

T0000749

GOVP1200506464

무지개송어의 IPNV 및 IHNV에 대한 예방 백신 개발에 관한

연구

Development of vaccines protecting rainbow trout
against IPNV and IHNV

2004. 12

울산대학교

해양수산부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “무지개송어의 IPNV 및 IHNV에 대한 예방 백신 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 12 월 19 일

주관연구기관명 : 울산대학교

총괄연구책임자 : 박 정 우

연 구 원 : 김 영 권

연 구 원 : 장 혁 준

연 구 원 : 문 창 훈

연 구 원 : 이 승 구

연 구 원 : 김 종 수

연 구 원 : 최 동 립

연 구 원 : 최 혜 승

연 구 원 : 도 정 완

연 구 원 : 차 승 주

협동연구기관명 : 국립수산과학원

협동연구책임자 : 박 명 애

요 약 문

I. 제 목

무지개송어의 IPNV 및 IHNV에 대한 예방 백신 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

연어류는 인간에게 고급 단백질을 제공하여 주는 고급어종으로써 북유럽, 북미, 남미, 일본 등을 포함하는 세계 여러 지역에서 대량 양식되고 있다. 그런데, 이들 양식 연어류에 전염성췌장괴저 바이러스 (Infectious Pancreatic Necrosis Virus, IPNV)와 전염성조혈괴저 바이러스 (Infectious Hematopoietic Necrosis Virus, IHNV)가 감염하여 대량폐사를 유발함으로써 막대한 피해를 주고 있다 (1). 우리나라의 경우에도, 양식 연어류에 바이러스성 질병에 의한 대량 폐사가 발생하여 매년 수천만 마리의 치어가 죽어가고 있는 실정이다. 본 연구진의 연구 결과 이들 연어류의 치어에서 IPNV (2, 3, 4)와 IHNV (5)가 검출되어 이들 두 종류 바이러스의 복합 감염이 대량폐사의 원인임이 확인되었다. 따라서 양식 연어류의 IPNV 및 IHNV 감염에 의한 피해를 줄이기 위한 대책 마련이 시급한 상황이다.

일반적으로 바이러스성 질병은 한번 발생하면 치료가 매우 어렵기 때문에 바이러스 질병을 막는 가장 좋은 방법은 효과적인 백신을 개발하여 바이러스 질병을 미연에 방지하는 것이다. 이러한 이유로 인하여 세계 여러 나라에서 IPNV 및 IHNV에 대한 백신을 개발하고자 많은 노력을 기울여 왔다. IPNV의 경우 VP1, VP2, VP3, 그리고 VP4 등의 4개의 구조단백질 중 capsid의 가장 바깥쪽에 위치하는 VP2에 중화 epitope가 있다는 보고 (6)를 바탕으로 VP2를 사용한 recombinant vaccine을 개발하였다 (7, 8, 9). 그리고 IHNV의 경우 L, G, N, M1, M2 등의 5종류 구조 단백질중 envelope protein인 G protein에 중화 epitope가 있다는 보고 (10)를 바탕으로 G를 사용한 recombinant vaccine을 개발하였다 (11, 12). 최근에는 IHNV의 G를 target gene으로 하여 DNA 백신을 개발하고자 연구를 진행 중에 있는데, recombinant vaccine 보다 효과가 좋은 것으로 보고되며 (13, 14), 친어에 처리시 치어의 발병을 어느 정도 줄일 수 있음이 보고되고 있다 (15). 그러나 이들 개발된 백신들은 그 효과가 매우 약하여 실용화되지 못하고 있는 실정이다.

아직까지 이들 개발중인 백신들의 효과가 낮은 이유를 정확하게 알지 못한다. 그러나 본 연구진의 최근 연구 결과에 따르면 지금까지 외국의 연구자들이 선정한 IPNV 및 IHNV의 백신 target 유전자에 문제가 있을 가능성이 높다고 판단된다. 본 연구진의 연구 결과 IPNV의 경우 VP2보다 VP3 (혹은 VP4)가 더 immunogenicity가 높음이 확인되었고 (16), IHNV의 경우 G보

다 M1이 더 immunogenicity가 높음이 확인되었다 (17, 18). 또한 아직 명확한 설명은 어렵지만 이들 단백질에 대한 항체가 IPNV와 IHNV 각각을 중화시킴을 확인하였다 (16, 17). 그리고 지금까지 백신으로 개발되어왔던 IPNV의 VP2, 그리고 IHNV의 G는 서로 다른 혈청형의 바이러스 사이에 변화가 많은 단백질들이다. 그런데, 본 연구진의 연구 결과 우리나라의 양식 연어류에 존재하는 IPNV 및 IHNV strain은 외국에서 백신제조에 사용한 strain들과는 혈청학적으로 다른 특성을 지니는 것들이 확인되었다 (3, 4, 5, 19). 따라서 외국에서 지금까지와 같은 target gene을 대상으로 개발 중에 있는 IPNV 및 IHNV 백신들은 우리나라에서 발생하고 있는 양식 연어류의 바이러스 질병을 예방하기에는 적합하지 않은 것으로 판단된다. 반면에 본 연구진에 의하여 immunogenicity가 높은 것으로 확인된 IPNV의 VP3와 IHNV의 M1은 바이러스 입자의 안쪽에 존재하는 구조단백질들로서 서로 다른 혈청형의 바이러스들 사이에서도 변이가 거의 없는 conserved된 단백질들이다.

따라서 기존에 외국에서 백신 대상으로 삼았던 것들과 본 연구진이 밝혀낸 것들을 대상으로 백신을 개발하는 경우 기존에 개발되어 왔던 IPNV 및 IHNV 백신보다 효과가 좋은 백신의 개발이 가능하리라 판단되며, 개발된 백신은 우리나라에 존재하는 바이러스뿐 아니라 외국에 존재하는 바이러스에도 적용 가능한 백신이 될 것으로 생각된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

우리나라에서 양식중인 무지개송어에 IPNV 및 IHNV 감염에 의한 대량폐사가 발생하여 양식어민들의 피해가 늘고 있는 상황이다. 본 연구에서는 첫째, IPNV, IHNV의 DNA 백신 및 단백질 백신 개발하여 무지개 송어 치어기의 바이러스 질병을 예방하고, 둘째, IPNV 및 IHNV의 역학조사를 실시하여 개발한 백신의 적용 범위를 확인하는 것을 목표로 하였다. 이와 같은 목표를 달성하기 위하여 수행한 연구내용은 다음과 같다.

1. IPNV 및 IHNV 유전자에 대한 효과적인 DNA 백신 확인

- IPNV의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1의 DNA 백신 제조
- 이들 유전자들을 각각 단독으로 혹은 여러 조합으로 구성하여 다음과 같은 내용의 연구를 수행
 - IPNV의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1의 DNA 백신을 각각 단독, 혹은 여러 조합으로 친어에 주사
 - DNA 백신을 주사한 친어의 혈청, 난액, 알 등을 대상으로 바이러스에 대한 항체 양 분석 (ELISA법 및 바이러스 중화실험 사용)
 - DNA 백신 처리한 친어에서 얻어진 치어의 난황속의 바이러스에 대한 항체 분석 (ELISA법 사용)

- 바이러스 감염 후 폐사율 분석

2. IPNV 및 IHNV의 combination DNA 백신 확인:

- IPNV의 VP2중 중화 epitope를 지니는 부분과 VP3의 전체를 하나로 연결하여 VP2-VP3와 같은 형태의 fusion gene 제조
- IHNV의 G중 중화 epitope를 지니는 부분과 M1의 전체를 하나로 연결하여 G-M1과 같은 형태의 fusion gene으로 제조
- 이와 같이 제조한 VP2-VP3 및 G-M1 fusion gene들을 dual expression vector인 pIRES에 subcloning하여 하나의 vector안에 IPNV의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1의 유전자가 모두 들어있는 combination DNA 백신 제조
- 이와 같이 제조한 IPNV-IHNV combination DNA 백신을 CHSE-214 연어 세포주에 transfection하여 IPNV의 VP2-VP3, 그리고 IHNV의 G-M1 fusion gene 발현을 확인
- 제조한 IPNV-IHNV combination DNA 백신을 친어의 근육에 주사한 후 IPNV의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1 모두에 대한 항체가 생성되고 또한 이 항체가 IPNV 및 IHNV의 감염성을 중화시킴을 확인
- IPNV-IHNV combination DNA 백신을 주사한 친어에서 나온 알의 난황에 IPNV 및 IHNV에 대한 항체가 전달됨을 확인

3. Immunostimulant를 사용한 DNA 백신의 효과 증대:

- pIRES mammalian expression vector에 murine GM-CSF, chum salmon의 GH 및 somatolactin cloning
- 연어세포주인 CHSE-214에서 발현을 확인
- IPNV의 VP2-VP3 fusion gene 혹은 IHNV의 G-M1 fusion gene에 cytokine gene 등을 첨가하여 면역증강효과 확인

4. IPNV 및 IHNV 유전자에 대한 효과적인 단백질 백신 확인

- IPNV의 VP2중 중화 epitope를 지니는 부분을 포함하는 재조합 단백질과 IPNV의 VP3 전체를 포함하는 재조합 단백질, 그리고 IHNV의 G와 M1 전체를 포함하는 재조합 단백질들을 제조
- 이들을 단독 혹은 여러 조합으로 구성하여 다음과 같은 내용의 연구를 수행
 - IPNV의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1의 재조합 단백질 백신을 각각 단독, 혹은 여러 조합으로 치어에 투여
 - IPNV의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1의 재조합 단백질 백신을 각각 단독, 혹은 여러 조합으로 성어에 투여
 - 치어 및 성어의 혈청을 대상으로 바이러스에 대한 항체 양을 분석 (ELISA법 및

바이러스 중화실험 사용)

- 바이러스 감염 후 폐사율을 분석

5. IPNV 및 IHNV의 combination 단백질 백신 확인:

- DNA 백신 제조 방법과 같이 IPNV의 VP2중 중화 epitope를 지니는 부분과 VP3의 전체를 하나로 연결하여 VP2-VP3와 같은 형태의 fusion gene 제조
- 이와 같이 제조한 VP2-VP3 fusion gene을 pET28a expression vector에 subcloning 한 다음 E.coli BL21에서 발현시켜 VP2-VP3 recombinant fusion protein을 제조
- 역시 IHNV의 G중 중화 epitope를 지니는 부분과 G의 전체를 하나로 연결하여 G-M1과 같은 형태의 fusion gene으로 제조
- 이와 같이 제조한 G-M1 fusion gene을 pET28a expression vector에 subcloning 한 다음 E.coli BL21에서 발현 시켜 G-M1 recombinant fusion protein을 제조
- 제조한 IPNV의 VP2-VP3 combination 단백질 백신 및 IHNV G-M1 combination 단백질 백신을 성어의 복강에 주사한 후 IPNV의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1에 대한 항체 생성 및 IPNV 및 IHNV에 대한 중화 역가 확인

6. Immunostimulant를 사용한 단백질 백신의 효과 증대:

- IPNV의 VP2-VP3 그리고 IHNV의 G-M1 fusion 하여 제조한 재조합 단백질 백신에 light oil (oil-in-water 및 water-in-oil), β -glucan, aluminum hydroxide 등의 adjuvant를 첨가하여 제조
- IPNV 및 IHNV의 재조합 단백질 백신에 여러 종류의 adjuvant들을 첨가하여 백신효과를 분석함으로써 어떤 adjuvant의 면역증강 효과가 가장 좋은지를 확인

7. 무지개송어 양식장에서의 IPNV 및 IHNV 분포 조사 및 type 확인

- 강원도, 경북, 경남의 무지개송어 양어장 7개소를 대상으로 월별로 시료를 채집하여 다음과 같은 연구를 수행함으로써 IPNV 및 IHNV의 감염 여부를 확인
 - 세포주에 접종하여 바이러스 존재 유무를 확인
 - RT-PCR을 사용하여 바이러스를 재확인
 - 분리 바이러스에 대한 유전자 cloning을 하여 바이러스의 type을 분석

8. PCR cloning 및 염기서열 분석을 통한 IPNV 및 IHNV type을 확인

- 분리한 바이러스 유전자들의 PCR cloning 및 염기서열 분석을 통한 바이러스 type 확인
- 우리나라의 무지개송어 양식장들에서의 바이러스 질병 발생 현황을 분석하고, IPNV 및 IHNV의 typing 함으로써 역학 분석

IV. 연구개발결과

1. IPNV 및 IHNV 유전자에 대한 효과적인 DNA 백신 확인

IPNV의 VP2와 VP3를 각각 혹은 동시에 발현하는 DNA 백신을 준비하였으며 또한 IHNV의 G와 M1를 각각 혹은 동시에 발현하는 DNA 백신을 준비하였다. 이와 같이 준비한 DNA 백신이 제대로 만들어 졌는지를 확인하기 위하여 *in vitro* translation system을 사용한 단백질 발현여부와 연어세포에 transfection 시킨 후 유전자 발현 여부를 분석하였다. *In vitro* translation 실험 결과 DNA 백신들로부터 IPNV의 VP2, VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1에 해당하는 단백질들이 발현됨을 확인하였으며, CHSE-214 연어세포에 transfection 실험을 수행한 결과 DNA 백신으로 제조한 각각의 gene들이 정상적으로 발현됨을 확인하였다.

앞에서와 같이 제조한 DNA 백신을 무지개송어의 친어에 주사하고 1개월이 지난 후 혈청에 존재하는 항체의 역가를 분석하였다. 그 결과 DNA 백신을 처리한 무지개송어의 친어에서 IPNV의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1 등의 각 구조 단백질들에 대한 항체가 생성되었음을 확인할 수 있었다. 다음으로 DNA 백신 처리한 무지개송어 친어에서 나온 알 및 알에서 부화한 치어의 난황을 대상으로 IPNV 및 IHNV에 대한 항체를 분석한 결과 비교적 높은 항체가가 존재함을 확인하였다. 이로부터 백신 처리한 친어의 항체가 난황을 통하여 치어에 전달 될 수 있음을 확인하였다.

이와 같이 친어의 항체를 지니는 치어에 IPNV 및 IHNV를 감염 시킨 후 폐사율을 분석한 결과 백신처리하지 않은 친어로부터 나온 치어는 90% 이상의 폐사율을 보인 반면 DNA 백신 처리한 친어에서 나온 치어의 경우 20%-38%의 폐사율을 보였다. 이로부터 무지개송어 친어에 DNA 백신을 처리함으로써 치어기의 IPNV 및 IHNV 감염에 의한 폐사를 막을 수 있음을 확인할 수 있었다. 백신을 처리한 그룹 중에는 IPNV의 VP2와 IHNV의 G 만을 처리한 그룹이 32%의 폐사율을 나타낸 반면 IPNV의 VP2, VP3, 그리고 IHNV의 G, M1을 처리한 그룹은 20%의 폐사율을 보였다. 이로부터 IPNV의 경우 VP3를 포함한 DNA 백신이, 그리고 IHNV의 경우 M1을 포함한 백신이 더 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

2. IPNV 및 IHNV의 combination DNA 백신 확인:

백신의 제조 단가를 줄일 목적으로 IPNV의 VP2와 VP3를 하나의 fusion gene으로 cloning 하였으며, IHNV의 G와 M1을 역시 하나의 fusion gene으로 cloning하였다. 이와 같이 제조한 IPNV의 VP2-VP3 및 IHNV의 G-M1 fusion gene들을 dual expression vector인 pIRES에 subcloning하여 IPNV-IHNV combination DNA 백신, pIRES-IPNV/IHNV를 제조하였다. 제조한 IPNV-IHNV combination DNA 백신을 연어 세포주인 CHSE-214 세포에 transfection 시킨 후 IPNV VP2-VP3 fusion gene과 IHNV G-M1 fusion gene의 발현을 분석한 결과 각 fusion gene이 정상적으로 발현됨을 확인할 수 있었다. 이와 같이 제조한 IPNV-IHNV combination DNA 백신을 무지개 송어 친어에 주사하고 1개월 후에 혈청에 존재하는 항체를 분석한 결과

IPNV 및 IHNV에 대한 항체가 생성됨을 확인하였으며 또한 친어에서 생성된 항체가 알에 전달됨을 확인하였다.

3. Immunostimulant를 사용한 DNA 백신의 효과 증대:

IPNV와 IHNV에 대한 DNA 백신의 효과를 극대화 시킬 수 있는 immunostimulant를 찾기 위하여 DNA 백신에 cytokine 유전자 등을 첨가한 후 백신효과를 분석하였다. pIRES mammalian expression vector에 murine GM-CSF, chum salmon의 GH 및 somatolactin 등의 유전자들을 cloning 하였다. 이 유전자들을 연어세포주인 CHSE-214에 transfection 시킨 후 발현여부를 분석한 결과 정상적으로 발현됨을 확인하였다. 이와 같이 준비한 유전자들을 IPNV 및 IHNV의 DNA 백신에 첨가하여 백신효과를 분석한 결과 GM-CSF의 면역증강효과가 가장 좋음을 확인할 수 있었다.

4. IPNV 및 IHNV 유전자에 대한 효과적인 단백질 백신 확인

IPNV 및 IHNV의 재조합단백질 백신 제조를 위하여 이들 바이러스의 구조단백질 유전자들을 E.coli에서 발현시켜 재조합단백질을 준비하였다. 먼저 IPNV의 경우, IPNV VP3는 전체 ORF를 포함하는 유전자의 재조합단백질을 발현시킬 수 있었다. 그러나 IPNV VP2는 전체 ORF를 포함하는 유전자의 재조합단백질 발현이 안되었다. 따라서 IPNV VP2의 유전자 중 중화 epitope를 포함하는 부분만을 subcloning한 다음 이에 해당하는 재조합단백질을 발현시켰다. 다음으로 IHNV의 경우 G와 M1 모두 전체 ORF를 포함하는 유전자의 재조합단백질을 E.coli에서 발현시킬 수 있었다. 이와 같이 준비한 재조합단백질들을 대상으로 MALDI-TOF 분석을 수행하여 각 바이러스의 단백질들이 맞음을 확인 하였다.

주사 방법을 사용하여 IPNV 및 IHNV의 재조합 단백질들을 여러 조합으로 백신 처리한 후 각 조합들의 항체 생성 능력 확인한 결과 IPNV의 경우 VP3가 VP2보다 10배 이상 많은 양의 항체를 생성함을 확인하였다. 그리고 IHNV의 경우 M1이 G보다 6배 이상 항체 생성이 많음을 확인하였다.

IPNV-VP2/VP3, IHNV-G/M1 모두를 포함하는 재조합 단백질 백신을 대상으로 주사, 경구, 침잠법을 사용하여 백신 처리 후 항체 생성 확인하였다. 그 결과 주사 방법을 통하여 백신 처리하였을 경우 IPNV 및 IHNV 모두에 대한 항체가 비교적 많이 생성 되었으나 경구 투여 및 침잠법을 사용하여 백신 처리한 경우 바이러스에 대한 항체 생성이 극히 미미함을 확인할 수 있었다. 또한 주사 방법을 통한 백신의 처리 시 바이러스 감염에 의한 폐사를 효과적으로 예방함을 확인할 수 있었다.

5. IPNV 및 IHNV의 combination 단백질 백신 확인:

재조합단백질 백신의 제조단가를 줄이기 위하여 IPNV의 VP2와 VP3의 fusion 재조합단백질, 그리고 IHNV의 G와 M1의 fusion 재조합단백질 제조하고자 하였다. 먼저 IPNV의 경우

IPNV의 VP2-VP3 fusion gene을 제조한 다음 expression vector인 pET28a에 subcloning 하였다. 이를 E.coli BL21에서 발현시켜 VP2-VP3 fusion 재조합단백질을 제조하였다. IHNV의 경우, IHNV의 G-M1 fusion gene을 제조한 다음 expression vector인 pET28a에 subcloning 한 후 E.coli BL21에서 발현시켜 G-M1 fusion 재조합단백질을 제조하였다.

이와 같이 제조한 IPNV VP2-VP3 fusion 재조합단백질 및 IHNV G-M1 fusion 재조합단백질을 무지개 송어에 주사하여 항체 생성 여부를 확인 하였다. 그 결과 IPNV의 VP2-VP3 fusion 재조합단백질을 주사한 무지개송어의 혈청에서 VP2 및 VP3에 대한 항체가 생성됨을 확인할 수 있었으며, 이 항혈청이 IPNV의 감염을 효과적으로 중화시킴을 확인하였다. 그리고 IHNV G-M1 fusion 재조합단백질을 주사한 무지개송어 혈청에서 G 및 M1에 대한 항체가 생성됨을 확인할 수 있었으며, 이 항혈청이 IHNV의 감염을 중화시킴을 확인하였다.

6. Immunostimulant를 사용한 단백질 백신의 효과 증대:

IPNV의 VP2-VP3 그리고 IHNV의 G-M1 fusion 재조합단백질 백신에 light oil (oil-in-water 및 water-in-oil), β -glucan, aluminum phosphate 등의 adjuvant를 첨가하여 이들 중 어떤 것의 면역증강 효과가 좋은 지를 분석하였다. 그 결과 Light oil (oil in water 및 water in oil)의 면역증강 효과가 가장 좋음을 확인하였다.

7. 세포 배양 및 RT-PCR을 통한 바이러스의 분포 확인

강원도 경북, 경남의 양식장을 대상으로 일정 기간별 시료를 채취하여 IPNV 및 IHNV의 분포를 확인하고자 하였다. 각각의 시료들을 CHSE-214와 EPC 세포주에 접종하여 CPE를 확인하였으며 IPNV 및 IHNV 각각의 PCR primer를 사용한 RT-PCR을 수행하여 IPNV 및 IHNV를 확인하였다. 그 결과 무지개송어 양어장 7개소 중 6개소에서 IPNV 또는 IHNV가 감염되어 있음을 확인하였다.

8. PCR cloning 및 염기서열 분석을 통한 IPNV 및 IHNV type을 확인

분리한 바이러스 유전자들의 type을 확인하기 위하여 PCR cloning 및 염기서열 분석을 수행하였다. 그 결과 본 연구에서 IPNV 및 IHNV 백신 개발에 사용한 strain들과 동일한 type의 IPNV 및 IHNV가 분포함을 확인하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

1. 현장보급방안

- 사용하기에 간편하고 저렴한 가격의 백신을 제조하여 양식어민들이 사용하기에 편리하고 무리가 없게 함
- 주사를 통한 DNA 백신 및 재조합 단백질 백신: 양식업자, 기구 제조업자와 기술을 제휴

하여 양식어가 stress를 가장 적게 받고 효율적으로 주사할 수 있는 방법을 개발하여 양식어민들에게 보급

- 위와 같은 백신의 사용법을 책자로 만들어 양식어민들에게 배포하고 또한 적절한 기회에 직접 설명함으로써 사용법을 익히도록 함

2. 산업화방안

- DNA 백신: 기존의 양식장과 제휴하여, 친어에 DNA 백신 처리 후 나오는, 바이러스에 내성이 강한 알을 판매
- 단백질 백신: 제약회사와 제휴하여 주사용 단백질 백신 판매

3. 추가기술개발방안

- 본 연구가 성공적으로 마무리되어 개발된 백신이 실용화 된 이후에도 정기적으로 양식어류에서 IPNV 및 IHNV를 분리하여 특성을 확인하여 새로운 돌연변이가 유입되거나 발생하면 이를 기존에 개발한 백신에 첨가
- 백신효과를 높일 수 있는 새로운 vector나 adjuvant가 개발되면 이 역시 기존에 개발한 백신에 첨가하여 더욱 효율이 높은 백신을 개발.
- 본 연구 결과 개발되는 백신을 양식 해산어에도 적용 가능한지를 확인

4. 기술이전방안

- IPNV 및 IHNV에 대한 백신을 국제 특허를 출원하여 취득 한 후 국내 제약회사 등에게 기술 이전
- 외국의 어류 백신 전문회사에게 기술이전

S U M M A R Y

I. Title

Development of vaccines protecting rainbow trout against IPNV and IHNV

II. Objectives and Significance

Salmonids is man's most important single source of high-quality protein and cultured intensively all around the world. However, the salmonid culture has been severely damaged by epizootics caused by Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) and Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) (1). In Korea, epizootics have occurred frequently among cultured salmonids in Korea and, previously, we have identified IPNV (2, 3, 4) and IHNV (5) as the causative agents of the epizootics. Thus, it is very urgent to develop any methods to protect the cultured salmonids from diseases caused by IPNV and IHNV.

No therapeutic agent for the fish viral diseases has been developed and, generally, it is well known that the most effect method against viral diseases is to prevent viral diseases by vaccination. Thus, many researchers around world have tried to develop protective vaccines against IPNV and IHNV. Based on the report that IPNV VP2 contains neutralizing epitope (6), recombinant protein vaccine against IPNV has been developed using VP2 as a target gene (7, 8, 9). In case of IHNV, it has been reported that glycoprotein (G) possesses neutralizing epitope (10) and recombinant protein vaccine against IHNV has been developed using the IHNV G as a target gene (11, 12). Recently, DNA vaccine against IHNV was developed using the IHNV G as a target gene and was reported to be more effective than the recombinant protein vaccine (13, 14) and to reduce the mortality of fry by vaccination of the mother fish (15). However, the protective efficacy of these vaccines against IPNV and IHNV infection has been reported to be very low.

Until now, it is not clear why the protective efficacies of IPNV and IHNV vaccines are low. However, based on our recent studies, it is highly possible that the immunogenicities of target genes used for the vaccine development is not high enough. Recently, we have found the immunogenicity of IPNV VP3 to be higher than that of IPNV VP2 (16) and also the immunogenicity of IHNV M1 to be higher than that of IHNV G (17, 18). In addition,

antibodies raised against IPNV VP3 and IHNV G neutralized the infection of IPNV and IHNV, respectively (16, 17). Korean isolates of IPNV and IHNV were serologically different from foreign strains which have been used for the vaccine development (3, 4, 5, 19). There were sequence variations in IPNV VP2 and IHNV G among different serotypes and, thus, current vaccines based on IPNV VP2 and IHNV G may not be effective against IPNV and IHNV prevailing in Korea. On the other hand, IPNV VP3 and IHNV M1 are highly conserved among different serotypes.

All these suggest that IPNV VP3 and IHNV M1 may be a better vaccine target genes than currently used IPNV VP2 and IHNV G and that new vaccines combined VP2 and VP3 of IPNV or G and M1 of IHNV may be superior in protective effect and spectrum to the current vaccines.

III. Content and Scope of the Study

This research project focuses on (1) the development of recombinant protein vaccines and DNA vaccines protecting rainbow trout from IPNV and IHNV and (2) the epidemiological screening for IPNV and IHNV to determine the spectrum of vaccines.

