大韓獸醫學會誌(2006) 第46卷 第3號
Korean J Vet Res(2006) 46(3) : 235~248

Infectious bursal disease virus 국내분리주 및 백신주의 VP2 gene의 비교분석

김길동 · 강정무 · 김선중[1] · 권혁무 · 한태욱*
강원대학교 수의학부, [1]서울대학교 수의과대학
(게재승인: 2006년 9월 11일)

Sequence analysis of VP2 gene of infectious bursal disease virus field isolate and vaccine strains

Ji-Dong Jin, Zheng-Wu Kang, Sun-Joong Kim[1], Hyuk Moo Kwon, Tae-Wook Hahn*
School of Veterinary Medicine, Kangwon National University Chuncheon 200-701, Korea
College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
(Accepted: Sep 11, 2006)

Abstract : The VP2 full gene of Korean infectious bursal disease virus (IBDV) strain, SH/92, three attenuated vaccine strains, Bur706, Bursine-2 and CEVAC strains, were amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and sequenced and compared with published VP2 gene sequences of IBDVs. The VP2 nucleotide sequence similarity between SH/92 and three vaccine stains was 95.6~96.5% whereas the nucleic acid similarity among three vaccine strains was 97.5~98.5%. The amino acid sequence similarity of VP2 of SH/92 compared with three vaccine strains was between 94.4 and 97.6% while the amino acid similarity among three vaccine strains was between 97.4 and 98.4%. The amino acid similarity between SH/92 and classical virulent strain, 52/70 and STC strain was 96.4 and 96.5%, respectively. The serine-rich heptapeptide was conserved in CEVAC and Bursine-2 as well as SH/92 but not in Bur706. The phylogenetic tree developed from amino acid sequences showed that SH/92 was categorized with vv IBDVs (HK46, OKYM, KK1, UPM94/273, SH95) in one branch while three vaccine strains were catagorized with STC strain in the other branch.

Key words : Infectious bursal disease virus (IBDV), VP2 gene, vaccine strain, sequence.

서 론

전염성 F낭병(infectious bursal disease, IBD)은 전 세계적으로 발병하는 닭의 급성 전염병으로 Infectious bursal disease virus(IBDV)가 원인체이다. 처음 발병한 지역 이름을 따서 Gumboro disease라고 불리기도 하는 IBDV [11]는 주로 36주령의 닭에서 깃털 역립, 설사, 침울 등의 임상증상을 동반한 폐사와 면역억제에 기인한 2차적인 병원체의 기회 감염 증대와 다른 백신에 대한 면역형성 저하를 유발하여 경제적으로 큰 손실을 끼치고 있다 [22]. IBDV에 대한 감수성은 닭의 나이와 품종에 따라서 차이가 있으며 [36], 바이러스 감염 후 34일 사이에 급속히 폐사가 증가하는 소위 spiked-mortality양상을 보이는 특징이 있다 [29].

IBDV는 serotype I과 II로 분류되며 [30] serotype II는 닭과 칠면조에 감수성은 있으나 병원성은 인정되지 않고 있다 [21]. Serotype I IBDV는 병원성과 항원성에 따라 Standard(classical), pathogenic, antigenic 및 vaccine subtype의 4그룹으로 분류한다. 표준주(Standard subtype)는 미국 Delaware주의 Gumboro지역에서 최초로 발병된 이래 현재 세계 각국에서 발병되고 있으며 감수성 있는 연령의 닭에서 30%까지 폐사를 일으킬 수 있으나 실제

*Corresponding author: Tae-Wook Hahn
School of Veterinary Medicine, Kangwon National University Chuncheon 200-701, Korea
[Tel: +82-33-250-8671, Fax: +82-33-244-2367, E-mail: twhahn@kangwon.ac.kr]

야외 발생 시에 폐사는 거의 문제가 되지 않고 6주령 이상에서는 거의 발병하지 않는다. 병원성 변이주(Pathogenic variant)는 1987년 네덜란드에서 최초로 발생한 후 유럽 [8, 13, 36]과 일본 [29], 그리고 국내에서 발병이 보고되었으며, 최근 남미 대륙에서도 새롭게 발병이 보고되었다 [12]. 이 바이러스는 혈청학적으로 표준주와 유사하나 병원성이 현격히 증가되어 감수성이 있는 SPF 닭의 경우 100%까지 폐사를 일으키며 7주령 이상의 닭에서도 병원성을 나타낸다. 항원성 변이주(Antigenic variant)는 1980년대부터 미국에서 보고되고 있는데 [18, 20, 31, 33] 이 바이러스는 항원성의 변화로 표준주를 이용하여 만든 생바이러스 백신이나 불활화 백신을 접종한 닭에서도 감염된다. 병원성은 약화되어 감수성이 있는 닭에 접종해도 뚜렷한 임상 증상을 보이지 않으며 F낭(Bursa of Fabricius)은 종대 과정 없이 바로 위축되는 병성과정을 밟는 특징이 있다 [18]. 백신주는 표준주 또는 병원성 변이주를 세포배양이나 종란에서 계대배양과정을 통하여 순화시킨 attenuated strain들로 세포배양에서 세포변성효과를 나타낸다.

IBDV의 genome 중 큰 분절인 segment A는 23개의 open reading frame(ORF)를 갖고 있으며 이 중 큰 ORF는 110kDa의 다 단백질로 번역된 후 viral protease인 VP4 [6]에 의해 cleavage되어 VP2(40 kDa), VP3(32 kDa), VP4(28 kDa)로 나누어진다 [4, 17]. 작은 ORF는 VP5 (17 kDa)로 발현되는데 [28] 최근 연구에서 이 비구조단백질은 병원성과 큰 관련이 있으며 감염세포의 apoptosis를 유도하는 것으로 알려지고 있다 [15, 38]. 작은 분절인 segment B는 viral RNA-dependent RNA polymerase인 VP1(98 kDa)으로 발현되는 것으로 알려져 있다 [4, 23]. 주요 구조 단백질 중의 하나인 VP2는 숙주 방어 항원으로 중화항체를 유도하는 항원부위를 포함하는 것으로 밝혀져 있다 [14]. VP2 gene의 염기서열은 대부분 보존되어 있지만 중화항체를 유도하는 것으로 알려진 중심부의 *Acc* I-*Spe* I 분절(205-350 amino acid)은 다양한 변이가 관찰되어 hypervariable region이라 부른다 [4]. 그 양쪽 끝 부위에는 친수성 부위(hydrophilic region)가 존재하는데, 이는 IBDV antigenic epitope의 구조 형성에 영향을 주어 항원성 및 병원성 변이의 원인으로 작용하는 것으로 보고되어있다 [16]. 표준주에 비하여 항원성 변이주 [35]와 병원성 변이주 [37]는 친수성 부위에 변이를 보여서 이 부위의 염기 서열 및 아미노산 서열의 분석은 야외 분리주 IBDV의 성상 파악 및 subtype 분류에 이용되고 있다 [10, 19].

VP2 유전자의 분석은IBDV의 성상을 파악하기 위해 474 bp 크기의 hypervariable region에 국한해서 다수 보고 되었으나 VP2 유전자 전체를 분석한 보고는 매우 드물다. 더구나 백신주의 경우에는 VP2 유전자 전체를 분석한 보고는 드물다. 본 연구에서는 국내분리주(SH/92)에서 증폭한 VP2 유전자를 Baculovirus expression system에서 발현시켰다. 발현된 VP2 단백질의 성상을 파악하기 위해서는 증폭된 VP2 유전자의 분석이 필요했다. 이와 더불어 현재 국내에서 사용되는 백신 중 Bur 706, Bursine-2, CEVAC 백신주의 VP2 유전자를 증폭하여 분석, 비교하였다.

Table 1. IBDV strains used for alignment and comparison of homology of nucleotides and amino acids with VP2 gene of SH/92, Bur706, Bursine-2 and CEVAC strains

Name of strain	Virulence	Countries isolated	Accession No. in GenBank	Reference
HK46	VV*	HongKong	AF092943	27
OKYM	VV	Japan	D49706	37
UPM94/273	VV	Malaysia	AF527039	24
SH95	VV	China	AY134874	34
KK1	VV	Korea	AF165150	25
K310	AV	Korea	AF165149	25
Variant-E	AV	U.S.A	AF133904	2
Variant-A	AV	U.S.A	M64285	26
Cu-1	A	Germany	D00867	4
CEF94	A	Netherlands	AF194428	7
STC	CV	U.S.A	D00499	23
52/70	CV	UK	D00869	4

*: VV = very virulent; AV = antigenic variant; A = attenuated; CV = classical virulent.

재료 및 방법

사용한 IBD virus

IBDV VP2 유전자를 증폭하기 위해 사용된 바이러스 중 국내분리주의 경우 1992년도에 분리된 vvIBDV(SH/92)를 국립수의과학검역원으로부터 분양받아 사용하였고 백신주의 경우 Burine-2(Intermediate vaccine strain)는 Fort Dodge Animal Health사 제품을, Bur 706(Attenuated vaccine strain)은 Merial사 제품을, CEVAC(Intermediate plus vaccine strain)은 Sanofi사 제품을 사용하였다. 염기 및 아미노산 서열을 비교 분석하기 위해 기존에 발표된 VP2 염기서열을 GenBank에서 받아 분석하였는데 이때 비교 분석한 IBDV는 Table 1과 같다.

