

碩士學位論文

EHV-1과 EHV-4의 subunit
vaccine과 혈청학적 진단법에
대한 연구



濟州大學校 大學院

獸醫學科

周海鎮

2007年 12月

EHV-1과 EHV-4의 subunit
vaccine과 혈청학적 진단법에
대한 연구

指導教授：林 允 圭

周 海 鎮

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 제출함

2007年 12月

周 海 鎮의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

審査長： 주 홍 구

審 查： 임 윤 규

審 查： 황 규 계

濟州大學校 大學院

2007年 12月

목 차

I. 서	론	-----	1
II. 재료 및 방법		-----	4
III. 결	과	-----	20
IV. 고	찰	-----	44
V. 참 고 문 헌		-----	47
영 문 초 록		-----	51

표 차례

Table 1.	PCR primers for the amplification of gD genes	9
Table 2.	Genotype of <i>E.coli</i> strain	11
Table 3.	Composition of medium per liter	13
Table 4.	Antibiotics solution	13
Table 5.	EHV-1 seed titration from CPE production	20
Table 6.	EHV-4 seed titration from CPE production	20
Table 7.	Determination of optimum culture condition for EHV-1	21
Table 8.	Determination of optimum culture condition for EHV-4	22
Table 9.	Homology ananlysis of Equine herpesvirus glycoprotein D gene	30

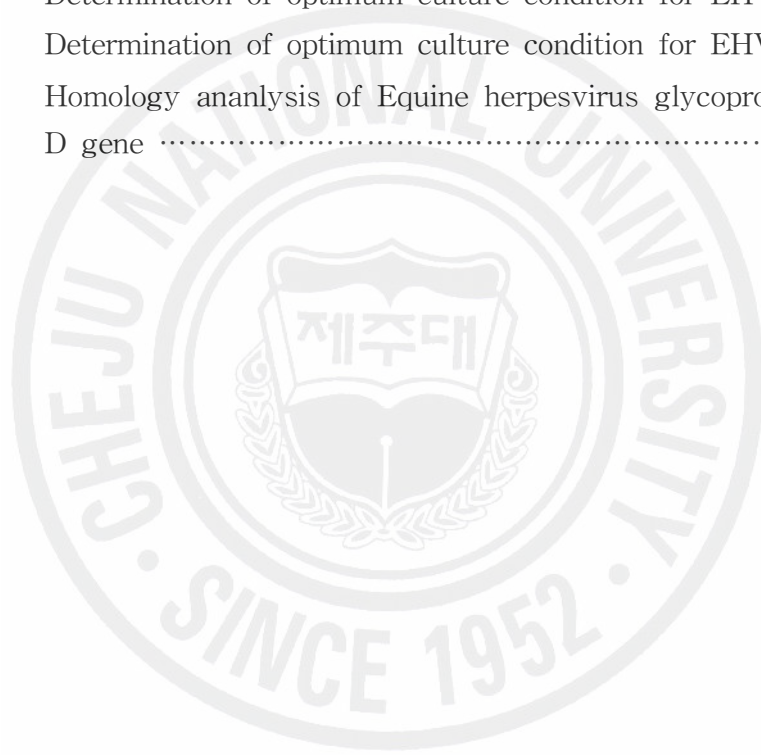


그림 차례

Fig. 1	Diagram of total process of recombinant EHV-1, 4 gD production ...	8
Fig. 2	Genetic map of pBlueXcm vector	11
Fig. 3	Genetic map of pQE30 vector (QIAGEN, Germany)	12
Fig. 4	Restriction analysis of EHV-1 gD subcloned plasmid and enzyme digestion of plasmid by <i>Hind</i> III	17
Fig. 5	Restriction analysis of EHV-4 gD subcloned plasmid and enzyme digestion of plasmid by <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	17
Fig. 6	Reactivity of Monoclonal antibodies against EHV-1 and EHV-4	24
Fig. 7	SDS-PAGE analysis of IgG	25
Fig. 8	SDS-PAGE analysis of Fc fraction	26
Fig. 9	Gradient PCR for EHV gD	27
Fig. 10	Ligation mixture of gD	28
Fig. 11	Clone screening using PCR with T3/T7 universal primer	29
Fig. 12	Restriction analysis of gD clone 4 and 16	29
Fig. 13	Blast search of pBX-EHV-1 gD clone	31
Fig. 14	Ligation mixture of gD subcloning	32
Fig. 15	PCR detection of gD subclone. Amplified gD gene using gD specific primer set	33
Fig. 16	Restriction analysis of gD subcloned plasmid and enzyme digestion of plasmid by <i>Hind</i> III	33
Fig. 17	SDS-PAGE analysis of expressed pQE30과 pQE-gfpII clone ...	34
Fig. 18	Representative western blot analysis of recombinant EHV-1 gD	35
Fig. 19	Restriction of pQE30 clone (<i>Eco</i> R I, <i>Hind</i> III) and pQE-gfp clone (<i>Eco</i> R I, <i>Nde</i> I)	36
Fig. 20	Optimal annealing temperature of gD PCR	37
Fig. 21	EHV-4의 PCR product	37
Fig. 22	pBXII-EHV-4 clone의 T3/T7 PCR detection	38
Fig. 23	Blast search of pBX EHV-4 gD clone	39
Fig. 24	pBX EHV-4 <i>Bam</i> H I/ <i>Sal</i> I restriction	40
Fig. 25	pQE30 EHV-4 clone의 PCR detection	41

Fig. 26	pQEGFPⅡ EHV-4 clone의 PCR detection	41
Fig. 27	SDS-PAGE analysis of expressed pQE30 and pQE-gfpⅡ clone EHV-4 gD	42
Fig. 28	Representative western blot analysis of recombinant EHV-4 gD	43



I. Introduction

Equine herpesvirus (EHV)의 호흡기 감염증은 EHV type 1과 type 4에 의하여 발병하며, 이 중 type 1과 4의 감염증은 전 세계적인 발생으로 마필산업의 생산성에 중대한 영향을 미치는 질병이다. EHV-1과 EHV-4 모두 호흡기 경로를 통해 전파되며 1차 발생부위는 상부호흡기 상피세포이다. EHV-1의 경우는 유산산의 증상을 보이기도 하며, 경우에 따라서 마비를 동반하는 신경증상을 일으키기도 한다(Crabb 등, 1995; Kydd 등, 1994). 그러나 EHV-4의 감염시에는 유산 혹은 신경증상을 일으키는 예가 거의 없다 (Patel 등, 2005).

EHV-1, 4의 예방을 위하여 modified-live virus 및 불활화 바이러스를 응용한 백신연구가 보고되어있다 (Dolby 등, 1995; Ellis 등, 1995). 현재 상용화되어 있는 것들은 1997년 Australia에서 개발된 EHV-1 및 EHV-4 혼합백신 (Duvaxyn™)의 예와 같이 formalin으로 처리한 불활화백신의 형태이다 (Gilkerson 등, 1997; Heldens 등, 2001). 이들 백신은 문제점은 바이러스 감염에 대한 방어력이 약하며 불완전하다는 점이다 (Mumford 등, 2003).

Foote 등 (2002)의 역학적 조사는, 1997년 Australia에서 사용한 시판 백신인 Duvaxyn™의 적용에도 불구하고 암말과 이유기의 어린 자마에서 지속적인 감염이 있었다고 하여, 현재 암말에 사용하는 백신의 효능이 완전하지 않음을 지적하였다.

EHV-1은 target organ인 호흡기로 감염되고 면역지속기간이 짧으며 (Grandell 등, 1980), 마찬가지로 시판되는 백신도 효능이 불완전하며 면역능의 지속기간이 짧다 (Burrow 등, 1984; Burki 등, 1990; Onions, 1991; Hannant 등, 1993). Zhang 등 (1998)은 명백한 감염이 있음에도 불구하고 강한 면역이 형성될 정도의 바이러스 복제가 이루어지지 않으며, 바이러스의 밝혀지지 않은 어떤 유전자가 면역반응을 회피하도록 작용하거나, 상기도 감염 경로에 기인하여 면역기억이 형성될 정도의 강한 반응을 유도시키지 못하는 것으로 추론하였다. 그러므로 효과적인 EHV-1 백신을 위해서는 이러한 약한 면역형성의 단점을 극복하는 것이 가장 중요한 문제이다.

이러한 환경은, EHV에 대한 면역형성에 있어서 핵심적인 역할을 하는 부분을 이용한 보다 효율적인 백신제제의 개발을 지속적으로 요구하고 있는데, EHV의 glycoprotein D (gD)는 이를 해결하기 위한 중요한 후보물질이 될 수 있을 것이다 (Zhang 등, 1998).

EHV의 glycoprotein D (gD)는 virion 외피의 구성요소 중의 하나로서 바이러

스 감염력의 필수요소로 알려져 있으며 virus-neutralizing antibody를 유도시키는 요소 중의 하나로서 (Flowers와 O'callaghan, 1992; Whittaker 등, 1992; Stokes 등, 1997; Csellner 등, 2000), EHV에 대한 면역형성에 가장 중요한 핵심 물질로 인식되고 있다.

EHV의 gD는 gB, gH, gL와 함께 상호 복합적으로 반응하여 바이러스의 세포 침입을 일으키며 (Connolly 등, 2005; Spear 등, 2004), plasma membrane과 바이러스 외피와의 융합을 일으킨다. 이러한 단계적인 과정은 감염세포의 종류에 따라 endocytic mechanisms 혹은 non-endocytic mechanisms을 보이는데 (Nicola 등, 2003), 두 가지 반응이 모두 gD가 receptor에 결합하였을 때 일어난다고 하였다 (Milne 등, 2005).

한편, gD의 효율적인 생산을 위하여 *Escherichia coli* (*E. coli*)나 baculovirus expression system에서 발현시킨 재조합단백을 방어면역에 응용한 연구도 다수 보고되어있다 (Tewari 등, 1994; Stokes 등, 1997; Packiarajah 등, 1998; Zhang 등, 1998). 또한, EHV의 gD gene을 삽입시킨 plasmid DNA를 응용한 DNA 백신이 중화항체를 유도시키고 비강내로 공격한 바이러스의 증식을 막고 병증을 완화시켰다는 보고 (Ruitenberg 등, 1999, 2000)는 재조합 gD를 subunit 백신에 응용할 수 있음을 시사한다.

백신접종에 따른 부작용을 줄이기 위한 subunit 백신은, 핵심적인 항원물질만 적용하여 안정성과 특이성의 장점을 지니는 반면 불활화 백신에서 볼 수 있는 광범위한 체액성 및 세포성 면역의 형성이 부족한 것으로 인식되고 있다. 그러나, Foote 등 (2005)은 IscomatrixTM 면역보강제를 적용한 EHV-1 재조합 gD가 상용화된 whole virus 백신에 필적할 만한 중화항체 유도를 보고하여, EHV의 gD가 subunit 백신의 강력한 후보물질이 될 수 있음을 주장하였다. 또한, Zhang (1998) 등은 gD subunit 백신을 상기도에 직접 적용하였을 때 매우 효과적이었음을 보고하여, 백신의 적용경로 또한 백신효능에 있어서 매우 중요한 사항임을 시사하였다.

한편, 방어항원의 효율적인 면역제시를 유도한다면 언급된 면역보강제와 적용 경로와 더불어 고 효능의 subunit 백신의 개발이 가능할 것으로 사료되며, 이를 위한 Dendritic cells (DCs)의 target 항원과 연관을 고려해 볼 수도 있을 것이다.

DCs는 T-cell 의존성 면역반응의 개시자로서 알려져 있으며, 면역계의 핵심 항원공여세포로서 NK 세포를 활성화시켜 인터페론, IL-12 등 면역에 필수적인 사이토카인을 생산케하고 림프구 관련 항원특이면역반응을 유도하는 것으로 알

려져 있다 (Steinman 등, 1991). 한편, DCs의 기능단백질 중 endocytosis에 관여하는 물질로는 IgG Fc 수용체 등이 알려져 있다. IgG의 domain인 Fc는 면역반응을 유도하는 항원-항체 복합체를 유도하는 것으로 알려져 있으며 antigen presenting cells (APC)의 표면에 있는 Fc receptors (FcRs)를 통해 APC가 항원-항체 복합체를 탐식하는 것을 증가시켜주기 때문이다 (Wen 등, 1999; Yada 등, 2003). FcRs는 면역복합체의 phagocytosis와 면역매개역할, antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, superoxide production등의 기능을 매개한다 (Unkeless et al., 1988). IgG-FcRs을 통한 antigen-IgG complex의 세포 내 유입을 매개를 촉진하면 pinocytosis의 경우에 비하여 1,000 내지 10,000배 더 강한 효과를 보인다고 보고되었다 (Ravetch 등, 1994; Sallusto 등, 1994; Regnault 등, 1999). FcRs는 DC에서 major histocompatibility complex (MHC) class I, II-restricted antigen presentation의 효율적인 항원제시경로를 제시하여 백신효율을 증가시킨다 (Ravetch 등, 1994; Sallusto 등, 1994; Regnault 등, 1999). 또한 FcRs에서 Fc와의 상호작용은 DCs의 표면분자를 up-regulation시켜주고 항원 표 현인자를 포함한 cytokine들을 활성화시킨다 (Regnault 등, 1999). 이러한 사실들은 항원과 더불어 DC 수용체를 촉발시킬 IgG의 Fc 분획을 개입시킬 경우에 면역의 활성화가 가능할 것이라는 단서를 제공하여 준다.

EHV의 감염을 예방하기 위해서는 두 가지 type 즉, EHV -1, -4 모두에 효과적인 백신의 개발이 꾸준히 요구되고 있는 바, 본 연구에서는 EHV 면역에 핵심이 되는 gD와 DCs의 endocytosis의 효율을 높이는 표적단백으로서 IgG의 Fc 분획을 연관한 고효율 백신의 개발에 필요한 소재로서 *E. coli* system에서 발현시킨 재조합 gD의 개발을 위하여 수행하였다. 아울러 EHV 감염의 혈청학적인 진단을 위한 소재로서 EHV에 대한 특이 단클론 항체를 개발을 수행하였다.

II. Materials and Methods

1. 바이러스

1) Virus seed

EHV-1은 2005년 2월과 3월에 제주도 북제주군 조천읍 소재 대영목장의 암마 2두의 유산태아 장기 (흉수, 혈액, 태반, 폐, 간)로부터 분리하였다. 흉수와 혈액을 제외한 각 장기들은 2.4 g을 취하여 DMEM 5 ml에 넣고 교반한 후 4°C에 3시간 정치하였다. 이후 상층액을 원심분리한 후 (600 g, 5 min) 0.22 μ m filter로 제균여과하였다. 흉수 및 혈액은 직접 원심분리 (600 g, 5 min)하고 제균여과하였다.

EHV-4는 American type culture collection (ATCC) (VR-2230 EHV)로부터 입수하였다.

2) EHV 배양 및 역가결정

바이러스 분리 및 증식을 위한 모든 세포배양과정은 37°C의 5% CO₂ incubator에서 실시하였다. Madin-Darby bovine kidney (MDBK) 세포주 (한국 세포주은행)를 DMEM (10% FBS, pH 7.16)배지에서 20시간 배양하여 약 90-100%의 세포단층 (monolayer)이 형성되도록 한 후, seed virus를 multiplicity of infection (MOI)값이 약 4가 되게 희석한 후 T-150 flask에 4 ml씩 접종하여 4시간동안 바이러스에 노출시켰다. 접종액을 제거하고 FBS가 2% 함유된 DMEM배지를 첨가하여 약 16시간 배양한 후 배지를 제거하고 무혈청 DMEM을 첨가하여 cytopathic effect (CPE)가 70~80% 정도 보일 때 배지를 회수하였다. 회수된 배지는 원심분리 (160 g, 5 min에 이어 500 g, 15 min)하여 상층액을 취한 후 6 μ l씩 소분시킨 aliquot을 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

역가시험을 위하여, 보관된 aliquot 중 한 vial을 취하여 96-well plate에 10진 희석하여 미리 96-well plate에 confluency상태로 배양된 MDBK cell의 각 well당 20 μ l씩 virus 희석액을 접종하였다. 접종 2시간 후 2% FBS가 함유된 DMEM 배지를 첨가하여 배지용량이 100 μ l/well이 되도록 한 후, 4~5일간 배양하며 CPE를 관찰하여 Median Tissue Culture Infectious Dose (TCID₅₀)을 결정하였다.

Seed virus와 MDBK cell간의 MOI 산정은 다음과 같이 실시하였다. 즉, MDBK 세포를 20시간 배양하여 100%의 세포단층이 형성되었을 때의 96-well

plate의 각 well 당 세포의 수와 TCID₅₀로 산출된 seed virus의 infectious particle의 숫자를 비교하여 MOI를 결정하였다.

EHV-1 수득의 최적조건을 알아보기 위하여 seed virus의 접종 및 배양의 조건을 변화시키며 관찰하였다. 바이러스의 배양은 MOI, cell mono-layer의 confluency 정도 및 배지의 FBS 첨가량을 달리하여 접종한 후, CPE 형성의 진행에 따라 배양상층을 취하여 바이러스의 역가를 조사하였다. CPE 형성의 정도는 현미경상의 100배 확대의 시야 중 임의로 9개소를 구획하고 관찰하여 CPE가 일어난 시야가 차지하는 대략적인 백분율을 산정하였다.

