

Avian Influenza H9N2 Virus의 HA와 NA 단백질 발현, 정제 및 항혈청 생산

이현지¹ · 송병학¹ · 김정민¹ · 윤상임¹ · 김진경¹ · 강영식¹ · 구용범² · 전익수³ · 변승준⁴ ·
이윤정⁵ · 권준현⁵ · 박종현⁵ · 주이석⁵ · 이영민^{1*}

¹충북대학교 의과대학 미생물학교실 · 기초의학연구소, ²인제대학교 의생명공학대학 생명공학부,

³농촌진흥청 축산과학원 축산기획조정과, ⁴농촌진흥청 축산과학원 응용생명공학과

⁵국립수의과학검역원

조류 독감바이러스(avian influenza virus, AIV)는 사람에게서 발생하는 인플루엔자 대유행에 중요한 역할을 한다. 특히 최근 AIV H9N2형에 의한 가금류 감염이 빈번히 나타나고 있어 인체 감염이 상당히 우려되는 실정이다. 본 연구에서는 최종적으로 AIV의 HA와 NA 단백질에 특이적으로 반응하는 항혈청을 생산하고자 하였다. 먼저 감염된 닭에서 분리된 AIV H9N2 한국분리주 A/Ck/Kr/MS96/96의 게놈 RNA로부터 RT-PCR 방법으로 HA와 NA 단백질 N-말단부위에 해당하는 염기서열을 증폭하였다. 이렇게 증폭된 DNA 단편은 *E. coli* 발현벡터 pGEX4T-1에 삽입한 후, BL21 세포에서 각각의 GST fusion protein (GST-HA1n와 GST-NA1n) 형태로 발현하였다. GST-HA1n와 GST-NA1n은 모두 glutathione sepharose column을 사용하여 분리 및 정제하였으며, 정제된 단백질을 항원으로 사용하여 토끼 항혈청을 생산하였다. 생산된 항혈청의 항원특이성은 AIV H9N2 한국분리주 A/Ck/Kr/MS96/96로 감염된 MDCK 세포의 cell extract를 사용하여 immunoblotting을 수행함으로써 확인하였다. 본 실험 결과 AIV H9N2의 HA와 NA 단백질 N-말단부위에 해당하는 재조합 GST fusion protein과, 이들 각각의 단백질에 특이적으로 반응하는 항혈청은 앞으로 AIV 감염의 진단 뿐만 아니라, AIV에 대한 기초연구에 중요한 재료로 사용될 것으로 기대한다.

Key words □ antiserum, avian influenza virus, GST, H9N2, HA, NA, protein expression

인플루엔자 바이러스(influenza virus)는 오소믹소비리데 과(*Orthomyxoviridae* family)에 속하는 RNA 바이러스이며, 현재 오소믹소비리데 과에는 *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Thogotovirus*, 및 *Isavirus*를 포함하여 5개의 속(genus)으로 분류되어 있다(31). 이 중에서 *influenzavirus A*와 B가 급성 바이러스성 호흡기 질환을 일으키는 주된 원인체이며, 미국에서만 인플루엔자 관련 질환으로 매년 200,000명 이상이 병원에 입원을 하며 약 36,000명이 사망한다고 보고된 바 있다(4, 5). 특히 *Influenzavirus A*의 경우, 자연숙주(natural reservoir)는 전 세계에 존재하는 수생조류(aquatic birds)이며, 이들 숙주와 평형상태를 유지함으로써 감염후 질병을 일으키지 않는다(29). 또한 *Influenzavirus A*는 HA와 NA 단백질의 항원성(antigenicity)에 따라서 다양한 아형(subtype)으로 구분되며, 현재 16개의 HA subtype (H1-H16)과 9개의 NA subtype (N1-N9)이 알려져 있다(6, 29).

Influenzavirus A, B 및 C 모두 매우 유사한 구조로 이루어져 있으며, 입자의 크기는 약 80~120 nm이다(18). *Influenzavirus A*와 B는 8개의 segmented negative-sense RNA를 게놈으로 가지

고 있으며, 이들로부터 hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), nucleoprotein (NP), matrix protein 1 (M1), matrix protein 2 (M2), nonstructural protein 1 (NS1), nonstructural protein 2 (NS2)/nuclear export protein (NEP), PA (polymerase acid), PB1 (polymerase basic 1), PB1-F2 및 PB2 (polymerase basic 2)라고 명명된 11개의 단백질을 발현한다(8). 이들 중에서 HA와 NA 단백질은 바이러스 입자의 표면에 있는 당단백질(glycoprotein)이다. HA 단백질은 receptor binding과 fusion activity를 가지고 있으며 주된 바이러스의 항원으로 작용하고, NA 단백질은 neuraminidase의 활성을 가지고 있으며 progeny virus의 방출에 중요한 역할을 한다(26). 따라서 이들 두 단백질이 항바이러스 제제 개발에 주요 타겟이며, 인체의 면역반응시 주요 항원으로 작용하는 것으로 알려져 있다(30).

