

최 종
연구보고서

돼지 생식기호흡기증 바이러스
진단법 및 예방 백신 개발

Development of Diagnostic Methods and
Vaccine for Porcine Reproductive and
Respiratory Syndrome Virus

연구기관
충북대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “돼지 생식기호흡기증바이러스 진단법 및 예방백신개발” 연구과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 7월 일

주관연구기관명:	충북대학교
총괄연구책임자:	강 신 영
제1세부연구책임자:	강 신 영
제1협동연구기관명:	충남대학교
제1협동연구책임자:	김 현 수
제2협동연구기관명:	강원대학교
제2협동연구책임자:	한 태 옥

요 약 문

I. 제 목

돼지 생식기호흡기증 바이러스 진단법 및 예방백신 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

양돈산업은 국내 축산업 가운데 가장 국제경쟁력이 있는 것으로 평가되고 있다. 그러나 이러한 경쟁력을 유지하기 위해서는 질병의 예방 및 근절이 매우 중요하다. 특히 최근 2-3년 동안 양돈장에 많은 피해를 준 대표적인 질병 중 하나가 임신 모돈에서 번식장애와 이유자돈에서 만성 호흡기증을 야기하여 성장 지연 등 생산성 저하의 요인이 되는 돼지생식기호흡기증(Porcine reproductive and respiratory syndrome: PRRS)으로 알려져 있다. 최근 선진국에서 PRRS virus의 감염예방 및 근절은 완전 돈군재편성(total depopulation), 부분적 돈군재편성(partial depopulation) 및 백신접종 등에 의하여 수행되고 있다. 그러나 국내의 실정으로 볼 때 부분적 돈군재편성에 의한 PRRS의 근절은 양돈규모의 영세성으로 충분한 여유돈사의 확보가 어려워 실효를 거두지 못하고 있으며, 완전한 돈군재편성에 의한 PRRS의 근절은 비용이 많이 들고 또한 값진 유전자원의 손실 등으로 인하여 실시하지 못하고 있다. 백신접종에 의한 PRRS의 예방 및 근절이 현재 국내에서 가장 보편적으로 수행되고 있지만 PRRS virus 백신을 외국으로부터 전량 수입하여야 하므로 외화의 낭비와 긴 수송기간으로 백신역가의 손실이 우려된다. 또한 수입되고 있는 백신은 순화바이러스생독백신(modified live virus vaccine)이기 때문에 백신 접종 후 vaccine virus가 농장에 장기간 잔류하는 문제점이 있으며, 장차 백신 바이러스가 병원성 바이러스로의 복귀(pathogenic reversion)가능성에 대한 연구 및 대비가 요구되지만 그러한 연구는 전혀 수행되지 못하고 있다. 또한 PRRS virus는 분리된 지역 또는 국가에 따라서 항원적으로 상당한 차이를 보이는 것으로 나타났으며 이러한 차이를 분자생물학적으로 규명한 연구결과가 이미 외국에서 보고된 바 있다. 따라서 이와 같이 바이러스간의 항원적인 차이 때문에 국내 양돈장에 사용할 백신은 국내 분리 PRRS virus 주에서 선발하여 항원적, 면역학적 및 분자생물학적으로 특성을 규명한 다음 가장 항원적으로 공통적인 바이러스를 선택하여 백신 바이러스주로 사용하면 접종시 높은 방어가를 보장할 수 있을 것이다. 또한 현재와 같이 백신바이러스가

접종된 후 상당기간 동안 돈군에 잔류하는 문제점은 사독백신을 사용하면 해결될 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 안전성이 높고 백신바이러스의 잔류문제가 없는 불활화 백신의 개발이 현 시점에서 요구되고 있으며 높은 중화항체를 생산하는 사독백신을 생산하기 위하여 중화항체를 유도하는 protein을 encoding 하는 유전자를 eucaryotic cell expression system에 발현시켜 이를 불활화 백신에 첨가하는 기술의 개발이 필요하다. 현재까지 사독 백신에 중화항체를 유도하는 단백질을 유전자재조합 기법으로 생산하여 첨가한 연구는 국내외적으로 수행된 적이 없으며, 세균항원을 첨가한 혼합백신에 관한 연구도 보고된 바가 없다. 그러므로 이와 같은 첨단분자생물학적 기술을 응용한 백신 생산기술 개발에 대한 연구는 반드시 수행되어야 할 것으로 생각된다.

PRRS virus 항원성의 차이는 특정 ORF에 endoding된 구조단백질의 amino acid에 상이한 amino acid의 치환(substitytion), 삭제(deletion), 혹은 첨가(addition) 등에 의한 것으로 알려져 있다. 이러한 이유로 항원적으로 상이한 바이러스가 다양하게 존재하는 것으로 알려져 있다. 실제로 바이러스가 분리된 대륙별 또는 국가별 면역학적인 항원성의 차이가 있는 것으로 보고 되었다. 이러한 항원성의 차이는 백신의 개발, 진단법의 개발 및 나아가서는 방제기술의 확립에 지대한 영향을 주게 된다. 따라서 국내 분리 PRRS virus 주와 외국에서 분리된 바이러스 주 사이에 존재 할 수 있는 항원성 차이를 규명하기 위해서 국내 분리 바이러스 주에 대한 분자생물학적 특성을 규명하는 연구는 매우 중요한 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 1) 신속진단법개발 2) 감염실태의 역학적 분석 3) 병원체의 분자생물학적 특성 조사 4) 효과적인 예방백신개발의 목적으로 두고 있다.

국내외의 PRRS virus는 항원적으로 서로 상이한 것으로 알려져 있다. 이러한 항원적인 상이성은 백신의 효과에 영향을 미칠 뿐만 아니라 혈청학적인 진단법의 개발에도 많은 영향을 미치게 된다.

PRRS virus에 대한 분자생물학적인 특성에 관한 연구의 목적은 백신 개발을 위한 한국 표준 바이러스 주의 선별, 진단 방법의 개발, 및 방제 기술을 개발하는데 매우 중요한 바이러스 유전 정보를 제공하는 것이다. 또한 생독 PRRS virus vaccine의 사용으로 인하여 vaccine 바이러스가 백신 접종 후 일정기간 동안 농장에 잔류하는 것으로 알려져 있는데 생독백신 바이러스의 잔류를 모니터링하기 위하여 백신 바이러스와 병원성 야외 독주를 감별 진단 할 수 있는 genetic marker을 찾아내는 것이 본 연구의 또 다른 목적이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 국내 양돈산업에서 피해가 큰 PRRS 바이러스의 진단법 과 예방기술개발을 위해 세 과제로 수행하였다. 제 1세부과제에서는 PRRS virus 감염실태 및 신속진단법 개발, 제 1협동과제에서는 PRRS virus의 분자생물학적 특성 연구, 제2협동과제에서는 PRRS virus 백신개발에 대하여 각각 연구를 수행하였다. 이와 같은 연구를 통해 PRRS의 국내의 감염 및 발생현황을 파악하고 국내 분리주와 외국 분리주와의 차이점을 통해 신속진단기법 개발 및 국내 분리주를 이용한 백신 개발 등 PRRS의 예방기술을 개발하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발결과

국내에서 PRRSV의 감염실태를 혈청학적으로 조사하기 위하여 2000년 7월부터 2002년 12월까지 전국의 비육돈, 모돈 및 수태지의 혈청을 수집하여 PRRSV 특이항체를 간접형광 항체법으로 확인하여 감염실태를 조사 분석하였다. 2000년 7월부터 2002년 12월의 연구기간 동안 모두 6,696개의 돼지 혈청으로부터 PRRSV 특이항체를 검사한 결과 3,449개의 혈청에서 PRRSV 항체 양성으로 나타나 51.5%의 감염율을 보였다. 일령별로는 1일령에서 30일령, 31일령에서 40일령, 41일령에서 50일령, 51일령에서 60일령 그리고 61일령 이상의 비육돈에서의 항체 양성율은 각각 24.1%, 19.2%, 28.0%, 50.9%, 및 72.1% 나타났으며, 후보 모돈, 모돈 및 용돈에서의 항체 양성율은 각각 55.2%, 21.7% 및 33.3%로 나타났다. PRRSV 항체 양성율은 일령이 증가함에 따라 높아지는 경향을 보였으며, 51일령 이상의 돼지에서는 50% 이상의 높은 양성율을 보였다. 30일령 미만의 자돈에서 검출된 항체는 대부분 모체이행항체로 생각되며 31일령에서 40일령에서 낮은 항체율을 보인 것은 이 시기에 모체이행항체가 소멸된 것으로 생각된다. 또한 41일령에서부터 항체 양성율이 증가하는 현상은 이 시기에 PRRSV 감염이 시작되는 것으로 여겨진다.

국내에서 분리된 PRRSV를 이용하여 PRRSV 특이항체를 신속하게 확인할 수 있는 ELISA법과 PRRSV 특이 단크론항체와 면역크로마토그래피 방법을 이용하여 PRRSV를 간편하고 신속하게 확인할 수 있는 신속 진단키트를 개발하였다.

PRRSV 특이항체를 신속하게 확인할 수 있는 ELISA법으로 대장균에서 발현된 nucleocapsid(N) 단백을 이용한 간접 효소면역흡착법(i-ELISA)과 경쟁 효소면역흡착법(c-ELISA)을 개발하였다. 대장균에서 발현된 N 단백 이용하여 개발된 i-ELISA의 민감도(sensitivity)와 특이성(specificity)을 조사한 결과, 양성 검출의 민감도는 92.1%이었고 음성

검출의 특이성은 95.6%로 나타났다. 대장균에서 발현된 N 단백질과 N 단백질 특이 단클론항체를 이용하여 개발한 c-ELISA의 진단효율은 양성 검출의 민감도의 경우 75.3%, 그리고 음성 검출의 특이성은 81.0%로 나타났다.

면역크로마토그래피 방법을 이용하여 PRRSV를 간편하고 신속하게 확인할 수 있는 신속 진단키트를 개발하기 위하여 PRRSV에 특이적인 단클론 항체를 생산하였다. 총 15개의 단클론항체 중 12개는 PRRSV의 N 단백질에 특이적인 것으로 확인되었으며 이들의 역가는 IFA법으로 6,400-25,600으로 나타났다. 생산된 단클론항체의 반응성을 IFA법으로 확인한 결과, 유럽 분리주인 Lelystad를 제외한 모든 PRRSV 분리주와 반응하였다. 반면 돼지 circovirus, parvovirus, rotavirus, 그리고 TGE 바이러스와는 반응하지 않아 생산된 단클론항체가 모두 PRRSV에 특이적인 것임을 확인할 수 있었다. PRRSV N 단백질 특이 단클론항체 중 6D7을 capture antibody로 그리고 16H8을 detector antibody로 사용하여 개발된 신속 진단키트의 특이성을 확인한 결과, 유럽 분리주인 Lelystad를 제외한 모든 PRRSV 분리주와의 반응에서 양성으로 나타났고 다른 돼지 바이러스와의 반응에서는 모두 음성으로 나타나 개발된 신속 진단키트가 PRRSV에 특이성이 있음이 확인되었다. 또한 신속 진단키트의 민감도를 대장균에서 발현된 N 단백질(rGST-ORF7)을 이용하여 확인한 결과, rGST-ORF7의 농도가 0.08 ug/ml에서도 육안적으로 band가 확인되어 8 ng까지 검색할 수 있는 것으로 확인되었다. 또한 역가가 10^{7.5} TCID₅₀/ml인 PRRSV를 가지고 확인한 결과, 10^{6.5} TCID₅₀/ml까지 검색할 수 있음을 확인하였다. RT-PCR법으로 PRRSV 양성으로 확인된 가검물로부터 제작된 신속 진단키트를 이용하여 PRRSV를 확인한 결과, PRRSV 감염이 확인된 5개의 폐에서 3개, 3개의 임파절에서 2개, 그리고 2개의 유산 태아에서 2개가 모두 양성으로 판정되어 각각 60%, 67%, 100%로 나타났으며 전체적으로는 10개의 가검물 중 7개에서 양성으로 판정되어 70%의 양성율을 나타냈다.

이상의 결과로 본 연구에서 개발된 i-ELISA와 신속진단 키트는 실험실이나 양돈장에서 PRRSV의 진단에 유용하게 활용될 것으로 사료된다.

본 연구는 PRRS virus 감염이 의심되는 농장으로부터 수집된 돼지 혈청으로부터 MARC-145 cell을 이용하여 PRRS virus를 분리하고 IFA 및 분자 생물학적인 방법으로 이들 분리주가 PRRS virus임을 동정하였다. 총 2,000개의 돼지 혈청으로부터 66주의 cytopathic effects를 나타내는 virus isolates를 분리하여 동정한 결과 6주 모두가 PRRS virus임이 증명되었다. 또한 PRRS virus CNV-1 genome의 nucleotide sequence를 완전히 분석하였다. PRRS virus CNV-1의 genome은 총 15,411 nucleotide로 구성되어 있으며

genome organization에서도 CNV-1은 VR-2332 (U.S. strain)과 동일한 반면 LV(European strain)와는 다소 차이가 있었다. Strain간의 nucleotide homology 비교에서 미국 분리주인 VR2332와는 97.0%, 중국 분리 주 CH-1a 와는 90.2%의 핵산 homology를 보였으며 유럽의 분리주인 LV와는 80.2%의 핵산 상등성을 보였다. 또한 ORF 5 gene의 비교에서 CNV-1을 비롯한 한국 분리 주들은 모두 North American genotype에 속하였으며, PRRS virus field isolates 들은 nucleotide의 변이에 따라 4 개의 group으로 나눌 수 있었다. 그 중 2개의 group은 CNV-1에 나머지 2개의 group은 US strain인 VR2332와 유사한 양상을 보였다. 또한 각 group은 ORF5 아미노산 상의 특정 부분들에서 동일한 아미노산을 공유하는 것으로 나타났다. 이상의 연구결과로 볼 때 국내 분리 PRRSV CNV-1은 North American genotype에 속하는 것으로 추정할 수 있었다.

병원성 바이러스와 vaccine 의 감별진단은 MluI을 이용한 RFLP 방법으로 구분이 가능하였으며 RFLP pattern이 불분명한 것은 유전자 분석으로 감별진단을 할 수 있다. 또한 Bsr SI restriction site는 약간의 예외는 있었지만 국내 분리 주에서만 존재하는 것으로 밝혀 졌다.

분리주 66주 가운데 RFLP를 실시한 32주 가운데 19주가 병원성 야외 분리 주 이었으며 13주는 vaccine virus 또는 Vaccine-related virus로 추정되었다. 백신 바이러스가 분리된 농장에 대한 영향을 임상증상, 증체율 등을 parameter로 하여 조사한 결과 다른 대조 herds 와 차이를 발견 할 수 없었다.

돼지 생식기 호흡기증 (PRRS) 국내 분리주와 미국 분리주의 8가지 단백질중 감염에 대한 방어에 주된 역할을 하는 것으로 알려진 envelope protein인 ORF5 단백질을 대량생산하기 위해 ORF5 단백질을 유전자 재조합 기술의 하나인 baculovirus expression system을 이용하여 insect cell에서 발현시켰다. 국내분리주인 CNV-1의 ORF5유전자를 reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용하여 증폭하였다. CNV-1의 ORF5의 염기 및 아미노산 서열은 VR2332의 ORF5와 비교할 때 각각 91%와 83%의 유사성을 보인 반면에, 유럽분리주인 Lelystad virus (LV)와는 각각 57%와 49%의 유사성을 보여 국내 분리주는 미국 분리주에 가까운 것으로 나타났다. Insect cell인 Sf9 cell에서 cotransfection시킨 결과 ORF5유전자가 삽입된 recombinant baculovirus의 의한 세포변성 효과(CPE)가 관찰되었으며 감염된 cell의 상층액과 세포에서 발현된 단백질을 SDS-PAGE 로 분석한 결과 배양 상층액에는 분비되지 않고 세포막에 삽입된 형태로 나타났다. 발현된 단백질을 검출하기 위해 야외에서 PRRSV에 감염된 돼지에서 분리한 anti-PRRS antibody

를 사용하여 Western hybridization을 실시한 결과 약 44 kDa을 보이는 Glutathion S-transferase (GST)에 fusion된 ORF5가 단일 밴드로 검출되었다. 이는 anti-GST antibody를 사용하였을 때에도 동일한 크기의 band가 나타났으며 nonglycosylated form인 것으로 추정되었다. Plaque assay를 실시하여 plaque purification에 의해 순수한 ORF5만을 발현하는 recombinant baculovirus clone을 확보하였다. Recombinant baculovirus에서 ORF5유전자를 PCR을 이용하여 증폭하였고 염기서열을 분석한 결과 변이가 되지 않은 것으로 확인되었다. ORF5의 발현정도가 미약하여 3종류의 insect cell, Sf9, Sf21 및 Hi-five cell에서 발현정도를 비교한 결과 Hi-five cell에서 약간 높게 발현되는 것으로 나타났다. 발현된 ORF5 단백질을 순수정제하기 위하여 GST fusion purification kit를 사용하여 GST에 fusion된 ORF5분리한 후 thrombin으로 절단하여 GST를 제거한 결과 약 25kDa에 해당되는 ORF5가 분리되었지만 정제된 단백질의 양은 매우 낮았다. 경제적인 측면만을 고려할 때 유리한 prokaryotic cell system에서 ORF5의 발현을 시키고자 추가적인 시험을 진행중에 있다. Whole virus vaccine을 개발하기 위해 가장 높은 역가를 나타내는 배양시점을 구하기 위해 CNV-1과 VR2332를 Marc-145 cell에서 배양하였다. CNV-1이 배양 5일째에 가장 높은 역가인 평균 $10^{8.01}$ TCID₅₀/ml를 나타낸 반면 VR-2332의 경우 배양 6일째에 $10^{7.46}$ TCID₅₀/ml를 나타내어 CNV-1이 VR2332보다 증식성과 역가면에서 약간 높게 나타났다. 바이러스를 Marc-145 cell에 계대배양한 후 ORF5유전자의 변이를 관찰하였다. CNV-1을 Marc-145 cell에 10대까지 계대후, 계대배양한 바이러스에서 RT-PCR을 실시하여 염기서열을 분석한 결과 1대와 10대사이에서 염기서열은 9개, 아미노산 서열은 5개의 차이가 있었다. 이러한 변이정도는 RNA virus에 있어서는 매우 높은 것으로 추후에 정밀한 검토가 이루어져야 할 것이다. 그러나 계대배양시 ORF5에서의 변이가 심하게 나타남이 확인되었고 이러한 영향이 백신의 효용성과 관련이 있는 것으로 판단된다. Marc-145 cell에서 CNV-1과 VR2332를 접종한 후 6일까지 배양시간별 ORF5의 발현정도를 분석한 결과 시간별 정도의 차이는 없는 것으로 나타났고 매우 미약하게 검출되었다. 따라서 유전자 재조합으로 발현된 ORF5를 첨가하는 것이 백신의 효능을 제고시키는 가능성이 있다고 사료된다. CNV-1과 VR2332의 불활화 백신을 제조하였고 유전자 재조합 백신도 제조하였다. 유전자 재조합 백신, CNV-1과 VR2332의 불활화 백신을 각각 토끼에 접종한 후 항체형성을 조사한 결과 ORF5에 대한 항체가 검출되는 것으로 확인되어 면역원성이 있는 것으로 확인되었다. Baculovirus에서 PRRSV의 ORF5단백질을 발현은 매우 낮은 것으로 나타나 경제적인 면에서 이점이 없는 것으로 나타났다. 따라서 대장균에서의 GST-ORF5의 fusion 단백

질을 발현시켜 검출이 확인되었으나 보완연구가 필요하다. 국내에서 분리되는 *Mycoplasma hyopneumoniae*의 검출을 보다 신속 정확하게 하고자 conventional PCR과 nested PCR기법을 개발 확립시켰다. 두 가지 PCR방법은 특이도와 민감도에서 매우 높게 나타났고 특히 nested PCR이 민감도 면에서 conventional PCR보다 100배 정도 높은 것으로 나타났다. 총 212두의 폐병변 조직에서 배양에 의해 총 23주의 *M. hyopneumoniae* 국내분리주를 분리하였다. 국내분리주중 대표주를 선별하기 위하여 Random amplified polymorphic DNA (RAPD)기법을 확립하였으며 12개의 primer를 스크리닝하여 가장 변별력이 있는 primer를 선별하였다. 야외 *M. hyopneumoniae*분리주를 배양시 배양시간이 매우 길었으며 역가도 매우 낮게 나타났다. 따라서 백신을 제조하기 위한 높은 역가를 나타내기 위해서는 계대배양을 많이 해야될 필요가 있는 것으로 판단된다. 이상의 결과는 안전성 면에서 부작용이 대두되고 있는 PRRS 생바이러스 백신을 대체할 수 있는 유전자 재조합 및 불활화 백신 개발의 가능성을 도출한 것으로 사료되며 추가적인 실험을 통해 국내 양돈환경에 적합한 백신의 생산을 할 수 있으리라 기대된다.

2. 활용에 대한 건의

- 1) 이상의 결과로 본 연구에서 개발된 i-ELISA와 신속진단 키트는 실험실이나 양돈장에서 PRRSV의 진단에 유용하게 활용될 것으로 사료된다.
- 2) 국내분리주와 외국 분리주간의 감별진단을 수의질병진단기관에서 활용할 것으로 사료된다.
- 3) 유전자 재조합된 단백질이 첨가된 불활화된 PRRS백신은 생바이러스 백신에 비해 안전성이 높고 일반 불활화 백신에 비해 효능이 높을 것으로 사료된다. 따라서 이러한 백신의 생산기술을 산업체에 이전시킨다.

SUMMARY

(영문요약문)

Project Title: Development of diagnostic methods and vaccine for porcine reproductive and respiratory syndrome virus

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is the causative agent of reproductive failure and respiratory disorders in pigs. To investigate the prevalence of PRRSV infection in Korea, porcine sera from fattener, sow, gilt and boar were collected throughout the country from July, 2000 to December 2002 and examined the PRRSV-specific antibody by indirect fluorescence antibody(IFA) test. From a total of 6,696 porcine sera tested, 3,449 were PRRSV positive and so PRRSV infection rate was 51.5%. The PRRSV positive ratio of 1-30, 31-40, 41-50, 51-60 and more than 61 days old fattener was 24.1%, 19.2%, 28.0%, 50.9%, and 72.1%, respectively, whereas that of gilt, sow and boar was 55.2%, 21.7% and 33.3%, respectively. Results showed that the PRRSV positive ratio of the pigs increased according to the increase of age and was more than 50% for the more than 51 days old pigs. Detected antibody from under 30 days old young pigs seem to be derived mainly from maternal antibody. The low PRRSV positive ratio from pigs between 31 and 40 days old might be due to the decrease of maternal antibody in this period. The increase of PRRSV positive ratio from 41 days old pigs suggest that pigs were started to be infected with PRRSV around this age.

We developed an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) to detect and confirm the PRRSV-specific antibody using PRRSV islated in Korea. And also, rapid diagnostic kit for the detection of PRRSV was developed using PRRSV-specific monoclonal antibodies(MAbs) and immunochromatographic method. Two ELISA systems, indirect ELISA(i-ELISA) and competitive ELISA(c-ELISA), were developed using nucleocapsid(N) protein expressed in *E. coli* for the examination of PRRSV-specific antibody and evaluated . The sensitivity and specificity of i-ELISA, which was

developed using N protein expressed in *E. coli*, were 92.1% and 95.6%, respectively. However, those of c-ELISA, which was developed using N protein expressed in *E. coli* and PRRSV N-specific MAbs, were 75.3% and 81.0%, respectively.

We produced PRRSV-specific MAbs and characterized to develop a simple and rapid diagnostic kit for the detection of PRRSV using immunochromatographic method. From a total of 15 MAbs produced, 13 were confirmed as PRRSV N protein specific and the antibody titer of these MAbs ranged from 6,400 to 25,600 by IFA. The reactivity of produced MAbs with different kinds of PRRSV strains and other important porcine viruses, such as porcine circovirus type 2(PCV-2) and porcine parvovirus(PPV), was examined by IFA. Test results showed that all MAbs reacted with all PRRSV strains examined except for European isolate, Lelystad and did not react with other porcine viruses. The specificity of rapid diagnostic kit, which was developed using PRRSV N-specific MAb 6D7 and 16H8 as capture and detector antibody, respectively, was tested. From this result, it was confirmed that the developed rapid diagnostic kit was PRRSV-specific, because it was reactive with all PRRSVs except for Lelystad strain and negative with other porcine viruses. The sensitivity of rapid diagnostic kit was also tested using recombinant N protein(rGST-ORF7) expressed in *E. coli* and PRRSV infected tissue culture fluid of viral titer of $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml. It was confirmed from the result that the rapid diagnostic kit could detect up to 8 ng of rGST-ORF7 and $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml of PRRSV. The efficacy of developed rapid diagnostic kit was evaluated using field samples, which were confirmed as PRRSV positive by RT-PCR. Three samples were confirmed as positive by rapid diagnostic kit with 5 PRRSV positive lungs and 2 were positive with 3 lymph nodes and 2 were positive with 2 aborted fetus samples, indicating that efficacy of rapid diagnostic kit was 70%.

From results mentioned above, i-ELISA and rapid diagnostic kit developed in this study will be used very efficiently in the laboratories and/or pig farms for the diagnosis of PRRSV infection.

We attempted to isolate PRRS virus from swine sera collected from the swine herds with symptoms of PRRS virus infection. Of the 2,000 swine sera, the cytopathic virus isolates were isolated from 66 serum samples. The isolates were identified as PRRS

virus by the IFA test and , in a few case, by molecular analysis. The full viral genome of CNV-1 was sequence and the nucleotide sequences were compared with foreign reference PRRS virus strains. The genome size of CNV-1 was 15,411 nucleotide long. The organization of genome was identical to that of CNV-1, however, there was a slight difference in genome organization between CNV-1 and LV. The nucleotide sequence homology between CNV-1, VR2332, and Ch-1a were 97.0%, 90.2% and 80.2%, respectively. In comparison of nucleotide sequence of ORF5 genes, Korean isolates were genetically more closer to North American genotype. On the basis of nucleotide variation of ORF5 gene of field isolates, the isolates could be divided into 4 different groups. Among the 4 groups, 2 groups were genetically more closer to CNV-1, whereas, the other 2 groups belonged to VR2332 type.

Pathogenic PRRS virus and vaccine-related virus could be differentiated by the RFLP method using MluI and Bsr SI enzyme. In the cases that a few isolates had an unclear RFLP pattern, additional nucleotide sequence were conducted and used them for the differential diagnosis between pathogenic isolates and vaccine-related isolates.

Of the 32 isolates which were subjected to RFLP, 19 isolates were pathogenic PRRS virus field isolates, and 13 isolate were vaccine-related virus.

We investigated the performance of pigs and breeding pigs at swine herds where vaccine-related virus or pathogenic virus was isolated. We used the parameters such as clinical signs and daily gains to evaluate pig performance. However, there were not much differences between swine herds.

The viral genome includes eight overlapping open reading frames (ORFs). The ORF5, one of the major glycoproteins is known as the immunologically important structural protein associated with virus neutralization. The genes encoding the ORF5 of Korean isolate of PRRSV, CNV-1 and American PRRS strain, VR2332, was amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), cloned and sequenced, respectively. The nucleotide and amino acid sequences of the ORF5 of CNV-1 shared 91% and 83% identity with American isolate (VR2332 strain) and 57% and 49% identity with European isolate (Lelystad strain), respectively. For the expression and easy purification of the ORF5, cDNA containing complete sequence of the ORF5 was cloned

into baculovirus transfer vector, which was fused with glutathione S-transferase (GST) and recombinant baculovirus transfer vector was transfected into Sf9 cells. GST-ORF5 fusion protein was detected in Sf9 cells by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western immunoblot analysis. Nucleotide analysis confirmed that the recombinant baculovirus from Sf9 cells contained complete gene of ORF5. Only ORF5 was expressed in Insect cells as detected by PRRS-specific pig antisera and anti-GST mouse antisera. Only single form with Mr approximately 44 kDa was found and this was speculated nonglycosylated form without N-terminal sequence. In order to determine optimal harvesting point of virus and to compare growth curve of both viruses, Marc-145 cells were infected with each of viruses. The growth curves for CNV-1 were similar to those of VR2332 but growth of CNV-1 was slightly faster than that of VR2332. Moreover, the titers of CNV-1 slightly higher than the titers obtained for the VR2332.

Nine nucleotides random mutations appeared in ORF 5 after 10 in vitro passages of CNV-1 isolate in Marc-145 cell. These resulted in 5 amino acid change and such high mutation rate is surprisingly exceptional for RNA viruses. Inactivated vaccine containing CNV-1, VR2332 and recombinant vaccine containing ORF5 were produced, respectively. These vaccines were injected into rabbit separately and induced PRRSV specific antibody.

Mycoplasma hyopneumoniae is the primary agent of swine mycoplasmal pneumonia which causes high economic losses in swine industry due to reduced growth rate and feed conversion efficacy. Although detection method of *M. hyopenumoniae* by polymerase chain reaction (PCR) has been developed previously, we modified the PCR method for rapid and best result from lung tissues and confirmed the amplification by nucleotide sequencing. A 649-bp DNA fragment of 16S rRNA gene from *M. hyopneumoniae* was amplified by the conventional PCR, whereas a 352-bp DNA fragment was amplified by the nested PCR. No amplification was observed from any other swine respiratory disease-related bacteria. The conventional PCR method was very sensitive enough to detect even 100fg of template DNA whereas the neste PCR was one hundred times sensitive than the conventional PCR. Sequencing of 649-bp PCR product

demonstrated that the nucleotide sequences were type-specific. Two hundred twelve lung samples from slaughtered pigs were tested for *M. hyopneumoniae* by cultivation and by PCR. From those samples, 23 *M. hyopneumoniae* were isolated by cultivation. Comparing both PCR method, the nested PCR is exceedingly more adequate for detection of *M. hyopneumoniae* from clinical samples than the conventional PCR. A random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting method has been applied for examining genetic diversity of other mycoplasma species. As a preliminary experiment, a total of 12 universal rice primers were screened with several mycoplasma species to select an appropriate primer. Among those primers, URP-1 could be suitable for the differentiation of mycoplasma strains. The growth of *M. hyopneumoniae* isolate was very slow and showed low titer. Therefore, field isolate should be passaged many times to have high titer for the production of vaccine.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter I. Introduction	13
Chapter II. Materials and Methods	17
The 1st Subtitle	17
The 1st Co-operative Project	34
The 2nd Co-operative Project	41
Chapter III. Results	55
The 1st Subtitle	55
The 1st Co-operative Project	86
The 2nd Co-operative Project	113
Chapter IV. References	145

목 차

제 1 장	서 론	13
제 2 장	연구수행방법	17
1. 제 1	세부과제	17
2. 제 1	협동과제	34
3. 제 2	협동과제	41
제 3 장	연구수행내용 및 결과	55
1. 제 1	세부과제	55
2. 제 1	협동과제	86
3. 제 2	협동과제	113
제 4 장	참 고 문 헌	145

제 1 장

서 론

돼지 생식기호흡기증후군(Porcine reproductive and respiratory syndrome: PRRS)은 모돈에서 유사산 및 허약자돈 분만 등의 번식장애 그리고 자돈 및 비육돈에서는 간질성 폐렴과 관련된 호흡기 증상을 특징으로 하는 전염성 질병으로 원인체는 *Arteriviridae* 과에 속하는 바이러스로 피막을 가지고 있으며 유전자는 positive sense, single-stranded RNA로 되어 있다. PRRSV의 유전자는 약 15 kb의 크기로 subgenomic mRNA가 서로 overlapping 되어 있는 8개의 open reading frames(ORFs)으로 구성되어 있다. PRRSV는 주요 구조단백질인 nucleocapsid 단백질(N: 14-15 kDa), nonglycosylated membrane 단백질(M: 18-19 kDa), 그리고 피막에 있는 당단백질(E: 25-26 kDa)로 구성되어 있다.

국내에서는 1993년 처음으로 PRRSV의 분리가 보고 되었으나 보관된 돼지 혈청에 대한 PRRSV 특이항체 검사 결과에 따르면 이미 1980년대 후반부터 발생이 되었던 것으로 추정된다. 양돈농가의 PRRSV 감염을 진단하기 위해서는 바이러스의 분리 동정, 바이러스 항원의 증명, 바이러스 특이항체의 검출 등 다양한 방법이 이용되고 있으나 PRRS 예방접종을 실시하지 않은 돈군의 경우에는 혈청학적 진단법을 이용하여 감염여부를 용이하게 확인할 수 있을 뿐만 아니라 감염상황에 대한 역학정보도 얻을 수 있어 유용한 진단법으로 간주되고 있다.

본 연구에서는 국내에서 PRRSV의 감염실태를 혈청학적으로 조사하기 위하여 다양한 일령의 비육돈은 물론 모돈과 숫돼지의 혈청을 수집하여 PRRSV 특이항체를 간접형광항체법으로 확인하여 감염실태를 조사 분석하였다.

PRRS는 1987년 미국에서 처음 발견된 이후 급속히 캐나다로 퍼졌으며 유럽에서는 1990년 독일을 중심으로 여러 유럽나라로 빠르게 전파되었고 최근에는 아시아의 필리핀, 일본뿐 아니라 국내에서도 발견되고 있다.

PRRSV 감염을 진단하기 위해서는 바이러스 분리 동정, 바이러스 항원의 증명, 바이러스 특이항체의 검출 등 다양한 방법을 이용할 수 있다. 전통적인 바이러스 분리 동정법 외에 유전자 진단법인 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction: PCR)법이 있으며 항체진단법으로는 혈청중화시험(Serum neutralization assay: SNA), 면역효소단층법

(Immunoperoxidase monolayer assay: IPMA), 간접형광항체법(Indirect fluorescence antibody: IFA), 효소면역흡착법(Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) 등이 있다. 이들 혈청학적 진단 방법 중 가장 일반적인 것은 IFA이며 이는 IPMA와 더불어 민감한 검사방법으로 알려져 있다. 그러나 두 검사방법 모두 조직배양을 통해 항원을 준비하여야 하고 이 방법을 주로 사용하고 있는 유럽에서는 야외 바이러스가 돼지 폐포 탐식세포에서만 증식하는 조직친화성을 가지고 있기 때문에 진단법으로 사용하기에는 번거로움이 있다. 바이러스 전체를 항원으로 이용한 간접 ELISA 역시 IFA에 비해 민감도와 특이도가 높고 다량의 샘플을 처리할 수 있는 장점이 있지만 정제된 바이러스를 항원으로 사용해야 하므로 이로부터 추출된 바이러스 단백질의 양이 적고 또한 같은 genotype인 미국 분리주들 사이에도 항원적으로 매우 다르기 때문에 false-negative 판단의 위험이 뒤따라 진단을 위한 방법으로 사용하기에는 적합하지 않다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 최근에는 곤충 세포나 대장균 발현체계를 이용하여 생산된 재조합 단백질을 항원으로 사용하여 PRRSV 특이항체를 검출할 수 있는 간접 혹은 경쟁적 ELISA가 개발되고 있다. 이 진단방법은 바이러스 전체를 항원으로 이용하고 있는 현 방법에 비해 비교적 경제적이고 민감도가 높으며 간편하다는 이점을 가지고 있다.

면역크로마토그래피(Immunochromatography) 원리를 이용한 진단법은 민감도와 특이도가 우수한 방법으로 혈청이나 분비물을 사용하여 10분 내에 신속히 판정을 내릴 수 있어 숙련된 전문가가 아니라도 즉석에서 쉽게 사용할 수 있다는 것이 최대의 장점이다. 이를 이용한 진단법은 이미 사람 의학 분야의 경우, 여러 가지 질병에 대하여 진단법이 개발되어 사용되고 있으며 수의학 분야에서도 몇몇의 질병에 대해서는 개발되어 사용되고 있다. 하지만 국내에서는 개발된 제품을 수입하여 사용하고 있는 실정이다.

본 연구에서는 국내에서 분리된 PRRSV를 이용하여 PRRSV 특이항체를 신속하게 확인할 수 있는 ELISA법과 PRRSV 특이 단클론항체와 면역크로마토그래피 방법을 이용하여 PRRSV를 간편하고 신속하게 확인할 수 있는 신속진단키트를 개발하는 것을 목적으로 하였다.

PRRS virus의 분자생물학적 특성 규명은 PRRS virus의 특성을 이해함으로써 예방대책 수립, 국내 표준 바이러스 주의 선택, 예방백신의 개발, 질병의 진단법의 개발 등을 위하여 필수적인 연구이다. 이를 위하여 본 연구에서는 야외에서 수집된 혈청으로부터 PRRS 바이러스를 분리 동정하였다. 이들 가운데 국내 분리 주 CNV-1 PRRS virus의 유전자를 완전히 분석하였으며 국외의 reference strain들과 포괄적인 유전적 특성을 비교 하였을 뿐만

아니라 구조단백질 및 비구조 단백질을 coding 하는 각각의 유전자에 대하여도 상호 비교하였다. PRRS는 virus가 그 원인체 이므로 대증요법 이외에는 별다른 치료법이 없음이 주지의 사실이다. 따라서 최근 PRRS virus 감염으로부터 돼지를 보호하기 위하여 자돈 및 육성 돈에서 백신이 사용되고 있다. 그러나 백신 접종 돈군에서 PRRS virus의 감염상태를 monitoring 하는데 어려움을 주고 있다. 그 이유는 현재 사용되고 있는 간접형광항체법이나 ELISA 등의 혈청학적 진단법이 야외 PRRS virus strain과 PRRS 백신 strain에 대한 감별 진단이 불가능하기 때문이다. 따라서 백신을 사용한 돈군에 대해서 야외 병원성 PRRS virus의 감염 및 백신 유래 바이러스의 잔류 여부 확인하기 위하여 야외 PRRS 바이러스와 백신 유래 약독 순화바이러스를 감별할 수 있는 방법의 개발이 절실히 요구된다. 특히 최근 PRRS virus 백신을 접종한 농장에서 수집한 혈청으로부터 PRRS virus가 분리되고 있으며 이러한 분리 PRRS virus가 백신 유래의 순화약독바이러스인지 또는 야외 병원성 PRRS virus인지 감별할 수 없기 때문에 백신접종 후 농장의 PRRS virus감염상태 (또는 재감염상태)를 monitoring하고 지속적인 PRRS virus 예방 및 근절대책을 추진하는데 어려움이 있다. 현재 까지 사용되고 있는 병원성 PRRS virus와 백신 virus의 감별진법은 ORF5를 RT-PCR로 증폭한 다음 restriction endonuclease를 이용한 restriction fragment length polymorphism(RFLP)의 분석법에 기초를 두고 있다. 그러나 최근 본 연구 조사에 의하면 소수의 PRRS virus isolates에서 기존의 RFLP pattern이 불분명한 경우가 있는 것으로 확인되었기 때문에 보다 광범위한 야외 분리 바이러스의 ORF5 gene의 염기서열을 분석하여 기존의 RFLP 법을 보완하였다.

PRRS백신은 현재까지 주로 약독화시킨 생 바이러스 백신을 사용하고 있으나 미국 및 유럽에서 약독화 바이러스가 돈군에서 역계대가 되어 병원성을 회복하거나 야외바이러스와의 재조합등이 일어나 새로운 바이러스가 생성되는 등 백신의 안전성면에서 문제가 되고 있다. 이러한 안전성 문제가 지적되어 최근에는 불활화백신이 개발되어 상용화 되고 있다. 그러나 앞서 언급했듯이 PRRS virus는 지역간에 많이 차이가 나고 있으며 특히 PRRS의 방어에 밀접하게 관련이 있는 ORF5단백질도 분리주간에 차이를 나타내고 있다. 따라서 국내에 적합한 안전한 백신을 개발하기 위해 국내분리주를 근간으로 하는 새로운 백신의 개발을 위해 본 연구를 수행하였다.

제 2 장

연구 수행 방법

제 1 절 :

제 1세부과제: 돼지 생식기호흡기증 바이러스의 감염실태 및 신속진단법 개발

1. 돼지 생식기호흡기증후군 바이러스의 감염실태

가. 세포

PRRSV에 감수성이 있는 MARC-145 세포는 10% 소 태아혈청(Fetal bovine serum: FBS)과 항생제가 함유된 alpha minimum essential medium(α -MEM)으로 배양하였다.

나. 돼지 혈청

2000년 7월부터 2002년 12월까지 전국의 비육돈, 모돈 및 숫돼지로부터 수집한 돼지 혈청을 사용하였으며 모든 혈청은 실험 전 56°C에서 30분간 비동화한 후 사용하였다.

다. 간접형광항체법(Indirect fluorescence antibody test: IFA)

양돈장에서 PRRSV에 대한 감염실태는 IFA 방법을 이용하여 다음과 같이 조사하였다. 즉, MARC-145 세포 단층이 형성된 96-well plate에 PRRSV(CNV strain)를 m.o.i가 0.01되도록 접종한 후 CPE가 나타나기 바로 직전에 cold ethanol로 고정하고 인산완충용액(Phosphate buffered saline: PBS)로 2회 세척하였다. 검사하고자 하는 돼지 혈청을 1:25로 희석하여 고정된 plate에 well당 100 μ l 첨가한 후 37°C, incubator에서 45분간 방치하였다. 45분간 반응 후 각 well을 PBS로 3회 세척하고 1:50으로 희석된 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated rabbit anti-swine IgG를 well 당 50 μ l씩 접종하였다. 위와 같은 조건으로 30분간 반응시킨 다음 PBS로 3회 세척하고 형광현미경으로 형광유무를 관찰하였다.

