삽입하였다. PCR에 의한 ORF O61R DNA 증폭산물은 *BamHI* 및 *XbaI* 절단하여 pUC19 plasmid(Gibco, USA)에 삽입하여 cloning하였다(pUC19/ASFV.O61R). 이렇게 cloning된 ORF O61R DNA는 동일한 제한효소로 절단하여 pUC19/ASFV.O61R로부터 추출하여 pBacPAK8(Clontech, USA)에 삽입하여 유전자재조합 발현벡터(pBacPAK/ASFV.O61R)를 작성하였다. 발현벡터내 ORF O61R DNA의 올바른 삽입여부는 PCR법, 제한효소절단법 및 염기서열분석의 방법에 의하여 확인하였다.

재조합 baculovirus BacPAK/ASFV,p12의 작성

ASFV ORF O61R을 포함하는 재조합 baculovirus는 발현벡터 pBacPAK/ASFV.O61R와 BacPAK6 linear DNA (*Bsu36I* digested)(Clontech, USA)를 *Spodoptera frugiperma* (Sf9) 곤충세포(Invitrogen, USA)에 미국 Clontech사에서

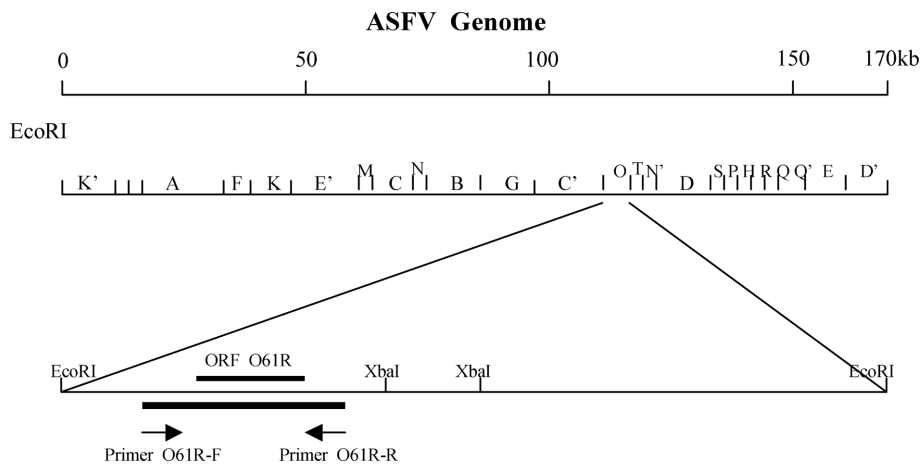


Fig. 1. *EcoRI* restriction map of ASFV BA71 genome. DNA fragment containing ORF O61R was amplified by PCR to generate recombinant baculovirus (BacPAK/ORF61R).

권장하는 방법에 따라 co-transfection 시킨 후 곤충세포를 27°C에서 저온배양하여 작성하였다. 재조합 baculovirus는 co-transfection 72시간 후 곤충세포배양상층액으로부터 채득하여 플라크법(plaque assay)으로 클로닝하였다. ASFV p12단백질을 발현하는 재조합 baculovirus(BacPAK/ORF61R)는 형광항체법으로 ASFV 고도면역 돼지혈청과의 반응여부를 확인함으로써 선발하였다.

재조합 ASFV p12 항원의 제조

재조합 ASFV p12 단백질(rASFVp12) 항원은 BacPAK/ORF61R를 감염시킨 Sf9 곤충세포로부터 추출하여 제조하였다. 즉, 미리 배양한 Sf9 세포에 5 M.O.I (multiplicity of infectivity)의 재조합 baculovirus(BacPAK/ORF61R)를 접종한 후 27°C 저온배양기에서 배양하였다. 감염 5일째 배양 세포액을 500×g로 20분간 원심분리하여 cell pellet만을 수확하였다. 그 후 cell pellet에 1/10 volume의 lysis buffer(0.01 M phosphate buffered saline containing 0.6% Triton X-100, 0.05% Tween 20 and protease inhibitor cocktail)를 첨가하여 얼음물에서 간단히 초음파처리(sonication)한 다음 10분간 방치함으로써 감염세포로부터 rASFVp12 단백질이 추출되게 하였다. 그 후 500×g로 20분간 원심분리하여 cell debris를 제거한 다음, rASFVp12 단백질이 함유된 상층액은 소분하여 실험에 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다. 정상 Sf9 곤충세포를 상기와 동일한 방법으로 추출하여 항원 음성 대조로 사용하였다.

