

최 종 보 고 서

세포 표면 발현용 벡터를 이용한 효과적인
Newcastle Disease (뉴캐슬병)에 대한 백신 개발
연구 및 진단법 개발에 관한 연구

Development of effective detection methods on
newcastle disease and vaccine development using
surface display systems

충남대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “세포 표면 발현용 벡터를 이용한 효과적인 Newcastle Disease (뉴캐슬병)에 대한 백신 개발 연구 및 진단법 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 07 월 10 일

주관연구기관명 : 충남대학교

총괄연구책임자 : 신현진

세부연구책임자 : 김철중

연 구 원 : 윤현

연 구 원 : 문호진

연 구 원 : 류지훈

연 구 원 : 박수형

연 구 원 : 박정은

연 구 원 : 유리운

연 구 원 : 후시린

협동연구기관명 : 충남대학교

협동연구책임자 : 이봉덕

협동연구기관명 : 생명공학연구원

협동연구책임자 : 부하령

요 약 문

I. 제 목

세포 표면 발현용 벡터를 이용한 효과적인 Newcastle Disease (뉴캐슬병)에 대한
백신 개발 연구 및 진단법 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

뉴캐슬병은 Paramyxoviridae에 의한 닭에서의 중요한 호흡기, 신경기 질환으로서 많은 백신에도 불구하고 아직까지 우리 나라에서 많은 경제적 피해를 유발하는 주요 법정 전염병으로서 바이러스 자체뿐 아니라 질병 양상, 병변 소견, 백신 개발 연구들 다양한 연구가 진행되고 있으며 또한 이러한 노력이 많이 요구되는 질병이다. 많은 범국가적인 백신 연구에도 불구하고 이러한 뉴캐슬병의 지속적인 발병 보고 및 피해 상황은 여러 가지 관점에서 우리가 이 질병에 대한 접근법을 다시한번 재고해 볼 필요가 있다고 생각된다. 이러한 맥락에서 본 연구진들이 수행하고자 했던 목적은 이 질병의 진단법에 대한 새로운 접근, 또한 이제까지 사용되고 있는 방법이 아닌 새로운 방법을 이용한 보다 간편한 백신 개발의 취지하에 본 연구를 수행하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

현재 일반적으로 사용되고 있는 뉴캐슬병의 진단법인 ELISA 방법이 whole virus를 이용하고 있는 반면, 본 연구는 그 중 특정 유전자를 발현하여 이를 분리 정제하여 이를 ELISA coating antigen으로 사용한 ELISA 법과 기존의 whole virus를 이용한 진단법의 차이점에 대해서 비교 실험 하고, 또한 두 방법의 문제점을 비교 검토 하였고, 또한 기존의 conventional 방법에 의한 백신 즉 whole virus를 이용한 백신법과 뉴캐슬 바이러스의 neutralizing epitope를 포함하는 특정 유전자의 발현을 이용한 백신법의 비교 실험을 통하여 이를 이용한 경구 백신의 가능성에 대해서도 모색하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구진들은 우선적으로 현재 사용되는 뉴캐슬병의 백신 균주와 wild type 균주와의 차이점을 분석하여 현재 만연하고 있는 strain이 유전적으로 백신 strain과 조금씩 달리 변하고 있다는 사실을 증명함으로써 새로운 백신 균주의 도입에 대한 기초 자료를 공급하고, 또한 현재 가장 일반적인 뉴캐슬병 진단법인 ELISA 방법에 이용되는 coating antigen으로서 기존에 사용하는 whole virus의 문제점, 즉 비용이라든지 시간적인 부담을 줄일수 있는 방안으로 특정 유전자를 발현 분리하여 이를 ELISA coating antigen으로 사용하는 방법에 대하여 모색하였고, 또한 이 바이러스에 대한 경구용 백신의 개발의 노력으로 유용 미생물을 transfer vector로 이용하는 새로운 경구 백신의 개발에 노력하였다. 이러한 결과를 이용하여 새로운 백신 strain의 분리 및 이를 이용한 백신의 효율성 연구와 이를 상업용으로 개발하여 보다 효율적인 백신의 도입에 유용한 자료로 이용하고자 한다. 또한 특정 유전자를 이용한 ELISA방법은 백신의 검증이나 뉴캐슬병의 발병을 보다 효율적으로 증명할 수 있는 방법으로 이용될 수 있을것이다. 또한 유용 미생물을 이용한 경구 백신은 보다 간편하게 사용할 수 있는 뉴캐슬병에 대한 백신으로 사용될 수 있으리라 기대된다.

SUMMARY

(영문요약문)

Newcastle Disease Virus (NDV) causes lethal disease in poultry. Paramyxoviruses initiate infection by attaching to cell surface receptors and fusing viral and cell membranes. Viral attachment proteins, hemagglutinin-neuraminidase (HN), hemagglutinin (HA), or glycoprotein (G), bind receptors while fusion (F) proteins direct membrane fusion. NDV infection is mediated by the hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein which is responsible for attachment to cellular receptors.

The present study was conducted to investigate the genetic profile of two prevalent avian pathogens in Korea namely, *Newcastle disease virus* and *Infectious bursal disease virus*. Two farms located in Yeongi-gun, Chungnam were selected for this study. The two viruses were isolated from various organs (spleen, trachea, bursa of Fabricius) of deceased chickens that showed clinical symptoms of Newcastle Disease or Infectious bursal disease like swelling and congestion of the F bursa, facial edema, lacrimation, greenish yellow diarrhea as well as pathological signs like airsacculitis, haemorrhages in the intestines and so on. For analysis of NDV and IBDV, a 466 and 435 base pair fragments corresponding to the HN and VP2 regions which are highly conserved among related strains of NDV and IBDV, respectively, were amplified by RT-PCR and analyzed by sequencing. Comparison of the VP2 region showed a 99.3% homology between the Korean IBDV isolate and the BJ836-attenuated vaccine strain. In contrast, the HN region of the Korean NDV isolate only has an 83 to 84% homology with the vaccine strains.

We also developed an ELISA-based protocol using recombinant modified-NDV HN protein, composed of the HN antigenic site and conserved region. This protein was derived from pET43-1a vector containing a 453 nucleotide fragment encoding the NDV HN (NDV HN 6982 nt - 7344 nt, Genbank Accession number 3386504). Protein purification was facilitated by His-Tag affinity chromatography and confirmed by western blot using anti-HIS antibody and polyclonal IgG obtained from chicken serum vaccinated by NDV LaSota strain. Finally, we successfully detected anti-NDV antibodies in field collected sera from fowls with recent history of the disease using this new NDV ELISA protocol.

As the alternative trials of NDV vaccine development, we also used two intracellular organisms, *Lactobacillus casei* and *Salmonella typhimurium*, as the transfer vector. We expressed HN, F and N proteins of NDV and inoculated those recombinant bacteria through oral route and tested their immune responses against NDV. Birds inoculated produced antibodies against NDV.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1 Introduction

Chapter 2 Current Status on related areas

Chapter 3 Research Contents and Results

section 1 Characterization of NDV vaccine strains and wild type strains and its comparison

section 2 Development new detection methods on NDV using recombinant proteins

section 3 Development of oral vaccine for NDV

Chapter 4 Accomplishment and contribution

Chapter 5 Plan for the usage on results

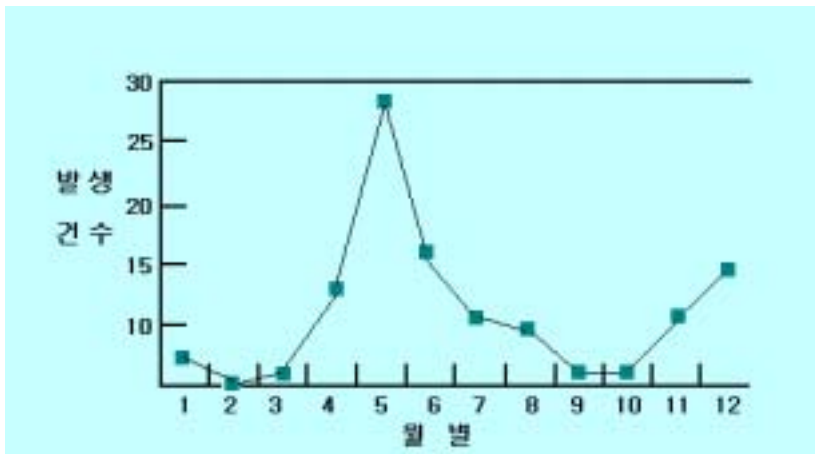
Chapter 6 Recently updated information from overseas

Chapter 7 References

제 1 장 연구개발과제의 개요

뉴캐슬병은 전염성이 매우 강할 뿐만 아니라 백신을 접종하지 않은 닭에 감염될 때, 대부분 폐사하게 되는 양계 농장에 있어서 가장 무서운 전염병중 하나이다. 원인체는 Paramyxoviridae에 속하는 바이러스이며, 강독 (Velogenic)과 중간독 (Mesogenic), 약독 (Lentogenic)으로 구분된다. 우리나라에서는 매년 발생 주의보를 발표하고 있으나 발생이 계속 증가하고 전국적으로 발생되는 추세에 있으며 큰 피해를 주고 있다. 국내에서의 뉴캐슬병 발생은 3-5년을 주기로 발생증가와 감소가 반복하는 특징을 보이고 있으며 백신의 사용량과 반비례하는 경향을 보이고 있다. 2000년도 월별 발생현황을 보면 4-6월 사이에 집중적으로 발생되고 있다.

2000년 월별 뉴캐슬병 발생 동향



질병은 닭에 가장 피해가 크고, 칠면조, 꿩, 참새, 까치, 오리, 거위등에 감수성이 있으나 피해는 적으며 기타 야조도 감염성이 있어 감염되어 전파시킨다. 강독에 감염되면 90-100%의 높은 폐사율을 보이고 전파력이 강하여 약하게 면역된 닭은 가벼운 호흡기증상으로 경과하다가 회복되는 경우가 많다. 주요 임상 증상으로는 처음에는 졸기 시작하여 콧물, 기침 등의 호흡기 증상(골골거리면서 답답하게 입을 벌리고 호흡을 하고 콧물과 침을 흘림), 신경증상은 머리를 좌우로 돌리며 다리와 목의 마비와 떨리는 증세를 보이고, 녹색 설사와 식욕이 없고 우모가 꺼칠하여 2-3일내에 폐사 한다. 병아리에서는 기침, 입을 벌리고 심한 호흡곤란을 가져오며, 침을 흘리고 콧물을 흘리면서 신경증상을 동반하기도 하며, 회복된 닭은 흔히 머리를

좌우로 돌리는 후유증이 나타나며, 부검하면 선위, 소장 등에 출혈반점 출현이 보이기도 한다. 백신 항체가 낮은 산란계나 종계는 폐사율은 낮으나 산란율이 떨어지거나 중지 되기도 한다. 예방 접종을 했더라도 접종시기나 방법이 잘못되어 항체가 높지 않은 닭에서는 폐사율은 적지만 다리와 목이 마비되는 신경증상이 나타난다. 예방 접종을 하지 않은 닭에 발생하면 2-15일 사이에 모두 죽는다. 이러한 뉴캐슬 질병은 양계 산업에 많은 피해를 주는 악성 질병으로써, 이 질병의 예방을 위한 연구 및 보다 효과적인 백신의 개발은 필수적이라 할 수 있다. 현재 우리나라에서는 초생추부터 생독 또는 사독 백신이 이용되고 있으나 아직까지도 발생 빈도 및 발병율은 낮아지지 않고 있어서 아직까지도 양계 농장에서 심각한 문제점 중의 하나이다.

또한 뉴캐슬 질병은 감염된 조류 또는 조류와의 직접 접촉, 호흡기 전염, 공기에 의한 전파 방법을 통하여 사람에서도 결막염으로 눈의 충혈, 눈물, 통증과 결막하조직 부종 등을 유발하는 인수 공통 전염병이다. 비록 사람에 있어서 사망을 유발하거나, 병변이 심하지는 않을지라도, 양계업에 종사하는 축산인이나, 인근 주민들, 특히나 어린이나 노인들에 보다 심한 질병을 일으킬 수 있다.

본 연구는 많은 백신에도 불구하고 현재까지 양계 농장에서 많은 경제적 손실을 일으키고 있는 뉴캐슬 바이러스에 대한 좀더 자세한 분석을 꾀하고자 하였다. 우선적으로 많은 백신에도 불구하고 이 질병의 발병 보고가 끊임없이 이어지는 이유를 밝히고자 현재 백신에 사용되고 있는 백신 strain과 또한 실제 농장에서 발병하고 있는 wild type strain 간의 유전자적 비교를 통하여 현재 사용되고 있는 백신에 대한 문제점이 없나를 알아보았다.

또한 현재 가장 일반적으로 사용되고 있는 뉴캐슬병에 대한 진단방법인 ELISA 방법을 좀더 개선하고자 하는 노력으로 특정 유전자를 발현하여 이를 ELISA coating antigen으로 사용함으로써 비용 및 시간을 절감할 수 있는 방안에 대하여 연구를 수행하고자 하였다. 이는 아직까지 뉴캐슬 바이러스를 효율적으로 키울수 없는 cell line이 없기 때문에 매번 SPF egg에 접종하여 바이러스를 키움으로써 발생하는 시간적 금전적 손실을 줄이는 방안으로, 뉴캐슬바이러스의 특정 유전자의 특정 부위를 대장균에서 발현하여 이를 대량으로 키운후 이를 정제한 단백질을 coating antigen으로 사용함으로써 보다 효율적이며 경제적인 진단법의 개발에 노력하였다.

또한 경구 백신 개발의 일환으로 바실러스 속 균주 유래의 폴리 감마 글루탐산의 합성에 관여하는 세포 외막 단백질(pgsBCA)을 이용하여 외래 단백질을 미생물의 표면에 효과적으로 발현시키는 새로운 벡터를 이용한 항원성 증진을 이용한 백신 개발에 관한 것이다. 최근 박테리오 파아지, 세균, 효모 등의 세포 표면에 필요한 외래단백질을 발현시키려는 연구가 진행되어 새로운 백신의 생산, 각종 항원과 항체의 스크리닝, 유용한 효소를 세포표면에 고정화하는 등의 용도로 널리 이용되고 있다.

세균의 표면에 단백질을 발현시키려는 시도는 백신을 안정적으로 생산하기 위해 항원성을 지

닌 펩타이드 부위를 세포 표면에 발현시키는 것으로 처음 시작되었다. 종래에는 백신의 생산을 위해 병원균을 무작위로 돌연변이시켜 안정하고 지속적으로 역가를 보인 세균을 찾아 사용하였다. 그러나 이러한 방법은 실제로 동물 또는 인간에 경구 투여할 경우 그 활성을 쉽게 잃어버리는 단점이 있으므로 이를 극복하고자 많은 시도가 이루어졌다. 먼저 그람음성 세균에서 세포 표면단백질을 이용하여 그 유전자를 항원으로 작용할 수 있는 단백질 유전자와 융합하고 이를 적당한 세균에 도입하여 융합단백질(fusion protein)을 효과적으로 세포 표면에 발현시키는 시도가 이루어졌다. 이렇게 제조된 단백질은 안정하게 세포 표면에 돌출하므로 효과적인 항원으로 작용할 수 있다. 특히 그람음성 세균인 경우 세포외막의 지질탄수화물(lipopolysaccharide, LPS)이 표면 발현된 단백질의 항원성(antigenicity)을 증가시키는 작용을 하므로 매우 효과적인 것으로 알려져 있다.

세균의 표면에 단백질이 발현되기 위해서는, 세포 내에서 생합성된 단백질이 세포막을 통과할 수 있는 분비신호(secretion signal)가 그 단백질의 일차 서열상에 있어야 한다. 또한 그람음성 세균인 경우는 세포내막과 세포막공간을 통과하여 세포외막에 삽입 부착되어 막 외부로 돌출되게 안착되어야 한다.

세균의 경우 이러한 분비신호와 세포 표면에 안착하게 하는 표적신호(targeting signal)를 갖고 있는 단백질로는 표면단백질, 특수한 효소, 독소단백질 등을 예로 들 수 있다. 실제로 이들 단백질이 갖는 분비신호와 표적신호 등을 적당한 프로모터와 함께 사용하면 세균의 표면에 단백질을 성공적으로 발현시킬 수 있다.

외래 단백질의 표면 발현에 사용된 세균의 표면단백질은 세포외막 단백질, 지질단백질(lipoprotein), 분비단백질, 세포 표면기관 단백질 등 크게 4가지로 나눌 수 있다. 현재까지 주로 그람음성 세균에 존재하는 표면단백질, 예를들면, LamB, PhoE, OmpA 등을 이용하여 필요한 외래단백질을 세균의 표면에 발현시키려는 시도가 이루어졌다. 이들 단백질을 이용한 경우 외래단백질을 세포표면에 돌출한 루프(loop)에 삽입시키므로 구조적으로 삽입할 수 있는 단백질의 크기가 제한된다. 또한 삽입될 외래단백질의 C-말단과 N-말단이 입체적으로 가깝게 위치하여야 하므로, 그 거리가 멀 경우에는 연결 펩타이드로 두 말단 사이를 가깝게 하여야 하는 문제가 있다.

실제로 LamB 나 PhoE를 이용한 경우 50-60개 이상의 아미노산으로 이루어진 외래 폴리펩타이드를 삽입하면 구조적 제한을 가져와 안정한 막단백질을 형성하지 못하였다 [Charbit et al., J. Immunol., 139: 1658-1664 (1987) ; Agterberg et al., Vaccine, 8: 85-91 (1990)]. OmpA를 사용하여 외래단백질을 돌출된 루프에 삽입한 경우도 있지만 구조적 제한을 극복하기 위하여 세포외막에 안착하게 할 수 있는 최소한의 표적신호를 포함하는 일부 OmpA 단편만을 사용하였다. 이러한 방법으로 베타락탐아제(β -lactamase)를 OmpA 표적신호 C-말단에 연결하여 세포표면에 발현시킨 사례가 있다.

또한 최근에 알려진 표면발현에 사용된 그람음성 세균의 세포외막 단백질로 슈도모나스 (*Pseudomonas*)속 유래의 빙핵활성 단백질(Ice-nucleation protein, INP)을 이용한 표면 발현이 시도되었다 [Jung et al., *Nat. Biotechnol.*, 16: 576-560 (1998), Jung et al., *Enzyme Microb. Technol.*, 22(5): 348-354 (1998), Lee et al., *Nat. Biotechnol.*, 18: 645-648 (2000)]. 정(Jung) 등은 N-말단, 중앙의 반복구간 그리고 C-말단으로 구성된 빙핵활성 단백질의 C-말단에 레반 슈크레이즈 (levansucrase)를, 그리고 중앙의 반복구간이 삭제된 N-말단 그리고 C-말단으로 구성된 빙핵활성 단백질의 C-말단에 카복실메틸셀룰레이즈(carboxymethylcellulase)를 융합하여 각각을 표면 발현시켜 효소 활성을 측정 확인하였다. 이(Lee) 등은 역시 N-말단, 혹은 N-말단과 C-말단으로 구성된 빙핵활성 단백질의 각각의 말단에 B형 간염 바이러스의 표면항원과 C형 간염바이러스의 코아(core) 항원을 대장균 또는 살모넬라 타이피 Ty21a (*Salmonella typhi* Ty21a) 균주의 표면에 발현시킨 다음 이들이 복합 생백신으로서 사용될 수 있음을 확인하였다.

지질단백질도 표면단백질로서 표면 발현에 이용되고 있다. 특히 대장균의 지질단백질은 그 N-말단에 분비번호를 갖고 세포내막을 통과할 수 있으며, 말단의 시스테인(L-cysteine)이 공유결합으로 세포외막 지질 또는 세포내막 지질과 직접 부착되어 있다. 주 지질단백질인 Lpp는 N-말단은 세포외막에, C-말단은 세포벽 (peptidoglycan, PG)에 결합되어 있어 세포외막 단백질 OmpA 단편과 연결될 경우 안정적으로 외래단백질을 세포외막까지 분비하여 표면 발현할 수 있다[Francisco et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 489: 2713-2717 (1992)]. 또 다른 지질단백질인 TraT는 지질단백질의 이러한 특성을 이용하여 폴리오바이러스의 C3 에피토프와 같은 펩타이드를 표면발현 하는데 사용되었다 [Felici et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 301-310 (1991)]. 또한 아직 정확한 기능은 밝혀지지 않은 세포벽 부착형 지질단백질 (Peptidoglycan-associated lipoprotein, PAL)도 재조합 항체의 표면발현에 사용되었다 [Fuchs et al., *Bio/Technology*, 9: 1369-1372(1991)]. 이 경우 PAL의 C-말단은 세포벽에 연결되고 N-말단은 재조합 항체에 연결되어 융합단백질이 표면 발현되었다.

세포외막을 통과하는 분비단백질도 표면단백질로서 이용될 수 있으나 그람음성 세균의 경우 분비단백질이 발달되어 있지 않으며, 몇몇 분비단백질의 경우만 그 특유의 분비기작에 관여하는 단백질들이 존재하여 세포외막 통과를 돕고 있다. 예를 들어 클렙시엘라(*Klebsiella*)속의 풀룰란아제(pullulanase)는 지질단백질로 그의 N-말단이 지방질로 치환되어 세포외막에 부착되어 있다가 완전히 세포 배양액 중으로 분비된다. 코낙커(Kornacker) 등이 풀룰란아제의 N-말단 단편을 이용하여 베타락타머제를 세포 표면에 발현시켰으나 발현된 풀룰란아제-베타락타머제 융합단백질은 잠시 세포 표면에 부착되어있다가 세포 배양액 중으로 유리되는 단점이 있었다. 또한 이를 이용하여 세포막 공간(periplasmic space) 단백질인 알칼린 포스파타제(alkaline phosphatase)를 발현시킨 경우, 이의 분비를 위해서는 적어도 14개 이상의 단백질

이 관련되므로 안정적으로 표면 발현되지 않았다 [Kornacker et al., Mol. Micro., 4: 1101-1109 (1990)].

독특한 분비체계를 갖고 있는 병원 미생물 나이세리아(Neisseria) 유래의 IgA 프로테아제는 C-말단에 존재하는 β -단편에 N-말단에 존재하는 프로테아제를 세포외막에 부착하게 하는 신호를 갖고 있다. 일단 세포외막에 도달하여 세포 표면에 돌출한 프로테아제는 자신의 가수분해능에 의해 세포 배양액으로 분비된다. 크라우저(Klauser) 등은 이 IgA 프로테아제 β -단편을 이용하여 약 12kDa의 콜레라 독소 B 소단위를 안정적으로 세포 표면에 발현시켰다 [Klauser et al., EMBO J., 9:1991-1999 (1990)]. 그러나 분비과정 중 세포막 공간에서 일어난 단백질의 접힘 (protein folding)에 의해 융합단백질의 분비는 억제되었다.

이외에도 그람음성 세균의 경우 세포 표면에 존재하여 표면 발현에 응용할 수 있는 세포기관으로는 편모(Flagella), 필리(Pili) 및 펴브리아(Fimbriae) 등이 있다. 편모의 구성 소단위인 편모단백질 (Flagellin)을 이용하여 콜레라 독소 B소단위와 B형 간염 바이러스로부터 유래한 펩타이드가 안정적으로 발현되었으며 이들은 그에 대한 항체와 강력하게 반응하였다 [Newton et al., Science, 244: 70-72 (1989)]. 세포 표면에 실처럼 생긴 펴브리아의 구성단백질인 펴브린(fimbrilin)을 이용하여 외래 펩타이드의 발현을 시도한 결과 작은 펩타이드의 경우만 성공적으로 발현되었다 [Hedegaard et al.,Gene, 85: 115-124 (1989)].

위와 같은 그람음성 세균의 표면단백질에 의한 표면 발현 시도 외에 그람양성 세균의 표면단백질을 이용한 표면 발현이 최근에 시도되었다 [Samuelson et al., J. Bacteriol., 177: 1470-1476 (1995)]. 이 경우도 세포내막을 통과할 수 있는 분비신호와 세포막에 부착되는 표면발현 모체를 필요로 한다. 실제로 스태필로코쿠스 (Staphylococcus hyicus) 유래의 리파제를 분비신호로 사용하고, 스태필로코쿠스 아우레우스(Staphylococcus aureus) 유래의 프로테인A를 막 부착 모체로 사용하여 80개 아미노산으로 이루어진 말라리아 항원(malaria blood stage antigen)과 스트렙토코쿠스 단백질G 유래의 알부민 부착 단백질을 효과적으로 그람양성 세균의 표면에 발현하였다.

이상과 같이 세균의 세포외막 단백질을 이용하여 외래단백질을 세포 표면에 발현시키기 위해서는 적당한 세포외막 단백질과 외래단백질을 유전자 수준에서 서로 연결하여 융합단백질이 생합성 되도록 유도하고, 이들이 안정하게 세포내막을 통과하여 세포외막에 부착되어 유지 되도록 해야 한다. 이를 위해서는 다음과 같은 요구조건을 갖는 세포외막 단백질을 선정하여 표면 발현의 모체로 사용해야 할 것이다: 먼저 세포내막을 통과할 수 있는 분비신호가 있을 것, 둘째 세포외막에 안정되게 부착될 표적신호가 있을 것, 셋째 세포 표면에 다량으로 발현될 것, 넷째 단백질의 크기에 관계없이 안정적으로 발현될 것. 하지만 위의 조건을 모두 만족시키는 표면발현 모체는 아직까지 개발되지 않은 상태이고 현재까지는 상기한 경우의 단점을 보완하는 수준이다.

