

국내에서 분리한 encephalomyocarditis virus의 성상

김원용·마점술*·김철중**·강신영***·최재윤·하용공****

한국과학기술연구원 유전공학연구소·서울대학교 수의과대학*

충남대학교 수의과대학**·충북대학교 농과대학 수의학과***

중앙가축전염병연구소****

(1992년 9월 8일 접수)

Charactrization of encephalomyocarditis virus isolated from Korea

Won-yong Kim, Jum-sool Mah*, Chul-joong Kim**, Shien-young Kang***,
Jae-yoon Choi, Yong-kong Ha****

Genetic Engineering Research Institute, KIST*, College of Veterinary Medicine, Seoul National University**
College of Veterinary Medicine, Chungnam National University**, Department of Veterinary Science, College of Agriculture,
Chungbuk National University***

Choong Ang Animal Disease Laboratory****

(Received Sep 8, 1992)

Abstract : We have investigated the characteristics of encephalomyocarditis (EMC) virus isolated in Korea. The CPE, buoyant density, polypeptide profile and the size of RNA of EMC virus were examined. The granulation, pyknosis and necrosis were observed from 30 to 48 hour's post inoculation of the virus into baby hamster kidney and lung cells. The buoyant density was 1.30 and 1.35g/ml. Three different polypeptides, 26Kd, 32Kd, and 34Kd in size, were observed and the size of viral RNA was 7.7Kb.

Key words : encephalomyocarditis(EMC) virus, CPE, buoyant density, polypeptide profile, RNA.

서 론

Encephalomyocarditis(EMC) 바이러스는 Picornaviridae과의 *Cardiovirus*속에 속하며 서로 다른 4개의 capsid protein의 icosahehdral 구조를 갖는 동물바이러스로서 plus-sense의 single stranded RNA genome을 갖는다.¹

EMC 바이러스의 자연감염숙주는 쥐^{2,3}, 다람쥐⁴, 코끼리⁵, 돼지⁶, 너구리, 영양, 조류⁷, 영장류^{8,9}에서도 감염이 보고되었다. 사람에서는 EMC 바이러스의 혈증 황체를 조사한 결과 1~50%의 비율로 나타났으나 뇌 염, 심근염 및 당뇨병에서와 같은 증상과는 직접적으로 관계가 없는 것으로 밝혀졌다.^{10,11}

Craighead¹²는 EMC 바이러스를 2개의 변이주 즉, 뇌 친화성인 E 변이주와 심장친화성인 M 변이주로 구분

하였다. 그 후 M 변이주 바이러스로부터¹³ 마우스에서 체장의 β 세포를 파괴하여 인슐린 의존형 당뇨병(type 1)을 유발하는 EMC D 주^{14,15}와 interferon을 생산하며 당뇨병을 유발하지 않는 EMC B 주¹⁶가 발견되어 인간 질병의 동물모델로서 널리 이용되고 있다.

EMC 바이러스는 마우스에서 자연감염하면 준임상 형의 증상이 나타나나 실험적으로 감염시키면 중추신경계 손상을 동반하여 폐사하며,¹⁷ 다른 동물에서는 심근괴사를 동반하는 심근손상이 주된 병변으로 나타난다.¹⁻⁷

돼지에서 EMC M변이주에 의한 별명은 파나마에서 Murnane 등¹⁸이 최초로 보고한 이래 세계 각국에서 이 질병의 발생이 확인되었다.

1960년부터 1966년 사이에 미국에서는 플로리다 지역

에서 다수의 자돈 폐사원인증의 하나로 중요시하였으며⁶, 1970년 호주에서는 EMC 바이러스로 인하여 수백 두의 돼지가 폐사한 이래 자돈폐사의 중요한 원인체로 알려져 있다.^{19, 20} 최근에는 돼지의 태아로부터 바이러스가 분리됨으로써 태반감염이 입증되어²¹ 돼지 번식장애의 중요한 요인으로 간주하고 있다.^{22~26} 캐나다에서는 폐사한 자돈으로부터 EMC 바이러스의 형체가 검출되는 경우가 있으나 모돈에서는 생식장애 피해는 없었다고 하였으며^{27, 28}, 영국에서는 임상증상이 나타나지 않은 도축돈에서도 28%의 형체가 검출되어 EMC 바이러스의 병원성은 바이러스 strain에 따라 다른 것으로 추정하고 있다.

EMC 바이러스가 돼지에 감염하면 20주령까지의 자돈에서는 뇌염 및 심근염을 일으키며 모돈에서는 임신 말기에 유산 및 사산을 유발한다.^{19, 21, 22}

조직배양법을 이용하여 Acland와 Littlejohns¹⁹는 fetal mouse fibroblast에서, Horner와 Hunter³⁰은 pig kidney 세포에서, Kim 등²³은 baby hamster kidney(BHK-21) 세포에서 EMC 바이러스의 분리배양에 성공하였으며, Dea 등³¹은 BHK-21 세포보다 Vero 세포가 바이러스를 분리하는데 더 좋다고 보고하였다.

EMC 바이러스가 자연숙주인 쥐에서 돼지로 전파되는 기전은 확실하지 않으나 Seaman 등³²은 쥐는 감염원으로 작용하며 EMC 발생농장에는 쥐가 많이 분포하고 있어 바이러스의 전파역할을 하는 것으로 추측하였다.

현재 우리나라에서는 몇개의 대단위 양돈장에서 번식장애를 일으키는 질병의 임상증상 및 병리소견을 종합하여 EMC 바이러스에 의한 감염을 보고하였으며³³, EMC 바이러스를 분리한 보고도 있다.³⁴

현재까지 돼지 EMC 바이러스에 관한 연구보고는 많지 않으나 최근에는 세계 여러나라에서 돼지 EMC 바이러스의 감염이 확인되고 이 바이러스로 인한 피해가 점차 증가하면서 부터 많은 연구가 진행되고 있다.

EMC 바이러스를 진단하는 방법으로서 혈청학적 진단, 감염태아로부터 바이러스 분리 및 병리 조직학적 검사 등^{35~37}에 중점을 두어 왔으나 시간이 오래 소요되고 무엇보다도 바이러스 분리율이 낮기 때문에 실제로 활용되지 못하고 있는 실정이다.

