

碩士學位論文

개 파보바이러스에 대한  
단일클론 항체



제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

濟州大學校 大學院

獸醫學科

朴民根

2002年 2月

## 초 록

# 개 파보바이러스에 대한 단일클론 항체

박 민 근

(지도교수 : 임윤규)

제주대학교 대학원

수의학과

개 파보바이러스 감염 진단에 이용할 목적으로 개 파보바이러스에 대한 단클론 항체를 생산하였다. 개 파보바이러스 약독주인 C-780916주를 CRFK cell monolayer에 접종해서 증식시킨 배양액을 자당 농도경사 초원심분리(SGUC)방법으로 정제하여 면역원으로 준비하였다. 정제 virus particle은 돼지 적혈구와의 응집력을 검사하고, BALB/c 마우스의 복강으로, 뉴질랜드 화이트종 토끼의 피하로 접종하여 단클론 및 다클론 항체를 얻었다. 개 파보바이러스에 대한 4종의 특이 항체는 IgG1형이고 1종은 IgG2b형이었다. 5종의 항체는 모두 protein A 및 protein G와 IgG Fc receptor에 반응성을 보였다. Immunoblotting으로 검사한 결과 VP2항원에 특이적인 반응성을 보였다.

---

중심어 : Canine parvovirus, monoclonal antibody, immunoblotting

## 목 차

I. 서	론.....	1
II. 재료 및 방법.....		3
III. 결	과.....	8
IV. 고	 찰.....	14
V. 결	론.....	16
VI. 참 고 문 헌.....		17
	영문초록.....	20

## I. 서 론

Canine parvovirus(CPV)는 Parvoviridae에 속하는 nonenveloped DNA virus로서 강아지에서 구토, 설사 및 심근염을 일으키는 질병으로 1978년 미국, 아시아, 호주 및 유럽에서 발생하였다. 주 증상 외에 중추신경 기능의 저하, 백혈구 감소 및 탈수 등의 임상증상을 나타낸다. 바이러스는 급성 장염기 동안 감염견의 분변을 통해 배출되고 환경 내에서 수개월 이상 생존하며 감염원으로 작용한다 (Cotmore와 Tattersall, 1987; Reed 등, 1988; Parrish, 1999; Truyen, 1999; Carmichael와 Binn, 1981).

CPV의 DNA를 포함하는 virion의 분자량은  $5.0 \times 10^6$ 에서  $6.2 \times 10^6$  Dalton이고 3가지의 구조단백 viral polypeptide(VP1, VP2, VP3)를 가진다. 동일한 messenger RNA의 대체접합으로 두 가지의 구조단백인 VP1과 VP2가 형성된다. VP1은 VP2에 비해 143의 부가적인 아미노산 잔기를 포함하고 VP3는 DNA를 포함하는 particle에서만 발생한다. CPV와 feline panleukopenia virus(FPLV)는 근연관계에 있는데 CPV는 세포배양에서 개와 고양이의 세포에서 증식하나 FPLV는 개의 세포에서 복제가 되지 않는다고 한다(Truyen과 Parrish, 1992; Cotmore와 Tattersall, 1987; Llamas-saiz 등, 1996).

국내에서는 1981년 5월부터 서울 및 경기지역에서 구토, 설사 및 출혈성장염을 주 증상으로 하는 환견이 대량 발생하였고, 본 병에 대한 임상병리학적 관찰 소견이 보고되었으며 병인학적 연구가 수행되어 본 증이 canine parvovirus감염증임이 처음 확인되었다. 그 후 국내 연구에서는 혈청학적 연구를 통한 전국적인 확산 확인과 자견 사육의 피해, 감염견에서 분리한 CPV의 조직배양 증식성, 혈구응집능에 대한 특성, 병리조직학적 및 면역조직화학적 관찰 소견 등이 보고되었다(한 등, 1982; 이 등, 1982; 김과 유, 1988; 최 등, 1991; 구 등, 1994).

지금까지 알려진 CPV의 검출방법으로는 전자현미경 관찰, 세포배양을 통한 바이러스 분리동정, 혈구응집반응, 효소결합면역흡착검사, 면역형광법 및 DNA hybridization의 방법 등이 있다. 이들 중 polymerase chain reaction 기법이 민감도와 특이성에서 다른 실험법을 앞서는 것으로 보고되어 있으며 혈구응집반응법은 다른 검사법에 비해 신속하고 간편하게 실행할 수 있어서 일반적인 검사법으로 적당하나 돼지 적혈구 등의 지속적인 공급이 어렵고, 비 특이적 반응이 문제

시 된다(Hirasawa 등, 1985; 김과 장, 1997; Uwatoko 등, 1995; Hirasawa 등, 1985).

