

## 소 로타바이러스(국내분리주)에 대한 단클론항체 생산 및 특성에 관한 연구

안재문 · 조선희\* · 강신영\*

충북농축산사업소  
충북대학교 수의과대학\*  
(1996년 1월 15일 접수)

Studies on the production and characterization of  
monoclonal antibodies against bovine rotaviruses isolated in Korea

Jae-moon Ahn, Sun-hee Cho\*, Shien-young Kang\*

Chungbuk Office of Agriculture and Livestock  
College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University\*

(Received Jan 15, 1996)

**Abstract :** Monoclonal antibodies(MABs) against field isolates of the bovine rotavirus A strain(G6), V strain(G10) and reference I-801 strain(G8) were produced and characterized. Six MABs(4C2, 4D9, 5E1, 5E7, 5D5, 3E4) against A strain had neutralizing activity and reacted only with the G6 bovine rotaviruses determined by fluorescence focus neutralization (FFN) test. Otherwise, five neutralizing MABs(1G2, 2G6, 5E2, 5E12, 5H7) against I-801 strain neutralized the G6 and G8 bovine rotaviruses. Five non-neutralizing MABs(5F12, 7F12, 5E11, 2A11, 2B12) were VP6-specific and cross-reacted with all bovine and porcine rotaviruses examined by fluorescence antibody(FA) test. None of the MABs reacted with bovine viral diarrhea virus(BVDV) and bovine coronavirus(BCV) determined by FA and FFN test.

**Key words :** Bovine rotaviruses, monoclonal antibodies, serotypes.

### 서 론

로타바이러스는 Reoviridae에 속하는 바이러스로서 포유류와 조류를 포함한 많은 종류의 어린 동물에서

장염을 일으키는 원인체로 밝혀졌다<sup>1,3-5,9-11</sup>. 로타바이러스는 이중나선 RNA(dsRNA) genome으로 11개의 segment로 분리되어 있다. 포유동물에서 11개의 로타바이러스 dsRNA segment는 분자량에 따라 4개의

이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

Address reprint requests to Dr Shien-young Kang, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Republic of Korea.

group으로 나뉘어지는데 segment 1에서 4는 group I, segment 5와 6은 group II, segment 7에서 9는 group III, segment 10과 11은 group IV로 나뉘어 진다<sup>7</sup>. Agarose와 polyacrylamide gel electrophoresis에서 dsRNA의 이동 pattern은 바이러스를 구별하는데 유용하게 쓰이며 특히 로타바이러스 감염증의 진단에 이용되고 있다<sup>18</sup>.

모든 로타바이러스는 전자현미경상에서 동일한 형태를 하고 있으며 또한 소장의 장점막세포에 병원성이 있는 점에서 동일하지만 면역전자현미경법이나 혈청중화시험에서 상당수의 차이점이 존재하여 동물간의 차이를 구별할 수 있다<sup>19</sup>. 초기의 혈청학적 연구에서 많은 수의 로타바이러스주들은 공통항원을 가지고 있는 것으로 생각되었으며<sup>20</sup>, 후에 혈청중화시험으로 비교하여 보았을 때 각각 다른 항원을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다<sup>22</sup>. 또한 하나의 로타바이러스주는 여러 개의 다른 바이러스 단백질을 가지며 이러한 항원의 복잡성과 다양성을 근거로 하여 많은 연구자들이 혈청학적인 분류를 시도하였다<sup>26-8,22</sup>. 여러 종류의 동물에서 분리된 로타바이러스는 면역형광법, 면역전자현미경법, 보체결합반응, ELISA 등에서 밝혀진 바와 같이 공통의 그룹항원(VP6)을 가지고 있다. 소에서 분리되는 로타바이러스는 대부분 serogroup A에 속하며 최근에 serogroup B 및 C 로타바이러스가 분리된 바 있다<sup>21</sup>. Serogroup A에 속하는 로타바이러스는 여러 가축의 신생축 및 사람의 유아기에 설사증세를 일으키는 주요한 원인체로서 다른 serogroup의 로타바이러스에 비해서 많은 연구가 이루어져 있다. Serogroup A 로타바이러스는 2개의 외피 단백질을 가지고 있는데 VP4(gene segment 4에 의해 encode됨)와 VP7(strain에 따라서 gene segment 7, 8, 또는 9에 의해 encode됨)이 있으며 이들은 각각 중화항체의 생산을 유도한다<sup>7</sup>. VP7과 관련된 중화특이성은 G type혈청형(glycoprotein)의 동정에 이용되며 VP4와 관련된 중화특이성은 P type혈청형(protease-sensitive protein)의 동정에 이용된다<sup>7,17</sup>. 현재까지 Serogroup A 로타바이러스는 14개의 G 혈청형이 동정되었고 이중에서 소 로타바이러스에는 7개의 G type(G1, G2, G3, G6, G8, G10, G11)이 존재하며 이중 G6, G8, G10이 주로 분리되고 병원성을 가지고 있는 것으로 알려졌다<sup>7</sup>. 국내에서는 김 등<sup>23</sup>과 유 등<sup>25</sup>이 송아지 설사변에서 로타바이러스의 검출율이 6일령

