

최 중
연구보고서

BSAG640M-199055-5



Dip-stick 면역크로마토그래피 기술방법에 의한
바이러스 질병 진단키트 개발

Development of diagnostic kit of diasease derived from
viral infection by immunochromato-graphic technology

연구기관
생명공학연구소

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Dip-stick 면역크로마토그래피 기술방법에 의한 바이러스 질병 진단키트 개발에 관한 연구” 과제 (세부과제 “Dip-stick 면역크로마토그래피 기술방법에 의한 바이러스 질병 진단키트 개발에 관한 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

1999. 11. 15 .

주관연구기관명 : 생명공학연구소

총괄연구책임자 : 정 태 화

연 구 원 : 권 두 한

연 구 원 : 송 은 영

연 구 원 : 김 경 아

연 구 원 : 이 홍 수

연 구 원 : 김 영 대

연 구 원 : 최 용 경

협동연구기관명 : 충북대학교

협동연구책임자 : 강 신 영

위탁연구기관명 : 동국대학교

위탁연구책임자 : 김 철 호

파오손면

1 ~ 2

히려 질병을 유발할 가능성이 있으며, 생바이러스백신을 투여했음에도 30-60%의 치사율을 나타내며, 그외에 설사증세를 나타내지 않으나 바이러스를 보균하고 있는 돼지 등에서는 효과가 나타나지 않을 뿐아니라 일선 현장에서 어떠한 바이러스에 의한 증상인지 명확히 구분할 수 있는 방법이 없다. 그러므로 현재 정확하고 간편한 진단 방법의 개발이 매우 시급한데, 재조합단백질 생산기술, 단일클론항체생산기술, Dip-stick진단기술을 혼합한 진단방법은 진단의 정확성과 사용방법의 간편함 그리고 경제성을 나타내줄 수 있을 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

가. 연구개발 내용 및 범위

1) 바이러스의 분리

ST세포를 세포배양용 플라스크에 10% 소 아태아 혈청이 포함된 MEM 배지에 배양한 후 돼지 위장염 바이러스(TGEV)를 감염시키고 세포의 90%이상이 플라스크 바닥에서 떨어졌을 때 플라스크내의 배양액을 초원심분리하여 돼지 위장염바이러스입자를 분리하였다. 돼지 유행성 설사 바이러스(PEDV)의 분리는, Vero세포를 10% 소 아태아 혈청이 포함된 MEM 배지에 배양한 후 인산완충용액으로 플라스크내의 혈청 성분을 세척하고, 트립신이 포함된 배지를 첨가하고 돼지 유행성 설사 바이러스를 감염시킨 후에 세포의 90%이상이 플라스크 바닥에서 떨어졌을 때 플라스크내의 배양액을 초원심분리하여 돼지 유행성 설사 바이러스입자를 분리하였다. 로타바이러스는 MA104세포를 10% 소 아태아 혈청이 포함된 MEM 배지에 배양한 후 인산완충용액으로 플라스크내의 혈청 성분을 세척하고, 트립신이 포함된 배지를 첨가하고 로타 바이러스를 감염시킨 후에 세포의 90%이상이 플라

스크 바닥에서 떨어졌을 때 플라스크내의 배양액을 초원심분리하여 돼지 로타바이러스입자를 분리하였다.

2) 복합 클론항체의 제조

- 정제된 각각의 TGEV, PEDV, rotavirus 바이러스입자를 토끼에 제각기 면역화한 뒤에 항체가가 최고조에 이르렀을때에 항혈청을 분리하였다. 복합클론항체의 정제는 항혈청을 protein-G column를 통과시켜서 복합클론항체를 정제하였다.

3) 단일클론항체생산

정제된 각각의 바이러스입자를 생쥐에 면역화하고 시험항혈청으로부터 항체의 역가를 확인한후 생쥐의 spleen을 적출하여 mono-cell화하여 쥐의 myeloma cell line인 SP2/0와 융합시키고 HAT 배지에서 hybridoma cell을 분리하고 EIA로 시험하여 돼지 위장염 바이러스, 돼지 유행성 설사바이러스, 로타바이러스에 대해 단일클론항체를 생산하는 hybridoma cell line을 분리하였다. 각 바이러스에 대한 단일클론항체를 생산하는 hybridoma cell들을 생쥐의 복강에 각각 주사하여 ascites fluids을 추출한 후, 각 ascites fluid을 protein-G column를 통과시켜서 단일클론항체를 분리 정제하였다.

5) Dip-stick진단키트의 제조

Micro-particle에 TGEV, PEDV, rotavirus에 대한 단일 또는 복합클론항체를 결합시킨 뒤에 분사방식에 의해 glass fiber pad에 항체가 결합된 micro-particles를 고착시켰으며 각 virus에 대한 단일 또는 복합클론항체와 이차항체를 nirtocellulose membrane에 고착화하고 membrane의 상단과 membrane과 pad가 연결된 반대편에 absorption pad를 각각 부착하여 시료를 적시는 pad와 시료의 이동을 촉진하는 pad로 구성

하였다. 시험 과정은 시료내에 바이러스가 존재할 경우, 시료를 적시는 pad에 적하하면 용액 내의 각 바이러스는 absorption pad을 통과하여 microparticle이 결합된 glass fiber pad에서 각 바이러스에 대한 항체와 결합하고 바이러스·항체·microparticle결합체는 membrane을 이동하여 membrane에 고착되어 있는 바이러스에 대한 항체와 결합하여 일부는 더 이상 이동하지 못하고 남은 일부는 더 이동하여 이차항체가 결합되어 있는 위치까지 이동하게 되어 membrane 상에 2 개의 band를 형성하였다. 시료내에 바이러스가 없는 경우는 항체·microparticle결합체는 이차항체가 결합되어 있는 위치까지 이동하게 되어 1 개의 band를 형성하였다. 이러한 시험과정은 10 분 이내에 완료되며 육안으로 시료내의 바이러스 존재 유무를 판정할 수 있었다. 각 바이러스 진단키트는 효소면역방법과 동일한 높은 특이성과 민감도를 나타내고 있었다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1) 연구개발 결과

본 연구에서는 설사를 일으킨 돼지의 분변에서 돼지에게 일어나는 설사증의 주요 원인인 돼지 위장염 바이러스, 돼지 유행성 설사 바이러스, 로타바이러스의 감염을 10 분 이내에 판정할 수 있는 바이러스 진단 키트를 개발하였다. 이들 바이러스 진단 키트는 돼지 위장염 바이러스, 돼지 유행성 설사 바이러스, 로타바이러스에 대해서 특이적으로 반응하며 효소면역방법과 유사한 특이성과 감도를 나타내었다. 따라서 전염력이 매우 강하고 치사율도 높은 이들 바이러스의 감염을 현장에서 10 분 이내에 판정이 가능하도록 하였다. 또한 결과판정에 고가의 기기도 필요없을 뿐 아니라, 육안 판정 방식을 채택하여 누구나 손쉽게 바이러스 감염을 알 수 있도록

하였다.

2)활용에 대한 건의

본 연구에서 개발된 바이러스 진단 키트는 분변에서 바로 바이러스 감염 여부를 판정할 수 있도록 개발된 진단키트이다. 이미 연구과정에서 분변에서 바이러스감염을 알 수 있도록 조건을 확립하였기 때문에 기업화가 매우 손쉽게 이루어 질 수 있다. 따라서 농수산 의약품 관련분야의 기업에서 이의 상업화를 제의하면 바로 기술이전과 상품생산에 들어갈 수 있다.

SUMMARY

Porcine diarrhea disease is a highly contagious disease of swine caused by transmissible gastroenteritis virus (TGEV), porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), and rotavirus. Its infectious disease usually causes only a transient diarrhea in adults but is a major cause of death in piglets under 2 weeks of age. These viruses have a very fast transmissibility, and a piglet infected by them is soon caused to die. Now the death of piglets infected by these viruses is a major economic loss for pig farmers. Therefore, development of a diagnosis method is needed to detect the infection of these viruses in an early stage. Diagnostic strips are non-isotopic, one-site field tests. The assay principle is based on immunochromatography on membrane paper. Test results are indicated by colored bands produced by colored microparticles conjugated with antibodies in ten minutes. In this study, we have developed specific monoclonal antibodies against TGEV or rotavirus, and developed diagnostic kits using antibodies against TGEV, PEDV, or rotavirus. Immunochromatographic test is a homologous sandwich immunoassay composed of a monoclonal antibody or polyclonal antibody for TGEV, PEDV, and rotavirus. The paper membrane has two solid antibodies as follows: (1) colored microparticles conjugated with mouse monoclonal antibody directed against TGEV or rotavirus.

