

최 중
연구보고서

사슴 만성소모성 질병(CWD)의 형질전환
동물모델 및 진단기법 개발

Development of transgenic animal
model and detection method for
chronic wasting disease

연구기관

건국대학교 수의과대학

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “사슴 만성소모성 질병(CWD)의 형질전환 동물모델 및 진단 기법에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 04 월 24일

주관연구기관명 : 건국대학교

총괄연구책임자 : 최 인 수

세부연구책임자 : 이 중 복

연 구 원 : 이 현 정

연 구 원 : 오 유 리

연 구 원 : 이 동 훈

연 구 원 : 송 영 조

연 구 원 : 정 승 환

연 구 원 : 정 현 정

연 구 원 : 김 도 근

연 구 원 : 김 미 영

연 구 원 : 김 성 은

연 구 원 : 손 현 주

연 구 원 : 이 세 영

연 구 원 : 최 영 표

연 구 원 : 정 혜 영

연 구 원 : 이 두 현

협동연구기관명 : 국립수의과학검역원

협동연구책임자 : 최 정 업

요 약 문

I. 제 목

사슴 만성소모성 질병(CWD)의 형질전환 동물모델 및 진단기법 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

사슴의 만성 소모성 질병(Chronic wasting disease, CWD)은 전염성 해면상 뇌증(Transmissible spongiform encephalopathy, TSE)의 일종으로 변형된 프리온 단백질인 PrP^{CWD}에 의해 사슴과 동물에서 발생한다. CWD에 감염되는 사슴의 종류에는 북미의 검은 꼬리 사슴 (*Odocoileus hemionus*), 흰 꼬리 사슴 (*Odocoileus virginianus*) 및 록키 마운틴 엘크 (*Cervus elaphus nelsoni*) 등이 있다. CWD의 감염의 특징은 목장에서 사육하는 사슴 및 야생에서 생활하는 사슴들에서 공통적으로 발생한다는 것이며, 주요 발생국은 미국 및 캐나다이다. 그러나 우리나라에서도 2001년 및 2004년도에 CWD가 발생한 바 있다.

사슴의 만성 소모성 질병은 주로 사슴의 나이가 약 3-5세 일 때 가장 많이 발생하는 것으로 보고되어 있으며, 다른 프리온 질병과 다른 점은 수평감염 및 수직감염이 가능하다는 것이다. 즉 감염된 개체의 분변이나 침을 통해서 배출된 CWD 원인체에 의해 감염될 수 있다는 것이 질병의 전파에 있어서 매우 중요한 요소로 작용한다. 감염된 사슴은 점진적인 체중감소, 다른 동물들과 어울리지 못함, 활기소실, 머리카락을 떨어뜨림, 무표정, 흥분, 과도한 음수섭취, 과도한 유연 및 이빨을 가는 증상 및 균형감각 상실 등의 신경증세를 보이면서 결국 폐사한다.

사슴 및 엘크 등 CWD에 감염되는 숙주를 이용한 감염 및 질병발생 기전을 연구하는 방법은 감염 후 최소 3-5년의 시간이 요구되기 때문에 시간적인 측면 및 경제적인 관점에서 매우 비효율적이다. 이러한 단점을 보완하기 위한 대안으로 가장 활발히 연구되는 것이 사슴의 PrP^C 단백질을 발현하는 형질전환 마우스를 개발하는 것이다. 이러한 형질전환 마우스는 CWD의 감염기전을 연구하는데

있어서 연구기간의 단축 및 연구비용의 절감 등 매우 다양한 장점을 보유하고 있다.

유전적 특성에 의해 Scrapie, Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) 및 variant Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) 등의 프리온 질병에 대한 감수성이 높아지는 것이 증명되고 있다. 즉 프리온 유전자인 PRNP 내에 존재하는 특정 아미노산의 발현여부가 프리온 질병에 대한 감염력 및 저항성에 결정적 역할을 한다는 사실이 밝혀지고 있다. 또한 사슴 프리온 유전자 내에 존재하는 특정 polymorphism에 의해서 CWD의 감수성이 변하는 사실이 증명되고 있다.

CWD에 감염된 사슴을 진단하는 방법으로는 Immunohistochemistry (IHC), Western blotting 및 CWD-ELISA 등 다양한 방법이 사용되고 있다. 이러한 방법을 이용하여 CWD를 진단하기 위해서 반드시 필요한 것이 사슴의 PrP^{CWD}를 특이적으로 인식하는 단클론 항체 및 폴리클론 항체다. IHC 및 Western blotting 방법 등이 변성된 프리온 단백질을 증명하는 전통적인 실험방법으로 사용되고 있으나, 변성 프리온이 적게 존재하는 조직에서는 감도가 다소 약하다는 것과 많은 샘플을 단시간에 동시에 처리하지 못한다는 단점이 있다. Immuno-PCR 방법은 이러한 단점을 극복할 수 있는 새로운 기법으로 개발되고 있다. Immuno-PCR을 수행하기 위해서도 PrP^{CWD}를 인식할 수 있는 단클론 항체 및 폴리클론항체가 반드시 필요하다.

따라서 본 연구에서는 위에서 열거한 필요성을 바탕으로 사슴에서 발생하는 CWD의 연구를 우리나라에서 독자적으로 수행하기 위한 기술적 기반을 마련한다는 목표 하에 다음과 같은 연구를 추진하였다. 첫째, 사슴의 프리온 단백질을 발현하는 형질전환 마우스를 개발하여 CWD 감염 연구기반을 확립한다. 둘째, 우리나라에 서식하는 사슴을 대상으로 프리온 단백질 유전자에 존재하는 polymorphism을 연구하여 CWD에 대한 감염가능성을 연구한다. 셋째, PrP^{CWD}를 특이적으로 인식하는 단클론 항체 및 폴리클론 항체를 생산하여 진단기법 개발에 활용한다. 넷째, PrP^{CWD}를 검출할 수 있는 Immuno-PCR 기법을 개발하여 진단 효율을 향상시킨다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 다음과 같은 연구를 수행하여 CWD를 연구할 수 있는 연구재료 및 연구결과 등을 확보하는 성과를 이루었다.

첫째, 고라니의 프리온 유전자를 발현하는 형질전환 마우스를 개발하였다. 고라니는 우리나라에서 고유하게 서식하는 사슴과 동물이지만 CWD에 감염성이 있는지는 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서 개발된 고라니 프리온 유전자 발현 형질전환 마우스는 고라니의 CWD에 대한 감염실험 동물로 사용될 수 있을 것이다. 본 연구에서 개발된 형질전환 마우스는 두 종류로 첫째는 마우스의 프리온 유전자가 존재하는 마우스를 이용하여 고라니의 프리온 유전자를 발현하는 형질전환 마우스를 개발하였으며, 둘째는 마우스의 프리온 유전자가 제거된 마우스를 이용하여 고라니의 프리온 유전자를 발현하는 형질전환 마우스를 개발하였다. 이들 형질전환 마우스의 chromosomal DNA 및 mRNA에 존재하는 고라니의 프리온 유전자를 PCR 및 RT-PCR 방법을 이용하여 확인하였다.

둘째, 우리나라에서 서식하는 꽃사슴 및 고라니의 프리온 단백질 유전자 내에 존재하는 polymorphism을 연구하여 꽃사슴에 존재하는 3개의 single-nucleotide polymorphism (SNP)를 검출하였으며 고라니에 존재하는 2개의 SNP를 검출하였다. 꽃사슴의 프리온 유전자에 존재하는 SNP는 100, 136 및 226번째 코돈에 위치하고 있으며 고라니의 프리온 유전자에 존재하는 SNP는 77 및 100번째 코돈에 위치하고 있었다. 또한 꽃사슴 및 고라니의 프리온 단백질을 분석한 결과 두 종류의 사슴이 모두 CWD에 감염에 중요하게 작용하는 아미노산서열을 보유하고 있는 것으로 판명되었다. 또한 SNP 검출 real-time PCR 기법을 개발하여 꽃사슴의 프리온 유전자에 존재하는 SNP를 검출하였다.

셋째, 변성 프리온 단백질인 PrP^{CWD}를 인식할 수 있는 폴리클론 항체 및 단클론 항체를 개발하였다. 항체를 개발하기 위하여 엘크의 프리온 유전자를 이용하여 재조합 프리온단백질을 제조한 후 토끼를 이용하여 폴리클론 항체를 생산하였으며, 마우스를 이용하여 7 종류의 단클론항체를 제작하였다 (A32-37, B48-57, B48-60, B85-05, B85-08, B85-12, B77-75). 이들 항체 중 4개인 B85-05, B85-08, B85-12 및 B77-75 클론들은 변성 프리온 단백질을 인식하는 특이성 및 감도가 매우 높은 항체임을 Western blot을 실시하여 검증하였다.

넷째, 프리온 단백질을 특이적으로 인식하는 폴리클론 및 단클론 항체와 바이

오틴이 부착된 항체 및 DNA probe를 이용하여 PrP^{CWD}를 검출할 수 있는 Immuno-PCR 기법을 개발하였다. PrP^{CWD}를 특이적으로 검출하는 PCR 산물을 확인함으로써 본 연구를 통해 개발된 Immuno-PCR 기법이 PrP^{CWD}를 검출할 수 있는 새로운 진단기법으로 활용될 수 있음을 증명하였다. 또한 real-time immuno-PCR 기법을 추가로 개발하여 진단시간의 감소 및 진단기법의 민감도를 향상시키는 연구성과를 거두었다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구를 통하여 개발된 형질전환 마우스들은 CWD 감염실험 시 질병의 발생기간 및 질병의 발생정도를 비교하는데 유용하게 사용될 것이다. 꽃사슴 및 고라니 등 우리나라에서 서식하는 사슴과 동물들의 프리온 단백질 유전자에 존재하는 polymorphism의 의미는 향후 CWD에 감염된 다른 사슴과 동물들과의 유전적 분석을 통해 꽃사슴 및 고라니가 CWD에 감염할 가능성을 연구하는데 중요한 자료가 될 것이다. 또한 본 연구를 통해 개발된 PrP^{CWD}에 특이적인 단클론항체들은 Western blot, IHC 및 Immuno-PCR 등 CWD 및 BSE 등과 같은 프리온 질병의 검출기법에 매우 유용하게 사용될 것이다. 변형프리온 단백질인 PrP^{CWD}를 특이적으로 검출할 수 있는 Immuno-PCR 기법의 개발 또한 CWD 및 기타의 프리온 질병을 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 신기술로 개발하는 성과를 거두었다.

본 연구의 최초 목적은 CWD 및 프리온 질병을 연구하는데 반드시 필요한 단클론항체 및 형질전환동물 등을 외국에 의존하지 않고 자체 개발하여 국내연구진의 프리온 질병 연구력을 향상시키는 기반을 확립하는 것이었다. 본 연구를 통하여 이러한 소기의 목적은 달성하였으나 개발된 형질전환 마우스 및 단클론항체를 충분히 검증하는 실험은 연구기간이 허락하지 않아 수행되지 못한 아쉬움이 있다. 따라서 본 연구를 통해 개발된 중요한 연구재료들을 이용한 검증실험이 후속과제를 통해 연속적으로 수행될 수 있는 정책과제가 제공된다면 프리온 연구의 발전에 많은 도움이 될 것으로 사료된다.

SUMMARY

Chronic wasting disease (CWD) is a kind of prion diseases affecting mainly mule deer (*Odocoileus hemionus*), white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) and Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*). Most of the CWD infections were reported in the USA and Canada. However, there were two cases happened in 2001 and 2004 in South Korea. Although nonhuman primates and cows could be infected by experimental infection, there were no report on CWD infection in sika deer and water deer living in Korea. In this study, two strains of transgenic mice expressing prion protein of the Korean subspecies of Chinese water deer (*Hydropetes inermis argyropus*) were generated. One strain of transgenic mice were generated with normal C57BL/6 mice, so they expressed both prion proteins of mouse and water deer. The other strain of transgenic mice only expressed the prion protein of water deer because they were generated with PrP knock-out mice. Polymorphisms of the prion protein gene (PRNP) have been detected in several cervid species. In order to confirm the genetic variations, single-nucleotide polymorphisms (SNP) were determined in the DNA sequences of the PRNP obtained from 33 captive sika deer. A total of three SNPs were found at codons of 100, 136, and 226 in the PRNP of the sika deer. The polymorphic site located at codon 100 has not been previously reported. The SNPs detected at codons 100 and 226 induced amino acid substitutions. The SNP detected at codon 136 was a silent mutation that does not induce any amino acid change. Two SNPs located at codons 77 and 100 were identified in the PRNP of 34 water deer. Whereas the one SNP located at codon 77 was a silent mutation, the other SNP located at codon 100 induced amino acid change. In addition, a real-time PCR method was developed to detect SNPs in the PRNP of sika deer. Monoclonal antibodies specific for PrP^{CWD} were generated by immunization of PrP knock-out mice with recombinant elk PrP. Seven clones such as A32-37, B48-57, B48-60, B85-05, B85-08, B85-12, B77-75 were selected. Four clones of them such as B85-05, B85-08, B85-12 및 B77-75 were finally confirmed to specifically react with PrP^{CWD} by Western blotting. Polyclonal antibody specific for cervid PrP

was generated from rabbit immunized with recombinant elk PrP. Immuno-PCR method was developed by using one chicken polyclonal antibody obtained from a chicken immunized with prion peptide, monoclonal antibody 6H4, biotinylated antibody and biotinylated DNA. The immuno-PCR was very sensitive and highly specific for PrP^{CWD}. This results indicated that the immuno-PCR may be used as an alternative detection method for PrP^{CWD}. These reagents and animals developed in this study will be useful in studying CWD.

CONTENTS

Chapte 1 Outline of Research -----	1
Chapter 2 Technology Development in Korea and other Countries ---	5
Chapter 3 Materials, Methods and Results -----	7
Section 1 Development of transgenic mice expressing water deer prion protein gene -----	7
Section 2 Polymorphism in the prion protein gene of deer -----	19
Section 3 Production of antibody specific for PrP ^{CWD} -----	28
Section 4 Development of Immuno-PCR for detecting PrP ^{CWD} -----	39
Chapter 4 Accomplishment and Contribution of Research -----	51
Chapter 5 Application Plan with Research Results -----	53
Chapter 6 Information Obtained from Conducting Research -----	54
Chapter 7 References -----	55

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	1
제 2 장	국내외 기술개발 현황	5
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	7
제 1 절	사슴의 프리온 단백질을 발현하는 형질전환 마우스의 개발	7
제 2 절	사슴의 프리온 유전자에 존재하는 polymorphism 연구	19
제 3 절	PrPCWD에 특이적인 항체 생산	28
제 4 절	PrPCWD를 검출하는 Immuno-PCR 기법 개발	39
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	51
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	53
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	54
제 7 장	참고문헌	55

제 1 장 연구개발과제의 개요

프리온 질병(Prion diseases) 혹은 전달성 해면상 뇌증(Transmissible spongiform encephalopathy, TSE)이란 사람 및 동물에 존재하던 정상 프리온 단백질(PrP^{C})이 다양한 기전에 의하여 변형 프리온 단백질(PrP^{Sc})로 변형된 후 중추신경계에서 증폭하며 신경계 세포를 파괴하는 질병이다 (Bueler et al., 1993; Novakofski et al., 2005; Watts et al., 2006). 대표적인 프리온 질병에는 소에서 발생하는 Bovine spongiform encephalopathy (BSE), 양에서 발생하는 Scrapie, 사슴에서 발생하는 Chronic wasting disease (CWD), 및 사람에서 발생하는 variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) 등이 있다. 이들의 공통적 특징은 뇌에서 변형 프리온 단백질의 축적, 뇌조직의 공포변성이 관찰되는 것이다 (Kristiansen et al., 2005). Scrapie의 발병기전은 아직 불명확하나 BSE가 Scrapie에 감염된 동물의 단백질을 이용한 사료를 통해서 발생하였으며, vCJD는 BSE에 감염된 소고기 및 기타 부산물을 섭취하여 발생한다 (Collinge et al., 1996).

사슴의 만성 소모성 질병(Chronic wasting disease, CWD)은 변형된 프리온 단백질인 PrP^{CWD} 에 의해 사슴에서 발생하는 질병으로 알려져 있으며, 1978년도에 미국의 콜로라도주의 한 농장에서 사육되던 흰 꼬리 사슴에서 처음으로 발견되었다. CWD에 감염되는 사슴의 종류에는 북미의 검은 꼬리 사슴 (*Odocoileus hemionus*), 흰 꼬리 사슴 (*Odocoileus virginianus*) 및 록키 마운틴 엘크 (*Cervus elaphus nelsoni*) 등이 있다 (Johanson et al., 2003; Miller et al., 2000). CWD의 감염의 특징은 목장에서 사육하는 사슴 및 야생에서 생활하는 사슴들에서 공통적으로 발생한다는 것이며, 주요 발생국은 미국 및 캐나다이다 (Salman 2003; Williams 2005). 그러나 우리나라에서도 2001년도에 캐나다에서 수입한 엘크에서 처음으로 CWD가 확인되었으며 2004년도에 두 번째로 CWD가 확인되어 더 이상 CWD의 안전지대가 아님이 확인되었다 (Kim et al., 2005). 사슴의 만성 소모성 질병은 주로 사슴의 나이가 약 3-5세 일 때 가장 많이 발생하는 것으로 보고되어 있으며, 다른 프리온 질병과 다른 점은 수평감염 및 수직감염이 가능하다는 것이다 (Angers et al., 2006; Mathiason et al., 2006; Miller and Williams 2003). 즉 CWD에 감염된 개체의 고기 및 기타 조직을 섭취하지 않고도 감염된 개체의 분변이나 침을 통해서 배출된 PrP^{CWD} 에 의해 감염될 수 있다는 것이 질병의 전파에 있어서 매우 중요한 요소로 작용한다. 감염된 사슴은 점진적인 체중감소,

다른 동물들과 어울리지 못함, 활기소실, 머리카락을 떨어뜨림, 무표정, 흥분, 과도한 음수섭취, 과도한 유연 및 이빨을 가는 증상 및 균형감각 상실 등의 신경증세를 보이면서 폐사한다. CWD는 실험적 감염을 통해 소 및 원숭이에 감염되는 것으로 보고되고 있으나 자연적 감염에 의해 사람 및 기타 동물에 전파된 경우는 없다 (Hamir et al., 2006; Kong et al., 2005; Marsh et al., 2005).

사슴 및 엘크 등 CWD에 감염되는 사슴과동물을 이용한 감염 및 질병발생기전을 연구하는 방법은 감염 후 최소 3-5년의 시간이 요구되기 때문에 시간적인 측면 및 경제적인 관점에서 매우 비효율적이다. 이러한 단점을 보완하기 위한 대안으로 가장 활발히 연구되는 것이 사슴의 PrP^C 단백질을 발현하는 형질전환 마우스를 개발하는 것이다 (Browning et al., 2004). 이러한 형질전환 마우스는 CWD의 감염기전을 연구하는데 있어서 연구기간의 단축 및 연구비용의 절감 등 매우 다양한 장점을 보유하고 있다. BSE 및 기타의 프리온 질병을 연구할 때 특정 동물의 프리온 단백질을 발현하는 형질전환 마우스를 개발하여 이용하는 것은 보편적 방법으로 확립되어 있다. 따라서 사슴의 프리온 유전자를 발현하는 형질전환 마우스를 우리나라에서 자체적으로 개발할 필요가 있다.