1970년대 이후 live poultry market에서 다양한 종류의 avian influenza virus (AIV)가 지속적으로 발견되고 있으며, 이러한 AIV가 사람에게 전파되어 인플루엔자 대유행(pandemic influenza)을 일으키는 데 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다(13, 14, 23~25). AIV H9N2 바이러스의 경우 아시아 지역에서 이미 각 나라의 가금에 오랜 기간 동안 풍토병으로 자리잡고 있었던 것으로 보고되고 있다(9). 또한 AIV H9N2 바이러스가 시간이 지날수록 사람을 포함한 다른 종(species)에게 보다 쉽게 전파될 수

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-43-261-2863, Fax: 82-43-272-1603
E-mail: ymlce@chungbuk.ac.kr

있을 것으로 추측되어 진다(11). 그 실례로 1999년 AIV H9N2 바이러스는 홍콩에서 두 명의 어린이에게 전파되어 악한 독감을 일으켰으나, 모두 곧 회복되었다(15, 20). 비슷한 시기에 중국에서도 비슷한 감염사례가 보고된 바 있다(9). 이러한 두 감염사례는 항원적으로 서로 다른 AIV H9N2 바이러스에 의해서 감염된 경우인 것으로 판명되었다. 즉 홍콩의 인체 감염사례는 A/quail/HK/G1/97 (H9N2)과 유사한 바이러스로써 AIV H5N1/97 바이러스의 유전형(genotype)을 가진 바이러스에 의한 경우였으며, 중국의 경우는 항원학적으로 A/duck/HK/Y280/97 (H9N2)과 A/chicken/HK/G9/97 (H9N2) 바이러스와 유사하나 유전학적으로 다른 AIV-like 바이러스에 의한 경우인 것으로 밝혀졌다(9). 이러한 H9N2 바이러스들은 human strain처럼 α (2, 6) sialic acid receptors에 결합할 수 있는 특성을 획득하였으며(17), 홍콩에서 돼지로부터 발견된 바 있다(19). 따라서 H9N2 바이러스는 현재 유라시아 지역의 가금류에서 손쉽게 발견이 되며(1, 2), 이것은 최근 20여년 동안 이들 바이러스가 감염할 수 있는 숙주범위가 넓어지고 있음을 암시하고 있다.

본 연구에서는 최근 문제가 되고 있는 AIV H9N2 바이러스의 HA와 NA 단백질의 N-말단부위를 GST fusion 형태로 *E. coli*에서 발현하고, 정제된 재조합 GST fusion protein을 항원으로 사용하여, 각각 토끼에서 항혈청을 생산하였다. 본 연구를 통해서 얻어진 재조합 단백질과 항혈청은 앞으로 H9N2 바이러스의 감염 진단과 바이러스의 세포내 증식과 관련된 분자생물학적 기초 연구에 중요한 재료로 사용될 것으로 기대된다.

재료 및 방법

세포 및 바이러스

MDCK 세포는 10% fetal bovine serum, nonessential amino acids, sodium pyruvate, Eagle's balanced salt solution, 페니실린/스트렙토마이신이 첨가된 minimum essential medium (MEM) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 본 연구에 사용된 AIV H9N2 바이러스는 감염된 닭으로부터 분리된 한국 분리주 A/Ck/Kr/MS96/96이며, 이 바이러스는 국립수의과학검역원 조류질병과로부터 분양받았다.

DNA 클로닝

모든 DNA 조작은 일반적인 DNA 재조합 기술을 사용하였다(22). PCR을 통해서 증폭된 모든 DNA 단편은 DNA sequencing을 통해서 확인하였다. 본 연구에 사용된 올리고뉴클레오타이드는 Table 1에 요약하였다. AIV H9N2 바이러스의 HA와 NA 단백질의 N-말단부위를 GST fusion protein 형태로 *E. coli*에서 발현하기 위해서 각각의 부위를 인코딩하는 염기서열을 pGEX4T-1 벡터에 클로닝하였다. 우선 200 μ l AIV H9N2 (A/Ck/Kr/MS96/96) 바이러스로부터 600 μ l TRizoL LS (Gibco-BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, USA)를 사용하여 제조사가 제공한 방법으로 계놈 RNA를 분리하였다. 분리된 H9N2 바이러스의 계놈 RNA를 주형으로 사용하여, HA (HA1n)와 NA (NAn) 단백질 N-말단

부위를 인코딩하는 염기서열을 reverse transcription (RT)-PCR 방법으로 증폭하였다. HA1n의 경우는 HA1-NF와 HA1-NR 프라이머를 사용하였으며, NAn의 경우는 NA-NF와 NA-NR 프라이머를 각각 사용하였다(Table 1). 일반적인 RT 반응은 10 μ l 바이러스 RNA, 5 pmol 프라이머, 100 U Superscript II 역전사효소 (Gibco-BRL), 40 U RNaseOUT (Gibco-BRL), 0.1 mM dithiothreitol (DTT), 10 mM deoxynucleoside triphosphate mix, 및 역전사효소 버퍼가 포함된 20 μ l 반응액으로 수행되었다. 역전사 반응은 37°C에서 1시간 동안 수행된 후 70°C에서 15분간 불활화시켰다. 계속해서 5 μ l의 역전사 반응액을 사용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 증폭은 Pyrobest DNA polymerase (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)를 사용하였으며, 반응사이클은 denaturation (94°C, 30초), annealing (60°C, 30초), extension (72°C, 30초)으로 총 30 cycle을 실행하였으며, 마지막 extension 단계는 72°C에서 10분 동안 지속시켰다. HA1n의 경우 471 bp 산물이 증폭되었으며, NAn의 경우 369 bp 산물이 증폭되었다. 증폭된 cDNA 단편을 forward primer 5' 말단에 삽입된 *EcoRI*과 reverse primer 3' 말단에 삽입된 *XhoI* (HA1n의 경우) 또는 *SalI* (NAn의 경우) 제한효소를 사용하여 절단한 다음, *EcoRI*과 *XhoI*으로 절단된 pGEX4T-1 (GE Healthcare, Piscataway, USA) 벡터와 접합하여 pGEX/HA1n와 pGEX/NAn construct를 합성하였다.

