

T0009586

최 종
연구보고서

닭의 마렉병과 백혈병/육종의 감별진단을 위한 DNA chip 진단법 개발

Development of DNA chip Diagnostic Method for
the Differential Diagnosis of Marek's Disease and
Leukosis/Sarcoma of Chickens

연구기관

전남대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “닭의 마렙병과 백혈병/육종의 감별진단을 위한 DNA chip 진단법 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 7월 일

주관연구기관명 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 조 경 오

세부연구책임자 : 조 경 오

연 구 원 : 김 유 정

연 구 원 : 박 수 진

연 구 원 : 박 상 익

협동연구기관명 : 동신대학교

협동연구책임자 : 김 계 엽

연 구 원 : 정 준 환

연 구 원 : 김 선 은

요 약 문

I. 제 목

닭의 마렉병과 백혈병/육종의 감별진단을 위한 DNA chip 진단법 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

국내는 물론 전 세계적으로 꾸준히 막대한 경제적 피해를 야기하고 있는 닭의 주요 바이러스성 종양성 질병인 닭 백혈병/육종 그룹의 종양과 마렉병을 효과적으로 진단할 수 있는 DNA chip 진단법을 개발하는 것이 본 연구의 목표이다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

세계적으로 양계농장에서 가장 골치 아픈 질병이 종양성 질병인데, 이는 예방, 진단 및 치료가 어렵기 때문이다. 이러한 종양성 질병의 거의 대부분은 바이러스에 의해서 유발되며, 크게 레트로바이러스(retrovirus)와 허피스바이러스(herpesvirus)가 문제이다. 레트로바이러스속 내에는 알파레트로바이러스(alpharetrovirus)에 속하는 일군의 백혈병/육종 그룹의 바이러스가 있다. 이 그룹의 바이러스는 닭에 림프구성 백혈병, 적아세포종, 골수아세포종, 골수세포종, 혈관종 등 다양한 유형의 종양을 일으킨다. 그 외에 실험적으로만 림프구성 종양을 일으키는 감마레트로바이러스(gammaretrovirus)에 속하는 세망내피종바이러스(reticuloendotheliosis virus)가 있지만, 이 바이러스에 의한 종양성 질병은 야외 농장에서의 발생보고는 없다.

한편 백혈병/육종 그룹의 바이러스는 어느 바이러스든지 림프구성 백혈병을 일

으킬 수 있다. 이 바이러스들 중에는 각각의 특이 바이러스성 종양원성 유전자가 있는 것이 있어서 그 유전자에 특이적인 종양을 일으킨다. 예를 들어서 v-erbB 유전자가 들어있는 바이러스는 적아세포종을, v-myb는 골수아세포종을, v-myc는 골수세포종을 일으킨다. 하지만 이러한 특이적인 유전자가 있음에도 불구하고 야외에서 상기의 다양한 종양보다는 대부분 림프구성 백혈병이 발생하는 이유는 야외에서는 1) 어린 연령의 2) 감수성 있는 품종에서 3) 대량의 바이러스가 감염되기 어렵기 때문이다.

닭에서 CD3+CD4+CD8- T cell 림프종을 유발하는 마렉병 바이러스는 최근 바이러스 제놈의 분석에 의해서 허피스바이러스 중에서 알파허피스바이러스로 재분류되었다. 이러한 마렉병 바이러스는 3가지 혈청형으로 분류되는데, 이 중에서 혈청형 1만이 숙주인 닭에서 종양을 일으킨다. 특징적인 것은 혈청형 1의 바이러스 중에도 초강독주, 강독주, 약독주가 있는데 약독주의 경우는 종양을 일으키지 않아서 실제 종양병변 내에서 마렉병 바이러스를 분리하여도 약독주와 강독주의 구별이 어려운 경우도 있다. 선행 연구에 의하면, 혈청형 1 마렉병 바이러스는 long terminal repeat와 long internal repeat에 존재하는 132 bp의 반복서열이 강독주는 3개 이하인 반면 약독주는 4개 이상이므로 PCR 기법에 의해서 어느 정도 감별이 가능하다고 한다. 하지만, PCR 기법의 단점 중의 하나인 위양성 band의 출현으로 감별이 어려운 것으로 알려져 있다.

마렉병 바이러스는 감염 후기에 간, 비장, 신장 등에 림프종을 유발한다. 하지만, 대부분의 수의사나 양계가들에 잘 알려져 있지 않는 특징적인 소견은 “마렉병 바이러스는 감염초기에 T세포를 만들어내는 흉선과 B세포를 만드는 F낭을 파괴시켜 심각한 면역저하를 유발시킨다”는 것이다. 따라서, 야외 양계농장에서 마렉병 바이러스 감염에 의한 종양발생도 중요하지만 면역억압에 의한 살모넬라와 같은 2차 감염도 중요하다. 하지만 이러한 2차 감염에 대한 실제적인 원인 인자인 마렉병 바이러스에 대한 조사는 무시되어 반복적으로 농장에 피해를 끼치고 있다. 뿐만 아니라 최근 마렉병 백신에 의해서도 예방이 되지 않는 혈청형 1중에서 초강독주가 발생하는 등 전 세계적으로 마렉병 예방에 비상이 걸려있는 실정이다.

이와 같이 닭에서 종양성 질병을 유발하는 주요 원인체는 알파레트로바이러스의 백혈병/육종 그룹의 바이러스와 알파허피스바이러스에 속하는 마렉병 바이러스로 압축이 된다. 이러한 종양성 질병을 진단하는데 여러 가지 방법이 사용되고 있

지만 통상 병리조직학적 방법이 전통적으로 자주 사용되어져 왔다. 하지만, 마렉병에 의한 림프종 중에서 말기 감염의 것은 형태학적으로 림프구성 백혈병과 유사한 림프아구의 형태로 구성되어 있다. 따라서, 병리전문가들도 림프구성 백혈병과 감별하지 못하여 오진단을 내리는 경우가 종종 있다.

그 외에 이러한 질병의 감별에 사용되는 방법으로 바이러스 분리, 종양병변 내에서 바이러스 항원이나 핵산 검출, 혈중 항체 검출 등 다양한 방법이 보고되고 있다. 하지만, 마렉병 바이러스는 3개의 혈청형 내에서 혈청형 1에 속하는 바이러스 중 강독주만이 종양을 일으키고 백신주로 사용되는 CVI988과 같은 약독주는 종양을 일으키지 않기 때문에 분리주가 백신주인가 강독주인가를 구별하기 어렵다. 바이러스 항원이나 핵산의 검출에 있어서도 한계가 있는데, 이는 바이러스가 종양세포 내에는 극소수가 있기 때문에 항원의 검출이 어려우며, 또한 핵산의 경우에 있어서도 백혈병/육종 바이러스인 레트로바이러스와 유사한 내인성 레트로바이러스와의 감별이 어렵다는 것이다.

현재 닭의 백혈병/육종의 예방을 위한 백신은 개발되어 있지 않아 예방이 불가능하며, 마렉병 또한 강독형 변이 바이러스가 10년 주기로 출현함에 따라 백신 이용에 대한 문제점이 대두되고 있는 실정이다. 따라서 닭의 바이러스성 종양 질병을 예방하기 위해서는 민감도와 특이도가 높으며 신속·정확한 진단법의 개발이 절실하다.

최근 바이러스성 질병에 자주 사용되는 분자생물학적 방법으로는 특이 유전자를 증폭하여 증폭산물의 존재 유무를 확인하는 PCR법, 특정 핵산 물질을 조직 내에서 직접 검출하는 In situ hybridization법 및 이들의 장점만을 접목시킨 In situ PCR법 등 다양한 방법들이 있다. 하지만, 이들은 한 종류 또는 몇 가지 종류의 한정된 병원체만을 검사할 수밖에 없어서 수십 개의 바이러스가 있는 백혈병/육종 그룹의 바이러스들과 혈청형 1내에서도 다양한 바이러스주가 있는 마렉병을 동시에 진단하는 것은 불가능하다. 뿐만 아니라 이러한 분자생물학적 방법들은 진단하는데 많은 시간이 걸리고 경제적인 부담이 크다는 것이 문제이다.

따라서 림프구성 백혈병과 마렉병을 감별하는데도 어려움이 있지만, 더불어 림프구성 백혈병으로 진단을 하여도 그 원인 인자가 백혈병/육종 그룹 내의 어느 바이러스에 의해 일어난다는 것을 알아야 하기 때문에 혼란이 가중되고 있다. 이러한 이유로 닭의 종양성 질병을 정확히 진단하는데는 선진국에서도 문제점이 많은 실정

이다. 최근 human genome project로 각광을 받기 시작한 DNA chip (microarray) 기술은 기존의 분자생물학적 지식과 기계 및 전자공학의 기술이 접목되어 만들어졌다. 즉 DNA chip이란 유전자 검색용으로서 많은 종류의 DNA를 유리나 같은 고형체에 고밀도로 붙여 놓은 것을 말한다.

이러한 DNA chip이 기존의 방법과 가장 큰 차이점은 동시에 최소한 수백 개 이상의 유전자를 빠른 시간 안에 검색할 수 있다는 것이다. 또 다른 장점은 다른 분자생물학적 방법과는 달리 DNA chip에서는 유리나 같은 고형체를 사용하여 아주 적은 양의 유전물질을 고밀도로 붙일 수 있다는 것이다. DNA chip은 그 제작 방법에 따라 크게 4가지로 분류할 수 있으나 널리 사용되고 있는 것은 cDNA chip과 oligonucleotide chip이다. cDNA chip과 oligonucleotide chip은 유전물질의 크기에 따라 다르게 사용되는데, 즉 cDNA chip에는 최소한 500 bp 이상의 유전자가 붙어있고 oligonucleotide chip에는 약 15-25개의 염기들로 이루어진 oligonucleotide가 붙어 있다.

본 연구를 통하여 국내는 물론 세계적으로 양계산업에 막대한 피해를 야기하고 있는 닭의 바이러스성 종양성 질병을 한번에 진단해 낼 수 있는 혁신적인 기술인 DNA chip을 개발함으로써 이를 통해 예방·치료와 새로운 백신 전략을 수립할 수 있을 것이다. 뿐만 아니라 위와 같은 기법을 우리나라 가축 전염병 예방에 첨병 역할을 하고 있는 국립수의과학검역원, 전국의 축산기술연구소 등에 보급함으로써 전국적인 방역망이 강화될 수 있을 것이다. 또한 이 기법을 지속적으로 연구·개발하여 보다 축적된 기술을 바탕으로 다른 감염성 질병 및 해외 악성 질병을 진단하는 기술로 발전시켜 나가고 이를 통해 동물의 질병을 정확하게 진단하여 이에 따라 즉각적인 방역조치를 실시할 수 있을 뿐만 아니라 그러한 질병의 전파와 유입을 차단하는데 크게 기여함으로써 축산업의 국제 경쟁력을 강화할 수 있을 것이다.

나. 경제·산업적 측면

개방화 시대에 있어 우리 축산업이 살아남기 위해서는 가축의 생산성을 향상시켜야 한다. 한편 국민 경제 수준의 향상에 따른 소득증대는 축산농가의 소득증대에 대한 필요성을 크게 부각시키고 있다. 이러한 시대적 요청에 부응하기 위해서는 무엇보다 질병을 근절시킴으로써 생산능력을 향상시켜야 한다. 왜냐하면, 육

류의 소비가에서 가축의 질병 부분에 해당되는 비용이 선진국의 경우 17%이며 개발도상국의 경우에는 34%에 이르기 때문이다. 국내에서도 연간 축산 총생산액(53,112억, 97년) 가운데 질병으로 인해 최소한 약 20%인 10,622억원의 경제적 손실을 낳고 있다.

국내 양계산업은 그동안 비약적인 발전을 하여 농진청 축산통계(2002년 12월)에 따르면 산란계는 약 5천만 수, 육계는 약 4천 5백만 수를 사육하는 것으로 파악되고 있다. 뿐만 아니라 사육 형태도 예전의 소규모 영세 사육형태에서 대단위 집약 사육 형태로 긍정적인 변화를 하였다. 하지만 대단위 집약사육에 있어서 문제점은 전염성이 강한 악성 질병이 발생하면 농장 전체에 걸쳐 질병이 발생하여 막대한 경제적 피해가 발생한다는 것이다. 좋은 예가 최근 충북의 충주시와 괴산, 청원 등지에서 급성의 마택병에 의해 5만 마리가 집단 폐사한 것을 들 수 있다. 따라서 이러한 전염성이 강한 질병을 초기에 신속·정확하게 진단할 수 있는 첨단진단기법의 개발이 절실하다.

한국의 육류 소비량을 보면 국민 1인당 27 kg으로 미국(114.5 kg), 호주(70.5 kg), 영국(59.9 kg), 대만(43.6 kg) 등에 비하여 아직은 낮은 소비 추세를 보이고 있지만 향후 국내 축산업의 성장추세가 지속될 수 있는 잠재력이 있다고 판단된다. 이러한 좋은 예가 닭고기의 평균 소비증가율(2002년 농진청 자료)이 90년 4.0 kg에서 97년 6.1 kg으로 연평균 소비증가율이 7.5%로 증가하였으며, 최근 패스트-푸드 산업의 발전에 힘입어 닭고기의 소비량은 더욱 증가될 전망이다. 따라서 첨단진단기법의 개발에 의한 질병 방제 등을 통한 효과적인 사양기술을 실시하면, 생산단가는 낮추고 판매량은 더욱 증가시킬 수 있어서 양계농가의 소득증대에 도움을 줄 수 있을 것이다.

국내 양계산업의 발달이 이루어진 배경에는 외국으로부터 수입되어온 우수한 종계와 관련 제품들에 의해 이루어졌음은 부정할 수 없으나 반면 그 부작용으로 우리나라에는 없던 외래 악성 전염병의 유입을 초래하여 양계업의 생산성 증가에 많은 역작용을 나타내기도 하였다. 1998년 우리나라 육용종계에서도 외래 악성 전염병인 백혈병/육종 그룹의 바이러스 중에서 J 바이러스가 유행하여 골수세포종을 일으켜 막대한 경제적 피해를 당하는 쓰디쓴 경험을 가지고 있다. 따라서 이러한 외래성 질병까지 동시에 검출할 수 있는 신속·정확한 첨단 진단기법의 개발이 절실하다.

선진국에서조차 자국 내에서 발생한 질병이 완전히 박멸되었다고 선언한 후에 다시 재발하여 막대한 경제적 손실을 보는 헤프닝이 자주 있다. 좋은 예가 영국에서 발생한 구제역이다. 이것은 어떤 질환이든 감염 초기나 후기에는 원인체가 극소수 존재하여 진단을 어렵게 하기 때문이다. 특히 닭에서 발생하는 백혈병/육종 그룹 바이러스들은 종계에 감염되어 난계대를 통한 수직감염이 전파의 주된 원인이기 때문에 단지 감염된 닭만 진단을 하여서는 박멸하기 어렵다. 따라서, 종계에서의 감염을 진단하여야 하는데, 종계에서의 감염은 때때로 불현성이어서 진단하기 어려운 경우도 있다. 이러한 소수의 원인체가 있는 질병을 진단하기 위해서는 민감도가 높은 첨단 진단법의 개발이 절실하다고 하겠다.

전염성 질병의 진단목적은 감염된 환축의 병인이 무엇인지 원인체를 정확히 밝혀내어 그 질병의 재발을 억제하고 더 이상의 확산을 막는 것이다. 따라서, 재발로 인해 발생할 수 있는 생산성 저하 및 축산물의 품질저하와 같은 경제적인 손실을 최소화하기 위해, 정확한 진단법의 개발이 절실히 요구된다. 지금까지 마렙병이나 백혈병/육종의 진단을 위한 다양한 진단기법들이 개발되어 왔으나, 기존의 진단기법들은 조작의 어려움, 위양성 반응, 많은 시간의 소요 등의 많은 단점들 때문에 오진으로 인한 시간적 손실과 적절하지 못한 치료로 과다한 약품비의 지출 등이 발생하고 있다.

본 연구에서 응용하고자 하는 DNA chip은 20개 이상의 바이러스 군으로 형성되어 있는 백혈병/육종 그룹의 바이러스들과 다양한 주들로 구성된 마렙병 병원체의 유전물질을 한번에 진단 할 수 있는 기술로써, 이를 이용하여 국내에 상재되어 있는 이러한 질병들을 가장 정확하고 신속하게 결과를 판정할 수 있는 진단 기법으로 개발하고자 한다.

다. 사회·문화적 측면

닭의 백혈병/육종 그룹 바이러스들과 마렙병 바이러스는 소비자들에게 심한 혐오감을 줄 수 있는 종양 병변을 유발시킨다. 물론 이러한 질병들에 대한 사람으로의 전파는 발생하지 않지만, 우리나라 국민의 급격한 보건인식 향상에 의한 위생적인 식품에 대한 욕구의 증가와 발맞추어 이러한 질병들이 시장에 잘못 유통되었을 때는 사회적으로 심각한 파장이 발생할 수 있을 것이다. 좋은 본 보기가 최근 국내에서 발생한 구제역 파동이라 할 수 있다.

마렉병 바이러스 감염 초기에는 심한 면역억압이 필연적으로 발생한다. 따라서 육계와 같은 경우 실제로 종양이 발생할 연령에 도달하기 전에 도계가 되지만, 면역능력은 크게 저하되어 있어서 쉽게 2차 감염이 발생할 수 있다. 이러한 2차 감염에는 닭에서만 발생하는 질병도 있겠지만, 가금의 파라티프스를 일으키는 *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* 등은 식중독의 주요 원인체로서 사망에 이르기까지 심각한 피해를 유발시킬 수 있다.

최근 인간의 유전자에 대한 비밀이 밝혀지면서 사회의 관심을 끌게된 DNA chip 기술은 이를 이용하여 인간의 유전병 및 암 뿐 아니라 각종 동식물의 검역, 식품의 안정성 검사, 신약의 개발, 장기 이식 가능 조직 검사, 용의자나 친자를 확인하는 법의학 영역까지 매우 다양한 응용 방법이 연구, 개발되고 있다. DNA chip을 비롯한 다양한 유전공학적 기법은 첨단 과학기술로써 현재 인간사회가 당면한 의료, 식량, 환경문제, 질병의 치료 및 예방 등을 위하여 전반적으로 활용될 수 있는 부분으로 이를 농축산 분야에 활용한다면 그 파급효과는 실제로 대단하리라 생각되어진다.

수입개방에 따른 농축산물의 국가 경쟁력 강화를 위해 국내 축산업은 생산비 절감과 양질의 축산물 생산 등에 노력해야 하며 또한 최근 발생한 구제역 파동과 같은 해외 악성 전염병의 유입을 차단하는 방법에 노력을 기울여야 하므로 이의 해결책으로 질병 진단의 첨단 기술 개발 연구는 매우 시기 적절할 것으로 생각되어진다. DNA chip을 이용한 가축 질병 진단법의 개발을 통해 우리나라의 축산 경쟁력을 높일 수 있을 뿐 아니라 세계적으로 분자생물학적 진단 기법 분야를 선도해 나가는 좋은 입지를 차지하는데 중요한 역할을 할 것으로 생각되어진다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 닭 마렉병과 백혈병/육종의 감별진단을 위한 DNA chip 진단법 개발

가. 재료 및 방법

1) 표준주 및 야외 분리주

본 연구에 사용된 마렉병 바이러스(Marek's disease virus; MDV) 표준주로는 혈청형 1 MDV 중에서 very virulent strain인 Md5, virulent strain인 JM, apathogenic strain인 CVI988이 있다. 혈청형 2 MDV로는 SB1주를 본 연구에 사용하였으며, 혈청형 3 MDV는 HVT를 사용하였다. 야외 발생 증례로는 03-06-1과 03-06-2를 사용하였다. 또한 국내 야외 분리 MDV 강독주 및 약독주로는 29-1, 29-2, 29-3, 29-5, 30-7, 31-1, 46-1 strains를 사용하였다.

백혈병/육종 그룹 바이러스 내의 subgroups A, B, C, D 표준주는 ATCC사로부터 구입하여 사용하였으며, subgroup J는 영국의 Institute for Animal Health의 Viral Oncogenesis Group의 Dr. K. Venugopal로부터 분양받아 사용하였다.

세포배양액은 M199에 5%의 fetal bovine serum, 항생제(penicillin 100 units, streptomycin 100 μ g, amphotericin B 0.25 μ g per ml)를 첨가하여 제조하였고, 세포배양은 37°C로 조정된 5% CO₂ 배양기에서 수행하였다. 유지배양액은 M199에 2% fetal bovine serum과 항생제(penicillin 100 units, streptomycin 100 μ g, amphotericin B 0.25 μ g per ml)를 첨가하여 제조하였다.

2) 표준주 및 야외 분리주의 인공접종 실험

마렉병 바이러스 표준주인 혈청형 1 강독주 Md5, 혈청형 2 MDV인 HPRS-24, 혈청형 3 MDV인 HVT, MDV 야외 분리주인 29-1를 바이러스 한 주당 1주령 병아리 30마리에 각각 복강으로 10⁴ PFU/0.2 ml씩 투여하였다. 백혈병/육종 바이러스 내의 subgroup A, B, C, D 표준주인 RAV-1, RAV-2, RAV-49, RAV-50 주를 바이러스 한 주당 1주일령 병아리 30마리에 복강 내로 0.2 ml씩 투여하였다. 또한 마렉병 강독주와 백혈병/육종 바이러스를 1주령 병아리 30마리에 각각 2개 주씩 상술한 바이러스 용량으로 복강 내에 접종하였다. 각각의 바이러스를 단독 혹은 혼합감염 시킨 후, 멸균된 음수와 사료를 자유 급여시켰다. 접종 후 10주령까지 임상증상 등을 관찰하였으며, 병변의 발생유무를 확인하기 위하여 매주 3마리씩 경추후두개 탈골법으로 안락사 시킨 후, 부검하여 내부장기의 종양발생 유무를 확인하였으며, 병리조직학적으로 최종 확인하였다. 부검 시에 신장, 비장, 간, 흉선, F낭, 혈액 등을 채취하여, PCR로 바이러스의 유무를 확인하였으며, 일부 조직은 -80 °C 에 보관하였다.

3) Oligonucleotide primers

Oligonucleotide primers는 표준주 및 야외주의 검출을 위한 것과 DNA chip에 사용될 것으로 구분하여 제작하였다. DNA chip에 사용될 PCR 증폭산물을 제작하기 위한 primer pairs는 다음과 같다. 즉 닭 백혈병/육종 그룹의 바이러스 중에서 subgroups A, B, C, D 및 ev를 증폭하기 위해서 닭 백혈병/육종 그룹 바이러스의 env gene 염기서열에서 primer pair를 제작하였으며, subgroup J 바이러스는 LTR 부분의 염기서열에서 primer pair를 제작하였다. 마력병 바이러스 혈청형 1, 2, 3을 동시에 증폭하기 위해서 마력병 바이러스의 pol gene 염기서열에서 primer pair를 제작하였다.

4) DNA 추출

AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit(Bioneer, Seoul, Korea)를 이용하여 표준주 및 야외분리주가 배양된 DEF와 야외 증례 시료 및 상술한 각각의 바이러스를 접종한 닭에서 채취한 재료에서 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 DNase가 없는 50 μ l DDW에 녹여 사용할 때까지 -80°C 에 보관하였다.

5) Single PCR 및 multiplex PCR

마력병 바이러스 혈청형 1, 2, 3 및 닭 백혈병/육종 그룹의 subgroups 바이러스들을 증폭하기 위해서 single PCR 혹은 multiplex PCR을 수행하였다. Single PCR은 추출한 DNA 10 μ l에 5 μ l 10X buffer [100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% gelatin], 5 μ l MgCl₂ (25 mM), 1 μ l 10 mM dNTP, downstream 및 upstream primer pair 1 μ l (50 pmol), 0.5 μ l Taq polymerase, DDW 26.5 μ l를 넣어 총 50 μ l가 되도록 제작하였다. Multiplex PCR용 PCR cocktail 양은 상술한 primer pairs의 양만큼 reaction buffer의 DDW 양을 줄였다. DNA chip에 사용될 single PCR 및 multiplex PCR은 PCR cocktail에 Cy5-dUTP 또는 Cy5-dCTP를 첨가하여 사용하였다. 이러한 PCR 산물들은 ethidium bromide가 들어있는 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 관찰하였다.

6) Probes 제작

Single PCR 혹은 multiplex PCR의 증폭산물에서 마렉병 바이러스 혈청형 1, 2, 3 및 닭 백혈병/육종 그룹의 subgroups 바이러스들을 검출하기 위한 oligonucleotide probes는 증폭하려는 각각의 바이러스 유전자 내에서 각각의 바이러스에 특이적인 염기서열을 선별하여 제작하였다.

7) DNA chip의 제작

상술한 바와 같이 합성한 oligonucleotide probes는 pin microarray 방법을 이용하여 슬라이드 위에 dotting 하였다.

8) Hybridization 및 검출

Single PCR 혹은 multiplex PCR 증폭산물에서 원하는 target DNA를 검출하기 위한 DNA chip의 사용은 아래의 방법에 따라 수행하였다. 즉 Cy5-dUTP 또는 Cy5-dCTP로 표지하면서 single 혹은 multiplex PCR에 의해 합성된 target DNA 10 μ l에 hybridization buffer (50% formamide, 6 \times SSC, 0.5% SDS, 50 mM Na-phosphate, pH 8.0, 5 \times Denhard's) 10 μ l를 섞은 후, tube를 PCR 기계에서 98 $^{\circ}$ C, 3분 동안 가열한다. 그런 다음, 즉시 얼음으로 옮겨 3분 동안 정치하였다. 이러한 반응액은 45 $^{\circ}$ C humid incubator에서 15시간 hybridization을 실시한 후, 슬라이드를 2X SSC, 0.1% SDS에서 5분간, 1X SSC에서 5분간, 0.5X SSC에서 5분간 80 rpm 정도로 흔들어 주면서 세척한 후 1500 rpm에서 5분 동안 원심분리하면서 건조시켰다. 시그널 검출은 Affymetrix 418 array scanner를 이용하여 수행하였다.

나. 결과

1) PCR 기법을 이용한 표준주 및 야외 분리주의 확인

각각의 바이러스에 특이적인 primer pair를 이용하여 표준주 및 야외 분리주를 접종하여 CPE가 형성된 세포에서 DNA를 추출하여 PCR을 수행한 결과, 각각의 바이러스에 특이적인 양성 밴드를 확인할 수 있었다. 따라서 닭 마렉병 및 백혈병/육종 그룹 표준주 및 야외 분리주들이 실제로 존재함을 확인할 수 있어서, DNA chip 개발에 이들 바이러스들을 사용할 수 있음을 확인하였다.

2) 표준주 및 야외 분리주를 접종한 실험용 닭의 병리학적 검사결과

마렉병 바이러스 표준주인 혈청형 1 강독주 Md5, 혈청형 2 MDV인 HPRS-24, 혈청형 3 MDV인 HVT, MDV 야외 분리주인 29-1를 바이러스 한 주당 1주일령 병아리 30마리에 각각 복강으로 10^4 PFU/0.2 ml씩 투여한 후 임상증상을 10주간 관찰하였다. 그 결과 닭에 마렉병 바이러스 강독주를 접종한 실험용 닭 및 마렉병 바이러스 강독주와 백혈병/육종 그룹의 바이러스를 동시에 접종한 닭에서는 접종 후 1일령에 침울 소견을 관찰할 수 있었다. 하지만 혈청형 2 및 3 마렉병 바이러스를 접종한 실험용 닭에서는 어떠한 임상증상도 관찰할 수 없었다. 또한 백혈병/육종 그룹의 바이러스를 접종한 닭에서는 어떠한 임상증상도 관찰되지 않았다. 접종 후 10주령까지 각각의 실험용 닭을 매주 3마리씩 부검하여 육안적으로 병변의 유무를 확인한 결과, 어떠한 종양병변도 각각의 실험용 닭에서 관찰되지 않았다. 하지만 강독주 마렉병 바이러스를 접종한 닭에서 접종 후 1주령부터 10주령 때까지 각각의 장기 및 조직을 채취하여 조직학적으로 관찰한 결과, F낭과 흉선은 접종 2주령부터 위축이 관찰되어 지속적으로 위축소견이 관찰되었으며, 간, 비장, 폐 등의 장기에서는 접종 3주령 이후부터 혈관 주위에 마렉병의 전형적인 조직소견인 다양한 크기의 림프구의 증식이 관찰되었다. 하지만, 혈청형 2 및 3 마렉병 바이러스와 닭 백혈병/육종 그룹의 바이러스들을 접종한 닭에서는 어떠한 조직학적 병변도 관찰되지 않았다.

3) 표준주 및 야외 분리주를 접종한 실험용 닭에서 바이러스 존재 유무 검사

마렉병 바이러스 표준주인 혈청형 1 강독주 Md5, 혈청형 2 MDV인 HPRS-24, 혈청형 3 MDV인 HVT, MDV 야외 분리주인 29-1를 바이러스 한 주당 1주일령 병아리 30마리에 각각 복강으로 10^4 PFU/0.2 ml씩 투여한 후, 매주 3마리씩 부검하여 채취한 신장, 비장, 간, F낭, 흉선, 혈액을 대상으로 혈청형 1, 2, 3 마렉병 바이러스를 동시에 증폭할 수 있는 primer pair (pol gene의 일부분)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, 혈청형 1 마렉병 바이러스인 Md5와 야외 강독주인 29-1를 접종한 닭에서는 접종 1주일령부터 실험이 끝날 때까지 양성의 반응이 지속적으로 검출되었다. 하지만 혈청형 2 및 3 마렉병 바이러스 표준주의 경우에는 양성의 반응을 실험기간 내에 관찰할 수 없었다. 또한 백혈병/육종 바이러스 내의 subgroup A, B, C, D 표준주를 접종한 증례에서도 접종 후 1주까지는 PCR에 의

해서 양성의 반응을 확인할 수 있었다.

4) DNA chip 진단법 개발

닭 마렉병 바이러스 혈청형 1-3 바이러스들과 백혈병/육종 그룹 내의 subgroup A, B, C, D, E, J 바이러스들을 DNA chip을 이용하여 감별진단하기 위해서, 마렉병 바이러스 표준주인 혈청형 1, 2, 3 바이러스와 마렉병 바이러스 야외 강독주 분리주 그리고 백혈병/육종 그룹 내의 subgroup A, B, C, D, J 바이러스를 대상으로 DNA chip을 응용하였다. 마렉병 바이러스 혈청형 1-3까지 동시에 증폭시킬 수 있는 primer pair, 백혈병/육종 그룹 내의 subgroups A-E까지 동시에 증폭시킬 수 있는 primer pair, 그리고 subgroup J 바이러스를 증폭시킬 수 있는 primer pair를 이용하여 각각의 바이러스들을 증폭시킨 후, DNA chip에 hybridization을 시켰다. 그 결과, 각각 바이러스들의 특이적인 spot에서 양성의 반응이 관찰되었다. 또한 DNA chip system의 혼합감염의 감별여부를 확인하기 위하여, 각각의 바이러스가 증식한 배양세포를 혼합한 후, DNA를 추출하여, multiplex PCR을 수행하여, DNA chip에 hybridization 시켰다. 그 결과, 각각의 양성반응을 DNA chip 슬라이드에서 관찰할 수 있었다.

닭 마렉병 바이러스 혈청형 1-3 바이러스들과 닭 백혈병/육종 그룹 내의 subgroups A-D 바이러스를 각각 혹은 혼합감염 시킨 닭에서 각각의 바이러스의 검출을 알아보기 위해서 DNA chip을 사용하였다. 마렉병 바이러스 혈청형 1-3까지 접종한 닭에서 채취한 장기나 조직에서, 양성의 반응은 오직 혈청형 1 마렉병 바이러스를 접종한 닭에서 지속적으로 관찰되었다. 닭 백혈병/육종 그룹 바이러스를 접종한 닭에서는 오직 양성의 반응이 접종 1주령과 2주령에서 관찰되었으며, 그 이후에는 관찰되지 않았다. 혼합감염 시킨 것에서도 상술한 결과와 유사하게, 마렉병 바이러스 강독주만이 지속적으로 관찰되었으며, 백혈병/육종 바이러스는 접종 1주일령과 2주일령에서만 관찰되었다.

2. 국내에서 분리한 닭 마렉병 바이러스의 특성규명

가. 재료 및 방법

1) 바이러스 표준주 및 세포배양주

혈청형 1 마렉병 표준주인 Md5주(very virulent MDV), GA주(virulent MDV), CVI988주(apatogenic MDV), 혈청형 2 마렉병 표준주인 HPRS-24주, 혈청형 3 마렉병 바이러스인 herpesvirus of turkey (HVT)주를 본 실험의 비교주로 사용하였다. 이러한 표준주 및 야외 증례에서 바이러스를 배양 혹은 분리하기 위해서 duck embryo fibroblasts (DEF)와 chicken embryo fibroblasts (CEF)를 오리 및 닭의 유정란에서 제작하여 사용하였다. 세포배양액은 M199에 5%의 fetal bovine serum, 항생제(penicillin 100 units, streptomycin 100 μ g, amphotericin B 0.25 μ g per ml)를 첨가하여 제조하였고, 세포배양은 37°C로 조정된 5% CO₂ 배양기에서 수행하였다. 유지배양액은 M199에 2% fetal bovine serum과 항생제(penicillin 100 units, streptomycin 100 μ g, amphotericin B 0.25 μ g per ml)를 첨가하여 제조하였다.

2) 야외 닭 가검물에서 바이러스 분리

전남지역의 총 8개 산란계 및 토종닭 양계장에서 의뢰된 35마리 닭에서 채취한 혈액 및 비장을 이용하여 마렉병 바이러스의 분리를 시도하였다. 이러한 양계장은 신경증상 및 쇠약을 특징으로 하는 임상소견을 보였으며, 마렉병 바이러스의 polymerase gene 및 meq gene에 특이적인 primer pair를 이용한 PCR에서 양성 반응을 보였던 것이었다. 살아있는 닭에서 혈액은 EDTA가 들어 있는 주사기를 이용하여 심장 천자하여 채혈하였고, 비장은 멸균적으로 채취한 후, 유지배양액 내에서 슬라이드 글라스로 잘게 마쇄하여 단일 세포로 만들었다. 혈액과 비장 세포는 OptiPrep을 이용하여 제조회사의 지시에 따라 peripheral blood mononuclear cells (PBMC)와 비장 림프구를 추출하였다. 이러한 PBMC와 비장 림프구는 DEF와 섞은 후 세포배양액에서 배양하였다. 이러한 배양액이 monolayer가 형성되면, 세포배양액을 버린 후 유지배양액을 첨가하여 배양을 시작하였다. 배양세포에서 세포변성효과(cytopathic effect; CPE)가 관찰되면, 유지배양액을 버린 후 trypsin을 첨가하여 배양세포를 수거하여, 새로운 DEF를 넣어 계대 배양을 실시하였다. 계대배양은 총 5회 수행하였다.

3) DNA 추출

AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit를 이용하여 표준주 및 야외분리주가 배양된 DEF에서 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 DNase가 없는 50 μ l DDW

에 녹여 사용할 때까지 -80°C 에 보관하였다.

4) Oligonucleotide primer pairs

본 연구에서 사용된 마력병 진단용 primer pairs와 유전자 염기서열 분석용 primer pairs를 제3장 제2절 2차년도 Table 4에 제시하였다.

5) 중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction; PCR)

국내 분리주의 meq, pp38, vIL-8 유전자의 염기서열을 분석하기 위하여, 각 유전자에 특이적인 primer pairs를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 추출한 DNA 10 μl 에 5 μl 10X buffer [100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl_2 , 0.01% gelatin], 5 μl MgCl_2 (25 mM), 1 μl 10 mM dNTP, downstream 및 upstream primer pair 1 μl (50 pmol), 0.5 μl Taq polymerase (5 U/ μl , Promega, Madison, WI), DDW 26.5 μl 를 넣어 총 50 μl 가 되도록 제작하였다. 그리고 meq, pp38 유전자를 증폭시키기 위해서 94°C 에서 5분간 preheating 시킨 후, 94°C 에서 1분, 55°C 에서 1분, 72°C 에서 1분씩 총 35회 반복하여 반응시킨 후, 최종 72°C 에서 10분간 반응시켰다. vIL-8은 94°C 에서 5분간 preheating 한 다음, 94°C 에서 1분, 45°C 에서 1분, 72°C 에서 1분씩 총 35회 반복하여 반응시킨 후, 최종 72°C 에서 10분간 반응시켰다. 이러한 PCR 산물들은 ethidium bromide가 들어있는 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 관찰하였다.

6) 핵산 및 아미노산 염기서열 분석

PCR로 증폭된 DNA는 QIAEX II gel extraction kit를 사용하여 정제하였다. 그리고 ABI system 3700을 이용하여 염기서열을 판독한 후, DNASIS 프로그램을 이용하여 국내 분리주 및 표준주의 염기서열과 아미노산 서열을 분석하였다. 또한 계통도는 MEGA version3.1의 UPGMA 방법을 이용하여 상관관계를 분석하였다.

나. 결과

1) 국내 양계장 닭에서 마력병 바이러스의 분리

마력병 바이러스에 특이적인 primer pairs를 이용한 PCR에 의해서 마력병 양

성으로 판정된 총 8개 양계농가의 35마리 닭 중에서 5개 농가 14마리의 닭에서 총 14개의 마렉병 바이러스가 분리되었다. 분리된 마렉병 바이러스는 DEF와 혼합 배양한 후 1차 계대부터 4-5일후에 CPE가 형성되었다. 마렉병 바이러스의 증식에 의해서 유발된 CPE는 세포의 크기가 줄어들어 원형화 되었으며, 집락의 형태로 관찰되었다. 하지만 mock 접종한 DEF에서는 CPE가 관찰되지 않았다. 이렇게 CPE가 형성된 DEF를 마렉병 진단용 primer pairs를 이용한 PCR에서 마렉병 바이러스에 특이적인 양성 반응을 모두 보였다.

2) 국내 마렉병 분리주에서 PCR을 이용한 meq, pp38, vIL-8 유전자의 검출

meq 유전자는 순화되어짐에 따라 proline-rich region의 copy 수의 차이로 인해 다양성이 증가된다. 따라서 한국에서 분리한 MDV 유전자 meq의 다양성을 알아보기 위해, meq 유전자에 특이적인 primer pair를 이용하여 7개 분리주에 대하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 한국에서 3종류의 meq를 전기영동상에서 관찰할 수 있었다. 즉 총 7개의 분리주에서 2개 분리주(29-1 및 46-1 strains)는 L-meq이 관찰되지 않았고, meq과 S-meq만을 관찰할 수 있었다. 반면에 나머지 5개의 분리주(29-2, 29-3, 29-5, 30-7 및 31-1)는 meq과 S-meq 외에도 L-meq이 관찰되었다. 따라서 29-1 및 46-1 마렉병 바이러스 분리주는 강독주로 추정되며, 그 외의 것들은 비교적 약독화된 주로 추정된다. 또한 pp38과 vIL-8에서는 특이적인 primer pairs로 PCR을 수행했을 때, 각각의 유전자에 특이적인 특정 크기의 양성 밴드를 관찰할 수 있었다.

3) meq 유전자 염기 및 아미노산 서열 분석

마렉병 바이러스 종양 유전자인 meq 유전자의 다양성을 확인하기 위하여 국내 분리주 7개 주의 meq 유전자 일부분(583 bp)을 PCR로 증폭하여 정제한 후 염기서열을 분석하였다. 염기서열을 분석한 결과 총 13개의 치환이 일어났으며, 이로 인해 총 10개의 point mutation이 아미노산 서열상에서 관찰되었다. 특이적인 것은 meq의 아미노산 서열 194번에서 비교적 강독주로 생각되는 국내 분리주 29-1과 46-1의 프롤린이 그 외의 29-2, 29-3, 29-5, 30-7, 31-1주들에서는 삭제되었다는 것이다. 또한 29-1주는 아미노산 서열 176과 179에서 다른 마렉병 바이러스 주들에서는 관찰되지 않았던 29-1주 특이적인 아미노산 치환이 있었다.

meq 유전자 염기서열을 이용하여 계통도를 분석한 결과, 마렉병 바이러스는 크게 2개로 그룹화(groups I and II) 되었다. 특히 염기서열을 이용한 계통도 분석에서 group I에 속하는 바이러스는 다시 2개의 subgroup으로 분리되었으며, subgroup 1은 A type 및 B type으로 세분되었다. A type에는 세계의 subtypes (types a, b and c)로 구성되어 있었으며, 국내 분리주 대부분(29-2, 29-3, 31-1, 30-7, 29-5 and 46-1 strains)은 A type 내의 subtype a에 속해있었다. B type은 오직 하나의 subtype (571 and 573 strains)만 존재하였다. Subgroup 2에는 오직 29-1 strain만 속해있었다. Group II는 크게 두 개의 subgroup (1 and 2)로 세분되었다. Subgroup 1에는 New strain만 속해 있었으며, subgroup 2는 다시 2개의 types (types 1 and 2)로 세분되었다. Subgroup 2의 type 1에는 U, 686, N, 648A, 660-A strains가 속해 있었다. Subgroup 2는 type은 다시 subtype 1과 2로 세분되었다. Subtype 1은 643P strain만 속해있었으며, subtype 2에는 TK, 595, X, 549, L 및 RL strains들이 속해있었다.

meg 유전자 아미노산 서열을 바탕으로 계통학적 분석을 실시한 결과, 염기서열분석결과와 유사하게 마렉병 바이러스는 크게 2개로 그룹화(groups I and II) 되었다. Group I에 속하는 바이러스는 다시 2개의 subgroup으로 분리되었으며 (subgroups 1 and 2), subgroup 1은 두 개의 types (types 1 and 2)로 세분되었다. Type A는 또다시 subtype a (RB1B, CVI988, 29-2, 29-3, GA, 31-1, 30-7, 29-5 and 46-1 strains), subtype b (W and Md5 strains), subtype c (617A, 567 and 637 strains)로 세분되었다. Group 1 내의 subgroup 2에는 517 및 573 strains만 속해있었다. Group II는 다시 subgroup 1과 2로 세분되었으며, subgroup 1에는 오직 New strain만 속해있었다. Group II 내의 subgroup 2에는 type A (686, 660-A, U, 648-A and N strains), type B (643P strain), type C (RL, X, 595, PK, L and 549 strains)로 세분되었다.

4) 국내 마렉병 바이러스 분리주의 pp38 유전자에 대한 계통학적 분석

마렉병 바이러스 초기 유전자인 pp38에 대한 염기서열의 변화에 따른 계통학적 차이점을 밝혀내기 위하여, 국내 분리주 7개주에 대한 pp38 유전자 일부분(850 bp)을 PCR로 증폭한 후, 증폭산물을 정제하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열을 계통학적으로 분석한 결과, 마렉병 바이러스들은 크게 2개의 group 즉 group I과

II로 분류할 수 있었다. 또한 group I에는 subgroup 1과 2로 구성되어 있었으며, subgroup 1에는 types A 및 B가 존재하였다. Type A에는 Md5, Md11, GA, 29-1, 46-1 strains로 구성되어 있었으며, type B에는 29-5, CVI988, 30-7, 29-2 strains로 구성되어 있었다. Subgroup 2에는 31-1 strain만 존재하였다. Group 2에는 국내 분리주인 29-3 strain만 있었다.

염기서열을 아미노산으로 치환하여 계통학적으로 분석한 결과, 마렉병 바이러스들은 크게 2개의 group 즉 group I과 II로 분류할 수 있었다. 또한 group I에는 subgroup 1과 2로 구성되어 있었으며, subgroup 1에는 types A 및 B가 존재하였다. Type A에는 GA, 29-1, Md5, Md11 strains로 구성되어 있었으며, type B에는 46-1 strain으로만 구성되어 있었다. Subgroup 2에도 types A 및 B가 존재하였는데, type A에는 29-5 strain으로 구성되어 있었다. Type B에는 31-1, 30-7, CVI988, 29-2 strains로 구성되어 있었다. Group 2에는 오직 29-3 strain만 존재하였다.

5) 국내 마렉병 바이러스 분리주의 vIL-8 유전자에 대한 계통학적 분석

vIL-8 유전자는 3개의 엑손으로 구성된 유전자이다. 국내 분리주 6개 주와 외국 보고주간의 vIL-8 유전자 일부분(710 bp)를 대상으로 계통학적으로 분석한 결과, 마렉병 바이러스는 총 2개의 group (groups I and II)으로 구분되었다. Group I에는 subgroup 1과 2로 구성되어 있었으며, subgroup 1은 다시 types A 및 B로 세분되었다. Type A는 subtype a (Md11, RB1B, 29-5, 31-1, CVI988, 29-2, CU2, 29-3 strains)과 subtype b (584A, PK-1, Md5 strains)로 세분되었다. Type B에는 GA strain으로만 구성되어 있었다. Subgroup 2에는 29-1 strain만 존재하였다. Group II는 오직 46-1로만 구성되어 있었다.

3. 국내 육용종계 및 재래닭 종란에서 외인성 및 내인성 레트로바이러스의 검출 및 내인성 레트로바이러스의 분자적 특성규명

가. 재료 및 방법

1) 육용종계 및 재래닭 종란

국내에서 가장 많이 사육하고 있는 육용계는 Cobb, Ross, 그리고 Hubbard이

다. 따라서 Cobb 종란장 18계 농가, Ross 종란장 1계 농가, Hubbard 종란장 1계 농가에서 유정란을 구입하여 본 실험에 사용하였다. 또한 국내 재래닭인 오골계, 흑색계, 적색계, 황색계의 유정란과, SPF White Leghorn chicken의 유정란을 본 실험에 사용하였다. 유정란은 11일령까지 부란기에서 성숙시킨 후, 태아를 끄집어 내어 계태아세포를 만들었다.

2) DNA 추출

DNA는 Cobb, Ross, Hubbard, 4개 재래닭 품종 및 White Leghorn chicken의 11일령 계태아세포에서 DNA Extraction Kit를 이용하여 추출하였다. 또한 외인성 레트로바이러스의 검출을 위한 positive control로 RAV-1 (subgroup A), RAV-2 (subgroup B), RAV-49 (subgroup C) 및 RAV-50 (subgroup D) strains를 American Type Culture Collection에서 구입하여 사용하였으며, HPRS-103 strain (subgroup J)는 영국 Institute for Animal Health의 Viral Oncogenesis Group의 Dr. K. Venugopal로부터 DNA를 분양받아 사용하였다. 추출한 DNA는 DNase가 없는 100 μ l DDW에 녹여 사용할 때까지 -80°C 에 보관하였다.

3) 중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction; PCR)

계태아세포에서 내인성 및 외인성 레트로바이러스를 검출하기 위해 다양한 primer pairs를 사용하였으며, 이에 대해서는 제3장 제2절 3차년도 Table 1 및 3에 요약되어 있다. PCR은 추출한 DNA 5 μ l에 5 μ l 10X buffer [100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% gelatin], 5 μ l MgCl₂ (25 mM), 1 μ l 10 mM dNTP, downstream 및 upstream primer pair 1 μ l (50 pmol), 0.5 μ l Taq polymerase, DDW 31.5 μ l를 넣어 총 50 μ l가 되도록 제작하여 수행하였다. 이러한 PCR 산물들은 ethidium bromide가 들어있는 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 관찰하였다.

4) 염기 및 아미노산 서열 분석

내인성 레트로바이러스의 염기 및 아미노산 서열분석을 위해서 각각의 primer pairs를 이용하여 ev 및 ev/J 바이러스는 env 유전자의 일부분을, EAV 바이러스는 TM 및 LTR 사이의 부분을, ART-CH의 경우는 gag-related region을 증폭하

였다. 증폭된 DNA는 QIAEX II gel extraction kit를 사용하여 정제하였다. 그리고 ABI system 3700을 이용하여 염기서열을 판독한 후, DNASIS 프로그램을 이용하여 국내 분리주 및 표준주의 염기서열과 아미노산 서열을 분석하였다. 또한 계통도는 MEGA version3.1의 neighbor-joining이나 UPGMA 방법을 이용하여 상관관계를 분석하였다.

나. 결과

1) PCR 기법에 의한 외인성 닭 백혈병/육종 그룹 바이러스의 유정란에서 검출

외인성 닭 백혈병/육종 그룹 바이러스의 검출을 Cobb, Ross, Hubbard, 국내 재래닭 4개 품종 및 SPF White Leghorn chickens의 계태아세포에서 시도하였다. 외인성 레트로바이러스 subgroups A-D 및 J의 표준주를 이용한 PCR에서는 각각의 바이러스에 특이적인 양성의 밴드를 확인할 수 있어서, 본 실험에서 사용한 PCR 기법이 이러한 바이러스 검출에 특이적임을 알 수 있었다. 따라서 각각의 바이러스에 특이적인 primer pairs를 이용하여 국내에서 사육중인 육용종계, 재래닭, White Leghorn chicken의 계태아세포에서 추출한 DNA를 대상으로 PCR을 수행한 결과, 어떠한 양성의 밴드도 확인할 수 없었다. 이러한 결과는 국내 육용종계, 재래닭 등에서 외인성 레트로바이러스가 부재함을 증명하는 것이었다.

2) PCR 기법에 의한 계태아세포에서 내인성 레트로바이러스의 검출

지금까지 알려진 닭의 내인성 레트로바이러스는 EAV, ev, ev/J 및 ART-CH가 있다. 이러한 내인성 레트로바이러스에 특이적인 primer pair를 이용하여 국내 육용종계, 재래닭, White Leghorn chicken의 계태아세포에서 추출한 DNA를 대상으로 PCR을 수행한 결과 모든 계태아세포에서 각각의 바이러스에 특이적인 양성의 밴드를 확인할 수 있었다.

3) EAV 내인성 레트로바이러스의 분자적 특성

국내 재래닭에서 증폭된 EAV 바이러스의 TM 및 LTR 사이의 유전자 염기서열을 분석한 결과, 국내 재래닭 사이에서는 100%의 상동성을 보였으며, EAV-0 및 Cobb, Ross, Hubbard와는 99.2%-99.6%의 높은 상동성을 보였다. 하지만 국내 재래닭 및 Cobb, Ross, Hubbard는 E-51과는 73.8%-74.6%의 낮은 상동성을 보였

다. 더욱이 아미노산 서열로 치환한 후 비교한 결과, 국내 재래닭 및 Cobb, Ross, Hubbard에서 검출된 EAV는 상호간에 100%의 상동성을, EAV-0와는 98.7%의 상동성을, 그러나 E-51과는 70.88%의 상동성을 보였다. 이러한 결과는 국내 EAV는 EAV-0와 매우 밀접한 관계를 보이지만, E-51과는 진화론적으로 상이함을 의미한다.

염기서열 및 아미노산 서열의 치환에 의한 계통학적 분석을 실시한 결과, EAV는 총 4개의 그룹으로 분류할 수 있었다. 첫 번째 그룹은 18개의 Cobb 농장 (EAV-1~18), 1개의 Ross 농장에서 검출한 EAV가 있었으며, 두 번째 그룹은 국내 재래닭 및 EAV-0가 속해 있었다. 세 번째 그룹은 오직 Hubbard 종란에서 검출된 것이 속해 있었으며, 네 번째 그룹은 E-51만 속해 있었다.