Viral RNA 추출 및 정제

IBDV에서 RNA를 Kwon [25] 등이 보고한 방법에 따라 RNaid kit(BIO101, USA)를 사용하여 분리하였다. IBDV sample과 동량의 chloroform을 넣고 상하로 흔들며 5회 혼합한 후, 12,000 rpm에서 2분간 원심분리 한 후, 상층액을 새로운 tube에 옮겼다. 여기에 sodium dodecyl sulfate(SDS, final concentration 2% wt/vol)와 proteinase K(final concentration 250 μg/m*l*)를 첨가한 후, 55°C에서 5분간 반응시킨 후 Acid phenol(pH 4.0)과 chloroform:isoamyl alcohol(49 : 1)로 추출하였다. 추출된 RNA는 RNaid kit(BIO101)를 사용하여 제공된 실험방법에 따라 정제하였다. 분리된 RNA는 2배의 absolute ethanol과 섞은 후 −70°C에서 3~4시간 혹은 overnight동안 정치시킨 후, 4°C, 12,000 rpm으로 25분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 침전된 RNA pellet은 빙냉의 1 m*l*의 70% ethanol로 세척한 후 Speed-Vac에서 건조시킨 후 90% DMSO로 용해시켰다. 분리된 RNA를 98°C에서 5분간 처리 후, 즉시 얼음에서 2분 이상 처리하여 double-strand RNA virus를 predenaturation시킨 후 −20°C에 보관하여 template로 사용하였다.

RT/PCR을 이용한 IBDV의 증폭 및 확인

Primer의 제작

IBDV 표준주(STC) [23]의 염기서열 토대로 VP2유전자 증폭을 위한 forward 및 reverse primer를 제작하였다(VP2F: 5'-ATAT**GGTACC**AAACGATCGCAGCG**ATG**ACAAAC-3', VP2R: 5'-GACT**GAATTC**TCATGCTCTTGCTTTTCCTGACG-3'). 특히 baculovirus transfer vector인 pBacPAK8에 클로닝할 것을 고려하여 염기서열에서 밑줄로 표시한 것과 같이, VP2 유전자의 forward primer에는 *Kpn* I restriction site를 reverse primer에는 *EcoR* I site를 삽입하여 제작하였다.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

분리된 RNA 5 μ*l*에 random primers 1 μ*l*, 0.5 mM deoxynucleotide triphosphate(dNTP) 그리고 DDW 5 μ*l*을 넣고 65°C에서 5분간 반응시킨 후, 5X buffer, 0.005 M DTT, 40 U의 RNasin을 넣고 25°C에서 10분, 42°C에서 2분간 반응시켰다. 200 U의 Superscript™II RNase H-RT를 넣고 42°C에서 50분, 70°C에서 15분 반응시킨 후 2 U의 Ribonuclease H를 37°C에서 20분, 85°C에서 10분간 반응 시켜 IBDV의 cDNA를 합성하였다.

PCR은 총용량 50 μ*l*로 하여 10X PCR buffer 5 μ*l*, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.4 mM dNTPs, 20 pmole primers, 2 U Expand High Fidelity PCR System(Roche, USA), template cDNA 3 μ*l*를 첨가하여 초기 denaturation은 95°C에서 5분간하였고, 95°C에서 30초, 51°C에서 30초, 72°C에서 2분간의 amplification을 35회 반복한 후, 72°C에서 7분간 더 반응시켰다. 증폭된 PCR 생성물은 ethidium bromide를 함유한 1% agarose gel에서 전기영동 한 후 관찰하였으며 size marker로는 1 kb DNA ladder(GibcoBRL, USA)를 사용하였다.

VP2 유전자의 cloning

RT-PCR에 의해 증폭된 VP2 유전자를 1% agarose gel에서 전기영동 한 후 gel상에 나타난 band를 절단한 후 Geneclean turbo kit(BIO 101, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 증폭된 VP2 유전자의 염기서열을 확인하기 위하여 PCR 2.1 TOPO vector system을 이용하여 cloning 한 후 예상되는 제한 효소 절편 패턴을 통해 VP2 유전자가 삽입된 재조합 plasmid를 얻었다. RT-PCR 또는 cloning시 염기서열이 변화될 수 있는 점을 감안해서 각 IBDV주 당 두 개 내지 세 개의 재조합 plasmid를 분리 정제한 후 염기서열을 분석하였다.

DNA 염기서열은 automatic DNA sequencer(long read IR4200, Li-cor, U.S.A)로 분석하였다. 분석된 IBDV 분리주 및 백신주의 염기서열을 DNASIS version 7.0 software(Hitachi Software Engineering, Japan)를 이용하여 기존에 발표된 IBDV 염기서열과 분석하였고, 다양한 IBDV strain간 구조 단백질의 유전적인 연관성을 알아보기 위하여 phylogenetic tree를 작성하였다.

결 과

IBDV의 RT-PCR

IBDV 백신주인 Bur-706, Bursine-2, CEVAC strain과

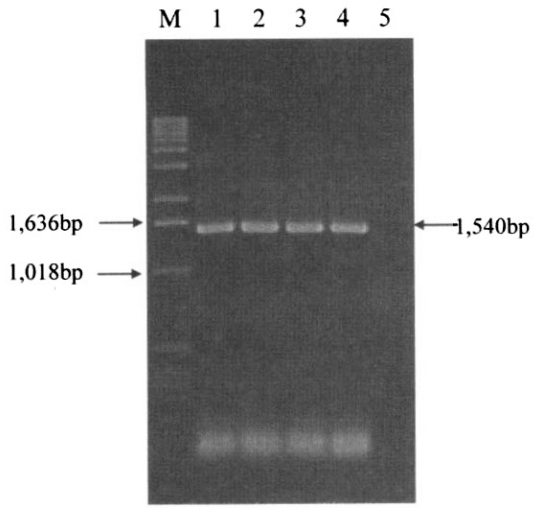


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products from the VP2 gene of the IBD vaccine strains and field isolates. Lanes M, 1 kb DNA ladder (GibcoBRL); 1, SH/92; 2, Bur706; 3, Bursine 2; 4, CEVAC; 5, negative. Numbers of left is molecular weight marker in kilobase pairs. Number at right is molecular weight in base pairs of PCR products of IBD strains used in this study.

국내분리주 SH/92의 RNA를 template로 하여 VP2F/VP2R primer을 사용하여 RT/PCR로 증폭하였을 때 3가지 백신주와 SH/92 분리주에서 약 1,540 bp 크기의 PCR product가 생성 되었다(Fig. 1).

염기 및 아미노산 서열 분석

증폭한 국내분리주 SH/92와 백신주 Bur-706, Bursine-2, 및 CEVAC 백신주의 VP2 PCR 절편을 TOPO vector에 클로닝 한 후 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기와 아미노산 서열은 이미 발표된 IBDV와 비교하였다(Fig. 1, 2). 비교 분석한 IBDV를 분류해보면 국내분리주 SH/92 및 HK46, SH95, OKYM와 UPM94/273과 국내분리주 KK1 등 강병원성주 6주와 variant E, variant A, K310 등 항원성 변이주 3주, 그리고 Cu-1, Bur706, CEF94 등 attenuated strain 등 3주, Bursine-2, CEVAC 두 가지 intermediate strain 2주, 52/70, STC 등의 표준주 2주 등 총 16주이다. 이들 16주의 VP2 gene의 염기 서열과 아미노산 서열은 각각 Fig. 2와 Fig. 3에, 염기 및 아미노산 서열의 상동성은 Table 2에 각각 나타냈다.

