

## 한국형 사람 Calicivirus Replicase 단백질의 발현 및 항원성 평가

<sup>1</sup>서강대학교 생명과학과, 한양대학교 의과대학 미생물학교실

장미윤<sup>1</sup> · 양재명<sup>1</sup> · 김경희

=Abstract=

### Expression and Antigenicity of Replicase Protein from Snow Mountain-Like Caliciviruses, Korean Isolates

Mi-Yoon Chang<sup>1</sup>, Jai Myung Yang<sup>1</sup> and Kyung-Hee Kim

<sup>1</sup>Department of Life Science, Sogang University, Seoul 121-742, and Department of Microbiology, Hanyang University College of Medicine, Seoul 133-791, Korea

In view of the potential of replicase protein as a diagnostic reagent for human caliciviruses (HuCVs), we have cloned and over-expressed this gene from the Snow Mountain-like Korean strains in *Escherichia coli* as a fusion protein with glutathione S-transferase (GST), and described the preliminary antigenic characterization of the recombinant products.

Each 470bp fragment corresponding to highly conserved region of RNA-dependent RNA polymerase was generated by RT-PCR from stools of two diarrheal children, cloned in pMOSBlue T-vector, and subcloned between the *EcoRI* and *SalI* restriction sites of pGEX-4T-3, a GST gene fusion vector, yielding pGCV<sub>pol</sub>. This construct expressed a Snow Mountain-like HuCV replicase under the control of the IPTG-inducible tac promoter. An extract prepared by sonication of the *E. coli* cell inclusion bodies bearing pGCV<sub>pol</sub> products was purified and analyzed by SDS-PAGE. After Coomassie blue staining, it was shown that the recombinant replicase migrated on the gels with an approximate molecular mass of 46.5 kDa, that was subsequently cleaved into a 26 kDa GST fragment and a 20.5 kDa replicase protein upon digestion with thrombin protease. The replicase was recognized on immunoblotting with the sera from symptomatic children with the HuCV-associated diarrhea but not by asymptomatic sera from adults.

The results presented the first biological activity of individually expressed HuCV replicase subunit and provided important reagents for diagnosis of HuCV infection.

**Key Words:** Calicivirus, replicase protein, Norwalk virus, Snow Mountain agent, gastroenteritis

### 서 론

사람 caliciviruses (HuCV)는 직경 25~35 nm의 정20면체내에 7.6 kb의 한줄짜리 +RNA 지놈을 가진 작은 바이러스로 Picornaviridae와 공통점이

있으며, 최근 지구 곳곳의 소아군에서 산발적/유행성 급성장염의 원인체로 자주 거론되고 있다 [1-3]. 그러나 대부분 환자 회복기 혈청을 사용하는 면역전자현미경으로 처음 발견되는 [4,5] 이들 바이러스들의 항원성이 매우 다양하여, 이들이 분리되었던 여러나라에서는 지놈서열 분석을

본 연구는 96년도 교육부 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

통한 dendrogram 규명작업이 활발히 이루어지고 있는 가운데 국내에서도 한국형 HuCV open reading frame 1 의 RNA polymerase (ORF1<sup>pol</sup>)의 염기 및 아미노산 서열이 규명되기 시작하였으며 [6,7], 3'-end의 염기 및 아미노산 서열도 규명되었다 [8].

1968년 미국 오하이오주 Norwalk시에 대유행 하였던 급성 장염 발발때 채취, 보관되었던 변검체의 전자현미경적 관찰에서 small, round-structured virus (SRSV)로 처음 발견되었던 원조격 calicivirus인 Norwalk virus [4]를 시작으로 형태학적으로 유사한 Hawaii agent [9], Taunton agent [10], Montgomery County agent [11], Southampton virus [12], Desert Shield virus (DSV, 절프전 때의 분리주) [13], Minireovirus [14], 아직 명명되지 않은 몇개의 혈청형 [15,16]등이 세계 곳곳에서 폭발적인 장염 유발체로 보고되었다. 서울에서도 유행성 급성 장염이 발발된 종합병원 신생아실에서의 영유아군 변검체들의 전자현미경적 관찰에서 HuCV가 관찰되었고 cDNA 합성-중합효소연쇄반응 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR), 클로닝 및 sequencing으로 ORF1<sup>pol</sup> 및 3'-end의 염기 및 아미노산 서열이 규명되면서 한국형 HuCV의 지놈 다양성이 밝혀지기 시작하였다 [6-8].

HuCV 지놈은 3개의 ORF를 표지하는데 ORF 1은 helicase, RNA-dependent RNA polymerase와 같은 비구조 단백을 만들고, ORF2는 capsid 단백을 표지하며, ORF3의 기능은 아직 밝혀져 있지 않다 [17-19]. 이 바이러스는 세포배양에서 자라지 않아 실용적인 진단법이 개발되지 못하였고, 감염자의 급성 및 회복기 혈청을 사용한 면역 전자현미경으로 관찰하거나, 분자생물학적 방법에 의하여 발견되어 왔으나 좀 더 보편적인 방법의 개발이 요구되어 왔다. 이에 따라 Norwalk virus capsid 유전자를 집어넣은 recombinant baculovirus로 감염된 곤충세포에서 발현된 virus-like particle (rNV)을 사용하는 효소면역측정법 (enzyme immunoassay, EIA) [19]이 개발되었으나 이 역시 비리온의 주되는 항원인 capsid의 유전적/항원적 다양성으로 인하여 rNV capsid와 유사한 일부 HuCV capsid 만을 탐지하는 것으로 밝혀졌으며 [6], ORF2 5'-end 부위의 안정된 이차구조로 인하여 타 분리주들의 capsid 증폭에 많은 어려움이 있다 [1,2].

