

소 코로나바이러스에 대한 단클론항체 생산과 특성

안재문·강신영*

충청북도 농축산사업소 북부지소
충북대학교 수의과대학*
(1998년 5월 4일 접수)

Production and characterization of monoclonal antibody against bovine coronavirus

Jae-moon Ahn, Shien-young Kang*

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

(Received May 4, 1998)

Abstract : Eight monoclonal antibodies(MAbs) against bovine coronavirus(BCV) were produced and characterized. Three MAbs(1G9, 4H12, 5C1) specific to the S glycoprotein and two HE glycoprotein-specific MAbs(2A5, 5G4) were found to neutralize the BCV in fluorescence focus neutralization(FFN) test. Two HE-specific MAbs from the neutralizing MAbs inhibited the hemagglutinating activity of the BCV. None of the N protein-specific MAbs(1C1, 5A12, 6H1) neutralized the virus infectivity. Bovine coronavirus and mouse hepatitis virus, which belong to group II coronaviruses, were differentiated from other groups of coronaviruses(porcine transmissible gastroenteritis virus, porcine epidemic diarrhea virus, canine coronavirus) by all MAbs in fluorescence antibody test(FA), but not in FFN test.

Key words : bovine coronavirus, monoclonal antibody.

서론

소 코로나바이러스는 생후 3~30일령의 송아지에서 소장에 심한 장염을 일으켜 설사를 일으키고 탈수와 산성

증으로 때로는 폐사를 일으킨다^{1,4}. 또한 장세포와 호흡기 상피세포에서 증식을 하여 장관에서 뿐 아니라 상부 호흡기도의 감염을 일으키는 것으로 알려져 있다⁵⁻⁸. 소 코로나바이러스는 겨울철에 일어나는 소의 설사증인 Winter dysentery(WD)에서도 분리되었으며 이 바이러스

Address reprint requests to Dr. Shien-young Kang, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Korea, 361-763.

는 소 코로나바이러스 Mebus strain과 형태학적 및 항원적으로 비슷한 것으로 보고되었다⁹.

소 코로나바이러스는 구형의 피막을 가진 바이러스로서 크기는 80~160nm이며¹⁰⁻¹², positive polarity를 가지는 single-stranded RNA genome을 가지고 있다¹³. 이들은 지질막 속에 뿌리를 내린 20~25nm 정도 크기의 곤봉모양의 peplomer(spike glycoprotein)를 가지고 있으며 또한 hemagglutinin(HE)으로 생각되는 작은 표면돌기를 가지고 있다¹⁰. 이들 두 단백질은 중화항체의 생산에 관여하며¹⁴ 세포표면의 receptor와 반응한다¹⁵. 소 코로나바이러스를 구성하는 주요한 구조단백질로서는 spike glycoprotein(S; 150~200kDa), membrane glycoprotein(M; 20~30kDa), nucleocapsid phosphoprotein(N; 43~50kDa), hemagglutinin(HE; 60~65kDa) 등 4가지로 구성되어 있다^{13,16}. S glycoprotein에는 A~D까지 4가지의 항원부위가 있는데 중화와 관련된 determinant는 주로 A-B domain에 국한되어 있다¹³. 소 코로나바이러스는 mouse hepatitis virus(MHV), transmissible gastroenteritis virus(TGEV), infectious bronchitis virus(IVB)와 같이 S protein이 S1과 S2 두 개의 subunit로 나뉘어지는데 S1은 type-specific한 중화항체의 생산과 관계가 있으며, S2는 두 개의 긴 α -helix로 이루어졌는데 group-specific한 중화항체의 생산과 관계가 있으며 감염시 membrane fusion에 관여하는 것으로 알려져 있다^{17,18}. HE protein은 2개의 65k unit가 결합된 dimer로서¹⁸ 중화와 혈구응집에 관계되는 단백질인데 이것에 대한 단크론항체는 송아지에서 코로나바이러스 감염을 방어하였으며¹⁹ influenza C virus의 HE protein과 아미노산 배열이나 결합 및 효소작용 등에서 비슷한 것으로 나타났다¹⁸. HE protein은 receptor와 결합할 수 있는 능력을 가지며 또한 acetylcholinesterase의 작용에 의해 receptor를 파괴하는 능력을 가지는데 이것은 바이러스의 세포내 침입에 필수적인 요건이 된다²⁰. N protein은 virus의 RNA와 결합하여 helical nucleocapsid의 구조적 기초가 되며 세포성 면역에 관여하는 것으로 알려졌다¹³. M protein은 membrane을 구성하는 성분인데 M gene의 sequence 분석결과 소 코로나바이러스, mouse hepatitis virus, human coronavirus OC 43은 모두 동일한 것으로 나타났다²¹.

