

< Original Article >

돼지 group C 로타바이러스 VP6 특이 단클론항체

윤영심¹ · 이승철² · 우상규² · 조경오³ · 강신영^{1*}

¹충북대학교 수의과대학, ²(주)중앙백신연구소, ³전남대학교 수의과대학

Monoclonal antibodies against porcine group C rotavirus VP6

Young-Sim Yoon¹, Seung-Chul Lee², Sang-Kyu Woo², Kyoung-Oh Cho³, Shien-Young Kang^{1*}

¹College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

²Choongang Vaccine Laboratories, Daejeon 305-348, Korea

³College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received 16 August 2012; revised 30 August 2012; accepted 3 September 2012)

Abstract

Rotaviruses have been known to be a major etiological agent of gastroenteritis in both infants and young animals. Subsequently new rotaviruses, which were morphologically indistinguishable but antigenically and electrophoretically distinct with each other, were reported from several animals throughout world including Korea. These new rotaviruses were named as non-group A or group B or group C rotaviruses and so on. It has been very difficult to isolate and grow the non-group A rotaviruses *in vitro*, and this has greatly limited the characterizations of non-group A rotaviruses and serological studies. In this study, monoclonal antibodies (MAbs) against porcine non-group A rotavirus were produced and characterized. The VP6 gene of porcine group C rotavirus Korean isolate(#06-52-1) was cloned and expressed. For expression of VP6 gene, baculovirus expression system was applied. The VP6 gene and expressed protein in the recombinant virus were confirmed by polymerase chain reaction (PCR), indirect fluorescence antibody (IFA) test and Western blot, respectively. The expressed VP6 was used for MAbs production. The MAbs produced in this study would be promising as diagnostic reagents for detection of group C rotavirus infection.

Key words : Group C rotavirus, Recombinant virus, VP6 protein, Monoclonal antibodies

서 론

로타바이러스(Rotavirus, RV)는 *Reoviridae* family, *Rotavirus* genus에 속하는 바이러스로 유전자는 11개의 분절로 되어 있는 double-stranded RNA (dsRNA)로 구성되어 있으며 바이러스입자의 크기는 직경 70 nm로 피막이 없는 바이러스이다. RV는 icosahedral 형태로 세겹의 단백질 capsid 즉, outer capsid, inner capsid 그리고 core capsid가 dsRNA를 감싸고 있다. 각각의 dsRNA 유전자는 6개의 구조단백질(VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7)과 6개의 비구조단백질(NSP1, NSP2,

NSP3, NSP4, NSP5, NSP6)을 각각 coding한다(Estes와 Cohen, 1989). Inner capsid에 위치하고 있는 VP6는 군(Group)을 결정하며 A~G까지 7개의 군으로 분류된다. Group A, B 그리고 C RV는 사람과 동물에서 설사와 위장염을 일으키는 반면, group D~G RV는 아직까지 동물에서만 보고되어 있다(Bridger, 1987). VP6는 같은 group에 속하는 RV strain 사이에 공통적인 epitope가 존재하기 때문에 진단할 때 주요한 표적 항원으로 알려져 있으며 중화능력은 없지만 최근 연구에서 VP6 특이 단클론항체가 RV에 대한 방어 가능성을 보여줌으로서 백신개발에 활용될 전망이다(Jiang 등, 1990; Madore 등, 1999).

Group C RV는 1980년대 돼지에서 처음 보고되어

*Corresponding author: Shien-Young Kang, Tel. +82-43-261-2598,
Fax. +82-43-267-2595, E-mail. sykang@cju.ac.kr

졌고, pararotavirus로 불려졌으며 그 후 1982년 사람에서도 보고되어 공중보건학적으로 중요하게 여겨지고 있다(Saif 등, 1988; Rodger 등, 1982). 사람과 돼지의 group C RV는 항원성과 SDS-PAGE 상에서 dsRNA 유전자의 이동 패턴양상이 비슷하다고 보고되어졌으며 group A, B, D 그리고 E RV와 형태학적으로는 동일하지만 항원성과 전기영동 상에서 뚜렷하게 구분되어진다고 보고되었다. Group C RV에 의한 사람 감염은 드물게 일어나지만 모든 연령대에서 위장염이 발생되어진다. 돼지 group C RV는 유전학적으로 항원성이 다양한 것으로 보고되었으며 이러한 항원 다양성이 어떠한 영향을 주며 다양성이 발생하는 이유는 확실히 밝혀지지 않았으며 아직 항원성에 관한 연구가 많이 수행되어 있지 않다(Collins 등, 2008). Saif 등(1988)은 돼지 group C RV인 Cowden strain을 초대 돼지 신장세포와 원숭이 신장세포에서 증식시키는데 성공하고 이를 이용하여 감염성, 항원성, 형태학 그리고 dsRNA 이동패턴에 대하여 많은 연구를 수행하였다. 그러나, 아직까지 Cowden strain 이외의 다른 non-group A RV들은 세포배양에서 증식시키기 어렵기 때문에 이들의 특성을 규명하기 위하여 RV의 주요 항원부위의 유전자를 클로닝하여 발현시키는 연구가 많이 진행되고 있다(Estes 등, 1987; Peralta 등, 2009; Tosser 등, 1992).