1. Preparation of DNA vaccines against IPNV and IHNV

- Preparation of plasmid DNA construct containing IPNV VP2, IPNV VP3, IHNV G, or IHNV M1 using a mammalian expression vector, pIRES
- Determination of the vaccine efficacies of the plasmid DNA constructs as follows:
 - Intramuscular injection of plasmid DNA constructs containing IPNV VP2, IPNV VP3, IHNV G or IHNV M1 into mother fish in various combinations
 - Analysis of antibody titers against IPNV and IHNV in the sera, ovarian fluids and eggs of vaccinated mother fish (using ELISA and neutralization assay)
 - Analysis of antibody titer against IPNV and IHNV in the egg yolk of fry obtained from vaccinated mother fish (using ELISA)
 - Analysis of mortality after challenge of infectious virus

2. Preparation of IPNV-IHNV combination DNA vaccine

- Preparation of plasmid DNA construct containing IPNV VP2-VP3 fusion gene by subcloning of IPNV VP2 gene fragment containing neutralizing epitope to the front of full ORF of IPNV VP3
- Preparation of plasmid DNA construct containing IHNV G-M1 fusion gene by

subcloning of IHNV G gene fragment containing neutralizing epitope to the front of full ORF of IHNV M1

- Preparation of plasmid DNA construct containing both IPNV VP2-VP3 fusion gene and IHNV G-M1 in one plasmid by subcloning of VP2-VP3 and G-M1 fusion genes into A and B cloning sites of dual expression vector, pIRES
- Transfection of the IPNV VP2-VP3 and IHNV G-M1 fusion genes into CHSE-214 cells and confirmation of their expression
- Intramuscular injection of pIRES DNA vector containing both IPNV VP2-VP3 and IHNV G-M1 fusion gene into mother fish and analyses of antibody titers against IPNV and IHNV by ELISA and neutralization test
- Analyses of antibody titers against IPNV and IHNV in the egg yolk of fry obtained from vaccinated mother fish (using ELISA)

3. Selection of immunostimulant to improve the efficacy of DNA vaccine

- Cloning of full ORFs of murine GM-CSF and growth hormone (GH) and somatolactin of chum salmon into pIRES mammalian expression vectors
- Confirmation of their expression in CHSE 214 cells by transfection experiment
- Analyses of the immune stimulatory effects of the immunostimulants by combining these genes into combination DNA vaccines

4. Preparation of recombinant protein vaccines against IPNV and IHNV

- Expression and purification of recombinant proteins of IPNV VP2 fragment containing neutralizing epitopes, IPNV VP3, IHNV G and IHNV M1
- Analyses of vaccine efficacies of these recombinant proteins as follows:
 - Vaccination of rainbow trout fry with recombinant proteins of IPNV VP2, IPNV VP3, IHNV G and IHNV M1 in various combinations
 - Vaccination of rainbow trout adult with recombinant proteins of IPNV VP2, IPNV VP3, IHNV G and IHNV M1 in various combinations
 - Analyses of antibody titer against IPNV and IHNV in the sera of fry and adult (using ELISA and neutralization assay)
 - Analysis of mortality after challenge of infectious virus

5. Preparation of combination recombinant protein vaccines of IPNV and IHNV

- Preparation of plasmid DNA construct containing IPNV VP2-VP3 fusion gene by subcloning of IPNV VP2 gene fragment containing neutralizing epitope to the front of

full ORF of IPNV VP3

- Subcloning of IPNV VP2-VP3 fusion gene into a prokaryotic expression vector, pET28a and expression of IPNV VP2-VP3 fusion protein in E.coli BL21.
- Preparation of plasmid DNA construct containing IHNV G-M1 fusion gene by subcloning of IHNV G gene fragment containing neutralizing epitope to the front of full ORF of IHNV M1
- Subcloning of IHNV G-M1 fusion gene into a prokaryotic expression vector, pET28a and expression of IHNV G-M1 fusion protein in E.coli BL21.
- Intraperitoneal injection of recombinant proteins of IPNV VP2-VP3 fusion gene and IHNV G-M1 fusion gene and analyses of antibody titer against IPNV and IHNV using ELISA and neutralization assay

6. Selection of adjuvants to improve the efficacy of recombinant protein vaccine

- Addition of light oil (oil-in-water or water-in-oil), β -glucan, or aluminum hydroxide to the recombinant protein vaccines
- Intraperitoneal injection of recombinant protein-adjuvant mixtures to rainbow trout and analyses for the antibody titer against IPNV and IHNV

7. Screening for the distribution and typing of IPNV and IHNV in cultured rainbow trout

- Collection of samples from rainbow trout cultured at Gangwon, Gyeongnam, and Gyeongbuk area and analyses for IPNV and IHNV as follows:
 - Inoculation of samples to cell lines and observation for the CPE
 - Gene amplification of IPNV and IHNV by RT-PCR
 - Determination of the distribution of IPNV and IHNV

8. Genotyping of IPNV and IHNV isolates by sequence analysis

- Genotyping of the virus isolates by PCR cloning and sequence analysis

IV. Results

1. Preparation of DNA vaccines against IPNV and IHNV

IPNV VP2, IPNV VP3, IHNV G, and IHNV M1 genes were subcloned into mammalian dual expression vector, pIRES. To determine whether or not the subcloned viral genes were properly expressed, gene expressions were analyzed using *in vitro* translation

system and transfection test. *In vitro* translation experiment showed that proteins were properly expressed from the DNA vaccine constructs and transfection of DNA vaccine constructs into CHSE-214 cells induced the transcription of viral genes properly.

DNA vaccines were injected into mother fish of rainbow trout and, at 1 month after the vaccination, antibody titers in the sera were analyzed. The results showed that mother fish injected with DNA vaccine produced antibodies against IPNV VP2, IPNV VP3, IHNV G and IHNV M1. In addition, antibodies against IPNV and IHNV could be detected in eggs and fry obtained from the vaccinated mother fish.

To determine whether the DNA vaccination of mother fish can protect fry from IPNV and IHNV, cumulative mortality of fry was analyzed after challenging with infectious IPNV and IHNV. While the mortality of fry from unvaccinated mother fish reached to 90%, those from vaccinated mother fish was 20% to 38%. This result suggests that DNA vaccination of mother fish can protect fry from IPNV and IHNV. Among the fry from vaccinated mother fish, the mortality of fry from mother fish vaccinated with IPNV VP2 and IHNV G was 32%. However, the mortality of fry from mother fish vaccinated with IPNV VP2, IPNV VP3, IHNV G and IHNV M1 was 20%. This suggests that addition of IPNV VP3 and IHNV M1 to DNA vaccine can increase protective effect of the DNA vaccine.

2. Preparation of IPNV-IHNV combination DNA vaccine

In order to reduce the production cost, IPNV VP2-VP3 and IHNV G-M1 fusion genes were generated. These fusion genes were subcloned into a mammalian dual expression vector, pIRES, to produce IPNV-IHNV combination DNA vaccine, pIRES-IPNV/IHNV. pIRES-IPNV/IHNV was transfected into CHSE-214 cells and the expression of IPNV VP2-VP3 and IHNV G-M1 fusion genes were confirmed by RT-PCR. Mother fish of rainbow trout was intramuscularly injected with pIRES-IPNV/IHNV and, at 1 month after injection, sera were collected from the vaccinated mother fish and antibody titers against IPNV and IHNV were analyzed. The results showed that the vaccinated mother fish produced antibodies against IPNV VP2, IPNV VP3, IHNV G and IHNV M1 and these antibodies were vertically transferred to eggs.

3. Selection of immunostimulant to improve the efficacy of DNA vaccine

We screened several cytokines and growth factors for immunostimulants to improve the DNA vaccine efficacy. As a first step, murine GM-CSF and growth hormone and somatotactin of chum salmon were subcloned into pIRES mammalian expression vector.

These genes were transfected into CHSE-214 and their expressions were confirmed by RT-PCR. After combining these genes into the previously prepared DNA vaccines and the immune stimulatory effect was analyzed. The results showed that the immune stimulatory effect of GM-CSF was superior to other genes tested in this study.

4. Preparation of recombinant protein vaccines against IPNV and IHNV

To prepare recombinant protein vaccines against IPNV and IHNV, several genes of structural proteins of IPNV and IHNV were expressed in *E.coli*. The recombinant protein of full length IPNV VP3 was successfully expressed in *E.coli*. However, even though we have tried so many times using various kinds of expression vectors, we have failed to express the full length IPNV VP2. Thus, we subcloned IPNV VP2 fragment gene containing neutralizing epitopes and could success in expressing the recombinant protein of this IPNV VP2 fragment. In case of IHNV, recombinant proteins of full length G and M1 were successfully expressed in *E.coli*. These recombinant proteins were confirmed to be the right ones by MALDI-TOF analyses.

The recombinant proteins were injected into rainbow trout in various combinations and antibody titers of the vaccinated fish were analyzed. The results showed that the titer of anti-IPNV VP3 antibody was 10 times higher than that of anti-IPNV-VP2 antibody and that the titer of anti-IHNV M1 antibody was 6 times higher than that of anti-IHNV G antibody.

To compare the vaccine efficacy between different vaccination methods, fish was vaccinated by injection, immersion or oral methods and, then, the antibody titers against IPNV and IHNV were analyzed. The results showed that while vaccination by injection method produced high titer of antibodies against IPNV and IHNV, vaccination by immersion or oral methods produced very low titer of antibodies against IPNV and IHNV. In addition vaccination by injection methods was found to protect rainbow trout from IPNV and IHNV.

5. Preparation of combination recombinant protein vaccines of IPNV and IHNV

In order to reduce the production cost, IPNV VP2-VP3 and IHNV G-M1 fusion genes were generated. These fusion genes were subcloned into a prokaryotic expression expression vector, pET28a and the resultant plasmid constructs were transformed into *E.coli* recombinant proteins were produced in the transformed *E.coli* BL21 as IPNV VP2-VP3 and IHNV G-M1 fusion proteins.

These recombinant fusion proteins were intraperitoneally injected into rainbow trout and

the sera from the vaccinated fish were analyzed for the antibody titers against IPNV and IHNV. The results showed that vaccination of IPNV VP2-VP3 fusion protein induced the production of antibodies against IPNV VP2 and IPNV VP3 and these antibodies were found to neutralize IPNV infection. In addition, vaccination of IHNV G-M1 fusion protein induced the production of antibodies against IHNV G and M1 and these antibodies neutralized IHNV infection.

6. Selection of adjuvants to improve the efficacy of recombinant protein vaccine

We screened several adjuvants for immunostimulant to improve the recombinant protein efficacy. Adjuvants such as light oil (oil-in-water and water-in-oil), β -glucan, or aluminum phosphate were added to IPNV VP2-VP3 and IHNV G-M1 recombinant fusion proteins and the immune stimulatory effect was analyzed. The results showed that the immune stimulatory effect of light oil (oil-in-water and water-in-oil) was superior to other adjuvants tested in this study.

7. Screening for the distribution of IPNV and IHNV using cell culture inoculation and RT-PCR

Samples were collected from rainbow trout cultured at Gangwon, Gyeongnam, and Gyeongbuk area. They were analyzed for the presence of IPNV and IHNV by observation of CPE after inoculation into CHSE-214 cells and by viral gene amplification using RT-PCR. The results showed that, among 7 fish farms, 6 fish farms were contaminated by IPNV and/or IHNV.

8. Genotyping of virus isolates by PCR cloning and analyses of the nucleotide sequences

In order to determine the genotype of the virus isolates, viral genes were cloned by PCR cloning and their nucleotide sequences were analyzed by blast searching. The results showed that the genotypes of IPNV and IHNV prevailing in Korea are same with those that were used in the development of vaccines in this study.

V. Suggestions for Application

1. Supply to fish farms

- Development of convenient and low-price IPNV and IHNV vaccines which can be easily applicable to the fish farms

- Injection vaccines: development of most effective and least stressful to cultured fish which can be easily applicable to the fish farms by technical tie-up with fish farmer and farming equipment maker
- Preparation of instruction manual for vaccination and providing it to the fish farmer

2. Industrialization

- DNA vaccine: marketing of the eggs obtained from vaccinated mother fish and, thus, resistant to the IPNV and IHNV diseases by technical tie-up with fish farms
- Recombinant protein vaccine: marketing of the injection vaccine by technical tie-up with pharmaceutical company

3. Additional development

- Periodical screening for the introduction of new genotypes of IPNV and IHNV and, in case of appearance of new genotypes, addition of the new viral genes to the current vaccine
- In case of introduction of new effective vectors and/or adjuvants, addition of them to the current vaccine to improve the vaccine efficacy
- Making an attempt to apply the vaccines to marine fish

4. Technology transfer

- Patent pending and technology transfer to Korean pharmaceutical companies
- Technology transfer to foreign pharmaceutical company specialized in fish vaccine

CONTENTS

Submission letter.....	1
Summary (Korean).....	2
Summary (English).....	10
Contents (English).....	18
Contents (Korean).....	21
Chapter 1. Introduction.....	24
Section 1. Technical aspect.....	24
Section 2. Economical and industrial aspects.....	29
Section 3. Social and cultural aspects.....	32
Chapter 2. The present status of technological development.....	33
Section 1. The present status of foreign countries.....	33
Section 2. The present status of Korea.....	33
Chapter 3. Content and Result of the Study.....	34
Section 1. Materials and Methods.....	34
1. Cell culture and viruses.....	34
2. Virus isolation.....	34
3. ELISA.....	34
4. Western blotting.....	35
5. Northern blotting.....	35
6. RT-PCR.....	35
7. Subcloning of viral structural proteins.....	36
8. Preparation of combination vaccine.....	36
9. Cloning of cytokine genes and growth hormone genes.....	36
10. Transfection.....	36
11. Vaccination.....	37
12. Neutralization test.....	37
13. Analyses of vaccine efficacies.....	37
Section 2. Contents of the Study.....	38
1. Preparation of DNA vaccines against IPNV and IHNV.....	38
2. Preparation of combination DNA vaccines against IPNV and IHNV.....	38

3. Improvement of DNA vaccine efficacy using immunostimulant.....	38
4. Preparation of protein vaccines against IPNV and IHNV.....	39
5. Preparation of combination protein vaccines against IPNV and IHNV.....	39
6. Improvement of protein vaccine efficacy using immunostimulant.....	39
7. Screening for the distribution of IPNV and IHNV in rainbow trout.....	40
8. Confirmation of the virus isolates by cell inoculation and RT-PCR.....	40
9. Genotyping of IPNV and IHNV by PCR cloning and sequence analyses.....	40
Section 3. Results.....	40
1. Preparation of DNA vaccine against IPNV and IHNV.....	40
2. Vaccination of DNA vaccine into mother fish.....	46
3. Analysis of antibody titer in the mother fish, eggs, and fry.....	48
4. Analysis of mortality in fry.....	51
5. Preparation of protein vaccines against IPNV and IHNV.....	53
6. Protective effect of protein vaccine in fry.....	57
7. Protective effect of protein vaccine in fingerling.....	59
8. Preparation of fusion genes of IPNV or IHNV.....	63
9. Preparation of DNA vaccines using VP2-VP3 and G-M1 fusion genes.....	72
10. Preparation of protein vaccines using VP2-VP3 and G-M1 fusion genes.....	75
11. Vaccination of mother fish with fusion gene DNA vaccines.....	78
12. Analysis of antibody titer of vaccinated mother fish	78
13. Analysis of the efficacies of fusion gene protein vaccines.....	79
14. Improvement of DNA vaccine efficacy using immunostimulant.....	81
15. Analysis of the effect of the immunostimulant on the DNA vaccines.....	83
16. Improvement of protein vaccine efficacy using immunostimulant.....	85
17. Epidemiological screening of fish viruses among rainbow trout in Korea.....	88
18. Confirmation of viruses by cell culture inoculation.....	88
19. Confirmation of viruses by RT-PCR.....	89
20. Epidemiological screening of fish viruses among rainbow trout in Korea-1.....	89
21. Confirmation of viruses by cell culture inoculation-1.....	90
22. Confirmation of viruses by RT-PCR.....	90
23. Genotyping of virus isolates by PCR cloning and sequence analysis.....	91
Chapter 4. The Attainment of Objectives.....	95
Section 1. Objectives of the Study.....	95
1. Ultimate Objective.....	95

2. Details of Objectives.....	95
Section 2. The Attainment of Objectives.....	95
1. Preparation of DNA vaccines against IPNV and IHNV.....	95
2. Preparation of combination DNA vaccines against IPNV and IHNV.....	96
3. Improvement of DNA vaccine efficacy using immunostimulant.....	96
4. Preparation of protein vaccines against IPNV and IHNV.....	96
5. Preparation of combination protein vaccines against IPNV and IHNV.....	97
6. Improvement of protein vaccine efficacy using immunostimulant.....	97
7. Screening of viruses using cell inoculation and RT-PCR.....	97
8. Genotyping of virus isolates by PCR cloning and sequence analysis.....	98
Section 3. Rate of Attainment.....	98
Chapter 5. Application	99
Section 1. Supply to fish farms.....	99
Section 2. Industrialization.....	99
Section 3. Additional development.....	99
Section 4. Technology transfer.....	99
Chapter 6. New Scientific and Technological Informations.....	100
Chapter 7. References.....	101

목 차

제출문.....	1
요약문.....	2
Summary.....	10
Contents.....	18
목차.....	21
제 1 장 연구개발과제의 개요.....	24
제 1 절 기술적 측면.....	24
제 2 절 경제.산업적 측면.....	29
제 3 절 사회.문화적 측면.....	32
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	33
제 1 절 국외 어류바이러스 백신 개발의 현황과 문제점.....	33
제 2 절 국내 어류바이러스 백신 개발의 현황과 문제점.....	33
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	34
제 1 절 연구수행 방법.....	34
1. 세포배양 및 바이러스.....	34
2. 바이러스의 분리.....	34
3. ELISA.....	34
4. Western blotting.....	35
5. Northern blotting.....	35
6. RT-PCR.....	35
7. 바이러스 구조단백질 유전자의 subcloning.....	36
8. Combination 백신 준비.....	36
9. Cytokine 및 hormone 유전자 cloning.....	36
10. Transfection을 통한 발현 확인.....	36
11. Vaccination.....	37
12. Neutralization 실험.....	37
13. 백신효과 측정.....	37
제 2 절 연구내용.....	38
1. IPNV 및 IHNV 유전자에 대한 효과적인 DNA 백신 확인.....	38

2. IPNV 및 IHNV의 combination DNA 백신 확인.....	38
3. Immunostimulant를 사용한 DNA 백신의 효과 증대.....	38
4. IPNV 및 IHNV 유전자에 대한 효과적인 단백질 백신 확인.....	39
5. IPNV 및 IHNV의 combination 단백질 백신 확인.....	39
6. Immunostimulant를 사용한 단백질 백신의 효과 증대.....	39
7. 무지개송어 양식장에서의 IPNV 및 IHNV 분포 조사 및 type 확인.....	40
8. 세포 배양 및 RT-PCR을 통한 바이러스의 분포 확인.....	40
9. PCR cloning 및 염기서열 분석을 통한 IPNV 및 IHNV type을 확인.....	40

제 3 절 연구 결과..... 40

1. IPNV 및 IHNV의 DNA 백신 제조.....	40
2. 친어에 IPNV 및 IHNV DNA 백신 투여.....	46
3. 친어, 알 및 치어의 난황에 존재하는 바이러스에 대한 항체양 분석.....	48
4. 치어의 폐사율 분석.....	51
5. IPNV 및 IHNV의 단백질 백신 제조.....	53
6. 치어의 단백질 백신 효과 실험.....	57
7. 자어(fingerling)의 단백질 백신 효과.....	59
8. IPNV 및 IHNV의 fusion gene 제조.....	63
9. IPNV의 VP2-VP3 및 IHNV의 G-M1 fusion gene을 사용한 DNA 백신 제조.....	72
10. IPNV의 VP2-VP3 및 IHNV의 G-M1 fusion gene을 사용한 단백질 백신 제조..	75
11. 친어에 IPNV 및 IHNV fusion gene DNA 백신 투여.....	78
12. 친어에 존재하는 바이러스에 대한 항체양 분석.....	78
13. Fusion gene으로부터 제조한 단백질 백신의 백신효과 실험.....	79
14. Immunostimulant를 사용한 DNA 백신의 효과 증대.....	81
15. Immunostimulant를 사용한 IPNV 및 IHNV DNA 백신 효과 증가 분석.....	83
16. Immunostimulant를 사용한 단백질 백신의 효과 증대.....	85
17. 무지개송어 양식장의 바이러스 역학조사 결과.....	88
18. 세포접종에 의한 바이러스 존재유무 확인.....	88
19. RT-PCR을 사용한 바이러스 확인.....	89
20. 무지개송어 양식장의 바이러스 분포조사 결과-1.....	89
21. 세포접종에 의한 바이러스 존재유무 확인-1.....	90
22. RT-PCR을 사용한 바이러스 확인-1.....	90
23. PCR cloning 및 염기서열 분석을 통한 IPNV 및 IHNV type 확인.....	91

제 4 장 목표달성도..... 95

제 1 절 연구개발 목표.....	95
--------------------	----

1. 최종 목표.....	95
2. 세부 목표.....	95
제 2 절 연구개발목표의 달성도.....	95
1. IPNV 및 IHNV 유전자에 대한 효과적인 DNA 백신 확인.....	95
2. IPNV 및 IHNV의 combination DNA 백신 확인.....	96
3. Immunostimulant를 사용한 DNA 백신의 효과 증대.....	96
4. IPNV 및 IHNV 유전자에 대한 효과적인 단백질 백신 확인.....	96
5. IPNV 및 IHNV의 combination 단백질 백신 확인.....	97
6. Immunostimulant를 사용한 단백질 백신의 효과 증대.....	97
7. 세포배양 및 RT-PCR을 통한 바이러스 분포 확인.....	97
8. PCR cloning 및 염기서열 분석을 통한 IPNV 및 IHNV type 확인.....	98
제 3 절 평가의 착안점에 따른 달성도.....	98
제 5 장 연구개발결과의 활용계획.....	99
제 1 절 현장보급 방안.....	99
제 2 절 산업화 계획 방안.....	99
제 3 절 추가기술 개발 방안.....	99
제 4 절 기술이전 방안.....	99
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	100
제 7 장 참고문헌.....	101

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 기술적 측면

1. 연어류 양식 및 바이러스 질병

- 연어류는 인간에게 고급 단백질을 제공하여 주는 고급어종으로써 북유럽, 북미, 남미, 일본 등을 포함하는 세계 여러 지역에서 대량 양식되고 있음.
- 연어류 양식과 관련된 산업은 국가 경제에도 큰 기여를 하고 있는 것으로 알려져 있는데, 특히 노르웨이의 경우 연어류 양식 관련 산업이 차지하는 비중이 GNP의 약 15 % 이상임.
- 이들 양식 연어류에 전염성췌장괴저 바이러스 (Infectious Pancreatic Necrosis Virus, IPNV)와 전염성조혈괴저 바이러스 (Infectious Hematopoietic Necrosis Virus, IHNV)가 감염하여 대량폐사를 유발함으로써 막대한 피해를 주고 있음 (1).
- 우리나라의 경우에도, 양식 연어류에 바이러스성 질병에 의한 대량 폐사가 발생하여 매년 수천만 마리의 치어가 죽어가고 있는 실정임.
- 강원도 일대로 회귀하여 오는 침연어의 알을 부화 시켜 방류함으로써 우리나라로 회귀하는 연어의 자원을 늘리고자 방류 사업을 수행하고 있는데, 최근 들어 바이러스 등의 질병에 의한 폐사 때문에 회귀율이 점점 감소하고 있음.
- 본 연구진의 연구 결과 이들 연어류의 치어에서 IPNV (2, 3, 4,)와 IHNV (5)가 검출되어 우리나라의 경우 이들 두 종류 바이러스의 복합 감염이 대량폐사의 원인임이 확인되었음.
- 따라서 양식 연어류의 IPNV 및 IHNV 감염에 의한 피해를 줄이기 위한 대책 마련이 시급한 상황임.

2. 국외 백신 개발현황

- 일반적으로 바이러스성 질병은 한번 발생하면 치료가 매우 어렵기 때문에 바이러스 질병을 막는 가장 좋은 방법은 효과적인 백신을 개발하여 바이러스 질병을 미연에 방지하는 것임.
- 이러한 이유로 인하여 세계 여러 나라에서 IPNV 및 IHNV에 대한 백신을 개발하고자 많은 노력을 기울여 왔음.
- IPNV의 경우 VP1, VP2, VP3, 그리고 VP4 등의 4개의 구조단백질 중 capsid의 가장 바깥쪽에 위치하는 VP2에 중화 epitope가 있다는 보고 (6)를 바탕으로 VP2를 사용한 recombinant vaccine을 개발하였음 (7, 8, 9).
- 그리고 IHNV의 경우 L, G, N, M1, M2 등의 5종류 구조 단백질중 envelope protein인 G protein에 중화 epitope가 있다는 보고 (10)를 바탕으로 G를 사용한 recombinant vaccine을

개발하였음 (11, 12).

- 최근에는 IHNV의 G를 target gene으로 하여 DNA 백신을 개발하고자 연구를 진행 중에 있는데, recombinant vaccine 보다 효과가 좋은 것으로 보고되며 (13, 14), 친어에 처리시 치어의 발병을 어느 정도 줄일 수 있음이 보고되고 있음 (15).
- 그러나 이들 개발된 백신들은 그 효과가 매우 약하여 실용화되지 못하고 있는 실정임.

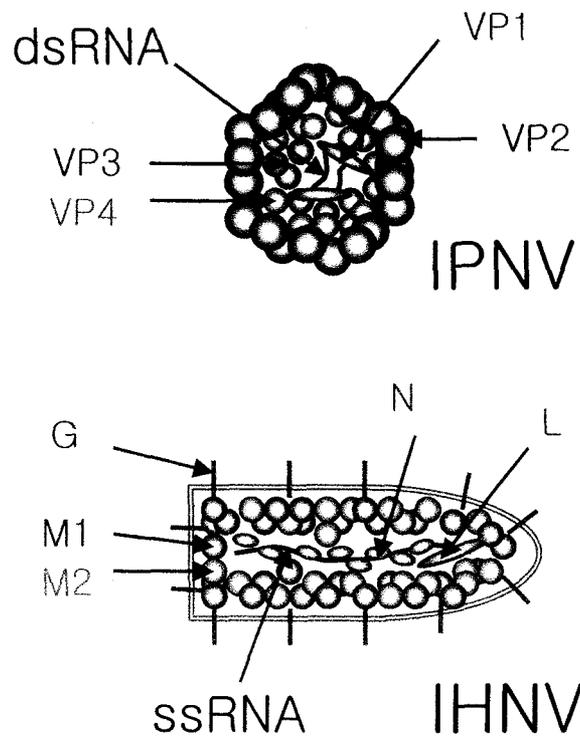


Fig. 1. Structural models of IPNV and IHNV

3. 국내 백신 개발현황

- 아직까지 이들 개발 중인 백신들의 효과가 낮은 이유를 정확하게 알지 못함. 그러나 본 연구진의 최근 연구 결과에 따르면 지금까지 외국의 연구자들이 선정한 IPNV 및 IHNV의 백신 target 유전자에 문제가 있을 가능성이 높다고 판단됨.
- 본 연구진의 연구 결과 IPNV의 경우 VP2보다 VP3 (혹은 VP4)가 더 immunogenicity가 높음이 확인되었고 (16), IHNV의 경우 G보다 M1이 더 immunogenicity가 높음이 확인되었음 (17, 18) (Fig. 2).
- 또한 아직 명확한 설명은 어렵지만 이들 단백질에 대한 항체가 IPNV와 IHNV 각각을 중화 시킴을 확인하였음 (16, 17).
- 그리고 지금까지 백신으로 개발되어왔던 IPNV의 VP2, 그리고 IHNV의 G는 서로 다른 혈청형의 바이러스 사이에 변화가 많은 단백질들임.
- 그런데, 본 연구진의 연구 결과 우리나라의 양식 연어류에 존재하는 IPNV 및 IHNV strain 은 외국에서 백신제조에 사용한 strain들과는 혈청학적으로 다른 특성을 지니는 것들이 확인되었음 (3, 4, 5, 19).
- 따라서 외국에서 지금까지와 같은 target gene을 대상으로 개발 중에 있는 IPNV 및 IHNV 백신들은 우리나라에서 발생하고 있는 양식 연어류의 바이러스 질병을 예방하기에는 적합하지 않은 것으로 판단됨.
- 반면에 본 연구진에 의하여 immunogenicity가 높은 것으로 확인된 IPNV의 VP3와 IHNV의 M1은 바이러스 입자의 안쪽에 존재하는 구조단백질들로서 서로 다른 혈청형의 바이러스들 사이에서도 변이가 거의 없는 conserved된 단백질들임.
- 따라서 기존에 외국에서 백신 대상으로 삼았던 것들과 본 연구진이 밝혀낸 것들을 대상으로 백신을 개발하는 경우 기존에 개발되어 왔던 IPNV 및 IHNV 백신보다 훨씬 효과가 좋은 백신의 개발이 가능하리라 판단되며, 개발된 백신은 우리나라에 존재하는 바이러스뿐 아니라 외국에 존재하는 바이러스에도 적용 가능한 백신이 될 것으로 생각됨.