코로나바이러스는 5개의 항원그룹으로 나뉘어지는데 소 코로나바이러스는 MHV, hemagglutinating encephalomyelitis virus(HEV)와 함께 group II에 속하며^{9,13,21,22} strain 간에 약간의 항원성이나 생물학적 특성의 차이가 있지

만 하나의 혈청형으로 구성된다^{12,13}. 소 코로나바이러스는 장관이나 호흡기 상피세포와 같은 점막에서 증식을 하여 혈중항체와 함께 국소항체의 생산을 유도하는데 점막표면에 존재하는 소 코로나바이러스의 구조단백질 중 일부 또는 전체에 대한 IgA는 바이러스의 재감염을 방어하는데 매우 중요한 역할을 한다⁶. 그리고 초유 중에 존재하는 S와 HE glycoprotein에 대한 IgG와 IgA는 송아지의 능동면역반응에 영향을 주어 이들 단백질에 대한 항체의 형성을 저하시킨다¹⁵.

이 실험에서는 소 코로나바이러스에 대한 단크론항체를 생산하여 Western blotting에 의해 단백질 특성을 조사하고 이들의 특성을 fluorescence antibody test(FA)와 fluorescence focus neutralization test(FFN)에 의하여 조사하였다.

재료 및 방법

바이러스 : 수의과학연구소에서 분양받은 소 코로나바이러스 표준주(Kakegawa strain)를 단크론항체 생산에 사용하였다. 바이러스의 배양은 Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cell을 사용하였으며, Eagle's minimum essential medium(EMEM)에 10% 소 태아혈청과 겐타마이신(40 μ g/ml)을 첨가하여 배양하였다. 바이러스는 MDBK cell에 감염시켜 2~3일후 세포변성이 나타나면 얼리고 녹이는 과정을 3회 반복하여 세포내 바이러스를 유리시켰다. 이것을 4,500rpm에서 30분 원심하여 세포를 제거하고 상층액을 serum free medium(SFM)으로 polyethylene glycol(PEG)과 NaCl이 각각 8%와 0.5M이 되도록 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 진탕하였다. 이것을 다시 8,000rpm에서 2시간 원심하여 상층액은 버리고 바이러스 pellet을 PBS로 2.0ml가 되도록 만들었으며 이것을 반투막에 넣고 PBS로 4 $^{\circ}$ C에서 진탕하며 투석하였다. 다른 그룹의 코로나바이러스로 mouse hepatitis virus(MHV)는 충북대학교 수의과대학에서 분양받았으며, 돼지 전염성 위장염 바이러스(TGEV)는 병원성이 약한 Purdue strain으로서 중앙가축전염병연구소에서 분양받아 사용하였다. 개 코로나바이러스(CCV), 돼지 유행성 설사증 바이러스(PEDV)는 충북대학교 수의과대학에서 분양받았으며, 소 로타바이러스는 야외에서 로타바이러스에 감염된 송아지에서 분리한 A strain(G6)을 MA104 cell을 사용하여 배양하였다. 소 바이러스성 설사증 바이러스(BVDV)

는 수의과학연구소에서 분양받아 사용하였다.

