

발간등록번호

11-1541000-000475-01

이종항원발현 생균백신 system을 이용한
PRRSV 백신 및 감별진단법 개발

(Development of a heterologous antigen-expressing
live bacterial vaccine against PRRS virus
infection and differential diagnostic tools)

(주)바이오리소스 생물공학연구소

농림수산식품자료실



0004625

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “이종항원발현 생균백신 system을 이용한 PRRSV 백신 및 감별진단법 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010 년 08 월 11 일

주관연구기관명 : (주)바이오리쏘스

주관연구책임자 : 정 승 기

세부연구책임자 : 정 승 기

협동연구기관명 : 전남대학교

협동연구책임자 : 이 재 일

협동연구기관명 : 전남대학교

협동연구책임자 : 김 태 중

요 약 문

I. 과제명

1. 이중항원발현 생균백신 및 감별진단법의 산업화
2. PRRSV 외막단백질을 이용한 감별진단법 개발 및 백신효능 검사
3. 이중항원발현 생균백신 시스템 개발

II. 연구개발의 최종목표

- 돼지 호흡기 바이러스성 질환인 PRRSV의 구조단백질인 GP5에서 미국주와 유럽주 표준주의 차이를 나타내는 부분을 peptide 항원으로 합성, 준비하고 이에 대한 각각의 항체를 준비하여 ELISA kit로 개발하여 국내 감염된 PRRSV의 야외감염 실태를 조사
- 미국주와 유럽주의 GP5와 GP6를 재조합 단백질로 발현하여 각각에 대한 항체를 준비하여 ELISA kit를 개발하고 국내 감염 상태를 확인하고 감별진단을 실시
- 각각 개발된 진단법을 이용하여 진단 kit의 산업화
- 재조합 GP5와 GP6를 이용하여 면역원성 실험을 실시
- PRRS의 각 단백질을 발현하는 *Bordetella bronchiseptica* (이중항원단백질 발현 약독화 *B. bronchiseptica*)를 개발하여 이의 면역원성 실험을 실시
- 개발된 이중항원단백질 발현 약독화 *B. bronchiseptica*의 백신으로써의 이용을 위하여 백신제형으로의 연구를 실시
- 최근 활발히 시도되고 있는 약독화 생균백신이나 유전자 돌연변이 백신에 비해서 월등히 안전하고 효과적인 생균백신의 산업화

III. 연구개발 내용 및 범위

- PRRSV 미국주인 VR2332와 유럽주인 Lelystad의 GP5에서의 상이 부분에 대한 peptide 항원 준비
- Peptide 항원에 대한 mouse 항체 생산 및 그를 이용한 peptide 항원의 항원성 확인
- Peptide 항원을 이용한 ELISA 진단법 개발
- PRRSV 미국주 및 유럽주의 GP5와 GP6를 재조합 단백질로 발현

- 발현된 항원에 대한 항체생산 및 이를 이용한 ELISA 진단법 개발
- 재조합 단백질의 혼합물을 이용한 면역원성 확인
- 약독화된 *B. bronchiseptica* 변이주에 PRRSV의 GP5와 GP6 protein 발현 생균제제 개발
- 이중항원 발현 약독화 *B. bronchiseptica* 변이주의 면역능력 확인
- 생균점막백신의 마우스에서의 면역능력 확인
- 마우스에서 변이주 백신효과 검증 및 임상시험
- 돼지에서 생균백신의 면역학적 검증
- 생균백신의 야외농장에 적용하여 효과검증
- 실험실 규모의 고농도 배양 및 안정화 연구
- 백신균주의 제형화 기초연구
- 돼지 PRRS vaccine 및 진단법에 대한 기존 개발 제품과의 현장 실증 비교 실험 및 경 제성 분석
- Pilot scale 고농도배양 및 제형화
- 시제품 생산
- 개발된 생균백신의 백신제형을 확립하여 실제 산업화에 적용

IV. 연구개발결과

- PRRSV 미국주인 VR2332와 유럽주인 Lelystad의 GP5에서의 상이 부분에 대한 peptide 항원을 이용한 ELISA 진단법 개발
- PRRSV 미국주 및 유럽주의 GP5와 GP6를 재조합 단백질로 발현, 항원에 대한 항체생산 및 이를 이용한 ELISA 진단법 개발
- 재조합 단백질의 혼합물을 이용한 면역원성 확인
- 약독화된 *B. bronchiseptica* 변이주에 PRRSV의 GP5와 GP6 protein 발현 생균제제 개발
- 이중항원 발현 약독화 *B. bronchiseptica* 변이주의 면역능력 확인
- 생균점막백신의 마우스에서의 면역능력 확인
- 마우스에서 변이주 백신효과 검증 및 임상시험
- 돼지에서 생균백신의 면역학적 검증
- 생균백신의 야외농장에 적용하여 효과검증
- 실험실 규모의 고농도 배양 및 안정화 연구
- 백신균주의 제형화 기초연구
- 돼지 PRRS vaccine 및 진단법에 대한 기존 개발 제품과의 현장 실증 비교 실험 및 경 제성 분석

- Pilot scale 고농도배양 및 제형화
- 시제품 생산

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 재조합 단백질 및 strain-specific한 peptide 항원을 이용하여 ELISA를 통한 새로운 진단법이 개발 - 지금까지의 PRRSV 감염 진단법 (미국 IDEXX kit)이 가진 많은 단점을 보완
- 이 연구에서 개발된 aroA 유전자 결손 변이주는 다른 호흡기 질병의 원인체의 항원 delivery vector로도 사용이 가능함
- 기타 다른 전염성 질병의 예방에도 효과적으로 응용
- 안전하고 면역원성이 확보된 생균백신로 국내 백신시장의 외산 수출현상 해소
 - 특허 및 논문 발표, 다양한 인력양성 (대학원 학생 및 연구원 기술개발인력) 실시

SUMMARY

Porcine reproductive and respiratory disease (PRRS) is an economically important disease around the globe. It is well established that PRRS is caused by an enveloped, single-stranded positive-sense RNA virus known as porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). GP5 and GP6 is the major envelope polypeptide of PRRSV, and it is associated with the development of neutralizing antibodies and protection the GP5 and GP6 protein. In this study, a heterologous PRRS glycoprotein 5 (GP5) and used as a live vaccine vehicle. To study the effect of BBS-GP5, we established an antigen-specific antibody (IgG & IgA) inductivity induced by BBS-GP5 using mouse and pig. Mice were primed with recombinant GP5 (rGP5) followed by boosting with live BBS-GP5 via the subcutaneous and intranasal route. Pig experiment is the same that. As a result, anti-GP5 IgG was significantly induced. our data is believed to be a good candidate for the development of a live-attenuated vaccine against PRRSV infections. furthermore antigen-specificity and sensitivity is more useful than other kit.

CONTENTS

Chapter 1. Purpose and necessity of the research ·	9
1. Necessity of the research	9
2. Purpose of the research	11
Chapter 2. Present situation of technical development on domestic and abroad	13
Chapter 3. Results and contents of the R&D's accomplishment	14
1. 1st year	14
2. 2nd year	41
3. 3rd year	66
Chapter 4. Proportion of achievement on object and contribution to related fields	89
Chapter 5. achievement of the R&D	90
1. 1st year	90
2. 2nd year	90
3. 3rd year	91
Chapter 6. Reference	92

목 차

제 1 장	연구개발의 필요성 및 목적	9
1.	연구개발의 필요성	9
2.	연구개발의 목표	11
제 2 장	국내외 기술개발 현황	13
제 3 장	연구 개발수행 내용 및 결과	14
1.	1차년도	14
2.	2차년도	41
3.	3차년도	66
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	89
제 5 장	연구개발성과	90
1.	1차년도	90
2.	2차년도	90
3.	3차년도	91
제 6 장	참고문헌	92

제 1 장 연구 개발의 필요성 및 목적

1. 연구개발의 필요성

가. 국내 동물약품 백신시장에서 외국기업으로의 쏠림현상이 지속되고 있는데 국내 실정에 맞는 효과적인 백신의 개발이 필요함

- (1) 국내 동물약품시장이 수년째 제자리 걸음을 걷는것과 달리 백신 시장은 매년 지속적으로 성장해 오고 있음
- (2) 특히 질병예방에 대한 농가의 관심이 부쩍 높아진 만큼 향후 백신 시장전망이 매우 밝은 상황임
- (3) 한국동물약품협회 집계에 따르면 2005년 1월부터 11월까지 국내 업체들의 백신판매 금액은 2백66억원, 수입백신 시장규모는 4백72억 원으로 국내 업체들의 매출액은 외국업체의 절반을 간신히 넘는 정도에 그침

나. 돼지생식기호흡기증후군 (PRRS)은 국내 양돈산업에 아주 심각한 피해를 주고 있는 질병임

- (1) PRRS는 모든의 유사산 및 태아의 폐척색증, 분만을 저하, 기타 2차적인 세균감염 등으로 인해 국내 및 국외에서 양돈산업에 심각한 피해를 주고 있는 질병임 (Zimmerman et al., 1997; 박최규 등, 1998; 한경수 외, 1999)
- (2) 이 질병의 원인체인 PRRSV의 구조단백질을 이용하여 백신을 개발하고자 하였으나 (Welch et al., 2004; Barfoed et al., 2004; Qiu et al., 2005; Bastos et al., 2004) 지금까지 효과적인 예방법은 없는 실정임



그림 1-1 PRRS에 의한 모든의 유사산 및 태아

다. 국내에서 외국계 백신에 의한 PRRS 전파가 우려됨

- (1) 백신주에 의한 바이러스의 전파는 이미 잘 알려진 바가 되었으며 (Prieto and Castro, 2005), 특히 오스트리아 (Indik *et al.*, 2005)나 태국 (Thanawongnuwech *et al.*, 2004)의 경우, 백신주를 이용한 백신이 허용되지 않았음에도 불구하고 국외로부터 유입된 돼지로 인해 북미주의 감염이 있다는 것은 우리나라의 경우에 비추어 볼 때 시사하는 바가 크다고 할 수 있음
- (2) 아시아 국가들 (Gao *et al.*, 2004; Thanawongnuwech *et al.*, 2004)의 분리주들도 북미주와 더 가까운 것은 밝혀졌고, 국내 분리주 PL97-1은 1997년 분리주로 최근 염기서열 분석의 결과 (Kang *et al.*, 2004), 역시 북미 백신주인 VR2332와 매우 유사한 것으로 나타났음.
- (3) 국내의 분리주들이 백신주인 VR2332와 유전적으로 매우 가깝다는 점은 역학적으로 의미하는 바가 매우 큰데 즉 우리나라의 경우도 무분별하게 백신주를 남용할 경우, 미국이나 (Opriessnig *et al.*, 2002)이나 오스트리아 (Indik *et al.*, 2005), 태국 (Thanawongnuwech *et al.*, 2004), 덴마크 (Madsen *et al.*, 1998)의 경우처럼 백신주에 의한 돼지 감염이 전반적으로 유행하게 될 수 있음.
- (4) 실제로 미국에서 분리되는 PRRSV 야외주는 유럽주에 비해 VR2332와 단순히 유전적으로 더 유사한 것들 이외에 일부는 VR2332에서 유래된 것으로 나타나 (Opriessnig *et al.*, 2002) 백신주에 의한 감염이 다양하게 보고되고 있음 (Prieto and Castro, 2005).
- (5) 이 백신주는 현재 우리나라에서도 사용이 되고 있는 상황이어서 국내에서도 이 백신주에 의한 감염이 얼마나 심각한지 알아볼 필요가 있음.

라. PRRS에 감염된 개체를 검출하기 위한 새로운 진단 키트가 필요함

- (1) 우리나라의 대부분의 분리주는 유럽주와는 다르고 북미주와 혈청학적으로나 유전학적으로 비슷한 특성의 PRRSV가 발병되고 있는 것으로 보고되고 있음
- (2) 최근 북미주인 VR2332가 아닌 유럽주와 유사한 PRRSV가 국내에서도 PCR 방법을 통해 검출된 바, 국내에서도 유럽주에 의한 PRRS의 발병이 확인되었음
- (3) 국외에서의 PRRSV 발병 상황을 살펴보면 이전에는 같은 지역간 분리주들의 특성이 비슷했던 것에 비하여 최근에는 유럽주 및 북미주의 발병이 동일지역에서 동시에 이루어지고 있는 특징을 보임 (Pesch *et al.*, 2005; Ropp *et al.*, 2004; Stadejek *et al.*, 2002)
- (4) 현재 PRRSV에 감염된 개체를 검출하기 위한 진단 kit로써 ELISA kit가 개발되어

상용화 되어 있음. 하지만 현재 시판중인 ELISA kit (Herdcheck[®] PRRSV antibody kit, IDEXX Laboratories, USA)에 사용되는 항원은 백신주인 VR2332 virus 자체가 이용되어 민감도는 높으나 VR2332와 유사하거나 여러 구조단백질 부위 중 공통항원성을 띄는 구조단백질을 보유한 변이주에 대해서도 반응을 할 것이므로 특이도에 있어서 문제가 있음

- (5) 이전의 보고에 의하면 VR2332과 유사한 strain이 아닌 유럽주, 예로 Lelystad주에 감염이 되어 있는 개체에서 형성된 항체는 VR2332와는 반응을 하지 않아 음성으로 판독되는 심각한 문제가 있음. 이것은 역으로도 마찬가지인데 즉, 유럽주인 Lelystad에 감염된 개체는 Lelystad에 대한 항체는 다량 보유할 수 있으나 이 항체는 VR2332와는 반응을 하지 않으므로 바꾸어 말하면 상용화된 ELISA kit (IDEXX laboratories)에서는 음성의 결과가 나타나므로 그 진단적 이용에 많은 문제가 있음
- (6) 정확한 감별 진단을 위해서는 북미주와 유럽주 각각의 특이적인 진단법이 이용되어 국내 감염주의 특성을 파악하는 연구가 필요하며 국내 감염주의 type을 신속히 규명할 수 있는 새로운 진단키트의 개발이 아주 필요함
- (7) 아울러 북미주인 VR2332에 대한 진단 및 백신뿐만이 아니라 유럽주에 대한 대책도 함께 강구되어야 할 것이므로 유럽주의 구조단백질들을 이용한 진단 및 예방법이 신속히 개발되어 앞으로 다가올 지 모르는 유럽주에 의한 감염에 대비하여야 함

2. 연구개발의 목표

가. PRRSV 미국주인 VR2332와 유럽주인 Lelystad의 GP5에서의 상이 부분에 대한 peptide 항원 준비하여 Peptide 항원에 대한 mouse 항체 생산 및 그를 이용한 peptide 항원의 항원성 확인하여 Peptide 항원을 이용한 ELISA 진단법 개발하고 PRRSV 미국주 및 유럽주의 GP5 및 GP6를 재조합 단백질로 발현시켜 발현된 항원에 대한 항체생산 및 이를 이용한 ELISA 진단법 개발

나. 미국주와 유럽주의 GP5 및 GP6를 재조합 단백질로 발현하여 각각에 대한 항체를 준비하여 ELISA kit를 개발하고 국내 감염 상태를 확인하고 감별진단을 실시하여 각각 개발된 진단법을 이용하여 진단 kit의 산업화

다. 재조합 단백질의 혼합물을 이용한 면역원성 확인 하고 약독화된 *B. bronchiseptica* 변이주에 PRRSV의 GP5와 GP6 발현 생균제 개발, 이중항원 발현 약독화 *B. bronchiseptica*

변이주의 면역능력 확인 및 생균점막백신의 마우스에서의 면역능력 확인 후 임상실험

라. 돼지에서 생균백신의 면역학적 검증 및 생균백신의 야외농장에 적용하여 효과검증

마. 실험실 규모의 고농도 배양 및 안정화 연구와 백신균주의 제형화 기초연구하여 돼지 PRRS vaccine 및 진단법에 대한 기존 개발 제품과의 현장 실증 비교 실험 및 경제성 분석 후 Pilot scale 고농도배양 및 제형화 및 시제품 생산

제 2 장 국내외 기술개발 현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
미국 네브라스카	PRRSV genome 자체만으로도 병원성을 일으킬 수 있음	미활용
미국 USDA	Baculovirus 발현 시스템을 이용하여 GP5,6,7 발현-혈청학적 진단	미활용
폴란드 국립수의과학연구소	GP4의 peptide sequence를 통한 유럽주간의 차이 규명	미활용
덴마크 식품수의연구소	ORF1-7 DNA vaccine	미활용
충북대학교	PRRSV의 재조합 ORF7 (N protein)을 이용한 진단 국내분리주 (PL97-1)의 ORF full sequencing을 통한 유전학적특성규명	미활용
서울대학교	PRRSV의 ORF5에 대한 PCR-RFLP를 이용한 감별진단 PRRSV의 ORF 6, 7에 대한 RT-PCR 진단	미활용
건국대학교	IFA와 ELISA와의 진단비교	미활용

제 3 장 연구 개발수행 내용 및 결과

1. 1차년도

가. 이중항원발현 생균백신 및 감별진단법의 산업화

(연구내용: 실험실 규모의 고농도 배양 및 안정화 연구)

(1) 고농도 세포배양에 필요한 산업용 최적 배지조성 개발

산업적으로 경제성을 가진 고농도 배양용 최적 배지 조성을 확립하고자 배지중의 탄소원 및 질소원 및 무기성분에 따른 생육 활성도를 측정하였다. 다량의 cell mass를 얻을 수 있는 저렴한 탄소원과 질소원을 이용하여 배양에 필요한 배지의 단가를 줄이고자 하였다. 따라서 본 실험에서는 탄소원으로 sugar, sucrose, glucose, lactose, glycerol 및 starch, 질소원으로는 soy, polypeptone, peptone, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}$, $(\text{NH}_4)_2\text{Cl}$ 및 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 등을 농도별로 처리하여 배양균의 생육활성도를 측정하였다.

본 실험에서 이용한 탄소원과 질소원의 종류와 농도별로 배양액을 조제하여 균주를 배양한 결과 균주의 생장에 가장 좋았던 탄소-질소원 조합을 나타낸 결과는 다음 표 3-1과 같다. 전반적으로 균주의 생장이 가장 우수한 질소원-탄소원 조합은 탄소원으로 peptone:saccharose=7:1.5(v/v)로 조합으로 한 배지조성에서 가장 높은 균체를 얻을 수 있었다.

표 3-1. 탄소원과 질소원에 따른 최적 배지 조성 비율

Carbon (%) Nitrogen (%)	Commercial sugar			Starch	Dextrose	Saccharose	Lactose	Glycerol	Galactose
	White color	Gray color	Blackish color						
Soy	3:10 ²⁾ (68.6)	3:2(75.6)	3:15(70.8)	3:0.5(34.4)	3:10(64.1)	3:10(57.3)	3:3(56.5)	3:10(32.8)	3:1.5(23.2)
Soy bean milk	1:10(6.9)	1:2(8.9)	3:10(26.8)	1:0.5(5.4)	3:10(12.4)	1:5(9.2)	2:8(12.7)	1:6(14.5)	1:5(12.9)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1:10(17.9)	1:2(23.2)	1:10(53.3)	3:0.5(8.2)	1:2.5(15.6)	1:2.5(18.4)	1:2.5(21.4)	2:5(12.9)	2:4.5(19.8)
(NH ₄) ₂ CO	0.5:1(1.8)	1:2(7.5)	1:3(27.3)	1:0.5(8.4)	1:2(1.6)	0.5:1(7.5)	1.2:2(14.8)	1.6:3(25.2)	1.2:4(11.5)
NH ₄ Cl	1:5(19.6)	1:2(25.4)	1:5(44.8)	3:0.5(2.4)	1:5(18.4)	1:5(18.6)	1:4.5(19.3)	1:4.2(12.3)	1:4(15.2)
Polypeptone	1:10(89.4)	1:2(87.0)	1:10(65.7)	3:0.5(76.2)	1:5(97.0)	1:10(85.9)	1:8(45.2)	1:5(65.3)	1:8(81.6)
Peptone	1:3(20.2)	2:5(36.2)	7:5(62.8)	5:1.9(25.6)	7:1.5(70.5)	7:1.5(100)	6:3(96.2)	5:1.5(30.2)	6:5(83.1)

²⁾ Nitrogen : carbon ratio (v/v ratio)

(2) 최적 DOI, pH, 온도, 교반속도 조건 확립

5L fermentor에서 세포배양에 따른 최적 pH 및 온도, 교반속도, DO profile 실험을 통해 고농도 세포배양을 위한 최적 조건을 측정 한 결과 pH 5.5의 조건에서 가장 높은 cell mass 를 나타내었으며 교반속도는 600rpm의 조건에서 적정 DO농도를 유지 함을 알 수 있었다.

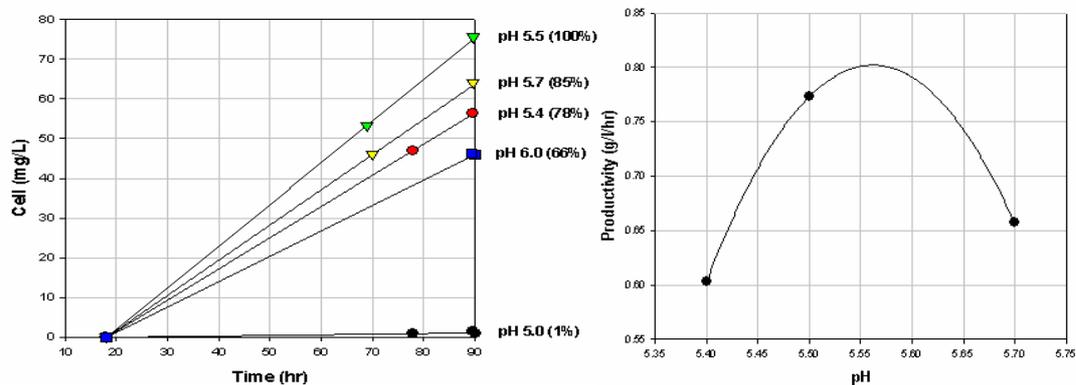


그림 3-1. 고농도 세포배양을 위한 최적 pH.

그림3-2. 5L Fermentor에서 세포배양중의 DO 변화에 따른 교반속도 및 pH profile.

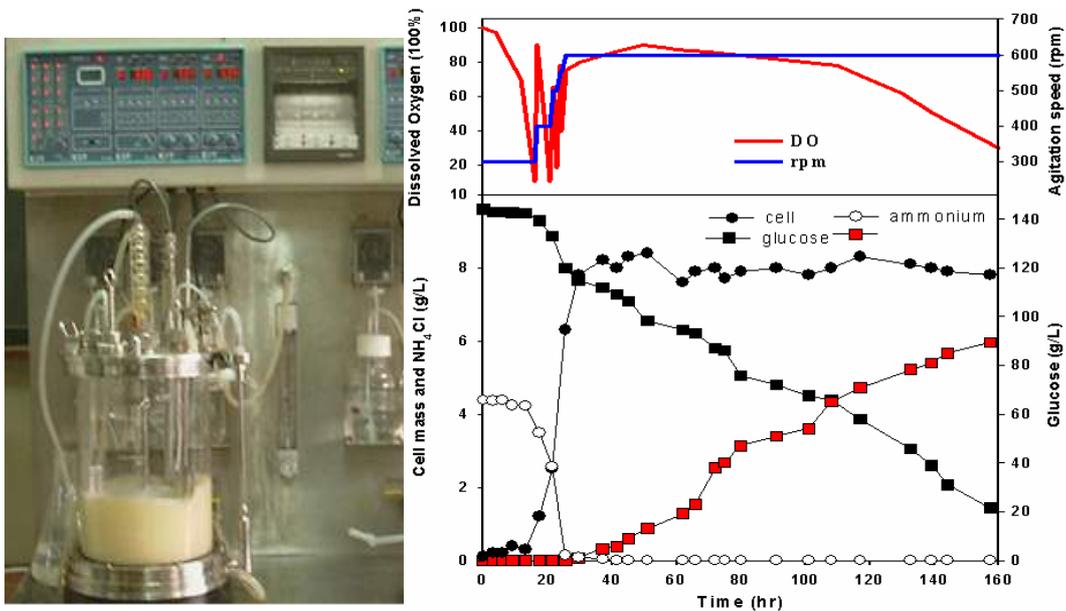


그림 3-3. 공정 변수 최적화를 통한 고농도 세포배양.

(3) 액상에서의 생균제 안정화

동결건조 시 안정성을 유지하기 위한 안정제에 따른 보존중의 균수 변화를 측정한 결과 탈지 미강, 탈지대두분 모두 우수한 보존성을 부여함에 따라 백신 제조를 위한 동결 건조시 보존제로서의 사용 가능성이 입증 되었다.

액상 상태에서 상온하 보관 시, 안정제로서 당밀 50% 첨가구가 대조구에 비하여 균수의 감소가 없어 안정제로서의 가능성이 인정되었다.

표 3-2. 액상 배양에서의 처리 조건에 따른 보존성 변화

항 목		1일차	10일차	20일차
동결건조	Broth+탈지미강 (100:50)	3.4×10^9 cfu/ml	3.2×10^9 cfu/ml	3.0×10^9 cfu/ml
	Broth+탈지대두분 (100:50)	3.3×10^9 cfu/ml	2.6×10^9 cfu/ml	3.1×10^9 cfu/ml
가온건조 80~100℃, 3day	Broth+glycine (100:100)	1.6×10^9 cfu/ml	1.4×10^9 cfu/ml	2.2×10^9 cfu/ml
	Broth (1L 원심분리 농축액)	2×10^{11} cfu/ml	5.6×10^{11} cfu/ml	5.4×10^{11} cfu/ml
액상(상온 보관)	Broth+탈지미강 (100:50)	4×10^7 cfu/ml	1×10^6 cfu/ml	1.0×10^6 cfu/ml
	Broth	3×10^9 cfu/ml	2×10^9 cfu/ml	4×10^9 cfu/ml
	Broth + 당밀(50%) (1:1)		1.4×10^9 cfu/ml	2.0×10^9 cfu/ml

나. PRRSV 외막단백질을 이용한 감별진단법 개발 및 백신효능검사
(연구내용: 약독화 *B. bronchiseptica* delivery system 개발)

(1) 공시균주 및 plasmids

대장균 JM109는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)사로부터 구입하여 사용하였고, pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA)는 cloning에 이용되었다. λ Red helper plasmid pKD46 (Genbank #AY048746)은 pBAD promoter를 이용하여 red와 gam 단백질을 생산하는 vector로서 균체 내로 외부 DNA가 유입되었을 경우, 상동 재조합을 일으키는 작용을 한다. 즉, λ Red recombinase를 포함하고 있는 vector이다. 선택 마커로 사용되는 Kan^R는 pKD13 helper vector (Genbank #AY048744)로부터 cloning하여 사용하였다. *B. bronchiseptica* 표준 균주는 국립수의과학 검역원에서 분양 받아 사용하였다.

