

Agar-gel immunodiffusion test를 이용한 돼지 혈청중 Aujeszky's disease virus 항체 검출에 관한 연구

조 호 권 · 전 무 형

충남대학교 농과대학 수의학과

(1990. 5. 21 접수)

Detection of antibodies in swine serum to Aujeszky's disease virus using agar-gel immunodiffusion test

Hyo-gueon Cho, Moo-hyung Jun

Department of Veterinary Medicine

College of Agriculture, Chungnam National University

(Received May 21, 1990)

Abstract: To establish an agar-gel immunodiffusion (AGID) test for detection of antibodies to Aujeszky's disease virus (ADV) in swine, the precipitating antigens were prepared by four procedures using the Aujeszky's disease virus, NYJ-1-87 strain isolated from the affected piglets in Korea. The optimal condition for AGID test and the properties of the antigens were investigated.

To determine the optimal concentration of antigens, four antigens were experimentally prepared by concentrating the viral fluids by 1/30 to 1/200. It was proved that the antigen precipitated with ammonium sulfate at concentration of 1/100 was the most efficient to detect ADV antibodies by AGID test. When the relationship between the concentration of the antigens and the size of precipitating in radial immunodiffusion test was investigated, a high correlation coefficient at $r=0.95$ ($y=0.23x+23.4$) was estimated.

In study on the effects of various buffered salt solutions and agars on the sensitivity of AGID test by using the experimental ADV antigens, it was found that 0.05M tris buffer without sodium chloride at pH 7.2 induced the most distinctive precipitating lines, and that there was no significant differences in the sensitivity between the agarose and Noble's special agar.

When the efficiency of AGID test was compared with serum neutralization (SN) test, the sensitivity of AGID test was 100% in SN titer over 1:16, 91.7% in SN titer of 1:8 and 57.1% in SN titer of 1:4. The specificity of AGID test compared with the sera with SN titer under 1:2 was 98.4%.

Protein analysis of the antigens by SDS-PAGE indicated that antigen I and antigen III showed a specific band of polypeptides with molecular weight of 116 K in comparison with the control antigen. Antigen IV, treated with tween-80 and ammonium sulfate, revealed specific polypeptides bands at the molecular weights 45K, 98K and 150 K.

Key words: Aujeszky's disease, Korean isolates, antibody detection, agar-gel immunodiffusion test.

Herpesviridae에 속하는 Aujeszky's disease virus (ADV)에 기인하여¹ 발병되는 돼지 오제스키병(일명 Pseudorabies)의 혈청학적 검사법으로 혈청중화시험², 간접혈구응집시험³, enzyme linked immunosorbent assay⁴, radioimmunoassay⁵, 보체결합시험⁶, counter-current immunoelectrophoresis⁷, immunodiffusion enzyme assay^{8,9}, 라텍스응집시험¹⁰, 형광항체시험¹¹, nucleic acid hybridization 법¹² 및 아가-겔 면역확산 시험^{13,14,15,16} 등이 보고된 바 있다.

우리나라에서 돼지 오제스키병은 1987년에 처음 발생되었으며¹⁷, 본 병의 원인체인 ADV의 항체검출법으로 중화항체시험^{2,18}과 면역확산시험^{8,9,11}이 주로 이용되고 있으나, 이 방법들은 감수성은 높지만 술식이 복잡하고 비교적 많은 시설과 전문적 기술을 요하기 때문에 시설에 다소 어려움이 있다.

면역확산시험은 가용성항원을 이용하여 아가-겔 내에 항원-항체반응의 침강대를 발현시킴으로써 항원 또는 항체를 동정하는 방법^{9,28}으로 감수성은 낮으나 특이성이 높은 장점이 있으며 술식이 비교적 간편하고 시설이 저렴하며 신속하여 여러가지 전염성 질병의 원인체 및 항체검출에 광범위하게 응용되고 있으며,²¹⁻²⁸ 돼지 오제스키병에서는 미국과 대만 등지에서 ADV감염돈군의 1차 스크린법으로 이용된 바 있다.¹³⁻¹⁶

돼지 오제스키병의 아가-겔 면역확산 시험용 ADV 항원은 황산암모늄 침전법, ADV 배양 상층액 농축법, tween-80 및 황산암모늄 동시 처리법 등으로 제조된 바 있으며, 이 항원을 이용한 면역확산시험법의 ADV 항체검출효율은 높았다고 보고 된 바 있다.

또한, 아가-겔 이중면역 확산시험에서 발현되는 침강대의 형태와 반응의 특이성은 추출된 ADV항원단백의 특이성과 밀접한 관련이 있으며, 조직배양세포에 감염시킨 ADV항원은 분자량 125K, 74K, 58K 및 98K의 major glycoprotein과 130K, 98K 및 62K의 minor glycoprotein이 있음이 구명된 바 있다.²⁹⁻³²

저자 등은 1987년 경기도 남양주지역에서 이환된 자돈에서 분리한 ADV, NYJ-1-87 주³³를 이용하여 아가-겔 면역확산 시험용 항원을 제조하고, 이 항원을 이용한 면역확산시험의 최적조건과 ADV항체검출 효능을 시험함과 동시에 추출된 항원단백의 성상을 구명하기 위해 일련의 실험을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

세포 및 바이러스 : 돼지 신장세포주인 PK-15세포주를 사용하였으며, 세포배양액은 Eagle's minimum essential medium (EMEM Gibco, USA)에 우태아 혈청 (Gibco, USA)을 시험목적에 따라 5 내지 10%되게 가하고 kanamycin (20 μ g/ml), penicillin (100IU/ml), streptomycin sulfate (100 μ g/ml) 및 fungizone (20 μ g/ml)을 첨가하여 사용하였다.

