

碩士學位論文

돼지 유행성 설사증 바이러스의
야외 발생주와 백신주간의 유전학적 분석

Genetic Analysis of Porcine Epidemic

Diarrhea Virus (PEDV)

Field Isolates and Vaccine Strain



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

濟州大學校 大學院

獸醫學科

李昌熙

2000年 2月

돼지 유행성 설사증 바이러스의
야외 발생주와 백신주간의 유전학적 분석

指導教授 李斗植

李昌熙

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

1999年 12月



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

李昌熙의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長

이종희



委

員

이준환



委

員

이득석



濟州大學校 大學院

2000年 2月

초 록

돼지 유행성 설사증 바이러스의 야외 발생주와 백신주간의 유전학적 분석

(지도교수: 이두식)

이 창 희

제주대학교 대학원 수의학과



돼지 유행성 설사증(Porcine Epidemic Diarrhea; PED) 바이러스의 유전학적 특성을 조사하고자 1997년부터 1999년까지 국립수의과학검역원에 병성감정 의뢰되어 PED로 진단된 자돈의 분변 또는 소장 시료와 PED 바이러스 표준주(CV777) 및 일본 백신주에서 특이 primer set를 이용한 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 실시하여 PED 바이러스의 nucleocapsid(N) gene의 일부를 증폭하였다. 이 PCR 증폭산물들을 각종 제한효소로 처리하여 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 분석을 실시하였다. 또한 국내에서 발생된 바이러스의 염기 및 아미노산 서열을 분석하여 표준주, 일본 백신주와 비교 분석하였다.

설정된 조건으로 RT-PCR를 실시하여 agarose gel상에서 특이 유전자의 증폭을 확인한 결과 야외 발생 시료, 표준주 및 백신주 모두에서 691bp의 특이 유전자가 증폭되었으며, PED 바이러스 이외의 다른 바이러스에서는 특이적인 band가 검출되지 않아 이 확립된 RT-PCR 방법이 PED virus의 N gene 증폭에 특

이적임을 확인하였다.

PCR 증폭산물을 제한효소로 처리하여 각각의 RFLP pattern을 비교 분석한 결과 대부분의 국내 발생주는 일본 백신주와 다른 양상을 보였으나, 2개의 야외 발생주(97-160, 98-53)는 3종의 제한효소(*Asp*LE I, *Msp*R9 I, *Hga* I) 처리에서는 일본 백신주와 동일한 양상을 보였다. 제한효소 *Tru*9 I으로 처리하였을 경우에는 모든 국내 발생주가 발생연도에 상관없이 일본 백신주 및 표준주와 구별되는 RFLP pattern을 나타내어 유전적 감별이 가능하였다. 국내 발생주간의 비교에서는, 97년도에 발생한 경우와 최근 98-99년도에 발생한 경우가 서로 다른 양상을 나타내었다.

국내 발생주의 염기서열 분석 결과 표준주인 CV777과는 95%의 homology를 보였으며 일본 백신주와는 93-94%의 homology를 보였다. 국내 발생주간의 염기서열 비교에서는 96-99%의 homology를 보이고 있으나 RFLP pattern이 서로 다른 발생주간의 homology는 99%을 보이고 있어 RFLP pattern의 차이가 sequence homology에는 큰 영향을 나타내지 않았다. 아미노산 서열 분석은 염기서열과 유사한 결과를 보였으나, 국내 발생주와 일본 백신주의 비교에서는 염기서열 homology보다 더 낮은 89-90%의 homology를 보여 아미노산에 대한 변화가 더 뚜렷함을 확인하였다

이 연구에서 확립된 RT-PCR 기법을 이용할 경우, 야외 감염 시료를 대상으로 신속하게 PED 감염을 진단할 수 있을 것으로 판단되며, 본 연구에서 사용된 제한 효소를 이용한 RFLP 분석은 야외 발생주와 백신주의 감별 등 바이러스간 특성구명에 유용할 것으로 사료된다. 그리고, 국내 발생주는 RFLP와 염기서열 및 아미노산 분석 결과 일본 백신주와 유전학적으로 차이를 보였으며 국내 발생주간의 비교에서도 RFLP pattern의 차이를 확인할 수 있어 발생시기 또는 지역 별로 PED 바이러스가 지속적으로 변이가 진행되고 있는 것으로 판단된다.

주요어 : 돼지 유행성 설사증 바이러스, 중합효소 연쇄반응, 제한 효소, RFLP 분석, sequence homology.

목 차

I. 서	론	6
II. 재료 및 방법		14
1. 바이러스 및 야외 시료		7
2. PEDV RNA 추출		7
3. Oligonucleotide primer 합성		10
4. 증합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction: PCR)		11
5. Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP)		12
6. Agarose gel로부터 DNA 정제		13
7. 염기서열 분석		14
III. 결	과	29
1. RT-PCR		18
2. RFLP 분석		23
3. 염기서열 분석		29
IV. 고	찰	34
V. 결	론	36
VI. 참	고 문 헌	44
VII. 영	문 초 록	46



I. 서 론

돼지 유행성 설사증(porcine epidemic diarrhea; PED)은 어린 자돈 뿐만 아니라 비육돈에서도 구토, 식욕부진, 원기저하 및 수양성 설사를 야기 시키는 돼지 급성 전염성 설사병이다(DeBouck와 Pensaert, 1980; Turgeon 등, 1980; Dea 등, 1985; Timoney 등, 1988; Pensaert, 1999). 그리고 연령에 따른 병원성의 차이가 극명한 특징을 보여 성돈에 감염시 미약한 증상을 보이다 1주일 정도 경과하면 회복되지만, 일령이 어릴수록 피해가 심하여 주로 1주령 이하의 포유자돈에서는 심한 설사와 급격한 탈수를 유발하여 높은 폐사율을 보이며 3일령 이하의 자돈은 폐사율이 거의 100%에 달한다(Pijpers 등, 1993; Pensaert, 1999; 강 등, 1994) 그러나 돼지 유행성 설사증 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus; PED virus)는 자돈보다는 성돈의 장에서 더 쉽게 증식하기 때문에 발생기간 동안 성돈에서 더 높은 이환율을 보이게 된다(Pensaert, 1999).

PED는 1971년 영국에서 최초로 포유자돈을 제외한 육성 및 비육돈에서 발생되었고, 그 후 1976년 같은 영국에서 포유자돈을 포함한 전일령에서 급성 설사증이 발생하여 전자를 epidemic viral diarrhea (EVD) type I, 후자를 EVD type II로 구분하여 명명하였다(Oldham, 1972; Wood, 1977). 그 후 1978년 coronavirus-like agent가 type II 발생과 관련이 있다는 것이 밝혀졌으며(Chasey와 Cartwright, 1978; Pensaert와 DeBouck, 1978), 1982년 EVD type I 과 typeII가 같은 coronavirus에 의한 것으로 밝혀져 PED로 명명하였다(Pensaert 등, 1982). 그 후 벨기에, 독일, 프랑스, 네덜란드 등 유럽 여러 나라에서 발생보고 되었고(Pensaert 등, 1982), 아시아 지역에서는 1983년 일본에서 발생보고 된 바 있다(Takahashi 등, 1983). 국내에서는 최초로 1992년에 발생보고 되었으나(박 등, 1993; 권 등, 1993) 그 이전인 1987년에 이미 국내에 PED가 유입되어 발생했다는 것이 확인되었으며(박과 이, 1997), 현재까지 전국적으로 매년 발생하여 양돈 농가에 많은 경제적 피해를 입히고 있다.

PED의 원인체는 *Nidovirales*, *Coronaviridae*의 coronavirus 속에 포함된 PED virus이다(Chasey와 Cartwright, 1978; Pensaert와 DeBouck, 1978; Lai와 Cavanagh, 1997; Pensaert, 1999). PED virus는 포유동물에 감염되는

coronavirus 중 돼지 전염성위장염 바이러스(transmissible gastroenteritis virus; TGEV), 돼지 호흡기 코로나바이러스(porcine respiratory coronavirus; PRCV), 개 코로나바이러스(canine coronavirus; CCV), 고양이 전염성 복막염 바이러스(feline infectious peritonitis virus; FIPV) 등과 함께 antigenic group 1로 분류되며 소 코로나바이러스(bovine coronavirus; BCV), 쥐 간염 바이러스(murine hepatitis virus; MHV), 돼지 혈구응집성뇌염 바이러스(porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus; HEV)는 group 2로 분류된다(McIntosh, 1983; Holmes, 1985; Yaling 등, 1988; Duarte 등, 1993; Lai와 Cavanagh, 1997). 돼지에 감염되는 주요 coronavirus인 PED virus, TGEV 그리고 PRCV는 모두 group 1에 속하는 바이러스로 서로 유사한 유전자 구조를 가지고 있으나 PRCV는 TGEV의 spike gene 중 일부가 결손 되어 있으며 PED virus는 TGEV와 PRCV와는 달리 open reading frame(ORF) 3이 분화되어 있지 않고 또한 ORF 7이 결손 되어 있는 것이 주요한 차이이다(Duarte 등, 1993; Paul 등, 1994; Lai와 Cavanagh, 1997)(Fig. 1).

PED virus는 크기가 95-190 nm로 envelope와 곤봉상의 spike를 갖는 다형태의 구형 바이러스이다. PED virus는 16-21 kilobase pair(kbp)의 single strand (+) sense RNA genome을 가지며 3종의 주요 구조 단백질 즉, 85-135 kilodalton(kDa)의 glycosylated spike(peplomer, S) protein, 20-32 kDa의 glycosylated membrane(M) protein, 그리고 58 kDa의 unglycosylated RNA-binding nucleocapsid(N) protein으로 구성되어 있다(Egberink 등, 1988; Hofmann과 Wyler, 1989; Pensaert, 1999).

Coronavirus의 구조 단백질중 N protein은 genomic RNA와 결합된 나선형의 RNA-binding nucleocapsid protein(RNP)을 형성한다. RNP내 N protein은 ribonuclease로부터 RNA genome을 보호하며 또한 viral RNA의 합성을 조절한다(Linda, 1993; Lai와 Cavanagh, 1997). N protein 내 변이는 바이러스의 안정성과 생존성에 영향을 줄 수 있으며 실제로 MHV 중 온도에 민감한 변이주인 경우 N protein 내 결손 또는 변이가 있었다고 보고된 바 있다(Koetzner 등, 1992; Peng 등, 1995; Lai와 Cavanagh, 1997). PED virus의 N gene은 다른 유전자 부위에 비해 변이가 적은 안정적인 부위로 3'말단으로부터 2개의 conserved motif,

즉 TTAAAC와 CTAAAC가 존재한다(Duarte 등, 1993; Tobler 등, 1994). PED virus의 N gene을 분석한 결과 같은 돼지 코로나바이러스인 TGEV보다는 human respiratory coronavirus인 HCV 229E와 유전학적으로 더 관련이 있었다고 보고하였다(Duarte와 Laude, 1994; Duarte 등, 1994). 또한 일본 야외에서 PED가 발생한 자돈의 소장 샘플을 이용한 RFLP 분석결과 국내 분리주와 그 양상이 동일하였으며 N gene 일부에 대한 염기서열 분석결과, 1996년에 분리된 일본 분리주가 1993년에 분리된 국내 분리주와 100% 일치한다고 보고된 바 있다(Kubota 등, 1999).