(2) aroA N- 및 C-terminal 각각 300 mer, 카나마이신 내성 유전자 (Kan^R) cloning

(가) aroA N-terminal 및 C-terminal cloning

- PCR 프라이머의 구성은 다음과 같다. 즉 기존의 aroA 유전자 정보를 이용하여 (GenBank database: AF182427), N-terminal의 증폭을 위해서 정방향 프라이머로서 aroA-N-F(P1): 5'-GCGC CTCGAG ATGAGCGGATTGGCATATCTCGACC-3'를 사용하였고, 역방향 프라이머로서 aroA-N-R(P2): 5'-ATAT AGATCT CCGGAACGCGGTGCCGGCGTTGCCT-3'을 사용하였다. C-terminal 300mer의 증폭을 위해서는 정방향 프라이머로서 aroA-C-F(P3): 5'-ATAT GGTACC TGCCGCCTGCGCAACATCGGCAGCT-3'를 사용하였고, 역방향 프라이머로서 aroA-C-R(P4): 5'-ATAT AAGCTT TCAGTCCCGCGCGGCCAGCAGGCCC-3'을 사용하였다.
- PCR결과, 양단에서 300 bp크기의 PCR 산물이 각각 증폭되었고 (그림3-4 A와 B) 이를 pGEM-T easy vector에 cloning하여 cloning된 construct를 다시 제한효소 *EcoRI*으로 처리하여 insert 여부를 확인하였다 (그림 3-5 A와 B).

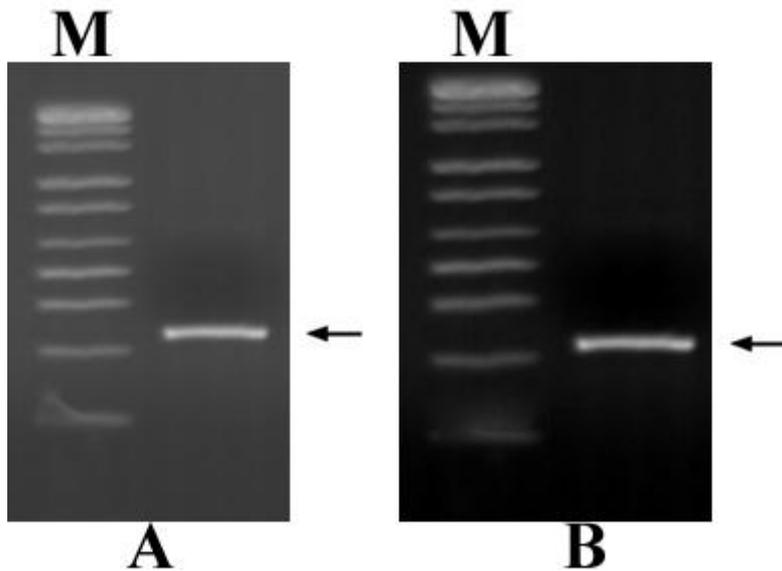


그림 3-4. PCR로 증폭된 aroA N-terminal (A)과 C-terminal (B)의 사진. M: 100 bp size marker.

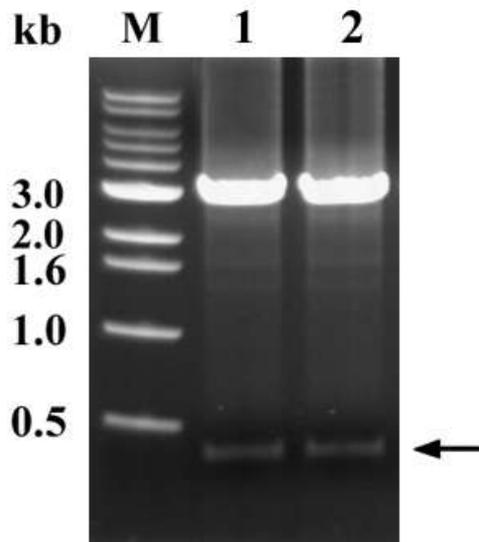


그림 3-5. 증폭된 aroA N-terminal (lane 1)과 C-terminal (lane 2)을 pGEM-T easy에 cloning 후 제한효소 *EcoRI*으로 처리한 그림. M: 1 kb size marker.

(나) 카마이신 내성 유전자 (Kan^R) cloning

- Kan^R 는 pKD13 helper vector (Genbank #AY048744)로부터 cloning하여 사용하였는데, 정방향 프라이머로서 Kan^R -F(P5): 5'-GCGC AGATCT ATGATTGAACAAGATGGATT-3'(서열번호 7)를 사용하였고, 역방향 프라이머로서 Kan^R -R(P6): 5'-GGCC GGTACC TCAGAAGAAGTTCGTCAAGAA-3'을 사용하였다.
- PCR결과, 약 0.7 kb크기의 PCR 산물이 각각 증폭되었고 (그림 3-6 A) 이를 pGEM-T easy vector에 cloning하여 cloning된 construct를 다시 제한효소 *EcoRI*으로 처리하여

insert 여부를 확인하였다 (그림 3-6 B).

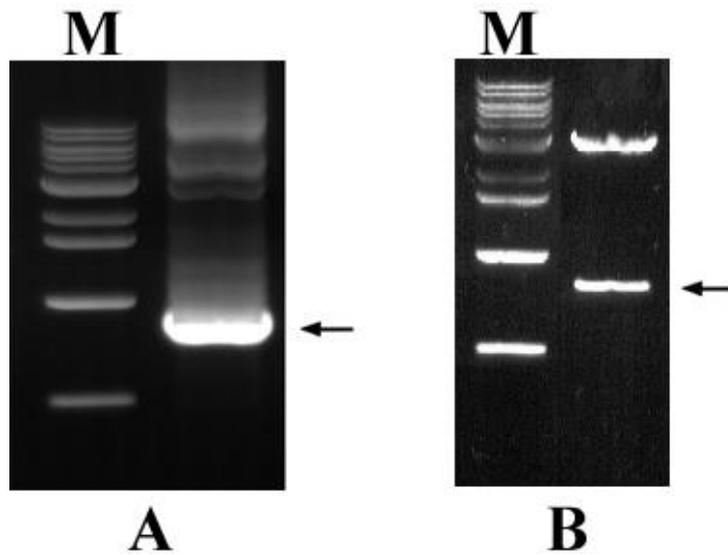


그림 3-6. A. PCR로 증폭된 kan^R 유전자의 사진. B. 증폭된 kan^R 유전자를 pGEM-T easy 에 cloning 후 제한효소 *EcoRI*으로 처리한 그림. M: 1 kb size marker.

(다) 상동재조합을 통한 *aroA* 유전자좌 제거

- 유전자 제거를 위한 전체 모식도는 다음 그림 4와 같다. 즉, 먼저 cloning 된 pGEM-*aroA*-F와 pGEM-*kanR*을 연결하고 마지막에 다시 *aroA*-R을 연결하여 최종적으로 이를 *XhoI*과 *HindIII*로 처리하여 homologous recombination용 insert를 준비하는 과정을 거친다.

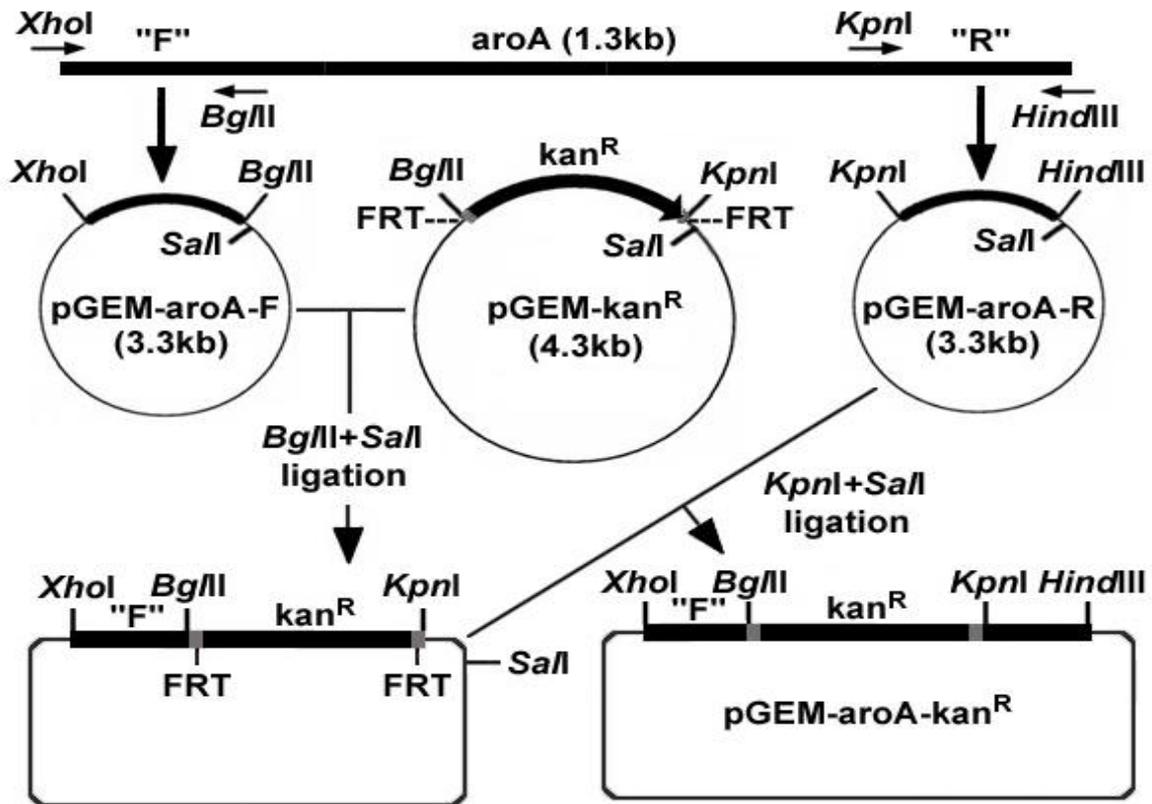


그림 3-7. aroA 유전자를 제거하기 위한 전체 모식도.

- 이를 위해 신선하게 준비된 *B. bronchiseptica* 배양액 5 ml을 500ml BHI broth (BBLTM, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD)에 접종하여 OD 값이 595 nm에서 0.5가 될 때까지 배양하고, 배양 후 얼음 위에서 20분간 냉각 후 4,000×g로 15분간 원심분리하여 균을 회수하였다. 이를 2.5 ml의 냉각된 10% glycerol 용액으로 농축하여, 전기천공용 competent cell을 제조하였다. 상기 균체에서 λ Red recombinase를 발현하기 위해 pKD46 plasmid를 Gene Pulser Xcell™ electroporation system (Bio-Rad, Hercules, CA)을 이용하여 형질전환 후, ampicillin과 L-arabinose (최종 농도 10 mM)가 첨가된 250 ml SOB 배지에서 선택 후, 30°C에서 OD값 이 0.5가 될 때까지 배양하였다. 그 후, 다시 2.5 ml의 냉각된 10% 글리세롤 용액으로 농축하여 먼저 제조된 homologous recombination 용 linear insert DNA를 형질전환하기 위한 electrocompetent cell를 제조하였다.
- 40 μ l의 electrocompetent cell에 1 μ l (100 ng)의 insert DNA를 전기천공법으로 형질전환하고, 50 μ g/ml 카나마이신이 첨가된 LB 배지에서 선택하여 aroA가 제거된 균을 선택하였다.

(라) 검증 PCR을 통한 *aroA* 유전자와 제거의 확인

- *B. bronchiseptica* genomic DNA상에서 변환된 DNA의 염기서열을 PCR로 확인하여 기대되는 구조의 DNA 염기서열이 존재함을 확인하였다. 즉 아래 그림 3-8과 같이 verification PCR을 수행하였다.

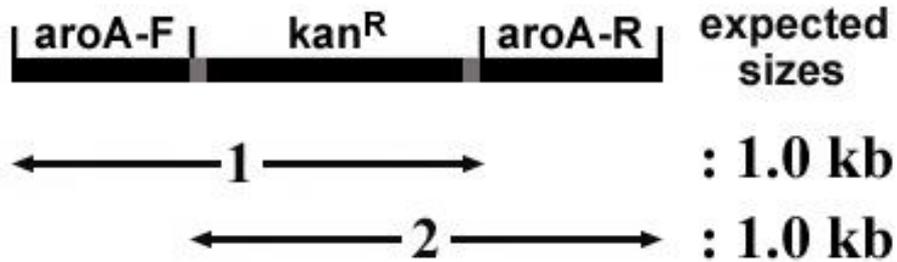


그림 3-8. *aroA* 유전자좌에 *kan^R* 유전자가 잘 삽입되었는지 확인하기 위한 verification PCR의 모식도

- 그 결과, 아래 그림 3-9와 같이 기대되는 크기 (약 1 kb)의 PCR 산물이 증폭되었음을 확인할 수 있었다. 그리고 이들의 sequence를 분석한 결과, 각각 *aroA*-N-terminal region 및 *kan^R* 유전자가 lane 1에서, 그리고 *kan^R*과 *aroA*-C-terminal region이 증폭되었음을 확인할 수 있었다.

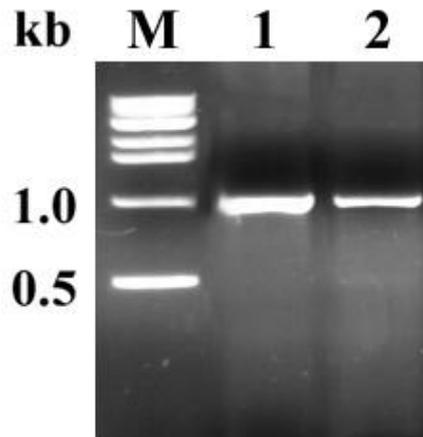


그림 3-9. Verification PCR을 통해 증폭된 PCR 산물

다. 이중항원발현 생균백신 시스템 개발

(연구내용: PRRS 표준주의 항원성에 따른 peptide 항원 준비 및 항체 제작 및 제조합 PRRS GP5, M protein 항원 발현)

(1) 북미주와 유럽주 단백질의 아미노산 서열 분석 및 N-terminal 부분을 peptide 항원으로 합성

(가) 재료 및 방법

- 북미형 및 유럽형 PRRSV (각각 VR2332 및 Lelystad)의 GP5 유전자 sequence를 상호 비교하여 strain-specific 할 수 있는 부분만을 선별하는 과정을 실시하였다. 그 결과, 아래 그림 3-10과 같이 두 strain간에는 많은 차이가 남을 알 수 있었다.

AM	18	WCIVPFCFAV---LANASNDSSSHLQLIYNLTLCELNGTDWLANKFDWAVESFVIFPVLT	74
		W + C + A+ + DSS++ Q IYNLI+CELNGTDWL++ F WAVE+FV++PV T	
EU	18	WWLFLLLCTGLSWSFADGNGDSSTY-QYIYNLTICELNGTDWLSHFVWAVETFVLYPVAT	76
AM	75	HIVSYGALTTSHFLDTVALVTVSTAGFVHGRYVLSSIYAVCALAALTCFVIRFAKNCMSW	134
		HI+S G LTTSHF D + L VSTAGFV GRYVL S+Y CA AA CFVIR AKNCM+	
EU	77	HILSLGFLTTSHFFDALGLGAVSTAGFVGGRYVLCVYGACAFAAFVCFVIRAAKNCMAC	136
AM	135	RYACTRYTNFLLDTKGRLYRWRSPVIEKRGKVEVEGHLIDLKRVVLDGVSATPITRVSA	194
		RYA TR+TNF++D +GR++RW+SP+++EK GK EV+G+L+ +K VVL+G A P+TR SA	
EU	137	RYARTRFTNFIVDDRGRVHRWKSPIVVEKLGKAEVDGNLVTIKHVVLEGVKAQPLTRTSA	196
AM	195	EQW	197
		EQW	
EU	197	EQW	199

그림 3-10. PRRSV 북미형 VR2332 (AM)과 유럽형 Lelystad (EU)의 GP5 sequence를 alignment 한 결과를 보여주는 그림.

- 한편 PRRSV VR2332 및 Lelystad의 GP5의 hydrophilicity 및 antigenicity를 Kite-Doolittle 법 및 Hopp-Woods법을 이용하여 Gene Runner™ software를 통해 아래의 그림 3-11과 같이 분석하고 2 strain간 similarity가 없으면서 항원성이 높은 부분을 선택하였다.

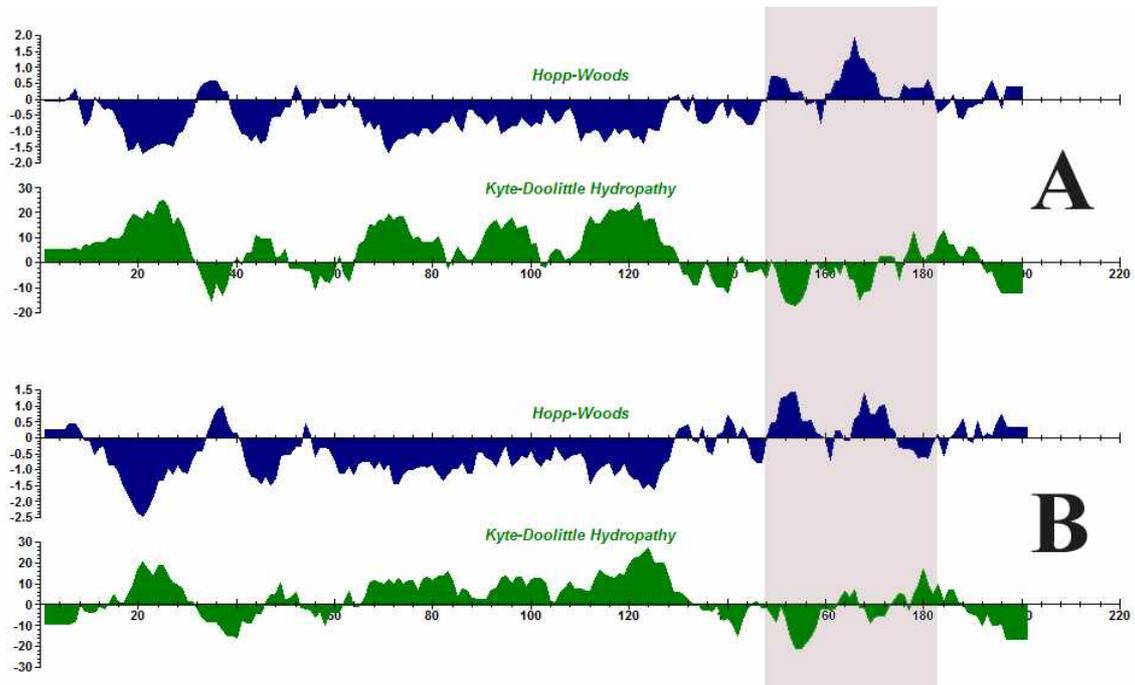


그림 3-11. VR2332와 Lelystad의 GP5 protein의 hydrophilicity 및 antigenic determinants를 분석한 그림.

- 그 결과, 약 145번째 아미노산부터 친수성 및 항원성이 나타나 (그림자 영역)이 부분을 1차로 선택대상에 포함시켰다.
- 마찬가지로 GP6 (M) protein에 대한 분석을 아래 그림 3-12와 같이 GP5와 동일한 방법을 실시하였다.

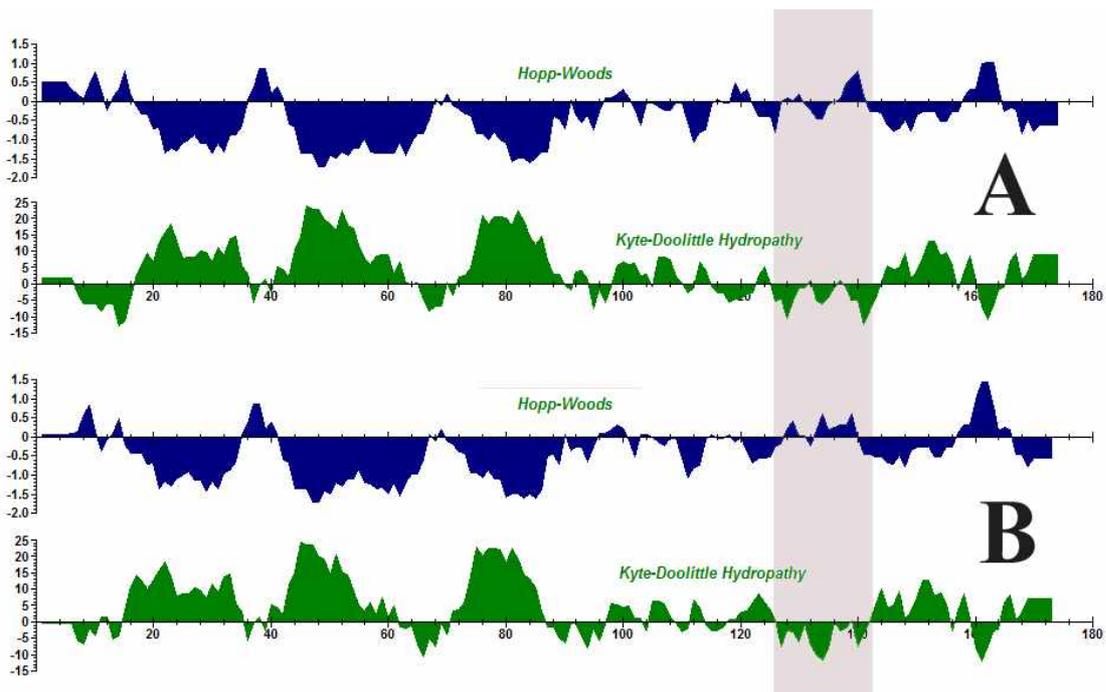


그림 3-12. VR2332와 Lelystad의 GP6 protein의 hydrophilicity 및 antigenic determinants를 분석한 그림.

- 그 결과, 약 127번째 아미노산부터 친수성 및 항원성이 나타나 (그림자 영역)이 부분을 1차로 선택대상에 포함시켰다.

(2) peptide 항원에 대한 항체 생산을 위해 peptide 항원에 glutaraldehyde를 이용하여 BSA와 coupling 실시 후 토끼 면역접종

- GP5와 GP6의 분석을 통해 북미주와 유럽주 상호간에 similarity가 없으면서 항원성 및 친수성이 좋은 부분을 선택하여 다음 표 3-3과 같이 peptide 부위를 선택하고 Anygen (Gwangju, Korea)에 합성을 의뢰하여 peptide를 합성하였다.

표 3-3. Amino acid sequences of segments of GP5 or GP6 protein of PRRSVs, VR2332 (American) and Lelystad (European)

Name	Amino acid sequence	Encompassing amino acid location
GP5-VR* #1	CLLDTKGGLYRWSPV	145-159 th
GP5-VR* #2	CVIIEKRGKVEVEGHLID	159-175 th
GP5-LV** #1	CIVDDRGRVHRWKSPI	147-161 th
GP5-LV** #2	CIVVEKLGKAEVDGNLV	161-176 th
M-VR*	CANDNHAFVRRPGSTT	127-142 th
M-LV**	CSGNRAYAVRKPLTSV	127-142 th

* VR: VR2332 strain, **: LV: Lelystad strain

- 합성된 peptide는 Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)를 사용하여 Jennemann 등 (1994 & 1996)의 방법으로 peptide-conjugation을 실시하였다.
- Conjugated peptide 항원들은 각각 1 mg/ml 200 μ l를 동량의 Freund's complete adjuvant 200 μ l와 혼합하여 formulation을 만들고 실험용 토끼 (6주령 New Zealand White, nzw, Orient Bio, Korea)에 접종을 실시하였다. 이후 같은 방법으로 2회 더 Freund's incomplete adjuvant와 함께 boosting을 실시하였다.

(3) peptide 항원의 면역원성 및 항원성을 ELISA로 검증

- 최종접종 후 7일째 되는 날 채혈을 실시하여 토끼 혈중에 peptide 항원에 대한 항체 생성 여부를 통해 항원성을 검증하였다.
- 항체 생성 여부는 ELISA방법을 통해 실시되었다. 즉, peptide 자체를 항원으로 이용한 ELISA를 실시하였다. 이를 위해 항원을 준비를 위하여 BHI에서 배양된 균주를 원심분리하여 pellet을 만들고 PBS를 이용하여 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 맞추어 96-well plates (Maxisorp™, Nunc, Denmark)에 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 의 농도로 coating하였다. 이 plate는 1% skim milk를 첨가한 PBS로 blocking 하고 PBST (PBS + 0.05% Tween-20, pH 7.4)로 washing하였다. 토끼의 혈청은 1:100으로 희석하여 사용하여 1차 항체로 사용하였다. 항체액은 PBST로 희석하였고 총 90 μl 를 첨가하여 사용하여 37°C에서 1시간 반응 후 3회 PBST로 washing 하고 다시 1:500으로 희석된 goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated (Serotec, UK)를 2차 항체로 사용하여 반응시켰다. 역시 2차 항체도 37°C에서 1시간 반응 후 3회 PBST로 washing 하였다.
- Peptide 항원간에는 공통항원성이 없을 것으로 분석되었지만 재확인을 하기 위해 항원간 cross-reactivity를 검증하였다. 즉, GP5 및 GP6 항원 각각은 상대의 항원에서 유래된 항체와 반응을 하여 항체가의 여부를 확인하였다.
- 결합된 2차항체의 검출은 기질용액 [100 mM citric acid buffer, pH 4.0, 10 ml ABTS stock solution (ABTS 100 mg in 4.5 ml DW) 250 μl H₂O₂ 50 μl]을 이용하여 발색을 실시하였다. 기질용액과의 반응은 암실에서 10분간 실시하였고 흡광도 405 nm에서 ELISA reader (Multiskan EX, Thermo LabSystems, Beverly, MA)를 이용하여 OD값을 측정하였다. 측정된 OD값은 평균값 \pm 표준편차 (SD)로 표기하였고 값들은 Student's *t*-test를 통해 통계적 유의성 검사를 실시하였고 *P* 값이 < 0.01 이면 “통계적으로 유의성 있다”고 평가하였다.
- 그 결과는 다음 표 3-4와 같다. 즉, 각각의 항원은 모두 매우 높은 수치의 항체가를 나타내었고 (표 2의 굵은 글씨체로써, 예를 들어 GP5-VR#1에 대한 토끼의 항체와 GP5-VR#1에 대한 ELISA OD값) 다른 항원들에게는 항체가를 나타내지 않았다.
- 이를 통해 각각의 항원들은 고유의 항원성을 보유하고 있으며 다른 peptide 항원과는 cross-reactivity가 없음을 확인하였다.