3) Virus 정제

다수의 flask를 사용하여 대량 배양한 바이러스 상층액을 회수하고 원심분리 (160 g, 5 min에 이어 1,300 g, 15 min)를 통하여 MDBK 세포성분을 제거하였다. 회수된 상층액을 초원심분리 (Centrikon T-324, 24000 g, 4°C, 2시간)한 침전을 PBS에 부유시켜 -70°C에 보관하여 동물면역 및 ELISA분석용 바이러스 항원으로 사용하였다.

2. Monoclonal Antibodies against EHV-1, -4

1) 마우스 면역

정제된 바이러스 항원액 (EHV-1: 약 1 mg/ml, EHV-4: 약 1 mg/ml)을 동량의 TiterMax Gold™ adjuvant (Sigma, USA)로 emulsion화 한 후, 마우스 마리당 200 μ l (100 μ g virus)씩 생후 4주령의 BALB/c 마우스의 복강에 주사하였다. 초회 면역은 formalin으로 불활화한 사독항원을 접종하였으며, 2주후 정제된 바이러스를 마리당 매일 50 μ g/200 μ l씩 3회 미정맥에 추가접종하였다.

2) Hybridoma 작성

최종면역 24시간 후 BALB/c mouse의 심장으로부터 전채혈하고 혈청을 분리하였으며, 세포 융합을 위하여 무균적으로 비장을 적출하였다.

적출된 비장은 70% ethylalcohol (EtOH)에 침적하는 즉시 washing media가 담긴 dish에 2회 더 침적하여 세척한 후, 50 ml conical tube에 고정시킨 mesh위에 놓고 washing media 10 ml을 점적하며 forcep으로 spleen을 파쇄시켜 spleen cell들이 conical tube내로 부유되도록 하였다. 이후 washing media 15 ml를 첨가하고 원심분리 (300 g, 5 min)하여 세척한 cell들을 25 ml씩의 washing media로 2회 더 세척하였다 (300 g, 5 min). 이 후의 원심분리 세척은 동일한 조건으로

실시하였다. Spleen cell을 2회째 세척할 때 왕성한 분열을 보이며 충분히 배양된 myeloma cell도 50 ml conical tube에 원심분리하여 세척하였다. 세척된 spleen cell 과 myeloma cell의 비율은 packed cell volume이 약 1 : 1이 되도록 혼합한 후, 추가로 2회 더 세척하였다. 세척 후의 washing media를 완전히 제거하고 부드럽게 tapping하여 cell을 tube 바닥에 골고루 퍼주었다.

세포융합은 PEG를 사용하여 실시하였다. 즉, 50% PEG 1500 (Roche, USA) 1.0 ml를 1분에 걸쳐 점적하고, 30초간 정치 한 후, 1분에 걸쳐 1.0 ml의 washing media를 추가로 점적하며 PEG의 농도를 희석하였다. 이후, 부드럽게 tube를 흔들어주며 3 ml의 washing media를 3분에 걸쳐 가한 후, 10 ml의 washing media를 서서히 가하여 세포융합을 종료시켰다.

세포융합이 완료된 tube는 37°C의 CO₂ incubator에 약 5분간 정치하여 안정화시킨 후 원심분리로 세척하고 HAT medium 50 ml을 가하여 cell pellet을 조심스럽게 부유시켰다. 세포부유액은 96-well tissue culture plate에 100 µl씩 분주한 후 37°C의 5% CO₂ incubator에 배양하였다. 세포융합에 사용된 모든 용액은 미리 37°C로 맞추어 사용하였다. 약 1주일 후 HT media로 교환 후 colony의 형성하는 hybridoma의 상층액을 ELISA로 screening하였다.

3) Hybridoma의 screening

마우스 혈청의 역가를 확인하고, 특히 항체를 분비하는 hybridoma의 screening을 위하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 실시하였다. 즉, ELISA용 plate에 coating buffer로 적당히 희석시킨 항원을 100 µl/well씩 가하고 plate에 코팅 (4°C, overnight)하였다. 이후 blocking solution 0.1%의 bovine serum albumin이 용해된 phosphate buffered saline (0.1% BSA-PBS) 100 µl를 각 well에 가하고 4°C에서 1시간동안 봉쇄 반응시킨 후, 0.05% Tween20이 용해된 PBS (PBS-T)로 3회 세척하였다. Hybridoma 배양 상층액 또는 mouse혈청을 PBST로 5배 희석하여 100 µl씩 각 well에 가하고 1시간 실온에서 반응시킨 후, PBS-T로 3회 세척하였다. 이후 HRP가 표지된 goat anti-mouse IgG 접합액을 PBST로 1,000배 희석하여 100 µl씩 가하고 실온에서 1시간 반응시켰다. 이후 PBS-T로 3회 세척하고, 0.1% 2-2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS, Sigma)를 well당 100 µl씩 가하여 실온에서 30분간 발색 반응을 일으켰다. 발색 정도는 ELISA reader (SLT, Australia)로 405 nm의 흡광도를 측정하였다.

3. Fractionation of Fc from equine IgG

1) 말 IgG의 정제

마혈청을 Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden)을 이용한 affinity chromatography를 실시하여 IgG를 분리하였다. 즉, sepharose gel을 syringe column (16 × 80 mm)에 충전시킨 후, 20 mM PBS (pH 7.2)로 2배 희석한 마혈청 40 ml을 flow rate가 1.0 ml/min가 되도록 하여 column에 가하였다. Protein G와 결합하지 않은 혈청은 충분한 양의 PBS로 세척하여 제거하였다. 결합된 IgG는 3M NaSCN을 가하여 용출시켰다. 용출된 분획은 20 mM PBS로 3회 외액을 교환하며 72시간 동안 투석하여 남아있는 3M NaSCN을 제거하고 제균여과하여 냉장보관하였다. 정제된 IgG를 확인하기 위하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)분석을 실시하였다. 정제된 IgG 분획을 10% polyacrylamide gel에 loading한 후 50 V로 15분간 영동하고, 이어서 100 V로 전압을 높인 후 bromophenol blue dye가 바닥에 도달할 때까지 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 coomassie gel staining solution으로 40분 동안 염색하였고 destaining solution으로 24시간 탈색하였다.

2) Fc분획의 정제

정제된 IgG를 papain으로 소화시킨 후 Fc분획을 정제하였다. Cystein-HCl이 함유된 sodium phosphate buffer (75 mM NaCl, 2 mM EDTA, 75 mM sodium phosphate, 10 mM cystein-HCl, pH 7.1)를 제조하여 소화 직전에 papain (Sigma)을 buffer에 첨가하여 약 5분간 녹여 최종적인 digestion solution을 제조하였다. IgG 1 mg당 papain 10 µg비율로 조정하여 37°C에서 4시간 반응시켜 IgG의 digestion을 실시한 후, 20 mM iodoacetate (Sigma)을 가하여 반응을 정지시켰다.

Fc분획을 정제하기 위해 papain으로 소화된 IgG를 protein G Sepharose를 통하여 재차 정제하였다.

4. Virus에 Fc의 표지

EHV가 Fc의 접합체를 제조하기 위해 two-step glutaraldehyde를 이용한 conjugation 방법을 사용하였다. 정제된 EHV (5 mg/ml) 2 ml를 25%

glutaraldehyde (Sigma), PBS 1 ml에 천천히 교반하면서 섞어준 후 교반을 계속 하면서 실온에서 8시간 동안 반응시켰다. 반응액은 phosphate buffer에서 투석한 후 확인된 분획을 합치고, (약 1 ml) 정제된 Fc (1 mg/ml) 1 ml을 천천히 섞어준 다음 0.1 ml의 1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6)를 첨가하여 천천히 교반하면서 4°C에서 약 12시간 반응시켰다. 0.1 ml의 lysine 용액 (0.2 M)을 다시 첨가하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 PBS용액 (pH 7.2)에 10회 정도 4°C에서 투석을 실시하였다. 투석이 끝난 재료는 protein G column을 통해 정제하여 최종 용출된 재료를 -70°C에 보관 하였다.

5. Recombinant glycoprotein D (gD)

EHV-1, 4 gD의 유전자를 pBT, pBXII vector에 cloning하고 염기서열을 확인한 후 발현 벡터인 pQE30, pQEGFPII vector에서 발현시켰으며 과정은 아래의 그림에서 나타내었다 (Fig. 1).

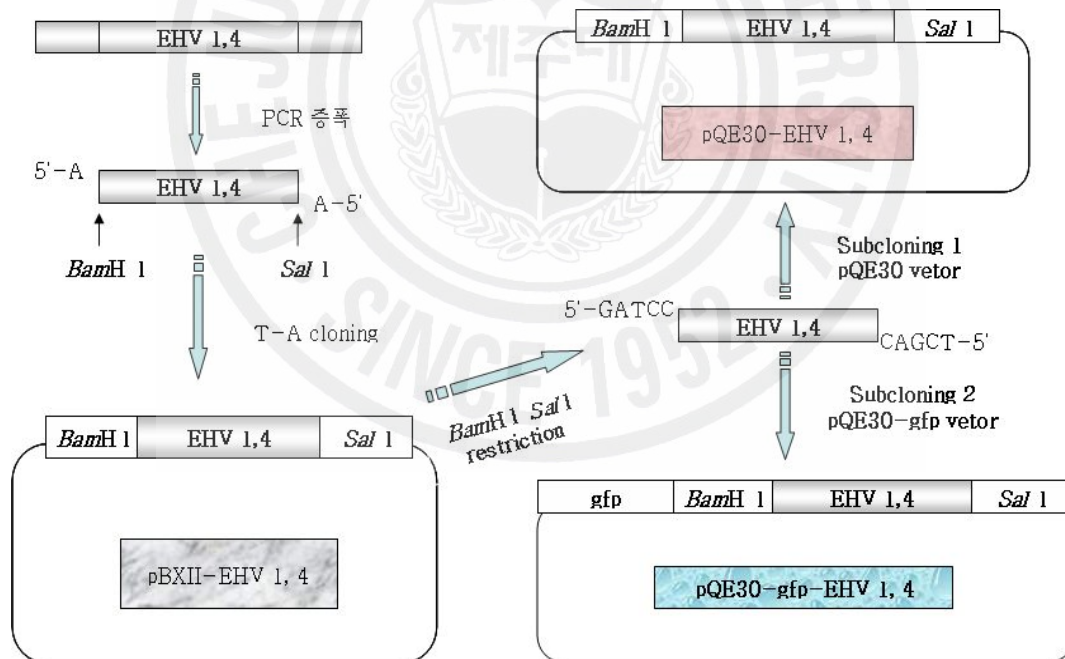


Fig. 1 Diagram of total process of recombinant EHV-1, 4 gD production.

The 1.38 kb DNA coding EHV-1 gD and 1.21 kb DNA coding EHV-4 gD cloned from pBT and pBXII vector by digestion with *Bam*HI and *Sal*I were inserted into expression vector pQE30, pQEGFP II.

1) PCR

(1) DNA 추출

바이러스 배양 상층액으로부터 QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Germany) 을 이용하여 시료 중의 DNA를 분리하였다. 즉, Micro-tube에 proteinase K 20 μ l를 가하고, 바이러스 상층액을 200 μ l를 넣었다. 이어서 lysis buffer 200 μ l를 가하여 15초 동안 강하게 교반하여 잘 혼합시킨 후 56°C의 수조에 10분간 정치시켜 lysis 반응이 일어나도록 하였다. 이 후 95% ethanol 200 μ l를 가하고 15초 동안 vortex mixer로 교반한 액 620 μ l를 QIAamp Spin Column에 분주하고 micro-centrifuge를 이용하여 1분간 원심분리를 8,000 rpm에서 하였다. 원심분리 후 collection tube를 교체하고 column에 washing buffer 1을 500 μ l를 가하여 동일조건으로 1분간 원심 분리하여 membrane에 남아있는 cell debris나 단백질을 제거하였다. 추가적으로 washing buffer 2를 500 μ l 분주하고 재차 14,000 rpm에서 3분간 원심분리를 실시하였으며, 최종적으로 template DNA를 용출시키기 위하여, collection tube를 교체하고 elution buffer 200 μ l를 분주하여 1분간 정치시킨 후 1분간 원심분리를 8,000 rpm으로 하여 얻어진 DNA를 PCR 분석에 사용하였다.

(2) Primer

EHV-1, 4의 glycoprotein D 염기서열의 forward와 reverse primer에는 각각 *Bam* HI과 *Sal* I의 restriction sites가 붙도록 primer를 설계하였다. 예상되는 gD의 PCR 산물들의 길이는 EHV-1은 1380 bp, EHV-4는 1210 bp가 되도록 하였다 (Table 1).

Table 1. PCR primers for the amplification of gD genes

Name	Sequence (5'→3')	mer	GC (%)	Tm
EHV1 gpD F	GAGAGAG <u>GATCC</u> ATGCCTGCTGTGCTGCTTG	19	58	57
EHV1 gpD R	GAGAGAG <u>TCGAC</u> CGGAAGCTGGGTATATTTAACATC	24	42	55
EHV4 gpD F	<u>GGATCC</u> ATGTCTACCTCAAGCCTATGAT	29	44	63
EHV4 gpD R	<u>GTCGAC</u> TTACGGAAGCTGAGTATATTTGA	29	41	61

The underlined sequences are the restriction enzyme sites of *Bam*H I or *Sal* I

(3) PCR조건

EHV-1의 PCR은 Takara 사의 EX taq을 사용하여 실시하였다. 조성은 11 ng/ μ l의 template 1 μ l, 10 pmol의 primer 각 1 μ l, 2.5 mM each dNTP 1 μ l, 5 U/ μ l Ex taq 0.3 μ l에 PCR buffer와 멸균된 D.W로 20 μ l가 되도록 하였다. Initial denaturing은 92°C에서 3분간 실시하였으며, denaturation은 94°C에서 30초, annealing온도는 53°C~67°C에서 25초, extension은 69°C에서 1분씩 반응시키며 35 cycles 실시하였다. Final extension을 위하여 72°C에서 10분을 추가하였다.

EHV-4의 PCR은 subcloning을 위하여 5' 말단에 *Bam*H I 과 *Sal* I site가 추가한 primer를 사용하였다. EHV-4의 sample DNA 1 μ l와 각 10 pmol의 primer 쌍, 10 mM dNTP (각 2.5 mM), 10x PCR buffer (with 15 mM MgSO₄), initial denaturing은 92°C에서 5분간 실시하였으며, denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 53°C~67°C에서 25초, extension은 69°C에서 1분씩 반응시키며 30 cycles을 실시하였다. Final extension을 위하여 72°C에서 5분을 추가하여 EHV-4 유전자를 증폭하였다.

(4) 전기영동

PCR products 10 μ l를 ethidium bromide (EtBr, 0.5 μ g/ml)가 첨가된 1% Agarose gel에 로딩한 후 1X TAE buffer (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA, pH 8.0)를 사용하여 mini-gel electrophoresis unit에서 100 V에서 80분간 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 UV-transilluminator로 증폭산물을 확인하였다.

2) gD gene cloning

(1) *E. coli* 와 플라스미드 vector

본 연구에 사용된 *E. coli* strain DH 5 α 및 JM109는 재조합 플라스미드를 형질전환 시키는 숙주로 사용하였고, M15는 발현 숙주로 사용하였다. Cloning vector는 pBlue scriptII KS(+) 유래의 pBXII vector (윤병수, 2006)를 사용하였으며, 발현 vector는 pQE30 vector (QIAGEN)를 사용하였다. 사용된 균주와 플라스미드 vector의 유전자형 및 특성은 Table 2와 Fig. 2, 3에 각각 표시하였다.

Table 2. Genotype of *E.coli* strain

strain	Genotype
<i>E.coli</i> JM 109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , λ , $\Delta(lac-proAB)$, [F', <i>traD36</i> , <i>pro AB</i> , <i>lacI</i> ^q Z Δ M15]
<i>E.coli</i> DH 5 α	F', ϕ 80dlacZ Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+), <i>supE44</i> , $\Delta(lacZYA-argF)$ U169, <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , λ

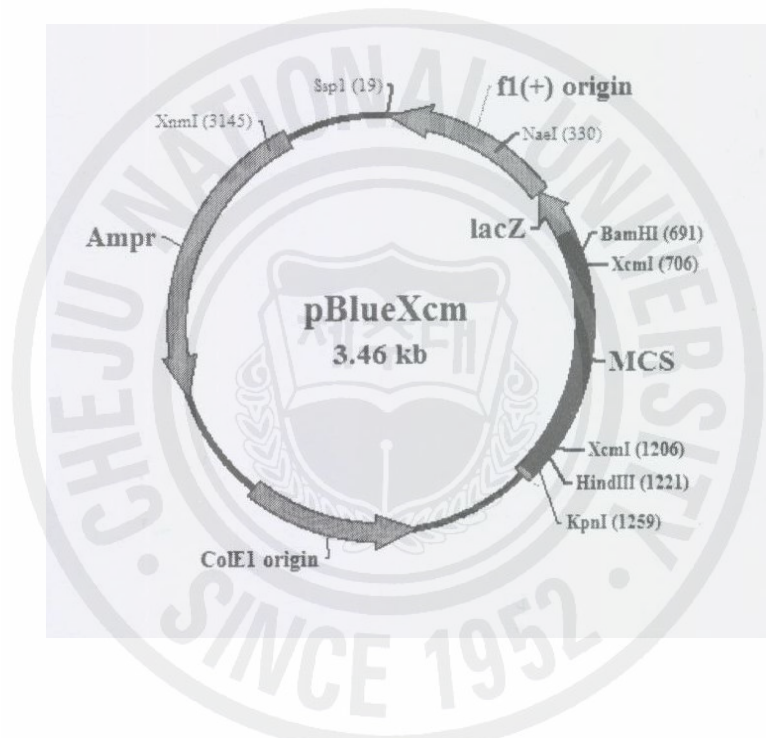


Fig. 2 Genetic map of pBlueXcm vector.

pBXII was originated from pBluescript II KS(+) (Stratagene, USA). Total vector size is 3.46 Kb and the vector has two restriction recognition site of XcmI in multiple cloning site. *Amp^r* and *lacZ* represent ampicillin resistance gene and β -galactosidase α subunit.

