

돼지생식기호흡기증후군 바이러스의 ORF6 유전자 발현

배수정 · 김진원 · 윤영심 · 강신영*

충북대학교 수의과대학 및 동물의학연구소

(접수 2009. 2. 3, 게재승인 2009. 3. 20)

Expression of ORF6 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus

Su-Jung Bae, Jin-Won Kim, Young-Sim Yoon, Shien-Young Kang*

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

(Received 3 February 2009, accepted in revised form 20 March 2009)

Abstract

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus is the etiological agent of diseases characterized by reproductive losses in sows and respiratory disorders in piglets. The PRRS virus is a small enveloped virus containing a positive-sense, single-stranded RNA genome. In the present study, ORF6 gene of Korean PRRS virus isolate, CNV, was cloned and expressed in baculovirus expression system. The ORF6 gene and expressed protein in the recombinant virus were confirmed by PCR/indirect fluorescence antibody (IFA) test and Western blotting, respectively. The recombinant protein with a molecular weight of approximately 24KDa was confirmed by Western blotting using His6 and PRRS virus-specific antiserum. Expressed ORF6 protein was applied for IFA to detect antibody against PRRS virus using field porcine sera. However, the sensitivity and specificity of developed IFA using expressed ORF6 protein were considerably low compared to those of commercial ELISA kit. This results suggest that IFA using expressed ORF6 protein could not be used as a diagnostic test for PRRS virus infection without further improvements.

Key words : PRRS virus, ORF6, Baculovirus expression

서 론

돼지생식기호흡기증후군(Porcine reproductive and respiratory syndrome: PRRS)은 1980년대 말에 북미지역에서 처음으로 발생한 이래, 현재는 전 세계적으로 돼지를 사육하고 있는 대부분의 국가에서 발생하고 있어 경제적으로 큰 손실을 일으키는 질병의 하나로 부상하고 있다(Keffaber, 1989; Zimmerman 등, 2006). 이

질병은 여러가지 형태의 임상증상으로 나타나지만, 임신돈에서 유산 등의 번식장애와 간질성 폐렴을 동반하는 호흡기 증상이 가장 빈번하게 나타나는 것으로 알려져 있다. 특히 호흡기 질환은 전 일령에서 나타날 수 있으며 포유자돈과 이유자돈에 집중 발생하여 생산성에 커다란 문제점을 일으키고 있다(Zimmerman 등, 2006).

PRRS의 원인체인 PRRS 바이러스는 *Arteriviridae* 과에 속하는 RNA 바이러스로 피막을 가지고 있으며 15Kb 크기의 단일가닥으로 구성되어있는 positive-

* Corresponding author: Shien-Young Kang, Tel. +82-43-261-2598,
Fax. +82-43-267-3150, E-mail. sykang@cbu.ac.kr

sense RNA 유전자를 가지고 있다(Cavanagh, 1997). PRRS 바이러스의 유전자는 8개의 open reading frames (ORF1a, ORF1b 그리고 ORFs2-7)으로 구성되어 바이러스의 구조 및 비구조단백질을 encode하는 것으로 알려져 있다(Bautista 등, 1998; Dea 등, 2000; Snijder와 Meulenberg, 1998). 즉, ORF1a와 ORF1b는 전체 유전자의 75% 정도를 차지하며 바이러스 복제에 필요한 RNA-dependent RNA polymerase을 encode하며 ORF2부터 ORF7까지는 바이러스의 구조 관련 단백질을 encode 한다(Dea 등, 2000; Snijder와 Meulenberg, 1998). 구조단백질 중 3개의 주된 단백질은 각각 ORF5, 6 그리고 7에 의해서 각각 만들어진다. 피막과 연관되어 있는 구조단백질 중의 하나인 M 단백질은 ORF6 유전자에 의하여 encode되는 비당단백질로 분자량은 18-19kDa이다. M 단백질은 아미노기 말단부위에는 소수성이 매우 강한 아미노산으로 구성되어 있어 이들이 피막에 삽입하는데 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌으며, 반면에 바이러스 입자 밖으로는 일부가 노출되어 있어 이들이 피막에서 주된 구조단백인 GP5와 heterodimer를 구성하고 PRRS 바이러스의 assembly와 budding에 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다(Dea 등, 2000).