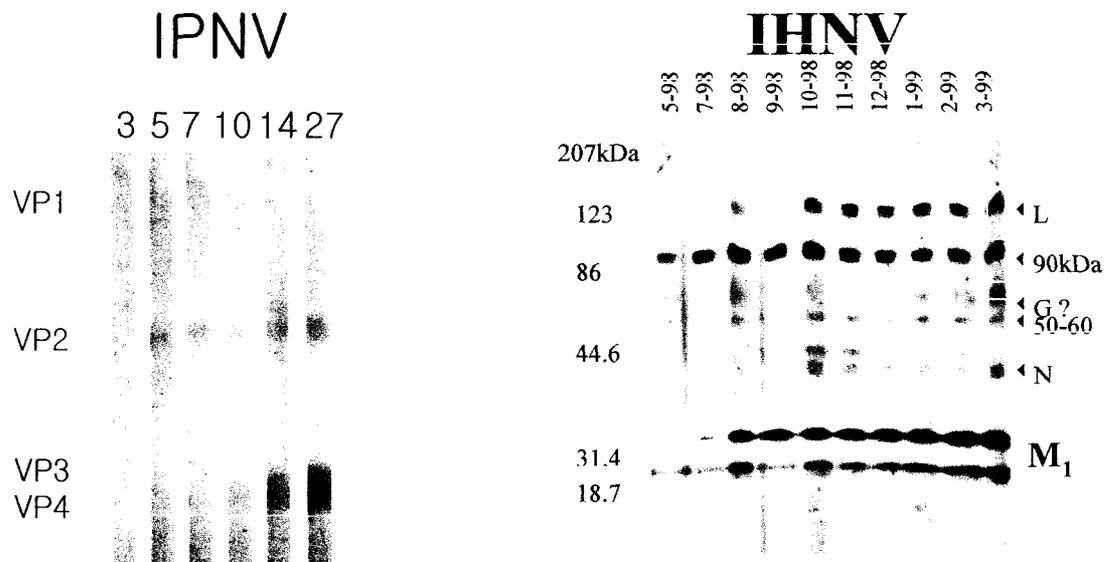


Fig.2. Antibody response against IPNV and IHNV. Sera were collected from immunized animals at indicated time and the levels of antibodies against viral proteins were assayed by Western blotting.

4. 기존 개발된 백신의 문제점 및 연구 개발의 필요성

- 현재 본 연구진은 IHNV의 G, M1 그리고 IPNV의 VP2, VP3를 prokaryotic expression vector인 pET vector에 subcloning 한 다음 E.coli에서 발현에 성공하였음.
- 이 단백질들을 대량으로 추출한 다음 이들 중 어떤 것이 백신 효과가 있는지를 확인하여 치어기의 바이러스 감염에 의한 폐사를 막을 필요가 있음.
- 또한 개발된 백신이 실제 사용될 수 있으려면 제조 단가가 저렴하여야 함.
- 현재 본 연구진이 개발한 백신은 IPNV의 VP2와 VP3의 full-length 유전자, 그리고 IHNV의 G와 M1의 full-length 유전자, 그리고 면역활성을 위한 유전자등 총 5개의 유전자를 대상으로 백신을 개발하였음.
- 이와 같이 개발된 백신이 효과는 있지만 제조 단가를 줄이기 위하여는 대상 유전자수를 줄이거나 혹은 각 유전자들의 epitope들을 확인한 후 이들의 fusion gene을 만듦으로써 제조 단가를 줄일 필요가 있음.
- 지금까지 본 연구진이 얻어낸 실험결과들을 바탕으로 IPNV와 IHNV의 DNA 백신 및 단백질 백신이 개발되면 연어류의 치어기에 발생하는, IHNV 및 IPNV의 감염에 의한 대량폐사를 막을 수가 있어 양식업자들의 피해를 줄임은 물론 양식업의 활성화에 큰 기여를 할 수 있을 것으로 판단됨.

제 2 절 경제 · 산업적 측면

- 인구가 증가하고 어족자원이 고갈되어 감에 따라 양식업의 중요성이 부각되어가고 있음.
- 또한 최근 들어 새로운 해양법이 적용되고 그 결과 각 나라마다 배타적 보호수역이 늘어남에 따라 양식업의 중요성이 더욱더 증가해 가고 있음.
- 따라서 세계 각국에서 양식업의 활성화를 위하여 많은 노력들을 기울이고 있음.
- 그 결과 1987년부터 1997년 사이에 양식어의 생산이 2배 이상 늘어났음 (Food and Agricultural Organization, 1999).
- 세계적으로 가장 많이 양식되는 종류는 잉어류, 새우, 굴, 그리고 연어류 등임 (22).
- 연어류의 경우 1997년에는 대서양 연어가 64만톤 정도 생산되어 생산량으로는 잉어류 (총 8백만톤) 굴 (297만톤), 틸라피아 (74만톤) 에 이어 4번째로 많이 생산한 어종임.
- 판매된 시장 규모로 보았을 때 대서양 연어는 1997년 21억 달러로, 잉어류 (81억 달러), 새우 (35억 달러), 굴 (32억 달러)에 이어 4번째로 큰 시장을 형성하였음.
- 그러나 생산장의 증가 속도 면에서는 1987년부터 1997년 사이에 약 22%의 성장을 보여 잉어 (15%), 틸라피아 (18%), 새우 (10%), 굴 (9.5%) 등의 주요 양식어종을 제치고 가장 빠른 성장 속도를 보였음.

Table 1. Global weight and value for nine of the most widely consumed aquaculture species (자료출처 Nature 2000, 405: 1017-1024)

종류	1997 생산량 (천톤)	년간 성장률 (1987-1997) %	1997 가격 (백만달러)
Common 잉어	2,237	7.6	2,709
Grass 잉어	2,662	15.9	2,444
Silver 잉어	3,146	7.8	2,917
Nile 틸라피아	742	18	885
Channel 메기	238	3.4	372
Atlantic 연어	639	22.4	2,113
Milkfish	393	1.7	697
Giant tiger 새우	490	10.6	3,501
Pacific cupped 굴	2,968	9.5	3,164

- 그 결과 2000년도의 경우 유럽, 일본, 캐나다, 미국 등의 선진국에서 약 114만톤의 연어류가 생산되어 약 3년 만에 2배 가까운 성장을 기록하였으며 2001년에는 다시 약 40%의 성장이 있을 것으로 예상을 하고 있음 (자료 출처, IntraFish).
- 따라서 향후 전 세계의 양식 시장에 있어서 연어류 양식이 가장 큰 규모로 발전할 가능성이 매우 높음.
- 이와 같은 거대한 시장을 선점하기 위하여 여러 선진국들에서 연어류 양식의 활성화를 위하여 많은 노력들을 기울이고 있음.
- 노르웨이의 경우 1997년도 한해에만 약 37만톤의 연어류를 생산하였는데, 이중 약 97% 정도를 일본 등의 외국에 수출하고 있으며, 국민 총생산의 15% 가까이가 연어 관련 산업일 정도로 연어류 양식이 국가 경제에 차지하는 비중이 매우 큼.
- 그러나 이들 양식 연어류에 IPNV 및 IHNV의 감염에 의하여 대량폐사가 발생하여 큰 피해를 주고 있음.
- 수산양식의 전문 보험사인 SMMI (Sunderland Marine Mutual Insurance)의 보고서에 따르면 영국과 아일랜드에서 1998년 발생한 claim의 33%가 질병관련이었고 특히 23%에 해당하는 claim이 IPNV 감염에 의한 질병관련 건이었음 (자료출처 IntraFish).
- 그리고 노르웨이의 경우 양식 연어류에 발생하는 전염성 질병 중 가장 많은 피해를 주고 있는 것이 IPNV이며, IPNV의 감염에 의하여 매년 6천만 달러 정도의 손실을 입고 있음 (9).
- 이와 같이 노르웨이에서 국가 경제의 큰 비중을 차지하는 big industry인 양식업에의 피해를 막기 위하여 국가차원에서 다음과 같은 두 가지에 주력을 하고 있음.
- 첫째 양식어의 수입 등 이동을 철저하게 관리하여 바이러스 등의 병원체가 확산되는 것을 방지하고
- 둘째, 바이러스 등의 병원체에 대한 백신을 개발하여 질병을 예방하는 것임.
- 노르웨이는 1990년대 초부터 연어류 병원체의 백신 개발에 착수하여 양식어류에 투여를 하

- 여 왔음. 비록 아직까지 효과 높은 바이러스 백신을 개발하지 못하였지만 자체적으로 개발한 IPNV 백신을 투여하여 왔으며 세균에 대한 백신을 개발하여 사용하여 왔음. 그 결과 양식연어의 질병 조절이 가능하여졌으며, 또한 양식어의 생산량을 급격하게 늘릴 수 있게 되었음.
- 일본의 경우 약 30만 톤의 연어류를 양식하고 있는데, 그동안 바이러스 등의 질병에 의한 폐사가 많이 발생하여 큰 피해를 입어왔음.
 - 이를 타개하기 위하여 일본 수산청에서 1999년도부터 “수산용 백신 추진화사업”을 실시하여 양식어류에 있어서 바이러스 등의 질병을 예방하기 위한 대책을 마련하여 추진하고 있음.
 - 우리나라의 경우 삼면이 바다로 둘러싸여 있고 특히 동해 및 동해안 일대의 하천은 연어 양식에 적합한 수질 및 수온을 지니고 있음. 따라서 연어 양식에 있어서 질병 및 기타 관리를 철저히 하는 경우 연어 양식업이 크게 발전할 수 있는 가능성이 매우 높음.
 - 실제 우리나라의 동해안에서 무지개 송어를 양식하고 있음.
 - 그 결과 농어민의 소득 증대에 큰 기여를 하는 한편 일반 국민들의 식생활에 있어서 고급 단백질의 대중화에 큰 기여를 하고 있음.
 - 또한 동해안으로 회귀하여 돌아오는 침연어의 알을 인공수정 하여 치어 까지 키운 다음 바다로 보냄으로써 세계 연어류의 어종 보호에 기여함은 물론 우리나라의 어종 자원 확보에 기여를 하고 있음.
 - 그러나 그 생산 규모가 2000년도에 약 2578톤 정도로 (자료 출처, Aqua-2000) 노르웨이나 일본에 비하여 매우 적을 뿐만 아니라 매년 이들 무지개 송어의 치어에 IPNV와 IHNV의 복합 감염에 의한 대량폐사가 발생하고 있음.
 - 그리고 인공수정하여 부화시킨 침연어의 치어에 바이러스성 질병이 발생하여 회귀율이 점점 감소하고 있음,
 - 따라서 양식어민들의 손실이 커짐에 따라 농어민들이 받는 경제적인 타격이 막대하여 농어촌 지역의 발전에 악영향을 주고 있음은 물론이고 우리나라의 어족자원 확보에도 많은 차질이 발생하고 있음.
 - 또한 부족한 만큼의 치어를 매년 외국에서 수입하기 때문에 우리나라의 전체 무역 수지에 있어서도 좋지 않은 영향을 미치고 있음.
 - 따라서 바이러스에 의한 피해를 줄이고 더불어 어민 소득의 증대를 위하여 체계적인 바이러스 백신의 개발이 반드시 이루어져야 할 필요한 사업이라고 할 수 있음.
 - 본 연구에서 개발하고자 하는 백신은 우리나라에서 주로 양식되는 무지개 송어 뿐만 아니라 세계의 주요 양식 연어류인 Atlantic salmon 및 기타 연어 및 송어에도 적용 가능한 백신임.
 - 연어류의 바이러스 백신이 개발되면 양식 연어류의 질병 조절이 가능해지고 보다 많은 규모의 연어 생산이 가능하여 짐.

- 또한 본 백신을 사용하여 현재의 무지개 송어이외에도 주요 양식 어종인 Atlantic salmon의 양식을 유도함으로써 양식규모를 대형화하여 일본 등의 외국에 수출함으로써 국가 경제에 기여함은 물론 양식어민들의 소득 증대에도 크게 기여할 수 있음.

제 3 절 사회·문화적 측면

- 최근 WTO 체제의 출범으로 농수산물의 시장이 개방되어 수산 양식업도 국제 경쟁력을 키워야 함.
- 또한 세계 주요 각국이 배타적 경제수역을 선포함에 따라 어획량에 제한이 가해지고 이와 더불어 어민들의 소득이 감소하게 되었음.
- 이에 대한 타개책 중의 하나로 기르는 어업인 양식업의 중요성이 더욱더 부각되는 상황임.
- 전 세계적으로 양식되는 어종 중 연어류 양식은 성장 속도가 가장 빠르고 시장성이 넓은 어종에 속함.
- 현재 북유럽, 칠레, 캐나다, 일본, 미국 등을 비롯한 세계 여러 나라에서 연어류 양식에 많은 노력을 쏟고 있음.
- 우리나라에서도 동해안 일대에서 연어류 양식을 하고 있음. 그러나 우리나라의 연어류 양식은 외국에 비하여 경쟁력이 떨어지는 상황임.
- 아직 양식 연어류에 발생하는 질병에 대한 대책 마련이 되어 있지 않은 상황임. 따라서 병원체에 의한 질병의 발생시 이를 조절하지 못하고 대량 폐사가 발생함은 물론이고 살아남은 어류도 보균상태가 되어 정상적인 성장을 하지 못하고 발육 부진의 상태가 됨.
- 그 결과 양식어민들이 큰 피해를 입음은 물론 양식어의 단가가 올라가게 되어 외국산 양식어와의 가격 경쟁에서 뒤지게 됨.
- 따라서 우리나라의 연어류 양식업은 경쟁력을 잃고 퇴보되는 결과를 가져오게 될 것임.
- 이에 대한 대비책으로써 바이러스성 질병에 의한 대량폐사에 따른 양식어 값의 상승은 적절한 조치를 취하는 경우 미리 막을 수가 있는 것으로 생각됨.
- 따라서 양식 연어류에 막대한 피해를 주고 있는 IPNV 및 IHNV의 백신을 개발하여 이들 바이러스에 의한 질병을 퇴치함으로써 우리 양식업을 경쟁력 있는 산업으로 키워 놓을 필요가 있음.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 어류 바이러스 백신 개발의 현황과 문제점

- IPNV의 경우 VP1, VP2, VP3, 그리고 VP4 등의 4개의 구조단백질 중 capsid의 가장 바깥쪽에 위치하는 VP2에 중화 epitope가 있다는 보고 (6)를 바탕으로 VP2를 사용한 recombinant vaccine을 개발하였음 (7, 8, 9).
- 그리고 IHNV의 경우 L (polymerase), G (glycoprotein), N (nucleocapsid), M1 (matrix protein 1), M2 (matrix protein 2) 등의 5종류 구조 단백질중 envelope protein인 G protein에 중화 epitope가 있다는 보고 (10)를 바탕으로 G를 사용한 recombinant vaccine을 개발하였음 (11, 12).
- 최근에는 IHNV의 G를 target gene으로 하여 DNA 백신을 개발하고자 연구를 진행 중에 있는데, recombinant vaccine 보다 효과가 좋은 것으로 보고되며 (13, 14), 치어에 처리시 치어의 발병을 어느 정도 줄일 수 있음이 보고되고 있음 (15).
- 그러나 이들 개발된 백신들은 그 효과가 매우 약하여 실용화되지 못하고 있는 실정임.

제 2 절 국내 어류 바이러스 백신 개발의 현황과 문제점

- 현재 본 연구진에서는 우리나라에서 분리한 IPNV (3, 4)와 IHNV (5) 모두를 확보하고 있으며
- 이들 각 바이러스의 면역유도 단백질을 확인한 상태임 (16, 17, 18)
- 또한 바이러스의 유전자들을 cloning 하였으며 (23, 24, 25) IPNV의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1 유전자들을 prokaryotic 및 mammalian expression vector에 subcloning하여 놓았음.
- 이들 중 mammalian expression vector에 subcloning한 것을 DNA 백신으로 하여 무지개송어에 백신 효과 실험을 수행한 결과 부화후 1개월까지의 치어에 백신효과가 있음을 확인하였음
- 그러나 IPNV 및 IHNV가 부화 후 3-4개월까지 폐사를 유발할 수 있기 때문에 부화 후 1개월 이후부터 3-4개월까지의 치어에 대한 단백질 백신을 개발할 필요가 있음
- 또한 개발되는 백신의 제조 단가를 줄이기 위하여 백신 대상으로 삼은 유전자의 수를 줄이고 또한 epitope 부분을 찾아 이들을 대상으로하는 저렴한 백신을 개발할 필요가 있음

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행 방법

1. 세포배양 및 바이러스

IPNV 및 IHNV의 숙주세포로서 CHSE-214 (Chinook Salmon Embryos)를 사용하였다. 세포는 fetal bovine serum이 10% 첨가된 minimum essential medium(MEM)을 사용하여 20°C에서 배양하였다. IPNV 및 IHNV는 본 연구진이 우리나라에서 분리한 strain들을 사용하였다.

2. 바이러스의 분리

양식 연어류에 감염하는 IPNV 및 IHNV의 역학 조사를 위하여 바이러스를 분리하였다. 죽어 가는 어류의 신장, 간장 조직을 TNE 완충용액(10mM Tris, pH 8.0, 0.1M NaCl, 1mM EDTA)에서 homogenization한 후 3000rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상등액을 penicillin과 streptomycin이 5배 농도로 들어있는 BSS에 넣고 4°C에서 24시간동안 배양한 다음 CHSE-214 cell에 접종하였다. 7-10일정도 관찰하면서 CPE가 나오는지를 관찰하였다. CPE가 관찰되는 경우 배양액을 취하여 다시 건강한 CHSE-214 cell에 접종하여 CPE를 확인하였다.

필요한 경우 바이러스를 순수분리 하였다. 바이러스에 감염된 세포 배양액을 3000rpm에서 원심분리하여 debris를 제거한 다음 상층액에 PEG 8000을 7% 농도로 첨가하였다. 4000rpm에서 20분간 원심분리한 다음 형성된 침전물을 TNE 완충용액에 재현탁 시켰다. 이를 sucrose gradient(25-60% continuous)상에서 25,000rpm으로 20시간, CsCl gradient(10-35%)상에서 30,000rpm으로 24시간의 연속적인 원심분리를 하여 바이러스를 순수 분리하였다.

3. ELISA

새로이 분리하는 바이러스의 혈청형을 분석하고 백신 처리한 어류에서의 항체 양을 측정하기 위하여 ELISA를 수행하였다. Coating buffer (0.5M carbonate-bicarbonate, pH 9.6)에 순수 분리된 바이러스를 1 μ g/ml 농도가 되도록 준비한 다음 ELISA용 96 well plate에 넣어 4°C에서 16시간 동안 coating하였다. Plate를 PBS로 씻은 후 1% BSA-PBS(1% BSA in PBS) 용액을 첨가하여 상온에서 1시간 동안 blocking 시켰다. Plate를 PBS-Tween 20(0.05% Tween 20 in PBS)으로 씻은 후 각 well에 적절하게 희석한 항체를 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. PBS-Tween을 사용하여 plate를 3번 씻은 후 alkaline phosphatase가 붙어 있는 secondary antibody를 첨가하였다. 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후 PBS-Tween으로 3번 씻고 기질(1mg of p-nitrophenyl phosphate/ml of 9.7% diethylamine, pH 9.8)을 넣었다. 상온에서 30분간 반응시킨 후 3M NaOH용액 50 μ l씩을 넣어 반응을 중지시킨 다음 405nm에서

OD값을 측정하였다.

4. Western blotting

바이러스 단백질을 E.coli에서 발현시킨 후 발현이 제대로 되는 지를 확인 할 목적으로, 그리고 transfection 한 후 바이러스 유전자의 발현이 잘되는 지를 확인 할 목적으로 Western blotting을 수행하였다. 단백질 시료들을 SDS-PAGE gel 상에서 전기영동을 한 후 다시 transfer buffer (25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM glycine, 20% methanol)를 사용하여 40 mA에서 16 시간동안 전기영동 함으로서 gel에 있는 단백질 band를 nitro cellulose (NC) paper에 옮긴다. NC paper를 PBS로 washing한후 1% PBS-BSA 용액에 1 시간동안 담가 두어 blocking 시켰다. NC paper를 PBS-Tween 20 (0.05%)으로 적당히 희석시킨 anti-viral protien 항체와 상온에서 2시간동안 반응 킨다. PBS-Tween으로 NC paper를 washing한후 alkaline phosphatase가 붙어 있는 secondary antibody와 상온에서 2 시간동안 반응시켰다. PBS-Tween으로 washing한 다음 BCIP/NBT phosphatase substrate (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate sodium salt 0.15 mg/ml, p-nitro blue tetrazolium chloride 0.3 mg/ml in carbonate buffer (0.1 M NaHCO₃, 1mM MgCl₂, pH 9.8))를 첨가하였다. 상온에서 15분 동안 발색시킨 후 증류수로 washing하여 반응을 중지시켰다.

5. Northern blotting

Transfection 한 세포에서 유전자가 발현되는 지를 확인하기 위하여, DNA 백신 처리 후 유전자가 발현되는 지를 확인하기 위하여 Northern blotting을 수행하였다. 세포 시료에서 4M guanidine thiocyanate를 사용한 방법으로 total RNA를 추출하였다. Total RNA 20 µg을 65℃에서 5분간 반응시켜 denature 시킨 다음 3% formaldehyde가 첨가된 1% agarose gel에 전기영동을 하였다. Gel을 EtBr로 염색하여 rRNA의 양 및 상태를 확인한 다음 nitrocellulose membrane에 capillary blot방법으로 transfer하였다. Membrane을 prehybridization 용액 (5 X SSC, 45 % formamide, 0.5 % SDS, 3 X Denhardt's solution)을 사용하여 42 ℃에서 16시간동안 prehybridize 시켰다. 이 용액에 ³²P 로 label된 probe (1x10⁶/ml)를 첨가한 후 42 ℃에서 24 시간동안 hybridization시켰다. Membrane을 2x SSC용액으로 상온에서 5분간 2회 세척, 그리고 0.1 % SDS가 포함된 2 x SSC로 상온에서 5분간 2회를 세척한 다음 X-ray film에 감광시켰다.

6. RT-PCR

새로이 분리되는 바이러스의 typing 목적과 바이러스 유전자를 세포에 transfection 한 후 발현을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 먼저 RT-PCR에 사용할 primer는 대상 유전자의 염기서열로부터 DNA oligomer를 사용하였다. 실험에 사용할 세포들로부터 mRNA를 추출한 다음 oligo-dT와 Moloney Murine leukemia virus reverse transcriptase를 사용하여

cDNA를 합성하였다. 이와 같이 준비된 cDNA를 template로 하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.0% agarose gel에서 전기영동을 걸어 확인하였다. 그리고 필요에 따라 PCR 산물을 pGEMt vector에 cloning 한 다음 그 염기서열을 확인하였다.

7. 바이러스 구조 단백질 유전자의 subcloning

현재 우리나라에서 분리된 IPNV와 IHNV의 모든 유전자를 cloning하여 놓은 상태이다. 또한 IPNV의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1 유전자들을 mammalian expression vector인 pIRES와 prokaryotic expression vector인 pET11b에 subcloning 하였으며 각각의 clone들을 연어세포주인 CHSE-214와 대장균에서 발현을 확인하였다. pIRES에 subcloning한 것은 DNA 백신으로 사용하고, pET11b에 subcloning하여 발현된 재조합 단백질은 단백질 백신으로 사용하였다.

8. Combination 백신 준비

IPNV 유전자중 백신 효과가 가장 좋은 것, 그리고 IHNV 중 백신 효과가 가장 좋은 것을 fusion 시켜 IPNV-IHNV combination 백신을 제조하였다. Combination 백신을 prokaryotic 및 eukaryotic system에서 발현시킨 후 단백질 백신 및 DNA 백신을 제조하였다.

9. Cytokines 및 hormone 유전자 cloning

백신의 효과를 증가시키기 위한 목적으로 murine의 GM-CSF, chum salmon의 growth hormone과 somatolactin 등의 유전자를 cloning하여 백신과 같이 처리하였다. 기존에 보고된 논문들을 바탕으로 이들 유전자들에 대한 PCR primer 들을 제작하였다. 무지개 송어 및 연어에서 제작한 cDNA를 template로 하여 PCR을 수행한 후 pGEMt vector에 cloning하였다.

이와같이 cloning한 cytokine 및 hormone들을 단백질 백신 혹은 DNA 백신과 같이 혼합하여 처리를 하였다.

10. Transfection을 통한 발현 확인

DNA 백신용으로 mammalian expression vector인 pcDNA에 subcloning한 IPNV 및 IHNV 유전자들 그리고 cytokine 및 hormone 들이 제대로 발현되는 지를 확인하기 위하여 CHSE-214 cell에 transfection 한 후 발현을 확인하였다. 원하는 유전자들이 subcloning된 pcDNA 3.1을 FuGENE™ 6 Transfection Reagent를 사용하여 CHSE-214 cell에 transfection 시켰다. 그 후 각각의 유전자에 대한 PCR primer를 사용한 RT-PCR, 그리고 각 단백질에 대한 항체를 사용한 Western blotting을 수행하여 각각 유전자가 발현되는 지를 확인하였다.

11. Vaccination

백신 투여는 2가지 방법을 사용하여 수행하였다.

첫째, 백신을 주사하거나 (injection),

둘째, 양식수에 단백질을 풀어 침잠 시켰다 (immersion).

두가지 방법들 중 백신의 투여 방법은 백신의 종류, 어류의 나이 및 크기에 따라 달리하였다.

DNA 백신의 경우 친어에 주사 방법을 사용하여 백신 투여하였다. 양식어를 0.04% 2-phenoxyethanol 용액으로 마취시킨 후 10-100ng의 DNA 백신을 근육에 주사하였다. 이때, GM-CSF, hormone 등의 유전자들도 같이 주사하여 백신 효과를 확인하였다.

단백질 백신의 경우 부화 초기의 치어는 아직 먹이를 먹지 않기 때문에 침잠법으로 백신 처리하였다. 바이러스 단백질을 풀어놓은 용기에 치어를 1-2분 정도 담가 놓음으로 백신 처리를 하였다.

친어 및 성어의 경우 주사 방법을 사용하거나 사료에 단백질 백신을 섞은 후 양식어에 투여하여 먹게 함으로써 백신 처리를 하였다. 주사 방법을 사용하는 경우 adjuvant로써 light oil, β -glucan, aluminum phosphate 등을 adjuvant로 사용하거나 GM-CSF, hormone 등을 같이 처리하였다.

12. Neutralization 실험

양식어에서 새로 분리하는 바이러스의 혈청형을 분석하고 백신 처리한 어류에 항체가 형성되었는지 분석하기 위하여 중화실험을 수행하였다. 중화실험은 Okamoto 등(1983)의 방법에 따라 행하였다. 혈청이 첨가되지 않은 MEM을 사용하여 항혈청을 1/2씩 연속적으로 희석한 다음 96 multiwell plate에 0.05ml씩 넣었다. 얼리지 않은, 새로 준비된 바이러스를 100 TCID₅₀/0.05ml의 농도로 희석시킨 후 항혈청이 들어 있는 multiwell plate에 0.05ml씩 넣고 20°C에서 1시간 동안 흔들며 반응시켰다.

CHSE-214세포를 MEM-10용액으로 1×10^5 cells/ml 농도가 되도록 희석한 후 각 well에 0.1ml씩 넣고 18°C에서 7일간 배양하며 CPE를 관찰하였다. 항혈청의 중화역가는 (ND₅₀/0.05ml) 접종된 세포의 50%를 바이러스로부터 보호하는 항혈청 희석치의 역수로부터 구하였다.