개 파보바이러스 감염증은 자견 폐사의 원인으로 높은 비중을 차지하고 있으나 적절한 치료법이 없는 실정이다. 따라서 신속한 진단을 통한 2차 감염의 방지와 집중적인 대증 치료를 실시한다면 환견의 생존율을 높일 수 있을 것으로 사료된다. 최근에는 immunochromatography방법에 의한 신속현장진단법이 상품으로 수입되어 임상에 유용하게 적용되고 있다. 본 연구는 CPV에 대한 특이 단클론항체를 개발하고 면역학적 진단법에 적용하기 위하여 수행되었다.



## II. 재 료 및 방 법

### 1. CPV 항원

동물의 면역과 면역분석의 항원으로 이용하기 위하여 백신생산용 바이러스인 ATCC C-780916 주를 사용하였다. 즉, 바이러스 증식을 위하여 고양이 신장세포에서 유래한 Crandel feline kidney (CRFK) cell line을 사용하였다. 세포배양액은  $\alpha$ -Modified Eagle's medium( $\alpha$ -MEM)에 fetal bovine serum(FBS)을 10%되게 가하고, penicillin(200 IU/ ml), streptomycin sulfate(200  $\mu$ g/ ml), kanamycin(200  $\mu$ g/ ml)을 첨가하여 배양하였다. 계대 24시간 후에 약 80%의 sheet를 확인하고 바이러스를 접종하여 120시간 후 대부분의 세포가 변성, 탈락되는 것을 확인한 후 세포배양액으로부터 정제하였다.

배양병을 동결과 해동을 3회 반복하고, 저속원심분리 (3,000  $\times$ g, 30min, 4 $^{\circ}$ C)로 상층액을 회수한 후 polyethylene glycol-6000(Junsei, Japan)을 가하여 침전시켰다. 즉, PEG-6000이 10%, NaCl이 0.5M되게 가하고 교반하여(4 $^{\circ}$ C, 6hr) 고속원심분리(10,000 $\times$  g, 45min, 4 $^{\circ}$ C, T-324, Kontron)하였다. 고속원심분리를 통해 얻은 침전물은 phosphate buffered saline (PBS) 10ml에 재 부유하여 10~40%의 농도경사로 sucrose gradient ultra-centrifugation(280,000 $\times$ g, 3hrs, 4 $^{\circ}$ C, L8-70M, Beckman)을 실시하였다. 회수된 분획은 HA titer를 검사한 후 -70 $^{\circ}$ C에 보관하며 동물의 면역접종과 면역분석의 항원으로 사용하였다.

### 2. 특이 항체생산

Monoclonal antibody

BALB/c 마우스 2두(6주령, 암컷)를 사용하였다. 정제한 CPV항원(0.2 mg/ ml)을 Freund's complete adjuvant(Sigma, USA)와 동량으로 emulsion하여 복강 내

에 0.2 ml씩 접종하였다. 초 회 접종 2주 후에 Freund's incomplete adjuvant와 동량의 항원을 emulsion하여 0.2 ml를 복강에 2차 접종하였고, 제 6주에는 연속 3일간 0.1 ml의 항원을 복강에 1일 1회 접종하였다. 세포융합은 마지막 면역 24 시간 후에 실시하였다. 면역된 마우스의 spleen을 분리하여 spleen cell과 SP/2 myeloma세포를 PEG 1,500(Sigma, USA)를 이용하여 융합하였다. 융합된 세포는 hypoxanthine-aminopterin-thymidine(HAT: Sigma, USA)이 첨가된 배지에 7일간 배양하였다. 세포융합 2주 후에 효소면역 측정법(Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)으로 특이항체를 생산하는 hybridoma를 확인하였다. 항체 양성인 hybridoma는 limiting dilution법으로 3회 cloning하여 단일 clone을 얻었다. Pristane(2, 6, 10, 14-tetra-methyl-pentadecane: Sigma)으로 감작한 마우스의 복강 내에 cloning hybridoma를  $10^6$ 회 접종하여 2주 후에 복수를 획득하였다.

