

Newcastle Disease Virus의 F와 HN 유전자 재조합 DNA 제조 및 면역원성

충남대학교 수의과대학, 국립수의과학검역원¹, 충남대학교 형질전환복제돼지연구센터²

김지영 · 초가기 · 박종현¹ · 서상희 · 박창식² · 김명철 · 전무형*

Construction of Recombinant DNA with F and HN Genes of Newcastle Disease Virus and Its Immunogenicity

Ji-Young Kim, Jiaqi Chu, Jong-Hyeon Park¹, Sang-Heui Seo, Chang-Sik Park²,
Myung-Cheol Kim and Moo-Hyung Jun *

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764,

¹National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang, 430-824,

²Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University,
Daejeon 305-764, Korea

Received : April 25, 2006

Accepted : June 12, 2006

Recombinant DNA vaccines, based on plasmid vectors expressing an antigen under the control of a strong promotor, have several advantages over traditional vaccines. They have been shown to induce a full spectrum of immune responses for humoral and cellular systems and to secure the higher safety and the simplicity of administration. Thus, establishment of DNA vaccines against Newcastle disease virus (NDV) in poultry has been widely investigated using various virus strains and vector systems. In this study, the F and HN genes of NDV CBP-1 strains isolated from diseased pheasants and attenuated by serial passages in egg embryos were cloned using pSLIA vector and constructed two recombinants of pSLIA-tsF and pSLIA-tsHN. The recombinant plasmids were transfected into COS-7 cell and the expression of HN and F proteins were verified by immunofluorescence, SDS-PAGE and Western blot. The recombinant plasmids were injected intramuscularly and intradermally into C57B/6 mouse and a significant increment of HN and F antibodies was detected by ELISA. According to the results, it was implicative that the recombinant DNA could be utilized for development of recombinant DNA vaccine for NDV.

Key Words: NDV vaccine, F and HN gene, Recombinant NDV vaccine

서 론

Newcastle disease virus (NDV)는 뉴캐슬병 (Newcastle disease; ND)의 원인체로써 family *Paramyxoviridae*의 genus *Avulavirus*에 속하며, 병원성 독주는 닭을 비롯한 조류에서 높은 이병율과 폐사를 일으키며, 사람에게 감염시 결막염 증세

*교신저자: 전무형. 305-764, 대전광역시 유성구 궁동 220,
충남대학교 수의과대학 미생물학교실
Phone: 042-821-6753, Fax: 042-821-6753,
e-mail: mhjun@cnu.ac.kr

를 동반하는 인수공통전염병의 병원체이다 (1,16,17). NDV는 150~300 nm 크기로 다양한 형태를 나타내며, 비리온은 외피막 (envelope)을 가지며, herringbone-shaped, 나선대칭형 뉴클레오캡시드를 가진다. 유전자는 negative-sense, single-stranded RNA이며 15~16 kb 크기로 구성되며, NP (nucleoprotein), P (phosphoprotein), M (matrix protein), F (fusion protein), HN (hemagglutinin-neuraminidase), 및 L (RNA-directed RNA polymerase)의 6가지 단백을 암호하는 유전자들로 구성되어 있다 (1,18). 이 중 바이러스 외피막에 존재하는 F와 HN 단백질은 NDV의 병원 기전과 면역방어 기전에 중요한 역할을 한다

(1,18,20,27).

F 단백질은 바이러스 외피막에 있는 두 가지 돌기 중에서 적은 것으로써, NDV가 세포 침입 전단계에서 바이러스와 세포막이 융합되게 하며, 뉴클레오캡시드와 그 부속 단백질이 세포 속으로 들어가게 하여 바이러스의 감염을 돕는다. 또한 침입된 뉴클레오캡시드를 해체하고, 감염 세포와 세포 간에 융합이 일어나도록 유도하여 합포체를 형성하게 하는 역할을 한다 (1,35). 또한 NDV의 복제 과정 중 합성된 F 단백질 F₀는 세포내 효소에 의해 F₁과 F₂ 아단위로 절개되며, F 단백질의 이러한 cleavage activation은 NDV의 병원성과 밀접하게 관련이 있다 (1,19,29). HN 단백질은 바이러스 외피막에 있는 돌기 중에서 큰 돌기로써 혈구응집소와 뉴라미니다제 (neuraminidase)의 기능을 한다. HN은 비리온을 세포 표면에 존재하는 sialic acid-함유 수용체에 부착시킴으로써 NDV가 다양한 동물의 적혈구와 응집반응을 일으키게 하며, F 단백질을 중계하여 바이러스가 세포에 쉽게 침입할 수 있도록 도와주는 기능을 한다. 또한 뉴라미니다제가 활성화 되면 세포 수용체의 파괴기능이 있다. 그러므로 HN은 NDV의 감염과 병원성 발현에 중요한 역할을 하는 물질이다 (15,29,30,35).

ND는 국내 양계농장에서 빈번히 발병되어 많은 경제적 손실을 야기하는 질병이며, 본 병 방역을 위해서는 백신 접종이 필수적이다. 현재 국내 양계장에서 사용할 수 있는 ND 백신은 약독생독백신과 불활화백신이 있으며, 이 두 백신에 대한 장점과 단점이 각각도로 평가되고 있다. 한편 기존 백신의 결점을 보완하기 위해 국내외 연구진들에 의해 subunit vaccine과 재조합백신에 대한 연구가 수행 중에 있다 (12,14).

최근 NDV에 대한 분자유전학적 연구를 바탕으로 병원성과 밀접한 관계를 가진 F 및 HN 유전자를 vaccinia virus (20), fowl pox virus (14,33), Marek's disease virus type 1 (25), human cytomegalovirus (34), baculovirus (6,18,19), turkey herpesvirus (23) 등 다양한 바이러스에 재조합하여 항원을 발현시키고, 이를 응용한 유전자 재조합백신 생산에 대한 연구가 추진 중에 있으며, 닭 생체 내에 접종 시 면역원성이 인정된다고 보고된 바도 있다 (13,18,23,28).

또 한편에서는 보다 기술이 간편하고 면역원성이 높은 "the third generation vaccine"이라고도 불리는 핵산 또는 DNA 백신을 연구하고 있으며 (9,21,24,32,34), herpes viruses, rabies virus, rotavirus, paramyxoviruses 등 동물 바이러스에 대한 DNA 백신이 제조되고 효능에 대한 시험 결과가 보고된 바 있다 (2,3,9).