PED virus는 1971년 발생보고 된 이후 배양세포 내에서의 증식이 어려웠으나 1988년 배지에 trypsin을 첨가함으로써 Vero 배양 세포에서 증식이 성공되었으며, Vero 배양 세포에 적용된 PED virus는 공포와 합포체 형성을 포함한 세포변성 효과(cytopathic effect, CPE)를 나타낸다고 보고하였다(Hofmann과 Wyler, 1988; Kusanagi 등, 1992). 배양 세포내에서 trypsin의 작용 기전은 interferon 생산을 억제하고 바이러스 단백질의 cleavage를 도와 세포내 감염에 기인하며, MHV와 같은 일부 coronavirus에서도 spike glycoprotein을 2개의 subunit로 분열시켜 바이러스의 흡착과 침투를 촉진시키며(Struman 등, 1985), 또한 배지 내 trypsin 존재는 감염을 일으키는 여러 바이러스에 필수적인 요소로 특히 TGEV와 BCV의 분리 배양은 세포 배양 배지에 trypsin을 첨가함으로써 촉진된다고 보고하였다(Dea 등 1980; Storz 등, 1981; Hirano 등, 1985; Komaniwa 등, 1986). 국내에서는 1993년 권 등에 의해 Vero 배양 세포에서 trypsin 존재 하에 수양성 설사와 탈수를 주증으로하여 폐사한 자돈의 소장에서 PED virus를 분리하여 보고한 바 있으며 이어 권 등(1998)이 추가로 PED virus를 분리하여 보고하였다.

PED virus의 잠복기는 12-40시간으로 일단 농장내 PED가 발생하면 급속하게 돈군에 전파됨으로써 2-3일 내에 대부분의 돼지가 감염된다. 바이러스는 대부분의 소장 용모상피세포 및 일부 결장 상피세포에 친화성이 있어 감염되면 소장 용모 상단의 성숙한 상피세포를 파괴하게 되며, 이에 대한 보상작용으로 미성숙한 용모 상피세포가 급격히 증식하여 용모를 재생하게 된다. 따라서 흡수불량과 분비과다로 장내 체액의 양이 증가하여 설사가 발생하게 되며 어린 자돈인 경우 용모가 재생되기도 전에 심한 설사와 급격한 탈수로 폐사에 이르게 된다(Moon,

1978; DeBouck 등, 1981a; Pensaert, 1999).

이에 따라, PED와 같은 급성 설사병의 경우 효과적인 방역을 위해서는 신속, 정확한 진단이 필수적이다. 그러나 PED는 특징적인 임상조건이 TGE, Porcine rotavirus 등과 유사하며 특히 TGE와는 임상증상, 병리학적 소견 및 원인 바이러스 입자의 형태 또한 유사하여 반드시 실험실내에서의 감별 진단이 요구된다 (Thake, 1968; Horvath와 Mocsari, 1981; Coussement 등, 1982; Pensaert, 1999). PED 진단법으로는 형광항체법(direct immunofluorescent antibody test, FA), 전자현미경법(electron microscopy, EM), 효소 면역항체 검사법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 바이러스 분리동정법 등이 보고되어 있다 (DeBouck 등, 1981a, b; Pensaert, 1999). 최근에는 유전자 진단법으로 PED virus의 핵산을 증명하는 *in situ* hybridization(박 등, 1998), 증합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)이 이용되고 있다. PCR의 경우 고가의 시약을 사용하는 단점이 있으나 신속하고 특이성이 높으며, 특히 TGE와 감별이 용이하기 때문에 진단목적으로 많이 이용되고 있다(Ishikawa 등, 1997; 류 등, 1997). PED에 대한 항체 진단법으로는 간접 형광항체법(indirect immuno fluorescent antibody test, IFA), ELISA, 혈청중화시험(serum neutralization test)등이 이용되고 있다(Pensaert, 1999; 류 등, 1997). 혈청중화시험으로는 돈군내 순환 감염을 증명할 수 있으며(박 등, 1998) blocking ELISA는 감염 후 7일, fixed cell ELISA는 감염 후 14일에 처음 PED virus에 대한 항체를 검출할 수 있다고 보고된바 있다(Hofmann과 Wyler, 1990; Van Niuewstadt와 Zetstra, 1991; Carvajal 등, 1995; 박 등, 1998). 또한, 국내에서 권 등(1994)은 ELISA법을 이용하여 돼지에 대한 항체 검사 결과 약 45%의 항체 양성율을 나타내었다고 보고하였다.

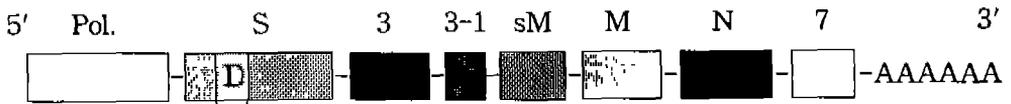
국내 설사병 발생 상황을 보면 96-97년도 바이러스와 관련된 설사병중 32%가 PED로 진단되었으며, 그 중 79.6%가 7일령 이하의 포유자돈에서 발생하여 그 피해가 가중되었다. 그러나 TGE는 최근 발생이 감소 추세이고 백신에 의해 어느 정도 방제가 되고 있는 것으로 판단되지만 PED의 경우는 1992년 발생보고 이후 매년 증가 추세에 있으며 특히 TGE와 PED 복합 감염이 증가하여 피해를 더욱 가중시키고 있다(박 등, 1998). 또한 PED는 외부온도에 약한 바이러스의

특성상 주로 동절기에 발생하였으나 혈청 중화시험을 이용한 돈군내 순환 감염을 증명한 결과 계절적 유행시기(10월-3월초) 이후에도 농장내 지속적으로 상재화 되는 경향을 보이며 이유 후 산발적인 돼지 설사병의 한 원인이라고 보고하였다(박 등, 1998). 또한 예방을 위해 국내 개발 백신과 일본 수입 백신이 사용되고 있지만 백신 접종에 따른 예방효과가 뚜렷하지 않은 실정이며 이로 인해 농장에서는 PED 발생시 인공감염을 통한 모든 면역이 보편화되고 있다.

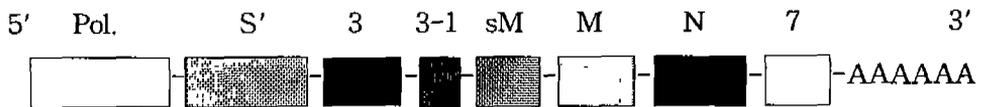
본 연구에서는, 국내에서 설사병으로 폐사한 돼지의 소장 또는 설사 분변에서 PED를 신속하게 진단하기 위한 reverse-transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) 기법을 확립하였고 실제 야외 발생주와 백신주에 적용하여 PED virus의 N gene을 증폭하였다. 증폭된 N gene을 이용하여 야외 발생주의 유전학적 특성을 규명하기 위해 제한효소를 이용한 RFLP 분석을 실시하였다. RFLP 분석결과 차이를 나타내는 야외 발생주에 대한 염기서열 분석 및 아미노산 서열 분석을 통하여 야외 발생주와 일본 백신주 및 표준주의 유전학적 차이를 비교 분석하였다.



TGEV



PRCV



PEDV



Fig. 1. Comparative genome structure of Porcine Coronaviruses. Pol. : Polymerase gene, S : Spike gene, D : Deleted region, S' : Partial deletion of nucleotide from S gene of TGEV, 3 : ORF 3 gene, 3-1 : ORF 3-1 gene, sM : Small membrane gene, M : Membrane gene N : Nucleocapsid gene, 7 : ORF 7 gene, NS gene : Non-structural gene (Paul 등, 1994; Lai와 Cavanagh, 1997).

II. 재료 및 방법

1. 바이러스 및 야의 시료

공시 바이러스는 Dr. Pensaert로부터 공여받은 PED virus CV777 표준주 (Pensaert와 DeBouck, 1978), PED 일본 백신주(NISSEIKEN CO., LTD., Tokyo, Japan), TGE virus(평택주), porcine rotavirus(OSU strain), 그리고 배양 세포로는 Vero cell line(african green monkey kidney cell)를 사용하였다. PED 바이러스에 대한 핵산 추출 재료로는 1997년부터 1999년까지 국립수의과학검역원 병리진단과에 의뢰되어 형광항체법에 의해 돼지 유행성 설사증으로 판명된 13개의 소장 또는 분변재료를 RT-PCR과 RFLP 분석에 사용하였다(Table 1).

2. PED virus RNA 추출

돼지 유행성 설사증 바이러스의 RNA를 추출하기 위해 CV777 표준주와 일본 백신주를 Vero 세포에 감염시켜 trypsin이 첨가된 α -MEM(0.3% Tryptose phosphate broth, 0.02% yeast extract, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trypsin, Gibco)에서 24-48시간 배양한 후 CPE를 확인한 후 얼리고 녹이는 과정을 3회 반복한 후에 배양액을 이용하였다. 분변과 1.5 ml tube에서 간단히 세절한 소장 시료는 동일한 양의 α -MEM으로 희석하여 1분 동안 교반한 후 원심한 상층액을 이용하였다. RNA 추출방법은 Chomczynski와 Sacchi(1987)가 보고한 single-step RNA isolation method (TRIzol[®] Reagent, Gibco)를 이용하였다. 시료 250 μl 에 0.75 ml의 TRIzol[®] Reagent을 넣고 5분 동안 실온에 정치한 후 200 μl chloroform을 첨가하여 잘 섞은 다음 다시 실온에서 10분간 정치하였다. 이것을 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 다른 tube에 옮기고 0.5 ml isopropanol을 첨가하여 실온에 10분간 정치하였다. 다시 12,000 rpm에서 10분간 원심한 후 상층액을 버리고 tube에 바닥에 가라앉은 pellet을 75% cold ethanol로 2회 세척하여 진공 건조시켰다. 건조된 pellet을 적당량의 Diethylpyrocarbonate (DEPC) 처리된 증류수에 용해시켜 RNA template로 사용하였다.