따라서 본 연구에서는 1) HuCV 지놈의 3개 ORF중 여러지역 분리주들간 유사성이 가장 높은 부분으로 RNA 바이러스의 계통발생학적 분류에 사용되는 ORF1<sup>pol</sup> 부위 [20] 일부를 한국형 HuCV들로부터 분리, 증폭하여 pMOSBlue T 벡터에 클론한 후 염기서열을 분석하여 분리주간의 유전적 상관성을 살피고, 2) 클론된 pMOSCV<sub>pol</sub> 들을 대장균 (*Escherichia coli*) 과발현 벡터인 pGEX-4T-3에서 아클론하여 과발현시켰고, 3) 과발현된 ORF1<sup>pol</sup> 단백질 및 Jiang등 [19]이 발현시켰던 recombinant NV capsid 단백을 sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE한 후 한국인 혈청을 사용한 immunoblot으로 이들의 진단시료 후보로의 역할을 상대적으로 비교, 평가하여 보았다.

## 재료 및 방법

### 1. HuCV RNA 분리정제 및 ORF1<sup>pol</sup> cDNA 합성

변검체를 멸균된 증류수로 10-30%로 희석한 후 전회 [6,8]와 같이 trichlorotrifluoroethane (Genetron 113; Allied Chemical Corp., Morristown, NJ) 및 hexadecyltrimethyl ammonium bromide (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 방법으로 RNA를 추출하였다. 분리된 RNA는 멸균된 증류수 25 µl에 녹이고, 5 µl를 cDNA를 합성하기 위한 주형으로 사용하였다.

HuCV ORF1<sup>pol</sup> 부위에서 채택된 primer쌍들인 p35/p36 (470bp), p51/p36 (404bp) 및 p51/p3 (206bp) (Table 1)를 사용한 RT-PCR은 10x PCR 완충용액 (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin) 5 µl, 5 mM dNTP 혼합용액 4 µl, antisense primer (0.1 µg/µl) 2 µl, RNasin 0.25 µl (40 units/µl), avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, 0.25 µl (50 units/µl)를 넣고 DNase, RNase-free water (Promega, Madison, WI)로 전체 부피를 50 µl로 맞춰 42℃에서 1시간 반응시킨 후, 합성된 cDNA 합성용액 50 µl에 sense primer 2 µl (0.3 µg/µl), 10 x Taq DNA polymerase 완충용액 (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin) 5 µl, Taq DNA polymerase (5 µ/µl) 0.3 µl를 넣고 증류수로 최종 부피가 100 µl가 되도록 하여 94℃에서 1분간 denaturation, 49℃에서 1분 20초간 annealing, 72℃에서 1분간 extension을 39회 실시하였다. PCR 산물을 전기영동후 ethidium bromide

로 염색하여 470, 404 또는 206bp의 DNA 띠를 확인하였다.

## 2. ORF<sup>pol</sup> RT-PCR 산물의 클로닝 및 염기서열 규명

RT-PCR로 증폭된 replicase 부위의 cDNA 조각들중 470bp 짜리를 젤로부터 절단한 후 glass milk를 이용한 GeneClean II kit (Bio 101 Inc., La Jolla, CA)로 정제하여 전회 [6-8]의 방법과 같이 pMOSBlue T-vector (Amersham, Buckinghamshire, England)에 ligation시켰으며 이 반응산물 1 µl를 pMOSBlue competent cell (Amersham) 20 µl에 제조사의 방법에 따라 형질전환시킨 후, RT-PCR 조각을 함유한 클론들의 확인을 위하여 LB-ampicillin 액체배지에 배양된 각 클론들의 plasmid DNA를 Wizard Plus minipreps kit (Promega)로 분리하고, 제한효소로 절단하여 DNA 크기를 확인하는 순서를 취하였다 [7].

위에서 정제된 동일 plasmid DNA를 dideoxy nucleotide chain termination [21] 원리를 이용한 Sequenase version 2.0 DNA sequencing kit (USB, Cleveland, OH)을 공급사의 사용방법에 따라 염기서열을 결정하였다. Primer는 vector내의 -40 forward primer와 T7 promoter primer를 사용하였다. Annealing은 annealing mixture를 65°C에서 2분 방치한 다음 30분 동안 30°C까지 내리면서 이루어졌고, 표지는 상온에서 3~5분간, termination은 37°C에서 5분간 실시하였다.

Sequencing에  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-dATP를 사용하여 DNA를 표지하고, 7M urea가 포함된 6% polyacrylamide젤에서 1,800 V로 전기영동한 후 vacuum gel dryer (Hofer Scientific Instrument, San Francisco, CA)로 건조시킨 젤을 -70°C에서 1~2일 X-ray film에 노출시켰다. 클론된 바이러스들의 cDNA들은 PC/Gene software, version 6.6 (IntelliGenetics Inc, Mountain View, CA)로 이들의 multiple sequence alignment 및 유전적 연관성을 예측하기 위한 dendrogram이 만들어졌다.

## 3. Replicase 단백질 과발현 plasmid 구축

Replicase 단백질 과발현 벡터로 pMAL-cR1 (New England Biolabs, Beverly, MA), pRSET (Invitrogen, San Diego, CA), pTrcHIS (Invitrogen), pET-22b(+) (Novagen, Madison, WI) 및 pGEX-4T-3 (Pharmacia, Piscataway, NJ)를 사용하였는데, 이

들중 pGEX-4T-3에서 융합 단백질의 형태로 replicase 단백질의 발현을 유도할 수 있었다.

pGEX 벡터는 glutathione S-transferase (GST) gene fusion system을 이용한 벡터로 원하는 유전자를 발현시킬 때 *Schistosoma japonicum*의 26 kDa GST와 함께 융합단백 형태로 발현된다 (Fig. 1).

pMOSBlue T-벡터에 클론되어 있는 470bp 크기의 replicase cDNA (pMOSCV<sub>pol</sub>1800, pMOSCV<sub>pol</sub>2188)를 *Eco*R I 과 *Sal* I 으로 이중 절단한 후 전기영동하여 각각의 replicase 부위 cDNA를 전기용출하였다. pGEX-4T-3를 동일 제한효소로 절단한 후 ligation시켰고 *E. coli* JM109에 형질전환시켜 얻은 집락의 pGCV<sub>pol</sub>1800 및 pGCV<sub>pol</sub>2188로부터 DNA를 분리하여 염기서열과 ORF를 확인하였다.