본 연구에서는 ND에 이환된 꿩에서 분리하여 부화계란에서 250대 계대 배양한 NDV CBP-1 주의 F와 HN 유전자를 RT-PCR로 증폭하고 CMV (cytomegalovirus) promoter와 BGH (bovine growth hormone) poly (A) signal을 지닌 pSLIA vector

에 재조합하여 DNA 백신을 제조하였다. 또한 제조된 pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN 재조합 DNA를 COS-7 세포에 transfection 하여 F와 HN 단백질 발현을 확인하고, C57B/6 마우스에 접종하여 면역원성을 측정하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스

ND에 이환된 꿩에서 분리하여 부화계란에서 250대 계대 배양한 NDV CBP-1주 (7)를 사용하였으며, 생독백신주인 Hitchner B1과 LaSota-IB를 참조주로 사용하였다. NDV CBP-1주는 9~10일령 된 SPF 부화계란의 요막강내 접종방법에 의해 증식하였다.

2. Primer 제조

GenBank에서 검색하여 얻은 B1주 (Accession# U37187)의 F와 HN 유전자의 염기서열과 Chang *et al* (6,7)의 방법을 참고하여 Clone Manager6, version 6.00 (Scientific & Educational Software)을 이용하여 작성하였다.

F 유전자 (1,710 bp)와 HN 유전자 (1,795 bp)를 증폭하고 클로닝하기 위해 각각 *Bam*HI site (밀줄부분)를 삽입하여 F 유전자에 대해 F1 forward primer; 5'-GATTCTGGATCCCGG-TTGGCGCTTCTAGG-3' (11 nt - 40 nt)와 F4 reverse primer; 5'-CGCGGATCCCATCTGTGTTCACATTTTGT-3' (1,687 nt - 1,717 nt)를 제조하고, HN 유전자에 대해 HN1 forward primer; 5'-CGCGGATCCCGACAGCAGTCCTCAGTCATG-3' (103 nt - 123 nt)와 HN4 reverse primer; 5'-CGCGGATCCCACTCACTAACCAGACCTGGC -3' (1,840 nt - 1,860 nt)를 제조하여 RT-PCR에 사용하였다.

3. 바이러스 RNA 추출

바이러스가 증식된 장노막강액 400 µl에 500 µl의 denaturing solution [Sol D: 4M guanidium isothiocyanate (ultra pure, BRL), 25mM sodium citrate (pH 7.0, Fisher Scientific), 0.5% N-laurylsarcosine (Sigma), 0.1 M 2-β-mercaptoethanol (Sigma)]을 첨가하여 37℃에서 1시간 반응시킨 후, 2 M sodium acetate (pH 4.5) 50 µl와 600 µl의 P/C/I (phenol/chloroform/isoamylalcohol; 25:24:1, Sigma)를 넣고 교반기로 잘 혼합시킨 후 실온에서 14,000×g로 10분 간 원심하였으며 상층액을 새 시험관에 옮겨, 다시 여기에 550 µl의 P/C/I를 첨가하여 교반기로 잘 혼합한 후, 실온에서 14,000×g로 10분 간 원심시킨 다음, 상층액 750 µl를 새 시험관에 넣었다. 그리고 동량의 isopropanol (Sigma)을 넣어 실온에서 10분 간 정치시킨 후, 14,000×g로 4℃에서 20분 간 원심하여 RNA를 침전시켰다.

시험관의 상층액을 제거하고 다시 Sol D와 isopropanol을 각각 300 μ l를 넣고 실온에서 10분 간 정치시키고 14,000 \times g에서 20분 간 원심하여 얻은 RNA를 다시 침지시킨 후, 75%의 에타놀로 두 번 세척하고 실온에서 건조한 다음 0.1%의 DEPC용액 (10 μ l)에 녹였다.

4. Reverse transcription – polymerase chain reaction (RT–PCR)

추출된 viral RNA template 20 μ l에 F와 HN 유전자에 대한 F1와 HN1 primer (50 pmol/ μ l)를 각각 1 μ l씩 첨가하고 70 $^{\circ}$ C에서 30분 간 처리하고, 4 $^{\circ}$ C에서 5분 간 반응시켜 template에 primer를 접합하였다. 그리고 이 반응물에 0.1%의 DEPC용액을 더 첨가하여 RT-Premix (Bioneer, Korea)와 잘 혼합한 다음, automated thermal cycler (Perkin Elmer Cetus Co., USA)에서 37 $^{\circ}$ C에서 60분, 42 $^{\circ}$ C에서 60분 간 반응하여 cDNA를 합성하였다.

유전자의 증폭은 Expand long Template PCR system kit (Roche, Germany)를 사용하여 수행하였다. 앞서 합성한 cDNA 5 μ l에 F와 HN 유전자에 대하여 각각 F1 (F), F4 (R) primer와 HN1 (F)와 HN4 (R) primer를 각각 1 μ l (50 pmol/ μ l)씩 넣고 Long Template PCR system buffer1 5 μ l와 10 mM dNTP 1.75 μ l, Polymerase mix 1 μ l, 멸균증류수 35 μ l를 첨가하여서 automated thermal cycler로 F 유전자는 93 $^{\circ}$ C에서 2분 간 예비열처리하고, 93 $^{\circ}$ C에서 10초, 50 $^{\circ}$ C에서 30초, 68 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 반응하는 과정을 10회 반복하고, 93 $^{\circ}$ C에서 10초, 50 $^{\circ}$ C에서 1분, 68 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 반응하는 일련의 과정을 20회 반복하면서 extension time을 매 사이클마다 20초씩 추가하여 반응시켰다. HN 유전자는 93 $^{\circ}$ C에서 2분 간 예비열처리하고, 93 $^{\circ}$ C에서 10초, 46 $^{\circ}$ C에서 30초, 68 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 반응하는 과정을 10회 반복하고, 93 $^{\circ}$ C에서 10초, 46 $^{\circ}$ C에서 30초, 68 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 반응하는 일련의 과정을 20회 반복하면서 매 사이클마다 annealing time을 2초씩, extension time은 20초씩 추가하여 반응시켰다. PCR product는 1.2% ethidium bromide agarose gel을 이용하여 전기영동으로 분석하였고 Image analyzer (Pharmacia, Sweden)로 판독하고 분석하였다.