Table 1. Field outbreak samples*, vaccine strain, and reference strain of PED virus used in this study.

Samples No.	Regional Distribution
97-128 (1997)	Chungnam
97-138 (1997)	Chungbuk
97-151 (1997)	Chungnam
97-160 (1997)	Kyungbuk
98-14 (1998)	Kyunggi
98-19 (1998)	Kyungnam
98-53 (1998)	Kyunggi
98-81 (1998)	Cheju
98-125 (1998)	Chungnam
99-32 (1999)	Kyunggi
99-98 (1999)	Kyunggi
99-158 (1999)	Kyungnam
99-188 (1999)	Kangwon
vaccine strain**	Japan
CV777 strain**	Belgium

* Field outbreak samples were collected from piglets suffered PED virus infection from 1997 to 1999.

** Tissue culture adapted porcine epidemic diarrhea virus strain.

() Year of samples collected.

2. Oligonucleotide primer 합성

돼지 유행성 설사증 바이러스를 증폭하기 위해 coronavirus의 conserved region인 N gene에서 1 set의 oligonucleotide primer를 합성하였다. PED virus F1은 N gene의 593-612 bp, PED virus R1은 1264-1283 bp로 691 bp의 PED virus 특이 유전자를 증폭 할 수 있는 부위를 선택하였다(Table 2).

3. RT-PCR

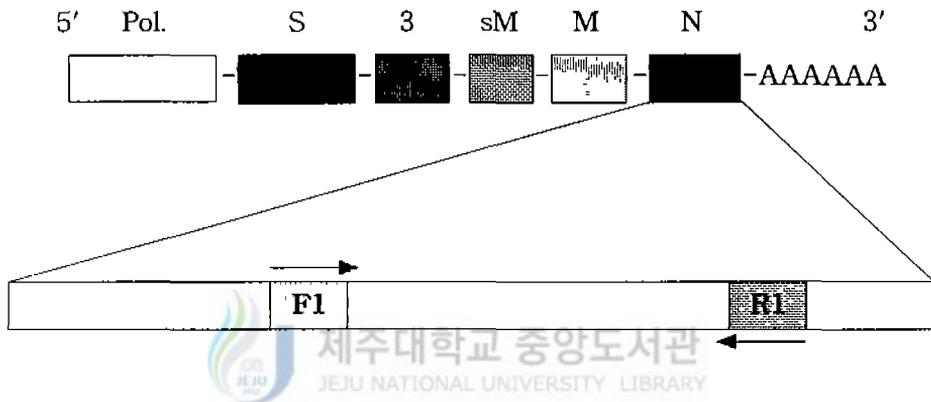
1) PED virus cDNA 합성

추출된 RNA template 10 μ l에 reverse primer 1 μ l를 첨가하고 5분 동안 끓인 후 얼음에 급속히 냉각시켰다. 냉각된 RNA에 20 μ l DEPC-treated D.W, 10 μ l 5 \times first strand buffer(250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, Gibco, USA)와 5 μ l 0.1 M dithiothreitol(DTT), 2 μ l 10 mM dNTP (Promega), 1 μ l RNase inhibitor(RNasin 40 U/ μ l, Promega), 1 μ l M-MLV Reverse transcriptase(200 U/ μ l, Gibco, USA)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에 60분 동안 반응 시켰다. 합성된 cDNA는 -20 $^{\circ}$ C에 보관하면서 PCR에 사용하였다.

2) 반응조건

PCR용 tube에 25 μ l reaction buffer mixture(50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 2.5 U Taq polymerase, Boehringer Mannheim), 1 μ l forward primer, 1 μ l reverse primer, 5 μ l cDNA, 18 μ l PCR grade sterile water를 첨가하여 총 용량이 50 μ l가 되도록 하여 GeneAmp PCR system 2400(Perkin Elmer, USA)에서 PCR을 실시하였다. PCR 반응 조건은 pre-denaturation을 95 $^{\circ}$ C에 5분간 실시한 다음, 52 $^{\circ}$ C에 45초, 72 $^{\circ}$ C에 1 분, 95 $^{\circ}$ C에 45초씩 30 cycle을 반복한 후, post-extension을 52 $^{\circ}$ C에 45 초, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 실시하여 증폭시켰다.

Table 2. Construction of primer set for the amplification of PED virus N gene. A 691 bp of N gene was amplified by RT-PCR using primer F1 and R1.



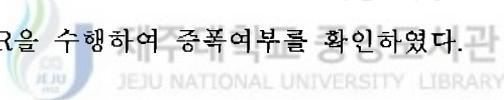
Primers	Nucleotide Sequences	Position of Primer
PED virus F1	5'-ACA AGT CTC GTA ACC AGT CC-3'	593-612bp of N gene
PED virus R1	5'-GTA TCA CCA CCA TCA ACA GC-3'	1264-1283bp of N gene

3) PCR products의 확인

PCR 증폭 산물 10 μ l를 1 μ l gel loading buffer(30% glycerol, 0.4% orange G, 0.01 M Tris, 0.1 M EDTA)와 혼합한 다음 2% agarose gel상에서 TAE buffer(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 사용하여 120V에서 30분간 전기영동을 실시하고 ethidium bromide(EtBr)로 염색하였다. 증폭 산물을 확인하기 위해 100bp DNA Ladder(Gibco)를 molecular size marker로 사용하였고 전기영동 후 UV transilluminator로 PED virus에 대한 특이적 band를 확인하였다.

4) RT-PCR의 특이성 확인

PED virus의 특이 유전자를 증폭하기 위한 RT-PCR의 특이성을 알아보기 위해 바이러스 비접종 Vero 세포 배양액과 같은 돼지 코로나바이러스인 TGE virus(평택주)와 porcine rotavirus(OSU strain)를 대상으로 RNA를 추출하여 동일한 방법으로 PCR을 수행하여 증폭여부를 확인하였다.



4. RFLP 분석

RFLP는 RT-PCR로 증폭된 DNA product를 4종의 제한효소(Table 3)로 소화시켜 agarose gel상에서 전기영동을 실시하여 분석하였다. PCR product 10 μ l, 10 \times buffer 2 μ l, 증류수 7 μ l, 각각의 제한효소 1 μ l(*Asp*LE I, *Tru*9 I, *Msp*R9 I, Bioneer; *Hga* I, New England Biolab)을 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 처리한 후 2% agarose상에서 전기영동을 실시하여 백신주와 표준주의 cleavage pattern과 비교 분석하였다. 또한 그 중 상이한 양상이 나오는 샘플은 정제하여 염기서열 분석을 실시하였다.

Table 3. Recognition site of restriction enzymes used in RFLP analysis.

Restriction Enzyme	Recognition Site Sequences
<i>Asp</i> LE I	GCG↓C
<i>Tru</i> θ I	T↓TAA
<i>Msp</i> Rθ I	CC↓N*GG
<i>Hga</i> I	↓N(10)GCGTC

* Nucleotide sequences

5. Agarose gel로부터 DNA 정제

Vogelstein과 Gillespie(1979)의 방법을 응용한 GENE CLEAN II® Kit(Bio 101 Inc)를 이용하여 PCR product DNA를 정제하였다. DNA 증폭산물을 1% agarose gel상에서 전기영동을 실시하여 원하는 특이적 band를 gel cutter를 이용하여 잘라내어 조각 낸 다음 microcentrifuge tube에 넣고 3배 용량의 6 M sodium iodide(NaI) 용액을 첨가하여 56°C 항온 수조에서 완전히 용해하였다. 그리고 나서 glass milk bead를 적당량(1 μg DNA/1 μl) 첨가하여 1분간 교반하고 실온에서 5분동안 정지한 후 수초간의 원심으로 bead를 침전시켜 washing buffer(NEW Concentrate 4 ml, 100% ethanol 310 ml, 증류수 280 ml)로 세척하였다. 이러한 방법으로 3회 세척 후 얻어진 bead pellet을 공기 건조시킨 후, 증류수에 용해하여 56°C 항온 수조에서 5분간 방치하고 다시 1분 동안 원심 하여 DNA를 추출하여 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다.

6. 염기서열 분석

ABI PRISM™ Dye Terminate cycle sequencing ready reaction kit(Perkin Elmer), GeneAmp PCR System 9600(Perkin Elmer), 그리고 ABI Prism™ 377 (Perkin Elmer)을 이용하여 염기서열 분석을 실시하였다. 정제된 PCR products (10-30 ng/ μl) 5 μl 를 넣고 terminate ready reaction mix 8 μl , forward primer 또는 reverse primer 1 μl , 그리고 DEPC treated water 6 μl 를 첨가하여 혼합하였다. 이 혼합물을 96°C 10초, 50°C 5초, 60°C 4분 과정을 25회 반응시킨 후 4°C에 정지하였다. 이 반응산물을 1.5 ml tube에 옮긴 후 3 M sodium acetate 2 μl , 95% ethanol 50 μl 를 첨가하여 교반하고 10분 동안 얼음에 정지시킨 후 4°C, 12,000 rpm으로 30분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 70% ethanol 250 μl 를 첨가하여 세척하였다. 그 pellet을 공기 건조시킨 후 sequencing loading buffer(5 volume deionized formamide : 1 volume 25 mM EDTA, 50 mg/ml Blue dextran) 6 μl 에 재현탁하여 90°C에서 2분 동안 가열한 후 사용할 때까지 얼음에 정지하였다.

염기서열 분석을 위해 gel cassette를 조립한 다음 4.5% acrylamide/ 6 M urea/1× TBE gel을 제작하였다. ABI PRISM™ 377(Perkin Elmer)에 gel cassette를 장착시킨 후 시료를 1680V로 7시간 동안 전기영동을 실시하였다. 염기서열 분석은 ABI PRISM™ 377 DNA sequencing analysis software를 사용하여 분석하였으며 표준주인 CV777의 염기서열은 GenBank에서 다운로드 받아 이용하였다. 국내 발생주, 백신주, 그리고 표준주와의 염기서열 및 아미노산의 homology 비교는 DNASIS program(Hitachi)을 사용하여 실시하였다.



III. 결 과

1. RT-PCR

PED 바이러스 핵산을 검출하기 위한 RT-PCR의 특이성 실험 결과 PED virus를 제외한 TGE virus, porcine rotavirus에서는 특이 유전자가 검출되지 않았다(Fig. 2). 그러나, 모든 야외 발생 시료, PED 바이러스 표준주, 그리고 백신주에서 RT-PCR을 실시한 결과 691 bp에 해당하는 특이 유전자 band를 확인하였다(Fig. 3).

