

발간등록번호

11-1541000-001496-01

국내 새우 간췌장바이러스 집단 의 게놈 분석과 이를 이용한 Real-Time PCR 진단 키트의 개발

(Sequence analysis of shrimp
hepatopancreatic parvovirus (HPV)
population in Korea and development of a
Real-Time PCR detection Kit)

부경대학교

농림수산식품자료실



0011965

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “국내 새우 간췌장바이러스 집단의 계통 분석과 이를 이용한 Real-Time PCR 진단 키트의 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 7월 31일

주관연구기관명 : 부경대학교

주관연구책임자 : 최 태 진

연 구 원 : 장 인 권

연 구 원 : 서 형 철

연 구 원 : 이 용 석

연 구 원 : 김 남 일

연 구 원 : 김 재 호

요 약 문

I. 제 목

국내 새우 간췌장바이러스 집단 의 게놈 분석과 이를 이용한 Real-Time PCR 진단 키트의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1970년대 이 후 새우 양식은 수산업에서 매우 중요한 경제적 위치를 차지해왔으나 양식의 증가에 따른 다양한 질병, 특히 바이러스성 질병에 의하여 매년 큰 피해가 발생하고 있다. 현재 새우 흰반점 바이러스 (White spot syndrome virus, WSSV)를 비롯한 약 20여 종의 바이러스가 양식 새우류에 심각한 피해를 일으키는 것으로 보고되어 있다. 이들 바이러스는 유생에서 성체에 이르기까지 다양한 발달 단계에 감염하며 초기 유생기에 발병할 경우 치사율이 높다. 국내에서는 2002년 이후 우리나라 고유 새우종인 대하 (*Fenneropenaeus chinensis*) 대신에 WSSV에 감수성이 덜 한 것으로 알려진 흰다리새우 (*Litopenaeus vannamei*) 가 도입되어 양식되고 있으며 그 결과 2011년 흰다리새우의 생산량이 2,844톤에 이른 반면 대하의 생산은 18톤에 불과하였다. 그러나 흰다리새우는 다른 바이러스들의 숙주생물로서 흰다리새우의 양식 증가에 의하여 새로운 바이러스에 의한 피해가 예상된다. 실제로 본 연구의 예비실험 결과 국내에서 양식되고 있는 흰다리새우가 WSSV외에 간췌장바이러스 (Hepatopancreatic parvovirus, HPV)에 감염되어 있는 것으로 확인되었다.

HPV는 외막이 없는 구형의 바이러스로 지름이 22 - 23 nm 정도이고 한 가닥의 선형 DNA 게놈을 가지고 있으며 *Parvoviridae*과에 속하는 바이러스이다. 이 바이러스는 1984년 싱가포르에서 야생의 *Penaeus merguensis* 와 *F. chinensis*로부터 분리된 후 동남아시아를 비롯한 전 세계에 분포하고 있으며 국내에서는 1985년 양식 대하에서 처음 보고되었다. 현재까지 인도, 태국과 호주에서 분리된 3개의 균주에 대한 전체 게놈의 염기서열이 알려져 있으며, 이

들 염기서열로부터 유추한 아미노산 서열에 의하여 3개의 유전자형으로 구분된다. 현재 우리나라에서 분리된 HPV의 전체 게놈에 대한 전체 염기서열은 알려져 있지 않으나, 부분적으로 이루어진 염기서열에 의하면 우리나라에서 분리되는 HPV는 마다가스카와 탄자니아에서 분리된 균주들과 함께 제 1형에 속하는 것으로 확인되었다.

III. 연구개발 내용 및 범위

현재 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 을 비롯한 다양한 HPV 검출법이 보고되어 있으나, HPV의 경우 분리된 숙주세어나 지역에 따라 유전적 변이가 심하여 한 균주에 적용된 검출법이 다른 균주에 적용되지 못하는 경우가 있다. 따라서 본 연구는 국내에서 분리된 HPV의 전체게놈의 염기서열을 밝히고 이를 이용하여 특이성 및 민감도가 높은 분자생물학적 검출 방법을 개발하고자 이루어졌다.

IV. 연구개발결과

국내의 양식 대하에서 분리된 *FcDNV*로 명명된 HPV의 전체 게놈은 6,336개의 염기로 구성되어 있으며, 이는 이제까지 보고된 HPV 게놈 중 가장 큰 것으로 전체 G+C 비율은 40% 였다. HPV의 게놈은 3개의 open reading frames (ORFs) 을 포함하고 있으며, 첫 번째와 두 번째 ORF는 일부 중복이 확인되었다. 3개의 ORF는 각각 425, 578 그리고 820개의 아미노산으로 구성된 NS2, NS1 그리고 VP 단백질을 암호화 하고 있다. 3개의 단백질 중 NS1 단백질이 기존에 보고된 다른 HPV 균주의 NS1 단백질과 가장 높은 아미노산 서열 상동성을 보였으며, 그 다음으로는 NS2 단백질과 VP 단백질이었다. 전체 염기서열 비교를 기초로 한 계통학적 분류에서, HPV는 3개의 그룹으로 분류되었으며, *FcDNV*는 마다가스카와 탄자니아에서 분리된 균주들과 함께 제1 유전형으로 분류되었다. 양성의 게놈 DNA의 5'과 3' 말단의 비 암호화 지역에 대한 염기서열 분석결과 이들은 각각 Y 자 모양과 머리핀 모양의 2차 구조를 이루는 것으로 확인되었다.

국내에서 분리된 HPV 균주의 염기서열을 토대로 WSSV와 HPV를 동시에 검출 할 수 있는 다중 PCR (multiplex-PCR) 키트를 개발하였다. WSSV의 경우 vp28 유전자의 604 염기를 대상으로 하였으며, HPV에 대하여는 8종의 균주에 대한 염기서열 비교 후 NS2와 NS1 단백질 유전자 사이의 338 염기를 목표로 하였다. 또한 반응의 양성 지표로 사용하기 위하여 흰다리새우, 대하 그리고 홍다리얼굴새우 (*P. monodon*)의 β -actin 유전자 139염기서열을 가진

DNA 조각을 증폭할 수 있는 프라이머를 합성함으로써 이들 세 종류의 바이러스로부터 두 종류의 바이러스를 동시에 검출할 수 있도록 하였다. 클로닝된 목표 DNA를 포함하고 있는 플라스미드를 대상으로 한 실험에서 WSSV와 HPV의 최소 검출한계는 각각 21.4 분자와 19.0 분자로 확인되었다. HPV, WSSV 및 β -actin 프라이머의 최적 비율은 3:1:1이었으며, 최적의 프라이머 결합온도는 57°C로 확인되었다. 17 곳의 새우 양식장에서 분리한 170개체의 흰다리새우에 대한 검사 결과 41.8%는 WSSV와 HPV에 의한 중복감염을 보였다. WSSV와 HPV에 의한 단독 감염은 각각 40.0%와 3.5%였으며, 바이러스에 감염되지 않은 새우 개체는 없었다. 자연상태에서 포획된 10개체의 대하에 대한 실험 결과 60%는 WSSV와 HPV에 의한 중복감염, 40%는 HPV에 대한 단독 감염을 나타내었다.

HPV 계놈은 분리된 숙주나 지역에 따라 높은 다양성을 보이기 때문에 각 균주에 적절한 검출 방법의 개발이 필요하다. 본 연구에서는 국내에서 분리된 HPV계놈의 염기서열을 토대로, 증폭된 SYBR 형광을 측정하는 Green star 키트와 형광 표지된 프로브의 분해에 따른 형광의 증가를 측정하는 Dual star 키트를 고안하였다. 이 키트는 DNA 시료 이외에 필요한 모든 구성물들을 포함하는 동결 건조 상태로 만들어 사용하기 편한 정량적 실시간 PCR 키트를 개발하였다. 두 키트는 1에서 1×10^9 분자의 클론된 HPV DNA를 검출할 수 있었으며, 감염된 새우를 이용한 실험에서 Green star와 Dual star 키트의 최소 검출 한계는 각각 7.74×10^1 과 9.06×10^1 분자로 확인되었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구에서 개발된 다중-PCR 키트와 정량적 실시간 PCR 키트는 국내에 발생하는 HPV를 단독 또는 WSSV와 동시에 검출할 수 있는 신속하고 효과적인 키트로서 어미나 유생에 대한 검사를 통하여 감염된 새우가 양식장에 이용되지 않도록 함으로써 이들 바이러스성 질병의 발생을 늦추고 발생 현황을 추적함으로써 이들 바이러스에 의한 경제적인 피해를 줄이는데 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다. 본 연구를 통하여 개발된 3종의 검출 키트는 기술이전을 통하여 상품화하여 보급될 예정이다.

SUMMARY

Since its introduction in the 1970s, shrimp aquaculture has been an economically important aquaculture species in Korea. However, increase of shrimp aquaculture resulted in the concurrent increase of diverse diseases, especially of viral diseases, which has caused huge economic losses. Currently about 20 shrimp viruses including White spot syndrome virus (WSSV) known to infect penaeid shrimps, has been reported from many countries. These viruses can infect shrimp at different developmental stages, from protozoa to the adult stage, with the highest mortality occurring at the early postlarval stage. Since 2002, *Fenneropenaeus chinensis*, the native shrimp species in Korea that is more susceptible to white spot syndrome virus (WSSV) has been largely replaced with the less susceptible *Litopenaeus vannamei*, and the production of *L. vannamei* in 2011 was 2844 MT compared to the 18 MT of *F. chinensis*. However, introduction of this new species has resulted in the occurrence of new viral diseases, and a recent survey of *L. vannamei* culture ponds showed a high incidence of another shrimp virus, hepatopancreatic parvovirus (HPV) in Korea.

HPV, a non-enveloped icosahedral virus of 22 - 23 nm diameter with a linear ssDNA, belongs to the *Parvoviridae* family. After the first report in 1984 involving wild *Penaeus merguensis* and *Fenneropenaeus chinensis* from Singapore (5), HPV has been reported around world including Asia-Pacific and was reported in 1985 from *F. chinensis* in Korea.

To date, the complete HPV genomes of three strains isolated in *P. monodon* (*PmDNV*), *P. monodon* (*PmDNV*), and *P. merguensis* (*PmergDNV*) from India, Thailand, and Australia, respectively and additional incomplete or partial genomic sequences including HPV isolated from *F. chinensis* in Korea and China are available. Phylogenetic analysis results based on the amino acid sequence of the right open reading frame (ORF) from seven isolates suggest that three HPV genotypes exist and the Korean isolates belong to the genotype I with isolates from Madagascar and Tanzania.

Several molecular diagnostic methods, such as polymerase chain reaction (PCR) have been developed for the detection of HPV. However, HPV shows high sequence

variations among isolates from different hosts or geographical regions and diagnostic tools specific one isolate cannot be applied to other isolates. Therefore, in this study the complete nucleotide sequence of a HPV Korean isolate was determined and sensitive and specific molecular diagnostic tools were developed.

The complete nucleotide sequence of a HPV strain isolated from the fleshy prawn *Fenneropenaeus chinensis* in Korea, named as *FcDNV*, was determined and compared to previously reported sequences. The entire genome of *FcDNV* contains 6,336 nucleotides, with 40% G+C content, which is the biggest of the known HPV strains. The HPV genome has three open reading frames (ORFs) with a slight overlap between the first and second ORFs. The three ORFs encode the NS2 and NS1 proteins and VP that consist of 425, 578, and 820 amino acids, respectively. Among the three proteins, the NS1 protein shows the highest sequence similarity to the NS1 protein of other known HPV strains, followed by the NS2 protein and the VP protein. Phylogenetic analyses showed that HPV can be grouped into three genotypes, as previously reported, and *FcDNV* can be grouped as genotype I, with HPV strains isolated in Madagascar and Tanzania. The nucleotide sequences of the noncoding regions at the 5'- and 3'-ends of the plus-strand genome showed a Y-shaped hairpin structure and simple hairpin structure, respectively.

A multiplex PCR kit for simultaneous detection of these two viruses was developed and field testing was conducted. A 604-bp target sequence was selected from the vp28 gene of WSSV. A primer set was developed to amplify a 338-bp DNA fragment at the junction of the NS2 and NS1 protein genes of HPV after alignment of eight sequences from different strains. Another internal positive control primer set produced a 139-bp PCR fragment from the β -actin gene by alignment of this gene from *L. vannamei*, *F. chinensis*, and *Penaeus monodon*, so that the multiplex PCR system can be used for the simultaneous diagnosis of these two viruses from all three of these host shrimps. The detection limits, tested using purified plasmids, for WSSV and HPV were 21.4 and 19.0 copies, respectively. The optimum ratio for HPV, WSSV, and β -actin was 3:1:1, with an optimum annealing temperature of 57°C. Field test of the multiplex PCR with 170 *L. vannamei* individuals from 17 aquaculture farms showed 41.8% coinfection with WSSV and HPV, and 40.0% and 3.5% single infection with WSSV and HPV, respectively. No virus-free shrimp was found. Ten

wild catch *F. chinensis* individuals showed 60% coinfection, and 40% were infected with HPV.

Two easy to use quantitative real-time PCR kits, the Green star and Dual star, were developed. These two kits contain all the necessary components for real-time PCR including HPV primers, using the primers obtained from the sequence of Korean isolates of HPV. These two kits could detect 1 to 1×10^9 copies of cloned HPV DNA. The minimum detection limits obtained from HPV infected shrimp were 7.74×10^1 and 9.06×10^1 copies in the Green star and Dual star assay kit, respectively.

The multiplex-PCR kits and the ready to use real-time PCR kits can be used for rapid, sensitive and an efficient screening of HPV for Korean isolates and WSSV before introduction of post larvae into culture pond and thereby decrease the incidence of early development of the diseases and could contribute to the reduction of the economic losses caused by these viruses.

CONTENTS

Chapter 1. General Introduction of the Research	10
I. Importance of the Research	10
1. Technical aspects	10
2. Economic and Industrial aspects	11
3. Sociocultural	12
Chapter 2. Developmental Stages	13
I. Domestic status	13
II. International status	13
III. Status of related industries	14
Chapter 3. Conducted Researches and Their Results	16
I. Nucleotide sequence analysis of a Korean strain of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from <i>Fenneropenaeus chinensis</i>	16
1. Introduction	16
2. Material and Methods	18
3. Results	21
II. Production of monoclonal antibodies for the development of a detection kit	37
1. Introduction	37
2. Material and Methods	38
3. Results	39
III. Development of genotype specific primers	47
1. Introduction	47
2. Material and Methods	47
3. Results	52
IV. Development of common primers for different genotypes and a duplex PCR detection kit for WSSV and HPV	55
1. Introduction	55
2. Material and Methods	57
3. Results	58
V. Development of Real-Time PCR kits for HPV detection	64
1. Introduction	64
2. Material and Methods	65
3. Results	70
Chapter 4. Achievements of the goals and contributions	77
Chapter 5. Products and future applications	78
Chapter 6. Collected informations during research period	89
Chapter 7. References	90

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	10
제 1 절	연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성	10
1.	기술적 측면	10
2.	경제, 산업적 측면	11
3.	사회, 문화적 측면	12
제 2 장	국내외 기술개발 현황	13
제 1 절	국내기술동향	13
제 2 절	국외기술동향	13
제 3 절	관련분야 산업화 현황	14
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	16
제 1 절	국내에서 분리된 HPV의 전체 게놈의 염기서열	16
1.	서론	16
2.	연구내용 및 방법	18
3.	연구 결과	21
제 2 절	재조합 단백질의 생성 및 진단 Kit 개발을 위한 단클론 항체 개발	37
1.	서론	37
2.	연구내용 및 방법	38
3.	연구 결과	39
제 3 절	HPV 유전형에 따른 프라이머의 개발	47
1.	서론	47
2.	연구내용 및 방법	47
3.	연구 결과	52
제 4 절	HPV 유전형 공통 프라이머 및 이를 이용한 HPV와 WSSV 동시 검출 키트의 개발	55
1.	서론	55
2.	연구내용 및 방법	57
3.	연구 결과	58
제 5 절	HPV의 실시간 진단용 키트 개발	64
1.	서론	64
2.	연구내용 및 방법	65
3.	연구 결과	70
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	77
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	78
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	89
제 7 장	참고문헌	90

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성

1. 기술적 측면

○ 바이러스에 의한 질병은 특별한 치료 방법이 없기 때문에 철저한 사전 검사를 통하여 바이러스의 유입을 차단하는 것이 최우선이다. 최근 들어 WSSV 등에 대하여는 PCR을 이용한 유전자 검사법 등을 통하여 무병 종묘의 입식을 통한 초기 바이러스 발병을 감소시키고 있다. 간체장바이러스 (Hepatopancreatic parvovirus, HPV)는 대하, 홍다리얼룩새우 (*P. monodon*), 인디아새우(*P. indicus*) 등에 광범위하게 확산되어 있는 바이러스로, 우리나라에서는 1991년도에 자연산 및 양식산 대하에서 발견된 것으로 보고되었으며, 직접적인 피해는 2004년에 처음 발생하였다. 감염된 새우는 초기 감염의 경우 폐사로 진행되기도 하며, 일반 감염된 새우는 특이적인 증상은 나타나지 않아 진단이 어려움에 있다. 그러나 감염된 새우는 성장이 저하되고, 건강이 악화되어 비브리오 등에 의한 2차 감염되어 폐사될 가능성이 높다 (그림 1-1).

○ PCR 등을 이용한 진단법 개발에는 바이러스 게놈의 염기서열 파악이 필수적이다. 우리나라에 존재하는 HPV는 genotype I으로 알려져 왔으나, 최근 들어 이들의 변이형 또는 다른 유전자형이 발견되어, 기존의 염기서열을 이용한 진단법 개발에 한계가 있다. 따라서 신속하고 정확한 진단법의 개발을 위해서는 우리나라에 존재하는 HPV의 염기서열 분석이 필수적이다. 또한 HPV의 염기서열 분석을 통한 진단법 개발은, 하나의 Kit으로 다양한 새우류 바이러스 검사를 할 수 있는 Multiplex 진단 Kit 개발에 필수적이다.



그림 1-1. 건전 대하(왼쪽)과 HPV에 감염된 대하(오른쪽)의 성장 비교

2. 경제·산업적 측면

○ 새우는 종교, 인종 그리고 국가에 관계없이 전 세계인들이 좋아하는 식품으로서 톤당 6,000~12,000불에 이르는 세계적으로 높은 고부가 수산물 중의 하나다. 세계의 새우양식 총생산량은 1994년에 약 88만톤에서 매년 증가하여 2002년도에는 148만톤에 이르렀고 생산 금액으로는 약 180억불(180조원)에 이르렀다. 국내의 새우양식은 외국에 비해서는 빈약하지만 1996년도부터 폐염 전이 새우 양식장으로 개발되면서 증가하여 2004년도에는 2,426톤에 달해 서·남해안 지역에서는 매우 중요한 양식 산업의 하나다 (해양수산부, 2005). 그러나 흰반점증후군바이러스(WSSV)에 의한 대하의 생산량이 급격히 감소하였으며, 특히 한국의 남해안 및 서해안에서 양식하는 대하류의 대량 폐사를 야기했다. WSSV 감염으로 인해 1993년 일본에서는 많은 새우 사육장들이 일시적으로 문을 닫았고, 한국에서도 2002년에 비슷한 문제에 직면했다 (Jang *et al.*, 2009). 2002년 이래, 대하(*Fenneropenaeus chinensis*)는 WSSV에 덜 취약한 태평양 흰새우인 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)로 대체되었고, 그 결과 2011년도 대하 생산량은 18MT 였으나 흰다리새우의 생산은 2844MT였다(<http://fs.fips.go.kr>). 흰다리새우가 WSSV에 덜 취약하긴 하지만, 한국에서 또 다른 새우 바이러스인 간췌장 파보바이러스(hepatopancreatic parvovirus, HPV)의 발병을 야기 하였으나 아직 이 바이러스에 의한 구체적인 피해가 보고 되어 있지 않다 (그림 1-2).

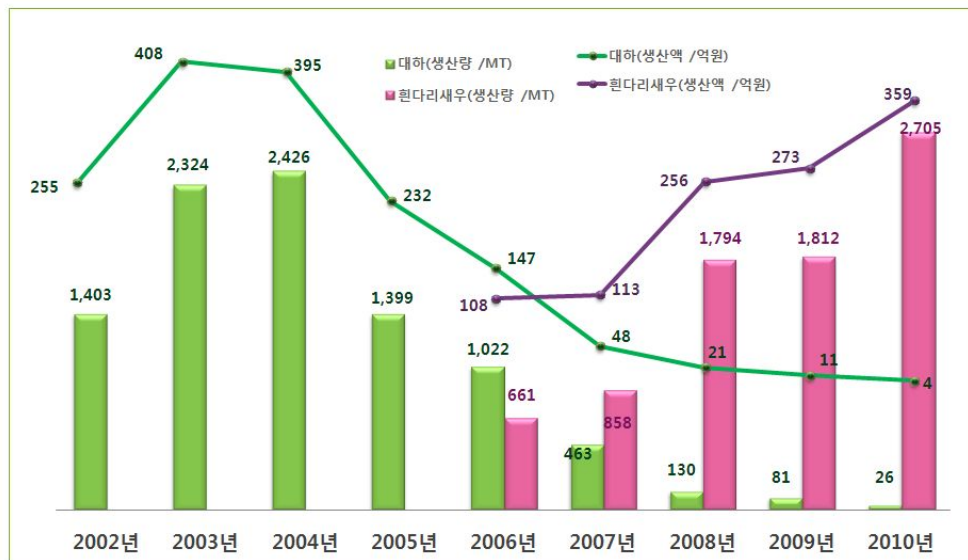


그림 1-2. 국내의 대하와 흰다리새우 생산량의 변화 추이

○ 최근, 간췌장바이러스 (HPV)에 의한 질병의 만연으로 새우 생산량 감소로 인한 피해가 속출하여 그 피해액만도 아시아에서만 매년 3조원이 넘고, 우리나라에서는 200억원이 넘고 있다. 이러한 피해를 막기 위해 양식업자들은 사료첨가제에 많은 비용을 쓰고 있다. 전 세계적으로 2조 원

이상의 비용을 쓰고 있지만 이를 막을 수 있는 효과적인 사료첨가제가 아직까지 시판되고 있지 않아 이 시장은 황금시장이라 할 수 있다.

3. 사회 문화적 측면

○ 바이러스 사전 검사에 의한 무병 종묘의 공급은 어민의 소득 증대를 위한 정부 및 연구기관에서 수행해야 할 주요 업무 중 하나이며, 정확한 진단에 의한 무병 종묘 보급에 따라 양질의 양식 새우를 생산함으로써 양식새우에 대한 소비자들의 인식을 변화시킬 필요가 있다. 또한 우수 종묘의 보급 및 생산을 통하여 새우 양식에 있어 국제 경쟁력을 강화하여 양식 어민을 보호할 수 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내기술동향

○ 국내에서의 새우류의 양식 및 질병에 관한 연구는 충남 태안에 위치한 국립수산물과학원 서해 특성화센터를 중심으로 이루어지고 있다. 서해특성화 연구센터에서는 “양식산 새우류 질병대책” 연구를 중심으로 대하 및 흰다리새우 등 우리나라 주요 양식 새우류에 대한 바이러스 감염 여부 조사 및 질병 방제 대책에 관한 연구를 수행 중이다.

○ 서해 특성화 연구센터가 최근에 발표한 Real Time PCR 자료에 의하면 서해안의 대하 양식장의 바닷물에서는 HPV가 많게는 4.43×10^5 copies/L로 발견되었으며, 흰다리 새우 양식장에서는 발견되지 않았다. 그러나 새우 조직에서는 대하와 흰다리새우 모두에서 HPV가 발견되었으며, 대하에서 약 201배 정도 많은 바이러스가 검출되었다 (Jang *et al.*, 2008).

○ 동의대 한방식품연구소와 국립수산물과학원 서해특성화연구센터는 새우의 흰반점 바이러스를 보균한 새우에 한약재제 첨가사료를 먹여 양식한 결과 일반새우보다 25%나 크고 건강한 새우를 1-2개월 빨리 수확하는데 성공했다는 보고를 하였으나, 이러한 첨가제가 HPV에 대하여는 어떠한 영향을 미치는지는 알려져 있지 않다.

제2절 국외기술동향

○ 최근 들어 바이러스에 감염되지 않은 어미 새우를 이용하여 바이러스에 감염되지 않은 종묘를 생산하는 연구가 미국, 태국 등에서 이루어지고 있으며, PCR이나 HPV에 대한 항체를 이용하여 바이러스를 진단하는 기술들이 개발되고 있다.

○ 태국에서는 새우를 만들기 위하여 Kung Krabaen Royal Development Study Center)에서 WSSV, IHHNV 및 TSV에 감염되지 않은 무병 홍다리 얼룩새우를 7세대 째 개발하고 있으며 이를 위해서 정부에서 2백만불(약 20억원)의 연구비를 지원하여 15ha의 무병새우 양성시설을 갖추고 무병새우의 종 보존과 양식 순치화(domestication)를 위한 연구를 계속하고 있다. 또한 Thailand의 Mahidol University에 있는 Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology (CENTEX SHRIMP)에서는 Timothy W. Flegel 교수의 주도로, White-Spot Syndrome Virus (WSSV), Yellow-Head Virus (YHV) and Hepatopancreatic Parvo Virus (HPV)등에 대하여 DNA를 기초로 한 진단법을 개발하여 왔으며, 동대학의 Shrimp Biotechnology Business Unit(SBBU)에서 상품화를 추진하고 있다 (<http://www.sc.mahidol>

.ac.th/research/shrimp. htm).

○ 미국의 애리조나 주립대학은 1970년대부터 새우질병전문연구를 위하여 National Sea Grant College Program을 수행하였으며, 그 결과 바이러스를 포함한 각종 질병에 관련된 첨단 연구 및 세계수역기구(O.I.E)의 표준 진단법 등을 주관하고 있다. 또한 애리조나 주립대학을 중심으로 건강한 새우 종묘를 생산하기 위하여 The United States Marine Shrimp Farming Program (USMSFP)을 운영하고 있는데, USMSFP는 여러 주가 함께 참여하는 연구 프로젝트로 세계 시장에서의 경쟁력 확보를 위하여 새우 양식업자들에게 기술과 연구 산물을 이전하는 것을 목표로 하고 있다.

○ HPV를 비롯한 바이러스의 진단을 위한 kit 개발을 위해서는 바이러스의 염기서열을 분석하는 것이 필수적이다. 미국 애리조나 대학의 Lighter 교수 그룹은 우리나라에서 분리한 HPV의 일부 염기서열을 분석하였으며, 그 결과 우리나라에서 분리되는 바이러스가 Tanzania, Madagascar 등에서 분리되는 HPV와 함께 Genotype 1에 해당한다고 보고하였다 (Global Aquaculture Advocate, July/August, 2008, P79-80). 또한 Genotype III에 해당하는 Australia strain에 대한 전체 염기서열과 (La Fauce *et al.*, 2007), Genotype II에 해당하는 Thailand strain에 대한 전체 염기서열이 보고된바 있다 (Sukhumsirichart *et al.*, 2006).

제3절 관련분야 산업화 현황

○ 비록 HPV는 아니지만 새우에 발생하는 대표적인 바이러스인 WSSV 등에 대하여는 이미 진단을 위한 kit가 생산 시판되고 있다. 예를 들어, 미국의 Texas 주 Austin에 위치한 Bio Scientific Corp.에서는 PCR을 이용한 WSSV 검출용 Kit인 Max Signal을 개발하여 시판하고 있으며(<http://www.biooscientific.com/catalog/WSSV.htm>), 일본의 동경에 위치한 Fujikura Kasei의 경우 Western blot을 이용한 WSSV 검출 Kit인 Shrimple을 생산하고 있다(http://www.fkkasei.co.jp/english/product/Shrimple_HP/english/product/shrimple/). 또한 대만에 위치한 GeneReach Biotechnology사도 WSSV와 TSV 검출 Kit을 생산·보급하고 있다 (http://www.i-screen.com.tw/en_product.html) (그림 2-1).



그림 2-1 시판 중인 새우류 바이러스 진단 Kit의 예

○ 대만에 위치한 GeneReach Biotechnology사도 WSSV와 TSV 검출 Kit을 생산보급하고 있다 GeneReach Biotechnology는 IQ2000이라는 상표로 Hepatopancreatic Parvovirus (HPV), White Spot Syndrome Virus (WSSV), Taura Syndrome Virus (TSV), Macrobrachium rosenbergii Nodavirus (MrNV), Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV), Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) 등 주요 새우류 바이러스에 대한 진단 키트를 개발하여 보급하고 있다(<http://www.iq2000kit.com/>). 또한 인도에 위치한 Bangalore Genei라는 회사에서는 Neted PCR 법을 이용한 HPV detection Kit을 개발하여 시판 중에 있다 (<http://www.bangaloregenei.com/>).

○ 이러한 HPV의 진단 Kit의 개발 및 상업화는 더욱 확대될 것으로 여겨진다. 그러나 이러한 진단 키트의 개발에 있어서 바이러스 게놈의 염기서열을 정확하게 알고 있어야 하며, 새로운 변이형의 생성이나, 새로운 유전자형의 유입에 대비하여 우리나라에서 발생하고 있는 HPV 집단의 염기서열을 분석하는 것은 필수적이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절. 국내에서 분리된 HPV의 전체 게놈의 염기서열 분석

1. 서론

○ 양식 새우에서 심각한 폐사를 일으키는 바이러스는 *Baculoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae* 과(科)에 속한다(Loh, 1999). 이들 바이러스는 유생에서 성체에 이르기까지 다양한 발달단계에 감염하며, 어린 시기에 감염하였을 경우 가장 높은 폐사를 유도한다. 최초의 새우 바이러스인 *Baculovirus penaei*는 *Penaeus duorarum*로부터 1970년대 초반에 발견되었으며, 그 후 다양한 새우 바이러스가 분리 보고되었다 (Loh, 1999; Loh *et al.*, 1997).

○ Hepatopancreatic parvovirus (HPV)는 새우류에서 보고된 20여 종의 대표적인 바이러스의 하나로 호주, 중국, 한국, 필리핀, 말레이시아, 케냐, 이스라엘, 남미와 북미 등 여러 나라에서 보고되었다 (Bonami, 2008). 이 바이러스는 인도-태평양 지역에서 유래한 것으로 알려져 있으며, 아시아로부터 양식 목적으로 살아 있는 새우를 이동하는 과정에서 미주 지역으로 전파된 것으로 여겨진다 (Flegel, 2006). 1984년 싱가포르에서 야생의 *Penaeus merguensis*와 *Fenneropenaeus chinensis*로부터 처음 보고된 이후 (Chong & Loh, 1985), HPV는 한국에서 1985년에 대하 (*F. chinensis*)에서 보고되었다 (Lightner & Redman, 1985). 2002년 이후 국내의 고유종이나 흰반점 바이러스(white spot syndrome virus, WSSV)에 심한 감수성이 있는 대하는 감수성이 덜한 것으로 알려진 흰다리새우 (*Litopenaeus vannamei*)로 대체 되어 왔다 (Jang *et al.*, 2008). 그러나 the effect of HPV 감염이 이 새로운 종에 얼마나 영향을 미치는지는 아직 정확히 파악되어 있지 않으나, 흰다리새우도 HPV에 감수성을 보이며, 국내의 흰다리새우가 HPV에 감염되어 있는 것으로 보고되어 있다 (Jang *et al.*, 2008).