항원제조 및 혈청 중화시험에 공시한 ADV는 전돈³³이 경기도 남양주에서 이환자돈으로부터 분리한 NYJ-1-87주를 PK-15 세포주에 계대 증식시켜 사용하였다.

항원제조 : 단층배양된 PK-15 세포주에 10^{7.5} TCID₅₀/0.2ml 역가의 ADV를 흡착시키고 우태아혈청을 가하지 않은 EMEM에서 증식시킨 후 95%의 cytopathic effects가 관찰되면 배양을 중지하고 Fig 1에서 기술한 바와 같이 항원을 제조하였다. 약술하던 antigen I은 동결용해, 초음파처리(14 KHz/S, 2min) 및 원심분리(1,500 \times g, 30min)하여 얻은 침전물을 증류수에 용해시키고 투석시킨 후 15% (w/v) polyethylene glycol (MW 20,000: PEG)로 60배 내지 200배로 농축하고 0.14M 되게 식염을 가한 0.05M tris buffer (pH 7.2)로 투석시켜 제조하였다.¹³ Antigen II는 위의 침전물을 인산완충 식염액(pH 7.2, PBS)에 용해시켜 60배 내지 200배로 농축하고 인산 완충식염액에 투석시켜 제조하였고^{26,27}, antigen III은 ADV배양상층액을 15% PEG를 이용하여 60배 내지 200배로 농축한 것이며¹⁵, antigen IV는 95%의 CPE가 관찰될 때 tween-80을 3%되게 가한 PBS와 황산암모늄을 처리하여 제조하였다.¹⁶

가검혈청 : ADV항체 양성 돼지혈청은 야외 감염 돼지 및 실험적 인공감염 돼지로부터 획득하였다. 혈청 중화항체가 2이하인 음성혈청은 도축장에서 도살되는 돼지에서 채취하였다.

아가-겔 면역확산시험 : Gutekunst et al¹³ 및 Johnson et al¹⁴의 방법을 응용하여 수행하였다. 약술하던 Noble's special agar (Difco)와 agarose (W Germany)를 시험목적에 따라 0.7, 1.0 및 1.5%로 하여 사용하였고, 완충용액은 0.05M tris buffer, 0.15M borate buffer 및 PBS를 사용하였다. 또한, 0.05M tris buffer에 0, 0.85, 4.0 및 8.0%되게 식염을 가하고 pH를 4.0, 7.2, 8.0 및 9.0으로 조정하여 시험하였으며, 주로 0.05M tris buffer(pH 7.2)에 식염을 첨가하지 않은 용액으로 수행하였다. 아가-겔 프레이트는 가열 용해시킨 아가를 90mm 페트리디쉬에 20ml씩 분주하

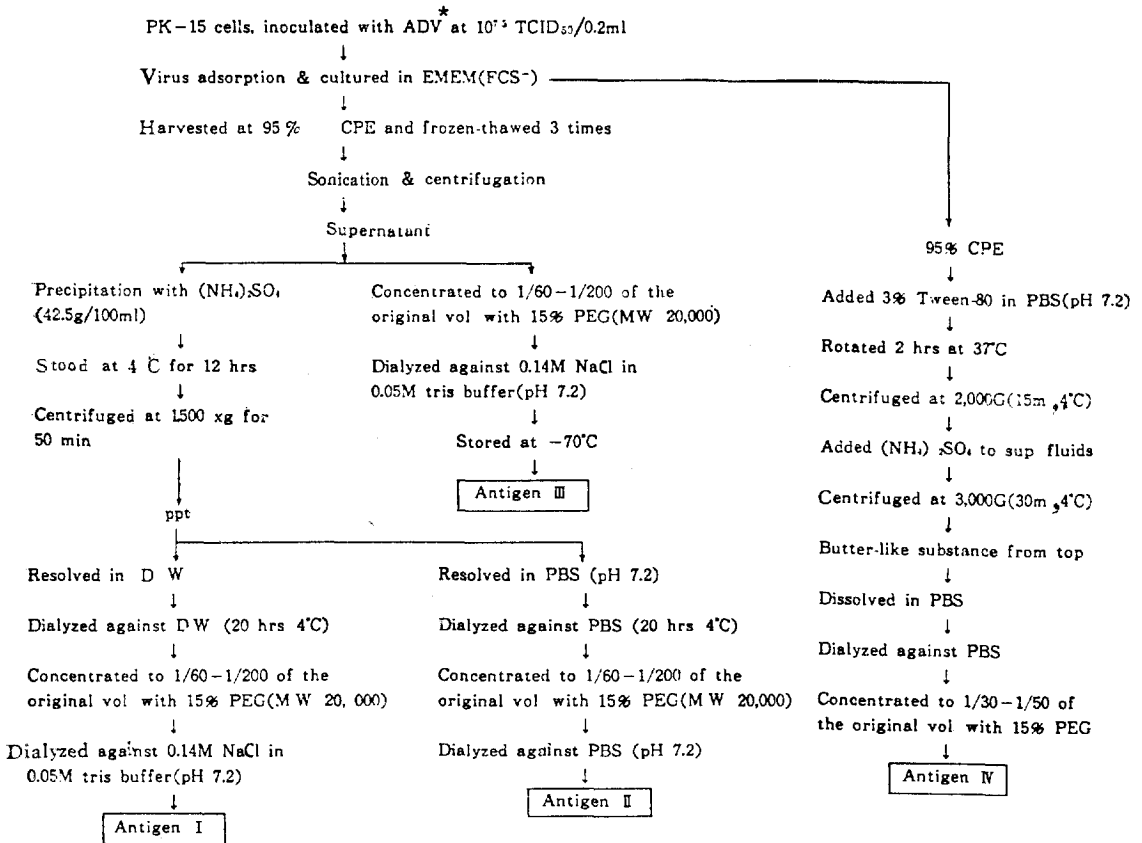


Fig 1. Procedures for preparation of ADV antigens for agar-gel immunodiffusion test.

