# (19) 대한민국특허청(KR)
# (12) 등록특허공보(B1)

| | |
|---|---|
| (51) 。Int. Cl. 7<br>C12N 15/38<br>A61K 39/265 | (45) 공고일자 2001년10월22일<br>(11) 등록번호 10 - 0293761<br>(24) 등록일자 2001년04월06일 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| (21) 출원번호 | 10 - 1993 - 0703773 | (65) 공개번호 | 특1994 - 0701448 |
| (22) 출원일자 | 1993년12월07일 | (43) 공개일자 | 1994년05월28일 |
| 번역문 제출일자 | 1993년12월07일 | | |
| (86) 국제출원번호 | PCT/NL1992/00097 | (87) 국제공개번호 | WO 1992/21751 |
| (86) 국제출원출원일자 | 1992년06월05일 | (87) 국제공개일자 | 1992년12월10일 |

(81) 지정국

국내특허 : 오스트레일리아, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 헝가리, 일본, 북한, 대한민국, 스리랑카, 마다가스카르, 노르웨이, 폴란드, 루마니아, 미국, 몽고,
AP ARIPO특허: 말라위, 수단,
EA 유라시아특허: 러시아,
EP 유럽특허: 오스트리아, 스위스, 리히텐슈타인, 독일, 덴마크, 스페인, 핀랜드, 영국, 룩셈부르크, 네덜란드, 스웨덴,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 9100989 1991년06월07일 네덜란드(NL)

(73) 특허권자

스티칭 센트랄 디르게네스쿤디히 인스티튜트
웬싱씨.제이.지.
네덜란드 엔엘 - 8219 피에이치 렐리스테드 에델허트웩 15

(72) 발명자

리제위크프란시스쿠스안토니우스마리아
네덜란드엔엘 - 1017제이피암스테르담스피겔그라츠19
반오르쇼트요하네스테오도루스
네덜란드엔엘 - 8212에이엔렐리스테드오스트랜드파크18
마에스로저카미엘
미합중국48864미시간오케모스애로우헤드2476

(74) 대리인

김윤배
이범일

심사관 : 임혜준

## (54) 소의 헤르페스비루스1형 결실돌연변이체, 그에 대한 백신 및 소헤르페스비루스1형 검출용 진단 키트

## 요약

본 발명은 글리코프로테인 gE-유전자중 결실을 갖는 소의 헤르페스 비루스 1형의 결실 돌연변이체에 대한 것이다. 돌연변이체는 추가로 티미딘 키나제 유전저 및/또는 글리코프로테인 gI-유전자중 결실을 갖거나, 삽입된 이종 유전자를 가질 수 있다. 본 발명은 gE-유전자 또는 그의 일부로 이루어진 재조합 핵산, 글리코프로테인 gE, 이를 기본으로 하는 펩타이드 및 글리코프로테인 gE와 gI의 복합체 및 이들에 대한 항체, 이들 물질중 어느 하나로 이루어진 백신 및 진단용 키트인 것이다.

## 대표도

도 1a

## 명세서

### [발명의 명칭]

소의 헤르페스비루스 1형 결실 돌연변이체, 그에 대한 백신 및 소 헤르페스비루스 1형 검출용 진단키트

### [발명의 분야]

본 발명은 병원균으로 인한 질병과 관련한 예방접종 및 진단학 분야에 관한 것으로, 활성이 있는 감쇠시킨 백신 또는 불활성화된 백신에 이르는 종래의 방법과 DNA 재조합 기술에 근거한 현대적인 방법 모두를 포함한다.

더욱 상세하게는, 본 발명은 소의 헤르페스비루스 1형(BHV-1)에 대해 동물, 특히 소를 보호하기 위한 활성이 있는 감쇠시킨 백신및 불활성화된 백신에 관한 것으로, 상기 백신은 안전하고 유효할 뿐만 아니라 백신을 접종시킨 집단내에서 비감염된 동물과 감염된 동물을 구별할수 있도록 설계되었다.

또한, 백신을 접종시킨 집단내에서 비감염된 동물과 감염된 동물을 구별하기 위한 시험에 사용될수 있는 진단키트도 본 발명의 분야이다.

### [발명의 배경]

전염성 소 rhinotrachetis 비루스(IBRV)와 전염성 농포 외음부질염 비루스(IPVV)를 포함하는 BHV-1은 소의 호흡계 질환및 번식력 장애의 확장에 상당한 영향을 미친다. 급성 전염후에 BHV-1은 대개 숙주에서 잠복형태로 존재한다.

잠복된 비루스는 -임상적 현상에 의해 수반되거나 수반되지 않을수 있는- 특히 스트레스 하에서 다시 활성화되어 분비될수 있다. 결과적으로, 전염된 소들은 일생동안 BHV-1의 잠재적인 산포체로써 간주되어야만 한다. BHV-1은 네덜란드의 축산업 농가 약 75%에서 풍토병처럼 발생한다. 특히 나이든 소는 혈청학적으로 양성이다.

BHV-1에 대해 접종할수 있는 불활성화된(" 죽은" ) 백신과 감쇠시킨(" 살아있는" )수많은 백신들이 있다. 불활성화된 백신은 열처리, 광조사 또는 에탄올이나 포르말린 처리 등에 의해 BHV-1 비루스를 억제하여 제조된다.

그러나, 이 방법은 종종 보호효과가 불충분하다. 감쇠된 백신은 동종(소)세포 또는 돼지나 개의 세포 등의 이종세포에서 다수의 계대접종에 의해 제조하고 때때로 비루스는 물리적 또는 화학적으로 처리된다. 이 방법에서 미지의 돌연변이/결실(缺失)이비루스 게놈내에서 발생하여 이것은 종종 비루스의 질별을 나타내는 작용을 감소시키기도 한다. 감쇠된 활성이 있는 백신이 불활성화된 백신보다 더 보호작용이 우수한데, 왜냐하면 이들은 숙주의 면역계에 대해 더 많은 비루스 항원이 존재하기 때문이다. 활성이 있는 백신의 또 다른 중요한 장점은 이들은 비내로, 즉 감염후 야생형 비루스의 최초 증식이 일어나는 부위에 투여될수 있다는 것이다. 그러나, 활성이 있는 백신은 개선의 여지가 있다. 활성이 있는 일부 백신은 그들이 퇴화능을 포함하는 것으로 보이는데, 이것은 특히 근육내 투여후에 명백해진다. 모든 활성이 있는 백신은 아마도 예방접종된 소에 잠복하여 남는 것으로 보인다. 또한 백신이 야생형 비루스와 약간만 다를 뿐일 때 발병

력으로의 발전이 일어날 수 있다. 그러나, BHV-1 백신은 야생형 비루스에 의한 감염을 예방할수 없다는 것이 중요한 문제점의 하나이다. 그 결과, 예방접종된 소가 야생형 BHV-1을 퍼뜨릴수 있다.

유효한 백신을 사용하는 것은 BHV-1의 순환을 상당히 감소시킬수 있고 백신과 야생형 비루스를 구별할수 있는 시험은 예방접종된 집단내에서 감염된 소를 검출(그리고나서 제거)할수 있으므로 적절한 BHV-1 조절프로그램에 있어서, 야생형 비루스를 구별할수 있는 유효하고 안전한 백신이 필요하다.

한편, 종래의 백신도자 더 안전하고 야생형 비루스를 구별하는 BHV-1 백신이 개발되었다. 퇴화의 정도가 낮고, 잠복이 적으며 재활성화될수 없는 티미딘 키나제 결실 돌연변이체가 단리되었다. 또한, 재조합 DNA 기술을 이용하여 글리코프로테인 gIII의 유전자중에 결질이 있는 BHV-1 백신이 제조되었고, 이것은 혈청학적 기술에 의해 이 백신을 야생형 BHV-1으로 부터 구별한다. 그러나 이 백신들에 대한 결함이 여전히 남아있다. 한편으로, 티미딘 키나제 유전자는 비루스의 복제에 연관되어 있고 복제가 적을수록 보호효과도 적어지게 된다. 다른 한편으로, 글리코프로테인 gIII 결실 백신이 효율적이 되게 한다. 실제적인 문제는 일반적으로 우수한 방어능을 주는 제조합 백신의 비내 투여가 일부 국가에서는 허락되지 않는다는 것이다.

따라서, 안전하고 유효할 뿐만 아니라 야생형 BHV-1으로부터 구별될 수 있는 백신이 필요하고, 바람직하기로는 이러한 백신중 1이상이 재조합 DNA 기술에 의한 비루스보다는 종래의 방법으로 감쇠시킨 비루스에 기초하는 것이다.

세포배양체의 계대접종을 통해 클리코프로테인 gE 유전자가 없는 BHV-1균주가 얻어졌다. 본 발명의 최초의 연구 결과는 이 유전자가 야생형 BHV-1과 관련한 혈청학적 분류에 아주 유용하고 발병력의 발현에 관련이 있다는 것이었다. 그러므로, 이의 결실은 안전성에 도움을 주고 티미딘 키나제 결실의 이용을 불필요하게 할 수 있다. 글리코프로테인 gE는 방어유도에 있어서 글리코프로테인 gIII보다 덜 중요한 것으로 생각된다. 야생형 비루스와 혈청학적으로 구별될 수 있는 일반적으로 감쇠된 BHV-1 균주는 독특하다. 여기에 최초로 기재된 gE 유전자의 위치와 DNA 시퀀스는 이전에는 알려지지 않았던 것이고 이들로부터 유도될 수 있는 올리고뉴클레오티드, 폴리펩티드 및 올리고펩티드도 알려져 있지 않다. gE 유전자를 기초로 한 혈청학적 분류를 위한 시험 또는 독특한 것이다.

이러한 " 일반적인" (여기서 " 일반적인" 이란 감쇠된 비루스를 단리하기 위해 종래의 방법을 이용하는 것을 말한다) gE 결실 돌연변이체의 중요한 장점은 재조합 백신에 관련된 한 비내 투여할 수 없는 나라에서 비내투여를 가능하게 한다는 것이다. 그러나, 안전성에 대한 다른 관점을 고려하여 이러한 일반적인 gE 결실 백신뿐만 아니라 잘 정의된 재조합 변환 또는 제조되었다. 상기 재조합 백신도 gE 결실을 가지며 - 티미딘 키나제 유전자중에서도 결실을 포함하거나 하지 않을수 있고 - 이종 유전자의 발현 벡터로써 사용될수 있다. 상기 재조합 백신 모두가 동일한 gE-특이성 시험으로 야생형 비루스와 구별될 수 있다. 한세트의 다른 종류의 백신에 대해 표준시험을 이용하는 것은 국제적인 노력으로 BHV-1에 대항하는데 매우 유리할수 있다. 이러한 접근은 BHV-1 백신의 분야에서 이전에는 언급되지 않은 것이다.

소의 항 BHV-1 반응의 혈청학적 분석에서 항-gE 항체의 중요한 분획이 글리코프로테인 gE 및 다른 BHV-1 글리코프로테인 : 글리코프로테인 gI에 의해 생성된 복합체에 대한 것으로 나타났다. 그러므로 이러한 복합체-특이성 항체의 존재를 증명할수 있는 혈청학적 시험은 항-gE 항체를 검출할수 있을 뿐인 시험보다 더 민감한 것이다. 단일 gE 결실 돌연변이체로 예방접종된 소들은 항-gI/gE항체의 검출을 방해할수 있는 항-gI 항체를 제조할수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 gI/gE 이중결실을 함유하는 백신을 포함한다.

[발명의 요약]

첫째로, 본 발명은 글리코프로테인 gE 유전자중에 결실을 갖는 BHV-1의 결실 변이체를 제공한다. 상기에서 " gE 유전자중에 결실" 이란 유전자 전체의 결실을 포함한다.

감쇠방법에 의한 글리코프롤인 gE-유전자 중에 결실을 갖는 이하에 기재된 결실 돌연변이체 Difivac-1 등의 BHV-1의 결실 돌연변이체는 본 발명의 바람직한 구현예이다.

재조합 DNA 기술에 의해 제조된 글리코프로테인 gE-유전자 중에 결실을 함유하는 이하에 기재된 결실 돌연변이체 1B7 또는 1B8 등의 BHV-1의 결실 돌연변이체는 본 발명의 다른 바람직한 구현예이다.

글리코프로테인 gE-유전자의 결실및 글리코프로테인 gI 유전자의 결실을 함유하는 이하에 기재된 gI/gE 이중결실 돌연변이체 Difivac-IE 등의 BHV-1의 이중 결실 돌연변이체는 본 발명의 또 다른 구현예이다.

또한, 최대 안전성 측면에서 본 발명에 따르면 BHV-1의 결실 돌연변이체는 글리코프로테인 gE-유전자 및 티미딘 키나제 유전자중에 결실을 가지는 것이 바람직하다. 본 발명은 글리코프로테인 gE 유전자, 글리코프로테인 gI-유전자및 티미딘 키나제 유전자중에 결실을 갖는 BHV-1의 결실 돌연변이체를 포함한다.

본 발명은 상기한 BHV-1의 결실 돌연변이체및 적당한 담체 또는 보조약을 함유하는, BHV-1에 대해 동물, 특히 포유동물, 더 구체적으로 소를 보호하기 위한 예방접종용 백신 조성물을 제공한다. 이 조성물은 활성인 또는 불활성인 백신 조성물이다.

본 발명은 글리코프로테인 gE-유전자중에 결실을 갖고 재조합 DNA 기술에 의해 삽입된 이종 유전자를 함유하는 BHV-1의 돌연변이체에 의해 구현된다. 바람직하기로는, 본 발명은 글리코프로테인 gE-유전자 위치에 재조합 DNA 기술에 의해 삽입된 이종유전자를 함유하는 BHV-1 돌연변이체에 관한 것으로, 이종 유전자는 gE-유전자의 조절 시퀀스의 조절하에 있고 시그널 펩티드를 코드하는 gE-유전자 부분에 임의로 부착되어 있다. 상기 이종 유전자는 BHV-1의 상이한 프로모터 또는 이종 프로모터의 조절하에 있을수 있다. BHV-1의 돌연변이체가 글리코프로테인 gE-유전자중에 결실이외에 티미딘 키나제 유전자 및/또는 글리코프로테인 gI-유전자중의 결실 등의 다른 결실을 가질 경우, 상기 이종 유전자는 이러한 추가의 결실 위치에 삽입될 수 있다. 하나의 결실위치에 함께 또는 여러개의 결실위치에 걸쳐서 여러개가 삽입될 수 있다.

삽입된 이종 유전자는 면역원성 프로테인 또는 다른 병원균의 프로테인을 코드하거나 면역반응을 촉진하는 사이토킨을 코드한다. 적당한 사이토킨의 예로는 인터루킨 2, 인터페론-알파 및 인터페론-감마가 있다.

본 발명은 또한, 면역원성 프로테인 또는 다른 병원균의 펩티드를 코드하는 이종유전자를 함유하는 BHV-1의 돌연변이와 적당한 담체 또는 보조약을 함유하는 (상이한 병원균에 대해 동물, 특히 포유동물, 더욱 구체적으로 소를 보호하기 위한 예방접종용 (활성이 있거나 불활성화된) 백신 조성물을 제공한다. 물론, 상기한 보호란 1이상의 병원균, 즉 다수의 이종 유전자를 함유하는 돌연변이체를 포함하는 다가의 백신에 관한 것이다.

본 발명은 BHV-1의 글리코프로테인 gE-우, 이 글리코프로테인 gE-의 일부 또는 이 글리코프로테인 gE-유전자로부터 유도된 뉴클레오티드 시퀀스를 함유하는 재조합 핵산으로 이루어진 조성물에 관한 글리코프로테인서이다.

상기 조성물은 BHV-1의 글리코프로테인 gE-유전자, 이 글리코프로테인 gE-유전자의 일부 또는 이 글리코프로테인 gE-유전자로부터 유도된 뉴클레오티드 시퀀스를 함유하는 재조합 핵산이 삽입된 클로닝 또는 발현벡터를 포함할수 있다.

본 발명은 또한 BHV-1의 글리코프로테인 gE, 이 글리코프로테인 gE의 일부, 이 글리코프로테인 gE로부터 유도된 펩티드 또는 글리코프로테인 gE 및 gI의 복합체를 함유하는 조성물및 BHV-1의 글리코프로테인 gE에 특정한 항체, 이 글리코프로테인 gE-유전자로부터 유도된 펩티드 또는 글리코프로테인 gE 및 gI의 복합체를 함유하는 조성물을 포함

한다. " 항체" 란 대부분의 사용에 바람직한 폴리클로날 항체 제조물과 모노클로날 제조물 모두를 의미한다. " 글리코프로테인 gE의 일부" 및 " 글리코프로테인 gE로부터 유도된 펩티드" 란 보통 적어도 약8개의 아미노산을 가지는 gE - 특이성 아미노산 시퀀스를 의미한다.

본 발명은 BHV - 1의 글리코프로테인 gE - 유전자부터 유도된 뉴클레오티드 시퀀스를 가지는 핵산 프로브 또는 프라이머와 핵산검출분석에 적합한 검출기구로 구성되고, 동물, 특히 포유동물, 더욱 구체적으로 소로부터 얻어진 샘플, 특히 혈액 또는 혈청, 혈세포, 우유 등의 생물학적 샘플, 눈물, 폐세척액, 콧물, 정충, 특히 정액, 타액, 가래 등의 체액 또는 조직, 특히 신경조직에서 BHV - 1의 핵산을 검출하기 위한 진단키트에 관한 것이다.

본 발명은 BHV - 1의 글리코프로테인 gE, 이 글리코프로테인 gE의 일부, 이 글리코프로테인 gE로부터 유도된 펩티드 또는 글리코프로테인 gE 및 gI의 복합체와 항체 검출분석에 적합한 검출기구로 구성되고, 동물, 특히 포유동물, 더욱 구체적으로 소로부터 얻어진 샘플, 특히 혈액 또는 혈청, 타액, 가래 등의 생물학적 샘플, 눈물, 폐세척액, 콧물, 우유 또는 조직에서 BHV - 1에 특이한 항체를 검출하기 위한 진단키트에 관한 것이다. 이러한 진단키트는 또한 BHV - 1의 글리코프로테인 gE 또는 BHV - 1의 글리코프로테인 gE 및 gI의 복합체에 특이한 1이상의 항체를 함유한다.

본 발명은 또한 BHV - 1의 글리코프로테인 gE 또는 BHV - 1의 글리코프로테인 gE 및 gI의 복합체에 특이한 1이상의 항체와 프로테인 검출분석에 적합한 검출기구로 구성되고, 동물, 특히 포유동물, 더욱 구체적으로 소로부터 얻어진 샘플, 특히 혈액 또는 혈청, 혈세포, 우유 등의 생물학적 샘플, 눈물, 폐세척액, 콧물, 정충, 특히 정액, 타액, 가래 등의 체액 또는 조직, 특히 신경조직에서 BHV - 1의 프로테인을 검출하기 위한 진단키트에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 BHV - 1의 글리코프로테인 gE - 유전자로 이루어진 핵산의 존재, 또는 BHV - 1의 글리코프로테인 gE의 존재, 또는 BHV - 1의 글리코프로테인 gE 및 gI의 복합체의 존재, 또는 BHV - 1의 글리코프로테인 gE 또는 글리코프로테인 gE 및 gI의 복합체에 특이한 항체의 존재에 대하여 동물에서 유래한 샘플, 특히 혈액 또는 혈청, 혈액 세포, 정충, 특히 정액, 타액, 가래등의 생물학적 샘플, 눈물, 폐세척액, 콧물, 우유 등의 체액, 또는 조직, 특히 신경조직 등을 검사하는 것으로 이루어진 동물, 특히 포유동물, 더 구체적으로 소의 BHV - 1 감염을 결정하는 방법을 제공한다.

시험샘플은 본 발명에 따른 백신 조성물로 미리 예방접종되지 않은 동물로부터, 또는 본 발명에 따른 백신 조성물로 미리 예방접종된 동물로부터 유래할 수 있다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 전체적으로 또는 부분적으로 글리코프로테인 gE - 유전자가 결핍된 살아 있고, 불활성화된 한 세트의 BHV - 1 백신에 관한 것이다. 이 세트는 천연 gE 결실 돌연변이체 및, 티미딘 키나제 유전자 및/또는 글리코프로테인 gI 유전자의 결실로 구성되거나 또는 구성되지 않은 조립 gE 결실 돌연변이체, 및 이종 유전자용 벡터로서 사용되는 조립 gE 결실 돌연변이체로 구성된다. 또한 본 발명은 BHV - 1 글리코프로테인 gE - 유전자를 코드하는 뉴클레오티드 시퀀스, 이 시퀀스에서 유도되는 올리고뉴클레오티드, 글리코프로테인 gE 그 자체, 상기 시퀀스에서 유도되는 펩티드 및 상기 시퀀스에서 유도되는 gE 글리코프로테인 및 펩티드에 대향하는 (모노클로날 또는 폴리클로날)항체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 BHV - 1의 글리코프로테인 gE 및 gI의 복합체 및 이와 같은 복합체에 대향하는 항체에 관한 것이다.

본 발명에 의한 이들 물질은 다음과 같은 것에 사용될 수 있다.

1) BHV - 1에 의해서 발병한 질병에 대해서 가축의 예방접종, 여기서 BHV - 1 감염동물과 예방접종된 동물을 구별할수 있고, 종래의 백신과 조립한 백신을 나란히 사용할 수 있다.

2) BHV - 1 질병과 다른 병원균에 의해서 발병한 질병 모두에 대해서 가축의 예방접종, 여기서 보호 항원용 코드시퀀스를 BHV - 1 결실 돌연변이체에 삽입할 수 있다.

3) 가축의 혈액, 혈청, 우유, 또는 기타 체액이 야생형 BHV - 1에 의해 감염되었는지 또는 gE 결실 돌연변이체로 예방접종되었는지 여부를 혈청학적으로 또는 핵산검출기술(예, PCR)로 측정하는 시험.

글리코프로테인 gE - 유전자 및 BHV - 1의 글리코프로테인 gI - 유전자의 코드 시퀀스에서 유도되는 올리고펩티드, 폴리펩티드 및 글리코프로테인의 합성

실시예에 기재된, 글리코프로테인 gE - 유전자(제3a도) 및 이 유전자를 코드하는 단리시킨 DNA절편의 DNA시퀀스분석결과로, 표준 분자 - 생물학적 과정을 사용하여 gE프로테인의 펩티드(올리고 또는 폴리펩티드)를 합성할 수 있고, 원핵경로(세균중에서)를 거쳐서 또는 진핵경로(예, 해양생물 세포중에서)를 거쳐서 gE 프로테인을 전체로 또는 대부분 발현시킬 수 있다. 이들 경로를 거쳐서, gE - 특이 항원을 얻을 수 있고, 이것은 예를 들면 gE - 특이 모노클로날 항체(Mabs)를 생성시키도록 작용할수 있다. 또한, gE - 특이항원(및 gE - 특히 Mabs)은 혈청학적 시험에 사용되어서 BHV - 1 gE결실 백신으로 예방접종시킨 동물과 야생형 BHV - 1 비루스로 감염된 동물을 구별할수 있다.

실시예에 기재된 글리코프로테인 gI - 유전자 및 이 유전자를 코드하는 단리시킨 DNA절편의 부분 DNA시퀀스분석결과와 글리코프로테인 gE를 발현시키는 진핵세포로 진핵세포중 gI/gE복합체를 발현시키도록 해준다(제13도 및 제14도 참조). 이 글리코프로테인 복합체는 gI/gE 특히 모노클로날 항체를 생산하기 위하여 사용될 수 있다. 또한 gI/gE 복합체는 혈청학적 시험에서 단일 gE BHV - 1 결실 돌연변이체 또는 이중 gI/gE BHV - 1 결실 돌연변이체로 예방접종시킨 가축과 야생형 BHV - 1 비루스로 감염된 가축을 구별하는 데 사용될 수 있다.

gE - 특이 펩티드

공지의 프로테인 코드 시퀀스에 기초해서, 자동 합성기에 의하여, 약 40 - 50이상의 아미노산을 갖는 폴리펩티드를 제조할 수 있다. BHV - 1 균주 Lam의 gE 글리코프로테인의 프로테인 코드 시퀀스가 해명되었고(제3a도), 이 BHV - 1 gE 글리코프로테인의 폴리펩티드가 합성될 수 있다. 이와 같은 폴리펩티드를 사용하고, 표준방법에 의해서, 마우스 또는 토끼와 같은 동물을 면역시켜서 gE - 특이 항체를 생성시킬 수 있다. 또한, 이들 gE - 특이 펩티드를 사용하여서, 항 gE 항체가 gE프로테인과 반응하는 위치(에피토프)를, 예를 들면 PEPSCAN법(Geysen et al., 1984, Proc. Nat1. Acad. Sci. USA 81, 3998 - 4002)으로 더욱 구체화할수 있다. gE - 특이 올리고펩티드는 항 gE항체를 증명하는 혈청학적 시험에 사용될 수 있다.

gE의 원핵 발현

세균중에서 gE 프로테인을 합성(즉, gE의 원핵발현)시키기 위하여, 글리코프로테인 gE 또는 그 일부를 코드하는 DNA절편을 원핵 발현 벡터 중으로 반드시 클로닝시켜야 한다. 원핵 발현 벡터는 환상 DNA분자들이며, 이것은 그 자체가 세균중에서 분리해서 복제하는 분자(플라스미드)로서 유지될 수 있다. 이들 발현 벡터는 하나 이상의 표시기 유전자를 함유할 수 있고, 이 유전자는 항생물질 저항체를 코드해서 발현 벡터로 세균을 선택할 수 있게 해준다. 또한, 발현 벡터는 (흔히 조절할 수 있는 프로모터 영역으로 구성되며, 이 영역 뒤에서 DNA 절편들은 연결될 수 있고, 이어서 프로모터 영향하에 발현된다. 많은 원핵 발현 벡터 중에서, 목적하는 프로테인이 발현되고, 한편으로 소위 담체 프로테인에 융합된다. 이와 같이 하기 위해서, 벡터 중에서 프로모터 뒤에 담체 프로테인의 코드 시퀀스이 위치하고, 이것에 직접 인접해서 목적하는 DNA 절편이 연결될 수 있다. 융합 프로테인은 흔히 더욱 안정하고, 보다 쉽게 인식될 수 있고, 단리될 수 있다. 특별한 융합 프로테인이 특정 세균 균주에서 얻어질 수 있는 고정상 레벨은 융합과 균주에 따라서 달라진다.

서로 다른 조합으로 하는 것이 관례이다.

글리코프로테인 gE - 유전자의 진핵 발현

비록 프로테인의 원시핵적인 발현이 어떤 잇점을 제공한다고 할지라고 프로테인은 진핵세포에서 발생되는 글리코실레이션 등과 같은 변성이 부족하다. 그 결과로, 진행적으로 발현된 프로테인은 보통 더욱 안정된 항원이 된다. 쥐세포와 같은 진핵세포에서 프로테인의 이종발현을 위하여 진핵발현벡터를 만들어서 사용한다. 이러한 벡터들은 대장균세포에서 증배될 수 있을 뿐 아니라 진핵세포에서 안정되게 생존할 수 있는 플라스미드이다. 진핵적 선택표식에 추가해서, 이들은 또한 진핵선택표식으로 이루어져 있다. 원시핵 발현벡터와 유사하게 진핵 발현벡터는 원하는 유전자가 결찰될 수 있는 촉진제부를 포함하고 있다. 하지만, 진핵 벡터에 있는 촉진제 시퀀스는 진핵세포에 대해 특별하다. 더우기, 진핵벡터에서 프로테인을 운반하기 위한 융해는 거의 좀처럼 이용되지 않는다. 이러한 벡터들은 표준 트랜스펙션법[F. L. Graham and A. J. van der Eb, 1973, Virology 52, 456 - 467]에 의해 진핵세포에 삽입된다. 진핵플라스미드벡터에 추가해서 이종 유전자가 비루스의 제놈(예를들면, 레토로비루스, 헤르페스비루스 및 종두비루스)으로 삽입되는 곳에 비루스성의 벡터가 또한 있다. 이때, 진핵세포는 재조합 비루스로 감염될 수 있다.

일반적으로, 벡터와 세포형태는 대부분 특별한 유전자 생성물에 대해 안정하다고 예측할 수는 없다. 대개, 여러 조합이 시도되게 된다.

글리코프로테인 gE와 글리코프로테인 gI의 진핵발현

얻어진 프로테인의 최종 구조는 그의 일차 아미노산 시퀀스, 그의 주름형성, 그의 번역후수식 등에 달려있다. 프로테인의 구조에 기여하는 가장 중요한 인자는 하나 또는 그 이상의 다른 프로테인과의 상호작용이다. 우리는 BHV - 1 글리코프로테인 gE가 적어도 하나의 다른 글리코프로테인: BHV - 1 글리코프로테인 gI의 복합체를 형성한다는 것을 발견할 수 있었다. 이러한 복합체를 위한 일차 표시는 지원자 항 - gE Mabs 1, 51, 67, 75 및 78(표 2)의 결과로 부터 나온다. 이러한 Mab은 DiFivac - 1와 Lam gE $^-$ 와 반응하지 않았으나, 글리코프로테인 gE - 발현 3T3 세포임을 확인하는데 실패하였다. 하지만, 이러한 Mab은 DiFivac - 1에 감염된 후에는 gE - 발현 3T3 세포와 반응을 하여 이러한 Mab에 대한 적절한 항원성 구조인 글리코프로테인 gE를 제시하도록 보충인자가 필요하다는 것을 보여주고 있다. Mab 81로 방사선 - 면역침전 실험의 일부에서, 겉보기 분자량 63kD로 프로테인의 상호침전이 있음을 발견하였다. 단순헤르페스 비루스 글리코프로테인 gE가 필적할만한 분자량(HSVI 글리코프로테인 gI)을 갖는 프로테인의 복합체를 형성한다는 측면에서, 우리는 BHV - 1 글리코프로테인 gE가 비루스 gI의 BHV - 1 동족체를 갖는 복합체를 형성한다는 것을 추론하였다. 이러한 BHV - 1 gE/gI 복합체를 연구하기 위하여 그리고, 적당한 항원성구조를 갖는 gE 항원을 생성시키기 위하여 우리는 하나의 진핵세포에 있는 글리코프로테인 모두를 발현시켰다. 이를 위해, 우리는 글리코프로테인 gE 단독의 진핵성 발현에서 기재한 것과 동일한 절차를 적용하였다. 다만 부가적인 필요조건으로는 서로 다른 진핵적으로 선택될 수 있는 표식을 갖는 발현벡터의 사용이다.

