

돼지 유행성 설사병 바이러스 스파크 단백질 유전자 발현 형질전환 담배 배양세포

양경실¹, 김현수², 권석윤³, 광상수¹, 이행순^{1*}

¹한국생명공학연구원 환경생명공학연구소, ³식물유전체연구소, ²충남대학교 수의과대학

Transgenic tobacco culture cells expressing spike protein gene of porcine epidemic diarrhea virus

Kyoung-Sil Yang¹, Hyeon-Soo Kim², Suk-Yoon Kwon³, Sang-Soo Kwak¹, and Haeng-Soon Lee^{1*}

¹Environmental Biotechnology Research Center

³Plant Genomics Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB),

111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea

²Department of Verternarian, Chungnam National University, Yuseong-gu, Daejeon 305-333, Korea

ABSTRACT Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) is an infectious and highly contagious virus of swine. In order to develop the transgenic tobacco culture cells producing PEDV antigen protein, four vectors expressing PEDV spike protein (SP) gene under the control of a CaMV 35S promoter were constructed. Four fragments of the SP region of PEDV, SP1 (444 bp, 1487-1930 bp), SP2 (1.7 kb, 2300-3987 bp), SP3 (1.4 kb, 1559-2950 bp), and SP4 (2.6 kb, 9-2643 bp) were amplified by PCR and then C-MYC tag was fused to the end of each SP gene, respectively. These cassettes are inserted into the pCAMBIA2300 (named as 35S::SP1-M, 35S::SP2-M, 35S::SP3-M, and 35S::SP4-M, respectively). Tobacco (cv. BY-2) cultured cells were transformed by co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* harboring expression vector. We selected kanamycin-resistant calli and checked for the presence of the introduced SP gene using PCR, resulting 70% of them showed the foreign gene. We selected the lines with high-level expression of PEDV antigen protein based on dot blot analysis. Southern blot analysis confirmed that the PEDV SP gene was integrated into the genome of the tobacco cultured cells. Northern blot analysis showed that the introduced gene was highly expressed in transgenic cultured cells. Transgenic tobacco cultured cells-derived antigen induced immunogenicity in mice as determined by a plaque reduction neutralization assay. These results suggest that the vectors expressing PEDV spike protein gene in this study will be useful for the development of transgenic plants and cultured cells producing PEDV antigen protein.

서 론

식물체 및 식물배양세포로부터 항원단백질을 발현시켜

백신으로 이용하는 것은 비용이 절감되고 정제가 용이하며 사용지역에서 식물을 재배할 수 있어 이동과 보관이 쉬울 뿐만 아니라 대량생산이 가능한 장점이 있다. 특히 식물배양세포는 단 기간내 상업화할 수 있고, 외부 환경에 영향을 받지 않고 배양할 수 있는 등 많은 장점이 있다 (Hellwig et

*Corresponding author Tel 042-860-4439 Fax 042-860-4608

E-mail: hslee@kribb.re.kr

al. 2004). 식물체로부터 항원단백질 생산 연구는 HBV (B형 간염 바이러스)의 표면 항원유전자 (HBsAg)를 발현시킨 형질전환 담배가 개발되면서 이 분야의 연구가 시작되었다 (Mason et al. 1992). 그중 가축백신용 항원단백질을 식물체로부터 생산한 경우는 돼지 설사병 방지용으로 대장균 K88ac의 pilin 유전자를 발현시킨 당근 (Lee and Hwang 2002), 전염성 위장염 바이러스(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)의 스파크 단백질을 발현시킨 담배 (Tuboly et al. 2000) 및 돼지 유행성 설사병 바이러스 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)를 발현시킨 담배에 대한 보고가 있다 (Bae et al. 2003, Kang et al. 2004; Kang et al. 2005a,b).

돼지 유행성 설사병 바이러스 (PEDV)는 TGEV와 비슷한 증상으로 최근 양돈산업에 큰 경제적 피해를 주고 있다 (Pensaert and de Bouck 1978). 이 바이러스는 돼지 소장의 용모 상피세포에서 증식하며 감염시 설사, 식욕부진, 구토를 일으키고 1주일 이내의 신생자돈에서는 탈수가 심하며, 감염 후 3-4일 이내에 폐사한다 (de Bouck and Pensaert 1980). 현재 사용되고 있는 순화 생독바이러스백신 (live attenuated virus vaccine)은 근육 주사용이기 때문에 혈중 IgG의 형성은 잘 되나 PED 예방에 중요한 점막 면역 (mucosal immunity, sIgA)의 형성이 잘되지 않아 양호한 예방효과를 얻지 못하고 있다. 따라서 안정하면서도 보다 효과적인 백신의 개발이 시급한 실정이다.