프리온 단백질 유전자 내에 존재하는 유전적 특성에 의해 Scrapie, Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) 및 variant Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) 등의 프리온 질병에 대한 감수성이 높아지는 것이 증명되고 있다. 즉 프리온 유전자인 내에 존재하는 대립형질(Allele) 및 특정 아미노산의 발현여부가 프리온 질병에 대한 감염력 및 저항성에 결정적 역할을 한다는 사실이 밝혀지고 있다 (Heaton et al., 2003; Hunter 1997; Jeong et al., 2005; Jonathan et al., 2004; Raymond et al., 2000). 또한 CWD에 감염된 사슴 및 비감염된 사슴의 프리온 유전자를 분석한 결과, 검은꼬리사슴, 흰꼬리사슴 및 엘크등의 프리온 유전자 내에 존재하는 특정 polymorphism에 의해서 CWD의 감수성이 변하는 사실이 증명되고 있다 (Brayton et al., 2004; Hamir et al., 2006; Johnson et al., 2006; O'Rourke et al. 1999; O'Rourke et al., 2004). 일본 및 중국에 서식하는 꽃사슴의 프리온 유전자에 polymorphism이 존재하는 것이 증명되었다 (Kataoka et al., 2005; Meng et al., 2005). 그러나 우리나라에 서식하는 꽃사슴 및 고라니 등이 CWD에 감수성이 증명되거나 감염된 예는 없다. 따라서 우리나라에 서식하는 꽃사슴 및 고라니의 프리온 유전자 분석을 통해 CWD 감염 가능성을 연구할 필요가 있다.

CWD에 감염된 사슴을 진단하는 방법으로는 Immunohistochemistry (IHC), Western blotting 및 ELISA 등이 있다. CWD가 의심되는 생축이나 사체에서 뇌 조직, 중추신경조직 혹은 림프절과 같은 조직을 채취하여 protenase K로 처리한 후 protenase K에 의해 분해되지 않는 PrP^{CWD}의 존재를 확인하는 것이 일반적인 진단의 원리이다 (Sigurdson et al., 1999; Wild et al., 2002). 이러한 진단방법을 사용하거나 혹은 응용하기 위해서는 반드시 사슴의 PrP^{CWD}를 특이적으로 인식하는 단클론 항체 및 폴리클론 항체가 필요하다 (O'Rourke et al., 1998).

IHC 및 Western blotting 방법 등이 변성된 프리온 단백질을 증명하는 전통적인 실험방법으로 사용되고 있으나, 변성프리온이 적게 존재하는 조직에서는 감도가 다소 약하다는 것과 많은 샘플을 단시간에 동시에 처리하지 못한다는 단점이 있다. Immuno-PCR 방법은 이러한 단점을 극복할 수 있는 새로운 기법으로 개발될 수 있다 (Komatsu et al., 2001). Immuno-PCR을 응용하면 매우 적은 양의 PrP^{CWD} 단백질을 빠른 시간 내에 그리고 매우 높은 감도로 변성 프리온 단백질을 검출해 낼 수 있다. Immuno-PCR은 항체-항원 복합체가 형성되는 원리와 함께 항체-DNA 복합체가 형성되도록 한 후 PCR을 이용하여 DNA 부분을 증폭시키는 원리를 이용하는 기법으로 기존의 Western blotting 이나 IHC 보다 더욱 효과적인 항원인식 방법이다. Immuno-PCR을 수행하기 위해서는 PrP^{CWD}를 인식할 수 있는 단클론 항체 및 폴리클론항체가 반드시 필요하다.

따라서 본 연구에서는 위에서 열거한 필요성을 바탕으로 사슴에서 발생하는 CWD의 연구를 우리나라에서 독자적으로 수행하기 위한 기술적 기반을 마련한다는 목표 하에 다음과 같은 연구를 추진하였으며 매우 의미 있는 결과를 획득하였다.

첫째, 사슴의 프리온 단백질을 발현하는 형질전환 마우스를 개발하여 CWD 감염 연구기반을 확립한다. 이러한 연구를 수행하기 위해 우리나라에 고유하게 서식하는 고라니의 프리온 유전자를 발현하는 형질전환 마우스를 개발하였다.

둘째, 우리나라에 서식하는 사슴을 대상으로 프리온 단백질 유전자에 존재하는 polymorphism을 연구하여 CWD에 대한 감염가능성을 연구한다. 이러한 목적 하에 꽃사슴 및 고라니의 프리온 유전자를 분석하여 SNP를 발견하였다.

셋째, PrP^{CWD}를 특이적으로 인식하는 단클론 항체 및 폴리클론 항체를 생산하여 진단기법 개발에 활용한다. 엘크의 프리온 단백질을 이용하여 PrPCWD에 특

이적인 항체를 개발하였다.

넷째, PrP^{CWD}를 검출할 수 있는 Immuno-PCR 기법을 개발하여 진단 효율을 향상시킨다. 이러한 목적을 충족하는 Immuno-PCR 기법이 개발되어 향후 CWD의 진단기법으로 활용될 수 있음을 증명하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재 사슴의 소모성 질병인 CWD의 발생은 미국, 캐나다 및 한국으로 국한되어 있다. 미국과 캐나다의 경우는 미국의 Colorado 주에서 처음 발생한 CWD가 점차 미국 및 캐나다의 다른 주로 빠르게 확산되는 추세이며, 한국의 경우는 캐나다에서 수입한 엘크에서만 발병하는 것으로 확인되었다. 그러나 CWD의 특징이 수평전파가 가능하고 그로인해 시간이 가면 갈수록 점차 많은 사슴류의 동물이 감염되는 것이며, 또한 PrP^{CWD}가 동물의 배설물 및 분비물을 통해 배출됨으로 인해 발병지역 자체의 오염을 방지할 방법이 전무하다는 것이 매우 중요한 문제로 대두되고 있다.

따라서 미국과 캐나다의 경우 지속적인 검사를 통해 CWD 양성 사슴을 도태하는 방법과 다른 주의 사슴반입을 금지하는 방법 등을 사용하여 CWD의 확산을 예방하려고 노력하고 있다. 우리나라도 마찬가지로 발생농가의 사슴을 모두 살처분하는 방법을 정책적으로 활용하고 있다. 이와 같은 과정에서 사슴의 CWD 감염을 확인하기 위해서 사용할 수 있는 방법은 Bio-Rad사가 개발한 CWD-ELISA를 이용하여 사슴의 림프절에서 채취한 조직을 테스트하는 것과 IHC를 이용하여 사슴의 편도조직을 테스트하는 방법이 사슴이 CWD로 인해 사망하기 전에 감염을 확인할 수 있는 유용한 방법으로 사용되고 있다. 이러한 진단기법에 반드시 사용되는 것이 PrP^{CWD}에 특이적인 단클론항체이기 때문에 이미 미국 등의 선진국에서는 오래전에 이러한 클론을 개발한 상황이다 (O'Rourke et al., 1998)

그러나 우리나라에서 자체적으로 개발되어 사용할 수 있는 진단키트 및 진단기법이 전무한 실정이므로 CWD 진단기법에 사용될 단클론 항체의 개발이 절실히 요구되고 있었다. 또한 CWD 감염기전을 연구할 수 있는 형질전환 마우스도 이미 수년전에 미국에서 개발되었으나 (Browning et al., 2004) 우리나라에서 자체적으로 제작한 형질전환 마우스는 전무한 실정이므로 이러한 실험동물을 개발

하는 것이 절대적으로 요구되는 상황이었다.

따라서 본 연구를 통해서 개발된 형질전환 마우스, 단클론 항체 및 폴리클론 항체 및 Immuno-PCR 기법 등은 CWD의 감염기전 연구 및 진단기법의 개발에 활용됨으로써 CWD를 비롯한 프리온 질병의 연구에 큰 도움을 줄 것이다. 또한 꽃사슴 및 고라니의 프리온 유전자분석을 통해 밝혀낸 SNP는 향후 이들의 CWD 감수성 연구에 필요한 기초자료로 활용될 수 있을 것이다. 특히 본 연구를 통해 확보된 동물 및 실험재료를 국내의 CWD 및 프리온 질병 연구에 적극 활용함으로써 그동안 프리온 질병 연구를 수행하는 과정에서 발생했던 외국에 대한 연구의 종속성을 탈피할 수 있는 좋은 계기가 될 것으로 사료된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 사슴의 프리온 단백질을 발현하는 형질전환 마우스의 개발

1. 실험재료 및 방법

가. 고라니의 프리온 단백질 (PrP) 유전자 클로닝

고라니의 프리온 단백질 유전자는 고라니의 혈액세포를 통하여 확보하였다. 즉 Blood extraction kit (General Bio)을 사용하여 blood 200 μ l에 Proteinase K (20mg/ml) 20 μ l를 첨가하였다. 이후 Buffer BL 200 μ l를 첨가 후 vortexing을 실시하였다. 56 $^{\circ}$ C에서 10분간 incubation 시킨 후 spin column에 sample을 분주하여 1분간 8000rpm으로 실온에서 원심분리를 하였다. 원심분리된 액을 버리고 다시 600 μ l의 BW buffer를 분주 후 1분간 13,000 rpm으로 원심분리를 하였다. 원심분리된 액을 버리고 700 μ l의 buffer TW를 분주한 후 1분간 13,000 rpm으로 원심분리를 시켰다. 이후 1.5ml tube에 column을 장착시키고 buffer AE를 200 μ l 분주한 후 2분간 실온에서 incubation시킨 후 13,000rpm에서 1분간 원심분리를 하여 DNA를 확보하였다. 추출된 DNA는 다음과 같은 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. Forward primer, 5'-ATG GTG AAA AGC CAC ATA GGC-3'; Reverse primer, 5'-CTA TCC TAC TAT GAG AAA AAT G-3'. PCR 반응은 20 pmol의 프라이머를 각각 1 μ l씩, 5 μ l의 10 X *Taq* DNA polymerase buffer, 0.2mM dNTP를 1 μ l, 2.5 units *Taq* DNA polymerase (Promega, USA) 0.5 μ l를 섞어 DW로 전체 볼륨을 50 μ l로 맞춰 준 후 수행하였다. PCR 조건은 다음과 같다. 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 denaturation, 후 총 30 cycles, 94 $^{\circ}$ C에서 45초간 denaturation, 50 $^{\circ}$ C에서 60초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 90초간 extension, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 마지막 extension으로 PCR을 수행하였다. 확보된 고라니의 프리온 유전자는 TOPO 클로닝 벡터(Invitrogen)에 클로닝하였다.

나. 형질전환 마우스용 벡터 내로 고라니 프리온 단백질 (PrP) 유전자 클로닝

고라니의 프리온 단백질 유전자는 총 771-bp로 구성되어 있으며 이 유전자를 함유하고 있는 TA cloning vector DNA를 Eco RI 제한효소를 이용하여 절단하였다. 이때 사용된 조건은 다음과 같다. 즉 30 μ l의 plasmid DNA, 5 μ l의 reaction buffer, 1 μ l의 Eco RI 제한효소, 14 μ l의 증류수를 넣은 튜브를 37°C에서 2시간 반응시킨 후 전기영동을 수행하여 절단된 고라니 프리온 유전자를 포함하고 있는 DNA 밴드를 확인하였다. 고라니의 프리온 유전자를 발현하기 위하여 사용된 형질전환용 벡터는 chicken beta-actin promoter를 보유한 pCAGGS (Sapporo Medical University)가 사용되었으며 벡터의 구조는 다음과 같다 (Fig. 3).

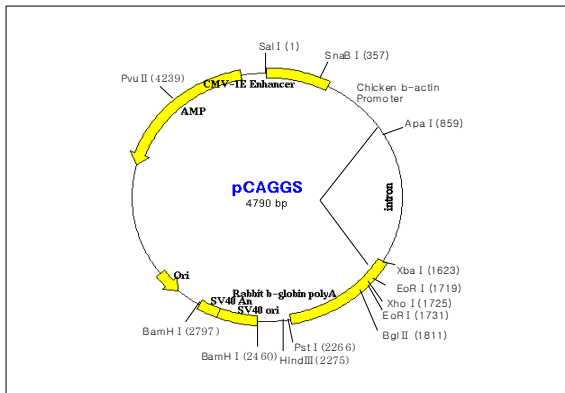


Fig. 3. pCAGGS vector map (Sapporo Medical University)

고라니의 프리온 유전자는 다음과 같은 방법에 의하여 pCAGGS 벡터 내로 삽입되어 발현되었다. 즉 Eco RI 제한 효소에 의해 절단된 고라니 프리온 단백질 유전자 DNA를 pCAGGS 벡터에 ligation 시키기 위해 pCAGGS 벡터를 EcoRI로 절단하였다. 이때 사용된 조건은 다음과 같다. 즉 30 μ l의 pCAGGS 벡터, 5 μ l의 반응 Buffer, 1 μ l의 EcoRI, 14 μ l의 증류수를 포함한 튜브를 37°C에서 두 시간 처리한 후 이 때 self ligation을 방지하기 위하여 Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)로 처리하였다. 이때의 조건은 다음과 같다. 즉 50 μ l의 EcoRI으로 절단된 pCAGGS 벡터, 2 μ l의 CI, 5 μ l의 반응 Buffer, 43 μ l의 증류수를 포함한 튜브를 37°C에서 한 시간 반 동안 반응을 시켰다. 이후 반응물을 agarose gel에서 전기영동하여 plasmid DNA 밴드를 DNA 정제키트(Qiagen)를 이용하여 추출하였다.

이후 Eco RI에 의해 절단된 pCAGGS vector 1 μ l, Eco RI에 의해 절단된 고라니 프리온 단백질 유전자 DNA 4 μ l, T4 ligase 1 μ l, 반응 Buffer 1 μ l, 증류수 3 μ l 를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 ligation을 시켰다. Ligation이 된 반응물을 M15 competent cell 내로 다음과 같은 방법에 의해 transformation 시켰다. 즉 M15 competent cell 100 μ l에 ligation 산물 3 μ l를 분주 후 얼음에서 20분간 반응시켰다. 이후 42 $^{\circ}$ C에서 90초간 열 충격 처리를 하고 psi broth를 500 μ l 첨가한 후에 한 시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 진탕배양 후 Ampicillin (100 μ g/ml)이 포함된 LB agar plate에 50, 100, 200 μ l씩 도말하였다. LB plate는 이후 37 $^{\circ}$ C 세균배양기에서 16시간 배양시킨 후 콜로니를 선택하여 Ampicillin (100 μ g/ml)이 포함된 LB broth에서 배양 시킨 후 plasmid DNA (Qiagen)를 추출하였다. 또한 고라니의 프리온 유전자가 pCAGGS 벡터에 정방향으로 삽입되었음을 확인하기 위해 KpnI과 HindIII 제한효소를 이용하여 절단하였다. 절단된 DNA 밴드를 DNA 정제키트(Qiagen)를 이용하여 정제하였다.

다. 세포 내 프리온 단백질 유전자 발현 확인

고라니 프리온 단백질 유전자를 발현하는 형질전환 마우스를 제작하기 전에 pCAGGS 벡터에 클로닝된 고라니 프리온 단백질 유전자가 포유동물 세포 내에서 발현되는 지를 증명하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 즉 6-well plate에 2 X 10⁵ 개의 3T3 세포를 분주한 후 70~80%의 monolayer가 될 때까지 세포를 배양하였다. Transfection에 필요한 PBS, 혈청 및 항생제가 첨가되지 않은 DMEM 배지는 실험 30분 전에 37 $^{\circ}$ C water bath에서 온도를 맞추어 놓았다. 이 후 Clean bench 내에서 멸균된 eppendorf tube에 고라니의 프리온 단백질 유전자를 보유한 pCAGGS DNA(10 μ g/ml)를 넣은 후 serum free medium 100 μ l, Lipofectamin 20 μ l 가하고 이를 혼합한 DNA와 혼합한 후 45분간 상온에서 반응을 시켰다. DNA와 Lipofectamin을 반응시키는 동안 3T3 세포가 배양되어 있는 6-well plate를 PBS로 2번 세척하였으며 이후 serum free medium을 well당 0.8 ml 씩 첨가하였다. 이후 Lipofectamin 과 DNA를 섞은 샘플을 각각의 well에 100 μ l씩 분주하고 고루 섞이도록 가볍게 흔들어 주었다. 6-well plate를 CO₂ incubator에서 5시간 incubation 한 후 혈청 및 항생제가 포함되어 있는 DMEM medium 으로 교체하여 60시간 정도 배양시켰다.

이후 고라니의 프리온 단백질 유전자 DNA가 transfection된 3T3 세포내에서 발현되었는지를 Reverse-transcription PCR (RT-PCR) 방법을 이용하여 다음과 같이 확인하였다. 즉 DNA를 transfection 시킨 세포를 PBS로 두 번 세척한 후

300 μ l의 Trypsin-EDTA를 각각의 well에 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 incubation 시켰다. 이후 Trypsin-EDTA로 처리되어 plate 바닥에서 탈락된 세포를 일정량의 medium과 섞어 15ml tube에 분주 후 1,000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리된 세포로부터 RNA extraction kit (QIAGEN)를 사용하여 회사에서 제시한 프로토콜에 준하여 RNA를 추출하였다. 추출한 mRNA를 이용하여 다음과 같이 cDNA를 제작하였다. 즉 mRNA 10 μ l에 reverse primer (5'-CTA TCC TAC TAT GAG AAA AAT G-3') 1 μ l를 첨가한 후 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 열처리를 하였다. 열처리 후 즉시 얼음에 튜브를 옮겨서 5분간 정치시켰다. 이후 다음과 같이 조성된 Master mix를 준비한다 (Master mix; 5X buffer 4 μ l, 0.1M DTT 1 μ l, 10mM dNTP 1 μ l, RNasin 1 μ l, RTase 1 μ l). 준비된 Master mix를 튜브에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 50분 이상 반응시켰다. 이 후 튜브를 70 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 반응 시킨 후 얼음에서 냉각시켰다. 생성된 cDNA를 이용하여 고라니의 프리온 단백질 유전자를 확인하기 위한 PCR 반응을 다음과 같이 수행하였다. 사용된 primer는 다음과 같다. Forward primer: 5-ATG GTG AAA AGC CAC ATA GGC-3', Reverse primer: 5-CTA TCC TAC TAT GAG AAA AAT G-3'. PCR 반응은 30 cycle로 수행되었으며 반응의 조건은 다음과 같다. 즉 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 초기 denaturation 반응 후, 94 $^{\circ}$ C에서 45초 동안 denaturation, 50 $^{\circ}$ C, 51.9 $^{\circ}$ C, 54 $^{\circ}$ C, 56.4 $^{\circ}$ C 및 58.8 $^{\circ}$ C의 gradient 온도를 이용하여 60초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 90초간 extension 후, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 extension 반응을 유도하였다.

