

한국형 홀스타인종 젖소의 BLV env 유전자의 특성분석

정행진¹ · 유성란² · 이준현² · 도창희¹ · 서국현³ · 류승희⁴ · 정상일⁵ · 상병찬^{1*}

¹충남대학교 동물바이오시스템과학과, ²충남대학교 동물자원생명과학과, ³전남대학교 수의과대학, ⁴충남 축산기술연구소, ⁵충남대학교 수의과대학

Characterization of BLV env gene in Korean Holstein dairy cattle

Hang-Jin Jeong¹, Seong-Lan Yu², Jun-Heon Lee², Chang-Hee Do¹, Guk-Hyun Suh³, Seung-Heui Ryoo⁴, Sang-Il Chung⁵, Byung-Chan Sang^{1*}

¹Department of Animal Biosystem Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

²Department of Animal Science and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

³College of Veterinary Medicine, Cheungnam National University, Gwangju 305-746, Korea

⁴Government of Changcheongnam-Do, Livestock Research Institute, Cheongyang 345-811, Korea

⁵College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Received on 16 May 2011, revised on 4 June 2011, accepted on 20 June 2011

Abstract : This study was performed to investigate the characterization of infectious BLV env gene isolated form *Korean Holstein Cattle* and to determine its incoming origin. Gp51 region of BLV env gene known as having important role in immunological function was characterized using PCR-RFLP sequencing and phylogenetic analysis. BLV env gene was grouped into PCR-RFLP patterns with three restriction endonucleases including Pvu II, BamHI and HaeIII, and we identified two new RFLP patterns from nucleotide sequences of each group. Phylogenetic analysis showed that 80% of the Korean Holstein was included in the USA and Japanese group. These results here can provide a valuable information about the character of the BLV env gene and research on infection route of BLV.

Key words : BLV, PCR-RFLP, Phylogeny

I. 서론

젖소의 유전능력이 우수하여도 생산능력에 치명적인 영향을 미치는 질병에 걸렸을 경우 생산성 향상은 기대하기 어렵다. 젖소의 생산능력에 지대한 영향을 미치는 소 백혈병(bovine leukosis, BL)은 전 세계적으로 발병하고 있는 혈액 종양성 질병이다. 이는 BLV(bovine leukemia virus) 감염이 원인이 되어 림프세포에 이상증상을 일으키며 우군에 감염되면 근절하기가 매우 어려워 낙농산업에 치명적인 손실을 초래하는 전염성 질병이다. 중남미의 경우 젖소의 30~50%정도가 BLV에 감염되어 있으며 이중 20~30% 정도가 백혈병(BL) 즉 지속성 림프증후군(persistent lymphocytosis, PL)으로 진행되고, 1~5%가 림프종양(lymphosarcoma)으로 발전하는 것으로 보고되고 있다(Xu 등,

1993; Mirsky 등, 1998). 젖소가 BLV에 감염되어 PL로 발전하면 그 지속기간이 증가함에 비례하여 림프증후군 상태가 악화되고 유량과 유지량은 현저히 감소한다(Da 등, 1993). 소 백혈병의 원인균인 BLV는 Retroviridae의 Deltaretrovirus에 속하는 bovine leukemia virus이며 sRNA 바이러스이다. BLV는 proviral DNA 상태는 Retroviridae에 공통으로 존재하며 5' LTR(long terminal repeat), gag, pol, env 및 3' LTR로 구성되어 있으며 BLV에 감염되면 숙주 genome내에 삽입되어 존재되는 것으로 알려져 있다(Sagata 등, 1985). BLV의 gag 유전자는 virus core protein을 coding하는 유전자이고, pol 유전자는 reverse transcriptase를 만들어 내는 유전자이며, env 유전자는 envelope glycoprotein을 coding한다. 특히 BLV env 유전자는 염기서열 code가 antigen-antibody작용이나 virus-host간의 작용들이 제한되는 것과 같은 생물학적으로 아주 중요한 기능들을 포함하는 유전자로 이 부위의 염기서열은 많은

