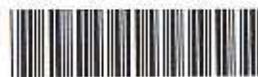


최      중  
연구보고서

마필농가의 생산성 향상을 위한 말허피스  
바이러스 고효능백신 및 초고속 진단법 개발  
Development of Fusion Protein Vaccine and Rapid  
Diagnostic Kits against Equine Herpesvirus for  
the Enhancement of Horse Productivity

제 주 대 학 교

농림수산식품자료실



0016170

농림수산식품부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “마필농가의 생산성 향상을 위한 말허피스 바이러스 고효능백신 및 초고속 진단법 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 25 일

주관연구기관명 : 제주대학교

총괄연구책임자 : 임 윤규

세부연구책임자 : 주 홍구

세부연구책임자 : 황 규계

연 구 원 : 양 재혁

연 구 원 : 이 홍식

연 구 원 : 한 미정

연 구 원 : 김 은희

주해진 김미형 Hoa VB

전경익 강혜영 고우리 김승희 김요한

김지은 변운영 설준호 손용석 양정진

윤세희 이기정 정희원 조순범 차인

석 피정현

# 요 약 문

## I. 제 목

마필농가의 생산성 향상을 위한 말허피스 바이러스 고효능백신 및 초고속 진단법 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구에서 개발한 백신은 체액성, 세포성면역을 향상시키기 위해 기존의 백신과는 달리 면역계의 전문적인 항원제시세포인 수지상세포(Dendritic cell)를 표적화(targeting)하여 개발한 새로운 개념의 백신이다. 수지상세포의 표면에 있는 항체수용체인 Fc receptor에 효율적으로 결합할 수 있도록 EHV 바이러스항원에 항체의 Fc 부분을 결합하여 항원의 전달을 극대화하고자 하였다. Fc receptor를 이용해 항원전달이 될 경우 항원이 탐식된 뒤 processing, presentation이 매우 효율적으로 이루어져 기존의 백신효능을 높일 수 있다.

마필질병의 경우 진단을 위한 시약이 제공되지 않고 있으나, 마필산업이 확장일로에 있다는 점에서 이들 진단시약의 수요가 증가할 것이며 이를 위한 국내 생산의 기반을 마련할 필요가 있다. 이를 위하여 ELISA 및 현장 rapid 진단법인 Immunochromatography를 개발하고자 하였다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서 백신후보물질의 효능을 검증하고자 마우스 모델을 제작한 뒤 *in vitro*, *in vivo* 실험을 실시하였다. 다양한 실험을 통해 체액성면역과 세포성면역의 형성 유무, 증진여부를 확인하였다. 백신후보물질의 접종량, 횟수, 접종 후 채혈시기 등의 각종 parameter에 대한 최적조건을 수립하였으며 체내 생성된 항체를 정량하기 위해 EHV 특이적인 ELISA를 이용하였으며 체내에서 바이러스에 감염된 세포를 죽일 수 있는 세포독성립프구의 생성여부를 확인하기 위해 CD4<sup>+</sup> 세포 내 IFN-gamma 염색, LDH cytotoxicity assay를 이용하였다. 또한 상업적으로 현재 이용되는 EHV 백신과의 비교를 통해 제작된 백신후보물질의 성능을 점검하였다.

진단시약의 개발을 위하여, 소재가 되는 특이항체와 이를 적용한 ELISA 및 ICG법을 제시하였으며, 항체가 진단을 위한 소재로서 E. coli계에서 발현시킨 recombinant gD를 개발하기 위한 제반 연구를 수행하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구를 통해 개발된 백신후보물질, 특히 Fc conjugated EHV-1은 일반적인 사독 백신보다 항체생성능 등의 백신효능이 매우 향상되었다. 백신개발의 기반기술인 Fc receptor를 표적화시키는 기술은 현재 학술적인 측면에서만 논의되고 있고 실제 상업용 백신을 개발한 예는 없는 실정이다. 본 연구에서 사용되었던 EHV 항원을 타 병원성 항원으로 교체할 경우 백신접종 시 면역형성이 어려운 질병에 대한 새로운 백신개발이 가능할 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서 개발된 기초기술은 다양하게 적용이 가능하기 때문에 한 단계 더 발전시켜 새로운 원천기술의 개발이 필요할 것으로 사료된다.

## SUMMARY

### Purpose

The vaccine developed in this study is a new type vaccine that target dendritic cells, the professional antigen-presenting cells (APCs) compared to conventional vaccines. To maximize the antigen delivery, we conjugated EHV antigen to Fc part of antibody. The Fc conjugated viral antigen is expected to be efficiently processed and presented after the entry into APCs.

In case of horse diseases, there is no available diagnostic kit, but the demand of kit should be increased as the industry related to horse is growing fast. It is thus necessary that the basis for the domestic production of diagnostic kits is established. For this, we tried to develop ELISA and Immunochromatography, a rapid diagnostic method.

### Contents and scope

In this study, we established the conditions of high-titer EHV production, and performed the *in vitro* and *in vivo* experiments after the establishment of mouse model to evaluate the efficacy of vaccine candidate. A variety of experiments revealed the generation of humoral and cellular immunity with the inoculation of vaccine candidates. The optimal conditions, such as the dose, times, sampling period of vaccine candidates, were established. And EHV-specific ELISA was used to determine the antibody amount in the inoculated mice and the intracellular IFN-gamma staining of CD4+ T cells was used to check if mice have the cytotoxic T lymphocytes, which can kill the virus infected cells. Furthermore, we compared our vaccine candidates with a commercially available EHV vaccine in the aspect of efficacy.

For the development of diagnostic reagents, the production of specific antibody as a basic material and the development of ELISA and ICG using antibody were suggested. And also, we performed the production of recombinant gD expressed in *E. coli* for the antibody detection.

### Suggestions for the use of research products

Among our vaccine candidates, Fc conjugated EHV-1 showed the higher vaccine efficacy including the production of antibody compared to generally used vaccine using dead virus. The technology used in this study, the targeting Fc receptor, is now discussed only in research area and there is no commercially available vaccine using this technology. If EHV antigen of our vaccine candidates will be replaced by other pathogenic antigens, we expected the development of new vaccines against diseases, which host can't generate enough immunity upon infection. And also, our basic techniques should be developed into further developed techniques with originality and thus a variety of efforts are needed.

# CONTENTS

Chapter 1. The outline of research project .....	12
Chapter 2. The present condition of technical development in and outside of country .....	14
Chapter 3. The contents and results of research project .....	16
Part 1 Materials and methods .....	16
1. EHV-Fc Fusion vaccine	
가. Culture and purification of virus	
나. Inactivation and purification of virus	
다. Purification of Fc fraction of horse IgG	
라. Production and purification of EHV-Fc protein conjugate	
2. Vaccine efficacy	
가. Development of dendritic cell targeting technology	
나. Culture of horse dendritic cells and confirmation of their function	
다. Selection of target protein	
라. Establishment of in vitro experiments (humoral and cellular immunity) using dendritic cells	
마. Establishment of high efficient culture techniques for equine dendritic cells	
바. Elucidation about the antigen uptake of equine IgG-FITC	
사. Mouse management	
아. Inoculation of EHV vaccine candidate and blood sampling	
자. ELISA for measuring of EHV-specific antibody (humoral immunity)	
차. FACS analysis for measuring of EHV-specific cellular immunity (cellular immunity)	
카. other experiments	
3. The diagnosis for EHV-1, -4	
가. Mouse immunization	
나. Production of hybridoma cells	
다. Hybridoma screening	
라. Purification of monoclonal antibody	
마. ELISA kit	
바. ICG kit	

4. Recombinant gD	
가. Isolation of viral gpD gene	
나. gD gene cloning	
다. Expression of EHV-1, 4 recombinant gD	
라. Purification of EHV-1, 4 recombinant gD	
5. The outbreak report of EHV-3	
가. Infected horses	
나. Culture of cells and virus	
다. DNA sequence analysis	
라. The observation using EM	
마. ELISA for EHV3 antibody	
Part 2 Results .....	51
1. EHV-Fc Fusion vaccine	
가. Virus titer	
나. Optimal MOI for mass production of virus	
다. Virus titration in media and MDBK cells depending on CPE	
라. Inactivation of virus	
마. Purification of horse IgG Fc fraction	
바. Production of EHV-Fc protein conjugate	
2. Vaccine efficacy	
가. Isolation and culture of equine dendritic cells and T lymphocytes	
나. Survey for dendritic cell targeting protein	
다. Mannosylated-FITC-albumin application	
라. EHV effects on the stimulatory capacity of dendritic cells	
마. Antigen uptake of Fc receptors on the surface of dendritic cells	
바. Humoral immune responses of vaccine candidates	
사. Cellular immune responses of vaccine candidates	
아. Immune function of dendritic cells inoculated with live or dead EHV-1 virus	
3. Diagnosis for EHV	
가. Characterization of monoclonal Abs	
나. ELISA	
다. ICG	
4. Recombinant gD	
가. Cloning and expression of EHV-1 gD	



나. Cloning and expression of EHV-4 gD	
다. Sequencing of EHV-1 and -4	
5. The first report of EHV-3 in Korea	
가. Antibody titer of experimental horse	
나. Infection of EHV-3 and the duration of antibody titer	
다. Sensitivity and specificity of ELISA compared to PCR	
라. Isolation of EHV3 and clinical symptoms	
마. EHV-3 PCR analysis in samples	
바. Virus culture	
사. The observation using EM	
Chapter 4. Achievement of goals and contribution to related areas .....	107
Chapter 5. Application of results of research projects .....	109
Chapter 6. Scientific and technological information gained from outside of country .....	110
The collected scientific and technical information from abroad during the research project (혹은)	
Chapter 7. References .....	111

## 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	12
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	14
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	16
제1절	재료 및 방법.....	16
1.	EHV-Fc Fusion 백신	
가.	바이러스 배양 및 정제	
나.	바이러스 불활화 및 정제	
다.	말 IgG Fc분획의 정제	
라.	EHV-Fc 단백 융합체의 제조 및 정제	
2.	백신 효능시험	
가.	수지상세포 표적화 기술개발	
나.	말 수지상세포 배양 및 기능 확인	
다.	표적화단백질 선별	
라.	수지상세포를 이용한 <i>in vitro</i> 시험법(체액성, 세포성면역) 확립	
마.	고효율 equine dendritic cells (DCs) 배양기술 확립	
바.	Equine IgG-FITC에 대한 항원탐식과정 규명	
사.	마우스의 사용 및 관리	
아.	EHV 백신후보물질의 접종 및 혈액채취	
자.	EHV특이항체의 정량을 위한 ELISA (체액성면역 측정)	
차.	EHV특이세포성면역의 측정을 위한 유세포분석 (세포성면역 측정)	
카.	기타 실험	
3.	EHV-1, -4에 대한 진단법	
가.	마우스면역	
나.	Hybridoma 작성	
다.	Hybridoma의 screening	
라.	단클론항체의 정제	
마.	ELISA kit	
바.	ICG kit	
4.	제조합 gD	
가.	Viral gpD gene 분리	

- 나. gD gene cloning
- 다. Expression of EHV-1, 4 recombinant gD
- 라. Purification of EHV-1, 4 recombinant gD
- 5. EHV-3의 발생 보고
  - 가. 환축
  - 나. 세포 및 바이러스 배양
  - 다. DNA 염기서열분석
  - 라. 전자현미경 관찰
  - 마. EHV3 항체검사를 위한 ELISA

제2절 결과 ..... 51

- 1. EHV-Fc Fusion 백신
  - 가. 바이러스의 역가
  - 나. 바이러스 대량배양을 위한 최적 MOI
  - 다. CPE별 배지와 MDBK 세포내의 virus titeration
  - 라. 바이러스의 불활화
  - 마. 말 IgG Fc분획의 정제
  - 바. EHV-Fc 단백 융합체의 제조
- 2. 백신 효능시험
  - 가. 말 수지상세포 및 T 림프구 분리, 배양
  - 나. 수지상세포 표적화 이용 가능한 단백질의 탐색
  - 다. Mannosylated-FITC-albumin 적용실험
  - 라. 수지상세포의 림프구자극능에 대한 EHV효과
  - 마. 수지상세포 표면 Fc 수용체의 탐식작용 연구
  - 바. 백신후보물질의 체액성면역 (humoral immunity) 시험결과
  - 사. 백신후보물질의 세포성면역 (cellular immunity) 시험결과
  - 아. Live or Dead EHV-1 virus를 접종한 수지상세포의 면역반응시험
- 3. EHV에 대한 진단법
  - 가. Monoclonal Abs의 특성
  - 나. ELISA
  - 다. ICG
- 4. 제조합 gD
  - 가. EHV-1 gD cloning 및 expression
  - 나. EHV-4 gD cloning 및 expression
  - 다. EHV-1 및,-4 sequencing

- 5. EHV-3의 국내최초 보고
  - 가. 실험마에서의 항체수준
  - 나. EHV-3의 감염과 항체지속기간
  - 다. PCR 검사와 비교한 ELISA의 민감도 및 특이도
  - 라. EHV3 원인 바이러스 분리 및 임상소견
  - 마. 가검물의 EHV-3 PCR 분석
  - 바. 바이러스 배양
  - 사. 전자현미경 관찰

제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	107
제 5 장	연구개발결과의 활용계획 .....	109
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	110
제 7 장	참고문헌 .....	111

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

국내마필산업은 경마산업, 승마산업 및 마필육성산업으로 대표되는 3개의 바퀴가 유기적으로 맞물려 돌아가고 있으며, 선진국의 반열에 진입함에 따라 그 규모가 급속히 확장되고 있는 실정이다.

마필산업은 상술한 문화사업과 연계되기 때문에 일반적인 축산업의 경우와는 대단히 다른 양상을 보이는 것이 특징이며, 부가가치가 대단히 높은 고급축산업이라는 표현이 가능할 지도 모르겠다. 이러한 관점에서의 산업적 의의로서는,

1. 레저문화산업으로서 관광승마, 경마공원, 레저스포츠로서의 위치가 공고하다. 경마공원의 경우, '03년도 기준으로 6조 2천여 억원으로 보고되어있다.
2. 또한, 이를 위한 육성농가의 소득원으로서 중요한 위치를 차지하고 있으며, '04년도 기준으로 1필의 경매가는 평균 3,000만원이라고 보고되어 있어, 높은 부가가치가 있기 때문에 마필산업의 비중이 확대되고 있는 추세이다.
3. 그 외에도 천연기념물로서의 혈통보존, 말을 이용한 심리치료 등 경제동물로서의 축산업과는 엄격히 차별화된 특수 산업으로 자리매김하고 있다.

상술한 바와 같이, 번창일로의 마필산업에도 불구하고 이에 부응하는 국내의 기반산업은 미미한 실정으로서, 미필질병 예방 및 치료를 위한 동물약품의 개발과 생산은 전무한 상태이다. 특히, 마필산업의 생산성에 가장 중대한 영향을 미치는 EHV에 대한 진단과 예방제제도 아직 국내의 제품이 제시된 바 없다.

한편, EHV의 진단과 예방에 있어서 다음과 같은 문제점이 있는 바,

1. EHV 특성상 잠복감염 및 불현성 감염을 하므로 임상 증상만으로는 진단하기 어렵다. (유용한 진단시약이 개발되어있지 않다)
2. 기존 수입백신의 효능이 매우 미약하며, 항체유지기간이 2개월 남짓으로 임신 암말의 경우엔 3회 이상 접종해야 하는 번거로움이 있다.
3. 백신공급의 난점 (국내 백신공급업체는 1개소뿐으로, 미국 Fort Dodge 社의 제품 (Killed virus vaccine)만 수입되고 있다. 이에 따라 환율이 불안정하거나 통관에 문제가 발생하면 백신프로그램에 막대한 지장을 초래하게 된다.
4. 수입백신 가격이 고가이고 수입하는 데 장시간이 소요될 뿐만 아니라 수송도중 품질이 변질될 위험성이 있다.

그러므로 마필산업의 높은 부가가치와 지속적인 성장추세를 감안할 때, 우수한 신속진단시약과 고효능의 백신 개발이 절실히 요구된다 하겠다.

본 연구는 국내뿐 아니라 범세계적으로 말 관련 산업 및 경제에 치명적인 악영향을 미치는 대표적인 바이러스 질환이 EHV의 예방을 위한 **새로운 개념의 고효능 백신**을 개발하기 위하여 수행되었다. 또한, EHV의 진단을 위한 면역학적인 진단소재로서 EHV-1 및 EHV-4에 대한 단클론항체를 개발하고, 항체가 측정을 위한 항원으로서는 recombinant gD를 개발하기 위하여 수행되었다.

이를 위하여, EHV를 효과적으로 예방할 수 있는 백신을 위한, 수지상세포 표적화기술 및 융합단백백신을 개발하여 이의 효능을 확인하였으며, 백신원료로서의 대량생산을 위한 최적배양조건을 조사하였다. 또한, 신속진단법인 ELISA 및 ICG를 위한 면역학적 소재인 단클론 항체를 분비하는 잡종세포를 개발하였으며, E. coli계를 이용한 recombinant gD를 개발하기 위한 제반 연구를 실시하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### \* 백신의 효능관점:

○ 현재 EHV의 예방을 위하여 생독 및 사독 백신이 사용되고 있으나 그 효과가 미약하고(Merchant와 Packer, 1967; O'Callaghan과 Harty, 1992), 또한 항체지속기간이 매우 짧아서 효과적인 백신의 개발이 절실히 요구된다.

○ 본 연구에서 추구하는 백신은 항원의 탐식과 T 림프구의 활성화 등 면역형성에 결정적인 역할을 수행하는 수지상세포(dendritic cell)를 표적화(targeting)하여 고도의 면역을 유도하는 것으로서 기존 백신의 작용기전과 근본적인 차이를 가지는 새로운 개념의 백신이다.

○ 수지상세포의 표면에 있는 수용체(Fc 수용체)와 특이적으로 결합할 수 있는 운반체(항체의 Fc 부분)를 EHV 항원과 결합시킴으로써 수지상세포에 의한 항원의 인식, processing, 그리고 presentation을 특이적으로 유도하고, 이를 통해 적은 양의 항원으로도 효과적인 면역(체액성면역과 세포성면역)을 형성케 하는 것이 본 연구의 핵심적 기술이다.

### \* 백신제작 분야에서 수지상세포 표적화기술의 응용

○ 수지상세포는 항원을 탐식하고 세포내에서 소화시켜 naive T 림프구를 활성화시킬 수 있는 유일한 면역세포이다. 따라서 항원탐식에 관여되는 체계가 효과적으로 발달되어 있고 어떤 경로로 항원탐식이 되는가에 따라 항원 presentation 능력과 형성되는 면역 반응의 양상이 결정된다.

○ 수지상세포의 표면에 다양한 종류의 항원탐식 수용체가 있는데 본 연구에서는 항체의 Fc part를 인식할 수 있는 Fc 수용체를 targeting하고자 하였다. Adaptive immunity에 의해 생산되는 항체는 host로 들어오는 병원성항원과 결합하여 immune complex를 형성한다. 이때 이를 효과적으로 탐식하여 2차면역반응을 일으킬 수 있도록 할 수 있는 분자가 항원제시세포 (antigen-presenting cells)의 Fc 수용체이다.

○ 수지상세포 표적기술과 이를 이용한 백신 개발은 세계적으로 초기단계에 있는 원천 기술로서 학술적 가치뿐만 아니라 경제적 산업적 가치가 대단히 크다.

○ 국외에서 수지상세포 표적화기술 개발에 대한 연구는 극소수 진행되었지만 대부분

암치료를 목표로 개발이 진행되었으며 실제 바이러스성 질병에 대한 백신개발은 이루어지고 있지 않다.

○ 국내에서 수지상세포에 대한 관련 연구는 비교적 활발히 수행되고 있지만 임상 및 산업계에 적용 가능한 응용연구, 특히 백신개발에서의 표적화연구는 전무한 상태이다.

\* EHV 항원단백에 대한 연구 및 백신응용 분야

○ EHV의 구성요소 중 gD를 포함하여 면역형성에 중요한 항원단백에 대한 연구가 비교적 잘 되어 있어서 EHV예방용 백신개발에 필요한 충분한 정보를 본 연구의 수행에 활용할 수 있었다.

○ EHV 예방을 위한 생독 및 사독 백신이 개발되어 사용되고 있으나 효과적인 면역형성을 유도하지 못하고 항체의 지속시간도 짧아서 새로운 백신의 개발이 필요한 실정이다.

○ EHV를 예방하기 위한 백신의 개발에 관한 연구는 국내에서는 현재까지도 전혀 이루어지고 있지 않다.

\* EHV관련 진단법 개발 분야

○ 비강폐렴이 발생한 말에서 EHV의 감염이 확인되었고, 혈청학적인 조사를 통하여 EHV에 대한 항체보유율과 국내에서 분리한 LC<sub>1</sub>주에 대한 면역원성 조사 등이 조 등에 의하여 1994년에 마우스를 이용하여 이루어졌다.

○ EHV의 특성상 잠복감염 및 불현성감염을 나타내기 때문에 국내 말 전문기관인 한국마사회에서도 진단 및 예방에 어려움을 호소하고 있다. 따라서 민감도와 특이도를 겸비한 신속한 진단법의 개발이 절실하다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제1절 재료 및 방법

#### 1. EHV-Fc Fusion 백신

##### 가. 바이러스 배양 및 정제

바이러스를 배양 및 정제를 하기위하여 먼저 바이러스의 대량배양조건을 확립하고 정제를 실시하였다. EHV-1과 EHV-4에 대한 바이러스 Seed를 제작하고 이를 바탕으로 EHV의 대량배양 조건을 탐색하고 정제하였다.

##### 1) virus seed

EHV-1 seed는 제주도 북제주군 조천읍에 위치한 대영목장의 말 2두(포멀스틱, 스토미샘)가 다른 임상증상은 없이 2005년 2월과 3월에 각각 유산을 일으켰고, 그 유산태아의 부검에서 다량의 흉수가 발견되었다. 유산의 원인이 EHV-1으로 확인되어 자마의 장기(흉수, 혈액, 태반, 폐, 간)를 면봉으로 swab 하였다. 흉수와 혈액을 제외한 각 장기들은 장기 약 2.4 g 에 DMEM 5 ml을 첨가하여 적당이 혼합시킨 후 상온에 3시간 정치하고 ×2000 rpm에 5분간 원심한 후 상층액을 회수 하였다. 각 장기의 상층액과 흉수 혈액은 멸균 filtering(0.45 $\mu$ m)하였다. EHV-4 seed는 미국(American Type Culture Collection, ATCC number:VR-2230TM)에서 수입하여 사용하였다.

##### 2) EHV-1 의 배양

MDBK 세포 (한국 세포주 은행, 2005년)를 DMEM (10% FBS, 0.1% SPK, pH 7.16)배지에서 20시간 배양하여 약 90-100%의 세포단층(monolayer)이 형성되도록 한 후 EHV-1을 multiplicity of infection (MOI)이 약 1이 되게 접종하고 37°C에서 4시간동안 반응시켰다. 접종액을 제거하고 FBS가 2% 함유된 DMEM배지를 첨가하여 37°C에서 약 40시간 배양하여 CPE가 60% 정도 발생하였음을 확인한 후 배지를 회수하였다. 회수된 배지는 500 g에서 15분간 원심하고 상층액을 채취하여 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

##### 3) EHV-4 의 배양

MDBK 세포 (한국 세포주 은행, 2005년)를 DMEM (10% FBS, 0.1% SPK, pH 7.16)배지에서 18시간 배양하여 약 90%의 세포단층(monolayer)이 형성되도록 한 후 EHV-4를 multiplicity of infection (MOI)이 약 0.5가 되게 접종하고 37°C에서 4시간동안 반응시켰다. 접종액을 제거하고 FBS가 2% 함유된 DMEM배지를 첨가하여 37°C에서 약 60시간 배양하여 CPE가 10% 정도 발생하였음을 확인한 후 배지를 회수하였다. 회수된 배지는

160g에서 5분간 원심하고 상층액을 채취하여 4°C에서 보관하였다. 배지를 회수하고 남은 EHV-4가 감염된 MDBK를 다시 계대배양 한 20시간 후에 4°C에서 보관 중이던 정제된 EHV-4 상층액을 37°C에서 4시간동안 접종하였다. 접종액을 제거하지 않고 FBS가 2% 함유된 DMEM배지를 첨가하여 37°C에서 약 40시간 배양하여 CPE가 70% 정도 발생하였음을 확인한 후 배지를 회수하였다. 회수된 배지는 160 g에서 5분간 원심하고 상층액을 채취하여 -70°C에서 보관하였다.

#### 4) 배양된 virus의 titration

소분시켜놓은 vial 하나를 녹여 96-well plate에 10진 희석하고 미리 96-well plate에 full sheet로 배양시킨 MDBK cell 에 virus를 접종하였다. 접종량은 well당 20 µl로 하고 2시간 후 2%FBS 함유된 DMEM 배지를 첨가하여 total volume을 100 µl/well이 되도록 보정한 후, 4~5일 배양하며 CPE를 관찰하여 CPE를 형성하는 virus 희석 배수를 찾았다.

#### 5) EHV-1의 대량 배양 관련 최적의 MOI 선정

MDBK 세포를 20시간 배양하여 약 50%, 70%, 90%, 100%의 세포단층이 형성되도록 한 후 EHV-1 seed 바이러스 ( $1.67 \times 10^{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml)를 FBS가 2%로 첨가된 DMEM배지로 희석하여 접종량을 달리하여 (MOI 0.5, 1, 2, 4, 8) 접종하였다. virus seed 접종 4시간 후에 접종액을 제거하고 PBS로 2번 세척 후(2분간 정치) 각각 2% FBS가 첨가된 DMEM배지와 혈청이 첨가되지 않은 DMEM배지를 첨가하여 virus 증식 효율을 시간에 따라서 측정하였다.

#### 6) EHV-4의 대량 배양 관련 최적의 MOI 선정

MDBK 세포를 20시간 배양하여 약 50%, 70%, 90%, 100%의 세포단층이 형성되도록 한 후 EHV-1 seed virus ( $1.67 \times 10^{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml)를 FBS가 2%로 첨가된 DMEM배지로 희석하여 접종량을 달리하여 (MOI 0.5, 1, 2, 4, 8) 접종하였다. 약 4시간 후에 접종액을 제거하고 PBS로 2번 세척 후 각각 2% FBS가 첨가된 DMEM배지와 혈청이 첨가되지 않은 DMEM배지를 첨가하여 virus 증식 효율을 시간에 따라서 측정하였다.

#### 7) CPE별 배지와 MDBK 세포내의 virus titration

MDBK 세포내와 배지의 virus양을 알아보기 위해서 T75 세포배양용 flask 10개에 DMEM (10% FBS, 0.1% SPK, pH 7.16)배지로 70%의 세포단층이 형성되도록 24시간동안 배양된 MDBK 세포에 EHV-1 seed virus( $1.67 \times 10^{11}$  TCID<sub>50</sub>/ml), EHV-4 seed virus ( $1.67 \times 10^{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml)를 MOI 4로 2ml 접종한 후 4시간 후에 배지를 10ml 첨가하여 CPE가 발생하기 직전(EHV-1 : virus 접종 후 18시간 , EHV-4 : virus 접종 후 26시간)에 무혈청의 DMEM배지를 flask 당 4 ml씩 첨가하여 CPE 발생정도에 따른

Cell과 배지의 titration을 하였다. CPE가 각각 10%, 20%, 50%, 70%, 90% 일 때 배지를 수거한 후 titration을 하고, flask에 PBS를 15ml 세척하여 남은 배지를 제거하고  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 급속히 냉동시킨 후  $37^{\circ}\text{C}$  water bath에서 3분간 해동(냉동과 해동을 3번 반복)을 하여 세포막을 파괴시킨 후 배지를 4ml 첨가하여 세포내 virus를 추출하여 DMEM 배지를 이용하여 10진 희석하고 MDBK 세포가 배양된 96-well cell culture flask에 희석액을 6 $\mu\text{l}$ 씩 8개 well에 접종 후 5일까지 세포를 관찰하여 CPE발생 여부를 관찰하여 역가를 알아보았다.

#### 8) 대량배양을 통한 EHV-1 항원의 제조

실험에서 확립한 바이러스 최적 생산 조건을 적용하여 EHV-1 항원을 제조하였다. T150 (배양면적  $150\text{ cm}^2$ ) flask 80개에 MDBK세포를 동일한 조건으로 계대배양하고 다음날 약 70~80%정도의 단층이 형성되었음을 확인하고 바이러스를 접종하였다. Seed 바이러스를 DMEM배지에 희석하여 MOI가 2가 되도록 각 flask에 4 ml씩 접종하고 4시간동안 반응시킨 후 2% FBS가 첨가된 DMEM배지를 20 ml씩 첨가하였다. 12시간 배양한 후 배지를 완전히 제거하고 PBS로 2번 세척(3분간 정치)한 후 무혈청의 DMEM배지를 flask 당 8 ml씩 첨가하여 약 20시간 정도 배양을 하였다 (이때의 CPE발생 정도는 약 60% 정도 임).

#### 9) 대량배양을 통한 EHV-4 항원의 제조

실험에서 확립한 바이러스 최적 생산 조건을 적용하여 EHV-4 항원을 제조하였다. T150 (배양면적  $150\text{ cm}^2$ ) flask 120개에 MDBK세포를 동일한 조건으로 계대배양하고 다음날 약 80~90%정도의 단층이 형성되었음을 확인하고 바이러스를 접종하였다. Seed 바이러스를 DMEM배지에 희석하여 MOI가 4가 되도록 각 flask에 4 ml씩 접종하고 4시간동안 반응시킨 후 2% FBS가 첨가된 DMEM배지를 20 ml씩 첨가하였다. 18시간 배양한 후 배지를 완전히 제거하고 PBS로 2번 세척(3분간 정치)한 후 무혈청의 DMEM배지를 flask 당 8 ml씩 첨가하여 약 24시간 정도 배양을 하였다 (이때의 CPE발생 정도는 약 90% 정도 임).

#### 10) virus 정제

대량 배양으로 수거된 배지를 160 g에서 3분간 원심분리하고 상층액을 다시 800 g에서 15분간 원심분리 하였다. 바이러스를 농축하기 위해 수거된 상층액을 Centrikon T-324(rotor A8.24)로 원심분리한 후(rotor temp  $4^{\circ}\text{C}$ , temp limit  $15^{\circ}\text{C}$ , rotor speed 22000, G-force 약 30000, time 2시간) 상층액은 버리고 침전물을 1.2ml의 PBS에  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간동안 교반하여 부유시켰다. 이와 같이 정제된 바이러스 부유액을 소분한 뒤  $-70^{\circ}\text{C}$  보관하고 다음날 소분된 tube 1개를 녹여 역가검정을 실시하였다. 역가는 약  $4 \times 10^{15}$  TCID<sub>50</sub>/ml 이었다.

## 나. 바이러스 불활화 및 정제

### 1) formalin 처리 최적 조건 선정

정제된 EHV-1(0.16 mg/ml), EHV-4(0.11 mg/ml)를 20  $\mu$ l씩 분주하여 각각 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.5% formalin을 20  $\mu$ l씩 첨가하고 1시간, 2시간, 4시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간 동안 4°C에서 반응시킨 후 0.2% BSA(Bovine serum albumin)를 40  $\mu$ l 첨가하여 quench 하였다. microcon Ym-100(millipore. 42413)을 사용하여 4°C에서 3분간 12000 g로 원심분리 하여 formalin과 BSA를 제거하고 1000 g로 원심분리를 하여 virus를 회수하였다. 불활화 처리된 EHV-1, EHV-4를 MDBK (90% cell seat)이 자라고 있는 96-well cell culture flask에 6  $\mu$ l씩 접종하여 titration을 하여 불활화 정도를 알아보았다.

### 2) EHV-1의 formalin 처리

실험에서 확립한 formalin 처리 조건을 적용하여 불활화 EHV-1 항원을 제조하였다. EHV-1 500  $\mu$ l(0.16 mg/ml)에 0.2% formalin 500  $\mu$ l를 첨가 후 4°C에서 24시간동안 교반 후 microcon Ym-100(millipore. 42413)을 사용하여 4°C에서 3분간 12,000 g로 원심분리 하여 formalin을 제거하고 정제된 불활화 EHV-1 항원을 얻은 후 분주하여 -70°C에 보관하였다.