표 3-4. Design and results of ELISA for cross-reactivity test (mean OD±SD)

antigen	Reacted antibodies raised against			
GP5-VR* #1	GP5-VR #1 (3.17±0.17)	GP5-VR #2 (0.34±0.20)	GP5-LV#1 (0.18±0.02)	GP5-LV #2 (0.52±0.31)
GP5-VR #2	GP5-VR #2 (3.05±0.50)	GP5-VR #1 (0.18±0.11)	GP5-LV #1 (0.09±0.07)	GP5-LV #2 (0.28±0.17)
GP5-LV** #1	GP5-LV #1 (2.28±0.24)	GP5-VR #1 (0.64±0.18)	GP5-VR #2 (0.27±0.03)	GP5-LV #2 (0.16±0.01)
GP5-LV #2	GP5-LV #2 (3.01±0.60)	GP5-VR #1 (0.50±0.23)	GP5-VR #2 (0.25±0.01)	GP5-LV #1 (0.14±0.02)
M-VR	M-VR (3.43±0.36)		M-LV (0.24±0.01)	
M-LV	M-LV (3.64±0.61)		M-VR (0.20±0.07)	

* VR: VR2332 strain, **: LV: Lelystad strain

(4) 항원성이 확인된 각각의 peptide 항원들을 이용하여 PRRSV strain-specific 혈청진단 (ELISA)를 실시하였다. 즉, 각각의 peptide를 항원으로 하여 PRRSV 백신을 접종하지 않은 21개 농장에서 무작위로 선택된 260개의 돼지 혈청을 이용하였다. 양성대조군으로는 PRRSV에 감염된 것으로 확인된 돼지의 혈청을 사용하였고 음성대조군으로는 PRRSV-free 모돈으로부터 출산한 초유 급이 이전의 자돈의 혈청을 사용하였다. 각 항원군별로 각각 음성 대조군의 값을 구해 음성대조군 평균 +(3×SD)값을 양성으로 설정하였다.

(5) 그 결과를 정리하면 다음 표 3-5와 같다. 즉, 각각의 peptide 항원 자체는 항원성이 높으나 PRRSV 감염이 따른 각각의 peptide 항원에 대한 항체가는 높지 않거나 유도되지 않는 것으로 나타났다.

표 3-5. 각각의 항원에 대한 양성, 음성 및 시료의 OD 평균값±SD

항원명	양성대조군	음성대조군	시료	양성개체수 (%)
GP5-VR* #1	0.394±0.081	0.278±0.091	0.344±0.295	28 (10)
GP5-VR #2	0.452±0.101	0.299±0.088	0.353±0.319	32 (12.3)
GP5-LV** #1	0.352±0.111	0.191±0.078	0.298±0.233	0
GP5-LV #2	0.414±0.091	0.222±0.104	0.335±0.312	0
M-VR	0.372±0.127	0.279±0.083	0.310±0.239	23 (8.8)
M-LV	0.466±0.077	0.245±0.101	0.361±0.308	0

* VR: VR2332 strain, **: LV: Lelystad strain

(6) 재조합 GP5 전체를 이용한 비교실험

GP5의 일부분인 peptide 항원만을 이용한 실험에서의 양성율이 기존의 문헌이나 기타 자료에 비해 상대적으로 낮게 검출되어 별도로 GP5 전체를 재조합 단백질로 준비하여 이 단백질을 이용하여 돼지 혈청 시료중에 GP5 단백질 전체에 대한 항체를 ELISA법을 이용하여 검출하여 그 결과를 GP5 peptide 분획의 결과와 비교하였다. 그 결과, 재조합 GP5를 이용한 ELISA 실험에서는 평균 항체가가 0.886±0.432로 나타났고 양성 개체수는 176개 (67.7%)로 나타나 기존의 실험과 유사한 결과를 보였다.

(7) 기존 ELISA kit를 이용한 양성-음성 비교 실험

- 한편 지금까지 전세계적으로 이용되는 PRRSV 감염에 대한 진단 kit는 PRRSV의 GP7 (N) protein을 이용하는 HerdChek PRRS Virus Antibody Test Kit (IDEXX Laboratories, USA)이다. 이 kit를 이용하여 본 실험군에 사용된 돼지의 혈청 중 anti-PRRSV 항체의 존재를 알아보았다. 그 결과, 실험군의 항체가는 0.853±0.519로 나타났고 S/P ratio로 보면 1.633±1.15로 나타났다. 위 결과로 보면 시료중에 양성개체는 총 212개 (81.5%)의 자연 감염율을 보였다.
- 결과를 정리하면 기존의 kit를 이용할 경우 약 81.5%의 양성 감염율을 보이고 별도의 실험으로 재조합 GP5를 이용한 결과에서도 67.7%의 양성율을 보인 것에 비해 peptide 항원을 이용할 경우, 그 검출이 통계적으로 유의성있게 ($P < 0.01$) 낮은 것으로 나타나 각각의 peptide 항원은 PRRSV 감염에 대한 혈청진단용 항원으로 적절하지 않은 것으로

나타났다.

- 한편 본 실험에 사용된 혈청검사 결과, 아직까지 유럽형 PRRSV의 감염은 확산이 되어 있지 않은 것으로 나타났다. 하지만 이를 더욱 확실하게 하기 위해서 연구 2차년도에는 재조합 GP6 단백질을 이용한 ELISA를 추가로 실시하여야 할 것으로 판단된다.

(8) 북미주 및 유럽주 항원 PCR cloning

(가) 공시 균주 및 RNA 준비

PRRSV는 현재 백신으로 사용중인 IngelVac® PRRS ATP (Boehringer Ingelheim, Germany)로부터 Trizol® reagent (Invitrogen, USA)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 total RNA를 추출하여 사용하였다. Cloning 및 단백질 발현에 사용된 competent *E. coli* JM109 및 BL21(DE3)pLysS 균주 (Invitrogen, USA)의 이용 및 균주에서 DNA, 단백질 분리 및 SDS-PAGE등의 작업은 Sambrook과 Russell (2001) 및 Ausubel 등 (2002)에 준하여 실시하였다. 분리된 RNA로부터 SuperScript™ III One-Step RT-PCR Systems (Invitrogen, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하고 제조사의 지시에 준하여 GP5 및 GP6 유전자의 증폭을 실시하였다.

(나) PCR cloning

① GP5 유전자 cloning

- GP5 유전자의 cloning을 위한 DNA 염기 서열 정보는 GenBank #AJ223082 하여 forward primer는 *Bam*HI site (underlined)를 포함하고 (GP5-F: 5'-AATT GGATCC ATGAGCAACGACAGCAGCTCCCA-3') reverse primer는 *Hind*III site (underlined)를 포함하게 (GP5-R: 5'-GGCC AAGCTT CTAAGGACGACCCCATGTGTT-3') 설계, 합성하였다. RT-PCR조건은 다음과 같다. 먼저 cDNA 합성을 위하여 45°C/1h 반응 후 94°C/5min pre-denaturation, 그리고 94°C/30s, 55°C/30s, 72°C/30s의 조건으로 30cycle PCR을 수행하고 마지막으로 68°C/5min의 조건으로 final extension을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 그 size (약 0.5 kb)를 확인 (그림 3-13)하였고 PCR purification kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 gel elution을 실시하였다.

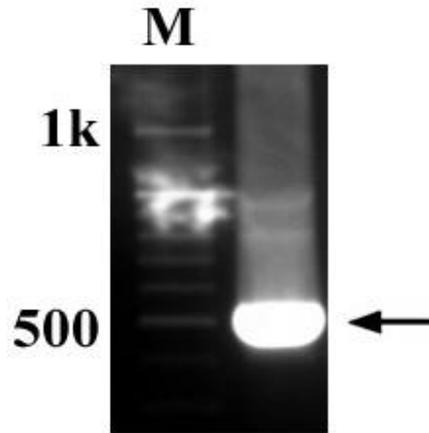


그림 3-13. PRRSV GP5 유전자를 PCR로 증폭한 사진. 기대되는 크기인 516bp의 PCR 산물이 확인되었음. M: 100 bp size marker.

- PCR로 증폭된 GP5 유전자는 cloning vector인 pGEM-T Easy에 cloning되었고 cloning의 여부는 제한효소 처리 (*Bam*HI+*Hind*III 처리, 그림 5) 및 sequencing을 통해 확인되었다.

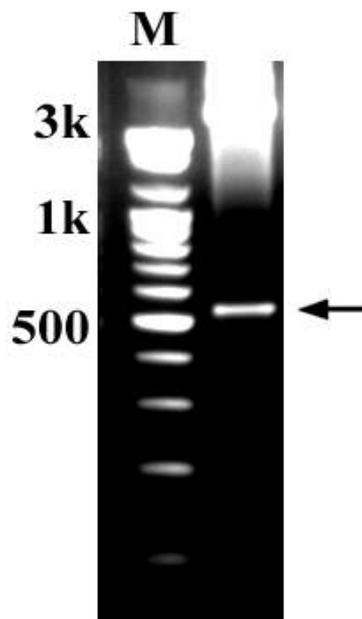


그림 3-14. pGEM-T Easy vector에 cloning된 GP5 유전자를 확인하기 위해 제한효소처리를 한 그림. Vector 크기인 3 kb 및 insert (GP5)인 516bp를 보여주는 그림. M: 1 kb size marker.

- 제한효소 *Bam*HI과 *Hind*III(B+H, Promega, USA)로 처리 후 위의 두 제한효소로 처리한 prokaryotic expression vector인 pRSET(Invitrogen, USA) (Studier and Moffatt,

1986)와 ligation을 실시하여 construct(pRSET-GP5)를 생산하였다. 그 후 준비된 pRSET-GP5를 competent *E. coli* JM109에 transformation 시키고 100 μ l/ml ampicillin 이 첨가된 LB agar plate에서 선택 후, 배양된 colony에서 QIAprep™ Spin Mini Kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 plasmid를 추출한 다음 2개의 제한효소(B+H)로 처리 하여 insert 유무를 확인하고 insert의 size가 확인된 것은 ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 sequencing을 실시하여 vector내의 ORF의 존재 및 shift 여부를 확인하였다.

- *Bam*HI 및 *Hind*III로 잘린 insert는 대장균에서 발현을 위해 대장균 발현 vector인 pRSET 에 subcloning을 위해 같은 효소인 *Bam*HI 및 *Hind*III로 처리된 pRSET A vector에 subcloning되었고 이 역시 *Bam*HI 및 *Hind*III로 처리하여 그 크기를 확인하였고 (그림 3-15), sequencing을 통해 ORF를 확인하였다. 이를 "pRSET-GP5" 라 명명하였다.

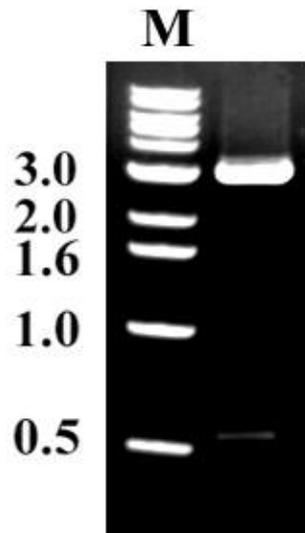


그림 3-15. pRSET A vector에 cloning된 GP5 유전자를 확인하기 위해 제한효소처리를 한 그림. Vector 크기인 3 kb 및 insert (GP5)인 516bp를 보여주는 그림. M: 1 kb size marker.

② GP6 유전자 cloning

- GP6 전자의 cloning을 위한 DNA 염기 서열 정보는 GenBank #AJ223082 를 기초로 하여 forward primer는 *Bam*HI site (underlined)를 포함하고 (GP6-F: 5'-AATT GGATCC ATGGGGGTCGTCCTTAGATGA-3') reverse primer는 *Hind*III site (underlined)를 포함하게 (GP6-R: 5'-GGCC AAGCTT TTATTTGGCATATTTGACAA-3') 설계, 합성하였다. RT-PCR조건은 다음과 같다. 먼저 cDNA 합성을 위하여 45°C/1h 반응 후 94°C/5min pre-denaturation, 그리고 94°C/30s, 58°C/45s, 72°C/30s의 조건으로 35cycle PCR을 수행하고 마지막으로 72°C/10min의 조건으로 final extension을 실시하였다.
- 증폭된 PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 그 size(0.5kb)를 확인하였고 PCR purification kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 gel elution을 실시하였다. Elution한 증폭 산물을 제한효소 *Bam*HI과 *Hind*III(B+H, Promega, USA)로 처리 후 위의 두 제한효소로 처리한 prokaryotic expression vector인 pRSET(Invitrogen, USA) (Studier and Moffatt, 1986)와 ligation을 실시하여 construct(pRSET-GP6)를 생산하였다.
- 그 후 준비된 pRSET-GP6를 competent *E. coli* JM109에 transformation 시키고 100µl/ml ampicillin이 첨가된 LB agar plate에서 선택 후, 배양된 colony에서 QIAprep™ Spin Mini Kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 plasmid를 추출한 다음 2개의 제한효소 (B+H)로 처리하여 insert 유무를 확인하고 insert의 size가 확인된 것은 ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 sequencing을 실시하여 vector내의 ORF의 존재 및 shift 여부를 확인하였다.

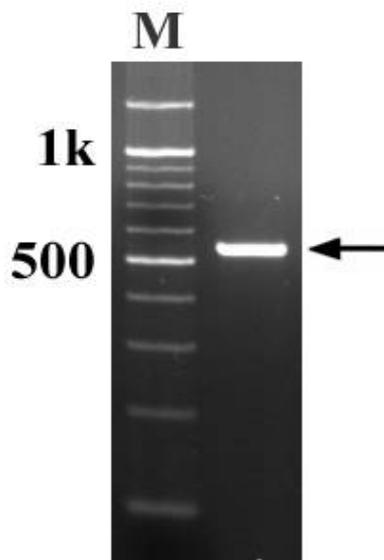


그림 3-16. PRRSV GP6 유전자를 PCR로 증폭한 사진. 기대되는 크기인 약 534bp의 PCR 산물이 확인되었음. M: 1 kb size marker.

- PCR로 증폭된 GP6 유전자는 cloning vector인 pGEM-T Easy에 cloning되었고 cloning의 여부는 제한효소 처리 (*Bam*HI+*Hind*III 처리, 그림 3-17) 및 sequencing을 통해 확인되었다.

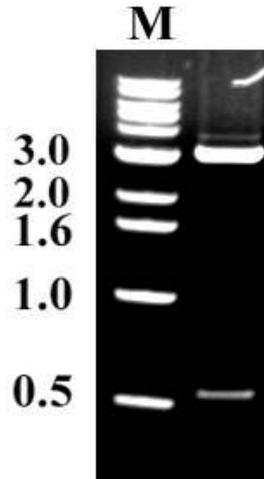


그림 3-17. pGEM-T Easy vector에 cloning된 GP6 유전자를 확인하기 위해 제한효소처리를 한 그림. Vector 크기인 3 kb 및 insert (GP6)인 534bp를 보여주는 그림. M: 1 kb size marker.

- *Bam*HI 및 *Hind*III로 잘린 insert는 대장균에서 발현을 위해 대장균 발현 vector인 pRSET에 subcloning을 위해 같은 효소인 *Bam*HI 및 *Hind*III로 처리된 pRSET A vector에 subcloning되었고 이 역시 *Bam*HI 및 *Hind*III로 처리하여 그 크기를 확인하였고 (그림 3-18), sequencing을 통해 ORF를 확인하였다. 이를 "pRSET-GP6" 라 명명하였다.

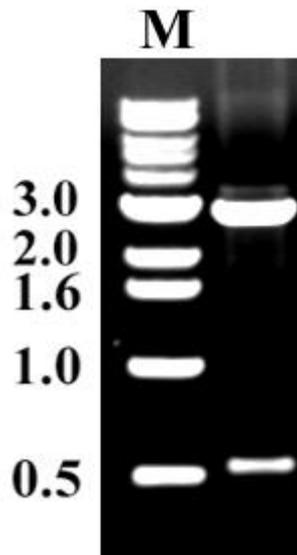


그림 3-18. pRSET A vector에 cloning된 GP6 유전자를 확인하기 위해 제한효소처리를 한 그림. Vector 크기인 3 kb 및 insert (GP6)인 534bp를 보여주는 그림. M: 1 kb size marker.

(다) 재조합 단백질 발현

① 재조합 GP5 단백질 발현

- 대장균 발현 vector인 pRSET에 subcloning이 확인된 construct인 pRSET-GP5는 단백질 발현용 대장균인 BL21(DE3)pLysS에 heat-shock법으로 transformation 되었고 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 chloramphenicol이 첨가된 LB 배지에서 생존한 colony들이 선택되었다.
- 선택된 colony들은 LB broth에서 miniscale expression study를 실시하여 IPTG를 첨가하여 시간별로 단백질의 발현 여부를 아래 그림 3-19와 같이 확인하였다. 재조합 GP5 단백질은 기대되는 크기인 약 23 kDa의 위치에서 확인할 수 있었다.



그림 3-19. 재조합 *pvpA*를 단백질 발현 후 SDS-PAGE를 실시하여 발현양상을 본 그림. 시료는 IPTG를 이용한 단백질 발현 전 및 발현 후 4시간째를 취하였다. M: 단백질 size marker, lane 1: 형질전환 이전의 대장균 control, lane 2-4: 단백질 발현 1시간-4시간.

- 발현된 단백질의 band가 재조합 단백질의 밴드인지 아니면 비특이적인 반응에 의한 단백질 band인지 알아보기 위하여 pRSET vector에서 만들어지는 재조합 단백질의 N-terminal에 tagging되어 있는 6XHisTM에 대한 항체를 이용하여 Western blot을 실시하였다. 즉, SDS-PAGE에서 전기영동된 gel을 methanol로 활성화된 PVDF (Bio-Rad)에 electro-transfer unit (Bio-Rad)를 이용하여 membrane으로 transfer 후 1% skim milk로 상온에서 약 4시간 blocking 후 항체로는 Anti-His G-HRPTM (Invitrogen)을 1:5,000의 비율로 희석 후 상온에서 약 2시간 반응시켰다. 이후 membrane을 PBS로 5회 washing 후 발색을 시켰다. 발색제로는 diaminobenzidine (DAB) concentrate 를 포함하는 DAB 기질 용액(Serotec, Oxford, UK)을 사용하였다. 그 결과, 기대되는 크기 (23 kDa)보다 약간 더 큰 크기의 band가 아래 그림 3-20과 같이 관찰되었다. 그리고 선택된 colony를 이용하여 단백질 대량발현을 실시하였다.

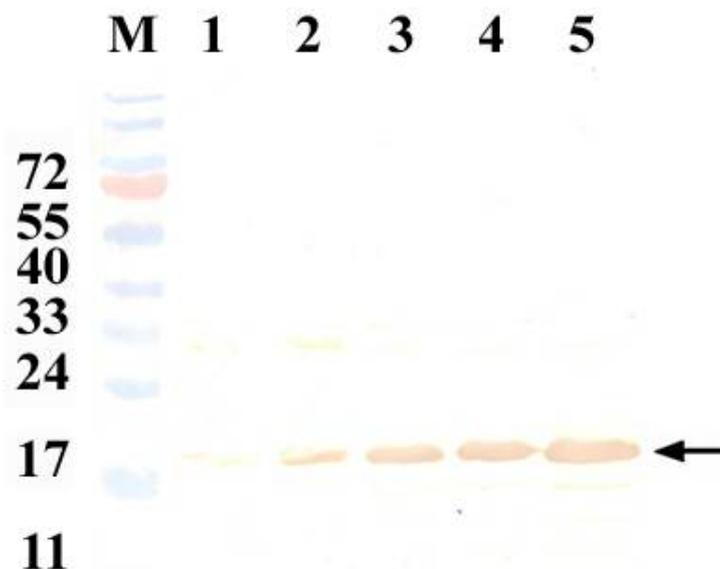


그림 3-20. GP5의 재조합 단백질로의 발현 여부를 확인하기 위하여 실시한 western blot 결과 사진. 재조합단백질의 기대되는 크기인 23 kDa의 band가 발현 약 1시간째부터 나타남을 보여 주는 그림. M: 단백질 size marker, lane 1: 형질전환 이전의 대장균 control, lane 2-8: 단백질 발현 0시간 - 6시간.

- 대량발현된 대장균 배양액을 Guanidium lysis buffer (Probond™, Invitrogen)을 첨가하여 재부유하고 이를 sonicator (Sonics & Materials, USA)를 이용하여 lysate를 만들었다. 준비된 lysate는 8,000 rpm/30 min/4°C에서 원심분리 후 상층액을 따로 회수하였다. 회수된 상층액에 Ni²⁺-charged affinity resin (Probond™)을 lysate 4 ml당 1 ml씩 첨가하여 상온에서 2시간 동안 binding 시켰다. Binding된 resin을 각각 pH 7.8, pH 6.0, pH 5.3의 5 ml의 washing buffer로 4번씩, 각 pH당 총 20 ml의 buffer를 사용하여 washing하고 마지막에 pH 4.0의 elution buffer로 binding된 단백질을 elution하고 1 ml의 fraction별로 보관하였다. 보관된 elution fraction에 원하는 재조합 단백질이 잘 elution 되었는지 확인하기 위해 아래 그림 3-21과 같이 SDS-PAGE로 그 크기 및 순도를 확인하였다.

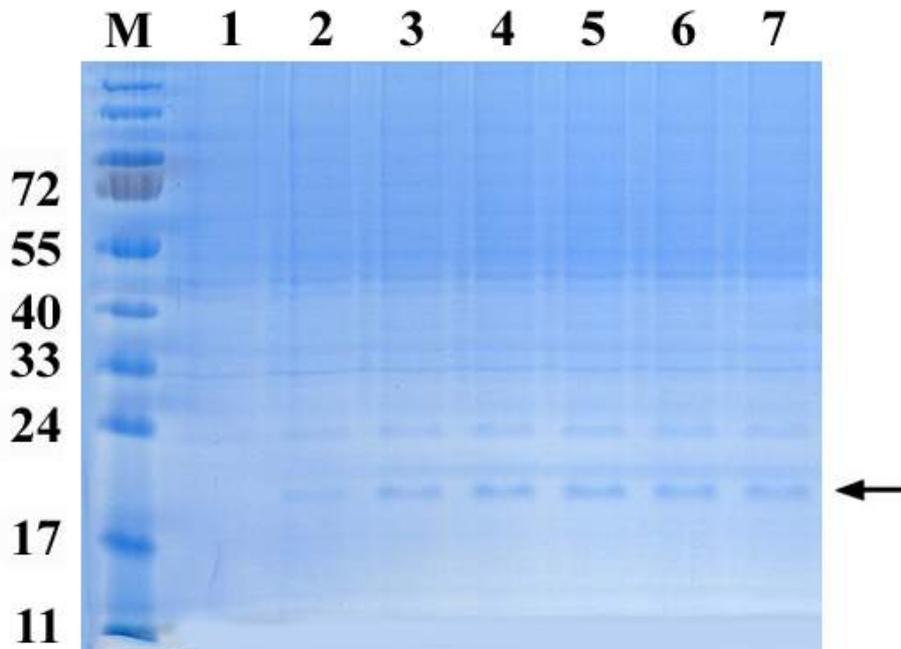


그림 3-21. GP5 단백질을 affinity binding 후 elution한 1 ml fraction을 SDS-PAGE를 실시하여 그 크기 및 순도를 확인한 그림으로 원하는 크기 (42 kDa)의 단백질이 fraction 1번부터 고순도로 elution됨을 보여주고 있음 (lane1-7: 1 ml elution fraction 1-7). M: 단백질 size marker.

- 고순도로 elution된 재조합 단백질이 원하는 재조합 단백질인지 다시 확인하기 위해 elution fraction에 대해 western blot을 다시 실시하였다. 그 결과 아래 그림 3-22와 같이 기대되는 단백질을 확인하였다.



그림 3-22. 재조합 GP5 단백질의 순수분리 후 분리된 단백질이 원하는 재조합 단백질인지 재 확인하기 위해 실시한 western blot 결과 사진. 재조합단백질의 기대되는 크기인 23 kDa의 band가 확인되었음을 보여주는 그림. lane 1-7: 1 ml elution fraction, M: protein size marker.

② 재조합 GP6 단백질 발현

- 대장균 발현 vector인 pRSET에 subcloning이 확인된 construct인 pRSET-GP6는 단백질 발현용 대장균인 BL21(DE3)pLysS에 heat-shock법으로 transformation 되었고 35 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 chloramphenicol이 첨가된 LB 배지에서 생존한 colony들이 선택되었다.
- 선택된 colony들은 LB broth에서 miniscale expression study를 실시하여 IPTG를 첨가하여 시간별로 단백질의 발현 여부를 아래 그림 3-23과 같이 확인하였다. 재조합 GP6 단백질은 기대되는 크기인 약 23 kDa 부위에 확인할 수 있었다.