*Corresponding author: Tel: +82-42-821-5788

E-mail address: bcsang@cnu.ac.kr

다형성을 포함하고 있다(Camargos 등, 2002). BLV의 유전자들 중 envelope부위는 gp51과 gp30으로 구성되어 있고 이 부위는 바이러스-숙주 간의 작용과 관련이 있다고 알려져 있다(Licursi 등, 2002; Licursi 등, 2003; Recabal 등, 2005; Monti 등, 2005; Hemmatzadeh, 2007). 따라서 최근에는 BLV env 유전자의 특성을 규명하기 위하여 RFLP, 염기서열분석에 의한 BLV type을 구별해 오고 있으며, BLV 유전자의 발현양상 및 유전적 기전에 대한 연구가 보고되고 있다(Licursi 등, 2002; Fechner 등, 1996; Asfaw 등, 2005). BLV 유전자의 특성에 대한 연구로는 Argentina, USA, Iran 및 Japan 등 여러 나라에서는 BLV 주요 유전자인 gag, pol 및 env 유전자에 대한 연구가 이루어져 왔다. 특히, BLV env 유전자의 gp51은 surface protein으로 바이러스의 결합에 영향을 끼치는 것으로 알려져 있어 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 각 국가들에서 연구된 BLV env 유전자의 염기서열과 비교 분석하거나 BLV type을 구별해왔다(Licursi 등, 2002; Licursi 등, 2003; Recabal 등, 2005; Monti 등, 2005; Hemmatzadeh, 2007).

오래전부터 외국으로부터 국내에 도입되어 사육되어온 한국형 홀스타인종에 대한 백혈병(BL)의 원인균인 BLV의 감염실태는 ELISA기법에 의거 진단한 결과 지역별 BLV감염율의 평균은 54.20%로 대체로 높은 것으로 보고하였다(서, 2004). 이는 한국형 홀스타인종 젖소의 BLV감염에 의한 지속성립프증후군(PL)에 의한 상당한 생산성의 저하가 있을 것으로 예상된다. 그러므로 한국형 홀스타인종 젖소에 유입된 백혈병의 원인균인 BLV의 분자유전학적 특성과 국내 유입경로의 규명에 대한 연구의 필요성이 시급히 요청된다. 따라서 본 연구는 우리나라에 오래 동안 사육되어온 한국형 홀스타인종에 감염된 BLV의 유전자 중 면역학적으로 아주 중요한 기능을 담당하고 있는 것으로 알려진 BLV env 유전자의 특성과 BLV의 국내 유입유래를 규명하고자 제한효소절편다형(RFLP)과 염기서열 및 계통도를 분석하여 백혈병의 원인균인 BLV의 유전적 특성과 유입유래를 연구하는데 귀중한 기초자료를 제공하고자 하는데 있다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물 및 재료

본 연구에 이용된 공시동물은 우리나라의 기후풍토에 오

랜 기간 동안 사육되면서 선발과 교배를 통하여 적응하여온 한국형 홀스타인종 젖소로 충청남도 소재한 충남대학교 동물사육장 18두, 대일목장 90두, 토성목장 36두, 연곡목장 26두와 충청북도 소재 청원모장 23두, 총 193두를 이용하였다.

혈액채취는 젖소의 경정맥에서 3 ml의 혈액을 EDTA가 함유된 진공채혈관(Vacutainer tube with EDTA)에 채취하였으며, genomic DNA 추출은 DNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN, Germany)를 이용하였고, 추출된 DNA는 4°C에 보관하여 사용하였다.

2. BLV env 유전자의 증폭

BLV env 유전자의 증폭을 위한 gp 51 region의 증폭 primer는 env5032(5'-TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA-3') / env5608r(5'-ACAACAACCTCTGG GAAGGGT-3')를 이용하여 PCR을 실행하였다(Sagata 등, 1985). PCR 증폭은 1× buffer, 1.5 mM MgCl₂ buffer, 0.2 mM dNTP, forward와 reverse oligonucleotide primer 각각 10 pmol, 1.5 units Taq DNA polymerase(AmpliTaq Gold, USA)와 50 ng genomic DNA와 멸균수를 첨가하여 총 50 μl 용량으로 반응하였다. PCR 반응조건은 최초 denaturation으로 94°C에서 10분간 반응시킨 후, 95°C에서 30초, 65°C에서 30초, 72°C에서 1분에서 37회 반복하였으며, 72°C에서 4분간 final extension 후 4°C에서 종료하였다. 증폭된 각각의 PCR product들은 2% agarose gel에 전기영동하여 증폭여부 및 크기를 확인하였다.