혈청

ASFV 고도면역 돼지혈청은 미국 National Veterinary Service Laboratory(NVSL)의 Dr. A. House로부터 제공받았다. 이 혈청은 본 연구에서 양성 대조혈청으로 사용되었다. ASFV감염 야외돼지유래 혈청 20점은 프랑스 Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments(AFFSA) 연구소의 Dr. M. Remond로부터 제공받았다. ASFV p12에 대한 양성혈청은 본 연구에서 생산된 rASFVp12 단백질을 기니픽에 접종함으로써 연구자의 실험실에서 제조하였다. 즉, rASFVp12 단백질(두당 약 1 mg)을 기니픽 2두에 3주 간격 2회 피하 접종하였다. 그 후 최종면역 2주에 채혈하여 혈청을 분리한 다음 pool하였다. 혈청에 곤충 세포 lysates(1×10^8 /혈청 ml)를 첨가하여 실온에서 1시간 처리함으로써 혈청내 존재하는 비특이 세포단백질 항체를 제거하였다. 이들 혈청이외에, 아프리카돼지콜레라 비발생 지역인 한국의 도축장에서 채취한 돼지 혈청 210점을 ASFV 음성 돼지 야외혈청으로 사용하였다.

Western blot

본 연구에서 발현된 rASFVp12단백질의 발현확인을 위하여 ASFV 고도면역 양성혈청과 기니픽 항 p12 혈청을 사용하여 Western blot을 실시하였다. 먼저, NuPAGE® Novex Bis-Tris Gels에서 rASFVp12 단백질을 Xcell SureLock™ Mini-cell(Invitrogen, USA)를 사용하여 제조사에서 권장하는 방법에 의거하여 전기영동을 실시하였다. 그 후, Xcell IITM Blot Module(Invitrogen, USA)을 사용하여 단백질 분획들을 gel로부터 nitrocellulose 막으로 전이시켰다. 그 후 단백질분획이 전이된 nitrocellulose 막을 blocking buffer(5% skimmed milk가 함유된 0.01 M phosphate buffered saline(PBS)으로 30분간 블로킹시킨 후 1:100 희석한 혈청(ASFV p12 및 ASFV에 대한 양성혈청)과 실온에서 90분간 반응시켰다. 그 후 단백질 분획과 결합한 항체는 blocking buffer로 1:1,000 희석한 anti-species IgG(H+L) conjugated with alkaline phosphatase(Kirkegaard-Perry, USA)로 실온에서 60분 반응시켜 검출한 다음 BCIP/NBT 기질용액(Kirkegaard-Perry, USA)를 사용하여 항원-항체반응산물을 발색시켰다.

간접 형광항체법

재조합 baculovirus로 감염시킨 Sf9 곤충 세포에서의 p12단백질의 발현 여부를 확인하기 위하여 간접 형광항체법을 실시하였다. 우선, 재조합 baculovirus를 감염시킨 후 3일째에 감염세포를 수확하였다. 감염세포는 0.01 M PBS, pH7.4로 간단히 세척한 후 slide glass에 도말하여 건조시켰다. 그 후 도말한 세포는 cold acetone으로 -20°C에서 10분간 고정하였다. 음성대조를 위하여 정상 Sf9 곤충세포를 동일한 방법으로 고정시켰다. ASFV 감염 Vero세포 slide glass의 경우 미국 NVSL의 Dr. J. House로부터 제공받았다. 고정된 슬라이드에 ASFV 고도면역 돼지혈청(1:5,000배 희석)을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 비반응 산물들을 제거하기 위하여 0.01 M PBS, pH 7.4로 간단히 세척하였다. 그 다음 FITC conjugated anti-swine IgG(H+L) 용액(Kirkegaard-Perry, USA; 1:500배 희석)을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킴으로써 항원-항체 결합 산물을 검출하도록 하였다. 검사한 세포에서의 형광염색 여부는 암실에서 형광현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