2. RFLP analysis

증폭된 PCR products의 N gene을 제한효소 *Asp*LE I, *Tru*9 I, *Msp*R9 I 및 *Hga* I으로 각각 처리한 다음 전기영동을 실시하여 cleavage pattern을 비교 분석하였으며, 염기서열 결과를 근거로 각각의 band size를 계산하였다(Table 4).

Tru 9 I 처리에서는 모든 샘플에서 제한효소 절단부위가 존재하였으나, 국내 야외 발생주는 백신주, 표준주와 다른 양상을 보여 감별이 가능하였다. 백신주와 표준주는 97 bp, 162 bp, 432 bp의 동일한 band를 형성하였다. 그러나 98-14를 제외한 국내 야외 발생주는 97 bp, 135 bp, 162 bp, 297 bp의 band를 보였고, 98-14는 제한효소 절단부위 하나가 결여되어 162 bp, 232 bp, 297 bp의 band를 형성하였다(Fig. 4).

*Asp*LE I 처리에서는 국내 야외 발생주 중 97-128, 97-138, 97-160, 98-53 그리고 백신주에서 제한효소 절단부위가 존재하지 않아 본래의 크기인 691 bp의 band로 동일한 양상을 보였다. 그러나, 나머지 야외 발생주에서는 제한효소 절단부위가 존재하여 335 bp, 356 bp의 band를 형성하였으며 이와는 다르게 표준주인 CV777에서는 59 bp, 632 bp의 band를 형성하였다(Fig. 5).

Hga I 처리에서도 역시 97-128, 97-138, 97-160, 98-53이 백신주와 표준주와 함께 제한효소 절단부위가 존재하여 343 bp, 348 bp의 band를 형성하여 동일한 양상을 보였다. 나머지 야외 발생주에서는 인식부위가 존재하지 않아 691 bp의

band만을 형성하였다(Fig. 6).

*Msp*R9 I 처리에서는 5가지의 다양한 양상을 보였다. 먼저 97-160, 98-53은 백신주와 함께 93 bp, 206 bp, 392 bp의 band를 형성하여 동일한 양상을 나타내었다. 97-128과 97-138은 72 bp, 93 bp, 134 bp, 392 bp, 그리고 표준주인 CV777에서는 206 bp, 485 bp의 band를 형성하였다. 나머지 야외 발생주에서는 4부위의 제한효소 절단부위가 존재하여 59 bp, 72 bp, 93 bp, 134 bp, 392 bp의 band를 형성하였다(Fig. 7).

3. 염기서열 분석

국내 야외 발생주, 백신주, 그리고 표준주의 유전자 유사성을 알아보기 위해 국내 야외 발생주의 RFLP 분석에서 상이한 양상을 보였던 97-138(PED 138), 97-151(PED 151), 97-160(PED 160)과 일본 백신주(PEDJVAC)의 염기서열 및 아미노산 서열을 분석하였고 CV777 표준주는 GenBank(Accession No. Z14976)에서 염기서열을 다운로드 받아 homology를 서로 비교하였다(Fig. 8 & 9).

염기서열 분석에서, 국내 발생주는 표준주 CV777과는 95%의 homology를 보였으나 일본 백신주와는 93-94%의 homology를 보였다. 국내 발생주간의 비교에서는 97%와 99%를 보였으나 RFLP pattern이 다른 97-151과 97-160의 비교에서 염기서열 homology가 더 높아 RFLP pattern과 sequence homology와는 다른 결과를 나타내었다(Table 5). 아미노산 서열 분석에서도 유사한 결과를 보였지만 국내 발생주가 표준주와는 91-92%, 일본 백신주와 89-90%로 염기서열 보다 더 낮은 homology를 보였다(Table 6).

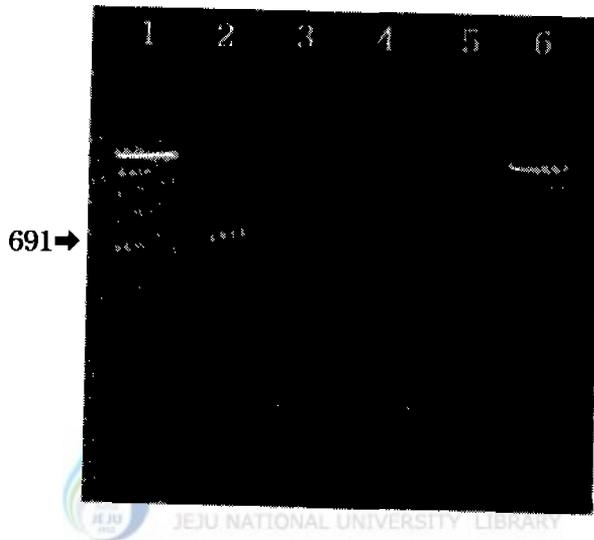


Fig 2. Specificity of the RT-PCR for the amplification of the PED virus nucleic acid was confirmed to other swine viral pathogens causing piglet diarrhea Lane 1 & 6 : 100bp DNA ladder, Lane 2 : PED virus CV777 strain, Lane 3 : TGEV, Lane 4 : porcine rotavirus, Lane 5 : Vero cell control.



Fig 3. RT-PCR amplification of N gene of PED virus from filed outbreak samples and reference strains. Lane 1 and 17 : 100bp DNA ladder, Lane 2 : 97-128, Lane 3 : 97-138, Lane 4 : 97-151, Lane 5 : 97-160, Lane 6 : 98-14, Lane 7 : 98-19, Lane 8 : 98-53, Lane 9 : 98-81, Lane 10 : 98-125, Lane 11 : 99-32, Lane 12 : 99-98, Lane 13 : 99-158, Lane 14 : 99-188, Lane 15 : Japanese vaccine strain, Lane 16 : CV777 strain

Table 4. RFLP patterns of PCR amplified N gene of field isolates, vaccine strain, and reference strain of PED virus by various restriction endonuclease digestion.

Samples	Digestion Fragment Size (bp)*			
	<i>Asp</i> LE I	<i>Tru</i> 9 I	<i>Msp</i> R9 I	<i>Hga</i> I
97-128	NC**	97, 135, 162, 297	72,93,134,392	343, 348
97-138	NC	97, 135, 162, 297	72,93,134,392	343, 348
97-151	335, 356	97, 135, 162, 297	59, 72, 93 134, 152, 333	NC
97-160	NC	97, 135, 162, 297	93, 206, 392	343, 348
98-14	335, 356	162, 232, 297	59, 93, 206, 333	NC
98-19	335, 356	97, 135, 162, 297	59, 72, 93 134, 152, 333	NC
98-53	NC	97, 135, 162, 297	93, 206, 392	343, 348
98-81	335, 356	97, 135, 162, 297	59, 72, 93 134, 152, 333	NC
98-125	335, 356	97, 135, 162, 297	59, 72, 93 134, 152, 333	NC
99-32	335, 356	97, 135, 162, 297	59, 93, 206, 333	NC
99-98	335, 356	97, 135, 162, 297	59, 72, 93 134, 152, 333	NC
99-158	335, 356	97, 135, 162, 297	59, 72, 93 134, 152, 333	NC
99-188	335, 356	97, 135, 162, 297	59, 72, 93 134, 152, 333	NC
vaccine strain	NC	97, 162, 432	93, 206, 392	343, 348
CV777	59, 632	97, 162, 432	206, 485	343, 348

* The fragment sizes (bp) were calculated on the basis of nucleotide sequencing data.

** Not cleavaged (691bp).

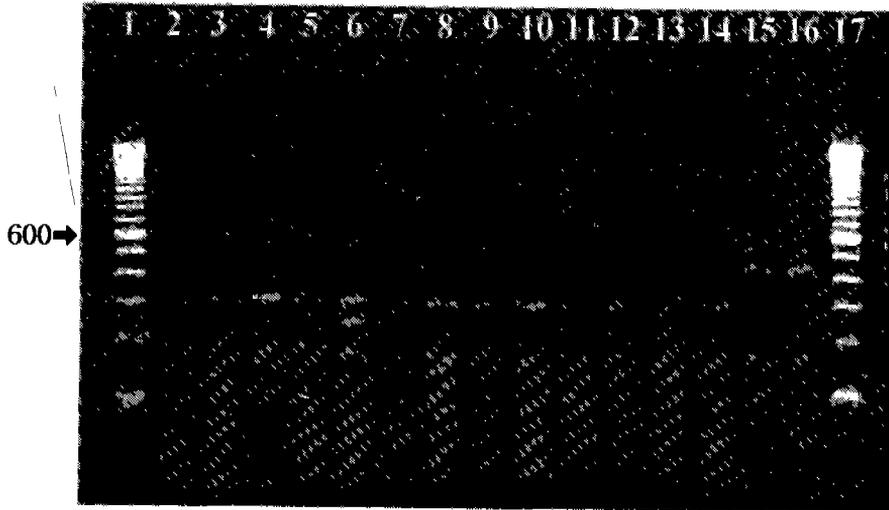


Fig 4 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns of the amplified partial N gene of PED virus digested with *Tru9 I*. Lane 1 and 17 : 100bp DNA ladder, Lane 2 : 97-128, Lane 3 : 97-138, Lane 4 : 97-151, Lane 5 : 97-160, Lane 6 : 98-14, Lane 7 : 98-19, Lane 8 : 98-53, Lane 9 : 98-81, Lane 10 : 98-125, Lane 11 : 99-32, Lane 12 : 99-98, Lane 13 : 99-158, Lane 14 : 99-188, Lane 15 : Japanese vaccine strain, Lane 16 : CV777 strain



Fig 5. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns of the amplified partial N gene of PED virus digested with *Asp*LE I. Lane 1 and 17 : 100bp DNA ladder, Lane 2 : 97-128, Lane 3 : 97-138, Lane 4 : 97-151, Lane 5 : 97-160, Lane 6 : 98-14, Lane 7 : 98-19, Lane 8 : 98-53, Lane 9 : 98-81, Lane 10 : 98-125, Lane 11 : 99-32, Lane 12 : 99-98, Lane 13 : 99-158, Lane 14 : 99-188, Lane 15 : Japanese vaccine strain, Lane 16 : CV777 strain.

