

17
F28.1
02887

碩士學位論文

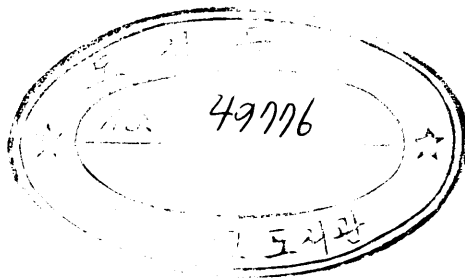
국내분리 Equine Herpesvirus Type 1 구조단백질을
구성하는 gD 유전자의 cloning과 발현

Cloning and Expression of gD Gene Encoding Structural Protein of Equine
Herpesvirus Type 1 Isolated Aborted Fetus in Korea



獸醫學科

梁 龍 修



1998年 12月

국내분리 Equine Herpesvirus Type 1
구조단백질을 구성하는 gD 유전자의
cloning과 발현

指導教授 李斗植

梁龍修

이 論文을 獸醫學碩士學位 論文으로 提出함



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

1998년 12월

梁龍修의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

委 員
委 員
委 員

長 員
員
員

정 신
송 태
리植



濟州大學教 大學院

1998年 12月

Cloning and Expression of gD gene Encoding Structural Protein of Equine herpesvirus type1 Isolated Aborted Fetus in Korea

Yong-Soo Yang

**Department of Veterinary Medicine
Graduate School, Cheju National University**

Cheju, Korea

(Supervised by Professor Du-Sik Lee)



Abstract

The aim of this paper was to develop diagnostic reagents and subunit vaccine for strains of equine herpesvirus 1 (EHV-1), EHV-1 causes respiratory disease, abortion, and neurological disorders in horses. EHV-1 gD is a conserved major glycoprotein that protects horses from clinical EHV-1 infections. One Korean isolate, strain LC1, was isolated from the aborted fetus of an imported horse in Cheju. The similarity of the restriction enzyme patterns with those of EHV-1 strain AB4 suggest that EHV-1 in Korea may have come from England. To compare the genetic characteristics of strain LC1 and reference strains, the gD gene was cloned and sequenced. The LC1 gD gene contains an open reading frame of 1380 nucleotides and encodes a protein with 453 predicted amino acids. The nucleotide sequence of the LC1 gD gene was 99.8% identical to that of strain

AB4. The gD gene was inserted into the genome of *Autographa californica* baculovirus to replace the baculovirus polyhedrin gene. Protein gD was produced in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells infected with the recombinant baculovirus. The gD protein reacted with anti-EHV polyclonal antibody, and had apparent molecular weights of 43 and 58 kDa.

Key words : Equine herpesvirus1, LC1 strain, gD, baculovirus, Sf9 cells

**Cloning and Expression of gD Gene Encoding
Structural Protein of Equine Herpesvirus Type 1
Isolated Aborted Fetus in Korea**

Yong-Soo Yang
(Supervised by professor Du-Sik Lee)



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF VETERINARY SCIENCE**

DEPARTMENT OF VETERINARY MEDICINE

GRADUATE SCHOOL

CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1998. 11

목 차

I. 서론	1
II. 재료 및 방법	3
III. 결과	16
IV. 고찰	32
V. 결론	34
VI. 참고문헌	35



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

초록

국내분리 Equine Herpesvirus Type 1 구조단백질을 구성하는 gD 유전자의 cloning과 발현

(지도교수 : 이두식)

양 용 수



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY
제주대학교 대학원

수의학과

Equine Herpesvirus Type 1은 말에서 호흡기성 질병, 유산 및 신경증상을 유발하는 전염성질환이다. EHV-1의 gD는 잘 보존되는 구조단백질이며 이 바이러스의 야외감염에서 숙주동물을 방어할 수 있다. 제주에서 분리된 EHV-1 LC1주는 수입말의 유산 태아에서 분리되었으며, 이 바이러스를 제한효소로 절단한 후 양상을 관찰한 결과 영국에서 분리된 표준주인 AB4주와 매우 유사한 양상을 나타내었고, 국내분리 바이러스는 영국에서 유입된 바이러스임이 의심되었다. 더 정확한 확인을위해 표준주와 국내분리주의 유전적 특성을 비교하였고, gD 유전자를 cloning한 후 염기서열을 분석하였다. gD유전자는 1,380개의 염기로 구성되어 있으며 이 염기들은 453개의 아미노산을 구성하는 것으로 나타났다.

LC1 gD 유전자의 염기서열을 분석한 후 표준주와의 상동성을 비교한 결과 99.8%의 유사성을 나타내었다. 그리고 gD 유전자를 발현하기 위해

baculovirus의 polyhedrin 유전자의 자리에 gD 유전자를 homologous recombination을 통해 삽입하였다. 이렇게 만들어진 재조합 바이러스를 곤충 세포 Sf-9에 감염시켜 재조합 gD 단백질을 발현하였다. 발현된 gD 단백질은 anti-EHV-1 다클론성 항체와 반응을 잘 나타내었으며, 발현된 gD 단백질의 분자량은 43kDa과 58kDa으로 나타났다.

본 실험의 목적은 국내분리된 EHV-1의 gD단백질을 발현하여 이를 이용한 진단법의 개발 및 subunit 백신 개발의 기초자료를 제공하고자 한다.

핵심용어 : EHV-1, LC1주, 재조합 gD 단백질, 재조합 baculovirus



I. 서론

말 비폐렴(equine rhinopneumonitis:ERP)바이러스는 Herpesviridae의 Alphaherpesvirinae의 equine herpesvirus(EHV)에 기인되는 전염병으로서 어린 말에 감염시는 일과성 발열과 비루를 주증으로하는 호흡기 소견을 나타내고, 임신 말에 감염시는 유산, 사산, 호흡기 질환, 신경장애 등을 나타내면서 말의 질병 중 가장 중요한 질병으로 대두되어 왔다.

Herpesviridae는 사람을 위시하여 거의 모든 동물이 감염숙주가 되며, equine herpesvirus는 Shimizu 등(1959)이 처음으로 항원적 차이를 보고한 이래 현재는 4종의 subtype으로 분류되었으며, 말에서 문제시되는 subtype은 EHV-1 subtype 1(EHV-1), EHV-1 subtype 2(EHV-4), EHV-3으로 알려져 있다(Vail, 1993).

EHV-1은 말의 폐, 비장 및 피부에서 유래된 세포와 돼지, 양, 토끼 및 햄스터의 신장에서 유래된 세포에서 증식되며, cytopathic effect(CPE)는 대개 24 시간 이내에 관찰할 수 있다(Purdy 등, 1977).

EHV-1은 크기는 150-170nm로써 capsid의 직경이 100 nm이고 162개의 capsomer로 구성된 5, 3, 2의 대칭구조를 가진 정20면체이며, 유전자의 분자량은 92×10^3 kD인 linear double stranded DNA 바이러스로서 short unique sequence(Us)와 long unique sequence(UL)로 구성되어 있으며(Henry 등, 1981; O'Callaghan과 Harty, 1992), pseudorabies virus(PRV)와 varicella-zoster(VZV)와 유사하고, G+C 함량이 56-57%, 부상밀도가 CsCl에서 1.716 g/cm³라고 보고된 바 있다(Soehner 등, 1965; Telford 등, 1992). EHV-1의 가지고 있는 genomic DNA에는 적어도 76개의 open reading frame(ORF)이 함유되어 있으며 이들 ORF는 단백질을 암호화하는 것으로 보여진다. EHV-1의 유전자 발현은 3개의 kinetic classes에 의해 전사되는데 이들은 immediate-early(IE), early, and late genes으로 구분될 수 있다.

EHV-1, bovine herpesvirus 1(BHV-1), 그리고 pseudorabies virus(PRV)는 이들 유전자의 조합과 특성의 유사성에 의해 herpesvirus D-type의 바이러스로 구분된다(Roizman 등, 1982). 이들의 genomic DNA의 구조와 특성은 서로 매우 유사하여 서로 다른 herpesvirus들간에 항원적으로 교차반응이 일어날 수 있음을 나타낸다고 한다(Honess 등, 1977). EHV-1 genome의 Us region에는 9개의 Open Reading Frames이 존재한다고 보고되었고(Audonnet 등, 1990; Colle 등, 1992), 이들 중 4개는 HSV-1의 gG(Colle 등, 1992), gD(Audonnet 등, 1990), gI 그리고 gE(Audonnet 등, 1990)와 거의 유사함이

밝혀졌다.

Glycoprotein D의 연구로는 HSV-1의 증식과정에 있어서 anti-HSV-1 gD 항체는 바이러스가 세포에 침입하는 과정을 방어함으로써 바이러스의 감염성을 중화한다고 보고하였다(Cohen 등, 1984). 그리고 이와 유사한 상동성을 가지고 있는 pseudorabies virus(PRV) gp50과 IBR(Infectious bovine rhinotrachitis virus) gIV인 경우에도 바이러스의 접착과 침입에 관여한다고 보고되었다(Peeters 등, 1992). 그리고 glycoprotein D가 바이러스가 감염을 일으키는데 대한 직접적인 이유는 HSV-1의 glycoprotein D를 제거한 재조합 바이러스를 만들어서 이를 세포에 감염시킨 결과 바이러스는 세포에 접착하여 있으나 감염을 일으키지 않는 것이 증명 됨으로서 glycoprotein D가 세포의 감염에 있어서 가장 필수적인 protein임을 보고하였다(Johnson 등, 1988; Ligas 등, 1988). 한편, 국내에서 EHV-1의 분리에 성공하였고, 국내 분리된 바이러스의 항원성과 물리학적 성상에 관해 연구 보고한 바 있다(조 등, 1995a, b, c).

최근 들어 급증하는 제주도내 종마산업에 있어서 EHV-1의 감염은 축산 농가에 심각한 경제적 손실을 야기하고 있고, EHV-1의 백신의 이용은 그 효과가 제한적이다. 효과적인 백신개발을 위해 EHV-1 감염에서 면역기전에 대한 많은 연구가 요구되고, 숙주 방어 기전에서의 중요한 바이러스의 구조 단백질에 대한 면역학적인 더 많은 연구가 요구된다.

이 실험의 목적은 국내에서 분리된 EHV-1의 생존에 가장 필수적인 구조단백질을 구성하는 gD 유전자를 발현하여 숙주에 안전하고 효과적인 면역을 유도할 수 있는 subunit vaccine개발 및 진단법 개발의 기초 자료를 획득 하고자 이 실험을 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 및 바이러스

EHV-1 국내분리주 strain LC-1은 MDBK(Marbin Darby Bovine Kidney) Cell Line에서 배양하였으며 세포배양액은 alpha minimal essential medium (α -MEM, Gibco, USA)에 fetal calf serum(FCS, Hybriserum, Austria)을 10%되게 첨가하였고, nonessential amino acid(0.01mM, Gibco, USA) 및 gentamicin을 50 μ g/ml이 되게 첨가하여 사용하였다.

