

# IBDV에 대한 단클론항체 생산 및 진단적 응용<sup>‡</sup>

류민상 · 송윤기 · 이승철<sup>1</sup> · 모인필 · 강신영\*

충북대학교 수의과대학, <sup>1</sup>중앙백신연구소

(접수 2011. 1. 24, 게재승인 2011. 3. 24)

## Production and diagnostic application of monoclonal antibodies against infectious bursal disease virus<sup>‡</sup>

Min-Sang Ryu, Yoon-Ki Song, Seung-Chul Lee<sup>1</sup>, In-Pil Mo, Shien-Young Kang\*

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

<sup>1</sup>Choongang Vaccine Laboratories, Daejeon 305-348, Korea

(Received 24 January 2011, accepted in revised from 24 March 2011)

### Abstract

Infectious bursal disease (IBD) caused by infectious bursal disease virus (IBDV) is a highly contagious viral disease in chicken. It causes heavy economic loss by immune suppression and high mortality. The IBDV, designated *Avibirnavirus* in the Family *Birnaviridae*, has a double-stranded RNA genome formed by two segments, segment A and segment B. Segment A encodes a 108 KDa polypeptide that is self-cleaved to produce pVP2, VP3 and VP4, and later pVP2 is cleaved to VP2. The VP2 contains the antigenic regions responsible for elicitation of neutralizing antibodies and VP3 is a major immunogenic protein of IBDV. In this study, monoclonal antibodies (MAbs) specific for IBDV were produced and characterized. All 15 MAbs were specific for IBDV and did not react with other viruses used in this study. The protein specificity of MAbs was determined by comparing the reactivity patterns of each MAb with IBDV VP2 and VP234 recombinant baculoviruses and Western blot analysis. As a result, 7 MAbs (1F5, 2C8, 2F4, 3C7, 4C3, 6F11, 6G5) and 5 MAbs (2A4, 2G2, 3F5, 3G2, 4F10) were specific for VP2 and VP3, respectively. The protein specificity of 3 MAbs (2B8, 3F7, 3F8) were not determined. Five (2C8, 2F4, 4C3, 6F11, 6G5) of the VP2-specific MAbs had a neutralizing activity against IBDV. Some MAbs reacted with IBDV-infected bursa of Fabricius by indirect fluorescence antibody (IFA) and immunohistochemistry (IHC) assay. The MAbs produced in this study would be used for diagnostic reagents for the detection of IBDV infection.

**Key words** : Infectious bursal disease virus (IBDV), monoclonal antibody, VP2, VP3

### 서 론

전염성F낭병(infectious bursal disease, IBD)은 닭에 서 치사율이 높은 급성전염병으로 infectious bursal

disease virus(IBDV)가 원인체이다. IBD는 주로 3~6 주령의 닭에서 F낭 내 B림프구의 파괴를 특징으로 하는 급성 바이러스질환으로 면역억제의 영향으로 2 차적 병원체의 감염이 쉬워지고, 백신에 대한 면역반 응저하를 유발하는 등 양계산업에서 경제적으로 커 다란 손실을 입히고 있다(Lukert와 Davis, 1974; Kibenge 등, 1988).

IBDV는 double-stranded RNA 바이러스로서 *Birna-*

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

<sup>‡</sup>이 논문은 2009학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음

*viridae*에 속하며, 유전자는 두 개의 분절(segment A와 segment B)로 되어있다(Delmas 등, 2004). Segment A는 2개의 open reading frames (ORFs)을 함유하고 있으며 이중 ORF1은 110kDa의 polyprotein (N-VPX-VP4-VP3-C)으로 번역된 후, viral protease인 VP4에 의해 VP2 (outer capsid), VP3 (inner capsid) 및 VP4 (protease)로 발현하며(Hudson 등, 1986; Spies 등, 1987; Bayliss 등, 1990) ORF2는 VP5 (nonstructural protein)로 발현된다(Mundt 등, 1995). 구조단백질인 VP2는 숙주에서 방어에 관여하는 주요 항원으로 중화항체를 생산하며 구조의존성 항원결정기를 포함하고 있다(Becht 등, 1988; Heine 등, 1991). 반면에 VP3는 capsid를 구성하는 중요한 구조단백질로 군특이항원(group-specific antigen)으로 알려졌다(Fahey 등, 1985).