* ADV, NYZ-1-87 strain isolated from the affected piglets in Korea.

여 응고시킨 후 켈펜처 (Shandon, W Germany)를 이용하여 직경 5mm의 well을 3mm간격으로 만들었다. 이 well에 항원과 혈청을 주입하고 실온에서 반응시킨 후 48시간에 침강선의 강도에 따라 0, 1, 2 및 3의 4단계 density scores로 최종 판정하였고²⁸, 필요에 따라 0.5% coomassie brilliant blue로 염색하여 보관하였다.^{13,14}

방사면역 확산시험: 항원수조내에서 48°C로 가온된 Noble's special agar에 중화항체가 128의 ADV양성혈청을 1:1로 혼합한 후 프라스틱 페트리디쉬(직경 50mm)에 분주하였다. 아가가 응고된 후 직경 5mm되는 well을 만들고 항원을 주입한 후 3일째 1차 판정, 4일째 2차 판정을 하여 침강선의 직경을 microcalliper로 측정하였다.²⁸

혈청중화시험: Hill et al¹⁸이 기술한 표준마이크로프레이트 방법을 응용하여 수행하였다. 요약하면, 56°C에서 30분간 비동화된 혈청을 EMEM배지로 2배 계단

희석한 후 각 시험관에 200 TCID₅₀/0.2ml의 ADV를 동량 가하여 5% CO₂배양기(LEEC Model GA₂, Colwick Industrial Estate, UK)에서 1시간 동안 중화시켰다. 그리고, PK-15 세포주로 단층배양된 96 wells flat bottomed microplates (Linbro, USA)의 배지를 제거하고, 각각혈청을 100μl씩 각 well에 분주하여 5% CO₂배양기에서 1시간 정치한 후 우태아 혈청이 2% 첨가된 EMEM배지를 100μl씩 각 well에 추가 분주하여 배양하면서 CPE를 관찰하였다. 중화항체역가 계산은 바이러스 대조 well에서 95%의 CPE가 일어났을 때 CPE가 일어나지 않은 희석배수의 역수를 동 혈청의 중화항체 역가로 계산하였다.

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis: Laemmli³⁵의 방법에 따라 실시하였다. 요약하면, 진단용 항원에 sodium dodecyl sulphate (SDS) sample buffer(6% SDS, 6% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.02% bromophenol blue in 0.125M

tris-HCl, pH 6.8)를 첨가하여 100°C에서 3분간 가열 처리한 후 7 내지 10% polyacrylamide gel slab에 충전하여 30mA에서 16시간 동안 전기영동(Shandon, W Germany)을 실시하였다. 전기영동이 끝난 겔은 염색액(0.025% coomassie brilliant blue R in 50% methanol, 5% acetic acid)으로 염색시킨 후 3mm여과지(Whatman, England)에 놓고 slab gel dryer(Shandon, W Germany)에서 5시간 동안 건조시켰다. 영동된 단백질의 분자량은 66K의 소 혈청알부민과 45K, 66K, 97.4K 및 116K의 high marker protein(Sigma)을 표준으로 비교하여 결정하였다.

결 과

제조항원의 효능 : 4가지 방법으로 11 batches의 ADV항원을 제조하였고, 항원 별로는 antigen I; 5 batches, antigen II; 2 batches, antigen III; 2 batches, 그리고 antigen IV; 2 batches였다(Table 1). 항원별 효능을 ADV항체 양성 및 음성혈청을 이용하여 시험한 바 antigen I, II 및 III에서는 농축비율이 100배 일 때 양성혈청에 대한 density scores가 2.7~3.0으로 높았으며, 60배와 70배에서는 1.6~2.7로 비교적 낮았다. tween-80과 황산암모늄으로 처리하여 만든 antigen IV는 50배로 농축할 경우 2.7의 density scores를 나타내었다(Table 1, Fig 3; A, B, C).

Antigen I으로 방사면역확산시험을 실시하여 항원의 농도와 침강선의 크기의 상관관계를 비교한 바 두 요인간에는 상관계수(r) 0.95로 고도의 상관관계가 인

정되었고, $y=0.23x+23.4$ 의 회귀식이 산출되었다(Fig 2 및 4).

아가겔의 성상이 면역확산시험에 미치는 영향 : 아가겔에 사용한 완충용액이 면역확산시험에 미치는 영향을 구명하기 위해 0.05M tris buffer, 0.15M borate buffer 및 PBS로 아가겔을 만들어서 ADV항체 양성 및 음성 혈청으로 감수성을 비교 시험하였다(Table 2). 그 결과 0.05M tris buffer에서 density scores 3.0으로

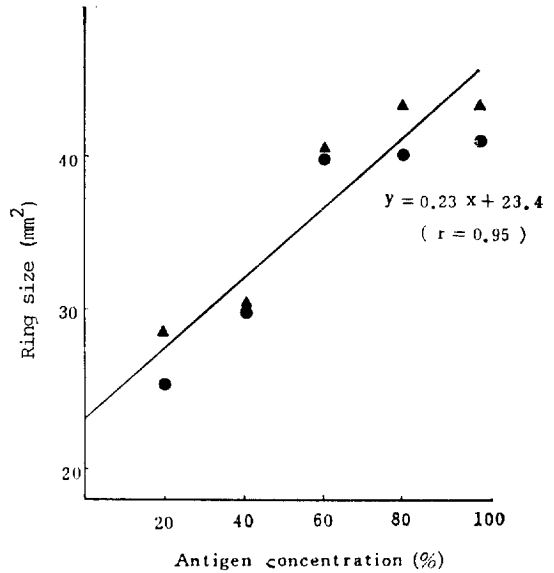


Fig 2. Relationship between concentration of ADV antigen and the size of precipitation ring (mm²).