○ HPV는 외막이 없는 구형의 바이러스로서 지름이 22 - 23nm이며, 크기가 약 6kb인 선형의 외가닥 DNA를 게놈으로 가지는 *Parvoviridae*에 속하는 바이러스이다 (Flegel, 2006). 이 바이러스의 게놈은 기능이 알려져 있지 않은 2개의 비구조 단백질과 외피 단백질을 암호화하는 유전자를 가진다 (La Fauce *et al.*, 2007; Safeena *et al.*, 2010; Sukhumsirichart *et al.*, 2006). 게놈의 5'과 3'말단에 존재하는 palindromic한 염기서열은 머리핀 유사구조를 형성할 수 있으며, 이는 바이러스의 복제과정에 프라이머로 작용하는 것으로 알려져 있다 (Muzyczka *et al.*, 2001).

○ HPV는 간체장과 중장의 표피세포에 감염하며, 전 세계에서 양식되고 있는 새우와 야생의 새우 그리고 민물새우인 *Macrobrachium rosenbergii*에 (Anderson *et al.*, 1990) 감염하는 것으로 알려져 있다. 심한 바이러스 감염은 성장 저해, 생산량 감소와 폐사를 유도한다 (Bonami, 2008; Manjanaik *et al.*, 2005; Phromjai *et al.*, 2001; Sukhumsirichart *et al.*, 1999). HPV 입자는 감염된 새우의 간체장 조직, 흉부 부속지와 분비물 등에서 분리된다 (La Fauce, Elliman & Owens, 2007; Manjanaik *et al.*, 2005; Pantoja & Lightner, 2000; Phromjai *et al.*, 2002; Phromjai *et al.*, 2001; Sukhumsirichart *et al.*, 1999). 반면에 또 다른 크기가 작은 새우 감염 파보바이러스인 infectious hypodermal and hepatopietic necrosis virus (IHHNV)는 크기, 모양, 계놈 구성에서 HPV와 유사하지만 외배엽이나 중배엽에서 유래한 다양한 조직에 감염한다 (Lightner *et al.*, 1993). 최근의 IHHNV 계놈에 대한 염기서열 분석 결과 이 바이러스의 계놈은 HPV의 계놈보다 작으며 (3,908 염기쌍) HPV의 유전자 배열이 NS2-NS1-VP인 것에 비하여 NS1-NS2-VP, 의 유전자 배열을 가지는 것으로 확인되었다 (Rai *et al.*, 2011).

○ 현재까지 인도의 *P. monodon* (PmDNV), 태국의 *P. monodon* (PmDNV)과 호주의 *P. merguensis* (PmergDNV)으로부터 분리된 3종의 HPV에 대한 전체 계놈 분석이 완료되었다 (La Fauce *et al.*, 2007; Safeena *et al.*, 2010; Sukhumsirichart *et al.*, 2006). 또한 한국과 중국의 대하에서 분리된 HPV 균주의 부분적 염기서열 (AY008257, GU371276)을 비롯하여, 일부 계놈의 유전자 분석이 이루어졌다. HPV 계놈의 우측에 있는 open reading frame (ORF)의 아미노산 서열을 기초로 한 7개의 균주에 대한 가계도 분석을 통하여 3종의 유전자형이 존재하는 것으로 확인되었으며, 이들은 각각 제1 유전자형 (한국, 마다가스카, 탄자니아), 제2 유전자형 (태국, 인도네시아), 제3 유전자형 (호주, 뉴칼레도니아)이다 (Tang *et al.*, 2008a).

○ 다양한 지역과 숙주 생물 종으로부터 유래한 HPV 계놈의 염기서열 분석은 이들 균주간의 진화학적 유연관계를 이해하는데 유용한 정보를 제공하며, 진단 또는 치료 방법의 개발을 가능케 한다. 본 장에서는 국내의 대하로부터 분리한 HPV 균주의 전체 염기서열을 밝히고, 유전자 구조 및 배열을 분석하였으며, 이미 보고된 다른 HPV 균주와의 유사성을 분석하였다.

2. 연구내용 및 방법

가. HPV 감염 시료의 확보

○ 2008년부터 2009년에 전국의 대하 양식장에서 수집한 대하로부터 Quagen 사의 DNeasy Kit을 이용하여 Total DNA를 추출하였다. 추출한 DNA에 대하여 표 3-1-1에 제시된 3종의 HPV 검출용 primer를 이용하여 PCR 검색을 수행하여 HPV의 존재여부를 조사하였다. PCR은 94°C 7분 반응 후 94°C 1분, 52°C 1분, 72°C 3분으로 이루어진 반응을 35회 실시한 후, 72°C에서 추가로 10분 반응시켰다. 이들 시료 중 충남 홍성에서 분리된 시료를 이용하여 HPV genome 클로닝을 시도하였다.

표 3-1-1. 대하로부터 HPV 감염진단에 Primer와 염기서열

Primer		Sequence	PCR product Size (BP)
TYPE 1 (Pantoja & lightner, 2000)	F	5' GGT GAT GTG GAG GAG AGA 3'	590
	R	5' GTA ACT ATC GCC GCC AAC 3'	
TYPE 2 (Phromjai <i>et al</i> 2002)	F	5' GCA TTA CAA GAG CCA AGC AG 3'	440
	R	5' ACA CTC AGC CTC TAC CTT GT 3'	
TYPE 3 (WSMRC)	F	5' CTA GCA TGG GAG CAG TCG TA 3'	120
	R	5' GAC CTG AAC AGT CTC TGC CA 3'	

나. HPV genome의 클로닝

○ 다양한 HPV genome 변이형을 얻기 위하여 GenBank에 등록되어 있는 HPV의 염기서열을 이용하여 4쌍의 primer를 제작하여 PCR을 수행하였다. PCR에 이용된 primer는 표 3-1-2에 제시되어 있으며, 이들의 위치는 그림 3-1-1에 표시되어 있다. PCR은 94°C 7분 반응 후 94°C 1분, 52°C 1분, 72°C 3분으로 이루어진 반응을 35회 실시한 후 72°C에서 추가로 10분 반응시켰다. PCR 결과는 그림 3-1-3에 제시하였으며, PCR 산물은 1% gel에서 전기 영동한 후 Gene all사의 Gel Cleanup SV kit를 이용하여 겔에서 분리하고 Invitrogen사의 pCR8/GW/TOPO TA Cloning vector에 cloning한 후 *Escherichia coli* TOP10에 형질전환하였다. 각 fragment에 대하여 각 20개의 클론을 확보한 후 Gene All사의 Plasmid Mini Prep Kit을 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 제한 효소 EcoRI으로 처리하여 insert의 유무를 확인한 후 대전 소재 GnC BIO사에 의뢰하여 vector 상에 존재하는 GW1, GW2 primers를 이용하여 염기서열을 분석하였으며, 그림 3-1-2 및 표 3-1-4에 제시되어 있는 internal primer를 이용하여 추가로 염기서열을 분석해 각 클론에 대한 염기서열을 완성하였다.

표 3-1-2. HPV 클론의 염기서열 분석에 이용된 primer와 염기서열

Primer Name	Sequence
F1R1	5' CTG CGG CAC TTA TAT TGT GG 3'
12F1R1	5' CGG CGA ATA AGA AGA GGA AG 3'
F2R2	5' TGC AGA GGA ATG AGG ATG AG 3'
34F2R2	5' GAC GCA GAG GAA TGA GGA TG 3'
F3R3	5' CGA CAG AAC GAC ATC GAC AG 3'
F4R4	5' CAA AGA GCG AGG ACA GTT 3'
74F4R4	5' TTG ACA ACA TGG CAA AGA GC 3'
GW1	5' GTT GCA ACA AAT TGA TGA GCA ATG C 3'
GW2	5' GTT GCA ACA AAT TGA TGA GCA ATT A 3'

*Primer의 위치는 그림 2에 나타나 있으며, GW1과 GW2는 vector 상에 존재하는 primer임

표 3-1-3. HPV의 genome PCR에 이용된 primer와 염기서열

Fragment	Primers	Sequence	Product Size (bp)
1	F1	5' GGC AGA TGT ATT TTG GAG TGA T 3'	1620
	R1	5' TAT AGC CCT AGA ACT GCT TAA CCT 3'	
2	F2	5' AGC CAA TAA AGT ATG TAA GAA CAT ATA TG 3'	1744
	R2	5' ACT GTG TCT GCA ACG ACC TG 3'	
3	F3	5' AGG ATG ATT CCA ATC AAG AAG AA 3'	1513
	R3	5' ACA CAT TGT CTC CAA TGT GTT TG 3'	
4	F4	5' GAG GCG GAA GAT ACG ATG G 3'	1061
	R4	5' AAG GGT AAA CCA CGC ACG 3'	

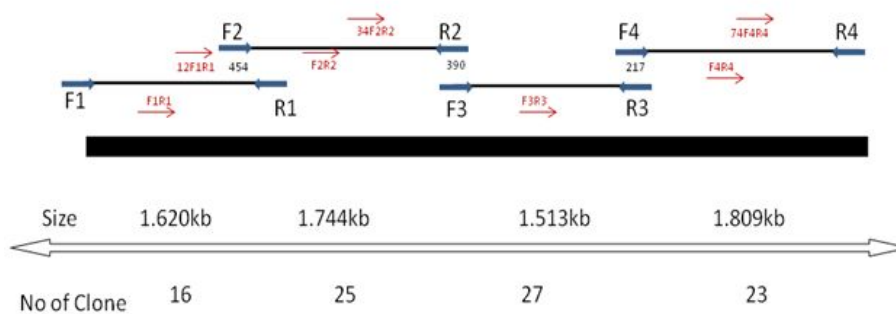


그림 3-1-1. HPV genome의 PCR에 사용된 Primer와 이들의 위치. HPV의 genome을 4개의 조각으로 나누어 PCR을 수행하였다.

○ HPV의 계놈은 그림 3-1-2에 나타난 바와 같이 양쪽 말단부위가 hairpin구조를 이루고 있으며, (+) sense와 (-) sense를 가지는 입자들이 혼재하기 때문에 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 기법을 이용하여 3'과 5'말단부위를 클로닝하고자 하였다 [(-) sense의 3' 말단이 (+) sense의 5'임]. 감염

된 대하로부터 추출한 DNA에 terminal deoxynucleotide transferase(TdT)를 이용하여 oligo dC tailing을 한 후, 그림 3-1-2에 나타나 있는 RACE PCR을 수행하였으며 사용된 primer는 표 3-1-4에 나타나 있다. 3' 말단은 AAP와 GSPF3 primer를 이용하여 1차 PCR을 수행한 후 다시 AUAP primer와 GSPR1로 2차 PCR을 수행하였으며 5' 말단은 AAP primer와 GSPF3 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 1차 PCR 반응은 95°C에서 3분간 반응 후, 95°C 30초, 55°C 1분, 72°C 1분의 반응을 35회 실시한 후 72°C에서 10분간 반응시켰다. 3' 말단을 위한 2차 PCR에서는 동일한 방식으로 PCR을 수행하였으나 annealing 온도만 60°C로 조정하였다. PCR 산물은 Gene all사의 Gel Cleanup SV kit를 이용하여 겔에서 분리하고 Invitrogen사의 pCR8/GW/TOPO TA Cloning vector에 cloning한 후 *Escherichia coli* TOP10에 형질전환 하였다. 형질전환된 대장균으로부터 Gene All사의 Plasmid Mini Prep Kit을 이용하여 DNA를 추출한 후 현재 대전 소재 GnC BIO사에 의뢰하여 vector 상에 존재하는 GW1, GW2 primer와 PCR에 사용된 primer를 이용하여 염기서열을 분석 하였다.

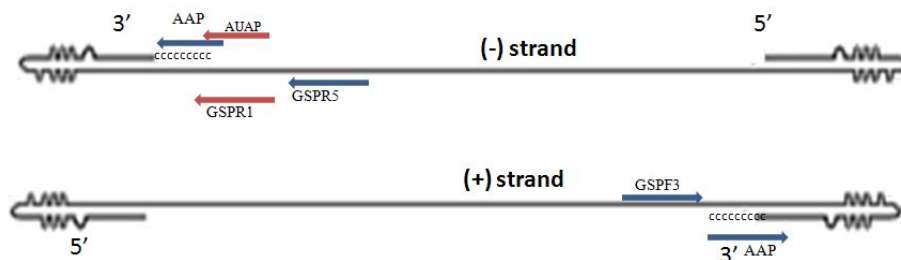


그림 3-1-2. RACE를 이용한 HPV의 3' 말단과 5' 말단 부위의 클로닝.

표 3-1-4. HPV 3' 말단과 5' 말단의 RACE 용 PCR primer

Primer Name	Sequence
AAP	5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG II G 3'
AUAP	5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC 3'
GSPR1	5' CAC TCC AAA ATA CAT CTG C 3'
GSPR5	5' GAT GTC TAT TCT CTG TTG 3'
GSPF3	5' GTA TAA AAC TAA TGT ATA ATG TTA TTG 3'

* deoxyinosine은 primer의 melting point를 낮추기 위하여 사용함.

3. 연구 결과

가. 대하로부터 HPV 감염진단

○ 총 90개의 시료에 대하여 PCR을 수행한 결과는 표 3-1-5에 있는 바와 같이 총 88개의 시료가 HPV에 대하여 양성인 것으로 나타나 감염률이 97.8%에 이르는 것으로 나타나났으며, PCR의 결과의 예는 그림 3-3에 보여주고 있다. 감염된 시료로부터는 590bp에 해당하는 DNA가 증폭되었으며, 그 외에 비 특이적인 DNA의 증폭은 발견되지 않았다. 이들 시료 중 충남 홍성에서 분리된 시료를 이용하여 HPV genome 클로닝을 시도하였다.

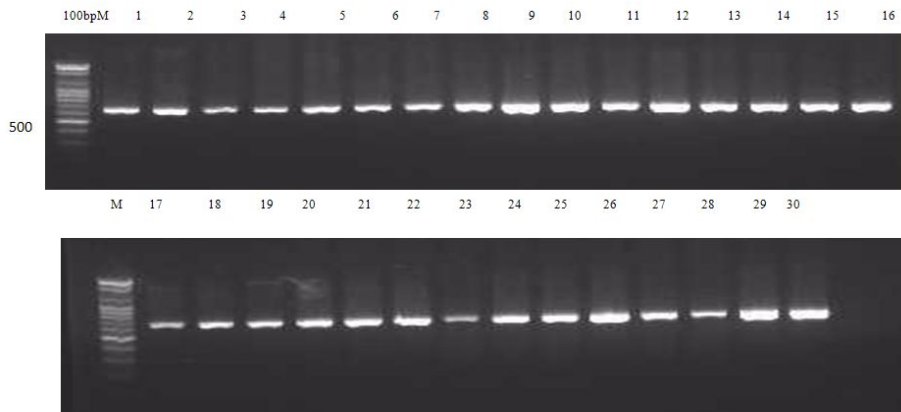


그림 3-1-3. PCR을 이용한 대하로부터의 HPV검출. 충남 홍성군의 대하 양식장 시료로부터 추출한 DNA를 Type I primer를 이용하여 PCR을 수행하였다.

표 3-1-5. PCR을 이용한 HPV 검출 및 시료 확보 결과

Location	Number of		Detected Types
	Tested Samples	Positive samples	
전남 나로도	10	10	TYPE1
전남 영광	10	10	TYPE2
충남 태안	10	10	TYPE3
충남 홍성	30	30	ALL
전남 해남	30	28	ALL

나. HPV 게놈의 염기서열 분석 및 조립

○ HPV의 게놈을 클로닝하기 위하여 4개의 primer 조합으로 PCR을 수행한 결과 1.6kb, 1.7kb, 1.5kb, 그리고 1.8kb의 PCR 산물을 얻었다 (그림 3-1-4A). 증폭된 PCR 산물은 pCR8/GW/TOPO TA Cloning vector에 클로닝하고 선별된 콜로니로부터 plasmid를 추출한 후 insert는 EcoRI 제한효소로 처리하여 확인하였으며, 그림 3-1-4B에서 fragment 1번에 대한 클로닝 결과를 보여주고 있다.

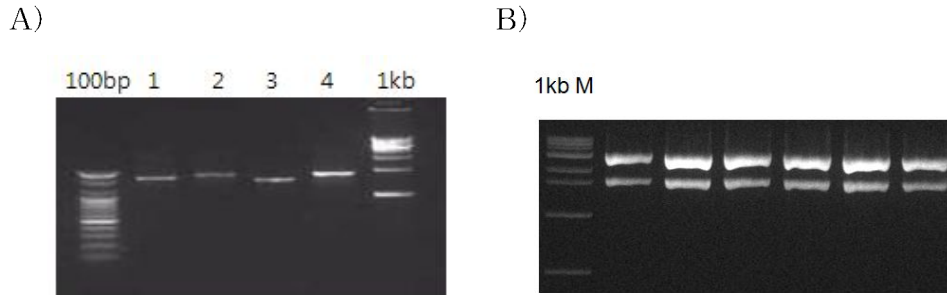


그림 3-1-4. HPV genome의 PCR 증폭 및 클로닝. A) HPV의 genome을 4개의 조각으로 증폭하였으며, 각각의 크기는 1.6kb, 1.7kb, 1.5kb, 1.8kb이다. B) PCR 산물을 pCR8/GW/TOPO TA Cloning vector에 클로닝하고 insert는 EcoRI 제한효소로 처리하여 확인하였으며, 사진은 fragment 1번의 일부 클론의 결과를 보여준다.

○ 각 조각 당 20개, 총 80개의 클론에 대한 염기분석을 실시하였다. ABI3730-XL 자동염기서열 분석기로부터 해독되어진 서열은 그림 3-1-5의 과정을 거쳐 분석하였다. 자동염기서열 분석기로부터 전달된 chromatogram file을 Phred program을 사용하여 trim-alt 0.05 (P-score>20)로 base calling한 후 Cross-match 프로그램을 이용하여 vector 서열을 제거하여 분석에 이용할 서열을 확보하였다. 확보되어진 서열을 Sequencer (ver. 4.6) 프로그램을 사용하여 assembly (50 bp 이상, 100% 상동) 하였다.

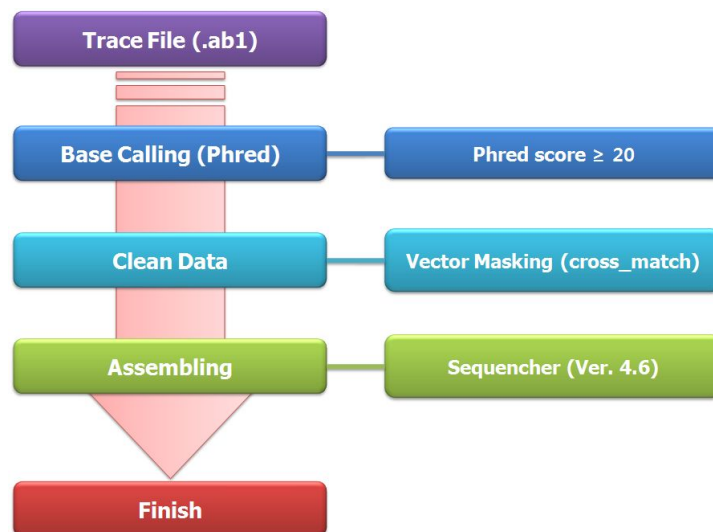


그림 3-1-5. HPV 서열의 분석방법

○ 분석된 Chromatogram file은 총 348개로, 각 fragment에 대하여 20개 클론의 염기서열을 확보하고, 다시 이들 4개의 조각에 대하여 100% 일치하는 염기서열끼리 연결하여 5,647bp의 2개의 완전한 서열을 확보하고 이들을 염기서열을 각각 HPV-KOR1, HPV-KOR2로 명명하였다 (그림 3-1-6).

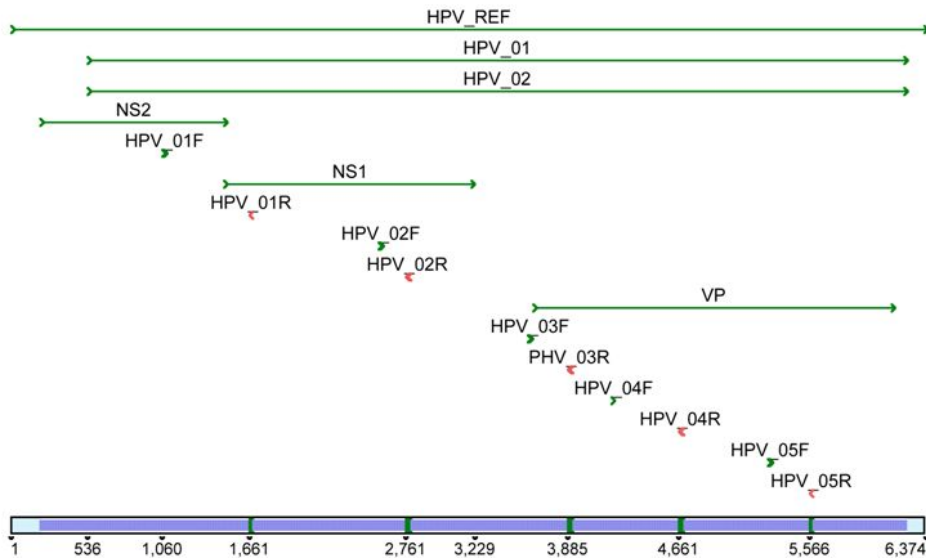


그림 3-1-6. HPV 검출을 위한 primer 위치. HPV-REF는 기존에 국내에서 보고된 strain이며, HPV-01, HPV-02는 본 연구 결과 얻어진 염기서열이며, 실선은 ORF를 나타내고 박스는 각 ORF의 위치를 보여준다.

다. 게놈의 5'과 3' 말단 구조 분석

○ PCR 결과 3' 말단은 1차 PCR에서 750bp, 2차 PCR에서 약 650bp의 PCR 산물을 얻었으며, 5' 말단의 경우 300bp의 PCR 산물을 얻었으며, 이들은 모두 예상되는 크기의 DNA 였다 (그림 3-1-7). PCR 산물은 Gene all사의 Gel Cleanup SV kit를 이용하여 겔에서 분리하고 Invitrogen사의 pCR8/GW/TOPO TA Cloning vector에 cloning한 후 *Escherichia coli* TOP10에 형질전환하였다. 형질전환된 대장균으로부터 Gene All사의 Plasmid Mini Prep Kit을 이용하여 DNA를 추출한 후 현재 대전 소재 GnC BIO사에 의뢰하여 vector 상에 존재하는 GW1, GW2 primer 와 PCR에 사용된 primer를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

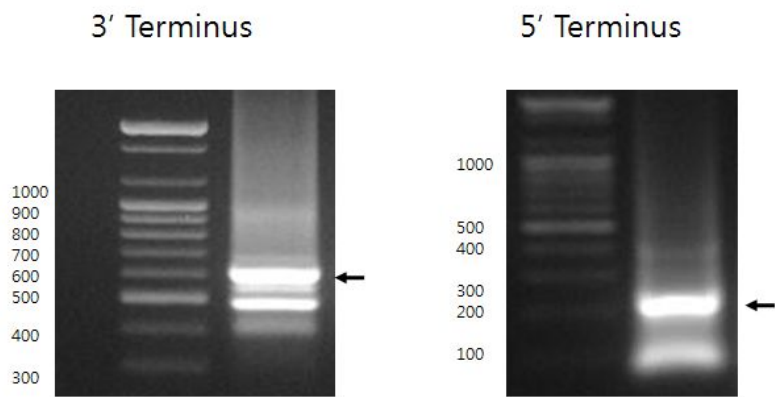


그림 3-1-7. RACE를 이용한 HPV genome의 3' 말단과 5' 말단의 증폭. 3' 말단은 2차 PCR 산물이며 화살표는 예상되는 크기의 PCR 산물을 보여준다.

○ (+) sense RNA를 기준으로 5' 말단의 비 암호화 구역은 게놈의 1에서 204 염기까지로 이루어져 있다. M fold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Quickfold>) 프로그램을 이용한 분석 결과 이 부분은 palindromic 염기서열을 가지고 있으며, 그 구조가 Y자형으로 기존의 다른 바이러스와는 유사하였으나, *PmDENV*와는 다른 형태를 보였다 (그림 3-1-8A). 3' 말단 부위의 비 암호화 구역은 게놈의 5' 말단으로부터 6,081에서 6,336까지의 염기로 이루어져 있으며 약 250염기로 구성된 palindromic repeats 때문에 loop와 같은 구조를 이루었으나 5' 말단 부위와는 다른 구조를 보였다 (그림 3-1-8B).

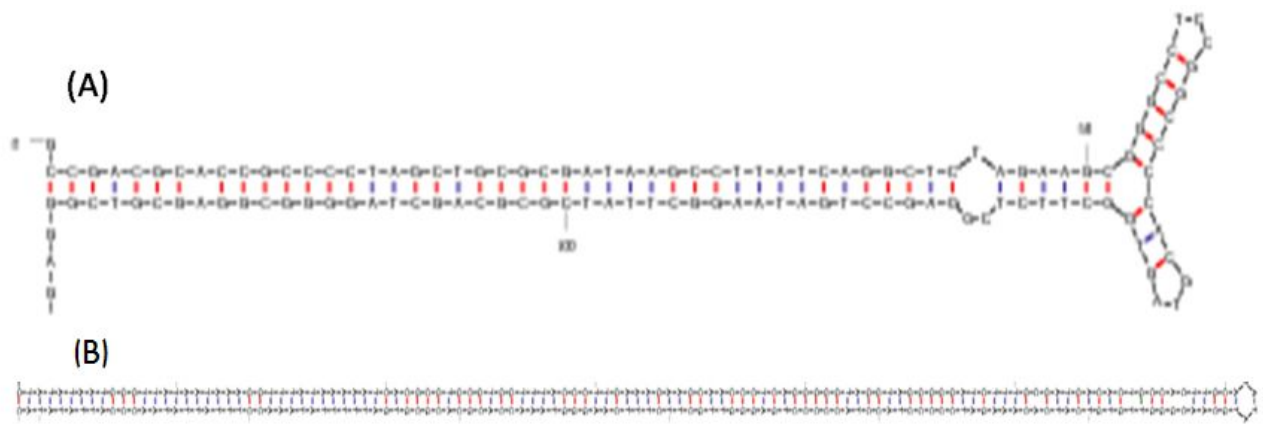


그림 3-1-8. 한국에서 분리된 HPV 게놈의 5' 및 3' 말단의 구조. (A) 5' 말단에 존재하는 Y자 모양의 머리핀 구조, (B) 3' 말단에 존재하는 루프 유사 구조.

라. HPV 전체 게놈에 대한 분석

○ 4개의 조각으로 분석된 게놈의 일부 염기서열과 RACE를 통하여 얻은 5' 및 3' 말단의 염기서열을 조립한 결과 국내에서 분리된 HPV의 전체 게놈은 6,336개의 염기로 이루어져 있으며, 태국에서 분리된 *PmDNV* (6,321bp), 인도에서 분리된 *PmDNV* (6,310bp) 및 호주에서 분리된 *PmergDNV* (6,321bp)보다 길이가 긴 것으로 확인되었다 (그림 3-1-9).

```

1  GCCGACGCACCGCCCCCTAGCTGCGCGATAAGCCTTATCAGGCTCTAGAAGCGGGCCCTCGG
61  GCCCCACGTAGTGGCTTCTCGGAGCCTGATAAGGCTTATCGCGCAGCTAGGGCGGGAGCG
121  TCGGGAGACCCCTATATATTGGTAAACCATGGGGCGGGGTAAGAGTCCTCTCCGAGTGG
      M A S K G E Y Y Y F T P
181  TCTAGCAGTGCAGTACTCAGCAAGATGGCGAGCAAAGGTGAATATTATTATTTACTCCT
      R D L V N F V N T L L C H K I S A I A M
241  AGAGATCTAGTGAATTTTGTGAATACCTTGCTCTGTCATAAGATAAGTGCTATAGCTATG
      K M L T M K E T E F L R E V W I P Y I Q
301  AAAATGCTGACCATGAAGGAGAAGGAAATCTTGAGAGAAGTTTGGATACCGTATATACAA
      G F Q T A H D L G V D K C G A A G S E Y
361  GGTTTCCAAACAGCTCATGACTTAGGAGTAGATAAGTCCGGTCCGGCGGGGAGTGAATAC
      K K V F L D E E K F M D F V T S F R R S
421  AAGAAAGTTTTTCTCGATGAGGAGAAGTTTATGGACTTTGTGACATCTTCCGCCCGCAGC
      V F I S Y G D K W R E D V S Y F M A D V
481  GTATTTATAAGTTTATGGAGATAAATGGAGAGAGGATGTATCATATTTTCATGGCAGATGTA
      F W S D Q L R Q F W M M I F G E C F H V
541  TTTTGGAGTGATCAGTTAAGGCAGTTTTGGATGATGATATTTGGAGAATGTTTCCATGTA
      N M S P C K R L Y I E M L P Y Y Y L A K
601  AACATGTCGCCATGTAAGAGATTGTATATAGAAATGTTGCCTTATTATTATTTAGCAAAG
      M T T E N R H L V E W E Y M N P C P N T
661  ATGACAACAGAGAATAGACATCTAGTAGAGTGGGAGTATATGAATCCATGTCCTAACACA
      H V R R N K M T G M N F C K Q G V V I D
721  CATGTAAGAAGAAATAAGATGACTGGTATGAATTTTTGTAAGCAGGGAGTTGTGATAGAT
      N E Y P D N Q M G C Y N I D E H P L P G
781  AATGAGTATCCAGACAATCAGATGGGTTGTTACAACATAGATGAACATCCATTACCAGGA
      G I R W S G I R N E Y R T G Y V H V N L A K
841  GGTATTAGATGGAGTGGTACGAACGAGTATCGTACAGGTTATGTACATGTTAATAAGGTA
      K W L G V A D K I S D M E E T S S D E E
901  AAATGGTTGGGAGTTGCAGATAAAATCAGTGACATGGAGGAGACATCAAGTGATGAGGAG
      V P S Q E K Y M K S K E Q Q K T
961  GTGCCACGACGCCAGGAGAAGTACATGAAGAGCAAGGAGAAGAAGGAACAACAGAGACA
      E K K E D E P A N K K R K F S L T N T V
1021  GAAAAGAAGGAGGATGAGCCGGCGAATAGAAGAGGAAGTTCTCGCTTACTAACACAGTA
      L E K Q K M E L G K F F R M E E E P I N
1081  TTGGAGAAGCAGAAGATGGAGTTGGGGAAGTTTTTCCGAATGGAAGAAGAACCAATCAAC
      I K L Y D L E E G K E H H V H E A I R I
1141  ATCAAGCTCTACGACCTGGAGGAAGGAAAGGAACACCATGTACATGAAGCTATACGTATT
      D G S N S K F A K K K D E Q G N V M D D
1201  GATGGTGTAACTCTAAGTTCGCAAAGAAGAACGAGCAGGGTAAATGTTATGGATGAT
      F K V I V C D G E N N L Y G F F A N T Q
1261  TTCAAGGTAATTGTTGTGATGGAGAGAATAACTTGATGGTTTTTTTGCAAACACACAA
      L N K L F N K W H G T K K Y S M K P E H
1321  TTGAATAAGTTATTTAACAAATGGCATGGAACAAAGAAATATAGTATGAAACCAGAACAC
      N I S L K V S Q I S E V R N G K M C I V
1381  AATATAAGTTTAAAGTTTTACAGATTTCAGAAGTTAGGAATGGAAGATGTGTATTGTA
      K M G I N D D V K C F A R *
      M F C Q V M K L K R E G
1441  AAGATGGGTATTAATGATGATGTAATAAGTTTTTCCAGGTAATGAAGTTGAAGAGAGAAG
      M V D H N P L V T F Y S G I I V K F E H
1501  GGATGGTGGATCAIAACCCCTCTTGTTACATTTTACTGGTATAATGTAAAGTTTGAAC
      W N N N V S K V R K F L Y K F A Q W L Y
1561  ATTGGAATAATAATGTCAGTAAAGTAAGAAAGTTTTTGTATAAGTTTGCACAGTGGTTGT

```

그림 3-1-9. 한국에서 분리된 HPV 균주 (*FcDNV*)의 전체 염기 서열. ORF로부터 유추된 아미노산 서열이 염기서열 위쪽에 배열되어 있으며, 번역 개시 및 정지코돈은 밑줄로, TATA box는 음영 표시되어 있으며, 이 염기서열은 Genbank에 JN082231으로 등록되었다.