IBDV에는 2가지의 혈청형(serotype)이 존재한다. Serotype I은 닭에서 병원성이 있지만 칠면조와 닭 모두에서 분리되는 serotype II는 닭에서 병원성을 나타내지 않는다(Ismail 등, 1988). Serotype I은 병원성에 따라서 classical strain, variant strain, attenuated strain 및 very virulent strain 등 4개의 그룹으로 분류된다(Lim 등, 1999). Classical strain은 미국 'Gumboro' 지역에서 처음 발병하여 보고된 이후로 세계적으로 양계산업에 영향을 미치고 있으며, 감염된 개체에서 F낭의 염증과 림프구의 괴사를 일으킨다(Lim 등, 1999). Variant strain은 classical strain과 항원적인 차이가 있고 심한 F낭 위축(atrophy)을 일으키며(Vakharia 등, 1994), classical strain과 달리 임상증상은 없다. Attenuated strain은 classical strain과 variant strain이 chicken embryonic fibroblast (CEF) 세포에서 약독화되어 만들어졌으며(Lim 등, 1999) 생백신주로 사용되고 있다. Very virulent strain은 1980년대 유럽, 일본 그리고 중국에서 발병하여 양계산업에 막대한 손실을 입혔으며 심각한 임상증상과 60~100%에 이르는 치사율을 특징으로 하며 모체이행항체에 의해서 생성된 면역체계를 무너뜨릴 수 있다(Berg, 2000).

국내의 경우 1980년에 classical IBDV의 발생이 처음 보고되었으며(이 등, 1981), 1992년 9주령 산란계에서 병원성이 증가한 very virulent IBDV의 발생이 확인되었다(권 등, 1995). 이후 백신접종정책 실시에도 불구하고 야외에서 IBD 발생이 지속적으로 발생하여 양계산업에 피해를 주고 있다.

현재 IBD의 진단은 임상증상, 발생피해, 백신접종 내용 및 spiked-mortality의 양상과 F낭의 괴사를 특징

으로 하는 병리학적 소견을 기초로 이루어진다. IBD로 의심되는 경우, 감염 닭에서 항원 검출 및 바이러스 분리 동정에 의해 최종 진단이 이루어진다. IBD 진단을 위해 적용되고 있는 항원 검출방법으로는 한천겔침강반응법(agar gel immunoprecipitation, AGP), 역전사중합효소연쇄반응법(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) 및 효소면역흡착법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 등이 있다. 하지만, 효소면역흡착법과 역전사중합효소연쇄반응법의 경우 비용이 많이 들고 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 한천겔침강반응의 경우에도 진단비용과 시간을 단축할 수 있으나 특이도가 떨어지는 단점이 있다.

이 연구에서는 IBDV에 대한 특이 단크론항체를 생산하여 특성을 규명하고 진단에 이들 단크론항체의 활용성을 확인하기 위해 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 바이러스와 세포

이번 실험에 사용된 IBDV (LZD228-JAC3 strain)는 중앙백신연구소에서 분양받아 Morser 등(1973)의 방법에 따라 계태아섬유아세포(chicken embryo fibroblast: CEF)에서 증식시켰다. 조류로타바이러스(ARV: AEQ strain, 오하이오주립대학교 Linda Saif 박사), 뉴캐슬병 바이러스(NDV: Lasota strain, 충북대학교 조류질병학실험실), 조류레오바이러스(REO: S-1133 strain, 충북대학교 조류질병학실험실) 및 조류인플루엔자바이러스(AIV: H9N2, 충북대학교 조류질병학실험실)는 단크론항체의 교차반응성을 확인하기 위하여 ARV는 MA104 세포, NDV와 AIV는 CEF 그리고 Reovirus는 chicken embryo liver (CEL) 세포에서 증식시켜 사용하였다. 세포융합에 사용된 myeloma 세포(SP2/O)는 10% 소태아혈청(fetal calf serum: FCS)이 함유된 RPMI 1640 (Invitrogen, USA) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

IBDV VP2 유전자와 VP234 유전자가 발현된 재조합 baculovirus (rVP2 and rVP234)는 중앙백신연구소(Daejeon, Korea)에서 분양받아 Miller (1988)의 방법에 따라 Sf9 세포에 감염시켜 사용하였다.

## 바이러스의 배양 및 정제

IBDV는 CEF 세포에 감염시킨 후, 세포변성효과(cytopathic effect: CPE)가 나타나면 동결과 해동과정을 3회 반복하여 세포 내의 바이러스가 유리된 배양액을 얻었다. 마우스 면역과 Western blot을 시행하기 위한 시료는 얻어진 배양액을 4°C, 3,000 rpm에 30분간 원심분리한 상층액을 4°C, 20,000 rpm에서 2시간 동안 원심분리하여 침전된 virus를 phosphate buffered saline (PBS)에 부유시켜 사용하였다.

## 단클론항체 생산 및 특성 규명

세포융합에 사용한 mouse는 4~5주령의 BALB/c strain (Samtako, Korea)을 사용하였으며 면역에 사용할 항원은 농축된 IBDV (50 µg/ml)를 동량의 Freund's complete adjuvant (Sigma, USA)와 잘 혼합한 후, Coyle 등(1992)의 방법에 따라 면역시켰으며 IBDV에 특이적인 단클론항체생산을 위한 세포융합은 전보(Kang 등, 1989)의 방법을 보완하여 실험하였다.