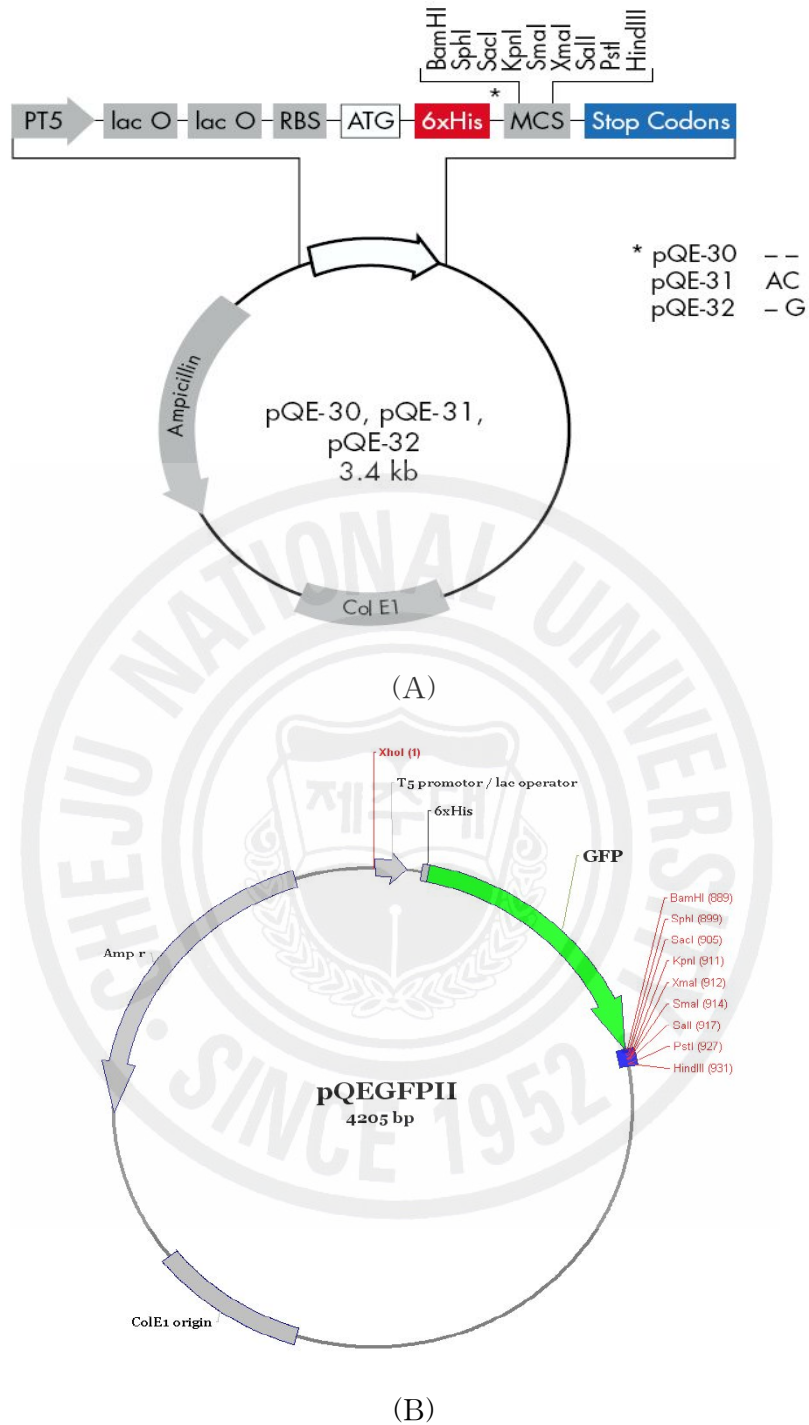


Fig. 3 Genetic map of expression vector (QIAGEN, Germany).

pQE30 or pQEGFP II is a kinds of prokayotic expression vector. Ampicillin represents ampicillin resistance gene. This vectors has 6x His-tag sequence. (a) : pQE30 (b) : pQEGFP II.

(2) 세균배양 배지 및 조성

E. coli 균주의 배양에는 일반적으로 LB (Luria-Bertani) medium (Gibco, USA)을 사용하였으며, ampicillin (Ap)에 내성이 있는 plasmid를 지닌 균주를 배양할 때에는 ampicillin의 최종농도가 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 사용하였다. 배지는 autoclave (121 $^{\circ}\text{C}$, 1.5기압, 15~20 min)하여 사용하였다. SOC 배지는 *E. coli* competent cell의 transformation시 받은 세포벽과 막의 손상을 보호하여, 세포 생존력을 높여 주기 위하여 사용하였다. 이런 특수 배지의 제법은 제조자의 지시를 따랐으며 각 시약은 고압멸균의 가능 여부를 확인한 후 사용하였다. 각 배지의 성분함량은 Table 3에 나타내었다.

항생제 배지는 실험에 필요한 미생물 개체만을 선별하기 위하여 사용하였다. 보관용 항생제는 0.45 μm syringe filter (Nalgene, USA)로 멸균하여 배지에 섞을 때는 Autoclave한 액체배지 또는 agar배지를 50 $^{\circ}\text{C}$ 이하로 식힌 다음 섞어서 사용하였다. 일반적으로 사용한 항생제 최종 유효 농도는 Table 4에 나타내었다.

Table 3. Composition of medium per liter

배지종류	성분	량
LB (Luria-Bertani)	Bacto-trypton	10 g
	Bacto-Yeast Extract	5 g
	NaCl	10 g
SOC medium	Bacto-trypton	20 g
	Bacto-Yeast Extract	5 g
	NaCl	0.5 g
	1M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (filtering-sterilization)	10 ml
	1M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (filtering-sterilization)	10 ml
	1M Glucose (filtering-sterilization)	20 ml

Table 4. Antibiotics solution

Antibiotics	Stock solution		Working solution	
	storage	concentration	range	recommendation
Ampicillin (Ap)	-20 $^{\circ}\text{C}$	50 mg/ml	20-60 mg/ml	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

3) EHV-1, 4 gD의 cloning

주형 DNA를 PCR로 증폭한 gD gene을 TA cloning 벡터인 pBT vector를 이용하여 cloning을 하였다.

(1) plasmid DNA 순수분리

pBXII vector는 ampicillin이 첨가된 LB broth에 colony를 접종하여 37°C에서 180 rpm으로 교반하여 24시간 배양하였다. Broth에 배양된 pBXII vector를 Accuprep Nano-plus plsmid Mini Extraction kit (Bioneer, Korea)로 회수하여 restriction에 사용하였다. 먼저 배양된 pBXII vector를 3,000 g에서 5분간 원심분리 하여 회수된 pellet에 resuspension buffer 250 μ l로 균체를 부유시킨 후 같은 튜브에 Nano-solution buffer 20 μ l를 첨가해 혼합한 후 lysis buffer 250 μ l와 neutralizing buffer 350 μ l를 넣고 혼합한 후 원심분리 (4°C, 13,000 rpm, 1 min)를 하여 회수된 상층액을 DNA binding column tube로 옮겨 원심분리 (13,000 rpm, 1 min)를 하였다. 원심 분리후 washing buffer 700 μ l를 가하여 원심분리 (13,000 rpm, 1 min)를 한 후, elution buffer 50 μ l를 가하여 plasmid DNA를 회수하였다. 추출한 plasmid DNA는 260 nm에서 흡광도를 측정하여 DNA를 정량하였다.

(2) Restriction analysis

Vector (147 ng/ μ l)는 최종 volume 50 μ l를 기준으로 하였으며, pBXII vector 18 μ l에 제한 효소인 *Xcm*I (5 units) 2 μ l와 buffer 5 μ l와 증류수 25 μ l를 첨가시켜 37°C에서 60분간 반응을 하였다. 절단된 pBXII vector는 DNA-spin Plasmid DNA Purification Kit (iNtRON, Korea)를 이용하여 정제하였다. PCR반응으로 얻은 gD는 PCR Purification Kit (Dyne Bio Inc, Korea)를 이용하여 정제하였다.

(3) Ligation 및 transformation

Vector와 insert DNA의 비는 약 1 : 3으로 조성하여 ligation 반응 (13°C, overnight)을 진행하였다. EHV-1의 ligation반응은 두 가지 조건으로 실시하였다. 즉, EHV-1 insert DNA (100 ng/ μ l) 12 μ l, vector (147 ng/ μ l) 4 μ l와 10x ligase buffer 2 μ l, T4 DNA ligase (1 unit) 1 μ l첨가시켜 total volume이 20 μ l가 되도록 반응시켰고, 한편, EHV-1 insert는 6 μ l, vector는 2.5 μ l를 넣어 주었고 10x ligase buffer 1 μ l, T4 DNA ligase (1 unit) 0.5 μ l로 total volume 10 μ l가 되게 하여 반응 (13°C, overnight)시켰다.

EHV-4의 ligation은 restricted pBXII (25 ng/ μ l) 4 μ l, EHV-4 (34 ng/ μ l) 4 μ l,

ligase 1 μl , ligase buffer 1 μl 로 total volume 10 μl 가 되게 하여 반응시켰다. 냉동 보관된 host cell DH5a competent cell을 꺼내서 ice에서 30분간 정치시켜 녹인 후 ligation된 mixture 20 μl 에 DH5a competent cell 20 μl 를 가하여 섞고 20분간 ice에 정치한 후 42°C의 수조에 45초간 정치하여 transformation을 유도하였다. Transformation이 종료되는 즉시 ice에 5분간 정치하여 안정화를 시킨 후 SOC medium 800 μl 를 첨가하여 shaking incubation (37°C, 180 rpm, 1시간) 후 ampicillin이 첨가된 LB plate에 50 μl 씩 도말한 후 배양 (37°C, overnight)하였다. Plate에서 자란 colony를 선택하여 picking을 한 후 배양 (37°C, overnight)하였다.

(4) Colony PCR , Restriction 및 전기영동

Transformation의 여부를 확인하기 위하여 universal primer인 T3 primer와 T7 primer를 사용하여 PCR을 실시하였다. 즉, plate에 자란 colony를 picking하여 튜브 내부에 도말한 후 T3 primer (10 pmol) 0.75 μl , T7 primer (10 pmol) 0.75 μl 를 가하고, dNTP (2.5 mM each) 1 μl , Ex taq (5 U/ μl) 0.2 μl , DW 5.5 μl 를 추가하여 total volume 10 μl 이 되도록 하여 PCR을 실시하였다. PCR은 initial denaturing 94°C에서 3분간, denaturation은 94°C에서 20초, annealing온도는 56°C에서 20초, extension은 72°C에서 1분씩 35 cycles을 실시하였으며, final extension은 72°C에서 10분간 PCR 반응시켰다.

PCR 산물로 부터 insert DNA를 확인 한 후, colony를 ampicillin이 첨가된 LB broth에 접종하고 배양한 (37°C, 180 rpm, overnight)후 Accuprep Nano-plus plasmid Mini Extraction kit (Bioneer, Korea)로 plasmid DNA를 회수하여 restriction에 사용하였다. D.W 14.3 μl , RE 10X buffer 2 μl , Acetylated BSA 0.2 μl , DNA 2 μl , Restriction enzyme (*EcoRI*) 1 μl 로 total volume 20 μl 가 되게 한 후 restriction반응 (37°C, 1시간)을 실시하였다. 반응액은 전기영동에서 PCR products 10 μl 를 ethidium bromide (EtBr, 0.5 $\mu\text{g/ml}$)가 첨가된 1% Agarose gel에 로딩한 후 1x TAE buffer를 사용하여 전기영동 (100 V, 80분간)을 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 UV-transilluminator로 gD gene에 대한 증폭 산물을 확인하였다.

각각의 EHV-1은 TA cloning에서 sequencing확인과 함께 *EcoRI*, *HindIII*를 이용하여 절단하였고, EHV-4는 *BamHI/SalI*으로 절단하는 모식도는 아래에 나타내었다 (Fig. 4, Fig. 5).

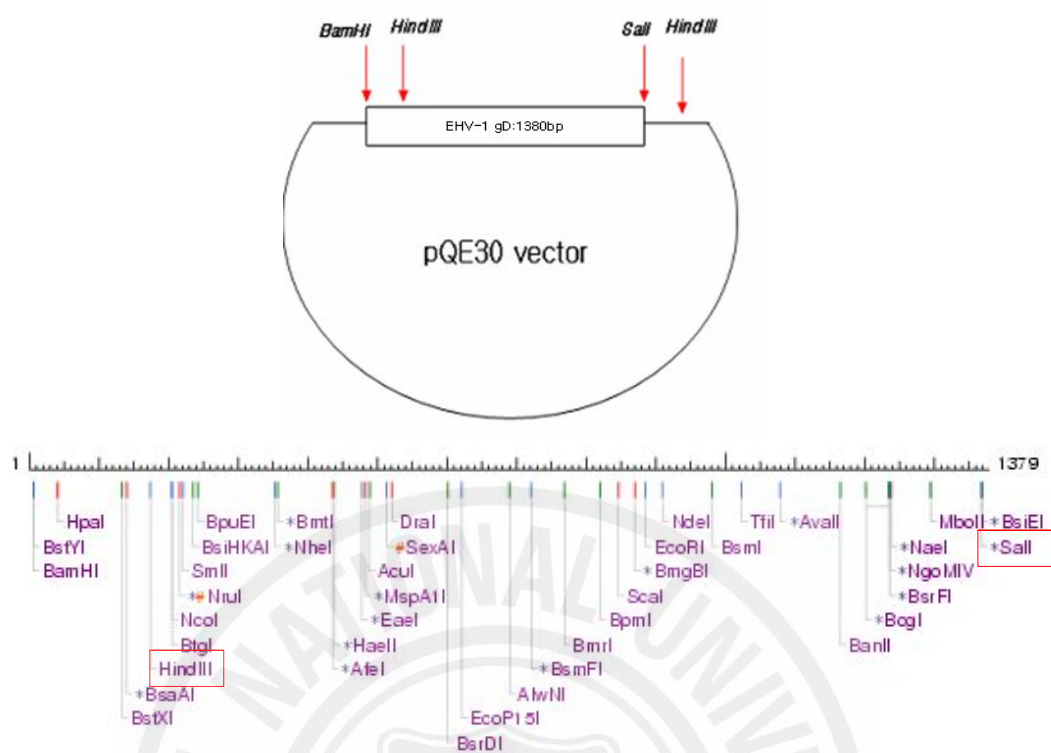


Fig.4 Restriction analysis of EHV-1 gD subcloned plasmid and enzyme digestion site of plasmid by *Hind*III.

(5) Sequencing

재조합된 pBXII-gD plasmid로부터 gD gene의 염기서열을 확인하기 위하여 pBXII vector의 T3 forward sequencing primer와 T7 reverse sequencing primer를 사용하여 PCR을 수행한 후, 염기서열을 분석 의뢰하였다. 염기서열 분석결과는 염기서열 분석 프로그램인 PCGENE과 Web 기반 프로그램인 Clustal X를 사용하였다.

4) Expression and Purification of the EHV-1, 4 recombinant gD

(1) Restriction

EHV-1의 subcloning을 확인을 위하여 제한효소 *Bam*HI과 *Sal*I으로 restriction 하였다. Restriction에 사용된 expression vector는 pQE30 (180 ng/ μ l) 혹은 pQEGFP II (100 ng/ μ l)를 사용하였으며, insert DNA는 pBT vector에 삽입되어 있는 gD4 (141 ng/ μ l) 혹은 gD16 (905 ng/ μ l)를 사용하였다. 각 성분은 pQE30, 5.5 μ l, pQEGFP II, 10 μ l, gD4, 9 μ l, gD16, 2 μ l를 사용하였으며, *Bam*HI, 10 U/1 μ l, 및 *Sal* I 10 U/1 μ l 1 μ l, Y Tango buffer 10 μ l를 사용하였다. 증류수는 각각 32.5 μ l, 28 μ l, 29 μ l, 12 μ l를 가하여 총량이 50 μ l가 되게 하였다. Restriction의 과정은 다음과 같다. 즉, 각 조성을 맞춘 후 30°C의 조건에서 *Bam*HI을 30분간 처리하고, 이후 *Sal*I를 추가하여 37°C에서 45분간 반응시켰다.