PRRS 바이러스의 혈청학적 진단법으로 혈청중화시험(Yoon 등, 1994; Wensvoort 등, 1991), 간접형광항체법(Indirect immunofluorescence antibody test; IFA)(Yoon 등, 1992) 및 면역효소법(Enzyme-linked immunoabsorbent assay; ELISA)(Sorensen 등, 1998; Albina 등, 1992; Houben 등, 1995) 등이 보고되어 있으며, 이 중 IFA와 ELISA법이 널리 사용되고 있다. 국내에서는 IFA법이 주로 이용되었으나 최근에는 상용화되어 있는 ELISA kit가 수입되어 PRRS 바이러스의 항체 검출에 널리 사용되고 있다. 상용화되고 있는 ELISA kit는 다량의 시료를 일시에 처리할 수 있으며 민감도 및 특이성이 높은 장점이 있으나 가격이 비싼 단점을 가지고 있다. 반면에 IFA법은 실험실 내에서 자체적으로 제작하여 사용할 수 있으나 결과 판독에 많은 문제점을 가지고 있다.

본 연구에서는 PRRS 바이러스의 구조단백질 유전자 중에서 가장 conserve하다고 알려진 ORF6 유전자를 baculovirus expression system을 이용하여 발현시키고, 발현된 단백질이 PRRS 바이러스의 혈청학적 진단법에 활용될 수 있는가를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

바이러스 배양 및 RNA 추출

돼지생식기호흡기증후군(Porcine reproductive respiratory syndrome: PRRS) 바이러스 CNV주는 김현수 교수(충남대학교 수의과대학)로부터 분양받아 원숭이 신장세포 유래인 MA104 세포주에서 Kim 등(1993)의 방법에 의하여 증식시켰다. 돼지생식기호흡기증후군 바이러스 감염에 의한 세포변성 효과를 확인한 뒤, QI-Aamp[®] viral RNA mini kit (Qiagen)를 사용하여 제조사의 술식에 따라 감염 상층액으로부터 바이러스 RNA를 추출하였으며 추출한 RNA는 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 처리된 증류수에 용해하여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

ORF6 유전자 클로닝 및 RT-PCR

PRRS 바이러스 ORF6 전체 유전자를 클로닝하기 위하여 ORF6 유전자에 특이적인 primer를 GenBank의 염기서열을 기초로 하여 제한효소절단부위(Underline)를 첨가하여 제작하였으며 forward primer (5'-GATGGATCCGTCATGGGAGGCCTAGATAA-3')와 reverse primer (5'-AGCAAGCTTCCCGCCATACTTG-ACGAGGTT-3')를 사용하여 RT-PCR을 다음과 같이 수행하였다. 즉, 순수 분리한 RNA template 5µl에 10pM reverse primer 1µl, 10pM forward primer 1µl, DEPC 처리된 증류수 3µl, 그리고 100mM DTT 2µl를 넣어 70°C에서 5분간 반응시킨 후, RT-&GO Master-mix(Q-biogene) 8µl를 첨가하여 42°C에서 60분 그리고 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA template 5µl에 10x Ex Taq buffer 4µl, Taq DNA polymerase (5U/µl, Takara) 1µl, forward primer (10pM/µl) 1µl, reverse primer (10 pM/µl) 1µl, 2.5mM dNTP 4µl 그리고 증류수 24µl를 넣어 전체 반응용량 40µl를 핵산증폭기(Biometra[®])를 사용하여 94°C에서 4분간 pre-PCR하였다. 이어 94°C에서 1분, 58°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초간 30회의 cycle로 증폭하고 72°C에서 5분간 post-PCR을 실시하였다. 반응산물은 1% agarose gel 상에서 전기영동한 뒤 ethidium bromide로 염색하여 유전자 크기를 확인하였다.