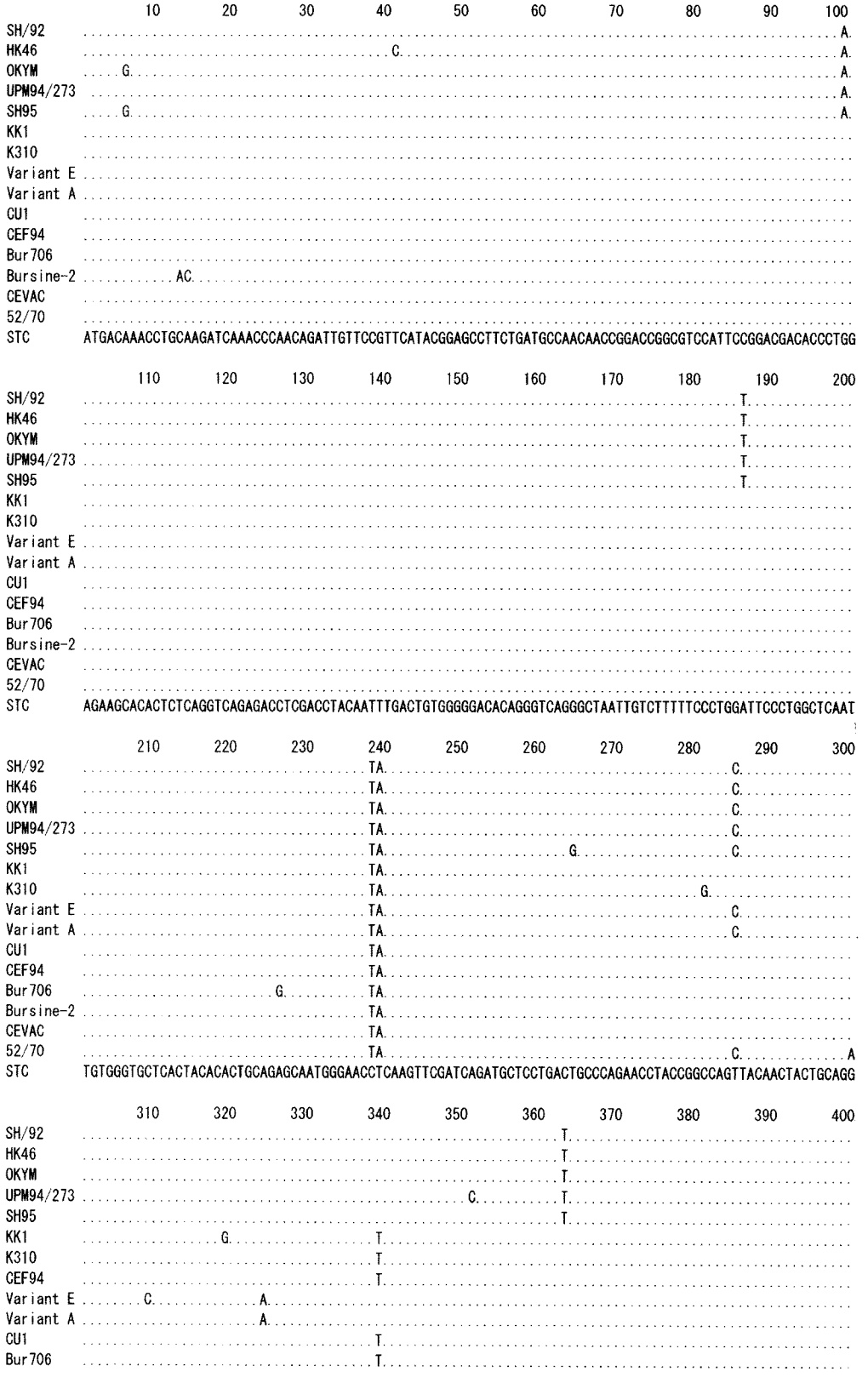
염기서열 비교분석에서 국내분리주인 SH/92는 백신주인 Bur706, Bursine-2, CEVAC strain과 각각 54, 58, 53개의 큰 염기차이를 나타냈고 다른 국내 분리주인 KK1,

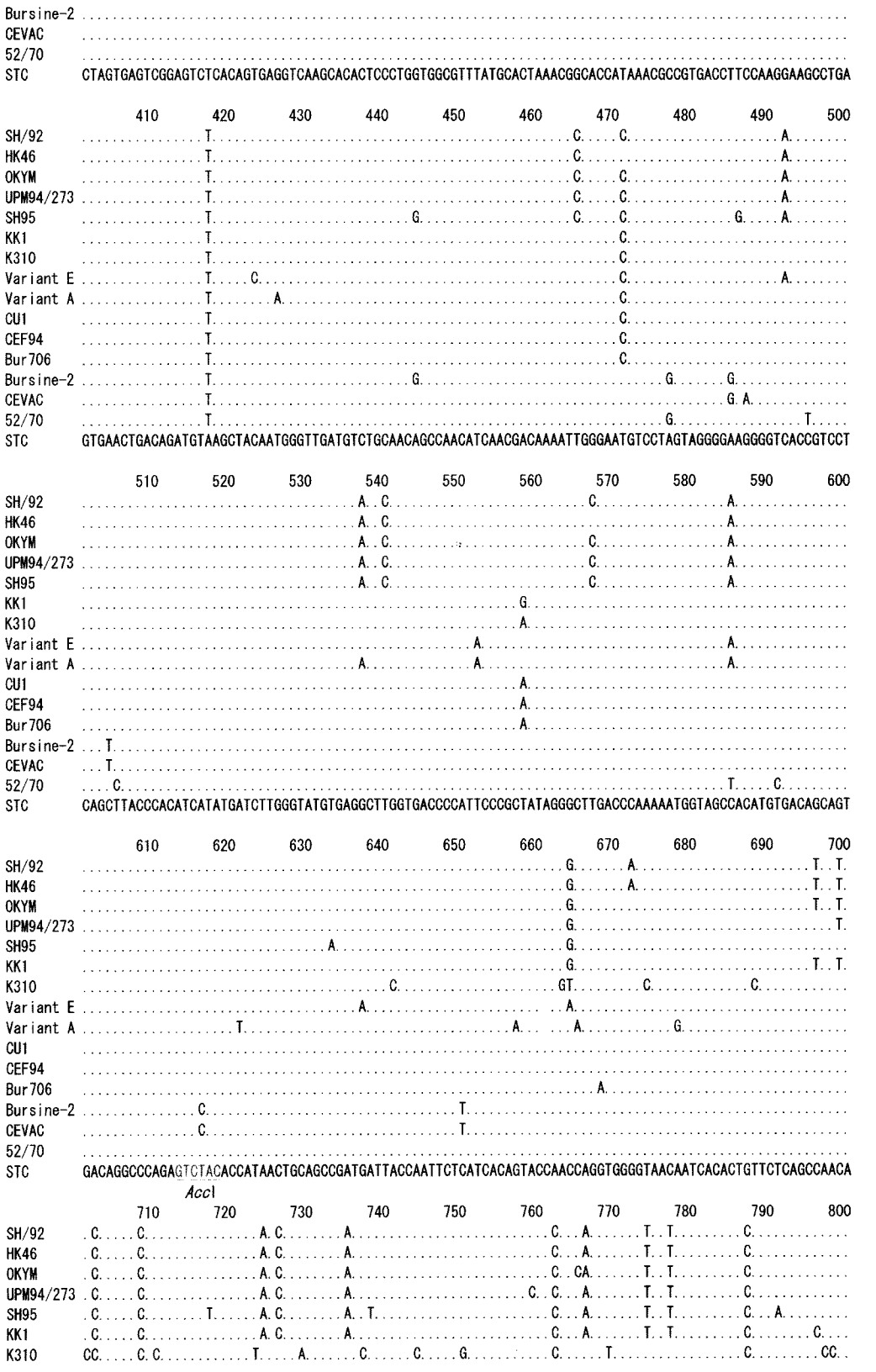
Table 2. Comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences of VP2 gene of IBDV strains

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
1		99.4**	99.6	99.2	99.4	99.0	94.8	96.8	98.0	97.6	97.8	97.2	96.6	97.4	98.6	97.6	1	SH/92
2	99.1*		99.8	99.4	99.6	99.2	94.6	96.6	97.6	97.4	97.6	97.2	96.6	97.8	97.4	96.8	2	HK46
3	99.3	98.9		99.6	99.8	99.4	95.0	96.8	97.8	97.6	97.8	97.2	97.0	98.0	99.0	98.0	3	OKYM
4	99.1	98.9	99.0		99.4	99.0	95.0	96.8	97.8	97.4	97.4	97.2	96.8	97.8	98.6	97.8	4	UPM94/273
5	98.7	99.6	99.1	98.6		99.2	94.6	96.6	97.6	97.4	97.6	97.0	97.0	98.0	98.8	97.8	5	SH95
6	98.1	97.9	98.2	97.9	97.7		94.6	96.2	97.2	97.2	97.8	96.8	96.4	97.6	98.6	97.4	6	KK1
7	94.5	94.2	94.2	94.5	94.0	94.8		94.6	95.6	95.4	95.4	95.2	94.4	94.8	95.6	95.6	7	K310
8	96.3	95.7	95.8	95.8	95.6	95.8	95.3		98.8	97.0	97.2	96.8	96.4	96.6	97.6	97.0	8	Variant E
9	96.5	96.1	96.3	96.2	96.1	96.1	95.1	97.7		98.0	98.2	97.8	97.4	97.4	98.6	98.4	9	Variant A
10	963	95.9	95.9	96.0	95.7	96.5	96.3	96.8	96.9		99.2	99.0	97.8	97.8	98.6	98.4	10	Cu-1
11	96.5	96.1	96.1	96.2	95.9	96.7	96.3	96.3	97.1	99.5		99.0	97.6	97.6	98.8	98.2	11	CEF-94
12	96.4	96.0	96.0	96.1	95.8	96.5	96.4	96.9	96.9	99.5	99.6		97.4	97.6	98.4	98.2	12	Bur706
13	96.1	95.9	95.9	95.8	95.8	96.1	95.6	96.7	96.9	97.4	97.5	97.5		98.4	98.0	97.8	13	Bursine2
14	96.5	96.3	96.1	96.1	95.9	96.5	95.7	96.7	96.9	97.7	97.7	97.7	98.5		98.6	98.2	14	CEVAC
15	96.4	96.2	96.2	96.3	95.9	96.3	95.8	96.9	97.0	97.4	97.6	97.5	97.6	97.7		99.0	15	52/70
16	96.5	96.5	96.3	96.3	96.1	96.7	95.8	96.9	97.3	97.9	97.9	97.9	97.9	98.8	97.9		16	STC
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		

* : Percent homology of nucleotide sequences.