일반적으로 *Picornaviridae*과의 바이러스는 약 7,500 nucleotide의 RNA를 가지고 있으며³⁸, 3' 말단은 poly(A)로서 polyadenylation되어 있는 관계로³⁹ deoxythymidine oligomer(oligo dT)를 이용하여 진핵세포의 mRNA에서와 같은 합성방법으로 RNA에 상보적인 cDNA를 합성할 수 있다.⁴⁰ 그러나 대부분의 진핵세포의 mRNA와는 달리 translation에 필요한 ribosome-binding reaction에

관하여는 5' 말단의 cap 구조는 없고 대신 공유결합된 단백질(covalently linked protein : VPg)을 가지고 있다.⁴¹

*Picornaviridae*과의 *Cardiovirus*속 바이러스는 genome의 5' 말단에 다양한 크기(150~330 base)의 poly(C) tract를 가지고 있어 이곳에 존재하는 염기서열의 차이와 크기로써 종류를 구별할 수 있다. 또 viral polyprotein을 coding하는 한개의 긴 open reading frame (ORF)를 가지고 있으며 이것은 5' 말단으로부터 약 700 nucleotide 위치에서 개시된다.⁴²

본 연구는 국내에서 분리한 EMC 바이러스에 대한 성상을 규명할 목적으로 조직배양에서의 CPE, buoyant density, polypeptide profile 및 viral RNA의 크기를 조사하였다.

재료 및 방법

바이러스 : 국내에서 분리된 돼지유래 encephalomyocarditis(EMC) virus K3주를 중앙가축전염병연구소로부터 분양받아 실험에 사용하였다.

Antiserum

1) Mouse antiserum : 정제한 EMC virus K3주를 Freund's complete adjuvant와 혼합하여 BALB/C mouse의 복강내에 접종하고 5주후 다시 Freund's incomplete adjuvant와 혼합한 바이러스를 추가접종하여 면역혈청을 얻었다.

2) Swine antiserum : EMC 바이러스에 대한 중화항체가 32배의 돼지 혈청으로서 농촌진홍청 가축위생연구소로부터 분양받았다.

바이러스 증식, 정제 및 적혈구 응집반응 : 바이러스의 증식을 위하여 line cell인 baby hamster kidney cell (BHK-21) 및 hamster lung cell(HmLu)을 사용하였다. fetal bovine serum(Gibco USA)을 5%로 첨가한 Eagle's minimum essential medium(Gibco, USA)에서 세포를 배양하여 monolayer로 형성되었을 때 $10^{6.9}$ TCID₅₀/ml의 바이러스 0.1ml를 접종하여 37°C CO₂배양기에서 2시간 정지한 다음 fetal bovine serum을 1%로 첨가한 Eagle's minimum essential medium을 가하여 cytopathic effect (CPE)가 뚜렷하게 출현할 때까지 배양하였다.

바이러스의 정제는 Rueckert와 Pallansch⁴³의 방법에 준하여 실시하였다. CPE가 잘 나타난 바이러스 감염세포의 배양액을 취하여 동결 용해를 3회 이상 반복하여 세포로부터 바이러스를 완전히 유리시킨 다음, 900×g (Beckman JA-10)에서 15분간 원심 분리(Beckman J2-21ME)하여 상동액만을 취하였다. 이 용액 100ml에 sodium chloride 2.22g과 polyethylene glycol 6,000을

7g 가하고 4°C에서 하룻밤 교반한 다음 4°C에서 2,000×g로 2시간 원심분리하여 pellet을 얻었다. pellet에 처음 양의 1/100양으로 PBS용액(pH 7.2)을 가하고 얼음속에 유지하면서 ultrasonicator(Ultrasonics USA)를 사용하여 10,000Hz에서 1초 간격으로 20초간 초음파 처리하였다. 초음파 처리한 용액은 3,000×g에서 10분간 원심분리하고 상동액만 취하여 cesium chloride(BRL USA) 0.46g과 Nonidet-P40(Sigma, USA)을 1%로 가한 다음 38K(Beckman SW41)로 24시간 초원심분리(Beckman XL-90 ultracentrifuge)하여 21G 주사침으로 바이러스 분획을 회수하였다. 회수한 바이러스 분획은 4°C에서 TE buffer(10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH 8.0)로 하룻밤 투석한 다음 0.5mℓ의 30% sucrose cushion에서 45K로 90분간 초원심하여 얻은 pellet을 TSA buffer(0.25M sodium chloride, 5mM Tris-acetate, pH 7.5, 0.01% BSA)에 용해하였다. 순수하게 정제한 바이러스는 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다(Fig 1).

바이러스의 적혈구응집가의 측정은 Craighead와 Shelokov⁴⁴의 microtiter system으로 실시하였다. 바이러스의 배양액을 초원심한 후 원심판의 하단부터 fraction collector(Biorad, model 2110)로 0.25mℓ씩 취하였다. 각 시료의 25μl씩을 U자형 microplate(Nunc, Denmark)에서 KCl-borate buffer(0.1M KCl, 0.05M boric acid, pH 8.0)로 단계 회석하고 동량의 0.6% 기니피 적혈구액과 혼합한 다음 실온에서 2시간 방치후 혈구의 응집을 판독하였다. 응집이 일어난 최고 회석배수를 각 시료의 적혈구 응집가로 판정하였다.

바이러스 단백질 분석 : 정제한 바이러스의 단백질을 분석하기 위하여 Laemmli⁴⁵의 방법에 따라 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시하여 전개하였다. 바이러스 0.7μg에 sample buffer(0.125M Tris-Cl pH 6.8 20% glycerol, 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 0.025% bromophenol blue)를 1:4의 비율로 가하고 95°C에서 4분간 가열한 다음 12% SDS-polyacrylamide gel에서 13~18mA로 5~6시간 전기영동하였다. molecular weight marker로는 SDS-PAGE protein standards, high and low range(Bio-rad USA)를 사용하였으며, gel은 0.1% coomassie blue R-250으로 30분간 염색하고 40% methanol, 10% acetic acid용액으로 background가 투명하게 될 때까지 탈색하였다.

EMC 바이러스의 항원을 분석하기 위하여 Burnette⁴⁶의 방법에 따라 western immunoblotting을 실시하였다. 바이러스 항원을 SDS-PAGE한 다음 polypeptide 분획을 Transphor transfer electrophoresis unit(Hoefer, T-

E50)를 사용하여 transfer buffer(25mM Tris-Cl, 192mM glycine, 20% methanol, pH 8.3)에서 4°C, 0.1A로 Hybond-C nitrocellulose membrane(Amersham, UK)에 16시간 transfer하였다. membrane은 0.1% ponceau S액으로 5분간 염색하여 polypeptide 분획의 이동을 확인한 후 TBS buffer(20mM Tris-Cl, 50mM NaCl, pH 7.5)로 탈색하고 3% gelatin 함유 TBS buffer에서 1시간 blocking하였다. blocking 한 membrane은 TTBS buffer와 (20mM Tris-Cl, 50mM NaCl 0.05% Tween-20, pH 7.5)로 5분간 2회 세척하였다. 여기에 1차 항체로서 mouse antiserum 또는 swine antiserum을 1:100으로 회석하여 가한 다음 37°C에서 3시간 반응시켰다. EMC 바이러스의 polypeptide와 결합하지 않은 항체를 제거할 목적으로 TTES buffer로 10분간 2회 세척하였다. 이와같이 처리한 것은 2차 항체로서 peroxidase labelled goat anti-mouse IgG(H+L) conjugate anti-swine IgG(γ) conjugate(KPL, USA)를 TTBS buffer로 1:1,000으로 각 회석하여 1시간 반응한 다음 TTBS buffer로 15~20분간 2회, TBS buffer로 15분간 3회 세척한 후 공기중에서 건조하여 4-chloro-1-naphtol과 30% H₂O₂를 사용하여 37°C에서 15~30분간 발색하였다.