라. 형질전환 마우스 제작

형질전환 마우스를 제작하기 위해 고라니 PrP를 보유하고 있는 expression vector인 pCAGGS (Dr. Tokuhsa, Chiba University)를 Sal I 및 Hind III로 절단하여 linearization 시킨 후 전기영동을 실시하여 고라니 PrP 유전자를 포함하고 있는 3.6 kb의 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA fragment를 순수 정제하여 DNA를 정량하고 microinjection buffer (10 mM Tris, pH 7.4, 0.3 mM EDTA)에 DNA 농도가 1-4 ng/ μ l 되도록 용해시켰다. 과배란을 유도하여 zygote를 확보하기 위하여 4주령된 암컷 C57BL/6N mouse에 PMSG와 hCG 호르몬 주사를 48 시간 간격으로 주사하고 수컷 마우스와 교미를 유도한 후 다음 날 난관으로부터 zygote를 채란하였다. 채란된 zygote에 DNA 용액을 microinjection 하였다. DNA가 주입된 수정란 중 생존한 것을 선별하여 대리모의 난관에 이식하여 이식 후 19일째 마우스를 분만시켰다. 분만 2주 후에 마우스의 꼬리를 잘라 genomic DNA를 추출하여 771-bp의 고라니 프리온 단백질 유전자의 삽입 여부를 확인하였다. 고라니의 PrP 삽입여부는 PCR을 이용하여 검증하였다. 사용된 primer는

다음과 같다. Forward primer: 5'-ATG GTG AAA AGC CAC ATA GGC-3', Reverse primer: 5'-CTA TCC TAC TAT GAG AAA AAT G-3'. PCR 조건은 다음과 같다; initial denaturation 94°C 5min, total 35 cycle의 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1min, final extension 72°C 10 min.

고라니의 PrP gene을 발현하는 형질전환 마우스 (F73-♂)와 mouse-PrP gene knockout mouse (6주령된 female)를 교배시켜 임신이 됨을 확인하고 19일 후에 6마리의 F1(F73-KO)을 확보하였다. PCR 수행결과 F1세대에서 고라니의 PrP 유전자를 발현하는 형질전환 마우스를 확인하였다. 그러나 이와 같이 확보된 마우스는 마우스의 PrP 유전자도 동시에 가지고 있는 마우스임으로, 다시 F1 세대의 형질전환 마우스끼리 교배를 통하여 고라니의 PrP 유전자만을 보유한 형질전환 마우스만을 선발하는 실험을 수행하였다.

마. 수정란동결을 위한 형질전환 마우스 선발

고라니의 프리온 단백질 유전자 발현하는 형질전환마우스 (F49-♂, F73-♂)와 wild type female mouse (6주령 C57BL/6N mouse)를 교배시켜 19일 후에 각각의 마우스에서 F1을 확보하였다. 확보된 마우스들이 고라니의 프리온 단백질 유전자를 보유하고 있는지를 확인하기 위하여 genomic DNA를 추출한 후 PCR 방법을 이용하여 고라니의 프리온 단백질 유전자를 검출하였다. 마우스의 genomic DNA추출은 QIAGEN kit를 사용하였다. DNA 추출과정은 회사에서 제시한 방법 및 시약을 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 즉 0.2cm 정도 잘라낸 마우스 꼬리를 1.5ml tube에 담고 ATL buffer 180µl와 proteinase K (50ug/ml) 로 처리한 후, 55°C에서 1시간 30분 동안 lysis 시켰다. Spin column을 장착 후 200µl의 EtOH를 위의 sample과 섞어 분주 후 1분간 원심분리하고 AW1과 AW2 buffer를 각각 500µl씩 분주 하여 washing 후 AE buffer 100µl로 elution 시켰다.

추출한 DNA를 이용하여 Polymerase Chain Reaction (PCR)을 다음과 같은 조건에서 수행하였다. 즉 고라니 프리온 단백질 유전자 뒤에 연결되어있는 Rabbit beta-globin poly A는 Transgenic 마우스에서만 가지고 있는 유전자이므로 고라니 프리온 단백질 유전자의 3' 말단 부분과 rabbit beta-globin gene의 앞부분을 프라이머로 디자인하여 PCR을 수행하였다. 이때 사용한 primer는 다음과 같으며 561-bp의 PCR product를 생산할 경우 고라니 프리온 단백질 유전자가 genomic DNA에 삽입된 것으로 판단하였다. Forward primer; 5'-CCC AAC CAA GTG TAC TAC AGG C-3', Reverse primer; 5'-ATG CTC AAG GGG

CTT CAT GAT G-3'. PCR 반응은 20 pmol의 프라이머를 각각 1 μ 씩, 10 X *Taq* DNA polymerase buffer 5 μ l, 0.2mM dNTP 1 μ l, 2.5units *Taq* DNA polymerase(Promega, USA) 0.5 μ l를 섞은 후 증류수로 전체 용량을 50 μ l로 맞춰준 후 수행하였다. PCR 반응은 30 cycle로 수행되었으며 이때 사용된 조건은 다음과 같았다. 즉 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 초기 denaturation, 94 $^{\circ}$ C에서 45초간 denaturation, 58 $^{\circ}$ C에서 45초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 60초간 extension 후 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 final extension.

앞서 실시한 PCR을 통해 고라니의 프리온 단백질 유전자를 발현하는 각 F-1 세대에서 mRNA 발현 정도를 알아보기 위하여 8 마리의 형질전환 마우스의 blood에서 RNA를 추출 하였다. RNA 추출은 QIAGEN kit를 사용하였으며 실험 방법 및 시약은 회사에서 제시한 것을 사용하였다. 각각의 마우스 눈에서 약 100 μ l의 blood를 채혈한 후 EL buffer를 500 μ l를 첨가하였다. 약 10분정도 ice에서 반응시킨 후 400 X *g* 에서 10분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 상층액에 존재하는 erythrocyte는 제거하고 pellet으로 존재하는 leukocyte는 EL buffer 500 μ l로 lysis 시킨 후 다시 400 X *g* 에서 10분간 원심분리를 실행하였다. 이 후 상층액을 제거하고 RLT buffer를 350 μ l 첨가하여 잘 섞어준 후 spin column-collection tube에 샘플을 분주하고 2분 동안 최대 14,000 RPM으로 원심을 실행한다. 이 때 사용된 spin column은 미리 DNase stock (1500 Kunitz units인 DNase I을 550 μ l RNase free water에 녹인것) 10 μ l를 70 μ l RDD buffer와 섞은 후 column에 분주하여 15분간 정치시킨 후 RW1 350 μ l로 세척한 것을 사용하였다. Sample column은 600 μ l의 70% ethanol로 세척한 후 700 μ l RW1와 500 μ l RPE buffer로 다시 세척하였다. 세척이 끝난 각 샘플은 30 μ l의 RNase-free water로 elution 하였다.

추출된 RNA는 QIAGEN 사에서 제공하는 Reverse Transcription kit를 사용하여 cDNA로 합성을 수행하였다. 먼저 10 X buffer RT 2 μ l, dNTP mix (5mM) 2 μ l, Oligo-dT primer (10 μ M) 2 μ l, RNase inhibitor (10 units/ μ l) 1 μ l, sensiscript reverse transcriptase 1 μ l, template RNA 10 μ l를 섞어주고 DW로 최종 용량을 20 μ l로 맞추는 후 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시키고 RT-PCR과정을 실시하였다. 합성된 cDNA를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 이 때 사용한 프라이머는 앞서 사용한 프라이머와 동일하며 PCR 조건도 앞서 수행한 조건과 동일한 조건으로 수행하였다.

2. 결과

가. 고라니의 프리온 단백질 (PrP) 유전자 클로닝

PCR에 의해 증폭된 고라니의 프리온 유전자 DNA는 1.5% 아가로스젤에 전기영동을 하여 크기를 확인하여 본 결과 771-bp로 증폭되었다. 확보된 DNA는 DNA sequencing을 통하여 사슴의 프리온 유전자와 비교함으로써 고라니의 프리온 유전자임을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 확보된 유전자는 TA 클로닝 벡터에 클로닝 한 후 선발된 클론의 플라스미드 DNA를 추출한 후 EcoRI 제한효소를 이용하여 절단하였다. 절단된 DNA 밴드는 795-bp로 고라니 프리온 단백질 유전자를 포함하고 있는 것으로 확인되었다 (Fig. 2).

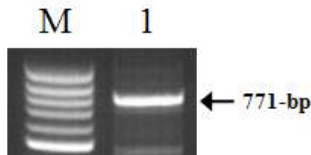


Fig 1. Water deer PrP gene amplified by PCR with genomic DNA extracted from peripheral blood mononuclear cells. M; 100-bp standard DNA marker, lane 1; water deer PrP

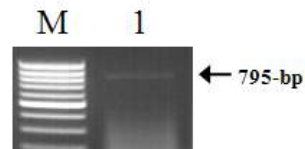


Fig 2. Water deer PrP gene in TA cloning vector. Plasmid DNA containing water deer PrP gene was digested with Eco RI. M; 100-bp standard DNA marker, lane 1; water deer PrP

나. 형질전환 마우스용 벡터 내로 고라니 프리온 단백질 (PrP) 유전자 클로닝

고라니의 프리온 유전자를 발현하기 위하여 사용된 형질전환용 벡터는 pCAGGS (Sapporo Medical University) 벡터가 사용되었다. 고라니의 프리온 유전자가 pCAGGS 벡터에 삽입되었음을 확인하기 위해 EcoRI 제한효소를 이용하여 절단하였다. 절단된 DNA 밴드는 795-bp로써 고라니의 프리온 유전자를 포함하고 있는 것으로 확인되었다 (Fig. 4). 이로써 고라니 프리온 단백질 유전자를 포함하고 있는 plasmid DNA를 확보하였다 또한 고라니의 프리온 유전자가 pCAGGS 벡터에 정방향으로 삽입되었음을 확인하기 위해 KpnI과 HindIII 제한효소를 이용하여 절단하여 1033-bp의 DNA를 확인하였다(Fig. 5)

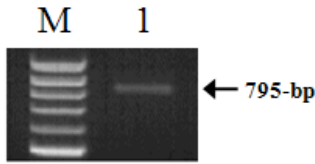


Fig 4. Water deer PrP gene in pCAGGS expression vector. Plasmid DNA containing water deer PrP gene was digested with Eco RI M; 100-bp standard DNA marker, lane 1; water deer PrP

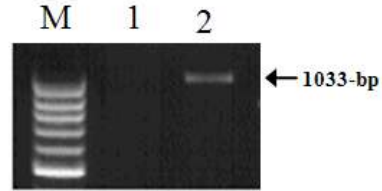


Fig 5. Water deer PrP gene in pCAGGS expression vector. Plasmid DNA containing water deer PrP gene was digested with Kpn I and Hind III. M; 100-bp standard DNA marker, lane 1; unligated plasmid DNA, lane 2; water deer PrP

다. 세포 내 프리온 단백질 유전자 발현 확인

형질전환 마우스를 제작하기 전에 pCAGGS 벡터에 클로닝 되어 있는 고라니의 프리온 유전자가 포유동물 세포 내에서 발현되는가를 확인하기 위하여 3T3 세포에 플라스미드 DNA를 transfection 한 후 3일째 세포에서 mRNA를 분리하였다. 분리된 mRNA에 존재하는 고라니의 프리온 유전자는 RT-PCR을 수행하여 확인하였다. RT-PCR 반응물을 전기영동한 후 771-bp인 고라니의 프리온 유전자가 증폭된 것을 확인하였다 (Fig. 6). 이와 같은 결과는 pCAGGS 벡터 내에 클로닝된 고라니의 프리온 단백질 유전자가 포유동물 세포 내에서 발현된다는 것을 증명하는 것이며 이는 또한 형질전환 마우스의 제작에 사용될 수 있음을 증명하는 것으로 판명하였다.

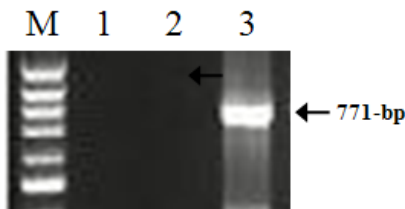


Fig 6. Water deer PrP expression in mammalian cells determined by RT-PCR. RT-PCR was conducted with mRNA extracted from 3T3 cells that were transfected with water deer PrP gene containing expression vector pCAGGS. M; 100-bp standard DNA marker, lane 1; annealing temperature at 58.8 °C, lane 2; annealing temperature at 56.4 °C, lane 3; annealing temperature at 54°C.

라. 고라니 프리온 단백질 유전자 발현 형질전환 마우스 제작

형질전환 마우스의 DNA를 추출하여 PCR을 수행하는 방법으로 고라니의 프리온 유전자를 보유하고 있는 마우스를 선별하였다. 총 103마리의 마우스 중 5마리의 마우스가 고라니의 프리온 유전자를 보유하고 있는 것으로 확인되었으며 그중에서 암컷은 1마리 그리고 수컷은 4마리로 확인되었다 (Fig. 7). 즉 형질전환 마우스로 제작된 마우스들은 마우스 프리온 유전자(mouse-PrP gene)를 보유한 상태에서 고라니 프리온 유전자(water deer-PrP gene)를 함께 발현하는 heterozygous 마우스로 확인되었다.

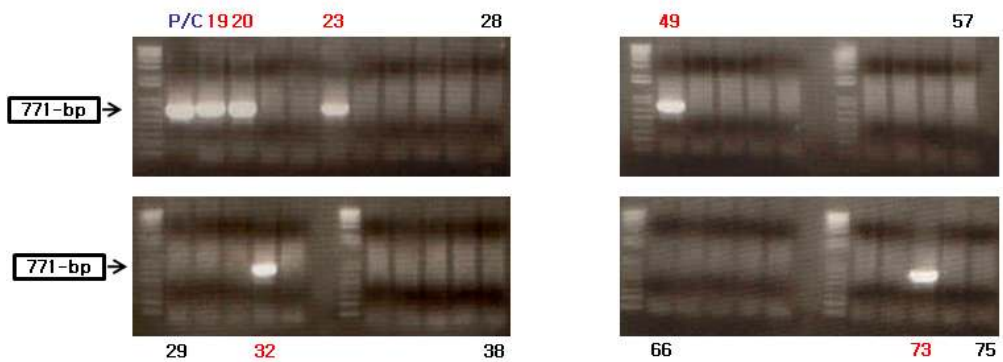


Fig 7. Identification of transgenic mice containing water deer PrP gene in their genomic DNA. P/C: positive plasmid DNA control, positive number: 19, 20 (dead), 23, 32, 49, 73.

F73 형질전환 마우스와 PrP knockout mouse를 통해 태어난 6마리의 마우스 중 양성으로 확인된 4마리의 마우스를 서로 교배하여 다시 8마리의 마우스를 확보하였다. 확보된 마우스는 genomic DNA를 추출 후 앞에서 제시한 primer로 PCR을 수행하였다. 또한 마우스의 PrP를 detection 할 수 있는 primer를 사용하여 다시 PCR을 한 후 고라니의 PrP만을 발현하는 마우스를 확보하였다. 실험 수행결과 BOD가 070814인 2 마리의 마우스와 BOD가 070815인 6마리의 마우스를 확보하였으며, 각각의 마우스에서 genomic DNA를 추출한 후에 고라니의 PrP gene이 삽입된 pCAGGS 벡터에서 PrP gene과 같이 연결된 b-globin gene의 일부분을 프라이머로 디자인하여 PCR을 수행하였다. PCR 결과 8마리의 모든 마우스에서 고라니 프리온 유전자를 보유하고 있는 형질전환 마우스만이 가지고 있는 b-globin gene을 확인하였다 (Fig. 8). 또한 마우스 PrP gene을 detection 할 수 있는 PCR을 다시 수행하여 BOD가 070815인 마우스에서 고라니 프리온

유전자를 보유하면서 마우스 프리온 유전자는 보유하고 있지 않은 순수한 homozygote transgenic 마우스 2마리를 확보하였다 (Fig. 9).

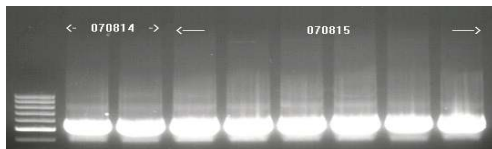


Fig. 8. Transgenic mice having water deer PrP gene in their genome.

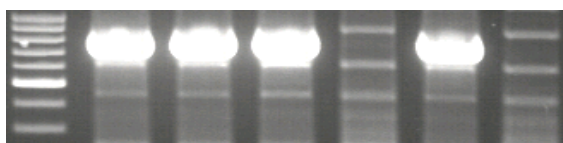


Fig. 9. Selection of transgenic mice expressing water deer PrP gene but not mouse PrP gene.

마. 수정란동결을 위한 고라니 프리온 유전자 발현 형질전환 마우스 선발

고라니의 프리온 단백질 유전자를 발현하는 heterozygote 형질전환마우스 (F49-♂, F73-♂)와 wild type female mouse (6주령 C57BL/6N mouse)를 교배시켜 19일 후에 각각의 마우스에서 F1을 확보하였다. 이들 중 고라니의 프리온 유전자를 발현하는 마우스를 선발하여 수정란동결을 위한 마우스로 사용하였다. PCR을 수행한 결과 고라니의 프리온 단백질 유전자가 genomic DNA에 삽입된 F1 마우스는 총 8 마리로 확인되었다 (Fig. 10).

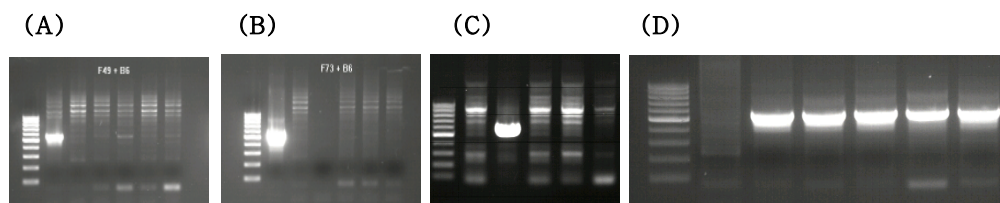


Fig. 10. Transgenic mice containing water deer PrP gene. Water deer specific PrP gene was identified as 561-bp PCR product. (A) One of six transgenic mice (DOB 070709) produced between F49 male and wild type female mice. (B) One of six transgenic mice (DOB 070724) produced between F73 male and wild type female mice. (C) One of five transgenic mice (DOB 070802) produced between F49 male and wild

type female mice. (D) Five of six transgenic mice (DOB 070818) produced between F73 male and wild type female mice. **DOB**: date of birth.

또한 선발된 형질전환 마우스의 mRNA를 분리하여 고라니의 프리온 유전자 발현 정도를 RT-PCR을 통하여 확인하였다. RT-PCR 결과 총 8 마리 마우스 중 4 마리가 고라니의 프리온 단백질 유전자를 mRNA로 높게 발현하는 것을 확인하였다 (Fig. 11).

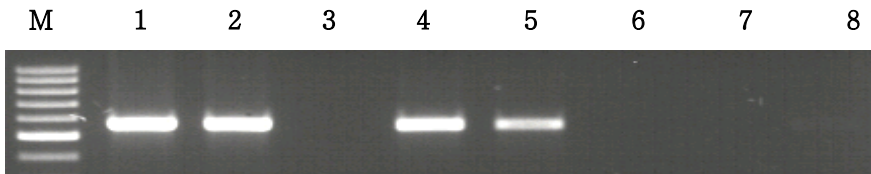


Fig. 11. Identification of transgenic mice expressing water deer PrP gene. M, 100-bp standard DNA ladder; lane 1, F49-F1 of BOD 070709; lane 2, F73-F1 of BOD 070724; lane 3, F49-F1 of BOD 070802, lanes 4, 5, 6, 7, 8, F73-F1 of BOD 070818.