RT-PCR로 증폭된 ORF6 amplicon을 primer sequence에 들어 있는 제한효소 *Bam*HI과 *Hind*III를

이용하여 자른 뒤 1% agarose gel에 전기영동하고 Gel extraction kit (Qiagen)를 사용하여 제조사의 술식에 따라 정제하였다. 이를 동일한 제한효소로 처리된 transfer vector pBlueBac4.5/V5-His TOPO vector® (Invitrogen)에 T4 DNA ligase를 사용하여 16°C에서 12시간 동안 ligation하였다. 이 ligation mixture를 *E. coli* DH5 α competent cell에 제조사의 술식에 따라 형질 전환한 뒤 형질 전환된 *E. coli* 배양액을 선택배지인 ampicillin (50 μ g/ml)을 함유하는 LB plate에 도말하여 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 성장한 집락으로부터 형질전환으로 인해 푸른색을 띠는 단일집락을 취하여 5ml의 LB broth에 접종하고 37°C에서 220rpm으로 16시간 진탕 배양한 다음 크로닝 유무를 조사하기 위하여 alkaline lysis법으로 plasmid를 분리하고 30 μ l의 TE buffer (pH 8.0)에 현탁하였다. 분리한 plasmid DNA는 제한효소 *Bam*HI과 *Hind* III를 가하여 37°C에서 1시간 절단하여 1.0% agarose gel에서 전기영동하여 ORF6 유전자가 삽입된 것을 확인하였다.

재조합 baculovirus 제작

ORF6 유전자가 크로닝된 baculovirus transfer vector pBlueBac 4.5-ORF6(PRRSV)는 Bac-N-blue transfection kit®(Invitrogen)를 사용하여 Bac-N-blue wild type DNA와 함께 제조사의 술식에 따라 Sf9 세포로 cotransfection하였으며 plaque법으로 재조합 baculovirus를 순수 분리하였다. 순수 분리된 재조합바이러스는 Sf9 세포에 감염시켜 27°C에서 5일간 배양하고 일부 배양액으로부터 DNA를 추출하여 PCR법으로 ORF6 유전자의 재조합 유무 및 wild type 바이러스의 혼입 여부를 확인하였다. ORF6 유전자가 재조합된 것으로 확인된 것은 Sf9 세포에 감염시켜 고역가의 재조합 baculovirus stock을 만들어 일부는 -20°C에 보관하고 일부는 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

재조합 ORF6 단백질 발현 확인

Plaque법으로 순수 분리한 재조합 baculovirus의 ORF6 단백질 발현여부는 간접형광항체법(Indirect fluorescence antibody test: IFA)과 Western blotting법으로 확인하였다.

IFA는 Sf9 세포가 배양된 96-well plate에 재조합 바이러스를 접종하여 72시간 배양한 후 80% acetone으로 고정하였다. 1차 항체로 His6에 특이적인 다크론항

체(Bethyl Laboratories Inc.)를 1 : 1,000으로 희석하여 50 μ l 넣어 37°C에서 1시간 반응하였다. 2차 항체로 FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (KPL)를 1 : 100으로 희석하여 50 μ l씩 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 후, 형광현미경으로 형광발색 유무를 관찰하였다.