2. 돼지 생식기호흡기증후군 바이러스의 신속진단법 개발

가. PRRSV 발현단백질을 이용한 효소면역흡착법(ELISA) 개발

1). 재료 및 방법

가). 바이러스 및 세포

본 연구에서 사용한 PRRSV는 충남대학교 수의과대학에서 분양 받은 CNV strain으로 원숭이 신장세포 유래인 MA104 세포로부터 크로닝한 MARC-145 세포에 배양하였다. MARC-145 세포는 10% 소 태아혈청(Fetal bovine serum: FBS)과 항생제가 함유된 alpha minimum essential medium(α -MEM)으로 배양하였다.

나). 바이러스 핵산 추출

조직배양에서 증식한 CNV로부터 RNA추출은 Chomczynski 등의 방법을 응용하여 다음과 같이 실시하였다. CNV 감염 배양액을 얼리고 녹이는 과정을 3회 실시한 후 배양액 600 μ l에 0.1 volume의 10% sodium dodecyl sulfate(SDS)와 2 M sodium acetate 30 μ l을 넣고 동량의 phenol을 넣어 잘 섞은 다음 15,000 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 상층액에 phenol-chloroform을 넣어 잘 섞은 후 원심 분리하여 조심스럽게 취한 상층액에 2 M sodium acetate와 isopropyl alcohol을 넣어 가볍게 섞은 후 원심 분리하여 상층액을 버리고 70% 에탄올로 2회 세척하였다. Pellet을 원심진공농축기(Spinvac, Hanil Corp.)로 건조시키고 DEPC(diethyl pyrocarbonate)처리된 증류수로 용해시켜 -20°C 에 보관하였다.

다). Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)

PRRSV 유전자(ORF7, ORF6, ORF5)는 각각의 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 RT-PCR법으로 증폭시켰다. 각각의 유전자에 특이적인 primer의 유전자 염기서열은 GenBank의 자료를 기초로 Table 1-5와 같이 제작하였으며 크로닝을 위해 5' 방향에 2개의 제한효소 site인 *Bam* HI(sense primer)과 *Eco* RI(antisense primer)를 추가하여 작성하였다. 추출한 RNA 샘플 10 μ l에 1 μ l의 reverse primer를 넣고 95°C 에서 5분간 변성시킨 후 얼음에 옮겨 5분간 방치하였다. 10,000 rpm에서 5~10초간 원심한 후 DEPC 처리된 증류수 20 μ l, 5X first strand buffer 10 μ l, 0.1 M DTT 5 μ l, 10 mM dNTP 2 μ l, RNase inhibitor 1 μ l, reverse transcriptase(200 U/ μ l) 1 μ l을 순서대로 넣어 반응용량 50 μ l를 37°C 에서 60분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA template 10 μ l에 DEPC 처리된 증류수 63 μ l, 10X PCR buffer 10 μ l, 25 mM MgCl_2 12 μ l, 10 mM dNTP 2 μ l, forward primer 1 μ l, reverse primer 1 μ l, Taq DNA polymerase(5 U/ μ l) 1 μ l를 넣어 전체 반응용량 100 μ l를 pre-PCR($95^{\circ}\text{C}/5$ min), PCR(denaturation $94^{\circ}\text{C}/10$ sec, annealing 5

0°C/30 sec, extension 72°C/30 sec, 25 cycles) 그리고 post-PCR(72°C/7 min)을 핵산증폭기 (GeneAmp PCR system 2400)를 사용하여 실시하였다. 반응산물은 1% agarose gel 상에서 전기영동한 뒤 ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였으며 증폭된 각각의 유전자 크기는 1 kb DNA ladder를 같이 전기 영동함으로써 확인하였다.

Table 1-5. Oligonucleotide primers for RT-PCR

Gene		Sequence(5' → 3')	Size(bps)
ORF7	+ sense	TTGGATCCATGCCAAATAACAACGGC	371
	- sense	TTGAATTCTCATGCTGAGGGTGATGC	
ORF6(Full)	+ sense	GCCGCCGGATCCATGGAGTCGTCCTTAGA	525
	- sense	GCCGCCGAATTCTCTCTTCTGCTGCTTGCC	
ORF6(Partial)	+ sense	GCCGATGGATCCGTGTACTCAGCCATAGAA	319
	- sense	GCCGCCGAATTCTCTCTTCTGCTGCTTGCC	
ORF5	+ sense	TTGGATTCATGTTGGGGAAATGCTTG	612
	- sense	TTGAATTCCTAAGGACGACCCCATTC	

(Underline: Restriction endonuclease site)

라). PRRSV 유전자 크로닝 및 발현

(1). ORF7 유전자(Nucleocapsid protein: N 단백) 크로닝 및 발현

(가). ORF7 유전자 크로닝

ORF7 유전자의 PCR 반응산물은 pGEM[®] T easy vector system II(Promega)를 이용하여 제조사의 술식에 따라 크로닝하였다. ORF7 유전자가 삽입된 ligate를 선택하기 위하여

ampicillin(50 mg/ml)이 첨가된 Lennox L(LB) agar에 isopropylthio- β -D-galactoside(IPTG, 20 mg/ml) 40 μ l와 5-bromo-4-chloro-3-indoly- β -D-galactoside (X-gal, 20 mg/ml in DMSO) 40 μ l를 도말 후 형질 전환된 *E. coli*를 도말하였다. 37°C에서 24시간 동안 배양한 LB/ampicillin/IPTG/X-gal 배지에서 하얀 집락만을 골라내어 ampicillin이 첨가된 LB broth 3 ml에 접종하고 37°C에서 10시간 동안 현탁 배양하였다. 배양된 *E. coli*로부터 플라스미드 추출은 Chowdhury에 의한 one step plasmid mini-preparation방법을 사용하였다. 추출된 플라스미드는 *Eco* RI(10 U/ μ l)으로 37°C에서 1시간 반응하여 벡터와 insert를 쪼갠 후 1% agarose gel 상에서 전기 영동하여 insert의 삽입유무와 크기를 확인하였다.

(나). 발현벡터 작성

ORF7 cDNA와 pGEX 4T-1 vector를 제한효소 *Bam* HI과 *Eco* RI으로 처리한 후 ligation과정을 거쳐 expression vector pGEX-ORF7을 제작하였다. 제작된 vector는 BL21 *E. coli* cell을 이용하여 제조사의 술식에 따라 크로닝하였다. ORF7 유전자가 삽입된 ligate를 선택하기 위하여 ampicillin(50 mg/ml)이 첨가된 LB agar에 형질 전환된 *E. coli* cell을 도말하였다. 37°C에서 24시간 동안 배양한 LB/ampicillin 배지로부터 여러 집락을 취하여 ampicillin이 첨가된 LB broth 3 ml에 접종하고 37°C에서 10시간 동안 현탁 배양하였다. 배양된 *E. coli*로부터 Chowdhury에 의한 one step plasmid mini-preparation방법으로 플라스미드를 추출하고 추출된 플라스미드는 *Bam* HI과 *Eco* RI 으로 37°C에서 1시간 반응하여 벡터와 insert를 쪼갠 후 1% agarose gel 상에서 전기 영동하여 insert의 삽입유무와 크기 그리고 방향을 확인하였다. 또한 negative control로 사용하기 위하여 어떠한 유전자도 삽입하지 않은 pGEX 4T-1 vector를 BL21 *E. coli* cell을 이용하여 같은 방법으로 크로닝하였다.

(다). N 단백질 발현

ORF7 유전자의 삽입과 크기 그리고 방향이 확인된 *E. coli*를 2X YT broth를 이용하여 37°C에서 18시간동안 현탁 배양하였다. 배양액을 1:10으로 희석하여 600nm에서 O.D(Optical density)값이 0.6-1.0이 되도록 37°C에서 1.5-2시간동안 현탁 배양하였다. 배양액에 IPTG의 최종농도가 0.1 mM이 되도록 첨가하여 37°C, 300 rpm에서 4시간동안 현탁 배양하였다.

IPTG를 이용하여 발현을 유도시킨 *E. coli*로부터 inclusion body를 얻는 과정은 Protein

refolding kit(Novagen)를 사용하여 제조사의 술식에 따라 실시하였다. 간단히 기술하면 먼저 발현이 유도된 *E. coli*를 6,500 x g에서 15분간 원심하여 세포를 가라앉힌 후 inclusion body wash buffer(IB wash buffer)에 부유시켰다. 부유시킨 세포를 sonication하여 10,000 x g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 pellet을 얻었다. Pellet을 IB wash buffer로 2회 세척한 후 원심하여 pellet을 다시 얻었다. Pellet에 0.3% N-lauroylsarcosine 이 포함된 inclusion body solubilization buffer를 첨가하여 실온에서 15분간 반응시킨 후 10,000 x g에서 10분간 원심하여 상층액을 얻어 inclusion body를 수집하였다.

(라). N 단백질 확인 및 정제

대장균에서 ORF7 단백질의 발현유무는 Western blotting법으로 GST 항체와 ORF7 특이 단백항체를 이용하여 다음과 같은 방법으로 확인하였다. 즉, 대장균에서 발현된 GST 발현단백질과 GST-N 발현단백질의 상층액 및 cell lysate를 sample buffer(60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 25% glycerol, 1.44 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)와 1:5의 비율로 섞어 100°C에서 5분간 끓여 변성시켰다. 이를 12.5% SDS-polyacrylamide gel에서 2시간동안 80 volt로 전기영동을 한 다음 gel을 꺼내어 transfer buffer(15.6 mM Tris base, 120 mM Glycine, pH 8.1~8.4)에 30분간 담구어 두었다. 미리 transfer buffer에 담가 놓은 filter paper(Bio-rad)와 nitrocellulose membrane (NENTM Life Science Products)사이에 gel을 넣어 semi trans-blot(Bio-rad)를 이용하여 13V에서 20분간 전이시켰다. Nitrocellulose membrane을 5% non-fat dry milk/tris buffered saline(10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5: TBS)에서 하룻밤 동안 blocking 시킨 후 TBS로 강하게 흔들며 3회 세척하였다. 1차 항체로 GST 항체와 ORF7에 특이적인 단백항체를 사용하여 1시간 동안 실온에서 흔들며 반응시켰다. TBS로 3회 세척한 후 2차 항체로 alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-goat IgG와 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG(Kirkegaard Perry Laboratory)를 1:2,000으로 희석하여 1시간 반응시킨 뒤 이를 TBS로 3회 세척하였다. 발색제로 NBT/BCIP stock solution(Promega)을 alkaline phosphatase buffer(0.1 M Tris-HCl, pH 9.5, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂) 10 ml에 섞어 사용하였다.

(2). ORF6 유전자(Membrane protein: M 단백질) 크로닝 및 발현

(가). ORF6 유전자 크로닝

전체 ORF6 유전자와 부분적인 ORF6 유전자의 PCR 반응산물은 pGEM[®] T easy vector system II를 이용하여 ORF7 유전자 크로닝과 동일한 방법으로 크로닝하였다.

(나). 발현벡터 작성 및 M 단백질 발현

각각의 cDNA와 pGEX 4T-1 vector를 사용하여 ORF7 유전자와 동일한 방법으로 발현 벡터 즉, 전체 ORF6 cDNA를 이용한 pGEX-ORF6/F와 부분적인 ORF6 cDNA를 이용한 pGEX-ORF6/P를 제작하였다. 각각의 유전자의 삽입과 크기 그리고 방향이 확인되어 형질 전환된 *E. coli*를 이용하여 ORF7과 동일한 방법으로 대장균에서 M 단백을 발현시켰다.

(3). ORF5 유전자(Envelope glycoprotein: E 당단백) 크로닝 및 발현

(가). ORF5 유전자 크로닝

RT-PCR에 의해 증폭된 ORF5 유전자를 1%의 agarose gel에서 전기영동한 후 gel상에 나타난 band를 따라 절단한 후 QIAEXII gel extraction kit를 이용하여 DNA를 extraction 하였다. 증폭된 ORF5 유전자의 염기서열을 확인하기 위해 pGEM T easy vector system 을 이용하여 cloning한 후 염기서열을 분석하였다. 염기서열을 분석한 후 pGEM T easy vector에 삽입된 ORF5유전자를 *Bam* HI과 *Eco* RI으로 처리하여 전기영동에 의해 분리, extraction한 후 baculovirus expression을 위한 transfer vector인 pBacPAK9의 *Bam* HI과 *Eco* RI site에 다시 cloning하였다. 정확히 cloning된 plasmid를 Qbiogene miniprep kit를 이용하여 증폭한 후 transfection의 재료로 사용하였다.

(나). ORF5 유전자 발현

① Sf21 세포 배양

Transfection과 plaque assay 등을 위해 TNM-FH 배지를 사용하여 27°C에서 배양하였다.

② Transfection

Sf21 세포를 3개의 60 mm tissue culture plate에 각각 2×10^6 개가 되도록 준비하였다. Recombinant virus 생산을 위해서는 recombinant plasmid DNA $20 \mu\text{l}$, BacPAK6 viral DNA $5 \mu\text{l}$ 와 Bacfectin $4 \mu\text{l}$ 를 넣어 혼합하였다. 혼합물을 15분간 정치시키는 동안 tissue culture plate에 있는 Sf21 세포를 세척하였다. Transfection 혼합액을 plate 전체에 방울방울 떨어뜨리고 실온에서 4시간 동안 배양한 후 TNM-FH 배지 1 ml을 첨가하였다.

Negative control로는 바이러스를 접종하지 않은 세포를, positive control로는 wild-type AcMNPV virus 10 μ l를 접종하여 주었다. 27°C의 조건에서 3일간 배양하여 현미경 하에서 transfection된 plate의 세포형태와 positive control/negative control의 세포형태를 비교하여 바이러스의 증식유무를 확인하였다.

③ Plaque assay

Transfection 후 바이러스의 생성이 확인되면 ORF5 유전자를 발현하는 recombinant 바이러스의 순수 분리를 위해 plaque assay를 실시하였다. 3개의 100 mm tissue culture plate에 Sf21 세포를 각각 7×10^6 을 분주하고 viral transfection 용액을 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} 으로 희석하여 100 μ l씩 접종한 후 27°C에서 1시간 동안 바이러스가 세포에 흡착되게 배양하였다. Agarplaque plusTM agarose를 증류수에 2%로 만들어 microwave에서 녹인 후 45°C의 water-bath에서 정치시키고 동량의 2X TNM-FH와 섞어서 최종적으로 0.8-1%의 agarose가 되도록 하였다. Plate에서 배지를 완전히 제거한 후 앞에서 준비한 agarose gel을 감염 세포 위에 overlay한 뒤 27°C에서 10일 동안 incubation하였다. 10일 후 현미경으로 plaque가 형성되었는지 일단 확인을 하고, 10개 정도의 plaque를 micropipette으로 선택하여 1 ml의 TNM-FH medium이 담긴 microcentrifuge tube에 각각의 plaque 채집물을 부유시켰다. 그리고 바이러스를 용출하기 위하여 4°C에서 rotating시키면서 18시간동안 방치하였다. 한편 12-well plate에는 11개의 well에 각각 Sf21 cell을 2×10^5 개의 cell을 분주하고 plaque pickup한 것을 500 μ l를 접종하고 27°C에서 3일간 incubation하였다. 바이러스의 역가를 높이기 위해 3일 후에 상층액을 취하여 1,000 \times g, 4°C에서 5분간 원심한 뒤 다시 상층액을 Sf21 세포에 접종하였다.

④. 발현단백 확인

CPE가 확인되면 viral supernatant와 cell을 분리하여 수거한 뒤 SDS-PAGE와 Western blotting법으로 발현된 단백질의 유무를 확인하였다.

마). 효소면역흡착법 (ELISA) 개발

PRRSV에 특이적인 항체를 검색하기 위하여 indirect sandwich ELISA(i-ELISA)와 competitive ELISA(c-ELISA)를 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

(1) i-ELISA의 표준화

i-ELISA는 Fig. 1-1에 따라 표준화 하였다.

(가). 발현단백질 농도조건 설정

GST 항체($5 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 pH 7.4로 적정된 0.01 M PBS에 희석하여 ELISA plate(Nunc)에 well당 $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 37°C 에서 1시간동안 교반을 통해 흡착시킨 후 세척용 완충액 (0.01 M PBS, 0.05% tween 20)으로 3회 세척하였다. 이 후 blocking buffer(5% skim milk in 0.01 M PBS)에 1:100부터 시작하여 2진법으로 단계 희석한 GST-N 발현단백질과 대조군으로 GST 발현단백질을 각 well당 $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 37°C 에서 1시간동안 반응시켰다. 세척용 완충액으로 3회 세척한 후 1차 항체로 ORF7 특이 단클론항체를 1:1,000과 1:10,000으로 각각 희석한 후 well당 $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. 37°C 에서 1시간동안 반응시킨 후 세척용 완충액으로 3회 세척하였다. 3회 세척 후 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG를 1:2,000으로 희석하여 1시간 반응시켰다. 세척용 완충액으로 3회 세척한 후 기질용액(o-phenylenediamine dihydrochloride in citrate phosphate buffer, pH 5.2)에 과산화수소가 0.015% 되도록 가하여 즉시 각 well당 $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가하고 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 이 후 1 M H_2SO_4 용액을 well당 $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 반응을 정지시킨 후 492nm에서 흡광도를 측정하였다.

(나). 혈청 희석농도 결정

GST 항체를 가)의 방법과 동일하게 흡착시킨 후 세척용 완충액으로 3회 세척하였다. 이 후 blocking buffer에 동일한 농도로 희석한 발현단백질을 각 well당 $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 37°C 에서 1시간동안 반응시켰다. 세척용 완충액으로 3회 세척한 후 1% bacterial cell lysates로 30분 동안 흡착시킨 PRRSV 양성 돼지혈청과 음성 돼지혈청을 각각 blocking buffer에 1:10부터 시작하여 단계 희석하였으며 well당 $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. 37°C 에서 1시간동안 반응시킨 후 세척용 완충액으로 3회 세척하였다. 이 후의 과정은 가)의 방법과 동일하게 수행하였다.

(다). 대조 혈청 panel의 결정

(나)의 방법과 동일하게 실시하되 1차 항체인 고역가의 양성 돼지혈청을 음성 돼지혈청으로 1:2부터 시작하여 2진법으로 단계 희석한 후 그것을 blocking buffer로 동일하게 희석하여 수행하였다.

(라). i-ELISA의 음성기준치 설정

PRRSV 특이항체 검색용으로 상용화된 진단키트인 HerdCheck* PRRS Virus Antibody Test Kit(IDEXX®)에 의해 PRRSV 항체 음성으로 판정된 혈청 144개를 대상으로 위의 방법과 동일하게 ELISA를 실시하여 95%의 특이도를 보일 수 있는 반응조건을 설정하였으며 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$95\% \text{ specificity (cut off)} = \text{s/p ratio}^a \text{ mean} + 2 \text{ SD}^b$$

$$a : \text{s/p ratio (sample)} = \frac{\delta\text{OD (sample)} - \delta\text{OD (negative control)}}{\delta\text{OD (positive control)} - \delta\text{OD (negative control)}}$$

b : standard deviation

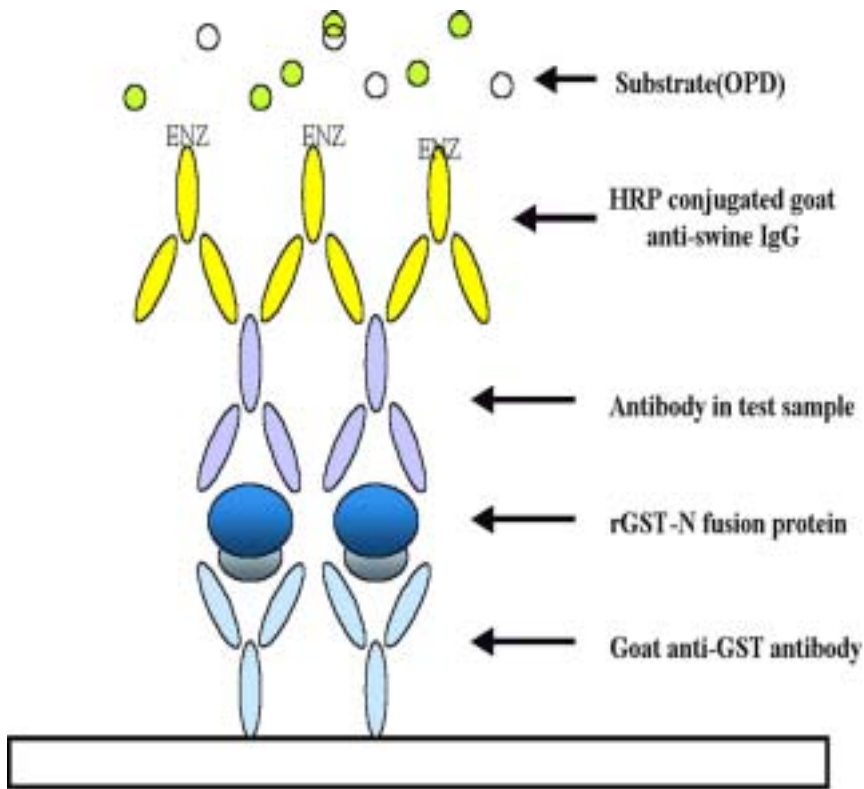
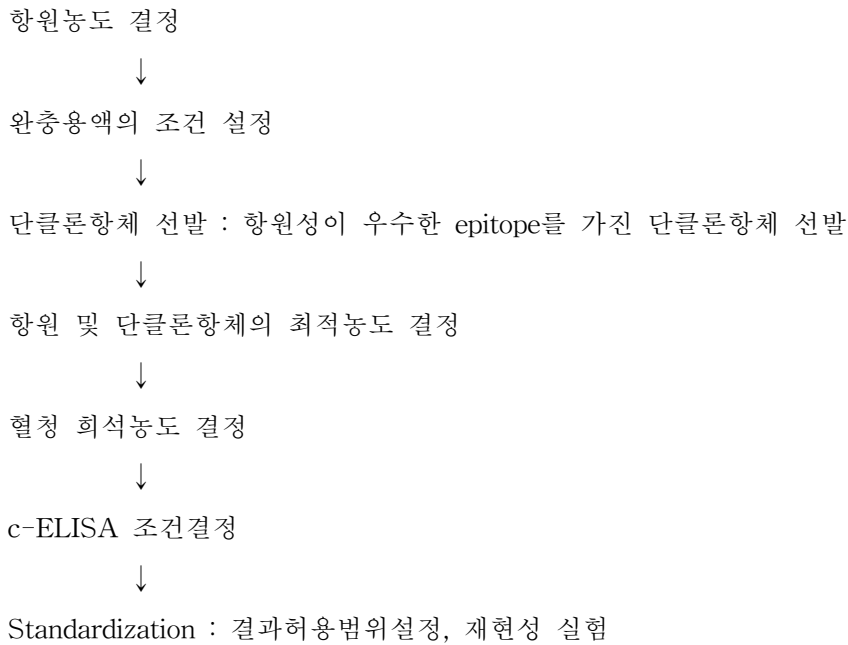


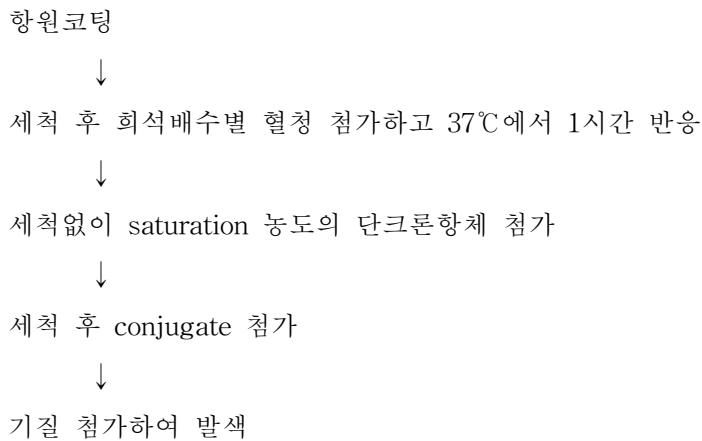
Fig. 1-1. Schematic diagram of indirect ELISA(i-ELISA)

(2) c-ELISA의 표준화

c-ELISA는 i-ELISA의 방법에 준하여 다음과 같이 표준화하여 수행하였다.



c-ELISA는 아래의 방법에 의하여 수행하였다.



% inhibition은 $[1 - \text{혈청시료 OD치} / \text{control (항원+blocking buffer +단클론항체)}] \times 100$

으로 계산하였다.

(3) ELISA 평가

돼지 혈청 315개를 개발된 i-ELISA법 및 c-ELISA 법으로 검사하여 특이성과 민감도를 조사하였다.

나. PRRSV 특이 단크론항체를 이용한 신속진단키트 개발

가). 바이러스 및 세포

본 실험에서 단크론항체 생산에 항원으로 사용한 PRRSV는 충남대학교 수의과대학에서 분양 받은 CNV strain이며 국립수의과학검역원에서 분양받은 PL96-1, PL97-1 그리고 PL97-1으로부터 plaque 크기가 큰 것을 본 실험실에서 purify한 PL97-1/LP1을 국내 분리 PRRSV로 사용하였다. PRRSV 국외 표준주로 미국 분리주인 VR2332, 그리고 유럽 분리주인 Lelystad strain을 사용하였다. 모든 PRRSV는 10% 소태아혈청(Fetal bovine serum : FBS)과 항생제가 함유된 alpha minimum essential medium(α -MEM)을 사용하여 MARC-145 세포에서 배양하였다.

나). 단크론항체 생산 및 특성 확인

(1). 항원 준비

(가). PRRSV 감염 조직배양액으로부터 항원 준비

PRRSV 증식을 위해서는 T75 flask에 배양된 MARC-145 cell monolayer에 국내 분리주 CNV를 접종한 후 PRRSV 특이 세포변성효과(CPE) 유무를 관찰하였다. 국내 분리주 CNV는 α -MEM 조직배양액을 사용해 100배로 희석한 후 T75 flask 당 2 ml를 접종한 후 37°C에서 1시간동안 배양하여 cell monolayer에 흡착시켰다. 그 후 FCS를 4% 함유한 20ml α -MEM을 각 flask에 첨가한 후 CPE가 나타날 때까지 배양하였다. CPE가 관찰된 flask의 조직배양액을 채집하여 얼리고 녹이는 과정을 3회 반복하여 세포 내의 바이러스를 유리시키고 배양액을 3,000rpm에서 30분간 원심하여 상층액을 수집하였다. 상층액을 25,000rpm에서 2시간 동안 sucrose cushion법으로 원심하고 pellet을 소량의 PBS로 부유하여 mouse 접종용 항원으로 사용하였다.

(나). 발현된 ORF5 단백

앞의 실험에서 baculovirus에서 발현된 ORF5 단백을 순수 정제하여 mouse 접종용 항원으로 사용하였다.

(2). Mouse 면역

(가). 복강 내 접종

6주령 된 숫컷 BALB/c mouse에 PRRSV 감염 조직배양액과 baculovirus에서 발현된 ORF5 단백질로부터 순수 정제한 항원을 Freund's complete adjuvant와 동량으로 혼합하여 복강 내로 0.5 ml 씩 1차 접종하였다. 2차와 3차 접종은 각각 접종 3주 후 항원을 Freund's incomplete adjuvant와 동량으로 혼합한 후 0.5 ml 씩 복강 내로 접종하였다. 3차 접종 후 마우스의 미정맥으로부터 채혈하여 PRRSV에 대한 항체역가를 확인하였다. 항체역가가 세포융합하기에 낮을 경우에는 3차 접종과 같은 방법으로 추가 접종하였다.

(나). Food-pad 접종

세포융합에 사용할 mouse를 면역시키는데 3주 간격으로 3-4회 접종할 경우 적어도 면역에만 2개월이 소요되는 단점이 있어 이를 보완하기 위하여 mouse의 foot pad에 접종하는 방법을 함께 시도하였다. 즉, 6주령의 숫컷 BALB/c mouse에 semi-purify한 PRRSV 또는 정제된 ORF5 발현단백 항원을 Freund's complete adjuvant와 동량으로 혼합하여 각각의 mouse foot pad로 50 μ l 1차 접종하였다. 2차와 3차 접종은 각각 마지막 접종 3일 후 항원을 Freund's incomplete adjuvant와 동량으로 혼합한 후 같은 부위에 50 μ l씩 접종하였다.

(3). 세포융합 및 양성 hybridoma 선별

세포융합은 Kohler와 Milestein의 방법과 Saif 등의 방법에 따라 실시하였다. 복강 내로 면역을 시킨 경우, 세포융합 전 3일에 PRRSV 항원 50 μ l를 정맥주사 하고 mouse의 비장을 무균적으로 채취하여 serum-free medium(SFM)으로 3회 세척하였다. Food-pad로 면역시킨 경우, 세포융합은 3차 접종 후 3-4일에 세혜부 림프절과 액와 림프절이 종대되어 있는 것을 확인한 후 mouse를 안락사 시켜 각각의 림프절을 무균적으로 채취하여 면역세포를 분리하고 SFM으로 3회 세척하였다. 3회 세척한 면역세포에 미리 준비한 SP2/0 myeloma cell과 1:5로 혼합하여 1회 원심한 뒤 PEG/DMSO를 이용하여 세포를 융합시켰다. 이 세포들을 HAT배지로 부유시킨 다음, 96-well microplate에 well당 200 μ l씩 분주하여 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 3-4일 간격으로 HAT배지를 교체하였으며 세포융합 10일 후

colony가 well의 1/3이상 형성된 융합세포의 배양 상층액을 채취한 후 PRRSV에 대한 항체 유무를 IFA법으로 확인하였다. IFA법은 96-well plate에 배양된 MARC-145 cell monolayer에 PRRSV를 접종 후 CPE가 관찰될 때 80% 아세톤으로 고정한 뒤 phosphate buffered saline(PBS)로 두 번 세척하고 검사하고자 하는 융합세포의 배양 상층액을 well당 100 μ l 첨가하였다. Plate를 37°C, incubator에서 45분간 방치한 후 각 well을 PBS로 3회 세척하였다. PBS로 50배 희석된 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse Ig(G+A+M)을 well 당 50 μ l씩 접종한 후 위와 같은 조건으로 45분간 방치한 다음 PBS로 3회 세척 후 형광현미경으로 관찰하였다. PRRSV 특이항체를 생산하는 융합 세포는 limiting dilution법으로 3회 이상 cloning을 실시하여 single clone을 선발하고 선발된 hybridoma 세포를 pristane으로 미리 감각시킨 BALB/c mouse의 복강 내로 접종하여 복수를 생산하였다.

(4). 단클론항체의 특성 확인

(가). 단클론항체의 Isotype 결정

생산된 단클론항체의 isotype을 결정을 위해 monoclonal antibody isotyping kit(Sigma)를 제조사의 술식에 따라 사용하였다.

(나). 단클론항체의 단백특이성 결정

단클론항체의 PRRSV 단백특이성은 Western blotting법으로 조사하였다. 즉, mouse 접종용 항원 제조와 같은 방법으로 농축한 PRRSV 또는 대장균 및 baculovirus에서 발현된 ORF7 N 단백 및 E 당단백을 농축하여 6X sample buffer(0.125M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol)에 섞어 5분간 boiling한 후 12.5% SDS-polyacrylamide slab gel에서 전기 영동하였다. 전기영동 후 gel을 transfer buffer(20 mM Tris-HCl, 170 mM glycine, 0.1% SDS, 20% methanol)로 평형시킨 후 semi-trans blot(Bio-rad)을 이용하여 transfer buffer로 평형시킨 PVDF membrane에 13 volt에서 20분간 전이시켰다. 5% non-fat-dry milk로 2시간 동안 membrane을 blocking 시킨 후 1:100으로 희석된 단클론항체 복수와 실온에서 1시간 반응시킨 후 Tris-buffered saline(Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH7.5)으로 5분씩 3회 세척하였다. 세척 후 1:2,000으로 희석한 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG와 1시간 반응시킨 후 발색제로 NBT-BCIP를 사용하여 반응시킨 후 결과를 관찰하였다.

(다). 단클론항체의 중화능 확인

생산된 단클론항체가 PRRSV를 중화하는가를 확인하기 위하여 FFN법을 다음과 같이 수행하였다. 즉, 검색할 hybridoma 배양 상층액 100 μ l에 PRRSV를 200 TCID₅₀/ml을 넣어 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. MARC-145 세포가 단층 배양된 96-well plate에 1시간 반응시킨 혼합물을 첨가하여 37°C에서 48시간 배양한 후, PBS로 2회 세척하고 80% 아세톤으로 고정하였다. 고정된 세포에 PRRSV nucleocapsid 단백질에 특이적으로 반응하는 단클론항체를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 1시간 반응 후, PBS로 3회 세척하고 FITC가 conjugate된 goat anti-mouse immunoglobulin을 첨가하여 다시 30분 동안 같은 온도에서 반응시켰다. 30분 후 세포를 PBS로 세척하고 형광현미경으로 관찰하여 대조군에 비하여 형광이 80% 이상 감소되거나 전혀 나타나지 않는 well의 hybridoma를 중화능력이 있는 단클론항체로 판정하였다.

(라). 단클론항체와 다른 바이러스와의 반응성 확인

생산된 단클론항체와 국외 PRRSV 표준주인 VR2332와 Lelystad, 그리고 국내 분리주인 CNV, PL96-1, PL97-1, PL97-1/LP1과의 반응성은 간접형광항체법으로 확인하였다. 또한 돼지에서 문제가 되고 있는 바이러스와 생산된 단클론항체와 반응성도 간접형광항체법으로 확인하였다.

다). 신속진단키트 개발

PRRSV를 검출하기 위하여 colloidal gold와 PRRSV 특이 단클론항체를 사용하여 Fig. 1-13의 원리를 이용하여 PRRSV 항원 검출용 신속키트를 제작하였다.

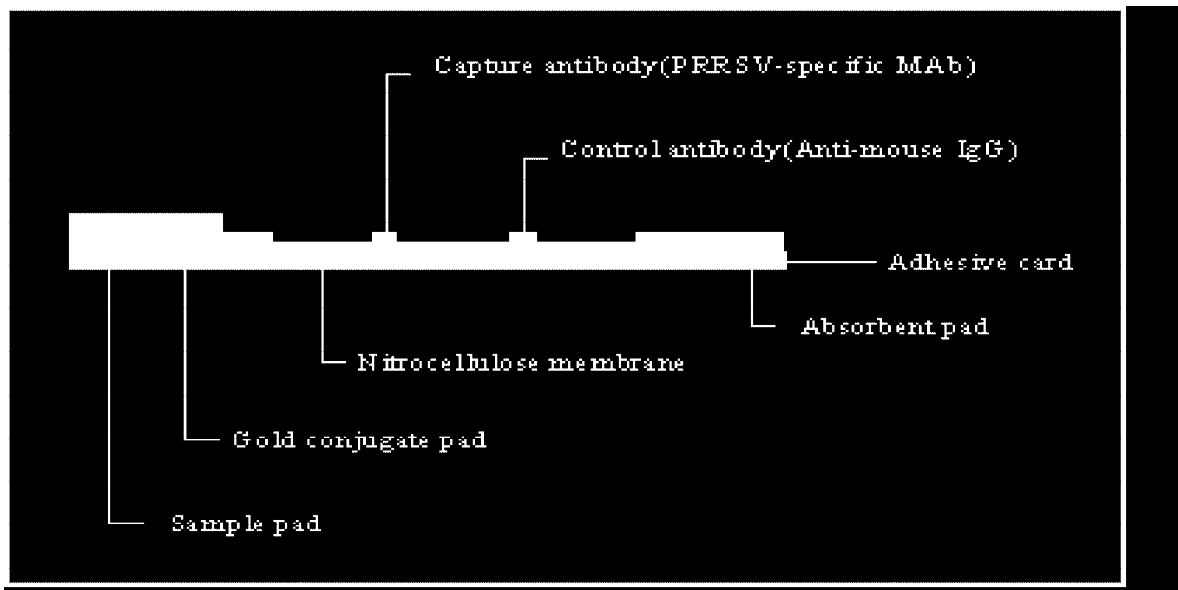
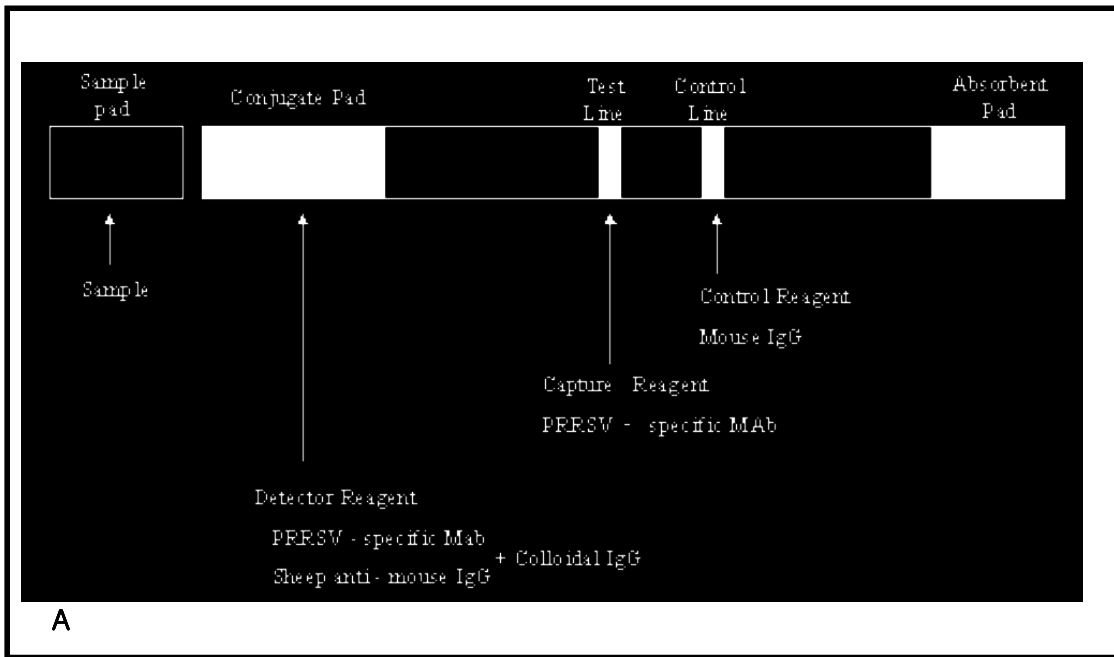


Fig. 1-13. Schematic diagram of rapid diagnostic kit for PRRSV
A: Top view, B: Front view

(1). 단크론항체 정제 및 선발

신속진단키트 개발에 capture 및 detector 항체로 사용할 PRRSV 특이 단크론항체는 Sepharose-protein A column을 이용하여 제조사의 술식에 따라 순수하게 정제하고 TCA 법으로 단백질의 양을 측정하였다. 본 연구에서 생산하여 순수 정제된 단크론항체를 실험적으로 조합하여 신속 진단키트에 적당한 detector 항체와 capture 항체를 선발하였다.

(2). Colloidal gold 농도

Conjugate용 colloidal gold의 농도를 520nm에서 OD가 1, 2, 5가 되도록 조정 한 후 immunochromatography 실험을 하여 결정하였다.

(3). Colloidal gold conjugate 제조

520nm의 파장에서 OD 값이 10인 colloidal gold 용액에 (1)에서 선발하여 순수 정제된 단크론항체를 최종농도가 500 ug/ml 되도록 첨가하였다. 천천히 교반하면서 20% 소혈청알부민(Bovine serum albumin: BSA)과 2% polyethylene glycol이 함유된 2 mM sodium tetraborate(pH 7.2) 용액을 9배량 첨가하였다. 20,000 x g에서 1시간 동안 원심하여 상층액을 제거하고 침전물에 520nm에서 OD 값이 10이 되도록 2 mM sodium tetraborate 용액을 첨가하여 부유하였다.

(4). 진단키트의 제조

(가). Conjugate pad의 제조

제조된 colloidal gold conjugate의 OD 값을 2.0로 희석하기 위하여 colloidal gold conjugate, 50% trehalose 그리고 증류수를 2:1:7의 비율로 첨가하여 교반한 후 교반된 복합체를 conjugate pad에 충분히 적신 후 습도 20% 이하의 45°C 건조기에서 3시간 동안 건조시켰다.

(나). 막스트립(Nitrocellulose membrane: NC membrane) 제조

Pore size 8.0 um의 NC membrane에 bioject dispenser를 사용하여 mouse IgG와 PRRSV 특이항체를 1.0% BSA가 함유된 TBS 완충용액을 이용하여 1 mg/ml의 농도로 희석하여 1 ul/cm의 속도로 각각 분주하고 습도 20% 이하의 37°C 건조기에서 3시간 동안 건조시켰다.