이하에서 96%, 7~14일령에서 65.7%로 매우 높게 나타나는 것으로 보고하였다. 장 등<sup>26</sup>은 1994년 송아지 설사변으로 부터 20주의 소 로타바이러스를 분리하였으며 이에 대한 G type혈청형을 조사한 결과 G6와 G10 type혈청형이 존재함을 보고하였다. 국내에서 광범위하게 발생되고 있는 소 로타바이러스 감염증의 진단 및 예방대책을 효과적으로 수행하기 위해서는 아의 소 로타바이러스의 혈청형 조사와 신속한 진단법의 개발이 필요하다. 따라서 국내분리 소 로타바이러스에 대한 serogroup에 대한 조사와 G type 및 P type에 대한 혈청형조사도 전국을 대상으로 더 많이 이루어져야 한다. 본 실험에서는 소 로타바이러스 각각의 혈청형에 특이적인 단크론항체를 이용한 혈청형 분석을 위하여 국내에서 분리된 소 로타바이러스에 대한 단크론항체를 생산하여 이들의 특성을 규명하였다.

## 재료 및 방법

**바이러스 배양 및 정제 :** 본 실험실에서 송아지 분변으로 부터 분리하여 혈청학적으로 G6와 G10으로 확인된 소 로타바이러스 A 및 V strain 그리고 소 로타바이러스 표준주인 I-801 strain을 TF104 cell에서 배양하였다. 바이러스의 정제는 각각의 바이러스를 감염시킨 후 세포변성효과(Cytopathic effect:CPE)가 나타나면 얼리고 녹이는 과정을 3회 반복하여 세포내의 바이러스를 유리시키고 바이러스가 증식된 배양액을 4,500rpm에서 30분 원심분리하여 상층액을 수집하였다. 상층액에 polyethylene glycol(PEG)과 NaCl이 각각 8%와 0.5M이 되도록 첨가하여 4℃에서 하룻밤동안 교반한 뒤 8,000rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액은 제거하고 침전물을 소량의 PBS로 부유하였다. 이와같이 농축된 바이러스를 10~50%의 cesium chloride density gradient를 이용하여 34,000rpm에서 24시간동안 원심분리하여 부력밀도가 1.32~1.36g/cm<sup>3</sup>에 해당하는 분획을 수거한 후 PBS로 투석하였다.

**단크론항체 생산 :** Kohler와 Milestein의 방법<sup>13</sup>과 Saif 등<sup>16</sup>의 방법을 수정하여 세포융합을 실시하였다. 6주령된 암놈 BALB/c 마우스에 정제된 바이러스를 Freund's complete adjuvant와 동량으

로 섞어서 복강내로 0.4ml씩 1차 접종하였다. 2차와 3차 접종은 각각 마지막 접종 2주 후에 바이러스를 Freund's incomplete adjuvant와 동량으로 섞은 다음, 0.4ml씩 복강내로 주사하였다. 3차 접종 후 마우스의 미정맥으로부터 채혈하여 로타바이러스에 대한 혈청역가를 FA법으로 검사하여 1:5,000 이상의 항체역가를 나타내는 것을 대상으로 융합전 마지막으로 정제된 바이러스를 0.4ml 정맥주사하였다. 정맥주사 후 3일째 되는 날 마우스의 비장을 무균적으로 채취하여 비장세포를 모아 serum-free medium(SFM)으로 3회 세척하였다. 여기에 미리 준비한 SP2/0 myeloma cell과 1:5로 혼합하여 1회 원심세척한 뒤 PEG/DMSO를 넣어 세포를 융합시켰다. 이 세포들을 hypoxanthine, aminopterin, thymidine(HAT) 배지로 부유시킨 다음, 96-well microplate에 well당 200μl씩 분주하여 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 2일 간격으로 HAT 배지를 100μl씩 교체하였으며 세포융합 10일 후 colony가 1/3이상 형성된 well의 배양상층액을 채취한 후 로타바이러스에 대한 항체 생산 여부를 FA 및 FFN법을 이용하여 확인하였다. 로타바이러스에 대한 항체를 생산하는 hybridoma는 limiting dilution법으로 3회이상 cloning을 실시하여 single clone을 선발하였다. 선발된 항체생산 hybridoma는 Pristane(2, 6, 10, 14-tetramethyl-pentadecane;Sigma)으로 미리 감작시킨 BALB/c 마우스에 복강내로 접종하여 복수를 생산하였다.