Western blotting법은 Towbin 등의 방법(1985)에 따라 다음과 같이 수행하였다. 즉, 재조합 바이러스를 접종하여 72시간동안 배양하여 수확한 Sf9 세포와 대조군으로 바이러스를 접종하지 않은 Sf9 세포를 원심 분리한 후 cell pellet을 동결과 해동을 3회 반복하고 sonicator를 사용하여 lysis시킨 후 원심하여 cell lysate를 취하였다. 이 cell lysate를 sample buffer (Nupage® LDS sample buffer)로 1 : 5의 비율로 섞어 100°C에서 5분간 끓여 denaturation시켰다. 이를 12% bis-tris gel에서 200V에서 1시간동안 전기영동 시켰다. 미리 transfer buffer로 평형화시켜둔 filter paper와 nitrocellulose membrane (MEN™ Life Science) 사이에 gel을 넣어 semi trans-blot module (Invitrogen)을 사용하여 30V에서 60분간 전이시켰다. Nitrocellulose membrane을 5% skim-milk/tris buffered saline (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1% Twee-20, pH 7.5 : TBS-T)에서 하룻밤 동안 blocking 시킨 후 TBS-T로 15분간 강하게 흔들면서 3회 세척하였다. 세척한 membrane을 적당한 크기로 잘라 각각의 절편에 따라 His₆와 PRRSV 특이 항체를 각각 1 : 1,000과 1 : 500으로 희석하여 1시간 30분 동안 실온에서 흔들며 반응시킨 다음 TBS-T로 15분씩 3회 세척하였다. 이후 2차 항체로 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit Ig(G+M) (KPL) 또는 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-swine IgG (KPL)를 각각 1 : 2,000으로 희석하여 1시간 반응시킨 뒤 3회 세척하였다. 발색제로 BCIP/NBT stock solution (Boehringer Mannheim) 200 μ l을 alkaline phosphatase buffer (0.1M Tris-HCl, pH9.5, 0.1M NaCl, 5mM MgCl₂) 10ml에 섞어 발색을 관찰한 후 증류수를 첨가하여 반응을 종료시켰다.

발현 단백질의 진단 활용성

발현된 ORF6 단백질의 PRRS 바이러스 진단에 있어서 활용 가능성을 조사하기 위하여 현재 상용화 되고 있는 PRRSV ELISA kit (HerdChek* PRRS 2XR: PRRSV antibody test kit, IDEXX Laboratories Inc.)를 사용하여 각각 PRRS 양성 및 음성으로 확인된 20개

돼지 혈청을 이용하여 Yoon 등(1992)의 방법에 따라 IFA를 실시하였다.

결 과

ORF6 유전자 클로닝

PRRS 바이러스 ORF6 유전자를 크로닝하기 위하여 CNV 주로부터 RNA를 추출하여 ORF6 유전자 특이 primer로 RT-PCR을 실시하여 전기 영동한 결과, 542bp에 해당하는 유전자 증폭산물을 확인할 수 있었다. 또한, baculovirus transfer vector를 이용하여 형질 전환된 *E. coli*로부터 plasmid DNA를 추출하여 제한효소인 *Bam*HI과 *Hind*III를 처리하여 전기 영동한 결과, 삽입된 ORF6 유전자 크기에 해당하는 542bp에서 제한효소 소화절편이 확인되었다.

ORF6 유전자 발현

재조합 baculovirus가 감염된 Sf9 세포로부터 DNA를 추출하여 PRRS 바이러스 ORF6 유전자 특이 primer와 baculovirus polyhedrin 특이 primer로 각각 PCR한 후 전기 영동한 결과, 542bp와 1,080bp에 해당

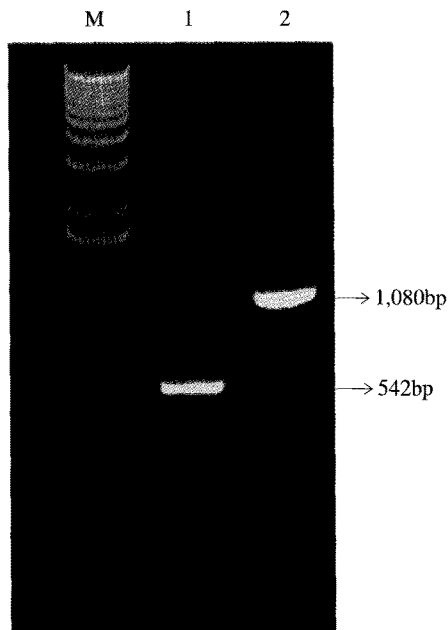


Fig. 1. Confirmation of ORF6 recombinant baculovirus by PCR. [ORF6 recombinant baculovirus was confirmed by PCR using ORF6-specific (lane 1) and baculovirus-specific (lane 2) primers. Lane M: 1Kb ladder marker].

하는 특이 amplicon이 확인되었다(Fig. 1).