4) ART-CH 내인성 레트로바이러스의 분자적 특성규명

ART-CH 내인성 레트로바이러스는 오직 Brown Leghorn chickens에 대해서 보고되어, 그 외의 품종에서의 감염여부와 분자적 특성은 규명되어 있지 않다. 또한 ART-CH는 여러 곳에서 다수의 염기들이 삭제되어 있기 때문에 아미노산을 encoding 하지 않고 있어서, 본 연구에서는 오직 염기서열만 분석하였다. ART-CH의 gag-related nt sequences에 특이적인 primer pair를 이용하여 PCR을 수행한 후 염기서열을 비교한 결과, 국내 육용종계간에는 98.6% 이상의 높은 상동성을 보였으며, ART-CH clone 5와는 94-95.8%를 clone 14와는 91.0-91.8%의 비교적 낮은 상동성을 보였다.

염기서열의 치환과 삭제에 의한 계통학적 분석에서, ART-CHs는 4개의 그룹으로 분류할 수 있었다. 또한 첫 번째 그룹은 2개의 subgroup으로 세분되었는데, 첫 번째 subgroup은 Cobb, Hubbard, 세 개의 국내 토종닭(흑색계, 적색계, 황색계)에서 검출된 ART-CHs가 속해 있었다. 반면에 두 번째 subgroup은 Ross에서 검출된 ART-CH가 속해 있었다. 두 번째 group은 오직 오골계에서 검출된 ART-CH만 속해 있었으며, 세 번째와 네 번째 group은 각각 ART-CH clone 5와 14가 각각 속해 있었으며, groups 1과 2와는 계통학적으로 차이가 있음을 알 수 있었다.

5) ev 내인성 레트로바이러스의 분자적 특성

ev 바이러스에 특이적인 primer pair를 제작하여 PCR을 수행한 후 염기서열을

비교하였다. 염기서열 치환에 의한 상동성의 차이 검사에서 국내 재래닭에서는 1.2%의 상동성 차이가 적색계와 황색계 사이에서 검출되었으며, 이러한 차이는 2.73%의 아미노산 상동성 차이를 일으켰다. 이러한 염기 및 아미노산 서열의 상동성은 외국에서 보고된 것과 비교하였을 때 조금 증가하는 경향을 보였는데, 즉 ev-1과는 염기서열에서 98.8%-99.8%, 아미노산 서열에서는 97.95%-99.0%를, ev-3와는 염기서열에서 98.4%-98.9%를 아미노산 서열에서는 97.49%-98.86%를, ev-6과는 염기서열에서 98.2%-98.6%를 아미노산 서열에서는 96.36%-97.50%의 차이를 보였다. 다른 내인성 레트로바이러스와 비교하였을 때, ev 내인성 레트로바이러스의 염기 및 아미노산 서열의 상동성은 높은 편이었다. 이러한 염기 및 아미노산 서열의 치환에 의한 계통학적 분석에서, ev 내인성 레트로바이러스는 총 3개의 그룹으로 분류할 수 있었다. 첫 번째 group은 또한 3개의 subgroup으로 세분되었는데, 첫 번째 subgroup은 18개의 Cobb, 1개의 Ross, 1개의 Hubbard 육용종계에서 검출된 ev 바이러스가 속해 있었다. 두 번째 subgroup은 재래 닭인 흑색계, 오폭계, 회색계에서 검출된 것이 속해 있었으며, 세 번째 subgroup은 재래 닭인 적색계에서 검출된 ev 바이러스가 속해 있었다. 두 번째 group은 ev-3가 subgroup 2a를 형성하였으며, ev-1과 ev-6가 subgroup 2b를 형성하였다. 이러한 모든 ev 내인성 레트로바이러스는 subgroups A, B, C 및 D 바이러스와는 계통학적으로 거리가 멀었다.

6) ev/J 내인성 레트로바이러스의 분자적 특성규명

ev/J 내인성 레트로바이러스의 env 유전자 일부분에 대한 primer pair를 제작하여 PCR을 수행한 후, 염기 및 아미노산 서열을 비교분석한 결과, 국내 육용계 및 외국 보고주와는 96.8%-98.1%의 염기서열 상동성을 보였으며, 아미노산 서열 상동성은 94.63%-96.98%를 보였다. 비록 ev/J 내인성 레트로바이러스간에 높은 염기 및 아미노산 서열의 상동성을 보였지만, 계통학적으로는 3개의 그룹으로 분류할 수 있었다. 첫 번째 그룹은 다시 두 개의 subgroup으로 분류할 수 있었는데, 첫 번째 subgroup은 Hubbard (ev/J-H), grey jungle fowl, Cobb (ev/J-C2~5, 7, 8, 13, 14), Ross (ev/J-R) 및 재래 닭 흑색계 (ev/J~B), 오폭계 (ev/J-O), 적색계 (ev/J-D)가 속해 있었다. 반면에 두 번째 subgroup에는 Cobb (ev/J-C1, 9~12)가 속해 있었다. 두 번째 group도 2개의 subgroup으로 세분되었는데, 첫 번째

subgroup에는 line 21 닭이 속해있었고, 두 번째 subgroup에는 Cobb (ev/J-C15), 재래닭 회색계((ev/J-L), 그리고 red jungle fowl이 속해있었다. 계통학적으로 group 2에 속해있는 ev/J 바이러스들이 subgroup J 백혈병/육종 바이러스와 가장 가까운 사이에 있었다. 세 번째 group은 다시 4개의 subgroup으로 분류할 수 있었다. 첫 번째 subgroup은 Cobb 일부 (ev/J-C6, C16)가 속해 있었고, 두 번째 subgroup에도 Cobb 일부 (ev/J-C17)가, 세 번째 subgroup에는 line N 닭이, 네 번째 subgroup에는 하나의 Cobb (ev/J-C18)가 속해 있었다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

- 가. 본 연구를 진행하는 동안 방문한 양계장에서 마렉병 발생이 거의 모든 농가에서 관찰되었다. 이러한 양계농가는 모두 마렉병 바이러스에 대하여 백신을 투여하고 있으나, 마렉병이 발생하고 있음을 알 수 있다. 따라서 향후에는 마렉병 백신 프로그램의 재조정이나 새로운 차원의 마렉병 바이러스 백신을 개발하여야 할 것이다.
- 나. 국내에서 가장 많이 사육하고 있는 육용계 종란장 및 재래닭의 유정란에서 닭 백혈병/육종 그룹의 subgroups A, B, C, D 및 J 바이러스는 검출되지 않아, 종란을 통한 이러한 바이러스의 난계대 감염은 훌륭히 방제되고 있음을 알 수 있었다. 하지만 지금까지 알려진 모든 내인성 레트로바이러스의 감염이 국내 육용계 및 재래닭에서 검출되었다. 내인성 레트로바이러스의 문제점은 새로운 강독형 바이러스의 출현을 일으킬 수 있다는 것이다. 좋은 예가 국내는 물론 전 세계적으로 발생하여 막대한 경제적 피해를 유발한 J 바이러스가 대표적이다. 따라서 향후 연구에서는 이러한 내인성 레트로바이러스 유전자를 유정란에서 제거하여 안전한 종계를 만드는 것이 필요할 것이다.
- 다. 본 연구에서 개발한 DNA chip 진단기법은 세계 최첨단의 진단법으로, 이러한 기법을 국립수의과학검역원, 각 시도의 축산기술개발 연구소 및 기업의 진단기관에 전수하여 닭의 바이러스성 종양의 감별진단에 활용하도록 한다.
 - ▶ 각 기관에서 발생하는 인력 및 시간적 낭비를 최소화시키고 합리화시켜 다른 중요 가축질병의 예방, 방역 및 진단에 더욱 더 많은 효과를

가져 올 수 있도록 할 것임

- ▶ 본 연구에서 개발한 기법을 쉽고 간편하게 임상에서 적용하도록 하여 질병을 예방하고 방제하는 감시인원의 비능률적인 단면들을 개선하여 인건비의 감소와 더불어 더욱 적극적이고 체계적인 방역활동을 수립할 수 있도록 함
- ▶ 궁극적으로 축산업의 국제 경쟁력이 조성될 것임

라. 본 연구과제를 통해 개발된 진단 기법에 대한 노하우 활용

- ▶ 동물의 전염성 질환에 대한 DNA chip 진단기법의 개발은 전 세계적으로 미미한 수준임
- ▶ 따라서 본 연구를 통해 획득한 DNA chip 진단기법에 대한 노하우는 다른 동물 질병의 진단법 개발에 바로 활용할 수 있음
- ▶ 분자생물학적 연구의 유용한 자료로서 활용될 수 있으며 국내 진단업체의 수준을 향상시키는데 이바지 할 수 있음

SUMMARY

I. Title

Development of DNA chip Diagnostic Method for the
Differential Diagnosis of Marek's Disease and
Leukosis/Sarcoma of Chickens

II. Purpose and Rationale of Research and Development

1. Purpose of Research and Development

The final goals of this study are development of DNA chip diagnostic method for the differential diagnosis of Marek's disease and leukosis/sarcoma of chickens, which continuously cause huge economical losses.

2. Rationale

Technical Aspect

Tumor diseases occurring in chickens are one of the most disastrous diseases worldwide because of the difficulty of prevention, diagnosis and treatment. The chicken tumors are usually caused by oncogenic viruses, retroviruses and herpesviruses. Avian leukosis/sarcoma group viruses (ALSV) within *retroviridae* caused variable tumors including lymphoid leukosis, erythroblastosis, myeloblastosis, myelocytoma, nephroblastoma, hemangioma, osteopetrosis, etc. Although reticuloendotheliosis virus within gammaretrovirus can also induce experimentally lymphoid tumor, the tumors caused by this virus are not reported in the field chicken farms.

The viruses belonging to ALSVs can cause lymphoid leukosis. These

viruses have a viral oncogene. For example, virus containing each v-erbB, v-myb, v-myc genes can cause erythroblastosis, myeloblastosis, myelocytoma, respectively. Although these viruses possess each viral oncogene, these viruses usually induce lymphoid leukosis because massive infection of these viruses in the young susceptible chicks are impossible in the field conditions.

Marek's disease virus causing CD3⁺CD4⁺CD8⁻ lymphoma is recently reclassified into alphaherpesvirus by the results of genome analysis. Marek's disease viruses are classified into 3 serotypes whose serotype 1 can cause lymphoma formation in the chickens. Serotype 1 Marek's disease virus can be further classified into very virulent plus, very virulent, virulent and apathogenic strains. In the previous studies, serotype 1 Marek's disease viruses can be differentiated by PCR with primer pair targeting 132 bp tandem repeats present in the long terminal repeat and long internal repeat: virulent strains have under 3 tandem repeats whereas apathogenic strains have over 4 tandem repeats on the gels. Sometimes, it is very difficult to interpretate the PCR results because the PCR frequently makes false positive bands.

Serotype 1 Marek's disease virus causes lymphoma in the liver, spleen, kidney etc. in the late infection. In addition, Marek's disease virus destructs the bursa of Fabricius and thymus, resulting in severe immunosuppression. Consequently, chickens infected with Marek's disease virus are very vulnerable to infect with 2nd infection. Because these 2nd infections caused by primary Marek's disease virus infection are usually passed over, economic losses due to Marek's disease are repeated in the farms. Moreover, recent occurrence of very virulent plus Marek's disease virus strains stunned the poult industry.

Although avian viral tumors can be diagnosed by variable techniques, histopathological tool is classically and the most frequently used method to diagnose the these tumors. Generally, Marek's disease virus causes pleomorphic lymphomas and ALSV causes lymphoblastic lymphoma. However, the late stage tumors caused by Marek's disease virus may consist of lymphoblastic lymphoma cells. Therefore, pathologists can easily misdiagnose

the Marek's disease tumor to leukosis/sarcoma tumor.

Currently, many diagnostic methods including virus isolation, viral antigen or nucleic acid detections and serum antibody detection are reported to diagnose the viral tumors. However, it is very difficult to differentiate between pathogenic and apathogenic serotype 1 Marek's disease virus by these methods. In addition, it is very difficult to use antigen or nucleic acid detection methods because tumor cells contained very few viral antigens and nucleic acids. ALSV subgroup A, B, C, D and J viruses are also very fastidious.

Since vaccines against the ALSVs are currently not developed, the ALSVs disease can not be protected. New virulent Marek's disease virus strains which can not be protected by currently used vaccines are emerged 10 years period. Therefore, diagnostic methods promising rapidity and accuracy should be urgently developed in order to eliminate the viral tumor diseases in the early time of occurrence.

The DNA chip diagnostic method is suitable for the diagnosis of multiple agents in the same time. Therefore, we will develop DNA chip diagnostic method for the differential diagnosis of serotypes 1, 2, 3 Marek's disease viruses and ALSV subgroups A, B, C, D, E and J viruses in the same time. This diagnostic method may provide the strategy to the protection and treatment of viral diseases.

Industrial aspect

The domestic livestock industry should develop competitive power because Korea has opened market in a full-scale. To develop competitive power, the productivity of livestock industry should be improved using the advanced scientific tools. An obstacle of livestock industry in Korea is "disease" because the diseases are attributable to decrease 20% losses in the total livestock output. Therefore, advanced methods should be applied to increase productivity of livestock industry.

The poultry industry in Korea is rapidly developed; 50 million layers and 45

million broilers are reared in Korea in 2002. Therefore, farm sizes are growing in the parallel with the number of chickens reared in Korea. The problems of large scale farms are rapid spread of malignant infectious diseases resulting in huge economic losses. Therefore, the diagnostic methods promising rapidity and accuracy should be urgently developed in order to eliminate the viral tumor diseases in the early time of disease occurrence.

The one of background for the rapid development of Korean poultry is use of the imported good breeds of chickens. On the contrast of this advantage, malignant infectious diseases can flow into Korean poultry farms and eventually can make economic problems. For example, ALSV subgroup J virus emerged in the Korean poultry farms and caused huge economic losses. Therefore, the diagnostic methods promising rapidity and accuracy should be urgently developed in order to eliminate the viral tumor diseases in the early time of disease occurrence.

The DNA chip diagnostic method is suitable for the diagnosis of multiple agents in the same time. Therefore, we will develop DNA chip diagnostic method for the differential diagnosis of serotypes 1, 2, 3 Marek's disease viruses and ALSV subgroups A, B, C, D, E and J viruses in the same time. This diagnostic method may provide the strategy to the protection and treatment of viral diseases.

Social and public health aspect

The tumors caused by ALAVs and Marek's disease viruses confer the severe abomination to the consumers. Although these diseases can not infect human beings, social problems can be occurred because Korean consumers are now thinking well-being. The good example is the foot and mouth disease which have influence the marked decrease of bovine meats in Korea.

Marek's disease viruses cause severe immunodepression to the infected chickens in the early time of infection. Since broiler chickens are slaughtered and gone to the market before tumor formation, secondary bacterial infections

can be occurred due to Marek's disease virus infection. The important secondary infections are fowl paratyphus caused by *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, etc. Therefore, the diagnostic methods promising rapidity and accuracy should be urgently developed in order to eliminate the viral tumor diseases in the early time of disease occurrence.

The DNA chip diagnostic method is suitable for the diagnosis of multiple agents in the same time. Therefore, we will develop DNA chip diagnostic method for the differential diagnosis of serotypes 1, 2, 3 Marek's disease viruses and ALSV subgroups A, B, C, D, E and J viruses in the same time. This diagnostic method may provide the strategy to the protection and treatment of viral diseases.

III. Results and Extents of Research and Development

A. Development of DNA chip diagnostic method for the differential diagnosis of Marek's disease and leukosis/sarcoma of chickens

1. Materials and methods

1) Reference and isolated viruses:

Marek's disease reference viruses used in this study included serotype 1 very virulent strain (Md5), virulent strain (JM) and apathogenic strain (CVI988), serotype 2 strain (SB1), and serotype 3 strain (HVT). This study used also the Korean serotype 1 Marek's disease viruses, 03-06-1, 03-06-2, 29-1, 29-2, 29-3, 29-5, 30-7, 31-1 and 46-1 strains.

The ALSVs used in this study were RAV-1 (subgroup A), RAV-2 (subgroup B), RAV-49 (subgroup C) and RAV-50 (subgroup D) strains purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA), and

the HPRS-103 strain (subgroup J) obtained from Dr. K. Venugopal (Viral Oncogenesis Group, Institute for Animal Health, Compton, Berkshire, UK).

Monolayers of the duck embryo fibroblast cell cultures were used to propagate these viruses. The growth medium was M199 supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics (penicillin, dihydrostreptomycin, and mycostatin). The maintenance medium was M199 supplemented with 2% FBS and 1% antibiotics.

2) Experimental inoculation of reference and wild viruses into chickens

The one day old chicks were housed in isolation rooms, and given food and water ad libitum. The serotypes 1 (Md5 and 29-1), 2 (HPRS-24) and 3 (HVT) MDV strains were made from duck embryo fibroblast cells. One-day-old chicks were allotted randomly into 12 groups of 30 birds. The birds in groups 1-4 were inoculated intra-abdominally with 1×10^4 PFU/0.2 ml of Md/5, 29-1, HPRS-24 and HVT MDVs at 1 week of age, respectively. The birds in groups 5-8 were inoculated intra-abdominally with 0.2 ml supernatant of ALSV subgroup A, B, C and D viruses at 1 week of age, respectively. The birds in groups 9-12 were inoculated intra-abdominally with 1×10^4 PFU/0.2 ml of Md/5 and 0.2 ml supernatant of each subgroup A, B, C and D virus, respectively.

The inoculated 3 chicks in each group were euthanized at 1 week intervals. The experiment was terminated when the birds were 10 weeks old. All of the birds were immediately necropsied upon sacrifice. When the experiment was terminated, all of the surviving birds in all groups were euthanized by cervical dislocation and then exsanguination. At necropsy, almost all organs and tissues were sampled for histological observation, virus detection by PCR and DNA chip application.

3) DNA extraction

The DNA was extracted from each DEF cell infected with each virus, field samples and samples obtained from chickens of each group using a DNA

extraction kit. The total DNA recovered was suspended in 50 μ l of DNase free water and stored at -80 °C until needed.

4) Polymerase Chain Reaction

The oligonucleotide primers were made for the detection of each serotype of Marek's disease viruses and each subgroup ALSV, and for the amplification of Marek's disease virus and each subgroup ALSV applicable for the DNA chip. The single PCR assay was performed in a 50 μ l reaction volume consisting of 5 μ l of the template, 5 μ l of 10X buffer [100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% gelatin], 5 μ l of MgCl₂ (25 mM), 1 μ l of 10 mM dNTPs, 1 μ l of the forward primer (50 pmol), 1 μ l of reverse primer (50 pmol), 0.5 μ l of Taq polymerase and 31.5 μ l of DNase free distilled water. The multiplex PCR assay was almost same with single PCR except the number of primer pairs, in which the amount of DDW was deleted with the amount of primer volume added. The PCR products were visualized on 1.2% agarose gels stained with ethidium bromide.

5) Preparation of probes

The probes specific to viruses were designated between the sequence of amplicons specific for each virus.

6) Preparation of DNA chip

The DNA chip was made by pin microarray method using probes synthesized as above mentioned.

7) Hybridization and detection

The amplified fragments by single or multiplex PCR were hybridized as described previously. Briefly, 10 μ l of the amplicons labelled with Cy5-dUTP or Cy5-dCTP were mixed with 10 μ l hybridization buffer (50% formamide, 6 \times SSC, 0.5% SDS, 50 mM Na-phosphate, pH 8.0, 5 \times Denhard's). After then, the

tube was heated 98°C, 3 min using PCR machine and kept for 3 min in the ice. These final solution were transferred on the DNA chip slides and incubated for 15 hours in the 45°C humid incubator. The DNA chip slides were washed with 2X SSC, 0.1% SDS for 5 min, 1X SSC for 5 min and 0.5X SSC for 5 min on the shaker and dried in 1500 rpm, 5 min in the centrifuge. The signal was analyzed by Affymetrix 418 array scanner.

2. Results

1) Confirmation of the presence of reference and wild type viruses by PCR

PCR assay with primer pairs specific to each virus was performed with DNA extracted from the cells infected with each virus. As a result, the expected bands for each primer pair were detected in the cells infected with each virus, indicating the presence of each virus in the cells and implying each virus applicable for the development of DNA chip.

2) Clinical and pathological findings of chickens infected experimentally with each virus

The chicks infected experimentally with virulent MDV or concurrently virulent MDV and each ALSV showed depression at 1 day post-inoculation. However, the chicks infected with serotype 2 and 3, and each ALSV virus did not show any clinical sign. Grossly, any specific lesions were not detected in the chickens experimentally infected with each virus. Histologically, however, multiple lymphoid cell aggregations in the variable size were detected in the chickens infected experimentally with virulent MDV or virulent MDV plus each ALSV but no lesions were observed in the chickens infected with serotype 2 and 3, and each ALSV.

3) Detection of Marek's disease virus and ALSV in the samples obtained from the chickens infected with each virus

The PCR assay was performed to detect each MDV and ALSV in the

samples obtained from the chickens infected with each virus. The virulent MDV was continuously detected from the samples obtained from the chickens infected with virulent MDV alone or virulent MDV plus each ALSV from 1 week to 10 weeks post-inoculation. However, positive band was not detected in the samples obtained from the chickens infected with each serotype 2 and 3 MDV. The expected band was present only at 1 week post-inoculation in the samples obtained from the chickens infected with each ALSV or each ALSV plus virulent MDV.

4) Development of DNA chip diagnostic method for the differential diagnosis of Marek's disease and leukosis/sarcoma of chickens

In order to confirm if DNA chip can detect reference or wild type MDVs and ALSVs grown in the cells, we applied the DNA chip with the amplicons from each virus strains. The DNA chips showed each specific signal for the amplicons of each virus, indicating that the DNA chip was very specific to detect each virus. Moreover, DNA chip hybridized with amplicons by multiplex PCR revealed positive signals for viruses used, meaning the DNA chip can diagnose the mixed infections.

We applied the DNA chip method to the experimental chickens. The positive signal was detected in the samples obtained from the chickens infected with virulent MDV or virulent MDV plus each ALSV from 1 week post-inoculation to 10 weeks post-inoculation. Moreover, the DNA chip detected positive signal in the samples obtained from the chickens infected with each ALSV or each ALSV plus MDV from 1 week post-inoculation to 2 weeks post-inoculation. From these results, the sensitivity of DNA chip was higher than that of PCR assay.

B. Molecular characterization of Marek's disease viruses isolated in the chickens in South Korea

1. Materials and methods

1) Reference viruses and cell line

Marek's disease reference viruses used in this study included serotype 1 very virulent strain (Md5), virulent strain (JM) and apathogenic strain (CVI988), serotype 2 strain (SB1), and serotype 3 strain (HVT).

Monolayers of the duck embryo fibroblast cell cultures were used to propagate the virus. The growth medium was M199 supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics (penicillin, dihydrostreptomycin, and mycostatin). The maintenance medium was M199 supplemented with 2% FBS and 1% antibiotics.

2) Virus isolation

The MDV isolation was performed from blood and spleens sampled from 35 chickens originated from 5 field layer farms and 3 Korean native chicken farms. These chickens showed emaciation, spastic paralysis of limbs and flaccid paralysis of neck, formed lymphoma in the variable organs and tissues, and tested positive by PCR with primer pairs specific to both MDV meg and pol genes as described below.

The peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and single spleen mononuclear and tumor cells were prepared as described elsewhere. The 1×10^4 cells of each PBMC, single spleen mononuclear cells and tumor cells were mixed with the same number of DEF cells and transferred into 6 well plates containing 3 ml of M199 supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum and 1% antibiotics (penicillin, dihydrostreptomycin, and mycostatin). When monolayers were formed in each well, the growth medium was discarded, replaced with the maintenance medium. The cultures were incubated for 7 days at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. When the cytopathic effects

including cell rounding and clustering were observed, the isolated virus was passaged 5 times including triple plaque purification prior to characterization. The isolated MDV was confirmed using a PCR, as described below.

3) DNA extraction

The DNA was extracted from each DEF cells infected with each field MDV isolate, using a DNA extraction kit. The total DNA recovered was suspended in 50 μ l of DNase free water and stored at -80°C until needed.

4) Polymerase Chain Reaction

The oligonucleotide primers used for sequencing meq, pp38 and vIL-8 genes, and for detecting MDV in the field samples and cultured cells for virus isolation were listed in Table 1. The PCR assay was performed in a 50 μ l reaction volume consisting of 5 μ l of the template, 5 μ l of 10X buffer [100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl_2 , 0.01% gelatin], 5 μ l of MgCl_2 (25 mM), 1 μ l of 10 mM dNTPs, 1 μ l of the forward primer (50 pmol), 1 μ l of reverse primer (50 pmol), 0.5 μ l of Taq polymerase and 31.5 μ l of DNase free distilled water. The PCR products were visualized on 1.2% agarose gels stained with ethidium bromide.

5) DNA sequencing and molecular characterization

The PCR products from each gene fragment were purified using a QIAEX II Gel Extraction kit according to the manufacture's instructions. DNA sequencing was carried out using an automated DNA sequencer. Using the DNA Basic module, each gene sequence were compared with those of the other known MDV strains.

6) Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis based on the nucleotide (nt) and the deduced amino acid (aa) alignments was constructed using the UPGMA method of Molecular

Evolutionary Genetics analysis (MEGA version3.1). A sequence similarity search for the field MDV isolates was performed using the LALIGN Query program of the GENESTREAM network server at the Institut de Génétique Humaine, Montpellier, FRANCE (<http://www.eng.uiowa.edu/~tscheetz/sequence-analysis/examples/LALIGN/lalign-guess.html>).

2. Results

1) Virus isolation from chicken farms

Of the 35 MDV-positive chickens from 8 farms by PCR, the MDV was isolated from 14 chickens from 5 farms. After the 1st or 2nd passage, infected cultures showed discrete focal plaques, which consisted of clusters of rounded, refractile degenerating cells. The cultures showing characteristic CPE tested positive by PCR with primer pairs specific to MDV pol genes.

2) Detection of MDV meq, pp38 and vIL-8 genes in the field MDV isolates

The meq gene is known to be polymorphic [long meq (L-meq), meq, and short meq (S-meq)] in the attenuated serotype 1 MDV and the MDV-transformed cell lines. In order to evaluate the diversity of meq gene in the Korean MDV isolates, PCR assay with primer pair specific to meq gene was performed with 7 Korean MDV isolates, of which 4 isolates (29-1, 29-2, 29-3 and 29-5) were isolated from one farm. The Korean MDV isolates, 29-1 and 46-1 had meq and S-meq but not L-meq. However, 5 Korean MDV isolates (29-2, 29-3, 29-5, 30-7 and 31-1) contained L-meq, meq and S-meq (see chapter 3, section 2, the second year results part, Fig. 7). From this result, it is confirmed that diverse forms of meq gene were present in the field MDV even in the viruses isolated from the same farm. The PCR assays with primer pairs specific to each pp38 and vIL-8 gene detected expected band in the 7 Korean MDV isolates. These 7 isolates were designated the 29-1, 29-2, 29-3, 29-5, 30-7, 31-1 and 46-1 MDV strains.

3) Molecular characterization of meq gene of Korean MDV strains

The genetic diversity of the MDV meq gene was investigated by sequencing 583 nt of the meq gene from 7 Korean MDV strains isolated from the field chickens. Among all strains analyzed, a total of 13 polymorphic nucleotides were identified in the 583 nt of the meq gene, compared with the reference strains. These polymorphisms led to 10 aa changes. Interestingly, proline at 194 aa which was present in the Korean 29-1 and 46-1 MDV strains, and all serotype 1 MDV strains compared was deleted in the Korean MDV strains, 29-2, 29-3, 29-5, 30-7 and 31-1.

Based on the total number of nucleotide substitutions and deletions, a phylogenetic tree of the 583 nt sequences was constructed using the Clustal method with the other known serotype 1 MDV strains. The nt alignment of a part of meq gene sequences suggests that the MDV can be classified into two groups. The Korean MDV strains belonged to group 1. The Korean MDV strains, 46-1 and 29-1 which had only meg and S-meq, located distantly from the other Korean MDV strains which contained L-meq, meq and S-meq. Phylogenetic analysis based on the 193 deduced aa sequences showed almost similar grouping as like that of nt sequences.

4) Phylogenetic analysis of pp38 gene of Korean MDV strains

Phylogenetic analysis of the nt and deduced aa sequences of a part (850 bp) of pp38 MDV gene showed that the Korean MDV strains, 29-1 and 46-1 clustered with very virulent (Md5 and Md11) and virulent (GA) MDV strains. In contrast, the other Korean MDV strains were closer to apathogenic serotype 1 MDV strain, CVI988. Interestingly, a Korean MDV strain, 29-3 was distant from all MDV strains compared.

5) Phylogenetic analysis of vIL-8 gene of Korean MDV strain

The MDV vIL-8 gene contained three exons and two introns. Therefore, phylogenetic analysis of nt sequence of MDV vIL-8 gene was conducted.

Phylogenetically, the Korean MDV strains, 46-1 and 29-1 were distantly clustered with the other known MDV strains in order. Interestingly, the other Korean MDV strains clustered with CVI988 strain, apathogenic serotype 1 strain.

C. Detection and molecular characterization of avian leukosis/sarcoma viruses in fertile Korean chicken eggs

1. Materials and methods

1) Samples

The fertile eggs from three types of broiler chickens [Cobb (18 farms), Ross (1 farm) and Hubbard (1 farm)], which are the most popularly reared chickens in Korea in that order, Korean native chickens (Ogol, Black, Dark-Brown and Light-Brown chickens) and imported White Leghorn chickens, which are used widely for experiments in Korea, were examined. In order to extract the DNA, chicken embryo cells (CEC) were prepared using 11-day-old embryonated chicken eggs using a mincing and trypsin treatment described elsewhere.

2) DNA extraction

The DNA was extracted from 11-day-old CEC of Cobb, Ross and Hubbard meat-type chickens, four lines of Korean native chickens, and White Leghorn chicken, respectively, using a DNA extraction kit. As positive controls of exogenous ALSVs, the DNA was extracted from the RAV-1 (subgroup A), RAV-2 (subgroup B), RAV-49 (subgroup C) and RAV-50 (subgroup D) strains purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA), and the HPRS-103 strain (subgroup J) obtained from Dr. K. Venugopal. The total DNA recovered was suspended in 100 μ l of DNase free water and stored at -80°C until needed.

3) Polymerase Chain Reaction (PCR)

The endogenous and the exogenous proviruses of the ALSVs in the cells of the embryonated chicken eggs were detected using PCR assays with different primer sets specific to each ALSV. The PCR assay was performed in a 50 μ l reaction volume consisting of 5 μ l of the template, 5 μ l of 10X buffer [100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% gelatin], 5 μ l of MgCl₂ (25 mM), 1 μ l of 10 mM dNTPs, 1 μ l of the forward primer (50 pmol), 1 μ l of reverse primer (50 pmol), 0.5 μ l of Taq polymerase and 31.5 μ l of DNase free distilled water. PCR products were visualized on 1.2% agarose gels stained with ethidium bromide.

4) DNA sequencing

The PCR assays with different primer sets specific to a part of the env gene of the ev and the ev/J, the region between the TM and the LTR of the EAV, and the gag-related region of the ART-CH were performed with the DNA extracted from the cells of embryonated chickens eggs. PCR products were purified using a QIAEX II gel extraction kit according to the manufacturer's instructions. The DNA was sequenced using an automated DNA sequencer. The nucleotide (nt) sequences of each ALSV were compared with those of other known endogenous ALSVs using the DNA Basic module. The deduced amino acid (aa) sequences were then assembled and analyzed on an Amino Acid Basic module. A sequence similarity search was performed for the EAV, ev, ev/J and ART-CH DNA and EAV, ev and ev/J protein using the LALIGN Query program of the GENESTREAM network server at Institut de Génétique Humaine, Montpellier, FRANCE (<http://www.eng.uiowa.edu/~tscheetz/sequence-analysis/examples/LALIGN/lalign-guess.html>). Phylogenetic analyses were conducted using the neighbor-joining and UPGMA methods of Molecular Evolutionary Genetics analysis (MEGA version 3.1) with the pairwise distance.

2. Results

1) Detection of exogenous ALSVs by PCR assays

The exogenous ALSVs in the fertile eggs of the meat-type Cobb, Ross and Hubbard chickens, Korean native chickens (Ogol, Black, Dark-Brown and Light-Brown chickens), and imported White Leghorn chickens were detected by PCR assays with the primer pairs specific to each exogenous ALSV on the DNA extracted from each CEC. The amplified fragments specific to each subgroup A, B, C, D and J were detected after amplification with the reference RAV-1 (subgroup A), RAV-2 (subgroup B), RAV-49 (subgroup C), RAV-50 (subgroup D) and HPRS-103 (subgroup J) strains. This suggests that the PCR assays with the primer pairs were specific to each subgroup A, B, C, D and J. In contrast, no positive reaction was detected in the CECs of the meat-type Cobb (18 breeders), Ross (1 breeder) and Hubbard (1 breeder) chickens, four Korean native chickens, and White-Leghorn chickens (data not shown), indicating these ALSVs are not present in the fertile eggs of these chickens.

2) Detection of endogenous ALSVs by PCR assays

The known endogenous ALSVs include EAV, ev, ev/J and ART-CH, which were all detected by PCR assays using the primer pairs specific to each endogenous ALSV in the CECs of Cobb (18 farms), Ross (1 farm) and Hubbard (1 farm) chickens, four Korean native chickens (Ogol, Black, Dark-Brown and Light-Brown), and imported White Leghorn chickens.

3) Molecular analysis of ART-CH, ev, ev/J and EAV ALSV

A comparison of the nt sequence of the region between the TM and the LTR of the EAV detected in all Korean native chickens exhibited 100% sequence homology to each other and 99.2-99.6% homology to that of the EAV-0 and other Korean meat-type chickens. However, E-51 had only 73.8-74.6% identity to the four lines of the Korean native chickens, Cobb, Ross and Hubbard and EAV-0, respectively. A comparison of the deduced aa

sequences of these regions of the EAV detected in all the Korean broiler chickens showed 100% homology to each other, 98.7% homology with EAV-0, and 70.88% identity with E-51. This indicates that the EAV detected in the Korean meat-type chickens is closely related to EAV-0 but distantly related to E-51. Phylogenetic data based on the total number of nt and deduced aa substitutions in the region between the TM and the LTR of the EAV showed that the EAV can be divided into 4 groups (Fig. 2A and 2B). The first group consists of EAVs detected in the 18 Cobb (EAV-1~18) and 1 Ross (EAV-R) broiler chickens. The second group includes the Korean native chickens (Ogol, Black, Dark-Brown and Light-Brown chickens) and the EAV-0. The third group contains only the EAV detected in the Hubbard broiler chicken. The E51, belonging to the fourth group, is phylogenetically distant from the EAVs of the 1st to 3rd groups.

Because only Brown Leghorn chickens were used to examine the presence of ART-CH in chickens, it is unclear if they are present in the other chicken breeds. In this study, only the variation in the nt sequence could be analyzed because ART-CH does not encode aa due to large and multiple nt deletions. Paired comparisons of the gag-related nt sequences showed that the Korean meat-type chickens had a high sequence identity (over 98.6%) to each other but slightly low sequence identity with ART-CH clones 5 (94.0-95.8%) and 14 (91.0-91.8%). Based on the total number of nt substitutions and deletions, the phylogenetic tree of the gag-related sequences was analyzed using the prototype ART-CH elements, clones 5 and 14. Phylogenetically, the gag-related nt sequence of ART-CH indicates that the ART-CHs can be divided into four groups. Furthermore, the first group can be divided into two subgroups. The first subgroup (subgroup 1a) consists mainly of the ART-CHs detected in all the Cobb chickens (ART-CH-C1~18), Hubbard (ART-CH-H) and three Korean native chickens [Black (ART-CH-B), Dark-Brown (ART-CH-D, and Light-Brown chickens (ART-CH-L)], whereas the second subgroup (subgroup 1b) includes only the ART-CH-R detected in the Ross chicken. The second

group contains only a single ART-CH element, ART-CH-O, which was detected in the Korean native chicken, Ogol. The ART-CH clones 5 and 14 make the third and fourth groups, respectively, and are clustered distantly from groups 1 and 2.

In the paired comparisons of the ev ALSV detected in the Korean meat-type chickens, the nt sequence substitutions of the ev ALSV indicated the maximum sequence divergence in the Korean native chickens, even in small substitutions (1.2% between Korean native Dark-Brown and Light-Brown). These nt substitutions led to a maximum 2.73% aa changes. The nt and aa sequence divergences tended to be slightly larger than the other known ev loci, ev-1 (nt; 98.8-99.8% and aa; 97.95-99.09%), ev-3 (98.4-98.9% and 97.49-98.86%) and ev-6 (98.2-98.6% and 96.36-97.50%). Overall, the nt and aa sequences of a part of the env gene of the ev ALSVs demonstrated a high degree of similarity. The phylogenetic tree of the env gene nt and aa sequences revealed that the ev ALSVs can be divided into two groups. The first group can be further divided into 3 subgroups; the first subgroup (1a) consists of ev ALSVs detected in 18 Cobb (ev-C1~18), 1 Ross (ev-R) and 1 Hubbard (ev-H) chickens, the second subgroup (1b) includes the ev ALSVs detected in the three Korean native chickens [Black (ev-B), Ogol (ev-O) and Light-Brown (ev-L) chickens], and third subgroup consists of the ev-ALSV detected in the Korean native chicken, Dark-Brown (ev-D). The second group consists of ev-3, forming subgroup 2a, and ev-1 and ev-6 forming subgroup 2b. All the ev-ALSVs were phylogenetically distant from subgroups A, B, C and D ALSVs.

A part of the env gene nt and aa sequences of the ev/J ALSV showed a high level of homology (nt; 97.5-99.5% and aa; 95.84-100%) in all Korean meat-type chickens and the other known ev/J sequences. Moreover, ev/J ALSV including the ev/J viruses detected in all the Korean meat-type chickens and the other known ev/J revealed 96.8-98.1% nt and 94.63-96.98% aa homology to that of subgroup J ALSV. Although all ev/J endogenous viruses

showed high nt and aa sequence identity, the ev/J ALSVs can be divided into 3 groups based on the total number of nt and aa substitutions. The first group consists of subgroups 1a and 1b; subgroup 1a consists of the ev/J viruses detected in the Hubbard (ev/J-H), grey jungle fowl, Cobb (ev/J-C2~5, 7, 8, 13, 14), Ross (ev/J-R) and three Korean native chickens [Black (ev/J-B), Ogol (ev/J-O) and Dark-Brown (ev/J-D) chickens], whereas subgroup 1b consists of ev/J viruses detected in the Cobb chickens (ev/J-C1, 9~12). The second group consists of 2 subgroups; subgroup 2a is an ev/J virus detected in the line 21 chicken, whereas subgroup 2b consists of the ev/J viruses detected in Cobb (ev/J-C15), a Korean native chicken [Light-Brown (ev/J-L)] and the red jungle fowl. Phylogenetically, the group 2 ev/J viruses are most closely related to subgroup J ALSV. The third group can be further divided into four subgroups; subgroup 3a consists of the ev/J viruses detected in the Cobb chickens (ev/J-C6 and 16), subgroup 3b is an ev/J virus detected in the Cobb chicken (ev/J-C17), subgroup 3c is an ev/J virus detected in the line N chicken and subgroup 3d is an ev/J-C18 detected in the Cobb chicken.

IV. Suggestions for the Application of Research Results

- A. During this research, we found out that almost chicken farms suffered from MD. Although these chickens of farms examined were vaccinated with MDV vaccines, MD was still occurred. Therefore, the further studies should be done to make optimal vaccine programs and new generation vaccines against the MDV.
- B. In this study, the amplified fragments specific to each subgroup A, B, C, D and J were detected after amplification with the reference RAV-1

(subgroup A), RAV-2 (subgroup B), RAV-49 (subgroup C), RAV-50 (subgroup D) and HPRS-103 (subgroup J) strains. This suggests that the PCR assays with the primer pairs were specific to each subgroup A, B, C, D and J. In contrast, no positive reaction was detected in the embryo cells of the meat-type Cobb (18 breeders), Ross (1 breeder) and Hubbard (1 breeder) chickens, four Korean native chickens, and White-Leghorn chickens, indicating these ALSVs are not present in the fertile eggs of these chickens. The results in this study suggest that the eradication procedure by breeders has significantly decreased the incidence of exogenous ALSVs infections by transmission of fertile eggs because no exogenous ALSVs were detected in the meat-type fertile eggs tested. However, ALSV-J is believed to have arisen by a recombination between exogenous ALSVs and the ev/J endogenous retrovirus. Therefore, the further studies should be done on the deletion of the these endogenous retroviruses present in the chicken genome in order to prevent the recombination events between endogenous and exogenous ALSVs.

- C. We developed the advanced DNA chip diagnostic method to differentially diagnose the MD and ALSVs. These assays are highly sensitive and specific to diagnose the MD and ALSVs. Therefore, we will transfer the protocols to NVRQS and local diagnostic labs.
- F. As above mentioned, we developed DNA chip diagnostic method for differential diagnosis of MD and ALSVs for the first time in the world. These techniques we developed are applicable to the other viral diseases. Our techniques can be used for other molecular biology research and will improve the level of Korean diagnostic industry.

CONTENTS

| | |
|---|----|
| Chapter I Purpose and Rationale of Research and Development | 50 |
| Section 1. Purpose and contents of Research and Development | 50 |
| Section 2. Rationale of Research and Development | 50 |
| 1. Technical Aspect | 50 |
| 2. Industrial Aspect | 53 |
| 3. Social and Public Health Aspects | 55 |
| Chapter II Status of the Technology in Domestic and Foreign Countries | 57 |
| Chapter III Contents and Results of the Research and Development | 58 |
| Section 1 Contents of the Research and Development | 58 |
| The first year (2003) | 58 |
| 1. The first research team: Search of genes specific to viruses causing tumors in chickens | 58 |
| 2. The second research team: Epidemiological survey on and sampling of chicken tumors occurring in Korea | 59 |
| The Second year (2004) | 61 |
| 1. The first research team: Development of DNA chip and application to virus isolates | 61 |
| 2. The second research team: Isolation and identification of ALSV and MD viruses, epidemiological survey on and sampling of chicken tumors occurring in Korea | 63 |
| The third year (2005) | 64 |
| 1. The first research team: Establishment of DNA chip using samples obtained from experimental and field chickens | 64 |

| | |
|---|---------|
| 2. The second research team: Detection and molecular characterization of avian leukosis/sarcoma viruses in fertile Korean chicken eggs and experimental inoculation of ALSV and MDV into chickens | 65 |
| Section 2 Results of the Research and Development | 66 |
| The first year (2003) | 66 |
| 1. The first research team: Search of genes specific to viruses causing tumors in chickens | 66 |
| 2. The second research team: Epidemiological survey on and sampling of chicken tumors occurring in Korea | 87 |
| The Second year (2004) | 96 |
| 1. The first research team: Development of DNA chip and application to virus isolates | 96 |
| 2. The second research team: Isolation and identification of ALSV and MD viruses, epidemiological survey on and sampling of chicken tumors occurring in Korea | 107 |
| The third year (2005) | 124 |
| 1. The first research team: Establishment of DNA chip using samples obtained from experimental and field chickens | 124 |
| 2. The second research team: Detection and molecular characterization of avian leukosis/sarcoma viruses in fertile Korean chicken eggs and experimental inoculation of ALSV and MDV into chickens | 139 |
| Chapter IV Achievement and Contribution of the Research and Development | 146 |
| Section 1 Achievement of the first research team | 148 |
| Section 2 Achievement of the second research team | 149 |
| Section 3 Contribution | 150 |
| Chapter V Plan to Apply the Results and Development | 152 |

| | |
|---|-----|
| Section 1 Suggestions for the application of research results | 152 |
| Chapter VI Information Acquired during Research and Development from Foreign Countries | 154 |
| Chapter VII References | 156 |

목 차

| | |
|---|--------|
| 제 1 장 연구개발과제의 개요 | 50 |
| 제 1 절 연구개발 목표와 내용 | 50 |
| 제 2 절 연구개발의 필요성 | 50 |
| 1. 기술적 측면 | 50 |
| 2. 경제·산업적 측면 | 53 |
| 3. 사회·문화적 측면 | 55 |
| 제 2 장 국내외 기술개발 현황 | 57 |
| 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 | 58 |
| 제 1 절 연구개발 수행내용 | 58 |
| 1차년도(2003년도) | 58 |
| 가. 제1세부과제: 닭에 종양을 유발하는 바이러스들에 대한 특이 유전자 탐색 | 58 |
| 나. 제1협동과제: 국내에서 발생하고 있는 닭의 바이러스성 종양성 질병의 발병조사와 시료채취 | 59 |
| 2차년도(2004년도) | 61 |
| 가. 제1세부과제: DNA chip의 개발과 국내에서 분리한 바이러스 분리주에 응용 | 61 |
| 나. 제1협동과제: 닭 백혈병/육종 그룹 바이러스와 마력병 바이러스의 분리·동정 및 야외 종양 발생례의 조사 및 재료 확보 | 63 |
| 3차년도(2005년도) | 64 |
| 가. 제1세부과제: DNA chip의 실험접종례와 야외발생 증례를 이용한 진단법 확립 | 64 |
| 나. 제1협동과제: 국내 주요 육용종계 및 재래닭 종란에서 닭 백혈병/육종 바이러스 검출 및 내인성 바이러스의 | |

| | |
|--|-----|
| 분자유전학적 분석과 마렉병 바이러스 분리주의 SPF 닭의 실험접종 | 65 |
| 제 2 절 연구개발 수행결과 | 66 |
| 1차년도(2003년도) | 66 |
| 가. 제1세부과제: 닭에 종양을 유발하는 바이러스들에 대한 특이 유전자 탐색 | 66 |
| 나. 제1협동과제: 국내에서 발생하고 있는 닭의 바이러스성 종양성 질병의 발병조사와 시료채취 | 87 |
| 2차년도(2004년도) | 96 |
| 가. 제1세부과제: DNA chip의 개발과 국내에서 분리한 바이러스 분리주에 응용 | 96 |
| 나. 제1협동과제: 닭 백혈병/육종 그룹 바이러스와 마렉병 바이러스의 분리·동정 및 야외 종양 발생례의 조사 및 재료 확보 | 107 |
| 3차년도(2005년도) | 124 |
| 가. 제1세부과제: DNA chip의 실험접종례와 야외발생 증례를 이용한 진단법 확립 | 124 |
| 나. 제1협동과제: 국내 주요 육용종계 및 재래닭 종란에서 닭 백혈병/육종 바이러스 검출 및 내인성 바이러스의 분자유전학적 분석과 마렉병 바이러스 분리주의 SPF 닭의 실험접종 | 139 |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 146 |
| 제 1 절 제1세부과제 연구목표 달성도 | 148 |
| 제 2 절 제1협동과제 연구목표 달성도 | 149 |
| 제 3 절 관련분야에의 기여도 | 150 |
| 제 5 장 연구개발결과의 활용계획 | 152 |
| 제 1 절 추가연구의 필요성 및 타 연구에의 응용 | 152 |
| 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 | 154 |
| 제 7 장 참고문헌 | 156 |

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발 목표와 내용

국내는 물론 전 세계적으로 꾸준히 막대한 경제적 피해를 야기하고 있는 닭의 주요 바이러스성 종양성 질병인 닭 백혈병/육종 그룹의 종양과 마렉병을 효과적으로 진단할 수 있는 DNA chip 진단법을 개발하는 것이 본 연구의 목표이다.

제2절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

세계적으로 양계농장에서 가장 골치 아픈 질병이 종양성 질병인데, 이는 예방, 진단 및 치료가 어렵기 때문이다. 이러한 종양성 질병의 거의 대부분은 바이러스에 의해서 유발되며, 크게 레트로바이러스(retrovirus)와 허피스바이러스(herpesvirus)가 문제이다. 레트로바이러스속 내에는 알파레트로바이러스(alpharetrovirus)에 속하는 일군의 백혈병/육종 그룹의 바이러스가 있다. 이 그룹의 바이러스는 닭에 림프구성 백혈병, 적아세포종, 골수아세포종, 골수세포종, 혈관종 등 다양한 유형의 종양을 일으킨다. 그 외에 실험적으로만 림프구성 종양을 일으키는 감마레트로바이러스(gammaretrovirus)에 속하는 세망내피종바이러스(reticuloendotheliosis virus)가 있지만, 이 바이러스에 의한 종양성 질병은 야외 농장에서의 발생보고는 없다.

한편 백혈병/육종 그룹의 바이러스는 어느 바이러스든지 림프구성 백혈병을 일으킬 수 있다. 이 바이러스들 중에는 각각의 특이 바이러스성 종양원성 유전자가 있는 것이 있어서 그 유전자에 특이적인 종양을 일으킨다. 예를 들어서 v-erbB 유전자가 들어있는 바이러스는 적아세포종을, v-myb는 골수아세포종을, v-myc는 골수세포종을 일으킨다. 하지만 이러한 특이적인 유전자가 있음에도 불구하고 야외에서 상기의 다양한 종양보다는 대부분 림프구성 백혈병이 발생하는 이유는 야외에서는 1) 어린 연령의 2) 감수성 있는 품종에서 3) 대량의 바이러스가 감염되기 어렵기 때문이다.

닭에서 CD3+CD4+CD8- T cell 림프종을 유발하는 마렉병 바이러스는 최근 바이러스 제놈의 분석에 의해서 허피스바이러스 중에서 알파허피스바이러스로 재분류되었다. 이러한 마렉병 바이러스는 3가지 혈청형으로 분류되는데, 이 중에서 혈청형 1만이 숙주인 닭에서 종양을 일으킨다. 특징적인 것은 혈청형 1의 바이러스 중에도 초강독주, 강독주, 약독주가 있는데 약독주의 경우는 종양을 일으키지 않아서 실제 종양병변 내에서 마렉병 바이러스를 분리하여도 약독주와 강독주의 구별이 어려운 경우도 있다. 선행 연구에 의하면, 혈청형 1 마렉병 바이러스는 long terminal repeat와 long internal repeat에 존재하는 132 bp의 반복서열이 강독주는 3개 이하인 반면 약독주는 4개 이상이므로 PCR 기법에 의해서 어느 정도 감별이 가능하다고 한다. 하지만, PCR 기법의 단점 중의 하나인 위양성 band의 출현으로 감별이 어려운 것으로 알려져 있다.

마렉병 바이러스는 감염 후기에 간, 비장, 신장 등에 림프종을 유발한다. 하지만, 대부분의 수의사나 양계가들에 잘 알려져 있지 않는 특징적인 소견은 “마렉병 바이러스는 감염초기에 T세포를 만들어내는 흉선과 B세포를 만드는 F낭을 파괴시켜 심각한 면역저하를 유발시킨다”는 것이다. 따라서, 야외 양계농장에서 마렉병 바이러스 감염에 의한 종양발생도 중요하지만 면역억압에 의한 살모넬라와 같은 2차 감염도 중요하다. 하지만 이러한 2차 감염에 대한 실제적인 원인 인자인 마렉병 바이러스에 대한 조사는 무시되어 반복적으로 농장에 피해를 끼치고 있다. 뿐만 아니라 최근 마렉병 백신에 의해서도 예방이 되지 않는 혈청형 1중에서 초강독주가 발생하는 등 전 세계적으로 마렉병 예방에 비상이 걸려있는 실정이다.