The diagnostic kit using immunochromatographic technology is a direct test for detecting the presence of TGEV, PEDV, or rotavirus in stool samples in 10 minutes, respectively. Therefore, this kit is suitable for use in a field.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	-----11
Section 1 Subject of project	-----11
1. Subject of project	-----11
2. Range of project	-----11
3. Current deveopment of diagnosis kits	-----13
Chapter 2. Cuture and isolation of viruses	-----15
Section 1. TGEV	-----15
Section 2. PEDV	-----15
Section 3. Rotavirus	-----16
Chapter 3. Isolation of viral specific antibodies	-----18
Section 1. Immunization	-----18
1. Polyclonal antibodies	-----18
2. Monoclonal antibodies	-----18
Section 2. Purification of antibodies	-----19
1. Purification of polyclonal antibodies	-----19
2. Purification of monoclonal antibodies	-----19
Chapter 4. Production of diagnostic kits for detection of viruses	---27
Section 1. Production of antibody-microparticle conjugate	----27
Section 2. Production of antibody immobilized membrane	-----29
Section 3. Composition of diagnostic kits	-----29
Section 4. Clinical test	-----36
Chapter 5. References	-----42

목 차

제 1 장 서 론	-----11
제 1 절 연구개발의 목적과 범위	-----11
1. 연구개발의 목적	-----11
2. 연구개발의 범위	-----11
3. 국내외 기술개발 현황	-----13
제 2 장 바이러스의 배양과 분리	-----15
제 1 절 돼지 위창염 바이러스	-----15
제 2 절 돼지 유행성·설사 바이러스	-----15
제 3 절 돼지 로타바이러스	-----16
제 3 장 바이러스 특이항체의 생산과 분리	-----18
제 1 절 면역화	-----18
1. 복합클론항체	-----18
2. 단일클론항체	-----18
제 2 절 항체의 분리 및 정제	-----19
1. 복합클론항체	-----19
2. 단일클론항체	-----19
제 4 장 Immunochromatographic strip의 제조	-----27
제 1 절 항체-microparticle conjugate의 제조	-----27
제 2 절 항체 고착화된 membrane paper제조	-----29
제 3 절 진단 키트의 구성	-----29
1. TGEV 진단키트	
2. PEDV 진단키트	
3. Rotavirus 진단키트	

제 4 절 임상시험 -----36

제 5 장 참고문헌 -----42

여 백

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구개발의 목적

돼지의 바이러스성 설사질환에서 가장 경제적 손실을 초래하는 바이러스군(TGE바이러스, PED바이러스, 로타바이러스)의 감염에 의해 일어나는 질병에 대하여 유전공학적 기술, 면역학적 기술, Dip-stick 진단기술을 이용한 질병진단 키트를 개발하고자 한다.

2. 연구개발의 범위

1) 바이러스의 분리

ST세포를 세포배양용 플라스크에 10% 소 아태아 혈청이 포함된 MEM 배지에 배양한 후 돼지 위장염 바이러스(TGEV)를 감염시키고 세포의 90%이상이 플라스크 바닥에서 떨어졌을 때 플라스크내의 배양액을 초원심분리하여 돼지 위장염바이러스입자를 분리하였다. 돼지 유행성 설사 바이러스(PEDV)의 분리는, Vero세포를 10% 소 아태아 혈청이 포함된 MEM 배지에 배양한 후 인산완충용액으로 플라스크내의 혈청 성분을 세척하고, 트립신이 포함된 배지를 첨가하고 돼지 유행성 설사 바이러스를 감염시킨 후에 세포의 90%이상이 플라스크 바닥에서 떨어졌을 때 플라스크내의 배양액을 초원심분리하여 돼지 유행성 설사 바이러스입자를 분리하였다. 로타바이러스는 MA104세포를 10% 소 아태아 혈청이 포함된 MEM 배지에 배양한 후 인산완충용액으로 플라스크내의 혈청 성분을 세척하고, 트립신이 포함된 배지를 첨가하고 로타 바이러스를 감염시킨 후에 세포의 90%이상이 플

스크 바닥에서 떨어졌을 때 플라스크내의 배양액을 초원심분리하여 돼지 로타바이러스입자를 분리하였다.

2) 복합 클론항체의 제조

- 정제된 각각의 TGEV, PEDV, rotavirus 바이러스입자를 토끼에 제각기 면역화한 뒤에 항체가가 최고조에 이르렀을때에 항혈청을 분리하였다. 복합클론항체의 정제는 항혈청을 protein-G column를 통과시켜서 복합클론항체를 정제하였다.

3) 단일클론항체생산

정제된 각각의 바이러스입자를 생쥐에 면역화하고 시험항혈청으로부터 항체의 역가를 확인한후 생쥐의 spleen을 적출하여 mono-cell화하여 쥐의 myeloma cell line인 SP2/0와 융합시키고 HAT 배지에서 hybridoma cell을 분리하고 EIA로 시험하여 돼지 위장염 바이러스, 돼지 유행성 설사바이러스, 로타바이러스에 대해 단일클론항체를 생산하는 hybridoma cell line을 분리하였다. 각 바이러스에 대한 단일클론항체를 생산하는 hybridoma cell들을 생쥐의 복강에 각각 주사하여 ascites fluids을 추출한 후, 각 ascites fluid을 protein-G column를 통과시켜서 단일클론항체를 분리 정제하였다.

5) Dip-stick진단키트의 제조

Micro-particle에 TGEV, PEDV, rotavirus에 대한 단일 또는 복합클론항체를 결합시킨 뒤에 분사방식에 의해 glass fiber pad에 항체가 결합된 micro-particles를 고착시켰으며 각 virus에 대한 단일 또는 복합클론항체와 이차항체를 nirtocellulose membrane에 고착화하고 membrane의 상단과 membrane과 pad가 연결된 반대편에 absorption pad를 각각 부착

하여 시료를 적시는 pad와 시료의 이동을 촉진하는 pad로 구성하였다. 시험 과정은 시료내에 바이러스가 존재할 경우, 시료를 적시는 pad에 적하하면 용액 내의 각 바이러스는 absorption pad을 통과하여 microparticle이 결합된 glass fiber pad에서 각 바이러스에 대한 항체와 결합하고 바이러스·항체·microparticle결합체는 membrane을 이동하여 membrane에 고착되어 있는 바이러스에 대한 항체와 결합하여 일부는 더 이상 이동하지 못하고 남은 일부는 더 이동하여 이차항체가 결합되어 있는 위치까지 이동하게 되어 membrane 상에 2 개의 band를 형성하였다. 시료내에 바이러스가 없는 경우는 항체·microparticle결합체는 이차항체가 결합되어 있는 위치까지 이동하게 되어 1 개의 band를 형성하였다. 이러한 시험과정은 10 분 이내에 완료되며 육안으로 시료내의 바이러스 존재 유무를 판정할 수 있었다. 각 바이러스 진단키트는 효소면역방법과 동일한 높은 특이성과 민감도를 나타내고 있었다.

3. 국내외 기술개발 현황

현재 농작물 또는 가축에 감염하는 바이러스를 진단하는 방법은 중합효소연쇄반응법(PCR, Polymerase Chain Reaction), DNA교잡(DNA hybridization)을 실시하거나, 효소면역측정법(Enzyme-linked immunoabsorbent assay), 형광면역측정법(immunofluorescent assay), 면역전기영동법(immunoelectrophoresis)등으로 바이러스의 존재를 진단하는 방법들이 사용되고 있다. DNA-probe를 이용한 PCR이나 DNA교잡방법, 효소면역측정법 등은 특이성은 높으나 측정방법에 있어 thermal cycler, EIA reader 등의 고가의 기기가 준비된 시설이 필요하며, 숙련된 연구기술자를 요구함에 따라, 질병의 발생지점에서 sample이나 개체를 위의 시설이 있는 곳까지 운반해야 하므로 이동에 걸리는 시간에

따라 결과의 판정에 영향을 미칠 수 있으며, 키트화가 되지않아 실험자의 자의적 해석에 따른 진단으로 잘못 판명되는 수도 있다. 이러한 단점을 극복하기위해 고가의 기기와 특정기술 없이도 현장에서 특정바이러스를 정확하고 신속하고도 손쉽게 알아낼 수 있는 진단 체계의 개발이 요구되고 있다.

현재 항체를 이용하여 바이러스를 진단하는 방법으로 국내에서 시판되고 있는 것은 돼지 오제스키바이러스를 진단하는 면역점적측정법(dot immunoassay)에 의한 진단키트가 있으나 결과판정까지 오랜시간이 걸리고(24시간), 감도와 진단의 간편성에서 dip-stick진단방법에 비해 떨어진다. Dip-stick진단방법은 분석의 신속성외에도 많은 sample을 대량으로 처리할수 있는 자동화가 가능하여 대단위의 가축사육규모에서도 모든 개체에 대한 진단을 신속하고 정확하게 할 수 있다.