5. cDNA 클로닝

클로닝 벡터로 CMV promoter와 BGH poly (A) signal을 가지고 있는 pSLIA plasmid (Veterinary Infectious Disease Organization, Canada)를 사용하였으며, F와 HN 유전자를 클로닝하기 위해 BamHI (TaKara, Japan)으로 처리하여 linear vector로 만들고 자가융합을 억제시키기 위하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 calf intestine alkaline phosphatase (Takara, Japan)로 처리

하였다. 증폭된 F와 HN 유전자의 PCR product를 30 $^{\circ}$ C에서 1시간 BamHI (TaKara, Japan)으로 처리하여 준비한 pSLIA plasmid에 융합하였고, 이렇게 하여 얻어진 플라스미드를 각각 pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN이라 하였다.

E. coli DH5 α competent cell을 재조합 pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN plasmid로 형질전환하여 클로닝한 다음, 앰피실린이 포함된 5 ml의 LB broth에 접종하고 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 진탕 배양하고 QIAGEN plasmid purification kit (QIAGEN, USA)를 이용하여 plasmid DNA를 추출하였다. 유전자의 삽입 여부를 확인하기 위해 재조합 플라스미드를 BamHI, EcoRI, PstI, 및 EcoRV로 처리하여 삽입유전자를 확인하였다.

6. Transfection

Lipofectamine plus (GIBCO BRL, USA)를 사용하여 pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN plasmid를 COS-7 cell에 transfection 하였다. Transfection 하기 전에 COS-7 세포는 트립신 처리하고 세포수가 2×10^5 개/200 μ l가 되게 하여 마이크로플레이트 (96 wells)에 주입하였다. Transfection 과정을 요약하면 시험관에 plasmid DNA를 PLUS reagent (plasmid DNA 1 μ g, PLUS reagent 6 μ g and Opti-MEM 100 μ l)와 혼합하여 실온에서 15분 동안 반응시켰다. 다른 시험관에 lipofectamine 4 μ l를 Opti-MEM 0.8 ml에 희석하고, 이 두 용액을 혼합하고 실온에서 15분 간 반응시킨다. 이 반응시간 동안 세포가 들어있는 well에 Opti-MEM을 넣고 여기에 반응시킨 DNA-PLUS-lipofectamine complex를 한 방울씩 잘 섞이게 떨어뜨린 후 5% CO $_2$ incubator (37 $^{\circ}$ C)에서 3시간 반응시킨 다음, 새 MEM 배지 (10% 우태아혈청)를 더 첨가하여 24시간 반응시킨 후 pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN plasmid가 transfection 되었는지를 시험하였다.

7. 발현 단백질 확인

1) 간접형광항체법

pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN plasmid를 transfection 하여 48시간 지난 COS-7 세포를 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)으로 1회 세척한 다음 80% 아세톤으로 5분 간 고정한 후, PBS로 1번 세척하고 F와 HN 단백질에 대한 각각의 anti-NDV monoclonal antibody (mouse ascites, Jeno Biotech. Korea; 1:500)와 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. 그리고 PBS로 3회 세척하고 2차 항체인 FITC-conjugated anti-mouse antibody (Cappel. USA; 1:100)와 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응하고 다시 PBS로 5회 세척한 후, 형광현미경으로 관찰하였다.

2) SDS–PAGE

pSLIA-tsF, pSLIA-tsHN plasmid를 transfection하여 48시간 지난 COS-7 세포를 수확하여 1,200 rpm에서 3분 동안 원심

Table 1. Immunization of the mice against recombinant DNA with F and HN genes

Groups*	Immunogens	No. of mouse	Routes	Dose at weeks (μ g)			
				0	2	4	6
I	pSLIA-tsF	5	IM	100	100	100	Sacrificed
II	pSLIA-tsHN	5	IM	100	100	100	Sacrificed
III	pSLIA-tsF	5	ID	100	100	100	Sacrificed
IV	pSLIA-tsHN	5	ID	100	100	100	Sacrificed
V	Control	5	IM	100	100	100	Sacrificed

*Mouse: C57BL/6, IM: Intramuscular injection in quadriceps muscle.

ID: Intradermal injection on tail. Control group was injected intramuscularly with pSLIA alone.

한 후 침전세포를 100 μ l의 PBS에 부유시킨 후 SDS reducing sample buffer [0.5 M Tris-HCl 1 ml, 10% SDS (pH 6.8), 2-mercaptoethanol 0.4 ml, 0.05% bromphenol blue, glycerol 2 ml, H₂O 7 ml] 300 μ l를 첨가하여 95°C에서 5분 동안 끓인 후, 12,000 rpm에서 3분 동안 원심하여 얻은 상층액을 시험하였다. 준비한 시료를 주입하고, tris-glycine electrophoresis buffer를 사용하여 80 V에서 30분 동안 prerunning 시킨 후, 150 V에서 2시간 정도 전기영동하였다. 분자량을 측정하기 위해 prestained protein molecular weight standards (GibcoBRL, USA)를 사용하였고, 전기영동이 완료된 겔을 분리하여 염색액 [Coomassie Brilliant Blue R-250 0.25 g, methanol 50 ml, H₂O 40 ml, acetic acid 10 ml]에 1시간 염색한 후 탈염색액 [methanol 30%, H₂O 60%, acetic acid 10%]으로 탈색시켜 관찰하였다.

3) Western blot

XCell II Blot Module (Invitrogen, USA)과 Vectastain ABC reagent kit (Vector Lab., USA), DAB substrate kit (Vector Lab., USA)를 이용하였다. SDS-PAGE가 완료된 겔과 니트로셀룰로즈막 (Osmonics, USA)을 25 V로 3시간 볼로팅시킨 후, 니트로셀룰로즈막을 꺼내어 blocking solution [10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, 5% Skim milk (Difco, USA), 5% Lacto-albumin (Difco, USA)]에 담가 4°C에서 24시간 반응하고, PBST [1.37 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0.05% (v/v) Tween 20]로 2번 세척하였다. 그 다음 각각 F와 HN 단백질에 대한 anti-NDV monoclonal antibody로 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 위와 같은 방법으로 세척하고, biotinylated goat anti-mouse IgG [H+L] (Vector Lab., USA)를 1시간, 그리고 Vectastain ABC reagent kit (Vector Lab., USA)의 A와 B solution을 PBS에 섞어 37°C에서 1시간 반응시켰다. 그리고 DAB substrate (5 ml)로 5분 동안 반응한 후 멸균증류수를 이용하여 세척하였다.