### 3) EHV-4의 formalin 처리

실험에서 확립한 formalin 처리 조건을 적용하여 불활화 EHV-4 항원을 제조하였다. EHV-4 600  $\mu$ l(0.11 mg/ml)에 0.2% formalin 600  $\mu$ l를 첨가 후 4°C에서 24시간동안 교반 후 microcon Ym-100(millipore. 42413)을 사용하여 4°C에서 3분간 12,000 g로 원심분리 하여 formalin을 제거하고 정제된 불활화 EHV-1 항원을 얻은 후 분주하여 -70°C에 보관하였다.

## 다. 말 IgG Fc분획의 정제

### 1) 말 IgG의 정제

말의 전혈로부터 혈청을 분리한 후 Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, sweden)을 이용한 affinity chromatography를 실시하여 Equine IgG를 분리하였다. Sepharose gel을 syringe column (16 × 80 mm)에 충전시킨 후 200 mM phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)로 2배 희석한 말혈청 40 ml을 가하였다 (flow rate: 1ml/min). Protein G와 결합하지 않은 혈청의 기타 성분은 약 50 ml의 PBS로 세척하여 제거하였다. 결합된 Equine IgG는 3 M NaSCN (pH 5.0)을 가하여 용출시켰다. 분획은 2 ml씩 나누어 회수하고, 단백질이 높은 분획은 합한 후 20 mM PBS에 72시간 동안 투석하고 제균여과하여 냉장보관 하였다.

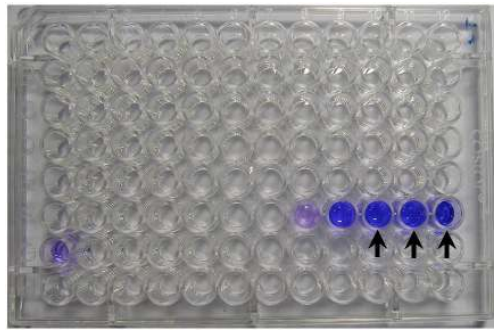


Fig. 1. Bio-Rad protein assay 법을 이용한 높은 분획의 확인.

## 2) Fc분획의 제조

정제된 IgG를 단백분해효소 (papain)로 처리하여 Fc분획을 제조하였다. IgG를 papain으로 처리하게 되면 IgG분자복합체의 여러 부분이 잘려질 수 있고 따라서 분획도 여러 개가 형성될 수 있는데, Di-sulfide 결합이 유지된 Fc분획 (dimer 형태의 분획)을 얻기 위해 Cystein-HCl이 함유된 Digestion buffer (75 mM NaCl, 2mM EDTA, 75 mM Sodium Phosphate, 10 mM Cystein-HCl, pH 7.1)를 제조하였고 digestion 실험 직전에 papain (Sigma, CAT:p-4792)을 buffer에 첨가하여 약 5분간 녹여 최종적인 digestion solution을 제조하였다. IgG 1 mg에 papain 10 ug 비율로 조정하여 37°C에서 4시간 반응시켜 IgG의 digestion을 실시하였고 20 mM iodoacetate (Sigma, CAT:I4386)을 첨가하여 반응을 중지시켰다.

## 3) Fc분획의 정제

Fc분획을 정제하기 위해 papain으로 처리한 IgG를 protein G sepharose 와 2시간 정도 4°C에서 반응시킨 후 column에 충전하여 unbound sup을 제거하고 PBS로 2회 세척하였다. 결합된 Fc는 3 M NaSCN (pH 5.0)을 가하여 용출시키고 PBS에 72시간동안 투석하고 제균여과하여 최종적인 Fc분획을 정제하였다. 정제된 Fc를 확인하기 위해 SDS-PAGE 분석을 실시하였다.

### 라. EHV-Fc 단백 융합체의 제조 및 정제

#### 1) EHV-Fc 단백 융합체의 제조 및 정제

EHV-Fc 단백 융합체를 제조하기 위해 two-step glutaraldehyde를 이용한 conjugation 방법을 사용하였다. 정제된 EHV(5 mg/ml) 2 ml에 glutaraldehyde가 2% 함유된 PBS 1 ml에 천천히 교반하면서 섞어준 후 교반을 계속하면서 실온에서 8시간 동안 반응시켰다. 반응액은 PD-10 column (Pharmacia-LKB, Sweden)에 통과시키면서 분획을 받고

280 nm에서 흡광도를 측정하여 활성화된 EHV분획을 확인하였다. 확인된 분획을 합친 후 (약 1 ml) 정제된 Fc (1 mg/ml) 1 ml을 천천히 섞어주고 0.1 ml의 1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6)를 첨가하여 천천히 교반하면서 4°C에서 약 12시간 반응시켰다. 0.1 ml의 Lysine 용액 (0.2M)을 다시 첨가하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 PBS용액 (pH 7.2)에 10회 정도 4°C에서 투석을 실시하였다. 투석이 끝난 재료는 protein G column을 통해 정제하여 최종 용출된 재료를 -70°C에 보관 하였다. 정제의 순도를 확인하기 위해서 SDS-PAGE 분석을 실시하였다.

## 2. 백신 효능시험

### 가. 수지상세포 표적화 기술개발

#### 1) 말 (equine) peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) 분리

혈액채취 및 PBMCs 분리: 건강한 1년생의 암컷 Thoroughbred (제주도 마사회 육성마 목장)에서 혈액을 채취하여 항응고제인 Acid Citrate Dextrose (ACD) solution에 4:1 (blood:ACD)의 비율로 혼합한 뒤 실험실내로 이동하여 사용하였다. 혈액 내의 백혈구만을 분리해내기 위해서 Ficoll histopaque-1077 (Sigma)을 이용하였다. 분리된 백혈구를 phosphate buffered saline (PBS)로 세척 후, 남아있는 소량의 적혈구를 제거하기 위해서 ammonium chloride potassium (ACK) lysis buffer를 첨가하고 실온에서 10분간 정치하였다. 다시 PBS로 세척한 백혈구에 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 units penicillin/streptomycin (GibcoBRL)이 첨가된 RPMI-1640 medium (Sigma)을 넣고 culture dish로 옮긴 후 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C incubator에서 배양하였다. 그 후 상층액은 걷어내고 바닥에 부착된 세포를 떼어내기 위해 versene solution (GibcoBRL)을 첨가하여 위와 동일한 조건의 incubator에서 15분간 배양했다. Cell Scraper (Sarstedt)로 세포를 모아 PBMCs로 사용하였다.

T cells 분리 및 동결보관: 배양 후 상층액은 걷어내어 다음 실험에서 T cells의 source로 사용하였다. 이를 위해 90%의 FBS와 10%의 DMSO를 혼합하여 만든 동결용액에 세포를 넣은 후 4°C, -20°C, -70°C에 차례로 냉동시켰다. 이후 냉동 vial은 장기보관을 위해 액체질소통에 보관하여 allogeneic stimulation을 위해 사용되었다.

### 나. 말 수지상세포 배양 및 기능 확인

#### 1) 말 수지상세포 배양

Cytokine 선택, GM-CSF 이용 배양: 말 혈액으로부터 수거된 PBMCs를 이용하여 6-well culture plate에 세포수가  $2 \times 10^5$  cells/well이 되도록 넣고 동일한 조성의 RPMI-1640 medium 과 10 ng/ml human GM-CSF (Biosource International), 10 ng/ml equine IL-4 (Roche Co.)를 사용하여 4일 동안 배양하였다. 이때 면역싸이토카인의 선택은 세계적으로 사용가능한 equine GM-CSF가 없는 관계로 단백질 구조가 유사해 cross activity가 있는 human GM-CSF를 선택하여 사용하였다. 예비실험으로 말 T cells에 대해 ConA 처리를 실시한 후 비특이적으로 활성화된 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T cells에 의해 생산되는 GM-CSF, IL-4를 얻어 본 실험에 이용하고자 시도하였다. 그러나 T cells의 상층액에 잔존하는 ConA에 의해 PBMCs에서도 비특이반응이 일어나 오히려 수지상세포의 배양에 방해가 되는 사실을 확인할 수 있었다.

#### 2) 수지상세포 형태 및 기능 확인

수지상세포의 형태관찰 및 생존율 측정: 사람의 혈액 PBMCs를 이용한 수지상세포 배양에서 7일간 배양한 세포를 사용하므로 말의 혈액 PBMCs를 이용한 본 연구에서는 7일째와 배지를 새로 교체해 주는 4일째에 주로 세포의 형태 및 생존율은 확인하였다. 초기 실험에서는 배양 후 매일 세포를 관찰하였으며 배양 4일, 7일째에 세포를 광학현미경상 사진촬영 (QWinLeica, Leica)으로 수지상세포의 특이적 형태를 관찰한 다음 수거하여 Trypan blue로 염색하고 hemocytometer를 이용하여 세포수와 생존율을 측정하였다.

### 3) 혼합배양법 (mixed lymphocyte reaction) 및 $^3\text{H}$ -thymidine incorporation assay

수지상세포의 allostimulatory capacity를 알아보기 위해, 다른 개체의 혈액에서 분리된 T lymphocyte를 가지고 MLR을 실시하였다. 혈액 내 T lymphocyte는 수지상 세포 분리 방법에서와 같이, Ficoll solution을 이용해 백혈구를 분리해내고 RPMI-1640 medium으로 동일한 조건의 incubator에서 90분간 배양한 후 상층액에서 얻어냈다. 96-well microplate에 T lymphocyte ( $2 \times 10^5$  cells/well)와 수지상세포 ( $1 \times 10^4$  cells/well)를 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 units penicillin/streptomycin, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acid (NEAA), 50  $\mu\text{M}$  2-mercaptoethanol (2-ME, all from GibcoBRL)이 첨가된 RPMI-1640 medium (Sigma)으로 5%  $\text{CO}_2$ 가 공급되는 37°C incubator에서 3일간 배양하였다. 배양 2일째  $^3\text{H}$ -thymidine (1  $\mu\text{Ci}$ /well)을 첨가하고 3일째  $^3\text{H}$ -thymidine의 DNA로의 편입을 automated liquid scintillation counter (MicroBeta Trilux, Wallac)로 평가하였다.

### 4) FITC-dextran 이용 antigen uptake

수지상세포의 항원 탐식 능력을 알아보기 위해서 FITC (fluorescein isothiocyanate, Sigma)-dextran uptake assay를 실시하였다. 배양 4일째 수지상세포 ( $1 \times 10^4$  cells/well)에 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  FITC-dextran을 첨가하여 4 °C와 37 °C에서 각각 1시간동안 배양하였다. 그 다음 ice-cold PBS로 세척한 후 0.1% sodium azide, 5% FBS, 1% paraformaldehyde 이 첨가된 FACS fixation solution에 고정한 후 FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson)와 CellQuest software를 이용해 측정하였다.

## 다. 표적화단백질 선별

### 1) Horse IgG-FITC conjugate, Mannosylated albumin-FITC 적용 실험

말 수지상세포를 이용한 항원 탐식능력 실험에 앞서 적정 실험 조건을 세우기 위해 마우스 수지상세포를 이용하였다. 7주령 이상의 Balb/c 또는 C57BL/6 mouse로부터 골수 세포를 분리한 후  $2 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 mouse GM-CSF (10 ng/ml)를 첨가하여 6-10일 동안 배양한 후 실험에 사용하였다.  $5 \times 10^5$  개의 수지상세포가 포함된 RPMI-1640 배지 (penicillin/ streptomycin, 5% FBS 함유)에 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\alpha$



-D-mannosylated-FITC-albumin과 1,000배, 10,000배, 100,000배 희석한 equine IgG-FITC (임윤규, 황규계 교수팀에서 분리)를 첨가하여 4°C와 37°C에서 60분 동안 반응하였다. 반응 후 0.1% sodium azide가 첨가된 PBS로 2회 세척하여 1% paraformaldehyde가 첨가된 FSS (5% FBS, 0.1% sodium azide가 첨가된 HBSS solution)에 고정한 후 유세포분석을 실시하였다.

라. 수지상세포를 이용한 *in vitro* 시험법(체액성, 세포성면역) 확립

#### 1) 바이러스 배양

본 실험에서는 EHV 배양을 위해 MDBK 세포주를 이용하였다. 먼저 75ml 플라스크에 배양 중인 MDBK를 꺼내 배지를 제거하였다. 세포를 바닥에서 떼기 위해 플라스크에 trypsin을 넣어준 후 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 10분간 배양하였다. 바닥에서 떨어진 세포는 원심분리하여 상층액을 제거하고 세포배양액을 이용해 나머지 trypsin용액을 세척했다. Trypan blue exclusion test를 이용하여 세포수를 센 뒤 6 well plate에 각 well 당  $5 \times 10^4$ /ml의 세포를 5ml 씩 넣어 seeding하였다. CO<sub>2</sub> incubator에서 세포를 안정화시킨 뒤 -70°C에 보관되어 있는 EHV를 녹여 세포에 감염시켰다. EHV는 동결보존 시 세포와 함께 들어있었기 때문에 다 녹은 후 원심분리하여 세포 또는 그 debris를 제거하고 상층액의 바이러스만 사용하였다. 바이러스 접종시간은 여러 번의 시도로 최적시간을 선정하였다. 바이러스가 포함된 상층액을 세포에 1시간에서 1시간 30분 동안 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 반응시켰다. 매 접종 시 바이러스의 역가를 균일하게 해 주기 위해서 바이러스가 포함된 상층액을 여러 개로 aliquot하여 동결보관시킨 뒤 하나씩 사용하였다. 반응 후 바이러스는 걸어서 원래 바이러스가 들어있던 conical tube에 다시 넣어주고, 사용되었다는 표시를 하였다

#### 2) 수지상세포에 EHV 접종

향후 사용될 EHV fusion 단백질(수지상세포의 세포표면에 전달가능한)을 *in vitro* 검정 시스템을 수립하기 위해 C57BL/6 마우스의 골수유래 수지상세포를 이용하였다. 배양 중인 수지상세포를 회수하여 세포수를 (trypan blue exclusion test 이용) 센 뒤  $5 \times 10^5$ /ml이 되도록 seeding하였다. 6-well plate 중 3개 well에 수를 맞춰준 미성숙수지상세포를 2 - 3ml씩 넣고 CO<sub>2</sub> incubator 넣어 두었다. 전날 준비해 놓은 MDBK와 MDBK - EHV를 스크레이퍼를 이용해 걸어서 -70°C에서 3번 freezing and thaw 하였고, MDBK를 불활성화 시킨 후 수지상세포가 들어있는 plate에 수지상세포의 부피와 동일한 부피를 각각 well에 넣어주었다. Control (대조군)에는 10% 배양배지를 같은 양 넣어 주었으며, 아래와 같은 setting을 만든 후 CO<sub>2</sub> incubator에서 하루 동안 배양하였다 (Table 1).

Table 1. EHV의 배양

	1	2	3
A	imDC + 10% CM (control)	imDC + MDBK	imDC + MDBK-EHV1
B			

### 3) T cell +수지상세포 co-culture

바이러스에 접촉된 수지상세포를 감별해 내기위해 동종마우스의 수지상세포와 splenic T cells를 이용한 *in vitro* 시험법을 확립하였다. C57BL/6의 splenic T cell을 준비하여 10% FBS가 포함된 배양배지에  $2 \times 10^5/100 \mu\text{l}$ , well이 되도록 세포수를 맞춰준 후 96 well plate에 setting 하였다. 전날 배양한 수지상세포와 MDBK를 scraper로 걷어내어 세포수를  $1 \times 10^4/100 \mu\text{l}$ , well이 되도록 세포수를 맞춰 주었다. 배양배지로 2번 washing 하면서 배지를 바꿔주었고 세포수를 맞춰준 후 1.7 ml tube에 3배씩 계단희석을 하였다. 이 때, 각 tube에 배지 800 $\mu\text{l}$ 를 넣고 고농도의 tube에서 400 $\mu\text{l}$ 씩 차례대로 옮기고 vortex를 잘 해준다. 세포를 100 $\mu\text{l}$ 씩 96well에 seeding 하고 CO<sub>2</sub> incubator에서 3일간 배양하였다.

#### 마. 고효율 equine dendritic cells (DCs) 배양기술 확립

1차년도에서 개발되었던 말초혈액 mononuclear cells을 이용한 수지상세포 배양기술을 더욱 발전시켜 그 생산성을 높임으로서 적은 양의 말혈액만을 가지고도 고순도의 말수지상세포를 만들고자 하였다.

#### 1) 혈액채취, PBMCs 분리, 수지상세포 배양

제주도 마사회 육성마 목장의 도움을 받아 Thoroughbred로부터 채취된 혈액을 이용하였다. 혈액은 채취된 뒤 항응고제인 Acid Citrate Dextrose (ACD) solution에 혼합하여 혈액응고를 방지하였고 Ficoll histopaque-1077 (Sigma)을 이용하여 원심분리를 통해 PBMCs를 분리하였다. Buffy coats에 PBMCs와 함께 남아있는 적혈구를 제거하기 위해 ammonium-chloride potassium (ACK) lysis buffer를 이용하였고 culture dish (직경 100 mm)에 10분간 배양한 뒤 바닥에 붙지 않은 세포는 회수하였다. 다른 dish에 부착되지 않은 세포를 넣어 다시 부착을 유도하여 최대 수의 PBMCs를 얻으려 하였다. 부착된 세포는 스크레이퍼를 이용하여 회수하였다. 또한 배양배지를 투입한 후 회수하여 세척과

정을 줄임으로서 세포회수율을 높였다. 기타 약간의 modification을 통해 최종적으로 얻은 수지상세포 또는 PBMCs의 세포생존율을 높일 수 있었다. 본 실험을 통해 살아있는 수지상세포의 수를 기존의 방법에 비해 2-3배 이상 높일 수 있었다. 사용된 배지는 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 units penicillin/streptomycin (GibcoBRL)이 첨가된 RPMI-1640 medium (Sigma)이었으며 5% CO<sub>2</sub> 37°C incubator에서 배양하였다.

2) 말 수지상세포 성숙실험

Equine 수지상세포를 배양한 뒤 성숙가능여부를 확인하기위해 일반적인 수지상세포 성숙유도물질인 lipopolysaccharide (LPS)를 투여하여 성숙여부를 확인하였다 (Fig. 2). 수지상세포 표면의 성숙마커인 CD83를 특이하게 감지할 수 있는 anti-CD83 mAb-FITC를 이용하여 FACS염색을 실시하였고 Flow cytometer를 통해 분석하였다.

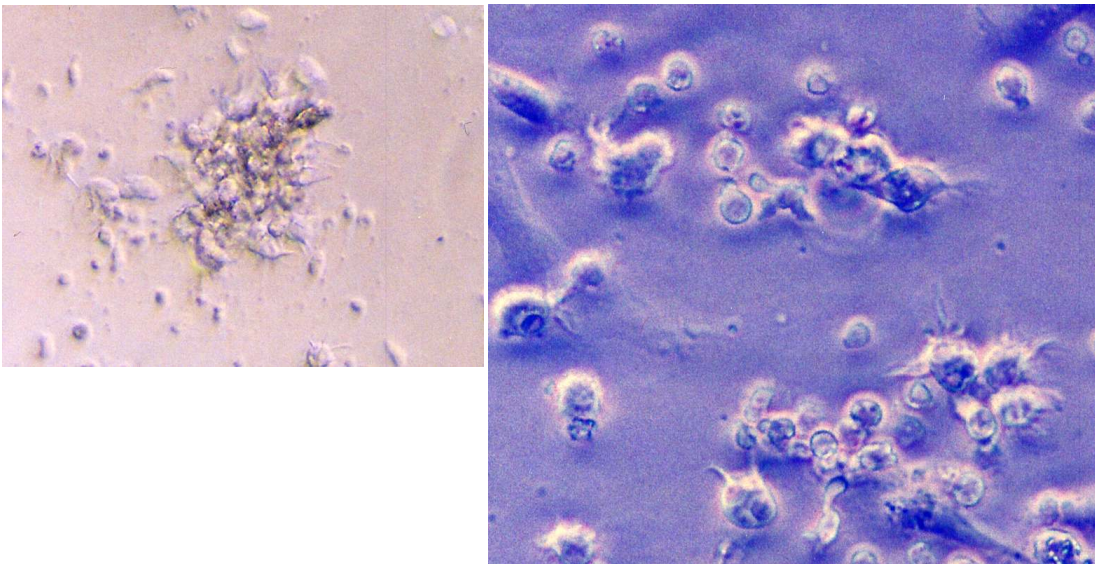


Fig. 2. 수지상세포의 성숙확인

바. Equine IgG-FITC에 대한 항원탐식과정 규명

1) confocal microscope 이용 및 staining 과정

Equine IgG-FITC를 이용 항원탐식과정을 규명하였다. 본 실험은 제주대학교 공동실험

실습관에 있는 confocal microscope를 이용하였다. 미리 제작된 equine IgG-FITC를 100, 1000, 10000배 희석하여 샘플에 처리하여 적당한 농도를 결정하였고 비슷한 방식으로 시간을 포함한 다른 최적조건을 수립하였다.

## 2) 최적조건을 수립

가) 적정 농도를 확인하였다.

나) 적정 반응시간을 확인하였다.

다) staining condition (chamber slide)을 확인하였다.

## 사. 마우스의 사용 및 관리

본 실험에서 사용된 마우스는 Balb/c, C57BL/6 strain이었고 모든 실험에서 7-12주령의 암컷을 사용하였다. 동물실험은 제주대학교 동물실험위원회의 동물사용에 관한 규정에 따라 실시하였다.

## 아. EHV 백신후보물질의 접종 및 혈액채취

본 연구에서 배양하고 불활화시킨 EHV사독백신을 마우스 한 마리당 각 1  $\mu$ g씩 접종했다. 피하에 접종하였으며 위치는 마우스의 등 (dorsal part)에 1 ml짜리 주사기를 이용하여 총량 100  $\mu$ l의 인산완충액에 동일한 함량의 백신후보물질을 희석시켜 접종하였다. 백신후보물질의 종류와 농도 등은 아래와 같다 (Table 2). 백신후보물질은 제조 후  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였고 실험에 필요할 때 녹여 즉시 사용하였다. 대조군은 strain과 주령이 비슷하고 EHV의 항원감작이 전혀 되지 않은 마우스가 사용되었다.

EHV 백신후보물질을 접종한 후 백신효능을 검증하기 위해 체액성면역과 세포성면역의 증가 여부를 확인하였다. 다른 연구팀의 확립된 실험방법을 기준으로 본 실험실의 실험에 맞게 약간 수정을 한 후 효능실험을 실시하였다. 각 백신후보물질은 마우스에 1회 접종하였고 3주 후에 미정맥 (tail vein)에서 혈액을 채취하였다. 혈액은 각 마우스에서 10  $\mu$ l씩을 채취하여 100  $\mu$ l의 인산완충액으로 혼합한 뒤 microcentrifuge를 이용하여 적혈구만을 원침시킨 뒤 혈장을 분리하였다. 실험실에서 최적화시킨 EHV 특이적인 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)에 대조군과 백신후보군의 마우스에서 분리된 혈장을 적용하여 EHV 특이항체를 정량하였다.

Table 2. 백신후보물질의 종류

이름	EHV type	formula	concentration
1A	EHV 1	formalin 처리 + Fc conjugation	0.58 mg/ml
1B	EHV 4	formalin 처리 + Fc conjugation	0.55 mg/ml
2A	EHV 1	Fc conjugation	0.61 mg/ml
2B	EHV 4	Fc conjugation	0.57 mg/ml
3A	EHV 1	formalin 처리	0.47 mg/ml
3B	EHV 4	formalin 처리	0.45 mg/ml

자. EHV특이항체의 정량을 위한 ELISA (체액성면역 측정)

0.625  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 갖는 EHV 항원을 100  $\mu\text{l/well}$ 씩 ELISA용 8-well strips에 overnight (약 16시간)동안 코팅하였다. 다음 날 각 well의 항원용액을 세척액을 이용해 제거하였고 assay buffer (이하 분석완충액)를 이용해 실온에서 1시간동안 blocking하였다. 마우스의 미정맥으로부터 얻은 혈장을 단계적으로 희석하여 각 well에 넣은 뒤 37°C에서 2시간동안 반응시켰다. 이 후 마우스항체를 인식할 수 있는 이차항체, horseradish peroxidase (HRP) labeled goat anti-mouse IgG를 넣어 37°C에서 2시간동안 반응시켰다. 발색약으로는 HRP를 이용하는 ELISA에서 다용되는 TMB solution을 사용하였다. 발색시간은 10분 이내에서 샘플간의 차이가 가장 명확하거나 고농도샘플의 흡광도가 1.5 정도 될 때까지로 최적화시켰다. Microplate reader를 이용해 450과 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

차. EHV특이세포성면역의 측정을 위한 유세포분석 (세포성면역 측정)

1) 마우스 비장세포 채취

EHV백신후보물질이 접종된 마우스를 안락사 시킨 뒤 비장세포를 채취하였다. 간략히 기술하면 마우스 비장을 채취하여 인산완충액이 들어있는 culture dish에 넣고 주사기를 이용해 기계적으로 눌러 비장세포를 얻어내었다. 저장성용액 (hypotonic solution)인 ammonium chloride potassium (ACK) lysis buffer를 이용해 비장세포에 포함되어 있는 적혈구를 용혈시킨 후 5% fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 RPMI-1640 배지에 넣어 1시간 동안 T75 조직배양 플라스크에 배양시켰다. 세포 배양액 중에 떠 있는 비장세포를 cell strainer에 통과시켜 단일세포를 얻어낸 후 실험에 사용하였다.

2) Syngeneic 마우스 수지상세포 배양

C57BL/6 마우스의 대퇴골과 경골을 채취하여 HBSS를 골수 강 내로 흘려서 골수세포를 얻어낸 후 0.83% ACK lysis buffer를 이용하여 실온에서 10분간 반응하여 적혈구를 용혈시켰다. 골수세포를 mouse GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating

factor)가 첨가된 RPMI-1640 (5% FBS) 배지에 부유시켜 6-well plate 넣고 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C incubator에서 배양하였다. 2일마다 GM-CSF가 첨가된 새로운 배지로 교체하였다. 배양 2일과 4일에는 전체 배지를 교체하여 배양액 중에 떠 있는 granulocyte와 lymphocyte를 제거하였고, 배양 6-10일에는 60% 이상의 배지를 새 것으로 교체하였고, 떠 있는 수지상세포를 실험에 사용하였다.

### 3) 수지상세포와 비장세포의 coculture를 통한 활성화된 림프구 생산

수지상세포에 EHV-1을 처리하여 4시간 동안 반응시킨 후 비장세포와 함께 배양하였다. 비장세포는  $2 \times 10^5$ /well, 수지상세포는  $1 \times 10^4$ /well로 96-well plate에 각각 100  $\mu$ l/well로 넣고 5일간 함께 배양한 후 면역형광염색을 실시하였다.

### 4) 세포표면 분자와 세포내 싸이토카인의 면역형광염색 (BD Cytotfix/Cytoperm™ kit)

싸이토카인 분비세포를 자극하여 싸이토카인 생산을 유도하기 위해 10 ng/ml PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), 1 ng/ml ionomycin을 함께 첨가하여 5시간 동안 배양하고 마지막 2시간에 세포내 단백질 합성 억제제인 monensin이 포함되어 있는 BD GolgiStop™ solution을 첨가하였다. 세포를 회수한 후, 비 특이반응을 억제하기 위해 anti-mouse CD16/32 항체를 4°C에서 15분간 반응하여 Fc receptor를 blocking하였다. 5% FBS, 0.1% sodium azide가 포함된 PBS 용액을 세포표면염색을 위한 staining buffer와 washing buffer로 사용하였고, 각 항체반응 후에 세포를 2회 washing하였다. FITC-conjugated anti-mouse CD4 항체를 4°C에서 30분간 반응시켜 세포표면 염색을 하였다. 세포 내 싸이토카인 염색을 위해 Fixation/Permeabilization solution을 첨가하여 4°C에서 20분 동안 세포 고정과 투과성 증가과정을 거쳤다. 세포의 투과성을 유지시켜 주기 위해 kit 내에 포함되어 있는 BD Perm/Wash™ buffer를 사용하여 2회 washing하였다. PE-conjugated anti-mouse interferon (IFN)-gamma 항체를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응하여 세포 내 싸이토카인, IFN-gamma를 염색하였다. 1% paraformaldehyde가 포함된 staining buffer에 세포를 고정시켜 BD CellQuest software와 FACS Calibur를 이용하여 분석하였다.

## 카. 기타 실험

### 1) 마우스 재조합 interleukin (IL)-2를 첨가한 coculture

C57BL/6 마우스에서 얻어낸 비장세포를  $2 \times 10^5$  cells/well, 생독 또는 사독 EHV-1에 반응시킨 수지상세포를  $1 \times 10^4$  cells/well로 96 well plate에 넣고 0.5 ng/ml의 마우스 재조합 IL-2를 첨가한 상태로 5일간 함께 배양하였다. 본 coculture setting을 이용하여 EHV-1이 처리된 수지상세포의 비장세포 증식능과 target cell에 대한 살해능을 확인하였다.

## 2) Cell counting kit (CCK)-8 assay

Coculture를 이용하여 5일간 배양한 세포에 10  $\mu$ l/well로 CCK-8 용액을 넣고 4시간 후에 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 수지상세포는 증식능이 거의 없는 세포이며 비장세포는 증식이 왕성하여 coculture에서 얻은 O.D.값은 대부분 비장세포의 증식으로 얻은 것으로 추론된다.

## 3) Lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity assay

Coculture를 이용하여 5일간 배양한 림프구를 회수하여 target cell과 반응시킨 후 target cell에 대한 림프구의 살해 능력을 확인하였다. Promega사에서 non-radioactive cytotoxicity kit을 구입하여 실험하였다. 먼저  $1 \times 10^5$ 의 MDBK cell을 T25 culture flask에 넣고 live EHV-1을 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 target cell로 사용하였다. 5일 동안 배양한 림프구를 회수하여 effector cell로 사용하였다. Effector cell과 target cell ( $1 \times 10^4$  /well)을 27:1, 9:1, 3:1, 1:1의 비율이 되도록 U-bottom 96-well plate에 넣고 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 동안 함께 배양하였다. 배양 마지막 45분에 maximum release를 위한 well에 20  $\mu$ l lysis solution을 첨가하였다. 세포를 원심분리한 후 세포배양액 50  $\mu$ l를 회수하여 flat-bottom 96-well plate에 넣고 50  $\mu$ l substrate를 첨가하여 혼합한 후 실온에서 빛을 차단한 상태로 30분간 반응하였다. 50  $\mu$ l stop solution을 첨가하여 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Target cell의 자연 용해 정도인 spontaneous release (SR), target cell의 100% 용해 정도인 maximum release (MR)를 측정한 후, 다음 공식으로 cytotoxicity를 계산하여 결과로 나타내었다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = (S_{\text{sample}} - \text{SR}) / (\text{MR} - \text{SR})$$

### 3. EHV에 대한 진단법

#### 가. 마우스면역

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

#### 나. Hybridoma 작성

최종면역 24시간 후 BALB/c mouse의 심장으로부터 전체혈하고 혈청을 분리 하였으며, 세포 융합을 위하여 무균적으로 비장을 적출하였다.

적출된 비장은 70% ethylalcohol (EtOH)에 침적하는 즉시 washing media가 담긴 dish에 2회 더 침적하여 세척한 후, 50 ml conical tube에 고정시킨 mesh위에 놓고 washing media 10 ml을 점적하며 forcep으로 spleen을 파쇄시켜 spleen cell들이 conical tube내로 부유되도록 하였다. 이후 washing media 15 ml를 첨가하고 원심분리 (300 g, 5 min)하여 세척한 cell들을 25 ml씩의 washing media로 2회 더 세척하였다 (300 g, 5 min). 이후의 원심분리 세척은 동일한 조건으로 실시하였다. Spleen cell을 2회째 세척할 때 왕성한 분열을 보이며 충분히 배양된 myeloma cell도 50 ml conical tube에 원심분리하여 세척하였다. 세척된 spleen cell 과 myeloma cell의 비율은 packed cell volume이 약 1 : 1 이 되도록 혼합한 후, 추가로 2회 더 세척하였다. 세척 후의 washing media를 완전히 제거하고 부드럽게 tapping하여 cell을 tube 바닥에 최대한 고르게 퍼주었다.