Dip-stick진단기술은 one step , one site에서 immunochromatography법으로 질병을 측정하는 진단방법으로서 현재 사람의 질병이나 임신여부를 가리는 진단키트에 응용되어 선진국의 일부 회사에서 개발, 상품화되고 있으나 아직 바이러스에 의한 질병의 진단을 대상으로 한 dip-stick진단키트는 HIV진단 이외에는 연구되지 않고 있다. 그러므로 immunochromatography법을 이용하여 바이러스를 각각 진단할수 있는 dip-stick진단법을 개발한다면 농수산분야 뿐만아니라 인체의 질병에서도 바이러스에 의해 유발된 질병의 진단법이 확립되지 않은 현 실정에 큰 변화를 가져올 수 있을 것이다.

제 2 장 바이러스의 배양과 분리

제 1 절 돼지 위장염 바이러스

1. TGE 바이러스의 배양

TGE바이러스는 FBS가 10% 함유된 Minimum essential medium(MEM)으로 배양된 swine testis(ST) 단층배양세포에서 증식시킨후 분리하였다. ST 세포를 플라스크 바닥에 완전히 찰 정도까지 배양하고 혈청이 없는 배지로 다시 배양플라스크를 채운후 TGE 바이러스 표준주인 Purdue strain 을 M.O.I.가 1.0 이 되도록 감염시킨 후 48시간에 80-90% 정도의 세포변성효과를 보였을 때 바이러스를 수집하였다.

2. TGE 바이러스의 분리

감염된 세포 및 배양상층액을 3 회 얼렸다 녹인 후 3,000×g 로 30분간 원심분리하여 cell debris를 제거하고 상층액을 수집하였다. 수집된 상층액은 25000rpm에서 2 시간 동안 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전물은 다시 PBS에 현탁하여 30-60% discontinuous sucrose gradient로 다시 25000rpm에서 2 시간 30 분 동안 원심분리하여 30%와 60% sucrose 층의 임계면에서 바이러스를 분리하였다.

제 2 절 돼지 유행성 설사 바이러스

1. 돼지 유행성 설사 바이러스의 배양

돼지 유행성 설사 바이러스는 FBS가 10% 함유된 Minimum essential medium(MEM)으로 배양된 Vero 단층배양세포에서 증식시킨후 분리하였다. Vero 세포를 플라스크 바닥에 완전히 찰 정도까지 배양하고 PBS로 플라스크를 2 회 세척한 혈청이 없는 배지에 trypsin을 최종 농도가 50ug/mL가 되도록 가하고, 돼지 유행성 설사 바이러스 CV777 strain을 M.O.I.가 1.0 이 되도록 감염시킨 후 48시간에 80-90% 정도의 세포변성효과를 보였을 때 바이러스를 수집하였다.

2. 돼지 유행성 설사 바이러스의 분리

감염된 세포 및 배양상층액을 3 회 얼렸다 녹인 후 3,000×g 로 30분간 원심분리하여 cell debris를 제거하고 상층액을 수집하였다. 수집된 상층액은 25000rpm에서 2 시간 동안 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전물은 다시 PBS에 현탁하여 30-60% discontinuous sucrose gradient로 다시 25000rpm에서 2 시간 30 분 동안 원심분리하여 30%와 60% sucrose 층의 임계면에서 바이러스를 분리하였다.

제 3 절 돼지 로타바이러스

1. 돼지 로타바이러스의 배양

로타바이러스는 FBS가 10% 함유된 Minimum essential medium(MEM)으로 배양된 MA104 단층배양세포에서 증식시킨후 분리하였다. MA104세포를 플라스크 바닥에 완전히 찰 정도까지 배양하고 PBS로 플라스크를 2 회 세척한 혈청이 없는 배지에 trypsin을 최종 농도가 50ug/L가 되도록 가하고 돼지 로타 바이러스 OSU strain 을 MA104단층배양세포에 M.O.I.가 1.0 이 되도록 감염시킨 후 48시간에 80-90% 정도의 세포변성효과를 보였을 때 바이러스를 수집하였다.

2. 돼지 로타 바이러스의 분리

감염된 세포 및 배양상층액을 3 회 얼렸다 녹인 후 3,000×g 로 30분간 원심분리하여 cell debris를 제거하고 상층액을 수집하였다. 수집된 상층액은 25000rpm에서 2 시간 동안 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전물은 다시 PBS에 현탁하여 30-60% discontinuous sucrose gradient로 다시 25000rpm에서 2 시간 30 분 동안 원심분리하여 30%와 60% sucrose 층의 임계면에서 바이러스를 분리하였다.

여 백

제 3 장 바이러스 특이항체의 생산과 분리

제 1 절 항체의 생산

1. 복합클론항체

상기에서 분리한 돼지 전염성 위장염 바이러스, 돼지 유행성 설사 바이러스, 돼지 로타바이러스 입자 100ug씩을 동량의 complete Freund Adjuvant을 유상화가 될 때까지 잘 혼합하여 각각 토끼의 피하에 주사하였고 2 번째부터는 2 주간격으로 처음 주사와 같은 양을 Freund's incomplete adjuvant (FIA)에 혼합하여 토끼에 주사하였다. 토끼의 귀에서 시험혈청을 분리하여 항체의 역가를 측정하여 역가가 안정화될 때까지 boost injection을 계속하였다. 항체의 역가가 안정화되면 토끼에서 전체 혈을 하여 항혈청을 분리하고 5mlTr 분주하여 -20℃에 보관하였다.

2. 단일클론항체

가. 면역화

하이브리도마 세포주의 개발에 필요한 면역화된 생쥐를 얻기 위하여, 상기에서 분리한 돼지 전염성 위장염 바이러스 입자와 동량의 complete Freund Adjuvant을 유상화가 될 때까지 잘 혼합하여 생후 6-8주 된 Balb/c 마우스의 복강내에 주사하였다. 2주 후에 처음 주사와 같은 양을 Freund's incomplete adjuvant (FIA)에 혼합하여 동일 부위에 주사하였다. 그 후 4~5일 후에 생쥐 꼬리 부위의 혈관에서 소량의 피를 뽑아내어 역가를 확인한 후 세포융합 실험 3~4일 전에 0.85% 생리식염수에 녹인 10 μ g의 돼지 전염성 위장염 바이러스 입자를 정맥 및 복강내에 주사하였다.

나. 세포 융합

하이브리도마 세포의 제조에 필요한 세포 융합을 실시하기 위하여, 상기에서 분리한 돼지 전염성 위장염 바이러스입자를 주사하여 얻은 생쥐의 비장세포 10⁸개와 myeloma세포(SP2/0) 10⁷개를 50ml의 시험관에 모았다. 세포융합의 모세포로는 SP2/0·Ag14을 사용하였다. 이 모세포는 10% FBS를 함유하는 RPMI 배지에서 최대밀도 5×10⁵/ml 정도로 항상 유지시켰다. 그리고 1)항에서 면역화 된 생쥐를 ether로 마취한 후 몸통의 좌측에 위치

한 비장조직을 꺼내서 조직분쇄기로 곱게 갈아서 HBSS를 이용하여 현탁액을 만들고, 이 때 얻어진 비장세포를 15ml 원심분리관에 넣어서 원심하고, 이 방법을 2회 반복하여 비장세포를 충분히 세척하였다. 한편 parent 세포인 SP2/0·Ag14도 HBSS를 이용하여 2회 원심분리하였다. 비장세포와 SP2/0·Ag14을 각각 10ml씩 재현탁시킨 후 각자의 세포 수를 세어서 비장세포와 SP2/0·Ag14을 10 : 1이 되도록 50ml의 원심분리관에서 섞어 다시 원심분리하여 침전시켰다. 원심분리된 침전물을 손가락으로 가볍게 두드려서 분산시키고, 37℃에서 1분간 유지시킨 후에 HBSS에 들어있는 45% PEG(w/v) -5% DMSO(w/v)의 혼합액 1ml를 1분간에 걸쳐 넣고 또 다시 1분간 약간 흔들어서 주었다. 그 후 RPMI 9ml을 3분간 걸쳐 첨가하고, 50ml이 될 때까지 흔들어서 주면서 서서히 RPMI를 첨가하였다. 이 현탁액을 다시 원심분리한 후 cell pellet을 HAT 배지에 $1\sim 2 \times 10^5$ /ml 정도로 재현탁시키고, 96 microtiter plate에 0.2ml씩 넣은 후 37℃로 조정된 CO₂ 습도 배양기 안에서 37℃ 에서 배양하였다.

다. 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 선별

실시에 4에서 제조한 하이브리도마 세포군 중에서 돼지 위장염 바이러스 항원에만 특이적으로 반응하는 하이브리도마 세포를 선별하기 위해 돼지 전염성 위장염 바이러스입자를 이용한 EIA법으로 스크리닝하였다. 높은 항체역가를 나타내는 클론을 재선별한 뒤 각각 생쥐에 주사하여 복수액을 만들었다.