8. 마우스 접종 및 면역원성시험

앞서 작제한 pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN plasmid로 형질전환된 *E. coli* (DH5 α)를 암피실린 (100 μ g/ml)이 첨가된 LB broth (1ℓ당 Bacto-tryptone 10 g, Bacto-yeast extract 5 g, NaCl 10 g, pH 7.0)에 대량 배양하여 plasmid mega kit (QIAGEN, USA)로 플라스미드 DNA를 추출하였고, 자외선분광기로 260 nm에서 측정하여 정량하고 -20°C에 저장하였다. 추출된 플라스미드의 순도 (A260/280 ratio)는 1.8~1.9이었으며, 접종 시 안전성을 높이기 위하여 triton X-114 (Cotten *et al.*, 1994)로 처리하여 lipopolysaccharide를 제거하였다. C57B/6 마우스 (4~8주령)를 Table 1과 같이 5개 군으로 나누고, pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN plasmid를 근육과 피내에 접종하였다. 근육 접종군은 왼쪽과 오른쪽 대퇴근에 50 μ g씩 1마리당 100 μ g을 2주 간격으로 3차례 접종하였고, 피하 접종군은 1마리당 100 μ g씩을 2주 간격으로 꼬리부위 피내에 3차례 접종하였으며, 대조군에는 pSLIA 100 μ g을 근육 접종하였다 (Table 1). 6주째에 Microtainer® Brand Serum Separator tube (Becton Dickinson, USA)를 사용하여 꼬리에서 채혈하였다. 채혈된 혈액은 ELISA (Avian Newcastle Disease Virus Antibody ELISA kit, Jeno Biotech)를 이용하여 면역원성을 측정하였다. NDV 항원이 흡착된 96 well 마이크로플레이트에 가검혈청 (1:100) 100 μ l를 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨 후, washing buffer 200 μ l로 3회 세척하고, Peroxidase-labeled horse anti-mouse IgG (H+L) (Vector, USA) (1:1000)를 100 μ l 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 그 후, 같은 방법으로 3회 세척하고 O-phenylenediamine ·2HCl이 첨가된 발색제 (TMB substrate)를 100 μ l 넣고 실온에서 약 10분 간 반응시키고 정지액을 넣어 발색을 중지시킨 후, Emax microplate reader (Molecular devices, USA)의 450 nm에서 흡광도 (OD₄₅₀)를 측정하였다. 양성 대조군으로 NDV F와 HN 단백질에 대한 monoclonal antibody (1:5000)를 사용하였다.

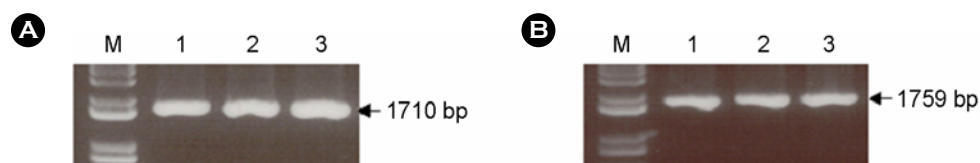


Figure 1. Amplification patterns of NDV F gene (A) and HN gene (B) by the RT-PCR. Lane M: 1 kb DNA ladder marker, lane 1: CBP-1, lane 2: Hitchner B1, lane 3: LaSota-IB strain.

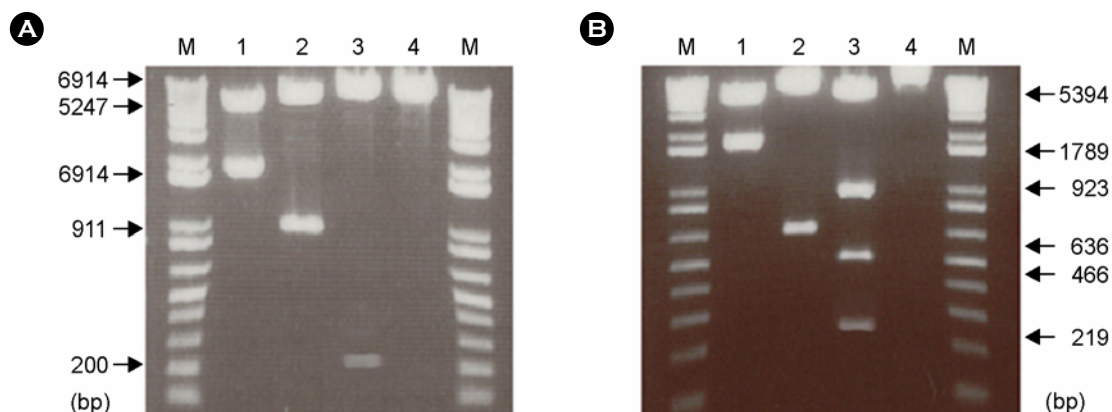


Figure 2. Cleavage patterns of F gene (A) and HN gene (B) inserted into pSLIA by various restriction endonucleases. Lane M: 1 kb DNA ladder marker, lane 1: *Bam*HI, lane 2: *Eco*RI, lane 3: *Pst*I, lane 4: *Eco*RV.