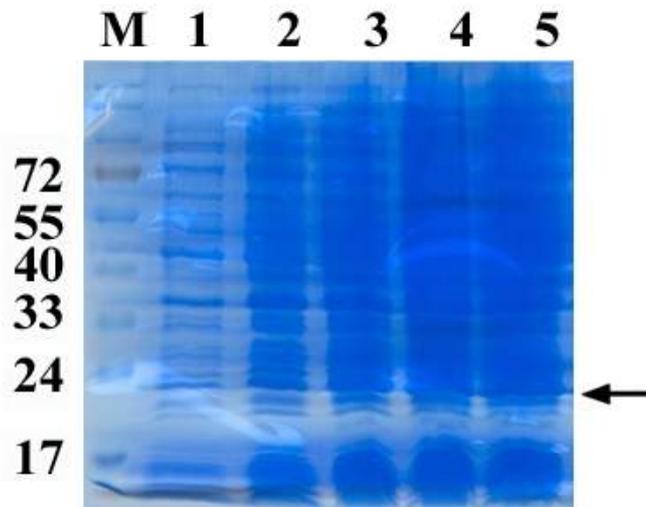


그림 3-23. 재조합 GP6를 단백질 발현 후 SDS-PAGE를 실시하여 발현양상을 본 그림. 시료는 IPTG를 이용한 단백질 발현 전 및 발현 후 4시간째를 취하였다. M: 단백질 size marker, lane 1: 형질전환 이전의 대장균 control, lane 2-8: 단백질 발현 0시간-6시간.

- 발현된 단백질의 band가 재조합 단백질의 밴드인지 아니면 비특이적인 반응에 의한 단백질 band인지 알아보기 위하여 pRSET vector에서 만들어지는 재조합 단백질의 N-terminal에 tagging되어 있는 6XHisTM에 대한 항체를 이용하여 Western blot을 실시하였다. 즉, SDS-PAGE에서 전기영동된 gel을 methanol로 활성화된 PVDF (Bio-Rad)에 electro-transfer unit (Bio-Rad)를 이용하여 membrane으로 transfer 후 1% skim milk로 상온에서 약 4시간 blocking 후 항체로는 Anti-His G-HRPTTM (Invitrogen)을 1:5,000의 비율로 희석 후 상온에서 약 2시간 반응시켰다. 이후 membrane을 PBS로 5회 washing 후 발색을 시켰다. 발색제로는 diaminobenzidine (DAB) concentrate 를 포함하는 DAB 기질 용액(Serotec, Oxford, UK)을 사용하였다. 그 결과, 기대되는 크기 (23 kDa)부위에 band가 아래 그림 3-24와 같이 관찰되었다. 그리고 선택된 colony를 이용하여 단백질 대량발현을 실

시하였다.



그림 3-24. GP6의 재조합 단백질로의 발현 여부를 확인하기 위하여 실시한 western blot 결과 사진. 재조합단백질의 기대되는 크기인 23 kDa의 band가 발현 약 1시간째부터 나타남을 보여주는 그림. M: 단백질 size marker, lane 1: 형질전환 이전의 대장균 control, lane 2-5: 단백질 발현 1시간 - 4시간.

- 대량발현된 대장균 배양액을 Guanidium lysis buffer (Probond™, Invitrogen)을 첨가하여 재부유하고 이를 sonicator (Sonics & Materials, USA)를 이용하여 lysate를 만들었다. 준비된 lysate는 8,000 rpm/30 min/4°C에서 원심분리 후 상층액을 따로 회수하였다. 회수된 상층액에 Ni²⁺-charged affinity resin (Probond™)을 lysate 4 ml당 1 ml씩 첨가하여 상온에서 2시간 동안 binding 시켰다. Binding된 resin을 각각 pH 7.8, pH 6.0, pH 5.3의 5 ml의 washing buffer로 4번씩, 각 pH당 총 20 ml의 buffer를 사용하여 washing하고 마지막에 pH 4.0의 elution buffer로 binding된 단백질을 elution하고 1 ml의 fraction별로 보관하였다. 보관된 elution fraction에 원하는 재조합 단백질이 잘 elution 되었는지 확인하기 위해 아래 그림 3-25와 같이 SDS-PAGE로 그 크기 및 순도를 확인하였다.

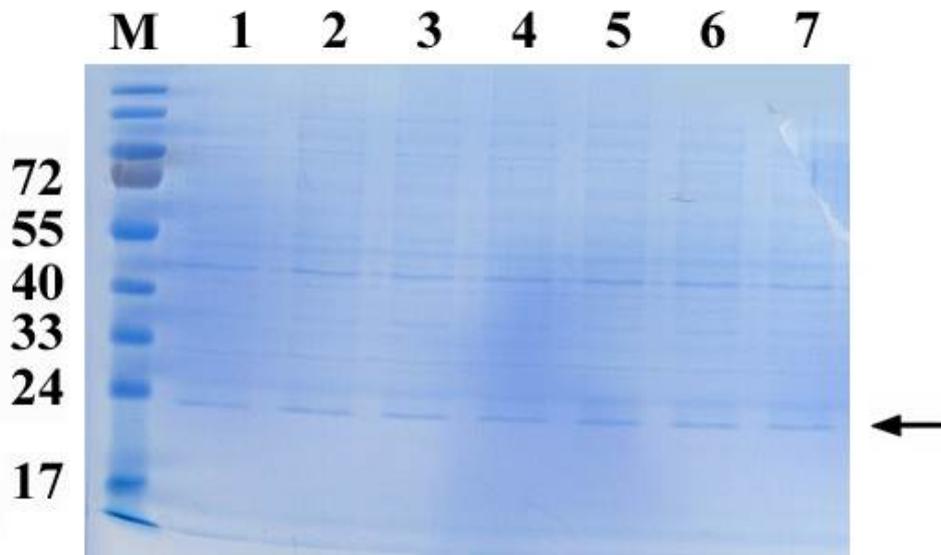


그림 3-25. GP6 단백질을 affinity binding 후 elution한 1 ml fraction을 SDS-PAGE를 실시하여 그 크기 및 순도를 확인한 그림으로 원하는 크기 (42 kDa)의 단백질이 fraction 1번부터 고순도로 elution됨을 보여주고 있음 (lane 1-7: 1 ml elution fraction 1-7). M: 단백질 size marker.

- 고순도로 elution된 재조합 단백질이 원하는 재조합 단백질인지 다시 확인하기 위해 elution fraction에 대해 western blot을 다시 실시하였다. 그 결과 아래 그림 3-26과 같이 기대되는 단백질을 확인하였다.

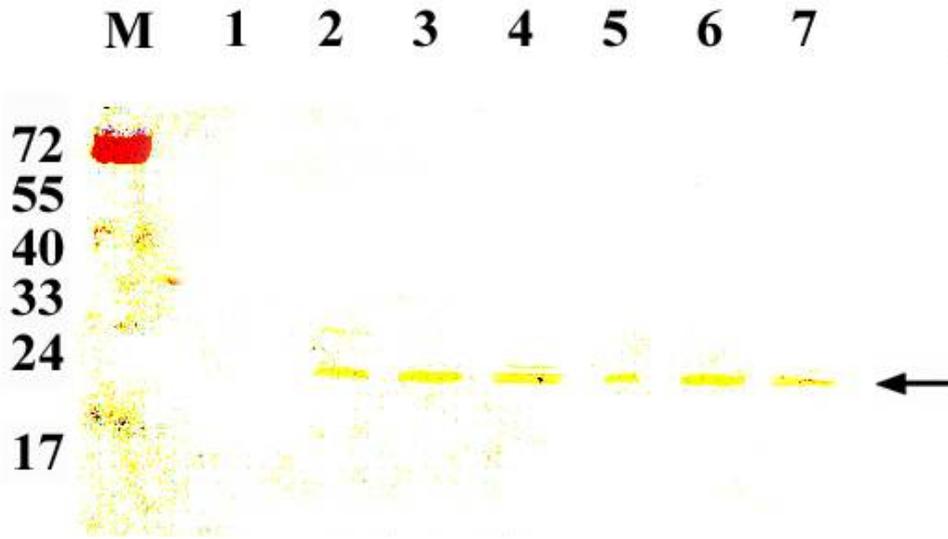


그림 3-26. 재조합 GP6 단백질의 순수분리 후 분리된 단백질이 원하는 재조합 단백질인지 재 확인하기 위해 실시한 western blot 결과 사진. 재조합단백질의 기대되는 크기인 23 kDa의 band가 확인되었음을 보여주는 그림. lane 1-7: 1 ml elution fraction, M: protein size marker.

2. 2차년도

가. 이중항원발현 생균백신 및 감별진단법의 산업화

(연구내용: 백신균주의 제형화 기초연구 및 Pilot scale 고농도배양 및 제형화 연구)

(1) 백신 균주의 제형화 기초연구

- 배양배지 최적화

개발된 이중항원 (PRRSV GP5) 발현 약독화 *B. bronchiseptica* (BBS-GP5)의 고농도 배양을 위해 기존에 일반적으로 사용되는 BHI broth를 대체 할 수 있는 새로운 배지 조성을 개발 하였다.

기존에 *B. bronchiseptica*를 배양하기 위하여 사용되는 BHI broth배지 조성은 표 3-6과 같다.

표 3-6. 기존에 사용되는 BHI 배지 조성

성분명	함량(g/L)
Calf brain Infusion from 200g	7.7
Beef heart Infusion from 250g/L	9.8
Proteose peptone	10
Dextrose	2
Sodium chloride	5
Disodium phosphate	2.5
pH	7.4 ± 0.2

Calf brain과 Beef heart를 대체하기 위해 Beef extract와 미네랄 혼합물, 비타민 혼합물을 사용하였고, Proteose peptone을 대체하기 위해 대두박과 African locust bean으로부터 직접 조제하여 사용하였다. Dextrose, Sodium chloride, Disodium phosphate는 첨가량을 조정하여 최적의 배지 조성을 찾아내었다.

● Peptone 조제

대두박과 African locust bean으로부터 peptone의 조제를 위하여 대한사료로부터 원료를 구매하였다. 원료중의 단백질, 지방, 수분함량을 분석하였다. 조단백질함량은 Microkjedhal법에 의해 측정하였으며 측정된 질소 함량에서 조단백질로의 전환 factor는 % N x 6.25(AOAC,1980)을 사용하였다. 지방함량은 Bligh and Dyer, 1959의 표준방법에 의해 행하였다. 수분함량은 적외선 수분측정기로 104℃에서 20분간 행하여 나타나는 수분함량으로 하였다.

표 3-7. 대두박과 African locust bean의 단백질, 지방, 수분함량

성분	대두박(%)	African locuse beans(%)
단백질	47.73	30.69
수분	4.83	3.4
지방	17.72	23.03

대두박과 African locust bean에서 이물질을 제거하고 50℃에서 건조한 후 껍질을 제거하고 분말화 하였다. 각각 시료를 헥산을 사용하여 soxhlet추출기로 지방성분을 추출하였고 지방성분이 제거된 대두박 40g을 재어 200ml증류수에 분산시켜 단백질 슬러리로 만들었다. 단백질슬러리의 pH를 1N NaOH로 6.5fh 조정한 후 0.25% 파파인(Novozyme)을 가해

60℃에서 3시간 동안 가수분해 시켰다. 이후 80℃로 온도를 조정하여 5분간 방치하여 효소를 불활성화 하였다. 가수분해된 각각의 시료를 10,000rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 분리 하였다. 상등액을 동결건조하여 펩톤분말을 얻었다.

- Beef extract와 미네랄혼합물, 비타민 혼합물의 최적조성을 찾기 위하여 다음과 같은 조성을 구성하였다. Beef extract(5,10,15g/L), mineral mixture($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 300mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 300mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 300mg, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100mg/ 증류수 1L)(5,10,15ml), 비타민 혼합물(thiamine-HCl 5mg, carnitine chloride 0.1mg, adenine- $\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3mg, choline chloride 10mg/증류수 1L)(2,5,10ml)을 사용하였으며 Beef extract는 “Bacto”제품(Becton, Dickinson and Company, MD,USA)을 사용하였으며 시약은 Wako Pure Chemical Industries Ltd, Osaka, Japan에서 구매하여 사용하였다.

이들 배지 조합중에서 PRRSV GP5을 최적으로 성장시키는 배지 조합을 찾기 위하여 Proteose peptone 10g/L, dextrose 2g/L, Sodium chloride 5g/L, Disodium phosphate 2.5g/L에 Beef extract, 미네랄 혼합물, 비타민 혼합물을 조정하여 PRRSV GP5 배양시험을 행하였다. 그 결과는 표 3-8과 같다.

표 3-8. 조제된 Beef extract와 미네랄혼합물, 비타민혼합물 조성에서 BBS-GP5생장비교

Beef extract(g/L)	미네랄 혼합물(g/L)	비타민 혼합물(g/L)	O.D 600nm	
5	5	2	0.72	
		5	0.82	
		10	0.86	
	10	10	2	0.69
			5	0.76
			10	0.77
	15	15	2	0.84
			5	0.65
			10	0.77
10	5	2	0.51	
		5	0.63	
		10	0.55	
	10	10	2	0.79
			5	0.82
			10	0.97
	15	15	2	0.88
			5	0.81
			10	0.77
15	5	2	0.62	
		5	0.66	
		10	0.75	
	10	10	2	0.64
			5	0.63
			10	0.79
	15	15	2	0.86
			5	0.83
			10	0.89

위 배지성분의 조성에서 BBS-GP5의 최적 배지조성은 Beef extract 10g/L, 미네랄 혼합물 15g/L, 비타민 혼합물 10g/L, Proteos peptone 10g/L, dextrose 2g/L, Sodium chloride 5g/L, Disodium phosphate 2.5g/L임을 알 수 있었다. 이렇게 확정된 배지 조성에서 다음으로는 대두박과 African locust bean으로부터 조제한 peptone을 사용하여 BBS-GP5의 최적 배양 배지 조건을 확립하였다.

- Beef extract 10g/L, 미네랄 혼합물 15g/L, 비타민 혼합물 10g/L, dextrose 2g/L, Sodium chloride 5g/L, Disodium phosphate 2.5g/L 의 함량에 대두와 African locust bean으로부터 조제한 peptone의 g수를 5, 10, 15g/L로 달리하여 BBS-GP5의 배양시험을 행하였다. 그 결과는 표 3-9와 같다.

표 3-9. 대두에서 조제한 펩톤과 African locust bean에서 조제한 펩톤의 PRRSV GP5생장 비교

	대두에서 조제한 펩톤(g/L)			African locust bean에서 조제한 펩톤(g/L)		
	5	10	15	5	10	15
PRRSV GP5	2.3×10^{10}	5.9×10^{10}	3.5×10^{10}	3.4×10^{10}	2.5×10^{10}	1.5×10^{10}
Wild type	3.7×10^{12}	5.2×10^{12}	5.1×10^{12}	2.4×10^{12}	4.3×10^{12}	3.2×10^{12}

* cfu/ml

최종적으로 BBS-GP5 최적 생장 배지 조건은 Beef extract 10g/L, 미네랄 혼합물 15g/L, 비타민 혼합물 10g/L, 대두에서 조제한 펩톤 10g/L, dextrose 2g/L, Sodium chloride 5g/L, Disodium phosphate 2.5g/L, Aromix 10ml/L로 확정 하였다.

- Aromix는 tryptophan 0.4g, tyrosine 0.4g, phenylalanine 0.4g을 1M HCl 4 ~ 5ml을 가하고 녹을때까지 교반한 후 dihydroxybenzoic acid 0.1g, para-aminobenzoic acid 0.1g을 증류수 50ml에 녹인 것과 혼합 후 최종적으로 100ml로 하여 멸균용기에 빛이 안들게 호일로 싸서 냉장고에 보관 한 용액을 10ml/L로 사용하였다. Kanamycin은 25mg/ml stock을 4ml을 배지 리터당 가하여 사용 하였다.

(2) Pilot scale 고농도 배양

- Seed 배양

BBS-GP5 삼각플라스크 배양을 위해 BHI broth 37g을 재어 1리터의 증류수에 녹인 후 250ml삼각플라스크에 150ml씩 분주 후 121℃에서 30분간 멸균후 냉각하고 여기에 Aromix stock 1.5ml, Kanamycin 0.6ml을 가한 액체 배지에 BBS-GP5 균주를 접종하여 37℃에서 하룻밤 교반시키면서 배양 하였다.

- Pilot scale 배양

Pilot scale의 고농도 배양을 위해 위에서 정해진 배지 구성분으로 20L 배지를 조제 하였다. 조제한 배지를 멸균, 냉각한 후 Aromix 200ml을 가하고 Kanamycin 25mg/ml stock 80ml을 가하였다. pH는 7.4±0.2가 되도록 5N NaOH가 자동으로 pH를 조정하도록 하였다. 발효조는 Bioneer사의 25L CellFarm 발효조를 사용하였으며 1,500cc/min의 공기를 공급하면서 삼각플라스크 Seed를 200ml 가하여 시간별로 배양액을 취하여 600nm에서 흡광도(UVmini-1240 spectrophotometer, Shimadzu)를 측정하였다.

그 결과 그림 3-28과 같다.

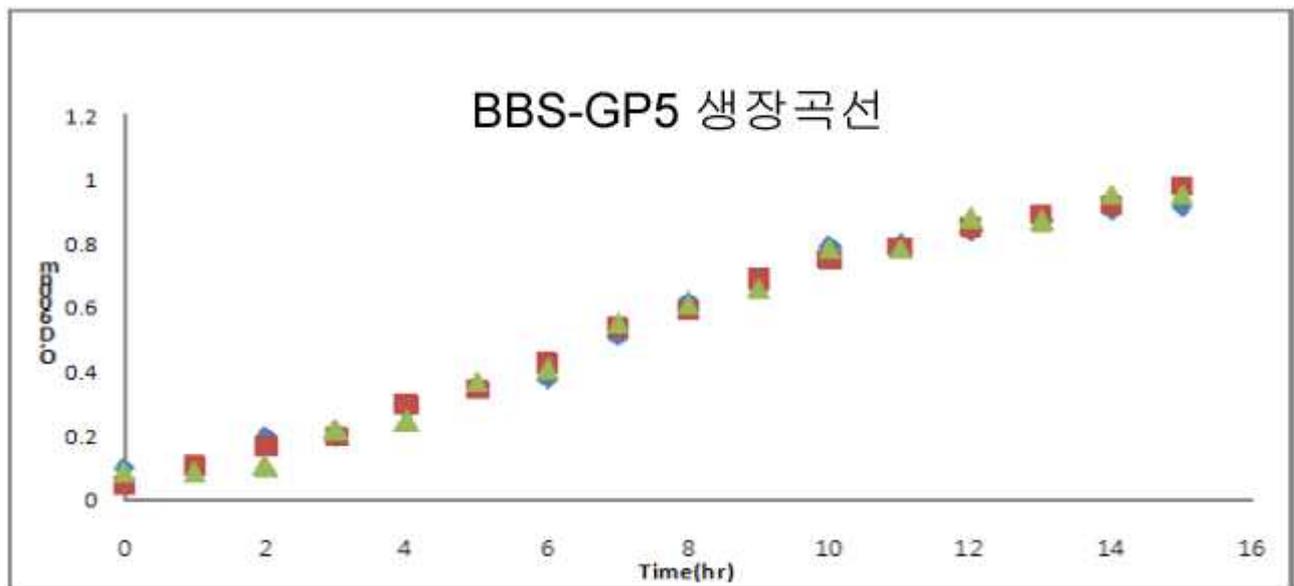


그림 3-27. BBS-GP5 성장곡선.

- BBS-GP5의 안정화

고농도 배양이 끝난 BBS-GP5를 5000rpm에서 30분간 원심분리 하여 상등액을 버리고 침전된 BBS-GP5 펠릿에 0.1M PBS(pH7.2)1리터에 분산 시킨 후 다시 5000rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 버리고 얻은 PRRSV GP5 펠릿에 10% 슈크로오스가 함유된 0.1M PBS(pH7.2)와 10% 과당을 함유한 0.1M PBS(pH7.2)와 10% 트레할로스가 함유된 0.1M PBS(pH7.2)에 분산시켜 4℃와 25℃실온에 보관하면서 2주일에 1회씩 시료를 채취하여 BHI agar plate에 6개월간 BBS-GP5 생존균수를 측정하였다.

그 결과는 그림 3-28, 그림 3-29와 같다.

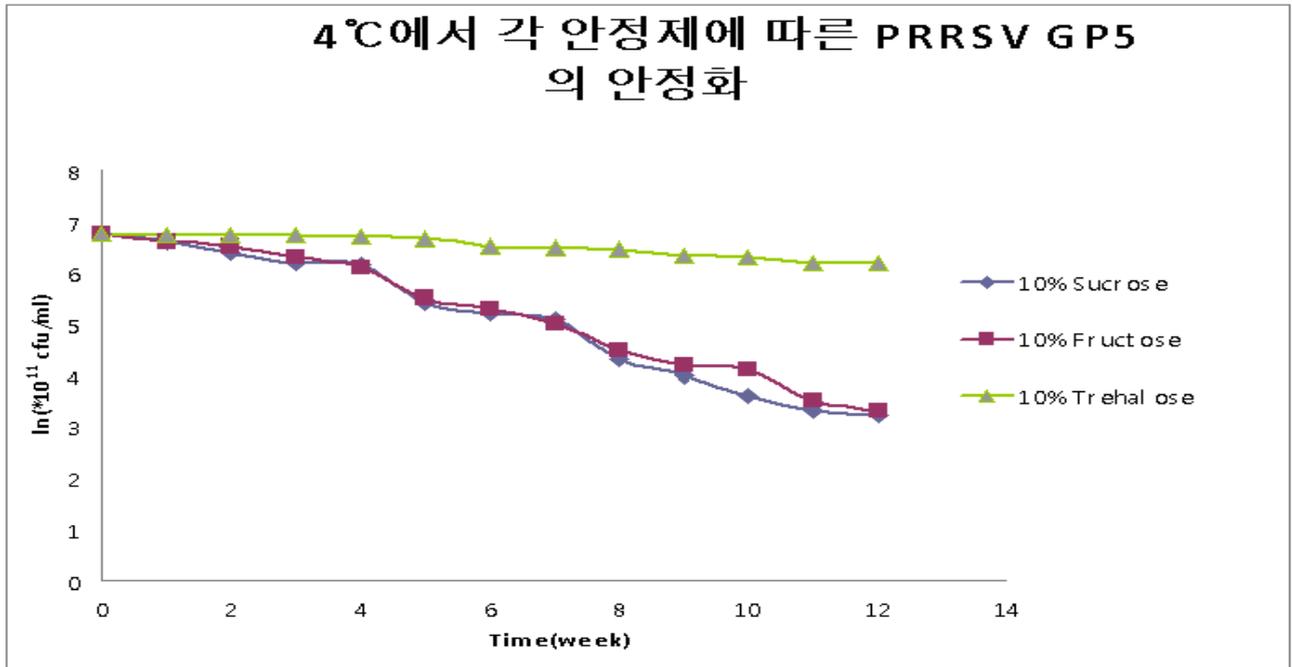


그림 3-28. 4°C에서 각 안정제에 따른 BBS-GP5의 안정화.

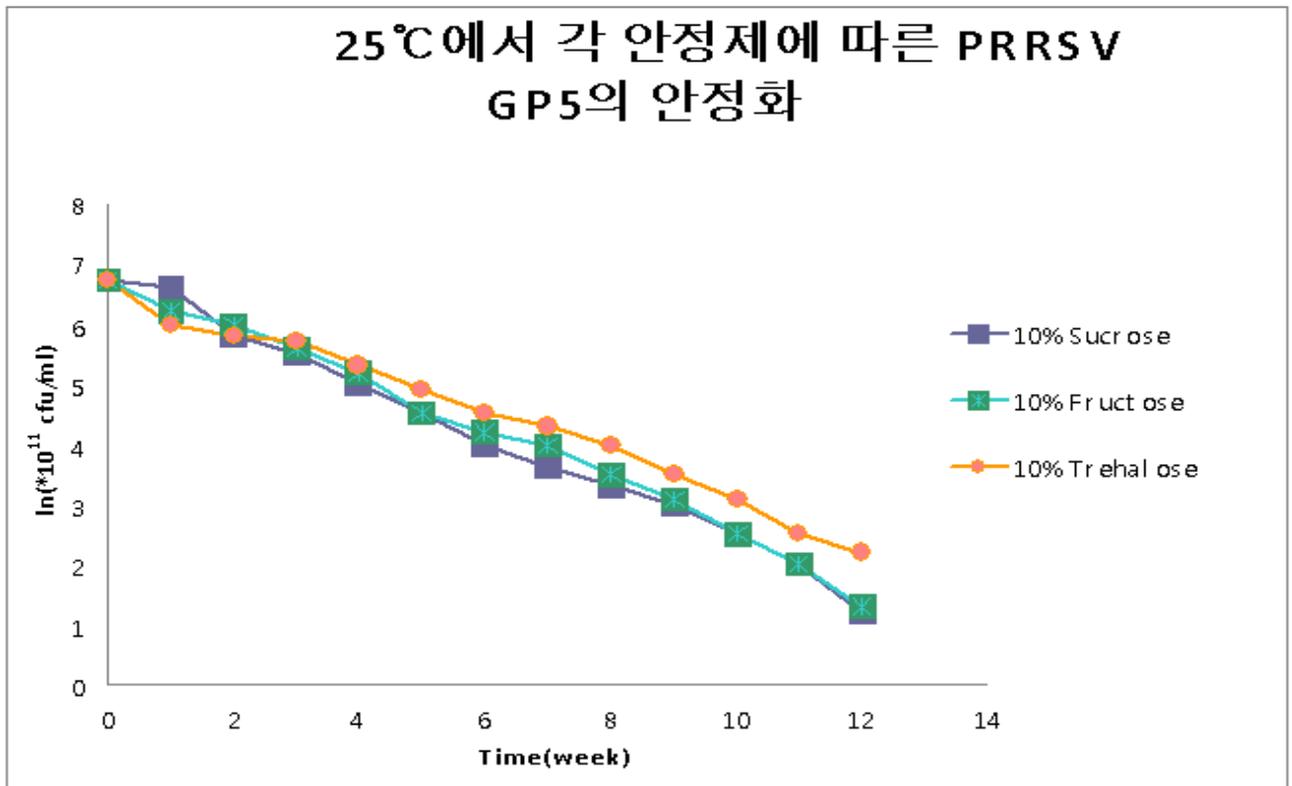


그림 3-29. 25°C에서 각 안정제에 따른 BBS-GP5의 안정화.