**FA 및 FFN test :** 세포융합 후 특이항체생산 여부 및 생산된 단클론항체의 각각의 표준바이러스에 대한 항체역가는 FA 및 FFN법으로 검사하였다. FA법은 TF104 cell이 단층배양된 96-well microplate에 로타바이러스를 접종하여 18시간 배양하고 CPE가 나타나기 전에 80% acetone으로 고정시켰다. 세포융합 배양상층액 혹은 단클론항체를 희석배수별로 100μl씩 well에 넣고 37℃에서 1시간 반응시킨 다음, PBS로 3회 세척하였다. FITC-conjugated anti-mouse IgG(Sigma)를 PBS로 1:100으로 희석하여 100μl씩 넣고 37℃에서 1시간 배양한 후 PBS로 3회 세척하고 glycerol buffer를 첨가하여 형광현미경으로 검사하였다. FFN법은 먼저 세포융합 배양상층액 혹은 희석된 각각의 단

클론항체와 각각의 로타바이러스(100TCID<sub>50</sub>/ml)를 섞어서 37℃에서 1시간 반응시킨 후 단층배양된 TF104 cell에 100μl씩 접종하였다. 37℃에서 18시간 배양한 후 80% acetone으로 고정시키고 PBS로 3회 세척한 뒤 로타바이러스 VP6에 특이적인 단클론항체(25A<sup>10</sup>, Kang 등<sup>12</sup>)를 PBS로 1:5로 희석하여 100μl씩 각 well에 넣고 37℃에서 1시간 배양하였다. PBS로 3회 세척하고 FITC-conjugated anti-mouse IgG(Sigma)를 PBS로 1:100으로 희석하여 100μl씩 넣고 37℃ 1시간 배양한 후 PBS로 3회 세척하고 glycerol buffer를 첨가하여 형광현미경으로 검사하였다. 음성대조로 SP2/0 myeloma cell을 BALB/c mouse에 접종하여 만든 복수를 사용하였으며 대조군에 비하여 80% 이상의 형광이 감소된 것을 양성으로 판정하였다.

**단클론 항체의 Isotyping :** 생산된 단클론항체의 isotype을 결정하기 위하여 monoclonal antibody isotyping kit(Sigma)를 사용하였다. Isotype specific한 antibody를 PBS로 1:1,000으로 희석하여 96-well microplate에 50μl씩 넣고 37℃에서 1시간 배양하였다. PBS-tween 20으로 3회 세척하여 coating solution을 제거한 뒤 hybridoma 배양상층액을 0.1ml씩 넣고 실온에서 1시간 배양하였다. 다시 PBS-tween 20으로 3회 세척하고 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG(Fab specific)를 PBS에 1:600으로 희석하여 0.1ml씩 각 well에 넣은 후 실온에서 30분 배양한 뒤 3회 세척하고 5-aminosalicylic acid(1mg/ml)와 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 기질로 첨가하여 15분 후 발색 반응을 관찰하였다.

**바이러스 단백질특이성 조사 :** 단클론항체의 로타바이러스 단백질특이성을 조사하기 위하여 Western blotting을 실시하였다. 마우스 접종용 면역항원 제조와 같은 방법으로 50배 농축한 항원을 sample buffer(0.125M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol)와 동량으로 섞어 100℃에서 90초간 처리후 12% SDS-polyacrylamide slab gel에서 80mA로 4시간 전기영동한 다음 gel을 꺼내어 transfer buffer(20mM Tris-HCl, 170mM glycine, 0.1% SDS, 20% methanol)로 평형시킨 후 transphor electrophoresis unit(Hoefer TE50)을 이용하여 nitrocellulose paper에 220mA

로 하룻밤 동안전이시켰다. 이 nitrocellulose paper를 3% bovine serum albumin(BSA)으로 실온에서 2시간 blocking하고 1:1000으로 희석된 단클론항체 복수를 실온에서 45분간 반응시킨 다음 Tris-Tween-buffered saline(Tris 20mM, NaCl 500mM, Tween-20 0.05%, pH 7.5)으로 3회 세척하였다. 세척후 1:1000으로 희석한 peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin(IgG, IgA, IgM)을 실온에서 45분간 반응시킨 후 발색제(0.05% 4-chloro-1-naph, 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 반응하여 관찰하였다.

국내 분리 소 로타바이러스와의 반응성 조사 : 생산된 단클론항체중 중화력이 있는 것을 선별하여 국내에서 분리된 소 로타바이러스와의 반응성을 FFN법으로 시험을 실시하였다. SFM으로 희석한 각각의 중화단클론항체를 야외에서 분리된 각각의 소 로타바이러스(100 TCID<sub>50</sub>/ml)와 섞어서 37℃에서 1시간 반응시킨 후 단층배양된 TF104 cell에 100μl씩 접종하였다. 37℃에서 18시간 배양한 후 80% acetone으로 고정하고 PBS로 3회 세척한 뒤 로타바이러스 VP6에 특이적인 단클론항체(25A<sup>10</sup>, Kang 등<sup>12</sup>)를 1:5로 희석하여 100μl씩 넣고 37℃에서 1시간 배양하였다. PBS로 3회 세척하고 FITC-conjugated anti-mouse IgG를 50μl씩 각 well에 넣고 37℃에서 1시간 배양한 다음 PBS로 3회 세척하여 glycerol buffer를 첨가하여 형광현미경으로 검사하였다.