RNA의 분리 및 formaldehyde gel electrophoresis : RNA의 분리는 Chomczynski와 Sacchi⁴⁷의 acid guanidium thiocyanatephenol-chloroform(AGPC)² method를 이용하였다. 순수분리한 바이러스 70μg(400μl)에 동량의 2×solution D.(4M guanidium thiocyanate, 25mM sodium citrate, 0.5% sarcosyl 0.1M 2-mercaptoethanol, pH 7.0)를 가하여 잘 혼합하였다. 여기에 2M sodium acetate(pH 4.0) 0.1mℓ, water saturated phenol 1mℓ, chloroform/isoamylalcohol(49:1) 0.2mℓ를 차례로 가하고 10초간 vortexing한 다음 얼음속에 15분간 방치하였다. homogenate는 4°C에서 10,000×g로 20분간 원심하여 상동액을

Virus infected in cells	freezing and thawing three times
Crude sample	centrifuge at 900×g for 15min.
Supernatant	add PEG 6000 7% and NaCl 2.22%
↓	centrifuge at 2000×g for 2hrs
Pellet	resuspend in PBS
	ultrasonication
↓	centrifuge at 3000×g for 10min
Supernatant	add CsCl 46% and Nonidet P-40 1%
↓	centrifuge at 38K for 24hrs.
Virus fraction	dialysis in TE buffer
.	30% sucrose density gradient
↓	centrifugation at 45K for 90min.
Pellet(purified virus)	resuspend in TSA buffer

Fig 1. Procedure for the purification of EMC virus.

취하고 isopropanol 1mℓ를 가한 다음 -20°C에서 1시간 방치하고 다시 10,000×g에서 20분간 원심하여 RNA를 침전하였다. 침전한 RNA는 solution D. 0.3mℓ로 용해하여 동량의 isopropanol을 가하고 -20°C에서 1시간 방치한 후 4°C에서 10분간 원심하고 75% ethanol로 세척하였다. 분리후 RNA는 diethylpyrocarbonate로 처리한 중류수에 용해하여 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

분리한 RNA는 spectrophotometer(Beckman, DU68)로 260 및 280nm에서 흡광도를 측정하여 정량한 다음, 1μg을 취하여 formaldehyde gel electrophoresis하였다. gel은 중류수에 agarose(FMC, S_{EAK}_{EM})를 1%로 가하고 가열용해한 다음 60°C에서 5×formaldehyde gel running buffer(10mM MOPS : pH 7.0, 40mM sodium acetate, 5mM EDTA : pH 8.0)를 최종농도 1×로 가하고, 12.3M formaldehyde를 최종농도 2.2M로 가하여 제조하였다. RNA는 1μg(5μl)에 5×formaldehyde gel running buffer 2.0μl, formaldehyde 3.5μl, formamide 10μl를 가하여 65°C에서 15분간 변성시킨 다음 gel loading buffer(50% glycerol, 1mM EDTA, pH 8.0, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol)2μl를 가하여 loading한 후 50V로 2시간동안 전기영동하였다. 전기영동후 gel을 0.1M ammonium acetate에 용해한 ethidium bromide-용액(0.5μg/mℓ)으로 30~40분간 염색하고 UV transiluminator로 RNA band를 관찰하였다.

결 과

Encephalomyocarditis virus의 CPE 및 buoyant density : EMC 바이러스 K3주를 baby hamster kidney(BHK-21)세포 및 hamster lung(HmLu) 세포에 감염시켜 37°C, CO₂ 배양기에서 배양하면서 경시적으로 cytopathic effect(CPE)를 관찰하였다. 바이러스 감염후 36~48시간 이내에 BHK세포 및 HmLu세포 모두에서 세포의 구형화 및 핵동축으로 인한 파사를 유발하는 전형적인 CPE가 관찰되었으며, 바이러스를 접종하지 않은 세포군에서는 CPE를 나타내지 않아 바이러스가 증식되었음을 알 수 있었다(Fig 2).

조직배양한 바이러스를 순수분리하기 위하여 PEG 처리 및 초원심분리법으로 바이러스를 농축하여 정제하였다. cesium chloride를 이용한 초원심분리에서 육안적으로 2개의 분획으로 구분되었으며 이것을 fraction collector로 분획하고 각 분획을 시험관에 0.25mℓ씩 취하여 기니픽 적혈구에 대한 혈구응집기를 측정한 결과 두 분획에서 26번째부터 30번째까지 시험관과 46번째부터 48번째까지 시험관은 모두 혈구응집기가 2,048배로서 가

장 높은 HA가를 나타내었다. 바이러스의 cesium chloride에 대한 density를 조사하기 위하여 2개의 분획에 대한 refractometry를 실시한 결과 density는 1.30내지 1.35g/mℓ이었다(Fig 3). 이 분획들을 모아 30% sucrose cushion을 이용한 정제를 시도하여 순수한 virion 만을 회수하고 정제된 바이러스의 순수도 및 자외선 흡수도를 조사하기 위하여 바이러스 액 30μl를 UV spectrophotometer로 240nm에서 400nm까지의 흡광도를 scanning한 결과 Fig 4에서와 같은 흡광도 spectrum을 얻을 수 있었다. 이 결과 OD 값은 240nm에서 0.068, 260nm에서 0.010, 280nm에서 0.054로 260nm에서 최대, 240nm에서 최소로 나타낸으로써 전형적인 바이러스의 특성을 나타내었으며 A₂₆₀/A₂₈₀의 비는 1.85, Amax/Amin의 비는 1.47이었다.