3. 제한효소 절편다형분석

PCR에 의해 증폭된 BLV env product을 제한효소 Pvu II, BamH I, Bcl I (New England Biolab, USA) 및 Hae III(Promega, USA)로 절단하였다. 제한효소처리 반응액은 3 unit의 PvuII, BamH I, Bcl I 및 HaeIII와 각 제한효소에 맞는 1× buffer 그리고 PCR product 15 μl를 첨가하여 최종 20 μl가 되도록 하였고, 이 반응액을 37°C에서 overnight으로 incubation하여 PCR product가 완전히 절단되도록 하였으며 DNA단편은 3% agarose gel에 전기영동을 실시하였다.

4. 염기서열 및 계통도 분석

PCR-RFLP를 통해 나타난 genotype들의 각 group별 염기서열을 확인하기 위하여 sequencing을 실시하였다. PCR 증폭산물을 PCR Purification Kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 정제한 후 Applied Biosystems 3730 DNA sequencer(PE Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열을 분석하였고, Chromas software(eqchnelysium, Australia)를 사용하여 염기서열을 확인하였다. 이들 염기서열은 ClustalW program을 이용하여 alignment한 후 단일염기다형을 확인하였다(http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2; Thompson 등, 1994). Sequence divergency는 Kimura2 parameter(K2P)모델을 이용하여 계산하였고, 계통도 분석은 MEGA3 프로그램(Tamura 등, 2007)의 K2P를 이용한 Neighbor-Joining(NJ) 방법으로 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

1. BLV *env* 유전자 증폭

소 백혈병의 원인균인 BLV의 유전자 중 면역학적으로 아주 중요한 기능을 담당하고 있는 BLV *env* 유전자의 gp51 region을 PCR 기법을 이용하여 증폭한 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 한국형 홀스타인종 젖소 BLV

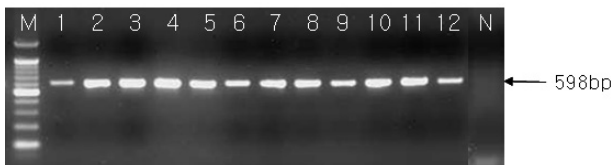


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis patterns for the BLV *env* gene (gp 51 region) products using PCR in Korean Holsteins. Lane M: 100 bp DNA ladder marker (ELPIS, Korea), lanes 1~12: PCR products for the BLV *env* gene in Korean Holstein.

유전자의 gp 51 region의 증폭산물이 lane 1-12에서 보는 바와 같이 598 bp 위치에서 잘 증폭된 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 Sagata 등(1985)이 보고한 BLV *env* 유전자의 gp 51 region의 증폭양상이 598 bp라고 보고한 결과와 잘 일치하였다.

2. 제한효소절편다형 및 염기서열분석

BLV *env* 유전자의 제한효소절편다형성(RFLP)을 분석하기 위하여 BLV *env* 유전자의 gp 51 region를 증폭시킨 후 *env* gene marker로 많이 사용되는 *Pvu*II, *Bcl*I, *Bam*H I 및 *Hae*III 4종류의 제한효소를 이용하여 이의 증폭산물을 절단한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 제한효소 *Pvu*II의 경우 598 bp의 크기로 절단 부위가 없었으며, *Bcl*I 은 292/306 bp의 한 가지 타입의 단편을 보였고, *Bam*H I의 경우 195/403 bp와 598 bp 두 가지 타입의 결과를 확인할 수 있었다. 이 세 가지의 제한효소는 기존에 보고된 제한효소절편다형의 결과와 잘 일치하는 것을 확인할 수 있었다(Fechner 등, 1997; Beier 등, 2001; Licursi 등, 2002).