PEDV의 항원성은 외피 단백질과 스파크 단백질에 의해서 결정되며 (Spaan et al. 1988) 총 4.162 kb의 스파크 단백질 유전자에서 일부분 (약 500 bp, 24 kDa, SP1)을 발현시키거나 발현율을 향상시키기 위하여 SP1 유전자 염기서열을 식물형으로 합성하여 담배식물체에서 발현시킨 보고가 있다 (Bae et al. 2003, Kang et al. 2004; Kang et al. 2005a, b). 특히 점막면역을 유도할 수 있도록 *E. coli* heat-labile enterotoxin (LTB)를 합성하여 SP1에 연결하여 담배식물체에 발현시키기도 하였다 (Kang et al. 2006). 그러나 형질전환 식물체에

서 발현한 PEDV 항원단백질의 면역원성을 분석한 예는 드물다 (Bae et al. 2003). 전체 스파크 단백질 유전자를 이용하거나 500 bp SP1 이외의 다른 부분에서 벡터를 제작하여 형질전환 식물배양세포 개발에 이용된 결과는 아직까지 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 PEDV의 항원성을 결정하는 스파크 단백질 유전자 부위 중 항원성이 알려진 에피토프 (SP1) 이외에 스파크 단백질의 다른 부분을 발현시킨 4 종류의 식물발현 벡터를 제작하고 이를 도입한 형질전환 담배 배양세포주를 개발하여 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

식물발현 벡터 제작

PEDV 스파크 단백질 유전자의 식물발현벡터 제작을 위하여 먼저 CaMV 35S 프로모터 앞뒤에 *Hind*III와 *Xba*I를 각각 붙여 pCAMBIA2300 벡터의 동일 제한효소 자리에 삽입하였다 (35Sp/pCAMBIA2300). 약 4.2 kb PEDV 스파크 단백질 유전자 염기서열로부터 444 bp (SP1, 염기서열 1,487부터 1,930까지)를 표1의 SP1 프라이머를 사용하여 PCR로 합성하고, SP1 3'에 MYC tag 3개를 (100 bp) 붙였다. 이 카세트를 *Eco*RV와 *Sac*I으로 절단한 후 35Sp/pCAMBIA2300를 *Sma*I과 *Sac*I으로 절단한 자리에 삽입하여 벡터를 완성하였다 (35S::SP1-M). 또 다른 PEDV 단편인 SP2 (1.7 kb, 염기서열 2,300부터 3,987까지), SP3 (1.4 kb, 염기서열 1,559부터 2,950까지) 및 SP4 (2.6 kb, 염기서열 9부터 2,643까지)를 염기서열 앞뒤에 *Bam*HI를 붙인 각각의 프라이머 (Table 1)를 각각 사용하여 PCR로 합성한 후 35S::SP1-M의 SP1 위치에 각각 삽입하였다. PEDV 각 단편들의 염기서열을 확인한 후 35S::SP2-M, 35S::SP3-M, 및 35S::SP4-M로 각각 명명하였다. 각각의 벡터는 형질전환을 위해 *Agrobacterium tumefaciens* EAH105에 도입하였다.

Table 1. Primer sequences for PEDV spike protein gene

primer name	Size of product (bp)	Sequences (5'-3')
SP1-F	459	GGATCCATGGAACAGCCAATTTCTTTTGT
SP1-R		GGATCCAAAAGAAACGTCTGTGATACC
SP2-F	1,713	GGATCCATGTCTCAGTATGGCCAAGTCA
SP2-R		GGATCCGTCACAAAGAACACCACTGC
SP3-F	1,407	GGATCCATGGCTTTTGGTGGTCTTAGTAGT
SP3-R		GGATCCATTGAGTCTCGCTTGAAGAGC
SP4-F	2,648	GGATCCAAATGAGGTCTTTAATTTACTTC
SP4-R		GGATCCGAAGCACCCAGCACATTA

형질전환 및 배양

형질전환 벡터를 함유한 *Agrobacteria* 배양액 100 μ L와 계대배양 5-7일째의 담배 배양세포를 10 mL의 액체배지가 들어 있는 petridish에 각각 넣어 잘 섞은 후 25°C, 암조건에서 2일 동안 공동배양하였다. *Agrobacteria*를 제거하기 위하여 공동배양한 배양세포를 15 mL 원심분리용 tube에 옮기고 원심분리 (1,000 rpm, 5 min, 25°C)하여 상등액을 제거한 후, 새로운 MS배지 (Murashige and Skoog 1962)에 넣고 원심분리 (1,000 rpm, 5 min, 25°C)하여 배양세포를 4번 세척하였다. 공동배양하였던 담배 배양세포를 선발배지 (MS 배지, KH_2PO_4 370 mg/L, 2,4-D 0.18 mg/L, Thiamin·HCl 1 mg/L, kanamycin 100 mg/L, claforan 400 mg/L)에 치상한 후 25°C, 암조건에서 3주 간격으로 3개월 이상 계대배양 하였다.