#### Polyclonal antibody

CPV에 대한 항혈청을 생산하기 위하여 New Zealand white rabbit 2두(8주령, 암컷)에 SGUC로 정제한 바이러스 항원 200  $\mu$ g을 Freund's complete adjuvant에 유제하여 1 ml씩 14일 간격으로 3회 접종하고 4주 후에 1회 피하 접종하였다. 최종 접종 10일 후에 심장을 통하여 채혈한 후 혈청을 분리하여 ELISA법으로 항체역가를 측정하였다.

#### 항체가 측정을 위한 ELISA

SGUC로 정제한 CPV항원을 50mM carbonate buffer에 1.25  $\mu$ g/ml되게 희석하여 96well microplate(U16 polysorp, Nunc, Denmark)에 100  $\mu$ l씩 분주하고 4°C에서 16시간 정치시킨 후 PBS(pH 7.2)로 3회 세척하였다. 여분의 면적을 봉쇄하기 위하여 0.2% bovine serum albumin(BSA: Sigma, USA)이 용해된 PBS(pH 7.2)를 150  $\mu$ l씩 분주하고 4°C에서 30분 동안 정치한 후 PBS로 3회 세척하여 ELISA용 plate를 준비하였다. 항체가 측정을 위하여 혈청과 hybridoma 배양

상층액을 각각 0.2% BSA와 0.05% Tween 20(Showa, Japan)이 용해된 PBS(BSA PBS-T)에 계단 희석하여 100  $\mu$ l씩 가하여 실온에 60분간 반응시켰다. 이후 goat anti-mouse IgG-HRP 접합체(Caltag, USA) 혹은 goat anti-mouse IgM-HRP 접합체(Sigma, USA)를 100  $\mu$ l씩 가하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 발색반응은 0.1% ABTS(Sigma, USA)를 0.1M citrate-phosphate buffer (pH 4.0)에 녹이고 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(Showa, Japan)를 첨가한 발색제를 각 well에 100  $\mu$ l씩 가하고 실온에서 30분간 발색시킨 후 ELISA reader(SLT, Columbus, Austria)로 405 nm(대조과장: 492 nm)에서 흡광도를 측정하였다.

#### 단클론항체의 isotyping

생산된 단클론항체의 isotyping은 isotyping kit(Sigma, USA)을 이용하여 수행하였다. 제조자의 술식에 따라 하이브리도마 배양상층액 2~3 ml를 적용하여 nitrocellulose membrane strip에서 biotin-avidin enzyme detection system으로 하이브리도마가 분비하는 항체의 isotype을 확인하였다. 즉, 15×75mm test tube를 이용하여 각각의 하이브리도마 배양상층액 2~3ml를 분주하고, 마우스 항체와 특이적으로 반응하도록 coating되어 있는 nitrocellulose membrane strip을 30분간 실온에서 반응시켰다. 반응 후 하이브리도마 배양상층액을 제거하고, 1% BSA와 0.05% Tween 20(Showa, Japan)이 용해된 PBS(BSA PBS-T)에 5분간 1회 세척하고, biotinylate된 2차 항체를 BSA PBS-T에 1:50 희석하여 5분간 반응시켰다. 다시 BSA PBS-T에 5분간 1회 세척하고, extravidin-peroxidase를 PBS-T-BSA에 1:50희석하여 5분간 반응시키고, BSA PBS-T에 5분간 1회 세척하였다. 마지막엔 PBS로 5분간 세척하였다. 기질용액(2.5M acetate buffer, pH 5.0)을 1:50, 발색제(3-amino-9-ethyl-carbazole in N,N-dimethyl formamide; AEC-DMF)를 1:100, 2%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 1:100되게 4ml의 2차 증류수에 희석하여 60초에서 10분간 반응시켜 붉은 색의 시그날이 나타나면 strip을 tube에서 제거하여 filter paper 사이에서 건조하여 isotype을 판독하였다.

### 3. 특이항체의 특성분석을 위한 Cell-ELISA

CRFK cell에 바이러스를 접종하고 24시간 경과한 후에 90% methanol에 4℃에서 30분간 고정하고 1% triton X-100(Sigma, USA)으로 disruption하였다. 1% BSA PBS용액으로 여분의 면적을 봉쇄한 후 rabbit serum과 hybridoma 배양상층액을 0.2% BSA PBS-T에 각각 1000배, 2배 희석하여 실온에 30분간 반응시킨 후 goat anti-rabbit 혹은 goat anti-mouse IgG HRP 접합체와 실온 30분간 반응시킨 후 DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)(Sigma, USA) 6 mg을 0.05M Tris-HCl(pH 7.2) 10ml에 녹이고 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(Showa, Japan)를 첨가한 발색액으로 발색을 관찰하였다. 발색이 일어나면 2차 증류수로 발색을 정지시켰다. CPV를 접종하지 않은 CRFK cell monolayer를 대조로 하였고 토끼항혈청을 적용하여 양성대조로 하였다.