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

세포융합이 완료된 tube는 37°C의 CO<sub>2</sub> incubator에 약 5분간 정치하여 안정화시킨 후 원심분리로 세척하고 HAT medium 50 ml을 가하여 cell pellet을 조심스럽게 부유시켰다. 세포부유액은 96-well tissue culture plate에 100  $\mu$ l씩 분주한 후 37°C의 5% CO<sub>2</sub> incubator에 배양하였다. 세포융합에 사용된 모든 용액은 미리 37°C로 맞추어 사용하였다. 약 1주일 후 HT media로 교환 후 colony의 형성하는 hybridoma의 상층액을 ELISA로 screening하였다.



#### 다. Hybridoma의 screening

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

#### 라. 단클론항체의 정제

특이항체를 분비하는 hybridoma clone은 BALB/c 마우스에  $2 \times 10^6$  cell 씩 접종하여 고농도의 단클론항체를 함유하는 복수를 생산하였다. 복수 생산용 마우스 (12주령, female)는 세포접종 1주일 전에 미리 pristane (2, 3, 10, 14-tetra-methyl-pentadecane, Sigma, USA) 0.5 ml 씩 복강 내로 접종하여 감각시켜 놓았다. 이 후 약 10일간 복수형성 상태를 살피며 복수를 채취하였다. 채취된 복수는 원심분리 후 냉동보관 하였다.

단클론 항체의 정제는, Protein G - sephrose 4B gel을 이용하여 복수중의 IgG를 정제하였다. 컬럼 (100 x 15 mm)에 충전시켰다. 복강에 접종하여 얻은 복수는 PBS로 5배 희석한 후 컬럼에 흘러 보냈으며 (0.3 ml/min), 이 후 세척은 PBS로, 항체 용출은 3M NaSCN을 사용하였다. 회수된 IgG 분획은 10 mM Phosphate buffer, pH 7.2 로 투석하고, 단백질량을 측정하고, 제균 여과한 (0.22  $\mu$ m pore size) 후, ELISA를 위한 흡착 plate 및 HRP 접합체의 제조에 사용하였다.

#### 마. ELISA kit

##### 1) HRP-MAb conjugates 생산

Wilson과 Nakane(1978년)의 방법에 따랐다. 우선 horse radish peroxidase(HRP, RZ=3.0) 5mg을 1.2ml 증류수에 녹인후 0.1M NaIO<sub>4</sub> 300 $\mu$ l를 첨가하고 실온에서 20분간 약하게 흔들어 주었다. 이후 MAb가 10mg/ml을 첨가하고 2시간 동안 실온에서 약하게 흔들어 준 후 NaBH<sub>4</sub> (4mg/ml)을 100 $\mu$ l를 넣어 주었다. 냉장에서 2시간 반응시킨 후

PBS를 이용하여 투석한 후 냉장에 보관하며 사용하였다. 접합체의 안정을 위하여 BSA를 10% 되게 가하고 0.02 %되게 thimerosal을 가하여 주었다.

#### 2) MAb coated plate 준비

정제된 단클론항체들을 항원으로 coating buffer에 희석하고, 이를 96well ELISA plate (Nunc, polysorb, USA)에 100 $\mu$ l씩 분주하며 37 $^{\circ}$ C의 항온기에 2시간 정치한 후 4 $^{\circ}$ C의 냉장조건으로 16시간 흡착시켰다.

#### 3) Antibody pair 결정

준비된 plate를 PBS로 3회 세척하고 양성배양액과 음성배양액을 PBS에 희석하여 well 당 100 $\mu$ l씩 분주하여 실온에서 30분간 다시 정치한 후 PBS로 3회 세척하였다. 이 후 HRP-항체 접합체를 Conjugate buffer에 희석하고 각 well에 100 $\mu$ l씩 분주하고 실온에서 30분간 방치 한 후에 PBS로 3회 세척하였다. Substrate buffer를 100 $\mu$ l씩 분주하고 30분 후에 이를 405nm와 refance 492nm에서 Reading하여 흡광도를 측정하였다.

#### 4) Sandwich ELISA를 위한 capture항체와 tracer항체의 조건 조사

결정된 Antibody pair의 각각의 항체를 capture항체 및 conjugate로 사용하여 배양된 항원을 통하여 ELISA system을 개발하였다. 흡착은 capture 항체를 약 10 $\mu$ g/ml이 되게 희석하여 실시하였고, blocking 용액으로는 0.2% bovine serum albumin (BSA)이 첨가된 PBS를 사용하였으며 이 후의 세척은 PBS로 3회 실시하였다. 항원으로는 spore 배양액을 0.2% BSA가 첨가된 PBS-T에 계단희석하여 40분간 실온에서 반응시켰다. Tracer로는 HRP와 결합시킨 단클론항체 접합체액을 항원희석액과 동일한 용액으로 희석하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 이 후의 반응은 항체가 측정을 위한 ELISA와 동일조건으로 실시하였다.

#### 바. ICG kit

Immunochromatography를 위한 과정은 선행연구 (Kim 등, 2007)에 준하여 실시하였다. Rapid kit 개발을 위한 연구내용의 간략한 사항은 아래와 같다.

#### 1) Colloidal gold 제작

20nm Gold Colloidal의 제조를 위하여, 철저히 세척 건조된 초자 비이커에 3차 증류수 95ml를 가하고 hot plate에서 100 $^{\circ}$ C로 가열하며 교반하였다. 가열되는 동안 1% tri-sodium citrate 4ml를 준비해두었다. 끓기 시작하면 1% gold chloride (tetrachloroauric (III) acid trihydrate, Sigma G-4022, USA) 1ml 를 넣고 교반해주며, 준비해둔 Sodium Citrate 액 4ml을 단숨에 가하였다. 반응액의 색상변화를 관찰하여 포도주 빛과 같은 암적색을 보이면 100 $^{\circ}$ C로 15분간 추가적으로 끓이며 교반하였다. 추가적인 seeding을 통하

여 입자 size를 확대하여 40nm 규격의 colloidal gold를 제조하기 위하여, 기 제조된 20nm colloidal gold 25ml에 물 153ml을 가하고, 끓는 상태에서 1% tri-sodium citrate 2ml을 추가하였다. 이후, 1% Gold Chloride 2ml를 물 18ml와 섞어 희석한 액을 1ml/min의 속도로 점적하며 점차적인 입자성장을 유도하였다. 이후, 약 20분간 추가적으로 끓여낸 후 실온에 정치하여 gold-ab conjugates 의 접합에 사용하였다.

### 2) Monoclonal Ab-Gold 접합체 제작

Gold 접합체를 만들기 위한 시작 조건은 전형적으로 plain gold의 OD514 값이 1.0이 되게 하고 단백질농도는 0.1mg/ml이 되게 하였다. Plain gold의 산도는 0.1% NaOH로 맞추다가 미세한 조정 시에는 0.01% NaOH를 사용하였다. 접합체 제조를 위하여 pH 7.5로 조정된 plain gold 10ml에 antibody를 점적한 후 30분간 정치하였다. NaOH로 pH를 9까지 올린 후 BSA (10ul of 10%/ml gold)를 가하였다. 10분간 정치 후 이를 원심분리 (10,000×g, 30min, 4°C)시켜 맑은 상층액을 걷어내고 Gold 접합체 희석액에 재 부유하였다. Gold 전용 희석액으로 적당히(1% T-20, 1% BSA, 2~3% Score in 100mM PB) 희석하여 사용하였다.

### 3) Membrane 선정

Nitrocellulose transfer membrane (Whatman, SP 003,USA)을 3mm 폭으로 절단하여 사용하였다. Antibody pair 선정을 위한 조건 설정은, 정제된 항체(S16)를 1mg/ml을 1.0ul 씩 넣고 dotting하여 실온에서 건조한 후 Immunochromatography를 실시하였다.

#### 4. 재조합 gD

EHV-1, 4 gD의 유전자를 pBT, pBXII vector에 cloning하고 염기서열을 확인 한 후 발현 벡터인 pQE30, pQEGFP II vector에서 발현시켰으며 과정은 아래의 그림에서 나타내었다 (Fig. 3).

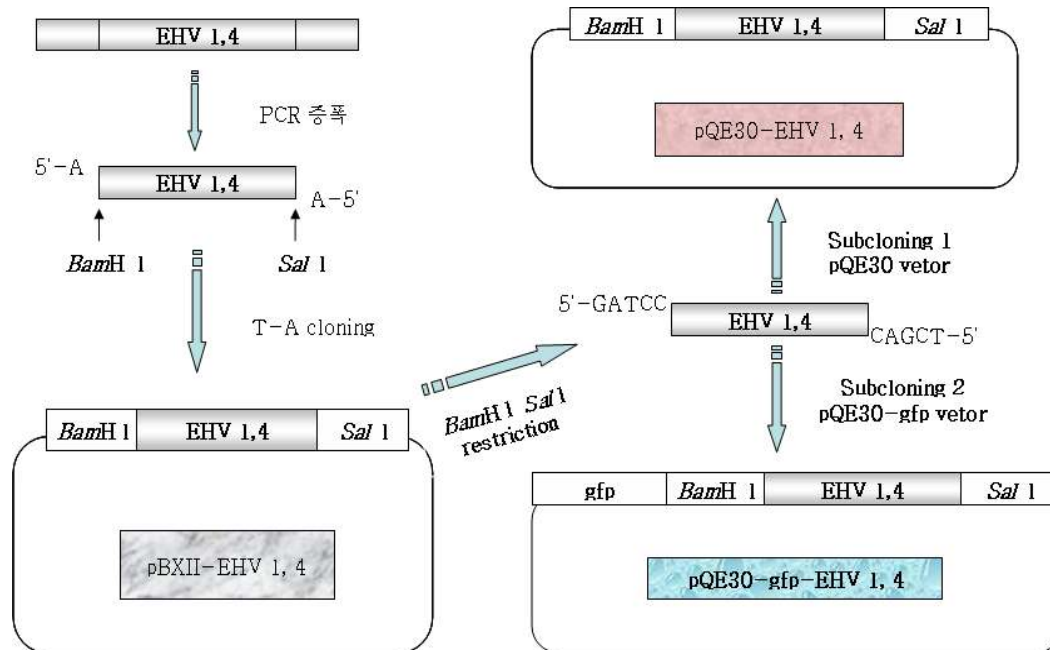


Fig. 3 Diagram of total process of recombinant EHV-1, 4 gD production.

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

#### 가. Viral gpD gene 분리

##### 1) DNA 추출

바이러스 배양 상층액으로부터 QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Germany)을 이용하여 시료 중의 DNA를 분리하였다. 즉, Micro-tube에 proteinase K 20  $\mu$ l를 가하고, 바이러스 상층액을 200  $\mu$ l를 넣었다. 이어서 lysis buffer 200  $\mu$ l를 가하여 15초 동안 강하게 교반하여 잘 혼합시킨 후 56°C의 수조에 10분간 정치시켜 lysis 반응이 일어나도록 하였다. 이후 95% ethanol 200  $\mu$ l를 가하고 15초 동안 vortex mixer로 교반한 액 620  $\mu$ l를 QIAamp Spin Column에 분주하고 micro-centrifuge를 이용하여 1분간 원심분리를

8,000 rpm에서 하였다. 원심분리 후 collection tube를 교체하고 column에 washing buffer 1을 500  $\mu$ l를 가하여 동일조건으로 1분간 원심 분리하여 membrane에 남아있는 cell debris나 단백질을 제거하였다. 추가적으로 washing buffer 2를 500  $\mu$ l 분주하고 재차 14,000 rpm에서 3분간 원심분리를 실시하였으며, 최종적으로 template DNA를 용출시키기 위하여, collection tube를 교체하고 elution buffer 200  $\mu$ l를 분주하여 1분간 정치시킨 후 1분간 원심분리를 8,000 rpm으로 하여 얻어진 DNA를 PCR 분석에 사용하였다.

## 2) Primer

EHV-1, 4의 glycoprotein D 염기서열의 forward와 reverse primer에는 각각 *Bam* HI과 *Sal* I의 restriction sites가 붙도록 primer를 설계하였다. 예상되는 gD의 PCR 산물들의 길이는 EHV-1은 1380 bp, EHV-4는 1210 bp가 되도록 하였다 (Table 3).

Table 3. PCR primers for the amplification of gD genes

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

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

## 3) PCR조건

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

EHV-4의 PCR은 subcloning을 위하여 5' 말단에 *Bam*H I과 *Sal*I site가 추가한 primer를 사용하였다. EHV-4의 sample DNA 1  $\mu$ l와 각 10 pmol의 primer 쌍, 10 mM dNTP (각 2.5 mM), 10x PCR buffer (with 15 mM MgSO<sub>4</sub>), initial denaturing은 92°C에서 5분간 실시하였으며, denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 53°C~67°C에서

25초, extension은 69°C에서 1분씩 반응시키며 30 cycles을 실시하였다. Final extension을 위하여 72°C에서 5분을 추가하여 EHV-4 유전자를 증폭하였다.

#### 4) 전기영동

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

#### 나. gD gene cloning

##### 1) *E. coli* 와 플라스미드 vector

본 연구에 사용된 *E. coli* strain DH 5 $\alpha$  및 JM109는 재조합 플라스미드를 형질전환시키는 숙주로 사용하였고, M15는 발현 숙주로 사용하였다. Cloning vector는 pBlue script II KS(+) 유래의 pBXII vector (윤병수, 2006)를 사용하였으며, 발현 vector는 pQE30 vector (QIAGEN)를 사용하였다. 사용된 균주와 플라스미드 vector의 유전자형 및 특성은 Table 4와 Fig. 4, 5에 각각 표시하였다.

Table 4. Genotype of *E.coli* strain

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

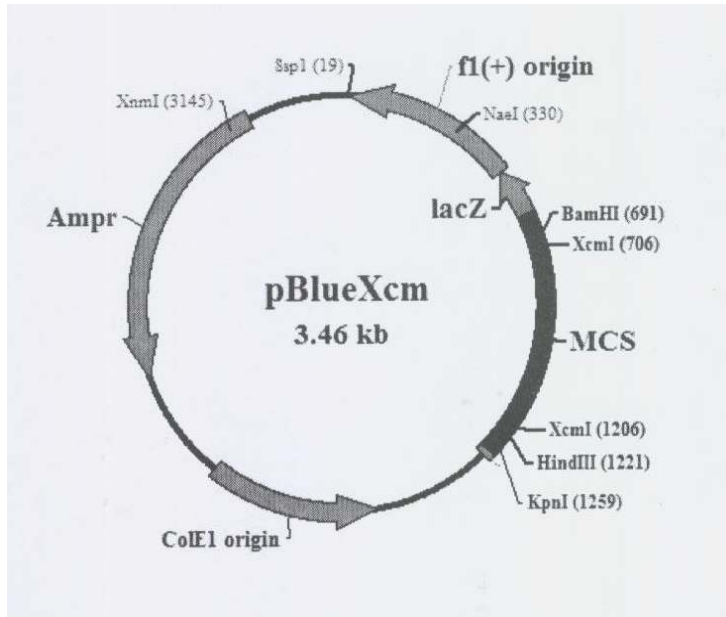
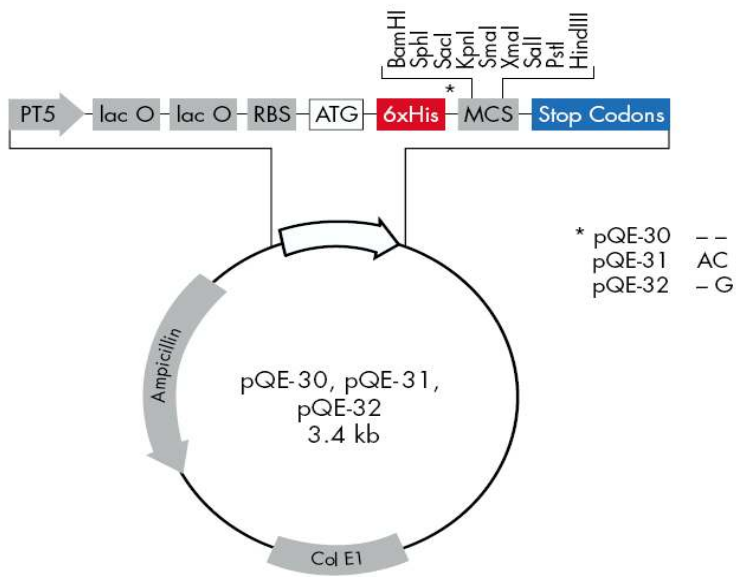
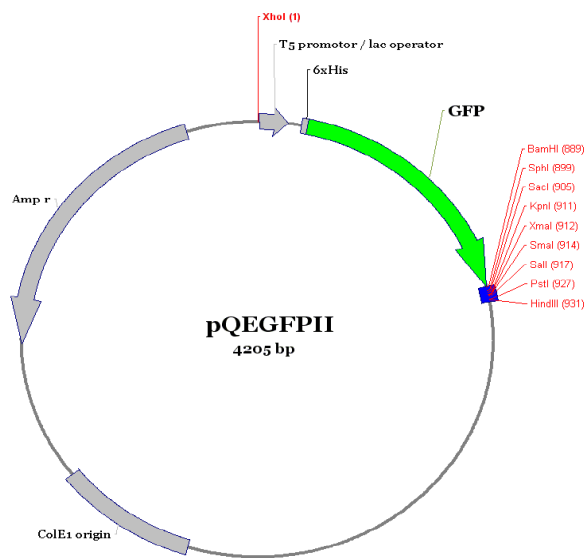


Fig. 4 Genetic map of pBlueXcm vector.

pBXII was originated from pBluescript II KS(+) (Stratagene, USA). Total vector size is 3.46 Kb and the vector has two restriction recognition site of *XcmI* in multiple cloning site. *Amp<sup>r</sup>* and *lacZ* represent ampicillin resistance gene and  $\beta$ -galactosidase  $\alpha$  subunit.



(A)



(B)

Fig. 5. Genetic map of expression vector (QIAGEN, Germany). pQE30 or pQEGFP II is a kinds of prokaryotic expression vector. Ampicillin represents ampicillin resistance gene. This vectors has 6x His-tag sequence. (a) : pQE30 (b) : pQEGFP II.

2) 세균배양 배지 및 조성



*E. coli* 균주의 배양에는 일반적으로 LB (Luria-Bertani) medium (Gibco, USA)을 사용하였으며, ampicillin (Ap)에 내성이 있는 plasmid를 지닌 균주를 배양할 때에는 ampicillin의 최종농도가 50 µg/ml가 되도록 사용하였다. 배지는 autoclave (121°C, 1.5기압, 15~20 min)하여 사용하였다. SOC 배지는 *E. coli* competent cell의 transformation 시 받은 세포벽과 막의 손상을 보호하여, 세포 생존력을 높여 주기 위하여 사용하였다. 이런 특수 배지의 제법은 제조자의 지시를 따랐으며 각 시약은 고압멸균의 가능 여부를 확인한 후 사용하였다. 각 배지의 성분함량은 Table 5에 나타내었다.

항생제 배지는 실험에 필요한 미생물 개체만을 선별하기 위하여 사용하였다. 보관용 항생제는 0.45 µm syringe filter (Nalgene, USA)로 멸균하여 배지에 섞을 때는 Autoclave 한 액체배지 또는 agar배지를 50°C 이하로 식힌 다음 섞어서 사용하였다. 일반적으로 사용한 항생제 최종 유효 농도는 Table 6에 나타내었다.

Table 5. Composition of medium per liter

배지종류	성분	량
LB (Luria-Bertani)	Bacto-trypton	10 g
	Bacto-Yeast Extract	5 g
	NaCl	10 g
SOC medium	Bacto-trypton	20 g
	Bacto-Yeast Extract	5 g
	NaCl	0.5 g
	1M MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O (filtering-sterilization)	10 ml
	1M MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (filtering-sterilization)	10 ml
	1M Glucose (filtering-sterilization)	20 ml

Table 6. Antibiotics solution

Antibiotics	Stock solution		Working solution	
	storage	concentration	range	recommendation
Ampicillin (Ap)	-20°C	50 mg/ml	20-60 mg/ml	50 µg/ml

### 3) EHV-1, 4 gD의 cloning

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

cloning을 하였다.

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

Restriction analysis: Vector (147 ng/µl)는 최종 volume 50 µl를 기준으로 하였으며, pBXII vector 18 µl에 제한 효소인 *XcmI* (5 units) 2 µl와 buffer 5 µl와 증류수 25 µl를 첨가시켜 37°C에서 60분간 반응을 하였다. 절단된 pBXII vector는 DNA-spin Plasmid DNA Purification Kit (iNtRON, Korea)를 이용하여 정제하였다. PCR반응으로 얻은 gD는 PCR Purification Kit (Dyne Bio Inc, Korea)를 이용하여 정제하였다.

Ligation 및 transformation: Vector와 insert DNA의 비는 약 1 : 3으로 조성하여 ligation 반응 (13°C, overnight)을 진행하였다. EHV-1의 ligation반응은 두 가지 조건으로 실시하였다. 즉, EHV-1 insert DNA (100 ng/µl) 12 µl, vector (147 ng/µl) 4 µl와 10x ligase buffer 2 µl, T4 DNA ligase (1 unit) 1 µl첨가시켜 total volume이 20 µl가 되도록 반응시켰고, 한편, EHV-1 insert는 6 µl, vector는 2.5 µl를 넣어 주었고 10x ligase buffer 1 µl, T4 DNA ligase (1 unit) 0.5 µl로 total volume 10 µl가 되게 하여 반응 (13°C, overnight)시켰다. EHV-4의 ligation은 restricted pBXII (25 ng/µl) 4µl, EHV-4 (34 ng/µl) 4µl, ligase 1 µl, ligase buffer 1 µl로 total volume 10 µl가 되게 하여 반응시켰다. 냉동 보관된 host cell DH5a competent cell을 꺼내서 ice에서 30분간 정치시켜 녹인 후 ligation된 mixture 20 µl에 DH5a competent cell 20 µl를 가하여 섞고 20분간 ice에 정치한 후 42°C의 수조에 45초간 정치하여 transformation을 유도하였다. Transformation이 종료되는 즉시 ice에 5분간 정치하여 안정화를 시킨 후 SOC medium 800 µl를 첨가하여 shaking incubation (37°C, 180 rpm, 1시간) 후 ampicillin이 첨가된 LB plate에 50 µl씩 도말한 후 배양 (37°C, overnight)하였다. Plate에서 자란 colony를 선택하여 picking을 한 후 배양 (37°C, overnight)하였다.

Colony PCR , Restriction 및 전기영동: Transformation의 여부를 확인하기 위하여 universal primer인 T3 primer와 T7 primer를 사용하여 PCR을 실시하였다. 즉, plate에

자란 colony를 picking하여 튜브 내부에 도말한 후 T3 primer (10 pmol) 0.75  $\mu$ l, T7 primer (10 pmol) 0.75  $\mu$ l를 가하고, dNTP (2.5 mM each) 1  $\mu$ l, Ex taq (5 U/ $\mu$ l) 0.2  $\mu$ l, DW 5.5  $\mu$ l를 추가하여 total volume 10  $\mu$ l이 되도록 하여 PCR을 실시하였다. PCR은 initial denaturing 94°C에서 3분간, denaturation은 94°C에서 20초, annealing온도는 56°C에서 20초, extension은 72°C에서 1분씩 35 cycles을 실시하였으며, final extension은 72°C에서 10분간 PCR 반응시켰다. PCR 산물로 부터 insert DNA를 확인 한 후, colony를 ampicillin이 첨가된 LB broth에 접종하고 배양한 (37°C, 180 rpm, overnight)후 Accuprep Nano-plus plasmid Mini Extraction kit (Bioneer, Korea)로 plasmid DNA를 회수하여 restriction에 사용하였다. D.W 14.3  $\mu$ l, RE 10X buffer 2  $\mu$ l, Acetylated BSA 0.2  $\mu$ l, DNA 2  $\mu$ l, Restriction enzyme (*EcoRI*) 1  $\mu$ l로 total volume 20  $\mu$ l가 되게 한 후 restriction반응 (37°C, 1시간)을 실시하였다. 반응액은 전기영동에서 PCR products 10  $\mu$ l를 ethidium bromide (EtBr, 0.5  $\mu$ g/ml)가 첨가된 1% Agarose gel에 로딩한 후 1x TAE buffer를 사용하여 전기영동 (100 V, 80분간)을 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 UV-transilluminator로 gD gene에 대한 증폭산물을 확인하였다.

각각의 EHV-1은 TA cloning에서 sequencing확인과 함께 *EcoRI*, *HindIII*를 이용하여 절단하였고, EHV-4는 *BamHI/SaI*으로 절단하는 모식도는 아래에 나타내었다 (Fig. 6, Fig. 7).



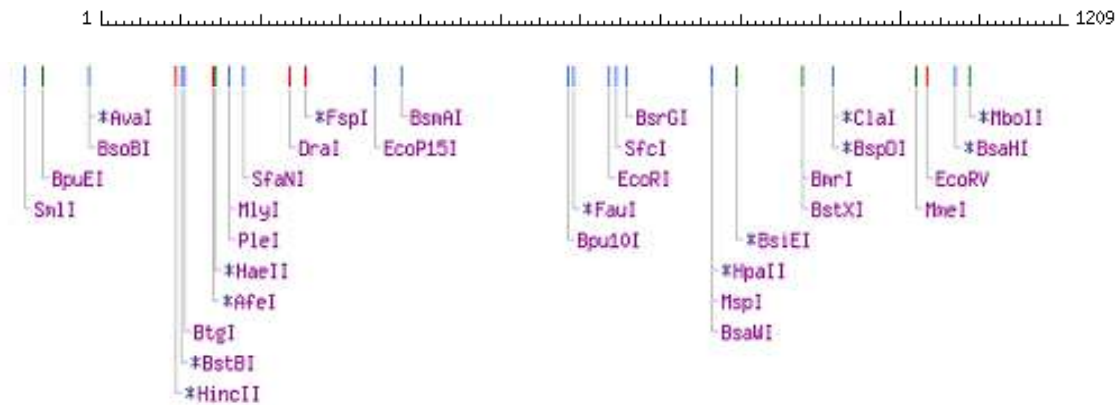
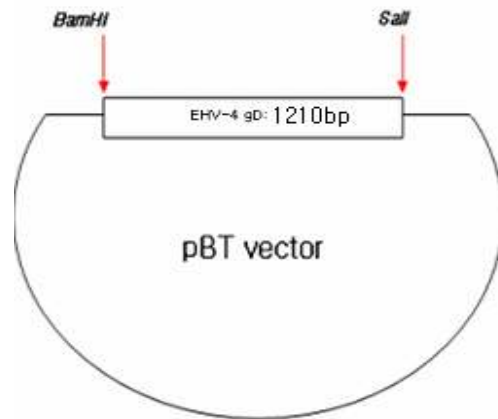


Fig. 7. Restriction analysis of EHV-4 gD subcloned plasmid and enzyme digestion site of plasmid by *Bam*HI/*Sal*I.

### 5) Sequencing

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

#### 다. Expression of EHV-1, 4 recombinant gD

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

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

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

Ligation 및 transformation: EHV-1의 ligation은 세 가지 반응으로 실시하였다. 각각 3개의 vector pQE30, gD4, pQEGFP II는 5 μl Insert DNA (pBT-gD, 37 ng/μl)는 6.5 μl가 되도록 첨가하고 5x ligase buffer 3 μl, T4 DNA ligase (2 units) 0.5 μl를 첨가시켜 total volume이 15 μl가 되도록 하여 ligation (13°C, overnight)을 실시하였다. EHV-4의 ligation반응은 EHV-4 (48 ng/μl) 4 μl, pQE30 (120 ng/μl) 4 μl, pQEGFP II (112 ng/μl) 4μl, ligase (1 U/μl) 1 μl, ligase buffer (10x) 1 μl 로 최종 volume 10 μl로 맞춘 후 반응 (13°C, overnight)하였다.

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

SDS-PAGE: Bio-rad의 MINI-PROTEIN II 기기를 사용하였으며, separating gel은 12%, stacking gel은 4%의 polyacrylamide gel을 사용하였다. Gel을 running tank에 장착한 후, running buffer를 채우고, 시료를 4x sample buffer를 이용하여 전체 volume

20  $\mu$ l에 맞춘 후 100°C에서 3분간 끓인 후, well에 loading하고 bromophenol blue dye가 바닥으로 빠져나올 때까지 전기영동 (80 V~100 V)하였다.

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

#### 라. Purification of EHV-1, 4 recombinant gD

##### 1) 재조합 DNA로부터 얻어진 단백질의 IPTG 농도별 발현 변화 확인

각기 발현 vector에 재조합된 clone들을 LB 배지 20ml에 100 $\mu$ g/ml ampicillin을 첨가하여 37°C, 180rpm에서 18시간 배양 한 후, LB배지 25ml에 100 $\mu$ g/ml ampicillin을 첨가한 배지에 배양한 균액을 1ml을 넣고 37°C, 180rpm에서 3시간 계대배양을 수행하였다. 재조합된 clone 단백질들의 과발현 유도를 위하여 계대 배양액에 100mM Isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG)를 첨가하여 각각 37°C, 180rpm에서 4시간 배양하여 induction을 실시하였다. 최적조건에서 자란 25ml 배양액을 50ml conical tube에 넣고 3000rpm에서 15분간 원심분리를 실시하였고 PBS로 1회 washing을 실시 한 후 10% glycerin이 포함된 PBS에 전체 부피를 750 $\mu$ l로 부유시키고 ice 상에서 초음파 분쇄기 (Sonicator : VCX-500, Sonics & Materials inc.)를 이용하여 amplitude 27%, pulse 0.7초, 0.3초로 1분 30초 동안 처리하고 Sonication을 수행한 cell lysate는 -20°C에서 냉동 보관하였다. 초음파로 파쇄하여 추출한 total protein sample은 Bio-rad의 MINI-PROTEAN III protein electrophoresis system을 사용하여 12% SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 분자량 별로 분리하여 확인하였다.

##### 2) 발현된 재조합 단백질의 His tag정제

일반 단백질의 His tag 정제: IPTG induction으로 과발현을 유도한 gP는 nickel column을 이용하여 정제작업을 수행하였다. pQE30 expression vector에 cloning된 재조합 단백질에는 N terminal에 6개의 연속된 아미노산 histidine으로 이루어진 His-tag이 결합되어 단백질을 발현시킨다. Histidine은 nickel에 친화력을 보임으로서 nickel이 결합된

column을 통해 발현된 재조합 단백질들을 정제할 수 있는 장점을 제공한다. 먼저 냉동고에 보관된 cell lysate를 ice에 30분간 정치하여 녹인 후 4°C, 12,000rpm으로 원심 분리하여 상등액만을 수집한다. 수집한 상등액은 column에 loading 하기 전까지 ice에 정치하였다. Hi-Trap column (Amersham, U.S.A.)의 cap을 제거하고 luer adaptor를 trap의 상단에 연결한다.

Hi-Trap column내의 20% ethanol 성분을 제거하기 위해 column의 하단부를 비틀어서 제거하고 5ml 주사기를 사용하여 5ml 멸균 증류수로 1회 washing 하여 ethanol을 제거하였다. 0.5ml의 metal salt solution (0.1M NiCl<sub>2</sub>)을 통과시킨다. 이때 nickel이 가지고 있는 고유의 색깔에 의해 column 전체가 옅은 푸른색으로 변한다. 5ml의 증류수와 5ml의 starter buffer를 차례로 통과시켜 column을 washing한다. ice에 정치된 sample을 column에 loading 한 후 5ml 이상의 starter buffer로 재차 washing 한다. 이 washing 과정은 비 특이적으로 결합된 숙주세포 기원 단백질들을 제거하는 과정으로 column을 빠져 나오는 용액을 bradford assay reagent가 분주되어 있는 96well ELISA plate에서 혼합하여 더 이상의 단백질들이 검출되지 않을 때까지 수행하였다.