Plaque법으로 순수 분리한 recombinant baculovirus에서 ORF6 유전자가 발현되는지 확인하기 위하여 IFA를 실시한 결과, 감염된 Sf9 세포에서만 형광을 나

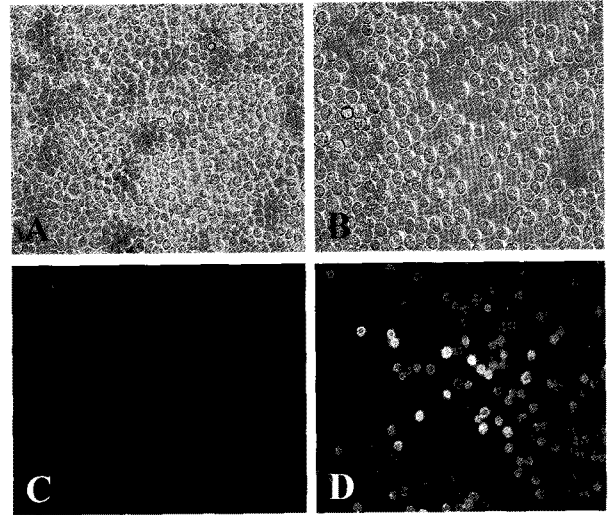


Fig. 2. Cytopathic effects and immunofluorescences of Sf9 cells infected with ORF6 recombinant virus ($\times 200$) [ORF6 recombinant virus infected Sf9 cells (B) were growthinhibited and enlarged compared to those of mock-infected (A) Sf9 cells. Mock-infected (C) and ORF6 recombinant virus infected (D) Sf9 cells were immunostained with rabbit His₆-specific antiserum].

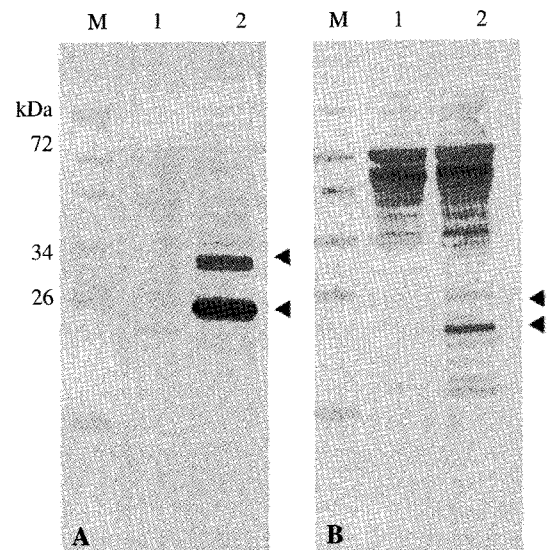


Fig. 3. Analysis of expressed ORF6 gene by Western blotting [Sf9 cells were infected with mock (lane 1) and ORF6 recombinant virus (lane 2), respectively. The cell lysates were subjected to Western blotting at 72 hr after infection using rabbit His₆-specific (A) and porcine PRRSV-specific (B) anti-serum, respectively. M: Molecular weight marker].

타면 반면 mock-infected Sf9 세포에서는 어떠한 형광도 나타내지 않았다(Fig. 2).

Recombinant 바이러스의 ORF6 단백질 발현 유무 및 성상을 확인 분석하기 위하여 Western blotting을 실시한 결과, His₆에 특이적인 항체인 경우에 24kDa 크기에서 특이 밴드가 확인되었으며 돼지 PRRS 바이러스 양성혈청을 사용한 경우에는 같은 크기에서 미약한 band가 확인되었다(Fig. 3).

발현 단백질의 진단 활용성

발현된 ORF6 단백질의 PRRS 바이러스 진단에 있어서 활용 가능성을 조사하기 위하여 현재 상용화 되고 있는 PRRSV ELISA kit를 사용하여 각각 PRRS 양성 및 음성으로 확인된 돼지 혈청을 20개를 이용하여 IFA를 실시한 결과는 Table 1과 같다. ELISA 양성으로 확인된 20개의 돼지 혈청 중 16개가 ORF6 발현단백질을 이용한 IFA법에서 양성으로 나타났으며 4개의 혈청은 음성으로 나타났다. 반면에 ELISA 음성으로 확인된 20개의 돼지 혈청 중 5개만이 음성으로 나타났으며 15개의 혈청은 양성으로 나타나 상용화되고 있는 ELISA kit를 기준으로 할 때 ORF6 발현단백질을 이용한 IFA법의 양성검출 민감도는 51.6%이었으며 음성검출 특이성은 55.6%로 나타났다.