간접 ELISA

본 연구에서 발현한 rASFVp12 단백질이 돼지 혈청시료로부터 ASF 항체를 검출할 수 있는지를 조사하기 위하여 간접 ELISA를 실시하였다. 우선 Maxisorp ELISA

plate(NUNC, Denmark)에 0.01 M PBS로 적정 농도로 희석한 rASFVp12 항원(총 단백질량 약 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 해당)을 well당 50 μl 씩 첨가하여 37°C에서 1시간동안 흡착시켰다. 그 후, 세척용 buffer(0.002 M PBS containing 0.05% Tween 20)로 ELISA plate를 3회 세척하여 흡착되지 않은 산물들을 제거시켰다. 그 후 blocking buffer (0.01 M PBS, 5% skimmed milk and 0.05% Tween 20)로 적정하게 희석한 검사혈청을 rASFVp12항원이 흡착된 plate에 각각 2반복으로 well당 50 μl 씩 첨가하여 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 상기와 동일한 방법으로 ELISA plate를 세척한 후 peroxidase-conjugated anti-swine IgG(H+L) 용액(Kirkegaard-Perry, USA; 1:1,500배 희석)을 well당 50 μl 씩 첨가하여 37°C에서 1시간동안 반응시킴으로서 항원-항체 결합산물을 검출하게 하였다. 그 후 O-phenylenediamine(OPD) 기질용액(Sigma, USA)을 well당 50 μl 씩 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 다음 1.25 M 황산용액으로 발색반응을 중지시켰다. 그 후 ELISA plate는 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검사 결과는 각 혈청의 흡광도를 T/P비율(검사혈청 흡광도/양성대조혈청 흡광도)로 전환하여 계산하였다. 만약 rASFVp12 항원 well에서 검사혈청의 T/P 비율이 0.3(음성혈청의 평균 T/P비율의 2배)이상일 경우 ASFV 감염 Vero 세포 slide를 이용한 간접 형광항체법으로 ELISA 비특이반응 여부를 조사하였다.

결 과

재조합 ASFV p12 단백질(rASFVp12)의 발현

ASFV p12 단백질을 암호화하는 genome 유전자 부위

는 ASFV의 genome 중 *EcoRI-XbaI* 핵산절편 부위 내에 존재하며, 이 절편(913 bps) 중 ORF O61R DNA(183 bps)를 포함하는 총 358 bp 크기의 DNA를 증폭하도록 하였다(Fig. 1).

재조합 baculovirus(BacPAK/ORF61R)는 단층이 형성된 Sf9 곤충세포내에서 pUC19/ASFV.O61R 벡터와 BacPAK6 linear DNA간의 유전자 재조합에 의하여 성공적으로 작성되었다. BacPAK/ORF61R에 감염된 곤충세포는 감염 3일째 뚜렷한 세포변성효과가 관찰되기 시작하였으며(Fig. 2A right), 바이러스 수거일인 감염 5일째에는 곤충세포의 90% 이상이 세포변성효과를 나타내었다. 그러나 정상세포에서는 세포변성효과가 관찰되지 않았다(Fig. 2A left). 감염 세포를 ASFV 고도면역 돼지혈청과 반응시킨 후 형광염색하였을 때, 감염세포는 강한 형광반응을 나타내었다(Fig. 2B right). 반면 정상 곤충세포에서는 그러한 형광반응을 나타내지 않았다(Fig. 2B left).

재조합 ASFV p12 단백질(rASFVp12)의 항원성

재조합 baculovirus BacPAK/ORF61R 감염 곤충세포로부터 재조합 발현단백질(rASFVp12)를 추출한 다음 그 항원성을 Western blot법과 간접 ELISA로 분석하였다. 발현단백질을 변성시켜 전기영동법으로 분획시킨 후 Western blot법으로 항 p12 기니픽 혈청과 반응시켰을 때, 약 12 kDa과 17 kDa의 단백질 분획들이 관찰되었다. 대부분의 발현 단백질은 약 12 kDa의 크기였다(Fig. 3A lane 2). 같은 방법으로 ASFV 고도면역 돼지혈청과 반응시켰을 때 ASFV 항체는 약 12 kDa의 단백질 분획과만 약한 반응을 나타내었다(Fig. 3A lane 3). 정상