돼지 group C RV가 장염의 주요 원인체로 인식되면서 분변으로부터 group C RV를 검출하기 위한 RT-PCR, nested PCR, 전자현미경 그리고 ELISA 등의 진단방법이 개발되었다(Jeong 등, 2009; Snodgrass 등, 1984; Thouless 등, 1982; Yolken 등, 1978). 이 연구에서는 국내에서 분리된 돼지 group C RV(#06-52-1)의 VP6 유전자를 baculovirus expression system을 이용하여 발현시켰으며 발현된 단백질을 이용하여 VP6에 대한 특이적인 단클론항체를 생산하고 특성을 규명하였다.

재료 및 방법

바이러스 및 RNA 추출

이 연구에서 group C RV 표준주로 사용한 Cowden strain은 Linda Saif 교수(오하이오 주립대학교)로부터 분양받아 Saif 등(1988)의 방법에 따라 원숭이 신장세포 유래인 MA104 세포에서 증식시켜 사용하였다. 또

한, 국내에서 RT-PCR법으로 group C RV 양성으로 확인된 돼지 설사분변(#06-52-1)은 전남대학교 수의과대학의 조경오 교수로부터 분양받아 사용하였다. Group C RV 표준주 및 설사분변재료에서 VP6 유전자 클로닝에 사용할 RNA는 QIAamp[®] viral RNA mini kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 제조사의 술식에 따라 추출하였다.

RT-PCR 및 클로닝

돼지 group C RV VP6 유전자를 증폭하기 위하여 GenBank에서 Cowden strain의 VP6 유전자 염기서열 (Accession number: M94157.1)을 참고하여 각각의 primer에 제한효소(Xho I과 Hind III, underlined) 절단부위를 넣어 DNASTAR program으로 forward primer는 GATCTCGAGTCATGGATGTGCTTTTTTCCA, 그리고 reverse primer는 ATCAAGCTTCATCACCATTCTC TTCACGGA로 제작하였다. VP6 유전자는 iScript[™] select cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories, USA)를 사용하여 제조사의 술식에 따라 합성하고 Park 등 (2011)의 방법을 일부 수정하여 PCR을 수행하였다. PCR로 증폭된 PCR 산물은 ethidium bromide가 첨가된 1% agarose gel에서 1 kb DNA ladder (Invitrogen, USA)와 같이 전기영동하여 확인하였으며 baculovirus expression system에서 발현시키기 위하여 pBlueBac4.5/V5-His-TOPO[®] vector (Invitrogen)를 이용하여 클로닝을 하였다.

VP6 재조합 baculovirus 작성 및 확인

돼지 group C RV VP6 재조합바이러스는 Bac-N-blue[™] transfection kit (Invitrogen)를 이용하여 VP6 유전자가 삽입된 transfer vector (pBlueBac4.5/GpC-VP6)와 Bac-N-blue wild type DNA를 제조사의 술식에 따라 Sf9 세포에 cotransfection하고 plaque picking법으로 재조합 baculovirus를 순수 분리하였다. Plaque picking법으로 순수 분리한 재조합바이러스에서 VP6 단백질 발현을 확인하기 위하여 간접형광항체법(Indirect fluorescence antibody, IFA)과 Western blot을 수행하였다. IFA은 Sf9 세포가 배양된 96-well plate에 VP6 재조합 바이러스를 감염시켜 세포변성효과(Cytopathic effect, CPE)를 확인한 후, 80% acetone으로 10분간 고정하였다. 1차 항체로 V5 epitope tag antibody (V5-specific antibody; Invitrogen)를 1 : 1,000으로 희석하여 100 µl