DNA ligation은 insert와 벡터 DNA의 mole 비율이 3:1이 되도록 섞어 10 units의 T4 DNA ligase와 10×ligation 완충용액 (500 mM Tris-HCl, pH 7.8, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dithiothreitol [DTT], 10 mM ATP) 1.5 µl를 넣고 증류수로 최종 부피를 15 µl로 조절한 뒤 30°C에서 3시간 ligation하였다. SOB 평판배지에 형성된 집락을 ampicillin (50 µg/µl)이 포함된 LB 배양액 5 ml에 37°C에서 12시간 이상 배양한 후 plasmid를 분리하여 *Eco*R I, *Sal*I으로 절단하여 벡터에 삽입된 replicase cDNA를 확인하였다.

## 4. *E. coli*에서 replicase 단백질 과발현 및 확인

pGCV<sub>pol</sub>1800 및 pGCV<sub>pol</sub>2188이 들어 있는 *E. coli*를 50 µg/ml ampicillin이 포함된 LB 배양액에서 OD<sub>600</sub>가 약 0.8~0.9가 될 때까지 배양하였다. 이 때를 기준시간으로 하여 isoprophylthio-β-D-galactoside (IPTG, USB, Cleveland, OH)의 최종 농도가 0.1 mM되게 첨가하여 발현을 유도하였으며 1시간 간격으로 1 ml씩 배양액을 수확하여 SDS-PAGE 시행시까지 -20°C에 보관하였다. pGEX-4T-3 융합단백 벡터는 벡터내 lac operon repressor의 지배하에 있으므로 tac promoter를 활성화시켜 발현을 유도하기 위하여 배지에 IPTG를 첨가하였다.

## 5. SDS-PAGE

시간별로 채취된 발현된 시료 1 ml씩을 100 µl의 solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris · Cl,

10 mM EDTA)으로 녹인 후, phenylmethylsulfonyl fluoride를 100 µg/ml 되도록 넣고, 2×DTT sample buffer (0.125 M Tris · Cl, 4% SDS, 20% glycerol, 0.2 M DTT, 0.02% bromophenol blue, pH 6.8)를 160 µl 첨가한 후 잘 섞어 주고, 5분간 끓인 후, 4℃에서 12,000×g로 10분간 원심분리하여 세포 찌꺼기를 제거한 후 그 상층액을 SDS-PAGE하여 분석하였다.

Discontinuous linear slab 젤 (10~15% separating gel, 5% stacking gel)에 전기영동 완충용액 (0.025 M tris, 0.192 M glycine, 0.1% SDS, pH 8.3)을 사용하여 각 well당 동량의 시료를 걸어 60 mA에 80분간 전기영동을 시행하였다 [22,23]. 전기영동 후 젤은 염색용액 (45% methanol, 10% glacial acetic acid, 0.1% Coomassie blue R-250)에서 1시간 염색하고, 탈 염색용액 (30% methanol, 10% acetic acid)에서 탈색한 후 Phospho image analyzer (Fugi Film, Tokyo, Japan)를 이용하여 젤 사진을 보관 및 출력하였다.

#### 6. GST-Replicase 융합 단백질의 수확 및 절단

Replicase가 가장 많이 발현되는 5시간까지 30 ml의 LB 액체배지 (ampicillin 농도, 50 µg/ml)에서 pGCV<sub>pol</sub>1800 및 pGCV<sub>pol</sub>2188을 IPTG로 유도하여 발현시키고, 발현된 단백질들이 inclusion body (IB)를 형성하는 것을 현미경으로 확인한 후, *E. coli* 숙주 단백질에서 따로 inclusion body만을 모으기 위해 다음의 방법을 실시하였다. 배양한 *E. coli*를 4℃에서 12,000×g로 10분간 원심분리하여 세포를 수확하고 세포 부양 완충용액 (500 mM NaCl, 55 mM Tris · Cl, 1.5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 100 g/ml PMSF, pH 8.0)을 첨가하여 세포를 부유시킨 후 lysozyme을 첨가하고 37℃에서 40분간 반응시켜서 세포벽의 파괴를 유도하였다. 세포 분쇄기 (Model 250 sonifier, Branson Ultrasonics Co. Danbury, CT) 55 Watts, 70% pulse로 3회 실시하여 세포를 완전히 파괴하였으며, 세포가 용해되었는지를 현미경으로 확인하였다. 세포 파쇄물을 4℃에서 7,200×g로 10분간 원심분리하여 상층액은 버린 후, IB만 수확하고 1% Triton X-100가 포함된 1×PBS (pH 8.0) 1 ml로 실온에서 10 분간 방치하여 IB를 두 차례 같은 방법으로 세척하였다. 4℃에서 7,200×g으로 10분간 원심분리한 뒤 2 ml의 8 M urea로 실온에서 1시간 동안 처리하여 IB를 분해하였다.

수확된 융합 단백질로부터 원하는 replicase를 얻기 위하여 이중 일부를 1×PBS로 1시간 간격으로 3번 갈아주며 12시간동안 4℃에서 투석하여 urea를 제거한 후, 이중 일부를 thrombin protease (Pharmacia, 0.15 g/ml)로 처리하여 GST-replicase 융합단백질을 절단하였다.

#### 7. 과발현된 단백질과 한국인 혈청과의 Immunoblot

IB로부터 수확한 GST-융합 replicase, 발현된 후 affinity chromatography로 정제된 GST, thrombin protease로 처리된 replicase를 SDS-PAGE로 분석한 후 국내인으로부터 항-HuCV 혈청으로 다음과 같이 immunoblot시켜 보았다.

전기영동이 끝난 젤을 transfer buffer (0.02 M Tris-HCl, pH 8.3, 0.19 M glycine, 20% methanol)에 넣고 1시간 동안 서서히 흔들어 준 후 transfer cassette에 고정시켜 3~4시간 동안 4℃에서 0.65 mA/gel cm<sup>2</sup>의 전류를 가하여 nitrocellulose (NC) paper에 electroblotting한 후 blocking buffer (6% non-fat dry milk, 0.1% tween 20, in tris buffered saline [TBS])에 4시간 동안 담구어 항체들의 비특이적 결합을 차단시켰다.