제 2 절 항체의 분리 및 정제

1. 복합클론항체의 분리

가. 돼지 전염성 위장염 바이러스, 돼지 유행성 설사 바이러스, 돼지 로타바이러스 항혈청에 대해 각각 protein-G chromatography를 실시하여 돼지 전염성 위장염 바이러스, 돼지 유행성 설사 바이러스, 돼지 로타바이러스에 대한 복합클론항체를 정제하였다. 정제한 각 복합클론항체 들은 분주하여 -20℃에 보관하였다.

2. 단일클론항체

가. 단일클론항체의 정제

돼지 위장염 바이러스 바이러스와 돼지 로타바이러스에 대한

복수액들을 각각 각각 protein-G chromatography를 실시하여 돼지 전염성 위장염 바이러스, 돼지 로타바이러스에 대한 단일클론항체를 정제하였다. 정제한 각 단일클론항체들은 분주하여 -20℃에 보관하였다.

나. 돼지 위장염 바이러스에 대한 단일클론항체

돼지 위장염 바이러스를 인식하는 단일클론항체들을 분리하여 돼지 유행성 설사 바이러스, 로타바이러스와의 반응성을 indirect -EIA 방법으로 분석하였다 (fig 3). 이 결과에서 2B12항체와 TGS25 항체가 돼지 위장염 바이러스를 특이적으로 인식하고 있음을 알아냈다. 2B12 항체는 돼지 위장염 바이러스의 nucleocapsid protein을 인식하며 TGS25 항체는 spike protein을 인식하고 있음을 western blotting 법으로 확인하였다. 또한 3F5 항체를 capture 항체로하고 2B12 항체를 detection 항체로 하는 돼지 위장염 바이러스를 EIA법으로 진단할 수 있는 system을 개발하였다 (fig).

다. 돼지 유행성 설사 바이러스에 대한 단일클론항체

돼지 유행성 설사 바이러스에 대한 단일클론항체는 총 7종을 분리하였으나 모두 돼지 유행성 바이러스 입자에 대한 affinity가 낮아서 다음 실험에 사용하지 못하였다. 따라서 돼지 유행성 설사 바이러스에 대한 항체는 복합클론항체를 membrane과 microparticle에 고착시키는 항체로 하였다.

라. 돼지 로타바이러스에 대한 단일클론항체

돼지 로타바이러스에 대한 여러 종류의 단일클론항체를 개발하였으나 로타바이러스 입자에 대한 affinity가 낮았다. R10 단일클론항체는 돼지 로타바이러스의 VP6 단백질을 인식하며(fig.) 다른 단일클론항체보다 가장 높은 affinity를 나타냈다(fig).

표 1. 돼지 위장염 바이러스에 대한 단일클론항체

Mabs	Immunization route	Isotype	Protein specificity	Assay
				FA
2B12	IP	G1	NC	2,560
2G6	FP	G1	NC	2,560
3F5	FP	G2b	NC	2,560
4B7	FP	G2a	E2	1,280
G4	FP	M		
TGS25	FP	G2a	E2	

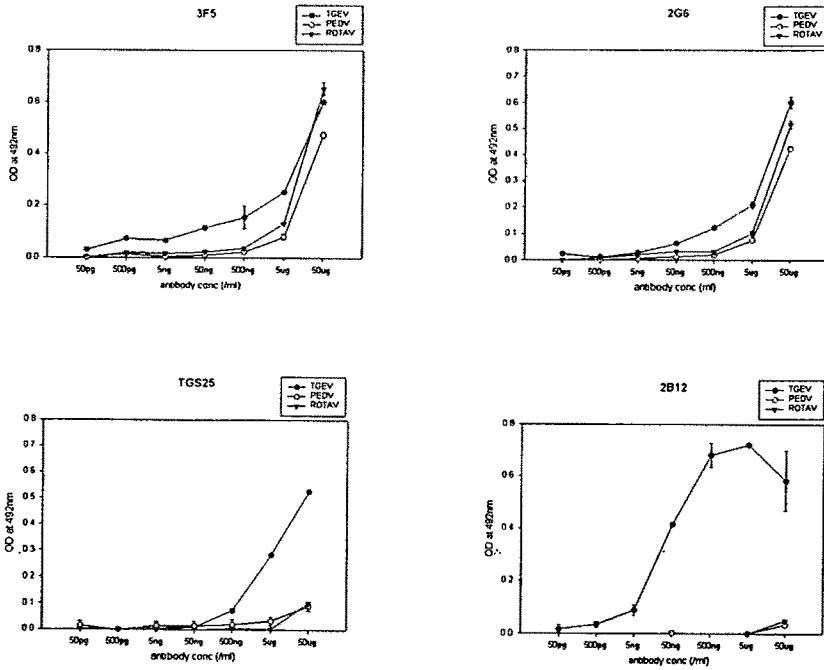


Fig. 1. Characterization of specificity of monoclonal antibodies against TGEV.

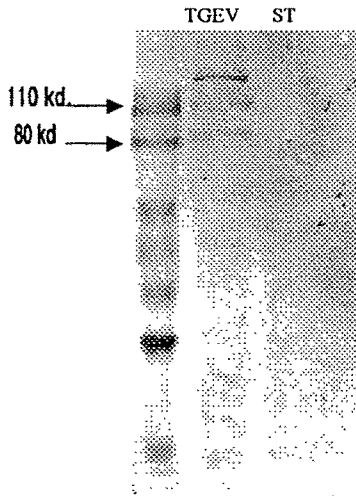


Fig. 2. Western blot of viral proteins of TGEV. Monoclonal antibody(2B12) were recognized three protein types, peplomer, S protein and S1 subunit of TGEV spike protein. The primary antibody was detected with horseradish peroxidase-labelled secondary antibody
Lane 1 : Cell lysate infected with TGEV, lane 2 : non-infected ST cell lysates

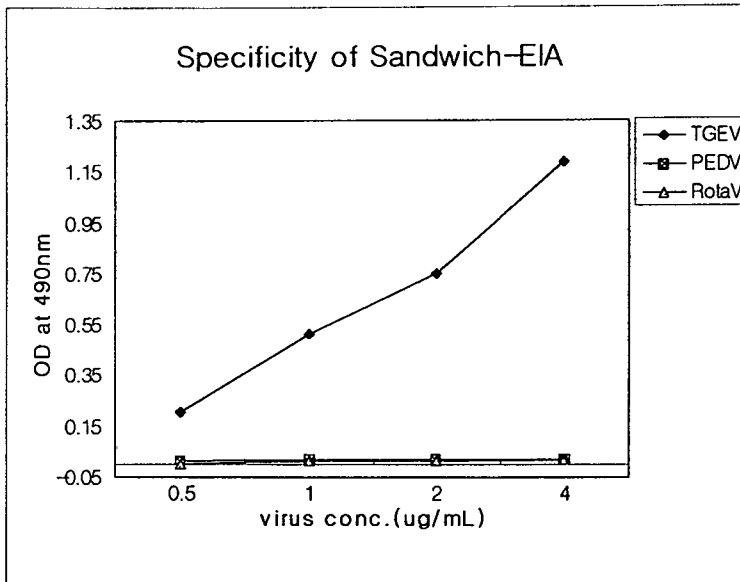


Fig. 3: development of EIA system for detection of TGEV

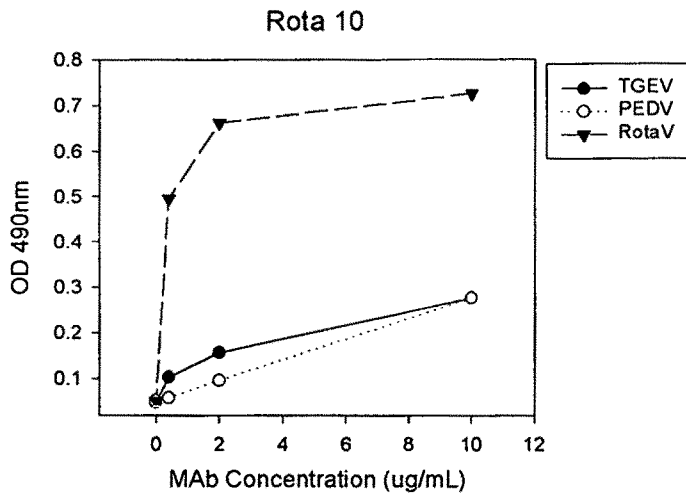


Fig. 4. Characterization of R10 monoclonal antibody against rotavirus

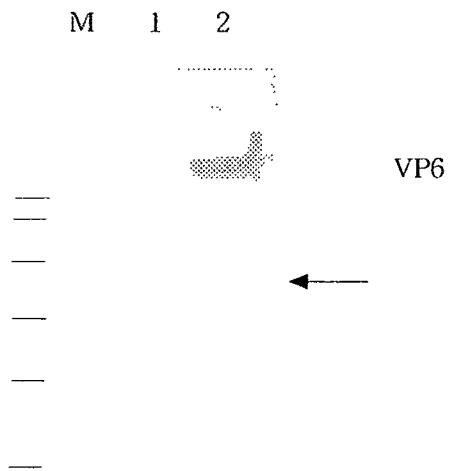


Fig. 5. The monoclonal antibody for rotavirus is only reacted with VP6 of rotaviral proteins.