*E. coli*에서 GST fusion protein 발현

클로닝된 두 개의 플라스미드(pGEX/HA1n와 pGEX/NAn)를 각각 *E. coli* BL-21 competent cell에 형질전환시켰다. 형질전환된 콜로니를 엠피실린이 첨가된 LB 액체배지에 각각 12시간 배양한 후, 250 ml LB에 1:50배로 희석 접종한 후 37°C에서 1시간 30분정도 배양하였다. A600 흡광도가 0.6~1.0정도 자라면 0.2 mM isopropyl- β -thiogalactoside (IPTG; Amresco Inc., Solon, USA)를 넣어 GST-HA1n과 GST-NAn 단백질 발현을 유도하였다. 발현의 유도는 IPTG 첨가 후 4시간 동안 지속하였다.

GST fusion protein 정제

pGEX/HA1n와 pGEX/NAn로 각각 형질전환된 BL21 세포에 IPTG를 첨가함으로써 4시간 동안 GST fusion protein의 발현을 유도하였다. 이렇게 얻어진 세포를 생리식염수(PBS, phosphate-buffered saline)에 부유시킨 다음, 초음파분쇄기를 이용하여 세포를 파괴하였다. 파괴된 세포의 부유액에 1% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, USA)을 30분간 실온에서 처리한 후, 4°C에서 20분간 12,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 획득하였다. 5 ml polypropylene column (Pierce, Rockford, USA)에 glutathione sepharose 4 fast flow beads (Amersham, Uppsala, Sweden)를 column 당 1.5 ml을 넣고 생리식염수로 beads를 세척하였다. 각각의 GST fusion protein이 포함된 세포의 상층액을 조립된 column에 loading한 이후, 0.03% Triton X-100가 포함된 PBS-T 버퍼로 세척하였다. 세척은 A280 흡광도가 0.01이하가 될 때까지 수행하였다. 세척이 끝난 다음 bead와 결합된 단백질을 elution 버퍼(30 mM glutathione, 50 mM Tris; pH 8.8)를 사용하

여 분리 정제하였다. 분리 정제된 단백질은 A280 흡광도를 측정 한 후에 Bradford 정량법을 사용해 정량하였다. 분리 정제된 단백질들은 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis로 분리하였으며, 분리된 단백질들은 commasie staining으로 확인하였다.

토끼 항혈청 생산

위에서 얻어진 GST fusion protein (GST-HA1n과 GST-NAn) 들을 항원으로 사용하여 토끼 항혈청을 생산하였다. 각각의 정제된 단백질은 일반적인 접종스케줄에 따라서 SPF (Specific Pathogen Free; 특정병원성미생물 부재동물) 토끼에 접종하였다. 간단히 설명하면, 1차 접종은 500 μ l의 complete adjuvant (Sigma)와 500 μ l의 각각의 GST fusion protein (200 μ g/ml)를 혼합한 후, 토끼의 목덜미와 뒷다리 근육부위에 접종하였다. 2차에서부터 6차 접종까지는 incomplete adjuvant (Sigma)를 사용하여 같은 방법으로 GST fusion protein과 혼합한 후 접종하였다. 접종스케줄은 1차와 2차 접종은 2주 간격으로, 3차부터 6차 접종까지는 1주 간격으로 실시하였다. 마지막 접종 후, 혈액을 1 ml정도 뽑아 혈장을 얻어 항혈청이 생성되었는지 확인하였다.

Immunoblotting

MDCK 세포에 AIV H9N2 바이러스를 감염시킨 후 72시간이 경과한 다음, 바이러스의 증식으로 인한 세포병변효과가 관찰되었을 때, 1 \times sample loading buffer (80 mM Tris-HCl; pH 6.8, 2.0% SDS, 10% glycerol, 0.1 M DTT, 0.2% bromophenol blue)를 감염된 세포의 단층에 직접 첨가함으로써 cell lysate을 준비하였다. 감염된 세포와 감염되지 않은 세포로부터 얻어진 동량의 cell lysate을 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis로 분리한 다음, PVDF membrane (Millipore, Billerica, USA)으로 blotting을 수행하였다. 1차 염색은 본 연구에서 얻어진 각각의 토끼 혈청 (1:1000 희석)을 사용하였으며 2시간동안 수행하였다. 1차 항체가 결합된 blot은 alkaline phosphatase (AP)-conjugated goat anti-rabbit IgG 2차 항체(1:5000 희석)로 다시 2시간 동안 수행하였다. 1차와 2차 항체가 결합된 blot은 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate와 nitroblue tetrazolium 기질을 사용하여 각각에 해당하는 단백질의 발현유무를 분석하였다.

결 과

AIV H9N2 바이러스의 HA와 NA 단백질의 N-말단부위를 발현하는 벡터 합성

Table 1. Oligonucleotides used for cDNA amplification in this study.

Oligonucleotide	Sequence (5' \rightarrow 3') ^a	Polarity
HA1-NF	GATGAATTCCTCCACAGAAACTGTTGAT	Sense
HA1-NR	TTTCTCGAGCTATTACCAATCGTTAGIATA	Antisense
NA-NF	GATGAATTCATGAATGCAGCATCCCC	Sense
NA-NR	TTTGTCGACCTATTAATGAGGGATCCTATC	Antisense

^aRestriction recognition sites used for cloning are underlined.