고 찰

최근 의학 분야는 물론 수의학 분야에서도 유전자재조합기법의 발달로 많은 바이러스의 유전자들이 prokaryotic 및 eukaryotic expression system에서 발현되고 이들의 특성이 규명되었으며, 발현된 단백질이 진단 및 예방수단으로 널리 사용되고 있다(Perrin 등, 2007; Kamata 등, 2005; Stewart 등, 2007). 현재 돼지생식기호흡기증후군(porcine reproductive respiratory syndro-

me)은 전 세계적으로 양돈 산업에서 가장 중요한 위치를 차지하고 있는 바이러스성 질병 중의 하나로 국내는 물론 여러나라의 연구자들이 이 질병에 대하여 효과적으로 대처하기 위하여 원인체 바이러스에 대하여 다양한 연구를 수행하고 있으며, 많은 연구결과가 보고되고 있다.

본 연구에서는 국내에서 분리된 PRRS 바이러스 CNV주를 이용하여 unglycosylated membrane 단백질을 encode하는 ORF6 유전자를 baculovirus expression system 하에서 발현시키고 발현된 단백질을 이용하여 PRRS 바이러스의 혈청학적인 진단법에 이용하는 연구를 수행하였다.

순수 분리한 재조합 baculovirus가 ORF6 단백질을 발현하는지 확인하기 위하여 IFA를 실시한 결과, His₆에 특이적인 항체로 반응시킨 감염된 세포에서 강한 형광을 관찰할 수 있었으며, PRRSV에 특이적인 돼지 혈청으로 반응시킨 세포에서도 His₆에 특이적인 항체로 반응시킨 것 보다는 약하지만 형광을 관찰할 수 있었고 mock-infected cell에서는 어떠한 형광도 나타나지 않아 ORF6 단백질이 정상적으로 발현됨을 확인할 수 있었다. 재조합 바이러스가 감염된 Sf9 세포로부터 cell lysate를 준비하여 Western blotting을 실시한 결과, His₆에 특이적인 항체로 반응시킨 것에서는 30KDa과 24KDa 크기에서 강한 band가 형성된 반면, PRRSV에 특이적인 돼지 혈청으로 반응시킨 것에서는 24KDa과 20KDa에서 band가 관찰되었다. Kreutz와 Mengeling (1997)은 baculovirus에서 발현시킨 PRRSV VR2332주의 ORF6 단백질의 크기가 21KDa로 보고하였으며 Dea 등(2000)은 ORF6 유전자가 encode하는 M 단백질의 크기가 18~19KDa라 보고하였다. 본 연구에서는 pBlueBac4.5/V5-His TOPO vector를 transfer vector로 사용할 경우, 발현단백질의 카복실기 말단에 6개의 histidine을 포함하여 20여 개의 아미노산이 추가로 형성되는 것을 고려할 때 His₆와 PRRSV에 특이적인 항체 반응에서 공통적으로 나타나는 24KDa 크기의 단백질이 ORF6 발현단백질로 추정된다. IFA와 Western blotting에서 His₆와 PRRSV에 특이적인 항체로 반응을 시켰을 때 PRRSV에 특이적인 돼지 혈청에서 보다는 His₆에 특이적인 항체와의 반응에서 더욱 강한 반응을 나타낸 것은 PRRSV에 특이적인 돼지 혈청의 경우 자연감염으로 인하여 면역이 형성된 것이고 His₆에 특이적인 항체는 adjuvant를 사용하여 실험적으로 몇 차례 접종을 하여 면역이 형성된 것으로 자연감염시보

Table 1. Results of 40 field serum samples examined by IFA and commercial PRRSV antibody test kit (HerdChek* PRRS 2XR)

		IFA		Total
		Positive	Negative	
HerdChek*	Positive	16	4	20
	Negative	15	5	20
PRRS 2XR*		31	9	40

HerdChek PRRS 2XR: PRRSV antibody test kit (IDEXX Laboratories Inc.)