혈청학적 시험

gE에 대한 항체를 기본으로 하는 Difivac - 1로 예방접종된 소와 야생형의 BHV - 1로 예방접종된 소들 간에 구별지우기 위한 혈청학적 방법은 gE에 대해 유도된 단클론항체의 사용을 기본으로 하는 것이 바람직하다. 이들은 다음의 방식에 사용될 수 있다.

a) Van Oirschot et al.(Journal of Virological Method 22, 191 - 206, 1988)에 기재된 원리에 따르면, 아우제스키병(Aujeszky's disease)의 비루스에 대한 gI항체의 검출를 위한 ELISA에서, 항체들은 gI에 두개의 다른 에피토프를 갖는 두 Mab의 반응에서 저지효과에 의해 증명되게 딘다. 이 시험은 다음과 같이 수행된다. 즉, 마이크로티터판을 37℃에서 하룻밤 동안 Mab 1으로 코팅한 후에 4℃ 또는 - 20℃에서 저장한다. 실험하고자 하는 혈청을 별도로 코팅되지 않은 마이크로티터판에서 예를들어 37℃에서 2시간 동안 항원으로 예비항온처리시킨다. 상기 Mab 1 - 코팅된 판을 예

를들어 5번 세척한 후에 고추냉이 퍼옥시다아제(HRPO)에 결합된 Mab이 위치하고 있는 판에 이동시키고, 37℃에서 1시간 동안 항온처리시킨다. 다시 이판을 세척하고, 기질을 각각의 웰에다 첨가한다. 실온에서 2시간 후에, 이판들을 분광측광법으로 읽었다. 각각의 판에는 4개의 네거티브 제어 혈청들과 4개의 포지티브 혈청의 체감희석을 포함하고 있다. 광학적 밀도(OD)값이 동일한 판에서 실험된 4개의 네거티브 제어 혈청의 평균 OD 값의 50%이하인 혈청은 포지티브이라고 생각된다.

b) IDAS(Indirect Double Antibody Sandwich)의 원리에 따르면, 마이크로티터판을 Mab이나 gE 프로테인에서 유도된 다클론성 혈청으로 코팅을 한다. gE - 항원 제조에 대한 항온처리는 코팅에 결합되어 있는 gE에 기인한다. 실험하고자 하는 소의 혈청에서 gE에 대해 특별하게 유도된 항체는 연속적으로 gE에 결합되게 된다. 이렇게 결합된 항체는 항 - 소의 면역글로불린 접합에 의한 것으로 인식된다. 이러한 접합에서의 항체는 퍼옥시다아제 효소에 공유결합적으로 결합되어 있다. 결국, 결합접합은 색소생산성 기질의 첨가에 의하여 눈에 보이게 된다. 반응의 특이성은 gE - 항원의 제조 대신에 gE - 네거티브 제어의 제조와 동일한 절차수행에 의하여 점검된다. 각각의 마이크로티터판에는 포지티브 및 네거티브제어 혈청들이 포함되어 있다. 이 시험은 포지티브 혈청이 어떤 희석물에서 포지티브로 기록된다면 유효한 것이다. 만일 그것의 OD가 표준 네거티브제어 혈청에 비해 0.2 이상일 경우에는 혈청이 포지티브이다.

c) 2 밑에 기재한 IDAS 원리에 따르지만, 시험하고자 하는 혈청의 항온 처리후에 항 - 소면역글로불린 접합 대진에 항 - gE Mab/HRPO가 사용된다. 항 - gE Mab 대신에 항 - Ge 펩타이드 혈청이나 항 - gE 다클론성 혈청이 사용될 수 있다. 판을 세척하고 각각의 웰에다 색소생산성 기질을 첨가한다. 실온에서 2시간 후에, 판을 분광측광법으로 읽는다. 4개의 네거티즈제어 혈청과 4개의 포지티브 혈청의 체감희석물을 각각의 판에 포함시킨다. 동일한 판에서 시험한 4개의 네거티브제어 혈청의 평균 OD값 보다 50% 이하의 OD값을 가지는 혈청은 포지티브라고 생각된다.

d) 저지 ELISA의 원리에 따라, 정제되거나 정제되지 않은 비루스 항원을 마이크로티터판에 하룻밤동안 코팅시킨다. 이들 판에서, 시험하고자 하는 혈청을 예를들어, 한시간 동안 또는 37℃에서 오랫동안 항온처리시킨다. 세척공정 이후에, 항 - gE Mab을 판에 첨가시킨 후에, 예를드렁, 37℃에서 1시간 동안 항온리한다. 항 - gE Mab 대신에 항 - gE 펩타이드 혈청이나 항 - g - E 다클론 혈청이 사용될 수 있다. 판을 세척하고, 각각의 웰에다 색소생산성 기질을 첨가한다. 실온에서 2시간 후에 판을 분광측광법에 의해 읽는다. 4개의 네거티브제어 혈청과 4개의 포지티브 혈청의 체감희석물을 각각의 판에 포함시킨다. 동일한 판에서 시험한 4개의 네거티브제어 혈청의 평균 OD값 보다 50% 이하의 OD값을 가지는 혈청은 포지티브라고 생각된다.

상기에 나열한 모든 것중에서, 통상적으로 gE가 포함된 성장 비루스 항원이 사용될 수 있지만, 원시핵 또는 진핵을 통해 발현된 gE - 항원도 사용될 수 있다. 다른 한편으로, 통상적인 항원 대신에 BHV - 1 gE 시퀀스를 기본으로 하는 올리고펩타이드가 상기 진단학 시험에 사용될 수 있다. 추가로, 이러한 올리고펩타이드는 Kemp et al., Science 241, 1352 - 1354, 1988에 기재된 원리에 따른 소위 " 카우 - 사이드(cow - side)" 시험의 개발을 위해 사용될 수 있다. 이러한 시험은 감염된 동물에 존재하는 gE에서 유도된 항체에 의한 올리고펩타이드의 항원 시퀀스의 결합을 기본으로 한다. 이러한 시험을 위해 올리고펩타이드를 소의 적혈구에 대한 Mab에 결합시키게 된다.

핵산분석사용 및 폴리머라아제 사슬반응

예방접종된 동물과 감염된 동물간의 구별을 위해 폴리머라아제 사슬반응에 올리고뉴클레오티드(탐침과 프라이머)가 사용될 수 있다. 폴리머라아제 사슬반응(PCR)은 병원체의 핵산을 단시간내에 수백만번 증배시킬 수 있는 기술이다(De polmerase kettingreactie, P.F.Hilderink, J.A. Wagenaar, J.W.B. van der Giessin and B.A.M. van der Zeijst, 1990, Tijdschrift voor Diergeneeskunde deel 115, 1111-1117). gE 포지티브 제놈에서 보다 gE 포지티브 제놈에서 다른 생성물이 형성되므로 gE 올리고뉴클레오티드가 선택될 수 있다. 이것의 잇점은 gE 결실백신으로 예방접종된 동물이 PCR 시험에서 포지티브 신호를 제시한다는 점이다. 하지만, 이러한 접근은 시료, 예를들어, 시험하고자 하는 동물에서 나온 혈액에서 비루스의 핵산 존재에 달려있다.

급성 BHV-1 감염후에, BHV-1 특이적 핵산이 혈액에서 실증될 수 있는 큰 변화가 있지만, BHV-1 핵산이 잠복시 혈액에서 실증될 수 있는지 아직 규명하지는 목하였다.

벡터로서 BHV-1의 사용

BHV-1 제놈에서 이종 유전자를 발현시키기 위하여, 이종 유전자를 삽입시키고자 하는 지역에 대한 정확한 정보의 정리가 필요하다. 필수적인 시퀀스의 어떤 혼란이 있으면 안되며, 이종 유전자의 발현을 위해 규칙적인 시퀀스를 이용할 수 있어야만 한다. 원리적으로, 글리코프로테인 gE-유전자는 이종 유전자를 발현시키기 위해 적당한 위치에 있다. gE-유전자는 필수적인 것이 아니므로, gE-유전자를 이종유전자로 대체시키는데 이의가 없다. 결론적으로 이종 유전자는 규칙적인 gE-유전자의 시퀀스의 영향하에 있을 수 있는 위치에 있게 할 수 있다. 하지만, 규칙적인 gE-유전자의 시퀀스를 사용할 필요는 없다. 이종 유전자의 발현은 예를들어, 보다 강한 다른 유전자의 규칙적인 시퀀스에 의해 제어될 수 있다. gE-유전자의 신호 펩타이드에 이종 유전자를 결찰시킬 수 있으므로 이종 유전자 생성물의 분비물이 영향을 받을 수 있다. gE-유전자 및 gE 프로테인의 상세한 지식은 매우 정확한 방식으로 벡터로서 BHV-1의 사용 가능성을 분명히 제공할 수 있다. 게다가 현상된 벡터는 혈청학적으로 야생형과 구별될 수 있다. 이종 유전자가 별현된 BHV-1 돌연변이체의 구조는 실시예에서 보는 바와 같이 gE 돌연변이체의 구조와 동일한 방식으로 수행할 수 있다. 하지만, 결실편을 이종 유전자가 결실위치에 위치하고 있는 편으로 대체시켜야 한다.

[실시예]

1) 정상 gE 결실 돌연변이체의 단리 및 식별

a) 정상 돌연변이체의 단리

제놈 RNA를 표분방법에 따라 여러개의 통상적으로 감쇠된 백신으로 부터 단리하고, 제한효소를 사용하여 분석하였다. 특히, 야생형의 BHV-1 비루스와 구별하기에 적당한 제놈 편차에 대해 조사하였다.

BHV-1 제놈의 Us 영역에 특히 주의하였다. 그 이유는 단순헤르페스비루스와의 동족성에 의해 중요하지 않은 글리코프로테인에 대해 코드하는 다수의 유전자가 영역에 위치하기 때문이다[세포 배양액에서 성장하는데 없어도 되는 유전자 군내의 단순 비루스 1 글리코프로테인 유전자의 식별, R. Longnecker, S. Chatterjee, R.J. Whitley and B. Roizman (1987) Proc. Nat1. Acad. Sci. 84, 4303-4307].

소의 수태생신세포와 소의 수태기관세포(Ebtr)에서 여러번 통과시킨 후에, 유고슬라비아의 자그레브 대학(Lugovic et al., Veterinarski Arhiv 55, 241-245, 1985)에서의 1회분의 BHV-1 백신은 정상 $U_S$영역에 추가해서 편차 $U_S$영역을 가지는 것이 입증되었다. 더우기, 이러한 백신은 Ebtr 세포상에 크고 작은 플러그형성을 나타낸다. 이러한 혼합된 집단에서, 3번의 제한 희석단계를 통해서 작은 편차 $U_S$영역을 갖는 비루스를 작은 플러그로 단리시켰다. 이러한 과정으로 단리된 비루스를 추가로 시험하였고, DiFivac-1이라 칭하였다. 이것은 1992년 5월27일자로 프랑스, 파리의 엥쉬띠트 파스퇴르(Insitut Pasteur)에 기탁번호 I-1213으로 기탁되었다.

b) Difivac-1의 gE 유전자 에서 결실의 식별

$U_S$ 영역에서 편차의 추가 분석을 위해, 표준방법에 따라 Difivac - 1의 제놈 DNA를 단리하였고, 써던 블롯분석(제1a도)을 조건으로 하였다. $^{32}P$ 라벨을 붙힌 야생형 Hind Ⅲ K 절편을 갖는 이러한 블롯의 교잡에서 Us 영역의 중심에 위치하고 있는 이 절편이 Difivac - 1에서 약 1.0킬로베이스(Kb)짧다는 것을 확인하였다. 더우기, 이러한 분석에 의하여 결손부위의 위치가 접근하게 된다(제1b도). 이러한 결실의 추가분석을 위해, 야생형 BHV - 1 균주 램의 Us 영역을 단리시키고, 원시핵성 벡터에 클론화시켰다. 그것을 위하여, 표준방법에 따라, 램 균주의 제놈 DNA(제2a도)를 단리시키고 벡터 pUC18, pACYC 및 pBR322(제2b도)에 클론화시켰다. 결실의 예상위치 주위에 그 지역의 물리적지도를 구성시켰다(제2c도). 이러한 물리적지도로 부터 출발하여, 이 지역의 뉴클레오티드 시퀀스를 결정하는데 적당한 서브클론을 벡터 pKUN19와 pUC18에 작도하였다(제2d도). 이러한 서브클론을 사용하여 전지역(제2c도에 표시한)의 두 사상체의 뉴클레오티드 시퀀스를 생거(Sanger)법으로 결정하였다. 이러한 뉴클레오티드 시퀀스(SEQ ID NO:1)은 PC/유전자 프로그램을 사용하여 분석하였다. 개념적인 번역으로 부터, 575 아미노산의 개방형판독프레임에 대한 뉴클레오티드(nt) 168 내지 nt 1893 코드가 나타난다(제3a도). 추가적인 분석에서 아미노산 시퀀스가 제3b도에서 보여주는 바와 같은 트랜스멤브레인 글리코프로테인의 특성을 보였다. 일차 26 아미노산(aa)이 대표적인 진핵성 신호로서 확인되었고, aa 423과 aa 450사이의 지역은 트랜스멤브레인 지역으로서 확인되었다. 추가해서, 이 시퀀스에서는 3개의 잠재적인 N - 결합글리코시레이션 부위가 발생되었다. 이렇게 예측된 아미노산 시퀀스는 단순헤르페스비루스(HSV)의 글리코프로테인 gE - 유전자와 유사한 면을 보였다(제4a도 및 제4b도 참조).

이들 및 유사체들은 발견된 유전자가 BHV - 1의 gE 동족체임라는 결론을 정당화하게 된다. 이러한 이유 때문에, 유전자를 gE로 칭한다. 이러한 BHV - 1 gE - 유전자가 DiFivac - 1에 결손되는 범위를 정하기 위하여, p318 절편을 단리하였다. p318 절편은 가정된 BHV - 1 개방형판독프레임전에 있는 AluI 부위 55nt와 그 뒤쪽에 선단 133nt에서 출발한다. 써던 블롯교잡을 사용하여 제놈성 Difivac - 1 DNA를 p318 절편으로 분석하였다. 여기서, Difivac - 1 및 p318를 검출할 수 있는 시퀀스가 포함되어 있지 않음이 밝혀졌다(제5도). 이 실험은 Difivac - 1은 결실을 포함하고 있고, 이 결실은 전 gE 유전자로 확장됨이 분명히 증명되었다.

결실된 영역의 크기와 위치를 결정하기 위하여, Difivac - 1의 Us 영역을 커버하는 제놈성 시퀀스를 원시핵성 벡터에 클론하였다. 제11c도에서 보는 바와 같다. 14.5kb EcoRI 절편을 pACYC 벡터에 클론하고, p775로 하였다. 7.4kb HindIII 절편을 독립적으로 pUC18벡터에 클론하고, p728로 하였다. 클론 p728로 부터 두개의 서브클론을 단리하였다. 즉, 클론 p737에 1.4kb PstI 절편과 클론 p754에 350bp AluI - PstI 절편. 이러한 클론의 제한 효소분석과 써던블롯 분석(데이타는 없음)은 Difivac - 1에서 gE 결실이 gE 유전자로부터 5'출발에서 Us 영역의 가장자리에서 끝나는 2.7kb로 길음이 증명되었다. 제11b도에서 보는 바와 같이, 이들 2.7kb는 반복영역의 이상확장으로써, gE 유전자의 반대편에 있는 Us영역에 위치하는 1kb 세그멘트의 중복에 의해 대체된다. 이 분석의 결과를 확인하고 정확한 재조합점을 결정하기 위하여 제12도에서와 같이, 대부분의 클론 p754의 삽입의 뉴클레오티드 시퀀스가 결정되고, 야생형의 시퀀스와 비교된다. 이 분석은 재조합점이 gE 유전자의 출발코돈으로 부터 위쪽의 77bp에 위치함을 보여주고 있다.

c) Difivac - 1의 안전성 및 효율성 평가

Difivac - 1을 BHV - 1 혈청음성인 특정 병원체가 없는 7주된 송아지에서 시험하였다. 8마리의 송아지를 비강내로 $10^5$ $TCID_{50}$ 2㎖로 예방접종하되 1㎖는 각각의 비공에 분사시켰다. 별도의 단리장치에 가두워진 8마리의 BHV - 1 혈청음성인 특정 병원체가 없는 7주된 송아지를 비강내로 배양매체 2㎖를 주고, 이것을 예방접종하지 않은 대조군으로 취급하였다. 예방접종 후 5주후에 예방접종된 송아지와 대조 송아지들은 높은 발병력이 있는 BHV - 1 균주 Iowa $10^7$ $TCID_{50}$로 비강내로 공격받았다. 공격받은 후 6주후에 목든 송아지들을 추정 잠복비루스가 활성화되도록 덱사메타손으로 5일동안 근육내로 치료하였다. 임상적인 표시, 렉탈 온도 및 몸체 성장을 기록하였다. 비루스 단리를 코면봉으로 수행하였고, 중성화 항체역가를 혈청으로 결정하였다.

백신의 접종 후에, 송아지의 행동, 식욕, 렉탈온도 및 성장속도가 정상적으로 유지되었지만, 예방접종된 송아지는 어떤 심각한 코배설이 있었고, 어떤 과유연이 있었다. 비점막에서의 병변은 관찰되지 않았다. 예방접종 후에 Difivac - 1을 코면봉으로 추출하였다(제17도). 예방접종된 모든 송아지들은 BHV - 1에 대한 중성의 항체를 생산하였다.

공격한 후에, 백신이 접종되지 않은 모든 대조 송아지들은 감정둔마, 식용감퇴, 눈과 코배설, 아랫턱의 치육의 조홍, 도전한 후 14일 동안 비점작의 심한 병변 및 4일 동안 성장정지를 나타내었다. 예방접종된 송아지는 비점막의 병변이 조금, 빠르게 치유되었고, 성장정지가 없었다. 공격한 후에 매일의 임상적인 점수, 렉탈온도 및 성장현상을 제18, 19 및 20도에 제시하였다. 공격한 후에, 모든 송아지는 코에서 비루스를 배출시켰다. 비루스 배출의 양과 기간은 예방접종된 송아지에서는 현저하게 감소되었다(제21도). 2차 항체반응은 예방접종된 송아지에서 전개되었으며, 백신이 접종되지 않은 송아지는 모두 공격후에 항체가 생성되었다.

활성화 후에, 공격비루스를 예방접종된 한마리의 송아지와 백신이 접종되지 않은 5마리의 송아지에서 단리시켰다. Difivac - 1은 활성화되지 않았다.

상기 결과는 Difivac - 1이 어린 송아지에서 어떤 질병의 표시를 유발하지 않았고, 활성화되지 않았음을 입증하고 있다. Difivac - 1는 질병의 혹독성과 공격후의 비루스 배출량을 현저하게 감소시켰다.

결론적으로, BHV - 1 감염에 대해 Difivac - 1은 소에 사용하는데 있어서 안전하고, 효험이 있는 백신이다.

2) BHV - 1 의 재조합 gE 결실 돌연변이체의 작도

Difivac - 1 보다 분자적으로 좋게 정의되고, 필요하다면 티미딘 키나아제 유전자에서의 결실과 부가적으로 gE 유전자에서의 결실을 포함하는 분화할 수 있는 BHV - 1 백신의 배열을 가질 수 있도록 하기 위하여, 재조합 gE 결실 돌연변이체와 Difivac - 1를 작도하였다. 글리코프로테인 gE - 유전자의 결정된 위치로 부터 출발하고, gE - 유전자가 측면에 있는 클론된 DNA 절편을 사용하여 gE 결실 절편을 작도하였다. 표준기술(F. L. Graham and A. J. vander Eb, 1973, Virology 52, 456 - 467)을 사용하여, 이 결실절편을 gE 결실 돌연변이체에서 기인한 야생형 BHV - 1 균주의 제놈으로 재조합하였다.

a) gE 결실 절편의 작도

gE 결실 절편의 작도에 대해, 야생형 제놈으로 재조합되도록 한편으로는 전체 gE 시퀀스가 부족하고 다른 한편으로는 측면 시퀀스가 충분한 절편을 목표로 하였다. 5'(윗)측면에서, gE 유전자의 출발코돈 전의 18nt에서 끝나는 1.2kb PstI - AsuII 절편을 선택하였다. 3'(아래)절편에 대해, gE 유전자의 정지코든 전의 2nt에서 출발하는 1.2kb EcoNI - DraI 절편을 선택하였다(제6도).

gE 결실 절편을 작도하기 위하여, gE 유전자의 5' 면에 위치한 BHV - 1 균주 램의 8.4 kb HindIII k 절편에서 나온 1.4kb PstI - SmaI 절편을 플라스미드 pUC18의 SmaI와 PstI 부위로 서브클론시켰다. 이 클론을 p515라 부른다. gE의 3'면에 위치하고, 4.1 kb HindIII - EcoRI 클론에서 나온 EcoNI - SmaI 절편을 단일 AsuII 부위에 클론시켰다. 따라서, gE 결실 절편의 작도는 완성되었으며, 이렇게 작도된 클론을 p519라 부른다. 원리적으로, p519의 전체 PstI - SmaI 삽입이 gE 결실 절편으로 사용된다 할지라도, 이것은 권할만 하지 못하다. 사실, PstI - SmaI는 Us 영역의 측면에 있는 반복시퀀스로 약 100 - 150 베이스 페어(bp)확장된다. 100 - 150bp의 조각은 반복시퀀스와 gE 유전자가 위치하지 않는 Us 지역의 다른 측면에서 재조합되어 원하지 않는 재조합 생성물을 산출하게 된다.

b) 야생형 BHV - 1의 제놈과 gE 결실 절편읜 재조합

작도된 gE 결실과 야생형 BHV - 1의 제놈간의 재조합 작용을 위하여 F.L. GrHAM과 A.J. van der Eb(1973, Virology 52, 456 - 467)의 표준방법에 따라 두개의 DNA분자의 마이크로그람의 양을 소의 생신(Ebtr) 세포에 상호전입시

켰다. 세포성 재조합 메카니즘은 세포에 의하여 합체되어진 DNA 분자(2 - 4%)의 재조합을 유도하게 된다. 재조합된 gE 결실 돌연변이체의 선택을 위하여 전입시킨 후에 형성된 비루스 혼합물을 신선한 Ebtr 세포배양액에 파종시킨다. 대부분의 경우에 이생의 비루스 집단에 의한 발육(반점)은 하니의 비루스에서 비롯된다. BHV - 1 균주 램의 gE 결실 돌연변이체의 단리에 대하여 이들 230 반점이 단리되며, Difivac - 1로 감염된 세포와 반응하지 않는 BHV - 1 특이성 단클론성 항체(Mabs)로 표준면역학적인 방법에 따라 실험된다. 이들 Mabs는 글리코프로테인 gE에 대한 것이다. 5개의 230반점은 이들 Mabs와 반응하지 않는다. 이들 5반점의 DNA는 더 조사를 하였다.

c) BHV - 1 균주램의 작도된 gE 결실 돌연변이체의 DNA분석

상기에서 언급한 5개의 지원자 gE 결실 돌연변이체의 돌연변이개(1B7, 1B8 및 2H10)의 DNA 제제는 써던 블롯분석기술(Sambrook et al. 1988)을 사용하여 추가로 시험하였다. PstI와 DraI로 이들 DNA 제제의 이주소화는 비루스군집 1B7과 1B8의 제놈의 gE 유전자가 원하는 방식으로 정확하게 제거되어진 것을 보이는 소식자와 같이 2.3kb PstI - DraI 결실 절편으로 겔 전기영동과 써던 블롯교잡에 의해 따르게 된다(제7a도 및 제7b도). 군집 2H10은 편차 PstI - DraI 절편을 갖는다. gE - 특이성 소식자로의 써던블롯교잡은 gE 시퀀스가 3개의 DNA 제제중 어느 것에도 위치하지 않음을 보여주고 있다(결과는 나타내지 않음). BHV - 1 비루스 군집 1B7과 1B8은 재조합성 gE 결실 돌연변이체를 가르킨다. BHV - 1 비루스 군집 1B7은 백신특성에 대해 시험되어 왔다.

d) 티미딘 키나아제의 작도/gE 이중 결질 돌연변이체

단지 하나의 유전자에서 결실이 있는 BHV - 1 재조합 결실 돌연변이체는 충분한 감소된 발병력이 없을 수 있기 때문에, 결실이 BHV - 1 균주 램과 하버링크의 티미딘 키나아제(TK) 유전자에도 제공되게 된다. 이러한 돌연변이체들은 상기에서 언급한 gE 결실 돌연변이체에 대해 사용된 것과 유사한 방식으로 작도하였다(결과는 나타내지 않음). 이러한 TK 결실 돌연변이체가 TK/gE 이중 결실 돌연변이체를 작도하는데 사용되게 된다.

e) 글리코프로테인 gI/글리코프로테인 gE 이중 결실 돌연변이체의 작도

단일 gE 결실 돌연변이체로 예방접종된 소는 항 gI/gE 항체(후술함)의 검출을 방해할 수 있는 항 - gI 항체를 생산할 수 있기 때문에 gI/gE 이중 결실을 가지는 백신을 발견하게 되었다. 이러한 gI/gE 이중 결실 돌연변이체는 gE 단일 결실 돌연변이체의 작도를 위하여 사용된 동일한 절차를 사용하여 작도할 수 있다. gE 유전자의 5'말단을 커버하는 1.8kb PstI 절편의 상류 말단의 부분 뉴클레오티드 시퀀스 분석은 다른 헤르페스비루스에서 발견된 gI 동족체에 대해 중요한 동족관계에 있는 개방판독프레임을 나타내게된다(제13도와 제14도). gI 유전자의 추정의 5' 말단을 둘러싸는 350 bp SmaI - PstI 절편과 gE 유전자의 하류에 위치하는 EcoNI - SmaI 절편을 사용하여 gI/gE 결실 절편을 작도할 수 있다. 이 절편을 야생형의 제놈과 재조합되어 BHV - 1 gI/gE 결실 돌연변이체를 산출하게 된다(제16도). 이론적으로 생산할 수 있는 80 - 90 아미노산은 항 - gI/gE 항체의 검출을 방해할 수 있는 항체를 유발할 수는 없을 것이다. 추가로 gI 유전자의 시퀀스분석은 완성된 gI 코드 영역을 커버하는 gI 결실의 작도를 허용하게 될 것이다. 이 gI/gE 이중 결실 돌연변이체를 Difivac - 1이라 부른다.

f) 램 $gE^-$ 와 램 $gE^-$ , $TK^-$ 돌연변이체의 안정성 및 효험 평가

램 gE$^-$ 와 램 gE$^-$ , TK$^-$ 돌연변이체 균주의 백신특성을 7주된 BHV - 1 혈청 음성, 특정 병원체가 없는 송아지로 시험을 하였다. 각각의 돌연변이체 균주를 6마리의 송아지에 비강내로 분사하였다. 각각의 송아지에다 총투여량이 $10^5$ TCID$_{50}$ 인 2㎖배양매체를 공급하되 비공에다가는 1㎖를 분사시켰다. 다른 6마리의 송아지는 비루스가 없는 배양매체를 비강내로 분사하고, 백신이 접종되지 않은 대조군으로 취급하였다. 예방접종한 후 5주후에 예방접종된 모든 송아지와 대조군은 비강내로 높은 발병력이 있는 BHV - 1 균주 Iowa $10^7$ TCID$_{50}$ 로 공격받았다. 백신의 접종 후에, 임상적인 표시, 렉탈온도 및 체중을 기록하였다. 코비루스 탈락의 일수를 결정하기 위하여 코면봉을 사용하였다. 예방접종 후에 송아지의 행동, 식욕, 렉탈온도 및 성장속도는 정상적으로 유지되었다. 예방접종된 모든 송아지는 심각한 코배설이 있었고, 비점막에서 약간의 병변이 관찰되었다. 약7일 동안 백신을 접종한 송아지의 코에서 비루스를 단리하였다(표 1). 공격을 한후에, 백신을 접종하지 않은 모든 대조 송아지는 감정둔마, 식욕감퇴, 눈과 코배설, 아래턱의 치육의 조흥, 심각한 비점막의 병변 및 성장이 감소하였다. 램 gE$^-$ , TK$^-$ 로 백신을 접종한 모든 송아지는 약간의 코배설이 발견되었고, 미소한 비점막의 병변을 보였다. 램 gE$^-$ 로 예방접종된 모든 송아지는 코배설 또는 비점막의 병변이 발견되지 않았다. 감정둔마, 식욕의 감퇴, 또는 다른 임상적인 질병증상이 백신을 접종한 송아지에서는 관찰되지 않았다. 공격을 한 후에, 렉탈온도, 성장 및 임상적인 점수를 제22도, 제23도 및 제24도에 나타내었다. 백신을 접종하지 않은 송아지는 코로 부터의 비루스 탈락이 백신을 접종한 송아지보다 2배이었다(표 1).

상기 결과는 램 gE$^-$ 와 램 gE$^-$ , TK$^-$ BHV - 1 돌연변이체 균주가 어린 송아지에서 어떤 임상적인 질병의 표시를 거의 유발하지 않음이 증명되었다. 돌연변이체 균주는 모두 질병을 방지하고, 코비루스 탈락기간을 50% 감소시키게 된다.

램 gE$^-$ 와 램 gE$^-$ , TK$^-$ BHV - 1 돌연변이체 균주는 안전하고, BHV - 1 감염에 대해 소에 백신을 사용하는데 효험이 있다.