이와 같이 닭에서 종양성 질병을 유발하는 주요 원인체는 알파레트로바이러스의 백혈병/육종 그룹의 바이러스와 알파허피스바이러스에 속하는 마렉병 바이러스로 압축이 된다. 이러한 종양성 질병을 진단하는데 여러 가지 방법이 사용되고 있지만 통상 병리조직학적 방법이 전통적으로 자주 사용되어져 왔다. 하지만, 마렉병에 의한 림프종 중에서 말기 감염의 것은 형태학적으로 림프구성 백혈병과 유사한 림프아구의 형태로 구성되어 있다. 따라서, 병리전문가들도 림프구성 백혈병과 감별하지 못하여 오진단을 내리는 경우가 종종 있다.

그 외에 이러한 질병의 감별에 사용되는 방법으로 바이러스 분리, 종양병변 내에서 바이러스 항원이나 핵산 검출, 혈중 항체 검출 등 다양한 방법이 보고되고 있다. 하지만, 마렉병 바이러스는 3개의 혈청형 내에서 혈청형 1에 속하는 바이러

스 중 강독주만이 종양을 일으키고 백신주로 사용되는 CVI988과 같은 약독주는 종양을 일으키지 않기 때문에 분리주가 백신주인가 강독주인가를 구별하기 어렵다. 바이러스 항원이나 핵산의 검출에 있어서도 한계가 있는데, 이는 바이러스가 종양세포 내에는 극소수가 있기 때문에 항원의 검출이 어려우며, 또한 핵산의 경우에 있어서도 백혈병/육종 바이러스인 레트로바이러스와 유사한 내인성 레트로바이러스와의 감별이 어렵다는 것이다.

현재 닭의 백혈병/육종의 예방을 위한 백신은 개발되어 있지 않아 예방이 불가능하며, 마렉병 또한 강독형 변이 바이러스가 10년 주기로 출현함에 따라 백신 이용에 대한 문제점이 대두되고 있는 실정이다. 따라서 닭의 바이러스성 종양 질병을 예방하기 위해서는 민감도와 특이도가 높으며 신속·정확한 진단법의 개발이 절실하다.

최근 바이러스성 질병에 자주 사용되는 분자생물학적 방법으로는 특히 유전자를 증폭하여 증폭산물의 존재 유무를 확인하는 PCR법, 특정 핵산 물질을 조직 내에서 직접 검출하는 In situ hybridization법 및 이들의 장점만을 접목시킨 In situ PCR법 등 다양한 방법들이 있다. 하지만, 이들은 한 종류 또는 몇 가지 종류의 한정된 병원체만을 검사할 수밖에 없어서 수십 개의 바이러스가 있는 백혈병/육종 그룹의 바이러스들과 혈청형 1내에서도 다양한 바이러스주가 있는 마렉병을 동시에 진단하는 것은 불가능하다. 뿐만 아니라 이러한 분자생물학적 방법들은 진단하는데 많은 시간이 걸리고 경제적인 부담이 크다는 것이 문제이다.

따라서 림프구성 백혈병과 마렉병을 감별하는데도 어려움이 있지만, 더불어 림프구성 백혈병으로 진단을 하여도 그 원인 인자가 백혈병/육종 그룹 내의 어느 바이러스에 의해 일어난다는 것을 알아야 하기 때문에 혼란이 가중되고 있다. 이러한 이유로 닭의 종양성 질병을 정확히 진단하는데는 선진국에서도 문제점이 많은 실정이다. 최근 human genome project로 각광을 받기 시작한 DNA chip (microarray) 기술은 기존의 분자생물학적 지식과 기계 및 전자공학의 기술이 접목되어 만들어졌다. 즉 DNA chip이란 유전자 검색용으로서 많은 종류의 DNA를 유리와 같은 고형체에 고밀도로 붙여 놓은 것을 말한다.

이러한 DNA chip이 기존의 방법과 가장 큰 차이점은 동시에 최소한 수백 개 이상의 유전자를 빠른 시간 안에 검색할 수 있다는 것이다. 또 다른 장점은 다른 분자생물학적 방법과는 달리 DNA chip에서는 유리와 같은 고형체를 사용하여 아

주 적은 양의 유전물질을 고밀도로 붙일 수 있다는 것이다. DNA chip은 그 제작 방법에 따라 크게 4가지로 분류할 수 있으나 널리 사용되고 있는 것은 cDNA chip과 oligonucleotide chip이다. cDNA chip과 oligonucleotide chip은 유전물질의 크기에 따라 다르게 사용되는데, 즉 cDNA chip에는 최소한 500 bp 이상의 유전자가 붙어있고 oligonucleotide chip에는 약 15-25개의 염기들로 이루어진 oligonucleotide가 붙어 있다.

본 연구를 통하여 국내는 물론 세계적으로 양계산업에 막대한 피해를 야기하고 있는 닭의 바이러스성 종양성 질병을 한번에 진단해 낼 수 있는 혁신적인 기술인 DNA chip을 개발함으로써 이를 통해 예방·치료와 새로운 백신 전략을 수립할 수 있을 것이다. 뿐만 아니라 위와 같은 기법을 우리나라 가축 전염병 예방에 첨병 역할을 하고 있는 국립수의과학검역원, 전국의 축산기술연구소 등에 보급함으로써 전국적인 방역망이 강화될 수 있을 것이다. 또한 이 기법을 지속적으로 연구·개발하여 보다 축적된 기술을 바탕으로 다른 감염성 질병 및 해외 악성 질병을 진단하는 기술로 발전시켜 나가고 이를 통해 동물의 질병을 정확하게 진단하여 이에 따라 즉각적인 방역조치를 실시할 수 있을 뿐만 아니라 그러한 질병의 전파와 유입을 차단하는데 크게 기여함으로써 축산업의 국제 경쟁력을 강화할 수 있을 것이다.

2. 경제·산업적 측면

개방화 시대에 있어 우리 축산업이 살아남기 위해서는 가축의 생산성을 향상시켜야 한다. 한편 국민 경제 수준의 향상에 따른 소득증대는 축산농가의 소득증대에 대한 필요성을 크게 부각시키고 있다. 이러한 시대적 요청에 부응하기 위해서는 무엇보다 질병을 근절시킴으로써 생산능력을 향상시켜야 한다. 왜냐하면, 육류의 소비가에서 가축의 질병 부분에 해당되는 비용이 선진국의 경우 17%이며 개발도상국의 경우에는 34%에 이르기 때문이다. 국내에서도 연간 축산 총생산액(53,112억, 97년) 가운데 질병으로 인해 최소한 약 20%인 10,622억원의 경제적 손실을 낳고 있다.

국내 양계산업은 그동안 비약적인 발전을 하여 농진청 축산통계(2002년 12월)에 따르면 산란계는 약 5천만 수, 육계는 약 4천 5백만 수를 사육하는 것으로 파

악되고 있다. 뿐만 아니라 사육 형태도 예전의 소규모 영세 사육형태에서 대단위 집약 사육 형태로 긍정적인 변화를 하였다. 하지만 대단위 집약사육에 있어서 문제점은 전염성이 강한 악성 질병이 발생하면 농장 전체에 걸쳐 질병이 발생하여 막대한 경제적 피해가 발생한다는 것이다. 좋은 예가 최근 충북의 충주시와 괴산, 청원 등지에서 급성의 마택병에 의해 5만 마리가 집단 폐사한 것을 들 수 있다. 따라서 이러한 전염성이 강한 질병을 초기에 신속·정확하게 진단할 수 있는 첨단진단기법의 개발이 절실하다.

한국의 육류 소비량을 보면 국민 1인당 27 kg으로 미국(114.5 kg), 호주(70.5 kg), 영국(59.9 kg), 대만(43.6 kg) 등에 비하여 아직은 낮은 소비 추세를 보이고 있지만 향후 국내 축산업의 성장추세가 지속될 수 있는 잠재력이 있다고 판단된다. 이러한 좋은 예가 닭고기의 평균 소비증가율(2002년 농진청 자료)이 90년 4.0 kg에서 97년 6.1 kg으로 연평균 소비증가율이 7.5%로 증가하였으며, 최근 패스트-푸드 산업의 발전에 힘입어 닭고기의 소비량은 더욱 증가될 전망이다. 따라서 첨단진단기법의 개발에 의한 질병 방제 등을 통한 효과적인 사양기술을 실시하면, 생산단가는 낮추고 판매량은 더욱 증가시킬 수 있어서 양계농가의 소득증대에 도움을 줄 수 있을 것이다.

국내 양계산업의 발달이 이루어진 배경에는 외국으로부터 수입되어온 우수한 종계와 관련 제품들에 의해 이루어졌음은 부정할 수 없으나 반면 그 부작용으로 우리나라에는 없던 외래 악성 전염병의 유입을 초래하여 양계업의 생산성 증가에 많은 역작용을 나타내기도 하였다. 1998년 우리나라 육용종계에서도 외래 악성 전염병인 백혈병/육종 그룹의 바이러스 중에서 J 바이러스가 유행하여 골수세포종을 일으켜 막대한 경제적 피해를 당하는 쓰디쓴 경험을 가지고 있다. 따라서 이러한 외래성 질병까지 동시에 검출할 수 있는 신속·정확한 첨단 진단기법의 개발이 절실하다.

선진국에서조차 자국 내에서 발생한 질병이 완전히 박멸되었다고 선언한 후에 다시 재발하여 막대한 경제적 손실을 보는 헤프닝이 자주 있다. 좋은 예가 영국에서 발생한 구제역이다. 이것은 어떤 질환이든 감염 초기나 후기에는 원인체가 극소수 존재하여 진단을 어렵게 하기 때문이다. 특히 닭에서 발생하는 백혈병/육종 그룹 바이러스들은 종계에 감염되어 난계대를 통한 수직감염이 전파의 주된 원인이기 때문에 단지 감염된 닭만 진단을 하여서는 박멸하기 어렵다. 따라서, 종계에

서의 감염을 진단하여야 하는데, 종계에서의 감염은 때때로 불현성이어서 진단하기 어려운 경우도 있다. 이러한 소수의 원인체가 있는 질병을 진단하기 위해서는 민감도가 높은 첨단 진단법의 개발이 절실하다고 하겠다.

전염성 질병의 진단목적은 감염된 환축의 병인이 무엇인지 원인체를 정확히 밝혀내어 그 질병의 재발을 억제하고 더 이상의 확산을 막는 것이다. 따라서, 재발로 인해 발생할 수 있는 생산성 저하 및 축산물의 품질저하와 같은 경제적인 손실을 최소화하기 위해, 정확한 진단법의 개발이 절실히 요구된다. 지금까지 마렙병이나 백혈병/육종의 진단을 위한 다양한 진단기법들이 개발되어 왔으나, 기존의 진단기법들은 조작의 어려움, 위양성 반응, 많은 시간의 소요 등의 많은 단점들 때문에 오진으로 인한 시간적 손실과 적절하지 못한 치료로 과도한 약품비의 지출 등이 발생하고 있다.

본 연구에서 응용하고자 하는 DNA chip은 20개 이상의 바이러스 군으로 형성되어 있는 백혈병/육종 그룹의 바이러스들과 다양한 주들로 구성된 마렙병 병원체의 유전물질을 한번에 진단할 수 있는 기술로써, 이를 이용하여 국내에 상재되어 있는 이러한 질병들을 가장 정확하고 신속하게 결과를 판정할 수 있는 진단 기법으로 개발하고자 한다.

3. 사회·문화적 측면

닭의 백혈병/육종 그룹 바이러스들과 마렙병 바이러스는 소비자들에게 심한 혐오감을 줄 수 있는 종양 병변을 유발시킨다. 물론 이러한 질병들에 대한 사람으로의 전파는 발생하지 않지만, 우리나라 국민의 급격한 보건인식 향상에 의한 위생적인 식품에 대한 욕구의 증가와 발맞추어 이러한 질병들이 시장에 잘못 유통되었을 때는 사회적으로 심각한 파장이 발생할 수 있을 것이다. 좋은 본 보기가 최근 국내에서 발생한 구제역 파동이라 할 수 있다.

마렙병 바이러스 감염 초기에는 심한 면역억압이 필연적으로 발생한다. 따라서 육계와 같은 경우 실제로 종양이 발생할 연령에 도달하기 전에 도계가 되지만, 면역능력은 크게 저하되어 있어서 쉽게 2차 감염이 발생할 수 있다. 이러한 2차 감염에는 닭에서만 발생하는 질병도 있겠지만, 가금의 파라티프스를 일으키는 *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* 등은 식중독의 주요 원인체로서

사망에 이르기까지 심각한 피해를 유발시킬 수 있다.

최근 인간의 유전자에 대한 비밀이 밝혀지면서 사회의 관심을 끌게된 DNA chip 기술은 이를 이용하여 인간의 유전병 및 암 뿐 아니라 각종 동식물의 검역, 식품의 안정성 검사, 신약의 개발, 장기 이식 가능 조직 검사, 용의자나 친자를 확인하는 법의학 영역까지 매우 다양한 응용 방법이 연구, 개발되고 있다. DNA chip을 비롯한 다양한 유전공학적 기법은 첨단 과학기술로써 현재 인간사회가 당면한 의료, 식량, 환경문제, 질병의 치료 및 예방 등을 위하여 전반적으로 활용될 수 있는 부분으로 이를 농축산 분야에 활용한다면 그 파급효과는 실제로 대단하리라 생각되어진다.

수입개방에 따른 농축산물의 국가 경쟁력 강화를 위해 국내 축산업은 생산비 절감과 양질의 축산물 생산 등에 노력해야 하며 또한 최근 발생한 구제역 파동과 같은 해외 악성 전염병의 유입을 차단하는 방법에 노력을 기울여야 하므로 이의 해결책으로 질병 진단의 첨단 기술 개발 연구는 매우 시기 적절할 것으로 생각되어진다. DNA chip을 이용한 가축 질병 진단법의 개발을 통해 우리나라의 축산 경쟁력을 높일 수 있을 뿐 아니라 세계적으로 분자생물학적 진단 기법 분야를 선도해 나가는 좋은 입지를 차지하는데 중요한 역할을 할 것으로 생각되어진다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

동물의 유전성 혹은 유전자 이상에 대한 질병뿐만 아니라 감염성 질환에 대한 DNA chip의 응용과 이용에 대한 연구는 전 세계적으로 전무한 실정이다. 이는 DNA chip이 단시간에 많은 정보를 분석해주는 장점을 가짐과 동시에 현재로는 많은 비용이 소요되기 때문이다. 하지만 DNA chip의 제작 장비와 스캐너의 성능이 향상되고 가격 또한 하락하고 있는 실정이어서 조만간 실용화하는데 문제가 없으리라 생각된다. DNA chip 기술을 바탕으로 닭에서 종양을 일으키는 병원체들을 한 번에 동정 및 진단해 내는 DNA chip을 개발하여 안으로는 국내 가축 질병 진단 기관과 가축방역정책 수립에 도움을 주며 밖으로는 축산업의 국제 경쟁력 강화의 기반을 다질 수 있는 좋은 기회가 될 것이다. 현재 국내외적으로 DNA chip의 응용분야는 다양한데 주로 사람의 유전자 이상에 의한 질병을 진단하는 목적으로 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 이에 대한 진단법도 상품화되어 있다. 감염성 병원체의 진단에 대한 응용은 사람에서 주로 AIDS의 원인체인 HIV, 자궁경부암을 유발하는 파필로마바이러스, 결핵균 등에 관한 연구가 이루어지고 있으며, 이에 대한 진단법도 상품화되어 있다. 닭의 바이러스성 종양성 질병은 국내외적으로 심각한 경제적 손실을 야기하고 있다. 따라서 이러한 질병을 신속·정확하게 동시에 진단할 수 있는 DNA chip 진단법이 개발된다면, 이러한 질병을 예방, 진단, 치료하는데 획기적인 방법으로 사용될 수 있다. 즉, 이러한 질병에 대한 경제적 피해를 격감시킬 수 있어서 국내 축산업의 경쟁력을 재고할 수 있을 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발수행 내용

1. 1차년도(2003년도)

가. 제1세부과제: 닭에 종양을 유발하는 바이러스들에 대한 특이 유전자 탐색

1) 백혈병/육종 그룹 바이러스들과 마택병 바이러스에 대해 국내외적인 발생을 조사하고 선발함

- ▶ 전 세계적으로 백혈병/육종 그룹 바이러스와 마택병 바이러스에 의한 종양성 질병의 발생양상이 변화되고 있음
- ▶ 국내에서도 최근 백혈병/육종 그룹에 의한 일반적인 림프구성 백혈병 외에 J 바이러스에 의한 골수세포종이 발생하고 있음
- ▶ 국내 마택병 바이러스도 초강독주인 very virulent plus strain이 출현하는 등 발생 상황이 세계적인 추세와 유사하게 변화됨
- ▶ 따라서 이러한 급변하는 종양성 질병의 발생변화를 자세히 조사하고 DNA chip에 의해서 검색할 바이러스 주를 선발함

2) 선발된 바이러스 주의 유전자 서열을 비교·분석하고 특이 부위 선정

- ▶ Medline 검색을 통한 참고문헌 및 gene bank 염기서열 자료의 비교·검토
- ▶ 각 바이러스의 specific sequence 탐색 및 발굴

3) 감별이 필요한 다른 바이러스와의 상동성 여부 확인

- ▶ 선정된 유전자 염기 서열과 감별을 요하는 다른 바이러스, 세균 및 기생충 등의 병원체 유전자 염기 서열과 비교 검색하여 상동성 여부를 확인함

- ▶ NCBI나 기타 프로그램 등의 homology search를 이용하여 상동성을 검사함

4) 대상 바이러스의 표준주 확보

- ▶ 기존의 보유하고 있는 바이러스 외에 추가로 그 대상이 되는 바이러스에 대한 표준주를 확보함

5) 각 대상 바이러스에 대한 PCR 수행

- ▶ 각각의 바이러스에 특이적인 primer를 gene bank 및 참고문헌 등에서 얻은 정보를 바탕으로 선발
- ▶ Primer는 Primer 3 program (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)을 이용 설계
- ▶ NCBI나 기타 프로그램 등의 homology search를 이용하여 상동성을 검사함
- ▶ 선정된 유전자 염기 서열과 감별을 요하는 다른 바이러스, 세균 및 기생충 등의 병원체 유전자 염기 서열과 비교 검색하여 상동성 여부를 확인함
- ▶ 특이 primer를 이용하여 각 표준주에서 PCR을 수행하여 primer의 특이성과 확보한 바이러스의 특이 유전자(바이러스성 종양유전자 등) 진위 여부 결정
- ▶ 1·2차 연도의 DNA chip에 사용될 PCR 기법으로서 확립

6) 선발된 유전자의 DNA chip 개발에 대한 응용성 검토

- ▶ Oligonucleotide probe를 의뢰하여 제작하고 dot blotting 등의 다양한 실험을 통한 DNA chip에 응용성을 조사

나. 제1협동과제: 국내에서 발생하고 있는 닭의 바이러스성 종양성 질병의 발병조사와 시료채취

1) 국내 닭 백혈병/육종 그룹 종양과 마력병의 발병실태조사

- ▶ 전국적인 규모로 하며, 각 연구기관과 긴밀한 공조 하에서 되도록 많은 농장의 발병 실태를 조사함

2) 국내 닭 백혈병/육종 그룹과 마력병의 종양조직 채취

- ▶ 자체 연구진 및 각 연구기관과 상호 긴밀한 공조 하에서 재료를 되도록 많이 확보함

3) 채취한 각각의 증례에서 종양병변의 분류

가) 병리조직학적 방법에 의한 분류

- ▶ 종양이 발생하여 죽거나 살아있는 닭을 부검
- ▶ 각 부위의 장기나 조직을 채취하여 10% 중성 포르말린에 고정
- ▶ 파라핀 봉입한 후, 4 μm 두께의 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin 염색
- ▶ 광학현미경하에서 종양을 분류

나) 면역조직화학적 방법에 의한 분류

- ▶ 냉동 보관된 종양 조직을 4 μm 두께로 절편 제작
- ▶ Cold acetone으로 고정
- ▶ 3% 과산화수소수가 들어있는 PBS 용액으로 내인성 페록시다제 불활화
- ▶ 조직 내의 비특이적인 결합물질을 제거하기 위해서 정상혈청과 작용
- ▶ CD3, CD4, CD8, IgG 등의 림프구 표면항원에 대한 항체로 작용
- ▶ 각각의 1차 항체에 대한 2차 항체로 작용
- ▶ Streptoavidin peroxidase complex를 작용
- ▶ 상기 각 단계 사이에서는 PBS로 10분간 3회 세척
- ▶ DAB 용액으로 발색시킨 후, 대조염색하고 광학현미경으로 관찰.

다) PCR이나 RT-PCR 기법 등을 이용한 분류

- ▶ 종양조직에서 RNA나 DNA 핵산의 추출
- ▶ 특이 primer를 이용한 RT 반응 후 혹은 바로 PCR 수행
- ▶ Agarose gel에 전기영동 후 UV하에서 특이 밴드 확인

2. 2차년도(2004년도)

가. 제1세부과제: DNA chip의 개발과 국내에서 분리한 바이러스 분리주에 응용

1) 각 바이러스에 대한 oligonucleotide chip 검증

가) 1차년도에 개발한 oligonucleotide chip을 각각의 표준주를 대상으로 검증

- ▶ cDNA 제작 방법의 유용성 검사: cDNA의 제작은 1) specific primer pairs를 이용한 multiplex PCR 등을 이용하여 제작

나) DNA chip slide의 제작

- ▶ DNA chip slide에는 amino-silan을 coating하여 제작하였음.
- ▶ 제작된 slide size는 wide가 25 ± 0.5 mm, length가 75 ± 0.5 mm, height가 1 ± 0.1 mm이었음.
- ▶ Spot은 morphology가 circle 형태이었으며, wide space가 0.30 mm, length space가 0.3 mm, diameter이 0.16 ± 0.05 mm 이었음.
- ▶ 이러한 spot은 columns가 6개 이었고, rows가 6개 이었다.
- ▶ 이러한 배열은 진단의 확실성을 높이기 위해서 한 slide 당 한 쌍을 spotting 하였음.

다) Multiplex PCR 기법에 의한 cDNA 합성의 유효성 검사(cDNA의 합성에 최적으로 예상됨)

- ▶ Multiplex PCR과 DNA chip의 combination이 다수 원인체를 동시에 검출할 수 있음
- ▶ 따라서, multiplex PCR이 DNA chip probe에 hybridization 하는데 타당할 것으로 예상됨
- ▶ 종양조직에서 RNA나 DNA 핵산의 추출
- ▶ 특히 primer를 이용한 RT 반응 후 혹은 바로 PCR 수행
- ▶ 하지만 레트로바이러스는 DNA인 provirus를 형성
- ▶ 따라서, provirus를 추출할 예정이므로 RNA의 추출과 RT 반응은 필요 없을 것 같음
- ▶ Agarose gel에 전기영동 후 UV하에서 특이 밴드 확인

라) DNA chip에 실제 사용할 cDNA의 multiplex PCR 기법에 의한 제작

- ▶ 나)번 항에서 기술한 바와 같이 유사하나, cDNA의 제작은 PCR 반응물에 Cy5-dUTP를 넣어 표지하게 하는 것이 다름

2) Oligonucleotide chip의 표준주 및 야외 분리주에서 응용

가) 각각의 방법에 의해서 제작한 표준주 및 야외 분리주의 cDNA를 oligonucleotide probe에 hybridization 유무 및 효율성 검사

나) 최적의 cDNA 제작 방법의 선정 및 oligonucleotide chip의 개발

다) Oligonucleotide chip의 예상 protocol

- ▶ 1차년도에 개발한 oligonucleotide chip의 준비
- ▶ 2차년도에 합성한 각 바이러스에 대한 cDNA의 준비
- ▶ Multiplex PCR에 의해 합성된 target DNA 10 μ l에 hybridization buffer (50% formamide, 6 \times SSC, 0.5% SDS, 50 mM Na-phosphate, pH 8.0, 5 \times Denhard's) 10 μ l를 섞은 후 PCR 기계에서 98 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 가열 후, 얼음 위에서 3분간 정지
- ▶ Chip slide에 반응시킨 후 coverslip으로 덮음
- ▶ 45 $^{\circ}$ C humid incubator에서 15시간 hybridization 실시
- ▶ Slide의 washing은 2X SSC, 0.1% SDS에서 5분간, 1X SSC에서 5분간, 0.5X SSC에서 5분간 80 rpm 정도로 흔들어 주면서 세척 후, 1500 rpm, 5분 동안 원심분리하면서 건조
- ▶ 시그널 검출은 Affymetrix 418 array scanner (Affymetrix, USA)를 이용하여 수행

3) 진단에 감별이 필요한 병원체 검색

- ▶ 바이러스를 포함한 여러 세균, 기생충들과의 homology 검색을 통한 특이도 비교 검토

4) 특이도 자료를 바탕으로 감별진단에 필요한 다른 병원체와의 실제 특이도 검사 수행

- ▶ 가항의 2)번에서 기술한 바와 같이 다른 병원체와의 multiplex PCR 수행
- ▶ 제작된 cDNA와 oligonucleotide간의 hybridization을 microarray를 이용하여 수행

나. 제1협동과제: 닭 백혈병/육종 그룹 바이러스와 마렉병 바이러스의 분리·
동정 및 야외 종양 발생례의 조사 및 재료 확보

1) 야외 발생주의 분리

- ▶ 1·2차년도에 채취한 종양조직을 사용
- ▶ 마렉병 바이러스 분리를 위해서는 chicken 혹은 duck embryo fibroblast 등을 이용
- ▶ 백혈병/육종 그룹 바이러스 분리를 위해서는 chicken embryo fibroblast, hematopoietic cell 등 다양한 세포주를 이용
- ▶ 배양에 의한 대량의 바이러스 확보
- ▶ 제1세부과제의 DNA chip 개발을 위해 제공

2) 분리한 바이러스의 동정

가) PCR 기법을 통한 야외 분리주의 특이성을 확인

- ▶ 배양된 세포에서 DNA 핵산의 추출
- ▶ 특이 primer를 이용한 PCR 수행
- ▶ Agarose gel에 전기영동 후 UV하에서 특이 밴드 확인

나) PCR 산물의 sequencing을 통한 특이 유전자 염기서열 확인

- ▶ PCR product가 있는 부위의 gel을 절취
- ▶ 이후의 과정은 QIAEX II kit를 이용
- ▶ Gel에서 DNA만을 회수한 다음 ABI system으로 염기서열 분석
- ▶ 염기서열 분석 결과와 virus sequence와 일치 여부를 확인

3) 국내 닭 백혈병/육종 그룹 종양과 마렉병의 발병실태조사(수행 방법은 1차년도와 동일함)

- ▶ 닭 백혈병/육종 그룹 종양과 마렉병의 발병실태를 정확히 파악하기 위해서 2차년도에도 계속적으로 발병실태조사

4) 국내 닭 백혈병/육종 그룹과 마렉병의 종양조직 채취(수행 방법은 1차년도와 동일함)

- ▶ 야외 바이러스의 분리와 DNA chip 개발에 사용하기 위해서 계속적으로

종양조직 채취

5) 채취한 각각의 증례에서 종양병변의 분류

- ▶ 병리조직학적 방법에 의한 분류(수행 방법은 1차년도와 동일함)
- ▶ PCR이나 RT-PCR 기법 등을 이용한 분류(수행 방법은 1차년도와 동일함)

3. 3차년도(2005년도)

가. 제1세부과제: DNA chip의 실험접종례와 야외발생 증례를 이용한 진단법 확립

1) 실험접종한 병변을 이용한 DNA chip의 응용

- ▶ 제1협동과제에서 실험접종에 의해 확보한 재료를 DNA chip의 응용에 이용.
- ▶ 이러한 병변을 이용하여 2차년도에서 개발한 DNA chip의 효율성을 검증.

2) 기존의 진단기법인 PCR 결과를 비교함으로써 진단의 정확성 및 신속성 등 검증

- ▶ 협동연구과제 팀에서 각각의 종양병변에 대하여 수행한 PCR 결과와 비교함으로써 진단의 정확성 및 신속성 등 검증

3) 내인성 레트로바이러스의 분자유전학적 분석

- ▶ 제1협동과제에서 검출한 국내 육용종계 및 재래닭 종란에서 내인성 레트로바이러스에 대한 분자유전학적 분석을 실시하였음.
- ▶ 각각의 primer pairs를 이용하여 ev 및 ev/J 바이러스는 env 유전자의 일부분을, EAV 바이러스는 TM 및 LTR 사이의 부분을, ART-CH의 경우는 gag-related region을 증폭하였음.
- ▶ 증폭된 밴드는 QIAEX II kit를 이용하여 순수 elusion한 후, ABI system 3700 sequencer (Applied Biosystem Inc., Foster City, CA, USA)

를 이용하여 염기서열을 분석하였음.

- ▶ 각각의 내인성 레트로바이러스 염기서열 분석은 DNA Basic module (DANsis MAX, Alameda, CA)를 이용하여 기존에 알려진 바이러스들과 비교분석하였음.
- ▶ 염기서열의 상동성 검사는 LALIGN Query program of the GENESTREAM network server (Institut de Genetique Humaine, Montpellier, France)를 이용하여 수행하였음.
- ▶ 계통학적 분석은 Molecular Evolutionary Genetics analysis의 UPGMA methods (MEGA version3.1)를 이용하여 수행하였음.

나. 제1협동과제: 국내 주요 육용종계 및 재래닭 종란에서 닭 백혈병/육종 바이러스 검출 및 내인성 바이러스의 분자유전학적 분석과 마렉병 바이러스 분리주의 SPF 닭의 실험접종

1) 국내 주요 육용종계 및 재래 닭 종란에서 닭 백혈병/육종 바이러스 검출 및 내인성 바이러스의 분자유전학적 분석

가) 재료

- ▶ 국내에서 주로 사육중인 육용종계인 Cobb 종란, Ross 종란, Hubbard 종란을 각각 18개, 1개, 1개 종란장에서 구입하였음.
- ▶ 국내 재래 닭인 오골계, 흑색계, 적색계, 황색계 종란을 구입하였음.
- ▶ 또한 독일에서 White Leghorn SPF 란을 구입하였음.
- ▶ 이들 종란이 11일령이 될 때, 태아를 잘게 세절한 후 닭 태아세포를 제작하여 실험에 사용하였음.

나) DNA 추출

- ▶ 상술한 육용종계 및 재래 닭의 종란 태아에서 DNA를 DNA extraction kit (Bioneer, Seoul, Korea)를 이용하여 추출하였음.
- ▶ 외인성 레트로바이러스 표준주인 RAV-1 (subgroup A), RAV-2 (subgroup B), RAV-49 (subgroup C), RAV-50 (subgroup D)를 ATCC사로부터

구입하여, 사용하였음.

- ▶ Subgroup J 바이러스인 HPRS-103주는 영국의 Institute for Animal Health, Viral Oncogenesis Group의 Dr. K. Venugopal로부터 DNA 형태로 분양받아 사용하였음.

다) Polymerase Chain Reaction

- ▶ 내인성 및 외인성 레트로바이러스를 검출하기 위하여, 각각의 subgroup에 특이적인 primer pair를 이용하여 PCR을 수행하였음.

2) DNA chip 진단법 확립을 위한 마렉병 바이러스 분리주를 닭에 실험접종 후 제1세부과제에 재료제공

가) 실험에 사용할 SPF 닭의 안전성 검사

- ▶ 닭에 종양을 유발하는 레트로바이러스에 특이적인 혹은 내인성 레트로바이러스에 특이적인 primer를 이용하여 내인성 혹은 난계대 감염된 레트로바이러스 감염 여부를 PCR 방법에 의한 검증
- ▶ SPF 닭에 자연 감염된 마렉병 바이러스 감염 여부를 마렉병 바이러스에 특이적인 primer를 이용하여 PCR 방법으로 검증

나) SPF 닭에 각각의 바이러스 실험접종

- ▶ 각각의 바이러스를 SPF 닭에 실험접종
- ▶ 최종적으로 분류한 재료의 DNA chip에 사용하기 위해 제1세부과제 연구팀에 제공

제 2 절 연구개발수행 결과

1. 1차년도(2003년도)

가. 제1세부과제: 닭에 종양을 유발하는 바이러스들에 대한 특이 유전자 탐색

- 1) 백혈병/육종 그룹 바이러스들과 마렉병 바이러스에 대해 국내외적인 발생을 조

하고 선발

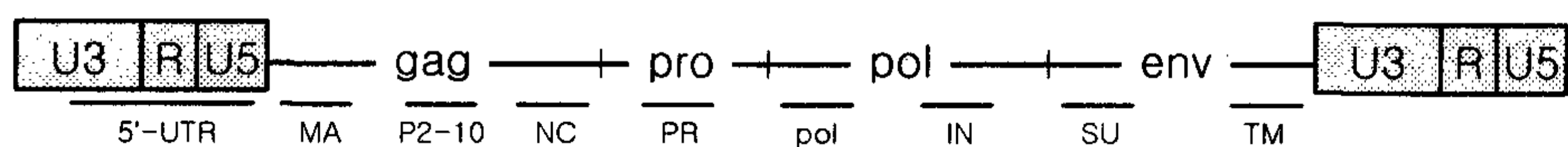
- ▶ 전 세계적으로 마택병 바이러스의 초강독주(very virulent plus)가 발생하여 양계업계를 긴장시키고 있음.
- ▶ 마택병 바이러스는 70년대 칠면조 유래의 마택병 바이러스 혈청형 3인 HVT 백신에 의해서 억제가 되었으나, 이로 인해 야외 발생주들이 점점 강독형만 남게 되어 80년대에는 HVT에 의해서 방어가 되지 않은 마택병이 출현하여, 결국 혈청형 2 마택병 바이러스인 SB1을 백신으로 투여하기 시작하였음.
- ▶ 또한 90년대에 들어와서는 강독주인 very virulent MDV가 발생하여 마택병 바이러스 혈청형 1중 비병원성인 CVI988주를 사용하게 되는 실정이 되었음.
- ▶ 하지만 90년대 중반을 넘어서면서 초강독주 즉 very virulent plus MDV가 발생하여, CVI988 백신으로도 방어가 되지 않는 실정이 되었음.
- ▶ 국내에서도 마택병이 꾸준히 발생하여 양계농가의 막대한 피해를 유발하고 있음.
- ▶ 하지만 국내에서는 초강독주인 very virulent plus MDV의 발생에 대해서는 아직까지 뚜렷한 증거는 제시되고 있지 않으나, 우리나라에서도 발생하고 있는 것으로 추정되고 있음.
- ▶ 전 세계적으로 양계 산업에 막대한 피해를 유발하고 있는 가장 중요한 종양성 질병은 마택병이지만 알파레트로바이러스에 의한 림프구성 백혈병도 꾸준히 양계산업에 문제를 일으키고 있음.
- ▶ 림프구성 백혈병은 마택병과 여러 면에서 전문가가 아니면 매우 감별이 어려워, 오진을 내리기 쉬운 질병임.
- ▶ 문헌 조사에 의하면 지난 수십 년간 백혈병은 림프구성 백혈병이 우세하게 발생하였지만, 90년대에 들어와서 J 바이러스에 의한 골수세포종이 외국은 물론 국내에서도 발생하고 있는 것을 알 수 있었음.
- ▶ 국내에서는 J 바이러스에 의한 골수세포종이 90년대 중반에 폭발적으로 발생하여 양계산업에 막대한 피해를 유발하여, 종계장에서 레트로바이러스가 free가 되도록 노력한 결과 현재는 그리 많이 발생하고 있지 않는 것으로 파악되었음.

- ▶ 이와 같이 국내외적으로 닭의 바이러스성 종양성 질병이 창궐하고 있어, 이러한 바이러스에 대한 선발은 국내외 여건에 맞게 하였음.
- ▶ 즉 국내에서는 마렉병 바이러스 초강독주(very virulent plus strain)의 발생이 확인되어 있지 않기 때문에, 마렉병 혈청형 3인 HVT, 혈청형 2인 SB1, 혈청형 1인 CVI988를 비롯하여 강독주(very virulent strain)까지만 표준 바이러스로서 선발하여 실험에 사용하였음.
- ▶ 닭 백혈병/육종 그룹의 바이러스인 경우에는 전 세계적으로 널리 발생하고 있는 subgroup A 백혈병/육종 바이러스인 RAV-1주만을 선발하여, 1차년도 실험에 사용하였음. 하지만 2차년도 이후에는 subgroups A외에도 B, C, D, J도 선발하여 사용하였음.

2) 선발된 바이러스 주의 유전자 서열을 비교·분석하고 특이 부위 선정

- ▶ Medline 검색을 통한 참고문헌 및 Genbank에 등록된 염기서열 자료를 비교·검토한 결과, MDV와 leukosis/sarcoma group retrovirus에서 각 바이러스의 specific sequence를 발굴하였음(Fig. 1).
- ▶ 이러한 부위에서 PCR용 primer와 DNA chip용 probe를 설계하였음.
- ▶ 각각의 primer와 probe sequence는 아래 5)항에서 자세히 기술하였음.

(1) Genomic structure of leukemia/sarcoma group retrovirus



(2) Genomic structure of Marek's disease virus

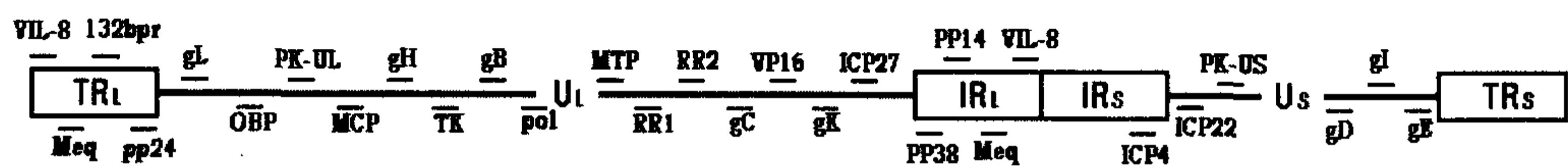


Fig. 1. Genomic structures of leukemia/sarcoma group retrovirus (1) and Marek's disease herpesvirus (2). Each specific sequence and their names are underlined and indicated.

3) 감별이 필요한 다른 바이러스와의 상동성 여부 확인

가) 선정된 유전자 염기 서열과 감별을 요하는 다른 바이러스, 세균 및 기생충 등의 병원체 유전자 염기 서열과 homology search 비교 검색

- ▶ 선정된 유전자 염기서열을 NCBI의 Nucleotide-nucleotide BLAST 검사를 실시하여 homology search를 한 결과, 어떠한 세균, 기생충 그리고 기타 다른 바이러스와 상동성을 확인할 수 없었음.
- ▶ 즉 leukosis/sarcoma group virus와 MDV에서 선정한 염기서열 부위는 각각의 바이러스에 특이적임을 증명할 수 있었음.

4) 대상 바이러스의 표준주 확보

- ▶ Leukosis/sarcoma group virus의 표준주를 확보하기 위해서 국립수의과학검역원 조류질병과의 성환우 박사님으로부터 RAV-1주를 분양받아 확보하였음.
- ▶ 또한 MDV는 국내에서 아직 very virulent plus MDV의 발생보고가 확실히 증명되지 않아서, 혈청형 1 중에서는 very virulent MDV strain인 Md5 strain (일본 홋카이도대학 수의과대학 오누마 미사오 교수님 분양), virulent인 JM strain (일본 홋카이도대학 수의과대학 오누마 미사오 교수님 분양), a pathogenic strain인 CVI988 (삼지약품)을 확보하였음.
- ▶ 혈청형 2 MDV인 SB1은 중앙백신연구소에서, 혈청형 3 MDV인 HVT는 삼지약품과 중앙백신연구소로부터 확보를 하였음.
- ▶ 이러한 표준주들은 chicken embryo fibroblast에서 배양하여 CPE 유무를 확인한 결과, 세포의 원형화 및 탈락 등 전형적인 CPE가 확인되어 (Fig. 2), 세포 및 상층액을 질소탱크 및 초저온 냉동고에 각각 보관 중에 있음.

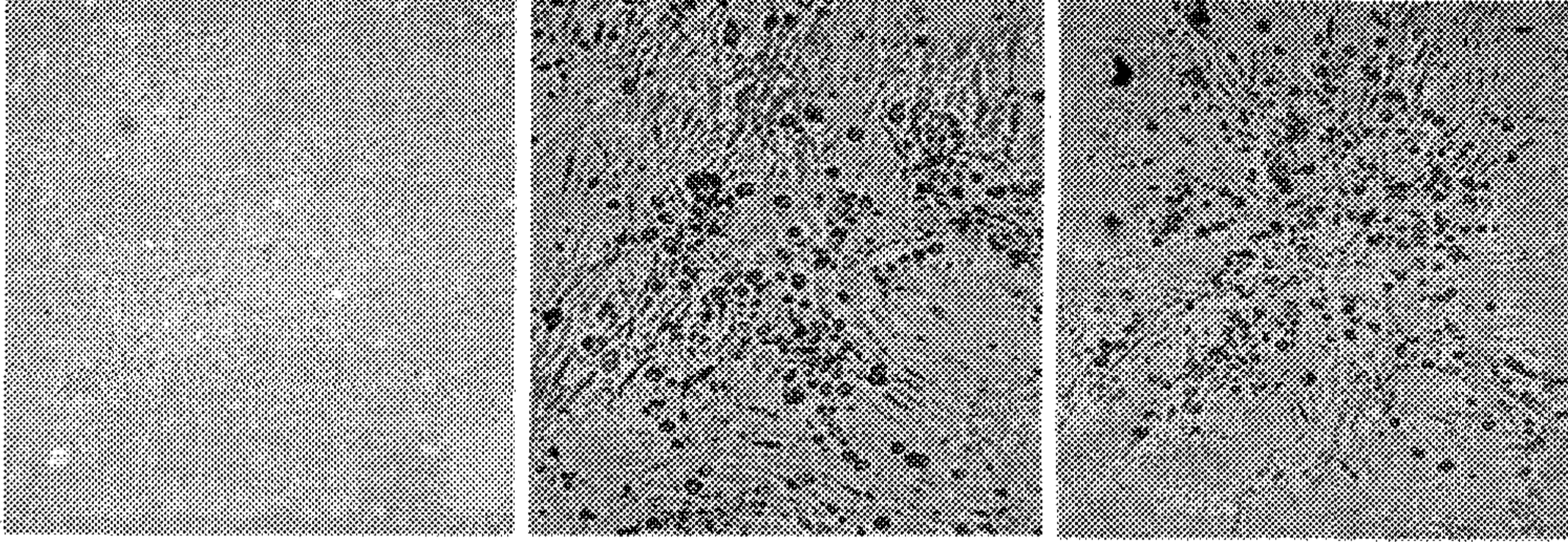


Fig. 2. Left. Uninoculated monolayer of chicken embryo fibroblast (CEF) cells 4 days after seeding. Middle. Cytopathic effects (CPE) at 3 days postinoculation of Md5 Marek's disease virus in CEF cells. The CPE are characterized by rounded, granular cells that occurred in clusters. Right. CPE at 3 days postinoculation of HVT serotype 3 Marek's disease virus in CEF cells. The CPE are characterized by rounded, granular cells that occurred in clusters.

† 대상 바이러스에 대한 PCR 수행

- ▶ 각각의 바이러스에 특이적인 primer를 Genbank 및 참고문헌 등에서 얻은 정보를 바탕으로 선발하였음.
- ▶ Primer는 Primer 3 program (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)을 이용 설계하였고, NCBI나 기타 프로그램 등의 homology search를 이용하여 상동성을 검사한 결과, 각각의 바이러스에 specific하였음(Table 1 & 2).
- ▶ Table 1과 2에서 보여주는 각각의 primer pairs의 위치는 Fig. 1의 genomic structure에서 그 부위를 나타내었음.
- ▶ 이렇게 선정된 유전자 염기 서열과 감별을 요하는 다른 바이러스, 세균 및 기생충 등의 병원체 유전자 염기 서열과 비교 검색하여 상동성 여부를 확인한 결과, leukosis/sarcoma group virus와 MDV 각각의 유전자에 specific하였음.
- ▶ 특이 primer를 이용하여 각 표준주에서 PCR을 수행하여 primer의 특이성과 확보한 바이러스의 특이 유전자 진위여부 결정하였음.
- ▶ 즉 Leukosis/sarcoma group virus와 MDV 유전자의 증폭을 위해서 선정되고 제작된 각각의 primer pairs를 이용하여 PCR (leukosis/sarcoma group virus와 MDV) 혹은 RT-PCR (leukosis/sarcoma group virus)을 수행하였음.
- ▶ 그 결과 각각의 유전자에 특이적인 PCR product를 확인하여, 각각 선발된 primer pairs가 이러한 바이러스에 특이적임을 증명할 수 있었음(Figs. 3-6).

Table 1. Primer pairs for the detection of Marek's disease virus (MDV)

| Gene | Product | Primer | Product size (bp) |
|-----------------------------------|---|---|-----------------------|
| TR _L , IR _L | 132 bpr (<i>Bam</i> HI D & H fragments of MDV) | F : 5'-ttggagttcgggtattacttc-3' R : 5'-tcctatgagaaagcgct-3' | 632, 509, 377, 245 |
| R-LORF2 | VIL-8 | F : 5'-actggcttggggcctattat-3' R : 5'-attgccaccatcttctcca-3' | 205 |
| R-LORF7 | Meq | F : 5'-agttggcttgcgatgagccag-3' R : 5'-tgttcgggatcctcggttaaga-3' | 583 |
| R-LORF14 | PP24 | F : 5'-tggggataagcatacagaga-3' R : 5'-tgttgcaaacaggaacttg-3' | 218 |
| UL1 | Glycoprotein L -forming a complex with UL22 gene product (glycoprotein H) | F : 5'-tccttcgtgctaggtatggt-3' R : 5'-tcacagaattctccaatcc-3' | 326 |
| UL9 | OBP | F : 5'-aatttgattcaaggagagca-3' R : 5'-caagcctacgataaatggc-3' | 362 |
| UL13 | Protein kinase (UL) | F : 5'-taacgtcaccgagggtccta-3' R : 5'-acaaatcagccgttcttgct-3' | 701 |
| UL19 | MCP | F : 5'-ggctgtatatcctacacca-3' R : 5'-ctggtaactctcgaacctg-3' | 395 |
| UL22 | Glycoprotein H -forming a complex with UL1 gene product (glycoprotein L) | F : 5'-aaatacggacgtcgagtaaa-3' R : 5'-aacatcgtttcattctcacc-3' | 301 |
| UL23 | TK | F : 5'-atgtgtaccaatctctccg-3' R : 5'-taaggatgaatgggaatctg-3' | 316 |
| UL27 | Major membrane protein glycoprotein B | F : 5'-aaccgtgatccgtctagaacc-3' R : 5'-gttacgcttgactggaaggc-3' | 667 |
| UL30 | DNA polymerase | F : 5'-gtacatcggagcacgaaaga-3' R : 5'-cgcagatgggtatcagtatcg-3' | 553 |
| UL36 | Major tegument protein | F : 5'-actccgacgggatactgatg-3' R : 5'-gtggtaaggaaggcgtcaag-3' | 690 |
| UL39 | Ribonucleotide reductase large subunit (RR1) | F : 5'-tagctctaatgcctacagcc-3' R : 5'-tacatccctgttttgagacc-3' | 448 |
| UL40 | Ribonucleotide reductase small subunit (RR2) | F : 5'-attacttctatgcacccgaa-3' R : 5'-gacacgtttattcaaccaa-3' | 405 |
| UL44 | Glycoprotein C | F : 5'-agactatgcatacccacgctc-3' R : 5'-taagttgtgtaggctgcg-3' | 687 |
| UL48 | VP16 | F : 5'-cgatgtattgtcgtgcttta-3' R : 5'-cggaagtattggaagagttg-3' | 306 |
| UL53 | Glycoprotein K | F : 5'-ctcatcggaaatattttgc-3' R : 5'-tccaaagatagctcacacaa-3' | 340 |

Table 1. Continues

| Gene | Product | Primer | Product size (bp) |
|-----------|---------------------|---|-------------------|
| UL54 | ICP27 | F : 5'-gcaagaagggcatcaccgaagaa-3' R : 5'-acgacgaatgcgcgataacaaaat-3' | 646 |
| R-LORF14a | PP38 | F : 5'-atggaattcgaagcagaacac-3' R : 5'-ctccagattccacctccccaga-3' | 850 |
| IRL | PP14 | F : 5'-gaggttctggcagagattcc-3' R : 5'-cttgtatgctacaacggc-3' | 538 |
| IRs | ICP4 | F : 5'-gatggtcagattggggttcc-3' R : 5'-cctccacgcctgtttgcggt-3' | 742 |
| US1 | ICP22 | F : 5'-atgagagcgcgacgaagatt-3' R : 5'-agagtcctgcgcagatgtgga-3' | 331 |
| US3 | Protein kinase (US) | F : 5'-caaaacccttgggagtga-3' R : 5'-tatgagcggcagttatcgtg-3' | 791 |
| US6 | Glycoprotein D | F : 5'-aatcccgtctccactgttg-3' R : 5'-tcactcgaatgggttctcc-3' | 408 |
| US7 | Glycoprotein I | F : 5'-ggctgtagagacgctgtggt-3' R : 5'-aggccatacggtcgacata-3' | 262 |
| US8 | Glycoprotein E | F : 5'-accctttacaccgagacgtg-3' R : 5'-ccacatacaatccagcatcg-3' | 835 |

Table 2. Primer pairs for the detection of avian leukosis/sarcoma group viruses.

| Gene | Product | Primer | Product size (bp) |
|---------|--|--|-------------------|
| myc | v-myc | F : 5'-agccgccgcatgccgctca-3' R : 5'-ccgtgctgcgccaggt-3' | 127 |
| 5' -UTR | A part of UTR region | F : 5'-gtgaccccgacgtgatagtt-3' R : 5'-gacgaccctctgagttctcg-3' | 204 |
| MA | 3' imperfect repeat; matrix protein | F : 5'-gttgcttatgtctccctcag-3' R : 5'-aactttgcttctcagatgt-3' | 177 |
| p2-p10 | A part of gag gene | F : 5'-tctccttatgtggggagtg-3' R : 5'-ggacctgtactcgcaagctc-3' | 225 |
| NC | Nucleocapsid protein | F : 5'-gagagggatggacaaactgg-3' R : 5'-tctgcactgttagcgttg-3' | 168 |
| PR | Neutral protease large subunit | F : 5'-aacagcgttcggtgtatc-3' R : 5'-ataacccccacctatcat-3' | 178 |
| Pol | Reverse transcriptase alpha-subunit | F : 5'-tgacctgttctcccactatc-3' R : 5'-taatcaaaagggtgagcact-3' | 660 |
| IN | Integrase | F : 5'-cgaggttatgcagctgtgaa-3' R : 5'-gcttggtgctagcggttct-3' | 199 |
| SU | Surface protein | F : 5'-gactttactggcggacctga-3' R : vgaacccttggtctgaaa-3' | 202 |
| TM | Transmembrane protein | F : 5'-tgagagactagcctgttggt-3' R : 5'-atgttcctcattagctgga-3' | 235 |

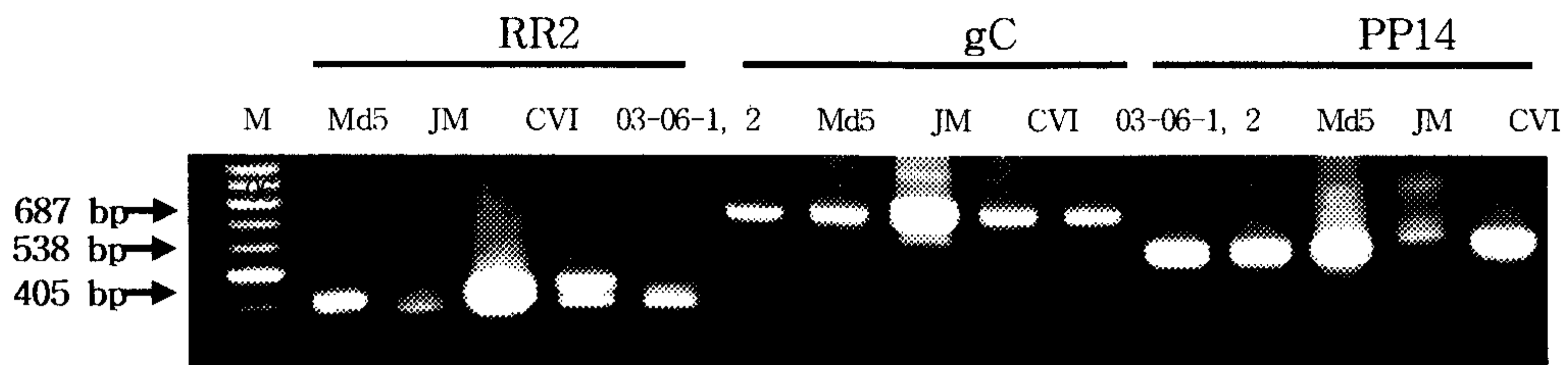


Fig. 3. Detection of Marek's disease virus genes from cells infected with Marek's disease virus (MDV) strains. M; 100 bp marker. RR2; ribonucleotide reductase small subunit. gC; glycoprotein C. PP14; 14-kD phosphoprotein. Md5 (serotype 1 MDV), JM (serotype 1 MDV), CVI (apathogenic serotype 1 MDV), 03-06-1, 2 (field blood samples).