(다). Sample pad 제조

Sample pad를 1.0% Tween 20이 함유되어 있는 10 mM Tris 완충액에 충분히 적신 후 습도 20% 이하의 45°C 건조기에서 3시간 동안 건조시켰다.

(라). Test strip 제조

Laminator를 이용하여 adhesive card에 흡습여지와 항체가 고정된 NC 막, colloidal gold conjugate가 흡착된 conjugate pad, sample pas를 붙이고 절단기를 사용하여 4.3 mm의 폭으로 절단하여 test strip를 제조하였다. 제조된 test strip은 카세트에 넣어 조립하였다.

(5). 신속 진단키트의 표준화 시험

(가). 신속 진단키트의 특이성 검사

제작된 신속 진단키트의 특이성은 국외 PRRSV 표준주인 VR2332와 Lelystad, 그리고 국내 분리주인 PL96-1, PL97-1, CNV, PL97-1/LP1 감염 조직배양액을 사용하여 확인하였다. 또한 돼지에서 문제가 되고 있는 돼지파보바이러스(PPV), 일본뇌염바이러스(JEV), 돼지췌코바이러스 2형(PCV-2), 로타바이러스(Rota), 전염성위장염바이러스(TGE), 레오바이러스(Reo) 감염 조직배양액을 사용하여 확인하였다.

(나). 신속 진단키트의 민감도 검사

제작된 신속 진단키트의 민감도를 대장균에서 발현된 nucleocapsid 단백(rGST-ORF7)을 이용하여 민감도를 조사하였다. 즉, rGST-ORF7의 농도가 8 ug/ml, 0.8 ug/ml, 0.08 ug/ml, 0.008 ug/ml이 되도록 10배 단계 희석하여 반응정도를 확인하였다. GST만이 발현된 단백(1 mg/ml)을 대조군으로 사용하였다. 또한 PRRSV의 역가가 10^{7.5} TCID₅₀/ml인 PL97-1을 10배 단계 희석하여 반응정도를 확인하였다.

(6). 신속 진단키트의 야외 시험

제작된 신속 진단키트를 이용하여 RT-PCR법으로 PRRSV 양성으로 확인된 가검물(유산 태아 및 폐장)로부터 PRRSV를 확인하였다.

제 2 절 :

제1협동과제 : 돼지 생식기 호흡기증 바이러스 분자생물학적 특성 연구

1. 병원성 야외 바이러스의 분리 및 동정

가. 세포배양

돼지 PRRS virus에 대하여 감수성이 있는 것으로 알려진 MARC-145 cell을 10% fetal bovine serum과 0.15% sodium bicarbonate를 첨가한 Eagle's Minimum Essential Medium(MEM: Sigma, U.S.A.)에 배양하였으며, cell monolayer가 형성된 후에는 fetal bovine serum 2%를 첨가 한 배지를 가하여 세포를 유지하였다.

나. PRRS virus의 분리

PRRS virus 감염으로 추정되는 농장에서 수집한 돼지혈청으로부터 MARC-145 cell을 이용하여 바이러스를 분리하고 PRRS virus -specific CPE의 관찰과 IFA 법에 의하여 분리주가 PRRS virus임을 동정하였다. 간단히 설명하면 PRRS virus 감염이 의심되는 야외농장에서 채집된 돼지 혈청을 세포 배양액에 약 20-40배 희석한 다음 50ul를 96-well tissue culture plate에 overnight 배양한 MARC-145 cell monolayer에 접종한 다음 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 한 시간 virus 흡착을 시킨 다음 접종물을 제거하고 다시 5% bovine calf serum을 가한 MEM 100ul을 각각의 well에 넣은 후 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하면서 세포변성효과(CPE)를 관찰하였으며 CPE가 관찰된 well의 media는 회수한 다음 -70°C에서 다음 사용 때 까지 보관하였다.

다. PRRS virus의 동정(identification)

돼지 혈청으로부터 분리된 virus를 PRRS virus로 동정하기 위하여 간접형광항체 법을 사용하였다. CPE를 나타내는 virus를 PRRS virus임을 증명하기 위해 IFA test를 실시하였다. 분리된 virus를 MARC-145 cell monolayer에 접종 후 CPE가 관찰될 때 100% 에탄올로 고정된 뒤 100 μ l의 phosphate buffered saline(PBS)로 두 번 세척 후 PBS로 20배 희석된 PRRSV 항체 양성 혈청을 첨가하였다. Plate는 37°C, 5% CO₂ incubator에서

45분간 방치 후 각 well을 100 μ l의 PBS로 5회 세척하였다. PBS로 50배 희석된 rabbit anti-swine immunoglobulin G conjugated with fluorescein isothiocyanate(FITC anti-swine IgG conjugate)을 well 당 50 μ l씩 가한 후 위와 같은 조건으로 45분간 방치하였다. 100 μ l의 PBS로 5회 plate를 세척 후 형광현미경으로 관찰하였다.

라. 순수 분리(plaque purification)

동일한 PRRSV isolate내에 있는 PRRSV particle간의 biological variation을 줄이기 위하여 이미 보고 된 방법에 의하여 plaque purification을 하였다. Tissue culture dishes에 배양된 MARC-145 cell monolayer를 PBS로 1번 세척하고 10씩 계단희석 한 virus 배양액 2ml을 접종한 다음 37 $^{\circ}$ C incubator에서 1시간 흡착시킨 후 바이러스 배양액을 제거한 다음 PBS로 monolayer를 한번 세척하였다. 4ml의 agarose-MEM 혼합배지(0.8% agarose, 2% fetal bovine serum, diethylaminoethyl dextran 100 μ l/ml)을 감염된 cell monolayer에 overlay하고 3일 동안 incubator에서 배양하였다. 그리고 나서 4ml의 2차 overlay media [0.8% agarose, 200 μ l의 neutral red(1:1000)]를 가하여 cell monolayer을 염색한 다음 large plaque을 선택하였으며, 이렇게 plaque purification된 PRRS virus를 다시 배양하여 실험에 사용하였다.

2. PRRS virus의 분자생물학적 특성조사

가. PRRS virus의 유전자 염기서열 분석

1) Primer 작제

국내에서 분리된 PRRSV CNV-1의 전체 유전자(structural protein gene 및 nonstructural protein gene)의 염기서열을 분석하기 위하여 이미 염기서열이 보고 된 VR2332 (US strain, Genbank accession number . U87392) 염기서열을 기초로 하여 특이적인 primers (forward and reverse oligonucleotide primers)들을 제작 하였다 (Table 1).

2) Competent cell 준비

1ml의 2 \times YT broth에서 하루 밤 배양시킨 *E. coli* DH5 α cell을 100ml의 2 \times YT broth로 옮기고, OD₆₀₀값이 0.6이 될 때까지 배양하였다. 배양액을 centrifuge bottle로 옮기고 5분 동안 얼음에 방치시킨 후, 5분간 5,000xg에서 원심분리 하였다. 상층 액을 제거하고, pellet은 40ml의 cold 0.1M CaCl₂로 재 부유 시킨 후, 얼음에서 20분간 방치하였다. 5,000xg에서 5분 동안 원심분리를 하여 상층 액을 제거하고 pellet은 5ml의 0.1M CaCl₂/14% glycerol

solution으로 재 부유시켰다. 재 부유된 cells을 pre-chilled된 1.5ml tube에 100 μ l씩 분주하여 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

3) Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)

유전자를 cloning하기 위하여, PRRS virus CNV-1을 배양한 culture media 200 μ l로부터 QIAamp Viral RNA mini kit(Qiagen, U.S.A)를 이용하여 kit 생산회사의 사용법에 따라 PRRS virus의 genomic RNA를 추출 하였다. 각각의 유전자 fragment에 상응하는 viral cDNA를 합성하기 위하여 Reverse transcription(RT) mixture[5 μ l RNA, 100 pmol antisense primer 1 μ l, 2.5M dNTP mixture (Roche, Germany) 5 μ l, RNase inhibitor(Takara, Japan) 1 μ l, 5X RT buffer[50mM Tris-HCl(pH 8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM DTT) 4 μ l 에 nuclease free water 3 μ l를 가한 후 68 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 가열한 다음 냉각 후 M-MLV reverse transcriptase (Promega, U.S.A) 1 μ l를 가하고 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응하였으며, 반응 후 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열하였다.

PRRS virus cDNA로부터 약 1.0kb 단위로 cDNA fragment를 증폭하기 위하여 총 50 μ l의 PCR reaction mixture [RT product 10 μ l, 10X PCR buffer μ l, 10 pmol forward primer 5 μ l, 10pmol reverse primer 5 μ l, 5units *Taq* polymerase (Roche, Germany), adequate volume of nuclease free water]를 denaturation 94 $^{\circ}$ C에서 20초, annealing 55-65 $^{\circ}$ C(각 fragment에 따라 약간의 차이가 있음)에서 40초간, extension 72 $^{\circ}$ C에서 50초로 구성된 일련의 반응을 한 cycle로 하여 각각 35 cycles씩 수행하였으며, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 8분간 polymerization 시켰다.

4) 유전자 클로닝

PCR product를 1% agarose에 전기영동 한 다음 Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, U.S.A.)로 순수 분리한 다음, 이들 PCR product를 pGEM-T plasmid vector의 lac Z 유전자의 multicloning site에 ligation 하였으며 *E. coli* DH5a competent cells을 host cell로 하여 각각의 유전자를 cloning 하였다. 간략하게 설명하면 -70 $^{\circ}$ C에 보관 중인 *E. coli* DH5a를 ice에서 녹인 다음 recombinant plasmid DNA를 포함하고 있는 새로운 tube에 100 μ l를 옮긴 다음 ice에 30분 간 방치한 다음 42 $^{\circ}$ C에서 90초간 heat shock한 다음 ice에 2분간 방치하였다. LB medium 1ml을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 진탕배양 한 다음 ampicillin(100ug/ml), X-gal, IPTG 등이 함유된 LB agar plate에 균일하게 spread 하여 3

7°C에서 overnight culture 한 다음 white colonies를 선택하여 염기서열 분석을 위한 DNA extraction에 사용하였다.

5) 염기서열 분석을 위한 DNA 준비

선택된 white colonies를 ampicillin을 함유하는 LB 4ml에 37°C에 overnight 진탕 배양한 다음 원심하여 cell pellet를 만들고 alkaline-lysis method에 의하여 plasmid DNA를 순수 분리하였다. 간단히 설명하면 cell pellet를 100 μ l의 Solution I [50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA and 100 ug/ml RNase]에 부유하고 다시 Solution II(0.2 N sodium hydroxide, 1 % sodium dodecylsulfate) 200 μ l를 가하여 혼합 한 후 ice에서 방치한 다음, Solution III (3 M potassium acetate, 5 M glacial acetic acid) 150 μ l을 가하였다. 12,000rpm에서 15분간 원심하여 DNA pellet를 만든 다음 상층 액을 버리고, 70% ethanol 500 μ l를 가하여 원심세척을 한 후 건조하였으며, 다시 TE buffer 30 μ l에 재 부유하여 restriction endonuclease를 처리하여 insert를 확인한 다음 염기서열 분석에 사용하였다.

6) 염기서열 분석

염기서열 분석은 M13 forward 및 reverse primers를 사용한 Big Dye Dideoxy cycle sequencing kit와 ABI 3700 DNA analyzer(Applied Biosystem, U.S.A) 로 실시하였다. Genome assembly와 computer analysis는 software phredphrap 와 BLAST를 이용하여 실시였다. Sequence alignment는 Clustal W method를 이용하였으며, Phylogenetic analysis 는 neighbour-joining method를 이용하였다.

7) 5'과 3' end 의 virus genome의 염기서열 결정

5'과 3' end 의 viral genomic RNA의 sequence를 5'/3' RACE kit(Roche, Germany)를 이용하여 증폭하였다. 간단히 설명하면 5' RACE의 first strand cDNA를 gene specific primer 와 reverse transcriptase 이용하여 poly(A)⁺ RNA로부터 합성한 후 High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Germany) 이용하여 순수 분리한 후 cDNA의 3' end에 homopolymeric (A) tails을 첨가하기 위하여 terminal transferase를 사용하였다. 이는 internal site에 dT-anchor primer가 부착하는 데 도움을 주기 위함이다. 5'gene specific primer와 oligo dT-anchor primer를 이용하여 tailed cDNA를 증폭하였다.

Specific reverse primer와 PCR anchor primer를 이용한 두 번째 PCR에 의하여 cDNA를

증폭하였다. 3'RACE의 first-strand cDNA는 oligo dT-anchor primer을 이용하여 mRNA의 poly(A)-tail로 부터 합성하였으며, 이들 cDNA로부터 PCR-anchor primer와 ORF7 forward primer로 3'end 부위의 유전자를 증폭하여 pGEMt-vector에 삽입하였다.

8) 중화항체 유도 단백질 유전자의 염기서열의 비교 분석

중화항체가 유도 단백질 유전자 분석은 중화 항체를 유도하는 것으로 알려진 ORF4와 ORF5 단백질을 암호화하는 유전자의 염기서열을 분석하고 상호 특성을 비교하기 위하여 위의“PRRS virus 유전자 염기서열 분석”에 사용된 시험법과 동일한 방법을 사용하였으며, PRRS strain들 간에 유전자를 비교하기 위하여 사용된 PRRS virus reference strain의 source는 Table 2. 와 같다.

Table 2-1. Oligonucleotide primer sequences

Primer ^a	sequence a (5' -3')	location in VR2332
S1F	TGGATCCATGACGTATAGGTGTTGCT	1~20
R	TGGATCCTTCAGGGACAGTGTACAGC	992~973
S2F	GGATCCAGTGGACATGTCTAAGTTCG	891~910
R	GGATCCTGTGACGGCAAAGAACT	1978~1961
S3F	GGATCCAATGTGTTTCAGGGCTGTTGTG	1758~1776
R	GGATCCGCCTAATGAAACCGGCT	2793~2734
S4F	GGATCCAGACGACTTCGGACATGAT	2541~2561
R	GGATCCATCACAAACTCACACGG	3527~3511
S5F	GGATCCGGGTGGACTGCTGACT	3396~3417
R	CAGGATCCCCAGCACTTTTACACC	4385~4367
S6F	GGATCCTGTTTCGCAGCCTTGTTG	4209~4231
R	GGATCCCAAACATAGCTGGCAATTG	5275~5255
S7F	TACGGATCCTGGCTCTCTGAC	5068~5090
R	GGATCCACATTACAAAACGGCCTG	6079~6059
S8F	GGATCCTATTGGCTAACATCTCTG	5888~5908
R	TAGGATCCTCGATAAAATTGACCGC	6913~6895
S9F	GGATCCTGCGGAATGAATCATGAGT	6769~6787
R	GAAGGATCCGGTTGTGAAATTGAC	7790~7767
S10F	GGATCCCTAGGTATGATGAATGTGCA	7589~7600
R	GGATCCAGTGATAGTTTGGCATGGT	8483~8465
S11F	GGATCCGAGTTATATGTACCGACCA	8310~8328
R	GGATCCAGTGATAGTTTGGCATGGT	9263~9243
S12F	GGATCCATATGGTGCTTAGTACTTCT	9093~9122
R	GGATCCTGAGCAACCGTTGCATTCTT	10161~10142
S13F	GGATCCGTTATTCATGCATGTGAGC	9846~9870
R	GGATCCTGAGCAACCGTTGCATTCTT	10860~10840
S14F	GGATCCGATGTGGTTACTTGCATTTG	10635~1065
R	TGGATCCGACGACTCTCTGTTGCGAA	11735~11711
S15F	GGATCCAACCTGAAGGTCGCTATTTCT	11612~11631
R	TCATGAAGCTTTGGCCGGGATCCA	12686~12663
S16F	GGATCCGTCTCGCATTAGTAGTTTG	12480~12498
R	GATCCTTCTCATCTTGTACATTGG	13506~13488
S17F	GGATCCTAGAATGGCTTCGTCCCTT	13235~13255
R	GGATCCTTGAGGTCGATCAGATGAC	14317~14299
S18F	GGATCCACTAAGGGCAGACTCTATC	14229~14247
R	GGATCCTGGTTTTGCTGAGCGATGA	14992~14974
Oligo dT anchor primer ^b	GACCACGCGTATCGATGTCGAC(T) ₁₅ V ^c	
PCR anchor primer ^b	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	
ORF 7 forward primer	GGATCCGAAAGCTGTTAAACAGG	14850~14867
5' reverse primer	GGATCCTAGGGAATTGGCGAAACGGCC	624~603

^a Primers were designed based on sequence for VR2332 (U. S. strain, GenBank accession number. U87392) ^b Contains *Mlu*I, *Cla*I, *Sal*I enzyme sites ; ^c V=A ,C or G

Table 2-2. References PRRSV strains used in study

Reference virus	GenBank Accession Number	Source
VR2332	U87392	Minnesota, US
16244B	AF046869	Nebraska, US
PA8	AF176348	Canada
CH-1a	AY032626	China
F1	AF030306	Taiwan
Kitasato 93-1	AB023782	Japan
SP	AF184212	Vaccine strain(N. America)
JK100	AF332735	Singapore
LV	NC_002533	Netherlands
PRRSOLOT	X92942	Spain

3 야외 농장에서 vaccine virus의 감염실태 조사를 위한 유전자 분석기법 개발 및 감염실태 조사

가. ORF5 gene의 증폭을 위한 primer 작성 , RT-PCR, 효소 처리 및 유전자 분석

야외 분리 병원성 PRRS virus와 vaccine virus (Ingelvac PRRS MLV vaccine, Boelinger Ingelheim)를 감별하기 위하여 virus strain 간에 유전자의 변이성이 가장 높은 ORF5의 유전자를 선택하였으며 우선 vaccine 바이러스의 ORF5의 유전자를 분석한 후 restriction endonuclease map를 작성한 다음 이를 기초로 하여 Mengeling (1999)등이 제시한 restriction fragment length polymorphism(RFLP) analysis 법에 의하여 야외 병원성 분리 바이러스 주와 백신 바이러스를 감별하였다.

간단히 설명하면 sense primer 5'-TTGAATTCAGCCTGTCTTTTTGCCAT-3' 과 reverse primer 5'-TTGGATCCCCTTTTGTGGAGCCGTGC-3 를 이용하여 위에 기술한 방법에 의하여 ORF5 gene을 증폭한 다음 restriction map을 기초로 선발된 제한 효소 *Mlu* I, *Bsr* SI으로 처리한 다음 2.0% agarose gel 상에 나타난 DNA fragment patterns를 관찰, 분석하였다. RFLP 상에서 확실한 pattern을 나타내는 것과 불분명한 pattern을 나타내는 것을 선택하여 ORF5 유전자의 염기서열을 분석하여 불분명한 RFLP pattern에 대한 원인을 규명하였다. 염기서열 분석을 위한 유전자의 증폭, cloning 등 은 위에 기술한 방법에 준하여 실시하였다.

제 3 절

제2협동과제 : 돼지 생식기 호흡기증 바이러스 백신개발

1. PRRSV 유전자 재조합 단백질의 발현

가. 사용한 PRRS virus (PRRSV), Baculovirus세포주의 배양 및 배양조건

국내분리주 바이러스는 제1협동과제에서 분리한 국내분리주 PRRS virus CNV-1를 사용하였고 대조 바이러스로는 미국 표준주인 VR2332를 사용하였다. PRRS virus의 배양을 위해서 MARC-145 세포주를 사용하였으며 기본 세포주 배양은 초기 1×10^6 cells/mL의 농도로 세포를 접종하여 5% CO₂, 37°C 조건으로 배양하였으며, 5일을 주기로 계대 배양하였다. Growth Medium으로는 Minimum Essential Medium Alpha Medium(Gibco BRL)에 1% antibiotics(x100 Gibco BRL), 5% FCS(Gibco BRL), 2.2g/1L NaHCO₃을 첨가하여 사용하였다.

Baculovirus는 Pharmingen사에서 판매하는 Baculovirus expression vector system을 이용하였다. Wild-type AcNPV, recombinant Xyle 및 glutathione S-transferase (GST)에 fused된 recombinant plasmid등은 제조회사의 방법대로 사용하였으며 Baculovirus의 배양은 Sf 9 cell을 이용하였다. Sf 9 cell은 Grace's insect medium (Gibco BRL)에 1% antibiotics (100x, Gibco BRL), 10% FBS (GibcoBRL)을 첨가한 growth medium을 사용하였고, 27°C에서 배양하였으며, cell monolayer의 형성이 95%정도일 때 계대배양하였다. Sf21 cell 및 Hi-Five cell도 각각의 제조회사의 방법대로 사용하였다.

나. 유전자 재조합 PRRS virus 단백질의 발현

1) PRRS virus의 RNA 분리

배양된 바이러스액 250 μ l에 Trizol[®] LS reagent(Gibco, USA) 750 μ l 혼합하여 가볍게 vortexing 한 후 실온에서 5분간 정치시킨후 Chloroform(Sigma) 250 μ l 첨가하여 15초간 가볍게 vortexing 한후 실온에서 10분간 정치 하였다. 이후 4°C 12,000x g 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 수거하여 Isopropanol alcohol(Sigma) 500 μ l를 첨가 10분간 정치시킨 후 앞과 동일한 조건으로 pellet을 얻었다. 75% ethanol(Sigma) 1ml을 첨가 한 후 4°C 7500x g에서 5분간 원심분리 하며 이 과정을 세 번 반복하여 pellet을 세척한 후 이후 진공건조기(Speed Vac)에서 5~10분간 pellet을 건조시켰다. 건조한 Pellet은 30~50 μ l의 DEPC water로 용해하여 55~60°C의 Water bath에서 10분간

incubation 시킨 후 -20°C에 보관하여 PCR의 Template로 사용하였다.

2) RT-PCR을 이용한 PRRSV의 증폭 및 확인

가) Primer Design

PRRSV 표준주(VR2332)의 염기서열과 제1협동과제의 결과를 토대로 하여 ORF 3, 5의 유전자에 알맞은 forward, reverse primer를 제작하였다. 특히 Baculovirus expression system에 사용할 것을 고려하여 forward primer에는 *BamH* I restriction site를 reverse primer에는 *EcoR* I restriction site를 삽입하여 제작하였다.

ORF3	Forward	5'-TT <u>GGATTC</u> ATG GTT AAT AGC TGT AC-3'	<i>BamH</i> I
	Reverse	5'-CC GAATTC CTA TCG CCG TAC GGC AC-3'	<i>EcoR</i> I
ORF5	Forward	5'-TT <u>GGATTC</u> ATG TTG GGG AAA TGC TTG-3'	<i>BamH</i> I
	Reverse	5'-TT <u>GAATTC</u> CTA AGG ACG ACC CCA TTC-3'	<i>EcoR</i> I

나) RT-PCR조건 및 PCR 생성물 확인

cDNA의 합성을 위한 반응으로 5 μ l의 RNA template, 1 μ l의 reverse primer, 5 μ l 10 \times PCR buffer(Bionics), 1 μ l RNasin, 1 μ l 10mM dNTPs, 5 μ l MgCl₂(Promega), 1 μ l M-MLV reverse transcriptase, 나머지는 DEPC-water로 50 μ l의 용량으로 조정하였으며 MJ research INC의 PTC100TM 에서 Thermal cycle은 Hot start PCR method를 사용하였다. 57°C에서 10분간 RNA의 pre-denaturation시킨 후 M-MLV reverse transcriptase 1 μ l 첨가, 40°C에서 60분간 synthesis, 94°C에서 5분간 불활화 하여 최종 cDNA를 얻었다.

PCR 본반응에서는 5 μ l의 10 \times Taq plus PCR buffer(서린과학, Korea), Primer(F & R) 각각 1 μ l씩, 2 μ l의 2mM MgCl₂, 1 μ l의 10mM dNTPs, 5 μ l의 cDNA, 1.5U Taq plus polymerase, 총 용량은 DEPC-water를 이용하여 50 μ l로 조정했다. Thermal cycle은 Hot Start PCR Method를 사용하였다. 94°C에서 4분간 Pre-denaturation 시킨 후 84°C에서 heat block시킨 채로 1.5U의 Taq plus polymerase를 첨가한 후 본 반응을 시작하였다. 본 반응으로는 94°C에서 40초간 denaturation, 55°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 45초간 elongation하고 이것을 35차례 반복한 후 최종적으로 72°C에서 추가적으로 elongation을 시킨 후 4°C에서 product를 보관하였다.

증폭된 PCR 생성물은 1.2% agarose gel에서 전기영동한 후 Ethidium Bromide 염색하여 관찰하였으며 100bp DNA ladder(Gibco BRL)를 marker로 사용하였다.

3) Baculovirus system에서의 PRRSV ORF5유전자의 발현

정제의 효율성의 기하기 위해 PharMingen에서 생산되는 Baculovirus expression vector system을 이용하였다. 이 system을 이용하면 target proteins이 glutathione S-transferase (GST)와 fusion되기 때문에 glutathione agarose beads column을 이용하여 단일step으로 fusion protein을 정제할 수 있고 정제한 후 bovine thrombin으로 처리, GST를 제거한 후 순수한 target protein을 얻을 수 있다.

가) ORF5유전자의 Baculovirus Transfer vector로의 cloning

전술한 바와 같이 RT-PCR에 의해 증폭된 ORF5 유전자를 1%의 agarose gel에서 전기영동한 후 gel상에 나타난 band를 따라 절단한 후 QIAEX II Gel Extraction Kit를 이용하여 DNA를 extraction하였다. 증폭된 ORF5 유전자의 염기서열을 확인하기 위해 *Bam*HI과 *Eco*R I restriction enzyme을 이용하여 유전자를 절단한 후 QIAquick PCR Purification Kit을 이용하여 정제하였다. 이렇게 처리된 ORF5유전자를 미리 *Bam*H I 과 *Eco*R I 으로 처리된 pUC19에 cloning 한 후 염기서열을 분석하였다. 염기서열을 분석한 후 pUC19에 삽입된 ORF5유전자를 *Bam*H I 과 *Eco*R I 로 절단하여 전기영동에 의해 분리, extraction한 후 Baculovirus expression을 위한 transfer vector인 pAcG2T의 *Bam*H I 과 *Eco*R I site에 다시 cloning하였다. 정확히 cloning된 plasmid를 QIAfilter™ Plasmid Maxi kits을 이용하여 대량 증폭한 후 transfection의 재료로 사용하였다.

나) Baculovirus expression system에 ORF5유전자를 발현

(1) *Sf* 9 cell의 배양

Transfection과 plaque assay등을 위하여 필요한 은 다음과 같다. 사용manual에 따라 *Sf* 9 cell을 27°C에서 CO₂가 필요 없으며 TNM-FH 배지(PharMingen)에서 배양하였다.

(2) Coransfection

Sf 9 cell을 3개의 60mm tissue culture plate에 cell density가 50~70%가 되도록 각각 2×10⁶개씩 준비하였다. Recombinant virus 생산을 위해서는 Recombinant Plasmid DNA 20μl와 Linearized BaculoGold® Baculovirus DNA

5 μ l를 microcentrifuge tube에 넣고 섞은 뒤 5분간 정치시켰다. 정치 후에 Transfection buffer B 1ml을 첨가하였다. 한편 transfection시킬 tissue culture plate에 있는 배지를 버리고 Transfection buffer A 1ml로 바꿔준 후 microcentrifuge tube에 담겨 있는 혼합물을 transfection plate에 방울방울 떨어뜨리면서 Calcium phosphate/DNA precipitate가 세포표면에 골고루 섞이도록 3~5방울마다 살살 흔들어 주었다. Transfection 시킨 후 4시간 후에 새로운 배지로 갈아주었다. Negative control로는 바이러스를 접종하지 않은 세포를, positive control로는 Wild-type AcNPV virus 10 μ l를 접종하여 주었다. 27 $^{\circ}$ C의 조건에서 4일간 배양하여 현미경하에서 transfection된 plate의 cell의 morphology와 positive control/negative control의 morphology를 비교하여 바이러스의 증식유무를 확인하였다.

(3) Plaque assay 및 plaque의 분리

Transfection후 바이러스의 생성이 확인되면 ORF5유전자를 발현하는 recombinant 바이러스의 순수 분리를 위해 Plaque assay를 실시하였다. 3개의 100mm tissue culture plate에 Sf 9 cell을 각각 3 \times 10⁶ cell을 분주하고 Viral transfection supernatant를 원액, 10⁻¹, 10⁻² 및 10⁻³으로 희석하여 100 μ l씩 접종한 후 27 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 바이러스가 세포에 흡착되게 배양하였다. Agarplaque plusTM agarose를 Protein-free medium에 2%로 만들어 microwave에서 녹인 후 45 $^{\circ}$ C의 water-bath에서 정치시키고 동량의 TNM-FH와 섞어서 최종적으로 0.8~1%의 agarose가 되게 하였다. plate에서 배지를 완전히 제거한 후에 앞에서 준비한 agarose gel을 cell위에 overlay한 뒤 27 $^{\circ}$ C에서 12일 동안 incubation하였다. 12일 후 현미경으로 plaque을 형성하였는지 일단 확인을 하고, 10개 정도의 plaque을 microcapillary tube로 따내어 1ml의 TMN-FH medium이 담긴 microcentrifuge tube에 각각의 plaque(virus particle) 채집물을 부유시켰다. 그리고 바이러스를 용출하기 위하여 4 $^{\circ}$ C에서 rotating시키면서 18시간동안 방치하였다. 한편 12-well plate에는 11개의 well에 각각 Sf 9 cell을 2 \times 10⁵ 개의 cell을 분주하고 plaque pick-up한 것을 500 μ l를 접종하고 27 $^{\circ}$ C에서 3일간 incubation하였다. 바이러스의 역가를 높이기 위해 3일 후에 상층액을 취하여 1,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 원심분리한 뒤 다시 상층액을 Sf9 cell에 접종하였다. CPE가 확인되면 viral supernatant와 cell을 분리하여

수거한 뒤 SDS-PAG와 Western hybridization으로 발현된 단백질의 유무를 확인하였다. Fig. 3-1은 ORF5의 유전자 재조합 단백질의 발현을 도식화한 그림이다.

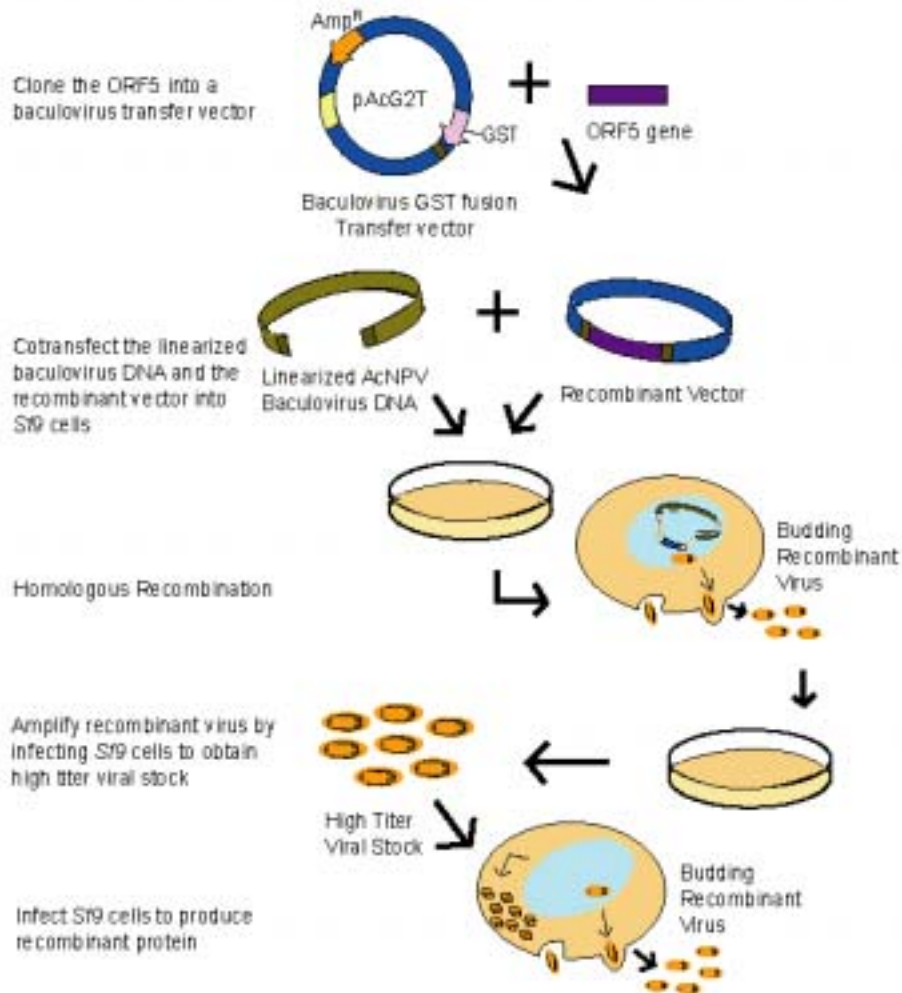


Fig. 3-1. Flow-diagram of generation of recombinant baculovirus containing the ORF5.

(4) Plaque purified한 재조합 바이러스의 passage

재조합 바이러스의 증폭을 위해 계대배양을 시켰다. 배양후 4일째에 배양세포와 액을 -70C에 얼린 후 녹이는 과정을 3차례 반복한 후 1,000rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 다음 배양시 접종재료로 사용하였다.

다) 발현된 단백질의 정제

Sf9 cell에서 발현된 유전자 재조합 GST-ORF5 단백질의 정제는 GST expression and purification kit (Pharmlingen)을 사용하여 실시하였다. 10개의 Flask 175cm²에 배양한 Sf9세포에 recombinant 바이러스를 3-5 MOI로 감염시킨 뒤 96시간에 배양액과 세포를 수거한 뒤 25,00 x g에서 5분간 원심분리하였다. Cell lyste를 만들기 위해 침전된 cell pellet에 protease inhibitor cocktail이 함유된 차가운 insect cell lysis buffer로 10ml 부유시킨 후 얼음에 45분간 반응시킨 후 sonication을 시킨 후 40,000 xg에서 45분간 원심분리한 뒤 상층액을 수거하였다. Glutathione agrose beads 1 ml로 GST-ORF5단백질이 부착시킨 후 1ml의 GST elution buffer를 첨가하여 GST-ORF5 단백질을 용출시켰다. GST를 제거하기 위해 thrombin cleavage를 200ug의 bovine thrombin을 사용하여 절단한 후 glutathione-coupled resin을 사용하여 잘려진 GST를 제거하고 ORF5만을 순수하게 분리하였다.

다. 대장균에서의 유전자 재조합 단백질의 발현

1) ORF5유전자의 클로닝

Baculovirus에서 ORF5 발현되는 정도가 매우 약하고 지금까지의 결과로 CNV-1의 경우 Baculovirus에서 glycosylated form이 검출되지 않는 것으로 보아 경제적으로 유리한 prokaryotic expression system을 사용하고자 pGEX expression vector를 사용하였다.

Baculovirus transfer vector인 pAcG2T에 삽입시켰던 각 CNV-1과 VR2332를 *EcoRI* 과 *BamHI*을 사용하여 제한 효소 처리후, clean up kit를 사용하여 ORF5유전자를 분리정제하였다. 각각의 insert DNA를 pGEX-4T-3에 ligation후 BL21(DE) *E. coli* strain에 electroporation 방법을 통해 transformation하였다. Transformation 후, colony screening을 통해 삽입여부를 확인하고, 선별된 colony를 배양하여

pGEX-CNV-1(ORF5)와 pGEX-VR2332(ORF5)를 얻었다. 선발된 clone과 양성 대조군으로서 pGEX-4T-3를 2× YTA 배지에 접종한 후 진탕배양하면서 OD₆₀₀=0.1이 될 때까지 배양한 후, IPTG의 최종농도가 0.1mM, 0.5mM, 및 1.0 mM이 되도록 첨가한 후, 4시간 더 추가 배양하였다. 4시간 배양 후, 13,000rpm에서 5초씩 원심분리하여 상층액은 버린 후 ice-cold PBS를 사용하여 cell pellet를 세척하였다. 멸균된 증류수로 cell pellet를 부유한 후 동량의 2× loading buffer를 넣고 잘 섞어준 후, 5분 동안 boiling water에서 끓인 후 SDS-PAGE로 발현정도를 분석하였다.

라. 발현된 단백질의 분석

발현된 단백질의 생성유무를 확인하기 위해 SDS-PAGE (5% stacking/ 12% separating gel)를 이용하였다. 세포 및 상층액을 분리한 후 세포의 경우 phosphate-buffered saline (PBS)로 2회 세척하였다. 각각의 sample은 동량의 2X SDS_PAGE loading buffer (0.1M Tris (pH6.8), 2% SDS, 20% glycerol, 85 β-mercaptoethanol, bromophenol blue)와 혼합한 후 55℃에서 1시간 처리하였다. 2~3시간 동안 전기영동한 다음 Gel을 Fixation solution에서 2시간, Coomassie brilliant 염색액에서 4시간 염색, 그리고 destaining 8시간 후에 증류수에 보관하였으며 view box를 통하여 band의 양상을 관찰하였다. 또한 ORF5의 특이적인 band를 관찰하기 위해 Western blotting을 실시하였다. Gel을 nitrocellulose membrane으로 western blotter를 사용하여 옮긴 후 단백질이 membrane에 흡착되었는지를 Ponceus S staining으로 확인한 후 membrane을 blocking시켰다. TTBS (20mM Tris, 50mM NaCl, 0.05% Tween-20)로 세차례 세척한 후 일차항체로 반응시켰다. 일차 항체로는 PRRS 양성항체 또는 anti-GST 양성항체를 사용하였다. Membrane에서의 밴드의 검출을 위해 사용한 이차항체로는 HRP-conjugated anti swine antibody 또는 HRP-conjugated anti mouse antibody를 사용하였으며 membrane을 세척후 4-chloro-1-naptol을 넣어 검출하였다.

2. Whole 바이러스에 대한 백신의 제조

가. Whole virus의 접종

MARC-145 세포주의 Passage Number에 따른 바이러스의 감염력 소실을 방지하기 위해 동일 계대 배양 또는 Passage No.가 작은 MARC-145 cell을 사용하였다. 75 cm²의 Cell culture flask에 MARC-145 cell을 1x10⁶cells/flask로 접종하여 flask 표면의

monolayer 형성률이 60~70%정도 되었을 때 바이러스액 1ml을 첨가한 뒤 5% CO₂ 37°C incubator에서 30분간 감염시킨 뒤 배양액을 제거한 후 CMF-PBS 세 번 세척 후 Medium을 첨가 5% CO₂ 37°C incubator에서 배양하였다. 매일 동일한 시간에 CPE 여부를 관찰하였으며 5일후 바이러스의 CPE 현상을 확인하였다. MARC-145 cell의 CPE가 확인된 culture flask를 Freeze & Thawing 방법을 세 번 실시하였다. Culture Medium은 Cornical Tube에 옮겨 원심분리기에서 15000g 10분간 원심분리하여 상층액을 분리한 후 상층액은 Cryobial Tube에 1.0ml씩 분주한 후 -70°C에 보관하였다.

나. PRRS 바이러스의 TCID₅₀ 측정

Master seed로 배양한 국내 PRRS 분리주 CNV-1과 미국 표준주 VR2332 1.5ml eppendorf Tube에서 10진 희석을 하여 10⁰에서 10⁹까지 희석하였다. 96-well Flat Bottom Plate(Corning)에 MARC-145 cell을 well당 1x10⁵씩 분주하여 monolayer 형성이 60~70 % 정도 되었을 때 Maintenance Medium에서 희석해 준비했던 바이러스를 각각의 well에 분주하였다. 37°C, 5% CO₂ Incubator에서 배양 하였으며 이후 매일 동일한 시간에 CPE 형성여부를 관찰하였으며 7일 후 최종 결과를 기록하였다.

다. One Step Growth Curve 작성

TCID₅₀ 결과 확인 후 바이러스의 Titer를 10^{4.5}TCID₅₀/0.1ml로 희석하여 준비하였다. 60mm cell culture dish 20개를 준비하여 각각의 Dish에 MARC-145 cell을 1x10⁵cell/ml의 농도로 접종하였다. 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양해 60~70% Monolayer형성 시킨 후 바이러스 접종 전에 culture dish의 Old Medium을 따라 버리고 10^{4.5}TCID₅₀/0.1ml로 조정된 PRRS 바이러스를 각각의 Culture Dish에 동일량을 접종하였고 30분간 37°C 5% CO₂ Incubator에서 배양하며 10분에 한번씩 흔들어 주었다. 이 후 바이러스가 포함된 Medium을 버리고 부착되지 않은 바이러스를 세척하기 위해 CMF-PBS로 3회 세척한 후 Maintenance Medium을 적정량 분주한 후 37°C 5% CO₂ Incubator에서 배양하였다. 시간에 따른 바이러스 증식을 알아보는 실험이므로 접종 후 2^h, 6^h, 12^h, 24^h, 2^d, 3^d, 4^d, 5^d, 6^d, 7^d 마다 CNV-1와 VR2332가 각각 접종된 Culture Dish를 하나씩 Incubator에서 꺼낸 후 Freeze & Thawing 방법을 3회 실시한 후 12,000x g에서 10분간 원심분리한 뒤 상층액을 -70°C 냉동고에 보관하였다. 배양 시간에 따른 바이러스의 역가를 알기 위하여 위에서 전술한 TCID₅₀ 방법을 사용하였으며 시간별로 바이러스의 역가를 측정, 증식곡선

을 작성하였다.