13. 백신효과 측정

백신 처리후 일정 수의 양식어를 취하여 RT-PCR, Northern blotting, 바이러스 중화실험, ELISA를 사용한 항체가 측정 등을 통하여 백신 처리가 잘 되었는지를 확인하였다. 그리고 백신처리 후 1month 그리고 2 month 되는 때에 live virus를 침잠법으로 감염시켰다. 그 후 body weight, cumulative mortality를 조사하였다.

제 2 절 연구 내용

1. IPNV 및 IHNV 유전자에 대한 효과적인 DNA 백신 확인

- IPNV의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1의 DNA 백신을 제조하였음
- 이들 유전자들을 각각 단독으로 혹은 여러 조합으로 구성하여 다음과 같은 내용의 연구를 수행하였음
 - ▶ IPNV의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1의 DNA 백신을 각각 단독, 혹은 여러 조합으로 친어에 주사 하였음
 - ▶ DNA 백신을 주사한 친어의 혈청, 난액, 알 등을 대상으로 바이러스에 대한 항체 양을 분석하였음 (ELISA법 및 바이러스 중화실험 사용)
 - ▶ DNA 백신 처리한 친어에서 얻어진 치어의 난황속의 바이러스에 대한 항체 양을 분석하였음 (ELISA법 사용)
 - ▶ 바이러스 감염 후 폐사율 분석

2. IPNV 및 IHNV의 combination DNA 백신 확인:

- IPNV의 VP2중 중화 epitope를 지니는 부분과 VP3의 전체를 하나로 연결하여 VP2-VP3와 같은 형태의 fusion gene을 만들었음
- IHNV의 G중 중화 epitope를 지니는 부분과 G의 전체를 하나로 연결하여 G-M1과 같은 형태의 fusion gene으로 만들었음
- 이와 같이 제조한 VP2-VP3 및 G-M1 fusion gene들을 dual expression vector인 pIRES에 subcloning하여 하나의 vector안에 IPNV의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1의 유전자가 모두 들어있는 combination DNA 백신 제조하였음
- 이와 같이 제조한 IPNV-IHNV combination DNA 백신을 CHSE-214 연어 세포주에 transfection하여 IPNV의 VP2-VP3, 그리고 IHNV의 G-M1 fusion gene이 발현됨을 확인하였음
- 제조한 IPNV-IHNV combination DNA 백신을 친어의 근육에 주사한 후 IPNV의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1 모두에 대한 항체가 생성되고 또한 이 항체가 IPNV 및 IHNV의 감염성을 중화시킴을 확인하였음
- IPNV-IHNV combination DNA 백신을 주사한 친어에서 나온 알의 난황에 IPNV 및 IHNV에 대한 항체가 전달됨을 확인하였음

3. Immunostimulant를 사용한 DNA 백신의 효과 증대:

- pIRES mammalian expression vector에 murine GM-CSF, chum salmon의 GH 및 somatolactin cloning 하였음

- 연어세포주인 CHSE-214에서 발현을 확인하였음
- IPNV의 VP2-VP3 fusion gene 혹은 IHNV의 G-M1 fusion gene에 cytokine gene을 첨가하여 백신 효과 확인결과 GM-CSF의 면역증강효과가 가장 좋음을 확인하였음

4. IPNV 및 IHNV 유전자에 대한 효과적인 단백질 백신 확인

- IPNV의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1 등의 재조합 단백질들을 제조하였음
- 이들을 단독 혹은 여러 조합으로 구성하여 다음과 같은 내용의 연구를 수행하였음
 - ▶ IPNV의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1의 재조합 단백질 백신을 각각 단독, 혹은 여러 조합으로 치어에 침잠 투여하였음
 - ▶ IPNV의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1의 재조합 단백질 백신을 각각 단독, 혹은 여러 조합으로 성어에 주사 혹은 침잠 투여하였음
 - ▶ 치어 및 성어의 혈청을 대상으로 바이러스에 대한 항체 양을 분석하였음 (ELISA법 및 바이러스 중화실험 사용)
 - ▶ 바이러스 감염 후 폐사율을 분석하였음

5. IPNV 및 IHNV의 combination 단백질 백신 확인:

- DNA 백신 제조 방법과 같이 IPNV의 VP2중 중화 epitope를 지니는 부분과 VP3의 전체를 하나로 연결하여 VP2-VP3와 같은 형태의 fusion gene을 만들었음
- 이와같이 제조한 VP2-VP3 fusion gene을 pET28a expression vector에 subcloning 한 다음 E.coli BL21에서 발현시켜 VP2-VP3 recombinant fusion protein을 만들었음
- 역시 IHNV의 G중 중화 epitope를 지니는 부분과 G의 전체를 하나로 연결하여 G-M1과 같은 형태의 fusion gene으로 만들었음
- 이와 같이 제조한 G-M1 fusion gene을 pET28a expression vector에 subcloning 한 다음 E.coli BL21에서 발현 시켜 G-M1 recombinant fusion protein을 만들었음
- 제조한 IPNV의 VP2-VP3 combination 단백질 백신 및 IHNV G-M1 combination 단백질 백신을 성어의 복강에 주사한 후 IPNV의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1 모두에 대한 항체가 생성되고 또한 이 항체가 IPNV 및 IHNV의 감염성을 중화시킴을 확인하였음

6. Immunostimulant를 사용한 단백질 백신의 효과 증대:

- IPNV의 VP2-VP3 그리고 IHNV의 G-M1 fusion 하여 제조한 재조합 단백질 백신에 light oil (oil-in-water 및 water-in-oil), β -glucan, aluminum hydroxide 등의 adjuvant를 첨가하여 제조하였음
- IPNV 및 IHNV의 재조합 단백질 백신에 여러 종류의 adjuvant들을 첨가하여 백신효과를 분석한 결과 light oil (oil in water 및 water in oil)의 면역증강 효과가 가장 좋음을 확인하였음

7. 무지개송어 양식장에서의 IPNV 및 IHNV 분포 조사 및 type 확인

- 강원도, 경북, 경남의 무지개송어 양어장 7개소를 대상으로 월별로 시료를 채집하여 다음과 같은 연구를 수행함으로써 IPNV 및 IHNV의 감염 여부를 확인하였음
 - ▶ 세포주에 접종하여 바이러스 존재 유무를 확인하였음
 - ▶ RT-PCR을 사용하여 바이러스를 재확인하였음
 - ▶ 분리 바이러스에 대한 유전자 cloning을 하여 바이러스의 type을 분석.

8. 세포 배양 및 RT-PCR을 통한 바이러스의 분포 확인

- 강원도 경북, 경남의 양식장을 대상으로 월별 시료를 채취하여 IPNV 및 IHNV의 분포를 확인하였음
- 각각의 시료들을 CHSE-214와 EPC 세포주에 접종하여 CPE를 확인하였으며 IPNV 및 IHNV 각각에 specific한 PCR primer를 사용하여 RT-PCR을 수행하여 IPNV 및 IHNV 임을 확인하였음
- 무지개송어 양어장 7개소 중 6개소에서 IPNV 또는 IHNV가 감염되어 있음을 확인하였음

9. PCR cloning 및 염기서열 분석을 통한 IPNV 및 IHNV type을 확인

- 분리한 바이러스 유전자들의 PCR cloning 및 염기서열 분석을 통한 바이러스 type 확인하였음
- 우리나라의 무지개송어 양식장들에서의 바이러스 질병 발생 현황을 분석하였고, IPNV 및 IHNV의 typing 함으로써 역학 분석을 수행하였음

제 3 절 연구결과

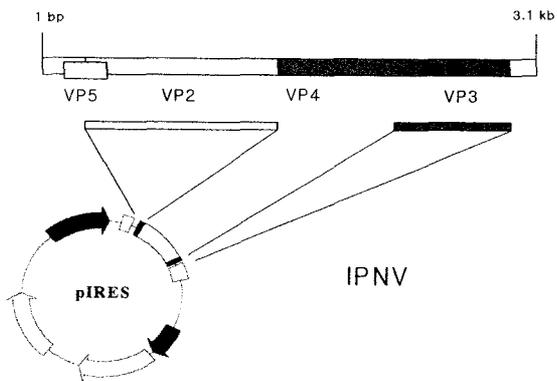
1. IPNV 및 IHNV의 DNA 백신 제조

IPNV-VR299 serotype의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1 등에 대한 유전자들의 full-length를 cloning 한 후 mammalian expression vector중 dual vector인 pIRES vector에 subcloning 하였다 (Fig. 3). pIRES vector는 두개의 유전자를 동시에 발현 할 수 있는 vector 로써, Table 2에서와 같이 하나의 vector에 하나의 유전자만을 넣거나 2개의 유전자를 동시에 넣는, 여러 가지 조합으로 subcloning하였다

Table 2. Preparation of DNA vaccine by suncloning of IPNV-VP2, VP3 and/or IHNV-G, M1 gene into pIRES mammalian expression dual vector

DNA vaccines	Viral genes	cloning site
IPNVP2-DNA-Vac	IPNV VP2	A
IPNVP3-DNA-Vac	IPNV VP3	B
IPNVP23-DNA-Vac	IPNV VP2와 VP3	A, VP2; B, VP3
IHNG-DNA-Vac	IHNV G	A
IHNM1-DNA-Vac	IHNV M1	B
IHNGM1-DNA-Vac	IHNV G와 M1	A, G; B, M1

A.



B.

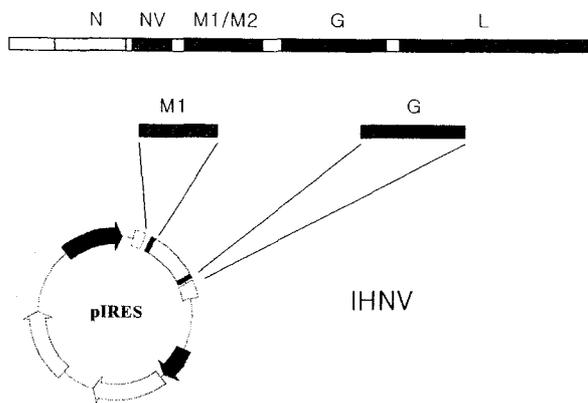


Fig. 3. Subcloning of viral genes into pIRES mammalian expression dual vector. A subcloning of IPNV-VP2 and VP3; B, subcloning of IHN V-G and M1.

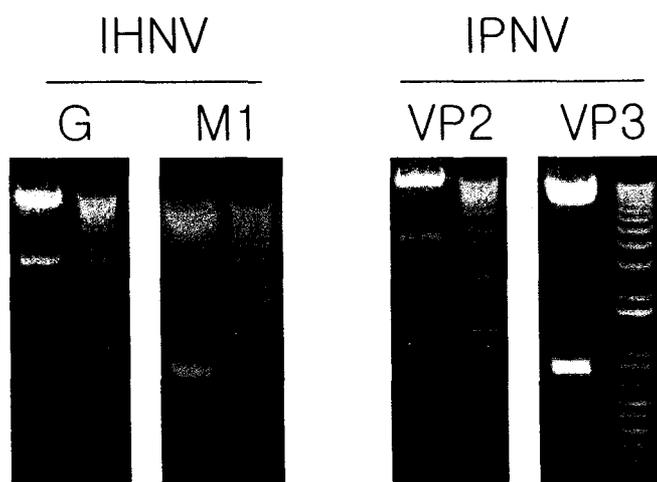


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of pIRES clones. Full-length cDNAs of IPNV-VP2/VP3 and IHNV-G/M1 were subcloned into pIRES dual vector. Each inserts were cut using restriction enzymes and were confirmed by agarose gel electrophoresis.

이와 같이 준비한 각각의 clone들에 IPNV 및 IHNV의 유전자들이 들어있는지를 확인하기 위하여 제한효소로 잘랐다. 이때 IPNV-VP2는 *NheI-MluI*, IPNV-VP3는 *XbaI-NotI*, IHNV G는 *SaII-NotI*, IHNV-M1은 *XhoI-SaII* 등의 제한효소로 잘른 후 agarose gel에 전기영동을 하여 각각의 gene들을 확인 하였다. 그 결과 Fig. 4에서와 같이 모든 바이러스 유전자들이 pIRES dual vector에 들어가 있음이 확인되었다.

다음으로 각 clone들이 실제 단백질을 합성할 수 있는지를 in vitro translation system을 사용하여 확인하였다. 즉 SP6 promoter를 사용하여 mRNA를 in vitro transcription 한 다음 reticulocyte lysate를 사용하여 in vitro translation을 수행하였다. 이때 새로이 합성되는 단백질 만을 확인하기 위하여 ³⁵S-methionine을 첨가하였다. 합성된 단백질을 SDS-PAGE로 전기영동하여 분리한 다음 X-ray film으로 확인하였다. 그 결과 Fig. 5에서와 같이 모든 유전자들이 단백질을 합성함이 확인되었다. 그리고 실제 이들 유전자들이 세포에 들어가서 발현하는 지를 확인하기 위하여 연어 세포인 CHSE-214에 transfection 한 다음 RT-PCR을 통하여 확인하였다. 그 결과 모든 유전자들이 CHSE-214 세포에서 정상적으로 발현함을 확인 할 수 있었다 (data not shown).

이상의 결과를 바탕으로 IPNV-VP2 및 VP3 그리고 IHNV-G 및 M1의 DNA 백신이 준비되었음을 확인한 다음 각각의 clone들의 DNA를 Endo-free Giga Prep kit (Qiagen)를 사용하여 대량으로 추출하여 이후 무지개송어에 접종할 DNA 백신으로 사용하였다.

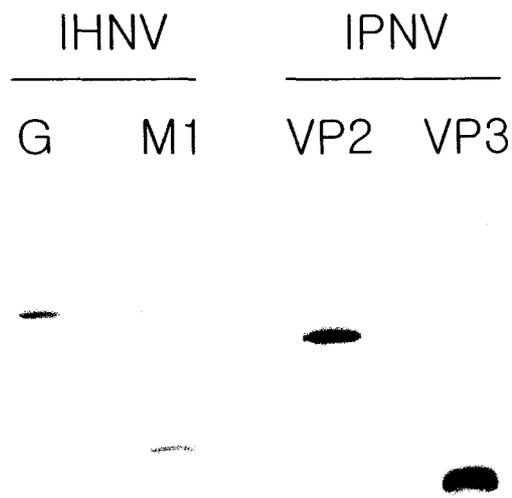


Fig. 5. SDS-PAGE of in vitro translation product of viral genes

2. 친어에 IPNV 및 IHNV DNA 백신 투여

바이러스에 의한 양식 어류의 대량폐사에 있어서 가장 중요한 시기는 부화 후 1개월 전후이다. 이 시기는 아직까지 자체 면역체계가 완전히 분화되지 않았기 때문에 바이러스의 감염에 의한 대량 폐사가 빈번하게 발생한다. 바이러스 감염 후 살아남은 어류도 바이러스의 잠복 상태가 유지되기 때문에 성장이 느릴 뿐 아니라 이후 생리 변화 및 사육 환경의 변화에 따라 바이러스 질병이 언제든지 재발할 가능성이 있다. 따라서 부화 후 1개월 전후의 시기에 바이러스 감염을 예방하는 것이 바이러스에 의한 양식 어류의 폐사를 막는 핵심 사항이다. 이의 한 방법으로 친어에 DNA 백신을 주사하여 바이러스에 대한 항체를 유도한 다음 이것이 난황을 통하여 치어에 전달되어 치어기의 폐사를 막는 개념의 백신을 시도하였다. 이와 같은 idea가 가능할 것으로 판단한 근거는 다음과 같은 3가지이었다.

첫째, 부화 초기 치어는 2-3주 동안 난황을 지니고 있음

둘째, 친어의 항체가 알을 통하여 치어에 전달이 된다는 보고 (Oshima et al., 1996)

셋째, steelhead trout의 알에서 바이러스 (IHNV)에 대한 항체가 검출되었다는 보고 (Shors & Winton, 1989)

따라서 친어에 본 연구진이 제조한 IPNV 및 IHNV의 DNA 백신을 주사한 후 치어기의 폐사를 예방 할 수 있는지를 확인 하였다. 그리고 만약 친어에의 백신 처리가 치어기의 폐사를 예방한다면 IPNV의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1들 중 어떤 조합으로 백신 처리하였을 때 백신효과가 좋은지를 확인하였다. 기존 외국의 연구 결과에서는 IPNV의 경우 VP2, IHNV의 경우 G가 백신으로 효과가 좋다고 보고 되었었다. 그러나 본 연구진은 IPNV의 경우 VP2보다는 VP3, IHNV의 경우 G 보다는 M1이 백신 효과가 좋을 가능성이 높다는 연구 결과를 발표한 바 있다 (Park & Jeong, 1996; Lee et al., 1996; Ristow et al., 2000). 이를 확인하기 위하여 무지개송어 친어에 다음과 같은 조합의 DNA 백신을 주사하였다. 이때 DNA 백신 주사시 GM-CSF 유전자도 같이 주사하여 면역 증진 효과 여부를 확인 하였다.

Table 3. Rainbow trout groups vaccinated with different combination of IPNV and IHNV DNA vaccines

Vaccinated fish	IPNV	IHNV	GM-CSF
Group 1	-	-	-
Group 2	VP2	G	-
Group 3	VP2	G	o
Group 4	VP2+VP3	G+M1	-
Group 5	VP2+VP3	G+M1	o

3. 친어, 알 및 치어의 난황에 존재하는 바이러스에 대한 항체 양 분석

앞의 Table 3에서와 같이 서로 다른 조합의 DNA 백신을 주사한 5개 group들의 친어와 여기에서 나온 알, 그리고 이 알에서 부화한 치어의 난황에 존재하는 IPNV 및 IHNV에 대한 항체 역가를 분석하였다. 친어의 경우 채란 일정에 맞추어 채란 30일 전에 DNA 백신을 100ug each DNA vaccine/kg body weight 농도로 근육 주사를 하였다. 그리고 채란 시에 꼬리 정맥으로부터 채혈을 하여 항체를 분석하였다. 알은 채란시에 일부를 받은 후 Shors & Winton (1989)의 방법에 따라 항체를 추출 후 역가를 분석하였다. 부화 초기 치어의 난황에 존재하는 항체의 경우 부화 후 1주일 째 되는 치어로부터 난황을 수집하여 역시 Shors & Winton (1989)의 방법을 사용하여 항체 역가를 분석하였다. 항체 양의 분석은 ELISA와 중화 실험을 사용하여 수행하였다. ELISA의 경우 각 바이러스의 재조합 단백질을 coating 한 다음 여기에 연속적으로 희석한 무지개송어 혈청을 첨가하고 이어서 토끼에서 제작한 무지개송어 IgM에 대한 항체, alkaline phosphatase에 부착된 goat anti-rabbit IgG, 마지막으로 기질을 첨가함으로써 수행하였다. 중화 실험은 항체를 연속적으로 희석한 다음 각 희석된 항체와 바이러스 100 TCID₅₀를 섞어 반응 시킨 다음 이 바이러스를 중화할 수 있는 항체의 최대 희석치의 역수로부터 중화 역가를 분석하였다. 그 결과 Table 4에서와 같았다. ELISA의 결과 각 바이러스 단백질들에 대한 총 항체양을 확인 할 수 있었는데, IPNV의 VP3가 VP2보다 10배 정도 더 많은 양의 항체 생산을 유도함을 확인 할 수 있었고 또한 IHNV의 M1이 G보다 5-6배 많은 양의 항체를 생산할 수 있음을 확인 할 수 있었다. 이 결과는 기존의 본 연구진의 연구 결과와 일치하는 것이었다. 또한 중화 실험 결과에서도 IPNV의 VP2, 그리고 IHNV의 G만 포함하는 DNA 백신 보다는 IPNV-VP2/VP3, 그리고 IHNV-G/M1을 포함하는 DNA 백신을 처리한 무지개송어의 혈청에 중화 항체가 더 높았다. 그리고 GM-CSF를 adjuvant로 첨가하였을 때 항체 생성 양이 증가하였다. 따라서 이 모든 결과를 종합하였을 때 IPNV-VP2/VP3, IHNV-G/M1 그리고 GM-CSF를 포함하는 DNA 백신처리시 최상의 백신 효과가 나타남을 확인 할 수 있었다.

다음으로 친어에 형성된 항체가 알 및 치어의 난황에 전달이 되는 지를 확인하여 보았다. 백신으로써 IPNV-VP2/VP3, IHNV-G/M1, 그리고 GM-CSF 모두를 포함하는 DNA 백신을 주사 후 친어, 알 그리고 치어의 난황에 존재하는 바이러스에 대한 항체의 양의 변화를 ELISA로 분석하였다. 그 결과 Fig. 6에서와 같았는데, 비록 친어의 혈청에 존재하는 항체의 양보다는 많이 적지만 알 및 치어의 난황에도 IPNV-VP2, 및 VP3, 그리고 IHNV-G 및 M1에 대한 항체들이 존재하였다. 알 및 부화 초기의 치어에는 활성화된 자체 면역체계가 없기 때문에 항체를 만들 수 없음을 감안하면 이들 알 및 치어의 난황에 존재하는 항체들은 친어의 항체가 전달된 것임으로 추측된다.

Table 4. Anti-IPNV and anti-IHNV antibody titers in the sera from DNA vaccinated rainbow trout mother fish

Vaccinated groups	ELISA titer				Neutralization titer	
	Anti-IPNV		Anti-IHNV		Anti-IPNV	Anti-IHNV
	anti-VP2	Anti-VP3	Anti-G	Anti-M1		
Group 1 (none)	100	100	200	200	50	50
	100	200	200	200	50	50
	100	200	200	400	50	50
	200	200	200	400	100	50
	200	200	400	400	100	100
Group 2 (IPNV-VP2 + IHNV-G)	6,400	400	3,200	200	3,200	8,00
	6,400	400	3,200	200	3,200	8,00
	12,800	400	6,400	400	6,400	1,600
	25,600	800	6,400	400	6,400	1,600
	25,600	800	12,800	800	12,800	3,200
Group 3 (IPNV-VP2 + IHNV-G + GM-CSF)	3,200	400	3,200	200	3,200	8,00
	12,800	800	6,400	400	6,400	1,600
	25,600	800	12,800	800	12,800	3,200
	25,600	800	12,800	800	12,800	3,200
	25,600	1,600	12,800	800	25,600	3,200
Group 4 (IPNV-VP2/VP3 + IHNV-G/M1)	3,200	25,600	3,200	6,400	12,800	1,600
	3,200	51,200	3,200	12,800	12,800	3,200
	6,400	102,400	3,200	12,800	25,600	6,400
	6,400	102,400	6,400	25,600	51,200	6,400
	12,800	204,800	6,400	51,200	51,200	12,800
Group 5 (IPNV-VP2/VP3 + IHNV-G/M1 + GM-CSF)	6,400	25,600	3,200	12,800	25,600	3,200
	6,400	102,400	6,400	12,800	25,600	6,400
	12,800	102,400	6,400	25,600	51,200	12,800
	12,800	204,800	12,800	51,200	51,200	12,800
	25,600	204,800	12,800	51,200	51,200	12,800

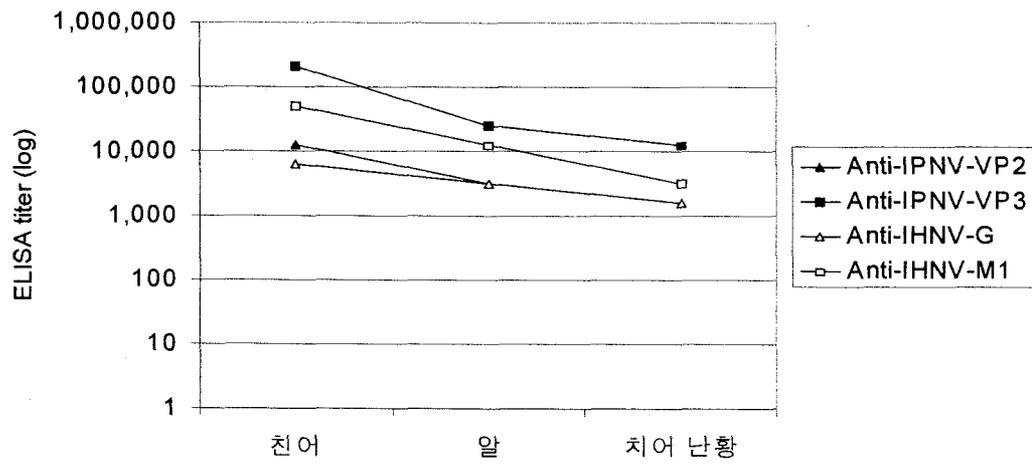


Fig. 6. ELISA titers of anti-IPNV and anti-IHNV antibody in the sera of mother fish, egg yolk of egg, and egg yolk of fry.

4. 치어의 폐사율 분석

백신 처리한 친어로부터 나온 치어가 바이러스 감염에 의한 폐사로부터 예방될 수 있는지를 확인 하였다. Table 3에서와 같이 서로 다른 조합의 DNA 백신을 처리한 친어로부터 채란한 다음 각 group의 알에서 부화한 치어를 대상으로 바이러스 감염에 의한 폐사를 관찰하였다. 그 결과 Fig. 7와 같았다. 백신처리하지 않은 group의 치어 경우 부화 후 15일 전후부터 폐사가 발생하기 시작하여 30일째에 총 90% 안팎의 폐사가 발생하였다. 폐사된 치어가 바이러스 감염에 의한 것인지를 확인하기 위하여 폐사된 조직에서 RNA를 추출하여 RT-PCR로 분석한 결과 IPNV 및 IHNV 모두가 검출되어 이들 바이러스의 복합 감염에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 이와 비교하였을 때 백신을 처리한 group들의 치어에서는 폐사율이 많이 감소하였는데, GM-CSF를 같이 처리한 group들에서 폐사율이 더 줄었으며, 특히 IPNV-VP2/VP3, IHNV-G/M1, GM-CSF 모두 들어있는 DNA 백신을 처리한 경우 30일 까지 거의 폐사가 발생하지 않았다. 이로부터 친어의 항체가 알을 통하여 부화 초기의 치어에 전달되어 바이러스 감염을 막음을 확인할 수 있었다. 그러나 30일 이후에는 모든 것을 포함하는 DNA 백신을 처리한 group 5의 치어에서도 폐사가 발생하여 20% 정도까지 폐사가 발생하였다. 이로부터 친어로부터 넘어온 항체에 의한 치어의 폐사는 난황이 완전하게 사라지고 나면 바이러스에 대한 면역력이 사라져 바이러스 감염에 취약한 시기가 됨을 알 수 있었다. 따라서 이 시기의 폐사를 막기 위해서는 난황이 사라지는 시기 즈음에 치어에 백신을 다시 처리하여 면역력을 증가시킬 필요가 있다.

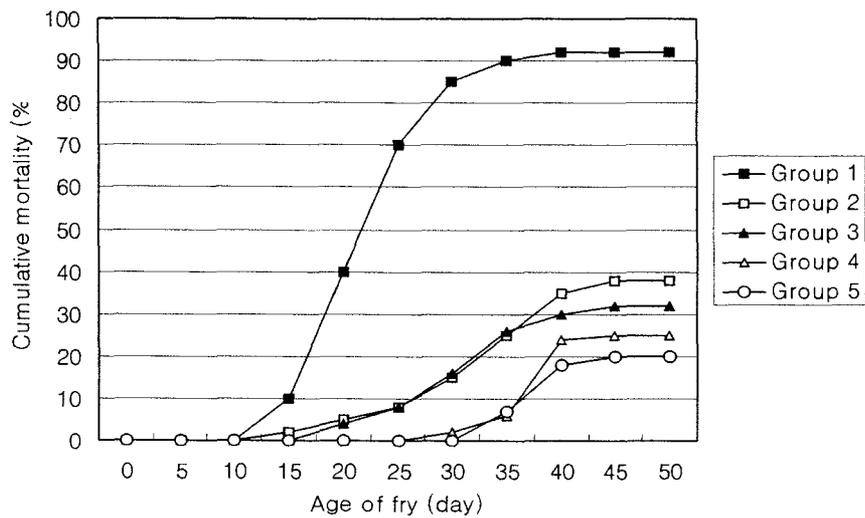


Fig. 7. Cumulative mortality of rainbow trout fry. Group 1, fry from non-vaccinated fish; group 2, fry from fish vaccinated with IPNV-VP2 and IHNV-G; group 3, fry from fish vaccinated with IPNV-VP2, IHNV-G, and GM-CSF; group 4, fry from fish vaccinated with IPNV-VP2/VP3, IHNV-G/M1; group 5, fry from fish vaccinated with IPNV-VP2/VP3, IHNV-G/M1, and GM-CSF.