M : protein mol. wt. marker

(111k, 77k, 48k, 33k, 29k and 20k)

1 : Cell lysate of MA104

2. : Lyaste of MA104 cell infected with rotavirus

제 4 장 Immunochromatographic strip의 제조

제 1 절 항체-microparticle conjugate의 제조

1. Pad의 전처리

Glass fiber pad는 borate 용액(20mM Borate, pH 9.0, 10% sucrose)에 적신 후에 건조기에서 완전히 건조한다.

2. TGS25 항체- 착색미립자 conjugate의 제조

돼지 위장염 바이러스에 대한 단일클론항체인 TGS25 항체 0.2mg을 PBS 0.45ml에 첨가하고 청색 미립자 용액(Bangslab. Co.USA, 10%)을 50ul 첨가하여 미립자의 최종 농도를 1%로 하였다. 항체와 미립자와의 결합반응은 실온에서 4 시간 동안 반응시킨 뒤에 PBS로 세척하고 PBST-3% BSA용액으로 1 시간 동안 미립자의 표면을 blocking 시켰다. 다시 PBS로 3회 세척하고 0.6ml PBS에 현탁시켰다. 현탁된 착색미립자의 표면은 fig.에서의 모식도와 같이 단일클론항체가 고르게 부착되어 있는 모양을 하게 된다. 그리고 앞서 sucrose를 처리한 glass fiber pad(4×5cm)에 분사하여 항체-착색미립자를 glass fiber pad에 부착시켰다. 다시 실온 건조기에서 16시간 동안 건조시킨 후에 kit 제작에 사용하였다.

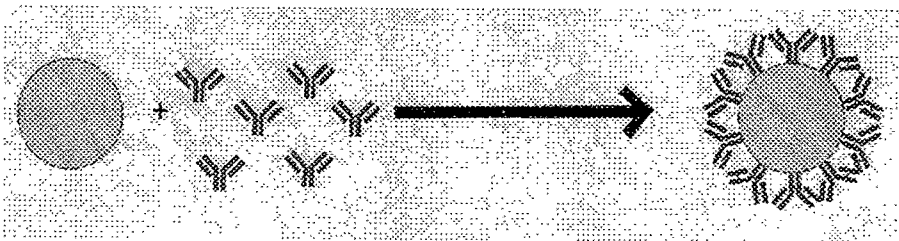


Fig. 6. Adsorption to microparticle

3. R10 항체- 착색미립자 conjugate의 제조

돼지 로타 바이러스에 대한 단일클론항체인 R10 항체 0.2mg을 PBS 0.45ml에 첨가하고 청색 미립자 용액(Bangslab. Co.USA, 10%)을 50ul 첨가하여 미립자의 최종 농도를 1%로 하였다. 항체와 미립자와의 결합반응은 실온에서 4 시간 동안 반응시킨 뒤에 PBS로 세척하고 PBST-3% BSA용액으로 1 시간 동안 미립자의 표면을 blocking 시켰다. 다시 PBS로 3회 세척

하고 0.6ml PBS에 현탁시켰다.

4. 돼지 유행성 설사 바이러스에 대한 복합클론항체-착색미립자 conjugate의 제조

돼지 유행성 설사 바이러스에 대한 단일클론항체들의 역가가 낮아서 돼지 유행성 설사 바이러스의 경우는 토끼에게서 분리한 복합클론항체를 청색미립자에 결합시켰다. 결합시킨 조건은 위의 TGS25항체-착색미립자 conjugate 제조법에 따랐다.

제 2 절 항체 고착화된 membrane paper제조

1. TGS25 단일클론항체가 고착화된 membrane 제조

syringe을 이용한 Limart(Kamac Co.)기기를 사용하여 laminated card에 부착되어 있는 nitrocellulose membrane(Millipore Co. SRHF)에 TGS25 단일클론항체 용액(0.5mg/ml)를 분사하였다. 분사량은 3ul/cm이었다. 2차 항체인 anti-mouse IgG 용액(2.5mg/mL)도 같은 방법으로 단일클론항체를 분사한 위치에서 5mm이동한 위치에 분사하였다. Membrane은 즉시 건조기에서 완전히 건조시켰다.

2. 돼지 유행성 설사 바이러스에 대한 복합클론항체가 고착화된 membrane 제조

가. 복합클론항체의 비특이적 반응을 감소시키기 위하여 돼지 유행성 설사 바이러스에 대한 복합클론항체(0.5mg/mL)에 1% 되게 FBS를 가하고 37℃에서 1 시간 반응하고 4℃에서 16시간 반응시킨 뒤에 12000rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 다음 실험에 사용하였다.

나. syringe을 이용한 Limart(Kamac Co.)기기를 사용하여 위와 같은 membrane에 TGS25 단일클론항체 용액(0.5mg/ml)를 분사하였다. 분사량은 3ul/cm이었다. 2차 항체인 anti-rabbit IgG 용액(2.5mg/mL)도 같은 방법으로 복합클론항체를 분사한 위치에서 5mm이동한 위치에 분사하였다. Membrane은 즉시 건조기에서 완전히 건조시켰다.

3. R10 단일클론 항체가 고착화된 membrane 제조

syringe을 이용한 Limart(Kamac Co.)기기를 사용하여 위와 같은 membrane에 R10 단일클론항체 용액(0.5mg/ml)를 분사하였다. 분사량은 3ul/cm이었다. 2차 항체인 anti-mouse IgG 용액(2.5mg/mL)도 같은 방법으로 단일클론항체를 분사한 위치에서 5mm이동한 위치에 분사하였다. Membrane은 즉시 건조기에서 완전히 건조시켰다.

제 3 절 진단 키트의 구성

1. 진단키트의 구성분

가. 시료 적하 pad

시료를 적하하는 부분으로 filter paper으로 구성

나. 항체-착색미립자 부착된 pad

시료내의 바이러스와 pad내 착색미립자의 항체와 결합하는

곳

다. 특이항체 고착화된 membrane

시료의 용액이 착색미립자와 같이 전개되는 부분으로 시험의 결과가 두 개 또는 하나의 band로 나타나는 부분.

라. Absorbent paper

Membrane 상에서 시료의 전개를 원활히 한다.

2. 진단키트의 구조

가. 진단키트의 모식도

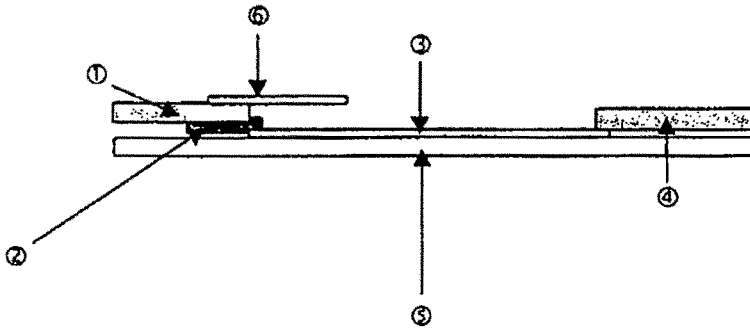


Fig. 7. 진단키트의 모식도

- ① 시료 적하 pad
- ② 항체-착색미립자 고착화된 pad
- ③ 특이항체 고착화된 membrane
- ④ Absorbent paper
- ⑤ laminated card
- ⑥ top laminates

나. 각 바이러스진단키트에서 시료의 전개

시료 적하 pad에 바이러스용액을 떨어뜨리면 용액은 시료적하 pad에서 conjugate pad로 이동하여 바이러스는 항체-착색미립자와 결합하여 같이 이동하여 1차 항체인 단일클론항체 또는 복합클론항체가 고착된 membrane 위치에서 항체와 결합하여 이동이 멈추게 됨에 따라 착색미립자가 membrane에 고착되게 되고 일부는 계속하여 이차항체인 anti-mouse IgG 또는 anti-rabbit IgG가 고착되어 있는 위치까지 이동한다. 바이러스가 없는 경우는 항체-착색미립자가 1차 항체가 고착되어 있는 곳을 통과하여 2차 항체가 있는 곳에서 이동을 멈추게 된다. 따라서 바이러스가 있는 경우는 1,2 차 항체 위치에서 2 개의 band가 눈에 보이게 되고 바이러스가 없는 경우는 2차 항체가 있는 곳에서만 1 개의 band만이 눈에 보이게 된다.