라. 바이러스의 불활화 및 Adjuvanting

바이러스를 대량 배양하기 위해 각각의 10개의 F150 flask에 Marc145세포 배양시킨 후 80% confluency를 보인 시점에서 CNV-1과 VR2332를 각각 $10^{3.29}TCID_{50}$, $10^{3.45}TCID_{50}$ 로 MARC-145 cell에 감염시킨 후 CNV-1 경우 배양 5일째에, VR2332의 경우 37°C, 5%CO₂하에서 배양 6일째에 수확하였다. 바이러스와 세포를 얼렸다 녹이는 방법을 3회 반복한 후 1,000rpm, 10분, 4°C에서 원심분리하여 상층액만을 수확하였다. 상층액의 일부를 채취하여 상기의 방법으로 바이러스의 역가를 측정하였다. 수확한 바이러스 배양액을 formalin 최종농도를 1:2000 되게 하여 상온에서 2일간 불활화 시켰다. 불활화 시킨 바이러스 배양액을 멸균된 3겹의 거즈로 여과시킨 후 PBS로 24시간 투석시켜 formalin을 제거하였다. 불활화된 바이러스의 일부를 채취하여 Marc-145세포에 접종하여 불활화 유무를 확인하였다. 불활화된 것을 확인한 후 CNV-1와 VR2332를 각각 $10^{6.0}TCID_{50}/ml$ 되게하여 Aluminum hydroxide gel (Rehydrigel)에 24시간 흡착시켜 CNV-1과 VR2332의 이가 불활화 백신을 만들었다. 이때 aluminum hydroxide의 양은 총 부피의 10%되게 첨가하였다.

Recombinant vaccine의 경우 정제시 매우 낮은 yield를 나타내는 이유로 일단 Sf9 cell lysate를 접종하는 방법으로 실시하였다. F120에 배양한 Hi-Five cell에 10 moi로 recombinant Baculovirus를 접종한 후 96시간 배양하여 CPE가 형성한 것을 확인하였다. 상층액과 세포를 수확한 후 2500rpm에서 5분간 원심분리를 한 후 상층액을 제거 한다. Cell pellet을 10ml의 PBS로 부유한 후 6000rpm에서 3분간 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. Cell pellet을 부유시킨 후 sonication을 실시하고 21 gauge needle을 10회 통과시키고 25 gauge needle을 10회 통과시킨 후 BCA방법에 의해 단백질 농도를 측정하였다. 단백질을 300ug/ml당 되게 농도를 조정한 후 앞에서 언급한 방법으로 aluminum hydroxide에 흡착시켰다.

3. 백신에 대한 면역원성 및 안전성 측정

가. Rabbit에서의 접종

Rabbit에서 백신의 면역원성을 측정하기 위해 4개월령 토끼에 접종하였다. CNV-1, VR2332 및 recombinant ORF5를 각각 접종하였고 1차 접종은 피하로 2ml를 주사하였고, 그 후 각 2주마다 근육주사를 통해서 2ml씩 3차까지 접종하였다. 체혈은 접종 2주 후 경

정맥에서 실시하였고, 3차 접종후 3주 후에 심장채혈을 통해 전혈을 채취한 후 혈청을 분리하였다. 음성대조혈청은 10%의 aluminum hydroxide gel만을 2ml 접종하였다.

나. Pig에서의 백신의 면역원성 및 안전성 검사

강원도에 원주에 위치한 K양돈장에서 아래와 같이 실시하였다. 모든의 경우 PRRS백신을 접종하지 않지만 자연감염에 의해 항체가 형성되기 모체이행항체가 최저에 도달하는 3주령에 접종하였다. 돈방관리를 하기 때문에 임의로 분류된 이유자돈의 군별로 접종두수는 20마리로 하였으며 Mycoplasma백신은 3주령에 접종하는 농장이기에 mycoplasma의 백신은 추가로 하지 않았다. 채혈은 각 군당 표식을 하여 10마리를 대상으로 실시하였다. 시험계획은 Table 3-1과 같았다.

백신접종전후 채혈을 실시한 뒤 혈청을 분리한 후 PRRS에 대한 항체를 Herd Check PRRS ELISA kit (IDEXX)를 사용하여 측정하였으며 방법은 제조사의 권장 사용방법에 따라 실시하였다.

Table 3-1. Experimental design

Group	Experimental Condition	Total pigs
1	CNV-1 (whole)	20
2	VR2332 (whole)	20
3	CNV-1+VR2332 (whole)	20
4	CNV-1+VR2332 (whole + recombinant)	20
5	Negative	10

4. *Mycoplasma hyopneumoniae*의 분리 및 백신 개발

가. *Mycoplasma hyopneumoniae*의 신속한 검출을 위한 convetional PCR과 nested PCR

1) 사용균주와 배지

본 연구에 사용된 균주들은 Table 1에 요약된 바와 같다. 총 15 표준주 사용하였으며 균주들은 국립수의과학검역원, 단국대학교, 경북대학교에서 분양 받았다. *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyorhinae*는 modified Friis' medium에서 배양 하였다. 모든 균주는 -70℃에서 보관하였으며, 폐조직의 조각을 접종한 broth도 같은 조건에서 보관하며 사용하였다.

2) 도축돈(豚) 폐병변 부위의 채취

야외에서 분리된 돼지의 폐를 이용한 PCR을 시행하기 위하여, 총 212두(頭)의 도축돈에서 폐병변 부위를 채취하였다. 병변부위의 폐를 절단한 후 채취하려는 부위의 표면은 화염(火焰)처리하여 소독하였다. 표면을 절개한 후 내부의 폐조직을 채취하여 이등분 한 후 일부는 직접 DNA를 추출하였고 나머지는 modified Friis' broth에 접종하였다. Broth에 접종한 후 37℃에서 배양하면서 modified Friis' broth의 색깔이 오렌지색에서 노란색으로 변할 때 수확하여 아래의 방법에 따라 DNA를 추출하였다.

Table 3-2. Bacterial strains used in this study

Species	Strain
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	ATCC 25934
<i>Mycoplasma flocculare</i>	ATCC 27716
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	ATCC 23829
<i>Mycoplasma synoviae</i>	WVU 1853
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	ATCC 19610
<i>Mycoplasma gallinaceum</i>	ATCC 33550
<i>Mycoplasma iowa</i>	ATCC 33552
<i>Mycoplasma pullorum</i>	ATCC 25524
<i>Mycoplasma anatis</i>	ATCC 25524
<i>Pasteurella multocida type D</i>	ATCC 6529
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	ATCC 19395
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 4012
<i>Mycoplasma hyopenumoniae 98-1</i>	Field isolate
<i>Mycoplasma hyopenumoniae 98-2</i>	Field isolate
<i>Mycoplasma hyopneumoniae 98-3</i>	Field isolate

3) DNA의 추출

가) 폐조직으로부터의 DNA추출

폐병변 부위로부터 채취한 약 500mg의 폐조직에 500 μ l의 멸균된 phosphate buffered saline(PBS)를 첨가한 후 해사(海沙)로 균질화시켰다. 가볍게 원심분리한 후 현탁액 300 μ l를 취하여 새 microcentrifuge tube로 옮긴 다음 phenol extraction 방법을 이용하여 DNA를 추출하였다.

나) 배양한 broth에서 DNA분리

배양한 broth culture 1ml을 취하여 12,000 \times g 에서 20분 동안 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 균침전물을 멸균 PBS로 2회 세척한 후 Mattsson 등(1995)이 사용한 방법에 따라 균침전물을 3차 멸균 증류수 50 μ l에 부유시킨 후 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하고 곧바로 얼음에서 5분간 정치시켰다. 열처리한 부유액을 12,000 \times g에서 2분간 4 $^{\circ}$ C의 조건에서 원심분리를 하고 난 뒤, 상층액을 수거하여 template DNA로 사용하였다. RAPD를 위한 표준균주들의 DNA를 가급적 많이 확보하기 위해서 상기의 방법대로 균주량 600 μ l DNA를 추출하여 4 $^{\circ}$ C에서 보관하여 사용하였다.

4) Primer와 PCR 조건

*M. hyopneumoniae*의 16S rRNA gene을 특이적으로 증폭시키기 위해 기존의 보고대로 forward primer 5'-GAG CCT TCA AGC TTC ACC AAG A-3'과 reverse primer 5'-TGT GTT AGT GAC TTT TGC CAC C-3'을 합성하여 primer로 사용하였다. *M. hyopneumoniae*의 염기서열은 GenBank(accession number Y00149)로부터 얻을 수 있었다.^{19,28)} Nested PCR을 위한 primer로는 forward primer의 경우 5'-ACT AGA TAG GAA ATG CAG GGT ATC T-3'(nucleotide position: 463-484)과 reverse primer로는 5'-GTG GAC TAC CAG GGT ATC T-3'(nucleotide position: 797-815)을 합성하여 사용하였다. Conventional PCR은 최종 volume을 50 μ l양으로 반응하였다. PCR용 tube에 10 \times PCR buffer (10mM Tris-HCl[pH9.0], 50mM KCl), 2mM MgCl₂, 10mM dNTP 0.2mM, 20pmol의 각 primers와 template DNA 5 μ l를 혼합한 후 멸균증류수를 첨가하여 동량의 50 μ l가 되게 맞추었다. 특이도를 높이기 위하여 이 mixture를 hot start PCR 방법을 이용했다.

우선 PCR mixture를 95°C를 4분 동안 가열 후에 82°C로 유지시킨 채로 1U의 *Taq* polymerase (Promega Wi. USA)를 첨가한 후 본반응으로 들어갔다. 본반응으로 DNA denaturation 94°C, 45초, primer annealing 60°C, 1분, extension 72°C, 2분간 35회 반복 실행 후 final extension을 72°C 10분간 실시하였다. Nested PCR의 경우 총 용량을 25ul로 하였으며 PCR용 tube에 10×PCR buffer (10mM Tris-HCl[pH9.0], 50mM KCl), 3mM MgCl₂, 10mM dNTP 0.2mM, 20pmol의 각 primers와 template DNA 5μl를 혼합한 후 멸균증류수를 첨가하여 동량의 50μl가 되게 맞추었다. 특이도를 높이기 위하여 이 mixture를 hot start PCR 방법을 이용했다. 우선 PCR mixture를 95°C를 4분 동안 가열 후에 82°C로 유지시킨 채로 1U의 *Taq* polymerase (Promega Wi. USA)를 첨가한 후 본반응으로 들어갔다. 본반응으로 DNA denaturation 95°C, 30초, primer annealing 60°C, 45초, extension 72°C, 30초의 반응을 30회 반복 실행 후 final extension을 72°C 10분간 실시하였다. PCR 산물은 ethidium bromide (0.5mg/ml)가 포함된 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 transilluminator에서 특이 band의 유무를 관찰하였다.

5) 특이도와 민감도 조사

PCR 조건이 *M. hyopneumoniae*의 template DNA에서만 특이적인 PCR 산물을 생성하는지 관찰하기 위하여 Table 1에서 기술한 표준균주들에 대해 PCR을 실시하였다. PCR의 민감도를 알아보기 위하여 *M. hyopneumoniae*의 chromosomal DNA를 DNA calculator (Gene Quant, Pharmacia, USA)를 이용하여 10ng/μl가 되도록 정량한 후에 10fg까지 십진 희석하여 PCR을 실시한 후 증폭산물을 확인하였다.

6) RAPD

*M. hyopneumoniae*에 RAPD 분석을 위한 primer로는 총 12개의 Universal Rice Primer(URPs, Seolin scientific, Korea)를 사용하였다. *M. hyopneumoniae*에 대하여 가장 높은 변별력을 보이는 primer를 스크리닝 하기 위해 *M. hyopneumoniae* template DNA와 각각의 URP를 다음과 같은 조건으로 혼합하였다. 10×*Taq plus* PCR buffer (2mM MgCl₂ 포함), 10mM dNTP, 20pmol의 각 URP primer, template DNA(100ng/μl), 1U *Taq plus* polymerase (Bionics, Korea)를 첨가한 후 멸균증류수로 총 30μl가 되도록 맞추었다. 94°C에서 4분간 pre-denaturation 시킨 후 본반응으로

DNA denaturation 94°C에서 1분, primer annealing 55°C에서 1분, extension 72°C에서 2분간 35 회 실행한 후 final extension을 72°C에서 7분간 실시하였다. PCR 산물을 2% agarose gel에서 전기영동한 후 가장 변별력이 있는 primer를 선발하였다. 선발된 URP를 이용하여, 이번에는 *M. hyopneumoniae*(ATCC25934) 표준주를 비롯하여 8종의 mycoplasma 주, 1종의 *Staphylococcus aureus*, 3종의 *M. hyopneumoniae* 국내분리주 DNA에 대해 상기의 방법대로 PCR을 실시하였다. PCR 산물은 2% agarose gel에서 전기영동한 후 image analysis (Vilberlourmat, France)로 촬영한 후, 각각의 DNA band를 binominal matrix code법으로 치환하여 TREECON package(Ver. 1.3b, Belgium)를 이용하여 분석하였다.

7) CCU의 측정

멸균된 시험관에 Friis medium을 1.8ml을 각각 분주한 뒤 첫 번째 tube에 0.2ml의 배양액을 첨가한 뒤 잘 섞었다. 그리고 0.2ml씩 취하여 계단 희석을 한 후 10-10까지 실시하였다. 희석배수당 3개의 tube를 사용하였다. 공기가 통하지 않도록 마개를 막은 뒤 37°C에서 천천히 shaking을 하면서 4주동안 배양하면서 노란색으로 변하는 희석배수를 평균하여 CCU로 간주하였다.

제 3 장

연구수행 내용 및 결과

제 1 절

1세부과제: 돼지 생식기호흡기증 바이러스의 감염실태 및 신속 진단법 개발

1. 돼지 생식기호흡기증후군 바이러스의 감염실태

PRRSV의 감염실태를 조사하기 위하여 IFA법으로 3년간의 돼지 혈청으로부터 PRRSV에 대한 항체유무를 조사한 결과는 Table 1-1, 1-2, 1-3과 같다. 2000년의 경우 총 1,124개의 돼지 혈청으로부터 PRRSV 특이항체를 검사한 결과 502(44.7%)개의 혈청에서 PRRSV 항체 양성으로 나타났다. 일령별로 살펴보면 1일령에서 30일령, 31일령에서 40일령, 41일령에서 50일령, 51일령에서 60일령 그리고 61일령 이상의 비육돈에서의 항체 양성율은 각각 26.3%, 7.0%, 26.1%, 54.1%, 및 63.0%로 나타났으며, 후보 모돈, 모돈 및 웅돈에서의 항체 양성율은 각각 33.3%, 39.2% 및 55.6%로 나타났다(Table 1-1). 2001년의 경우, 총 3,391개의 가검 혈청으로부터 항체를 검사한 결과 1,765(52.1%)개의 혈청에서 PRRSV 항체 양성으로 나타났다. 일령 별로 살펴보면 1일령에서 30일령, 31일령에서 40일령, 41일령에서 50일령, 51일령에서 60일령, 61일령에서 70일령, 71일령에서 100일령, 그리고 100일령 이상의 비육돈에서의 항체 양성율은 각각 24.2%, 19.0%, 25.4%, 53.7%, 54.8%, 77% 및 79.7% 나타났으며, 후보 모돈, 모돈 및 웅돈에서의 항체 양성율은 각각 61.0%, 30.0% 및 37.5%로 나타났다(Table 1-2). 2002년의 경우, 총 2,181개의 가검 혈청으로부터 항체를 검사한 결과 1,182 (54.2%)개의 혈청에서 PRRSV 항체 양성으로 나타났다. 일령 별로 살펴보면 1일령에서 30일령, 31일령에서 40일령, 41일령에서 50일령, 51일령에서 60일령, 61일령에서 70일령, 71일령에서 100일령, 그리고 100일령 이상의 비육돈에서의 항체 양성율은 각각 15.5%, 22.8%, 40.9%, 41.5%, 67.5%, 76.4% 및 78.6% 나타났으며, 후보 모돈, 모돈 및 웅돈에서의 항체 양성율은 각각 54.7%, 2.9% 및 0%로 나타났다. 총 검사 두수에 대한 항체 양성율은 54.2%로 나타났다(Table 1-3). 총 연구기간 동안 6,696개의 돼지 혈청으로부터 PRRSV 특

이항체를 검사한 결과 3,449개의 혈청에서 PRRSV 항체 양성으로 나타나 51.5%의 감염율을 보였다. 일령별로는 1일령에서 30일령, 31일령에서 40일령, 41일령에서 50일령, 51일령에서 60일령 그리고 61일령 이상의 비육돈에서의 항체 양성율은 각각 24.1%, 19.2%, 28.0%, 50.9%, 및 72.1% 나타났으며, 후보 모돈, 모돈 및 웅돈에서의 항체 양성율은 각각 55.2%, 21.7% 및 33.3%로 나타났다(Table 1-4).

가검 혈청을 수집한 농장 가운데 전형적인 PRRSV 감염증상인 유산, 사산 등의 번식장애와 자돈폐사 및 호흡기증상 모두가 관찰된 농장은 소수에 불과하였으며 대다수의 감염농장에서 관찰된 임상증상은 이유자돈, 육성돈 및 비육돈에서의 호흡기증상과 그로 인한 성장 지연 등 만성감염 증상을 보였다. 일부의 농장에서는 PRRSV 항체가 양성으로 나타났음에도 불구하고 임상증상이 관찰되지 않은 농장도 있었다. 또한 대다수의 만성감염 농장에서 PRRSV 감염이 일부의 돈군에 국한되어 있었으며, 특히 비육돈군에 감염이 국한된 경우가 많았다.

PRRSV 항체 양성율은 일령이 증가함에 따라 높아지는 경향을 보였으며, 51일령 이상의 돼지에서는 50% 이상의 높은 양성율을 보였다. 육성돈 및 비육돈에서 높은 항체 양성율은 최근 야외에서 만성감염 농장에서 PRRSV 감염이 대부분 육성돈 및 비육돈군에 국한되어 있다는 사실과 일치하였다. 30일령 미만의 자돈에서 검출된 항체는 대부분 모체이행항체로 생각되며 31일령에서 40일령에서 낮은 항체율을 보인 것은 이 시기에 모체이행항체가 소멸된 것으로 생각된다. 또한 41일령에서부터 항체 양성율이 증가하는 현상은 이 시기에 PRRSV 감염이 시작되는 것으로 여겨진다. 웅돈에서의 항체 양성율이 비교적 높은 것은 웅돈이 번식돈군에 대한 PRRSV의 중요한 전염원 역할을 할 것으로 생각되며, 특히 웅돈은 종부시 돈군간 또는 농장간 PRRSV 전파에 중요한 매개역할을 할 것으로 생각된다. 30일령 미만의 자돈에서 검출된 항체는 대부분 모체이행항체로 생각되며 31일령에서 40일령에서 낮은 항체율을 보인 것은 이 시기에 모체이행항체가 소멸된 것으로 생각된다. 또한 41일령에서부터 항체 양성율이 증가하는 현상은 이 시기에 PRRSV 감염이 시작되는 것으로 여겨진다.

Table 1-1. Seroprevalence of PRRSV antibody in swine sera collected in 2000

Pig	Age(Days)	No. of tested	No. of positive	Positive rate(%)
Fattener	1 - 30	266	70	26.3
	31 - 40	43	3	7.0
	41 - 50	69	18	26.1
	51 - 60	85	46	54.1
	>61	449	283	63.0
Gilt		45	15	33.3
Sow		158	62	39.2
Boar		9	5	55.6
Total		1,124	502	44.7

Table 1-2. Seroprevalence of PRRSV antibody in swine sera collected in 2001

Pig	Age(Days)	No. of tested	No. of positive	Positive rate(%)
Fattener	1 - 30	385	93	24.2
	31 - 40	373	71	19.0
	41 - 50	59	15	25.4
	51 - 60	121	65	53.7
	61 - 70	447	245	54.8
	71 - 100	596	459	77.0
	>100	681	543	79.7
Gilt		177	108	61.0
Sow		544	163	30.0
Boar		8	3	37.5
Total		3,391	1,765	52.1

Table 1-3. Seroprevalence of PRRSV antibody in swine sera collected in 2002

Pig	Age(Days)	No. of tested	No. of positive	Positive rate(%)
Fattener	1 - 30	71	11	15.5
	31 - 40	158	36	22.8
	41 - 50	22	9	40.9
	51 - 60	65	27	41.5
	61 - 70	379	256	67.5
	71 - 100	479	366	76.4
	>100	541	425	78.6
<hr/>				
Gilt		75	41	54.7
<hr/>				
Sow		384	11	2.9
<hr/>				
Boar		7	0	0
<hr/>				
Total		2,181	1,182	54.2
<hr/>				

Table 1-4. Seroprevalence of PRRSV antibody in swine sera collected from July, 2000 to December, 2002

Pig	Age(Days)	No. of tested	No. of positive	Positive rate(%)
Fattener	1 - 30	722	174	24.1
	31 - 40	574	110	19.2
	41 - 50	150	42	28.0
	51 - 60	271	138	50.9
	>61	3,572	2,577	72.1
Gilt		297	164	55.2
Sow		1,086	236	21.7
Boar		24	8	33.3
Total		6,696	3,449	51.5

2. 돼지 생식기호흡기증후군 바이러스의 신속진단법 개발

가). RT-PCR

PRRSV 국내분리주인 CNV strain으로부터 추출한 RNA를 ORF6 및 ORF7 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 증폭한 결과 525bp의 ORF6 전체 유전자와 319bp의 부분적인 ORF6 유전자 그리고 371bp의 ORF7 유전자를 증폭할 수 있었다(Fig. 1-2). 또한 ORF5 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 증폭한 결과 612bp의 유전자를 증폭할 수 있었다(Fig. 1-3).

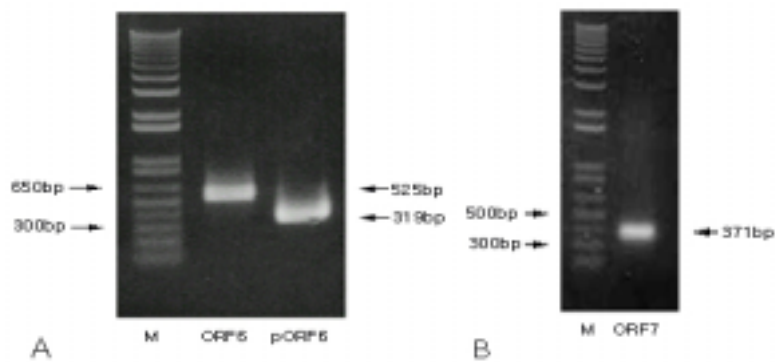


Fig. 1-2. Detection of PRRSV ORF6(A) and ORF7(B) gene by RT-PCR.
 M: Marker, ORF6: full ORF6 gene, pORF6: partial ORF6 gene

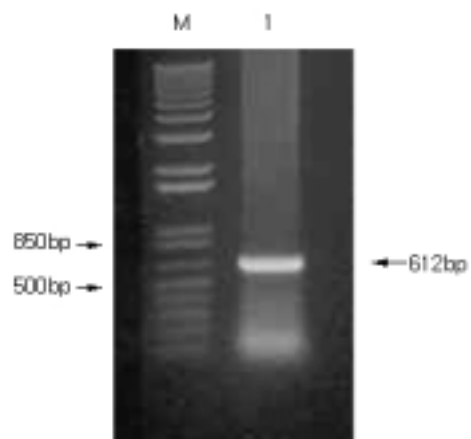


Fig. 1-3. Detection of PRRSV ORF5 gene by RT-PCR.
 M: Marker

나). PRRSV 유전자 발현

(1). N 단백질 발현

PRRSV에 특이적인 항체를 검색할 수 있는 ELISA법을 개발하기 위하여 ORF7 유전자를 대장균 발현체계를 이용하여 발현하였으며 발현된 ORF7의 특성을 SDS-PAGE (Fig. 1-4A, Fig. 1-5A)와 Western blotting (Fig. 1-4B, Fig. 1-5B)법으로 분석한 결과 SDS-PAGE에서 41 kDa의 ORF7 band를 확인할 수 있었다. 또한 GST 항체 (Fig. 1-4B)와 PRRSV ORF7에 특이적인 단클론항체 (Fig. 1-5B)를 사용하여 Western blotting을 실시한 결과 뚜렷한 ORF7을 확인할 수 있었으며 41 kDa의 크기에서 특이적인 band를 형성함을 확인하였다.

(2). M 단백질 발현

(가). Full-size M 단백질 분석

Full-size M 단백질 발현을 위해 생산한 형질전환 *E. coli*에 IPTG를 가하여 유도된 GST-M fusion protein 발현을 SDS-PAGE와 Western blotting을 실시하여 확인한 결과 Fig. 1-6와 같은 결과를 얻었다. SDS-PAGE를 실시한 결과 negative control로부터 발현이 유도된 GST protein(26kDa)은 명확한 band로 확인이 되었으나 발현이 유도된 Full-length M protein에 대해서는 뚜렷한 band를 확인할 수 없었으며 Western blotting으로 확인한 결과에서도 GST protein에 대해서는 뚜렷한 band를 확인할 수 있었으나 M protein에 대해서는 어떠한 band도 확인할 수 없어 full-length M 단백질의 발현이 일어나지 않았음을 알 수 있었다.

(나). Partial M 단백질 분석

Partial M(pM) 단백질 발현을 위해 생산한 형질전환 *E. coli*에 IPTG를 가하여 유도된 GST-pM fusion protein 발현을 SDS-PAGE와 Western blotting을 실시하여 확인한 결과는 Fig. 1-7과 같다. SDS-PAGE를 실시한 결과 negative control로부터 발현이 유도된 GST protein(26kDa)은 명확한 band로 확인이 되었으나 발현이 유도된 pM protein에 대해서도 뚜렷한 band를 확인할 수 없었다. 하지만 Western blotting으로 확인한 결과, GST protein에 대해서 뚜렷한 band를 확인할 수 있었으며 pM protein에 대해서도 명확한 band를 확인하여 발현이 유도되었음을 알 수 있었다.

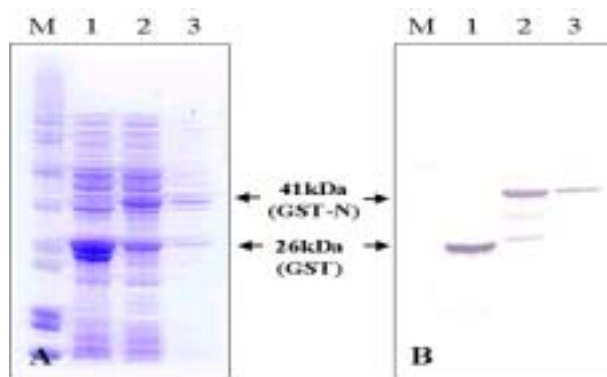


Fig. 1-4. Analysis of expressed GST-N recombinant protein in *E. coli* BL 21 by SDS-PAGE (A) and Western blotting using GST antibody (B).

M : molecular weight marker, lane 1 : supernatant of sonicated bacterial cells containing GST protein, lane 2 : supernatant of sonicated bacterial cells containing GST-N recombinant fusion protein, lane 3 : cell pellet of sonicated bacterial cells containing GST-N recombinant fusion protein

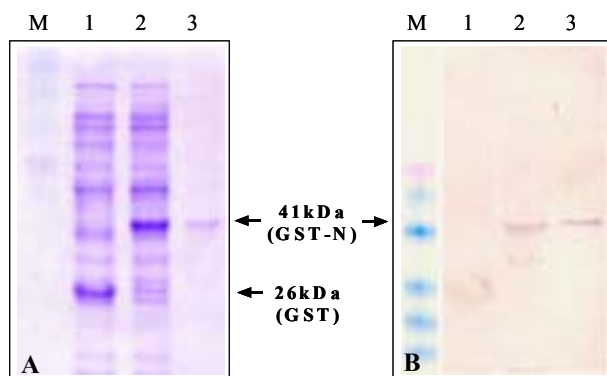


Fig. 1-5. Analysis of expressed GST-N recombinant protein in *E. coli* BL 21 by SDS-PAGE (A) and Western blotting using PRRSV-N specific monoclonal antibody (B).

M : molecular weight marker, lane 1 : supernatant of sonicated bacterial cells containing GST protein, lane 2 : supernatant of sonicated bacterial cells containing GST-N recombinant fusion protein, lane 3 : cell pellet of sonicated bacterial cells containing GST-N recombinant fusion protein

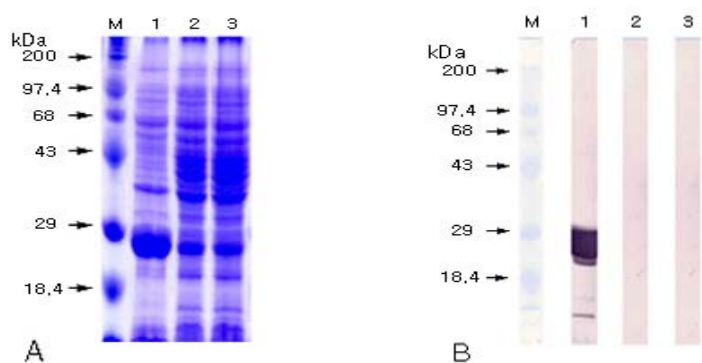


Fig. 1-6. Analysis of expressed full-length ORF6 fusion protein in *E. coli* by SDS-PAGE(A) and Western blotting(B).

M: Marker, lane 1: Induced pGEX4T-1, lane 2: Uninduced pGEX-ORF6, lane 3: Induced pGEX-ORF6

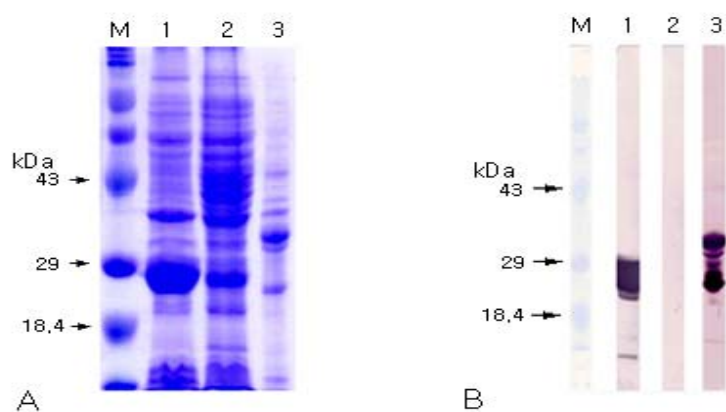


Fig. 1-7. Analysis of expressed partial-length ORF6(pORF6) fusion protein in *E. coli* by SDS-PAGE(A) and Western blotting(B).

M: Marker, lane 1: Induced pGEX4T-1, lane 2: Uninduced pGEX-pORF6, lane 3: Induced pGEX-pORF6

(3). E 당단백 발현

(가). Recombinant virus에 의한 세포변성효과

Recombinant baculovirus와 wild type baculovirus를 Sf21 세포에 감염시킨 결과 Fig. 1-8과 같은 세포변성효과(Cytopathic effects: CPE)를 관찰할 수 있었다. 즉, 바이러스를 접종하지 않은 Sf21 세포(A)에서는 어떠한 세포변성효과를 관찰할 수 없었으나 polyhedrin 유전자를 결손시키고 그 자리에 ORF5 유전자를 삽입시킨 recombinant virus가 감염된 Sf21 세포(B)에서는 감염 후 polyhedrin은 형성되지 않고 세포가 커지는 recombinant virus 특유의 CPE를 관찰할 수 있었다.

(나). 간접 형광항체법에 의한 recombinant virus 확인

PRRSV에 특이적인 돼지 혈청을 사용하여 간접형광항체법으로 recombinant virus의 발현을 확인한 결과 Fig. 1-8과 같이 recombinant virus가 감염된 Sf21 세포(D)에서만 강한 형광이 관찰되었다. 그러나 바이러스를 접종하지 않은 대조군(C)에서는 어떠한 형광도 관찰되지 않았다.

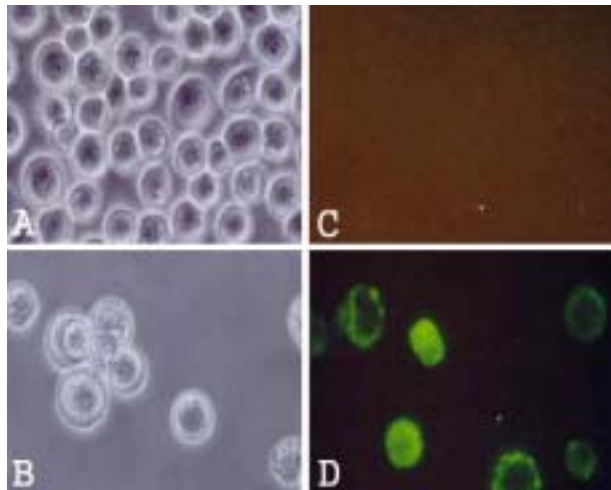


Fig. 1-8. Cytopathic effects and immunofluoresences produced by recombinant virus in Sf21 cells.

Sf21 cells were infected with mock(A), and recombinant virus(B). Mock(C) and recombinant virus(D) infected Sf21 cells were reacted with PRRSV-specific porcine antiserum.

(다). 발현 E 당단백 확인

SDS-PAGE와 Western blot법으로 발현된 E 당단백을 확인한 결과는 Fig. 1-9과 같다. SDS-PAGE를 실시한 후 Coomassie blue로 염색하여 본 결과 뚜렷한 GP 단백질 band를 확인할 수 없었다. 그러나 PRRSV에 특이적으로 반응하는 돼지 혈청을 사용하여 Western blot을 한 결과, 25Kda 크기의 당단백을 확인할 수 있었다.

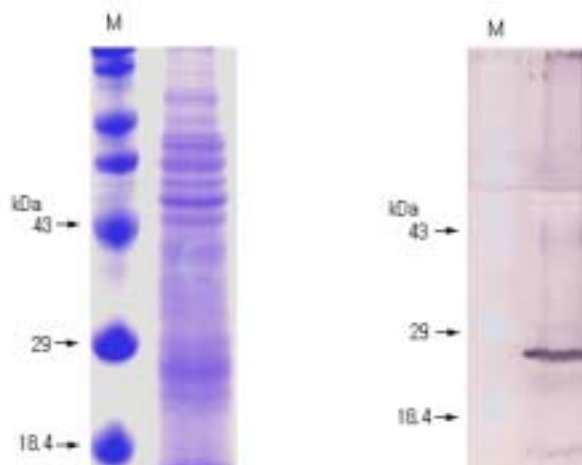


Fig. 1-9. Analysis of expressed ORF5 protein in baculovirus by SDS-PAGE and Western blotting.

M: Marker

다). PRRSV 특이항체 진단용 ELISA 개발

(1) ELISA 표준화

(가). 발현단백질과 혈청 희석농도 결정

PRRSV 특이항체 검출을 위한 ELISA법은 GST 항체를 이용한 간접 sandwich ELISA (i-ELISA) 방법을 개발하였다. 우선 GST 항체를 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 ELISA plate에 부착시켰으며, 발현단백질 항원의 적정농도를 측정기 위해 1차 항체로 ORF7에 특이적인 단클론항체를 사용하였다. 1차 항체와 발현단백질의 반응성을 조사한 결과 대조군인 GST 발현단백질과는 반응성이 거의 없는 반면에 GST-N 발현단백질과는 높은 반응성을 보였으며 발

현단백질의 적정농도를 조사한 결과 1:3,200이하의 희석농도에서 흡광도가 저하되어 발현 단백질의 희석농도는 1:3,200으로 결정하였다 (Fig. 1-10). 동일한 방법으로 i-ELISA에 적용할 검사혈청의 적정 희석농도를 조사한 결과 혈청 희석농도 1:100에서 양성혈청과 음성혈청간의 OD값의 차이가 뚜렷하여 검사 혈청의 적정 희석농도는 1:100으로 결정하였다 (Fig. 1-11).

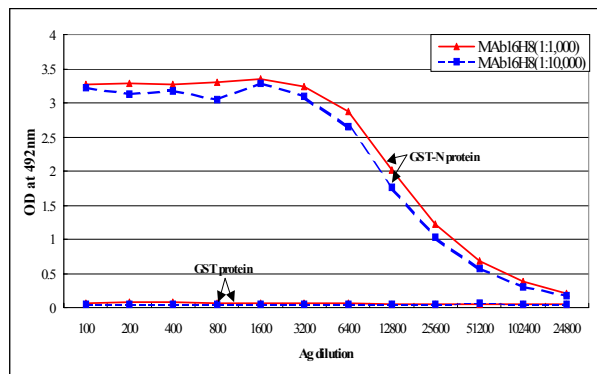


Fig. 1-10. Determination of optimal concentration of recombinant GST-N (rGST-N) protein used for indirect sandwich ELISA

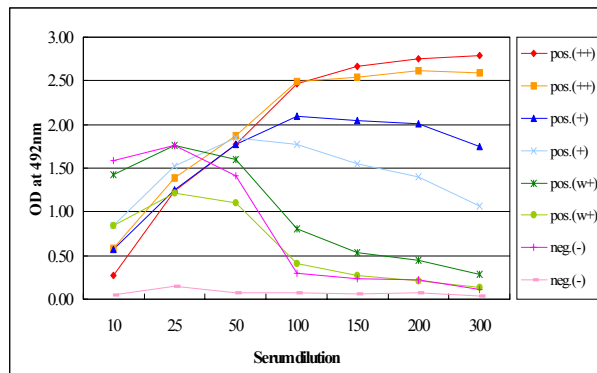


Fig. 1-11. Determination of optimal dilution of test serum used for indirect sandwich ELISA

(나). 대조 혈청 panel의 결정

대조 혈청의 선별을 위해 ELISA titration을 실시한 결과 Fig. 1-12에서 보는 바와 같이 강한 양성혈청 희석배수는 upper limit와 central point의 중간 OD 값을 보이는 1:4의 희석배수로, 약한 양성혈청 희석배수는 central point와 lower limit의 중간 OD 값을 보이는 1:32를 희석배수로 결정하였다. 위의 결과들을 종합하여 PRRSV에 특이적인 항체를 진단할 수 있는 i-ELISA를 Table 1-6과 같이 표준화하였다.

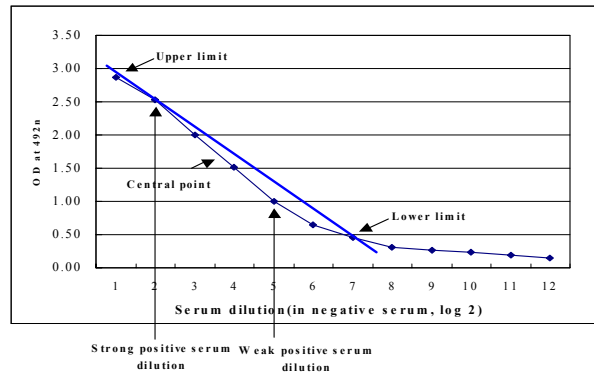


Fig. 1-12. Establishment of control serum panel used for indirect sandwich ELISA

Table 1-6. Standardization of indirect sandwich ELISA

Dilution factor	Diluted concentration	Dilution buffer	incubation period
Capture antibody	5 μ g/ml	0.01M PBS	37°C, 1hr
Antigen	1:3,200	Blocking buffer ^a	37°C, 1hr
Serum	1:100	Blocking buffer	37°C, 1hr
Conjugate (HRP conjugated anti-swine IgG)	1:2,000	Blocking buffer	37°C, 1hr
Color development (OPD)		Citrate-phosphate buffer	25°C, 10min
Stop solution (1M H ₂ SO ₄)			
Reading	492nm		

^aBlocking buffer : 5% skim milk in PBS

(다). ELISA의 음성기준치 설정

PRRSV의 특이항체 검색용으로 상용화된 진단키트인 HerdCheck* PRRS virus antibody test kit(IDEXX[®])에서 PRRSV 항체 음성으로 판정된 혈청 144개를 대상으로 i-ELISA를 실시하였다. 이들 혈청에 대한 반응성을 분석한 결과 혈청 144개의 평균 s/p ratio는 0.1, 표준편차는 0.16이었으며 95% 신뢰도 기준 [cut off = 평균 s/p ratio (0.1) + 2× 표준편차 (0.16)]을 보이기 위한 조건으로 양성 판정치 s/p ratio (검사혈청 흡광도/대조양성 혈청 흡광도)는 0.42였다.