소아 장염환자의 혈청을 6% non-fat dry milk가 있는 세척용 완충액 (1×TBS, 0.1% tween 20) 1:50에 NC membrane를 담구어 6시간 동안 회전하며 반응시켰다. 세척용 완충액으로 3회 세척하고 biotin conjugated anti-human IgG를 6% non-fat dry milk가 들어 있는 세척용 완충액으로 1:2,000 희석하여 90분간 회전하면서 반응시켰다. 다시 세척용 완충액으로 3회 세척하고 horseradish peroxidase가 결합된 avidin을 1:2,000으로 희석하여 1시간 동안 회전하면서 반응시켰다. 마지막으로 세척용 완충액으로 3회 세척후 chloronaphthol 용액을 기질로하여 발색시키고 띠가 확인되면 TBS로 세척하여 발색반응을 중단시켰다. NC membrane이 건조되면 Phospho image analyzer (Fugi Film)를 이용하여 사진들을 보관 및 출력하였다.

#### 8. rNV EIA 및 Western blot

96 microtiter plate (Dynatech, Chantilly, VA)를 한 well당 100µl (1µg/ml in 0.01M PBS, pH 7.2)의 rNV로 씌우고 실온에서 4시간 보관하였다. 각 well을 200µl의 0.05% Tween 20-PBS (이하 모든

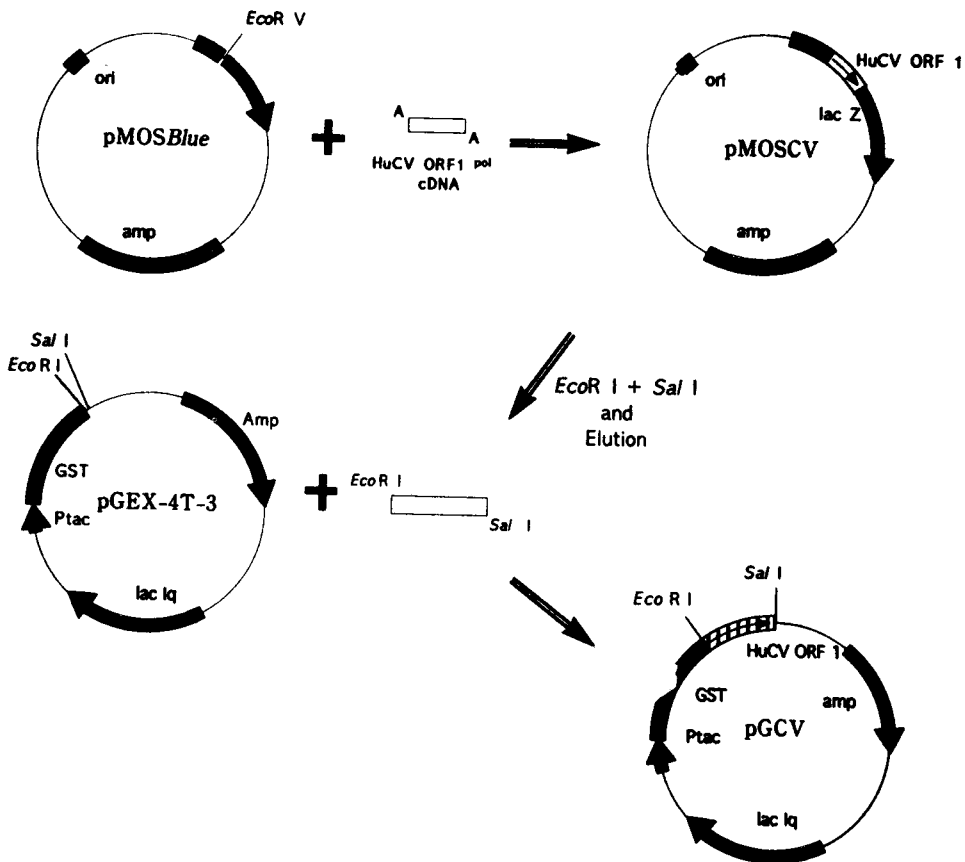
세척액 상등)로 씻고 200 $\mu$ l씩의 5% skim milk (in 0.01M PBS)를 첨가한 후 4 $^{\circ}$ C에서 일주야 보관하였다. 200 $\mu$ l씩의 세척액으로 두번 씻고 1% skim milk-PBS로 1: 64로 희석하여 일단 검사한 후 양성이면 1: 9600까지 2 배수씩 희석하고, 음성이면 1: 16, 1: 32로 재검사하였다. 사람 혈청 100 $\mu$ l을 두개씩의 well에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 보관하였다. 다시 6번 씻고 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-human IgG, M, A (Cappel Organon Teknika Corp., West Chester, PA)을 1% skim milk-PBS로 1: 5,000 희석하여 그 희석액을 well당 100 $\mu$ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 보관한 후 다시 6번 씻었다. 2,2-azino-di [3-ethylbenz-thiazoline-6-sulphonate]) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 100 $\mu$ l씩을 넣고 30분후에 A414에서 OD값을 측정하였다.

rNV (2.5 mg/ml) [19]의 SDS-PAGE 및 환자 혈청과의 immunoblot은 위의 replicase의 그것과 유사한 조건에서 rNV에 대한 다가 토끼혈청 (rabbit anti-rNV), 0.5% BSA/TBS로 2배수로 1/100까지 희석된 환자 혈청, horseradish peroxidase가 결합된 anti-human immunoglobulin (Sigma) (0.5% BSA/TBS용액으로 1/3,000~1/5,000 희석) 및 발색기질인 chloronaphthol의 사용으로 수행되었다.

## 결과 및 성적

### 1. 한국형 HuCV ORF1<sup>pol</sup>들의 염기배열 규명 및 과발현 대상 선택

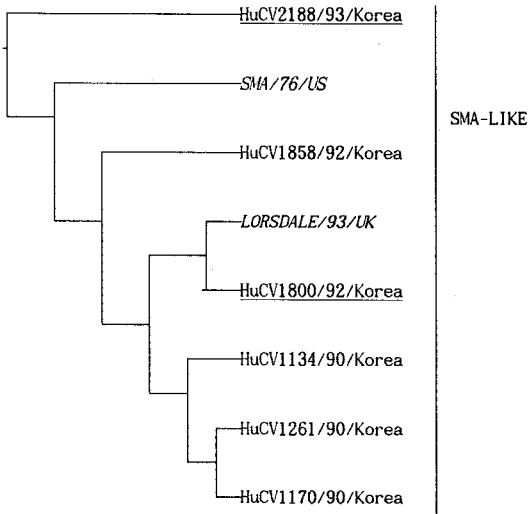
국내 장염소아들의 변 검체를 대상으로 HuCV ORF1<sup>pol</sup> 부위에서 채택된 primer쌍들 (Table 1)을 사용한 RT-PCR을 적용하였더니 470, 404 또는



**Fig. 1.** Construction of expression vector, pGCVpol. Each 470bp fragment corresponding to ORF1<sup>pol</sup> sequence from cDNA was amplified by PCR, cloned in pMOSBlue T-vector, and subcloned in pGEX-4T-3, a glutathione S-transferase (GST) gene fusion vector.