Direct (Double Antibody Sandwich) Reaction Scheme

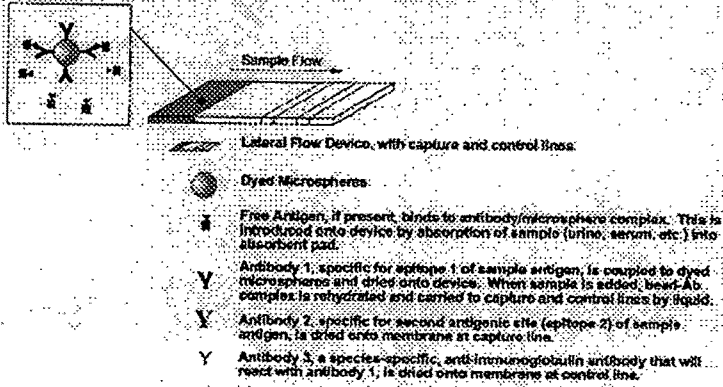


Fig. 8 Flow reaction of samples using a homogenous double antibody

다. 위에서 본 시료의 전개 (바이러스가 양성인 경우)

Typical Immunochromatography Test Strip

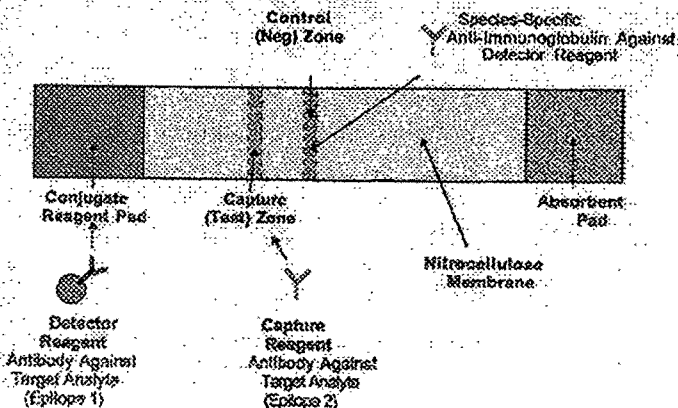


Fig. 9. Typical immunochromatography test strip

3. 돼지 위장염 바이러스 진단키트 제조

TGS25 항체 (0.5mg/ml)을 conjugate-pad에서 8mm 떨어진 위치에 Limart기기를 이용하여 syringe로 membrane에 분사하였다. 5mm 떨어진 위치에는 anti-mouse IgG 용액(2.5mg/ml)을 분사하였다. 분사가 끝나면 실은 건조기로 건조시켰다. 건조가 끝난 membrane이 있는 laminate card에 항체-착색미립자가 결합된 pad, adsorbent paper, 시료 적하 pad를 fig. 과 같이 연결하여 laminate card에 붙인다. 이렇게 제작된 돼지 위장염 바이러스 진단키트는 10^5 PFU까지 진단할 수 있었다. Fig. 에서 보는 바와 같이 돼지 위장염 바이러스가 없는 경우는 control zone에서만 band를 형성하나 돼지 위장염 바이러스가 존재하는 경우는 test zone과 control zone에 모두 band를 형성하여 2 개의 band가 눈으로 보이게 된다.

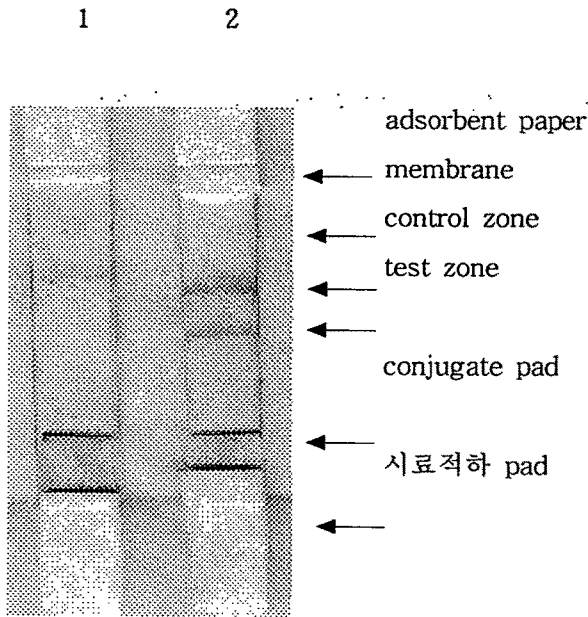


Fig. 10 Diagnosis of TGEV using a TGEV-diagnosis kit.

- 1: TGEV-free sample
- 2: TGEV positive sample

4. 돼지 유행성 설사 바이러스 진단키트 제조

복합클론항체 (1mg/ml)을 1% FBS를 가하여 37℃에서 1 시간 반응시킨뒤에 다시 4℃에서 16시간 반응시키고 12000rpm에서 20분간 원심분리하고 상등액을 conjugate-pad에서 8mm 떨어진 위치에 Limart기기를 이용하여 syringe로 membrane에 분사하였다. 5mm 떨어진 위치에는 anti-mouse IgG 용액(2.5mg/ml)을 분사하였다. 분사가 끝나면 실온 건조기로 건조시켰다. 건조가 끝난 membrane이 있는 laminate card에 항체-착색미립자가 결합된 pad, adsorbent paper, 시료 적하 pad를 fig. 과 같이 연결하여 laminate card에 붙인다. 이렇게 제작된 돼지 유행성 설사 바이러스 진단 키트는 10^5 PFU까지 진단할 수 있었다. Fig. 에서 보는 바와 같이 돼지 위장염 바이러스가 없는 경우는 control zone에서만 band를 형성하나 돼지 유행성 설사 바이러스가 존재하는 경우는 test zone과 control zone에 모두 band를 형성하여 2 개의 band가 눈으로 보이게 된다.

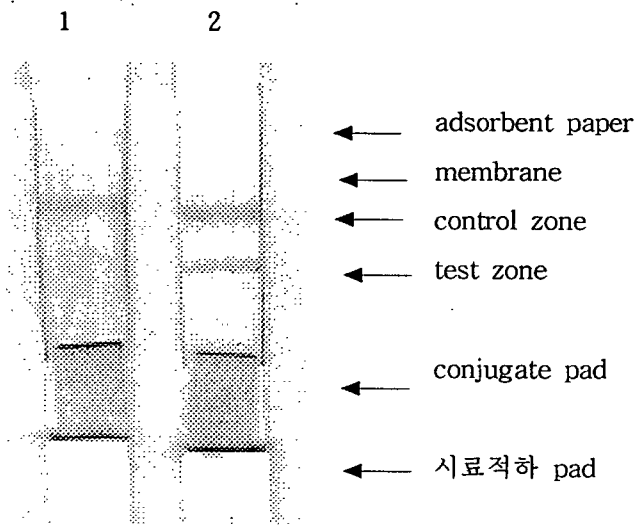


Fig. 11. Diagnosis of PEDV using a PEDV-diagnosis kit.

1: PEDV free sample

2: PEDV positive sample

5. 돼지 로타 바이러스 진단키트 제조

R10항체 (0.5mg/ml)을 conjugate-pad에서 8mm 떨어진 위치에 Limart기기를 이용하여 syringe로 membrane에 분사하였다. 5mm 떨어진 위치에는 anti-mouse IgG 용액(2.5mg/ml)을 분사하였다. 분사가 끝나면 실온 건조기로 건조시켰다. 건조가 끝난 membrane이 있는 laminate card에 항체-착색미립자가 결합된 pad, adsorbent paper, 시료 적하 pad를 fig. 과 같이 연결하여 laminate card에 붙인다. 이렇게 제작된 돼지 로타 바이러스 진단키트는 10^5 PFU까지 진단할 수 있었다. Fig. 에서 보는 바와 같이 돼지 로타바이러스가 없는 경우는 control zone에서만 band를 형성하나 돼지 로타바이러스가 존재하는 경우는 test zone과 control zone에 모두 band를 형성하여 2 개의 band가 눈으로 보이게 된다

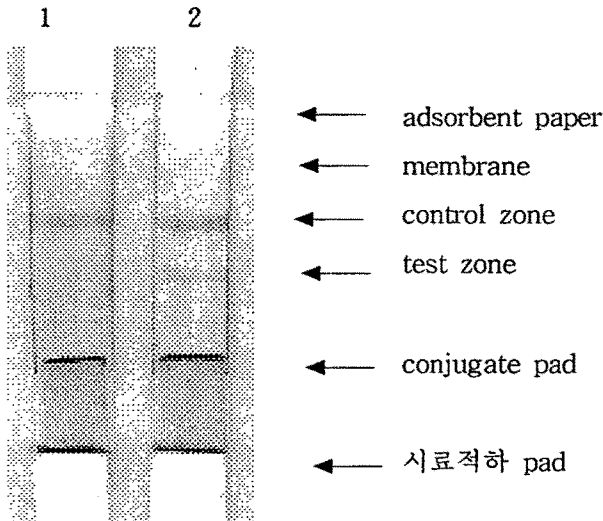


Fig. 12. Diagnosis of rotavirus using a Rotavirus-diagnosis kit.