바. 고라니의 프리온 유전자 발현 형질전환 마우스 스크리닝 및 수정란 기탁

마우스 성별을 확인해본 결과 Date of birth (DOB)가 070818 (F73-F1)인 4번 마우스 (F73-F1-4) 만이 수컷으로 확인되었다. 따라서 4번 수컷 마우스를 이용하여 SPF 형질전환 마우스를 다량 생산하기 위해 sperm을 채취하여 암컷의 난자와 인공수정을 시켰다. 인공수정된 수정란을 wild type 암컷 대리모 마우스에 이식하였다. Wild type의 암컷 마우스는 19일의 임신기간이 지나 총 12마리의 마우스를 생산하였으며 생후 14일이 지난 12마리의 마우스에서 고라니 프리온 단백질 유전자의 삽입을 확인하기 위해 꼬리를 일부분 절단하여 DNA를 추출하였다. Genomic DNA 추출은 앞서 기술한 QIAGEN사의 genomic DNA 추출방법과 동일하며, 추출된 genomic DNA를 이용하여 PCR을 수행하여 고라니의 프리온 단백질 유전자를 확인하였다. 이 때 사용한 프라이머는 앞서 사용한 프라이머와 동일하며 PCR 조건도 앞서 수행한 조건과 동일한 조건으로 수행하였다. PCR 결과 1, 2, 3, 6, 8, 9, 11, 12의 마우스들이 고라니 프리온 단백질을 보유하고 있음이 확인되었다 (Fig. 12). 마우스의 성별을 확인한 결과 1, 2, 3, 8, 9 번 마우스들이 수컷 마우스로 확인되어 이들을 과배란을 유도시킨 wild type의 암컷 마우스와 교배를 실시한 후 8-cell stage의 수정란 323개를 획득하여 생명공학원

에 기탁한 후(수탁번호: KCTC 11283BP) 특허를 출원하였다 (출원번호: 10-2008-0026540).

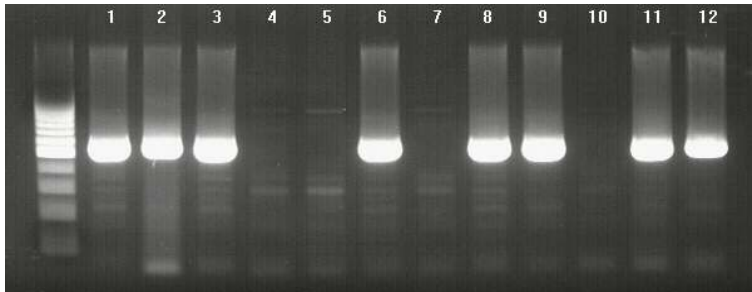


Fig. 12. Identification of transgenic mouse containing water deer PrP gene produced from F73-F1-4 of DOB 070818. 561-bp of PCR product was identified as water deer PrP gene.

제 2 절. 사슴의 프리온 유전자에 존재하는 polymorphism 연구

1. 실험재료 및 방법

가. 고라니와 꽃사슴 샘플

실험에 쓰인 blood sample은 고라니 7마리, 꽃사슴 33마리에서 채취하였으며, 근육조직은 27마리의 고라니에서 채취하였다. 혈액에서 Genomic DNA를 추출하는 방법 (Qiagen, USA)은 다음과 같다. 즉 200 μ l의 혈액을 1.5ml tube에 담고 proteinase K (50ug/ml)를 20 μ l 처리하였다. AL buffer를 200 μ l 첨가 하여 56 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 시켰다. Spin column을 장착 후 200 μ l의 EtOH를 위의 sample과 섞은 후 column에 분주 후 1 분간 spin down 시켰다. AW1과 AW2를 각각 500 μ l씩 분주 후 spin down 시킨 후 AE buffer로 100 μ l elution 시켰다. 근육 조직에서 Genomic DNA 추출 (Qiagen, USA) 방법은 다음과 같다. 즉 25mg의 근육 조직을 1.5ml tube에 담고 ATL buffer 180 μ l를 분주하였다. 20 μ l의 proteinase K (50ug/ml)로 처리한 후, 55 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 동안 lysis 시켰다. RNase 처리 후 AL buffer를 200 μ l 첨가 하여 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 시켰다. Spin column을 장착 후 200 μ l의 EtOH를 위의 sample과 섞은 후 column에 분주 후 1 분간 spin down 시켰다. AW1과 AW2를 각각 500 μ l씩 분주 후 spin down 시킨 후 AE buffer로 100 μ l elution 시켰다.

나. 프리온 유전자 검출 PCR

이후 추출한 Genomic DNA로 PCR 수행하였으며 이때 사용한 primer는 다음과 같다. Forward primer, 5'-ATG GTG AAA AGC CAC ATA GGC-3'; Reverse primer, 5'-CTA TCC TAC TAT GAG AAA AAT G-3'. PCR 반응은 2.5 units의 *Taq* DNA polymerase (Promega, USA) 0.5 μ l와 0.2 mM dNTP를 1 μ l, 10 X *Taq* DNA polymerase buffer 5 μ l, 20 pmol의 primer를 각각 1 μ l를 첨가한 후 D.W로 50 μ l를 맞추는 후 수행하였다. PCR은 30 cycle로 수행하였으며 반응조건은 다음과 같다; denaturation 94 $^{\circ}$ C for 45 sec, annealing 58 $^{\circ}$ C for 60 sec, extension 72 $^{\circ}$ C for 90 sec, final extension 72 $^{\circ}$ C for 5 min.

다. 고라니 및 꽃사슴 PrP gene (*PRNP*)에서의 polymorphisms

Nucleotide sequencing 반응은 Applied Biosystems 사의 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kits 을 이용하여 진행하였다. MJ Research 사의 PTC-225 Peltier Thermal Cycler를 사용하여 PCR 반응이 진행되며, primer를 이용하여 sequence를 읽었다. 반응이 끝나면 Ethanol을 이용하여 반응에 참여하지 않은 dNTP와 반응물을 분리해 내며, 정제된 PCR product는 3차 증류수에 다시 녹여 ABI PRISM 3730XL Analyzer 에서 분석을 하였다. 사용한 프라이머는 다음과 같다.

Forward primer; 5'-ATG GTG AAA AGC CAC ATA GGC-3'

Reverse primer; 5'-CTA TCC TAC TAT GAG AAA AAT G-3'.

라. SNP 검출 Real-Time PCR

본 실험에서는 41마리의 고라니 샘플과 45마리의 꽃사슴 샘플을 이용하여 SNP Real-Time PCR을 수행하였다. 고라니의 경우 100번째 코돈을, 꽃사슴의 경우 100, 136 및 226번째 코돈에 존재하는 SNP를 검출하고자 하였다. 사용한 primer 및 probe는 다음과 같다.

Marker Name	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Probe sequence
Sika deer_1-A	CACATGGTGGTGGAGGCT	TTGGTTTACTGGGCTTGTCCA	TGGTACCCACAGTCAG
Sika deer_1-G	CACATGGTGGTGGAGGCT	TTGGTTTACTGGGCTTGTCCA	TGGTACCCACGGTCAG
Sika deer_2-T	CCTCGGTGGCTACATGCT	CGGTCCTCATAGTCATTGCCAAAAT	CCTGCTCATAGCACTT
Sika deer_2-C	CCTCGGTGGCTACATGCT	CGGTCCTCATAGTCATTGCCAAAAT	CTGCTCATGGCACTT
Sika deer_3-C	AAATGTGCATCACCCAGTACCA	CACACTTGCCCTCTTTGGT	ATAAGCCTGGGATTCT
Sika deer_3-G	AAATGTGCATCACCCAGTACCA	CACACTTGCCCTCTTTGGT	AAGCCTCGGATTCT
Water deer_2-A	GGGTCAGCCCCATGGT	TGCTTCATGTTGGTTTTTGGTTTACTG	TACCCACAATCAGTGGAA
Water deer_2-G	GGGTCAGCCCCATGGT	TGCTTCATGTTGGTTTTTGGTTTACTG	CCACAGTCAGTGGAA

사용된 real-time PCR condition은 다음과 같다. PCR은 총 40 cycle에 의해 수행되었으며 95°C에서 15초 간 denaturation, 60°C에서 1분 간 annealing하였다. PCR 반응에는 template DNA 1 µl (20 ng/µl), 40X forward, reverse, probe 각각 0.125 µl, 2X probe mix 2.5µl, D. W. 1.875 µl로 총 반응용액은 5 µl로 조성되었다. Real-time PCR 기기는 ABI 7900 HT 기종이 사용되었다.

2. 결과

가. 고라니와 꽃사슴 프리온 유전자 확보

고라니 및 꽃사슴에 특이적인 프라이머와 이들의 blood 및 근육조직에서 채취한 genomic DNA를 이용하여 PCR을 수행한 결과 771-bp의 고라니와 꽃사슴의 PrP 유전자가 증폭된 것을 확인하였다 (Fig. 1).

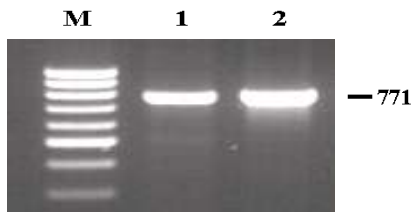


Fig. 1. Prion protein gene of water deer and sika deer. M, 100 bp standard DNA ladder; lane 1, 771-bp of water deer PrP gene; lane 2, 771-bp of sika deer PrP gene.

나. 고라니 PrP gene (*PRNP*) 에서의 polymorphisms

총 34마리의 고라니 샘플을 이용하여 프리온 유전자를 분석한 결과 2개의 single-nucleotide polymorphism (SNP)를 발견하였다. SNP가 발견된 위치는 코돈 77 및 100번 이었다. 코돈 77번에 위치한 231번째 뉴클레오타이드에서 A가 T로 바뀔 수 있었으나 아미노산기의 변화는 없는 silent mutation으로 밝혀졌다 (Fig. 2). 그리고 코돈 100번에 위치한 299번째 뉴클레오타이드에서는 A가 G로 바뀔 수 있었고 아미노산기가 Asparagine에서 Serine으로 바뀔 수 있었다 (Fig. 3).

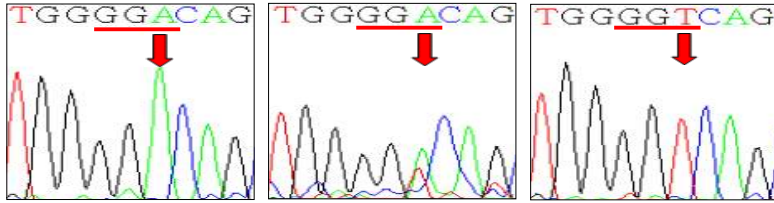


Fig. 2. Single-nucleotide polymorphism at codon 77 in water deer PRNP. Left panel, GGA/GGA (Gly/Gly); middle panel, GGA/GGT (Gly/Gly); and right panel, GGT/GGT (Gly/Gly).

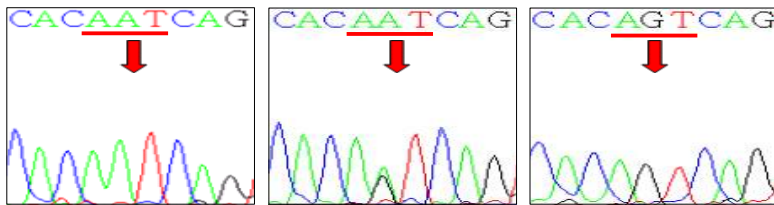


Fig. 3. Single-nucleotide polymorphism at codon 100 in water deer PRNP. Left panel, AAT/AAT (Asn/Asn); middle panel, AAT/AGT (Asn/Ser); right panel, AGT/AGT (Ser/Ser).

다. 꽃사슴 PrP gene (*PRNP*)에서의 polymorphisms

총 33마리의 꽃사슴 샘플을 이용하여 프리온 유전자를 분석한 결과 3곳의 코돈 즉 코돈 100, 136 및 226번에서 SNP가 존재하는 것을 확인 할 수 있었다. 코돈 100번에 위치한 298번째 뉴클레오타이드에서는 A가 G로 바뀐것을 확인 할 수 있었으며 (Fig. 4), 코돈 136번에 위치한 408번째 뉴클레오타이드에서는 T가 C로 바뀌었고 (Fig. 5), 코돈 226번에 위치한 676번째 뉴클레오타이드에서는 C가 G로 바뀐 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 6). 아미노산기의 변화는 코돈 100번에서 Serine이 Glycine으로 바뀔을 확인할 수 있었고, 226번째 코돈에서는 Glutamine이 Glutamic acid로 바뀔을 확인할 수 있었다.

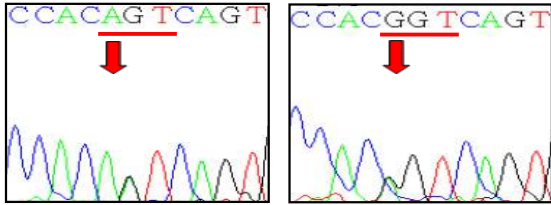


Fig. 4. Single-nucleotide polymorphism at codon 100 in the sika deer PRNP. Left panel, AGT/AGT (Ser/Ser); right panel, AGT/GGT (Ser/Gly).

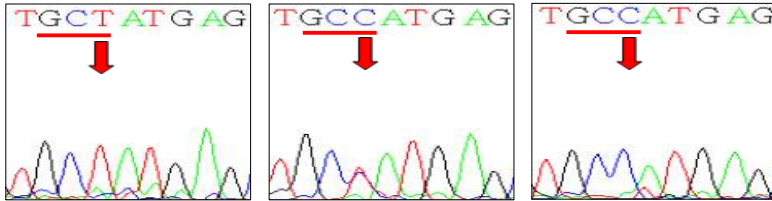


Fig. 5. Single-nucleotide polymorphism at codon 136 in the sika deer PRNP. Left panel, GCT/GCT (Ala/Ala); middle panel, GCT/GCC (Ala/Ala); right panel, GCC/GCC (Ala/Ala).

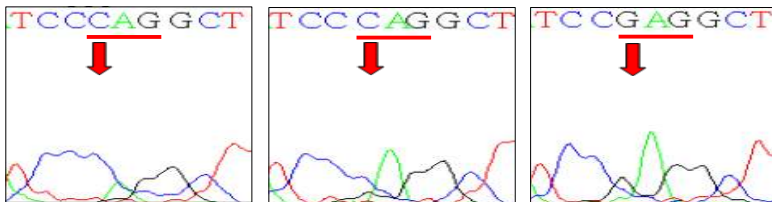


Fig. 6. Single-nucleotide polymorphism at codon 226 in the sika deer PRNP. Left panel, CAG/CAG (Gln/Gln); middle panel, CAG/GAG (Gln/Glu); right panel, GAG/GAG (Glu/Glu).

라. 고라니 *PRNP* polymorphism의 genotype과 allele frequencies

고라니의 PrP 유전자에서 관찰된 single nucleotide polymorphism (SNP)는 총 2개로 코돈 77과 100에서 관찰되었으며 그들의 genotype frequency 및 allele frequency는 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. Analysis of single-nucleotide polymorphism in the PRNP of the water deer.

Polymorphism	Total, <i>n</i>	Genotype frequency, <i>n</i> (%)			Allele frequency	
		A/A	A/T	T/T	A	T
Codon 77	34	10 (29.41)	7 (20.59)	17 (50.00)	39.71	

Polymorphism	Total, <i>n</i>	Genotype frequency, <i>n</i> (%)			Allele frequency	
		A/A	A/G	G/G	A	G
Codon 100	34	15 (44.12)	10 (29.41)	9 (26.47)	58.82	

마. 꽃사슴 PRNP polymorphism의 genotype과 allele frequencies

꽃사슴의 PrP 유전자에서 관찰된 single nucleotide polymorphism (SNP)는 총 3개로 코돈 100, 136 및 226에서 관찰되었으며 그들의 genotype frequency 및 allele frequency는 다음과 같다 (Table 2). 또한 꽃사슴의 개체수를 45마리로 증가한 후 real-time PCR을 이용하여 SNP를 검출하였다 (Table 3). 검출된 SNP에서 allele frequency는 대체로 비슷한 경향을 나타내었다.

바. 고라니, 꽃사슴의 PrP 아미노산기와 elk, white-tailed deer, mule deer의 아미노산기와의 상동관계 (%) 분석

고라니 (DQ358969)와 꽃사슴 (DQ358970)의 prion protein 아미노산기와 Elk (*Cervus elaphus nelsoni*; AF016228), White-tailed deer (*Odocoileus virginianus*; AF156185), Mule deer (*Odocoileus hemionus*; AY360091)의 prion protein 아미노산기의 비교 결과 다음과 같이 매우 높은 상동성을 나타내었다 (Table 4).

Table 2. Analysis of single-nucleotide polymorphism in the PRNP of the sika deer.

Polymorphism	Total, <i>n</i>	Genotype frequency, <i>n</i> (%)			Allele frequency	
		A/A	A/G	G/G	A	G
Codon 100	33	31 (93.94)	2 (6.06)	0 (00.00)	96.97	
Polymorphism	Total, <i>n</i>	Genotype frequency, <i>n</i> (%)			Allele frequency	
		T/T	T/C	C/C	T	C
Codon 136	33	12 (36.36)	15 (45.45)	6 (18.19)	59.10	
Polymorphism	Total, <i>n</i>	Genotype frequency, <i>n</i> (%)			Allele frequency	
		C/C	C/G	G/G	C	G
Codon 226	33	8 (24.24)	10 (48.48)	9 (27.27)	58.82	

Table 3. Analysis of single-nucleotide polymorphism in the PRNP of the sika deer by real-time PCR

polymorphism	Total number	Genotype frequency (n, %)				Allele frequency (%)	
		A/A	A/G	G/G	undetermined	A	G
Codon 100	45	42 (93.33)	2 (4.44)	0 (0.00)	1 (2.22)	95.55	2.22
polymorphism	Total number	Genotype frequency (n, %)				Allele frequency (%)	
		T/T	T/C	C/C	undetermined	T	C
Codon 136	45	9 (20.00)	23 (51.11)	13 (28.89)	0 (0.00)	45.56	54.44
polymorphism	Total number	Genotype frequency (n, %)				Allele frequency (%)	
		C/C	C/G	G/G	undetermined	C	G
Codon 226	45	11 (24.44)	22 (48.89)	11 (24.44)	1 (2.22)	48.89	48.89

Table 4. Analysis of % homology of prion protein genes of cervids

	Elk (%)	White tailed deer (%)	Mule deer (%)
Water deer	98.4	99.2	96.9
Sika deer	99.23	100	97.6

사. 고라니와 꽃사슴의 프리온 단백질 아미노산 염기 서열과 CWD에 감수성이 있는 엘크 및 사슴의 아미노산기 염기 서열 분석

CWD에 감수성이 있는 엘크, mule deer, white-tailed deer의 PrP 아미노산 서열에서 공통적으로 관찰되는 것이 Q95, G96, A116, M132, S225, Q226으로 알려져 있다. 이러한 아미노산기가 고라니 및 꽃사슴의 PrP에도 존재함이 증명되었다 (Fig. 7).

elk	MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGGW	60
mule	MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGGW	60
white	MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGGW	60
sika	MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGGW	60
water	MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGGW	60
elk	GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGGWQGGGTHSQWNKPSKPKTNMKHVAGAAA	120
mule	GQPHXGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGGWQGGGTHSQWNKPSKPKTNMKHVAGAAA	120
white	GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGGWQGGGTHSQWNKPSKPKTNMKHVAGAAA	120
sika	GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGGWQGGGTHSQWNKPSKPKTNMKHVAGAAA	120
water	GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGGWQGGGTHNQWNKPSKPKTNMKHVAGAAA	120
elk	AGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPLIHFGNDYEDRYRENMYRYPNQVYYRPVDQYNNQNTFVH	180
mule	AGAVVGGGLGGYMLGSAMXRPLIHFGNDYEDXYRENMYRYPNQVYYRPVDQYNNQNTFVH	180
white	AGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPLIHFGNDYEDRYRENMYRYPNQVYYRPVDQYNNQNTFVH	180
sika	AGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPLIHFGNDYEDRYRENMYRYPNQVYYRPVDQYNNQNTFVH	180
water	AGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPLIHFGNDYEDRYRENMYRYPNQVYYRPVDQYNNQNTFVH	180
elk	DCVNI TVKQHTVTTTTKGENFTETDIKMMERVVEQMCITQYQRESEAYYQRGASVILFSS	240
mule	DCVNI TVKQHTVTTTTKGENFTETDIKMMERVVEQMCITQYQRESEQAYYQRGASVILFSS	240
white	DCVNI TVKQHTVTTTTKGENFTETDIKMMERVVEQMCITQYQRESEQAYYQRGASVILFSS	240
sika	DCVNI TVKQHTVTTTTKGENFTETDIKMMERVVEQMCITQYQRESEQAYYQRGASVILFSS	240
water	DCVNI TAKQHTVTTTTKGENFTETDIKMMERVVEQMCITQYQRESEQAYYQRGASVILFSS	240

elk	PPVILLISFLIFLIVG	256
mule	PPVILLISFLIFLIVG	256
white	PPVILLISFLIFLIVG	256
sika	PPVILLISFLIFLIVG	256
water	PPVILLISFLIFLIVG	256

Fig. 7. Analysis of amino acid sequences of cervid prion proteins. Water deer, sika deer, elk (AF016227), mule deer (AF009181), white-tailed deer (AY275711).