형질전환 배양세포의 선발

카나마이신이 첨가된 선발배지에서 선발된 캘러스를 대상으로 PCR로 형질전환된 캘러스 라인을 확인하였다. 캘러스로부터 genomic DNA를 추출한 후 PEDV 스파크 단백질 유전자 특이 primer (Table 1)를 이용하여 94°C에서 1분간 DNA를 변형시키고 56-58°C에서 1 분간 annealing, 72°C에서 1-2분 동안 extension 반응을 30회 반복시켜 DNA를 합성한 후 1% agarose gel에 전기영동하여 합성된 밴드를 확인하였다. Annealing 온도는 SP1, SP3, SP4의 경우 56°C이고, SP2는 58°C이었으며 extension은 SP1의 경우 1분이었고 나머지 primer들은 2분 동안 수행되었다.

Southern blot 및 northern blot 분석

DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 카나마이신 저항성 캘러스로부터 genomic DNA를 분리하였다. 분리한 DNA (30 μ g)를 *Hind*III로 절단하여 0.8% agarose gel에 전기영동한 후, Zeta Probe membrane (Bio-Rad 제품)으로 전이시켰다. Probe는 *nptII* 유전자를 PCR로 합성하여 이용하였다 (700 bp). 이 DNA를 동위원소 [α - 32 P] dCTP로 labelling시켜 prehybridization-용액 (Zeta Probe membrane 용)에 첨가하여 65°C에서 24시간 동안 혼성화시켰다. 반응을 마친 membrane을 세척하고 X-ray 필름에 노출시켜 밴드를 확인하였다.

형질전환 담배배양세포에서 도입된 PEDV 유전자가 정상

적으로 발현되는지를 알아보기 위하여 RNA를 추출해 northern blot 분석을 수행하였다. 형질전환 담배배양세포 1 g을 액체 질소를 이용하여 막자사발에서 곱게 분쇄하였다. 여기에 5 mL의 TRI 시약 (Molecular Research Center, MRC)를 이용하여 일상의 방법에 의해 RNA를 분리하였다. Probe는 PEDV 스파크 단백질 유전자 특이 primer (Table 1)를 이용하여 각각 PCR로 합성한 DNA 단편들을 이용하였으며 이후 Southern blot 시와 동일한 방법으로 수행하였다.

Dot blot 분석

형질전환 담배 배양세포로부터 생산되는 PEDV 스파크 단백질을 확인하기 위하여 dot 분석을 실시하였다. 형질전환 담배 배양세포로부터 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)를 사용하여 전체 수용성 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질 80 μ g을 nitrocellulose membrane으로 전이하였다. 일차 항체는 anti C-Myc를 사용하였으며 TBST로 세척한 후 이차 항체 (peroxidase conjugated anti-rabbit IgG)로 membrane을 1시간 동안 반응시킨 후 ECL kit (amersham pharmacia biotech사)로 감지하였다

형질전환 담배 배양세포유래 PEDV 스파크 단백질의 활성 분석

형질전환 담배 배양세포로부터 생산되는 PEDV 스파크 단백질의 면역활성을 조사하기 위하여 dot blot 조사에서 가장 높게 발현하는 형질전환 세포주 (35S::SP1-M의 3번, 35S::SP2-M의 74번, 35S::SP3-M의 61번, 35S::SP4-M의 56번)를 현탁배양하여 동결건조 시킨 후 PBS로 현탁액을 만들어 6주령의 BALB/c 마우스에 1일 1회 씩 3주간 200 mg/마우스에 연속 투여하였고 총 6마리를 이용하였다.

마우스로부터 채혈은 최초 투여시작 후 3주부터 7주까지 매주 1회 안구로부터 1회 약 300 - 500 μ L의 혈액을 채혈하여 혈청을 분리하여 -70°C 냉동고에 보관하였다. 마우스로부터 얻은 serum을 56°C 항온 수욕조에서 30분간 불활화하였다. Serum free MEM 50 μ L를 96-well culture plate의 각 well에 넣고 5배 희석한 mouse 혈청 50 μ L plate의 첫 well에 가하여 2배로 희석한 후 동량의 바이러스 희석액 50 μ L (1 X 100 TCID₅₀/0.1 mL)를 각각의 well에 넣고 37°C, 5% CO₂를 함유하는 배양기에 1시간 동안 항체항원 반응을 시킨 다음 Vero cell 부유액 100 μ L를 각 well에 첨가한 후 37°C, 5%

CO₂를 함유하는 배양기에 배양하면서 CPE (cytopathic effect)를 관찰하였다. CPE가 관찰된 최종 희석배수를 항체역가로 산정하여 면역원성을 측정하였으며 총 6일 동안 관찰하였다.