3) gE의 원시핵적 발현

BHV - 1 글리코프로테인 gE - 유전자의 원시핵적 발현을 위하여, 지금까지는 pGEX 발현벡터를 만들어 사용하였다(D. B. Smith and K.S.Johnson, Gene 67 (1988) 31 - 40). pGEX 벡터는 이소프로필티오 갈락토오스(IPTG)에 의하여 발현될 수 있는 택 프로모터의 영향하에 있는 일본주혈흡층으로 부터 담체 프로테인 글루타티온 S - 트랜스퍼라아제(GST)에 대해 코드된다. GST - gE 융합 프로테인의 일례로는 작도 pGEX - 2T600s3(제8a도)의 생성물이 있다.

이러한 작도에서, 표준 분자 - 생물학적 기술(Sambrook et al. 1989)을 사용하여, Ge 프로테인의 200 아미노산의 N - 말단영역에 대해 코드된 600 bp SmaI 절편을 GST 유전자를 두에 결찰시켰다. 이러한 작도는 GST에 결찰되어 있는 600bp 절편의 다른 판독프레임을 여러번인 삼겹으로 설계하였다. 이러한 모든 작도는 IPTG로 유발된 대장균주 DH5α로 인가되고, 형성된 프로테인은 웨스턴 블롯팅에 의하여 폴리아크릴아미드 겔 전기영동후에 니트로셀룰로오스로 전이되었다. 항 - GST 하체로의 면역학적 검출은 gE 프로테인지역에 대해 코드된 적절한 판독프레임(No. 3) 이 예측된 크기인 27k(GST) + 20k(gE) = 47k의 융기된 용융 프로테인의 발현을 유도하게 된다. 우리에 의하여 단리된 Difivac - 1과 반응하지 않는 이들 Mabs는 웨스턴 블롯에서 47kD GST - gE 용융 프로테인로 인식된다.(제8b도).

4)글리코프로테인 gE - 유전자의 진핵적인 발현

글리코프로테인 gE - 유전자의 진핵적인 발현을 위하여, 지금까지는 이중에서도 벡터 pEVHis가 선택되어 왔다. 이 pEVHis 벡터는 진핵적인 표식으로서 2.5mM 히스티디놀의 독성 농도를 소생시키기 위한 세포를 일으키는 히스티디놀 탈수소효소에 대해 코드하는 HisD 유전자를 갖는다[EC 1.1.1.23](C. Hartmann and R. Mulligan, 1988, proc. Nat1. Acad. Sci. USA 85, 8047 - 8051). 더우기 이 벡터는 뒤에 위치하는 단일 제한효소부위와 함께 인간세포거대비루스(HCMV)의 인접한 초기 유전자의 프로모터 영역으로 이루어져 있다. pEVHis/gE 발현벡터의 작도를 위하여 글리코프로테인 gE - 유전자의 전체 코드영역을 이루는 절편을 만들어 사용하였다. gE의 가정된 개방판독프레임 앞의 AluI 부위 55bp에서 출발하고 그 뒤의 55bp에서 끝난다. 이 영역은 pEVHis 벡터의 HCMV 프로모터 뒤에서 클론되어 작도 pEVHis/gE가 형성된다(제9도). 이 pEVHis/gE는 대장균 DH5α세포에서 증폭시켰고, 염화세슘성분으로 정제시켰다(Sambrook et al., 1989). 이 정제된 DNA 는 Graham과 van der Eb의 방법에 따라 Balb/C - 3T3 세포로 전입시켰다. 전

형된 세포를 히스티디놀로 선택하고, 20개의 히스티디놀 내성 클론을 단리시켰다. 이들 클론들을 면역 퍼옥시다아제 단층 시금(IPMA)에 의하여 Mab81로 시험하였다. 4개의 클론이 gE 프로테인을 발현하는 것으로 입증되었다. 이들 4개의 클론중, 3T3gE 클론 9를 높은 gE 발현을 가지는 서브 클론을 단리하는데 사용하였다. 이러한 방법으로 단리된 클론(3T3gE 9.5로 칭함) 항-gE 단클론성 항체를 특정화하는데 사용하였다.

5) 동일한 세포내에서 BHV-1 글리코프로테인 gE와 BHV-1 글리코프로테인 gI의 진핵적인 발현

BHV-1 글리코프로테인 gE와 같은 동일한 세포내에서 BHV-1 글리코프로테인 gI를 발현시키기 위하여, 먼저 BHV-1 글리코프로테인 gI 유전자의 추정위치를 결정하였다. 단순헤르페스비루스 글리코프로테인 gI 유전자는 글리코프로테인 gE 유전자 바로 위에 위치하므로 BHV-1 gI 유전자는 해당 위치에 놓여 있음이 예상되었다. 이 실험을 위하여 시퀀스는 BHV-1 gE 유전자의 출발의 약 1kb 상류에 위치한 283 뉴클레오티드의 영역으로 결정되었다. 이 영역의 개념적인 수식은 이차 판독프레임이 단순 헤르페스비루스 글리코프로테인 gI 와 동족체인 94 아미노산 시퀀스에 대해 코드되는 것을 보여준다(제13도와 제14도). 동족체 세그멘트는 출발코돈에서 부터 약80 아미노산이며, BHV-1 gI 유전자의 개방판독프레임의 예상출발은 시퀀스된 영역에서 부터 약 250nt 의 상류로 평가된다. 이들로 부터, 시퀀스된 영역에서부터 400nt 상류로 출발하여 gE 유전자내에서 끝나는 1.7kb SmaI 절편은 BHV-1 gI 유전자의 완성된 코드영역을 포함하여야 한다. 이 1.7kb SmaI 절편은 진핵적인 벡터 MSV-neo로 클론되어진다(제15도). 이 벡터는 강한 Murine Sarcoma 비루스 프로모터와 항생적인 G-418 황산염 유전성에 대한 내성에 대해 코드되는 선택자 유전자 neo를 포함한다. 최종의 작도된 MSVneoGI는 대장균 DH5α세포에서 증배되며, Graham과 Van der Eb의 방법을 사용하여 3T3gE 9.5세포로 전이된다. 이 전이된 세포는 400㎍ 유전성/㎖ 배양매체로 선택되고, 내성 클론이 단리되고, 3T3gE 9.5세포와의 반응이 실패한 지원자 항-gE Mabs로 시험된다. 이것으로 부터 우리는 야생형 BHV-1와 마찬가지로 Mab66과 반응하는 3T3gE/gI R20 클론을 선택하였다.

6) 지원자 항-gE Mabs의 특성

Mabs는 야생형 BHV-1에 대해 생산되며, Difivac-1 감염된 수태한 소의 기관(Ebtr) 세포와 반응하도록 그들의 결핍에 대해 선택된다. 이들의 Mabs는 다음의 것들과의 반응성에 대해 시험되어진다.

a) 램 gE- 결실 돌연변이체;

b) 웨스턴 블롯에서 상기에 언급한 원시핵적인 발현 생성물;

c) 상기에 기재한 gE-발현성 Balb/c-3T3 세포;

d) c) 밑에 기재한 세포와 Difivac-1로 감염된 세포, 및

e) gE/gI 복합체를 발현하는 Balb/c-3T3 세포.

a, c, d 및 e하에서 반응성 시험에 대해 면역 퍼옥시다아제 단층 시금(IPMA)를 사용하였다. 표 2에서의 결과는 gE(nts. 2, 3, 4, 52, 66, 68, 72 및 81)에 대한 제조된 Mab와 gE/gI 복합체에 강고한 항원성 영역에 대한 것일 수 있는 Mabs(nrs 1, 51, 53, 67, 75 및 78)을 가지고 있음을 보여주고 있다. 최소한 4 항원성 영역을 나타내는 여러가지 Mabs이 글리코프로테인 gE에 존재하고 있고, 하나의 영역이 gE/gI 복합체에 의해 형성된 것이다(표 2).

BHV-1에 의해 감염된 가축에서 항-gE 항체의 검출

gE에 대한 감염된 가축 항체의 혈청에 간접 블록킹 IPMA가 존재하는지를 시험하기 위하여 16 지원자 gE-Mabs으로 수행하였고, 다음의 8개의 혈청을 선택하였다.

- Difivac - 1으로 예방접종하고 발병력이 있는 Iowa 균주로 공격한 소의 2 혈청을 공격한 후에 14일만에 수집하였다.

- 실험적으로 BHV - 1 보조타입 1 비루스로 감염시킨 소의 2혈청을 감염후에 20개월만에 수집하였다. 소중에서 한마리를 접촉노출로 감염시켰다.

- 실험적으로 BHV - 1 보조타입 1b 비루스로 감염시킨 소의 2혈청을 감염후에 20개월만에 수집하였다. 소중에서 한마리를 접촉노출로 감염시켰다.

- ts 돌연변이체 백신으로 예방접종하고 3주후에 BHV - 1 보조타입 2b 비루스로 공격한 특이성 병원체가 없는 송아지의 혈청을 공격한 후 7주만에 수집하였다.

- ts 돌연변이체 백신으로 예방접종하고 3주후에 BHV - 1 보조 2b 비루스로 공격한 송아지의 혈청을 공격한 후에 7주만에 수집하였다.

표 2는 모든 혈청이 gE에 위치한 항원성 영역 III과 IV와 gE/gI 복합체에 위치한 항원성 영역 I에 대한 항체를 포함하고 있음을 보여주고 있다. 따라서, 우리는 gE가 BHV - 1에 감염된 것과 예방접종된 가축간에 구별을 위한 적당한 혈청학적인 표식를 나타낸다고 결론을 내렸다.

7) BHV - 1 gE - 특이성 프라이머를 사용한 PCR과정에 의하여 BHV - 1 핵산의 검출

BHV - 1 gE 유전자의 결정된 뉴클레오티드 시퀀스에서 출발하여, PCR에 대해 적합한 프라이머쌍을 Lowe et al.에 의한 프라이머 선택 프로그램을 사용하여 선택하였다(T. Lowe, J.Sharefkin, S.Qi Yang and C. W. Dieffenbach, 1990, Nucleic Acids Res. 18, 1757 - 1761). 이들 프라이머를 제10도에서 보는 바와 같이, $P_3$과 $P_4$라 부른다. 이 프라이머는 200nt와 떨어져서 놓여 있고, 200nt의 절편의 증배를 유도하게 된다. 프라이머 $P_3$와 $P_4$를 사용하여 BHV - 1 DNA를 단리하고, PCR절차를 위한 조건을 최적으로 하였다. 여기에는 특히 $MgCl_2$농도, 글리세롤 농도 및 사이클링 조건의 변화를 포함하고 있다. BHV - 1 DNA의 증배를 위한 $P_3$와 $P_4$의 사용에 대해 최적의 조건으로는 10mM Tris pH 8.0, 50mM KCl, 0.01% 젤라틴, 2.6mM $MgCl_2$및 20% 글리세롤이다. 최적의 사이클 조건(Perkin Elber Cetus DNA Thermal Cycler)은 사이클 1 - 5; 1분 98℃, 30초 55℃ 및 45초 72℃ 그리고, 사이클 6 - 35; 30초96℃, 30초 55℃ 및 45초 72℃이었다. PCR 증배 이후에, 얻어진 200nt DNA 절편은 니트로셀룰로오스에 블롯되고, 계속해서 써던 블롯분석을 조건으로 사용된 32P dCTP의 라벨이 붙혀진 탐침은 프라이머 결합부위(제10도) 사이에 놓여 있는 137bp TaqI 절편이다. 교잡된 필터의 자동 방사선 사진술 후에 200bp 밴드가 관찰될 수 있다. 이 과정을 통해서 단지 10 BHV - 1 제놈의 증배(약 $1.5\times10^{-15}$ μg DNA)는 적절하게 검출될 수 있는 시그날을 이끌어내게 된다(결과는 나타내지 않음). 비교할 수 있는 방식으로, PCR 과정은 BHV - 1 글리코프로테인 gIII의 코드 시퀀스를 기본으로 한 프라이머를 사용하여 현상하였다(D.R.Fitzpatrick, L.A.Babiuk and T.Zamb, 1989, Virology 173, 46 - 57). 야생형의 BHV - 1 DNA와 gE결실 돌연변이체 백신사이에서 만들어진 것을 구별하기 위하여, DNA 샘플을 gE - 특이성 PCR과 gIII - 특이성 PCR 분석으로 처리하였다. 이러한 시험에서, Difivac - 1 DNA 제제는 gIII 포지티브와 gE 네거티브인 것을 발견하였다.

소의 정액에 BHV - 1 DNA의 검출이 BHV - 1 특이성 PCR 과정에 중요하게 사용될 수 있기 때문에 BHV - 1에 감염된 소의 정액에 gE - 특이성 PCR을 수행하도록 시도하였다. 하지만, 정액에서 잘알려지지 않은 성분이 폴리머라아제 사슬반응에서 강한 억제작용을 갖고 있다. 따라서, 소의 정액으로 부터 BHV - 1 DNA 단리하기 위한 병력을 작성하였다. 소의 정액으로 부터 DNA를 단리하기 위하여, 정액 30㎕를 300㎕의 0.15M NaCl, 0.5% Na - 사코실과 40mM DTT의 전체부피중에 1mg/㎖ 프로테인분해효소 K(pK)와 함께 60℃에서 항온처리시켰다. 1시간 후에, 이 샘플을 실온 이하로 냉각하고, 300㎕의 6M NaI을 첨가하고, 5분 동안 항온처리하엿다. 이 혼합물로 부터 DNA를 표준 클로로포름/이소아밀에탄올 추출물로 단리하고, 1부피의 이소프로판올로 침전시켰다. 이 침전물을 2.5M $NH_4Ac$/70% 에탄올로 세척하고, 2차 항온처리를 위해, 10mM Tris PH 7.4, 1 mM EDTA, 0.5% Tween 80 및 0.1 mg/㎖ pK로 60℃에서 1시간 동안 현탁시켰다. 이 DNA 제제를 직접적으로 폴리머라아제 사슬반응에 따르게 할 수 있다.

[도면의 설명]

제1도

Difivac-1 및 Iowa BHV-1 균주의 써던 블롯(Southern blot)분석

제1a도는 Difivac-1 및 Iowa 제놈성 DNA의 써던 블롯의 자동방사선 사진(autoradiogram)이다. 레인 1 및 3에서, Difivac-1 DNA는 각기 HindIII 및 Pst I에 의해 제한 효소 분해후 적용되었다. 레인 2와 4에 있어서, Iowa DNA는 각기 HindIII 및 Pst I에 의해 제한 효소 분해후 적용되었다. 절편의 크기는 킬로베이스(kb)로 표시된다.

비루성의 DNA는 베크만(Beckman) L5-65 초원심분리기의 SW27 회전날개로 20krpm에서 150mM NaCl 및 1mM EDTA, 트리스 pH 7.4 10mM 중 25%(W/W)슈크로스 완충물을 통해서 2시간 동안 비루스 감염된 Ebtr 세포와 배양매체(70㎖/450㎠ Ca의 롤러버틀)를 원심분리하여 단리시켰다. 이렇게 얻은 비루스 펠렛으로부터, DNA는 표준방법(J.Sambrook, E.F.Fritsch 및 T.Maniatis의 " 분자 클로닝(Molecular cloning)" (실험교재 2판, 콜드 스프링 하버 레이보라토리 출판, 뉴욕)에 따라 단리 시켰다. 이 DNA에서, 제한 효소 분해는 제조회사에서 공급되는 SuRE/cut 완충용액중 베링거 만하임(Boehringer Mannheim)의 효소에 의해 실행하였다.

니트로 셀룰로스 필터(Schleicher & Schuell, Inc)에서 수평 전기이동 및 브롯팅을 위한 0.7% 아가로우스(agarose)겔에서 분리후, 필터를 50% 포름아미드, 3×SSC(1×SSC=0.15M NaCl 및 0.015M Na-시트레이트, pH7.4), 50㎕ 변성된 연어정자 DNA(Sigma/㎖) 및 0.02% 소혈청 알부민, 0.02% 폴리비닐피롤리돈 및 0.02% 피콜(ficoll) 및 0.1% Na-도데실설페이트(SDS)중 42℃에서 6시간 동안 미리 혼성화하였다. 이어서, 혼성화를 32P dCTP(Amersham)표시된 HindIII K 절편의 동일 용액을 첨가하여 실행하였다(HindIII K 절편의 선택은 다음에 기초한다 : John F. Mayfield, Peter J. Good, Holly J. VanOort), Alphonso R. Campbell 및 David A. Reed의 Jounal of Virology(1983), 259-264의 " 소의 헤르페스 비루스 1(쿠퍼균주)로부터 DNA의 클로닝 및 절단 부위 지도화" ). 혼성화 12 내지 14 시간후, 필터를 60℃에서 0.1% SDS 및 0.1×SSC중에서 2시간동안 세척하였다. HindIII K 절편을 표준 클로닝 방법에 따라 pUC18 벡터내로 클론하였다(J. Sambrook, E.F. Fritsch 및 T.Maniatis, 1989, 분자클로닝(Molecular cloning): 실험교재 2판, 콜드 스프링 하버 레이보러토리 출판, 뉴욕). pUC/8.4 HindIII K 클론의 분해후, pUC18 벡터를 0.7% 저융점 아가로우수(Low Melting Point Agarose;BRL, Life Technologies, Inc)에서 전기이동에 의해 8.4kb HindIII K 절편으로 부터 다시 분리시키고, 표준 페놀 추출 및 에탄올 침전에 의해 아가로우스로부터 단리하였다. 단리된 HindIII K 절편을 베링거 만하임(Boehrimger Manheim)의 렌덤 프라임드 DNA표시 키트 1004.760(Randon Primed DNA Cabeling Kit 1004.760)로 표시하였다. 혼성화된 필터의 자동방사선 사진을 반사스크린을 사용하여, -70℃에서 코닥 XAR 필름의 36시간 노출을 통해 찍었다.

제1b도는 Iowa의 8.4kb HindIII K 절편 및 Difivac-1의 7.4kb HindIII 절편의 물리적인 지도이다. Difivac-1에서 64Kb Pstv I 절편의 동시이동(comigration) 및 1.8kb Pst I 절편의 부재 관점에서, 결실(缺失)은 창구지역(hatched area)에서 요구된다.

제2도

Difivac-1에서 부족한 영역 주위의 야생형 BHV-1 절편이 서브클로닝(subcloning)

제2a도에서 BHV-1 제놈의 성분은 유니크 롱($U_L$)영역, 유니크 쇼트($U_S$)영역 및 두반복(Ir 및 Tr)을 나타낸다. 이 지도는 쿠퍼(Cooper)균주의 공개된 분석에 기초한다(John F. Mayfield, Peter J. Good, Holly J. Van-Oort, Alphonso R. Campbell 및 David A. Reed의 Journal of Virology(1983) 259-264).

제2b도에서 절편은 PACYC중 15.2kb EcoR I 절편 및 pUC18중 8.4kb Hing III 절편 및 pBR322중 2.7kb 및 4.1kb EcoRI-HindIII 절편의 원시핵적인(prokaryotic) 벡터로 클론되어진 $U_S$영역으로 부터 나타난다. 비루스성 DNA 절편의 단리는 제1a도의 예로 언급된 공정에 따라 실행하였다. 여러가지 벡터내로 이 절편들의 클로닝을 표준공정을 따라 실행하였다(J.Sambrook, E.F.Fritsch 및 T. Maniatis, 1989, 분자 클로닝(Molecular cloning); 실험교재 2판, 콜드 스프링 하버 레이보러토리 출판, 뉴욕).

제2c도에서, 물리적인 지도는 Difivac-1에서 요구된 결실이 국한되는 영역을 나타낸다.

제2d도에서, 이 영역의 어떤 서브클론은 추가분석을 위해 사용되는 것을 나타낸다. 두 PstI 절편을 pKUN19내로 클론화 하였고, pUC18내로 남아있는 절편을 클론화 하였다.

제3도

제3a도는 제2c도에 나타난 바와 같이 Difivac-1중 결실되어진 [맨 왼쪽의 AluI, 인식 위치로 부터 맨오른쪽의 HincII 인식 위치] 요구된 위치 둘레의 BHV-1 균주 Lam의 $U_S$영역으로부터 2027 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 시퀀스이다. 제2d도에 나타난 서브클론의 삽입에서 뉴클레오티드 시퀀스를 생어등의 디데옥시 시퀀스 방법(F. Sauger, S.Nicken 및 A. R. Coulson, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467)을 사용하여 두가닥으로 분석하여서 측정하였다. 그 끝에 대해, 파마시아(Pharmacia)의 T7 시퀀스 키트를 제조사에 의한 특별한 공정에 의해 사용하였다. 방사선 활성(radioactive) 표시를 위해 [35S]dATP(Amersham)를 사용하였다. 인위구조 압축에 의해 GC 부(富)영역의 시퀀스 분석을 파마시아 키트의 7-디아자-dGTP 변이체에 의해 반복하였다. 뉴클레오티드 시퀀스 아래에 지시는 3-글자 코드로, 575aa 잔류물의 오픈 리딩 프레임(open reading frame)의 아미노산(aa) 시퀀스이고, 뉴클레오티드 시퀀스의 개념상의 번역후 나타났다. 이 번역은 만능코드(universal code)로 기초하고, PC/유전자 컴퓨터 프로그램(PC/유전자 버전 1.03, 1987년 11월)을 사용해 측정하였다. 575aa의 오픈 리딩 프레임은 nt168에서 메티오닌(methionine)으로 시작하고, 뉴클레오티드 1893에서 정지 코돈(stop codon)으로 끝난다.

또한, 575aa 잔류물의 오픈 리딩 프레임의 구조적인 분석은 PC/유전자 컴퓨터 프로그램으로 실행하였다. 처음 26aa는 도면에서 " 시그날 펩티드(signal peptide)" 로 나타나는 진핵적인(eukaryotic) 송출 시그날을 형성한다. 6,2의 스코어에 의해, 이 시그날 시퀀스의 분열은 aa26과 aa27 사이에 예측된다. 575aa의 시퀀스는 아미노산 잔류물하의 라인에 의해 나타난 가능한 N-결합 글리코시레이션(glcosylation) 부위(NXT/S) 3을 갖는다. RaO 및 Argos 방법에 따라 도면에서 " 막횡단 나선(transmembrane helix)" 으로 지칭된 aa423과 aa450 사이에 막횡단 영역이 있다. 제한효소 AsuII, SmaI, HindIII 및 EcoNI를 위한 인지 시퀀스(부위)는 밑줄쳐져 있다. 이 폴리펩티드의 계산된 분자량은 61212이다.

제3b도는 상기한 575aa 오픈리딩 프레임의 구조적인 특성의 개략도를 나타낸다.

제4도

헤르페스 단순 비루스(HSV) gE 유전자 및 다른 gE 동족체[슈도라비스(pseusdorabies) 비루스(PRV)gI 및 바리셀라-조스터(varicella-zoster, VZV)gpI]유전자의 아미노산 시퀀스와 BHV-1 gE 유전자의 아미노산 시퀀스의 아미노산 비교.

이 비교를 위해 사용된 시퀀스는 다음의 공개로부터 취하였다; HSV: 헤르페스 단순 비루스형의 제놈에서 쇼트 유니크 영역의 시퀀스 측정 및 유전자의 함량(Sequence ceter mination and genetic content of the short unique region in the genome of herpes simplex virus type 1). D. J. McGeoch, A. Dolan, S. Donald 및 F. J. Rixon (1985) Journal Mo1. Bio1. 181, 1-13., VZV: 바리셀라-조이터 비루스 제놈의 $U_S$성분의 DNA 시퀀스(DNA sequence of the $U_S$ component of the varicella-zoster virus genome). A. J. Davidson(1983), EMBO Journal 2, 2203-2209., PRV : 헤르페스 단순 비루스 및 바리셀라-조스터 비루스 글리코프로테인에 대한 동족체와 2 슈도라비스(pseudorabies) 비루스를 위한 유전체를 단리시키기 위하여 λgt11의 사용(Use of λgt11 to isolate genes for two pseudorabies virus glycoproteins with homology to herpes simlex virus and varicella-zoster virus glycoproteins). E. A. Petrovskis, J.G. Timmins 및 L. E. Post(1986) Jounal of Virology 60, 185-193]. 시퀀스들을 뮬탈린(Multalin) 시퀀스 분석 프로그램을 사용하여 비교하였다(F. Corpet, 1988, Nucl. Acid Res. 16, 10881-10890).

제4a도는 4 아미노산 시퀀스 전체를 개략적으로 나타낸다. 여기서, 예견된 막횡단 부분(TM)을 각 아래에 나타낸다. 예견된 송출 시그날 시퀀스(SP)와 가능한 N-결합 글리코프로테인 부위(I)에 첨가하여, 두개의 보존된 면적을 나타냈고, 시스테인 잔류물의 상대위치는 자주 변하지 않는다(CCC).

제4b도에서 결과는 4gE버젼의 중앙에 위치한 시스테인 부(富)영역의 뮤탈린 비교를 나타냈다. 별표는 명확한 아미노산과 콜론은 유사체 아미노산을 나타낸다.

제5도

Difivac-1 및 Iowa의 써던 블롯 분석으로 얻어진 사진의 도면

페널 A : BstI(1, 2), EcoRI(3, 4) 및 HindIII(5, 6)에 의한 Difivac-1 및 Iowa 제한효소 분해의 제노믹 DNA는 0.7% 아가로우스 겔로 분리하고, 니트로 셀룰로스로 블롯트하고, 제1a도의 예에서 특정한 공정에 따라 BHV-1 균주 Lam의 32P 표시된 HindIII K 절편에 의해 혼성화 하였다.

페널 B : 페널 A에서와 같은 동일한 겔의 니트로셀룰로우스 블롯을 BHV-1 gE-특정 프로브 p318에 의해 혼성화 하였다. 이 프로브는 제2c도에서 나타난 전체 A1uI-HincII 영역으로 이루어진다.

제6도

gE 결실 절편 BHV-1의 구조

제6a도는 gE 유전자 및 사용된 클론의 위치를 나타낸다. BHV-1 제놈의 성분은 유니크 롱($U_L$)영역, 유니크 소트($U_S$)영역 및 두 반복(IR 및 TR)이다. gE 유전자의 5'옆에 위치된 영역을 얻기 위하여, BHV-1 균주 Lam의 8.4kb HindIII K 절편으로부터 1.4kb PsrI-SmaI 절편을 플라스미드(plasmid) pUC18의 SmaI 및 PstI 부위내로 서브클론하였다. 이 클론을 p515로 칭하였고 제6b도에 나타냈다. 4.1kb HindIII-EcoRI 클론으로부터 오는 gE의 3' 옆에 위치된 ECoNI-SmaI 절편을 p515의 유니크 AsuII부위 내로 클론하였다.

Asu II 잔여분에 대한 EcoNI 잔여분의 결찰을 가능하게 하기 위하여, 클론 515를 AsuII로 분해하였고, 이어서 표준 방법에 따라(Sambrook등 1989) AsuII 잔여분에서 1개의 시토신(cytosine)잔류물을 제공하기 위하여 클래노우 효소(Boehringer Mannheim) 및 dCTP로 처리하였다. 이 부가적인 시토신은 제6d도에서 별표로 나타낸다. 이어서 p515를 SmaI 효소에 의해 또한 분해하였고, 그후 EcoNI 절편을 이 벡터내로 결찰시킬 수 있었다. 이렇게 형성된 콜론은 p519로 칭하였다.

제7도

제7a도는 1B7, 1B8 및 2H10의 DNA 제조의 씨던 블롯 분석에서 얻어진 사진 도면이다. DNA 단리, 제한효소 분해, 블롯팅 및 혼성화를 제1a도의 예로 기재된 공정에 따라 실행하였다. DNA 제조 1B7, 1B8 및 2H10의 PstI - DraI 이중 분해후, 절편을 0.7% 아가로우스 겔로 분리하였고, 니트로셀룰로스 필터로 연속적으로 블롯하였다. 이 필터를 프로브로 32P dCTP 표시된 2.3kb PsrI - DraI 결실 절편에 의해 혼성화하였다. 3을 통한 레인 1에서, 샘플 1B7, 1B8 및 2H10을 각각 분리하였다. 레인 4에서, Lam 균주의 야생형 BHV - 1 DNA를 적용하였고, 레인 5에서 2.3kb 결실절편을 적용하였다.

제7b도는 BHV - 1 균주 Lam 의 15.2kb EcoRI 절편의 물리적인 지도이다. 지도는 PstI, DraI 및 HindIII인식부위의 위치와 제7a도의 혼성화 프로브의 위치를 나타낸다.

제8도

BHV - 1 gE의 원시핵적인(prokaryotic) 발현.

BHV - 1 gE의 원시핵적인 발현을 위해, gE 유전자의 600bp SmaI절편을 벡터 pGEX - 2T(D. B. Smith 및 K. S., Johnson, Gene 67(1980) 31, 40)에서 스치스토소마 자포니쿰(Schistosoma Japonicum)으로부터 글루타치온 - S - 트란스퍼레이스 유전자의 코드 영역에 대한 3 리딩 프레임에서 융합하였다. SmaI 절편의 특성(syn)방향에 이一한 재결합성 분자를 표준방법을 사용하는 제한 효소 분석의 수단으로 확인하였다. 이 융합구조에 의한 E. Coli DH5α 클론을 pGEX - 2T600s1, pGEX - 2T600s2 alc pGEX - 2T600s3으로 칭하였다.

제8a도는 pGEX - 2T600s 구조의 하나의 도면이다. GST - GE 융합 생성물을 위한 코드 영역의 $NH_2$옆에 위치는 tac 프로모우터 영역을 유발하는 이소프로필치오갈락토사이드(IPTG)이다.