제 3 절. PrP^{CWD}에 특이적인 항체 생산

1. 실험재료 및 방법

가. 엘크의 뇌 조직에서 genomic DNA 추출

엘크의 뇌 조직 25 mg을 1.5ml tube에 담고 ATL buffer 180 μ l를 분주한 후 proteinase K (50ug/ml) 로 처리한 후, 55 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 동안 lysis 시켰다. RNase 처리 후 AL buffer를 200 μ l 첨가 하여 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 시켰다. Spin column을 장착 후 200 μ l의 EtOH를 위의 sample과 섞은 후 column에 분주 후 1분간 spin down 시켰다. AW1과 AW2를 각각 500 μ l씩 분주 후 spin down 시킨 후 AE buffer로 100 μ l elution 시켰다. 추출된 genomic DNA는 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

나. Polymerase Chain Reaction (PCR)

추출한 엘크의 DNA는 PrP^c 단백질을 발현하는 771-bp의 유전자와 재조합 단백질로 발현 시 성숙 단백질로 작용하는 660 bp를 클로닝 하였다. 이 때 사용한 primer는 다음과 같다. 771-bp 유전자를 PCR 할 경우는 다음과 같았다; Forward primer, ATG GTG AAA AGC CAC ATA GGC AG; Reverse primer, CTA TCC TAC TAT GAG AAA AAT GAG. 660-bp 유전자를 PCR할 경우는 다음과 같았다; Forward primer, TGC AAA AAG CGA CCA AAA CC; Reverse primer, CAC AGG AGG GGA GGA GAA GAG GAT. PCR 반응은 20 pmol의 프라이머를 각각 1 μ l씩, 5 μ l의 10X *Taq* DNA polymerase buffer, 0.2mM dNTP를 1 μ l, 2.5units *Taq* DNA polymerase(Promega, USA) 0.5 μ l를 섞어 DW로 전체 볼륨을 50 μ l로 맞춰 준 후 수행하였다. PCR 조건은 다음과 같았다; 94 $^{\circ}$ C에서 5min 동안 초기 denaturation; 94 $^{\circ}$ C에서 45sec 동안 denaturation, 50 $^{\circ}$ C에서 60sec 동안 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 90sec 동안 extension, 총 30 cycles; 72 $^{\circ}$ C에서 5min 동안 final extension으로 PCR을 수행 하였다. 증폭된 유전자 DNA는 1.5% 아가로스젤에 전기영동을 하여 크기를 확인하였다

다. 엘크의 프리온 유전자 클로닝

771-bp 및 660-bp의 PCR product를 purification 한 후 TOPO TA cloning kit (Invitrogen)로 30분간 실온에서 ligation 시켰다 (vector 1 μ l, salt solution 1 μ l, insert 4 μ l). Ligation 시킨 product를 DH5a competent cell 50 μ l와 혼합한 후 42 $^{\circ}$ C에서 1분간 반응 시킨 후 SOC 배지를 250 μ l 섞고 37 $^{\circ}$ C incubator에 한 시간 동안 shaking 시켰다. Ampicillin(100ug/ml)이 포함된 LB agar plate에 200 μ l 도말한 후 37 $^{\circ}$ C incubator에 12시간~16시간 배양시켰다. Colony들을 selection 하여 Ampicillin이 포함된 LB broth 1ml씩에 배양시키고 12시간 후에 cell을 pellet down 시킨 후 plasmid DNA kit (QIAGEN)로 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 EoRI 으로 1시간 동안 digestion 후 1.5% agarose gel에서 전기영동을 하였다

라. 엘크의 프리온 단백질 유전자를 pQE 30 vector에 subcloning

프리온 단백질은 아미노산 서열이 24-243으로 구성된 부분만이 성숙단백질로 작용하는 것으로 알려져 있기 때문에 TA 벡터에 클로닝 된 프리온 유전자를 다른 primer를 이용하여 유전자를 재 증폭한 후 단백질 발현 벡터인 pQE30 vector (Qiagen) 내로 삽입하였다. 이 때 사용된 primer는 다음과 같다.

Forward primer, 5'-CAT GCA TGC TGC AAA AAG CGA CCA AAA CC-3'; Reverse primer, 5'-CCC AAG CTT CAC AGG AGG GGA GGA GAA GAG GAT-3'. Forward primer는 Sph I 제한효소 염기서열을 포함하며, reverse primer는 Hind III 제한효소 염기서열을 포함하도록 디자인 하였다 (밑줄친 부분). PCR 반응은 20pmol의 프라이머를 각각 1 μ l씩, 5 μ l의 10X *Taq* DNA polymerase buffer, 0.2mM dNTP를 1 μ l, 2.5units *Taq* DNA polymerase(Promega, USA) 0.5 μ l를 섞어 DW로 전체 볼륨을 50 μ l로 맞춰 준 후 수행하였다. PCR 조건은 다음과 같다. 94 $^{\circ}$ C에서 5min 동안 초기 denaturation; 총 30 cycle을 아래의 조건에서 수행하였다; 94 $^{\circ}$ C에서 45sec 동안 denaturation, 50 $^{\circ}$ C에서 60sec 동안 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 90sec 동안 extension, 72 $^{\circ}$ C에서 5min 동안 final extension. 증폭된 유전자 DNA는 1.5% 아가로스젤에 전기영동을 하여 크기를 확인하였다.

PCR product를 purification 후 TOPO TA cloning kit (Invitrogen 사) 로 30분간 실온에서 ligation 시켰다. ligation 시킨 product를 DH5a competent cell 50 μ l와 혼합한 후 42 $^{\circ}$ C에서 1분간 반응 시킨 후 SOC 배지를 250 μ l 섞고 37 $^{\circ}$ C incubator에 한 시간 동안 shaking 시켰다. Ampicillin (100ug/ml)이 포함된 LB

agar plate에 200 μ l 도달한 후 37 $^{\circ}$ C incubator에 12~16시간 배양시켰다. Colony들을 selection 하여 Ampicillin이 포함된 LB broth 1ml씩에 배양시키고 12시간 후에 cell을 pellet down 시킨 후 plasmid DNA kit (QIAGEN)로 추출하였다. 추출된 plasmid DNA를 SphI과 HindIII로 2시간 동안 digestion 후 1.5% agarose gel로 전기영동 하여 확인하였다.

이후 pQE30 vector를 SphI과 HindIII로 digestion하여 linear하게 만들고 TA cloning vector에 삽입된 PrP gene을 sphI과 hindIII로 digestion하여 gel elution kit (QIAGEN)로 추출하였다. Insert 1 μ l, pQE vector 1 μ l, T4 ligase 2 μ l, ligase buffer 1 μ l, D-W 5 μ l를 넣고 2시간 실온에서 반응시켰다. 2시간 후에 M15 competent cell 100 μ l를 분주 후 ice에 20분간 반응시킨 후에 42 $^{\circ}$ C에서 90초간 heating처리를 하고 psi broth를 500 μ l 섞은 후에 한 시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 shaking 후 LB agar plate (amp:100 μ g/ml, kan:25 μ g/ml)에 50, 100, 200 μ l씩 도달하였다. 37 $^{\circ}$ C incubator에 12시간~16시간 배양시킨 후 몇 개의 colony를 선택하여 LB broth(amp:100 μ g/ml, kan:25 μ g/ml)에 배양 시킨 후 plasmid DNA kit로 추출하여 SphI과 HindIII를 사용하여 절단하였다.

마. 재조합 엘크 프리온 단백질 발현 및 정제

pQE vector에 ligation된 colony만을 선택하여 LB broth (amp:100 μ g/ml, kan:25 μ g/ml) 1ml에 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 배양 시킨 뒤, 100 μ l를 취하여 새로운 LB broth (amp:100 μ g/ml, kan:25 μ g/ml) 5ml에 분주 후 2시간 동안 다시 37 $^{\circ}$ C에서 배양시켰다. 2시간 후에 IPTG (1mM)를 첨가 후 다시 6시간 동안 배양시킨 후 cell을 harvest 한 후 12000rpm에서 5분간 cell pellet down 시킨 후 2x sample buffer와 pellet을 1:1로 섞어 준 후 5분간 boiling 하였다. 이후 12% SDS-PAGE gel에 100V에서 한 시간 동안 전기영동 하였다

Western blot은 Prionics-check western kit를 사용(Prionics, Switzerland)하였다. 먼저 SDS-PAGE gel에 sample을 전기영동 한 뒤 PVDF membrane으로 150V, 한 시간 가량 blotting을 하였다. blotting한 membrane을 PVDF blocking buffer에 30분 동안 실온에서 incubation하였다. 6H4 first antibody(mouse anti-PrP IgG₁)를 1:5000으로 희석하여 실온에서 한 시간 동안 blotting한 membrane을 incubation하였다. TBST로 3번 washing 해준 후 (5분 간격으로)secondary antibody-AP (goat anti-mouse IgG-AP)를 1: 5000으로 희석하여 실온에서 30분 동안 incubation 한다. TBST를 이용하여 5분 간격으로 5번

washing 해준 후 1x Luminescence buffer로 5분 동안 incubation하였다. 1x Luminescence buffer 5ml에 CDP-Star (23.5mM)를 100 μ l 섞어 준 후 glass plate위에 membrane을 올려놓고 희석한 buffer를 조심스럽게 뿌려준 후 5분간 incubation하였다. 티슈로 최대한 membrane에 남아있는 buffer를 제거해 준 후 암실로 가서 X-Ray film을 사용해 membrane을 노출시켰다.

단백질 발현을 Westen blot으로 확인한 후 정제는 다음과 같이 실시하였다. LB broth(amp:100 μ g/ml, kan:25 μ g/ml) 20ml에 pQE vector에 ligation된 colony만을 선택하여 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 배양 시켰다. 새로운 LB broth (amp:100 μ g/ml, kan:25 μ g/ml) 1L를 만들어 위의 배양시킨 broth를 1:50 으로 희석하여 OD₆₀₀이 0.6이 될 때 까지 다시 배양시켰다. 1mM이 되도록 IPTG를 첨가해 준 후 4시간 동안 배양시켰다. 9000rpm에서 30분간 centrifugation 시킨다. Pellet을 buffer B로 g당 5ml씩 넣어 풀어주었다. (Buffer B:100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, 8M urea, Adjust pH 8.0 using NaOH) 실온에서 15-60분간 cell이 완전히 풀어져서 투명하게 될 때까지 교반기로 천천히 돌려 lysis 시켰다. Sonication을 200-300W로 10초 간격으로 6번 해준다. 7,000rpm으로 실온에서 30분 동안 centrifugation 해준 후 cleared lysate 상층액만을 수거하였다. Lysate와 50% Ni-NTA를 1:5 비율로 섞어준 후 실온에서 15~60분간 천천히(200 rpm) shaking 하였다. Column을 rack에 장착하여 섞어준 lysate를 조심스럽게 column 속으로 분주하였다. Column밑으로 흘러내린 샘플은 SDS-PAGE 분석을 위해 보관하였다. Buffer C로 4ml씩 두 번 washing 해 주었다 (Buffer C: 100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, 8M urea, Adjust pH 6.3 using HCl). Buffer D로 0.5ml씩 네 번 elution을 해주고, buffer E로 0.5ml씩 네 번 elution을 해주었다 (Buffer D: 100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, 8M urea, Adjust pH 5.9 using HCl, Buffer E: 100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, 8M urea, Adjust pH 4.5 using HCl)). Elution한 각각의 농도를 측정 한 후 SDS-PAGE 분석을 수행하였다.

바. 엘크의 재조합 프리온 단백질을 이용한 폴리클론 항체 생산

E. coli에서 발현되어 정제된 엘크의 재조합 프리온 단백질을 이용하여 토끼 및 마우스를 면역시켰다. 즉 토끼에는 500 ug의 재조합 단백질을 250 ug의 CpG motif와 혼합하여 3차에 걸쳐 접종하였으며, 마우스에는 100 ug의 재조합 단백질을 50 ug의 CpG motif와 혼합하여 3차에 걸쳐 접종한 후 혈청을 채취하여 항체가를 측정하였다. 엘크의 재조합 프리온 단백질을 ELISA 마이크로 플레이트에 coating 한 후 채취된 동물의 혈청을 첨가하여 반응을 유도한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

사. Monoclonal antibody 생산

총 771 bp의 DNA로 구성되어 256개의 아미노산을 발현하는 엘크의 PrP 유전자 중에서 E. coli에서 성숙한 형태인 24-243기의 아미노산으로 구성된 단백질을 발현하기 위해 660 bp의 유전자를 PCR로 획득하였다. 획득된 유전자를 E. coli 단백질 발현 벡터인 pQE (Qiagen)에 subcloning 하여 단백질로 발현한 후 순수 정제하여 항원으로 사용하였다. 선행 연구자들에 의해서 엘크 및 사슴의 PrP^{Sc}를 공통적으로 인식할 수 있는 단클론항체 제작에 사용된 peptide를 다음과 같이 제작하여 카르복실기 말단에 KLH를 연결하여 항원으로 사용하였다. AA 93-107; WGQGGTHSQWNKP나-KLH. PrP gene이 없는 PrP gene knockout mouse (PrP^{-/-})를 이용하여 단클론항체 제작을 다음과 같이 수행하였다. 두 마리의 C57BL6 PrP^{-/-} mouse에게 0.5 mg의 재조합 엘크 프리온 단백질을 복강 내로 주사하였다. 2주 후 동일한 용량의 재조합 단백질을 이용하여 boosting을 하였다. 2주 후 0.25 mg의 KLH가 conjugation 된 peptide 항원을 복강 내로 주사하였다. 마지막 boosting은 엘크의 재조합 프리온 단백질 (0.5 mg)과 KLH가 없는 peptide 항원 (0.25 mg)을 복강으로 주사하였다. 1주 후에 spleen을 적출하여 myeloma cell line (SP2/0 Ag14)과 PEG method를 이용하여 세포융합을 유도시켰다. 하이브리도마 1차 스크린에서는 항원으로 OVA-conjugated peptide (2 ug/ml)와 재조합 PrP 단백질 (2 ug/ml)을 coating 한 후 indirect ELISA를 실시하여 peptide 항원 및 재조합단백질 항원에 특이적인 클론을 선발하였다. 선발된 항체를 이용하여 Western blot을 실시하였다.

2. 결과

가. 엘크의 프리온 단백질 유전자 클로닝

엘크의 프리온 단백질을 발현하는 유전자는 총 771-bp로 구성되어 있다. 따라서 엘크의 뇌 조직에서 추출한 genomic DNA를 기질로 하여 PCR을 수행한 결과 771-bp의 PCR product를 증폭하였다 (Fig. 1).

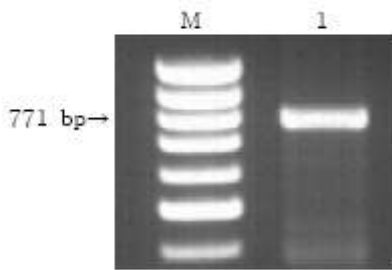


Fig. 1. PCR product of entire elk PRNP. M, standard DNA marker; lane 1, 771-bp of entire elk prion protein gene.

또한 *E. coli* 시스템에서 재조합단백질로 발현하기 위해 필요한 유전자는 N-terminal에 존재하는 signal 부분이 필요없다. 따라서 그 부분을 제거한 660-bp의 PCR product를 증폭할 수 있었다 (Fig. 2).

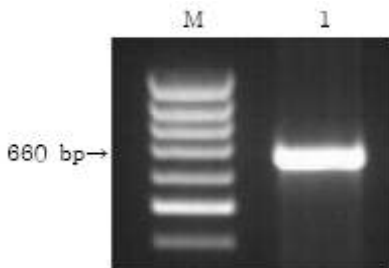


Fig. 2. PCR product of a part of elk PRNP necessary for recombinant protein expression. M, standard DNA marker; lane 1, 660-bp of entire elk prion protein gene.

TA 클로닝 벡터에 삽입된 전체 프리온 단백질 유전자 및 재조합 단백질로 제조하기 위한 유전자 부분을 *Eco* RI 제한효소를 이용하여 절단하여 본 결과 두 개의 유전자가 모두 TA 클로닝 벡터에 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 3 and 4).

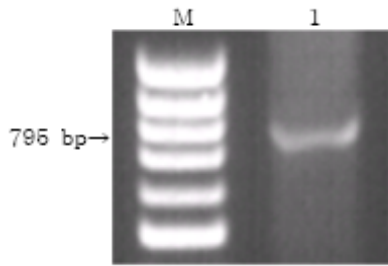


Fig. 3. Entire elk PRNP in TA cloning vector digested by Eco RI. M, standard DNA marker; lane 1, Eco RI-digested 795-bp of DNA containing entire elk PRNP.

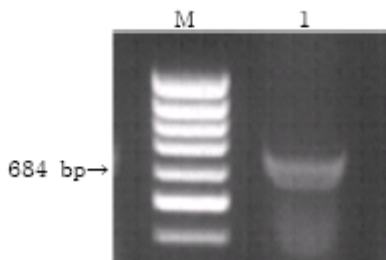


Fig . 4. N-terminal removed elk PRNP in TA cloning vector digested by Eco RI. M, standard DNA marker; lane 1, Eco RI-digested 684-bp of DNA containing N-terminal removed elk PRNP.