AIV H9N2 바이러스의 표면에 위치하며 주항원 단백질인 HA와 NA에 특이적으로 반응하는 각각의 항혈청을 생산하기 위해서, 본 연구에서는 먼저 각각의 단백질의 ectodomain 중에서 친수성이 높고 *E. coli* 발현에 적절하다고 판단되는 부위를 Table 1에 열거된 프라이머를 사용하여 RT-PCR방법으로 증폭함으로써 해당부위의 cDNA를 합성하였다. 본 연구에 사용된 AIV H9N2 바이러스는 국내의 감염된 닭으로부터 분리된 한국분리주 A/Ck/Kr/MS96/96이다. 560개의 아미노산으로 구성된 HA 단백질의 경우 HA1-NF와 HA1-NR을 사용하여 151개의 아미노산에 해당하는 부위(HA1n; aa 30-180)를 증폭하였으며, 469개의 아미노산으로 구성된 NA 단백질의 경우 NA-NF와 NA-NR을 사용하여 116개의 아미노산에 해당하는 부위(NAn; aa 40-155)를 증폭하였다(자료 미제시). 각각의 증폭된 cDNA 단편은 프라이머의 말단에 클로닝 작업을 원활하게 수행하기 위해서 인위적으로 삽입한 제한효소를 사용하여 *E. coli* 발현벡터인 pGEX4T-1에 삽입하였다. 구체적으로, HA1n을 증폭한 cDNA 단편(471 bp)은 *EcoRI*과 *XhoI*를 사용하였으며, NAn을 증폭한 cDNA 단편(369 bp)은 *EcoRI*과 *Sall*를 사용하여 GST 단백질을 인코딩하는 염기서열 바로 뒤에 삽입하여 pGEX/HA1n과 pGEX/NAn이라고 명명된 플라스미드를 각각 합성하였다(Fig. 1). 삽입된 cDNA 단편의 존재여부와 염기서열의 정확도는 *EcoRI*, *AvaI*, *ApaI*, *BglII*, 및 *NsiI* 제한효소를 사용한 genetic mapping과 BigDye terminator cycle sequencing system을 이용한 염기서열 분석결과 확인하였다(자료 미제시).

GST-HA1n과 GST-NAn fusion protein의 발현 및 정제

위에서 합성된 두 개의 *E. coli* 발현벡터(pGEX/HA1n과 pGEX/NA)를 사용하여, BL21 세포에서 다량의 재조합 단백질(HA1n과 NAn)을 GST의 C-말단에 융합된 fusion protein 형태로 발현하고자 하였다. 먼저 각각의 플라스미드로 형질전환된 *E. coli* BL21 세포를 4시간 동안 IPTG와 함께 배양함으로써, GST fusion protein의 발현을 유도하였다. 각각의 GST fusion protein의 발현과 정제가능 여부를 알아보기 위해서, 발현 유도된 각각의 세포를 수확한 후 total cell lysate를 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 이렇게 정제 분리된 단백질은 commasie 염색법으로 염색하였다.

pGEX/HA1n 벡터로 형질전환된 BL21 세포에서 정제된 대부분의 단백질은 최소한 2개 이상의 단백질로 구성되어있음을 알 수 있었다. 단백질의 분자량을 기준으로 보면, 이 중의 하나는 GST-HA1n fusion protein의 예상치와 유사한 ~44 kDa (Fig. 2A,

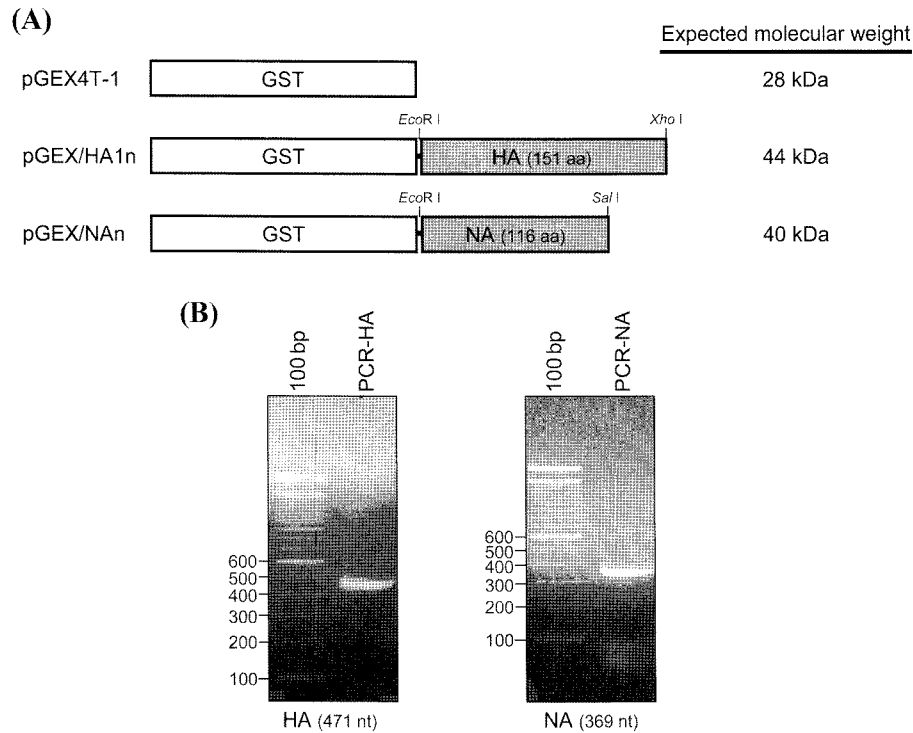


Fig. 1. *E. coli* GST-fusion protein expression vectors and PCR amplicons used in this study. (A) Schematic presentation of the pGEX/HA1n and pGEX/NA constructs. These two constructs were designed to express the N-terminal region of the HA and NA proteins of AIV H9N2 fused to the C-terminus of GST. The corresponding regions of each protein were amplified by RT-PCR using AIV H9N2 as a parental virus. The *EcoRI*-*XhoI* (for HA) or *EcoRI*-*SalI* (for NA) fragment of cDNA amplicons was cloned into a multiple cloning site of the pGEX4T-1 vector. Indicated in kDa are the predicted molecular weights of each recombinant protein. (B) PCR amplicons for HA and NA cDNA fragments. The genomic RNA of AIV H9N2 was isolated and used for RT-PCR amplification using a pair of the corresponding primers designated in Table 1. PCR products were separated by 1% agarose gel electrophoresis and staining with ethidium bromide.