생산된 단클론항체의 isotype은 Ig isotyping kit (Sigma, USA)를 이용하여 제조사의 사용 술식에 따라 hybridoma 배양상층액을 사용하여 ELISA법으로 확인하였으며 생산된 단클론항체의 IBDV 단백질특이성은 Towbin 등(1979)의 방법에 따라 Western blotting을 다음과 같이 실시하였다. 즉, mouse 면역 유도시 준비하였던 농축 항원을 sample buffer (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol)와 동량으로 섞어 100°C에서 5분 간 처리 후, 7.5% SDS-polyacrylamide gel에서 80 volt로 30분 동안 전기영동하였다. 전기영동한 gel을 transfer buffer (20 mM Tris-HCl, 170 mM glycine, 0.1% SDS, 20% methanol)로 평형화한 후, semi transblot (Invitrogen)을 이용하여 nitrocellulose membrane (NEN<sup>TM</sup> Life Science Products, USA)에 13 volt로 25분간 전이시켰다. Nitrocellulose membrane을 5% skim milk로 실온에서 하룻밤 동안 blocking하고 TBS-T (Tris-Tween 20 buffered saline; 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5)로 5분씩 3회 세척한 다음 각각의 hybridoma 상층액으로 실온에서 60분간 반응시켰다. 이를 다시 TBS-T로 5분씩 3회 세척한 후, TBS-T에 1 : 1,000으로 희석한 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG + IgM (Jackson ImmunoResearch

Lab, USA)을 실온에서 1시간 반응시킨 다음 TBS로 3회 세척하였다. Alkaline phosphatase용 NBT/BCIP buffer 5 ml에 NBT/BCIP용액(Promega, USA)을 넣어 나타나는 band의 발색을 확인하고 증류수에 담그어 반응을 종료시켰다.

## 바이러스 중화시험

생산된 단클론항체들의 중화반응성을 확인하기 위하여 바이러스 중화시험을 다음과 같이 실시하였다. 1 : 500으로 희석된 IBDV와 생산된 단클론항체 배양상층액을 각각 50 µl씩 섞어 37°C에서 1시간 동안 배양시킨 후 CEF세포가 단층 배양된 96-well plate에 접종하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 48시간 배양하였다. Acetone (80%)을 이용하여 감염배양세포를 고정하고 IBDV에 특이적인 단클론항체와 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L)을 이용하여 형광염색한 후 형광현미경으로 검사하였다. 음성 대조군에 비교하여 형광이 80%이상 감소한 것을 IBDV에 중화능력이 있는 단클론항체로 판정하였다.

## 다른 조류 바이러스들과의 반응패턴 조사

생산된 단클론항체들이 다른 조류 바이러스, 즉 ARV, NDV, Reovirus, IBV, AIV와의 교차반응 패턴은 간접형광항체법과 ELISA법으로 확인하였다. 각각의 바이러스가 감염된 세포를 48~72시간 후에 CPE가 나타나면 80% acetone으로 고정했다. PBS로 3회 세척한 후 검사하고자 하는 hybridoma 배양상층액을 100 µl씩 well에 분주하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 3회 세척하고 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG+M을 1 : 100으로 희석하여 50 µl씩 분주하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 3회 세척한 후 mounting buffer를 50 µl 떨어뜨려 형광현미경으로 관찰하였다. ELISA법은 각각의 바이러스에 대한 항체를 측정할 수 있는 상용 kit (Idexx, USA)를 사용하여 제조사의 술식에 따라 수행하였다.

## 단클론항체의 조직 내에서의 반응성 조사

생산된 단클론항체의 조직 내에서 반응성을 확인하기 위해 임상증상 및 역전사중합효소연쇄반응으로 IBDV 감염이 확인된 닭의 F낭 조직을 이용하여

간접형광항체법과 면역조직화학염색법(immunohistochemistry assay, IHC)을 다음과 같이 실시하였다. IHC를 위하여 감염된 조직을 10% neutral buffered formalin 용액으로 48시간 고정한 후 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 조직절편을 준비하였다. 염색 전에 조직절편은 xylene을 사용하여 wax를 제거하였으며 3% 과산화수소가 함유된 methanol로 30분간 처리하여 조직 내의 peroxidase 활성을 제거하고 PBS로 3회 세척하였다. 조직 내의 항원을 노출하기 위해서 2N HCl을 37°C에서 20분간 처리 후 PBS로 3회 세척한 후 0.1% trypsin을 37°C에서 20분간 처리 후 PBS로 3회 세척하였다. 항체의 비특이적 결합을 배제하기 위하여 5% normal horse serum을 37°C에서 20분간 처리 후 PBS로 3회 세척하였다. 위와 같이 처리된 조직절편에 IBDV 특이 단클론항체를 37°C에서 3시간 반응시킨 후 PBS로 3회 세척하였다. 2차 항체로 biotinylated goat anti-mouse antibody(Vector laboratories, USA)를 37°C에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 3회 세척하고 ABC reagent(Vector laboratories)를 37°C에서 40분 반응시켰다. 반응시킨 조직은 발색액(0.6 mg/ml DAB, 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.01M PBS, pH 7.2)으로 반응시킨 후 증류수로 세척하고 hematoxylin으로 대조염색하였고 탈수와 세정 후 검사하였다. 간접형광항체법은 IHC와 1차 항체까지의 과정은 동일하고 2차 항체로 FITC-con-