N-terminal 1-23개의 아미노산이 제거된 24-243 아미노산을 encoding 하는 유전자로 구성된 엘크 프리온 유전자를 E. coli expression vector인 pQE30 vector에 sub-cloning하기 위하여 디자인된 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 성공적으로 증폭된 것을 확인하였다. 이 후 증폭된 유전자를 TA 클로닝 벡터에 클로닝한 plasmid DNA를 정제하여 Sph I과 Hind III로 절단하였다. 이후 같은 제한효소로 절단된 pQE30 expression vector와 정제된 DNA를 ligation 시켰다. pQE30 vector에 클로닝 된 엘크 것을 Sph I과 Hind III로 절단하여 확인하였다 (Fig. 5). 이로써 최종적으로 엘크의 프리온 단백질 유전자 중 E. coli 시스템에서 재조합 단백질로 발현되기 위한 유전자가 클로닝 되었다.

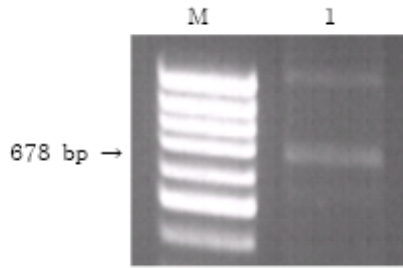


Fig. 5. Elk PRNP in *E. coli* expression vector. Elk PRNP composed of 660-bp cloned into pQE30 vector was digested with Sph I and Hind III. M, standard DNA marker; lane 1, 678-bp of Sph I and Hind III-digested plasmid DNA.

나. 재조합 엘크 프리온 단백질 발현

엘크의 재조합 프리온 단백질 발현은 *E. coli* 시스템에서 실시하였다. IPTG를 이용하여 단백질이 발현되는 것을 SDS-PAGE를 실시함으로써 확인하였다. 재조합 엘크 프리온 단백질은 24.9 kDa의 크기로 발현되었다 (Fig. 6). Prionics-check western kit를 이용하여 Western blotting을 실시함으로써 프리온 단백질을 최종적으로 확인하였다 (Fig. 7).

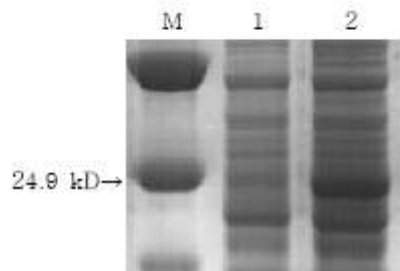


Fig. 6. Recombinant elk prion protein expressed in *E. coli*. M, standard protein marker, lane 1, no IPTG added to *E. coli*; lane 2, IPTG-induced prion protein.

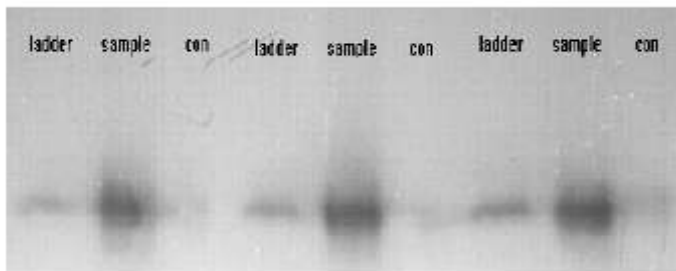


Fig. 7. Identification of elk prion protein by Western blotting.

발현된 엘크의 프리온 단백질을 affinity column을 이용하여 정제함으로써 항체 생산에 사용하고자 하는 엘크의 프리온 재조합단백질 항원을 확보할 수 있었다 (Fig. 8). 정제된 엘크의 재조합 프리온 단백질 또한 Western blot으로 확인하였다.

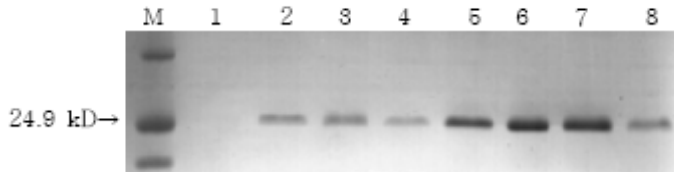


Fig. 8. Purification of elk prion protein. M, standard protein marker; lane 1-4, elk prion protein eluted by buffer D; lane 5-8, elk prion protein eluted by buffer E.

다. 프리온 단백질을 인식하는 polyclonal antibody 생산

토끼와 마우스에 엘크의 재조합 프리온 단백질을 이용하여 면역시킨 결과, 토끼에서 엘크의 재조합 프리온 단백질에 특이적인 항체가 형성된 것이 검증되었으며 마우스에서도 높은 항체가가 증명되었음 (Fig. 9). 따라서 재조합 엘크의 프리온 단백질을 이용한 면역 방법이 토끼 및 마우스에서 매우 효과적으로 프리온 단백질에 대한 특이 항체를 형성시킬 수 있음이 증명되었다.

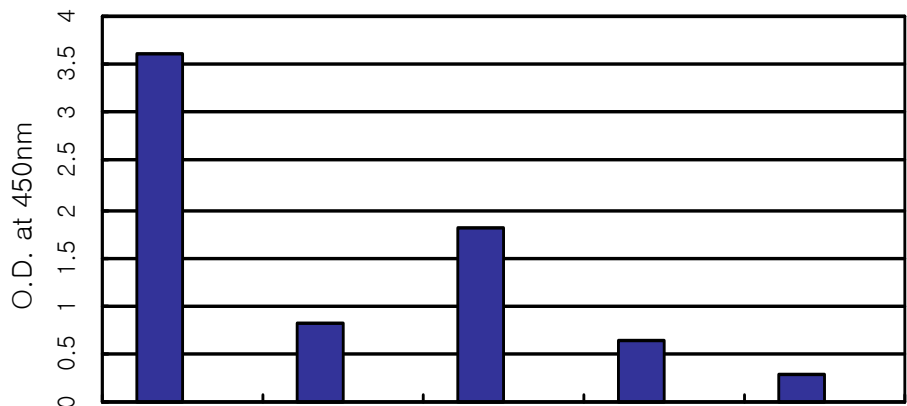


Fig. 9. Production of polyclonal antibody in rabbit and mouse.

라. 변형 프리온 단백질을 인식하는 monoclonal antibody 생산

1차 클론선발에서 총 15개의 클론이 선발되었다. 1차로 선발된 클론 중에서 클론 # A10, A25, A32, A53, B48, B53, B77 및 B85가 선발되어 2차 클로닝을 실시하였다. 최종적으로 선발된 클론은 총 8개였으며 이중 IgM 이 2개, IgG는 6개로 밝혀졌다. 선발된 클론의 마스터세포주를 작성하고 항체를 대량생산하여 항원반응성을 조사하여 본 바 다음과 같은 결과를 얻었다. 1차로 선발된 클론 중에서 클론 # A10, A25, A32, A53, B48, B53, B77 및 B85가 선발되어 2차 클로닝을 실시하였다. 최종적으로 선발된 클론은 총 8개였으며 이중 IgM 이 2개, IgG는 6개로 밝혀졌다. 선발된 클론의 마스터세포주를 작성하고 항체를 대량생산하여 항원반응성을 조사하여 본 바 다음과 같은 결과를 얻었다. 재조합 엘크 PrP 단백질에 특이적으로 강하게 반응하는 클론은 A32-24, A32-37, B77-75, B85-5, B85-8, B85-12 였고, 재조합 단백질 및 peptide에 약하게 반응하는 클론은 B48-57과 B48-60이었다. 또한 엘크 PrP 재조합 단백질 및 peptide에 모두 강하게 반응하는 클론은 B85-5, B85-8과 B85-12였다 (Table 1).

선발된 클론 중 A32-37, B48-57, B48-60, B85-05, B85-08, B85-12, B77-75 인 총 7개의 클론을 선정하여 Western blot을 실시하여 사슴의 변형 프리온 단백질에 대한 특이성을 확인하였다. 총 7개의 클론 중 3 개의 클론을 제외한 4개의 클론 즉 B85-05, B85-08, B85-12, B77-75는 사슴의 변형 프리온 단백질을 매우 특이적으로 인식하는 것이 증명되었다 (Fig. 10).

Table 1. Specificity of monoclonal antibodies to elk prion protein and eptiope peptide.

No.	Clone	ELISA OD (450nm)			Isotype	Remark
		ELK PrP-OVA	rELK PrP	Control		
1	A32.24	0.051	2.333	0.043	IgG1	MCB작성
2	A32.37	0.049	2.304	0.049	IgG1	MCB작성
3	B48.57	0.521	0.393	0.048	IgM	MCB작성
4	B48.60	0.916	0.511	0.054	IgM	MCB작성
5	B77.75	0.048	2.786	0.046	IgG1/ IgG2a	MCB작성
6	B85.5	2.777	2.145	0.051	IgG1	MCB작성
7	B85.8	2.939	2.234	0.063	IgG1	MCB작성
8	B85.12	3.430	2.333	0.046	IgG1	MCB작성

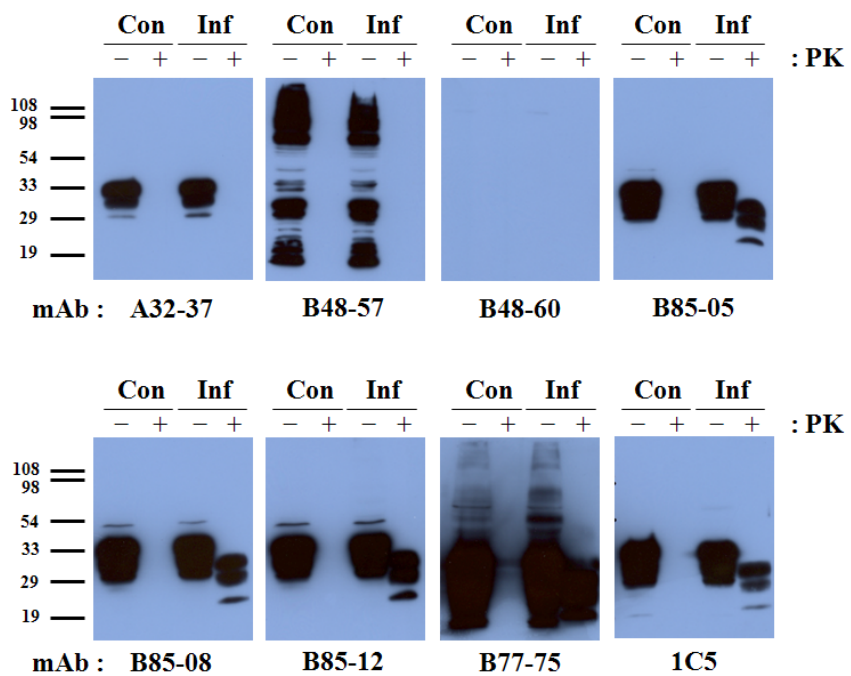


Fig. 10. Identification of specificity of monoclonal antibodies for PrP^{CWD} by Western blot.

제 4 절. PrP^{CWD}를 검출하는 Immuno-PCR 기법 개발

1. 실험재료 및 방법

가. 엘크의 정상 뇌조직유래 프리온 유전자 추출, 증폭 및 클로닝

엘크의 정상 뇌조직으로부터 프리온 유전자 mRNA는 RNeasy RNA extraction kit (Qiagen, USA)를 이용하여 추출하였다. 추출된 프리온 유전자 mRNA는 RT-PCR premix kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 reverse transcriptase PCR법으로 증폭하였다. 프리온단백질 (aa 23-257)을 암호화하는 프리온 유전자 증폭을 위하여 사용된 PCR primer는 다음과 같다. 유전자 클로닝을 위하여 forward primer에는 *EcoR I* 부위를, reverse primer의 경우 *Hind III* 부위를 각각 삽입하였다.

Forward primer; 5`-TGCAAGAATTCACCAAAACCTGG-3`

Reverse primer; 5`-TCCTAAAGCTTGAAAAATGAGGA-3`

증폭산물은 유전자 서열분석을 통하여 프리온 유전자임을 확인한 후, N-terminal에 6개의 histidine-tag 된 pRESTC 발현벡터의 *EcoR I*과 *Hind III* 제한효소부위에 삽입하여 클로닝함으로써 재조합 발현벡터 pRESTC/ePrP를 작성하였다.

나. 재조합 엘크 프리온 단백질의 발현 및 생산

재조합 pRESTC 발현벡터를 발현용 균주 *E.coli*(BL21(DE3)pLysS) (Invitrogen, USA)에 형질 전환시켰다. 형질전환된 대장균을 SOB agar에 배양한 후 ampicillin과 chlramphenicol에 저항성을 보이는 colony를 pick up하였다. 이들 colony로부터 plasmid를 추출하여 제한효소 처리법으로 원하는 프리온 유전자 DNA가 삽입 여부를 확인하였다. 원하는 재조합 plasmid를 함유하고 있는 대장균 colony는 ampicillin과 chlramphenicol가 함유된 SOB broth에서 밤새 배양시켰다. 배양된 대장균 세포를 lysis한 후 추출한 histidine-tagged된 재조합 엘크 프리온 단백질은 Probond Purification system (Invitrogen, USA)을 이용하여 정제

하였다. 정제된 단백질은 웨스턴 블로팅상에서 단클론항체 R63(NDYE)와의 특이 반응성 여부를 통하여 프리온 단백질의 발현을 확인하였다.

다. 프리온 항원과 프리온 항체간의 항원 항체반응성 조사

생산한 재조합 프리온 단백질과 프리온 항체간의 반응성 여부는 sandwich ELISA법으로 확인하였다. 즉, 폴리클로날 항체인 C73 또는 S1을 ELISA plates(Nunc, Denmark)에 코팅한 후, 재조합 프리온 단백질을 반응시켜서 항원-항체반응이 일어나게 한 다음, 항원-항체 반응산물은 biotinylation된 단클론항체 R63 또는 6H4을 이용하여 검출하게 하였다.

라. Reporter DNA(pUC19)의 생산

프리온 항원-항체 결합물에 대한 reporter DNA(pUC19)의 결합반응은 streptavidin을 이용하여 유도시켰다. Biotinylation된 reporter DNA(pUC19)는 5'말단에 biotin이 부착된 forward primer (biotin-5'-ATT GTT GCC GGG AAG CTA GAG TAA GTA GTT-3)와 reverse primer (5'-TAT GCA GTG CTG CCA T AA CCA TGA-3')를 제작하여 94°C 1분, 60°C 1분, 72°C 1분간 30 cycle 조건으로 PCR을 수행하여 작성하였다.

마. PrP^{CWD} 검출을 위한 뇌조직에서 전처리 방법

사슴 프리온 단백질은 검역원에서 개발된 방법을 이용하여 추출하였으며 음성조직은 obex부분에서 양성은 사슴 대뇌 또는 소뇌를 이용하여 분석하였다. 간략하면 뇌유제액을 20%되게 tissue grinder로 유제한 후 500ul씩 소분하여 사용하기 전까지 -20°C에 보관하였다. PrP^{CWD}를 검출하는 Immuno-PCR기법확립을 위하여 감염된 뇌에서 PrP^{CWD}만 선택적으로 추출하였다. 뇌유제액을 50°C에서 10분간 단백분해효소 반응시켜 정상 사슴프리온을 선택적으로 제거한 후 chaotropic agent와 alcohol을 넣어 PrP^{CWD}를 농축 시켰다. 마지막으로 denature buffer를 이용하여 80°C 5min간 반응 후 희석버퍼를 넣어 반응하였다. 양성대조군은 재조합 사슴단백질을 이용하였다.

바. 사슴의 뇌조직에서 PrP^{CWD}를 검출하는 효소면역반응(ELISA)

ELISA는 사슴의 프리온 단백질을 인식하는 항체와 biotin이 부착된 2차 항체

를 바탕으로 면역학적인 검출방법을 이용하여 사슴의 PrP^C 및 PrP^{CWD} 등의 인식 여부를 확인하였다. 프리온 단백질을 인식하는 항체로는 C73과 6H4가 사용되었다. C73은 prion peptide가 접종된 닭혈청을 정제하여 얻어졌으며 6H4는 프리온 단백질이 결핍 mouse에서 생산된 단클론항체로 프리온 단백질의 core 부분을 인식하는 항체이다. C73은 capture 항체로서 4℃ 16시간 코팅하였으며 비특이 반응을 줄이기 위한 blocking buffer로 37℃에서 2시간 반응하였다. 시료는 37℃에서 1시간 반응 후 detection antibody로 6H4를 사용 후 2차항체반응 후 TMB를 이용한 발색반응 실시하였으며 주과장 450nm, 부과장 620nm로 OD값을 측정하였다.

사. 사슴의 뇌조직에서 PrP^{CWD}를 검출하는 Immuno-PCR 기법

Immuno-PCR을 위한 ELISA는 2차항체로 biotinylated 된 것을 사용하고 polypropylene microplates (MicroAmp Optical 96 well reaction Plate, Applied Biosystems)를 이용한 것 외에는 ELISA와 동일한 방법으로 하였다. 각 단계의 반응액은 웰당 50ul로 하였으며 streptavidin과 biotinylated reporter DNA와 실온에서 15분간 반응 후 그 결과 반응된 streptavidin-DNA complex를 실온에서 30분 반응 후 PBS로 5회, 3차증류수로 3회 세척 후 real time을 수행하였다. 증폭은 ABI 7500 Fast Real-Time PCR System으로 다음과 같은 조건에서 수행하였다. 50ul의 반응액중 50% 2X SYBER Green PCR master mix(Applied Biosystems), 각 20 pM primer, 46%의 nuclease free water를 사용하였다. 사용된 real time immuno-PCR의 조건은 biotinylated reporter DNA 2nM, streptavidin 1nM 였으며, SYBR green을 이용한 real time PCR의 반응 조건은 96℃에서 6분간 반응 후 95℃에서 15초, 60℃에서 2분간 40 cycle이었다. 항원-항체 복합체와 Reporter DNA 사이의 결합의 정도는 (재조합 프리온 단백질 항원에 대한 mock control로 사용된 PBS의 CT값 평균)/(set 당 CT값)의 비율을 비교하여 나타내었다.

2. 결과

가. 엘크 뇌조직유래 프리온 유전자 추출, 증폭 및 클로닝

엘크 뇌조직으로부터 프리온 유전자를 추출 증폭한 결과, 예측했던 대로 698-bp에 해당하는 DNA가 증폭되었다. 증폭된 DNA가 실제 원하는 elk의 프리온 유전자인지 여부를 확인하기 위하여 유전자 염기서열을 분석한 결과, Genbank (Accession no. AY748456)에 기 등록된 엘크의 프리온 유전자 염기서

결과와 동일한 염기서열을 보였다. 프리온 단백질 발현을 위하여 제작한 프리온 유전자 DNA 삽입 재조합 pRESTC 벡터는 약 3.7 kb에 해당하는 유전자 크기를 보였다. 재조합 발현벡터 pRESTC/ePrP가 실제로 원하는 프리온 유전자를 포함하고 있는지를 제한효소법으로 조사하였다 (그림 1). 그 결과, *EcorR1/HindIII*로 처리한 경우 698-bp과 3-kb에 해당되는 DNA 절편이 확인되었으며, *PstI*으로만 단독 처리한 결과는 3.3-kb와 360-bp에 해당하는 DNA 절편이 확인되었다. 또한 프리온 특이 PCR primer를 이용하여 재조합 plasmid로부터 증폭한 결과, 698bp에 해당하는 증폭산물이 확인되었다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 본 연구에서 작성한 재조합 pRESTC/ePrP 벡터는 원하는 프리온 유전자 DNA를 함유하고 있는 것으로 판단되었다.