Spodoptera frugiperda (Sf9, ATCC CRL 1711)은 Grace's medium (Difco, USA)과 fetal calf serum이 10%가 첨가된 TNM-FH media를 사용하여 28 $^{\circ}$ C에서 배양하였다.

Wild type baculovirus인 *Autographa Californica nuclear polyhedrosis virus*(AcNPV) 및 recombinant baculovirus는 Sf9 cell에서 증식시켰다.

2. Vector 및 *E. coli*

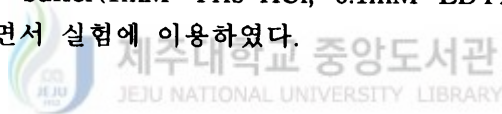
유전자를 cloning하는 과정에서 이용되는 competent cell은 DH5 α (*E. coli*; Gibco, USA)을 사용하였으며 cloning vector는 pBR322(Pharmacia, USA)를 변형한 pBRHN, 그리고 pGEM-T easy vector(Promega, USA)를 이용하였고 baculovirus expression vector는 pVL1393을 이용하였다.

3. 바이러스 분리 및 DNA의 추출

EHV-1 DNA의 추출은 Nishmori 등(1987)의 방법을 응용하여 바이러스 감염세포와 상층액에서 genomic DNA를 추출하는 방법을 사용하였다.

약술하면 MDBK 세포를 증식시켜 단층세포가 형성된 후 200 TCID₅₀/ml의

EHV-1을 접종하여 배양하였으며, 세포변성효과(cytopathic effect : CPE)가 80~90% 관찰될 때 세포를 수확하여 TBS(10mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.4)로 1,500rpm에서 5분간 3회 원심세척하고, 이를 TBS에 부유시킨 후 0.6% SDS (sodium dodesyle sulfate; Sigma)와 proteinase K(400 μ g/ml, Gibco, USA)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 방치하였다. 그 후 이 lysate를 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1)을 사용하여 단백질을 제거하였으며, 2.5 volume의 ethanol과 1/10 volume의 3M Sodium Acetate(pH5.2)를 가하여 -70 $^{\circ}$ C에서 2시간 방치 후 microcentrifuge(Heraeus, Scientific, Vs 15,000)에서 12,000rpm으로 20분 동안 DNA 및 RNA를 침전시켰다. 그리고 그 핵산성분을 건조시킨 후 TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)에 용해시켜 RNase(100 μ g/ml, BRL, USA)와 proteinase K(200 μ g/ml)를 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 처리하여 RNA 성분을 제거시킨 후 전술한 바와 같이 다시 1 volume의 phenol/chloroform/isoamylalcohol로 2회 추출하였으며, 다시 chloroform/isoamylalcohol(24:1)로 1회 더 추출하여 ethanol과 sodium acetate 로 -70 $^{\circ}$ C에서 2시간 방치 후 12,000rpm에 15분간 원침하여 DNA를 침전시켰다. 이 후 침전된 DNA 성분을 70% ethanol로 1회 washing 후 건조시켰다. 여기에 0.1 \times TE buffer(1mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH8.0)로 용해하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하면서 실험에 이용하였다.



4. 제한효소 처리 및 분석

DNA의 제한효소 처리 및 분석은 Maniatis 등(1982)의 방법을 응용 하였으며, 공시된 제한효소는 *KpnI*, *PstI*, *SmaI*, *DraI*, *HpaI*, *SacI* 등(NEB, USA)을 사용하였다. 처리방법은 제한효소를 37 $^{\circ}$ C에서 1~2시간 반응시킨 후 1/10 volume loading buffer(0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol, 1% SDS, 100mM EDTA, pH8.0)을 가하여 반응을 멈춘 후 etidium bromide (EtBr, 0.5 μ g/ml)가 첨가된 0.6% agarose gel에서 20mA에서 16시간 전기영동하였다. 전기영동 buffer는 Tris-acetate EDTA buffer(TAE: 40mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH8.0)를 사용하였고, molecular size marker로는 1kb ladder(Gibco)를 이용하였다. 전기영동 pattern의 관찰은 단파장 (short-wave length) UV illuminater(Spectroline, USA)상에서 실시하였다.

5. Agarose Gel에서 목적 DNA의 추출

Agarose gel로 부터 목적하는 DNA band의 추출은 GeneClean III kit(BIO 101, USA)를 이용하여 제조사가 제안한 방법으로 추출하였다.

약술하면 agarose gel에서 전기영동을 한 후 target band를 도려내어 ependorf tube에 옮겨 담는다. 그 후 6M NaI(Sodium Iodide) solution을 1ml 넣고 55℃에서 완전히 녹인다. 여기에 silica matrix인 glassmilk를 5~10 μ l 첨가하여 얼음에 5분간 정치한다. 원심한 후 상층액을 버리고 new wash solution으로 2회 세척 후 침전물을 건조한 후 glassmilk의 10~15 μ l의 증류수를 넣고 57℃에서 5분 정치 후 원심하여 상층액을 받는다. 이 상층액을 -20℃에 보관하며 사용하였다.

6. Polymerase Chain Reaction

PCR은 Mullis 등(1987) 및 Saiki 등(1988)의 방법을 이용하였다. Primers는 glycoprotein D에 C-terminal region을 암호화하는 염기서열을 DNA 합성기 (ABI 392)를 이용하여 합성하였으며, primer의 sequence는 표 1에 나타내었다.

표 1. Nucleotide sequence of primer

Forward primer 5'-CCGGATCCGTCACAATTTTATGCCTGC-3'

Reverse primer 5'-CGGGATCCAAGGCATTTGTCACAACGCA-3'

PCR condition은 표 2에 나타난 바와 같이 하였고 PCR buffer final concentration이 1mM dNTP, 10mM MgCl₂, 2.5mM primer, 2.5unit Taq polymerase, Template DNA로는 추출한 EHV-1 DNA를 사용하였다. PCR은

Perkin Elmer 9600(USA)을 사용하였으며, 반응조건은 94℃에서 1분간 denature시키고, 54℃에서 1분간 annealing, 그리고 72℃에서 1분간 elongation time을 두었다. Final extention은 72℃에서 5분간 실행하도록 하고 총 30 cycle을 반응하도록 programing하였다. PCR product는 3μl를 0.7% agarose gel에 loading하여 확인하였다. PCR product의 purificaton은 Geneclean kit III를 이용하였다.

표 2. Condition used in PCR reaction

Glycoprotein	Denaturation		Annealing		Elongation	
	Temp(℃)	Time(secs)	Temp(℃)	Time(secs)	Temp(℃)	Time(secs)
D primer	94	60	54	60	72	60

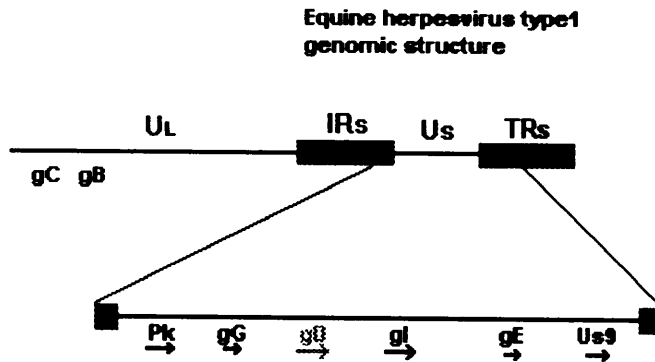


Fig. 1. The structure of the viral genome is shown with the UL and Us segment

7. Cloning Vector의 작성

Cloning vector로는 pBRHN과 pGEM-T Vector(Pharmacia, USA)을 이용하였으며 외부 유전자와 결합할 수 있는 제한효소(NEB, USA)로 처리한 후 Vector DNA의 self ligation을 막기 위해 calf intestinal alkaline phosphatase(CIAP, Pharmacia, USA)를 37℃에서 30분간 처리하고, Vector DNA를 phenol로 추출하고, ethanol로 침전시켜 0.1×TE buffer에 용해하여 -20℃에서 보관 사용하였다.

8. Ligation, *E. coli* 형질전환(Transformation) 및 cloning

8-1. Ligation



Ligation과 transformation은 Maniatis 등(1982)의 방법을 참고 하였으며, ligation은 전술한 agarose gel에서 추출한 0.1 μ g정도의 목적 DNA와 작성된 Vector DNA 1 μ g에 1mM ATP 1 μ l, 10×T4 DNA ligase buffer(0.5M Tris-HCl, pH7.6, 0.1M MgCl₂, 0.1M dithiothreitol, 0.5mg/ml bovine serum albumin)와 2~4 units의 T4 DNA ligase(10 unit/ μ l, NEB)를 넣고, total 10 μ l 되게 증류수를 첨가한 후 15℃에서 18시간 반응시켰다.

8-2. *E. coli*의 형질전환(Transformation)

Transformation을 시행하기 위해서는 *E. coli* DH5 α 균주를 competent cell로 공시하였다. Competent cell의 준비는 Pebal(1988)의 방법을 응용하여 만들었으며 Lauria-Bertain agar(LB agar : 1% Bactotrypton, 0.5% Bactoyeast extract, 1% NaCl, 1.5% Bactoagar) plate에 증식된 집락을 채취하여 5ml의 LB broth(1% Bactotrypton, 0.5% Bactoyeast extract, 1% NaCl)에 접종하고, 37℃에서 18시간 competent cell을 진탕 배양하였다. 1차 배양액 5ml을 LB broth 500ml에 첨가하여 다시 37℃에서 3시간 동안 진탕 배양하고 600nm에서

의 흡광도가 0.40~0.55가 되게 한 후 얼음에서 20분간 냉장시켰다. 냉장된 세포를 800g로 냉장 원심한 후 상층액을 제거하고, pellet을 30ml의 냉장 TFB I(30mM KoAc, 50mM MnCl₂, 100mM RbCl₂, pH5.8 with 10% acetic acid)에 부유하여 얼음에 15분간 방치하였다. 이 부유액을 800g로 냉장 원심하여 상층액을 제거하고, pellet을 30ml의 TFB II(10mM MOPS, pH7.0 with 75mM CaCl₂, 10mM RbCl₂, 15% glycerol)에 부유시켜 300 μ l씩 분주한 후 액체질소를 이용하여 순간적으로 동결시킨 후 -70 $^{\circ}$ C에 보관시켜 사용하였다. Transformation은 -70 $^{\circ}$ C에 보관된 competent cell을 얼음중에서 녹인 후 ligation된 DNA에 100 μ l를 첨가하여 얼음에서 30분간 방치한 후 LB broth를 첨가하여 42 $^{\circ}$ C에서 90초간 heat shock을 가하였다. 그리고 얼음에서 5분간 정치한 후 LB broth를 1ml 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 진탕 배양한 후 6,000 rpm에서 30초간 원심하여 상층액 800 μ l를 버리고, 200 μ l를 ampicillin(50 μ g/ml)이 함유된 LB agar plate에 접종하여 18시간 배양 후 집락을 선별하였다.