### 4. 특이항체의 특성분석을 위한 면역형광항체법

바이러스를 세포에 접종하고 24시간이 경과한 후에 90% methanol에 4℃에서 30분간 고정후 1% triton X-100으로 disruption하였다. 1% BSA PBS용액으로 여분의 면적을 봉쇄한 후 rabbit serum을 0.2% BSA PBS-T에 1000배 희석하여 반응시킨 후 goat anti-rabbit 혹은 goat anti-mouse IgG FITC 접합체와 실온 30분간 반응시킨 후 형광을 관찰하였다. CPV를 접종하지 않은 CRFK cell monolayer를 대조로 하였고 토끼항혈청을 적용하여 양성대조로 하였다.

### 5. Immunoblotting

#### SDS-PAGE

정제한 바이러스 부유액 20  $\mu$ l와 4×sample buffer 5  $\mu$ l를 혼합하여 100℃에서 4분간 가열한 후 전기영동 재료로 사용하였다. 10% separating gel에 sample을

loading하고 100 V에서 90분간 전기영동을 실시하였다.

#### Immunoblotting

토끼의 항혈청과 단클론항체의 CPV capsid protein과 반응을 western blotting을 통해 밴드를 확인하였다. NC paper에 전이한 바이러스 단백을 3% non fat milk로 30분간 blocking한 후 0.5% tween20이 포함된 TBS-T(0.15 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5)에 10분 동안 세척한 후 TBS-T에 hybridoma 배양상층액을 5배 희석하여 실온에서 1시간동안 반응시켰다. TBS-T에 10분간 3회 세척하고 goat anti-mouse IgG-HRP를 45분간 반응 후 다시 TBS-T에 10분간 3회 세척하고 0.1% DAB(0.2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 1분에서 10분간 반응시켜 발색이 나타나면 2차 증류수로 발색을 정지 시켰다.



### Ⅲ. 결 과

#### 1. 바이러스의 배양

바이러스를 접종하고 24시간이 경과한 CRFK cell에서 바이러스의 침입을 Cell-ELISA법과 면역형광항체법으로 검사하였다. 각각 세포질에 갈색의 염색상과 세포질의 특이형광을 관찰하였다(Fig. 1., Fig. 2.).

세포주를 subculture 24시간 후에 바이러스를 접종하고 96시간이 경과한 후 세포변성 효과가 관찰되기 시작했으며 120시간이 지나자 대부분의 세포가 변성되었다. 특징적인 세포변성효과는 rounding되어 탈락되는 형태를 나타냈다.

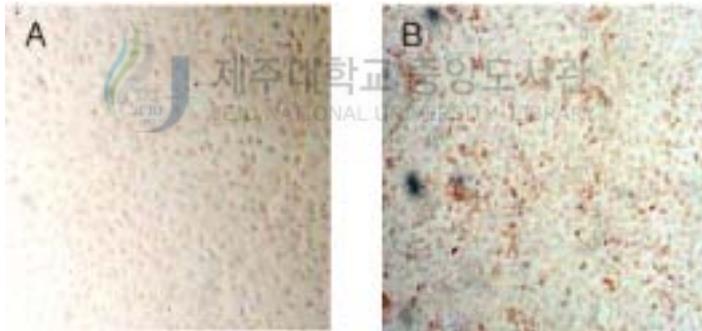


Fig. 1. Viral infiltration was observed in the CRFK cells by Cell-ELISA.

- A: normal CRFK cell,  $\times 40$  B: postinoculation 24 hr,  $\times 40$

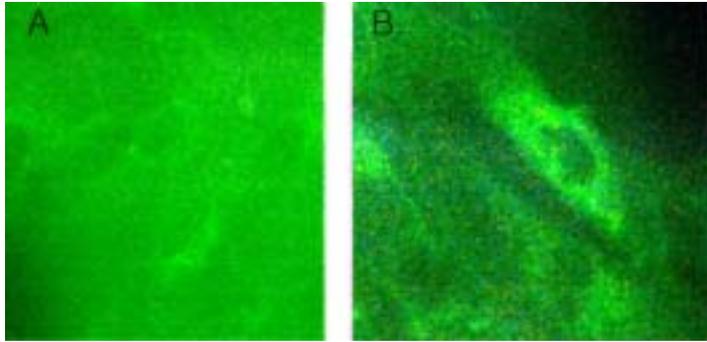


Fig. 2. Immunofluorescence in the CRFK cells.