jugated goat anti-mouse IgG+IgM을 1 : 100으로 희석하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 3회 세척하고 탈수시킨 후 형광현미경을 이용하여 관찰하였다.

## 결 과

### 단클론항체의 특성

IBDV로 면역시킨 mouse를 사용하여 세포융합을 수행하여 15개의 IBDV 특이 단클론항체를 생산하였으며 이들의 특성은 Table 1과 같다. 생산된 단클론항체 모두 IBDV가 감염된 계태아섬유아세포에서 양성 대조군으로 사용한 IBDV 특이 닭혈청과 마찬가지로 뚜렷한 형광이 관찰되었으나 IBDV-free SPF 닭혈청에서는 형광이 관찰되지 않았다(Fig. 1A). 단클론항체와 IBDV 단백질과의 반응성을 확인하기 위하여 각각의 단클론항체와 IBDV VP2 및 VP234 재조합 baculovirus와의 반응성을 IFA법으로 확인한 결과, 7개의 단클론항체(1F5, 2C8, 2F4, 3C7, 4C3, 6F11, 6G5)가 VP2와 VP234가 발현된 재조합바이러스에서 양성으로 나타나 이들 단클론항체는 VP2에 특이적인 것으로 추정할 수 있었다. 또한, 5개의 단클론항체(2A4, 2G2, 3F5, 3G2, 4F10)는 Western blotting법에서 32KDa크기

**Table 1.** Characterization of monoclonal antibodies (MAbs) against infectious bursal disease virus (IBDV)

MAb	Isotype	Protein specificity	Reactivity by the following tests				
			IFA*			NA**	Western blot
			Whole	rVP2	rVP234		
2C8	G2b	VP2	+	+	+	+	-
4C3	G2a	VP2	+	+	+	+	-
2F4	G2a	VP2	+	+	+	+	-
6F11	G2b	VP2	+	+	+	+	-
6G5	M	VP2	+	+	+	+	-
2A4	G2a	VP3	+	-	+	-	+
3F5	G2a	VP3	+	-	+	-	+
4F10	G2a	VP3	+	-	+	-	+
2G2	G2a	VP3	+	-	+	-	+
3G2	G2b	VP3	+	-	+	-	+
2B8	G2a	?***	+	-	+	-	-
3F7	G2a	?	+	-	+	-	-
3F8	M	?	+	-	+	-	-
3C7	G2a	VP2	+	+	+	-	-
1F5	M	VP2	+	+	+	-	-

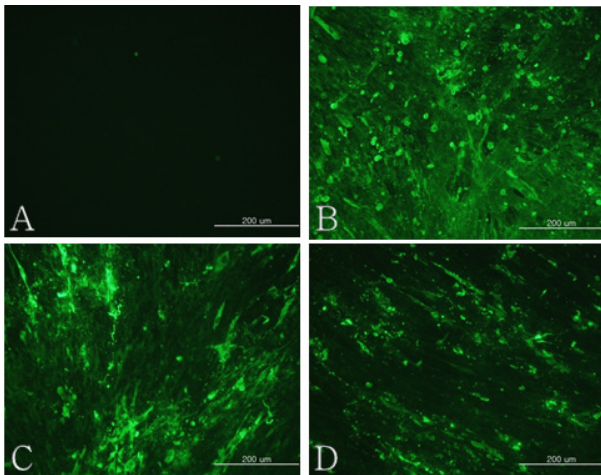
\*Indirect fluorescence antibody assay, Whole: IBDV-infected CEF cells, rVP2: IBDV VP2 recombinant baculovirus-infected Sf9 cells, rVP234: IBDV VP234 recombinant baculovirus-infected Sf9 cells, \*\*Neutralizing activity, \*\*\*Not determined.

의 VP3와 반응하여 VP3에 특이적인 것으로 확인되었다(Fig. 2). 하지만, 3개의 단클론항체(2B8, 3F7, 3F8)는 본 연구에서 단백특이성을 확인할 수 없었다. 단클론항체의 isotype은 3개의 단클론항체가 IgM, 9개의 단클론항체는 IgG2a, 그리고 3개의 단클론항체는 IgG2b로 확인되었다(Table 1).