제8b도는 pGEX - 2T600S로 변형된 DH5α세포의 전체 프로테인 제조물의 웨스턴(Western) 블롯 분석으로 얻어진 사진도면이다. 구조 pGEX - 2T600s1,pGEX - 2T600s2 및 pGEX - 2T600s3로 변형된 DH5α세포의 일야(一夜)배양을 암피실린(ampicillin) 50μg/㎖dml의 Luria - Bertani(LB) 매체에서 1/10을 연속하였고, 1시간후 성장을 5시간동안 IPTG에 의해 유발하였다. 이 유도된 배양을 6,000×g에서 5분간 원심분리하였고, 1×층혼합물(layermix)(2%SDS, 10% 글리세롤, 5% 메르캅토에탄올 및 0.01% 모로모페놀블루)에 인가하였고(1.5㎖ 배영액을 500μℓ층혼합물에 인가하였다), 5분간 95℃로 가열하였다. 이어서, 레인당 50μℓ를 표준방법에 의해 12.5% 폴리아크릴아미드 겔에서 수직으로 분리하였고, 제조회사에 의한 특정의 조건하에서 LKB - multiphor II Nova Blot 시스템을 사용하는 니트로셀룰로스 필터에 연속적으로 Semi - 건조 블롯하였다.

레인 M에서, 미리 착색된 표시프로테인을 적용하였고(BRL Life Technol - ogies, Inc. 236k, 112k, 71k, 44k, 28k, 18k 및 15k), 레인 1, 2 및 3에서 3개이 각각 프레임(pGEX - 2T600s1, pGEX - 2T600s2 및 pGEX - 2T600s3)으로 변형된 DH5α세포의 전체 프로테인 제조물 적용하였다.

페널 A에서, 결과는 안티 - GST 혈청으로 웨스턴 블롯 분석을 보게될 수 있다. 그 끝에 대해, 필터를 저지 완충액(blocking buffer)(PBS+2% 분유 및 0.05% Tween 20)에서 표준방법(E. Harlow 및 D. Lane, 1986, Antibodies : 실험교재, 콜드 스프링 하버 레이보리토리 출판, 뉴욕)에 의해 항온처리 하였고, 폴리클로날 안티 - GST rabbit 혈청으로 연속적으로 처리하였다. 이러서, 필터를 세척하고, 염소 - 안티 - 토끼 면역글로불린 혈청 접합된 고추냉이 과산화효소(horseradish; HRPO)로 항온처리하였다. 이어서 결합된 염소항체를 색소(디아미노벤지딘, 클로로나프톨 및 $H_2O_2$로 면역화학적으로 감지하였다. 화살표로 표시된 GST 융합 생성물은 프레임 3에서 단지 약47K의 예측크기를 가진다.

페널 B에서, 결과는 gE 프로테인을 인식하는 단일클로날 항체 Mab 4로 웨스턴 블롯 분석을 볼 수 있었다. 그 끝에 대해 페널 A에서와 같이 이중 필터를 차단, Mab으로 항온처리, 세척 및 토끼-안티-쥐 혈청이 접합된 HRPO에 의해 항온처리하였다. 이어서, 결합된 토끼 항체를 색소에 의해 면역화학적으로 감지 하였다. 레인 3(프레임 3)에서 볼수 있는 밴드는 크기가 47K이고, 화살표로 나타냈다.

제9도

BHV-1 gE 유전자의 진핵적인 발현을 위한 pEVHis gE 플라스미드의 구조

gE 유전자의 진핵적인 발현을 위해, 전체 gE 코드영역은 표준공정(Sambrook등 1989)을 사용하여 발현벡터 pEVHis의 HCMV 프로모터 영역뒤의 특성방향으로 클론하였다. 그 끝에 대해, gE의 오픈 리딩 프레임이전에 55bp를 출발하는 394bp A1uI 절편을 pUC18내로 클론화하였고, p201로 칭하였다. 이어서, p201의 HincⅡ 분해후, gE 유전자의 커진 부분으로 이루어진 1740bp HincⅡ 절편을 p201로 클론하였다. pUC18의 폴리링커가 gE의 출발 코돈 이전에 A1uI 부위 55bp로 부터 gE의 정지 코돈 이후의 HincⅡ 부위 133bp의 전체 gE 코드 면적으로 이루어진 플라스미드 p318을 얻었다. 벡터의 폴리링커에서 제한효소 부위를 사용하는 이 절편은 효소 BamHI 및 SphI에 의해 p318으로부터 절단했다. 첫째 p318을 SphI로 분해하고, 이어서 SphI 부위를 클래노우 중합효소 및 dNTP's를 사용하여 충전하였다. BamH로 분해후, 1.9kb 삽입을 저융점 아가로우스(Low Meltin Point Agarose)로 pUC18 벡터로부터 분리하였고, 끝에서 BamHI 및 EcoRV로 분해되어진 pEVHis 벡터에서 결찰하였다. 이렇게 형성된 플라스미드를 pEVHis/gE라 칭하였다.

제10도

gE-특이한 프라이머와 BHV-1 DNA 감지를 위한 PCR 공정을 위한 프로브

제10도는 뉴클레오티드 1272 내지 2027[시퀀스는 제3도로 부터 취했다]의 BHV-1 글리코프로테인 gE 유전자의 핵산 시퀀스를 나타낸다. gE-특이한 PCR 공정을 위해 사용된 프라이머는 $P_3$ 및 $P_4$로 칭하였다. $P_3$ 및 $P_4$를 위한 프라이머 결합 부위는 밑줄을 그었다. $P_3$의 뉴클레오티드 시퀀스는 5'-ACG-TGG-TGG-TGC-CAG-TTA-GC-3'(SEQ ID NO : 2)이다. $P_4$의 뉴클레오티드 시퀀스는 5'-ACC-AAA-CTT-TGA-ACC-CAG-AGC-G-3'(SEQ ID NO : 3) 이다 (상기의 특이한 프라이머 결합 시퀀스를 보충). PCR 증폭된 DNA의 감지를 위한 써던 블롯 혼성화를 위해 사용된 프로브는 이절편의 끝에 나타난 프라이머 결합 부위 사이에 위치한 137bp TagI 절편이다. 제3도와 비교하기 위해, HindⅢ와 EcoNI부위를 또한 나타냈다.

제11도

Difivac-1의 gE 결실의 지도화

제11도는 야생형 BHV-1 균주 Lam의 15.5kb EcoRI 절편의 물리적인 지도를 나타낸다. 제11b도는 Difivac-1의 14.5kb EcoRI 절편의 물리적인 지도를 나타낸다. EcoRI 절편 모두는 각 비루스의 제놈의 완전한 유니크 쇼트 영역을 덮는다. gE 유전자의 위치와 gI 유전자의 추정위치는 오픈 박스로 나타내었다. 지도 A 및 B를 이러한 방식으로 위치시켰고 각 지도내의 6kb PsrI 절편을 정렬하였다. 내부반복 및 말단 반복 시퀀스 지도 모두에서 창구박스로 나타냈다. 반복 아래 화살표는 이 시퀀스들의 방향을 나타낸다.

제11a도에서 $U_S$ 영역의 부분은 Difivac-1 균주에서 손실을 나타내는 것이다.

제11c도는 gE 결실을 지도화 하기 위해서와, 제11b도에서 나타난 물리적인 지도를 얻기 위하여 사용된 클론화된 Difivac-1 절편의 위치를 나타낸다. 클론 p728, p737 및 p754의 삽입 아래의 화살표는 재결합점을 측정하기 위하여 시퀀스되어진 영역을 나타낸다.

약어(略語)

A=A1uI, E=EcoRI, P=PstI, H - HindIII, r=재결합점, IR=내부반복, TR=말단반복.

제12도

Difivac - 1의 $U_S$ 영역에서 정확한 재결합 점의 측정

Difivac - 1 균주에서 발견된 gE 결실의 정확한 경계를 측정하기 위하여, 클론 p754와 클론 p728 및 p737의 끝을 시퀀스하였다. 이 클론들의 삽입은 제11도에 나타냈다. 사용된 시퀀스 공정은 제3도의 예에 기재되어 있다.

제12a도에서 A1uI - PstI 절편의 대부분의 시퀀스를 나타냈다. 이 시퀀스는 gE 유전자의 프로모터 영역에서 출발한다. 추측 TATA 박스는 밑줄을 쳤다. r점에서(재결합점), 이 프로모터 영역은 $U_S$ 영역의 반대 부위에서[명칭 : 전환반복(inverted repeut)] 또한 발견된 시퀀스에 융합된다. 완전한 재결합점은 $U_S$ 영역의 반대부위에서 발견된 반복의 복사본과 gE 프로모터 영역에서 발견된 반복을 비교함에 의해서 측정하였다. 이점은 " r" 에 의해 제12b(I)도에서 나타내어진 벗어난 시퀀스 이었다. 유사한 비교를 Difivac - 1에서 발견된 gE 프로모터 시퀀스 및 야생형 균주 램에서 발견된 gE 프로모터에 의해 만들어졌다. 이점은 제12b(II)도에서 벗어난 시퀀스이고, " r" 로 또한 지칭된다. 나타난 재결합점은 동일하다.

제13도

BHV - 1 gI 유전자의 부분 시퀀스.

BHV - 1 균주 Lam의 1.8kb PstI 클론을 사용하여 BHV - 1 gI 및 gE 유전자내로 도달하고(제11도 참조). BHV - 1 gI의 코드 영역내로 284 뉴클레오티드의 시퀀스를 측정하였다. 사용된 시퀀스 공정은 제3도에 기재된 예로 하였다. 사용된 시퀀스 공정은 제3도에 기재된 예로 하였다. 시퀀스는 PC/유전자 컴퓨터 프로그램 버젼 1.03(Nov. 1987)에 의해 만능코드하에 번역하였다. 이차 리딩 프레임에 의해 코드된 아미노산 시퀀스는 뉴클레오티드 시퀀스 아래의 1 - 글자 코드로 주어졌다. 이 아미노산 시퀀스는 다른 헤르페스 비루스 gI 동족체의 코드 영역에 대해 유사하다(제14도 참조).

제14도

헤르페스 단순 비루스(HSVI) gI 유전자, 슈도라비스 비루스(PRV) gp63 유전자 및 바리셀라 - 조스터 비루스(VZV) gpIV 유전자의 코드 영역의 해당부분에 의한 추상 BHV - 1 gI 유전자의 부분 아미노산 시퀀스의 아미노산 비교.

PRV 시퀀스는 아미노산 82에서 출발하고, HSV1 시퀀스는 aa80에서 출발하고, VZV 시퀀스는 그들의 각기 코드영역의 aa76에서 출발한다. 사용된 시퀀스는 제4도의 예로 언급된 논문에 공개되었다. 비교를 뮬타린 컴퓨터 프로그램을 사용하여 실행하였다. 별표는 명확한 아미노산을 나타내고, 콜론은 아미노산 유사체를 나타낸다.

제15도

BHV - 1 gI 유전자의 진핵적인 발현을 위한 MSVneoGI 플라스미드의 구조

BHV - 1 gI 유전자의 부분 시퀀스의 아미노산 비교하에, BHV - 1 gI 유전자의 추측 위치를 평가하였다. 이 평가에 기초하여, 이것은 1.7kb SmaI 절편이 BHV - 1 gE 유전자의 완전한 코드 영역을 함유하게 되는 것을 의미한다.

이 1.7kb SmaI 절편의 위치를 제15a도에 나타내었다. 이 1.7kb SmaI 절편의 무딘 끝에 대해, BamHI 링커는 표준공정을 사용하여 결찰하였다. 얻어진 생성물을 BamHI로 분해하였고, 진핵적인 발현 벡터 MSV - neo로 결찰하였다. MSV - neo 벡터는 MSV - LTR 뒤의 유니크 BamHI를 갖고, 강한 프로모터 활성도를 갖는다. 이 벡터는 Rijsewijk등의 1987, EMBO J. 6, 127 - 131에 기재되어 있다.

제16도

BHV - 1 gI/gE 이중 결실 절편의 구조

BHV - 1의 $U_S$ 영역에서 글리코프로테인 gE 유전자의 위치와 글리코프로테인 gI 유전자의 위치를 제16a도에 나타냈다. 창구 블록은 $U_S$ 영역 경계선 반복을 나타낸다. 제16b도는 두 유전자의 위치에 관한 어떤 본질적인 제한 효소 부위에 물리적인 지도를 나타낸다. gI 유전자를 포함하는 1.7kb SmaI 절편을 함유하는 gI/gE 결실 절편 클론 p1.7 - SmaI/o를 구성하기 위하여, PstI로 분해되게 된다. 남아있는 350bp SmaI - PstI 삽입의 PstI 부위는 표준분자 생물학적인 공정을 사용하여 무딘 끝으로 만들게 된다. EcoNI - SmaI 절편(제6b도 참조)은 제6a도에 기재된 4.1kb HindIII - EcoRI 절편으로 부터 단리되고, 또한 무딘 끝으로 만들어지고, 변형된 PstI 부위에 결찰되었다. 이것은 제16c도 및 제16d도에서 나타냈다. 얻어진 클론 pΔIE로부터 1.4kb SmaI - DraI 절편은 야생형 BHV - 1 DNA에 의해 재결합을 위해 단리 시킬 수 있다.

약어

E=EcoRI, H=HindIII, S - SmaI, P=PstI, ENI=EcoNI, D=DraI, kb=kilobase 및 $U_S$ =유니크 쇼트

제17도

예방접종후 송아지로부터의 코 비루스의 평균튀김(・ =Difiva - 1로 예방접종, o=비접종 조절).

제18도

제17도의 핵심과 같이 발병성 BHV - 1 균주에 의한 접종후, 송아지의 일일 임상 평균 스코어.

제19도

제17도의 핵심과 같이 발병성 BHV - 1 균주로 접종후, 송아지의 평균 직장(直腸)온도

제20도

제17도의 핵심과 같이 발병성 BHV - 1 균주로 접종후, 송아지의 평균 성장

제21도

제17도의 핵심과 같이 발병성 BHV - 1 균주로 접종후, 송아지로부터의 코 비루수의 평균튀김

제22도

발병성 BHV - 1 균주로 접종후, 송아지의 평균 직장온도(・ =Lam $gE^-$ 로 예방접종, o=Lam $gE^-/TK^-$ 로 예방접종, x=비접종된 조절)

제23도

제22도의 핵심과 같이 발병성 BHV - 1 균주로 접종후, 송아지의 평균성장

제24도

제22도의 핵심과 같이 발병성 BHV - 1 균주로 접종후, 송아지의 일일 임상 평균 스코어

**[표 1: Lam gE- 또는 Lam gE-/TK-로 송아지를 예방접종한 후와 상기 예방접종된 송아지와 대조군 송아지의 독성 BHV-1 균주 접종후 송아지의 코 비루스 박리**

| 그 룹 | 코 비루스 박리의 평균 일수<br>접 종 후 | 균주 접종후 |
|---|---|---|
| 대조군 | 0 | 10.33±1.51 |
| Lam gE- | 7.00±0.89 | 4.83±1.17 |
| Lam gE-/TK- | 7.17±1.33 | 5.17±0.98 |

**[표 2: gE-맵(Mab)의 특성화]**

| 맵 | 캔디데이트 gE-맵과의 반응성 | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Difi-vac-1 3T3/ EBTR | Lam gE- | 원핵 | 3T3 gE | 3T3 gE Difi-vac-1 | 3T3 gE/gI | Ag군 | Ab 소 |
| 1 | - | - | nd | - | + | ? | I | + |
| 2 | - | - | - | + | + | + | II | - |
| 3 | - | - | + | + | + | + | ? | - |
| 4 | - | - | + | + | + | + | ? | - |
| 42 | - | - | nd | - | - | ? | V? | ± |
| 51 | - | - | nd | - | + | + | III | + |
| 52 | - | - | + | + | + | + | ? | - |
| 53 | - | - | nd | - | + | + | III | + |
| 59 | - | - | nd | - | - | + | III | + |
| 66 | - | - | nd | + | + | + | III | + |
| 67 | - | - | nd | - | + | + | III | + |
| 68 | - | - | - | + | + | + | IV | + |
| 72 | - | - | - | + | + | + | V | ± |
| 75 | - | - | nd | - | + | ? | I | + |
| 78 | - | - | nd | - | + | ? | nd | - |
| 81 | - | - | - | + | + | + | II? | - |

+ : 8개의 시험된 혈청 스코어 모두가 간접 블로킹 IPMA에서 > 50%의 블로킹 퍼센트를 가지는 경우

±: 혈청 스코어가 ±50%의 블로킹 퍼센트를 가지는 경우

-: 혈청 스코어가 < 50%의 블로킹 퍼센트를 가지는 경우

시 퀀 스

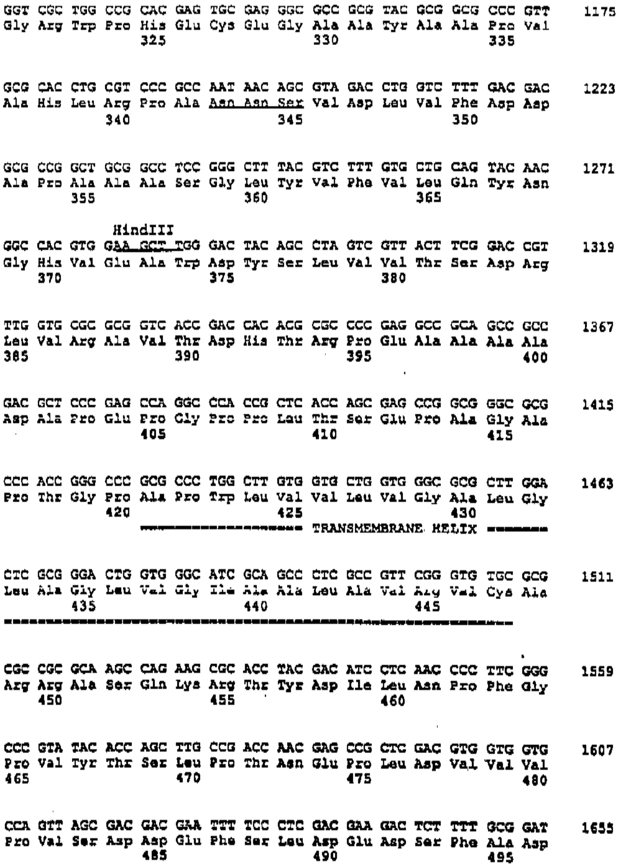
시퀀스 번호 : 1

길 이 : 2027 뉴클레오티드, 575개 아미노산

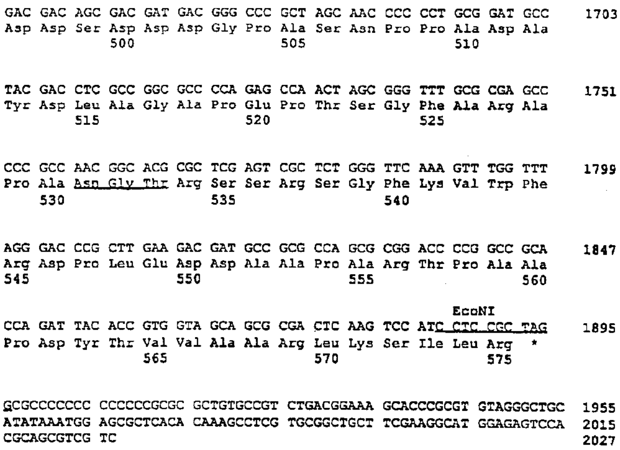
종 류 : 뉴클레오티드및 아미노산

가 닥 : 단일가닥

```
AGGGCGGAGC GTTGAGCGGC CCGACCGCCG CCGGGTTGTT AAATGGGTCT CGCGCGGCTC    60

                                 |----> deleted in Difivac1
GTGGTTCCAC ACCGCCGGAG AACCAGCGCG AGCTTCGCTG CGTGTGTCCC GCGAGCTGCG   120

                                  AsuII
TTCCGGGGAA CGGCGCACGC GAGAGGGTTC GAAAAGGGCA TTTGGCA                 167


ATG CAA CCC ACC GCG CCG CCC CGG CGG CGG TTG CTG CCG CTG CTG CTG      215
Met Gln Pro Thr Ala Pro Pro Arg Arg Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu
 1              5                   10                  15
-------------------------------- SIGNAL PEPTIDE ----------------


CCG CAG TTA TTG CTT TTC GGG CTG ATG GCC GAG GCC AAG CCC GCG ACC      263
Pro Gln Leu Leu Leu Phe Gly Leu Met Ala Glu Ala Lys Pro Ala Thr
            20                  25                  30
-------------------------------------------


        SmaI
GAA ACC CCG GGC TCG GCT TCG GTC GAC ACG GTC TTC ACG GCG CGC GCT      311
Glu Thr Pro Gly Ser Ala Ser Val Asp Thr Val Phe Thr Ala Arg Ala
        35                  40                  45


GGC GCG CCC GTC TTT CTC CCA GGG CCC GCG GCG CGC CCG GAC GTG CGC      359
Gly Ala Pro Val Phe Leu Pro Gly Pro Ala Ala Arg Pro Asp Val Arg
    50                  55                  60


GCC GTT CGC GGC TGG AGC GTC CTC GCG GGC GCC TGC TCG CCG CCC GTG      407
Ala Val Arg Gly Trp Ser Val Leu Ala Gly Ala Cys Ser Pro Pro Val
65                  70                  75                  80


CCG GAG CCC GTC TGC CTC GAC GAC CGC GAG TGC TTC ACC GAC GTG GCC      455
Pro Glu Pro Val Cys Leu Asp Asp Arg Glu Cys Phe Thr Asp Val Ala
                85                  90                  95


CTG GAC GCG GCC TGC CTG CGA ACC GCC CGC GTG GCC CCG CTG GCC ATC      503
Leu Asp Ala Ala Cys Leu Arg Thr Ala Arg Val Ala Pro Leu Ala Ile
            100                 105                 110


GCG GAG CTC GCC GAG CGG CCC GAC TCA ACG GGC GAC AAA GAG TTT GTT      551
Ala Glu Leu Ala Glu Arg Pro Asp Ser Thr Gly Asp Lys Glu Phe Val
        115                 120                 125




                                PvuII
CTC GCC GAC CCG CAC GTC TCG GCG CAG CTG GGT CGC AAC GCG ACC GGG      599
Leu Ala Asp Pro His Val Ser Ala Gln Leu Gly Arg Asn Ala Thr Gly
    130                 135                 140


GTG CTG ATC GCG GCC GCA GCC GAG GAG GAC GGC GGC GTG TAC TTC CTG      647
Val Leu Ile Ala Ala Ala Ala Glu Glu Asp Gly Gly Val Tyr Phe Leu
145                 150                 155                 160


TAC GAC CGG CTC ATC GGC GAC GCC GGC GAC GAG GAG ACG CAG TTG GCG      695
Tyr Asp Arg Leu Ile Gly Asp Ala Gly Asp Glu Glu Thr Gln Leu Ala
                165                 170                 175

CTG ACG CTG CAG GTC GCG ACG GCC GGC GCG CAG GGC GCC GCG CGG GAC      743
Leu Thr Leu Gln Val Ala Thr Ala Gly Ala Gln Gly Ala Ala Arg Asp
            180                 185                 190


GAG GAG AGG GAA CCA GCG ACC GGG CCC ACC CCC GGC CCG CCG CCC CAC      791
Glu Glu Arg Glu Pro Ala Thr Gly Pro Thr Pro Gly Pro Pro Pro His
        195                 200                 205


CGC ACG ACG ACA CGC GCG CCC CCG CGG CGG CAC GGC GCG CGC TTC CGC      839
Arg Thr Thr Thr Arg Ala Pro Pro Arg Arg His Gly Ala Arg Phe Arg
    210                 215                 220

                                        SmaI
GTG CTG CCG TAC CAC TCC CAC GTA TAC ACC CCG GGC GAT TCC TTT CTG      887
Val Leu Pro Tyr His Ser His Val Tyr Thr Pro Gly Asp Ser Phe Leu
225                 230                 235                 240


CTA TCG GTG CGT CTG CAG TCT GAG TTT TTC GAC GAG GCT CCC TTC TCG      935
Leu Ser Val Arg Leu Gln Ser Glu Phe Phe Asp Glu Ala Pro Phe Ser
                245                 250                 255


GCC AGC ATC GAC TGG TAC TTC CTG CGG ACG GCC GGC GAC TGC GCG CTC      983
Ala Ser Ile Asp Trp Tyr Phe Leu Arg Thr Ala Gly Asp Cys Ala Leu
            260                 265                 270


ATC CGC ATA TAC GAG ACG TGC ATC TTC CAC CCC GAG GCA CCG GCC TGC     1031
Ile Arg Ile Tyr Glu Thr Cys Ile Phe His Pro Glu Ala Pro Ala Cys
        275                 280                 285


CTG CAC CCC GCC GAC GCG CAG TGC AGC TTC GCG TCG CCG TAC CGC TCC     1079
Leu His Pro Ala Asp Ala Gln Cys Ser Phe Ala Ser Pro Tyr Arg Ser
    290                 295                 300


GAG ACC GTG TAC AGC CGG CTG TAC GAG CAG TGC CGC CCG GAC CCT GCC     1127
Glu Thr Val Tyr Ser Arg Leu Tyr Glu Gln Cys Arg Pro Asp Pro Ala
305                 310                 315                 320
```



```
GGT CGC TGG CCG CAC GAG TGC GAG GGC GCC GCG TAC GCG GCG CCC GTT    1175
Gly Arg Trp Pro His Glu Cys Glu Gly Ala Ala Tyr Ala Ala Pro Val
                325                 330                 335

GCG CAC CTG CGT CCC GCC AAT AAC AGC GTA GAC CTG GTC TTT GAC GAC    1223
Ala His Leu Arg Pro Ala Asn Asn Ser Val Asp Leu Val Phe Asp Asp
            340                 345                 350

GCG CCG GCT GCG GCC TCC GGG CTT TAC GTC TTT GTG CTG CAG TAC AAC    1271
Ala Pro Ala Ala Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Asn
        355                 360                 365

             HindIII
GGC CAC GTG GAA GCT TGG GAC TAC AGC CTA GTC GTT ACT TCG GAC CGT    1319
Gly His Val Glu Ala Trp Asp Tyr Ser Leu Val Val Thr Ser Asp Arg
    370                 375                 380

TTG GTG CGC GCG GTC ACC GAC CAC ACG CGC CCC GAG GCC GCA GCC GCC    1367
Leu Val Arg Ala Val Thr Asp His Thr Arg Pro Glu Ala Ala Ala Ala
385                 390                 395                 400

GAC GCT CCC GAG CCA GGC CCA CCG CTC ACC AGC GAG CCG GCG GGC GCG    1415
Asp Ala Pro Glu Pro Gly Pro Pro Leu Thr Ser Glu Pro Ala Gly Ala
                405                 410                 415

CCC ACC GGG CCC GCG CCC TGG CTT GTG GTG CTG GTG GGC GCG CTT GGA    1463
Pro Thr Gly Pro Ala Pro Trp Leu Val Val Leu Val Gly Ala Leu Gly
            420                 425                 430
                ------------------- TRANSMEMBRANE HELIX -------

CTC GCG GGA CTG GTG GGC ATC GCA GCC CTC GCC GTT CGG GTG TGC GCG    1511
Leu Ala Gly Leu Val Gly Ile Ala Ala Leu Ala Val Arg Val Cys Ala
        435                 440                 445
-----------------------------------------------------------

CGC CGC GCA AGC CAG AAG CGC ACC TAC GAC ATC CTC AAC CCC TTC GGG    1559
Arg Arg Ala Ser Gln Lys Arg Thr Tyr Asp Ile Leu Asn Pro Phe Gly
    450                 455                 460

CCC GTA TAC ACC AGC TTG CCG ACC AAC GAG CCG CTC GAC GTG GTG GTG    1607
Pro Val Tyr Thr Ser Leu Pro Thr Asn Glu Pro Leu Asp Val Val Val
465                 470                 475                 480

CCA GTT AGC GAC GAC GAA TTT TCC CTC GAC GAA GAC TCT TTT GCG GAT    1655
Pro Val Ser Asp Asp Glu Phe Ser Leu Asp Glu Asp Ser Phe Ala Asp
                485                 490                 495
```



```
GAC GAC AGC GAC GAT GAC GGG CCC GCT AGC AAC CCC CCT GCG GAT GCC    1703
Asp Asp Ser Asp Asp Asp Gly Pro Ala Ser Asn Pro Pro Ala Asp Ala
            500                 505                 510

TAC GAC CTC GCC GGC GCC CCA GAG CCA ACT AGC GGG TTT GCG CGA GCC    1751
Tyr Asp Leu Ala Gly Ala Pro Glu Pro Thr Ser Gly Phe Ala Arg Ala
        515                 520                 525

CCC GCC AAC GGC ACG CGC TCG AGT CGC TCT GGG TTC AAA GTT TGG TTT    1799
Pro Ala Asn Gly Thr Arg Ser Ser Arg Ser Gly Phe Lys Val Trp Phe
    530                 535                 540

AGG GAC CCG CTT GAA GAC GAT GCC GCG CCA GCG CGG ACC CCG GCC GCA    1847
Arg Asp Pro Leu Glu Asp Asp Ala Ala Pro Ala Arg Thr Pro Ala Ala
545                 550                 555                 560

                                                    EcoNI
CCA GAT TAC ACC GTG GTA GCA GCG CGA CTC AAG TCC ATC CTC CGC TAG    1895
Pro Asp Tyr Thr Val Val Ala Ala Arg Leu Lys Ser Ile Leu Arg  *
                565                 570                 575

GCGCCCCCCC CCCCCCGCGC GCTGTGCCGT CTGACGGAAA GCACCCGCGT GTAGGGCTGC  1955
ATATAAATGG AGCGCTCACA CAAAGCCTCG TGCGGCTGCT TCGAAGGCAT GGAGAGTCCA  2015
CGCAGCGTCG TC                                                      2027
```

시퀀스 번호 : 2

길 이 : 20 뉴클레오티드

종 류 : 뉴클레오티드

가 닥 : 단일가닥

ACGTGGTGGT GCCAGTTAGC

시퀀스 번호 : 3

길 이 : 22 뉴클레오티드

종 류 : 뉴클레오티드

가 닥 : 단일가닥

ACCAAACTTT GAACCCAGAG CG

## (57) 청구의 범위

### 청구항 1.

소의 헤르페스비루스 1형의 글리코프로테인 gE-유전자를 함유하는 재조합 핵산, 이 글리코프로테인 gE-유전자의 gE-특이적 일부 또는 이 글리코프로테인 gE-유전자에서 유도된 gE-특이적 뉴클레오티드 시퀀스로 이루어지되, 상기 gE-유전자는 BHV-1 스트레인에서 제3a도에 기재된 아미노산 시퀀스를 갖는 프로테인인 조성물.