GST-HA)이었으며, 다른 하나는 ~65 kDa (Fig. 2A, asterisk)으로 BL21세포에서 유래되었을 것으로 추정되는 단백질을 알 수 있었다. 또한 이 두 단백질들과 함께 ~44 kDa 크기보다 작은 여러 개의 단백질 밴드들이 관찰되었으며, 이들은 아마도 truncated form의 GST fusion protein이거나 혹은 *E. coli*에서 internal initiation에 의한 발현일 가능성이 높다고 생각된다. 대조군으로써 pGEX4T-1 벡터로 형질전환된 세포에서 정제된 단백질은 대부분이 ~28 kDa 크기의 GST 단백질을 알 수 있었다(Fig. 2A, GST).

pGEX/NA 벡터로 형질전환된 BL21 세포에서는 ~40 kDa의 GST-NA fusion protein으로 추정되는 단백질이 대다수 분리 정제되었다(Fig. 2B, GST-NA). pGEX/HA1n의 경우와 마찬가지로, 소량의 ~65 kDa 크기의 단백질 밴드와 ~35 kDa 보다 작은 여러 개의 단백질들이 ~40 kDa 크기의 단백질과 함께 정제되었다. 본 실험에서도 대조군으로 사용된 pGEX4T-1 벡터로 형질전환된 세포에서는 예상했던 것과 같이 ~28 kDa 크기의 GST 단백질이 다량으로 분리 정제되었다(Fig. 2B, GST).

pGEX/HA1n 및 pGEX/NA 벡터로 형질전환된 BL21 세포에서 각각의 GST fusion protein으로 추정되는 단백질외에 이들과 함께 정제된 크고 작은 단백질이 GST fusion protein인지를 알아보

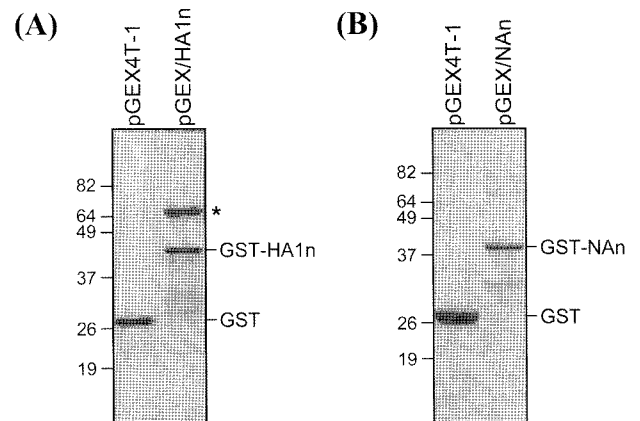


Fig. 2. Coomassie staining of recombinant GST-HA1n and GST-NA fusion proteins expressed in *E. coli* BL21. BL21 cells were transformed with the parental pGEX4T-1 or one of either recombinant constructs, pGEX/HA1n (A) and pGEX/NA (B), as indicated. Each bacterial culture was incubated with IPTG to induce the corresponding recombinant proteins. The GST-fused proteins were purified using a glutathione sepharose columns and resolved by 12% SDS-polyacrylamide gels. The eluted proteins were visualized by Coomassie staining.

기 위해서, 각각의 플라스미드로 형질전환된 세포에서 정제된 단백질을 10% SDS-PAGE로 분리한 후 GST에 특이적으로 반응하는 마우스 단클론 항체(Anti-GST Mab)를 사용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. Figure 3에 나타난 것과 같이, pGEX/HA1n 및 pGEX/NA 벡터로 형질전환된 세포로부터 각각 ~44 kDa의 GST-HA1n과 ~40 kDa의 GST-NAn이 주로 정제됨을 알 수 있었다. 그리고 commasie 염색에서 나타난 이들 보다 작은 크기의 단백질 밴드들도 anti-GST Mab에 결합하는 것을 알 수 있었다; 따라서 이들 단백질들도 GST fusion protein임을 알 수 있었다. 하지만 ~44 kDa의 GST-HA1n과 ~40 kDa의 GST-NAn 보다 크기가 큰 ~66 kDa의 단백질(들)은 anti-GST Mab로 인지되지 않음을 알 수 있었다; 따라서 이 단백질(들)은 BL21 세포로부터 유래된 bacterial protein일 것으로 추정된다.

AIV H9N2 바이러스의 HA와 NA 단백질에 특이적으로 반응하는 항혈청 생산

다음으로 pGEX/HA1n 및 pGEX/NA 벡터로 형질전환된 BL21 세포로부터 정제된 GST fusion protein을 토끼에 접종함으로써, 이들 재조합 단백질에 특이적으로 반응하는 항혈청을 생산하고자 하였다. 우선 정제된 각각의 단백질을 Bradford 정량법을 이용하여 정량한 후, 토끼 한 마리당 200 µg/ml의 재조합 단백질을 complete adjuvant (1차 접종) 또는 incomplete adjuvant (2차 이후의 접종)와 함께 스케줄에 따라서 접종하였다. 재료 및 방법에 기술한 것과 같이 주기적으로 6차례 접종한 후, 토끼 혈관으로부터 혈액을 채취하여 혈장을 얻었다. 토끼에서 얻어진 각각의 혈

청이 AIV H9N2 바이러스의 HA와 NA 단백질을 인식하는지를 분석하기 위해서, MDCK 세포에 이 바이러스를 감염시킨 후 얻은 cell extract를 사용하여 immunoblotting을 수행하였다. GST-HA1n의 정제된 단백질로 접종한 후 얻어진 토끼 혈청의 경우, ~76 kDa 크기의 단백질이 AIV H9N2 바이러스가 감염된 MDCK 세포에서 관찰되었다(Fig. 4A). 또한 GST-NAn의 정제된 단백질로부터 얻어진 토끼 혈청의 경우, ~55 kDa 크기의 단백질이 AIV H9N2 바이러스에 감염된 세포로부터 발현됨을 알 수 있었다(Fig. 4B). 대조군으로써 AIV H9N2 바이러스로 감염되지 않은 MDCK 세포에서는 이러한 두 단백질이 관찰되지 않았다. 본 실험과정에서 사용된 cell extract의 양은 anti-GAPDH 항체를 사용하여 immunoblotting을 수행한 결과 별 차이가 없음을 확인하였다(자료 미제시).