Table 1. Summary of preparation of Aujeszky's disease virus antigen for agar-gel immunodiffusion test

	Antigens										
	I					II		III		IV	
	1	2	3	4	5*	1	2	1	2	1	2
Vol of culture fluids(ml)	300	150	70	100	250	70	100	70	100	100	100
Conc rate	1/200	1/60	1/70	1/100	1/100	1/70	1/100	1/70	1/100	1/50	1/30
Final vol (ml)	1.5**	2.5	1.0	1.0	2.5	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	3.3
Immunodiffusion tests***	NS-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	NS-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PS-1	3.0	1.6	2.7	3.0	3.0	2.0	2.7	2.7	3.0	2.7
	PS-2	3.0	1.6	2.7	3.0	3.0	2.0	2.7	2.7	3.0	2.7

* Batches of antigen production.

** The numbers represent the mean density scores of precipitin lines.

*** Tests were carried out 0.7% agarose gel in 0.05M tris buffer (pH 7.2) was used.

NS : negative reference swine serum, PS : positive reference swine serum.

PS-1 : SN titers of 1 : 32, PS-2 : SN titer of 1 : 64.

Table 2. Effects of various buffers in agarose on development of precipitin lines in agar-gel immunodiffusion test

Buffers*	Reference serums				
	PS-1 (1:32)**	PS-2 (1:64)	PS-3 (1:128)	NS-1 (0)	NS-2 (0)
0.05M tris buffer	3.0***	3.0	3.0	0	0
0.15M borate buffer	1.7	2.0	2.0	0	0
Phosphate buffered saline	2.0	2.3	2.3	0	0

* 0.7% of agarose (pH 7.1~7.2) was used.

** The values mean the titers of serum neutralizing antibody for Aujeszky's disease virus in porcine serums.

*** The numbers represent the mean density scores of precipitin lines.

Table 3. Effects of NaCl concentration and pH in agar on development of precipitin lines in agar-gel immunodiffusion test

Buffer*	Conc (%) of NaCl	pH	Reference serums				
			PS-1 (1:32)**	PS-2 (1:64)	PS-3 (1:128)	NS-1 (0)	NS-2 (0)
0.05M tris buffer	0	4.0	0***	0	0	0	0
		7.2	3.0	3.0	3.0	0	0
		8.0	2.0	2.3	2.3	0	0
	0.85	9.0	0	0	0	0	0
		7.2	2.7	2.7	2.7	0	0
		4.0	7.2	2.3	2.3	2.3	0
8.0	7.2	1.7	1.7	1.7	0	0	

* 0.7% of agarose was used as agar medium.

** The values mean the titers of serum neutralizing antibody for Aujeszky's disease virus in porcine serums.

*** The numbers represent the mean density scores of precipitin lines.

Table 4. Comparison of agar media for detection of antibody to Aujeszky's disease virus by agar-gel immunodiffusion test

Agar-gels*	Conc(%) of agar	Reference serums				
		PS-1** (1:32)	PS-2 (1:64)	PS-3 (1:128)	NS-1 (0)	NS-2 (0)
Agarose	0.7	3.0***	3.0	3.0	0	0
	1.0	1.0	2.0	2.0	0	0
	1.5	0	0	1.0	0	0
Noble's special agar	0.7	2.0	3.0	3.0	0	0
	1.0	1.0	2.0	3.0	0	0
	1.5	0	0	1.0	0	0

* 0.05M tris buffer (pH 7.2) was used.

** The values mean the titers of serum neutralizing antibody for Aujeszky's disease virus in porcine serums.

*** The numbers represent the mean density scores of precipitin lines.

가장 높았고, 0.15M borate buffer에서는 1.7~2.0으로 가장 낮았다. 또한 아가-겔에 사용한 0.05M tris buffer의 pH를 4.0~9.0으로 조정하고 식염을 0, 0.85, 4.0 및 8.0%되게 가한 후 감수성을 시험한 바, pH 7.2에 식염이 첨가되지 않은 겔에서 density scores가 3.0으로 가장 높았으며, pH 7.2에서 0.85%의 식염이 첨가된 경우는 density scores 2.7, 4.0%의 식염이 첨가된 경우는 density scores 2.3으로 나타났으며, pH 4.0 및 9.0에서는 첨가대가 전혀 인정되지 않았다 (Table 3). 아가의 농도와 종류가 면역확산시험에 미치는 영향을 구명하기 위해 0.05M tris buffer (pH 7.2)에 agarose와 Noble's special agar를 0.7, 1.0, 및 1.5% 되게 가하여 시험하였다. 그 결과 아가의 농도 0.7%에서 density scores 3.0으로 가장 높게 나타났고 1.5%에서는 0~1.0으로 가장 낮았으며, agarose와 Noble's special agar사이에는 감수성에 차이가 인정되지 않았다 (Table 4).