그러나 제한효소 *Hae*III는 PCR-RFLP를 수행하여 확인한 결과 61/37/285/27/94/94 bp와 61/37/87/198/27/94/94 bp 두 가지 pattern의 다형성이 나왔으나, 단편들의 크기가 작아 정확한 크기를 판별하기는 어려웠다. 따라서 BLV *env* 유전자의 증폭산물에 대한 각각의 제한효소에서 같은 pattern으로 나온 샘플 group별로 PCR를 수행한 후 sequencing하여 염기서열을 확인한 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 각각의 BLV *env* 유전자의 gp51에 대한 증폭산물에 대한 각각의 제한효소에서 같은 pattern으로 나온 샘플 group을 sequencing을 하여 분석한 결과 총 10개의 group으로 나누어진다. 이렇게 나누어진 sequence들을 갖고 각 enzyme site들을 찾아서 비교해본 결과 *Pvu*II, *Bcl*I 그리고 *Bam*H I의 경우에는 PCR-

Table 1. PCR-RFLP patterns for the BLV *env* gene products in Korean Holstein dairy cattle.

RFLP pattern	Restriction enzyme				Sample group
	<i>Pvu</i> II	<i>Bam</i> H I	<i>Bcl</i> I	<i>Hae</i> III	
1	598	195/403	292/306	61/37/285/27/94/94	Group 1, 8, 9
2	598	195/403	292/306	61/37/87/198/27/94/94	Group 2-6, 10
3	598	598	292/306	61/37/6/81/198/27/94/94	Group 7



Fig. 2. Alignment of the BLV env gene sequence variations for the Korean (KOR_group 1-10) and Japanese (K02120) Holstein dairy cattle. Dots indicate identical nucleotides with K02120.

RFLP를 수행하여 확인한 결과 기준에 보고된 제한효소 절편다형과 동일함을 확인할 수 있었다(Fechner 등, 1997; Beier 등, 2001; Licursi 등, 2002). 그러나 *HaeIII*의 경우에는 PCR-RFLP 결과에서는 2가지 타입이 나왔지만 염기

분석결과 세 가지 타입으로 나왔다. 처음에 나온 두 가지 타입 중 61/37/87/198/27/94/94 bp보다 한 곳이 더 잘리는 61/37/6/81/198/27/94/94 bp의 다형성이 있음을 확인하였다. 이들 중 61/37/87/198/27/94/94 bp의 경우에는

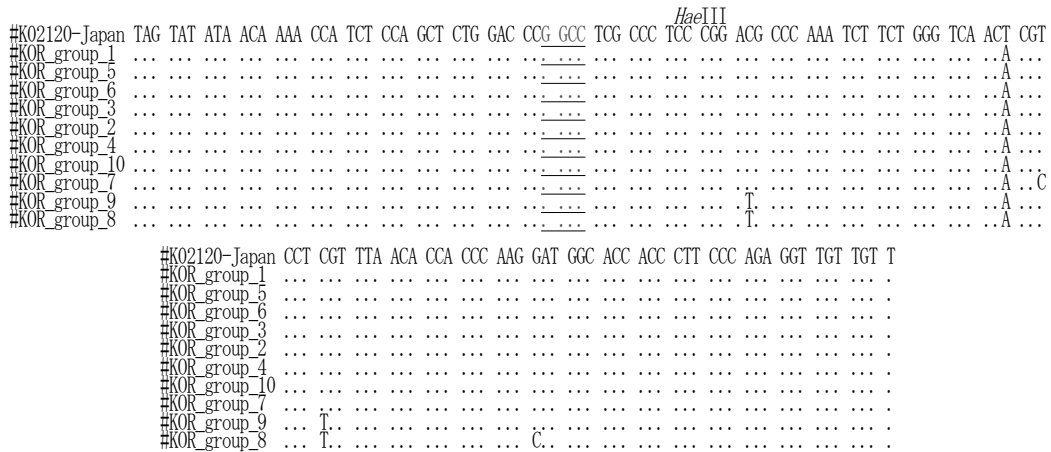


Fig. 2. Continued.