결과 및 고찰

형질전환 벡터 제작

약 4.2 kb PEDV 스파이크 단백질 유전자로부터 4종류의 단편을 PCR로 합성하여 벡터를 제작하였다. SP1 (0.44 kb, 염기서열 1,487-1,930 bp), SP2 (1.69 kb, 2,300-3,987 bp), SP3 (1.39 kb, 1,559-2,950 bp) 및 SP4 (2.63 kb, 9-2,643 bp) 각각을 PCR로 합성한 후 각 단편들 뒤에 MYC tag 3개를 붙여 (100 bp) 연결시킨 카세트를 완성한 후 염기서열을 확인하였다. 각각의 카세트를 CaMV 35S 프로모터 조절을 받도록 제작한 다음 pCAMBIA2300 벡터에 삽입하여 벡터를 완성한 후 35S::SP1-M, 35S::SP2-M, 35S::SP3-M 및 35S::SP4-M으로 각각 명명하였다 (Figure 1). 각각의 벡터를 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105에 도입하여 담배 배양세포 형질전환에 이용하였다.

Agrobacterium 매개에 의한 형질전환 및 배양세포주 선발

앞서 제작된 35S::SP1-M, 35S::SP2-M, 35S::SP3-M 및 35S::SP4-M 벡터를 각각 함유하고 있는 아그로박테리아와 담배 BY-2 배양세포를 공동배양하여 형질전환 하였다. 계대배양 4일

된 BY-2 현탁배양세포를 아그로박테리아와 2일 동안 공동 배양한 후 선발배지에 배양한 후 형성된 kanamycin 저항성 cluster를 선발하여 계속하여 동일배지에서 증식시켰다. 선발배지에서 4주 배양 후부터 cluster가 형성되기 시작하였으며 3주 간격으로 새로운 선발배지로 계대배양하여 형성된 세포괴를 선발하였다 (Figure 2).

Kanamycin 첨가 선발배지에서 각 벡터 당 50개에서 70개 정도의 라인을 얻었으며 외래 유전자 도입을 확인하기 위하여 PCR를 수행하였다. 캘러스로부터 genomic DNA를 분리하고 nptII 유전자 특이 primer 혹은 PEDV 단편들 각각의 특이 primer를 이용하여 PCR를 수행하였다 (결과 미제시). 그 결과 각 벡터별 형질전환 효율은 75%에서 85%이었으며, 39개에서 60개의 형질전환 세포주를 확보하였다 (Table 2).

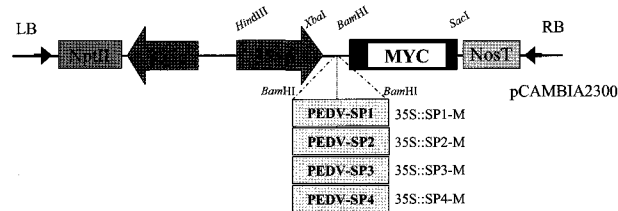


Figure 1. Plant transformation vectors for expression of PEDV spike protein gene, 35S::SP-M/pCAMBIA2300. 35Sp. CaMV 35S promoter; SP1-SP4, PEDV spike protein gene; MYC, C-Myc Tag; NosT, nopaline synthase terminator; NptII, neomycin phosphotransferase II; LB, left border; RB, right border.

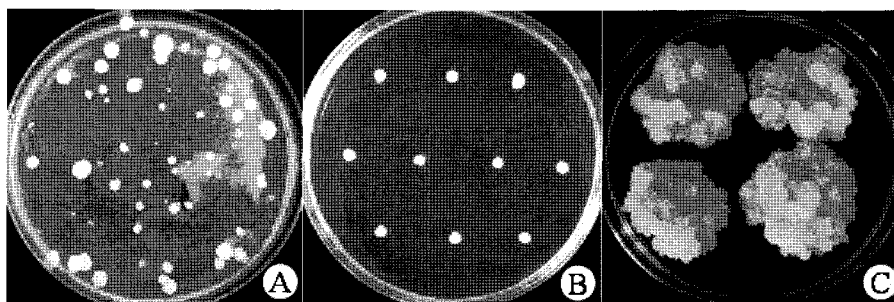


Figure 2. Development of transgenic tobacco (cv. BY-2) callus after *Agrobacterium*-mediated transformation. A, Formation of kanamycin-resistant clusters on selection medium with 100 mg/L kanamycin; B and C, Calli were developed on selection medium.