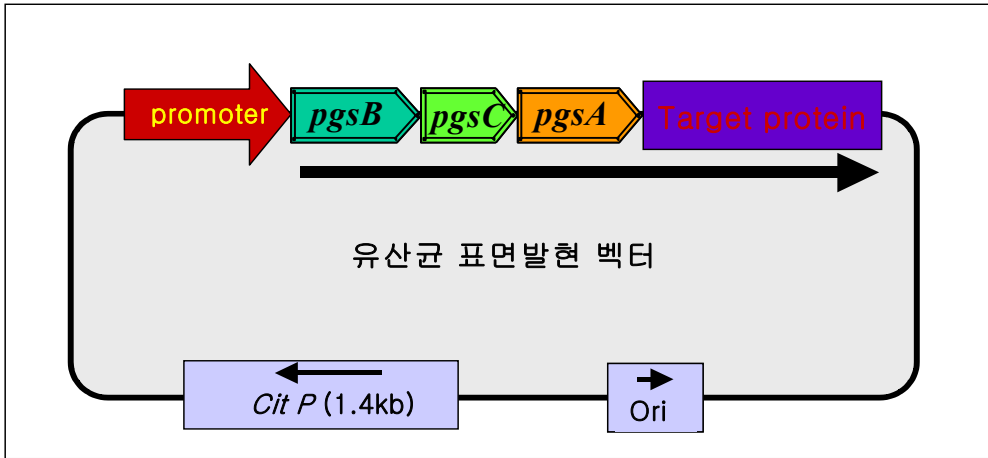
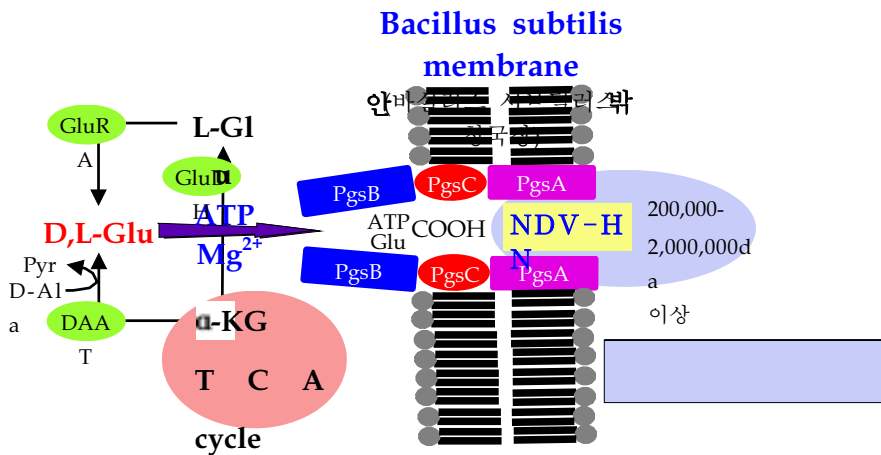


그림. 단백질 표면 발현을 위한 유산균 표면 발현 벡터



이와 같은 배경에서, 본 연구는 바실러스 속 균주 유래의 폴리 감마 글루탐산의 합성 유전자(pgsBCA)를 새로운 표면발현 모체로 활용하는 것에 대하여 예의 검토하고 연구한 바, pgsBCA 단백질을 이용하여, 외래단백질을 미생물의 표면에 효과적으로 발현시키는 새로운 벡터를 이용하여, 미생물의 표면에 외래단백질, 즉 뉴캐슬 질병의 fusion protein과 HN protein을 다량 발현시키는 방법으로 백신의 효과를 극대화 하는 방법을 개발하고자 하였다. 또한 락토바실러스 뿐 아니라 diaminopimelic acid (DAP) mutant Salmonella typhimurium H683을 이용한 경구 백신의 가능성에 대해서도 연구를 수행하고 있다. 이를 위해 사용된 pYA292 vector라는 미국의 Washington University에서 개발되어 분양된 Salmonella

typhimurium H683에 대한 발현 vector이다. 이는 매우 특별히 design된 vector로서 host strain인 Salmonella typhimurium 683 cell에서 특이적으로 replication 하여 단백질을 발현하도록 만들어진 vector이다. 또한 host strain인 Salmonella typhimurium 683 cell은 diaminopimelic acid (DAP) mutant strain으로, 이 diaminopimelic acid (DAP)는 Gram 음성균의 세포벽을 형성하는 중요한 peptidoglycan의 일종으로 알려져 있다. 이 mutant strain은 배양에 반듯이 diaminopimelic acid (DAP)을 필수 요소로 요구하고 있으므로 배양에 반듯이 이 diaminopimelic acid (DAP)를 첨가하여 배양하였다. 이렇게 뉴캐슬 단백질이 발현된 Salmonella typhimurium H683을 SPF chicken에 경구 투여함으로써 이들이 발현하는 항체의 양이나 특성을 비교 검사하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재 생명공학 분야에 있어서 기능성 효소, 호르몬, 백신사용 항원, 항체 및 치료용 단백질과 같은 기능성 단백질을 대량으로 발현하는 것은 가장 중요한 핵심 사항중 하나라고 할 수 있다. 이런 단백질 발현 시스템으로는 현재 원핵 세포나 효모에서의 단백질 발현 시스템이 개발되어 사용되고 있으나, 진핵 세포 유래의 단백질 발현을 위해서는 낮은 효율과 실험시 조작의 난이성 등으로 인해 여러 가지 어려움이 있다. 또한 이러한 여러 가지 발현 시스템을 이용한 단백질들이 실제로 항원성이나 기능적이라 측면에서는 추구하던 바와는 다를 수 있다.

국내외적으로 아직도 많은 질병에 대한 방어를 위하여 많은 연구가 시도되고 있고, 특히나 보다 효과적이고 경제적인 백신의 개발은 필수적이라 할 수 있다. 과거뿐 아니라 현재도 널리 사용되고 있는, 생독 및 사독 백신은 효율적인 면에는 어느 정도 성과가 있는 백신들도 있지만, 그렇지 않은 백신들도 많으며, 이러한 백신의 제조를 위해서는 항상 많은 병원균을 지속적으로 배양해서 보관해야한다는 부담감과 특히나 생독 백신 같은 경우에는 언제라도 취급 부주의에 의한 병원균의 병원성이 되살아 날 수 있다는 커다란 맹점도 가지고 있는 것도 사실이다. 이러한 단점을 보완하기 위해서 보다 안전하고 효과적인 백신의 개발을 위해서 현재는 생명공학 기법을 이용한 재조합 백신의 개발에 대한 연구가 활발히 진행중이다. 이러한 생명공학적 재조합 백신은 안전성이 매우 높으며, 제조하는 과정 또한 훨씬 간단한 장점을 가지고 있다. 그럼에도 불구하고 현재 소수의 재조합 백신이 사용되고, 아직까지도 많은 생독 사독 백신이 사용되는 이유는 재조합 백신의 효율성이 상대적으로 낮기 때문이다. 이는 병원균의 항원을 일부분만 사용하는 이유일 것이다.

이러한 맥락에서 보다 안전성이 높고, 효율적인 백신의 개발의 필수 과제라 할 수 있다. 이를 위해 보다 효율적으로 항원 단백질을 발현 시켜 항원성을 높이는 기술의 개발이 절대적으로 필요하다. 이를 위해 병원균의 항원과 가장 비슷하게 항원 단백질을 발현하고자 하는 다양한 연구들, 즉 Adenovirus, Baculovirus, Vaccinia virus와 같은 바이러스 벡터를 이용하는 방법, yeast expression system을 이용하는 방법등 많은 시도가 이루어져 오고 있다. 그러나 Baculovirus 벡터는 곤충 세포에만 감염되어 외래 단백질 생산에 유용하게 사용할 수 있으나 생성된 단백질의 glycosylation pattern의 차이로 인해 실질적으로 사용의 제약이 따르며, Vaccinia virus 나 Adenovirus는 단백질 발현량이 적을 뿐 아니라 homologous recombination을 이용하여 screening 해야 하는 문제점들 발현 벡터 체계로는 문제가 있다. 그러나 이들 바이러스를 이용한 벡터는 cytopathic effect가 강하고, 기술적인 어려움으로 인해 광범위하게 사용되고 있지는 않다. 이로써 보다 효율적으로 많은 양의 단백질을 생성하면서 항원성을 높일 수 있는 발현 시스템의 개발이 절실히 요구된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

닭 뉴캐슬병 (Newcastle disease, ND) 는 Paramyxoviridae에 Rubulavirus 속(genus)의 avian paramyxovirus type I (APMV-I) serotype의 감염으로 발생하는 질병으로 제1종 법정 전염병이며 국제수역사무국에서 지정하는 List A 질병이다. 특히나 이 뉴캐슬병은 우리나라 양계 산업에서의 3 대 질병이라 하는 뉴캐슬과 저 병원성 인플루엔자, IB 등 중의 일종으로 우리나라에서 아직까지 매우 심각한 경제적 영향을 미치고 있는 질병중 하나이다.

또한 이 Newcastle disease virus는 다른 paramyxovirus와 마찬가지로 NDV는 15kb의 negative, single stranded RNA로 구성된 청어가시 모양의 nucleocapsid를 포함한다.

negative single stranded RNA는 세 가지 주요 protein과 관계되며, 여기에는 nucleocapsid(NP), phosphoprotein(P), RNA-dependent RNA polymerase (L)이 있다. NP protein은 RNA 합성에 있어서 중요한 역할을 담당하며 non-viral RNA에 의한 무분별한 encapsidation을 방해하는 chaperone으로서의 역할도 한다. 이외의 다른 protein에는 matrix(M), fusion(F), haemagglutinin-neuraminidase(HN)가 있으며, HN과 F glycoprotein은 바이러스의 감염성과 병원성에 있어서 중요하다. 이 두 가지 protein은 모두 protective immunity를 유도한다.

최소한 9개의 뚜렷한 항원 타입의 avian paramyxoviruses(PMV-1~PMV-9)가 있으며 NDV가 prototype이며 PMV-1/NDV라고 표시한다. 핵산을 포함한 NDV 조사를 해보면 다양하게 나타난다. avian paramyxoviruses는 다른 paramyxoviruses와 함께 여러 가지 생화학적, 물리적 특성을 공유한다. 항원적으로 NDV는 human parainfluenza virus type 1과 가깝게 관계되어 있다. 경주 비둘기에서 분리한 avian paramyxovirus type 1과 NDV사이에 높은 교차 반응성이 보여진다. 그러나 이런 바이러스들은 hemagglutination-inhibition titers에 의하여 감별이 가능하다.

1926년에 Java, Indonesia, Newcastle-upon-Tyne, England에서 처음으로 Newcastle disease의 전염이 보고 되었으며, 이제는 전 세계적으로 다양한 host의 새에 두루 퍼져있다. 감염성 바이러스는 섭식이나 흡입에 의해 전파된다. 닭에서 분리된 원인체가 야기한 증상에 따라서 세 가지 pathotype으로 분류된다. Lentogenic pathotype은 adult bird에서 질병을 일으키지 않으며 병원성이 없는 것으로 여겨진다. 중간 정도의 병원성을 지닌 바이러스는 호흡기 질병을 야기하는 것으로서, mesogenic이라 하며, 고도의 치사율을 나타내는 바이러스는 velogenic이라 한다. velogenic virus의 neurotropic & viscerotropic form은 전 세계적으로 보고 되어 왔다. viscerotropic velogenic virus는 앵무새 수입 경로를 통해 미국에 전파되었으며, 1970년대 초기에 남부 캘리포니아에서 질병 전파의 주요 원인체였다.

NDV의 감별진단법으로는 polyclonal NDV-specific antisera를 이용한 hemagglutination inhibition이나 enzyme-linked immunosorbent assay를 포함한다. NDV strain을 감별하기 위

해서 oligonucleotide probe와 RNA fingerprinting analysis법이 쓰이기도 하지만 성공률이 낮다. pathotype을 예상하기 위해서 보통 embryonated egg에 NDV를 접종하여 embryo가 폐사하기까지 걸리는 평균 시간을 잰다. 미국에서는 viscerotropic velogenic NDV를 neurotropic velogenic form과 구분하기 위해 intracloacal inoculation pathogenicity test가 쓰인다. 또한 병원성 NDV는 trypsin의 첨가 없이도 대부분의 조류와 포유류의 cell에서 증식하는 능력으로 감별된다. 모든 NDV가 chicken embryo kidney cell에서 증식하지만, lentogenic form은 조류의 섬유아세포와 포유류의 cell type에서 증식하기 위해서는 trypsin을 필요로 한다.

NDV 병원성은 fusion protein cleavage site의 amino acid sequence와, 각기 다른 pathotype의 fusion protein에 특이적인 세포성 protease의 능력에 의하여 결정된다. lentogenic NDV는 mesogenic NDV나 velogenic NDV에 비하여 fusion protein cleavage site내에 basic amino acid가 적게 있다. 다양한 NDV strain의 fusion protein gene sequence를 증폭하기 위해 RT-PCR방법이 쓰이지만, 증폭한 유전자 산물을 restriction enzyme 처리한 뒤 agarose gel electrophoresis 로 분석한 결과는 일관성이 없었다.

Newcastle Disease는 급성의, 고도의 전염성을 지닌 chickens, turkeys, 또 다른 조류의 질병이며 respiratory disease, neurological disease, enteritis, hemorrhagic lesion을 특징으로 하며, 종종 높은 치사율을 보인다. 전파의 심도는 90%의 치사율을 보이는 매우 치명적인 정도에서 불현성 감염까지 다양하다. 인도네시아 Djakarta에서 Kraneveld가 처음으로 발견했다. England Newcastle-on-Tyne의 chicken flock에서 일어난 질병에서 병의 이름이 유래되었다. 1940년대에 Newcastle Disease는 전세계적으로 인정이 되었다. chicken, turkeys, guinea fowl, ducks, geese, pigeons, doves, pheasants, partridges, 그 외에 많은 야생 조류들이 감수성이 있다. 때로는 사람에서 결막염을 일으키기도 한다.

NDV는 다섯가지의 형태를 취하며 여기에는 viscerotropic velogenic, neurotropic velogenic, mesogenic, lentogenic, asymptomatic이 있다. viscerotropic velogenic form은 viscerotropic velogenic Newcastle disease (VVND)virus에 의한 Doyle's form으로 나타난다. Beach's form은 avian pneumoencephalitis 라고도 불리며, neurotropic velogenic strain에 의하여 발생한다. velogenic형의 발생은 갑작스럽고 심급성의 death가 흔하다. 증상으로는 현저한 depression, dyspnea, progressive prostration이 있다. diarrhea와 dehydration이 자주 보여지며, 두부의 부종도 역시 보여진다. 이 형태의 치사율은 100%에 이른다. Mesogenic form은 Beaudette's form이라고도 알려졌으며, dyspnea와 cough를 동반한 호흡기 감염의 빠른 전파가 특징적이며, 이후에 신경증상이 나타난다. 치사율은 50%에 이른다. Lentogenic form은 Hitchner's form이라고도 알려졌으며, 치사율은 무시할 만큼 낮고 신경증상 없이 약한 호흡기 증상을 나타낸다. Asymptomatic form이 몇몇 나라에서 보여진다.

모든 연령에 감수성이 있으며, 어린 개체가 나이든 개체보다 더 심각하게 영향 받는다. 호흡기 증상으로 시작하며 종종 설사가 뒤따른다. 잠복기는 4~14일로 다양하게 나타나며 보통은 5일정도 이다. 질병의 심각성은 새의 나이와 면역상태, strain의 병원성, 감염 경로, 혼합 감염

정도에 따라서 달라진다. 생후 몇 일~몇 주 사이의 연령에 있는 어린 병아리에서는 호흡기 증상으로 시작하여 많은 양의 diarrhea가 뒤따른다. 감염은 빠르게 퍼지며, gasping이후에 습성 수포음, 악설음이 들린다. 많은 예에서, 신경증상은 호흡기 증상 발현 후 몇 일 뒤에 나타난다. 아주 어린 병아리에서 심한 마비 증상을 보인다. 새들은 발가락을 구부리며 머리를 수그린 채 눈은 감고 있거나 한쪽 다리 또는 양다리를 쓸 수 없으며 횡와자세로 누워있다. 다른 증상으로는 staggering, torticollis, opisthotonos, posterior propulsion과 같은 ataxia가 있다. 이 때에 손으로 다루면 신경증상이 심해진다. 치사율이 상당히 높으며, 살아남아도 가치가 없게 된다. 다 자란 새에서 치사율은 약 90~100%로서 어린 병아리와 상당히 유사하다. mesogenic form은 덜 심각한 증상이 보이며 산란계에서 육안적인 이상란을 낳거나, 갑작스런 난생산 감소가 보여진다. 비산란기 후에 낳는 알들은 보기 좋으며, 연하고 불완전한 shell을 지닌다. lentogenic form에서 볼 수 있는 유일한 변화는 약간의 난 생산 감소이며, 새들이 회복된 후 4~8주가 지나야 이전 상태로 돌아갈 수 있다. 어린 turkey에서의 질병은 심각하며, 50%의 치사율을 보인다.

NDV는 저온 살균(pasteurization)과 ultraviolet light에 의하여 파괴된다. 감염 조직의 pulp는 phosphorus pentoxide가 있는 진공상태에서 건조되며, 냉장고에서 몇 년 동안 병원성을 띠지 않게 저장되어 있다. 감염된 부화란의 allantoic-amniotic fluid는 습한 곳이나 -70°C에서 동결 건조한 상태로 보관할 경우 몇 년 동안 병원성을 띠지 않는다. 1958년 Boyd와 Hanson은 다양한 온도와 습도의 soil에서 이 바이러스의 생존력에 대해서 연구했다. 약간의 수분이 있는 상태에서 이 바이러스는 놀랍게도 저항성을 나타내었다. NDV는 formalin처리나 60°C에서 30분간 처리 시에 불활성화된다.

NDV는 부화란에서 쉽게 배양되어진다. 세균이 하나도 없는 바이러스를 포함하는 부유물을 chorioallantoic membrane을 통하여 접종하면, 2~6일만에 바이러스가 embryo를 죽인다. 바이러스 접종 후 3일 이후에 죽은 embryo나 이틀날 죽은 embryo를 포함하는 egg에서 접종 부위의 chorioallantois부분에 작고 불투명한 부분이 보인다. 때때로 융모 요막은 부종을 띠고, 난황혈관은 충혈되고, embryo는 붉어 보이며, 특히 발과 다리가 심하다. 머리 주위의 피부는 출혈을 보이며, 간은 보통 충혈되어 있다. NDV는 다양한 종류의 세포 배양물에서 cytopathic effect를 낸다. 몇몇 cell line에서 그 효과는 현미경으로만 보인다. 세포질내 봉입체와 다핵 세포가 배양물에서 나타나기도 하며, 가끔씩 경계가 명확한 핵내 봉입체가 보인다. 세포 배양물은 바이러스의 방출이 있거나 없을 때에 만성적으로 감염되고 자주 cytopathic effect를 나타내지 않는다. interferon이 persistent infection을 중재할 경우, 세포는 다른 가깝게 연계된 바이러스에 저항한다.

NDV는 직접 접촉이나 공기감염에 의해 빠르게 전파된다. 병아리는 감염 부화장으로부터 또는 감염 새와의 접촉에 의하여 가금 농장에 바이러스를 전파한다. 감수성이 있는 개체는 감염된 분비물이나 병든 가금의 조직에서 병을 얻을 수도 있고, 오염된 물이나 오염된 feed bags와 feed container를 통해서도 병을 얻는다. 급성 감염된 암탉이 낳은 알은 바이러스를 포함할

것이다. 전파는 psittacidae과에 속하는 만성 감염된 무증상의 새를 통해서 또는 사료를 오염시키는 야생 비둘기로부터 이루어지기도 한다. 1983년과 1984년에 Great Britain에서는 avian paramyxovirus 1에 감염된 비둘기에 의한 ND 전파가 19~22 case나 보고 되었다. 바이러스는 경구나 공기 감염을 하여 감수성 있는 조류에 침입한다. 초기 증식이 상부 호흡기도에서 일어나며, trachea에서 바이러스가 쉽게 분리된다. 초기 증식 뒤에 영향 받는 조직은 NDV의 strain과 bird의 species에 따라서 차이가 난다. 병원성이 덜한 strain은 오직 장에만 감염하며, velogenic과 같이 병원성이 높은 것은 호흡기와 신경계에 심각하고 치사적인 감염을 초래한다. 병변의 성질과 미치는 범위는 질병의 병원성에 달려있다. mild한 경우에는 유일하게 나타나는 변화가 흐릿한 기낭막, 종대된 비장, 기관의 fluid나 mucus의 축적이다. velogenic형에서는 petechial hemorrhage, 때로는 미란이 proventriculus, cloaca, gizzard 장관의 점막에 나타난다. 비장이 종대되고, 다른 기관이 충혈될 수 있다. 산란계에서 ovum에 신선한 수양성 난황의 축적과 난소 혈관의 충혈이 뒤따른다. 신경증상이 나타난다면, 미약한 encephalitis의 현미경적 소견이 보일 수 있다.

NDV에서 회복한 가금은 몇 년 동안 저항성이 있다. hemagglutination-inhibiting & serum-neutralizing antibody가 면역에 있어서 필수적이며, 몇 년 동안 견뎌낼 수 있다. 항체가 없어도 병원성 바이러스 노출에 견뎌낼 수 있다; 세포 매개성 뿐 아니라 체액성 면역 모두 보호에 관여한다. 포유류에서 항체 활성은 분비성 IgA과 관계 있다. NDV를 주입한 뒤에 serum-neutralizing(SN), hemagglutination-inhibition(HI), precipitating(P)antibody의 생성에 부합하여 total serum protein의 상승이 보여진다. SN, HI, P antibody는 IgM과 IgG에서 모두 발견되어진다. serum IgM은 바이러스 접종 후 첫 주 동안에 나타나며, 감소하였다가 이차 백신 접종 뒤에 다시 한번 상승한다. 불활성화 되거나 mesogenic한 strain의 NDV에 대한 host 저항성 생성 기전은 정상인 새와 면역 결핍된 새에서 모두 연구되었다. 대부분의 정상 새는 mesogenic NDV에 저항하지만, T-cell이 결핍된 새는 좀 더 감수성이 있다. agammaglobulinemic bird는 극도로 감수성이 있다.

본 연구진들은 우선 현재 우리가 사용하고 있는 기존의 방법에 대한 문제점을 해결하고자 우선 현재 사용되고 있는 시스템을 우선 분석하고자 노력하였다. 우선 양계 농장에서 현재 사용되고 있는 경구, 스프레이 백신등 많은 종류와 다른 타입의 백신이 개발되어 사용되고 있음에도 불구하고, 꾸준한 발병 보고를 볼때 현재 가지고 있는 백신의 형태나 타입에 문제가 있는 않나를 알아 보고자 하였다. 이를 위해 현재 사용되고 있는 백신 strain과 wild type에 발병되고 있는 type 간의 유전자적 유사성을 일단 검사해 보고자 하였다. 이를 위해 다음과 같은 연구를 진행하였다.

1. 현재 우리나라에서 발병하고 있는 뉴캐슬 바이러스의 유전자적 특성 및 기존의 백신 strain과의 비교

가. sample processing

하루에 600마리 정도의 폐사가 일어난 닭 농장 두 곳으로부터 샘플 검사를 의뢰받았다. 충남 연기군 전의면에 위치하고 있는 A 농장은 42000수 규모의 닭을 기르고 있었으며 하루에 600수 정도의 폐사가 일주일 정도 지속된 것으로 보여졌다. A 농장에서는 10일령의 닭에서 IBD 발생이 추정되었고, 샘플을 의뢰하기 2주 전에 농장 방문 시 전형적인 신장염형 IBD 병변 소견이 보여졌다. 또 다른 농장으로 충남 연기군 조치원 읍에 위치하고 있는 B 농장은 29일령의 닭을 80000수 규모로 기르고 있었고, 하루에 700마리 정도의 폐사가 일어난 것으로 보여졌다. 폐사 전 주증상은 F낭 종대 및 심한 충 출혈, 웅크림, 깃털 역립등의 IBD로 의심되는 증상이었으며, 소수 증상으로 사경, 선위 쪽의 출혈 증상, 안면부의 종창, 눈물, 회황색 설사 등의 ND로 추정되는 증상들이 보여졌다. 각 농장에서 spleen, trachea, F낭을 채취하였으며 conical tube에 각 샘플을 넣어 11개의 tube를 만든 후 Minimun Essential Medium(MEM)을 cell culture medium으로 하여 10ml 정도를 넣어 준 뒤, 멸균 소독된 가위로 조직을 미세하게 잘라주었다. 6000rpm으로 10분간 원심분리 하여 RNA extraction을 위한 준비를 마쳤다.

나. RNA extraction

sample processing한 것에서 바이러스 RNA를 추출하는 방법으로 QIAamp Viral RNA Mini Spin Protocol(QIAGEN, France)을 이용했다. 준비한 샘플은 15~20℃에서 균형을 맞춰주며, AVL/carrier buffer에 침전물이 있으면 열을 가해서 녹여준 뒤, 사용 직전에 실온에서 식혀주었다. 모든 centrifugation은 실온에서 시행했다.