(2). ELISA 평가

본 실험에서 개발된 i-ELISA의 진단효율을 조사하기 위해 315개의 야외 혈청을 대상으로 HerdChek* PRRS virus antibody test kit(IDEXX[®])와 i-ELISA를 비교 분석한 결과 HerdChek* PRRS virus antibody test kit(IDEXX[®])에서 양성혈청으로 판정된 178개의 혈청 시료 중 i-ELISA는 164개를 양성혈청으로, 14개를 음성혈청으로 판단하였다. 또한 HerdChek* PRRS virus antibody test kit(IDEXX[®])에서 음성혈청으로 판정된 137개의 혈청 시료 중 i-ELISA는 131개를 음성혈청으로, 6개를 양성혈청으로 판단하였다(Table 1-7). 위의 결과를 토대로 본 연구에서 개발된 i-ELISA의 민감도(sensitivity)와 특이성(specificity)를 조사한 결과, 양성 검출의 민감도는 92.1%이었고 음성 검출의 특이성은 95.6%로 나타났다(Table 1-10). 반면에 c-ELISA의 진단효율을 조사하기 같은 혈청을 이용하여 i-ELISA

와 동일한 방법으로 비교 분석한 결과, HerdChek* PRRS virus antibody test kit(IDEXX®)에서 양성혈청으로 판정된 178개의 혈청 시료 중 c-ELISA는 134개를 양성혈청으로, 44개를 음성혈청으로 판단하였다. 또한 HerdChek* PRRS virus antibody test kit(IDEXX®)에서 음성혈청으로 판정된 137개의 혈청 시료 중 i-ELISA는 111개를 음성혈청으로, 26개를 양성혈청으로 판단하였다(Table 1-8). 본 연구에서 개발된 c-ELISA의 민감도(sensitivity)와 특이성(specificity)을 조사한 결과, 양성 검출의 민감도는 75.3%이었고 음성 검출의 특이성은 81.0%로 나타났다(Table 1-10).

Table 1-7. Results of 315 field serum samples examined by commercial ELISA kit(IDEXX) and i-ELISA

		i-ELISA		
		Positive	Negative	Total
IDEXX ^a	Positive	164	14	178
	Negative	6	131	137
	Total	170	145	315

^aIDEXX : HerdChek* PRRS virus antibody test kit(IDEXX®)

Table 1-8. Results of 315 field serum samples examined by commercial ELISA kit(IDEXX) and c-ELISA

		c-ELISA		
		Positive	Negative	Total
IDEXX ^a	Positive	134	44	178
	Negative	26	111	137
	Total	160	145	315

^aIDEXX : HerdChek* PRRS virus antibody test kit(IDEXX®)

Table 1-9. Results of 315 field serum samples examined by i-ELISA and c-ELISA

		c-ELISA		
		Positive	Negative	Total
i-ELISA	Positive	146	24	170
	Negative	14	121	145
	Total	160	145	315

Table 1-10. Comparison of sensitivity and specificity of the 3 serological tests used for validation of the i-ELISA and c-ELISA

Test X	Reference test					
	IDEXX ELISA		i-ELISA		c-ELISA	
	Sensitivity ^a	Specificity ^b	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity
IDEXX ELISA	*	*	96.5	90.3	83.8	76.6
i-ELISA	92.1	95.6	*	*	91.3	83.4
c-ELISA	75.3	81.0	85.9	83.4	*	*

$$^a \text{Sensitivity}(\text{test X}) = 100 \times \frac{\text{number of positive in both X and reference test}}{\text{total number of positive in the reference test}}$$

$$^b \text{Specificity}(\text{test X}) = 100 \times \frac{\text{number of negative in both X and reference test}}{\text{total number of negative in the reference test}}$$

3). 고찰

본 연구에서는 대장균 발현체계를 통해 발현된 nucleocapsid (N) 단백질을 효소면역 흡착법 (ELISA)에 항원으로 이용하고자 실험을 수행하였다.

MA104 세포로부터 유래된 permissive clone (MARC 145, CL2621)에서 PRRSV가 성공적으로 증식되면서 PRRSV의 혈청학적 진단으로 간접형광항체법(IFA)과 면역효소단층법(IPMA)이 많은 실험실에서 이용되고 있으며 두 방법 모두 PRRSV의 혈청학적 진단에 매우 민감한 검사로 알려져 있다. 그러나 돼지 폐포탐식세포를 이용해야 하는 IPMA의 경우 탐식세포의 모든 batch가 PRRSV 감염에 균일하게 민감한 것이 아니며 또한 일부 돼지 혈청이 감염되지 않은 대조군의 탐식세포에 반응함으로써 비특이반응이 나타난다는 단점이 있다. IFA 역시 감염된 세포 상층액으로부터 회수되는 바이러스의 감염 역가가 낮고 미국 분리주와 유럽 분리주가 항원적으로 다르기 때문에 false-negative 진단의 위험이 뒤따르는 단점이 있다. 비록 ELISA가 IFA에 비해 비교적 민감도와 특이도가 높지만 이 검사법 역시 항원으로서 바이러스 전체를 사용하고 있어 이로부터 얻어진 바이러스 단백질의 양이 적으므로 대량의 혈청시료를 진단하는 방법으로 적합하지 않다. 최근에는 이러한 문제점을 극복하기 위해 단백질 발현체계를 이용하여 생산된 재조합 단백질을 항원으로 이용한 ELISA가 개발되고 있는 추세이다.

PRRSV에 대한 숙주의 체액성 면역에 관한 연구가 수행되고 있는 가운데 돼지에서 PRRSV 감염동안 생산되는 대부분의 항체가 N 단백질에 특이적이라는 것과 감염된 세포에서 대량으로 발현된다는 것이 보고되었다. N 단백질은 같은 genotype의 다른 분리주들에 있어 비교적 conserved region이라고 알려져 있으나 미국 분리주와 유럽 분리주 사이의 N 단백질은 아미노산서열에 있어 59%의 낮은 상동성을 보이고 있다. 그럼에도 불구하고 N 단백질에 특이적인 단크론항체를 이용한 실험에서 두 분리주 사이에 공통의 epitope가 존재하며 N 단백질 내에 존재하는 5개의 antigenic domain 중에서 단백질의 central region (aa 50~66)에 두 분리주가 공통적으로 인지하는 conformational epitope가 있음이 Meulenberg 등에 의해 밝혀졌다. 이런 결과를 근거로 N 단백질이 바이러스 특이항체를 검출하거나 질병진단에 적합한 항원으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 N 단백질을 ELISA의 항원으로 이용하고자 대장균 발현체계를 이용하여 발현하였으며, ORF5와 ORF6 유전자도 함께 발현하여 분자생물학적인 특성을 규명하였다.

간접 ELISA에 항원으로 사용되는 N 재조합 단백질은 *E. coli*보다 baculovirus 발현체계를 이용하여 많이 발현되어 왔는데 그 이유는 baculovirus에서 발현된 N 단백질이 *E.*

*coli*보다 ELISA의 민감도와 특이도를 증진시키기 때문으로 알려졌다. 그러나 baculovirus expression system은 항원을 생산하기 위해 곤충 세포를 배양해야 하는 번거로움과 세포를 배양하는데 소 태아혈청(Fetal calf serum)이 사용되기 때문에 돼지 혈청과 반응하는데 있어 비특이반응이 나타날 수 있다는 단점이 있다. 또한 PRRSV N 단백질은 피막에 존재하고 있는 E 당단백과 달리 glycosylation이 되어 있지 않아 glycosylation에 따른 conformation 변화가 적은 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 대장균 발현체계를 통해 N 재조합 단백질을 발현시켜 ELISA에 항원으로 이용하였다.

본 실험에서 개발된 i-ELISA의 평가는 PRRSV 특이항체 검색용으로 상용화된 HerdChek[®] PRRS virus antibody test kit(IDEXX[®])로 하였으며 진단효율성을 평가하기 위해 315개의 야외혈청을 이용하여 비교하였다. HerdChek[®] PRRS virus antibody test kit(IDEXX[®])는 현재 사용되어지고 있는 진단 방법 중 민감도(sensitivity)와 특이성(specificity)이 높아 최근에 많이 이용되고 있는 방법 중의 하나이다. 본 실험의 진단효율성은 315개의 야외혈청을 판단하였으며 그 결과 i-ELISA의 sensitivity는 92.1%, specificity는 95.6%로 나타났다. 이는 i-ELISA가 혈청 14개를 false-negative로, 6개를 false-positive로 판단한 것을 바탕으로 얻어진 결과이다. 그러나 이것은 HerdChek[®] PRRS virus antibody test kit(IDEXX[®]) 단독검사에만 의존하여 비교되어진 결과이므로 추후 기존의 진단 방법인 IFA 또는 IPMA와 병행되어 진행된다면 본 연구에서 개발된 i-ELISA를 PRRSV 특이항체를 검색할 수 있는 간단하고 신속·정확한 ELISA kit로 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 반면에 같은 방법으로 c-ELISA의 진단효율성을 평가한 결과, c-ELISA의 sensitivity는 75.3%, specificity는 81.0%로 나타나 i-ELISA보다 훨씬 진단효율성에 있어서 낮은 것으로 나타났다. 일반적으로 c-ELISA는 민감도 및 특이성에 있어서 indirect ELISA 보다 높은 것으로 알려져 있다. 하지만 본 연구에서 c-ELISA의 진단효율성이 낮게 나타난 것은 c-ELISA에 사용한 단클론항체의 competition activity가 낮은 것으로 추정된다. Competition activity가 높은 단클론항체를 선발하여 연구를 수행하면 특이성 및 민감도가 높은 진단법을 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

PRRSV는 현재 양돈산업이 성행하는 모든 나라에 이미 상재되어 있으며 국내에서도 PRRS의 발생이 보고된 이후 지속적으로 전파되고 있고 지금도 계속 진행되고 있는 실정이다. 따라서 PRRSV 발생에 따른 효과적인 진단법이 필요하다고 생각되며 본 연구에서 개발된 i-ELISA가 국내 PRRSV의 혈청학적 진단을 연구하는데 있어 도움이 될 것이라고 사료된다.

나. PRRSV 특이 단클론항체를 이용한 신속진단키트 개발

가). 단클론항체 생산 및 특성

복강 내 접종 및 foot pad를 통하여 면역시킨 mouse를 사용하여 세포융합을 실시한 결과, 모두 15개의 PRRSV에 특이적으로 반응하는 hybridoma를 확보하였으며 이들의 특성을 규명한 결과는 Table 1-11과 같다. 생산된 단클론항체의 isotype을 확인한 결과, 하나의 단클론항체 4D7은 IgM, 3개(6B10, 6H8, 7D8)의 단클론항체는 IgG2a, 다른 3개(5G5, 6D7, 8A2)의 단클론항체는 IgG2b 그리고 나머지 8개(2G7, 6G3, 8D10, 9B4, 12C4, 13F11, 16H8, 17F11)의 단클론항체는 모두 IgG1이었다. 이들 모두 IFA에서 PRRSV와 반응하여 형광을 나타내 PRRSV에 특이적인 단클론항체로 확인되었으나(Fig. 1-14), FFN법 결과 모두 중화력이 없는 것으로 나타났다. FA법으로 확인한 복수의 항체역가는 5G5와 6G3의 경우 800과 1,600으로 낮게 나타난 반면 나머지 단클론항체는 6,400-25,600으로 나타났다. 3개(4D7, 5G5, 6G3)의 단클론항체의 단백특이성을 Western blotting법으로 확인한 결과 다른 단클론항체와 달리 N 단백질에서 특이적인 band를 확인할 수 없었으며 ORF5 E 당단백에서도 특이적인 band를 확인할 수 없어 최종적으로 단백특이성을 확인할 수 없었다. Whole 바이러스를 복강 내 및 food-pad를 통하여 접종시킨 mouse를 사용하여 생산한 12개의 단클론항체를 Western blotting법으로 PRRSV 단백특이성을 확인한 결과 N 단백질에서 명확한 band가 나타나 모두 N 단백질(Nucleocapsid protein: N)에 특이적인 것으로 확인되었다(Fig. 1-15). Whole 바이러스를 면역시킨 mouse를 사용한 세포융합에서는 PRRSV 피막에 존재하고 있는 당단백(Glycoprotein: ORF5 유전자 product)에 특이적으로 반응하는 단클론항체를 생산하지 못하여 baculovirus에서 발현된 ORF5 단백을 정제하여 이를 mouse에 면역시켜 세포융합을 실시하였다. 세포융합 결과, 3개(4D7, 5G5, 6G3)의 PRRSV 특이 단클론항체를 생산하였으나 이들 모두 예상하였던 것과는 달리 FFN법으로 PRRSV를 중화시키지 못하였다.

생산된 단클론항체와 다른 종류의 PRRSV strain 그리고 다른 돼지 바이러스와의 반응성을 FA법으로 확인한 결과는 Table 1-12와 같다. 단클론항체 생산에 면역원으로 사용된 PRRSV CNV strain은 물론 다른 PRRSV 국내분리주인 PL96-1, PL97-1, 그리고 PL97-1/LP1과 반응에서 양성으로 나타났다. 국외 표준주로 사용한 미국 분리주 VR2332와는 반응한 반면 유럽 분리주인 Lelystad와는 반응을 하지 않았다. 반면 돼지 circovirus, parvovirus, rotavirus, 그리고 TGE 바이러스와는 반응하지 않아 생산된 단클론항체가 모두 PRRSV에 특이적인 것임을 확인할 수 있었다.

Table 1-11. Characterization of PRRSV-specific monoclonal antibodies(MAbs)

MAbs	Immunogen ■	Inoculation route#	Isotype	Protein specificity*	Antibody titer	
					FFN	FA
2G7	W	FP	G1	N	<10	6,400
4D7	ORF5	FP	M	?	<10	1,600
5G5	ORF5	FP	G2b	?	<10	800
6B10	W	IP	G2a	N	<10	6,400
6D7	W	IP	G2b	N	<10	12,800
6G3	ORF5	FP	G1	?	<10	1,600
6H8	W	FP	G2a	N	<10	12,800
7D8	W	FP	G2a	N	<10	6,400
8A2	W	IP	G2b	N	<10	12,800
8D10	W	FP	G1	N	<10	12,800
9B4	W	FP	G1	N	<10	25,600
12C4	W	IP	G1	N	<10	25,600
13F11	W	IP	G1	N	<10	6,400
16H8	W	FP	G1	N	<10	25,600
17F11	W	IP	G1	N	<10	12,800

■ W : CNV whole virus, ORF5 : E glycoprotein expressed in Baculovirus

#FP : food-pad inoculation, IP : intraperitoneal inoculation

*N : Nucleocapsid protein, ? : Not confirmed

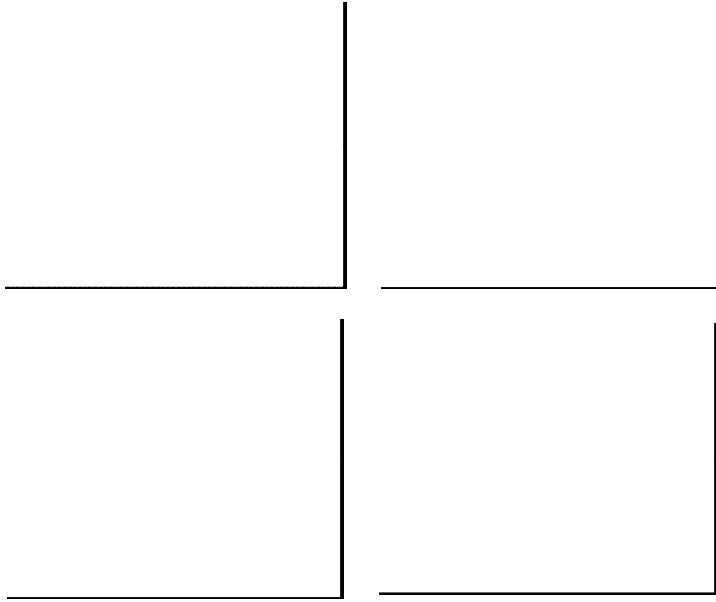


Fig. 1-14. Results of IFA test with PRRSV-specific MAbs
A:6H8, B:16H8, C:9B4, D:SP2/0 배양상층액(negative control)

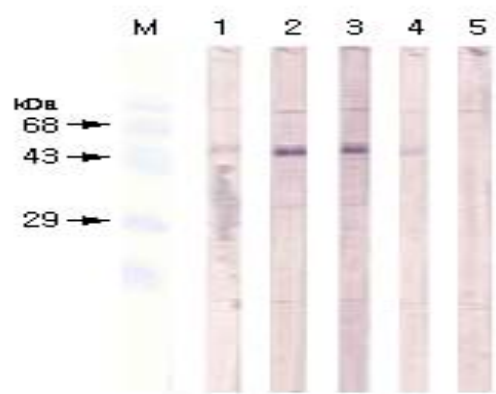


Fig. 1-15. Determination of viral protein specificity of PRRSV-specific monoclonal antibodies(MAbs) by Western blotting.

M: Marker, lane 1:9B4, lane 2:8D10, lane 3:16H8,
lane 4:6H8, lane 5:7D8

Table 1-12. Reactivity of PRRSV-specific MAbs with other viruses by FA test.

MAbs	PRRSV strains						Circo	PPV	Rota	TGE
	CNV	VR2332	Lelystad	PL96-1	PL97-1	LP1				
2G7	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
4D7	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
5G5	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
6B10	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
6D7	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
6G3	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
6H8	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
7D8	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
8A2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
8D10	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
9B4	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
12C4	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
13F11	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
16H8	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
17F11	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-

나). 신속 진단키트

(1). 단클론항체 정제 및 선발

Sepharose-Protein A column를 사용하여 immunoaffinity chromatography법으로 복수로부터 immunoglobulin을 정제하고 정제된 단클론항체를 ELISA법으로 시험한 결과 O.D.값이 6D7은 2.12, 16H8은 2.31로 확인되었다. PRRSV N 단백 특이 단클론항체를 각각의 조

합으로 하여 detector antibody와 capture antibody를 immunochromatography법으로 확인한 결과 6D7은 capture antibody로, 16H8은 detector antibody로 사용하는 것이 진단키트에 효과적인 것으로 나타났다.

(2). Colloidal gold 농도

Conjugate용 colloidal gold의 농도를 520nm에서 OD가 1, 2, 5가 되도록 조정 한 후 immunochromatography 실험을 수행한 결과, OD 5에서는 반응 line은 선명하나 background가 변색되고 OD 2에서는 반응 line도 선명하고 background색도 변색이 없고 OD 1에서는 background는 깨끗하나 반응 line이 흐려서 colloidal gold 의 농도는 OD 2의 값이 적당한 것으로 확인되었다(Fig. 1-16).

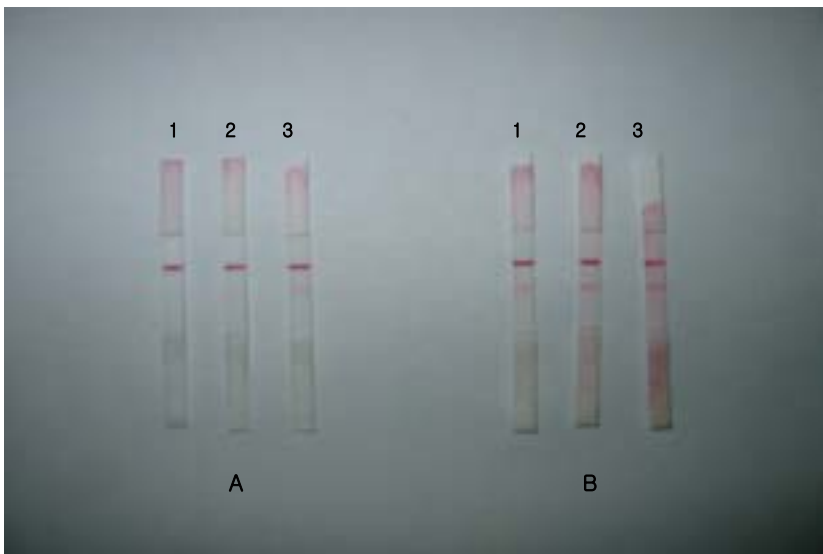


Fig. 1-16. Determination of colloidal gold concentration for conjugation and selection of detector and capture monoclonal antibody(MAb) for rapid diagnostic kit.

Colloidal gold concentration was adjusted to OD value 1, 2, and 5 at 520nm and tested using MAb 6D7 and 16H8 as detector and capture antibody(A), respectively or MAb 16H8 and 6D7 as detector and capture antibody(B), respectively.

Lane 1: OD value 1, lane 2: OD value 2, lane 3: OD value 5

(3). 신속 진단키트의 특이성 확인

제작된 신속진단키트의 특이성을 국외 PRRSV 표준주인 VR2332와 Lelystad, 그리고 국내 분리주인 PL96-1, PL97-1, CNV, PL97-1/LP1 감염 조직배양액을 사용하여 확인한 결과, Lelystad strain을 제외한 모든 PRRSV에서 band가 확인되었다(Fig. 1-17A). 또한 돼지에서 문제가 되고 있는 돼지파보바이러스(PPV), 일본뇌염바이러스(JEV), 돼지췌코바이러스 2형(PCV-2), 로타바이러스(Rota), 전염성위장염바이러스(TGE), 레오바이러스(Reo) 감염 조직배양액을 사용하여 확인한 결과, 모든 바이러스에서 음성으로 나타났다(Fig. 1-16B).

Fig. 1-17. Specificity of rapid diagnostic kit for PRRSV
Different strains(VR2332, Lelystad, PL96-1, PL97-1, CNV,
PL97-1/LP1) of PRRSV(A) and various porcine viruses
(Porcine parvovirus:PPV, Japanese encephalitis virusJEV,
Porcine circovirus type 2:PCV-2, Porcine rotavirus:Rota,
Transmissible gastroenteritis virus:TGE, Porcine reovirus:Reo)
(B) were tested using rapid diagnostic kit for PRRSV.

(4). 신속 진단키트의 민감도확인

제작된 신속 진단키트의 민감도를 대장균에서 발현된 nucleocapsid 단백(rGST-ORF7)을 이용하여 확인한 결과 rGST-ORF7의 농도가 0.8 ug/ml일때 뚜렷하게 구별되었으며 0.08 ug/ml에서도 육안적으로 band가 확인되어 8 ng까지 검색할 수 있는 것으로 확인되었다 (Fig. 1-18). 대조균으로 사용한 GST만이 발현된 단백질에서는 음성으로 나타났다. 또한 PRRSV의 역가가 $10^{7.5}$ TCID₅₀/ml인 PL97-1을 10배 단계 희석하여 반응정도를 확인한 결과, 10^{-1} 에서 band가 확인되어 $10^{7.5}$ TCID₅₀/ml까지 검색할 수 있음을 확인하였다(Fig. 1-19).



Fig. 1-18. Sensitivity of rapid diagnostic kit for PRRSV
 rGST-ORF7(8 ug/ml) was diluted from 10^8 to 10^4 and tested using rapid diagnostic kit for PRRSV



Fig. 1-19. Sensitivity of rapid diagnostic kit for PRRSV
 PRRSV PL97-1 strain(10^8 TCID $_{50}$ /ml) was diluted from 10^8 to 10^4 and tested using rapid diagnostic kit for PRRSV

(5). 신속 진단키트의 야외 시험

RT-PCR법으로 PRRSV 양성으로 확인된 가검물로부터 제작된 신속 진단키트를 이용하여 PRRSV를 확인한 결과는 Table 1-13과 같다. RT-PCR로 PRRSV 감염이 확인된 5개의 폐에서 3개, 3개의 임파절에서 2개, 그리고 2개의 유산 태아에서 2개가 모두 양성으로 판정되어 각각 60%, 67%, 100%로 나타났다. 대조군으로 사용한 PRRSV 음성의 4개 폐에서는 모두 음성으로 나타났다.

Table 1-13. Results of rapid diagnostic kit for PRRSV detection from field samples

	Tissue*	No. of sample tested	No. of positive by kit(%)
PRRSV positive	Lung	5	3(60)
	Lymph node	3	2(67)
	Aborted fetus	2	2(100)
PRRSV negative	Lung	4	0(0)

*PRRSV was confirmed by RT-PCR

3). 고찰

면역크로마토그래피(Immunochromatography) 원리를 이용한 진단법은 민감도와 특이성이 우수한 진단법으로 알려져 있으며 무엇보다 간단하고 신속하게 결과를 확인할 수 있는 방법으로 사람의 의학 분야에서는 여러 가지 질병에 대하여 널리 사용되고 있다. 현재 수의학 분야에서는 애완동물의 진단법으로 이러한 신속 진단키트가 개발되어 사용되고 있다. 즉, 개파보바이러스과 심장사상충 등의 진단법을 예로 들 수 있다. 폐지에서 면역크로마토그래피 원리를 이용한 진단법 개발은 무엇보다 경제성이 고려되어야 할 것이다. 최근에 국립수의과학검역원에서는 구제역을 단시간 내에 진단할 수 있는 신속 진단키트를 개발하여 보고하고 실제 야외에서 활용한 적이 있다.

앞의 연구에서는 돼지 혈청으로부터 PRRSV 특이항체를 확인할 수 있는 ELISA법을 개발하였으나 본 연구에서는 PRRSV 항원을 직접 검색할 수 있는 신속 진단키트를 면역크로마토그래피 원리를 이용하여 개발하였다. 먼저 신속 진단키트 개발에 사용할 PRRSV 특이 단클론항체를 일반적인 세포 융합법으로 생산하였다. 총 15개의 PRRSV 특이 단클론항체를 생산하였는데 12개의 단클론항체가 ORF7 유전자 산물인 N 단백질에 특이적인 것으로 나타났다. 이는 N 단백질이 PRRSV에서 major 단백질인 것을 고려할 때 다른 연구자들의 연구 결과와 일치한다. PRRSV 피막에 존재하고 있는 E 당단백에 특이적인 단클론항체를 생산하기 위하여 baculovirus에서 발현된 E 재조합 단백을 면역원으로 사용하여 3개의 단클론항체를 생산하였는데 이들 또한 PRRSV를 중화시키지 못하였다. PRRSV의 E 당단백은 중화항체형성에 관여하며 방어에 중요한 역할을 하는 PRRSV 단백질로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 생산된 3개의 단클론항체는 E 당단백에서 중화항체형성과 관계가 없는 epitope에 대한 것으로 추정된다. 생산된 단클론항체와 다른 PRRSV 분리주의 반응관계를 IFA법으로 조사한 결과, 단클론항체 생산에 면역원으로 사용된 PRRSV CNV strain은 물론 다른 PRRSV 국내분리주인 PL96-1, PL97-1, 그리고 PL97-1/LP1과 반응에서 양성으로 나타났다. 하지만 국외 표준주로 사용한 미국 분리주 VR2332와는 반응한 반면 유럽 분리주인 Lelystad와는 반응을 하지 않았다. 이는 유럽 분리주와 미국 분리주 간에 N 단백질 유전자 염기서열 및 아미노산의 동질성이 각각 63%와 59%인 것을 고려할 때 PRRSV CNV strain과 국내에서 분리되는 PRRSV는 미국 분리주와 유사한 것으로 추정할 수 있다. 이러한 결과는 제2세부과제에서 PRRSV의 유전자 염기서열 분석으로도 확인되었다. 반면 돼지 circovirus, parvovirus, rotavirus, 그리고 TGE 바이러스와는 반응하지 않아 생산된 단클론항체가 모두 PRRSV에 특이적인 것을 확인할 수 있었다.

13개의 N 단백질 특이 단클론항체를 사용하여 신속 진단키트에 사용할 detector와 capture antibody를 여러 가지의 조합을 만들어 실험한 결과 detector antibody로는 16H8 그리고 capture antibody로는 6D7이 가장 적당한 확인되었다. 개발된 신속진단키트의 특이성을 국외 PRRSV 표준주인 VR2332와 Lelystad, 그리고 국내 분리주인 PL96-1, PL97-1, CNV, PL97-1/LP1 감염 조직배양액을 사용하여 확인한 결과, Lelystad strain을 제외한 모든 PRRSV에서 band가 확인되었다. 이것은 생산된 단클론항체가 모두 IFA법으로 유럽 표준주인 Lelystad strain과 반응을 하지 않아 예상대로 나타난 결과이다. 반면에 돼지에서 문제가 되고 있는 돼지파보바이러스(PPV), 일본뇌염바이러스(JEV), 돼지췌코바이러스 2형

(PCV-2), 로타바이러스(Rota), 전염성위장염바이러스(TGE), 레오바이러스(Reo) 감염 조직배양액을 사용하여 확인한 결과, 모두 음성으로 나타나 개발된 진단키트가 미국 표준주 type PRRSV에 특이적이며 국내에서 분리되고 있는 대부분의 PRRSV가 미국 표준주 type인 것을 고려할 때 국내에서 문제점 없이 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 하지만 유럽 표준주 type의 PRRSV가 언제라도 국내에 유입될 수 있는 상황임을 것을 감안할 때 이들과 반응하는 단크론항체를 생산하여 PRRSV 모든 type을 검색할 수 있는 신속 진단키트 개발이 계속 진행되어야 할 것이다. 제작된 신속 진단키트의 민감도를 대장균에서 발현된 nucleocapsid 단백질(rGST-ORF7)을 이용하여 확인한 결과, rGST-ORF7의 농도가 0.8 ug/ml일 때 뚜렷하게 구별되었으며 0.08 ug/ml에서도 육안적으로 band가 확인되었다. 따라서 신속 진단키트로 검사할 때 가검물을 100 μ l를 적용함으로써 결과적으로 8ng까지 검색할 수 있는 것으로 확인되었다. 또한 PRRSV의 역가가 10^{7.5} TCID₅₀/ml인 PL97-1을 10배 단계 희석하여 반응정도를 확인한 결과, 10¹에서 band가 확인되어 10^{7.5} TCID₅₀/ml까지 검색할 수 있음을 확인하였다.

RT-PCR법으로 PRRSV 양성으로 확인된 가검물로부터 제작된 신속 진단키트를 이용하여 PRRSV를 확인한 결과, PRRSV 감염이 확인된 5개의 폐에서 3개, 3개의 임파절에서 2개, 그리고 2개의 유산 태아에서 2개가 모두 양성으로 판정되어 각각 60%, 67%, 100%로 나타났으며 전체적으로는 10개의 가검물 중 7개에서 양성으로 판정되어 70%의 양성율을 나타냈다. 이는 가검물에 존재하고 있는 PRRSV의 양이 적은 것이 하나의 이유가 될 수 있다. 일반적으로 PCR법으로는 소량의 바이러스가 존재하여도 검색할 수 있는 것으로 알려져 있으며 또한 본 연구에서 PRRSV 조직배양액을 사용하여 민감도를 확인한 결과 10^{7.5} TCID₅₀/ml 이상이 되어야 양성으로 나타났다. 본 연구에서는 신속 진단키트의 야외 시험으로 10개의 가검물 밖에 시험을 못하였으나 실용화하기 위해서는 보다 많은 가검물에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다. 특히 개발된 신속 진단키트를 보다 실용적이고 간편하게 사용하기 위하여 돼지의 호흡기 분비물, 정액, 혈청 중에서의 PRRSV 검색에 대한 연구가 계속 수행되어야 할 것이다.

제 2 절

제 1협동과제: 돼지생식기호흡기증 바이러스의 분자생물학적 특성 연구

1. 바이러스 분리(isolation) 및 동정(Identification), plaque purification

PRRS virus 감염이 의심되는 농장에서 수집한 2,000개의 혈청으로부터 PRRS virus 분리를 시도한 결과 PRRS virus-specific cytopathic effects(CPE)를 나타내는 66 주의 PRRS virus를 분리하였다(Table 2-1). 대부분의 이들 분리 바이러스 주들은 MARC-145 cell monolayer 상에서 초대 배양에서 CPE를 보였으며 소수의 분리 바이러스 주에서는 2-3 대 계대한 후에 PRRS virus specific cytopathic effects가 관찰 되었다. (Fig. 2-1.).

분리된 66주의 cytopathic virus들은 간접형광항체(IFA) 시험에서 모두 PRRS virus임을 확인하였다. 세포에 착색된 형광은 주로 세포질 내에서 관찰되었다(Fig. 2-2). PRRS virus의 순수 분리를 시도한 결과 3-4번의 plaque purification 시험 과정 후 독립된 PRRS virus plaque를 순수 분리할 수 있었다(Fig. 2-3).

Table 2-3. Isolation and identification of PRRS virus from swine sera collected from swine herds with PRRS signs.

Virus isolates	IFA results	Virus isolates	IFA results	Virus isolates	IFA results	Virus isolates	IFA results
3946	+ ^a	4724	+	6656	+	2172	+
4017	+	4728	+	9146	+	2247	+
4112	+	4889	+	9148	+	2248	+
4119	+	4989	+	1429	+	2249	+
4120	+	5023	+	1490	+	2277	+
4296	+	5159	+	1537	+	2288	+
4358	+	5273	+	1538	+	2290	+
4359	+	5503	+	1551	+	2373	+
4365	+	5504	+	1655	+	2368	+
4409	+	5615	+	1744	+	2431	+
4420	+	5660	+	1810	+	2432	+
4431	+	5695	+	1824	+	DB-6	+
4454	+	5888	+	1825	+	DB-8	+
4490	+	5919	+	1929	+	DB-9	+
4548	+	6281	+	2089	+	DB-10	+
4705	+	6327	+	2090	+		
4723	+	6607	+	2162	+		

^a :+ indicates IFA positive

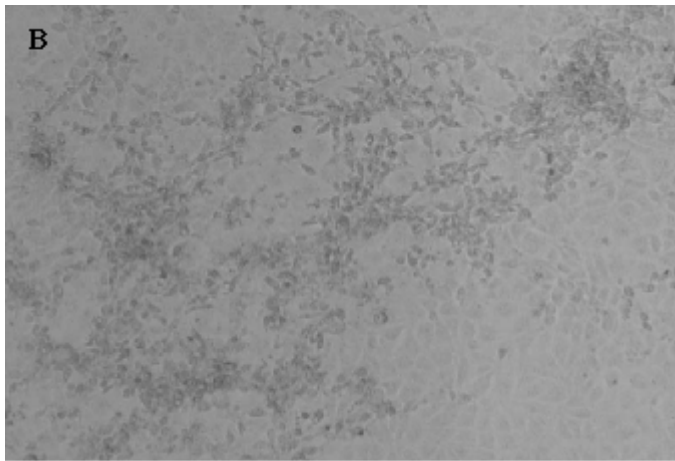
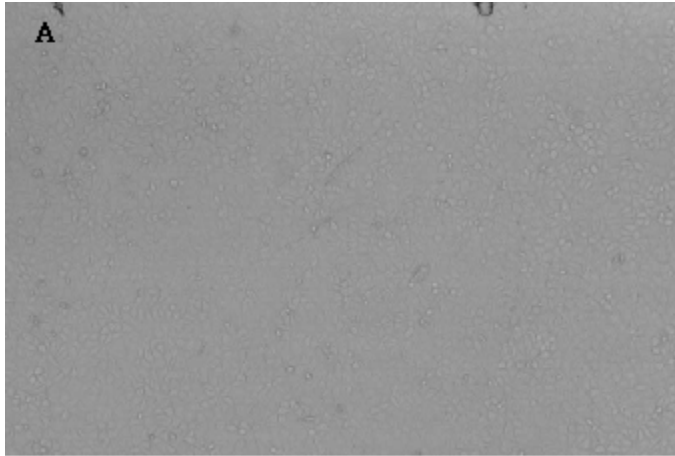


Fig. 2-1. CPE observed on the MARC-145 cell monolayer infected with cytopathic virus isolates. No CPE was observed on the noninfected cells (A). CPEs were observed on the infected cell monolayers with degenerating cells at 3 days post inoculation (B).

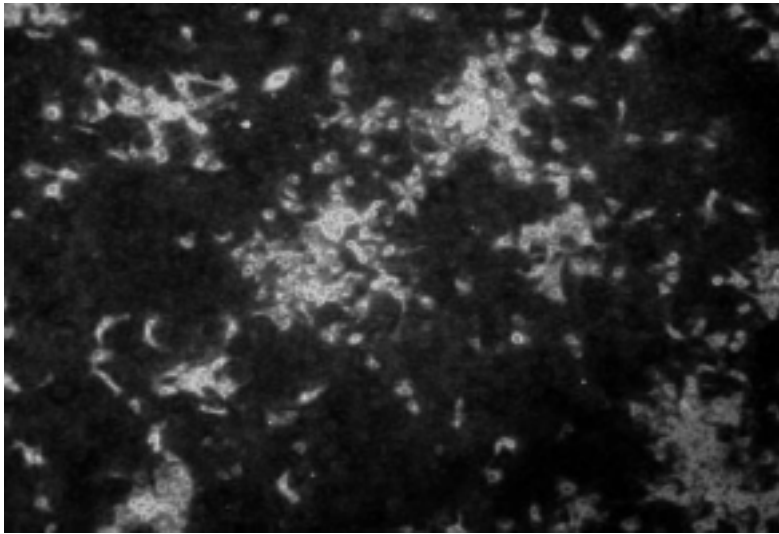


Fig. 2-2. Indirect immunofluorescent antibody test of MARC-145 cells. Infected cells with cytoplasmic fluorescence were observed 3 days post inoculation .

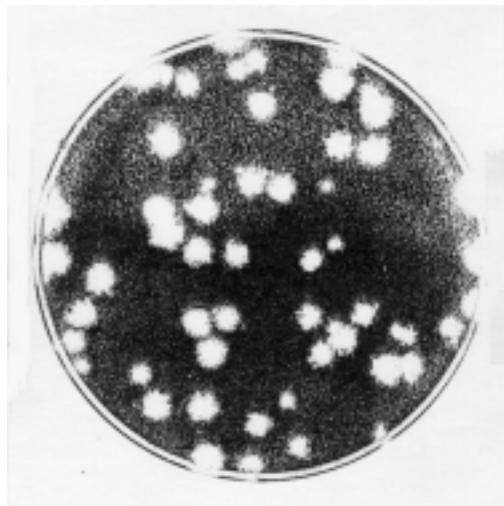


Fig.2-3. The plaque morphology of PRRS virus on MARC-145 cell monolayer. The large plaque was selected after 4 cycles of plaque test.

결론적으로 이상의 실험의 결과에서 보듯 본 연구에는 2000개의 돼지 혈청을 PRRS virus 감염 이 의심되는 농장으로부터 수집하여 MARC-145 cell을 이용하여 성공적으로 PRRS virus를 분리할 수 있었으며, PRRS virus-specific CPE의 관찰, IFA test 등을 이용하여 분리된 cytopathic virus가 PRRS virus임을 동정할 수 있었으며, 또한 plaque purification test를 통하여 biological variation이 다양한 virus isolate로부터 biological characteristics가 동일한 virus를 순수 분리할 수 있었다.

2. PRRS virus의 분자생물학적 특성조사

가. PRRS virus strain 상호간 Genome organization의 비교

PRRS virus의 RNA로부터 RT-PCR을 통하여 1.0kb cDNA fragment를 증폭한 다음 pGEM-T vector에 cloning한 다음 transformation 된 *E. coli* DH5 α 집락 3개씩 선발하여 양 방향으로 염기서열을 분석한 결과 PRRSV CNV-1의 총 염기수는 poly(A) trail를 제외하고 15,411 였으며, genomic organization은 North America strain인 VR 2332 및 16244B와 유사하였다(Table 2-4,). PRRS virus genotype에는 European type와 North American type이 있는데 CNV-1은 North American type와 동일하였다. CNV-1의 nucleotide homology는 VR2332와 16244B와 각각 97%, 및 96%이었다. 또한 Chinese strain과는 90.2%의 homology를 나타내었으며 European PRRS virus인 LV와는 80.6%의 homology를 보였다.

Table 2-4. Comparison of the genome organization between PRRS virus strains

	CNV-1	VR2332	LV
Genome size excluding poly(A)	15,411	15,411	15088
5'UTR	1-189	1-189	1-221
ORF1a	190-7701	190-7701	222-7412
ORF1b	7698-12071	7698-12071	7394-11785
ORF2	12073-12843	12073-12843	11796-12545
ORF3	12696-13460	12696-13460	12404-13201
ORF4	13241-13777	13241-13777	12946-13497
ORF5	13788-14390	13788-14390	13494-14099
ORF6	14375-14899	14375-14899	14087-14608
ORF7	14889-15260	14889-15260	14598-14984
3'UTR	15261-15411	15261-15411	14985-15088

나. 5' UTR 및 3' UTR의 비교

5' UTR 및 3' UTR은 PRRSV genome에서 매우 conserved한 region으로 알려져 있으며 US strain의 5' UTR 및 3' UTR은 European PRRSV와 매우 다른 것으로 알려져 있다. 이러한 이유로 인하여 5' UTR 및 3' UTR의 nucleotide의 sequence는 genotype을 결정하는데 이용된다. 국내 분리 바이러스인 CNV-1의 5' UTR의 nucleotide sequence 가운데 단지 2개의 nucleotide 만이 VR2332와 달랐으며 또한 3' UTR의 nucleotide sequence에서는 4개의 nucleotide가 VR2332와 달랐고 이들 4개의 다른 nucleotide는 poly(A)의 upstream에 위치하였다. 5' leader body junction sequence(UUAACC)의 upstream sequence는 strain 간에 매우 conserved 하였으며, leader body junction sequence는 CNV-1을 비롯하여 본 시험에 비교된 모든 strain에서 동일하였다 (Fig.

2-4, Fig 2-5).

다. Non-structural 및 structural genes의 비교

PRRSV 는 8개의 ORF를 가지고 있다. 8개 가운데 ORF1a 와 1b는 non-structural protein gene에 속한다. CNV-1 바이러스의 ORF1a amino acid sequence의 homology는 VR2332, LV 및 Ch-1a(Chinese strain) 과 각각 91%, 51%와 83%를 나타내었다. ORF1b의 amino acid sequence는 ORF1a에 비하여 더 conserved하였으며, CNV-1은 VR2332, LV 및 Ch-1a와 각각 98%, 68%와 96%의 homology 나타내었다.