Encephalomyocarditis virus의 polypeptide profile : EMC 바이러스의 단백질을 분석하기 위하여 정제한 바이러스를 SDS와 mercaptoethanol로 처리하여 SDS-PAGE한 gel을 coomassie blue R-250으로 염색하였다. EMC 바이러스의 polypeptide는 3종류로서 분자량은 26, 32 및 34Kd이었다(Fig 5). 3종류의 polypeptide 항원성을 규명하기 위하여 EMC 바이러스를 SDS-PAGE로 전개하여 nitrocellulose membrane으로 electroblotting하고 100배 희석한 돼지 및 마우스 antiserum과 반응한 다음 peroxidase labelled anti-swine conjugate, anti-mouse conjugate를 이차 항체로 각각 이용하여 4-chloro-1-naphthol과 30% H₂O₂로 발색케 하였다. 각 분획은 모두 EMC 바이러스의 항체와 결합하여 특이적인 양성반응을 나타내었으며, 대조혈청으로 사용한 마우스 음성혈청에서는 반응하지 않았다. Fig 6에서 보는 바와 같이 lane A는 마우스 antiserum으로 반응한 26, 32 및 34Kd 분획으로 모두 강한 반응을 보여 뚜렷한 band를 나타내었으며, 돼지 antiserum으로 반응한 lane B는 각 분획에서 마우스 antiserum 보다 미약한 반응을 나타내었으며, 26Kd 분획은 32 및 34Kd 분획보다 약하게 나타났다.

Encephalomyocarditis virus RNA의 분자량 : 정제한 EMC 바이러스로부터 guanidium thiocyanate를 이용하여 분리한 RNA는 UV spectrophotometer로 정량한 결과 175μg의 바이러스로부터 3.6μg의 RNA를 분리할 수 있었다. 분리한 RNA의 순수도 및 자외선 흡수양상을 조사하기 위하여 240nm에서 400nm까지의 흡광도를 UV spectrophotometer로 scanning한 결과 OD 값은 260nm에서 최대를 나타내어 전형적인 바이러스의 핵산 형태를 나타내었으며, 260nm에서 0.84, 280nm에서 0.43이었다. A₂₆₀/A₂₈₀의 비율은 1.95로서 RNA가 순수하게 분리되었음을 알 수 있었다(Fig 7).

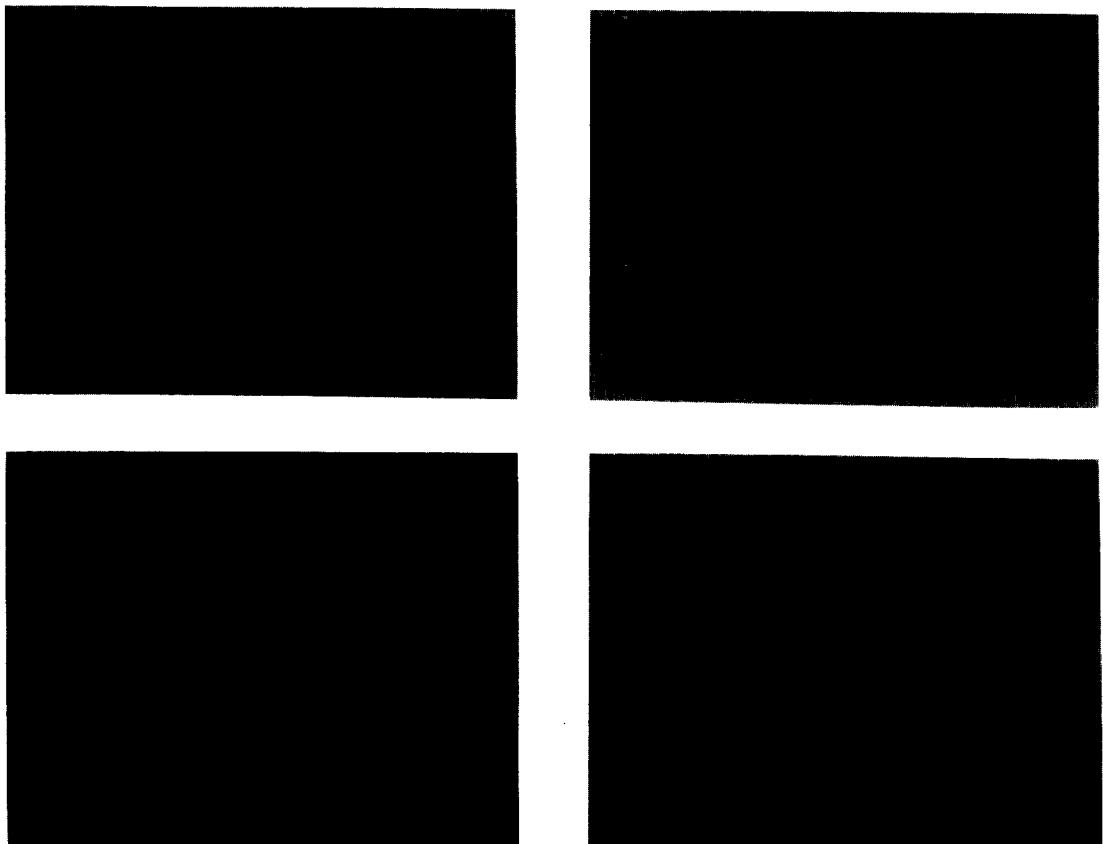
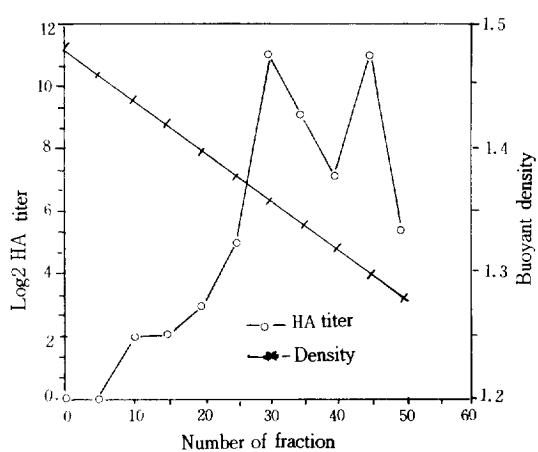


Fig 2. Cytopathic effects in baby hamster kidney(BHK-21) cells and hamster lung(HmLu) cells inoculated with EMC virus K3.

- A : Noninfected control in BHK-21 cells.
- C : Infected monolayers 24hrs after inoculation in BHK-21 cells.
- B : Noninfected control in HmLu cells.
- D : Infected monolayers 24hrs after inoculation in HmLu cells.



(○)HA titers, (×)buoyant density.

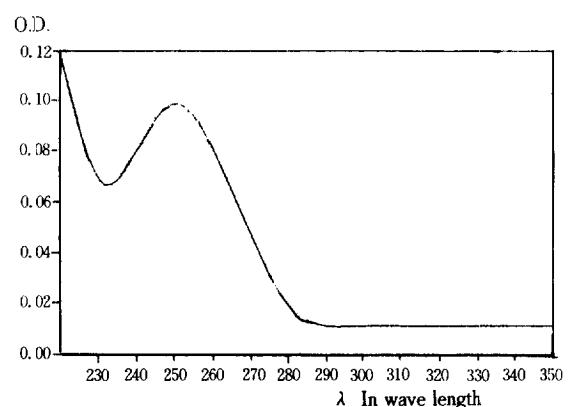


Fig 4. Ultra-violet (U.V) absorption spectra of purified EMC virus K3.