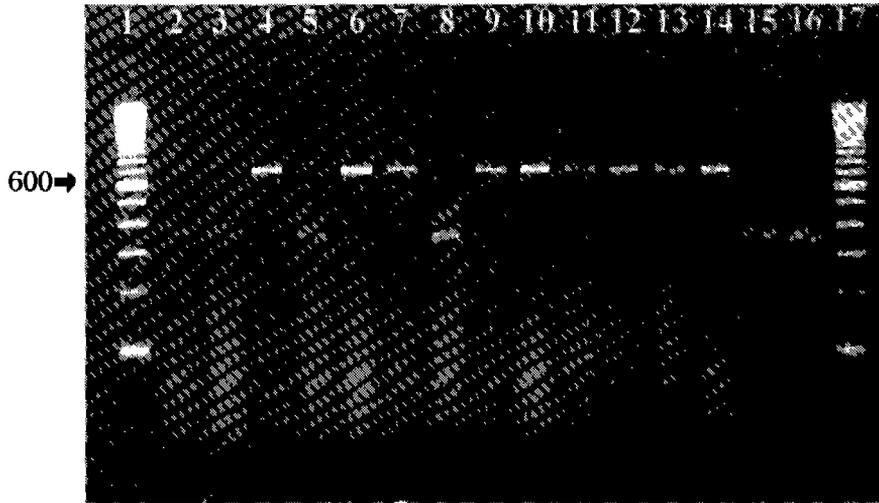


Fig 6. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns of the amplified partial N gene of PED virus digested with *Hga* I. Lane 1 and 17 : 100bp DNA ladder, Lane 2 : 97-128, Lane 3 : 97-138, Lane 4 : 97-151, Lane 5 : 97-160, Lane 6 : 98-14, Lane 7 : 98-19, Lane 8 : 98-53, Lane 9 : 98-81, Lane 10 : 98-125, Lane 11 : 99-32, Lane 12 : 99-98, Lane 13 : 99-158, Lane 14 : 99-188, Lane 15 : Japanese vaccine strain, Lane 16 : CV777 strain.

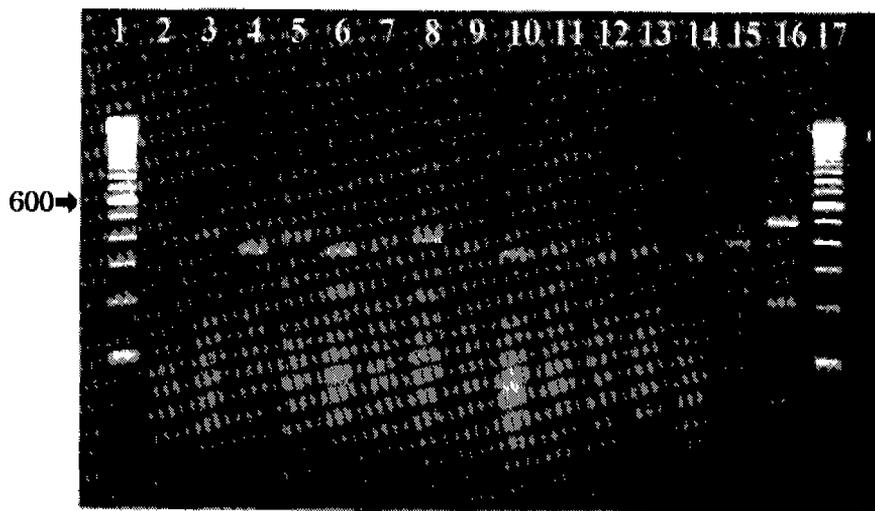


Fig. 7. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns of the amplified partial N gene of PED virus digested with *Msp*R9 I. Lane 1 and 17 : 100bp DNA ladder, Lane 2 : 97-128, Lane 3 : 97-138, Lane 4 : 97-151, Lane 5 : 97-160, Lane 6 : 98-14, Lane 7 : 98-19, Lane 8 : 98-53, Lane 9 : 98-81, Lane 10 : 98-125, Lane 11 : 99-32, Lane 12 : 99-98, Lane 13 : 99-158, Lane 14 : 99-188, Lane 15 : Japanese vaccine strain, Lane 16 : CV777 strain.

	10	20	30	40	50
PED138	GGTGTAA	CATCACGCG	ATGACCTTGGT	GCTGTCAAGG	ATGCCCTTAA
PED151
PED160	TT.....
PEDJVAC	..AA.G...	T.....	T.....
CV777	T.....	A.....

	60	70	80	90	100
PED138	ATCTTTGGGT	ATTGGAGAAA	ATCCTGACAG	ACATAAGCAA	CAGCACAAGC
PED151
PED160C.....T.	G.T..TT...GC...
PEDJVACG.....G.....
CV777G.....G.....

	110	120	130	140	150
PED138	CTCAGCAGGA	AAAGTCTGAC	AACAACGGCA	AAAATACACC	TAAGAAGAAC
PED151G.....
PED160	..A.....G.....
PEDJVAC	..A.....G..A.....
CV777	..A.....G.....

	160	170	180	190	200
PED138	AAATCCAGGG	CCACTTCGAA	GGAACGTGAC	CITAAGGACA	TCCCAGAGTG
PED151A.....
PED160A.....
PEDJVACC..A.....
CV777C..A.....

Fig. 8 Comparison of nucleotide sequences for the partial N gene of the three Korean field isolates (PED 138, PED 151, PED 160), Japanese vaccine strain (PEDJVAC), and CV777 of PED virus.

	210	220	230	240	250
PED138	GAGGAGAATT	CCCAAGGGCG	AAAATAGCGT	A_GAGCTTGC	TTCGGCCC-A
PED151-
PED160-
PEDJVACGC.....	A..C.
CV777GC.....	A..C.

	260	270	280	290	300
PED138	GGGGGGGCTT	_AGAAATTTT	GGAGATGCGG	AGTTTGTCSA	AAAAGTGTT
PED151A.....	A.....
PED160A.....	A.....
PEDJVAC	C.A.....	A.....
CV777A.....	C.A..C..	A.....



제주대학교 중앙도서관

JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

	310	320	330	340	350
PED138	GATGCGTCAG	GCTATGCTCA	GATCGCCAGT	TTGGCACCAA	ATGTTGCAGC
PED151C.....T.....
PED160T.....
PEDJVACG.....
CV777A.....

	360	370	380	390	400
PED138	ATTGCTCTTT	GGTGGTAATG	TGGCTGTTCG	TGAGCTAGCG	GACTCTTACG
PED151
PED160
PEDJVACT.....
CV777

Fig. 8. Continued

	410	420	430	440	450
PED138	AGATTACATA	TAACTATAAA	ATGACTGTGC	CAAAGTCTGA	TCCAAATGTT
PED151
PED160G..	C.....	A..	T.....
PEDJVAC	..CC.....
CV777C.....	A..

	460	470	480	490	500
PED138	GAGCTTCTTG	TTTCACAGGT	GGATGCATTT	AAAACCTGGGA	ATGCAAAACC
PED151
PED160
PEDJVAC	T.T.T...
CV777T



제주대학교 중앙도서관

	510	520	530	540	550
PED138	CCAGAGAAAG	AAGGAAAAGA	AGATCAAGCG	TGAAACCATT	CAGCAGCAGA
PED151	T.....	TT.....
PED160G.....	T.....	GC.....
PEDJVAC	A.....	CG.....
CV777	A.....	CG.T.....C

	560	570	580	590	
PED138	ATGAAGAGGT	CATCTACGAT	GATGTGGGTG	TGCGATGTGA	TGTGAC
PED151T.....	G..G..
PED160T.T.....	G..G..
PEDJVACC..A..T..	C.....	C..C..	A...
CV777C.....	C..C..C..

Fig. 8. Continued

	10	20	30	40	50
PED138	GVTSRDDLVA	AVKDALKSLG	IGENPDRHKQ	QHKPQQEKSD	NNGKNTPKKN
PED151	GVTSRDDLVA	AVKDALKSLG	IGENPDRHKQ	QHKPQQEKSD	NSGKNTPKKN
PED160	GVTSRDDLVA	AVKDALKSLG	IGENPDRLIQ	QQQPKQEKSD	NSGKNTPKKN
PEDJVAC	GM_SRDDLVA	AVNDALKSLG	IGENPDRHKQ	QQQPKQEKSD	NSGKNTPKKN
CV777	GVTSRDDLVA	AVKDALKSLG	IGENPDRHKQ	QQQPKQEKSD	NSGKNTPKKN

	60	70	80	90	100
PED138	KSRATSKERD	LKDIPWRRRI	PKGENSEV_AC	FG_RGG_RNF	GDAEFVEKGV
PED151	KSRATSKERD	LKDIPWRRRI	PKGENSEV_AC	FG_RGG_KNF	GDAEFVEKGV
PED160	KSRATSKERD	LKDIPWRRRI	PKGENSEV_AC	FG_RGG_KNF	GDAEFVEKGV
PEDJVAC	KSRATSKERD	LKDIPWRRRI	PKGENSEVAAAC	FGPRGGFKNF	GDAEFVEKGV
CV777	KSRATSKERD	LKDIPWRRRI	PKGENSEVAAAC	FGPRGGFKNF	GDAEFVEKGV

	110	120	130	140	150
PED138	DASGYAQIAS	LAPNVAALLF	GGNVAVRELA	DSYEITYNYK	MTVPKSDPNV
PED151	DAPGYAQIAS	FAPNVAALLF	GGNVAVRELA	DSYEITYNYK	MTVPKSDPNV
PED160	DASGYAQIAS	FAPNVAALLF	GGNVAVRELA	DSYEITYNYK	MTVPKSDPNV
PEDJVAC	DASGYAQIAS	LAPNVAALLF	GGNVAVRELA	DSYEITYNYK	MTVPKSDPNV
CV777	DASGYAQIAS	LAPNVAALLF	GGNVAVRELA	DSYEITYNYK	MTVPKSDPNV

	160	170	180	190	200
PED138	ELLVSQVDAF	KTGNAKPQRK	KEKKIKRETI	QQQNEEVIYD	DVGVRCDV..
PED151	ELLVSQVDAF	KTGNAKPQRK	KEKKIKRETI	QQQNEEVIYD	DVGVRCDV..
PED160	ELLVSQVDAF	KTGNAKPQRR	KEKKIKRETS	QQQNEEVIYD	DVGVRCDV..
PEDJVAC	ELLVSQVDAF	KTGNSIPQRK	KEKKNKRETT	QQQNEEAIYD	DLGVPSDE..
CV777	ELLVSQVDAF	KTGNAKLQRK	KEKKNKRETT	LQHEEEAIYD	DVGAPSDV..

Fig. 9. Alignments of predicted amino acid sequences for the partial N gene of the three Korean field isolates, Japanese vaccine strain, and CV777 of PED virus.

Table 5 Comparison of nucleotide sequence homology for the partial N gene of the three Korean field isolates, vaccine strain, and CV777 of PED virus.

Samples	Nucleotide Sequence Homology (%)				
	97-138	97-151	97-160	vaccine	CV777
97-138	-	99	96	94	95
97-151	99	-	96	94	96
97-160	96	96	-	93	95
vaccine	94	94	93	-	96
CV777	95	96	95	96	-

Table 6. Comparison of amino acid sequence homology for the partial N gene of the three Korean field isolates, vaccine strain, and CV777 of PED virus.