고 찰

본 연구에서는 최근 사람에게로의 전파가능성 증가로 인해서 사회적으로 문제가 되고 있는 AIV H9N2 바이러스의 주항원 단백질인 HA와 NA 단백질에 대한 토끼 항혈청을 생산하고자 하였다. 이를 위해서 첫째 H9N2 한국분리주의 HA와 NA 단백질 N-말단부위를 GST fusion protein 형태로 발현하였으며, 둘째 정제된 각각의 GST fusion protein을 토끼에 접종시킴으로써 HA와

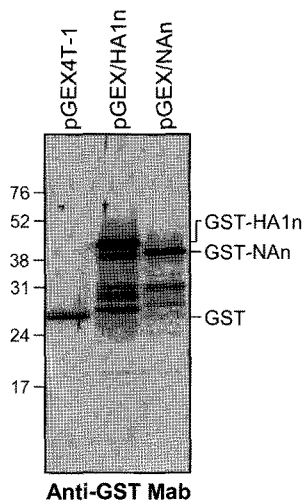


Fig. 3. Immunoblotting of the recombinant GST-HA1n and GST-NAn proteins that are expressed and purified from *E. coli* BL21. BL21 cells were transformed with pGEX4T-1, pGEX/HA1n, or pGEX/NA construct, as indicated. The GST or GST-fused proteins were induced and purified as described in Materials and Methods. Purified GST-fused proteins were separated by 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto methanol-activated PVDF membranes. The GST-fused proteins were visualized by immunoblotting using a mouse monoclonal antibody (Mab) specific to GST.

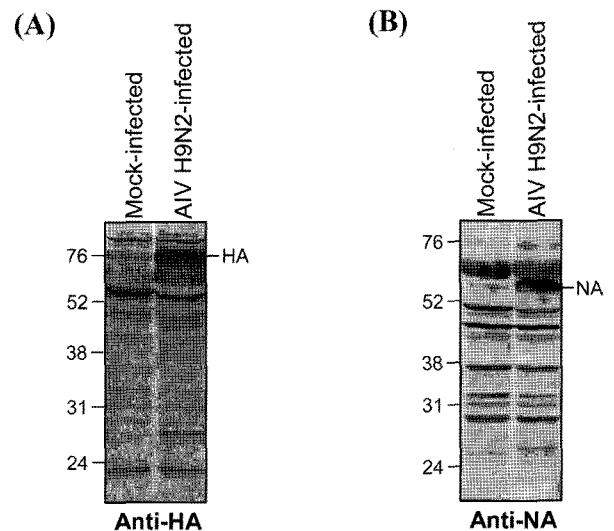


Fig. 4. Immunoblotting of the HA and NA proteins that are expressed in AIV H9N2-infected MDCK cells. Naive MDCK cells were mock-infected or infected with AIV H9N2 virus at a multiplicity of infection of 1. At 48 hr after infection, cells were lysed with 1x sample loading buffer; total cell lysates were separated by 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto methanol-activated PVDF membranes. The blots were stained with a primary rabbit antiserum raised against GST-HA1n [(A) Anti-HA] or GST-NAn [(B) Anti-NA] proteins and subsequently with a secondary AP-conjugated goat anti-rabbit IgG. The immunoreactive protein bands were visualized by incubation with a mixture of BCIP and NBT.

NA 단백질에 대한 항혈청을 성공적으로 생산하였고, 셋째 생산된 항혈청은 AIV H9N2 바이러스의 HA와 NA 단백질에 특이적으로 반응하는 것을 immunoblotting 분석을 통해서 확인하였다. 본 연구결과 얻어진 HA와 NA 단백질 N-말단부위를 가진 GST fusion protein과 이로부터 생산된 항혈청은 앞으로 AIV 감염의 진단과 인플루엔자 바이러스의 생활사 중에서 entry 단계에 대한 다양한 기초연구의 중요한 재료로 사용될 것으로 기대한다.

본 연구에서는 HA와 NA 단백질의 N-말단부위에 존재하는 151개(HA)와 116개(NA)의 아미노산을 각각 GST fusion protein으로 *E. coli* BL21 세포에서 발현하였다. 이들을 발현 및 정제하는 과정에서, 아미노산의 분자량을 기준으로 계산된 ~44 kDa GST-HA1n과 ~40 kDa GST-NA_n 단백질 뿐만 아니라, 이들 보다 분자량이 큰 단백질이 정도의 차이는 있었지만 함께 정제되는 것을 관찰하였다. Anti-GST Mab를 사용한 immunoblotting 분석을 통해서 이 단백질(들)은 GST fusion protein이 아님을 확인함으로써, 아마도 BL21 세포에서 유래된 bacterial protein인 것으로 추정된다(12, 21, 27). 비록 본 실험에서 수행한 HA와 NA 단백질에 특이적으로 반응하는 항혈청을 생산하는 데는 큰 장애가 되지 않았지만, 이들 GST fusion protein을 진단용 시약이나 기타의 목적으로 사용하고자 할 경우에는 재조합 단백질에 대한 순도를 개선할 필요가 있을 것으로 생각되며, 동시에 본 연구에서 얻어진 HA 및 NA 항혈청이 다른 AIV 혈청형과 어떻게 반응하는지에 대한 실험이 추가되어야 할 것으로 생각된다. 또한, 이와 같은 bacterial protein이외에 예상된 각각의 GST fusion protein보다 분자량이 작은 단백질들이 다수 함께 정제됨을 알 수 있었다. 이 단백질들은 Anti-GST Mab로 염색되는 것으로 보아 각각의 GST fusion protein의 truncated form인 것으로 판단되며, 이는 internal initiation 혹은 premature termination일 가능성이 있다(10).