단클론항체 생산 : Kohler와 Milstein의 방법²³과 Saif *et al*²⁴의 방법을 응용하여 세포융합을 실시하였다. 6주령 된 암컷 BALB/c 마우스에 앞에서 만든 바이러스를 Freund's complete adjuvant와 동량으로 섞어서 마우스 복강내로 0.4ml씩 1차 접종하였다. 2차와 3차 접종은 Freund's incomplete adjuvant와 섞어서 접종하였으며, 3차 접종 후 마우스의 미정맥으로부터 채혈하여 코로나바이러스에 대한 혈청역가를 FA법으로 검사하여 1:5,000배 이상의 역가를 나타내는 것을 대상으로 융합전 마지막으로 바이러스를 0.2ml 정맥주사하였다. 정맥주사 후 3일째에 마우스의 비장을 무균적으로 채취하여 비장세포를 모아 SFM으로 3회 세척하였다. 여기에 미리 준비한 SP2/0 myeloma cell과 1:5로 혼합하여 1회 원심세척한 다음 50% PEG/DMSO를 1ml 점적하여 세포를 융합시켰다. 이 세포들은 원심하여 pellet을 hypoxanthine, aminopterin, thymidine(HAT)가 첨가된 배지로 부유시켜 96-well microplate에 well당 200µl씩 분주하여 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 5일째되는 날부터 2일간격으로 배지를 100µl씩 교체하였으며, 세포융합 10일 후 세포의 성장이 양호한 것을 대상으로 코로나바이러스에 대한 항체 생산 여부를 FA법으로 검사하여 양성을 나타내는 것을 선발하였다. 이들 양성 hybridoma는 limiting dilution 법으로 3회 이상 cloning을 실시하여 single clone을 선발하였다. 선발된 항체생산 hybridoma는 pristane(2,6,10,14-tetramethylpentadecane)으로 미리 잠작시킨 BALB/c 마우스에 접종하여 복수를 형성시킨 다음 채취하여 -20℃에 보관하며 단클론항체의 특성조사에 사용하였다.

단클론항체의 Isotyping : 생산된 단클론항체의 isotype은 monoclonal antibody isotyping kit(Sigma)를 사용하여 제조회사의 술식에 따라 수행하였다. 즉, 먼저 각각의 isotype이 coating 된 strip을 시험관에 넣고 생산된 단클론항체를 200배 희석하여 30분간 반응시켰다. 다음에 PBS-tween으로 한번 세척하고 mouse immunoglobulin에 대한 biotinylated antibody와 5분간 반응시킨 다음 다시 PBS-tween으로 세번 세척하고 Extravidin peroxidase가 conjugate 된 anti-mouse IgG(Fab specific)를 반응시켰다. 다시 PBS-tween으로 한번 세척하고 substrate chromogen(3-amino-9-ethyl-carbazole in N,N-dimethyl formamide)과 2% hydrogen peroxide를 넣어 발색시켰다.

바이러스 단백질이성 조사 : 생산된 단클론항체의 코

로나바이러스 단백질이성을 조사하기 위하여 Western blotting을 실시하였다. 즉, 정제된 코로나바이러스를 sample buffer와 동량으로 섞어 100℃에서 90초간 처리한 후 12% SDS-polyacrylamide slab gel에서 80mA로 4시간정도 전기영동한 다음 gel을 꺼내어 transfer buffer로 평형시킨 후 semi-dry transfer cell(Biorad)을 이용하여 nitrocellulose paper에 15V에서 1시간동안 전이시켰다. 이 nitrocellulose paper를 3% bovine serum albumin(BSA)으로 실온에서 2시간 blocking하고 1:1,000으로 희석된 단클론항체 복수를 실온에서 45분간 반응시킨 다음 Tris-tween-buffered saline으로 3회 세척하였다. 세척 후 1:1,000으로 희석한 peroxidase가 conjugate 된 anti-mouse immunoglobulin IgG를 실온에서 45분간 반응시킨 후 발색제(BCIP/NBT; 5-bromo-4-choloro-3-indolyl-phosphate, nitroblue tetrazolium)로 반응하여 관찰하였다.

단클론항체의 역가조사 : 생산된 단클론항체의 역가는 FA(fluorescence antibody)법과 FFN(fluorescence focus neutralization)법으로 검사하였다. FA법은 MDBK cell이 단층배양된 96-well microplate에 코로나바이러스를 접종하여 1시간 배양하고 80% acetone으로 고정시켰다. 단클론항체를 희석배수별로 100µl씩 well에 넣고 37℃에서 1시간 반응시킨 다음, PBS로 3회 세척하였다. 다음에 FITC-conjugated anti-mouse IgG를 100µl씩 넣고 37℃에서 1시간 반응시킨 다음, PBS로 세척하여 glycerol buffer를 넣고 형광현미경으로 검사하였다. FFN 법은 먼저 희석된 단클론항체와 코로나바이러스(100TCID₅₀/ml)를 섞어서 37℃에서 1시간 반응시킨 후 단층배양된 MDBK cell에 100µl씩 접종하였다. 37℃에서 18시간 배양시킨 다음, 80% acetone으로 고정시키고 PBS로 3회 세척한 다음, 코로나바이러스 단클론항체를 100µl씩 각 well에 넣고 37℃에서 1시간 반응시켰다. 다음에 FITC-conjugated anti-mouse IgG를 100µl씩 넣고 37℃에서 1시간 반응시킨 다음, PBS로 세척하여 glycerol buffer를 넣고 형광현미경으로 검사하였다. 음성대조로 SP2/0 myeloma cell을 BALB/c 마우스에 접종하여 만든 복수를 사용하였으며, 음성대조군에 비하여 80% 이상의 형광이 감소된 well을 양성으로 판정하였다.