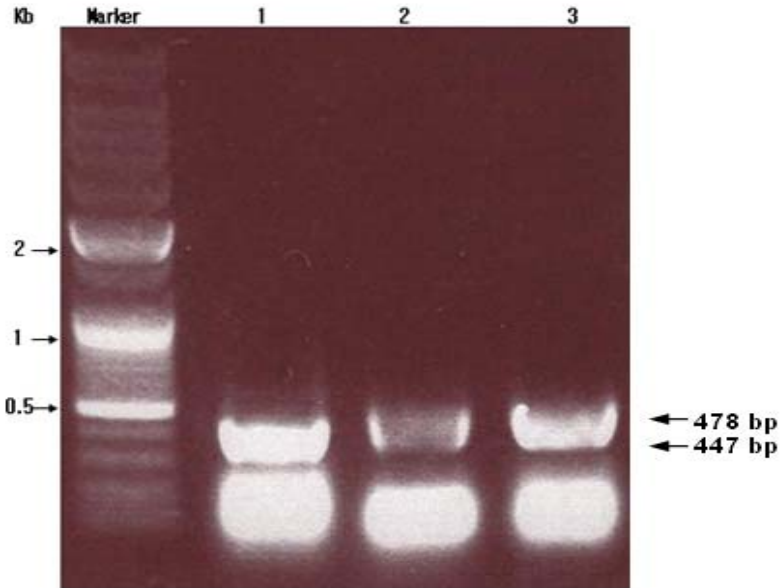
1.5ml microcentrifuge tube에 carrier RNA를 포함하는 AVL buffer를 560 μ l를 준비해 놓은 뒤, sample 140 μ l를 AVL/carrier RNA가 들어있는 튜브에 넣고 15초동안 vortexing하여 섞어주었다. 섞어준 튜브 안에서 바이러스 입자의 lysis가 일어날 수 있도록 10분 동안 15~25℃의 실온에서 배양하였다. 1.5ml microcentrifuge tube를 짧은 시간동안 원심 분리하여 뚜껑 안으로부터 물방울을 제거해주었다. 순도 96~100%의 ethanol을 560 μ l씩 샘플에 가한 뒤 15초 동안 vortexing한 뒤, 다시 뚜껑안의 물방울을 제거하기 위해 짧게 원심분리 하였다. 1.5ml tube안의 용액 630 μ l를 QIAamp spin column에 적용하고 6000 \times g에서 1분간 원심분리 한 뒤 여과액을 버리고 column을 새로운 2ml collection tube에 옮기는 과정을 두 번 반복했다. 500 μ l의 AW1 buffer를 column에 가한 뒤 6000 \times g로 1분간 원심분리 한 뒤, 새로운 collection tube에 column을 옮기고 여과액을 버렸다. 500 μ l의 AW2 buffer를 column에 가한 뒤 14000rpm에서 1분 동안 원심분리하고 새로운 2ml의 collection tube에 column을 옮긴 후, 13000rpm으로 1분

간 원심분리 했다. 1.5ml microcentrifuge tube에 column을 옮기고 AVE buffer 60 μ l를 가한 뒤 1분 동안 실온에서 배양한 것을 6000 \times g로 1분 동안 원심분리 해주었다.

다. Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)

ONE-STEP RT-PCR PreMix kit(iNtRON, Korea)를 사용하여 수행하였다. 각 ONE-STEP RT-PCR PreMix kit에는 single stranded cDNA를 합성하고 PCR을 수행하기 위해 필요한 모든 성분 즉, AMV Reverse transcriptase, RT-PCR buffer(10 \times), dNTPs, Taq DNA polymerase, stabilizing buffer를 포함하고 있었다. 준비한 PCR tube마다 8 μ l씩의 ONE-STEP RT-PCR PreMix를 분배하였다. RNA template 3 μ l와 forward primer, reverse primer 각 2 μ l를 PCR tube에 첨가하였다. reverse transcription 반응으로 생성된 cDNA를 가지고 PCR 반응을 수행하기 위해서 Gumboro-VP2 gene의 forward primer로는 5' -TACACCATAACTGCAGCCGATGATTAC-3' 을 썼으며, reverse primer로는 5' -TGTGACGGGACGGAGGGCCCCTGGATAGTT-3' 을 사용하였다.

NDV를 감지하기 위한 primer로는 ND-HN forward primer로서 5' -GGATCCACCCCCACACAGTCACACTCA-3' 을, reverse primer로는 5' -AAGCTTGGTACCCTAGGTCTTATTGGTCTTGACCACTTT-3' 을 사용하였다. 각 sample에서 viral RNA를 감지하기 위해 F낭, spleen이 들어있는 tube에는 Gumboro-VP2 gene을 검출하기 위한 forward primer와 reverse primer를 적용하고 trachea가 들어있는 tube에는 ND-HN gene을 검출하기 위한 forward primer와 reverse primer를 적용하였다. total volume을 20 μ l로 맞추기 위해 멸균증류수를 5 μ l를 첨가하였다. 몇 번의 pipetting을 통하여 mixture가 잘 섞이도록 하였다. PCR machine을 사용하여 45 $^{\circ}$ C에서 35분 동안 reverse transcription 반응이 일어나도록 한 다음, 94 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 반응시켜서, RNA : cDNA hybrid의 denaturation이 일어나도록 하였다. 94 $^{\circ}$ C에서 50초(denaturation), 54 $^{\circ}$ C에서 50초 (primer annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 50초(primer extension)동안 반응하는 일련의 과정을 40회 반복 하였으며, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켰다. PCR product는 1% ethidium bromide agarose gel을 이용하여 전기 영동하였고 image analyzer로 판독하였다.



The amplified RT-PCR products of the viral genes of IBDV and NDV (M; 100 bp plus DNA ladder, lane 1; VP2 (435bp) of IBDV, lane 2; HN (470bp) of NDV, lane 3; HN (470bp) of NDV)

라. Insert DNA 와 Vector

PCR product는 PCRquick-spin™ PCR Product Purification kit(iNtRON, Korea)를 사용하여 purification하였다. 1.5ml Microcentrifuge tube안에 들어있는 PCR product 20 μ l에 binding buffer 500 μ l를 첨가하여 잘 섞어준 뒤, 1분 동안 실온에서 배양하였다. 배양한 샘플을 2ml collection tube에 삽입해 놓은 column에 적용하고 13000rpm에서 1분 동안 원심 분리하였다. collection tube에 걸러진 여과액을 버리고, 다시 column을 collection tube에 옮겼다. 750 μ l의 washing buffer를 column에 적용하고 13000rpm에서 1분 동안 원심분리 하고 여과액을 버린 뒤, 다시 같은 collection tube에 column을 삽입 후 13000rpm으로 1분 동안 원심 분리하여 spin membrane을 건조시켰다. column을 멸균된 centrifuge tube에 옮기고, 50 μ l의 멸균 증류수를 적용하여 1분 동안 방치하였다. 1분이 지난 뒤, 13000rpm으로 1분 동안 원심 분리하였다.

Insert DNA를 ligation하기 위한 vector로서 pGEM-T Easy Vector(Promega, U.S.A.)를 EcoR V로 처리하고 끝에 3' terminal thymidine을 붙여서 만들었다.

마. Ligation

pGEMT-Easy Vector System I을 사용하여 수행하기로 하였다. pGEM-T Easy Vector(50ng/ μ l), Control Insert DNA(4ng/ μ l), T4 DNA ligase, 2×Rapid Ligation Buffer로 구성된 pGEMT-Easy Vector System I의 protocol을 이용하였다. pGEMT-Easy Vector와 Control Insert DNA가 들어있는 tube를 짧은 시간동안 원심분리하고 2×Rapid Ligation Buffer는 사용하기 전에 vortexing 해주었다. 2×Rapid Ligation Buffer와 T4 DNA ligase 5 μ l, pGEM-T Easy Vector 1 μ l, PCR product 2 μ l, T4 DNA ligase (3 Weiss units/ μ l) 1 μ l, 멸균 증류수 10 μ l가 섞인 것을 pipetting으로 반응물을 섞어주고 한 시간 동안 실온에서 배양하였다.

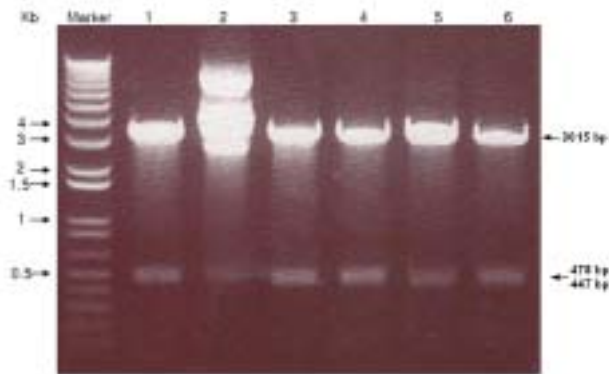
바. Transformation

LB/ampicillin/IPTG/X-Gal plate를 이용하여 transformation과정을 수행하기로 하였다. ligation mixture를 포함하는 tube를 원심분리하고 2 μ l씩을 덜어 1.5ml microcentrifuge tube에 옮겨서 ice에 보관하여 두었다. JM83 competent cell 50 μ l을 ligation mixture가 들어있는 tube에 넣어 손가락으로 가볍게 쳐서 섞어준 뒤 ice에서 20분 동안 반응시켰다. 반응 시킨 tube를 42°C에서 90초 동안 heatshock을 가해준 뒤 다시 ice에서 5분간 둔다. 900 μ l의 LB broth를 각 tube에 넣어준 뒤 37°C에서 90분 동안 강하게 교반하여 배양하였다. 1200rpm에서 10분 동안 원심분리 하여 상층액을 덜어내고 남은 200 μ l의 LB broth로 재부유하여 100 μ l만을 LB/ampicillin/IPTG/X-Gal plate에 초자봉으로 도말하고 37°C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 각 plate마다 insert DNA가 삽입된 white colony 5개를 선택하여 100 μ l/ml의 ampicillin을 포함하는 LB broth에 접종하였다.

사. plasmid DNA 추출

DNA-spin™ plasmid DNA purification kit(iNtRON, Korea)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 흰색 집락을 접종한 ampicillin(100 μ l/ml)이 포함된 LB broth tube를 37°C에서 하룻밤동안 진탕 배양하였다. 1.5ml effendorf tube에 배양액 1.5ml을 옮기고, 13000rpm에서 30초 동안 원심분리한 후 상층액을 버리고, 침전물을 냉장 보관된 resuspension buffer 250 μ l에 부유시켜 침전물이 남지 않도록 vortexing 해주었다. 여기에 250 μ l의 lysis buffer를 첨가하고 몇 번만 tube를 뒤집어서 부드럽게 섞어준 뒤에 350 μ l의 neutralization buffer를 첨가하여 역시 같은 방법으로 부드럽게 섞어주었다. 13000rpm으로 4°C에서 10분 동안 원심 분리하였다. 원심 분리 후에 상층액을 준비한 column에 옮겨서 13000rpm에서 60초 동안 원심분리하고 collection tube에 걸러진 여과액을 버리고 다시 column을 같은 collection tube에 옮겼다. 500 μ l의 washing buffer A를 column에 적용하여 13000rpm에서 60초 동안 원심분리 한 뒤 여과액을 버리고 다시 column을 collection tube에 위치시켰다. 750 μ l의 washing buffer B를 적용하여

13000rpm에서 60초 동안 원심분리하고 여과액을 버린 다음 1분 동안 다시 13000rpm에서 원심분리 하여 spin membrane을 건조시켰다. column을 멸균 1.5ml effendorf tube에 삽입한 후 멸균 증류수 45 μ l를 적용하여 1분 동안 방치한 후 13000rpm에서 1분 동안 원심분리 하였다. insert가 있는 것으로 의심되는 plasmid는 EcoR I (N.E.B, U.S.A)으로 처리하여 1% agarose gel에 걸어서 insert의 유무를 확인하였다. 클로닝 된 것이 확실한 것은 순수배양을 위해 ampicillin이 첨가된 LB broth에 하룻밤 동안 다시 배양하였다.



The cleavage patterns of cloned pGEM-T Easy/VP2 and pGEM-T Easy/HN by EcoR I restriction enzyme. The inserted DNA genes of NDV and IBDV were evident at 470bp and 435bp, respectively. (M; 100bp plus DNA ladder, lane 1; VP2 of IBDV, lane 2; VP2 of IBDV, lane 3; HN of NDV, lane 4; HN of NDV, lane 5; HN of NDV, lane 6; HN of NDV)

아. Nucleotide sequencing and analysis

염기서열 분석은 ABI PRISM 3700 DNA analyzer(Perkin Elmer Cetus Co., U.S.A.)를 이용하여 Bigdye terminator cycle sequencing ready reaction kit법으로 실시하였다. ddNTP에 형광물질을 표지하는 방식으로 sequencing reaction은 96 $^{\circ}$ C에서 10초, 50 $^{\circ}$ C에서 5초, 60 $^{\circ}$ C에서 4분 동안의 반응을 25 cycle 반복하여 시행하였으며 sequencing reaction cleanup kit(cat No.LSKS09624)를 이용하여 sequencing반응에 참여하지 않은 형광물질로 표지된 ddNTP를 제거하였다. genome 번역과 컴퓨터 분석은 phredphrap & BLAST software를 이용하여 시행하였다. sequence는 clustal W method로 배열하였다. 계통발생학적인 분석은 neighbour-joining method에 의하여 수행하였으며, 그래프 출력은 TreeView 1.5를 통해서 이루어졌다. 분석을 위해 GenBank의 유전 정보를 이용하였다.

자. RT-PCR에 의한 분리 바이러스의 유전자 확인과 샘플 진단

폐사 원인으로 IBD와 ND가 의심되는 샘플들을 각각 IBD-VP2 primer와 ND-HN primer를 이용하여 RT-PCR을 시행하였다. PCR product를 1.0% agarose gel에 걸어서 전기영동을 시행한 결과 IBD, ND의 양성 샘플에서 500bp의 특이적인 밴드가 관찰되었다. 11개의 샘플들 중에서 A 농장에서 폐사한 닭에서 분리한 F낭 sample인 1번에서 IBD 양성반응이 나왔고, B 농장에서 폐사한 닭에서 분리한 trachea sample인 8번과 11번에서 NDV 양성 반응이 나왔다. 반면, A농장에서 분리한 2개의 trachea와 2개의 spleen에서는 바이러스를 분리할 수 없었고, B 농장에서 분리한 2개의 F낭과 2개의 spleen에서도 바이러스를 분리하지 못했다.

차. IBD-VP2 gene과 ND-HN gene의 클로닝

IBD-VP2(F) 와 IBD-VP2(R) primer, ND-HN(F)와 ND-HN(R) primer를 이용하여 RT-PCR로 증폭된 유전자를 PCR quick-spin™ PCR Product Purification kit(iNtRON, Korea)를 이용하여 추출한 후에 pGEM-T Easy Vector System (Promega, U.S.A.)을 plasmid vector로 하여 ligation을 시행하였다. 이렇게 만들어진 plasmid를 JM83 competent cell에 transformation한 후 ampicillin이 첨가된 LB agar에 스크리닝하였다. 그리고 선택된 집락을 ampicillin이 첨가된 LB broth에 배양한 다음 miniprep으로 plasmid DNA를 추출하고 다시 EcoR I 으로 처리하여 1% agarose gel에 전기 영동한 결과 500bp의 뚜렷한 insert DNA band 와 3.1kb의 pGEM-T Easy Vector DNA band를 확인할 수 있었다.

카. sequencing analysis

IBD-VP2 primer와 NDV-HN primer로 증폭한 유전자의 genome 번역과 컴퓨터 분석을 phredphrap & BLAST software를 이용하여 시행하였고, 계통발생학적인 분석은 neighbour-joining method을 이용하였다. 이 결과를 토대로 하여 이번 실험에서 분리한 바이러스의 다른 strain과의 유사성을 비교하였고, 병원성에 있어 얼마나 차이가 나는지를 알수 있었다. A농장에서 나온 한 개의 F낭에서 분리한 IBD virus의 염기서열을 분석하여 본 결과 BJ836-attenuated vaccine strain과는 99.3%의 상동성을 나타내었으며, very virulent(vv) phenotype에 속하는 것으로 알려진 India strain, kal2001-Egypt strain과도 99.3%의 상동성을 보였다. 또한 china strain, Tri-Bio strain과는 각각 99.1%, 99.3%의 상동성을 나타내었다. B 농장에서 분리한 8번 trachea에서 분리한 NDV는 우리나라에서 백신주로 사용하고 있는 B1, Lasota, VGGA strain과 각각 85.3%, 85% , 84.6%의 상동성을 같은 농장의 11번 trachea에서 분리한 바이러스와는 98.8%의 상동성을 보였다. 이외에도 Italy00, JS-3-98-Go, Russia91, Taiwan95, US72, ZJ1-China strain과는 각각 91.0%, 98.2%, 85.9%, 94.1%, 90.1%, 97.7%의 상동성을 보였다. B농장의 11번 trachea에서 분리된 바이러스는 우리나라 백신주인 B1, Lasota, VGGA strain과 각각 84.6%, 84.1%, 83.9%의 상동성을 Italy00, JS-3-98-Go, Russia91,

Taiwan95, US72, ZJ1-China strain과는 각각 90.5%, 97.5% , 85.3%, 93.4% ,89.9%, 97.0%의 상동성을 나타내었다.

Table 1. percent similarity (NDV)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1		98.8	85.3	85.0	84.6	91.0	98.2	85.9	94.1	90.1	97.7	1
2	0.9		84.6	84.1	83.9	90.5	97.5	85.3	93.4	89.9	97.0	2
3	15.5	16.2		97.9	98.8	85.6	84.6	83.4	87.1	87.3	84.6	3
4	15.5	16.5	1.9		97.5	85.6	84.1	83.4	86.1	86.4	84.1	4
5	16.4	17.1	1.2	2.6		84.9	83.9	82.9	86.4	86.6	83.9	5
6	9.6	9.6	15.1	15.0	15.9		90.7	89.8	92.5	93.4	91.4	6
7	1.9	2.4	16.1	16.4	17.0	9.6		86.6	94.6	90.4	99.1	7
8	13.0	13.0	15.3	15.3	16.2	8.8	11.8		88.9	89.6	86.9	8
9	6.2	6.7	13.4	14.0	14.3	7.9	5.7	9.2		92.9	94.8	9
10	10.3	10.3	14.0	14.6	14.9	7.0	9.8	8.4	7.3		90.6	10
11	2.4	2.8	16.1	16.4	17.0	8.8	0.9	11.5	5.4	9.5		11
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	

①8.SEQ

②11.SEQ

③B1-HN.seq

④Lasota-HN.seq

⑤VGGA.SEQ

⑥Italy00.SEQ

⑦JS-3-98-Go.SEQ

⑧Russia91.SEQ

⑨Taiwan95.SEQ

⑩US72.SEQ

⑪ZJ1-China.SEQ

Table 2. percent similarity (IBDV)

	1	2	3	4	5	6	
1		99.3	99.1	99.3	99.3	99.3	1
2	0.7		99.8	100	100	100	2
3	0.9	0.2		99.8	99.8	99.8	3
4	0.7	0.0	0.2		100	100	4
5	0.7	0.0	0.2	0.0		100	5
6	0.7	0.0	0.2	0.0	0.0		6
	1	2	3	4	5	6	

① IBD-Korean sample.SEQ

⑤ Kal2001-Egypt.SEQ

② BJ836-attenuated vaccine.SEQ

⑥ Tri-Bio.SEQ

③ China.SEQ

④ India.SEQ



Clinical signs

- depression
- severe prostration
- ruffled feather
- open mouth breathing



Greenish yellow diarrhea



Specific sign of Newcastle Disease

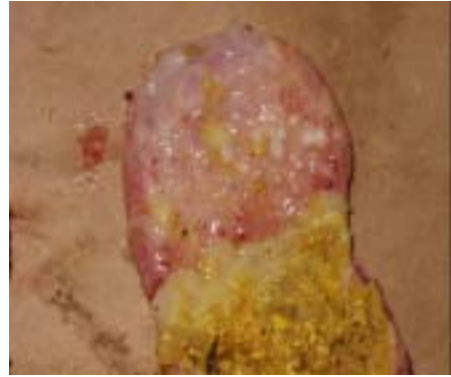


clinical signs -soiled vent feathers

- whitish watery diarrhea
- depression



-normal spleen & enlarged spleen



vesicles in the mucosa of gizzard



↓
- cloudy air sac membranes and hemorrhage(airsacculitis)



↓
- petechial hemorrhages in the intestine

타. 요약

Newcastle Disease(ND)는 닭에서 호흡기 증상, 신경 증상, 장염, 출혈성 병변을 특징으로 하며 종종 높은 치사율을 보이는 질병으로서 사람에서 결막염을 일으킬 수 있다는 사실이 보고 된 바 있으며, Infectious bursal disease(IBD)는 주로 어린 닭에서 의기소침, 수양성의 설사, 식욕부진, 우울, 진진, 극도의 쇠약, 폐사 등의 증상을 야기하는 질병이다.

본 연구에서는 국내에서 ND와 IBD의 질병 특이적인 증상을 나타내고 폐사된 닭에서 ELISA 양성반응을 확인한 후, 닭에서 분리한 바이러스의 분자 유전학적 성상을 규명하고 대장균 시스템을 이용하여 NDV의 HN gene과 IBD의 VP2 gene을 발현하기 위한 전단계 시험으로서 클로닝을 수행하였으며, 국내 분리 strain을 국내에서 사용하고 있는 백신 strain 또는 외국에서 분리된 strain과 그 유사성을 비교하였다.

충남 연기군 진의면과 조치원읍에 각각 소재하고 있는 두 곳의 농장으로부터 전형적인 ND와 IBD 증상을 나타내다가 폐사한 닭으로부터 분리한 sample의 분자유전학적 진단을 의뢰받았다. 바이러스를 분리하기 위한 주요 sample은 spleen, trachea, F낭을 이용하였으며 spleen과 F낭에서 추출한 viral RNA가 들어있는 tube에는 IBD-VP2 primer를 이용하고 trachea에서 추출한 viral RNA가 들어있는 tube에는 NDV-HN primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하였고 2개의 sample에서 NDV 양성 반응을 나타내는 500bp의 뚜렷한 밴드를 확인하였으며 1개의 sample에서 IBD 양성 반응을 나타내는 500bp의 뚜렷한 밴드를 확인할 수 있었다. NDV를 감지하기 위한 방법으로 PCR에 기초한 진단 기술은 오늘날 실험실에서 진단법으로서 큰 호응을 얻고 있다. 또한 IBD에 대한 autoantibody를 진단하기 위한 방법으로 agar gel precipitation, virus neutralization, ELISA 등이 쓰이고 IBDV RNA를 감지하기 위한 방법으로 radiolabeled and nonradiolabeled cDNA probe가 다른 방법에 비해 감수성이 높은 것으로 알려져 있으나 RT-PCR에 의한 진단법도 그 정확성을 널리 인정받고 있다.

NDV의 감염성과 병원성에 있어서 중요하고 protective immunity를 유도하는 hemagglutinin-neuraminidase와 IBD에 있어서 중화항체의 생성을 유도하는 epitope를 포함하고 있는 VP2 gene을 이용하여 insert DNA를 만들고 pGEM-T Easy Vector에 클로닝하여 염기서열 분석을 수행하였다. 분석을 위하여 GenBank의 유전정보를 이용하였다.

이번 연구에서 분리한 8번 trachea sample의 NDV 염기서열 분석결과 우리나라에서 백신주로 이용하고 있는 B1-HN, Lasota-HN, VGGA strain과는 85.3, 85.0, 84.6 %의 아주 낮은 homology를 나타내었으며, 11번 trachea sample역시 B1-HN, Lasota-HN, VGGA strain과 84.6, 84.1, 83.9%의 아주 낮은 homology를 나타내었다. 또한 8번과 11번 NDV는 JS-3-98-Go strain, ZJ1-China strain과는 97~98%정도의 homology를 보였으며 Russia나 Taiwan에서 분리된 바이러스와도 아주 낮은 homology를 보였다. 따라서 이번 연구에서 분리된 국내 NDV 바이러스는 그동안 백신주로 널리 사용하여 왔던 비교적 낮은 병원성의 Lentogenic pathotype과는 아주 상이한 분리주인 것으로 결론지을 수 있었다.

이번 실험에서 분리된 IBDV는 우리나라에서 백신주로 사용하고 있는 BJ836-attenuated

vaccine strain의 염기서열과는 99.3%의 상당히 높은 homology를 보였으며 India, China, Kal2001-Egypt strain과도 각각 99.1, 99.3, 99.3%의 높은 homology를 나타내었다. 다른 연구에서 알려진 바와 같이 India와 Egypt에서 분리된 IBDV는 very virulent(vv) phenotype에 속하므로 발생 계통학적인 상관관계로 볼 때 이번에 국내에서 분리된 IBDV도 very virulent(vv) phenotype에 속하는 것으로 결론지을 수 있었다. 다른 연구에서 보고된 바에 의하면 국내 진주에서 분리되었던 IBDV의 염기서열 분석 결과, attenuated strain, classical virulent strain과는 관계가 먼 very virulent(vv) phenotype으로 분류되었다.

이번 연구에서 나타난 결과와 같이 국내 NDV strain을 백신주와 외국 strain과 비교하였을 때 아주 낮은 근연성을 보이므로 질병을 예방함에 있어서 백신의 효과가 많이 뒤떨어질 수 밖에 없다는 사실과 함께, 국내에서 분리한 NDV HN gene에 대한 분자유전학적인 규명에 정진하여 새로운 백신을 개발하는 것에 힘써야 한다는 결론에 이르렀다.