다도 더 강력한 면역반응이 유도된 것에 기인한 것으로 추정된다. 일반적으로 baculovirus expression system에서 발현되는 단백질의 양은 다른 발현체계에서 보다 많이 발현된다고 알려져 있으나 본 연구에서는 발현된 ORF6가 많이 발현되지 않은 것으로 나타났다. Kreutz와 Mengeling (1997)은 ORF6 단백질에는 소수성 아미노산으로 주로 구성되어 있는 membrane anchoring domain을 가지고 있기 때문에 발현정도가 낮은 것으로 설명하였다. Qian 등(2003)은 PRRS 바이러스 CH-1a 주의 ORF6 유전자를 modify하여 yeast expression system에서 발현한 결과, 2g/L의 높은 수준으로 ORF6 단백질이 발현되었다고 보고하였다. Baculo-virus expression system에서 ORF6 유전자의 발현수준이 낮은 것이 Qian 등(2003)의 연구에서와 같이 ORF6 유전자와 발현 vector 유전자 간의 문제에 의한 것인지는 추후에 규명할 필요가 있는 것으로 사료된다.

현재까지 ORF6 단백질에 특이적인 단클론항체의 생산 및 특성에 관한 연구가 매우 미진한 상태이다. 이는 일반적으로 PRRS 바이러스 입자를 면역원으로 사용하여 생산되는 단클론항체는 대부분이 ORF7 단백질에 특이적인 것으로 ORF5 및 ORF6 단백질에 특이적인 것은 보고가 되어 있지 않다. 특히 ORF6 단백질의 역할이 확실하게 밝혀져 있지 않은 현 시점에서 이에 대한 단클론항체는 ORF6 단백질 특성규명에 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 면에서 본 연구에서 발현된 ORF6 단백질은 ORF6 단백질에 특이적인 단클론항체 생산에 면역원으로 활용될 것이다.

ORF6 유전자에 의하여 code되는 M 단백질은 N 단백을 coding하는 ORF7 유전자에 의하여 code되는 N 단백질에 비하여 보다 더 conserve되어 있는 구조 단백질이므로 혈청학적인 검사를 위한 목표단백으로 오래 전부터 여겨져 왔다(Dea 등, 2000). 이러한 이유로 본 연구에서는 발현된 ORF6 단백질이 PRRS 바이러스에 대한 항체를 검색할 수 있는 진단법에 활용될 수 있는가를 조사하기 위하여 발현된 ORF6 단백질을 이용하여 IFA를 실시하였는데 양성검출 민감도는 51.6%이었으며 음성검출 특이성은 55.6%로 나타났다. 이는 박 등(1998)이 국내에서 분리된 PL96-1 주 및 MA104 세포를 이용한 IFA 법과 비교하였을 때 매우 낮은 것으로 나타나 IFA 진단법으로는 활용 가능성이 매우 낮은 것으로 생각된다. 민감도 및 특이성이 낮게 나타난 원인 중의 하나로 일반적으로 돼지 혈청을 사용하였을 때 IFA 및 ELISA에서 background가 강하게 나타나는 것

으로 추정되며 이를 최대한으로 감소시키면 민감도 및 특이성이 증가할 것으로 생각된다. 이러한 문제점 해결과 함께 발현된 ORF6 단백질을 순수 분리하여 coating 항원으로 사용하는 면역효소법 개발 연구가 진행 중이다.

감사의 글

이 논문은 2007학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

결 론

돼지생식기호흡기증후군 바이러스는 모돈에서 유사산 그리고 자돈에서 호흡기증상을 일으키는 질병의 원인으로 피막을 가지고 있으며 positive sense의 단일가닥으로 구성된 RNA를 유전자를 가지고 있다.