혈구응집억제시험 : 96-well microplate에 PBS를 50µl씩 넣은 다음, 단클론항체를 0.2% bovine serum albumin (BSA)이 함유된 PBS로 2진 희석하여 8HA unit의 코로나 바이러스를 희석된 각 well에 50µl씩 넣고 실온에서 30분

간 반응시켰다. 다음에 1% mouse erythrocyte를 각 well에 50μ씩 넣고 4℃에서 2시간 반응시킨 다음 혈구응집억제 여부를 조사하였다.

결 과

소 코로나바이러스에 면역된 BALB/c 마우스의 비장 세포와 SP2/0 myeloma cell의 융합결과 모두 62개의 hybridoma가 만들어졌는데 FA로 screening한 결과 25개의 양성 clone을 얻었다. 이것을 limiting dilution법으로 cloning하는 과정에서 세포의 상태와 성장율이 양호한 것

8개(1C1, 1G9, 2A5, 4H12, 5A12, 5C1, 5G4, 6H1)를 선발 하였다. 이들의 isotype은 IgG1(1C1, 2A5, 5A12, 5C1, 5G4, 6H1)과 IgG2a(1G9, 4H12)의 두가지 였으며, Western blotting 결과 이들의 단백질특이성은 S protein(1G9, 4H12, 5C1), HE protein(2A5, 5G4), N protein(1C1, 5A12, 6H1)에 특이적인 것으로 나타났다. FFN test에서 양성을 나타내어 중화력을 가지는 것은 모두 5개(1G9, 2A5, 4H12, 5C1, 5G4)였으며, 나머지 3개(1C1, 5A12, 6H1)는 중화력을 가지지 않았다. 중화력을 가지는 것중 HE glycoprotein에 대한 단크론항체 2개(2A5, 5G4)는 10,240배 까지 혈구응집을 억제하였다(Table 1).

Table 1. Characterization of monoclonal antibodies(MAbs) against bovine coronavirus(Kakegawa strain) by isotype, protein specificity and activity

MAbs	Isotype	Protein specificity*	Antibody titers by**		
			FFN	FA	HI
1C1	IgG1	N	< 10	5,120	< 10
1G9	IgG2a	S	20,480	20,480	< 10
2A5	IgG1	HE	20,480	20,480	10,240
4H12	IgG2a	S	10,240	10,240	< 10
5A12	IgG1	N	< 10	5,120	< 10
5C1	IgG1	S	20,480	20,480	< 10
5G4	IgG1	HE	20,480	20,480	10,240
6H1	IgG1	N	< 10	10,240	< 10

* N : nucleocapsid, S : spike, HE : hemagglutinin

**FFN : fluorescence focus neutralization, FA : fluorescence antibody test, HI : hemagglutination inhibition test.

Table 2. Reactivity patterns of monoclonal antibodies(MAbs) with other enteric viruses by fluorescence antibody(FA) test

MAbs	Coronaviruses*					BRV**	BVDV***
	BCV	MHV	TGEV	CCV	PEDV		
1C1	+	+	-	-	-	-	-
1G9	+	+	-	-	-	-	-
2A5	+	+	-	-	-	-	-
4H12	+	+	-	-	-	-	-
5A12	+	+	-	-	-	-	-
5C1	+	+	-	-	-	-	-
5G4	+	+	-	-	-	-	-
6H1	+	+	-	-	-	-	-

* BCV : bovine coronavirus, MHV : mouse hepatitis virus, TGEV : transmissible gastroenteritis virus, CCV : canine coronavirus, PEDV : porcine epidemic diarrhea virus.