EHV-4의 subcloning도 EHV-1의 경우와 동일하게 실시하였다. 즉, pBXII-EHV-4 (430 ng/ μ l) 8 μ l, pQE30 (150 ng/ μ l) 14 μ l, pQEGFP II (134 ng/ μ l) 14 μ l, *Bam*HI, 10 U/1 μ l, *Sal* I, 10 U/1 μ l, 1 μ l, Y Tango buffer (10x) 4 μ l, D.W 6 μ l로 하여 total volume 20 μ l하여 반응 (37°C, 90 min)시켰다.

Restriction된 vector는 DNA Purification Kit (iNtRON, Korea)로 정제하였다. PCR반응으로 얻은 gD는 PCR Purification Kit (Dyne Bio, Korea)를 이용하여 정제하였다.

(2) Ligation 및 transformation

EHV-1의 ligation은 세 가지 반응으로 실시하였다. 각각 3개의 vector pQE30, gD4, pQEGFP II는 5 μ l Insert DNA (pBT-gD, 37 ng/ μ l)는 6.5 μ l가 되도록 첨가하고 5x ligase buffer 3 μ l, T4 DNA ligase (2 units) 0.5 μ l를 첨가시켜 total volume이 15 μ l가 되도록 하여 ligation (13°C, overnight)을 실시하였다. EHV-4의 ligation반응은 EHV-4 (48 ng/ μ l) 4 μ l, pQE30 (120 ng/ μ l) 4 μ l,

pQEGFP II (112 ng/ μ l) 4 μ l, ligase (1 U/ μ l) 1 μ l, ligase buffer (10x) 1 μ l 로 최종 volume 10 μ l로 맞추는 후 반응 (13°C, overnight)하였다.

Ligation mix를 냉동 보관된 DH5a competent cell을 사용하여 ice에서 30분간 정치시켜 녹인 후 ligation된 mixture 20 μ l에 DH5a competent cell 20 μ l을 넣고 섞어서 20분간 ice에 정치한 후 42°C에서 45초간 정치하여 transformation을 유도하였으며, 곧바로 ice에 5분간 정치하여 안정화를 시킨 후 SOC medium 800 μ l을 첨가하여 37°C에서 1시간동안 180 rpm으로 shaking incubation하였다. 1시간 반응 후 ampicillin이 첨가된 LB plate에 50 μ l씩 분주하여 도말한 후 배양 (37°C, overnight)하였다. Plate에서 자란 colony를 선택하여 picking을 한 후 배양 (37°C, overnight)하였다.

(3) SDS-PAGE

Bio-rad의 MINI-PROTEIN II 기기를 사용하였으며, separating gel은 12%, stacking gel은 4%의 polyacrylamide gel을 사용하였다. Gel을 running tank에 장착한 후, running buffer를 채우고, 시료를 4x sample buffer를 이용하여 전체 volume 20 μ l에 맞추는 후 100°C에서 3분간 끓인 후, well에 loading하고 bromophenol blue dye가 바닥으로 빠져나올 때까지 전기영동 (80 V~100 V)하였다.

(4) Western blot 분석

SDS-PAGE로 수행한 polyacrylamide gel을 NC Membrane (Protran BA 85)에 transfer (100 V, 400 mA, 120 min)하여 분석하였다. Blotting이 된 막은 Ponceau's sloution으로 transfer의 진행양상을 확인하였다. Blocking은 5% skim milk, tris buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBS-T)를 이용하여 실온에서 60분간 반응시킨 후 TBST로 15분씩 3회 세척하였다. 이후 2% skim milk TBS-T에 EHV 항체 양성인 horse serum을 희석한 후 60분간 shaking하여 반응시켰다. TBST로 15분씩 3회 세척한 후 rabbit-anti horse IgG-HRP를 2% skim milk TBS-T에 희석하여 60분 동안 반응시켰다. TBST로 15분간 2회, TBS로 1회 세척후 diaminobenzidine HCl (DAB) (KPL, USA) 발색 기질액을 발색반응을 관찰하였다. 적당한 반응이 확인되면 즉시 PBS에 넣어서 반응을 정지시켰다. Western blotting분석의 모든 반응 (50 rpm, 15 mim)과 세척 (100 rmp, 15 mim)은 교반기를 이용해서 실온에서 교반하여 실시하였다.

III. Results

1. 바이러스

1) EHV-1의 역가

96-well cell culture plate에 MDBK cell을 배양 하고 역가검정을 위해 EHV-1 접종을 실시하였다. EHV-1 접종 후 5일까지 세포를 관찰하였을 때 $10^{8.75} \times \text{TCID}_{50}/6 \mu\text{l}$ 로 나타났으므로, EHV-1 seed의 역가는 $5.6 \times 10^8 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ 로 확인되었다 (Table 5).

Table 5. EHV-1 seed titration by CPE production (TCID_{50})*

	1	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9	10^{10}	10^{11}
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

* TCID_{50} was estimated by calculating exponential mean of end points showing CPE by inoculating EHV into the wells.

2) EHV-4의 역가

96-well cell culture flask에 MDBK cell을 배양 하고 다음날 역가검정을 위한 EHV-4 접종을 실시하였다. EHV-4 접종 후 5일까지 세포를 관찰하여 CPE발생 여부를 관찰하였다. 이를 기준으로 $10^{8.5} \times \text{TCID}_{50}/6 \mu\text{l}$ 로 나타났으므로, EHV-4 seed의 역가는 $3.2 \times 10^8 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ 으로 확인되었다 (Table 6).

Table 6. EHV-4 seed titration from CPE production (TCID_{50})*

	1	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9	10^{10}	10^{11}
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
F	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
H	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

* $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ was estimated by calculating exponential mean of end points showing CPE by inoculating EHV into the wells.

3) EHV-1의 대량 배양을 위한 최적조건

바이러스의 역가는 100% confluency를 보인 cell layer에, 4 MOI의 바이러스를 접종하고 2% FBS DMEM에 배양하여 60%의 CPE를 보였을 때 가장 높았으나, 경제상의 편의를 위하여 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 4 MOI를 100%의 cell confluency를 보인 MDBK에 접종하여 70%의 CPE를 보인 시점에서 바이러스를 회수하는 조건을 선택하였다. (Table 7).

Table 7. Determination of optimum culture condition for EHV-1

MOI	Inoculation time*	TCID ₅₀			
		2% FBS DMEM		DMEM	
		MDBK (70%)**	MDBK (100%)	MDBK (70%)	MDBK (100%)
1	0 %	0	2	0	2
	25%	4	3.5	3	4
	50%	6	5	4	5
	60%	5.5	6	3	5
	70%	6	6	7.5	7
	90%	7	4.5	5	6
2	0 %	2	3	3	3
	25%	3	3	4	2
	50%	5	5.5	4	5
	60%	5	4	3.5	4
	70%	5.5	4	5	3.5
	90%	4	3.5	4	3.5
4	0 %	3	3	3	2
	25%	4	6	5.5	4.5
	50%	5	10	4	9
	60%	10	11.5	9	10.5
	70%	7.5	10	7	11
	90%	5	6	6.5	5
8	0 %	2	2	3	3
	25%	4	7	5	6
	50%	7	8	8	7.5
	60%	6.5	7	6	7
	70%	7	4	7.5	7
	90%	7	6	7	5

* at the point of CPE appearance

** a point of view of cell confluency

4) EHV-4의 대량 배양을 위한 최적조건

바이러스의 역가는 100% confluency를 보인 cell layer에, 4 MOI의 바이러스를 접종하고 2% FBS DMEM에 배양하여 90%의 CPE를 보였을 때 가장 높았으나, 경제상의 편의를 위하여 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 4 MOI를 70%의 cell confluency를 보인 MDBK에 접종하여 90%의 CPE를 보인 시점에서 바이러스를 회수하는 조건을 선택하였다 (Table 8).

Table 8. Determination of optimum culture condition for EHV-4

MOI	Inoculation time*	TCID ₅₀			
		2% FBS DMEM		DMEM	
		MDBK (70%)**	MDBK (100%)	MDBK (70%)	MDBK (100%)
1	0%	0	0	0	0
	25%	2	1	3	1
	50%	× ***	×	×	×
	60%	×	×	×	×
	70%	×	×	×	×
	80%	×	×	×	×
	90%	×	×	×	×
2	0%	0	0	0	0
	25%	3	2	3	1
	50%	3	×	3	3
	60%	×	×	1	×
	70%	×	×	×	×
	80%	×	×	×	×
	90%	×	×	×	×
4	0%	1	2	1	1
	25%	4	3	3	2
	50%	7	6	5	5
	60%	9	7	8	6
	70%	10	9	9	8
	80%	10	9	9	8
	90%	11	9.5	10.5	9
8	0%	0	1	0	0
	25%	2	2	2	2.5
	50%	4	3	3	3
	60%	6.5	7	6	5.5
	70%	8	8	9	7
	80%	8	8	9	7
	90%	9.5	10	10	8

* at the point of CPE appearance

** a point of view of cell confluency

*** CPE did not extended in some case

5) EHV 항원의 단백질농도

Standard BSA의 standard curve를 이용하여 시료를 10진 희석하여 단백질량을 측정하였다. 약 50 ml의 배양상층액을 정제하여 정제된 바이러스 부유액은 최종적으로 EHV-1은 0.98 mg/ml의 0.7 ml, EHV-4은 0.96 mg/ml의 0.7 ml였다.

2. Monoclonal anti-EHV-1, 4

세포융합을 통하여 얻어진 hybridoma 중 안정적인 항체분비를 보이는 clone들을 선별하였다. EHV-1에 대한 10개의 clones과 EHV-4에 대한 12개 clones이 분비하는 monoclonal anti-EHV-1 및 -4의 항체가 측정 하였다. 이들 MAb들은 EHV-1, 및 -4 바이러스에 모두 교차반응을 보였다. 특히 모든 MAb들은 EHV-1에 비하여 EHV-4 항원에 보다 강한 반응을 보였다. 또한, EHV-4를 면역시켜 얻은 MAb들이 EHV-1을 면역시켜 얻은 MAb 들에 비하여 보다 높은 항원가를 나타내었다. (Fig. 6).



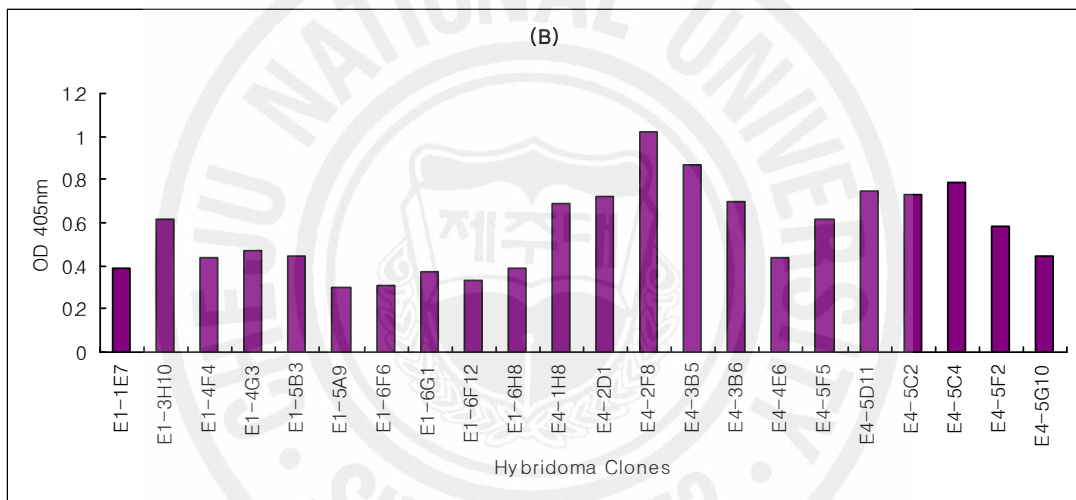
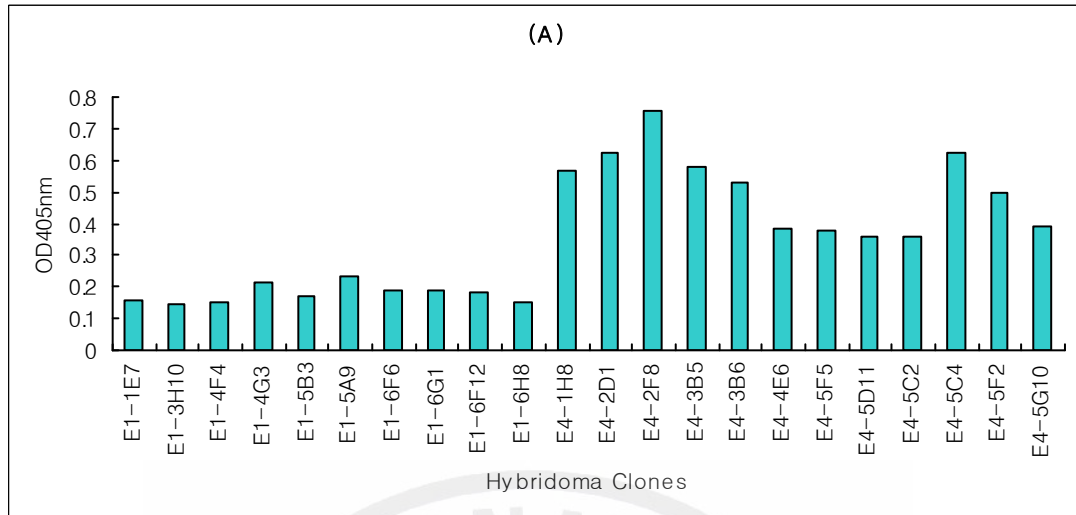


Fig. 6 Reactivity of Monoclonal antibodies against EHV-1 and EHV-4.

Indirect ELISA was performed using EHV-1 or -4 coated ELISA plates. Supernants of cultured hybridoma was diluted with PBST (supernant 1/2) (E1-** MAbs to EHV-1, E4-** MAbs to EHV-4). (A) reactivity with EHV-1. (B) reactivity with EHV-4.

3. Fractionation of Fc from equine IgG

(1) Fc 단백질 확인

Affinity chromatography를 실시하여 정제한 equine IgG는 전기영동으로 분석하였을 때, Fig. 7과 같이 heavy chain과 light chain에 해당하는 53 kDa 및 31 kDa의 분획이 확인되어 순수분리가 성공적이었다고 판단되었다.

정제된 IgG로부터 papain 소화에 의한 affinity chromatography로 분리된 Fc fraction을 전기영동에서 확인한 결과 Fig. 8과 같이 약 28 kDa에 해당하는 Fc의 단일분획을 확인하였다.

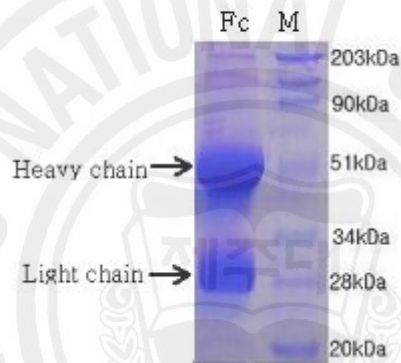


Fig. 7 SDS-PAGE analysis of IgG.

The arrows indicates the position of 53 kDa heavy chain and 31 kDa light chain. M: Standard size marker; Fc: Affinity purified equine IgG.

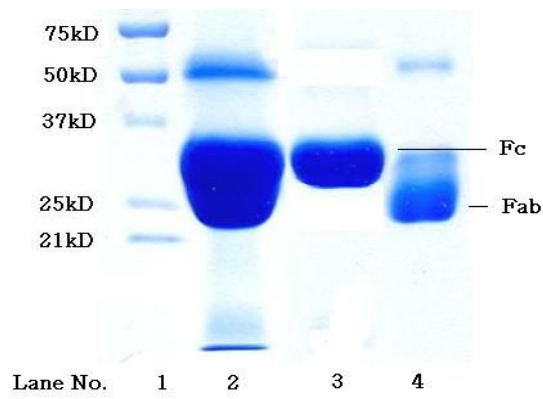


Fig. 8 SDS-PAGE analysis of Fc fraction.

The arrows indicates the position of Fc and Fab. lane 1: size marker, lane 2: fraction after papain digestion, lane 3: elution fraction of affinity chromatography, lane 4: pass-out fraction of affinity chromatography.

4. Recombinant glycoprotein D (gD)

1) EHV-1, 4 gD cloning

(1) EHV-1 gD확인

EHV-1 gD gene 검출을 위한 PCR 과정 중의 annealing 적정온도를 조사하기 위하여 53°C, 55.3°C, 59°C, 63.3°C, 65.9°C, 67°C의 조건으로 PCR을 실시한 결과를 Fig. 9에 나타내었다. 적용된 각각의 annealing 온도조건에서 1380 bp의 EHV-1의 gD의 밴드가 확인되었으나, 59°C의 조건에서 PCR 산물의 양이 가장 많은 것으로 판단되어, PCR의 최적 annealing 온도조건은 59°C로 결정하였다.