EMC 바이러스 RNA의 크기를 규명할 목적으로 분리한 RNA 1μg을 formamide와 formaldehyde로 처리하여 formaldehyde를 첨가한 1% agarose gel에 전기영동하여

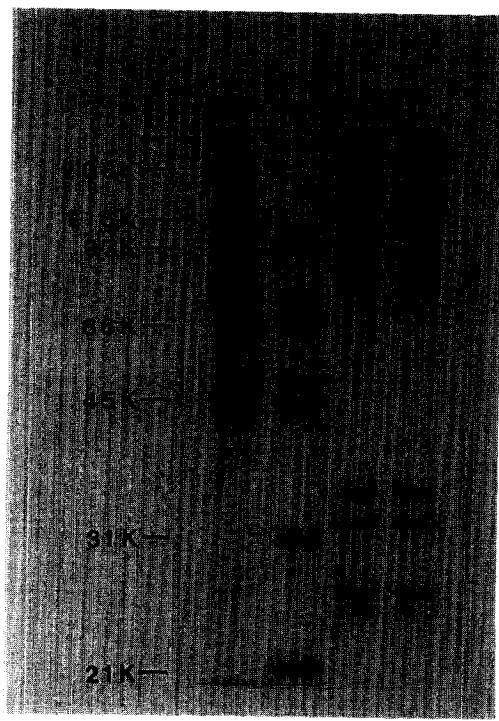


Fig 5. Polypeptide profile of EMC virus K3 on 12% SDS-PAGE.

Lane M : Molecular weight marker proteins.

Lane EMC : EMC virus K3.

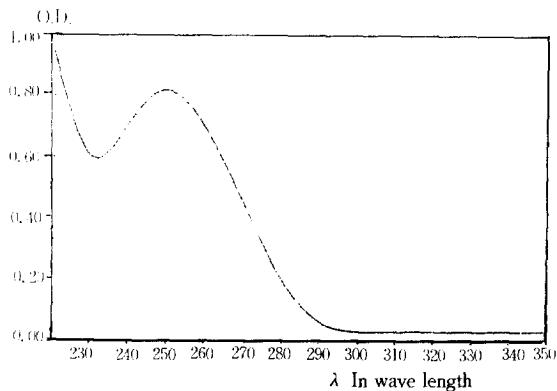


Fig 7. Ultra-violet(U.V) absorption spectra of EMC K3 viral RNA.

분자량을 조사한 결과 1개의 RNA 분획으로 분획되었다.

RNA의 분자량을 marker로 사용한 RNA ladder와 비교하여 크기를 측정한 결과 분자량은 7.7kb이었다(Fig 8).

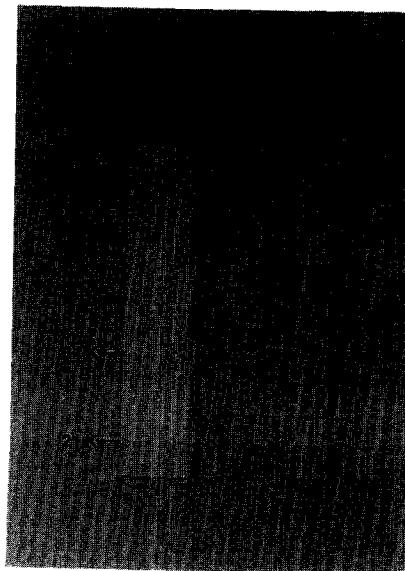


Fig 6. Western immunoblot analysis of EMC virus K3 structural proteins from 12% SDS-PAGE.

Lane M : molecular weight markers, Lane A : mouse antiserum,

Lane B : swine antiserum, Lane C : mouse negative serum

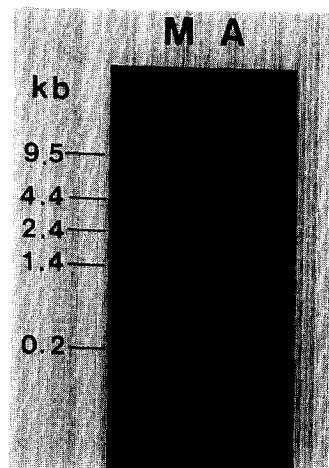


Fig 8. Electrophoretic patterns of EMC K3 viral RNA on 1% formaldehyde agarose gel.

Lane M : RNA ladder(0.24~9.5kb)

Lane A : EMC K3 viral RNA

고 찰

최근에 미국이나 유럽에서 원인이 불명확한 새로운 돼지 질병이 발생하여 그로 인한 피해를 중요시하고 있다. 이 질병은 아직까지 원인을 확실하게 규명하지

못하였기에 “Mystery disease”이라고 불리어지고 있으며, 미국에서는 swine infertility and respiratory syndrome (SIRS)⁴⁸, 네덜란드에서는 porcine epidemic abortion and respiratory syndrome(PEARS)⁴⁹, 영국에서는 blue ear disease⁵⁰의 병명으로 불리어지고 있다. 본 질병의 원인체로서 의심되는 것은 EMC virus, pseudorabies virus, swine parvovirus, swine enterovirus, swine influenza virus, leptospira 및 mycotoxin 등이 거론되었으나 최근에 네덜란드에서 이 질병의 원인체로서 분리한 바이러스는 Totaviridae과 유사한 새로운 바이러스로 보고하였으나^{51, 52} 아직도 이에 대한 의견차이가 있다. 국내에서도 “Mystery disease”의 병원체로서 의심하고 있는 EMC 바이러스를 분리함으로써 이로 인한 질병발생이 확인되었다.³⁴

본 연구는 국내 분리 EMC 바이러스의 성상을 규명하고 유전자 cloning 및 유전자를 이용한 진단에의 활용을 도모하고자 하였다.

*Picornaviridae*과는 *enterovirus*, *cardiovirus*, *rhinovirus*와 *phthuvirus*의 4개 genus로 나뉘며, EMC 바이러스는 *cardiovirus*에 속한다. *Picornaviridae*과에 속하는 바이러스는 protein shell 내에는 single stranded positive sense의 RNA genome이 존재하며, capsid는 6종의 subunit로 구성되어 있는 서로 다른 4종의 polypeptide로 구성되어 있다.⁵³

일반적으로 바이러스에 대한 감수성 세포는 바이러스 단백질 합성에 요구되는 에너지와 전구체를 공급하며 바이러스의 receptor, virion assembly에 필요한 세포막과 viral RNA 합성에 필수적인 인자들을 제공한다. *Picornaviridae*과의 바이러스는 permissive 세포의 세포질에서 증식 함으로 바이러스 genome 합성에 작용하는 효소는 바이러스를 자체 생산하며⁵⁴, cytopathic effect(CPE)는 phospholipase와 같은 lyosomal enzyme의 재분배에 의하여 배개한다.⁵⁵ 바이러스가 세포에 침입하면 감염 세포는 1시간 이내에 염색질의 margination을 일으키며⁵⁷, 세포 RNA, DNA 및 단백질의 합성이 감소하기 시작한다.⁵⁸ *Cardiovirus*에서는 histon의 조성이 달라지고 감염 말기에는 바이러스 입자가 세포질에서 발견되기도 한다.⁵⁹

*Picornaviridae*과 바이러스는 일반적으로 세포에 대한 용해성 감염을 취한다고 알려져 있으나 EMC virus는 마우스⁶⁰, Chinese hamster ovary 세포⁶¹에서 지속적인 감염을 유발하기도 한다는 보고가 있다.