## 결 과

단클론항체의 특성조사 : 국내 송아지 설사분변으로 부터 분리한 로타바이러스 A strain(G6)과 V strain(G10) 그리고 로타바이러스 표준주인 I-

801 strain(G8) 등 3가지 로타바이러스에 대한 단클론항체를 만들어 이들의 특성을 조사하였다. A strain(G6)에 대한 단클론항체는 Table 1과 같이 6개(4C2, 4D9, 5E1, 5E7, 5D5, 3E4)가 만들어졌는데 이들의 isotype은 IgG1(5E1, 5E7, 5D5)과 IgG2a(4C2, 4D9, 3E4)의 두가지 이었으며 이들의 단백질특이성은 VP4와 VP7간의 구별이 명확하게 나타나지 않았다(Fig 1A). 이들은 모두 FFN법에서 양성반응을 나타내어 중화력을 가지고 있음을 알 수 있었다. G8 혈청형의 표준주인 I-801 strain에 대한 단클론항체는 8개(5H7, 5E12, 5E2, 1G2, 2G6, 5F12, 7F12, 5E11)가 만들어 졌는데 isotype은 IgA(5H7), IgM(5E2), IgG1(5E12, 2G6), IgG2a(5F12, 7F12) IgG2b(1G2, 5E11)등으로 나타났으며 이들중 5개(5H7, 5E12, 5E2, 1G2, 2G6)는 FFN법에서 양성반응이 나타나 중화능력이 있는 것으로 확인되었고 단백질특이성은 VP4와 VP7간의 구별이 명확하지 않았다. 나머지 3개(5F12, 7F12, 5E11)는 FFN법에서 음성반응을 나타내어 중화력을 가지지 않았으나 FA법에서 20,480배 이상의 역가를 나타내었고 단백질특이성은 VP6로 확인되었다(Table 2). V strain(G10)에 대한 단클론항체는 2개가 만들어졌는데 isotype은 IgM(2A11)과 IgG1(2B12)이었다. 이들은 중화능력이 없었고 FA법에서 10,240이상의 역가를 나타내었으며 단백질특이성은 VP6로 나타났다(Table 3, Fig 1B).

단클론항체와 다른 바이러스와의 반응 : 각각의 소 로타바이러스 혈청형에 대하여 만들어진 단클론항체의 특성조사를 위하여 혈청형이 서로 다른 로타바이러스 및 장관내 병원성이 있는 바이러스와의 반응을 FA 및 FFN법으로 조사하였다. A

Table 1. Characterization of monoclonal antibodies(MABs) against A strain(G6) by their isotype, protein specificity and activity

MABs	Isotype	Protein specificity	Antibody titer	
			FFN	FA
4C2	IgG2a	VP4/VP7*	20,480	20,480
4D9	IgG2a	VP4/VP7	20,480	20,480
5E1	IgG1	VP4/VP7	10,240	10,240
5E7	IgG1	VP4/VP7	1,280	20,480
5D5	IgG1	VP4/VP7	20,480	20,480
3E4	IgG2a	VP4/VP7	640	1,280

\* Protein specificity was not clear.

**Table 2.** Characterization of monoclonal antibodies(MAbs) against I-801 strain(G8) by their isotype, protein specificity and activity

MAbs	Isotype	Protein specificity	Antibody titer	
			FFN	FA
5H7	IgA	VP4/VP7*	20,480	20,480
5E12	IgG1	VP4/VP7	10,240	20,480
5E2	IgM	VP4/VP7	640	5,120
1G2	IgG2b	VP4/VP7	5,120	5,120
2G6	IgG1	VP4/VP7	5,120	5,120
5F12	IgG2a	VP6	<10	20,480
7F12	IgG2a	VP6	<10	20,480
5E11	IgG2b	VP6	<10	20,480

\* Protein specificity was not clear.