IBD의 예방을 위하여 attenuated 또는 inactivated 형태의 다양한 백신이 쓰여지고 있다 그러나 이러한 백신들은 특정 neutralizing epitope에 대한 제한된 quality를 가진 polyclonal antisera를 유도하기 때문에 백신 연구에 있어서의 초점은 특정 epitope에 대한 neutralizing antibody의 생성을 유도하는 단백질을 발현하기 위한 바이러스 유전자 연구에 맞추어져 있다. vvIBDV에 대한 백신과 진단시약을 개발하기 위한 단백질을 발현하기 위해서는 segment A에 대한 분자학적인 특성의 연구가 더 진행되어야 할 것이다.

2. NDV 바이러스의 유전자를 이용한 ELISA 방법 개발

또한 이번 연구에서는 기존의 가장 일반적이면서 가장 많이 사용되고 있는 뉴캐슬병의 진단법인 ELISA 방법의 개선을 위하여 기존에 사용되지 않은 새로운 방법을 이용한 진단법의 개발에도 연구를 수행하였다.

기존의 뉴캐슬병 진단법에 이용되었던 ELISA 방법은 whole virus를 이용한 방법이 사용되었다. 이러한 방법은 매번 바이러스를 culture해야만 하는 시간적, 금전적 부담감을 가지고 있다. 특히나 아직까지 이 뉴캐슬 바이러스를 효율적으로 키울만한 cell line이 없다는 부담감 때문에 매번 SPF egg를 이용해야 하는 부담감이 매우 높다고 할 수 있었다. 또한 whole virus를 사용할때는 strain이 다르다거나 유전적으로 변이종이 나타날 시에는 유전자의 차이점 때문에 진단이 negative로 잘못 진단될 수도 있다. 이러한 문제점을 해결하고자 본 연구진들은 현재까지 알려진 모든 NDV strain의 유전자를 비교 검토하여 가장 유전적으로 homology가 높은 부위를 찾아서 이 특정 부위를 RT-PCR을 이용하여 특정 유전자를 증폭하고 또한 이들을 cloning하여 *E. coli*에서 발현 정제하여 이를 ELISA coating antigen으로 이용한 새로운 방법을 모색하였다. 이를 이용한 진단법과 기존에 사용되고 있는 whole virus를 이용한 진단법의 비교 실험을 통하여 보다 효율적이고 빠른 진단법의 개발을 모색하고자 하였다.

가. NDV RNA 추출 및 Reverse transcription

NDV virus (Lasota strain)을 구입하여 이들과로부터 RNA를 추출하기 위하여 Qiagen viral RNA Extraction kit을 이용하여 NDV RNA를 추출한 후, 이 RNA를 이용하여 RT(reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA를 만들었다. cDNA를 합성하기 위한 조건은 다음과 같다.

RT수행 과정 및 사용 시약		
	oligo dT primer	Random primer
primer	1 μ l	1 μ l
RNA	3 μ l	3 μ l
10m dNTP	2 μ l	2 μ l
DEPC H ₂ O	6 μ l	6 μ l
	total 12 μ l	total 12 μ l
incubation at 65°C for 5min and chill on ice immediately		
5x cDNA synthesis buffer	4 μ l	4 μ l
0.1M DTT	1 μ l	1 μ l
HPRI	1 μ l	1 μ l
DEPC H ₂ O	1 μ l	1 μ l
Thermoscript RT	1 μ l	1 μ l
Random primer : incubation at 25°C for 10min and incubation at 50°C for 60min oligo dT primer : incubation at 50°C for 60min without 25°C		
chill on ice immediately and keep at -20°C		

이를 이용하여 NDV HN 및 F gene에 specific한 primer를 작성하여 PCR을 수행하였다.

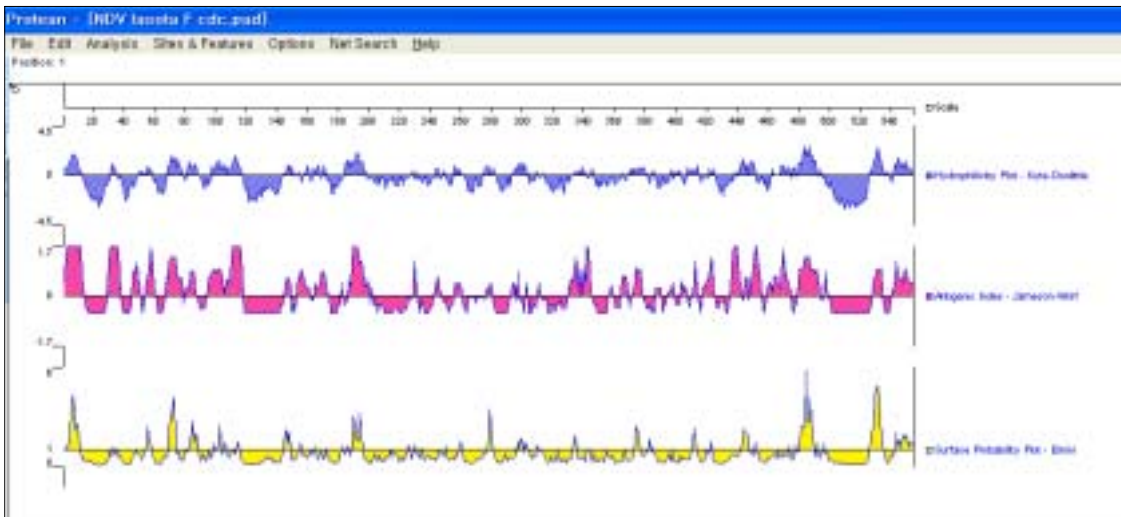
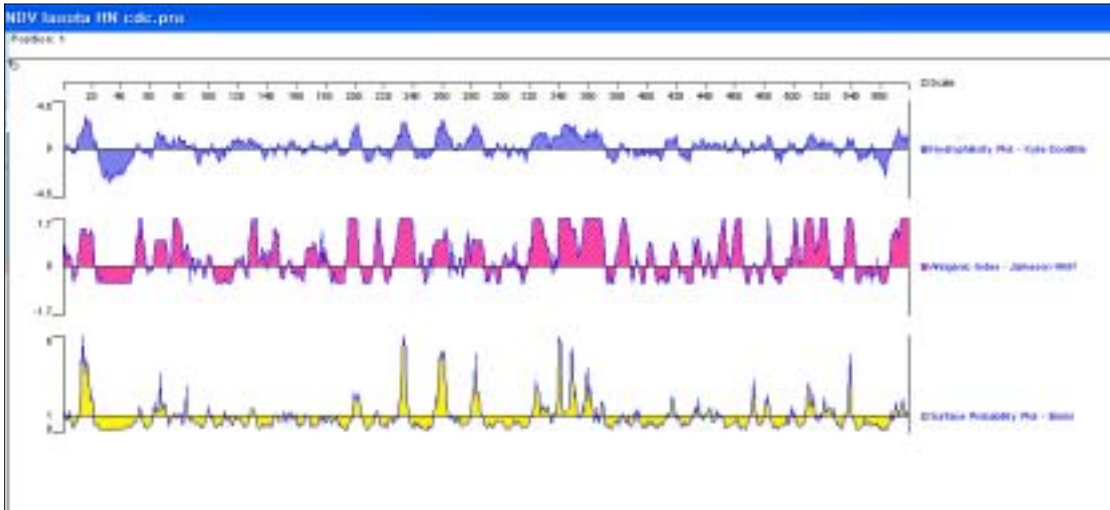
나. PCR (polymerase chain reaction)을 하기 위한 발현 단백질의 위치 결정

ELISA 항원으로 사용할 NDV 유전자의 발현을 위하여 우선이 유전자중 가장 항원성이 높고, strain 간의 homology가 가장 높은 부위, 또한 neutralizing epitope등 여러 가지 factor를 고려하여 어느 부위를 발현할 것인지에 대하여 많은 토의를 거쳤다.

또한 NDV의 RNA sequence중에 antigenic index와 hydrophilicity plot, surface probability plot등을 이용하여 NDV의 어느 부분이 더 효과적으로 표면 발현과 가장 항원성이 높은 부위를 파악하고자 여러 논문을 통해 conserved sequence를 찾았고 이 부위를 포함하도록 construct를 구성하여 이들 부위를 이용하여 NDV의 다른 여러 가지 strain도 검출이 가능한 진단법에 이용하고 또한 높은 항원성부위를 이용한 세포 표면 발현 부위로 이용하고자 하였다. 항원성이 높은 부위는 단백질의 표면에 존재한다고 추측이 가능하므로 이들의 항원성은 상대적으로 높다고 평가되기 때문에 hydrophilicity 가 높은 부위를 선택했다. 또한 이들 부위를 발현하여 가장 좋은 유전자 발현을 위하여 현재 시판되고 있는 여러 가지 E. coli용 발현

벡터들 중, pQE30, pRSET, pET 등 다양한 형태와 시스템의 벡터에 cloning 하여 이들을 다양한 시스템에서 발현하고자 노력하였다.

아래 그림은 antigenic index와 hydrophilicity plot, surface probability plot을 나타내는 것으로써 위의 열거한 자료를 토대로 어떤 부위의 protein을 발현 시킬 것인지를 결정하고 clone을 만들게 된다.



위에서 언급하였듯이 이러한 방식을 이용하여 총 5개의 primer set를 제작하였고, F의 경우 F1, F2 각각의 부위와 두 부위를 다 포함하는 형태로 만들었고, HN의 경우 두 가지 다른 크기의 유전자를 선택하였다. 다음 모식도는 이번에 사용한 HN과 F 유전자 부위를 대략적으로 설명한 것이다.

선택한 151개의 아미노산 중에서 234-NRKSCS-239 sequence는 모든 paramyxoviridae에 conserved region이며 hydrophilic한 성질을 나타낸다. HN의 12개의 primer를 만들때 원래의 주형에서 DNA sequence 만을 바꾸어 아미노산의 변화는 주지 않았으며 E.coli에서 적은 양으로 존재하는 amino acid를 cell 내에 많이 존재하는 amino acid로 바꾸어 주었다. 이로 인해 이론상으로 세포내에서 발현되기 힘든 amino acid의 발현율을 높일 수 있도록 하였다.

NDV F antigen

```

ttg ctc acc ccc ctt ggt gac tct atc cgt agg ata caa gag tct gtg 48
Leu Leu Thr Pro Leu Gly Asp Ser Ile Arg Arg Ile Gln Glu Ser Val
1 5 10 15
act aca tct gga ggg ggg aga cag ggg cgc ctt ata ggc gcc att att 96
Thr Thr Ser Gly Gly Arg Gln Gly Arg Leu Ile Gly Ala Ile Ile
20 25 30
ggc ggt gtg gct ctt ggg gtt gca act gcc gca caa ata aca gcy gcc 144
Gly Gly Val Ala Leu Gly Val Ala Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Ala
35 40 45
gca gct ctg ata caa gcc aaa caa aat gct gcc aac atc ctc cga ctt 192
Ala Ala Ile Ile Gln Ala Lys Gln Asn Ala Ala Asn Ile Leu Arg Leu
50 55 60
aaa gag agc att gcc gca acc aat gag gct gtg cat gag gtc act gac 240
Lys Glu Ser Ile Ala Ala Thr Asn Glu Ala Val His Glu Val Thr Asp
65 70 75 80
gga tta tgc caa cta gca gts gca gtt ggg aag atg cag cag ttt gtt 288
Gly Leu Ser Gln Leu Ala Val Ala Val Gly Lys Met Gln Gln Phe Val
85 90 95
aat gac caa ttt aat aaa aca gct gag gaa tta gac tgc atc aaa att 336
Asn Asp Gln Phe Asn Lys Thr Ala Gln Glu Leu Asp Cys Ile Lys Ile
100 105 110
gca cag caa gtt ggt gta gag ctc aac ctg tac cta acc gaa ttg act 384
Ala Gln Gln Val Gly Val Glu Leu Asn Leu Tyr Leu Thr Glu Leu Thr
115 120 125
aca gta ttc gga cca caa atc act tca cct gct tta aac aag ctg act 432
Thr Val Phe Gly Pro Gln Ile Thr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Leu Thr
130 135 140
att cag gca ctt tac aat cta gct ggt gga aat 465
Ile Gln Ala Leu Tyr Asn Leu Ala Gly Gly Asn
145 150 155

```

NDV F antigen (modified for E.coli)

```

ttg ctc acc cgg ctt ggt gac tct atc cgt cgt att caa gag tct gtg 48
Leu Leu Thr Pro Leu Gly Asp Ser Ile Arg Arg Ile Gln Glu Ser Val
1 5 10 15
act aca tct ggt ggg ggg cgt cag ggg cgc ctt att ggc gcc att att 96
Thr Thr Ser Gly Gly Arg Gln Gly Arg Leu Ile Gly Ala Ile Ile
20 25 30
ggc ggt gtg gct ctt ggg gtt gca act gcc gca caa att aca gcy gcc 144
Gly Gly Val Ala Leu Gly Val Ala Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Ala
35 40 45
gca gct ctg att caa gcc aaa caa aat gct gcc aac atc ctc cgt ctt 192
Ala Ala Ile Ile Gln Ala Lys Gln Asn Ala Ala Asn Ile Leu Arg Leu
50 55 60
aaa gag agc att gcc gca acc aat gag gct gtg cat gag gtc act gac 240
Lys Glu Ser Ile Ala Ala Thr Asn Glu Ala Val His Glu Val Thr Asp
65 70 75 80
ggt tta tgc caa tta gca gts gca gtt ggg aag atg cag cag ttt gtt 288
Gly Leu Ser Gln Leu Ala Val Ala Val Gly Lys Met Gln Gln Phe Val
85 90 95
aat gac caa ttt aat aaa aca gct gag gaa tta gac tgc atc aaa att 336
Asn Asp Gln Phe Asn Lys Thr Ala Gln Glu Leu Asp Cys Ile Lys Ile
100 105 110
gca cag caa gtt ggt gta gag ctc aac ctg tac ctt acc gaa ttg act 384
Ala Gln Gln Val Gly Val Glu Leu Asn Leu Tyr Leu Thr Glu Leu Thr
115 120 125
aca gta ttc gga cca caa atc act tca cct gct tta aac aag ctg act 432
Thr Val Phe Gly Pro Gln Ile Thr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Leu Thr
130 135 140
att cag gca ctt tac aat tta gct ggt ggt aat 465
Ile Gln Ala Leu Tyr Asn Leu Ala Gly Gly Asn
145 150 155

```

NDV HN antigen

```

aat ttt atc ceg ggg cct act aca gga tca ggt tgc act cga ata ccc 48
Asn Phe Ile Pro Ala Pro Thr Thr Gly Ser Gly Cys Thr Arg Ile Pro
1 5 10 15
tca ttt gac atg agt gct acc cat tac tgc tac acc cat aat gta ata 96
Ser Phe Asp Met Ser Ala Thr His Tyr Cys Tyr Thr His Asn Val Ile
20 25 30
ttg tct gga tgc aga gat cac tca cat tca tat cag tat tta gca ctt 144
Leu Ser Gly Cys Arg Asp His Ser His Ser Tyr Gln Tyr Leu Ala Leu
35 40 45
ggg gtg ctc cgg aca tct gca aca ggg agg gta ttc ttt tct act ctg 192
Gly Val Leu Arg Thr Ser Ala Thr Gly Arg Val Phe Phe Ser Thr Leu
50 55 60
cgt tcc atc aac ctg gac gac acc caa aat cgg aag tct tgc agt gtg 240
Arg Ser Ile Asn Leu Asp Asp Thr Gln Asn Arg Lys Ser Cys Ser Val
65 70 75 80
ast gca act ccc cgt ggt ggt gat atg ctg tgc tgc aaa gtc acg gag 288
Ser Ala Thr Pro Leu Gly Cys Asp Met Leu Cys Ser Lys Val Thr Glu
85 90 95
aca gag gaa gaa gat tat aac tca gct gtc cct acg cgg atg gta cat 336
Thr Glu Glu Asp Tyr Asn Ser Ala Val Pro Thr Arg Met Val His
100 105 110
ggg agg tta ggg ttc gac gcc cag tac cac gaa aag cac cta gat gtc 384
Gly Arg Leu Gly Phe Asp Gly Gln Tyr His Glu Lys Asp Leu Val
115 120 125
aca aca tta ttc ggg gac tgg gtg gcc aac tac cca gga gta ggg ggt 432
Thr Thr Leu Phe Gly Asp Trp Val Ala Asn Tyr Pro Gly Val Gly Gly
130 135 140
gga tct ttt att gac agc cgc 465
Gly Ser Phe Ile Asp Ser Arg
145 150 155

```

NDV HN antigen (modified for E.coli)

```

aat ttt atc ceg ggg cct act aca ggt tca ggt tgc act cgt att cgg 48
Asn Phe Ile Pro Ala Pro Thr Thr Gly Ser Gly Cys Thr Arg Ile Pro
1 5 10 15
tca ttt gac atg agt gct acc cat tac tgc tac acc cat aat gta att 96
Ser Phe Asp Met Ser Ala Thr His Tyr Cys Tyr Thr His Asn Val Ile
20 25 30
ttg tct ggt tgc cgt gat cac tca cat tca tat cag tat tta gca ctt 144
Leu Ser Gly Cys Arg Asp His Ser His Ser Tyr Gln Tyr Leu Ala Leu
35 40 45
ggg gtg ctc cgt aca tct gca aca ggg cgt gta ttc ttt tct act ctg 192
Gly Val Leu Arg Thr Ser Ala Thr Gly Arg Val Phe Phe Ser Thr Leu
50 55 60
cgt tcc atc aac ctg gac gac acc caa aat cgt aag tct tgc agt gtg 240
Arg Ser Ile Asn Leu Asp Asp Thr Gln Asn Arg Lys Ser Cys Ser Val
65 70 75 80
ast gca act ccc cgt ggt ggt gat atg ctg tgc tgc aaa gtc acg gag 288
Ser Ala Thr Pro Leu Gly Cys Asp Met Leu Cys Ser Lys Val Thr Glu
85 90 95
aca gag gaa gaa gat tat aac tca gct gtc cct acg cgt atg gta cat 336
Thr Glu Glu Asp Tyr Asn Ser Ala Val Pro Thr Arg Met Val His
100 105 110
ggg agt tta ggg ttc gac gcc cag tac cac gaa aag cac tta gat gtc 384
Gly Arg Leu Gly Phe Asp Gly Gln Tyr His Glu Lys Asp Leu Val
115 120 125
aca aca tta ttc ggg gac tgg gtg gcc aac tac cca ggt gta ggg ggt 432
Thr Thr Leu Phe Gly Asp Trp Val Ala Asn Tyr Pro Gly Val Gly Gly
130 135 140
ggt tct ttt att gac agc cgc 465
Gly Ser Phe Ile Asp Ser Arg
145 150 155

```

다. PCR (polymerase chain reaction)

cDNA로부터 PCR을 수행하기 위한 primer들은 아래와 같다.

F1 Sense BamHI	CGC GGATCC GAT GGT AGA CCT CTT GCA G
F1 Antisense KpnI/ HindIII	CCC AAGCTT GGTACC TTA TTA ATT TCC ACC AGC TAG ATT G
F2 Sense BamHI	CGC GGATCC GTC GGT TCT GTG ATA GAA
F2 Antisense KpnI/ HindIII	CCC AAGCTT GGTACC TTA TCA CAT TTT TGT AGT GGC
HN Sense BamHI	CGC GGATCC ACT ACA GGA TCA GGT TGC
HN 1 Antisense KpnI/ HindIII	CCC AAGCTT GGTACC TTA TTA TAC AGT CAG TAC CGG GTC
HN 2 Antisense KpnI/ HindIII	CCC AAGCTT GGTACC TTA TTA TGC TGC TTT GGT ACT GCT

각 primer 의 앞부분과 뒷 부분에 *BamHI*, *KpnI*, *HindIII*가 인지 할수 있는 site를 넣었으며 이는 pQE와 pRSET는 *BamHI*, *HindIII*를 pAT는 *BamHI*, *KpnI*를 이용하여 cloning을 하기위한 restriction enzyme site로써 삽입하였다.

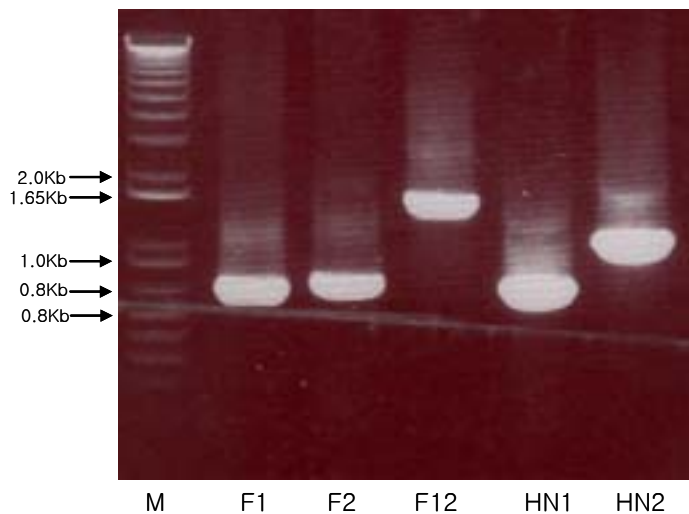
PCR 과정은 7종의 primer를 가지고 5개의 clone을 만들었으며 다음과 같다.

clone	사용되는 primer
F1	F1 Sense BamHI + F1 Antisense KpnI/ HindIII
F2	F2 Sense BamHI + F2 Antisense KpnI/ HindIII
F12	F1 Sense BamHI + F2 Antisense KpnI/ HindIII
HN1	HN Sense BamHI + HN 1 Antisense KpnI/ HindIII
HN2	HN Sense BamHI + HN 2 Antisense KpnI/ HindIII

PCR은 다음과 같은 조건으로 수행하였다.

시약	용 량	비 고
cDNA	2 μ l	
primer	각 2 μ l(sense, anti-sense)	F1,F2, F12, HN1, HN2
dNTP	5 μ l	
10x buffer	3 μ l	
Taq polymerase	1 μ l	Takara EX Taq, PFU 등
DW	15 μ l	
total	30 μ l	

위의 조성으로 98 $^{\circ}$ C predenature 5분, 95 $^{\circ}$ C denature 50초, 54 $^{\circ}$ C annealing 50초, 72 $^{\circ}$ C extension 2분의 과정을 30회 반복하여 수행 후 마지막 extension 5분을 수행하였다. PCR의 경우는 Bioneer와 Takara 그리고 solgent등의 일반 taq과 PFU, EX taq등 다양하게 사용하였다.



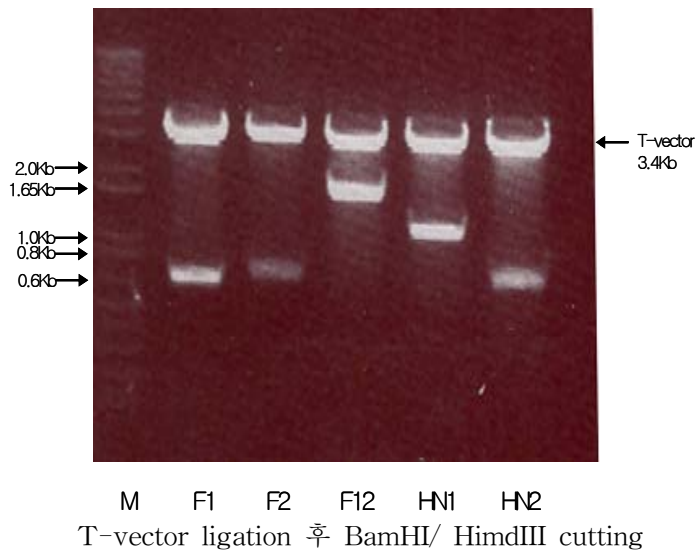
NDV DNA의 PCR 증폭 결과 (1% agarose gel)

라. T-vector ligation

이렇게 증폭된 DNA를 1% agarose gel에서 확인한 후에 DNA를 정제하고 T-vector에 cloning을 하였다.