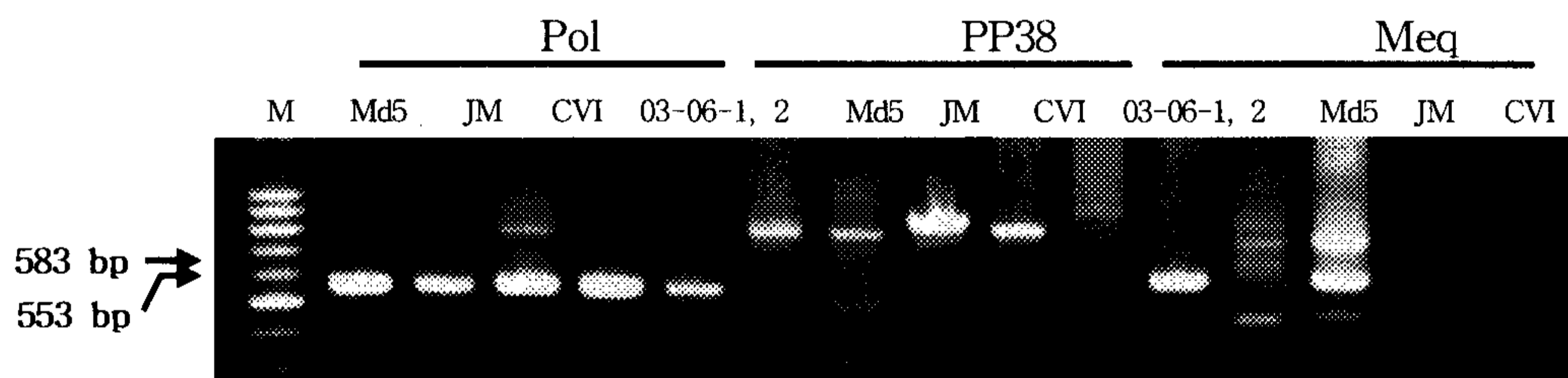


Fig. 4. Detection of Marek's disease virus genes from cells infected with Marek's disease virus (MDV) strains, respectively. M; 100 bp marker. Pol; MDV DNA polymerase. PP38; MDV 38-kD phosphoprotein. Meq; MDV EcoQ. Md5 (serotype 1 MDV), JM (serotype 1 MDV), CVI (apathogenic serotype 1 MDV), 03-06-1, 2 (field blood samples). Note various sizes of PCR products of Meq gene.

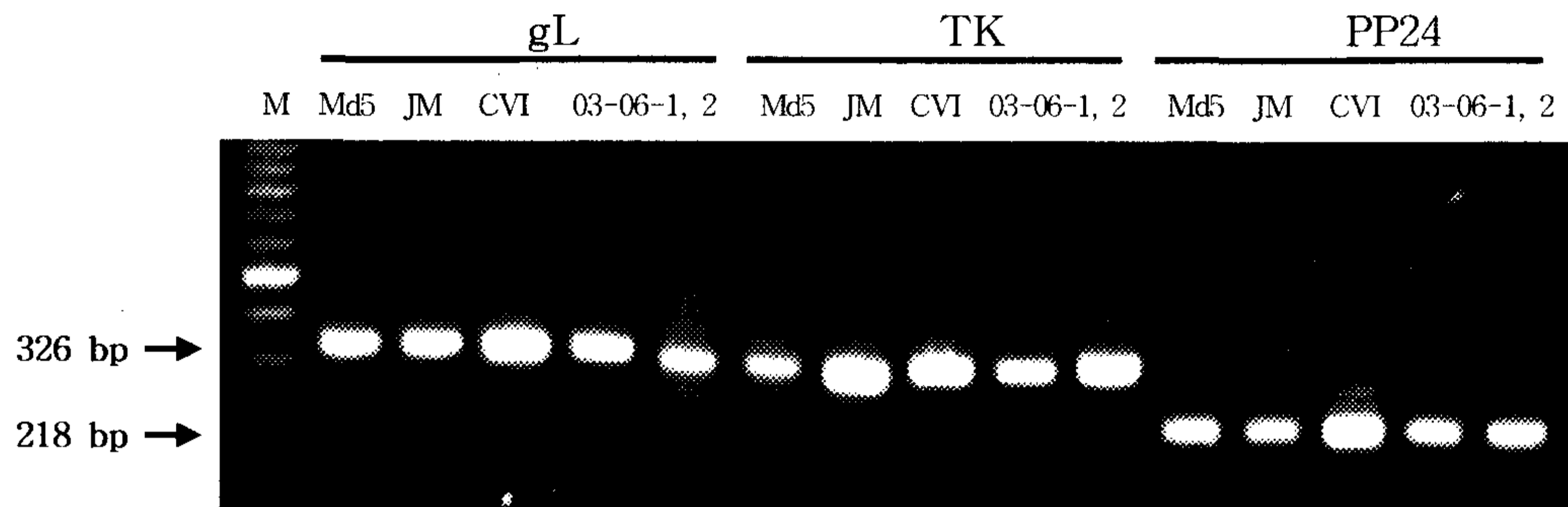


Fig. 5. Detection of Marek's disease virus genes from cells infected with Marek's disease virus (MDV) strains respectively. M; 100 bp marker. gL; MDV glycoprotein L. TK; MDV thymidine kinase. PP24; MDV 24-kD phosphoprotein. Meq; Marek's EcoQ. Md5 (serotype 1 MDV), JM (serotype 1 MDV), CVI (apathogenic serotype 1 MDV), 03-06-1, 2 (field blood samples).

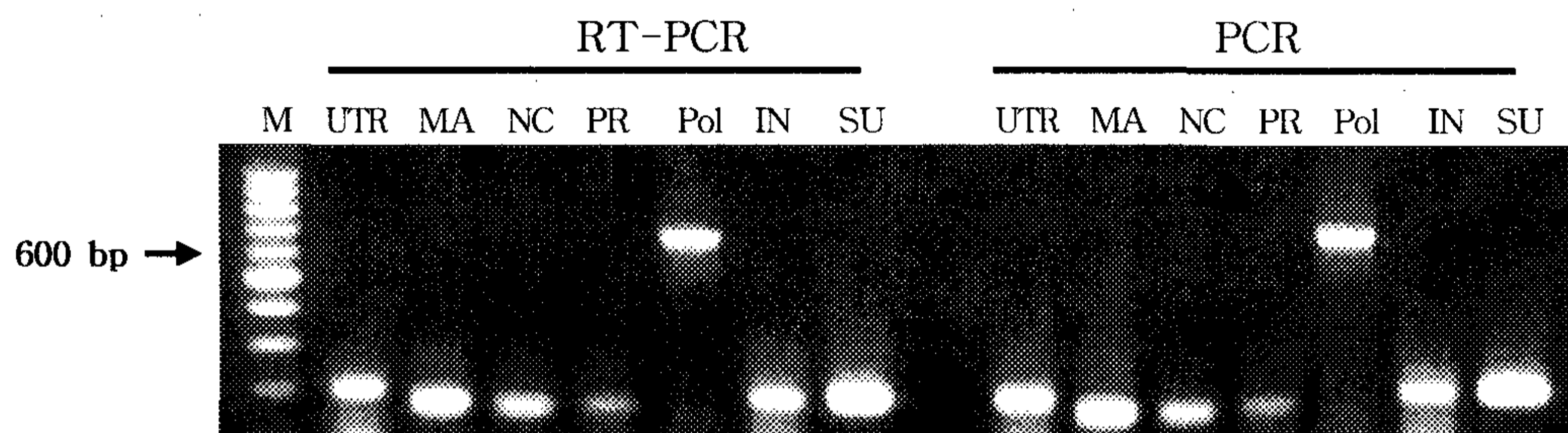


Fig. 6. Detection of avian leukosis/sarcoma group virus (ALSV) genes from cells infected with RAV-1 strain. M; 100 bp marker. UTR; ALSV untranslated region. MA; ALSV matrix protein. NC; ALSV nucleocapsid protein. PR; ALSV protease. Pol; ALSV reverse transcriptase. IN; ALSV integrase. SU; ALSV surface protein.

- ▶ 상술한 바와 같이 본 연구과제팀에 의해 개발·제작된 primer pairs는 각각의 유전자들에 특이적인 것을 확인하여, DNA chip 개발에 사용하려고 함.
- ▶ 핵산 염기서열 분석: 각각의 primer pair에 의해서 증폭된 유전자 산물 중 일부분을 gel에서 순수 분리하여서, nucleotide sequence와 deduced amino acid sequence를 분석하였음.
- ▶ 그 결과 증폭된 산물은 기존의 보고된 nucleotide 혹은 amino acid sequence와 high sequence homology를 보였음.
- ▶ 이러한 nucleotide sequence와 deduced amino acid sequence의 homology 결과 중 마력병 바이러스 종양 유전자인 meq 유전자에 대한 결과를 Tables 3-5에 나타냈음. 이렇게 확립된 방법을 통하여 2차년도에서 분리한 마력병 바이러스 야외주의 특성 규명에 사용하였음.
- ▶ 또한 각각의 분리주들에 대한 계통분석도 중 일부는 Fig. 7에 제시하였음.
- ▶ 본 연구팀에서 확보한 표준주들은 기존에 보고된 original 표준주에 비해서 약간의 nucleotide 혹은 deduced amino acid에 변화가 발생하였지만, 이러한 것들은 각각 바이러스를 다른 실험실에 몇 년 혹은 몇 십년간 계대배양하면서 자연적으로 발생한 변이라고 추정됨.

Table 3. Comparison of meq gene nucleotide sequence homology with that of the other known Marek's disease viruses

| | Md5 MDV strain retained |
|-----------------|-------------------------|
| CVI988-1 | 95.7 |
| CVI988-2 | 97.3 |
| CVI988-3 | 93.1 |
| CVI988-4 | 97.9 |
| CVI988-5 | 95.2 |
| CVI988-6 | 95.9 |
| CVI988-7 | 95.9 |
| CVI988-8 | 96.2 |
| Md11 | 97.0 |
| MDCC-MSB1 | 81.8 |
| MDCC-MSB1-L-meq | 95.9 |
| MDCC-RP1 | 96.7 |
| mMDV-1-CU-2 | 95.9 |
| vMDV-1-567 | 97.0 |
| vMDV-1-571 | 96.4 |
| vMDV-1-573 | 96.4 |
| vMDV-1-617A | 97.0 |
| vMDV-1-637 | 97.0 |
| vMDV-1-BC-1 | 95.9 |
| vMDV-JM10 | 95.9 |
| vv+MDV-1-648A | 95.9 |
| vv+MDV-1-660-A | 95.9 |
| vv+MDV-1-686 | 95.9 |
| vv+MDV-1-N | 95.9 |
| vv+MDV-1-New | 96.2 |
| vvMDV-RB1B | 96.7 |
| vv+MDV-1-RL | 95.9 |
| vv+MDV-1-TK | 95.9 |
| vv+MDV-1-U | 95.9 |
| vv+MDV-1-W | 97.0 |
| vv+MDV-1-X | 95.9 |
| vvMDV-1-549 | 95.9 |
| vvMDV-1-595 | 95.9 |
| vvMDV-1-643P | 95.9 |
| vvMDV-Md5 | 97.0 |

Table 4. Comparison of deduced amino acid sequence homology of meq and polymerase genes with that of the other known Marek's disease viruses

(1) Comparison of meq gene of Md5 MDV strain retained

| | Md5 MDV strain retained |
|-----------------|-------------------------|
| CVI988-1 | 75.3 |
| CVI988-2 | 73.4 |
| CVI988-3 | 88.6 |
| CVI988-4 | 98.3 |
| CVI988-5 | 97.7 |
| CVI988-6 | 83.6 |
| CVI988-7 | 73.4 |
| CVI988-8 | 98.3 |
| Md11 | 99.4 |
| MDCC-MSB1 | 25.0 |
| MDCC-MSB1-L-meq | 73.4 |
| MDCC-RP1 | 73.1 |
| mMDV-1-CU-2 | 73.4 |
| vMDV-1-567 | 98.9 |
| vMDV-1-571 | 97.1 |
| vMDV-1-573 | 97.1 |
| vMDV-1-617A | 98.9 |
| vMDV-1-637 | 98.9 |
| vMDV-1-BC-1 | 73.4 |
| vMDV-JM10 | 73.4 |
| vv+MDV-1-648A | 96.6 |
| vv+MDV-1-660-A | 96.6 |
| vv+MDV-1-686 | 96.6 |
| vv+MDV-1-N | 96.6 |
| vv+MDV-1-New | 98.3 |
| vvMDV-RB1B | 98.3 |
| vv+MDV-1-RL | 97.1 |
| vv+MDV-1-TK | 97.1 |
| vv+MDV-1-U | 96.6 |
| vv+MDV-1-W | 99.4 |
| vv+MDV-1-X | 97.1 |
| vvMDV-1-549 | 97.1 |
| vvMDV-1-595 | 97.1 |
| vvMDV-1-643P | 96.6 |
| vvMDV-Md5 | 99.4 |

(2) Comparison of polymerase gene of Md5 MDV strain retained

| | Md5 retained | Md11 | GA | HPRS24 | Md5 |
|--------------|--------------|------|------|--------|------|
| Md5 retained | | 98.1 | 98.1 | 76.9 | 98.1 |
| Md11 | | | 100 | 77.6 | 100 |
| GA | | | | 77.6 | 100 |
| HPRS24 | | | | | 77.6 |
| Md5 | | | | | |

Table 5. Comparison of deduced amino acid sequence homology of UTR region and protease gene with that of the other known leukosis/sarcoma group viruses

(1) Comparison of UTR region of RAV1 retained

| | RAV1 | HPRS-103 | ADOL-7501 | ALV-RSA |
|----------|------|----------|-----------|---------|
| RAV1 | | 85.7 | 85.7 | 86.5 |
| HPRS-103 | | | 97.3 | 85.6 |
| DOL-7501 | | | | 85.0 |
| ALV-RSA | | | | |

(2) Comparison of protease gene of RAV1 retained

| | RAV-1 | HPRS-103 | DOL-7501 | ALV-RSA | ev-1 |
|-----------|-------|----------|----------|---------|------|
| RAV-1 | | 93.3 | 91.7 | 100 | 100 |
| HPRS-103 | | | 98.3 | 93.3 | 93.3 |
| ADOL-7501 | | | | 91.7 | 91.7 |
| ALV-RSA | | | | | 100 |
| ev-1 | | | | | |

Table 6. Oligonucleotide probes for the detection of MDV genes by DNA chip

| Gene | Product | Oligonucleotide probe |
|-----------------------------------|---|--------------------------------------|
| TR _L , IR _L | 132 bpr (<i>Bam</i> HI D & H fragments) | 5'-aactgcccttgctagggttcttcacacgag-3' |
| R-LORF2 | VIL-8 | 5'-cgctgttgacgtgataccaccgggtataca-3' |
| R-LORF7 | Meq | 5'-atcttcctgcattgtgtcctgttaccgag-3' |
| R-LORF14 | PP24 | 5'-acttgacgtagcacaaaaatattagtgtt-3' |
| UL1 | Glycoprotein L -forming a complex with UL22 gene product (glycoprotein H) | 5'-gaattcattctatggtatgaacaaaaagc-3' |
| UL9 | OBP | 5'-gtttagtgtacatcgctcaaataaatgttt-3' |
| UL13 | Protein kinase (UL) | 5'-gatgagggcagattatcttttagatatact-3' |
| UL19 | MCP | 5'-tgactgagactgtcctagaaaaatagatt-3' |
| UL22 | Glycoprotein H -forming a complex with UL1 gene product (glycoprotein L) | 5'-tacggttctcgcatggcgaataacgacct-3' |
| UL23 | TK | 5'-ccagtaatattaatcgttcgatgtaag-3' |
| UL27 | Major membrane protein glycoprotein B | 5'-tccatataaatttaaagtgacgctttatta-3' |
| UL30 | DNA polymerase | 5'-cagaatgtggcaagcgagtagctgtgcatg-3' |
| UL36 | Major tegument protein | 5'-tgatacatgggccacattgtacatgataa-3' |
| UL39 | Ribonucleotide reductase large subunit (RR1) | 5'-atttcaccctcttcagtaatatgttag-3' |
| UL40 | Ribonucleotide reductase small subunit (RR2) | 5'-gaatttgaatcagtgacgatcttagagac-3' |
| UL44 | Glycoprotein C | 5'-tagaggagctacgttggtttctacaataac-3' |
| UL48 | VP16 | 5'-ccaatagaagttttgtatgtcgtctacat-3' |
| UL53 | Glycoprotein K | 5'-taattctaccttgatatacagcactggg-3' |
| UL54 | ICP27 | 5'-atatacgggtaccattggaaaaatagag-3' |
| R-LORF14a | PP38 | 5'-ctgttctgcaaatcattattactaggat-3' |
| IRL | PP14 | 5'-ataagtctgtaagaatgtaatgcttcgtac-3' |
| IRs | ICP4 | 5'-accactcacctcaggccacggctgactac-3' |
| US1 | ICP22 | 5'-aatagagtcttattggaaacctttatgtc-3' |
| US3 | Protein kinase (US) | 5'-tacgatagaacggggttgcttgagcatt-3' |
| US6 | Glycoprotein D | 5'-gagcatgtgggagaccaattattacgtg-3' |
| US7 | Glycoprotein I | 5'-tataaggagtagcaaatcttgggctgtaa-3' |
| US8 | Glycoprotein E | 5'-tgcagaacaatcggtatgtcatttcgcatc-3' |

Table 7. Oligonucleotide probes for the detection of leukosis/sarcoma group virus genes by DNA chip

| Gene | Product | Oligonucleotide probe |
|---------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| myc | v-myc | 5'-tccccagcaagaactacgattacgactacg-3' |
| 5' -UTR | A part of UTR | 5'-aatagtggtcggccacagacggcgtggcga-3' |
| MA | 3' imperfect repeat; matrix protein | 5'-gtacttgggaaatcgggagagtaa-3' |
| p2-p10 | A part of gag gene | 5'-tcctccttatgtggggagtggtttgtatcc-3' |
| NC | Nucleocapsid protein | 5'-aaagtcaggaaacagccgtgagcgatgtca-3' |
| PR | Neutral protease large subunit | 5'-gacatcactattatttcagaggaggactg-3' |
| Pol | Reverse transcriptase alpha-subunit | 5'-tacaatatcttgggtacaagttaggcagta-3' |
| IN | Integrase | 5'-ctcttttgcaggcatttctgactggatac-3' |
| SU | Surface protein | 5'-aatattgctcagatttccggtataaccggg-3' |
| TM | Transmembrane protein | 5'-atctgagtgatcacagtgagtctatacaga-3' |

- ▶ PCR로 증폭된 각각의 증폭산물을 QIAEX II kit로 특이증폭산물만 정제하여, 이를 boiling water에서 10분간 변성시킨 후, 급속 냉각시켰음.
- ▶ 여기에 DIG-labelled probe 혼합액을 넣고, 37 °C에서 3시간 작용시킨 후, EDTA를 첨가하여 반응을 정지시키고 100% 에탄올을 넣어 DNA를 결합시킨 후, 초고속원심 하여 침전물을 nucleic acid membrane에 50 μ l 씩 점적한 후 상온에서 건조하였음.
- ▶ Membrane을 120°C에서 baking, UV crosslink하였고, 발색액을 첨가하여 그 결합반응을 살펴보았음.
- ▶ 그 결과, Fig. 8에서 보이는 바와 같이 특이 결합반응을 확인할 수 있었음.
- ▶ 따라서 각각의 바이러스들의 유전자들에 대해 개발된 각각의 probe sequences들은 아주 특이적이어서, DNA chip에 바로 응용할 수 있음을 확인할 수 있었음.

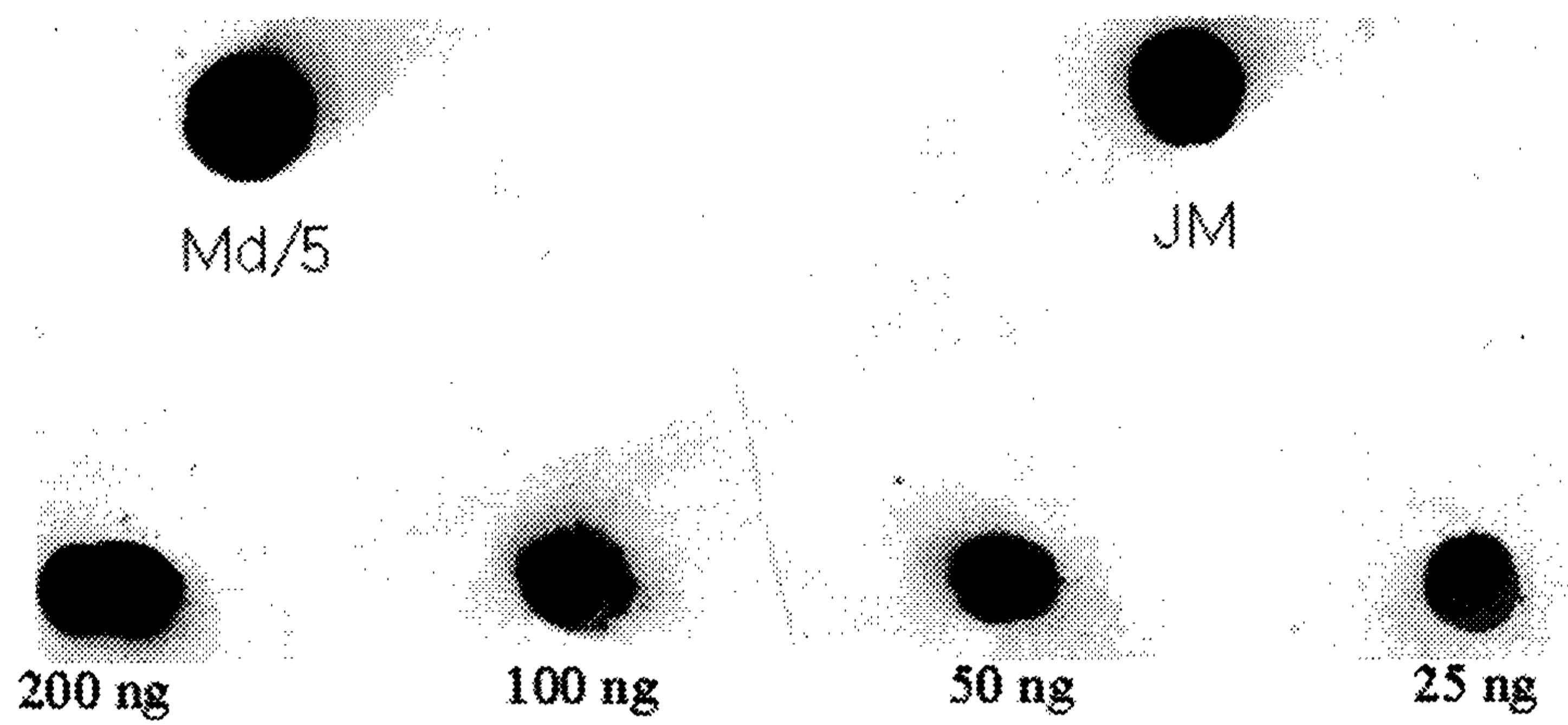


Fig. 8. Dot blot hybridization of cell culture propagated Marek's disease virus using DIG-labelled probe prepared from the pp38 gene probe.

나. 제1협동과제: 국내에서 발생하고 있는 닭의 바이러스성 종양성 질병의 발
병조사와 시료채취

1) 국내 닭 백혈병/육종 그룹 종양과 마렉병의 발병실태조사

- ▶ 국내 닭 백혈병/육종 그룹 종양과 마렉병의 발병실태조사를 실시한 결과, 2003년도에는 닭 백혈병/육종 그룹 종양은 1건, 마렉병은 37건, 골수 세포종은 2건 등 총 40건이 발생하여 2003년도 바이러스성 질환 중 상위 2위에 속하였음(Table 8).
- ▶ 2004년도 5월까지 집계된 닭 백혈병/육종 그룹 종양은 아직까지 없었으며, 마렉병의 경우에는 토종닭 1건, 육용종계에서 1건, 산란계에서 2건, 총 4건이 확인되었음.
- ▶ 2003년도 본 연구팀에 의한 자체조사결과, 기타 질병으로 의심되어 진단된 증례들을 조사한 결과 토종닭 1건, 산란계 2건에서 마렉병의 발생을 확인할 수 있었음.
- ▶ 2003년까지 최근 7년까지의 국내 양계질병 발생 실태를 조사한 결과, 국내에서의 양계질병 중에서 마렉병을 포함한 바이러스성 종양성 질병은 최근까지 질병발생 순위 5위내에 항상 들어있는 무서운 질병으로서 국내에서 막대한 경제적 피해를 유발하고 있는 것을 알 수 있었음(Table 8).
- ▶ 또한 축산 선진국인 미국에서도 바이러스성 종양성 질병은 국내와 유사하게 육계와 산란계 모두에서 상위 3위내에 들어있는 질병으로 파악되었음(Table 9).

Table 8. Incidence of highly prevalence viral poultry diseases in Korea

| 년도 순위 | 97년 | 98년 | 99년 | 00년 | 01년 | 02년 | 03년 |
|----------|---------------|---------------|---------------|------------|---------------|---------------|---------------|
| | 1 | VT (12.3%) | VT (10.2%) | IB (7.8%) | AI (7.6%) | IB (6.0%) | IB (5.2%) |
| 2 | ND (8.2%) | ND (4.3%) | VT (5.6%) | ND (7.0%) | VT (5.5%) | IBD (3.6%) | VT (19.1%) |
| 3 | IB (6.4%) | IB (4.3%) | IBD (4.0%) | IB (4.6%) | IBD (3.9%) | VT (3.5%) | API (9%) |
| 4 | IBD (5.7%) | IBD (3.1%) | ND (3.0%) | IBD (3.8%) | AI (2.6%) | ND (3.5%) | IB (8.6%) |
| 5 | FP (2.1%) | AE (0.9%) | FP (2.1%) | VT (3.6%) | ND (1.9%) | AI (1.2%) | IBD (8.1%) |

VT: Chicken viral tumors including MD, LL, myelocytoma. ND: Newcastle disease. IB: Infectious bronchitis. IBD: Infectious bursal disease. FP: Fowl pox. AE: Avian encephalitis. API: Avian pneumovirus infection. 괄호 내 수치(%)는 전체 닭 질병 발생보고 건에 대한 비율임(국립수의과학검역원 자료).

Table 9. Incidence of highly prevalence poultry diseases in USA

| 종 류 | 년도 순위 | 92년 | 93년 | 94년 | 95년 | 96년 |
|-----|----------|-------|-------|---------|-----|-----|
| | | 산란계 | 1 | SE | SE | SE |
| 2 | MD | | AI | MD | MD | MD |
| 3 | IB | | MG/MS | E. coli | SE | FP |
| 육 계 | 1 | IB | MG/MS | IB | MD | IB |
| | 2 | MD | MD | MD | AI | MD |
| | 3 | MG/MS | IB | MG/MS | IB | 기타 |

SE: *Salmonella enteritidis*. MD: Marek's disease. IB: Infectious bronchitis. MG/MS: *Mycoplasma gallisepticum*/*Mycoplasma meleagridis*. E. coli: *Escherichia coli*. AI: Avian influenza. FP: Fowl pox(97년 미국가금질병심포지움. RL Witter 발표참고).

2) 국내 닭 백혈병/육종 그룹과 마렉병의 종양조직 채취

- ▶ 상술한 바와 같이 2003년도에는 닭 백혈병/육종 그룹 종양은 1건, 마렉병은 37건, 골수세포종은 2건이 발생한 것으로 확인되었음.
- ▶ 2004년도 5월까지 집계된 닭 백혈병/육종 그룹 종양은 아직까지 없었으며, 마렉병의 경우에는 토종닭 1건, 육용종계에서 1건, 산란계에서 2건, 총 4건이 확인되었음.
- ▶ 2003년도 본 연구팀에 의한 자체조사결과, 기타 질병으로 의심되어 진단된 증례들을 조사한 결과 토종닭 1건, 산란계 2건에서 마렉병의 발생을 확인할 수 있었음.
- ▶ 따라서 광주·전남지방에서 발생한 농장을 방문하여, 질병으로 이환된 것으로 의심되는 증례들을 선별하여, 림프구의 채취를 혈액, 비장에서 시도하여, 일부분은 액체질소에 보관하고 일부분은 PCR과 바이러스 배양을 위해서 사용하였음.
- ▶ 또한 그동안 마렉병으로 진단된 증례들의 파라핀 블록을 광주·전남 수의기관에서 분양받아 PCR 및 종양병변의 분류에 사용하였음.
- ▶ 닭 백혈병/육종 그룹의 종양은 2004년도에는 발생보고가 없었음.
- ▶ 따라서 종양의 분류 및 상술한 PCR용 primer pair의 특이성을 확인하기 위해서, 수의과학검역원에서 기존에 발생한 J 바이러스에 의한 닭 골수세포종 파라핀 블록을 분양받아서 종양병변의 분류 및 PCR의 응용에 사용하였음.
- ▶ 또한 닭 림프구성 백혈병도 2004년도에는 국내 발생이 보고되지 않아서 제1세부과제 책임자인 조경오 교수가 일본 홋카이도 대학에서 분양받아가져온 것 파라핀 블록을 이용하여 종양병변의 분류 및 상술한 PCR용 primer pair의 특이성을 확인하기 위해서 사용하였음.

3) 채취한 각각의 증례에서 종양병변의 분류

가) 병리조직학적 방법에 의한 분류

- ▶ 본 연구팀에 의뢰된 가검물들은 쇠약, 의기소침과 이 중에서는 특징적인 임상소견인 말초신경 증상을 보이는 가검물도 관찰되었음(Fig. 9).
- ▶ 또한 종양성 결절들이 간을 비롯하여, 비장, 폐, 피부 등에서 관찰되었음

(Fig. 10).

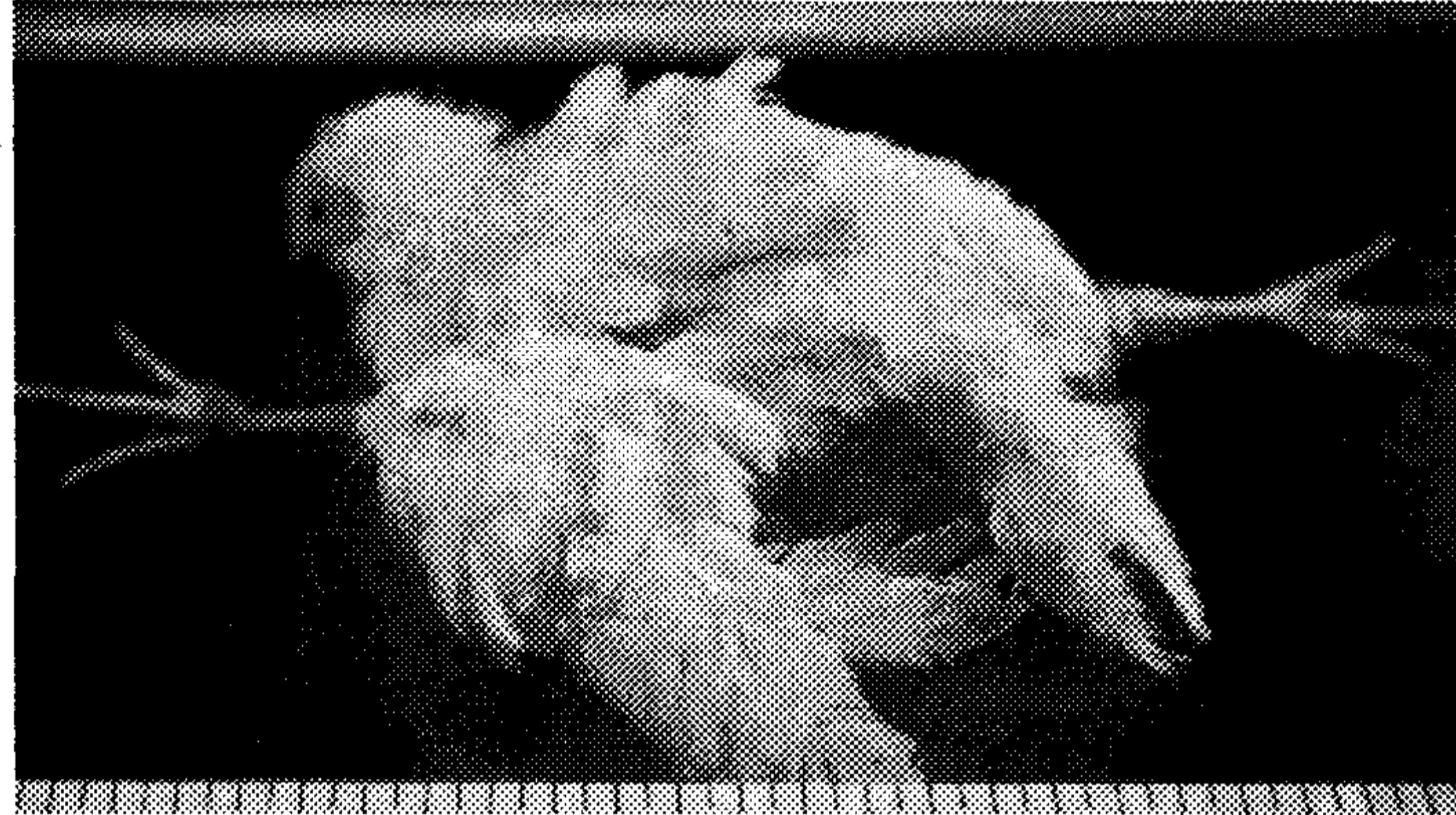


Fig. 9. Characterized leg and wing paralysis due to MDV infection in a chicken



Fig. 10. Marek's disease tumor lesions. Note multiple white nodular masses in the liver (left). Spleen shows multiple white tumor cell infiltration (right).

- ▶ 이렇게 의뢰된 가검물들을 부검하여 고정, 파라핀 봉입, 절편 제작, 염색 과정을 거쳐 광학현미경으로 관찰한 결과, 다양한 양상의 마렉병 병변들이 관찰되었음.
- ▶ 어떠한 증례의 예에서는 침윤한 종양세포들이 주로 소형의 림프구로 구성된 것부터, 소형과 대형의 림프구들로 이루어진 것, 주로 대형의 림프

구들로 형성된 것까지 다양하였음(Fig. 11).

- ▶ 특히 후자인 대형의 림프구들로 구성된 종양 병변은 림프구성 백혈병과 매우 흡사하여 광학현미경적으로 구별이 매우 어려웠음.

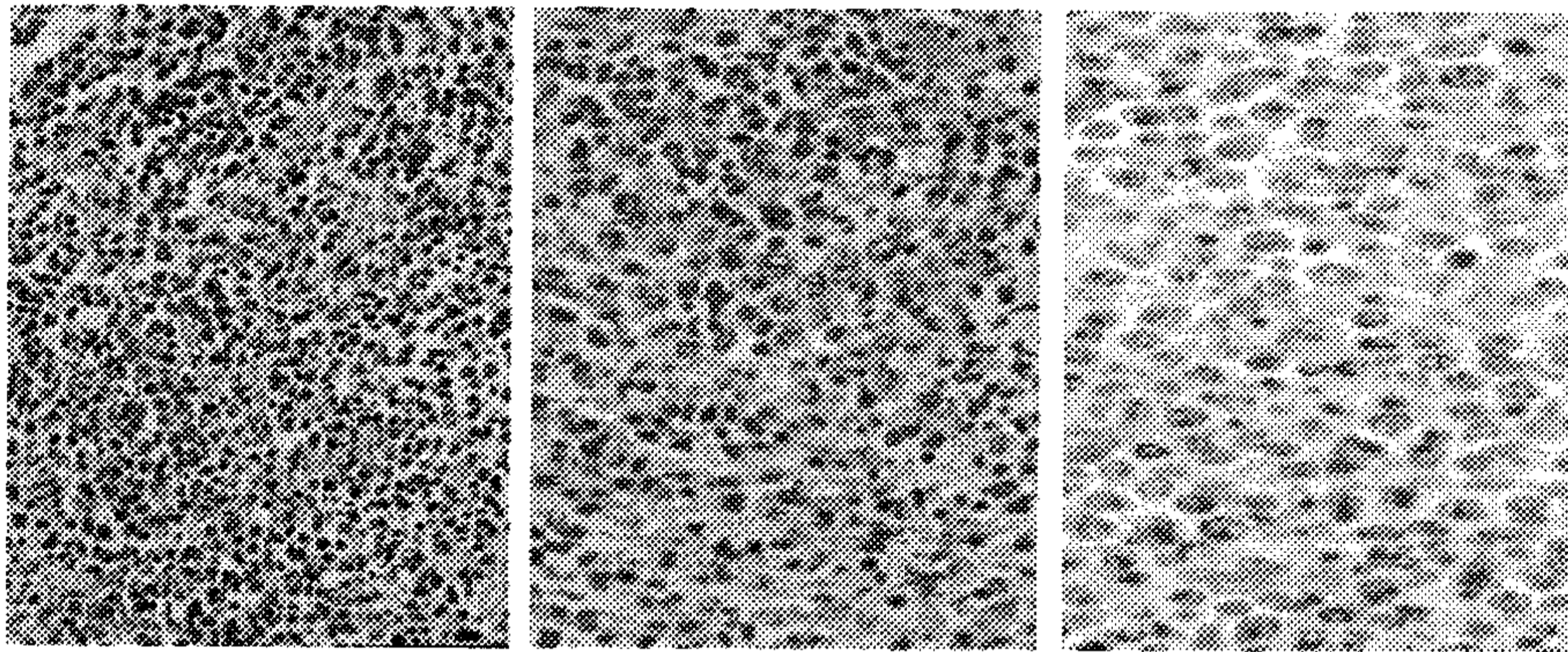


Fig. 11. Marek's disease tumor lesions reveal various compositions of tumor cells including mainly small lymphocytes (left), mixture of small and large lymphocytes (middle), and mainly large lymphoblastic cells (right). Lesions consisting mainly of large lymphoblasts (right) are very similar to those of lymphoid leukemia.

- ▶ J 바이러스에 의해서 유발된 골수세포종을 수의과학검역원 조류질병과에서 파라핀 블록 형태로 분양받았음.
- ▶ 이러한 골수세포종 조직을 광학현미경으로 관찰한 결과, 골수세포종의 특징적인 소견인 종양세포내의 구형의 호산성 과립을 다수 관찰할 수 있었음(Fig. 12 left).
- ▶ 특이한 것은 이러한 골수세포종이 발생한 증례를 조직학적으로 자세히 관찰한 결과 어떤 증례에서는 골수세포종과 함께 골수아구종도 병발되어 있음을 알 수 있었음(Fig. 12 middle & right).

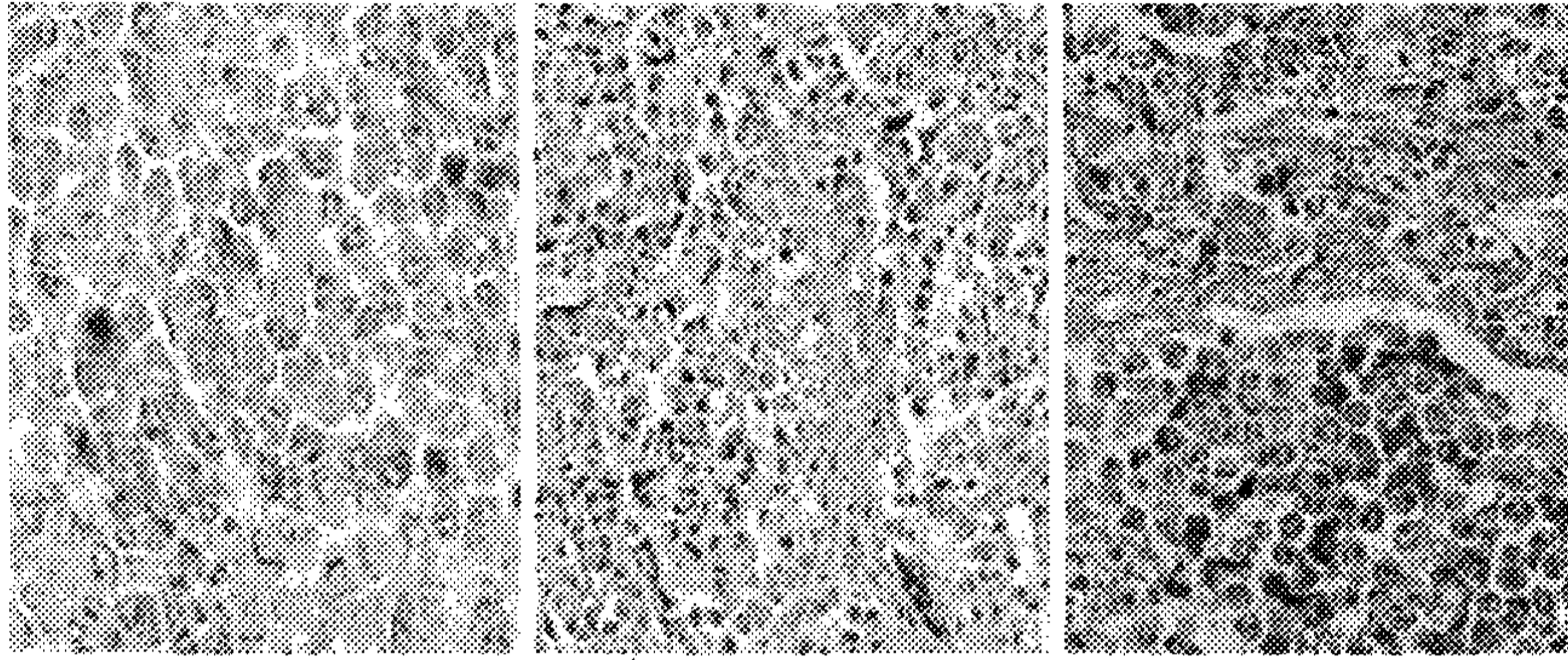


Fig. 12. Left. Myelocytoma lesion consists of round to polyhedral tumor cells, containing characteristic eosinophilic granules in the cytoplasm. Middle. Note Large round to polyhedral myeloblastoma tumor cells which are separated by fibrovascular connective tissue. Right. The tumor lesions consist of myelocytoma (down) and myeloblastoma (upper).

- ▶ 2004년에 국내 림프구성 백혈병이 발생하지 않아, 일본 홋카이도대학에서 분양받은 파라핀 블록을 이용한 조직검사에서, 림프구성 백혈병의 특징적인 소견을 관찰할 수 있었음.
- ▶ 즉 종양병변은 대형의 림프구아구로 구성되어 있었으며, 종양병변은 주위조직으로 팽창하는 양상을 보였음(Fig. 13).

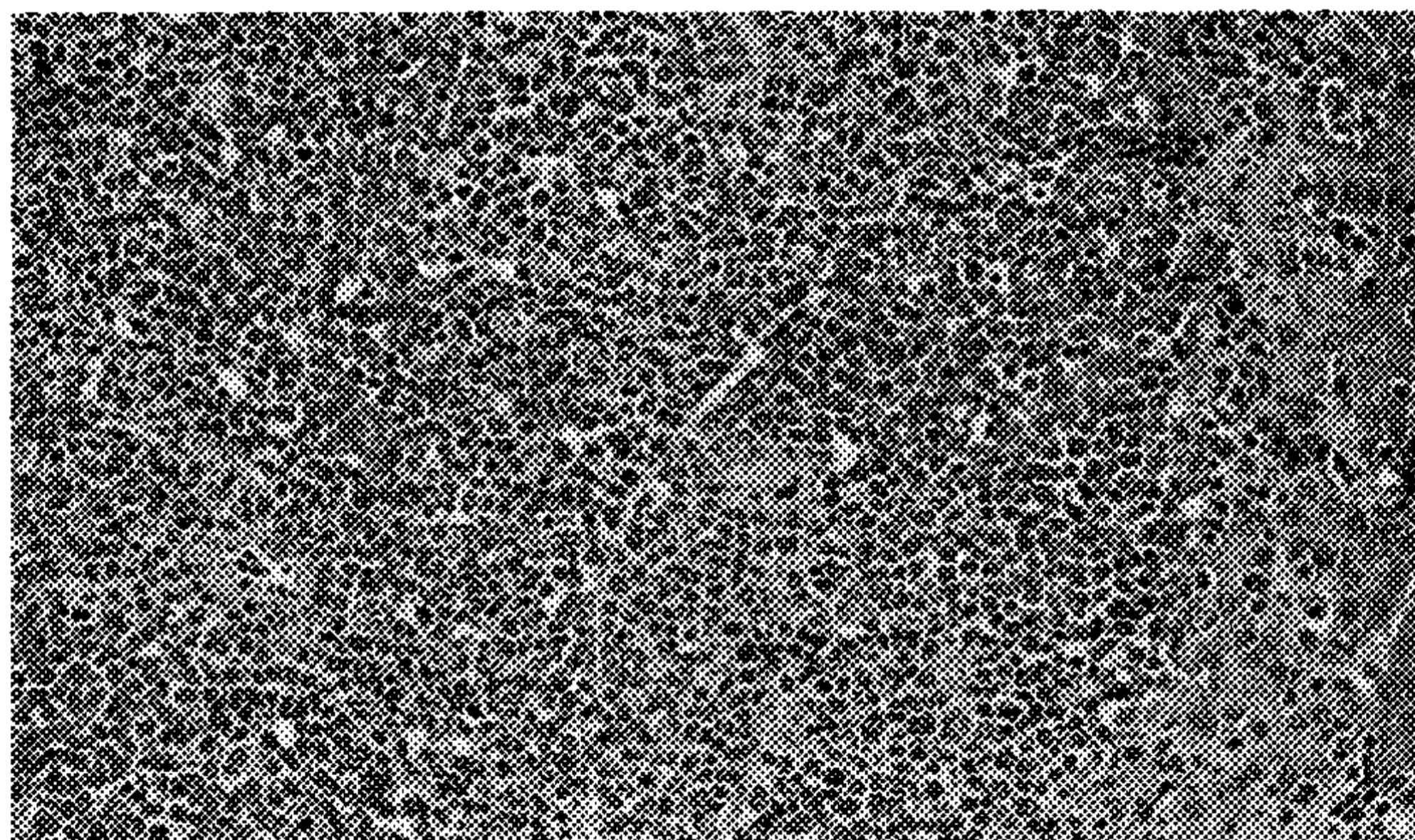


Fig. 13. Lymphoid leukemia tumor lesion consisting of large lymphoblastoid cells expand into the adjacent hepatic tissue.

나) 면역조직화학적 방법에 의한 분류

- ▶ 마렉병 종양세포는 주로 CD3+CD4+CD8-의 T lymphocyte로 구성되어 있음.
- ▶ 이러한 T lymphocyte를 검출하기 위해서는 조직을 냉동절편하여서 제작하여야 함.
- ▶ 반면에 lymphoid leukosis 종양병변은 IgM+IgG- B lymphocyte로 구성되어 있음.
- ▶ 따라서 종양세포인 B lymphocyte를 확인하기 위해서는 냉동절편이나 포르말린 고정 조직 모두 사용할 수 있음.
- ▶ 마렉병 종양병변의 종양세포를 검출하기 위해서 종양병변의 냉동절편을 제작하여 CD3, CD4, CD8, IgG 등의 림프구 표면항원에 대한 항체로 면역염색을 하였음.
- ▶ 그 결과 마렉병 종양병변은 CD3+CD4+CD8-였으며, IgG나 IgM은 negative였음(Fig. 14).
- ▶ 또한 lymphoid leukosis 종양병변을 항 IgM과 IgG 항체로 염색한 결과 IgM에서만 종양세포막에서 양성 반응을 확인할 수 있었음(Fig. 14).