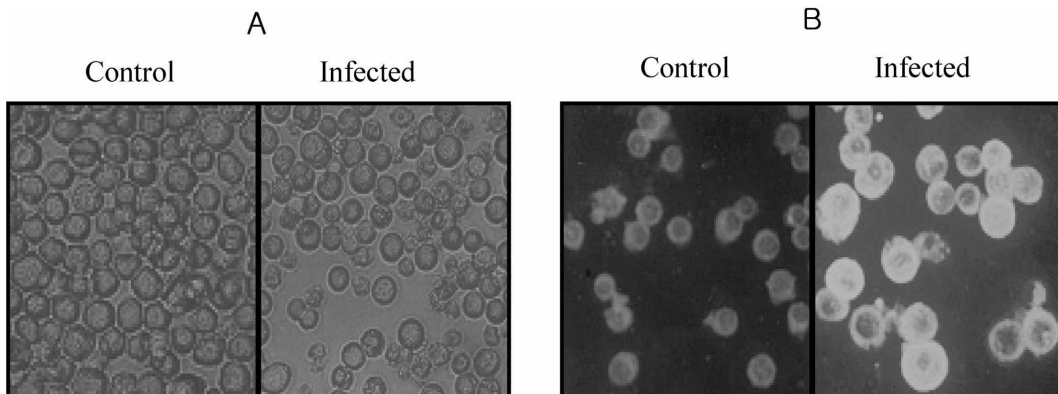


Fig. 2. Expression of ORF O61R gene of ASFV by recombinant baculovirus BacPAK/ORF61R. (A) BacPAK/ASFV.ORF61R infected cells (right) showing cytopathic effects. (B) BacPAK/ASFV.ORF61R infected cells (right) showing strong reactivity with hyperimmune ASFV pig serum in indirect immunofluorescence assay.

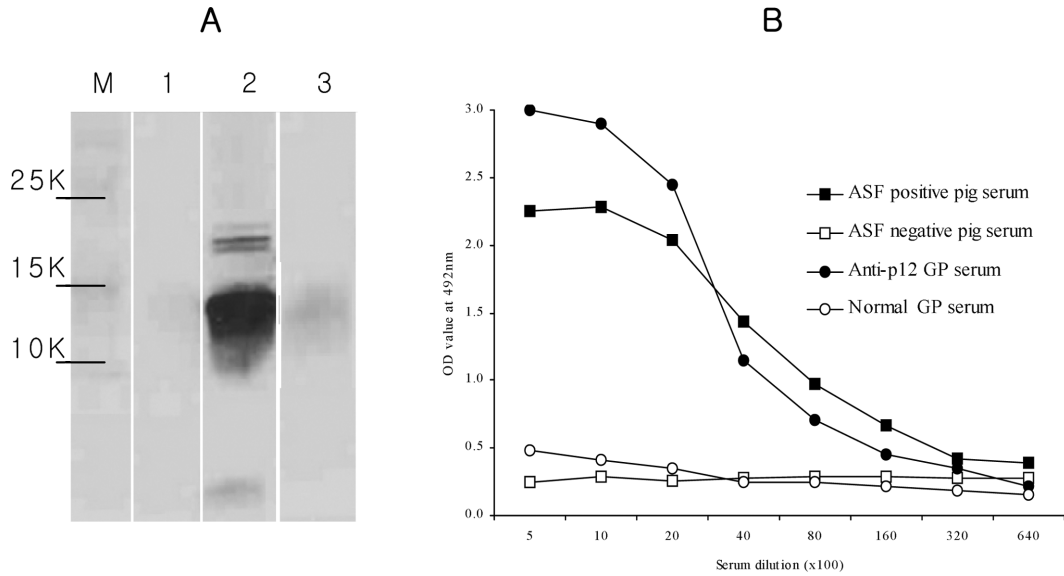


Fig. 3. Antigenicity of rASFVp12 produced by recombinant baculovirus BacPAK/ORF61R. (A) Western blot analysis of rASFVp12 protein using anti-p12 GP serum (lane 2) and hyperimmune ASFV pig serum (lane 3). Mock infected insect cells showed no reactivity with hyperimmune ASFV pig serum (lane 1). (B) ELISA reactivity of rASFVp12 protein using anti-p12 guinea pig serum and hyperimmune ASFV pig serum.