기존 보고된 pattern과 같으나(Fechner 등, 1997; Beier 등, 2001; Licursi 등, 2002), 나머지 61/37/285/27/94/94 bp와 61/37/6/81/198/27/94/94 bp의 두 타입은 기존 연구에서는 보고되지 않은 새로운 제한효소 절편다형(RFLP)임을 확인할 수 있었다. 결과적으로 sequence를 확인한 결과 총 10개의 group이 나왔으며 이 중 group 1, 8, 9와 group 2-6, 10은 *PvuII*, *BamHI* 그리고 *BclI*은 같은 단편이 나왔으나, *HaeIII*의 경우 group 2-6, 10들이 group 1, 8, 9들 보다 한 site가 더 잘리는 결과가 나와 두 가지의 pattern으로 나뉘게 되었다. 그리고 나머지 group 7은 제한효소 *PvuII*와 *BclI*의 제한효소절편다형이 기존에 보고된 것과 동일하였으나, *BamHI*은 잘리지 않은 크기의 598 bp만이 나타났고, *HaeIII*의 경우에도 group 2-6, 10 group 보다 한번 더 잘린 단편이 나와 새로운 하나의 pattern으로 구분되었다. 따라서 BLV *env* 유전자의 *HaeIII* 처리에 의한 RFLP에서 나온 기존에 보고되지 않는 새로운 pattern들은 한국형 Holstein 중에서만 특이하게 나타나는 부분으로 생각되어져 이 중에 감염된 BLV *env* 유전자의 특성을 연구하는데 유용한 정보로 제공될 수 있을 것으로 사료된다.

3. 계통도분석

한국형 홀스타인종에 감염된 BLV의 유입유래를 확인하기 위하여 BLV *env* 유전자에 대한 sequencing을 하여 NCBI에 등록된 기존의 sequence들과 align한 후 비교분석하여 작성한 계통도는 Fig. 3에 나타난 바와 같다.

NCBI에 등록된 111 BLV *env* 유전자의 Phylogenetic tree는 크게 3개의 그룹으로 나뉘는데 첫 번째 그룹은 남아

메리카와 유럽이 포함되어있고, 두 번째 그룹은 이번 실험에서 사용한 한국을 포함해서 일본과 미국이 주로 포함되어 있으며, 마지막으로 세 번째 그룹은 이란, 아르헨티나 및 오스트리아 그리고 일부 일본이 포함되어 있다. 한국형 홀스타인종의 시료에서 채취한 BLV *env* 유전자에 대한 제한효소 절편다형 및 염기서열 분석에 의하여 3개의 타입으로 Group화한 10개의 시료 중 KH1, KH2, KH3, KH4, KH5, KH6, KH7, KH10의 8개의 샘플은 미국 및 일본과 같은 그룹을 형성하고 있는 것으로 나타내었다. 이러한 결과는 우리나라의 홀스타인종이 그동안 미국에서 주로 도입되어진 결과에 따른 것으로 생각되어진다. 본 실험의 샘플들 중 KH8와 KH9의 경우는 일부 일본과 기존에 NCBI에 등록되어 있던 한국과 함께 남아메리카와 유럽 그룹에서 sub그룹을 형성하고 있으며 일부 일본의 경우에도 그들과 같은 그룹을 형성하고 있다. 이는 우리나라와 일본에서 사육되는 홀스타인종은 미국에서 도입된 홀스타인종으로 이는 오래전 미국의 홀스타인종이 유럽에서 도입되어진 결과에 따른 것으로 사료된다. 이상의 결과에서 한국형 홀스타인종 젖소는 오래전부터 주로 미국에서 도입되어 사육 및 증식되었기 때문에 BLV *env* 유전자의 계통도분석에서 한국형 홀스타인종에 감염된 BLV 샘플의 80%가 미국 및 일본 그룹에 속해있는 것으로 사료된다.