Samples	Amino Acid Sequence Homology (%)				
	97-138	97-151	97-160	vaccine	CV777
97-138	-	98	94	90	92
97-151	98	-	96	90	92
97-160	94	96	-	89	91
vaccine	90	90	89	-	94
CV777	92	92	91	94	-

IV. 고 찰

자돈의 설사병은 육성, 비육돈의 호흡기 질병, 모돈의 유사산 질병과 더불어 양돈 생산성에 가장 큰 피해를 입히는 질병의 유형이다. 특히 우리 나라에서는 동결기를 중심으로 자돈 설사병으로 인한 피해가 심각하여 매년 상당수의 자돈이 설사병으로 인해 폐사되는 것으로 추정된다. 박 등(1998)의 보고에 의하면 96-97년 자돈 설사병의 원인체로 바이러스성이 전체 발생 중 48%을 차지하여 세균 또는 기생충에 의한 설사병보다 많은 피해를 주고 있다고 보고하였다. 특히 PED는 1992년 국내 발생이 확인된 이후로 매년 지속적으로 발생하고 있으며, 자돈 폐사 등 이로 인한 경제적 손실이 막대하여 양돈업계에 심각한 피해를 주고 있는 실정이다.

자돈의 바이러스성 설사병은 잠복기가 짧고 발생시 급속하게 전파되어 수일내 전 돈군이 감염됨으로 방제를 위해서는 바이러스의 사전 유입을 차단하기 위한 철저한 기초방역조치가 필요하며, 이에 따른 설사병 원인체에 대한 신속, 정확한 진단법이 요구되어 지고 있다. PED 감염의 진단을 위해서는 특이 단클론성 항체를 이용하여 감염 자돈의 동결절편한 소장으로부터 바이러스 항원을 증명하는 형광항체법이 가장 많이 이용되고 있으며, 전자현미경을 이용하여 직접 분변 중에서 원인체 확인으로 신속하게 진단할 수도 있다. 그러나, 감염자돈의 장조직 채취시거나 보관상태에 따라 특이 항원을 관찰할 수 있는 장용모가 소실되었을 경우나 검사시료가 분변일 경우에는 형광항체법을 이용한 진단이 불가능하다. 또한, 전자현미경법은 coronavirus의 특징인 spike가 손상되면 확인이 불가능하며, 관찰되더라도 TGE virus와 PED virus를 감별할 수 없다는 단점이 있다. 감염 자돈의 분변 또는 소장조직을 배양세포에 접종하여 바이러스를 분리할 경우 특이적인 CPE를 나타내므로 진단이 가능하나 세계적으로 PED virus를 세포배양으로 분리 동정하는 것은 극히 어려우며, 배양이 가능하더라도 수회 맹목계대 후 확인이 가능하기 때문에 동정까지 많은 시간이 요구됨으로써 신속한 진단을 내릴수 없다는 단점이 있다(Pensaert, 1999). 따라서, 최근에는 유전자 진단법으로 PED virus의 핵산을 증명하는 PCR 기법을 진단에 많이 적용하고 있다. 실험적으로 10^4 TCID₅₀/ml ~ 10^2 TCID₅₀/ml 역가까지 바이러스의 핵산을 검출할

수 있으며 또한 인공감염시 접종 후 1일만에 검출이 가능하다고 보고되어 이미 진단의 신속성과 민감도가 증명되었다(Kweon 등, 1996; Ishikawa 등, 1997).

본 연구에서는 coronavirus중 변이가 적고 안정적인 부위인 N gene 부위에서 primer set을 선별하였고 이를 이용한 PCR 기법을 확립하였다. Coronavirus의 N gene은 구조 유전자중 비교적 변이가 적은 부위이며, 바이러스에 감염된 세포에는 N protein이 encoding된 viral mRNA가 많이 발현되기 때문에 PCR 기법을 이용한 유전자 증폭이 용이한 부위로 판단된다(Siddell 등, 1983; Kubota 등, 1999). 선별된 primer set를 이용하여 PED virus를 대상으로 PCR을 실시한 결과, 691bp의 PCR 증폭산물을 확인할 수 있었으며 동일 조건하에서 바이러스성 설사병을 유발하는 TGE virus와 porcine rotavirus에서는 특이적인 band가 검출되지 않아 그 특이성을 입증할 수 있었다(Fig. 2). 또한 야외 발생 시료에 대해 적용하였을 경우에도 동일한 결과를 얻을 수 있어, 본 연구에서 확립된 PCR 기법을 실제 야외에 적용할 경우 신속하게 농장내 발생 여부를 확인 할 수가 있어 질병의 조기 방제에 많은 도움을 줄 것으로 사료된다.

PED 야외 바이러스의 특성을 분석하기 위하여 국내에서 발생한 PED 감염돈의 분변 또는 소장시료로부터 RT-PCR을 실시하여 PED 바이러스의 N gene 일부를 증폭하였고(Fig. 3), 이를 각종 제한효소를 이용하여 RFLP 분석을 실시하였으며, 또한 RFLP pattern에 따라 특징적인 차이를 나타내는 야외 발생주에 대해서는 염기서열 및 아미노산 서열 분석을 실시하여 이를 표준주 및 백신주와 비교하였다. 표준주 CV777은 1978년 벨기에에서 발생한 PED 감염자돈에서 분리되었고(Pensaert와 DeBouck, 1978), 이후 세포배양에 성공하여 계대 증식된 바이러스이며(Hofmann과 Wyler, 1988), 일본 백신주는 1983년 일본 가고시마현에서 분리된 83P-5 strain으로 1996년부터 일본에서 예방백신으로 허가되어진 세포배양 바이러스로 현재 국내에 수입되어 사용되고 있다(Kuwahara 등, 1988; Kusanagi 등, 1992). 따라서 국내 야외 발생주와 표준주 및 일본 백신주의 유전자에 대한 RFLP pattern, 유전자 염기서열 및 아미노산 서열의 비교 분석은 국가(지역)간 또는 발생연도별 바이러스 특성변화의 유무를 고찰하는데 의의가 있을 것으로 판단된다.

먼저 RELP 분석에서, 제한효소 *Tru9 I* 처리에서는 모든 야외 발생주가 표준주 및 백신주와는 구별되는 RFLP pattern을 보였다(Fig. 4). 야외 발생주간의 비교에서는 98-14(162, 232, 297)를 제외한 12개의 발생주가 동일한 양상(97, 135, 162, 297)을 나타낸 반면에 세포에 적응된 표준주와 백신주는 야외 발생주와 구별되지만 서로 같은 양상을 나타내었다(97, 162, 432). 따라서, 제한효소 *Tru9 I* 을 이용할 경우 백신주와 야외 발생주간의 감별이 가능할 것으로 사료되며, 실제 야외에서 백신 바이러스에 의한 감염을 의심할 경우 이를 야외 바이러스와 감별하는 것이 가능함으로써 진단상의 혼동을 피할 수 있을 것으로 기대되어 진다.

제한효소 *AspLE I* 과 *Hga I* 처리에서는 4개의 야외 발생주를 제외한 대부분의 야외 발생주가 백신주 및 표준주와 구별되는 다른 양상을 나타내었다(Fig. 5 & 6). *AspLE I* 처리에서는 야외 발생주 중 97-128, 97-138, 97-160, 98-53이 백신주와 함께 제한효소 절단부위가 존재하지 않아 원래의 크기인 691 bp를 보였으나, 나머지 9개의 야외 발생주에서는 동일한 부위가 절단되어 같은 RFLP 양상(335, 357)을 나타내었다. *Hga I* 처리에서도 마찬가지로 위 4개의 야외 발생주와 백신주 및 표준주에서 같은 제한효소 절단부위의 존재로 동일한 결과(343, 348)를 나타내었으나 나머지 9개의 야외 바이러스는 제한효소 절단부위가 존재하지 않는 단일 band(691 bp)를 보였다. 이 2종의 제한효소 처리에서 백신주와 동일한 양상을 보인 야외 발생주중 97-138, 97-160 그리고 다른 양상을 보인 야외 발생주중 97-151에 대해서는 염기서열 분석을 실시하여 자세한 비교 분석을 시도하였다.

제한효소 *MspR91* 처리에서는 5가지의 다양한 양상을 나타내었다(Fig. 7). 2개의 야외 발생주, 즉 97-160, 98-53은 백신주와 동일한 양상(93, 206, 392)을 보였다. 97-128, 97-138(72, 93, 134, 392) 그리고 98-53, 99-32(59, 93, 206, 333)을 제외한 나머지 야외 발생주에서 서로 동일한 RFLP 양상(59, 72, 93, 134, 152, 333)을 나타내었다.

야외 발생주 97-160, 98-53은 3종의 제한효소 처리에서 백신주와 동일한 결과를 나타내었다. 그러나 대부분의 야외 발생주는 일본 백신주와 RFLP pattern에 있어서 상당한 차이를 보였다(Table 4). Kubota 등(1999)은 1993년도에 분리된

국내 분리주와 일본 야외 발생주의 N gene에 대하여 3종의 제한효소(*Dra* I, *Eco*R I, *Pst* I)를 이용한 RFLP 분석에서 서로 동일한 양상을 보였다고 보고하여 본 연구에서 사용한 제한효소에 의한 RFLP 분석 결과와 상이한 결과를 보였다. 이는 사용된 제한효소의 차이에 따른 결과일 수도 있으나 국내 분리주와 일본주와의 염기서열 비교에서도 Kubota 등(1999)은 100% 일치하는 것으로 보고하고 있어 본 연구의 염기서열 분석과도 일치하지 않으므로 이에 대해서는 추후 다양한 분석이 요구되어 진다.

국내 발생주간의 RFLP 분석에서 97년도와 98년도 초반에 발생한 경우와 98년도 및 99년도에 발생한 경우가 서로 다른 RFLP pattern을 나타내었다. 이는 PED의 국내 발생 상황이 하절기에는 물론 주기적으로 재발하는 경우가 확인되는 등 최근 들어 농장내 상재화 되는 경향을 보이고 있어 이러한 발병 양상에 따른 바이러스 특성의 변화가 최근 발생 바이러스와 97년도의 유행성 바이러스 간에 RFLP pattern의 차이와 관련이 있을 것으로 추정된다.