곤충세포유래 단백질을 동일한 방법으로 추출하여 반응시켰을 때 ASFV 항체와 반응하는 단백질 분획은 관찰되지 않았다. 반면, 간접 ELISA 방법으로 발현 단백질(rASFVp12)의 반응성을 조사하였을 때, ASFV 고도면역 돼지혈청과 항 p12 기니픽 혈청은 모두 1:10,000배 이상(P/N ratio 2.0 이상 기준)의 높은 역가를 나타내었다(Fig. 3B).

재조합 p12단백질을 이용한 ELISA에 의한 ASF 항체검출

본 연구에서 발현한 재조합 p12단백질이 ASFV 항체를 검출하기 위한 진단항원으로서 유용한 지 여부를 간접 ELISA로 조사하였다. Checkerboard titration법을 실시한 결과 재조합 p12항원과 검사 혈청의 적정한 희석 배수는 각각 1:150 및 1:100이었다(Fig. 4).

또한 적정농도 조건의 rASFVp12 항원 및 검사혈청을 사용하여 간접 ELISA를 확립하여, rASFVp12 항원이 ASFV 특이항체를 검출할 수 있는 지 여부를 조사하였다(Fig. 5). 유효성 평가를 위하여 ASFV 항체양성 돼지혈청 20점과 ASFV 항체음성 돼지혈청 210점을 사용하였다. ASFV 항체양성 돼지혈청 20점중 15점(75%)은 0.90 이상의 높은 T/P 비율을 나타내었다. 가장 낮은 반응성을 보인 양성혈청의 T/P 비율은 0.56이었다. 반면 음성 혈청의 88.5%(186/210점)는 0.2이하의 낮은 T/P 비

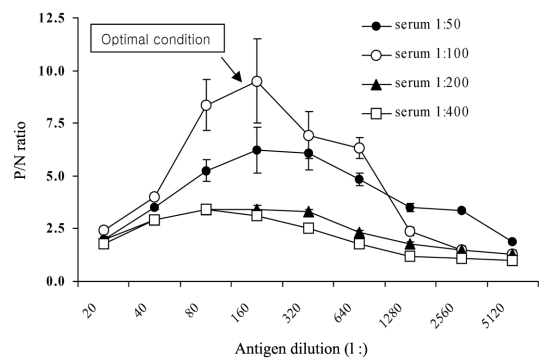


Fig. 4. Checkerboard titration using antigen (rASFVp12) and control positive and negative sera. T/P ratio was calculated by dividing ASFV positive serum into ASFV negative serum.

율을 나타내었으며, 7점의 음성혈청은 0.3 이상의 상대적으로 높은 T/P 비율(최대 0.46 T/P비율을 보임)을 나타내었다. 높은 T/P비율(0.3이상)을 보인 음성 돼지혈청들의 경우 ASFV감염 Vero 세포를 이용한 간접 형광항체법으로 교차검사 결과 모두 음성반응을 나타내었다(data not shown).

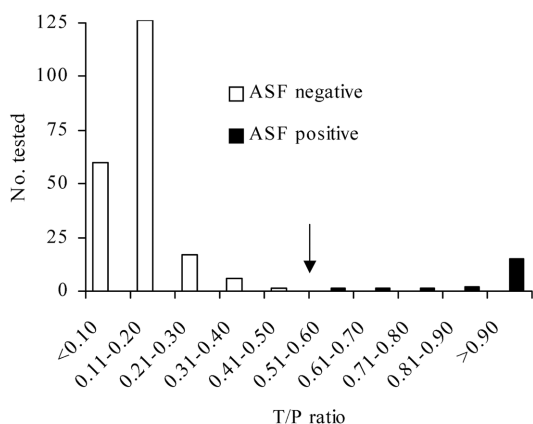


Fig. 5. Distribution of T/P ratio of test serum samples in indirect ELISA. The arrow indicates T/P criteria between ASFV positive and ASF negative sera in the ELISA.

고 찰

ASFV 입자는 receptor매개 endocytosis에 의해 감수성 세포내로 침입하며 [2], 이 과정에서 p12단백질은 세포 receptor를 인식하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다 [11]. ASFV p12 단백질은 ASFV의 복제기작 과정에서 숙주세포 attachment와 관련된 역할을 하는 것 이외에 감염된 돼지에서 가장 빨리 숙주내 항체를 유도하는 구조 단백질로 확인되었다 [3, 21]. 또한 p12단백질은 바이러스들간의 변이가 적은 구조단백질로 보고되었다 [5]. 이러한 p12 단백질의 항원성과 유전적 안정성은 이를 진단항원으로서 적용할 수 있는 가능성을 제시해 주는 것이다.