**Table 3.** Characterization of monoclonal antibodies(MAbs) against V strain(G10) by their isotype, protein specificity and activity

MAbs	Isotype	Protein specificity	Antibody titer	
			FFN	FA
2A11	IgM	VP6	<10	10,240
2B12	IgG1	VP6	<10	20,480

**Table 4.** Reactivity patterns of monoclonal antibodies(MAbs) with other enteric viruses determined by FA test

MAbs	Bovine Rotaviruses			Porcine Rotaviruses		BVDV**	BCV***
	A(6)*	NCDV(6)	I-801(8)	B223(10)	Gott(4)		
4C2	+	+	-	-	-	-	-
4D9	+	+	-	-	-	-	-
5E1	+	+	-	-	-	-	-
5E7	+	+	-	-	-	-	-
5D5	+	+	-	-	-	-	-
3E4	+	+	-	-	-	-	-
5E12	+	+	+	-	-	-	-
5E2	+	+	+	-	-	-	-
1G2	+	+	+	-	-	-	-
2G6	+	+	+	-	-	-	-
5H7	+	+	+	-	-	-	-
5F12	+	+	+	+	+	-	-
7F12	+	+	+	+	+	-	-
5E11	+	+	+	+	+	-	-
2A11	+	+	+	+	+	-	-
2B12	+	+	+	+	+	-	-

\* Number in parenthesis represents serotype

\*\* BVDV : bovine viral diarrhea virus

\*\*\* BCV : bovine coronavirus

strain에 대한 단크론항체(4C2, 4D9, 5E1, 5E7, 5D5, 3E4)는 모두 A strain과 반응하였으며 같은 혈청형 바이러스인 Nebraska calf diarrhea virus (NCDV)와도 특이적으로 반응하였으나 나머지

바이러스와는 반응하지 않았다. I-801 strain에 대한 단크론항체 3개(5F12, 7F12, 5E11)와 V strain에 대한 단크론항체 2개(2A11, 2B12)는 모두 단백특이성이 VP6로서 FA법에서 소와 돼지 로타바

**Table 5.** Reactivity pattern of monoclonal antibodies (MAbs) with other enteric viruses determined by FFN test

MAbs	Bovine Rotaviruses				Porcine Rotaviruses		BVDV**	BCV***
	A(6)*	NCDV(6)	I-801(8)	B223(10)	Gott(4)	OSU(5)		
4C2	20,480	20,480	<10	<10	<10	<10	<10	<10
4D9	20,480	20,480	<10	<10	<10	<10	<10	<10
5E1	10,240	10,240	<10	<10	<10	<10	<10	<10
5E7	1,280	560	<10	<10	<10	<10	<10	<10
5D5	20,480	10,240	<10	<10	<10	<10	<10	<10
3E4	640	40	<10	<10	<10	<10	<10	<10
5E12	20	20	10,240	<10	<10	<10	<10	<10
5E2	40	40	640	<10	<10	<10	<10	<10
1G2	320	320	5,120	<10	<10	<10	<10	<10
2G6	320	160	5,120	<10	<10	<10	<10	<10
5H7	160	160	20,480	<10	<10	<10	<10	<10
5F12	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
7F12	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
5E11	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
2A11	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
2B12	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

\* Number in parenthesis represents serotype

\*\* BVDV : bovine viral diarrhea virus

\*\*\* BCV : bovine coronavirus

**Table 6.** Reactivity pattern of monoclonal antibodies(MAbs) with bovine rotavirus isolates in Korea by FFN test

Group	Isolates	4C2	4D9	5E1	5E7	5D5	3E4	5E12	5E2	1G2	2G6
I	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	P44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1(6)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
II	E	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	6(VRI2)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	2(9)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
III	598	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	288	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
IV	101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	592	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	91181	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	04771-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	678	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VMRI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	90065	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0221-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

이러스 모두에 반응을 나타내었다. I-801 strain에 대한 나머지 단크론항체 5개(5E12, 5E2, 1G2, 2G6, 5H7)는 중화력을 가지고 있었으며 I-801 strain 및 G6 serotype인 A strain과 NCDV에 교차 반응을 나타내었다. 이들 단크론항체 모두는 소에

서 설사증을 일으키는 바이러스인 bovine viral diarrhea virus(BVDV)와 bovine coronavirus(BCV)와는 반응하지 않았다(Table 4). 3가지 혈청형의 소로타바이러스에 대하여 만들어진 단크론항체중 중화력을 가진 단크론항체로 FFN test에 의해 특