씩 넣어 37°C에서 1시간 반응시킨 후, PBS로 3회 세척하였다. 2차 항체로 FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG+M (ImmunoResearch Lab, USA)을 1 : 100으로 희석하여 50 µl씩 넣어 1시간 반응시킨 후, PBS로 3회 세척하고 mounting buffer (80% glycerol in PBS)를 50 µl씩 첨가하여 형광현미경으로 관찰하였다. 또한, 사람 group A RV Wa strain의 VP6 재조합바이러스와 돼지 group C RV인 Cowden strain과 #06-52-1의 VP6 재조합바이러스를 Sf9 세포에 감염시키고 29°C에서 48시간 동안 배양하였다. CPE가 확인되면 세포배양 flask에서 세포를 수확하여 2,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 생성된 pellet을 PBS 1 ml를 넣어 초음파세포파쇄기(Vibra cell™, Sonics & Materials, USA)를 이용하여 파괴한 후, 원심 분리한 상층액을 Western blot 재료로 사용하여 Towbin 등(1979)의 방법에 따라 수행하였다.

돼지 group C RV VP6 특이 단클론항체 생산

Sf9 세포에 group C RV VP6 재조합바이러스를 접종하여 CPE가 나타나는 것을 확인한 다음 감염된 세포를 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet에 멸균된 PBS 1 ml를 첨가하여 초음파세포파쇄기로 파괴한 후, 원심 분리하여 상층액을 단클론항체 생산에 항원으로 사용하였다. 항원과 Freund's adjuvant (Sigma, USA)를 동량으로 섞어 잘 혼합한 후, Orlik와 Altaner (1988)의 방법에 따라 4~5주령의 BALB/C mouse의 foot-fad에 3일 간격으로 3회 접종하였으며 1차 접종 시는 Freund's complete adjuvant를 그리고 2차와 3차 접종 시는 Freund's incomplete adjuvant와 혼합하여 접종하였다.

세포융합은 VP6 재조합단백질로 면역된 mouse의 서혜립프절과 비장으로부터 준비한 세포와 SP2/0 myeloma 세포를 polyethylene glycol 1500 (PEG: Roche, Germany)을 사용하여 Kang 등(1989)과 Orlik와 Altaner (1988)의 방법에 따라 수행하였으며 양성 hybridoma는 IFA법으로 선별하고 2회 이상 limiting dilution법을 수행하여 cloning하였다.

단클론항체와 다른 바이러스와의 교차반응

이 연구에서 생산된 단클론항체와 다른 바이러스들과의 반응유무는 다음과 같이 IFA법으로 확인하였다. 즉, MA104 세포를 96-well plate에 배양한 후, 돼

지 group C RV (Cowden), 사람 group A RV (Wa, DS-1, M, ST3, F45), 소 group A RV (NCDV, B223), 돼지 group A RV (OSU, Gottfried) 그리고 닭 group A RV (AEQ)을 감염시켰다. 배양 24시간 후, CPE가 관찰되면 80% acetone으로 10분간 고정시켰다. 또한, 돼지 유행성설사병바이러스(CV777)와 전염성위장염바이러스(평택주)는 Vero와 ST 세포가 배양된 96-well plate에 각각 감염시켜 CPE를 확인한 후, 80% acetone으로 고정시켰다. PBS로 3회 세척한 후, 검사하고자 하는 hybridoma 배양 상층액 100 µl를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 후, PBS로 3회 세척하고 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG+M (ImmunoResearch Lab)을 1 : 100으로 희석하여 50 µl씩 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 3회 세척한 후, mounting buffer을 50 µl씩 첨가하여 형광현미경으로 관찰하였다.

결 과

VP6 유전자 클로닝 및 발현

국내에서 심한 설사증상을 보이는 돼지 분변(#06-52-1)과 Cowden strain 감염 조직배양액으로부터 RNA를 추출하여 group C RV VP6 특이 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과, 1,188 bp 크기의 VP6 유전자가 증폭되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 돼지 group C RV VP6 재조합바이러스의 특이단백발현 여부는 간접형광항체법, PCR 및 Western blot법을 이용해서 확인하였다. 돼지 group C RV VP6 재조합바이러스를 Sf9 세포에 감염시킨 결과, 재조합바이러스

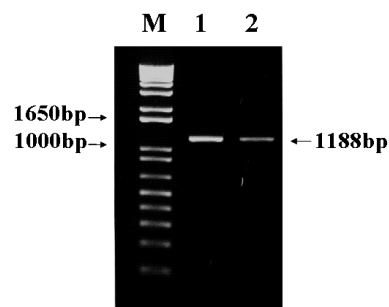


Fig. 1. Amplification of porcine group C rotavirus VP6 gene by RT-PCR. Lane 1: porcine group C rotavirus Cowden strain, lane 2: porcine group C rotavirus Korean isolate(#06-52-1), M: 1 kb ladder marker.