Structural protein gene은 ORF2에서 ORF7까지로 CNV-1의 nucleotide sequence는 VR2332, Ch-1a 및 Kitasato (Japanese strain)의 염기서열과 각각 92%, 91% 및 90%의 homology를 나타내었다.

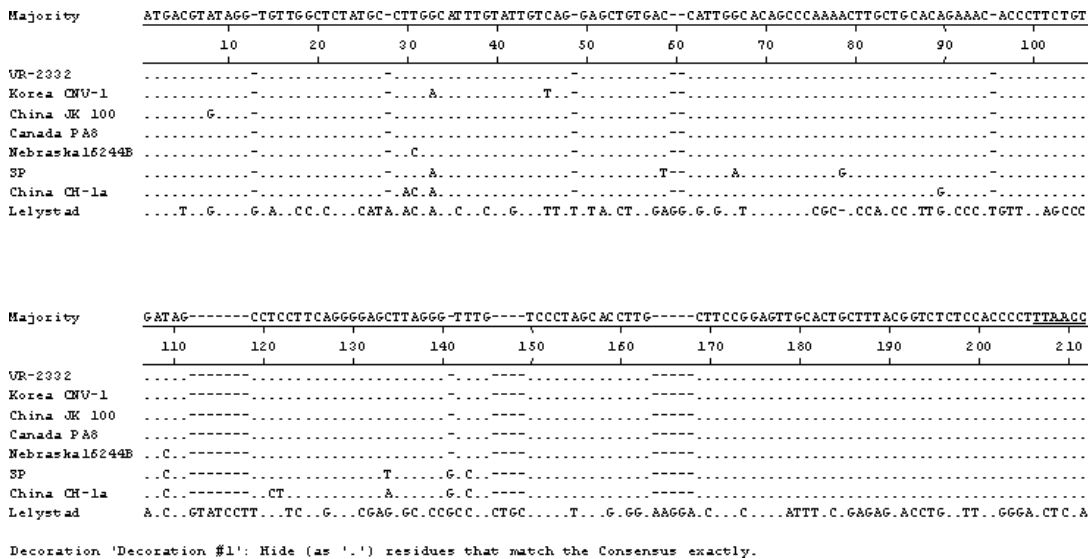


Figure 2-4. Nucleotide multialignment of 5'UTR.
The leader sequence are underlined.

```

Majority TGGGCTGGCATTCTTGAGGCATCTCAGTGTTTGAATTGGAAGAAATGTGTGGTGAAATGGCACTGATTGACATTGTGCC
          10      20      30      40      50      60      70
UR-2332 .....
CNV-1 .....
15244B .....
PA8 .....A.....
CH-1a .....T.....TG.....C.....A.....G.....C.....
Kitasato .....A.....A.C.....-.....-.....T.....
SP .....T.....
LV .....CGC.....G.G.GTG...
PRRSVLOT .....CGC.....G.GTG...

```

```

Majority TCTAAGTCACCTATTCAATTAGGGCGACCCTGTGGGGGTGAGATTTAATTGGCGAGAACCATGGCGGCCGAAATT
          80      90      100     110     120     130     140     150
UR-2332 .....-.....-.....
CNV-1 .....C.....A.....-.....G.....
15244B .....-.....
PA8 .....-.....C.....
CH-1a .....-.....
Kitasato .....AG.....-.....C.....
SP .....A.....-.....A.....
LV .....G.....T.ACA.....C.T.C.....CA..AG.....T.A.....
PRRSVLOT .....T.ACA.....C.A.C.....CA..AG.....T.A.....

```

Decoration 'Decoration #1': Hide (as '.') residues that match the Consensus exactly.

Figure 2-5. Nucleotide multialignment of 3'UTR.
The leader sequence are underlined.

라. Minor structural protein gene의 비교

Minor structural protein gene은 GP2(ORF2 gene), GP3(ORF3 gene) 와 GP4 gene (ORF4 gene)을 말한다. GP2 amino acid sequence의 homology는 CNV-1과 North America strain 사이에 91.1%에서 93%로 strain 간에 약간의 차이를 보였다. 반면에 유럽에서 분리된 LV와 비교할 때 CNV-1과 사이에는 59.2%의 amino acid homology를 나타내었다. Leader body junction은 CNV-1에서 ORF2에서 약 20 nucleotides upstream에 위치하였다(Fig. 2-6).

CNV-1의 GP3는 LV와 비교할 때 C-terminal 부위에서 12개의 amino acid가 deletion 되어 있었다. 그러나 North America strain에서도 같은 위치에 amino acid가 deletion되어져 있는 것으로 알려져 있다 (Fig. 2-7). GP3 protein 만을 비교할 때 CNV-1은 US strains 보다 Asian strains (Ch-1a, Kitasato 93-1)에 유전적으로 더욱 가까운 것으로 나타났다.

ORF4는 neutralizing epitopes를 가지고 있으며 epitope 의 위치는 amino acid 59-67사이에 존재하며 PRRS virus 사이에 neutralizing domain에서의 amino acid의 deletion 또는 substitution 등으로 인하여 strain 간에 서로 혈청학적으로 반응하지 못하는 것으로 알려져 있다.

CNV-1 strain의 ORF4의 neutralizing domain에 있는 amino acid sequence를 다른 PRRS virus strain들과 비교할 때 strain들 간에 매우 heterogeneous한 것으로 나타났다. CNV-1과 다른 국외 reference strain사이에 다양한 nucleotide substitution 이 발견되었다(Fig. 2-7)

```

Majority MKKGGPKKAFITKLANFLWMLSES SMCPLL ISLYFMPFCLASPSUGWWSFASDWFAPRYSVREALPFTLSNYERSYEAFLSQCQVDIPTWG
      10      20      30      40      50      60      70      80      90
VR2332 .....
CMV-1 .....S.....F.....LS.....S.....
16244B .....
CH-1a .....L.S.....NF.....S.....
PA8 .....S.....A.....
SP .....V.....N.....S.....H.....S.....
LV .....Q..H.GU---S.SCS.TP.L..LLVW..LPPSL.Y..G...QD.Y...F.E...F.....P.....GL.PM.RP.V.QPA

```

```

Majority TKKFLGMLWPHKVVSTLIDEMVSRMYRIMEKAGQAAMKQVVSEATLSRISLDDVVAHFQHLAAIESETCKYLASRLPMLHMLEMTGSMVT
      100     110     120     130     140     150     160     170     180
VR2332 .....
CMV-1 I...I.....T.....R.A.....
16244B .....S.....
CH-1a V.....
PA8 .....
SP I...V.....V.....V.....
LV V.....F..MR..H.....I.QT..HS.....G...TKL.G..I.T.....V..DS.RF.S...V..K..AV--G..S

```

```

Majority IUYNSTLNQGF AIFPTPGSRPKLHDFQQMLIAVHSSIFSSVAASCTLFVVLWLEVP ILRTVGFPRWLG AIFLSNSQ-
      190     200     210     220     230     240     250
VR2332 .....
CMV-1 .....Y.....Q..M.....S..SLR..
16244B .....H.....
CH-1a .....S.....I.M..S.....L..R..
PA8 .....
SP ...G.....M.....P.S.W..
LV LQ..T..DR.EL.....T...T..R...S..A.....S.V...I...I..A..Y...H.PT.THR.S.

```

Decoration 'Decoration #1': Hide (as '.') residues that match the Consensus exactly.

Fig. 2-6. A multialignment of ORF2 amino acid sequence.

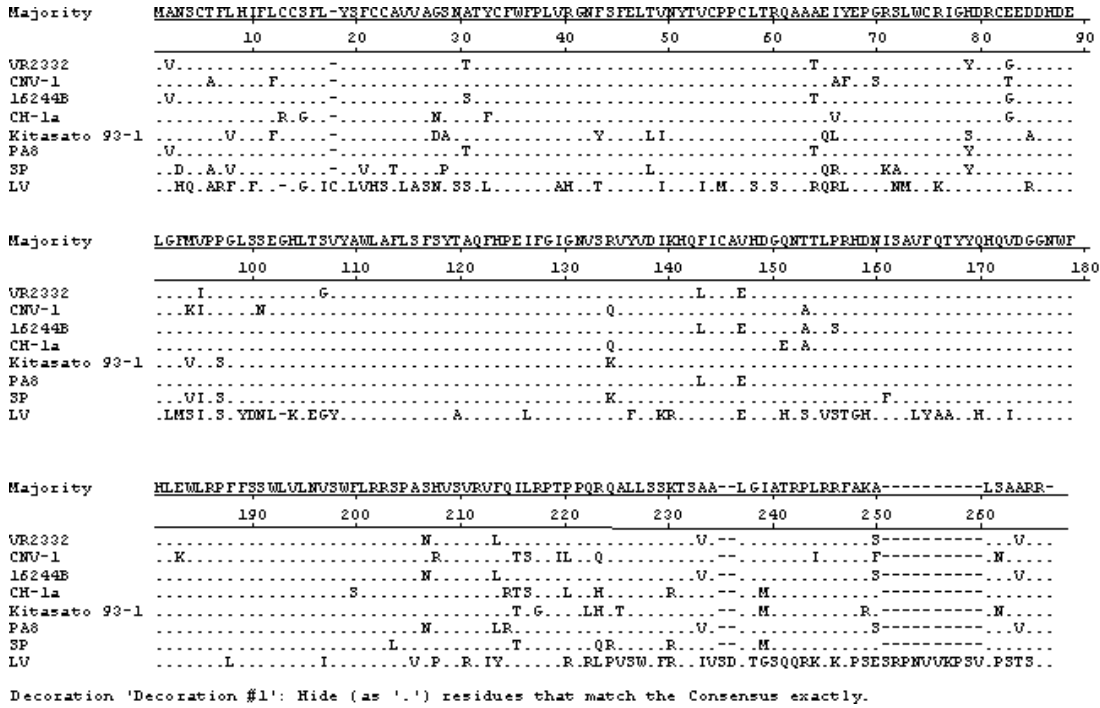


Fig. 2-6. A multialignment of ORF3 aminoacid sequence.

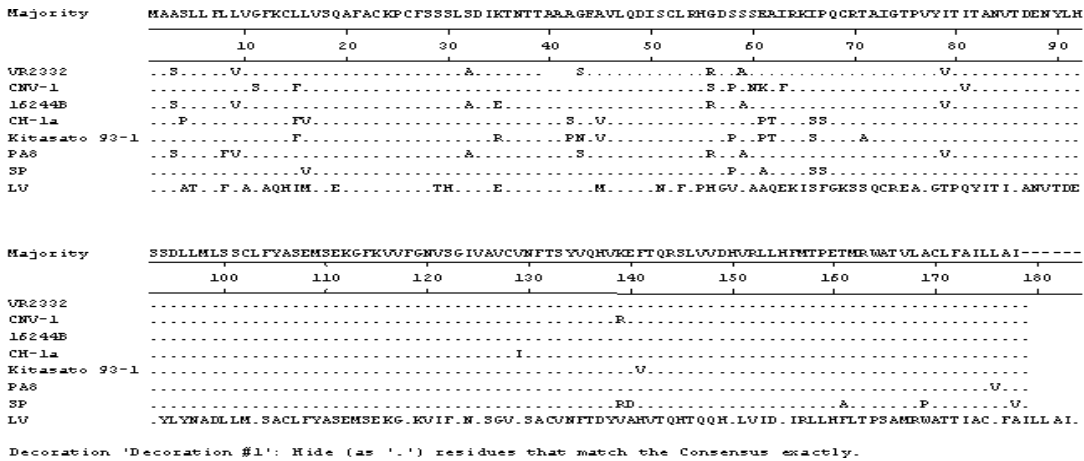


Fig. 2-7. A multialignment of ORF4 amino acid sequence
The region of neutraling epitope is underlined.

마. Major structural protein gene의 비교

PRRS virus의 major structural protein에는 GP5(E), M 및 N protein이 있다. ORF5 gene sequence는 structural protein gene들 가운데 가장 variation이 크기 때문에 strain 간에 ORF5 gene을 비교하면 strain 간에 genetic evolution을 파악할 수 있는 것으로 알려져 있다. LV를 제외한 CNV-1 strain과 다른 PRRS virus strain 사이의 homology는 대체로 80-90%이었으나 LV와 CNV-1의 사이에 homology는 54.2% 이었다. ORF5 amino acid sequence의 homology는 CNV-1과 Ch-1a, 및 Kitasato 93-1사이에서 가장 유사하였다(Fig. 2-8).

CNV-1 virus에서 amino acid 1에서 39번 까지는 변이가 심하며 (hypervariable) 국내 분리주 CNV-1 virus는 Ch-1a, Kitasato 93-1과 amino acid position 33, 34, 38에서 Asp(N), Ser(S) 및 Ser(S)를 공유하고 있었다. GP 5의 neutralizing epitope (epitope B) 는 매우 conserved하며, 두개의 amino acid stretches 즉 S37 H38 (L/F) 39 및 I42, Y43, N44, L45로 구성되어 있다. 그러나 CNV-1은 amino acid position 38에서 histidin 대신에 asparagine을 가지고 있었다(Fig. 2-8). ORF5 gene을 기초로 하여 실시한 phylogenetic analysis에서 CNV-1의 genotype는 Asian lineage에 속하는 것으로 확인되었다(Fig. 2-9).

```

Majority      M-----LGKCLT&GCCSRLLSLWC I-UPFCFAULUNASNNSSSHLQLIYNLTLCELNGTDWLANKFDWAW
              10         20         30         40         50         60         70
VR-2332      -----E-----A---D-----
CMV-1        -----M.PF-----S.VA.S.NS---NF-----D-----
CH-1a       -----T-----NS---F-----
Kitasato-93-1 -----PF-----L.A---NS-----
15244B      -----E-----A---S-----R-----
SP          -----F-----YS-----
PA8         -----W.Q---G---A---D---V-----
LV          .RCSHK..RF..PHS.FWW.F.L.TGLSWS-----DG.GD..TY.Y....I.....SSH.G...

```

```

Majority      ESFVIIPVLTHIVSYGALTTSHFLDTUGLVTUST&GFVHGKRYLSSIY&VCALAALTCFVIRFAKNQMSW
              80         90         100        110        120        130        140
VR-2332      -----A-----
CMV-1        .T-----G---F-----I..V-----
CH-1a       .T-----G---Y---I---L-----
Kitasato-93-1 -----C-----G.A---Y---I---V---LT-----
15244B      -----A-----
SP          -----Y---I---L-----
PA8         -----A-----
LV          .T..LY..A..L.L.F.....F.&L..GA.....G....C.V.GA..F..FV....A....AC

```

```

Majority      RYACTRYTNFLLDTKGRLYRMRSPWIEKGGKVEVEGHLIDLEKRVULDGSVATPITRVS&EQWGRP-
              150        160        170        180        190        200
VR-2332      -----R-----
CMV-1        .S-----K..E---V---R---L-----
CH-1a       .S-----V-----L---L-----
Kitasato-93-1 .S-----N-----A---K-----
15244B      -----R-----
SP          .S-----S-----A---L-----
PA8         -----R-----
LV          ...R..F...IV.DR..VH..K..IVV..L..A..D.N.UTI.H...E.VK.Q.L..T....E-A.

```

Decoration 'Decoration #1': Hide (as '.') residues that match the Consensus exactly.

Fig. 2-8. A multialignment of ORF5 amino acid sequence,
The region of neutraling epitope is underlined.

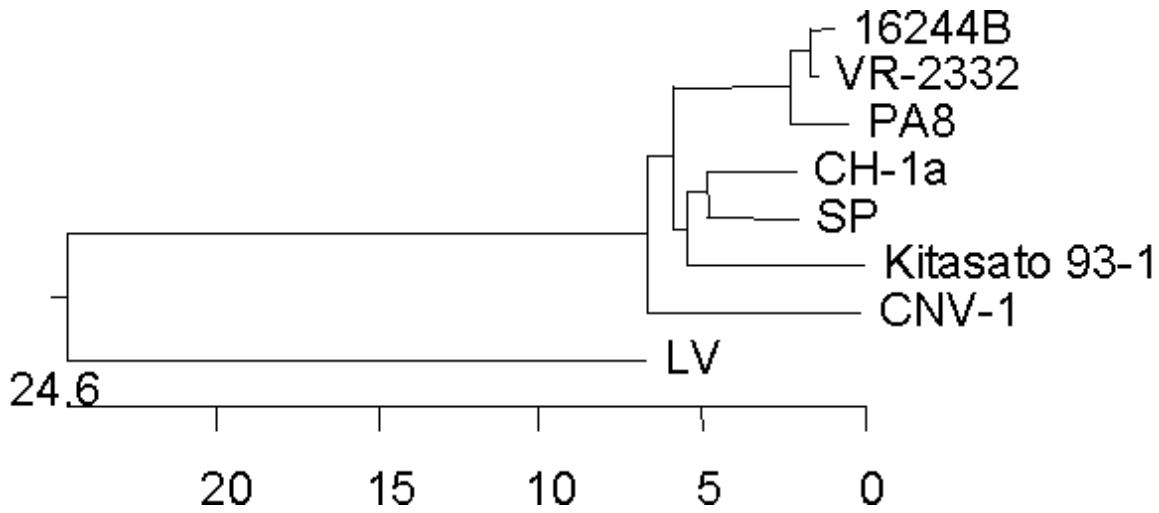


Fig. 2-9. Phylogenetic tree of PRRS virus strains based on ORF5 nucleotide sequences.

ORF6와 ORF7은 PRRS virus genome 가운데 가장 conserved한 것으로 알려져 있다. 따라서 이들 region들은 진단적 목적으로 활용성이 높은 것으로 알려져 있다.

국내 분리 CNV-1과 U.S strain인 VR 2332의 ORF6의 amino acid sequence를 비교할 때 단지 5개의 amino acid 가 상이하였다(Fig. 2-10).

CNV-1 virus의 ORF7의 nucleotide sequence는 LV를 제외하고는 모든 virus strain에서 매우 유사하였으며, CNV-1과 VR2332 사이에 98.4%의 homology가 있었으며, 반면에 LV와 CNV-1 사이에는 단지 55.6%의 nucleotide가 동일한 것으로 나타났다 (Fig. 2-11).

ORF7의 nucleotide sequence homology를 기준으로 할 때, 국내 분리주 CNV-1은 Asian strain들 보다 North American strain VR 2332에 더욱 가까운 것으로 증명 되었다 (Fig. 2-12). VR2332에서 확인된 바가 있는 nucleolar localization signal sequences(PGKKNKK)가 CNV-1을 비롯한 다른 PRRS virus에서도 amino acid position 41에서 46 사이에 존재 하였다 (Fig. 2-11)

```

Majority      MGSSLDDFCHDET APQKOLLAFS ITYTPOMIYALKVSRGELLGLLHLL IFLNCAFTFGYMT F&HFGSTNKUALTMG&WVALLWGVYS&IE
              10          20          30          40          50          60          70          80          90
VR2332       .....
CNV-1        .....L.....V.....R.....I.....
15244B       .....T.....
CH-1a        .....S.....V.....R.....
Kitasato 93-1 .....L.....T.....F.....
P&S          ...P.....
SP           .....R.....
LV           ..G-...N.P.I.A..LV.....I.....I.....S.....YV.....R...L.....PT.
  
```

```

Majority      TWKFITSRCLCLLGRKYILAPAHVESA&GFHP IA&NDNH&FVORPGETTONGTLVPLKSLVLGGPKAVKQGVUNLVKYAK-
              100          110          120          130          140          150          160          170
VR2332       .....R.....
CNV-1        .....
15244B       .....G.....
CH-1a        .....
Kitasato 93-1 ..R.V.....R.....
P&S          .....
SP           ..R.....R.....T.....R.....
LV           S.....C...R.....L.S.S.SG.R.Y&..K..L.S.....R.....KR...R.....GR.
  
```

Decoration 'Decoration #1': Hide (as '.') residues that match the Consensus exactly.

Fig. 2-10 A multialignment of ORF6 amino acid sequence

```

Majority      MPMNNNGKQQKQKKK---GDGQPUNQLCQMLGKIIAQQNQSRGKGPGKKNKKKNPEKPHFLATEDDDURHH
              10      20      30      40      50      60      70
VR2332      .....R.....
CMU-1       .....R.....
16244B      .....R.....
CH-1a       .....R.....N.....S.....
Kitasato 93-1 .....R.....S.....
P&S        .....R.....
SP          .....Y.....
LV          .AGK.QS.K...ST&PM.N.....L..AM.KS.---.QQPR.GQA...K.....A...I...

```

```

Majority      FTPSERQLCLSSIQTAFNQG&GTCTLSDSGRISYTVEFSLPTHHTVRLIRVT&SPSA-----
              80      90      100     110     120     130
VR2332      .....
CMU-1       .....T.....
16244B      .....
CH-1a       .....
Kitasato 93-1 ...N.....H.....Q.....
P&S        .....
SP          .....
LV          L.QT..S...Q.....&S..S..KV.FQ...M..VA.....STSASQGAS.

```

Decoration 'Decoration #1': Hide (as '.') residues that match the Consensus exactly.

Fig. 2-11, A multialignment of ORF7 amino acid sequence
 Nuclear localization signal sequence is underlined

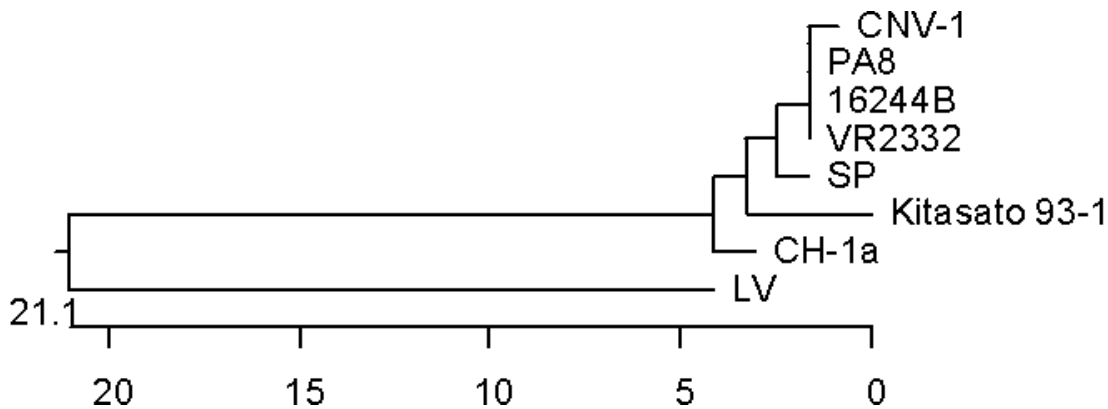


Fig. 2-12. Phylogenetic tree of PRRS virus strains based on ORF7 nucleotide sequences.

3. 야외 농장에서 vaccine virus의 감염실태 조사를 위한 유전자 분석기법 개발 및 감염실태 조사

가. RT-PCR에 의한 ORF5 유전자 증폭

분리주 가운데 선발된 32주의 야외분리 virus와 vaccine virus (Ingelvac PRRS MLV vaccine, Boelinger Ingelheim) 배양액 200 μ l로부터 genomic viral RNA를 분리하고 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하고 PCR을 통해 cDNA으로부터 ORF5 유전자를 증폭하였다. PCR product를 1.0% agarose gel에 전기영동 한 결과 80bp의 flanking sequence를 포함하는 약 680bp정도의 ORF5 유전자의 band를 확인할 수 있었다 (Fig. 2-13).

나. RFLP analysis

야외 분리 32주의 virus와 vaccine virus로부터 증폭된 ORF5 유전자는 제한효소인 *Mlu* I 로 각각 처리한 후 2.0% agarose gel에서 전기영동 하여 RFLP pattern을 분석하였다. *Mlu* I에 의한 RFLP pattern의 경우, vaccine과 같은 두 개의 band를 나타낸 분리주는 13주였으며, 19주는 하나의 DNA band 만을 나타내어 *Mlu* I에 절단되지 않았음을 확인하였다 (Fig.2-14. Table 2-5). 이전의 연구보고에 의하면 *Mlu* I에 의한 RFLP pattern이 wild type 야외 분리주와 vaccine virus를 구별하는데 중요한 방법이라고 알려진 바와 같이 본 연구

에서 *Mlu* I에 의해 두 개의 band를 나타낸 13주는 vaccine과 관련된 PRRS virus 인 것으로 생각되었던 반면 *Mlu* I에 의하여 절단되지 않은 19개주는 야외 병원성 PRRS virus로 생각되었다. 또한 PRRS virus 의 ORF5 유전자 분석의 결과 *Bsr* SI restriction site marker가 국내에서 분리된 야외 병원성 바이러스인 CNV-1에 존재하나 현재까지 알려진 백신 strain을 비롯하여 미국분리 주에는 존재하는 것으로 알려져 있으며 *Bsr* SI은 백신 바이러스의 ORF5 유전자를 절단하지 않은 반면 야외 병원성 PRRS viurs의 ORF5 gene을 절단하여 *Mlu* I과 상반된 결과를 나타내었다, 그러나 RFLP를 분석된 총 32개의 야외 바이러스 분리 주 가운데 3주는 *Mlu* I과 *Bsr* SI 모두에서 2개의 DNA band가 관찰되었고, 다른 3주에서는 *Mlu* I과 *Bsr* SI 모두에서 절단되지 않음을 관찰하였다(Table 2-5). 따라서 이러한 예외적인 분리 주에 대하여 원인을 규명하기 위하여 향후 보다 광범위한 유전자 분석이 요구된다.

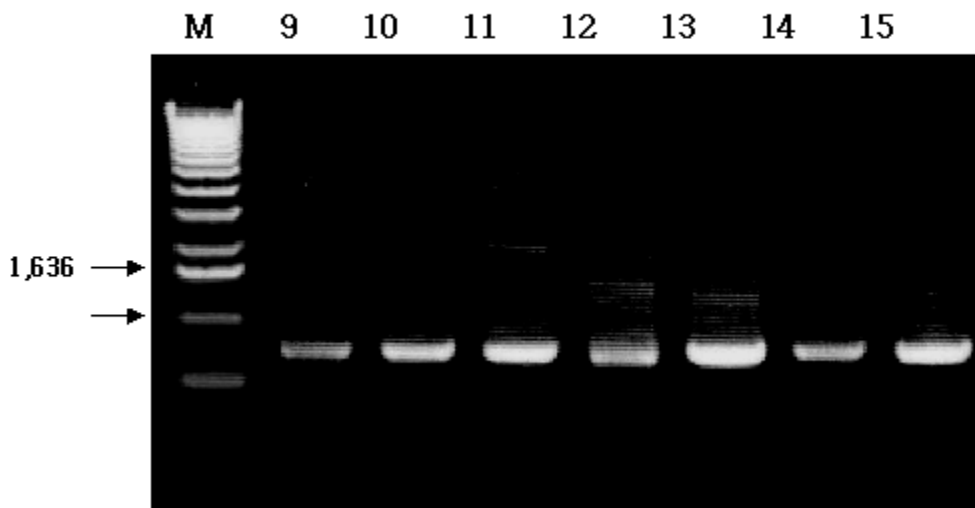
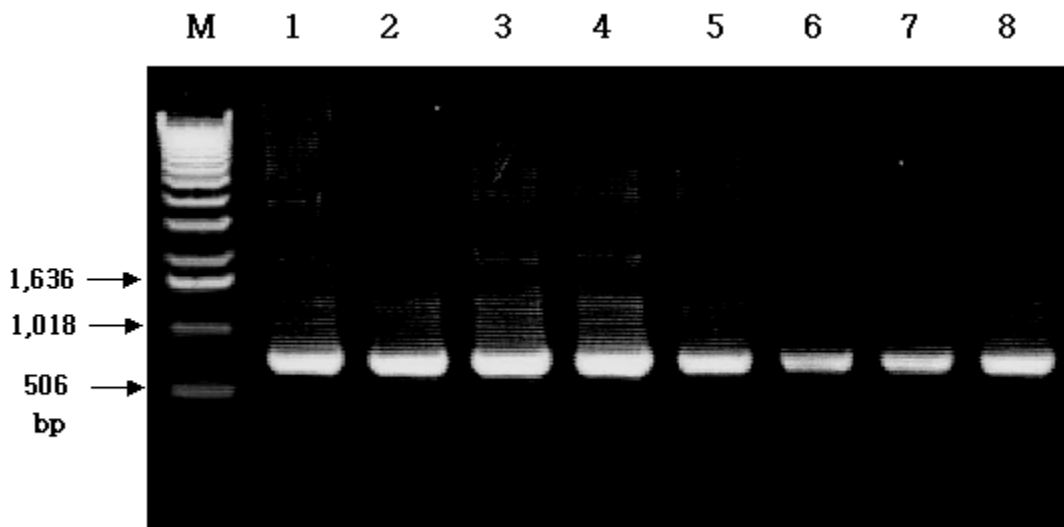


Fig. 2-13. Agarose gel electrophoresis of ORF5 RT-PCR products of 14 selected PRRS virus isolates and PRRS vaccine virus. Lane M : 1kb ladder. Lanes 1 to 15 represent vaccine virus, 1429, 1655, 2666, 3565, 3721, 4409, 4420, 4431, 4454, 4989, 5023, 3589, 4724 and 4989, respectively.

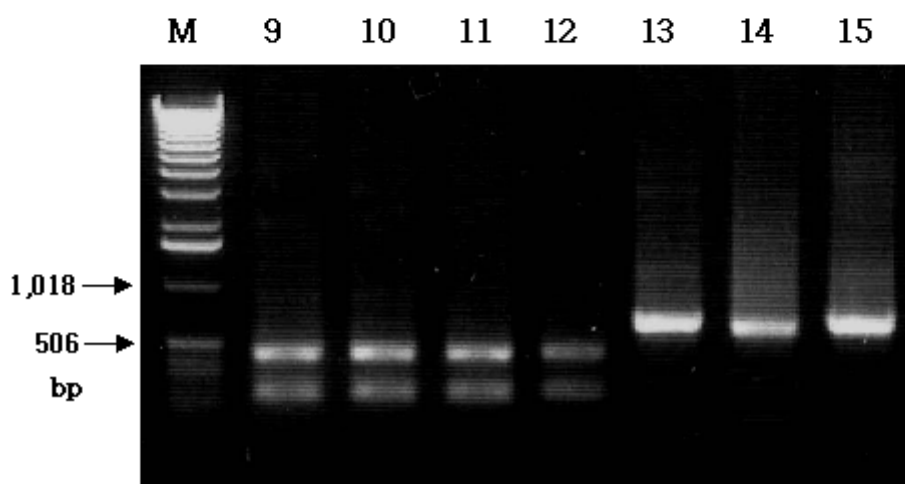
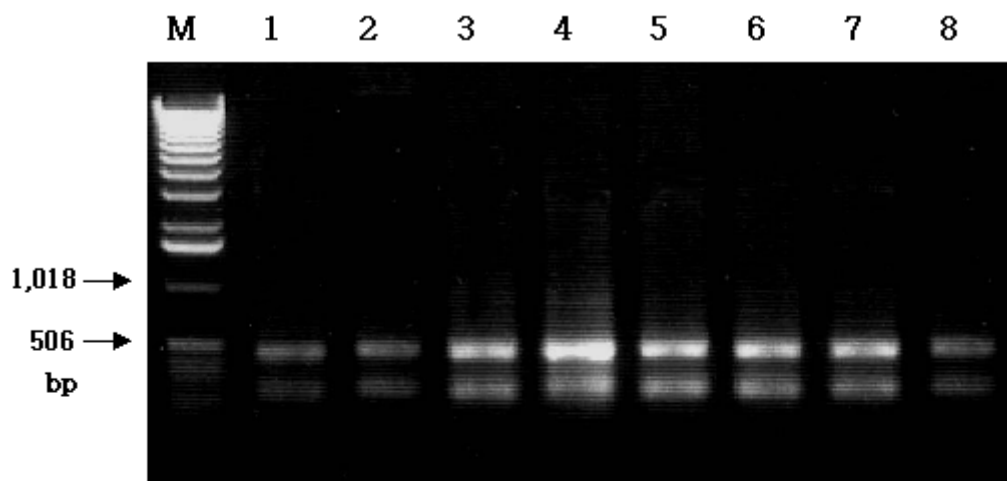


Fig. 2-14. RFLP patterns of 14 selected cytopathic virus isolates and vaccine virus by *Mlu* I. M : 1kb ladder. Lane 1 to 15 represent vaccine virus, 1429, 1655, 2666, 3565, 3721, 4409, 4420, 4431, 4454, 4989, 5023, 3589, 4724 and 4989, respectively.

Table 2-5. Electrophoretic patterns of ORF5 gene of field isolates treated with restriction

endonuclease *Mlu*I and *Bsr*SI

PRRS virus strains	RFLP patterns		PRRS virus strains	RFLP patterns	
	<i>Mlu</i> I	<i>Bsr</i> SI		<i>Mlu</i> I	<i>Bsr</i> SI
Vaccine virus	2	1	9148	2	1
4989	2	1	3565	1	2
4296(271)	2	2	3544	1	2
4490	1	2	3580	1	2
4120	2	1	1429	2	1
4724	1	2	1537	1	2
4705	1	2	1546	1	2
4409	2	2	1551	1	2
4431	2	2	1655	2	1
4548	1	2	4723	1	2
4019	1	2	5023	2	1
4454	2	1	5159	1	1
4420	2	1	5615	1	2
5660	1	2	BD-6	1	2
2666	2	1	BD-8	1	1
3721	2	1	BD-9	1	2
			BD-10	1	1

다. PRRS virus field isolate로부터 ORF5 유전자의 분석

RFLP 분석법에 의한 PRRS virus 감별진단에 대한 유전적인 정보를 얻기 위하여 야외로부

터 분리한 PRRS virus의 ORF5 gene을 PCR로 증폭하고 pGEM-T plasmid vector에 cloning한 다음 유전자를 분석한 결과 한국에서 분리된 PRRS virus field isolate는 4개의 lineages로 나누어 졌다(Fig. 2-15). 4개의 lineages 가운데 2개는 CNV-1과 유전적으로 가까웠고 나머지 2개는 VR2332와 가까운 것으로 나타났다. CNV가 속한 clade는 amino acid 98번 위치에 Glycine과 143번 위치에 Serine을 공통적으로 가지고 있었으며, VR 2332가 속한 clade에서는 amino acid 98과 143번 위치에 Alanine를 공통적으로 가지고 있었다. 그동안 vaccine virus (RespPRRS MLV VR2332) 의 genetic marker로 알려진 *Mlu* I restriction site (ACGCGT)가 6개의 isolates 에서 발견되었으며 이들은 동일한 clade에 속해있었다. 그러나 같은 clade에 속한 PRRS virus isolate 5159 는 *Mlu*I site(ACGCGT->ATGCGT)를 상실한 것으로 생각된다(Fig.2-16)

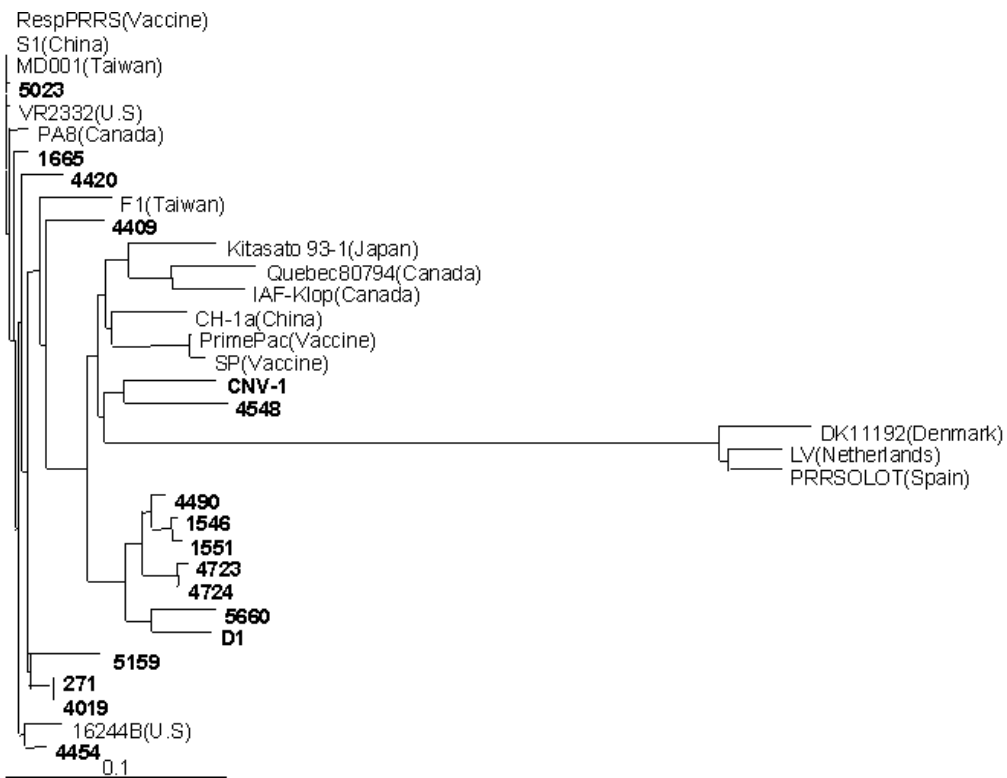


Fig. 2-15. Phylogenetic tree of PRF 5 gene including domestic field isolates. The bold letters represent the Korean field isolates.

Majority

M-----L GKCLTAGCCSRLLSLMCI-WPFCFAMLUWASMYSSSHLQLIYMLTLCELNGTDWLANKFDWAV

10 20 30 40 50 60 70

VR-2332E.....A.....D..... 190

1546K.....Q.F.....S.V.....S.NG.....N.....D.....

1551Q.F.....S.V.....S.NG.....N.....D.....

4490Q.F.....S.V.....S.NG.....N.....D.....

4723Q.F.....S.SV..AS..S.....N.....G.....

4724Y.Q.F.....S.V..AS..S.....N.....G.....

5660R.....F.F.F.....S.V.....S.NG.....N.....D.N...

D1P.F.F.....S.V.....S.N.....N.....NK.....

4409V.....Q.F.....C.....T.....KF.....

5159ER.....Q.....Y.....V.....D.....S.....N.....

271K.....A.....S.....D.....

4019A.....S.....

4420E.....A.....K.....

4454ER.....L.....A.....SM.....

1665E.....Q.....A.....H.....

5023E.....V.....A.....D.....

4548Q.F.....WC.....G.TM.....F.....D.....

CNU-1M.PF.....S.VA..S.NS.....NF.....D.....

LVRCSHK..RF..PHS.FWW.F.L.TGLSWS.....-DG.GD..TY.Y.....I.....SSH.G...

Majority	<u>ESFWIFPVLTHIUSYGALTTSHFLDTVGLVTVSTAGFVHGGRVLLSSIVMICALA&LTCFVIRFAKNCMSM</u>							
	80	90	100	110	120	130	140	
VR-2332A.....							400
1546	.C.....L.....L.....							
1551	.C.....L.....L.....							
4490	.C.....L.....F.....							
4723	.C.V.....L.....L.....							
4724	.C.V.....L.....L.....							
5660	.C.....L.....							
D1	.C.....R.....L.....							
4409A.....							
5159A.....							
271A.....							
4019A.....							
4420A.A.....I.....							
4454I.....A.....							
1665A.....							
5023A.....							
4548	.T.....A.....I.....I.V.....							
CNU-1	.T.....F.....I.V.....							
LV	.T..LY..A..L.L.F.....F.&L..GA.....G.....C.V.GA..F..FU.....A.....&C							

Mlu I

Majority	RYACTRYTNFLLDTKGRLYRMRSPVIEKRGKVEVEGHLIDLKRWLDGSAVATPITRVSÆQWGRP-									
	150	160	170	180	190	200				
UR-2332									
1546	S			Q	A	A	V			SS
1551	S			Q		A	V			
4490	S			Q		A	V			
4723	S			Q		A	V			
4724	S			Q		A	V			
5660	S	H		V	DQ	A	I			H
D1	S			Q		A	V			
4409							V			
5159	S		K			A	V			
271			K				I			
4019							I			
4420							I			
4454			K				I			
1665							I			
5023			G				I			
4548	S			G		A	I	K		R
CNV-1	S			G		K	E	V		R
LV	R	F	I	D	R	V	H	K	I	W
	L	A	D	N	V	T	I	H	E	V
	K	Q	L	T	E	A				

Fig. 2-16 . A multialignment of amino acid of ORF5 gene from the field isolates.

The the field virus isolates which belongs to same clade with CNV-1 are written in bold letters.

라. 야외 농장에서 vaccine virus의 감염실태 조사

위에서 기술한 바와 같이 야외로부터 분리한 총 66주 가운데 RFLP 시험 또는 유전자 염기

서열 분석이 완료된 32개 주에서 13주가 백신 virus로 추정되었다. 총 66주 모두 분석할 경우 백신 바이러스의 감염 레는 늘어날 것으로 생각된다. 또한 RFLP pattern이 약간 불분명한 것을 야외병원성 바이러스 또는 변형된 백신 바이러스에 의한 것인지 향후 연구할 예정이다.