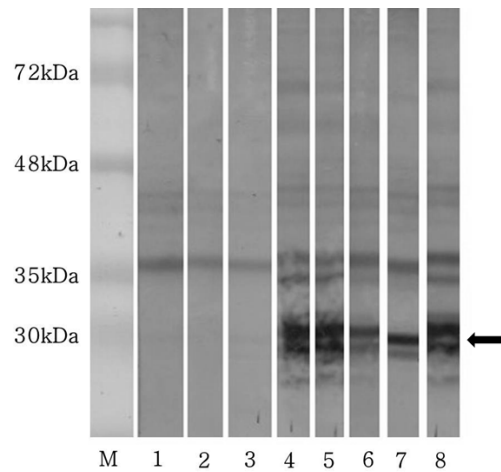
IBDV에 대한 중화능을 검사한 결과, 15개의 단클

론항체 중 5개의 단클론항체(2C8, 2F4, 4C3, 6F11, 6G5)만이 IBDV를 중화시키는 것으로 확인되었다.

생산된 단클론항체와 다른 조류 바이러스와의 반응성을 IFA와 ELISA법으로 조사한 결과는 Table 2와 같다. 생산된 모든 단클론항체는 IBDV 이외의 다른 바이러스와는 반응을 나타내지 않았다.



**Fig. 1.** Immunofluorescence of IBDV-specific monoclonal antibodies (MAbs) IBDV-infected chicken embryo fibroblast (CEF) cells were reacted with IBDV-specific MAbs. (A) IBDV-free SPF chicken serum, (B) IBDV-specific chicken serum, (C) MAb 2G2, (D) MAb 6F11.

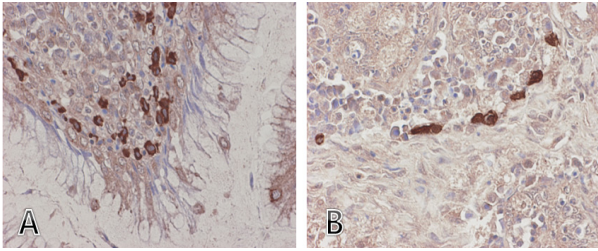


**Fig. 2.** Western blotting analysis of IBDV-specific monoclonal antibodies. Arrow indicates the IBDV VP3-specific 32KDa protein. M: Molecular weight marker, lane 1: MAb 3F7, lane 2: MAb 3F8, lane 3: MAb 4F7, lane 4: MAb 2A4, lane 5: MAb 2G2, lane 6: MAb 3F5, lane 7: MAb 3G2, lane 8: MAb 4F10.

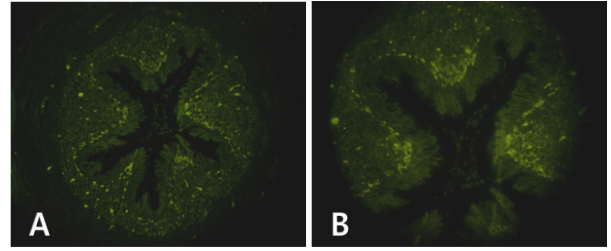
**Table 2.** Reactivity patterns of IBDV-specific monoclonal antibodies (MAbs) with other avian viruses by IFA or ELISA

MAb	Reaction with other avian viruses*									
	IBDV		ND		AIV		IBV	REO	ARV	
	IFA	ELISA	IFA	ELISA	IFA	ELISA	ELISA	IFA	IFA	
1F5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2A4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2B8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2C8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2F4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2G2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3C7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3F5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3F7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3F8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4C3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3G2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4F10	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6F11	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6G5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

\*NDV: Newcastle disease virus, ARV: Avian rotavirus, AIV: Avian influenza virus, REO: Avian reovirus, IBV: Infectious bronchitis virus.



**Fig. 3.** Immunohistochemical staining of IBDV-infected chicken bursa of Fabricius. Bursa of Fabricius infected with IBDV was reacted with IBDV VP2-specific MAb 4C3 (A) and IBDV VP3-specific MAb 3F5 (B).



**Fig. 4.** Confirmation of IBDV infection by indirect fluorescence antibody (IFA) assay using IBDV-specific monoclonal antibodies (MAbs). Bursa of Fabricius infected with IBDV was reacted with IBDV-specific MAb 4C3 (A) and 1F5 (B).