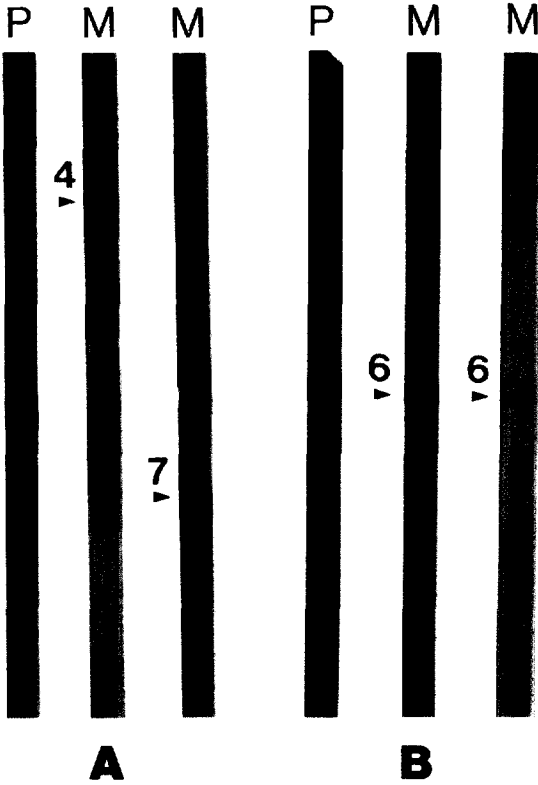


Fig 1. Viral protein specificity of monoclonal antibodies (MAbs) against bovine rotavirus determined by Western blot analysis.

A : VP4/VP7 specific MAbs, B : VP6 specific MAbs  
 (P: polyclonal serum, M: monoclonal antibody)

성을 조사하였다. 혈청형 G6인 A strain에 대하여 만들어진 단클론항체(4C2, 4D9, 5E1, 5E7, 5D5, 3E4)는 혈청형 G6인 A strain과 NCDV에 특이적으로 반응하였으며 혈청형 G8인 I-801 strain에 대하여 만들어진 단클론항체중 5개(5E12, 5E2, 1G2, 2G6, 5H7)는 I-801 strain과 반응하였으며 또한 혈청형 G6에 속하는 A strain과 NCDV와도 교차 반응을 나타내었다. 이들은 G6와 G8을 제외한 다른 혈청형인 소 로타바이러스 B223 strain(G10)과 돼지 로타바이러스인 Gottfried(G4) strain과 OSU(G5) strain에는 중화력을가지지 않았다(Table 5).

국내분리 소 로타바이러스와의 반응 조사 : 국내에서 분리된 소 로타바이러스 21주와 중화력을 가지고 있는 단클론항체 10개와의 반응패턴을 FFN법에 의해 조사하여본 결과 크게 4개의 그룹

으로 나눌 수 있었다. 제 I 그룹은 G6 혈청형인 A strain에 대하여 만들어진 6개의 단클론항체(4C2, 4D9, 5E1, 5E7, 5D5, 3E4) 및 G8 혈청형인 I-801 strain에 대하여 만들어진 4개의 단클론항체(5E12, 5E2, 1G2, 2G6) 모두와 반응하였다. 제 II 그룹은 하나의 단클론항체(3E4)를 제외하고 모든 단클론항체와 반응하였으며 제 III 그룹은 I-801 strain에 대하여 만들어진 4개의 단클론항체와 모두 반응하였고 A strain에 대하여 만들어진 6개의 단클론항체와는 반응하지 않았다. 제 IV 그룹은 위의 모든 단클론항체와 전혀 반응하지 않았다(Table 6).

### 고 찰

Kohler와 Milstein<sup>13</sup>은 세포융합에 의해 생산된 단클론항체는 면역원중 하나의 면역원 결정기(epitope)에 대하여 항체를 생산하는 단세포군의 산물이므로 면역원에 대한 결합력이 동일하고 특이적이라고 하였다. 이 단클론항체의 특성 및 장점이 바이러스 항원분석 및 질병의 치료 특히 진단에 널리 이용되고 있다<sup>24</sup>. 로타바이러스 subgroup은 6번째 유전자에 의해 만들어진 42K 단백질(VP6)에 의해 구분되며<sup>11</sup> 이 단백질은 내부구조단백질로서 바이러스에 많은 양이 존재하여 보체 결합반응이나 면역부착 혈구응집반응(immune-adhesion hemagglutination ; IAHA), 면역 방사선법(radial immunoassay : RIA), 효소면역반응(ELISA)에 의해 쉽게 검출된다. 이러한 42K 단백질의 다양성은 중화특이성을 나타낸다고 생각되었으나 나중의 유전학적인 연구에서 subgroup 특이성은 중화특이성과는 별개인 것으로 밝혀졌다<sup>22</sup>. Greenberg 등<sup>8</sup>은 로타바이러스의 혈청형은 바이러스가 가지고 있는 중화능력에 의해 구분되며 이러한 중화능력은 7~9번째의 바이러스유전자에 의해 만들어지는 34K 단백질(VP7)에 의해 결정된다고 하였으며 Kang 등<sup>12</sup>은 중화단클론항체는 중화와 관련된 바이러스 단백질의 항원결정기를 분석하는데 매우 유용하다고 하였다. 이 실험에서 만들어진 단클론항체의 바이러스 단백질특이성을 조사하기 위하여 실시한 Western blot에서 VP6는 명확하게 구분이 되었으나 VP7은 2개의 band가 나타나 구별이 어려웠다. 이는 VP7 단백질이 conformation한 것으로서 Western blot 과정중 항원구조가 변형되기 때문인 것으로 사료