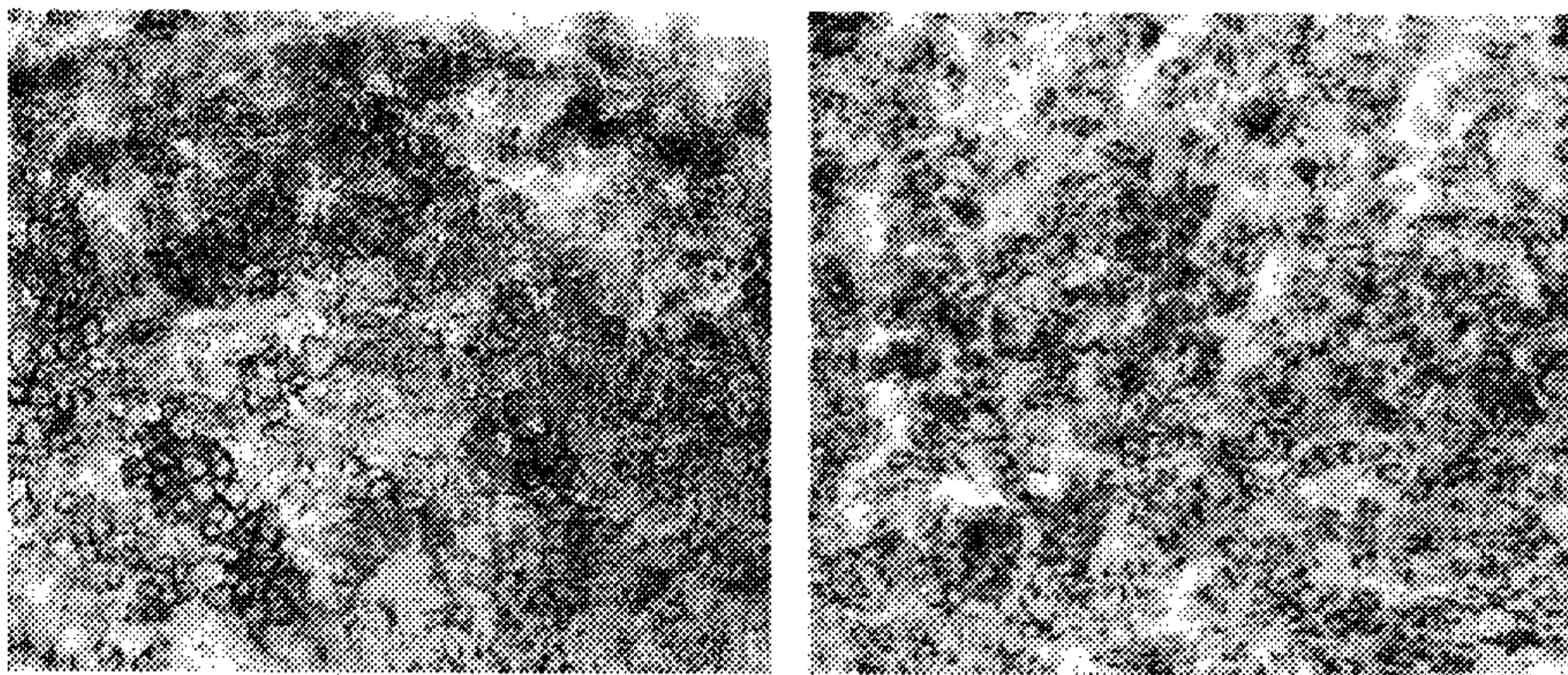


Fig. 14. Left. Marek's disease (MD) tumor cells are positive for CD4. Note strong positive reaction is observed in the cell membrane. Right. Lymphoid leukosis tumor cells are positive for IgM. Positive reaction confines in the cell membrane.

다) PCR이나 RT-PCR 기법 등을 이용한 분류

- ▶ 야외 양계농장에서 발생한 마렉병 종양 조직에 대해 본 연구팀에 의해서 제작된 여러 가지 primer pairs를 이용하여 PCR을 수행하였음.
- ▶ 그 결과, 야외 마렉병 종양 조직에서도 각각의 마렉병 바이러스 유전자에 특이적인 증폭산물을 확인할 수 있었음(Fig. 15).
- ▶ 또한 림프구성 백혈병과 J 바이러스에 의해 유발된 골수세포종 파라핀 블록에서 DNA를 추출하여 PCR을 수행한 결과 각각의 유전자에 특이적인 증폭산물을 확인할 수 있었음(Fig. 16).
- ▶ 따라서 제1세부과제 팀이 개발한 마렉병 바이러스 및 백혈병/육종 그룹의 바이러스 검출용 primer pairs들은 아주 특이적인 것이어서, DNA chip 개발에 아주 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각되었음.
- ▶ 야외 마렉병 발생 증례를 이용한 PCR 수행 결과 아주 흥미로운 것은, 야외 마렉병 종양 증례에서 백혈병/육종 그룹 레트로바이러스 유전자인 UTR 부분이 PCR에 의해서 검출되었다는 점(Fig. 15).
- ▶ 현재 국내외적으로 백혈병/육종 그룹의 종양을 진단하기 위해서 UTR 부분을 타겟으로 하는 PCR이 자주 사용되고 있는데, 따라서 닭 백혈병/육종 그룹의 종양성 질병을 진단하는데 있어서 UTR 부분을 타겟으로 하는데 신중을 기해야 할 것임.
- ▶ 또한 야외 마렉병 발생증례에서 DNA를 추출하여 마렉병 바이러스 종양 유전자인 meq 유전자를 타겟으로 PCR을 수행한 결과, 그 증폭산물의 크기가 다양하였음.
- ▶ 이러한 증폭산물을 QIEX II kit를 이용하여 정제하여 sequence를 수행한 결과, 기존의 sequences와 비교하여, deletion, insertion이 여러 곳에서 발생하였음.
- ▶ 이러한 결과에 대해서는 차년도 결과란에서 자세히 기술하였음.

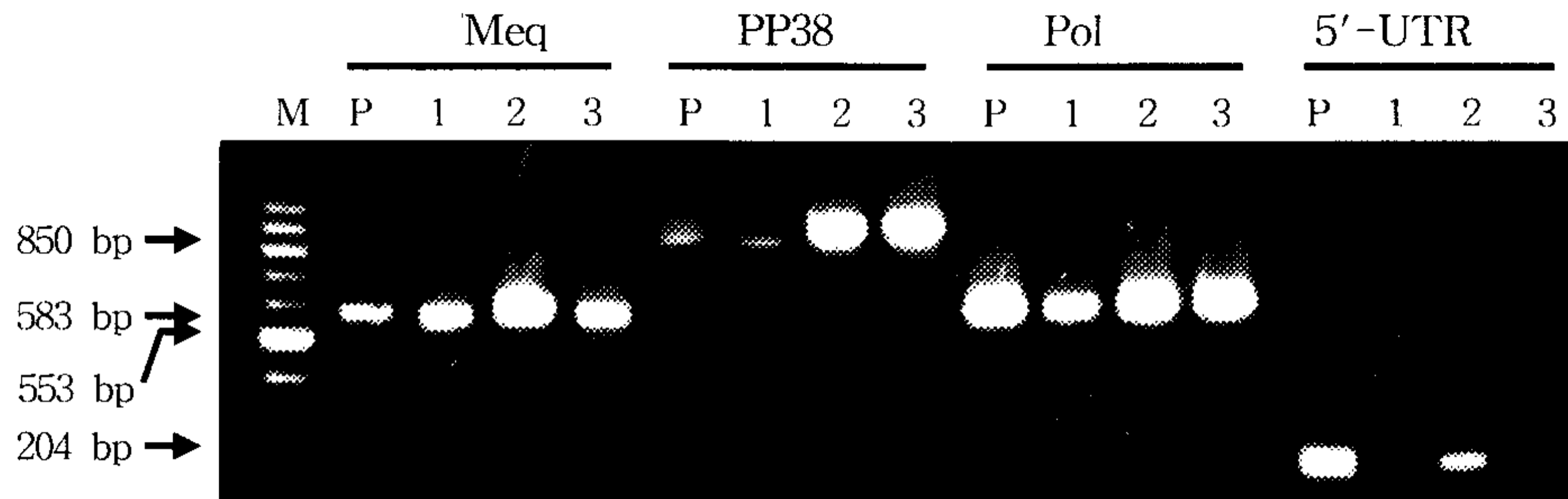


Fig. 15. Detection of MDV genes and 5'-UTR gene of leukosis/sarcoma group virus from MDV-infected chickens. Note 5'-UTR gene of leukosis/sarcoma group virus is amplified in the MD tumor lesions. M; 100 bp marker. Meq; Marek's EcoQ. PP38; 38-kD phosphoprotein. Pol; DNA polymerase. 5'-UTR; untranslated region.

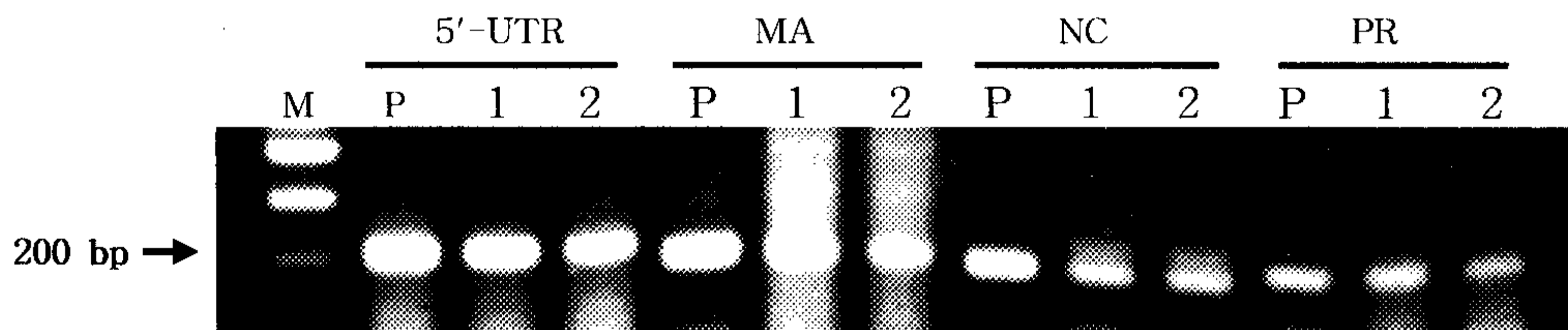


Fig. 16. Detection of leukosis/sarcoma group virus genes from tumor cell line and leukosis/sarcoma group virus-infected chickens. M; 100 bp marker. 5'-UTR; untranslated region. MA; matrix protein. NC; nucleocapsid protein. PR; protease.

2. 2차년도(2004년도)

가. 제1세부과제: DNA chip의 개발과 국내에서 분리한 바이러스 분리주에 응용

1) 각 바이러스에 대한 oligonucleotide chip 검증

가) 1차년도에 개발한 oligonucleotide chip을 각각의 표준주를 대상으로 검증

- ▶ 1차년도에 개발한 oligonucleotide chip의 응용성을 검사하기 위해서 우선 검출하려고 하는 각각의 바이러스의 유전자들을 어떠한 방법으로 증폭할 것인지가 관건임.
- ▶ 일반적으로 증폭에 사용되는 방법은 specific primer pairs를 이용하는 방법과 random hexamer를 이용하는 방법이 있으나, 현재 전 세계적으로 specific primer pairs를 사용하는 것이 더욱 간단하고 특이적이며 증폭 효율이 좋기 때문에, specific primer pairs를 사용하였음(Table 1).
- ▶ 그 결과, specific primer pairs를 이용하여 마렉병 바이러스 혈청형 1, 2, 3과 백혈병/육종 그룹 종양 바이러스인 A, B, C, D, E, J 바이러스에 대하여 표준주를 사용하여 PCR을 수행한 결과 전부 특이적인 양성의 band를 확인할 수 있었음(Fig. 1).

Table 1. Primer pairs used for PCR amplification of serotypes 1, 2 and 3 Marek's disease virus and subgroups A, B, C, D, E, and J of avian leukosis/sarcoma group viruses

| Primers ¹ | Oligonucleotide sequence (5'-3') | Gene name | Product size | Amplification targets |
|----------------------|-------------------------------------|--------------|-----------------|-----------------------------|
| H5-F | ggatgaggtgactaagaaag | env | 1.1 kbp | subgroups A, B, C, D and ev |
| ALV-R | ggtttg(a)gtgaaactaccttg | | | |
| J-F | gaacgcgatgtgacggg | LTR | 734 bp | subgroup J |
| J-R | cataccatgatcatacca | | | |
| cPol-F | aca(t)ttttcaat(c)ccg(c)tac | Pol | 약 1.5 kbp | serotypes 1, 2 and 3 |
| cPol-R | tct(c)aacttgtaactttgca | | | |

¹F: Forward primer. R: Reverse primer.

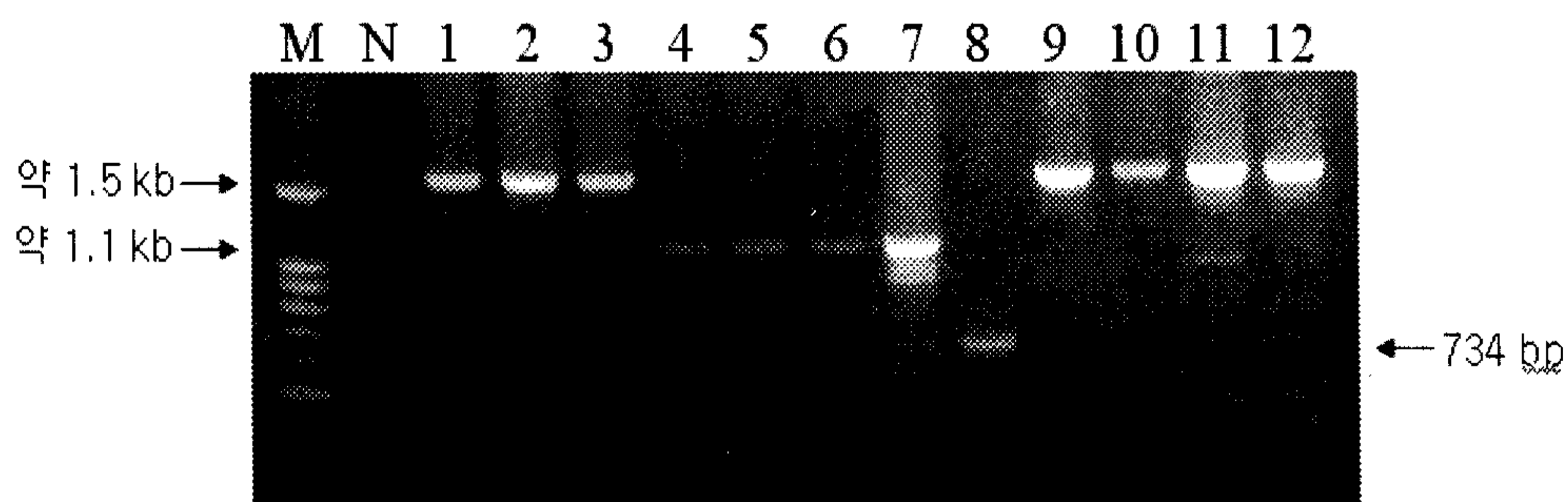


Fig. 1. PCR amplification of serotypes 1, 2 and 3 of Marek's disease viruses (MDV) and subgroups A, C, D, E and J of avian leukosis/sarcoma group viruses (ALSV) with primer pairs specific for each virus. M: 100 bp marker, N: negative control, lane 1: serotype 1 MDV (Md5 strain), lane 2: serotype 2 MDV (SB1), lane 3: serotype 3 MDV (HVT), lane 4: subgroup A ALSV, lane 5: subgroup C ALSV, lane 6: subgroup D ALSV, lane 7: subgroup E ALSV, lane 8: subgroup J ALSV, lanes 9-12: field MDV isolates.

나) DNA chip slide의 제작

- ▶ DNA chip slide에는 amino-silan을 coating하여 제작하였음.
- ▶ 제작된 slide size는 wide가 25±0.5 mm, length가 75±0.5 mm, height가 1±0.1 mm이었음.
- ▶ Spot은 morphology가 circle 형태이었으며, wide space가 0.30 mm, length space가 0.3 mm, diameter이 0.16±0.05 mm 이었음.
- ▶ 이러한 spot은 columns가 6개 이었고, rows가 6개 이었다.
- ▶ 이러한 배열은 진단의 확실성을 높이기 위해서 한 slide 당 한 쌍을 spotting 하였음.

Table 2. Properties of DNA chip slide

| Coating | Amino-silanized | |
|-----------------------|-----------------|--------------|
| Slide size | Wide | 25±0.5 mm |
| | Length | 75±0.5 mm |
| | Height | 1±0.1 mm |
| Spot | Morphology | Circle |
| | Wide space | 0.30 mm |
| | Length space | 0.30 mm |
| | Diameter | 0.16±0.05 mm |
| Spot # in subarray | Columns | 6 |
| | Rows | 6 |

다) Multiplex PCR 기법에 의한 cDNA 합성의 유효성 검사(cDNA의 합성에 최적
으로 예상됨)

- ▶ Multiplex PCR과 DNA chip의 combination이 다수 원인체를 동시에 검출할 수 있기 때문에 각각의 primer pair를 섞은 후, 각각의 바이러스에 대하여 PCR을 수행한 결과 특이적인 양성의 반응이 관찰되었음.
- ▶ 따라서 향후 DNA chip을 사용함에 있어서 multiplex PCR 방법이 마렉병 바이러스 혈청형 1, 2, 3과 백혈병/육종 그룹 subgroup A, B, C, D, E, J를 검출하는데 있어서 최적의 방법으로 판단되었음.

라) DNA chip에 실제 사용할 cDNA의 multiplex PCR 기법에 의한 제작

- ▶ 나)번 항에서 기술한 바와 같이 유사하나, cDNA의 제작은 PCR 반응물에 Cy5-dUTP를 넣어 표지 하게 하는 것이 다름.
- ▶ 이상의 방법을 사용하여 PCR을 수행한 결과 양성의 산물이 전기영동상에서 관찰되었음.

2) Oligonucleotide chip의 표준주 및 야외 분리주에서 응용

가) 각각의 방법에 의해서 제작한 표준주 및 야외 분리주의 cDNA를 oligonucleotide probe에 hybridization 유무 및 효율성을 검사하기 위하여, 상술한 각각의 primer pairs를 이용한 PCR 증폭산물 내에서 혈청형 1, 2, 3 마렉병 바이러스와 백혈병/육종 그룹 종양 바이러스 subgroups A, B, C, D, E, J에 특이적인 probe를 제작하여야 하였음(Table 2).

나) cDNA 제작 방법 선정 및 oligonucleotide chip의 개발: 상술한 바와 같이 cDNA의 제작은 specific primer를 이용한 multiplex PCR 기법을 선정하였음. 또한 oligonucleotide chip의 개발에 있어서 중요한 probe의 제작은 상술한 Table 2에 기술한 것을 선정하였음.

다) Oligonucleotide chip의 probe 위치 및 제작: Oligonucleotide probe의 spotting은 지금까지 4가지 방법이 알려져 있음. 이번 oligonucleotide chip은 specific한 sequence를 선별하여 oligonucleotide probes를 합성하여, 합성한

probe를 pin을 이용하여 슬라이드 위에 spotting하였음. 본 DNA chip에 사용된 probe의 제작과 spotting은 모두 (주) 마크로젠에서 수행하였음.

Table 3. Oligonucleotide probes used for the differential diagnosis of each serotype of Marek's disease virus and avian leukosis/sarcoma group virus, respectively

| Probes | Oligonucleotide sequence (5'-3') | Position & gene name | Accession numbers |
|------------|--|----------------------|-------------------|
| ALV-A | atgcgtaggcttcagg(a)ccaa(c)aaggggttcttggtatctg(a)ggttggtcta | 5890-5919 (env gene) | M37980 |
| ALV-B | acacatccttc(t)tgaccgaccagggaacaatcctttcttgataaggcct | 5714-5743 (env gene) | AF052428 |
| ALV-C | tttttaggttggtctaacaaggctctcgcggttctctccgtcacccttt | 5902-5955 (env gene) | J02342 |
| ALV-D | gacacacatccttaaccaacccccctgataatcctttcttaaccgtgctt | 5681-5733 (env gene) | D10652 |
| ALV-E | cagatttgataatgataatttacacctgtggagatgtgcagacagtca | 6038-6087 (env gene) | Z46390 |
| ALV-J | cggatggtctgatggccaaatagagcaagctagatag(a)gtaactgcgaaat | 7444-7493 (LTR) | AY013303 |
| Serotype 1 | tggtgaagaatatgtctttctaaactttgaggattgtgaggatgtgtggccg | 264-315 (pol gene) | AF147806 |
| Serotype 2 | atagtaccataaccgccgctaagtagaccgcccgggacggggagagatacctt | 71-120 (pol gene) | AB049735 |
| Serotype 3 | acgaacaaaacgctttgcggtacagaattggccagggcagaggtgcgaag | 62-111 (pol gene) | AF282130 |

Table 4. Spotting methods for making DNA chip

| DNAchip 제작 기술 | 특징 | chip 종류 |
|------------------|---|------------------------|
| Pin microarray | Pin을 이용한 micro dotting (surface contact) | cDNA & oligonucleotide |
| Inkjet | Inkjet 원리를 이용한 micro dropping | cDNA & oligonucleotide |
| Photolithography | Photolithography를 이용한 oligonucleotide 직접 합성 | oligonucleotide |
| Electronic array | 전기를 이용한 oligonucleotide addressing | oligonucleotide |

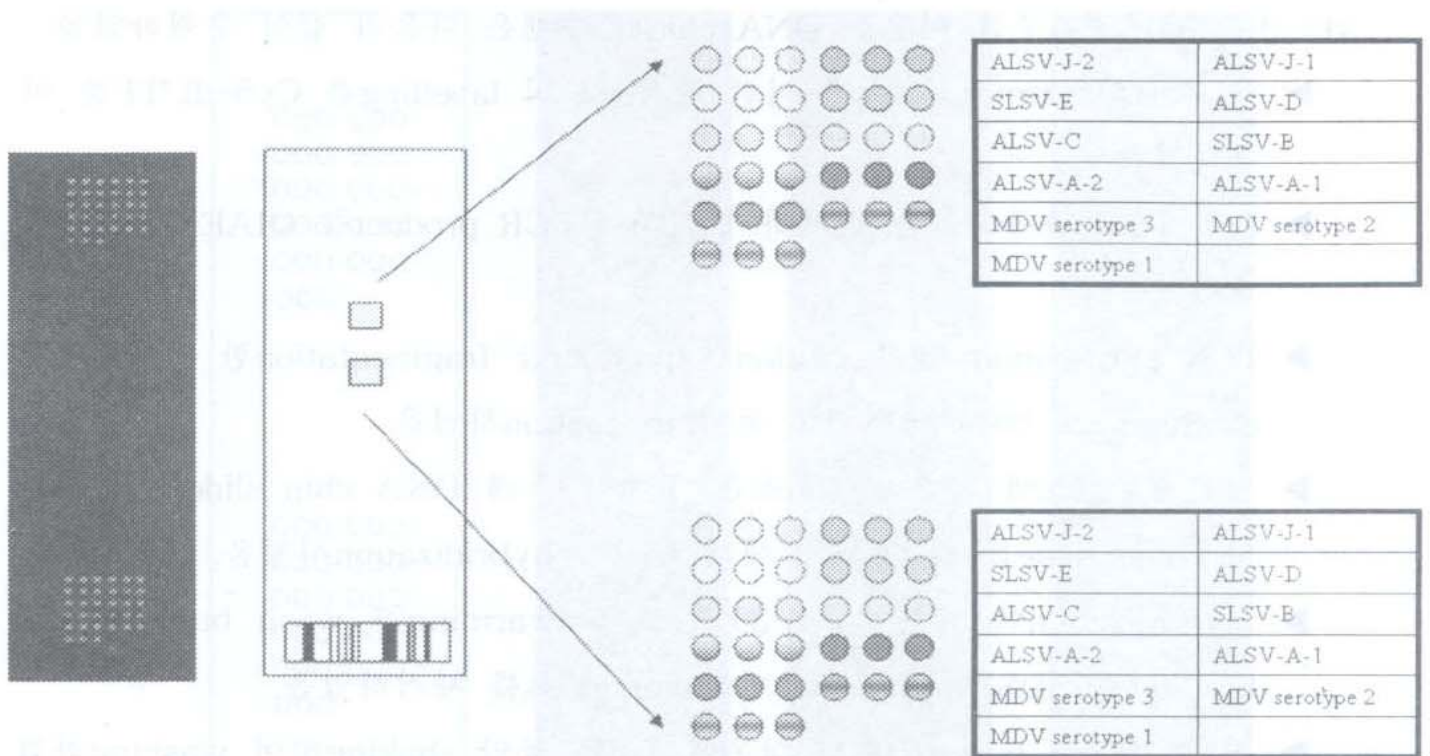


Fig. 2. DNA chip for the differentiation of serotypes 1, 2 and 3 of Marek's disease viruses (MDV), and subgroups A, B, C, D, E, J of avian leukosis/sarcoma group viruses (ALSV). (Left panel) Arrangement of probes specific for each serotype of MDV and subgroup of ALSV. 1: subgroup J-2 of ALSV. 2: subgroup J-1 of ALSV. 3: subgroup E of ALSV. 4: subgroup D of ALSV. 5: subgroup C of ALSV. 6: subgroup B of ALSV. 7: subgroup A-2 of ALSV. 8: subgroup A-1 of ALSV. 9: serotype 3 of MDV. 10: serotype 2 MDV. 11: serotype 1 MDV. To increase the specificity, three spots for each virus are made. (Right panel) To confirm the exact spotting of each probe, slide is stained with topro stain.

- 라) 표준주와 분리주를 이용한 DNA chip의 수행은 다음과 같이 수행하였음.
- ▶ 즉 각각의 primer pairs에 의한 증폭산물의 labelling은 Cy5-dUTP를 이용하였음.
 - ▶ 또한 PCR 증폭산물을 정제하기 위하여 PCR product를 QIAEX kit를 이용하였음.
 - ▶ PCR purification kit로 elution한 product를 fragmentation한 후에, PCR machine으로 98 °C에서 3분 동안 incubation하였음.
 - ▶ 다음으로 Ice에 넣은 후 30초간 정치한 후에 DNA chip slide에 분주하고 cover slide를 덮고 45 °C에서 15시간 hybridization시켰음.
 - ▶ Hybridization이 끝난 다음 30 °C로 prewarming한 wash buffer I (2× SSC/0.1% SDS)로 조심스럽게 cover glass를 제거하였음.
 - ▶ 이 후 Wash buffer I 으로 실온에서 5분 동안 shaking하여 washing하였고, Wash buffer II (1× SSC)로 실온에서 5분 동안 shaking하여 washing하였음.
 - ▶ 마지막으로 Wash buffer III (0.5× SSC)로 실온에서 5분 동안 shaking하여 washing한 후에, 1500 rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 chip을 말리고, DNA chip scanner로 관찰하였음.
 - ▶ 표준주인 혈청형 1, 2, 3 마렉병 바이러스인 Md5 strain, HPRS24 strain, HVT strain를 CEF 세포에서 증식하여 이들 바이러스들에 특이적인 primer pair를 이용하여 single PCR을 수행하였음.
 - ▶ PCR 증폭산물을 상술한 방법에 의하여 DNA chip에 응용한 결과, 각각의 바이러스에 특이적인 양성의 반응을 확인할 수 있었음(Fig. 3).
 - ▶ 백혈병/육종 그룹 바이러스 subgroup A, B, C, D, E, J 바이러스를 CEF에서 배양하여, 이들 바이러스들에 특이적인 primer pairs를 이용하여 single PCR을 수행한 후, PCR 증폭산물을 상술한 방법에 의하여 DNA chip에 응용한 결과, 각각의 바이러스에 특이적인 양성의 반응을 확인할 수 있었음(Fig. 4).

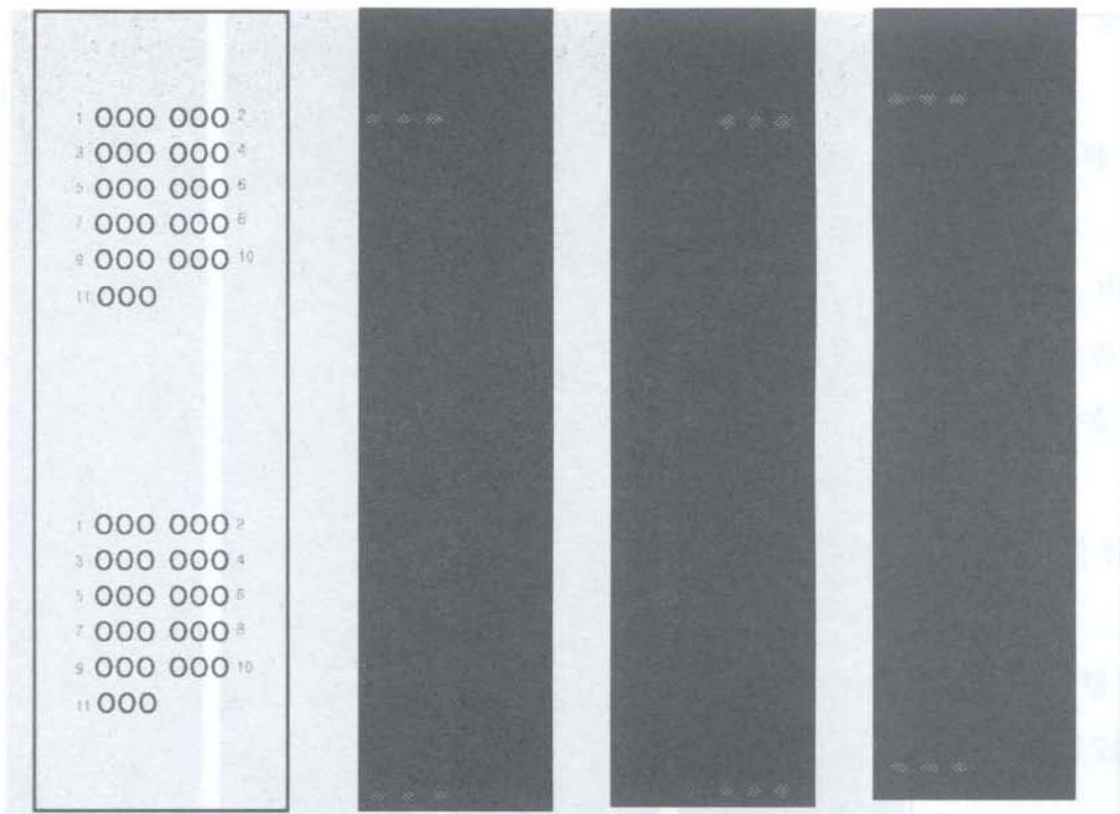


Fig. 3. DNA chip for the differentiation of serotypes 1, 2 and 3 of Marek's disease viruses (MDV), and subgroups A, B, C, D, E and J of avian leukosis/sarcoma group viruses (ALSV). (Left panel) Arrangement of probes specific for each serotype of MDV and subgroup of ALSV. 1: subgroup J-2 of ALSV. 2: subgroup J-1 of ALSV. 3: subgroup E of ALSV. 4: subgroup D of ALSV. 5: subgroup C of ALSV. 6: subgroup B of ALSV. 7: subgroup A-2 of ALSV. 8: subgroup A-1 of ALSV. 9: serotype 3 of MDV. 10: serotype 2 MDV. 11: serotype 1 MDV. To increase the specificity, three spots for each virus are made. (Middle left panel) Hybridization is performed with PCR amplicon of serotype 1 MDV (Md5 strain) and its probes. Strong positive signal specific for serotype 1 MDV is detected on the DNA chip microarray. (Middle right panel) Hybridization is carried out with PCR amplicon of serotype 2 MDV (HPRS-24 strain) and its probes. Strong positive signal specific for serotype 2 MDV is present. (Right panel) Hybridization is done with PCR amplicon of serotype 3 MDV (HVT strain) and its probe. Strong positive signal of serotype 3 MDV is observed on the DNA chip microarray.

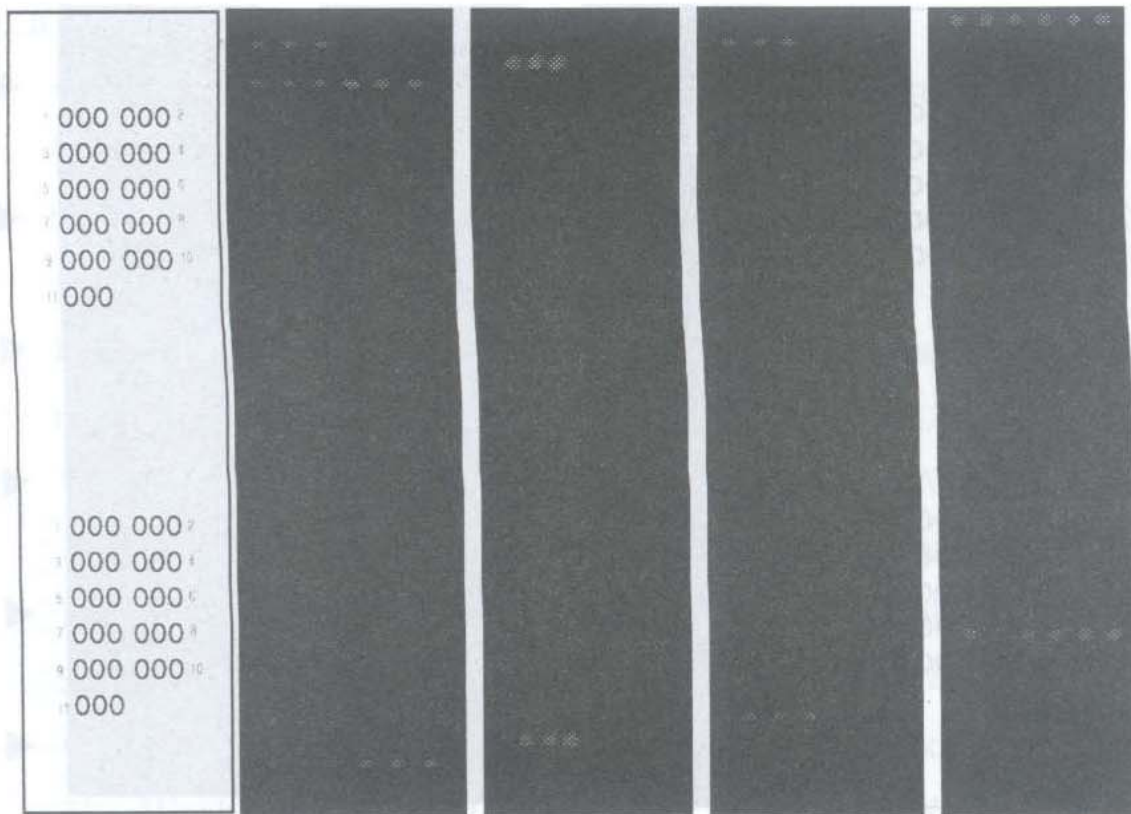


Fig. 4. DNA chip for the differentiation of serotypes 1, 2 and 3 of Marek's disease viruses (MDV), and subgroups A, B, C, D, E and J of avian leukosis/sarcoma group viruses (ALSV). (1st panel) Arrangement of probes specific for each serotype of MDV and subgroup of ALSV. 1: subgroup J-2 of ALSV. 2: subgroup J-1 of ALSV. 3: subgroup E of ALSV. 4: subgroup D of ALSV. 5: subgroup C of ALSV. 6: subgroup B of ALSV. 7: subgroup A-2 of ALSV. 8: subgroup A-1 of ALSV. 9: serotype 3 of MDV. 10: serotype 2 MDV. 11: serotype 1 MDV. To increase the specificity, three spots for each virus are made. (2nd panel) Hybridization is performed with PCR amplicon of RAV-1 (subgroup A) ALSV and its probe. Strong positive signal specific for subgroup A ALSV is detected on the DNA chip microarray. (3rd panel) Hybridization is carried out with PCR amplicon of RAV-49 (subgroup C ALSV) and its specific probe. Strong positive signal of subgroup C ALSV is observed on the DNA chip microarray. (4th panel) Hybridization is done with PCR amplicon of subgroup E ALSV and its specific probe. Strong positive signal is present on the DNA chip microarray. (5th panel) Hybridization is performed with HPRS-103 (subgroup J ALSV) and its specific probe. Strong positive signal is observed on the DNA chip microarray.

- ▶ 마력병과 백혈병/육종 그룹의 바이러스들의 감별진단을 위해서는 multiplex PCR을 수행한 후, DNA chip에 응용할 필요가 있음.
- ▶ 왜냐하면 single PCR을 수행하는 경우 너무 많은 시간적 경제적 손실이 불가피하기 때문임.
- ▶ 따라서 마력병 바이러스 혈청형 1, 2, 3과 백혈병/육종 그룹 바이러스 subgroup A, B, C, D, E, J에 대한 각각의 primer pairs를 혼합한 후, 각각의 바이러스들에 대한 multiplex PCR을 수행하여 DNA chip에 응용하였음.
- ▶ 그 결과 각각의 바이러스들에 특이적인 양성의 반응들이 관찰되었음 (Fig. 5).
- ▶ 더욱이 이들 바이러스들을 각각 혼합하여 multiplex PCR을 수행한 결과 각각 섞어진 바이러스들에 대한 양성의 반응을 확인할 수 있었음(Fig. 5).

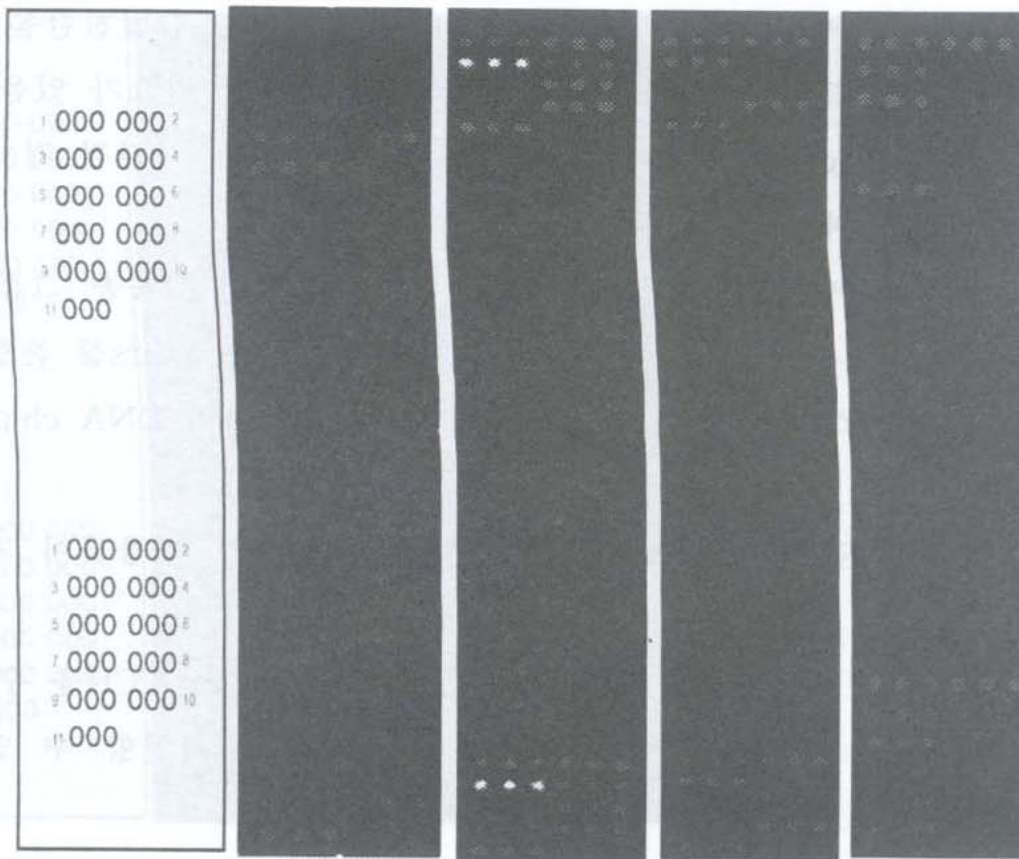


Fig. 5. DNA chip for the differentiation of serotypes 1, 2 and 3 of Marek's disease viruses (MDV), and subgroups A, B, C, D, E and J of avian leukosis/sarcoma group viruses (ALSV). (1st panel) Arrangement of probes specific for each serotype of MDV and subgroup of ALSV. 1: subgroup J-2 of ALSV. 2: subgroup J-1 of ALSV. 3: subgroup E of ALSV. 4: subgroup D of ALSV. 5: subgroup C of ALSV. 6: subgroup B of ALSV. 7: subgroup A-2 of ALSV. 8: subgroup A-1 of ALSV. 9: serotype 3 of MDV. 10: serotype 2 MDV. 11: serotype 1 MDV. To increase the specificity, three spots for each virus are made. (2nd panel) Hybridization is performed with multiplex PCR amplicons of serotypes 1, 2 and 3 MDV, and their specific probes, respectively. Strong positive signal specific for each serotype of MDV is detected on the DNA chip microarray. (3rd panel) Hybridization is carried out with multiplex PCR amplicons of serotypes 1 and 2 MDV, subgroups A, B, C, D and E of ALSV, and their specific probes, respectively. Strong positive signal of each virus are detected on the DNA chip microarray. (4th panel) Hybridization is carried out with multiplex PCR amplicons of serotypes 1 and 2 MDV, subgroups C and D of ALSV, and their specific probes, respectively. Strong positive signal of each virus are detected on the DNA chip microarray. (5th panel) Hybridization is carried out with multiplex PCR amplicons of serotype 1 MDV, subgroups C, D, E and J of ALSV, and their specific probes, respectively. Strong positive signal of each virus are detected on the DNA chip microarray.

3) 진단에 감별이 필요한 병원체 검색

- ▶ 마렉병 바이러스 혈청형 1, 2, 3과 백혈병/육종 그룹 바이러스 subgroups A, B, C, D, E, J에 특이적인 primer pairs와 probes를 제작하였음.
- ▶ 이들 primer pairs와 probes의 특이도를 검사하기 위해서 Genbank 상에서 검사를 수행한 결과, 어떤 바이러스나 세균 등 homology를 가지고 있는 병원체는 관찰할 수 없었음.
- ▶ 즉 본 연구팀에 의해서 개발된 primer pairs와 probes는 닭 마렉병과 백혈병/육종 그룹의 바이러스에 대하여 특이적이었음.

4) 특이도 자료를 바탕으로 감별진단에 필요한 다른 병원체와의 실제 특이도 검사 수행

- ▶ 1)항의 가)번에서 기술한 바와 같이 본 연구진에 의해서 개발된 primer pairs를 이용하여 *S. pullorum*, *S. gallinarum*, *E. coli*, Newcastle virus, Infectious bronchitis virus, Infectious bursal disease virus, Infectious laryngotracheitis virus 등과 PCR 혹은 RT-PCR을 수행한 결과 양성의 반응을 확인할 수 없었음.
- ▶ 또한 Cy5-dUTP 이용한 PCR 혹은 RT-PCR 산물을 이용하여 DNA chip에 응용하여도 어떤 양성반응도 확인할 수 없었음.
- ▶ 즉 본 연구팀에 의해서 개발된 primer pairs와 probes는 닭 마렉병과 백혈병/육종 그룹 바이러스들에 특이적이라는 것을 알 수 있었음.

나. 제1협동과제: 닭 백혈병/육종 그룹 바이러스와 마렉병 바이러스의 분리·동정 및 야외 종양 발생례의 조사 및 재료 확보

1) 야외 발생주의 분리

- ▶ 마렉병 및 닭 백혈병/육종 그룹 바이러스들을 분리하기 위해서 야외에서 채취한 조직을 사용하였음.
- ▶ 마렉병 바이러스의 분리는 chicken 혹은 duck embryo fibroblast 등을 이용하였음.
- ▶ 마렉병으로 진단된 총 8개 농장 34개의 재료를 대상으로 마렉병 바이러스 분리를 시도한 결과 총 5개 농장에 14마리의 닭에서 14개의 바이러스

스를 분리하였음.

- ▶ 분리된 마렉병 바이러스는 DEF와 혼합배양한 후 1차 계대부터 4-5일 후에 CPE가 형성되었음(Fig. 6).
- ▶ 마렉병 바이러스의 증식에 의해서 유발된 CPE는 세포의 크기가 줄어들어 원형화 되었으며, 집락의 형태로 관찰되었음.
- ▶ 하지만 mock 접종한 DEF에서는 CPE가 관찰되지 않았음(Fig. 6).

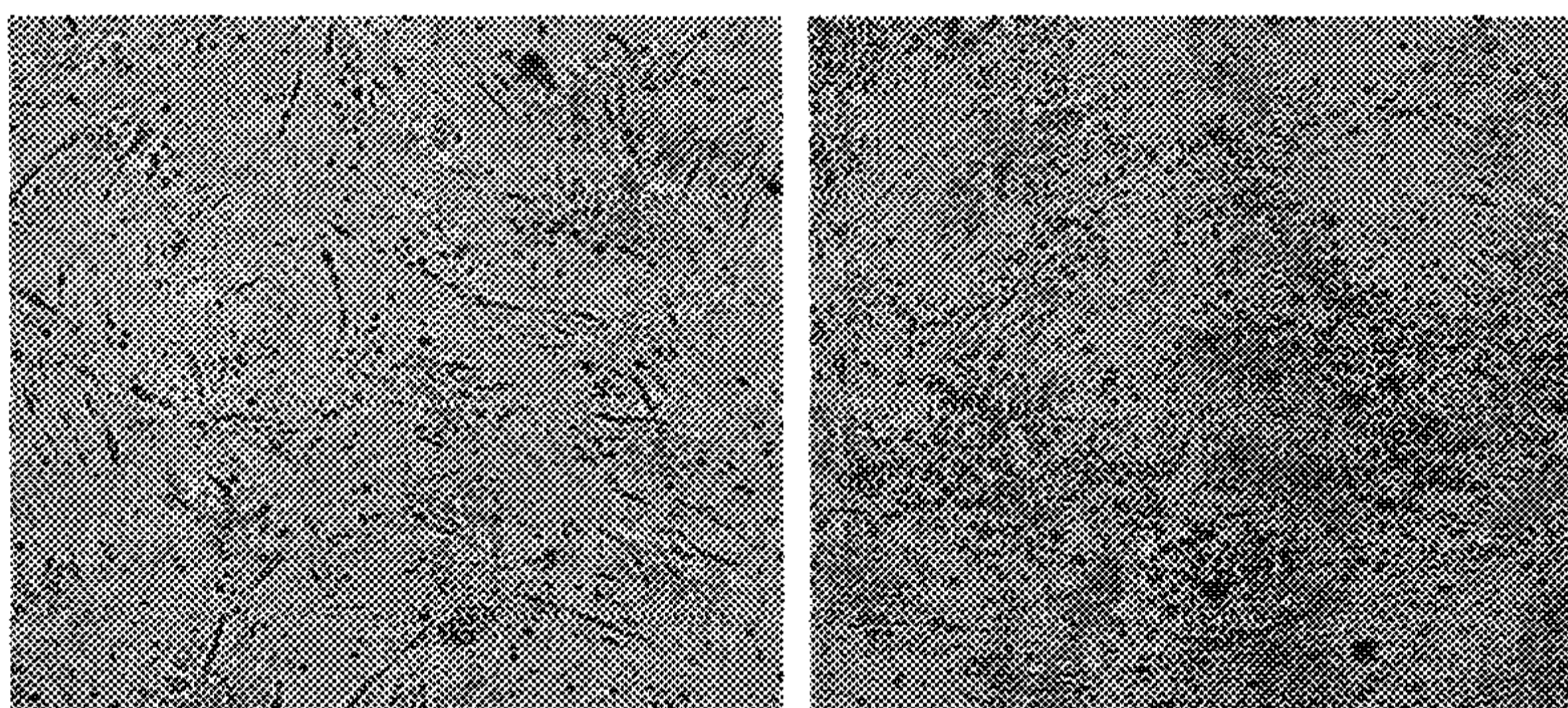


Fig. 6. (Left panel). Mock-inoculated duck embryo fibroblast cells (DEF). (Right panel). Korean Marek's disease virus isolates induced cytopathic effects characterized by cell rounding and clustering at 5 days postinoculation on DEF.

- ▶ 이렇게 CPE가 형성된 DEF를 마렉병 진단용 primer pairs (Table 4)를 이용한 PCR에서 마렉병 바이러스에 특이적인 양성 반응 모두 보였음.
- ▶ 또한 이러한 바이러스들은 DEF에서 계속 대량 배양하여 질소탱크에 보관 중에 있음.
- ▶ 백혈병/육종 그룹 바이러스 분리를 위해서 chicken embryo fibroblast, hematopoietic cell 등 다양한 세포주를 이용하였음.
- ▶ 하지만 현재 국내에서 닭 백혈병/육종 그룹 바이러스에 의한 종양성 질병은 검출이 되지 않아 바이러스의 분리는 시도하지 못하였음.
- ▶ 하지만 국내에서 닭 백혈병/육종 그룹 바이러스 중에서 내인성 바이러스인 subgroup E 바이러스 감염이 마렉병 바이러스 분리용으로 사용된 41개 육용계 종란장에서 관찰하였기에 이러한 조직들을 배양 보관 중에 있음.

2) 분리한 바이러스의 동정

가) 국내 마렉병 분리주에서 PCR을 이용한 meq, pp38, vIL-8 유전자의 검출

- ▶ 상술한 마렉병 바이러스 진단용 및 유전자 분석용 primer pairs를 Table 4에 표시하였음.
- ▶ meq 유전자는 순화되어짐에 따라 proline-rich region의 copy 수의 차이로 인해 다양성이 증가됨.
- ▶ 따라서 한국에서 분리한 MDV 유전자 meq의 다양성을 알아보기 위해, meq 유전자에 특이적인 primer pair를 이용하여 7개 분리주에 대하여 PCR을 수행하였음.
- ▶ 그 결과 한국에서 3종류의 meq를 전기영동상에서 관찰할 수 있었음.

Table 4. The oligonucleotide primers of the meq, pp38 and vIL-8 genes of the MDV used for detection or DNA sequencing

| Genes | Sequence (5'→3') | Region | Source or references |
|-------|---|---------|----------------------|
| pol | F: GTACATCGGAGCACGAAAGA R: CGCAGATGGTATCAGTATCG | 36-588 | Ui, 1998 |
| meq | F: AGTTGGCTTGTCATGAGCCAG R: TGTTCGGGATCCTCGGTAAGA | 347-929 | Chang-b, 2002 |
| pp38 | F: ATGGAATTCGAAGCAGAACAC R: CTCCAGATTCCACCTCCCCAGA | 1-850 | Buranathai, 1997 |
| vIL-8 | F: GCAGGCGTTGTTGCTAGTAT R: TTACAGGAGGTAGCAATTAA | 3-712 | This study |

Accession number: AF147806.

- ▶ 즉 총 7개의 분리주에서 2개 분리주(29-1 및 46-1 strains)는 L-meq이 관찰되지 않았고, meq과 S-meq 만을 관찰할 수 있었음(Fig. 7A).
- ▶ 반면에 나머지 5개의 분리주(29-2, 29-3, 29-5, 30-7 및 31-1)는 meq과 S-meq외에도 L-meq이 관찰되었음(Fig. 7A).
- ▶ 따라서 29-1 및 46-1 마렉병 바이러스 분리주는 비교적 강독주로 추정되며, 그 외의 것들은 비교적 약독화된 주로 추정됨.
- ▶ 또한 pp38과 vIL-8에서는 특이적인 primer pairs로 PCR을 수행했을 때, 각각의 유전자에 특이적인 특정 크기의 양성밴드를 관찰할 수 있었음(Fig. 7B & C).