K E C T Y I H N I S A A V H D R C K D D
 1621 ATAAGGAATGTACATACATCCACAATATAAGTGCCGCGAGTTCATGATAGATGTAAAGATG
 C C K D S A N K V C K N I Y G P H L H I
 1681 ATTGTTGTAAAGACTCAGCCAATAAAGTATGTAAGAACATATATGGTCCTCATTACACA
 L L E S V N E N W S K S S K R V L F R G
 1741 TTTTATTGGAGAGTGTGAATGAGAATTGGAGTAAGAGTAGCAAGAGGGTTTTATTCCGCG
 Y E K I L Q H E N K Q L W E D L G L Q K
 1801 GCTACGAGAAGATCCTACAGCACGAGAACAAGCAGCTATGGGAGGACCTAGGACTACAGA
 T S P S S M S L W D G E M F K W Y M F R
 1861 AGACATCACCTTCGTCGATGAGTCTATGGGATGGTGAGATGTTTAAAGTGGTACATGTTCA
 D R K Y A K V H G T Y Y Y S S S E E L L
 1921 GAGATAGAAAATATGCAAAGGTGCATGGAACATACTACTATAGTAGTAGTGAGGAATTGT
 S K L V K M K D T Q E R D D L Y E K A C
 1981 TGAGTAAATTAGTAAAGATGAAGGATACACAGGAGAGAGATGATTTGTATGAGAAGGCAT
 Q F K K D K N A A R K I E N S T A K T L
 2041 GTC AATTCAAGAAAGATAAGAATGCAGCAAGAAAGATTGAGAACAGTACTGCTAAGACAT
 D G A D N D N I R L S S S R A I Y L E N
 2101 TAGATGGTGCTGATAATGACAATATAAGGTTAAGCAGTCTAGGGCTATATACTAGAGA
 L Q V L E K Y L V K H K C Y T I Q D F K
 2161 ATTTACAGGTATTGGAGAAGTATCTAGTAAAGCATAAGTGTACACAATTCAAGATTTTA
 M M Q R N E D E I W V N Y M Y D I Q N L
 2221 AGATGATGCAGAGGAATGAGGATGAGATTTGGGTGAATTACATGTATGATATACAGAATC
 E K V I E K L N I M E Y S L Q Q A D Y I
 2281 TAGAGAAGGTTATAGAGAAGTTGAACATCATGGAATATAGTTTACAGCAGGCAGATTATA
 E G N T W I G E D L W N T N S A Y M R T
 2341 TTGAGGGAAATACATGGATAGGAGAAGATTTATGGAACACTAACAGTGCATACATGAGAA
 V K R G T D R Y Y W Y I Q R H I S N R A
 2401 CTGTCAAGAGAGGTTACTGATAGATACTATTGGTATATTCAGAGACATATTTCAAATAGAG
 S L I G Q S R Q I C I D G A Y M M F N I
 2461 CCAGTTTGATTGGACAGAGCAGACAGATTTGTATTGATGGAGCATATATGATGTTTAATA
 I E N M K V E S R P K T I P I I S K N K
 2521 TCATTGAGAATATGAAAGTAGAGTCAAGGCCAAAGACAATACCGATAATAAGCAAGAATA
 T V Q W I Q D F M D I M H G N L P K I N
 2581 AGACAGTACAATGGATACAAGATTTTATGGATATCATGCATGGAAATTTACCCAAGATTA
 C M M L Y G N S N S G K T Q L I E A L T
 2641 ACTGTATGATGTTATAACGAAATAGTAACAGTGGAAAGACACAGTTGATTGAGGCTTTGA
 G L V N T A I M T N V G D G G T F H F S
 2701 CAGGATTGGTAAATACAGCCATAATGACAAATGTTGGTGATGGTGGAAACATTCCATTTC
 N I T E M G T I V V G N E T K I R T Q T
 2761 GTAATATAACAGAGATGGGTACAATTGTAGTAGGAAATGAGACCAAATAGGACTCAGA
 I E Q W K G L C G G E N V T M P M K Y K
 2821 CAATTGAACAATGGAAGGGATTATGTGGAGGAGAGAATGTAACAATGCCTATGAAGTATA
 E H K T H M F R K P V F L T N Q H H P L
 2881 AAGAACAAGACTCATATGTTTCAGGAAGCCTGTATTTTACTAATCAGCATCAOCCAT
 V D I S H Y D D R R A I E N R S F M Y K
 2941 TGGTAGACATATCACATTATGATGACAGAAGAGCTATAGAGAATAGAAGTTTCATGTATA
 V E L G K E P V N A H I K F P N R M I P
 3001 AAGTAGAGTTAGGAAAGGAACCAGTAAATGCACATATAAAATTTCCCAATAGGATGATTC

그림 3-1-9. (Continued).

I K K N P E L T Q F V L A S M Q Y V H T
 3061 CAATCAAGAAGAACCAGAACTAACGCAGTTTGTATTGGCCAGCATGCAGTATGTTTCATA
 N Y M N R P D K K F K I G F F N K L Y D
 3121 CAACTATATGAACAGACCAGACAAGAAGTTTAAAATTGGATTTTCAACAAGCTTTATG
 A L F E N S *
 3181 ACGCGCTGTTTGAGAACAGCTAAACTATGTACGCAGGGTTCAAGTTTTCCCGGCATAAA
 3241 TAAAGTGATAAGATAAGATTGAGAGTTTGAATATCCACGTCACACACAAAGGTAGTATAC
 3301 CATGAGTCTAGTATGGGAGCAGTCGTATCTGCAGTTGCTGCAGTAATAGCTGTAGTAGTC
 3361 GAAGTCGTCGAGTTCATAGTCGATGTCGTGGAAGTGGCTTTCGTGGTGGCAGAAACTGTA
 3421 CAGGTCGTTGCAGACACAGTCGATTACTTTGTTGGCGCGATAGTACTGCGCAGAACGAT
 3481 CAGAGCAATCOGAAGACGGAGGGAGCTAACGAAATTAACGACAGAACGACATCGACAGAA
 3541 GTAGGAGTGAGACAGGGCCATATGCTAGGACCTGATCAGCTGGACGAATACCTGGAGAGA
 M S P T R K G G N Y F A S K H
 3601 GCCACAGAAATAGACTAAAGTACCTACAGAAAAGGAGGAAATTATTTGCAAGTAAAC
 F Q S K R K N K L G K V K D L L A S K K
 3661 ATTTTCAAAGTAAGAGGAAGAATAAACTAGGAAAAGTAAAGGATCTACTAGCAAGCAAGA
 K E R K F K G K G N T L S E E P S T S G
 3721 AGAAAGAAAGAAAGTTTAAAGGAAAGGGAAATACTTTGAGTGAAGAGCCAAGTACATCGG
 W K D P V R Q R F P A L E Q E E R N T F
 3781 GGTGGAAGGATCCAGTAAGACAGAGATTTCCAGCATTAGAACAAGAAGAGAAAATACAT
 A G L L A I E A A P D Q R Q L G R D S N
 3841 TTGCAGGATTATTGGCAATAGAAGCAGCACCCGGATCAAAGACAACACTAGGACGTGATAGTA
 N Q L A L V Q R D T R V A V R Q S T N R
 3901 ACAACCAGTTAGCATTGGTTCCAGAGAGATACAAGAGTAGCAGTAAGACAAAGTACAAACA
 R E A L E V V R A A N Q A I R S G G E R
 3961 GAAGAGAAGCATTAGAAGTAGTAAGAGCAGCAAATCAAGCAATAAGATCGGGTGGAGAGA
 L A E L V Q T Y A S G F S D S T E I V E
 4021 GACTAGCAGAATTAGTACAGACATACGCATCAGGATTTTCGGACAGTACAGAAATAGTAG
 V R Q E D R I Q R D I F Q E E R Q N L L
 4081 AGGTAAGACAAGAAGATAGAATACAAGAGATATATTCCAAGAAGAAAGACAAAACCTTAT
 A I E I A L E G P S S V T Q Q F D Q E R
 4141 TAGCTATCGAAATCGCATTAGAAGGACCAAGCAGTGTAAACACAGCAATTTGATCAAGAGA
 T P A V K R A L E L T Q E E E Q L E R I
 4201 GAACTCCAGCAGTCAAAGAGCTCTAGAACTAACTCAAGAAGAAGAACAGTTAGAACGGA
 E N A K K Y I E E V I E E T N R E F E S
 4261 TAGAAAACGCTAAGAATATATTGAGGAAGTTATAGAGGAGACAAACAGAGAATTTGAAA
 E V R Q E T S A E A E D T M A S A A P T
 4321 GTGAAGTAAGACAAGAGACAAGTGCGGAGGCGGAAGATACGATGGCCAGCGCCGACCTA
 P M E T S E P G V T A A P H Q K S A A G
 4381 CTCCGATGGAAACCTCTGAGCCAGGGGTTACCGCCGCACCAGCAAAATCTGCAGCGG
 G G G G G G G S G G E T A G Y G K N T N
 4441 GCGGTGGTGGCGGTGGTGGTGGCAGTGGAGGTGAGACAGCAGGGTATGGTAAAAACACCA
 D A F Q R H R N Q P I D L K H I G D N V
 4501 ACGATGCATTCCAGCGCCACCCAATCAACCTATCGATCTCAAACACATTGGAGACAATG
 Y V A Q R V Y K V E A E C K L I N D K L
 4561 TGTATGTAGCTCAGAGGGTTTACAAGGTAGAGGCTGAGTGTAAAGCTAATAAATGACAAGT
 T W S A T A D N P F V R R L M G L N A S
 4621 TAACATGGTCAGCAACAGCAGACAATCCATTTGTACGAAGACTGATGGGATTGAATGCAA

그림 3-1-9. (Continued).

S N S G D I K Y S F N A L L H G S I G L
 4681 GCAGTAACAGTGGAGATATTAAGTACAGTTTTAACGCTCTACTGCATGGAAGTATTGGAC
 G N L A L G N Y I N A W G I D N M A K S
 4741 TTGGAAATCTTGCGTTGGGTAACATACATAAACGCATGGGGTATTGACAACATGGCAAAGA
 E D S R A I I S T R G K M N H L Q A F E
 4801 GCGAGGACAGTGGGCTATTATATCTACAAGAGGTAAGATGAACCACTTGCAAGCATTG
 M I P Q M Q G E T I M G Y T S A P V Q F
 4861 AAATGATTCCACAAATGCAAGGAGAAACCATAAATGGGATACACAAGTGCTCCAGTACAGT
 G K L L G H I Y Y P D P K G E E K I K V
 4921 TTGGTAAGTTACTGGGACACATATATTATCCAGATCCAAAGGGAGAGGAGAAAATAAAGG
 A N N S D G Q E Y K I F D G A L N G Y P
 4981 TAGCAAATAACAGTGACGGTCAAGAATAACAAGATATTTGATGGAGCATTAAATGGTTACC
 L D D D M N Q K K I T A D Q H H V Y M F
 5041 CACTGATGACGATATGAACCAAGAAGATCACAGCAGACCAACATCACGTATACATGT
 T D L R D A P M I S K V T A Y L N T D N
 5101 TTACAGACTTAAGAGATGCACCAATGATAAGTAAAGTAACAGCATACTAAACACGGACA
 P P Q I N G I G I E H Q G F D M S N D A
 5161 ATCCACCACAAATAAATGGCATAGGAATAGAACATCAAGGATTGACATGTCAAACGATG
 N T A L I G V M P S N C I R K R K E I Q
 5221 CTAATACAGCTCTCATTGGAGTCATGCCAAGTAACTGTATAAGAAAGAGGAAAGAAATAC
 S G M D N V V L W S M Q S N R L I D K R
 5281 AGTCAGGTATGGATAATGTAGTACTCTGGTCAATGCAAAGCAATAGACTGATAGACAAGA
 F W T P E G W S L K S V N G M A N D R I
 5341 GATTCTGGACACCAGAAGGTTGGAGTCTCAAAGCGTGAACGGTATGGCTAATGACAGGA
 D M P S E G A P I F D E A H V T R T S N
 5401 TAGATATGCCATCAGAGGGTGCTCCGATATTGATGAAGCTCATGTAACCAGGACATCAA
 Y A E W A R N E I Y Y S A D T S D N A F
 5461 ACTATGCAGAGTGGGCCAGGAATGAGATATACTACAGCGCTGACACTTCAGATAATGCTT
 A P G N T G A F A Q K Y N V S N Q Y A T
 5521 TCGCACCAGGTAATACGGGAGCATTGCGACAGAAGTATAATGTGAGTAACCAATATGCTA
 N I F F M P Y A H T Q R G A I Q D I V I
 5581 CCAACATTTTCTTCATGCCTTATGCTCATAACAGAGAGGTGCGATACAAGATATCGTTA
 N F D L T L Q I M V K R I P R S V Y N D
 5641 TAACTTTGACCTAACACTACAAATTATGGTCAAGAGAATCCACGGAGTGTATAACAAG
 F Y H I N A R A G V V P T V Y D E Y K D R
 5701 ACTTCTATATAAAAGCTAGAGCCGTTGGTACCACTGTGTATGATGAATATAAGGATA
 T F G A T E I S H R G K N I H V N I T G
 5761 GGACATTTGGAGCTACTGAGATATCTCACAGAGGTAAGAACATACAGTAAACATAACTG
 T H G S K Y S D R G Q V S R I G A T K K
 5821 GAACTCATGGAAGCAAATATTGAGATAGAGGACAAGTATCAAGAATTGGAGCAACAAAGA
 N F A T R A Y G Q K Q L L L N E G I T R
 5881 AGAAGCTTGCACAAGGGCATATGGACAGAAAACACTACTCCTGAATGAAGGTATAACAA
 R K T R S S A A A E D D I P D D C E D F
 5941 GAAGGAAGACAAGAAGCAGTGGCGCGCGAAGATGATATACCAGACGATTGTGAGGACT
 L E T S E M E S P P Q P Q L Q K K K K K
 6001 TCCTAGAAACTTCGGAGATGGAGTCACCGCCGACCCGAGTTGCAGAAGAAGAAGA
 Y K T N V *
 6061 AGTATAAACTAATGTATAATGTTATTGTATTACAAATGTATATAATGGGTTATAATAAA

 6121 GGTTTATAAAAATCACGCGTGGTGGTTTACCCTTGAAAGAAGCAACCCTCAGGGGGTAG

 6181 GTAGGGGGATCTTTGCGATGACACTGCCACTTGCATATATGCAACGGGTTGTGTATCAC

 6241 AAAGATCCCCTAOCCTACCCCTGAGGGTTCCTTCTTCAAGGGTAAACCACGCACGCGT

 6301 GATTTTTATAAACCTTTATTATAACCCATTATATAC

그림 3-1-9.

○ 이 염기서열은 대하에서 분리된 균주를 사용하였기 때문에 FcDNV로 명명하였고, GenBank에 JN082231으로 등록되었다. 전체 게놈의 염기구성은 A 36%, C 15%, G 25% 그리고 T 24%이며, 전체 게놈에 대한 비교분석 결과 Chinese strain (6,085bp)에 87.5%로 가장 높은 상동성을 보였으며, *Pmerg*DNV (6,299bp)에 84.2%, *Pm*DNV(6,310bp)에 83.2%, Madagascan(5,742bp) strain에 78.3%, Tanzanian strain(5,685bp)에 77.7%의 상동성을 보였으며 phylogenetic analysis 결과 HPV type I으로 확인되었다 (그림 3-1-10).

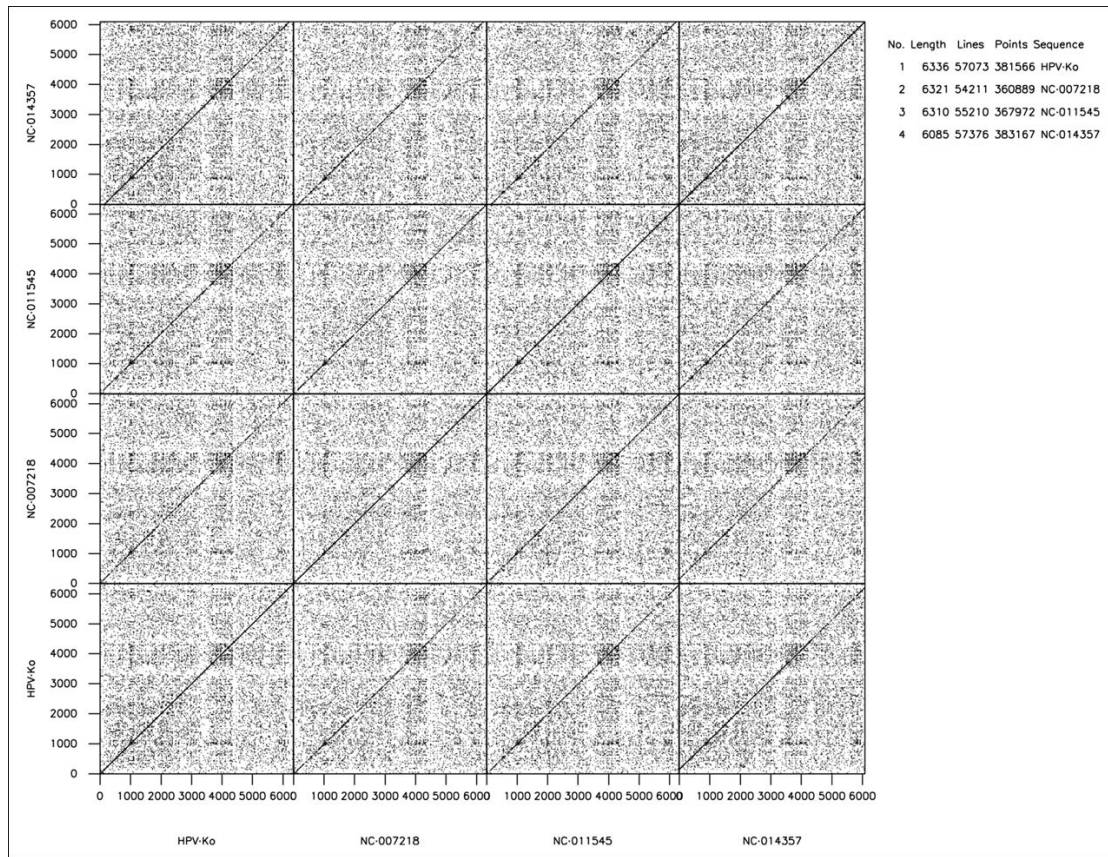


그림 3-1-10. 국내에서 분리된 HPV 균주 FcDNV와 *Pm*DNV (인도, NC011545 6,310bp; 태국, NC007218, 6321bp) 및 중국 균주 (NC014357, 6085)의 비교.

마. HPV 게놈에 암호화된 유전정보의 분석

○ 한국에서 분리된 HPV는 ORF1과 II는 Nonstructural (NS) proteins을 암호화하며 이들은 바이러스 DNA 복제 및 유전자 발현 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. ORF3는 viral protein 또는 structural protein (VP)으로 알려진 단백질을 암호화 하고 있는 ORF로 2,462개의 염기로 구성되어 있고 820개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화 하

지만 바이러스에 존재하는 외피 단백질은 57kDa 정도의 크기를 가지고 있어, 발현 후 변형 과정이 이루어지는 것으로 알려져 있다 (그림 3-1-11, 12).

○ *FcDNV*의 게놈 구조 및 open reading frame (ORF)의 배열은 *PmergDNV*와 *PmDNV*와 매우 유사하다. *FcDNV* 게놈은 3개의 ORF를 가지고 있으며, 1번과 2번 ORF는 15염기가 겹쳐져 있으나 각각 1+ 과 3+의 서로 다른 ORF를 이용한다 (그림 3-1-10, 3-1-11).

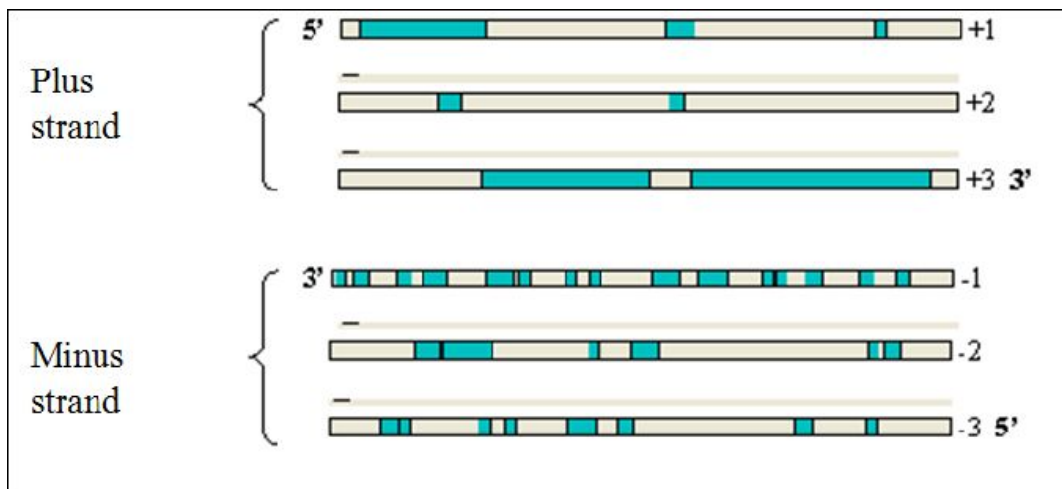


그림 3-1-11. HPV 한국 균주 (*FcDNV*) 게놈의 양성 및 음성 가닥에 존재하는 ORF 분석.

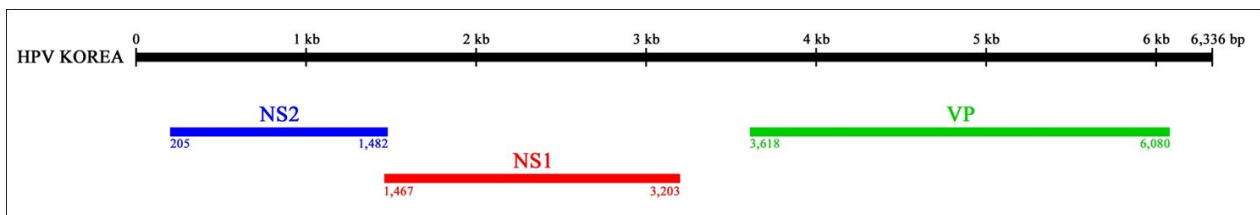


그림 3-1-12. HPV 한국 균주 (*FcDNV*) 게놈이 암호화 하고 있는 단백질의 개괄도. NS2와 NS1 단백질은 비구조 단백질이며, VP는 구조 단백질인 외피 단백질을 암호화 한다.

○ 왼쪽에 있는 첫 번째 ORF는 425개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 분자량이 50 kDa 인 비구조 단백질 2 (NS2)를 암호화하고 있다. 중간 ORF는 비구조 단백질 1 (NS1)을 암호화하고 있으며, 이 단백질은 578개의 아미노산으로 되어 있고 분자량은 68kDa이다. 이 단백질에 대한 BLAST 분석 결과 다른 HPV 균주와 IHNV가 암호화하고 있는 비구조 단백질과 유사성을 나타내었다. 다른 HPV 균주가 암호화 하고 있는 NS1 단백질처럼, *FcDNV*

○ 게놈의 오른쪽에 존재하는 VP 또는 구조 단백질을 암호화하는 ORF는 820개의 아미노산으로 되어 있으며, 아미노산 276-286 사이에 외피 단백질의 N-말단 부위의 노출에 관여하는 glycine-rich 부위를 가지고 있었으며 아미노산 281 - 284 사이에는 외피 단백질의 조립에 필수적인 것으로 알려진 GGSG 모티프를 포함하고 있다.

바. 파보비리데 과에 속하는 다른 바이러스와의 게놈 구조 비교

○ FcDNV와 다른 HPV 균주는 감염하는 숙주에 의하여 *Parvoviridae* 과의 *Densovirinae* 아과에 속하며, 현재까지 게놈 분석이 이루어진 바이러스는 모두 densoviruses로 명명되었다 (La Fauce *et al.*, 2010; Sukhumsirichart *et al.*, 2006). 그러나 이제까지 연구된 HPV의 모든 균주는 게놈 구조상에서 구별되는 특징이 있다.

○ *Densovirinae* 아과에 속하는 모든 바이러스는 3개의 ORF를 암호화하고 있다. 그러나 NS2 단백질보다 크기가 큰 NS1 단백질 유전자는 NS2 단백질 유전자의 앞쪽에 위치하며, NS2 유전자 전체를 포함한다. 그러나 HPV와 IHNV의 경우 유전자의 배열이 NS2-NS1-VP이며, IHNV에서 NS2와 NS1 단백질 유전자의 중첩이 더 많은 것으로 나타났다 (그림 3-1-14).

○ 또한 척추동물을 감염하는 parvoviruses는 일반적으로 alternative splicing에 의하여 여러 종류의 NS 단백질을 생산하는 반면, 무척추동물에 감염하는 파보바이러스는 NS 단백질의 ORF들이 겹쳐지는 특징이 있다. 또한 FcDNV에서는 PmDNV와 마찬가지로 3개의 OR에 대하여 각각의 독립적인 TATA 박스, 전사개시 신호 및 하부 프로모터 요소 (downstream promoter elements, DPE)를 포함하는 프로모터를 가지고 있다 (Sukhumsirichart *et al.*, 2006). 따라서 게놈의 크기, 게놈 상에서의 ORF의 배열, 전사 방법 등을 고려할 때 HPV *Densovirinae* 아과에서 독립적인 속으로 분류되어야 할 것으로 여겨진다.

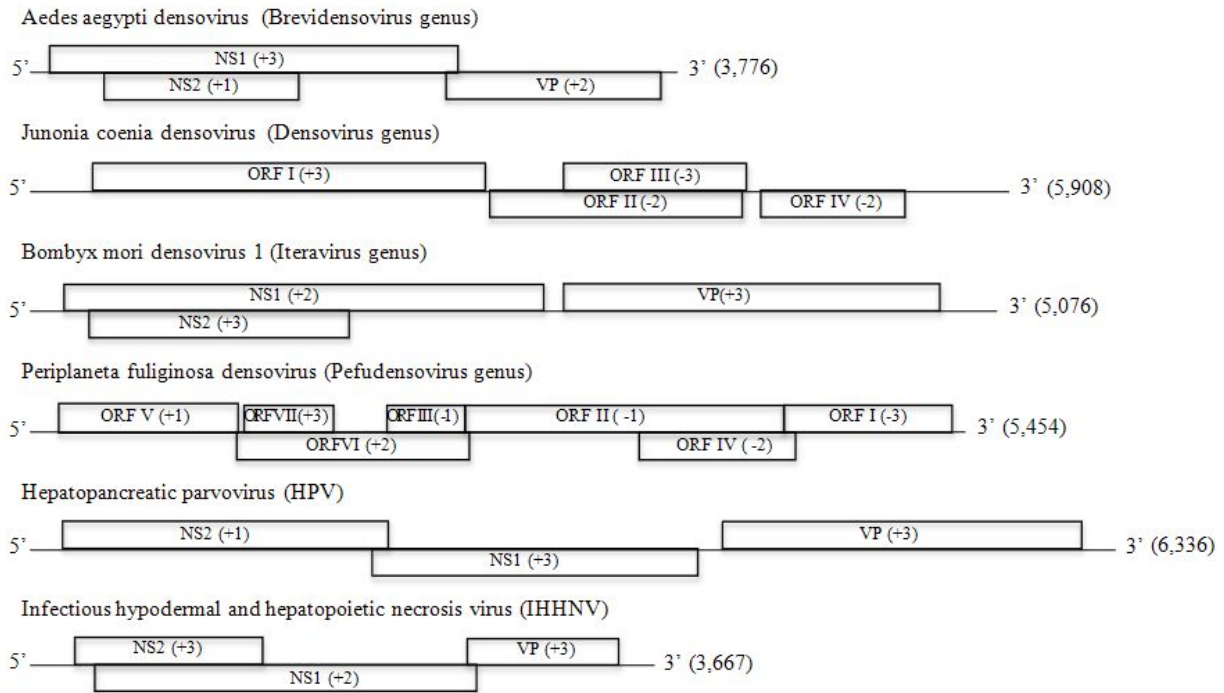


그림 3-1-14. HPV와 *Densovirinae* 아과에 속하는 바이러스의 게놈 구조 비교

사. *FcDNV* 단백질의 유사성 비교

○ *FcDNV*가 암호화 하고 있는 3개의 단백질을 다른 HPV 균주 및 IHHNV가 암호화 하고 있는 단백질들과 비교하였다. 3개의 단백질 중 NS1 단백질이 다른 HPV 균주의 NS1 단백질들과 가장 높은 상동성을 보였으며, 그 다음으로 NS2 단백질과 VP 단백질이었다. 이미 보고된, *F. chinensis*에서 분리된 국내 분리 HPV 균주 (AY008257)를 제외하고, 세 개의 단백질 모두 인도, 태국 및 호주에서 분리된 균주 보다는 마다가스카와 탄자니아에서 분리된 균주의 단백질들과 높은 상동성을 보였다.