Table 2. Formation of PCR-positive tobacco callus using *Agrobacterium*-mediated transformation with PEDV spike protein gene

Vectors	No. of kanamycin-resistant cluster	No. of PCR-positive cluster (%)
35S::SP1-M	50	42 (84.0)
35S::SP2-M	70	60 (85.7)
35S::SP3-M	50	39 (78.0)
35S::SP4-M	60	45 (75.0)

형질전환 담배 배양세포 분석

PCR로 도입유전자가 확인된 형질전환 담배 배양세포주를 대상으로 PEDV 스파크단백질 고생산 라인을 선발하고자 C-Myc 항체를 사용하여 dot blot를 실시하였다 (Figure 3). 그 결과 세포주별로 다양한 수준으로 PEDV 스파크 단백질이 발현되었으나 비형질전환 담배 배양세포주의 경우 아무런 spot도 관찰되지 않았다. 형질전환 배양세포주의 특성분석을 위해 백터별로 6개의 PEDV 스파크단백질 고생산 세포주를 선발하였다. 즉, 35S::SP1-M 세포주의 경우는 2, 3, 9, 44, 45 및 46번을, 35S::SP2-M 세포주에서는 27, 57, 60, 63, 68 및 74번을, 35S::SP3-M 세포주는 36, 47, 52, 60, 61 및 62번을, 35S::SP4-M 세포주에서는 40, 46, 54, 56, 57 및 61번을 각각 선발하였다.

Dot blot으로 PEDV 스파크 단백질 고생산 세포주를 각 백터당 2 라인씩 선발하여 *np1II* 유전자를 탐침으로 이용하여 Southern blot 분석을 실시하였다. 그 결과 1 - 3 copy씩 외래 유전자가 도입되었음을 확인하였다 (Figure 4). 이러한

결과로부터 도입유전자의 카피수와 유전자 발현 정도와는 직접적인 관련이 없음을 알 수 있었다.

Dot blot 방법으로 선발된 6개씩의 고생산 세포주의 PEDV 유전자 발현을 조사하기 위하여 northern blot 분석을 실시하였다. 그 결과 35S::SP1-M 세포주의 경우 3번과 9번 라인, 35S::SP2-M 세포주의 경우 57번과 74번이, 35S::SP3-M 세포주는 52번, 61번, 35S::SP4-M 세포주에서는 56번과 57번 라인에서 PEDV 스파크단백질 유전자가 강하게 발현하였다 (Figure 5). 형질전환 담배 배양세포에서 PEDV 스파크 단백질 유전자의 발현은 RNA 수준과 단백질 수준에서 정확하게 일치하지 않았다. 즉, PEDV 스파크 단백질 유전자는 전사후 수준에서 조절됨을 알 수 있었다.

형질전환 담배 현탁배양세포의 면역활성 조사

동결건조시킨 형질전환 담배배양세포 분말을 현탁액으로 만들어 BALB/c mouse에 경구투여하여 PEDV에 대한 면역

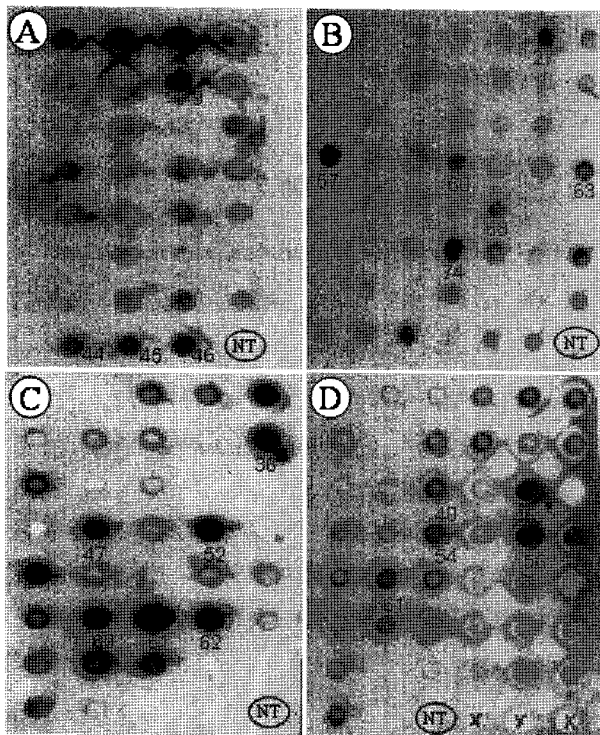


Figure 3. Dot blot analysis of transgenic tobacco cultured cells expressing PEDV spike protein gene. A, 35S::SP1-M; B, 35S::SP2-M; C, 35S::SP3-M; D, 35S::SP4-M. Equal amounts (80 µg) of soluble protein were blotted onto a nitrocellulose membrane. C-Myc and peroxidase conjugated anti-rabbit IgG were used as a primary and secondary antibody, respectively.