면역확산시험의 감수성 및 특이성: 제조된 항원을 이용하여 ADV항체 검출에 대한 면역확산시험의 감수성과 특이성을 혈청 중화시험과 비교하였다. Table 5에서 기술한 바와 같이 중화항체역가가 2~≥128인 147건의 양성 혈청과 63건의 음성 혈청에 대해 면역확산법으로 시험한 바 중화항체가 2에서 14.2%, 4에서 57.1%, 8에서 91.7% 그리고 16이상에서는 100% 일치하였으며, 중화항체 음성인 경우는 63건중 1건(1.6%)이 양성으로 판정되었다. 또한 중화항체시험에 대한 아가겔 면역 확산법의 특이성과 감수성을 비교한 바 면역확산법은 음성 혈청에 대한 특이성이 98.4%, 양

Table 5. Comparative assay for Aujeszky's disease virus antibody in swine serums by agar-gel immunodiffusion and serum neutralization tests

SN titers	No. of serums	ID test (%)
≥128	18	18/18(100)*
64	21	21/21 (100)
32	21	21/21 (100)
16	21	21/21 (100)
8	24	22/24(91.7)
4	21	12/21(57.1)
2	21	3/21(14.2)
<2	63	1/63(1.6)
Total	210	119/210

* No positive/No. tested.

Table 6. Specificity and sensitivity of immunodiffusion test in comparison with serum neutralization test for detection of Aujeszky's disease virus antibody

	SN test		Total
	Positive	Negative	
ID test			
Positive	118(80.3)	1	119
Negative	29	62(98.4)	91
Total	147	63	210

()=% to SN test.

성 혈청에 대한 감수성은 80.3%였다 (Table 6).

항원단백의 SDS-PAGE 분석: 면역확산시험에 이용된 시제 ADV 항원단백질의 성상을 구명하기 위해 황산암모늄으로 처리하여 만든 antigen I, ADV배양상층액을 농축하여 만든 antigen III와 tween-80 및 황산암모늄을 처리하여 제조한 antigen IV를 SDS-PAGE로 분석하였다. 대조로는 ADV를 접종하지 않은 세포 배양액 추출물을 동시에 시험하였다. 그 결과 antigen I과 III는 대조에 비해 116K에서 특이한 band가 나타났고 (Fig 5:A), antigen IV는 45K, 98K, 및 150K에서 특이한 band가 인정되었다 (Fig 5:B).

고 찰

아가-겔 면역확산시험을 이용하여 돼지에서 ADV 항체를 검출하기 위한 연구는 많은 학자들에 의해 수행된 바 있으며, 항원제조에 대해 다양한 연구결과가 보고된 바 있다. Gutekunst et al¹³ 및 Johnson et al¹⁴은 단층배양된 세포에 고역가의 ADV를 증식시켜 초음파처리(14 KHz/S, 20min)한 후 원심분리(1,500×g, 30min)하고 42.5% 황산 암모늄으로 처리하여 100배 농축한 항원의 감수성이 가장 높다고 보고하였으며, 또한, Smith와 Stewart¹⁵는 ADV 배양상층액을 수확하여 70배로 농축하여 제조한 항원의 감수성이 높다고 보고 하였다. Pfeiffer와 Schipper¹⁶는 tween-80을 3% 되게 가한 PBS (pH 7.2)와 황산암모늄을 처리하고 30배 농축한 항원이 높은 감수성과 특이성을 보였다고 보고한 바 있다.

본 시험에서는 국내분리주 ADV, NYJ-1-87³³ 주를 이용하여 아가-겔 면역확산시험에 이용할 ADV항원을 선인들의 방법을 응용하여 제조하고 그 효능을 시험하였다. 그 결과 Smith와 Stewart¹⁵ 및 Pfeiffer와

Schipper¹⁶의 방법에 의해 제조한 antigen I, II 및 III 보다 Gutekunst et al¹³의 방법에 따라 생산한 antigen I이 더욱 높은 효능을 보였고 농축비율은 100배가 적절한 것으로 판명되었다.

ADV항체검출을 위한 면역확산시험에서 아가젤의 조성 에 관하여 Gutekunst et al¹³은 0.05M tris buffer (pH 7.2)와 0.15M borate buffer로 만든 것이 적절하고 식염을 가하지 않은 0.69% agarose를 사용할 때 효능이 높았으며 0.025% sodium azide (NaN₃) 첨가는 미생물의 오염방지 효과가 있었다고 보고하였다. 그리고 Smith와 Stewart¹⁵는 1.25%식염을 가한 0.15M borate buffer (pH 8.5)에 agarose를 1.0%되게 가하여 만든 겔이 반응능이 높았다고 하였고, Pfeiffer와 Schipper¹⁶는 식염을 0.87%되게 가한 0.025M veronal buffer(pH 8.6)에 1.0% Noble's special agar를 녹여 사용하였다.

본 시험결과 시제 항원의 감수성과 특이성은 식염을 가하지 않은 0.05M tris buffer (pH 7.2)에 Noble's special agar를 0.7%되게 가하여 만들 때 가장 높다는 사실이 밝혀졌다. 이와 같은 성적은 Gutekunst et al¹³의 성적과 거의 일치하고 Smith와 Stewart¹⁵의 성적과 부분적으로 일치하였다.

아가-겔 면역확산시험의 ADV 항체검출 효능을 중화항체시험과 비교한 실험이 여러 학자에 의해 수행된 바 있다. Gutekunst et al¹³은 2,203개의 혈청 가검물로 면역확산 시험을 실시하고 그 결과를 중화항체 시험과 비교한 바 중화항체가 8에서 94%, 16이상에서 100%의 일치율을 나타내었고, 1,713개의 중화항체 음성 혈청에서 8개가 양성으로 판정되어 고도의 특이성이 있었다고 보고하였다. 또한 Smith와 Stewart¹⁵는 중화항체역가 16에서 86%, 32이상에서 100% 일치하였고 중화항체 음성 혈청에 대한 특이성은 100%였다고 보고하였다. 그리고 Johnson et al¹⁴은 중화항체 역가 16에서 92%, 32이상에서 100%의 일치율을 나타냈고, 특이성은 99%라고 보고하였다.