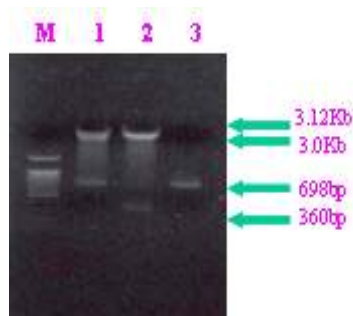


그림 1. 재조합 발현벡터 pRESTC/ePrP내 프리온 유전자 DNA 삽입여부 확인. Lane M : 100bp ladder, lane 1: *EcoR I / HindIII* 처리한 결과, lane 2: *Pst I* 처리한 결과, lane 3: 엘크 프리온 유전자 PCR 산물

나. 재조합 엘크 프리온 단백질의 발현 및 생산

재조합 발현벡터 pRESTC/ePrP를 발현용 균주 *E.coli(BL21(DE3)pLysS)* (Invitrogen, USA)에 형질 전환시킨 결과, SOB agar에 배양한 후 ampicillin과 chlramphenicol에 저항성을 보이는 colonies가 관찰되었다. 재조합 발현벡터 pRESTC/ePrP를 함유하고 있는 자란 항생제 내성 세균 colony들이 제한효소 처리법으로 조사하여 선별하였다. 이들 세균 colony들은 *EcorR1/HindIII*로 처리하였을 때 698bp에 해당하는 프리온 유전자 DNA가 삽입되어 있음을 확인하였다. 이들 대장균 콜로니로부터 추출하여 histidine 항체를 이용하여 재조합 단백질을 순수 정제하여 전기영동법으로 조사한 결과, acrylamide 겔에서 프리온 단백질의 예상 크기에 해당하는 약 25 kDa에 해당하는 재조합 단백질의 발현이 확인되었다. 이 단백질이 프리온 단백질을 확인하기 위하여 추가적으로 웨스턴 블로팅

을 실시한 결과, 발현단백질은 프리온특이 단클론항체 R63과 특이적으로 반응하였으며, 프리온 항체와 특이반응을 보인 단백질은 전기영동상에서 확인된 25 kDa의 단백질이었다 (그림 2). 예상했던 대로, control로 사용된 Prionics사의 truncated 재조합 발현단백질 또한 단클론항체 R63과 특이반응을 보였다. 따라서 이러한 결과는 발현 단백질이 엘크의 프리온 단백질임이 제시하는 것이다.

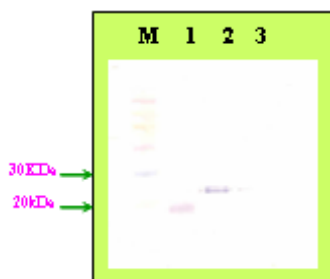


그림 2. 형질전환 대장균에서의 재조합 엘크 프리온 단백질의 발현 (웨스턴 블로팅).
Lane M : Protein maker, lane 1: control (Prionics check western: PrPc), lane 2: purified His-PrP(2µg), lane 3: purified His-PrP(1µg).

다. 프리온 항원과 프리온 항체간의 항원 항체반응성 조사

프리온 항원-항체 반응 여부를 sandwich ELISA법으로 조사하기 위하여 사용된 재조합 프리온 단백질과 프리온에 대한 항체의 반응조건을 조사하였다. 프리온 aa73-aa88부위를 인식하는 C73 다클론항체와 프리온 aa 89-aa112부위를 인식하는 S1 다클론 항체를 coating항체로 각각 별도로 사용하였으며, 프리온의 중심부위를 인식하는 biotinylated R63을 검출 항체로 이용하였다. 사용된 항체들은 C73(2µg/ml)과 biotinylated R63(10µg/ml), C73(2µg/ml)과 biotinylated R63(2µg/ml), S1(2µg/ml)과 biotinylated R63(10µg/ml), S1(2µg/ml)과 biotinylated R63(2 µg/ml) 조건하에서 재조합 프리온 단백질 항원에 대한 ELISA 반응성을 조사하였다(그림 3). 그 결과, 재조합 프리온 단백질 항원은 농도추이에 따라 각 프리온 항체와 전형적인 S형 항원-항체 양성반응의 양상을 보였다. 각 항원-항체반응 조합 결과를 볼 때, S1 항체를 coating하고 R63 항체로 검출한 경우에 가장 우수한 항원-항체 결과를 나타내었다. 이 경우 재조합 프리온 단백질의 농도가 1.0 µg/ml이상, biotinylated R63의 농도가 10µg/ml인 경우에서 최적의 항원-항체

반응성을 나타내었다 (최대 반응성: >1.0 OD450nm). 한편, C73 항체를 coating 항체로 적용한 경우 재조합 프리온 단백질과의 반응성은 S1항체를 적용한 경우에 비하여 현저히 낮았다 (최대 반응성: 0.5 OD450nm). 상기의 결과로 볼 때, 재조합 프리온 단백질을 검출하기 위한 ELISA 조건에서는 S1 항체가 유리한 조건을 가진 것으로 판단되었다.

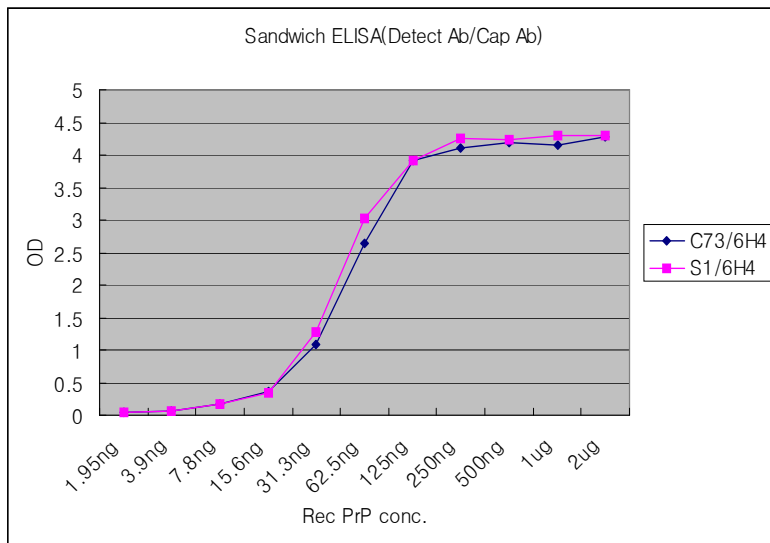
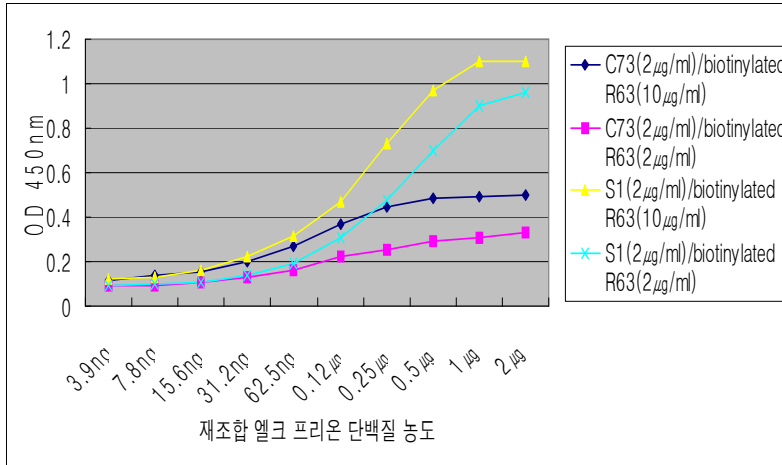


그림 3. Sandwich ELISA를 이용한 재조합 엘크 프리온 단백질과 프리온 특이 항체간의 반응성

그러나 재조합 단백질을 이용하여 sandwich ELISA 확립을 위한 항체 set의 민감

도를 확인한 결과 R63보다 6H4를 검출항체로 사용할 경우 민감도가 배로 상승됨을 확인하였으며, 코팅항체를 S1으로 이용한 경우 보다 C73을 적용시 특이도가 상승됨을 확인하였다 (그림3).

라. Biotinylated 항체를 이용한 사슴의 PrP^C 및 PrP^{CWD}의 인식확인

사슴의 프리온 단백질을 인식하는 항체와 biotin이 부착된 2차항체를 바탕으로 면역학적인 검출방법을 이, 사슴의 PrP^C 및 PrP^{CWD}등의 인식여부를 확인하였다. 프리온 단백질을 인식하는 항체로는 C73과 6H4가 사용되었다. C73은 prion peptide가 접종된 닭혈청을 정제하여 얻어졌으며 6H4는 프리온 단백질이 결핍 mouse에서 생산된 단클론항체로 프리온 단백질의 core 부분을 인식한다. 면역학적인 검출기법으로는 웨스턴블롯과 엘라이자(ELISA)법이 사용되었다. 웨스턴블롯법에서는 사슴유래 PrP^C 및 PrP^{CWD}에 먼저 6H4 및 C73을 반응시킨 후, 바이오틴이 부착된 2차항체를 반응시켰다. 마지막으로 alkaline phosphatase가 부착된 streptoavidin을 반응시킨 후 발색제를 반응시킨결과 PrP^C 및 PrP^{CWD}가 바이오틴이 부착된 항체에 잘 인식됨을 확인할 수 있었다 (그림 4).

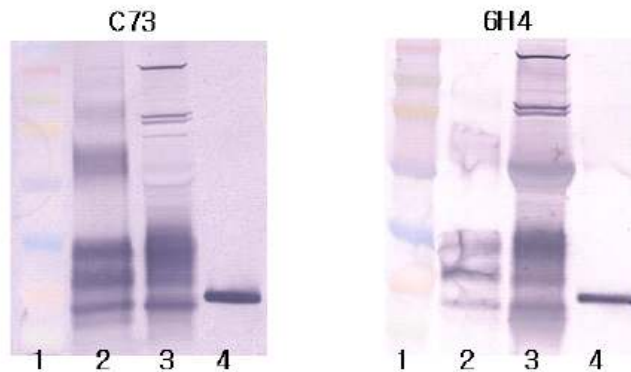


그림 4. 웨스턴 블롯법을 통한 biotinylated 항체와 사슴 PrP^C 및 PrP^{CWD}의 반응성 조사. Lane 1: marker, lane 2: 사슴 PrP^C, lane 3: 사슴 PrP^{CWD}, lane 4: 사슴재조합 PrP.

엘라이자법을 이용한 반응성조사에서는 사슴 PrP^{CWD} 및 사슴 재조합 PrP를 항원으로 사용하였다. 플레이트에 C73코팅항체를 코팅한 후 항원을 반응시켰다. 6H4 항체를 이용하여 항원을 검출한 후, biotin이 부착된 2차항체를 반응시켰다.

마지막으로 Horseradish peroxidase(HRP)가 부착된 Streptoavidin을 반응시킨후 발색제를 반응시킨 결과 사슴 PrP^{CWD} 및 사슴유래 재조합 PrP 가 바이오틴이 부착된 항체에 잘 인식됨을 확인할 수 있었다 (그림 5). CWD감염 뇌조직을 음성 뇌조직으로 확인된 시료로 희석하여 ELISA를 실시한 결과 약 1:500까지 검출이 가능함을 확인할 수 있었다 (그림 6).

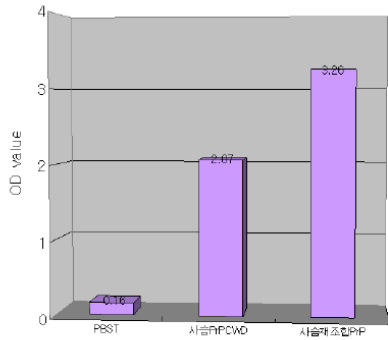


그림 5. ELISA 법을 통한 Biotinylated 된 항체와 사슴 PrP^C 및 PrP^{CWD} 의 반응성 조사

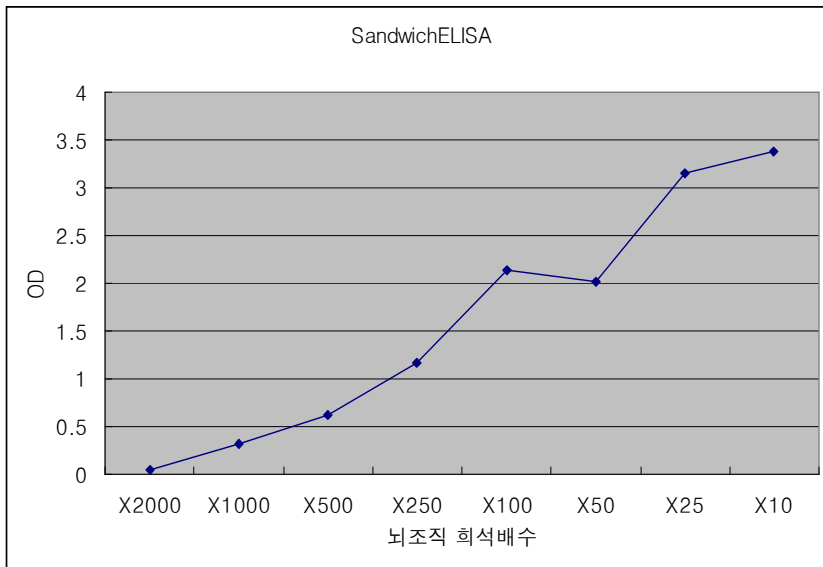


그림 6. ELISA를 이용한 희석배수별 CWD 감염뇌조직에서 변형 프리온 단백질 검출

마. Reporter DNA(pUC19)를 이용한 프리온 항원-항체 복합체의 검출

Immuno-PCR 조건을 적용하기 위하여 reporter DNA(pUC19)를 이용한 프리온 항원-항체 복합체의 검출할 수 있는 지 여부를 real-time PCR기법을 이용하여 조사하였다. 상기에서 적정 조건을 설정한 C73(2 μ g/ml)과 biotinylated R63(10 μ g/ml)를 사용한 경우 (set1), S1(2 μ g/ml)과 biotinylated R63(2 μ g/ml)을 사용한 경우(set2) 두 가지 그룹으로 나누어 조사하였다. 이 때 사용한 재조합 엘크 프리온 단백질의 농도는 2 μ g/l이었으며 항원에 대한 mock-control로서 PBS를 사용하였다. 항원-항체 복합체와 Reporter DNA 사이의 결합의 정도를 분석 한 결과, C73(2 μ g/ml)과 biotinylated R63(10 μ g/ml)를 사용한 경우 (set1) 23.5 ratio를, S1(2 μ g/ml)과 biotinylated R63(2 μ g/ml)을 사용한 경우(set2) 29.7 ratio를 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때, reporter DNA(pUC19)는 미리 형성된 프리온 항원-항체 복합체를 검출할 수 있다고 판단되었다 (그림7).

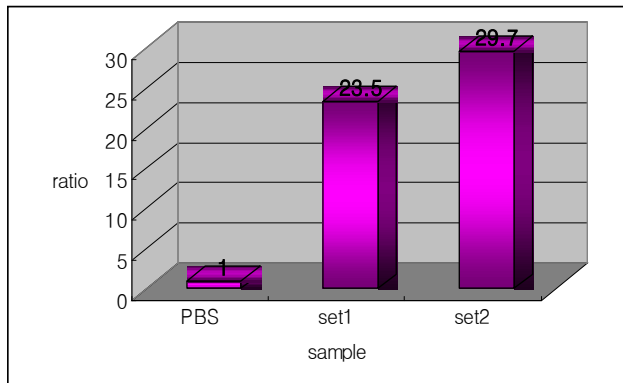


그림 7. Reporter DNA(pUC19)를 이용한 프리온 항원-항체 복합체의 검출. 항원-항체 복합체와 Reporter DNA 사이의 결합의 정도는 (PBS CT값 평균)/(set 당 CT값)의 ratio로 비교하였다. Set 1: 코팅 항체: C73(2 μ g/ml)/ 검출 항체: biotinylated R63(10 μ g/ml); set 2: 코팅 항체: S1(2 μ g/ml)/ 검출 항체: biotinylated R63(2 μ g/ml)

그러나 CWD 양성과 음성 시료를 이용할 경우 biotin conjugated 항체는 conjugated 안된 항체에 비하여 특이도와 민감도가 저하됨을 확인하였으며 특이도와 민감도가 가장 좋은 C73과 6H4항체를 사용하였다.

바. Biotinylated된 DNA의 증폭

바이오틴이 부착된 DNA의 준비를 위하여 pUC19 vector를 사용하였다. 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행한 결과 바이오틴이 부착된 265-bp의 DNA를 준비하였다. 프리온 항원항체 결합물을 통한 바이오틴부착 DNA의 증폭을 위하여 C73 항체가 코팅된 plate를 이용하였다. 사슴재조합 PrP항원으로 PBST를 음성대조군으로 이용하였으며 plate에 부착되어있는 항원검출을 위하여 6H4가 사용되었다. Streptoavidin을 바이오틴에 부착 DNA에 미리 결합시킨 후, 그 복합체를 프리온 항원-항체 결합물이 있는 plate에 첨가하여 반응시켰다. Plate에 부착된 DNA의 증폭을 위하여 사용된 프라이머는 위와 동일하며, 면역중합효소연쇄반응(immuno-PCR)을 수행한 결과 바이오틴이 부착된 DNA의 증폭을 확인하였다(그림 8).

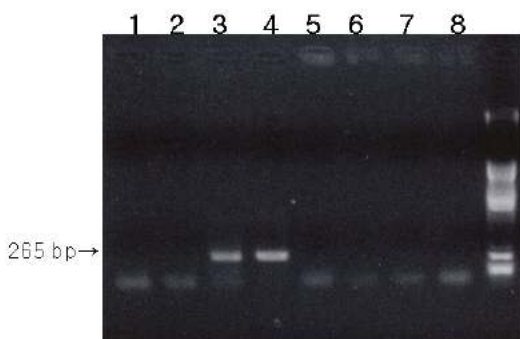


그림 8. 면역효소중합반응(immuno-PCR)을 이용한 biotinylated DNA의 증폭

사. 사슴뇌조직에서 PrP^{CWD}를 검출하는 Immuno-PCR 기법 확립

C73항체가 코팅된 plate에 전처리가 끝난 시료를 반응시켰으며 양성대조군으로는 사슴재조합 PrP를 음성대조군으로 PBST를 사용하였다. Plate에 부착되어있는 항원 검출을 위하여 6H4를 사용하였다. Streptoavidin을 바이오틴 부착 DNA에 미리결합시킨후, 그 복합체를 프리온 항원-항체 결합물이 있는 plate에 첨가하여 반응시켰다. Plate에 부착된 DNA의 증폭을 위하여 사용된 프라이머는 위와 동일하였으며, 면역중합효소연쇄반응(immuno-PCR)을 수행한 결과 CWD감염된

뇌 시료에서만 특징적으로 DNA의 증폭이 일어남을 알 수 있었다 (그림 9). 재조합 사슴단백질로 검출한계를 살펴본 결과 15ng/ml까지 검출이 가능함이 확인되어 ELISA와 비슷한 검출한계를 나타내었다.