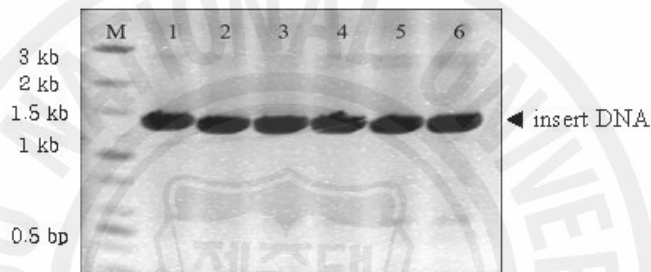


Fig. 9 Gradient PCR for EHV gD.

M: DNA size marker (3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 0.8 kb, 0.6 kb, 0.5 kb, 0.4 kb, 0.3 kb, 0.2 kb, 0.1 kb); Annealing temperature of lane 1 was 53°C; lane 2 was 55.3°C; lane 3 was 59°C; lane 4 was 63.3°C; lane 5 was 65.9°C lane 6 was 67°C. About 3 μ l samples among total volumes were loaded in each well.

(2) Ligation 확인

TA cloning 중 ligation mixture는 전기영동으로 cloning반응의 성공여부를 확인하였다. Fig. 10에서와 같이 1번 lane은 ligation mixture I이며, 3번은 ligation mixture II로서 각 1, 3번 lane은 화살표의 vector와 insert보다 큰 분자량의 밴드가 확인되었으므로 ligation이 이루어진 것으로 판단하였다.

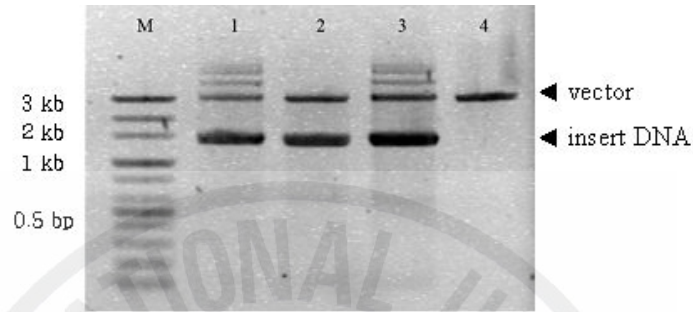


Fig. 10 Ligation mixture of gD.

M: DNA size marker (3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 0.8 kb, 0.6 kb, 0.5 kb, 0.4 kb, 0.3 kb, 0.2 kb, 0.1 kb); lane 1: Ligation mixture of I label; lane 2: Vector and insert of same weight of used to ligation I. lane 3: Ligation mixture of II label; lane 4: Vector of same weigh of used to ligationII. The arrows indicates the position of vector and EHV-1 gD.

(3) T3/T7 universal PCR

Transformation 후 생성된 colony에서 insert DNA가 삽입된 clone을 선별하기 위해 T3/T7 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. Colony를 용균시켜 template로 사용하여 PCR을 수행하였으며 이를 전기영동으로 확인하였다. EHV-1은 transformation후 plate에서 자란 colony를 picking하여 T3/T7 universal PCR로 확인하였다. 1에서 8 lane은 첫 번째 ligation 조건으로, 9에서 16 lane은 두 번째 ligation 조건으로 실시한 PCR 산물이다. 성공적으로 cloning된 것 중 밴드가 가장 강한 반응을 나타낸 4번 및 16번 lane의 colony를 선택하여 transformation에 적용하였다 (Fig. 11).

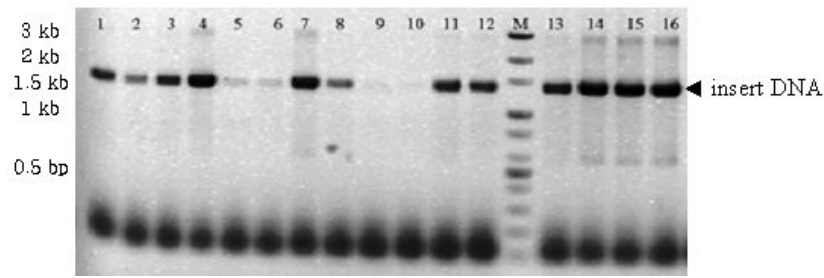


Fig. 11 Clone screening using PCR with T3/T7 universal primer.

M: DNA size marker (3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 0.8 kb, 0.6 kb, 0.5 kb, 0.4 kb, 0.3 kb, 0.2 kb, 0.1 kb) ; lane 1~8 : ligation mixture I ; lane 9~16 : ligation mixture II. Sample selected lane 4 among ligation mixture I and Sample selected lane 16 among ligation mixture II.

(4) Restriction analysis

gD gene이 삽입된 것을 확인된 4번 lane과 16번 lane에 해당하는 colony를 LB 배지에 접종해서 16시간 배양 한 후 plasmid DNA를 분리하여 restriction analysis를 하였다. 1, 2번은 PCR screening시 4번 lane의 colony plasmid를 확인하였고, 3, 4번은 16번 lane의 colony plasmid를 확인하였다. 각각의 colony를 이용하여 plasmid를 분리하여 *EcoR* I 으로 절단한 결과 2번 lane의 4번 lane의 colony plasmid에서 900 bp와 500 bp에서 밴드가 확인되어 TA cloning이 성공적으로 이루어진 것으로 판단하였다 (Fig. 12).

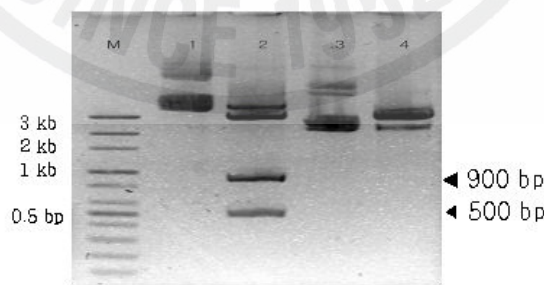


Fig. 12 Restriction analysis of gD clone 4 and 16.

M: DNA size marker (3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 0.8 kb, 0.6 kb, 0.5 kb, 0.4 kb, 0.3 kb, 0.2 kb, 0.1 kb); lane 1 and 2: gD clone no. 4; lane 3 and 4: gD clone no. 16; lane 1 and 3 was unrestrictied plasmid DNA, lane 2 and 4 was restricted DNA by *EcoR* I restriction enzyme. The arrows indicates 900 bp and 500 bp bands.

(5) Sequencing

PCR 및 sequencing 후 비교한 결과는 유사산된 자마로부터 분리된 바이러스의 염기서열은 각각 다른 바이러스 주와의 비교할 때 100%에서 99%의 상동성을 보였다 (Table 9). 또한, cloning된 EHV-1의 sequence는 AY464052주와 비교한 결과 C의 좌가 T로 변이되어, AY464052주와 비교할 때 99 %의 homology를 보였다 (Fig. 13).

Table. 9 Homology analysis of Equine herpesvirus glycoprotein D gene

Accession	Description	Total score	Query coverage (%)	Max ident (%)
AY464052.1	Equine herpesvirus 1 strain v592, complete genome	2499	98	99
AY665713.1	Equine herpesvirus 1 strain Ab4, complete genome	2499	98	99
M59773.1	Equine herpesvirus glycoprotein D gene, complete cds	2499	98	99
M60946.1	Equine herpesvirus glycoprotein 17/18 gene, complete cds, strain	2494	98	99
AB279610.1	Equine herpesvirus 1 EVS6 gene for glycoprotein D, complete cds	2492	98	99
M87497.2	Equine herpesvirus 1 protein kinase (EVS1) gene, partical cds	2470	98	99
M62923.1	Equine herpesvirus type-1 glycoprotein D homolog (EHV-1) gene, complete cds	2470	98	99
AB279607.1	Equine herpesvirus 1 EVS6 gene for glycoprotein D, complete cds	2440	96	99
D88734.1	Equine herpesvirus 1 DNA for membrane glycoprotein, complete cds	942	36	100
D88733.1	Equine herpesvirus 1 DNA for membrane glycoprotein, complete cds	942	36	100
M36299.1	Equine herpesvirus type 1 glycoproteins qE, qI and 10 kDa protein	887	35	99

Query	13	ATGCCTGCTGTGCTGCTTGTACTGTATGTTAACCCGCCCCGAGCGTCTGTATATAACT	72
Sbjct	131115	ATGCCTGCTGTGCTGCTTGTACTGTATGTTAACCCGCCCCGAGCGTCTGTATATAACT	131174
Query	73	CAAAAATTATCCCTTGGCCTTTACAACCAAGTGGTGGCGTGTATGCAGAAGCGTCCACCG	132
Sbjct	131175	CAAAAATTATCCCTTGGCCTTTACAACCAAGTGGTGGCGTGTATGCAGAAGCGTCCACCG	131234
Query	133	CCCTGGTACGTGTTTTCAATAAACGAAGCATGTCTACCTTCAAGCTTATGATGGATGGA	192
Sbjct	131235	CCCTGGTACGTGTTTTCAATAAACGAAGCATGTCTACCTTCAAGCTTATGATGGATGGA	131294
Query	193	CGTTTGGTTTTTGGCATGGCAATCGCGATCTTGAGCGTTGTGCTCTCTTGTGGAACATGC	252
Sbjct	131295	CGTTTGGTTTTTGGCATGGCAATCGCGATCTTGAGCGTTGTGCTCTCTTGTGGAACATGC	131354
Query	253	GAGAAAGCCAAAGCGTGCAGTTTCGAGGACGCCAGGATAGGCCAAAGGAGTTCCACCACCC	312
Sbjct	131355	GAGAAAGCCAAAGCGTGCAGTTTCGAGGACGCCAGGATAGGCCAAAGGAGTTCCACCACCC	131414
Query	313	CGCTATAACTATACAATTTTAAACAAGATACAACGCGACTGCGCTAGCATCACCGTTTATT	372
Sbjct	131415	CGCTATAACTATACAATTTTAAACAAGATACAACGCGACTGCGCTAGCATCACCGTTTATT	131474
Query	373	AACGACCAAGTAAAAATGTTGACTTGGCGGATTGTTACTGCTACGCGCCCATGTGAAATG	432
Sbjct	131475	AACGACCAAGTAAAAATGTTGACTTGGCGGATTGTTACTGCTACGCGCCCATGTGAAATG	131534
Query	433	ATAGCGCTGATCGCTAAGACAAACATAGACTCAATCCTGAAGGAGCTGGCCGCTGCCCAA	492
Sbjct	131535	ATAGCGCTGATCGCTAAGACAAACATAGACTCAATCCTGAAGGAGCTGGCCGCTGCCCAA	131594
Query	493	AAAACCTATTCCGCCAGACTCACCTGGTTTTAAATATGCCAACGTGTGCAACGCCTATA	552
Sbjct	131595	AAAACCTATTCCGCCAGACTCACCTGGTTTTAAATATGCCAACGTGTGCAACGCCTATA	131654
Query	553	CACGATGTTAGTTATATGAAATGCAACCCGAAGCTATCATTGCAATGTGTGATGAGAGA	612
Sbjct	131655	CACGATGTTAGTTATATGAAATGCAACCCGAAGCTATCATTGCAATGTGTGATGAGAGA	131714
Query	613	TCAGACATACTATGGCAAGCTAGTTAATTAATACTATGGCTGCTGAAACTGACGATGAACTT	672
Sbjct	131715	TCAGACATACTATGGCAAGCTAGTTAATTAATACTATGGCTGCTGAAACTGACGATGAACTT	131774
Query	673	GGACTTGTACTGGCAGCCCTGCACATTCTGCCTCGGGACTGTATCGCCGTGTTATAGAA	732
Sbjct	131775	GGACTTGTACTGGCAGCCCTGCACATTCTGCCTCGGGACTGTATCGCCGTGTTATAGAA	131834
Query	733	ATCGACGGAAAGCGAATTTACACGGACTTTTCTGTAACTATCCAGTGAACGGTGTCCG	792
Sbjct	131835	ATCGACGGAAAGCGAATTTACACGGACTTTTCTGTAACTATCCAGTGAACGGTGTCCG	131894
Query	793	ATTGCCCCTTGAGCAAAACTTTGGCAATCCGGATCGGTGTAAACTCCAGAGCAGTACTCG	852
Sbjct	131895	ATTGCCCCTTGAGCAAAACTTTGGCAATCCGGATCGGTGTAAACTCCAGAGCAGTACTCG	131954
Query	853	CGGGGAGAAGTTTTTACACGTCGGTTTTCTGGTGAATCAACTTCCACAAAGGAGAGCAT	912
Sbjct	131955	CGGGGAGAAGTTTTTACACGTCGGTTTTCTGGTGAATCAACTTCCACAAAGGAGAGCAT	132014
Query	913	ATGACATGGTTGAAGTTCGGTTCGTCTACGATGGTGGAAACCTACCAGTGCAGTTTTAT	972
Sbjct	132015	ATGACATGGTTGAAGTTCGGTTCGTCTACGATGGTGGAAACCTACCAGTGCAGTTTTAT	132074
Query	973	GAAGCCAGGCATTGCAAGACCCGTCCTCCGGATAACCACTGGATTGATCTCTGTT	1032
Sbjct	132075	GAAGCCAGGCATTGCAAGACCCGTCCTCCGGATAACCACTGGATTGATCTCTGTT	132134
Query	1033	GAGTCGGAGATTACACAAAATAAACAGACCCGAAACCAGGCCAGGCCGACCCAAACCC	1092
Sbjct	132135	GAGTCGGAGATTACACAAAATAAACAGACCCGAAACCAGGCCAGGCCGACCCAAACCC	132194
Query	1093	AATCAGCCTTTTAAAGTGGCCAGCATCAAACTTGGCCCCAAGACTCGATGAGGTGGAT	1152
Sbjct	132195	AATCAGCCTTTTAAAGTGGCCAGCATCAAACTTGGCCCCAAGACTCGATGAGGTGGAT	132254
Query	1153	GAGGTCATAGAGCCCGTAACAAAGCCCTAAAACAGTCTAAGAGCAACTCTACGTTTGTG	1212
Sbjct	132255	GAGGTCATAGAGCCCGTAACAAAGCCCTAAAACAGTCTAAGAGCAACTCTACGTTTGTG	132314
Query	1213	GGCATCAGCGTCGGTTGGGTATCGCCGGCCTAGTATTGGTGGCGTCAATCTATACGTC	1272
Sbjct	132315	GGCATCAGCGTCGGTTGGGTATCGCCGGCCTAGTATTGGTGGCGTCAATCTATACGTC	132374
Query	1273	TGCTTGCCTCGAAGAAGGAACTGAAAAAGTCTGCACAGAACGGCTTGACTCGCCTACGC	1332
Sbjct	132375	TGCTTGCCTCGAAGAAGGAACTGAAAAAGTCTGCACAGAACGGCTTGACTCGCCTACGC	132434
Query	1333	TCGACCTTTAAGGATGTTAAATATACCCAGCTTCCG	1368
Sbjct	132435	TCGACCTTTAAGGATGTTAAATATACCCAGCTTCCG	132470

Fig. 13 Blast search of pBX-EHV-1 gD clone.

2) Expression and Purification of EHV-1 gD

(1) Ligation

Ligation mixture의 전기영동 결과는 lane 1, 2에서 pQE30 vector가 없는 것을 확인하였고 lane 3에서 pQE30 vector와 gD gene이 ligation 반응 후 lane 4에서 완전히 ligation 된 것을 확인하였다 (lane 4, red arrow). 또한 vector와 gD의 ligation 반응을 확인하였다 (lane 6, red arrow) (Fig. 14).

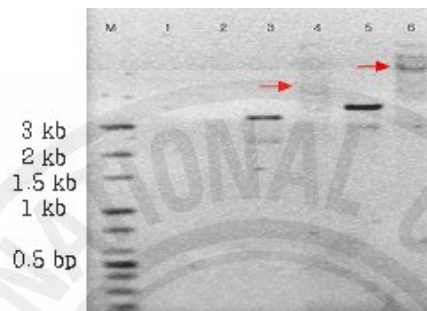


Fig. 14 Ligation mixture of gD subcloning.

M: DNA size marker (Bionics, Korea, 3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 800 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp); lane 1: eluted pQE30 and gD after digest; lane 2: ligation mixture using pQE30; lane 3: eluted gD4 and gD after digest; lane 4: ligation mixture using gD4; lane 5: eluted pQEGFP II and gD after digest; lane 6: ligation mixture using pQEGFP II. The arrows indicates ligation mixture bands.

(2) PCR을 이용한 clone screening

pQE vector와 pQEGFP II vector의 subcloning에서 확보된 colony 중 각 2개씩을 선별하여 PCR로 screening하였다. gD specific primer를 이용하여 screening 후 결과는 4개의 clones에서 모두 증폭시 1380 bp의 product의 밴드를 확인하였다. Control로서 TA cloning되어있는 gD clone을 template로 사용하여 같은 size를 확인하였다 (Fig. 15).