** : Percent homology of amino acid sequences.


10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
SH/92 ..... A.
HK46 ..... C. ..... A.
OKYM ..... G. ..... A.
UPM94/273 ..... A.
SH95 ..... G. ..... A.
KK1 .....
K310 .....
Variant E .....
Variant A .....
CU1 .....
CEF94 .....
Bur706 .....
Bursine-2 ..... AC. .....
CEVAC .....
52/70 .....
STC ATGACAAACCTGCAAGATCAAACCCAACAGATTGTTCCGTTCATACGGAGCCTTCTGATGCCAACAACCGGACCGGCGTCCATTCCGGACGACACCCTGG
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
SH/92 ..... T. .....
HK46 ..... T. .....
OKYM ..... T. .....
UPM94/273 ..... T. .....
SH95 ..... T. .....
KK1 .....
K310 .....
Variant E .....
Variant A .....
CU1 .....
CEF94 .....
Bur706 .....
Bursine-2 .....
CEVAC .....
52/70 .....
STC AGAAGCACACTCTCAGGTCAGAGACCTCGACCTACAATTTGACTGTGGGGGACACAGGGTCAGGGCTAATTGTCTTTTTCCCTGGATTCCCTGGCTCAAT
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
SH/92 ..... TA. ..... C. .....
HK46 ..... TA. ..... C. .....
OKYM ..... TA. ..... C. .....
UPM94/273 ..... TA. ..... C. .....
SH95 ..... TA. ..... G. ..... C. .....
KK1 ..... TA. .....
K310 ..... TA. ..... G. .....
Variant E ..... TA. ..... C. .....
Variant A ..... TA. ..... C. .....
CU1 ..... TA. .....
CEF94 ..... TA. .....
Bur706 ..... G. ..... TA. .....
Bursine-2 ..... TA. .....
CEVAC ..... TA. .....
52/70 ..... TA. ..... C. ..... A
STC TGTGGGTGCTCACTACACACTGCAGAGCAATGGGAACCTCAAGTTCGATCAGATGCTCCTGACTGCCCAGAACCTACCGGCCAGTTACAACTACTGCAGG
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
SH/92 ..... T. .....
HK46 ..... T. .....
OKYM ..... T. .....
UPM94/273 ..... C. ..... T. .....
SH95 ..... T. .....
KK1 ..... G. ..... T. .....
K310 ..... T. .....
CEF94 ..... T. .....
Variant E ..... C. ..... A. .....
Variant A ..... A. .....
CU1 ..... T. .....
Bur706 ..... T. .....