(3) 개발된 이중항원 (PRRSV GP5) 발현 약독화 B. bronchiseptica를 이용한 백신효능 검사

(가) 자돈 준비

- 전북 소재 HACCP 농장으로부터 18일령 이유자돈 9마리를 구입하여 실험에 공하였음
- 3일간 안정화 후 사료와 음수는 자유로이 공급함
- 모돈으로부터 이행되는 모체이행항체 및 이유기 이전에 기 감염으로 인해 자돈이 보유하고 있을 수 있는 anti-PRRSV 항체의 존재를 알아보기 위해 자돈의 혈청중의 항체가 screening 실시
- 이를 위해 자돈 혈청을 준비하고 PRRSV 진단 키트 (IDEXX, HerdChek)를 이용하여 항체가 진단을 실시하였고 그 결과는 아래 표 3-10과 같음.

표 3-10. 실험전 자돈의 보유 항체가 측정을 위한 screening 실험 결과

Group	평균 S/P ratio 값 (\pm SD)	판정
1	0.11 (0.04)	음성
2	0.07 (0.008)	음성
3	0.04 (0.002)	음성

- 실험결과, 모든 자돈에서 음성으로 확인됨

(나) 자돈 면역

- 생산된 생균백신의 효능을 알아보기 위한 접종은 다음 표 3-11과 같이 실시되었음

표 3-11. 생균백신 효능검정을 위한 백신 프로그램

일시	Group 1	Group 2	Group 3
Day 0	rGP5 200ug in PBS + Freund's complete adjuvant, SC*	rGP5 200ug in PBS + Freund's complete adjuvant, SC	rGP5 200ug in PBS + Freund's complete adjuvant, SC
Day 14	rGP5 200ug in PBS + Freund's incomplete adjuvant, SC	1×10^8 BBS-PRRSV GP5**/kg, nasal	1×10^8 BBS-aroA*** /kg, nasal
Day 21	모든 자돈에서 채혈 및 항체가 측정		
Day 28	rGP5 200ug in PBS + Freund's incomplete adjuvant, SC	1×10^8 BBS-PRRSV GP5/kg, nasal	1×10^8 BBS-aroA/kg, nasal
Day 35	모든 자돈에서 채혈 및 항체가 측정		
Day 42	PRRSV challenge		
Day 47	채혈 및 부검 실시		

*SC: 피하접종, **PRRSV GP5 발현-약독화 *B. bronchiseptica*, *** 약독화 *B. bronchiseptica*

- Group 1은 재조합 단백질을 이용한 양성 항체가 생성군으로써 실험의 양성 대조군으로 사용되었다.
- Group 2는 실험군으로써 BBS-PRRSV 생균백신을 접종하였다.
- Group 3은 약독화 *B. bronchiseptica*만을 사용한 음성대조군으로써 *B. bronchiseptica* 균주 자체가 가지는 영향을 평가하기 위해 사용되었다.
- Day 21과 day 35에는 채혈을 통해 혈중 항체가가 상승하는지를 monitoring하였다.
- Day 42에는 Boehringer Ingelheim사의 PRRSV 생독 (IngelVac)을 주사하여 감염을 유도하였으며 day 49일째 모든 돼지를 희생하고 면역장기인 림프절을 채취하여 PRRSV의 존재 여부 및 viral clearance를 비교하였다.

(다) ELISA 항체가 측정

- Day 21째 전군의 돼지로부터 채혈을 실시하고 혈중 anti-PRRSV GP5 항체가를 측정하였다. 이를 위해 재조합 GP5를 항원으로 이용하여 $1 \mu\text{g/ml}$ 로 맞추어 96-well plates (Maxisorp™, Nunc, Denmark)에 $100 \mu\text{l/well}$ 의 농도로 coating하였다. 이 plate는 1%

skim milk를 첨가한 PBS로 blocking 하고 PBST (PBS + 0.05% Tween-20, pH 7.4)로 washing하였다. 각 group의 mouse 혈청은 1:100으로 희석하여 사용하여 1차 항체로 사용하였다. 항체액은 PBST로 희석하였고 총 90 μ l를 첨가하여 사용하여 37°C에서 1시간 반응 후 3회 PBST로 washing 하고 다시 1:500으로 희석된 goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated (Serotec, UK)를 2차 항체로 사용하여 반응시켰다. 역시 2차 항체도 37°C에서 1시간 반응 후 3회 PBST로 washing 하였다.

- 결합된 2차항체의 검출은 기질용액 [100 mM citric acid buffer, pH 4.0, 10 ml ABTS stock solution (ABTS 100 mg in 4.5 ml DW) 250 μ l H₂O₂ 50 μ l]을 이용하여 발색을 실시하였다. 기질용액과의 반응은 암실에서 10분간 실시하였고 흡광도 405 nm에서 ELISA reader (Multiskan EX, Thermo LabSystems, Beverly, MA)를 이용하여 OD값을 측정하였다. 측정된 OD값은 평균값 \pm 표준편차 (SD)로 표기하였고 값들은 Student's *t*-test를 통해 통계적 유의성 검사를 실시하였다.
- 그 결과는 다음 표 3-12와 같다. 즉, 1회 boosting 후에는 어느 group에서도 통계적으로 유의성이 있게 항체가가 높지 않았다.

표 3-12. 1차 boosting 후 돼지 혈중 항체가 측정 결과

Group	평균 OD 값 (\pm SD)	통계적 의의
1	0.47 (0.08)	없음
2	0.36 (0.07)	없음
3	0.45 (0.09)	없음

- 같은 방법으로 day 35째 채혈을 실시하고 항체가를 측정하였고 그 결과는 표 3-13과 같다. 즉, 재조합 단백질을 이용한 양성대조군에서는 예상한 바와 같이 높은 항체가가 형성되었으며 생균백신을 접종한 실험군에서도 음성대조군에 비해 통계적으로 유의성있게 높은 수치의 항체가를 형성하였다.

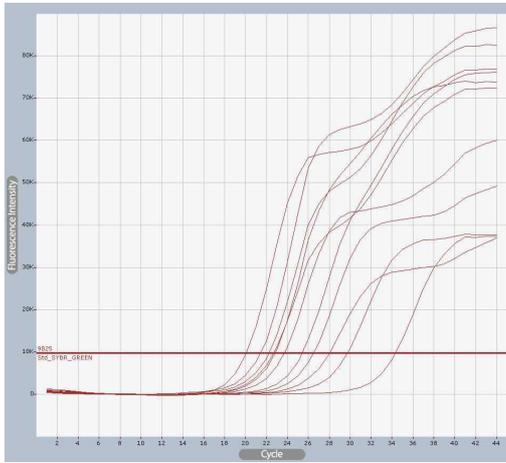
표 3-13. 최종접종 후 돼지 혈중 항체가 측정 결과

Group	평균 OD 값 (\pm SD)	통계적 의의
1	2.02 (0.30)	있음 (1-2: P<0.05, 1-3; P<0.01)
2	1.27 (0.37)	있음 (2-3: P<0.1)
3	0.67 (0.13)	없음

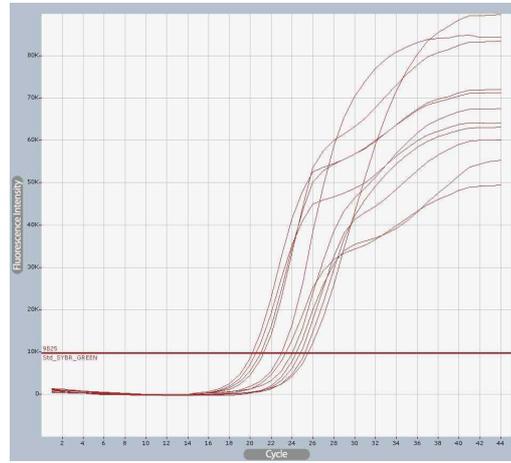
- 위의 결과를 볼 때, 이중항원으로 PRRSV GP5를 발현하는 생균백신을 비강을 통해 접종하더라도 혈중에서 유의성있게 항체가 형성됨을 알 수 있었다.

(라) 공격접종 및 viral clearance

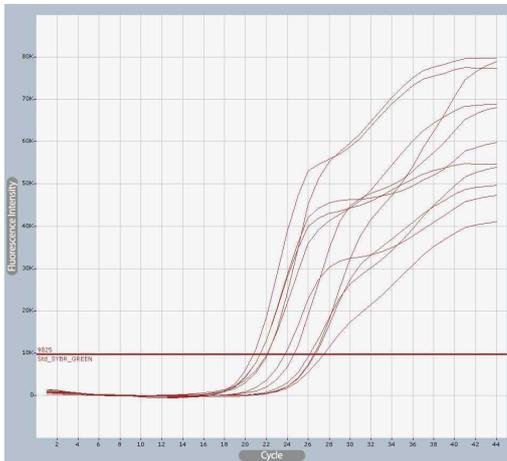
- IngelVac ($10^{4.9}$ TCID) 생독원액을 돼지 마리당 10ml씩 근육주사를 실시하고 접종 5일 후 (day 47) 부검을 실시하였다.
- 부검을 위해 돼지를 Zoletil과 xylazine으로 마취 후 전사시켰고 조직내 viral RNA의 검출을 위해 superficial lymph node (LN), submandibular LN, mediastinal LN, 그리고 medial iliac LN를 채취하여 순간동결 후 조직에서 RNA를 추출하였다.
- RNA 추출은 Tissue RNA PrepMate™ (Bioneer)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 total RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 이용, cDNA를 합성하였다. cDNA 합성은 Superscript™ III First-strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen)을 이용하였고 first strand 합성용 primer는 GP5-R primer를 이용하였으며 제조사의 지시에 따라 cDNA를 합성하였다.
- 합성된 cDNA를 이용, 각 조직내에 존재하는 PRRSV RNA의 양을 정량 PCR을 이용하여 정량하였다. 정량 PCR을 위해 SYBG-Green-based quantitative PCR을 Exicycler™ Quantitative Thermal Block (Bioneer)를 이용하였다. 정량 PCR을 위해 primer 로는 GP5-F와 GP5-R을 사용하였다. PCR에 사용된 재료는 AccuPower™ GreenStar qPCR PreMix (Bioneer)를 이용하였다.
- Viral RNA의 양은 PCR의 threshold cycle (Ct) 수에 의해 판정되었다. 즉, 역치값에 이르는 PCR의 cycle 수는 적을수록 2^n 의 RNA copy가 더 들어있음을 의미한다.
- 그 결과를 도식화하면 다음 그림 3-30과 같다.



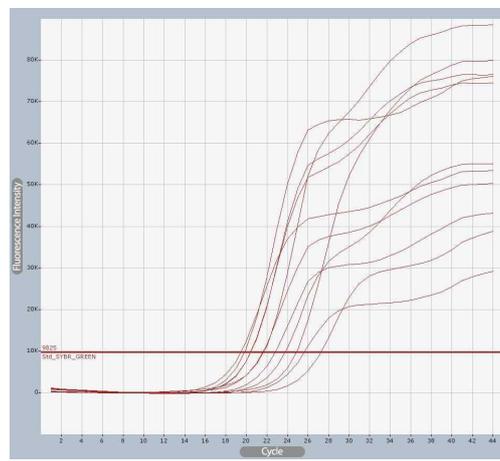
A: superficial LN



B: submandibular LN



C: mediastinal LN



D: medial iliac LN

그림 3-30. 정량 PCR을 실시한 결과를 나타내는 그림으로 threshold cycle (Ct)의 차이가 나타남을 보여주는 그림.

- 각 장기별, 그리고 group별 Ct값을 비교한 결과는 다음 표 X와 같다. 즉, 양성대조군과 실험군에서 형성된 통계적으로 유의성있는 항체의 존재로 인해 PRRSV가 음성대조군에 비해 훨씬 더 많은 virus가 조직으로부터 제거되었음을 알 수 있었다.

표 3-14. 조직내 viral RNA 정량을 위해 실시된 정량 PCR의 결과로 나타난 Ct값

	Group 1	Group 2	Group 3	비고
Superficial LN	21.74 (1.83)	23.49 (1.69)	30.71 (3.26)	P<0.01
Submandibular LN	22.01(2.45)	23.04 (2.49)	22.90 (1.45)	
Mediastinal LN	22.42 (1.23)	23.84 (2.78)	25.15 (3.29)	
Medial iliac LN	21.65 (1.20)	23.02 (2.33)	24.24 (3.90)	

- 위 표 3-14의 결과를 해석하면 음성대조군에 비해 양성대조군 (group 1)과 실험군 (group 2)의 superficial LN에서 각각 $2^{8.97}$ 배 및 $2^{7.22}$ 배 더 적은 virus RNA가 검출 되었다.
- 이를 좀 더 알기 쉽게 도식화하면 다음 그림 31과 같다.

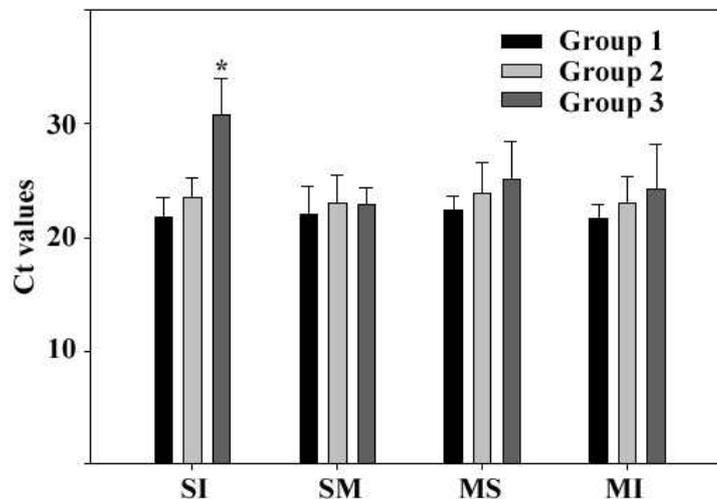


그림 3-31. Viral clearance를 알아보기 위해 실시한 정량 PCR에서의 Ct값의 분포. superficial LN에서 양성대조군과 점종군은 음성대조군에 비해 통계적으로 유의성있게 빨리 viral RNA를 제거함을 보여주는그림. SI: superficial LN, SM: submandibular LN, MS: mediastinal LN, MI: media iliac LN.

- 비록 통계적으로 유의성은 보이지 않았지만 mediastinal LN 및 media iliac LN에서도 음성대조군에 비해 Ct값이 낮음을 보여주었다.

(마) 결론

- 이중항원으로 PRRSV GP5를 발현하는 약독화된 *B. bronchiseptica*를 이용하여 비강접종을 실시할 경우, 통계적으로 유의성 있게 혈중항체가 형성되며 공격접종에 대해서도 통계적으로 유의성있게 virus를 조직으로부터 제거함을 알 수 있었고 이 생균백신이 백신으로서 의의가 충분함을 알 수 있었음.

나. PRRSV 외막단백질을 이용한 감별진단법 개발 및 백신효능검사

(연구내용: 개발된 PRRSV 진단법을 이용한 효능검사 및 개발된 재조합 단백질 항원들의 백신효능 검사)

(1) 기존의 ELISA kit (HerdChek, IDEXX)와 비교하여 진단법 비교분석

(가) 민감도, 특이도 등의 비교를 실시

- 1차년도에 합성을 한 후 면역원성 확인이 끝난 peptide 항원이 재조합 GP5단백질에 비해 그 적용가능성이 낮게 나타남으로 인해 새로운 조합을 이용하여 peptide 항원의 활용가능성을 알아보았다. 즉, GP5-VR#1에서 28개의 양성만이, 그리고 GP5-VR#2에서는 32개의 양성만이 검출되었기에 2 peptide 항원의 길이 (amino acid 개수)가 짧아서 일어나는 문제일 것으로 추정하여 2개의 peptide를 동시에 항원으로 coating하여 ELISA를 실시하였다.
- 혈청시료로는 1차년도의 260개 시료중에서 망실된 2개의 시료를 제외하여 258개의 혈청시료를 사용하였다.
- 항원은 VR#1과 VR#2를 동량 1:1로 혼합하여 ELISA well coating을 실시하였다. 그리고 재조합 GP5의 농도를 기존 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서 $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 증량하여 사용하였다. 이외 ELISA법은 1차년도와 동일하다.
- 실험결과를 정리하면 다음 표 3-15와 같다.

표 3-15. 5가지의 항원형을 이용한 PRRSV 진단 실험 결과.

Antigens	N*	VR #1**	VR #2**	VR #1+2	rGP5
Positive	209	28	32	208	253
Negative	49	230	226	50	5
True positive		23	28	181	208
False positive		5	4	27	45
False negative		186	181	28	1
True negative		44	45	22	4
Sensitivity		11.00	13.40	86.60	99.52
Specificity		89.80	91.84	44.90	8.16

* N: N protein of PRRSV, HerdChek kit, ** two-sided P value <0.001 , which is extremely significant on Fisher's exact test.

- 위의 결과를 분석하면 다음과 같다. 먼저 1차년도에 낮은 양성율과 검출율을 보였던 2개의 peptide 항원 (VR#1과 VR#2)는 각각을 항원으로 사용하였을 경우, 감염에 대한 진단에 이용이 곤란하였으나 2개의 항원을 동시에 사용할 경우, 기존의 진단 kit인 HerdChek kit 및 재조합 GP5 단백질에 준하거나 통계적으로 매우 유사한 결과를 보임으로서 이 2항원의 혼합물은 PRRSV 감염증에 대한 진단용 항원으로서 가치가 충분함을 알 수 있었다.
- 재조합 GP5 단백질은 상업적인 진단 kit에 비해 민감도가 99.52, 특이도가 8.16으로 양성 혈청을 검출함에 있어 매우 탁월한 효과를 보였다. 하지만 위양성율이 상대적으로 높게 (45 samples) 나타났다. 이는 진단 kit와 재조합 GP5 단백질 사이의 항원성의 차이로 판단된다. 즉, 진단 kit에 이용되는 항원인 ORF7 (N 단백질)은 항체의 생성이 감염초기에 GP5보다 신속하고 빠르게 일어나는 반면 그 항체가 오랫동안 유지되지 못하는 단점이 있다. 그러나 GP5는 감염초기에 신속한 항체 유도 N 단백질보다는 느리지만 항체의 존속기간이 더 오랫동안 유지되는 것으로 알려져 있다. 즉, GP5를 이용한 항체가 검사에서는 양성이지만 N 단백질을 항원으로 이용하는 kit의 경우, 모두 PRRSV에 실제 감염된 개체라 하더라도 N 단백질에 대한 항체는 시간이 지남에 따라 GP5보다 먼저 감소함으로써 인해 감염중후기에 혈청시료가 채취되는 경우, kit에서는 음성으로 나타나지만 GP5를 이용하면 감염 중후기 까지 그 진단이 가능하게 된다.
- 위 결과를 놓고 볼 때, PRRSV에 감염된 개체의 진단을 위해서는 감염초기에 주로

반응을 보이는 항-N 단백질 항체의 검출과 더불어 감염중후기까지 항체가 유지되는 GP5를 별도 내지는 동시에 항원으로 사용하여 감염여부의 확인을 하여야 할 것으로 판단된다.

(나) 북미주와 유럽주에 대한 감별 진단 가능 여부 확인

- 북미주와 유럽주의 감별을 위하여 준비된 peptide 항원을 이용하여 유럽주 특이적인 반응을 보이는 개체의 진단을 실시하였다. 즉, GP5-LV#1과 LV#2를 항원으로 이용하여 ELISA를 실시하였다. 실시된 방법은 GP5-VR#1과 VR#2에서 사용한 방법과 동일하였다.
- 그 결과는 다음 표 3-16과 같다. GP5-VR#1과 #2에서와 같이 기존의 kit에서 나타난 결과 대비, 항원의 양성율과 음성을 비교하였다.

표 3-16. 2가지의 항원형을 이용한 PRRSV 진단 실험 결과

Antigens	N*	LV #1**	LV #2**
Positive	209	2	4
Negative	49	256	252
True positive		0	0
False positive		2	4
False negative		256	252
True negative		0	0

* N: N protein of PRRSV, HerdChek kit, ** two-sided P value < 0.001, which is extremely significant on Fisher's exact test.

- 하지만 결과에서 보는 바와 같이 국내에서 채취된 시료에서는 유럽형 특이적인 2 항원에 반응을 보이는 개체가 258 시료중에 2개 또는 4개로써 그 진단의 신뢰도가 매우 낮아 확실한 유럽형에 의한 감염임을 말할 수 없었다.

(2) 재조합 단백질 각각 및 혼합물을 면역접종

(가) adjuvant screening (chitosan, 기타 비자극성 물질 탐색)

- 기초조사: chitosan을 이용한 adjuvant로서의 적응에 대한 실험을 실시하였다. 기존에 알려진 바에 의하면 chitosan 수용액은 일반적인 면역증강 효과 및 점막 자극 효과등이 있는 것으로 알려져 있었다.
- 또한 국내외의 연구를 살펴보면 수용액 상태의 chitosan액은 adjuvant로서의 효과가 약하거나 없는 것으로 알려져 있으나 입자화 (granulation)을 할 경우, 항원을 대조군에 비해 더 장기간 함유하며 천천히 항원을 방출하는 것으로 알려져 있다.
- 이에 본 실험에서는 2가지 type의 chitosan formulae를 준비하여 각각의 chitosan formulae가 가질 수 있는 adjuvant로서의 potential을 알아보았다.
- 먼저 low molecular weight chitosan (Sigma)를 준비하고 이를 2% acetic acid 용액에 녹여 0.25% chitosan solution을 만들었다.
- Chitosan 과립은 다음과 같이 준비하였다. 먼저 15% TPP (sodium triphosphate) 용액을 준비하고 삼각플라스크에 담고 magnetic stirring bar를 넣고 섞는다. 여기에 이 용액 5ml당 0.25% chitosan 용액을 25ml을 천천히 적하하여 과립화를 시킨다. 과립화가 종료된 후 PBS로 3회 원심 및 washing을 실시하고 최종 volume을 계산하여 chitosan 과립액을 준비하였다.
- 준비된 재조합 GP5 단백질을 mouse에 투여함에 있어 다음 표 3과 같이 접종을 실시하여 chitosan formulae의 adjuvant로서의 작용여부를 확인하였다.
- mouse는 6주령 ICR마우스 암컷을 사용하였고 각 group당 3마리씩 무작위 선별하여 준비된 항원 및 formulae 혼합물을 피하로 투여하였다. 이후 동일한 방법으로 (양성대조군인 Freund's adjuvant 투여군은 boosting 부터는 Freund's incomplete adjuvant) 2회씩 더 boosting을 실시하고 최종 접종 7일 후 마우스를 희생하여 채혈하고 항체가를 ELISA로 측정하였다.
- Group 1과 2는 adjuvant가 포함되지 않은 음성 대조군으로, 그리고 group 3은 상용화된 adjuvant를 사용하여 양성 대조군으로 사용하였다.

표 3-17. 마우스 접종을 위한 chitosan formulae의 종류 및 투여방법

Group	항원	formulae	boosting	마리수
1	PBS	PBS	PBS	3
2	rGP5 50ug	PBS	rGP5+ PBS	3
3	rGP5 50ug	Freund's complete	rGP5+ Freund's incomplete	3
4	rGP5 50ug	0.25% chitosan sol.	rGP5+ 0.25% chitosan sol.	3
5	rGP5 50ug	0.25% chitosan 과립	rGP5+ 0.25% chitosan 과립	3
6	rGP5 50ug	0.5% chitosan 과립	rGP5+ 0.5% chitosan 과립	3
7	rGP5 50ug	1% chitosan 과립	rGP5+ 1% chitosan 과립	3
8	rGP5 50ug	2% chitosan 과립	rGP5+ 2% chitosan 과립	3

- 최종 접종 후 7일째 준비한 혈청시료중의 항체가를 측정하기 위해 ELISA를 실시하였다. 즉, 재조합 GP5를 항원으로 이용하여 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 맞추어 96-well plates (Maxisorp™, Nunc, Denmark)에 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 의 농도로 coating하였다. 이 plate는 1% skim milk를 첨가한 PBS로 blocking 하고 PBST (PBS + 0.05% Tween-20, pH 7.4)로 washing하였다. 각 group의 mouse 혈청은 1:100으로 희석하여 사용하여 1차 항체로 사용하였다. 항체액은 PBST로 희석하였고 총 90 μl 를 첨가하여 사용하여 37°C에서 1시간 반응 후 3회 PBST로 washing 하고 다시 1:500으로 희석된 goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated (Serotec, UK)를 2차 항체로 사용하여 반응시켰다. 역시 2차 항체도 37°C에서 1시간 반응 후 3회 PBST로 washing 하였다.
- 결합된 2차항체의 검출은 기질용액 [100 mM citric acid buffer, pH 4.0, 10 ml ABTS stock solution (ABTS 100 mg in 4.5 ml DW) 250 μl H₂O₂ 50 μl]을 이용하여 발색을 실시하였다. 기질용액과의 반응은 암실에서 10분간 실시하였고 흡광도 405 nm에서 ELISA reader (Multiskan EX, Thermo LabSystems, Beverly, MA)를 이용하여 OD값을 측정하였다. 측정된 OD값은 평균값 \pm 표준편차 (SD)로 표기하였고 값들은 Student's *t*-test를 통해 통계적 유의성 검사를 실시하였고 *P* 값이 < 0.01 이면 “통계적으로 유의성 있다”고 평가하였다.
- ELISA 결과는 다음 표 3-18과 같다.