결 과

1. F와 HN 유전자 증폭과 클로닝

NDV CBP-1주, Hitchner B1주, 및 LaSota-IB 백신주에서 추출한 cDNA로 F1 forward primer, F4 reverse primer와 HN1 forward primer, HN4 reverse primer를 각각 이용하여 RT-PCR을 수행한 바, 증폭된 1,710 bp 크기의 F 유전자와 1,795 bp 크기의 HN 유전자에 대한 밴드가 각각 관찰되었다 (Fig. 1). 재조합 pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN를 *Bam*HI로 처리하여 전기영동한 결과 pSLIA-tsF에서 1.7 kb, pSLIA-tsHN에서 1.8 kb 크기의 뚜렷한 insert DNA와 5.2 kb 크기의 pSLIA의 벡터 DNA를 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 또한 F와 HN 유전자에 대한 제한효소 cleavage patterns과 pSLIA에 삽입된 상태를 확인하기 위해 제한효소를 처리한 결과, pSLIA-tsF는 *Eco*RI에서는 6,003 bp, 911 bp, 그리고 *Pst*I에서는 6,714 bp, 200 bp 크기로 추정되는 밴드가 각각 관찰되었고, *Eco*RV에서는 6,914 bp 크기의 단일 밴드가 확인되었다 (Fig. 2-A). pSLIA-tsHN는 *Eco*RI에서 6,376 bp, 636 bp, *Pst*I에서는 5,394 bp, 923 bp, 466 bp, 219 bp 크기로 추정되는 밴드들이 관찰되었으며, *Eco*RV에서는 절단부위가 관찰되지 않았다 (Fig. 2-B).

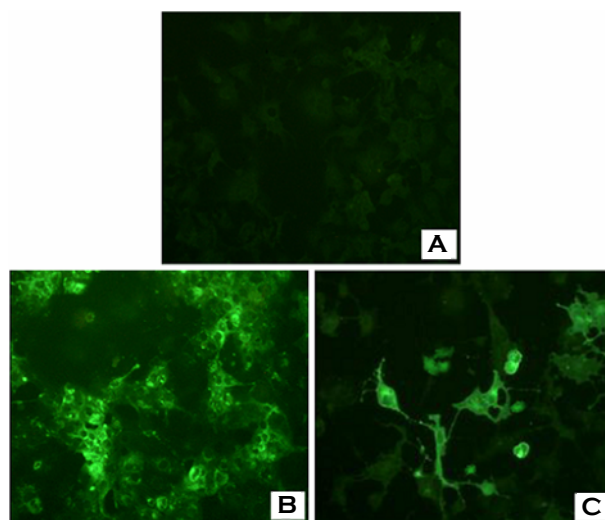


Figure 3. Detection of F and HN proteins expressed by recombinant pSLIA-tsF and pSLIA-tsHN by immunofluorescent assay using monoclonal antibodies. A: Control cells, B: pSLIA-tsF-transfected COS-7 cells, C: pSLIA-tsHN-transfected COS-7 cells.

2. pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN의 transfection과 발현

pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN를 COS-7 세포에 각각 transfection하고 monoclonal antibody를 사용하여 면역형광항체시험을 한 결과, F 단백질과 HN 단백질의 발현 상태를 확인할 수 있

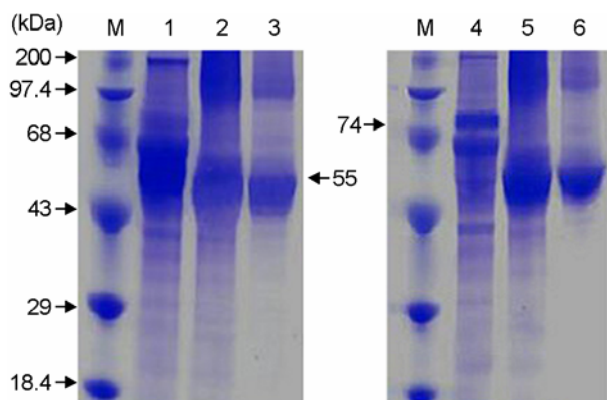


Figure 4. SDS-PAGE patterns of F and HN proteins in COS-7 cell transfected with pSLIA-tsF and pSLIA-tsHN plasmids. Lane M: pre-stained protein marker, lane 1: pSLIA-tsF, lane 2: pSLIA, lane 3: Control, lane 4: pSLIA-tsHN, lane 5: pSLIA, lane 6: Control.

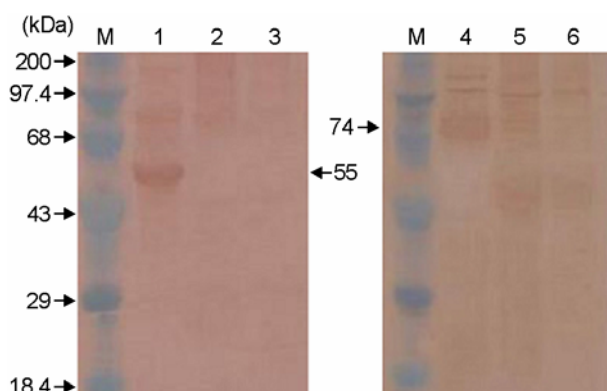


Figure 5. Western blot analysis of F and HN proteins in COS-7 cell transfected with pSLIA-tsF and pSLIA-tsHN plasmids. Lane M: pre-stained protein marker, lane 1: pSLIA-tsF, lane 2: pSLIA, lane 3: Control, lane 4: pSLIA-tsHN, lane 5: pSLIA, lane 6: Control.

었다 (Fig. 3). 또한, SDS-PAGE와 Western blot를 수행한 결과, F 단백질에 대한 55 kDa의 밴드와 HN 단백질에 대한 74 kDa의 밴드를 확인할 수 있었고, F와 HN 유전자가 삽입되지 않은 pSLIA와 대조군에서는 밴드가 관찰되지 않았다 (Fig. 4 & 5).

3. 마우스 접종 및 면역원성

pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN를 각 각 C57B/6 마우스 (4~8주령)의 대퇴근에 1마리당 100 μ g씩 2주 간격으로 3차례 접종하였고, 같은 방법으로 1마리당 100 μ g씩 2주 간격으로 꼬리부위 피내에 3차례 접종하고, 6주 후에 채혈하여 얻어진 혈청을 군별로 합쳐서 ELISA를 3회 수행하였다. 그 결과 ELISA value는 모든 접종군 (I-IV)에서 대조군 (V) 보다 유

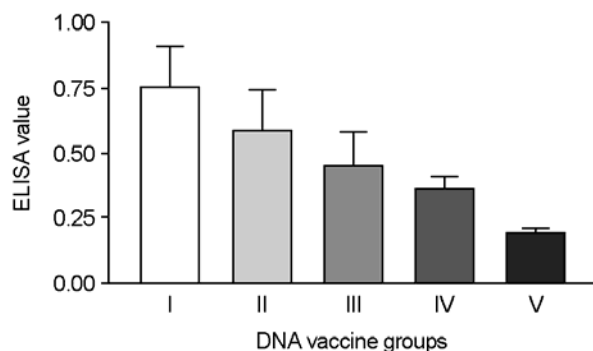


Figure 6. Comparison of ELISA values in the mice injected by intramuscular (IM) and intradermal (ID) routes with the pSLIA-tsF and pSLIA-tsHN. ELISA values were measured at 6 weeks after immunization with the plasmids as shown in Table 1. I and II: injected intramuscularly, III and IV: injected intradermally, V (control): injected intramuscularly with pSLIA alone.