국내 발생주의 N gene 일부에 대한 염기서열과 아미노산 분석에서도 RFLP 분석과 유사한 결과를 보였다. 국내 발생주 그리고 일본 백신주의 염기서열을 표준주인 CV777과 비교한 결과, 염기서열 homology가 95-96%로 나타났으나, 국내 발생주와 일본 백신주간의 비교에서는 염기서열은 93-94% homology, 일부이지만 아미노산 서열은 더 낮은 89-90% homology로 RFLP 분석 결과와 마찬가지로 Kubota 등(1999)이 보고한 결과와 상이하게 나타났다. 이는 Kubota 등(1999)이 비교한 대상이 국내 야외 발생주가 아닌 분리주로 세포에 장기간 계대 배양된 바이러스이기 때문에 세포배양유래 바이러스간 특성의 유사성 때문에 그러한 결과를 보인 것으로 사료된다. 그러나, 세포배양으로 계대됨으로써 생겨난 변이인지 근본적으로 바이러스 strain간 유전적 특성에 따른 차이인지는 추후 연구를 통하여 밝혀져야 할 부분으로 사료된다. 국내 발생주간의 유전자 염기서열 비교에서는 발생주간에 다소 차이가 있어 96%와 99%의 homology을 보이고 있으나, RFLP pattern이 서로 다른 97-138과 97-151이 99%의 homology을 나타내는 것으로 보아 RFLP pattern의 차이와 해당 염기서열의 전체적인 homology와는 유의성 있는 연관성을 나타내지는 않았다. 이로 미루어 coronavirus의 특성인 point mutation이 PED virus에도 지속적으로 적용되고 있는 것으로 추정된다.

PED 예방을 위해 백신 접종이 실시되고 있으나 이에 대한 중화시험 결과 항체가 추이도 일정한 수준을 보이지 않고 있으며 백신 효과 또한 논란이 많은 실정이다. 이에 대한 원인으로 PED virus가 설사를 유발하는 다른 바이러스에 비해 면역원성이 약하여 추후 재감염을 막을 만한 면역이 기대 수준 이하일 수도 있다는 점 등 몇몇 요인들이 제기되고 있지만 여기에 대해서는 앞으로 많은 연구가 진행되어야 할 것이다(Timoney 등, 1988; 황 등, 1994). 또한 RFLP 분석 결과 몇몇 야외 발생주가 세포에 적응된 백신주 또는 표준주와 동일한 양상을 보이고 있어 야외 바이러스의 분리를 통하여 세포배양 계대 및 바이러스 변이 정도 조사 등 이들의 상관성 유무에 대한 분석이 필요한 것으로 사료되며, 이를 위하여 바이러스 분리 동정법의 확립이 우선되어야 할 것으로 판단된다.

이상 본 연구를 통하여 PED virus의 특이 유전자를 증폭할 수 있는 RT-PCR 기법을 확립하였고 이는 야외 감염 시료를 대상으로 신속하게 PED 감염을 조기에 진단하여 질병 방지에 도움을 줄 것으로 사료된다. 국내에서 발생하고 있는 PED virus의 야외 발생주에 대한 RFLP 분석과 염기서열 및 아미노산 서열 분석 결과, 바이러스간에 어느 정도 변이가 일어났음을 확인할 수 있었다. 대부분의 국내 발생주는 일본 백신주나 표준주와는 다른 RFLP pattern을 나타내었으며, 염기서열과 아미노산 서열 homology가 비교적 낮아 유전학적 차이를 입증할 수 있었다. 그러나 이 연구는 PED virus N gene 일부만에 대해서 분석한 결과이므로, 더 나아가 coronavirus의 면역반응 유도 및 표적세포 인식 및 바이러스막과 세포막의 융합의 기능을 하는 등 실제 병원성에 관여하는 것으로 추정되는 S gene에 대한 RFLP 분석 등을 실시하여 이에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료되어 진다.

V. 결 론

돼지 유행성 설사병 바이러스의 유전학적 특성과 일본 백신주와의 유전학적 차이를 분석하기 위해 돼지 유행성 설사증으로 진단된 자돈의 분변 또는 소장 시료와 백신주 그리고 표준주로부터 PED 바이러스의 N gene 일부를 증폭하는 RT-PCR을 실시하였다. PCR 증폭산물은 RFLP 분석으로 cleavage pattern을 비교하였으며, 야외 발생주(97-138, 97-151, 97-160)와 백신주의 N gene 일부분의 염기서열을 결정하여 표준주와의 염기서열 및 아미노산 서열을 비교하였다.

1. 본 연구에서 사용한 RT-PCR 기법은 PED 바이러스의 N gene을 특이적으로 검출할 수 있었으며, 실제 야외에서 발생한 시료와 백신주, 그리고 표준주로부터 691 bp의 PED virus 특이 유전자가 증폭되었다.
2. RFLP 분석을 이용한 cleavage pattern 비교에서는 제한효소 *Tru9 I* 으로 처리하였을 경우 국내 발생주는 백신주 그리고 표준주와는 전혀 다른 양상을 보여 백신주와 감별이 가능하였다. 국내 발생주에서는 98-14만이 다른 양상을 보였다.
3. 제한효소 *AspLE I* 과 *Hga I* 으로 처리하였을 경우 4개의 국내 발생주(97-128, 97-138, 97-160, 98-53)만이 백신주와 동일한 양상을 보였다.
4. 제한효소 *MspR9 I* 의 경우에는 5가지의 다양한 양상을 보였으며 97-160, 98-53이 백신주와 동일한 양상을 보였으며 국내 발생주 간에도 서로 다른 양상을 보였다.
5. 염기서열 분석 결과, 국내 발생주는 표준주인 CV777과 95-96% homology를 보여 PED 바이러스임이 입증되었으며 백신주와는 93-94%의 homology를 보였다.

6. 국내 발생주간의 염기서열 homology는 각각 97%와 99%를 보였으나, RFLP pattern이 서로 다른 발생주간의 homology가 99%를 보이고 있어 RFLP 분석의 차이가 sequence homology에는 큰 영향을 나타내지 않았다.
7. 아미노산 서열 분석 결과, 국내 발생주와 일본 백신주는 염기서열 homology 보다 더 낮은 89-90%의 homology를 보였다.

이상의 결과로써, PED 바이러스의 N gene을 특이적으로 증폭할 수 있는 RT-PCR 기법이 확립되었으며 실제 야외 시료에 적용하여 PED 바이러스의 특이 유전자를 확인할 수 있었다. 또한, RFLP 분석을 이용하여 야외 발생주와 백신주와의 감별이 가능하였다. RFLP 분석과 염기서열 및 아미노산 서열 분석에서 국내 야외 발생주와 일본 백신주는 유전학적 차이가 인정되었다. 국내 발생주간의 비교에서는 염기서열에 있어서 커다란 변화가 없지만 서로 다른 RFLP pattern을 보이고 있어 PED 바이러스의 N gene에 대해서 지속적으로 변이가 진행되고 있음을 확인하였다.



VI. 참고 문헌

- Carvajal A, Lanza I, Diego R, Rubio P and Carmenes P. 1995. Evaluation of a blocking ELISA using monoclonal antibodies for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and its antibodies. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7:60-64.
- Chasey D and Cartwright SF. 1978. Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhea. *Research in Veterinary Science*, 25:255-256.
- Chomczynski P and Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162:156.
- Coussement W, Ducatelle R and DeBouck P. 1982. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. I. Histological and histochemical study. *Vet. Pathol.*, 19:46-56.
- Dea S, Roy RS and Begin ME. 1980. Bovine coronavirus isolation and cultivation in continuous cell lines. *Am. J. Vet. Res.*, 41:30-38.
- Dea S, Vaillancourt J, Elazhary Y and Martineau GP. 1985. An outbreak of diarrhea in piglets caused by a coronavirus antigenically distinct from transmissible gastroenteritis virus. *Can. Vet. J.*, 26:108-111.
- DeBouck P and Pensaert M. 1980. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus CV777. *Am. J. Vet. Res.*, 41(2):219-223.
- DeBouck P, Pensaert M and Coussement W. 1981a. The pathogenesis of an enteric infection in pigs experimentally induced by coronavirus-like agent

CV777. *Vet. Microbiol.*, 6:157-165.

DeBouck P, Callebaut P and Pensaert M. 1981b. The diagnosis of coronavirus-like agent(CVLV) diarrhea in suckling pigs. *Curr. Top Vet. Med. Animal. Sci.*, 13:59-61.

Duarte M, Gelfi J, Lambert P, Rasschaert D and Laude H. 1993. Genome organization of porcine epidemic diarrhea virus. *Coronaviruses, Plenum Press*:55-60.

Duarte M and Laude H. 1994. Sequence of the spike protein of the porcine epidemic diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.*, 75:1195-1200.

Duarte M, Tobler K, Bridgen A, Rasschaert D, Ackermann M and Laude H. 1994. Sequence analysis of the porcine epidemic diarrhea virus genome between the nucleocapsid and spike protein genes reveals a polymorphic ORF. *Virology*, 198:466-476.

Egberink HF, Ederveen J, Callebaut P and Horzinek MH. 1988. Characterization of the structural proteins of porcine epizootic diarrhea virus, strain CV777. *Am. J. Vet. Res.*, 49:1320-1324.

Hirano N, Sada Y, Tuchiya K, Ono K and Murakami T. 1985. Plaque assay of bovine coronavirus in BEK-1 cells. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 47:679-681.

Hofmann M and Wyler R. 1988. Propagation of virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J. of Clin. Micro.*, 256:2235-2339.

Hofmann M and Wyler R. 1989. Quantitation, biological and physiochemical properties of cell culture-adapted Porcine Epidemic Diarrhea coronavirus (PEDV). *Vet. Microbiol.*, 20:131-142.

Hofmann M and Wyler R. 1990. Enzyme-linked Immunsorbent Assay for the Detection of Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus Antibodies in Swine Sear. *Vet. Microbiol.*, 21:263-273.

Horvath I and Mocsari E. 1981. Ultrastructural changes in the small intestinal epithelium of suckling pig affected with a transmissible gastroenteritis(TGE)-like disease. *Arch. Virol.*, 68:103-113

Holmes KV. 1985. Replication of coronaviruses. *Virology, Raven Press* :1331-1343.

Ishikawa K, Sekiguchi H, Ogino T and Suzuki S. 1997. Direct and Rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus by RT-PCR. *J. of Virol. Methods*, 69:191-195.

Koeatzner CA, Parker MM, Ricard CS, Sturman LS and Masters PS. 1992. Repair and mutagenesis of the genome of a deletion mutant of the coronavirus mouse hepatitis virus by targeted RNA recombination. *J. Virol.*, 66:1841-1848.

Komaniwa H, Makabe T, Fukusho A and Shimizu Y. 1986. Isolation of transmissible gastroenteritis virus from feces of diarrheic pigs in roller culture of CPK cells in the presence of trypsin. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 48:1245-1248.