- A: normal cell,  $\times 400$  B: postinoculation 24hr,  $\times 400$

CRFK cell과 A72 cell에 virus를 접종하여 접종하고 3시간, 6시간, 이후 12시간의 시간간격을 두고 배양상층액을 회수하여 바이러스의 혈구응집역가를 측정하여 CRFK cell에서의 증식성이 우위에 있음을 확인하였다(Fig. 3).

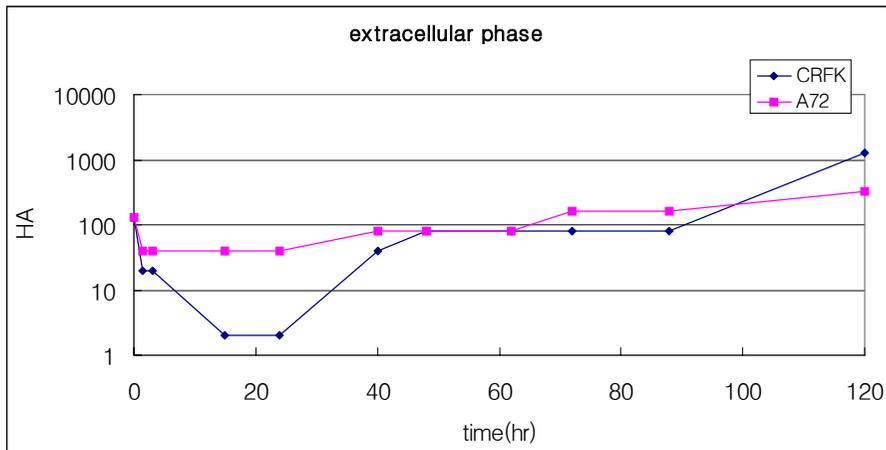


Fig. 3. Comparison to changes of haemagglutination titre in CRFK cells with A72 cells.

## 2. 바이러스항원의 정제

CPV C-780916(ATCC)주 배양액을 PEG 침전법으로 농축하여 SGUC법으로 각 1 ml씩 분획 한 후 단백질농도와 돼지적혈구(0.75%) 응집역가를 나타내었다 (Fig. 4). 바이러스는 25~40% sucrose농도에서 육안적으로 확인할 수 있는 밴드를 형성하였다. 분획 중에서 혈구응집능을 나타내는 분획을 사용하였다. 바이러스의 배양, 정제에서의 바이러스 회수율을 각 단계별로 비교하였다(Table 1).

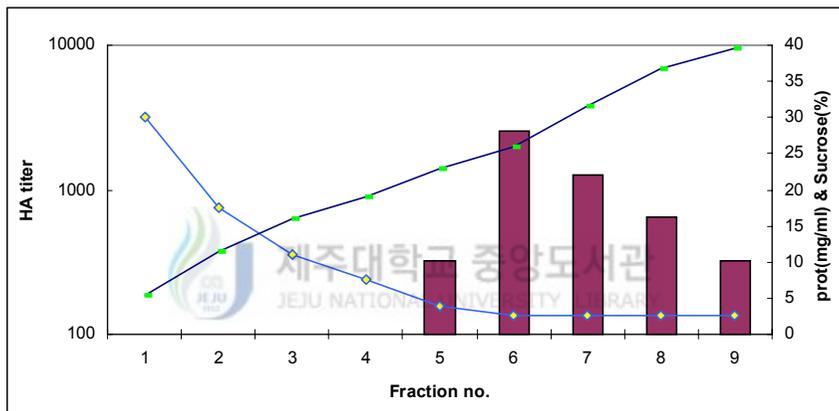


Fig. 4. Purification of CPV antigen from the CPV culture medium by SGUC.

- Fraction volume: 1 ml each.

Table 1. Comparison of yields of viral protein.

Fraction	Volume (ml)	HA titer (unit/0.025 $\mu$ l)	Protein concentration (mg/ml)	HA yield(%)
Cell culture media	500	512	1.5	100
PEG precipitate	10	12800	2.7	50
33% sucrose	15	6400	0.25	37.5

정제한 바이러스항원의 10% acrylamide gel에서의 전기영동상을 나타내었다. Capsid protein VP1, VP2, VP3로 예상되는 밴드가 약 84kDa, 65kDa, 62kDa에서 확인되었다(Fig. 5.).