의하게 높았으며, 근육 접종군과 피내 접종군 간 비교에서 pSLIA-tsF를 접종한 군 (I, III)이 pSLIA-tsHN을 접종한 군 (II, IV)보다 더 높게 나타났다. 접종부위 별 비교에서는 근육 접종군 (I, II)이 피내 접종군 (III, IV)보다 ELISA value가 높았다 (Fig. 6).

고 찰

NDV는 닭에 감염하여 급성 전염병을 일으키는 바이러스로써 최근에는 집단사육하고 있는 펙과 메추리에도 감염하여 피해를 주고 있다. 최근 ND 예방을 위해 사용되고 있는 백신의 문제점을 극복할 수 있는 subunit vaccine과 재조합 백신에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있으며 (12,14,21,24), NDV에 대한 분자유전학적 연구를 바탕으로 병원성과 밀접한 관계를 가진 F 및 HN 유전자 재조합백신과 기술이 간편하고 면역원성이 높은 DNA 백신에 대한 연구가 추진되고 있다 (13,18,23). 또한 최근 PCR 법과 특이 유전자 검출 기법의 효능성이 확인됨으로써 바이러스 배양법에서 PCR 법으로 진단법이 개선되고 있다 (6,7,25).

본 연구에서는 ND에 이환된 펙으로부터 분리하여 부화계란에서 250대 계대 배양한 내열성 NDV CBP-1주를 공시하여 RT-PCR 기법을 확립하였고, ND 재조합 DNA 백신 제조를 위해 pSLIA에 F와 HN 유전자를 재조합하고 클로닝하여 단백질의 발현 상태와 제조된 재조합 DNA 백신의 면역원성을 확인하기 위한 일련의 연구를 수행하였다.

CBP-1주와 Hitchner B1주 및 LaSota-IB 백신주에 대하여 단일 primer set를 이용한 RT-PCR을 수행하였던 바, 1,710 bp의 F 유전자와 1,795 bp의 HN 유전자에 대한 cDNA를 증폭할 수 있었으며, 이와 같은 결과는 여러 연구자 (5,6,7,8,25,

26,29)들이 PCR로 NDV F나 HN 유전자를 증폭하였던 결과와 일치하였다. 또한 Chang *et al* (6,7)은 CBP-1주와 약독 백신주의 F 및 HN 유전자의 염기서열을 비교 분석하여 F 유전자는 98~99%, HN 유전자는 97.8~98.4%의 상동성이 있음을 보고한 바 있다.

본 시험에서 F와 HN 유전자를 RT-PCR로 증폭한 후, CMV (cytomegalovirus) promoter와 BGH (bovine growth hormone) poly (A) signal을 지닌 pSLIA 벡터에 삽입하여 재조합 pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN를 제조하였고 Lipofectamine plus (GIBCO BRL, USA)를 사용하여 COS-7 세포에 transfection 하고 발현된 F와 HN 단백을 monoclonal antibody를 사용하여 면역형광항체법으로 확인하였다. 그 결과, 재조합 pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN는 F와 HN 단백을 효과적으로 발현한다는 사실을 확인할 수 있었다. 재조합 DNA에서 발현되는 항원의 농도와 성상은 사용한 플라스미드 벡터에 내장된 promoter와 poly(A) signal의 구조 등에 의해 영향을 받는다 (10). 조류의 DNA 백신 제작에 활용될 수 있는 promoter와 transcription termination signals를 지닌 플라스미드를 확보하기 위한 연구들이 수행된 바 있었고 (15,21), 그 결과 cytomegalovirus promoter와 bovine growth hormone termination signal을 지닌 expression vectors가 조류의 DNA 백신에서 효능이 높다는 것이 인정되었다. 본 연구에서는 CMV promoter와 BGH poly(A) signal을 지닌 플라스미드를 공시하였으며, 연구 결과 공시한 pSLIA 벡터가 적합하게 작용됨을 알 수 있었다. 얻어진 면역형광항체 반응 패턴은 Fang and Liang (10), Murakami *et al* (18), 및 Wu *et al* (33)의 면역학적 연구 결과와 유사하였다.

발현 단백질의 성상을 조사하기 위해 SDS-PAGE를 수행하고, monoclonal antibody를 이용하여 Western blot를 수행한 결과, F 단백질에 대하여 55 kDa의 밴드를 확인할 수 있었다. F 단백질의 위치는 gel의 농도에 따라 다르며, F₁ 단백질은 15% polyacrylamide gel에서 51 kDa, 그리고 10% polyacrylamide gel에서는 56.5 kDa이고, F₂는 분자량이 적어 측정하기 어려웠다고 보고된 바 있다 (1,19). 또한 F₁은 54.7 kDa 그리고 F₂는 10.3 kDa으로 관찰되었고, F₀에 해당하는 66~67 kDa의 단백질은 검출되지 않았다고 기술된 바 있다 (10,18). 본 시험에서 관찰된 55 kDa 밴드는 F₁에 해당되며, F₂ 단백질은 관찰되지 않은 것으로 추정된다. Fang and Liang (10)이 NDV F48E9주의 F 유전자를 RhCMV (human cytomegalovirus) immediate early enhancer와 promoter를 지닌 pcDNA3에 삽입시켜 재조합 플라스미드 pcDNA3-F를 제조하여 electroporation에 의해 vero cell에 transfection하여 F 단백질 발현을 간접형광 항체법으로 확인하고 SDS-PAGE와 Western blot을 실시하여 55 kDa의 F 단백을 관찰하였다고 보고하였다. 이 결과를 유