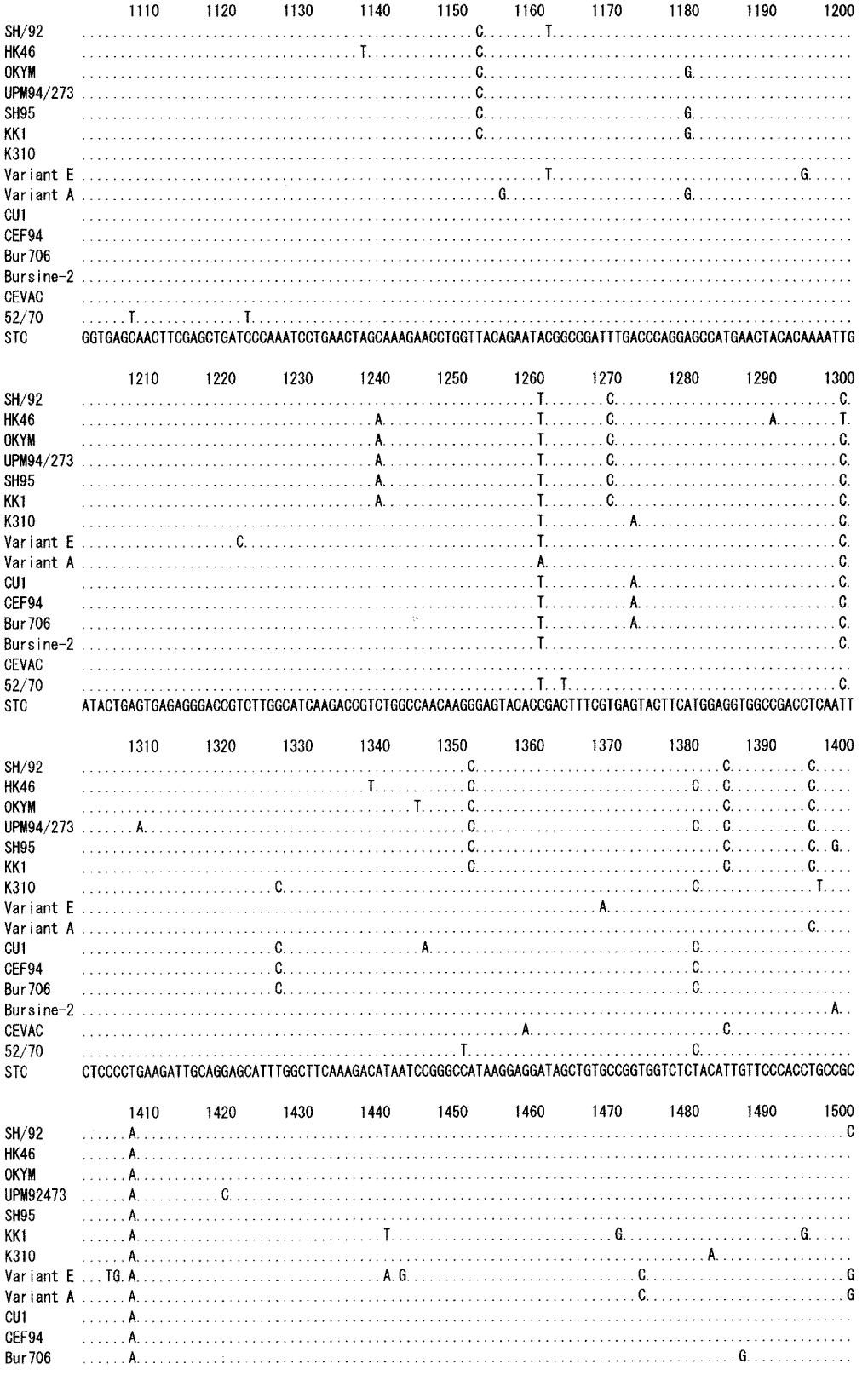

Bursine-2
CEVAC
52/70
STC CTAGTGAGTCGGAGTCTCACAGTGAGGTCAAGCACACTCCCTGGTGGCGTTTATGCACTAAACGGCACCATAAACGCCGTGACCTTCCAAGGAAGCCTGA
410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
SH/92
HK46
OKYM
UPM94/273
SH95
KK1
K310
Variant E
Variant A
CU1
CEF94
Bur706
Bursine-2
CEVAC
52/70
STC GTGAACTGACAGATGTAAGCTACAATGGGTTGATGTCTGCAACAGCCAACATCAACGACAAAATTGGGAATGTCCTAGTAGGGGAAGGGGTCACCGTCCT
510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
SH/92
HK46
OKYM
UPM94/273
SH95
KK1
K310
Variant E
Variant A
CU1
CEF94
Bur706
Bursine-2
CEVAC
52/70
STC CAGCTTACCCACATCATATGATCTTGGGTATGTGAGGCTTGGTGACCCCATTCCCGCTATAGGGCTTGACCCAAAAATGGTAGCCACATGTGACAGCAGT
610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
SH/92
HK46
OKYM
UPM94/273
SH95
KK1
K310
Variant E
Variant A
CU1
CEF94
Bur706
Bursine-2
CEVAC
52/70
STC GACAGGCCCAGAGTCTACACCATAACTGCAGCCGATGATTACCAATTCTCATCACAGTACCAACCAGGTGGGGTAACAATCACACTGTTCTCAGCCAACA
AccI
710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
SH/92
HK46
OKYM
UPM94/273
SH95
KK1
K310

```
Variant E .....C.....T.....CA.....A.C.....G.C.....
Variant A .....C.....T.....A.....A.C.....C.....
CU1 .....C.....C.C.....C.C.....
CEF94 .....C.....C.C.....C.C.....
Bur706 .....C.....C.C.....C.C.....
Bursine-2 .....T.....C.....
CEVAC .....T.....C.....
52/70 .....A.....C.....
STC TTGATGCTATCACAAGCCTCAGCGTTGGGGGAGAGCTCGTGTTTCAAACAAGCGTCCAAGGTCTTGTACTGGGCGCCACCATCTACTTTATAGGCTTTGA

                 810       820       830       840       850       860       870       880       890       900
SH/92 .....G.....A.....A.....A.....T.....C.....A.....G....
HK46 .....G.....T..A.....A.....T.....C.....A.....G....
OKYM .....G.....A.....A.....T.....C.....A.....G....
UPM94/273 .....GA.....A.....A.....T.....C.....A.....C.....G....
SH95 .....G.....A.....A.....T.....C.....A.....G....
KK1 .....G....G.....A.....A.....T.....C...G.....A.....G....
K310 ....T.C.....G.C.....A.....T..GA.....C...T.....T.....
Variant E .....G.....A.....T.....T...
Variant A .....G.....T..A.....A.....A.....T.....T...
CU1 .....A.....T...A.....A.....C.....T....A.....
CEF94 .....AG.....A.....A.....C...T.....A.....
bur706 .....A.....A.....A.....C.....A.....
bursine-2 .....A.....T.....TA.....T.....
CEVAC .....A.....
52/70 .....G.....A.....T.....C.....T...
STC TGGGACTACGGTAATCACCAGGGCTGTGGCCGCAGACAATGGGCTGACGGCCGGCACCGACAATCTTATGCCATTCAATCTTGTGATTCCAACCAACGAG

                 910       920       930       940       950       960       970       980       990      1000
SH/92 .....A.....T....G.....A.....
HK46 .....A.....T....G.....A.....
OKYM .....A.....T....G.....A.....
UPM94/273 .....A.....T....G.....A.....
SH95 .....G.....A.....T....G.....A.....
KK1 .....A.....T....G.....A.....
K310 .....T.....T.....G.....A.....C...C..T....T....C.....C...
Variant E .....A.....A...T.....A.....
Variant A .....G.....A.....A...T.....
CU1 .....A.....T.....AA.....
CEF94 .....A.....T.....G.....A.....
Bur706 .....A.....T.....A.....
Bursine-2 .....A.....C..T.....C.....
CEVAC .....T.....A.....C.....
52/70 .....A.....T.....
STC ATAACCCAGCCAATCACATCCATCAAACTGGAGGTAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGCCAGGCAGGGGATCAGATGTCATGGTCGGCAAGTGGGAGCCTAG

                1010      1020      1030      1040      1050      1060      1070      1080      1090      1100
SH/92 .....T.....C..
HK46 .....T.....C..
OKYM .....C.....G..T.....C..
UPM94/273 .....T.....T.....C..
SH95 .....G..T.....C..
KK1 .....C.....T.....
K310 ...C...A..T..T.....A.....T.....T.....T.....
Variant E .....T.....A.....G.....T.....
Variant A .....T.....T.....C..
CU1 .....T.....G....G.....
CEF94 .....T.....G....G.....
Bur706 .....T.....G....G.....
Bursine-2 .....A....T.....C..
CEVAC .....T.....
52/70 .....T.....
STC CAGTGACGATCCACGGTGGCAACTATCCAGGGGCCCTCCGTCCCGTCACACTAGTAGCCTACGAAAGAGTGGCAACAGGATCCGTCGTTACGGTCGCTGG
                                                  SpeI
```


1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
SH/92 C. T.
HK46 T. C.
OKYM C. G.
UPM94/273 C.
SH95 C. G.
KK1 C. G.
K310
Variant E T. G.
Variant A G. G.
CU1
CEF94
Bur706
Bursine-2
CEVAC
52/70 T. T.
STC GGTGAGCAACTTCGAGCTGATCCCAAATCCTGAACTAGCAAAGAACCTGGTTACAGAATACGGCCGATTTGACCCAGGAGCCATGAACTACACAAAATTG
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
SH/92 T. C. C.
HK46 A. T. C. A. T.
OKYM A. T. C. C.
UPM94/273 A. T. C. C.
SH95 A. T. C. C.
KK1 A. T. C. C.
K310 T. A. C.
Variant E C. T. C.
Variant A A. C.
CU1 T. A. C.
CEF94 T. A. C.
Bur706 T. A. C.
Bursine-2 T. C.
CEVAC
52/70 T. T. C.
STC ATACTGAGTGAGAGGGACCGTCTTGGCATCAAGACCGTCTGGCCAACAAGGGAGTACACCGACTTTCGTGAGTACTTCATGGAGGTGGCCGACCTCAATT
1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
SH/92 C. C. C.
HK46 T. C. C. C. C.
OKYM T. C. C. C.
UPM94/273 A. C. C. C. C.
SH95 C. C. C. G.
KK1 C. C. C.
K310 C. C. T.
Variant E A.
Variant A C.
CU1 C. A. C.
CEF94 C. C.
Bur706 C. C.
Bursine-2 A.
CEVAC A. C.
52/70 T. C.
STC CTCCCCTGAAGATTGCAGGAGCATTTGGCTTCAAAGACATAATCCGGGCCATAAGGAGGATAGCTGTGCCGGTGGTCTCTACATTGTTCCCACCTGCCGC
1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
SH/92 A. C
HK46 A.
OKYM A.
UPM92473 A. C.
SH95 A.
KK1 A. T. G. G.
K310 A. A.
Variant E TG. A. A. G. C. G
Variant A A. C. G
CU1 A.
CEF94 A.
Bur706 A. G.

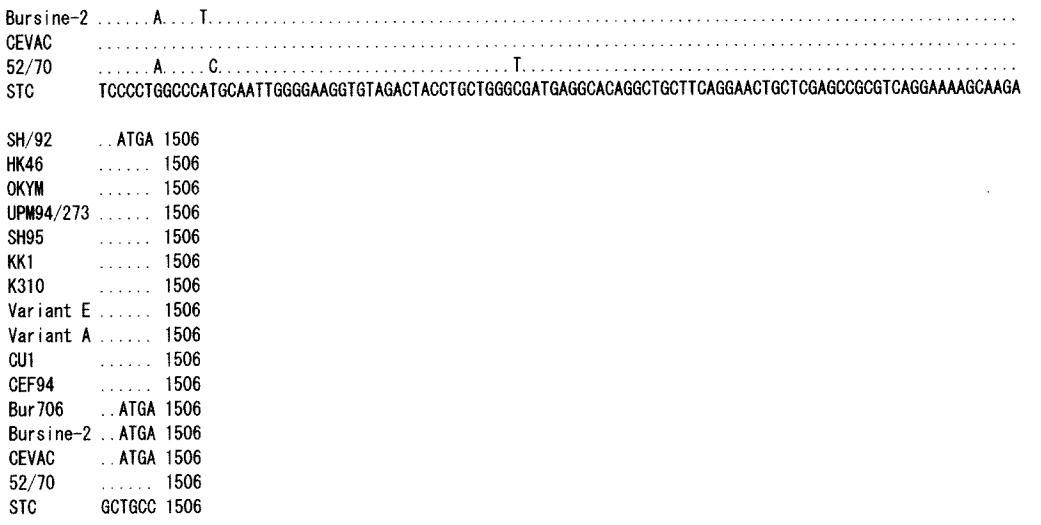


Fig. 2. Nucleotide sequences of VP2 region of 16 IBDV strains. IBDV strains for comparison include vaccine strain (Bur706, Bursine2, and CEVAC) vvIBDV strains (HK46, OKYM, UPM94/273 and SH95), attenuated strains (Cu-1 and CEF94), Korean field isolates (SH/92, KK1, K310), antigenic variant (variant-A and E) and classical virulent strain (STC and 52/70). The sequences are compared with STC sequence. A dot indicates a position where the sequence is identical that of STC while nucleotide changes are indicated. The *Acc*I and the *Spe*I restriction sites flanking the variable domain are underlined.

K310과 각각 28, 83개의 염기차이를 나타냈으며 classical virulent strain인 52/70과 STC strain과는 각각 54, 52개의 염기차이를 나타내었다(Fig. 2). 염기서열 상동성에서 강병원성 바이러스주간에는 97.7~99.6%의 상동성을 보였으며 항원성 변이주간에는 95.1~97.7%의 상동성을 보였다(Table 2). 한편 강병원성주와 항원성 변이주간에는 94.0~96.5%의 상동성을 보였다. 국내분리 항원성 변이주인 K310주와 이들간의 상동성은 94.0~94.8%을 보였다. 국내분리주 SH/92와 강병원성주 및 항원성 변이주간의 상동성은 각각 98.1~99.3%, 94.5~96.5%의 상동성을 보여 비교한 강병원성주와 유사한 상동성을 보였다. 국내분리주SH/92와 백신주인 Bur706, Bursine-2, CEVAC의 상동성은 각기 96.4, 96.1, 96.5%를 보였으며 백신주간에는 95.4~97.7%를 보였다. SH/92와 classical virulent strain인 52/70과 STC strain과는 각각 96.4, 96.5%의 상동성을 보였다. 국내분리주(SH/92, KK1, K310)와 백신주(Bur706, Bursine-2, CEVAC)는 94.4~97.6%의 상동성을 보였다.