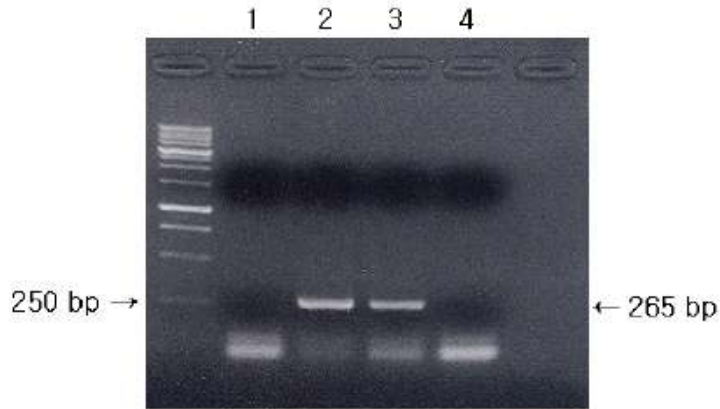


그림 9. Immuno-PCR을 이용한 CWD 감염 뇌시료에서 PrP^{CWD} 검출. Lane 1: PBST (음성대조군), lane 2: deer PrP (양성대조군), lane 3 : CWD 감염사슴뇌, lane 4: 정상사슴뇌

아. 사슴 뇌조직에서 PrP^{CWD}를 검출하는 real-time Immuno-PCR 기법 확립

민감도를 높이고 정량이 가능하도록 real time immuno-PCR을 확립하고자 하였으며 사용된 모든 시료는 조직병리학검사 및 면역조직화학적 검사법, Bio-Rad ELISA로 진단이 완료된 시료를 이용하였다. 우리가 확립한 면역검출기법은 재조합사슴프리온 단백질을 이용한 검출한계를 살펴본 결과 NVRQS ELISA는 7~15 ng/ml이고 real-time immuno-PCR 1 pg/ml 까지 검출이 가능함을 확인할 수 있었으며 ELISA보다 1000배 정도 민감한 것으로 사료된다. 음성 뇌조직은 20개의 시료를 시도하여 본 결과 Ct값이 19~22 이었고 감염시료의 경우 10개의 시료를 시도한 결과 Ct 값이 11~17이었다 (그림 10). 뇌유체액은 시료의 감염정도에 따라 다르겠지만 희석배수별로 확인한 결과 NVRQS ELISA는 1:500배 까지 검출이 가능하며 real-time immuno-PCR은 1 : 1,000배까지 검출이 가능함을 확인하였다.

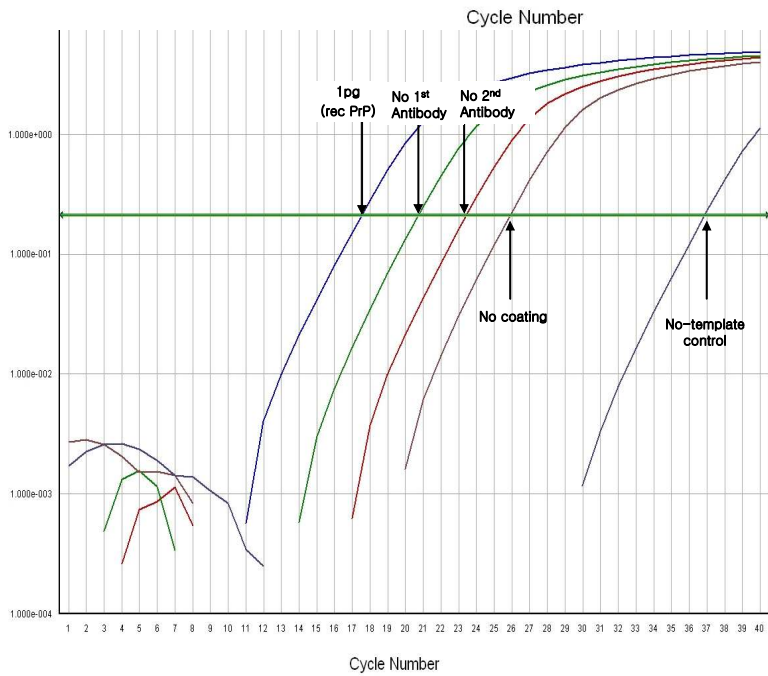
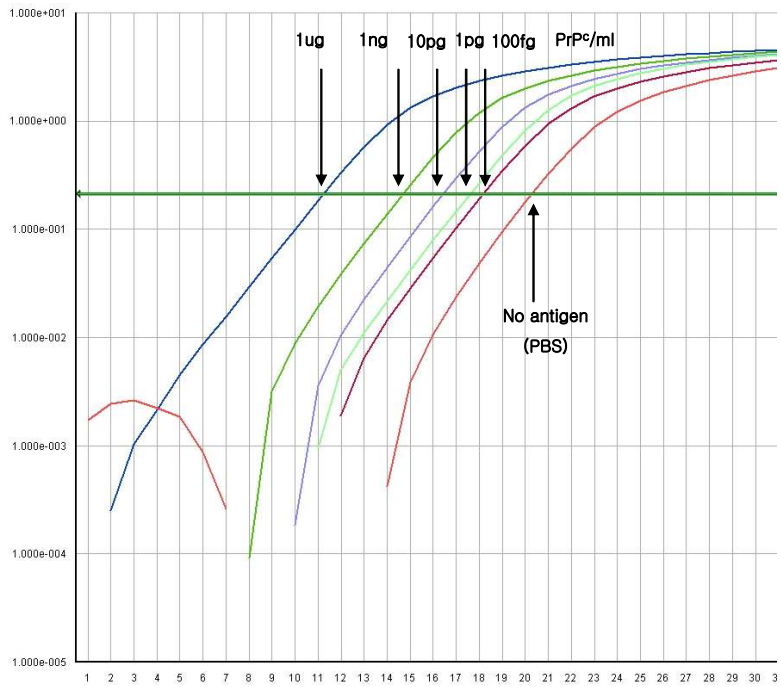


그림 10. Real-time PCR을 이용한 사슴 재조합 단백질의 검출

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구과제의 최종 목표는 사슴의 프리온 유전자를 발현하는 형질전환 마우스의 개발, 사슴 프리온 유전자의 polymorphism 확인, PrP^{CWD}에 특이적인 단클론 항체의 및 폴리클론 항체 생산, PrP^{CWD}를 검출하는 Immuno-PCR 기법 개발 등 이었다. 본 과제는 3차 년도에 걸쳐 수행되었으며 목표했던 연구를 다음과 같이 성공적으로 달성하였다.

첫째, 고라니의 프리온 유전자를 발현하는 형질전환 마우스를 개발하였다. 즉 마우스의 프리온 유전자를 발현하는 정상 마우스 및 마우스의 프리온 유전자가 결여된 knock-out 마우스를 이용하여 고라니의 프리온 유전자를 발현하는 형질전환 마우스를 제작하였다. 이러한 마우스들은 향후 CWD를 감염시켜 병원성을 확인하는데 유용하게 활용될 것이다. 또한 본 연구에서 제작된 형질전환 마우스에 대한 국내특허를 출원함으로써 연구자원에 대한 원천기술력을 확보하였다.

둘째, 고라니 및 꽃사슴의 프리온 유전자에 존재하는 polymorphism을 확인하였다. 본 연구를 통해서 기존에 밝혀져 있지 않았던 고라니 및 꽃사슴 프리온 유전자에 존재하던 polymorphism의 위치를 확인하였으며, 프리온 유전자에 관한 genotype 및 allele frequency에 관한 정보를 획득하였다. 본 연구에서 밝혀진 polymorphism은 향후 고라니 및 꽃사슴이 CWD에 감염할 가능성에 관한 연구를 수행하는데 있어서 중요한 기초자료가 될 것이다. 본 연구를 통해서 밝혀진 고라니 및 꽃사슴의 프리온 유전자에 관한 국내특허를 등록함으로써 연구자원을 확보하였다.

셋째, 사슴의 변형 프리온 단백질(PrP^{CWD})에 특이적인 monoclonal antibody 및 polyclonal antibody를 생산하였다. 본 연구를 통해서 총 4개의 monoclonal antibody 클론이 확보되었으며 이들은 매우 특이적으로 또한 감도가 높게 변형 프리온 단백질을 인식하는 것으로 확인되었다. 이러한 항체는 CWD 및 기타 프리온 질병을 진단하는 키트의 개발 및 학문적 발전에 기여할 연구에 매우 유용하게 사용될 것이다.

넷째, 변형 프리온 단백질을 검출하는 Immuno-PCR 및 real-time immuno-PCR 기법을 개발하였다. Immuno-PCR 기법은 기존의 Western blot 및

기타의 검출기법보다 감도가 높을 뿐만 아니라 진단시간의 단축 등 여러 가지의 장점을 보유하고 있으므로 새로운 CWD 검출기법으로 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

본 연구과제를 수행하면서 당초 목표했던 세부연구들을 성공적으로 수행함으로써 계획서 상에서 기술한 바대로 CWD 및 프리온 질병을 국내에서 독자적으로 수행하는데 필요한 연구재료 및 실험동물을 확보할 수 있었다. 이와 같은 연구성과는 향후 CWD 및 프리온 질병 연구분야를 발전시키는데 중요한 역할을 할 것으로 기대한다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구과제에서 개발한 고라니의 프리온 단백질을 발현하는 형질전환 마우스들은 향후 CWD 및 기타의 프리온 질병 원인체를 감염시킨 후 질병의 발생 기전을 연구하는데 사용될 것이며 프리온 질환의 치료제 개발에도 사용될 수 있을 것이다. 본 연구를 통해서 개발된 PrP^{CWD}를 특이적으로 인식하는 단클론 항체는 CWD 뿐만 아니라 BSE 및 vCJD 등 다른 프리온 질병을 검출할 수 있는지를 검증하는 추가적 연구가 필요가 있다. 이러한 연구를 통하여 변형 프리온 단백질을 인식하는 단클론 항체가 CWD 및 기타의 프리온 질병을 검출하는 신속진단 키트, ELISA 및 Western blot 키트 등 여러 가지 키트로 개발될 수 있다고 판단된다. 향후 기업체와의 협의를 통해 단클론 항체를 이용한 산업화 방안을 강구할 예정이다. 또한 본 연구과제에서 개발된 Immuno-PCR 기법 또한 CWD 뿐만 아니라 기타의 프리온 질병을 검출하는 새로운 기법으로 산업화가 가능할 것으로 기대한다. 본 연구를 통해 개발된 기술들은 궁극적으로 우리나라의 프리온 질병의 방제 정책 및 기초연구에 적극적으로 활용될 수 있을 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

프리온 질병을 적극적으로 연구하는 선진국가에서는 CWD 및 BSE 등 동물에서 발생하는 프리온 질병 뿐만 아니라 vCJD 등 사람에서 발생하는 프리온 질병의 발생기전을 연구하는 기초적 연구가 활발히 진행되고 있다. 프리온 단백질을 발현하는 다수의 형질전환 마우스들이 개발되어 감염연구에 활용되고 있으며 특히 프리온 질병의 감수성에 동물 및 사람의 프리온 유전자의 유전적 특성이 매우 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀짐에 따라서 사람 및 동물이 보유하고 있는 프리온 유전자에 대한 기초 연구가 심도있게 수행되고 있다. 또한 프리온 질병을 조기에 신속히 검출할 수 있는 진단키트의 개발에도 많은 노력을 기울이고 있는 것으로 판단되었다.

제 7 장 참고문헌

Angers RC, Browning SR, Seward TS, Sigurdson CJ, Miller MW, Hoover EA, Telling GC. Prions in skeletal muscles of deer with chronic wasting disease. *Science*. 2006, 311, 1117.

Brayton KA, O'Rourke KI, Lyda AK, Miller MW, Knowles Jr DP. A processed pseudogene contributes to apparent mule deer prion gene heterogeneity. *Gene*. 2004, 326, 167–173.

Browning SR, Mason GL, Seward T, Green M, Eliason GAJ, Mathiason C, Miller MW, Williams ES, Hoover Ed, Telling GC. Transmission of prions from mule deer and elk with chronic wasting disease to transgenic mice expressing cervid PrP. *J Virol*. 2004, 78(23), 13345–13350.

Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*. 1993, 73, 1339–1347.

Collinge J, Sidle KCL, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*. 1996, 383(24), 685–690.

Hamir AN, Gidlewski T, Spraker TR, Miller JM, Creekmore L, Crocheck M, Cline T, O'Rourke KI. Preliminary observations of genetic susceptibility of elk (*Cervus elaphus nelsoni*) to chronic wasting disease by experimental oral inoculation. *J Vet Diagn Invest*. 2006, 18(1), 110–114.

Hamir AN, Kunkle RA, Miller JM, Greenlee JJ, Richt JA. Experimental second passage of chronic wasting disease (CWD mule deer) agent to cattle. *J Comp Path*. 2006, 134, 63–69.

Heaton MP, Leymaster KA, Freking BA, Hawk DA, Smith TPL, Keele JW, Snelling WM, Fox JM, Chitko–McKown CG, Laegreid WW. Prion gene sequence variation within diverse groups of U.S. sheep, beef cattle, and deer. *Mamm Genome*. 2003, 14, 765–777.

Hunter N. PrP genetics in sheep and the implications for scrapie and BSE. *Trends Microbiol*. 1997, 5(8), 331–334.

Jeong BH, Sohn HJ, Lee JO, Kim NH, Kim JI, Lee SY, Cho IS, Joo YS, Richard IC, Kim YS. Polymorphisms of the prion protein gene (PRNP) in Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) and Holstein cattle. *Genes Genet Syst.* 2005, 80, 303–308.

Johnson C, Johnson J, Vanderloo JP, Keane D, Aiken JM, McKenzie D. Prion protein polymorphisms in white-tailed deer influence susceptibility to chronic wasting disease. *J Gen Virol.* 2006, 87, 2109–2114.

Johnson C, Johnson M, Clayton M, McKenzie D, Aiken J. Prion protein gene heterogeneity in free-ranging white-tailed deer within the chronic wasting disease affected region of Wisconsin. *J Wildl Dis.* 2003, 39(3), 576–581.

Kataoka N, Nishimura M, Horiuchi M, Ishiguro N. Surveillance of chronic wasting disease in sika deer, *cervus nippon*, from Tokachi District in Hokkaido. *J Vet Med Sci.* 2005, 67(3), 349–351.

Kim TY, Shon HJ, Joo YS, Mun UK, Kang KS, Lee YS. Additional cases of chronic wasting disease in imported deer in Korea. *J Vet Med Sci.* 2005, 67(8), 753–759.

Komatsu M, Kobayashi D, Saito K, Furuya D, Yagihashi A, Araake H, Tsuji N, Sakamaki S, Niitsu Y, Watanabe N. Tumor necrosis factor- α in serum of patients with inflammatory bowel disease as measured by a highly sensitive Immuno-PCR. *Clin Chem.* 2001, 47(7), 1297–1301.

Kong Q, Huang S, Zou W, Vanegas D, Wang M, Wu D, Yuan J, Zheng M, Bai H, Deng H, Chen K, Jenny AL, O'Rourke K, Belay ED, Schonberger LB, Petersen RB, Sy MS, Chen SG, Gambetti P. Chronic wasting disease of elk: Transmissibility to humans examined by transgenic mouse models. *J Neurosci.* 2005, 25(35), 7944–7949.

Kristiansen M, Messenger MJ, Klöhn PC, Brandner S, Wadsworth JDF, Collinge J, Tabrizi SJ. Disease-related prion protein forms aggregates in neuronal cells leading to caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem.* 2005, 280(46), 38851–38861.

Marsh RF, Kincaid AE, Bessen RA, Bartz JC. Interspecies transmission of chronic wasting disease prions to squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J Virol.* 2005, 79(21), 13794–13796.

Mathiason CK, Powers JG, Dahmes SJ, Osborn DA, Miller KV, Warren RJ, Mason GL, Hays SA, Hayes-Klug J, Seelig DM, Wild MA, Wolfe LL, Spraker TR, Miller MW, Sigurdson CJ, Telling GC, Hoover EA. Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science*. 2006, 314, 133–136.

Meng LP, Zhao DM, Liu HX, Yang JM, Ning ZY, Wu CD, Han CX. Polymorphisms of the prion protein gene (PRNP) in Chinese domestic sika deer (*Cervus nippon hortulorum*). *Anim Genet*. 2005, 36(3), 266–267.

Miller MW, Williams ES. Prion disease: Horizontal prion transmission in mule deer. The gathering of deer during winter may foster the spread of chronic wasting disease. *Nature*. 2003, 425, 35–36.

Miller MW, Williams ES, McCarty CW, Spraker TR, Kreeger TJ, Larsen CT, Thorne ET. Epizootiology of chronic wasting disease in free-ranging cervids in Colorado and Wyoming. *Wildl Dis*. 2000, 36(4), 676–690.

Novakofski J, Brewer MS, Mateus-Pinilla N, Killefer J, McCusker RH. Prion biology relevant to bovine spongiform encephalopathy. *J Anim Sci*. 2005, 83, 1455–1476.

O'Rourke KI, Baszler TV, Miller JM, Spraker TR, Sadler-Riggelman I, Knowles DP. Monoclonal antibody F89/160.1.5 defines a conserved epitope on the ruminant prion protein. *J Clin Microbiol*. 1998, 36(6), 1750–1755.

O'Rourke KI, Besser TE, Miller MW, Cline TF, Spraker TR, Jenny AL, Wild MA, Zebarth GL, Williams ES. PrP genotypes of captive and free-ranging Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) with chronic wasting disease. *J Gen Virol*. 1999, 80, 2765–2769.

O'Rourke KI, Spraker TR, Hamburg LK, Besser TE, Brayton KA, Knowles DP. Polymorphisms in the prion precursor functional gene but not the pseudogene are associated with susceptibility to chronic wasting disease in white-tailed deer. *J Gen Virol*. 2004, 85, 1339–1346.

Raymond GJ, Bossers A, Raymond LD, O'Rourke KI, McHolland LE, Bryant III PK, Miller MW, Williams ES, Smits M, Caughey B. Evidence of a molecular barrier limiting susceptibility of humans, cattle and sheep to chronic wasting disease. *EMBO J*. 2000, 19(17), 4425–4430.

Salman MD. Chronic wasting disease in deer and elk: Scientific facts and findings. *J Vet Med Sci.* 2003, 65(7), 761–768.

Sigurdson CJ, Williams ES, Miller MW, Spraker TR, O'Rourke KI, Hoover EA. Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrPres in mule deer fawns (*Odocoileus hemionus*). *J Gen Virol.* 1999, 80, 2757–2764.

Wadsworth JDF, Asante EA, Desbruslais M, Linehan JM, Joiner S, Gowland I, Welch J, Stone L, Lloyd SE, Hill FH, Brandner S, Collinge J. Human prion protein with valine 129 prevents expression of variant CJD phenotype. *Science.* 2004, 306, 1793–1796.

Watts JC, Balachandran A, Westaway D. The expanding universe of prion diseases. *PLoS Pathog.* 2006, 2(3), 152–163.

Wild MA, Spraker TR, Sigurdson CJ, O'Rourke KI, Miller MW. Preclinical diagnosis of chronic wasting disease in captive mule deer (*Odocoileus hemionus*) and white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) using tonsillar biopsy. *J Gen Virol.* 2002, 83, 2629–2634.

Williams ES. Chronic wasting disease. *Vet Pathol.* 2005, 42, 530–549.

주 의

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