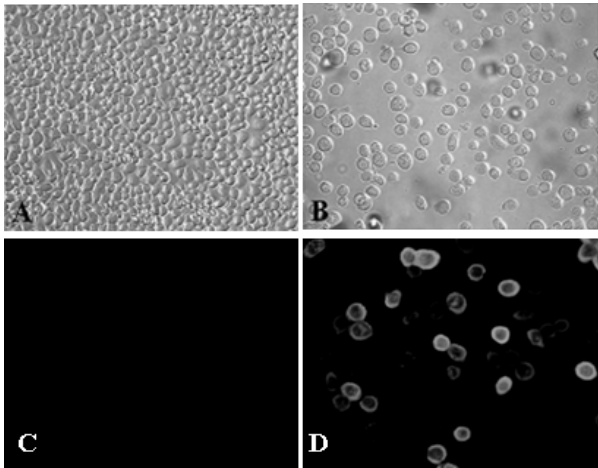


Fig. 2. Cytopathic effects and immunofluorescences of Sf9 cells infected with porcine group C rotavirus VP6 recombinant baculovirus. (A) Mock-infected Sf9 cells. (B) Porcine group C rotavirus VP6 recombinant baculovirus infected Sf9 cells. (C) Immunofluorescences of mock-infected Sf9 cells. (D) Immunofluorescences of porcine group C rotavirus VP6 recombinant baculovirus infected Sf9 cells.

를 접종하지 않은 Sf9 세포에서는 어떠한 세포변성효과를 관찰할 수 없었으나 재조합바이러스가 감염된 세포에서는 감염 후 세포가 커지는 등의 baculovirus 특유의 CPE를 관찰할 수 있었다(Fig. 2, A와 B). V5 특이항체를 사용하여 간접형광항체법으로 확인한 결과, 바이러스를 접종하지 않은 대조군에서는 어떠한 형광도 관찰되지 않았지만 재조합바이러스가 감염된 세포에서는 강한 형광이 관찰되었다(Fig. 2, C와 D).

돼지 group C RV VP6 재조합바이러스가 감염된 Sf9 세포 배양 상층액으로부터 DNA를 추출하여 VP6와 baculovirus에 특이적인 primer를 이용하여 PCR하고 전기영동한 결과, clone 1에서는 wild type baculovirus가 혼입되어 이후의 실험에서는 두 번째 clone 2의 재조합바이러스를 실험에 사용하였다(Fig. 3).

Baculovirus expression system에서 발현된 VP6 단백질을 확인하기 위하여 V5 특이항체와 돼지 group C RV VP6 특이항체를 사용하여 Western blot을 수행한 결과, V5 특이항체로 반응시킨 후, group A RV에 속하는 Wa의 VP6 재조합바이러스 감염 cell lysates, group C RV에 속하는 Cowden strain과 #06-52-1의 VP6 재조합바이러스 감염 cell lysates 모두에서 46kDa 크기의 밴드가 뚜렷하게 나타났으나 mock-infected Sf9 cell lysates에서는 밴드가 나타나지 않았다. 또한, 돼지 group C RV VP6 특이항체로 반응시킨 결과, Cowden strain과 #06-52-1의 VP6 재조합바이러스 감

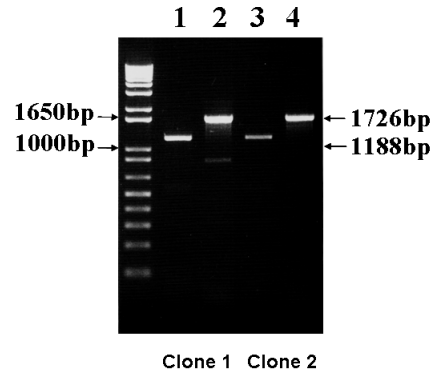


Fig. 3. Confirmation of porcine group C rotavirus VP6 recombinant baculovirus by PCR. Lane 1 and 3: porcine group C rotavirus VP6 specific primers, lane 2 and 4: baculovirus specific primers, M: 1 kb ladder marker.