### 단크론항체의 진단 활용성

생산된 단크론항체의 IBDV 진단에서 활용 가능성을 조사하기 위하여 임상증상 및 RT-PCR법으로 IBDV 감염이 확인된 닭의 F낭 조직을 이용하여 IFA와 면역조직화학염색법을 실시한 결과, F낭과 총배설강을 연결하는 Plica uroproctodeales 부분과 F낭의 follicle내의 림프구에서 갈색의 양성반응이 나타나 단크론항체 4C3, 3F5, 1F5가 IBDV 감염세포를 특이적으로 검출하는 것을 확인하였다(Fig. 3 및 Fig. 4).

### 고 찰

전염성F낭병은 전 세계적으로 양계산업에서 경제적으로 큰 피해를 주고 있는데 국내에서도 전염성F낭병이 1980년 처음 보고된 이후 백신접종에도 불구하고 지속적으로 발생하고 있어 양계산업에 큰 피해를 주고 있는 실정이다. 전염성F낭병의 진단은 주로 의심시료를 IBDV 항체 부재 발육계란에 접종하여 바이러스 증식여부를 검사하여 최종 진단을 하고 있다. 하지만, 이러한 검사방법은 높은 검사비용과 검사기간이 길다는 단점이 있다. 이러한 이유로 특이도와 민감도가 높은 RT-PCR법과 real-time PCR법이 대체 진단법으로 이용되고 있다. 하지만, 이러한 진단법 또한 분자생물학적 전문지식과 고가의 장비를 구비해야 하는 단점이 있다. 그러므로 많은 수의 병성감정 실시기관에서는 가격이 저렴하고 간편하게 실시할 수 있는 한천겔침강반응법(AGP)으로 검사를 하고 있으나 이 또한 역시 민감도가 낮고 검사기간이 길다는 단점이 있다. 근래에 이러한 IBDV진단법의 단점을 보완한 ELISA와 면역크로마토그래피법의 개발이

활발하게 진행되고 있다. 따라서 본 연구에서는 IBDV에 대한 특이적인 단크론항체를 생산하여 특성을 규명하고, IBDV 진단에 이들 단크론항체의 활용성을 확인하였다.

이번 연구에서 생산된 15개의 단크론항체(2A4, 2G2, 3F5, 3G2, 4F10, 1F5, 2C8, 2F4, 3C7, 4C3, 6F11, 6G5, 2B8, 3F7, 3F8)는 모두 IBDV로 감염된 세포에서 양성으로 나타났다. IBDV VP2와 VP234 유전자 재조합 baculovirus에 감염된 Sf9 세포에서 IFA법을 실시한 결과 7개의 단크론항체(1F5, 2C8, 2F4, 3C7, 4C3, 6F11, 6G5)는 두 개의 유전자 재조합 baculovirus 모두에서 양성으로 나타나 이들 단크론항체가 VP2에 특이적인 것으로 추정할 수 있었다. 반면에 나머지 8개의 단크론항체는 IBDV VP234 유전자 재조합 baculovirus에 감염된 세포에서만 양성으로 나타났다. 단백질 특이성을 Western blotting법으로 확인한 결과, 15개의 단크론항체 중 5개(2A4, 2G2, 3F5, 3G2, 4F10)에서 32KDa에서 특이적인 밴드를 확인하여 이들 단크론항체가 VP3에 특이적인 것을 확인할 수 있었다. 반면 나머지 10개의 단크론항체는 특이 밴드를 확인하지 못하였다. 특히 VP2에 특이적인 단크론항체 7개는 모두 특이 밴드를 확인할 수 없었다. Fahey 등(1989)은 VP2가 SDS와 boiling에 의해 파괴되는 구조적인 epitope을 가지고 있다는 것을 증명하였다. 이번 연구에서도 Fahey 등(1989)의 연구에서와 마찬가지로 Western blot에서 항원을 처리하는 과정에서 boiling을 하고 또한, loading하는 과정 중의 SDS의 영향으로 VP2부분의 epitope이 파괴되어 VP2 특이 단크론항체가 반응하지 못하였을 것으로 추정할 수 있다. 생산된 15개의 단크론항체에 대한 바이러스 중화능력 또한 5개(2C8, 2F4, 4C3, 6F11, 6G5)의 단크론항체가 중