8-3. Plasmid DNA 추출

gD 유전자를 cloning하여 형질전환된 *E. coli*로부터 cloning된 것을 확인하기 위하여 Maniatis 등(1982)의 plasmid 소량추출(mini-preparation)을 사용하였다. LB agar plate에 생긴 집락을 선별하여 ampicillin(50 μ g/ml)이 함유된 1ml의 LB broth에 접종하고 18시간 배양하였다. 배양된 세균을 12,000rpm에서 2분간 원심하여 상층액을 제거하고 lysozyme(100 μ g/ml)이 함유된 STET 용액[8% sucrose, 50mM Tris-HCl(pH8.0), 50mM EDTA, 0.5% Triton X-100] 300 μ l를 첨가하여 진탕 부유시킨 후 끓는 물에 1분간 처리하고, 즉시 얼음에 5분간 정치한다. 12,000rpm에서 12분간 원심하여 pellet을 건져내고 상층액에 isopropanol 200 μ l를 첨가하여 -70 $^{\circ}$ C에서 20분간 정치시키고, 12,000rpm에서 10분간 원심시킨 후 상층액을 조심스럽게 제거한 후 건조시킨다. 건조시킨 DNA를 30 μ l 멸균증류수에 용해하여 적절한 제한효소를 사용하여 cloning된 plasmid DNA를 확인하였다. 한편, 소량추출법으로 확인된 gD clone들을 maxi-preparation하였다. 즉 200ml의 LB broth(ampicillin 함유) 형질전환된 *E. coli*를 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 진탕 배양 후 3,000rpm에서 20분간 원심한 후 pellet을 냉장된 PI buffer(100 μ g/ml RNase A, 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH8.0) 4ml에 부유시켜 얼음에 10분간 정치시킨다. 여기에 P2 buffer(200mM NaOH, 1% SDS) 4ml을 첨가하여 조심스럽게 혼합한 다음 얼음에서 10분간 용해시킨 후 냉장된 P3 buffer(3M KAc, pH5.5) 4ml을 넣어 혼합하고, 10분간 정치하여 중화시킨 다음 4,000rpm에서 20분간 원심하고 상층

액을 1경의 여과지로 여과하였다. 한편, Sephadex colume(QIAGEN, USA)을 QBT buffer(750mM NaCl, 50mM MOPS, 15% ethanol, pH7.0, 0.15% Triton X-100) 4ml로 충전한 다음 여기에 여과한 DNA 용액을 colume에 가한 후 QC buffer(1M NaCl, 50mM MOPS, 15% ethanol, pH7.0) 10ml로 두번 세척하고, QF buffer(1.25M NaCl, 50mM Tris-HCl, 15% ethanol, pH8.5) 5ml로 DNA를 추출하였다. 추출된 plasmid DNA에 0.7 volume의 isopropanol을 첨가하여 -70℃에서 30분간 침전시킨 후 12,000rpm에서 20분간 원침하였다. 이후 상층액을 제거하고 70% ethanol로 1회 세척하여 건조하고 200~300 μ l 0.1×TE buffer에 용해한후 -20℃에 보관사용하였다.

9. gD유전자 Subclone 작성 및 염기서열 분석

Elizabeth 등(1992)이 보고한 EHV-1 AB4 strain과의 염기서열을 비교하기 위해 부분적인 subclone을 작성하였다. EHV-1 LC1의 BamHI D 분절이 함유된 pBR-BamD를 PCR을 이용하여 gD gene을 증폭하였다. 증폭된 gD를 Geneclean II kit로 추출한 DNA를 EcoRI으로 처리하고 pGEM7zf(Promega, USA) vector를 EcoRI/BamHI으로 처리하고, CIAP처리한 다음 gD 유전자의 EcoRI/BamHI fragment 860bp와 500bp를 각각 pGEM Vector와 ligation하여 pTgD800과 pTgD500을 작성하였다(그림. 2). Cloning된 gD 유전자의 염기서열 분석은 ABI PRISM Dye Primer Cycle Sequencing Kit(Perkin Elmer, USA)를 사용하였으며, DNA template 및 premix reagent를 혼합하는 한편 DMSO를 10%농도가 되도록 첨가하고 Taq DNA polymerase를 이용하여 PCR(Gene Amp PCR system 9600, Perkin Elmer)한 다음, 4% acrylamide gel에서 3,000 volts로 2.5시간 전기영동 하였다(377 Autosequencer, Perkin Elmer). DNA염기서열 분석은 DNASIS(Hitachi, version 7.0) program을 사용하였다.

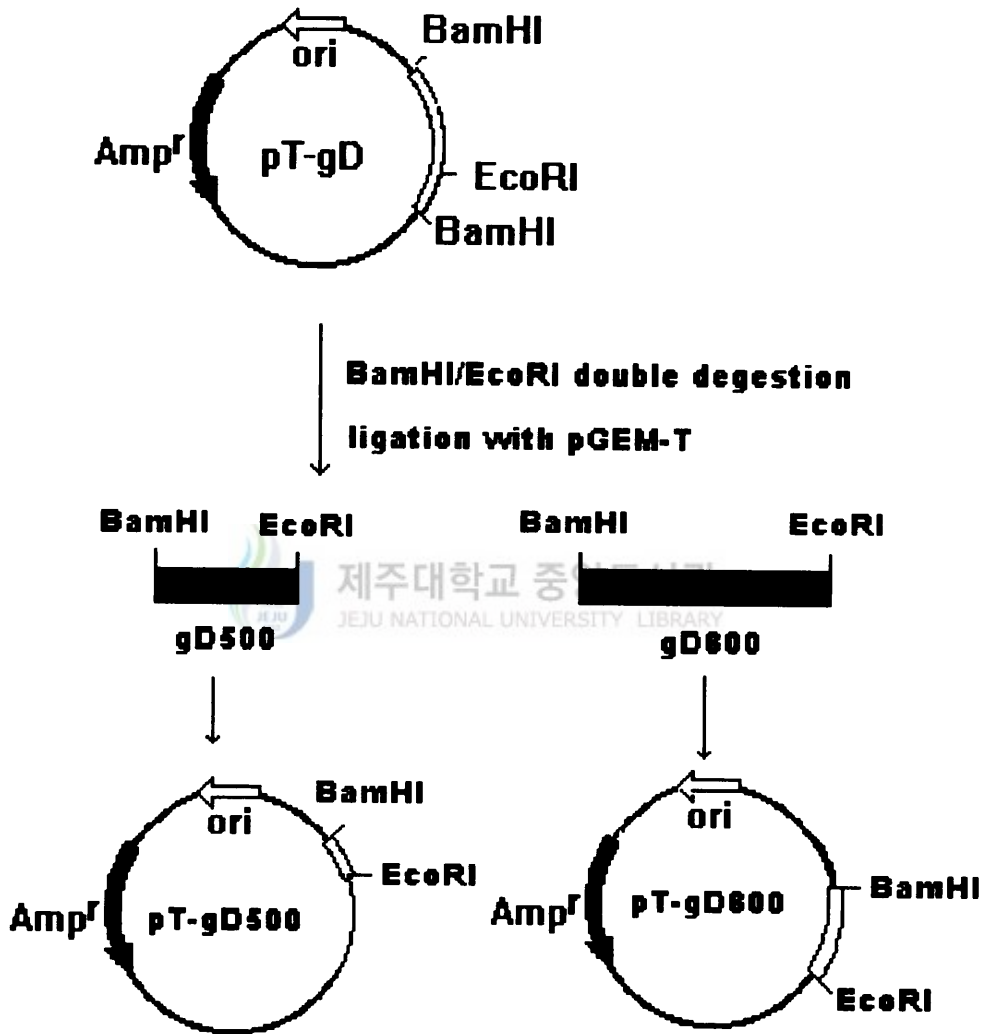


Fig. 2. Construction of subclones pT-gD500, pT-gD800 from the pT-gD cloning vector

10. Baculovirus expression system을 이용한 EHV-1 gD 유전자의 발현

10-1. gD 유전자의 expression vector cloning

gD 유전자 발현 vector로는 baculovirus expression system중에 pVL 1393 baculovirus transfer vector(Invitrogen)를 사용하였다. pGEM-gD clone을 *Bam HI*으로 절단하여 gD 유전자의 1.3kb 분절을 추출해내고, *Bam HI*으로 절단하여 pVL1393 vector와 ligation 시킨 후 앞의 transformation과 mini-prep방법을 이용하여 clone을 선발하였다 (그림. 3).

10-2. gD 유전자가 함유된 제조합 Baculovirus의 작성

gD 유전자를 baculovirus expression system에서 발현시키기 위해 Sf9 (ATCC CRL 1711) 세포와 linear baculovirus DNA로 구성된 transfection kit(Clontech, USA)를 사용하였다. 발현을 위한 cotransfection을 다음과 같이 실시하였다. Culture flask(25cm²)에 Sf9 세포를 2×10^6 cells/ml을 넣고 8시간 배양후 Sf9 세포가 최적상태일 때 배지를 제거하고 항생제와 혈청이 들어있지 않은 Grace's medium으로 3회 세척하였다. 멸균된 1.5ml tube를 두 개 준비하여 A tube에는 43 μ l의 멸균 8차증류수와 5 μ l의 plasmid DNA(100 μ g/ μ l) 및 2 μ l linear baculovirus DNA를 혼합하고, B tube에는 증류수 92 μ l와 lipofectin(1 mg/ml, Gibco. BRL) 8 μ l를 혼합하였다. 15분간 실온에서 A tube를 반응시킨 후 B tube의 혼합액 50 μ l를 A tube에 가하여 30분간 반응시킨다. 이 반응이 끝나면 위에서 준비된 Sf9 세포에 혼합액을 가하고 free Grace's media 1ml을 가하여 배지가 고루 퍼지게 흔들어주고, 27 $^{\circ}$ C에서 3시간 배양 후 10% 혈청과 항생제가 들어있는 Grace's medium 1.5ml을 첨가하여 27 $^{\circ}$ C에서 5일간 배양한 후 recombinant baculovirus(Bac-gD)에 의한 세포변형효과가 출현하면 상층액을 수확하여 일부는 -70 $^{\circ}$ C에 보관하고, 일부는 2대 계대 배양하여 seed 바이러스로 사용하였으며 seed 바이러스의 역가측정은 1×10^5 농도의 Sf9 세포를 96 well microplate(Nunc, USA)에 0.1ml씩 분주하였고, 바이러스는 10진 단계 희석하고 접종 후 3일간 배양하여 그 역가를 판독하였다.