한편, 과도한 washing은 nickel에 결합되어 있는 재조합 단백질들도 떨어뜨릴 수 있기 때문에 과도한 washing은 피하였다. 1~3ml의 elution buffer를 천천히 주입하여 column에 결합된 재조합 단백질들을 elution 하였다. 이때 elution buffer의 flow rate가 너무 빠를 경우 nickel에 결합된 재조합 단백질들을 효과적으로 elution 할 수 없으므로 제조사 측에서 제시한 1ml/min의 flow rate를 유지하였다. Elution buffer는 낮은 pH를 가지고 있으므로 pH에 민감한 단백질인 경우 변성된 상태를 유지하고 있다. 따라서 단백질의 renaturation을 위해서 Column을 통과한 재조합 단백질 용액을 Tris/HCl(pH 9.0)을 100 µl씩 넣어둔 microtube에 1ml씩 분주하였다.

Elution이 끝난 column은 0.1M EDTA 용액을 사용하여 column에 결합된 nickel 이온을 제거하고 멸균 증류수로 세척한 후, 20% ethanol을 500µl 주입하여 재사용할 수 있게 냉장 보관하였다. Elution 된 재조합 단백질용액은 bradford assay reagent (Sigma, U.S.A.)와 ELISA reader를 사용하여 595nm에서 단백질을 정량하였다. 정량값을 바탕으로 단백질 농축 여부를 결정하였다. 정제에 관련된 buffer 및 시약의 조성은 Table 7에 나타내었다.

Table 7. Compositions of reagents related to nickel column purification



Name	Component	Content	Reference column.
Stater Buffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.02 M	* Adjust to pH 7.2
	NaCl	0.5 M	0.45 $\mu$ m filtration Store - Room temperature
Elution Buffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.02 M	* Adjust to pH 7.2
	NaCl	0.5 M	0.45 $\mu$ m filtration Store - Room temperature
Metal Salt Solution	Nickel Chloride	0.1 M	* 0.45 $\mu$ m filtration Store - Room temperature

Inclusion body의 His tag 정제: pQE32-ELP11-Thrombin-p60의 단백질을 700 $\mu$ l에 100mM PMSF를 최종 농도 1mM로 하여 첨가하고 ice에서 10분간 정치한 후 *amplitude* 27%, pulse 0.7초, 0.3초로 1분 30초간 파쇄하였고, 5분간 ice에 정치시킨 후 다시 같은 조건으로 2회 파쇄하였다. 이때 파쇄한 total lysate 단백질을 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분 동안 원심분리한 후 상등액과 pellet을 나누고 상등액을 제거한 pellet은 세척액 (20mM Tris/Cl pH8.0, 0.5% tween 20, 최종 pH8.5로 조정)으로 1회 세척하고 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분 동안 원심분리한 후 pellet을 증류수로 1회 세척하고 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분 동안 원심분리한 후에 700 $\mu$ l의 평형 용액 (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 5mM imidazole)으로 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 보관하였다. 용해한 단백질을 ice에 10분 정치한 후 ice속에서 sonication을 수행하고 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분 동안 원심분리한 후에 상층을 회수하여 1.2 $\mu$ m로 여과한 후 His trap kit (Amersham biosciences Co., U.S.A)을 이용하여 정제하였다. 정제한 단백질은 100% TCA를 이용하여 농축하였고 추출한 total protein sample은 Bio-rad의 MINI-PROTEANIII protein electrophoresis system을 사용하여 12% SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 분자량 별로 분리하여 확인하였다.

## 5. EHV-3의 발생 보고

### 가. 환축

한국마사회 제주경주마목장 씨수말 24두, 민간 씨수말 3두 및 시정마 1두에 대하여 비강, 구강점막, 귀두, 음경, 포피, 후지 및 복부 등을 시진하였다. 또한, 제주지역 생산농가의 씨암말 327두와 내륙에서 제주경주마목장으로 이동한 씨암말 5두의 외부 생식기, 후지, 유방 및 복부 그리고 씨암말과 동거하는 포유망아지에 대하여서도 결막, 비강 및 구강부위를 검사하였다. 검사시료는 면봉을 이용하여 생식기 병변부위 및 비강에서 시료를 채취하였다.

### 나. 세포 및 바이러스 배양

#### 1) 세포배양

바이러스를 증식시키기 위하여 소 신장유래 MDBK cell(KCLB 10022)과 토끼 신장유래 RK-13 cell(ATCC 174)을 사용하였다. MDBK cell의 배양액은  $\alpha$ -Modified Eagle's medium( $\alpha$ -MEM)에 fetal bovine serum(FBS)를 10%되게 가하고, penicillin(200IU/ml), streptomycin sulfate(200 $\mu$ g/ml), kanamycin(200 $\mu$ g/ml)을 첨가하여 사용하였고, RK-13 cell의 배양은 10% FBS, penicillin(100IU/ml), streptomycin sulfate(100 $\mu$ g/ml), amphoterin B(2.5 $\mu$ g/ml), 0.1mM sodium pyruvate, 0.1mM nonessential amino acids, 1.5g/L sodium bicarbonate가 첨가된  $\alpha$ -MEM을 사용하였다. 모든 세포는 플라스틱 배양병(Corning, Mexico)을 이용하였고, 5% CO<sub>2</sub> 분압, 37°C 환경 하에서 배양하였다.

#### 2) 바이러스 배양 및 분리정제

MDBK cell과 RK-13 cell를 배양하여 계대 24시간 후에 약 70~80% sheet를 확인하고 바이러스를 접종하여 세포가 변성, 탈락되는 것을 확인 하였다. 바이러스의 회수는 배양병을 동결과 해동을 3회 반복하고, 8000 $\times$ g, 30분 동안 원심분리 하여 상층액을 회수한 후 20,000rpm에서 2시간동안 고속원심분리를 실시하였다. 고속원심분리를 통해 얻은 침전물은 phosphate buffered saline(PBS)에 하룻밤동안 다시 부유시키고 sucrose gradient ultra centrifuge(SGUC, 14,8000 $\times$ g)를 2시간동안 실시하여 바이러스를 정제 하였다. 회수된 분획은 당도계를 이용하여 당도를 확인하고 PCR을 통해 type을 확인한 후 각 실험에 사용하였다.

### 다. DNA 염기서열분석

DNA 염기서열은 생명과학기업인 (주) 마크로젠(서울, 한국)에 분석을 의뢰하였고 분석 기기는 ABI 3730XK(Big Dye Chemistry, USA)를 이용하였으며, 표준주는 미국립보건원 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)에 등록되어있는 EHV-3 334/74 strain과 비교하였다.

#### 라. 전자현미경 관찰

바이러스를 정제한 후 투과전자현미경(Transmissible electron microscope)으로 관찰하였다.

#### 마. EHV3 항체검사를 위한 ELISA

##### 1) ELISA용 Virus 항원 준비

Rabbit kidney cell line인 RK-13 세포가 배양된 배양병에서 배지를 제거한 후 적당량의 바이러스를 접종하고 2시간 동안 37°C에서 흡착시켰다. 그 후 배지를 첨가하여 배양한 다음 CPE가 80~90 %정도 나타나면 감염세포를 -70 °C에 얼려서 냉동과 해동을 반복하고 8,000×g에서 30분간 원심분리하여 pellet은 제거하였다. 그리고 상층액만을 회수하여 다시 48,300×g에서 2시간 동안 원심분리를 하여 얻어진 바이러스를 ELISA 항원으로 사용하였다.

##### 2) ELISA Plate

ELISA Plate (8 well strip flat-bottom microplates, Costar 2580, U.S.A.)의 각 well에 흡착용 완충액 (50mM Carbonate pH 9.6, containing 0.02% sodium azide)으로 희석한 바이러스 항원을 100µl씩 분주하고 냉장온도에서 약 16시간동안 정치하여 흡착시켰다. PBS로 세척한 각 well당 0.5% BSA가 함유된 PBS 200µl씩 가하고 실온에서 30분간 정치하였다. 이후 PBS로 세척하고 및 건조시켜 ELISA에 사용하였다.

##### 3) ELISA

검사 혈청을 PBS-T로 희석하여 100µl씩 각 well에 가하고 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 4회 세척 후 Horseradish peroxidase (HRP)가 표지된 goat anti-horse Ig G를 임 (1991)의 방법대로 제조 및 사용하여 100µl씩 가하고 1시간동안 실온에서 반응 시켰다. 이후 4회 세척하고 발색제 ABTS를 100µl씩 가하였다. 30분간의 발색반응이 지나면 100 µl의 0.005% sodium azide 수용액을 넣어 반응을 정지시키고 즉시 reader를 이용하여 파장 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이때 492 nm에서의 흡광치를 대조 파장으로 대입하였다. Cut-off value는 음성대조군인 2세 이상의 암수 각각 10두씩 선별하였다. 선별기준은 첫째, 번식경험이 없고 번식마가 아닌 말. 둘째, 생식기에 임상증상 및 백점 (white spot)이 없는 말. 셋째, 모체이행항체가 모두 소멸 된 시점의 마필을 대상으로 고려하였다. 이들의 항체가를 중복(duplicate) 측정하여 평균값을 구하고 평균값에 표준편차의 3배를 다한 값을 cut-off value로 결정하였다.

## 제2절 결과

### 1. EHV-Fc Fusion 백신

#### 가. 바이러스의 역가

##### 1) 배양된 EHV-1의 titration

96-well cell culture flask에 MDBK cell을 계대배양 하고 다음날 역가검정을 위한 EHV-1 접종을 실시하였다. 바이러스 재료를 DMEM배지를 이용하여 10진 희석하고 희석액을 각각 8개의 well에 6  $\mu$ l씩 접종하였다. EHV-1 접종 후 5일까지 세포를 관찰하여 CPE발생 여부를 관찰하고 역가를 다음 Table 8과 같이 산출하였다.

Table 8. CPE 발생 상황에 따른 바이러스의 역가 산출

	1	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>	10 <sup>11</sup>
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

\* 8개의 well 중 CPE가 발생한 well이 반수 (4개 well)인 바이러스 희석배수를 정하고 바이러스 접종량을 고려하여 역가를 산출하였다:  $1 \times 10^9 \times (1000 \mu\text{l}/6 \mu\text{l}) = 1.67 \times 10^{11} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$

##### 2) 배양된 EHV-4의 titration

96-well cell culture flask에 MDBK cell을 계대배양 하고 다음날 역가검정을 위한 EHV-4 접종을 실시하였다. 바이러스 재료를 DMEM배지를 이용하여 10진 희석하고 희석액을 각각 8개의 well에 6  $\mu$ l씩 접종하였다. EHV-4 접종 후 5일까지 세포를 관찰하여 CPE발생 여부를 관찰하고 역가를 다음 Table 9와 같이 산출하였다.

Table 9. CPE 발생 상황에 따른 바이러스의 역가 산출

	1	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>	10 <sup>11</sup>
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
F	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
H	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

\* 8개의 well 중 CPE가 발생한 well이 반수 (4개 well)인 바이러스 희석배수를 정하고 바이러스 접종량을 고려하여 역가를 산출하였다:  $1 \times 10^8 \times (1000 \mu\text{l}/6 \mu\text{l}) = 1.67 \times 10^{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml

나. 바이러스 대량배양을 위한 최적 MOI

1) EHV-1의 대량 배양 관련 최적의 MOI 선정

CPE의 발생시기는 접종 MOI에 따라서 ±4시간정도 차이가 있었으며 무혈청 배지보다는 2% FBS 배지에서 2~4시간정도 늦게 나타났다. 대량배양을 위한 최적의 조건은 100% 단층이 형성된 MDBK세포에 바이러스를 MOI 4로 접종한 후 2% FBS배지로 교환한 상태에서 배양을 하여 CPE 60%일 때 (바이러스 접종 후 약 40시간) 배지를 수거하는 것이었다. 백신으로 사용하기 위한 바이러스의 배양에는 이종단백질 (특히 FBS)가 없어야 하므로 EHV-1 접종 후 배지교환은 무혈청배지로 하는 것이 타당하다고 사료된다. 또한 CPE가 70%일 때가 60%일 때보다 바이러스의 수확량이 다소 많지만 시간이 지나면서 그 양이 급속히 감소하므로 바이러스가 함유된 배지의 수확 시기는 CPE가 70%이상 되기 전에 실시해야 할 것으로 판단된다.

Table 10. 바이러스 접종량과 세포의 조밀도 그리고 배양시간에 따른 바이러스 수확량의 비교

		CPE가 발생한 well 수가 50%이상인 EHV-1의 회석배율 10 <sup>x</sup>			
		2% 혈청배지		무혈청배지	
접종 MOI	CPE	MDBK 70%seat	MDBK 100%seat	MDBK 70%seat	MDBK 100%seat
1	0%	0	2	0	2
	25%	4	3.5	3	4
	50%	6	5	4	5
	60%	5.5	6	3	5
	70%	6	6	7.5	7
	90%	7	4.5	5	6
2	0%	2	3	3	3
	25%	3	3	4	2
	50%	5	5.5	4	5
	60%	5	4	3.5	4
	70%	5.5	4	5	3.5
	90%	4	3.5	4	3.5
4	0%	3	3	3	2
	25%	4	6	5.5	4.5
	50%	5	10	4	9
	60%	10	11.5	9	10.5
	70%	7.5	10	7	11
	90%	5	6	6.5	5
8	0%	2	2	3	3
	25%	4	7	5	6
	50%	7	8	8	7.5
	60%	6.5	7	6	7
	70%	7	4	7.5	7
	90%	7	6	7	5

2) EHV-4의 대량 배양 관련 최적의 MOI 선정

CPE의 발생시기는 접종 MOI에 따라서 ±24시간으로 큰 차이가 있었으며 무혈청 배지보다는 2% FBS 배지에서 2~4시간정도 늦게 나타났다. 또한 MOI 1과 2로 접종시에는 CPE의 발생이 생기다가 어느 정도가 되면 더 이상 발생하지를 않았다. 백신을 만들기

위한 대량배양의 최적 조건은 70% 단층이 형성된 MDBK세포에 EHV-4를 MOI 4로 접종한 후 CPE가 생성되기 바로 직전인 접종 후 14(±2)시간에 무혈청 배지로 교환한 것이다.

Table 11. 바이러스 접종량과 세포의 조밀도 그리고 배양시간에 따른 바이러스 수확량의 비교

		CPE가 발생한 well 수가 50%이상인 EHV-4의 회석배율 10 <sup>x</sup>			
		2% 혈청배지		무혈청배지	
접종 MOI	CPE	MDBK 70%seat	MDBK 100%seat	MDBK 70%seat	MDBK 100%seat
1	0%	0	0	0	0
	25%	2	1	3	1
	50%	×	×	×	×
	60%	×	×	×	×
	70%	×	×	×	×
	90%	×	×	×	×
2	0%	0	0	0	0
	25%	3	2	3	1
	50%	3	×	3	3
	60%	×	×	1	×
	70%	×	×	×	×
	90%	×	×	×	×
4	0%	1	2	1	1
	25%	4	3	3	2
	50%	7	6	5	5
	60%	9	7	8	6
	70%	10	9	9	8
	90%	11	9.5	10.5	9
8	0%	0	1	0	0
	25%	2	2	2	2.5
	50%	4	3	3	3
	60%	6.5	7	6	5.5
	70%	8	8	9	7
	90%	9.5	10	10	8

다. CPE별 배지와 MDBK 세포내의 virus titration

96-well cell culture flask에 MDBK cell을 계대배양 하고 역가검정을 위한 접종을 실시하였다. 바이러스 재료를 DMEM배지를 이용하여 10진 희석하고 희석액을 각각 8개의 well에 6 µl씩 접종하였다. 접종 후 5일까지 세포를 관찰하여 CPE별 MDBK 세포내와 배지의 virus 역가 여부를 관찰하여 Table 12와 같은 결과를 얻었다.

Table 12. 바이러스 접종량과 세포의 조밀도 그리고 배양시간에 따른 바이러스 수확량의 비교

		CPE가 발생한 well 수가 50%이상인 희석배율 10 <sup>x</sup>			
		EHV-1		EHV-4	
접종 MOI	CPE	세포내	배지	세포내	배지
	10%	2	3	2	2
	20%	2	4	3	3
4	50%	3	6	3	6
	70%	2	8	1	9
	90%	×	6	×	9



라. 바이러스의 불활화

1) EHV-1의 formalin 처리 불활화 최적 조건 선정

Formalin 농도와 처리시간의 조건을 찾기 위하여 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.5% formalin을 첨가하여 1시간, 2시간, 4시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간 동안 4°C에서 반응시킨 불활화 EHV-1을 역가검정하여 Fig 2.와 같은 결과를 얻었다. 최적의 조건은 0.2% formalin을 24시간 동안 반응시켰을 때 완전히 불활화가 됨을 알 수 있었다. 0.5% formalin은 48시간, 0.1% formalin은 72시간 동안 반응시켰을 때 완전히 불활화가 되었다.

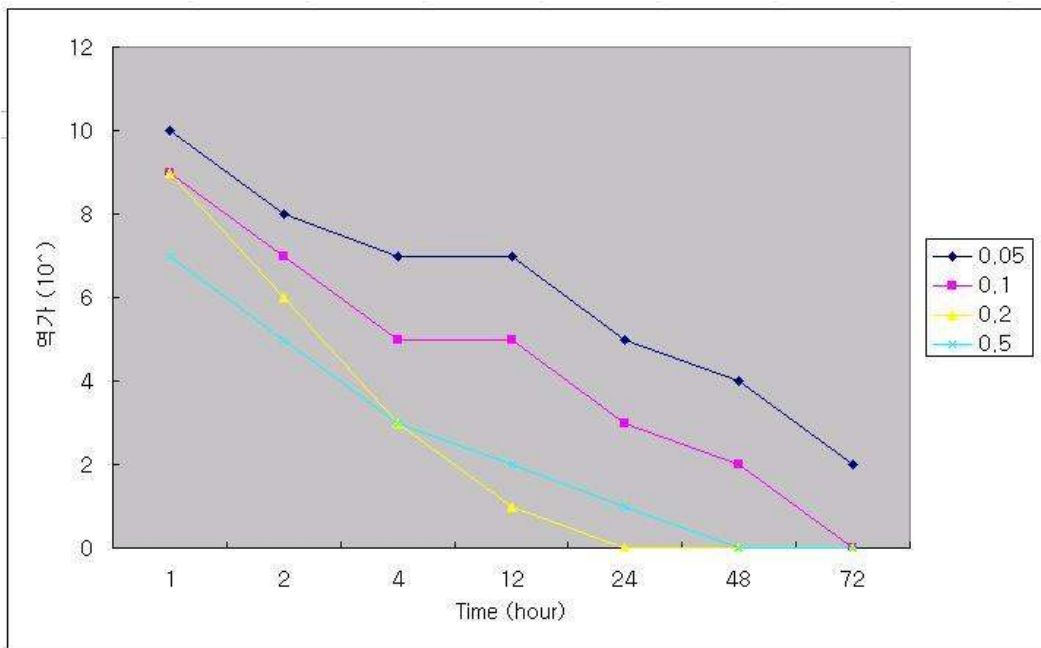


Fig. 8.. Formalin 처리의 농도와 시간에 따른 EHV-1의 역가

2) EHV-4의 formalin 처리 불활화 최적 조건 선정

Formalin 농도와 처리시간의 조건을 찾기 위하여 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.5% formalin을 첨가하여 1시간, 2시간, 4시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간 동안 4°C에서 반응시킨 불활화 EHV-4를 역가검정 하여 Graph 1.과 같은 결과를 얻었다. 0.1%, 0.2%, 0.5% formalin을 24시간 동안 반응시켰을 때 완전히 불활화가 됨을 알 수 있었다. 0.05% formalin은 48시간 반응시 완전히 불활화가 되었다. 최적은 조건은 0.1% formalin으로 24시간동안 반응시키는 것이다.

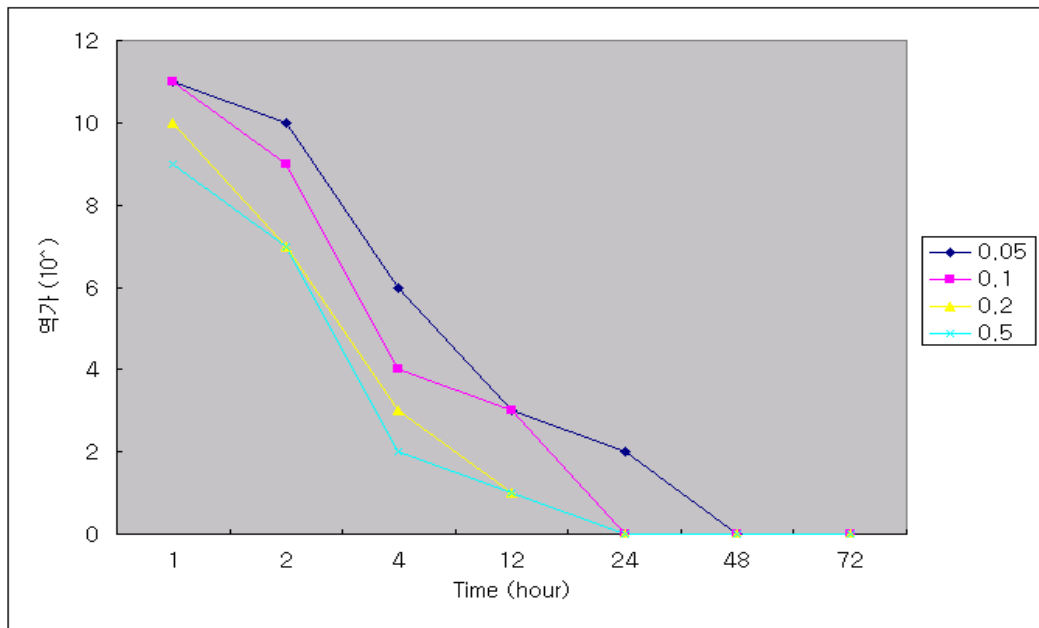


Fig. 9. Formalin 처리의 농도와 시간에 따른 EHV-4의 역가

마. 말 IgG Fc분획의 정제

1) 말 IgG 정제 확인

전혈로부터 혈청을 분리한 후 Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, sweden)을 이용한 affinity chromatography를 실시하고 정제된 IgG를 확인하기 위하여 SDS-PAGE 분석을 실시하였다. 정제된 IgG 분획을 10% polyacrylamide gel에 loading한 후 50 V에서 15분간 그리고 100 V에서 bromophenol blue dye가 바닥에 도달할 때까지 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gell은

Coomassie gel staining solution으로 40분 동안 염색하였고 Coomassie gel destaining solution 으로 24시간 탈색하였다. Heavy chain과 light chain으로 여겨지는 2개의 분획은 53 KDa 및 31 KDa 부분에서 확인 되었다.

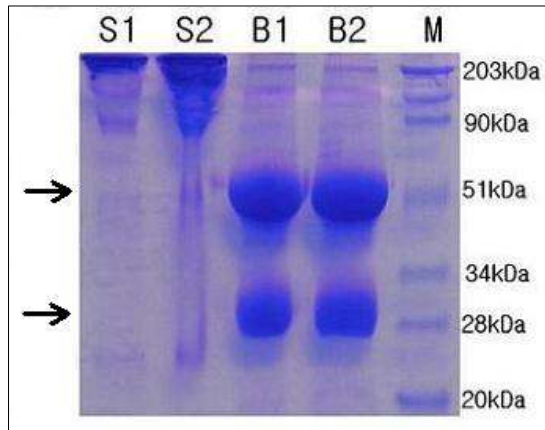


Fig. 10. 정제된 말 IgG의 SDS-PAGE 분석 결과, (S1과 S2: Mercaptoethanol 없는 buffer 사용, B1과 B2: Mercaptoethanol 있는 buffer 사용)

2) 정제된 Fc를 확인하기 위해 SDS-PAGE 분석을 실시하여 순수한 Fc분획이 정제되었음을 확인하였다.

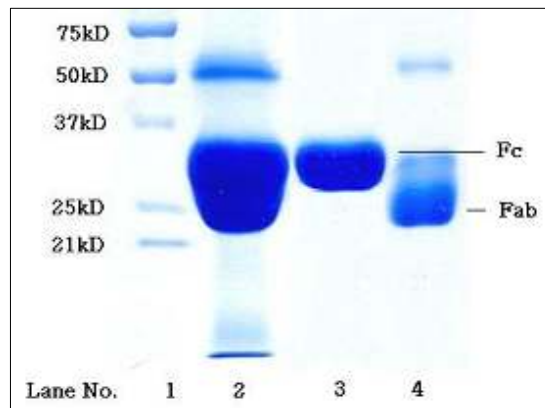


Fig. 11. Fc 분획의 정제도 확인을 위한 SDS-PAGE 분석 결과 (Lane 1, 2, 3 그리고 4는 각각 단백질 marker, papain 절단 직후, protein G column 정제 후 용출액 그리고 column loading 후 빠져 나온 pass-out 물질)

바. EHV-Fc 단백질 융합체의 제조

Two-step glutaraldehyde를 이용한 conjugation 방법으로 제조된 EHV-Fc 단백 융합체의 제조와 정제를 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 하였다. 10% acrylamide gel을 제작하고 Fc 25 $\mu$ l와 EHV-1-Fc 단백질 융합체 25 $\mu$ l 그리고 EHV-4-Fc 단백질 융합체 25 $\mu$ l를 각각 25 $\mu$ l의 sample buffer와 혼합하고 100 $^{\circ}$ C에서 3분간 끓인 후 전기영동을 하였다. 바이러스-Fc 융합은 대체로 성공적으로 이루어졌으며, 일부 유리된 Fc의 분획이 소량 잔류하였으나 융합백신의 실험적 제제로는 적절한 것으로 판단되었다.

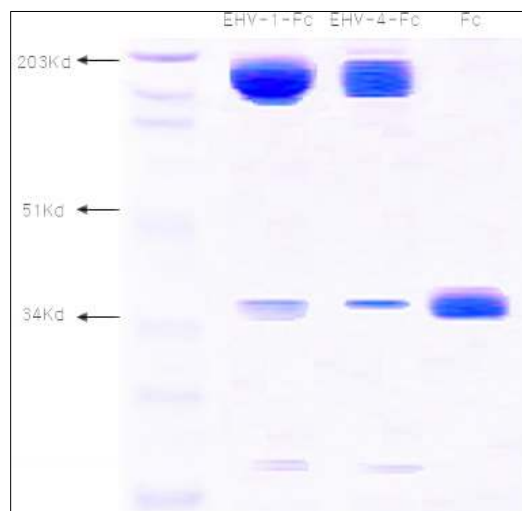


Fig. 12. EHV-Fc 단백질 융합체의 제조와 정제의 확인을 위한 SDS-PAGE 분석 결과 (Lane 1, 2, 3 그리고 4는 각각 단백질 marker, EHV-1-Fc 접합체, EHV-4-Fc 접합체 그리고 접합에 사용된 Fc)

## 2. 백신 효능시험

### 가. 말 수지상세포 및 T 림프구 분리, 배양

#### 1) PBMCs 분리 및 수지상세포 배양

말 PBMCs를 분리하여 human GM-CSF와 equine IL-4 처리하여 세포를 얻었다. 현미경으로 관찰한 결과 세포 표면에 dendritic process 등 전형적인 수지상세포의 특징을 보였다. 광학현미경으로 400배의 배율에서 찍은 사진을 얻었으며 (Fig. 13) 수지상세포의 분화에 따른 여러 가지 형태를 관찰하였다. 또한 수지상세포의 생존율 측정을 위해 면역싸이토카인을 처리하지 않은 대조군과 면역싸이토카인을 처리한 군을 대상으로 trypan blue exclusion test를 실시하였다. 실험결과 대조군은 40%의 생존율을 나타낸 반면, 면역싸이토카인 처리군 (human GM-CSF + equine IL-4)에서는 66%의 생존율을 보였다 (Fig. 14).

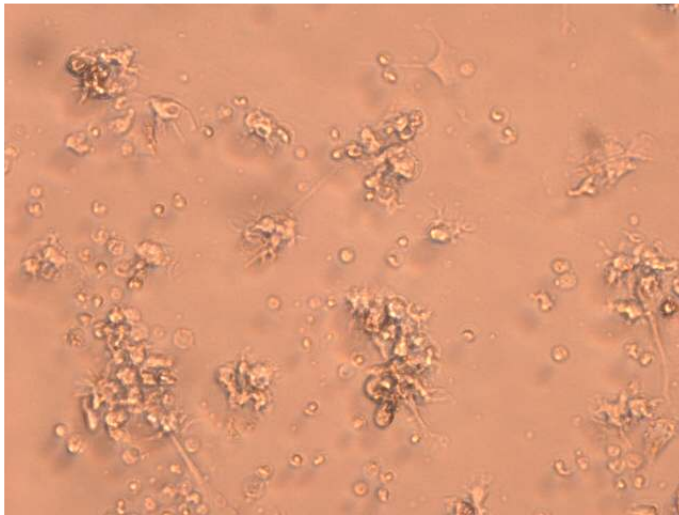


Fig. 13. Cells propagated from peripheral blood mononuclear cells with human GM-CSF and equine IL-4. Cells display typical DC morphology with projections.  $\times 400$  optical microscope.

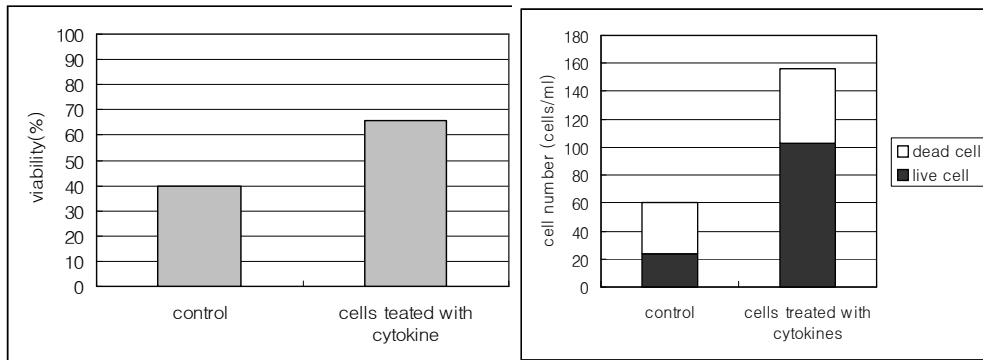


Fig. 14. The viability of DCs was enhanced by human GM-CSF and equine IL-4.

After 4 days culture, PBMCs were seeded at a concentration of  $1.3 \times 10^5$  cells/ml in 24-well culture plate. Cells were treated with human GM-CSF and equine IL-4 for 4 days. The viability of DCs was measured by using trypan blue exclusion test. Result is representative of two individual experiments.

## 2) 수지상세포의 항원공여능력 측정

수지상세포는 대표적인 antigen presenting cells (APCs)이기 때문에 T lymphocytes에 항원을 공여할 수 있는 능력을 가지고 있다. 본 실험에서 human GM-CSF와 equine IL-4를 이용하여 배양된 세포가 수지상세포인지 확인하기 위해 allogeneic T lymphocyte의 활성화 능력을 측정하였다. 수지상 세포와 T cell의 세포수 비율은 1:20으로 하고, 수지상세포를 넣지 않은 T cell 대조군을 두어 실험을 실시하였으며  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation을 통해 평가하였다 (Fig. 15). 면역싸이토카인에 의해 배양된 세포는 대조군에 비해 유의하게 증가된 proliferation을 보여 APCs로서의 역할을 수행할 수 있는 사실을 확인하였다.