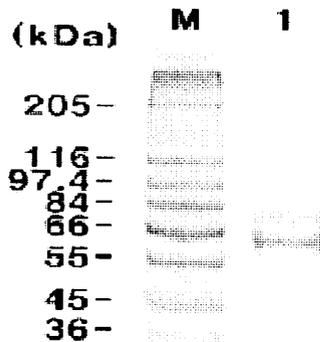


Fig. 5. SDS-PAGE, CPV capsid protein

M: High molecular marker, lane 1: loading 10  $\mu$ g

### 3. Monoclonal antibody

개발한 5종의 단일클론성 항체의 isotype을 확인한 결과 IgG1이 4종 IgG2b가 1종으로 나타났다. 또한 IgG1은 protein A와 반응성이 보였고, IgG2b는 protein G와 반응성이 보였다(Table 2).

Table 2. Characterization of monoclonal antibodies to canine parvovirus by isotype.

MAb	Isotype	Binding with Fc receptors	
		Protein A	Protein G
CP03	IgG1	++	+
CP05	IgG2b	+	++
CP09	IgG1	+	+
CP11	IgG1	+	+
CP12	IgG1	+	+

### 4. Immunoblotting

CPV의 10% acrylamide gel 전기영동 후 NC paper에 바이러스 단백을 전이시키고 hybridoma 배양상층액을 반응시켜 CPV capsid protein의 약 84kDa의 VP1과 약 65kDa의 VP2 밴드가 나타났다. 5개의 단클론항체가 모두 약 65kDa의 VP2와 반응하였다. 토끼항혈청과의 반응에서는 VP1, VP2, VP3에 해당하는 밴드와 또한 바이러스항원으로 추정되는 다양한 분획과 반응을 보였다(Fig. 6.).

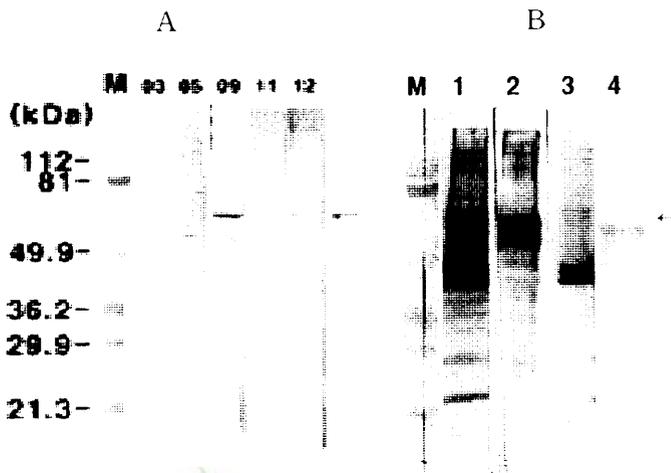


Fig. 6. Characterization of monoclonal antibodies to canine parvovirus by immunoblotting.

A) monoclonal antibodies, CP03, CP05, CP09, CP11, CP12, B) rabbit serum, 1,3: immunized purified CPV capsid, 2,4: immunized vaccine, M: molecular marker, arrow indicate (65kDa)

## IV. 고 찰

Canine parvovirus는 전 세계적으로 존재하고 국내에서의 확산이 확인되어 보고된 바 있다. 출혈성장염 및 심근염이 주증이며, 강아지에서 치사율이 높은 급성전염병의 원인체로 임상적으로 민감하고 특이적인 진단법의 필요성이 높으므로 본 연구에서는 면역학적 신속검출법개발을 위해 특이 단클론항체를 개발하고 그 특성을 조사하였다.

CPV의 CRFK cell에 대한 접종시험에서 세포변성효과는 접종 24시간이후 rounding이 분명하고 48시간이후 세포의 탈락이 시작되어 96시간이후 대부분의 세포가 탈락되었으며, 남은 세포는 clump를 형성하였다. 또한 Extracellular phase의 폐지적혈구의 응집역가측정시 CPV접종 24시간 후에 증가하기 시작하여 48시간에서 72시간사이에 최대치에 도달하였다. 이는 앞선 연구자들의 연구결과와 일치했다(Hirasawa 등, 1985).