**Table 1.** Sequences and polarity of oligonucleotide primers used for RT-PCR

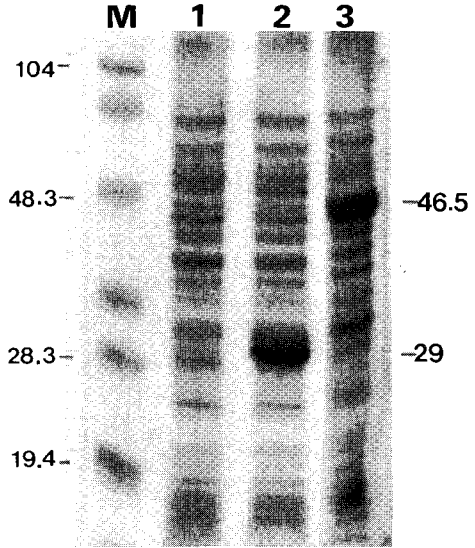
Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Polarity
35	CTTGTTGGTTTGAGGCCATAT	-
51	GTTGACACAATCTCATCATC	-
36	ATAAAAAGTTGGCATGAACA	+
3	GCACCATCTGAGATGGAT	+



**Fig. 2.** Dendrogram of the RNA polymerase region of Snow Mountain-like caliciviruses. The nucleic acid sequences between primers 36/35 were aligned using the PC/Gene multiple alignment program. The reference for each of the caliciviruses is from our laboratory and from EMBL/GenBank Data bases [6-8]. Underlined indicate the viral strains of which replicases expressed in *E. coli* in this study.

206 bp의 길이를 가지는 cDNA가 관찰되었다. 이들을 pMOSBlue-T 벡터에 삽입하여 *E. coli*에 형질전환시키고 염기서열을 규명한 결과 positive-strand RNA virus의 RNA polymerase region에 공통되는 GLPSG와 YGDD 아미노산 motif가 관찰되었다. 분석된 염기서열에 의거하여 multiple sequence alignment 및 유전적 연관성을 예측하기 위한 dendrogram이 만들어졌는데 한국형 분리주들의 62%가 유전적으로 SMA-like calicivirus였다.

따라서 발현대상 바이러스를 국내에 많은 SMA 유전자군에서 선택하기로 결정하였으며, cDNA 단편들중 가장 큰 470bp의 SMA-like 재조합 클론 (pMOSCV<sub>pol</sub>1800 및 pMOSCV<sub>pol</sub>2188)을 대장균 과발현 벡터에 아클론하였다. HuCV1800/92/Korea 및 HuCV2188/93/Korea는 SMA와 90~



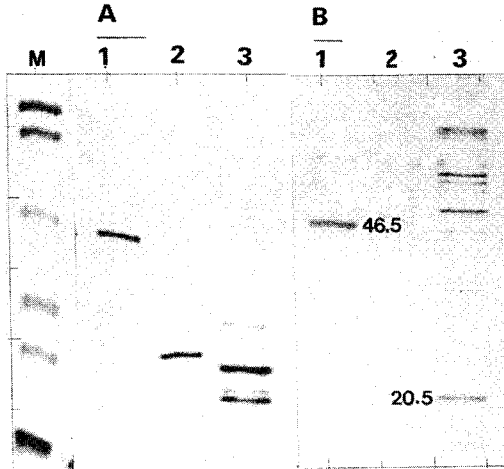
**Fig. 3.** SDS-PAGE of *E. coli* cell extracts expressing pGEX-4T-3 (lane 2) and pGCV<sub>pol</sub> recombinant products (lane 3), compared to that of untransformed host cells (lane 1). The positions (in thousands) of molecular weight markers are shown to the left of the gel. The lane 2 reveals the location of a dense 29 kD glutathione S-transferase (GST) protein and the lane 3 shows that of a 46.5 kDa fusion protein of GST-replicase that are not present in lane 1.

95%의 아미노산 서열을 공유하고 있는 한국형 사람 calicivirus이다 (Fig. 2) [7].

## 2. HuCV ORF 1<sup>pol</sup> cDNA의 과발현

시험된 5개의 발현 벡터들중 pGEX-4T-3 벡터에서 replicase region 단백질의 과발현을 유도할 수 있었으며, 이 재조합 발현 벡터를 pGCV<sub>pol</sub>1800와 pGCV<sub>pol</sub>2188로 명명하였다. 각 클론들을 LB-ampicillin 배지에 접종 후 IPTG를 첨가하여 발현을 유도한 결과, 형질전환시키지 않은 음성 대조 속 주세포인 JM109에서는 새로운 단백질이 관찰되지 않은 (Fig. 3, lane 1) 반면 pGEX 4T-3 벡터만을 발현시킨 경우에는 29 kDa의 GST 단백질이 강하게 발현되었으며 (lane 2), IPTG로 pGCV<sub>pol</sub>의 발현이 유도되었을때는 46.5 kDa정도의 replicase-GST 융합 단백질이 관찰되었다 (lane 3). 이 융합 단백질의 발현은 IPTG 처리후 시간이 지나면서 점차로 증가되어 5시간 후 정점을 이루었으며, 그 이후에는 더 이상 증가하지 않았다.