추해 보면 본 연구에서 관찰된 55 kDa의 밴드는 F₁ 단백질로 인정할 수 있었다. 한편 본 시험에서 HN 단백질에 대한 분석에서는 74 kDa의 밴드를 관찰할 수 있었다. 이 결과는 B1주의 HN 유전자를 baculovirus expression vector에 삽입하여 제조된 재조합 바이러스를 Sf 곤충 세포에 접종하여 재조합 HN 단백을 발현시키고, 이것을 Western blot으로 분석하여 74 kDa의 재조합 HN 단백질이 검출되었다는 Nagy *et al* (19)과 재조합 바이러스에 감염된 DF1 세포에서 74 kDa의 HN 단백을 검출한 Panda *et al* (22)과 NDV B1주와 AB주에 감염된 COS-7 세포에서 74 kDa의 HN 단백을 검출한 Stone-Hulsander and Morrison (27)의 결과와 유사하였다.

현재 사용되고 있는 ND 백신의 단점을 보완할 수 있는 제 3세대 백신으로 NDV 유전자백신에 대한 연구는 많은 연구자들에 의해 수행되고 있다. 그 중 재조합 DNA 백신은 제조하기 쉽고 안전하며, 집단사육 계군에 사용하기 쉽고, neonatal tolerance와 모체이행항체 (maternal antibody)에 의한 백신효능 차단 현상을 극복할 수 있으며, 체액성 면역과 세포성 면역의 두 면역계를 모두 자극하는 장점이 있다 (2,3,9,21). DNA 백신의 이런 장점은 세포 면역이 중요한 요소로 작용하는 조류 질병 예방에는 더욱 중요하다고 지적되고 있다 (3,9,21,31).

생체 내에 주입된 DNA 백신의 작용 기전에 대해서는 아직 불명한 점이 많지만 DNA 백신을 근육 내로 주입 시에는 근육 세포나 단핵 세포에서 항원물질을 발현하고 면역증강 기능을 하며 (2,3), 피내 접종 시에는 피부조직에 산재해 있는 상정 세포들이 항원 발현에 동원되고 면역반응 유발에 중요한 기능을 하는 것으로 추정하고 있다 (2,3,4,9). 본 시험에서 제조한 재조합 pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN의 면역반응을 마우스 생체 내에서 측정하기 위해 C57B/6 마우스의 근육에 100 µg씩 3차 접종하고, 피내에 10 µg씩 3차 접종하여 NDV ELISA kit를 이용하여 항체생성 상태를 측정하였던 바, 접종군에서 음성 대조군 보다 유의하게 높은 항체가가 관찰되었고, pSLIA-tsF를 접종한 군이 pSLIA-tsHN을 접종한 군보다 더 높은 항체가를 나타내었으며, 근육 접종이 피내 접종보다 높은 항체가를 나타냄을 알 수 있었다. 또한 근육 접종군은 1차 접종 후부터 대조군에 비해 높은 항체가를 나타내었고, 피내 접종군은 2차 접종 후부터 유의한 ELISA vlaues가 관찰되었다. 이런 결과는 DNA 백신 접종시험에서 대개 근육 접종이 피내 접종 보다 면역효능이 높게 나타났다는 다른 결과들과 유사하였다 (11,21,24).

또한 본 시험 과정 중 재조합 DNA를 1차 접종한 후 1주째 일부 마우스를 채혈하여 ELISA를 시행한 바 대조군에 비해 유의한 항체가 증가가 관찰되었다. 따라서 재조합 DNA의 농도와 접종 회수 그리고 경시적인 면역형성 과정에 대

한 체계적인 시험이 요구된다. 확립된 pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN의 면역효능과 작용 기전을 규명하고, 닭에 대한 응용성을 평가하기 위해 이 재조합백신을 부화계란내 접종 (*in ovo* vaccination)하여 계태아 내에서 면역원성과, 아울러 기존 백신과의 면역학적 상호 관련성에 대해 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 농림부 농림기술개발사업의 지원(201109-3)에 의해 이루어진 것이며, 또한 일부는 한국과학재단 우수연구센터 (R11-2002-100-0000-0)지원으로 수행되었다. 저자들은 이에 대하여 감사드리는 바이다.