또한 수지상세포는 미성숙일 때 항원을 탐식하는 능력이 뛰어나다. 이는 수지상세포가 APCs로서의 역할을 수행하기 위해 필수적인 기능으로 수지상세포 여부를 판별하는 기준이 된다. 주로 FITC-dextran을 시험물질로 수행하며 유(동)세포분석기를 이용하여 탐식된 형광정도를 분석하였다 (Fig. 16). 면역싸이토카인을 이용해 배양한 수지상세포를  $4^\circ\text{C}$ 와  $37^\circ\text{C}$ 에서 반응시켰을 때  $4^\circ\text{C}$ 에서 mean fluorescence intensity (MFI) 값이 58을 보인 반면  $37^\circ\text{C}$ 에서는 MFI 값이 107로 2배가량 유의하게 증가했다. 이는 배양된 세포가 항원탐식작용이 있는 수지상세포임을 확인할 수 있었다.

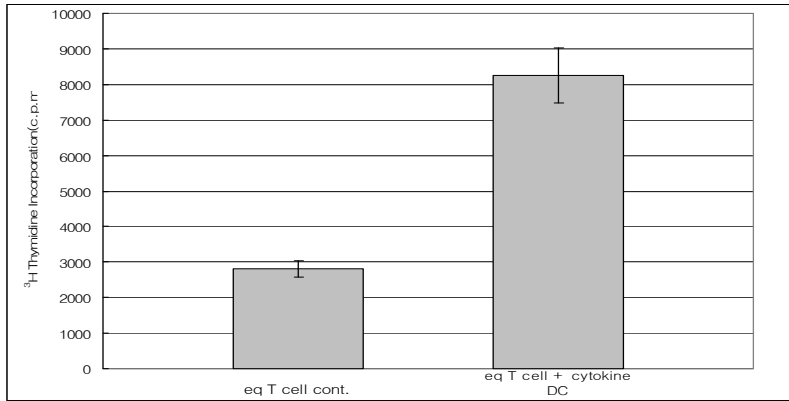


Fig. 15. DCs treated by human GM-CSF and equine IL-4 stimulated allogeneic T lymphocytes. To quantitate the level of lymphocyte proliferation, the incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine was used. The ratio of 1:20 (DCs : T cells) was used during the stimulation. This data is the representative of two individual experiments.

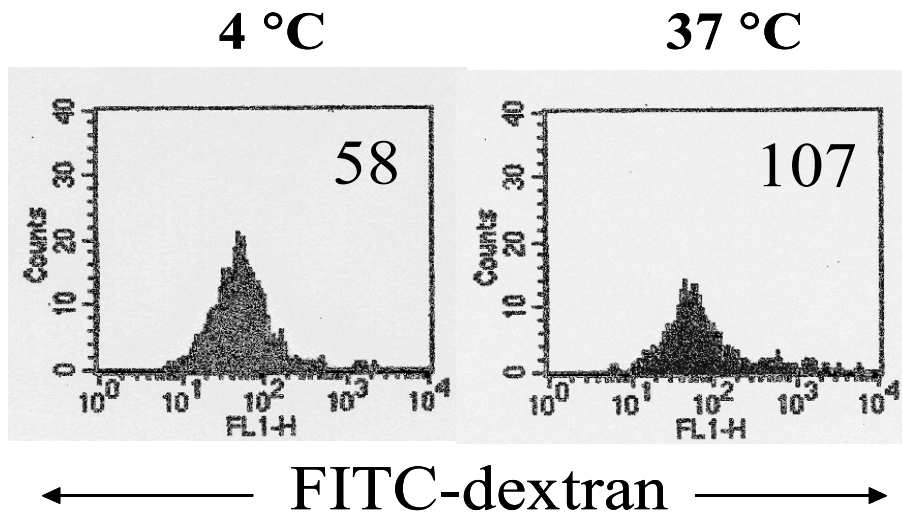


Fig. 16. DC differentiated by cytokines obtained the capacity of antigen-uptake. FITC-dextran was used as soluble antigen, and then was added to DCs cultured for 4 days. Cells were incubated for 60 min at 4 °C and 37°C respectively. Cells were analyzed with flow cytometry and CellQuest software.

나. 수지상세포 표적화 이용 가능한 단백질의 탐색

마우스 수지상세포에 1,000배, 10,000배, 100,000배 희석한 equine IgG-FITC를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응한 후 flow cytometry를 이용해 분석하였다 (Fig. 17). 그림 안의 수치는 평균형광강도 (MFI: mean fluorescence intensity)를 의미한다. 실험 결과 1,000배 (좌측 상단), 10,000배 (우측 상단), 100,000배 (좌,우측 하단)의 희석 순으로 형광강도가 감소하였고, 4°C (좌측 하단)보다 37°C (우측 하단)에서 증가를 보였다.

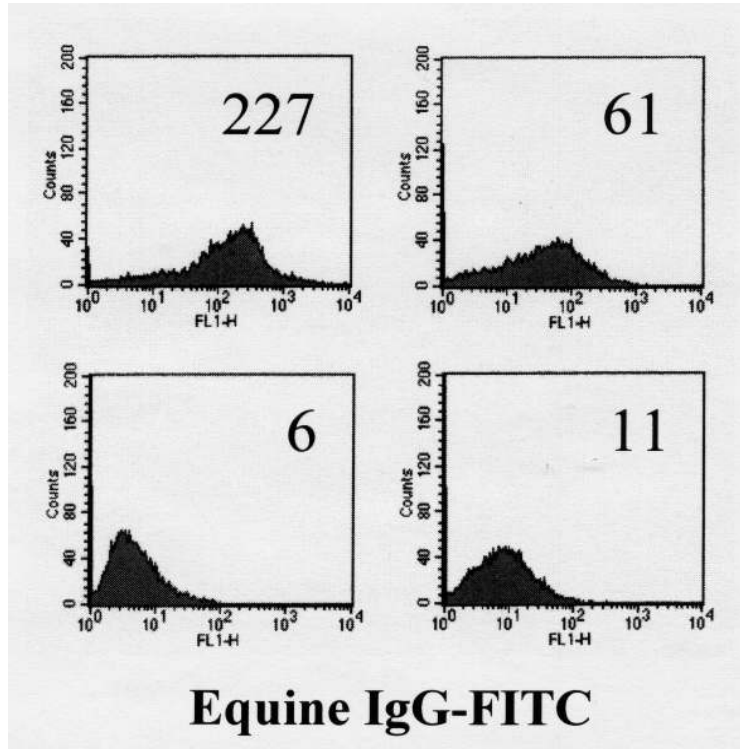


Fig. 17. DC differentiated by cytokines obtained the capacity of antigen-uptake.

Equine IgG-FITC was used as soluble antigen, and then was added to DCs cultured for 6 days. Cells were incubated for 60 min at 4 °C (lower left) or 37°C respectively. Cells were analyzed with flow cytometry and CellQuest software.



다. Mannosylated-FITC-albumin 적용실험

: 마우스 수지상세포에  $\alpha$ -D-mannosylated -FITC-albumin을  $2.5\mu\text{g/ml}$ 으로 처리하여  $4^\circ\text{C}$ 와  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간동안 반응한 후 flow cytometry를 이용해 분석하였다 (Fig. 18). 그림안의 수치는 평균형광강도 (MFI: mean fluorescence intensity)를 의미한다. 실험 결과  $4^\circ\text{C}$  (우측 상단)보다  $37^\circ\text{C}$  (우측 하단)에서 형광을 나타내는 세포가 30배 가량 높게 나타났다. 좌측 하단의 그림은 두 결과를 함께 overlay하여 나타내었다.

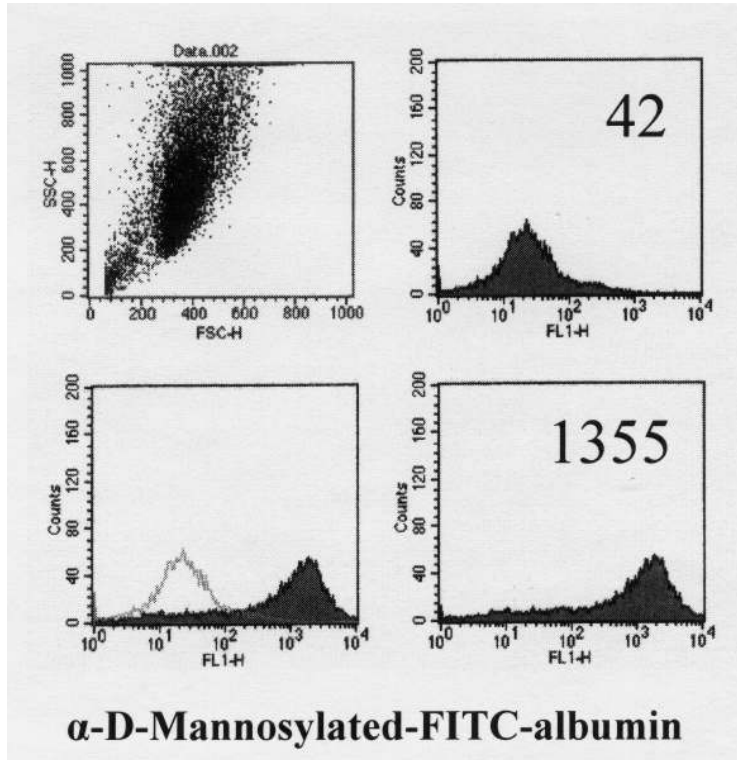


Fig. 18. Antigen-uptake of DCs using mannosylated-FITC-albumin.

Mannosylated-FITC-albumin was used as soluble antigen, and then was added to mouse BMDCs cultured over 6 days. Cells were incubated for 60 min at  $4^\circ\text{C}$  (upper right) or  $37^\circ\text{C}$  (lower right), overlaid figure (lower left) respectively. Cell size was determined by FSC/SSC (upper left). Cells were analyzed with flow cytometry and CellQuest software.

라. 수지상세포의 림프구자극능에 대한 EHV효과

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A						$3^3$						$3^3$
B						$3^2$						$3^2$
C						$3^1$						$3^1$
D					$1 \times 10^4/100\mu\ell$						$1 \times 10^4/100\mu\ell$	
E						$3^3$	T cell control (10% LCM $100\mu\ell$ )					
F						$3^2$						
G						$3^1$						
H					$1 \times 10^4/100\mu\ell$							

Fig. 19. 수지상세포 림프구자극능 측정을 위한 plate map 구성

최종적으로 96-well culture plate에 Fig. 19와 같이 setup된 co-culture는 CCK-8이라는 물질을 4시간 동안 처리한 뒤 microplate reader를 이용해 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 수지상세포를 넣지 않은 T cell만 존재 시 생성된 흡광도 수치를 모든 흡광도에서 전체적으로 빼 주었다. 수지상세포가 낮은 농도 (1:540)에서는 생성된 흡광도의 양은 모든 처리군에서 T cell만 단독으로 존재했을 때와 비슷한 수준이었다.

수지상세포의 농도가 증가할수록 미성숙수지상세포와 미성숙수지상세포 + MDBK세포만을 처리한 군에 비해 미성숙수지상세포 + MDBK세포 EHV 처리군이 유의하게 증가된 흡광도를 보였다 (Fig. 20). 이는 증가된 흡광도가 EHV 바이러스에 의한 것이며 현재의 *in vitro* 분석시스템이 바이러스 및 바이러스연관물질을 효율적으로 검증할 수 있는 사실을 검증하는 것으로 사료된다. 또한 본 실험체계를 이용하면 EHV 백신후보물질에 대한 여러 가지 면역학적 parameter를 적용할 수 있기 때문에 보다 효율적으로 효능검증을 할 수 있을 것으로 기대된다.

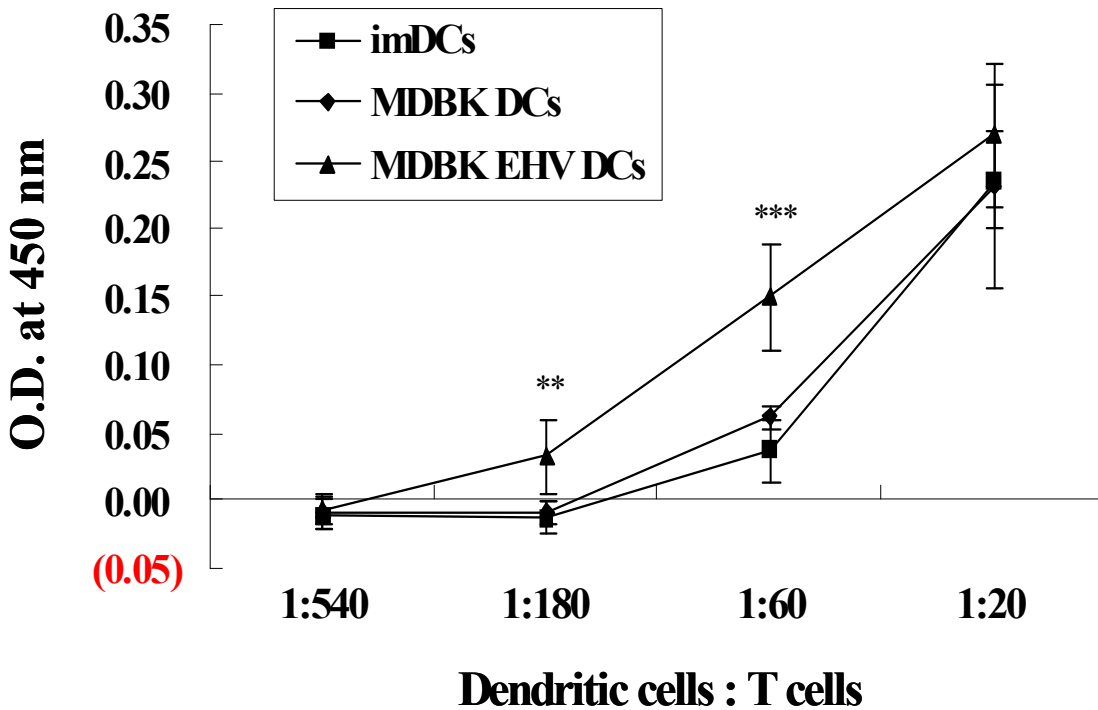


Fig. 20. 수지상세포 림프구자극능에 대한 EHV 효과

실험결과, 대조군과 LPS처리군에 비해 세포 size비교 (윗 panel)에서 비슷한 수준의 세포 생존율을 보였으며 전체 세포에서 수지상세포의 ratio는 50%내외로 매우 높은 편이었다 (Fig. 21).

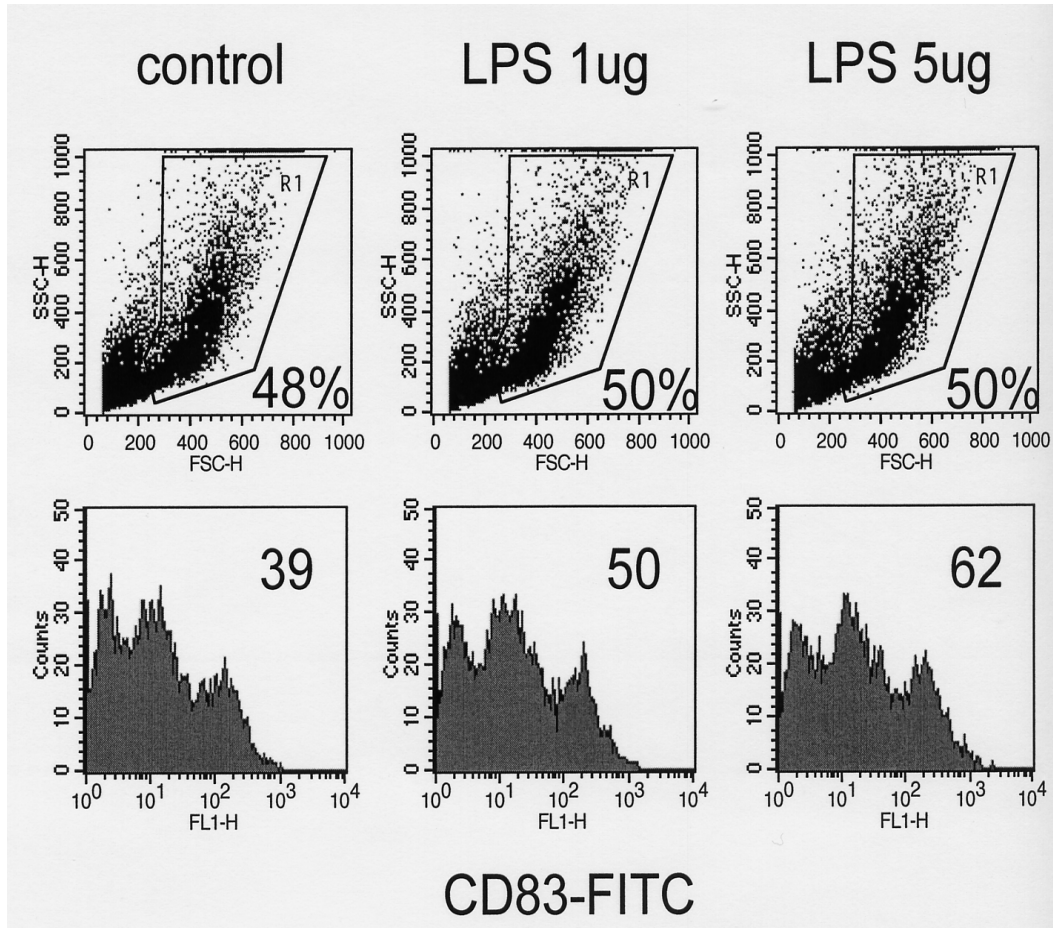


Fig. 21. LPS 처리 후 말 수지상세포의 성숙마커 변화

LPS처리군은 대조군에 비해 세포표면에 발현된 CD83의 함량이 농도의존적으로 높아진 현상을 관찰할 수 있었다. 이는 CD83 분자가 대표적인 수지상세포 성숙인자로 사용되므로 LPS의 농도 증가에 따라 수지상세포가 성숙됨을 알 수 있다. 따라서 본 과제를 통해 얻은 수지상세포는 정상적인 성숙과정을 거치며 고유의 기능을 하는 것으로 파악된다.

마. 수지상세포 표면 Fc 수용체의 탐식작용 연구

실험결과 100배 희석액은 37°C에서 매우 높은 세포내 침착을 보인 반면 같은 농도의 4°C에서는 표면만 침착하는 현상을 볼 수 있었다 (Fig. 22). 이는 IgG를 이용한 세포표면 Fc수용체의 항원탐식과정이 4°C에서도 약간 일어나며 표면아래 일정부위에 적은 규모로 침착하는 사실을 확인할 수 있었다. 37°C에서는 세포내에서 침착하는 양상이 매우 커 처리한 지 한 시간 만에 거의 세포내 핵과 같은 크기로 침착된 inclusion body가 커져 있었다. 본 실험을 통해 세포내로 전달되는 equine IgG-FITC의 항원탐식과정을 실시간으로 확인할 수 있었으며 일련의 실험과정을 본 실험실에 setup할 수 있었다. 또한 FACS분석기와 같이 confocal microscope는 정확한 이미지를 제시하고 단백질의 양을 정량화시킬 수 있는 고급기자재이므로 향후 실험진행에 많은 도움이 될 수 있을 것으로 예상된다.

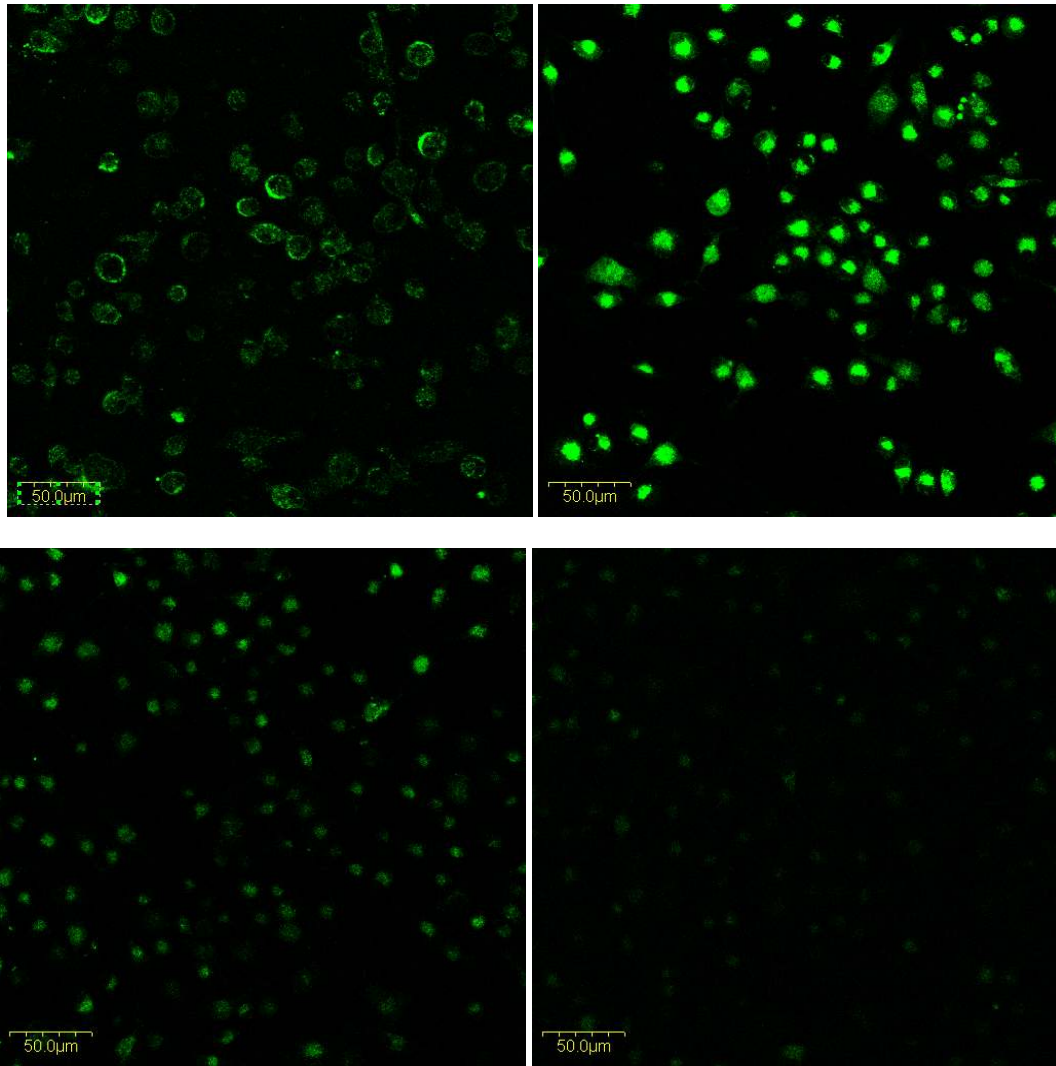


Fig. 22. The processing of antigen uptake of DCs. 4°C 100x dilution (upper left), 37°C 100x dilution (upper right), 37°C 1000x dilution (lower left), 37°C 10000x dilution (lower right).

바. 백신후보물질의 체액성면역 (humoral immunity) 시험결과

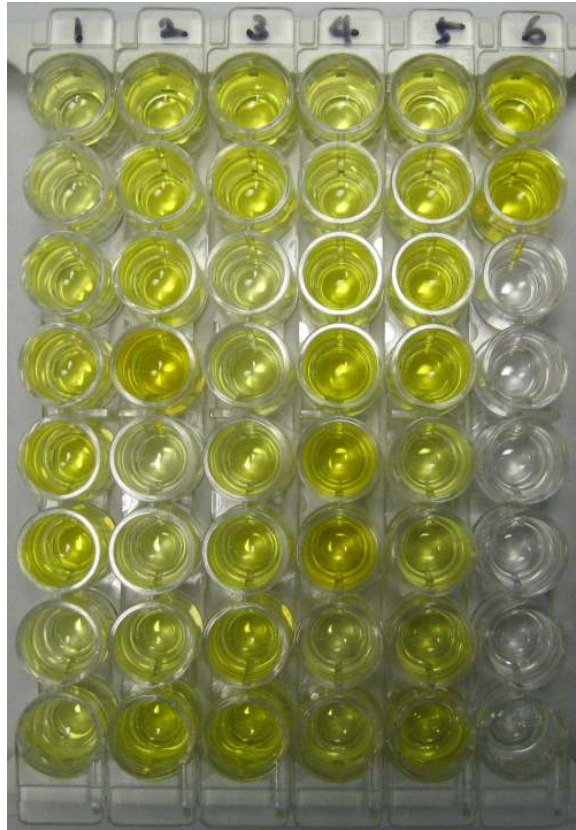


Fig. 23. ELISA strip을 이용한 EHV 특이항체 검출실험

실험방법에 제시된 대로 PBS (대조군) 및 EHV 백신 후보물질을 마우스에 접종한 후 3주가 지난 뒤 미정맥에서 혈액을 채취했다. EHV 항원을 바닥에 coating시킨 후 분리된 혈장, 이차항체, substrate를 차례로 처리한 결과 ELISA strip의 색깔 변화를 관찰할 수 있었다. 각 혈액샘플은 샘플 당 2배씩 6단계로 희석해 실험하였다 (Fig. 23). 또한 재현성을 위해 다른 실험군을 이용해 반복실험을 실시하였다.

ELISA 결과를 이용해 그래프를 작성하였다 (Fig. 24).

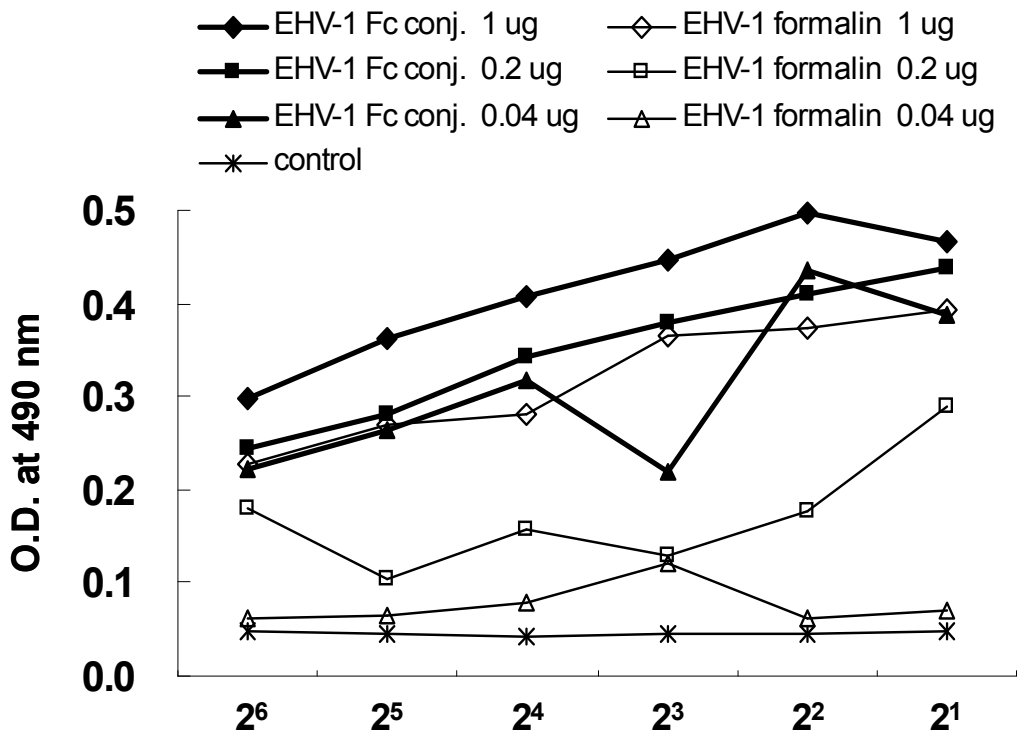


Fig. 24. 대조군 및 백신후보물질을 투여한 마우스 혈액의 항체가 조사

본 실험의 수행 전 다수의 실험을 통해 1회 항원접종양, 접종횟수, 접종 후 샘플채취시기 등의 다양한 parameter들의 optimal condition을 조사한 후 본 실험을 수행하였다.

EHV백신후보물질 중 EHV-1 Fc conjugate와 EHV-1 formalin 접종군을 농도별로 비교하였다. 마우스에 각 후보물질을 마우스 당 1, 0.2 또는 0.04  $\mu\text{g}$ 으로 1회 접종하였고 3주 후에 미정맥에서 혈액을 채취한 후 분리된 혈장에 포함되어 있는 EHV 특이항체를 정량한 결과이다. 위의 결과에서 두 후보물질 모두 마우스에 접종한 항원양이 높을수록 높은 항체가를 나타냈다.

또한 EHV-1 Fc conjugate (2A) 접종군의 혈장은 EHV-1 formalin (3A) 접종군의 혈장



에 비해 EHV-1 특이적인 ELISA에서 더 많은 항체가 생성된 것으로 분석되었다. 따라서 EHV에 Fc를 conjugation하여 백신을 개발할 경우 일반 사독화백신에 비해 보다 강력한 백신효과가 있을 것으로 기대된다.

앞서 백신효과를 확인했던 백신후보물질과 시판되는 EHV commercial 백신을 비교하였다 (Fig. 25).

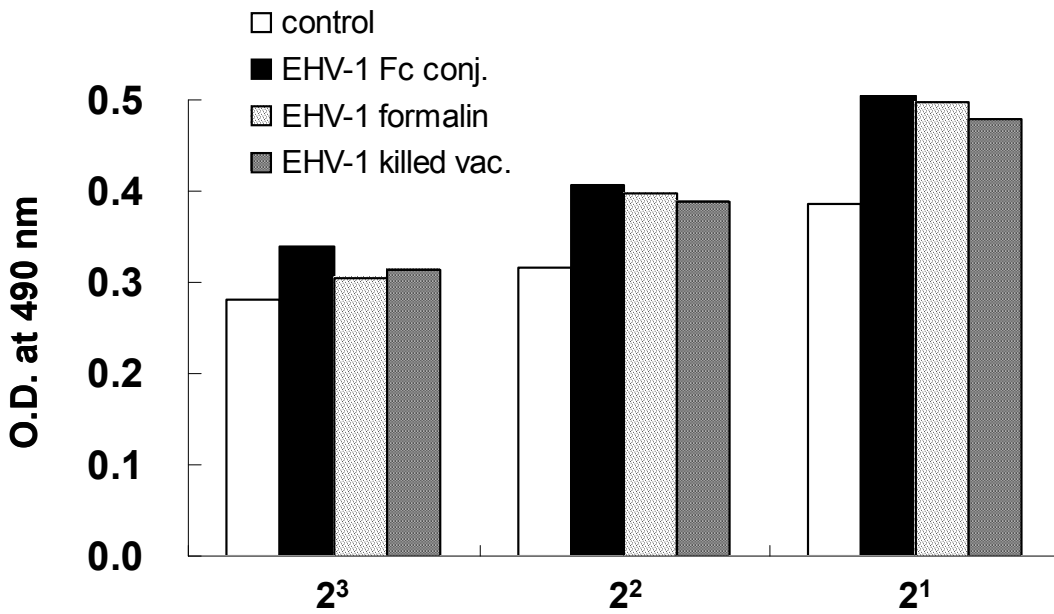


Fig. 25. 시판중인 상업용 백신과 백신후보물질의 humoral antibody 생산능 비교

현재 시판중인 상업용 백신 1종을 마사회의 협조를 얻어 구입하였다. 확인한 결과 백신의 설명서에 구체적인 EHV 항원량, adjuvant의 종류 및 양 등 자세한 구성성분이 제시되지 않았다. 반면 본 연구과제에서 제작된 백신후보물질 들은 adjuvant가 첨가되지 않은 상태로 전 실험에 사용되어 둘 사이에 절대적인 비교는 하기 힘든 실정이었다. 따라서 실험의 객관성을 최대한 유지하기 위해 상업용 백신을 일반적인 Bradford법으로 단

백질 정량한 다음 실험에 사용하였다.