발현된 단백질이 대장균내의 세포질로 발현되는지 또는 세포밖의 배지속으로 방출되는지를 알



**Fig. 4.** SDS-PAGE of purified GST-replicase fusion protein (lane 1), GST (lane 2) and replicase alone (lane 3) stained with Coomassie blue (panel A) or immunoblotted using anti-HuCV serum (panel B). The GST-replicase fusion protein was eluted from inclusion bodies by sonication and cleaved by thrombin protease. A 46.5 kDa fusion protein of the GST-replicase and a 20.5 kDa replicase are labeled with their molecular weights in panel B.

아보기 위하여 IPTG로 유도되기 전과 후의 대장 균액을 위상차 현미경으로 관찰하였다. 또한 Triton X-100 및 lysozyme을 첨가하여 숙주세포를 완전히 파괴한 후 원심분리하여 세포질과 inclusion body만을 따로 분리하여 전기영동한 결과 46.5 kDa의 replicase-GST 융합단백이 세포질 쪽보다 inclusion body쪽에서 관찰되었다. 이로서 융합단백이 발현된 후 세포질이나 세포 배양액으로 방출되기보다는 inclusion body의 형태로 세포내에 축적됨을 알 수 있었다. 또한 pGCV<sub>pol</sub>1800과 pGCV<sub>pol</sub>2188의 두 클론 모두 동일한 분자량의 융합 단백을 생산하였다.

Western blot에 사용될 시료로 이 융합단백에서 replicase 단백을 분리하고 순수정제하기 위하여 sonicator와 8M urea를 이용하여 inclusion body를 용해시키고 thrombin protease로 절단한 결과, 20.5 kDa의 replicase 단백과 26 kDa의 GST 단백을 분리할 수 있었다 (Fig. 4).

### 3. 항혈청을 이용한 융합 단백질의 발현 확인

Replicase 단백질의 항원성을 파악하기 위하여 발현 단백질과 HuCV로 감염된 소아 장염환자들의 혈청들과의 immunoblotting 결과 46.5 kDa의 re-

**Table 2.** Cross Reactivity between *E. coli*-Expressed Replicase

Pediatric Sera	pGCV <sub>pol</sub> 2188 <sup>a</sup>	pGCV <sub>pol</sub> 1800 <sup>a</sup>	pGCV <sub>pol</sub> 2188 and/or pGCV <sub>pol</sub> 1800
1	+	++	++
2	+	-	+
3	-	+	+
4	+++	-	+++
5	+++	++	+++
6	-	+	+
7	-	+	+
8	-	+++	+++
Control	-	-	-

Note. <sup>a</sup>SMA, Snow Mountain like agent. pGCV<sub>pol</sub>2188 shares 92% amino acid sequence homology with pGCV<sub>pol</sub>1800.

**Table 3.** Serological study of recombinant Norwalk virus capsid and replicases SMA-like HuCVs

Sera of	rReplicases of	rNV Capsid
	pGCV <sub>pol</sub> 2188/ pGCV <sub>pol</sub> 1800	EIA or WB
Infants and children with gastroenteritis	8/8 (100) <sup>a</sup>	6/8 (75)
Healthy adults	2/11 (18)	9/11 (82)

Note. <sup>a</sup> No. positive/ No. tested (%).

placase-GST 융합 단백 및 20.5 kDa의 replicase 단백질이 있는 시료에서만 양성반응이 관찰되었고, GST 단백 자체는 음성반응을 나타내었다 (Fig. 4).

발현된 pGCV<sub>pol</sub>1800은 8 혈청 검체중 4개와 반응하였고 pGCV<sub>pol</sub>2188은 6개와 반응하여, 클론에 따라 반응이 다양한 것으로 밝혀졌으며, 두가지 클론을 같이 사용할 시는 100%의 양성 반응을 나타내었다 (Table 2). 이를 baculovirus에서 발현된 rNV capsid를 항원을 사용한 EIA 및/또는 immunoblot의 성적과 비교하여 보았을때 소아환자 혈청을 대상으로 한 경우 rNV capsid는 8 검체중 6개의 검체를 탐지한 반면 본 연구에서의 *E. coli*에서 발현된 replicase 단백을 항원으로 하였을때는 동일 검체 8개 모두에서 양성반응이 관찰되었다. 또한 SMA 무증상 성인 혈청을 대상으로 하였을때는 거꾸로 재조합 replicase의 양성 검출율이 18%인 반면 rNV capsid의 그것은 82% (Table 3) 로 무증상 혈청에는 RNA 바이러스 복제를 담당하는 replicase에 대한 항체는 탐지되지 않았다. 즉 재조합 replicase는 무증상과 증상을

구별할 수 있는 특이도를 표현하였다.

## 고 찰

원인이 밝혀지지 않은 폭발적/산발적 급성장염 발발로 어려움이 많은 국내에서 오염된 물이나 어패류 등의 음식을 감염원으로 하는 HuCV가 많을 것으로 예상이 되어오던중, 김 [8]은 한국형 HuCV의 탐지 및 이의 급성장염 원인체로서의 중요성에 관하여 보고하였다. 세계적인 분포도를 나타내는 급성장염/설사는 유아 사망율을 높이는데 크게 기여해 왔으며 대부분이 바이러스성으로 보고되는 가운데 [2,3], 장염/설사로 서늘지역의 종합병원에 입원한 소아환자들 (5세 이하)에서의 HuCV 출현율이 10%로 기존의 장염원인체로 잘 알려진 adenovirus 40/41의 검출율을 증가하였으며 [6,8] 이들 HuCV 분리주들이 유전적으로 매우 다양하다는 사실이 밝혀졌다 [7].

HuCV 지놈이 파악되면서 [1,2,17,18] RT-PCR로 positive-strand RNA virus들의 RNA polymerase region에 공통되는 GLPSG 와 YGDD 아미노산 motif를 탐지하는 분자생물학적인 방법이 사용되기 시작하였으며, 이에 따라 HuCV들은 NV 유전자군, SMA 유전자군, 동물주와 유사한 Sapporo 유전자군을 포함하는 세가지 유전자군으로 분류되기 시작하였다. 그러나, 국내에는 이들 유전자군 이외에 변종들이 상당수 함께 출현하고 있다 [7]. 또한 replicase에 의한 동일 유전자형이라도 capsid의 성격에 따라 항원형에 차이가 있어 rNV로는 HuCV 일부만을 검출할 수 있음이 국내외에서 보고되었다 [6,25].