### 청구항 2.

제1항에 있어서, 소의 헤르페스비루스 1형의 글리코프로테인 gE-유전자를 함유하는 재조합 핵산의 삽입과 글리코프로테인 gE-유전자의 gE-특이적 일부 또는 글리코프로테인 gE-유전자에서 유도된 gE-특이적 뉴클레오티드 시퀀스를 갖는 클로닝 또는 발현벡터로 이루어진 조성물.

### 청구항 3.

소의 헤르페스비루스 1형의 글리코프로테인 gE, 글리코프로테인 gE의 gE-특이적 일부, 글리코프로테인 gE에서 유도된 gE-특이적 펩티드, 또는 소의 헤르페스비루스 1형 글리코프로테인 gE 및 gI의 복합체로 이루어지고, 상기 gE는 BHV-1 스트레인에서 제3a도에 기재된 아미노산 시퀀스를 갖는 프로테인인 조성물.

### 청구항 4.

소의 헤르페스비루스 1형의 글리코프로테인 gE, 글리코프로테인 gE의 gE-특이적 일부, 글리코프로테인 gE에서 유도된 gE-특이적 펩티드, 또는 소의 헤르페스비루스 1형 글리코프로테인 gE 및 gI의 복합체에 대해서 특이적인 항체로 이루어지고, 상기 gE는 BHV-1 스트레인에서 제3a도에 기재된 아미노산 시퀀스를 갖는 프로테인인 조성물.

### 청구항 5.

제4항에 있어서, 소의 헤르페스비루스 1형의 글리코프로테인 gE, 글리코프로테인 gE의 gE-특이적 일부, 글리코프로테인 gE에서 유도된 gE-특이적 펩티드 또는 소의 헤르페스비루스 1형 글리코프로테인 gE 및 gI의 복합체에 대해서 특이적인 모노클로날 항체로 이루어지는 조성물.

### 청구항 6.

제4항에 있어서, 소의 헤르페스비루스 1형의 글리코프로테인 gE, 글리코프로테인 gE의 gE-특이적 일부, 글리코프로테인 gE에서 유도된 gE-특이적 펩티드 또는 소의 헤르페스비루스 1형 글리코프로테인 gE 및 gI의 복합체에 대해서 특이적인 폴리클로날 항체로 이루어지는 조성물.

### 청구항 7.

특정 BHV - 1 스트레인에서 제3a도에 기재한 아미노산 시퀀스를 갖는 프로테인인 소의 헤르페스비루스 1형의 글리코프로테인 gE - 유전자에서 유도된 뉴클레오티드 시퀀스를 갖는 헥산 프로브 또는 프라이머 및 핵산검출분석에 적합한 검출기구로 구성되고, 동물, 특히 포유동물, 더 구체적으로 소에서 유래한 샘플, 특히 혈액 또는 혈청, 혈구, 우유 등의 생물학적 샘플, 눈물, 폐세척액, 콧물, 정충 특히 정액, 타액, 가래 또는 조직, 특히 신경조직 등의 체액 중에서 소의 헤르페스비루스 1형의 핵산을 검출하기 위한 진단키트.

## 청구항 8.

특정 BHV - 1 스트레인에서 제3a도에 기재한 아미노산 시퀀스를 갖는 프로테인인 소의 헤르페스비루스 1형의 글리코프로테인 gE, 글리코프로테인 gE의 gE - 특이적 일부, 글리코프로테인 gE에서 유도된 gE - 특이적 펩티드, 또는 소의 헤르페스비루스 1형 글리코프로테인 gE 및 gI의 복합체와 항체검출분석에 적합한 검출기구로 구성되고, 동물, 특히 포유동물, 더 구체적으로 소에서 생기는 샘플, 특히 혈액 또는 혈청, 타액, 가래 등의 생물학적 샘플, 눈물, 폐세척액, 콧물, 우유 또는 조직 등의 체액 중에서 소의 헤르페스비루스 1형에 대해서 특이적인 항체 검출용 진단키트.

## 청구항 9.

제22항에 있어서, 소의 헤르페스비루스 1형의 글리코프로테인 gE, 또는 소의 헤르페스비루스 1형 글리코프로테인 gE 및 gI의 복합체에 대해서 특이적인 한 개 이상의 항체를 더 포함해서 구성되는 진단키트.

## 청구항 10.

특정 BHV - 1 스트레인에서 제3a도에 기재한 아미노산 시퀀스를 갖는 프로테인인 소의 헤르페스비루스 1형의 글리코프로테인 gE, 또는 소의 헤르페스비루스 1형 글리코프로테인 gE 및 gI의 복합체에 대해서 특이적인 항체와 프로테인검출분석에 적당한 검출기구로 구성되고, 동물, 특히 포유동물, 더 구체적으로 소에서 유래한 샘플, 특히 혈액 또는 혈청, 혈구, 우유 등의 생물학적 샘플, 눈물, 폐세척액, 콧물, 정충 특히 정액, 타액, 가래 또는 조직, 특히 신경조직 등의 체액 중에서 소의 헤르페스비루스 1형의 특이적 항체를 검출하기 위한 진단키트.

## 청구항 11.

특정 BHV - 1 스트레인에서 제3a도에 기재한 아미노산 시퀀스를 갖는 프로테인인 소의 헤르페스비루스 1형의 글리코프로테인 gE - 유전자로 되는 핵산의 존재 또는 이 소의 헤르페스비루스 1형 글리코프로테인 gE 및 또는 이 소의 헤르페스비루스 1형 글리코프로테인 gE 및 gI 복합체의 존재, 또는 이 소의 헤르페스비루스 1형의 글리코프로테인 gE 또는 소의 헤르페스비루스 1형 글리코프로테인 gE 및 gI의 복합체에 대한 특이적인 항체의 존재에 대해서, 동물에서 유래한 샘플, 특히 혈액 또는 혈청, 혈구, 정충, 특히 정액, 타액, 가래 등의 생물학적 샘플, 눈문, 폐세척액 콧물, 우유, 조직, 특히 신경조직 등의 체액을 검사하는 것으로 되는, 동물 특히 포유동물, 더 구체적으로 소의 소 헤르페스비루스 1형의 감염을 결정하는 방법.

## 청구항 12.

불활성 gE 유전자를 갖는 소의 헤르페스비루스 1형과 gE - 유전자중의 결실을 갖는 소의 헤르페스비루스 1형을 구별하는 방법으로 선택될 수 있거나 선택된 방법은 비루스의 헥산이 gE에 대해서 또는 gE의 아미노산 시퀀스로부터 유도된 펩티드에 대해서 나온 gE - 특이 항체와 반응하는지 조사하는 단계로 이루어지는 것인 소의 헤르페스비루스 1형 돌연변이체.

### 청구항 13.

gE 발현하는 소의 헤르페스비루스 1형과 gE-유전자중의 결실을 갖는 소의 헤르페스비루스 1형을 구별하는 방법으로 선택될 수 있거나 선택된 방법은 비루스가 gE에 대해서 또는 gE의 아미노산 시퀸스로부터 유도된 펩티드에 대해서 나온 gE-특이 항체와 반응하는지 조사하는 단계로 이루어지는 것인 소의 헤르페스비루스 1형 돌연변이체.

### 청구항 14.

gE-유전자중의 결실 이외에 티미딘 키나제 유전자중의 결실, gI 유전자중의 결실 또는 이들 모두를 갖고, 상기 이종유전자는 상기 결실의 적어도 하나의 위치에 삽입되지만, 단 돌연변이가 gE 유전자중의 결실과 티미딘 키나제 유전자중의 결실로 이루어진 이중 결실을 갖는 경우, 상기 이종 유전자는 티미딘 키나제 유전자의 위치에 삽입되지 않는 소의 헤르페스비루스 1형 돌연변이체.

### 청구항 15.

gE-유전자중의 결실 이외에 티미딘 키나제 유전자중의 결실, gI 유전자중의 결실 또는 이들 모두를 갖고, 상기 이종유전자는 상기 결실의 적어도 하나의 위치에 삽입되지만, 단 돌연변이체가 gE 유전자중의 결실과 티미딘 키나제 유전자중에 결실로 이루어진 이중 결실을 갖는 경우, 상기 이종 유전자는 소의 흐흡 유착 비루스 F 또는 N 유전자가 아닌 소의 헤르페스비루스 1형 돌연변이체.

### 청구항 16.

gE-유전자중의 결실 이외에 티미딘 키나제 유전자중의 결실, gI 유전자중의 결실 또는 이들 모두를 갖고, 상기 이종유전자는 상기 결실의 적어도 하나의 위치에 삽입되지만, 단 돌연변이체가 gE 유전자중의 결실과 티미딘 키나제 유전자중의 결실로 이루어진 이중 결실을 갖는 경우, 적어도 두 개의 이종 유전자가 삽입되는 것인 소의 헤르페스비루스 1형 돌연변이체.

### 청구항 17.

제14항 내지 제16항중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 이종 유전자는 면역원성 단백질 또는 다른 병원균의 펩티드를 코드하거나 사이토킨을 코드하는 것인 소의 헤르페스비루스 1형 돌연변이체.

### 청구항 18.

12항, 13항 및 14항 내지 17항중 어느 하나의 항에 의한 소의 헤르페스비루스 1형의 돌연변이체 및 적당한 담체 또는 보조약으로 구성되고, 특히 포유동물, 더 구체적으로 소를 소의 헤르페스비루스 1형에 대해서 보호하기 위한 예방접종용 백신조성물.

### 청구항 19.

글리코프로테인 gE-유전자중의 결실을 갖고, 재조합 DNA 기술에 의해서 도입되고, 면역 프로테인 또는 병원균의 펩티드를 코드하는 이종 유전자와 적당한 담체 또는 보조약을 함유하는 제1항, 2항, 4항, 6항 내지 11항, 12항, 14항 및 14항 내지 17항중 어느 하나의 항에 의한 소의 헤르페스비루스 1형의 돌연변이체로 구성되고, 동물, 특히 포유동물, 더 구체적으로 소를 병원균에 대해서 보호하기 위한 살아있는 또는 불활성 백신인 예방 접종용 백신 조성물.

### 청구항 20.

특정 BHV-1 스테레인에서 제3a도에 기재한 아미노산 시퀸스를 갖는 프로테인인 소의 헤르페스비루스 1형의 글리코프로테인 gE-유전자 또는 소의 헤르페스비루스 1형의 글리코프로테인 gE와 gI의 복합체에 대한 특이적 항체 및 핵산

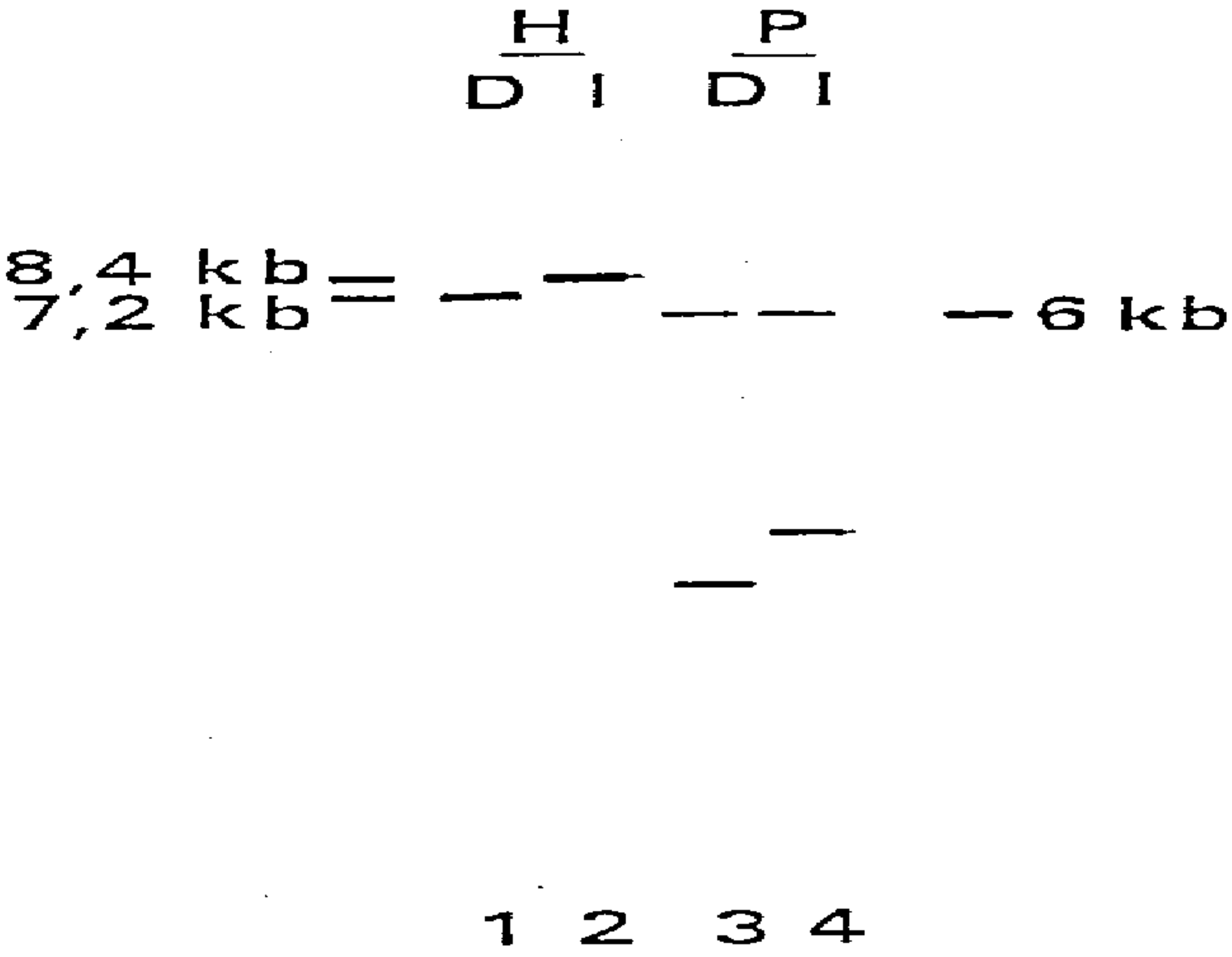
검출분석에 적합한 검출기구로 구성되고, 동물, 특히 포유도울, 더 구체적으로 소에서 유래한 샘플, 특히 혈액 또는 혈청, 혈구, 우유 등의 생물학적 샘플, 눈물, 폐세척액, 콧물, 정충 특히 정액, 타액, 가래 또는 조직, 특히 신경조직 등의 체액 중에서 소의 헤르페스비루스 1형의 프로테인을 검출하기 위한 진단키트.

## 청구항 21.

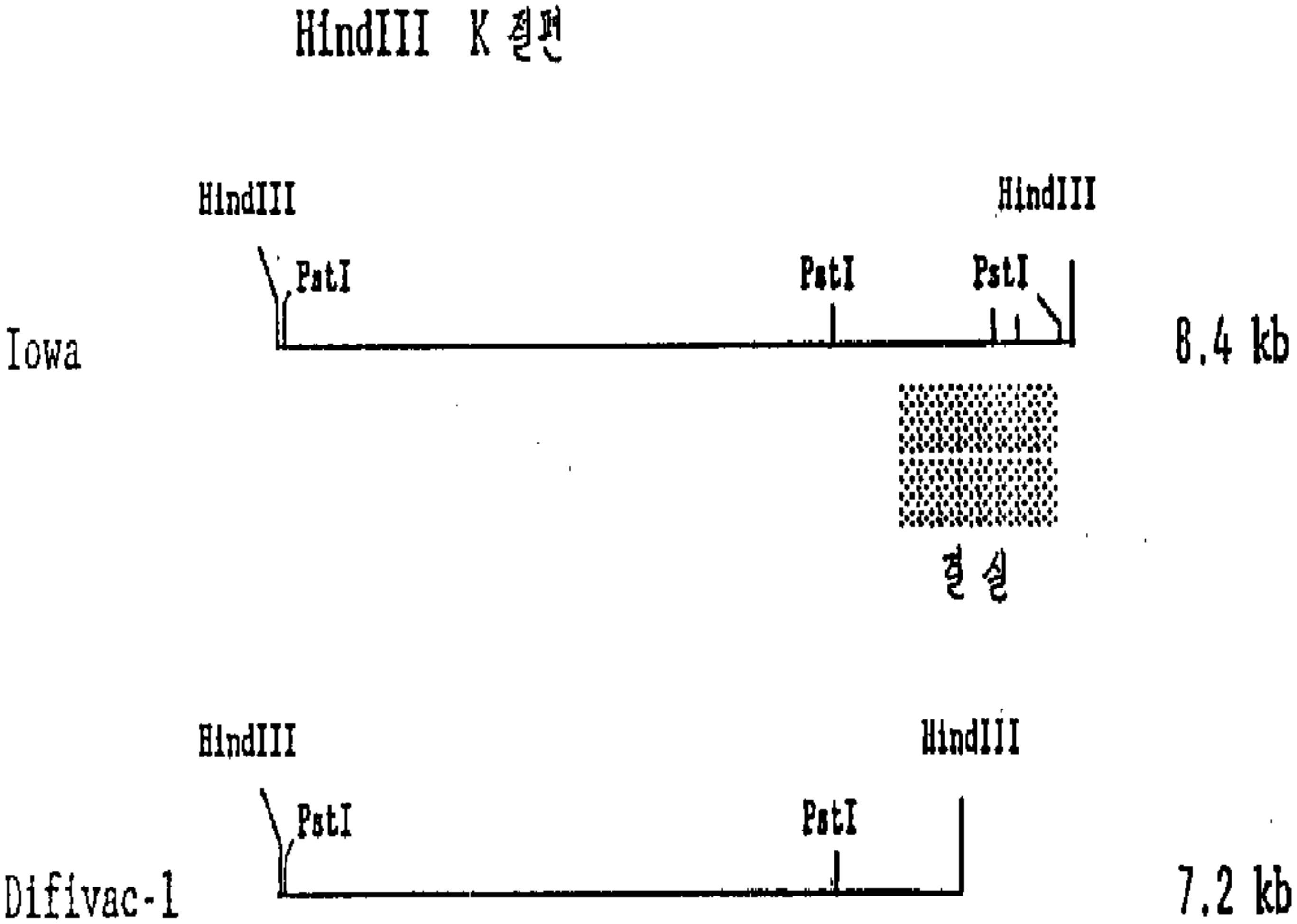
특정 BHV-1 스테레인에서 제3a도에 기재한 아미노산 시퀀스를 갖는 프로테인인 소의 헤르페스비루스 1형의 글리코프로테인 gE-유전자로 되는 핵산의 존재 또는 이 소의 헤르페스비루스 1형의 글리코프로테인 gE 또는 이 소의 헤르페스비루스 1형 글리코프로테인 gE 및 gI 복합체의 존재, 또는 이 소의 헤르페스비루스 1형의 글리코프로테인 gE 또는 소의 헤르페스비루스 1형 글리코프로테인 gE 및 gI의 복합체에 대해서 특이적인 항체의 존재에 대해서, 제33항에 따른 백제 제조물로 예방되어지는 동물에서 유래한 샘플, 특히 혈액 또는 혈청, 혈구, 정충, 특히 정액, 타액, 가래 등의 생물학적 샘플, 눈물, 폐세척액 콧물, 우유, 조직, 특히 신경조직 등의 체액을 검사하는 것으로 되는, 동물 특히 포유동물, 더 구체적으로 소의 소 헤르페스비루스 1형의 감염을 결정하는 방법.

## 도면

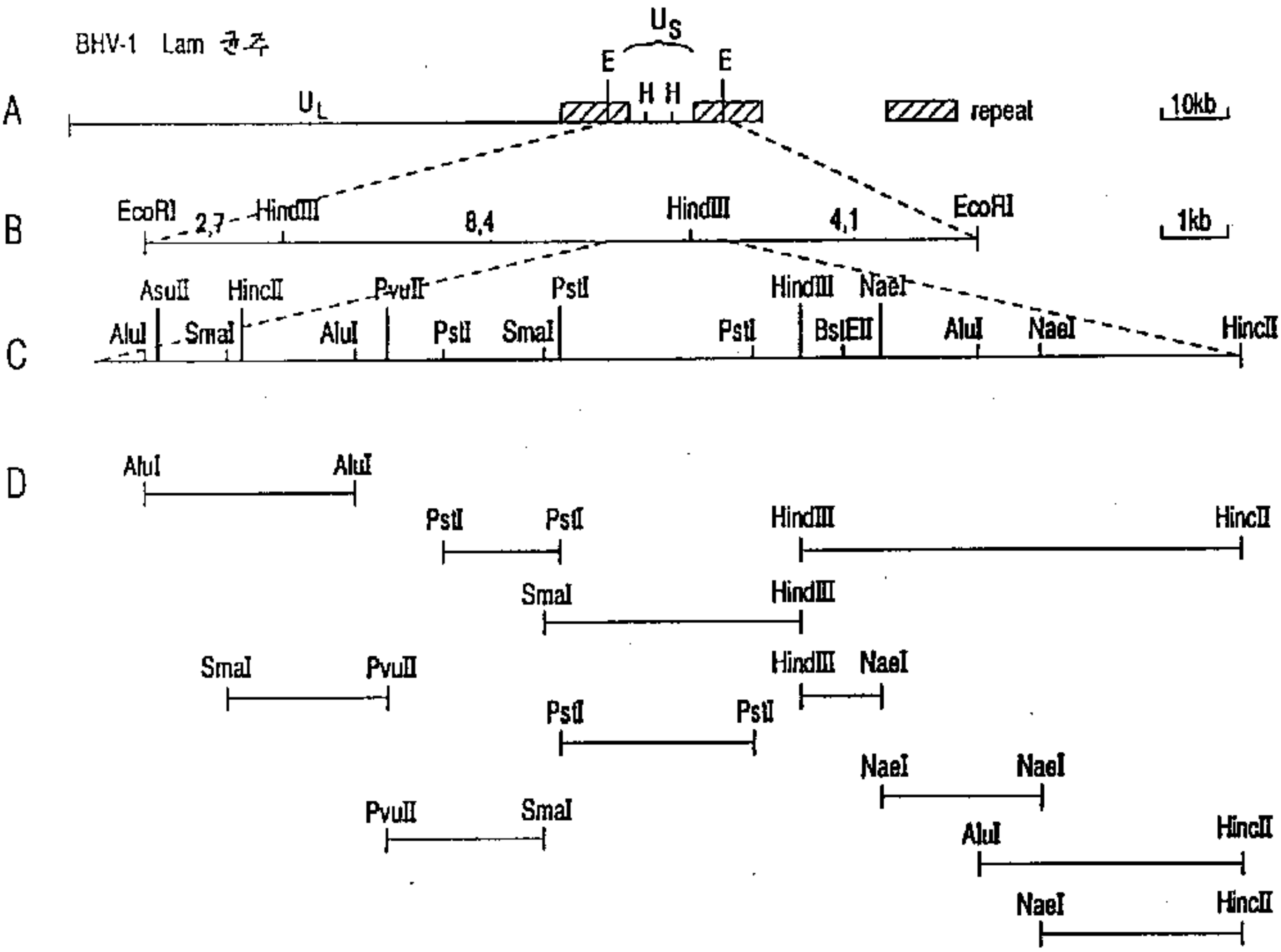
### 도면 1a



도면 1b


HindIII K 절편
HindIII
HindIII
PstI
PstI
PstI
Iowa
8.4 kb
결실
HindIII
HindIII
PstI
PstI
Difivac-1
7.2 kb

# 도면 2


BHV-1 Lam 균주
A
U_L
U_S
E
H H
E
repeat
10kb
B
EcoRI
2,7
HindIII
8,4
HindIII
4,1
EcoRI
1kb
C
AsuII
HincII
PvuII
PstI
HindIII
NaeI
AluI
SmaI
AluI
PstI
SmaI
PstI
BstEII
AluI
NaeI
HincII
D
AluI
AluI
PstI
PstI
HindIII
HincII
SmaI
HindIII
SmaI
PvuII
HindIII
NaeI
PstI
PstI
NaeI
NaeI
PvuII
SmaI
AluI
HincII
NaeI
HincII

도면 3aa

```
AGGGCGGAGC GTTGAGCGGC CCGACCGCCG CCGGGTTGTT AAATGGGTCT CGCGCGGCTC      60

                                   |----> Difivac1 에서 결실
GTGGTTCCAC ACCGCCGGAG AACCAGCGCG AGCTTCGCTG CGTGTGTCCC GCGAGCTGCG     120

                                  AsuII
TTCCGGGGAA CGGCGCACGC GAGAGGGTTC GAAAAGGGCA TTTGGCA                   167

ATG CAA CCC ACC GCG CCG CCC CGG CGG CGG TTG CTG CCG CTG CTG CTG       215
Met Gln Pro Thr Ala Pro Pro Arg Arg Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu
 1               5                  10                  15
============================== 시그널 펩티드 ================

CCG CAG TTA TTG CTT TTC GGG CTG ATG GCC GAG GCC AAG CCC GCG ACC       263
Pro Gln Leu Leu Leu Phe Gly Leu Met Ala Glu Ala Lys Pro Ala Thr
                20                  25                  30
=======================================

       SmaI
GAA ACC CCG GGC TCG GCT TCG GTC GAC ACG GTC TTC ACG GCG CGC GCT       311
Glu Thr Pro Gly Ser Ala Ser Val Asp Thr Val Phe Thr Ala Arg Ala
        35                  40                  45

GGC GCG CCC GTC TTT CTC CCA GGG CCC GCG GCG CGC CCG GAC GTG CGC       359
Gly Ala Pro Val Phe Leu Pro Gly Pro Ala Ala Arg Pro Asp Val Arg
    50                  55                  60

GCC GTT CGC GGC TGG AGC GTC CTC GCG GGC GCC TGC TCG CCG CCC GTG       407
Ala Val Arg Gly Trp Ser Val Leu Ala Gly Ala Cys Ser Pro Pro Val
65                  70                  75                  80
```

## 도면 3ab

```
CCG GAG CCC GTC TGC CTC GAC GAC CGC GAG TGC TTC ACC GAC GTG GCC        455
Pro Glu Pro Val Cys Leu Asp Asp Arg Glu Cys Phe Thr Asp Val Ala
                85                  90                  95

CTG GAC GCG GCC TGC CTG CGA ACC GCC CGC GTG GCC CCG CTG GCC ATC        503
Leu Asp Ala Ala Cys Leu Arg Thr Ala Arg Val Ala Pro Leu Ala Ile
            100                 105                 110

GCG GAG CTC GCC GAG CGG CCC GAC TCA ACG GGC GAC AAA GAG TTT GTT        551
Ala Glu Leu Ala Glu Arg Pro Asp Ser Thr Gly Asp Lys Glu Phe Val
        115                 120                 125

                                PvuII
CTC GCC GAC CCG CAC GTC TCG GCG CAG CTG GGT CGC AAC GCG ACC GGG        599
Leu Ala Asp Pro His Val Ser Ala Gln Leu Gly Arg Asn Ala Thr Gly
    130                 135                 140

GTG CTG ATC GCG GCC GCA GCC GAG GAG GAC GGC GGC GTG TAC TTC CTG        647
Val Leu Ile Ala Ala Ala Ala Glu Glu Asp Gly Gly Val Tyr Phe Leu
145                 150                 155                 160

TAC GAC CGG CTC ATC GGC GAC GCC GGC GAC GAG GAG ACG CAG TTG GCG        695
Tyr Asp Arg Leu Ile Gly Asp Ala Gly Asp Glu Glu Thr Gln Leu Ala
                165                 170                 175

CTG ACG CTG CAG GTC GCG ACG GCC GGC GCG CAG GGC GCC GCG CGG GAC        743
Leu Thr Leu Gln Val Ala Thr Ala Gly Ala Gln Gly Ala Ala Arg Asp
            180                 185                 190
```

## 도면 3ac

```
GAG GAG AGG GAA CCA GCG ACC GGG CCC ACC CCC GGC CCG CCG CCC CAC     791
Glu Glu Arg Glu Pro Ala Thr Gly Pro Thr Pro Gly Pro Pro Pro His
        195                 200                 205

CGC ACG ACG ACA CGC GCG CCC CCG CGG CGG CAC GGC GCG CGC TTC CGC     839
Arg Thr Thr Thr Arg Ala Pro Pro Arg Arg His Gly Ala Arg Phe Arg
    210                 215                 220

                                        SmaI
GTG CTG CCG TAC CAC TCC CAC GTA TAC ACC CCG GGC GAT TCC TTT CTG     887
Val Leu Pro Tyr His Ser His Val Tyr Thr Pro Gly Asp Ser Phe Leu
225                 230                 235                 240

CTA TCG GTG CGT CTG CAG TCT GAG TTT TTC GAC GAG GCT CCC TTC TCG     935
Leu Ser Val Arg Leu Gln Ser Glu Phe Phe Asp Glu Ala Pro Phe Ser
                245                 250                 255

GCC AGC ATC GAC TGG TAC TTC CTG CGG ACG GCC GGC GAC TGC GCG CTC     983
Ala Ser Ile Asp Trp Tyr Phe Leu Arg Thr Ala Gly Asp Cys Ala Leu
            260                 265                 270

ATC CGC ATA TAC GAG ACG TGC ATC TTC CAC CCC GAG GCA CCG GCC TGC    1031
Ile Arg Ile Tyr Glu Thr Cys Ile Phe His Pro Glu Ala Pro Ala Cys
        275                 280                 285

CTG CAC CCC GCC GAC GCG CAG TGC AGC TTC GCG TCG CCG TAC CGC TCC    1079
Leu His Pro Ala Asp Ala Gln Cys Ser Phe Ala Ser Pro Tyr Arg Ser
    290                 295                 300
```