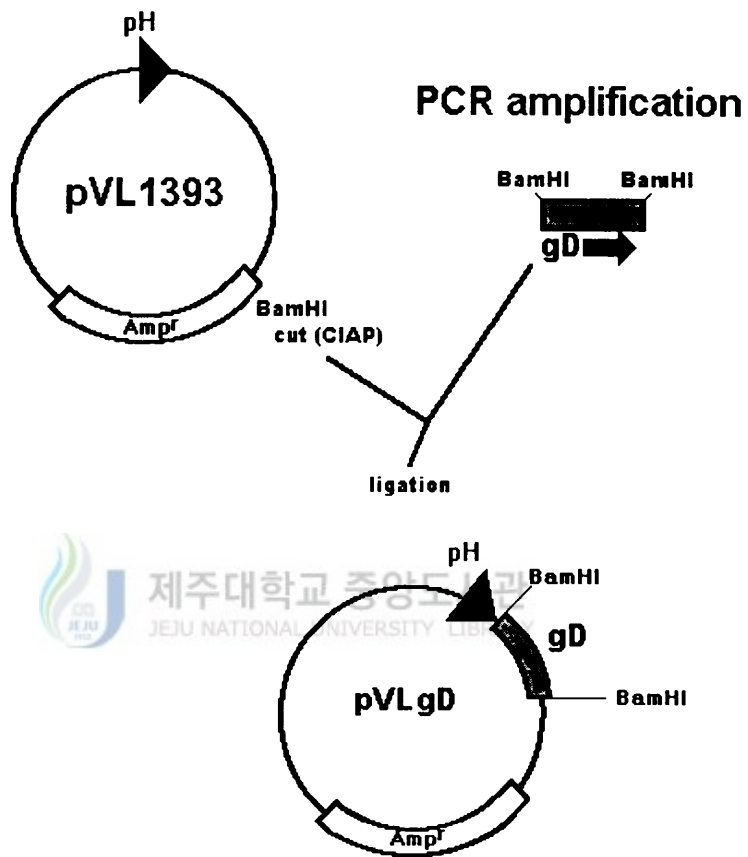


Fig. 3. Strategy to construct the recombinant baculovirus transfer vector containing the gD gene of LC1

11. EHV-1 gD 유전자의 발현 단백질 확인

11-1. Indirect fluorescence test

Cell culture petridish(Costar, 60mm)에 cover slide와 S₉세포(2×10^6 cells/ml)을 넣고, recombinant virus를 1moi되게 접종하여 4일간 배양 후 상층액을 제거하고, PBS로 1회 세척한 다음 80% acetone으로 5분간 고정 후 cover slide를 꺼내어 건조시키고, EHV-1 anti-horse혈청으로 30분간 반응시켰다. 그리고 PBS로 3회 세척하고, FITC-conjugated goat anti-horse IgG (Sigma)와 30분간 반응시킨 후 다시 PBS로 세척하고 나서 mounting buffer를 떨어뜨려 형광현미경으로 관찰하였다.

11-2. Immunocytochemical Stain (ICS)

Immunocytochemical staining은 recombinant virus(Bac-gD)를 10진 단계 희석하고 S₉ 세포가 배양된 petridish(60mm)에 접종하고 1.5% low melting point agarose를 overlay시켜 굳힌 후 80-100%의 습도를 유지하면서 27℃에서 3-5일간 배양하였다. 배양 후 gel을 제거하고 PBS로 1회 세척하여 80% cold acetone에 5분간 고정 후 완전히 건조시켰다. 여기에 blocking solution(1-2% foetal calf serum in 10ml PBS)을 가하고 실온에서 30분간 반응하였으며, anti-horse serum을 30분간 반응 후 PBS로 3회 세척하였다. 2차 항체인 horse redish peroxidase-conjugate anti-horse IgG(Sigma)를 가하고, 다시 PBS로 3회 세척하고, 기질(9ml PBS, 6 mg 3',3'-diaminobenzidinetetra hydrochloride dihydrate, 30% H₂O₂) 10 μ l를 첨가하여 발색시켰다.

11-3. SDS-PAGE

Laemmli 등(1973)의 방법을 응용하여 gD의 발현 여부를 관찰하고자 S₉세포가 배양된 petridish(60mm)에 recombinant virus를 접종하고 대조로는

*AcNPV*를 접종하여 5일간 배양 후 세포를 수확하였다. 수확된 세포를 6,000 rpm에서 2분간 원심 후 세포를 PAGE항원으로 사용하였고, 다시 cell pellet을 PBS로 3회 원심 세척하고, cell pellet을 1% NP40 cell lysis buffer(1% Nonidet P-40, 10mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl)를 1ml 가하여 얼음에서 30분간 처리한 후 원침하여 PAGE항원으로 이용하였다. 그리고 대조 항원으로는 *AcNPV*배양 상층액을 이용하였다. 이들 항원을 SDS reducing sample buffer(0.5M Tris-HCl, 10% SDS pH 6.8, 2-mercaptoethanol 0.4ml, 0.05% bromophenol blue, H₂O 4ml: Total volume 10ml) 300 μ l를 첨가하여 실온에서 10분간 방치하고, 5분간 끓인 후, 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 시험에 이용하였다. SDS-PAGE gel을 만드는데 사용되는 30% acrylamide는 27.6% acrylamide와 2.4% N'N'-bis-methylene-acrylamide를 증류수 100ml에 녹여 여과 후 4 $^{\circ}$ C 암실에 보관 사용하였고, gel running buffer(0.3% Tris, 1.44% glycine, 0.1%SDS, pH 8.3)을 이용하여 전기영동 kit(bio-rad)사용하였다. SDS-PAGE gel을 만들기 위해 10% separating gel(H₂O 8.2ml, 1.5M Tris 11.4ml pH 8.0 30% acrylamide/bis 10ml, 10% SDS 300 μ l, 10% Ammonium persulfate 150 μ l, TEMED 15 μ l)를 먼저 굳힌 후 5% stacking gel(H₂O 6.1ml, 0.5M Tris 2.5ml pH 6.8, 30% acrylamide/bis 1.3ml, 10% SDS 100 μ l, 10% APS 50 μ l, TEMED 10 μ l)를 가하고 comb를 설치한 뒤 굳혀서 사용하였다. gel running buffer를 사용하여 70V에서 5-6시간 전기영동하여 bromophenol blue가 gel의 하단 끝에 도달할 때 전기영동을 멈추었다. 분자량을 측정하기 위해 prestained protein molecular weight marker (Gibco-BRL, USA)을 사용하였고, 전기영동이 완료된 gel을 떼내어 염색액(50% methanol, 50% H₂O, 0.2% Coomassie brilliant blue, 7% acetic acid)에 3시간 염색 후 탈색액(15% methanol, 10% acetic acid, 75% H₂O)으로 탈색시켜 관찰하였다.

11-4. Western blot

Western blot은 Towbin 등(1979)의 electroblotting 방법을 응용하여 Hoefer blot system(Hoefer, USA)을 사용하였고, enzyme immunoassay는 vectastain ABC Kit(Vector, USA)를 이용하였다. Blotting은 두꺼운 filter paper 2장을 transfer buffer(0.3% Tris, 1.44% glycine, 20% methanol, pH 8.3)에 적셔 제일 하단에 놓고, Nitrocellulose(NC) membrane을 transfer buffer에 적셔 그 위에 올려놓은 후, 전기영동이 완료된 gel을 NC membrane

에 놓고, filter paper 2장을 transfer buffer에 적서 그 위에 올려놓는다. 그리고 그 사이에 기포를 완전히 제거한다. 그 다음 음극에서 양극으로 약 40mA 정도에서 over-night transfer시킨다. NC membrane을 꺼내어 blocking solution(10% skim milk, 5% lactoalbumine hydrolysate in PBS)에 담가 37℃에서 2시간 반응하였다. 그리고 washing buffer(0.05% Tween 20, 0.01% BSA in PBS)로 5분간 3회 washing하고, 그 다음 anti-EHV horse serum으로 1시간 반응시키고, 위와 동일한 방법으로 washing한 다음 2차 항체인 anti-horse IgG HRP conjugate(Sigma)로 1시간 반응시키고, 다시 위와 같은 방법으로 세척한다. 마지막으로 기질(9ml PBS, 6mg 3'3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride dihydrate, 30% H₂O₂) 10 μ l를 첨가하여 발색시켰다.



Ⅲ. 결 과

1. genomic DNA의 Restriction enzyme mapping

국내분리 EHV-1인 LC1주와 LC2주의 유전자의 제한효소분석을 위해 이를 감염시킨 MDBK세포로부터 DNA를 분리하고, 여러 종류의 제한효소로 처리하여 agarose gel상에서 전기영동하여 관찰한 결과 두 개의 분리주는 처리된 모든 제한효소에서 똑 같은 형태의 분절을 나타냄으로써 이들 바이러스들은 같은 종임이 증명되었다(그림. 4). 이들 중 gD 유전자를 cloning하기 위해 genomic DNA를 *Bam*HI으로 처리하고 이를 전기영동하여 4번째 분절을 pBRHN vector에 cloning하여 각종 제한효소(*Sma*I, *Hind*III, *Eco*RI, *Nde*I, *Pst*I, *Dra*I, *Bsp*HI, *Sac*I, *Kpn*I, *Bam*HI, *Bsp*MI, *Bst*XI) 분석한 바 그림. 5와 같이 *Sma*I에서는 0.8, 4.0 5.7kb의 3개의 분절로 절단되었고, *Eco*RI은 6.2, 7.3kb의 두 분절로 나뉘었다. 그리고 *Hind*III는 1.1, 1.2, 4.1, 6.3kb의 네 개의 분절로 나뉘었다. 또한 *Nde*I으로 처리한 경우 0.6, 3.0, 4.1, 5.1kb의 네 개의 분절로 나뉘었다. 그리고 *Bsp*MI으로 처리하였을 경우에는 이미 genomic sequence가 알려진 AB4주와 비교할 때 6개의 enzyme site개 더 생겨났으며 그 크기는 0.4, 0.7, 1.2, 2.5, 4.6kb정도 되는 분절들이 관찰되었다. 그리고 *Bsp*HI으로 처리하였을 경우 표준주에서는 enzyme site가 없으나 LC1에서는 하나의 enzyme site가 생겨난 것을 알 수 있었다. 또한 *Bst*XI으로 처리할 경우 표준주에서는 enzyme site가 한 개 존재하였으나 분리주에서는 enzyme site가 사라진 것을 볼 수 있었다(그림. 5).