본 실험에서 제조한 항원을 이용하여 실시한 면역확산시험의 감수성은 중화항체가 8에서 91.7%, 16이상에서 100%의 일치율을 보였고, 음성 혈청에 대한 특성은 98.4%로 매우 높았다. 이런 결과는 Gutekunst et al¹³, Smith와 Stewart¹⁵, 및 Johnson et al¹⁴의 성적과 거의 일치하였다.

이상에서 얻어진 일련의 결과를 볼 때 본 실험에서 확립된 면역확산시험은 현재 국내에서 이용되고 있는 중화항체시험 및 효소면역시험법에 비해 감수성이 다소 낮지만, 특이성이 높은 장점이 있고 신속하고 간편

하여 ADV양성돈군의 스크린 검사법으로 응용될 가치가 있는 것으로 사료된다.

ADV가 감염된 배양세포로부터 추출된 ADV항원의 성상에 대한 연구는 방사성 동위원소로 표지된 methionine, glucosamine 및 leucine을 이용하여 glycoprotein 및 viral proteins을 SDS-PAGE법 및 western blotting법 등으로 연구된 바 있으며, Stevely³⁶는 분자량 20K 내지 230K에서 20개의 단백질이 있음을 보고하였다. 또한, Hample et al³²은 58K, 74K, 98K 및 125K의 major glycoprotein과 62K, 98K 및 130K의 minor glycoprotein이 있음을 보고하였으며, Lukacs et al³⁷은 90K, 122K 및 155K에서 3종의 major glycoprotein이 있음을 보고하였다.

본 시험에서는 SDS-PAGE를 실시한 가검 ADV항원 단백질이 정제되지 않고 세포배양물질과 바이러스 단백질이 혼합된 상태이며, 비교적 감수성이 둔한 단백질 염색법을 이용하였기 때문에 ADV 단백을 특이하게 분석하기가 어려웠다. 그러나 배양세포추출물인 대조항원과 비교하였을 때 antigen I, II 및 III에서 각각 특이한 band가 선인들³³⁻³⁶이 언급한 ADV protein band와 비슷한 위치에서 관찰되었기에 이들은 ADV관련 단백질이라 추정된다. 또한 antigen I과 II에서는 한 개의 특이 band가 관찰된 반면, antigen III는 3개의 특이한 band가 관찰되어 황산암모늄의 단독처리보다 tween-80을 동시에 처리할 경우에 세포관련 단백질과 ADV특이 단백질과의 차이를 더욱 명확히 분석해 볼 수 있는 것으로 사료된다.

그러나 본 시험에서 얻어진 시제 ADV항원의 전기영동분석 결과는 제조항원의 면역학적 또는 화학적 특성에 대한 설명근거로는 불충분하기 때문에 더 명확한 자료를 얻기 위해서는 ADV항원의 정제 및 보다 정확한 면역화학적 분석법을 이용한 연구가 추가되어야 한다고 생각된다.

결 론

국내 이환자돈으로 부터 분리한 Aujeszky's disease virus, NYJ-1-87주를 이용하여 아가-겔 면역확산법에 사용할 항원을 제조하고, 이들 항원을 이용하여 아가-겔 면역확산 시험법을 확립하여 돼지 혈청중 ADV 항체검출 효능에 대하여 연구하였으며, 아울러 이 항원의 단백질성상을 SDS-PAGE법으로 분석 연구한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. ADV항원의 적정농도를 구명하기 위해 ADV 배양세포추출액을 30배 내지 200배로 농축하여 면역확산

시험을 실시한 바 황산암모늄으로 침전시키고 100배 농축하여 얻어진 항원이 가장 명확한 침전대를 형성하였다.

2. 방사면역확산시험으로 항원의 농도와 침강환의 크기의 상관관계를 비교 실험한 바 두 요인간에는 고도의 상관관계($r=0.95$, $y=0.23x+23.4$)가 인정되었다.

3. 아가-젤의 완충용액의 성상이 면역확산시험의 효능에 미치는 영향을 실험한 바 식염을 가하지 않은 0.05M tris buffer (pH 7.2)가 가장 적합하였다. 또한 아가-젤의 성상이 면역확산시험에 미치는 영향을 구명하기 위해 agarose 및 Noble's special agar를 비교한 바 두 기질사이에는 유의한 차이가 인정되지 않았다.

4. 중화항체시험 결과와 본 시험에서 확립된 면역확산시험 성적을 비교한 바 중화항체가 8에서 91.7%, 16이상에서 100%의 일치율을 나타냈고, 중화항체시험에 대한 면역확산시험의 감수성은 80.3%, 특이성은 98.4%였다.

5. 면역확산시험에 사용한 ADV 항원단백의 성상을 SDS-PAGE법으로 분석한 결과 대조항원에 비해 antigen I 과 III는 분자량 116K에 특이한 band가 인정되었고, tween-80과 황산암모늄을 처리한 antigen IV는 분자량 45K, 98K 및 150K에서 특이한 band가 검출되었다.

Legends for figures

Fig 3. The reactions of agar-gel immunodiffusion test for detection of ADV-antibody in the swine sera experimentally and naturally infected with ADV, NYJ-1-87 strain. The precipitating bands were stained with coomassie brilliant blue.

A. The reactions performed at the optimal conditions. Central well: Antigen I prepared by ammonium sulfate precipitation. Peripheral wells: reference sera

①=SN titer <2, ②=SN titer 2, ③=SN titer 4 ④=SN titer 8, ⑤=SN titer 16, showing 2 precipitating lines, ⑥=SN titer 32, showing 2 precipitating lines

B. The reactions between the ADV reference positive serum(AS) at serum neutralization titer of 1:32 and various ADV antigens (Conc rate) prepared.