## 도면 3ad

```
GAG ACC GTG TAC AGC CGG CTG TAC GAG CAG TGC CGC CCG GAC CCT GCC     1127
Glu Thr Val Tyr Ser Arg Leu Tyr Glu Gln Cys Arg Pro Asp Pro Ala
305                 310                 315                 320

GGT CGC TGG CCG CAC GAG TGC GAG GGC GCC GCG TAC GCG GCG CCC GTT     1175
Gly Arg Trp Pro His Glu Cys Glu Gly Ala Ala Tyr Ala Ala Pro Val
                325                 330                 335

GCG CAC CTG CGT CCC GCC AAT AAC AGC GTA GAC CTG GTC TTT GAC GAC     1223
Ala His Leu Arg Pro Ala Asn Asn Ser Val Asp Leu Val Phe Asp Asp
            340                 345                 350

GCG CCG GCT GCG GCC TCC GGG CTT TAC GTC TTT GTG CTG CAG TAC AAC     1271
Ala Pro Ala Ala Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Asn
        355                 360                 365

             HindIII
GGC CAC GTG GAA GCT TGG GAC TAC AGC CTA GTC GTT ACT TCG GAC CGT     1319
Gly His Val Glu Ala Trp Asp Tyr Ser Leu Val Val Thr Ser Asp Arg
    370                 375                 380

TTG GTG CGC GCG GTC ACC GAC CAC ACG CGC CCC GAG GCC GCA GCC GCC     1367
Leu Val Arg Ala Val Thr Asp His Thr Arg Pro Glu Ala Ala Ala Ala
385                 390                 395                 400

GAC GCT CCC GAG CCA GGC CCA CCG CTC ACC AGC GAG CCG GCG GGC GCG     1415
Asp Ala Pro Glu Pro Gly Pro Pro Leu Thr Ser Glu Pro Ala Gly Ala
                405                 410                 415
```

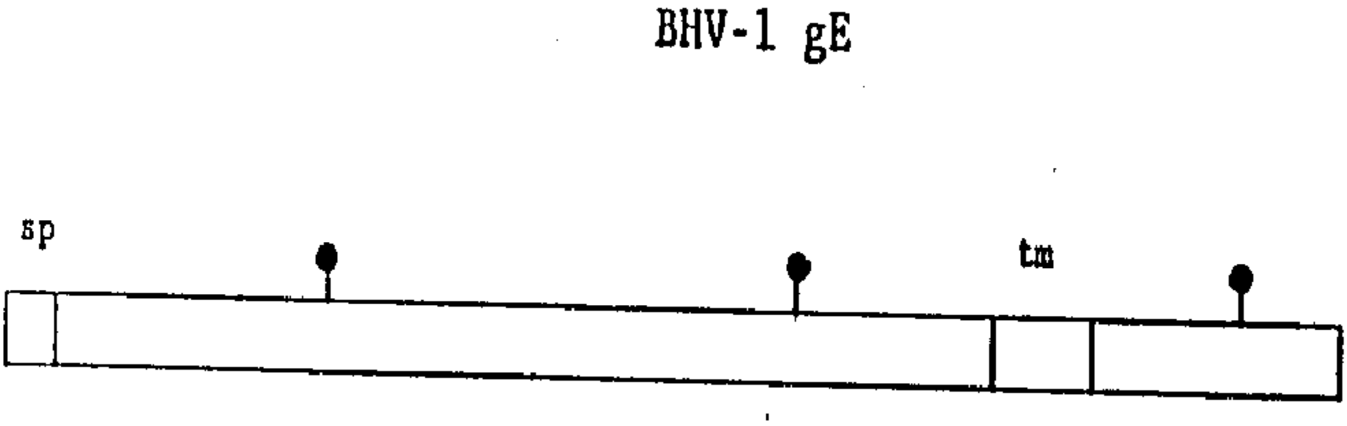
# 도면 3ae

```
CCC ACC GGG CCC GCG CCC TGG CTT GTG GTG CTG GTG GGC GCG CTT GGA   1463
Pro Thr Gly Pro Ala Pro Trp Leu Val Val Leu Val Gly Ala Leu Gly
            420                 425                 430
                ===================  투과막 헬릭스     =======

CTC GCG GGA CTG GTG GGC ATC GCA GCC CTC GCC GTT CGG GTG TGC GCG   1511
Leu Ala Gly Leu Val Gly Ile Ala Ala Leu Ala Val Arg Val Cys Ala
        435                 440                 445
===========================================================

CGC CGC GCA AGC CAG AAG CGC ACC TAC GAC ATC CTC AAC CCC TTC GGG   1559
Arg Arg Ala Ser Gln Lys Arg Thr Tyr Asp Ile Leu Asn Pro Phe Gly
    450                 455                 460

CCC GTA TAC ACC AGC TTG CCG ACC AAC GAG CCG CTC GAC GTG GTG GTG   1607
Pro Val Tyr Thr Ser Leu Pro Thr Asn Glu Pro Leu Asp Val Val Val
465                 470                 475                 480

CCA GTT AGC GAC GAC GAA TTT TCC CTC GAC GAA GAC TCT TTT GCG GAT   1655
Pro Val Ser Asp Asp Glu Phe Ser Leu Asp Glu Asp Ser Phe Ala Asp
                485                 490                 495

GAC GAC AGC GAC GAT GAC GGG CCC GCT AGC AAC CCC CCT GCG GAT GCC   1703
Asp Asp Ser Asp Asp Asp Gly Pro Ala Ser Asn Pro Pro Ala Asp Ala
            500                 505                 510
```

도면 3af

```
TAC GAC CTC GCC GGC GCC CCA GAG CCA ACT AGC GGG TTT GCG CGA GCC     1751
Tyr Asp Leu Ala Gly Ala Pro Glu Pro Thr Ser Gly Phe Ala Arg Ala
        515                 520                 525

CCC GCC AAC GGC ACG CGC TCG AGT CGC TCT GGG TTC AAA GTT TGG TTT     1799
Pro Ala Asn Gly Thr Arg Ser Ser Arg Ser Gly Phe Lys Val Trp Phe
    530                 535                 540

AGG GAC CCG CTT GAA GAC GAT GCC GCG CCA GCG CGG ACC CCG GCC GCA     1847
Arg Asp Pro Leu Glu Asp Asp Ala Ala Pro Ala Arg Thr Pro Ala Ala
545                 550                 555                 560

                                                    EcoNI
CCA GAT TAC ACC GTG GTA GCA GCG CGA CTC AAG TCC ATC CTC CGC TAG     1895
Pro Asp Tyr Thr Val Val Ala Ala Arg Leu Lys Ser Ile Leu Arg  *
                565                 570                 575

GCGCCCCCCC CCCCCCGCGC GCTGTGCCGT CTGACGGAAA GCACCCGCGT GTAGGGCTGC  1955
ATATAAATGG AGCGCTCACA CAAAGCCTCG TGCGGCTGCT TCGAAGGCAT GGAGAGTCCA  2015
CGCAGCGTCG TC                                                      2027
```

도면 3b



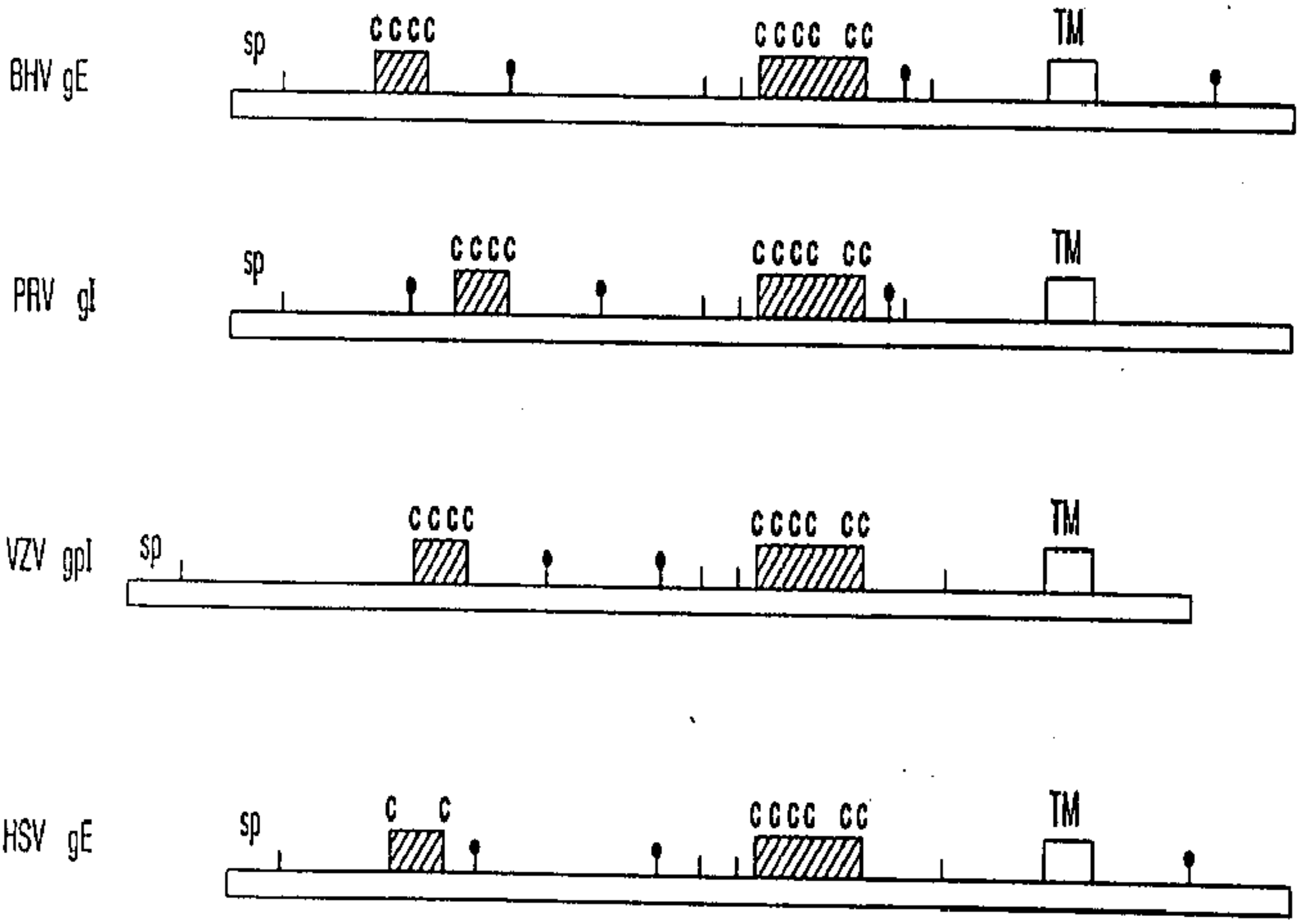
575 아미노산

sp = 시그널 펩티드 26 잔기

● = 추정 N-글리코실레이팅 부위

tm = 투과막 헬릭스 잔기 423-450

도면 4a

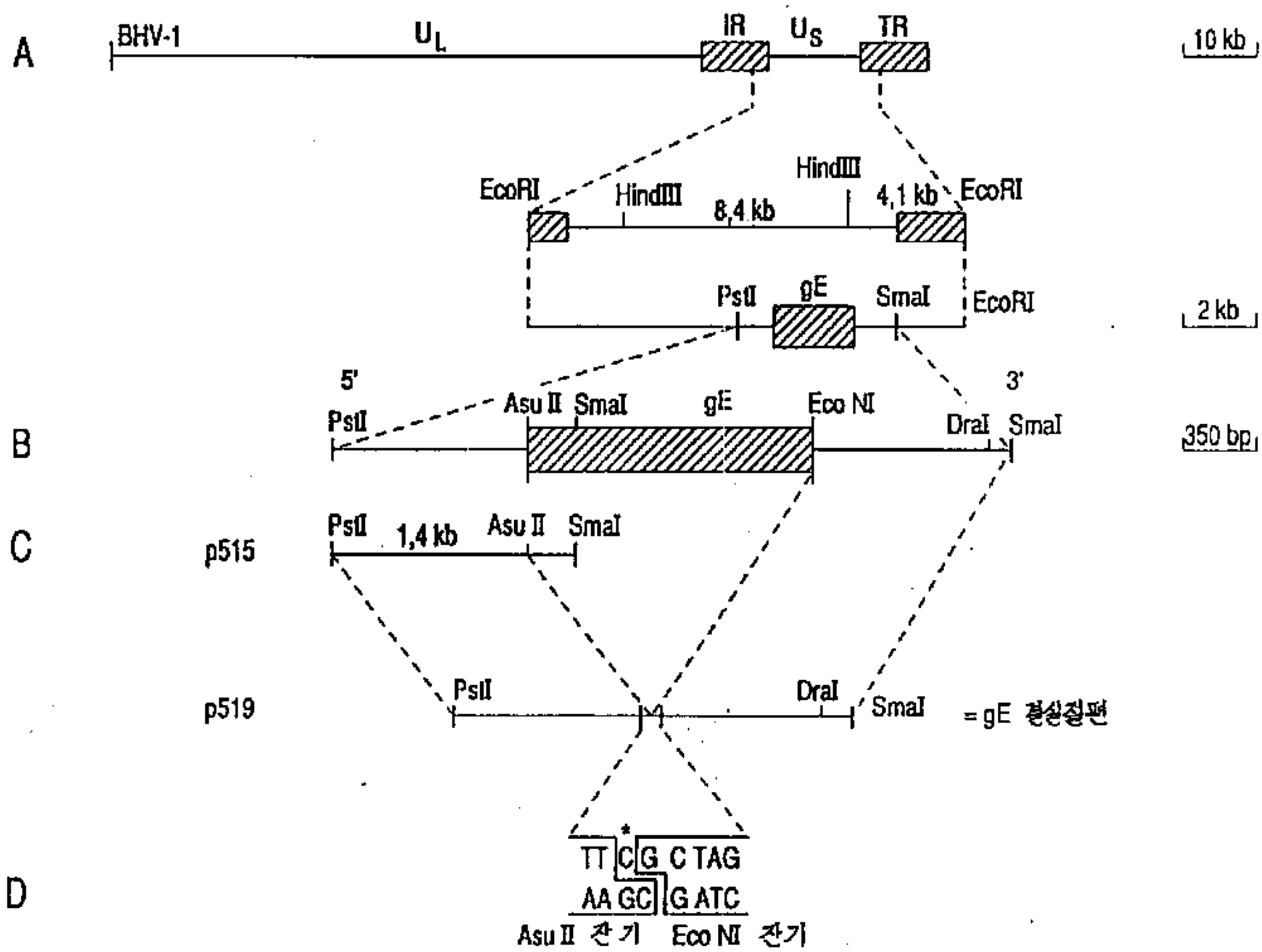

BHV gE
sp
CCCC
CCCC CC
TM
PRV gI
sp
CCCC
CCCC CC
TM
VZV gpI
sp
CCCC
CCCC CC
TM
HSV gE
sp
C C
CCCC CC
TM

## 도면 4b

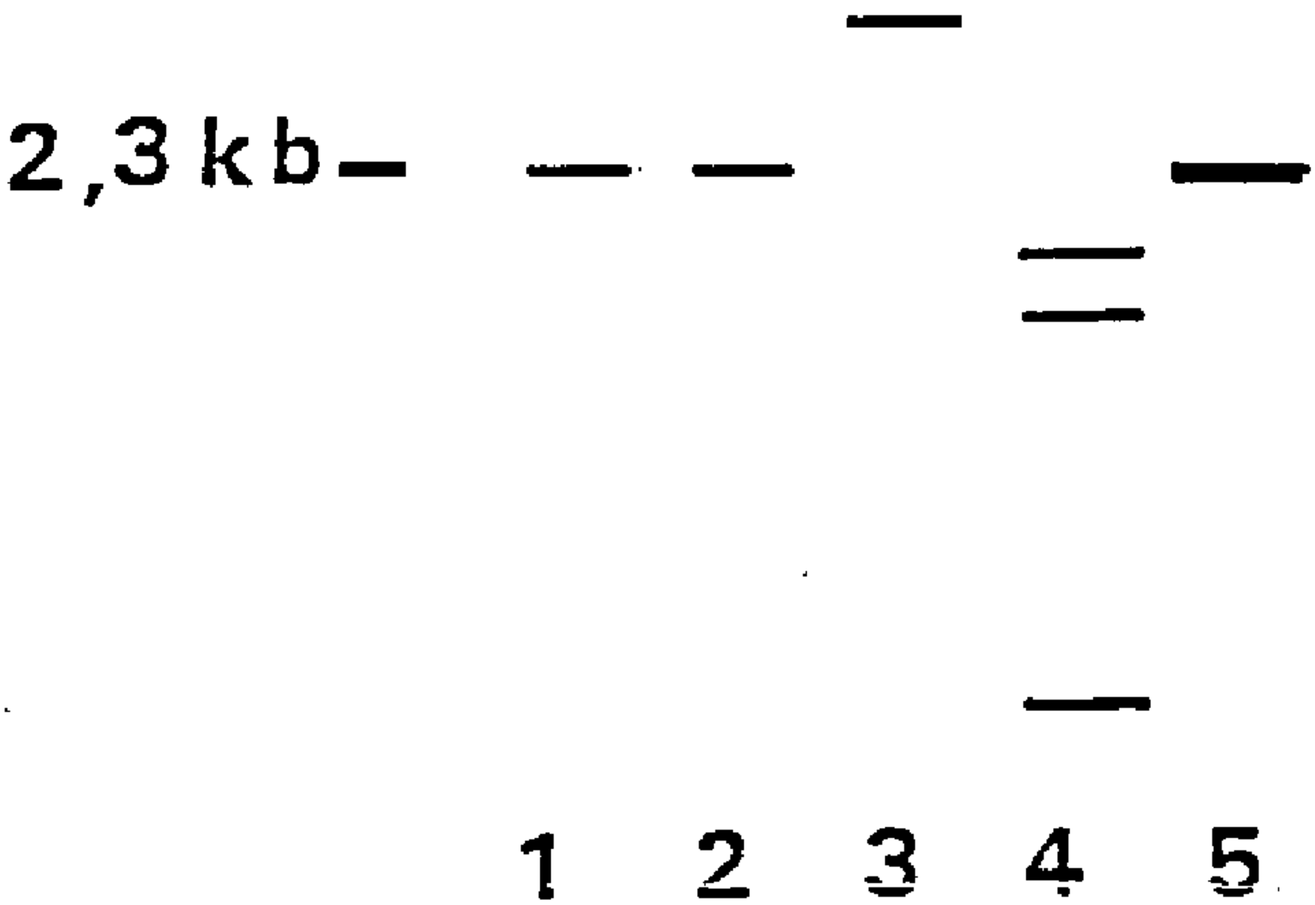
```
          기호 비교용  :    DAYHOFF.DAT;      갭 페널티 : 8
       1       10        20        30        40        50        60
PRV    HSQLFSPGDTFDLMPRVVSDMGDSRENTFTATLDWYYARAPPRCLLYYVYEPCIYHPRAP
       **::** **** *  ::   :    *  *   *:* *    * *    :*  *:*** **
VZV    HSHVFSVGDTFSLAMHLQYKI.H..EAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAP
       ****:  ** * * ::**       ****   ::* ::     *  :*:* **::** **
BHV    HSHVYTPGDSFLLSVRLQSEFFD..EAPFSASIDWYFLRTAGDCALIRIYETCIFHPEAP
          :: **: *   * ::    *  :  :*  : *  :     ** :**** *::**: *
HSV    EAILFSPGETFSTNVSIHAIAHD..DQTYSMDVVWLRFDVPTSCAEMRIYESCLYHPQLP
       1       10        20          30        40        50

               70        80        90       100       110
PRV    ECLRPVDPACSFTSPARAALVARRAYASCSPLLGDRWLTACPFDAFGEEVH.........
       :**  ::  * ****  *  **   *  *     *     *      *
VZV    QCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNC..EHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGT
        **   :  *** **   : * * :*: *  : *      * *     *   *   :
BHV    ACLHPADAQCTFASPYRSETVYSRLYEQCRPDPAGRWPHECEGAAYAAPVAHLRPANNSV
        ** **** *  *   :   :  * *  *        *  *   *   **  *     **
HSV    ECLSPADAPC..AASTWTSRLAVRSYAGCSRTNP...PPRCSAEAHMEPVPGLAWQAASV
       60          70        80        90          100       110

                 120       130       140
PRV    ....TNATADESGLYVLVMTHNGHVATWDYTLVAT
            :     *****: :  ****    **:* *
VZV    TLKFVDTPESLSGLYVFYVYFNGHVEAVAYTVVST
        * * * *   ****** : :******  * :* *
BHV    DLVFDDAPAAASGLYVFVLQYNGHVEAWDYSLVVT
       :* * **    ****: *:  * *: **    : *
HSV    NLEFRDASPQHSGLYLCVVYVNDHIHAWGHITIST
           120       130       140     148
```

도면 5

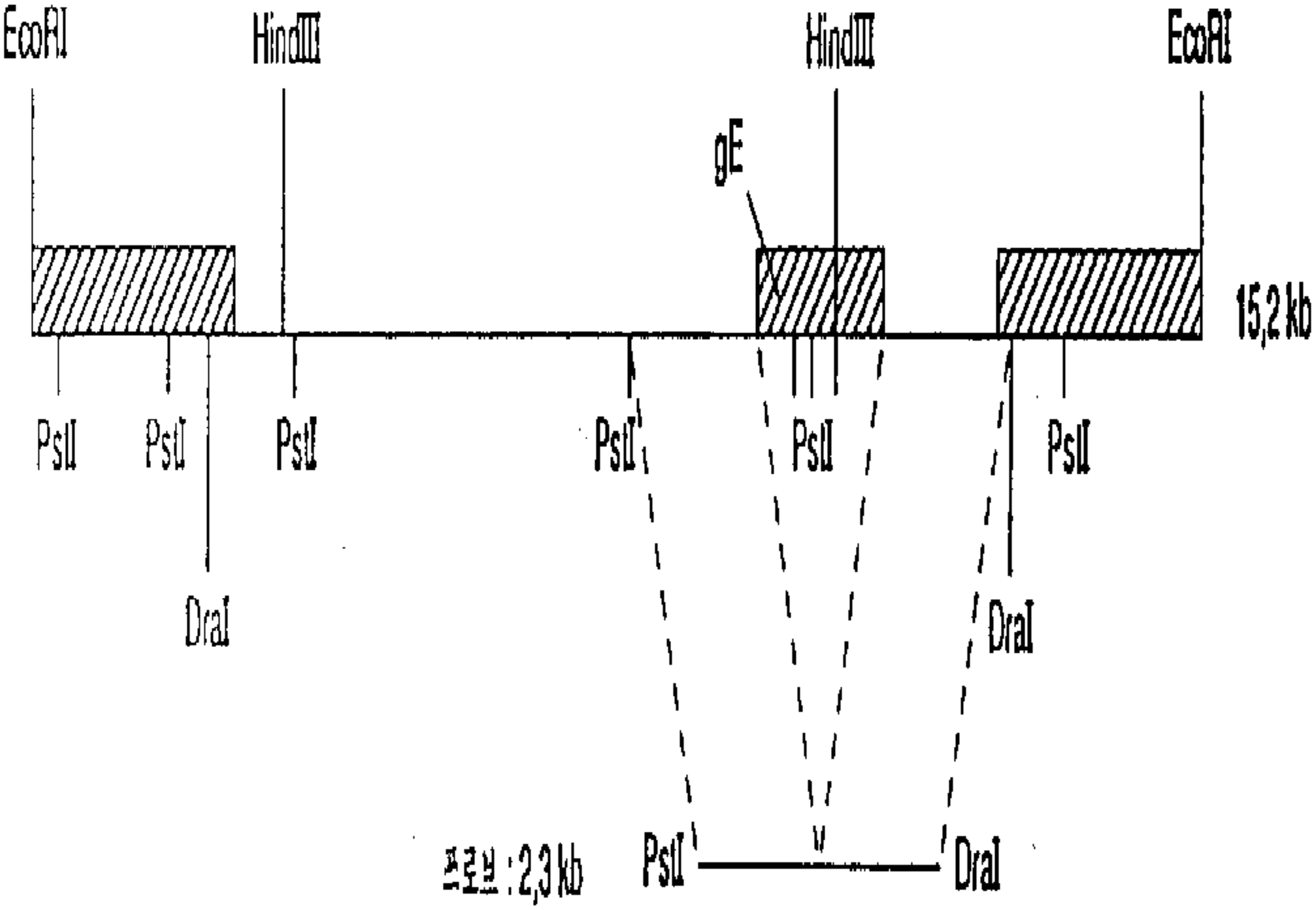
## 도면 6


A
BHV-1
U_L
IR
U_S
TR
10 kb
EcoRI
HindIII
8,4 kb
HindIII
4,1 kb
EcoRI
PstI
gE
SmaI
EcoRI
2 kb
5'
3'
B
PstI
Asu II
SmaI
gE
Eco NI
DraI
SmaI
350 bp
C
p515
PstI
1,4 kb
Asu II
SmaI
p519
PstI
DraI
SmaI
= gE 결실절편
D
TT C G C TAG
AA GC G ATC
Asu II 잔기
Eco NI 잔기

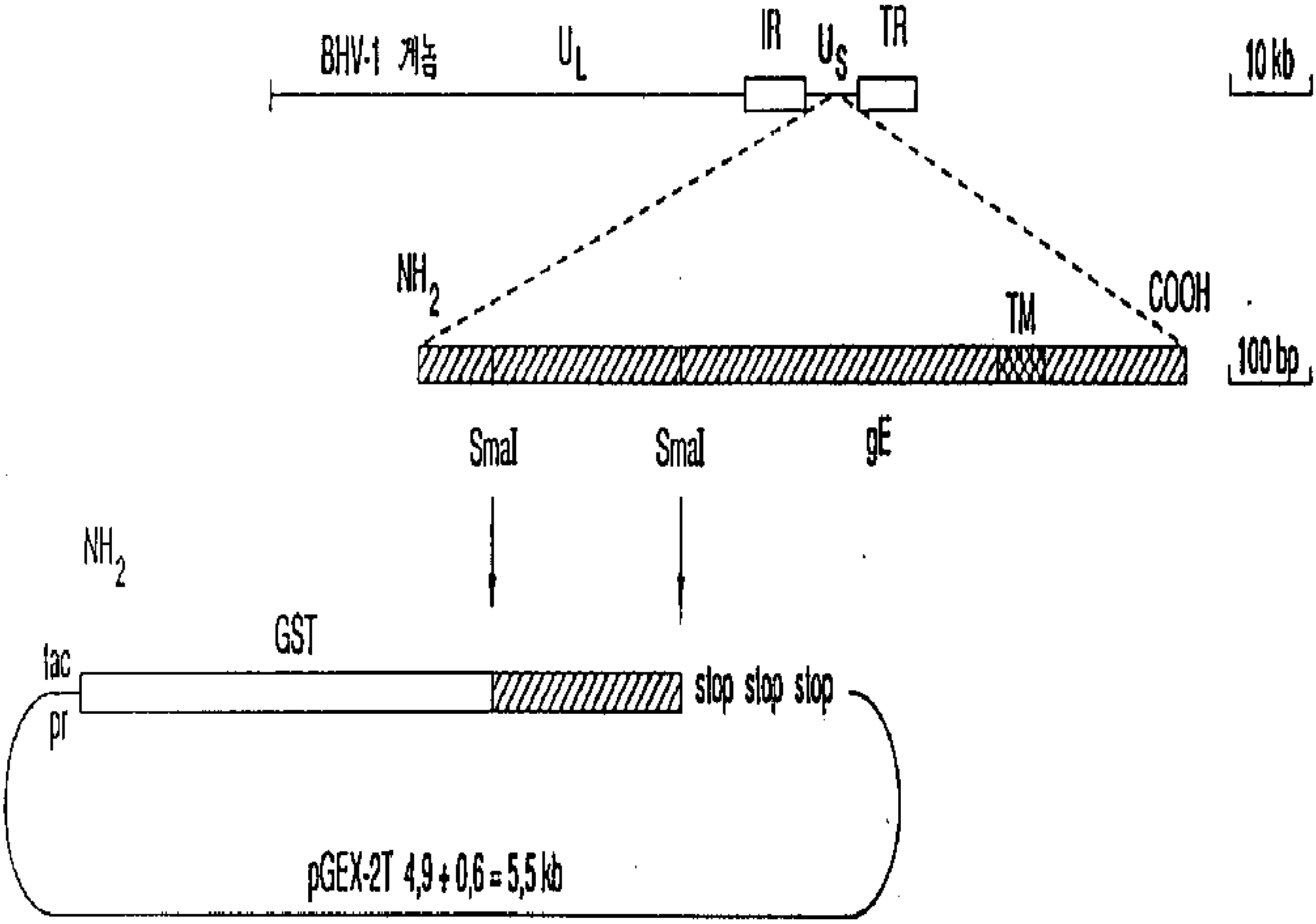
도면 7a



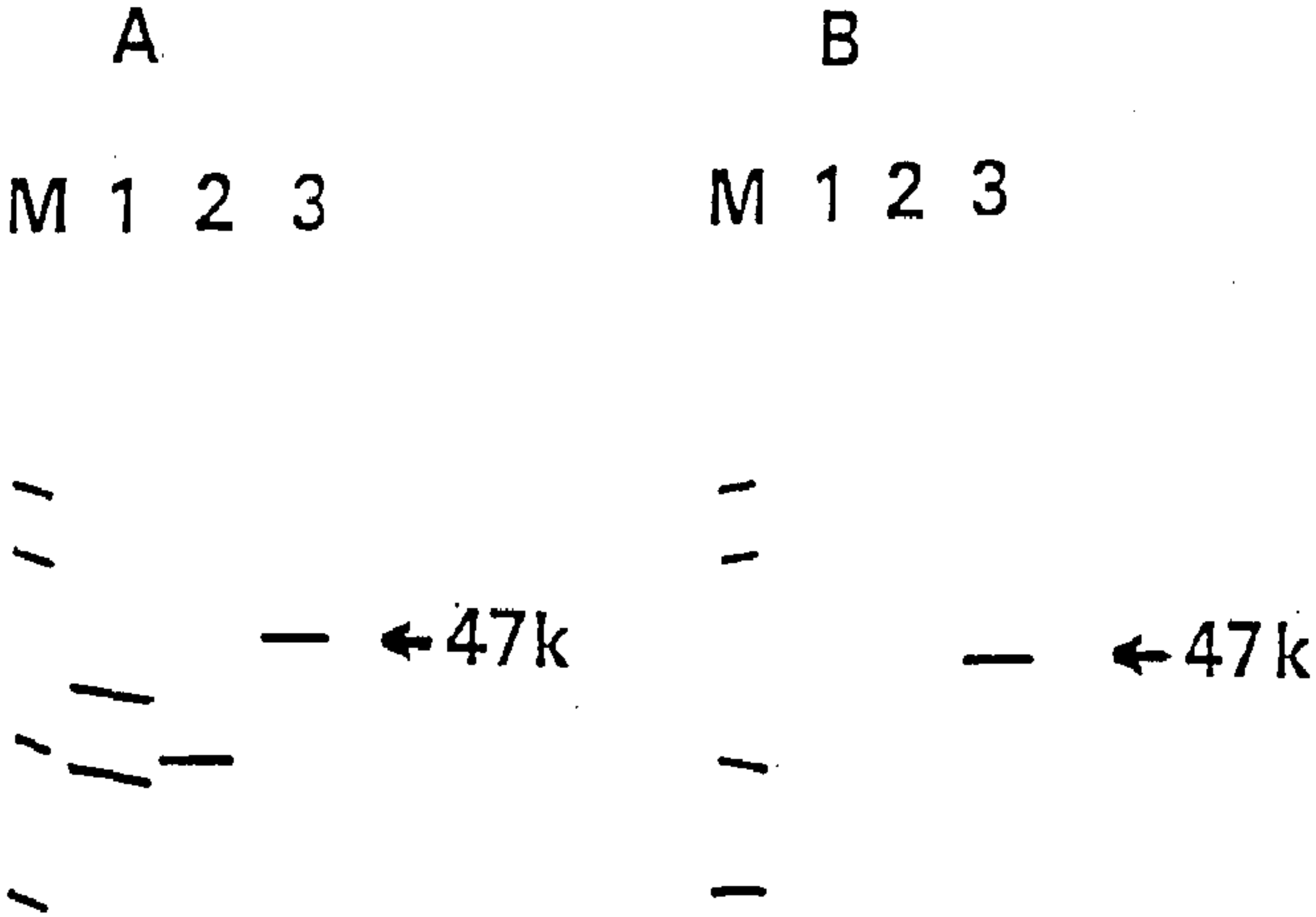
도면 7b


EcoRI
HindIII
HindIII
EcoRI
gE
15,2 kb
PstI
PstI
PstI
PstI
PstI
PstI
DraI
DraI
프로브 : 2,3 kb
PstI
DraI