앞에서와 동일한 방법으로 EHV백신후보물질과 상업용 백신 (EHV-1 killed vaccine)은 마우스에 0.2  $\mu\text{g}$ 으로 1회 접종하고 3주 후에 채취한 혈액 내의 EHV 특이항체를 정량하였다. EHV-1 Fc conjugate (2A) 접종군의 혈장샘플에서 EHV-1 formalin (3A) 접종군 혈장샘플에 비해 EHV-1 특이항체의 함량이 높았다. 특히 EHV-1 Fc conjugate 접종군은 상업용 사독백신에 비해 높은 희석배수로 갈수록 상대적으로 높은 특이항체를 보였다. 또한 EHV-1 formalin 접종군도 일부 희석배수에서 상업용 백신에 비해 높은 항체가를 보였다.

따라서 adjuvant의 부재에도 불구하고 EHV-1 Fc conjugate 백신후보물질은 상업용백신에 비해 체내에 투여 시 더 향상된 체액성면역을 유도할 수 있을 것으로 기대된다.

사. 백신후보물질의 세포성면역 (cellular immunity) 시험결과

체내에서 항원특이적인 항체를 생성하는 체액성면역과 함께 바이러스에 이미 감염된 세포를 공격하여 제거할 수 있는 세포성면역의 생성이 백신효과의 주요 부분을 담당한다. 세포성면역은 주로 항원에 특이적인 cytotoxic T lymphocyte (CTL)을 생성시키고 그 수를 유지시키는데 있다. CTL의 검증을 위해서 본 연구에서는 interferon- $\gamma$ 를 세포 내에서 생산할 수 있는 Th1 (T helper 1) cells의 비율을 확인하였다 (Fig. 26).

마우스의 말초혈액은 마리당 얻을 수 있는 혈액세포의 양이 매우 적어 비장세포를 얻은 뒤 실험에 사용하였다. 비장의  $\text{CD4}^+$ 세포 중  $\text{IFN-}\gamma^+$  양성세포의 비율이 대조군에서 2.1%, Fc conjugate 접종군에서 3.3%, formalin처리 접종군에서 2.3%를 나타내었다. 또한  $\text{IFN-}\gamma^+$  cell/  $\text{CD4}^+$  cell의 비율은 대조군에서 0.18, Fc conjugate 접종군에서 0.27, formalin처리 접종군에서 0.19로 분석되었다.

따라서 Fc conjugation에 의한 백신제조는 대조군과 formalin처리 백신후보물질에 비해 상대적으로  $\text{IFN-}\gamma$  생산  $\text{CD4}^+$  T cell, 즉 Th1 세포의 비율을 증가함을 알 수 있었다. 체내접종 시 Th1세포의 증가는 세포성면역의 증가와 직결되어 체액성면역과 더불어 백신의 효과를 극대화시킬 수 있을 것으로 생각된다.

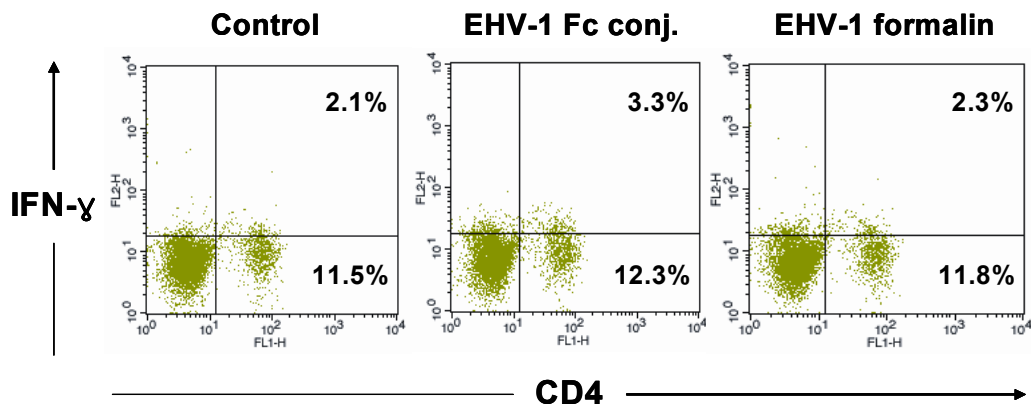


Fig. 26. 백신후보물질의 T helper 1 cell 생성 증진 효과

아. Live or Dead EHV-1 virus를 접종한 수지상세포의 면역반응시험

항 EHV-1 virus 면역형성에 수지상세포를 이용할 수 있는지 여부에 대해 CCK-8 증식능시험(Fig. 27)과 LDH cytotoxicity시험(Fig. 28)을 이용하여 조사하였다. 본 실험은 Fc conjugation을 이용한 백신후보물질의 제조 전에 수행하였다.

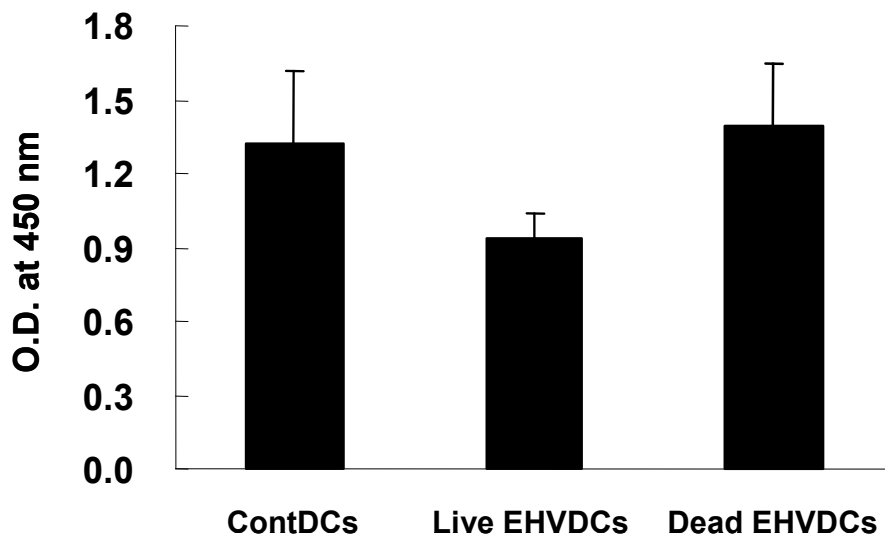


Fig. 27. Live or dead EHV-1 virus를 접종한 수지상세포의 증식능

Live 또는 dead EHV-1을 일정시간 접종한 수지상세포와 마우스 비장세포를 마우스 재조합 IL-2 (0.5 ng/ml)를 첨가한 상태로 5일간 함께 배양한 후 CCK-8 용액을 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 측정된 결과이다.

CCK-8 assay의 원리를 간단히 설명하면, CCK-8 solution에 포함된 WST-8은 cellular dehydrogenase에 의해 감소되어 오렌지색의 formazan을 생성하는데, formazan product는 세포 배지에 쉽게 용해되며, formazan의 양을 통해 살아있는 세포의 수를 상대적으로 측정할 수 있는 방법으로 민감하고 방사능을 이용하지 않는 비색법으로 세포증식과 세포독성 실험에서 살아있는 세포의 수를 확인하기 위해 최근 사용되고 있는 방법이다.

수지상세포에 의한 비장세포의 증식은 대조군에서  $1.327 \pm 0.287$ , 생독 EHV를 접종한 수지상세포에서  $0.936 \pm 0.099$ , 사독 EHV를 접종한 수지상세포에서  $1.391 \pm 0.252$ 로 나타났다. Dead EHV-1은 수지상세포의 비장세포 증식능을 증가시킬 수 있는 반면 live EHV-1은 억제하는 사실을 알 수 있었다.

LDH cytotoxicity 결과

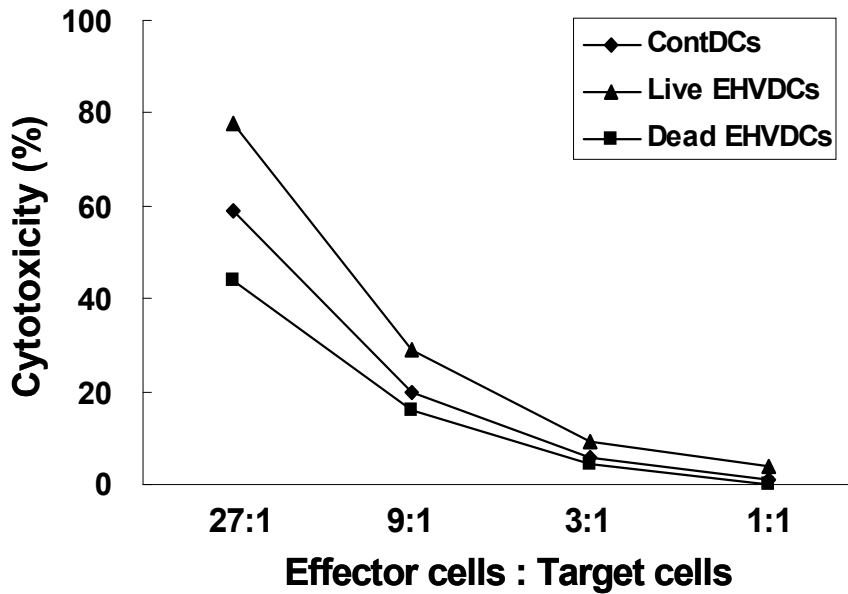


Fig. 28. Live or dead EHV-1 virus를 접종한 수지상세포에 의해

활성화된 비장세포의 세포살해능

마우스 비장세포와 live 또는 dead EHV-1에 반응시킨 수지상세포를 마우스 재조합 IL-2 (0.5 ng/ml)를 첨가한 상태로 5일간 함께 배양한 후 증식된 비장세포를 회수하여 target cell과 4시간 동안 반응시켜 target cell에 대한 비장세포의 살해능을 확인한 결과이다.

위의 결과는 생독 EHV-1을 접종한 MDBK cell을 target cell로 실험한 것이다. Effector cell의 target cell에 대한 세포살해능은 effector cell인 비장세포의 수에 비례하여 증가되어 effector cell의 수가 27, target cell의 수가 1일 때 가장 높은 세포살해능을 보였다. Live EHV-1을 접종한 수지상세포에 의해 활성화된 비장세포는 target cell에 대해 가장 높은 세포살해능을 나타냈다. Dead EHV-1을 접종한 경우는 대조군보다 낮게 나타났다. 따라서 live EHV-1을 접종한 수지상세포에 의해 활성화된 비장세포는 EHV-1 바이러스에 감염된 target cell을 살해하는 능력이 더 효과적임을 알 수 있다.

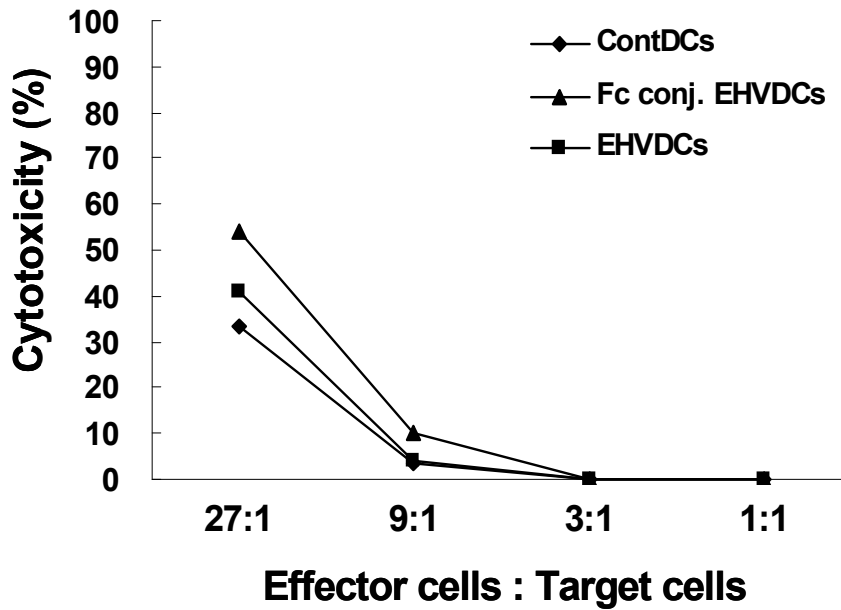


Fig. 29. 백신후보물질을 접종한 수지상세포에 의해 활성화된 비장세포의 세포살해능

Fc conjugated EHV-1을 접종시킨 수지상세포와 마우스의 비장세포를 마우스 재조합 IL-2 (0.5 ng/ml)를 첨가한 상태로 5일간 함께 배양하였다. 증식된 비장세포를 회수하여 target cell과 4시간 동안 반응시켜 target cell에 대한 비장세포의 살해능력을 확인한 결과이다. Effector cell의 target cell에 대한 세포살해능력은 effector cell인 활성화된 비장세포의 수에 비례하여 증가되었다 (Fig. 29).

본 실험을 통해 Fc conjugated EHV-1을 접종한 수지상세포에 의해 자극된 비장세포에서 target cell을 살해하는 능력이 더 높은 것을 알 수 있었다.

### 3. EHV-1, -4에 대한 진단법

#### 가. Monoclonal Abs의 특성

세포융합을 통하여 얻어진 hybridoma 중 안정적인 항체분비를 보이는 clone들을 선별하였다. EHV-1에 대한 10개의 clones과 EHV-4에 대한 12개 clones이 분비하는 monoclonal anti-EHV-1 및 -4의 항체가 측정하였다. 이들 MAb들은 EHV-1, 및 -4 바이러스에 모두 교차반응을 보였다. 특히 모든 MAb들은 EHV-1에 비하여 EHV-4 항원에 보다 강한 반응을 보였다. 또한, EHV-4를 면역시켜 얻은 MAb들이 EHV-1을 면역시켜 얻은 MAb 들에 비하여 보다 높은 항원가를 나타내었다. (Fig. 30). 이들 클론중, 비교적 고역가를 보이는 EHV-1 및 -4에 대한 Hybridoma클론의 복수를 대상으로 실시한 Affinity chromatography로 얻은 단클론항체의 내역은 Table 13과 같으며, 모두 IgG1 type이었다.

Table. 13. Titer and protein concentration of affinity purified monoclonal ant-EHV-1 &4.

Clone	Protein Con. mg/ml	Titre (log10)	Volume( ml)	Ig type
E4-2F8	1.2	7	5.5	IgG1
E4-9B5	1.0	6	6	IgG1
E4-5D11	0.9	6	5.5	IgG1
E4-5C4	1.1	6	7.5	IgG1
E1-3H11	0.4	5	8.5	IgG1

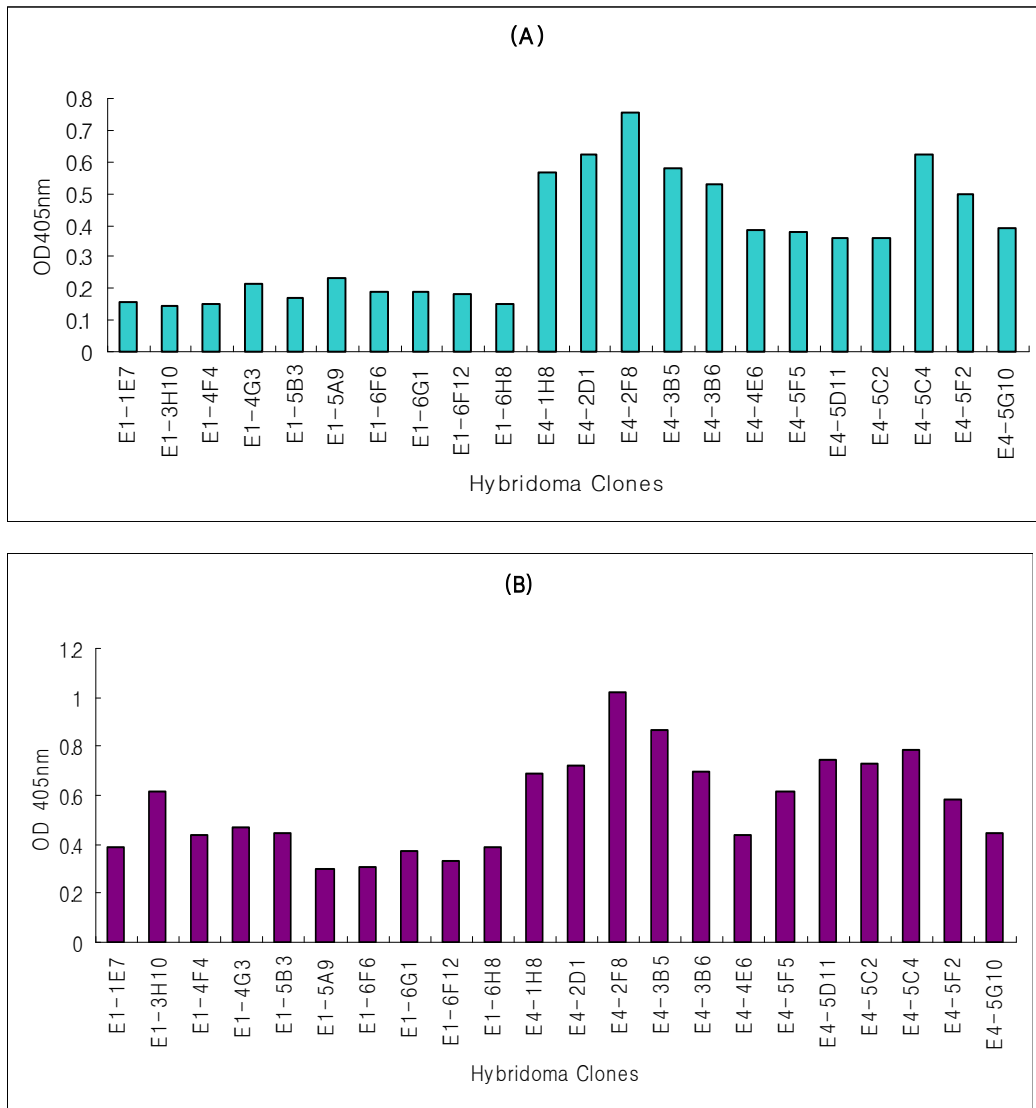


Fig. 30. Reactivity of Monoclonal antibodies against EHV-1 and EHV-4.

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

#### 나. ELISA kit



1) Antibody pair 결정

Sandwich ELISA의 capture 및 Tracer antibody의 결정을 위하여 정제된 항체를 각각 plate coating 및 효소 (HRP) 접합체를 제조한 후 약  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/100 $\mu$ l을 사용하여 분석한 결과는 E4-5C4 및 E4-2F8 단클론항체를 사용할 때 가장 양호한 결과가 나왔다. 전반적으로 signal은 강하지 않았으며 동일한 단클론항체끼리도 경쟁관계가 뚜렷하지 않았는데, 이는 바이러스의 구성항원들이 다수 표면에 존재하기 때문인 것으로 사료되었다. 검사법 개발을 위한 항체의 선정은 상기 두가지를 capture 혹은 detector 항체로 적용하였다.

Table 14. Determination of antibodies pair of sandwich ELISA for the detection of *P. larvae* spore antigen.

		Tracer (HRP-MAb conjugates)				
		E4-2F8	E4-9B5	E4-5D11	E4-5C4	E1-3H11
Capture (plate coating Mab)	E4-2F8	-	-	+	++	+
	E4-9B5	+	-	+	+	+
	E4-5D11	+	+	+	+	+
	E4-5C4	++	+	+	+	+
	E1-3H11	+	+	+	+	-

2) Sandwich ELISA의 검출한계

ELISA kit의 검출 민감도를 조사하기 위해 바이러스 배양액  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^1$  TCID<sub>50</sub>/ml가 되게 희석하여 sandwich ELISA를 실시하였다. fig 25와 같이  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml의 검출감도를 보였으며 이는 100 $\mu$ l의 시료량으로 고려할 때  $1 \times 10^4$  까지 검출이 가능한 성적이며, 추가적인 최적화를 실시하여 ELISA kit의 산업화에 적용할 계획이다.

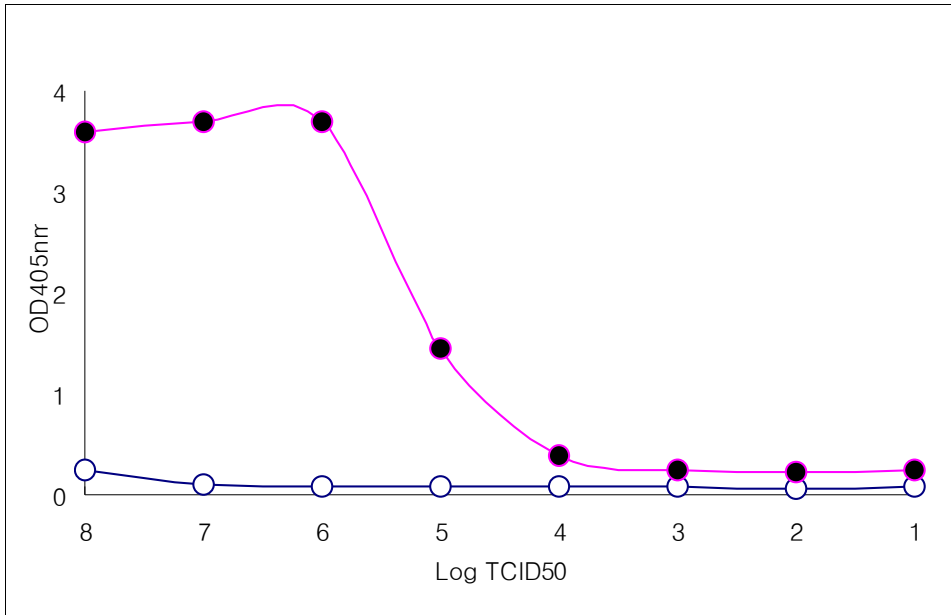


Fig. 31. Sensitivity study of sandwich ELISA for the detection of *M. pluton* spore antigen. Void circle: DMEM.

### 3). ELISA kit의 민감도 및 특이도

EHV의 ELISA진단에는 아직까지 표준화된 진단법이 제시되어있지 않고, 대부분 임상진단에 의존하기 때문에, ELISA kit의 민감도 및 특이도의 비교는 본 연구에서 적용한 PCR 방법을 표준으로 비교하여 보았으며, 민감도 92.3%, 특이도 75.0%를 보였다.

Table. 15. PCR법과 ELISA검사 결과의 비교

ELISA kit	PCR (Ref. method)		소계
	양성	음성	
양성	12	2	14
음성	1	6	7
소계	13	8	

(Sensitivity:  $12/(12+1)*100= 92.3\%$ , Specificity:  $6/(6+2)*100= 75.0\%$ )

다. ICG

1) Immunochromatography법의 검출한계 조사

Virus 배양액 수준에서의 EHV 바이러스 검출 민감도를 조사하기 위해 EHV-4  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^1$  TCID50/ml 되게 희석하여 immunochromatographic assay를 실시하였을 때,  $1 \times 10^6$  TCID50/ml의 검출감도를 보였으며 이는 100 $\mu$ l의 시료량으로 고려할 때  $1 \times 10^5$  까지 검출이 가능한 성적이며, 일반적으로 ELISA assay 법에 비하여 약 1/10 배 정도의 검출감도를 보였다.

TCID50	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^8$
Grade	-	-	-	±	+	+	+

2) Rapid kit의 민감도 및 특이도

EHV의 진단에는 아직까지 표준화된 진단법이 제시되어있지 않고, ELISA의 경우와 마찬가지로 민감도 및 특이도의 비교는 본 연구에서 적용한 PCR 방법을 표준으로 비교하여 보았으며, 민감도 87.0%, 특이도 78.9%를 보여, 현장 screening 진단용으로 활용이 가능할 것으로 사료되나 보다 민감도와 특이도를 높여 산업화에 적용할 계획이다.

Table. 16. PCR법과 ICG검사 결과의 비교

Rapid kit	PCR (Ref. method)		소계
	양성	음성	
양성	20	4	24
음성	3	15	18
소계	23	19	

(Sensitivity:  $20/(23) \times 100 = 87.0\%$ , Specificity:  $15/(19) \times 100 = 78.9\%$ )

#### 4. 제조합 gD

##### 가. EHV-1 gD cloning

##### 1) EHV-1 gD gene 확인

EHV-1 gD gene 검출을 위한 PCR 과정 중의 annealing 적정온도를 조사하기 위하여 53°C, 55.3°C, 59°C, 63.3°C, 65.9°C, 67°C의 조건으로 PCR을 실시한 결과를 Fig. 32에 나타내었다. 적용된 각각의 annealing 온도조건에서 1380 bp의 EHV-1의 gD의 밴드가 확인되었으나, 59°C의 조건에서 PCR 산물의 양이 가장 최대인 것으로 판단되어, PCR의 최적 annealing 온도조건은 59°C로 결정하였다.

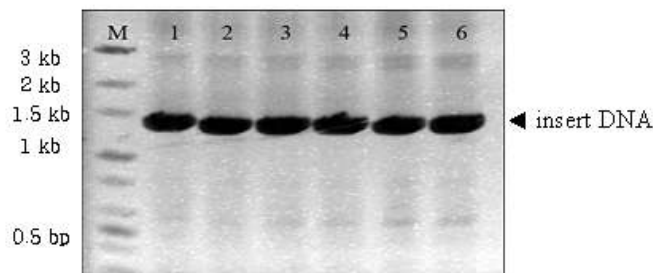


Fig. 32. Gradient PCR for EHV gD. M: DNA size marker (3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 0.8 kb, 0.6 kb, 0.5 kb, 0.4 kb, 0.3 kb, 0.2 kb, 0.1 kb); Annealing temperature of lane 1 was 53°C; lane 2 was 55.3°C; lane 3 was 59°C; lane 4 was 63.3°C; lane 5 was 65.9°C lane 6 was 67°C. About 3  $\mu$ l samples among total volumes were loaded in each well.

##### 2) EHV-1 과 EHV-4의 PCR 전기 영동 결과

EHV-1 및 EHV-4 gD PCR 산물은 각각 EHV-1은 1380bp, EHV-4은 1210bp에서 밴드를 확인하였으며, 이들 PCR 산물을 이용하여 restriction을 실시하였다.



Fig. 33. EHV-1, -4 의 PCR detection. Lane M : 1 kb DNA size marker; Lane 1: EHV-1 PCR; lane 2: EHV-1 PCR, the size were 1.38 kb and 1.21kb.

### 3) Restriction 결과

각각의 EHV-1, -4의 gD와 발현벡터인 pQE30, pQegfp는 BamHI/ SalI을 이용하여 각각의 enzyme을 37 °C에서 1시간 30분씩 반응하여 벡터와 insert가 삽입될 수 있도록 절단하였다. Lane 1은 EHV-1을 절단하였고, lane 4, 5 또한 EHV-1이며, lane 6은 EHV-4를 나타내며, lane 2,3은 발현 벡터인 pQE30, pQegfp를 절단한 결과이다.



Fig. 34. Restriction analysis of gD clone 4 and expression vector. M: DNA size marker; lane 1: cutted insert gD; lane 2: cutted Pqe30; lane 3: cutted pqe-gfp; lane 4,5,6: PCR product; lane 7,8: vector.

#### 4) EHV-1 클로닝 후 PCR 확인

발현벡터인 pQE30과 pQEGFP를 이용한 gD의 cloning을 확인하기 위하여 각각의 바이러스에 특이적인 primer를 이용하여 PCR로 screening하였다. specific primer를 이용하여 screening후 결과는 pQE30에서는 8개 모두에서 PCR 밴드를 확인 할 수 있었는데, pQEGFP에서는 밴드를 확인할 수가 없었다. 따라서 pQE30 발현벡터에서는 gD가 삽입된 것을 확인할 수 있었다.

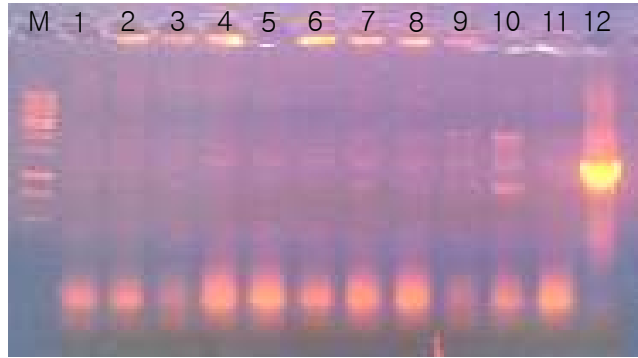


Fig. 35. EHV-1 gD clone screening using PCR. M: DNA size marker; lane 1~3: Pqe30 vector; lane 4~11: EHV-1 gD; lane 12: EHV-1 PCR product.

#### 5) 클로닝 후 EHV-1 plasmid DNA 확인

gD가 발현벡터에 삽입되었는가를 gD가 삽입된 EHV-1 plasmid DNA를 전기영동을 통하여 확인하였다. Lane9~12는 ligation 반응액을 확인한 결과 벡터와 insert보다도 윗부분에 존재하는 밴드가 있으므로 ligation 되었다고 판단하였고, 각각의 클로닝 plasmid들은 전기영동 결과 전체 8개중에서 lane 2,3,5,7,8인 5개에서 클로닝 된 산물이 확인되었다.

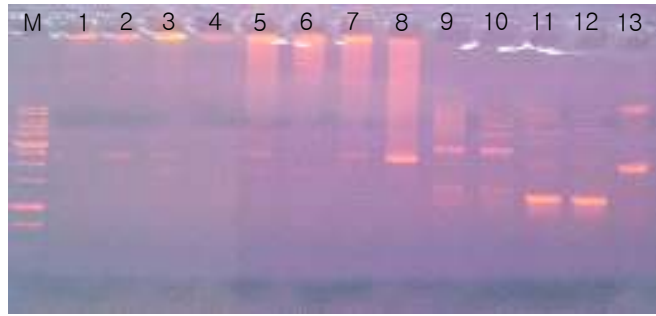


Fig. 36. Detection of EHV-1 plasmid DNA. M: DNA size marker; lane 1~8: EHV1 plasmid DNA; lane 9~10: EHV1 ligation mixture; lane 11~12: EHV-4 ligation mixture; lane 13: pQE30.

#### 6) EHV-1 IPTG 유도

M15 균주에 삽입하여 발현을 유도시킨 결과, 총 7개의 colony에서 정도의 차이는 있으나 모두 gP를 발현하여, 결과적으로 약 50kD에서 발현 전 후의 양상이 다르게 나타나는 것이 확인되었다. 전기영동상에서 발현정도를 확인한 후 western blot을 통해 단백질 발현을 확인하였다.

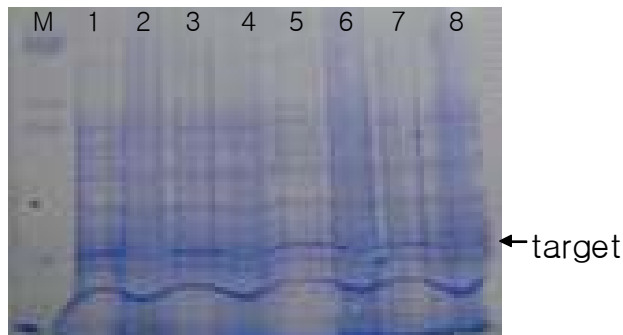


Fig. 37. SDS-PAGE analysis of expressed pQE30 clone EHV-1 gD. Recombinant EHV-1 gD generated in transformed *E. coli* cells was separated on SDS- 10 % acrylamide gels. Lane M; marker; lane 1,3,5,7; EHV1 의 각 colony IPTG 발현유도 (E1-1,E1-2,E1-3,E1-4); lane 2,4,6,8: no IPTG (E1-1,E1-2,E1-3,E1-4).

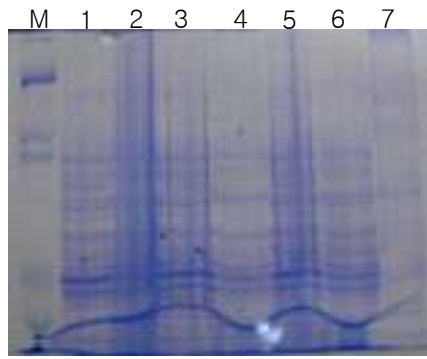


Fig. 38. SDS-PAGE analysis of expressed pQE30 clone EHV-1 gD. Recombinant EHV-1 gD generated in transformed *E. coli* cells was separated on SDS- 10 % acrylamide gels. Lane M; marker; lane 1,3,5,7; EHV1 의 각 colony IPTG 발현유도 (E1-5,E1-6,E1-7); lane 2,4,6,8: no IPTG (E1-5,E1-6,E1-7).