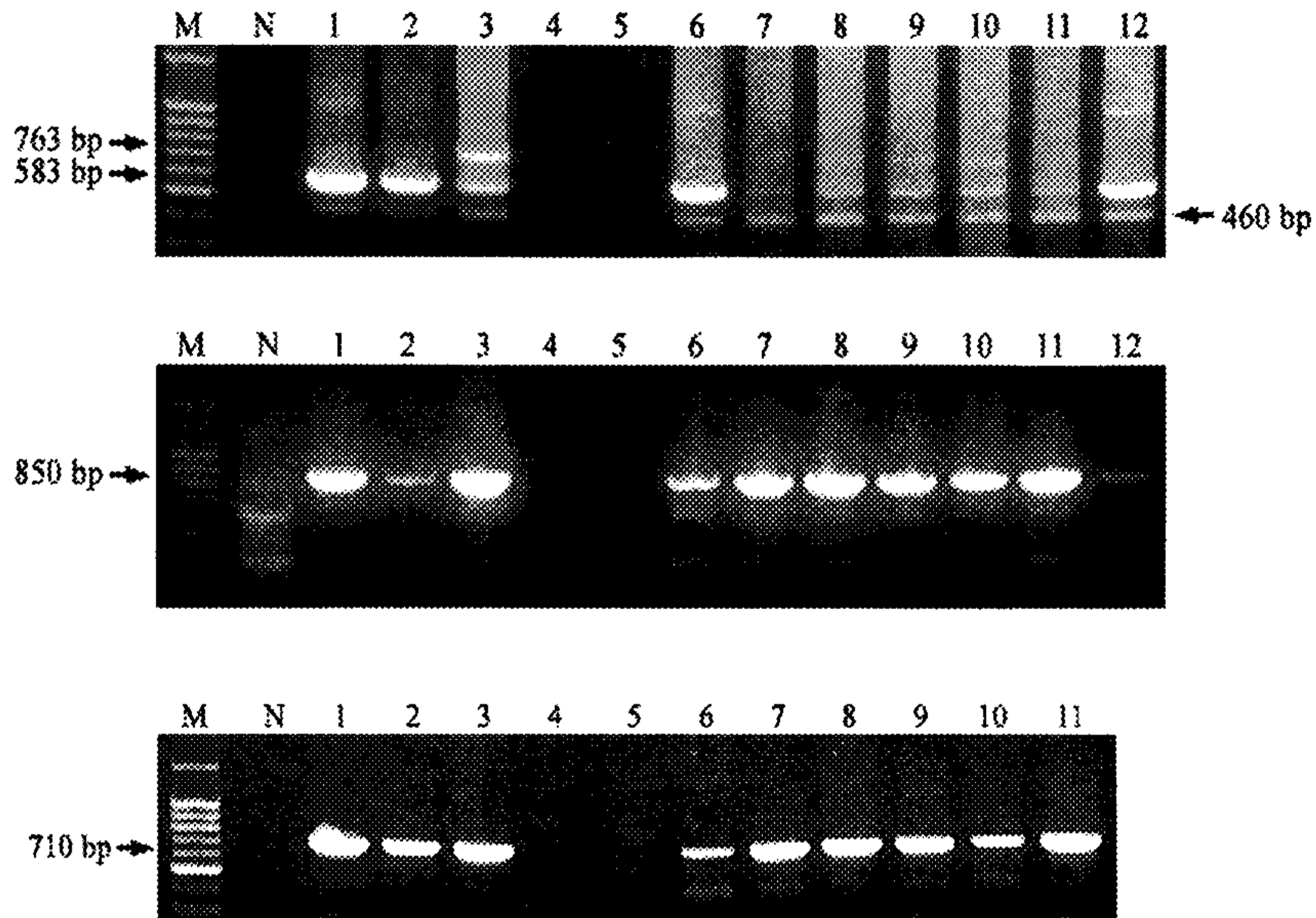


Fig. 7. Detection of meq (A), pp38 (B) and vIL-8 (C) genes of Marek's disease viruses isolated in the field chickens. M; 100 bp marker. N; negative control. Lane 1: Md5, lane 2: GA, lane 3: CVI988, lane 4: HPRS-24, lane 5: HVT, and lanes 6-12: Korean isolates of MDV.

나) PCR 산물의 sequencing을 통한 특이 유전자 염기서열 확인

(1) meq 유전자 염기 및 아미노산 서열 분석

- ▶ 마렉병 바이러스 종양 유전자인 meq 유전자의 다양성을 확인하기 위하여 국내 분리주 7개주의 meq 유전자 일부분(583 bp)을 PCR로 증폭하여 정제한 후 염기서열을 분석하였음.
- ▶ 염기서열을 분석한 결과 총 13개의 치환이 일어났으며, 이로 인해 총 10개의 point mutation이 아미노산 서열상에서 관찰되었음(Fig. 8).
- ▶ 특이적인 것은 meq의 아미노산 서열 194번에서 비교적 강독주로 생각되는 국내 분리주 29-1과 46-1의 프롤린이 그 외의 29-2, 29-3, 29-5, 30-7, 31-1주들에서는 삭제되었다는 것임(Fig. 8).
- ▶ 또한 29-1주는 아미노산 서열 176과 179에서 다른 마렉병 바이러스 주들에서는 관찰되지 않았던 29-1주 특이적인 아미노산 치환이 있었음

(Fig. 8).

- ▶ meq 유전자 염기서열을 이용하여 계통도를 외국에서 보고된 바이러스 주들(Table 5)과 분석한 결과, 마력병 바이러스는 크게 2개로 그룹화 (groups I and II) 되었음(Fig. 9A).
- ▶ 특히 염기서열을 이용한 계통도 분석에서 group I에 속하는 바이러스는 다시 2개의 subgroup으로 분리되었으며, subgroup 1은 A type 및 B type으로 세분되었음.
- ▶ A type에는 세 개의 subtypes (subtypes a, b and c)로 구성되어 있었으며, 국내 분리주 대부분(29-2, 29-3, 31-1, 30-7, 29-5 and 46-1 strains)은 A type 내의 subtype a에 속해있었음.
- ▶ B type은 오직 하나의 subtype (571 and 573 strains)만 존재하였음.
- ▶ Subgroup 2에는 오직 29-1 strain만 속해있었음.
- ▶ Group II는 크게 두 개의 subgroup (1 and 2)로 세분되었음.
- ▶ Subgroup 1에는 New strain만 속해 있었으며, subgroup 2는 다시 2개의 types (types A and B)로 세분되었음.
- ▶ Subgroup 2의 type A에는 U, 686, N, 648A, 660-A strains가 속해 있었음.
- ▶ Subgroup 2는 type은 다시 subtype a과 b로 세분되었음.
- ▶ Subtype a는 643P strain만 속해있었으며, subtype b에는 TK, 595, X, 549, L 및 RL strains들이 속해있었음.
- ▶ meg 유전자 아미노산 서열을 바탕으로 계통학적 분석을 실시한 결과, 염기서열분석결과와 유사하게 마력병 바이러스는 크게 2개로 그룹화 (groups I and II) 되었음(Fig. 9B).
- ▶ Group I에 속하는 바이러스는 다시 2개의 subgroup으로 분리되었으며 (subgroups 1 and 2), subgroup 1은 두 개의 types(types A and B)로 세분되었음.
- ▶ Type A는 또다시 subtype a (RB1B, CVI988, 29-2, 29-3, GA, 31-1, 30-7, 29-5 and 46-1 strains), subtype b (W and Md5 strains), subtype c (617A, 567 and 637 strains)로 세분되었음.
- ▶ Type B에는 29-1 strain만 속해있었음.

- ▶ Group 1 내의 subgroup 2에는 571 및 573 strains만 속해있었음.
- ▶ Group II는 다시 subgroup 1과 2로 세분되었으며, subgroup 1에는 오직 New strain만 속해있었음.
- ▶ Group II 내의 subgroup 2에는 type A (686, 660-A, U, 648A and N strains), type B (643P strain), type C (RL, X, 595, TK, L and 549 strains)로 세분되었음.

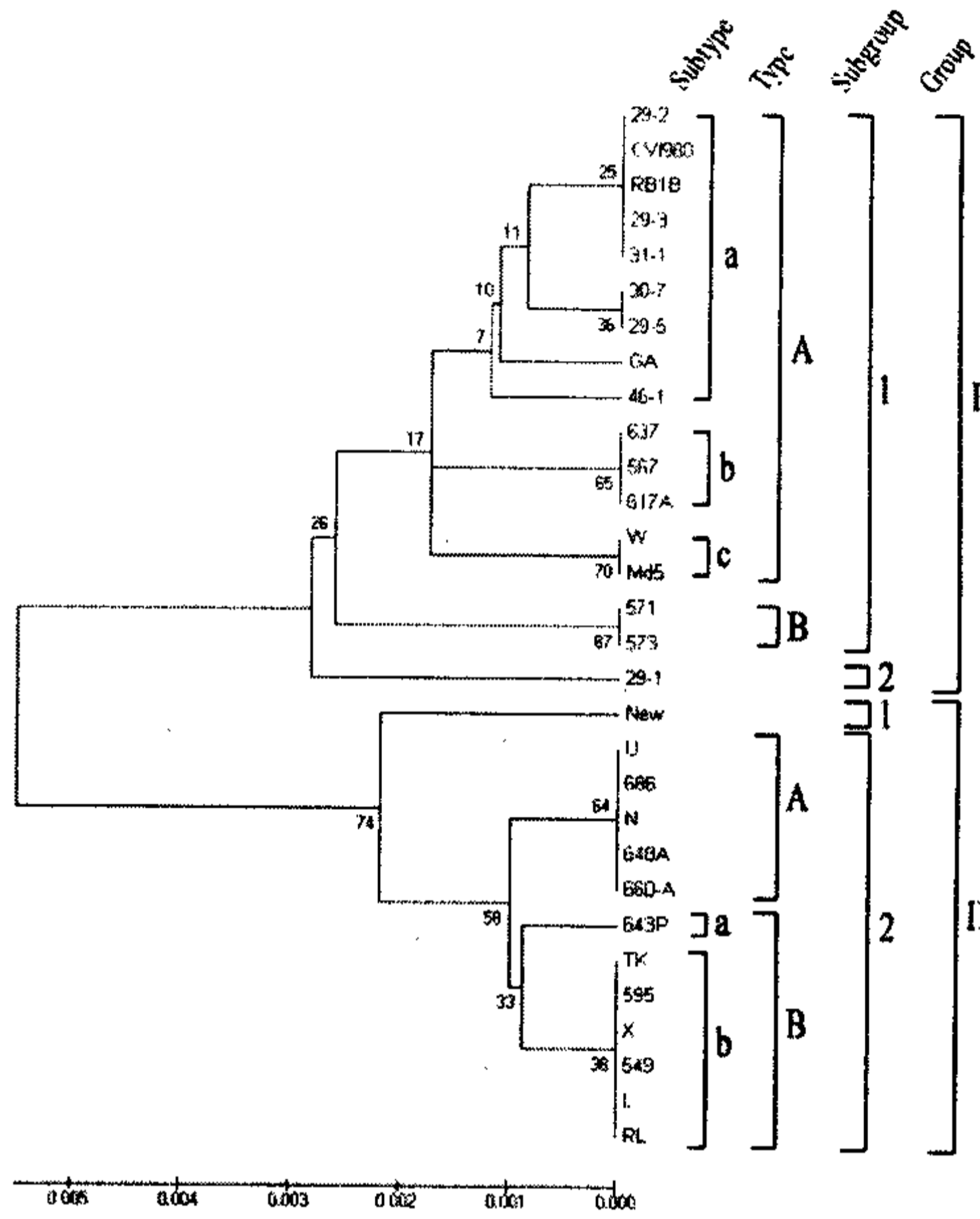
Table 5. Genbank accession numbers of Korean and the reference MDVs used in phylogenetic analysis

| Genes | Strains or Isolates | Accession Numbers | Genes | Strains or Isolates | Accession Numbers |
|------------------|---------------------|-------------------|-------|---------------------|-------------------|
| meq, pp38, vIL-8 | Md5 | AF243438 | meq | 549 | AY362714 |
| meq, pp38, vIL-8 | GA | AF147806 | meq | 595 | AY362715 |
| meq, pp38, vIL-8 | Md11 | AY510475 | meq | 643P | AY362716 |
| meq | L | AY362717 | meq | 567 | AY362709 |
| meq | N | AY362718 | meq | 571 | AY362710 |
| meq | New | AY362719 | meq | 573 | AY362711 |
| meq | RL | AY362720 | meq | 617A | AY362712 |
| meq | TK | AY362721 | meq | 637 | AY362713 |
| meq | U | AY362722 | meq | CVI988 | AY164639 |
| meq | W | AY362723 | pp38 | CVI988 | S76060 |
| meq | X | AY362724 | vIL-8 | 584A | AF551844 |
| meq | 684A | AY362725 | vIL-8 | PK-1 | AF489277 |
| meq | 660-A | AY362726 | vIL-8 | RB1B | AF489276 |
| meq | 686 | AY362727 | vIL-8 | CU2 | AF489269 |
| meq | RB1B | AY243332 | vIL-8 | CVI988 | AF489270 |

Fig. 8. Comparison of the predicted amino acid sequences of the meq gene according to the Marek's disease virus (MDV) strains.

| Strains or Isolates | Virulence | 119 | 153 | 176 | 179 | 180 | 194 | 217 | 277 | 281 | 283 |
|---------------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| RL | vv+ | R | Q | A | D | A | P | A | L | G | A |
| X | vv+ | R | Q | A | D | A | P | A | L | G | A |
| TK | vv+ | R | Q | A | D | A | P | A | L | G | A |
| L | vv+ | R | Q | A | D | A | P | A | L | G | A |
| 686 | vv+ | R | Q | A | D | A | P | A | P | G | A |
| 660-A | vv+ | R | Q | A | D | A | P | A | P | G | A |
| 648A | vv+ | R | Q | A | D | A | P | A | P | G | A |
| N | vv+ | R | Q | A | D | A | P | A | P | G | A |
| U | vv+ | R | Q | A | D | A | P | A | P | G | A |
| New | vv+ | R | Q | A | D | T | P | A | L | G | V |
| 595 | vv | R | Q | A | D | A | P | A | L | G | A |
| 549 | vv | R | Q | A | D | A | P | A | L | G | A |
| 643P | vv | R | Q | A | D | A | P | A | F | G | A |
| W | vv+ | C | P | P | D | T | P | A | L | G | V |
| RB1B | vv | C | P | P | D | T | P | P | L | G | A |
| GA | v | C | P | P | D | T | P | P | L | G | A |
| Md5 | vv | C | P | P | D | T | P | A | L | G | V |
| 617A | v | R | P | P | D | T | P | A | L | G | A |
| 567 | v | R | P | P | D | T | P | A | L | G | A |
| 637 | v | R | P | P | D | T | P | A | L | G | A |
| 571 | v | C | P | H | D | T | P | P | L | V | A |
| 573 | v | C | P | H | D | T | P | P | L | V | A |
| CVI988 | m | C | P | P | D | T | P | P | L | G | A |
| 29-1 | | C | P | S | N | T | P | A | L | G | A |
| 29-2 | | C | P | P | D | T | - | P | L | G | A |
| 29-3 | | C | P | P | D | T | - | P | L | G | A |
| 29-5 | | C | P | P | D | T | - | A | L | G | A |
| 30-7 | | C | P | P | D | T | - | P | L | G | A |
| 31-1 | | C | P | P | D | T | - | L | L | G | A |
| 46-1 | | C | P | P | D | T | P | P | L | G | A |

(A)



(B)

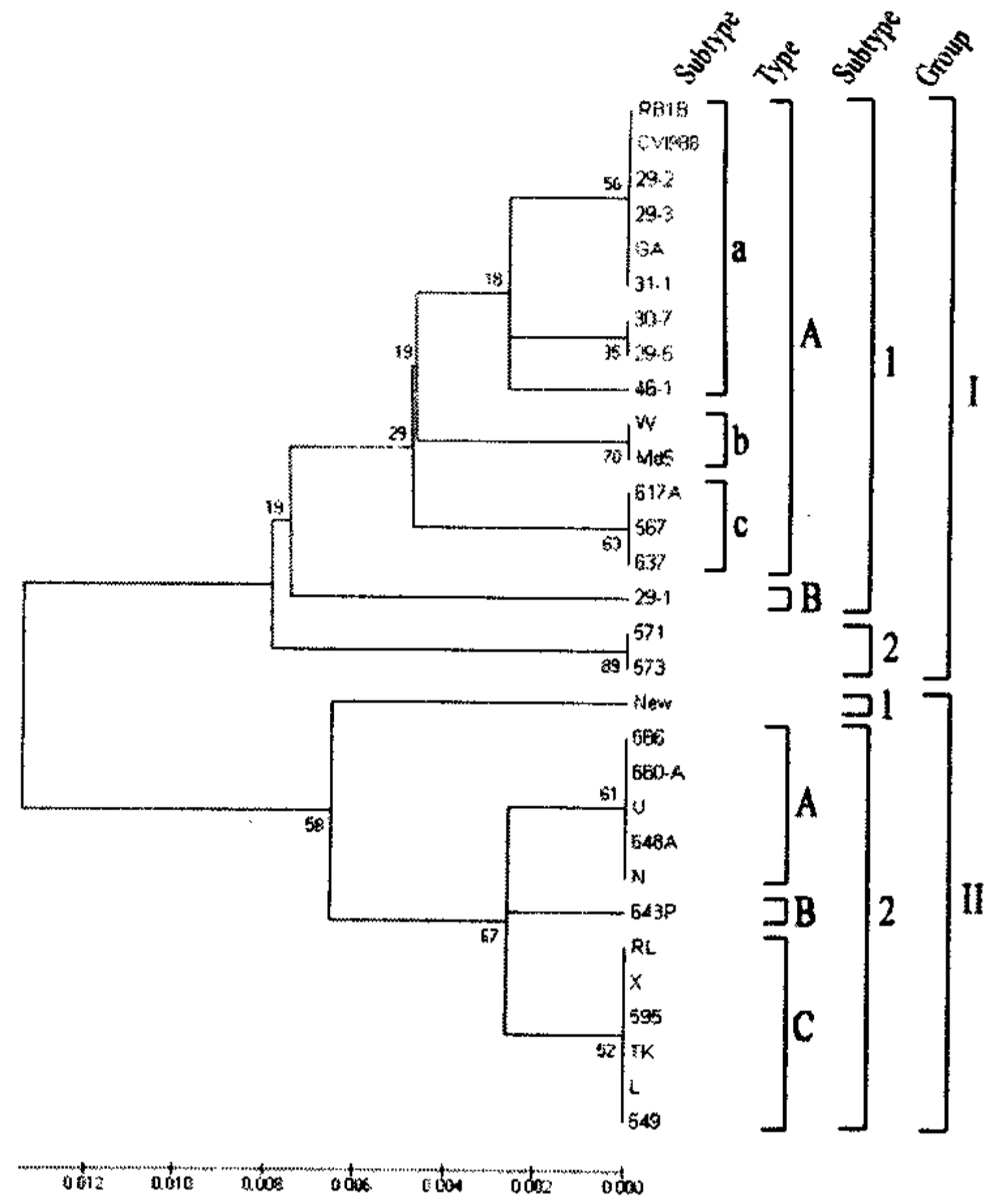
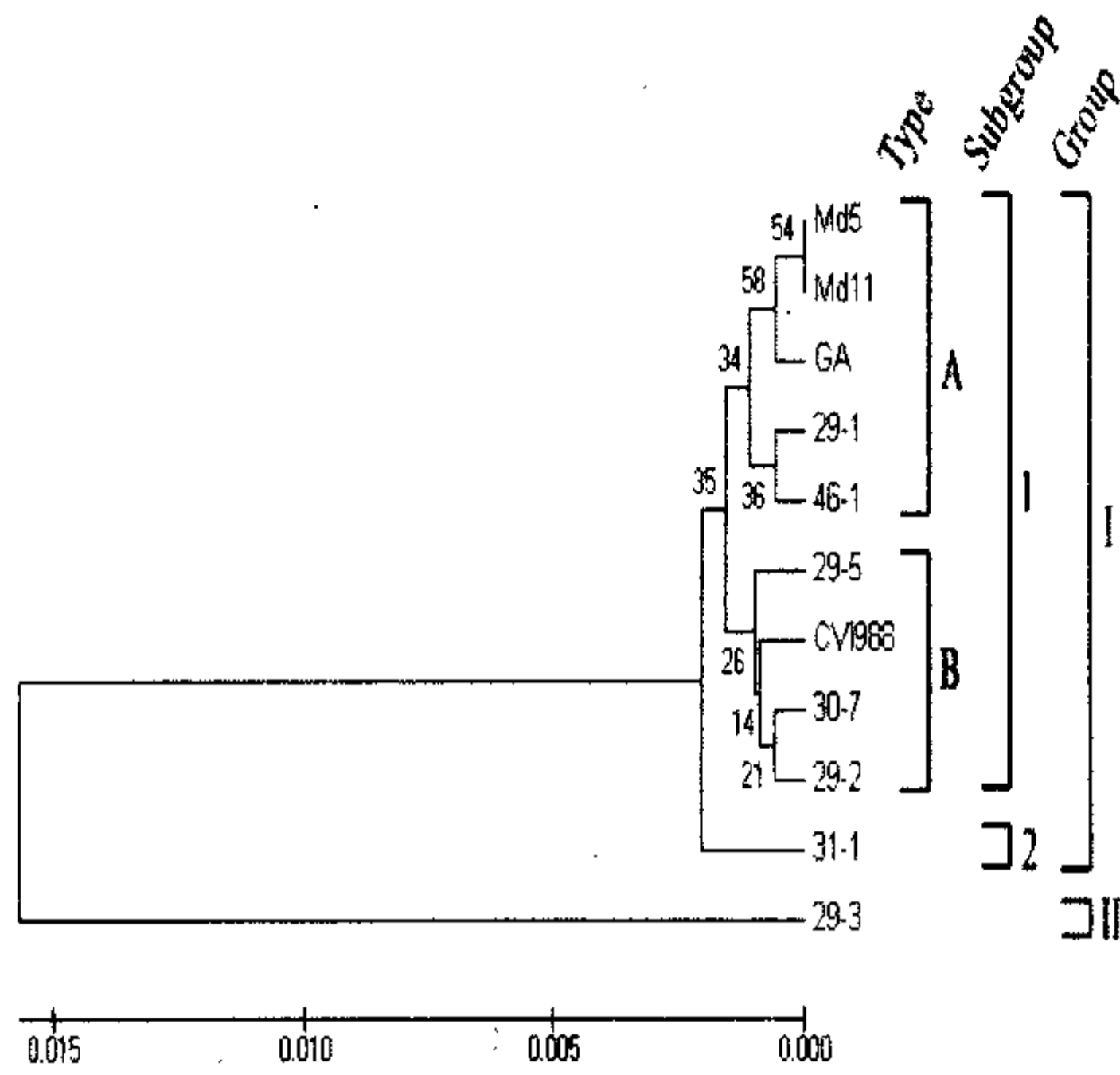


Fig. 9. The phylogenetic tree of the meq gene nucleotide (A) and deduced amino acid (B) sequences of Marek's disease viruses (MDV) isolated in Korea in comparison with the other known MDV strains.

(2) 국내 마력병 바이러스 분리주의 pp38 유전자에 대한 계통학적 분석

- ▶ 마력병 바이러스 초기 유전자인 pp38에 대한 염기서열의 변화에 따른 계통학적 차이점을 밝혀내기 위하여, 국내 분리주 7개주에 대한 pp38 유전자 일부분(850 bp)을 PCR로 증폭한 후, 증폭산물을 정제하여 염기서열을 분석하였음.
- ▶ 염기서열을 계통학적으로 분석한 결과, 마력병 바이러스들은 크게 2개의 group 즉 group I과 II로 분류할 수 있었음(Fig. 10A).
- ▶ 또한 group I에는 subgroup 1과 2로 구성되어 있었으며, subgroup 1에는 types A 및 B가 존재하였음.
- ▶ Type A에는 Md5, Md11, GA, 29-1, 46-1 strains로 구성되어 있었으며, type B에는 29-5, CVI988, 30-7, 29-2 strains로 구성되어 있었음.
- ▶ Subgroup 2에는 31-1 strain만 존재하였고, group 2에는 국내 분리주인 29-3 strain만 있었음.
- ▶ 염기서열을 아미노산으로 치환하여 계통학적으로 분석한 결과, 마력병 바이러스들은 크게 2개의 group 즉 group I과 II로 분류할 수 있었음(Fig. 10B).
- ▶ 또한 group I에는 subgroup 1과 2로 구성되어 있었으며, subgroup 1에는 types A 및 B가 존재하였음.
- ▶ Type A에는 GA, 29-1, Md5, Md11 strains로 구성되어 있었으며, type B에는 46-1 strain으로만 구성되어 있었음.
- ▶ Subgroup 2에도 types A 및 B가 존재하였는데, type A에는 29-5 strain으로 구성되어 있었음.
- ▶ Type B에는 31-1, 30-7, CVI988, 29-2 strains로 구성되어 있었음.
- ▶ Group 2에는 오직 29-3 strain만 존재하였음.

(A)



(B)

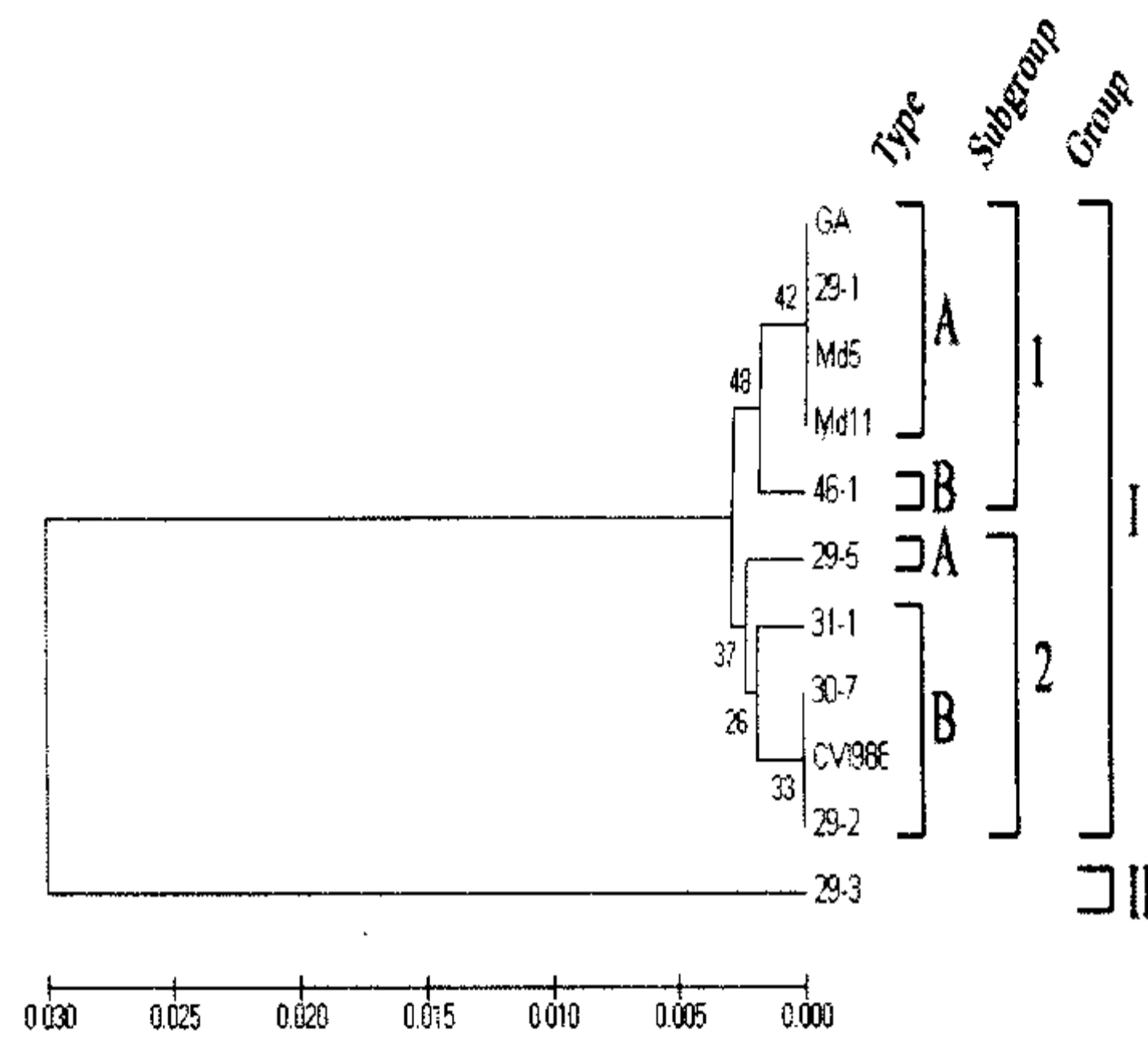


Fig. 10. The phylogenetic tree of the pp38 gene nucleotide (A) and deduced amino acid (B) sequences of Marek's disease viruses (MDV) isolated in Korea in comparison with the other known MDV strains.

(3) 국내 마렉병 바이러스 분리주의 vIL-8 유전자에 대한 계통학적 분석

- ▶ vIL-8 유전자는 3개의 엑손으로 구성된 유전자임(Parcells, 2001).
- ▶ 국내 분리주 6개 주와 외국 보고주간의 vIL-8 유전자 일부분(710 bp)를 대상으로 계통학적으로 분석한 결과, 마렉병 바이러스는 총 2개의 group (groups I and II)으로 구분되었음(Fig. 11).
- ▶ Group I에는 subgroup 1과 2로 구성되어 있었으며, subgroup 1은 다시 types A 및 B로 세분되었음.
- ▶ Type A는 subtype a (Md11, RB1B, 29-5, 31-1, CVI988, 29-2, CU2, 29-3 strains)와 subtype b (584A, PK-1, Md5 strains)로 세분되었음.
- ▶ Type B에는 GA strain으로만 구성되어 있었음.
- ▶ Subgroup 2에는 29-1 strain만 존재하였음.
- ▶ Group II는 오직 46-1로만 구성되어 있었음.

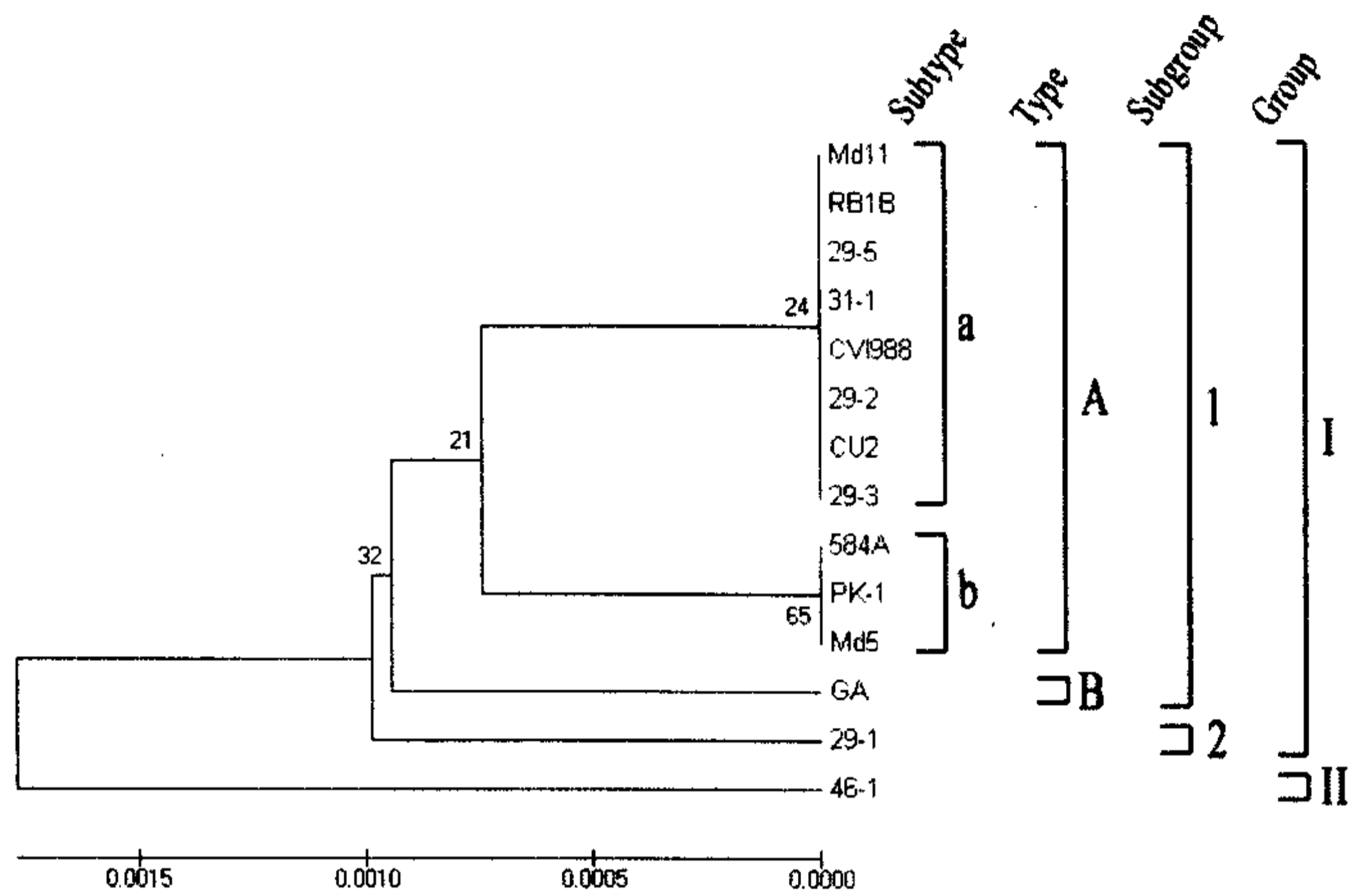


Fig. 11. The phylogenetic tree of the vIL-8 gene nucleotide sequences of Marek's disease viruses (MDV) isolated in Korea in comparison with the other known MDV strains.

3) 국내 닭 백혈병/육종 그룹 종양과 마렉병의 발병실태조사

- ▶ 국내 마렉병 및 닭 백혈병/육종 그룹 종양성 질병의 발병실태를 2004년 1월부터 2005년 3월까지 검사한 결과 마렉병은 총 1486건의 의뢰건 중에서 28건이 검출되었음(Table 6).
- ▶ 마렉병의 발생경향을 월별로 살펴보면 특이한 호발경향은 없고 연중 골고루 발생하는 것이 관찰되었음.
- ▶ 마렉병의 발생빈도는 닭 질병 중에서는 8위에 해당하였지만, 바이러스성 질병만을 살펴보았을 때에는 뉴캐슬병 다음으로 호발하는 무서운 질병이었음.

Table 6. The prevalence of chicken diseases in Korea during January 2004 to March 2005

| Diseases \ Year | 2004 | | | | | | | | | | | | 2005 | | | Total |
|-----------------------------|------|----|----|----|-----|-----|-----|----|----|----|----|-----|------|----|-----|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 1 | 2 | 3 | |
| Colibacillosis | 28 | 39 | 33 | 44 | 34 | 40 | 43 | 38 | 35 | 22 | 30 | 61 | 45 | 42 | 51 | 585 |
| Salmonellosis | 7 | 8 | 4 | 5 | 5 | 5 | 12 | 7 | 3 | 18 | 8 | 4 | 2 | 4 | 7 | 99 |
| Coccidiosis | 6 | 4 | 4 | 5 | 5 | 12 | 16 | 3 | 4 | 4 | 4 | 7 | 3 | 4 | 9 | 90 |
| Fowl typhoid | 6 | 2 | 2 | 1 | 5 | 8 | 8 | 2 | 1 | 4 | 17 | 4 | 3 | 1 | 2 | 66 |
| Newcastle disease | 8 | 3 | 6 | 4 | 6 | 5 | 3 | 1 | 1 | | 1 | | | 3 | 4 | 45 |
| Paratyphoid | | | | | 4 | 1 | 5 | 3 | 3 | 2 | | 2 | 8 | | 4 | 32 |
| Staphylococcosis | | 2 | 2 | 2 | | 3 | 2 | 1 | 4 | 2 | 2 | 2 | 3 | 4 | 1 | 30 |
| Marek's disease (MD) | 3 | 1 | 2 | 2 | | | 1 | | 2 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 2 | 28 |
| IBD | 3 | | | 2 | 3 | 6 | 3 | 4 | 3 | | 1 | | | 1 | 2 | 28 |
| AI (LPAI) | 1 | | | 5 | 8 | 5 | | | | 2 | | 3 | | 2 | | 26 |
| IB | 3 | 1 | | 3 | 7 | 3 | | | 1 | | | | 3 | 1 | 2 | 24 |
| Avian pneumovirus infection | 2 | | 2 | | | | 1 | 1 | | 1 | 2 | 4 | 3 | 1 | 2 | 19 |
| Aspergillosis | | | 3 | 2 | | 1 | | 1 | 1 | 1 | 2 | | 1 | | | 12 |
| 기타 | 31 | 27 | 23 | 23 | 30 | 27 | 26 | 26 | 28 | 18 | 25 | 17 | 41 | 16 | 44 | 402 |
| Total | 98 | 87 | 81 | 98 | 107 | 116 | 120 | 87 | 86 | 75 | 94 | 107 | 116 | 84 | 130 | 1,486 |

- ▶ 국내 양계장에서 닭 백혈병/육종 그룹의 종양성 질병을 검사한 결과 닭 백혈병/육종 그룹 종양은 관찰되지 않았음.
- ▶ 하지만 상술한 바와 같이 내인성 레트로바이러스인 ART-CH, ev, EVA, ev/J subgroup E virus를 3개 육용계 품종을 기르는 41개 농장에서 관찰할 수 있었음.
- ▶ 또한 국내 모 대학교의 SPF White Leghorn 종란과 외국에서 수입한 SPF 종란에서도 이러한 내인성 레트로바이러스를 검출할 수 있었음.
- ▶ 내인성, 외인성 레트로바이러스의 종란에서의 검출 결과 및 계통학적 분석에 대해서는 3차년도에서 자세히 기술하겠음.

4) 국내 닭 백혈병/육종 그룹과 마렉병의 종양조직 채취 및 종양병변의 분류

- ▶ 상술한 바와 같이 닭 마렉병이 발생한 농장으로부터 종양조직을 채취하여 종양병변의 분류를 다음과 같이 수행하였음.

가) 병리조직학적 방법에 의한 분류

- ▶ 본 연구팀에 의뢰된 가검물들은 쇠약, 의기소침과 이 중에서는 특징적인 임상소견인 말초신경 증상을 보이는 가검물도 관찰되었음.
- ▶ 이러한 증례들은 간, 피부, 비장, 선위, 소장, 말초신경 등에 특징적인 종양성 결절들이 관찰되었음(Fig. 12 and 13).



Fig. 12. Marek's disease tumor lesions. Note white nodular mass in the jejunum (left panel) and serosa of gizzard (right panel) in layers.

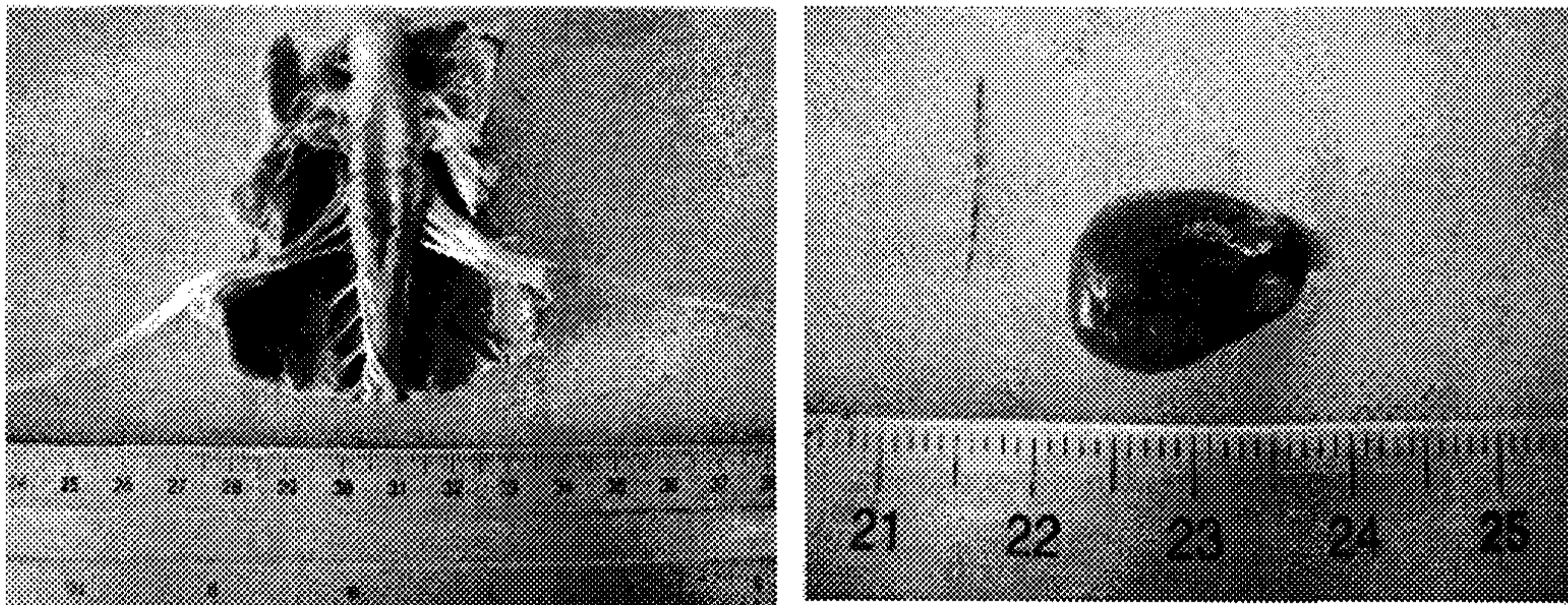


Fig. 13. Unilateral enlargement of sciatic nerve (left) and multiple nodular masses in the spleen due to Marek's disease infection in the layer.

- ▶ 이렇게 의뢰된 가검물들을 부검하여 고정, 파라핀 봉입, 절편 제작, 염색 과정을 거쳐 광학현미경으로 관찰한 결과, 다양한 양상의 마렉병 병변들이 관찰되었음.
- ▶ 어떠한 증례의 예에서는 침윤한 종양세포들이 주로 소형의 림프구로 구성된 것부터, 소형과 대형의 림프구들로 이루어진 것, 주로 대형의 림프구들로 형성된 것까지 다양하였다(Fig. 14).
- ▶ 특히 후자인 대형의 림프구들로 구성된 종양 병변은 림프구성 백혈병과 매우 흡사하여 광학현미경적으로 구별이 매우 어려웠음.

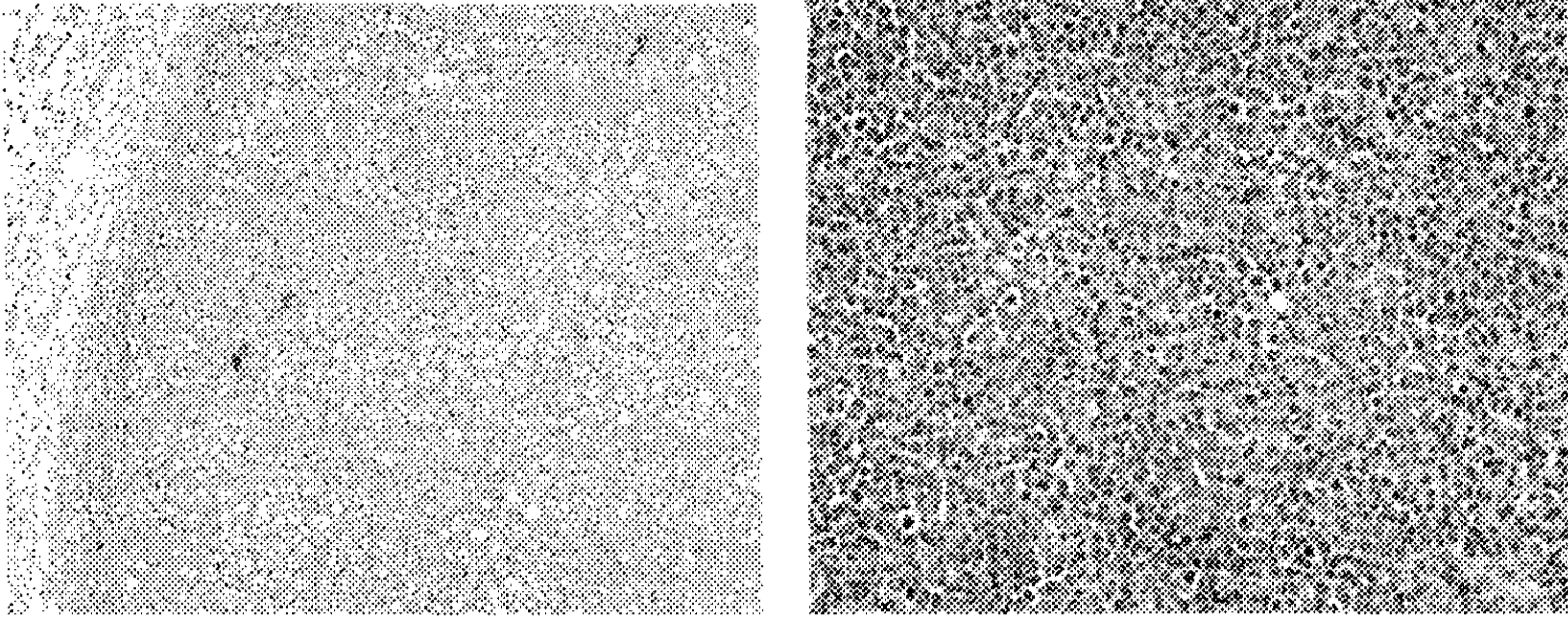


Fig. 14. Marek's disease tumor lesions in the sciatic nerve (left) and skin (right) consisting of pleomorphic lymphoid cells.

나) PCR 기법을 이용한 분류

- ▶ 야외 양계농장에서 발생한 마렉병 종양 조직에 대해 본 연구팀에 의해서 제작된 여러 가지 primer pairs를 이용하여 PCR을 수행하였음.
- ▶ 그 결과, 야외 마렉병 종양 조직에서도 각각의 마렉병 바이러스 유전자에 특이적인 증폭산물을 확인할 수 있었음.
- ▶ 또한 혈청형 1, 2, 3 마렉병을 동시에 검출할 수 있는 primer pair를 이용한 PCR에서 모두 양성 반응을 확인할 수 있었음(Fig. 15).
- ▶ 또한 혈청형 1에 특이적인 primer pair를 이용한 PCR에서도 야외 증례는 모두 양성 반응을 보였음(Fig. 16).
- ▶ 반면에 혈청형 2나 3 마렉병 바이러스 유전자에 대한 PCR에서는 모두 음성이었음.

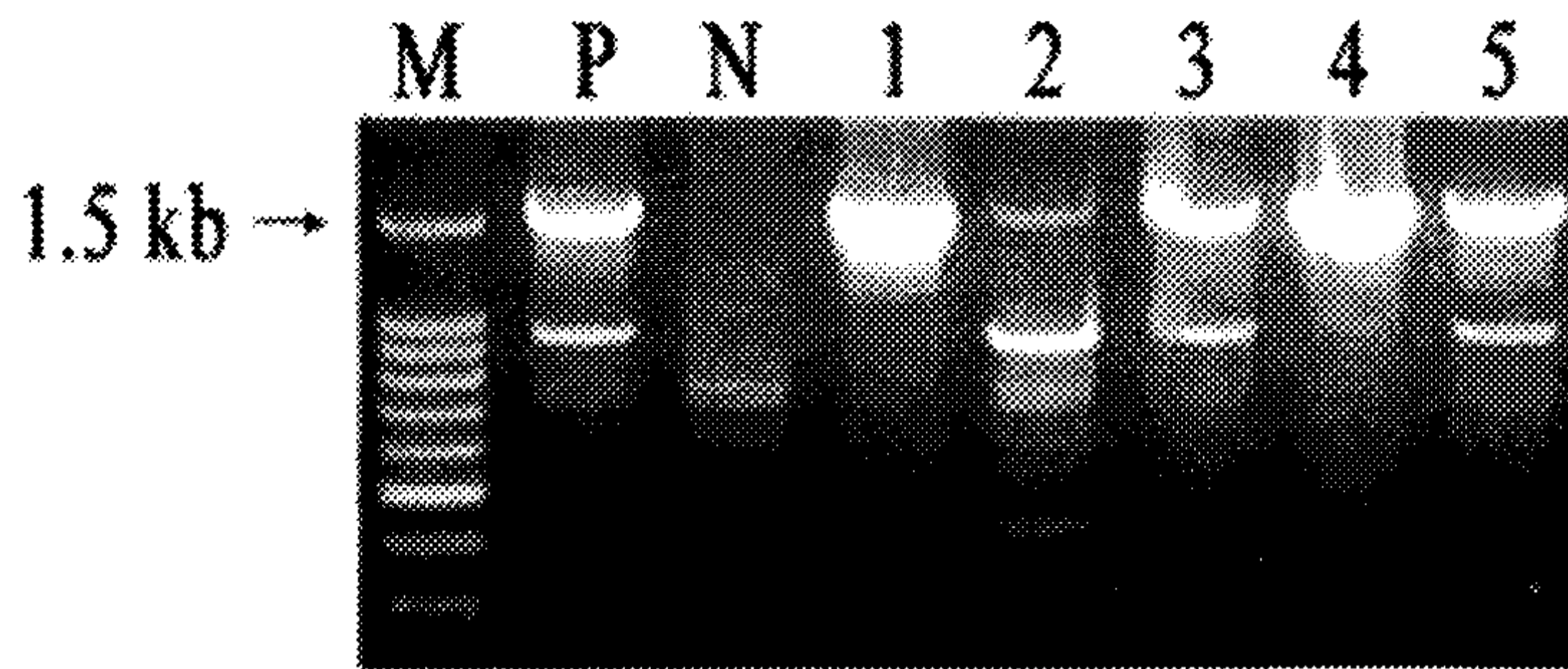


Fig. 15. Amplification of Marek's disease virus (MDV) pol gene with primer pair specific for serotypes 1, 2, 3 MDV. M: 100 bp marker. Lane P: Md5 strain of MDV. N: negative control. Lanes 1-5: wild type MDV.