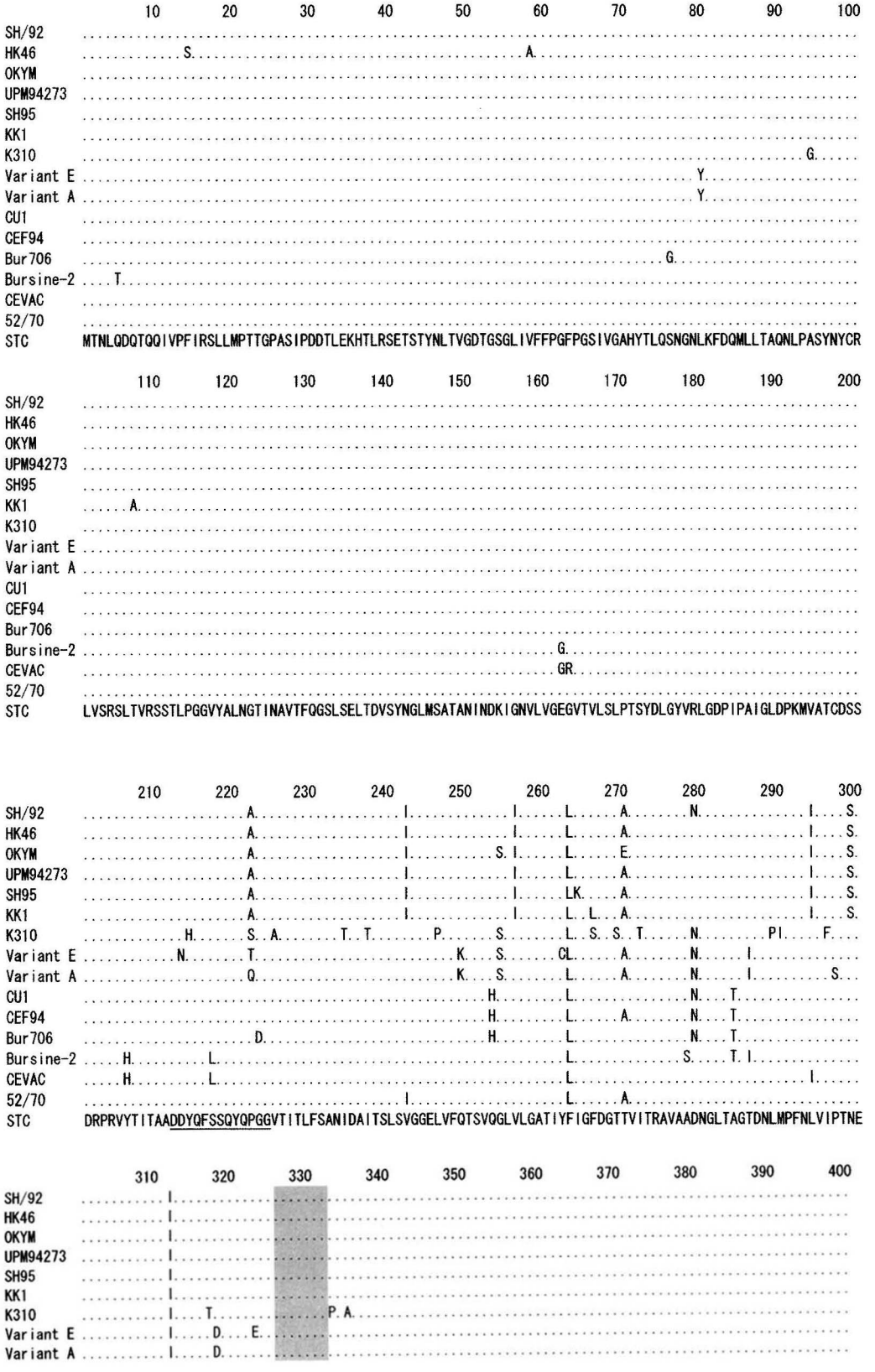
VP2 gene의 아미노산 서열을 기준으로 한 상동성 비교에서 국내분리주인 SH/92는 외국 백신주인 Bur706, Bursine-2, CEVAC strain과 각각 14개, 17개, 13개의 차이를 나타내어 96.1~96.5%의 상동성을 나타내었고 백신주들 간에는 97.4~98.4%의 상동성을 나타내었다(Fig. 3 & Table 2). 분리주SH/92와 vvIBDV인 HK46, OKYM, KK1, UPM94/273, SH95 strain과의 상동성은 99.0~99.6%의 높은 상동성을 나타내었고 classical virulent strain인 52/70과 STC strain과는 각각 7개, 12개의 차이를 나타내어 각각 98.6및 97.6%의 상동성을 나타냈다.

국내분리주(SH/92, K1, K310) 및 미국 변이주(DELE)에서 보존되었던 serine-rich heptapeptide는 백신주 중에서 CEVAC과 Bursine-2에서 보존되었고 Cu-1 strain은 330(S → K)에서, CEF94와 Bur706 strain은 330(S → R)에서 아미노산의 변환을 나타냈다.

VP2 아미노산 서열을 바탕으로 한 phylogenetic tree를 작성한 결과 SH/92 strain은 vvIBDV인 HK46, OKYM, KK1, UPM94/273, SH95 strain등과 동일한 그룹으로 분류되었다. 백신주인 CEVAC와 Bursine-2 및 Bur706은 STC strain과 한 계통으로 분류되었다(Fig. 4).

고 찰

IBDV의 단백질 중 VP2는 방어에 관여하는 항체를 유도하는 항원 결정기를 최소한 세 개 이상을 포함 하고 있기 때문에 subunit백신을 개발할 때 주요한 목적 단백질이다 [3, 5]. 더구나 대부분의 아미노산 서열의 변화가 VP2 단백질의 중간 부위에 있는 hyper-variable region에서 나타나며 이러한 변화는 serotype I IBDV 중 병원성 변이주 또는 항원성 변이주 등으로 구별하는데 중요한 지표가 된다 [38]. 따라서 지금까지는 염기서열분석의 편의상 주로 IBDV의 VP2유전자중 hypervariable region


10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
SH/92
HK46 S. A.
OKYM
UPM94273
SH95
KK1
K310 G.
Variant E Y.
Variant A Y.
CU1
CEF94
Bur706 G.
Bursine-2 T.
CEVAC
52/70
STC MTNLQDQTQQIVPFIRSLLMPTTGPASIPDDTLEKHTLRSETSTYNLTVGDTGSGLIVFFPGFPGSIVGAHYTLQSNGNLKFDQMLLTAQNLPASYNYCR
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
SH/92
HK46
OKYM
UPM94273
SH95
KK1 A.
K310
Variant E
Variant A
CU1
CEF94
Bur706
Bursine-2 G.
CEVAC GR.
52/70
STC LVSRSLTVRSSTLPGGVYALNGTINAVTFQGSLSELTDVSYNGLMSATANINDKIGNVLVGEGVTVLSLPTSYDLGYVRLGDPIPAIGLDPKMVATCDSS
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
SH/92 A. I. I. L. A. N. I. S.
HK46 A. I. I. L. A. I. S.
OKYM A. I. S. I. L. E. I. S.
UPM94273 A. I. I. L. A. I. S.
SH95 A. I. I. LK. A. I. S.
KK1 A. I. I. L. L. A. I. S.
K310 H. S. A. T. T. P. S. L. S. S. T. N. PI. F.
Variant E N. T. K. S. CL. A. N. I.
Variant A Q. K. S. L. A. N. I. S.
CU1 H. L. N. T.
CEF94 H. L. A. N. T.
Bur706 D. H. L. N. T.
Bursine-2 H. L. L. S. T. I.
CEVAC H. L. L. I.
52/70 I. L. A.
STC DRPRVYTITAADDYQFSSQYQPGGVTITLFSANIDAITSLSVGGELVFQTSVQGLVLGATIYFIGFDGTTVITRAVAADNGLTAGTDNLMPFNLVIPTNE
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
SH/92 I.
HK46 I.
OKYM I.
UPM94273 I.
SH95 I.
KK1 I.
K310 I. T. P. A.
Variant E I. D. E.
Variant A I. D.