** BRV : bovine rotavirus, *** BVDV : bovine viral diarrhea virus.

Table 3. Reactivity patterns of monoclonal antibodies(MAbs) with other enteric viruses by fluorescence focus neutralization(FFN) test

MAbs	Coronavirus*					BRV**	BVDV***
	BCV	MHV	TGEV	CCV	PEDV		
1G9	+	-	-	-	-	-	-
2A5	+	-	-	-	-	-	-
4H12	+	-	-	-	-	-	-
5C1	+	-	-	-	-	-	-
5G4	+	-	-	-	-	-	-

* BCV : bovine coronavirus, MHV : mouse hepatitis virus, TGEV : transmissible gastroenteritis virus, CCV : canine coronavirus, PEDV : porcine epidemic diarrhea virus.

** BRV : bovine rotavirus, *** BVDV : bovine viral diarrhea virus.

단크론항체의 특성조사를 위하여 다른 코로나바이러스와 장관내 병원성이 있는 바이러스와의 반응을 FA 및 FFN법으로 조사하였다. 모든 단크론항체(1C1, 1G9, 2A5, 4H12, 5A12, 5C1, 5G4, 6H1)는 FA법에서 소 코로나바이러스와 반응하였으며, 소 코로나바이러스와 같은 그룹에 속하는 mouse hepatitis virus(MHV)와도 특이적으로 반응하였다. 그러나 다른 코로나바이러스 그룹에 속하는 돼지 전염성 위장염 바이러스(TGEV), 개 코로나바이러스(CCV), 돼지 유행성 설사증 바이러스(PEDV)와는 반응하지 않았으며, 소 로타바이러스(BRV), 소 바이러스성 설사증 바이러스(BVDV)와도 반응하지 않았다(Table 2). 소 코로나바이러스에 대하여 중화력을 가지는 단크론항체(1G9, 2A5, 4H12, 5C1, 5G4)로 FFN test에 의해 특성을 조사한 결과 이들 단크론항체는 소 코로나바이러스와 반응하였으나 다른 코로나바이러스와 소에서 설사증을 일으키는 BVDV와 BRV와는 반응하지 않았다(Table 3).

고 찰

소 코로나바이러스에 대한 단크론항체는 여러 연구자들이 각각의 분리주를 사용하여 생산하였으며 이를 이용하여 코로나바이러스의 구조단백에 대한 특성을 조사하고 중화력이 있는 단크론항체를 이용하여 *in vivo*에서의 방어효과 등을 조사하였다. Clark *et al*²⁵은 소 코로나바이러스 S2 분리주로 8개의 단크론항체를 만들어 간접형광항체법, 중화시험, 혈구응집억제시험으로 특성을 조사하였는데 이중 5개는 위의 세가지 방법으로 검사한 결

과 모두 양성을 나타내었으나 Western blot에서 단백질과 결합에 실패하였다. 나머지 3개는 간접형광항체 검사에만 양성을 나타내었고 Western blot에서 52K nucleocapsid protein과 결합하였다. 그리고 이들 단크론항체는 간접형광항체법에서 감염세포내의 분포상황에서 다른 양상을 나타내었지만 이 단크론 항체를 이용한 다른 소 코로나바이러스 분리주의 간접형광항체법과 혈구응집시험에서 strain간의 차이는 매우 적게 나타났다.

Deregt *et al*¹⁹은 소 코로나바이러스 Quebec 분리주를 이용하여 6개의 단크론항체를 만들어 중화능력이 있는 E2(S)와 E3(HE) glycoprotein에 대한 단크론항체를 *in vivo*에서 바이러스 중화시험을 하였는데 이중 4개는 villi의 atrophy를 방지하여 코로나바이러스에 대하여 방어할 수 있는 것으로 나타났으며 이들은 antigenic domain A에 specific하였다. 그러나 antigenic domain B와 C에 특이적인 단크론항체는 이와 반대로 방어력이 없었다^{19,26}. Hussain *et al*¹⁶은 소 코로나바이러스 Mebus strain(BCV-L9)을 이용하여 단크론항체를 만들었는데 gp100/S에 대한 단크론항체는 Western blot에서 mild condition에서는 반응하였으나 denaturing condition에서는 반응하지 않아 epitope가 불연속인 것으로 나타났으며, 이들은 소 코로나바이러스의 감염성을 중화시켰다. 반면에 p53/N에 대한 단크론항체는 Western blot에서 mild condition과 denaturing condition의 두가지 조건에서 모두 반응하여 epitope가 연속적인 것으로 나타났다. 그러나 이들은 소 코로나바이러스의 감염성을 중화시키지 못하였다. El-Ghorri *et al*²⁷은 송아지 설사변에서 분리된 소 코로나바

이러스를 polyclonal serum과 단크론항체로 간접형광항체법, 혈구응집억제시험, 중화시험을 한 결과 human coronavirus는 strain간에 구별이 가능하였으나 소 코로나바이러스는 결과가 비슷하게 나타나 strain의 구별을 할 수 없다고 하였다.