본 연구에서는 국내에서 분리된 PRRS 바이러스 CNV 주의 ORF6 유전자를 크로닝하여 배쿨로바이러스 발현체계에서 발현하였다. 생성된 재조합바이러스에서 ORF6 유전자는 효소중합법과 간접형광항체법으로 확인하였으며 발현된 단백질은 His6와 PRRS 바이러스에 특이적인 항체를 이용하여 Western blotting 방법으로 조사한 결과, 24KDa 크기의 단백을 확인할 수 있었다. 발현된 단백을 이용하여 돼지 혈청에서 PRRS 바이러스에 대한 항체를 검색하기 위한 간접형광항체법을 실시한 결과, 민감도와 특이성이 상용화되고 있는 효소면역법 키트에 비하여 상당히 낮은 것으로 나타나 민감도와 특이성을 향상시키지 않으면 본 연구에서 개발된 발현단백을 이용한 간접형광항체법은 PRRS 바이러스 혈청검사에 활용되지 못할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 박취규, 류영수, 이창희 등. 1998. 돼지 생식기호흡기증후군 바이러스항체 검색에 있어 간접형광항체법(IFA)과 효소면역법(ELISA)의 진단효율 비교. 대한수의학회지 38: 314-318.
- Albina E, Leforban Y, Baron T, et al. 1992. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory

- syndrome virus. *Ann Rec Vet* 23: 167-176.
- Bautista EM, Meulenberg JJ, Choi CS, et al. 1998. Structural polypeptides of the American (VR-2332) strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* 141: 357-1365.
- Cavanagh D. 1997. Nidovirales: A new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae*. *Arch Virol* 142: 629-633.
- Dea S, Gagnon CA, Mardassi H, et al. 2000. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Arch Virol* 145: 659-688.
- Houben S, Callebaut P, Pensaert MB. 1995. Comparative study of a blocking enzyme linked immunosorbent assay and the immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. *J Virol Methods* 51: 125-128.
- Kamata K, Shinozaki K, Okada M, et al. 2005. Expression and antigenicity of virus-like particles of norovirus and their application for detection of noroviruses in stool samples. *J Med Virol* 6: 129-136.
- Keffaber KK. 1989. Reproductive failure of unknown etiology. *Am Assoc Swine Pract Newsletter* 1: 1-10.
- Kim HS, Kwang J, Yoon IJ, et al. 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch Virol* 133: 477-483.
- Kreutz LC, Mengeling WL. 1997. Baculovirus expression and immunological detection of the major structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 59: 1-13.
- Perrin A, Albina E, Breard E, et al. 2007. Recombinant capripoxviruses expressing protein of bluetongue virus: evaluation of immune responses and protection in small ruminants. *Vaccine* 25: 6774-6783.
- Qian P, Li X, Tong G, et al. 2003. High-level expression of the ORF6 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in *Pichia pastoris*. *Virus Genes* 27: 189-196.
- Snijder EJ, Meulenberg JJ. 1998. The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol* 79: 961-979.
- Sorensen KJ, Strandbygaard B, Botner A, et al. 1998. Blocking ELISA's for the distinction between antibodies against european and american strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 60: 169-177.
- Stewart ME, Bonne N, Shearer P, et al. 2007. Baculovirus expression of beak and feather disease virus (BFDV) capsid protein capable of self-assembly and haemagglutination. *J Virol Methods* 141: 181-187.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1985. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
- Wensvoort G, Terpstra C, Laak EA, et al. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: The isolation of Lelystad virus. *Vet Quart* 13: 121-130.
- Yoon IJ, Joo HS, Christianson WT, et al. 1992. An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *J Vet Diagn Invest* 4: 144-147.
- Yoon IJ, Joo HS, Goyal SM, et al. 1994. A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *J Vet Diagn Invest* 6: 289-292.
- Zimmerman JJ, Benfield DA, Murtaugh MP, et al. 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (Porcine arterivirus). In: Disease of swine. Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DL. eds. 9th eds, Blackwell publishing, Oxford: 387-417.