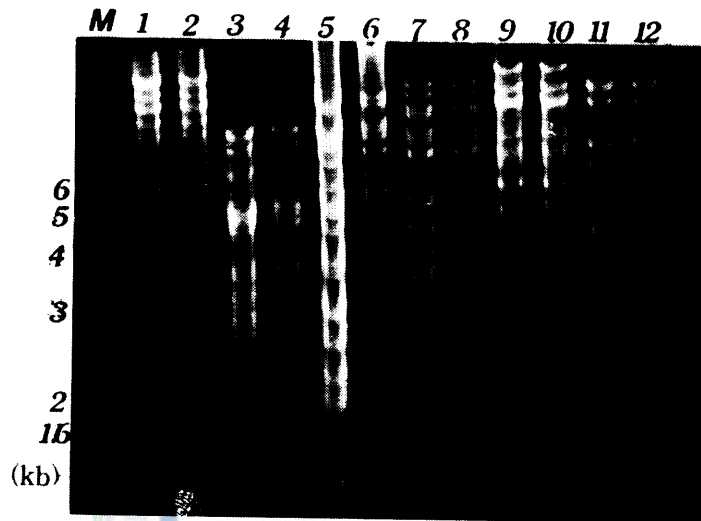


Fig. 4. Cleavage pattern of LC1 and LC2 DNA with various restriction endonucleases

lane M : 1kb DNA ladder

LC1	LC2
lane 1 : <i>KpnI</i> ,	lane 2 : <i>KpnI</i> ,
lane 3 : <i>PstI</i> ,	lane 4 : <i>PstI</i> ,
lane 5 : <i>SmaI</i> ,	lane 6 : <i>SmaI</i> ,
lane 7 : <i>DraI</i> ,	lane 8 : <i>DraI</i> .
lane 9 : <i>HpaI</i> ,	lane 10 : <i>HpaI</i>
lane 11 : <i>SacI</i> ,	lane 12 : <i>SacI</i>

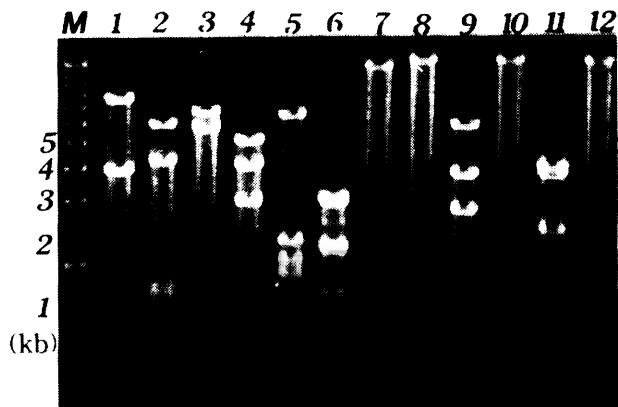


Fig. 5. Cleavage pattern of BamHI D fragment of LC1 strain DNA with various restriction endonucleases

lane M : 1kb ladder, lane 1 : *SmaI*, lane 2 : *HindIII*, lane 3 : *EcoRI*,
 lane 4 : *NdeI*, lane 5 : *PstI*, lane 6 : *DraI*, lane 7 : *BspHI*, lane 8
 : *SacI*, lane 9 : *KpnI*, lane 10 : *BamHI*, lane 11 : *BspMI*, lane
 12 : *BstXI*

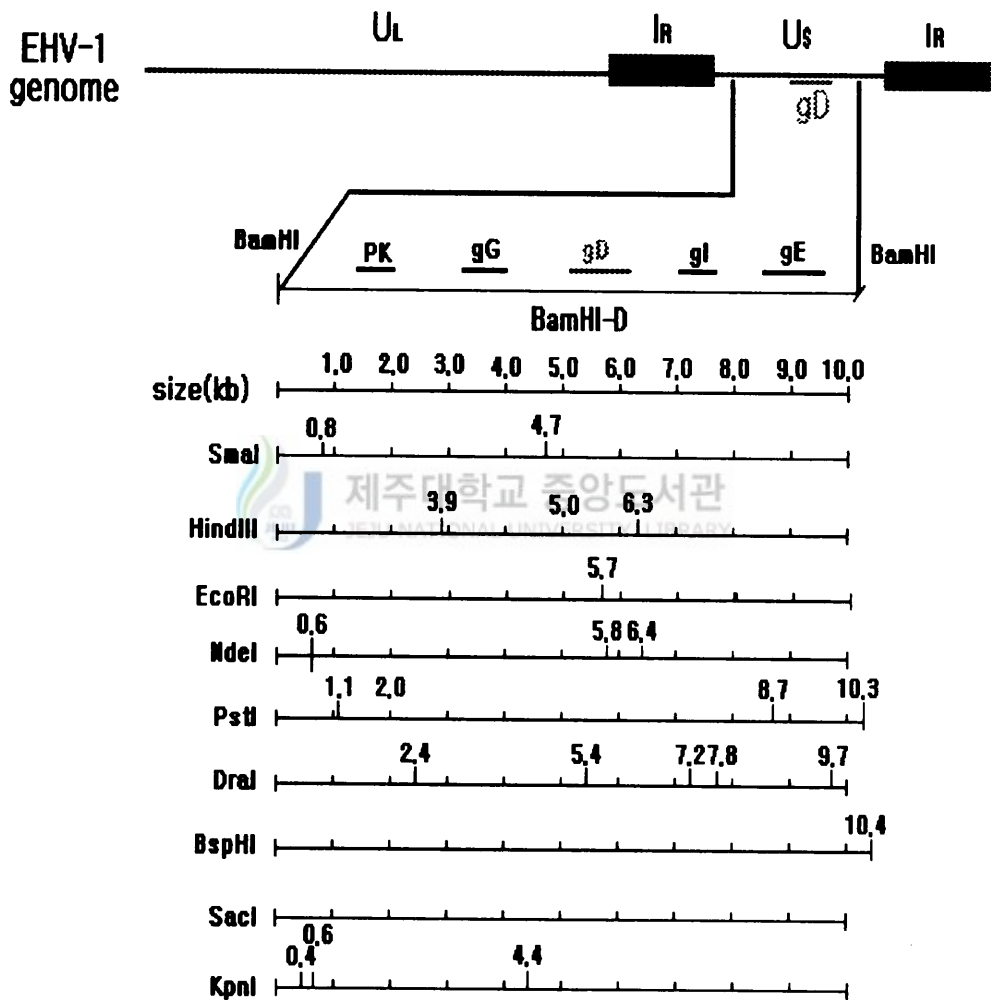


Fig. 6. Restriction enzyme cleavage sites in the cluster of glycoprotein genes in the unique short(Us) part of LC1

2. PCR을 통한 gD 유전자의 증폭과 cloning

EHV-1 gD 유전자의 증폭은 gD 유전자에 특이적인 primer를 이용하여 gD 유전자(1.3Kb)를 증폭하였으며 LC1과 pBR-BamD에서는 특이 band가 나타났고, nested PCR을 한 결과 lane 3에서와 같이 500bp의 특이 band가 나타났다(그림. 7). 이 PCR을 통해 증폭된 gD 유전자를 pGEM-T vector와 pVL1393을 이용하여 cloning하고, 재조합된 유전자의 이름을 pT-gD와 pVL-gD라 하였으며, 그리고 cloning된 유전자를 확인하기 위해 *Bam*HI으로 처리하여 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인한 결과 각각의 vector 유전자의 분절과 1.3kb의 gD 유전자가 전기영동상에서 나타났다(그림. 8).

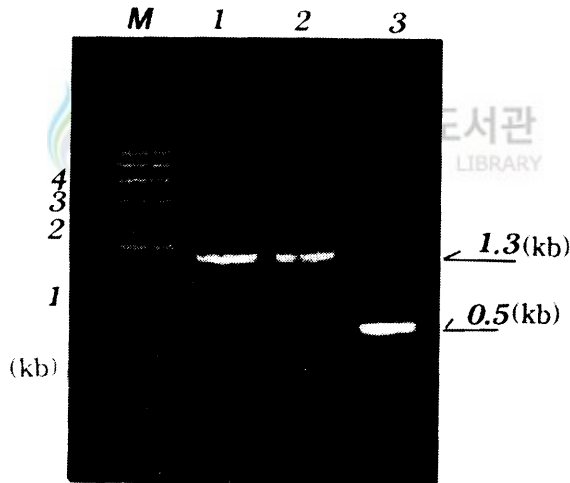


Fig. 7. Amplification of gD gene by polymerase chain reaction
lane M : 1kb DNA ladder, lane 1 : LC1 genomic DNA, lane 2 : pBR-BamD, lane 3 : nested PCR



Fig. 8. Cloning of gD gene

lane M : 1kb DNA ladder, lane 1 : pT-gD (gD gene cloning vector),

lane 2 : pVL-gD (gD gene transfer vector)

3. Subcloning of the gD gene for sequencing

유전자의 염기서열 분석을 위하여 pT-gD를 *Bam*HI과 *Eco*RI으로 double digestion하여 각각의 분절(0.5kb, 0.8kb)을 얻었고, 이를 pGEM-T7zF sequencing vector에 cloning하여 각각 pT-gD500, pT-gD800이라 하였다(그림. 9). 이를 competent cell에 형질전환시켜 Qiagen mini kit(Qiagen)로 DNA를 깨끗이 추출하여 염기서열을 분석하는데 사용하였다.



Fig. 9. Subclones for sequencing

lane M : 1kb DNA ladder, lane 1 : pT-gD500 / *Bam*HI & *Eco*RI,

lane 2 : pT-gD800 / *Bam*HI & *Eco*RI

4. gD 유전자의 염기서열 분석

Glycoprotein D 유전자의 염기서열을 분석한 결과 표준주로 공시된 Ab4 strain과 비교하여볼 때 상동성이 99.8%임이 증명 되었고(그림. 10), 유전자 염기서열분석을 실시한 결과 392번째 T 염기가 C 염기로 교차된 것을 알 수 있었다(그림. 11). 또한 아미노산 분석결과 127번째 alanine이 valine으로 변한 것을 알 수 있었으며 교환된 아미노산은 모두 소수성의 특성을 가진 것을 알 수 있었다(그림. 12).