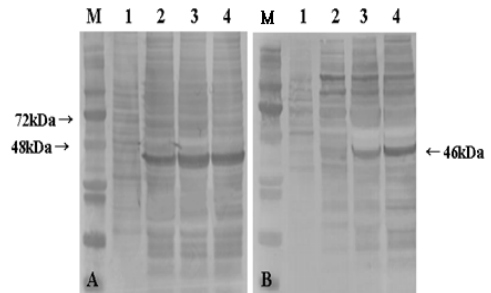


Fig. 4. Western blot analysis of expressed porcine group C rotavirus VP6 recombinant protein using V5-specific (A) and VP6-specific antibody (B). Lane 1: mock-infected Sf9 cell lysates, lane 2: group A rotavirus (Wa) VP6 recombinant baculovirus-infected Sf9 cell lysates, lane 3: porcine group C rotavirus (Cowden) VP6 recombinant baculovirus-infected Sf9 cell lysates, lane 4: porcine group C rotavirus(#06-52-1) VP6 recombinant baculovirus-infected Sf9 cell lysates, M: molecular weight marker.

염 cell lysates에서 밴드가 뚜렷하게 나타나 VP6 단백질이 정상적으로 발현됨을 확인할 수 있었으나 mock-infected cell lysate와 Wa의 VP6 재조합바이러스 감염 cell lysate에서는 반응이 나타나지 않았다(Fig. 4).

단클론항체의 특성

Baculovirus expression system에서 발현된 돼지 group C RV VP6 단백질을 이용하여 생산된 단클론항체의 특성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 단클론항체의 특이성을 조사하기 위해서 간접형광항체법과 Western blot법으로 확인한 결과, 돼지 group C RV VP6에 대한 단클론항체 8개 모두 group C RV Cowden strain에 감염된 MA104 세포에서 뚜렷한 형

Table 1. Characterization of monoclonal antibodies against porcine group C rotavirus VP6

MAb	Isotype	Western blot*	Reaction with [†]			
			Cowden	rVP6 (Cowden)	rVP6 (#06-52-1)	rVP6 (Wa)
1E5	G2b	+	+	+	+	-
2C5	M	-	+	+	+	-
2B8	G2a	-	+	+	+	-
3F7	G1	-	+	+	+	-
4B9	G2b	-	+	+	+	-
4C9	M	+	+	+	+	-
7E7	G3	-	+	+	+	-
9B3	G1	+	+	+	+	-
25A11 [‡]	G2b	-	-	-	-	+

*Western blot was performed using group C rotavirus VP6 recombinant baculovirus infected cell lysates. [†]Examined by IFA Cowden: Group C rotavirus (Cowden) infected MA104 cells, rVP6 (Cowden): Group C rotavirus (Cowden) VP6 recombinant baculovirus infected Sf9 cells, rVP6 (#06-52-1): Group C rotavirus(#06-52-1) VP6 recombinant baculovirus infected Sf9 cells, rVP6 (Wa): Group A rotavirus (Wa) VP6 recombinant baculovirus infected Sf9 cells. [‡]Group A rotavirus VP6-specific MAb.

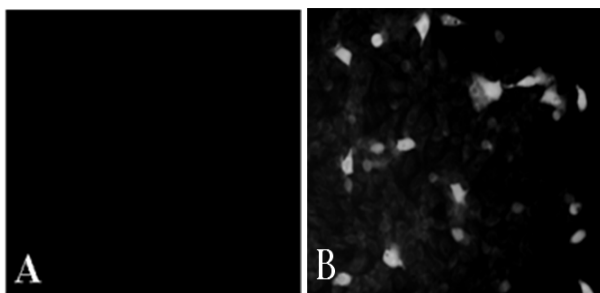


Fig. 5. Immunofluorescences of porcine group C rotavirus VP6-specific monoclonal antibodies (MAbs). Porcine group C rotavirus (Cowden strain) infected MA104 cells were reacted with MAb 25A11 (A) and MAb 7E7 (B).

광을 나타냈다(Fig. 5). 또한, Cowden strain과 #06-52-1의 VP6 재조합바이러스를 감염시킨 Sf9 세포에서 형광을 나타내었으나 group A RV인 Wa strain의 VP6 재조합바이러스를 감염시킨 Sf9 세포에선 형광이 관찰되지 않았다. Western blot법으로 확인한 결과, 3개의 단클론항체(1E5, 4C9, 9B3)는 46 kDa 크기에서 band를 확인할 수 있었으나 나머지 5개의 단클론항체에서는 band를 확인할 수 없었다(Fig. 6).