성분 및 시약	용 량	비 고
T-vector	1 μ l	
insert	3 μ l	F1,F2, F12, HN1, HN2
ligase	1 μ l	
10x buffer	2 μ l	
DW	13 μ l	
total	20 μ l	

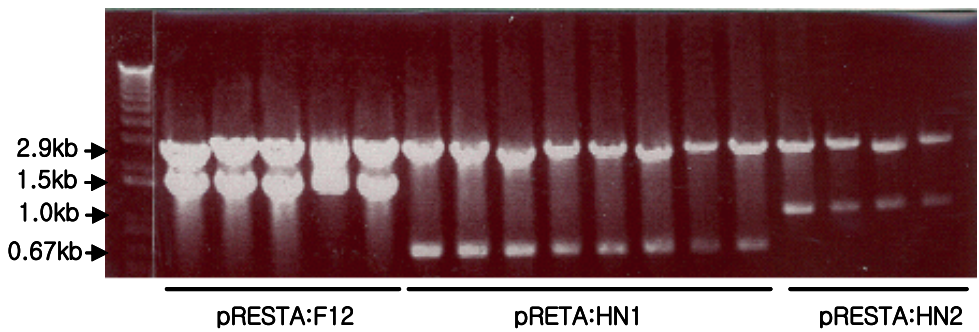
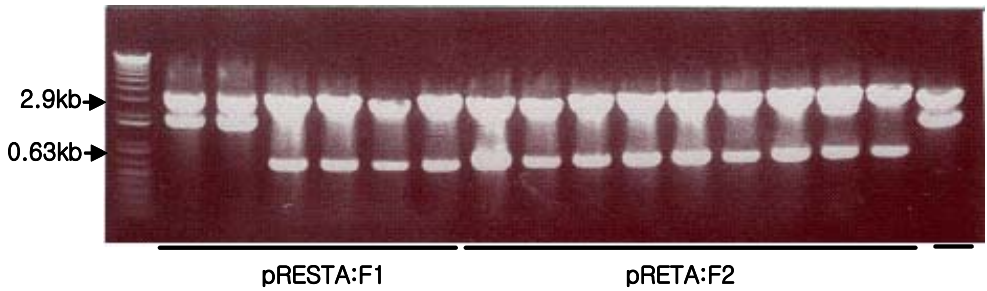
T-vector에 원하는 NDV gene이 정확하게 들어간 것을 확인하게 된 후에는 다시 pQE30과 pRSET vector에 coling을 하였다.



마. pQE30, pRSETA vector ligation 및 transformation

T-vector에서 restriction enzyme 인 *Bam*HI, *Kpn*I, *Hind*III를 이용하여 원하는 NDV 유전자만을 잘라내고 이를 pQE30 vector 및 이보다 pRSET vector에서 viral protein이 더 잘 발현된다는 실험 결과에 의해 pQE30와 pRSET 모두 cloning 하였다.

이 vector들을 E.coli나 락토바실루스에 형질 전환을 시키게 되는데 이것은 두가지 방법을 이용하였다.



pRSETA : NDV clone을 BamHI/ HindIII cutting 으로 확인

바. pQE30, pRSET-A의 발현

이 cell 들은 각기 다른 온도(25℃, 30℃, 37℃, 42℃)에서 발현을 진행하였다. 500ml culture flask에 100ml의 LB broth 및 다른 6종의 배지를 이용하여 배양액의 1%의 cell을 접종한 후 배양하였다. 접종된 flask를 OD₆₀₀에서 0.4-0.5가 될 때까지 배양한후에 IPTG (Isopropyl b-D-thiogalactopyranoside)를 1mM에서 2mM사이로 다양한 농도를 넣어 발현을 시켰다.

발현율을 높여 더욱 많은 단백질을 얻고자 LB broth뿐 아니라 다른 다양한 배지를 선택하고 이 배지에서 다양한 조건에서 induction을 진행 중에 있다.

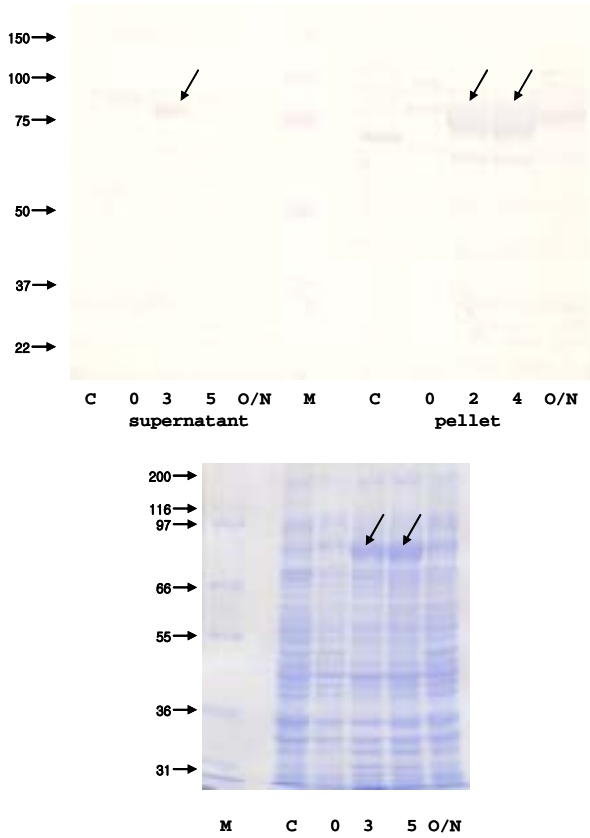


사. pETexpression

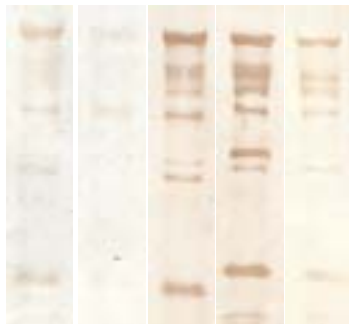
확인된 T-vector의 HN gene을 잘라내어 이를 pET43-1a vector에 ligation 후 이를 다시 sequencing과정을 통해 확인한다. 이렇게 확인된 pET43-1a:NDV F, HN을 induction을 하기 위해 DE3 cell에 transformation 후, 이것을 30°C에서 수행하였다. Induction 조건은 100ml 2x LB broth에 pET43-1a : HN 배양액을 1% seeding 한 후 30°C에서 약 3시간정도 배양하고 OD600값 0.463일때 IPTG를 final conc. 2mM이 되도록 넣어준 후 0, 2, 4, 24 시간동안 시간 별로 발현율을 확인하였다.

pET-43-1a만 단독적으로 발현될 경우 약 60kDa이 되며 HN이 fusion 된 형태로 발현될 경우는 약 76kDa정도에 해당한다.

발현이 확인된 NDV F, HN의 fusion protein을 His-Tag을 이용하여 확인한 결과이다.

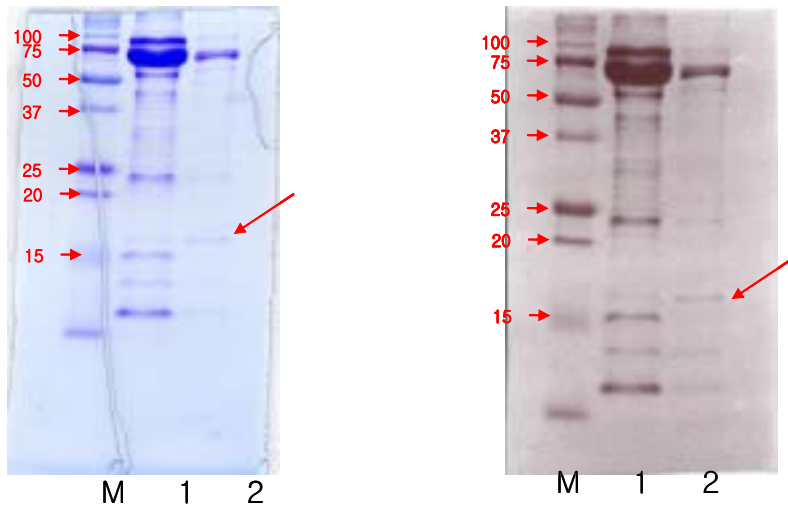


또한 보다 확실한 결과의 확정을 위하여 NDV positive chicken serum과의 반응 결과이다.



이를 His-tag antibody를 이용하여 purify 한 후 이를 확인하기 위하여 다시 한번

SDS-PAGE 및 Westernblot 방법을 이용하여 확정하였다.



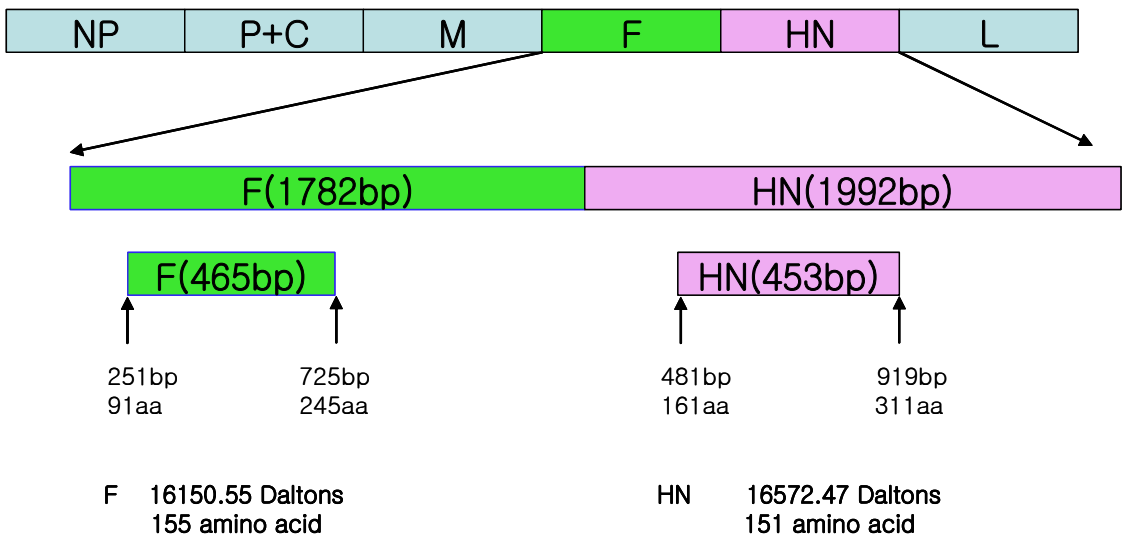
pET43-1a : HN Elution 1 sample
M : marker
1 : E1 sample (2.6ug/ul, 10ul loading)
2 : rEK 처리된 E1 sample 10ul loading

15% gel

아. PCR (polymerase chain reaction)을 하기 위한 발현 단백질의 다른 위치 결정

1차 년도에 실험하였고 발현 되었던 NDV F와 HN은 비교적 낮은 발현율을 보였다. 또한 발현하고자 하는 크기가 정제하기 위해서는 약간 부적합한 점이 없지 않아서 새로운 방법으로 다시 발현을 시도 하였다.

물론 1차 년도에 비해 단백질의 위치 결정에는 큰 변화가 없었지만 좀 더 안정적으로 발현될 수 있고 쉽게 정제 할 수 있는 방법을 선택하였다. 방법은 1차 년도와 동일하면 위치상에서 약간의 변화를 주었다. 이 부분도 또한 DNA sequence중에 antigenic index와 hydrophilicity plot, surface probability plot등을 이용하여 NDV의 어느 부분이 더 효과적으로 표면 발현과 antigen으로써의 역할이 다른 곳에 비해 좋은지를 파악하였고 여러 논문을 통해 conserved sequence(모든 NDV가 공통적으로 가지고 있는 염기 서열 :이 부분에 의해서 항체가 생성이 된다면 이 부분을 가지고 있는 모든 NDV는 검출이 가능하다.)를 찾았고 이 부위를 포함하도록 construct를 구성하여 NDV의 다른 여러 가지 strain도 검출이 가능하도록 계획하였고 크기를 약간 줄였으며 vector를 이용하여 원하는 크기보다 더욱 큰 단백질을 만들어 냈다.



위 그림은 새로 선택되어진 단백질의 위치를 나타내는 모식도이고 이전의 PCR과는 다른 방법으로 증폭을 하였다. Fusion 단백질은 465 아미노산의 하나의 부분적인 단백질만을 선택하였고 Hemagglutinin- neuraminidase도 마찬가지로 453아미노산 하나의 부분적인 단백질만을 선택하였다.

자. PCR (polymerase chain reaction)

기존의 PCR 과정과는 다르게 gene을 합성하는 방식의 PCR 기법을 사용하였으며 그에 따른 primer는 다음과 같다.

NDV F Sense 1(48)

5' cc gga tcc ttg ctc acc cca ctt ggt gac tct atc cgt cgt att caa g 3'

NDV F Sense 2(49)

a ggg cgt ctt att ggc gcc att att ggc ggt gtg gct ctt ggg gtt gca

NDV F Sense 3(49)

tg att caa gcc aaa caa aat gct gcc aac atc ctt cgt ctt aaa gag ag

NDV F Sense 4(49)

gtc act gac ggt tta tca caa tta gca gtg gca gtt ggg aag atg cag c

NDV F Sense 5(49)

t cag gaa tta gac tgt atc aaa att gca caa caa gtt ggt gta gag ctc

NDV F Sense 6(50)

tc ggt cca caa atc act tca cct gct tta aac aag ctg act att cag gca

NDV F Anti sense 1(49)

3' ca taa gtt ctc aga cac tga tgt aga cca ccc ccc gca gtt ccc gca ga 5'

5' --ag acg ccc ttg acg ccc ccc acc aga tgt agt cac aga ctc ttg aat ac 3'

NDV F Anti sense 2(49)

ccc caa cgt tga cgg cgt gtt taa tgt cgc cgg cgt cga gac taa gtt c

--c ttg aat cag agc tgc ggc cgc tgt aat ttg tgc ggc agt tgc aac ccc

NDV F Anti sense 3(49)

a ttt ctc tca taa cgg cgt tgg tta ctc cga cac gta ctc cag tga ctg

--gtc agt gac ctc atg cac agc ctc att ggt tgc ggc aat act ctc ttt a

NDV F Anti sense 4(49)

tc tac gtc gtc aaa caa tta ctg gtt aaa tta ttt tgt cga gtc ctt aa

--aa ttc ctg agc tgt ttt att aaa ttg gtc att aac aaa ctg ctg cat ct

NDV F Anti sense 5(49)

cat ctc gag ttg gac atg gaa tgg ctt aac tga tgt cat aag cca ggt g

--g tgg acc gaa tac tgt agt caa ttc ggt aag gta cag gtt gag ctc tac

NDV F Anti sense 6(61)

taa gtc cgt gaa atg tta aat cga cca cca tta att att cca tgg aga gct cct tgc aac c

--c caa gct tcc tgc aga ggt acc tta tta att acc acc agc taa att gta aag tgc ctg aat

NDV HN Sense 1(47)
cc gga tcc aat ttt atc cca gcg cct act aca ggt tca ggt tgt act
NDV HN Sense 2(48)
cat tac tgt tac acc cat aat gta att ttg tct ggt tgt cgt gat cat
NDV HN Sense 3(48)
gtg ctc cgt aca tct gca aca ggg cgt gta ttc ttt tct act ctg cgt
NDV HN Sense 4(48)
aag tct tgc agt gtg agt gca act cca ctg ggt tgt gat atg ctg tgt
NDV HN Sense 5(48)
tat aac tca gct gtc cct acg cgt atg gta cat ggg cgt tta ggg ttc
NDV HN Sense 6(48)
gtc aca aca tta ttc ggg gac tgg gtg gcc aac tac cca ggt gta ggg

NDV HN Anti sense 1(48)
3' cca aca tga gca taa ggt agt aaa ctg tac tca cga tgg gta atg aca 5'
5' --aca gta atg ggt agc act cat gtc aaa tga tgg aat acg agt aca acc 3'
NDV HN Anti sense 2(48)
gca cta gta agt gta agt ata gtc ata aat cgt gaa cca cac gag gca
--acg gag cac acc aag tgc taa ata ctg ata tga atg tga atg atc acg
NDV HN Anti sense 3(48)
tga gac gca agt tag ttg gac ctg ctg tgg gtt tta gca ttc aga acg
--gca aga ctt acg att ttg ggt gtc gtc cag gtt gat tga acg cag agt
NDV HN Anti sense 4(48)
tac gac aca agt ttt cag tgc ctc tgt ctc ctt ctt cta ata ttg agt
--tga gtt ata atc ttc ttc ctc tgt ctc cgt gac ttt tga aca cag cat
NDV HN Anti sense 5(48)
aat ccc aag ctg ccg gtc atg gta ctt ttc ctg aat cta cag tgt tgt
--tgt tgt gac atc taa gtc ctt ttc atg gta ctg gcc gtc gaa ccc taa
NDV HN Anti sense 6(61)
cca cat ccc cca cca aga aaa taa ctg tgc gca att att cca tgg aga gct cct tgc aac c
-c caa gct tcc tgc aga ggt acc tta tta acg gct gtc aat aaa aga acc acc ccc tac acc

각 primer 의 앞부분과 뒷 부분에 *Bam*HI과 *Kpn*I, *Hind*III, *Xho*I가 인지 할수 있는 site를 넣었으며 이는 pET43-1a는 *Bam*HI, *Xho*I을 pAT는*Bam*HI, *Kpn*I를 이용하여 cloning을 하기 위한 restriction enzyme site로써 삽입하였다.

PCR 과정은 각각 12개의 primer를 이용하였고 2개의 clone 만들었으며 다음과 같다.

clone	사용되는 primer
F	F Sense BamHI + F Antisense HindIII/ <i>Xho</i> I / KpnI
HN	HN Sense BamHI + HN Antisense HindIII/ <i>Xho</i> I / KpnI

PCR을 각각의 12개의 primer를 합성하기위한 1차 PCR과정과 여기서 만들어진 합성물을 template로 이용하여 증폭시킨 2차 PCR 과정이 있으며 PCR은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

첫 번째 PCR 조건은 다음과 같으며 일반적으로 사용되는 PCR과는 다른점이 있으며 DNA나 RNA로부터 증폭을 하여 만드는 과정이 아닌 단지 primer만을 이용하여 합성하는 방법을 사용하였다.

성분 및 시약	용 량	비 고
pimer	각 1 μ l	10pM
dNTP	8 μ l	각각0.4mM
10x buffer	5 μ l	1X
Pyrobest	1 μ l	Takara Pyrobest 5U
DW	24 μ l	
total	50 μ l	

위에 열거한 mixture를 predenature 과정과 last extension 과정 없이 진행하였으며 95 $^{\circ}$ C denature 50초, 54 $^{\circ}$ C annealing 50초, 72 $^{\circ}$ C extension 2분의 과정을 30회 반복하여 유전자를 합성하였다.

그리고 이어서 두 번째 PCR 과정을 다음과 같은 조건으로 수행하였다. 여기서는 첫 번째 PCR산물로 만들어진 합성된 DNA를 template로 이용하여 PCR을 수행하였다.

성분 및 시약	용 량	비 고
Pyrobest product	2 μ l	
primer	각 5 μ l(sense1, anti-sense6)	F, HN 각각 50pM
dNTP	5 μ l	0.2mM
10x buffer	10 μ l	1X
Taq polymerase	1 μ l	Takara EX Taq 5U
DW	69 μ l	
total	100 μ l	

위의 조성으로 95 $^{\circ}$ C predenature 5분, 95 $^{\circ}$ C denature 50초, 54 $^{\circ}$ C annealing 50초, 72 $^{\circ}$ C extension 2분의 과정을 40회 반복하여 수행 후 마지막 extension 5분을 수행하였다. 증폭된

DNA를 pGEMT vector에 ligation 한 후에 restriction enzyme과 sequencing 과정을 통해 원하는 F, HN이 증폭 되었는지 를 확인하였다.

차. pET43-1a vector 를 이용한 HN, F 단백질의 대장균에서의 발현

다른 대장균용 expression vector인 pET43-1a를 이용하여 또다른 발현 양상을 시도하였다. 확인된 pET43-1a vector : NDV F, HN은 각기 다른 온도(25℃, 30℃, 37℃, 42℃)에서 발현을 진행하였다. 500ml culture flask에 100ml의 2X LB broth 배지를 이용하여 배양액의 1%의 cell을 접종한 후 키우게 된다. 접종하는 cell은 만들어진 확인된 colony를 18시간 전에 5ml의 배지에 먼저 키운 것으로 이것을 preculture라 한다. 접종된 flask를 OD₆₀₀에서 0.4-0.5가 될 때까지 배양한후에 IPTG(Isopropyl b-D-thiogalactopyranoside)를 1mM에서 2mM사이로 다양한 농도를 넣어 발현을 시켰다.

열거된 조건 중에서 30℃에서 약 6시간 정도 발현시켰을 때 가장 잘 발현이 되었으며 이렇게 발현된 NDV F 와 HN 단백질은 약 76kDa이 되면 이는 pET vector 내에 존재하는 tag과 fusion이 되는 형태이므로 원하는 사이즈 보다 60kDa 크게 발현되는 것이다. 물론 tag이 원하는 F, HN 보다 크기 때문에 약간의 간섭은 있을 것이지만 이 단백질은 정제를 위한 단백질이기 때문에 큰 영향을 미치지 않았다.



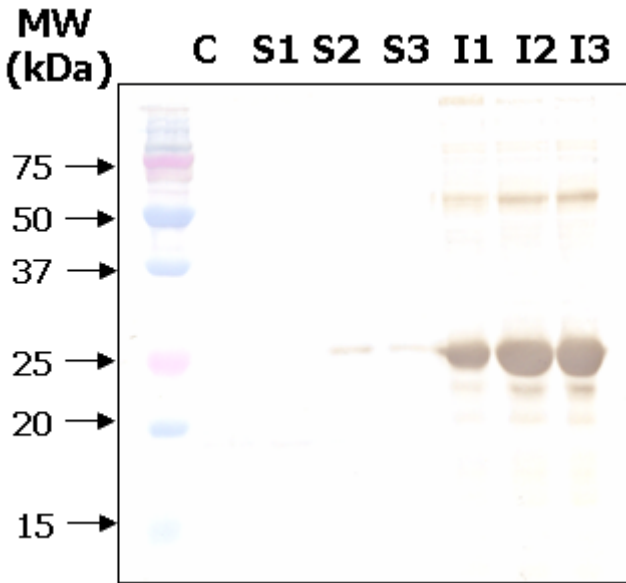
M: marker
 DE3: control
 1 : pET43-1a:F 0시간 5 : pET43-1a:F 0시간 9 : pET43-1a:HN 0시간
 2 : pET43-1a:F 3시간 6 : pET43-1a:F 3시간 10 : pET43-1a:HN 3시간
 3 : pET43-1a:F 5시간 7 : pET43-1a:F 5시간 11 : pET43-1a:HN 5시간
 4 : pET43-1a:F 22시간 8 : pET43-1a:F 22시간 12 : pET43-1a:HN 22시간

Expect size : 76kDa

현재까지의 경험에 비추어 볼 때, NDV HN은 F보다 쉽게 발현되고 매우 안정적인 발현율을 보여 준다. 그러나 fusion 단백질의 경우는 매우 불안정하여 쉽게 발현이 잘 되지 않는다. 물론 위의 사진은 발현을 시킨 것이지만 이를 정제 하였을 경우 손실율이 매우 크며 쉽게 변성이 된다. 그러나 HN의 경우는 비교적 안정적으로 정제되고 보관도 쉬운 편이다. 이에 먼저 HN 단백질을 이용하여 ELISA test를 수행하였으며 field serum을 통해 상용화된 제품과 비교를 하였다. fusion 단백질의 경우는 어떠한 이유인지는 모르지만 발현이 전혀 되지 않거나 발현율이 너무나 작다는 문제점을 가지고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 다양한 노력을 기울이고 있는 중이다.

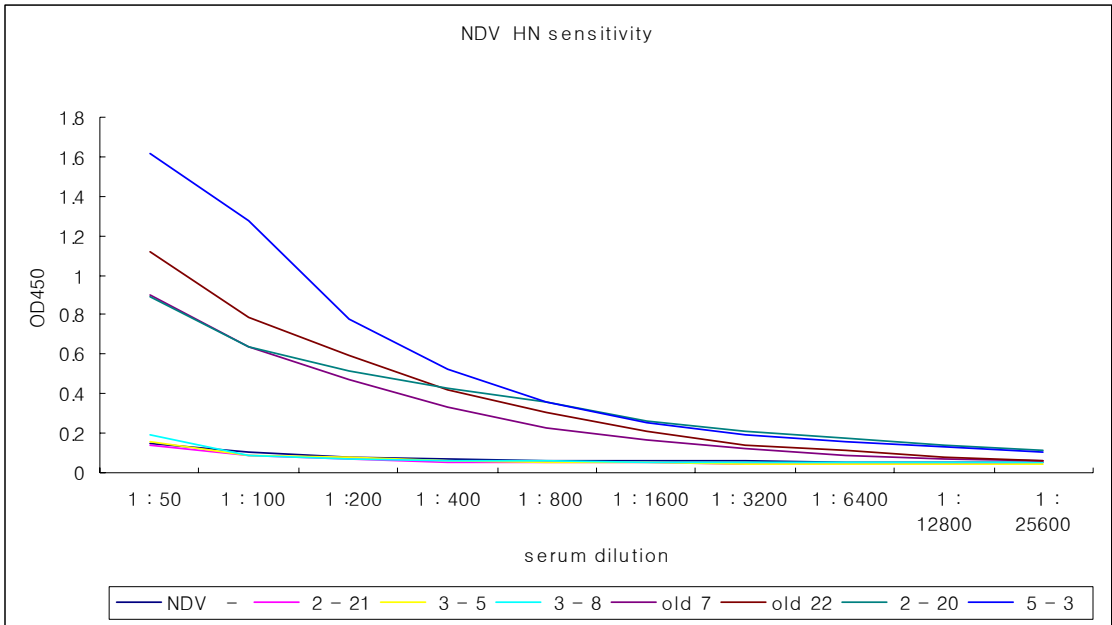
카. pRSET:HNExpression

다른 대장균용 expression vector인 pRET를 이용하여 또다른 발현 양상을 시도하였다.