KOREAN I SOLATE EQUINE HERPESVIRUS 1 GLYCOPROTEIN D DNA TRANSLATION



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

```

start →
      1 Met Pro Ala Val Leu Leu Val Leu Tyr Val Asn Pro      12
      1 ATG CCT GCT GTG CTG CTT GTA CTG TAT GTT AAC CCG      47
      ***
13  Pro Pro Ser Val Cys Ile Leu Thr Gln Lys Leu Ser Leu Gly Leu Tyr      28
48  CCC CCG AGC GTC TGT ATA TTA ACT CAA AAA TTA TCC CTT GGC CTT TAC      95
      ***
29  Asn Gln Trp Trp Arg Val Cys Arg Ser Val Pro Pro Pro Trp Tyr Val      44
96  AAC CAG TGG TGG CGT GTA TGC AGA AGC GTG CCA CCG CCC TGG TAC GTG      143

45  Phe Phe Asn Lys Arg Ser Met Ser Thr Phe Lys Leu Met Met Asp Gly      60
144 TTT TTC AAT AAA CGA AGC ATG TCT ACC TTC AAG CTT ATG ATG GAT GGA      191

61  Arg Leu Val Phe Ala Met Ala Ile Ala Ile Leu Ser Val Val Leu Ser      76
192 CGT TTG GTT TTT GCC ATG GCA ATC GCG ATC TTG AGC GTT GTG CTC TCT      239
      ***      ***
77  Cys Gly Thr Cys Glu Lys Ala Lys Arg Ala Val Arg Gly Arg Gln Asp      92
240 TGT GGA ACA TGC GAG AAA GCC AAG CGT GCG GTT CGA GGA CCG CAG GAT      287
  
```

다음페이지 계속

93	Arg Pro Lys Glu Phe Pro Pro Pro Arg Tyr Asn Tyr Thr Ile Leu Thr	108
288	AGG CCA AAG GAG TTT CCA CCA CCC CGC TAT AAC TAT ACA ATT TTA ACA	335
109	Arg Tyr Asn Ala Thr Ala Leu Ala Ser Pro Phe Ile Asn Asp Gln Val	124
336	AGA TAC AAC GCG ACT GCG CTA GCA TCA CCG TTT ATT AAC GAC CAA GTA	383

125	Lys Asn Val Asp Leu Arg Ile Val Thr Ala Thr Arg Pro Cys Glu Met	140
384	AAA AAT GTC GAC TTG CCG ATT GTT ACT GCT ACG CGC CCA TGT GAA ATG	431
141	Ile Ala Leu Ile Ala Lys Thr Asn Ile Asp Ser Ile Leu Lys Glu Leu	156
432	ATA GCG CTG ATC GCT AAG ACA AAC ATA GAC TCA ATC CTG AAG GAG CTG	479
157	Ala Ala Ala Gln Lys Thr Tyr Ser Ala Arg Leu Thr Trp Phe Lys Ile	172
480	GCC GCT GCC CAA AAA ACT TAT TCC GCC AGA CTC ACC TGG TTT AAA ATT	527
	***	***
173	Met Pro Thr Cys Ala Thr Pro Ile His Asp Val Ser Tyr Met Lys Cys	188
528	ATG CCA ACG TGT GCA ACG CCT ATA CAC GAT GTT AGT TAT ATG AAA TGC	575

189	Asn Pro Lys Leu Ser Phe Ala Met Cys Asp Glu Arg Ser Asp Ile Leu	204
576	AAC CCG AAG CTA TCA TTT GCA ATG TGT GAT GAG AGA TCA GAC ATA CTA	623
205	Trp Gln Ala Ser Leu Ile Thr Met Ala Ala Glu Thr Asp Asp Glu Leu	220
624	TGG CAA GCT AGT TTA ATT ACT ATG GCT GCT GAA ACT GAC GAT GAA CTT	671
221	Gly Leu Val Leu Ala Ala Pro Ala His Ser Ala Ser Gly Leu Tyr Arg	236
672	GGA CTT GTA CTG GCA GCC CCT GCA CAT TCT GCC TCG GGA CTG TAT CGC	719
237	Arg Val Ile Glu Ile Asp Gly Arg Arg Ile Tyr Thr Asp Phe Ser Val	252
720	CGT GTT ATA GAA ATC GAC GGA AGG CGA ATT TAC ACG GAC TTT TCT GTA	767

253	Thr Ile Pro Ser Glu Arg Cys Pro Ile Ala Phe Glu Gln Asn Phe Gly	268
768	ACT ATT CCC AGT GAA CCG TGT CCG ATT GCC TTT GAG CAA AAC TTT GGC	815

269	Asn Pro Asp Arg Cys Lys Thr Pro Glu Gln Tyr Ser Arg Gly Glu Val	284
816	AAT CCG GAT CCG TGT AAA ACT CCA GAG CAG TAC TCG CCG GGA GAA GTT	863
285	Phe Thr Arg Arg Phe Leu Gly Glu Phe Asn Phe Pro Gln Gly Glu His	300
864	TTT ACA CGT CGG TTT CTT GGT GAA TTC AAC TTC CCA CAA GGA GAG CAT	911
301	Met Thr Trp Leu Lys Phe Trp Phe Val Tyr Asp Gly Gly Asn Leu Pro	316
912	ATG ACA TGG TTG AAG TTC TGG TTC GTC TAC GAT GGT GGA AAC CTA CCA	959
317	Val Gln Phe Tyr Glu Ala Gln Ala Phe Ala Arg Pro Val Pro Pro Asp	332
960	GTG CAG TTT TAT GAA GCC CAG GCA TTC GCA AGA CCC GTG CCT CCG GAT	1007

다음페이지 계속

333	Asn His Pro Gly Phe Asp Ser Val Glu Ser Glu Ile Thr Gln Asn Lys	348
1008	AAC CAC CCT GGA TTT GAT TCT GTT GAG TCG GAG ATT ACA CAA AAT AAA	1055
349	Thr Asp Pro Lys Pro Gly Gln Ala Asp Pro Lys Pro Asn Gln Pro Phe	364
1056	ACA GAC CCG AAA CCA GGC CAG GCG GAC CCC AAA CCC AAT CAG CCT TTT	1103
365	Lys Trp Pro Ser Ile Lys His Leu Ala Pro Arg Leu Asp Glu Val Asp	380
1104	AAG TGG CCC AGC ATC AAA CAC TTG GCC CCA AGA CTC GAT GAG GTG GAT	1151
381	Glu Val Ile Glu Pro Val Thr Lys Pro Pro Lys Thr Ser Lys Ser Asn	396
1152	GAG GTC ATA GAG CCC GTA ACA AAG CCC CCA AAA ACG TCT AAG AGC AAC	1199
397	Ser Thr Phe Val Gly Ile Ser Val Gly Leu Gly Ile Ala Gly Leu Val	412
1200	TCT ACG TTT GTG GGC ATC AGC GTC GGT TTG GGT ATC GCC GGC CTA GTA	1247

413	Leu Val Gly Val Ile Leu Tyr Val Cys Leu Arg Arg Lys Lys Glu Leu	428
1248	TTG GTG GGC GTC ATT CTA TAC GTC TGC TTG CGT CCG AAG AAG GAA CTG	1295
429	Lys Lys Ser Ala Gln Asn Gly Leu Thr Arg Leu Arg Ser Thr Phe Lys	444
1296	AAA AAG TCT GCA CAG AAC GGC TTG ACT CGC CTA CGC TCG ACC TTT AAG	1343
	stop	
445	Asp Val Lys Tyr Thr Gln Leu Pro ***	
1344	GAT GTT AAA TAT ACC CAG CTT CCG TAA	

Fig. 10. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the gD gene of LC1 strain. The numbering of the gene sequence starts from A of the initiation codon of the gD gene as 1. cystein residues are marked with asterisk.

	370	380	390	400	410	420
AB4 GD	CACCGTTTATTAACGACCAAGTAAAAAATGTTGACTTGCGGATTGTTACTGCTACGGCG					

LC1 GD	CACCGTTTATTAACGACCAAGTAAAAAATGTCGACTTGCGGATTGTTACTGCTACGGCG					

FIG. 11. gD sequence homology search those of reference strain (AB4)

	120	127
AB4 gD	Ser Pro Phe Ile Asn Asp Gln Val Lys Asn Val Asp Leu Arg Ile Val	
	* * * * * * * * * * * * * * *	
LC1gD	Ser Pro Phe Ile Asn Asp Gln Ala Lys Asn Val Asp Leu Arg Ile Val	

Fig. 12. gD amino acid homology search those of reference strain (AB4)

5. gD 유전자의 Expression vector 작성



gD 유전자의 expression vector의 작성은 그림 3에 도식화하였다.

6. gD 유전자를 포함한 재조합 Baculovirus의 PCR을 통한 확인

재조합 바이러스(Bac-gD)에 재조합된 EHV gD 유전자를 증명하기 위해 PCR을 통해 검증하였다. 그림 13에 나타난 바와 같이 pBR-BamD와 재조합 바이러스(Bac-gD)에서는 1.3kb의 분절이 PCR을 통해 증폭되었으며, AcNPV에서는 같은 분절이 증폭되지 않았다(그림. 13).

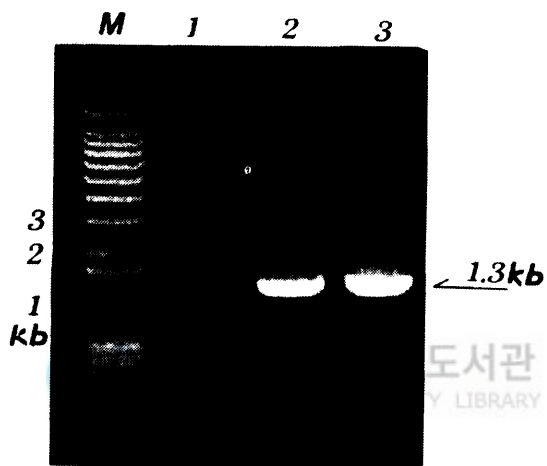


Fig. 13. Detection of gD gene by PCR in recombinant baculovirus
lane M : 1kb DNA ladder, lane 1 : *AcNPV* genomic DNA, lane 2 :
pBR-BamD, lane 3 : Recombinant baculovirus genomic DNA

7. 재조합 바이러스 (Bac-gD)에서 발현된 재조합 gD 단백질의 항원성 조사

Baculovirus에서 합성된 gD 단백질의 항원성의 검증은 간접형광항체법 과 조직면역화학염색(Fig. 14)을 통해 검증하였다. 약술하면 재조합 baculovirus seeds를 Sf9 cell에 접종하여 CPE가 발생한 것을 확인한 후 80% cold acetone으로 고정하고, 이를 잘 말린 다음 anti-EHV horse serum으로 처리하고, 2차 항체로는 anti-horse FITC conjugate 또는 anti-horse HRP conjugate (Sigma)를 반응시키고 똑같은 방법으로 wild type AcNPV에 감염된 바이러스를 반응시켜 현미경하에서 비교 관찰하였다. 재조합 baculovirus에서 발현된 재조합 gD 단백질은 IFA와 ICS에 의해 EHV의 epitope에 생물학적 활성이 있음이 증명되었다. 이들 결과는 EHV gD 유전자가 baculovirus에 의해 성공적으로 발현되었으며 발현된 재조합 단백질은 생산 후 세포표면에 발현되는 것이 밝혀졌다(그림. 14).