단클론항체와 다른 바이러스와의 반응성 조사

돼지 group C RV VP6에 대한 단클론항체와 group A RV 및 돼지에서 문제가 되고 있는 소화기성 바이러스와의 반응을 IFA법으로 확인한 결과는 Table 2와 같다. 8개의 단클론항체 모두 group C RV Cowden strain과는 반응하였으나 이번 연구에서 사용된 사람

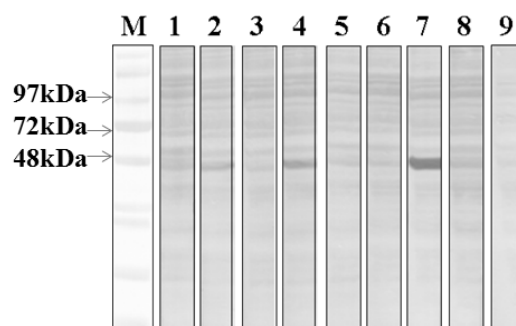


Fig. 6. Western blot analysis of porcine group C rotavirus VP6-specific monoclonal antibodies (MAbs). M: molecular weight marker, lane 1: MAb 2C5, lane 2: MAb 9B3, lane 3: MAb 3F7, lane 4: MAb 4C9, lane 5: MAb 2B8, lane 6: MAb 4B9, lane 7: MAb 1E5, lane 8: MAb 7E7, lane 9: MAb 25A11.

및 동물 group A RV 그리고 돼지 유행성설사증바이러스와 전염성위장염바이러스와는 반응을 나타내지 않았다.

고 찰

Group A RV는 유아나 어린 동물에서 설사병을 일으키는 중요 원인체로 전 세계적으로 발생되고 있으며(Anderson과 Weber, 2004; Parashar 등, 2003) 효과적인 백신개발을 위하여 바이러스의 특성이 분자생물학적 수준으로 연구되었다. 이와 반면에 group C RV를 포함한 non-group A RV에 의한 감염이 서서히 증가되고 있으나 아직 이들에 대한 연구는 아직 부족한

Table 2. Reactivity of monoclonal antibodies (MAbs) with other enteric viruses

MAb	Cowden*	Human Rotaviruses					Animal Rotaviruses					PEDV	TGEV
		Wa	DS-1	M	ST3	F45	Gott	OSU	NCDV	B223	AEQ		
1E5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2C5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2B8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3F7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4B9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4C9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7E7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9B3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25A11 [†]	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
4D7 [‡]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
3C6 [§]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

*Group C rotavirus Cowden strain. [†]Group A rotavirus VP6-specific MAb. [‡]PEDV-specific MAb. [§]TGEV-specific MAb.

실정이다(Kim 등, 1999). 이번 연구에서는 국내 돼지 분변 시료(#06-52-1)에서 분리한 RV의 VP6 유전자 염기서열을 결정하여 group C RV로 확인하였으며 group C RV의 혈청학적 진단에 이용하기 위하여 VP6 유전자를 발현시키고 특이적인 단클론항체를 생산하여 그 특성을 규명하였다.

이 연구에서 group C 로타바이러스를 순수분리하기 위하여 MA104 세포를 사용하여 Saif 등(1988)의 방법으로 수차례 배양을 시도하였으나 group C RV를 순수 분리할 수 없었다. 현재까지 돼지 group C RV에서 Cowden strain을 제외하고 세포에서 증식된 연구결과가 보고된 바가 없다(Saif 등, 1988). 하지만 특정 바이러스 단백질을 얻기 위해 이에 대응하는 특정 유전자를 PCR하여 증폭시킨 후, 클로닝하고 baculovirus expression system을 이용하여 발현시키는 실험이 많이 진행되고 있다(Estes 등, 1987; Peralta 등, 2009; Tosser 등, 1992). 이러한 연구결과를 바탕으로 group C RV로 확인된 #06-52-1의 VP6 유전자를 클로닝하여 baculovirus expression system으로 발현시키고 발현된 단백질로 단클론항체를 생산하는 연구를 수행하였다. VP6 단백질이 발현되었는지 확인하기 위하여 간접형광항체법을 실시한 결과, 감염된 세포에서 강한 형광이 관찰되어 VP6 단백질이 정상적으로 발현됨을 확인할 수 있었다. 또한, Western blot을 실시한 결과, 46 kDa 크기의 밴드를 확인할 수 있었다. Ojeh 등(1991)은 Cowden strain RV VP6에 특이적인 단클론항체가 모두 41 kDa 단백질과 반응하였다고 보고하였으며 Tosser 등(1992)은 Cowden strain의 VP6 유전자를 pVL941을 transfer vector로 baculovirus expression system을 이용하여 발현시켜 Western blot을 한 결과,

43 kDa에서 밴드를 확인하였다고 보고하였다. 본 연구에서 발현시킨 VP6 단백질은 46 kDa에서 밴드를 관찰할 수 있었는데 이러한 반응 단백질의 크기에서 차이가 있는 것은 pBlueBac4.5/V5-His-TOPO[®] vector를 사용할 경우 카복실기 말단에 발현되는 histidine 및 V5 epitope 부위 때문일 것으로 생각된다.