Kubota S, Sasaki O, Amimoto K, Okada N, Kitazima T and Yasuhara H. 1999. Detection of porcine epidemic diarrhea using polymerase chain reaction and comparison of the nucleocapsid protein genes among strains of the virus. *J. Vet. Med. Sci.*, 61(7):827-830.

Kusanagi K, Kuwahara H, Katoh T, Nunoya T, Ishikawa Y, Samejima T and Tajima M. 1992. Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. *J. Vet. Med. Sci.*, 54(2):313-318.

Kuwahara H, Nunoya T, Samejima T and Tajima M. 1988. Passage in piglets of a coronavirus associated with porcine epidemic diarrhea. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 41:169-173.

Kweon CH, Lee JG, Han MG and Kang YB. 1997. Rapid Diagnosis of Porcine epidemic diarrhea virus infection by Polymerase Chain Reaction. *J. Vet. Med. Sci.*, 59(3):231-232.

Lai MC and Cavanagh D. 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 48:1-100.

Linda JS. 1993. Coronavirus immunogens. *Vet. Microbiol.*, 37:285-297.

McIntosh K. 1985. Coronaviruses. *Virology, Raven Press*:1323-1330.

Moon HW. 1978. Mechanisms in the Pathogenesis of Diarrhea: A Review. *JAVMA*, 172:443-447.

Oldham J. 1972. Pig Farming. *Oct. suppl.*, :72-73.

Paul PM, Halbur PG and Vaughn EM. 1994. Significance of porcine respiratory coronavirus infection. *Continuing Education Article #6*, 16: 1223-1234

Peng D, Koetzner CA, McMahon T, Zhu Y and Mastas PS. 1995. Construction of murine coronavirus mutants containing interspecies chimeric nucleocapsid proteins. *J. Virol.*, 69:5475-5484.

Pensaert MB and DeBouck P. 1978. A new coronavirus-like particles associated with diarrhea in swine. *Arch Virol*, 58:243-247.

Pensaert MB, Callebaut P and DeBouck P. 1982. Porcine epidemic diarrhea (PED) caused by a coronavirus: Present knowledge. *Proc. Int. Congr. Pig Vet. Soc.*, 7:52.

Pensaert MB. 1999. Porcine Epidemic Diarrhea. *Diseases of Swine 8th ed*, Chapter 16:179-185.

Pijpers A, van Nieuwstadt AP, Terpstra C and Verheijden JHM. 1993. Porcine epidemic diarrhoea virus as a cause of persistent diarrhoea in a herd of breeding and finishing pigs. *Vet. Record*, 132:129-131.

Siddel S, Wege H and ter Meulen V. 1983. The biology of coronaviruses. *J. Gen. Virol.*, 64:761-776.

Storz J, Rott R and Kaluza G. 1981. Enhancement of plaque formation and cell fusion of an enteropathogenic coronavirus by trypsin treatment. *Infect. Immun.*, 31:1214-1222.

Struman LS, Richard CS and Homles KV. 1985. Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90K cleavage fragments. *J. Viro.*, 56:904-911.

Takahashi K, Okada K and Ohshima K. 1983. An outbreak of swine diarrhea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 45(6):829-832.

Thake DC. 1968. Jejunal epithelium in transmissible gastroenteritis of swine: An electron microscopic and histochemical study. *Am. J. Pathol.*, 53:149-168.

Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW and Barlough JE. 1988. Porcine Epidemic Diarrhea. *Hagan and Bruner's microbiology and infectious disease of domestic animals 8th ed.*, pp. 897-898.

Tobler K, Bridgen A and Ackermann M. 1994. Sequence analysis of the nucleocapsid protein gene of porcine epidemic diarrhea virus. *Coronaviruses, Plenum Press*:49-54.

Turgeon DC, Morin M, Jolette J, Higgins R, Marsolais G and Difrancio E. 1980. Coronavirus-like particles associated with diarrhea in baby pigs in Quebec. *Can. Vet. J.*, 21:100-101.

Van Nieuwstadt AP and Zetstra T. 1991. Use of two enzyme-linked immunosorbent assays to monitor antibody responses in swine with experimentally induced infection with porcine epidemic diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.*, 52:1044-1050.

Vogelstein B and Gillespie D 1979. Preparation and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76:615-619.

Wood EN. 1977. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhea. *Vet. Rec.*, 100:243-244.

Yaling Z, Ederveen J, Egberink H, Pensaert M and Horzinek MC. 1988. Porcine epidemic diarrhea virus(CV777) and feline infectious peritonitis virus(FIPV) are antigenically related. *Arch. Virol.*, 102:63-71.

강영배, 권창희, 권병준. 1994. 돼지 유행성 설사(porcine epidemic diarrhea): 발생 피해, 병리 진단 및 방역대책. *대한수의사회지*, 31:38-56.

권준현, 김병한, 양동균, 신 응, 조수동, 안수환, 강문일. 1998. 설사 자돈으로부터 돼지 유행성 설사증 바이러스 분리. *대한수의학회지*, 38(3):71.

권창희, 권병준, 정태성, 기영진, 허동호, 황의경, 이재진, 안수환. 1993. 돼지 유행성 설사 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus)의 국내 분리주 작성에 관한 연구. *대한수의학회지*, 33(2):249-254.

권창희, 권병준, 강영배, 안수환. 1994. 돼지 유행성 설사 바이러스 국내 분리주 (KPEDV-9)의 세포 증식성 및 혈청학적 역학조사. *대한수의학회지*, 34(2):321-326.

류영수, 박최규, 장정호. 1997. 가축 질병 진단. *이공 WORLD*, 81-92.

박남용, 조경오, 조성수. 1993. 돼지 유행성 설사증 바이러스의 분리동정. *대한수의사회지*, 29:360-365.

박남용, 이석윤. 1997. In situ hybridization에 의한 돼지 유행성 설사증의 국내발생 역추적 진단. *대한수의학회지*, 37(4):809-816.

박봉균, 한경수, 류광수, 김준영, 정현규. 1998. 돼지 유행성 설사증(porcine epidemic diarrhea)의 상재화에 대한 혈청학적 증명. *대한수의학회지*, 38(4):818-822.

박최규, 류영수, 김로미, 김재훈, 이창희. 1998. 최근 자돈 설사병의 병인학적 연구. *농촌진흥청 수의과학연구논문집*, 40(1):26-31.

황의경, 김재훈, 진영화, 배유찬, 윤순식, 박최규, 권창희, 윤용덕, Ackermann M. 1994. 돼지 유행성 설사증의 최근 발생 동향. *농촌진흥청 수의과학연구논문집*, 36(1):587-596.



Genetic Analysis of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) Field Isolates and Vaccine Strain

Chang-hee Lee

Department of Veterinary Medicine
Graduate School, Cheju National University
Cheju, Korea
(Supervised by Professor Du-sik Lee)

Abstract

Genetic characteristic and restriction fragment length polymorphism (RFLP) pattern of the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) encoding partial nucleocapsid (N) protein were determined using 13 field samples collected from nationwide during 1997~1999 in Korea. These samples were examined to confirm PEDV antigen by direct immunofluorescent antibody (FA) test using monoclonal antibody to PEDV.

Partial N gene was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using a specific primer set to PEDV. RFLP pattern was analyzed by restriction endonuclease digestion with *Tru9* I, *Asp*LE I, *Hga* I, and *Msp*R9 I. RT-PCR condition was optimized and 691bp of expected PEDV specific DNA fragment was amplified from field specimens, PEDV CV777 strain, and Japanese vaccine strain. With the exception of PED virus, no DNA product was detected from other swine enteric viral pathogens such

as transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine rotavirus.

RFLP patterns of the 11 field isolates using *AspLE I*, *Hga I*, and *MspR9 I* were different from Japanese vaccine strain, but 2 isolates obtained from field outbreak showed the same migration pattern with Japanese vaccine strain. All 13 Korean field isolates could be differentiated from Japanese vaccine strain and CV777 strain by RFLP analysis of the amplified N gene using *Tru9 I* restriction endonuclease. RFLP patterns of the 1997 outbreak were different from those of the samples collected in 1998 and 1999. It may indicate that there are some ongoing mutations in the field.

Nucleotide sequences and amino acid homology of 3 field isolates were analyzed by comparing sequences of the prototype PEDV strain CV777 and Japanese vaccine strain. Homogeneity of the field isolates was 95% with CV777 and 93%~94% with Japanese vaccine strain, respectively. However, nucleotide sequence homology among field isolates was 96~99%, which indicate that these isolates are more closely related to each other than that of the CV777 and Japanese vaccine strain. The relationship between sequence homology and RFLP pattern was independent in this study.

In conclusion, PEDV specific nucleotide was successfully amplified and considered to be a rapid, sensitive, and specific diagnostic method for the identification of PEDV infection in pigs. RFLP analysis of the PEDV nucleocapsid gene may a potential promising tool to distinguish a field strain from vaccine virus unless mutations alter a sequence at the corresponding sequences of the restriction sites. Partial sequence analysis of the PEDV N gene obtained from field outbreak of the PEDV infection revealed progressive mutations in the PEDV genome.

Key words : PEDV, RT-PCR, RFLP analysis, nucleotide sequence homology

감사의 글

저의 작은 결실을 맺는데 있어서 감사를 전할 사람들이 많이 있습니다. 먼저 제가 이 길을 가게끔 해주신 양기천 교수님과 이두식 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 논문을 성심껏 심사해주신 배종희 교수님과 우호춘 교수님께 고마움을 전합니다. 제가 학위를 할 수 있도록 많은 조언을 해주신 수의학과 교수님께 감사를 드립니다.

제가 실험실에 잘 적응하고 앞으로의 방향을 일깨워 주신 류영수 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 실험에 있어서나 삶에 있어서나 저에게 항상 힘이 되어 주신 박희규 선생님 정말 고맙습니다. 지금은 이 하늘아래 안 계시지만 제 논문을 누구보다도 기다리신 장정호 선생님 너무 보고 싶습니다. 주후돈 선생님 성심껏 도와주셔서 고맙습니다. 사랑하는 면역병리실 식구들 정금화 여사님, 이은동 선생, 박연주 선생, 김한숙 선생, 송경화 양 여러분이 없었다면 저의 결실은 불가능 하였을 것입니다. 진심으로 감사를 드립니다. 2년 동안 대학원 일들을 처리 해주면서 도와준 전용철 후배에게도 고마움을 전합니다. 그리고 안양에 있다는 핑계로 연락을 자주 못 전하는 우리 용우회 벗들과도 이 기쁨을 함께 나누고 싶습니다.

사랑하는 우리 가족들 할머니, 아버지, 엄마, 창언이, 창용이, 정혜에게 감사를 드리며 이 논문을 함께 하겠습니다.

1999년 12월 이창희