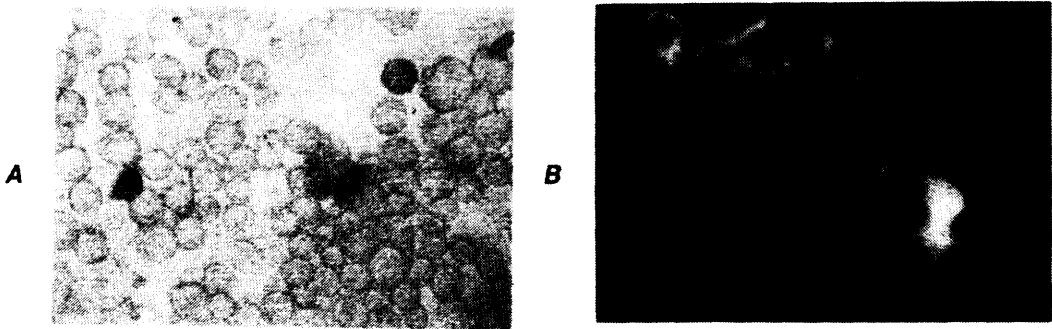


Fig. 14. Immunocytochemical staining(A) and Indirect fluorescent assay(B) of Sf9 cells infected with recombinant baculovirus using anti-EHV horse serum

8. Immunodotting을 이용한 Recombinant gD protein의 확인

Recombinant virus에 감염된 *Sf9* cell을 수확하여 TBS로 3회 세척한 후 이를 sonicated하여 dot-blot apparatus를 이용하여 dot blotting을 실시하였다. 여기서는 재조합 baculovirus에 감염된 세포에서는 반응을 나타냈으나 wild type *AcNPV*와 상층액에서는 반응을 보이지 않았다(그림. 15).



Fig. 15. Immunodot assay for detection of recombinant gD in *Sf9* cells infected with Bac-gD.

lane 1 : gD expressed by Bac-gD infected cell, lane 2 : *AcNPV* infected cell lysate, lane 3 : cell lysate, lane 4 : culture supernatant (Bac-gD infected), lane 5 : *Sf9* cell lysate (Bac-gD infected), lane 6 : *Sf9* cell lysate (*AcNPV* infected)

9. Western blotting을 이용한 재조합 gD 단백질의 확인

발현된 단백질의 분자량은 재조합 baculovirus에 감염된 S9 cell에서 추출하여 10% SDS-polyacrylamide gels에서 전기영동하여 이를 염색하고 western blot analysis를 통해 immunoactivity를 확인하였다. 이는 감염된 cell을 sonication하여 이를 SDS와 2-mercaptoethanol을 이용하여 denature시킨 다음 10% acrylamide gel에서 전기영동하여 염색한 결과 43 kDa, 그리고 58 kDa 정도의 size가 관찰되었다. 이 결과는 재조합 baculovirus에서 정확히 생산되는 것을 증명하는 것이고, western blotting에서 면역활성을 가진 band는 43 kDa과 52 kDa으로 나타났으며 wild type AcNPV에서는 관찰되지 않았다 (그림. 16).



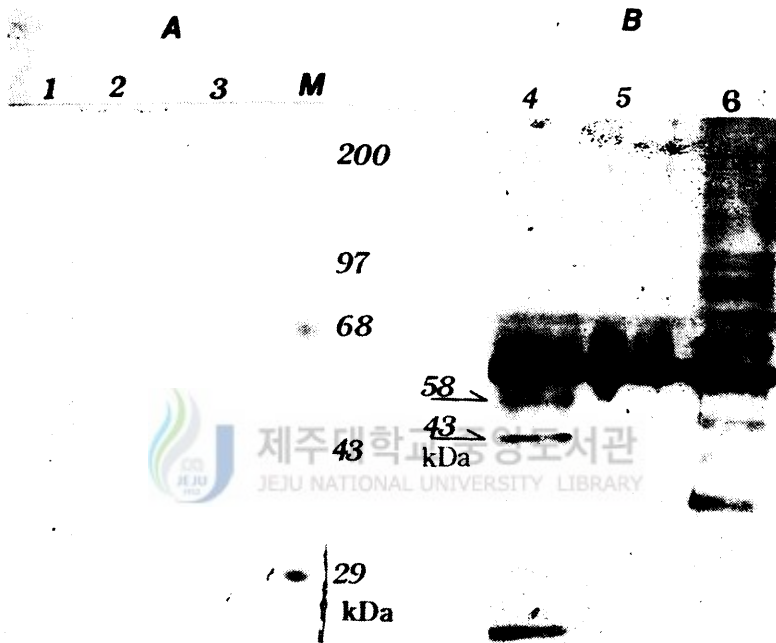


Fig. 16. SDS-PAGE (A) and Western blot analysis (B) of recombinant gD protein expressed in *Sf9* cell by recombinant baculovirus (Bac-gD)

lane 1,6 : Normal cell lysate, lane 2,5 : Bac-gD infected cell lysate,
 lane 3,4 : *AcNPV* infected cell lysate, lane M : Prestained protein
 molecular high marker (Marker size 200. 97. 68. 43. 29kDa)

IV. 고찰

지금까지 EHV-1의 중요 당단백질로는 gD, gE, gB, gI, gH등이 알려져 있으나 이들중 특히 gD 단백질은 감염성 세포에 대한 바이러스의 침입을 억제하고 중화항체를 생산하는 등 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Johnson 등, 1988; Ligas 등, 1988). 그러므로 본 실험에서도 국내 분리주인 LC1주를 공시하여 이에 대한 genomic mapping을 실시하였고, 더불어 중화항체 생산능이 있는 gD 유전자를 cloning하고 염기서열을 분석하였으며, 마지막으로 재조합 단백질을 생산하여 이에 대한 특성을 규명하였다. 또한 pG-gD를 baculoexpressin vector(pVL1393)에 cloning하여 homologous recombination을 통해 재조합 바이러스를 만들어 곤충세포에서 expression하였다.

국내 분리된 EHV-1인 LC1과 LC2를 여러 가지 제한효소를 이용하여 처리한 결과 이 두 바이러스는 동일한 바이러스임이 증명되었다. genomic DNA mapping을 한 결과 국내 분리주는 표준주로 공시된 AB4주(Elizabeth 등, 1992)와 매우 유사한 형태의 분절을 나타내었으나 *BspHI*, *BspMI*, 그리고 *BstXI*에서 enzyme site의 변화가 있음을 알 수 있었다. 이는 국내분리주는 표준주와 비교하여 볼 때 유전적 변이가 일어났을 가능성이 있는 것으로 보인다.

국내분리주를 *BamHI*으로 처리하고 이를 pBRHN vector에 cloning하여 이를 여러 다양한 제한효소로 처리한 결과 *BspMI*으로 처리할 경우 6개의 enzyme sites가 더 생겨났으며, *BspHI*으로 처리한 경우는 표준주와 비교해 볼 때 표준주에는 enzyme site가 없었으나 국내분리주에서는 1개의 enzyme site가 생겨난 것을 알 수 있었다. 또한 *BstXI*으로 처리한 경우는 표준주에서는 1개의 enzyme site가 있었지만 국내 분리주에서는 enzyme site가 사라진 것을 알 수 있었다.

EHV genomic DNA를 *BamHI*으로 처리하여 4번째 분절을 추출하여 pBRHN vector에 cloning하여 이를 PCR의 template DNA로 이용하여 비특이적으로 다른 유전자가 증폭될 가능성을 조금은 배제할 수 있었고, gD에 특이적인 primer를 이용하여 이를 증폭하였다. 증폭된 유전자는 1.3kb정도의 size가 증폭되었으며, 이를 이용하여 유전자의 염기서열을 분석하고 표준주와 상동성을 비교 하였다.

염기서열을 분석한 결과 99.8%의 염기서열의 상동성을 나타냈다. 또한 아미노산 분석결과 127번째 alanine이 valine으로 변한 것을 알 수 있었으며, 이것은 392번째 T 염기가 C 로 point mutation을 일으킨데 기인된 것이고, 이러한

변이가 바이러스의 당단백질에 대한 항원성의 변이를 일으킨다고는 생각치 않는다. 이것은 ICS나 IFA처럼 여러 항원성 실험을 통해 증명되었기 때문이다. 염기서열 분석결과 strain간의 높은 homology는 Feenstra 등(1990)의 보고처럼 당단백질 gD 단백질의 EHV의 증식 및 생물학적 기능을 수행하는 데 있어 가장 필수적인 물질로서 염기서열이 잘 보존된 결과라고 생각된다. 그리고 cloning된 유전자에 세포의 세포질에 박혀있는 transmembrane domain을 제거하지 않았으므로 발현된 단백질은 세포표면에서 상층액으로 분비되지 않은 것으로 보인다. dot blot analysis에서 세포의 상층액과 infected cell lysate를 동시에 실험한 결과 cell lysate에서는 짙은 발색을 나타냈으나 감염 상층액에서는 발색이 매우 약하게 나타났다. 발현된 단백질을 전기영동하여 western blotting을 한 결과 Flowers 등(1991)이 triple-pattern의 band가 보인다고 보고한 것에 비해 이 실험에서는 2가지의 다른 band(43 kDa, 58 kDa)가 보였다. 그리고 gD 단백질을 구성하는 아미노산의 추정 분자량은 52 kDa정도인데 이들간의 분자량의 차이는 Matsuura 등(1987)이 보고와 같이 곤충세포에서의 부분적인 glycosylation에 기인한 것으로 보인다.

Baculovirus에서 HSV-1과 HSV-2 gD 유전자를 expression한 보고가 있으며(Ghiasi 등, 1991; Krishna 등, 1989), 그리고 BHV-1 gIV(vanDrunen, 1991), PRV gp50(Thomsen 등, 1990), 그리고 EHV-1 gD 유전자(Love 등, 1993) 또한 baculovirus에서 발현한 보고가 있다. 여기에서 발현된 재조합 단백질을 가지고 실험동물에 면역율 시킨결과 치사량을 주사해도 감염에 방어능력을 갖는 것을 밝혀냈다(Ghiasi 등, 1991; Krishna 등, 1989). 이를 바탕으로 발현된 EHV-1 재조합 gD 단백질을 숙주동물에 면역율 시켜 EHV-1의 gD subunit 항체를 생산할 수 있으리라 생각된다.

본 실험결과를 기초로 EHV-1 gD의 subunit vaccine개발과 EHV-1감염증 진단법의 개발을 위한 기초자료로서 본 연구에서 발현된 재조합 gD 단백질이 이용될 수 있으리라 생각된다.