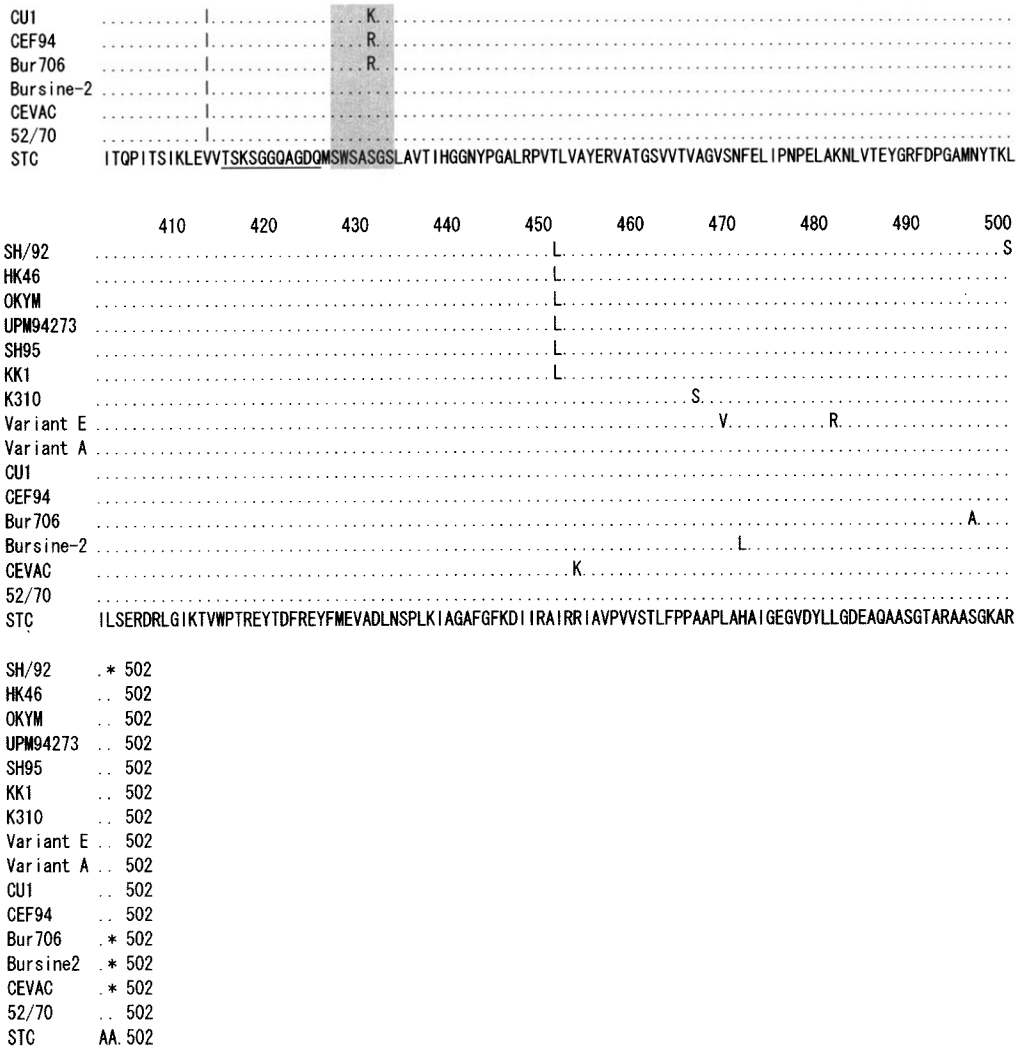


Fig. 3. Deduced amino acid sequences of VP2 region of 16 IBDV strains. IBDV strains for comparison include vaccine strain (Bur706, Bursine2, and CEVAC) vvIBDV strains (HK46, OKYM, UPM94/273 and SH95), attenuated strains (Cu-1 and CEF94), Korean field isolates (SH/92, KK1, K310), antigenic variant (variant-A and E) and classical virulent strain (STC and 52/70). The sequences are compared with STC sequence. A dot indicates a position where the sequence is identical that of STC while amino acid changes are indicated. Two hydrophilic regions (212-224, 314-324) are underlined and the serine-rich heptapeptide (326-332) is shaded.

을 중심으로 염기서열의 분석이 이루어져 왔다. 그러나 약 1,540 bp 크기의 VP2의 유전자는 RT-PCR에 의해 증폭이 용이하지 않다. 또한 PCR 과정에서 *Taq* polymerase 증폭시 낮은 확률이지만 유전적 변이가 일어날 수도 있다. 유전자 재조합 기술에 의해 발현된 VP2의 유전자의 분석은 발현되는 VP2가 원래의 VP2 단백질과 동일한지를 확인하기 위해 필요하다. 본 연구에서는 SH/92 국내분리주(vvIBDV) VP2 유전자와 더불어 국내에서 사용중인 세가지 종류의 백신주인 Bur706, Bursine-2 및 CEVAC주의 VP2 유전자를 증폭하여 VP2 전체 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 분석하였다. 국내분리주 SH/92의 경우 기존에 권 등(2000)이 VP2 gene을 포함하는 polyprotein gene(senment A) 염기서열을 분석 보고 하였으나 이들 세가지 백신주의 VP2 유전자 전체 염기서열이 분석이 되지 않았기에 의미가 있다고 판단된다.

국내분리주 SH/92의 VP2의 염기서열은 기존에 발표된 VP2 gene 염기서열과 동일한 것으로 나타났다 [25]. 또한 VP2 gene에서도 각 바이러스주간의 차이가 크게 나타나는 부위가 hypervariable region(*Acc*I과 *Spe*I사이)인 것으로 나타나 기존의 보고와 일치한다.

VP gene의 염기서열 비교분석에서 국내분리주인 SH/92는 외국 백신주인 Bur706, Bursine-2, CEVAC strain과

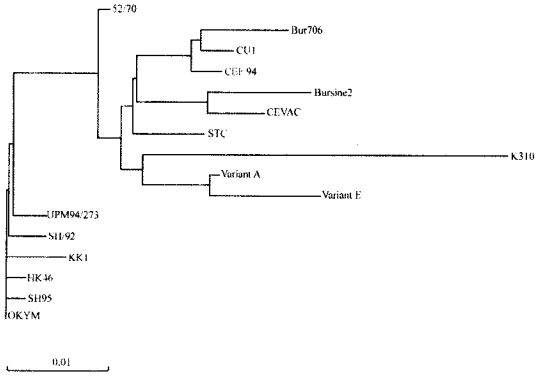


Fig. 4. Phylogenetic tree analyzed based on deduced amino acid sequences of the VP2 gene of 16 IBDV strains denoted from Fig. 3.

각각 54, 58, 53개의 큰 염기차이를 나타냈으며 SH/92와 외국 백신주인 Bur706, Bursine-2, CEVAC의 상동성은 각기 96.4, 96.1, 96.5%를 보였으며 백신주간에는 95.4~97.7%를 보였다. 아미노산 서열을 기준으로 한 상동성 비교에서 국내분리주인 SH/92는 외국 백신주인 Bur706, Bursine-2, CEVAC strain과 각각 14개, 17개, 13개의 차이를 나타내어 96.1~96.5%의 상동성을 나타내었고 백신주들간에는 97.4~98.4%의 상동성을 나타내었다. 아미노산 서열을 기초로 하여 phylogenetic tree를 그려본 결과 SH/92는 강병원성의 KK1과 동일한 그룹으로 분류되고 Bursine-2, Bur706및 CEVAC백신주는 STC와 한 그룹으로 나타나나 두 그룹간은 갈라지는 것으로 나타났다.

병원성 IBDV에서 보존되는 것으로 알려진 serine-rich heptapeptide인 SWSASGS는 백신주 중에서 intermediate 백신주인 CEVAC과 Bursine-2에서 보존되었고, attenuated 백신주인 Bur706 주에서는 330(S → R)에서 아미노산의 변환을 나타냈다. 따라서 이 부위의 보존과 병원성과의 관련성을 암시하고 있다.

Serotype I IBDV 중 standard strain 또는 classical strain과 비교시 highly virulent strain 또는 variant strain들의 공통적인 아미노산 서열의 치환은 구조결정기(conformational epitope)로 neutralizing antigenic determinants가 있는 hypervariable region의 아미노산 서열 206-305에 집중적으로 나타나는 것으로 보고되고 있다 [32, 37, 39]. 이 부위는 Fig. 3에서 제시된 것처럼 2개의 major hydrophilic region(residues 212-224와 314-324)과 그 사이에 2개의 minor hydrophilic region(residues 248-252와 279-290)이 위치하고 있으며 minor hydrophilic region이 항원성에 결정적인 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다 [39]. STC strain으로 대표되는 IBDV standard strain과 비교 시 유럽, 일본, 중국에서 분리한 highly virulent IBDV는 공통적으로 aa residue 222은 P → A로, aa residue 256은 V → I로, aa residue 294은 L → I로 변환되어 있어 vvIBDV strain의 특이적인 대치로 간주되고 있다 [9, 39]. 본 연구에서 조사한 SH/92의 경우 aa residue 222은 P → A로, aa residue 256에서 V → I로, aa residue 294는 L → I로 변환되어있어 현재까지 보고된 highly virulent IBDV strain들과 완전히 일치하는 성상을 보여주었다. 그러나 백신주중에서는 CEVAC에서만 aa residue 294이 L → I로 변환되어있어 어느 정도 병원성의 존재 가능성을 확인하였다 [10].

국내의 경우 IBD가 1980년도 처음 보고된 이 후 [1] 백신프로그램의 진보에도 불구하고 IBD는 계속 발생하고 있어 양계산업에 큰 피해를 주고 있다. 새로운 강병원성 IBDV의 출현으로 이를 예방하기 위해 생바이러스 백신도 attenuated strain에서 intermediate strain을 사용하고 있지만 때로는 이러한 백신주가 중등도의 F낭의 위축을 일으켜 면역억제상태를 유발하곤 한다. 따라서 보다 안전하고 강병원성 IBDV에도 효과적인 면역을 유발할 수 있는 백신의 개발이 필요하다. 본 연구에서 분석된 VP2 유전자는 baculvirus system에서 VP2 단백질로 발현되는 것이 확인되었다. 발현된 재조합 VP2 단백질이 백신으로서의 사용하기 위해서는 많은 연구가 뒤따라야 할 것이다.