표 3-18. 상이한 chitosan formulae에 의한 항체가 생성도 조사 결과

Group	항원	항체가 (SD)	통계적 의의 (P)
1	PBS	0.29 (0.21)	의의 없음
2	rGP5 50ug	0.32 (0.16)	의의 없음
3	rGP5 50ug	1.83 (0.65)	의의 없음
4	rGP5 50ug	0.05 (0.00)	의의 없음
5	rGP5 50ug	0.04 (0.00)	의의 없음
6	rGP5 50ug	0.72 (0.45)	의의 없음
7	rGP5 50ug	1.08 (0.61)	의의 있음
8	rGP5 50ug	1.16 (0.39)	의의 있음

(나) 마우스에서 단백질에 대한 항체 생성 여부 확인 (Western blot 및 ELISA)

- 재조합 항원 및 peptide 항원이 실험동물에서 항체를 생성하는지 알아보기 위해 실험을 실시하였다. 즉, 재조합 GP5 단백질과 GP6 단백질, 그리고 peptide 항원들을 이용하여 실험동물 접종을 실시하고 이에 따른 항체가 생성여부를 확인함으로써 각각의 항원이 항원성 및 면역원성을 가지는지 확인하였다.
- 이를 위하여 준비된 각각의 항원 (rGP5, rGP6, VR#1, VR#2, LV#1, 그리고 LV#2)에 Freund's adjuvant를 혼합하여 백신 formulae를 만들고 접종을 실시하였다.
- 이 중 peptide 항원인 VR#1, VR#2, LV#1, 그리고 LV#2의 항원성 실험 결과는 1차년도 보고서에 기재된 바, 2차년도 보고서에서는 생략하기로 한다.
- 항원의 농도는 마우스 마리당 50ug으로 동일하게 설정하였다. 접종 방법은 초회 Freund's complete adjuvant로, 그리고 boosting 2회의 경우는 Freund's incomplete adjuvant로 실시하였다.
- 최종 접종 후 7일째 마우스를 희생하고 채혈하여 혈청을 1:100으로 희석하여 1차 항체를 준비하고 2차 항체는 goat anti-mouse IgG-HRP를 1:5,000으로 사용하였다.

- ELISA에 사용된 방법은 상기 기술한 방법과 동일하다. 음성대조군은 PBS만을 주사한 개체들을 이용하였다.
- 그 결과는 다음 표 3-19와 같다. 즉, 모든 항원이 마우스에서 강한 면역원성 및 항원성을 나타내었다.

표 3-19. 재조합 항원을 이용한 실험동물 (마우스)에서의 항원성 검사 결과

Antigens	OD값 (SD)	음성값 (SD)	음성대비 P값
rGP5	2.871 (0.04)	0.6 (0.01)	P < 0.01
rGP6	2.14 (0.01)	0.6 (0.06)	P < 0.01

(다) 어린 돼지에서 단백질에 대한 항체 생성 여부 확인 (Western blot 및 ELISA)

- 실험동물에서 항원성이 확인된 재조합 항원이 목적동물인 돼지에서도 통계적으로 유의성 있는 항체가 형성하는지 알아보기 위해 실험을 실시하였다. 즉, 동일한 방법으로 준비된 항원을 돼지 마리당 200ug씩, 동일한 adjuvant인 Freund's complete 및 incomplete adjuvant를 사용하여 항체를 확인하였다. 마찬가지로 최종 접종 후 7일째 혈액을 채취하여 혈청을 준비한 다음 1:100으로 희석한 것을 1차 항체로 그리고 goat-anti pig IgG-HRP를 1:5,000으로 희석하여 2차 항체로 사용하였다.
- 그 결과는 다음 표 6와 같다. 즉, 모든 항원이 마우스에서 강한 면역원성 및 항원성을 나타내었다.

표 3-20. 재조합 항원을 이용한 목적동물 (돼지)에서의 항원성 검사 결과

Antigens	OD값 (SD)	음성값 (SD)	음성대비 P값
rGP5	1.6 (0.3)	0.5 (0.1)	P < 0.01
rGP6	1.2 (0.2)		P < 0.05

- 실험 결과, 실험동물에서와 마찬가지로 2 항원 모두 통계적으로 유의성 있게 높은 항체가를 유도함을 보여주어 2 항원 모두가 재조합 백신의 대상으로 유용함을 보여 주었다. 비록 rGP5에 대한 항체가가 rGP6에 대한 항체가보다 높으나 rGP5와 rGP6 사이에는 통계적으로 유의성있는 차이가 나타나지 않았다.

다. 이중항원발현 생균백신 시스템 개발

(연구내용: 약독화된 *B. bronchiseptica*에서 PRRSV 항원단백질을 발현하는 생균백신 개발)

(1) Cloning strategy

- PRRSV의 GP5 단백질을 발현하는 *B. bronchiseptica* aroA gene 결손 변이주 개발의 개괄적인 모식은 다음 그림 3-32와 같다. 즉, *B. bronchiseptica*의 aroA 유전자와 사이에 cloning 된 insert (Kan^R 및 PRRSV GP5 유전자)를 삽입하여 aroA 유전자를 knock-out 시키면서 동시에 이중항원을 발현하는 균주를 개발하였다. 항생제를 위한 선별 유전자로 kanamycin 저항유전자인 Kan^R을 이용하였다.
- Cloning을 위한 pGEM[®]-T Easy vector는 Promega에서, 그리고 Kan^R을 cloning 하기 위한 template는 pKD13을 이용하였다.
- Homologous recombination을 위한 Red recombinase는 pKD46 vector를 이용하였고 recombinase의 induction은 arabinose를 이용하였다.

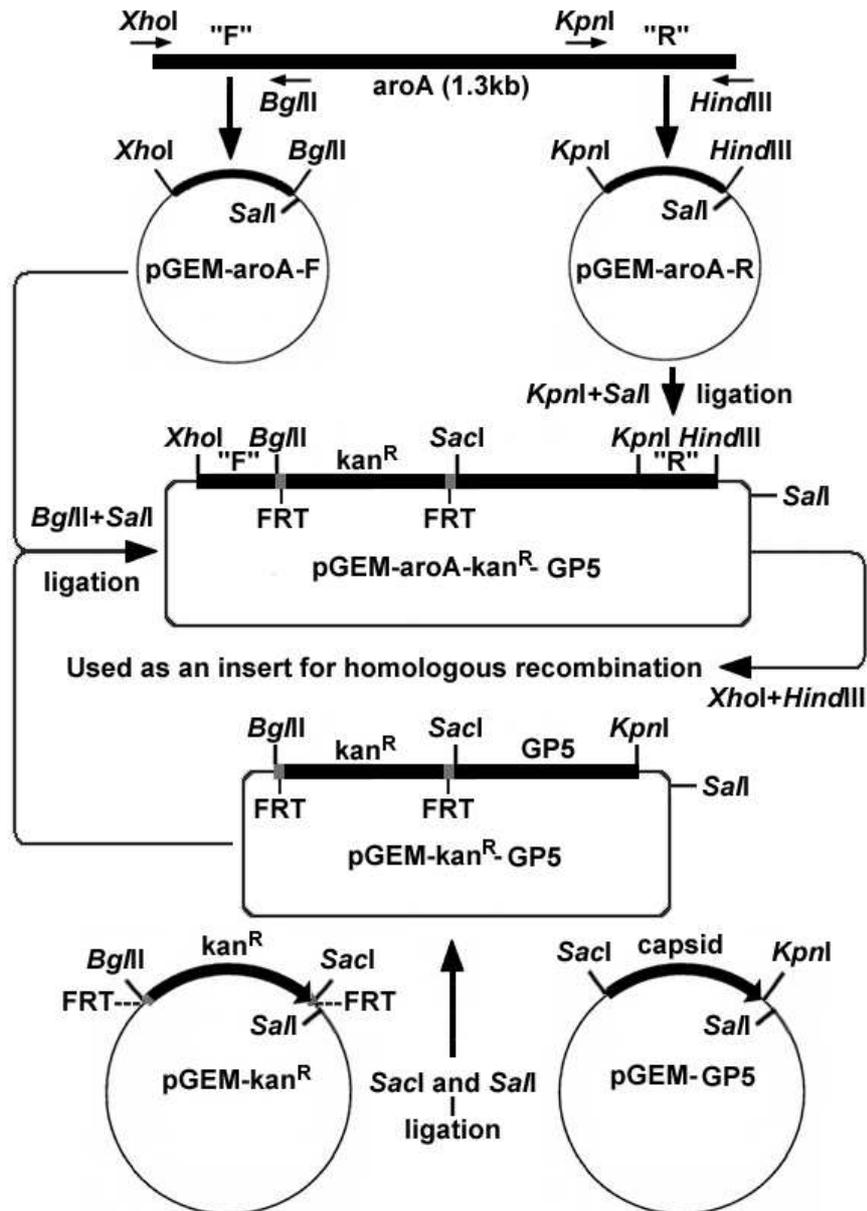


그림 3-32. PRRSV의 GP5 단백질을 발현하는 *B. bronchiseptica* *aroA* gene 결손 변이주 개발의 개괄적인 모식도.

- 과정을 살펴보면 다음과 같다. 먼저 *B. bronchiseptica*의 *aroA* 유전자와 N-말단과 C-말단을 각각 300bp 정도씩 cloning을 실시하였다. 그리고 pKD13을 template로 하여 Kan^R 유전자를 cloning하고 IngelVac (Boehringer Ingelheim)의 IngelVacso의 PRRSV에서 total RNA를 추출하고 cDNA 합성 후 GP5 유전자를 cloning 하였다.
- 제한효소법을 이용하여 그림 1에서와 같이 각각 4개의 PCR 산물을 pGEM-T Easy

vector에 cloning한 다음 제한효소를 이용하여 결합시켰다.

- 최종 결합된 pGEM-Kan-GP5를 2개의 제한효소인 BglII와 KpnI으로 처리하여 homologous recombination용 insert를 준비하였다.

(2) homologous recombination

- 준비된 insert (aroA-F + Kan^R + PRRSV GP5 + aroA-R)를 *B. bronchiseptica*에 형질 전환시키기 위하여 electro-competent cell을 준비하였다.
- 즉, 18시간 동안 BHI 500ml에서 배양한 *B. bronchiseptica* 배양액을 8,000rpm으로 10분간 원심분리 후 펠렛을 4°C의 10% glycerol 용액 50ml로 재부유, 다시 원심분리 후 펠렛을 4°C의 10% glycerol 용액 5ml로 재부유하였다.
- 이것을 100ul씩 분주하여 competent cell로 준비하였다.
- 상기 균체에서 λ Red recombinase를 발현하기 위해 pKD46 플라스미드를 Gene Pulser Xcell™ electroporation system (Bio-Rad, Hercules, CA)을 이용하여 형질전환 후, ampicillin과 L-arabinose (최종 농도 10 mM)가 첨가된 250ml SOB 배지에서 선택 후, 30°C에서 OD값이 0.5가 될 때까지 배양하였다. 그 후, 다시 2.5ml의 냉각된 10% glycerol 용액으로 농축하여 먼저 제조된 상동 재조합용 선형 DNA를 형질전환하기 위한 electro-competent cell을 제조하였다.
- 40 μ l의 electro-competent cell에 1 μ l (100ng)의 insert DNA를 electroporation법으로 형질전환하고, 50 μ g/ml kanamycin이 첨가된 LB 배지에서 선택하여 aroA가 제거된 균을 선택하였다.
- 이 변이주는 대사에 관련된 aroA 유전자가 없기 때문에 일반배지에서는 증균하지 못한다. 따라서 aromix [tryptophan (4mg/ml), phenylalanine (4mg/ml), dihydroxybenzoic acid (1mg/ml), para-aminobenzoic acid (1mg/ml)]가 첨가된 BHI 배지에서 증균시켰다.

(3) 변이주 chromosomal DNA의 유전학적 확인

- *B. bronchiseptica*의 chromosomal DNA가 변해 있는지를 확인하기 위해 확인 PCR 및 sequencing을 실시하였다. 즉, 원래의 *B. bronchiseptica*의 유전작인 구조에는 나타나지 않을 삽입된 insert들 (Kan^R 및 GP5)가 존재하는지를 PCR로 확인하였다. 확인을 위한 모식도는 다음 그림 3-33과 같다.



그림 3-33. 변이주의 유전적인 구조의 규명을 위한 PCR의 모식도. 기대되는 PCR 산물의 크기는 우측에 명기되었음.

- 그 결과, 변이주 *B. bronchiseptica*의 DNA를 template로 하여 실시된 검증 PCR의 결과, 기대되는 3개의 PCR band가 아래 그림 3-34과 같이 관찰되었다.

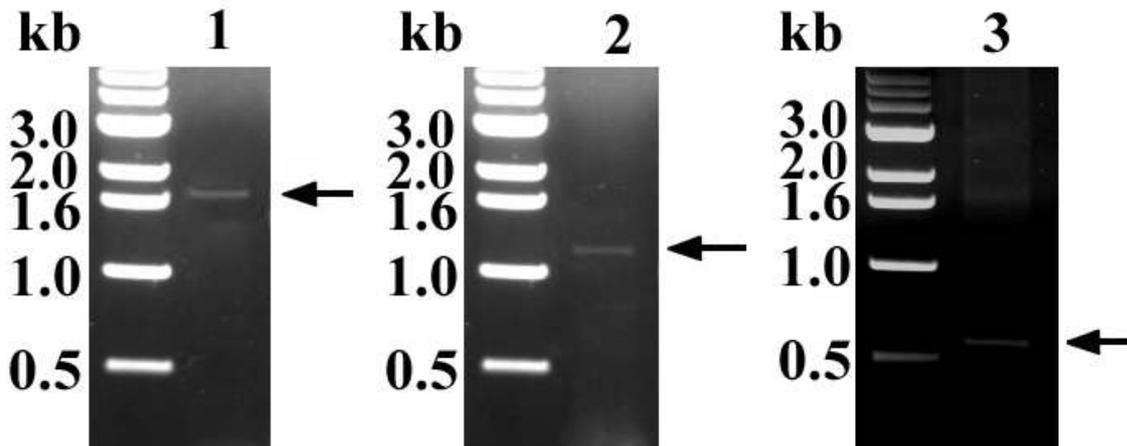


그림 3-34. 검증 PCR의 결과, 기대되었던 3개의 PCR 산물이 관찰되었음을 보여주는 그림.

- 이들의 sequence를 확인하여 원하는 유전자가 정위치에 삽입되었는지 확인한 결과 (data not shown), 모두 예상되는 유전자와 및 순서에 의해 삽입되었음을 확인하였다.

(4) 변이주에서 이중항원인 PRRSV GP5 단백질의 발현 확인

- 선택된 변이주에서 PRRSV GP5 단백질이 발현되는지 알아보기 위하여 Western blot을 실시하였다.
- 즉, 균주배양액 5ml을 원심분리하여 pellet을 준비하고 2X sample buffer를 첨가하여

denaturing 후 10% SDS-PAGE에서 전기영동을 실시하고 PVDF membrane으로 단백질을 transfer 후 1협동과제에서 생산한 rGP에 대한 항체를 1차항체로, goat anti-mouse IgG HRP-conjugated (Pierce, USA)를 2차항체로 사용하여 PRRSV GP5 단백질의 발현을 알아보았고 그 결과, 원하는 크기 (약 23 kDa)의 단백질에 대한 band가 형성되어 단백질의 발현 여부를 확인하였다(그림 3-35).

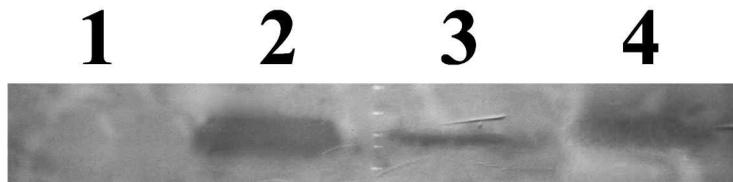


그림 3-35. 변이주에서 이중항원인 PRRSV GP5의 발현여부 확인. 각 균주의 lasate를 항-PRRSV GP5 항체를 이용하여 반응시켰음. Lane 1: 형질전환 이전의 *B. bronchiseptica aroA(-)*, lane2:GP5-expressing *E.coli* (1협동과제 제공), lane3: BBS-GP5, lane4: recombinant GP5 (1협동과제 제공).

- 그 결과, 야외형 *B. bronchiseptica*에서는 보이지 않는 band가 (lane 1) 변이주에서는 관찰되었다 (lane 3). 여기서 GP5를 발현하는 대장균 (lane 2)과 순수분리된 rGP (lane 4)는 양성 대조군으로 사용되었다.

3. 3차년도

가. 이중항원발현 생균백신 및 감별진단법의 산업화

(연구내용 : 백신그룹과 비백신 그룹의 차이 조사 및 경제성 분석)

(1) 백신그룹과 비백신 그룹 사이의 발병율, 병원체 분리율, 항체가등의 조사

(가) BBS PRRS GP5 vaccine제조

BHI broth(Difco)에서 BBS PRRS GP5를 배양한 후 5000prm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 버리고 pellet를 PBS에 suspension 시키고 다시 5000rpm에서 원심분리 후 pellet을 10^{10} cfu/ml이 되게 백신을 제조 하였다.

광주 하남공단 소재 천하중공업에 의뢰하여 온도조절장치, 환기조절장치, 습도조절장치, 조도조절장치가 장착된 인큐베이터를 제작하였다. 포유자돈의 증체율을 높이고 사고율을 줄이기위해 포유유도장치와 자돈유인장치를 부착하였다. 백신 실험을 위하여 백신접종 group과 비백신 접종 group을 나누기 위하여 각각의 인큐베이터를 제작하였다.

인큐베이터의 최적 환경조건은 다음과 같이 하였다. 두 인큐베이터의 조건은 동일하였다.

표3-21. 인큐베이터 시스템 환경조건

Age	Temperature (°C)	Ventilation rate($m^3/min/head$)		Relative humidity (%)	Illumination (lx)
		winter	summer		
Parturition~1hour	35	0.235	1.01	60~80	100~600
~1 day	33				
~2day	31				
~1 week	30				
~2 weeks	27				
~3 weeks~15 weeks	24				



화순지역의 돼지 1000두를 사육하고있는 K 농장에서 IDEXX사의 ELISA Kit를 사용하여 PRRS음성인 생후 3주령인 자돈10두씩 각각 대조군와 시험군으로 하였다. 채혈은 각군당 표식을 하여 실시하였다. 제조된 BBS PRRS GP5 vaccine을 시험군의 돼지 10마리의 코에 분무 접종하였다. 백신 비접종 group은 백신 접종 group과 동일량의 PBS를 분무하였다.

백신 접종 후부터 시작하여 2주마다 채혈을 실시한 뒤 혈청을 분리한 후 PRRS에 대한 항체를 IDEXX사의 ELISA Kit를 사용하여 측정하였으며 방법은 제조사의 권장 사용방법에 따라 실시하였다.

표 3-22. Experimental condition

Group	Experimental condition	Total Pigs
백신 접종 group	BBS PRRS GP5 비강분무	10
백신 비접종 group	PBS 비강분무	10

표 3-23. 인큐베이터 조건에서 발병율, 병원체 분리율

Test group	Test item	days postinoculation									
		0	3	5	7	9	11	15	21	28-98†	105
백신접종group	발병율	0	0	0	0	0	1	4	4	4	4
	병원체 분리율	0	0	0	0	0	1	4	4	4	4
백신 비접종group	발병율	0	0	0	0	0	1	4	4	4	4
	병원체분리율	0	0	0	0	0	1	4	4	4	4

* Number of pigs positive by each test

† † Identical response from samples collected at 7-days intervals from 28 to 98 days PI.

3-24. Results of antibody to the BBS PRRS GP5 in incubator breeding pigs

Test group	Period(weeks)	No. of samples	Percent of antibody positive	Positive / tested(%)	Remarks S/P ratio 1.0>
백신접종group	0	10	65	10/10	9
	4	10		4/10	3
	8	10		10/10	7
	12	10		10/10	10
백신 비접종 group	0	10	65	9/10	3
	4	10		5/10	5
	8	10		6/10	3
	12	10		9/10	3

(2) 돼지에 *P. molitocida* wild-type을 공격 접종하여 백신 효능 및 경제성 분석

(가) 백신효능분석

● *Bordetella bronchiseptica* Wild type

표준균주로 *Bordetella bronchiseptica* KCCM 21998을 wild type으로 하여 백신 효능 및 경제성 분석을 행하였다. *Bordetella bronchiseptica* KCCM 21998을 Nutrient broth, 37℃에

서 배양하여 5000rpm에서 원심분리 한 후 상등액을 버리고 PBS로 suspension한 후 다시 5000rpm에서 원심분리 후 상등액을 버리고 PBS에 1×10^{10} cfu/ml suspension시켜 제조 하였다.

다른 형태의 wild type으로는 화순의 K농장에서 BHI broth가 충분히 침적된 면봉으로 비경부를 알콜로 충분히 소독한 후 면봉을 제 1견치 부근의 비갑개골 부위까지 조심스럽게 넣어서 시료를 분리한 후 *B. bronchiseptica* 를 분리 하였다.

일차적으로 MocConkey agar에 dextrose(1g/100ml), furazolidone(25ug/ml), fungizone(5ug/ml)을 각각 무균적으로 혼합한 modified Farrington-Switzer medium(Farrington과 Switzer,1977)을 분리배지로 사용하였다. nasal swab재료를 획선도말한 분리배지를 37℃에서 48시간 배양한 후 집락형태, Gram 염색성 및 균형태를 확인하였다. 집락의 형태 및 용혈성은 혈액한천과 MacConkey agar에 3일간 배양하면서 관찰하였으며 potassium tellurite또는 NaCl tolerance는 각각 2% K_2TeO_3 가 함유된 혈액한천과 NaCl이 6%, 7.5%, 9%첨가된 nutrient broth에서의 발육여부를 7일간 관찰하였다. 이렇게 하여 얻은 *B. bronchiseptica* 를 *B. bronchiseptica* BR-BBS로 명명하였다.

● 공격접종

IDEXX사의 ELISA Kit를 사용하여 PRRS음성인 생후 3주령인 자돈10두를 시험군으로 하여 위의 인큐베이터 조건하에서 실시하였다. 제조된 BBS PRRS GP5 vaccine을 시험군의 돼지 10마리의 코에 분무 접종한 7일 후 *B. bronchiseptica* wild-type KCCM 21998과 *B. bronchiseptica* BR-BBS을 공격접종하였다.

공격접종 후부터 매일 BHI broth가 충분히 침적된 면봉으로 비경부를 알콜로 충분히 소독한 후 면봉을 제 1견치 부근의 비갑개골 부위까지 조심스럽게 넣어서 시료를 분리한 후 *B. bronchiseptica* 를 분리 동정 하였다.

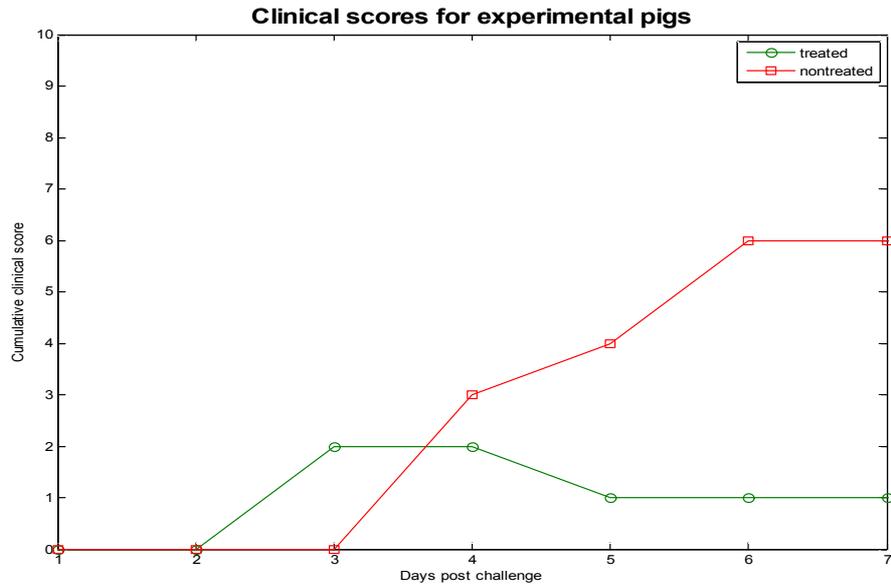


그림 3-36. *Bordetella bronchiseptica* KCCM 21998 공격접종하여 BBS symptom을 나타내는 돼지 마리수($p < 0.001$, using two tailed Fisher's exact test).

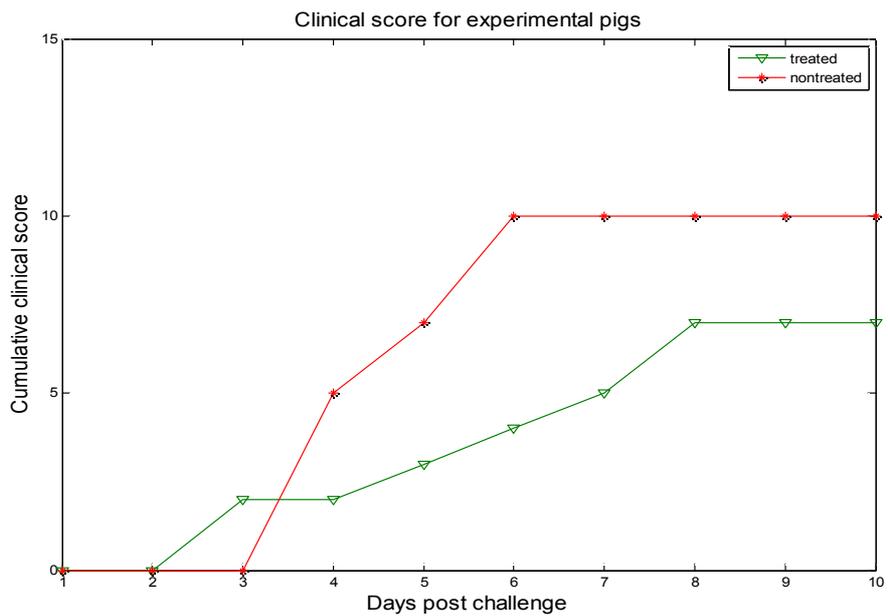


그림 3-37. *Bordetella bronchiseptica* BR-BBS 공격접종하여 BBS symptom을 나타내는 돼지 마리수 ($p < 0.001$, using two tailed Fisher's exact test).

(나) 경제성분석

① 재료및 방법

경제성 분석을 위해 먼저 PRRS negative이고 BBS negative인 생후 3주령인 이유자돈10 두씩을 시험군과 대조군으로 하여 위의 인큐베이터 조건하에서 실시하였다. 2주령의 이유자돈을 대조구(n=10)와 시험구(n=10)로 구별하여 각각의 무게를 측정하여 귀에 표식을 하였다. 3주령과 6주령째의 시험구 5마리씩에 BBS-GP5를 분무 접종하였다. 10주째와 19주째 무게를 측정하였다.