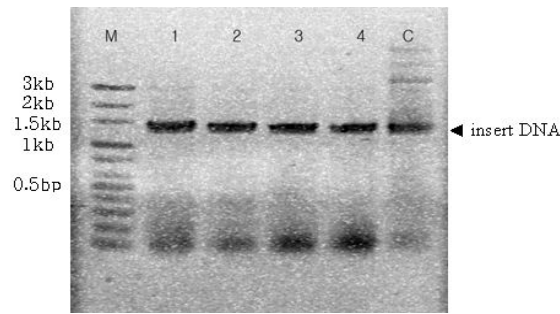


Fig. 15 PCR detection of gD subclone. Amplified gD gene using gD specific primer set. M: DNA size marker (3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 800 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp); lane 1 and 2: cloned to pQE30 vector; lane 3 and 4: cloned to pQEGfp vector; C: positive control. All samples were detected 1380 bp.

(3) Restriction을 이용한 clone screening

PCR로 확인된 colony를 액체배지에 배양하여 plasmid miniprep후 *Hind* III를 이용하여 restriction analysis를 하였다. Control로서 앞서 나온 PCR product를 사용하여 절단하였다. *Hind* III로 절단시 4개 colony 모두 vector 부분의 밴드와 약 1.38 kb에서 insert gD 부분의 밴드를 확인하였다 (Fig. 16).

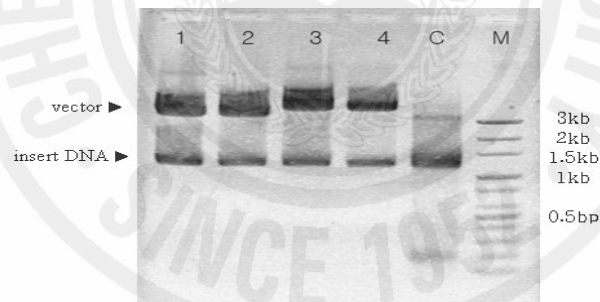


Fig. 16 Restriction analysis of gD subcloned plasmid and enzyme digestion of plasmid by *Hind* III.

M: DNA size marker (3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 800 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp) ; lane 1 and 2: cloned to pQE30 vector ; lane 3 and 4: cloned to pQEGfp vector ; C: positive control. Clones were separated vector and gD using *Hind* III.

(4) SDS-PAGE and Western blot

M15 균주에 삽입하여 발현을 유도한 결과, lane 5, 6, 7의 pQE30에서는 vector와 clone이 거의 일치하는 결과가 나타나서 발현이 양상이 구분되지 못하였다. Lane 1, 2, 3의 pQEGFPⅡ에서는 50 kDa 근방에 형성된 band는 51 kDa 인 gD일 것으로 판단하여 western blot을 통해 발현을 확인하였다. 35 kDa 과 25 kDa 사이에 형성된 band는 host로 사용된 cell에서 잘 발현되지 않는 codon 부분에서 끊어져서 나타나게 된 band로 확인하였다 (Fig. 17).

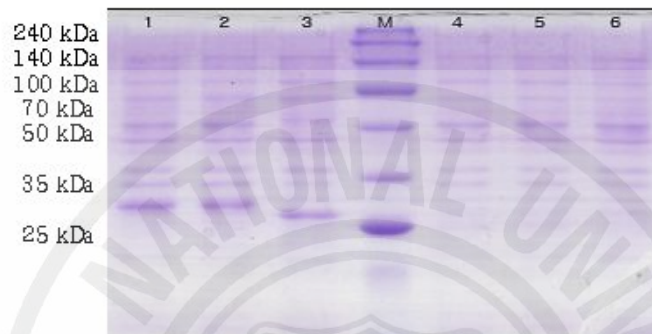


Fig. 17 SDS-PAGE analysis of expressed pQE30과 pQEGFPⅡ clone EHV-1 gD. Recombinant EHV-1 gD generated in transformed *E. coli* cells was separated on SDS- 12 % acrylamide gels. Lane M; Dok-do marker; Lane 1; pQEGFPⅡ ① clone was inserted M15; Lane 2; pQEGFPⅡ ② clone was inserted M15; Lane 3; pQE-gfp vector was inserted M15; Lane 4; pQE30 ① clone was inserted M15; Lane 5; pQE30 ② clone was inserted M15; Lane 6; pQE30 vector was inserted M15.

Western blot assay를 위하여 12% acrylamide gels을 이용하여 전기영동하여 발현 여부를 확인한 뒤, EHV-1과 EHV-4에 대하여 항체양성인 말혈청을 이용하여 하였다. 전기영동 시료는 IPTG유도 전 후로 구분한 쌍으로 맞추어 비교하였다. Figure 18 (A)에서 나타나 바와 같이 ponceaus염색한 결과는 IPTG에 의한 발현 전후의 양적비교가 뚜렷하였으나 (B)에 나타낸 western blot 결과에서는 예상 target size인 약 80 kDa에서 변화된 양상이 관찰되지 않았다.

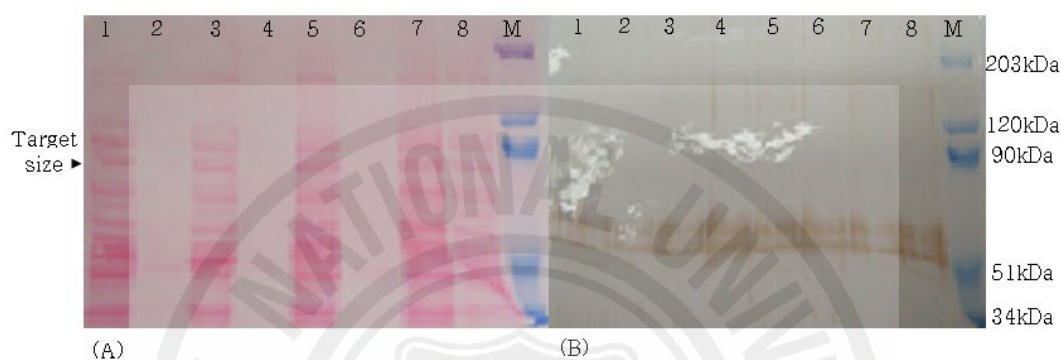


Fig. 18 Representative western blot analysis of recombinant EHV-1 gD.

Recombinant EHV-1 gD generated in transformed *E. coli* cells was separated on SDS- 8 % acrylamide gels. Lane M : Broad range marker (203 kDa, 120 kDa, 90 kDa, 51 kDa, 34 kDa); Lane 1: pQEGFP II EHV-1-1 (0 mM IPTG); Lane 2: pQEGFP II EHV-1-1 (0.3 mM IPTG); Lane 3: pQEGFP II EHV-1-1 in M15 (0 mM IPTG); Lane 4: pQEGFP II EHV-1-2 in M15 (0.3 mM IPTG); Lane 5: pQEGFP II EHV-1-3 in M15 (0 mM IPTG); Lane 6: pQEGFP II EHV-1-3 in M15 (0.3 mM IPTG); Lane 7: pQEGFP II (0.3 mM IPTG); Lane 8: pQEGFP II (0 mM IPTG); (A): ponceaus sloution staining; (B): western blot.

(5) Restriction

gD gene이 삽입되어있는 pQE30 vector는 *EcoR* I 과 *Hind*III을, pQEGFPⅡ vector는 *EcoR* I 과 *Nde* I 을 이용하여 restriction을 했을 때 pQE30-2 clone은 약 3.4 kbp, 710 bp, 515 bp, 175 bp의 band가 형성되었으나, pQE30-1 에서는 약 3.4 kbp로 예상되는 band 하나를 확인하였다. 또한, pQEGFPⅡ를 *EcoR* I, *Nde* I 을 이용하여 restriction 했을 경우, restriction site는 약 3.9 kbp, 1.4 kbp, 226 bp 위치에 band가 형성되었으나, pQEGFPⅡ-1 에서는 예상했던 band 중 1.4 kbp, 226 bp의 band밖에는 발견되지 않았다. restriction 결과 pQE30-2 clone에서 EHV-1 gD가 삽입된 것을 확인하였다 (Fig. 19).

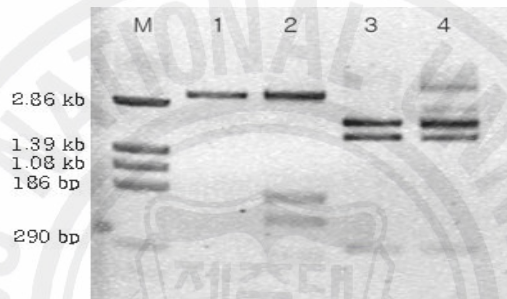


Fig. 19 Restriction of pQE30 clone (*EcoR* I, *Hind*III) and pQEGFPⅡ clone (*EcoR* I, *Nde* I)

Lane M; PS44(B/S) marker; Lane 1; pQE30-1 clone was digested with restriction enzyme *EcoR* I and *Hind*III; Lane 2; pQE30-2 clone was digested with restriction enzyme *EcoR* I and *Hind*III; Lane 3; pQEGFPⅡ-1 clone was digested with restriction enzyme *EcoR* I and *Nde* I; Lane 4; pQEGFPⅡ-2 clone was digested with restriction enzyme *EcoR* I and *Nde* I.

3) EHV-4 gD cloning

(1) EHV-4 gD

본 연구에 사용된 EHV-4 gD의 annealing 온도는 각각 53°C, 53.7°C, 54.4°C, 55.8°C, 57.4°C, 59.1°C, 60.8°C, 62.5°C, 64.2°C, 65.6°C, 66.3°C, 67°C로 구분하여 실험을 한 결과 최적 annealing 온도는 64.2°C로 1210 bp부분에서 제일 진한 밴드를 확인하였다. 다른 밴드보다도 더 선명하고 두껍게 나타난 것으로 이 온도에서 특이적임을 확인하였다 (Fig. 20, 21).



Fig. 20 Optimal annealing temperature of gD PCR.

EHV-4 gD was detected 1210 bp size. lane M, 1 kbp DNA size ladder marker; lane 1, Annealing temperature of lane 1 was 53°C; lane 2 was 53.7°C; lane 3 was 54.4°C; lane 4 was 55.8°C; lane 5 was 57.4°C lane 6 was 59.1°C; lane 7 was 60.8°C; lane 8 was 62.5°C; lane 9 was 64.2°C lane 10 was 65.6°C; lane 11 was 66.3°C lane 12 was 67°C.

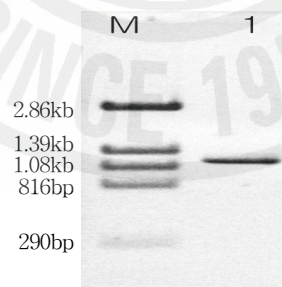


Fig. 21 EHV-4의 PCR product.

EHV-4 gD was detected 1210 bp size. Lane M : PS44 DNA size Marker; Lane 1 : EHV-4의 PCR product.

(2) T3/T7 universal PCR 및 EHV4 PCR

생성된 colony에서 clone을 선별하기 위해 T3/T7 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. Colony를 용균시켜 template로 사용하여 PCR을 수행하였으며 이를 전기영동으로 확인하였다. EHV-4는 pBX vector를 이용하여 gD를 T-클로닝 실시한 후 배양된 plate상에서 5개 colony를 선택하여 LB broth에 배양시켜 DNA를 분리하였다. Vector는 DNA-spin Plasmid DNA Purification Kit (iNtRON)를 이용하여 분리하여 전기영동을 실행하였다. 5개의 colony중에서 3번 lane에서 약 1210 bp위치에서 밴드를 확인 할 수 있었다 (Fig. 22).

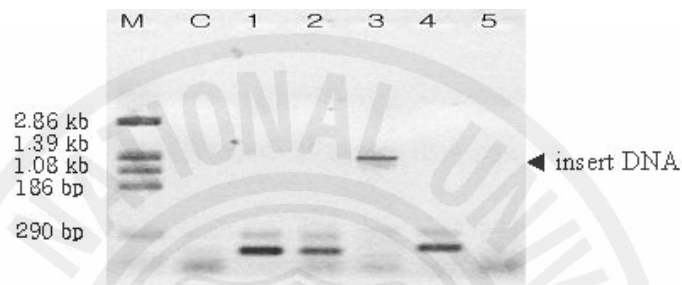


Fig. 22 pBXII EHV-4 clone의 T3/T7 PCR detection.

Lane M : PS44 DNA size marker; Lane C : Negative control (Non-template PCR); Lane 1-5 : colony 1~5번의 T3/T7 PCR; lane 3 was positive clone, the size was 1.21 kb.

(3) Sequencing

염기서열 결정을 위한 DNA의 순수분리는 Intron 사의 DNA spinTM kit를 사용하였으며 염기서열 결정은 Solgent사의 유전자 분석팀에게 의뢰를 하였다. 그리고 GenBank에 수록되어 있는 EHV-4유전자와 비교분석은 BLAST, CLUSTAL X program을 이용하여 실시되었다.

NCBI의 blast를 이용하여 pBXII-EHV-4유전자의 염기서열을 분석한 결과 equine herpesvirus 4 EHV-4 (Accession no. S65633.1)의 유전자와 99%의 상동성을 가지는 것으로 확인되었다. 879 bp 위치에서 T의 좌가 A로 변이되었으며, one point mutation이 있는 것으로 확인하였다 (Fig. 23).

Query	7	ATGTCACCTTCAAGCCTATGATGAACGGATGTTGGTGTGGCGGCTATTATAACGCTC	66
Sbjct	292	ATGTCACCTTCAAGCCTATGATGAACGGATGTTGGTGTGGCGGCTATTATAACGCTC	351
Query	67	TTGAGTTTTATGCTATCTCTGGGAACATGCGAAAAATTACAGGCGTGTGGTTCGGGGGAA	126
Sbjct	352	TTGAGTTTTATGCTATCTCTGGGAACATGCGAAAAATTACAGGCGTGTGGTTCGGGGGAA	411
Query	127	CAAAATCAGCGACCCGAGTTCCACCACCCGATACAACCTTACAATTGTGACAACATAC	186
Sbjct	412	CAAAATCAGCGACCCGAGTTCCACCACCCGATACAACCTTACAATTGTGACAACATAC	471
Query	187	AATGAAACGTCGCTACCATCACCGTTTATTAACGACCAAGTAAAAATTGTTGACGTTTCA	246
Sbjct	472	AATGAAACGTCGCTACCATCACCGTTTATTAACGACCAAGTAAAAATTGTTGACGTTTCA	531
Query	247	ACCGTGGCTGCTACACGCCCATGTGAAATGATAGCGCTGATTGCAAAAACAAACGTAGAC	306
Sbjct	532	ACCGTGGCTGCTACACGCCCATGTGAAATGATAGCGCTGATTGCAAAAACAAACGTAGAC	591
Query	307	TCAATTATAAAGAGCTAGATGCTGCCACAAAACATATTCGCAAGACTGACTTGGTTT	366
Sbjct	592	TCAATTATAAAGAGCTAGATGCTGCCACAAAACATATTCGCAAGACTGACTTGGTTT	651
Query	367	AAAATTACGCCAACATGCGCAACGCCAATCCATGATGTTGTTTATGAAATGCAATCCA	426
Sbjct	652	AAAATTACGCCAACATGCGCAACGCCAATCCATGATGTTGTTTATGAAATGCAATCCA	711
Query	427	AAGTATTATTTGGAATGTGTATGAGCGATCAAATATTTATGGCTCAATAGTTTGATT	486
Sbjct	712	AAGTATTATTTGGAATGTGTATGAGCGATCAAATATTTATGGCTCAATAGTTTGATT	771
Query	487	ACAACCTGCTGCGGAGACAGACGACGAACCTGGACTTGTATTGGCCTCCCTGCCATAGC	546
Sbjct	772	ACAACCTGCTGCGGAGACAGACGACGAACCTGGACTTGTATTGGCCTCCCTGCCATAGC	831
Query	547	TACTCTGGACTGTATAGGCGGTTATACAAATTGATGGAAGCGAATTTATACAGACTTT	606
Sbjct	832	TACTCTGGACTGTATAGGCGGTTATACAAATTGATGGAAGCGAATTTATACAGACTTT	891
Query	607	TCCGTAACAATTCGAGCAGCCATTGTCCGCTTCTTTTGAGCAGAACTTTGGTAATCCT	666
Sbjct	892	TCCGTAACAATTCGAGCAGCCATTGTCCGCTTCTTTTGAGCAGAACTTTGGTAATCCT	951
Query	667	GATCGCTGTAAAACCTCGAGCAATACTCGCGGGTGAAGTATATACAAGTCGTTTCTC	726
Sbjct	952	GATCGCTGTAAAACCTCGAGCAATACTCGCGGGTGAAGTATATACAAGTCGTTTCTC	1011
Query	727	AGTGAATCAACTACAGACAAGGTGTACATTTAGCATGGGTAAAACACTGGTTTGTGCAA	786
Sbjct	1012	AGTGAATCAACTACAGACAAGGTGTACATTTAGCATGGGTAAAACACTGGTTTGTGCAA	1071
Query	787	GATGGTGGAAACCTTCCAGTACAGTTTTACGAAGCCAGGCGTTGCAAGACCAGTACCA	846
Sbjct	1072	GATGGTGGAAACCTTCCAGTACAGTTTTACGAAGCCAGGCGTTGCAAGACCAGTACCA	1131
Query	847	CCGGATAATCACCCAGGATTTGATTCGGTCAATCGGATAAACAACAAAATAAAACAAAC	906
Sbjct	1132	CCGGATAATCACCCAGGATTTGATTCGGTCAATCGGATAAACAACAAAATAAAACAAAC	1191
Query	907	CCAAAGCAAGAACAGGCAAGTCCAAAACCAATCCACATTTAAGTGGCCAGTATAAAA	966
Sbjct	1192	CCAAAGCAAGAACAGGCAAGTCCAAAACCAATCCACATTTAAGTGGCCAGTATAAAA	1251
Query	967	CAATTGGCCCCAAGAATCGATGAGGTGGATAATGCCAAAGAAATCACCAaaaaaaCCA	1026
Sbjct	1252	CAATTGGCCCCAAGAATCGATGAGGTGGATAATGCCAAAGAAATCACCAAAAAAACCA	1311
Query	1027	CCAGCGTCTAATAGCAACTCTACGTTTATTGGAGTTGTTATTGGTTTGGGTGTTGGC	1086
Sbjct	1312	CCAGCGTCTAATAGCAACTCTACGTTTATTGGAGTTGTTATTGGTTTGGGTGTTGGC	1371
Query	1087	TTGATATCAGTTGGAGCAATTTTATACGTTTGTGGCGTCAAGAAAGTCACAGAACAAG	1146
Sbjct	1372	TTGATATCAGTTGGAGCAATTTTATACGTTTGTGGCGTCAAGAAAGTCACAGAACAAG	1431
Query	1147	TCTGaaaaaaaaTGGCTACCTAGCCTACGCTCTACCTTTAAGGATGTCAAATATACTCAG	1206
Sbjct	1432	TCTGAAAAAAAAATGGCTACCTAGCCTACGCTCTACCTTTAAGGATGTCAAATATACTCAG	1491
Query	1207	CTTCCGTAA 1215	
Sbjct	1492	CTTCCGTAA 1500	

Fig. 23 Blast search of pBXII EHV-4 gD clone.