참 고 문 헌

- 1) Alexander DJ: Newcastle disease. *Br Poult Sci* **42**: 5-22, 2001.
- 2) Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk SL: Immunization of animals: from DNA to the dinner plate. *Vet Immunol Immunopathol* **72**: 189-202, 1999.
- 3) Babiuk LA, Babiuk SL, Loehr BI, van Drunen Littel-van den Hurk S: Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. *Vet Immunol Immunopathol* **76**: 1-23, 2000.
- 4) Bos JD: The skin as an organ of immunity. *Clin Exp Immunol* **107**: 3-5, 1997.
- 5) Bruckner L, Stauber N, Brechtbuhl K, Hofmann MA: Detection of extraneous agents in vaccines using the polymerase chain reaction of Newcastle disease virus in poultry biologicals. *Dev Biol Stand* **86**: 175-182, 1996.
- 6) Chang KS, Kim JY, Kim S, Kim, TY, Song HJ, Jun MH: Expression of F protein gene of a thermostable isolate of Newcastle disease virus using Baculovirus expression system. *Journal of Bacteriology and Virology* **31(2)**: 163-174, 2001.
- 7) Chang KS, Kwak KH, Jand SI, Kim JY, Kim TY, Song YH, Song HJ, Jun MH: Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding hemagglutinin-neuraminidase (HN) of Newcastle disease virus isolated from a diseased pheasant in Korea. *Korean J Vet Serv* **25**: 245-257, 2002.
- 8) Colman PM, Hoyne PA, Lawrence MC: Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *J Virol* **67**: 2972-2980, 1993.
- 9) Dufour V: DNA vaccines: new applications for veterinary medicine. *Vet Sci Tomorrow* **1**: 1-19, 2001.
- 10) Fang WH, Liang XY: Expression of the Newcastle disease virus fusion glycoprotein in vero cells using attenuated *Salmonella typhimurium* as transgenic carrier. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao* **34**: 488-493, 2002.
- 11) Fodor I, Horvath E, Fodor N, Nagy E, Rencendorsh A, Vakharia VN, Dube SK: Induction of protective immunity in chickens immunized with plasmid DNA encoding infectious bursal disease virus antigens. *Acta Vet Hung* **47**: 481-492, 1999.
- 12) Homhuan A, Prakongpan S, Poomvises P, Maas RA, Crommelin DJA, Kersten GFA, Jiskoot W: Virosome and ISCOM vaccines against Newcastle disease; preparation, characterization and immunogenicity. *Eur J Pharmacol Sci* **22**: 459-468, 2004.
- 13) Kamiya N, Niitura M, Ono M, Kai C, Matsuura Y, Mikami T: Protective effect of individual glycoproteins of Newcastle disease virus expressed in insect cells; the fusion protein derived from an avirulent strain had lower protective efficacy. *Virus Res* **32**: 373-379, 1994.
- 14) Karaca K, Sharma JM, Winslow BJ, Junker DE, Reddy S, Cochran M, McMillen J: Recombinant fowl pox viruses coexpressing chicken type I IFM and Newcastle disease virus HN and F genes ; influence of IFN on protective efficacy and humoral responses of chickens following *in ovo* or post-hatch administration of recombinant viruses. *Vaccine* **16 (16)**: 1496-1503, 1998.
- 15) Kodihalli S, Haynes JR, Robinson HL, Webster RG: Cross-protection among lethal H5N2 influenza viruses induced by DNA vaccine to the hemagglutinin. *J Virol* **71**: 3391-3396, 1997.
- 16) Mayo MA: Virus Taxonomy-Houston 2002. *Arch Virol* **147**: 5, 2002a.
- 17) Mayo MA: A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch Virol* **147**: 8, 2002b.
- 18) Murakami Y, Kagino T, Niikura M, Mikami T, Ishii K, Matsuura Y: Characterization of Newcastle disease virus envelope glycoproteins expressed in insect cells. *Virus Res* **33**: 123-137, 1994.
- 19) Nagy E, Huber P, Krell PJ, Derbyshire JB: Synthesis of Newcastle disease virus-like envelopes in insect cells infected with a recombinant baculovirus expressing the hemagglutinin-neuraminidase of NDV. *J Gen Virol* **72**: 753-756, 1991.
- 20) Nishino Y, Niikura M, Suwa T, Onuma M, Gotoh B, Nagai Y, Mikami T: Analysis of the protective effect of the

- hemagglutinin-neuraminidase protein in Newcastle disease virus infection. *J Gen Virol* **71**: 1187-1190, 1991.
- 21) **Oshop GL, Elankumaran S, Heckert RA**: DNA vaccination in the avian. *Vet Immunol Immunopathol* **89**: 1-12, 2002.
 - 22) **Panda A, Elankumaran S, Krishnamurthy S, Huang Z, Samal SK**: Loss of N-linked glycosylation from the hemagglutinin-neuraminidase protein alters virulence of Newcastle disease virus. *J Virol* **78(10)**: 4965-4975, 2004.
 - 23) **Reddy SK, Sharma JM, Ahmad J, Reddy DN, McMillen JK, Cook SM, Wild MA, Schwartz RD**: Protective efficacy of a recombinant herpesvirus of turkeys as an *in ovo* vaccine against Newcastle and Marek's diseases in specific-pathogen-free chickens. *Vaccine* **14**: 469-477, 1996.
 - 24) **Robinson HL**: Nucleic acid vaccines: an overview. *Vaccine* **15**: 785-787, 1997.
 - 25) **Sakaguchi M, Nakamura H, Sonoda K, Okamura H, Yokogawa K, Matsuo K, Hira K**: Protection of chickens with or without maternal antibodies against both Marek's and Newcastle diseases by one-time vaccination with recombinant vaccine of Marek's disease virus type 1. *Vaccine* **16(5)**: 472-479, 1998.
 - 26) **Stauber N, Brechtbuhl K, Bruckner L, Hofmann MA**: Detection of Newcastle disease virus in poultry vaccines using the polymerase chain reaction and direct sequencing of amplified cDNA. *Vaccine* **13**: 360-364, 1995.
 - 27) **Stone-Hulslander J, Morrison TG**: Detection of an interaction between the HN and F proteins in Newcastle disease virus-infected cell. *J Virol* **71(9)**: 6287-6295, 1997.
 - 28) **Suarez DL, Schultz-Cherry S**: The effect of eukaryotic expression vectors and adjuvants on DNA vaccines in chickens using an avian influenza model. *Avian Dis*, **44**: 861-868, 2000.
 - 29) **Tan WS, Lau CH, Ng BK, Ibrahim AL, Yusoff K**: Nucleotide sequence of the hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene of a Malaysian heat resistant viscerotropic-velogenic Newcastle disease virus (NDV) strain AF2240. *DNA Seq* **6(1)**: 47-50, 1995.
 - 30) **Taylor J, Edbauer C, Rey-senelonge A, Bouquet JF, Norton E, Goebel S, Desmettre P, Paoletti E**: Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowl pox virus recombinant confers protection in chickens. *J Virol* **64**: 1441-1450, 1990.
 - 31) **Thacker EL, Fulton JE, Hunt HD**: *In vitro* analysis of a primary, major histocompatibility complex (MHC)-restricted, cytotoxic T-lymphocyte response to avian leukosis virus (ALV), using target cells expressing MHC class I cDNA inserted into a recombinant ALV vector. *J Virol* **69**: 6439-6444, 1995.
 - 32) **Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A**: Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* **259**: 1745-1749, 1993.
 - 33) **Wu YT, Peng DX, Liu XF, Liu WZ, Zhang RK**: A recombinant fowl pox virus expressing the fusion protein of Newcastle disease virus strain F48E8 and its protective efficacy. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* **16**: 591-594, 2000.
 - 34) **Yamanouchi K, Barrett T, Kai C**: New approaches to the development of virus vaccines for veterinary use. *Rev Sci Tech* **17(3)**: 641-653, 1998.
 - 35) **Zeng J, Fournier P, Schirmacher V**: High cell surface expression of Newcastle disease virus proteins via replicon vectors demonstrates syncytia forming activity of F and fusion promotion activity of HN molecules. *Int J Oncol* **25(2)**: 293-302, 2004.