마. 백신 바이러스 잔류농장에서의 임상증상 조사

상기 RFLP법에 의하여 vaccine virus로 판명된 13개 virus 주가 분리된 돼지 농장과 wild type virus가 분리된 19개 농장에 대하여 번식장애, 호흡기, 및 육성돈 과 비육돈에서의 증체율 등을 조사한 결과 두 group 간에 차이가 뚜렷하지 않았다. 대부분의 농장에서 주된 임상 증상은 이유 자돈 및 육성돈에서 호흡기 증상이었으며, 급성 PRRS증상인 번식장애와 자돈의 폐사 등은 관찰되지 않았다. 백신 바이러스가 분리된 농장에서도 호흡기 증상이 관찰되었으며 이러한 임상증상이 vaccine virus에 의한 것인지 또는 vaccine virus의 변이에 의한 병원성의 획득에 의한 것인지, 아니면 병원성 wild type virus와의 혼합감염에 의하여 임상증상을 야기한 것인지는 판단할 수 없었다. Vaccine virus와 wild type virus가 혼합 감염되어 있을 경우 cell culture에 adaptation이 잘된 vaccine virus는 CPE를 빨리 일으켜 wild type virus이 replication을 저해 할 가능성이 있는 것으로 생각되기 때문에 혼합감염 시 wild type virus의 분리기 매우 어려운 것으로 여겨진다.

제 3 절

제 2협동과제 : 돼지 생식기호흡기증 바이러스 백신개발

1. 유전자 재조합 PRRS 바이러스 백신의 개발

가. RT-PCR을 이용한 ORF5유전자의 증폭

RT-PCR에 의해 증폭된 ORF5의 유전자는 예측한 대로 VR2332와 CNV-1 모두 612bp의 크기를 나타냈다 (Fig. 3-2). 이 유전자는 CNV-1과 VR2332바이러스주 모두에서 나타났다. 그러나 ORF3의 경우 20여차례 Primer와 RT-PCR조건등을 달리하면서 증폭시도를 하였으나 증폭되지 않았다. 따라서 ORF3유전자는 유전자 재조합 백신 성분에서 제외시켰다.

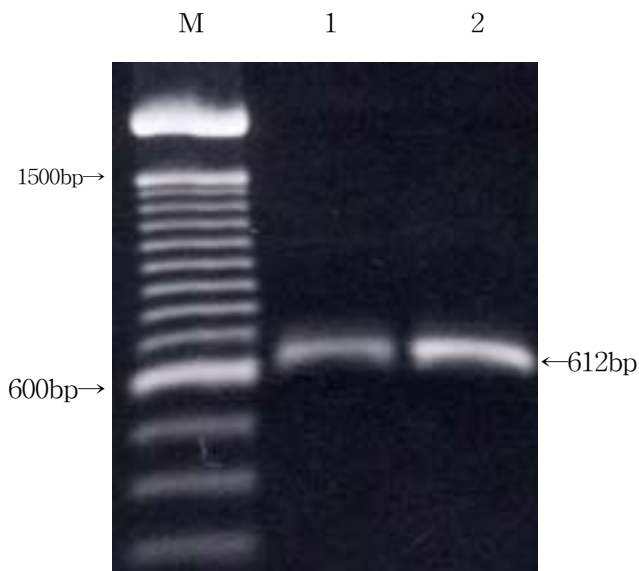


Fig. 3-2. Amplification of ORF5 gene of PRRS virus by RT-PCT. lanes; 1, 100bp size marker; 2, ORF 5 DNA of VR2332; 3, ORF 5 DNA of CNV-1.

나. Cloning한 insert의 염기서열 분석

PCR 산물은 양쪽이 각각 *Bam*HI과 *Eco*RI의 제한효소부위를 지니고 있기 때문에 PCR 산물을 각각 *Bam*HI과 *Eco*RI으로 절단한 후 gel에서 분리한 후 이미 동일한 효소로 처리한 pUC19에 삽입시킨 후 각각 pUC19CNV와 pUC19VR2332를 만들어 염기서열을 분

석하였다. 분석한 염기서열 및 아미노산 서열을 Fig. 3-3과 같이 나타냈다. CNV-1의 ORF5의 염기 및 아미노산 서열은 VR2332의 ORF5와 비교할 때 각각 91%와 83%의 유사성을 보였으며 반대로 유럽분리주인 LV와는 각각 57%와 49%의 유사성을 보였다. 따라서 국내에서 분리한 CNV-1의 경우 유럽 분리주보다 미국 분리주에 가까운 것으로 나타났다. 염기서열 및 아미노산 서열에서의 변화는 전 염기서열에서 관찰되었으나 특별히 결손된 부위는 없는 것으로 나타났다. PCR로 증폭된 VR2332의 ORF5는 기존에 Genbank(accession No. U87392)의 염기서열과 일치하는 것으로 나타났다. 아미노산 서열에 있어서 예상되는 *N*-glycosylation site는 CNV-1과 LV의 ORF5의 경우 2개의 *N*-glycosylation site가 VR2332의 ORF5경우 3개의 *N*-glycosylation site가 존재하는 것으로 나타났다.

A

CNV-1 ATGTTGGGGA AATGCTTGAC CGCGGGCTGT TGCTTGGGAT TGCCTTTTTT GTGGTGTATC
VR2332A.C.....T..C.....
LV ...AGAT.TT CTCA,AAATT G.G.C.T.TC .TGACT.CGC ACT...GC..C....GC.T

CNV-1 GTGCCGTCCT GT TTTGTTACGC TGTTCAGCGC CAACAGCAAC AGCAGCTCCA
VR2332T.. ..C.GT...C..A...G..ACG...C
LV T.TTT.CTG. ..ATGTT ..GTCCGG.T C.T.TGC..A TGG..A.GG. GA.....G.

CNV-1 TTGACGCTAT AITTCAGTT GATTATAAC GTGAGCTGAA TGGCACAGAC TGGCTAGCTG
VR2332C.A...C.....C.....T.....A
LVA...CA.A...A.A.C..A.....C.....G..C...T.GT.CA

CNV-1 ATAAATTGA CTGGGCAGTG GAGACTTTTG TCATCTTTC CGTGTGACT CACATTGTT
VR2332 .C.....T.....G.....T.....C.
LV GCC.TG...G T.....C.....C....GC.T.AC..G..TGCC...T..CC.C.

CNV-1 CCTATGGTGC CCTCACTACT AGCCATTTC TTGACACAGT CGGCCTGGTC ACTGTGTCCA
VR2332C.....CTT.A.....T.
LV .ACTG...TT TC...A.A.....TT.....G.GC...T..C.G.G...A...

CNV-1 CCGCOGGTTT TTTCCACGGG CGGTATGTCC TGAGTAGCAT CTACGCGGTC TGTGCCCTGG
VR2332G...G.T.....A.....
LV .T..A..A...G.TGG...C..A..CT.C...G.....GC.CT.....TT.C.

다. Insect cell 에서의 ORF5의 발현

pUC19에 삽입된 ORF5 fragment를 각각 BamHI과 EcoRI제한효소를 절단한 후 612 bp를 분리하여 동일한 제한 효소로 처리한 pAcG2T baculovirus transfer vector에 클로닝한 후 recombinant plasmid를 대량분리하였다. 삽입된 부위의 인접부위를 염기서열한 결과 pAcG2T transfer vector내에 존재하는 glutathione S-transferase(GST)에 in-frame 되게 ORF5가 삽입된 것이 확인되었다. 삽입된 recombinant와 linearized baculovirus DNA를 baculoGold에 의해 cotransfection을 시켜 CPE를 관찰하였다 (Fig. 3-4). 각각의 occlusion body를 에워싸는 polyhedral envelope가 관찰되었고 분열이 중지되고 부착된 세포들이 부유되는 것이 관찰되었다. 여러차례 실시한 결과 감염 후 96-120시간에 수확하는 것이 가장 적합한 것으로 나타났다.

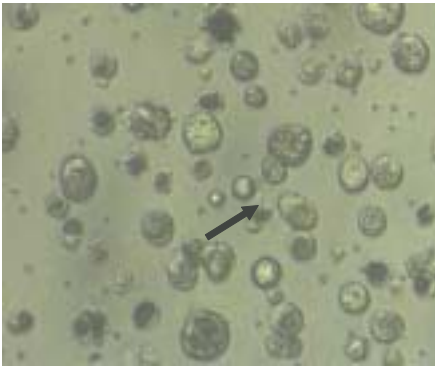
라. 재조합된 ORF5의 발현분석

ORF5가 fusion된 GST를 지니고 있는 재조합 baculovirus, wild type AcNPV와 재조합 XylE 지니고 있는 baculovirus를 Sf9 세포에서 접종시킨 후 4일 후에 수확한 후 발현정도를 12% SDS-PAGE에서 분석하였다. 세포와 상층액을 따로 분리하여 분석을 실시하였다. Coomassie blue 염색을 한 결과 cell pellet의 경우 background로 인해 recombinant band를 검출할 수 없었으며 supernatant의 경우 한 개의 band가 검출되었는데 예상하는 크기가 아니었다 (Fig. 3-5). 일반적으로 Coomassie blue staining시 PRRSV의 ORFs의 검출은 매우 어려운 것으로 나타났다.

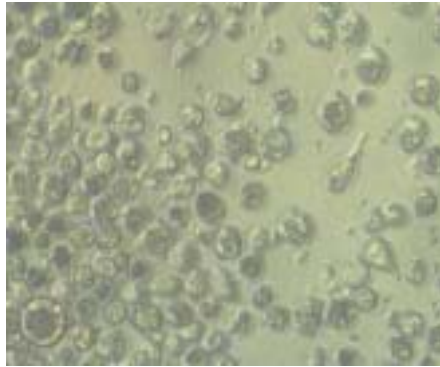
PRRS양성항체와 anti-GST monospecific antibody를 가지고 western blot을 실시한 결과 Sf9 cell lysate에서 재조합된 ORF5만이 검출되는 것이 확인되었다 (Fig. 3-6A). 또한 anti-GST monoclonal antibody로도 동일한 크기의 밴드가 검출되는 것으로 나타났다 (Fig. 3-6B). 예상하는 GST와 fusion된 ORF5 (GST-ORF5)의 크기는 약 51kDa (GST 26kDa + ORF5 25kDa)인데 비해 확인된 GST-ORF5는 약 44kDa를 나타내는 것으로 nonglycosylated form인 것으로 사료된다. ORF5의 크기는 PRRSV의 strain에 따라 다양한 크기로 보고되고 있는데 보통 18.5-25 kDa의 범위를 지니고 있다. 가장 작은 크기를 나타내는 경우는 N-terminal signal sequence가 없는 nonglycosylated form인 것으로 보고되고 있다. 또한 strain에 따라 glycosylated form의 수가 각각 다르게 나타나고 있다. Fig. 2에서 나타난 아미노산서열에서 예상되는 N-glycosylation site는 2군데로 나타나나 Western hybridization에서는 한가지 band로 나타나는 것은 glycosylation이 되지

않는 것으로 사료되며 또한 크기도 예상보다 작은 것으로 나타나는 이유는 N-terminal signal sequence가 없기 때문으로 판단된다. 발현된 ORF5는 야외에서 얻은 PRRSV 회복기 혈청으로 검출되었기 때문에 PRRSV의 고유의 topology를 지닌 단백질인 것으로 확인되었다. 따라서 발현된 ORF5는 이전의 보고와 같이 국내에서도 PRRSV의 여러 단백질중에서 면역원성이 좋은 백신 후보 물질임이 간접적으로 확인되었다. 발현정도를 측정해본 결과 Sf9세포에 접종후 2일, 3일에서는 발현정도가 매우 미약하게 나타났다 (data not shown).

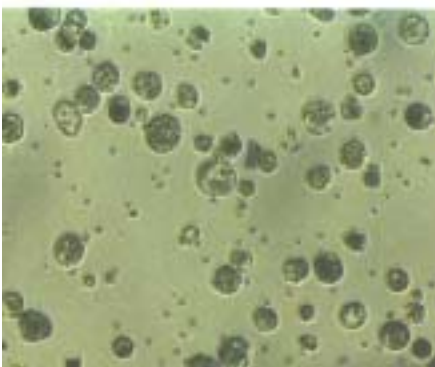
ORF5만을 지닌 recombinant baculovirus clone을 순수하게 분리하기 위해 plaque assay를 실시하여 plaque를 purification 하였다. 각 plaque plug을 배지에 담아 Sf9cell에 접종한 후 96시간 배양한 뒤 수확하여 western blot hybridization을 실시한 결과 일부에서만 GST-ORF5만이 검출되는 것이 관찰되었다 (Fig. 3-7). 검출된 clone은 역가를 높이기 위해 3-5차례 계대배양하였다.



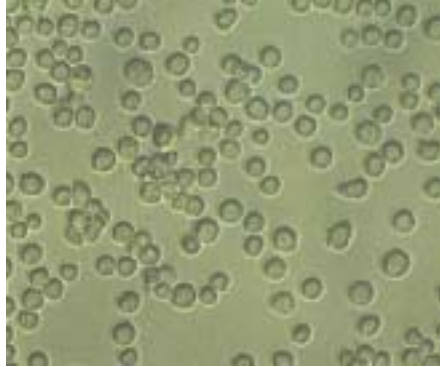
(A)



(B)



(C)



(D)

Fig. 3-4. Morphology of infected and non-infected Sf9 cells. The pictures were taken with inverted microscope ($\times 200$). (A), Sf9 cells infected with recombinant baculovirus containing the ORF5 of PRRSV; (B), Sf9 cells infected with wild-type AcNPV; (C), Sf9 cells infected with recombinant Xy1E; (D), Non-infected cells. Infected Sf9 cells had many occlusion bodies in nuclei (an arrow).

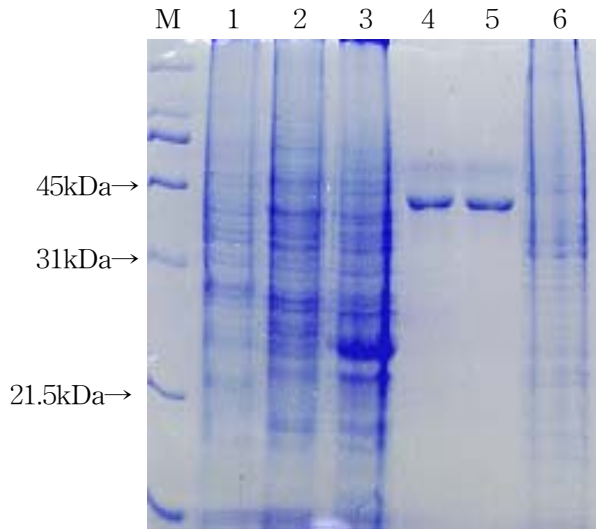


Fig. 3-5. Confirmation of the expression of the ORF5 of CNV-1 by SDS-PAGE. The supernatant and cell pellets were harvested at 4 days post inoculation and were separated by SDS-PAGE (12%). The gel was stained with Coomassie blue. Lanes: M, broad range marker; 1, cell lysate of *Sf9* infected with recombinant baculovirus containing the ORF5; 2, cell lysate of *Sf9* infected with wild-type AcNPV; 3, cell lysate of *Sf9* infected with XylE recombinant baculovirus; 4, supernatant of *Sf9* infected with recombinant baculovirus containing the ORF5; 5, supernatant of *Sf9* infected with wild-type AcNPV; 6, cell lysate of non-infected *Sf9* cell.

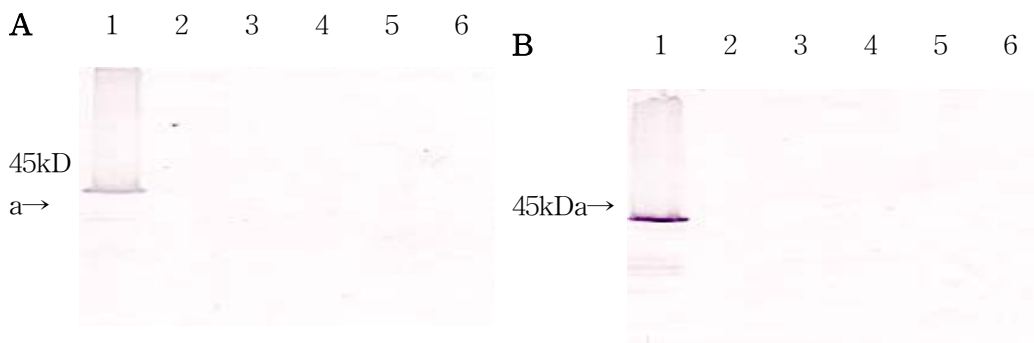


Fig. 3-6. Analysis of the expression of proteins by Western immunoblot probed with

swine anti-PRRSV serum (A) and mouse anti-GST monospecific antibody (B). The supernatant and the cells were harvested at 4 days post infection and were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes. The proteins were detected with peroxidase-labelled anti-pig IgG (A) and peroxidase-labelled anti-mouse IgG (B). Lanes: 1, cell lysate of Sf9 infected with recombinant baculovirus containing the ORF5; 2, cell lysate of Sf9 infected with wild-type AcNPV; 3, cell lysate of Sf9 infected with recombinant Xy1E; 4, supernatant of Sf9 infected with recombinant baculovirus containing the ORF5; 5, supernatant of Sf9 infected with wild-type AcNPV; 6, non-infected Sf9 cell lysate. The numbers at left indicate size markers.

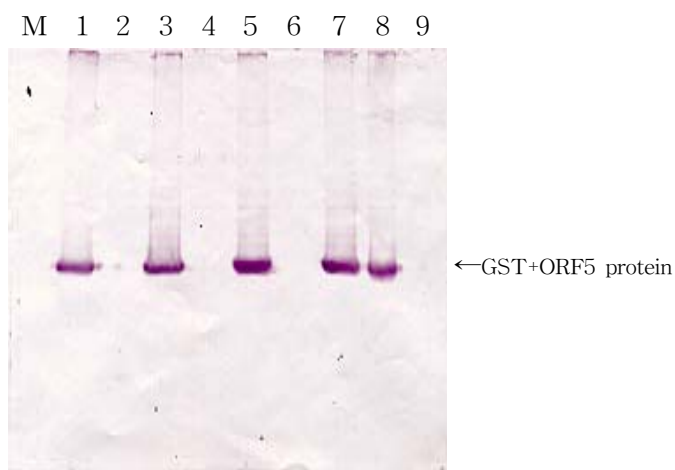


Fig. 3-7. Western immunoblotting of recombinant virus expressing ORF5. lanes: M, Broad range marker; 1- 8, recombinant virus by plaque picking-up; 9, cell lysates

마. 재조합된 baculovirus에서의 ORF5의 염기서열의 분석

재조합된 baculovirus에서 ORF5 유전자가 제대로 삽입되어 있는지를 확인하기 위해 앞서 언급한 방법으로 PCR을 실시한 후 생성된 612 bp의 PCR 산물을 pCR2.1TOPO (Invitrogen)에 삽입한 후 염기서열을 분석한 결과 Fig. 2에서와 같이 100% 동일한 염기

서열을 나타내는 것으로 확인되었다 (data not shown).

바. *Sf9*, *Sf21* 및 Hi-five cell에서의 발현율의 비교

초기 *Sf9* cell에서 배양시 recombinant ORF5의 발현이 극히 낮게 나타나 보다 높은 단백질 발현을 위해서 *Sf9* (Pharmigen), *Sf21*(Invitrogen) 및 Hi-five (Invitrogen) cell을 사용하였다. total cell lysate에서 GST-ORF5에 해당하는 band의 (44 kDa)의 density를 비교하였다 (Fig. 3-8). 일반적으로 moi (multiplicity of infection)보다는 세포의 수가 많을수록 band의 density가 높은 것으로 나타났으며 동일한 세포의 수일 경우 Hi-five cell에서 발현이 다소 높게 나타났다.

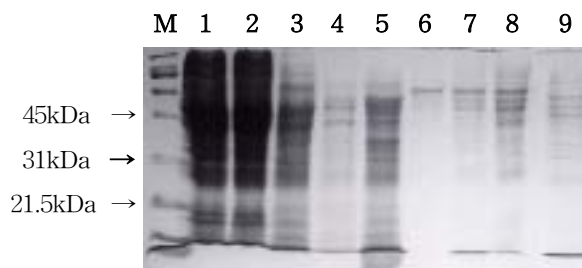


Fig. 3-8. SDS-PAGE of total cell lysate from different cell culture. Lanes 1 and 2, Hi-five cell 2×10^7 , 10moi; 3, Hi-five cell, 8×10^6 cell, 25moi; 4 and 5, Hi-five, 4×10^6 cell, 50moi; 6 and 7, *Sf9* 4×10^6 cell 50moi; 8 and 9, *Sf21*, 4×10^6 cell, 50moi

사. Recombinant CNV-1 ORF5의 정제

Sf21 (50moi, 4×10^6 cell), *Sf9*(50moi, 4×10^6 cell) 및 Hi-five cell(10 moi, 2×10^7 cell)의 농도가 서로 다른 cell 농도로 배양한 후 동일한 양의 recombinant virus를 접종한 후 배양 4일째에 원심 분리하여 상층액을 제거한 후 cell lysate를 만들었다. GST fusion protein purification kit를 사용하여 cell lysate에서 GST-ORF5 fusion protein을 정제하였다. 정제

된 GST-ORF5 fusion protein을 thrombin으로 자른뒤 GST를 다시 kit로 제거한 후 순수하게 분리된 SDS-PAGE로 분석하였다. 25kDa에 해당하는 ORF5의 band가 검출되었으나 가장 density가 높은 것을 Hi-five cell에서 배양했을 경우였다 (Fig. 3-9).

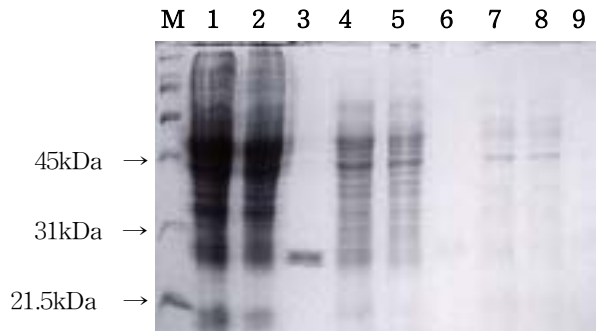


Fig. 3-9. SDS-PAGE of total cell lysate and purified ORF5. Lanes: 1-3, total cell lysate, supernatant and purified ORF5 from culture in Hi-five cells, respectively; 4-6, total cell lysate, supernatant and purified ORF5 from culture in *Sf21* cells, respectively; 7-9, total cell lysate, supernatant and purified ORF5 from culture in *Sf9* cells, respectively.

2. Whole PRRSV의 불활화 백신제조 제조

가. CNV-1과 VR2332 Master seed 제조 및 최적 생산조건 선정을 위한 증식곡선의 작성

CNV-1 및 VR2332를 대량 배양하여 이미 master seed를 확보하였고 각각의 seed 바이러스 역가를 산출하기 위해 3차례 정량 분석하여 두 바이러스의 역가가 $10^{7.5}$ TCID₅₀/0.1ml로 희석하여 Master seed를 확보하여 -70C에 보관하였다.

CNV-1과 VR2332를 각각 $10^{4.5}$ TCID₅₀/0.1ml로 초기 접종농도로 하여 준비된 MARC-145cell에 접종한 후 시간대별로 수확한 후 각각의 수확한 샘플을 대상으로 TCID₅₀를 측정하여 결과를 Fig. 3-10에 나타내었다.

CNV-1이 배양 5일째에 평균 $10^{8.01}$ TCID₅₀/ml를 나타낸 반면 VR-2332의 경우 배양 6일째에 $10^{7.46}$ TCID₅₀/ml를 나타내어 CNV-1이 VR2332보다 증식성과 역가면에서 약간 높게 나타났다. 따라서 배양 5일째에 바이러스를 harvest하는 것이 불활화 백신제조시 가장 높은

역가의 PRRSV를 얻는 것으로 나타났다.

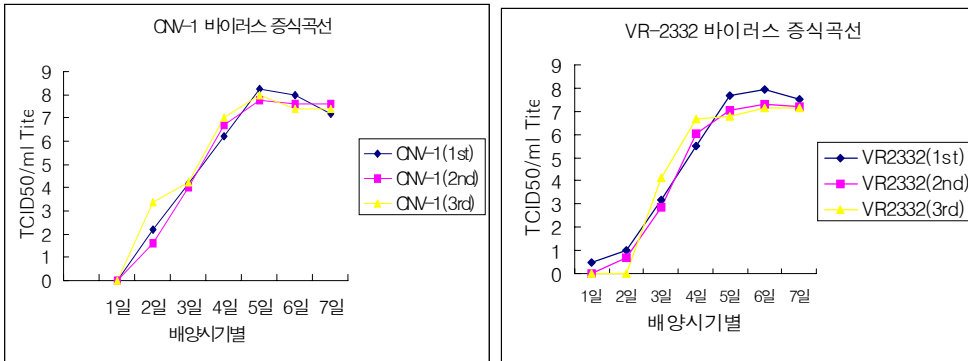


Fig. 3-10. One step growth curve of CNV-1 and VR-2332.

나. 계대배양에 따른 ORF5유전자의 변이조사

폐포 대식세포에서 VR-2332를 계대배양시 특히 ORF5의 유전자의 변이가 나타나는 것으로 보고되어 있다. 따라서 불활화 백신주를 생산할 때 CNV-1과 VR-2332가 Marc-145에 계대배양시 나타날 수 있는 유전자의 변이를 관찰하기 위해 10대까지 계대배양한 후 stock(0대), 5대, 10대에서 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA로 RT-PCR을 실시한 후 pCR2.1-TOPO 에 클로닝 하였다. 염기서열 분석을 실시하여 계대배양에 따른 CNV-1의 ORF5의 유전자의 차이를 분석하였다 (Fig. 3-11). 계대 배양 1대와 10대의 염기서열을 비교한 결과 6개의 염기가 변이되었으며 아미노산의 서열로도 6개의 아미노산의 변화가 있음이 확인되었다 (Fig. 3-12). 이러한 결과는 Indik 등 (2000)이 발표한 체크 바이러스주가 Marc-145에서 152대 배양하였을 때 9군데 point mutation이 일어나고 그 결과 5개의 아미노산의 변이가 있었다는 결과보다 높은 mutation rate를 나타내고 있다. 따라서 보다 많은 계대배양을 통해 CNV-1의 ORF5의 염기서열의 변화를 보다 체계적으로 관찰할 필요가 있는 것으로 사료된다. 이러한 변화가 ORF5의 항원성의 변화로 나타날 수 있는지는 확인할 수 없었으나 일단 Master seed를 다량 확보하여 가급

적 계대를 시키지 않는 것이 바람직 한 것으로 나타났다. 반대로 계대배양시 바이러스의 병원성의 감소와 ORF5의 변이와 관련이 있는 것으로도 보고 되고 있다.

1 atgttgggga aatgcttgac cgcgggctgt tgctgctat tgctttcctt ttggtgtatc
10t.....c..t..

1 gtgccgctct gtttgttgc gctcgttagc gccaacgaca acagcagctc caattccag
10c..cg.a.gg..

1 ttgatttata acttgacatt atgtgagctg aatggcacag actggctagc tgataaattt
10g..

1 gactgggcag tggagacttt tgcatcttt cccgtgttga ctcacattgt ttctatggt
10

1 gccctcacta ctagccattt ccttgacaca gtcctttgg tctgtgtgc caccgcccgt
10

1 tttctccag ggcggtatgt cctgagtaac atctacacgg tctgtgcctt ggctgcattg
10g.g..

1 acttgcttgg tcattaggtt cgtgaagaac tgcattgtcct ggcgccactc atgtactagg
10 g.....cat.t.....

1 tataccaact ttctcttga caccaagggc aggetctatc gttggcggtc gcccgctatc

```

10 .....c.....
1 atagagaaag ggggctaagt tgaggtcgaa ggtcactga tcgacctcat gaaagttgtg
10 .....
1 ctggaaggtt ccgtggcaac ccctgtaacc agagtttcag cggaacaatg gggtcgtcct
10 .....g.....
1 ta--acataa
10 ..-.....

```

Fig. 3-11. Alignment and comparison of the nucleotide sequences of ORF5 between 1-passage CNV-1 and 10-passage CNV-1. Dots indicate nucleotides identical to 1-passage strain and deletions are indicated by dashes (-).

```

1 MLGKCLTAGCCLRLFLWCIVPSCFVALVSANDNSSSNFQLIYNLTLCELNGTDWLANR
10. ....G.....
1 FDWAVESTVIFPVLTHIVSYGALTTSHFLDTVALVTVSTAGFVHGRYVLSNIYTVCALA
10. ....T.....S.A.....
1 ALTCFIIRFVKNCMSWRHSCTRYTNFLLDTKGRLYRWSPVIEKRGKVEVEGHLIDLM
10. ....Y.....
1 KKVLEGSVATPITRVSAEQWGRP*EF
10. ....*...

```

Fig. 3-12. Alignment and comparison of the deduced amino acid sequences of ORF5 between 1-passage CNV-1 and 10-passage CNV-1. Dots indicate nucleotides identical to 1-passage strain and deletions are indicated by dashes (-).

다. 배양시간에 따른 ORF5의 발현

CNV-1과 VR2332의 시간에 따른 ORF5의 발현을 알아보기 위하여, 각각을 F25 flask에 배양한 MARC-145 cell에 각각 $10^{4.5}$ TCID₅₀/0.1ml로 접종한 후, 6일간 배양하였다. 배양 24시간마다 수확한 후 바이러스를 freeze-thawing 방법에 의해 세포내에 존재하는 바이러스를 분리하였다. 동일한 양의 샘플을 SDS-PAGE로 분석한 결과 Fig. 3-13과 같이 나타났다. 약 25kDa 크기의 ORF5가 매우 희미하게 검출되었으며 이는 바이러스의 배양 시간에 따라 별 차이가 없는 것으로 확인되었다. 따라서 불활화 백신을 제조시 ORF5의 양은 매우 적은 양으로 발현되기 때문에 유전자 재조합된 ORF5를 whole virus에 첨가해 주는 것은 방어항체를 유도하는데 바람직한 것임이 확인되었다.

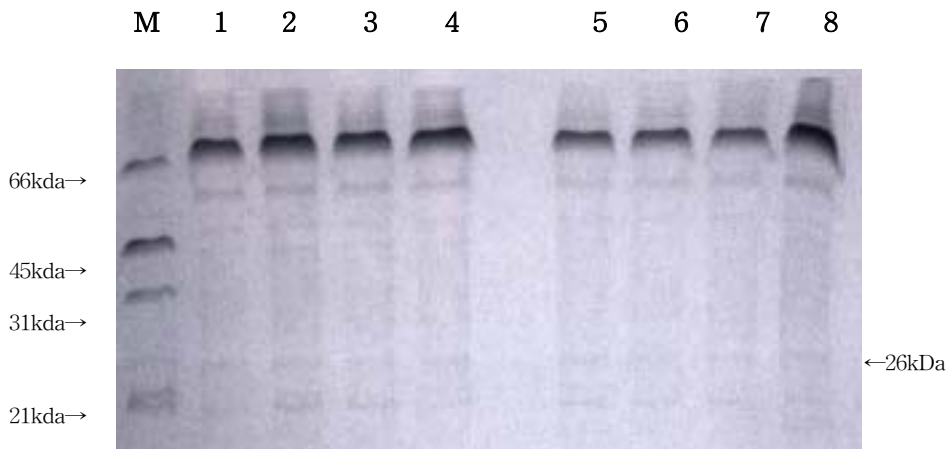


Fig. 3-13. Expression of viral proteins of CNV-1 and VR2332 according to cultivation time. lanes, M, SDS-PAGE broad range marker; 1-4, CNV-1 harvested at 3, 4, 5, 6 day post infection (dpi), respectively; 5-8, VR2332 harvested at 3, 4, 5, and 6 dpi.

3. 백신의 면역원성 및 안전성 조사

가. Rabbit에서의 형성된 면역원성 및 안전성 조사

Rabbit에서 CNV-1, VR2332 및 유전자 재조합 ORF5단백질을 접종한 후 분리한 혈청과 음성혈청에서의 PRRSV 특이적인 단백질을 검출하기 위해 PRRSV에 감염된 Marc145cell에서 Western blot hybridization을 실시하였다. 음성 혈청에서는 어떠한 단백질 밴드가 검출되지 않았다 (Fig. 3-14). 그러나 Recombinant ORF5를 접종한 후 형성된 항체에서는 여러 개의 크기가 다른 밴드가 확인되었다 (Fig. 3-15). 이러한 밴드가 여러 가지 형성된 이유는

백신에 세포배양에서 유래된 여러 가지 단백질이 포함되어 있기 때문으로 판단된다. 따라서 IFA를 통해 보다 특이적인 항체를 조사해야 할 것으로 판단된다. 백신 접종 후 토끼에서는 특별한 임상증상이나 이상소견을 발견할 수 없어 안전한 것으로 사료되었다.

나. 돼지에서의 형성된 항체의 측정

유전자 재조합 백신의 제조가 지연됨으로 인해 현재 방법에서와 같이 실시하고 있으며 시기별로 임상증상과 생산성을 조사하고 혈청을 대상으로 ELISA 및 IFA의 항체가를 측정하려 한다.

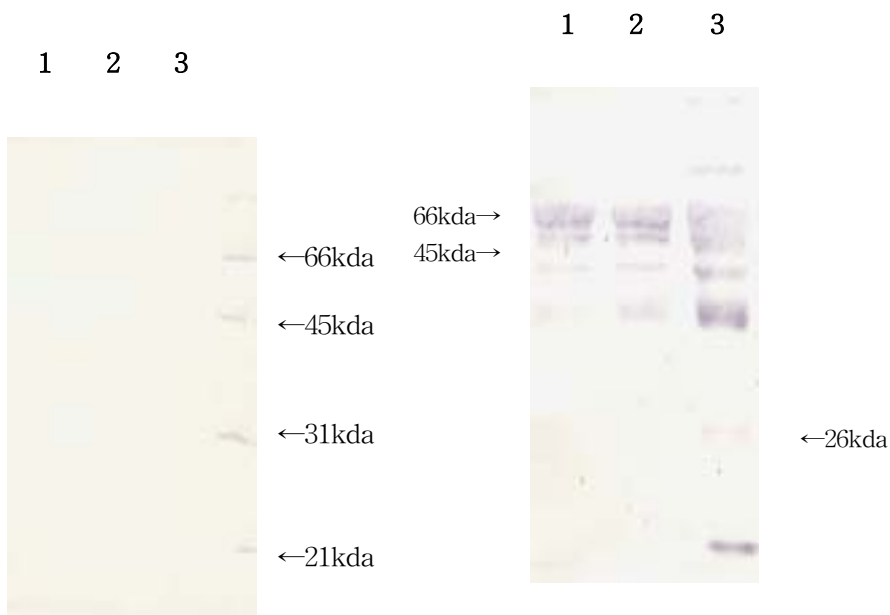


Figure. 3-14. Western blot hybridization probed with preimmune serum from rabbit. Lanes: 1, VR2332; 2, CNV-1; 3, recombinant baculovirus.

Figure. 3-15. Western blot hybridization probed with immune serum with recombinant baculovirus from rabbit. Lanes: 1, VR2332; 2, CNV-1; 3, recombinant baculovirus.

4. Prokaryotic system에서의 recombinant ORF5 발현

Baculovirus system에서의 유전자 재조합 ORF5유전자의 발현정도가 매우 낮으며 Fetal

calf serum등을 사용하기 때문에 백신의 제조 단가상 경제적인 측면에서 매우 불리한 것으로 작용되기 때문에 유전자 재조합 ORF5의 단백질을 *E. coli*에서 발현시키기 위해 pGEX-4T-3 vector를 사용하였다. CNV-1의 ORF5와 VR2332의 ORF유전자를 삽입한 recombinant pGEX plasmid를 *E. coli* BL21에 형질 전환 시킨 후 ORF5유전자를 지닌 recombinant clone을 수개씩 선발하여 각각 IPTG로 발현시킨 후 SDS-PAGE를 실시하여 Coomassie-blue stain과 anti-PRRSV antibody를 사용하여 western blot hybridization을 실시하였다. GST와 fusion된 ORF5의 크기는 약 51 kDa로 IPTG의 농도에 따라 발현정도를 살펴보았다. Coomassie-blue의 염색시는 background로 인해 GST-ORF5의 발현정도를 구분할 수 없었다 (Fig. 3-16 & 17). 그러나 anti-PRRS antibody로 western blot hybridization을 실시한 결과 44kDa의 뚜렷한 band와 51kDa근처의 희미한 band가 검출됨을 볼 수 있었다 (Fig. 3-18). 44kDa의 밴드는 control vector에서도 검출되는 것으로 비특이적인 밴드인 것으로 사료되며 51kDa가 GST-ORF5인 것으로 판단된다. IPTG 0.5mM 또는 1mM에서 잘 발현이 되는 것으로 확인 되었으며 31kDa이하로 몇 개의 희미한 band가 관찰되는 것을 볼 때 proteolysis가 일어나는 것으로 사료된다.

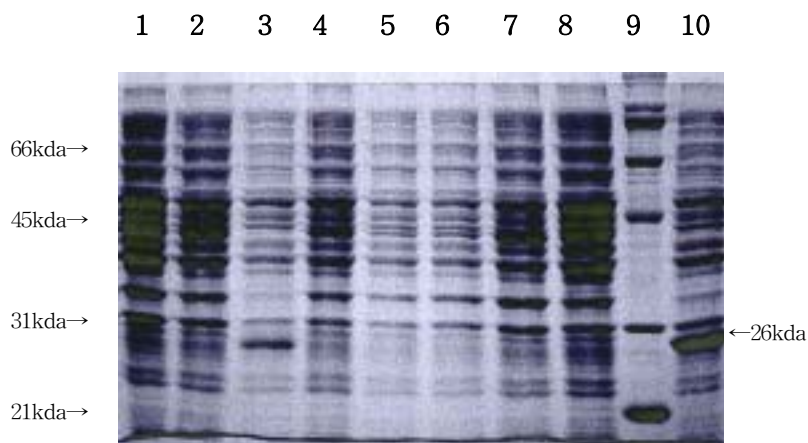


Fig. 3-16. Analysis of GST-ORF5 in total cell lysate after IPTG induction in SDS-PAGE gel stained with Coomassie brilliant blue staining. Lanes: 1~8, *E. coli* containing recombinant pGEX-4T-3 with ORF5 of CNV-1; 9, broad range marker; 10, pGEX-4T-3.

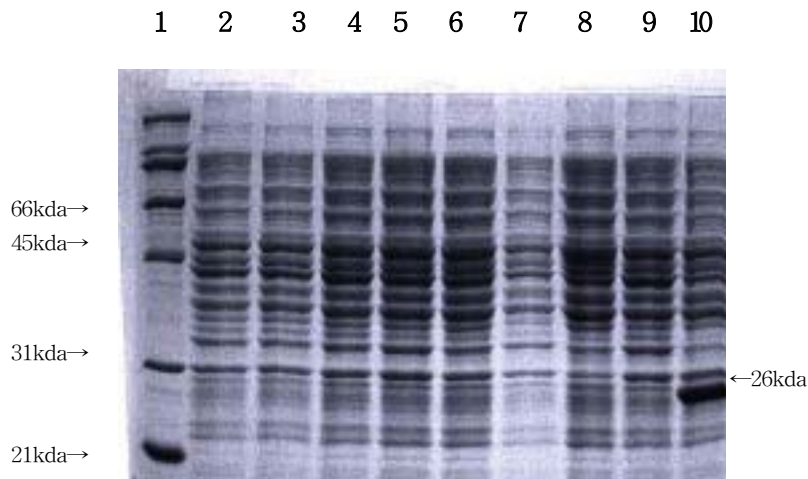


Fig. 3-17. Analysis of GST-ORF5 in total cell lysate after IPTG induction in SDS-PAGE gel stained with Coomassiae brilliant blue staining. Lanes: 1. broad range marker; 2~9, E. coli containing recombinant pGEX-4T-3 with ORF5 of VR2332; 9, broad range marker; 10, pGEX-4T-3.

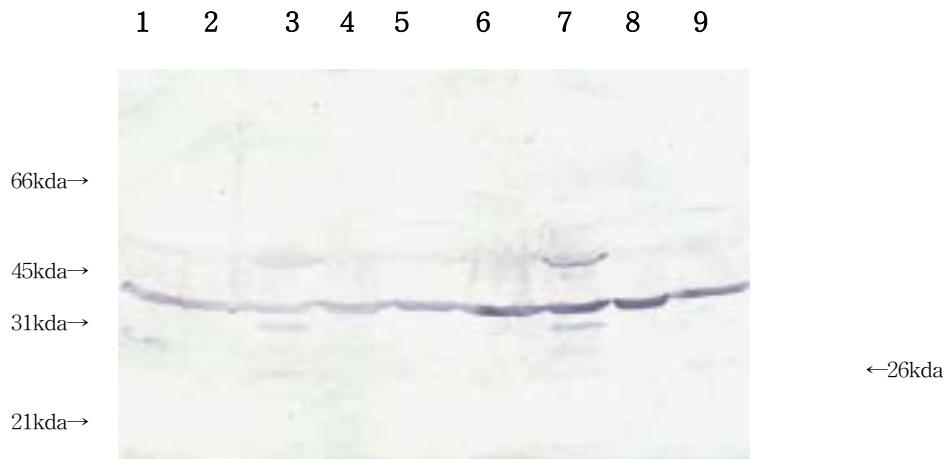


Fig. 3-18. Western blot analysis of GST-ORF5 in total cell lysate after IPTG induction. Blot was hybridized with anti-PRRSV antiserum. Lanes: 1. pGEX-4T-3(0mM); 2, pGEX-4T-3(1mM); 3 & 4: pGEX-ORF5 of CNV-1 (1mM); 5, pGEX-ORF5 of VR2332 (0.5mM); 6, pGEX-4T-3(0.5mM); 7 & 8: pGEX-ORF5 of CNV-1(0.5mM); 9: pGEX-ORF5 of VR2332(0.5mM).