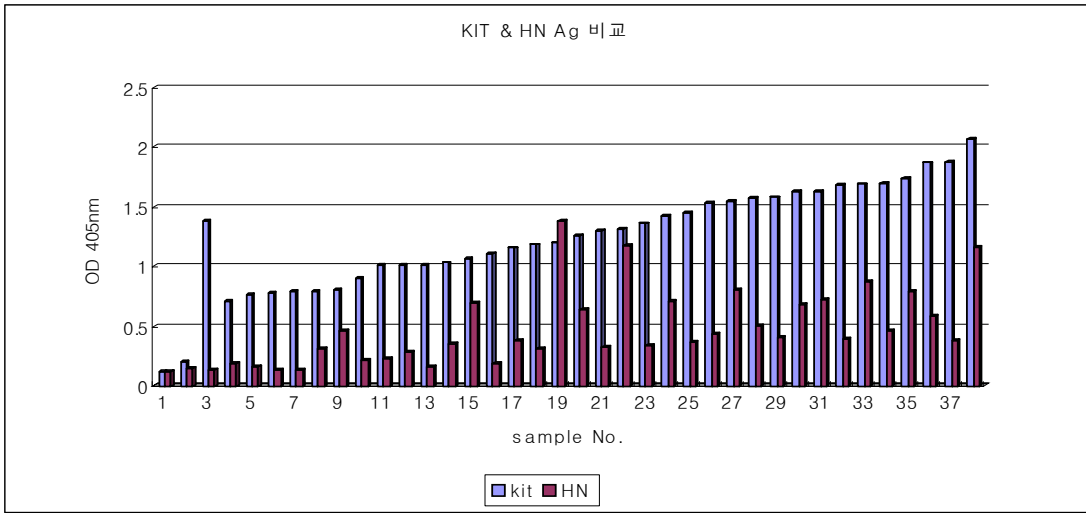


C:control(BL21(DE3)pLysS)
 S1,S2,S3 :solubleprotein
 IS,IS2,IS3:insolubleprotein

타. NDV 유전자를 이용한 새로운 rELISA 및 기존의 방법과의 비교

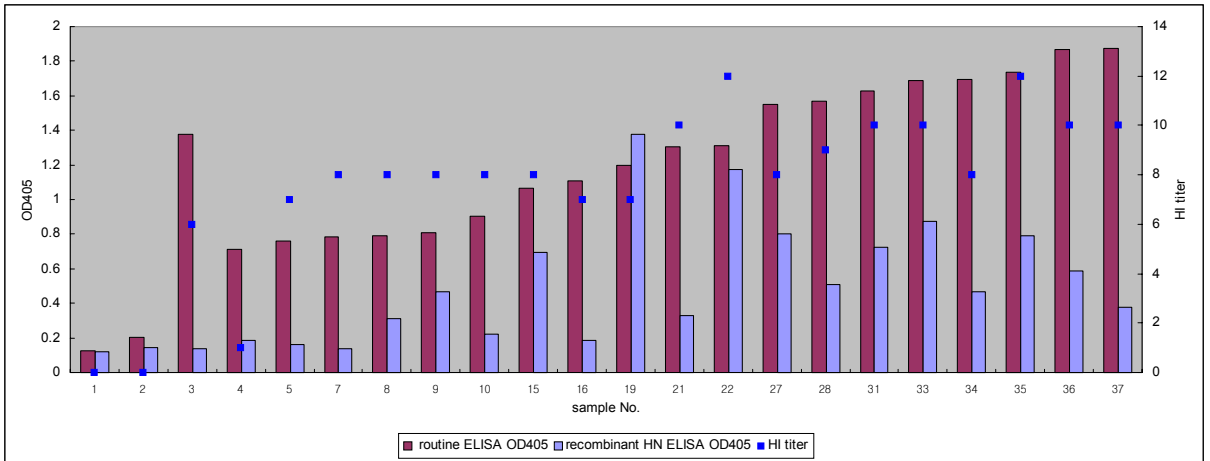


먼저 발현된 단백질이 항원으로서 얼마나 정확한 민감성을 가지고 있는지 알아보기 위한 실험을 해보았다. 이는 동일한 양의 항원을 코팅하고 negative serum과 positive serum을 serial dilution을 하여 얼마나 민감하게 반응을 하는지 실험한 것이다.



이 그림은 실제로 field serum을 이용하여 상용화된 제품과 발현된 HN을 가지고 그 결과를 비교한 것으로 상용화된 제품이 하나만을 제외하고 모든 값이 월등이 높았다. 그 이유는 상용화된 제품은 NDV LaSota strain의 whole virus를 코팅하여 ELISA를 수행하고 우리의 경우는 오로지 HN 단백질의 일부분만을 이용하여 진단을 하는 것이기 때문에 serum 내에 존재하는 항체들이 결합할수 있는 종류가 많아지고 적어지기에 따라 약간의 차이가 있을 것으로 보인다. 즉 serumso에 존재하는 많은 항체들중에서 상용화된 제품은 모든 항체 즉 NP, P, M, F, HN, L 단백질에 대한 모든 항체가 결합할 기회가 있는 반면에 HN만을 이용하는 것은 상대적으로 결합할수 있는 항체의 종류가 적어지므로 그만큼 값이 낮아 질거라는 예상을 하고있다.

이에 이 값을 이용하여 몇 개의 sample에 대하여 HI titer를 측정하여 비교해보았다. 이 결과는 상용화된 제품보다는 HN에 대한 ELISA에서 더욱 연관성이 있다. 즉 전부 일치하는 결과는 아니지만 HI titer와 HN에 대한 ELISA값이 상용화된 제품보다는 그 결과값에 있어서 비슷한 패턴을 보인다. 즉 HI titer의 값에 대해 HN에 대한 ELISA 값 또한 비례해서 증감되는 것을 볼수 있다.



위 결과에서 보듯이 모두 연관되어 있다고 할 수는 없지만 상용화 제품보다는 더 연관성이 있다. HI titer와 HN ELISA는 모두 HN 단백질을 이용하므로 그로 인해 더 많은 유사성이 존재한다고 생각된다. 또한 진단 titer가 높다고 하여 그것이 즉 항체가 많다고 하여 그 항체가 꼭 바이러스 감염 시에 있어서 완벽하게 막아주는 것은 아니다. 즉 nuclecapsid 단백질에 의해 생성된 항체들은 매우 많은 수로 존재한다. 그러나 NC 단백질은 NDV에 있어서 중요한 단백질인 것은 사실이지만 그렇다고 NC 단백질에 특이적인 항체가 NDV 감염을 막을 수는 없다. 오히려 HN에 특이적인 항체가 NC 단백질에 의한 항체보다 감염을 피하는데 있어서는 더 중요하다. 즉 위의 결과에서처럼 단순히 ELISA 값만 높다고 해서 그 개체가 반드시 감염을 피할 수 있는 것은 아니다. 오히려 HN ELISA에 의해 측정된 값이 감염을 피할 수 있는 연관성이 더 많다고 생각된다.

파. 요약.

가장 일반적인 뉴캐슬병의 진단법으로 이용되고 있는 ELISA 방법은 현재로서는 whole virus를 이용하는 방법이 가장 일반적인 방법이다. 이러한 방법은 매번 바이러스를 culture해야만 하는 시간적, 금전적 부담감을 가지고 있다. 특히나 아직까지 이 뉴캐슬 바이러스를 효율적으로 키울만한 cell line이 없다는 부담감 때문에 매번 SPF egg를 이용해야 하는 부담감이 매우 높다고 할 수 있었다. 또한 whole virus를 사용할때는 strain이 다르다거나 유전적으로 변이종이 나타날 시에는 유전자의 차이점 때문에 진단이 negative로 잘못 진단될 수도 있다. 이러한 문제점을 해결하고자 본 연구진들은 현재까지 알려진 모든 NDV strain의 유전자를 비교 검토하여 가장 유전적으로 homology가 높은 부위를 찾아서 이 특정 부위를 RT-PCR을 이용하여 특정 유전자를 증폭하고 또한 이들을 cloning하여 *E. coli*에서 발현 정제하여 이를 ELISA

coating antigen으로 이용한 새로운 방법을 모색하였다. 이를 이용한 진단법과 기존에 사용되고 있는 whole virus를 이용한 진단법의 비교 실험을 통하여 보다 효율적이고 빠른 진단법의 개발을 모색하고자 하였다.

이를 위하여 HN, F 유전자의 특정 부위를 RT-PCR로 증폭하여 이 부위를 다양한 대장균 발현 벡터에 cloning하여 이들 유전자를 발현 분리 하여 이를 ELISA coating antigen으로 사용하고자 하였다. 이를 위해 cloning이 확인된 pET43-1a vector : NDV F, HN은 각기 다른 온도(25℃, 30℃, 37℃, 42℃)에서 발현을 진행하였다. 500ml culture flask에 100ml의 2X LB broth 배지를 이용하여 배양액의 1%의 cell을 접종한 후 키우게 된다. 접종하는 cell은 만들어진 확인된 colony를 18시간 전에 5ml의 배지에 먼저 키운 것으로 이것을 preculture라 한다. 접종된 flask를 OD₆₀₀에서 0.4-0.5가 될 때까지 배양한후에 IPTG(Isopropyl b-D-thiogalactopyranoside)를 1mM에서 2mM사이로 다양한 농도를 넣어 발현을 시켰다.

열거된 조건 중에서 30℃에서 약 6시간 정도 발현시켰을 때 가장 잘 발현이 되었으며 이렇게 발현된 NDV F 와 HN 단백질은 약 76kDa이 되면 이는 pET vector 내에 존재하는 tag과 fusion이 되는 형태이므로 원하는 사이즈 보다 60kDa 크게 발현되는 것이다. 물론 tag이 원하는 F, HN 보다 크기 때문에 약간의 간섭은 있을 것이지만 이 단백질은 정제를 위한 단백질이기 때문에 큰 영향을 미치지 않았다.

여기서 중요한 것은 NDV HN은 F보다 쉽게 발현되고 매우 안정적인 발현율을 보여 준다. 그러나 fusion 단백질의 경우는 매우 불안정하여 쉽게 발현이 잘 되지 않는다. 물론 위의 사진은 발현을 시킨 것이지만 이를 정제 하였을 경우 손실율이 매우 크며 쉽게 변성이 된다. 그러나 HN의 경우는 비교적 안정적으로 정제되고 보관도 쉬운 편이다. 이에 먼저 HN 단백질을 이용하여 ELISA test를 수행하였으며 field serum을 통해 상용화된 제품과 비교를 하였다. fusion 단백질의 경우는 아직 정제를 하지 못하여 ELISA를 진행하지 못하고 있으며 현재는 HN 단백질만을 이용하여 ELISA를 수행하고 있다.

이 그림은 실제로 field serum을 이용하여 상용화된 제품과 발현된 HN을 가지고 그 결과를 비교한 것으로 상용화된 제품이 하나만을 제외하고 모든 값이 월등이 높았다. 그 이유는 상용화된 제품은 NDV LaSota strain의 whole virus를 코팅하여 ELISA를 수행하고 우리의 경우는 오로지 HN 단백질의 일부분만을 이용하여 진단을 하는 것이기 때문에 serum 내에 존재하는 항체들이 결합할수 있는 종류가 많아지고 적어지고에 따라 약간의 차이가 있을 것으로 보인다. 즉 serumso에 존재하는 많은 항체들중에서 상용화된 제품은 모든 항체 즉 NP, P, M, F, HN, L 단백질에 대한 모든 항체가 결합할 기회가 있는 반면에 HN만을 이용하는 것은 상대적으로 결합할수 있는 항체의 종류가 적어지므로 그만큼 값이 낮아 질거라는 예상을 하고있다.

이에 이 값을 이용하여 몇 개의 sample에 대하여 HI titer를 측정하여 비교해보았다. 이 결과는 상용화된 제품보다는 HN에 대한 ELISA에서 더욱 연관성이 있다. 즉 전부 일치하는 결과는 아니지만 HI titer와 HN에 대한 ELISA값이 상용화된 제품보다는 그 결과값에 있어서 비

슷한 패턴을 보인다. 즉 HI titer의 값에 대해 HN에 대한 ELISA 값 또한 비례해서 증감되는 것을 볼수 있다.

위 결과에서 보듯이 모두 연관되어 있다고 할 수는 없지만 상용화 제품보다는 더 연관성이 있다. HI titer와 HN ELISA는 모두 HN 단백질을 이용하므로 그로 인해 더 많은 유사성이 존재한다고 생각된다. 또한 진단 titer가 높다고 하여 그것이 즉 항체가 많다고 하여 그 항체가 꼭 바이러스 감염 시에 있어서 완벽하게 막아주는 것은 아니다. 즉 nucleocapsid 단백질에 의해 생성된 항체들은 매우 많은 수로 존재한다. 그러나 NC 단백질은 NDV에 있어서 중요한 단백질인 것은 사실이지만 그렇다고 NC 단백질에 특이적인 항체가 NDV 감염을 막을 수는 없다. 오히려 HN에 특이적인 항체가 NC 단백질에 의한 항체보다 감염을 피하는데 있어서는 더 중요하다. 즉 위의 결과에서처럼 단순히 ELISA 값만 높다고 해서 그 개체가 반드시 감염을 피할 수 있는 것은 아니다. 오히려 HN ELISA에 의해 측정된 값이 감염을 피할 수 있는 연관성이 더 많다고 생각된다.

3. 경구백신용 뉴캐슬 백신의 개발 연구

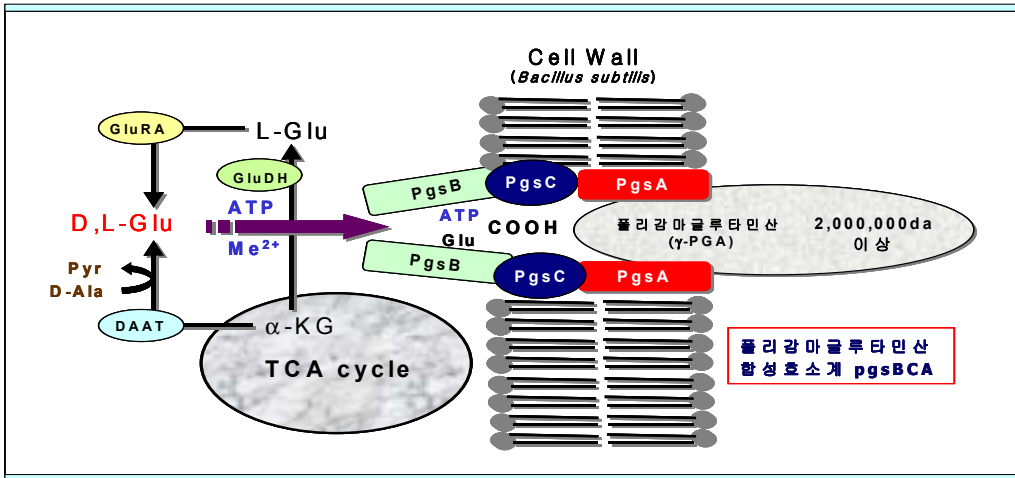
현재 양계농장에서 이용되고 있는 뉴캐슬백신은 주로 spray 방법이나 또는 음수용으로 사용되고 있는 백신이 대부분이다. 또한 여러 가지 이유로 이 뉴캐슬병에 대한 백신은 여러차례 접종되고 있지만 아직까지 이 질병의 박멸은 요원해 보이고 매년 발생 보고가 많고 또한 이로 인한 경제적인 피해또한 매우 많은 법정 전염병이다.

이러한 문제를 해결하는 하나의 방안으로 본 연구진들은 유용 미생물을 이용한 경구용 백신을 개발하고자 노력하였다. 이를 위하여 유용 미생물인 *Lactobacillus casei*, *Salmonella typhimurium*을 transfer vector로 이용하여 NDV의 neutralizing epitope 부위를 이들 미생물의 표면에 발현하여 이들로 하여금 local immunity를 높이는 방법으로 경구용 뉴캐슬 백신 개발에 노력하였고 또한 추가적인 연구 또한 진행중이다.

이를 위하여 폴리 감마 글루탐산 합성 유전자(pgs)를 이용한 유산균 표면 발현 기술 개발에 노력하였는데, 폴리 감마 글루탐산의 합성 효소 (막단백질)의 유전자 pgsB, pgsC, pgsA가 세균의 표면에 외래 항원 단백질을 발현시킬 수 있는 표면 발현 모체 (motif)임을 확인하였다.

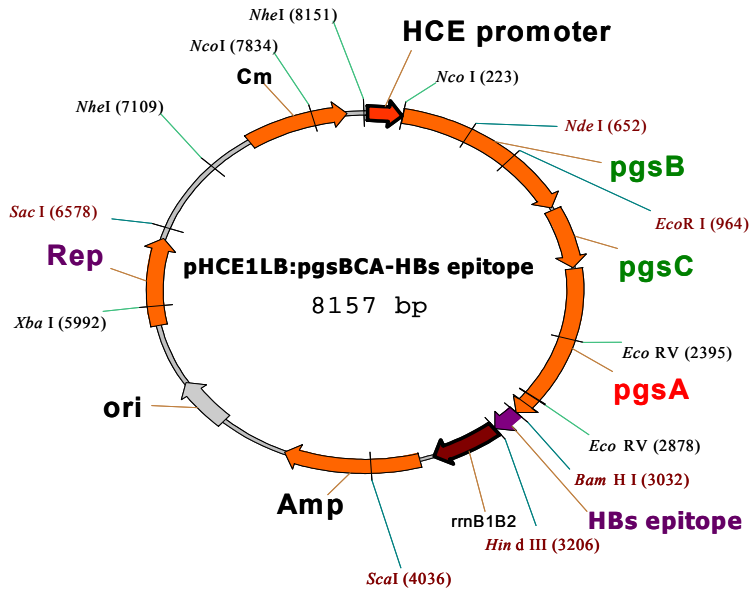
고분자 폴리 감마 글루탐산을 합성하는 합성효소계 (막단백질)의 기작이 밝혀졌고 (그림) 그 합성효소계의 유전자 pgsB, pgsC, pgsA는 국내 전통 발효식품인 청국장에서 분리한 *Bacillus subtilis chungkookjang* 으로부터 분리가 되어 cloning된 후 이들 유전자에 의해 외래의 target 단백질이 gram-negative균인 대장균과 gram-positive균인 유산균들의 표면에 발현될 수 있음을 확인하였다.

폴리감마글루타민산 합성효소계 pgsBCA 기작



가. 대장균-유산균 shuttle 표면발현 벡터의 제작 및 B형 간염바이러스 S항원 epitope 표면발현 벡터의 제작

현재 항시적으로 단백질을 발현시킬 수 있는 HCE promoter와 표면발현모체인 pgsBCA 유전자 그리고 gram-negative균에서 그리고 gram-positive균에서 각각 복제가 가능하도록 두개의 replication origin 부위를 함유한 대장균-유산균 shuttle 벡터 pHCE1LB:pgsBCA를 제작하였다. 이때 유산균에서 복제가 가능하도록 도와주는 origin 부위는 보유한 장내정착형 유산균인 *Lactobacillus casei*에서 추출한 plasmid를 sequencing하고 이 plasmid내 origin 부위를 cloning하여 그 정보를 기초로 한 것이다. 제작한 shuttle 벡터 pHCE1LB:pgsBCA내 pgsA의 C-말단 부위에 외래 단백질로 B형 간염바이러스의 S항원내 epitope 부위를 증폭하여 삽입함으로써 표면발현의 모델로 선택하였으며 표면 발현벡터인 pHCE1LB:BCA:HBs epitope을 제작하였다.

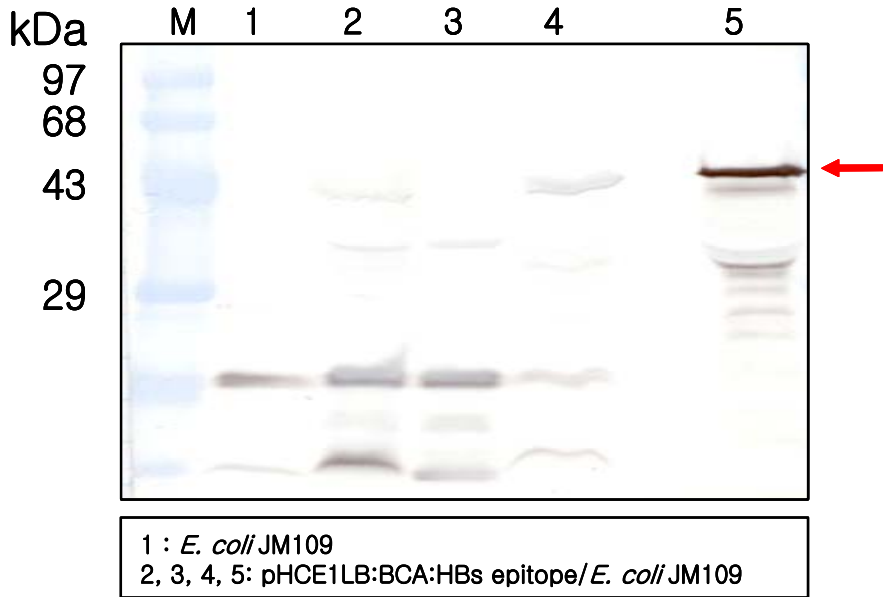


대장균-유산균 shuttle 표면발현 벡터 모식도

나. B형 간염바이러스 S항원 epitope의 표면발현

제작된 표면 발현벡터 pHCE1LB:BCA:HBs epitope이 gram-negative균인 대장균 (*Escherichia coli* JM109)과 gram-positive균인 유산균(*Lactobacillus casei*)에 형질 전환되었고, 형질 전환된 각각의 균에서 pgsA와 융합된 S항원의 epitope 단백질이 발현됨을 Anti-HBs 항체를 가지고 수행한 western blot 방법에 의해서 확인하였다. 대장균 및 유산균의 균체표면에 pgsBCA에 의해 HBV의 S항원 epitope이 발현되었음을 확인하기 위하여 증식한 대장균 및 유산균 균체를 분획하여 즉, 대장균의 경우 세포질과 innermembrane 및 outermembrane 등을 분획하여, 유산균의 경우 세포질과 세포벽 등을 분획하여 얻은 단백질들을 Anti-HBs 항체를 가지고 수행한 western blot 결과 pgsA와 융합된 S항원 epitope 단백질 대부분이 대장균의 outermembrane에, 유산균의 경우 세포벽에 위치함을 확인하였다. 또한 직접적으로 대장균 및 유산균의 균체표면에 pgsBCA에 의해 S항원의 epitope이 돌출되었음을 확인하기 위하여 증식한 대장균 및 유산균 균체를 Anti-HBs 항체 그리고 fluorescence (FITC)와 반응시킨 후 형광-활성 세포 선별 측정방법 (Fluorescence-activating cell sorting (FACS) flow cytometry machine)으로 균체 표면에 발현된 HBs epitope과 반응한 fluorescence를 측정된 결과 control과 비교하여 S항원 epitope을 표면 발현하는 균체에서는 fluorescence 밀도가 높아 오른쪽으로

이동한 그래프를 확인 할 수 있었다. 즉, gram-negative균인 대장균과 gram-positive균인 유산균의 표면에 S항원 epitope이 pgsBCA에 의해서 발현되었음을 확인하였고 pgsBCA가 표면



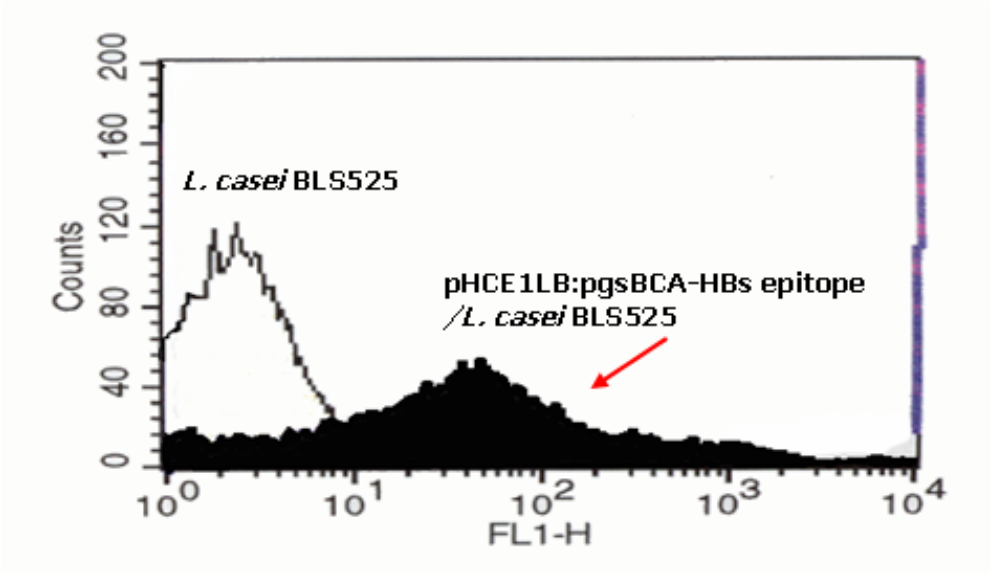
발현 모체임을 확인하였다.

표면 발현 벡터가 발현 되었을때 서로 발현량을 본 것으로 같은 벡터의 클론이라도 세포의 상태에 따라 약간씩의 차이가 있음을 보여주는 그림이다.