5. IPNV 및 IHNV의 단백질 백신 제조

IPNV-VR299 serotype의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1 등에 대한 유전자들의 full-length를 cloning 한 후 prokaryotic expression vector인 pET29a에 다음과 같이 subcloning하였다

Protein 백신	바이러스 유전자	비고
IPNVP2-Protein-Vac	IPNV VP2	
IPNVP3-Protein-Vac	IPNV VP3	
IHNG-Protein-Vac	IHNV G	
IHNM1-Protein-Vac	IHNV M1	

이 clone들을 E.coli BL21에 transformation 시킨 후 단백질 발현 여부를 확인 한 결과 IPNV VP3, IHNV G, IHNV M1은 다량으로 발현됨을 확인 하여 이들을 순수 분리하여 재조합 단백질 백신으로 사용하였다 (Fig. 8 & 10). 그러나 IPNV VP2의 경우 전체를 transformation 시킨 E.coli가 죽어서 단백질 발현에 성공하지 못하였다. 따라서 IPNV VP2의 경우에는 기존에 보고된 연구 결과를 바탕으로 중화 epitope를 지니는 부분만을 포함하는 deletion mutant를 만든 후 이를 E.coli에서 발현 시켰다. 즉 Frost 등 (1995)과 Liao & Dobos (1995)의 연구 결과에 따르면 IPNV의 VP2의 453 amino acid 잔기 중에서 153-330 aa 부분에 중화 epitope들이 있음이 확인 되었다. 따라서 이들을 포함하는 147-355 부분으로 구성된 deletion mutant를 제조한 다음 (Fig. 9) 이를 E.coli에서 다량발현에 성공하여 이것을 재조합 단백질 백신 실험에 사용하였다 (Fig. 10).

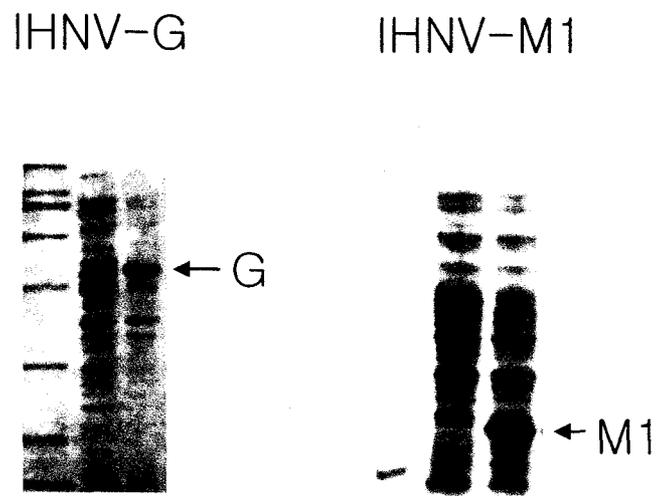


Fig. 8. Expression of recombinant proteins of IHNV-G and M1

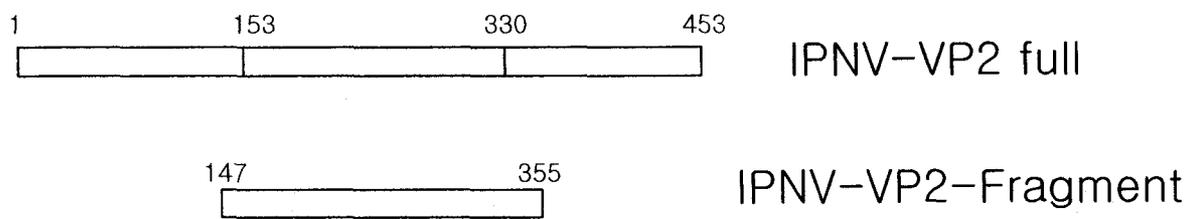


Fig. 9. Deletion mutant of IPNV-VP2

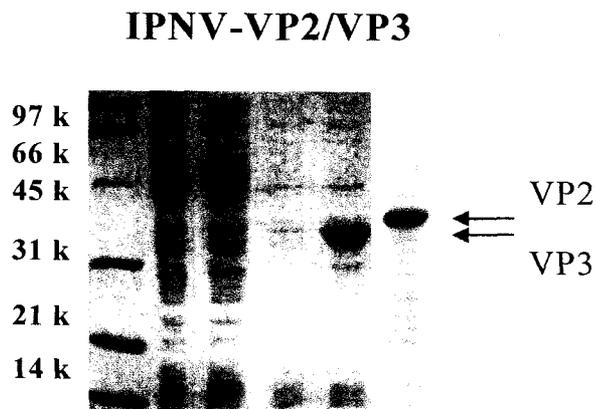


Fig. 10. Expression of recombinant proteins of IPNV-VP2-fragment and VP3

6. 치어의 단백질 백신 효과실험

앞의 연구 결과에 따르면 IPNV-VP2/VP3, IHNV-G/M1 그리고 GM-CSF 모두를 포함한 DNA 백신을 처리한 친어로부터 나온 치어의 경우 난황에 친어의 항체가 어느 정도 남아있는, 부화 후 30일 정도까지는 치어에 폐사가 거의 발생하지 않았다. 그러나 난황이 완전히 사라지는, 부화 후 30일 이후부터는 폐사가 발생하여 부화 후 50일 정도에 약 20% 정도의 누적폐사율이 발생하였다. 따라서 부화 후 30일 이후에 발생하는 폐사를 막고자 부화 후 20일 정도의 치어에 IPNV-VP2/VP3 및 IHNV-G/M1의 재조합 단백질을 침잠법으로 처리하였다. 재조합 단백질은 100ng each protein/g body weight의 농도로 처리하였으며 이후 부화 후 60일 까지 바이러스 감염에 의한 치어의 폐사를 분석한 결과 Fig. 11과 같았다. 즉, 앞의 결과에서와 같이, DNA 백신을 주사한 친어에서 나온 치어는 (V-1과 V-2)는 약 25-30% 정도의 누적폐사율을 보였다. 반면에 DNA 백신 처리한 친어에서 나온 치어에 재조합 단백질 백신을 추가로 처리한 치어의 경우 (VT-1과 VT-2) 부화 후 60일 까지 5% 미만 (1-2%정도)의 누적폐사율을 보였다. 그러나 친어에 DNA 백신을 처리하지 않고 치어에 단백질 백신만을 처리한 경우 (T-1과 T-2) 80% 안팎의 누적폐사율을 보여 백신효과가 거의 보이지 않음을 확인할 수 있었다. 이 결과로부터 부화 초기의 치어 폐사를 예방하기 위하여는 친어에의 DNA 백신 처리와 치어에 단백질 백신 처리 모두가 필요한 것으로 판단되며 이중 친어에의 DNA 백신 처리 효과가 폐사 예방에 매우 중요함을 확인할 수 있었다.

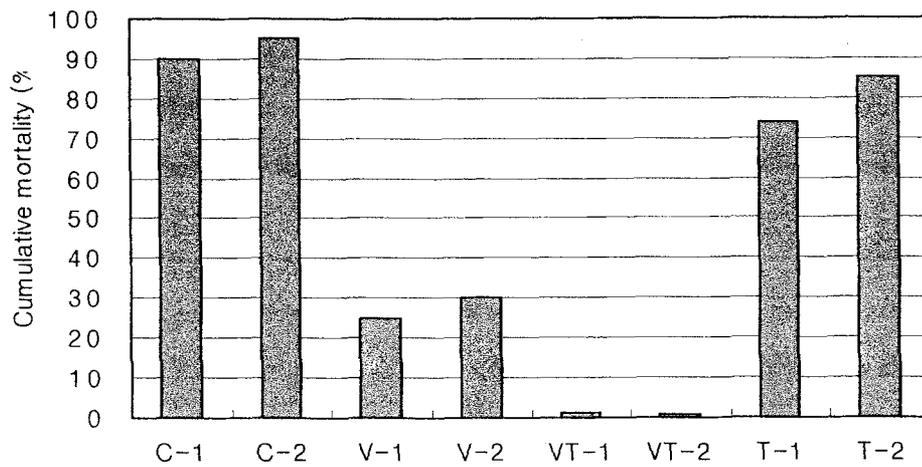


Fig. 11. Cumulative mortality of rainbow trout fry. C, non-vaccinated group; V, DNA vaccine treated group; VT, DNA vaccine + recombinant protein vaccine; T, recombinant protein vaccine treated group.

7. 자어 (fingering)의 단백질 백신효과

자어는 이후 상품화가 될 것이기 때문에 DNA 백신을 처리하지 않고 단백질 백신을 처리하였다. 제조합 단백질 백신인 IPNV-VP2, VP3, 그리고 IHNV-G, IHNV-M1들을 Table 5와 같은 조합으로 침잠 및 주사방법으로 백신 처리하였다.

제조합 단백질 백신을 30일 간격으로 2회 백신 처리하고, 마지막 백신 처리한 30일 후에 꼬리정맥에서 채혈을 하여 혈청 내 항체 역가를 ELISA 및 바이러스 중화 실험 등으로 측정하였다. 그 결과 Table 6과 7에서와 같았는데, 주사방법이나 침잠 방법 모두 무지개송어의 면역체계를 활성화 시켜 IPNV-VP2, VP3 그리고 IHNV-G, M1 등에 대한 항체 생성을 유도하였다. 그러나 전반적으로 침잠 방법을 사용하여 백신 처리하였을 때보다 주사 방법을 사용하여 백신 처리하였을 때가 항체가 훨씬 더 높게 나왔다. 특히 IPNV의 경우 외국에서 백신 target으로 삼고 있는 VP2 보다 본 연구진이 더 좋은 백신 target으로 주장하고 있는 VP3가 더 높은 titer (ELISA titer)의 항체 생성을 유도하였다. 그리고 IHNV의 경우 역시 외국에서 백신 target으로 삼고 있는 G보다 M1이 더 높은 titer (ELISA titer)의 항체 생성을 유도하였다. 이 결과로부터 기존에 외국에서 개발된 혹은 개발 진행 중인 IPNV 및 IHNV 백신에 본 연구진이 제시하는 IPNV-VP3 및 IHNV-M1을 첨가하는 경우, 효과가 더 좋은 백신의 개발이 가능함을 알 수 있었다.

Table 5. Rainbow trout groups vaccinated with different combination of IPNV and IHNV DNA vaccines

Group	재조합 단백질 백신	비고
1	IPNV-VP2	
2	IPNV-VP3	
3	IPNV-VP2-3	
4	IHNV-G	
5	IHNV-M1	
6	IHNV-G-M1	
7	IPNV-VP2-3-IHNV-G-M1	
8	None	

Table 6. Anti-IPNV and anti-IHNV antibody titers in the sera from rainbow trout vaccinated with recombinant protein by injection methods

Vaccinated groups	ELISA titer				Neutralization titer	
	Anti-IPNV		Anti-IHNV		Anti-IPNV	Anti-IHNV
	anti-VP2	Anti-VP3	Anti-G	Anti-M1		
Group 1 (IPNV-VP2)	25,600	200	200	200	6,400	50
Group 2 (IPNV-VP3)	100	204,800	100	200	6,400	50
Group 3 (IPNV-VP2/VP3)	12,800	102,400	100	200	12,800	100
Group 4 (IHNV-G)	100	200	12,800	400	100	6,400
Group 5 (IHNV-M1)	100	100	100	51,200	100	3,200
Group 6 (IHNV-G/M1)	100	100	6,400	25,600	200	12,800
Group 7 (IPNV-VP2/VP3 + IHNV-G/M1)	12,800	204,800	6,400	25,600	12,800	12,800
Group 8 (None)	100	200	200	200	50	50

Table 7. Anti-IPNV and anti-IHNV antibody titers in the sera from rainbow trout vaccinated with recombinant protein by immersion methods

Vaccinated groups	ELISA titer				Neutralization titer	
	Anti-IPNV		Anti-IHNV		Anti-IPNV	Anti-IHNV
	anti-VP2	Anti-VP3	Anti-G	Anti-M1		
Group 1 (IPNV-VP2)	1,600	100	100	100	800	100
Group 2 (IPNV-VP3)	100	6,400	100	100	400	50
Group 3 (IPNV-VP2/VP3)	1,600	3,200	100	100	1,600	50
Group 4 (IHNV-G)	100	100	1,600	200	100	800
Group 5 (IHNV-M1)	100	200	200	1,600	100	800
Group 6 (IHNV-G/M1)	100	100	800	1,600	200	1,600
Group 7 (IPNV-VP2/VP3 + IHNV-G/M1)	1,600	3,200	800	1,600	1,600	800
Group 8 (None)	100	200	200	200	50	50

8. IPNV 및 IHNV의 fusion gene 제조

- 1차년도 연구 결과 IPNV의 경우 VP2와 VP3를 모두 포함하는 백신이 VP2만을 포함하는 백신에 비하여 효과가 좋음이 확인 되었고 IHNV의 경우 G와 M1을 모두 포함하는 백신이 G만을 포함하는 백신보다 효과가 좋음이 확인 되었다.
- 따라서 IPNV는 VP2와 VP3 모두를 지니는 백신을, 그리고 IHNV는 G와 M1 모두를 포함하는 백신을 개발하는 것이 필요하다는 결론을 얻었다.
- 이와 같은 결과는 IPNV의 경우 VP2보다는 VP3, IHNV의 경우 G 보다는 M1이 백신 효과가 좋을 가능성이 높다는 본 연구진의 이전의 연구 결과와 (Park & Jeong, 1996; Lee et al., 1996; Ristow et al., 2000) 일치하는 것이었다.
- 그런데, 이러한 백신이 효과가 좋더라도 제조단가가 비싼 경우에는 실용화가 어려운 상황이 된다.
- IPNV의 경우 노르웨이의 Intervet에서 VP2를 대상으로 하는 recombinant vaccine을 제조하여 판매하고 있다. 본 연구진의 연구 결과 VP2와 VP3를 같이 사용하면 효과가 더 좋음이 확인 되었는데, 효과가 좋더라도 VP2와 VP3를 각각 만들면 제조 비용이 2배가 되어 현장에의 적용에 어렵게 된다.
- IHNV는 아직 시판되는 제품이 없어서 IPNV와는 다른 경우가 되지만 비슷하게 백신 효과를 높이기 위하여 G와 M1을 각각 만드는 경우 역시 제조 단가가 2배가 되어 현장에의 적용에 어려움이 발생하게 된다.
- 따라서 본 연구의 2차 년도에서는 IPNV 및 IHNV의 제조 단가를 줄이는 방법으로써 IPNV의 VP2와 VP3를 하나의 단백질로 연결시킨 fusion protein을, 그리고 IHNV도 G와 M1을 하나의 단백질로 연결시킨 fusion protein을 제조함으로써 제조 단가를 반으로 줄이고자 한다.
- 이 과정 중 fusion protein의 크기가 너무 커지면 단백질의 발현 효율이 떨어질 수가 있다. 이를 막기 위하여 각 백신 대상 단백질들에 존재하는 중화 epitope를 포함하는 작은 fragment를 만들어 이를 사용한 fusion protein을 제조하였다.
- IPNV의 경우 VP3는 아직 중화 epitope에 대한 연구가 되어 있지 않다. 반면에 VP2는 즉 Frost 등 (1995)과 Liao & Dobos (1995)의 연구 결과 VP2의 453 amino acid 잔기 중에서 153-330 aa 부분에 중화 epitope들이 있음이 확인되었다. 따라서 이들을 포함하는 147-355 부분으로 구성된 fragment를 제조한 후 full length 의 VP3와 연결시켜 fusion gene을 제조하고자 하였다 (Fig. 12).

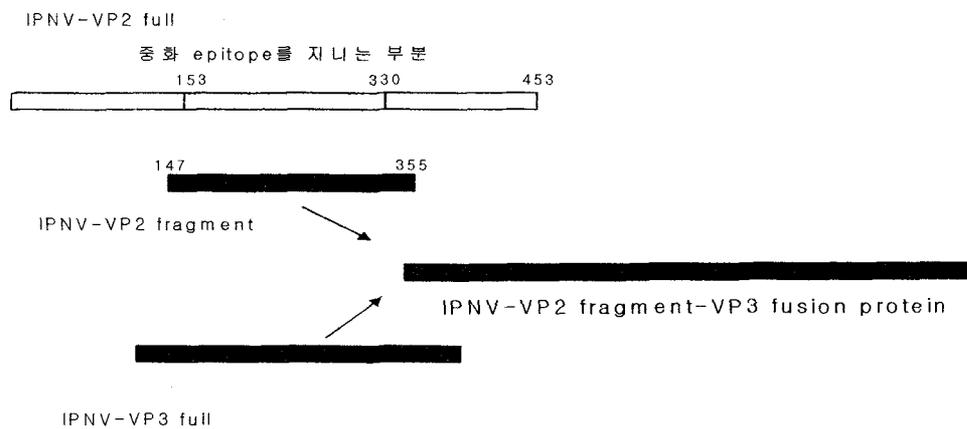


Fig. 12. Experimental protocol for the preparation of IPNV VP2-VP3 fusion gene

- 이를 위하여 먼저 PCR primer를 다음과 같이 제조하였다.
 VP2 (147-355)-Up: 5'-GCTAGCATGAACCCACAGGACAAGGTCAACAAT-3'
 VP2 (147-355)-Down: 5'-CACTAGGGTTATGGGTCT-3'
 VP3-Up: 5'-AGACCCATAACCCTAGTGATGGCCAGAGCAAAAGAAGTG-3'
 VP3-Down(for pIRES): 5'-GCGGCCGCTTACTTCTCCGTCATCGCCGGA-3'
 VP3-Down(for pET28a): 5'-ACGCGTGCTTACTTCTCCGTCATCGCCGGA-3'
- 이와같이 제조한 PCR primer를 사용하여 먼저 partial VP2와 full VP3를 각각 증폭시킨 다음 각 PCR product를 gel에서 elution 하였다. Elution한 각 PCR product들을 1:1 mole 농도로 섞은 후 이를 template로 하여 PCR을 수행하였다. 이때 사용한 PCR primer는 다음과 같았다.
- DNA vaccine용 (pIRES vector용)
 VP2(147-355)-VP3-Up: 5'-GCTAGCATGAACCCACAGGACAAGGTCAACAAT-3'
 VP2(147-355)-VP3-Down (for pIRES):
 5'-GCGGCCGCTTACTTCTCCGTCATCGCCGGA-3'
- 단백질 백신용 (pET28a용)
 VP2(147-355)-VP3-Up: 5'-GCTAGCATGAACCCACAGGACAAGGTCAACAAT-3'
 VP2(147-355)-VP3-Down: 5'-ACGCGTGCTTACTTCTCCGTCATCGCCGGA-3'
- 그 결과 Fig. 13에서와 같이 pVP2는 624 bp, full VP3는 675 bp, 그리고 이 두개를 fusion시킨 fusion gene은 1299 bp의 크기로 증폭됨을 확인 하였다.
- 이와 같이 증폭된 VP2-VP3의 fusion gene을 pET28a vector에 subcloning 한 다음 올바른 염기서열을 지니고 있는지를 확인하여 보았다. 그 결과 Fig. 14a 에서와 같이 원하는 대로 VP2의 partial 부분과 VP3 full이 연결되어 있었고 이들의 reading frame이 맞는지를 확인한 결과 Fig. 14b에서와 같이 reading frame이 올바르게 되어 있음을 확인할 수 있었다.

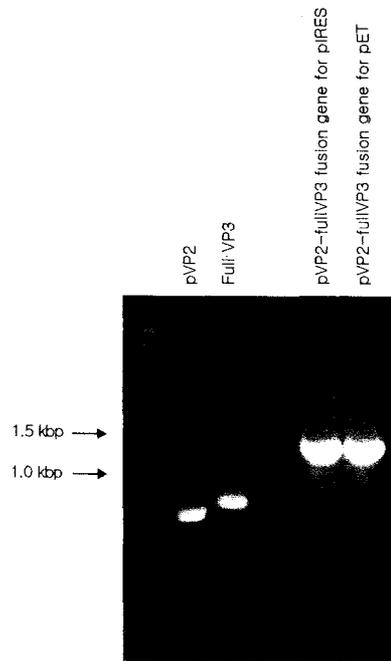


Fig. 13. Agarose gel electrophoresis of the PCR products of partial VP2, full-length VP3 and VP2-VP3 fusion gene.

A

atgaaccacagggacaaggtcaacaatcaactagtgaccaaaggaattactgtcctgaatctaccaactgggttgacaagccatacgtc
cgccatagaggacgagacaccacagggccccagtcctgaacggagcaaggatgaggcgacagctgccatgcaccaaggaggt
atgaaatcgacctccatccgaacgactgccgaccgtggccgactgggacccaacaacaatttatgaggggaatgctgacatcgt
gaactccacagcagtcaccggggacataacattccagctcgaggccgaaccctcaatgagacacgggttcgacttcattctacagttct
ggggctggacaacgacgtccccgtgggtaccgtgacaagctccacgctagtcacagcggacaactacagggggcgctcagccaagt
tcaccagtccaatcccaacagaaatgattaccaaccaatcacacgggtcaagctggcctaccagctcaaccggcagaccgcaattgca
aacgcagcaacgctcggagccaaggggcccggcatcagttctattctatccgggaacggcaatgtgccgggggtcctaagaccata
accctagtgatggccagagcaaaaagaagtgaaggacgcggaagtgttcaacttctgaaactcatgtcatggacaagaaagaacgac
ctcacagatcacatgtatgagtggtaaaggaggatcctgatgcaatcaaatggcaggtcgtcagcccccccaaacaccaaga
gaagccaaaaggacctgaccagcacaccgcccaggaggcaaaaggccaccaggattcactggacgcctcaaaagccggcgagac
tttgctcccagagtggatcgcgagagaacaactaccacggccatcccaggccagttcaagtactacatgataacgggcagagtcc
caaacccgggagaagagtacgaggactatgtgcaaaaaccgataaccgaccaaccgacatggacaaaatcagacgcctagccaac
agtgtctacggcctgccccaccaagaaccgaccagacgacttctaccaggcagtcgtcaggtgttcgcagaaaacgggggaaga
ggccccgaccaagaccaaatgcaagacctgagggacttggcaaggcagatgaaacgacgacccccaccagctgagacacgcagggc
aaaccaagactccaccaggggcggaacctccagtgatcgcggtttaccccctccggcgatgacggagaagtgtaa

B

MNPQDKVNNQLVTKGITVLNLPTGFDKPYVRLEDETPQGPQSMNGARMRRTAAIAPRRYE
IDLPSERLPTVAATGTPTTIYEGNADIVNSTAVTGDITFQLEAEPVNETRFDLQFLGLDND
VPVVTVTSSSTLVTADNYRGASAKFTQSIPTMITKPITRVKLAYQLNRQTAIANAATLGA
KGPASVSFSSGNGNVPGLVLRPITLVMARAKEVKDAEVFKLLKLMSWTRKNDLTDHMYEW
SKEDPDAIKFGRLVSTPPKHQEKPKGPDQHTAQEAKATRISLDAVKAGADFASPEWIAENN
YHGSPGQFKYYMITGRVPNPGEEYEDYVRKPITRPTDMDKIRRLANSVYGLPHQEPAPDD
FYQAVVEVFAENGGRGPDQDQMQLRDLARQMKRRRPRPAETRRQTKTPPRAATSSGSRF
TPSGDDGEV

Fig. 14. A. The pVP2-VP3 fusion gene was subcloned into pET28a and the nucleotide sequence was analyzed using automatic sequencer. The nucleotide sequence with red color was from partial VP2 and that with blue color was from VP3. Underlined regions were used as PCR primers. B, The ORF of the VP2-VP3 fusion gene.

- IHNV의 경우 M1에 존재하는 중화 epitope에 대한 연구가 되어있지 않다. 그러나 G의 경우 Huang 등(1996)의 연구 결과 아미노산 잔기 78-276 사이에 중화 epitope가 존재함이 확인되었다. 따라서 이 부분을 포함하는 G의 fragment를 제조한 다음 Fig. 15에서와 같이 M1의 full length와 fusion 시키고자 하였다.
- 이를 위하여 다음과 같은 PCR primer들을 제조하였다.
 - G (50-290)-Up: 5'-GACAAACTCTCCAAGGTCAATG-3'
 - G (50-290)-Down: 5'-TCTCCATCTGACATTAGATAGGCAAAGT-3'
 - M1-Up: 5'-ACTTTGCCTATCTAATGTCAGATGGAGA-3'
 - M1-Down: 5'-CTATTGACCTTGCTTCATGC-3'
- 이와같이 제조한 PCR primer를 사용하여 먼저 partial G와 full M1을 각각 증폭시킨 다음 각 PCR product를 gel에서 elution 하였다. Elution한 각 PCR product들을 1:1 mole 농도로 섞은 후 이를 template로 하여 PCR을 수행하였다. 이때 사용한 PCR primer는 다음과 같았다.
- DNA vaccine용 (pIRES vector용)
 - G (50-290)-M1-Up: 5'-AAAGTCGACATGGACAAACTCTCCA-3'
 - G (50-290)-M1-Down: 5'-AAAGCGGCCGCCTATTGACCTTGCTTCA-3'
- 단백질 백신용 (pET28a용)
 - G (50-290)-M1-Up: 5'-AGCTAGCATGGACAAACTCTCCA-3'
 - full VP3-Down(for pET28a): 5'-AAAGCTTCTATTGACCTTGCTTCA-3'
- 그 결과 Fig. 16에서와 같이 pG는 756 bp, full M1은 693 bp, 그리고 이 두개를 fusion 시킨 fusion gene은 1449 bp의 크기로 증폭됨을 확인 하였다.
- 이와 같이 제조된 fusion gene의 염기서열이 올바르게 되었는지를 확인 한 결과 Fig. 17a에서와 같이 맞게 subcloning 되었음이 확인 되었다. 또한 이 fusion gene의 reading frame이 맞는 지를 확인 한 결과 Fig. 17b 에서와 같이 올바르게 되었음을 확인 할 수 있었다.

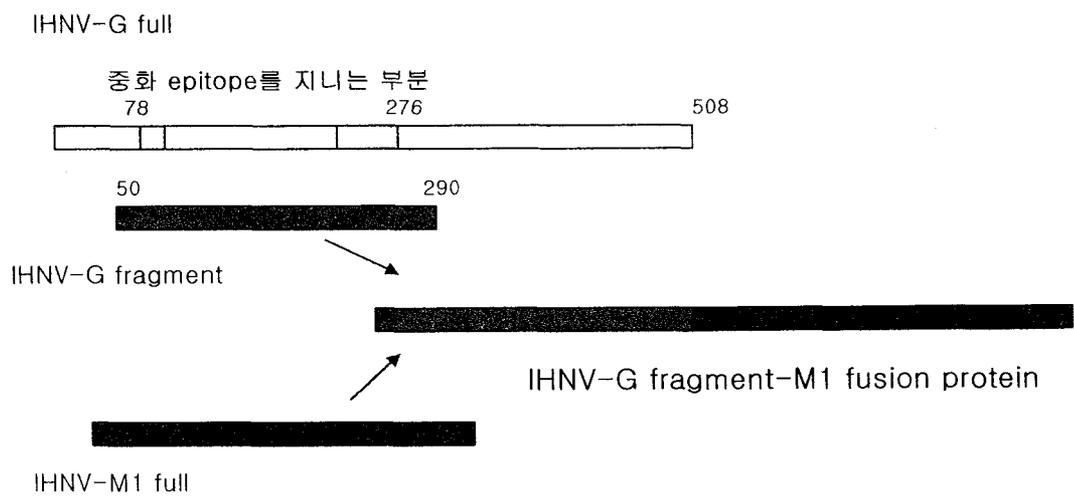


Fig. 15. Experimental protocol for the preparation of IHNV G-M1 fusion gene.