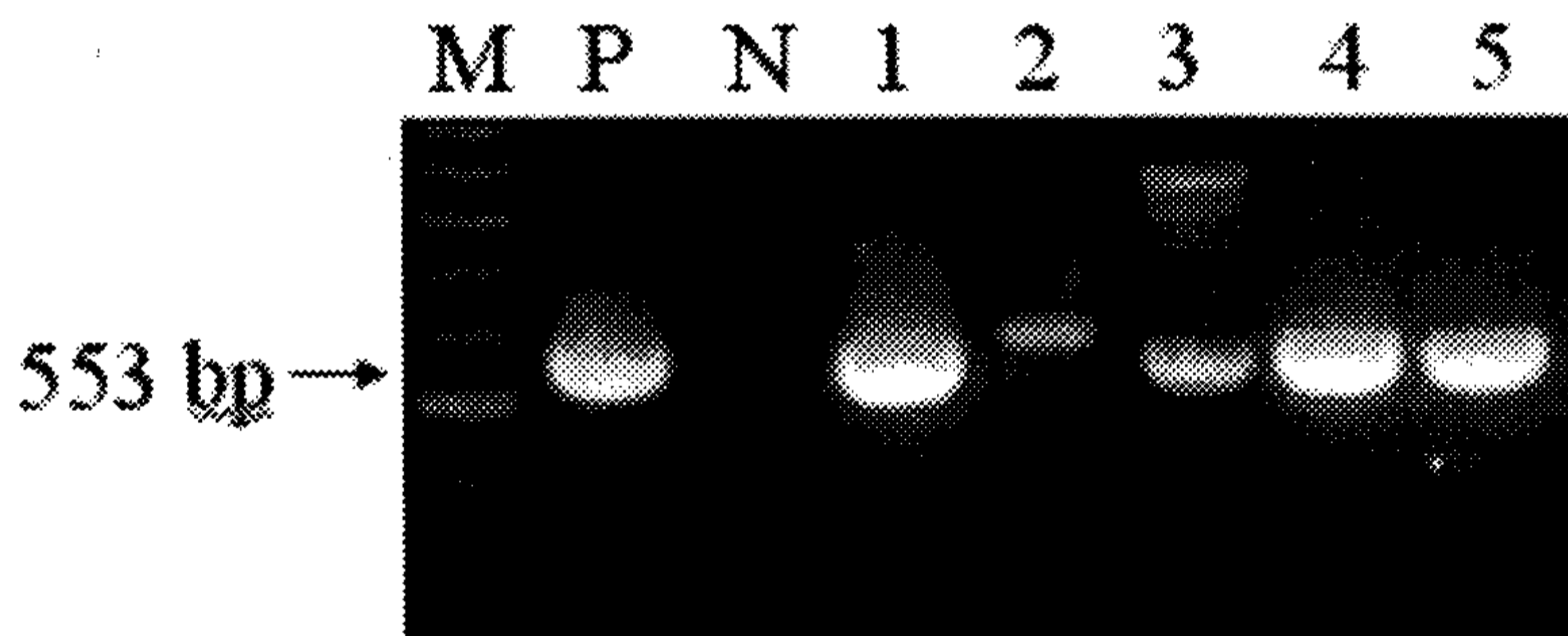


Fig. 16. PCR assay with primer pair specific for MDV serotype 1 pol gene. M: 100 bp marker. Lane P: Md5 strain of MDV. N: negative control. Lanes 1-5: wild type MDV.

3. 3차년도(2005년도)

가. 제1세부과제: DNA chip의 실험접종례와 야외발생 증례를 이용한 진단법 확립

1) 실험 접종한 닭에서 채취한 재료를 이용한 DNA chip의 응용

- ▶ 하기한 바와 같이 제1협동과제에서 실험접종에 의해 확보한 재료를 DNA chip의 응용에 이용하였음.
- ▶ 각각의 MDV를 접종한 닭에서 채취한 각각의 장기를 대상으로 3가지 혈청형 MDV 및 백혈병/육종 바이러스의 subgroups에 특이적인 primer pairs와 PCR 반응액에 Cy5-dCTP를 넣어 multiplex PCR을 수행하여, DNA chip에 2차년도에서 기술한 바와 같이 hybridization시켜 반응을 확인한 결과, 오직 MDV 혈청형 1 바이러스와 백혈병/육종 바이러스에서는 내인성 바이러스만 접종 후 지속적으로 검출되었음.
- ▶ 이러한 결과는 혈청형 1 MDV만이 닭에 접종 하였을 경우에 증식이 되어 DNA chip에 의해서 검출이 가능하며, 백신주로 사용되는 혈청형 2 및 3은 숙주 내에서 증식이 제한적이라는 것임을 알 수 있음.
- ▶ 또한 내인성 레트로바이러스가 검출되었다는 것은 국내는 물론 전 세계적으로 사육되는 모든 닭에서 내인성 레트로바이러스가 감염되어 있다는 것을 의미함. 이러한 결과는 하기한 내인성 레트로바이러스의 감염실태와 그 분자적 특성부분을 참조바람.
- ▶ 각각의 백혈병/육종 바이러스들을 접종한 닭에서 채취한 각각의 장기를 대상으로 MDV 3가지 혈청형 및 백혈병/육종 바이러스의 subgroups에 특이적인 primer pairs와 PCR 반응액에 Cy5-dCTP를 넣어 multiplex PCR을 수행하여, DNA chip에 hybridization시켜 반응을 확인한 결과, 각각의 백혈병/육종 바이러스들이 접종 후 2주째 재료까지 선택적으로 검출되었음.
- ▶ 또한 상술한 바와 같이 내인성 레트로바이러스는 지속적으로 검출되었음.
- ▶ 마력병 바이러스와 백혈병/육종 바이러스들의 혼합감염에 의한 오진률을 없애기 위하여 마력병 바이러스와 백혈병/육종 바이러스들을 혼합감염한

닭에서 채취한 조직을 대상으로 DNA chip을 응용한 결과, 각각의 특이적인 반응을 확인할 수 있었음(Fig. 1).

2) 기존의 진단기법인 PCR 결과를 비교함으로써 진단의 정확성 검증

- ▶ 기존의 마렙병 및 백혈병/육종 바이러스의 진단법인 PCR 기법과 본 DNA chip의 민감도를 검사한 결과, 기존의 PCR 기법에서 육안으로 검출되지 않았던 즉 음성으로 처리되었던 재료에서도 DNA chip에서는 양성 반응을 확인할 수 있어서, 본 DNA chip이 PCR 기법보다 더욱 정확함을 알 수 있었음.

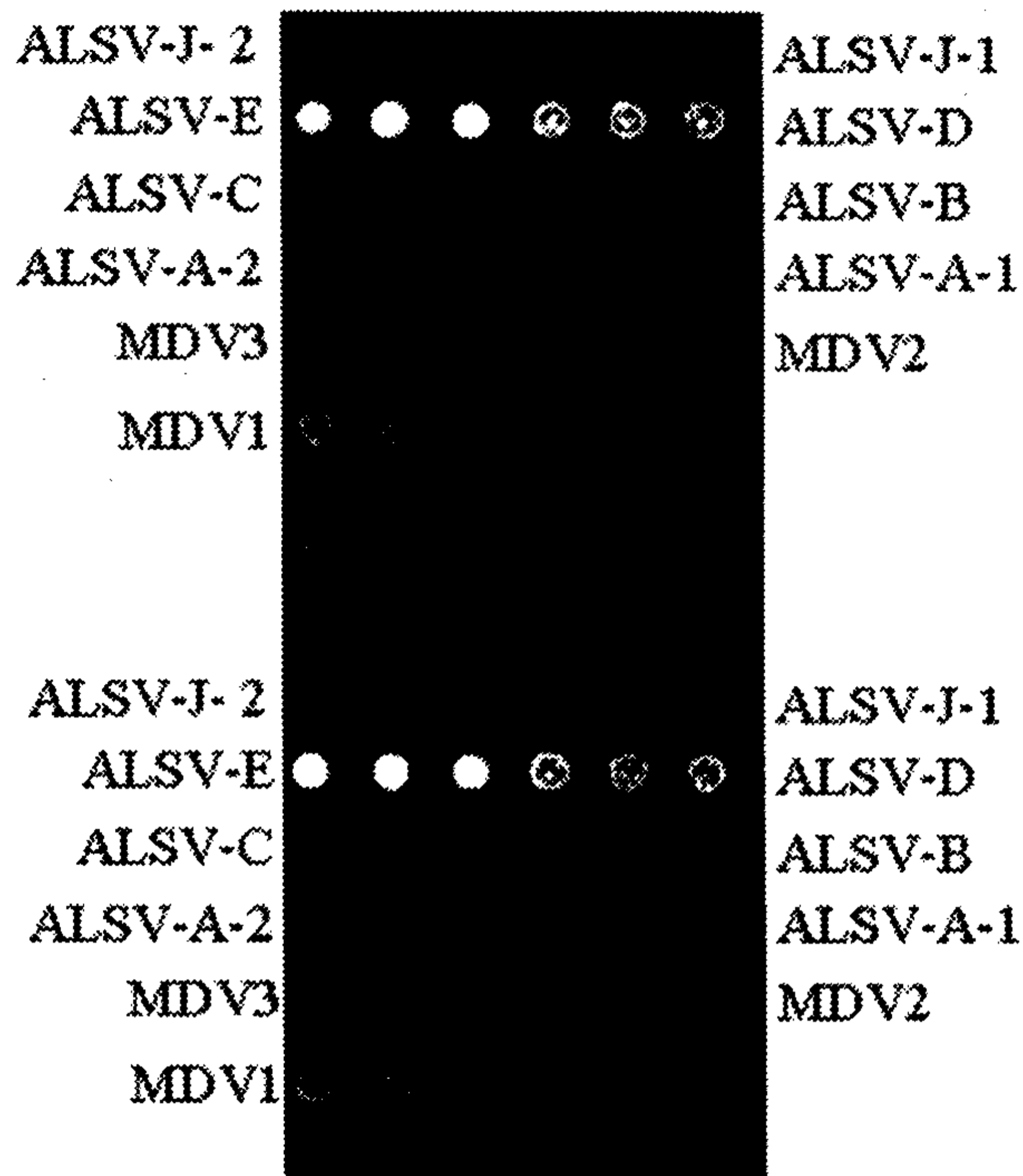


Fig. 1. DNA chip for the differentiation of serotypes 1, 2 and 3 of Marek's disease viruses (MDV), and subgroups A, B, C, D, E and J of avian leukosis/sarcoma group viruses (ALSV). DNA chip was applied to the kidney sample obtained at 2 weeks post-inoculation from a chicken inoculated with Md5 and ALSV subgroup D strain, RAV-50. ALSV-J-2: ALSV subgroup J virus, ALSV-J-1: ALSV subgroup J virus, ALSV-E: ALSV subgroup E virus, ALSV-D: ALSV subgroup D virus, ALSV-C: ALSV subgroup C virus, ALSV-B: ALSV subgroup B virus, ALSV-A-2: ALSV subgroup A virus, ALSV-A-1: ALSV subgroup A virus, MDV3: serotype 3 MDV, MDV2: serotype 2 MDV, MDV1: serotype 1 MDV.

3) 국내 주요 육용종계 및 재래 닭 종란에서 내인성 레트로바이러스의 분자적 특성 규명

가) EAV 내인성 레트로바이러스의 분자적 특성

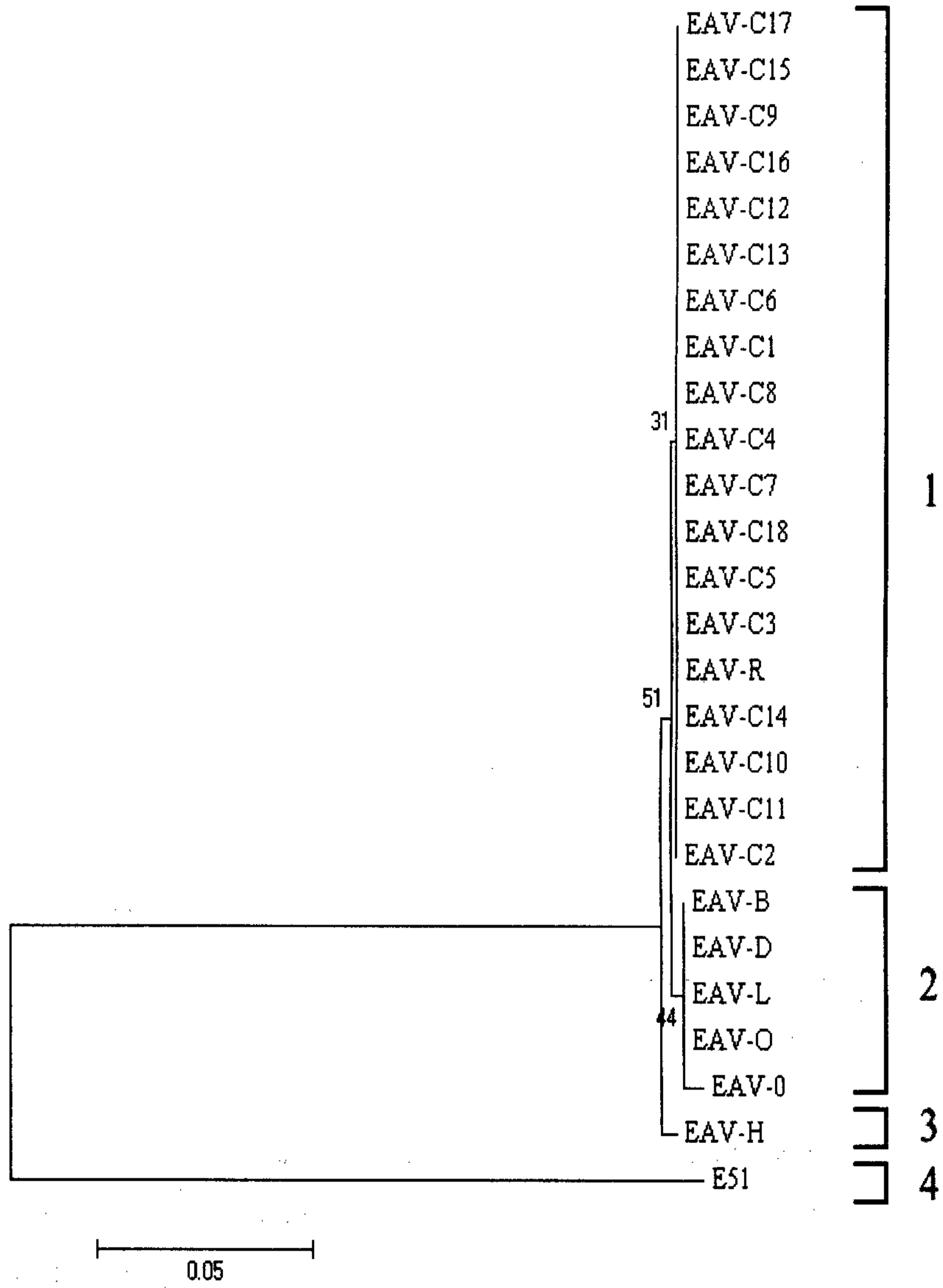
- ▶ 국내 재래닭에서 증폭된 EAV 바이러스의 TM 및 LTR 사이의 유전자 염기서열에 특이적인 primer를 이용하여 분석한 결과(Table 1), 국내 재래닭 사이에서는 100%의 상동성을 보였으며, EAV-0 및 Cobb, Ross, Hubbard와는 99.2%-99.6%의 높은 상동성을 보였음.
- ▶ 하지만 국내 재래닭 및 Cobb, Ross, Hubbard는 E-51과는 73.8%-74.6%의 낮은 상동성을 보였음.
- ▶ 또한 아미노산 서열로 치환한 후 비교한 결과, 국내 재래닭 및 Cobb, Ross, Hubbard에서 검출된 EAV는 상호간에 100%의 상동성을, EAV-0와는 98.7%의 상동성을, 그러나 E-51과는 70.88%의 상동성을 보였음.
- ▶ 이러한 결과는 국내 EAV는 EAV-0와 매우 밀접한 관계를 보이지만, E-51과는 진화론적으로 상이함을 의미함.
- ▶ 염기서열 및 아미노산 서열의 치환에 의한 계통학적 분석을 실시한 결과, EAV는 총 4개의 그룹으로 분류할 수 있었음(Fig. 2A and B).
- ▶ 첫 번째 그룹은 18개의 Cobb 농장(EAV-1~18), 1개의 Ross 농장에서 검출한 EAV가 있었으며, 두 번째 그룹은 국내 재래닭 및 EAV-0가 속해 있었음.
- ▶ 세 번째 그룹은 오직 Hubbard 종란에서 검출된 것이 속해 있었으며, 네 번째 그룹은 E-51만 속해 있었음.

Table 1. The oligonucleotide primers used for DNA sequencing of endogenous avian leukosis/sarcoma viruses in the fertile eggs

| Subgroups | Sequence (5'→3') | Region | Source or references |
|-----------|--------------------------------------|-------------------|----------------------|
| ev | H5: GGATGAGGTGACTAAGAAAG | 5209-6089 | Smith et al., 1999 |
| | ev-AR: TTTGACTGTCTGCACATCTC | | This study |
| | ev-BF: CAATCCTTTCTTTAACAGCG | 5900-6612 | This study |
| | ALSV-R: TAACGGACCAACAGGCTAGT | | This study |
| ev/J | ev/J 3' gag-F: ACACCATTGGTGGCGCGTGTC | 2435-3254 | Ruis et al., 1999 |
| | ev/J-AR: TCCAGGTGGTAAAGTTAGGA | 3130-3954 | This study |
| | ev/J-BF: ACTCCCACCAGGTATTTTCT | | This study |
| | TM-R: CCCGTCACATCGCGTTC | Ruis et al., 1999 | |
| EAV | EAV F2: GATGTGAGGATGTCTGAAGG | 1554-1794 | Tsang et al, 1999 |
| | EAV/ART-R: ACAAAGCATGGAAGACAGA | | This study |
| ART-CH | ART-F: CTCAAGGTGGCTCATTTAAC | 2006-3662 | This study |
| | EAV/ART-R: ACAAAGCATGGAAGACAGA | | This study |

Accession numbers: ev-AY013303, ev/J-NC005947, EAV-X59844, ART-CH-L25261.

(A)



(B)

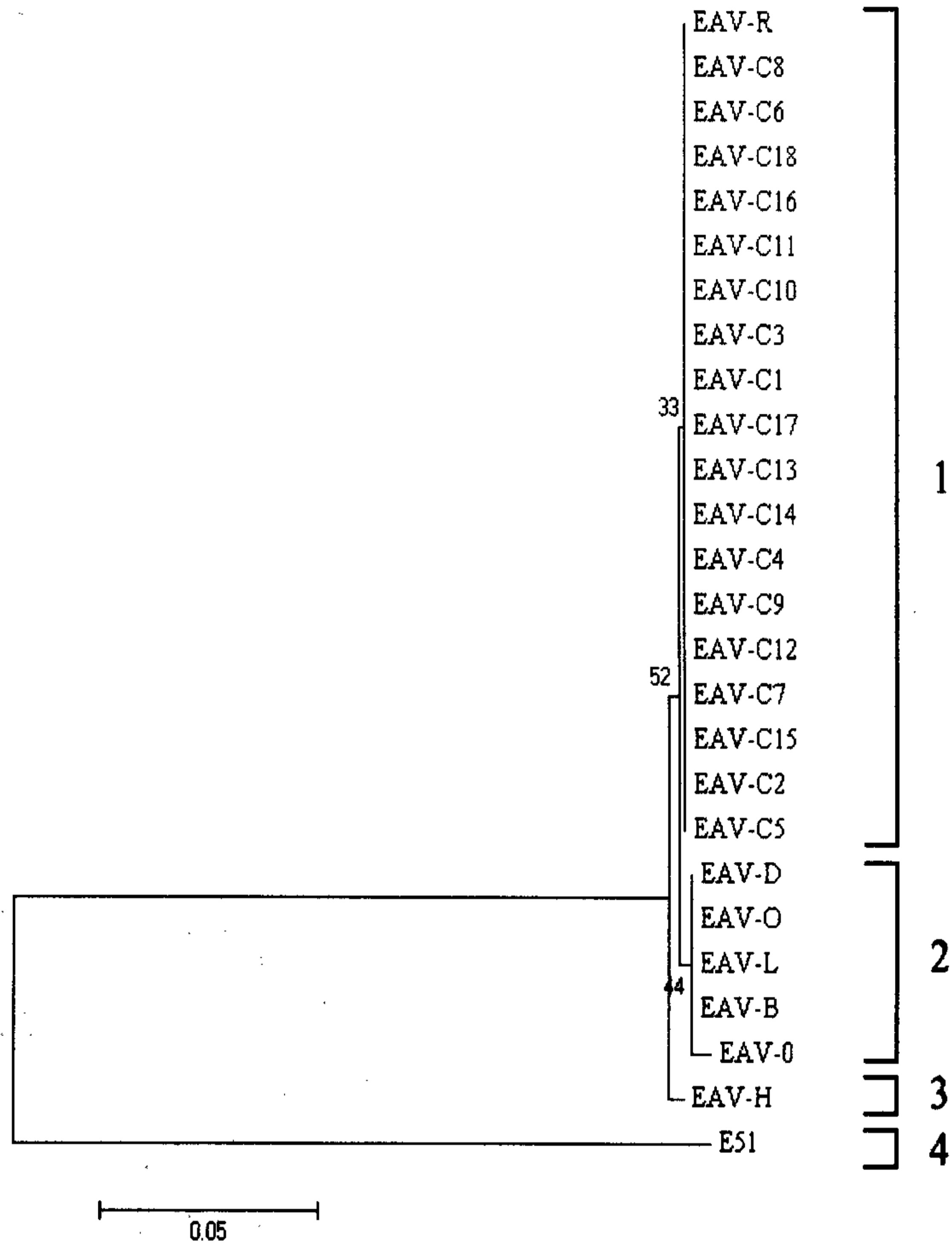


Fig. 2. Phylogenetic tree of (A) nucleotide and (B) amino acid sequences of endogenous EAV avian leukosis/sarcoma viruses made using the neighbor-joining method of Molecular Evolutionary Genetics analysis (MEGA version 3.1). EAV-C1~C18: Cobb. EAV-H: Hubbard. EAV-R: Ross. EAV-O: Ogol. EAV-B: Black. EAV-D: Dark-Brown. EAV-L: Light-Brown. EAV-0 and E51: Prototype of EAV.

나) ART-CH 내인성 레트로바이러스의 분자적 특성

- ▶ ART-CH 내인성 레트로바이러스는 오직 Brown Leghorn chickens에 대해서 보고되어, 그 외의 품종에서의 감염여부와 분자적 특성은 규명되어 있지 않음(Gudkov et al., 1992).
- ▶ 또한 ART-CH는 여러 곳에서 다수의 염기들이 삭제되어 있기 때문에 아미노산을 encoding 하지 않고 있어서, 본 연구에서는 오직 염기서열만 분석하였음.
- ▶ ART-CH의 gag-related nt sequences에 특이적인 primer pair (Table 1)를 이용하여 PCR을 수행한 후 염기서열을 비교한 결과, 국내 육용종 계간에는 98.6% 이상의 높은 상동성을 보였으며, ART-CH clone 5와는 94.0-95.8%를 clone 14와는 91.0-91.8%의 비교적 낮은 상동성을 보였음.
- ▶ 염기서열의 치환과 삭제에 의한 계통학적 분석에서, ART-CHs는 4개의 그룹으로 분류할 수 있었음(Fig. 3).
- ▶ 또한 첫 번째 그룹은 2개의 subgroup으로 세분되었는데, 첫 번째 subgroup은 Cobb, Hubbard, 3개의 국내 토종닭(흑색계, 적색계, 황색계)에서 검출된 ART-CHs가 속해 있었음.
- ▶ 반면에 두 번째 subgroup은 Ross에서 검출된 ART-CH가 속해 있었음.
- ▶ 두 번째 group은 오직 오골계에서 검출된 ART-CH만 속해 있었음.
- ▶ 세 번째와 네 번째 group은 각각 ART-CH clone 5와 14가 각각 속해 있었으며, groups 1과 2와는 계통학적으로 차이가 있음을 알 수 있었음.

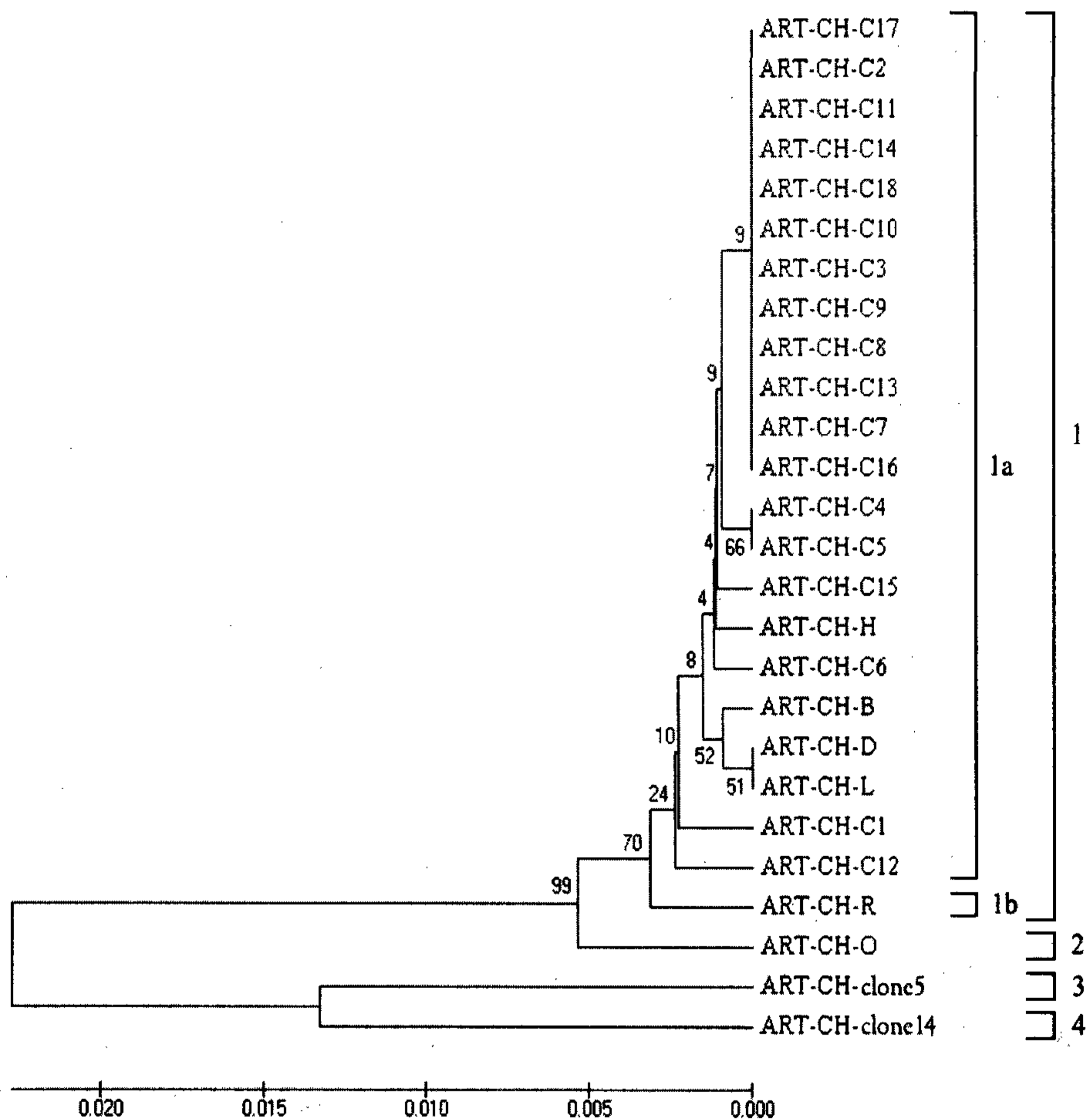
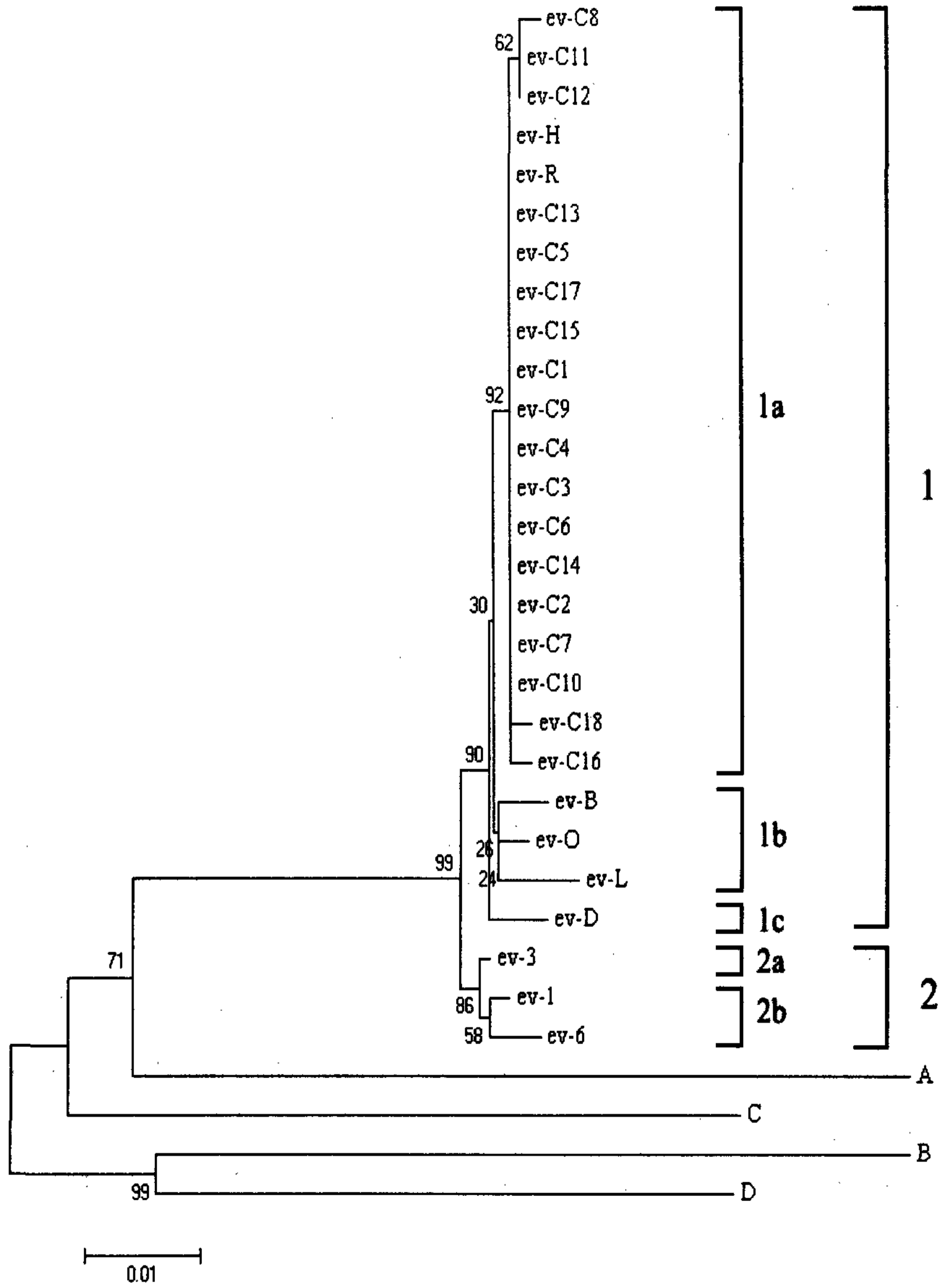


Fig. 3. Phylogenetic tree of nucleotide sequence of endogenous ART-CH element made using the UPGMA method of Molecular Evolutionary Genetics analysis (MEGA version3.1). ART-CH-C1~C18: Cobb. ART-CH-H: Hubbard. ART-CH-R: Ross. ART-CH-O: Ogol. ART-CH-B: Black. ART-CH-D: Dark-Brown. ART-CH-L: Light-Brown. ART-CH-clones 5 and 14: Prototype of ART-CH provirus.

다) ev 내인성 레트로바이러스의 분자적 특성

- ▶ ev 바이러스에 특이적인 primer pair를 제작하여 PCR을 수행한 후 염기서열을 비교하였음(Table 1).
- ▶ 염기서열 치환에 의한 상동성의 차이 검사에서 국내 재래닭에서는 1.2%의 상동성 차이가 적색계와 황색계 사이에서 검출되었으며, 이러한 차이는 2.73%의 아미노산 상동성 차이를 일으켰음.
- ▶ 이러한 염기 및 아미노산 서열의 상동성은 외국에서 보고된 것과 비교하였을 때 조금 증가하는 경향을 보였는데, 즉 ev-1과는 염기서열에서 98.8-99.8%, 아미노산 서열에서는 97.95-99.0%를, ev-3와는 염기서열에서 98.4-98.9%를 아미노산 서열에서는 97.49-98.86%를, ev-6과는 염기서열에서 98.2-98.6%를 아미노산 서열에서는 96.36-97.50%의 차이를 보였음.
- ▶ 다른 내인성 레트로바이러스와 비교하였을 때, ev 내인성 레트로바이러스의 염기 및 아미노산 서열의 상동성은 높은 편이었음.
- ▶ 이러한 염기 및 아미노산 서열의 치환에 의한 계통학적 분석에서, ev 내인성 레트로바이러스는 총 2개의 그룹으로 분류할 수 있었음(Fig. 4A and B).
- ▶ 첫 번째 group은 또한 3개의 subgroup으로 세분되었는데, 첫 번째 subgroup은 18개의 Cobb, 1개의 Ross, 1개의 Hubbard 육용종계에서 검출된 ev 바이러스가 속해 있었음.
- ▶ 두 번째 subgroup은 재래 닭인 흑색계, 오골계, 회색계에서 검출된 것이 속해 있었으며, 세 번째 subgroup은 재래닭인 적색계에서 검출된 ev 바이러스가 속해 있었음.
- ▶ 두 번째 group은 ev-3가 subgroup 2a를 형성하였으며, ev-1과 ev-6가 subgroup 2b를 형성하였음.
- ▶ 이러한 모든 ev 내인성 레트로바이러스는 subgroups A, B, C 및 D 바이러스와는 계통학적으로 거리가 멀었음.

(A)



(B)

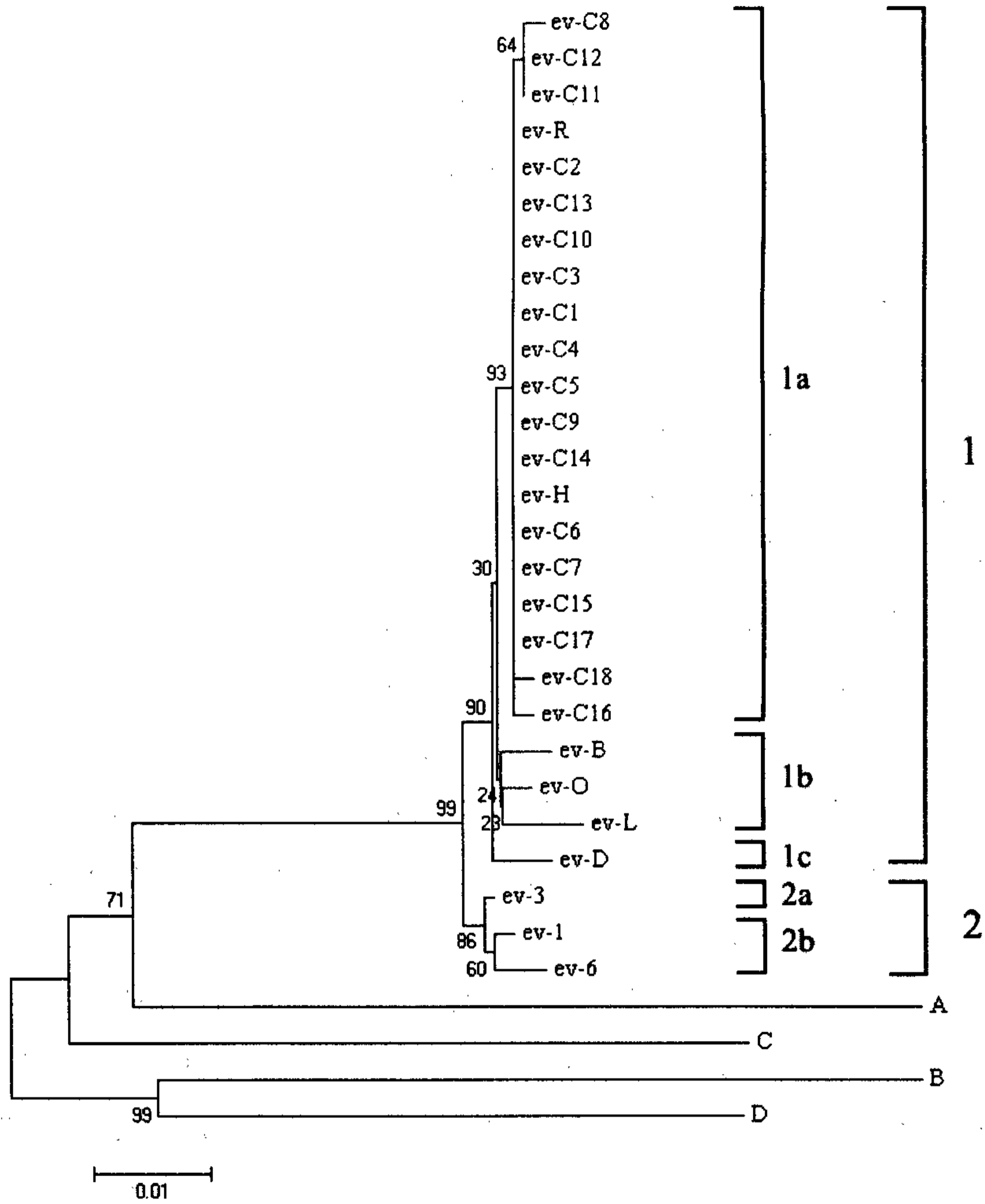
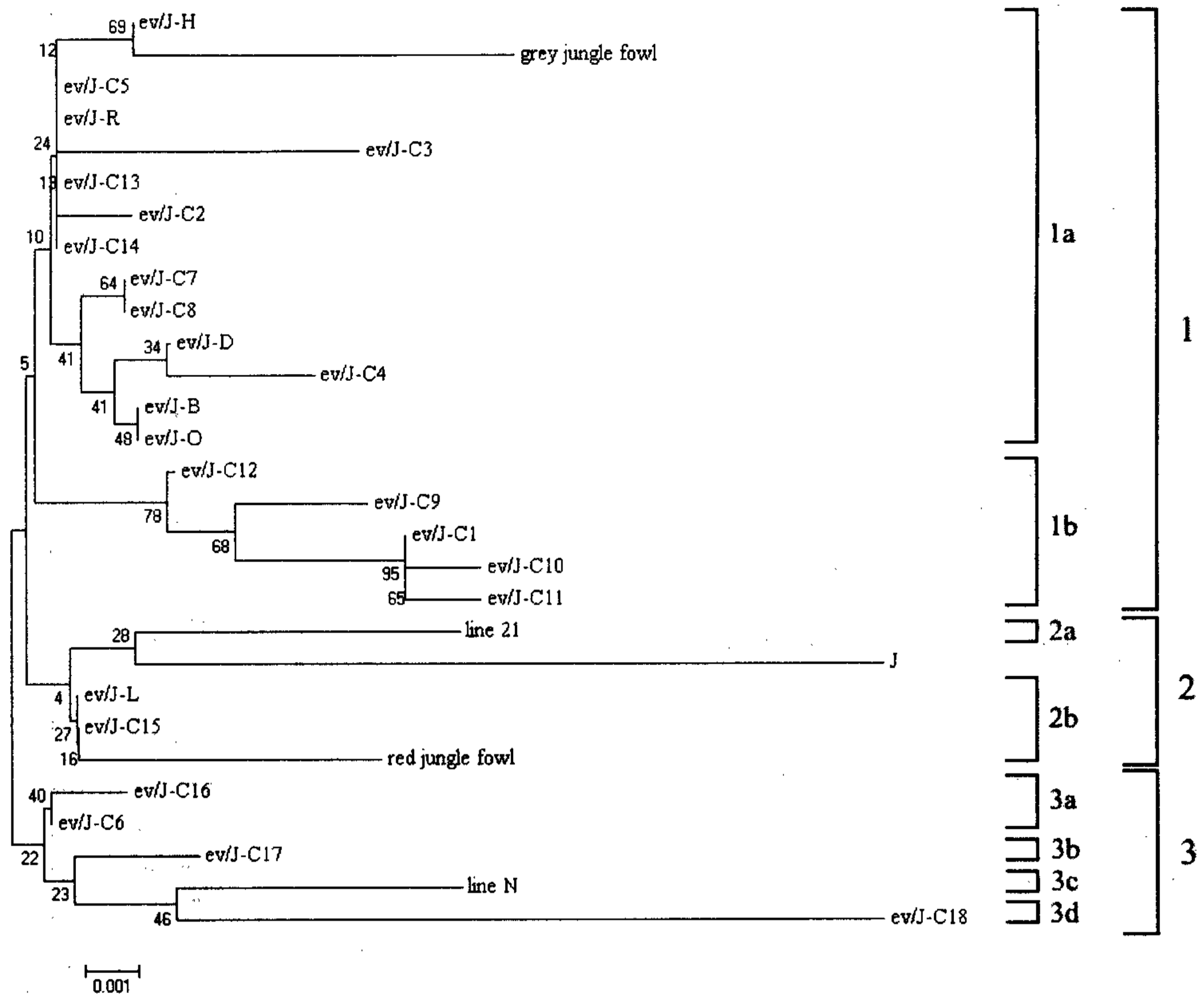


Fig. 4. Phylogenetic tree of (A) nucleotide and (B) amino acid sequence of endogenous ev avian leukosis/sarcoma viruses (ALSVs) made using the neighbor-joining method of Molecular Evolutionary Genetics analysis (MEGA version3.1). ev-C1~C18C: Cobb. ev-H: Hubbard. ev-R: Ross. ev-O: Ogol. ev-B: Black. ev-D: Dark-Brown. ev-L: Light-Brown. A, B, C and D: subgroup A, B, C and D ALSVs.

다) ev/J 내인성 레트로바이러스의 분자적 특성

- ▶ ev/J 내인성 레트로바이러스의 env 유전자 일부분에 대한 primer pair를 제작하여 PCR을 수행한 후(Table 1), 염기 및 아미노산 서열을 비교분석한 결과, 국내 육용계 및 외국 보고주와는 96.8-98.1%의 염기서열 상동성을 보였으며, 아미노산 서열 상동성은 94.63-96.98%를 보였음.
- ▶ 비록 ev/J 내인성 레트로바이러스간에 높은 염기 및 아미노산 서열의 상동성을 보였지만, 계통학적으로는 3개의 그룹으로 분류할 수 있었음(Fig. 5A and B).
- ▶ 첫 번째 그룹은 다시 두 개의 subgroup으로 분류할 수 있었는데, 첫 번째 subgroup은 Hubbard (ev/J-H), grey jungle fowl, Cobb (ev/J-C2~5, 7, 8, 13, 14), Ross (ev/J-R) 및 재래닭 흑색계 (ev/J~B), 오골계 (ev/J-O), 적색계 (ev/J-D)가 속해 있었음.
- ▶ 반면에 두 번째 subgroup에는 Cobb (ev/J-C1, 9~12)가 속해 있었음.
- ▶ 두 번째 group도 2개의 subgroup으로 세분되었는데, 첫 번째 subgroup에는 line 21 닭이 속해있었고, 두 번째 subgroup에는 Cobb (ev/J-C15), 재래닭 황색계((ev/J-L), 그리고 red jungle fowl이 속해있었음.
- ▶ 계통학적으로 group 2에 속해있는 ev/J 바이러스들이 subgroup J 백혈병/육종 바이러스와 가장 가까운 사이에 있었음.
- ▶ 세 번째 group은 다시 4개의 subgroup으로 분류할 수 있었음.
- ▶ 첫 번째 subgroup은 일부 Cobb (ev/J-C6, C16)가 속해 있었고, 두 번째 subgroup에는 하나의 Cobb (ev/J-C17)가, 세 번째 subgroup에는 line N 닭이, 네 번째 subgroup에는 Cobb (ev/J-C18)이 속해 있었음.

(A)



(B)

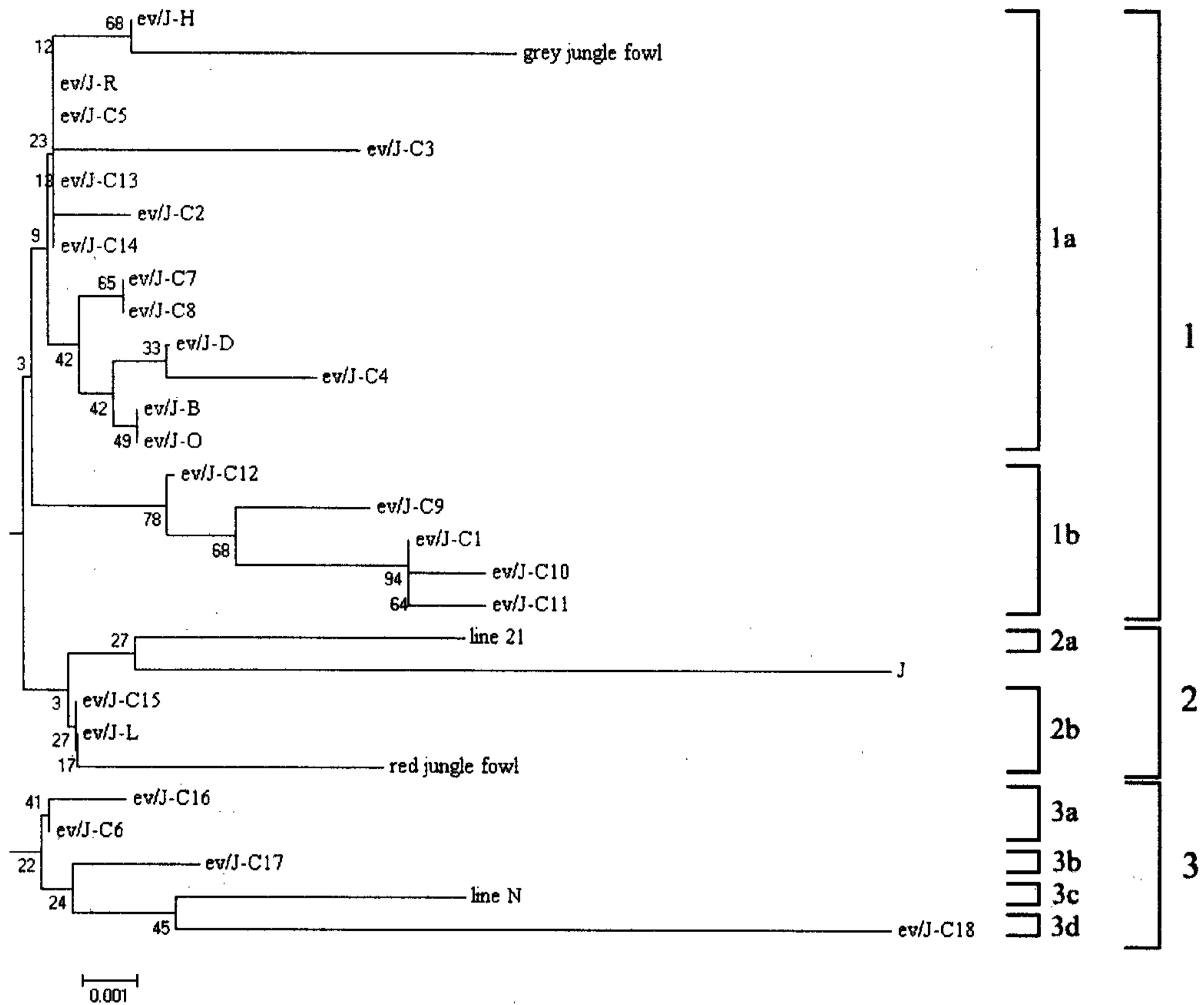


Fig. 5. Phylogenetic tree of (A) nucleotide and (B) amino acid sequence of endogenous ev/J avian leukosis/sarcoma viruses (ALSVs) made using the neighbor-joining method of Molecular Evolutionary Genetics analysis (MEGA version3.1). ev/J-C1~C18: Cobb. ev/J-H: Hubbard. ev/J-R: Ross. ev/J-O: Ogol. ev/J-B: Black. ev/J-D: Dark-Brown. ev/J-L: Light-Brown. J: subgroup J ALSVs. Green jungle fowl, red jungle fowl, line 21 and line N: ev/J proviruses of each bird.

나. 제1협동과제: 국내 주요 육용종계 및 재래닭 종란에서 닭 백혈병/육종 바이러스 검출 및 내인성 바이러스의 분자유전자학적 분석과 마력병 바이러스 분리주의 SPF 닭의 실험접종

1) 국내 닭 백혈병/육종 그룹 종양과 마력병의 발병실태조사

- ▶ 국내 마력병 및 닭 백혈병/육종 그룹 종양성 질병의 발병실태를 2005년 4월부터 2006년 4월까지 검사한 결과 마력병은 총 1663건의 의뢰건 중에서 41건이 검출되었음(Table 2).
- ▶ 마력병의 발생경향을 월별로 살펴보면 특이한 호발경향은 없고 연중 골고루 발생하는 것이 관찰되었음.
- ▶ 마력병의 발생빈도는 닭 질병 중에서는 6위에 해당하였지만, 바이러스성 질병만을 살펴보았을 때에는 가장 호발 하는 무서운 질병이었음.
- ▶ 국내 양계장에서 닭 백혈병/육종 그룹의 종양성 질병을 검사한 결과 닭 백혈병/육종 그룹 종양은 관찰되지 않았음.
- ▶ 하지만 상술한 바와 같이 내인성 레트로바이러스인 ART-CH, ev, EVA, ev/J subgroup E virus를 3개 육용계 품종을 기르는 41개 농장에서 관찰할 수 있었음(3-5항 참조).
- ▶ 또한 국내 모 대학교의 SPF White Leghorn 종란과 외국에서 수입한 SPF 종란에서도 이러한 내인성 레트로바이러스를 검출할 수 있었음(3-5항 참조).