V. 결 론

1995년 제주에서 우리 나라 최초로 분리한 EHV-1, LC1주의 분자 유전학적 성상을 밝히기 위해 EHV-1의 일부 유전자의 제한효소 분석을 실시하였으며, 국내분리주를 유전자원으로 subunit 백신개발을 위한 기초자료를 획득하고자 유전자 재조합기술을 이용하여 EHV의 중요 방어항원인 gD의 유전자를 cloning하였고, baculovirus system에 의한 재조합 유전자의 발현을 시도하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 국내분리 EHV-1인 LC1주는 표준주인 AB4주와는 다르게 *BamHI* D fragment에서 *BspMI*으로 처리할 경우 6개의 enzyme sites가 더 생겨났으며, *BspHI*으로 처리한 경우에는 국내분리주에서 1개의 enzyme site가 더 생겨난 것을 알 수 있었다. 또한 *BstXI*으로 처리할 경우 표준주에 존재 하는 enzyme site가 국내 분리주에서는 사라진 것을 알 수 있었다

2. *BamD* fragment는 KyA주는 Unique long부분에 있는 반면 Ab4주는 Unique short 부분에 존재한다. PCR 기법을 이용하여 genomic DNA와 *BamHI* D fragment를 template DNA로 하여 gD 유전자를 증폭할 때 모두 증폭된 것으로 보아 gD 유전자는 예상대로 바이러스의 Us 부분에 존재하고 있는 것처럼 국내분리주는 여러면으로 genomic structure가 Ab4 주와 많은 부분이 유사하게 나타났다.

3. 증폭된 유전자를 pGEM-T vector에 cloning하여 염기서열을 분석한 결과 Ab4 주의 gD 염기서열과 99.8%의 높은 일치율을 나타냈고, 아미노산 분석 결과 127번째 Alanine이 Valine으로 변한 것을 알 수 있었으며, 이것은 392번째 T 염기가 C 로 point mutation을 일으킨데 원인을 찾을 수 있었다.

4. gD 유전자의 발현을 위해 recombinant expression vector, pVL1393에 gD 유전자를 cloning하여 pVL-gD를 제작하여 linear baculovirus DNA와 homologous recombination을 통해 재조합 바이러스(Bac-gD)를 제작하였다.

5. 재조합 바이러스에서 생산되어 나오는 recombinant gD protein의 항원성을 조사한 결과 ICS와 IFA에서는 세포표면에 발현되어 발색이 되어나오는 것을 볼수 있었고, Dot blot analysis에서는 감염된 상층액내에서 signal이 감염된 세포의 cell lysate보다 signal이 약한 것으로 보아 상층액중에는 재조합 단백질이 거의 secretion되지 않는다는 것을 확인하였다.

6. 재조합 바이러스(Bac-gD)를 Sf9 세포에 감염시켜 Western blotting을 한 결과 58kDa, 45kDa에 해당하는 재조합 단백질을 확인할 수 있었다.

VI. 참고문헌

- Audonnet, J. C., J. Winslow., G. Allen and E. Paoletti. 1990. Equine herpesvirus type 1 unique short fragment encodes glycoproteins with homology to herpes simplex virus type 1 gD, gI, and gE. *J. Gen. Virol.* 71 : 2969-2978.
- Cohen, G. H., M. Dietzchold., M. Ponce de Leon., D. Long., E. Golub., A. Varrichio., L. Pereira and R. J. Eisenberg. 1984. Localization and synthesis of an antigenic determinant of herpes simplex virus glycoprotein D that stimulates the production of neutralizing antibody. *J. Virol.* 49 : 102-108
- Colle, C. F., C. C. Flowers and D. J. O'Callaghan. 1992. Open reading frames encoding a protein kinase, homolog of glycoprotein gX of pseudorabies virus, and a novel glycoprotein map within the unique short segment of equine herpesvirus type 1. *Virol.* 188 : 545-557
- Elizabeth, A. R. T., Moria., S. Watson., K. McBride and A. J. Davison. 1992. The DNA sequence of Equine herpesvirus 1. *Virol.* 189 : 104-316.
- Feenstra, V., Hodaic, M and Johnson, D. C. 1990. Deletions in Herpes simplex virus glycoprotein D define non-essential and essential domains. *J. Virol.* 64 : 2096-2107
- Flowers, C. C., E. M. Eastman and D. J. O'Callaghan. 1991. Sequence analysis of a glycoprotein D gene homolog within the unique short segment of the EHV-1 genome. *Virol.* 180 : 175-184.
- Ghiasi, H., Nesburn, A. B., Kaiwar, R and Wechsler, S. L. 1991. Immunoselection of recombinant baculoviruses expressing high levels of biologically active herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. *Arch. Virol.* 121 : 163-178
- Henry, B. E., R. A. Robinson., S. A. Dauenhauer., S. S. Atherton., G. S.

Hayward and D. J. O'Callaghan. 1981. Structure of the genome of equine herpesvirus type 1. *Viol.* 115 : 97-114

Honess, R. W and D. H. Watson. 1977. Unity and diversity in the herpesviruses. *J. gen. Virol.* 37 : 15-38

Johnson, D. C and M. W. Ligas. 1988. Herpes simplex viruses lacking gD are unable to inhibit virus penetration : quantitative evidence for virus-specific cell surface receptors. *J. Virol.* 62 : 4605-4612

Krishna, S., Blacklaws, B. A., Overton, H. A. 1989. Expression of glycoprotein D of herpes simplex virus type 1 in a recombinant baculovirus : protective responses and T cell recognition of the recombinant-infected cell extract. *J. Gen. Virol.* 70 : 1805-1814

Laemmli, U. K. 1973. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage 14. *Nature*, 227 : 680-685

Ligas, M. W and D. C. Johnson. 1988. A herpes simplex virus mutant in which gD sequences are replaced by β -galactosidase sequences binds to but is unable to penetrate into cells. *J. Virol.* 62 : 1486-1494

Love, D. N., Bell, c. w., Pye, D. 1993. Expression of equine herpesvirus 1 glycoprotein D by using a recombinant baculovirus. *J. Virol.* 67 : 6820-6823.

Maniatis, T., E. F. Fritsch and Sambrook. 1982. *Molecular cloning, A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY. USA.

Matsuura, Y., R. D. Possee., H. Overton and D. H. L. Bishop. 1987. Baculovirus expression vector : The requirements for high level expression of proteins including glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 68 : 1233-1250

Mullis, K. B and Faloona F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155 : 335-350

- Nishmori, T., T. Imada., M. Sakuri., H. Kitabayashi., H. Kawamura and Nakajima. 1987. Restriction endonuclease analysis of Aujeszky's disease virus isolated in Japan. *Jpn. J. Sci.* 49 : 365-367.
- O'Callaghan, D. J., Harty, R. N. 1992. Equine herpesviruses. encyclopedia of virology. Academic Press. 1 : 423-429
- Pebal, B. 1988. A practical guide to molecular cloning, 2nd Ed. A wiley-Interscience publication. New York. USA.
- Peeters, B., N. deWind., M. Hoojsma., F. Wagenaar., A. Gielkens and R. Moormann. 1992. Pseudorabies virus envelope glycoproteins gp50 and gII are essential for virus penetration, but only gII is involved in membrane fusion. *J. Virol.* 66 : 894-905.
- Purdy, C. W., Ford, S. J., Porter, R. C. 1977. Equine rhinopneumonitis vaccine : immunogenicity and safety in adult horses, including pregnant mares. *Am. J. Vet. Res.* 39 : 377-383.
- Roizman, B. 1982. The family herpesviridae. General description, taxonomy and classification. *The Herpesvirus 1* : 1-23
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 : 487-491
- Shimizu, T., R. Ishizaki., S. Ishi., Y. Kawakami., T. Kaji., K. Sugimura and M. Matumoto. 1959. Isolation of equine abortion virus from natural cases of equine abortion in horse kidney cell culture. *Jap. J. Exp. Med.* 29 : 643-649
- Soehner, R. L., G. A. Gentry and C. C. Randall. 1965. Some physiochemical characteristics of EHV nucleic acid. *Viol.* 26 : 394-405
- Thomsen, D. R., Post, L. E and Elhammer, A. P. 1990. Structure of O-glycosidically linked oligosaccharides synthesized by the insect cell line Sf9. *J. Cell. Biochem.* 43 : 67-79.

Towbin, H., Staehelin, T and 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.

Telford, E. A. R., Watson, M. S., McBride, K., Davison, A. J. 1992. The DNA sequence of equine herpesvirus-1. Virol. 189 : 304-316

Vail, C. D. 1993. Herpesvirus infection of horse. Equine Practice. 15 : 19-22

vanDrunen Littel-van den Hurk, S., Parker, M. D., Fitzpatrick, D. R. 1991. Expression of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV by recombinant baculovirus and analysis of its immunogenic properties. J. Virol. 65 : 263-271.

조길제. 김봉한. 이두식. 신태균. 양기천. 임윤규. 조성수. 1995a. 말 비페럼 바이러스에 대한 혈청학적 역학조사. 대한수의학회지. 제35권, 제4호, 735-741.



조길제. 김봉한. 이두식. 오문유. 오미희. 1995b. 국내분리 말 비페럼 바이러스의 특성 및 면역원성조사. 대한수의학회지. 제35권, 제4호. 743-752.

조길제. 김봉한. 소신희. 이두식. 1995c. 말 비페럼 바이러스의 실험동물에 대한 면역원성 조사. 대한수의학회지. 제35권, 제4호. 753-758.

감사의 글

이 논문이 쓰여지기 까지 아낌없이 후원해 주신 은사 이두식 교수님께 감사를 드립니다. 아울러 논문을 정성껏 심사해주신 정종태 교수님, 신태균 교수님께 감사드립니다. 그리고 절위해 항상 곁에서 돌봐주신 수의과학 검역원의 현방훈 선생님께 어떻게 감사를 드려야 할 질 모르겠습니다. 너무도 많은 것을 알려주셨고 저에게는 큰 나무와 같은 그분을 정녕 잊지 않겠습니다. 그리고 언제나 곁에서 돌봐주신 송재영 연구관님 저에게는 생명의 은인과도 같은 분이기에 어찌 감사를 드려야 할지 모르겠습니다. 그리고 손위 형같은 차상호 선생님, 언제나 넉넉하신 박종현 선생님, 안동준 선생님의 넉살이 그리워 집니다. 언젠고 제가 살아가는 한 이분들의 따뜻한 정을 잊지 않을 것입니다. 그리고 언제나 어머니 같은 최윤녀 아주머니의 정 또한 영원히 잊지 않을 것입니다. 내 몸은 멀리 있지만 아주머니의 마음을 저의 가슴속에 넣어 가니 세상이 아무리 혹하게 나를 몰아쳐도 내 마음만은 언제나 따뜻하리라 생각합니다. 그리고 너무도 오랫동안 떨어져 있으면서도 당신의 손, 발이 부르트도록 흠을 만지시면서도 언제나 저의 안부를 먼저 생각해주는 부모님, 정말 감사합니다. 또한 언제나 당신이 바쁜 와중에도 언제나 동생의 안위를 안타까와 하시며 격려해주신 나의 사랑하는 형님, 형수님에게 감사드립니다. 타향에 나와 있으면서 언제나 항상곁에서 나를 다독여준 내 사랑하는 여인 정연희에게 진심으로 감사와 사랑의 마음을 전합니다. 그리고 실험실에서 삶의 혹독함을 깨우치며 살아가는 내 사랑하는 후배 환규, 그리고 종진에게 감사의 마음을 전합니다.