Cell-ELISA 및 간접형광항체법으로 세포 내 바이러스의 침입을 확인하였고 Cell-ELISA의 경우 접종 24시간에 세포질에 갈색의 염색상을 관찰할 수 있었으며, 간접형광항체법에서는 세포질의 형광반응을 관찰할 수 있었다. CRFK cell 및 A72 cell에 CPV를 접종하고 바이러스 배출을 세포배양액의 혈구응집능을 검사하여 비교하였다. CRFK cell의 바이러스 증식성이 A72 cell보다 높은 것으로 나타나 이후의 실험에서 바이러스증식을 위한 세포주로 CRFK cell을 사용하였다.

CRFK cell에 CPV를 접종하여 대부분의 세포에서 세포변성효과가 나타나면 동결과 해동을 3회 반복하고 세포탈락물을 원심분리하여 제거하였다. PEG-6000을 이용하여 virus를 침전시키고 sucrose농도경사 초 원심분리를 통해 viral protein을 정제하였다. 정제한 viral protein의 전기영동상에서 CPV의 구조단백으로 여겨지는 밴드가 나타났다. CPV는 3가지의 구조단백을 가지고 있으며 각각의 단백질은 79,000에서 82,500Dalton의 VP1, 65,000에서 66,000의 VP2, 62,000에서 63,500의 VP3로 알려져 있다(Mengeling 등, 1988). VP1은 VP2의 완전한 sequence를 포함하고 아미노산 종말에 부가영역이 있으며 VP3는 VP2에서 15에

서 20아미노산이 떨어져나간 형태이다. Capsid는 VP1이 10% VP2와 VP3의 조합이 90%로 이루어져 있다(Tsao등, 1991). CPV viral polypeptide의 유전자 재조합을 통한 재조합백신의 개발 가능성의 조사 및 항원성의 연구가 보고된 바 있다(최 등, 2000; Parker와 Parrish, 1997).

본 연구에서는 세포배양을 통해 획득한 바이러스 항원을 정제하여 마우스에 면역시켜 비장세포와 myeloma cell의 세포융합을 통해 단클론항체를 생산하는 hybridoma를 획득하였다. ELISA를 통해 특이항체를 생산하는 hybridoma를 검색하였다. hybridoma가 생산하는 단클론항체의 특성을 분석하기 위해 hybridoma 배양상층액을 immunoblotting을 통해 CPV의 capsid protein에 특이 반응을 하는 단클론항체를 선정하였다. major protein인 VP2와 반응하는 단클론항체는 이후 바이러스검색에 이용할 수 있을 것이며, 본 연구에서는 규정하지 못한 밴드의 발색은 바이러스나 세포주에서 유래한 protease에 의해 viral polypeptide의 degradation 및 cleavage가 있었을 것으로 추측되며 그에 관한 조사가 추가적으로 이뤄져야 할 것으로 여겨진다. 또한, CPV의 strain간의 아미노산 서열에 변이가 있으며 이로 인해 면역학적으로 strain에 따라 중화항체의 반응성에 차이가 있음이 정의되었다(Strassheim 등, 1994; Truyen 등, 1995). 따라서 본 연구에서 개발된 항체와 각각의 strain과의 반응성에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

개 과보바이러스(CPV)에 대한 바이러스 검출 신속진단법에 적용할 단클론항체를 개발하고 그 특성을 조사한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CRFK cell 및 A72cell에서 CPV를 접종하고 배양상층액의 돼지적혈구 응집역가를 측정하여 CRFK cell의 혈구응집역가가 높았다.
2. vaccine주(ATCC C-780916)에 대하여 5종의 단클론항체를 개발하였고 모두 CPV의 major protein인 VP2에 특이적으로 반응하였다.



## VI. 참고 문헌

- Carmichael, L. E and Binn, L. N., 1981. New enteric viruses in the dog. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 25, 1-37.
- Choi, J. Y., Woo, S. D., Lee, H. K., Hong, H. K., Je, Y. H., Park, J. H., Song, J. Y., An, S. H and Kang, S. K., 2000. High-level expression of canine parvovirus VP2 using *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus vector. Arch. Virol. 145, 171-177.
- Cotmore, S. F and Tattersall, P., 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. Adv. Virus Res. 33, 91-174.
- Hirasawa, T., Kaneshige, T and Mikazui, M., 1994. Sensitive of canine parvovirus DNA by the nested polymerase chain reaction. Vet. Micro. Biol. 41, 135-145.
- Hirasawa, T., Tsujimura, N and Konish, S., 1985. Multiplication of canine parvovirus in CRFK cells. Jpn. J. Vet. Sci. 47(1), 89-99.
- Llamas-Saiz, A. L., Agbandje-Mckenna, M., Parker, J. S. L., Wahid, A. T. M., Parrish, C. R and Rossmann, M. G., 1996. Structural analysis of a mutation in canine parvovirus which controls antigenicity and host range. Virology. 225, 65-71.
- Mengeling, W. L., Ridpath, J. F., Vorwald, A. C., 1988. Size nad antigenic comparisons among the structural proteins of selected autonomous parvoviruses. J. Gen. Virol. 69(4), 825-837.
- Parker, J. S. L and Parrish, C, R., 1997. Canine parvovirus Host range is

determined by the specific conformation of an additional region of the capsid. J. virol. 71, 9214-9222.