본 실험에서 만들어진 단크론항체 8개중 S와 HE glycoprotein에 특이적인 5개의 단크론항체는 중화력을 나타내어 Deregt *et al*¹⁴의 E2와 E3에 대한 단크론항체 및 Hussain *et al*¹⁶의 gp100/S에 대한 단크론항체와 비슷한 것으로 생각되며, 나머지 N protein에 대한 3개의 단크론항체는 Hussain *et al*¹⁶의 p53/N에 대한 단크론항체와 비슷한 것으로 생각된다. Vautherot *et al*¹⁸은 S1에 대한 단크론항체는 강한 중화능력을 나타내지만 S2에 대한 단크론항체는 중화능력이 없다고 하였는데 이번에 만들어진 S glycoprotein에 대한 단크론항체 3개(1G9, 4H12, 5C1)는 모두 중화능력을 나타내어 S1에 대한 단크론항체로 추정된다. 이러한 결과는 중화에 관계된 중요한 epitope가 mouse hepatitis virus(MHV), transmissible gastroenteritis virus(TGEV), infectious bronchitis virus(IBV) 등의 코로나바이러스 S molecule의 S1에 존재한다는 것¹⁸과 일치한다.

Storz *et al*²⁰은 소 코로나바이러스의 S와 HE glycoprotein에 대한 단크론항체로 혈구응집 억제시험을 하였는데 S glycoprotein에 대한 단크론항체는 receptor-destroying enzyme(RDE)를 억제하지 못하여 HI 역가가 1:16에서 1:128을 나타냈으나 HE glycoprotein에 대한 단크론항체는 1:65,000 이상의 배수에서 혈구응집을 억제하였다고 보고하였다. 이 실험에서도 HE에 대한 2개의 단크론항체(2A5, 5G4)는 1:10,240 배에서 혈구응집을 억제하였고 S protein에 대한 단크론항체는 HI 역가가 나타나지 않아 Storz *et al*²⁰의 결과와 비슷하게 나타났다.

Vautherot *et al*¹⁸은 소 코로나바이러스 G110 분리주에 대하여 S1과 S2 그리고 HE protein에 대한 단크론항체를 생산하여 S1과 HE protein에 중화에 관련된 determinant가 존재한다고 하였으며, 이중 S1이 가장 높은 중화능력을 가지는 단크론항체의 생산에 관여한다고 하였다. 또한 이들은 소 코로나바이러스의 HE protein에 대한 단크론항체는 acetylerase의 작용을 억제하는 것을 발견하였는데 다른 바이러스의 receptor 파괴효소(RDE)인 influenza A virus의 neuraminidase와 New castle disease virus(NDV)의 hemagglutinin-neuraminidase에 대한 단크론항체도 마찬가지로

지로 RDE의 작용을 억제하여 이것에 대한 기전은 acetylerase가 효소활동부위 근처에서 작용하기 때문인 것으로 생각된다고 하였다. 이번 실험에서 2A5, 5G5 두개의 단크론항체가 혈구응집을 억제한 것은 이들의 단특이성이 HE protein에 대한 것으로서 소 코로나바이러스의 HE protein에 대한 억제작용을 나타냈기 때문일 것이라고 생각된다. Vautherot *et al*¹⁸은 acetylerase를 억제하는 단크론항체 3개 모두 중화시험과 혈구응집억제시험에서 다른 양상으로 나타났다고 하였지만 Parker *et al*²⁸은 4개의 acetylerase에 대한 단크론항체가 모두 동일한 양상으로 나타났다고 하였다. 이 실험에서 만들어진 2개의 단크론항체는 모두 중화시험, 혈구응집억제시험, 형광중화시험 등에서 동일하게 나타나 Parker *et al*²⁸의 결과와 비슷하였다.