○ 표 3-1-6에 제시한 바와 같이, 본 연구를 통하여 한국에서 분리된 HPV 균주는 다른 HPV 균주에 비하여 3개 모두의 ORF에서 이들 두 균주에 높은 상동성을 보였다. *FcDNV*가 암호화하고 있는 단백질과 AY008257의 암호화 단백질을 비교한 결과 NS1 단백질이 99.8% 아미노산 서열의 상동성을 보였으며, 그 다음으로 NS2 단백질(99.4%)과 VP(98.9%)였으며, 이들 모두 중국에서 분리된 균주보다는 높은 상동성을 보였다. 중국 분리 균주 (GU371276)와 비교하였을 때 NS1 단백질이 가장 높은 상동성을 보였다. 중국 균주의 NS2 단백질은 64번과 65번 위치에 2개의 추가적인 아미노산 잔기를 포함하고 있다. *FcDNV*와 중국 균주의 VP를 서로 비교해 보면 다른 두 단백질들에 비하여 높은 변이를 보였다. 중국 균주의 VP의 경우 282번에 위치한 glycine 잔기가 결여되어 있어 한국 균주가 8개의 연속된

glycine 잔기의 배열을 가지는 것에 비하여 7개의 glycine 연속잔기를 보였다. 대조적으로 중국 균주의 경우 780번과 781번 위치에 2개의 아미노산 잔기를 추가로 가지고 있어 한국 균주가 총 820개의 아미노산으로 되어 있는 반면 중국 균주의 VP는 821개의 아미노산으로 되어 있다.

표 3-1-6. 국내분리 HPV 균주 FcDNV와 기존의 HPV 및 IHHNV 균주의 단백질 비교

Proteins Strain Accession Number	NS2 (425 AA)			NS1 (578 AA)			VP (820 AA)		
	N. of AA	% Similarity	% Identity	N. of AA	% Similarity	% Identity	N. of AA	% Similarity	% Identity
HPV chin-Korean strain Y008257	343*	99.4	98.8	578	99.8	99.3	820	98.9	97.4
HPV-China GU371276	427*	97.0	95.6	578	99.3	98.3	821 [†]	91.6 [†]	83.1 [†]
HPV-Thailand/ <i>Pm</i> DNV DQ002873	428	94.2	89.0	579	97.1	92.4	818	87.7	74.8
HPV-India / <i>Pm</i> DNV FJ410797	426	95.3	89.0	577	97.1	93.3	819	87.3	75.4
HPV-Australia/ <i>Pm</i> egDNV DQ458781	340*	92.6	87.1	578	97.1	93.3	819	89.8	78.8
HPV-Madagascar EU247528	349*	95.1	88.5	578	97.8	95.2	820	92.2	83.3
HPV-Tanzania EU588991	344*	95.3	88.1	578	97.8	94.8	821	93.2	86.5
HPV-New Caledonia EU346369	-	-	-	-	-	-	819	88.0	77.1
IHHNV-Thailand AY362547	363	33.2	14.8	666	34.7	17.6	329	13.1	7.1
IHHNV-Taiwan AY355308	363	29.5	14.0	666	33.5	16.5	329	13.1	7.2
IHHNV-Fujian EF633688	363	24.3	13.7	666	24.8	13.7	329	13.1	7.0
DsDNV-France AF036333	275	6.2	3.7	545	32.6	16.4	809	24.6	15.1

○ 그림 3-1-15에 제시된 계통수를 보면 FcDNV 과 중국 균주와의 차이가 분명하게 나타난다. 예전의 연구에서 보고된 바와 같이(Tang *et al.*, 2008a; Tang *et al.*, 2008b), 두 균주는 하나의 클러스터를 형성하지만 NS1 단백질들의 경우 중국 균주는 한국에서 분리된 HPV 균주보다 마다가스카 균주에 더 가까운 유사성을 보인다. HPV의 병원성에 영향을 미치는지는 알려져 있지 않지만, 아미노산의 변이나 추가적인 아미노산의 존재가 이미 보고된 바 있다 (Safeena *et al.*, 2010; Sukhumsirichart *et al.*, 2006). 보통 파보바이러스의 비구조 단백질이 구조단백질 보다 더 잘 보존 되었다 (Hemauer *et al.*, 1996; Truyen *et al.*, 1995). HPV에서 발견되는 높은 변이율은 이들 바이러스가 분리된 숙주의 지리적 분포와 관련 있는 것으로 여겨진다 (Tang *et al.*, 2008a). HPV strain 염기서열 AY008257의 대상이 되는

HPV는 한국의 대하에서 유래한 것으로 알려져 있으나, 자세한 정보가 존재하지 않으며, 본 연구에서 이용된 HPV와는 분리 기간에 있어 15년의 차이가 있다. 반면, 본 연구에서 비교된 중국샘플은 본 연구에서 사용된 바이러스와 마찬가지로 2008년 수집 되었다. 따라서 중국과 한국 균주 사이에 높은 염기서열 차이는 숙주의 지리적 분포가 HPV 균주간의 다양성에 영향을 미치는 것으로 설명된다.

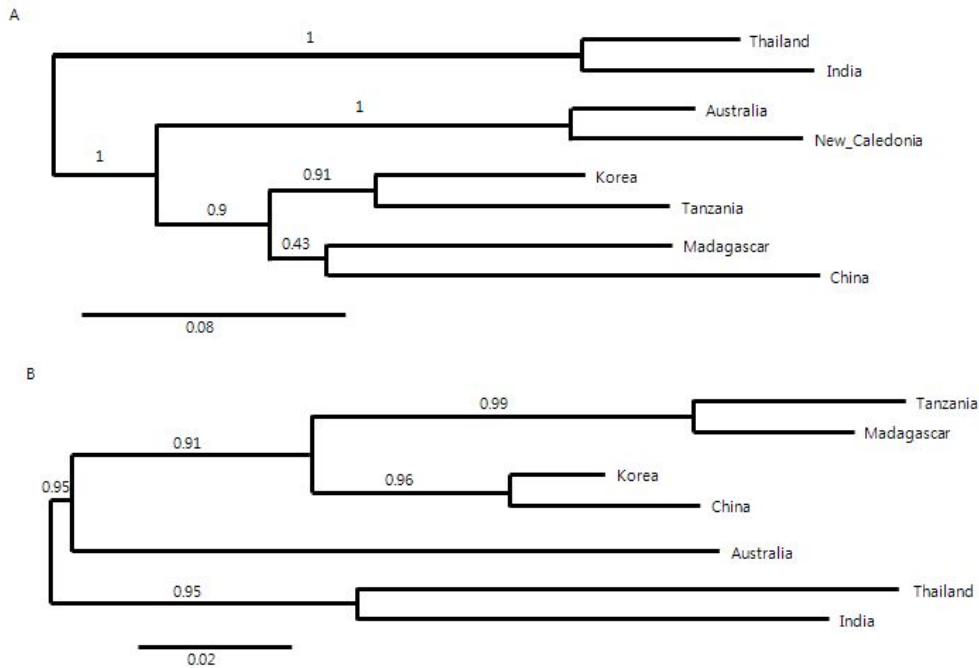


그림 3-1-15. 다양한 HPV 균주의 계통수. A와 B는 각각 NS1 단백질과 VP의 아미노산 서열을 기초로 작성되었으며, 각 균주가 분리된 지역이 표시되어 있으며, GenBank accession 번호는 표 3-1-6에 제시되어 있다.

아. HPV 균주들의 5' 및 3' 말단 염기서열 비교

○ *FcDNV*와 인도에서 분리된 *PmDNV* 그리고 호주에서 분리된 *PmergDNV*의 HPV 균주의 5'-말단 염기서열의 비교 결과는 그림 3-1-16A에 나타내었다. 약 45개의 상동성이 높은 염기서열 이후에 다른 균주에는 존재하는 12 염기가 *FcDNV*와 *PmergDNV*에서 발견되었으며, 그 이후에는 염기서열의 상동성이 낮은 것으로 나타났다. 두 번째로 나타나는 상동성 부위는 계놈 말단의 머리핀 구조를 형성하는데 관여하지 않는 것으로 나타났다. 5' 말단의 높은 염기서열 상동성을 고려할 때, 머리핀 구조 형성에 관여하지 않는 5' 말단에 존재하는 구아닌 염기는 계놈에 실제적으로 존재하는 염기로 여겨진다.

○ 5'-말단과는 다르게 HPV 균주들의 3'-말단은 높은 상동성을 보이지 않았다 (그림 3-1-16B). 그러나 말단으로부터 약 50개 위치에 상동성을 보이는 부분이 나타났다. 또한 FcDNV의 5' 말단과 3' 말단의 염기서열 비교에서는 상동성이 발견되지 않았다.

A

Korea	GCCGACGCACCGCCCTAGCTCGCGGATAAGCCTTATCAGGCTCTAG-----A	48
Australia	GCCGACGCACCGCCCTAGCTCGCGGATAAGCCTTATCAGGCTCCAG-----C	48
Thailand	GCCGACGCACCGCCCTAGCTCGCGGATAAGCCTTATCAGGCTCTCGGCTAOGGCGAGC	60
India	GCCGACGCACCGCCCTAGCTCGCGGATAAGCCTTATCAGGCTCCAGCAGCCCGG---AA	57

Korea	AGCGGGCCTCGGCCACGCTAGTGGCTTCTCGGAGCCTGATAAGGCTTATCGCGCAG--	106
Australia	AGCGGGCCTAGGCCCTCGGGCTGCTCGCGTAGGGATGAGAGCCTGATAAGGC	108
Thailand	AGCGGGCTTTCGGCCCTCGGGCTGCTGG-AGCCTGATAAGGCTTATCGCGGAG--	118
India	AGGAGGCGAAGGCGCGCCTCGCGAAACAAAAACCTAATAAACTTATCACAAAA	117
** ,*** ,*** * ,* : : : : : * : : : : *		
Korea	CTAGGGGGGAGCGTGGGAGACCCCTATATATTGGTAAACCTGCGGGCGGGG-TAAGA	165
Australia	TTATCGGGGAGCGTGGGAGACCCCTATATATTGGTAAACCTGCGGGGATGTGTGAAGA	168
India	CTAAAAACAAAGCGTGGGAGACCCCTATATATTGGTAAACCTCGGGGGTGTGA-CAAGA	177
Thailand	CTAGGGGGGAGCGTGGGAGACCCCTATATATTGGTAAACCTCGGGGATGTGTGA-CAAGA	176
** ,* ,* :***** :***** ** , * * ****		
Korea	GTCCTCTCCGAGTGGTCTAGCAGTGCAGTACTCAGCAAG-----	207
Australia	GTCCTCTCCGAGTGGTCTAGCAGTGAAGTTCTCAGCACGATGGCGAGCAAAGGTGAATAT	237
Thailand	GTCCTCTCCGATTGGTCTAGCAGTGAAGTTCTCAGCACG-----	204
India	GTCCTCTCCGATTGGTCTAGCAGTGAAGTTCTCAGCACG-----	215
***** ***** ,** :***** *		

B

Korea	TGTTATTGTATTACAAATGTATATAATGGGTTATAATAAAGTTTATAAAAAATCACGCGT	6,139
Australia	TGTC AATGTAATATAAATATATGTATGGGAATGTAATAAAG--GTTATAAAAACACACGT	6,140
India	GTTTGACATATTACAAATGTATATAATGGGTTACAATAAAG-GTTTAAAAATCACGCGT	6,148
Thailand	TGTTGACATAATACAAATGTATATATTTGAGTTACAATAAAGTTATAAAAAATCACGCGT	6,158
* : ,** :** ***,** ,** : * , * ,* :** , * :***** ***,**		
Korea	GOGTGGTTTACCCTTGAAG-AAGCAACCCCTCAGGGGTAGGTAGGGGATCTTTGCGAT	6,199
Australia	GOGTGGTTTACCCTTCAAAGAGCGAGCATCCGGGGTAGGTAGGGGATCTCG-CGAT	6,198
India	GOGTGGTTTACCCTTCAAAGAGCGACTCTCAGGGGTAGGTAGGGGATCTTTGCGAT	6,207
Thailand	GOGTGGTTTACCCTTCAAAGAGCGATTCTCCGGGGTAGGTAGGGGATCTTTGCGAT	6,218
***** * ,* ,** ,* ,** ,***** *****		
Korea	GACACTGCCACTTGCATATATGCAACGGGTTGTGCATCACAAGATCCCOCTACCTACC	6,259
Australia	GACATGCOCCACGGCATATATTTATATTGACATTACATAACAGTTCTGTACTTCT	6,256
India	GACACTGCCAGTTGCATATATGCAACTGGCAGTGCATCGCAAAGATCCCOCTACCTACC	6,267
Thailand	GACACTGCCAGTTGCATATATGCGTGGCCATGTGCATCGCAAAGATCCCOCTACCTACC	6,278
**** ***, ***** , : ** :** ,** : : * :** :		
Korea	COCTGAGGGTTG-CTTCTTTCAAGGG-TAAACCAACGACGCGTGATTTTTATAAACCTTT	6,317
Australia	TCTTCTTTTGGTAACTGCGGCTGCGGCGGCGACTCCATCTA-----	6,299
India	COCTGAGAGTCG-CTCCTTTTGAAGGGTAAACCAACGACGCGTG-----	6,310
Thailand	COCCGAGAATCG-CTCCTTTTGAAGGGTAAACCAACGACGCGTG-----	6,321
* : * * : ** ,* ,* ,* ,* ,* ,* :		
Korea	ATTATAACCCATTATATAC	6,336
Australia	-----	
India	-----	
Thailand	-----	

그림 3-1-16. 다양한 HPV 균주의 5' (A)과 3' 말단 (B)의 염기서열 비교. 각 균주의 유래지역이 왼쪽에 표시되어 있으며, 계놈은 (+) 센스로 표시하였다.

제2절. 재조합 단백질의 생성 및 진단 Kit 개발을 위한 단클론 항체 개발

1. 서론

○ 감염된 새우로부터 병원균을 검출하는 방법은 다양하며, 이 중 항체를 이용한 혈청학적 방법이 있으며, 혈청학적 기법에 의한 몇 가지의 검출 방법이 개발되어 있다. 단클론 항체를 이용하여 새우에 감염하는 다양한 *Vibrio* 속의 세균을 검출하는 방법이 개발되어 있다 (Chen *et al.*, 1992). 효소 항체법 (Enzyme immunoassays, EIAs)는 *Vibrio vulnificus*와 *Vibrio harveyi* (Song *et al.*, 1992)를 검출하는데 사용되었다.

○ 다클론 항체 (pAbs) 및 단클론 항체 (mAbs) 가 새우 바이러스의 검출을 위하여 개발되었다. 형광물질을 부착한 pAb를 이용한 BMNV의 검출, ELISA를 기초로한 pAb를 이용한 BP 검출, 그리고 rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS)에 대한 pAb 등이 보고된바 있으며, HPV, YHV, WSSV, BP, 그리고 IHNV에 대한 단클론 항체가 개발되었다. 단클론 항체를 기초로 한 진단 방법은 이 방법의 민감도, 적용성, 낮은 비용, 짧은 소요시간, 간편성 등에 의하여 널리 선호된다. 그러나 단클론 항체의 개발에 있어 각 바이러스에 대한 특이성이 고려되어야 한다. 단클론 항체는 특정한 바이러스에 대한 특이성을 보이나 특정한 조건에서는 IgM 항체의 특성상 새우 조직에 대한 비특이적 반응을 보이기도 한다 (Poulos *et al.*, 1994).

○ 최근들어 WSSV의 VP28 및 YHV의 구조 단백질 p20에 대한 단클론 항체를 이용한 스트립 형태의 진단 키트가 개발된바 있다(Sithigorngul *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2003). 태국에서는 PmDENV의 재조합 VP에 대하여 만들어진 단클론 항체를 이용하여 HPV 감염을 검출하려는 시도가 이루어졌다. 그러나 이 방법의 민감도는 기존의 분자생물학적 방법을 이용한 검출 방법과 비교하여 민감도가 떨어지는 것으로 확인되었다 (Srisuk *et al.*, 2011).

○ 본 연구에서는 한국에서 분리된 HPV 균주 FcDENV의 VP 재조합 단백질에 대한 단클론 항체를 획득하고, 이를 이용하여 HPV의 감염을 검출할 수 있는 검출 키트를 개발하고자 하였다.

2. 연구내용 및 방법

가. VP 단백질 유전자의 클로닝

○ 항체를 이용한 진단 Kit의 개발을 위하여 기존에 알려진 Korean strain (AY008257)과 본 연구에서 얻어진 두 개의 변이형 (HPV-KOR1, HPV-KOR2)의 염기서열을 토대로 외피 단백질 유전자 (VP) 부분의 증폭을 위한 두 개의 primer (HPV capsid F, 5' GGA TCC GCA GCG GGC GGT GGT 3'; HPV capsid R 5' CTC GAG TTA TAC ATT AGT CTT ATA C 3') 를 제작하였으며 이들 primer에는 클로닝을 위하여 각각 BamH I site와 Xho I site를 가지도록 하였다. 외피 단백질 유전자의 증폭을 위한 PCR은 94°C 7분간의 initial incubation에 이어 94°C 1분, 52°C 1분, 72°C 3분의 반응 35회를 실시한 후 72°C에서 10분간의 extension을 실시하였다. 확인된 PCR 산물은 Gene all사의 Gel Cleanup SV kit를 이용하여 겔에서 분리하고 Invitrogen사의 pCR8/GW/TOPO TA cloning vector에 cloning한 후 Escherichia coli TOP10에 형질전환하였다. 형질전환된 대장균으로부터 Gene All사의 Plasmid Mini Prep Kit을 이용하여 DNA를 추출한 후 염기서열을 분석하여 이상이 없음을 확인한 후 insert는 BamHI과 Xho I으로 절단하여 agarose gel에서 순수분리한 후 BamHI과 Xho I으로 절단된 pGEX-4T vector에 클로닝하고 *E.coli* expression host Rosetta(DE3) pLysS에 형질전환하였다.

나. 재조합 단백질의 발현 및 순수 분리

○ 형질전환 *E. coli*는 DYT 배지에서 overnight으로 배양하고 500 μ l를 새로운 DYT배지 10 ml에 접종하여 37°C에서 OD 값이 0.6이 될 때까지 배양한 후 0.5 mM의 IPTG로 처리하여 3시간 동안 배양하였다. 배양된 *E. coli* 세포는 침전 후 sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 의하여 재조합 단백질의 발현을 조사하였다. 배양된 세포는 원심분리하여 모은 후 sonication에 의하여 파쇄한 뒤, 파쇄한 세포에서 얻어진 soluble protein은 anti-Histag column을 이용하여 순수분리 하였다.

다. 다클론 항체의 제조

○ Polyclonal 및 monoclonal 항체는 (주)중검에 의뢰하여 생산하였다. Polyclonal 항체는 토끼를 이용하여 생산하였다. 토끼 1마리당 1회 500 ug의 항원을 adjuvant와 혼합하여 2주 간격으로 3차에 걸쳐 근육주사를 실시하고, 7주차에 이(耳)정맥에서 혈액을 채혈한 후 ELISA 실험법으로 항체의 titer를 검사한 후 일정 수준의 Ab농도가 형성되었을 때, 전혈을 진행하였다.

라. 단클론 항체의 제조

○ Monoclonal antibody는 6주령의 암컷 BALB/c mouse 1마리당 1회 100ug의 항원을 Adjuvant와 mix하여 2주 간격으로 3차까지 복강 내에 투여하고, 8주차에 adjuvant없이 항원 100ug을 미정맥에 투여한 후 5일째에 cell fusion을 실시하였다. 주사가 이루어진 쥐로부터 최종 boosting 후 4-6일 사이에 spleen을 채취하여 세포를 분리하고 분리된 세포와 SP2/O 세포를 PEG를 이용하여 융합한 후 CO2 incubator에서 선별배지를 이용하여 세포주를 분리하였다.

마. 대장균 발현을 위한 유전자의 최적화

○ 대장균에서의 재조합 단백질의 발현을 극대화하고자 (주) 바이오니아에 의뢰하여 HPV의 VP 유전자를 대장균의 codon에 맞도록 염기서열을 변화시켜 DNA를 합성하였다. 합성된 DNA는 Promega사의 pGEM-T easy vector에 cloning한 후 *Escherichia coli* TOP10에 형질전환하였다. 형질전환된 대장균으로부터 Gene All사의 Plasmid Mini Prep Kit을 이용하여 DNA를 추출한 후 염기서열을 분석하여 이상이 없음을 확인한다. 그 다음 insert는 BamHI 과 Xho I으로 절단하여 agarose gel에서 순수분리한 후 BamH I과 Xho I으로 절단된 pGEX-4T vector에 클로닝하고 *E.coli* expression host Rosetta(DE3)pLysS에 형질전환 하였다.

3. 연구결과

가. 클로닝 및 재조합 단백질의 발현

○ PCR 산물을 1% agarose gel에서 분석한 결과 약 1.6kb의 PCR 산물을 확인할 수 있었다 (그림 3-2-1A). PCR 산물은 pCR8/GW/TOPO TA cloning vector에 cloning한 후 염기서열을 분석한 결과 염기서열에 변화가 없음을 확인하고, 그 insert를 대장균 발현 벡터인 pET28a, pMAL, pCold, pGEX-4T vector에 클로닝하고 대장균 Rosetta(DE3)pLysS에서 발현하였다.

○ 각각의 발현 벡터로 형질전환한 대장균을 0.5mM IPTG로 처리하여 재조합 단백질의 발현을 유도한 후 SDS-PAGE를 이용하여 재조합 단백질의 발현을 조사한 결과 pET28a과 pMAL 벡터에서는 재조합 단백질이 발현되지 않았으나, pCold 벡터와 pGEX-4T vector에서는 재조합 단백질의 발현이 확인되었으며, pCold 벡터를 이용한 발현 결과가 그림 3-2-1B에 제시되었다.

○ 재조합 단백질은 pCold 벡터와 pGEX-4T vector에서는 재조합 단백질의 발현이 확인되었으나, pGEX-4T vector의 경우 N-말단에 26 kDa의 GST 단백질이 연결되어 있는 반면, pCold 벡터의 경우 Histidine tag만이 존재하기 때문에 이 벡터에서 발현된 단백질을 항체 생산에 이용하였다. 그러나 발현된 단백질은 비수용성의 inclusion body를 형성하였다. 따라서 발현된 단백질은 SDS-PAGE로 분리한 후 겔에서 분리하여 항체 생산에 이용하였다.

A)

B)

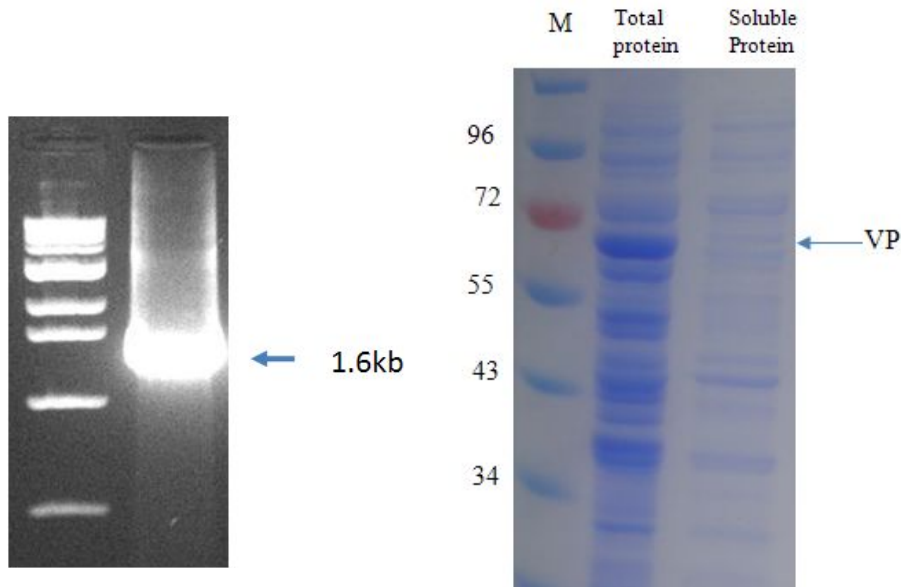


그림 3-2-1. HPV 외피 재조합 단백질의 발현. HPV의 외피 단백질 유전자를 PCR 증폭한 후 (A) pCold vector에 클로닝하여 *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS에 도입하고 0.5mM IPTG로 단백질 발현을 유도한 후 전체 단백질과 세포 파쇄 후 상등액 (B) 분석.

나. 다클론 항체의 생산

○ Polyclonal 항체는 토끼를 이용하여 생산하였으며, 3차에 걸쳐 근육주사를 실시하고, 7주차에 ELISA 실험법으로 항체의 titer를 검사한 후 일정 수준의 Ab농도가 형성되었을 때, 전혈을 진행하였다. 3마리의 토끼로부터 총 150ml의 혈청을 확보하였다.

○ 확보된 항체에 대하여 Western blot을 실시한 결과 그림 3-2-2에서 보는바와 같이 원래의 항원 band와 이 보다 크기가 작은 단백질 band가 검출되었으며, 크기가 작은 단백질은 원 단백질이 일부 분해되어 나온 것으로 파악된다. 따라서 토끼로부터 VP에 대한 다클론 항체가 생성된 것으로 확인되었다.



그림 3-2-2. 재조합 HPV VP에 대한 단클론 항체의 웨스턴 블롯. 대장균에 IPTG로 재조합 단백질의 발현을 유도한 대장균의 전체 단백질에 대한 웨스턴블롯의 결과이며, 화살표는 재조합 단백질의 예상 크기를 나타낸다.

다. 단클론 항체의 생산

○ 얻어진 세포주 960개에 대하여 주사한 항원을 이용하여 ELISA를 실시하여 총 9개의 candidate (1H7, 2E5, 3C9, 5H2, 6F3, 8H1, 10A4, 10H6, 10D9)를 확보하였다 (그림 3-2-2). 이들 세포주의 배양액을 확보하여 통상의 방법으로 웨스턴블롯을 실시한 결과는 그림 3-2-3에 나타난 것과 같이 항체 생산에 이용된 항원에 대해서는 특이적으로 반응하나, PCR을 통하여 바이러스의 존재가 확인된 새우로부터는 특이적인 밴드가 검출되지 않았다. 또한 검출 대상 단백질보다 크기가 큰 단백질이 검출되어 이에 대한 MALDI-TOF 분석을 실시한 결과 새우 단백질로 확인되어 생산된 단클론 항체가 새우 단백질에 비 특이적으로 반응하는 반면, 감염된 새우로부터 바이러스를 검출하지는 못하였다. 이와 같은 결과가 나타난 이유는 재조합 단백질에 대하여 만들어진 단클론 항체가 자연상태에 존재하는 HPV VP의 에피토프를 인식하지 못하거나, 비록 PCR에 의해서는 HPV의 존재가 확인되었다 하더라도 새우 조직 내의 HPV의 titer가 낮은 경우 웨스턴블롯에 의하여 검출되지 않을 수도 있다. 따라서 HPV에 감염된 새우 시료를 충분히 확보하여 바이러스를 순수분리한 후, 순수 분리된 바이러스를 이용하여 단클론 항체를 생산하는 것이 필요한 것으로 여겨진다.

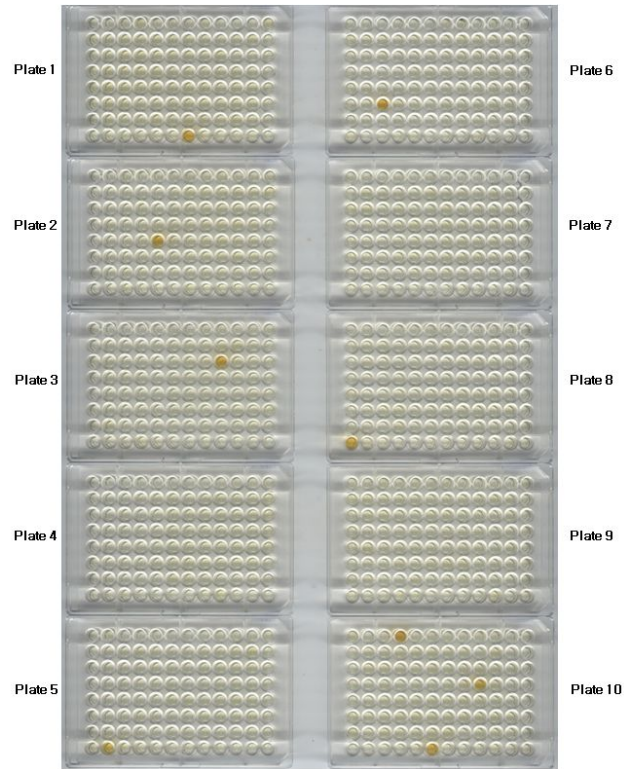


그림 3-2-3. ELISA를 이용한 HPV VP에 대한 단클론 항체 생산 세포주의 선별. 세포 융합을 통하여 얻어진 세포주 960개를 대상으로 ELISA를 실시하였으며, 그 결과 9개의 단클론 항체 생성 세포주 (1H7, 2E5, 3C9, 5H2, 6F3, 8H1, 10A4, 10H6, 10D9)를 선별하였다.

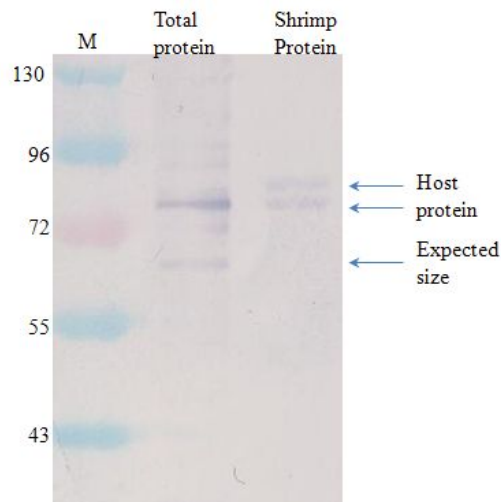


그림 3-2-4. 단클론 항체를 이용한 HPV 단백질 검출. 단클론 항체 1H7을 이용하여 재조합 단백질이 발현된 대장균 전체 단백질 (total protein) 및 HPV 감염 새우의 전체 단백질에 대한 웨스턴블롯을 실시하였다.

라. 코돈 최적화 DNA를 이용한 단백질의 발현 및 단클론 항체 생산

○ 대장균 발현을 위한 코돈 최적화 HPV의 VP 유전자를 원래의 유전자와 비교한 결과는 그림 3-2-5에 나타나 있다. 그림 3-2-5에 나타나듯이 총 183개의 염기가 치환되었으며, 이들 모두는 아미노산 서열에는 영향을 미치지 않으며, 대장균에서의 발현을 증가시키기 위하여 염기서열만 수정하였다.