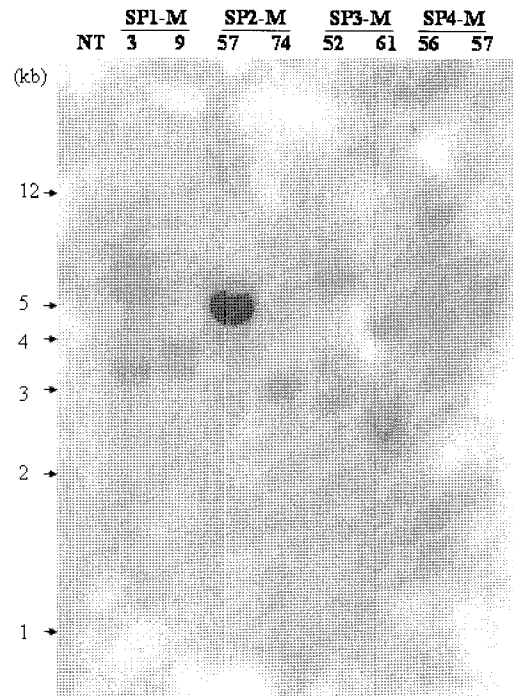


Figure 4. Southern analysis of genomic DNA prepared from transgenic and non-transgenic tobacco cultured cells. Equal amounts (30 µg) of genomic DNA were digested with the *HindIII*, electrophoresed in 0.8% agarose gel, and blotted onto a membrane. The blot was hybridized with the 700 bp fragment of *np1II* gene as a probe. NT, Non-transgenic tobacco callus. Numerals, Transgenic tobacco callus with high-expressing PEDV spike protein. The positions of size markers are shown on the left.

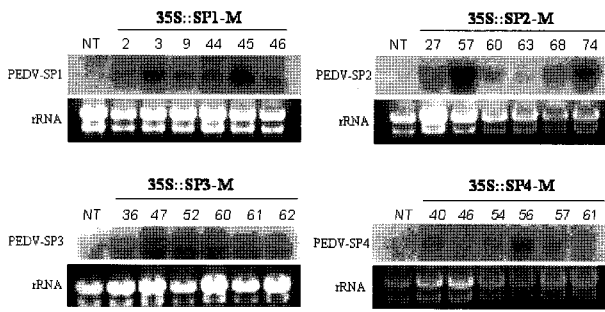


Figure 5. Northern blot analysis of transgenic tobacco callus expressing PEDV spike protein gene. Total RNA was extracted from transgenic and non-transgenic tobacco callus. Equal amounts (15 µg) of RNA were electrophoresed in 1% agarose gel, and blotted onto a membrane. The blot was hybridized with the SP fragment (SP1, SP2, SP3, and SP4, respectively) as a probe. NT, Non-transgenic tobacco callus. Numerals, Transgenic tobacco callus. rRNA was used to control for equal loading.

원성을 분석한 결과 경구투여한 BALB/c mouse의 혈청을 serum neutralization (SN) test 및 plaque reduction neutralization test로 PEDV에 대한 면역원성을 분석한 결과 형질전환 담배 배양 세포주와 대조구인 비형질전환 담배 배양세포 현탁액을 투여한 경우 약간의 면역원성의 차이를 나타내었다 (Table 3). 35S::SP1-M과 35S::SP2-M를 투여한 혈청에서 3주차부터 6주차까지 1:10의 희석배수까지 바이러스 증식 억제 효과가 관찰되었으며, 35S::SP4-M는 투여 5주차에 1:10 희석배수에서 바이러스 증식 억제 현상이 관찰되었다. 그러나 1:20, 1:40, 1:80 및 1:160 희석배수에서는 시험군과 대조군에서 면역원성의 차이를 발견할 수 없었고 35S::SP3-M의 경우 1:10 이상의 희석배수에서 바이러스 증식 억제효과를 나타내지 않았다. 반면에 대조군의 혈청에서는 1:5의 희석배수에서

Table 3. Serum neutralization titers and plaque reduction neutralization assay using mouse sera collected from mice administered with suspension cultured cells of transgenic tobacco for 3 weeks