결 론

IBDV SH/92 국내분리주와 Bur706, Bursine-2 및 CEVAC 백신주의 VP2 gene을 RT-PCR로 증폭시킨 후 염기서열을 결정하고 기존에 발표된 IBDV염기 및 아미노산 서열과 비교 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 염기서열 비교 분석에서 사용중인 백신주와 국내분리주(SH/92, KK1, K310)과는 95.6~96.5%의 상동성을 보였고 백신주간에는 97.5~98.5%를 보였다. 아미노산 서열 비교 분석에서 국내에서 사용중인 백신주와 국내 분리주와는 94.4~97.6%의 상동성을, 백신주들 간에는 서로 97.4~98.4%의 상동성을 나타내었다.

2. 국내분리주 SH/92와 강병원성주 및 항원성 변이주간의 상동성은 각기 98.1~99.3%, 94.5~96.5%의 상동성을 보여 비교적 강병원성주와 유사한 상동성을 보였다. SH/92와 classical virulent strain인 52/70과 STC strain과는 각각 96.4, 96.5%의 상동성을 보였다.

3. 아미노산 서열의 비교분석에서 두 hydrophilic region에서 국내분리주(SH/92, K1, K310) 및 미국변이주(DELE)에서 보존되었던 serine-rich heptapeptide는 백신주 중에서 CEVAC과 Bursine2 strain에서만 보존되었다.

4. 아미노산 서열을 바탕으로 한 phylogenetic tree분석

에서 SH/92 분리주는 vv IBDV인 HK46, OKYM, KK1, UPM94/273, SH95 strain과 한 계통으로 분류되었고 Bur706, CEVAC과 Bursine-2 백신주는 STC strain과 한 계통으로 분류되었다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

1. **이영옥, 김순재, 최정옥, 김순복, 전우상, 박근식.** Infectious bursal disease virus의 감염상황 및 분리주의 생물학적 특성. 가축위생연구소 시험연구보고서 1980, 182-200.
2. **Akin A, Wu CC, Lin TL.** Amplification and cloning of infectious bursal disease virus genomic RNA segments by long and accurate PCR. J Virol Methods 1999, **82,** 55-61.
3. **Azad AA, Jagadish MN, Brown MA, Hudson PJ.** Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. Virology 1987, **161**, 145-152.
4. **Bayliss CD, Spies U, Shaw K, Peters RW, Papageorgiou A, Müller H, Boursnell ME.** A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. J Gen Virol 1990, **71**, 1303-1312.
5. **Becht H, Muller H, Muller HK.** Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. J Gen Virol 1988, **69**, 631-640.
6. **Birghan C, Mundt E, Gorbalenya AE.** A non-canonical lon proteinase lacking the ATPase domain employs the Ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. EMBO J 2000, **19**, 114-123.
7. **Boot HJ, ter Huurne AA, Peeters BP, Gielkens AL.** Efficient rescue of infectious bursal disease virus from cloned cDNA: Evidence for involvement of the 3'-terminal sequence in genome replication. Virology 1999, **265**, 330-341.
8. **Box P.** High maternal antibodies help chicks beat virulent strains. World Poultry 1989, **53**, 17-19.
9. **Brown MD, Green P, Skinner MA.** VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical' strains. J Gen Virol 1994, **75**, 675-680.
10. **Cao YC, Yeung WS, Law M, Bi YZ, Leung FC, Lim BL.** Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains. Avian Dis 1998, **42,** 340-351.
11. **Cosgrove AS.** An apparently new disease of chickens: avian nephrosis. Avian Dis 1962, **6**, 385-389.
12. **Di Fabio J, Rossini LI, Eterradossi N, Toquin MD, Gardin Y.** European-like pathogenic infectious disease viruses in Brazil. Vet Record 1999, **145**, 203-204.
13. **Eterradossi N, Picault JP, Drouin P, Guittet M, L'Hospitalier R, Bennejean G.** Pathogenicity and preliminary antigenic characterization of six infectious bursal disease virus strains isolated in France from acute outbreaks. Zentralbl Veterinarmed 1992, **39**, 683-691.
14. **Fahey KJ, McWaters P, Brown MA, Erny K, Murphy VJ, Hewish DR.** Virus neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of chickens. Avian Dis 1991, **35**, 365-373.
15. **Fernandez-Arias A, Martinez S, Rodriguez JF.** The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. J Virol 1997, **71**, 8014-8018.
16. **Heine HG, Haritou M, Failla P, Fahey K, Azad A.** Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I strains. J Gen Virol 1991, **72**, 1835-1843.
17. **Hudson PJ, McKern NM, Power BE, Azad AA.** Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. Nucleic Acids Res 1986, **14**, 5001-5012.
18. **Ismail NM, Saif YM, Wigle WL, Havenstein GB, Jackson C.** Infectious bursal disease virus variant from commercial Leghorn pullets. Avian Dis 1990, **34**, 141-145.
19. **Jackwood DJ, Jackwood RJ.** Infectious bursal disease viruses: molecular differentiation of antigenic subtypes among serotype 1 viruses. Avian Dis 1994, **38**, 531-537.

20. **Jackwood DJ, Saif YM, Hughes JH.** Nucleic acid and structural proteins of infectious bursal disease virus isolates belonging to serotypes I and II. Avian Dis 1984, **28**, 990-1006.
21. **Jackwood DJ, Saif YM, Moorhead PD.** Immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus serotypes I and II in chickens. Avian Dis 1985, **29**, 1184-1194.
22. **Kibenge FS, Dhillon AS, Russell RG.** Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. J Gen Virol Review 1988, **69**, 1757-1775.
23. **Kibenge FS, Jackwood DJ, Mercado CC.** Nucleotide sequence analysis of genome segment A of infectious bursal disease virus. J Gen Virol 1990, **71**, 569-577.
24. **Kong LL, Omar AR, Hair-Bejo M, Aini I, Seow HF.** Sequence analysis of both genome segments of two very virulent infectious bursal disease virus field isolates with distinct pathogenicity. Arch Virol 2004, **149**, 425-434.
25. **Kwon HM, Kim DK, Hahn TW, Han JH, Jackwood DJ.** Sequence of precursor polyprotein gene (segment A) of infectious bursal disease viruses isolated in Korea. Avian Dis 2000, **44**, 691-696.
26. **Lana DP, Beisel CE, Silva RF.** Genetic mechanisms of antigenic variation in infectious bursal disease virus: analysis of a naturally occurring variant virus. Virus Gene 1992, **6**, 247-259.
27. **Lim BL, Cao Y, Yu T, Mo CW.** Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2. J Virol 1999, **73**, 2854-2862.
28. **Mundt E, Müller H.** Complete nucleotide sequences of 5'- and 3'-noncoding regions of both genome segments of different strains of infectious bursal disease virus. Virology 1995, **209**, 10-18.
29. **Nunoya T, Otaki Y, Tajima M, Hiraga M, Saito T.** Occurrence of acute infectious bursal disease with high mortality in Japan and pathogenicity of field isolates in specific-pathogen-free chickens. Avian Dis 1992, **36**, 597-609.
30. **Öppling V, Müller H, Becht H.** Heterogeneity of the antigenic site responsible for the induction of neutralizing antibodies in infectious bursal disease virus. Arch Virol 1991, **119**, 211-223.
31. **Rosales AG, Villegas P, Lukert PD, Fletcher OJ, Mohamed MA, Brown J.** Isolation, identification, and pathogenicity of two field strains of infectious bursal disease virus. Avian Dis 1989, **33**, 35-41.
32. **Schnitzler D, Bernstein F, Muller H, Becht H.** The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. J Gen Virol 1993, **74**, 1563-71.
33. **Snyder DB, Lana DP, Cho BR, Marquardt WW.** Group and strain-specific neutralization sites of infectious bursal disease virus defined with monoclonal antibodies. Avian Dis 1988, **32**, 527-534.
34. **Sun JH, Lu P, Yan YX, Hua XG, Jiang J, Zhao Y.** Sequence and analysis of genomic segment A and B of very virulent infectious bursal disease virus isolated from China. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2003, **50**, 148-154.
35. **Vakharia VN, He J, Ahamed B, Snyder DB.** Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. Virus Res 1994, **31**, 265-273.
36. **Van den Berg TP, Meulenmans G.** Acute infectious bursal disease in poultry: Protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. Avian Pathol 1991, **20**, 409-421.
37. **Yamaguchi T, Iwata K, Kobayashi M, Ogawa M, Fukushi H, Hirai K.** Epitope mapping of capsid proteins VP2 and VP3 of infectious bursal disease virus. Arch Virol 1996, **141**, 1493-1507.
38. **Yao K, Vakharia VN.** Induction of apoptosis in vitro by the 17-kDa nonstructural protein of infectious bursal disease virus: possible role in viral pathogenesis. Virology 2001, **285**, 50-58.
39. **Yu L, Li JR, Huang YW, Dikki J, Deng R.** Molecular characteristics of full-length genomic segment A of three infectious bursal disease virus in China: Two attenuated strains and one virulent field strain. Avian Dis 2001, **45**, 862-874.