Codon-optimized HPV-VP	GGATCCGCCGCGGGCGGTGGTGGCGGTGGGGGTGGCAGTGGAGGCGAGACAGCGGGGTAT 60 GGATCCGCAGCGGGCGGTGGTGGCGGTGGTGGTGGCAGTGGAGGTGAGACAGCAGGGTAT 60 *****
Codon-optimized HPV-VP	GGGAAAAACCAACGATGCGTTCAGCGCCATCGCAATCAGCCTATCGATCTCAAACAC 120 GGTAAAAACCAACGATGCATTCCAGCGCCACCGCAATCAACCTATCGATCTCAAACAC 120 ** *****
Codon-optimized HPV-VP	ATTGGTGACAATGTGTATGTAGCTCAGCGTGTTTACAAGGTTGAGGCGAATGCAAGCTA 180 ATTGGAGACAATGTGTATGTAGCTCAGAGGGTTACAAGGTAGAGGCTGAGTGTAAAGCTA 180 *****
Codon-optimized HPV-VP	ATCAATGACAAATTAACATGGTCCGCAACCGCAGACAATCCATTTGTACGACGCCTGATG 240 ATAAATGACAAGTTAACATGGTCCAGCAACAGCAGACAATCCATTTGTACGAAGACTGATG 240 ** *****
Codon-optimized HPV-VP	GGCCTGAACGCAAGCAGCAATTCCGGAGACATTAAGTACAGTTTTAATGCCCTGCTGCAT 300 GGATTGAATGCAAGCAGTAACAGTGGAGATATTAAGTACAGTTTTAACGCTCTACTGCAT 300 ** **** ***** ** *****
Codon-optimized HPV-VP	GGAAGCATTGGTCTTGGCAACCTTGCTTTGGGTAACACTACATCAACGCCTGGGGTATAGAC 360 GGAAGTATTGGACTTGGAAATCTTGCCTGGGTAACACTACATAACGCATGGGGTATTGAC 360 *****
Codon-optimized HPV-VP	AACATGGCAAAGAGCGAGGACTCCCGGGCTATCATATCTACACGTGGTAAGATGAATCAT 420 AACATGGCAAAGAGCGAGGACAGTCCGGCTATTATATCTACAAGAGTAAGATGAACCAC 420 *****
Codon-optimized HPV-VP	TTGCAAGCATTGAAATGATTCCCAAATGCAAGGCGAAACCATAATGGGATACACGTCC 480 TTGCAAGCATTGAAATGATTCCCAAATGCAAGGAGAAACCATAATGGGATACACAAGT 480 *****
Codon-optimized HPV-VP	GCTCCTGTGCAGTTTGGTAAGTTACTGGGACACATATATTATCCAGATCCTAAGGGAGAG 540 GCTCCAGTACAGTTTGGTAAGTTACTGGGACACATATATTATCCAGATCCAAAGGGAGAG 540 *****
Codon-optimized HPV-VP	GAGAAAATAAAGGTTGCAAATAACAGCGACGGTCAAGAGTATAAGATCTTTGATGGGGCT 600 GAGAAAATAAAGGTAGCAAATAACAGTGACGGTCAAGAATACAAGATATTTGATGGAGCA 600 *****
Codon-optimized HPV-VP	TTAAACGGCTACCCGTTAGATGATGATATGAACCAGAAGAAGTACCCGAGACCAACAT 660 TTAAATGGTTACCCACTAGATGACGATATGAACCAGAAGAAGTACACAGCAGACCAACAT 660 *****
Codon-optimized HPV-VP	CACGTCTATATGTTTACAGACTTAAGAGATGCACCAATGATCAGTAAGGTCACAGCATA 720 CACGTATACATGTTTACAGACTTAAGAGATGCACCAATGATAAGTAAAGTAACAGCATA 720 *****
Codon-optimized HPV-VP	CTGAATACGGATAATCCGCCACAGATAAACGGCATCGGAATCGAACATCAAGGATTTCGAC 780 CTAACACGGACAATCCACCACAAATAAATGGCATAGGAATAGAATCAAGGATTTCGAC 780 ** ** *****
Codon-optimized HPV-VP	ATGTCAAACGATGCCAATACGGCGCTCATTGGAGTCATGCCTAGTAACTGTATACGCAAG 840

HPV-VP ATGTCAAACGATGCTAATACAGCTCTCATTGGAGTCATGCCAAGTAACTGTATAAGAAAG 840
***** ** ***** * **

Codon-optimized HPV-VP CGGAAGGAAATACAGTCTGGTATGGATAACGTTGTACTGTGGTCAATGCAGAGCAATCGT 900
AGGAAAGAAATACAGTCTGGTATGGATAATGTAGTACTCTGGTCAATGCAAAGCAATAGA 900
**** ***** ** ***** *

Codon-optimized HPV-VP CTGATTGACAAAAGATTCTGGACCCCGAAGGTTGGAGTCTTAAGAGCGTGAACGGAATG 960
CTGATAGACAAGAGATTCTGGACACCAGAAGGTTGGAGTCTCAAAGCGTGAACGGTATG 960
***** ***** ** ***** *

Codon-optimized HPV-VP GCTAACGACCGAATTGACATGCCATCCGAGGGCGCGCCGATATTTGATGAAGCTCATGTG 1020
GCTAATGACAGGATAGATATGCCATCAGAGGGTCTCCGATATTCGATGAAGCTCATGTA 1020
***** ** * ** * ***** ** ***** *****

Codon-optimized HPV-VP ACCAGGACATCAAATATGCCGAGTGGGCCCGTAATGAGATATATTACTCGGCTGACACT 1080
ACCAGGACATCAAATATGCAGAGTGGGCCAGGAATGAGATATACTACAGCGCTGACACT 1080
***** ***** * ***** ** *****

Codon-optimized HPV-VP TCAGATAATGCTTTTGCACCGGGCAATACGGGAGCATTGCGACAGAAGTATAATGTGAGC 1140
TCAGATAATGCTTTTGCACCGAGTAATACGGGAGCATTGCGACAGAAGTATAATGTGAGT 1140
***** ** *****

Codon-optimized HPV-VP AACCAGTATGCGACCAACATTTTCTTCATGCCTTATGCCATACGCAGAGAGGGGCGATC 1200
AACCAATATGCTACCAACATTTTCTTCATGCCTTATGCTCATACACAGAGAGGTGCGATA 1200
***** ***** *****

Codon-optimized HPV-VP CAAGATATCGTTATCAACTTTGACCTTACGCTGCAAATTATGGTCAAGCGGATTCCGCGG 1260
CAAGATATCGTTATAAAGTTTACCTAACACTACAAATTATGGTCAAGAGAATTCCACGG 1260
***** ***** ** * ***** * ***** **

Codon-optimized HPV-VP TCGGTGTATAACGACTTTTATCATATAAAGCTAGAGCCGTGGTACCCACTGTGTATGAT 1320
AGTGTATAACGACTTCTATCATATAAAGCTAGAGCCGTGGTACCAACTGTGTATGAT 1320
** * ***** *****

Codon-optimized HPV-VP GAATATAAAGATCGCACGTTTGGAGCCACTGAAATCTCTCACAGAGGTAATAATACAC 1380
GAATATAAAGATAGGACATTTGGAGCTACTGAGATATCTCACAGAGGTAAGAACATACAC 1380
***** ** * ** ***** ** ***** *****

Codon-optimized HPV-VP GTAAATATAACTGGGACCCATGGCTCTAAGTATTCAGATCGTGGCAAGTATCACGCATT 1440
GTAACATAACTGGAATCATGGAAGCAAATATTCAGATAGAGGACAAGTATCAAGAATT 1440
***** ***** ** ***** ** ***** * **

Codon-optimized HPV-VP GGCGCCACAAAGAAGAACTTTGCAACACGTGCATATGGCCAGAAGCAGTTGCTCCTGAAT 1500
GGAGCAACAAAGAAGAACTTCGCAACAAGGGCATATGGACAGAAACAACACTACTCCTGAAT 1500
** * ***** ***** * ***** ***** * *****

Codon-optimized HPV-VP GAAGGTATCACAAGAAGGAAGACTAGAAGCAGTGCGGCGGCGGAAGATGATATCCCGAC 1560
GAAGGTATAACAAGAAGGAAGACAAGAAGCAGTGCGGCGGCGGAAGATGATATACCAGAC 1560
***** ***** ***** ** **

Codon-optimized HPV-VP GATTGTGAAGACTTCTAGAACTTCGGAGATGGAATCGCCGCCGACCCGAGCTGCAG 1620
GATTGTGAGGACTTCTAGAACTTCGGAGATGGAGTACCAGCCGACCCGAGCTGCAG 1620
***** ***** *****

Codon-optimized HPV-VP AAAAAGAAGAAGAAATACAAAACCAATGTGTAACCTCGAG 1659
AAGAAGAAGAAGTATAAGACTAATGTATAACCTCGAG 1659
** ***** ** ** ***** *****

그림 3-2-5. 최적화 전 (HPV-VP)와 최적화 된 (Codon-optimized) HPV VP 유전자의 염기서열 비교.

○ pGEM-T easy 벡터에 클론된 최적화 DNA는 BamH I과 Xho I으로 절단하여 pET28a에 클로닝한 후 대장균 Rosetta(DE3)pLysS에 형질전환하고 발현을 유도하였다. 코돈 최적화 이전의 DNA를 이용하였을 경우 동일한 벡터와 대장균으로부터 재조합 VP가 발현되지 않았으나, 코돈을 최적화한 후에는 재조합 단백질의 발현이 확인되었다. 그러나 pCold에서 발현된 재조합 단백질과 마찬가지로, 코돈이 최적화된 DNA로부터 발현된 재조합 단백질도 배양온도가 20℃ 또는 37℃에서 비수용성의 inclusion body를 형성 (그림 3-2-6) 하였으며, 이는 대장균의 상관 따라서 비수용성 재조합 단백질은 8M urea를 이용한 denaturation 과정을 거친 후 anti-His tag column을 이용하여 순수분리한 후 (주) Abfrontier에 의뢰하여 단클론 항체 제작을 실시하였다.

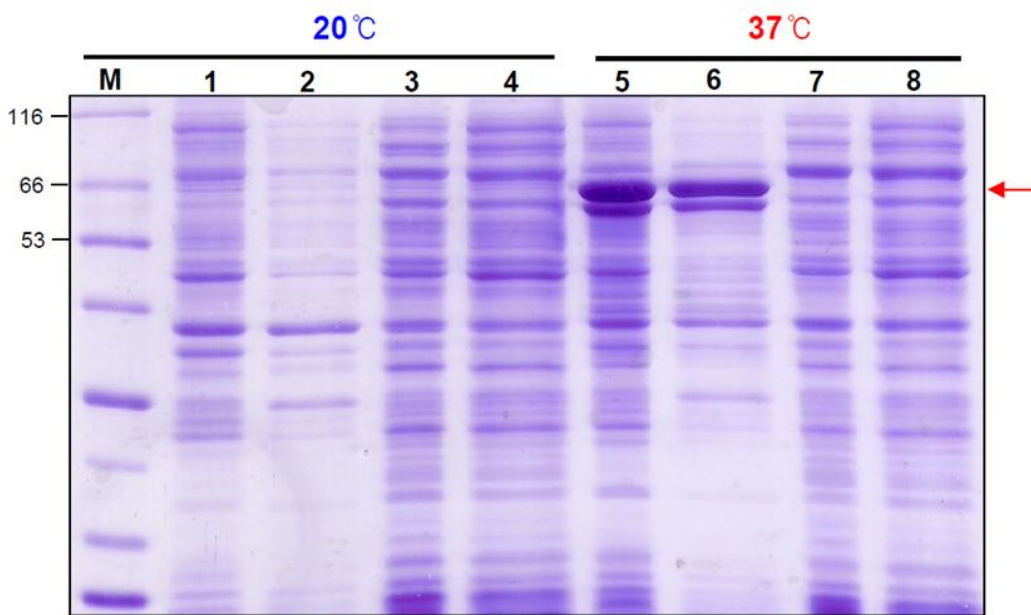


그림 3-2-6. 코돈 최적화된 HPV VP 재조합 단백질의 발현 및 수용성 정도. 형질전환된 대장균을 20℃ 또는 37℃에서 배양하고 0.4mM의 IPTG로 37℃에서는 4시간, 20℃에서는 12시간 단백질 발현을 유도하고 전체 단백질 및 상등액의 단백질을 분석하였다. Lane 1, 5: 전체 단백질, Lane 3, 7: 세포 파쇄 상등액, 2, 6; 전체 단백질, Lane 4, 8: 세포 파쇄 상등액

○ 총 470개의 융합 세포주에 대하여 ELISA로 선별한 결과 450nm에서 OD 값이 1.0 이상인 세포주 35개에 대해 1차 선별하고 선별된 이들을 2차선별 하여 총 5개의 세포주로부터 단클론 항체를 확보하였다.

○ 확보된 단클론 항체에 대하여 바이러스에 감염된 새우를 대상으로 웨스턴블롯을 실시한 결과, 확보된 단클론 항체들은 대장균에서 발현된 재조합 단백질에 대하여는 반응하나 PCR을 통하여 감염된 확인된 새우에서는 바이러스를 검출하지 못하였다 (그림 3-2-7). 따라서 GST-VP, 또는 VP 단독으로 발현시킨 재조합 단백질을 이용할 경우 새우 조직 내에 존재

하는 자연 상태의 바이러스를 검출하지 못하는 것으로 나타나 새우 조직으로부터 분리된 순수한 바이러스를 단클론 항체의 개발이 필요한 것으로 여겨진다.

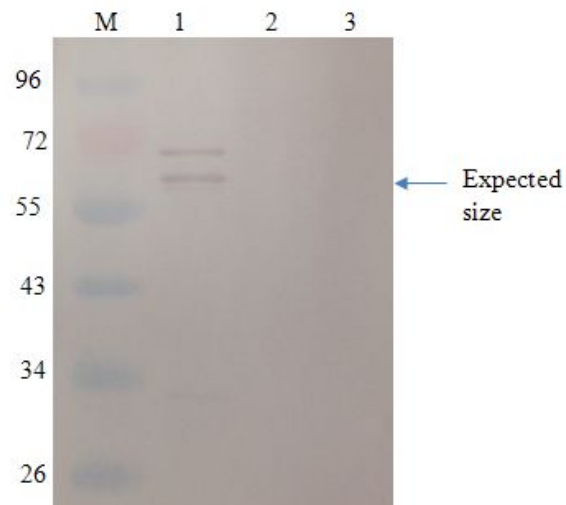


그림 3-2-7. 코돈 최적화 재조합 단백질에 대한 단클론 항체의 웨스턴블롯. Lane1; 재조합 단백질 발현 대장균의 전체 단백질, Lane 2; HPV 감염 새우, Lane 3; HPV 비감염 새우.

제3절 HPV 유전형에 따른 프라이머의 개발

1. 서론

○ 바이러스는 절대 세포내 기생체로서 환경 중에는 하나 또는 그 이상의 숙주와 안정적인 관계를 유지하면서 존재한다 (Wilcox & Gubler, 2005). 또한 바이러스는 환경이나 숙주 내에서 효과적인 복제 및 전파 방법을 가지고 있어야 한다. 그러나 환경은 숙주 생물의 유전적 변이 및 숙주의 방어 기작 때문에 지속적으로 변화한다. 이러한 환경의 변화는 유전적 요인에 의하여 자연 상태에서 좀 더 잘 적응할 수 있는 돌연변이나, 유전적 변이형의 선택을 유도한다 (Walker & Mohan, 2009).

○ HPV의 계놈은 IHHNV와 TSV와 같은 다른 새우 바이러스와 비교하여 높은 유전적 변이를 보인다. 현재 부분적인 염기서열을 포함하여 GenBank에는 8 종의 HPV 계놈의 염기서열이 존재하며, 이 중 4개의 경우 전체 계놈이 분석되어 있다 (Jeeva *et al.*, 2012; La Fauce *et al.*, 2007; Safeena *et al.*, 2010; Sukhumsirichart *et al.*, 2006). 다양한 HPV 균주에 대한 염기서열 분석 결과 서로 다른 새우 숙주 또는 지역에서 분리된 HPV 균주는 유전적으로 상이한 것으로 확인되었다 (La Fauce *et al.*, 2007). HPV의 세가지 ORF 중 오른쪽에 위치하며 바이러스의 구조 단백질을 암호화하는 ORF3는 다른 ORF와 비교하여 높은 염기서열 변이를 보이며, 아미노산 서열에 의하여 세 가지의 유전자형으로 구분되며, 제 1유전자형은 한국, 탄자니아, 마다가스카 유래 균주, 제 2 유전자형은 태국과 인도네시아 유래 균주, 제 3 유전자형은 뉴칼레도니아와 호주에서 유래한 균주를 포함한다 (Tang *et al.*, 2008a). 본 연구에서는 한국에서 분리된 제 1 유전자형을 포함하여 각 유전자형에 특이적인 프라이머를 개발하여 현재 한국에 존재하는 유전자형 이외에 다른 유전자형의 도입을 모니터링 할 수 있는 체계를 갖추하고자 실시하였다.

2. 연구내용 및 방법

가. Type specific primer의 제작

○ HPV의 3개 type (Type I, II, III)의 염기서열을 토대로 각 Type에 specific 한 primer를 작성하기 위하여 그림 3-3-1과 같은 생물정보학적 분석을 수행하였다.

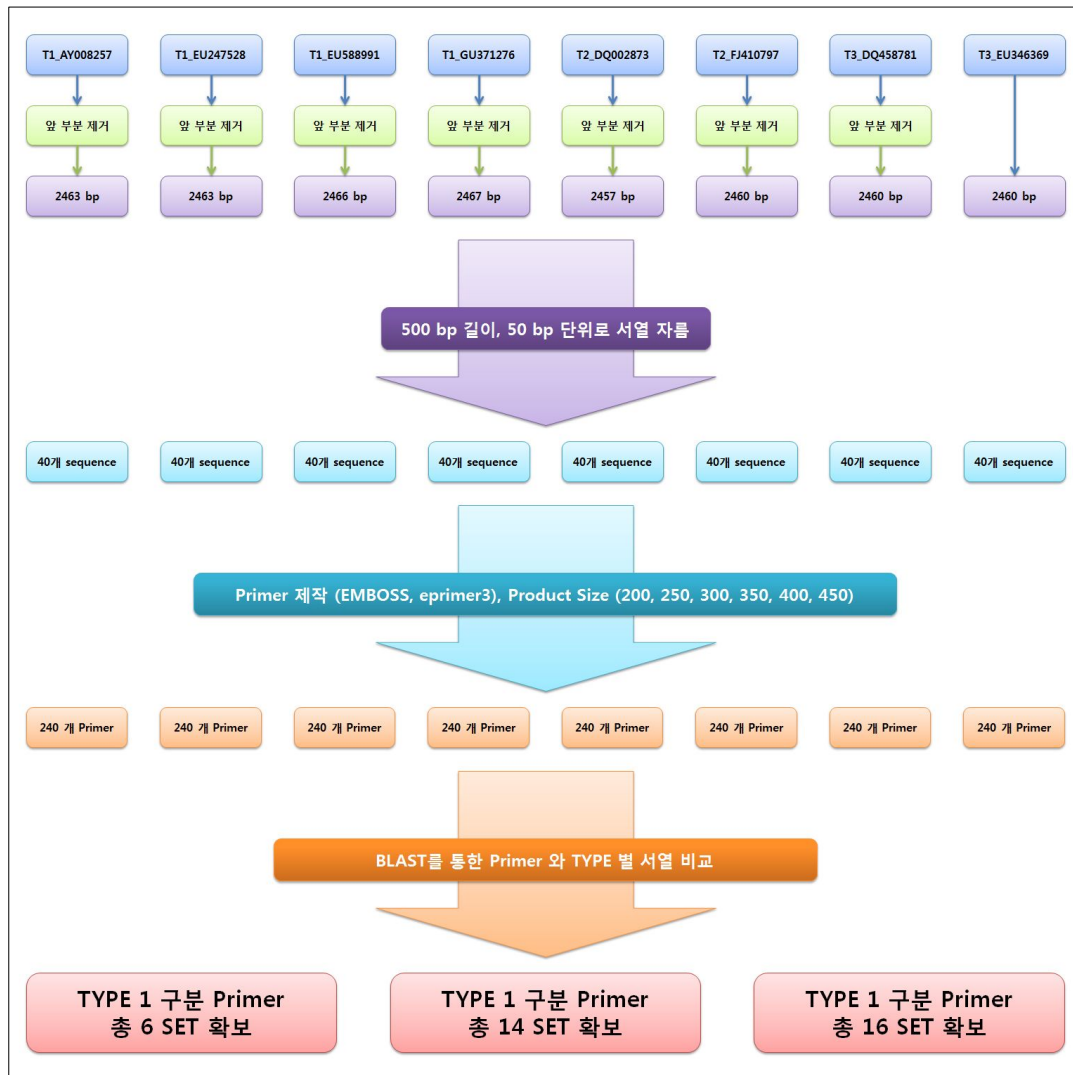


그림 3-3-1. HPV 유전자형에 따른 프라이머 제작 과정

○ 3개 Type 의 HPV 서열 8가지를 GenBank에서 다운로드 받아 multiple alignment 하였다. 8가지 서열의 저장 번호는 AY008257.2 (Type 1), EU247528.1 (Type 1), EU588991.1 (Type 1), GU371276.1 (Type 1), DQ002873.1 (Type 2), FJ410797.2 (Type 2), DQ458781.4 (Type 3), EU346369.1 (Type 3) 이었다.

○ Multiple alignment 결과 제3 유전자형에 해당하는 EU346369.1 서열이 2,460 bp 로 가장 짧았는데 Type specific primer의 신뢰도를 높이기 위하여 모든 서열이 겹쳐지는 영역만 남기고 나머지 부분은 trimming 하였다. Trimming 후 남은 서열의 길이는 약 2,500 bp 정도였다. Type specific primer를 작성할 때 최대한 많은 변수를 고려하기 위하여 1-500, 51-550, 101-600와 같은 방식으로 50 bp 씩 증가시키면서 500 bp 씩 잘라 단편서열을 만들었다. 그 결과 8개의 서열에서 총 320개의 단편서열(각 서열별 40개 단편서열)을 얻을 수 있었다.

었다. Perl script 를 활용하여 EMBOSS package 의 eprimer3 프로그램을 자동화 한 후 320 개의 서열에 대하여 Primer를 제작하였다. 이 때 Primer product size는 200, 250, 300, 350, 400, 450 으로 제작하였다. 그 결과 각 40개의 서열에서 총 240 개의 primer set 제작 총 8 개의 서열에서 총 1,920 개의 primer set를 제작하였다.

○ 1,920개의 primer set 를 대상으로 주형서열인 각 8개의 서열을 데이터베이스로 만든 후 BLASTn 을 통해 매치시켜 검증하였다. 제1 유전자형 서열의 검증방법은 제1 유전자형 의 4개의 서열에서 제작한 각각 240 개의 primer set 가 같은 Type의 서열에는 매치가 되면서 다른 Type 에는 매치가 되지 않는 primer를 검색하는 방법을 통해 검증하였다. 제 2, 제3 유전자형 서열 역시 위와 같은 방법으로 검증하였다. 확인 결과 제1 유전자형에서는 총 6 개, 제2 유전자형에서는 14 개, 제3 유전자형에서는 16개의 primer set가 선별되었으며, 이

들의 성공확률은

고	← 성공확률 →	저
1	2	3

 같이 색상으로 구분하여 기록하였다 (표 3-3-1, 2, 3).

표 3-3-1. HPV 유전자형 1에 특이적인 프라이머 후보군

TYPE 1 Primer	Product size	Primer Sequence
450. T1_EU588991. 1. P12	458	>450.T1_EU588991.1.P12_F : GACCAAGAGAAAACCTCCAGCA >450.T1_EU588991.1.P12_R : CCACTGTCCTCTGTTTCTGACC
200. T1_GU371276. 1. P06	200	>200.T1_GU371276.1.P06_F : TCGCATTAGAAGGACCAAGC >200.T1_GU371276.1.P06_R : CGACGCACTTGCTCTTTGTC
250. T1_AY008257. 2. P07	252	>250.T1_AY008257.2.P07_F : TCGCATTAGAAGGACCAAGC >250.T1_AY008257.2.P07_R : CTGGCTCAGAGGTTTCCATC
250. T1_EU247528. 1. P08	259	>250.T1_EU247528.1.P08_F : TGA AATTCATTAGAAGGACCA >250.T1_EU247528.1.P08_R : CCCTGACTCAGAGGTTTCCA
250. T1_EU588991. 1. P22	263	>250.T1_EU588991.1.P22_F : TCCACAAATGCAAGGTGAAA >250.T1_EU588991.1.P22_R : TCATCATTGGTGCATCTCGT
350. T1_AY008257. 2. P10	359	>350.T1_AY008257.2.P10_F : TCGCATTAGAAGGACCAAGC >350.T1_AY008257.2.P10_R : GAATGCATCGTTGGTGTGTTT

표 3-3-2. HPV 유전자형 II에 특이적인 프라이머 후보군

TYPE II Primer	Product size	Primer Sequence
300.T2_FJ410797.2.P32	312	>300.T2_FJ410797.2.P32_F : CCAATGCAGCTCTTATTGGAC : >300.T2_FJ410797.2.P32_R : CACTTGGTCCAACACTTCCA
450.T2_DQ002873.1.P30	450	>450.T2_DQ002873.1.P30_F : CAACCACGTATTTGCATTAC : >450.T2_DQ002873.1.P30_R : TCACTTGGTCCAACACTTCC
250.T2_DQ002873.1.P38	269	>250.T2_DQ002873.1.P38_F : ACGGAAGTGTGGACCAAGT : >250.T2_DQ002873.1.P38_R : TTCGTCGTATCCGAATGATCT
250.T2_FJ410797.2.P01	254	>250.T2_FJ410797.2.P01_F : CGGAGTGGAACGATCCTGTA : >250.T2_FJ410797.2.P01_R : TTCTGCTAATCTGTCTCCACCA
300.T2_DQ002873.1.P30	297	>300.T2_DQ002873.1.P30_F : CTCATTGGTCTCATGCCAAG : >300.T2_DQ002873.1.P30_R : TGGTCCAACACTTCCGTATG
350.T2_DQ002873.1.P37	350	>350.T2_DQ002873.1.P37_F : TGAAGAAGCTCACGTAACCAG : >350.T2_DQ002873.1.P37_R : TTTCGTCGTATCCGAATGAT
400.T2_DQ002873.1.P30	390	>400.T2_DQ002873.1.P30_F : GCAGCATACCAGACCAACG : >400.T2_DQ002873.1.P30_R : TGGTCCAACACTTCCGTATG
400.T2_FJ410797.2.P30	393	>400.T2_FJ410797.2.P30_F : CAGCATACCAGACAACACTGACG : >400.T2_FJ410797.2.P30_R : CACTTGGTCCAACACTTCCA
250.T2_FJ410797.2.P35	258	>250.T2_FJ410797.2.P35_F : TTGGACCAAGTGACAATGGA : >250.T2_FJ410797.2.P35_R : CGTCGTATCCGAATGTTCTGT
350.T2_DQ002873.1.P24	350	>350.T2_DQ002873.1.P24_F : CGTGGGGTATGGACAACATA : >350.T2_DQ002873.1.P24_R : TGGCGAATCTCTCAAGTCTG
400.T2_DQ002873.1.P12	417	>400.T2_DQ002873.1.P12_F : ACCAGGAGAGAACTCCAGCA : >400.T2_DQ002873.1.P12_R : CCCCTACCAGTTTACTCAGC
400.T2_DQ002873.1.P37	400	>400.T2_DQ002873.1.P37_F : ACGGAAGTGTGGACCAAGT : >400.T2_DQ002873.1.P37_R : CTCTGTGCATATGCTCTCTGG
450.T2_DQ002873.1.P11	456	>450.T2_DQ002873.1.P11_F : TTGCATTACAAGAACCAAGCA : >450.T2_DQ002873.1.P11_R : CCCCTACCAGTTTACTCAGC
450.T2_DQ002873.1.P22	450	>450.T2_DQ002873.1.P22_F : AACGGCAACAGTAACTCTGGA : >450.T2_DQ002873.1.P22_R : TGGCGAATCTCTCAAGTCTG

표 3-3-3. HPV 유전자형 III에 특이적인 프라이머 후보군

TYPE III Primer	Product size	Primer Sequence
400.T3_DQ458781.4.P03	404	>400.T3_DQ458781.4.P03_F : ACATCAGGGTGGAGAGATCC : >400.T3_DQ458781.4.P03_R : ACACTGCTCGGTCCCTCTAA
400.T3_DQ458781.4.P37	417	>400.T3_DQ458781.4.P37_F : GGTGGGCAAGGACTGAAGTA : >400.T3_DQ458781.4.P37_R : GGTCTGCTTTGATTGCCTTC
450.T3_DQ458781.4.P37	455	>450.T3_DQ458781.4.P37_F : CGAAGACGCTTATGTATGCAG : >450.T3_DQ458781.4.P37_R : GGTCTGCTTTGATTGCCTTC
350.T3_DQ458781.4.P02	358	>350.T3_DQ458781.4.P02_F : TCAGGGTGGAGAGATCCAGT : >350.T3_DQ458781.4.P02_R : TCTGTCCCTCTGCTTGAAT
300.T3_DQ458781.4.P19	300	>300.T3_DQ458781.4.P19_F : CTAGCGCCAGTAACCAAGGA : >300.T3_DQ458781.4.P19_R : TGGTCTCTTCTCCCTTTGGA
300.T3_DQ458781.4.P34	299	>300.T3_DQ458781.4.P34_F : AGACATCCCAGCAGAAGGTG : >300.T3_DQ458781.4.P34_R : CATTATACACATGGCGTGCAA
350.T3_DQ458781.4.P13	361	>350.T3_DQ458781.4.P13_F : CACGCAAGAGCGACAAGATA : >350.T3_DQ458781.4.P13_R : GGCGCTAGACAGTCCCATTA
350.T3_EU346369.1.P29	367	>350.T3_EU346369.1.P29_F : GCCAGACGAAGATCACATCA : >350.T3_EU346369.1.P29_R : GGAGCACCTTCTGCTGGTAT
350.T3_EU346369.1.P37	351	>350.T3_EU346369.1.P37_F : TACTGGGGCATTTCACACAGA : >350.T3_EU346369.1.P37_R : TCTGCCTTGATTGCCTTCTT
400.T3_DQ458781.4.P20	391	>400.T3_DQ458781.4.P20_F : CTAGCGCCAGTAACCAAGGA : >400.T3_DQ458781.4.P20_R : TTTTGGCTCATGTCGTCGT
400.T3_DQ458781.4.P38	424	>400.T3_DQ458781.4.P38_F : TACTGGGGCATTTCACACAGA : >400.T3_DQ458781.4.P38_R : GCTTCTGGTCCTCCTCACTG
400.T3_EU346369.1.P02	416	>400.T3_EU346369.1.P02_F : GAAAGGACAGAAGATTCAAAGGAA : >400.T3_EU346369.1.P02_R : ATTCTGTCCCTCTGCTTGA
400.T3_EU346369.1.P28	396	>400.T3_EU346369.1.P28_F : GCCAGACGAAGATCACATCA : >400.T3_EU346369.1.P28_R : TCCTGCACACATAAGCGTCT
450.T3_DQ458781.4.P03	450	>450.T3_DQ458781.4.P03_F : GAAAATTCAAAGGAAAGGGAAA : >450.T3_DQ458781.4.P03_R : TTACACTGCTCGGTCCCTCT
450.T3_DQ458781.4.P28	450	>450.T3_DQ458781.4.P28_F : CCATAAAAGTTGCAGGCATTG : >450.T3_DQ458781.4.P28_R : CACCTTCTGCTGGGATGTCT
450.T3_EU346369.1.P14	452	>450.T3_EU346369.1.P14_F : CAGAGAAGTCCACTGAAGAGC : >450.T3_EU346369.1.P14_R : TGCATAGGTTAAGATTCCCCATA

나. 유전자형 특이 프라이머 제작 및 PCR

○ 위의 제1-제3 유전자형에 특이적인 프라이머 중 성공확률이 가장 높은 것으로 예상되는 5개의 프라이머 세트를 선별 제작하였다. 제 1 유전자형의 경우 위의 표에 제시된 프라이머 중 T1-P06, T1-P07, T1-P08, T1-P22의 4 세트, 제 2 유전자형의 경우 T2-P38, T2-P32, T2-P30의 3개 프라이머 세트, 제 3 유전자형의 경우 T3-P02, T3-P03, T3-P37, 의 3개 프라이머를 (주) 바이오니아에 의뢰하여 제작한 후 개별적인 PCR을 수행하였다.