된다. 이 실험에서 소 로타바이러스 각각의 혈청형(G6, G8, G10)을 구분할 수 있는 중화력을 가진 단크론항체를 생산하고자 하였는데 G6에 대한 중화단크론항체 6개(4C2, 4D9, 5E1, 5E7, 5D5, 3E4)는 G6 혈청형 바이러스에만 반응하여 혈청형을 구분할 수 있는 단크론항체로 인정되었지만 G8에 대한 중화단크론항체 5개(5E12, 5E2, 1G2, 2G6, 5H7)는 G6 혈청형 바이러스와 교차반응하였으며 또한 G8과 G10에 대한 단크론항체 5개(5F12, 7F12, 5E11, 2A11, 2B12)는 중화력을 가지지 않아 이들 단크론항체로는 혈청형을 구분하는데 사용될 수 없는 것으로 판단되었다. 따라서 소 로타바이러스의 혈청형을 결정하기 위해서는 G8과 G10에 특이적으로 반응하는 중화력이 있는 단크론항체를 생산하여야 할 것이다. Roseto 등<sup>15</sup>은 로타바이러스에 대한 단크론항체를 생산하여 bovine, human, simian rotavirus와 반응시킨 결과 모두 양성반응을 나타내어 이것을 group antigen이라고 하였는데 본 실험에서 생산된 V strain에 대한 단크론항체 2개(2A11, 2B12)와 I-801 strain에 대한 단크론항체 3개(5F12, 7F12, 5E11)는 중화력이 없는, VP6에 특이적인 것으로서 이 group antigen의 epitope에 대한 단크론항체로 생각된다.

국내에서 분리된 소 로타바이러스 21주에 대하여 중화력이 있는 10개의 단크론항체와 FFN 시험으로 반응시켜본 결과 4개의 그룹으로 구분이 되었다. 제 I 그룹과 제 II 그룹은 A strain에 대하여 만들어진 6개의 단크론항체와 반응하여 이들의 혈청형이 A strain(G6)과 동일한 것으로 생각되며 이들이 G8 혈청형에 대한 단크론항체와 반응한 것은 이 단크론항체의 특성상 G6혈청형과 교차반응이 나타났기 때문인 것으로 생각된다. 제 III 그룹인 1주(288)는 I-801 strain에 대한 단크론항체하고만 반응하여 이 분리주의 혈청형이 G8인 것으로 추정된다. 제 IV 그룹인 나머지는 이 실험에서 생산된 어떠한 단크론항체에도 중화되지 않았다. 이것은 이들 중화단크론항체의 단백특이성이 확인되지 않은 상태로서, 본 실험에서 생산된 중화단크론항체가 VP7에 특이적으로 반응하는 것일 경우 제 IV 그룹에 속하는 바이러스들의 혈청형이 G6와 G8를 제외한 G10 또는 그밖의 혈청형이기 때문에 시험에 사용된 G6와 G8 혈청형에 특이적인 단크론항체와 반응하지 않았을 것으로 사료된다. 반면에 이들 중화단크론항체가 VP4에 특이적으로 반응하는 것일 경우 제 IV 그룹에 속하는 바이러스들은 G6 혈청형에 속하지만 P type이 제 I, II

그룹에 속하는 바이러스와 다를 것으로 추정된다. 이것에 대한 확인은 단백질이 분해되지 않는 방법으로 Western blot을 실시하여 중화단크론항체의 단백특이성을 확인하거나 그룹별 소 로타바이러스의 VP4 또는 VP7 gene을 cloning하여 그룹별로 비교 분석하면 가능할 것이며 현재 이 실험이 본 실험실에서 진행중이다.

## 결 론

소 로타바이러스 야외분리주인 A strain(G6) 및 V strain(G10) 그리고 표준주인 I-801 strain(G8)의 3가지 혈청형에 대하여 각각의 단크론항체를 생산하여 이들의 특성을 조사한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. A strain에 대한 단크론항체 6개(4C2, 4D9, 5E1, 5E7, 5D5, 3E4)는 모두 중화력이 있었으며 V strain에 대한 단크론항체 2개(2A11, 2B12)는 중화력이 없었다.
2. I-801 strain에 대한 단크론항체 8개(5F12, 5E12, 5E2, 7F12, 5E11, 1G2, 2G6, 5H7)중 5개(1G2, 2G6, 5E2, 5E12, 5H7)는 중화력이 있는 것으로 확인되었다.
3. 중화력이 있는 단크론항체는 FA 및 FFN법에 의하여 다른 소 로타바이러스 strain과 교차반응을 하였으나 돼지 로타바이러스 및 BVDV, BCoV와는 반응하지 않았다.
4. 중화력이 없는 단크론항체중 2A11과 2B12는 FA 법으로 소 로타바이러스 및 돼지 로타바이러스와 반응하였으며 VP6에 특이적인 항체로 확인되었다.