#### 7) Western blot

12% acrylamide gels을 이용하여 전기영동하여 발현여부를 확인한 뒤, EHV-1 및 ,EHV-4에 대하여 항체양성인 말혈청을 이용하여 Western blot assay를 실시하였다. 전기영동 시료는 IPTG유도 전후로 구분한 쌍으로 맞추어 비교하였다. EHV-1의 western blot은 50 kDa에서 IPTG발현 유무에 따라서 발현의 정도는 달랐으나, 8개의 EHV-1 gD의 gene이 삽입되어 단백질 발현을 확인하였다.

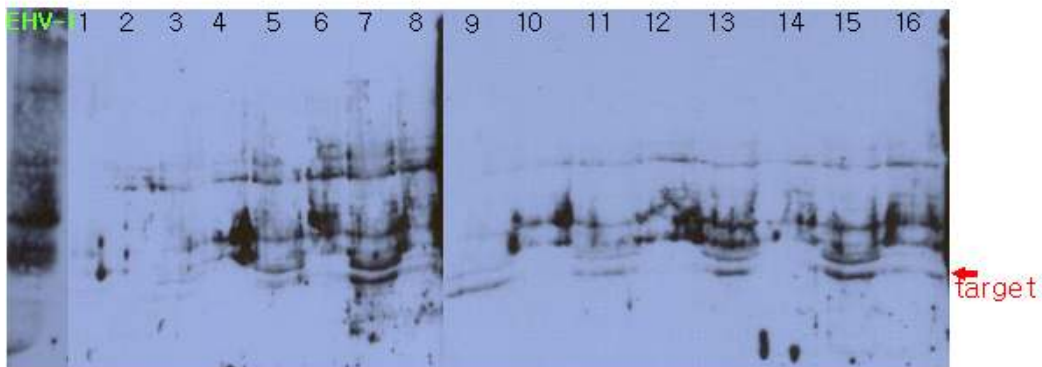


Fig. 39. Western blot analysis of expressed pQE30 clone EHV-1 gD. EHV-1 gD were electrophoresed through a 10% polyacrylamide gel, and the separated proteins



were transferred to nitrocellulose. Membrane bound EHV- positive serum, secondary antibody was rabbit anti- horse IgG. Target size was 50kDa. Lane 1: E1 (IPTG); lane 2: E1 (NO IPTG); lane 3: E1-2 (IPTG); lane 4: E1-2 (NO IPTG); lane 5: E1-3 (IPTG); lane 6: E1-3 (NO IPTG); lane 7: E1-4 (IPTG); lane 8: E1-4 (NO IPTG); lane 9: E1-5 (IPTG); lane 10: E1-5 (NO IPTG); lane 11: E1-6 (IPTG); lane 12: E1-6 (NO IPTG); lane 13: E1-7 (IPTG); lane 14: E1-7 (NO IPTG); lane 15: E1-8 (IPTG); lane 16: E1-8 (NO IPTG).

#### 나. EHV-4 gD cloning

##### 1) EHV-4 gD gene 확인

본 연구에 사용된 EHV-4 gD의 annealing온도는 각각 53°C, 53.7°C, 54.4°C, 55.8°C, 57.4°C, 59.1°C, 60.8°C, 62.5°C, 64.2°C, 65.6°C, 66.3°C, 67°C로 구분하여 실험을 한 결과 최적 annealing 온도는 64.2°C로 1210 bp부분에서 제일 진한 밴드를 확인하였다. 다른 조건이 경우보다 더 선명하고 산물의 양이 많았기 때문에 이 온도를 적정조건으로 판단하였다.

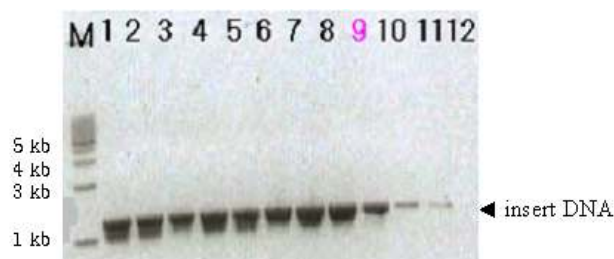


Fig. 40. Optimal annealing temperature of gD PCR. EHV-4 gD was detected 1210 bp size. lane M, 1 kbp DNA size ladder marker; lane 1, Annealing temperature of lane 1 was 53°C; lane 2 was 53.7°C; lane 3 was 54.4°C; lane 4 was 55.8°C; lane 5 was 57.4°C lane 6 was 59.1°C; lane 7 was 60.8°C; lane 8 was 62.5°C; lane 9 was 64.2°C lane 10 was 65.6°C; lane 11 was 66.3°C lane 12 was 67°C.

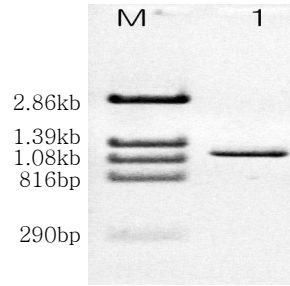


Fig. 41. EHV-4의 PCR product. EHV-4 gD was detected 1210 bp size. Lane M : PS44 DNA size Marker; Lane 1 : EHV-4의 PCR product.

### 2) EHV-4 클로닝 후 PCR 확인

생성된 colony에서 clone을 선별하기 위하여 specific primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. Colony를 용균시켜 template로 사용하여 PCR을 수행하였으며 이를 전기영동으로 확인하였다. 각각의 바이러스를 발현 벡터를 이용하여 클로닝 한 결과 pQE30발현 벡터에서 15개의 clone에서 모두 밴드가 확인되었으나, pQEGFP에서는 밴드가 확인되지 않았다.



Fig. 42. EHV-4 gD clone screening using PCR. M: DNA size marker; lane 1~15: EHV-1 gD; lane 16: EHV-4 PCR product.

### 3) 클로닝 후 EHV-4 plasmid DNA 확인

gD가 발현벡터에 삽입되었는지의 여부를, gD가 삽입된 EHV-4 plasmid DNA 전기영동을 통하여 확인하였다. 총14개의 clone중에서 lane 1,2,5,6,7,8,9,10,11,12인 10개의 clone에서 벡터보다 윗부분에서 밴드가 확인되었으므로 클로닝이 성공적으로 수행되었음을 확

인하였다. EHV-4에서도 클로닝 plasmid 확인 결과 lane1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12에서 벡터보다 상부에서 밴드가 확인되었다.



Fig. 43. Detection of EHV-4 plasmid DNA. M: DNA size marker; lane 1~14: EHV-4 plasmid DNA; lane 15: pQE30.

#### 4) EHV-4 IPTG 유도

M15 균주에 삽입하여 발현을 유도한 결과, 총 5개의 clone에서 발현의 정도의 차이는 있으나 5개 모두 약 45kD에서 모두 밴드가 확인이 되었으며, EHV-4의 경우는 전기영동상에서 보다 뚜렷한 밴드가 확인되었다. 전기영동상에서 발현정도를 확인한 후 western blot을 통해 단백 발현을 확인하였다.

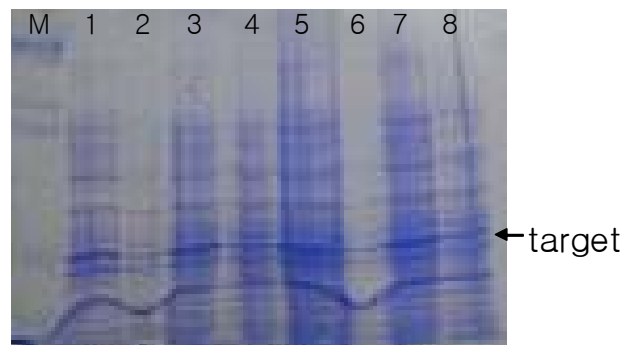


Fig. 44. SDS-PAGE analysis of expressed pQE30 clone EHV-4 gD. Recombinant EHV-4 gD generated in transformed *E. coli* cells was separated on SDS- 10 % acrylamide gels. Lane 1, 3, 5, 7: EHV4 의 각 colony IPTG 발현유도(E4-1, E4-3, E4-4, E4-5); lane 2,4,6,8: no IPTG (E4-1,E4-3,E4-4,E4-5).

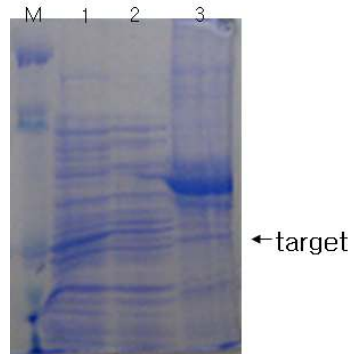


Fig. 45. SDS-PAGE analysis of expressed pQE30 clone EHV-4 gD. Recombinant EHV-4 gD generated in transformed *E. coli* cells was separated on SDS- 10 % acrylamide gels. Lane 1: EHV4 colony IPTG 발현유도 (E4-2); lane 2: no IPTG (E4-2); lane 3: EHV-4.

#### 5) Western blot

Western blot assay를 위하여 12% acrylamide gels을 이용하여 전기영동하여 발현 여부를 확인한 뒤, EHV-1과 EHV-4에 대하여 항체양성인 말혈청을 이용하였다. 전기영동 시료는 IPTG유도 전 후로 구분한 쌍으로 맞추어 비교하였다. EHV-4에 대한 western blot의 결과는 EHV-1에 비하여 상대적으로 단백 발현이 진하게 나타났으며, 45 kDa부분에서 발현 단백질이 확인되었다. IPTG발현 유무에 발현의 정도는 달랐으나, 7개의 EHV-4 gD의 gene이 삽입되어 단백질 발현을 확인하였다.

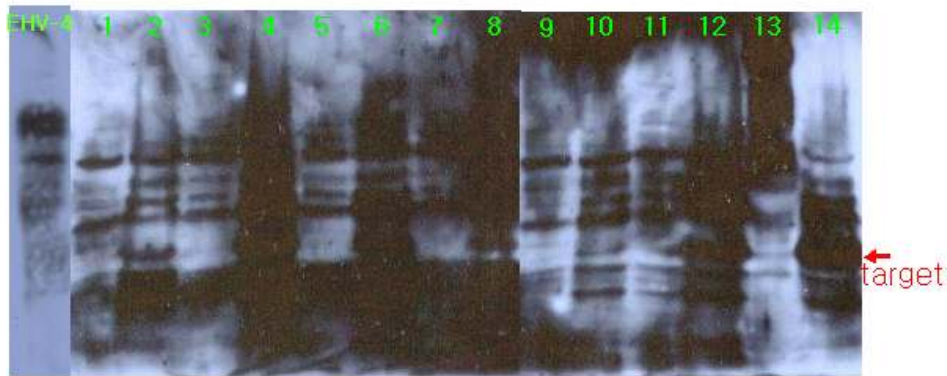


Fig. 46. Western blot analysis of expressed pQE30 clone EHV-4 gD. EHV-4 gD were electrophoresed through a 10% polyacrylamide gel, and the separated proteins were transferred to nitrocellulose. Membrane bound EHV- positive serum, secondary antibody was rabbit anti- horse IgG. Target size was 45kDa. Lane 1: E4 (IPTG); lane 2: E4 (NO IPTG); lane 3: E4-2 (IPTG); lane 4: E4-2 (NO IPTG); lane 5: E4-3 (IPTG); lane 6: E4-3 (NO IPTG); lane 7: E4-4 (IPTG); lane 8: E4-4 (NO IPTG); lane 9: E4-5 (IPTG); lane 10: E4-5 (NO IPTG); lane 11: E4-6 (IPTG); lane 12: E4-6 (NO IPTG); lane 13: E4-7 (IPTG); lane 14: E4-7 (NO IPTG).

다. EHV-1, 및 -4 sequencing

1) EHV-1 sequencing

PCR 및 sequencing 후 비교한 결과는 유사산된 자마로부터 분리된 바이러스의 염기서열은 각각 다른 바이러스 주와의 비교할 때 100%에서 99%의 상동성을 보였다 (Table 17). 또한, cloning된 EHV-1의 sequence는 AY464052주와 비교한 결과 C의 좌가 T로 변이되어, AY464052주와 비교할 때 99 %의 homology를 보였다 (Fig. 47).

Table. 17. Homology analysis of Equine herpesvirus glycoprotein D gene

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

Query 13 ATGCCTGCTGTGCTGCTTGTACTGTATGTTAACCCGCCCCCGAGCGTCTGTATATTA ACT 72  
 Sbjct 131115 ATGCCTGCTGTGCTGCTTGTACTGTATGTTAACCCGCCCCCGAGCGTCTGTATATTA ACT 131174  
 Query 73 CAAAAATTATCCCTTGGCCTTTACAACCAAGTGGTGGCGTGTATGCAGAAGCGTGCCACCG 132  
 Sbjct 131175 CAAAAATTATCCCTTGGCCTTTACAACCAAGTGGTGGCGTGTATGCAGAAGCGTGCCACCG 131234  
 Query 133 CCCTGGTACGTGTTTTCAATAAACGAAGCATGTCTACCTTCAAGCTTATGATGGATGGA 192  
 Sbjct 131235 CCCTGGTACGTGTTTTCAATAAACGAAGCATGTCTACCTTCAAGCTTATGATGGATGGA 131294  
 Query 193 CGTTTTGGTTTTTGGCATGGCAATCGCGATCTTGAGCGTTGTGCTCTCTTGTGGAACATGC 252  
 Sbjct 131295 CGTTTTGGTTTTTGGCATGGCAATCGCGATCTTGAGCGTTGTGCTCTCTTGTGGAACATGC 131354  
 Query 253 GAGAAAGCCAAGCGTGGCGTTCCGAGGACGCCAGGATAGGCCAAAAGGAGTTCCACCACCC 312  
 Sbjct 131355 GAGAAAGCCAAGCGTGGCGTTCCGAGGACGCCAGGATAGGCCAAAAGGAGTTCCACCACCC 131414  
 Query 313 CGCTATAACTATAACAATTTTAAACAAGATACAACGCGACTGCGCTAGCATCACCGTTTATT 372  
 Sbjct 131415 CGCTATAACTATAACAATTTTAAACAAGATACAACGCGACTGCGCTAGCATCACCGTTTATT 131474  
 Query 373 AACGACCAAGTAAAAAATGTTGACTTGGCGATTGTTACTGCTACGCGCCCATGTGAAATG 432  
 Sbjct 131475 AACGACCAAGTAAAAAATGTTGACTTGGCGATTGTTACTGCTACGCGCCCATGTGAAATG 131534  
 Query 433 ATAGCGCTGATCGCTAAGACAAAACATAGACTCAATCCTGAAGGAGCTGGCCGCTGCCCAA 492  
 Sbjct 131535 ATAGCGCTGATCGCTAAGACAAAACATAGACTCAATCCTGAAGGAGCTGGCCGCTGCCCAA 131594  
 Query 493 AAAACTTATTCGGCCAGACTCACCTGGTTTTAAAAATTATGCCAACGTGTGCAACGCCTATA 552  
 Sbjct 131595 AAAACTTATTCGGCCAGACTCACCTGGTTTTAAAAATTATGCCAACGTGTGCAACGCCTATA 131654  
 Query 553 CACGATGTTAGTTATATGAAATGCAACCCGAAGCTATCATTGCAATGTGTGATGAGAGA 612  
 Sbjct 131655 CACGATGTTAGTTATATGAAATGCAACCCGAAGCTATCATTGCAATGTGTGATGAGAGA 131714  
 Query 613 TCAGACATACTATGGCAAGCTAGTTTAACTACTATGGCTGCTGAAACTGACGATGAACCT 672  
 Sbjct 131715 TCAGACATACTATGGCAAGCTAGTTTAACTACTATGGCTGCTGAAACTGACGATGAACCT 131774  
 Query 673 GGACTTGTACTGGCAGCCCTGCACATTCTGCCTCGGGACTGTATCGCCGTGTTATAGAA 732  
 Sbjct 131775 GGACTTGTACTGGCAGCCCTGCACATTCTGCCTCGGGACTGTATCGCCGTGTTATAGAA 131834  
 Query 733 ATCGACGGAAGGCGAATTTACACGGACTTTTTCTGTAACCTATCCAGTGAACGGTGTCCG 792  
 Sbjct 131835 ATCGACGGAAGGCGAATTTACACGGACTTTTTCTGTAACCTATCCAGTGAACGGTGTCCG 131894  
 Query 793 ATTGCCCTTTGAGCAAAAACTTTGGCAATCCGGATCGGTGTA AAAACTCCAGAGCAGTACTCG 852  
 Sbjct 131895 ATTGCCCTTTGAGCAAAAACTTTGGCAATCCGGATCGGTGTA AAAACTCCAGAGCAGTACTCG 131954  
 Query 853 CGGGGAGAAGTTTTTACACGTGGTTTTCTTGGTGAATTC AACTTCCACAAAGGAGAGCAT 912  
 Sbjct 131955 CGGGGAGAAGTTTTTACACGTGGTTTTCTTGGTGAATTC AACTTCCACAAAGGAGAGCAT 132014  
 Query 913 ATGACATGGTTGAAGTTCTGGTTCGTCTACGATGGTGGAAAACCTACCAGTGCAGTTTTAT 972  
 Sbjct 132015 ATGACATGGTTGAAGTTCTGGTTCGTCTACGATGGTGGAAAACCTACCAGTGCAGTTTTAT 132074  
 Query 973 GAAGCCCAGGCATTGCAAGACCCCGTGCCTCCGGATAACCAACCTGGATTTGATTCTGTT 1032  
 Sbjct 132075 GAAGCCCAGGCATTGCAAGACCCCGTGCCTCCGGATAACCAACCTGGATTTGATTCTGTT 132134  
 Query 1033 GAGTCGGAGATTACACAAAATAAAAACAGACCCGAAACCAAGGCCAGGCGGACCCCAAACCC 1092  
 Sbjct 132135 GAGTCGGAGATTACACAAAATAAAAACAGACCCGAAACCAAGGCCAGGCGGACCCCAAACCC 132194  
 Query 1093 AATCAGCCTTTTAAAGTGGCCAGCATCAAACACTTGGCCCAAGACTCGATGAGGTGGAT 1152  
 Sbjct 132195 AATCAGCCTTTTAAAGTGGCCAGCATCAAACACTTGGCCCAAGACTCGATGAGGTGGAT 132254  
 Query 1153 GAGGTCATAGAGCCCGTAACAAAAGCCCTAAAAACGTCTAAGAGCAACTCTACGTTTGTG 1212  
 Sbjct 132255 GAGGTCATAGAGCCCGTAACAAAAGCCCTAAAAACGTCTAAGAGCAACTCTACGTTTGTG 132314  
 Query 1213 GGCATCAGCGTCGGTTTTGGGATCGCCGGCTAGTATTGGTGGGCGTCATTCTATACGTC 1272  
 Sbjct 132315 GGCATCAGCGTCGGTTTTGGGATCGCCGGCTAGTATTGGTGGGCGTCATTCTATACGTC 132374  
 Query 1273 TGC TTGCGTCGGAAGAAGGAAGTGA AAAAGTCTGCACAGAACGGCTTGACTCGCCTACGC 1332  
 Sbjct 132375 TGC TTGCGTCGGAAGAAGGAAGTGA AAAAGTCTGCACAGAACGGCTTGACTCGCCTACGC 132434  
 Query 1333 TCGACCTTTAAGGATGTTAAATATACCCAGCTTCCG 1368  
 Sbjct 132435 TCGACCTTTAAGGATGTTAAATATACCCAGCTTCCG 132470

Fig. 47. Blast search of pBX-EHV-1 gD clone.

## 2) EHV-4 sequencing

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

NCBI의 blast를 이용하여 pBXII-EHV-4유전자의 염기서열을 분석한 결과 equine herpesvirus 4 EHV-4 (Accession no. S65633.1)의 유전자와 99%의 상동성을 가지는 것으로 확인되었다. 879 bp 위치에서 T의 좌가 A로 변이되어, one point mutation이 일어난 것으로 판단하였다 (Fig. 48).



```

Query 7 ATGTCTACCTTCAAGCCTATGATGAACGGATGTTTGGTGTTTGC GGCTATTATAACGCTC 66
Sbjct 292 ATGTCTACCTTCAAGCCTATGATGAACGGATGTTTGGTGTTTGC GGCTATTATAACGCTC 351
Query 67 TTGAGTTTTATGCTATCTCTGGGAACATGCGAAAAATTACAGGCGTGTGGTTCGGGGGAAC 126
Sbjct 352 TTGAGTTTTATGCTATCTCTGGGAACATGCGAAAAATTACAGGCGTGTGGTTCGGGGGAAC 411
Query 127 CAAAATCAGCGACCCGAGTTTCCACCAACCCCGATACAACCTTACAATTGTGACAACATAC 186
Sbjct 412 CAAAATCAGCGACCCGAGTTTCCACCAACCCCGATACAACCTTACAATTGTGACAACATAC 471
Query 187 AATGAAACGTCGCTACCATCACCGTTTTATTAACGACCAAGTAAAAATTGTTGACGTTCCA 246
Sbjct 472 AATGAAACGTCGCTACCATCACCGTTTTATTAACGACCAAGTAAAAATTGTTGACGTTCCA 531
Query 247 ACCGTGGCTGCTACACGCCCATGTGAAATGATAGCGCTGATTGCAAAAAACAACGTAGAC 306
Sbjct 532 ACCGTGGCTGCTACACGCCCATGTGAAATGATAGCGCTGATTGCAAAAAACAACGTAGAC 591
Query 307 TCAATTATAAAAAGAGCTAGATGCTGCCACAAAAACATATCCGCAAGACTGACTTGGTTT 366
Sbjct 592 TCAATTATAAAAAGAGCTAGATGCTGCCACAAAAACATATCCGCAAGACTGACTTGGTTT 651
Query 367 AAAATTACGCCAACATGCGCAACGCCAATCCATGATGTTGTTTATATGAAATGCAATCCA 426
Sbjct 652 AAAATTACGCCAACATGCGCAACGCCAATCCATGATGTTGTTTATATGAAATGCAATCCA 711
Query 427 AAGTTATATTTTGAATGTGTGATGAGCGATCAAATATATTATGGCTCAATAGTTTGATT 486
Sbjct 712 AAGTTATATTTTGAATGTGTGATGAGCGATCAAATATATTATGGCTCAATAGTTTGATT 771
Query 487 ACAACTGCTGCGGAGACAGACGACGAACCTGGACTTGATTTGGCCTCCCCTGCCCATAGC 546
Sbjct 772 ACAACTGCTGCGGAGACAGACGACGAACCTGGACTTGATTTGGCCTCCCCTGCCCATAGC 831
Query 547 TACTCTGGACTGTATAGGCGCGTTATACAAATTGATGGAAGGCGAATTTATACAGACTTT 606
Sbjct 832 TACTCTGGACTGTATAGGCGCGTTATACAAATTGATGGAAGGCGAATTTATACAGACTTT 891
Query 607 TCCGTAACAATCCGAGCAGCCATTGTCCGCTTCTTTTGGAGCAGAACTTTGGTAATCCT 666
Sbjct 892 TCCGTAACAATCCGAGCAGCCATTGTCCGCTTCTTTTGGAGCAGAACTTTGGTAATCCT 951
Query 667 GATCGCTGTAAAACCTCCTGAGCAATACTCGCGGGGTGAAGTATATACAAGTCGTTTTCTC 726
Sbjct 952 GATCGCTGTAAAACCTCCTGAGCAATACTCGCGGGGTGAAGTATATACAAGTCGTTTTCTC 1011
Query 727 AGTGAATTCAACTACAGACAAGGTGTACATTTAGCATGGGTAAAACACTGGTTTGTGCAA 786
Sbjct 1012 AGTGAATTCAACTACAGACAAGGTGTACATTTAGCATGGGTAAAACACTGGTTTGTGCAA 1071
Query 787 GATGGTGGAAACCTTCCAGTACAGTTTTACGAAGCCCAGGCGTTTGAAGACCAGTACCA 846
Sbjct 1072 GATGGTGGAAACCTTCCAGTACAGTTTTACGAAGCCCAGGCGTTTGAAGACCAGTACCA 1131
Query 847 CCGGATAATCACCCAGGATTTGATTCGGTTCGAATCGGATATAACACAAAAATAAAACAAAC 906
Sbjct 1132 CCGGATAATCACCCAGGATTTGATTCGGTTCGAATCGGATAAACAACAAAAATAAAACAAAC 1191
Query 907 CCAAAGCAAGAACAGGCAAGTCCAAAACCCAATCCACCATTTAAGTGGCCCAAGTATAAAA 966
Sbjct 1192 CCAAAGCAAGAACAGGCAAGTCCAAAACCCAATCCACCATTTAAGTGGCCCAAGTATAAAA 1251
Query 967 CAATTGGCCCCAAGAATCGATGAGGTGGATAATGCCAAAGAAATCACCACaaaaaaCCA 1026
Sbjct 1252 CAATTGGCCCCAAGAATCGATGAGGTGGATAATGCCAAAGAAATCACCACAAAAAAACCA 1311
Query 1027 CCAGCGTCTAATAGCAACTCTACGTTTTATTGGAGTTGTTATTGGTTTGGGTGTTGTTGGC 1086
Sbjct 1312 CCAGCGTCTAATAGCAACTCTACGTTTTATTGGAGTTGTTATTGGTTTGGGTGTTGTTGGC 1371
Query 1087 TTGATATCAGTTGGAGCAATTTTATACGTTTGTGGCGTCGAAGAAAAGTCACAGAACAAG 1146
Sbjct 1372 TTGATATCAGTTGGAGCAATTTTATACGTTTGTGGCGTCGAAGAAAAGTCACAGAACAAG 1431
Query 1147 TCTGaaaaaaTG GCTCACCTAGCCTACGCTCTACCTTAAAGGATGTCAAATATACTCAG 1206
Sbjct 1432 TCTGAAAAAATGGCTCACCTAGCCTACGCTCTACCTTAAAGGATGTCAAATATACTCAG 1491
Query 1207 CTTCCGTAA 1215
Sbjct 1492 CTTCCGTAA 1500

```

Fig. 48. Blast search of pBX II EHV-4 gD clone.

5. EHV-3의 국내최초 보고

가. 실험마에서의 항체수준

EHV-3 에 의한 임상증상과 항체가의 관계를 알아보기 위하여 Table 18과 같이 144두의 항체양성율을 ELISA로 조사하였다. 임상증상이 양성인 마필에서의 항체양성인 개체는 43두로 59.7 %(43/72)로 나타내었으며, 항체 음성인 개체는 29두로 40.2 %(29/72)를 나타내었다. 임상증상이 음성이면서 양성인 말은 13.9 %(10/72)였고 임상증상과 OD값이 모두 음성인 말은 62두였다.

Table 18. Comparion of clinical sign and ELISA OD value.

		Clinical sign		
		Positive	Negative	Subtotal
ELISA	Positive	43	10	53
	Negative	29	62	91
	Subtotal	72	72	144

EHV-3에 노출된 씨암말과 망아지에서의 항체전이를 알아보기 위하여 임상증상을 나타내는 12두의 씨암말과 그 포유망아지에서의 항체를 조사하였다. 모든 경우에서 씨암말의 항체가가 포유망아지의 그것보다 높았고, 씨암말의 항체가가 높은 경우 포유망아지도 그에 비례하여 높아지는 경향을 보였다. 임상증상을 보였던 씨암말과 그의 망아지에서의 혈중 항체가와는 상관관계( $y=0.5418x-0.0158$   $R^2=0.4931$ )를 보여 씨암말의 감염에 따른 특이항체전이가 있었음을 짐작할 수 있었다.

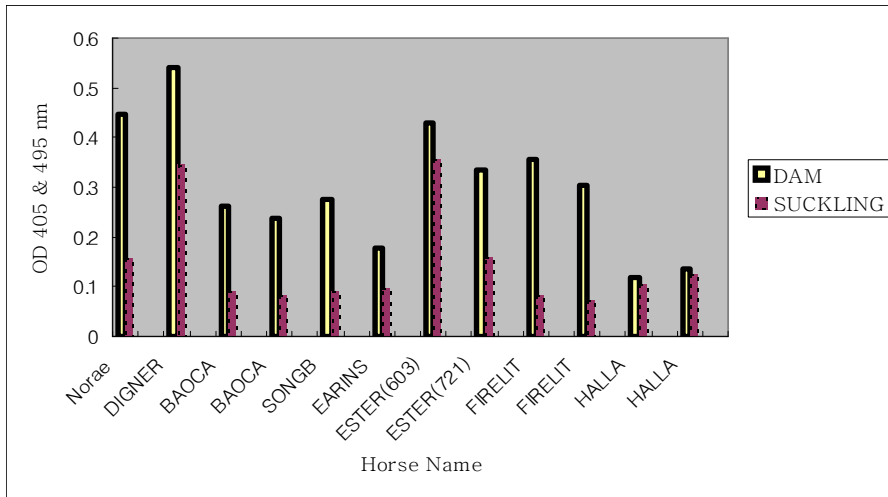


Fig. 49. Antibody titer against EHV-3 in dam and her suckling.

EHV-3의 감염과 항체지속기간: 19두의 씨수말, 씨암말 및 포유망아지를 대상으로 발병 시기였던 4월과 5월에 1차 채혈을 하였고 11월에 2차 채혈을 하여 항체가를 측정하여 6개월이 지나도 대부분 항체가 지속적으로 존재하는 것을 확인하였다.

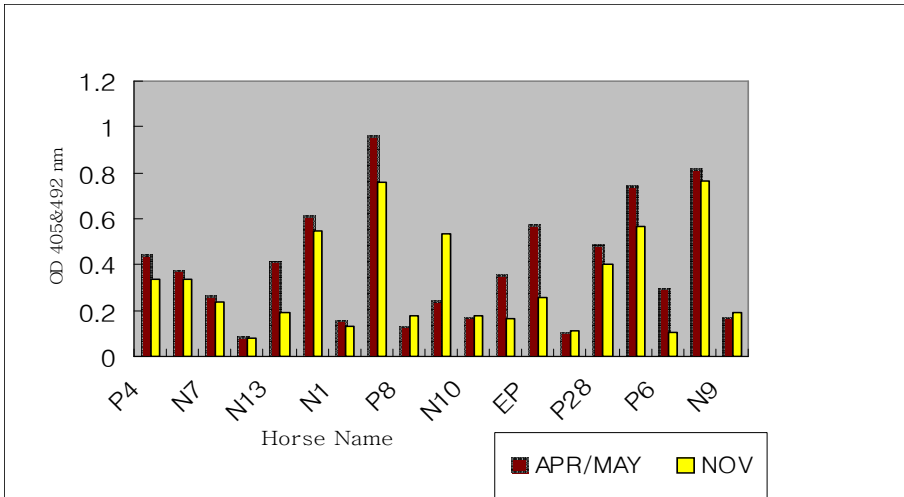


Fig. 50. Antibody titer against EHV-3 checked on APR/MAY and NOV in affected horses.

또한, 교배에 의한 전파원으로서의 알려져 있는 수말(씨수말 및 시정마)의 임상검사, PCR 검사 및 ELISA 검사결과를 Table 19에 나타내었다. 한국마사회 씨수말 2두에서 PCR의 결과와 ELISA 결과는 비례하였다. 민간 씨수말 2두에서는 임상증상이 한국마사회의 씨수말과 비교하여 심하였고 항체가도 높았다. 한편, 시정마를 검사하였을 때 임상증상은 발견되지 않았으나, 비강에서 바이러스가 검출되었으며, 항체는 음성으로 나타났다.

Table 19. ECE clinical signs, PCR result and ELISA titers in male horses

Males	Clinical signs*	P C R†			E L I S A‡	
		EHV-1	EHV-4	EHV-3	(APR ~ MAY)	(NOV)
KS I	+++	-	-	++++	++++	+++
KS II	+++	-	-	+++	++	-
PS I	++++				++++	+++
PS II	++++				+++	++
TS	-			+	-	-

KS= Korea Racing Association stallion, PS= Private stud stallion, TS=teaser.