○ PCR은 2009년도에 서해안 지역의 양식장에서 채집한 새우로부터 추출된 DNA를 이용하였다. 모든 프라이머에 대한 PCR 반응은 다음 조건에서 수행하였다: 초기 95°C에서 3 분간의 denaturation 후에 95°C에서 30초간의 denaturation, 53°C에서 40초의 annealing, 72°C에서 1분의 polymerization이 35회 이루어진 후 72°C에서 10분의 polymerization을 수행되었다. PCR 산물은 1.2% 아가로스 겔에서 전기영동을 하여 확인하였다.

3. 연구결과

가. 제 1 유전자형의 PCR

○ 제 1 유전자형에 특이적인 프라이머 4 세트에 대한 PCR 결과 선별된 4개의 프라이머 모두 예상 크기의 PCR 산물을 증폭하였다 (그림 3-3-2). 이 중 T2-P08 프라이머 세트에 의하여 증폭된 259bp 크기의 DNA를 겔에서 분리하여 pGEM-T easy 벡터에 클로닝 한 뒤 염기서열을 확인한 결과, 제 1 유전자형의 염기서열과 100% 상동성을 보이는 것으로 확인되었다. 따라서 검사한 프라이머 모두는 제1 유전자형의 게놈을 검출할 수 있는 것으로 판단된다. 그러나 이들 프라이머가 제2 또는 제3 유전자형에 비 특이적으로 작용하지 않는지의 여부는 이들 유전자형이 존재하는 지역의 연구자에게 분석을 의뢰할 필요가 있다.

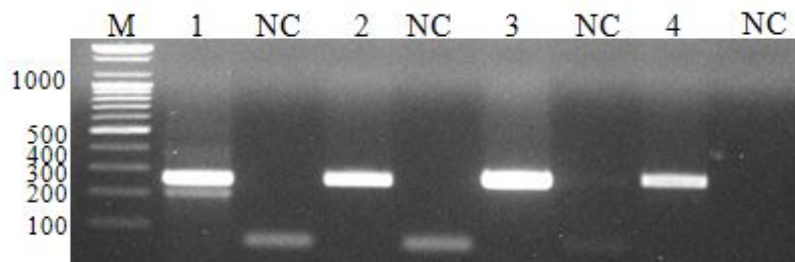


그림 3-3-2. HPV 제1 유전자형 특이 프라이머 세트를 이용한 PCR 결과. 각 반응에는 동일한 새우를 사용하여 PCR을 수행하였다. M;100 bp, Lane 1;T1-P06, Lane 2; T1-P07, Lane 3;T1-P08, Lane 4;T1-P22, Lane NC; Negative control

나. 제 2 유전자형의 PCR

○ 제 2 유전자형의 경우 3개의 프라이머 세트에 대하여 분석을 실시하였다 (그림 3-3-3). T2-P38 프라이머의 경우 크기가 900bp 정도 되는 PCR 산물이 생성되었으나 예상 PCR 산물의 크기가 269bp 이므로 이 PCR 산물은 비 특이적 산물로 여겨진다. 또한 T2-P32 프라이머 세트의 경우 약 90bp 크기의 PCR 산물이 생성되었으나, 표적 DNA 크기가 300bp 이므로 이 PCR 산물은 비 특이적 증폭의 결과로 여겨진다. T2-P30 프라이머의 경우 비 특이적인 증폭이 나타나지 않았다.

○ 현재 국내에는 제1 유전자형의 HPV만 존재하는 것으로 확인되었으며, 제 2 유전자형의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였을 때 PCR 산물이 생성되지 않는 것은 국내에는 제 2 유전자형이 존재한다는 것을 제시한다. 제2 유전자형의 경우 인도와 태국 등에 존재하는 것으로 알려져 있으며, 이 프라이머를 이용할 경우 이들 국가에서 제 2 유전자형의 HPV가 유입되는지를 확인할 수 있을 것이다. 다만 이 프라이머 세트가 제2 유전자형에 특이적으로 작용하는지는 이 프라이머를 제 2 유전자형이 발생하는 지역의 연구자에게 보내거나 표적 DNA를 포함하고 있는 클론을 획득하여 검사할 필요가 있다.

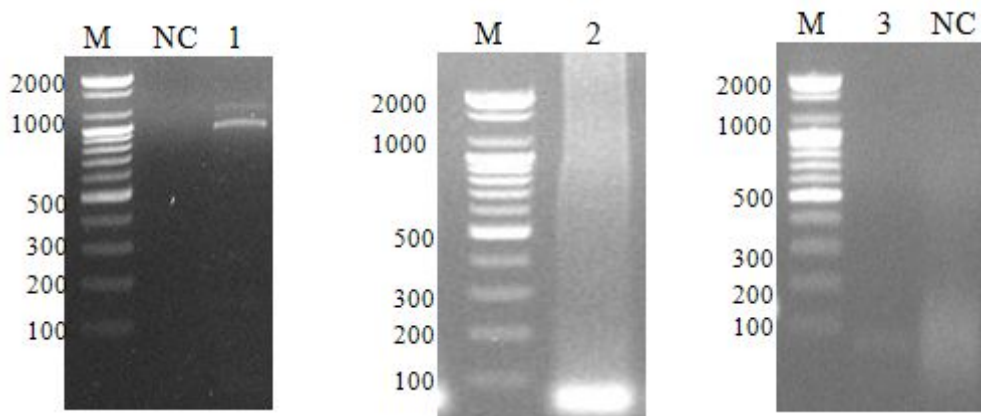


그림 3-3-3. HPV 제2 유전자형 특이 프라이머 세트를 이용한 PCR 결과. 각 반응에는 동일한 새우를 사용하여 PCR을 수행하였다. M;100 bp, NC; Negative control, 1;T2-P38, Lane 2; T2-P32, Lane 3;T2-P30

다. 제 3유전자형의 PCR

○ 제3 유전자형의 경우, P3-P02, P3-P03, T3-P37의 3개의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하였다 (그림 3-3-4). P3-P02의 경우 일부 시료에서 비 특이적 PCR 산물이 검출되었으며, HPV의 titer가 높은 시료에서는 예상 크기인 358bp의 PCR 산물이 검출되기도 하였으

나, 이들에 대한 염기서열 분석 결과 제1 유전자형의 표적 DNA에 비 특이적으로 프라이머가 결합하여 PCR 산물이 생성된 것으로 확인되었다.

○ T3-P03의 경우에도 일부 시료에서 예상 크기인 400bp보다 크기가 약간 큰 PCR 산물이 생성되었으나, 이 산물에 대한 염기서열 분석 결과 제 1 유전자형에 비특이적으로 결합하여 DNA를 증폭한 것으로 확인되었다. T3-P37 프라이머는 검사한 모든 시료에서 PCR 산물이 검출되지 않았다.

○ 현재 국내에는 제1 유전자형의 HPV가 존재하기 때문에 T3-P37 프라이머는 제3 유전자형에 특이적인 프라이머로 여겨진다. 그러나 제 2 유전자형 특이 프라이머와 마찬가지로 이 프라이머 세트가 제3 유전자형에 특이적으로 작용하는지는 이 프라이머를 제 3 유전자형이 발생하는 호주 또는 뉴칼레도니아 지역의 연구자에게 보내거나 표적 DNA를 포함하고 있는 클론을 획득하여 검사할 필요가 있다.

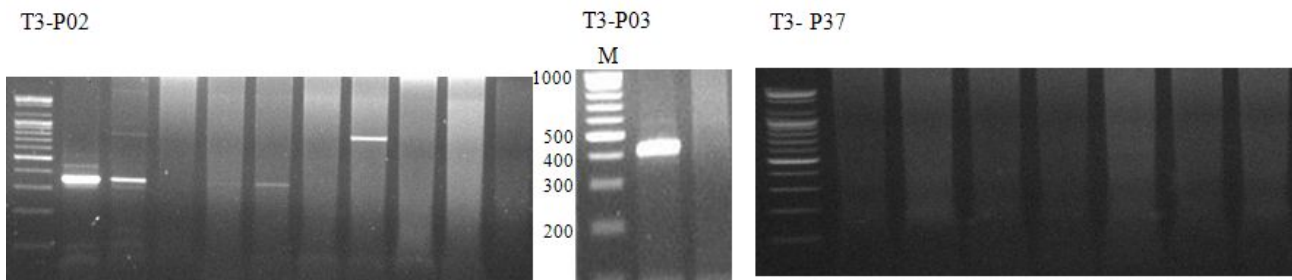


그림 3-3-4. HPV 제3 유전자형 특이 프라이머 세트를 이용한 PCR 결과. 각 반응에 사용한 시료는 PCR 결과 HPV wp1 유전자형에 감염된 새우이며, PCR에 사용된 프라이머는 겔 사진의 위쪽에 제시하였다.

제4절 HPV 유전자형 공통 프라이머 및 이를 이용한 HPV와 WSSV 동시 검출 키트의 개발

1. 서론

○ 양식은 많은 나라에서 먹거리 확보, 빈곤완화, 고용창출 그리고 경제적 이익창출의 중요한 역할을 하고 있으나, 질병을 방지하는 것에만 의존하고 있다 (Haq, Vignesh & Srinivasan, 2012). 한국에서 1970년대부터 도입된 새우양식은 경제적으로 중요한 양식 종으로 대두되어 왔다. 한국의 토종새우인 대하의 생산은 2004년에 2,400톤의 최대 생산량을 나타내었지만 white spot syndrome virus (WSSV)의 감염으로 인해 급속도로 생산량이 줄어들었다.

○ *Nimaviridae*과의 *Whispovirus* 속에 속하는 White spot syndrome virus는 급속히 증식하는 치명적 병원체이다. WSSV는 181-184개의 open reading frames를 포함하고 있는 293-300 kbp 정도의 큰 circular 형태의 이중나선 DNA genome을 포함하한 막대 모양의 nucleocapsid로 구성되어 있다 (Van Hulten *et al.*, 2001). 이 virus는 태국 (Chiang & Lo, 1995)과 중국 (Zhan *et al.*, 1998)에서 처음 발견되었으며, 그 후 거의 모든 아시아 국가와 미국 전역에 넓게 퍼져 있다. WSSV는 한국의 남해와 서해의 보리새우를 대량으로 폐사시키기도 하였다 (Park *et al.*, 1998). White spot disease는 대부분 증상이 보이기 시작한 시기로부터 한 주 뒤 80-100%의 새우가 죽는 것으로 나타났다 (Chiang & Lo, 1995; Park *et al.*, 1998). WSSV의 감염으로 인해 1993년 일본에서는 많은 새우 양식장들이 임시 휴업하였고 (Inouye *et al.*, 1994), 한국도 2002년 비슷한 현상이 일어났었다 (Jang *et al.*, 2009).

○ 2002년 이후, 생산량이 저하된 대하대신 WSSV에 감염이 덜 일어나는 것으로 알려진 흰다리새우로 교체되기 시작하여 (Jang *et al.*, 2008), 2011년엔 흰다리새우의 생산량이 2,844톤 인데 반해 대하는 18톤이 생산되었다 (<http://fs.fips.go.kr>). 흰다리새우가 WSSV에 저항성이 있는 것으로 알려졌으나 (Briggs *et al.*, 2004; Rosenberry, 2004), 이 새로운 종의 유입은 새로운 바이러스성 질병을 발생시키는 결과를 낳았다. 예를 들어 흰다리새우의 수입은 중국에 hematopoietic necrosis virus (IHHNV)와 Taura syndrome virus (TSV) 그리고 대만에 TSV 같은 질병을 확산시키는 결과를 가져왔다 (Yang *et al.*, 2007; Yu & Song, 2000).

○ 그에 반해서 흰다리새우 양식장의 최근 조사에는 다른 새우 바이러스인 hepatopancreatic parvovirus (HPV)가 한국에서 높게 발생한 것으로 확인되었다 (Jang *et al.*, 2008). HPV는 한국에서 1985년에 대하에서 처음 발견되었고 (Lightner & Redman, 1985), 대하와 흰다리새

우 두 개의 종 모두 감염시키는 것이 확인되었다 (Jang *et al.*, 2008; Jang *et al.*, 2011). HPV는 *Parvoviridae* 과의 densovirus 그룹에 속하는 외막이 없는 20면체 virus이다 (Bonami *et al.*, 1995). 이 virus는 거의 6-kb 크기의 단일 나선 DNA genome 구조로 이루어져있고, 이 genome 은 비구조 단백질 2 (NS2), 비구조 단백질 1 (NS1), 그리고 구조 단백질인 VP을 암호화 하고 있다 (Jeeva *et al.*, 2012; La Fauce *et al.*, 2007; Safeena *et al.*, 2010; Sukhumsirichart *et al.*, 2006). 최근 한국대학에서 분리한 HPV 의 대부분의 계놈의 염기서열이 본 연구진에 의하여 밝혀졌다 (Jeeva *et al.*, 2012).

○ 일련의 분자생물학적 연구 방법들, 예를 들어 polymerase chain reaction (PCR) (Lo *et al.*, 1996; Manjanaik *et al.*, 2005; Pantoja & Lightner, 2000; Sukhumsirichart *et al.*, 1999), PCR-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Sukhumsirichart *et al.*, 2002), ELISA (Chen *et al.*, 2002), loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Kono *et al.*, 2004; Nimitphak *et al.*, 2008), real-time PCR (Sritunyalucksana *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2007), LAMP combined with lateral flow chromatographic strips (LFCS), in situ hybridization (Pantoja & Lightner, 2001; Phromjai *et al.*, 2002), 그리고 specific immune chromatographic tests (ICTs) (Wang & Zhan, 2006)은 HPV와 WSSV의 발견을 가능하게 해주었다. 새우를 감염시키는 20개 이상의 virus들의 보고되어져 왔으며 virus의 동시감염 사례는 흔한 것으로 확인되어었다. 새우의 동시 감염 바이러스들은 각각의 독립된 타겟 PCR방법 (Tan *et al.*, 2009), 조직학적 관찰과 PCR혼합방법 (Manivannan *et al.*, 2002), 역전사 PCR을 이용한 RNA와 DNA 이원탐지 방법 (Khawsak *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2007), 다중 loop-mediated isothermal amplification(LAMP) 방법 (Yang *et al.*, 2006) 등 다양한 방법으로 발견된다 (He & Xu, 2011).

○ 본 연구 과정에서 2009, 2010 그리고 2011년 까지 수집된 350개체의 흰다리새우에 관한 예비 조사에서 이 새우들은 IHNV와 TSV에는 감염되지 않지만, WSSV와 HPV에는 감염된 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구에서는 멀티플렉스 PCR을 이용하여 WSSV와 HPV를 동시에 검출하는 키트를 개발하고자 하였다. 이를 위하여 두 바이러스에 특이적인 프라이머를 제작하고, 각 프라이머의 비율 조정 및 annealing 온도 결정 등 최적의 반응 조건을 확립하였다. 또한 양식장에서 직접 채집한 새우 시료를 대상으로 본 연구에서 개발된 멀티플렉스 PCR 키트를 이용하여 양식 새우의 두 바이러스에 의한 감염 정도를 조사하였다.

2. 연구내용 및 방법

가. 시료 수집

○ 흰다리새우 (*Litopenaeus vannamei*) 시료를 한반도 서해안에 위치한 17개의 새우 양식장으로부터 수집하였다. 수집한 양식장은 흰다리새우 생산의 주된 지역으로 그 중 6개의 양식장은 충남 홍성군에 위치했고, 11개는 전남 신안군에 위치해 있다. 30마리 이상의 건강하게 보이는 개체들을 수확기 중간인 2011년 9월에 양식장으로부터 채집하였다. 20마리의 살아있는 자연산 대하 (*Fenneropenaeus chinensis*)는 홍성군의 어시장에서 구입하였다. 10마리의 개체들을 각 시료로부터 무작위적으로 선별했고, 핵산을 분리하기 전에 50mL 코니칼 튜브에 나눠 담고 약 -80°C 에 보관하였다.

나. 핵산 추출

○ 냉동된 시료로부터 약 20mg의 유영각(pleopod)을 취하여 0.1M NaCl, 20mM Tris-HCl, EDTA 및 0.5% SDS를 함유하는 500 μL 버퍼에 녹여 균질화 시켰다. 균질화 된 시료에 페놀:클로로포름:이소아밀알콜 (25:24:1)을 500 μL 첨가하여 DNA를 용해시킨 뒤, 원심 분리하여 상등액 만을 취해 새로운 tube에 옮기고, 0.1 부피(volume)의 3M NaOAc (pH 5.3)와 2 부피의 무수 에탄올을 이용해 침전시킨 후, 침전물을 70% 에탄올로 세척하고 대기 중에 건조시킨 뒤 100 μL TE 완충액에 재현탁하였다.

다. 프라이머 고안 및 새우 감염 바이러스 스크린

○ ClustalW2 (EBI)를 이용해 다중 DNA 서열 정렬을 수행하여, 다양한 WSSV 또는 HPV 균주 내 보존된 서열의 위치를 찾았다. WSSV 서열의 GenBank 등록 번호는 DQ902658, AY324881, EU414753, AY249442 및 AY249443이다. DNA 서열 JN082231, AY008257, EU588991, EU247528, DQ002873, DQ458781, FJ410797 및 GU371276 는 HPV의 특이적 프라이머 디자인에 이용했다. 내부 양성 대조군으로서, DNA서열 JQ241179(보리새우(*Penaeus monodon*)), DQ205426(대하) 및 AF300705(흰다리새우)의 β -액틴 유전자를 비교하여 특이적인 프라이머를 디자인하였다. 다중 서열 정렬 후, 보존성 영역을 검색했고, 예상된 PCR 생성물이 아가로스 겔 상에서 명확하게 분리되도록 프라이머를 디자인하였다.

라. WSSV 및 HPV DNA 클로닝

○ WSSV 및 HPV 유전체 유래의 DNA 절편을 추출된 DNA로부터 증폭시키고, 클로닝하여 민감도 시험에 이용했다. PCR 프로그램은 denaturation 을 95°C에 3분 처리하고, 35번의 cycle 안의 denaturation은 30초, annealing 은 57°C에서 1분, 그리고 polymerization의 경우 72°C에서 1분 반응 시킨 뒤, 추가적으로 polymerization 을 72°C에서 10분을 수행하는 것으로 이루어 졌다. PCR 결과물을 아가로스 겔 상에서 정제 한 뒤, TA 클로닝 키트 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용해 pCR8/GW/TOPO 벡터로 클로닝하고, 대장균 (*Escherichia coli*) TOP10 세포에 형질전환 시켰다. DNA 염기서열을 확인한 후, Victor³ Multilabel Plate Reader(PerkinElmer, Shelton, CT, USA)를 이용해 농도를 확인하여 이를 카피수 (copy number)로 변환시켰으며, 주형 DNA에 대한 연속적인 10배 희석을 이용해 검출 한계를 결정했다.

마. WSSV 및 HPV 검출을 위한 멀티플렉스 PCR (multiplex PCR)

○ WSSV 및 HPV 두 가지 모두가 동시에 검출되기 위한 멀티플렉스 PCR을 개발했다. 앞의 두 표적 바이러스의 프라이머와 함께, 새우 β-액틴에 대한 프라이머 세트를 내부 양성 대조군으로서 추가했다. 반응 혼합물에는 감염된 새우로부터 추출된 총 DNA 40ng, 1U의 prime Taq DNA 중합효소(GeNet Bio, Cheonan, Korea), 0.5mM의 dNTPs, 4mM MgCl₂ 및 2× reaction buffer(Prime Taq premix2X; GeNet Bio)과 멀티플렉스 PCR 생성물의 양이 개별 PCR로부터의 것과 유사하게 되도록 다양한 비율의 3가지 프라이머 세트를 포함시켰다. PCR 프로그램은 방법 <4. WSSV 및 HPV DNA 클로닝>에 기재된 것과 같다.

3. 연구결과

가. 프라이머 디자인

○ 서로 다른 숙주 및 지리학적 기원의 WSSV 및 HPV의 동시 검출을 위해, 두 바이러스에서 보존성 영역 유래의 프라이머 세트를 디자인하였고, 내부 대조군 프라이머 세트는 3가지의 WSSV 및 HPV 숙주인 세 종의 새우류의 β-액틴 유전자의 서열 비교를 근거로 디자인 하였다. PCR 프라이머의 서열 및 생성물의 크기를 표 3-4-1에 제시했다.

표 3-4-1. WSSV 및 HPV 동시 진단용 멀티플렉스 프라이머

Target	Primer	Nucleotide Sequence	G+C Content (%)	Tm (°C)	Product (bp)
WSSV	WSSVF	5'-CTTTCACCTCTTTCGGTCTGTGTC-3'(서열번호 1)	50	59.2	604
	WSSVR	5'-TACTCGGTCTCAGTGCCAGA-3'(서열번호 2)	55	58.0	
HPV	HPV1414F	5'-GTTAGGAATGGAAAGATGTGT-3'(서열번호 3)	38	51.8	338
	HPV1750R	5'-CTCCAATAAAATGTGTAAATGAGG-3'(서열번호 4)	33	55.6	
β-actin	β251F	5'-GTCAYCAGGGTGTGATGGTC-3'(서열번호 5)	58	55.3	139
	β251R	5'-ATCTTCTCCATGTCRTCCCAG-3'(서열번호 6)	50	55.1	

○ 본 연구에서는 WSSV의 검출을 위해 5개의 vp28 유전자 서열을 비교했고, 100% 염기서열의 동일성을 나타내는, AF332093 유전체 서열의 뉴클레오티드 244,252-244,855에 해당하는 604bp DNA 절편을 선별했다. 다른 숙주 및 지리학적으로부터 HPV 검출을 가능하게 하기 위해 HPV 유전체 내에서 가장 보존적인 영역을 결정하였다. HPV 유전체 서열 중 8개의 완전 또는 부분적 다중 정렬 후, JN082231(GenBank 등록 번호)의 염기 1,414-1,751에 해당하는 338bp DNA 절편을 증폭시키기 위한 프라이머 세트를 디자인했다.

○ DNA 추출을 위해 에탄올 침전화를 이용한 페놀:클로로포름 추출법 및 시판 유전체 DNA 추출 키트(Bioneer, Daejeon, Korea)의 두 가지 방법을 시도했으나, 차이점을 발견하지 못하였다(데이터 미제시). 그러나 다양한 숙주 새우류로부터 두 바이러스를 검출하며, DNA 추출 과정에서의 DNA의 이상여부를 확인할 수 있도록 내부 양성 대조군으로 β-액틴 유전자에 대한 프라이머 세트를 포함시켰다. β-액틴 유전자의 프라이머 세트는 흰다리새우 β-액틴 유전자(GenBank 등록 번호 AF300705)의 염기서열 190-328에 해당하는 139bp DNA 절편을 증폭했다. 그림 3-4-1에 제시된 바와 같이, 서로 다른 프라이머 세트는 세 종 모두의 표적 유전자를 성공적으로 증폭하여, 멀티플렉스 PCR 시스템이 임의의 다른 숙주 생물체 유래의 WSSV 및 HPV의 동시 검출에 적용될 수 있음을 시사했다.

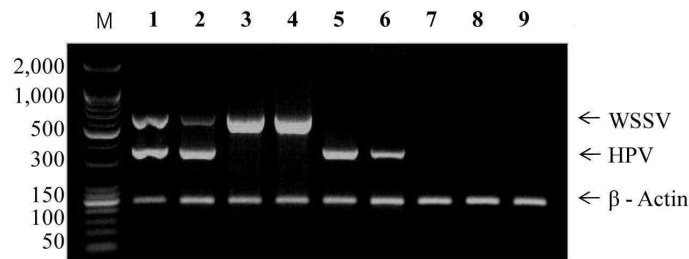


그림 3-4-1. 멀티플렉스 PCR을 이용한 WSSV와 HPV 동시 감염 검출 결과. 양식장에서 채집한 흰다리 새우 2개체씩에 대하여 multiplex PCR (lane 1 and 2), WSSV 특이적 PCR (lanes 3 and 4) HPV 특이적 PCR (lanes 5 and 6)을 수행하였으며, 바이러스에 감염되지 않은 대하 (lane 7), 흰다리새우 (lane 8), 보리새우(lane 9)는 내부 양성 대조를 위한 β -액틴 유전자의 프라이머 세트를 이용한 PCR을 수행하였다.

나. 최적화 및 민감도 시험

○ 멀티플렉스 PCR 반응 조건을 annealing 온도 및 프라이머 비율의 측면에서 최적화하였다. 먼저, 각 프라이머 세트에 대한 최적 annealing 온도는 바이러스가 없는 흰다리새우 및 WSSV 또는 HPV에 감염된 흰다리새우로부터 추출된 전체 DNA를 이용해 결정했다. 50-60°C의 annealing 온도를 이용한 구배적 PCR (gradient PCR)에서는 WSSV 표적 DNA가 52-60°C의 annealing 온도에서 증폭되었다는 것을 보여줬다. HPV의 경우, 증폭은 57°C가 될 때까지 일정했고, 58°C 이상에서는 연속적으로 감소했다(데이터 미제시). 멀티플렉스 PCR에 대한 최적 annealing 온도는 52-57°C였다. 더 낮은 annealing 온도에서는, 1개의 추가적인 PCR 생성물이 관찰되었으며, 이 DNA에 대한 염기서열 분석 결과 이 생성물은 WSSV 프라이머가 HPV 유전체에 비특이적으로 결합하여 생성된 것을 확인하였다. Annealing 온도를 57°C로 조정하면, 이 비특이적 밴드가 사라졌으며, 따라서, annealing 온도는 57°C로 설정했고, 57°C의 annealing 온도를 갖도록 β -액틴 프라이머 세트를 고안했다.

○ 멀티플렉스 PCR에서 고려된 두번째 요인은 프라이머 비율이다. 두 바이러스의 이상적 증폭은 다양한 HPV:WSSV: β -액틴 프라이머 세트 비율을 이용해 시험하였고, 최적의 비율은 3:1:1(20 μ L 반응액 중 7.5pmole HPV 프라이머)로 나타났으며, 3:1:1 비율을 이용한 멀티플렉스 PCR 및 단독 PCR로부터의 PCR 생성물의 상대적인 양을 그림 3-4-2에 제시했다.

○ 멀티플렉스 PCR의 민감도는 HPV 및 WSSV 표적 유전자를 포함하는 정제된 재조합 플라스미드를 이용하여 결정했다. 플라스미드 DNA가 연속적으로 10배씩 희석되었고, 멀티플렉스 PCR용 DNA 주형으로 사용되었다. 아가로스 겔 전기영동은 검출 한계가 WSSV의 경우 21.4카피(0.079pg)이고, HPV의 경우 19.0카피(0.0678pg)임을 결정했다 (그림 3-4-3).

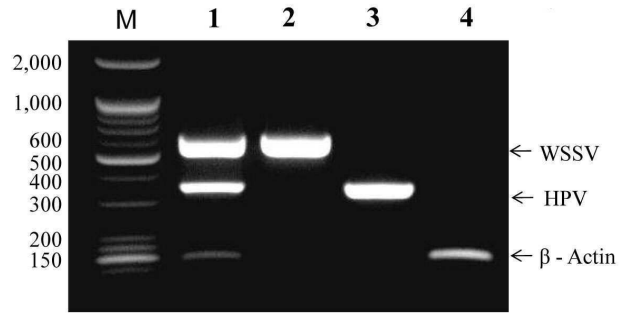


그림 3-4-2. 멀티플렉스 PCR 의 최적화 결과. WSSV와 HPV에 동시 감염된 흰다리 새우에 대하여 HPV:WSSV: β -actin 유전자 프라이머를 3:1:1의 비율로 회석한 멀티플렉스 PCR (lane 1) 동일한 양의 프라이머를 이용한 WSSV (lane 2), HPV (lane 3), 그리고 β -actin 유전자 (lane 4)에 대한 단독 PCR을 수행하였다. Lane M은 100-bp DNA marker를 나타낸다.

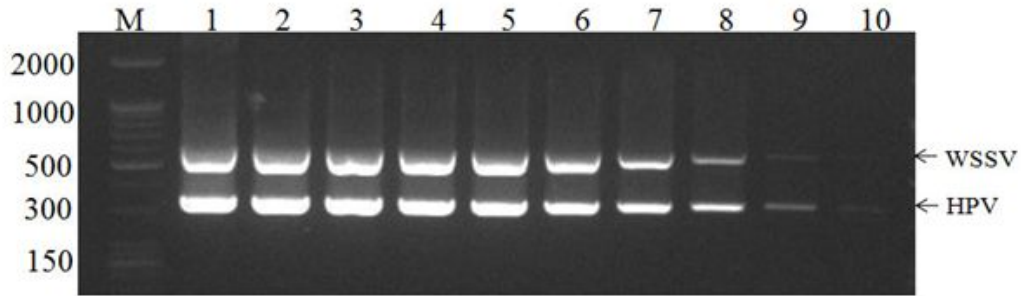


그림 3-4-3. WSSV와 HPV에 대한 동시 검출의 민감도 조사. 클론된 표적 DNA를 포함하고 있는 플라스미드를 WSSV의 경우 2.14×10^{10} (79ng)에서 21.4copies(0.079pg), HPV의 경우 1.9×10^{10} (67.8ng)에서 to19.0(0.0678pg)로 연속적인 10배 희석 후 PCR을 수행하였다. Lane M은 100-bp DNA marker를 나타낸다.