Parrish, C. R., 1999. Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. Vet. Microbiol. 69, 29-40.

Reed, A. P., Jones, E. V and Miller, T. J., 1988. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. J. Virol. 62, 266-276.

Strassheim, M. L., Gruenberg, A., Veijalainen, P., Sgro, J and Parrish, C. R., 1994. Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid. Virology. 198, 174-184.

Tsao, J., Chapman, M. S., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Luo, M., Smith, T. J., Rossmann, M. G., Compans, R. W and Parrish, C. R., 1991. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. Science. 251, 1456-1464.

Tresnan, D. B., Southard, L., Weichert, W., Sgro, J-Y and Parrish, C. R., 1995. Analysis of the cell and erythrocyte binding activities of the dimple and canyon regions of the canine parvovirus capsid. Virology. 211, 123-132.

Truyen, U., Parrish, C. R., 1992. Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline pnaleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. J. Virol. 66, 5399-5408.

Truyen, U., 1999. Emergence and recent evolution of canine parvovirus. Vet. Microbiol. 69, 47-50.

Truyen, U., Agbandje, M and Parrish, C. R., 1994. Characterization of the feline host range and a specific epitope of feline panleukopenia virus. *Virology*. 200, 494-503.

Truyen, U., Gruenberg, A., Chang, S-F., Obermaier, B., Veijalainen, P and Parrish, C. R., 1995. Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. 1995. *J. Virol.* 69, 4702-4710.

Uwatoko, K., Sunairi, M., Nakajima, M and Yamaura, K., 1995. Rapid method utilizing the polymerase chain reaction for detection of canine parvovirus in feces of diarrhetic dogs. *Vet. Microbiol.* 43, 315-323.

구자록, 서일복, 임창형. 1994. 개 파보바이러스장염의 감염일령에 따른 병변의 병리조직학적 및 면역조직화학적 관찰. *대한수의학회지*. 34(3), 537-547

김두, 장욱. 1997. Polymerase chain reaction을 이용한 canine parvovirus성 장염의 진단과 역학조사. *한국임상수의학회지*. 14(2), 177-184.

김태중, 류영수. 1988. 개 파보바이러스의 조직배양 증식성 및 혈구응집능에 관한 연구. *건국대학교 축산과학 연구소 논문집*. 13, 1-7.

이영옥, 최대영, 박봉균. 1982. 개 파보바이러스성 장염의 국내 발생. *대한수의학회지*. 22(2), 171-174.

최해연, 전무형, 박성국. 1991. 설사증 이환견으로부터 분리한 canine parvovirus의 성장에 관한 연구. *대한수의학회지*. 31(3), 295-302.

한홍률, 황의경, 유규연. 1982. 개의 파보바이러스성 장염의 국내 발생 보고. *대한수의학회지*. 22(2), 167-170.

# Monoclonal Antibodies to the Canine parvovirus

Minkeun Park

Department of Veterinary Medicine, Graduate School  
Cheju National University  
Jeju, Korea

(Advised by Professor Yoon-Kyu Lim)

## Abstract

In order to use of monoclonal antibodies as an immunological detector, monoclonal antibodies were produced against canine parvovirus(CPV). Monoclonal antibodies against CPV antigen were produced. Attenuated CPV strain C-780916 was inoculated into Crandel feline kidney cell monolayers and propagated virus particles were purified by sucrose gradient ultra-centrifugation to prepare immunogen. The purified viral protein were tested for their haemagglutination titer of swine erythrocyte and inoculated via intra-peritoneally to BALB/c mice and subcutaneously into New Zealand White rabbits to raise mono and polyclonal antibodies. Four from 5 specific monoclonal antibodies against CPV were IgG1 type and one was IgG2b type. And they all showed binding properties with the IgG Fc receptors, protein A and protein G. After immunoblotting they all are specific to the VP2 proteins in immunoblotting test.

---

Key words : Canine parvovirus, monoclonal antibody, immunoblotting