5. *M. hyopneumoniae*의 분리 및 백신주의 스크리닝

가. *M. hyopneumoniae*를 신속진단하기 위한 conventional PCR과 nested PCR의 기법확립

1) Conventional PCR과 nested PCR의 비교

conventional PCR의 경우 649bp의 band가 검출되었고 nested PCR의 경우 352bp의 유전자가 증폭되었다 (Fig. 3-19).

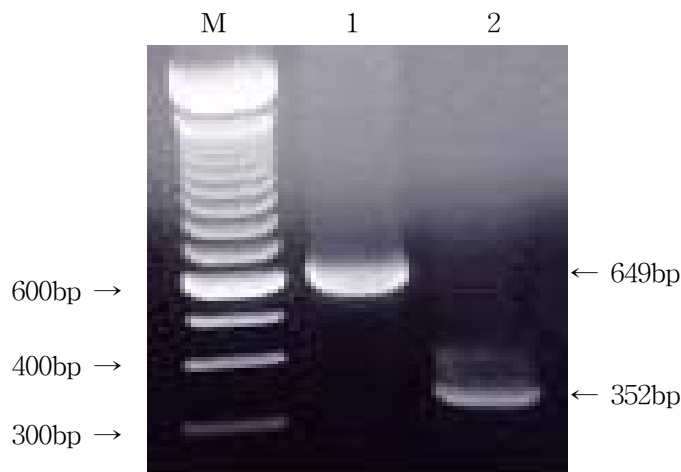


Fig. 3-19. Electrophoresis of amplified DNA of *Mycoplasma hyopneumoniae* by conventional PCR and nested PCR. M: 100bp Marker; Lane 1: 649bp PCR product of conventional PCR assay; Lane 2: 352bp PCR product of nested PCR assay.

2) 특이도

PCR 특이도를 시험하기 위하여 *M. hyopneumoniae* 표준주를 비롯하여 *M. flocculare*, *M. hyorhinitis*, *M. gallisepticum*, *M. gallinaceum*, *M. synoviae*, *M. anatis*, *M. iowa*, *M. pullorum*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* 및 *Staphylococcus aureus*의 template를 가지고 실시한 바 *M. hyopneumoniae*에서만 해당되는 크기의 유전자가 증폭 검출되었다. 특히 면역학적으로 교차반응을 일으킨 정도로 유전학적으로 비슷한 *M. flocculare*와 *M. hyorhinitis*에서도 검출되지 않을 만큼 특이도가 높았다 (Fig. 3-20). 또한 이들 증폭된 유전자의 염기서열을 분석한 결과

기존에 발표된 염기서열과 동일한 것으로 나타났다.

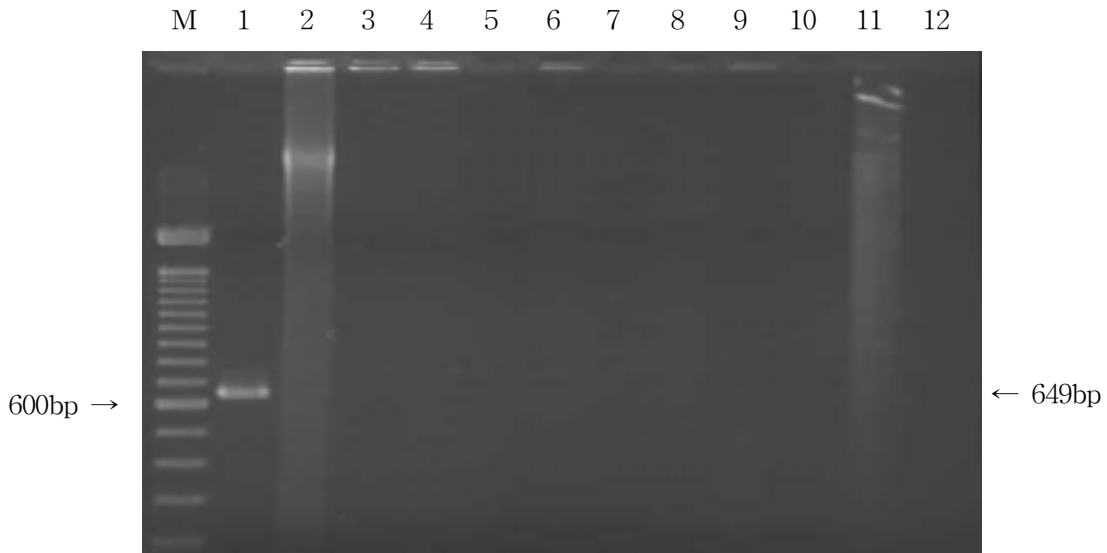


Fig. 3-20. Conventional PCR specificity. Template DNA from 9 mycoplasma species and 3 non-mycoplasma species were used in conventional PCR and PCR products were electrophoresed in 1.5% agarose gel. A 649-bp size band was detected only in *M. hyopneumoniae*. Lanes; M, 100bp DNA molecular mass marker; 1, *M. hyopneumoniae*; 2, *M. flocculare*; 3, *M. hyorhinis*; 4, *M. gallisepticum*; 5, *M. gallinaceum*; 6, *M. synoviae*; 7, *M. anatis*; 8, *M. iowa*; 9, *M. pullorum*; 10, *Pasteurella multocida*; 11, *Bordetella bronchiseptica*; 12, *Staphylococcus aureus*.

3) 민감도

PCR의 민감도를 확인하기 위하여 정량된 *M. hyopneumoniae*의 template DNA를 10ng에서 10fg까지 십진희석한 후 각각 희석된 template DNA를 사용하여 PCR을 실시한 결과 100fg에서도 검출될 정도로 높은 예민성을 나타냈다 (Fig. 3-21). Conventional PCR과 nested PCR의 민감도를 비교할 때 conventional PCR의 경우 100fg까지 검출하는 반면 nested PCR의 경우 그보다 100배 정도 (1fg) 훨씬 예민한 것으로 나타났다

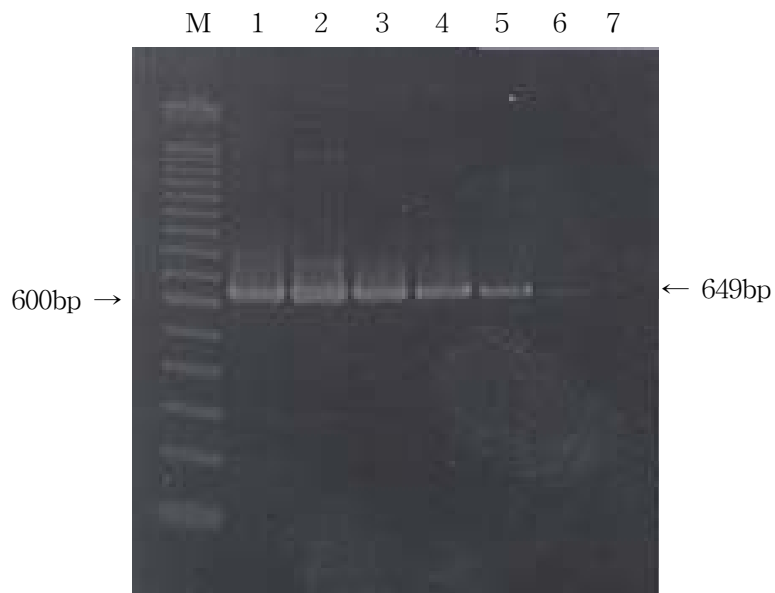


Fig. 3-21. Conventional PCR sensitivity. Tenfold dilutions of the extracted *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA from 10ng to 10fg were used. Lane M is 100bp DNA size marker; Lanes from 1 to 8 indicate 10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg and 10fg template DNAs of *M. hyopneumoniae* used in PCR, respectively. Product was detected up to the 100fg of template DNA.

4) 증폭된 PCR 산물의 염기서열 확인

증폭된 649-bp 크기의 PCR 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 kit를 이용하여 gel에서 DNA를 추출한 후 *EcoR* I 과 *Hind*III로 각각 절단하여 band pattern을 확인하여 보았다. 절단된 band pattern은 예상한 크기 pattern을 보였다. 증폭된 PCR 산물의 염기서열을 분석하기 위하여 gel상에서 추출한 DNA를 pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen, CA)에 삽입하여 cloning하였다. Cloning한 plasmid DNA를 정제하여 염기서열을 분석 의뢰한 결과, PCR 증폭산물은 GenBank에서 얻은 Sequence상과 100% 일치하는 것으로 나타났다 (Fig. 3-22).

```

1      GAGCCTTCAA  GCTTCACCAA  GAAATGGGGT  GCGCAACATT  AGTTAGTTGG
.....
51     TAGGGTAAAT  AGCCTACCAA  GACGATGATG  TTTAGCGGGG  CCAAGAGGTT
.....
101    GTACCGCCAC  ACTGGGATTG  AGATACGGCC  CAGACTCCTA  CGGGAGGCAG
.....
151    CAGTAAGGAA  TATTCCACAA  TAAGCGAAAG  CTTGATGGAG  CGACACAGCG
.....
201    TGCAGGATGA  AGTCTTTCGG  GATGTAAACT  GCTGTTGTAA  GGGAAGAAAA
.....
251    AACTAGATAG  GAAATGCTCT  AGTCTTGACG  GTACCTTATT  AGAAAGCGAC
.....
301    GGCAAATAT  GTGCCAGCAG  CCGCGGTAAT  ACATAGGTCG  CAAGCGTTAT
.....
351    CCGGAATTAT  TGGGCGTAAA  GCGTCCGTAG  GTTTTTTGTT  AAGTTTAAAG
.....
401    TTAAATGCTA  AAGCTCAACT  TTAGTCCGCT  TTAGATACTG  GCAAAATAGA
.....
451    ATTATGAAGA  GGTTAGCGGA  ATTCTTAGTG  GAGTGGTGGG  ATACGTAGAT
.....
501    ATTAGGAAGA  ACACCAATAG  GCGAAGGCAG  CTAAGTGGTC  ATATATTGAC
.....
551    ACTAAGGGAC  GAAAGCGTGG  GGAGCAAACA  GGATTAGATA  CCCTGGTAGT
.....
600    CCACGCCGTA  AACGATGATC  ATTAGTTGGT  GGCAAAAGTC  ACTAACACA
.....

```

Fig. 3-22. Nucleotide sequence analysis of 649-bp sized 16S rRNA *Mycoplasma hyopneumoniae* amplified by conventional PCR. It show 100% homology with those of *M. hyopneumoniae* from Genbank (Accession No. Y00149).

5) 도축돈 폐병변에서의 검출

1차년도 150두의 폐조직에서 13주의 야외 분리주를 분리하였다. 2차년도에는 도축장에서 도축한 12농장에서 총 62두의 폐병변에서 10주의 *M. hyopneumoniae*를 분리하였다 (Table 3-3). 따라서 총 212두의 폐에서 23주의 *M. hyopneumoniae*를 분리하였다. 보관된 분리주는 -70C에서 보관했는데 대부분이 recovery가 되지 않고 2차년도에 분리한 10주만이 생존하였다. 일반적으로 폐병변이 높고 PCR에서 높은 양성율을 나타냄에도 불구하고 다른 세균의 오염되지 않았음에도 불구하고 배양에 의한 분리율이 낮은 이유는 출하돈을 폐재료로 사용한 것이라 판단된다. 출하돈의 경우 폐병변은 존재하나 이미 항체에 의해 *M. hyopneumoniae*가 중화되어 소실된 것이라 사료된다. 따라서 *M. hyopneumoniae*의 분리율을 높이기 위해서는 이유자돈 및 육성돈에서 분리하는 것이 효율적이라 사료된다.

Table 3-3. Comparison of the recovery of *M. hyopneumoniae* by conventional PCR, nested PCR and culture method

No.	conventional	nested	culture	No.	conventional	nested	culture
A	20%(1/5)	80%(4/5)	0%(0/5)	H	80%(4/5)	100%(5/5)	40%(2/5)
B	80%(4/5)	100%(5/5)	40%(2/5)	I	80%(4/5)	80%(4/5)	20%(1/5)
C	40%(2/5)	100%(5/5)	0%(0/5)	J	60%(3/5)	100%(5/5)	20%(1/5)
D	20%(1/5)	80%(4/5)	20%(1/5)	K	80%(4/5)	100%(5/5)	0%(0/5)
E	20%(1/5)	100%(5/5)	20%(1/5)	L	0%(0/7)	71.4%(5/7)	14.3%(1/7)
F	20%(1/5)	100%(5/5)	0%(0/5)	Total	43.5%(27/62)	91.9%(57/62)	16.1%(10/62)
G	40%(2/5)	100%(5/5)	20%(1/5)				

6) Random primer의 discriminatory power

M. hyopneumoniae 표준주와 3개의 *M. hyopneumoniae* 분리주의 template DNA로 사용하여 12개의URPs를 스크리닝한 결과, URP-1 primer가 *M. hyopneumoniae*에서 가장 많은 다형성 band를 증폭하여 변별력이 뛰어난 것으로 확인되었다 (data not shown). 선발된 URP-1 primer로 3주의 *M. hyopneumoniae* 분리주를 포함한 13주의 균주 DNA를 대상으로 PCR을 실시하였다 (Fig. 3-23). DNA fingerprint로부터 얻어진 각각의 band를 binominal matrix code (2진법)로 변환시켜 TREECON으로 unweighted pair group arithmetic averages (UPGMA) program을 이용하여 phylogenetic tree를 작성하였다. 형성된 dendrogram은 bootstrap으로 신뢰성을 확인할 수 있었다 (Fig. 3-24). Fig. 5에 나타난 바와 같이 *M. hyopneumoniae* 표준주와 3개의 *M. hyopneumoniae* 분리주는 가장 가까운 cluster에 묶여 있고, 분류상 mycoplasma와는 무관한 *S. aureus*는 mycoplasma 균주와는 전혀 다른 branch로 분류됨을 확인하였다.

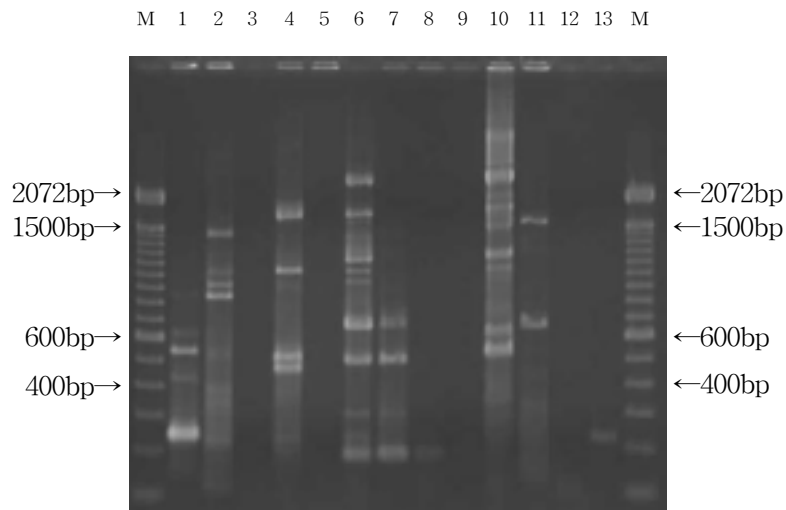


Fig 3-23. RAPD-PCR for different *Mycoplasma* species and non-mycoplasma obtained by using URP-1 primer. The PCR product amplified by RAPD-PCR was electrophoresed in 2% agarose gel. Lanes; M, 100bp standard size marker; 1, *M. gallisepticum*; 2, *M. synoviae*; 3, *M. anatis*; 4, *M. iowa*; 5, *M. pullorum*; 6, *M. hyopneumoniae*; 7, *M. hyopneumoniae 98-1*; 8, *M. hyopneumoniae 98-2*; 9, *M. hyopneumoniae 98-3*; 10, *M. flocculare*; 11, *M. hyorhinae*; 12, *M. gallinaceum*; 13, *Staphylococcus aureus*.

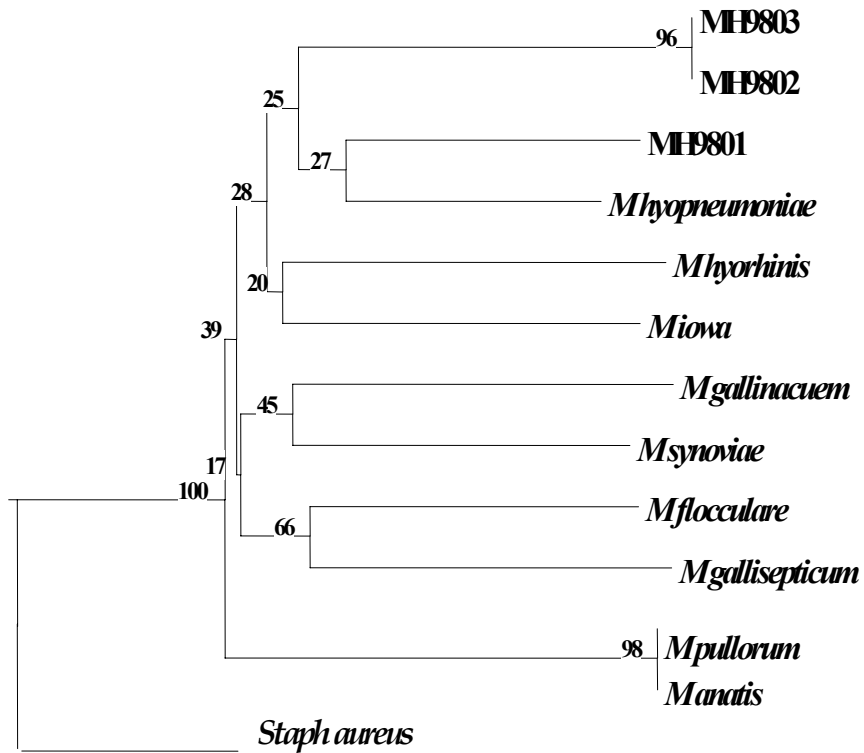


Fig. 3-24. The phylogenetic tree of mycoplasma and non-mycoplasma obtained by URP-1 primers. Clustering was done with the unweighted pair group arithmetic averages (UPGMA) algorithm and confirmed bootstrap analysis.

나. 마이코플라즈마 항원의 생산

표준주를 사용하여 Friis배지에서의 증식성을 보았다. 증식을 정량적으로 관찰하기 위해 colony forming unit를 구하는 것을 사용하였으나 결과의 매 실험마다 큰 차이가 나타나 신빙성이 없었다. 따라서 color change unit (CCU)를 구하는 방법으로 Mycoplasma의 역가를 측정하였다. . 2주까지 M. hyopneumoniae 표준주 ATCC 25943과 ATCC 25617의 CCU는 1×10^7 CCU과 1×10^6 CCU을 나타내었다. 그러나 국내분리주의 경우 모두가 6주까지 배양을 하더라도 1×10^3 CCU이하를 나타냈다. 따라서 향후 M. hyopneumoniae의 백신을 제조하기 위해서는 In vitro상에서 많은 계대배양을 시켜 세균의 역가를 올리는 방안을 강구해야 할 것으로 사료된다.

제 4 장

참 고 문 헌

<제 1 세부과제>

1. Cho HJ, Deregt D, Joo HS. (1996) An ELISA for porcine reproductive and respiratory syndrome: production of antigen of high quality. *Can. J. Vet. Res.* 60:89-93.
2. Chomczynski P, Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
3. Conzelmann KK, Visser N, Woensel PV, et al. (1993) Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Virology* 193:329-339.
4. Coyle PV, Wyatt D, McCaughey C, et al. (1992) A simple standardised protocol for the production of monoclonal antibodies against viral and bacterial antigens. *J. Immunol. Methods* 153:81-84.
5. Dea S, Gagon CA, Mardassi H, et al. (2000) Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch. Virol.* 145:659-688.
6. Dea S, Wilson L, Therrien D, et al. (2000) 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* 87:109-122.
7. Denac H, Moser C, Tratschin JD, et al. (1997) An indirect ELISA for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant nucleocapsid protein as antigen. *J. Virol. Methods* 65:169-181.
8. Drew TW. (1995) Comparative serology of porcine reproductive and respiratory syndrome in eight European laboratories, using immunoperoxidase monolayer assay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Rev. Sci. Tech.* 14:761-775.

9. Dyr JE, Surtmar J. (1997) Separation used for purification of recombinant proteins. *J. Chromat.* 699:383-401.
10. Houben S, Callebaut P, Pensaert MB. (1995) Comparative study of blocking enzyme-linked immunosorbent assay and the immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. *J. Virol. Methods* 51:125-128.
11. Kohler G, Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.
12. Kreutz LC, Mengeling WL. (1997) Baculovirus expression and immunological detection of the major structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 59:1-13.
13. Meng XJ, Paul PS, Halbur PG, et al. (1995) Phylogenetic analyses of the putative M (ORF6) and N (ORF7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe. *Arch. Virol.* 140:745-755.
14. Meulenber JJM, Bende RJ, Pol JMA, et al. (1995) Nucleocapsid protein N of Lelystad virus : expression by recombinant baculovirus, immunological properties, and suitability for detection of serum antibodies. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 2:652-656.
15. Meulenber JJM, Nieuwstadt AP, Zandbergen AE, et al. (1998) Localization and fine mapping of antigenic sites on the nucleocapsid protein N of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with monoclonal antibodies. *Virology.* 252:106-114.
16. Nelson EA, Hennings JTC, Benfield DA. (1994) Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6:410-415.
17. Rossow KD. (1998) Review article: porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Pathol.* 35:1-20.
18. Weaver MS, Walker IW, McNeilly F, et al. (1998) The reverse transcription polymerase chain reaction for diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome: comparison with virus isolation and serology. *Vet. Microbiol.* 62:207-215.
19. Yoon IJ, Joo HS, Christianson WT, et al. (1992) An indirect fluorescent antibody test

for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4:144-147.

20. Yoon KJ, Zimmerman JJ, Swenson SL, et al. (1995) Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7:305-312.

<제 1 협동과제>

1. Christianson, W. T., J. E. Collins, D. A. Benfield, L. Harris, D. E. Gorcyca, D. W. Chladek, R. B. Morrison, and H.S. Joo. (1992) Experimental reproduction of swine in fertility and respiratory syndrome in pregnant sows. *Am J Vet Res* 53:485-488

2. Halbur, P. G., P. S. Paul, M. L. Frey, J. Landgraf, K. Eernisse, X. J. Meng, J. J. Andrews, M. A. Lum, and J. A. Rathje. (1996) Comparison of the antigen distribution of two U.S porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet Pathol* 33:159-170

3. Halbur, P. G., P. S. Paul, Meng, M. A. Lum, J. J. Andrews, and J. A. Rathje. (1996) Comparison pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS virus) isolates in a five week old cesarean-derived colostrum-deprived pig model. *J Vet Diagn Investig* 8:11-20

4. Hopper, S. A., M. E. White, and N Twiddy. (1992) An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain. *Vet Rec* 131:140-144

5. Rossow, K. D., E. M. Bautista, S. M. Goyal, T. W. Molitor, M. P. Murtaugh, R. B. Morrison, D. A. Benfield, and J. E. Collins. (1994) Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10 -week-old pigs. *J Vet Diagn Investig* 6:3-12

6. Yoon, I. J., H. S. Joo, W. T. Christianson, H. S. Kim, J. E. Collins, J. H. Carlson, and S. A. Dee. (1992) Isolation of a cytopathic virus from weak pigs on farms with a history of swine infertility and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest* 4:139-143
7. Goyal SM (1993) Porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest* 5:656-664
8. Rossow KD, Collin JE, Goyal SM, Nelson EA, Christopher-Hennings J, Benfield DA (1995) Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotics pigs. *Vet Pathol* 32:361-373
9. Rossow KD (1998) Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Pathol* 35:1-20
10. Cavanagh D (1997) Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* 142:629-133
11. Snijder EJ, Meulenber JM (1998) The molecular biology of arteriviruses. *J Gen virol* 79:961-979
12. Conzelmann K.K., N. Visser, P. Van Woensel, and H. J. Thiel. (1993) Molecular characterization of porcine reproductive respiratory syndrome virus, a member of the Arterivirus group. *Virology* 193:329-339
13. Meulenberg, J. J. M., A. den Besten, E. J. de Meur, P. L. M. J. Moonen, A. den Besten, E. P. de Kluyver, G. Wensvoot and R. J. M. Moorman (1995) Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) is related to LDV and EAV. *Virology* 192:62-72
14. Brierly I, Diggard P, Inglis SC (1989) Characterization of an effective coronavirus

ribosomal frameshifting signal, requirement for an RNA pseudoknot. *Cell* 57:537-547

15. Nelson, E. A., J. Christopher-Hennings, and D. A. Benfield. (1994) Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J Vet Diagn Investig* 6:410-415

16. Nelson, E.A., J. Christopher-Hennings, T. Drew, G. Wensvoort, J. E. Collins, and D. A. Benfield. (1993) Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 31:3184-3189

17. Meulenbergh, J. J., E. J. de Meijer, and R. J. Moormann. (1993) Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader body junction sequence. *J Gen Virol* 74:1697-1701

18. Meulenbergh, J. J., M. M. Hulst, E. J. de Meijer, P. L. M. J. Moonen. 1994. Lelystad virus belongs to a new virus family, comprising latent dehydrogenase elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus. *Arch. Virol. suppl.* 9:441-448

19. Nelson C. J., Marttaugh MP, Faaberg KS (1999) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol* 73:270-280

20. Meulenbergh JJM, Petersen-Den Besten A (1996) Identification and characterization of a sixth structural protein of Lelystad Virus :the glycoprotein GP2 encoded by ORF 2 is incorporated in virus particle. *Virology* 225:44-51

21. van Nieuwstadt AP, Meulenbergh JJM, Van Essen-Zandbergen A., Petersen-Den Besten A, Bende RJ, Moorman RJM, Wensvoort G (1996) Proteins encoded by open reading frame 3 and 4 of the genome of Lelystad virus (Arteriviridae) are structural proteins of the virion. *J Virol* 70 :4767-4772

- 22.Mardassih H, Massie B, Dea S (1996) Intracellular synthesis of the ORF3-7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 221:98-112
- 23.S. Dea, C. A.Gagnon,H. Mardassi,B. Pirzadeh, and D. Rogan (2000) Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the American and European isolates. 145:659-688
- 24.Meng-X- J, Paul PS, Halbur PG, Lum MA(1995) Phylogenetic analysis of the putative M (ORF6) and N (ORF7) genes of porcine virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe. *Arch Virol* 140:745-755
- 25.Allende R, Lewis TL, Lu Z, Rock DL, Kutish GF, Ali A, Doster AR, Osorio FA (1999) North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in nonstructural protein coding regions.*J Gen Virol* 80:307-315
- 26.Kijona F. Key, Gholamreza Haqshenas,denis K. Guenette, Sabrina L.Swenson, Thomas E. Toth, Xiang-Jin Meng (2001) Genetic variation and phylogenetic trees analyses of the ORF5 gene of acute porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet Microbiol* 83:249-263
- 27.Kim HS, Kwang J, Yoon IJ, Joo HS, Frey ML (1993) Enhanced respiratory of PRRS virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch Virol* 133:477-483
- 28.Jee-yong Park, Bae-keun Lim, Hyun-soo Kim (1999) Sequence analysis of ORF4 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) Korean isolate CNV-1.Korean *J Vet Res* 39(2):294-300
- 29.Kwang J, Kim HS, Joo HS. (1994) Cloning, expression, and sequence analysis of the ORF4 gene of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus MN-1b. *J Vet*

Diagn Invest 6:293-296

30. Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Harris JE, Enning L, Shaw JC, Goyal DP, Cullough SM, Morrison S, Joo RB, Gorcyck HS, Chladek DW (1992) Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* 4:117-126

31. Benfield, D.A., E. Nelson, J.E. Collins, L. Harris, S.M. Goyal, D. Robison, W. T. Christianson, R. B. Morrison, D. E. Gorcyca, and D. W. Chladek. (1992) Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Investig* 4:127-133

33. Higgins DG, Sharp PM (1988) Clustal: a package for performing multiple sequence alignments on a microcomputer. *Gene* 73:237-244

34. Satou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for new constructing phylogenetic trees. *Mol Bio Evol* 4:406-425

35. Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791

36. Page, R. D. M (1996) TreeView :an application to display phylogenetic trees on personal computer. *Computer Applications in the Biosciences* 12:357-358

37. Oleksiewicz MB, Botner A, Nielson J, Sorgaard T (1999) Determination of the 5' leader sequences from radically disparate strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus reveals the presence of highly conserved sequence motifs. *Arch Virol* 144:981-987

38. Murtaugh MP, Elam MR, Kakach LT (1995) Comparison of the structural protein

coding sequences of the VR2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. Arch Virol 140:1451-1460

39. Meng X-J, Paul PS, Halbur PG, Morozov I (1995) Sequence comparison of open reading frame 2 to 5 of low and high virulence United states isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Gen Virol 76:3181-3188

40. Mozove I, Meng XJ, Paul PS (1995) Sequence analysis of open reading frames (ORFs) 2 to 4 of US isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Arch Virol 140:1313-1319

41. Meulenbergg JJM, van Nieuwstadt AP, van Essen-zandbergen A, Langeveld JPM (1997) Post-translational processing and identification of neutralization domain of the GP4 protein encoded by ORF4 of Lelystad virus. J Virol 71:6061-6067

42. Andreyev VG, Wesley RD, Mengeling WL, Vowald AC, Larger KM (1997) Genetic variation and phylogenetic relationship of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. Arch Virol 142:993-1001

43. Kapur V, Elam MR, Pawlovich TM, Murtaugh MP (1996) Genetic Variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the Midwest United states. J Gen Virol 77:1271-1276

44. M. Ostrowski, J. A. Galeota, A. M. Jar, K. B. Platt, F. A. Osorio, and O. J. Lopez (2002) Identification of nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. J Virol 76:4241-4251

45. R. R. Rowland, Roberta Kervin, Christopher Kuckleburg, Ann Sperlich, David A. Benfield (1999) The localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus

nucleocapsid protein to the nucleolus of infected cells and identification of a potential nucleolar localization signal sequence. *Virus Res* 64 1-12

46.Kijona F. Key, Gholamreza Haqshenas, Denis K. Guenette, Sabrina L. Swenson, Thomas E. Toth, Xiang-Jin Meng (2001) Genetic variation and phylogenetic analyses of the ORF5 gene of acute porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet. Microbiol.* 83: 249-263

47.Mengling, W.L.,Lager, K. M. Vorwald, A. C. (1998) Clinical consequences of exposing pregnant gilts to strains of porcine reproductive and respiratory syndrome(PRRS) virus isolated from field cases of atypical PRRS. *Am. J Vet Res* 59: 1540-1544

<제 2 협동과제>

Albina E. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): An overview. *Vet Microbiol*, 55:309-316, 1997.

Allende R, Lewis TL, Lu Z, Rock DL, Kutish GF, Doster AR, Osorio FA. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J Gen Virol*, 80:307-315, 1999.

Allende R, Laefreid WW, Kutish GF, Galeota JA, Wills RW, Osorio FA. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J Virol*, 74:10834-10837, 2000.

Balasuriya UB, Timoney PJ, McCollum WH, MacLachlan NJ. Phylogenetic analysis of open reading frame 5 of field isolates of equine arteritis virus and identification of conserved and nonconserved regions in the GL envelope glycoprotein. *Virology*, 214:690-697, 1995.

Bautista EM, Morrison RB, Goyal SM, Collins JE, Anelli JF. Seroprevalence of PRRS

virus in the United States. *Swine Health Prod.*, 1:4-7, 1993.

Benfield DA, Nelson JE, Harris CL, Robinson GD, Christianson WT, Morrison RB, Gorcyca DE, Chladek DW. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn*, 4:127-133, 1992.

Calvin NM, Hanawalt PC. High efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol*, 170:2796-2801, 1988.

Cavanagh D. Nidovirales: A new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae*. *Arch Virol*, 142:629-633, 1997.

Cheon DS, Chae C. Restriction fragment length polymorphism analysis of open reading frame 5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in Korea. *Arch Virol*, 145:1481-1488, 2000.

Cho SH, Freese WR, Yoon IJ, Trigo AV, Hines RJ. Seroprevalence of indirect fluorescent antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in selected swine herds. *J Vet Diagn Invest*, 5: 259-260, 1993.

Christopher-Hennings J, Nelson EA, Nelson JK, Benfield DA. Effect of a modified-live virus vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in boars. *Am J Vet Res*, 58:40-45, 1997.

Conzelmann KN, Visser N, van Woensel P, Thiel H. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Virology*, 193:329, 1993.

Davis AH. Current methods for manipulating baculoviruses. *Bio/Technology*, 12:47-50, 1994.

Duan X, Nauwynck HJ, Favoreel HW, Pensaert MB. Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar macrophages. *J Virol*, 72:4520–4523, 1998.

Duran JP, Climent I, Sarraseca J, Urniza A, Cortés E, Vela C, Casal JI. Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection. *Virus Genes*, 14:19–29, 1997.

Goldberg TL, Hahn EC, Weigel RM, Scherba G. Genetic, geographical and temporal variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Illinois. *J Gen Virol*, 81:171–179, 2000.

Le CT, Gray GC, Poddar SK. A modified rapid method of nucleic acid isolation from suspension of matured virus: applied in restriction analysis of DNA from an adenovirus prototype strain and a patient isolate. *J Med Microbiol*, 50:571–4, 2001.

Han KS, Lyoo KS, Park BK. Current situation of porcine reproductive and respiratory syndrome in Korea. *Korean J Vet Res*, 39:133–137, 1999.

Indik S, Valiček L, Dieter K, Klánová J. Variations in the major envelope glycoprotein GP5 of Czech strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 81:2497–2502, 2000.

Kapur V, Elam MR, Pawlovich TM, Murtaugh MP. Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States. *J Gen Virol*, 77:1271–1276, 1996.

Katz JB, Shafer AL, Eernisse KA, Landgraf JG, Nelson EA. Antigenic differences between European and American isolates of porcine reproductive and respiratory

syndrome virus (PRRSV) are encoded by the carboxyterminal portion of viral open reading frame 3. *Vet Microbiol*, 44:65-76, 1995.

King LA, Posse RD. The baculovirus expression system: A laboratory guide. *Champion and Hall*, London, 1992.

Kreutz LC, Mengeling WL. Baculovirus expression and immunological detection of the major structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol*, 59:1-13, 1997.

Kwang J, Zuckermann F, Ress G, Yang S, Ororio F, Liu W, Low S. Antibody and cellular immune responses of swine following immunisation with plasmid DNA encoding the PRRS virus ORF's 4, 5, 6 and 7. *Res Vet Sci*, 67:199-201, 1999.

Kweon CH, Kwon BJ, Lee HJ. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Korea. *Korean J Vet Res*, 34:77-83, 1994.

Laemli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.

Le Potier MF, Blanquefort P, Morvan E, Albina E. Results of a control program for PRRS in the French area 'Pays de Loire'. Proc. of the 2nd Int. Symp on PRRS, Copenhagen (Denmark), 9-10 August, p.34, 1995.

Luckow VA, Summers MD. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology*, 6:47-55, 1988.

Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon -mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol*, 67:4566-4579, 1993.

Mardassi H, Mounir S, Dea S. Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Québec reference strain. *Arch Virol*, 140:1405-1418, 1995.

Mardassi H, Massie B, Dea S. Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, 221:98-112, 1996.

Mardassi H, Gonin P, Gagnon CA, Massie B. A subset of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP₃ glycoprotein is released into the culture medium of cells as a non-virion-associated and membrane-free (soluble) form. *J Virol*, 72:6298-6306, 1998.

Meng XJ, Paul PS, Halbur PG, Morozov I. Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 76:3181-3188, 1995.

Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC. Safety and efficiency of vaccination of pregnant gilts against porcine reproductive and respiratory syndrome. *Am J Vet Res*, 60:796-801, 1999.

Meulenberg JJM, Hulst MM, de Meijer EJ, Moonen LM, Petersen-den Besten A, de Kluyver EP, Wensvoort G, Moormann RJM. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology*, 192:62-72, 1993.

Meulenberg JJM, Petersen-den Besten A, de Kluyver EP, Moormann RJM, Wensvoort G. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology*, 206:155-163, 1995.

Meulenberg JJM, Bos-Ruijter JNA, van de Graag R, Wensvoort, Moormann RJM. Infectious transcripts from cloned genome-length cDNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol*, 72:380-387, 1998.

Mortensen S, Thomsen LK, Buch HN, Ruby V, Nyby-Pedersen P, Willeberg P. Adverse effects of the IngelvacTM PRRS modified live vaccine on sow productivity in herds infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Nottingham University Press, In *proceedings of the 15th IPVS Congress*, vol 2, p.128, 1998.

Murtaugh MP, Elam MR, Kakach LT. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch Virol*. 140:1451-1460, 1995.

Nielsen HS, Oleksiewicz MB, Forsberg R, Stadejek T, Bøftner A, Storgaard T. Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. *J Gen Virol*, 82:1263-1272, 2001.

Nelson CJ, Murtaugh MP, Faarberg KS. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: Divergent evolution on two continents. *J Virol*, 73:270-280, 1999.

Park CK, Chang CH, Kang YB, Lee CH, Lyoo YS, Kim HS. Seroprevalence and epidemiological analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Korea. *Korean J Vet Res*, 39:111-117, 1999.

Park JY, Lim BK, Kim HS. Sequence analysis of ORF4 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) Korean isolate CNV-1. *Korean J Vet Res*, 39:294-300, 1999.

Patel G, Nasmyth K, Jone N. A new method for the isolation of recombinant baculovirus. *Nucleic Acids Res*, 20:97-104, 1992.

Peakman TC, Harris R, Gewert DR. Highly efficient generation of recombinant baculoviruses by enzymatically mediated site-specific *in vitro* recombination. *Nucleic Acids Res*, 20:495-500, 1992.

Pirzadeh B, Gagnon CA, Dea S. Genomic and antigenic variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus major envelope GP₅ glycoprotein. *Can J Vet Res*, 62:170-177, 1998.

Pirzadeh B, Dea S. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 79:989-999, 1998.

Plana-Durán J, Bastons M, Urniza A, Vayreda M, Vilá, Mané H. Efficacy of an inactivated vaccine for prevention of reproductive failure induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol*, 55:361-370, 1997.

Rodríguez MJ, Sarraseca J, Fominaya J, Cortes E, Sanz A. Identification of an immunodominant epitope in the C terminus of glycoprotein 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 82:995-999, 2001.

Suárez P, Díaz-Guerra M, Prieto C, Esteban M, Castro JM, Nieto A, Ortín J. Open reading frame 5 porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *J Virol*, 70:2876-2882, 1996.

Storgaard T, Oleksiewicz M, Bøftner A. Examination of the selective pressures on an live PRRS vaccine virus. *Arch Virol*, 144:2389-2401, 1999.

Tacket CO, Losonsky G, Lubeck MD, Danis AR, Mizutani S, Horwith G, Hung P, Edelman R, Levine MM. Initial safety and immunogenicity studies of an oral recombinant adeno-hepatitis B vaccine. *Vaccine*, 10:673-676, 1992.

Thanawongnuwech R, Halbur PG, Ackermann MR, Thacker EL, Royer RL. Effects of low (modified-live vaccine) and high (VR-2385) -virulence strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on pulmonary clearance of copper particles in pigs. *Vet Pathol*, 35:398-406, 1998.

Wagstrom EA, Yoon KJ, Cook C, Zimmerman JJ. Diagnostic performance of a reverse transcription-polymerase chain reaction test for porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest*, 12:75-78, 2000.

Wesley RD, Mengeling WL, Larger KM, Cluser 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 ORF5. *J Vet Diagn Invest*, 10:140-144, 1998.

Wootton SK, Nelson EA, Yoo DW. Antigenic structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin and Diagn Lab Immunol*, 5:773-779, 1998.

Wootton SK, Yoo D, Rogan D. Full-length sequence of a Canadian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolate. *Arch Virol*, 145:2297-2323, 2000.

Yang SX, Kwang J, Laefreid W. Comparative sequence analysis of open reading frames 2 to 7 the modified live vaccine virus and other North American isolates of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol*, 143:601-612, 1998.

Yuan S, Nelsen CJ, Murtaugh MP, Schmitt BJ, Faarberg KS. Recombinant between North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res*, 61:87-97, 1999.