Baculovirus expression system에 의해 발현된 단백질은 로타바이러스에서 뿐만 아니라 다른 바이러스에서도 높은 항원성을 가지고 있다고 보고되었다(Estes 등, 1987; Peralta 등, 2009; Tosser 등, 1992; Yang 등, 2005). 이러한 재조합단백질로 단클론항체와 다클론항체를 생산하는데 사용될 수 있다는 연구결과에 따라 단클론항체 생산의 항원으로 사용하였다. 단클론항체 생산 실험결과, group C RV VP6 단백질에 대한 단클론항체 8개를 생산하였고, 8개 단클론항체 모두 group C 로타바이러스 VP6 재조합바이러스에 감염된 Sf9 세포에서 형광이 관찰되었다. 또한, 돼지 group C RV Cowden strain으로 감염시킨 MA104 세포에 모두 형광이 관찰됨으로서 돼지 group C RV VP6에 대한 단클론항체가 성공적으로 생산되었다는 것을 확인할 수 있었다. 단클론항체를 이용하여 Western blot을 실시한 결과, 8개의 단클론항체 중 9B3와 4C9는 46 kDa 크기에서 희미하게 밴드를 확인할 수 있었고, 1E5는 뚜렷한 밴드를 확인할 수 있어 이들 3개의 단클론항체는 linear epitope에 작용하며 다른 5개의 단클론항체와는 서로 다른 epitope에 작용하는 것으로 추정할 수 있다.

이 연구에서 생산한 VP6 특이 단클론항체와 다른 바이러스들의 교차반응성을 조사한 결과, 예상했던 대로 group A에 속하는 사람 RV인 Wa, DS-1, M, ST3

그리고 F45 strain과는 모두 반응을 하지 않았으며 동물 RV인 Gottfried, OSU, NCDV, B223 그리고 AEQ strain과도 반응이 나타나지 않았다. 또한, 돼지 장내에서 설사병의 주요 원인체인 돼지 유행성설사증바이러스와 전염성위장염바이러스와도 반응하지 않아 8개의 VP6 단클론항체가 group C RV VP6에 특이적인 것으로 확인할 수 있었다. Ojeh 등(1991)은 Cowden strain에 특이적인 단클론항체 3개를 생산하여 간접형 광학체법과 면역침전법으로 group A와 group B RV와의 교차반응성을 조사한 결과, group A와 group B RV와는 반응을 하지 않았지만 소와 돼지의 group C RV와 반응이 나타나 생산된 group C RV 단클론항체는 돼지와 소에서 group C RV를 진단할 때 유용하게 사용될 것이라고 보고하였다. 이러한 group C RV를 진단할 때 사용되는 단클론항체 진단키트를 제작하기에 있어서 단클론항체가 다른 group간에 교차반응이 나타나지 않아야 하며, group A와 group C RV VP6 단백질의 minor한 공통항원이 존재할 수 있기 때문에 단클론항체가 두 RV에서 반응이 일어날 수 있는 가능성을 배제할 수 없다.

이 연구에서 발현된 돼지 group C RV VP6 재조합 단백질과 8개의 단클론항체는 group C RV를 group C RV에 감염된 돼지의 소장에서 IFA법이나 면역조직화학염색법을 이용하여 직접 확인하거나 역학조사 및 진단키트를 개발하는데 이용될 수 있을 것으로 생각한다.

결 론

국내 돼지 group C RV(#06-52-1) VP6 유전자를 클로닝하여 발현시키고 VP6에 특이적인 단클론항체를 생산하였으며 그 특성을 규명하였다. Baculovirus expression system을 이용하여 국내 돼지 group C RV(#06-52-1) VP6 유전자를 발현시켰으며 발현된 단백질을 Western blot법으로 46 kDa 크기에서 확인할 수 있었다. 또한, 발현된 돼지 VP6 단백질을 이용하여 group C RV VP6에 대한 단클론항체 8개를 생산하였으며 8개의 단클론항체 모두 group C RV(Cowden strain)와는 반응하였으나 group A RV와 다른 돼지 장내 바이러스와는 반응하지 않았다. 이 연구에서 발현한 VP6 단백질과 VP6 특이 단클론항체는 group C RV 진단에 활용될 것으로 생각한다.