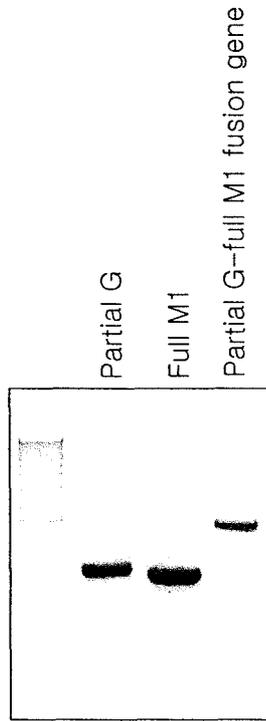


Fig. 16. Agarose gel electrophoresis of the PCR products of partial G, full-length M1, and G-M1 fusion gene.

A

ATGGACAAACTCTCCAAGGTCAATGCCTCTCAACTGAGATGCCCAAGGATCTTCGATG
 ATGAGAATAGGGGGCTGATTGCCTATCCCACATCCATCCGGTCCCTGTCGGTCGGAAA
 CGACCTCGGGGATATTCACACCCAAGGGA^{ACTACATCCACAAAAGTCCTGTACCGCACC}
 ATCTGCTCAACAGGGTTTTTCGGGGGTCAGACGATAGAGAAGGTGCTTGTAGAAATG
 AAACTCTCCACGAGAGAAGCAGGGGCATATGACACCACAACCGCAGCCGCTCTGTACT
 TCCCAGCTTCCCGATGCCAATGGTACACCGACAACGTACAAAATGATCTCATCTTCTA
 CTACACAACCCAAAAGAGTGT^{TTTTGAGAGATCCCTACACTAGAGACTTTCTGGACTCA}
 GATTTTATTGGAGGAAAGTGC^{ACTAAATCACCC}TGCCAGACTCATTGGTCCAACGTAG
 TTTGGATGGGCGATGCANGGATACCAACTTGTGATTTAGCCAAGAGATAAAAGGTC
 ACCTCTTTGGTGATAAAAATNTCCAATCGAGTCGTGAAGGCAACGAGCTACGAACACCA
 CCCTTGGGGACTGCATCGGGCCTGTATGATTGAATTCTGTGGGGGGCAGTGGATACGG
 ACAGATCTCGGTGACCTGATATCTGTTCGTATAACAATTCTGGATCAGTAACCTCTCGT
 TCCCGAAGTGTGAGGACAAGACGGTGGGGATGAGGGGGA^{ACTTGGATGACTTTGCCTA}
 TCTAATGTCAGATGGAGAAGGAGAACAGTTCTTTCGATCTAGAAGGCAAAGACATACT
 GAGGCTAGAATCCCGCCTGAAAACCCACGGAATGACGGGCAAATCGGCAAGAACCCC
 AGGCAACGGAAGGAGGACCAGGTGCCTCGAGAGGA^{ACCAAGAAGACCACCGAGGAGAC}
 CCGACAAGAACAAGGGTCTATCCCAACTGGAGCAACTAATCCTAAAGTACGTTGAGGA
 GGAGAGCTGTCAGGATGCCCTGAAGGAGTTCGGAGGTCTAATAGCCAACATCAGACAG
 GCCACCAGGTGCAACTGACATCTCACCTAGAAAAGGTTGCTACGGAGCACCGAGCCA
 ATCTTCAGGCTCTTACAAAGTCCCAGCAAGAGCACGAGAAAGTCTCGAAGGAGATTTT
 GTCTGCGGTAATTGCTATTCGGTCCAACCTCAACGAGAACACAGTCCCCGGCCCAAG
 CCACTCGACCCGGATCAGGTGAAGGCCGCTCGTGCCCTTGGATTCCGGAATTGGGTATC
 GAACGGCCCTCAATGTCTTTCGACCGAGTCAAGGGAGTCAACCCAGACACCGCAGGATCC
 CAAGAGGTGAAGAACATGGCCACTCGGGCGGCAGAGGAGGATGAATACGAGGGGAGTC
 CCACTTTCTTCGGGAGGGTGATAGACACCGTAAAGAAGCGCATGANGCAAGGTCAATA
 G

B

MDKLSKVNASQLRCPRIFFDENRGLIAYPTSIRSLSVGNLDLGDHITQGN^{YIHKVLYRTICSTG}
 FFGGQTIEKVLVEMKLS^{TREAGAYDTTTAAALYFPASRCQWYTDNVQNDLIFYTTQKS}
 VLRDPYTRDFLSDFIGGKCTKSPCQTHWSNVVWMGDAXIPTCDFSQEIKGHLFGDKXSN
 RVVKATSYEHHPWGLHRACMIEFCGGQWIRTDLGD^{LISVVYNSGSVTLSPFKCEDKTVGM}
 RGNLDDFAYLMSDGEQE^{FFDLEGKDILRLESRLKTPRNDGQIGKNPRQRKEDQVPREPK}
 KTTRRPDKNKGLS^{QLEQLILKYVEEESCQDALKEFGGLIANIRQAHQVELTSHLEKVATEH}
 RANLQALTKSQEHEKVSKEILSAVIAIRSNLNENNSPRPKPLDPDQVKAARALGFGIGYRT
 ALNVFDRVKGVTPDTAGSQEVKNMATRAAEEDEYEGSPTFFGRVIDTVKKRMXQGG

Fig. 17. A. The IHNV G-M1 fusion gene was subcloned into pET28a and the nucleotide sequence was analyzed using automatic sequencer. The nucleotide sequence with blue color was from partial G and that with red color was from M1. Underlined regions were used as PCR primers. B, The ORF of the G-M1 fusion gene.

9. IPNV의 VP2-VP3 및 IHNV의 G-M1 fusion gene을 사용한 DNA vaccine 제조

- 앞서서와 같이 제조된 fusion protein을 대상으로 DNA 백신을 만들었다.
- DNA 백신의 경우 1차년도와 같이 dual vector인 pIRES mammalian expression vector를 사용하여 DNA 백신을 제조하였는데, 이 경우 한 vector안에 IPNV의 VP2/VP3 fusion gene 과 IHNV의 G/M1 fusion gene 모두를 포함하도록 제조하여 하나의 plasmid 안에 IPNV와 IHNV 모두가 포함되는 백신을 제조하였다.
- 제조 방법은 앞서서와 같이 제조한 IPNV fusion gene을 *NheI/MluI*으로 double digestion 한 다음 pIRES의 MCS-A에 ligation 시켰다. 그리고 IHNV의 fusion gene은 *Sall/NotI*으로 double digestion 한 다음 IPNV의 VP2-VP3 fusion gene이 들어 있는 pIRES vector의 MCS-B에 subcloning 하였다. 이와같은 방법을 사용하여 Fig. 18에서와 같이 하나의 pIRES vector안에 IPNV의 VP2-VP3 그리고 IHNV의 G-M1 모두를 지니고 있는 IPNV-IHNV combination DNA vaccine을 제조하였다.
- 이와 같이 제조한 DNA 백신이 실제 어류세포에 들어가서 단백질을 발현 하는 지를 확인하기 위하여 CHSE-214 세포에 transfection 하였다. 이후 RT-PCR을 통하여 IPNV의 VP2-VP3 fusion gene, 그리고 IHNV의 G-M1 fusion gene이 발현됨을 확인 하였으며 VP2, VP3 항체, 그리고 G 및 M1 항체를 사용한 ELISA를 통하여 단백질이 발현 되는 지를 확인 하였다.
- IPNV의 VP2-VP3 fusion gene이 발현되는 지를 확인하기 위하여 Fig. 14a의 밑줄 친 부분과 같이 VP2 부분의 염기서열에서 forward primer를 제조하였고 VP3 부분의 염기서열에서 reverse primer를 제조 하였다.
- 그리고 IHNV의 G-M1 fusion gene의 발현을 확인하기 위하여 역시 Fig. 17a의 밑줄 친 부분과 같이 G 부분의 염기서열에서 forward primer를, 그리고 M1의 염기서열에서 reverse primer를 제조하였다.
- 이와 같이 제조한 primer들을 사용하여 DNA 백신을 transfection 시킨 CHSE-214 세포를 대상으로 RT-PCR을 수행한 결과 Fig. 19 에서와 같이 IPNV의 VP2-VP3 fusion gene 및 IHNV의 G-M1 fusion gene 등으로부터 각각 220 bp 및 190 bp 의 PCR product가 만들어져 IPNV 및 IHNV의 fusion gene들이 발현됨을 확인 할 수 있었다. 대조구로써 pIRES vector만을 transfection 시킨 CHSE-214 세포의 경우 전혀 PCR product가 만들어지지 않았다.

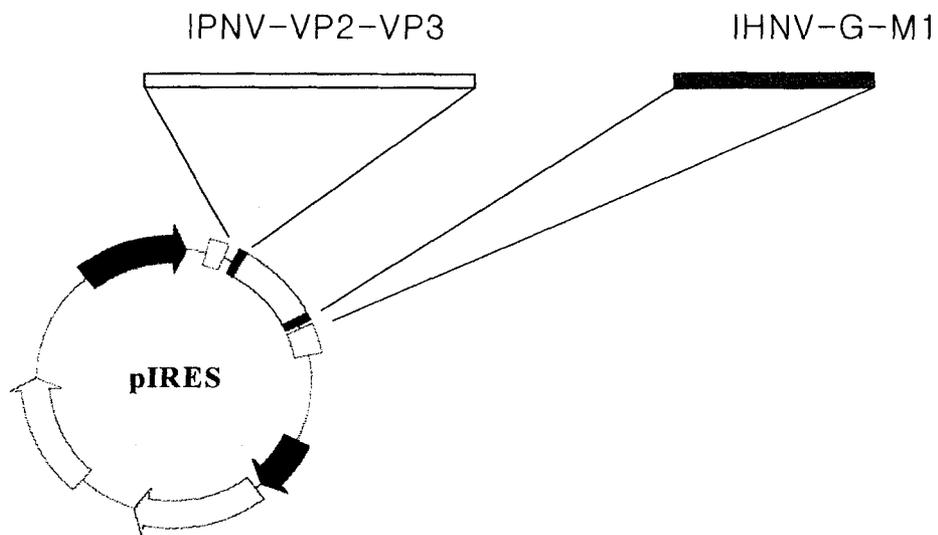


Fig. 18. Experimental protocol for the preparation of IPNV VP2-VP3/IHNV-G-M1 combination DNA vaccine.

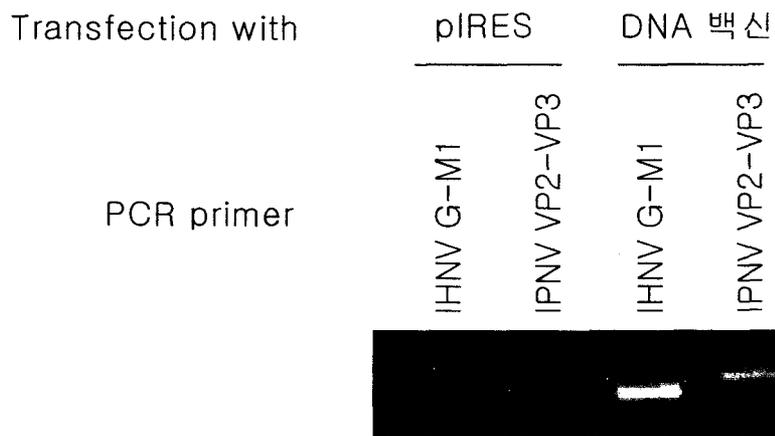


Fig. 19. Confirmation of gene expression in CHSE-214 cells transfected with pIRES-IPNV/IHNV. CHSE-214 cells transfected with pIRES vector only were used as negative control.

- 다음으로 이와 같이 발현되는 fusion gene들로부터 단백질들이 만들어지는 지를 확인하기 위하여 DNA 백신을 transfection 시킨 CHSE-214 세포의 lysate를 대상으로 ELISA를 수행하였다. 이때 사용한 항체는 1차년도의 연구결과 얻어진 IPNV의 VP2 및 VP3 그리고 IHNV의 G 및 M1 등의 재조합 단백질을 토끼에 주사하여 얻은 항혈청 들을 사용하였다. 그 결과 Table 8에서와 같이 pIRES vector만을 transfection 시킨 CHSE-214 세포의 경우 ELISA 값이 거의 나타나지 않은 반면 DNA 백신을 transfection 시킨 CHSE-214 세포의 경우 IPNV의 VP2 및 VP3, 그리고 IHNV의 G 및 M1에 대한 항혈청과 반응하는 단백질들이 발현됨을 확인 할 수 있었다.

Table 8. Confirmation of protein expression in CHSE-214 cells transfected with pIRES-IPNV/IHNV using ELISA. CHSE-214 cells transfected with pIRES vector only were used as a negative control.

항혈청		OD at 405nm	
		pIRES	DNA 백신
IPNV	anti-IPNV VP2	0.035	0.82
	anti-IPNV VP3	0.062	0.93
IHNV	anti-IHNV G	0.043	0.68
	anti-IHNV M1	0.049	0.59

10. IPNV의 VP2-VP3 및 IHNV의 G-M1 fusion gene을 사용한 단백질 백신 제조

- IPNV의 VP2-VP3와 IHNV의 G-M1 fusion gene으로부터 재조합 단백질을 제조한 다음 이를 사용하여 침잠 및 주사 방법을 통하여 백신 처리함으로써 바이러스에 의한 폐사를 막을 수 있는 지를 확인하고자 하였다.
- 이를 위하여 앞에서와 같이 제조한 fusion gene을 prokaryote의 expression vector인 pET28a에 다음의 Fig. 20과 같이 subcloning하였다.
- Subcloning 방법은 다음과 같았다. 앞에서와 같이 제조한 IPNV의 VP2-VP3 fusion gene을 *NheI/NotI*으로 double digestion 한 다음 pET28a에 subcloning 하였다. 그리고 IHNV의 G-M1 fusion gene은 *NheI/HindIII*로 double digestion 한 다음 pET28a에 subcloning 하였다. 이 clone들을 *E.coli* BL21에 transformation 시킨 후 단백질 발현 여부를 확인 한 결과 IPNV VP2-VP3의 fusion protein 및 IHNV G-M1의 fusion protein들이 발현됨을 확인 할 수 있었다 따라서 이들을 순수 분리하여 이후의 단백질 백신 실험에 사용하였다. (Fig. 21).

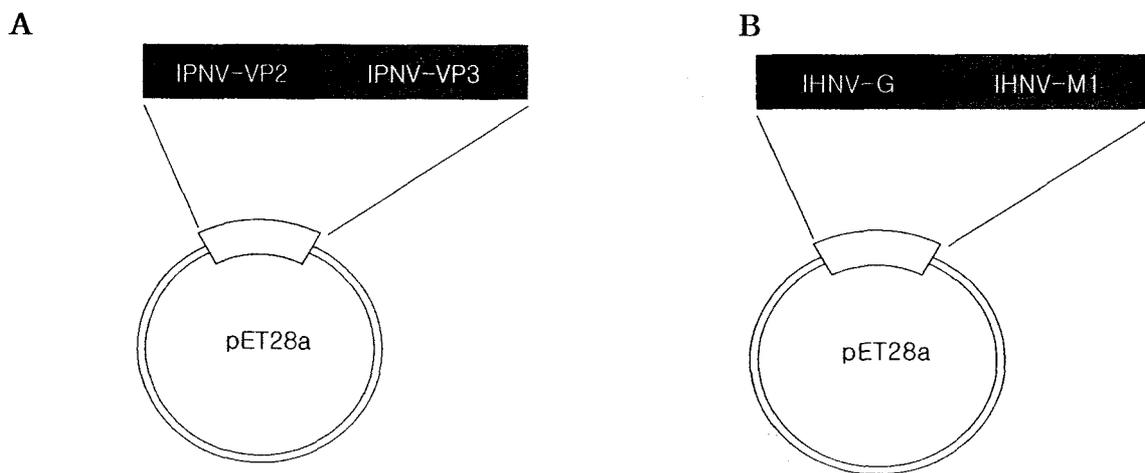


Fig. 20. Experimental protocol for the preparation of (A) IPNV VP2-VP3 fusion protein and (B) IHNV-G-M1 fusion protein.

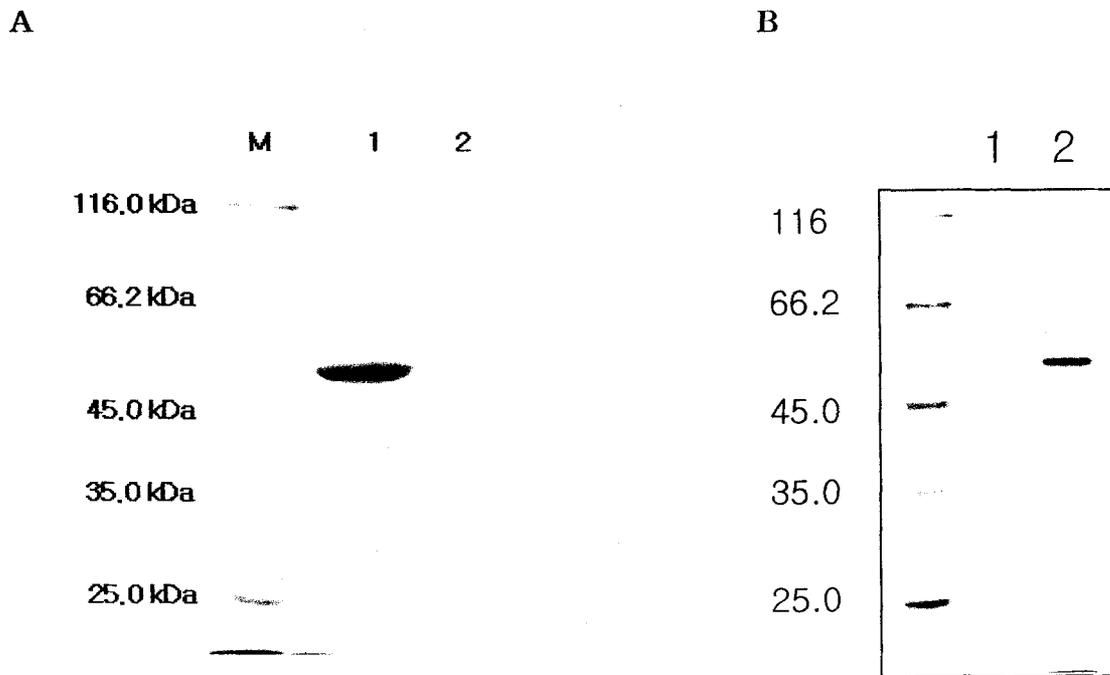


Fig. 21. SDS-PAGE of IPNV and IHNV fusion proteins. Fusion proteins were expressed in *E.coli* BL21 and was purified using Nickel affinity column. The purified fusion protein was analyzed in 12.5% SDS-PAGE. A, IPNV VP2-VP3 fusion protein; lane 1, VP2-VP3 fusion protein; lane 2, *E.coli* control. B, IHNV G-M1 fusion protein; lane 1, *E.coli* control; lane 2, IHNV G-M1 fusion protein.

11. 친어에 IPNV 및 IHNV fusion gene DNA 백신 투여

- 양식 연어류의 대량폐사에 있어서 가장 중요한 시기는 부화 후 1개월 전후이다. 이 시기는 아직까지 자체 면역체계가 완전히 분화되지 않았기 때문에 바이러스의 감염에 의한 대량 폐사가 빈번하게 발생한다. 바이러스 감염 후 살아남은 어류도 바이러스의 잠복 상태가 유지되기 때문에 성장이 느릴 뿐 아니라 이후 생리 변화 및 사육 환경의 변화에 따라 바이러스 질병이 언제든지 재발할 가능성이 있다. 따라서 부화 후 1개월 전후의 시기에 바이러스 감염을 예방하는 것이 바이러스에 의한 양식 어류의 폐사를 막는 핵심 사항이다. 본 연구의 연구 결과 친어에 DNA 백신을 주사하여 바이러스에 대한 항체를 유도한 다음 이것이 난황을 통하여 치어에 전달되어 치어기의 폐사를 막는 개념의 백신을 시도한 결과 DNA 백신을 처리한 친어에서 생성된, 바이러스에 대한 항체가 난황을 통하여 치어에 전달됨을 확인하였는데, 이는 기존의 보고들과 (Oshima et al., 1996; Shors & Winton, 1989) 일치하는 것이었다. 그리고 난황에 전달된 항체에 의하여 부화 후 1개월 전 후의 폐사가 상당히 예방되었음을 확인 하였다.
- 앞에서 준비한 바와 같은, 하나의 vector에 IPNV VP2-VP3 및 IHNV G-M1 fusion gene 모두 들어있는 DNA combination vaccine을 친어에 처리함으로써 치어기의 폐사를 예방할 수 있는지를 확인 하였다. DNA 백신 주사시 면역 증진효과를 위하여 GM-CSF 유전자도 같이 주사하였다.

Table 9. Rainbow trout groups vaccinated with IPNV/IHNV combination DNA vaccine

Vaccinated fish	DNA combination vaccine	GM-CSF
Group 1	-	-
Group 2	IPNV-VP2-VP3/IHNV-G-M1	O

12. 친어에 존재하는 바이러스에 대한 항체 양 분석

- 앞의 Table 9에서와 같이 IPNV-VP2-VP3와 IHNV-G-M1 모두를 포함하는 DNA combination 백신을 주사한 group의 친어에서 IPNV 및 IHNV에 대한 항체가 어느 정도 생성되는지를 분석하였다. 친어의 채란 일정에 맞추어 채란 30일 전에 DNA 백신을 100ug each DNA vaccine/kg body weight 농도로 근육 주사를 하였다. 그리고 채란 시에 꼬리 정맥으로부터 채혈을 하여 항체를 분석하였다.
- 알은 채란시에 일부를 받은 후 Shors & Winton (1989)의 방법에 따라 항체를 추출 후 역가를 분석하였다. 항체 양의 분석은 ELISA와 중화 실험을 사용하여 수행하였다.
- ELISA의 경우 각 바이러스의 재조합 단백질을 coating 한 다음 연속적으로 희석한 무지개

송어 혈청을 첨가하고 이어서 무지개송어 IgM에 대한 항체, alkaline phosphatase가 부착된 goat anti-rabbit IgG, 마지막으로 기질을 첨가함으로써 수행하였다. 중화 실험은 항체를 연속적으로 희석한 다음 각 희석된 항체와 바이러스 100 TCID₅₀를 섞어 반응 시킨 다음 이 바이러스를 중화할 수 있는 항체의 최대 희석치의 역수로부터 중화 역가를 분석하였다.

- 그 결과 Table 10에서와 같았다. ELISA의 결과 각 바이러스 단백질들에 대한 총 항체양을 확인 할 수 있었는데, 기본적으로 IPNV 및 IHNV 모두에 대한 항체가 생성됨이 확인 되었다. 그리고 IPNV의 경우 VP3가 VP2보다 더 많은 양의 항체 생산을 유도함을 확인할 수 있었고 또한 IHNV의 M1이 G보다 많은 양의 항체를 생산할 수 있음을 확인 할 수 있었다. 이 결과는 기존의 본 연구진의 연구 결과와 일치하는 것이었다.
- 다음으로 친어에 형성된 항체가 알의 난황에 전달이 되는 지를 확인하여 보았다. 그 결과 알의 난황에도 IPNV-VP2, 및 VP3, 그리고 IHNV-G 및 M1에 대한 항체들이 존재하였다. 알은 아직 자체로 항체를 만들 수 없기 때문에 난황에 존재하는 항체는 친어로부터 전달된 것이며 이와 같이 전달되는 친어의 항체가 1차년도 결과에서와 같이 이 후 부화 초기의 치어기에 IPNV 및 IHNV 감염에 의한 폐사를 예방할 수 있음을 확인 할 수 있었다.

Table 10. Anti-IPNV and anti-IHNV antibody titers in the sera from DNA vaccinated rainbow trout mother fish

Vaccinated groups	ELISA titer				Neutralization titer	
	Anti-IPNV		Anti-IHNV		Anti-IPNV	Anti-IHNV
	anti-VP2	Anti-VP3	Anti-G	Anti-M1		
Group 1 (none)	50	100	100	50	50	50
	50	100	100	100	50	50
	100	100	200	200	50	100
	100	200	200	400	50	100
	200	200	200	400	100	100
Group 2 (IPNV-VP2-VP3/IHNV-G-M1 + GM-CSF)	1,600	25,600	1,600	6,400	6,400	1,600
	1,600	25,600	3,200	6,400	6,400	1,600
	3,200	25,600	3,200	6,400	12,800	3,200
	3,200	51,200	3,200	12,800	12,800	3,200
	6,400	102,400	3,200	25,600	12,800	6,400

13. Fusion gene으로부터 제조한 단백질 백신의 백신효과 실험

- 본 연구진의 단백질 백신 실험결과 주사방법을 통하여 처리한 것만 백신 효과가 있음을 확인 할 수 있었다. 따라서 이후부터는 주사 방법만을 사용하여 백신 처리를 하였다. 치어의 경우 너무 작기 때문에 주사 방법을 사용하여 백신처리를 할 수 없었다. 따라서 어느 정도 성장한 자어에 단백질 백신을 주사하였다. 자어는 이후 상품화가 될 것이기 때문에 DNA 백

신을 처리하지 않고 단백질 백신을 처리하였다. 재조합 단백질 백신인 IPNV-VP2, VP3, 그리고 IHNV-G, IHNV-M1들을 Table 11과 같은 조합으로 주사방법으로 백신 처리하였다.