IV. 결론

본 연구는 한국형 홀스타인종 젖소에 감염된 BLV *env* 유전자의 특성과 국내 유입의 유래를 규명하고자 수행하였다. BLV 유전자 중 면역 기능에 중요한 역할을 담당하고

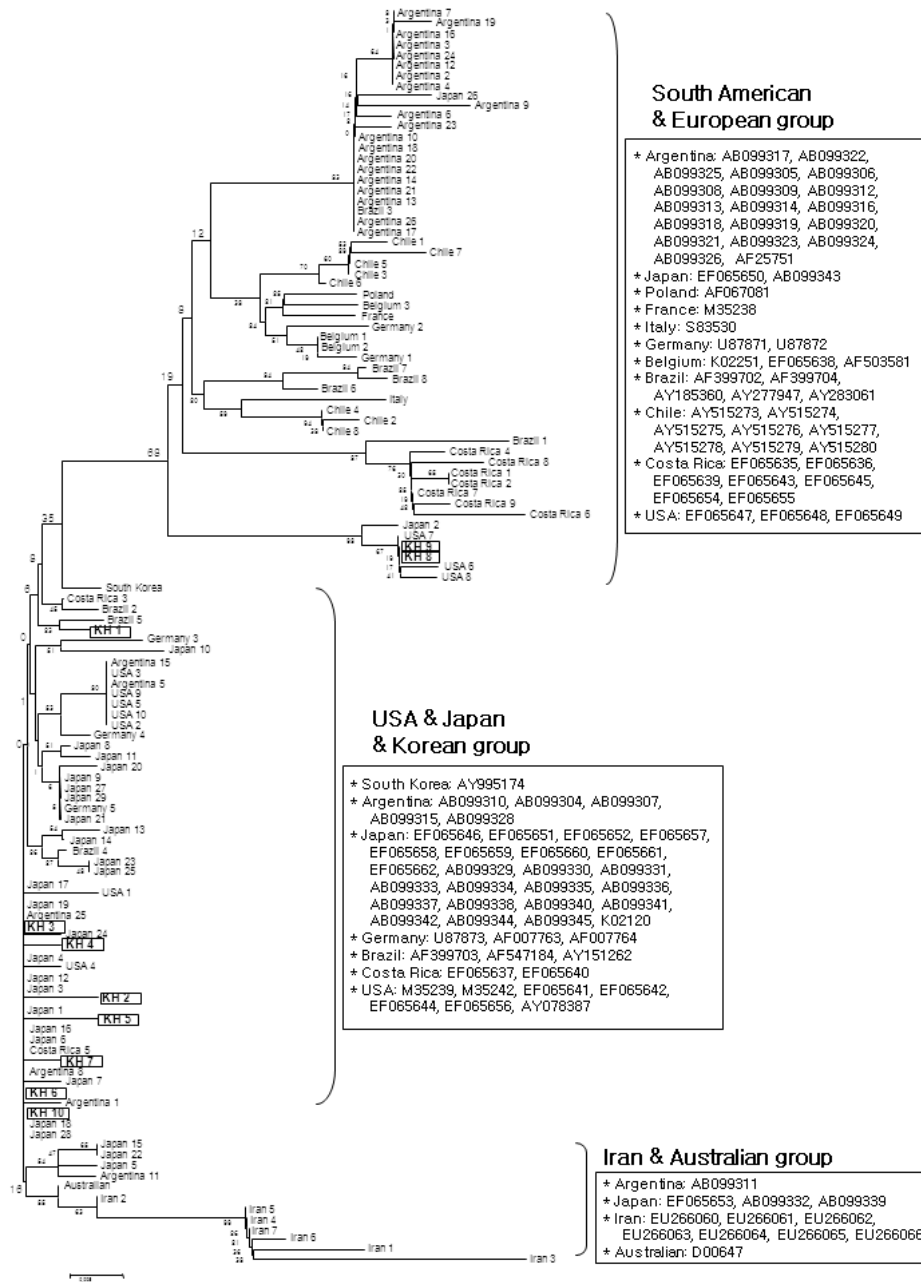


Fig. 3. Phylogenetic tree constructed using the *env* region of 111 BLV isolates. Neighbour-joining method, 1,000 bootstrap replications. The same set of sequences were subjected to a restriction enzyme site search. Sequences representing BLV variants KH groups were shown in bold. KH: Korean Holstein group. Accession numbers were shown in box.