1: rotavirus-free sample

2: rotavirus positive sample

제 4 절 임상시험

1. 임상시료

각 바이러스 진단 키트의 임상시험에 사용된 시료는 수의과학검역원에서 RT-PCR의 방법에 의하여 돼지 위장염 바이러스의 유전자가 병성감정이 확인된 분변 시료 2 종, 돼지 유행성 설사 바이러스의 유전자에 대해서 병성검정 결과 양성인 시료 10종 음성인 시료 5 종이었다.

2. 돼지 위장염 바이러스 진단키트의 임상시험

돼지 위장염 바이러스 진단키트의 임상시료로 사용된 시료는 상기 시료중 돼지 위장염 바이러스 감염으로 병성진단이 확인된 시료 2종, 돼지 유행성 설사 바이러스에 대해 감염이 양성으로 확인된 시료 3종, 음성으로 나타난 시료 3 종, 미확인된 시료 1종 이었다. 이 시험결과에서 돼지 위장염 바이러스 감염으로 병성진단된 시료 2종은 본 진단키트의 결과에서도 모두 양성으로 두 시험의 결과가 일치하였으며, 미확인된 시료도 돼지 위장염 바이러스에의 감염에 의해 설사가 유발된 것으로 추측된다. 돼지 유행성 설사 바이러스의 유전자를 이용한 RT-PCR로 돼지 유행성 설사 바이러스 감염이 확인된 시료 3 종은 매우 약한 양성을 나타냈으며 돼지 유행성 설사 바이러스 유전자가 확인되지 않은 시료 3종중 2종이 본 진단키트에서는 돼지 위장염 바이러스에 대해 양성으로 나타냈다. 이 결과의 시료들에서는 돼지 위장염 바이러스이 양성으로 확인된 시료에서는 돼지 유행성 설사 바이러스는 발견되지 않았다. 본 연구에서 제작된 돼지 위장염 바이러스 진단 키트는 아직 많지 않은 시료에 대한 결과이나 RT-PCR의 결과와 일치하고 있으며 민감도와 특이성은 유사하며 그 진단 방법의 편리성에 대해서는 RT-PCR법이나 다른 진단방법은 비교할 수 없을 정도로 본 진단키트는 분변 시료에 대해 10분 안에 바이러스 감염을 알려줄 수 있다.

표 2. 돼지 위장염 바이러스 진단키트의 임상시험

* 수의과학검역원에서 RT-PCR법에 의하여 바이러스 감염에 대하여 병성감정한 결과.

Samples	immunochromatography result	diagnosis*	
		identification	method
TGEV-p	+++	TGEV+	RT-PCR
TGEC-b	+++	TGEV+	RT-PCR
한성-1	+-	PED+	RT-PCR
한성-2	+-	PED+	RT-PCR
인화-1	+-	PED+	RT-PCR
#290	-	PED-	RT-PCR
#291	+	PED-	RT-PCR
#295-2	+	PED-	RT-PCR
diarrhea-4d	++	unknown	
virus-free	-	control	

3. 돼지 유행성 설사 바이러스 진단키트의 임상시험

돼지유행성 설사 바이러스 진단키트의 임상시료로 사용된 시료는 상기 시료중 돼지 유행성 설사 바이러스 감염이 병성진단결과 양성으로 확인된 시료 9종, 음성으로 확인된 시료 3종, 그리고 돼지 위장염 바이러스에 대해 감염이 양성으로 확인된 시료 1종 이었다. 이 시험결과에서 돼지 유행성 설사 바이러스 감염으로 병성진단된 시료 9종은 본 진단키트의 결과서도 모두 양성으로 두 시험의 결과가 일치하였으며, RT-PCR의 결과 돼지 유행성 설사 바이러스의 유전자가 발견되지 않은 시료 1종에서도 양성으로 나왔다. 돼지 위장염 바이러스에의 감염에 의한 분변은 본 돼지 유행성 설사 바이러스진단키트에서 음성으로 나왔다. 이 결과에서 돼지 유행성 설사 바이러스의 유전자를 이용한 RT-PCR법과 본 돼지유행성 설사 바이러스 진단키트의 시험결과가 분변 시료 1종을 제외하고 모두 일치하였다. 아마도 RT-PCR법과 본 진단키트와 시험결과가 차이나는 시료 1종은 mRNA 분리과정에서 probe에 대한 상보적인 서열을 갖는 mRNA가 붕괴되었을 가능성이 있다. 따라서 본 연구에서 제작된 돼지 유행성 설사 바이러스 진단 키트도 아직 많지 않은 시료에 대한 결과이나 RT-PCR의 결과와 일치하고 있으며 민감도와 특이성은 유사하며 그 진단 방법의 편리성에 대해서는 RT-PCR법이나 다른 진단방법은 비교할 수 없을 정도로 본 진단키트는 분변 시료에 대해 10분 안에 바이러스 감염을 알려줄 수 있다.

표 3. 돼지 유행성 설사 바이러스 진단키트의 임상시험

* 수의과학검역원에서 RT-PCR법에 의하여 바이러스 감염에 대하여 병성감정한 결과.

Samples	immunochromatography result	diagnosis*	
		identification	method
PED-1	+++	PED+	RT-PCR
PED-2	+	PED+	RT-PCR
PED-3	++	PED+	RT-PCR
PED-4	+++	PED+	RT-PCR
PED-5	++	PED+	RT-PCR
한성-1	+	PED-	RT-PCR
한성-2	++	PED+	RT-PCR
인화-1	++	PED+	RT-PCR
PED-oral	+	PED+	artificial infection
#290	-	PED-	RT-PCR
#291	-	PED-	RT-PCR
#295-3	+	PED-	RT-PCR
TGEV	-	TGEV+	RT-PCR
virus-free	-	control	

4. 돼지 로타 바이러스 진단키트의 임상시험

돼지 로타 바이러스 진단키트의 임상시료로 사용된 시료는 상기 시료중 돼지 위장염 바이러스 감염으로 병성진단이 확인된 시료 1종, 돼지 유행성 설사 바이러스에 대해 감염이 양성으로 확인된 시료 6종, 음성으로 나타난 시료 3 종이었고 이들 시료중에 대해서 수의과학검역원에서 로타바이러스의 감염을 병성진단한 결과는 없다. 따라서 본 연구에서 제작한 로타바이러스 진단키트에 의해 진단한 결과와 돼지 위장염 바이러스, 돼지 유행성 설사 바이러스 감염분석시험을 수행한 결과와 비교하였다. 이 시험결과에서 돼지 위장염 바이러스 감염으로 병성진단된 시료 1종은 로타바이러스 진단키트의 결과에서 음성으로 나타났으며, 돼지 유행성 설사 바이러스의 유전자를 이용한 RT-PCR로 돼지 유행성 설사 바이러스 감염이 확인된 시료 6 종 중 5 종이 양성으로 나타났으며 돼지 유행성 설사 바이러스 유전자가 확인되지 않은 시료 3종중 2종이 본 진단키트에서는 돼지 로타 바이러스에 대해 양성으로 나타냈다. 따라서 이들 2 종의 시료는 돼지 로타 바이러스 감염에 의해 유발된 설사분변으로 추정된다. 본 연구에서 제작된 돼지 로타 바이러스 진단 키트에 대한 임상시험도 앞서의 돼지 위장염 바이러스 진단키트, 돼지 유행성 설사 바이러스 진단키트와 마찬가지로 많지 않은 시료에 대한 결과이나 현재 로타바이러스가 다른 바이러스와 혼합감염되어 있을 가능성이 많은데 본 임상시험결과는 이를 뒷받침하는 결과라고 생각된다. 본 돼지 로타바이러스 진단키트도 분변 시료에 대해 10분 안에 바이러스 감염을 알려줄 수 있다.

표 4. 돼지 로타 바이러스 진단키트의 임상시험

* 수의과학검역원에서 RT-PCR법에 의하여 바이러스 감염에 대하여 병성감정한 결과.