Table 11. Rainbow trout groups vaccinated with different combination of IPNV and IHNV recombinant protein vaccines

Group	재조합 단백질 백신	비고
1	none	
2	IPNV-VP2-VP3	
3	IHNV-G-M1	
4	IPNV-VP2-VP3/IHNV-G-M1	

- 재조합 단백질 백신을 30일 간격으로 2회 백신 처리하고, 마지막 백신 처리한 30일 후에 꼬리정맥에서 채혈을 하여 혈청 내 항체 역가를 ELISA 및 바이러스 중화 실험 등으로 측정하였다.
- 그 결과 IPNV의 VP2-VP3 fusion protein을 주사한 경우 VP2와 VP3 모두에 대하여 항체가 생성되었는데, 이전의 연구 결과와 유사하게 VP2에 대한 항체보다 VP3에 대한 항체가 훨씬 더 많이 생성되었다. 또한 이 항체가 지니는 IPNV의 중화 역가를 확인한 결과 상당히 높은 중화 역가를 지니고 있음을 확인할 수 있었다 (Table 12). 여기서 얻어진 ELISA 값 및 중화 역가는 1차 년도에서 얻어진, VP2와 VP3의 재조합 단백질을 각각 제조한 후 이를 섞어서 주사한 경우와 거의 유사한 값을 보였다. 이로부터 IPNV의 구조단백질들 중 백신의 대상 단백질인 VP2와 VP3를 하나의 VP2-VP3 fusion protein으로 만들어 백신을 제조함으로써 백신효과를 높게 유지하면서 제조단가를 하나의 재조합 단백질과 같이 저렴하게 만들 수 있음을 확인 하였다.
- IHNV의 G-M1 fusion protein을 주사한 경우 역시 G와 M1 모두에 대하여 항체가 생성되었는데, G 보다 M1에 대한 항체가 훨씬 더 많이 생성되었다. 그리고 이전의 연구에서 G와 M1 각각의 재조합 단백질을 섞은 후 주사한 경우와 거의 비슷한 정도로 IHNV를 중화시키는 효과를 보였다. 따라서 IHNV 역시 G와 M1의 fusion protein을 백신으로 사용함으로써 백신효과는 높게 유지하며 제조 비용이 저렴한 IHNV 재조합 단백질 백신을 개발하였다.
- 이와 같이 백신 처리한 group들을 대상으로 바이러스 감염 후 폐사율의 변화를 확인하였다. 바이러스의 감염은 실제 양식장에서의 감염 상황과 일치시키기 위하여 자연 감염 시켰는데, 바이러스 질병이 진행 중인 양식 수조의 양식수를 사용하여 사육함으로써 자연 감염 시켰다. 사육중인 무지개송어의 조직을 대상으로 IPNV 및 IHNV 두 바이러스에 의하여 복합 감염되어 있음을 확인하고 폐사율을 분석하고자 하였으나 실험 기간동안 뚜렷한 폐사가

발생하지 않아 백신 처리에 따른 폐사율의 변화는 확인 하지 못하였다. 그러나 백신을 처리한 group들은 실험 기간 중 먹이의 섭취 및 이동 pattern이 매우 정상적인 반면에 백신을 처리하지 않은 대조구의 경우 실험 기간 중 한동안 먹이를 섭취하지 않았으며 몇 마리의 물고기 시료를 대상으로 RT-PCR 법으로 확인 한 결과 IPNV 및 IHNV가 감염되었음을 확인할 수 있었다.

Table 12. Anti-IPNV and anti-IHNV antibody titers in the sera from rainbow trout vaccinated with recombinant protein by injection methods

Vaccinated groups	ELISA titer				Neutralization titer	
	Anti-IPNV		Anti-IHNV		Anti-IPNV	Anti-IHNV
	anti-VP2	Anti-VP3	Anti-G	Anti-M1		
Group 1 (None)	50	100	100	200	50	50
Group 2 (IPNV VP2-VP3)	6,400	51,200	100	200	12,800	50
Group 3 (IHNV G-M1)	100	100	6,400	12,800	100	6,400
Group 4 (IPNV VP2-VP3 + IHNV-G/M1)	6,400	25,600	3,200	12,800	6,400	3,200

14. Immunostimulant를 사용한 DNA 백신의 효과 증대

- 지금까지의 본 연구진 연구 결과 IPNV의 VP2와 VP3가 면역유도 특성이 있음을 확인하였다. 특히 VP2보다는 VP3의 면역유도 특성이 더 강함을 확인 하였으며 이를 국제 학술지에 보고하였다 (Moonch et al., 2004). 그리고 IHNV 역시 G와 M1이 면역유도 특성을 지님을 확인 하였고 이중 M1의 면역유도 특성이 G보다 더 강력함을 확인 하였다. 이와 같은 결과는 이전에 본 연구진이 제시하였던 내용을 (Park and Jeong, 1996; Ristow et al., 2000) 재 확인하는 결과이다.
- IPNV의 VP2와 VP3 모두 면역유도 특성이 있기 때문에 이 두 유전자 모두를 사용한 백신을 개발하는 경우 각각 하나씩만을 대상으로 백신을 제조하였을 때보다 백신 효과가 훨씬 좋을 것으로 예상할 수 있었으며 실제 두개의 유전자 모두를 사용한 백신이 각각을 사용한 백신보다 효과가 좋았다. IHNV 역시 마찬가지로 면역유도 특성을 지니는 G와 M1 각각을 사용한 백신보다 G와 M1을 같이 사용한 백신이 더 좋은 백신효과를 보였다. 그러나 이들 각 바이러스의 백신에 있어서 2개의 유전자를 대상으로 각각 백신을 제조하는 경우 효과는

증가하지만 제조단가가 2배로 증가하여 실용화에 어려울 수가 있다. 따라서 이를 보완하기 위하여 두개의 유전자를 하나의 fusion gene으로 제조하여 제조단가가 싸면서 백신효과를 최대로 증가시킨 combination 백신을 제조하였다.

- 이어지는 연구로서 면역반응을 최대로 올릴 수 있는 적절한 adjuvant를 백신과 같이 처리하여 백신에 대한 면역반응을 극대화 시켜야 한다. 지금까지 보고된 바에 따르면 murine의 GM-CSF (Kanellos et al., 1999), chum salmon의 growth hormone 및 somatolactin (Sakai et al., 1996 & 1997) 등이 무지개송어 등의 어류에서 면역증강효과를 보인다는 보고가 있었다. 따라서 본 연구에서도 이들 cytokine 및 hormone등이 본 연구진이 개발한 IPNV 및 IHNV의 DNA 백신의 백신효과를 증가시킬 수 있는지를 확인하고자 하였다. 이를 위하여 이들의 cDNA를 cloning하였다.
- 먼저 murine GM-CSF의 경우 balb/c mouse의 spleen cell에서 cDNA를 합성한 다음 GenBank 상의 murine GM-CSF 유전자의 염기서열을 (GenBank accession number, X03019) 바탕으로 제작한 PCR primer를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR에 사용한 PCR primer는 다음과 같다.

GM-CSF-UP: GCTAGCATGTGGCTGCAGAATTTA

GM-CSF-DOWN: ACGCGTTCATTTTTGGACTGGTTT

- RT-PCR을 수행하여 얻은 유전자를 pIRES mammalian expression vector에 cloning 한 다음 이의 염기서열을 분석한 결과 다음과 같이 GenBank 상의 murine GM-CSF 염기서열과 일치함을 확인할 수 있었다.

(ORF, 426 bp)

```
atgtggctgcagaatttacttttctgggcattgtggctacagcctctcagcaccacccgctcacccatcactgtcaccggccttgaa
gcatgtagaggccatcaaagaagccctgaacctctggatgacatgctgtcacattgaatgaagaggtagaagtcgtcttaacgagt
tctcttcaagaagctaacaatgtgtgcagaccgctgaagatattcagcaggggtctacggggcaatttcaccaaactcaaggcgcc
ttgaacatgacagccagctactaccagacatactgcccccaactccgaaacggactgtgaacacaagttaccacctatgcggattc
atagacagccttaaacctttctgactgatatccccttgaatgcaaaaaaccagtccaaaaatga
```

- Chum salmon의 growth hormone의 경우 chum salmon의 kidney에서 cDNA를 합성한 다음 GenBank 상의 chum salmon growth hormone 유전자 염기서열을 (K03050) 바탕으로 제작한 PCR primer를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 증폭된 유전자를 pIRES에 cloning한 다음 염기서열을 분석하여 growth hormone임을 확인 하였다.

GH-UP: GCTAGCATGGGACAAGTGTTTCTG

GH-DOWN: ACGGTCTACAGAGTGCAGTTGG

(ORF, 633 bp)

```
atgggacaagtgtttctgctgatgccagtcttactggctcagttgtttcctgagtcaggggcagcgatagaaaaccaacggctcttcaac
atcgcggtcagtcgggtgcaacatctccacctattggctcagaaaatgttcaatgactttgacggtaccctgttgctgatgaacgcaga
cagctgaacaagatattcctgctggacttctgtaactctgactccatcgtgagcccagtcgacaagcagcagactcagaagagttcagtc
ctgaagctgctccacatttcttccgtctgattgaatcctgggagtaccctagccagaccctgatcatctccaacagcctaattggtcagaaa
cgccaaccagatctctgagaagctcagcgacctcaaatgggcatcaacctgctcatcacggggagccaggatggcgactgagcct
ggatgacaatgactctcagcagctgccccctacgggaaactactaccagaacctggggggcgacggaaacgtcaggaggaactacg
agttgtggcatgcttcaagaaggacatgcacaaggtcgagacctctgaccgtcgccaagtgcaggaagtcactggaggccaact
gcactctgtag
```

- Chum salmon somatolactin은 chum salmon의 kidney cell에서 cDNA를 합성한 다음 GenBank 상의 chum salmon somatolactin 유전자 염기서열을 (GenBank accession number, D10640) 바탕으로 제작한 PCR primer를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR에 사용한 PCR primer 및 pIRES vector에 cloning한 다음 확인한 염기서열을 아래와 같다.

Somatolactin-UP: GCTAGCATGAACATGATGCAAG

Somatolactin-DOWN: ACGCGTCTAATGAAGGAAACAGCTG

(ORF, 702 bp)

```
atgaacatgatgcaagtcatgcagagtgttggtgggagtgctactctggcctgtctggtgtccttgggtgtccctctggagtgtaag
gacgagcagggcagcatcactatgtgctccatctccaaggagaaactactggaccgggtcatccaacacgccgagctcatctacc
gtgtctctgaggagtctctgactctgtttgaggagatgtttgtccctttccctatgctcctccagaggaaccaggcaggatacacatgctg
ccaccaaggccttccccatccccgggctccaaaagcgaatccagcagatctcggacaagtggctcctccactctgtcctaattctggtcc
agtctctggattgagccattgggtgtacctgcaaaccttgaccgctatgatgacgccccgacctctactcaaaaagaccaaatgg
gtgtcagaaaaactccttagtttgagcaaggagtgggtgctcctcatcaggaagatgctggacgatgacatgctgaccctctactact
gagcaggggtgtggctccgtacgccctgcagcctgaggtgttgagtcagttctgagggactacactctgctcagctgcttcaagaagg
acgccacaagatggagaccttctcaagctcctcaagtgctgccagactgacaatacagctgtttccttcattag
```

- 이와 같이 증폭한 유전자들을 pIRES mammalian expression vector에 cloning 한 후 이들을 각각 연어 세포주인 CHSE-214 세포에 transfection 하여 발현 여부를 확인하였다. 그 결과 세 개의 모든 유전자들이 CHSE-214 세포에서 발현함을 확인하였다.

15. Immunostimulant의 IPNV 및 IHNV DNA 백신 효과 증가 분석

- 앞에서 준비한 바와 같은, GM-CSF, growth hormone, somatolactin 등의 immunostimulant 들을 IPNV VP2-VP3 및 IHNV G-M1 fusion gene으로 제조한 DNA combination vaccine에 첨가하여 무지개 송어에 처리하여 어느 것이 함으로써 치어기의 폐사를 예방 할 수 있는지를 확인 하였다.

Table 13. Rainbow trout groups vaccinated with IPNV/IHNV combination DNA vaccine and immunostimulants

Vaccinated fish	DNA combination vaccine	Immunostimulant		
		GM-CSF	GH	Somatolactin
Group 1	-	-	-	-
Group 2	IPNV-VP2-VP3/IHNV-G-M1	-	-	-
Group 3	IPNV-VP2-VP3/IHNV-G-M1	+	-	-
Group 4	IPNV-VP2-VP3/IHNV-G-M1	-	+	-
Group 5	IPNV-VP2-VP3/IHNV-G-M1	-	-	+

- 앞에서와 같이 IPNV-VP2-VP3와 IHNV-G-M1 모두를 포함하는 DNA combination 백신에 앞에서와 같이 준비한 3종류의 immunostimulant를 첨가하여 주사한 group들의 무지개송어에서 IPNV 및 IHNV에 대한 항체가 어느 정도 생성되는 지를 분석하였다 (Table 13). DNA 백신의 처리는 100ug each DNA vaccine/kg body weight 농도로 근육 주사를 하였다. 그리고 꼬리 정맥으로부터 채혈을 하여 항체를 분석하였다.
- 항체의 분석은 ELISA 및 바이러스 중화실험을 통하여 분석하였는데, ELISA의 경우 각 바이러스의 재조합 단백질을 coating 한 다음 연속적으로 희석한 무지개송어 혈청을 첨가하고 이어서 무지개송어 IgM에 대한 항체, alkaline phosphatase가 부착된 goat anti-rabbit IgG, 마지막으로 기질을 첨가함으로써 수행하였다. 중화 실험은 항체를 연속적으로 희석한 다음 각 희석된 항체와 바이러스 100 TCID₅₀를 섞어 반응 시킨 다음 이 바이러스를 중화할 수 있는 항체의 최대 희석치의 역수로부터 중화 역가를 분석하였다.
- 그 결과 Table 14에서와 같았다. ELISA를 수행하여 바이러스에 대한 총 항체양을 확인 할 수 있었는데, 기본적으로, immunostimulant를 첨가하지 않은 경우에도, IPNV 및 IHNV 모두에 대한 항체가 생성됨이 확인 되었다. 그리고 IPNV의 경우 VP3가 VP2보다 더 많은 양의 항체 생산을 유도함을 확인할 수 있었고 또한 IHNV의 M1이 G보다 많은 양의 항체를 생산할 수 있음을 확인할 수 있었다. 바이러스 중화 역가 역시 immunostimulant를 첨가하지 않아도 IPNV와 IHNV 모두에 대한 중화 항체가 검출되었다.
- 다음으로 IPNV 및 IHNV의 DNA 백신에 GM-CSF, GH, somatolactin 등을 immunostimulant로 첨가하여 이들에 의한 면역 증감 효과를 분석하였다. 그 결과 세종류 모두 IPNV 및 IHNV에 대한 면역 증강 효과가 있었다. 그러나 GH 및 somatolactin의 경우에는 면역 증가효과가 매우 미미한 반면 GM-CSF의 경우에는 뚜렷한 면역증가효과를 나타내었다. 이 결과로부터 DNA 백신 처리시 바이러스 유전자만을 처리하는 것 보다는 immunostimulant를 첨가하는 것이 더 효율적임을 알 수 있었으며 본 연구에서 실험 대상으로 삼은 immunostimulant들 중에는 GM-CSF의 면역 증가효과가 가장 좋음을 확인할 수 있

었다.

Table 14. Anti-IPNV and anti-IHNV antibody titers in the sera from rainbow trout injected with DNA vaccine and immunostimulants

Vaccinated groups	ELISA titer				Neutralization titer	
	Anti-IPNV		Anti-IHNV		Anti-IPNV	Anti-IHNV
	anti-VP2	Anti-VP3	Anti-G	Anti-M1		
Group 1 (none)	50	50	50	100	50	50
	50	100	100	100	50	50
	50	100	100	200	50	50
	100	100	200	200	100	50
	200	200	200	400	100	100
Group 2 (IPNV-VP2-VP3/IHNV-G-M1)	200	3,200	400	800	800	200
	400	3,200	400	800	800	400
	800	3,200	400	1,600	1,600	400
	800	3,200	800	1,600	1,600	800
	800	6,400	800	3,200	3,200	1,600
Group 3 (IPNV-VP2-VP3/IHNV-G-M1 + GM-CSF)	800	12,800	1,600	3,200	3,200	800
	1,600	25,600	1,600	6,400	6,400	1,600
	1,600	25,600	3,200	6,400	6,400	3,200
	3,200	51,200	3,200	12,800	12,800	3,200
	6,400	51,200	3,200	25,600	12,800	6,400
Group 4 (IPNV-VP2-VP3/IHNV-G-M1 + GH)	400	3,200	400	800	800	800
	400	6,400	800	1,600	1,600	800
	800	6,400	800	1,600	3,200	800
	800	12,800	1,600	3,200	3,200	800
	1,600	12,800	1,600	6,400	6,400	1,600
Group 5 (IPNV-VP2-VP3/IHNV-G-M1 + somatolactin)	400	3,200	400	800	800	400
	400	3,200	400	1,600	800	400
	400	6,400	800	1,600	1,600	8,00
	800	6,400	800	1,600	3,200	1,600
	1,600	6,400	1,600	3,200	6,400	1,600

16. Immunostimulant를 사용한 단백질 백신의 효과 증대

- 본 연구진의 연구결과 IPNV의 VP2-VP3의 fusion gene을 E.coli에서 발현시켜 제조한 재조합 단백질이 VP2와 VP3 모두에 대한 항체를 유발함을 확인하였다. 그리고 IHNV의 G-M1 fusion gene을 E.coli에서 발현시켜 제조한 재조합 단백질 역시 G와 M1 모두에 대한 항체를 유발함을 확인할 수 있었다. 따라서 백신효과는 높으며 제조 단가가 저렴한 IPNV 및 IHNV의 백신을 제조할 수 있었는데, 이 재조합 단백질 백신의 효과를 극대화시키기 위해서는 적절한 adjuvant의 선택이 필요하다.

- IPNV 및 IHNV 재조합단백질 백신의 adjuvant로서 light oil, β -glucan, aluminum hydroxide를 대상으로 실험을 수행하였다. Light oil의 경우 oil-in-water와 water-in-oil의 2가지를 사용하여 실험을 수행하였다. 재조합 단백질과 adjuvant들을 Table 15에서와 같은 조합으로 준비하여 백신처리 하였다. IPNV 및 IHNV의 재조합단백질 백신을 adjuvant와 혼합한 다음 200 μ g protein/kg fish body weight의 양으로 무지개송어의 복강에 주사하였다. 동일하게 준비된 재조합 단백질 백신을 30 간격으로 2회 주사한 다음 마지막 주사 후 30일 후에 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하였다.

Table 15. Rainbow trout groups vaccinated with IPNV/IHNV recombinant protein vaccine and adjuvants

Vaccinated fish	recombinant protein vaccine	Immunostimulants			
		β -glucan	oil-in-water	water-in-oil	aluminum hydroxide
Group 1	-	-	-	-	-
Group 2	IPNV-VP2-VP3 /IHNV-G-M1	-	-	-	-
Group 3	IPNV-VP2-VP3 /IHNV-G-M1	+	-	-	-
Group 4	IPNV-VP2-VP3 /IHNV-G-M1	-	+	-	-
Group 5	IPNV-VP2-VP3 /IHNV-G-M1	-	-	+	-
Group 6	IPNV-VP2-VP3 /IHNV-G-M1	-	-	-	+

- 혈액에서 혈청을 분리한 다음 혈청에 존재하는 IPNV 및 IHNV에 대한 항체의 역가를 ELISA 및 바이러스 중화 실험 등으로 측정하였다.
- 그 결과 IPNV의 VP2-VP3 fusion protein만을 주사한 경우에도 IPNV에 대한 항체가 생성되었다. VP2와 VP3에 대한 항체의 양을 ELISA로 측정한 결과 VP3에 대한 항체의 역가가 VP2에 대한 항체의 역가보다 더 높았는데, 이는 이전의 연구 결과와 유사한 것이었다. 그리고 IPNV의 VP2-VP3 재조합 단백질만을 주사한 경우에도 IPNV의 감염성을 중화시킬 수 있는 중화 역가가 증가함을 확인할 수 있었다.
- IHNV 역시 G-M1 fusion protein 만을 주사한 경우에도 역시 G와 M1 모두에 대하여 항체가 생성되었으며 IHNV의 중화 역가가 증가함을 확인할 수 있었다. 그리고 ELISA 실험 결과로부터 G 보다 M1에 대한 항체가 훨씬 더 많이 생성됨을 확인할 수 있었다.
- 이와같은 IPNV 및 IHNV 재조합 단백질 백신에 여러 종류의 adjuvant를 첨가하여 항체의 생성이 증가하는 지를 확인하였다. 그 결과 adjuvant를 사용하지 않은 group에 비하여

adjuvant를 사용한 group들이 항체 생성양이 많았으며 바이러스 중화역가도 더 많이 증가하였다. 그런데 adjuvant 사이에도 면역증강효과가 차이가 있었는데, light oil을 adjuvant로 사용한 group의 항체 역가가 가장 높았으며 다음으로 β -glucan 혹은 aluminum hydroxide을 처리한 group들은 비슷한 항체 증가효과를 나타내었다. Light oil을 adjuvant로 사용한 group들 중 oil-in-water 방식 보다는 water-in-oil 방식의 adjuvant가 더 면역증가효과를 나타내었다 (Table 16). 이 결과로부터 재조합 단백질 백신을 사용하는 경우 adjuvant를 같이 첨가하는 것이 면역효과가 증가하며 특히 water-in-oil 방식의 light oil을 adjuvant로 사용하는 것이 가장 면역 증가효과가 있음을 확인할 수 있었다.

Table 16. Anti-IPNV and anti-IHNV antibody titers in the sera from rainbow trout injected with recombinant protein and adjuvants

Vaccinated groups	ELISA titer				Neutralization titer	
	Anti-IPNV		Anti-IHNV		Anti-IPNV	Anti-IHNV
	anti-VP2	Anti-VP3	Anti-G	Anti-M1		
Group 1 (none)	50	50	50	100	50	50
	100	100	100	100	50	100
	100	100	100	100	100	100
Group 2 (IPNV-VP2-VP3 /IHNV-G-M1)	400	3,200	800	1,600	1,600	400
	800	6,400	800	1,600	3,200	800
	1,600	6,400	1,600	3,200	6,400	1,600
Group 3 (IPNV-VP2-VP3 /IHNV-G-M1 + β -glucan)	800	12,800	1,600	3,200	3,200	1,600
	1,600	12,800	3,200	3,200	3,200	1,600
	3,200	25,600	3,200	6,400	6,400	3,200
Group 4 (IPNV-VP2-VP3 /IHNV-G-M1 + oil-in-water)	1,600	12,800	1,600	6,400	6,400	1,600
	3,200	25,600	3,200	6,400	6,400	3,200
	3,200	51,200	6,400	12,800	12,800	6,400
Group 5 (IPNV-VP2-VP3 /IHNV-G-M1 + water-in-oil)	3,200	51,200	3,200	12,800	6,400	3,200
	6,400	51,200	3,200	12,800	12,800	6,400
	12,800	102,400	6,400	25,600	25,600	12,800
Group 6 (IPNV-VP2-VP3 /IHNV-G-M1 + aluminum hydroxide)	800	6,400	800	1,600	3,200	800
	1,600	12,800	1,600	3,200	6,400	1,600
	3,200	12,800	3,200	6,400	6,400	3,200

17. 무지개송어 양식장의 바이러스 역학조사 결과

- 우리나라 무지개송어 양식장에 IPNV 및 IHNV의 분포 상황 및 혈청형을 분석하기 위하여 경남, 경북, 강원도 등 무지개송어 양식을 주로 하고 있는 3개의 지역을 대상으로 역학 조사를 하였다. 이들 지역에서 IPNV 및 IHNV의 계절별 분포 상황을 확인할 계획을 세웠으며 현재까지 총 5회에 걸쳐 시료를 채취하여 분석하였다.
- 채취한 시료에 바이러스의 존재를 확인하기 위하여 즉시 CHSE-214 세포에 접종하여 CPE를 관찰함으로써 바이러스의 존재 여부를 확인 하였으며 CPE가 나오는 경우 바이러스 감염된 세포를 대상으로 IPNV와 IHNV 각각에 specific한 PCR primer를 사용하여 RT-PCR을 수행하여 각 바이러스의 존재여부를 확인 하였다.

18. 세포접종에 의한 바이러스 존재 유무 확인

- 3개 지역에서 5회에 걸쳐 세포접종에 의한 바이러스 감염여부를 조사한 결과, 2월에는 대부분의 양식장에서 바이러스가 검출되었으나 6월 조사에서는 세포배양에서 CPE가 관찰되지 않았다. IPNV와 IHNV 사이의 지역별 감염차이는 별로 없었으나 시기별 감염에는 차이를 나타내었다 (표 17).

표 17. 세포접종법에 의한 무지개송어 바이러스 감염여부

채집시기	장소	크기	바이러스 감염여부	
			IPNV	IHNV
2001. 10월	밀양	1년어	-	-
	울진	2년어	-	-
	양양	1년어	+	-
2001. 12월	밀양	1년어	-	+
	울진	1, 2년어	-	-
	양양	발안란	-	+
2002. 2월	밀양	1년어	+	-
	울진	1, 2년어	+	+
	양양	치어, 1년어	+	+
2002. 4월	밀양	1년어	-	-
	울진	1, 2년어	+	-
	양양	치어, 1년어	+	+
2002. 6월	밀양	1년어	-	-
	울진	2년어	-	-
	양양	치어, 1년어	-	-

19. RT-PCR을 사용한 바이러스 확인

○ 3개 지역의 샘플에서 RT-PCR로 IPNV 및 IHNV를 실험한 결과, 세포배양에서는 바이러스 검출이 불가능하였던 19개의 음성 개체 중에서 11개체의 샘플에서 추가로 바이러스 감염이 확인되었다. 이때 사용한 IPNV 및 IHNV의 PCR primer 들은 다음과 같다.

· 실험에 사용한 Primer

(IHNV) Sence : 5'-TGGCACTTTTGTGCTTTGAG-3'

Antisence : 5'-TGGGGAGGAAGTGAAGATTG-3'

(IPNV) Sence : 5'-TCACGGAAATACGACATCCA-3'

Antisence : 5'-TGTTGGAATTGACTGGGGTG-3'

표 18. RT-PCR에 의한 바이러스 감염여부

채집시기	장소	크기	바이러스 감염여부	
			IPNV	IHNV
2001. 10월	밀양	1년어	+	-
	울진	2년어	-	+
	양양	1년어	+	+
2001. 12월	밀양	1년어	-	+
	울진	1, 2년어	-	+
	양양	발안란	+	+
2002. 2월	밀양	1년어	+	-
	울진	1, 2년어	+	+
	양양	치어, 1년어	+	+
2002. 4월	밀양	1년어	+	-
	울진	1, 2년어	+	+
	양양	치어, 1년어	+	+
2002. 6월	밀양	1년어	+	-
	울진	2년어	-	+
	양양	치어, 1년어	+	+

20. 무지개송어 양식장의 바이러스 분포조사 결과-1

○ 우리나라 무지개송어 양식장에 IPNV 및 IHNV의 분포 상황을 분석하기 위하여 경남, 경북, 강원도 등 무지개송어 양식을 주로 하고 있는 7개 양식장을 대상으로 분포 조사를 하였다. 이들 지역에서 IPNV 및 IHNV의 분포 상황을 확인할 계획을 세웠으며 총 7회에 걸쳐 시료를 채취하여 분석하였다.

- 채취한 시료에 바이러스의 존재를 확인하기 위하여 즉시 CHSE-214 및 EPC 세포에 접종하여 CPE를 관찰함으로써 바이러스의 존재 여부를 확인하였으며 CPE가 나오는 경우 바이러스 감염된 세포를 대상으로 IPNV와 IHNV 각각에 specific한 PCR primer를 사용하여 RT-PCR을 수행하여 각 바이러스의 존재여부를 확인하였다.

21. 세포접종에 의한 바이러스 존재 유무 확인-1

- 7개지역 에서 세포접종에 의한 바이러스 감염여부를 조사한 결과, 2월과 6월을 제외한 대부분의 양식장에서 CPE가 관찰되었다.

표 19. 세포접종에 의한 무지개송어 바이러스 감염여부

채집시기	장 소	어 종	세포접종결과(CPE)	
			CHSE-214	EPC
2002. 12월	경남 밀양	무지개송어 성어	+	-
		무지개송어 치어	-	-
2003. 1월	경북 울진 (A)	무지개송어 친어	+	-
		무지개송어 수정란	+	-
		무지개송어 치어	+	-
		왕연어	-	-
2003. 2월	경북 울진 (B)	산천어	-	-
		무지개송어 치어	-	-
2003. 3월	경북 의성	무지개송어 성어(A)	+	-
		무지개송어 성어(B)	+	-
2003. 5월	경북 청도	무지개송어 치어	+	+
		무지개송어 성어	+	+
2003. 6월	강원 영월 (A)	무지개송어 성어	-	+
		무지개송어 성어	-	+
2003. 7월	강원 영월 (B)	무지개송어 치어	분석중	분석중
		무지개송어 성어	분석중	분석중

22. RT-PCR을 사용한 바이러스 확인-1

- 7개지역의 샘플에서 RT-PCR로 IPNV 및 IHNV를 실험한 결과, 세포배양에서는 바이러스 검출이 불가능하였던 영월 및 울진지역의 음성 개체 중에서 추가로 바이러스 감염이 확인되었다.
- 그러나 세포배양에서는 CPE가 관찰되었으나 PCR에서는 검출되지 않은 밀양 및 영월의 샘플에서는 VHS 및 ISAV가 검출되었다.