소 코로나바이러스의 진단을 위하여 여러 연구자들이 단크론항체를 이용한 방법을 보고하였는데 Crouch *et al*²⁹은 소 코로나바이러스 P.Q. 분리주를 이용한 단크론항체로, Smith *et al*³⁰은 polyclonal과 monoclonal antibody를 이용하여 capture ELISA를 개발하였고, Sato *et al*³¹은 소 코로나바이러스 단크론항체중 중화와 혈구응집억제 능력이 있는 것으로 ELISA를 개발하였으며, Thoms *et al*³²은 단크론항체를 이용하여 소 코로나바이러스와 로타바이러스 그리고 병원성대장균 K99 항원을 동시에 검출할 수 있는 ELISA를 개발하였다. 이러한 결과에 비추어 본 연구에서 만들어진 단크론항체를 이용하여 분변중의 코로나바이러스를 쉽게 진단할 수 있는 효소면역진단법(ELISA)를 개발하는 것이 가능할 것으로 사료된다.

결론

소 코로나바이러스에 대한 단크론항체를 생산하여 이에 대한 특성조사를 한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 소 코로나바이러스 Kakegawa strain에 대한 단크론항체 8개(1C1, 1G9, 2A5, 4H12, 5A12, 5C1, 5G4, 6H1)를 생산하였는데, 이중 5개(1G9, 2A5, 4H12, 5C1, 5G4)는 중화능력이 있었고, 나머지 3개(1C1, 5A12, 6H1)는 중화능력이 없었다. 그리고 중화능력이 있는 단크론항체중 2개(2A5, 5G4)는 혈구응집을 억제하였다.

2. 생산된 단크론항체는 형광항체시험에서 소 코로나바이러스와 mouse hepatitis virus (MHV)와 특이적으로 반

응하였으며, 형광중화시험에서는 중화력이 있는 5개의 단크론항체가 소 코로나바이러스에만 반응을 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Benfield DA, Saif LJ. Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. *J Clin Microbiol*, 28:1454-1457, 1990.
2. Saif LJ. Development of nasal, fecal and serum isotype-specific antibodies in calves challenged with bovine coronavirus or rotavirus. *Vet Immunol Immunopathol*, 17:425-439, 1987.
3. Heckert RA, Saif LJ, Mengel JP, et al. Isotype-specific antibody responses to bovine coronavirus structural proteins in serum, feces, and mucosal secretions from experimentally challenge-exposed colostrum-deprived calves. *Am J Vet Res*, 52:692-699, 1991.
4. Saif LJ, Redman DR, Moorhead PD, et al. Experimentally induced coronavirus infections in calves: viral replication in the respiratory and intestinal tracts. *Am J Vet Res*, 47:1426-1432, 1986.
5. Heckert RA, Saif LJ, Hoblet KH, et al. A longitudinal study of bovine coronavirus enteric and respiratory infections in dairy calves in two herds in Ohio. *Vet Microbiol*, 22:187-201, 1990.
6. Heckert RA, Saif LJ, Myers GW, et al. Epidemiologic factors and isotype specific antibody responses in serum and mucosal secretions of dairy calves with bovine coronavirus respiratory tract and enteric tract infections. *Am J Vet Res*, 52:845-851, 1991.
7. Heckert RA, Saif LJ, Myers GW. Mucosal and systemic isotype-specific antibody responses to bovine coronavirus structural proteins in naturally infected dairy calves. *Am J Vet Res*, 52:852-857, 1991.
8. Saif LJ, Brock KV, Redman DR, et al. Winter dysentery in dairy herds: electron microscopic and serological evidence for an association with coronavirus infection. *Vet Rec*, 128:447-449, 1991.
9. Tsunemitsu H, Yonemichi H, Hirai T, et al. Isolation of bovine coronavirus from feces and nasal swabs of calves with diarrhea. *J Vet Med Sci*, 53:433-437, 1991.
10. Dea S, Michaud L, Milane G. Comparison of bovine coronavirus isolates associated with neonatal calf diarrhoea and winter dysentery in adult dairy cattle in Quebec. *J Gen Virol*, 76:1263-1270, 1995.
11. Saif LJ. A review of evidence implicating bovine coronavirus in the etiology of winter dysentery in cows: an enigma resolved? *Cornell Vet*, 80:303-311, 1990.
12. Tsunemitsu H, Saif LJ. Antigenic and biological comparisons of bovine coronaviruses derived from neonatal calf diarrhea and winter dysentery of adult cattle. *Arch Virol*, 140:1303-1311, 1995.
13. Saif LJ. Coronavirus immunogens. *Vet Microbiol*, 37:285-297, 1993.
14. Deregt D, Babiuk LA. Monoclonal antibodies to bovine coronavirus: characteristics and topographical mapping of neutralizing epitopes on the E2 and E3 glycoproteins. *Virol*, 161:410-420, 1987.
15. Heckert RA, Saif LJ, Mengel JP, et al. Mucosal and systemic antibody responses to bovine coronavirus structural proteins in experimentally challenge-exposed calves fed low or high amounts of colostrum antibodies. *Am J Vet Res*, 52:700-708, 1991.
16. Hussain KA, Storz J, Kousoulas KG. Comparison of bovine coronavirus(BCV) antigens: monoclonal antibodies to the spike glycoprotein distinguish between vaccine and wild-type strains. *Virol*, 183:442-445, 1991.
17. Vautherot JF, Laporte J, Boireau P. Bovine coronavirus spike glycoprotein: localization of an immunodominant region at the amino-terminal end of S2. *J Gen Virol*, 73:3289-3294, 1992.
18. Vautherot JF, Madelaine MF, Boireau P, et al. Bovine coronavirus peplomer glycoproteins: detailed antigenic analyses of S1, S2 and HE. *J Gen Virol*, 73:1725-1737, 1992.
19. Deregt D, Gifford GA, Ijaz MK, et al. Monoclonal antibodies to bovine coronavirus glycoproteins E2 and E3: demonstration of *in vivo* virus-neutralizing activity. *J Gen Virol*, 70:993-998, 1989.