Dea 등³¹은 캐나다에서 분리한 EMC 바이러스를 continuous monkey kidney(Vero), baby hamster kidney(BHK-21), porcine kidney(PK-15), porcine Fallopian tube(P-

FT) 및 swine testicle (ST) 세포에 감염하여 세포구형화와 핵농축 등의 CPE 소견을 보았으나 국내에서 분리한 EMC 바이러스 K3주를 baby hamster kidney(BHK-21) 세포 및 hamster lung(HmLu) 세포에서 배양한 결과 36~48시간 이내에 세포 구형화와 핵농축으로 인한 전형적인 EMC 바이러스 배양에서 나타나는 CPE를 나타내어 Dea 등³¹의 성적과 유사하였다.

EMC 바이러스를 cesium chloride를 이용한 초원심 분리법으로 정제하면 2~3개의 바이러스 분획으로 분리되며⁴⁷, virion의 buoyant density는 1.34, shell의 buoyant density는 1.30으로 알려져 있다.⁶² 또한 HA activity는 potassium과 boron ion의 영향을 받으며²¹, 적혈구에 대한 바이러스의 attachment는 적혈구의 receptor 수에 관계한다.⁶³ 사람 적혈구의 EMC 바이러스에 대한 receptor는 major erythrocyte sialoglycoprotein인 glycophorin으로 알려져 있다.⁶⁴

EMC virus K3주를 cesium chloride를 이용한 초원심 분리한 결과 2개의 바이러스 분획으로 구분되었으며 시니피 적혈구에 대한 적혈구 응집(HA) 반응을 실시한 결과 2개의 분획은 2,048배의 높은 HA가를 나타내어 바이러스 함유 분획임을 알 수 있었다.

○ 결과는 상층부에 형성된 분획의 buoyant density는 1.36g/ml로서 empty particle 또는 세포단백질과 일부 결합되어 있는 바이러스로 추정되며 하층분획의 buoyant density 1.35를 나타낸 것은 EMC virion으로 사료된다. 이 결과는 Dae 등³¹이 보고한 buoyant density 1.30~1.30g/ml의 성적과 일치하였다.

*Cardiovirus*를 포함하는 *Picornaviridae*과의 capsid protein은 VP₁, VP₂, VP₃ 및 VP₄의 4종의 polypeptide chain으로 조성되어 있으며, EMC 바이러스의 각 해당 capsid protein은 31.7, 29.0, 25.1 및 7.2Kd의 4 가지의 polypeptide chain으로 조성되어 있다.⁶⁵ 이를 polypeptide chain은 “mature” protomer라고 하는 동일한 4 가지의 segmented protein subunit의 구성요소가 되며,⁶⁶ protomer는 oligomeric protein의 가장 작은 동일 subunit이다.⁶⁷

SDS-PAGE로 전개하고 western immunoblotting으로 확인한 EMC K3주의 polypeptide는 분자량이 약 26, 32, 34 Kd으로서 Kim 등²⁴이 미국에서 분리한 EMC 주에 대한 성적 26, 32, 34Kd과는 일치하였으나 Dea 등³¹이 캐나다에서 분리한 EMC 주의 25.5, 29, 32, 39Kd과는 차이가 있었다. Kim 등²⁴은 이와 같은 차이가 polypeptide의 분자량이 적을 경우 감도 낮은 염색상에 기인하거나 바이러스 정제과정에서 손실되었기 때문이라고 하였으나 Dea 등³¹의 캐나다 EMC 주와 국내 분리 EMC K3주는 polypeptide 구성이 원천적으로 다르거나 분자

량이 큰 것은 glycosylation이 변성되어 약간 작은 분획으로 전기영동상에 나타날 수 있는 가능성을 생각할 수 있다.

바이러스에 대한 항체를 검출하는 혈청학적 방법에는 여러 가지가 있다. 바이러스 활성을 억제하는 항체의 능력을 측정하는 neutralization test와 hemagglutination inhibition test는 널리 사용하고 있으나 바이러스 표면에 존재하는 항원에 대한 항체만을 측정할 수 있다는 단점이 있어 민감하지 못한 방법이라 할 수 있다. 그러므로 근래에 항원과 항체의 반응이 민감한 radioimmunoassay (RIA), western immunoblotting, immunofluorescence test를 이용하고 있다.⁶⁸

SDS-PAGE로 분획된 EMC K3주 의 polypeptide에 대한 EMC 항체를 western immunoblotting으로 측정한 결과 마우스 및 돼지 antiserum에 대하여는 polypeptide 분획 모두 항원·항체 양성반응을 나타내었다. 마우스 antiserum에는 모든 분획이 강한 양성반응으로 나타났으나 돼지 antiserum에는 26Kd의 분획이 매우 미약하게 반응하였다. 돼지 antiserum에서 미약하게 반응한 것은 야외에서 중화항체법으로 검사한 양성혈청으로서 항체가 낮은 것으로 추정되며 마우스 antiserum은 EMC 바이러스를 마우스에 감염하여 인공면역시켜 제조한 hyperimmune serum으로서 항체가가 높았기 때문이라고 생각한다.

세포로부터 RNA를 분리하는 방법에는 여러 가지가 있으나 최근에는 protein denaturant인 guanidium thiocyanate를 이용한 분리법을 널리 사용하고 있다. EMC K3주로부터 acid-guanidium 법으로 정제한 viral RNA를 formaldehyde gel electrophoresis로 확인한 결과 7.7Kb의 크기로서 Jordan 등⁶⁹이 methylmercuric hydroxide gel electrophoresis를 실시하여 보고한 EMC B주 및 EMC D주의 viral RNA 크기인 7.7Kb와 일치하였다.

reverse transcriptase의 발견⁷⁰으로 RNA를 genome으로 갖고 있는 바이러스는 RNA에 상보적인 DNA의 합성이 가능함으로써 이들 바이러스 genome의 분석, 염기배열결정 등 유전공학적 연구가 진전되어 유전자 진단이나 recombinant 또는 subunit vaccine 등의 개발이 가능할 것이다.