따라서 본 연구에서는 HuCV 지놈의 ORF들중 분리주들간 유사성이 가장 높은 부위로 RNA 바이러스들의 계통발생학적 분류에도 사용되는 replicase 유전자 [20] 일부를 한국형 HuCV들로부터 분리, 증폭하여 pMOSBlue T-벡터에 클론한 후 염기서열 분석을 통하여 분리주간의 유전적 상관성을 살피고, 클론된 pMOSCV<sub>poi</sub> 들을 대장균 과발현 벡터인 pGEX-4T-3에서 아클론하여 과발현시켰고, 과발현된 replicase 단백질 및 Jiang등 [19]이 발현시켰던 recombinant NV capsid 단백을 SDS-PAGE한 후 한국인 혈청을 사용한 immunoblot으로 이들의 항원성 및 진단시약 예비후보의 역할을 상대적으로 비교, 평가하여 보았다. 국내 장염소아들의 변 검체를 대상으로 NV

ORF1<sup>poi</sup> 부위에서 채택된 primer쌍들을 사용한 RT-PCR 및 염기서열 분석에 의거하면 한국형 분리주들의 62%가 유전적으로 SMA-like HuCV였으므로 발현대상 바이러스를 prototype SMA와 90~95%의 아미노산 서열을 공유하는 HuCV 1800/92/Korea 및 HuCV2188/93/Korea로 결정하였으며, 이들의 cDNA단편들중 가장 큰 470bp 단편은 작은 단편들을 포함하는 크기로 발현후 작은 단백질보다 항원성 및 민감성이 높을 가능성 때문에 470bp 산물의 재조합 클론 (pMOSCV<sub>poi</sub>1800 및 pMOSCV<sub>poi</sub>2188)을 대장균 과발현 벡터에 아클론하였다.

pGEX-4T-3 벡터는 발현하고자 하는 외래단백을 GST와의 융합단백의 형태로 발현시키는데 이 벡터 자체만을 발현시키는 경우에는 29 kDa 크기의 GST 단백질이 관찰되나 외래 유전자를 ligation시킨 후 발현하여 thrombin protease로 절단할 때는 *SalI* 부터 stop codon까지의 벡터부위를 외래단백에게로 뺏기게 되어 GST가 26 kDa 크기로 작아지는 대신 외래단백이 실제의 분자량보다 그만큼 커지는 결과를 나타낸다. 본 연구에서도 아클론된 pGCV<sub>poi</sub>1800와 pGCV<sub>poi</sub>2188 클론들을 LB-ampicillin배지에 접종후 IPTG를 첨가하여 발현을 유도한 결과, pGEX 4T-3 벡터만을 발현시킨 경우에는 29 kDa의 GST 단백질이 강하게 발현되었으나, 두 클론의 재조합 산물인 46.5 kDa정도의 replicase-GST 융합단백을 각각 thrombin protease로 절단하여 전기영동하였을때, 20.5 kDa의 replicase 단백질과 26 kDa의 GST 단백질이 분리되었음을 확인할 수 있었다.

이러한 replicase-GST 융합단백의 발현은 GST 유전자가 *tac* promoter 조절하에 있으므로 *tac* promoter를 유도하기 위하여 IPTG로 처리한 후 시간이 경과하면서 점차로 증가되어 5시간 후 정점을 이루었다. 또한 IPTG로 유도되기 전과 후의 대장균액을 위상차 현미경으로 관찰하여 발현된 단백질 재조합 replicase 단백질 대부분이 세포질내의 inclusion body의 형태로 발현됨을 확인하였다.

HuCV의 prototype인 NV 지놈중 ORF1은 replicase나 helicase와 같은 비구조 단백질을 생산하는데 그 분자량이 약 193 kDa 정도이다 [19]. 본 연구에서와 같은 20.5 kDa의 replicase 단백질은 HuCV의 ORF1중 3D내 일부를 발현시킨 것으로 replicase의 단편단백이라 할 수 있겠다.



Replicase 단백질의 immunoblotting 결과, 46.5 kDa의 replicase-GST 융합단백 및 20.5 kDa의 replicase 단백질이 항원성을 표현하였으나 GST 단백질 자체는 음성반응을 나타내어 재조합 replicase 단백질이 훌륭한 진단 시료가 될 수 있음을 확인시켜 주었다. 또한 20.5 kDa의 분자량을 갖는 replicase 이외의 띠 (>47 kDa)도 양성 반응을 나타냈는데 이는 *E. coli*의 세포질 단백질 것이며 이는 정상적으로 환자의 장내에 상재균총으로 존재하는 *E. coli*에 대한 항혈청의 작용으로 추정된다. 음성 대조군으로 사용된 JM109을 항혈청과 반응시켰을 때에도 상당히 많은 단백질 띠가 나타났는데 이것도 이와 같은 까닭인 것으로 분석된다.

본 연구에서 발현된 pGCV<sub>poi</sub>1800와 pGCV<sub>poi</sub>2188 산물의 환자혈청과의 반응을 살펴보면 전자는 59%, 후자는 75%의 양성반응을 나타내어 클론이 반응하는 범위가 다양한 것으로 밝혀졌으며, 두가지 클론을 같이 사용하였을 경우는 100%의 반응을 나타내었다. 따라서 여러 유전자군에 해당되는 클론들의 발현 산물을 혼합하여 진단시료로 사용한다면 진단시약의 민감도를 최대화할 수 있겠다. Baculovirus에서 발현된 rNV capsid [19]를 항원을 사용한 EIA 및/또는 immunoblot 성적 [25]과 비교하여 보았을 때 RNA 바이러스의 복제에 관여하는 재조합 replicase의 민감도가 높았다. 이는 국내에서의 SMA 또는 NV 유전자군 calicivirus의 상대적인 출현 빈도를 대변하여 주는 성적이기도 하겠다. 그러나, 재조합 replicase 단백질이 무증상 혈청과 증상 혈청을 구별할 수 있는 특이도를 발휘한다는 점에서 재조합 capsid 단백질에 비하여 진단시료로서의 가치가 월등하게 확인되었다.