표 20. RT-PCR에 의한 무지개송어 바이러스 감염여부

채집시기	장 소	어 종	바이러스 감염여부		
			IPNV	IHNV	기 타
2002. 12월	경남 밀양	무지개송어 성어	-	-	VHS
		무지개송어 치어	-	-	
2003. 1월	경북 울진 (A)	무지개송어 친어	+	-	
		무지개송어 수정란	-	-	
		무지개송어 치어	-	-	?
		왕연어	-	-	
2003. 2월	경북 울진 (B)	산천어	-	-	
		무지개송어 치어	+	-	
2003. 3월	경북 의성	무지개송어 성어(A)	+	-	
		무지개송어 성어(B)	+	-	
2003. 5월	경북 청도	무지개송어 치어	+	+	
		무지개송어 성어	+	+	VHS
2003. 6월	강원 영월 (A)	무지개송어 성어	+	+	VHS
		무지개송어 성어	+	-	ISAV
2003. 7월	강원 영월 (B)	무지개송어 치어	분석중	분석중	
		무지개송어 성어	분석중	분석중	

23. PCR cloning 및 염기서열 분석을 통한 IPNV 및 IHNV type을 확인

- 분리한 바이러스 유전자들의 PCR cloning한 다음 염기서열을 분석하였다. 염기서열을 분석한 결과 대표적인 IHNV isolate의 염기서열은 Fig. 22와 같았다.

IHNV-YB2-M13F

```

TTTGTGCTTTGAGACCGAACGCAACTCGCAGAGACCCACCAAACCAATGGACACCATG
ATCACCCTCCGCTCATTCTCATTCTAATCACCTGTGGAGCAAACGGCCAAACCGTCCC
ACCCGACACCGCAAGCGAATCAGACCAACCCACCTGGTCAAACCCGCTCTTCACCTACC
CCGAGGGATGCACTCTGGACAACTCTCCAAGGTCAATGCTTCTCAACTGAGATGCCC
AAGGATCTTCGATGATGAGAACAGGGGGCTGATTTCCCTATCCCACCGCCATCAGGTCC
CTGGTGGTCGGAAACGACCTCGGGGCGATTACACCCAGGGGGACTACATCCACAAAG
TCCTGTACCGCACCATCTGCTCAACCGGGTCTTCGGGGGTCAGACGATAGAGAAGGT
GCTTGTAGAAATGAACTCTCTACGAGAGAAGCAGGGGCATATGACACCACAACCGCA
GCCGCTCTGTACTTCCCAGCTCCCCGATGCCAATGGTATACCGACAACGTACAAAATG
ATCTCATCTTCTACTACACAACCCAAAAGAGTGTTCTGAGAGATCCCTACACCAGAGA
CTTTCTGGACTCAGATTT
    
```

IHNV-YB2-SP6

TGGGGAGGAAGTGAAGATTGAGGTCCTTTAGGACCTGTTTGCCAGGTGATACATGGG
GATACTCTGCGGTGCGGAGGGAGTGGGAGGTCTCCCTGACCAGCAGCAGCACGCGGCA
ACAGCAAGGAGGAGAACCAGGGGAACCCACCCAGTGTGGAGATTGTGGGCCAGAAAC
TCCAGTGGAGTGATTGAAGGTCGAACGAGTCCAATTTCCCTGATGGAGATCCCAGATAT
GTCTGTCTCATTGTAGAAGGCCAGGATGCTCGGATGGGGTACGGATTTGATGCTCATC
GGTTCCATCATGCTCATCTTGTACTGGGCGACGTATTTCTCCAGGTCTGGAATAATGG
TGATGTTGTTTCCGTGCAATCCGTGAAAGCCCTCCCCTCATCCCCAAAGGGTCGTTC
CCATTTTCGTGAAGTTGGTGGCGTGATGGGCCCTGTACATCGTCCTGTCCTTGGATACC
TCGTCCACAGCGACCGTCATGCACATCCCGTGATAGATGGAGCCTTTGTGCATAGCGT
AGACGTCATTTATTCCGGGATGTGGAGATCGGAACTTAGATAGGAGGTATGGAGTCA
CACTGTTTGTGATATTATCTCGGCGTGCGCCTCAAGACATTCCTCTCTGCTCTC

Fig. 22. Nucleotide sequences of PCR-cloned genes of IHNV isolates

- 이들의 염기서열을 기존에 GenBank에 보고된 다른 IHNV의 유전자 염기서열들과 비교한 결과 95-97%의 유사성을 보여 IHNV의 유전자임을 확인 하였다.
- 다음으로 이와 같이 분리된 IHNV가 본 연구진이 IHNV 백신에 사용한 strain과 유사성이 어느 정도 있는지를 확인 하여 보았다. 만약 IHNV 백신 제조에 사용한 strain과 현재 우리나라 양식 무지개송어에 감염하는 strain 사이에 염기서열이 많이 다른 경우 본 연구진이 제조한 백신의 사용 범위가 많은 제약을 염기서열의 차이가 심한 경우에는 제조한 백신이 실제 현장에서 효과가 없을 수도 있다.
- 따라서 IHNV 백신 제조에 사용한 IHNV-PRT strain과 현재 양식장에서 분리한 IHNV의 염기서열을 비교 분석한 결과 97%의 유사성을 보여 거의 차이가 없음을 확인할 수 있었다 (Fig. 23). 따라서 IHNV-PRT가 분리되었던 1990년대 초반부터 (5) 지금까지 우리나라의 무지개 송어에 감염하는 IHNV들 사이에 염기서열 상의 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 즉 본 연구진이 IHNV-PRT strain을 사용하여 제조한 백신이 현재 우리나라의 무지개송어에 감염하고 있는 IHNV들을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였다. IPNV의 경우도 본 연구에 사용한 strain인 IPNV-DRT strain과 현재 양식중인 무지개송어에 감염하는 strain 사이에 염기서열상의 큰 차이가 없음 (약 97% 이상의 유사성)을 확인할 수 있었으며 이로 부터 본 연구에서 제조한 IPNV 백신 역시 현재 양식 무지개송어에 감염하고 있는 IPNV를 효과적으로 억제할 수 있음을 확인할 수 있었다.

IHNV-PRT: 8 tttgtgctttgagaccgaacgcaactcgagagaccacccaaaaaatggacacccatgat 67
|||||
IHNV-YB2-M13F: 1 tttgtgctttgagaccgaacgcaactcgagagaccacccaaaaaatggacacccatgat 60
|||||
IHNV-PRT: 68 gaccactccgctcattctcattctaatcacctgaggagcaaacagccaaaccgtccaacc 127
|||||
IHNV-YB2-M13F: 61 caccactccgctcattctcattctaatcacctgtggagcaaacggccaaaccgtcccacc 120
|||||
IHNV-PRT: 128 cgacaccgcaagcgaatcagaccaaccacctggcacaaccgctcttcacctaccocga 187
|||||
IHNV-YB2-M13F: 121 cgacaccgcaagcgaatcagaccaaccacctggcacaaccgctcttcacctaccocga 180
|||||
IHNV-PRT: 188 gggatgactctggacaaactctccaaggcgaatgcctctcaactgagatgcccaggat 247
|||||
IHNV-YB2-M13F: 181 gggatgactctggacaaactctccaaggcgaatgcctctcaactgagatgcccaggat 240
|||||
IHNV-PRT: 248 cttcgatgatgagaatagggggctgattgcctatcccacatccatccgggtccctgtcgg 307
|||||
IHNV-YB2-M13F: 241 cttcgatgatgagaacagggggctgatttcctatcccaccgccatcagggtccctgtcgg 300
|||||
IHNV-PRT: 308 cggaaacgacctcggggatattcacaccaagggaactacatccacaaagtccctgtaccg 367
|||||
IHNV-YB2-M13F: 301 cggaaacgacctcggggcgaattcacaccagggggactacatccacaaagtccctgtaccg 360
|||||
IHNV-PRT: 368 caccatctgctcaacagggtttttcgggggtcagacgatagagaagggtcctgttagaaat 427
|||||
IHNV-YB2-M13F: 361 caccatctgctcaacagggttcttcgggggtcagacgatagagaagggtcctgttagaaat 420
|||||
IHNV-PRT: 428 gaaactctccacgagagaagcaggggcataatgacaccacaaccgagccgctctgtactt 487
|||||
IHNV-YB2-M13F: 421 gaaactctctacgagagaagcaggggcataatgacaccacaaccgagccgctctgtactt 480
|||||
IHNV-PRT: 488 cccagctccccgatgccaatgggtacaccgacaacgtacaaaatgatctcatcttctacta 547
|||||
IHNV-YB2-M13F: 481 cccagctccccgatgccaatgggtacaccgacaacgtacaaaatgatctcatcttctacta 540
|||||
IHNV-PRT: 548 cacacccaaaaagagtgttttgagagatccctacactagagactttctggactcagattt 607
|||||
IHNV-YB2-M13F: 541 cacacccaaaaagagtgtctgagagatccctacaccagagactttctggactcagattt 600
|||||
IHNV-PRT: 975 gagagcagagaggaatgtcttgaggcgcacgccgagataatatcaacaacagtggtgact 1034
|||||
IHNV-YB2-SP6: 633 gagagcagagaggaatgtcttgaggcgcacgccgagataatatcaacaacagtggtgact 574
|||||
IHNV-PRT: 1035 ccatacctcctatccaagttccgatctccacatcccgaataaatgacgtctacgctatg 1094
|||||
IHNV-YB2-SP6: 573 ccatacctcctatcctaagttccgatctccacatcccgaataaatgacgtctacgctatg 514
|||||
IHNV-PRT: 1095 cacaaaggctccatctatcacgggatgtgcatgacggtcgctgtggacgaggtatccaag 1154
|||||
IHNV-YB2-SP6: 513 cacaaaggctccatctatcacgggatgtgcatgacggtcgctgtggacgaggtatccaag 454
|||||
IHNV-PRT: 1155 gacaggacgacgtacagggccatcacgctaccaacttcacgaaatgggaacgacccttt 1214
|||||
IHNV-YB2-SP6: 453 gacaggacgacgtacagggccatcacgctaccaacttcacgaaatgggaacgacccttt 394
|||||
IHNV-PRT: 1215 ggggatgagtgaggaggctttcacggattgcacggaacaacaccaccattattccagac 1274
|||||
IHNV-YB2-SP6: 393 ggggatgagtgaggaggctttcacggattgcacggaacaacaccaccattattccagac 334
|||||
IHNV-PRT: 1275 ctggagaaatacgtcgcccagtcacaagacgagcatgatggaaccgatgagcatcaaatcc 1334
|||||
IHNV-YB2-SP6: 333 ctggagaaatacgtcgcccagtcacaagacgagcatgatggaaccgatgagcatcaaatcc 274
|||||
IHNV-PRT: 1335 gtaccccatccaagcatcctggccttctacaatgagacagacgtatcagggatctccatc 1394
|||||
IHNV-YB2-SP6: 273 gtaccccatccagcatcctggccttctacaatgagacagacataatctgggatctccatc 214
|||||

제 4 장 목표달성도

제 1 절 연구개발 목표

1. 최종목표

- 무지개송어에 감염하는 IPNV와 IHNV에 대한 백신을 개발하여 치어기의 대량폐사를 예방

2. 세부 목표

- IPNV, IHNV의 DNA 백신 및 단백질 백신 개발.
 - DNA 백신: 친어에 주사하여 친어의 항체가 알을 통하여 치어에 전달되도록 함으로써 부화 후 1개월까지 바이러스 질병 예방
 - 단백질 백신: 부화 후 1-2개월 정도의 치어에 침잠 혹은 경구 투여하여 부화후 1-4개월 사이의 바이러스 질병 예방
 - 제조 단가를 최소화하여 양식어민들이 경제적으로 큰 부담 없이 사용할 수 있도록 함
- IPNV 및 IHNV의 역학조사
 - 우리나라의 무지개송어에 감염하는 IPNV 및 IHNV의 type 및 분포 상황을 조사
 - 이로부터 개발한 백신의 적용 범위를 확인

제 2 절 연구개발 목표의 달성도

1. IPNV 및 IHNV 유전자에 대한 효과적인 DNA 백신 확인

- IPNV의 VP2와 VP3를 각각 혹은 동시에 발현하는 DNA 백신 준비완료
- IHNV의 G와 M1를 각각 혹은 동시에 발현하는 DNA 백신 준비 완료
- In vitro translation system을 사용하여 위에서와 같이 준비한 DNA 백신들로부터 IPNV의 VP2, VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1이 발현됨을 확인
- 연어세포에 위의 각 DNA 백신에 해당하는 DNA들을 transfection 시킨 후 발현을 확인
- 친어에 DNA 백신 주사 완료
- DNA 백신 처리한 친어에서의 IPNV의 VP2와 VP3, 그리고 IHNV의 G와 M1 등의 각 구조 단백질들에 대한 항체 생성 및 역가 확인 완료
- DNA 백신 처리한 친어에서 나온 알과 여기에서 부화한 치어의 난황에서 항체의 존재를

확인

- DNA 백신 처리한 친어에서 나온 치어가 바이러스 감염에 의한 폐사에 내성이 강함을 확인
- IPNV의 경우 VP3를 포함한 DNA 백신이, 그리고 IHNV의 경우 M1을 포함한 백신이 더 효과가 있음을 확인

2. IPNV 및 IHNV의 combination DNA 백신 확인:

- IPNV의 VP2-VP3 fusion gene cloning 완료
- IHNV의 G-M1 fusion gene cloning 완료
- IPNV의 VP2-VP3와 IHNV의 G-M1 fusion gene을 dual expression vector인 pIRES에 subcloning 완료하여 IPNV-IHNV combination DNA 백신제조 완료
- IPNV-IHNV combination DNA 백신인 pIRES-IPNV/IHNV를 연어 세포주인 CHSE-214 세포에 transfection 시킨 후 IPNV VP2-VP3 fusion gene과 IHNV G-M1 fusion gene이 발현됨을 확인
- IPNV-IHNV combination DNA 백신을 무지개 송어 친어에 주사하여 항체 생성확인
- 친어에서 생성된 항체가 알에 전달됨을 확인

3. Immunostimulant를 사용한 DNA 백신의 효과 증대:

- IPNV와 IHNV 유전자들을 combination 시킨 DNA 백신의 백신효과를 최대화 할 수 있도록 cytokine 유전자 첨가
- pIRES mammalian expression vector에 murine GM-CSF, chum salmon의 GH 및 somatolactin cloning 완료
- 연어세포주인 CHSE-214에서 발현 확인
- IPNV의 VP2-VP3 fusion gene 혹은 IHNV의 G-M1 fusion gene에 cytokine gene을 첨가하여 백신 효과 확인결과 GM-CSF의 면역증강효과가 가장 좋음을 확인

4. IPNV 및 IHNV 유전자에 대한 효과적인 단백질 백신 확인

- IPNV의 VP2와 VP3를 E.coli에서 발현시켜 재조합 단백질 준비 완료
- IPNV VP2의 재조합 단백질 발현에 있어서 VP2 전체를 E.coli에서 발현시키면 발현이 잘 안되고 중화 epitope를 포함하는 일부분만 발현시켜야 발현이 많이 됨을 확인
- IHNV의 G와 M1을 E.coli에서 발현시켜 재조합 단백질 준비 완료
- 주사 방법을 사용하여 IPNV 및 IHNV의 재조합 단백질들을 여러 조합으로 백신 처리한 후 각 조합들의 항체 생성 능력 확인한 결과 IPNV의 경우 VP3가 VP2보다 10배 이상 많은 양의 항체를 생성함을 확인
- IHNV의 경우 M1이 G보다 6배 이상 항체 생성이 많음을 확인

- IPNV-VP2/VP3, IHNV-G/M1 모두를 포함하는 재조합 단백질 백신을 대상으로 주사, 경구, 침잠법을 사용하여 백신 처리 후 항체 생성 확인
- 그 결과 주사 방법을 통하여 백신 처리하였을 경우 IPNV 및 IHNV 모두에 대한 항체가 비교적 많이 생성 되었으나 경구 투여 및 침잠법을 사용하여 백신 처리한 경우 바이러스에 대한 항체 생성이 극히 미미함을 확인
- 또한 주사 방법을 통한 백신의 처리 시 바이러스 감염에 의한 폐사를 효과적으로 예방함을 확인

5. IPNV 및 IHNV의 combination 단백질 백신 확인:

- IPNV의 VP2-VP3 fusion gene을 expression vector인 pET28a에 subcloning 완료
- IPNV의 VP2-VP3 fusion gene을 E.coli BL21에서 발현시켜 VP2-VP3 fusion protein 제조 완료
- IHNV의 G-M1 fusion gene을 expression vector인 pET28a에 subcloning 완료
- IHNV의 G-M1 gene을 E.coli BL21에서 발현시켜 G-M1 fusion protein 제조 완료
- IPNV VP2-VP3 fusion protein을 무지개 송어에 주사하여 VP2 및 VP3에 대한 항체가 생성됨을 확인
- 또한 이항체가 IPNV의 감염을 효과적으로 중화 시킴을 확인
- IHNV G-M1 fusion protein을 무지개 송어에 주사하여 G 및 M1에 대한 항체가 생성됨을 확인
- 이 항체가 IHNV의 감염을 중화 시킴을 확인

6. Immunostimulant를 사용한 단백질 백신의 효과 증대:

- IPNV의 VP2-VP3 그리고 IHNV의 G-M1 fusion 하여 제조한 재조합 단백질 백신에 light oil (oil-in-water 및 water-in-oil), β -glucan, aluminum phosphate 등의 adjuvant를 첨가
- Light oil (oil in water 및 water in oil)의 면역증강 효과가 가장 좋음을 확인

7. 세포 배양 및 RT-PCR을 통한 바이러스의 분포 확인

- 강원도 경북, 경남의 양식장을 대상으로 월별 시료를 채취하여 IPNV 및 IHNV의 분포를 확인하였음
- 각각의 시료들을 CHSE-214와 EPC 세포주에 접종하여 CPE를 확인하였으며 IPNV 및 IHNV 각각에 specific한 PCR primer를 사용하여 RT-PCR을 수행하여 IPNV 및 IHNV 임을 확인
- 무지개송어 양어장 7개소 중 6개소에서 IPNV 또는 IHNV가 감염되어 있음을 확인

8. PCR cloning 및 염기서열 분석을 통한 IPNV 및 IHNV type을 확인

- 분리한 바이러스 유전자들의 PCR cloning 및 염기서열 분석을 통한 바이러스 type 확인
- 우리나라의 무지개송어 양식장들에서의 바이러스 질병 발생 현황 분석 및 IPNV 및 IHNV의 typing 함으로써 역학 분석

제 3 절 평가의 착안점에 따른 달성도

구 분	평가의 착안점 및 달성도		
	착 안 사 항	척 도 (점수)	달성도(%)
1차년도 (2001년)	○ IPNV 및 IHNV 유전자에 대한 효과적인 DNA 백신 확인	40/100	100
	○ IPNV 및 IHNV 유전자에 대한 효과적인 단백질 백신이 확인	40/100	100
	○ 세포 배양 및 RT-PCR을 통한 바이러스의 분포 확인	20/100	100
2차년도 (2002년)	○ IPNV-IHNV combination DNA 백신의 개발	40/100	100
	○ IPNV, IHNV combination 단백질 백신의 개발	40/100	100
	○ 염기서열 분석 등을 통하여 IPNV 및 IHNV의 typing	20/100	100
3차년도 (2003년)	○ Immunostimulant를 사용하여 DNA 백신의 효과가 증가	40/100	96
	○ Immunostimulant를 사용하여 단백질 백신의 효과가 증대	40/100	96
	○ IPNV 및 IHNV의 역학조사 결과 종합적으로 분석	20/100	95

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 현장보급방안

- 사용하기에 간편하고 저렴한 가격의 백신을 제조하여 양식어민들이 사용하기에 편리하고 무리가 없게 함
- 주사를 통한 DNA 백신 및 재조합 단백질 백신: 양식업자, 기구 제조 업자와 기술을 제휴하여 양식어가 stress를 가장 적게 받고 효율적으로 주사할 수 있는 방법을 개발하여 양식어민들에게 보급
- 위와 같은 백신의 사용법을 책자로 만들어 양식어민들에게 배포하고 또한 적절한 기회에 직접 설명함으로써 사용법을 익히도록 함

제 2 절 산업화계획방안

- DNA 백신: 기존의 양식장과 제휴하여, 친어에 DNA 백신 처리 후 나오는, 바이러스에 내성이 강한 알을 판매
- 단백질 백신: 제약회사와 제휴하여 주사용 단백질 백신 판매

제 3 절 추가기술개발방안

- 본 연구가 성공적으로 마무리되어 개발된 백신이 실용화 된 이후에도 정기적으로 양식어류에서 IPNV 및 IHNV를 분리하여 특성을 확인하여 새로운 돌연변이가 유입되거나 발생하면 이를 기존에 개발한 백신에 첨가
- 백신효과를 높일 수 있는 새로운 vector나 adjuvant가 개발되면 이 역시 기존에 개발한 백신에 첨가하여 더욱 효율이 높은 백신을 개발.
- 본 연구 결과 개발되는 백신을 양식 해산어에도 적용 가능한지를 확인

제 4 절 기술이전방안

- IPNV 및 IHNV에 대한 백신을 국제 특허를 출원하여 취득 한 후 국내 제약회사 등에게 기술 이전
- 외국의 어류 백신 전문회사에게 기술이전

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- DNA 백신의 경우 transmembrane region을 포함하는 surface protein이 백신 효과가 뛰어나
- 재조합단백질 백신의 adjuvant로서 mineral oil을 사용시 백신효과가 높을수록 장유착, 근육내 염증반응 등의 부작용 발생률도 높아짐
- 주사제 백신은 어류에 스트레스를 많이 주고 투여 방법이 어렵기 때문에 coating제를 사용한 경구 백신, 사료 첨가제 방식의 경구백신 등의 개발을 적극 추진하고 있음

제 7 장 참고문헌

1. Pilcher, K. S., and J. L. Fryer. 1980. The viral diseases of fish: a review through 1978. *Crit. Rev. Microbiol.* 7: 287-364.
2. Hah, Y. C., S. W. Hong, M. H. Kim, J. L. Fryer, and J. R. Winton. 1984. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from gold fish (*Carassius auratus*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in Korea. *KOR. J. Microbiol.* 22(2):85-90.
3. Hedrick, R. P., W. D. Eaton, J. L. Fryer, Y. C. Hah, J. W. Park, and S. W. Hong. 1985. Biochemical and serological properties of birnaviruses isolated from fish in Korea. *Fish Pathol.* 20(4):463-468.
4. Park, J. W., J. J. Lee, G. Jeong, and Y. C. Hah. 1989. Characterization of the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolated from pen-cultured rainbow trout in Korea. *KOR. J. Microbiol.* 27(3):225-230.
5. Park, M. A., S. G. Sohn, S. D. Lee, S. K. Chun, J. W. Park, J. L. Fryer and Y. C. Hah. 1993. Infectious Hematopoietic Necrosis Virus from salmonids cultured in Korea. *J. Fish Dis.* 16:471-478
6. Nagy, E., and P. Dobos. 1987. Epitope mapping of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) polypeptides using monoclonal antibodies. VII. International Congress of Virology, Edmonton, Canada. Abstracts. OP 25.2, p. 311.
7. Lawrence, W. R., E. Nagy, R. Duncan, P. Krell, and P. Dobos. 1989. Expression in *E. coli* of the major outer capsid protein of infectious pancreatic necrosis virus. *Gene.* 79: 369-374.
8. Frost, P., A. Ness, N. P. Maaseide, D. H. Knappskog, and O. M. Rodseth. 1995. Efficacy of recombinant vaccine against infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon post-smolt. *Intervet Norvio.* pp784.
9. Christie, K. E. 1997. Immunization with viral antigens: infectious pancreatic necrosis. *Dev. Biol. Stand.* 90: 1-9
10. Engelking, H., and J. C. Leong. 1989. The glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus elicits neutralizing antibody and protective responses. *Virus Research.* 13: 213-230.
11. Gilmore, R. D., H. M. Engelking, D. S. Manning, and J. C. Leong. 1988. Expression in *E. coli* of an epitope of the glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus protect against viral challenge. *Bio/Technology.* 6(3): 85-90.
12. Xu, L., D. V. Mourich., H. M. Engelking, S. Ristow, J. Arnzen, and J. C. Leong. 1991. Epitope mapping and characterization of infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein, using fusion proteins synthesized in *E. coli*. *J. Virol.* 65(3): 1611-1615.
13. Anderson, E. D., D. V. Mourich, S. C. Fahrenkrug, S. Lapatra, J. Shepherd, J. A. Leong. 1996. Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against

- infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 5: 114-122.
14. Boudinot, P., M. Blanco, P. de Kinkelin, A. Benmansour. 1998. Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout. *Virology* 249: 297-306
 15. Corbeil, S., S. E. Lapatra, E. D. Anderson, G. Kurath. 2000. Nanogram quantities of a DNA vaccine protect rainbow trout fry against heterologous strains of infectious hematopoietic necrosis virus. *Vaccine*. 18: 2817-2824.
 16. Park, J. W., and G. Jeong. 1996. Identification of VP3 as an important neutralising epitope from DRT strain, a Korean isolate of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish & Shellfish Immunol.* 6: 207-219.
 17. Lee, J. Y., W. J. Cho, J. W. Do, H. J. Kim, J. W. Park, M. A. Park, S. G. Sohn, G. Jeong, and Y. C. Hah. 1996. Monoclonal antibodies raised against infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) G protein and a cellular 90 kDa protein neutralize IHNV infection in vitro. *J. Gen. Virol.* 77: 1731-1737.
 18. Ristow, S. S. E. LaPatra, R. Dixon, C. R. Pedrow, J. W. Park, and G. H. Thorgaard. 2000. Responses of cloned rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) to an attenuated strain of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus. *Dis. Aquat. Org.* (in press)
 19. Sohn, S. G., M. A. Park, J. W. Do, J. Y. Choi, and J. W. Park. 1995. Birnavirus isolated from cultured flounder in Korea. *Fish Pathol.* 30(4): 279-280.
 20. Oshima, S., J. Hata, C. Segawa, S. Yamashita. 1996. Mother to fry, successful transfer of immunity against infectious hematopoietic necrosis virus infection in rainbow trout. *J. Gen. Virol.* 77: 2441-2445
 21. Food and agricultural Organization Aquaculture Production Statistics 1988-1997 (Food and Agricultural Organization, Rome, 1999)
 22. Naylor, R. L. et al., Effect of aquaculture on world fish supplies. (2000) *Nature* 405: 1017-1024
 23. Moon, C. H., 1998. Gene cloning of nucleocapsid protein of a Korean isolate of infectious hematopoietic necrosis virus. *Korean Journal of Microbiology* 34: 69-73.
 24. Moon, C. H., 2000. Cloning of the non-virion (NV) of a Korean Isolate of Infectious Hematopoietic Necrosis and identification of the role of the NV in IHNV replication. *Korean Journal of Microbiology* 36(2): 103-108
 25. Park, J. M., et al., 1998. Gene cloning of matrix proteins of a Korean isolate of infectious hematopoietic necrosis virus. *Korean Journal of Microbiology* 34: 64-68.
 26. Okamoto, N. et al., 1983. Antigenic relationship of selected strains of IPNV and eel virus european (EVE). *J. Fish Dis.* 6: 19-25