통계처리는 분산분석과 proportions test를 행하였다. 백신 group과 비백신 group간의 몸무게 차이가 큰값을 경제적 이익을 산출하는데 이용하였다. 백신group과 비백신 group간에 동등하게 적용된 가정들은 다음과 같았다. 사료전환율 2.5, 사료비용 214.192원/kg, 생체무게 당 1338.7원/kg, 도태 생체무게 584.16원/kg로 하였다. 3주째와 6주째의vaccination결과는 다르지 않았기 때문에 각각의 값들을 평균하여 경제성 분석에 사용하였다. 경제성 분석 결과를 표 3-25와 같이 나타냈다.

② 결과

표 3-25. BBS-GP5 vaccination에 의한 경제성 분석

	3주령 vaccination	6주령 vaccination	비백신group	p-value
도태율(%) ⁺	1.68	0.86	6.31	<0.001
폐사율(%)	4.29	4.66	9.51	<0.01
ADG(kg/day)	0.84	0.84	0.79	<0.0001
BBS-GP5 vaccination에 의한 경제적 이익	11,987원		NA	NA

+ 최종 무게 측정시 몸무게 82kg이하인 개체

경제적 분석결과 BBS-GP5 vaccination에 의해 백신group과 비백신 group간의 차이가 매우 유의미하게 나타났다. 백신 group은 낮은 폐사율과 도태율을 보였고 성장속도도 높게 나타났다. BBS-GP5 vaccination에 의한 경제적 이익은 돼지 두당 약 11,987원으로 산출 되었다.

(3) 농장에서의 백신 방어 효능 검사

(가) 자돈 준비

- 화순 소재 Y, L, P 농장에서부터 3주령 이유자돈 90마리를 구입하여 실험함.
- 사료와 음수는 자유로이 공급함
- 모돈으로부터 이행되는 모체이행항체 및 이유기 이전에 감염으로 인해 자돈이 보유하고 있을 수 있는 anti-PRRSV 항체의 존재를 알아보기 위해 자돈의 혈청중의 항체가 측정.
- 이를 위해 자돈 혈청을 준비하고 PRRSV 진단 키트 (IDEXX, HerdChek)를 이용하여 항체가 진단을 실시하였고 그 결과는 아래 표 3-26과 같음.

표 3-26. 자돈의 보유 항체가 측정을 위한 실험 결과

Group	평균 S/P ratio 값 (±SD)	판정
1(n=30)	0.11 (0.04)(n=12)	음성
	2.56 (0.05)(n=18)	양성
2(n=30)	0.07 (0.008)(n=10)	음성
	3.24 (0.02)(n=20)	양성
3(n=30)	0.04 (0.002)(n=9)	음성
	3.66 (0.05)(n=21)	양성

- 실험결과, Group 1에서는 자돈60%, Group 2에서는 자돈66%, Group3에서는 자돈 70%가 양성으로 판정되어서 음성으로 판정된 자돈을 대상으로 실험을 진행함.

(나) 자돈 면역

- 생균백신의 효능을 알아보기 위한 접종은 다음 표 3-27과 같이 실시.
- Adjuvant로는 Quilaza saponin을 사용하였음.

표 3-27. 생균백신 효능검정을 위한 백신 프로그램

일시	Group 1	Group 2	Group 3
Day 0	rGP5 200ug in PBS + Quilaza saponin, SC*	rGP5 200ug in PBS + Quilaza saponin, SC	rGP5 200ug in PBS + Quilaza saponin, SC
Day 14	rGP5 200ug in PBS + Quilaza saponin, SC	1×10 ⁸ BBS-PRRSV GP5**/kg, Quilaza saponin, nasal	1×10 ⁸ BBS-aroA*** /kg, Quilaza saponin, nasal
Day 21	모든 자돈에서 채혈 및 항체가 측정		
Day 28	rGP5 200ug in PBS + Quilaza saponin, SC	1×10 ⁸ BBS-PRRSV GP5/kg, Quilaza saponin, nasal	1×10 ⁸ BBS-aroA/kg, Quilaza saponin, nasal
Day 35	모든 자돈에서 채혈 및 항체가 측정		
Day 42	PRRSV challenge		
Day 47	채혈 및 부검 실시		

*SC: 피하접종, **PRRSV GP5 발현-약독화 *B. bronchiseptica*, *** 약독화 *B. bronchiseptica*

- Group 1은 재조합 단백질을 이용한 양성 항체가 생성군으로써 실험의 양성 대조군으로 사용되었다.
- Group 2는 실험군으로써 BBS-PRRSV 생균백신을 접종하였다.
- Group 3은 약독화 *B. bronchiseptica*만을 사용한 음성대조군으로써 *B. bronchiseptica* 군주 자체가 가지는 영향을 평가하기 위해 사용되었다.
- Day 21과 day 35에는 채혈을 통해 혈중 항체가 상승하는지를 monitoring하였다.
- Day 42에는 Boehringer Ingelheim사의 PRRSV 생독 (IngelVac)을 주사하여 감염을 유도하였으며 day 49일째 모든 돼지를 희생하고 면역장기인 림프절을 채취하여 PRRSV의 존재 여부 및 viral clearance를 비교하였다.

(다) ELISA 항체가 측정

- Day 21째 31두 돼지로부터 채혈을 실시하고 혈중 anti-PRRSV GP5 항체를 측정하였다. 이를 위해 재조합 GP5를 항원으로 이용하여 1 µg/ml로 맞추어 96-well plates (Maxisorp™, Nunc, Denmark)에 100 µl/well의 농도로 coating하였다. 이 plate는 1%

skim milk를 첨가한 PBS로 blocking 하고 PBST (PBS + 0.05% Tween-20, pH 7.4)로 washing하였다. 각 group의 mouse 혈청은 1:100으로 희석하여 사용하여 1차 항체로 사용하였다. 항체액은 PBST로 희석하였고 총 90 μ l를 첨가하여 사용하여 37°C에서 1시간 반응 후 3회 PBST로 washing 하고 다시 1:500으로 희석된 goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated (Serotec, UK)를 2차 항체로 사용하여 반응시켰다. 역시 2차 항체도 37°C에서 1시간 반응 후 3회 PBST로 washing 하였다.

- 결합된 2차항체의 검출은 기질용액 [100 mM citric acid buffer, pH 4.0, 10 ml ABTS stock solution (ABTS 100 mg in 4.5 ml DW) 250 μ l H₂O₂ 50 μ l]을 이용하여 발색을 실시하였다. 기질용액과의 반응은 암실에서 10분간 실시하였고 흡광도 405 nm에서 ELISA reader (Multiskan EX, Thermo LabSystems, Beverly, MA)를 이용하여 O.D값을 측정하였다. 측정된 OD값은 평균값 \pm 표준편차 (SD)로 표기하였고 값들은 Student's *t*-test를 통해 통계적 유의성 검사를 실시하였다.
- 그 결과는 다음 표 3-28과 같았다. 즉, 1회 boosting 후 어느 group에서도 통계적으로 유의성이 있게 항체가가 높지 않았다.

표 3-28. 1차 boosting 후 돼지 혈중 항체가 측정 결과

Group	평균 OD 값 (\pm SD)	통계적 의의
1	0.23 (0.07)	없음
2	0.27 (0.12)	없음
3	0.46 (0.53)	없음

- 같은 방법으로 day 35째 채혈을 실시하고 항체가를 측정하였고 그 결과는 표 3-29과 같았다.

표 3-29. 최종접종 후 돼지 혈중 항체가 측정 결과

Group	평균 OD 값 (\pm SD)	통계적 의의
1	0.42 (0.62)	없음
2	0.37 (0.37)	없음
3	0.67 (0.13)	없음

35일째 채혈을 실시하고 항체가를 측정하였으나 1차 boosting 후 돼지 혈중 항체가 측정결과와 거의 동일하게 항체가가 높지 않았다.

(라) 발병율, 병원체 분리율

- 백신 group과 비백신 group간의 발병율과 병원체 분리율을 조사하였다. BHI broth가 충분히 침적된 면봉으로 비경부를 알콜로 충분히 소독한 후 면봉을 제 1견치 부근의 비갑개끝 부위까지 조심스럽게 넣어서 시료를 분리한 후 *B. bronchiseptica* 를 분리 하였다. 일차적으로 MocConkey agar에 dextrose(1g/100ml), furazolidone(25ug/ml), fungizone (5ug/ml)을 각각 무균적으로 혼합한 modified Farrington-Switzer medium(Farrington과 Switzer,1977)을 분리배지로 사용하였다. nasal swab재료를 획선도말한 분리배지를 37℃에서 48시간 배양한 후 집락형태, Gram 염색성 및 균형태를 확인하였다. 집락의 형태 및 용혈성은 혈액한천과 MacConkey agar에 3일간 배양하면서 관찰하였으며 potassium tellurite또는 NaCl tolerance는 각각 2% K₂TeO₃가 함유된 혈액한천과 NaCl이 6%, 7.5%, 9%첨가된 nutrient broth에서의 발육여부를 7일간 관찰하였다.
- 농장에서의 발병율, 병원체 분리율을 검사한 결과 표 3-30과 같았다. 농장에서의 실험에 대한 기피로 인하여 많은 수의 실증실험을 하지는 못하였다.

표 3-30. 농장에서의 발병율, 병원체 분리율

Test group	Test item	Days post-inoculation									
		0	3	5	7	9	11	15	21	28-98†	105
1(n=12)	발병	0	0	0	0	0	0	2	1	5	1
	병원체 분리	0	0	0	0	0	0	2	1	5	1
	폐사	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1
2(n=10)	발병	0	0	0	0	0	0	1	3	3	1
	병원체 분리	0	0	0	0	0	0	1	3	3	1
	폐사	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
3(n=9)	발병	0	0	0	0	0	0	4	1	2	1
	병원체 분리	0	0	0	0	0	0	4	1	2	1
	폐사	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1

* Number of pigs positive by each test

† † Identical response from samples collected at 7-days intervals from 28 to 98 days PI.

- 농장에서의 BBS-GP5의 시험 결과 Group1에서는 25% Group 2에서는 20%, Group3에서는 11%가 면역력이 발생한 것으로 판단되었다. 폐사율은 Group1에서는 33% Group 2에서는 30%, Group3에서는 33%였다. 위의 결과로 볼 때 BBS-GP5에 의한 vaccination이 농장 현장에서의 효과는 없는 것으로 판단되었다.

나. PRRSV의 외막단백질을 이용한 감별진단법 개발 및 백신효능검사

(연구내용: 약독화된 *B. bronchiseptica*에서 PRRS 항원단백질을 발현하는 생균백신의 독성검사 및 인증과정 실험)

(1) 기준 시험법에 의한 이화학적 분석 (함량실험)

(가) 재료 및 방법

1) 방법 : ELISA 실시 후 OD값을 비교하는 방법을 이용하여 균체내의 이중항원 농도 (PRRSV GP5)를 간접측정하였음. 즉,

- ① BBS-GP5 균주 stock 400ul를 50ml BHI +kanamycin 100ul 에 inoculation후 37°C O/N 실시함
- ② 배양한 culture의 OD₆₀₀ 0.5이상을 확인 후 원심분리를 실시하고 얻어진 pellet을 lysis하여 cell lysate를 조제함
- ③ lysate를 8000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만 따로 모은 다음 이를 실험전까지 4°C에 보관하여 사용함
- ④ 이 상층액 내의 이중항원 (PRRSV GP5)의 농도를 측정하기 위해 ELISA를 실시함

- 먼저 BCA method을 이용하여 재조합 rGP5 및 lysate의 단백질 농도를 측정함
- 그 결과, rGP5는 0.958ug/ul, cell lysate는 3.6ug/ul로 확인됨.
- 항원 coating을 위해 아래 그림 3-38과 같이 micro-well plate를 design하고 다음과 같은 농도로 coating을 실시함
- 음성대조군은 1차항체가 PBS로 대체된 것이며 양성대조군은 rGP5에 대한 mouse 항체를 사용함
- 2차항체는 goat anti-mouse IgG HRP를 이용함
- 발색을 위해서 DAB substrate 및 DAB solution (Serotec, UK)을 이용함
- 흡광도는 405nm에서 발색 5분에 측정하였고 발색은 stop solution (Serotec)을 이용하여 정지시킴

1	0.1	0.01	0.001	1	10	100
1	0.1	0.01	0.001	1	10	100
1	0.1	0.01	0.001	1	10	100
↑ rGP5 Ag coating				↑ lysate Ag coating		

(-)*	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
(+)**	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

그림 3-38. micro-well plate의 design 및 coating된 항원의 농도. 항원별로 (rGP5 및 lysate) 세로축의 항원농도는 동일. * negative control,** positive control.

2) 결과

ELISA를 실시하고 흡광도를 측정한 결과, 생균내의 항원농도는 아래 표 3-39와 같이 얻을 수 있었음

표 3-39. 흡광도를 이용한 lysate내의 이중항원농도 간접측정 결과

	1	2	3	4	5	6	7
시료 1	2.227	1.740	0.503	0.636	0.810	1.315	1.097
시료 2	1.860	1.619	0.492	0.516	0.878	1.019	1.134
시료 3	1.769	1.265	0.547	0.494	0.945	1.152	1.208
mean	1.952	1.541	0.514	0.548	0.877	1.162	1.146
SD	0.242	0.246	0.029	0.076	0.067	0.148	0.056
(-)	0.367	0.137	0.101	0.103	0.128	0.108	0.106
(+)	1.585	1.519	0.415	0.357	0.671	0.957	0.933

위 결과를 도식화하여 아래 그림 3-39과 같은 결과를 얻음

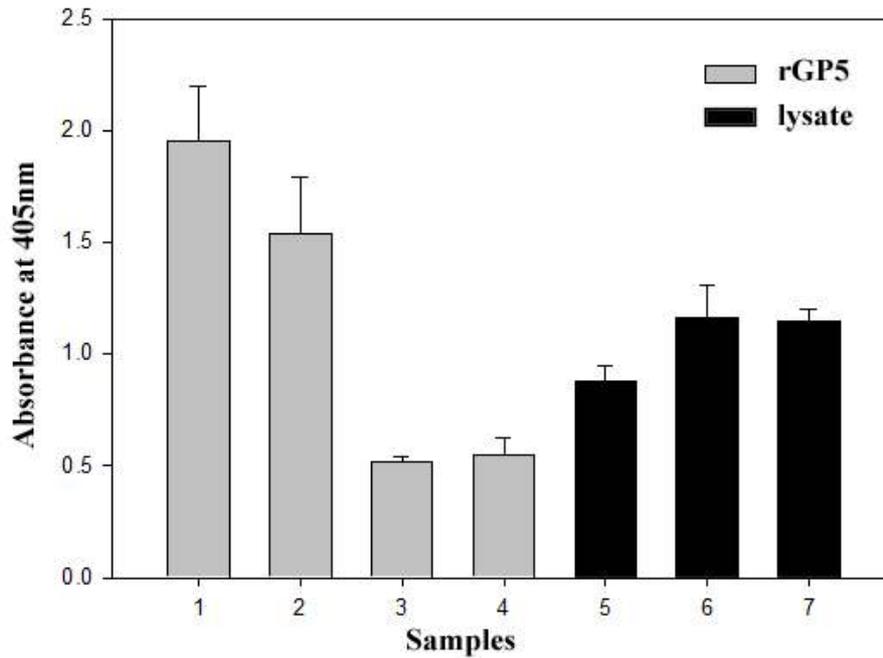


그림 3-39. 흡광도를 이용한 lysate내의 이중항원농도 간접측정 결과의 도식화. 1-4: rGP5 1 - 0.001ug/ul, 5-7: lysate 1 - 100ug/ul.

이 결과를 토대로 단백질 상태농도를 구하여 본 결과, 농도별 대조군의 농도곡선은 아래 그림 3-40과 같이 분포하였음.

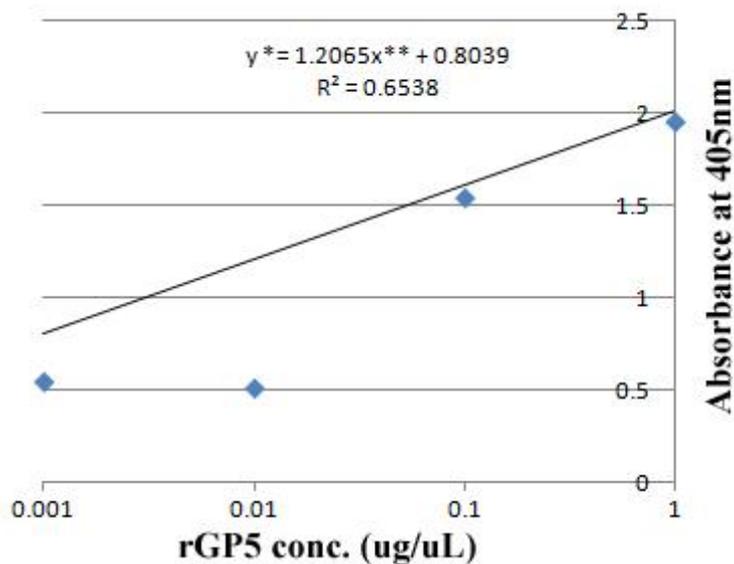


그림 40. 재조합 단백질의 농도를 기준으로 환산한 농도곡선. *Y: 측정된 시료의 OD값 항목, **X: 계산될 시료의 단백질 농도.

이 농도기준표를 이용하여 시료내 상대농도를 측정 한 결과, 생균에서 분비되는 이중항원 (PRRSV-GP5)의 농도는 rGP5와 비교하여 1uL당 약 0.06ug/ul의 농도로 생성됨을 알 수 있었음.

(2) 기준 시험법에 의한 안정성 검토 (장기보존시험/가속시험)

신물질 (의약품) 안정성 평가를 위한 기준 시험법인 장기보존 시험과 가속시험을 국립수의과학검역원 기준에 의해 실시하였다.

(가) 장기보존시험

1) 재료 및 방법

먼저 개발된 생균의 장기보존실험을 위해 2008년 4월에 개발한 BBS-GP5 stock을 보관 후 18개월째까지 최소3회 이상 시료채취 (해동)하여 균수 측정을 통해 장기보관에 따른 생존력 유지에 대한 평가를 수행함. 이를 위해

- ① 3개월에 1번씩 stock 1 vial을 취하여 해동 후 stock 40ul을 5ml BHI +kan10ul 에 inoculation후 37°C shaking/incubation/ O/N을 실시함
- ② 해동 후 re-activation된 배양액 시료를 chocolate agar plate에 접종하기 위해 균 배양액을 serial dilution하여 10^{-6} 및 $10^{-7}/100ul$ 로 희석하고 agar 접종 후 spreading하여 37°C incubation O/N을 실시함
- ③ 다음날 colony conuter를 이용하여 CFU측정함

2) 결과

- ① 10^{-6} 희석된 plate에서의 colony 수는 다음 표 3-31과 같다

표 3-31. 10^{-6} 희석된 plate에서의 colony 수의 평균치 및 환산된 ml당 CFU

plate	1차	2차	3차	4차	5차	6차
평균	197	199.5	170	132	125	185
stock CFU/ml	1.97×10^9	1.99×10^9	1.7×10^9	1.32×10^9	1.25×10^9	1.85×10^9

② 10^{-7} plate 희석된 plate에서의 colony 수는 다음 표 3-32와 같다

표 3-32. 10^{-7} 희석된 plate에서의 colony 수의 평균치 및 환산된 ml당 CFU

plate	1차	2차	3차	4차	5차	6차
평균	25	28	22.5	17	15	29
stock CFU/ml	2.5×10^9	2.8×10^9	2.2×10^9	1.7×10^9	1.5×10^9	2.9×10^9

위의 결과, -20°C 에서 18개월간 장기보관에 의한 균수의 감소 또는 소실은 전혀 관찰되지 않았음

(나) 가속시험

1) 재료 및 방법

- ① -20°C 의 보관상태 보다 더 좋지않은 조건 (4°C)에서의 생존조건을 알아보기 위해 보관상태를 냉동에서 냉장으로 보관하여 경과에 따른 CFU측정
- ② 이를 위해 기준시험법에 따라 최소4번의 실험을 수행하여야 하며 개시일을 포함하여 0, 2, 4, 6개월 중 3번 이상 수행하여 확인함
최초 동결보관된 시료를 냉장상태로 유지하면서 아래와 같은 시기에 시료를 채취하여 냉장상태에서의 생존능을 확인함
 - i) 1회: 2008년 04월 ~ 2008년 10월
 - ii) 2회: 2008년 10월 ~ 2009년 04월
 - iii) 3회: 2009년 04월 ~ 2009년 08월
 - iv) 4회: 2009년 08월 ~ 2010년 02월
- ③ 매 기간 마지막 날에 1번씩 stock 1 vial을 취하여 stock 40ul을 5ml BHI +kan10ul 에 inoculation후 37°C shaking/incubation/ O/N을 실시함
- ④ 배양액 시료를 chocolate agar plate에 접종하기 위해 균 배양액을 serial dilution하여 10^{-6} 및 $10^{-7}/100\text{ul}$ 로 희석하고 agar 접종 후 spreading하여 37°C incubation O/N을 실시함
- ⑤ 다음날 colony conuter를 이용하여 CFU측정함

2) 결과

① 10^{-6} plate 희석된 plate에서의 colony 수는 다음 표 3-33과 같다

표 3-33. 10^{-6} 희석된 plate에서의 colony 수의 평균치 및 환산된 ml당 CFU

plate	1차(10/21)	2차(12/21)	3차(2/21)	4차(4/21)
평균	184	213	197	194
stock CFU/ml	1.84×10^9	2.13×10^9	1.97×10^9	1.94×10^9

② 10^{-7} plate 희석된 plate에서의 colony 수는 다음 표 3-34와 같다

표 3-34. 10^{-7} 희석된 plate에서의 colony 수의 평균치 및 환산된 ml당 CFU

plate	1차(10/21)	2차(12/21)	3차(2/21)	4차(4/21)
평균	24.7	21	21	22
stock CFU/ml	2.4×10^9	2.1×10^9	2.1×10^9	2.2×10^9

위의 결과, 4°C의 가혹조건에서 보관중인 시료 역시 가혹조건보관에 의한 균수의 감소 또는 소실은 전혀 관찰되지 않았음

다. 이중항원발현 생균백신 시스템 개발

(연구내용 : PRRS 항원 발현 증가 모델 개발 및 고향원성 생균백신 개발)

(1) T7 promoter region 및 ribosome-binding site 첨가등에 의한 항원 고발현 시스템 개발

(가) T7 promoter region 첨가

1) 재료 및 방법

① T7 pol-pro

지금까지 알려진 prokaryotic expression system중 가장 강력한 promoter로 알려진 T7

promoter를 BBS-GP5내의 PRRSV GP5 앞 부분 (5'쪽)에 삽입하여 이중항원 단백질 발현의 극대화 추구함.

이를 위해 BBS-GP5를 개발하기 위해 2차년도에 사용된 vector construct (pGEM-aroAF-kan^R-GP5-aroAR)를 back-bone으로 사용하여 kan^R 뒷 부위에 T7 polymerase 유전자와 T7 promoter를 삽입하였음.

Cloning을 위한 pGEM-T Easy vector는 Promega에서, 그리고 T7 polymerase 유전자를 cloning 하기 위한 template는 BL21(DE3)pLysS 을 이용하였고, T7 promoter는 pRSET A vector를 template으로 이용하였다. 과정을 살펴보면 먼저 T7 polymerase의 유전자와 N-말단과 C-말단에 맞게 올리고 제작 후 2.6kb 정도를 PCR 수행하였다. 본 실험에 사용된 primer들의 sequence는 아래 표 3-35와 같다.

그리고 T7 promoter와 RBS, gene10 leader, X-press를 포함한 부분을 올리고 제작하여 180bp 정도를 PCR 수행하였다.

각각의 PCR 산물은 SOEing(Splicing by Overlap Extension) 방법에 의해 재PCR이 이루어졌고, 이는 GP5 유전자 산물과 2차 SOE PCR을 실시하여 최종 결합된 insert(T7pol-pro-GP5)를 제작하였다. 이 때 SOE 조건은 Tag을 이용한 95°C 5분, 72°C 3분 조건하에 10cycle수행하였고, 일반적인 PCR방법을 사용하였다.

2개의 제한효소인 BamHI과 KpnI으로 처리하여 insert를 pGEM-T Easy vector에 cloning한 다음 vector construct와 sub-cloning을 실시하였다. 최종 결합된 pGEM-aroAF-kan^R-T7pol-pro-GP5-aroAR을 2개의 제한효소인 XhoI과 HindIII로 처리하여 homologous recombination용 insert를 준비하였다(그림 3-41).

표 3-35. SOE 및 유전자 증폭에 사용된 primer (oligonucleotide) sequence

name	sequence(5'→3')	size
T7pol-F	AATTGGTACCATGAACACGATTAACATCGC	2.6kb
T7pro-pol-R	TAGTGAGTCGTATTAATTTTACGCGAACGCGAAGT	
T7pol-pro-F	GCGTTCGCGTAAAATTAATACGACTCACTATAGGG	180bp
GP5-T7pro-R	GCTGCTGTCGTTGCTCATATCCTTATCGTCATCGTCGT	
T7pro-GP5-F	GATGACGATAAGGATATGAGCAACGACAGCAGCTCCCA	0.5kb
GP5-BamH-R	AATTGGATCCCTAAGGACGACCCCATTTGTT	

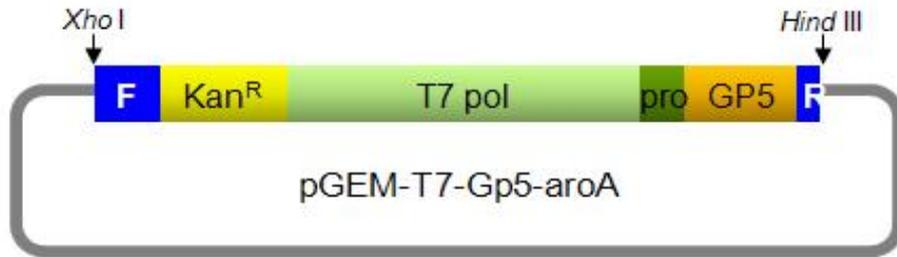


그림 3-41. homologous recombination을 위한 cloning strategy.