다. WSSV 및 HPV 동시감염의 양식장 시험

○ 17개의 새우 양식장에서 각 10개체씩 수집된 흰다리새우 시료 및 자연산 대하의 단일 균 유래의 10개체를 WSSV 및 HPV 동시감염에 대하여 멀티플렉스 PCR을 수행하였다 (표 3-4-2).

표 3-4-2. 2011년도 한국의 17개 사육장에서 WSSV 및 HPV의 검출율

Sample	Location	WSSV	HPV	WSSV/HPV	Negative
1	Cheonbuk-myeon, Boryeong-si	2	3	0	5
4	Cheonbuk-myeon, Boryeong-si	0	0	2	8
5	Cheonbuk-myeon, Boryeong-si	8	0	2	0
13	Taeon-eup, Taean-gun	2	0	8	0
3	Taeon-eup, Taean-gun	6	0	4	0
15	Anmyeon-eup, Taean-gun	0	0	9	1
6	Jido-eup, Sinan-gun	10	0	0	0
7	Jido-eup, Sinan-gun	10	0	0	0
9	Jido-eup, Sinan-gun	1	0	9	0
14	Palgeum-myeon, Sinan-gun	4	0	3	3
8	Palgeum-myeon, Sinan-gun	10	0	0	0
11	Anjwa-myeon, Sinan-gun	8	0	0	2
12	Anjwa-myeon, Sinan-gun	0	0	10	0
16	Anjwa-myeon, Sinan-gun	0	0	9	1
17	Anjwa-myeon, Sinan-gun	2	0	7	1
18	Anjwa-myeon, Sinan-gun	2	0	8	0
2	Anjwa-myeon, Sinan-gun	3	3	0	4
<i>L. vannamei</i> total (%)		68 (40%)	6 (3.5%)	71 (41.8%)	25 (14.7%)
<i>F. chinensis</i>	Wild catch	0	4	6	0

○ 검사 결과 모든 양식장이 WSSV 또는 HPV로 감염된 것으로 나타났으며, 3개의 양식장은 100% WSSV 감염율을 나타냈고(시료 6, 7, 8), HPV 감염은 나타나지 않았으며 HPV만으로 감염된 양식장은 없었다. 1개의 양식장은 새우의 80%가 WSSV에 감염되었고 나머지 20%는 virus-free로 나타났고(시료 11), 1개의 사육장에서는 WSSV와 HPV 모두 감염되었고 virus-free인 개체도 확인할 수 있었다(시료 2). 또한 1개의 사육장에서는 10개의 개체 모두 WSSV와 HPV에 동시 감염된 경우도 나타났다(시료 12). 종합해 보면, 총 17개 양식장 중 12개의 흰다리새우 양식장에서 WSSV와 HPV가 동시에 감염된 것으로 나타났다.

○ 샘플링 대상 양식장 모두 WSSV 또는 HPV로 감염된 것으로 나타났으나, 일부 사육장 유래의 개체들은 두 바이러스에 대해 음성이었고, 총 170마리 중 25마리(14.7%)의 흰다리새우가 두 바이러스에 대해 음성이었다. 총 170마리의 흰다리새우 개체들 중, 71마리(41.8%)가 WSSV 및 HPV에 동시 감염되었고, 68마리(40.0%)가 WSSV로만 단독으로 감염되었으며, 6마리(3.5%)는 HPV로만 감염되었다. 따라서, 81.8%의 개체들이 WSSV로 감염되었고, 45.3%가 HPV로 감염되었고, 오직 14.7%만이 바이러스가 검출되지 않았다(그림 3-4-4). 대하의 경우, 6마리의 개체(60%)가 WSSV 및 HPV로 동시 감염되었고, 4마리(40%)가 HPV만으로 감염되어, 100% HPV 감염율을 나타내었다.

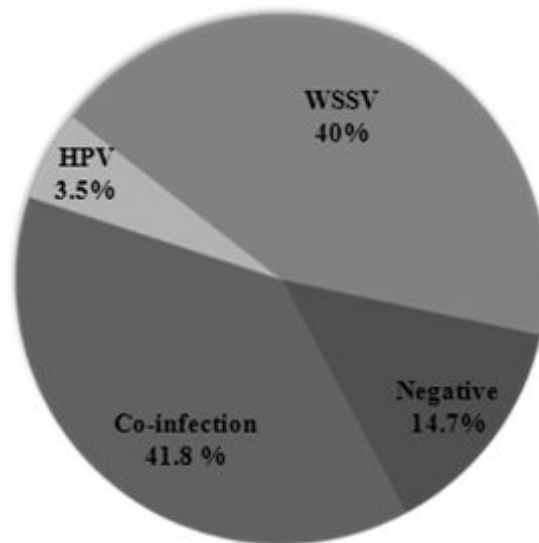


그림 3-4-4. 멀티플렉스 PCR을 이용한 양식장 흰다리 새우의 WSSV 및 HPV 동시 감염 조사. 170 마리의 흰다리새우를 17개의 양식장에서 채집하여 멀티플렉스 PCR을 이용하여 조사하고 중복 감염, WSSV 또는 HPV에 의한 단독 감염 여부를 나타내었다.

제5절 HPV의 실시간 진단용 키트 개발

1. 서론

○ 1974년에 Couch가 바이러스 질병에 대해 처음 보고한 이후로, 양식 새우의 바이러스성 질병은 아시아, 인도양 및 미국에서 경제적 손실의 중요한 요인이 되었다 (Lightner, 2011). 양식 새우에서 발생하는 질병 손실의 약 60%는 바이러스성 질병과 연관되어 있고, 40%는 박테리아, 곰팡이 및 다른 병원균들과 연관되어 있다 (Flegel, 2012).

○ 두 가지의 작은 새우 파보바이러스인 감염성 피하 및 혈구 괴사 바이러스 (IHHNV) 및 간체장 파보바이러스 (HPV)는 파보비리대(*Parvoviridae*)과의 주요한 성질을 공유하는 것으로 보고되어 있다 (Bonami, 2008). 20여 가지의 새우 바이러스 중에서 주된 새우 감염성 바이러스인 HPV는 소화선(간체장) 및 중장의 상피 세포에 감염된다 (Loh *et al.*, 1997). HPV 감염 세포의 전자 현미경 분석은 지름 22-24nm의 바이러스성 입자를 포함하는 핵 내부의 봉입체(nuclear inclusion bodies)를 나타내며 (Bonami *et al.*, 1995; Sukhumsirichart *et al.*, 1999), 이러한 바이러스는 높은 사망률 및 감염된 유충 및 후기 유충 그리고 유생의 성장 지연을 초래할 수 있다. 성충 새우의 감염은 100% 사망을 야기하지 않으나, 질병의 뚜렷한 징후를 보이지 않는 바이러스의 운반체가 될 수 있어 상업적인 수산 양식에 영향을 끼칠 수 있다 (Tang & Lightner, 2011).

○ HPV의 6.3kb 단일 가닥 선형 DNA 유전체는 세계의 ORF(open reading frame)를 포함하는데, 왼쪽 및 중간의 ORF는 비구조 단백질(NS1 및 NS2)을 코딩하고, 오른쪽 ORF는 바이러스 구조 단백질(VP)을 코딩한다(Sukhumsirichart *et al.*, 2006). 블랙타이거새우 (*Penaeus monodon*), 브라운타이거새우(*P. esculentus*), 보리새우(*P. japonicas*), 홍다리얼룩새우(*P. semisulcatus*), 인도흰새우(*P. indicus*), 붉은꼬리새우(*P. penicillatus*), 남부흰새우(*P. schmitti*), 바나나새우(*P. merguensis*), 서방청새우(*P. stylirostris*), 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*), 대하(*Fenneropenaeus chinensis*) 및 담수산새우(*Macrobrachium rosenbergii*)를 포함하는 숙주의 넓은 범위 및 지리적 영역 때문에 HPV의 서로 다른 균주들은 계놈의 염기서열에서 높은 다양성을 보여줬다 (Bonami, 2008; Gangnonngiw *et al.*, 2009; Loh, 1999). 현재까지 HPV의 네 개의 완전한 유전체가 보고되었는데(Jeeva *et al.*, 2012; La Fauce *et al.*, 2007; Safeena *et al.*, 2010; Sukhumsirichart *et al.*, 2006), 이것들은 전체 유전체 크기(6,321bp, 6,310bp, 6,299bp 및 6,336bp), 유전체 서열 및 5' 및 3' 말단에서의 고리 유사 구조(loop like structure) 같은 유전체 구조가 모두 다르다. 또한, 정제된 바이러스 입자의 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 분석 결과 블랙타이거새우에서 분리된 종(*PmDNV*)에서 이중 밴드(54 및 57kDa)를 나타낸 것

대조적으로 한국의 대하에서 분리된 HPV 중에서 약 54kDa의 단일 밴드를 나타냈다 (Bonami *et al.*, 1995; Sukhumsirichart *et al.*, 2006).

○ HPV의 효과적인 진단 방법의 개발은 유년기의 새우 양식장으로의 도입과 보균체들에 의한 2차 감염의 예방에 있어 중요하다. 초기에는 시간이 오래 걸리고, 바이러스 양적 분석 및 HPV의 유전적으로 다양한 종의 분석에 있어 제한적인 민감도를 가지고 있는 조직병리학 및 전자 현미경 관찰법과 같은 전통적인 진단 방법이 사용되었다 (Lightner & Redman, 1985; Loh, 1999). 이러한 방법들의 한계점을 극복하기 위해, 인시투 혼성화(in situ hybridization), 유전자 탐지자(probe), 중합효소 연쇄반응-효소 연계 면역흡수검정(PCR-ELISA), 웨스턴블롯, 루프-매개성 등은 증폭(LAMP), 중합효소연쇄반응(PCR) 같은 빠른 분자적 및 면역학적인 방법을 기반으로 한 고감도 진단 방법들이 개발되었다 (Lightner *et al.*, 1994; Manjanaik *et al.*, 2005; Nimitphak *et al.*, 2008; Pantoja & Lightner, 2000; Srisuk *et al.*, 2011; Sukhumsirichart *et al.*, 2002; Sukhumsirichart *et al.*, 1999).

○ 전통적인 PCR 방법에 더하여, 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)은 DNA 증폭 과정의 감지를 가능하게 하였고, 새우 바이러스 증폭에 적용되었다 (La Fauce *et al.*, 2007). 실시간 중합효소 연쇄반응 과정에서, DNA의 합성은 PCR 과정 동안 생성되는 형광의 강도에 의해 측정되며 이것은 모니터에서 확인할 수 있다 (Dorak, 2006). 형광 신호의 생성을 기반으로 한 세 가지의 가장 일반적인 qRT-PCR 방법이 있다. 첫번째는, 이중 가닥 DNA에 혼입될 때 형광이 급격히 증가하는 SYBR green I 및 SYBR green ER 염료와 같은 형광 물질이 반응에 첨가되고, DNA가 합성되는 동안 형광물질의 혼입이 감지된다. 두번째 방법은 형광 프라이머 확장을 기반으로 빛을 활용한 방법(LUX RT-PCR)으로, 형광 프라이머는 5' 말단에 4 내지 6개의 뉴클레오티드의 짧은 서열 꼬리를 가지며, 이것은 3' 말단과 상보적이다. 헤어핀 2차 구조의 결과는 형광의 적절한 억제를 제공하며, 프라이머가 PCR 과정 동안 이중 가닥 DNA에 결합될 때, 형광이 발산되고 10배까지 신호가 증가하게 된다. 세번째 방법은, 5' 말단에 형광 리포터 염료 및 다른 끝에 소광제에 의해 표지된 가수분해 탐지자(20 내지 30 염기)가 반응 혼합액에 첨가되는 것이다. 탐지자가 온전히 남아있는 동안, 소광제와 형광 리포터 염료의 근접은 리포터에 의해 발산된 형광을 현저하게 감소시킨다. DNA 합성 동안, Taq DNA 폴리머라제의 5'에서 3'으로의 엑소뉴클레아제 활성은 소광제로부터 리포터 염료를 분리하고, 리포터 염료 신호는 비례적으로 증가하게 된다 (Dorak, 2006; Van der Velden *et al.*, 2003).

○ 비록 분자 기반 진단법이 특이적이고 민감하지만, 위의 방법은 HPV 계통의 높은 다양성 때문에 다양한 HPV 균주에 대하여는 검출 효율이 낮아질 수 있고, 진단 시 병원균의 진단이 안 될 가능성도 있다. 7개의 HPV 균주에서 유래된 오른쪽 ORF의 아미노산 서열을 기반

으로 한 계통발생학적 분석법은 HPV 균주에서 3가지의 유전자형이 존재한다는 것을 보여 준다 (Tan *et al.*, 2008a). 따라서 국내 고유의 HPV 균주에 대한 빠르고 민감한 진단 방법의 개발은 매우 중요하다.

○ 본 연구는 한국에서 분리된 HPV 종의 서열 비교를 통해 얻은 프라이머를 이용하여 한국 HPV 분리균주의 효과적인 스크리닝을 위한 신뢰할 수 있고 시간 소모가 적은 두 가지 실시간 정량 중합효소 연쇄반응 키트를 개발하였다.

2. 연구내용 및 방법

가. DNA 분리

○ 본 연구의 HPV와 관련된 DNA는 2008년 충남 서천군에 위치한 새우 양식장에서 수집한 대하(*Fenneropenaeus chinensis*)의 흉각(pereiopod)에서 분리하였고, 흰다리새우 (*Litopenaeus vannamei*)는 2010년에 전남 신안군에 위치한 새우 양식장에서 수집하였다.

○ 개별 새우에서 흉각의 약 20mg을 취하여 0.1M NaCl, 20mM Tris-HCl, EDTA 및 0.5% SDS를 함유하는 500ul 버퍼로 균질화시켰다. 페놀:클로로포름:이소아밀알콜 (25:24:1)의 혼합물의 같은 부피를 이용해 균질화물로부터 직접 DNA를 추출한 후, 0.1부피(volume)의 3M NaOAc (pH 5.3) 및 2부피의 무수 에탄올을 이용해 침전시켰다. 침전물을 70% 에탄올로 세척하고, 대기에서 건조시킨 침전을 100ul TE 완충액에 재현탁시켰다. DNA 농도는 ASP-3700 분광광도계(ACTGene, Inc., New Jersey USA)를 이용하여 OD 260/280nm에서 광학 농도를 측정하여 결정했다.

나. 표준 플라스미드 준비

○ 추출된 총 DNA에서 표 3-5-1에 표기된 서열 F2/R2, F3/R3 및 F4/R4 프라이머를 이용하여 약 1.7, 1.5 및 1.8kb의 DNA 절편을 증폭했고, pCR8/GW/TOPO 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA)에 클로닝하였다. 재조합 플라스미드는 플라스미드 미니 추출 키트(GeneAll, Seoul, Korea)를 이용하여 분리했고, 삽입된 DNA의 확인을 위해 *EcoRI*으로 절단 후 1% 아가로스 겔 상에서 전기영동을 수행했다. 그리고 G&C Bio(Daejeon, Korea)에서 서열을 분석했다.

○ 재조합 플라스미드의 농도와 순도는 Victor³ Multi label Plate Reader (PerkinElmer, Shelton, CT, USA)를 이용하여 260/280nm에서 흡광량으로 측정했고 카피수로 변환했다.

다. 실시간 중합효소 연쇄반응을 위한 프라이머

○ 대하에서 유래된 3개의 플라스미드와 흰다리새우에서 유래된 3개의 플라스미드의 총 6개 플라스미드의 뉴클레오티드 서열을 결정했고, 각 DNA 절편에서 유래된 실시간 PCR 프라이머 세트 고안을 위해 비교했다. 프라이머의 세가지 세트는 www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3에서 이용 가능한 Primer3 소프트웨어를 이용하여 실시간 PCR 용도로 고안했다.

○ 프라이머 서열은 표 3-5-1에 나타냈고, 대하(*FcDNV*, JN082231)에서 유래된 HPV 한국 균주에서의 각 프라이머의 위치는 다음과 같다; RT-1F/RT-1R: 2,325-2,487(162bp), 상의 RT-2F/RT-2R: 3,476-3,604(129bp), RT-3F/RT-3R: 5,232-5,432(201bp). 종래의 PCR 방법으로 상기 프라이머 세트의 특이성과 annealing 온도를 시험했다.

○ 각 프라이머 10pmol과 40-100ng의 DNA 주형이 첨가된 PCR 반응 혼합액 튜브(Prime Taq premix2X, Genetbio, Nonsan, Korea)에서 PCR을 수행했다. PCR 반응은 Gradient Thermal cycler(Bio-Rad Laboratories, Inc, USA)를 이용하여 95℃에서 3분 동안의 최초 변성; 95℃에서 30초 변성, 52-55℃에서의 40초 annealing 및 72℃에서의 1분 중합의 35회 반응을 수행했다. 각 프라이머 세트의 annealing 온도는 표 3-5-1에 나타내었다.

표 3-5-1. 본 실험에 사용된 프라이머의 뉴클레오티드 서열, 위치 및 T_m

Primer	Nucleotide Sequences (5'-3')	Nucleotide Location *	T _m
RT-1F RT-1R	CAG GCA GAT TAT ATT GAG G TCT GTC TGC TCT GTC CAA TCA	2325-2346 2487-2467	52°C
RT-2F RT-2R	ACG ATC AGA GCA ATC CGA AG TGG CTC TCT CCA GGT ATT CG	3476-3495 3604-3585	55°C
RT-3F RT-3R	CTC ATT GGA GTC ATG CCA AG GAA TAT CGG AGC ACC CTC TG	5232-5251 5432-5413	52°C
F2 R2	AGC CAA TAA AGT ATG TAA GAA CAT ATA TG ACT GTG TCT GCA ACG ACC TG	1696-1725 3421-3440	52°C
F3 R3	AGG ATG ATT CCA ATC AAG AAG AA ACA CAT TGT CTC CAA TGT GTT TG	3051-3073 4541-4563	52°C
F4 R4	GAG GCG GAA GAT ACG ATG G GAG GCG GAA GAT ACG ATG G	4347-4563 6138-6155	52°C

라. SYBR green을 이용한 실시간 중합효소 연쇄반응에 의한 프라이머 시험

○ 분석의 민감도와 재현성을 결정하기 위해 표준 플라스미드를 포함하는 HPV 유전자의 1×10^9 부터 1×10^4 카피의 일련의 희석을 통해 세 개의 표준 곡선을 독립적으로 생성했다. HPV에 감염된 조직에서 추출된 DNA 및 주형이 없는 대조군을 각각 양성 대조군 및 음성 대조군으로 사용했다.

○ 10pmol의 각 프라이머, 10배 희석된 표준 플라스미드 또는 약 80ng의 HPV 관련 DNA를 첨가한 20ul의 *AccuPower* Green Star qPCR premix(Bioneer Corporation, Daejeon, Korea)으로 Exicycler 기기(Bioneer Corporation, Daejeon, Korea)를 이용해 반응을 수행했다.

○ 온도 변화는 95°C에서 7분 동안의 최초 변성; 95°C에서 30초 변성, 52-55°C에서 40초의 40회 반응으로 구성된 2 단계 변화로 구성하였다.

마. 선별된 표적의 서열 분석

○ RT-2F 및 RT-2R 프라이머로 증폭하여 생성된 129bp의 선별된 표적 서열은 프라이머 및 탐지자 결합 위치의 다양성을 비교하기 위해 Clustal W2 (EBI)를 이용하여 GenBank (JN082231(*Fc*DNV, 한국), AY008257(HPVchin, 한국), EU588991(탄자니아), EU247528(마다

가스카르), DQ002873(*PmD*NV, 태국), DQ458781(*PmergD*NV, 호주), FJ410797(*PmD*NV, 인도) 및 GU371276(중국)) 내에서 가능한 다른 HPV 서열과 함께 다중 정렬을 수행했다.

마. Green Star qRT-PCR 진단 키트의 개발과 시험

○ SYBR green I 염료를 이용하는 Green Star qRT-PCR 진단 키트는 초기 SYBR green RT-PCR 시험에서 최상의 결과를 나타낸 RT-2F/RT-2R 프라이머 세트를 사용하여 한국의 대전에 위치한 (주) 바이오니아에서 고안하고 생산했다.

○ 상기 키트는 15pmole의 RT-2F 및 RT-2R 프라이머, SYBR green I 염료 및 RT-PCR 을 위한 필수 구성 성분이 포함되었다. 시험 키트는 HPV에 감염되거나 감염되지 않은 샘플 의 표준 플라스미드를 이용해 분석되었다.

○ 각 20ul의 반응에서 표준 곡선 생성을 위하여 HPV 표준 플라스미드의 연속된 희석($1 \times 10^3 - 1 \times 10^9$)을 사용했고, HPV에 감염되거나 감염되지 않은 새우로부터 추출한 총 DNA 의 80ng을 샘플 시험에 사용했다.

○ RT-PCR 온도 순환은 95°C에서 7분 동안의 최초 변성; 95°C에서 30초 변성, 55°C에서의 40초 annealing 및 DNA 합성의 40회 반응으로 구성된 프로그램으로 Exicycler를 이용하여 수행되었다. 용해 곡선 분석은 0.1°C/2초의 전환 조건으로 60°C부터 95°C까지의 온도 증가를 통해 수행되었다. qRT-PCR 특이성은 용해 정점(melting peak) 분석과 증폭된 PCR 생성물의 2% 아가로스 겔 전기영동을 통해 시험했다. 순환 역치값(C_T)은 Exicycler3s 버전 3.547의 자동화된 역치 분석을 통해 결정되었다. 최소 검출 한계는 클로닝된 HPV DNA의 1부터 1×10^8 카피를 이용하여 분석되었다.

사. Dual Star qRT-PCR 진단 키트의 개발과 시험

○ 형광 탐지자를 이용한 Dual Star qRT-PCR 반응 키트는 동결 건조된 형태로 한국의 대전에 위치한 (주) 바이오니아에서 생산했다.

○ 한국 중 HPV(*FcD*NV)의 서열에서 유래된, FAM이 결합된 TaqMan 탐지자 (5'-CGGAGGGAGCTAACGAAATTAACGA-3'; 서열번호 13)는 www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3에서 이용 가능한 Primer3 소프트웨어를 이용하여 고안했다. 동결 건

조된 각 튜브의 최종 반응 혼합액 20ul 내에는 real-time PCR 반응에 필요한 모든 구성 성분, RT-2F 및 RT-2R 15pmol 프라이머 및 탐지자 15pmol이 포함되어 있다. HPV 표준 플라스미드의 연속된 희석($1 \times 10^3 - 1 \times 10^9$)은 표준 곡선 생성에 사용되었고 HPV에 감염되거나 감염되지 않은 새우에서 추출된 80ng 총 DNA는 실험군으로 사용되었다.

○ RT-PCR 온도변화는 95°C에서 7분 동안의 최초 변성; 95°C에서 30초 변성, 55°C에서의 40초 프라이머 어닐링 및 DNA 합성의 40회 반응으로 구성된 프로그램으로 Exicycler를 이용하여 수행되었다. 표준 증폭물은 특이성 시험을 위해 2% 아가로스 겔 상에서 분석되었다. Dual Star 키트의 최소 검출 한계는 클로닝된 HPV DNA의 1부터 1×10^8 카피를 이용하여 분석되었다.

아. 검출 한계의 결정

○ 연속 희석된 HPV 플라스미드 DNA는 1부터 1×10^8 카피까지 제조되었다. 분석은 연속적으로 희석된 HPV 플라스미드 DNA 및 나머지 반응 성분이 포함된 20ul의 Green Star 및 Dual Star 반응 튜브 내에서 수행했다.

○ 온도 순환 반응은 95°C에서 7분 동안의 최초 변성; 95°C에서 30초 변성, 55°C에서의 40초 프라이머 어닐링 및 DNA 합성의 40회 반응으로 구성된 프로그램으로 Exicycler를 이용하여 수행되었다.

3. 연구결과

가. 최적 프라이머 조합의 선별

○ RT-1F/RT-1R, RT-2F/RT-2R 및 RT-3F/RT-3R의 세 가지 프라이머 세트는 종래의 PCR 반응 수행을 통해 클로닝된 DNA로부터 각각 163bp, 129bp 및 201bp의 예상된 크기로 표적 DNA를 증폭시켰다. 모든 프라이머 세트에서 비특이적 증폭 및 프라이머 다이머는 나타나지 않았다 (데이터 미제시). 따라서 클로닝된 DNA 및 HPV에 감염되거나 감염되지 않은 새우에서 추출된 DNA를 주형으로 하여 위의 세가지 프라이머 세트의 민감도 및 효율을 실시간 PCR 방법을 이용해 시험되었다.

○ 세 가지 프라이머 세트 모두 클로닝된 DNA 및 HPV에 감염된 새우에서 추출된 DNA

로부터 형광 신호를 생산했으며 바이러스에 감염되지 않은 새우의 DNA에서는 형광 신호가 감지되지 않았다. 그러나 RT-3F/RT-3R 프라이머 세트를 사용한 RT-PCR은 일관되지 않았고, 표준 곡선의 기울기 값은 -0.1866이었다. RT-2F/RT-2R 프라이머 세트를 이용한 반응의 효율은 99%였고 RT-1F/RT-1R은 87%, RT-3F/RT-3R은 57%였다. 따라서 본 연구에서는 RT-2F/RT-2R 프라이머 세트를 진단 키트 개발을 위한 프라이머로 선정하였다.

나. 서열 분석

○ RT-2F/RT-2R 프라이머 증폭을 통해 생성된 129bp의 표적 서열은 프라이머 위치 및 RT-PCR 탐지자 위치와 함께 그림 3-5-1에 나타내었다. HPV 한국 분리균인 *FcDNV* 및 대하로부터 분리된 HPVchin 및 흰다리새우에서 유래된 표적 서열은 100% 뉴클레오티드 서열과 동일성을 나타냈다.

<i>FcDNV</i>	ACGATCAG-AGCAATCCGAAGA C-----GGAGGGAGCTAACGAAATTAACGA CAGAACGA 54
<i>L.vannamei</i>	ACGATCAG-AGCAATCCGAAGA C-----GGAGGGAGCTAACGAAATTAACGA CAGAACGA 54
HPVchin	ACGATCAG-AGCAATCCGAAGA C-----GGAGGGAGCTAACGAAATTAACGA CAGAACGA 54
China	ACGATCAGCAGCAATCCGAAGACCTGGTGAAGGAGTTAACGAAATTAACGACAGAACAA 60
Tanzania	ACGATCAG-AGCAATCCGAAGAC-----GGAGGGAGTTAACGAGATTAACGACAGAACAA 54
Madagascar	ACGATCAG-AGCAATCCGGAGAC-----GGAGGGAGTTAATGAGATTAACGACAGAACGA 54
<i>PmergDNV</i>	ACGATCAG-AGCAATCCGCGAGC-----GGAAGGTATTTACGAAATCAACGACAGATCGA 54
<i>PmDNV</i> Thailand	ACGATCAG-AGCGATCCGGAGAC-----GCAGGCAGCTAATGAGGTCAGCAGTACAGCAG 54
<i>PmDNV</i> India	ACGATCAG-AGCAATCCGGAGAC-----GCAGGGAGCTAATGAGGTCAGCGGTACAGCAG 54
	***** *
<i>FcDNV</i>	CATCGACAGAAGTAGGA-GTGAG-ACAGGGCCATATGCTAGGACCTGATCAGCTG-GACG 111
<i>L.vannamei</i>	CATCGACAGAAGTAGGA-GTGAG-ACAGGGCCATATGCTAGGACCTGATCAGCTG-GACG 111
HPVchin	CATCGACAGAAGTAGGA-GTGAG-ACAGGGCCATATGCTAGGACCTGATCAGCTG-GACG 111
China	CATCGACGGAAGTAGGACGTGAGCACAGGGCCATATGCTAGGACCTGATCAGCTACGACG 120
Tanzania	CATCGACAGAAGTAGGA-GTGAG-ACAGGGCCATATGCTAGGACCTGATCAATTG-GACG 111
Madagascar	CATCGACAGAAATAGGA-GTGAG-ACAGGGCCATATGCTAGGACCTGATCAGTTG-GAAG 111
<i>PmergDNV</i>	CAGCAGGAGAAGTAGTA-GTGAG-ACAGGGCCATATGCTAGGACCTGATCAGTTG-GAAG 111
<i>PmDNV</i> Thailand	AATCGACAAACGTAGGA--GGAAGTCAGGGCTACATGTTAGGACCCGAACAGTTG-GACG 111
<i>PmDNV</i> India	AATCGACAAACGTAGGA--GGAAGTCAGGGATATATGTGGGGACCTGGAGATCTG-GACG 111
	* *
<i>FcDNV</i>	AATACCTGGAGAGAGCCA 129
<i>L.vannamei</i>	AATACCTGGAGAGAGCCA 129
HPVchin	AATACCTGGAGAGAGCCA 129
China	AATACCTGGAGAGAGCAA 138
Tanzania	AATATCTGGAGAGAGCCA 129
Madagascar	AATATCTGGAGAGAGCCA 129
<i>PmergDNV</i>	ATTACCTGGAGAGAGCCA 129
<i>PmDNV</i> Thailand	ATTACATAGATAGAGCTA 129
<i>PmDNV</i> India	ATTACATAGATAGAGCCA 129
	* *

그림 3-5-1. 다양한 분리균의 표적 뉴클레오티드 서열의 다양성 및 표적 영역의 프라이머 및 탐지자 위치. *FcDNV*, *L.vannamei* 및 HPVchin은 한국 분리균주이다. GenBank 등록 번호와 해당 균주: JN082231:*FcDNV*, AY008257:HPVchin, EU588991: 탄자니아, EU247528: 마다가스카르, DQ002873:*PmDNV*, 태국), DQ458781:*PmergDNV*, 호주, FJ410797:*PmDNV*, 인도, GU371276: 중국. 탐지자 서열은 밑줄로 나타냈다. 정방향 및 역방향 프라이머는 음영처리하였다.

○ 그러나, 위의 영역은 다음과 같이 다른 지리학적 지역에서 분리된 HPV 종과는 낮은 서열 동일성 나타냈다. 탄자니아 종과 94.6%, 마다가스카르 종과 93.8%, 중국 종과 88.5%, *PmergDNV*와 88.4%, *PmDNV* 인도 종과 76.3%, *PmDNV* 태국 종과 72.4%의 동일성을 나타냈다.

다. Green Star qRT-PCR 진단 키트의 분석

○ Green Star 키트는 HPV 표준 플라스미드 및 HPV에 감염된 새우에서 무작위로 선별된 DNA 샘플을 이용해 분석했다. 표준 플라스미드의 1×10^9 부터 1×10^3 까지의 반응당 카피수로 증폭 곡선 및 표준 곡선을 생성했다(그림 3-5-2). 표준 곡선은 -0.3257의 적절한 기울기를 나타냈고, 회귀 계수(regression coefficient) R^2 값은 0.997을 나타냈다.