본 연구에서 생산된 토끼 항혈청이 실험 목적으로 설정한 대로 H9N2 바이러스의 HA와 NA 단백질을 탐지할 수 있는 지를 바이러스가 감염된 MDCK세포와 감염되지 않은 세포를 대조군으로 사용하여 immunoblotting을 수행하였다. 토끼에 6회 접종 결과 얻어진 각각의 항혈청은 HA와 NA 단백질에 특이적으로 반응을 하였으나, 이와 함께 여러 개의 단백질 밴드들이 바이러스가 감염된 세포와 감염되지 않은 세포에서 모두 비특이적으로 관찰되었다. 이러한 비특이적 반응은 아마도 본 실험에서 사용한 항원의 크기가 작은 이유에서 기인되었을 가능성이 있을 것으로 추정된다(HA의 경우 151개의 아미노산, NA의 경우 116개의 아미노산). 즉 이들의 일부 또는 전체의 linear antigen을 가진 단백질이 MDCK 세포에 존재하는 것으로 생각된다. 이러한 비특이적 반응은 항원의 크기를 구분할 수 있는 immunoblotting을 통해서 항원을 탐지할 경우는 별 문제가 되지 않으나, 항원의 양에 의존한 ELISA 또는 Dot blot의 경우는 항원특이성에 문제가 될 것으로 사료된다.

1990년대 이후 전 세계적으로 가금류에서 인플루엔자 H9N2 바이러스의 감염 빈도가 높아지고 있다(1~3, 9). 특히 일본에서는 중국으로부터 수입된 닭에서부터 H9N2 바이러스가 검출된

바 있으며, 유전자 분석결과 중국에서 1997년 유행한 A/DK/HK/Y280/97 바이러스와 유사한 것으로 밝혀졌다(9, 16). H9N2 바이러스와 함께 최근 high pathogenic H5N1 인플루엔자 바이러스의 감염도 큰 문제로 대두되고 있는 실정이다(7, 28). 이러한 인플루엔자 바이러스의 감염이 가금에 끼치는 경제적 손실을 고려해 볼 때 앞으로 이 바이러스에 대한 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다. 본 연구결과 얻어진 HA와 NA 단백질에 대한 항혈청은 이들 바이러스의 생활사, 특히 virus entry와 관련된 단백질의 기능 및 분자생물학적 특성에 관한 기초연구에 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20070401-034-027)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

- Alexander, D.J. 2000. A review of avian influenza in different bird species. *Vet. Microbiol.* 74, 3-13.
- Alexander, D.J. 2003. Report on avian influenza in the Eastern hemisphere during 1997-2002. *Avian Dis.* 47, 792-797.
- Banks, J., E.C. Speidel, P.A. Harris, and D.J. Alexander. 2000. Phylogenetic analysis of influenza A viruses of H9 haemagglutinin subtype. *Avian Pathol.* 29, 353-359.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2005. Key facts about influenza and the influenza vaccine. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA.
- Dolin, R. 2005. Influenza-interpandemic as well as pandemic disease. *N. Engl. J. Med.* 353, 2535-2537.
- Fouchier, R.A., V. Munster, A. Wallensten, T.M. Bestebroer, S. Herfst, D. Smith, G.F. Rimmelzwaan, B. Olsen, and A.D. Osterhaus. 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J. Virol.* 79, 2814-2822.
- Gambotto, A., S.M. Barratt-Boyes, M.D. De Jong, G. Neumann, and Y. Kawaoka. 2008. Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Lancet* 371, 1464-1475.
- Ghedini, E., N. Sengamalay, M. Shumway, J. Zaborsky, T. Feldblyum, V. Subbu, D. Spiro, J. Sitz, H. Koo, P. Bolotov, D. Dornovoy, T. Tatusova, Y. Bao, K.S. George, J. Taylor, D. Lipman, C. Fraser, J. Taubenberger, and S. Salzberg. 2005. Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature* 437, 1162-1166.
- Guo, Y.J., S. Krauss, D.A. Senne, I.P. Mo, K.S. Lo, X.P. Xiong, M. Norwood, K.F. Shortridge, R.G. Webster, and Y. Guan. 2000. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia. *Virology* 267, 279-288.
- Harper, S. and D.W. Speicher. 2008. Expression and purification of GST fusion proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.* Chapter 6: Unit 6.6.
- Horimoto, T. and Y. Kawaoka. 2005. Influenza: Lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 591-600.