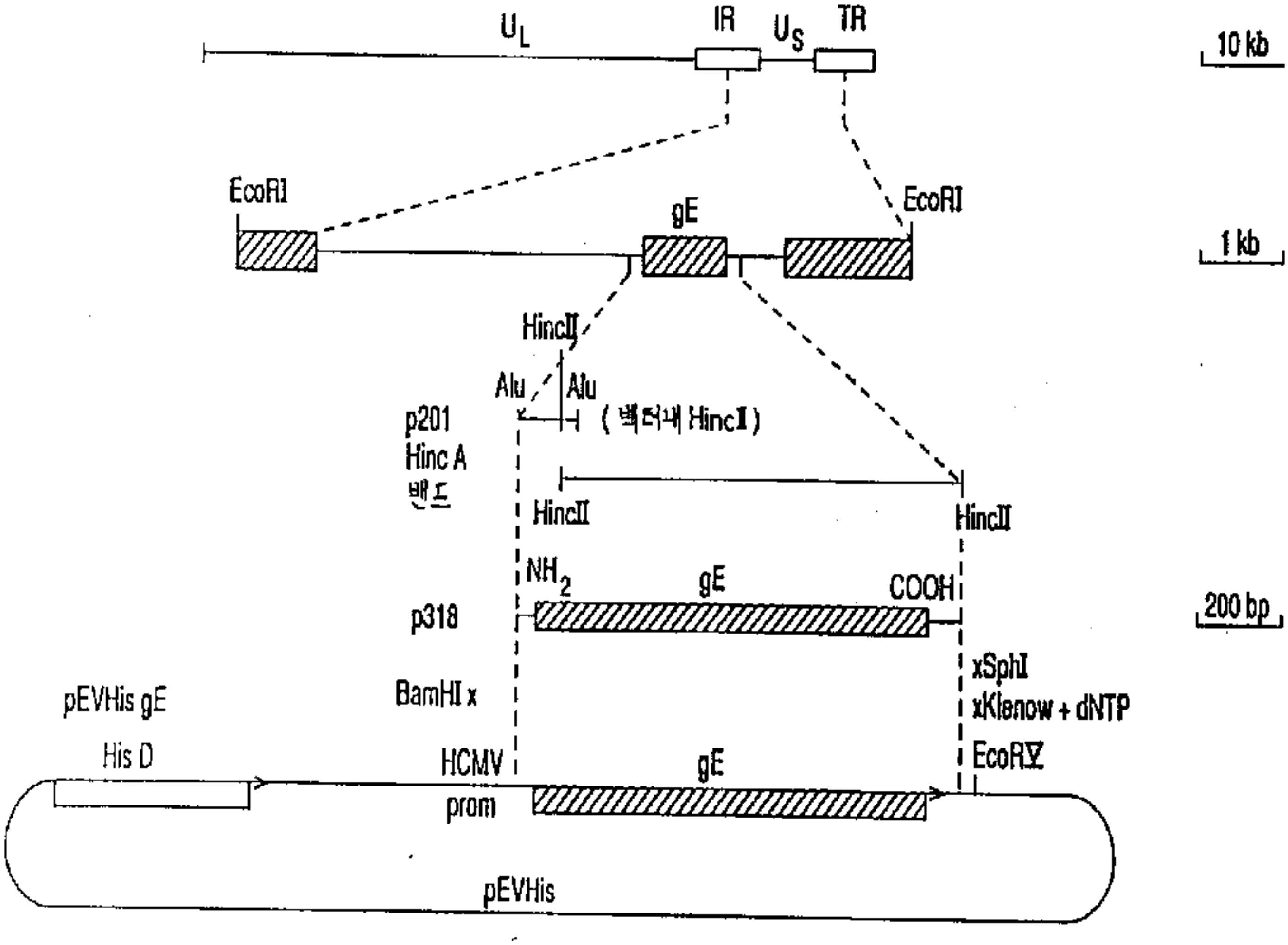
**도면 8a**


BHV-1 게놈
$U_L$
IR
$U_S$
TR
10 kb
$NH_2$
TM
COOH
100 bp
SmaI
SmaI
gE
$NH_2$
GST
lac
pr
stop stop stop
pGEX-2T 4,9 + 0,6 = 5,5 kb

도면 8b



## 도면 9


U_L
IR
U_S
TR
10 kb
EcoRI
gE
EcoRI
1 kb
HincII
Alu
Alu
( 벡터내 HincII )
p201
Hinc A
밴드
HincII
HincII
NH2
gE
COOH
p318
200 bp
pEVHis gE
BamHI x
xSphI
xKlenow + dNTP
His D
HCMV
prom
gE
EcoRV
pEVHis

## 도면 10

1272 GGCCACGTGGAAGCTTGGGACTACAGCCTAGTCGTTACTTCGGACCGTTTGGTGCGCGCGGTCACC

HindIII

GACCACACGCGCCCCGAGGCCGCAGCCGCCGACGCTCCCGAGCCAGGCCCACCGCTCACCAGCGAGCCGGCGGGCGCG

CCCACCGGGCCCGCGCCCTGGCTTGTGGTGCTGGTGGGCGCGCTTGGACTCGCGGGACTGGTGGGCATCGCAGCCCTC

GCCGTTCGGGTGTGCGCGCGCCGCGCAAGCCAGAAGCGCACCTACGACATCCTCAACCCCTTCGGGCCCGTATACACC

AGCTTGCCGACCAACGAGCCGCTCGACGTGGTGGTGCCAGTTAGCGACGACGAATTTTCCCTCGACGAAGACTCTTTT

$P_3$ TaqI

GCGGATGACGACAGCGACGATGACGGGCCCGCTAGCAACCCCCCTGCGGATGCCTACGACCTCGCCGGCGCCCCAGAG

CCAACTAGCGGGTTTGCGCGAGCCCCCGCCAACGGCACGCGCTCGAGTCGCTCTGGGTTCAAAGTTTGGTTTAGGGAC

TaqI $P_4$

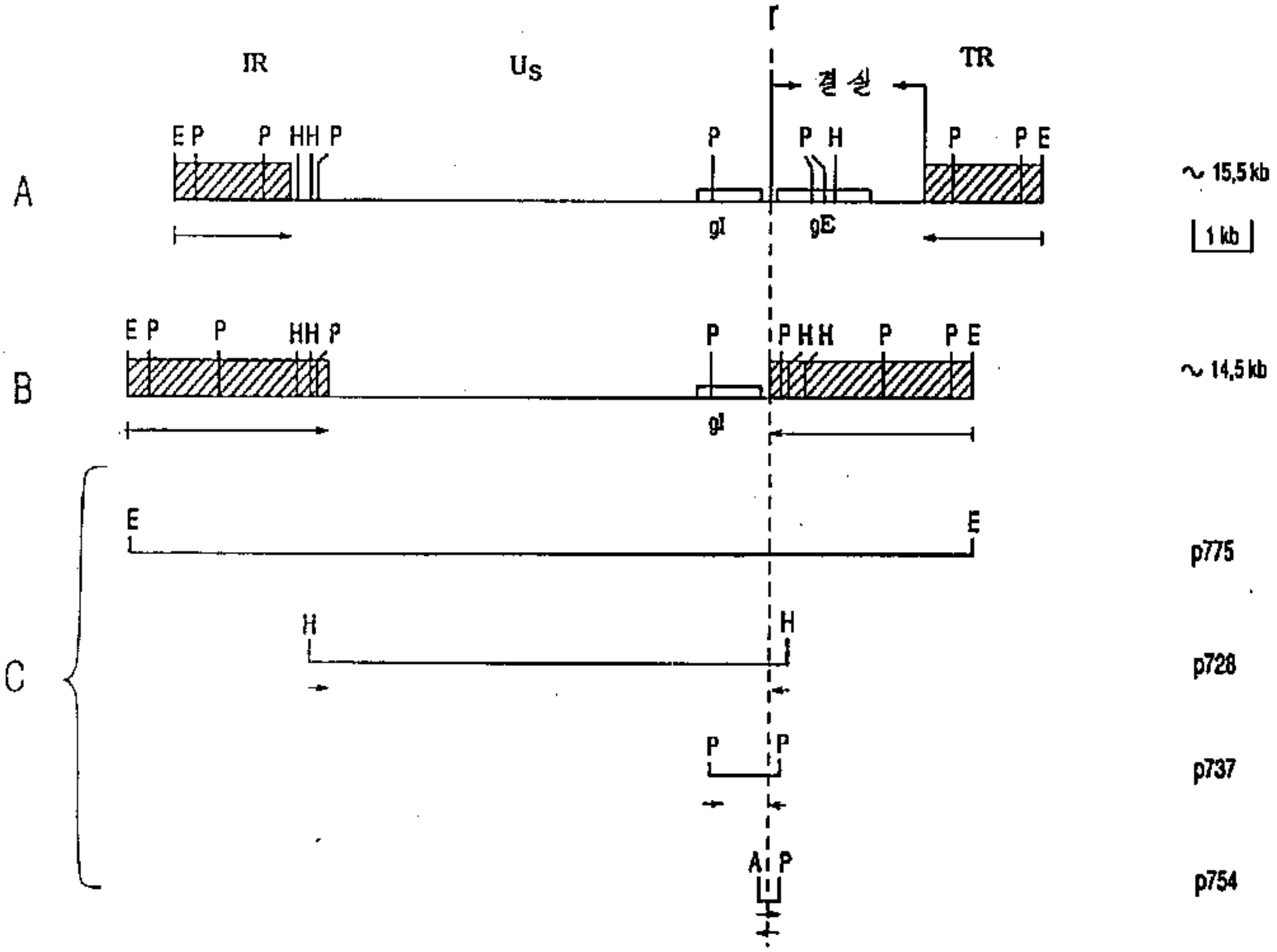
CCGCTTGAAGACGATGCCGCGCCAGCGCGGACCCCGGCCGCACCAGATTACACCGTGGTAGCAGCGCGACTCAAGTCC

ATCCTCCGCTAGGCGCCCCCCCCCCCCCGCGCGCTGTGCCGTCTGACGGAAAGCACCCGCGTGTAGGGCTGCATATAA

EcoNI

ATGGAGCGCTCACACAAAGCCTCGTGCGGCTGCTTCGAAGGCATGGAGAGTCCACGCAGCGTCGTC 2027

## 도면 11


IR
Us
결실
TR
A
E P P HH P
P
P H
P P E
gI
gE
~ 15,5 kb
1 kb
B
E P P HH P
P
P HH P P E
gI
~ 14,5 kb
C
E
E
p775
H
H
p728
P
P
p737
A
P
p754

## 도면 12

A

```
 ------------------> gE  프로모터 영역   ------------------------------>
5'GAGCGGCCCGACCGCCGCCGGGTTGTTAAATGGGTCTCGCCGCGGCTCGTGGTTCCACACCGCCGGAGAA
       r
------>|<-----------      역 복 제     <--------------------------------
CCAGCGC|TGCGAGGGGGGCTTGGTGGCTGGCCGACTCTTTAAGGCGTGCCGGCCACGAGCAAGAAGACGGC
       |
<-------------------      역 복 제     <-----------------------------
CTGTATGCTATGCTCCCGCCGGACTATTTTCCGGTGGTGCCCGTCGTCCAAGCCCCTGCTGGTGAAAGTT 3'
```

B(I)

```
                             r
                 특이단편     |     역 복 제
역복제 부위  :  GGCACCGGTCCCCGA|TGCGAGGGGGGCTTGG
(역 시퀀스)              *   *|*****************
 재조합 영역  :  CCGGAGAACCAGCGC|TGCGAGGGGGGCTTGG
```

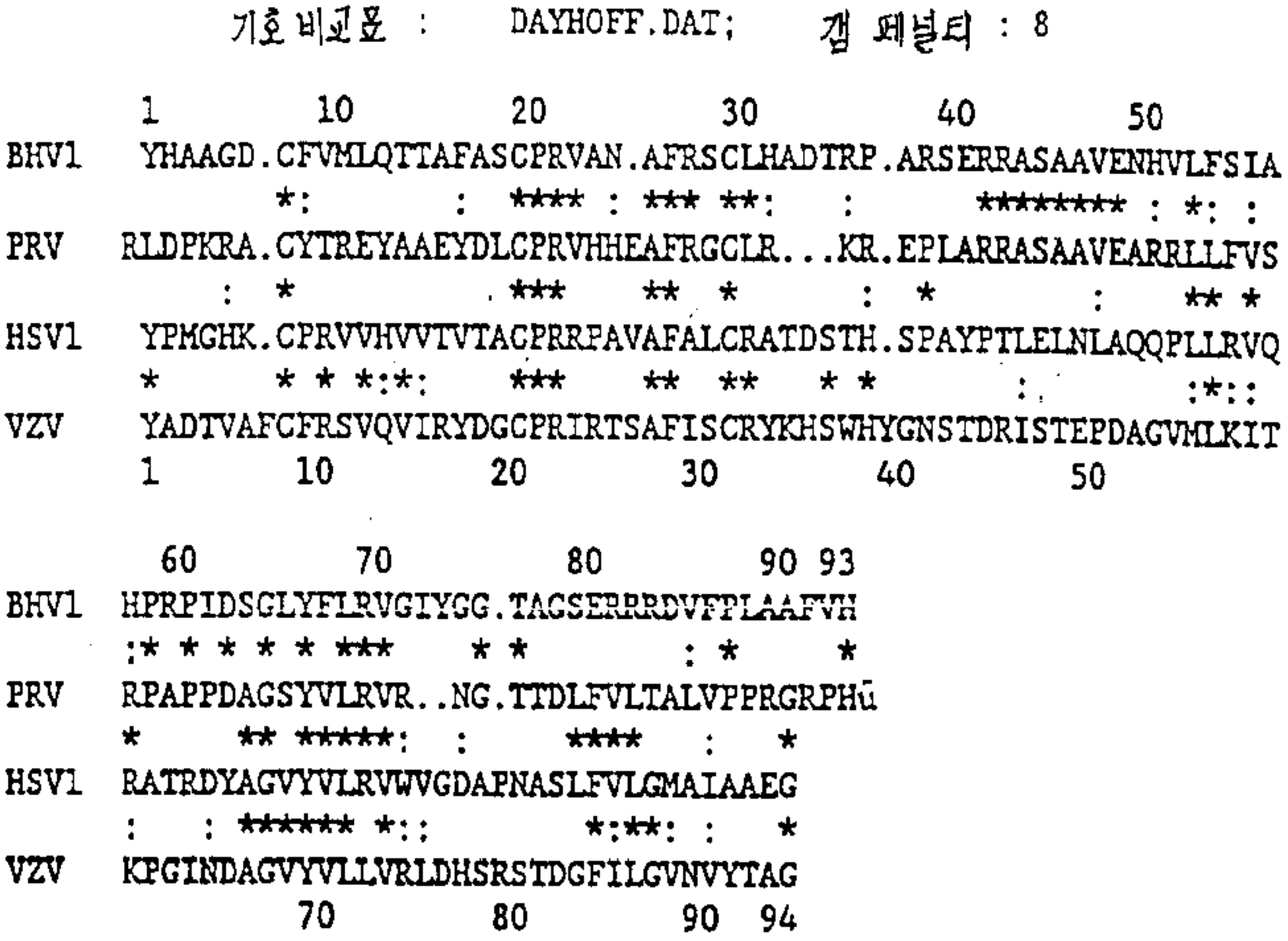
B(II)

```
                             r
 재조합 영역  :  CCGGAGAACCAGCGC|TGCGAGGGGGGCTTGG
               ***************|      *  *  *  *
야생형gE 영역  :  CCGGAGAACCAGCGC|GAGCTTCGCTGCGTGTG
                              | gE  리 더    --->
```

# 도면 13

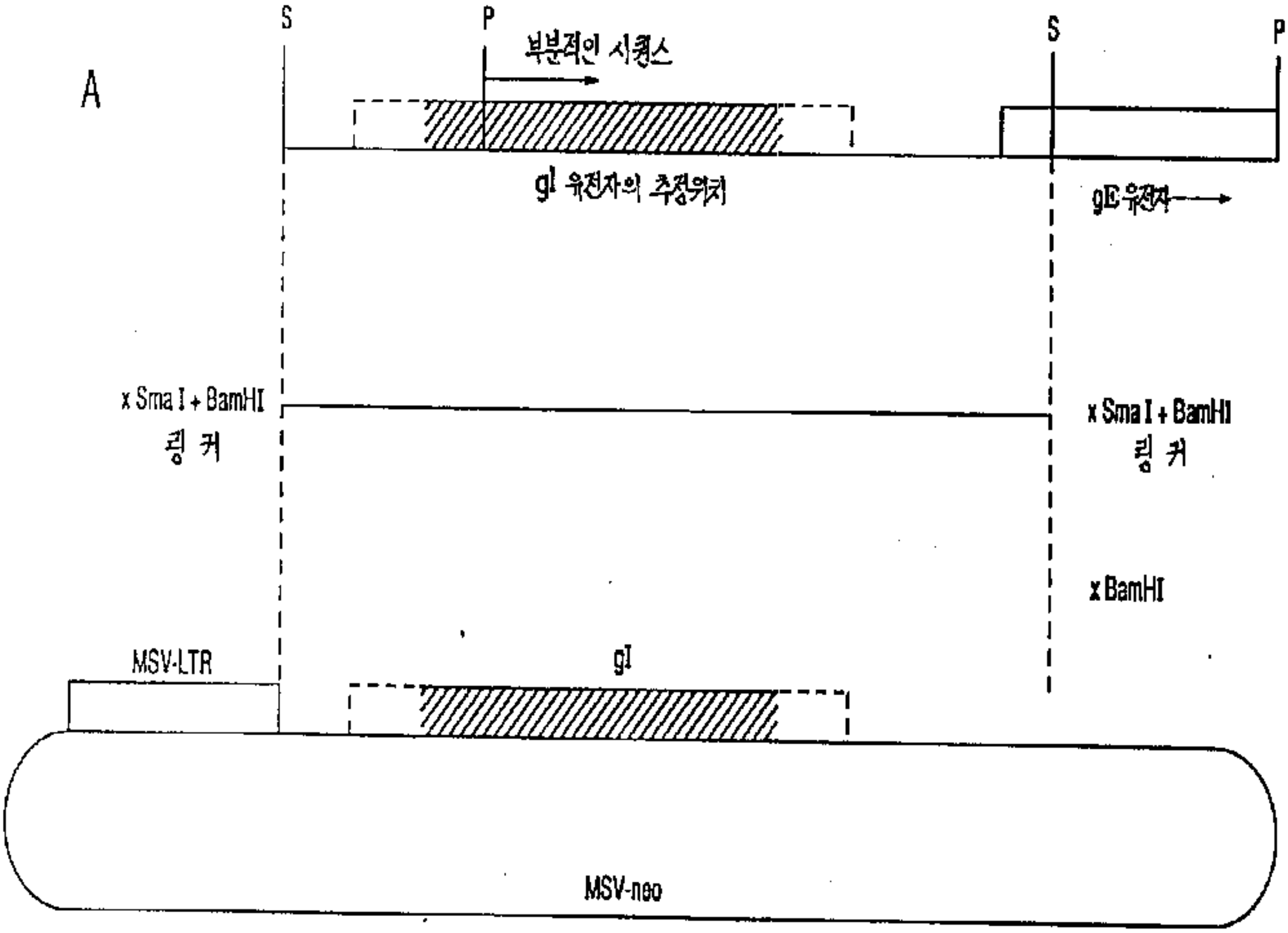
```
        10        20        30        40        50        60
         |         |         |         |         |         |
CTACCACGCCGCGGGCGACTGCTTCGTTATGCTGCAGACGACCGCGTTCGCCTCCTGCCC

  Y  H  A  A  G  A  C  F  V  M  L  Q  T  T  A  F  A  S  C  P

        70        80        90       100       110       120
         |         |         |         |         |         |
GCGCGTCGCGAACGACGCCTTTCGCTCCTGCCTGCACGCCGACACGCGCCCCGCTCGCAG

  R  V  A  N  D  A  F  R  S  C  L  H  A  D  T  R  P  A  R  S

       130       140       150       160       170       180
         |         |         |         |         |         |
CGAGCGGCGCGCGAGCGCCGCGGTCGAAAACCACGTGCTCTTCTCCATCGCCCATCCGCG

  E  R  R  A  S  A  A  V  E  N  H  V  L  F  S  I  A  H  P  R

       190       200       210       220       230       240
         |         |         |         |         |         |
CCCAATAGACTCAGGGCTCTACTTTCTGCGCGTCGGCATCTACGGCGGCACCGCGGGCAG

  P  I  D  S  G  L  Y  F  L  R  V  G  I  Y  G  G  T  A  G  S

       250       260       270       280
         |         |         |         |
CGAGCGCCGCCGAGACGTCTTTCCCTTGGCCGCGTTTGTACACA

  E  R  R  R  D  V  F  P  L  A  A  F  V  H
```

## 도면 14

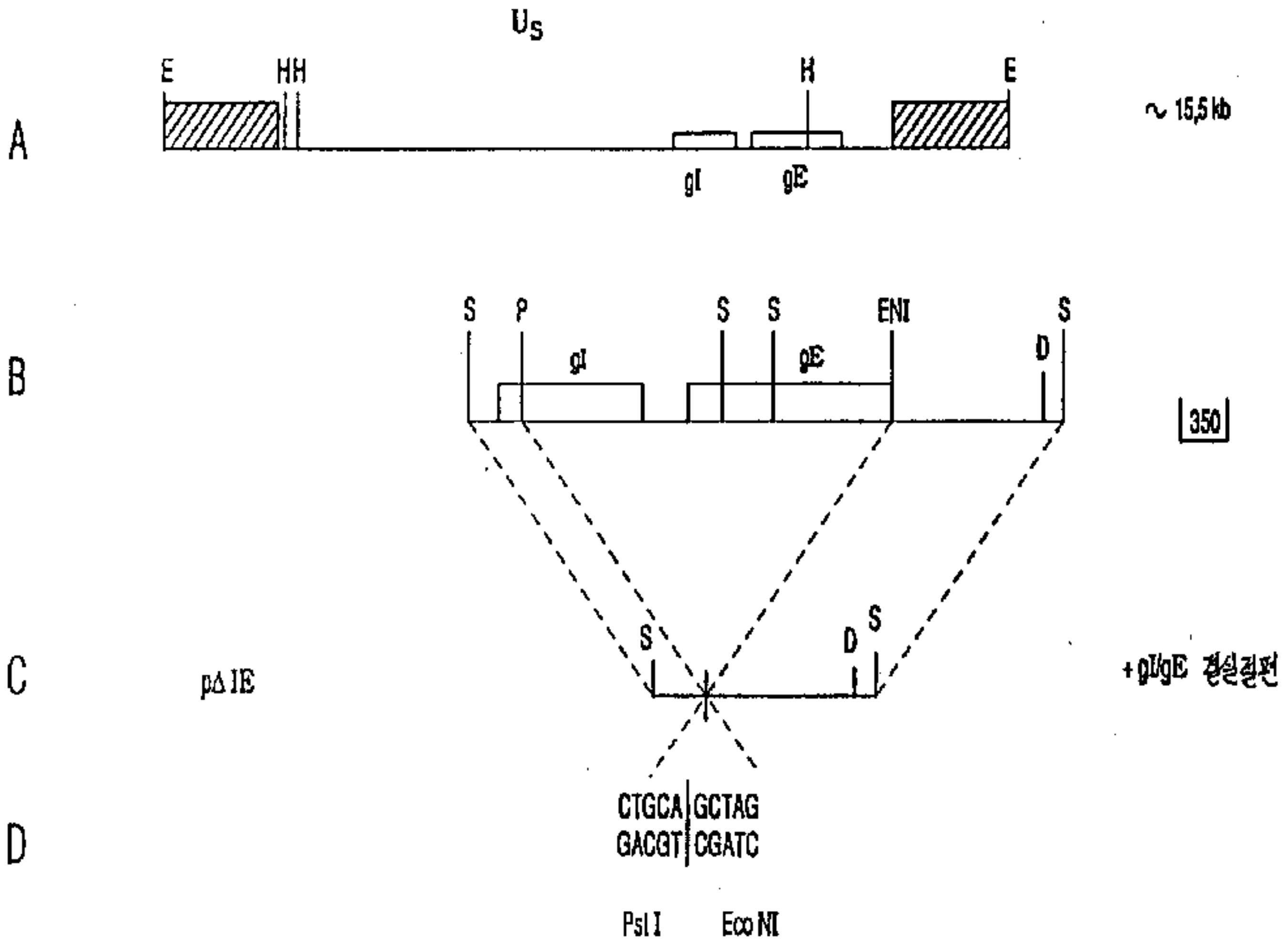


```
             기호 비교표 :    DAYHOFF.DAT;    갭 페널티 : 8

         1        10        20         30         40        50
BHV1     YHAAGD.CFVMLQTTAFASCPRVAN.AFRSCLHADTRP.ARSERRASAAVENHVLFSIA
                *:       :  **** : *** **:   :      ******** : *: :
PRV     RLDPKRA.CYTREYAAEYDLCPRVHHEAFRGCLR...KR.EPLARRASAAVEARRLLFVS
             :  *           ***    **  *      :  *        :    ** *
HSV1     YPMGHK.CPRVVHVVTVTACPRRPAVAFALCRATDSTH.SPAYPTLELNLAQQPLLRVQ
         *      * * *:*:    ***    **  **   * *       :        :*::
VZV      YADTVAFCFRSVQVIRYDGCPRIRTSAFISCRYKHSWHYGNSTDRISTEPDAGVMLKIT
         1       10        20        30        40        50

          60        70         80        90 93
BHV1    HPRPIDSGLYFLRVGIYGG.TAGSERRRDVFFLAAFVH
        ;* * * * * ***    * *        : *     *
PRV     RPAPPDAGSYVLRVR..NG.TTDLFVLTALVPPRGRPHū
        *     ** *****:  :     ****   :   *
HSV1    RATRDYAGVYVLRVWVGDAPNASLFVLGMAIAAEG
        :   : ****** *::        *:**: :   *
VZV     KPGINDAGVYVLLVRLDHSRSTDGFILGVNVYTAG
                 70        80        90  94
```