있는 것으로 알려진 BLV *env* 유전자의 gp51 region을 증폭하여 제한효소절편다형과 염기서열 및 계통도를 분석하였다. BLV *env* 유전자의 증폭된 gp51 region을 제한효소 *Pvu*II, *Bam*HI, *Bcl*I 및 *Hae*III의 절편양상에 따른 group 별 염기서열을 분석한 결과 *Hae*III에서 기준에 보고되지 않은 염기치환에 의한 새로운 2가지 제한효소 절편타입이 존재함을 확인하였다. 한편, 한국형 홀스타인종 젖소의 BLV

env 유전자의 계통도를 분석한 결과 BLV의 10개 샘플그룹 중 8개인 80%가 미국 및 일본의 BLV 그룹에 속하는 것으로 확인되었다. 이상의 결과는 한국형 홀스타인종 젖소에 감염된 BLV *env* 유전자의 특성과 BLV의 국내 유입유래를 연구하는데 중요한 정보를 제공해 줄 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21사업(과제번호:2007 0404031)의 지원에 의하여 이루어진 연구결과의 일부이며 연구비지원에 감사드립니다.

참고 문헌

- Asfaw Y, Tsuduku S, Konishi M, Murakami K, Tsuboi T, Wu D, Sentsui H. 2005. Distribution and superinfection of bovine leukemia virus genotypes in Japan. *Arch. Virol.* 150: 493-505.
- Beier D, Blankenstein P, Marquardt O, Kuzmak J. 2001. Identification of different BLV provirus isolates by PCR, RFLPA and DNA sequencing. *Berl. Munchierarztl. Wochenschr.* 114: 252-256.
- Camargos, MF, Stancek D, Rocha MA, Lessa, LM, Reis, JK, Leite RC. 2002. Partial sequencing of *env* gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samples and phylogenetic analysis. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 49: 325-331.
- Da Y, Shanks RD, Stewart JA, Lewin HA. 1993. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 6538-6541.
- Fechner H, Kurg A, Geue L, Blankenstein P, Mewes G, Ebner D, Beier D. 1996. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *J. Vet. Med. B.* 43: 621-630.
- Fechner H, Blankenstein P, Looman AC, Elwert J, Geue L, Albrecht C, Kurg A, Beier D, Marquardt O, Ebner D. 1997. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology.* 237: 261-269.
- Hemmtzadeh F. 2007. Sequencing and phylogenetic analysis of gp51 gene of bovine leukemia virus in Iranian isolates. *Vet. Res. Commun.* 31: 783-789.
- Licursi M, Inoshima Y, Wu D, Yokoyama T, Gonz lez ET, Sentsui H. 2002. Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts. *Virus Res.* 86: 101-110.
- Licursi M, Inoshima, Y, Wu D, Yokoyama T, Gonz lez ET, Sentsui H. 2003. Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan. *Vet. Microbiol.* 96: 17-23.
- Mirsky ML, Olmstead C, Da Y, Lewin HA. 1998. Reduced bovine leukaemia virus proviral load in leuكتically resistant cattle. *Anim Genet.* 29: 245-252.
- Monti G, Schrijver R, Beier D. 2005. Genetic diversity and spread of Bovine leukaemia virus isolates in Argentine dairy cattle. *Arch. Virol.* 150: 443-458.
- Sagata N, Yasunaga T, Tsuzuku-Kawamura J, Ohishi K, Ogawa Y, Ikawa Y. 1985. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 677-681.
- Shu GH. 2004. Establishment of a bovine leukemia virus-free dairy herd. Ph. D. dissertation, Cheunnam National Univ., Cheunnam, Korea. [in Korean]
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Xu A, van Eijk MJ, Park C, Lewin HA. 1993. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *J. Immunol.* 151: 6977-6985.