재조합 replicase 단백질들의 혼합물을 진단시료로 사용한다면 다양한 calicivirus를 찾을 수 있어 임상진단이 실용화될 수 있고, 수질오염 및 어패류 오염이 심각한 국내에서 HuCV의 주 감염원인 물, 음식, 어패류등의 검사에 적용시킬 수 있겠다.

## 결 론

본 연구에서는 1) HuCV 지놈의 ORF중 여러지역 분리주들간 유사성이 가장 높은 부분이며 따라서 RNA 바이러스의 계통발생학적 분류에 사용되는 ORF1<sup>poi</sup> 부위를 prototype SMA와 90~

95%의 아미노산 서열을 공유하는 HuCV1800/92/Korea 및 HuCV2188/93/Korea로부터 분리, 증폭하여 pMOSBlue T 벡터에 클론한 후 염기서열을 규명하고, 2) 클론된 pMOSCV<sub>poi</sub> 들을 대장균 과 발현 벡터인 pGEX-4T-3에서 아클론하여 과발현시켜 20.5 kDa의 replicase 단백을 생산하였으며, 3) 이 발현 산물의 항원성을 증상 및 무증상 혈청에 대한 Western blot으로 평가하였더니 재조합 replicase 단백질은 baculovirus에서 발현된 rNV capsid 항원을 사용한 EIA 및/또는 immunoblot 성적보다 민감도가 우수할 뿐만 아니라 무증상 혈청과 증상 혈청을 구별할 수 있는 특이도를 표현하여 진단시료로서의 가치를 확고히 하였다.

따라서 calicivirus의 여러 유전자군을 대표하는 클론들의 발현 산물을 혼합하여 진단시료로 사용한다면 다양한 HuCV를 찾을 수 있는 임상진단이 실용화될 수 있겠고, 수질오염 및 어패류 오염이 심각한 국내에서 HuCV의 주 감염원인 물, 음식, 어패류등의 검사에 적용시킬 수 있겠다.

## 참 고 문 헌

1. Cubitt, WD, Bradley D, Carter M, Chiba S, Estes M, Saif L, Schaffer F, Smith A, Studdert M, Thiel HJ: *Caliciviridae*. Classification and nomenclature of viruses. Sixth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Arch Virol in press.
2. Kapikian AZ, Estes MK, Chanock RM: Norwalk group of viruses, p. 783-810. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B and Straus SE (ed.), Virology. Lippincott-Raven Press Ltd., New York. 1996.
3. PHLS Working Party on Viral Gastroenteritis: Foodborne viral gastroenteritis (with a brief comment on hepatitis A). PHLS Microbiol Dig 5: 69-75, 1990.
4. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM: Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. J Virol 10: 1075-1081, 1972.
5. Dolin R, Riechman RC, Roessner KD, Tralka TS, Schooley RT, Gary W, Morens D: De-

- tection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. *J Infect Dis* 146: 184-189, 1982.
6. Kim, Kyung H, Xiang, X: Norwalk-like viruses, a common cause of sporadic acute gastroenteritis in Korean children. *J Kor Soc Microbiol* 31: 227-235, 1997.
  7. Han, Dong P, Kim, Ji A, Yang, Jai M, Kim, Kyung H: Human Caliciviruses in Korea: a new prevalent group defined by RNA-dependent RNA polymerase diversity. *J Kor Soc Virol*, 1997.
  8. Kim, Kyung H: Small, round-structured virus in Seoul: determination of its importance and direct sequencing of a genome. *J Korean Society Virol* 25: 23-28. 1995.
  9. Schreiber DS, Blacklow NR, Trier TJ: The small intestinal lesion induced by Hawaii agent: acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Infect Dis.* 129: 705-708, 1974.
  10. Caul EO, Ashley C, Pether JVS: "Norwalk" like particles in epidemic gastroenteritis in the UK. *Lancet* 2: 1292, 1979.
  11. Thornhill TS, Wyatt RG, Kalica AR, Dolin R, Chanock RM, Kapikian AZ: Detection by immune electron microscopy of 26-27 nm virus-like particle associated with two family outbreaks of gastroenteritis. *J Infect Dis* 135: 20-277, 1977.
  12. Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN: Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science* 259: 516-519, 1993.
  13. Lew JF, Kapikian DZ, Jiang X, Estes MK, Green KY: Molecular characterization and expression of the capsid protein of a Norwalk-like virus found in a desert shield with gastroenteritis. *Virology* 200: 319-325, 1994.
  14. Lew JF, Petric M, Kapikian AZ, Jiang X, Estes MK, Green KY: Identification of mini-reovirus as a Norwalk-like virus in pediatric patients with gastroenteritis. *J Virol* 68: 3391-3396, 1994.
  15. Lewis D: Norwalk agent and other small-round structured viruses in the U.K. *J Infection* 23: 220, 1991.
  16. Okada S, Sekine S, Ando T, Hayashi Y, Murao M, Yabuuchi K, Miki T, Ohashi M: Antigenic characterization of small, round-structured viruses by immune electron microscopy. *J Clin Microbiol* 28: 1244-1248, 1990.
  17. Jiang X, Graham D, Wang K, Estes M: Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 250: 1580-1583, 1990.
  18. Jiang X, Wang M, Wang K, Estes M: Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 195: 1-11, 1993.
  19. Jiang X, Wang J, Graham DY, Estes MK: Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 66: 6527-6532, 1992.
  20. Zanotto P, Gibbs M, Gould EA, Holmes EC: A reevaluation of the higher taxonomy of viruses based on RNA polymerases. *J Virol* 70: 6083-6096, 1996.
  21. Sanger F, Coulson AR: A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94: 444, 1975.
  22. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680, 1970.
  23. Towbin H, Staehlin T, Gordon: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose: procedure and some application. *Proc Natl Acad Sci* 76: 4350, 1979.
  24. Blake MS, Johnston KH, Russel-Jones GJ, Gotschlich EC: A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blot. *Anal Biochem* 136: 175. 1984.
  25. Kang, Shin J, Nam, Ki B, Cho, Yang J, Kim, Kyung H: Seroprevalence of Norwalk-like viruses (NLVs) in Seoul: Detection using baculovirus-expressed Norwalk virus capsid antigen. *J Kor Soc Virol* 27: in press, 1997.