4) Expression and Purification of the EHV-4 gD

(1) Restriction Electrophoresis

*Bam*H I/*Sal* I 으로 restriction한 결과 gD insert부분인 1210 bp부분의 밴드와 잘려진 vector의 두 밴드 모두 확인이 되었다 (Fig. 24).

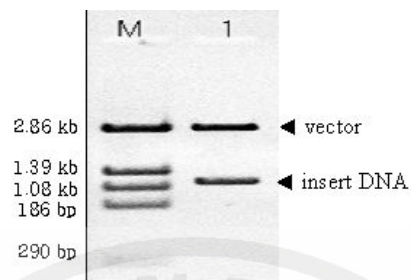


Fig. 24 pBXII EHV-4 *Bam*H I/*Sal* I restriction.

Lane M: PS44 DNA size marker; Lane 1: pBXII-EHV-4 *Bam*H I/*Sal* I restriction. Clone was separated vector and EHV-4 gD. EHV-4 gD was detected 1.21 kb size.

(2) PCR을 이용한 clone screening

생성된 colony에서 clone을 선별하기 위해 EHV-4 gD primer 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. Colony를 용균시켜 template로 사용하여 PCR을 수행하였으며 이를 전기영동으로 확인하였다. *Bam*H I/*Sal* I 이 붙어 있는 specific한 primer를 이용한 결과 pQE30 vector에서는 10개의 colony중에서 2개 colony에서 양성의 밴드가 1210 bp에서 확인되었다 (Fig. 25).

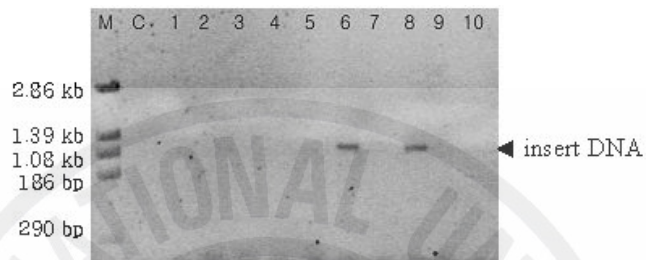


Fig. 25 pQE30 EHV-4 clone의 PCR detection.

Lane M : PS44 DNA size marker ; Lane C : Negative control (Template : pQE30) ; Lane 1-10 : colony 1-10번 PCR detection. pQE30 EHV-4 clones of lane 4 and lane 8 were detected 1.21 kb size.

*Bam*H I/*Sal* I 이 붙어 있는 specific한 primer를 이용한 결과 pQEGFP II vector에서는 5개의 colony중에서 4 colony에서 양성의 밴드가 1210 bp에서 확인되었다 (Fig. 26).

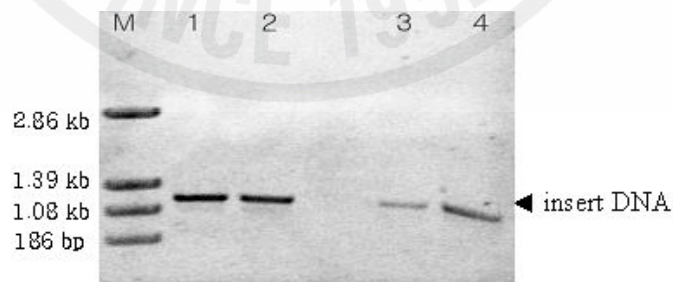


Fig. 26 pQEGFP II EHV-4 clone의 PCR detection.

Lane M : PS44 DNA size marker ; Lane 1-5 : colony 1~10 PCR detection. pQEGFP II EHV-4 clones were detected 4 clones among 5 clones and 4 clones were detected 1.21 kb size.

(3) SDS-PAGE

단백 발현 후 전기영동의 결과 lane 4의 pQEGFPⅡ-EHV-4의 융합단백질은 70 kDa 윗 부근인 75 kDa에서 발현확인 되었다. Lane 8의 EHV-4 단백질은 50 kDa보다 아래에서 발현되었다 (Fig. 27).

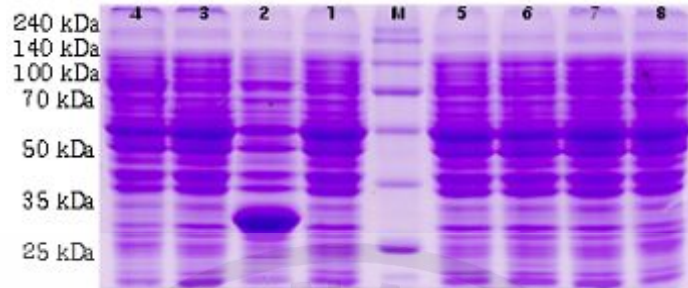


Fig. 27 SDS-PAGE analysis of expressed pQE30과 pQEGFPⅡ clone EHV-4 gD.

Recombinant EHV-4 gD generated in transformed *E. coli* cells was separated on SDS- 12 % acrylamide gels. Lane M : Elips Dokdo protein size marker (240 kDa, 140 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 50 kDa, 35 kDa, 24 kDa, 20 kDa, 15 kDa, 7 kDa); Lane 1: M15 (0.5 mM IPTG); Lane 2: pQEGFPⅡ in M15 (0.5 mM IPTG); Lane 3: pQEGFPⅡ-EHV4 in M15 (IPTG 0 mM); Lane 4: pQEGFPⅡ-EHV4 in M15 (IPTG 0.5 mM); Lane 5: M15 (0.5 mM IPTG); Lane 6: pQE30 in M15 (0.5 mM IPTG); Lane 7: pQE30-EHV4 in M15 (0 mM IPTG); Lane 8: pQE30-EHV4 in M15 (0.5 mM IPTG).

Western blot assay를 위하여 12% acrylamide gels을 이용하여 전기영동하여 발현 여부를 확인한 뒤, EHV-1과 EHV-4에 대하여 항체양성인 말혈청을 이용하였다. 전기영동 시료는 IPTG유도 전 후로 구분한 쌍으로 맞추어 비교하였다. Fig. 28 (A)에서 나타나 바와 같이 ponceaus염색한 결과는 IPTG에 의한 발현전후의 양적비교가 뚜렷하였으나 (B)에 나타낸 western blot 결과에서는 예상 target size인 약 75 kDa에서 변화된 양상이 관찰되지 않았다.

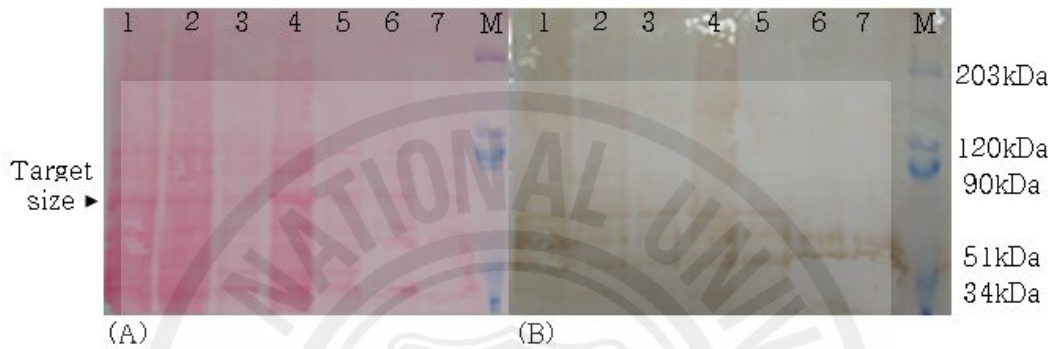


Fig. 28 Representative western blot analysis of recombinant EHV-4 gD.

Recombinant EHV-4 gD generated in transformed *E. coli* cells was separated on SDS- 8 % acrylamide gels. Lane M : Broad range marker (203 kDa, 120 kDa, 90 kDa, 51 kDa, 34 kDa); Lane 1: pQEGFPⅡ-EHV-4 ① (0.3 mM IPTG); Lane 2: pQEGFPⅡ-EHV-4 ② (0.3 mM IPTG); Lane 3: pQEGFPⅡ-EHV-4 ② in M15 (0 mM IPTG); Lane 4: pQEGFPⅡ-EHV-4 ③ in M15 (0.3 mM IPTG); Lane 5: pQEGFPⅡ-EHV-4 ③ in M15 (0 mM IPTG); Lane 6: pQEGFPⅡ (0.3 mM IPTG); Lane 7: pQEGFPⅡ (0 mM IPTG); A): ponceaus solution staining; (B): western blot.

IV. Discussion

Flowers와 O'Challaghan (1992)은 EHV-1의 감염에 방어 할 수 있는 subunit vaccine의 중요한 요소로서 gD를 지적하였다. EHV-1 gD에 대한 monoclonal antibody는 in vitro의 조건에서 바이러스의 감염성을 중화시키고 (Whittaker 등, 1992), 햄스터모델에서 EHV-1은 수동면역 역할을 하며 (Stokes 등, 1989), target cell에서는 EHV-1의 침입을 막아준다고 하였다 (Whittaker 등, 1992).

EHV gD의 백신응용 연구보고 중, recombinant gD는 대부분 eukaryotic expression vector에서 glycosylation이 이루어진 것을 사용하였다. 그러나 Weerasinghe 등 (2006)의 보고에 따르면, C-terminal에 hexa-histidine tag이 결합된 *E. coli*에서 발현된 gD와 insect cell에서 glycosylation을 유도하여 발현시킨 recombinant gD를 EHV 마우스 모델실험에서 비교실험하였는데, *E. coli*에서 발현된 gD가 중화항체 형성을 유도하였으며 gD-specific-Ab를 생산하여 EHV의 감염에 대한 방어능을 제공하였다고 보고하였다 (Weerasinghe 등, 2006). 이러한 연구결과를 기반으로 하여 본 연구에서는 *E. coli* system에서 EHV의 gD gene을 cloning하고 host로서 *E. coli* M15주를 이용하여 gD 단백을 발현시켰다.

EHV-1은 감염이 의심되는 임신마의 유사산 장기로부터 분리하였다. 분리된 바이러스의 gD gene을 sequencing하여 비교한 결과는 각각 다른 바이러스 균주와의 비교했을 때 100% - 99%의 상동성을 보였으며, cloning된 EHV-1의 sequence는 보고된 AY464052주에 비하여 1개소의 C 좌가 T로 변이된 것으로 확인되었다. 결과적으로 본 연구에서의 분리주를 포함하여 EHV의 유전자는 비교적 변이가 크지 않은 것으로 사료된다.

EHV-4의 경우는 본 연구과정중 채취한 검체로부터 분리되지 않았으므로, ATCC로부터 분양받아 배양한 바이러스로부터 gD의 gene을 확보하여 실험에 사용하였다. 이는 바이러스 분리를 위한 검체가 유사산 태아에 관련된 것에 국한되었기 때문일 것으로 사료되나, 국내의 감염보고가 없는 것으로 볼 때 국내의 주된 감염원은 EHV-1인 것으로 판단되며 EHV-4의 감염역학은 추후 정밀한 조사가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

바이러스 배양 수율을 알아보기 위한 비교 실험 결과, CPE의 발생시기는 접종 MOI에 따라서 ± 4 시간정도 차이가 있었으며 (결과 미제시), 무혈청 배지보다는 2% FBS 배지에서 2~4시간정도 늦게 나타났다. 결과적으로 대량배양을 위한 최적의 조건은 100% 단층이 형성된 MDBK세포에 바이러스를 MOI 4로 접종한 후

2% FBS배지로 교환한 상태에서 배양을 하여 CPE 60%일 때 (바이러스 접종 후 약 40시간) 배지를 수거하는 것이었다. 그러나 백신으로 사용하기 위한 바이러스 항원은 이중단백질의 혼입을 방지하는 것이 중요하므로, EHV-1 접종 후 배지교환은 무혈청 배지를 선택하는 것이 바람직할 것이다. 또한 CPE가 70%일 때가 60%일 때보다 바이러스의 수확량이 다소 많지만 시간이 지나면서 그 양이 급속히 감소하므로 바이러스가 함유된 배지의 수확 시기는 CPE가 70%이상 되기 전에 실시해야 CPE의 발생시기는 접종 MOI에 따라서 ± 24 시간으로 큰 차이가 있었으며 무혈청 배지보다는 2% FBS 배지에서 2~4시간정도 늦게 나타났다. 또한 MOI 1과 2로 접종시에는 CPE의 발생이 생기다가 어느 정도가 되면 더 이상 발생하지를 않았다. 이상의 여건을 고려한다면, 백신을 만들기 위한 대량배양의 최적 조건은 70% 단층이 형성된 MDBK세포에 EHV-4를 MOI 4로 접종한 후 CPE가 생성되기 바로 직전인 접종 후 14 (± 2)시간에 무혈청 배지로 교환한 것이 적당하다고 사료된다.

바이러스의 배양 시, EHV-4는 EHV-1에 비해 rabbit kidney cell에 대한 감염력이 약하기는 하나 두 가지 type 바이러스의 gD는 rabbit kidney cell에 일정한 감염력을 갖는 것으로 보고되어 있다 (Whalley 등, 2007). 본 연구에서 사용한 MDBK cell에는 EHV-1이 바이러스의 감염력이 상대적으로 더 높은 것으로 나타났다. 이는 동일한 MOI를 접종했을때 CPE가 발생하는 시간이 EHV-1이 3~4시간이 더 빠른 것으로도 확인 할 수 있었으며, EHV-4의 경우에는 0.5 MOI 이하에서는 CPE가 발생하지 않는 것도 확인되었다. EHV-1의 TA cloning에서 유전자의 삽입을 확인하기 위하여 pBT vector에 존재하는 universal primer인 T3/T7 primer를 이용하여 EHV-1 TA cloning을 screening한 결과 두 가지의 ligation조건에서 12개의 양성 clone이 확인되었는데, 그 중에서 반응이 강한 4번 lane과 16번 lane의 colony를 선택하여 sequence의 확인과 subcloning을 실시하였다. EHV-4는 EHV-1과 마찬가지로 universal primer인 T3/T7 primer를 이용하여 screening한 결과 5개의 colony 중에 한개의 colony가 양성으로 확인이 되어 해당 clone의 subcloning을 실시하였다.

EHV-1 gD를 baculovirus에서 발현을 하여 확인한 결과 43 kDa, 55 kDa, 58 kDa에서 단백을 확인하였다고 보고하고 있다 (Love 등, 1993; Flowers 등 1995). 본 연구에서 사용한 E. coli M15 균주에서 발현된 EHV-1 gD의 subcloning시의 결과는, pQE30 vector에 삽입시킨 경우에는 gD의 발현의 확인이 되지 않았으나, pQEGFP II vector에 삽입시킨 경우에는 50 kDa 근방에 형성된 band와 35 kDa과 25 kDa 사이에 형성된 band에서 볼 수 있듯이 vector만 갖는 E. coli의 산물에 비하여 다소 큰 분자량에 해당하는 band가 형성된 것을 볼 수 있는데, 50 kDa 근방에 형성된 band는 51 kDa인 gD일 가능성이 높다고 판단되었고, 35

kDa과 25 kDa 사이에 형성된 band는 host로 사용된 cell에서 잘 발현되지 않는 codon부분에서 끊어져서 나타나게 된 band일 것이라고 판단하였다. 이를 확인하기 위하여 gD gene 이 삽입된 clone을 정제하여 restriction 한 결과, 예상된 pQE30 clone의 약 3.4 kbp, 710 bp, 515 bp, 175 bp의 band가 형성되었다. 한편, pQEGFPⅡ vector에 gD gene을 삽입되었을 경우, 예상된 약 3.9 kbp, 1.4 kbp, 226 bp 위치에 band가 형성되지 않고 1.4 kbp, 226 bp의 band만이 확인되었다. 그러나 pQEGFPⅡ를 이용한 두개의 clone 모두에서 약 1.7 kbp정도의 길이의 band가 형성되었는데, 이는 *Nde* I 효소에 의한 restriction이 충분히 이루어지지 않아서 나타난 결과인 것으로 사료되었다.