② SD-T7pol-pro

GP5의 과발현을 유도하기 위해 Kan^R 뒷쪽에 Shine-Dalgarno(SD) sequence를 넣어 Construction 된 것을 "T-SDPPG(FKR)"이라 명명함(그림 3-42).

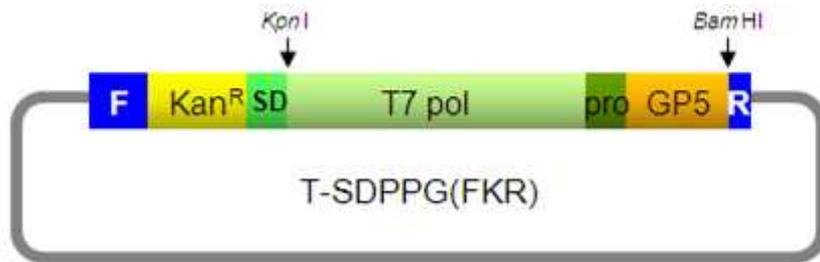


그림 3-42. 발현유도를 위한 Shine-Dalgarno(SD) sequence를 포함한 두번째 cloning strategy

2개의 제한효소인 BamHI과 KpnI으로 처리하여 insert를 pGEM-T Easy vector에 cloning한 다음 vector construct와 sub-cloning을 실시하였다. 최종 결합된 pGEM-aroAF-kan^R-SD-T7pol-pro-GP5-aroAR을 2개의 제한효소인 XhoI과 HindIII로 처리하여 homologous recombination용 insert를 준비하였다.

③ 6xHis-T7pol-pro

Kan^R 뒷쪽의 stop codon을 없애고 6xHis를 넣어 발현유도하기 위해 Construction 을 변경하고 "T-6H-PPG(FKR)"이라 명명함(그림 3-43).

name	sequence(5'→3')	size
kan-kpn-6His-R	ATAGGTACCATGATGATGATGATGATGGAAGAACTCGTC AAG	0.8kb

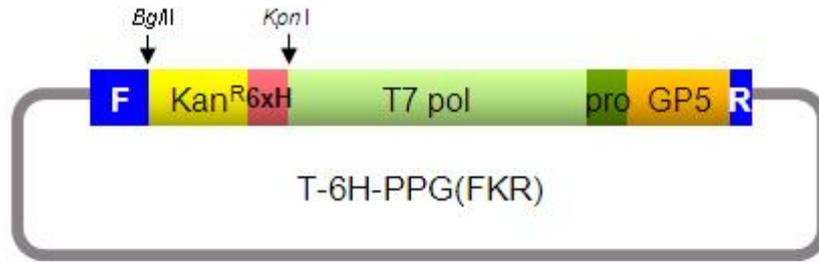


그림 3-43. 발현유도를 위한 6x His를 포함한 세 번째 cloning strategy

2개의 제한효소인 BamHI과 KpnI으로 처리하여 insert를 pGEM-T-easy vector에 cloning 한 다음 vector construct와 sub-cloning을 실시하였다. 최종 결합된 pGEM-aroAF-kan^R-6xHis-T7pol-pro-GP5-aroAR을 2개의 제한효소인 XhoI과 HindIII로 처리하여 homologous recombination용 insert를 준비하였다.

④ 6xHis-T7pol-pro-Kan

Kan^R 유전자와 6xHis와의 발현양상을 확인하기 위해 Construction 을 변경하고 "T-F6h-PKR"이라 명명함(그림 3-44)

표 3-36. 6X His를 삽입하기 위해 사용된 primer sequence

name	sequence(5'→3')
T7pol-kpnI-R	AATGGTACCCGCGAACGCGAAGTCCGACT
Kan-KpnI-F	CTGGGTACCATGATTGAACAAGATGGATT
Kan-BamHI-R	TCGGGATCCTTAGAAGAAGTTCGTCAAGAAGGC
T7pol-6h-Bgl-F	TCGAGATCTCATCATCATCATCATATGAACACGATTAACATCGC



그림 3-44. 발현유도를 위한 네번째 cloning strategy

(나) homologous recombination

1) 재료 및 방법

준비된 insert (aroA-F + Kan^R + T7region + GP5 + aroA-R)를 *B. bronchiseptica*에 형질전환시키기 위하여 electro-competent cell을 준비하였다.

즉, 18시간 동안 BHI 500ml에서 배양한 *B. bronchiseptica* 배양액을 8,000rpm으로 10분간 원심분리 후 펠렛을 4°C의 10% glycerol 용액 50ml로 재부유, 다시 원심분리 후 펠렛을 4°C의 10% glycerol 용액 5ml로 재부유하였다.

이것을 100ul씩 분주하여 competent cell로 준비하였다.

상기 균체에서 λ Red recombinase를 발현하기 위해 pKD46 플라스미드를 Gene Pulser XcellTM electroporation system (Bio-Rad, Hercules, CA)을 이용하여 형질전환 후, ampicillin과 L-arabinose (최종 농도 10 mM)가 첨가된 250ml SOB 배지에서 선택 후, 30°C에서 OD값이 0.5가 될 때까지 배양하였다. 그 후, 다시 2.5ml의 냉각된 10% glycerol 용액으로 농축하여 먼저 제조된 상동 제조합용 선형 DNA를 형질전환하기 위한 electro-competent cell을 제조하였다.

40 μ l의 electro-competent cell에 1 μ l (100ng)의 insert DNA를 electroporation법으로 형질전환하고, 50 μ g/ml kanamycin이 첨가된 LB 배지에서 선택하여 aroA가 제거된 균을 선택하였다.

이 변이주는 대사에 관련된 aroA 유전자가 없기 때문에 일반배지에서는 증균하지 못한다. 따라서 aromix [tryptophan (4mg/ml), phenylalanine (4mg/ml), dihydroxybenzoic acid (1mg/ml), para-aminobenzoic acid (1mg/ml)]가 첨가된 BHI 배지에서 증균시켰다.

(다) 변이주 chromosomal DNA의 유전학적 확인

1) 재료 및 방법

*B. bronchiseptica*의 chromosomal DNA가 변해 있는지를 확인하기 위해 확인 PCR 및 sequencing을 실시하였다. 즉, 원래의 *B. bronchiseptica*의 유전자인 구조에는 나타나지 않을 삽입된 insert들 (Kan^R 및 GP5)이 존재하는지를 PCR로 확인하였다.

2) 결과

변이주 *B. bronchiseptica*의 DNA를 template로 하여 실시된 검증 PCR의 결과, 다음과 같이 기대되는 밴드가 확인되었다(그림 3-45).

① T7pol-pro

㉠ PCR of Pro+GP5 (0.2+0.5 kb)



㉡ PCR of T7 polymerase (2.6 kb)



그림 3-45. PCR 산물이 관찰되었음을 보여주는 그림.

② SD-T7pol-pro



그림 3-46. promotor와 GP5 region이 확인되었음(0.7kb)을 보여주는 PCR산물.

③ 6xHis-T7pol-pro



그림 3-47. promotor와 GP5 region이 확인되었음(0.7kb)을 보여주는 PCR산물.

이들의 sequence를 확인하여 원하는 유전자가 정위치에 삽입되었는지 확인한 결과 (data not shown), 모두 예상되는 유전자좌 및 순서에 의해 삽입되었음을 확인하였다.

④ 6xHis-T7pol-pro-Kan

Homologous recombination을 위해 pKD46/BBS로 electro-competent cell을 만들어 electroporation을 수행한 후, Kanamycin을 selectable maker로 사용하였으나 kanamycin 배지에서 colony를 형성하지 못함.

(라) 변이주에서 이중항원인 PRRSV GP5 단백질의 발현 확인

1) 재료 및 방법

선택된 변이주에서 PRRSV GP5 단백질이 발현되는지 알아보기 위하여 Western blot을 실시하였다.

즉, 균주배양액 5ml을 원심분리하여 pellet을 준비하고 2X sample buffer를 첨가하여 denaturing 후 10% SDS-PAGE에서 전기영동을 실시하고 PVDF membrane으로 단백질을 transfer 후 1협동과제에서 생산한 rGP5에 대한 항체를 1차항체로, goat anti-mouse IgG HRP-conjugated (Pierce, USA)를 2차항체로 사용하여 PRRSV GP5 단백질의 발현을 알아보았다.

2) 결과

T7pol-pro, SD-T7pol-pro, 6xHis-T7pol-pro를 이용하여 사용한 PCR산물에서는 Sequence까지 확인되었으나 Western blot을 실시한 결과 아래 그림 3-48과 같이 기존의 BBS-GP5에 비해 월등하게 증가된 단백질 생산은 관찰되지 않았음

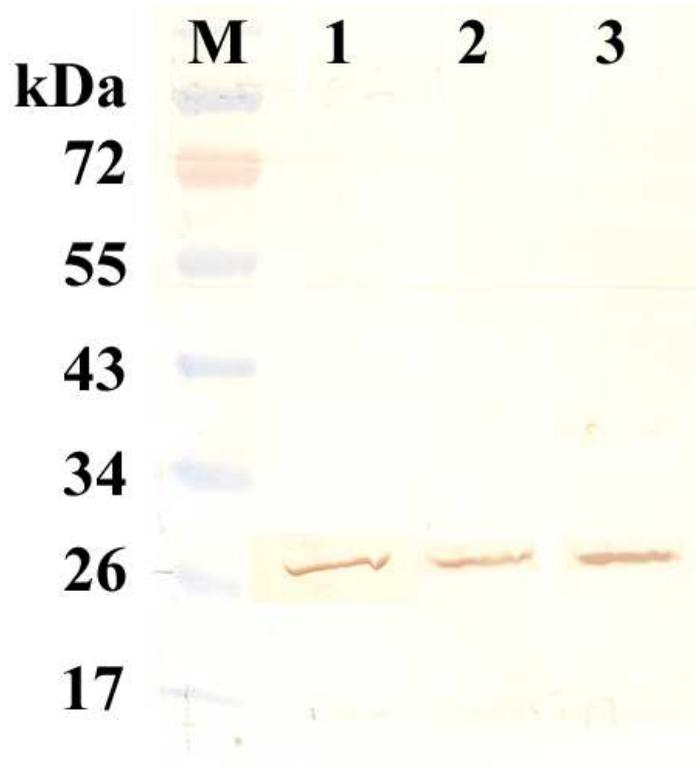


그림 3-48. 새로이 생산된 BBS-T7-GP5의 단백질 발현 양상. 대조군 (BBS-GP5)에 비해 월등이 높은 단백질 발현은 보이지 않음. M: protein size marker, Lane 1: 대장균에서 합성한 재조합 GP5 (양성대조군), lane 2: BBS-GP5 (실험대조군), lane 3: 새로이 합성된 BBS-T7-GP5.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 재조합 단백질 및 strain-specific한 peptide 항원을 이용하여 ELISA를 통한 새로운 진단법이 개발 - 지금까지의 PRRSV 감염 진단법 (미국 IDEXX kit)이 가진 많은 단점을 보완
 - 이 연구에서 개발된 aroA 유전자 결손 변이주는 다른 호흡기 질병의 원인체의 항원 delivery vector로도 사용이 가능함
 - 기타 다른 전염성 질병의 예방에도 효과적으로 응용
 - 안전하고 면역원성이 확보된 생균백신로 국내 백신시장의 외산 수출현상 해소
- 특허 및 논문 발표, 다양한 인력양성 (대학원 학생 및 연구원 기술개발인력) 실시

제 5 장 연구개발 성과

1. 1차년도

(1) 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2008	Expression of heterologous PRRSV GP5 from attenuated <i>Bordetella bronchiseptica</i>	박정섭	이재일	천병규	Vaccine		국외	SCI
2008	Serodiagnosis of PRRSV infection using peptide antigens	김성환	김태중	전승하	Journal of Veterinary Science		국내	SCIE

(2) 특허 성과

출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2008	약독화 <i>Bordetella bronchiseptica</i> 에서 발현된 이중항원을 이용한 PRRSV 백신	바이오리쏘스, 전남대학교 산학협력단	한국	
2008	펩타이드항원을 이용한 PRRSV wlses법	바이오리쏘스, 전남대학교 산학협력단	한국	

나. 2차년도

(1) 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2009	Expression of heterologous PRRSV GP5 from attenuated <i>Bordetella bronchiseptica</i>	표효주	김태중	이재일	Vaccine		국외	SCI
2009	Serodiagnosis of PRRSV infection using peptide antigens	표효주	김태중	이재일, 서자영	Canadian Journal of Veterinary Research		국외	SCI

(2) 특허 성과

출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2008	돼지생식기호흡기증후군 바이러스(PRRSV)의 GP5를 발현하는 약독화된 보르데텔라 브론키셉티카 균주를 포함하는 PRRSV 감염증 예방 또는 치료용 조성물, 및 그의 제조 방법	바이오리쏘스, 전남대학교 산학협력단	한국	2008-0092402
2008	복미형 PRRSV에 특이적인 면역원성 펩티드 및 그의 용도	바이오리쏘스, 전남대학교 산학협력단	한국	2008-0122601

다. 3차년도

(1) 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2010	Serodiagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using glycoprotein 5 antigens.	표효주	김태중	이재일	Canadian Journal of Veterinary Research	-	국외	SCI

(2) 특허 성과

출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호

제 6 장 참고문헌

1. 박취규, 류영수, 이창희, 정종욱. 돼지 생식기호흡기증후군 바이러스항체 검색에 있어 간접형광항체법 (IFA)과 효소면역법 (ELISA)의 진단효율 비교. 대한수의학회 1998, **38**, 314-318.
2. 한경수, 류광수, 박봉균. 한국의 돼지생식기호흡기증후군 (PRRS) 발생경향. 대한수의학회 1999, **39**, 133-137.
3. Barfoed AM, Blixenkrone-Moller M, Jensen MH, Botner A, Kamstrup S. DNA vaccination of pigs with open reading frame 1-7 of PRRS virus. Vaccine 2004, **22**, 3628-3641.
4. Bastos RG, Dellagostin OA, Barletta RG, Doster AR, Nelson E, Zuckermann F, Osorio FA. Immune response of pigs inoculated with *Mycobacterium bovis* BCG expressing a truncated form of GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vaccine 2004, **22**, 467-474.
5. Bey RF, Shade FJ, Goodnow RA, Johnson RC. Intranasal vaccination of dogs with liver avirulent *Bordetella bronchiseptica*: correalation of serum agglutination titer and the formation of secretory IgA with protection against experimentally induced infectious tracheobronchitis. Am J Vet Res 1981, **42**, 1130-1132.
6. Bøtner A, Strandbygaard B, Sørensen KJ, Have P, Madsen KG, Madsen ES, Alexandersen S. Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. Vet Rec 1997, **141**, 497-499
7. Cavanagh D. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. Arch Virol 1997, **142**, 629-633.
8. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichiacoli* K- 12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci USA 2000, **97**, 6640-6645.
9. Dea S, Ganon CA, Mardassi H, Pirzadeh B, Rogan D. Current knowledge on the structural proteins for porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. Arch Virol 2000, **145**, 659-688.
10. Dea S, Wilson L, Therrien D, Cornaglia E. Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant *E. coli*-expressed nucleocapsid protein as antigen. J Virol Methods 2000, **87**, 109-122.

11. **Elias B, Gergely P, Boros G.** Epizootiological studies on porcine atrophic rhinitis. XV. Results of local immunization with a live *Bordetella bronchiseptica* strain in a large-scale pig herd affected by atrophic rhinitis. *Acta Vet Hung* 1988, **36**, 198-204.
12. **Ellis JA, Haines DM, West KH, Burr JH, Dayton A, Townsend HG.** Effect of vaccination on experimental infection with *Bordetella bronchiseptica* in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2001, **218**, 367-375.
13. **Forsberg R, Oleksiewicz MB, Petersen AM, Hein J, Bøtner A, Storgaard T.** A molecular clock dates the common ancestor of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus at more than 10 years before the emergence of disease. *Virol* 2001, **289**, 174-179.
14. **Forsberg R, Storgaard T, Nielsen HS, Oleksiewicz MB, Cordioli P, Sala G, Hein J, Bøtner A.** The genetic diversity of European type PRRSV is similar to that of the North American type but is geographically skewed within Europe. *Virol* 2002, **299**, 38-47.
15. **Frey A, Di Canzio J, Zurakowski D.** A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *J Immunol Methods* 1998, **221**, 35-41.
16. **Gonin P, Pirzadeh B, Gagnon CA, Dea S.** Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. *J Vet Diagn Invest* 1999, **11**, 20-26.
17. **Gao ZQ, Guo X, Yang HC.** Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Arch Virol* 2004, **149**, 1341-1351.
- Goodnow RA.** Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Rev* 1980, **44**, 722-738.
- Halbur PG, E Bush.** Update on abortion storms and sow mortality. *J Swine Health Prod* 1997, **5**, 73.
18. **Hoiseith SK, Stocker BA.** Aromatic-dependent *Salmonella typhimurim* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 1981, **291**, 238-239.
19. **Hoop TP, Woods KR.** Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, **78**, 3824.
20. **Indik S, Schmoll F, Sipos W, Klein D.** Genetic variability of PRRS virus in Austria: consequences for molecular diagnostics and viral quantification. *Vet Microbiol* 2005, **107**, 171-178.
21. **Kang SY, Yun SI, Park HS, Park CK, Choi HS, Lee YM.** Molecular

characterization of PL97-1, the first Korean isolate of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 2004, **104**, 165-179.

22. Keffaber KK. Reproductive failure of unknown etiology. *Am Assoc Swine Pract News*, 1989, **1**, 1-10.

KIM SK. A control of PRDC caused by PRRSV infection through mass vaccination using Ingelvac PRRS MLV singled-site swine farm in Korea. *Proceedings of the 18th IPVS Conf*, 2004.

23. KIM TJ, LEE J.I. Cloning and expression of genes encoding transferrin-binding protein A and B from *Actionobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Protein Expr Purif* 2006, **45**, 235-240.

24. Kyte J, oolittle R. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 1982, **57**, 105-132.

25. Loula T. Mystery pig disease. *Agric Prac* 1991, **12**, 23-34.

26. Matherne CM, Steffen EK, Wagner JE. Efficacy of commercial vaccines for protection guinea pigs against *Bordetella bronchiseptica* pneumonia. *Lab Anim Sci* 1987, **37**, 191-194.

27. Madsen KG, Hansen CM, Madsen ES, Strandbygaard B, Bøtner A, Sorensen KJ. Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of the American type collected from Danish swine herds. *Arch Virol* 1998, **143**, 1683-1700.

28. McArthur JD, West NP, Cole JN, Jungnitz H, Guzman CA, Chin J, Lehrbach PR, Djordjevic SP, Walker MJ. An aromatic amino acid auxotrophic mutant of *Bordetella bronchiseptica* is attenuated and immunogenic in a mouse model of infection. *FEMS Microbiol Lett* 2003, **221**, 7-16.

29. Meng XJ. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol* 200, **74**, 309-329.

30. Meulenbergg JJM. PRRSV, the virus. *Vet Res* 2000, **31**, 11-21.

31. Meulenbergg JJM, van Nieuwstadt AP, van Essen-Zandbergen A, Bos-de Ruijter JNA, Langeveid JPM, Meloen RH. Localization and fine mapping of antigenic sites on the nucleocapsid protein N of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with monoclonal antibodies. *Virol* 1998, **252**, 106-114.

32. **Murtaugh MP, Xiao Z, Zuckermann F.** Immunological response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Microbiol* 2002, 55, 265-276.
33. **Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS.** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol* 1999, 71, 270-280.
34. **Nelson EA, Christopher-Hennings J, Benfield DA.** Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J Vet Diagn Invest* 1994, 6, 410-415.
35. **Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, Mabry JW, Bush EJ, Seitzinger AH, Green AL, Zimmerman JJ.** Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 2005, 227, 385-392.
36. **Opriessnig T, Halbur PG, Yoon KJ, Pogranichniy RM, Harmon KM, Evans R, Key KF, Pallares FJ, Thomas P, Meng XJ.** Comparison of molecular and biological characteristics of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine (Ingelvac PRRS MLV), the Parent Strain of the Vaccine (ATCC VR2332), ATCC VR2385, and two recent field isolates of PRRSV. *J Virol* 2002, 76, 11837-11844.
37. **Osorio FA, Zuckermann F, Wills R, Meier W, Christian S, Galeota J, Doster A.** PRRSV: comparison of commercial vaccines in their ability to induce protection against current PRRSV strains of high virulence. *Allen D. Lemay Swine Conf* 1998, 25, 176-182.
38. **Ostrowski M, Galeota JA, Jar AM, Platt KB, Osorio FA, Lopez OJ.** Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J Virol* 2002, 76, 4241-4250.
39. **Plagemann PGW.** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. In: origin hypothesis. *Emerg Infect Dis* 2003, 9, 903-908.
40. **Plagemann PGW.** The primary GP5 neutralization epitope of North American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol. Immunopathol* 2004, 102, 265-278.
41. **Prieto C, Castro JM.** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection

in the boar: a review. *Theriogenology* 2005, **63**, 1-16.

42. **Roberts M, Cropley I, Chatfield S, Dougan G.** Protection of mice against respiratory *Bordetella pertussis* infection by intranasal immunization with P.69 and FHA. *Vaccine* 1993, **11**, 866-872.

43. **Roberts M, Maskell D, Novotny P, Dougan G.** Construction and characterization in vivo of *Bordetella pertussis* aroA mutants. *Infect Immun* 1990, **58**, 732-739.

44. **Ropp SL, Wees CE, Fang Y, Nelson EA, Rossow KD, Bien M, Arndt B, Preszler S, Steen P, Christopher-Hennings J, Collins JE, Benfield DA, Faaberg KS.** Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. *J Virol* 2004, **78**, 3684-3703.

45. **Qiu HJ, Tian ZJ, Tong GZ, Zhou YJ, Ni JQ, Luo YZ, Cai XH.** Protective immunity induced by a recombinant pseudorabies virus expressing the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 2005, **106**, 309-319.

46. **Ropp SL, Wees CE, Fang Y, Nelson EA, Rossow KD, Bien M, Arndt B, Preszler S, Steen P, Christopher-Hennings J, Collins JE, Benfield DA, Faaberg KS.** Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. *J Virol* 2004, **78**, 3684-3703.

47. **Shien-Young K, Sang-Im Y, Hyo-Sun P, Choi-Kyu P, Hyo-Seong C, Young-Min L.** Molecular characterization of PL97-1, the first Korean isolate of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *VirusRes* 2004, **104**, 165-179.

48. **Sambrook J, Russell DW.** Molecular cloning. A laboratory manual. (3rd ed.) Cold Spring Harbor Lab Press, 2001.

49. **Sang-Ho C, Eun-Jin C, Jong-Hyeon P, So-Rah Y, Jae-Young S, Jun-Hun K, Hee-Jong S, Kyoung-Jin Y.** Molecular characterization of recent Korean porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) viruses and comparison to other Asian PRRS viruses. *Vet Microbiol* 2006, **117**, 248-257.

50. **Shien-Young K, Sang-Im Y, Hyo-Sun P, Choi-Kyu P, Hyo-Seong C, Young-Min L.** Molecular characterization of PL97-1, the first Korean isolate of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 2004, **104**, 165-179.

51. **Smith IM, Baskerville AJ, Brothwell E, Oliphant J.** Immunogenicity of killed *Bordetella bronchiseptica* vaccines in the mouse. *Res Vet Sci* 1982, **32**, 248-252.
52. **Snijder EJ, Meulenberg JJ.** The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol* 1998, **79**, 961-979.
53. **Snijder EJ, Meulenberg JJM.** Arteriviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B, Strauss SE. (4th ed.) *Fields Virol* Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia, PA, 2001, 1205-1220.
54. **Snijder EJ, Dobbe JC, Spaan WJ.** Heterodimerization of the two major envelope proteins is essential for arterivirus infectivity. *J Virol* 2003, **77**, 97-104.
55. **Stadejek T, Stankevicius A, Storgaard T, Oleksiewicz MB, Balak S, Drew TW, Pejsak Z.** Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses. *J Gen Virol* 2002, **83**, 1861-1873.
56. **Stevenson A, Roberts M.** Use of a rationally attenuated *Bordetella bronchiseptica* as a live mucosal vaccine and vector for heterologous antigens. *Vaccine* 2002, **20**, 2325-2335.
57. **Stevenson A, Roberts M.** Use of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis* as live vaccines and vectors for heterologous antigens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003, **37**, 121-128.
58. **Strugnell R, Dougan G, Chatfield S, Charles I, Fairweather N, Tite J.** Characterization of a *Salmonella typhimurium* aro vaccine strain expressing the P.69 antigen of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1992, **60**, 3994-4002.
59. **Studier FW, Moffatt BA.** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 1986, **189**, 113-130.
60. **Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tatsanakit A, Damrongwatanapokin S.** Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. *Vet Microbiol* 2004, **101**, 9-21.
61. **Welch SK, Jolie R, Pearce DS, Koertje WD, Fuog E, Shields SL, Yoo D, Calvert JG.** Construction and evaluation of genetically engineered replication-defective porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine candidates. *Vet Immunol Immunopathol* 2004, **102**, 277-290.

- 62. Weiland E, Wiczorek-Krohmer M, Kohl D, Conzelmann KK, Weiland F.** Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. *Vet Microbiol* 1999, **66**, 171-186.
- 63. Wesley RD, Mengeling WL, Lager KM, Clouser DF, Landgraf JG, Frey ML.** Differentiation of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine strain from North American field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 5. *J Vet Diagn Invest* 1998, 10, 140-144.
- 64. Zimmerman JJ, Yoon KJ.** PRRS Compendium. National Pork Board, Des Moines, Iowa, 2003.

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.

[부 표]

인 쇄 내 용

I. 인쇄규격

1. 크기 : A4 신판(가로 210mm * 세로297mm)

2. 제본 : 좌철

3. 용 지

가. 표지 200g/m² 양면 아트지

나. 내용 80g/m² 모조지

4. 인쇄방법

가. 표지 : 바탕 백색, 활자 흑색

나. 내용 : 흑색 지정활자

다. 양면인쇄

II. 편집순서

1. 표 지

2. 제출문

3. 보고서 요약서

4. 요약문

5. 영문 요약서(Summary)

6. 영문 목차(Contents)

7. 목 차

8. 본 문

9. 뒷면지

III. 참고사항

전자조판 인쇄시에는 이에 준한다.