	Cell lines	SN titers				No. of Plaque			
		1:5	1:10	1:20	1:40	1: 5	1: 10	1: 20	1:40
3 weeks	NT	+	-	-	-	10	25	36	45
	35S::SP1-M	+	+	-	-	4	7	30	43
	35S::SP2-M	+	+	-	-	6	8	34	40
	35S::SP3-M	+	-	-	-	3	19	31	38
	35S::SP4-M	+	-	-	-	5	17	33	42
4 weeks	NT	+	-	-	-	15	23	30	43
	35S::SP1-M	+	+	-	-	3	4	20	38
	35S::SP2-M	+	+	-	-	2	5	23	41
	35S::SP3-M	+	-	-	-	2	17	27	39
	35S::SP4-M	+	-	-	-	3	17	25	43
5 weeks	NT	+	-	-	-	11	27	40	48
	35S::SP1-M	+	+	-	-	5	6	38	42
	35S::SP2-M	+	+	-	-	7	8	35	47
	35S::SP3-M	+	-	-	-	4	16	39	41
	35S::SP4-M	+	+	-	-	6	7	33	40
6 weeks	NT	+	-	-	-	10	24	34	45
	35S::SP1-M	+	+	-	-	7	9	30	40
	35S::SP2-M	+	+	-	-	7	6	28	44
	35S::SP3-M	+	-	-	-	6	18	35	39
	35S::SP4-M	+	-	-	-	8	20	27	43
7 weeks	NT	+	-	-	-	17	28	38	47
	35S::SP1-M	+	-	-	-	10	23	36	40
	35S::SP2-M	+	-	-	-	7	20	32	39
	35S::SP3-M	+	-	-	-	8	24	40	44
	35S::SP4-M	+	-	-	-	9	22	33	41

-: CPE observation, indicating no existence of antibody.

+: No CPE observation, indicating existence of antibody.

NT: non-transgenic tobacco suspension cultured cells.

35S::SP1-M, 35S::SP2-M, 35S::SP3-M, 35S::SP4-M: transgenic tobacco suspension cultured cells.

약간의 바이러스 억제 현상이 관찰되었는데 이러한 낮은 희석배수에서 관찰된 바이러스 억제 현상은 혈액내에 비특이적으로 바이러스를 억제하는 인자가 있기 때문으로 생각된다. Plaque reduction neutralization test로 PEDV에 대한 면역원성을 분석한 결과 SN test에서 관찰된 결과와 마찬가지로 35S::SP1-M과 35S::SP2-M를 투여한 시험군에서 3주차에서 6주차까지 1:10의 희석배수까지 plaque reduction 현상이 관찰되었으며, 또한 35S::SP4-M를 투여한 mouse serum에서는 5주차에서 1:10의 희석배수까지 plaque reduction 현상이 관찰되었다 (Table 3).

형질전환 식물체에서 발현시킨 PEDV 항원단백질이 면역활성이 있음이 보고된 바 있다. PEDV 항원단백질을 생산하는 형질전환 담배식물체를 건조시켜 5 mg 분말을 마우스에 경구투여한 결과 항체가 형성되었다 (Bae et al. 2003). 이때 투여된 항원단백질 함량은 약 0.5 µg로 추정된다. 본 연구에서는 형질전환 담배배양세포로부터 생산되는 항원단백질의 함량을 측정하지는 못하였다. 담배식물체의 총 단백질 함량이 배양세포보다 높은 점을 감안할 때 본 연구에서 동결건조시킨 형질전환 담배 배양세포 200 mg을 투여하였으므로 다른 보고에서 관찰된 바와 같이 면역활성나타내기에 충분한 단백질이 투여된 것으로 생각된다. 이상의 결과에서와 같이 형질전환 담배 배양세포 유래 PEDV 항원단백질의 면역원성은 확인되었지만 그 활성이 낮아 질병을 예방하기에는 미흡한 것으로 생각된다. 또한 면역활성을 나타내지 않은 35S::SP3-M 세포주를 대상으로는 계속적인 분석이 요구된다. 이것은 형질전환 담배 배양세포로부터 생산되는 항원단백질의 함량이 낮기 때문으로 생각된다. 따라서 아미노산 코돈을 식물에 적합하도록 코돈을 최적화 하거나 면역성을 증강시키는 adjuvant에 관한 연구 등 항원단백질의 생산성을 향상시켜 면역원성을 높일 수 있는 방법에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

현재까지 PEDV 항원단백질의 항원활성은 스파크 단백질의 SP1 부위에서만 알려져 있다 (Chang et al. 2002, Bae et al. 2003, Kang et al. 2004; 2005a,b). 본 연구결과 스파크 단백질 유전자 SP1 부위 이외의 다른 부위에서도 약한 정도의 면역활성이 확인되었다. 하지만 뚜렷한 항원활성을 나타내기 위해서는 항원단백질의 생산성을 향상시키기 위한 많은 연구가 필요하다. 또한 항원단백질의 특성을 고려하여 고구마처럼 생식이 가능한 식물 또는 사료작물을 이용하는 것이 중요하다. 결과적으로 본 연구는 담배 배양세포에서 PEDV

항원단백질을 생산하는 4종류의 발현벡터를 스파크 단백질 유전자로부터 제작하였으며 이들을 도입한 담배배양세포로부터 높은 생리활성을 나타내는 발현벡터를 선발하여 궁극적으로는 고구마 등과 같은 경구용 사료 작물에 활용하고자 한다. 특히 고구마의 경우 저장뿌리에서 고발현 프로모터를 활용할 수 있어 저장뿌리에서 단백질 고생산을 기대할 수 있는 장점이 있다.