본 연구 결과 ASFV 항체양성 혈청과 ASFV 항체음성 혈청간에 재조합 p12 단백질(rASFVp12)와의 뚜렷한 ELISA 반응 정도의 차이가 관찰되었다. ASFV감염 돼지혈청의 경우 대부분 p12단백질과 강한 반응(0.9 이상의 T/P비율)을 나타내었다. 일부 감염 돼지혈청은 상대적으로 낮은 T/P비율(최하 0.56)을 보였지만, 최고 T/P비율을 보인 돼지 음성혈청(T/P비율 0.46)보다는 강한 반응을 나타내었다. 상대적으로 높은 T/P비율을 보인 돼지 음성 혈청들은 간접 형광항체법에서 ASFV와의 항원 항체반응이 관찰되지 않은 것으로 보아 비특이 ELISA 반응에 의해 상대적으로 높은 ELISA 발색반응을 나타낸 것으로 사료된다. 결론적으로 본 연구에서 생산한 재조합 p12단백질은 ASFV 항체진단용 ELISA의 진단항원으로서 유용할 것으로 판단된다. 이 연구 결과는 재조합 rASFVp12 항원이 ELISA 진단항원으로서 적용 가능

하다는 것을 처음으로 제시하였다는 점에서 진단학적으로 중요한 의의를 지니고 있다.

다른 연구자들의 보고에 의하면 baculovirus를 이용하여 발현할 경우 재조합 p12단백질 발현량이 우수하고, ASFV의 native p12와 유사한 생물학적 기능을 나타내는 것으로 보고되었다 [6, 10, 11]. 이것은 재조합 baculovirus에 의해 발현된 p12단백질이 진단항원으로서 적합함을 제시하는 것이다. 본 연구에서 재조합 baculovirus에 의해 생산된 재조합 rASFVp12 단백질은 대부분 약 12 kDa에 해당하는 단백질 형태로 발현되었으며, 일부 17 kDa의 단백질 형태도 발현되었다. 아미노산 61개로 구성되어 있는 p12단백질은 예상 분자량이 6.5 kDa [2]임을 고려해 볼 때 본 연구에서 발현된 재조합 p12단백질은 monomer 형태보다는 dimer(12 kDa)나 trimer(17 kDa) 형태로 발현됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Angulo 등 [6] 등이 보고한 재조합 p12단백질의 immunoprecipitation 결과와 일치하였고, 대장균발현 p12 단백질에서도 관찰되었다 [1]. 그러므로, 이러한 p12 단백질의 multimerization은 Angulo 등 [6]이 지적한 바와 같이 glycosylation의 영향보다는 disulfide 결합에 기인한 것으로 판단된다.

본 연구에서 생산한 재조합 rASFVp12 단백질은 검사 방법에 따라 항원성의 차이가 관찰되었다. 즉, 간접 ELISA에서의 반응 결과와 달리, Western blot에서는 ASFV 고도면역 돼지혈청과 매우 약한 반응을 나타내었다. 흥미롭게도 Western blot에서의 항원-항체반응은 약 12 kDa의 단백질 분획에서 관찰되었지만 17 kDa의 단백질 분획에서는 관찰되지 않았다. 본 연구 결과와 유사한 결과가 Pastor 등 [19] 및 Carrascosa 등 [10]에 의해서도 보고된 바 있다. Immunoprecipitation assay(RIPA)에서의 p12단백질의 강한 항원성을 보였지만 Western blot으로 실시하였을 때 항원성의 대부분을 상실하였다. 즉 항원 단백질의 변성처리과정없이 항원성을 검사한 ELISA나 RIPA와 달리, Western blot의 경우 2-ME(2-mercaptoethanol)와 같은 화학제로 rASFVp12 항원을 처리(변성)시킨 후 단백질을 분획하여 항원성을 조사하였다는 점을 고려해 볼 때, 단백질 변성 처리는 p12 단백질에 존재하는 면역원성이 강한 입체적인 항원구조의 상실을 초래하는 것으로 여겨진다. 흥미롭게도 p12 발현단백질 면역 기니픽혈청은 ASFV감염돼지혈청과 달리 Western blot에서도 강한 항원 항체반응을 나타내었다. 이러한 결과는 linear epitope들이 ASFV virion에서는 구조적으로 외부로 노출되어 있지 않아 면역반응을 매우 약하게 나타내는 데 반해, 재조합 p12단백질에서는 이러한 linear epitopes들이 외부로 노출된 형태로 존재하여 면역반응을 유도하기 때문인 것으로 판단된다. 즉, ASFV감염 돼지에서의 p12에 대한 면역반응은 linear