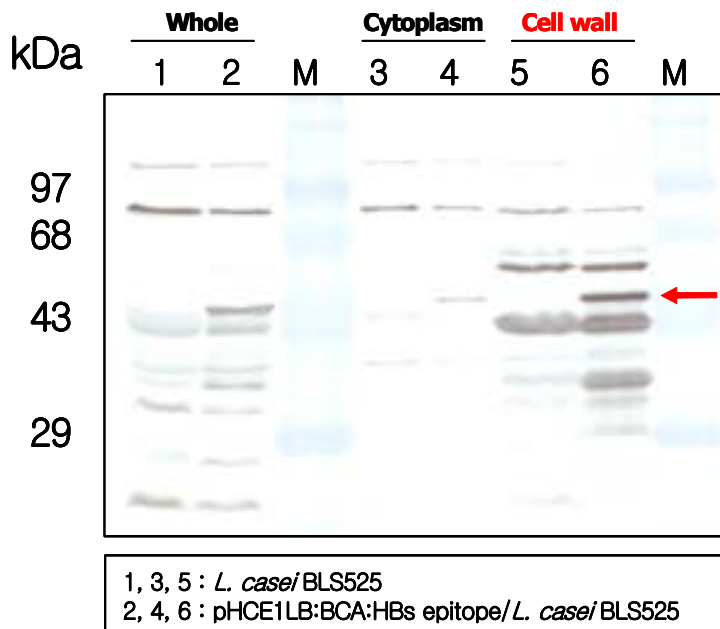
여기서 발현율이 좋은 세포들을 찾아내고 이를 이용하게 된다. 또한 다른 *E. coli*(JM83, DH5 α , Mach1, XLI-blue)에서도 비교 실험을 하였을 때 차이를 나타낸다.

이러한 표면 발현의 확정을 위하여 FACS scan을 통하여 이들 단백질들이 표면에 발현된 정도를 알 수 있었다.

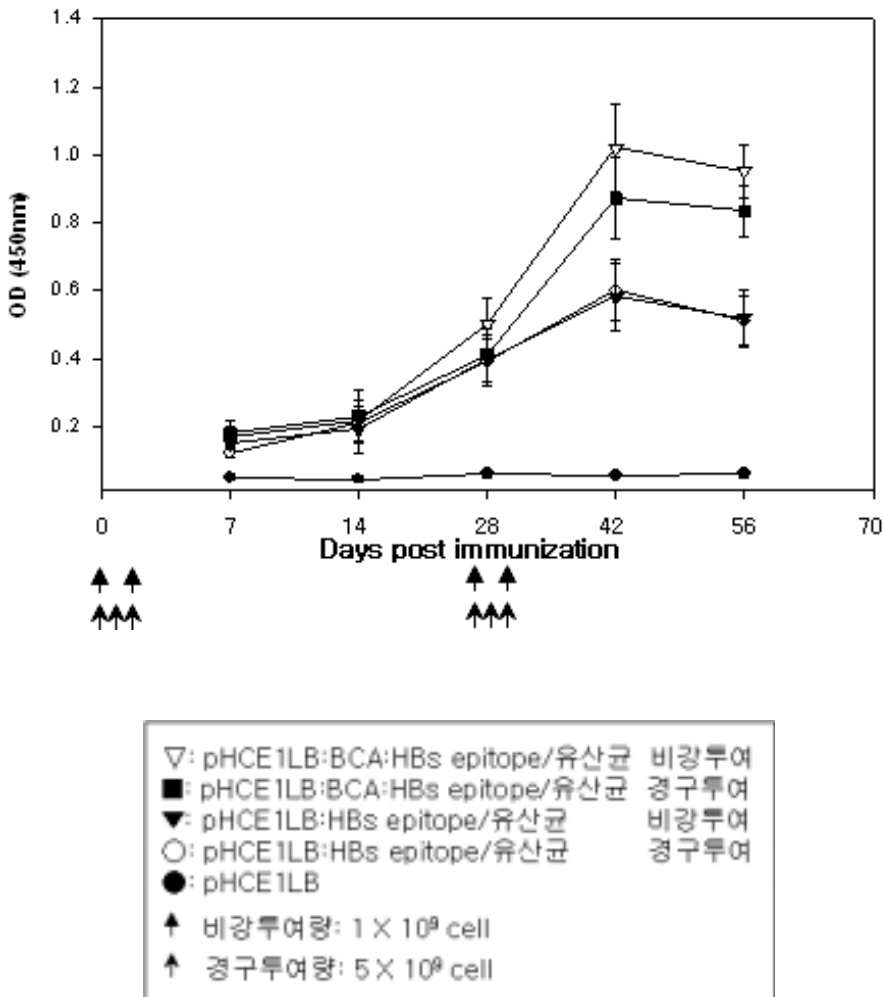
B



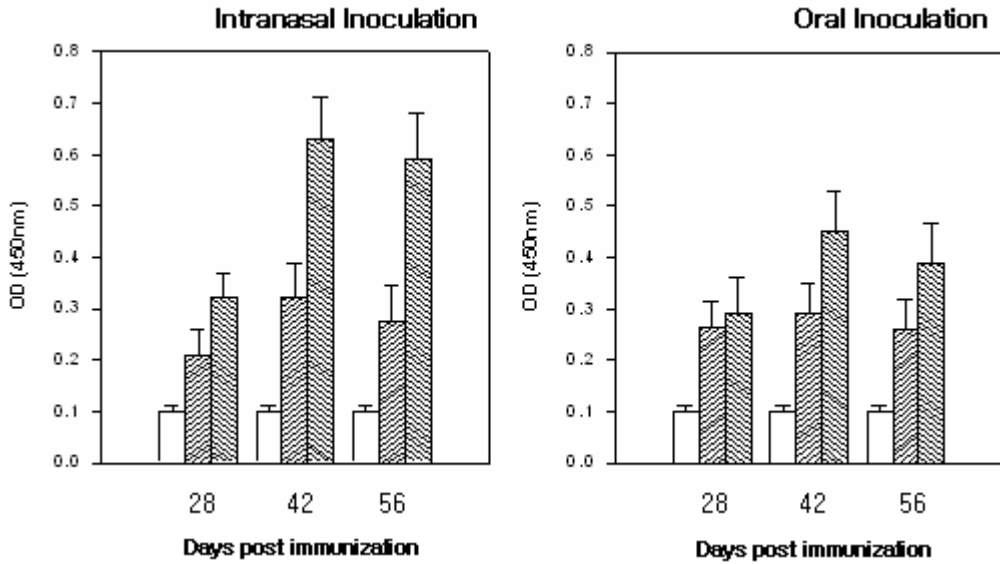
또한 표면 발현 벡터가 정확히 어디에 존재하는지를 알아보기 위해 한 실험으로 세포 전체를 western blot으로 발현 확인 여부를 판단한 후에 이 세포들을 파괴한 후에 원심분리를 통해 각 부위를 분별하고 cytoplasm과 cell wall을 나누어 각기 western blot을 수행한 결과로 표면 발현에 의한 외래 단백질이 cell wall에서만 검출 되는 것을 확인할 수 있었다. 물론 cytoplasm에서 발현된 미량의 단백질도 있지만 이는 합성된 외래 단백질이 세포 표면으로 이동하는 과정에 있는 단백질인 것으로 보인다.



또한 이들 발현된 유산균을 이용하여 쥐를 이용한 항체 발현 정도 실험의 결과는 다음과 같다.

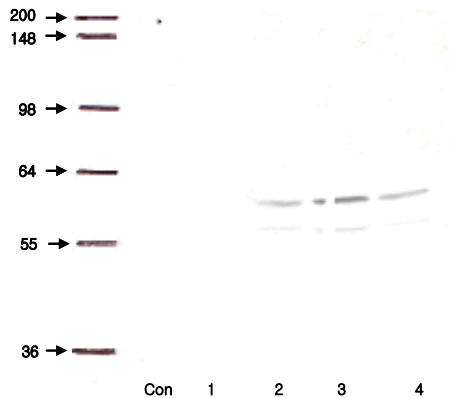


또한 이들이 장내에서의 local immunity 유발 여부를 알아보기 위하여 HBV의 S항원 epitope에 대한 mouse 장내 IgA 항체가 측정하여 이에 대한 결과도 알아 보았다.



- : pHCE1LB/유산균
- ▨ : pHCE1LB:HBs epitope/유산균
- ▩ : pHCE1LB:BCA:HBs epitope/유산균

다. Avian myostatin 단백질의 표면발현



또다른 항원으로서 avian myostatin을 이용하여 표면 발현 벡터를 이용하여 발현을 시킨후 외래 단백질에 대한 특정한 항체를 사용하여 발현이 되었는지를 실험한 결과로 원하는 단백질이 발현된 것을 확인 하였다.

이것은 pAT:A 벡터에 외래 단백질 Avian myostatin을 발현 시킨 실험한 것으로써 Avian myostatin에 대한 항체를 이용하여 검출한 것이다.

라. 폴리 감마 글루탐산 합성 유전자를 뉴캐슬바이러스 유전자의 유산균 표면 발현 기술 개발

이를 위해 뉴캐슬 바이러스의 RNA를 추출하여 HN과 F gene에 specific한 primer를 제작하여 이를 바탕으로 RT-PCR 기법을 이용하여 각각의 gene들을 증폭한다. 증폭된 각각의 뉴캐슬 gene들을 미생물 표면 발현용 벡터에 클로닝하였다. 클로닝을 확인하기 위하여 여러 가지 restriction enzyme을 사용하고, sequencing하였다. 클로닝이 확인된 각각의 sample들을 상기 미생물 표면발현용 벡터를 이용하여 상업용 competent cell (E.coli)에 transformation하였다.

이렇게 증폭된 DNA를 1% agarose gel에서 확인한 후에 DNA를 정제하고 T-vector에 cloning을 한다.

성분 및 시약	용 량	비 고
T-vector	1 μ l	F1,F2, F12, HN1, HN2
insert	3 μ l	
ligase	1 μ l	
10x buffer	2 μ l	
DW	13 μ l	
total	20 μ l	

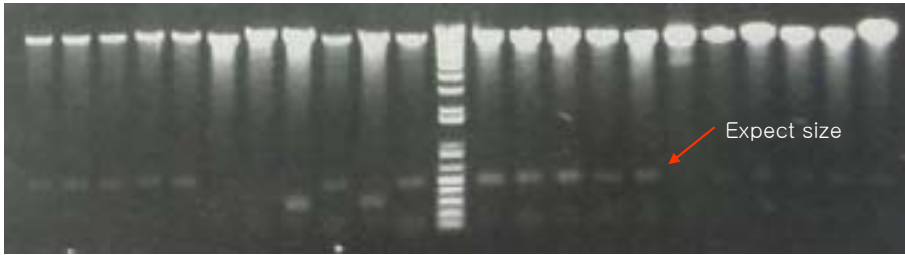
위의 조성으로 16°C에서 4시간 이상의 반응 시간을 주어 실험을 하지만 확실하게 ligation이 되도록 12시간의 반응 시간을 두어 vector와 insert가 충분히 결합하도록 하였다. PCR의 결과로 만들어진 NDV DNA의 마지막 부분들은 poly A tail을 갖게되고 이를 이용하여 T-vector가 가지고 있는 poly T tail과 결합을 하게 되는 것이다. 이후 transform을 통해 세포내로 형질 전환시키는 것이다. 그리고 sequence까지 확인된 F와 HN을 가지고 pET43-1a vector에 ligation을 진행하였다.

마. pAT vector ligation 및 transformation

T-vector에서 restriction enzyme 인 *Bam*HI, *Kpn*I, *Xho*I를 이용하여 원하는 NDV 유전자만을 잘라내고 이를 E.coli 발현 vector인 pET43-1a vector와 유산균 발현 vector인 pAT vector에 ligation을 하였다.

성분 및 시약	용 량	비 고
pAT vector	1 μ l	F, HN
insert	3 μ l	
ligase	1 μ l	
10x buffer	2 μ l	
DW	13 μ l	
total	20 μ l	

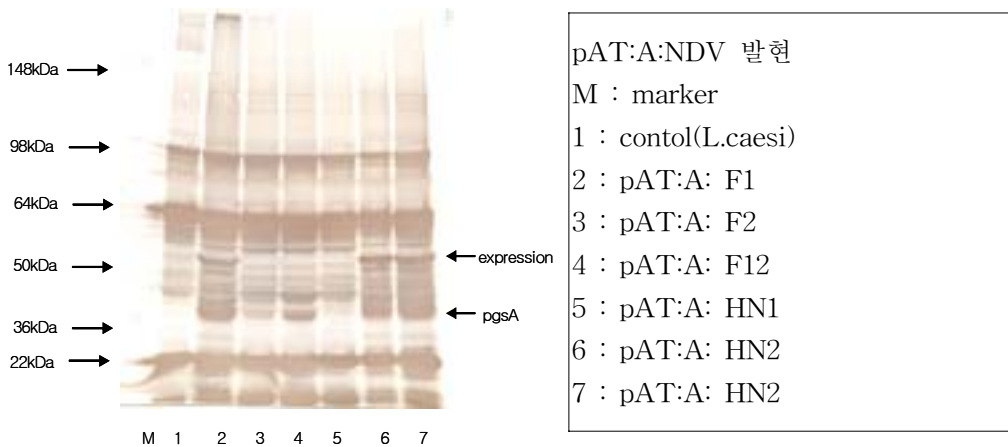
락토 바실루스에 삽입된 유전자를 확인 하는 방법은 일반 대장균에서와 마찬가지로 방법으로서는 확인이 거의 불가능하다. 따라서 이런 경우는 colony PCR을 통해 원하는 유전자가 올바르게 cloning되어 있는지 확인하게 되었다.



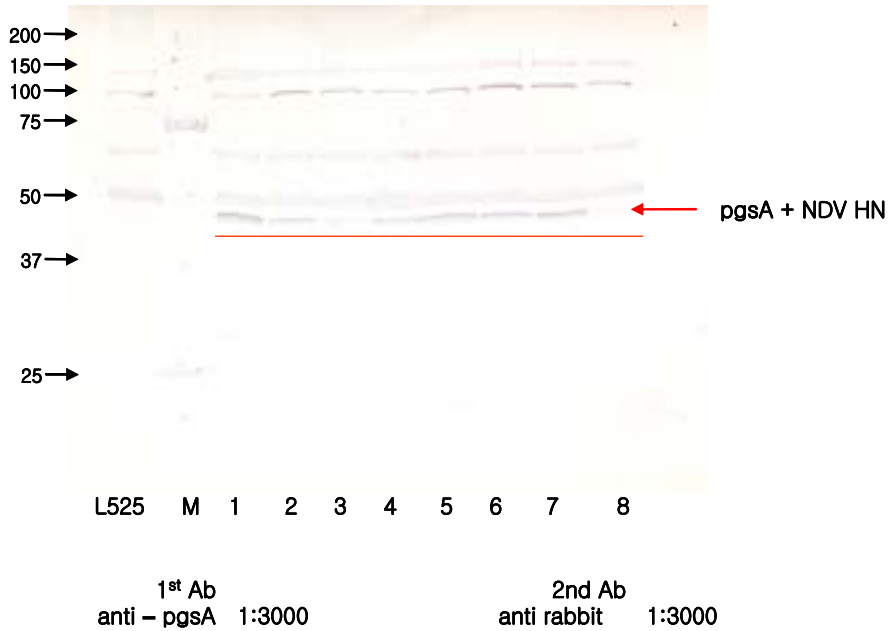
pAT : slpA : pgsA264 : linker : NDV F, HN
 bamHI / KpnI cutting

바. NDV HN 및 F 단백질의 표면 발현

pAT 박터는 induction promotor가 아니므로 IPTG와 같은 inducer가 필요치 않고, 배양하면서 자연스레 단백질을 발현하도록 박터가 디자인되어 있다. 락토바실루스에서는 MRS broth를 사용하여 30℃에서 혐기적 조건으로 배양하였고 NDV viral protein의 발현을 확인하였다.



본 연구진들은 발현하기 매우 까다롭고 어려운 이 NDV 단백질을 효율적으로 발현하기 위하여 여러 가지 다양한 형태의 변형을 줌으로써 발현율을 높이고자 하였다. 다음의 결과는 중간에 linker를 첨가 함으로써 발현율을 높이고자 하는 실험 결과이다. 이것을 확인하기 위하여 pAT vector의 fusion 단백질인 pgsA에 대한 항체로 발현을 확인한 결과이다.



L525 : control

M : marker

1 : pAT : slpA : pgsA 264 : linker : NDV HN 6

3 : pAT : slpA : pgsA 264 : linker : NDV HN 10

5 : pAT : slpA : pgsA 264 : linker : NDV HN 13

7 : pAT : slpA : pgsA 264 : linker : NDV HN 17

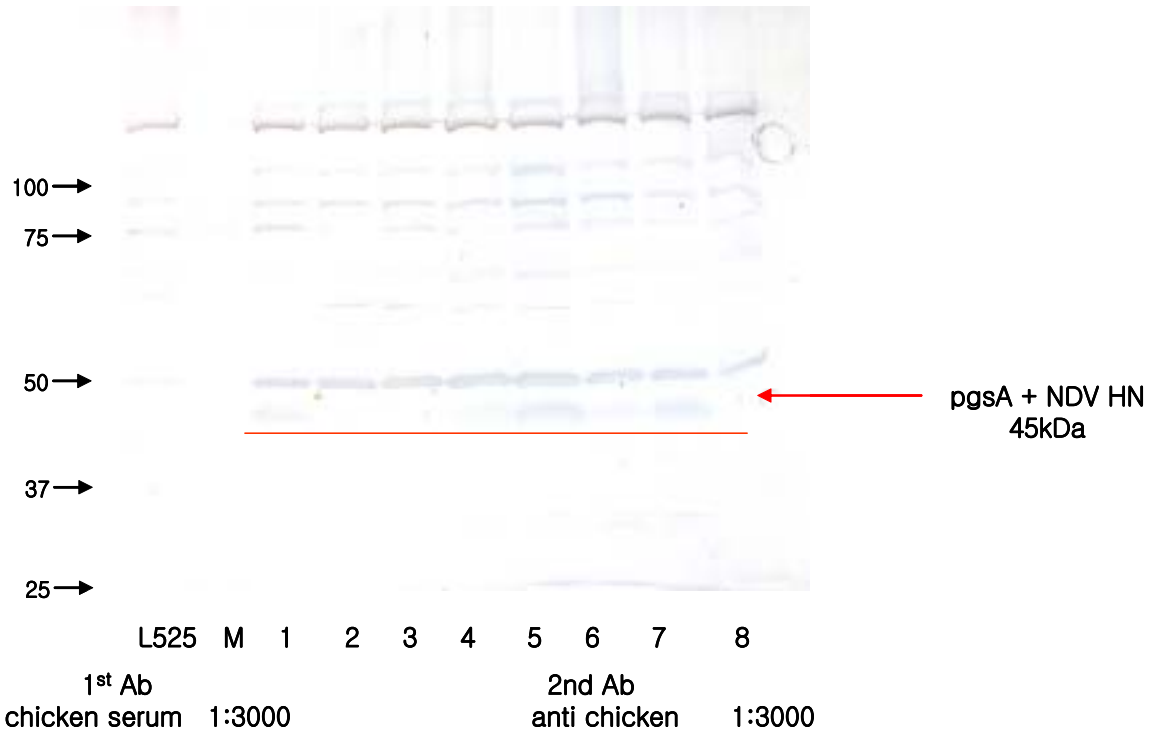
2 : pAT : slpA : pgsA 264 : linker : NDV HN 9

4 : pAT : slpA : pgsA 264 : linker : NDV HN 11

6 : pAT : slpA : pgsA 264 : linker : NDV HN 16

8 : pAT : slpA : pgsA 264 : linker : NDV HN 18

HN 단백질은 pgsA264에 fusion 형태로 발현되므로 HN 단백질의 크기 16kDa과 pgsA264 단백질 29kDa이 합쳐져 약 45kDa의 크기를 나타내며 이것은 일단 pgsA 항체로 확인하였다. L525는 락토바실루스로써 negative control로 사용되었다. 또한 이러한 발현을 좀더 확정하기 위하여 NDV 백신을 한 닭에서 serum을 분리하여 이 serum으로 다시 확인하였고 이 단백질이 확실히 NDV HN 단백질이라는 것을 증명 하였다.

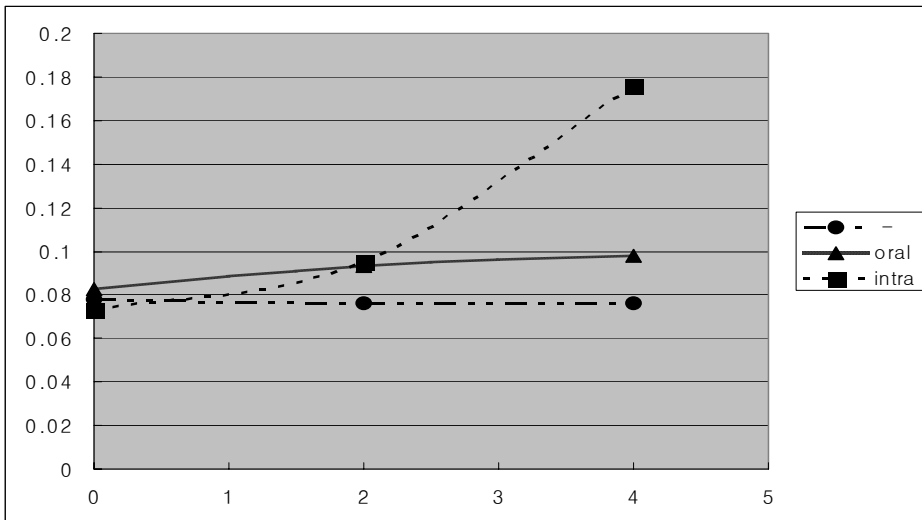


여기서 또 하나의 문제점은 NDV HN 단백질을 prokaryotic cell에서 발현을 시키기 때문에 glycosylation이 존재하지 않는다. 즉 약간의 구조적인 변화는 존재 할 것으로 보이며 이미 발현 한 HN 단백질의 부분에서의 glycosylation site가 3곳이나 존재하므로 구조의 변화는 있을 것이라 생각되며 이로 인해 serum으로 확인 하는데 어려움이 있었다. 즉 항체에 결합되는 항원이 구조적으로 변화가 존재하므로 결합 능력 자체가 약간은 저하되고 따라서 serum으로 확인할 때는 pgsA 항체보다 훨씬 적은 양의 band가 관찰되었다.

사. 표면 발현된 뉴캐슬 HN 단백질의 면역원성 실험

클로닝 및 단백 발현이 확인된 락토바실루스를 닭에 접종하기 이전에 우선 쥐(C57BL6)에게 접종하여 실험을 진행했고 대조군은 2개의 군 각 3마리로 PBS(phosphate buffed saline)만을 투여하는 군과 락토바실루스만 투여하는 군으로 분리하여 실험을 실시하였다. 투여군은 HN 단백질이 발현된 락토바실루스를 경구 투여, 그리고 다른 한 군은 intranasal로 투여하였다. oral 투여 군의 cell 수는 100ul에 5×10^{11} 개의 cell을 intranasal은 20ul에 1×10^{11} 개의 cell을 매일 4주 동안 투여를 하였다. 투여 전에 serum을 채취하고 투여후 2,4주에 serum을 채취하여 이 serum을 ELISA로 비교하여 과연 이 HN 단백질이 발현된 락토바실루스가 NDV를 막아 줄 수 있을만한 항체를 생산하게 될것인지를 비교 하였다. 그렇지만 뉴캐슬 HN 단백질을 발현하는 락토바실루스는 쥐에서 아무런 항체 생성 반응을 유발하지 않았다.

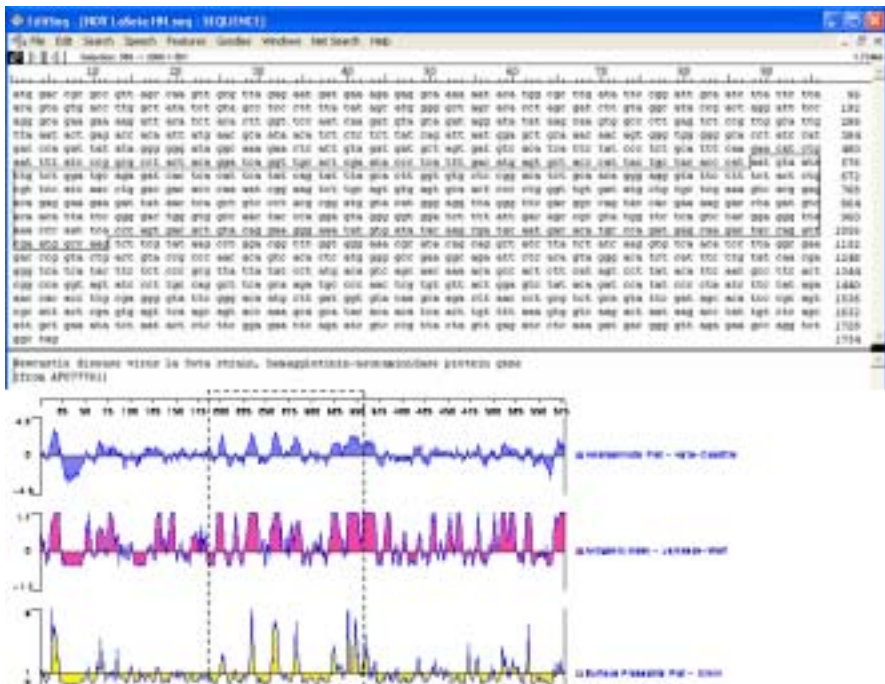
다음 단계로 SPF 병아리를 구입하여 쥐와 같은 방법으로 negative control group과 두가지 다른 투여군, oral 및 intra-nasal group으로 분리하여 각각 20마리의 SPF 병아리에 접종을 실시하였다. 투여 방법은 부화 후, 3일부터 3주동안 연속적으로 접종을 실시한 후, 1주일간의 휴식기를 가진후, 혈액을 채취하여 항체 생성 여부를 검사하였다



위의 도표는 접종 4주 후의 항체 역가 생성 여부이다. 결과적으로 4주 후, intra-nasally 접종된 group에서는 control group에 비해서 매우 높은 항체 생성 역가를 나타내었으며, 경구 투여 group에서도 항체 증가를 나타내었다.