화능력이 있는 것으로 나타났으며 이들 단크론항체는 모두 VP2 특이 단크론항체로 확인되었다. VP2 단백질은 바이러스 capsid를 구성하는 주요한 성분으로 중요한 숙주방어 항원이며 바이러스 중화항체를 생산하는데 필요한 구조의존성 항원결정기를 포함하고 있다(Becht 등, 1988; Heine 등, 1991). Martinez-torrecuadrada 등(2000)의 연구를 따르면 VP2는 중화항체를 생성하는 반면 VP3는 중화항체를 생산해 내지 못하였다. 또한, Pitcovski 등(2003)은 VP3를 baculovirus에서 발현시켜 닭에 접종한 결과, 높은 역가의 항체가 생성되었으나 vvIBDV 공격접종시 방어작용이 없었다고 보고하였다. 이처럼 이번 연구에서 생산된 VP2 특이 단크론항체는 VP2 단백질의 특성인 중화능력이 있는 것으로 밝혀졌으며, VP3 특이 단크론항체는 중화능력이 없는 것으로 밝혀졌다. 하지만, VP2에 특이적인 7개의 항체와 VP3에 특이적인 5개의 항체 외에 3개의 단크론항체(2B8, 3F7, 3F8)는 명확히 판명되지 못했다. 유전자 재조합바이러스를 이용한 실험에서 VP2에는 반응하지 않았으므로 VP2에 특이적인 항체가 아닌 VP3이나 VP4에 특이적인 항체로 생각한다. 교차반응실험의 결과, 15개의 단크론항체 모두 5종(ARV, NDV, AIV, IBV 그리고 Reovirus)의 조류바이러스에 반응하지 않았다. 위의 5종의 바이러스와 교차반응이 나타나지 않은 점으로 보아 이번 실험에서 생산된 단크론항체는 특이도가 높은 것으로 생각한다.

이번 연구에서 생산된 단크론항체의 진단활용 가능성을 알아보기 위하여 임상증상 및 RT-PCR법으로 IBDV 감염이 확인된 닭의 F낭 조직을 이용하여 IFA와 면역조직화학염색법을 적용한 결과, 3개의 단크론항체(4C3, 3F5, 1F5)에서 감염세포를 특이적으로 검출할 수 있었다. 조직에 적용한 단크론항체는 VP2와 VP3 특이 단크론항체와 IBDV 단백질특이성이 확인되지 않은 단크론항체 그룹에서 각각 하나씩 적용하였다. 이로써 생산된 단크론항체의 진단활용 가능성을 확인할 수 있었다.

이번 실험을 통해 생산된 IBDV 특이적 단크론항체는 질병의 발생 시 신속히 진단할 수 있는 면역크로마토그래피법 또는 ELISA법을 이용한 진단키트의 생산에 이용될 수 있다. Choi 등(2010)은 VP2에 특이적인 단크론항체를 이용하여 IBDV를 검출하도록 고안된 면역크로마토그래피법 검사키트를 이용하여

IBDV 진단에 유용성을 조사한 결과, IBDV의 진단에 매우 유용하다는 결론을 도출하였다. 또한, Jeon 등(2008)은 VP2에 특이적인 단크론항체를 이용하여 DAS-ELISA법을 개발하여 진단에 유용성을 조사한 결과, IBDV의 진단에 적합하다고 보고한 바 있다. 따라서, 본 연구에서 생산된 VP2 특이 단크론항체 역시 민감도와 특이도를 높이기 위한 국내에서 분리된 여러 가지 IBDV와의 교차반응성 확인 등의 추가 적용 실험을 통해 위와 같은 진단키트의 개발에 유용하게 사용될 수 있을 것이라고 생각한다.

## 결 론

전염성F낭병은 IBDV에 의해서 발생하는 질병으로 양계산업에 경제적으로 큰 피해를 주는 질병이다. 이번 연구에서는 IBDV에 특이적으로 반응하는 단크론항체를 생산하여 이들의 특성을 규명하고 진단활용 가능성에 대하여 실험하였다.

정제한 IBDV로 면역시킨 mouse를 사용하여 일반적인 단크론항체 생산방법을 이용하여 세포융합을 하고 IBDV에 특이적인 항체를 생산하는 hybridoma를 간접형광항체법을 이용하여 선별하였다. 생산된 15개의 단크론항체는 간접형광항체법에서 양성으로 나타났으며, 7개의 단크론항체는 VP2에 특이적으로 나타났으며 5개의 단크론항체는 Western blot법으로 32KDa로 VP3에 특이적인 것을 확인할 수 있었다. 단크론항체의 중화반응성을 확인한 결과, 5개의 VP2 특이 단크론항체가 IBDV를 중화시킴을 확인하였다. 조류 바이러스(NDV, AIV, Rotavirus, IBV 그리고 Reovirus)와 교차반응실험을 실시한 결과, 모든 단크론항체가 이들 바이러스와 교차반응을 나타내지 않았다. IBDV에 감염된 닭의 F낭을 사용하여 일부 단크론항체로 조직화학염색과 간접형광항체법을 수행한 결과, 생산된 단크론항체는 IBDV 감염세포를 특이적으로 검출할 수 있었다.

이상의 결과로부터 이번 실험에서 생산된 단크론항체 중 중화능력이 있는 단크론항체는 향후 중화반응에 관여하는 epitope mapping 연구에 사용될 수 있으며 15개의 단크론항체 모두 특이성이 높아 IBDV 진단에 활용될 것으로 생각한다.