12. Kim, G.Y., M.K. Nam, S.S. Kim, H.Y. Kim, S.K. Lee, and H.A. Rhim. 2008. Simple and rapid strategy for the molecular cloning and monitoring of mouse HtrA2 serine protease. *Biotechnol. Lett.* 30, 397-403.
13. Kung, N.Y., R.S. Morris, N.R. Perkins, L.D. Sims, T.M. Ellis, L. Bissett, M. Chow, K.F. Shortridge, Y. Guan, and M.J. Peiris. 2007. Risk for infection with highly pathogenic influenza A virus (H5N1) in chickens, Hong Kong 2002. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 412-418.
14. Kung, N.Y., Y. Guan, N.R. Perkins, L. Bissett, T. Ellis, L. Sims, R.S. Morris, K.F. Shortridge, and J.S. Peiris. 2003. The impact of a monthly rest day on avian influenza virus isolation rates in retail live poultry markets in Hong Kong. *Avian Dis.* 47, 1037-1041.
15. Lin, Y.P., M. Shaw, V. Gregory, K. Cameron, W. Lim, A. Klimov, K. Subbarao, Y. Guan, S. Krauss, K. Shortridge, R. Webster, N. Cox, and A. Hay. 2000. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9654-9658.
16. Liu, J., K. Okazaki, H. Ozaki, Y. Sakoda, Q. Wu, F. Chen, and H. Kida. 2003. H9N2 influenza viruses prevalent in poultry in China are phylogenetically distinct from A/quail/Hong Kong/G1/97 presumed to be the donor of the internal protein genes of the H5N1 Hong Kong/97 virus. *Avian Pathol.* 32, 551-560.
17. Matrosovich, M.N., S. Krauss, and R.G. Webster. 2001. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology* 281, 156-162.
18. Palese, P. and M.L. Shaw. 2007. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication, p. 1647-1689. In D.M. Knipe and P.M. Howley (eds.), *Fields Virology*, 5th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, Philadelphia, USA.
19. Peiris, J.S., Y. Guan, D. Markwell, P. Ghose, R.G. Webster, and K.F. Shortridge. 2001. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? *J. Virol.* 75, 9679-9686.
20. Peiris, M., K.Y. Yuen, C.W. Leung, K.H. Chan, P.L. Ip, R.W. Lai, W.K. Orr, and K.F. Shortridge. 1999. Human infection with influenza H9N2. *Lancet* 354, 916-917.
21. Rosales, J.L. and K.Y. Lee. 2000. Purification of dual-tagged intact recombinant proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 1058-1062.
22. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA.
23. Senne, D.A., J.E. Peason, and B. Pahigrahy. 1992. Live poultry markets: a missing link in the epidemiology of avian influenza. Proceedings of the Third International Symposium on Avian Influenza; May 27-29.
24. Shortridge, K.F. 1992. Pandemic influenza: a zoonosis? *Semin. Respir. Infect.* 7, 11-25.
25. Shortridge, K.F., W.K. Butterfield, R.G. Webster, and C.H. Campbell. 1977. Isolation and characterization of influenza A viruses from avian species in Hong Kong. *Bull. World Health Organ.* 55, 15-20.
26. Suzuki, Y. 2005. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 399-408.
27. Ubach, J., Y. Lao, I. Fernandez, D. Arac, T.C. Südhof, and J. Rizo. 2001. The C2B domain of synaptotagmin I is a Ca²⁺-binding module. *Biochemistry* 40, 5854-5860.
28. Uyeki, T.M. 2008. Global epidemiology of human infections with highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses. *Respirology* 13(Suppl 1), S2-S9.
29. Webster, R.G., W.J. Bean, O.T. Gorman, T.M. Chambers, and Y. Kawaoka. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 56, 152-179.
30. Wilson, J.C. and M. Von Itzstein. 2003. Recent strategies in the search for new anti-influenza therapies. *Curr. Drug Targets.* 4, 389-408.
31. Wright, P.F., G. Neumann, and Y. Kawaoka. 2007. Orthomyxoviruses, p. 1692-1740. In D.M. Knipe and P.M. Howley (eds.), *Fields Virology*, 5th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, Philadelphia, USA.

(Received September 8, 2008/Accepted September 23, 2008)

ABSTRACT: Expression, Purification and Antiserum Production of the Avian Influenza H9N2 Virus HA and NA Proteins

Hyunji Lee¹, Byung-Hak Song¹, Jeong-Min Kim¹, Sang-Im Yun¹, Jin-Kyoung Kim¹, Youngsik Kang¹, Yongbum Koo², Iksoo Jeon³, Sung June Byun⁴, Youn-Jeong Lee⁵, Jun-Hun Kwon⁵, Jong-Hyeon Park⁵, Yi-Seok Joo⁵, and Young-Min Lee^{1*} (¹Department of Microbiology, College of Medicine and Medical Research Institute, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea, ²School of Biotechnology and Biomedical Science, Inje University, Gimhae 621-749, Republic of Korea, ³Research Planning Team, National Institute of Animal Science, Suwon 441-707, Republic of Korea, ⁴Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, Suwon 441-707, Republic of Korea, ⁵National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-856, Republic of Korea)

Avian influenza virus (AIV) is recognized as key to the emergence of pandemic influenza for humans; there are growing concerns that AIV H9N2 may become more efficient to transmit to humans in the near future, since the infection of poultry with AIV H9N2 has been common in recent years. In this study, we aimed to produce anti-

sera recognizing the HA and NA proteins of AIV H9N2. Initially, coding sequences corresponding to the N-terminal regions of the HA and NA proteins of the Korean AIV H9N2 (A/Ck/Kr/MS96/96) isolated from a domestic chicken were amplified from the genomic RNA. Following cloning of the amplified cDNA fragments into pGEX4T-1 vector, two GST-fusion proteins (GST-HA1n and GST-NAn) were expressed in *E. coli* BL21 and purified with glutathione sepharose columns; the recombinant GST-HA1n and GST-NAn proteins were both used as immunogens in rabbits. The antigenicity of the rabbit antisera was analyzed by immunoblotting of the cell lysates prepared from AIV H9N2-infected MDCK cells. Overall, the recombinant HA1n and NAn proteins fused to the C-terminus of GST and the rabbit antisera raised against the corresponding recombinant proteins would provide a valuable reagent for AIV diagnosis and basic research.