Table 2. The prevalence of chicken diseases in Korea during April 2005 to April 2006

| Diseases | Year | 2005 | | | | | | | | | | 2006 | | | | Total |
|--------------------------------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|------|-----|-----|-------|-------|
| | | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 1 | 2 | 3 | 4 | | |
| Colibacillosis | | 41 | 52 | 39 | 38 | 31 | 31 | 39 | 25 | 32 | 30 | 38 | 58 | 53 | 507 | |
| Coccidiosis | | 12 | 3 | 11 | 17 | 10 | 4 | 11 | 5 | 1 | 4 | 4 | 5 | 14 | 101 | |
| Fowl typhoid | | 8 | 9 | 14 | 19 | 13 | 11 | 4 | 4 | 3 | 2 | 3 | 8 | 2 | 100 | |
| Salmonellosis | | 12 | 5 | 5 | 2 | 6 | 2 | 7 | 3 | 8 | 5 | 5 | 9 | 11 | 80 | |
| Staphylococcosis | | 2 | 2 | 14 | 4 | 5 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 5 | 5 | 3 | 56 | |
| Paratyphoid | | 5 | 1 | 4 | 3 | 9 | 3 | 5 | 3 | 3 | 2 | 0 | 1 | 2 | 41 | |
| Marek's disease (MD) | | 1 | 7 | 2 | 2 | 6 | 3 | 0 | 7 | 3 | 3 | 0 | 2 | 5 | 41 | |
| Newcastle disease | | 7 | 2 | 3 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 8 | 0 | 2 | 27 | |
| Inclusion body hepatitis (IBH) | | 3 | 2 | 3 | 5 | 3 | 0 | 1 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 0 | 27 | |
| IBD | | 3 | 3 | 0 | 7 | 2 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 22 | |
| IB | | 1 | 3 | 7 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 3 | 1 | 20 | |
| Streptococcosis | | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 3 | 3 | 0 | 1 | 13 | |
| Chicken infectious anemia | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 2 | 3 | 1 | 0 | 2 | 12 | |
| AI (LPAI) | | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 10 | |
| Others | | 25 | 59 | 67 | 64 | 27 | 42 | 30 | 46 | 30 | 30 | 55 | 64 | 67 | 606 | |
| Total | | 122 | 150 | 170 | 166 | 116 | 106 | 101 | 105 | 89 | 91 | 125 | 157 | 165 | 1,663 | |

2) DNA chip 진단법 확립을 위한 마렉병 바이러스 분리주를 닭에 실험접종 후 제1세부과제에 재료제공

가) 실험에 사용할 닭의 안전성 검사

- ▶ 닭에 종양을 유발하는 레트로바이러스에 특이적인 혹은 내인성 레트로바이러스에 특이적인 primer를 이용하여 내인성 혹은 난계대 감염된 레트로바이러스 감염 여부를 각각의 바이러스들에 대한 특이적인 primer pair를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 오직 내인성 레트로바이러스만 검출되었음.
- ▶ SPF 닭에 자연 감염된 마렉병 바이러스 감염 여부를 마렉병 바이러스에 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 어떤 양성반응도 검출되지 않았음.

나) 실험용 닭에 각각의 바이러스 실험접종

- ▶ MDV 표준주인 혈청형 1 강독주 Md5, 혈청형 2 MDV인 HPRS-24, 혈청형 3 MDV인 HVT, MDV 야외 분리주인 29-1를 바이러스 한 주당 1주령 병아리 30마리에 각각 복강으로 10^4 PFU/0.2 ml씩 투여하였음.
- ▶ 백혈병/육종 바이러스 내의 subgroup A, B, C, D 표준주인 RAV-1, RAV-2, RAV-49, RAV-50 주를 바이러스 한 주당 1주령 병아리 30마리에 복강 내에 0.2 ml씩 투여하였음.
- ▶ 또한 마렉병 강독주와 백혈병/육종 바이러스를 1주령 병아리 30마리에 각각 2개주씩 상술한 바이러스 용량으로 복강 내에 접종하였음.
- ▶ 바이러스를 접종 후 10주령까지 임상증상 등을 관찰하였음.
- ▶ 그 결과 강독주인 Md5와 야외 MDV 분리주인 29-1과 마렉병 강독주와 백혈병/육종 바이러스를 각각 혹은 동시에 접종한 실험용 닭에서 접종 후 1일 후에 침울 소견을 보였음.
- ▶ 하지만 어떠한 증례에서도 육안적인 종양은 관찰되지 않았음.
- ▶ 이러한 강독주 MDV를 접종한 닭에서 접종 후 1주령부터 10주령 때까지, 각각의 장기 및 조직을 채취하여 조직학적으로 관찰한 결과, F낭과 흉선은 접종 2주령부터 위축이 관찰되어, 지속적으로 위축소견이 관찰되었으며, 간, 비장, 폐 등의 장기에서는 접종 3주령 이후부터 혈관 주위에 마렉병의 전형적인 조직소견인 다양한 크기의 림프구의 증식이 관찰되

었지만, 혈청형 2 및 3 마력병 바이러스를 접종한 닭에서는 어떠한 조직학적 병변도 관찰되지 않았음.

- ▶ 또한 각각의 백혈병/육종 바이러스를 접종한 실험용 닭에서도 특이적인 병변은 관찰되지 않았음.
- ▶ MDV 및 백혈병/육종 바이러스를 각각 접종 후 매주 3마리씩 혈액을 채취한 후, 비장, 흉선, F낭, 신장을 채취하여 PCR로 바이러스의 존재 여부를 검사하였음.
- ▶ 그 결과 MDV는 지속적으로 신장, 비장, 흉선, F낭에서 관찰되었음(Fig. 6).
- ▶ 또한 백혈병/육종 바이러스 내의 subgroup A, B, C, D 표준주를 접종한 증례에서도 접종 후 1주까지는 PCR에 의해서 양성의 반응을 확인할 수 있었음.
- ▶ 따라서 채취한 조직을 DNA chip에 사용하기 위해 제1세부과제 연구팀에 제공하였음.

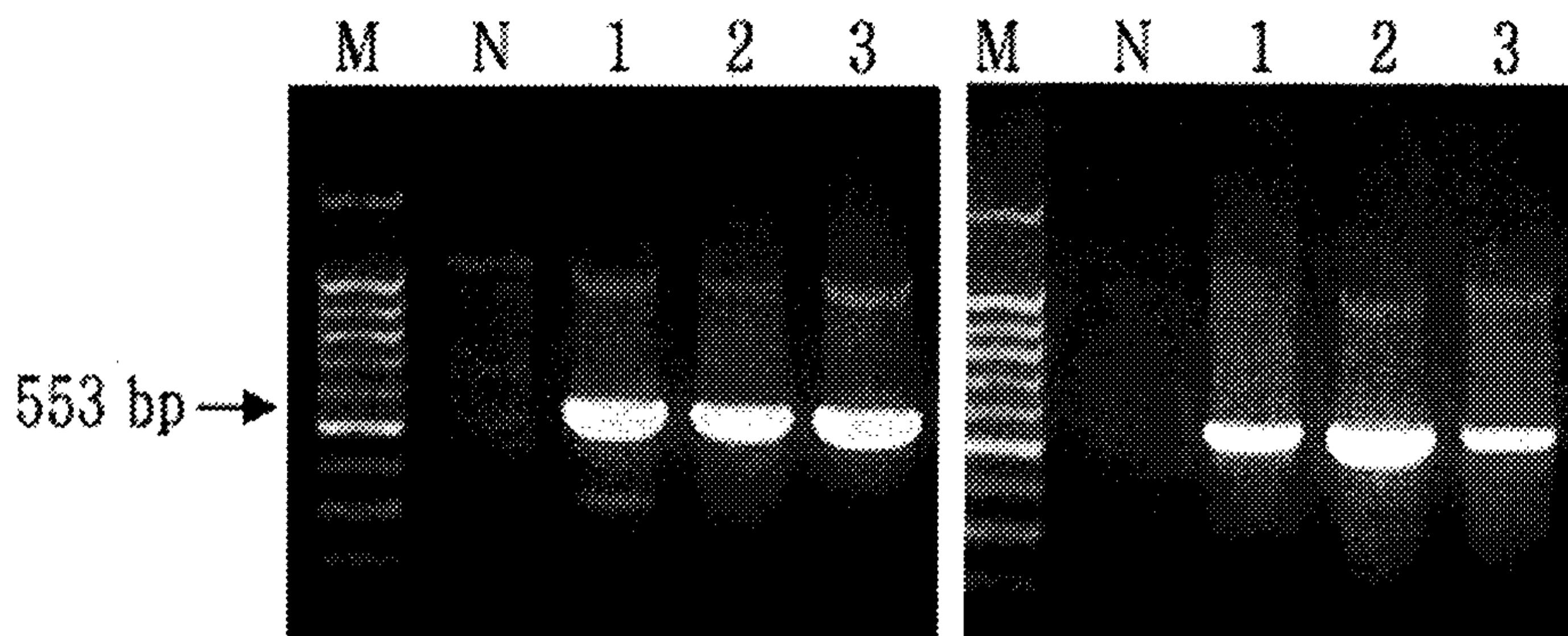


Fig. 6. Representative PCR results for the detection of a part of Marek's disease virus pol gene in the chickens inoculated with the Md5 (left panel) and field Marek's disease virus strain, 29-1, respectively. M = 100 bp marker, lane N = a kidney sampled from mock-inoculated chicken, lane 1 = a kidney sampled at 1 week post inoculation (wpi) from a chicken inoculated with Md5 strain (left panel) and 29-1 (right panel), lane 2 = a kidney sampled at 3 wpi from a chicken inoculated with Md5 (left panel) and 29-1 (right panel) strains, lane 3 = a kidney sampled at 9 wpi from a chicken inoculated with Md5 (left panel) and 29-1 (right panel) strains.

3) 국내 주요 육용종계 및 재래 닭 종란에서 닭 백혈병/육종 바이러스 검출

- ▶ 국내에서 주로 사육중인 육용종계인 Cobb 종란, Ross 종란, Hubbard 유정 종란 및 국내 재래닭인 오골계 종란, 흑색계, 적색계, 황색계 유정 종란을 대상으로 외인성 레트로바이러스에 특이적인 primer pairs (Table 3)를 이용하여 PCR을 수행하였음.
- ▶ 그 결과 양성의 반응은 오직 외인성 레트로바이러스 표준주인 RAV-1 (subgroup A), RAV-2 (subgroup B), RAV-49 (subgroup C), RAV-50 (subgroup D), HPRS-103 (subgroup J)에서만 검출되었으며, 국내 육용종계 및 재래닭의 유정 종란에서는 검출되지 않았음.
- ▶ 따라서 국내에서 막대한 경제적 피해를 유발한 subgroup J 바이러스의 발생 이후, 각각의 농가에서 시행한 양성계 퇴치 운동이 효과가 있었음을 알 수 있었음.

4) 국내 주요 육용종계 및 재래 닭 종란에서 내인성 레트로바이러스 검출

- ▶ 내인성 닭 백혈병/육종 바이러스로는 EAV, ev, ev/J 및 ART-CH가 알려져 있음.
- ▶ 이러한 내인성 바이러스들에 특이적인 primer pairs (Table 2)를 이용하여 각각의 유정 종란에 대하여 PCR을 수행한 결과 모두 양성 반응을 확인할 수 있었음(Fig. 7).

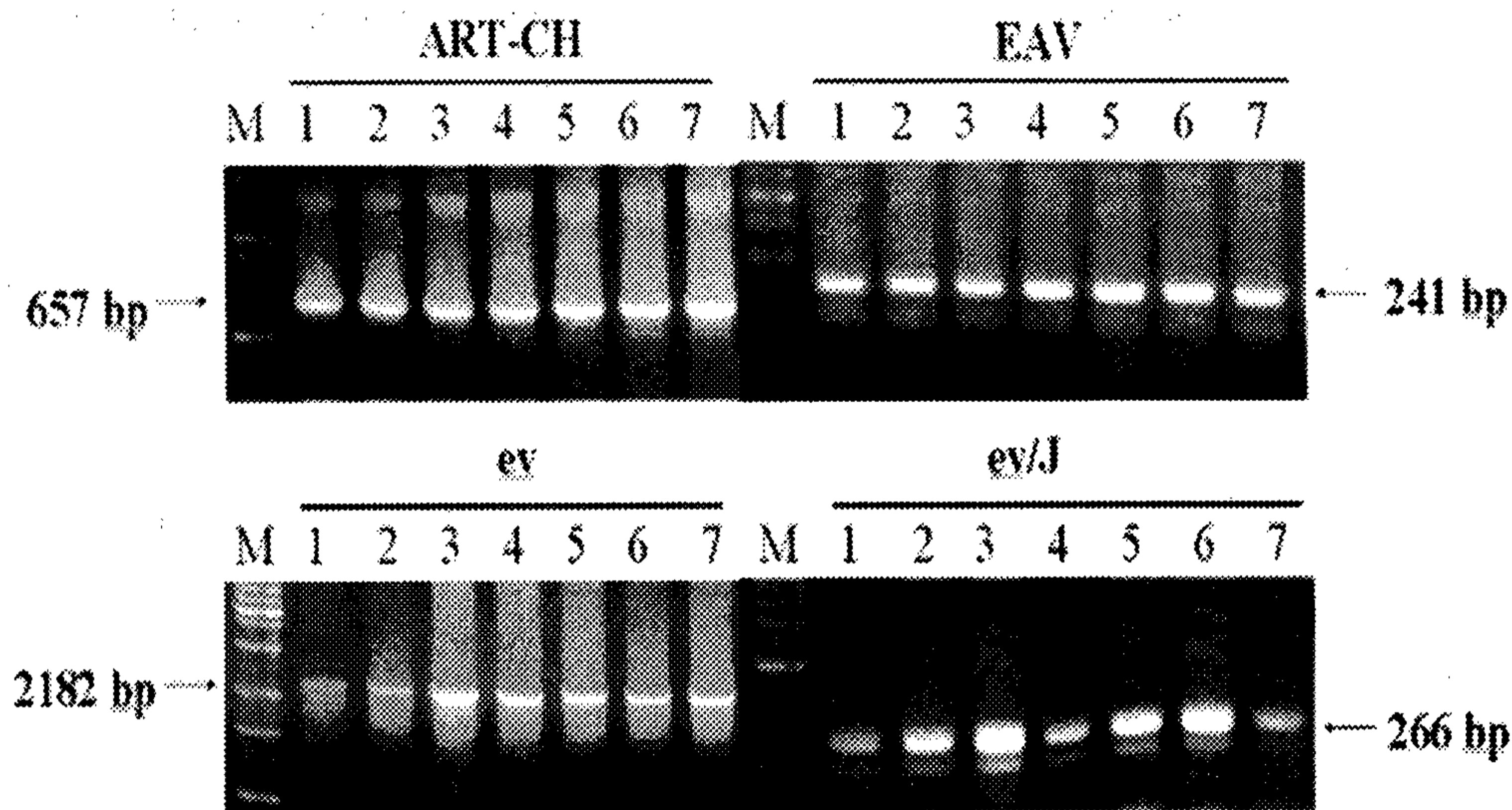


Fig. 7. Representative PCR results for the detection of the ART-CH, EAV, ev and ev/J proviruses of subgroup E avian leukosis/sarcoma virus in the embryonated eggs from three broiler chickens (Cobb, Ross and Hubbard) and four Korean native chickens (Ogol, Black, Dark-Brown and Light-Brown). M: 100 bp marker. Lane 1: Cobb. Lane 2: Ross. Lane 3: Hubbard. Lane 4: Ogol. Lane 5: Black. Lane 6: Dark-Brown. Lane 7: Light-Brown.

Table 3. Sequence of oligonucleotide primers used for the detection of avian leukosis/sarcoma group viruses in the fertile eggs

| Subgroups | Target genes | Sequence (5'→3') | Region | Source or references |
|-----------|--------------------|---|-----------|--|
| A | env | F: GGATGAGGTGACTAAGAAAG R: GAACCCCTTGTGGTCTGAAA | 5026-5652 | Smith et al., 1999 This study |
| B | env | F: GGATGAGGTGACTAAGAAAG R: TGTTCCCTGGGTCGGTCAGA | 5053-5742 | Smith et al., 1999 This study |
| C | env | F: GGATGAGGTGACTAAGAAAG R: GGTGGAGGTAAAGGGGTGAC | 5267-5964 | Smith et al., 1999 This study |
| D | env | F: GGATGAGGTGACTAAGAAAG R: ATCAGGGGGGTTGGTTAAGA | 5020-5711 | Smith et al., 1999 This study |
| J | env | F: GGATGAGGTGACTAAGAAAG R: CGAACCAAAGGTAACACACG | 5258-5802 | Smith et al., 1999 Smith et al., 1999 |
| EAV | TM and LTR | F: GATGTGAGGATGTCGAAGG R: ACAAAGCATGGAAGACAGA | 1554-1794 | Tsang et al., 1999 This study |
| ART-CH | gag-related region | F: CTCAAGGTGGCTCATTTAAC R: ACAAAGCATGGAAGACAGA | 2006-2662 | This study This study |
| ev | env | F: GGATGAGGTGACTAAGAAAG R: CATAGCTTCGTCTACGCCCATAT | 5209-7390 | Smith et al., 1999 Lupiani et al., 2000 |
| ev/J | env | F: ACACCATTGGTGGCGCGTGTC R: CGAACCAAAGGTAACACACG | 2435-2700 | Ruis et al., 1999 Smith et al., 1999 |

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

| 세부과제 및 주요내용 | 연도 | 2003년도 (1차년도) | 2004년 (2차년도) | 2005년 (3차년도) |
|----------------|--|------------------|-----------------|-----------------|
| | 제1세부과제 <ul style="list-style-type: none"> ■ 백혈병/육종 그룹 바이러스들과 마력 병 바이러스에 대해 국내외적인 발생 조사 및 선발 ■ 선발된 바이러스 주의 유전자 서열 비교·분석 및 특이부위 선정 ■ 감별이 필요한 다른 원인체와의 상동성 여부 검사 ■ 대상 바이러스의 표준주 확보 ■ 각각의 표준주에 대한 PCR 수행 ■ 선발된 유전자의 DNA chip 개발에 대한 응용성 검토 ■ 각 바이러스에 대한 oligonucleotide chip 검증 ■ Oligonucleotide chip의 표준주 및 야외 분리주에 응용 ■ 특이도 자료를 바탕으로 감별진단에 필요한 다른 병원체와의 실제 특이도 검사 ■ 실험접종한 닭에서 채취한 재료를 이용한 DNA chip의 응용 ■ 기존 진단기법인 PCR 결과와 진단의 정확성 비교 | | | |

(전장에 이어 계속)

| 세부과제 및 주요내용 | 연도 | 2003년도 (1차년도) | 2004년 (2차년도) | 2005년 (3차년도) |
|----------------|--|------------------|-----------------|-----------------|
| | <p>■ 국내 주요 육용종계 및 재래 닭 종란에서 내인성 레트로바이러스의 검출 및 분자적 특성 규명</p> <p>제1협동과제</p> <p>■ 국내 닭 백혈병/육종 그룹 종양과 마렉병의 발병실태조사</p> <p>■ 국내 닭 백혈병/육종 그룹과 마렉병의 종양조직 채취</p> <p>■ 채취한 각각의 증례에서 종양병변의 분류</p> <p>■ 야외발생주의 분리·동정</p> <p>■ DNA chip 진단법 확립을 위한 마렉병 바이러스 및 닭 백혈병/육종 그룹 바이러스들의 닭에 실험접종</p> <p>■ 국내 주요 육용종계 및 재래 닭 종란에서 닭 백혈병/육종 바이러스 검출</p> <p>■ 국내 주요 육용종계 및 재래 닭 종란에서 내인성 레트로바이러스 검출</p> | | | |

계획: _____

성과:

제 1 절 제1세부과제 연구목표 달성도

- ▣ 백혈병/육종 그룹 바이러스들과 마력병 바이러스에 대해 국내외적인 발생 조사 및 선발
 - 국내는 물론 전 세계적인 마력병 및 백혈병 육종 그룹 바이러스들에 의한 발병실태조사 및 바이러스의 선발을 성공적으로 완수하였음.
- ▣ 선발된 바이러스 주의 유전자 서열 비교·분석 및 특이부위 선정
 - 선발된 바이러스 주의 유전자 서열 비교·분석과 특이부위 선정을 성공적으로 완수하였음.
- ▣ 감별이 필요한 다른 원인체와의 상동성 여부 검사
 - 감별이 필요한 바이러스성 질환 등의 상동성 여부를 검사한 결과 본 연구에서 확보한 염기서열이 마력병 바이러스와 닭 백혈병/육종 그룹 바이러스들에 각각 특이적임을 확인하였음.
- ▣ 대상 바이러스의 표준주 확보
 - 혈청형 1-3까지 마력병 바이러스 표준주와 닭 백혈병/육종 그룹의 subgroups A-D 및 J 바이러스 표준주를 각각 분양받았음.
- ▣ 각각의 표준주에 대한 PCR 수행
 - 구입한 각각의 표준주들에 대한 본 연구에서 개발한 각각의 바이러스에 특이적인 primer pair를 이용하여 PCR을 수행한 결과 성공적으로 증폭되어, 본 연구에서 개발한 primer pair가 특이적임을 알 수 있었고, 분양받은 바이러스들도 본 실험에 사용할 수 있음을 알 수 있었음.
- ▣ 선발된 유전자의 DNA chip 개발에 대한 응용성 검토
 - 선발된 유전자들을 dot blotting을 수행하여 검사한 결과, 각각의 바이러스들에 특이적임을 알 수 있어서, DNA chip에 응용할 수 있음을 알 수 있었음.
- ▣ 각 바이러스에 대한 oligonucleotide chip 검증
 - 마력병 바이러스 및 닭 백혈병/육종 그룹 바이러스들을 증폭하기 위해 multiplex PCR 기법이 가장 우수하다는 것을 알 수 있었음.
- ▣ Oligonucleotide chip의 표준주 및 야외 분리주에 응용
 - Multiplex PCR 기법에 의해 표준주 및 야외 분리주를 이용하여 각각 증폭

산물을 제작한 후, 본 연구에서 개발한 oligonucleotide chip에 응용한 결과 각각의 바이러스에 특이적인 양성 반응을 확인하여, 본 연구에 의해 개발된 DNA chip이 상술한 바이러스 검출에 유용함을 알 수 있었음.

▣ 특이도 자료를 바탕으로 감별진단에 필요한 다른 병원체와의 실제 특이도 검사

- 감별진단에 필요한 병원체를 검색한 결과, 마렉병과 닭 백혈병/육종 그룹 바이러스들 외에는 없었음.

▣ 실험 접종한 닭에서 채취한 재료를 이용한 DNA chip의 응용

- 각각의 바이러스의 단독 혹은 혼합감염 시킨 닭에서 채취한 재료에서 DNA를 추출한 후, multiplex PCR을 수행하여 DNA chip에 응용한 결과 진단의 정확성을 확인할 수 있었음.

▣ 기존 진단기법인 PCR 결과와 진단의 정확성 비교

- 본 연구를 통해 개발한 DNA chip 진단법과 통상적으로 자주 사용되고 있는 PCR 진단법과의 진단의 정확성을 비교한 결과 DNA chip 진단법이 우수하다는 것을 알 수 있었음.

▣ 국내 주요 육용종계 및 재래 닭 종란에서 내인성 레트로바이러스의 분자적 특성 규명

- 국내 주요 육용종계 및 재래 닭 종란에서 내인성 레트로바이러스의 검출 및 분자적 특성을 성공적으로 규명하였음.

제 2 절 제1협동과제 연구목표 달성도

▣ 국내 닭 백혈병/육종 그룹 종양과 마렉병의 발병실태조사

- 전국적인 규모로 닭 백혈병/육종 그룹 종양과 마렉병의 발병실태 조사를 성공적으로 완수하였음.

▣ 국내 닭 백혈병/육종 그룹과 마렉병의 종양조직 채취

- 전국적인 규모로 재료를 성공적으로 채취하였음.

▣ 채취한 각각의 증례에서 종양병변의 분류

- 채취한 각각의 종양병변을 병리조직학적, 면역조직학적, 분자생물학적 방법 등에 의해서 성공적으로 분류하였음.

▣ 야외발생주의 분리·동정

- 특히 마렉병 바이러스를 야외 닭에서 분리하였으며, 성공적으로 동정하였음.

▣ DNA chip 진단법 확립을 위한 마렉병 바이러스 및 닭 백혈병/육종 그룹 바이러스들의 닭에 실험접종

- 마렉병 바이러스 및 닭 백혈병/육종 그룹 바이러스들을 실험용 닭에 접종하여 병변의 발병유무, 바이러스 검출 등을 성공적으로 수행하였으며, 채취한 재료를 제1세부과제에 제공하였음.

▣ 국내 주요 육용종계 및 재래 닭 종란에서 외인성 닭 백혈병/육종 바이러스 검출

- 닭 백혈병/육종 그룹의 외인성 바이러스들의 국내 주요 육용종계 및 재래 닭 종란에서 검출을 시도한 결과 모두 음성이었음을 확인하였음.

▣ 국내 주요 육용종계 및 재래 닭 종란에서 내인성 레트로바이러스 검출

- 닭 백혈병/육종 그룹의 내인성 바이러스들의 국내 주요 육용종계 및 재래 닭 종란에서 검출을 시도한 결과 모두 양성이었음을 확인하였음.

제 3 절 관련분야에의 기여도

육류의 소비가에서 가축의 질병 부분에 해당되는 비용이 선진국에서도 17%이며, 개발도상국의 경우에는 34%에 이른다고 한다. 또한 마렉병과 닭 백혈병/육종 그룹에 의한 종양성 질병이 국내는 물론 전 세계적으로 양계산업을 위협하고 있다. 따라서 본 연구를 통해 개발한 DNA chip의 진단 기법은 닭의 바이러스성 종양성 질병의 신속·정확한 진단이 가능하게 하여 예방대책의 확립 및 방역대책의 조기 수립이 가능함으로써 육류의 고급화 및 생산성을 향상시킬 수 있다. 또한 이러한 질환의 치료비 손실 및 인력낭비 등을 절감할 수 있어서 이러한 경제적 효과는 실로 막대하다 할 수 있음

이러한 예방대책의 확립 및 방역대책의 조기 수립을 통하여 무병동물의 생산으로 질 높은 육류 및 계란의 생산이 가능하게 되어 위생적이고 안전한 육류 및 계란의 생산으로 국내 소비를 늘릴 수 있으며, 국제적으로 가격 경쟁력을 확보할 수 있어서 수출시장을 더욱 넓힐 수 있다고 생각한다.

최근 활발히 사용되고 있는 PCR 기법 등을 포함한 분자생물학적 방법과 혈

정확적 방법 등 기존의 방법에 비교하면, 진단의 정확성이 향상된 것은 사실이지만 다양한 원인체를 동시에 정확하게 진단하는 데는 한계점이 있다. 본 연구를 통해 만들어지게 될 DNA chip은 세계 최첨단의 진단법으로 한꺼번에 마렉병 바이러스 혈청형 1, 2, 3 바이러스들 및 닭 백혈병/육종 subgroups A, B, C, D, E, J 바이러스까지 동시에 진단할 수 있는 획기적인 방법이라 할 수 있다.

따라서 본 기술의 지속적인 발전을 통해 이에 연관된 제반 국내 기술을 향상할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 본 기술을 바탕으로 지속적인 기술개발을 통해 여러 기자재와 다양한 시약 등의 국내 생산을 유도할 수 있다고 사료된다. 결과적으로 본 진단기법의 각 연구소나 유사 관련기관에 보급함으로써 조기 방역체계 확립이 기대되며, 타 전염성 질병의 현장 진단 기술에 응용이 가능하며, 전문 기술 인력의 확보와 이러한 기법의 산업적 적용이 가능하게 될 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가연구의 필요성 및 타연구에의 응용

- ▣ 본 연구를 진행하는 동안 방문한 양계장에서 마렉병 발생이 거의 모든 농가에서 관찰되었다. 이러한 양계농가는 모두 마렉병 바이러스에 대하여 백신을 투여하고 있으나, 마렉병이 발생하고 있음을 알 수 있다. 따라서 향후에는 마렉병 백신 프로그램의 재조정이나 새로운 차원의 마렉병 바이러스 백신을 개발하여야 할 것이다.
- ▣ 국내에서 가장 많이 사육하고 있는 육용계 종란장 및 재래 닭의 유정란에서 닭 백혈병/육종 그룹의 subgroups A, B, C, D 및 J 바이러스는 검출되지 않아, 종란을 통한 이러한 바이러스의 난계대 감염은 훌륭히 방제되고 있음을 알 수 있었다. 하지만 지금까지 알려진 모든 내인성 레트로바이러스의 감염이 국내 육용계 및 재래 닭에서 검출되었다. 내인성 레트로바이러스의 문제점은 새로운 강독형 바이러스의 출현을 일으킬 수 있다는 것이다. 좋은 예가 국내는 물론 전 세계적으로 발생하여 막대한 경제적 피해를 유발한 J 바이러스가 대표적이다. 따라서 향후 연구에서는 이러한 내인성 레트로바이러스 유전자를 유정란에서 제거하여 안전한 종계를 만드는 것이 필요할 것이다.
- ▣ 본 연구에서 개발한 DNA chip 진단기법은 세계 최첨단의 진단법으로, 이러한 기법을 국립수의과학검역원, 각 시도의 축산기술개발 연구소 및 기업의 진단기관에 전수하여 마렉병 바이러스 혈청형 1, 2, 3 바이러스들과 닭 백혈병/육종 subgroups A, B, C, D, E, J 바이러스 감별진단에 활용하도록 한다.
 - ▶ 각 기관에서 발생하는 인력 및 시간적 낭비를 최소화시키고 합리화시켜 다른 중요 가축질병의 예방, 방역 및 진단에 더욱 더 많은 효과를 가져 올 수 있도록 할 것임
 - ▶ 본 연구에서 개발한 기법을 쉽고 간편하게 임상에서 적용하도록 하여 질병을 예방하고 방제하는 감시인원의 비능률적인 단면들을 개선하여 인건비의 감소와 더불어 더욱 적극적이고 체계적인 방역활동을 수립할

수 있도록 함

- ▶ 궁극적으로 축산업의 국제 경쟁력이 조성될 것임
- ▣ 본 연구과제를 통해 개발된 진단 기법에 대한 노하우 활용
 - ▶ 동물의 전염성 질환에 대한 DNA chip 진단기법의 개발은 전 세계적으로 미미한 수준 임
 - ▶ 따라서 본 연구를 통해 획득한 DNA chip 진단기법에 대한 노하우는 다른 동물 질병의 진단법 개발에 바로 활용할 수 있음
 - ▶ 분자생물학적 연구의 유용한 자료로서 활용될 수 있으며 국내 진단업계의 수준을 향상시키는데 이바지 할 수 있음

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- ▣ Baigent et al. (2006)은 bacterial artificial chromosome (BAC) clones에 재조합시킨 HVT를 닭에 접종한 후, 강독주 마렉병 바이러스주인 RB-1B를 공격접종하였을 때, 100% 예방이 되었다고 한다. 따라서 향후에 국내에서도 BAC 기술을 이용한 백신의 개발도 수행되어야 할 것으로 사료된다.
- ▣ 마렉병 바이러스의 종양원성 유전자는 meq gene으로 알려져 있다. 하지만 meq gene에 의해서 어떻게 종양이 발생하는지는 확실히 규명되어 있지 않았는데, Brown et al. (2006)에 의하면 MEQ 단백질은 세포 내에서 분화, 증식, 아포토시스의 전사 공통억제인자인 C-terminal-binding protein과 결합함으로써 종양이 발생한다고 보고하였다. 이러한 기전의 규명을 통하여 인간의 바이러스성 질환의 치료에 마렉병 바이러스 연구가 좋은 모델로 사용할 수 있음을 시사하였다.
- ▣ 닭의 바이러스성 종양질환을 감별하는데 있어서 문제점은, 혼합감염 등이라 할 수 있다. Gimeno et al. (2005)는 마렉병 바이러스 및 백혈병/육종 바이러스의 다양한 유전자를 증폭할 수 있는 real-time PCR 기법을 이용하여, 각각의 바이러스의 단독감염 및 혼합감염 때 이러한 유전자의 발현상태를 검사함으로써 단독 및 혼합감염 상태를 진단할 수 있다고 보고하였다. 즉 마렉병 바이러스에 의해서 유발된 종양은 마렉병 바이러스 잠복감염이나 마렉병 바이러스에 대해 백신을 하였으나 레트로바이러스에 의해서 유발된 종양에 비해서 100배 이상의 유전자 발현이 있다고 보고하였다.
- ▣ 최근 마렉병 바이러스의 유전자 기능 규명 및 이의 백신으로의 활용에 대하여 많은 연구가 수행되고 있다. 이러한 연구의 일환으로 Jarosinski et al. (2005)는 그 기능이 규명되지 않았지만 RLORF4 유전자를 삭제시킨 바이러스는 약독화되며, 백신으로의 사용도 가능하다고 보고하였다.
- ▣ 많은 바이러스들은 숙주의 방어기전을 회피 혹은 억제시키기 위해서 숙주의 사이토카인 유전자를 그들의 지놈 내에 보유하고 있는 경우가 많다. 마렉병 바이러스도 숙주의 사이토카인인 IL-8을 지놈 내에 보유하고 있다. 본 연구에서

도 vIL-8 유전자가 분리한 국내 주에서 모두 관찰되었는데, Cui et al.(2005)에 의하면, 강독주 마렉병 바이러스에서 vIL-8 유전자를 삭제시키면 약독화된다고 보고하였다. 따라서 이러한 deletion mutant 주들은 향후 백신으로의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

제 7 장 참고문헌

1. Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, Zsak L, Rock DL, Kutish GF. 2001. The genome of turkey herpesvirus. *J. Virol.* 75:971-978.
2. Arita K, Nii S. 1979. Effect of culture temperature on the production of Marek's disease virus antigens in a chicken lymphoblastoid cell line. *Biken J.* 22:31-34.
3. Baba TW, Humphries EH. 1984. Avian leukosis virus infection; Analysis of viremia and DNA integration in susceptible and resistant chicken lines. *J. Virol.* 51:123-130.
4. Bai J, Howes K, Payne LN, Skinner MA. 1995. Sequence of host-range determinants in the env gene of a full-length, infectious proviral clone of exogenous avian leukosis virus HPRS-103 confirms that it represents a new subgroup (designated J). *J. Gen. Virol.* 76:181-187.
5. Bai J, Payne LN, Skinner MA. 1995. HPRS-103 (exogenous avian leukosis virus, subgroup J) has an env gene related to those of endogenous elements EAV-0 and E51 and an E element found previously only in sarcoma viruses. *J. Virol.* 69:779-784.
6. Baigent SJ, Petherbridge LJ, Smith LP, Zhao Y, Chesters PM, Nair VK. 2006. Herpesvirus of turkey reconstituted from bacterial artificial chromosome clones induces protection against Marek's disease. *J. Gen. Virol.* 87:769-776.
7. Biggs PM. 2001. The history and biology of Marek's disease virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 255:1-24.
8. Brown AC, Baigent SJ, Smith LP, Chattoo JP, Petherbridge LJ, Hawes P, Allday MJ, Nair V. 2006. Interaction of MEQ protein and C-terminal-binding protein is critical for induction of lymphomas by Marek's disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:1687-1692.

9. Buranathai C, Rodriguez J, Grose C. 1997. Transformation of primary chick embryo fibroblasts by Marek's disease virus. *Virology* 239:20-35.
10. Calnek and Witter, Marek's disease virus. in Saif Y.M (ed). *Diseases of poultry.*, 11thed. Iowa State University Press, Ames, 2003, pp. 465-516.
11. Calnek BW, Shek WR, Schat KA. 1981. Spontaneous and induced herpesvirus genome expression in Marek's disease tumor cell lines. *Infect. Immun.* 34:483-491.
12. Chang KS, Lee SI, Ohashi K, Ibrahim A, Onuma M. 2002. The detection of the meq gene in chicken infected with Marek's disease virus serotype 1. *J. Vet. Med. Sci.* 64(5):413-417.
13. Chang KS, Ohashi K, Onuma M. 2002. Diversity (Polymorphism) of the meq gene in the attenuated Marek's disease virus (MDV) serotype 1 and MDV-transformed cell lines. *J. Vet. Med. Sci.* 64(12):1097-1101.
14. Chen XB, Sondermeijer PJ, Velicer LF. 1992. Identification of a unique Marek's disease virus gene which encodes a 38-kilodalton phosphoprotein and is expressed in both lytically infected cells and latently infected lymphoblastoid tumor cells. *J. Virol.* 66(1):85-94.
15. Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G. 1999. Making and reading microarrays. *Nat. Genet.* 21:15-19.
16. Cho KO, Ohashi K, Onuma M. 1999. Electron microscopic and immunohistochemical localization of Marek's disease (MD) herpesvirus particles in MD skin lymphomas. *Vet. Pathol.* 36:314-320.
17. Cho KO, Endoh D, Onuma M, Itakura C. 1999. Analysis of transcriptional and translational activities of Marek's disease (MD) virus genes in MD central nervous system lesions in chickens. *Avian Pathol.* 28:47-53.
18. Cho KO, Endoh D, Oian JF, Ochiai K, Onuma M, Itakura C. 1998. Central nervous system lesions induced experimentally by a very virulent strain of Marek's disease virus in Marek's disease-resistant chickens. *Avian Pathol.* 27:512-517.
19. Cho KO, Endoh D, Kimura T, Ochiai K, Itakura C. 1997. Significance of

- Marek's disease virus serotype 1-specific phosphorylated proteins in Marek's disease skin lesions. *Avian Pathol.* 26:707-720.
20. Cho KO, Ochiai K, Fujikawa Y, Itakura C. 1997. Cutaneous lesions in broiler chickens spontaneously affected with Marek's disease. *Avian Pathol.* 26:277-291.
 21. Cho KO, Mubarak M, Kimura T, Ochiai K, Itakura C. 1996. Sequential skin lesions in chickens experimentally infected with Marek's disease virus. *Avian Pathol.* 25:325-343.
 22. Crittenden LB, McMahon S, Halpern MS, Fadly AM. 1987. Embryonic infection with the endogenous avian leukosis virus Rous-associated virus-0 alters responses to exogenous avian leukosis virus infection. *J. Virol.* 61:722-725.
 23. Cui X, Lee LF, Hunt HD, Reed WM, Lupiani B, Reddy SM. 2005. A Marek's disease virus vIL-8 deletion mutant has attenuated virulence and confers protection against challenge with a very virulent plus strain. *Avian Dis.* 49:199-206.
 24. Cui ZZ, Yan D, Lee LF. 1990. Marek's disease virus gene clones encoding virus-specific phosphorylated polypeptides and serological characterization of fusion proteins. *Virus Genes* 3(4):309-322.
 25. Cui X, Lee LF, Reed WM, Kung HJ, Reddy SM. 2004. Marek's disease virus-encoded vIL-8 gene is involved in early cytolytic infection but dispensable for establishment of latency. *J. Virol.* 47:4753-4760.
 26. Cui Z, Qin A, Lee LF, Wu P, Kung HJ. 1995. Construction and characterization of H19 epitope point mutant of MDV CVI988/Rispens strain. *Acta. Virol.* 43:169-173.
 27. Davidson I, Borenshtain R, Weisman Y. 2002. Molecular identification of the Marek's disease virus vaccine strain CVI988 in vaccinated chickens. *J. Vet. Med. B* 49:83-87.
 28. Dunn K, Nazerian K. 1977. Induction of Marek's disease virus antigens by IdUrd in a chicken lymphoblastoid cell line. *J. Gen. Virol.* 34:413-419.

29. Dunwiddie CT, Resnick R, Boyce-Jacino MT, Alegre JN, Faras AJ. 1986. Molecular cloning and characterization of gag-, pol-, and env- related gene sequences in the ev- chicken. *J. Virol.* 59:669-675.
30. Endoh D, Cho KO, Tsukamoto K, Morimura T, Kon Y, Hayashi M. 2000. Application of representational difference analysis to genomic fragments of Marek's disease virus. *J. Clin. Microbiol.* 38:4310-4314.
31. Endoh D, Ito M, Cho KO, Kon Y, Morimura T, Hayashi M, Kuwabara M. 1998. Retroviral sequence located in border region of short unique region and short terminal repeat of Md5 strain of Marek's disease virus type 1. *J. Vet. Med. Sci.* 60:227-235.
32. Endoh D, Kon Y, Hayashi M, Morimura T, Cho KO, Iwasaki T, Sato F. 1996. Detection of transcripts of Marek's disease virus serotype 1 ICP4 homologue (MDV1 ICP4) by in situ hybridization. *J. Vet. Med. Sci.* 58:969-975.
33. Faga B, Maury W, Bruckner DA, Grose C. 2001. Identification and mapping of single nucleotide polymorphism in the varicella-zoster virus genome. *Virology* 280:-6.
34. Ewert DL, Steiner I, Duttadaway J. 1990. In ovo infection with the avian retrovirus RAV-1 leads to persistent infection of the central nervous system. *Lab. Invest.* 62:156-162.
35. Fadly AM. 1988. Avian leukosis virus (ALV) infection, shedding, and tumors in maternal ALV antibody-positive and -negative chickens exposed to virus at hatching. *Avian Dis.* 32:89-95.
36. Fadly AM, Witter RL. 1993. Effects of age at infection with serotype 2 Marek's disease virus on enhancement of avian leukosis virus-induced lymphomas. *Avian Pathol.* 22:565-576.
37. Fadly AM, Witter RL, Lee LF. 1985. Effects of chemically or virus-induced immunodepression on response of chickens to avian leukosis virus. *Avian Dis.* 29:12-25.
38. Fadly AM, Crittenden LB, Smith EJ. 1987. Variation in tolerance induction

- and oncogenicity due to strain of avian leukosis virus. *Avian Pathol.* 16:665-677.
39. Fukuchi K, Sudo M, Lee YS, Tanaka A, Nonoyama M. 1984. Structure of Marek's disease virus DNA: detailed restriction enzyme map. *J. Virol.* 51:102-109.
40. Fynan E, Block TM, DuHadaway J, Olson W, Ewert DL (1992) Persistence of Marek's disease virus in a subpopulation of B cells that is transformed by avian leukosis virus, but not in normal bursal B cells. *J Virol* 66:5860-5866.
41. Gimeno IM, Witter RL, Fadly AM, Silva RF. 2005. Novel criteria for the diagnosis of Marek's disease virus-induced lymphomas. *Avian Pathol.* 34:332-340.
42. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bollmfield CD, Lander ES. 1999. Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286:531-537.
43. Hirai K, Ikuta K, Kitamoto N, Kato S. 1981. Latency of herpesvirus of turkey and Marek's disease virus genomes in a chicken T-lymphoblastoid cell line. *J. Gen. Virol.* 53:133-143.
44. van Iddekinge B JL, Stenzler L, Schat KA, Boerrigter H, Koch G. 1999. Genome analysis of Marek's disease virus strain CVI988: effect of cell culture passage on the inverted repeat regions. *Avian Dis.* 43:82-188.
45. Jarosinski KW, Osterrieder N, Nair VK, Schat KA. 2005. Attenuation of Marek's disease virus by deletion of open reading frame RLORF4 but not RLORF5a. *J. Virol.* 79:1164-1159.
46. Jones D, Lee L, Liu JL, Kung HJ, Tillotson JK. 1992. Marek disease virus encodes a basic-leucine zipper gene resembling the fos/jun oncogenes that is highly expressed in lymphoblastoid tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4042-4046.
47. Kanamori A, Ikuta K, Ueda S, Kato S, Hirai K. 1987. Methylation of

- Marek's disease virus DNA in chicken T-lymphoblastoid cell lines. *J. Gen. Virol.* 68:1485-1490.
48. Kanter MR, Smith RE, Hayward WS. 1988. Rapid induction of B-cell lymphomas: Insertional activation of c-myb by avian leukosis virus. *J. Virol.* 62:1423-1432.
 49. Lee LF, Cui X, Cui Z, Gimeno I, Lupiani B, Reddy SM. 2005. Characterization of a very virulent Marek's disease virus mutant expressing the pp38 protein from the serotype 1 vaccine strain CVI988/Rispens. *Virus Genes* 31:73-80.
 50. Lee LF, WU P, Sui D, Ren D, Kamil J, Kung HJ, Witter RL. 2000. The complete unique long sequence and the overall genomic organization of the GA strain of Marek's disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6091-6096.
 51. Lee SI, Takagi M, Ohashi K, Sugimoto C, Onuma M. 2000. Difference in the meq gene between oncogenic and attenuated strains of Marek's disease virus serotype 1. *J. Vet. Med. Sci.* 62:287-292.
 52. Liu JL, Ye Y, Oian Z, Qian Y, Templeton DJ, Lee LF, Kung HJ. 1999. Functional interactions between herpesvirus oncoprotein meq and cell cycle regulator CDK2. *J. Virol.* 73:4208-4219.
 53. Liu JL, Ye Y, Lee LF, Kung HJ. 1998. Transforming potential of the herpesvirus oncoprotein meq: Morphological transformation, serum-independent growth, and inhibition of apoptosis. *J. Virol.* 72:388-395.
 54. Lupiani B, Lee LF, Reddy SM. 2001. Protein-coding content of the sequence of Marek's disease virus serotype 1. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 255:159-190.
 55. McGeoch DJ, Dolan A, Aalsh AC. 2000. Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *J. Virol.* 74: 10401-10406.
 56. Parcels MS, Lin SF, Dienglewicz RL, Majerciak V, Robinson DR, Chen HC, Wu Z, Dubyak GR, Brunovskis P, Hunt HD, Lee LF, Kung HJ.

2001. Marek's disease virus (MDV) encodes an interleukin-8 homolog (vIL-8): characterization of the vIL-8 protein and a vIL-8 deletion mutant MDV. *J. Virol.* 75:5159-5173.
57. Morgan RW, Xie Q, Cantello JL, Miles AM, Bernberg EL, Kent J, Anderson A. 2001. Marek's disease virus latency. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 255:223-243.
58. Morimura T, Cho KO, Kudo Y, Hiramoto Y, Ohashi K, Hattori M, Sugimoto C, Onuma M. 1999. Anti-viral and anti-tumor effects induced by an attenuated Marek's disease virus in CD4- or CD8-deficient chickens. *Arch. Virol.* 144:1809-1818.
59. Ohashi K, Morimura T, Takagi M, Lee SI, Cho KO, Takahashi H, Maeda Y, Sugimoto C, Onuma M. 1999. Expression of bcl-2 and bcl-x genes in lymphocytes and tumor cell lines derived from MDV-infected chickens. *Acta. Virol.* 43:128-132.
60. Payne LN, Brown SR, Bumstead N, Howes K, Frazier JA, Thouless ME. 1991. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens. *J. Gen. Virol.* 72:801-807.
61. Payne LN, Howes K, Gillespie AM, Smith LM. 1992. Myeloid leukaemogenicity and transmission of the HPRS-103 strain of avian leukosis virus. *Leukemia* 6:1167-1176.
62. Peng Q, Shirazi Y. 1996. Isolation and characterization of Marek's disease virus (MDV) cDNAs from a MDV-transformed lymphoblastoid cell line: identification of an open reading frame antisense to the MDV Eco-Q protein (*Meq*). *Virology* 221:368-374.
63. Penn SG, Rank DR, Hanzel DK, Barker DL. 2000. Mining the human genome using microarrays of open reading frames. *Nat Genet* 26:315-318.
64. Pizer E, Humphries EH. 1989. RAV-1 insertional mutagenesis: disruption of the *c-myc* locus and development of avian B-cell lymphoma. *J. Virol.* 63:1630-1640.

65. Pizer E, Baba TW, Humphries EH. 1992. Activation of the c-myb locus is insufficient for the rapid induction of disseminated avian B-cell lymphoma. *J. Virol.* 66:512-523.
66. Pulaski JT, Tieber VL, Coussens PM. 1992. Marek's disease virus mediated enhancement of avian leukosis virus gene expression and virus production. *Virology* 186:113-121.
67. Reddy SM, Lupiani B, Gimeno IM, Silva RF, Lee LF, Witter RL. 2002. Rescue of a pathogenic Marek's disease virus with overlapping cosmid DNAs: Use of a pp38 mutant to validate the technology for the study of gene function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(10):7054-7059.
68. Rispens BH, VanVloten HJ, Mastenbroek N, Maas HJL, Schat HA. 1972. Control of Marek's disease virus (strain CVI988) and its use in laboratory vaccination trials. *Avian Dis.* 16:108 - 125.
69. Robinson HL, Gagnon GC. 1986. Patterns of proviral insertion in avian leukosis virus induced lymphomas. *J. Virol.* 57:28-36.
70. Robinson HL, Ramamoorthy L, Collart K, Brown DW. 1993. Tissue tropism of avian leukosis viruses: analyses for viral DNA and proteins. *Virology* 193:443-445.
71. Schat KA, Shek WR, Calnek BW, Abplanalp H. 1982. Syngeneic and allogeneic cell-mediated cytotoxicity against Marek's disease lymphoblastoid tumor cell lines. *Int. J. Cancer* 29(2):187-194.
72. Schat KA. 1987. Marek's disease: A model for protection against herpesvirus-induced tumours. *Cancer Surv* 6:1-37.
73. Schat KA, Markowski-Grimsrud CJ. 2001. Immune responses to Marek's disease virus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 255:91-120.
74. Shamblin CE, Greene N, Arumugaswami V, Dienglewicz RL, Parcels MS. 2004. Comparative analysis of Marek's disease virus (MDV) glycoprotein-, lytic antigen pp38- and transformation antigen Meq-encoding genes: association of meq mutations with MDVs of high virulence. *Vet. Microbiol.* 102:147-167.

75. Silva RF, Lee LF, Kutish GF. 2001. The genomic structure of Marek's disease virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 255:143-158.
76. Smith DR, Vogt PK, Hayman MJ. 1989. The v-sea oncogene of avian erythroblastosis retrovirus S13: Another member of the protein-tyrosine kinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5291-5295.
77. Szallasi Z. 1998. Gene expression patterns and cancer. *Nat. Biotechnol.* 16:1292-1293.
78. Tieber VL, Zalinskis LL, Silva RF, Finkelstein A, Coussens PM. 1990. Transactivation of the Rous sarcoma virus long terminal repeat promoter by Marek's disease virus. *Virology* 179:719-727.
79. Ubertini T, Calnek BW. 1970. Marek's disease herpesvirus in peripheral nerve lesions. *J. Natl. Cancer Inst.* 45:507-514.
80. Ui M, Endoh D, Cho KO, Kon Y, Iwata A, Maki Y, Sato F, Kuwabara M. 1998. Transcriptional analysis of Marek's disease virus (MDV) genes in MDV-transformed lymphoblastoid cell lines without MDV-activated cells. *J. Vet. Med. Sci.* 60(7):823-829.
81. Van Woensel PAM, Van Blaaderen A, Mooman RJM, De boer GF. 1992. Detection of proviral DNA and viral RNA in various tissues early after avian leukosis virus infection. *Leukemia* 6(Suppl 3):135S-137S.
82. Vernet G. 2002. DNA-chip technology and infectious diseases. *Virus Res.* 82:65-71.
83. Witter RL. 2001. Protective efficacy of Marek's disease vaccine. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 255:58-90.
84. Xie Q, Anderson AS, Morgan RW. 1996. Marek's disease virus (MDV) ECP4, pp38, and meq genes are involved in the maintenance of transformation of MDCC-MSB1 MDV-transformed lymphoblastoid cells. *J. Virol.* 1125-1131.
85. Zhu GS, Iwata A, Gong M, Ueda S, Hirai K. 1994. Marek's disease virus type 1-specific phosphorylated proteins pp38 and pp24 with common amino acid termini are encoded from the opposite junction regions

between the long unique and inverted repeat sequences of viral genome.
Virology 200:816-820.

86. Zhu GS, Ojima T, Hironaka T, Ihara T, Mizukoshi N, Kato A, Ueda S, Hirai K. 1992. Differentiation of oncogenic and nononcogenic strains of Marek's disease virus type 1 by using polymerase chain reaction DNA amplification. *Avian Dis.* 36:637-645.