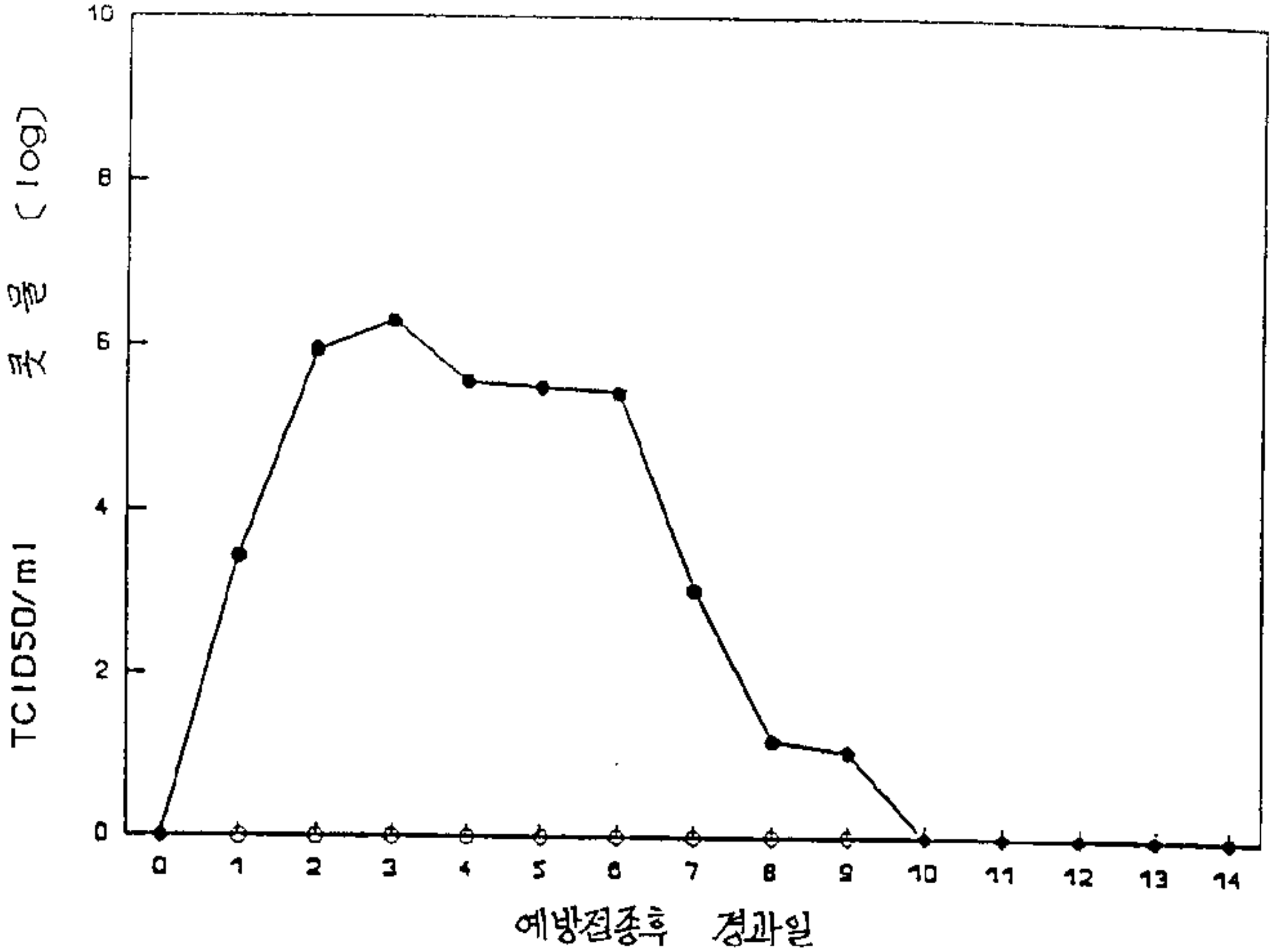
## 도면 15


A
S
P
부분적인 시퀀스
S
P
gI 유전자의 추정위치
gE 유전자
x Sma I + BamHI
링 커
x Sma I + BamHI
링 커
x BamHI
MSV-LTR
gI
MSV-neo

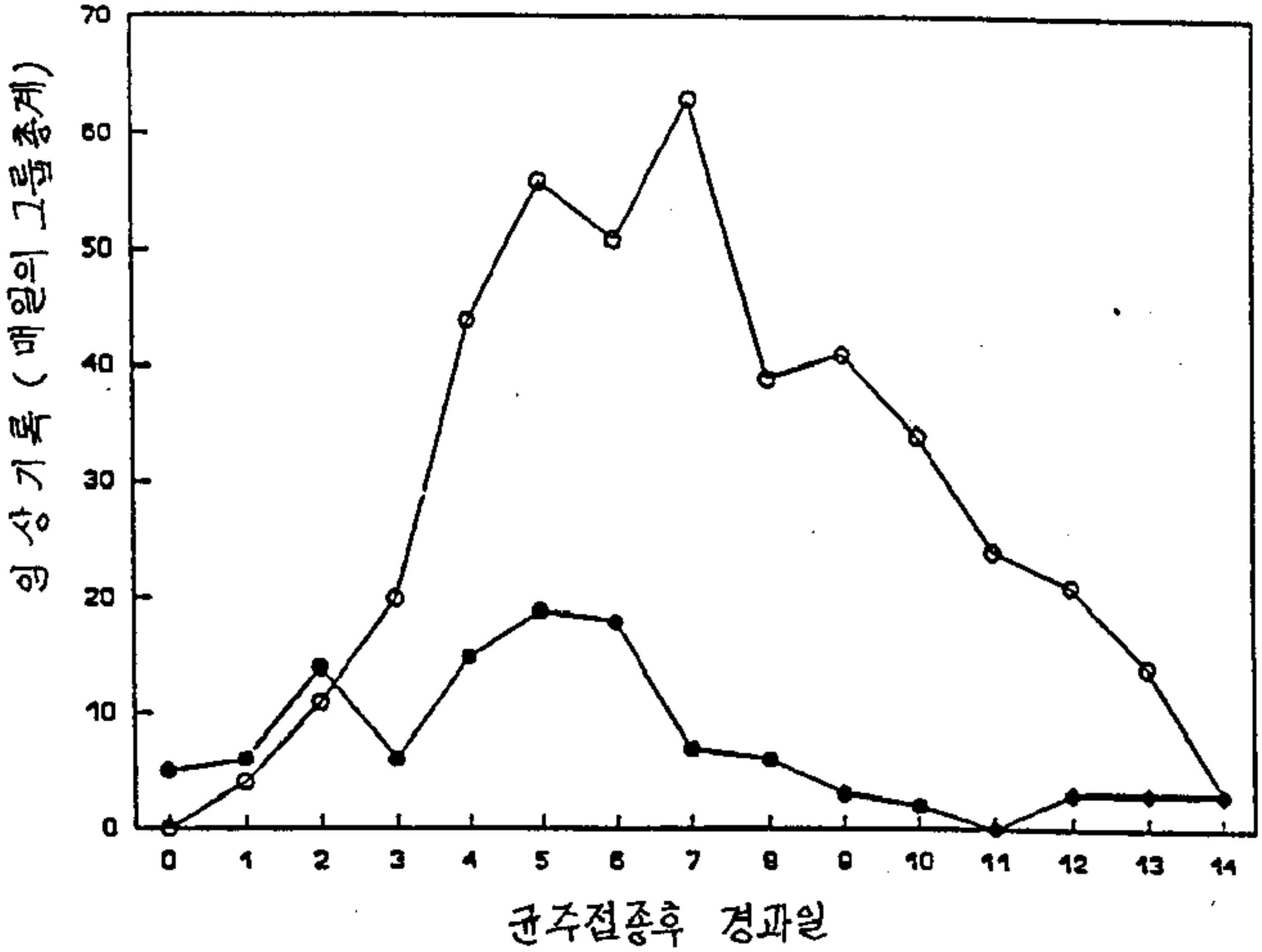
# 도면 16


US
A
E
HH
H
E
~15,5 kb
gI
gE
B
S
P
S
S
ENI
S
gI
gE
D
350
C
pΔIE
S
D
S
+gI/gE 결실절편
D
CTGCA GCTAG
GACGT CGATC
PstI
EcoNI

도면 17

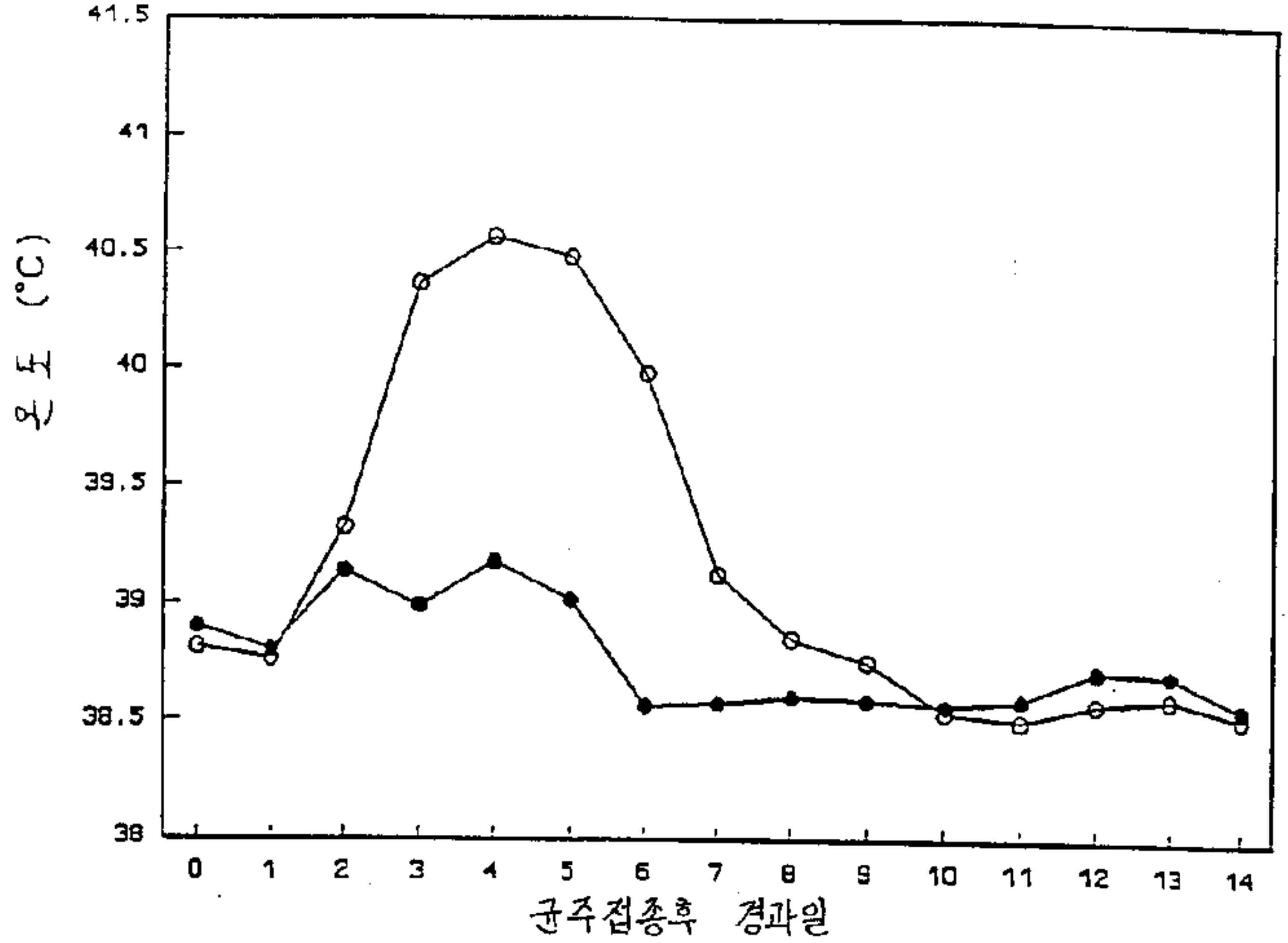


## 도면 18

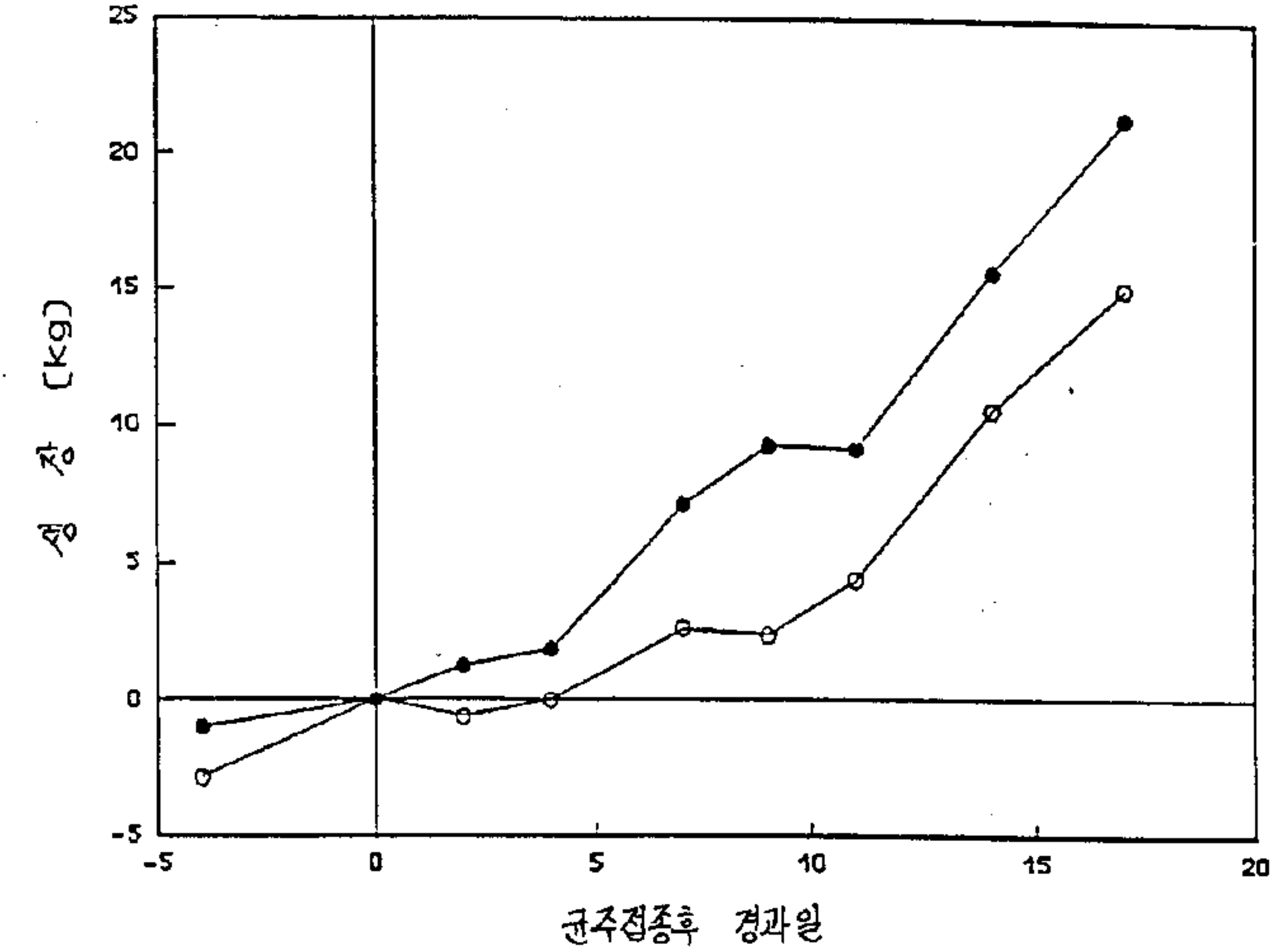


잉 상 기 록 ( 매일의 그룹총계 )
0
10
20
30
40
50
60
70
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
균주접종후 경과일

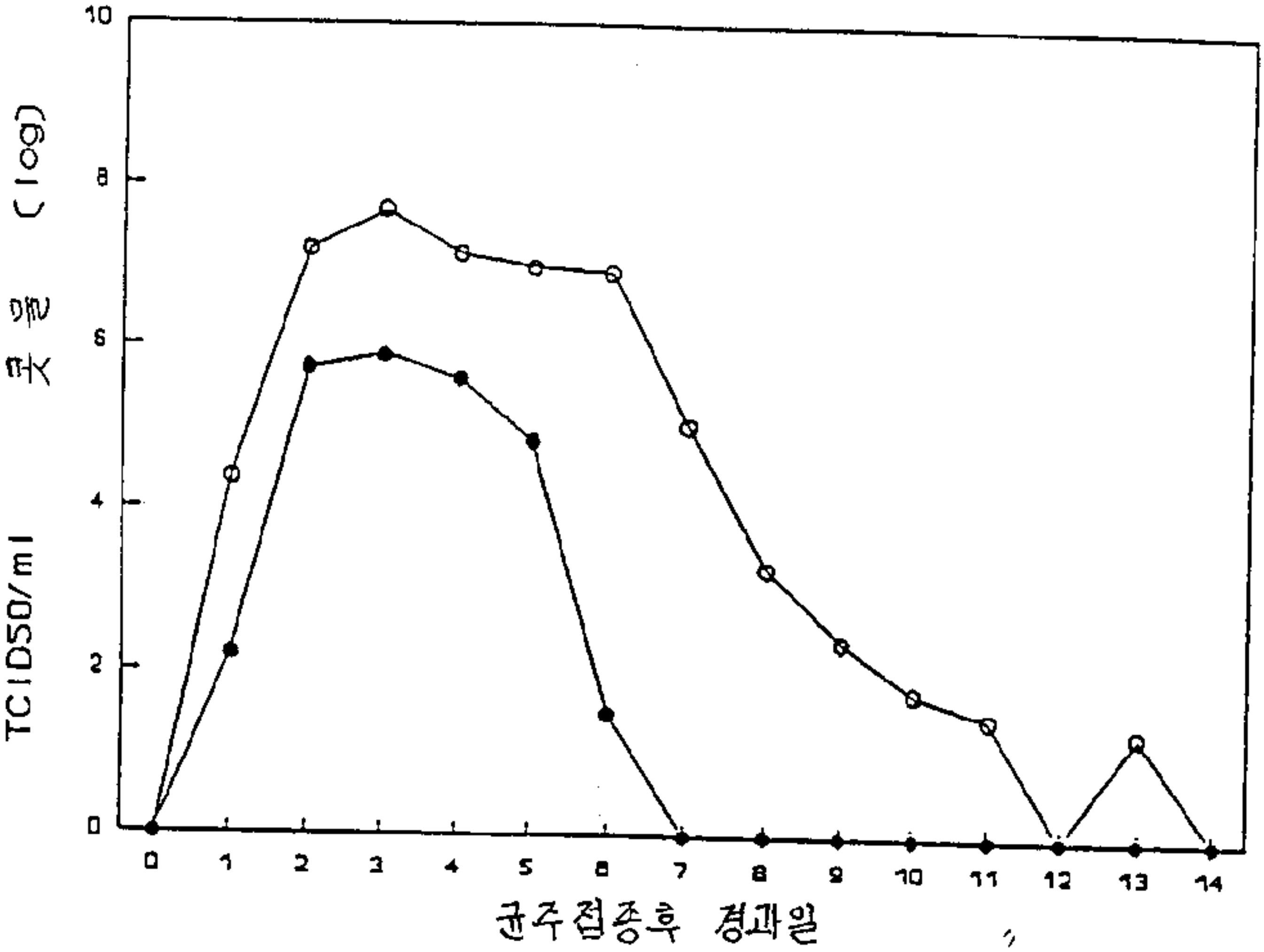
도면 19


41.5
41
40.5
40
39.5
39
38.5
38
온도 (°C)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
균주접종후 경과일

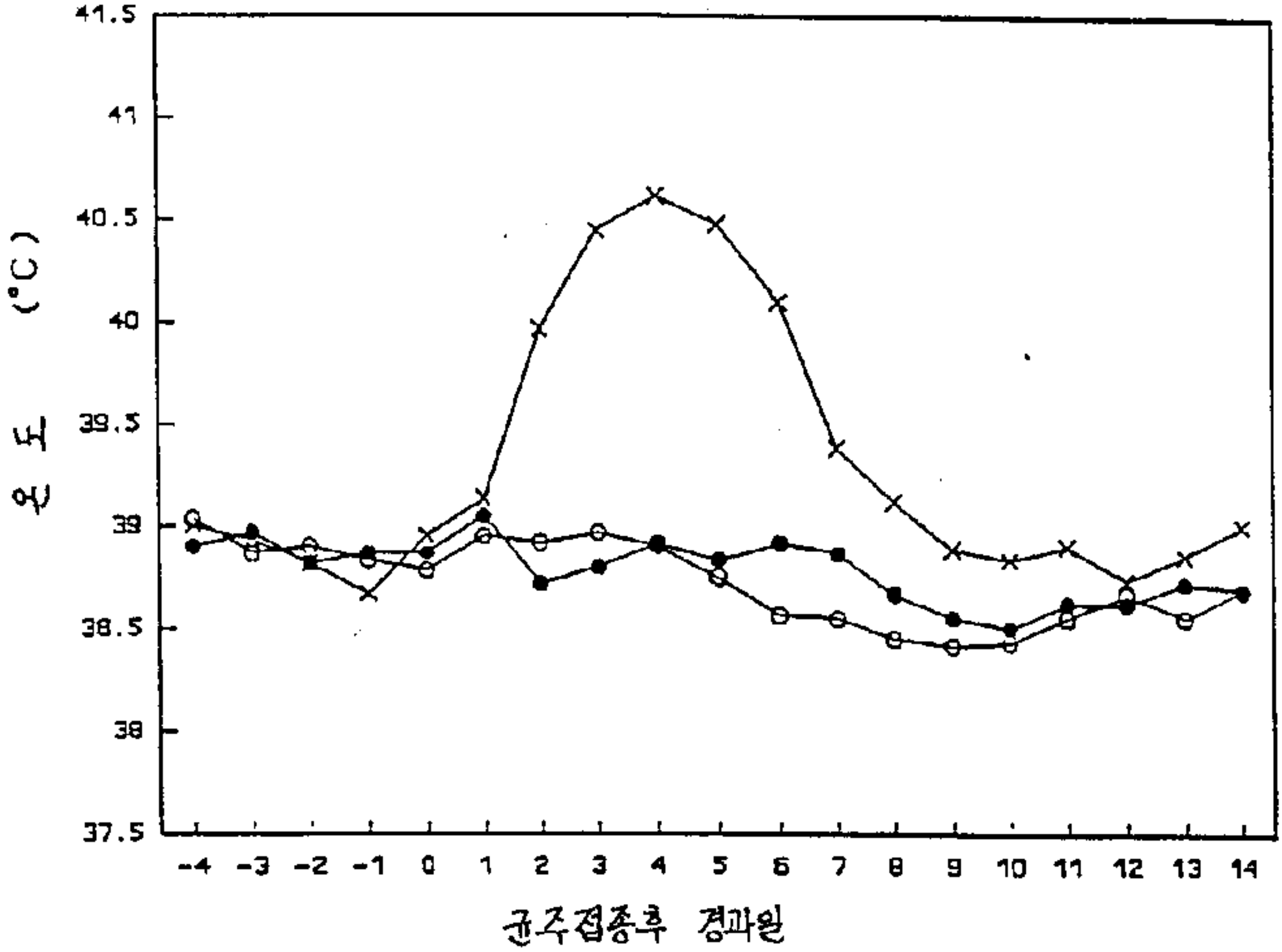
## 도면 20



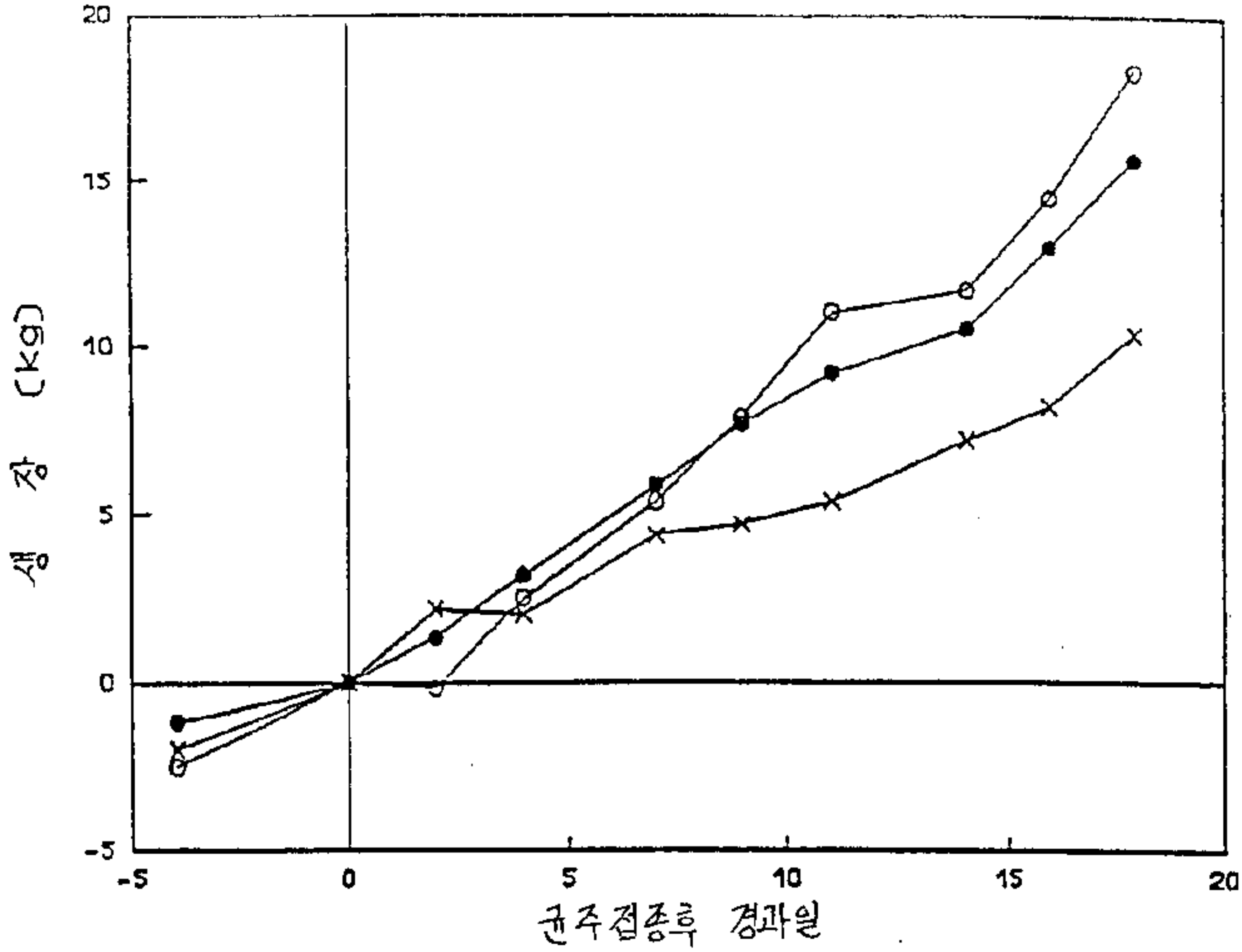
## 도면 21



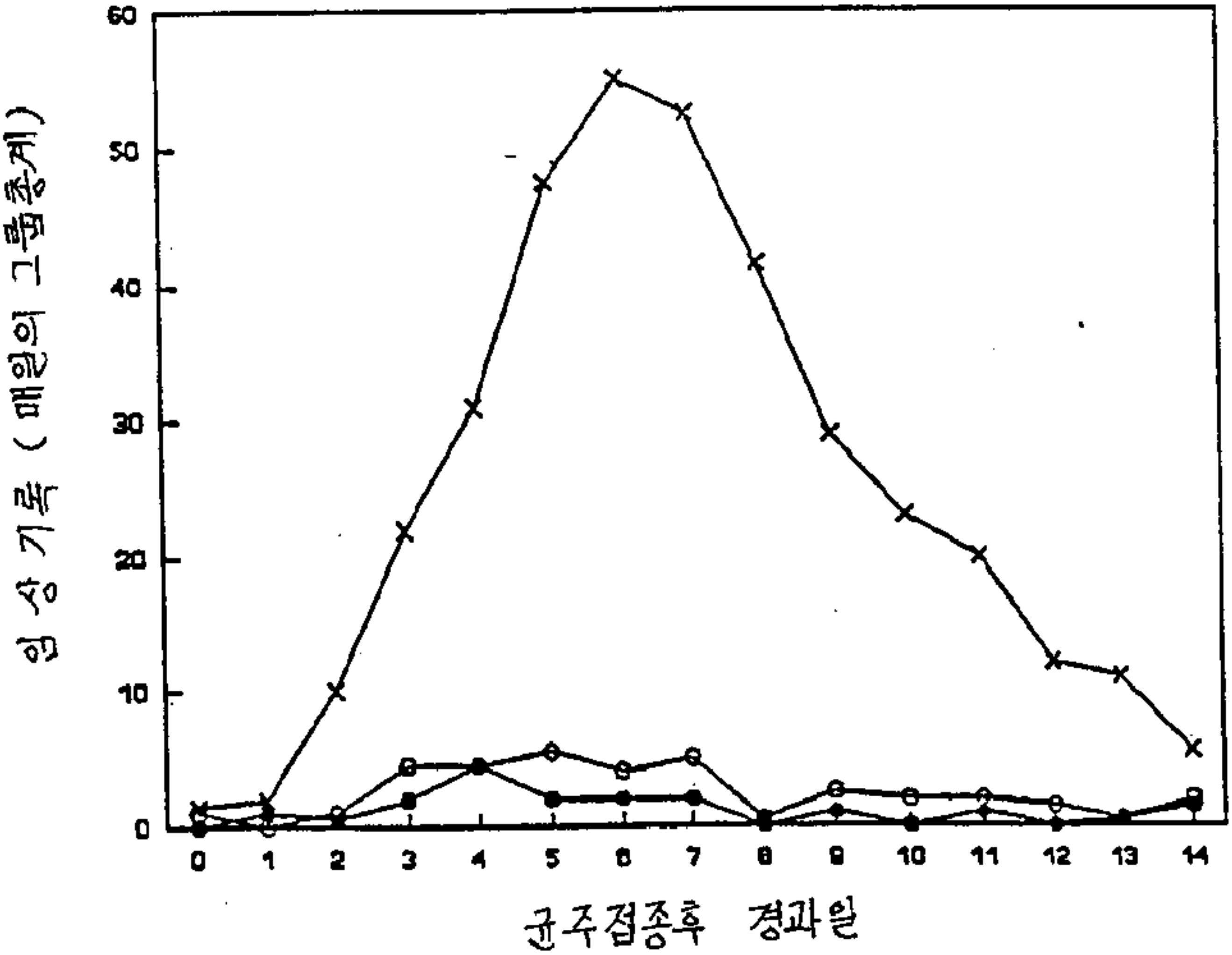
도면 22


온 도 (°C)
41.5
41
40.5
40
39.5
39
38.5
38
37.5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
균주접종후 경과일

## 도면 23



도면 24


임상기록(매일의 그룹총계)
0
10
20
30
40
50
60
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
균주접종후 경과일