①=Antigen I; 1/70, ②=Antigen IV; 1/30, ③=Antigen III; 1/70, ④=Antigen II; 1/70, ⑤=Antigen IV; 1/50 ⑥=Antigen I; 1/100

C. The reactions performed at the optimal conditions. Central well: Antigen IV prepared by Tween-80 Peripheral wells: reference sera;

①=SN titer <2, ②=SN titer 4, ③=SN titer 8 ④=SN titer 16, ⑤=SN titer 32, ⑥=SN titer 64

Fig 4. Relationship between the concentration of ADV antigen and the size of precipitating ring (mm²) in radial immunodiffusion test. Concentration of ADV antigen:

①=100% ②=80% ③=60% ④=40% ⑤=20% ⑥=10% ⑦=control

Fig 5. Profiles of ADV antigens prepared for agar-gel immunodiffusion test by SDS-PAGE (7.5% acrylamide). The arrow indicates the specific band different from the control antigen.

A: lane 1. Bovine serum albumin (MW 66,000)

lane 2. Standard marker protein; egg albumin (MW 45,000), bovine albumin (MW 66,000), phosphorylase b(MW 97,400), β -galactosidase (MW 116,000)

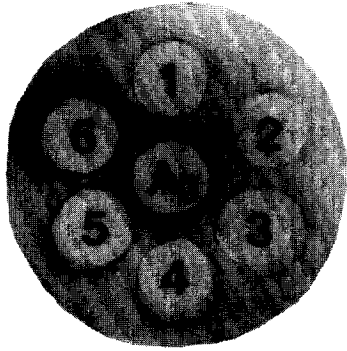
lane 3. Control antigen, mock infected

lane 4. Antigen I, lane 5. Antigen III

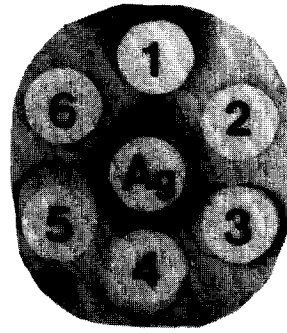
B: lane 1. Bovine serum albumin (MW 66,000)

lane 2. Standard marker protein; egg albumin (MW 45,000), bovine albumin (MW 66,000), phosphorylase b(MW 97,000), β -galactosidase(MW 116,000)

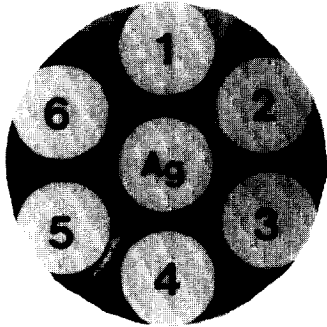
lane 3. Control antigen, mock infected, lane 4. Antigen IV