적 요

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)는 돼지의 급성장염을 유발하여 설사 등의 증상을 일으키는 바이러스이다. 본 연구에서는 PEDV 항원단백질을 생산하는 담배 배양세포주를 개발하고자 하였다. PEDV에서 항원성이 알려진 스파크 단백질의 일부분을 암호화하는 유전자를 PCR로 합성하여 4종류의 형질전환 벡터를 제작하였다. 담배 배양세포 BY-2를 재료로 하여 *Agrobacterium tumefaciens*을 매개로 형질전환하였다. 선발배지 (MS salt, KH_2PO_4 370 mg/L, 2,4-D 0.18 mg/L, Thiamin·HCl 1 mg/L, kanamycin 100 mg/L, claforan 400 mg/L)에서 캘러스를 3주 간격으로 3개월 동안 계대배양하여 카나마이신 저항성 캘러스를 선발하였다. 선발된 캘러스를 대상으로 PCR 분석한 결과 형질전환 효율은 75% 이상이었으며 벡터당 40 여개 이상의 형질전환 배양세포주를 얻었다. 형질전환 배양세포주를 대상으로 Southern blot 분석하여 PEDV 유전자가 고구마 식물체의 게놈으로 안정적으로 도입되었음을 확인하였다. Northern blot 분석 결과 PEDV 스파크 단백질 유전자가 높은 수준으로 발현함을 확인하였으며 dot blot으로 PEDV 스파크 단백질 고생산 배양세포주를 선발하였다. 형질전환 담배 배양세포로부터 생산된 PEDV 항원단백질을 BALB/c 마우스에 경구투여 하여 면역활성을 조사한 결과 형질전환 세포주인 35S::SP1-M, 35S::SP2-M, 35S::SP4-M 세포주에서 1:10의 희석배수까지 바이러스 억제 효과가 관찰되었다. 제작된 형질전환 벡터는 고구마와 같은 경구용 사료작물에 활용할 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 한국생명공학연구원 기관고유사업 및 전북분원 일반사업의 연구비 지원에 의해 수행되었다.

인용문헌

- Bae JL, Lee JG, Kang TJ, Jang HS, Lang YS, Yang MS (2003) Induction of antigen-specific systemic and mucosal immune responses by feeding animals transgenic plants expressing the antigen. *Vaccine* 21: 4052-4058
- Chang SH, Bae JL, Kan TJ, Kim J, Chung GH, Lim CW, Laude H, Yang MS, Jang YS (2002) Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus. *Mol Cells* 14: 295-299
- de Bouck P, Pensaert M (1980) Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV 777. *Am J Vet Res* 41: 219-223
- Hellwig S, Drossard J, Twyman R, Fischer R (2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat Biotech* 22: 1415-1422
- Kang TJ, Kang KH, Kin JA, Kwon TH, Jang YS, Yang MS (2004) High-level expression of the neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus by a tobacco mosaic virus-based vector. *Protein Expr Purif* 38: 129-135
- Kang TJ, Kim YS, Jang YS, Yang MS (2005a) Expression of the synthetic neutralizing epitope gene of porcine epidemic diarrhea virus in tobacco plants without nicotine. *Vaccine* 23: 2294-2297
- Kang TJ, Seo JE, Kim DH, Kim TG, Jang YS, Yang MS (2005b) Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants. *Protein Expr Purif* 41: 378-383
- Kang TJ, Han SC, Yang MS, Jang YS (2006) Expression of synthetic neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus fused with synthetic B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in tobacco plants. *Protein Expr Purif* 46: 16-22
- Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11745-11749
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Pensaert MB, de Bouck P (1978) A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol* 58: 243-247
- Spaan W, Cavanagh D, Horzinek MC (1988) Coronavirus: structure and genome expression. *J Gen Virol* 69: 2939-2952
- Tuboly T, Yu W, Bailey A, Degrandis S, Du S, Erickson L, Nagy E (2000) Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. *Vaccine* 18: 2023-2028

(접수일자 2008년 2월 29일, 수리일자 2008년 3월 18일)