20. Storz J, Herrler G, Snodgrass DR, *et al.* Monoclonal antibodies differentiate between the haemagglutinating and the receptor-destroying activities of bovine coronavirus. *J Gen Virol*, 72:2817-2820, 1991.
21. Dea S, Verbeek AJ, Tijssen P. Antigenic and genomic relationships among turkey and bovine enteric coronaviruses. *J Virol*, 64:3112-3118, 1990.
22. Tsunemitsu H, El-kanawati ZR, Smith DR, *et al.* Isolation of coronaviruses antigenically indistinguishable from bovine coronavirus from wild ruminants with diarrhea. *J Clin Microbiol*, 33:3264-3269, 1995.
23. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256:495-497, 1975.
24. Saif LJ, Rosen BI, Kang SY, *et al.* Cell culture propagation of rotaviruses. *J Tissue Cult Meth*, 11:147-156, 1988.
25. Clark MA, Campbell I, El-Ghorr AA, *et al.* A comparison of bovine coronavirus strains using monoclonal antibodies. *Adv Exp Med Biol*, 276:461-466, 1990.
26. Milane G, Kourtesis AB, Dea S. Characterization of monoclonal antibodies to the hemagglutinin-esterase glycoprotein of a bovine coronavirus associated with winter dysentery and cross-reactivity to field isolates. *J Clin Microbiol*, 35:33-40, 1997.
27. El-Ghorr AA, Snodgrass DR, Scott FM, *et al.* A serological comparison of bovine coronavirus strains. *Arch Virol*, 104:241-248, 1989.
28. Parker MD, Cox GJ, Deregt D, *et al.* Cloning and *in vitro* expression of the gene for the E3 haemagglutinin glycoprotein of bovine coronavirus. *J Gen Virol*, 70:155-164, 1989.
29. Crouch CF, Raybould TJG, Acres SD. Monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine enteric coronavirus. *J Clin Microbiol*, 19:388-393, 1984.
30. Smith DR, Tsunemitsu H, Heckert RA, *et al.* Evaluation of two antigen-capture ELISAs using polyclonal or monoclonal antibodies for the detection of bovine coronavirus. *J Vet Diagn Invest*, 8:99-105, 1996.
31. Sato M, Akashi H. Detection of bovine coronavirus by enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J Vet Med Sci*, 55:771-774, 1993.
32. Thorns CJ, Bell MM, Chasey D, *et al.* Development of monoclonal antibody ELISA for simultaneous detection of bovine coronavirus, rotavirus serogroup A, and *Escherichia coli* K99 antigen in feces of calves. *Am J Vet Res*, 53:36-43, 1992.