결 론

본 연구는 국내에서 분리한 encephalomyocarditis(EMC) 바이러스의 성상을 조사할 목적으로 EMC 바이러스의 CPE, buoyant density, polypeptide profile 및 viral RNA의 크기를 조사한 결과 CPE의 출현은 바이러스 접종후 30~48시간에 구형화, 핵농축 및 피사소견으로

나타났고 buoyant density는 1.30 및 1.35g/ml, viral protein은 3종의 polypeptide로서 크기는 각 26Kd, 32Kd, 34Kd, viral RNA의 크기는 7.7Kb으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. Putnak JR, Phillips BA. Picornaviral structure and assembly. *Microbiol Rev* 1981 ; 45 : 287~315.
2. Craighead JE. Some properties of the encephalomyocarditis, Columbia SK and mengo viruses. *Proc Soc Exp Bio Med* 1965 ; 119 : 408~412.
3. Craighead JE. The role of viruses in the pathogenesis of pancreatic disease and diabetes mellitus. *Prog Med Virol* 1975 ; 19 : 161~214.
4. Vizoso AD, Vizoso MR, Hay R. Isolation of a virus resembling encephalomyocarditis from red squirrels. *Nature* 1960 ; 201 : 849~850.
5. Simpson CF, Lewis AL, Gashkin JM. Encephalomyocarditis virus infection of captive elephants. *J Amer Vet Med Assoc* 1977 ; 171 : 902~905.
6. Gainer JH. Encephalomyocarditis virus infections in Florida, 1960 ~ 1966. *J Amer Vet Med Assoc* 1967 ; 151 : 421~425.
7. Gaskin JM, Jorge MA, Simpson CF. The tragedy of encephalomyocarditis virus infection in zoological parks of Florida. *Amer Assoc Zoo Vet Ann Proc* 1980 ; 1~7.
8. Helwing FC, Schmidt EGH. A filter-passing agent producing interstitial myocarditis in anthropoid apes and small animals. *Science* 1945 ; 102 : 31~33.
9. Roca-Garcia M, Sanmartin-Barberi C. The isolation of encephalomyocarditis virus from Aotus monkeys. *Amer J Trop Med Hyg* 1957 ; 6 : 840~852.
10. Jonkers AH. Serosurvey of encephalomyocarditis virus neutralizing antibodies in southern Louisiana and Peruvian Indian populations. *Amer J Trop Med Hyg* 1961 ; 10 : 593~599.
11. Tesh RB. The prevalence of encephalomyocarditis virus neutralizing antibodies among various human populations. *Amer J Trop Med Hyg* 1978 ; 27 : 144~149.
12. Craighead JE. Pathogenicity of the M and E variants of the encephalomyocarditis (EMC) virus. I. Myocardiotropic and neurotropic properties. *Am J Pathol* 1966 ; 48 : 333~342.
13. Craighead JE, McLane MF. Diabetes mellitus : In-

- duction in mice by encephalomyocarditis virus. *Science* 1968 ; 162 : 913~914.
14. Yoon JW, Notkins AL. Virus-induced diabetes in mice. *Metabolism* 1983 ; 32(Suppl) : 37~40.
 15. Yoon JW, Onodera T, Notkins AL. Virus-induced diabetes mellitus : VII. Passage of encephalomyocarditis virus and severity of diabetes in susceptible and resistant strains of mice. *J Gen Virol* 1977 ; 37 : 225~232.
 16. Yoon JW, McClintock PR, Onodera T, et al. Virus-induced diabetes mellitus. X VIII. Inhibition by a nondiabetogenic variant of encephalomyocarditis virus. *J Exp Med* 1980 ; 152 : 878~892.
 17. Andrewes C, Pereira HG, Wildy P. Viruses of vertebrates. 4th ed. Bailliere Tindall, London, 1978 ; 17 ~19.
 18. Murnane TG, Mondragon H, Shelokov A. Fatal disease of swine due to encephalomyocarditis virus. *Science* 1960 ; 131 : 498~499.
 19. Acland HM, Littlejohns IR. Encephalomyocarditis virus infection of pigs. 1. An outbreak in New South Wales. *Aust Vet J* 1975 ; 51 : 409~415.
 20. Littlejohns IR, Acland HM. Encephalomyocarditis virus infection of pigs. 2. Experimental disease. *Aust Vet J* 1975 ; 51 : 416~422.
 21. Littlejohns IR. Encephalomyocarditis virus from stillborn pigs. *Aust Vet J* 1984 ; 61 : 93.
 22. Joo HS, Kim HS, Leman AD. Detection of antibody to encephalomyocarditis virus in mummified or stillborn pigs. *Arch Virol* 1988 ; 100 : 131~134.
 23. Kim HS, Christianson WT, Joo HS. Pathogenic properties of encephalomyocarditis virus isolates in swine fetuses. *Arch Virol* 1989 ; 109 : 51~57.
 24. Kim HS, Christianson WT, Joo HS. Characterization of encephalomyocarditis virus isolated from aborted swine fetuses. *Am J Vet Res* 1991 ; 152 : 1649 ~1652.
 25. Links IJ, Whittington RJ, Kennedy DJ, et al. Association between encephalomyocarditis virus infection and reproductive failure in pigs. *Aust Vet J* 1986 ; 63 : 150~152.
 26. Love RJ, Grewel AS. Reproductive failure in pigs caused by encephalomyocarditis virus. *Aust Vet J* 1986 ; 63 : 128~129.
 27. Sanford SE, Derbyshire JB, Josephson GKA. Serological evidence of encephalomyocarditis virus in pigs in Ontario. *Can Vet J* 1985 ; 26 : 228.
 28. Sanford SE, Rehmtulla AJ, Josephson GKA. Encephalomyocarditis virus outbreak among suckling pigs. *Can Vet J* 1989 ; 30 : 178.
 29. Sanger DV, Rowlands DJ, Brown F. Encephalomyocarditis virus antibodies in sera from apparently normal pigs. *Vet Rec* 1977 ; 100 : 240~241.
 30. Horner GW, Hunter R. Experimental infection in pigs with encephalomyocarditis virus. *NZ Vet J* 1979 ; 27 : 202~203.
 31. Dea SA, Bilodeau R, Martineau GP. Isolation of encephalomyocarditis virus among stillborn and post-weaning pigs in Quebec. *Arch Virol* 1991 ; 117 : 121 ~128.
 32. Seaman JT, Boulton JG, Carrigan MJ. Encephalomyocarditis virus disease of pigs associated with a plaque of rodents. *Aus Vet J* 1986 ; 63 : 292~294.
 33. Park NY, Chung CY, Ri CY, et al. Encephalomyocarditis virus infection in pigs associated with reproductive failure. *Korean J Vet Res* 1990 ; 30 : 441 ~446.
 34. Ha YK, Yoon SM, Jung BT, et al. Isolation and cultivation of swine encephalomyocarditis virus. *Korean J Vet Res* 1991 ; 31 : 479~484.
 35. Kim HS, Joo HS, Bergeland ME. Serologic, virologic and histopathologic observations of encephalomyocarditis virus infection in mummified and stillborn pigs. *J Vet Diagn Invest* 1989 ; 1 : 101~104.
 36. Zimmerman JJ, Hill HT, Beran GW, et al. Serologic diagnosis of encephalomyocarditis virus infection in swine by the microtiter serum neutralization test. *J Vet Diagn Invest* 1990 ; 2 : 347~350.
 37. Zimmerman JJ, Owen WJ, Hill HT, et al. Seroprevalence of antibodies against encephalomyocarditis virus in swine of Iowa. *J Amer Vet Med Assoc* 1991 ; 199 : 1737~1741.
 38. Baltimore D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev* 1971 ; 35 : 235~241.
 39. Yogo Y, Wimmer E. Polyadenylic acid at the 3'-terminus of poliovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972 ; 69 : 1877~1882.
 40. Racaniello VR, Baltimore D. Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc Natl*