epitope에 의한 면역반응보다는 conformational epitope에 의해 대부분 이루어진다는 것을 의미한다 하겠다. 그러므로, conformational epitope의 항원구조를 파괴시킬 수 있는 단백질 항원변성 처리과정을 거치지 않는 진단방법을 고려한다면, 재조합 p12단백질의 진단적 적용은 매우 유용할 것으로 판단된다.

또한, 본 연구에서 생산한 재조합 p12단백질은 ASFV 항체를 검출하는 진단항원으로서 다음과 같은 잇점을 제공한다. 첫째, 불활화바이러스 항원과 달리 재조합 p12 단백질 항원은 항원생산과정에서 전염성이 있는 ASFV를 취급하지 않으므로 일반 실험실에서도 쉽게 진단항원을 생산할 수 있다. 둘째, 불활화 바이러스항원을 제조하기 위하여 BEI(binary ethyleneimine)와 같은 발암성 불활화제의 취급이 필수적이거나, 재조합 p12단백질 항원의 제조과정에서는 그러한 발암성 화학제를 사용하지 않으므로 취급자에 대한 생체위해도가 매우 낮다. 셋째, baculovirus를 이용하여 생산하는 p12 단백질 항원은 고농도로 쉽게 생산할 수 있기 때문에 항원생산비가 저렴하다 [10]. 결론적으로, 본 연구에서 발현된 재조합 p12단백질 항원은 진단항원으로서 항원성이 우수하고, 안전하며, 쉽게 생산할 수 있는 장점을 가지고 있다. 다만, 본 연구에서 적용한 p12단백질 항원을 이용한 ELISA를 ASF 진단이나 예찰 목적으로 사용하기 위해서는 보다 다양한 야외형질 시료들을 확보하여 추가적인 유효성 평가가 필요하다.

결 론

(1) ASFV의 ORF O61R 유전자를 삽입한 재조합 baculovirus를 작성하였다. 작성된 재조합 baculovirus에 의해 근층세포에서 발현된 재조합 단백질은 대부분 12 kDa의 dimer형태였으며, 일부는 17 kDa의 trimer 형태였다.

(2) 재조합 baculovirus에 의해 발현된 재조합 p12단백질을 간접 ELISA의 진단항원으로 사용한 결과 ASFV 항체양성 돼지혈청은 T/P비율 0.5이상을 나타내어, 0.5 미만의 T/P 비율을 나타낸 ASFV 항체음성 돼지혈청과의 감별이 가능하였다. 그러므로, 본 연구에서 생산한 재조합 p12단백질은 ASFV 항체진단용 ELISA의 진단항원으로서 유용할 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Alcami A, Angulo A, Lopez-Otin C, Munoz M, Freije JM, Carrascosa AL, Vinuela E. Amino acid sequence and structural properties of protein p12, an