## 참 고 문 헌

- 權容國, 毛仁筆, 成換雨, 姜文日, 高泓范, 李政吉, 楊昌根. 1995. 傳染性 F囊病 바이러스 國內 分離株 SH/92 病原性研究. 農業科學論文集 37: 637-647.
- 이영옥, 김순재, 최정옥 전우상, 박근식. 1981. 국내종계의 infectious bursal disease virus의 감염상황 및 분리주의 생물학적 특성. 농사시험보고서(축산, 가축위생편) 23: 136-142.
- Bayliss CD, Spies U, Shaw K, Peters RW, Papageorgiou A, Müller H, Bournnell ME. 1990. 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* 71(6): 1303-1312.
- Becht H, Müller H, Müller HK. 1988. Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol* 69(3): 631-640.
- Berg TP. 2000. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol* 29(3): 175-194.
- Choi KS, Oh JS, Jeon WJ, Na KS, Lee EK, Lee YJ, Sung HW, Ha GW, Kwon JH. 2010. Rapid detection of infectious bursal disease virus(IBDV) in chickens by an immunochromatographic assay kit. *J Poult Sci* 37(2): 167-172.
- Coyle PV, Wyatt D, McCaughey C, O'Neill HJ. 1992. A simple standardised protocol for the production of monoclonal antibodies against viral and bacterial antigens. *J Immunol Methods* 153(1-2): 81-84.
- Delmas B, Kibenge FSB, Leong JC, Mundt E, Vakharia VN, Wu JL. 2004. In *Virus Taxonomy. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses: Birnaviridae*. Academic Press. London: 561-569.
- Fahey KJ, O'Donnell IJ, Bagust TJ. 1985. Antibody to the 32K structural protein of infectious bursal disease virus neutralizes viral infectivity in vitro and confers protection on young chickens. *J Gen Virol* 66(12): 2693-2702.
- Fahey KJ, Emy K, Crooks J. 1989. A conformational immunogen on VP-2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens. *J Gen Virol* 70(6): 1473-1481.
- Heine HG, Haritou M, Failla P, Fahey K, Azad A. 1991. 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* 72(8): 1835-1843.
- Hudson PJ, McKern NM, Power BE, Azad AA. 1986. Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res* 14(12): 5001-5012.
- Ismail NM, Saif YM, Moorhead PD. 1988. Lack of pathogenicity of five serotype 2 infectious bursal disease viruses in chickens. *Avian Dis* 32(4): 757-759.
- Jeon WJ, Chang BS, Park MJ, Lee EK, Joo HD, Kwon JH, Choi KS. 2008. Detection of infectious bursal disease virus by double antibody sandwich ELISA. *J Bacteriol Virol* 38(3): 139-147.
- Kang SY, Saif LJ, Miller KL. 1989. Reactivity of VP4-specific monoclonal antibodies to a serotype 4 porcine rotavirus with distinct serotypes of human(symptomatic and asymptomatic) and animal rotaviruses. *J Clin Microbiol* 27(12): 2744-2750.
- Kibenge FS, Dhillon AS, Russell RG. 1988. Growth of serotypes I and II and variant strains of infectious bursal disease virus in Vero cells. *Avian Dis* 32(2): 298-303.
- Lim BL, Cao Y, Yu T, Mo CW. 1999. 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* 73(4): 2854-2862.
- Lukert PD, Davis RB. 1974. Infectious bursal disease virus: growth and characterization in cell cultures. *Avian Dis* 18(2): 243-250.
- Martinez-Torrecuadrada JL, Lazaro B, Rodriguez JF, Casal JJ. 2000. Antigenic properties and diagnostic potential of baculovirus-expressed infectious bursal disease virus proteins VPX and VP3. *Clin Diagn Lab Immunol* 7(4): 645-651.
- Miller LK. 1988. Baculoviruses for foreign gene expression in insect cells. *Review. Biotechnology* 10: 457-465.
- Morser MJ, Kennedy SI, Burke DC. 1973. Virus-specified polypeptides in cells infected with Semliki forest virus. *J Gen Virol* 21(1): 19-29.
- Mundt E, Beyer J, Müller H. 1995. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *J Gen Virol* 76(2): 437-443.
- Pitcovski J, Gutter B, Gallili G, Goldway M, Perelman B, Gross G, Krispel S, Barbakov M, Michael A. 2003. Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. *Vaccine* 21(32): 4736-4743.
- Spies U, Müller H, Becht H. 1987. Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Res* 8(2): 127-140.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(9): 4350-4354.
- Vakharia VN, Snyder DB, Luticken D, Mengel-Whereat SA, Savage PK, Edwards GH, Goodwin MA. 1994. Active and passive protection against variant and classic infectious bursal disease virus strains induced by baculovirus-expressed structural proteins. *Vaccine* 12(5): 452-456.