- Acad Sci USA* 1981 ; 78 : 4887~4891.
41. Kitamura N, Semler B, Rothberg PG, et al. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* 1981 ; 291 : 547 ~ 553.
 42. Black DN, Stephenson P, Rowlands DJ, et al. Sequence and location of the poly C tract in aphtho and cardiovirus RNA. *Nucleic Acids Res* 1979 ; 6 : 2381 ~ 2390.
 43. Rueckert RR, Pallansch MA. Preparation and characterization of encephalomyocarditis (EMC) virus. *Meth Enzymol* 1981 ; 78 : 315 ~ 325.
 44. Craighead JE, Shelokov A. Encephalomyocarditis virus hemagglutination inhibition test using antigens prepared in HeLa cell culture. *Proc Soc Exp Bio Med* 1961 ; 108 : 823 ~ 826.
 45. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 ; 227 : 680 ~ 685.
 46. Burnette WH. Western blotting : Electrophoretic transfer of proteins from SDS-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radio iodinated protein A. *Anal Biochem* 1981 ; 112 : 195 ~ 203.
 47. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987 ; 162 : 156 ~ 159.
 48. Christianson WT, Collins JE, Benfield DA, et al. Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. *Am J Vet Res* 1992 ; 53 : 485 ~ 488.
 49. Pol JMA, Van Dijk JE, Wensvoort G, et al. Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease synonym : porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS). *Vet Q* 1991 ; 137 ~ 143.
 50. Patron DJ, Brown IH, Edwards S. Blue ear disease of pigs. *Vet Rec* 1991 ; 128 : 617.
 51. Terpstra C, Wensvoort G, Pol JMA et al. Experimental reproduction of epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus : Koch's postulated fulfilled. *Vet Q* 1991 ; 13 : 131 ~ 136.
 52. Wensvoort G, Terpstra C, Pol JMA, et al. Mystery swine disease in the Netherlands : The isolation of Lelystad virus. *Vet Q* 1991 ; 13 : 121 ~ 130.
 53. Ahlquist P, Kaesberg P. Determination of the length distribution of poly(A) at the 3' terminus of the viroid RNAs of EMC virus, poliovirus, rhinovirus, RAV-61 and CPMV and of mouse globin mRNA. *Nucleic Acids Res* 1979 ; 7 : 1195 ~ 1204.
 54. Crocker TT, Pfleider E, Spendlove R. Poliovirus growth in non-nucleate cytoplasm. *Science* 1964 ; 145 : 401 ~ 403.
 55. Rice JM, Wolff DA. Phospholipase in the lysosomes of HEp-2 cells and its release during poliovirus infection. *Biochim Biophys Acta* 1975 ; 381 : 17 ~ 21.
 56. Wolff DA, Bubel HC. The disposition of lysosomal enzymes as related to specific viral cytopathic effects. *Virology* 1964 ; 24 : 502 ~ 505.
 57. Franklin RM, Baltimore D. Patterns of macromolecular synthesis in normal and virus-infected mammalian cells. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1962 ; 27 : 175 ~ 194.
 58. Bablanian R, Eggers HJ, Tamm I. Studies on the mechanism of polio virus-induced cell damage. II. The relation between poliovirus growth and virus induced morphological changes in cells. *Virology* 1965 ; 26 : 114 ~ 121.
 59. Holoubeck V, Crocker TT. Histones and RNA metabolism in EAT cells infected with Maus-Elberfeld virus. *Virology* 1971 ; 43 : 527 ~ 530.
 60. Cronin ME, Love LA, Miller FW, et al. The natural history of encephalomyocarditis virus-induced myositis and myocarditis in mice : Viral persistence demonstrated by in situ hybridization. *J Exp Med* 1988 ; 168 : 1639 ~ 1648.
 61. Taber R, Alexander V, Wald N. The selection of virus-resistant Chinese hamster ovary cells. *Cell* 1976 ; 8 : 529 ~ 533.
 62. Rueckert RR. Picornaviral architecture. In : Maromosch, K, and Kurstak, E. eds. Comparative virology. Orlando, Academic Press, 1971 : 255 ~ 306.
 63. Angel MA, Burness ATH. The attachment of encephalomyocarditis virus to erythrocytes from several animal species. *Virology* 1977 ; 83 : 428 ~ 432.
 64. Allaway GP, Burness ATH. Site of attachment of encephalomyocarditis virus on human erythrocytes. *J*

- Virol* 1986 ; 59 : 768~770.
65. Palmenberg AC, Kirby EM, Janda MR, et al. The nucleotide and deduced amino acid sequence of the encephalomyocarditis viral polyprotein coding region. *Nucleic Acid Res* 1984 ; 12 : 2969~2985.
 66. Rueckert RR, Dunker AK, Stoltzfus CM. The structure of Maus-Elberfeld virus : a model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969 ; 62 : 912~919.
 67. Monod J, Wyman J, Changeux J. On the nature of allosteric transitions : a plausible model. *J Mol Biol* 1965 ; 12 : 88~118.
 68. McIntosh K. Diagnostic virology. In : Fields, BN, and Knipe DM, eds. *Virology*. Raven Press 1990 ; 411~440.
 69. Jordan GW, Cohen SH, Dandekar S, et al. The genomic RNA of diabetogenic encephalomyocarditis virus : Characterization and molecular cloning. *Virol* 1987 ; 120~125.
 70. Temin HM, Baltimore D. RNA-directed DNA synthesis and RNA tumor viruses. *Adv Virus Research* 1972 ; 17 : 129~186.
-