- African swine fever virus attachment protein. J Virol 1992, **66**, 3860-3868.
2. Alcami A, Carrascosa AL, Vinuela E. The entry of African swine fever virus into Vero cells. Virology 1989, **171**, 68-75.
3. Alcaraz C, De Diego M, Pastor MJ, Escribano JM. Comparison of a radioimmunoprecipitation assay to immunoblotting and ELISA for detection of antibody to African swine fever virus. J Vet Diagn Invest 1990, **2**, 191-196.
4. Alcaraz C, Rodriguez F, Oviedo JM, Eiras A, De Diego M, Alonso C, Escribano JM. Highly specific confirmatory western blot test for African swine fever virus antibody detection using the recombinant virus protein p54. J Virol Methods 1995, **52**, 111-119.
5. Angulo A, Vinuela E, Alcami A. Comparison of the sequence of the gene encoding African swine fever virus attachment protein p12 from field virus isolates and viruses passaged in tissue culture. J Virol 1992, **66**, 3869-3872.
6. Angulo A, Vinuela E, Alcami A. Inhibition of African swine fever virus binding and infectivity by purified recombinant virus attachment protein p12. J Virol 1993, **67**, 5463-5471.
7. Arias M, Sanchez Vizcaino JM. Manual de diagnostico serologico de la peste porcina africana (Manual of diagnostic serology for African Swine fever). pp.1-44, Ministry of Agriculture, CISA-INIA, Valdeolmos-28130, Madrid, 1992.
8. Barderas MG, Wigdorovitz A, Merelo F, Beitia F, Alonso C, Borca MV, Escribano JM. Serodiagnosis of African swine fever using the recombinant protein p30 expressed in insect larvae. J Virol Methods 2000, **89**, 129-136.
9. Bech-Nielsen S, Fernandez J, Martinez-Pereda F, Espinosa J, Perez Bonilla Q, Sanchez-Vizcaino JM. A case study of an outbreak of African swine fever in Spain. Br Vet J 1995, **151**, 203-214.
10. Carrascosa AL, del Val M, Santarén JF, Viñuela E. Purification and properties of African swine fever virus. J Virol 1985, **54**, 337-344.
11. Carrascosa AL, Sastre I, Viñuela E. African swine fever virus attachment protein. J Virol 1991, **65**, 2283-2289.
12. Coggins L. African swine fever virus. Pathogenesis. Prog Med Virol 1974, **18**, 48-63.
13. Dixon LK, Costa JV, Escribano JM, Rock DL,

- Viñuela E, Wilkinson PJ.** The Asfarviridae. *In*: Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carsten EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (ed.), Virus Taxonomy, 7th Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses, pp. 159-165, Academic Press, New York, 2000.
14. **Forman AJ, Wardley RC, Wilkinson PJ.** The immunological response of pigs and guinea pigs to antigens of African swine fever virus. *Arch Virol* 1982, **74**, 91100.
 15. **Kihm U, Ackerman M, Mueller H, Pool R.** Approaches to vaccination. *In*: Becker Y(Ed.) African Swine Fever, pp. 127-144, Martinus Nijhoff Publishing, Boston, 1987.
 16. **Mebus CA.** African swine fever. *Adv Virus Res* 1988, **35**, 251-269.
 17. **Leitao A, Cartaxeiro C, Coelho R, Cruz B, Parkhouse RME, Portugal FC, Vigario JD, Martins CLV.** The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. *J Gen Virol* 2001, **82**, 513-523.
 18. **Oviedo JM, Rodriguez F, Gomez-Puertas P, Brun A, Gomez N, Alonso C, Escibano JM.** High level expression of the major antigenic African swine fever virus proteins p54 and p30 in baculovirus and their potential use as diagnostic reagents. *J Virol Methods* 1997, **64**, 27-35.
 19. **Pastor MJ, Arias M, Escibano JM.** Comparison of two antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay to detect African swine fever antibody. *Am J Vet Res* 1990, **51**, 1540-1543.
 20. **Penrith ML, Thomson GR, Bastos ADS.** African swine fever. *In*: Coetzer JAW, Tustin RC, Eds, Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa, 2nd ed, pp.1087-1119, Oxford University Press, Cape Town, 2004.
 21. **Tabares E, Martinez J, Martin E, Escibano JM.** Proteins specified by African swine fever virus: IV. Glycoproteins and phosphoproteins. *Arch Virol* 1983, **77**, 167-180.
 22. **Vidal MI, Stiene M, Henkel J, Bilitewski U, Costa JV, Oliva AG.** A solid-phase enzyme linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies, for the detection of African swine fever virus antigens and antibodies. *J Virol Methods* 1997, **66**, 211-218.
 23. **Viñuela E.** African swine fever. *Curr Top Microbiol Immunol* 1985, **116**, 151-170.
 24. **Yáñez RJ, Rodríguez JM, Nogal ML, Yuste L, Enriquez C, Rodríguez JF, Viñuela E.** Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. *Virology* 1995, **208**, 249-278.