\*Clinical sign (-: negative, +: mild, ++: moderate, +++: severe, ++++: very severe), † PCR (-: negative, +: mild bright, ++: moderate bright, +++: very bright, very very bright), ‡ELISA(OD value) (-: <0.334, +:0.334 ~0.400 ++:>0.400, +++: >0.600, ++++: >0.800)

나. EHV-3의 감염과 항체지속기간

한편, 임상증상을 보이는 말에서 PCR 결과와 ELISA 결과가 모두 일치하지는 않았다. 4월과 5월에 1차 채혈을 한 말의 ELISA OD값이 양성인 말이 2차 채혈 때인 11월에는 음성인 말도 있었고 1차 채혈 때 음성인 말이 2차 때에는 양성인 경우도 있었으며 1, 2차 모두에서 음성인 말도 관찰됐다.

임상증상을 보이는 씨암말을 대상으로 EHV-1, 4,3 항원 검출을 위한 PCR 및 ELISA를 통한 항체를 조사하여 아래 Table에 나타내었다. PCR 양성이며 항체양성인 개체가 12두였으며 이중 2두(26, 28번마)는 교미시점과 6개월 후에 항체를 유지하는 동시에, PCR 항원 양성을 보였다. PCR 양성으로서 항체음성을 보인 경우는 7두로 나타났다. 한편 EHV-3로 의심되는 임상증상을 보이며 PCR에 의한 바이러스항원이 검출되지 않는 경우도 15두가 있었으며 이중 항체 양성인 말이 2두였다.

Table 20. ECE clinical signs, PCR result and ELISA titers in broodmares

Broodmares	Clinical signs	P C R(APR~MAY)			E L I S A	
		EHV-1	EHV-4	EHV-3	(APR~MAY)	(NOV)
1	++	-	-	++	-	-
2	++++	-	-	++++	-	-
3	+++			+++	+++	
4	++			++	++	
6	++			++	-	-
7	++			+++		++
8	++			++	-	-
9	++			+++	-	+
11	++			+++		++
12	++			++		+++
13	++			++	-	++
14	++			++		+++
15	+++			++	-	
24	+++			++	+++	
25	++			++		-
26	++			++	+++	++
27	++	-	-	++	++	
28	++++			++	++	++
29	++++	-	-	++++		-
30	++			-	-	-
31	++			-		-
32	++			-		
33	++			-	-	-
34	++			-	-	
35	++			-	-	-
36	++	-	-	-	-	-
37	++	-	-	-	-	
38	++			-	-	-
39	++	-	-	-	-	-
40	++			-		++++
41	++			-		
42	+++	-	-	-	++	-
43	+			-		
44	+			-	-	-
45	+			-		

\*Clinical sign (-: negative, +: mild, ++: moderate, +++: severe, ++++: very severe), † PCR (-: negative, +: mild bright, ++: moderate bright, +++: very bright, very very bright), ‡ELISA(OD value) (-: <0.334, +:0.334 ~0.400 ++:>0.400, +++: >0.600, ++++: >0.800)

다. PCR 검사와 비교한 ELISA의 민감도 및 특이도

PCR의 양성결과 중 ELISA에서도 양성인 말은 13두로써 민감도는 65.0 %(13/20)를 나타내었고 PCR 음성결과 중 ELISA에서도 음성인 말은 9두로서 특이도는 81.8 %(9/11)를 나타내었다.

Table 21. Comparison of PCR and ELISA

		PCR		Subtotal
		Positive	Negative	
ELISA	Positive	13	2	15
	Negative	7	9	16
	Subtotal	20	11	31

#### 라. EHV3 원인 바이러스 분리 및 임상소견

본 과제의 수행 중, 제주경주마목장의 씨수말 2두에서 EHV 3에 의한 말구진(Equine coital exanthema)과 유사한 임상증상이 발현되었으며, 이는 임상증상과 PCR 분석에 의하여 EHV 3의 감염으로 확인되었다. 또한, 이를 대상으로 바이러스의 분리를 시도하였다. 임상증상은 그림 및 표에 정리된 바와 같이 같이 귀두, 요도구, 음경체 및 포피에 수포, 농포, 궤양 및 가피 등의 증상이 발현하였다. 또한, 감염된 씨암말 1두에서의 증상으로는 회음부, 음순 및 점막피부접합부에서 병변을 관찰되었으며, 증상이 소멸된 후에 탈색반점을 관찰하였으나, 유두, 복부 및 양후지에서는 임상증상을 관찰되지 않았다.

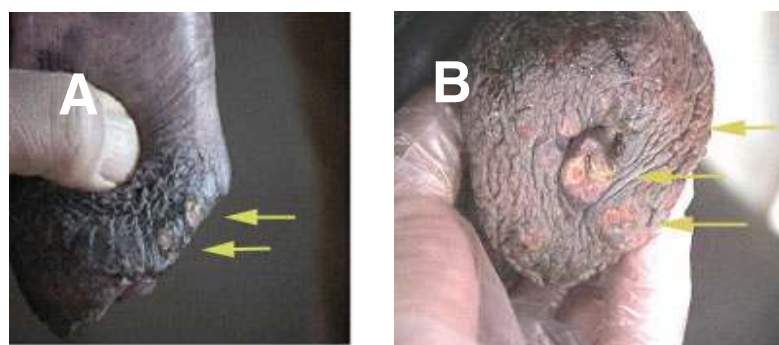


Fig. 51. Coital exanthema at a penis of a Thoroughbred stallion KSI, showing the pustules particularly in the area of the glans. A: Ulcers on glans penis. B: Pustules on urethral process and glans penis.



Fig. 52. Coital exanthema lesions on a penis of a Thoroughbred stallion KSII. A: Scabs on glans penis, body of penis and prepuce. B: Ulcers around preputial ring. C: Pustules on urethral process.

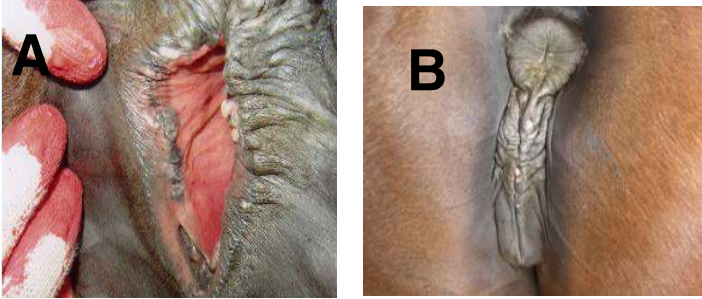


Fig. 53. Coital exanthema lesions on vulva of a Thoroughbred broodmares. A: Early stage of ECE, B: Late stage of ECE.

Table 22. Clinical signs of Thoroughbred stallions affected with equine herpesvirus type 3

Symbol of stallions	Sites	Vesicles	Pustules	Scabs	Ulcers	Edema	White spots
KS I	Glans	+	+	+	+	+	+
	Penis	+	+	+	+	-	+
	Prepuce	+	+	+	+	+	+
	Scrotum	-	-	-	-	+	-
	Hind limbs	-	-	-	-	-	-
KS II	Glans	++	++	++	++	++	++
	Penis	++	++	++	++	-	++
	Prepuce	++	++	++	++	-	++
	Scrotum	-	-	-	-	-	-
	Hind limbs	-	-	-	-	-	-

-: no lesions, + mild, ++: moderate, +++: severe

Table 23. Clinical signs of Thoroughbred broodmares affected with equine herpesvirus type 3

Sites	Vesicles	Pustules	Scabs	Ulcers	Edema	White spots
Perineal region	+	+	+	+	-	+
Vulva	+	+	+	+	+	+
Mucocutaneous junction	++	++	++	++	++	++
Outer Vagina	+	+	+	+	+	+
Inner Vagina	-	-	-	+	+	-
Clitoral fossa	-	-	-	-	-	-
Udder	-	-	-	-	-	-
Hind Limbs	-	-	-	-	-	-
Abdomen	-	-	-	-	-	-

- : No sign detected, + : under 5 horses, ++ : 5~ 24 horses, +++ : over 25 horses



마. 가검물의 EHV-3 PCR 분석

EHV-3의 gG gene을 확인하기 위해 1쌍의 primer를(Hartley 등, 1999) 사용하여 PCR 검사를 한 결과, 518 bp의 PCR 산물을 확인할 수 있었다 (Fig. 54).

Primer	Sequence	Orientation
P1 (792-812)	GCGTCTCTCGGCCTTGCCAG	Sense
P2 (1,309-1,290)	GCGTCTCGAAAAGCGAGAG	Antisense

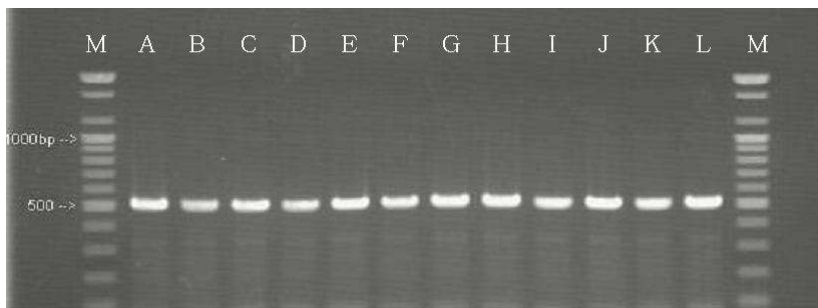


Fig. 54. Amplified PCR products of EHV-3 gG gene from field specimens. M : Molecular weight marker(100bp DNA Ladder), Lane A-L: Field samples.

gpG단백의 염기분석: 국내분리 EHV-3 주(Georo strain으로 명명함)의 gG 특정부위에 대한 염기서열은 EHV334/74주와 비교할 때, 400개의 염기 중 397개와 일치하여 99.25%의 상동성을 보였다.

Georo	1	CAATGAGGCCGATGAGGAGACACACTCCCA	30
334/74	1234	CAATGAGGCCGATGAGGAGACACACTCCCA	1205
Georo	31	AGATGAGAAAGCCGATACCCGCGTAGTTGG	60
334/74	1204	AGATGAGAAAGCCGATACCCGCGTAGTTGG	1175
Georo	61	TCCCCTTCTGCTGTCCGCACTCAGGACCGG	90
334/74	1174	TCCCCTTCTGCTGTCCGCACTCAGGACCGG	1145
Georo	91	ACACGAGAATGCCGCCGGTGTACCACGGAG	120
334/74	1144	ACACGAGAATGCCGCCGGTGTACCACGGAG	1115
Georo	121	ATCCGTCTCCGCGCGCAGGTGCGTCTTGCT	150
334/74	1144	ATCCGTCTCCGTCGGCAGGTGCGTCTTGCT	1115
Georo	151	CGTCGCATCCCGGGGCCGGTGGCGCTGGGG	180
334/74	1084	CGTCGCATCCCGGGGCCGGTGGCGCTGGGG	1085
Georo	181	TTGGCTCGTTATCCCCGTTTTCTCTTCTT	210
334/74	1054	TTGGCTCGTTATCCCCGTTTTCTCTTCTT	1055
Georo	211	CTTTCTCCTCGTCATCGGTGGGAGAAGCGG	240
334/74	1024	CTTTCTCCTCGTCATCGGTGGGAGAAGCGG	1025
Georo	241	GGGTTTTTTCCGAAGGCTTTTTCTTCGGGTT	270
334/74	994	GGGTTTTTTCCGAAGGCTTTTTCTTCGGGTT	965

Georo	271	CTGTTACGTCGGCCGCGGATTCCCTGTCTG	300
334/74	964	CTGTTACGTCGGCCGCGGATTCCCTGTCTG	935
Georo	301	CGCCGCGGGCAGACCCTCTGGAATTTTGCC	330
334/74	934	CGCCGCGGGCAGACCCTCTGGAATTTTGCC	905
Georo	331	<b>T</b> CAGCTGGTTCGTACGT <b>C</b> TCGCCCCGGCAGCA	360
334/74	904	GCAGCTGGTTCGTACGTTTCGCCCCGGCAGCA	875
Georo	361	TGTACCAGCGCTGGCTCAGGATGCGAAGTC	390
334/74	874	TGTACCAGCGCTGGCTCAGGATGCGAAGTC	845
Georo	391	CCAGGGCGCC	400
334/74	844	CCAGGGCGCC	835

Fig. 55. Comparison of the nucleotide sequences of gG gene from Georo strain with those of EHV-3 334/74 strain(Accession number AF081188).

#### 바. 바이러스 배양

RK-13 cell의 EHV-3 시료의 접종하였을 때, 접종 48시간부터 세포변성효과가 나타났으며, 72시간부터는 세포탈락이 시작되었다. 세포를 수확하여 PCR 검사를 수행하였다. 감염된 배양세포는 EHV-3에만 양성이었다

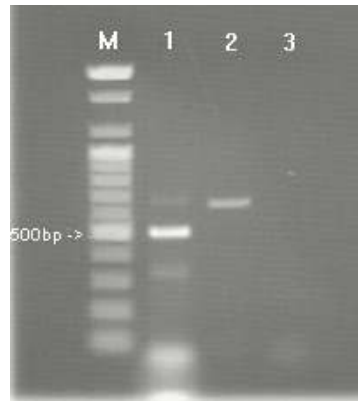


Fig. 56. PCR of EHV-3 gG gene from RK-13 cell inoculated with specimen. lane M: DNA ladder, Lane 1: EHV-3, Lane 2: EHV-1, Lane 3: EHV-4.

사. 전자현미경 관찰

TEM 검경시의 사진은 아래의 그림과 같다. EHV3로 여겨지는 약 150 nm의 particle이 관찰되었으나, 이는 추가적인 확인이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

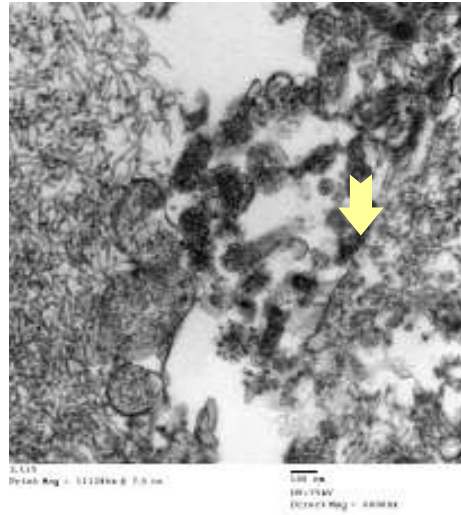


Fig. 57. Transmission electron micrograph of EHV-3(60000X). Scale represents 100 nm.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1절 목표달성도

#### 1. 수지상세포의 표적화

연구 1차년도에 말 수지상세포의 배양법과 PBMC와 수지상세포의 혼합배양법을 실험실에 성공적으로 확립시켰다. 연구 2차년도에 표적화 연구를 위해 수지상세포 표면의 mannose 수용체, Fc 수용체에 대한 연구를 수행하였다. 유세포분석기와 공촛점현미경을 이용해 수지상세포의 표면을 통해 형광물질이 부착된 항원단백이 세포내로 들어가는지를 증명하였다.

#### 2. 항원-표적단백 백신의 개발

연구 2차년도에 표적화단백질을 Fc receptor로 선정하여 Fc conjugate의 제조를 유전자 재조합법을 사용한 fusion protein의 생산, 항체의 Fc part를 EHV에 화학적으로 결합시킨 백신후보물질의 생산을 연구하였다. 또한 이와 관련된 *in vitro* 면역시험법의 최적조건을 수립하였다. 연구 3차년도에 *in vivo* 면역실험을 위해 백신후보물질을 마우스에 접종한 후 항체생성능, cytotoxicity 실험을 성공적으로 실시하여 기존의 백신에 비해 효능이 매우 향상된 백신후보물질을 발굴하였다.

#### 3. EHV 진단 kit 개발

면역학적 진단을 위하여 필수적으로 소요되는 특이항체로서 monoclonal Ab를 개발하였다. 이는 ELISA에 적용하기 위하여 흡착용 capture Ab 및 접합체로서의 detector Ab로 구성되어 EHV-1 및 EHV-4에 특이적인 것이었다. 이를 이용하여 ELISA 및 Immunochromatography 법을 구성하였다. 이러한 면역학적인 진단법을 응용함은 기존에 경험에 의한 육안적인 검사와 임상증상만을 토대로 진단하는 방법에 비하여 매우 정확하고 편리하게 현장에서 응용될 것이다.

한편, E. coli 계에서 얻어진 recombinant gD를 활용한다면, 항체 추이를 검사하기위한 면역학적인 진단법의 필수 소재이나, 상대적으로 정제가 까다롭고 고가인 virus Ag를 대체할 수 있는 물질로 활용될 수 있다.

### 제 2절 관련분야에의 기여도

#### 1. 동물용 백신 제조업체의 생산성향상의 관점에서

가. 고효능 항원을 응용한 고역가 백신제조의 가능

수지상세포의 표적화 단백질을 IgG의 Fc로 결정한 후 Fc 분획의 정제를 실시하고 대량

생산된 바이러스를 사용하여 EHV-Fc 단백 융합체를 제조하고 바이러스를 불활화 하여서 실험에 사용될 바이러스 항원을 제공하였다. EHV-1, EHV-4의 실험실적 배양 조건의 탐색과 대량 배양된 바이러스는 사독백신의 개발뿐만이 아니라 후에 이루어질 진단 Kit의 개발과 차세대 백신의 개발에 기본적인 항원을 제공하였고 개발된 사독백신은 EHV의 확산예방에 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

#### 나. 저농도의 항원으로 고역가 실현

본 연구에서 우수한 백신효능을 보인 EHV Fc conjugate는 기존의 백신인 dead EHV를 이용한 것에 비 약 25배의 저농도 항원을 사용하고도 비슷한 효능을 보였다. 이는 수지상세포를 비롯한 항원제시세포에 항원을 효율적으로 전달하고 항원제시능을 확인했다는 측면에서 향후 다양한 종류의 백신개발에 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

#### 다. 마필대상 생물학적제제 시장의 창출

마필산업은 아직까지 국내 축산업의 비중이 작은 것으로 여겨져 왔기 때문에 마필을 대상으로 예방약이나 진단시약을 고려하지 않았으나, 마필시장의 성장추세를 미루어 볼 때, 작지 않은 시장이 형성될 것으로 판단된다. 일반 축산동물과 달리 마필을 대상으로 적용되는 약제는 매우 고부가가치를 갖는 것으로서, 향후 관련시장에 진출할 시발점으로 서 의의가 있다고 사료된다.

## 2. 마필산업 육성의 관점에서

마필산업은 최근까지도 한국마사회의 수요에 따른 제한된 공급을 위한 육성이 이루어져 왔으나, 경마와 승마 등 문화스포츠 산업의 확대에 따라 마필사육농가의 숫적 질적인 증가가 이루어지고 있다. 바람직한 현상인지 판단하기는 어려우나, 일부지역에서는 마육의 식용으로서 적용하고 있어 마필산업의 수요는 지속적으로 증가하고 있다. 이러한 시점에서 마필의 질병진단과 예방 및 치료를 위한 약제의 국내개발 및 생산이 이루어져야 할 필요성이 대두되고 있으며, 국산화를 통하여 마필산업의 생산성 향상에 필요한 약제를 적시에 염가로 공급하여 마필산업의 육성에 일조할 수 있을 것으로 기대된다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- \* 추가연구의 필요성, 타연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술
- \* 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목적은 변경 가능함

현재 마필농가에서는 EHV에 대한 백신을 접종함에도 불구하고 감염되어 유산 등의 문제를 일으키는 경우가 많다고 한다. 따라서 본 연구를 통해 백신효능이 향상된 것으로 증명된 Fc conjugated EHV-1은 향후 소정의 말을 이용한 임상시험을 실시할 경우 상업용 백신의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

이러한 추가적 연구를 위하여, 제주대학교 수의과대학은 한국마사회와 ‘연구업무 상호협조를 위한 양해각서’를 2008년도 4월에 체결하였으며, 이를 계기로 마사회의 협조를 받아, 참여기업에서 생산한 시제품을 ‘시험마’에 적용하여 임상시험을 실시할 예정이다.

본 과제로 얻어진 결과의 기본골자는 ‘고도면역을 위한 항원의 효율적인 제시’라는 관점에서 볼 때, 현재 사용되고 있는 사독백신의 분야에 적용이 가능할 것으로 사료되며, 더 나아가 생독백신의 단점을 보완해 줄 수 있는 대안으로서 그 적용 범위가 대단히 광범위하다고 사료된다.

이러한 점은 연구 분야에서도 응용범위가 넓다. 본 연구에서 target으로 선정되었던 Fc 수용체는 수지상세포의 표면에 대량으로 발현하며 항원탐식작용을 하면서도 동물 종간의 차이가 크지 않아 백신개발을 위한 일반적인 target으로 사용이 가능할 것으로 생각된다. 따라서 후속연구를 통해 마필관련 백신개발 뿐 아니라 다양한 산업동물, 애완동물 관련 백신개발에도 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

본 과제의 완료로써 참여기업에서의 백신원료의 생산에 필수적인 수율향상을 위한 배양 기본 프로토콜이 제시되었으며, 보다 대량생산으로 전환할 때 추가적인 QC가 이루어진다면 큰 어려움 없이 빠른 시일 내에 제품의 출시가 이루어질 것으로 판단된다. 이 후 접합백신의 제조 공정 등에는 연구자들이 직접 시제품 생산에 참여하여 공정개선에 일조할 것이다. 이 후의 제조허가를 득하기 위한 안전성 시험은 일반적인 실험동물에서의 안전성 검사 외에도, 마사회의 협조를 받아 시험마에서 유용성을 확인할 것이다.

한편, 참여기업의 경우 동물용 진단 시약은 협력회사를 통하여 생산하고 있는 바, 아직 마필의 질병진단시약의 품목은 없으므로 본 연구 결과물을 시작으로 마필 대상 질병진단시약사업을 개시할 수 있을 것으로 사료된다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1) 국외에서 수행되는 새로운 EHV 백신개발의 전략

해외의 연구팀들은 말의 혈액에서 채취한 수지상세포 전구세포 등을 체외배양한 뒤 EHV 항원을 pulse시킨 뒤 다시 말에 접종하여 EHV에 대한 면역능을 증가시키는 연구를 수행하고 있다. 현재 인체백신의 개발에서도 이런 방법을 시도하지만 현실적으로는 매우 어려운 작업으로 보인다. 본 연구팀도 1차년도에 말의 혈액을 이용하여 말의 수지상세포를 배양하는데 성공하였지만 인체의 수지상세포에 비해 전구세포 대비 수지상세포 생산량이 매우 적게 나오는 단점이 있었다. 이는 말 수지상세포 배양에 필요한 전용 면역싸이토카인의 개발이 덜 되어있기 때문으로 판단된다. 반면 본 연구팀에서 개발한 수지상세포의 표면에 대량으로 발현된 Fc receptor를 target으로 하는 항원 conjugate의 개발은 백신제조상 훨씬 효율적이므로 경쟁력이 있을 것으로 사료된다.

## 제 7 장 참고문헌

- Breathnach CC, Soboll G, Suresh M, Lunn DP. Equine herpesvirus-1 infection induces IFN- $\gamma$  production by equine T lymphocyte subsets. *Vet Immunol Immunopathol* 103: 207-215, 2005
- Burki F, Rofsmanith W, Nowotny N, Pallan C, Mostl K, Lussy H., Viremia and abortions are not prevented by two commercial equine herpesvirus-1 vaccines after experimental challenge of horse. *Vet Quarter* 12: 80-86, 1990
- Burrows R, Goodridge D, Denyer MS. Trials of an inactivated equine herpesvirus-1 vaccine: challenge with a subtype-1 virus. *Vet Res* 114: 369-374, 1984
- Connolly SA, Landsburg DJ, Carfi A, Whitbeck JC, Zuo Y, Wiley DC, Cohen GH, Eisenberg RJ., Potential nectin-1 binding site on herpes simplex virus glycoprotein D. *J. Virol* 2005; 79: 1282-1295
- Crabb BS, Studdert MJ., Equine herpesviruses 4(equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus)., *Adv Virus Res* 1995; 45: 153-190
- Csellner H, Walker C, Wellington JE, McLure LE, Love DN, Whalley JM., EHV-1 glycoprotein D(EHV-1 gD) is required for virus entry and cell-cell fusion, and an EHV-1 gD deletion mutant induces a protective immune response in mice., *Arch. Virol* 2000; 145: 2371-2385
- Dolby CA., Hannant D., Mumford JA., Response of ponies to adjuvanted EHV-1 whole virus vaccine and challenge with virus of the homologous strain., *Br. Vet. J* 1995; 151: 27-37
- Edens LM, Crisman MV, Toth TE, Ahmed SA, Murray MJ. In vitro cytotoxic activity of equine lymphocytes on equine herpesvirus-1 infected allogenic fibroblasts. *Vet Immunol Immunopathol* 52: 175-189, 1996
- Ellis JA., Bogdan JR., Kanara EW., Morley PS., Haines PS., Cellular and antibody responses to equine herpesviruss 1 and 4 following vaccination of horses with modified-live and inactivated viruses., *J. Am. Vet. Assoc* 1995; 206: 823-832
- Flowers CC, Flowers SP, Sheng Y, Tarbet EB, Jennings SR, O'Callaghan DJ., Expression of membrane-bound and secreted forms of equine herpesvirus 1 glycoprotein D by recombinant baculovirus., *Virus Res* 1995; 35: 17-34
- Flowers CC, O'Callaghan DJ., Equine herpesvirus 1 glycoprotein D: mapping of the transcript and a neutralization epitope., *J. Virol* 1992; 66: 6541-6460
- Foote CE, Love DN, Gilkerson JR, Wellington JE, Whalley JM. EHV-1 and EHV-4 infection in vaccinated mares and their foals. *Vet Immunol Immunopathol* 111: 41-46, 2006
- Gilkerson JR, Love DN, Whalley JM., Areview of equine herpesvirus vaccine: from



the traditional to the experimental. *Aust Equine Vet* 15: 27–32, 1997

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

Kim, S–H, Kim, JY, Han, W, Jung, BY1, Pham, DC, Joo, H, Hoa, VB, Son, W–G, Jee, Y, Yoon, B–S, Lee, Y–S, and Lim, Y–K. Development and Evaluation of an Immunochromatographic Assay for Screening *Listeria* spp. in Pork and Milk. *Food Sci. Biotechnol.* 16 (4), 515–519, 2007.

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

Kydd JH, Townsend HGG, Hannant D. The equine immune response to equine herpesvirus–1: The virus and its vaccines. *Vet Immunol Immunopathol* 111: 15–30, 2006

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

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

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

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

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

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

Ravetch JV., Fc receptor., *ruber redux*, *Cell* 1994; 78: 553–560

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

- Ruitenbergh KM, Gilkerson JR, Wellington JE, Love DN, Whalley JM. Equine herpesvirus 1 glycoprotein D expressed in *Pichia pastoris* is hyperglycosylated and elicits a protective immune response in the mouse model of EHV-1 disease. *Virus Res* 79: 12256-135, 2001
- Ruitenbergh KM, Walker C, Wellington JE, Love DN, Whalley JM., DNA-mediated immunization with glycoprotein D of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in a murine model of EHV-1 respiratory infection. *Vaccine* 17: 237-244, 1999
- Ruitenbergh KM, Walker C, Wellington JE, Love DN, Whalley JM., Potential of DNA-mediated vaccination for equine herpesvirus 1., *Vet. Microbiol* 1999; 68: 35-48
- Sallusto F, Lanzavecchia A., Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony stimulating factor plus interleukin 4 and down-regulated by tumor necrosis factor  $\alpha$ ., *J. Exp. Med.* 1994; 179: 1109-1118
- Siedek EM, Whelan M, Edington N, Hamblin A. Equine herpesvirus type 1 infects dendritic cells in vitro: stimulation of T lymphocyte proliferation and cytotoxicity by infected dendritic cells. *Vet Immunol Immunopathol* 67: 17-32, 1999
- Smith PM, Zhang Y, Grafton WD, Jennings SR, O'callaghan DJ. Severe murine lung immunopathology elicited by the pathogenic equine herpesvirus 1 strain RacL11 correlates with early production of macrophage inflammatory proteins 1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , and 1 and tumor necrosis factor alpha. *J Virol* 74: 10034-10040, 2000
- Smith PM, Zhang Y, Jennings SR, O'callaghan DJ. Characterization of the cytolytic T-lymphocyte response to a candidate vaccine strain of equine herpesvirus 1 in CBA mice. *J Virol* 72: 5366-5372, 1998
- Spear PG., Herpesvirus simplex virus: receptor and ligands for cell entry., *Cellular Microbiol* 2004; 6: 401-410
- Steinbach F, Borchers K, Ricciardi-Castagnoli P, Ludwig H, Stingl G, Elbe-Burger A. Dendritic cells presenting equine herpesvirus-1 antigens induce protective anti-viral immunity. *J Gen Virol* 79: 3005-3014, 1998
- Steinmam, R. M., The dendritic cell system and its role in immunogenicity., *Annual Review of Immunology* 1991; 9: 271-296
- Stokes A, Allen GP, Pullen LA, Murray PK., A hamster model of equine herpesvirus type 1(EHV-1) infection; passive protection by monoclonal antibodies to EHV-1 glycoproteins 16, 14 and 17/18. *J Gen Virol* 70: 1173-1183, 1989
- Stokes A, Cameron RS, Marshall RN, Killington RA., High level expression of equine herpesvirus 1 glycoproteins D and H their role in protection against virus challenge in the C3H(H-2K<sup>K</sup>) murine model., *Virus Res* 1997; 50: 159-173
- Telford EAR, Watson MS, Perry J, Cullinane AA, Davison AJ., The DNA sequence

- of equine herpesvirus-4., J. Gen. Virol 1998; 79: 1197-1203
- Tewari D, Whalley JM, Love DN, Field HJ., Characterization of immune responses to baculovirus-expressed equine herpesvirus type 1 glycoproteins D and H in a murine model., J. Gen. Virol 1994; 75: 1735-1741
- Unkeless JC., Scigliano E, Freedman VH., Structure and function of human and murine receptors for IgG., Ann. Rev. Immunol 1988; 6: 251-281
- Weerasinghe CU, Learmonth GS, Gilkerson JR, Foote CE, Wellington JE, Whalley JM. Equine herpesvirus 1 glycoprotein D expressed in *E. coli* provides partial protection against equine herpesvirus infection in mice and elicits virus-neutralizing antibodies in the horse. Vet Immunol Immunopathol 111: 59-66, 2006
- Wen YM, Qu D. and Zhou SH., Antigen-antibody complex as therapeutic vaccine for viral hepatitis B., Int Rev Immunol. 18: 251-258, 1999
- Whalley M, Robertson G, Bell C, Love D, Elphinstone M, Whiley L, Craven D., Identification and comparative sequence analysis of a gene in equine herpesvirus-1 with homology to the herpes simplex virus glycoprotein -D Gene. Virus Genes 1991; 5: 313-325
- Whittaker GR, Taylor LA, Elton DM, Giles LE, Bonass WA, Halliburton IW, Killington RA, Meredith DM., Glycoprotein-60 of equine herpesvirus type-1 is a homologue of herpes simplex virus glycoprotein-D and plays a major role in penetration of cell., J. Gen. Virol 1992; 73: 801-809
- Yada A, Ebihara S, Matsumura K, Endo S, Maeda T, Nakamura A, Aiba S. and Takai T., Accelerated antigen presentation and elicitation of humoral response in vivo by FcγIIb- and FcγRIII-mediated immune complex uptake., Cell Immunol 2003; 225: 21-32
- You Z, Huang X, Hester J, Toh HC. and Chen S-Y., Targeting dendritic cells to enhance DNA vaccine potency., Cancer Res 2001; 61: 3704-3711
- Zhang YF, Smith PM, Tarbet EB, Osterrieder N, Jennings SR, O'Challaghan DJ., Protective immunity against equine herpesvirus type-1 (EHV-1) infection in mice induced by recombinant EHV-1 gD., Virus Res 56: 11-24, 1998
- 윤병수 (1999) 분자생물학 연구방법론 II. 경기대학교