아. 살모넬라를 이용한 뉴캐슬 경구 백신 개발 연구

앞에서 언급한 *Lactobacillus*를 transfer vector로 이용한 응용 실험 이외에 본 연구진들은 *Salmonella typhimurium*을 이용한 비슷한 연구도 수행하였다. 이를 위해 새롭게 발견된 NDV에 대한 다른 위치의 neutralizing epitope를 찾아서 이를 바탕으로한 primer를 새로이 design 하였다. 다음은 sequence 및 이를 바탕으로한 primer 정보 이다. 이 부위들은 앞에서 기존에 실험했던 부위와는 전혀 다른 위치로서 가장 최근에 NDV에 대해서 번역원성이 매우 뛰어나다고 발표된 자료를 바탕으로 다른 부위를 지정하였다. 이를 바탕으로 HN, F, N gene을 각각 RT-PCR로 증폭하여 다시 이 다른 부위를 발현하고자 하였다.



pYA292 sequencing primer

Primer Name	Sequence	Length	Tm°
pYA292 seq S	5' ATT AAT CAT CCG GCT CGT AT 3'	20 nt	48.2°C

NDV HN

Primer Name	Sequence	Length	Tm°
NDV-HN-568-BamHI S	5' GGA TCC AAT GTA ATA TTG TCT GGA TGC 3'	27 nt	52.9°C
NDV-HN-1068-XhoI AS	5' CTC GAG TCA CTT GGC CAT TCG AAT CTG 3'	27 nt	51.6°C

NDV F

Primer Name	Sequence	Length	Tm°
NDV-F-1-BamHI S	5' GGA TCC ATG GGC TCC AGA CCT TCT 3'	24 nt	48.0°C
NDV-F-411-XhoI AS	5' CTC GAG TCA CGC TGT TAT TTG TGC 3'	24 nt	52.6°C

NDV NP

Primer Name	Sequence	Length	Tm°
NDV-N-1081-BamHI S	5' GGA TCC AGA CTT GGA GTA GAG TAC GC 3'	26 nt	70.0°C
NDV-N-1470-XhoI AS	5' CTC GAG TCA ATA CCC CCA GTC GGT GT 3'	26 nt	53.9°C

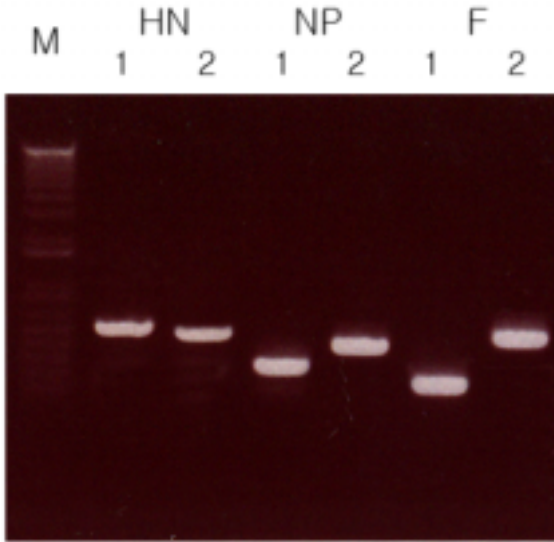
이를 위해 앞에서와 같은 방법으로 RT-PCR을 수행하여 특정 유전자를 증폭하였다. 이를 위하여 우선 cDNA를 제조 하였는데, 그 조건은 다음과 같다.

Distilled water	6 ul	
5RT buffer	4 ul	
Random hexamer (10M)	5 ul	
RNase out (40U/l)	1 ul	
Omniscript RT (200U/l)	1 ul	
vRNA template	3 ul	
	20 ul	
Reaction mixture for cDNA synthesis of NDV viral genome.		

또한 cDNA 제조후, 증폭하기 위하여 다음과 같은 primer들을 design하여 이를 PCR에 이용하였다.

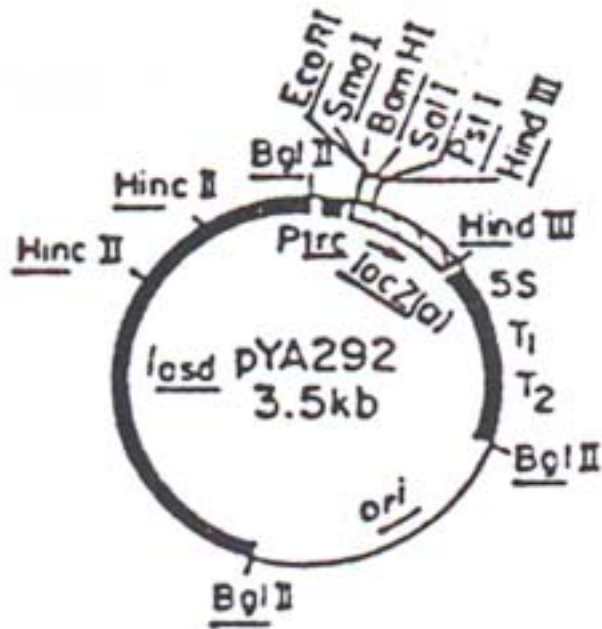
Primers used in amplifying gene fragments for cloning of NDV target antigens in pYA292 cloning/expression vector.	
Primer Name	Sequence
NDV-HN-568S	5' GGA TCC GAA TTCAAT GTA ATA TTG TCT GGA TGC 3'
NDV-HN-1068AS	5' GGA TCC TCT AGA TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG CTT GGC CAT TCG AAT CTG GTA GTC 3'
NDV-F-175S	5' GGA TCC GAA TTC GGA TCA ATC ATA GTT AAG CTC 3'
NDV-F-270AS	5' GGA TCC TCT AGA TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG AGT GGT CAA TGT CCT GTT GTA TGC 3'
NDV-N-1270S	5' GGA TCC GAA TTC TCC CAA GCT CTA CAA GGC GGA TC 3'
NDV-N-1467AS	5' GGA TCC TCT AGA TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG TCA ATA CCC CCA GTC GGT 3'

이를 이용한 RT-PCR 결과는 다음과 같다.



RT-PCR 결과(NDV HN, NP, F).

여기에서 기술된 pYA292 vector은 미국의 Washington University에서 개발되어 분양된 Salmonella typhimurium H683에 대한 발현 vector이다. 이는 매우 특별히 design된 vector로서 host strain인 Salmonella typhimurium 683 cell에서 특이적으로 replication 하여 단백질을 발현하도록 만들어진 vector이다. 또한 host strain인 Salmonella typhimurium 683 cell은 diaminopimelic acid (DAP) mutant strain으로, 이 diaminopimelic acid (DAP)는 Gram 음성균의 세포벽을 형성하는 중요한 peptidoglycan의 일종으로 알려져 있다. 이 mutant strain은 배양에 반듯이 diaminopimelic acid (DAP)을 필수 요소로 요구하고 있으므로 배양에 반듯이 이 diaminopimelic acid (DAP)를 첨가하여 배양하였다.



```

      -35                               +10
ATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAAATCATCCGGCTCGTAATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAA
      50
TTTCACACACGGAAACAGACC ATG CCG GGA TTC GCA ATT CCC GGG GAT CCG TCG ACC TGC AGC
      Met Pro Glu Phe Ala Ile Pro Gly Asp Pro Ser Thr Cys Ser
      Hind III
CAA GCT CCC AAG CTT GGG AGC TTG GCA CTG → lacZ(α)
      Gin Ala Pro Lys Leu Gly Ser Leu Ala Leu
  
```

pYA292 for eukaryotic expression of recombinant antigen. cloning 위치는 EcoRI과 BamHI 이고 이렇게 구성된 clone들은 host strain인 Salmonella typhimurium H683으로 transformation하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구는 우선적으로 많은 백신에도 불구하고 아직까지 매년 발생하고 있는 뉴캐슬병의 발병 이유를 분석하고자 현재 사용되고 있는 백신 strain과 농장에서 발병하고 있는 wild type과의 유전자 비교 결과 현재 wild type strain들이 변화하고 있음을 증명함으로써 새로운 백신 균주의 준비에 대한 기초 자료를 공급했다. 이는 blind하게 pass 되고 있는 뉴캐슬 백신 균주의 검증과 또한 보다 효율적인 백신 균주의 개발에 대한 기초자료라고 평가된다.

또한 우선 현재 가장 일반적으로 사용되고 있는 뉴캐슬병 진단 방법인 ELISA 방법의 불편함을 개선하고자 특정 유전자의 발현 정체를 이용하여 이를 ELISA coating antigen으로 사용함으로써 보다 효율적인 진단법의 개발에 노력하였다. 이 연구를 수행하면서 본 연구진들이 field에서 직접 경험하고 있는 수의사들과의 많은 토의 결과에 의해 새롭게 알게된 사실은 현재 뉴캐슬병의 백신은 일반적으로 농장에서 3-5회 이루어 지고 있으나 이 백신에 의해 많은 항체가 유발되는 것을 증명하였다. 그러나 이 백신에 의해 생성되는 항체는 거의 90% 이상이 nucleocapsid 단백질에 대한 항체로 이루어졌다는 것을 발견하였다. 이러한 nucleocapsid 단백질은 중화능이 전혀 없는 항체로서 아무리 항체가가 높다하더라도 중화능이 없기 때문에 백신으로서의 효과가 매우 미비한 것으로 알려져 있다. 이러한 것을 보다 효율적으로 진단하기 위한 실험이 각각의 NDV 구조 단백질인 nucleocapsid (N), fusion (F), hemagglutinin (HN), 각각을 따로 발현하여 이를 다른 ELISA plate에 coating 하여 이를 이용한 진단법이 매우 효과적이라고 판단된다. 그러나 이들 NDV 구조 단백질은 발현하기가 매우 까다롭고 매우 어렵다고 평가된다. 이것이 단순한 작업으로 여겨질것이지만 실제로 이들 단백질을 prokaryotic cell에서 발현한 report가 거의 없는 실정이다. 이는 본 연구진들도 경험한 바, 보다 효율적으로 이들 단백질의 발현양을 늘릴 수 있는 방안이 진행중이다. 그렇지만 이제까지의 경험으로 본 연구진들은 조만간 이 마무리 작업을 끝낼것이며 이는 우리나라 뉴캐슬 백신의 검정 및 백신효과에 대한 중요한 자료를 제공하리라고 확신한다.

미생물 표면에 외래 단백질을 효율적으로 발현시킬 수 있도록 표면 발현 모체로서 바실러스 속 균주에서 유래한 폴리 감마 글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자 (pgsBCA)를 이용하여, 외래단백질을 그람양성 세균과 그람음성 세균의 표면에 안정적으로 발현시키는 새로운 벡터와 목적으로 하는 외래 단백질의 유전자를 삽입시킬 수 있도록 구성된 전기 표면 발현용 벡터에 의하여 형질 전환된 형질 전환체 및 전기 표면 발현용 벡터에 외래 단백질을 코딩하는 유전자를 삽입한 발현 벡터로 형질 전환체를 제조하여 배양하고, 미생물 표면에 발현시키는 제조 방법으로 보다 안전하고 효율적인 질병에 대한 백신 개발을

추구하고자 하였다. 이렇게 표면에 발현된 단백질은 세포 외막에 발현됨으로 매우 높은 항원성을 가진다. 높은 항원성에 의한 항체 형성 능력 또한 높다고 할 수 있다. 특히나 표면 발현된 단백질이 신체에 무해한 유용 미생물을 통하여 장내까지 전달되어 발현됨으로써, 안전성 및 효율성 측면에서 효과를 극대화 할 수 있으리라 기대된다. 장내 미생물이기 때문에 면역 거부 반응도 일어나지 않을뿐더러, 이들 미생물들이 쉽게 장내 세포로 침윤하고 그 속에서 증식하여 많은 단백질을 발현하는 큰 장점이 있다. 이들 미생물과 단백질들은 장내 세포에서 GALT와 같은 면역 세포를 자극하여 면역 반응을 유도한다.

이러한 맥락에서 NDV virus의 HN 및 F 단백질의 특정 neutralizing epitope 와 또한 strain 간의 homology가 높은 부위를 결정하여 이를 락토바실루스의 표면에 발현하여 이를 이용한 경구 백신의 가능성에 대하여 연구를 진행하였다. 이 연구또한 이들 NDV 구조 단백질의 발현이 매우 어렵기 때문에 어려움을 겪고 있으나, 마무리 작업에 진행중이며, 일단 실시한 동물 실험 결과, 항체가의 증가를 발견하였다. 또한 살모넬라를 이용한 경구 백신의 개발 또한 연구 진행중이며, 동물 실험 단계에 있다. 이러한 신기술에 의한 백신의 개발로 다량의 백신에도 불구하고 아직까지 양계 농장에서 심각한 문제를 야기하고 있는 뉴캐슬병에 대한 효과적인 예방법을 적용함으로써, 양계 농장 및 국내 축산업, 또한 사료 업계에도 상당한 파급 효과를 높일 수 있으리라 기대된다. 또한 이러한 신기술을 이용한 방법을 이용하여 현재 양돈, 양계 산업에 영향을 미치고 있는 다른 질병 등의 예방법에 대해서도 연구함으로써, 우리나라 축산업에 상당한 기여를 할 수 있으리라 기대된다. 또한 이들 백신은 현재 시중에서 일반적으로 사용되고 있는 생독·사독 백신들이 가지고 있는 여러 가지 문제점들, 즉 안전성이나 많은 양의 바이러스를 항상 배양·보관해야 한다는 경제적, 시간적인 측면에서도 많은 부분이 보완되는 백신이라고 할 수 있다. 이것은 생산 단가도 상당히 경제적이므로 백신 가격 또한 낮출 수 있으리라 기대된다. 이러한 신기술에 의한 백신의 고부가가치 상품이 될 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

이러한 표면 발현 백터와 형질 전환 균체를 이용한 외래 단백질 발현 백터 시스템을 구축함으로써 항원성과 안전성이 매우 높은 단백질을 대량 생산할 수 있으므로 많은 연구 기관에서의 외래 단백질 발현 시스템 및 백신 제조에 유용하게 이용될 것으로 보인다. 이들 백신은 장내 미생물로 투여되기 때문에 장내 미생물의 활성화에도 도움이 되어 증체율에도 영향을 미칠 것으로 기대된다.

이를 이용해 뉴캐슬 백신에 대한 특허를 출원하고 이를 실제 축산 농가에 보급함으로써, 아직까지 막대한 피해를 주고 있는 뉴캐슬병에 대한 예방을 도모하여 축산 농가에 상당한 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

외래유전자의 세포내 발현은 현재의 생명공학분야에 있어서 핵심이 되는 사항이며 효율적인 유전자의 발현 기술의 개발은 차세대 연구 분야에 특히나 질병 예방을 위한 백신의 개발이란 측면에서 생각한다면, 필수적인 요소라 생각된다. 이상에서 상세히 설명하였듯이, 본 연구는 미생물 표면에 외래 단백질을 효율적으로 발현시킬 수 있도록 표면 발현 모체로서 바실러스 속 균주에서 유래한 폴리 감마 글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자(pgsBCA)를 이용하여, 외래단백질을 그람양성 세균과 그람음성 세균의 표면에 안정적으로 발현시키는 새로운 백터와 목적으로 하는 외래 단백질의 유전자를 삽입시킬 수 있도록 구성된 전기 표면 발현용 백터에 의하여 형질 전환된 형질 전환체 및 전기 표면 발현용 백터에 외래 단백질을 코딩하는 유전자를 삽입한 발현 백터로 형질 전환체를 제조하여 배양하고, 미생물 표면에 발현시키는 제조 방법으로 보다 안전하고 효율적인 질병에 대한 백신 개발을 추구하고자 한다. 이렇게 표면에 발현된 단백질은 세포 외막에 발현됨으로 매우 높은 항원성을 가진다. 높은 항원성에 의한 항체 형성 능력 또한 높다고 할 수 있다. 특히나 표면 발현된 단백질이 신체에 무해한 유용 미생물을 통하여 장내까지 전달되어 발현됨으로써, 안전성 및 효율성 측면에서 효과를 극대화 할 수 있으리라 기대된다. 장내 미생물이기 때문에 면역 거부 반응도 일어나지 않을뿐더러, 이들 미생물들이 쉽게 장내 세포로 침윤하고 그 속에서 증식하여 많은 단백질을 발현하는 큰 장점이 있다. 이들 미생물과 단백질들은 장내 세포에서 GALT와 같은 면역 세포를 자극하여 면역 반응을 유도한다.

이러한 신기술에 의한 백신의 개발로 다량의 백신에도 불구하고 아직까지 양계 농장에서 심각한 문제를 야기하고 있는 뉴캐슬병에 대한 효과적인 예방법을 적용함으로써, 양계 농장 및 국내 축산업, 또한 사료 업계에도 상당한 파급 효과를 높일 수 있으리라 기대된다. 또한 이러한 신기술을 이용한 방법을 이용하여 현재 양돈, 양계 산업에 영향을 미치고 있는 다른 질병 등의 예방법에 대해서도 연구함으로써, 우리나라 축산업에 상당한 기여를 할 수 있으리라 기대된다. 또한 이들 백신은 현재 시중에서 일반적으로 사용되고 있는 생독·사독 백신들이 가지고 있는 여러 가지 문제점들, 즉 안전성이나 많은 양의 바이러스를 항상 배양·보관해야 한다

는 경제적, 시간적인 측면에서도 많은 부분이 보완되는 백신이라고 할 수 있다. 이것은 생산 단가도 상당히 경제적이므로 백신 가격 또한 낮출 수 있으리라 기대된다. 이러한 신기술에 의한 백신의 고부가가치 상품이 될 것으로 기대된다.

보다 효율적으로 질병 발생에 대응하기 위하여 정확하고 신속한 진단법의 개발의 질병 예방의 필수 요소라고 할 수 있을 것이다. 이러한 목표로 우리는 좀더 정확한 진단법의 개발로 정확한 진단으로 인한 질병 전파의 차단을 준비하고자 한다.

위에서 언급했던 이제까지의 결과를 체계적으로 전개하고 준비하여 앞으로 논문 발표를 준비 중에 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

현재 실제로 field에서 이용되고 있는 뉴캐슬바이러스에 대한 진단법은 우선 임상증상 및 부검 소견에 의한 1차적인 진단법이다. 그렇지만 실제 많은 경우 단순히 뉴캐슬병 바이러스의 단독 감염보다는 다른 감염 질병원과 혼합 감염하는 경우가 거의 대부분이기 때문에, 단순한 교과서적인 임상 증상이나 병변 소견만으로 진단이나 확진하기는 매우 어려운 현실이다. 이러한 맥락에서 실험실 진단이 가장 요구되면 반드시 거쳐야 하는 필수 요소가 되고 있다. 이러한 실험실 진단법으로 많이 사용되는 방법이 ELISA이다. 이는 양계 산업의 특성상 샘플 수가 매우 많기때문이기도 하다. 그러나 이 방법의 모순점을 보완하기 위한 진단법들이 새로이 여러 가지가 개발되고 있는 중이다. 기존의 conventional ELISA 방법은 단순한 항체값만 측정하다보니 백신에 의한 항체의 생성과 감염에 의한 항체의 생성을 구분하기란 매우 어렵다. 이러한 맹점을 해소하기 위하여 최근 백신 균주와 wild type을 구별하기 위한 진단법으로 특이 primer를 이용한 RT-PCR방법의 개발이나 dot blot assay 방법, strip을 이용한 진단법등 다양한 시도가 진행중이다.

또한 NDV에 대한 백신의 개발 노력으로 세계 여러 나라에서 다른 형태의 백신 개발에 집중하고 있는 추세이다. DNA vaccine이라든지 본 연구진들과 비슷한 시스템의 경구 백신의 개발 또한 일본과 같은 나라에서 추진하고 있는 중이다. 이 뉴캐슬병은 현재까지 많은 나라의 많은 양계 산업에서 경제적 손실을 끼치고 있는바 많은 연구진들이 보다 효율적이고 간편한 백신의 개발에 집중하고 있는 추세이다.

제 7 장 참고문헌

1. Abdul-Aziz, T.A and L.H. Arp. 1983 Pathology of the trachea in turkeys exposed by aerosol to lentogenic strains of Newcastle disease virus Avian Dis 27:1002-1011
2. Adair, B.M, M.S. McNulty, D. Todd, T.J. Connor and K. Burns 1989. Quantitative estimation of Newcastle disease virus antibody levels in chickens and turkeys by ELISA Avian Patholo 18:175-192
3. Alexander,D.J. 1988. Newcastle Disease: Methods of spread. In D.J.Alexander (ed). Newcastle Disease. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, pp.256-272
4. Alexander D.J., N.J. Chettle, and and G. Parsons. 1979. Resistance of chickens to challenge with the virulent Herts 33 strain of Newcastle disease virus induced by prior infection with serologically distinct avian paramyxoviruses. Res Vet Sci 26:198-201
5. Allan, W.H., J.E. Lancaster, and B. Toth. 1978 Newcastle disease vaccines—their production and use. FAO Animal Production and Health Series No.10. FAO, Rome, Italy
6. Asplin, F.D. 1952. Immunization against Newcastle disease with a virus of low virulence (Strain F) and observation on subclinical infection in partially resistant fowls. Vet Rec 64:245-249
7. Beard, C.W., and R.P. Hanson. 1984. Newcastle Disease. In M.S. Hofstad, H.J. Barnes, B.W.Calnek, W.M. Reid, H.W. Yoder (eds). Disease of Poultry. 8th ed. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 452-470
8. Beaudette, F.R., J.A. Bivins, and B.R. Miller 1949. Newcastle disease immunization with live virus. Cornell Vet 39:302-334
9. Bennejean, G. 1988. Newcastle disease: Control policies. In D.J. Alexander (ed.). Newcastle Disease. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, pp. 303-317

10. Bournsnell, M.E.G., P.F. Green, A.C.R Samson, J.I. Campbell. 1990. A recombinant fowlpox virus expressing the hemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle disease virus (NDV) protects chickens against challenge by NDV. *Virology* 176:297-300
11. Bournsnell, M.E.G., P.F. Green, J.I. Campbell, A.Deuter, R.W.Peters, F.M. Tomley, A.C.R. Samson, P.Chambers, P.T. Emmerson, and M.M.Bins. 1990. Insertion of the fusion gene from Newcastle disease virus into a non-essential region in the terminal repeats of fowlpox virus and demonstration of protective immunity induced by the recombinant. *J Gen Virol*. 71:621-628
12. Box, P.G., H.C. Holmes, A.C. Bushell and P.M. Finney. 1988. Impaired response to killed Newcastle disease vaccine in chicken possessing circulating antibody to chickens anemia agent. *Avian Pathol* 17:713-723
13. Chambers, P., N.S. Millar, and P.T. Emmerson. 1986. Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus *J Gen Virol* 67:2685-2694
14. Cosset, F.L., J.F. Bouquet, A. Drynda, Y. Chebloune, G.Verdier. 1991. Newcastle disease virus (NDV) vaccine based on immunization with avian cells expressing the NDV hemagglutination-neuraminidase glycoprotein. *Virology* 185:862-866
15. Cvelic-Cabrilo, V., H.Mazija, Z.Bidin and W.L. Ragland 1992. Correlation of hemagglutination inhibition and enzyme linked immunosorbent assays for antibodies to Newcastle disease virus *Avian Patholo* 21:509-512
16. Gough, R.E., W.H. Allan, D.J. Knight and J.W.G. Leiper. 1974. The potentiating effect of and interferon inducer on oil-based inactivated Newcastle disease vaccine. *Res Vet Sci* 17:280-284
17. Jorgensen, E.D., P.L. Collins and P.T. Lomedico. 1987. Cloning and nucleotide sequence of Newcastle disease virus hemmagglutinin-neuraminidase mRNA: Identification of a putative sialic acid binding site. *Virology* 156:12-24

18. Galn, JE, K Malayama and R Curtiss III. 1990. Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonellavaccine* strains. *Gene* 94:29–35.
19. Gambrione. 1997. Vaccination methods in the hatchery. *World Poultry Misset* 13:19–.
20. Mebatsion, T, MJM Koolen, LTC de Vaan, N de Haas, M Braber, A Rmer–Oberdrfer, P van den Elzen, and P van der Marel. 2002. Newcastle disease virus (NDV) marker vaccine: an immunodominant epitope on the nucleoprotein gene of NDV can be deleted or replaced by a foreign epitope. *J Virol.* 76:10138–10146.
21. Toyoda, T, B Gotoh, T Sakaguchi, H Kida, and Y Nagai. 1988. Identification of amino acids relevant to three antigenic determinants on the fusion protein of Newcastle disease virus that are involved in fusion inhibition and neutralization. *J Virol.* 62:4427–4430.
22. Zhao, Y and RW Hammond. 2005. Development of a candidate vaccine for Newcastle disease virus by epitope display in the Cucumber mosaic virus capsid protein. *Biotech Lett.* 27:375–382.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