Samples	immunochromatography result	diagnosis*	
		identification	method
PED-1	-	TGEV+	RT-PCR
PED-3	+	TGEV+	RT-PCR
한성-1	+++	PED+	RT-PCR
한성-2	++	PED+	RT-PCR
인화-1	+++	PED+	RT-PCR
#290	++	PED-	RT-PCR
#295-1	+	PED-	RT-PCR
#295-3	++	PED-	RT-PCR
TGEV	-	TGEV+	RT-PCR
PED-oral	-		artificial infection

제 5 장 참고문헌

1. Park S, Sestak K, Hodgins DC, Shoup DI, Ward LA, Jackwood DJ, Saif LJ (1998) Immune response of sows vaccinated with attenuated transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and recombinant TGEV spike protein vaccines and protection of their suckling pigs against virulent TGEV challenge exposure. *Am J Vet Res* Aug;59(8):1002-8
2. Paton D, Ibata G, Sands J, McGoldrick A(1997) Detection of transmissible gastroenteritis virus by RT-PCR and differentiation from porcine respiratory coronavirus. *J Virol Methods* Jul;66(2):303-9
3. Cornaglia E, Chretien N, Charara S, Elazhary Y (1994) Detection of porcine respiratory coronavirus and transmissible gastroenteritis virus by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Microbiol* 1994 Dec;42(4):349-59
4. Cox E, Pensaert MB, Callebaut P (1993) Intestinal protection against challenge with transmissible gastroenteritis virus of pigs immune after infection with the porcine respiratory coronavirus. *Vaccine* :11(2):267-72
5. Benfield DA, Jackwood DJ, Bac I, Saif LJ, Wesley RD (1991) Detection of transmissible gastroenteritis virus using cDNA probes. *Arch Virol* :116(1-4):91-106
6. van Nieuwstadt AP, Cornelissen JB, Zetstra T (1988) Comparison of two methods for detection of transmissible gastroenteritis virus in feces of pigs with experimentally induced infection. *Am J Vet Res* Nov;49(11):1836-43
7. Guscetti F, Bernasconi C, Tobler K, Van Reeth K, Pospischil A, Ackermann M (1998) Immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhea virus compared to other methods. *Clin Diagn Lab Immunol* May;5(3):412-4
8. Ishikawa K, Sekiguchi H, Ogino T, Suzuki S (1997) Direct and rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus by RT-PCR. *J Virol Methods* Dec;69(1-2):191-5

9. Kweon CH, Lee JG, Han MG, Kang YB (1997) Rapid diagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection by polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci Mar*:59(3):231-2
10. Carvajal A, Lanza I, Diego R, Rubio P, Carmenes P (1995) Evaluation of a blocking ELISA using monoclonal antibodies for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and its antibodies. *J Vet Diagn Invest Jan*:7(1):60-4
11. Sanekata T, Kishimoto E, Sato K, Honma H, Otsuki K, (1991) Detection of porcine rotavirus in stools by a latex agglutination test. *Vet Microbiol 1991 May*:27(3-4):245-51
12. Bellinzoni RB, Mattion NM, Matson DO, Blackhall J, La Torre JL, Scodeller EA, Urasawa S, Taniguchi K, Estes MK (1990) Porcine rotaviruses antigenically related to human rotavirus serotypes 1 and 2. *J Clin Microbiol Mar*:28(3):633-6
13. Fu ZF, Hampson DJ, Blackmore DK (1989) Detection and survival of group A rotavirus in a piggery. *Vet Rec Dec 2*:125(23):576-8
14. Shaw DP, Morehouse LG, Solorzano RF (1989) Experimental rotavirus infection in three-week-old pigs. *Am J Vet Res Nov*:50(11):1961-5
15. Pongsuwanne Y, Taniguchi K, Choonthanom M, Chiwakul M, Susansook T, Saguawongse S, Jayavasud C, Urasawa S (1989) Subgroup and serotype distributions of human, bovine, and porcine rotavirus in Thailand. *J Clin Microbiol Sep*:27(9):1956-60
16. Collins JE, Benfield DA, Duimstra JR (1989) Comparative virulence of two porcine group-A rotavirus isolates in gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res Jun*:50(6):827-35
17. Sneyers M, Thiriart C, Bruyns C, Lambert AF, Collignon C, Schwes A, Coppe P, Antoine H, Franssen JD, Urbain J, et al (1989) Detection of rotavirus in faecal specimens with a monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay: comparison with polyclonal antibody enzyme immuno-assays and a latex agglutination test. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* :12(4):95-104
18. van Nieuwstadt AP, Cornelissen JB, Zetstra T (1988) Comparison of two methods for detection of transmissible gastroenteritis virus

in feces of pigs with experimentally induced infection. Am J Vet Res
Nov:49(11):1836-43

19. Bukrinskaia AG, Rukhadze GG, Selivanov IaM, Molibog EV, Tentsov
IuIu (1988) Heterologous system of immunoenzyme analysis for the
diagnosis of human rotavirus infection and its comparison with RNA
electrophoresis. Vopr Virusol Jan-Feb:33(1):52-8

20. Ferrari M, Gualandi GL, Gelmetti D (1986) Isolation of
cytopathic strains of rotavirus from pigs. Microbiologica
Jul:9(3):287-94

21. Benfield DA, Stotz IJ, Nelson EA, Groon KS (1984) Comparison of a
commercial enzyme-linked immunosorbent assay with electron
microscopy, fluorescent antibody, and virus isolation for the
detection of bovine and porcine rotavirus. Am J Vet Res
Oct:45(10):1998-2002

22. Askaa J, Bloch B (1984) Infection in piglets with a porcine
rotavirus-like virus. Experimental inoculation and ultrastructural
examination. Arch Virol :80(4):291-303

23. Bernard S, Groom J, Lantier (1984) Experimental infection of
fattening swine with rotavirus: study of local immunity using
coproantibodies. Ann Rech Vet :15(3):425-36

24. Askaa J, Bloch B, Bertelsen G, Rasmussen KO (1983) Rotavirus
associated diarrhoea in nursing piglets and detection of antibody
against rotavirus in colostrum, milk and serum. Nord Vet Med
Dec:35(12):441-7

25. Fukusho A, Shimizu Y, Ito Y (1981) Isolation of cytopathic
porcine rotavirus in cell roller culture in the presence of trypsin.
Arch Virol :69(1):49-60

26. Takeda T, Yamagata K, Yoshida Y, Yoshino K, Nomura T (1998)
Evaluation of immunochromatography-based rapid detection kit for
fecal Escherichia coli O157. Kansenshogaku Zasshi Aug:72(8):834-9

27. Schramm W, Angulo GB, Torres PC, Burgess-Cassler A (1999) A
simple saliva-based test for detecting antibodies to human
immunodeficiency virus. Clin Diagn Lab Immunol Jul:6(4):577-80

28. Tsutsumi H, Ouchi K, Ohsaki M, Yamanaka T, Kuniya Y, Takeuchi Y, Nakai C, Meguro H, Chiba S (1999) Immunochromatography test for rapid diagnosis of adenovirus respiratory tract infections: comparison with virus isolation in tissue culture. *J Clin Microbiol* Jun:37(6):2007-9
29. Torlesse H, Wurie IM, Hodges M (1997) The use of immunochromatography test cards in the diagnosis of hepatitis B surface antigen among pregnant women in West Africa. *Br J Biomed Sci* Dec:54(4):256-9
30. Laize V, Ripoche P, Tacnet F (1997) Purification and functional reconstitution of the human CHIP28 water channel expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif* Dec:11(3):284-8
31. Uchio E, Aoki K, Saitoh W, Itoh N, Ohno S (1997) Rapid diagnosis of adenoviral conjunctivitis on conjunctival swabs by 10-minute immunochromatography. *Ophthalmology* Aug:104(8):1294-9
32. Gerentes L, Kessler N, Thomas G, Aymard M (1996) Simultaneous purification of influenza haemagglutinin and neuraminidase proteins by immunochromatography. *J Virol Methods* Apr 26:58(1-2):155-65
33. Seto NO, Gillam S. (1994) Expression and characterization of a soluble rubella virus E1 envelope protein. *J Med Virol* Oct:44(2):192-9
34. Herranen M, Vuento M. (1994) Staining of immunoblots by immunochromatography. *Anal Biochem* May 1:218(2):468-70
35. Dixon RA, Nathans D. (1985) Purification of simian virus 40 large T antigen by immunoaffinity chromatography. *J Virol* Mar:53(3):1001-4
36. Wahlstrom T, Nieminen P, Narvanen A, Suni J, Lehtovirta P, Saksela E, Vaheri A. (1984) Monoclonal antibody defining a human syncytiotrophoblastic polypeptide immunologically related to mammalian retrovirus structural protein p30. *Placenta* Nov-Dec:5(6):465-73.
37. King RM, Burke DC, Northrop F, Secher DS. (1983) Characterization and properties of a modified human interferon-alpha containing an additional 18 amino acids at the N-terminus. *J Gen Virol* Aug:64 (Pt

8):1815-8 .

주 의

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