감사의 글

이 논문은 농림수산식품부의 농림기술개발연구과제(2008-2011) 연구비지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

- Anderson EJ, Weber SG. 2004. Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis* 4: 91-99.
- Bridger JC. 1987. Novel rotaviruses in animals and man. *Ciba Found Symp* 128: 5-23.
- Collins PJ, Martella V, O'Shea H. 2008. Detection and characterization of group C rotaviruses in asymptomatic piglets in Ireland. *J Clin Microbiol* 46: 2973-2979.
- Estes MK, Cohen J. 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 53: 410-449.
- Estes MK, Crawford SE, Penaranda ME, Petrie BL, Burns JW, Chan WK, Ericson B, Smith GE, Summers MD. 1987. Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system. *J Virol* 61: 1488-1494.
- Jeong YJ, Park SI, Hosmillo M, Shin DJ, Chun YH, Kim HJ, Kwon HJ, Kang SY, Woo SK, Park SJ, Kim GY, Kang MI, Cho KO. 2009. Detection and molecular characterization of porcine group C rotaviruses in South Korea. *Vet Microbiol* 138: 217-224.
- Jiang BM, Saif LJ, Kang SY, Kim JH. 1990. Biochemical characterization of the structural and nonstructural polypeptides of a porcine group C rotavirus. *J Virol* 64: 3171-3178.
- 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: 2744-2750.
- Kim YJ, Chang KO, Straw B, Saif LJ. 1999. Characterization of group C rotaviruses associated with diarrhea outbreaks in feeder pigs. *J Clin Microbiol* 37: 1484-1488.
- Madore HP, Estes MK, Zarley BH, Parsons DD, Greiner S, Smith R, Jiang B, Corsaro B, Barniak V, Crawford S, Conner ME. 1999. Biochemical and immunologic comparison of virus-like particles for a rotavirus subunit vaccine. *Vaccine* 17: 2461-2471.
- Ojeh CK, Jiang BM, Tsunemitsu H, Kang SY, Weilnau PA, Saif LJ. 1991. Reactivity of monoclonal antibodies to the 41-kilodalton protein of porcine group C rotavirus with homologous and heterologous rotavirus serogroups in immunofluorescence tests. *J Clin Microbiol* 29: 2051-2055.
- Orlik O, Altaner C. 1988. Modification of hybridoma technology which improve the yield of monoclonal antibody producing cells. *J Immunol Methods* 115: 55-59.
- Parashar UD, Hummelman EG, Breesee JS, Miller MA, Glass RI.

2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 9: 565-572.
- Park SI, Jeong YJ, Kim HJ, Park JG, Kang SY, Woo SK, Kim CH, Jung CH, Kang MI, Cho KO. 2011. Genetically diverse group C rotaviruses cause sporadic infection in Korean calves. *J Vet Med Sci* 73: 479-482.
- Peralta A, Molinari P, Taboga O. 2009. Chimeric recombinant rotavirus-like particles as a vehicle for the display of heterologous epitopes. *J Virol* 6: 192-201.
- Rodger SM, Bishop RF, Holmes IH. 1982. Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant. *J Clin Microbiol* 16: 724-726.
- Saif LJ, Terrett LA, Miller KL, Cross RF. 1988. Serial propagation of porcine group C rotavirus (pararotavirus) in a continuous cell line and characterization of the passaged virus. *J Clin Microbiol* 26: 1277-1282.
- Snodgrass DR, Herring AJ, Campbell I, Inglis JM, Hargreaves FD. 1984. Comparison of atypical rotaviruses from calves, piglets, lambs and man. *J Gen Virol* 65: 909-914.
- Thouless ME, Beards GM, Flewett TH. 1982. Serotyping and subgrouping of rotavirus strains by the ELISA test. *Arch Virol* 73: 219-230.
- Tosser G, Labbé M, Brémont M, Cohen J. 1992. Expression of the major capsid protein VP6 of group C rotavirus and synthesis of chimeric single-shelled particles by using recombinant baculoviruses. *J Virol* 66: 5825-5831.
- Towbin H, Staechelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
- Yang DK, Kweon CH, Kim BH, Lim SI, Kwon JH, Kim SH, Song JY, Han HR. 2005. Immunogenicity of baculovirus expressed recombinant proteins of Japanese encephalitis virus in mice. *J Vet Sci* 6: 125-133.
- Yolken RH, Barbour B, Wyatt RG, Kalica AR, Kapikian AZ, Chanock RM. 1978. Enzyme-linked immunosorbent assay for identification of rotaviruses from different animal species. *Science* 201: 259-262.