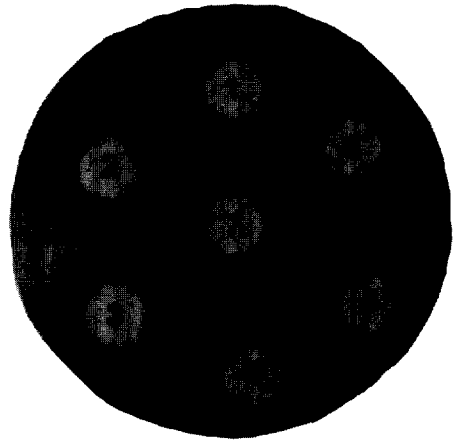
3A



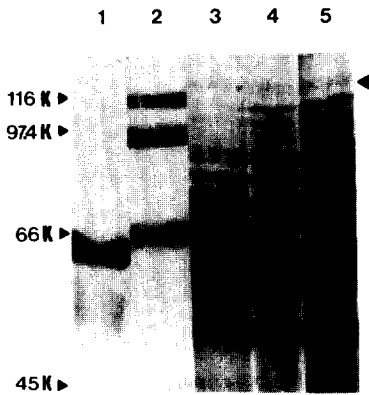
3B



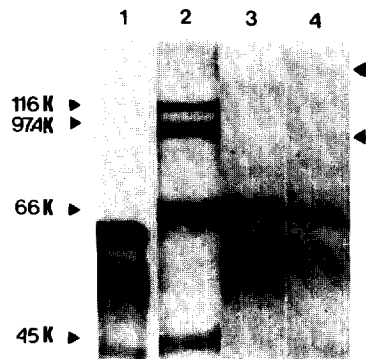
3C



4



5A



5B

참 고 문 헌

1. Gillespie JH, Timony JF. In Hagan and Bruner's infectious diseases of domestic animals. The herpesviridae. 7th ed. New York: Cornell University Press, 1981;551~594.
2. McFerran JB, Dow C, Hildebrand WRP. Aujeszky's disease virus. *Vet Rec* 1966;78:700.
3. Haffer K, Gustafson DP, Kanitz CL. Indirect hemagglutination test for pseudorabies antibody in swine. *J Clin Microbiol* 1980;11:218~219.
4. Eloit M, Fargeaud D, Vannier P, et al. Development of an ELISA to differentiate between animals either vaccinated with or infected by Aujeszky's disease virus. *Vet Rec* 1989;124:91~94.
5. Csontos J, Staudinger WL, Rhodes MB. Indirect solid phase microradioimmunoassay for detection of pseudorabies virus antibody in swine sera. *Am J Vet Res* 1978;39:1955~1957.
6. Csontos J, Romvary J. Diagnosis of Aujeszky's disease in pigs by the complement fixation test. *Am J Vet Res* 1978;39:1955~1957.
7. Banks M, Cartwright S. Comparison and evaluation of four serological tests for detection of antibodies to Aujeszky's disease virus. *Vet Rec* 1983;113:38~41.
8. Joo HS, Molitor TW, Leman AD. Radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies to pseudorabies virus in swine serum. *Am J Vet Res* 1984;45:2096.
9. An SH, Kweon CH, Lee JB. Modified radial immunodiffusion enzyme assay for diagnosis of pseudorabies infection in swine. *J Kor Soc Virol* 1987;17:45~50.
10. Seidler M, Stettner M. A test for the rapid diagnosis of Aujeszky's disease(AD) in swine. *Dtsch Tierärztl Wschr* 1988;95:468.
11. Allan GM, McNulty MS, McCracken RM, et al. Rapid diagnosis of Aujeszky's disease in pigs by immunofluorescence. *Res Vet Sci* 1984;36:225~239.
12. Belak S, Limme T. Rapid detection of Aujeszky's disease(pseudorabies) virus infection of pigs by direct filter hybridization of nasal and tonsillar specimens. *Res Vet Sci* 1988;44:303~308.
13. Gutekunst DE, Pirtle EC, Mengeling WL. Development and evaluation of a microimmunodiffusion test for detection of antibodies to pseudorabies virus in swine serum. *Am J Vet Res* 1978;39:207~210.
14. Johnson ME, Thawley DG, Solorzano RF, et al. Evaluation of the microimmunodiffusion test for the detection of antibody to pseudorabies virus. *Am J Vet Res* 1983;44:28~30.
15. Smith PC, Stewart WC. Agar-gel immunodiffusion assay for pseudorabies virus antibody. *J Clin Microbiol* 1978;7:423~425.
16. Pfeiffer NE, Schipper IA. Evaluation of pseudorabies viral antigens in the agar-gel immunodiffusion test. *Am J Vet Res* 1979;40:595~595.
17. 이중복, 안수환, 김병한 등. 돼지 오제스키병에 관한 연구 : I. 감염자돈으로부터 원인체의 분리 및 동정. 대한수의학회지, 1988;28(1):99~103.
18. Hill HT, Crandell RA, Kanitz CL, et al. Recommended minimum standards for diagnostic tests employed in the diagnosis of pseudorabies (Aujeszky's disease). *Proc Annu Meet Am Assoc Vet Lab Diagn* 1977;375~390.
19. Gaskin JM, Neal FC, Rubin HL. Equine antibody to bovine serum induced by several equine vaccines as a source of extraneous precipitin lines in the agar gel immunodiffusion test for equine infectious anemia. *Am J Vet Res* 1977;38:373~377.
20. LeJeune JM, Hart LT, Larson AD, et al. Microimmunodiffusion test for detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus in bovine serum. *Am J Vet Res* 1977;38:459~463.
21. Miller JM, Vandermaaten MJ. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Europ J Cancer* 1977;13:1369~1375.
22. Phillips M, Miller JM, Vandermaaten MJ. Isolation of a precipitating glycoprotein antigen from cell cultures persistently infected with bovine leukemia virus. *J Natl cancer Inst* 1978;60:213~217.
23. Cnuma M, Olson C, Driscoll DM. Properties of

- two isolated antigens associated with bovine leukemia virus infection. *J Natl Cancer Inst* 1976;57:571~578.
24. Onuma M, Olson C, Baumgartener LE, et al. An ether-sensitive antigen associated with bovine leukemia virus infection. *J Natl Cancer Inst* 1975;55:1155~1158.
 25. Nougayrede PH, Pellen J, Quentel C, et al. Enzootic bovine leukosis: Preparation of an antigen for the agar gel immunodiffusion test and statistical comparison with other antigens. *Vet Microbiol* 1981;6:247~257.
 26. 전무형, 정운익, 안수환, 소백혈병(Bovine Leukosis)에 관한 연구: III. 소 백혈병 바이러스 항원(진단액) 생산 및 성장에 관한 연구. 농사시험보고. 1983;25:68~74.
 27. 전무형, 정운익, 박봉균 등. 소 백혈병(Bovine Leukosis)에 관한 연구: IV. 면역확산법과 보체결합반응에 의한 항체검출 효과비교. 한국수의공중보건학회지, 1983;25:68~74.
 28. Weir DM, Herzenberg LA, Blackwell C, et al. Handbook of experimental immunology. I. Immunochemistry. 4th ed. Oxford: Blackwell scientific publications, 1986;32:17.
 29. Ben-Porat T, Shimono H, Kaplan AS. Synthesis of proteins in cells infected with herpesvirus: II. Flow of structural viral proteins from cytoplasm to nucleus. *Virology* 1969; 37:56~61.
 30. Ben-Porat T, Shimono H, Kaplan AS. Synthesis of proteins in cells infected with herpesvirus: IV. Analysis of the proteins in viral particles isolated from the cytoplasm and the nucleus. *Virology* 1970;41:256~264.
 31. Ben-Porat T, Kaplan AS. Synthesis of proteins in cells infected with herpesvirus: V. Viral glycoprotein. *Virology* 1970;41:265~273.
 32. Hample H, Ben-Porat T, Ehrlicher L, et al. Characterization of the envelope proteins of pseudorabies virus. *J Virology* 1984;52:583~590.
 33. 전무형, 조성환, 안수환 등. 이환자돈으로 부터 오제스키병 바이러스 분리와 생물학적 성장. 대한수의사회지, 1988;24(3):163.
 34. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1969; 2:235.
 35. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 1970;227:680~685.
 36. Stevely WS. Virus-induced proteins pseudorabies-infected cells: II. Proteins of the virion and nucleocapsid. *J Virology* 1975;16:944~950.
 37. Lukacs N, Thiel HJ, Mettenleiter TC, et al. Demonstration of three major species of pseudorabies virus glycoproteins and identification of a disulfide-linked glycoprotein complex. *J Virology* 1985;55:166~173.