## 참 고 문 헌

1. Adams WR, Kraft LM. Epizootic diarrhea of infant mice : identification of the etiologic agent. *Science*, 141 : 359~360, 1963.
2. Beards GM, Desselberger U. Determination of rotavirus serotype-specific antibodies in sera by competitive enhanced enzyme immunoassay. *J Virol Methods*, 24 : 103~110, 1989.
3. Bridger JC, Woode GN. Neonatal calf diarrhea: identification of a reovirus-like(rotavirus) agent in feces by immunofluorescence and immune electron microscope. *Br Vet J*, 131 : 528~535, 1975.
4. Castrucci G, Ferrari M, Frigeri F, et al. Isolation and characterization of cytopathic strains rotavirus from



- rabbits. *Arch Virol*, 83 : 99~104, 1990.
5. Conner ME, Gillespie JH, Schiff EI, et al. Detection of rotavirus in horses with and without diarrhea by electron microscopy and Rotazyme test. *Cornell Vet*, 73 : 280~287, 1983.
  6. Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol*, 32 : 1338~1340, 1994.
  7. Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. VP4 typing of bovine and porcine Group A rotaviruses by PCR. *J Clin Microbiol*, 32 : 1333~1337, 1994.
  8. Greenberg H, McAuliffe V, Valdesuso J, et al. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus using monoclonal antibodies. *Infect Immun*, 39 : 91~99, 1983.
  9. Hess GR, Bachmann PA. Distribution of antibodies to rotavirus in serum and lacteal secretions of naturally infected swine and their suckling pigs. *J Vet Res*, 42 : 1149~1152, 1981.
  10. Hoshino Y, Wyatt RG, Scott FW, et al. Isolation and characterization of a canine rotavirus. *Arch Virol*, 72 : 113~125, 1981.
  11. Hoshino Y, Wyatt RG, Greenberg HB, et al. Isolation and characterization of an equine rotavirus. *J Clin Microbiol*, 18 : 585~591, 1983.
  12. Kang SY, Benfield DA, Gorziglia M, et al. Characterization of the neutralizing epitopes of VP7 of the Gottfried strain of porcine rotavirus. *J Clin Microbiol*, 31 : 2291~2297, 1993.
  13. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256 : 495~497, 1975.
  14. Rosen BI, Parwani AV, Lopez S, et al. Serotype differentiation of rotaviruses in field samples from diarrhetic pigs by using nucleic acid probes specific for porcine VP4 and human and porcine VP7 genes. *J Clin Microbiol*, 32 : 311~317, 1994.
  15. Rosero A, Scherrer R, Cohen J, et al. Isolation and characterization of anti-rotavirus immunoglobulins secreted by cloned hybridoma cell lines. *J Gen Virol*, 64 : 237~240, 1982.
  16. Saif LJ, Rosen BI, Kang SY, et al. Cell culture propagation of rotaviruses. *J Tissue Culture Methods*, 11 : 147~156, 1988.
  17. Santos N, Talty MR, Clark HF, et al. VP4 genotyping of human rotavirus in the United States. *J Clin Microbiol*, 32 : 205~208, 1994.
  18. Shaw RD, Stoner-Ma DL, Estes MK, et al. Specific enzyme-linked immunoassay for rotavirus serotypes 1 and 3. *J Clin Microbiol*, 22: 286~291, 1985.
  19. Shekarchi IC, Fuccillo DA, Sever JL, et al. Avidin-biotin latex agglutination assay for detection of antibodies to viral antigens. *J Clin Microbiol*, 26: 954~956, 1988.
  20. Theil KW, Bohl EH, Agnes AG. Cell culture propagation of porcine rotavirus (Reovirus-like agent). *Am J Vet Res*, 38 : 1765~1768, 1977.
  21. Tsunemitsu H, Jiang B, Saif LJ. Detection of group C rotavirus antigens and antibodies in animals and humans by ELISA. *J Clin Microbiol*, 30 : 2129~2134, 1992.
  22. Wyatt RG, James Jr HD, Pittman AL, et al. Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes. *J Clin Microbiol*, 18 : 310~317, 1983.
  23. 김 두, 유영수, 유한상 등. 한우 송아지의 포유기간 중의 설사발생에 관한 연구. *대한수의학회지*, 30 : 255~260, 1990.
  24. 신광순. 단세포균 항체를 이용한 한탄바이러스 검출용 ELISA법에 대한 연구. *대한미생물학회지*, 27 : 297~305, 1992.
  25. 유영수, 김두희, 안수환. 송아지에서 Rotavirus 감염증. *농시논문집(가축위생편)*, 31 : 6~10, 1989.
  26. 장정호, 정정원, 조재진 등. 소 로타바이러스 및 코로나바이러스 혼합생독백신 개발에 관한 연구. *농시논문집*, 158~171, 1994.