본 연구에서 EHV gD의 발현확인을 위한 western blot assay는 감염마의 양성혈청을 사용하였는데, 비특이 반응이 강하여 발현의 확인이 어려웠다. 한편, 감염마의 혈청에는 *E. coli* 항원에 대하여 강한 양성반응을 나타내었으므로 (자료 미제시) 이에 기인한 결과로 사료되며, 추후의 연구에서는 사용할 1차 항체를 *E. coli* 항원으로 충분히 중화시킨 후에 western blot 분석에 사용해야 할 것이다.

다양한 방법의 EHV 진단법이 소개되어있으나 현장에서 적용 가능한 신속 진단법에 대해서는 아직 보고된 바 없다. 본 연구에서 개발한 MAb들은 EHV type 1과 type 4에 대하여 모두 교차반응을 보였으므로 이를 이용한 면역학적 진단법은 immunochromatography 등에 적용할 때 EHV-1, 및 -4 감염의 동시 screening을 위한 신속진단법으로의 응용이 가능할 것으로 사료된다.

한편, EHV-4를 면역시켜 얻은 MAb들은 EHV-1을 면역시켜 얻은 그것들에 비하여 EHV-1 및 EHV-4 항원을 대상으로 indirect ELISA를 실시하였을 때 상대적인 역가가 높은 것으로 나타났다. 이러한 현상은 말에서도 EHV-4의 감염시의 면역반응이 EHV-1의 감염시보다 강하게 나타날 것으로 예상할 수 있다. 이러한 사실은 숙주와 기생체와의 면역관계에서 EHV-4가 EHV-1에 비하여 존속이 불리한 요인으로 고려할 수 있으며, EHV-4의 분리가 되지 않은 이유가 될 수도 있을 것으로 사료된다.

결론적으로, 본 연구에서 개발된 EHV-1 및 EHV-4에 대한 MAb들은 면역학적진단소재로 응용이 가능할 것으로 사료되며, 유전자 재조합 방식에 의하여 얻어진 gD는 추가적인 발현 및 면역보강연구가 보완된다면 효율적인 subunit vaccine의 원료물질로 이용이 가능할 것으로 사료된다.

V. Reference

Burki F, Rofsmanith W, Nowotny N, Pallan C, Mostl K, Lussy H. Viremia and abortions are not prevented by two commercial equine herpesvirus-1 vaccines after experimental challenge of horse. *Vet Quarter* 1990, 12, 80-86.

Burrows R, Goodridge D, Denyer MS. Trials of an inactivated equine herpesvirus-1 vaccine: challenge with a subtype-1 virus. *Vet Res* 1984, 114, 369-374.

Connolly SA, Landsburg DJ, Carfi A, Whitbeck JC, Zuo Y, Wiley DC, Cohen GH, Eisenberg RJ. Potential nectin-1 binding site on herpes simplex virus glycoprotein D. *J Virol* 2005, 79, 1282-1295.

Crab BS, Studdert MJ. Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). *Adv Virus Res* 1995, 45, 153-190.

Csellner H, Walker C, Wellington JE, McLure LE, Love DN, Whalley JM. EHV-1 glycoprotein D (EHV-1 gD) is required for virus entry and cell-cell fusion, and an EHV-1 gD deletion mutant induces a protective immune response in mice. *Arch Virol* 2000, 145, 2371-2385.

Dolby CA., Hannant D., Mumford JA., Response of ponies to adjuvanted EHV-1 whole virus vaccine and challenge with virus of the homologous strain. *Br Vet J* 1995, 151, 27-37.

Ellis JA., Bogdan JR., Kanara EW., Morley PS., Haines PS. Cellular and antibody responses to equine herpesviruss 1 and 4 following vaccination of horses with modified-live and inactivated viruses. *J Am Vet Assoc* 1995, 206, 823-832.

Flowers CC, O'Callaghan DJ. Equine herpesvirus 1 glycoprotein D: mapping of the transcript and a neutralization epitope. *J Virol* 1992, 66, 6541-6460.

Flowers CC, Flowers SP, Sheng Y, Tarbet EB, Jennings SR, O'Callaghan DJ.

Expression of membrane-bound and secreted forms of equine herpesvirus 1 glycoprotein D by recombinant baculovirus. *Virus Res* 1995, 35, 17-34.

Foote CE, Love DN, Gilkerson JR, Whalley JM. Serological responses of mares and weanlings following vaccination with an inactivated whole virus equine herpesvirus 4 vaccine. *Vet Microbiol* 2002, 88, 13-25.

Foote CE, Love DN, Gilkerson JR, Rora J, Trevor-Jones P, Ruitenberg KM, Wellington JE, Whalley JM. Serum antibody responses to equine herpesvirus 1 glycoprotein D in horses, pregnant mares and young foals. *Vet Immunol Immunopathol* 2005, 105,47-57.

Gilkerson JR, Love DN, Whalley JM. A review of equine herpesvirus vaccine: from the traditional to the experimental. *Aust. Equine Vet* 1997, 15, 27-32.

Grandell RA, Mock RA, Lock TF. Vaccination of pregnant ponies against equine rhinopneumonitis. *Am J Vet Res* 1981, 41, 994-996.

Heldens JCM, Hannant D, Cullinane AA, Predergast MJ, Mumford JA, Nelly M, Kydd JH, Weststrate MW, van den Hoven R. Clinical and virological evaluation of the efficacy of an inactivated EHV1 and EHV4 whole virus vaccine (Duvaxyn EHV_{1,4}). *Vaccination/challenge experiments in foals and pregnant mares. Vaccine* 2001, 19, 4307-4317.

Hannant D, Jesset DM, O'Neill TF, Dolby CA, Cook RF, Mumford JA. Response of ponies to equid herpesvirus-1 ISCOM vaccination and challenge with virus of the homologous strain. *Res Vet Sci* 1993, 54, 299-305.

Kydd JH, Smith KC, Liversay GJ, Mumford JA. Distribution of equine herpesvirus-1 (EHV1) in respiratory tract associated lymphoid tissue: implications for cellular immunity. *Equine Vet J* 1994, 26, 470-473.

Love DN, Bell CW, Pye D, Edwards S, Heyden M, Lawrence GL, Boyle D, Pye T, Whalley JM. Expression of equine herpesvirus 1 glycoprotein D by using a baculovirus recombinant. *J Virol* 1993, 67, 6820-6823.

Milne RSB, Nicola AV, Whibeck JC, Eisenberg RJ, Cohn GH. Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 2005, 79, 6655-6663.

Mumford EL, Traub-Dargatz JL, Carman J. Occurrence of infectious upper respiratory tract disease and response to vaccination in horses on six sentinel premises in northern Colorado. *Equine Vet J* 2003, 35, 72-77.

Nicola AV, McEvoy AM, Straus SE. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese Hamster Ovary cells. *J Virol* 2003, 77, 5324-5332.

Onions D. Equine herpesvirus: New approaches to an old problem. *Equine Vet J* 1991, 23 (1), 6-7.

Packiarajah P, Walker C, Gilkerson J, Whalley JM, Love DN. Immune responses and protective efficacy of recombinant baculovirus-expressed glycoproteins of equine herpesvirus 1 (EHV-1) gB, gC and gD alone or in combinations in BALB/c mice. *Vet Microbiol* 1998, 61, 261-278.

Patel JR, Heldens J. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)-epidemiology, disease and immunoprophylaxis: A brief review. *J Vet* 2005, 170, 14-23.

Ravetch JV. Fc receptor. *Cell* 1994, 78, 553-560.

Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Thery C, Rescigno M, Saito T, Verbeek S, Bonnerot C, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorens S. Fc γ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* 1999, 189, 371-380.

Ruitenbergh KM, Walker C, Wellington JE, Love DN, Whalley JM. DNA-mediated immunization with glycoprotein D of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in a murine model of EHV-1 respiratory infection. *Vaccine* 1999, 17, 237-244.

Ruitenbergh KM, Walker C, Wellington JE, Love DN, Whalley JM. Potential of DNA-mediated vaccination for equine herpesvirus 1. *Vet Microbiol* 1999, 68, 35-48.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony stimulating factor plus interleukin 4 and down-regulated by tumor necrosis factor α . *J Exp Med* 1994, 179, 1109-1118.

Spear PG. Herpesvirus simplex virus: receptor and ligands for cell entry. *Cellular Microbiol* 2004, 6, 401-410.

Steinman, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Ann Rev Immunol* 1991, 9, 271-296.

Stokes A, Cameron RS, Marshall RN, Killington RA. High level expression of equine herpesvirus 1 glycoproteins D and H their role in protection against virus challenge in the C3H (H-2K^k) murine model. *Virus Res* 1997, 50, 159-173.

Stokes A, Allen GP, Pullen LA, Murray PK. A hamster model of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection; passive protection by monoclonal antibodies to EHV-1 glycoproteins 16, 14 and 17/18. *J Gen Virol* 1989, 70, 1173-1183.

Tewari D, Whalley JM, Love DN, Field HJ. Characterization of immune responses to baculovirus-expressed equine herpesvirus type 1 glycoproteins D and H in a murine model. *J Gen Virol* 1994, 75, 1735-1741.

Unkeless JC., Scigliano E, Freedman VH. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Ann Rev Immunol* 1988, 6, 251-281.

Weerasinghe CU, Learmonth GS, Gilkerson JR, Foot CE, Wellington JE, Whalley JM. Equine herpesvirus 1 glycoprotein D expressed in *E. coli* provides partial protection against equine herpesvirus infection in mice and

elicits virus-neutralizing antibodies in the horse., *Vet Immunol Immunopathol* 2006, 111, 59-66.

Wen YM, Qu D. and Zhou SH. Antigen-antibody complex as therapeutic vaccine for viral hepatitis B. *Int Rev Immunol* 1999, 18, 251-258.

Whittaker GR, Taylor LA, Elton DM, Giles LE, Bonass WA, Halliburton IW, Killington RA, Meredith DM. Glycoprotein-60 of equine herpesvirus type-1 is a homologue of herpes simplex virus glycoprotein-D and plays a major role in penetration of cell. *J Gen Virol* 1992, 73, 801-809.

Yada A, Ebihara S, Matsumura K, Endo S, Maeda T, Nakamura A, Aiba S. and Takai T. Accelerated antigen presentation and elicitation of humoral response in vivo by FcγIIb- and FcγRIII-mediated immune complex uptake. *Cell Immunol* 2003, 225, 21-32.

Zhang YF, Smith PM, Tarbet EB, Osterrieder N, Jennings SR, O'Challaghan DJ. Protective immunity against equine herpesvirus type-1 (EHV-1) infection in mice induced by recombinant EHV-1 gD. *Virus Res* 1998, 56, 11-24.

윤병수. 분자생물학 연구방법론 II. pp. 72-74, 경기대학교, 2006.

Abstract

Studies on Serological Diagnosis and Subunit Vaccine Against EHV-1 and EHV-4

HaeJin Joo

(Supervised by Professor Yoon-Kyu Lim)

Department of Veterinary Medicine,
Graduate School, Cheju National University,
Jeju, Korea

Equine herpesvirus (EHV) is one of the major cause of economic loss of the equine industry. There is a continuing need to develop efficient diagnostic tool and vaccine to diagnose and prevent EHV infection. After conditioning of high titer production of EHV, we could obtain the viruses up to $10^{11.75}$ TCID₅₀/ml. We have constructed 22 hybridoma clones secreting monoclonal antibodies (MAbs) specific to EHV by fusion of mouse myeloma cells with lymphocytes of mice immunized with EHV-1 and EHV-4. The envelope glycoprotein D (gD) of EHV-1, 4 are essential for virus infectivity and are a potent inducer of virus-neutralizing antibody. To develop an efficient subunit vaccine, gD of EHV-1, 4 were expressed with C-terminal hexa-histidine tag in *E. coli* using pQE30 and pQEgfpII vectors. SDS-PAGE analysis using expressed EHV-1 gD demonstrated the presence of gD bands at 80 kDa, 50

kDa and SDS-PAGE analysis using expressed EHV-4 gD demonstrated the presence of gD bands at 75 kDa, 45 kDa. Two gDs of EHV-1 and -4 were ninety nine percent homologous based on amino acid sequence. MAbs and recombinant gDs developed in this study could be applied as the source materials for diagnostic tools and subunit vaccines to control the EHV epidemic in equine industry, and additional research need to be continued for industrialization.

keywords: Equine herpesvirus-1, Equine herpesvirus-4, recombinant glycoprotein D, Vaccine, Monoclonal antibody



감사의 글

2년이라는 시간은 제게 제 인생 전체를 볼 때 가장 큰 발전과 발돋움의 기간이었습니다. 이렇게 변화할 수 있게 도와주신 제 주위에 모든 분들께 감사의 말씀을 드립니다.

무엇보다도 늘 잘 챙겨주시고 실수 투성인 저에게 재치 있는 웃음과 가르침을 주신 저에게는 아버지 같은 우리 임윤규 교수님, 항상 저에게 우리 해진이 하시며 사랑으로 아껴주신 은혜 부족하지만 지금에서야 교수님께 사랑한다고 감사드린다고 말씀드리고 싶습니다. 부족한 제가 질문할 때마다 항상 자상하게 대답해 주시고 다시는 잊지 못할 주옥 같은 강의를 해주신 황규계 교수님, 항상 학생들 눈높이에서 들어주시고, 친구 못지 않은 진솔한 해답을 주시고, 젠들한 웃음으로 항상 반겨주셨던 손원근 교수님, 논문심사를 해주신 주홍구 교수님께도 진심으로 감사드립니다.

아울러 제가 실험으로 힘들어 할 때 많은 조언과 도움을 주셨던 경기대학교 윤병수 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

항상 따뜻한 웃음을 선보여 주셨던 신태균 교수님, 지영혼 교수님, 박현정 교수님, 이영재 교수님께도 진심으로 감사의 말을 전합니다.

실험실에서 생활하면서 가장 많이 의지 하며 위로가 되어준 실험실 동기 화반바 멀리 베트남에 있지만 항상 좋은 일만 가득하길 응원할께, 같이 힘든 시기를 겪으며 서로에게 위안이 되어준 인선언니, 몸이 아프면서도 힘든 내색 안하고 여러모로 도와준 경익이, 짧은 시간이었지만 많은 것을 나눴던 기정이, 승희언니, 처음 공중보건학 실험실에 들어와 적응 못하는 나에게 먼저 손내밀어주면서 반겨주던 인식오빠, 정진이, 정현이, 형준이, 언제나 우리실험실을 지켜줬던 순범오빠, 영훈오빠, 용석오빠, 승태, 승헌이, 형석이 아울러 공중보건학 실험실 선배님들께 감사하고 고맙다는 말씀을 드리고 싶습니다.

그리고 자주 뵙지는 못하지만 언제나 신경써주시고 응원해 주신 김영주 과장님과 양재혁, 강원명 선배님께도 감사하다는 말씀을 드리고 싶습니다.

마지막 학기 논문 쓰느라 바쁜데도 이렇게 논문이 완성될 수 있도록 도와준 경기대학교 생물학과 김을환씨, 실험하다가도 모르는 것이 있어 언제나 달려가도 반겨주면서 도움을 줬던 해양대 생물학과 철홍오빠에게도 너무나 감사하다는 말씀을 전합니다.

마지막으로 무사히 졸업을 할 수 있도록 애써주고, 행복한 가정을 유지할 수

있게 해준 사랑하는 남편과 무엇보다도 바꿀 수 없는 우리 아들 승환이에게도 사랑한다고 전하고 싶습니다. 그리고 늘 저를 믿어주시고 항상 투자를 아낌없이 해주신 엄마, 아빠께 가슴 깊이 감사드리고, 제가 이 논문이 나오기까지 묵묵히 응원해 주시고 아껴주신 저의 아버님과 어머님께도 평상시 드리지 못했던 사랑한다는 말 그리고 감사하다는 말을 전하고 싶습니다.

부족하지만 대학원 생활의 마지막 결실인 이 논문을 바치고 싶습니다.

이제 졸업을 앞두고 사회를 나가는 문턱에 서니 설레임과 두려움이 앞섭니다. 하지만 지금까지 해왔던 것처럼 주위에 모든 분들 실망시키지 않고 후회 없는 삶을 살도록 하루 하루 노력하는 사람이 되겠습니다. 감사합니다.