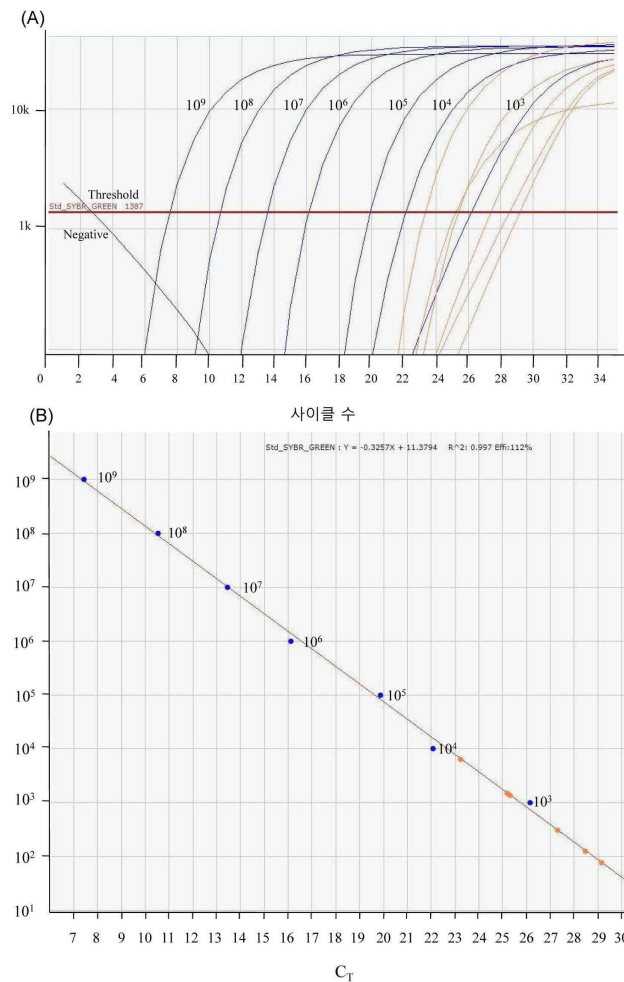


그림 3-5-2. Green Star qRT-PCR 키트를 이용한 결과. (A) 표준 플라스미드 및 샘플 증폭 곡선 분석, (B) 표준 플라스미드 및 샘플 표준 곡선 분석. 표준 플라스미드는 1×10^9 부터 1×10^3 까지 연속적으로 희석했고 HPV에 감염되거나 감염되지 않은 DNA 샘플은 시험 샘플로 사용했다. 연속 희석된 표준 플라스미드의 곡선 및 시험 샘플의 결과를 선(A) 또는 점(B)으로 나타냈다.

○ Green Star 키트의 특이성은 비특이 결합 또는 프라이머 다이머로부터 생성되는 다른 부가적인 피크 없이 하나의 반응 당 바람직한 단일 증폭 정점만을 보여주는 용해 정점 (melting peak) 분석을 통해 확인했다(그림 3-5-3A).

○ 위의 결과는 증폭된 PCR 생성물의 아가로스 겔 전기영동을 통해 추가적으로 확인했다 (그림 3-5-3B). 무작위로 선별된 샘플 시험은 HPV에 감염된 새우에서 추출된 총 DNA의 80ng에서 7.74×10^1 부터 1.49×10^3 카피의 HPV를 나타냈다.

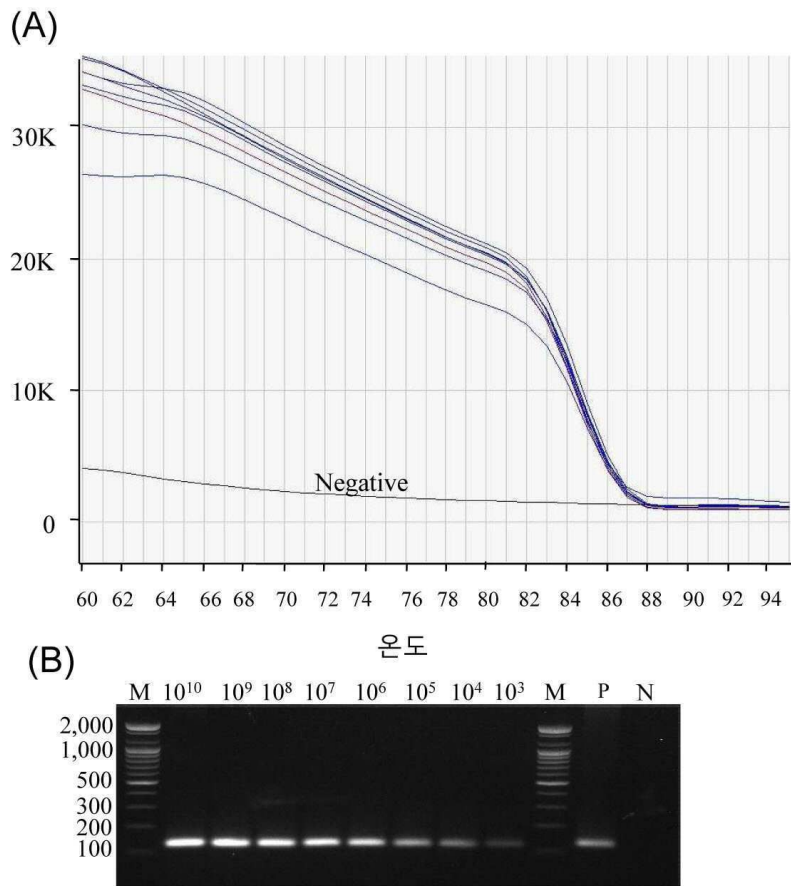


그림 3-5-3. Green Star 키트의 특이성 분석. 용해 곡선 분석으로 시험한 결과(A) 및 PCR 생성물의 겔 전기영동 분석을 통한 Green Star 키트의 특이성 분석(B)을 보여준다. M은 100bp DNA 마커, P는 HPV 감염 DNA 샘플, N은 바이러스가 없는 새우 DNA를 나타냈다.

라. Dual Star qRT-PCR 진단 키트의 분석

○ Dual Star 키트의 증폭 곡선과 표준 곡선은 그림 3-5-4에 나타난 바와 같이 1×10^9 부터 1×10^3 반응당 카피수까지의 표준 플라스미드를 통해 나타냈다.

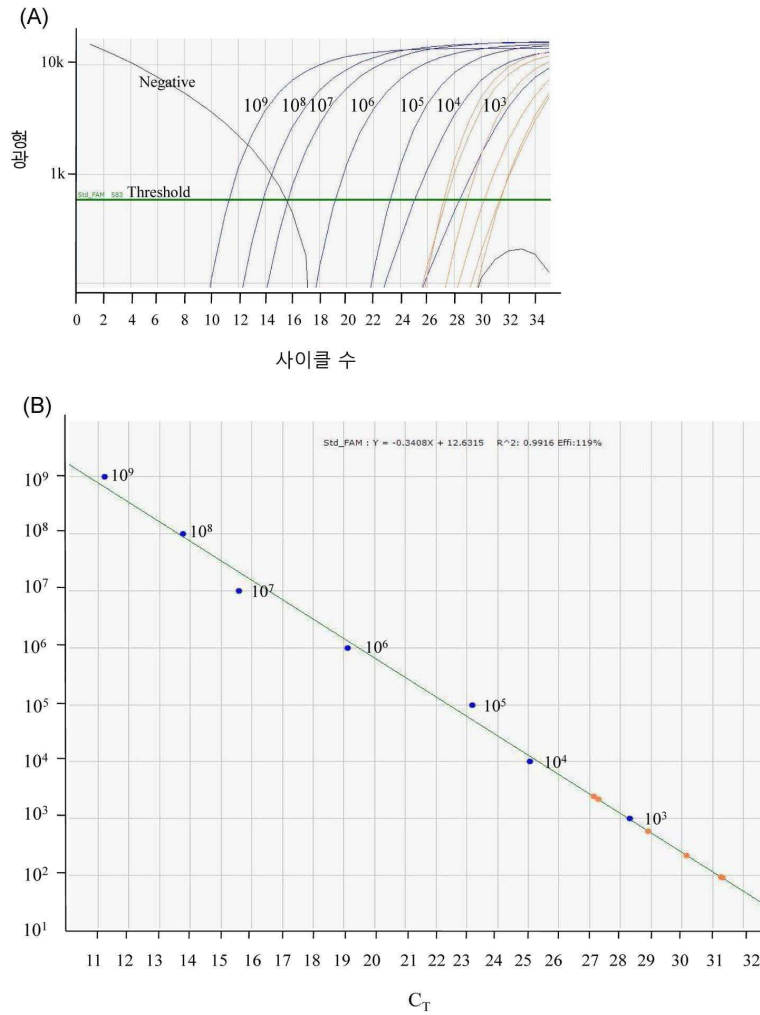


그림 3-5-4. Dual Star qRT-PCR 키트를 이용한 표준 플라스미드와 샘플 증폭 곡선 분석 (A) 및 표준 플라스미드와 샘플 표준 곡선 분석(B). 표준 플라스미드는 1×10^9 부터 1×10^3 까지 연속적으로 희석했고 HPV에 감염되거나 감염되지 않은 DNA 샘플은 시험 샘플로 사용했다. 연속 희석한 표준 플라스미드의 곡선 및 시험 샘플의 결과를 선(A) 또는 점(B)으로 나타냈다.

○ 표준 곡선은 -0.348의 적절한 기울기를 나타냈고, 0.9916의 높은 회귀 계수 R^2 값을 나타냈다. 증폭신호는 클로닝된 DNA 및 감염된 샘플에서만 검출되었다. HPV에 감염되지 않은 새우에서 추출된 총 DNA에서는 증폭 신호가 나타나지 않았다.

○ Dual Star 키트의 특이성은 모든 증폭된 PCR 생성물의 2% 아가로스 겔 전기영동을 통해 분석했다. 그림 3-5-5에서 나타낸 바와 같이, 129bp의 PCR 생성물만이 클로닝된 DNA 및 감염된 새우에서 검출되었고 다른 비특이증폭은 나타나지 않았다. 무작위로 선별된 DNA 샘플로 수행된 시험은 80ng의 총 DNA에서 9.06×10^1 부터 2.16×10^3 카피의 HPV 일치성

을 보이는 특정 증폭을 나타냈다.

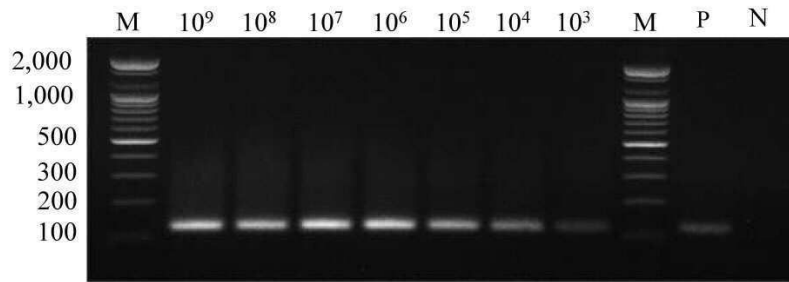


그림 3-5-5. PCR 생성물의 겔 전기영동 분석을 통한 Dual Star 키트의 특이성 분석. M은 100bp DNA 마커, P는 HPV 감염 DNA 샘플, N은 바이러스가 없는 새우 DNA를 나타냈다.

마. 검출 한계의 결정

○ 두가지 진단 키트의 검출 한계는 반응당 표준 플라스미드의 1부터 1×10^8 카피수까지의 연속 희석을 이용해 결정했다.

○ 표준 곡선은 Green Star에서는 -0.3238 , Dual Star에서는 -0.314 의 적절한 기울기를 나타냈다. Green Star 분석법의 회귀 계수 R^2 값은 0.997 , 효율은 111% 를 나타냈고 모든 희석된 플라스미드 DNA 샘플에서 신호가 검출되었다 (그림 3-5-6). Dual Star 분석법 역시 106% 의 높은 효율을 나타냈고 회귀 계수 R^2 값은 0.9441 을 나타냈으며 전체 희석된 플라스미드 DNA의 증폭 신호가 검출되었다 (그림 3-5-6).

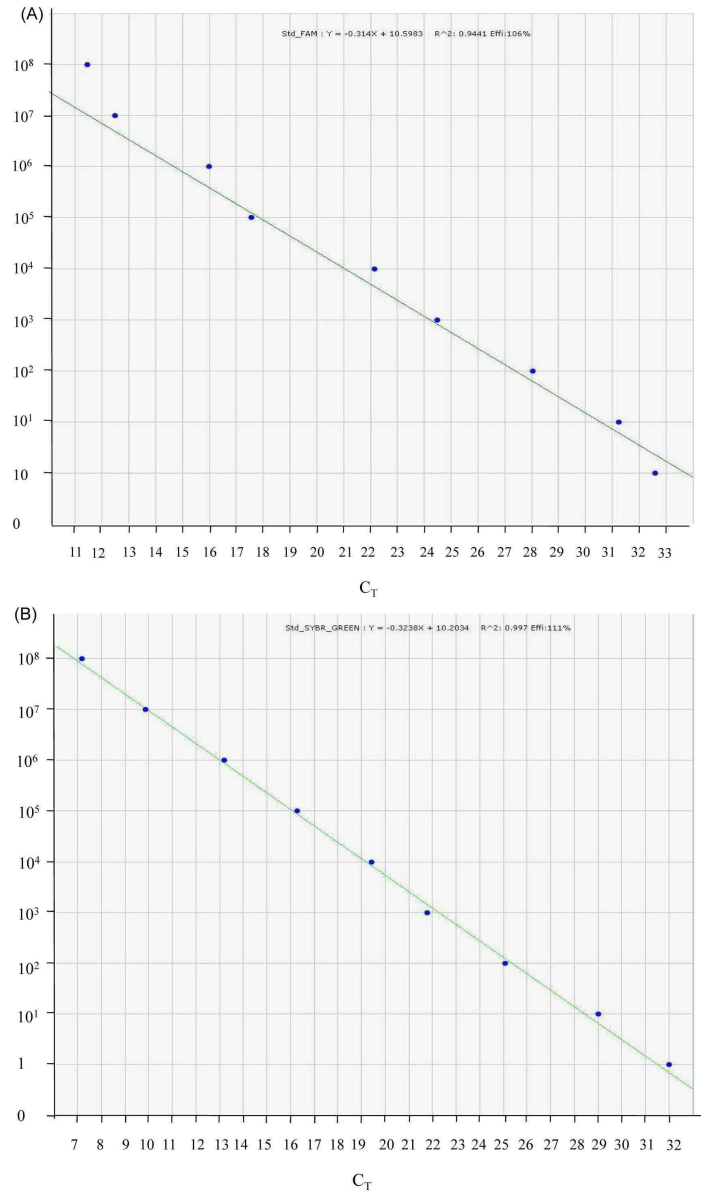


그림 3-5-6. 클로닝된 HPV DNA를 이용한 Green Star 키트의 최소 검출 한계를 분석한 결과(A) 및 Dual Star 키트의 최소 검출 한계를 분석한 결과(B). 클로닝된 HPV DNA는 1×10^8 부터 1카피까지 연속으로 희석하여 주형으로 사용했다.

○ 위의 결과는 두 키트 모두 주형 DNA의 반응 당 1 카피의 낮은 농도까지 검출 가능성을 나타냈다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	국내에 발생하는 HPV의 다양한 시료 확보 (30종 이상)	200	국내의 5개 지점으로부터 총 62점의 시료를 확보하여 PCR로 바이러스 검출 완료
	국내 HPV 바이러스의 유전자의 PCR 클로닝 및 염기서열 분석 (PCR fragment당 20개 이상)	100	5개 이상의 시료에 대하여 PCR 후 각 PCR fragment 당 20개 이상의 클론 염기서열 분석
	국내 발생 HPV의 계놈 분석	100	국내에서 분리된 HPV rbswn (FcDNV)의 전체 계놈 분석 완료 후 논문 투고
	외피 단백질 유전자의 클로닝, 발현 및 항체 제작	100	외피 단백질 발현 및 순수분리 하고 다클론 및 단클론 항체 제작 준비
2차 연도 (2010)	유전자형 별 검출을 위한 primer 제작 및 분석	100	1차년도 연구 결과와 발표된 염기서열을 비교하여 Type I, II, III에 특이적인 primer 36쌍을 design한 후, 10 세트를 선정 제작하여 PCR 반응 실시
	신규 primer를 이용한 바이러스 집단분석	100	각 유전자형에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 후 각 유전자형에 특이적인 프라이머 1 세트 씩을 선별함
	외피 단백질 유전자의 클로닝, 발현 및 항체 제작	100	HPV의 외피 재조합 단백질을 대장균에서 발현하고 쥘 용매에 의뢰하여 도끼로부터 polyclonal antibody를 제작하였으며, HPV 외피 단백질에 특이적인 monoclonal antibody를 생성하는 세포주 9개를 확보하여 이들로부터 확보된 단클론 항체에 대한 분석 실시
	진단 Kit 개발을 위한 primer 제작	100	본연구를 통해서 얻은 염기서열과 기존의 염기서열 비교를 통하여 유전자형 1-3에 공통적으로 적용할 수 있는 프라이머 및 국내에 존재하는 제1 유전자형에 대한 real-time PCR을 위한 프라이머 고안
3차 연도 (2011)	ELISA Kit 완성	90	HPV의 VP 유전자를 대장균에서 발현 할 수 있도록 코돈을 최적화하여, 재조합 단백질을 생산한 후 이들에 대한 단클론 항체를 생산하는 세포주 10개를 확보하여 이들이 생산하는 항체에 대한 분석 완료
	Type specific PCR Kit 완성	150	- HPV 제1-3 유전자형에 공통적인 프라이머를 제작 HPV와 함께 WSSV의 중복 감염을 확인할 수 있는 multiplex PCR detection kit의 시제품 제작 완료 - 제작된 multiplex PCR Kit를 이용한 양식장 시료의 분석 - 제작된 시료의 시제품 생산 완성
	Real-Time PCR Kit 완성	150	- 한국에 존재하는 HPV에 특이적인 진단 키트 제작을 위한 프라이머 제작 - 제작된 프라이머를 이용한 Green Star Kit와 Dual Star Kit의 제작 - 제작된 Kit의 민감도 조사 - 제작된 시료의 시제품 생산 완성
총괄	국내 새우 간체장바이러스 집단의 계놈 분석과 이를 이용한 Real-Time PCR 진단 키트의 개발	120	- 국내 대하에서 분리한 HPV균주 (FcDNV)의 전체 계놈 분석 및 논문 발표 - HPV VP 재조합 단백질에 대한 10종의 단클론 항체 제작 - 제 1-3 유전자형의 HPV와 WSSV의 중복 감염을 검출할 수 있는 진단 키트의 개발 및 시제품 제작 및 분석 완료 - 한국에 특이적인 HPV를 검출할 수 있는 2종의 Real-Time PCR Kit의 제작 및 시제품 제작 및 분석 완료

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

* 실용화·산업화 계획

○ 본 연구를 통하여 HPV 및 WSSV의 중복 감염을 검출할 수 있는 Duplex PCR Kit 1종 및 한국에 발생하는 HPV에 특이적인 균주를 검출할 수 있는 Real-Time PCR Kit인 Green Star Kit와 Dual Star Kit 2종 등 총 3종의 진단 키트를 제작하여 참여기업인 (주) 바이오니아와 함께 시작품을 제작하고 이들에 대한 실제 적용 실험을 완료하였다 (그림 5-1).

○ 2010년 냉동 흰다리 새우 수입은 14,387MT 약 740억원에 이르며, 대하양식 성공에 의하여 냉동 흰다리 새우 수입의 1/3 감소 시 약 250억원 경제효과가 기대된다

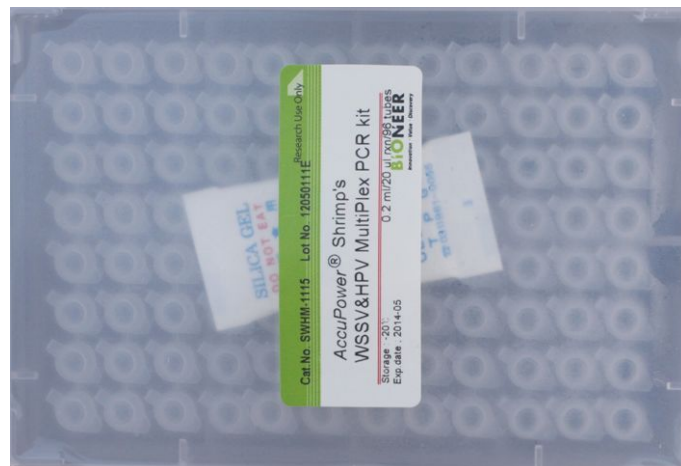
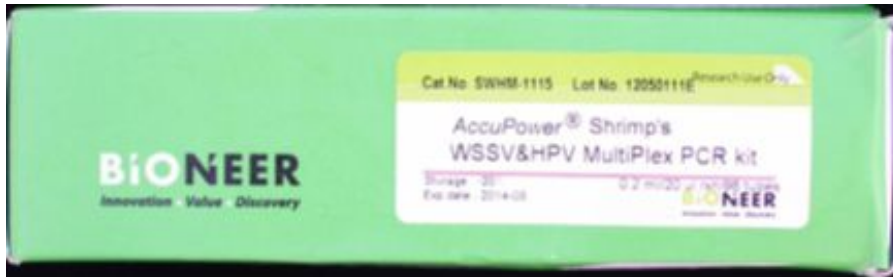


그림 5-1. 본 연구를 통하여 참여기업인 (주) 바이오니아 개발한 새우의 WSSV 및 HPV 중복 감염 검출을 위한 WSSV & HPV multiplex PCR Kit



그림 5-2. 본 연구를 통하여 참여기업인 (주) 바이오니아와 개발한 새우의 HPV의 Quantitative Real-Time PCR Kit인 HPV GreenStar Kit

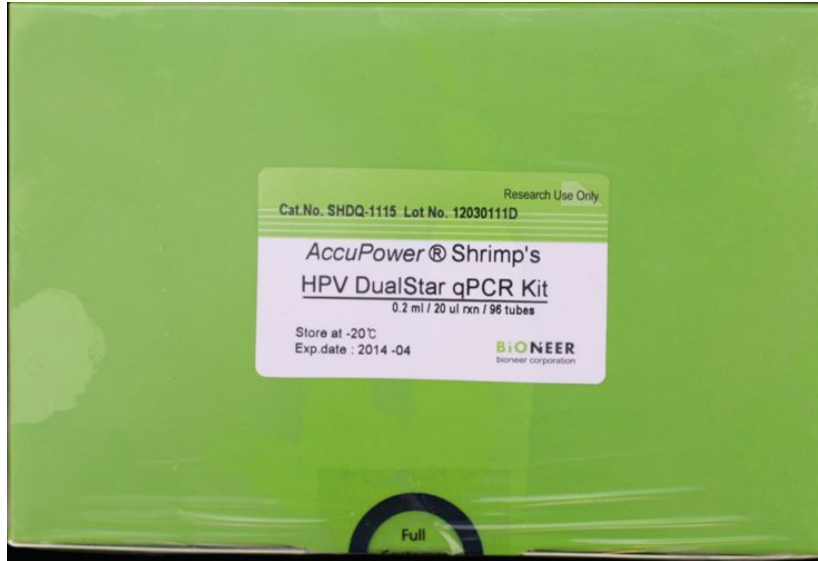


그림 5-3. 본 연구를 통하여 참여기업인 (주) 바이오니아 개발한 새우의 HPV의 Quantitative Real-Time PCR Kit인 HPV DualStar Kit

○ 따라서 본 연구 결과에 의한 시제품은 실제 산업화에 대한 모든 준비가 완료된 상태이며, (주) 바이오니아 협의를 거쳐 기술이전을 실시하고 빠른 기간 내에 본 제품의 시판이 이루어질 수 있도록 할 예정이다.

*** 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등**

○ 본 연구를 통하여 개발된 3종의 진단 키트는 기술이전 협약이 끝나는 대로 언론 홍보 및 관련 기관 및 양식어민에 대한 홍보를 실시하여 개발된 제품이 현장에서 적용될 수 있도록 추진할 예정이다.

*** 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등**

○ 본 연구를 통하여 얻어진 결과는 논문 1편 발표완료 및 2편 투고완료, 특허 2건의 출원 완료, 국제 학술대회 1건 발표 완료 및 2건의 2012년 6월 발표 예정 등 충분한 업적을 이룬 것으로 평가되며, 필요한 경우 참여기업과 협의하여 국제 특허 출원을 실시할 계획이다 (첨부자료 참고)

Complete nucleotide sequence analysis of a Korean strain of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Fenneropenaeus chinensis*

Subbiah Jeeva · Se-Won Kang · Yong-Seok Lee · In Kwon Jang · Hyung Chel Seo · Tae-Jin Choi

Received: 4 July 2011 / Accepted: 12 September 2011 / Published online: 24 September 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Hepatopancreatic parvovirus (HPV) of shrimp is distributed worldwide and the entire genome of Thailand and Indian strains (*PmDNV*) and one Australian strain (*PmergDNV*) have now been reported. The complete nucleotide sequence of a HPV strain isolated from the fleshy prawn *Fenneropenaeus chinensis* in Korea (*FcDNV*) was determined and compared to previously reported sequences. The entire genome of *FcDNV* contains 6,336 nucleotides, with 40% G+C content, which is the biggest of the known HPV strains. The HPV genome has three open reading frames (ORFs) with a slight overlap between the first and second ORFs. The three ORFs encode the NS2 and NS1 proteins and VP that consist of 425, 578, and 820 amino acids, respectively. Among the three proteins, the NS1 protein shows the highest sequence similarity to the NS1 protein of other known HPV strains, followed by the NS2 protein and the VP protein. Phylogenetic analyses showed that HPV can be grouped into three genotypes, as previously reported, and *FcDNV* can be grouped as genotype I, with HPV strains isolated in Madagascar and Tanzania. The nucleotide sequences of the noncoding

regions at the 5'- and 3'-ends of the plus-strand genome showed a Y-shaped hairpin structure and simple hairpin structure, respectively.

Keywords Hepatopancreatic parvovirus · *Fenneropenaeus chinensis* · Complete nucleotide sequence · HPV Korea · End terminals

Introduction

The major penaeid shrimp viruses associated with serious mortality in cultured shrimp belong to the *Baculoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Parvoviridae*, and *Picomaviridae* families [1]. These viruses can infect shrimp at different developmental stages, from protozoa to the adult stage, with the highest mortality occurring at the early postlarval stage. The first shrimp virus, *Baculovirus penaei* from *Penaeus duorarum*, was isolated in the early 1970s, and since then, several shrimp viruses have been characterized in cultured shrimp species [1, 2]. Hepatopancreatic parvovirus (HPV), one of about 20 shrimp viruses known to infect penaeid shrimps, has been reported from many countries, including Australia, China, Korea, the Philippines, Indonesia, Malaysia, Kenya, and Israel, as well as from North and South America [3]. This virus is known to have originated in the Indo-Pacific region and to have spread in the wild shrimp species of America through the export of live Asian shrimp to America for aquaculture purposes [4]. After the first report in 1984 involving wild *Penaeus merguensis* and *Fenneropenaeus chinensis* from Singapore [5], HPV was reported in 1985 from *F. chinensis* in Korea [6]. Since 2002, *F. chinensis*, the native shrimp species in Korea that is more susceptible to white spot syndrome virus (WSSV) has been largely replaced with the less susceptible

S. Jeeva · T.-J. Choi (✉)
Department of Microbiology, Pukyong National University,
599-1, Daeyeon 3-Dong, Nam-Gu, Busan 608-737,
Republic of Korea
e-mail: choitj@pknu.ac.kr

S.-W. Kang · Y.-S. Lee
Department of Parasitology, College of Medicine and Frontier
Inje Research for Science and Technology, Inje University,
Busan 614-735, Korea

I. K. Jang · H. C. Seo
Aquaculture Industry Division, West Sea Fisheries Research
Institute, National Fisheries R&D Institute, Incheon 400-420,
Republic of Korea

<투고완료 논문 1>



Development of a multiplex PCR system for the simultaneous detection of white spot syndrome virus and hepatopancreatic parvovirus infection

Journal:	<i>Aquaculture Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Jeeva, Subbiah; Pukyong National University, Microbiology Kim, Nam-Il; Bioneer Corporation, Molecular Science Division Choi, Tae-Jin; Pukyong National University, Microbiology
Keywords:	Hepatopancreatic parvovirus, White spot syndrome virus, Multiplex PCR, Coinfection in Korea

SCHOLARONE™
Manuscripts

<투고완료 논문 2>



Development of a multiplex PCR system for the simultaneous detection of white spot syndrome virus and hepatopancreatic parvovirus infection

Journal:	<i>Aquaculture Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Jeeva, Subbiah; Pukyong National University, Microbiology Kim, Nam-Il; Bioneer Corporation, Molecular Science Division Choi, Tae-Jin; Pukyong National University, Microbiology
Keywords:	Hepatopancreatic parvovirus, White spot syndrome virus, Multiplex PCR, Coinfection in Korea

SCHOLARONE™
Manuscripts

<국제 학술대회 발표 완료 1>

International Union of Microbiological Societies 2011 Congress
 Meetings of the Three Unions of the International Union of Microbiological Societies, 2011

IUMS

IUMS 2011
 Sapporo

The Unlimited World of Microbes

XV International Congress of Virology
 FINAL PROGRAM

11-16 September 2011
 Sapporo Convention Center
 Sapporo Business Innovation Center

Host: Federation of Microbiological Societies of Japan
 Joint Host: Science Council of Japan

Monday, 12 September 14:30-18:00 Room C

VI-SY9	Parvoviruses
Conveners: Anan Srivastava USA Kelya Ozawa Japan	
VI-SY9-1	ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CANINE PARVOVIRUS TYPE 2C (CPV-2C) FROM SYMPTOMATIC VACCINATED DOGS Rodrigo E Puentes ¹ , Natasha Ellopulos ¹ , Ruben Perez ² , Gabriela Franco ¹ , Katia Sosa ¹ , Pablo Bianchi ¹ , Agustin Furtado ¹ , Silvia Hubner ³ , Paulo Esteves ⁴ ¹ Microbiología, Facultad de Veterinaria - Universidad de la República Oriental del Uruguay, Uruguay; ² Genetic section, Facultad de Ciencias - Universidad de la República Oriental del Uruguay; ³ Facultad de Veterinaria - Universidad Federal de Pelotas - RS, EVB/RS - Empresa Brasileira de Recursos Agropesqueiros - SC
VI-SY9-2	CPG DISTRIBUTION IN PARVOVIRUSES AND THE METHYLATION PATTERN OF PPV Zoltan Zádori, Zsuzsa Veres, Renata Tóth Veterinary Medical Research Institute, Hungarian Academy of Sciences, Hungary
VI-SY9-3	COMPLETE NUCLEOTIDE SEQUENCE ANALYSIS OF A KOREAN STRAIN OF HEPATOPANCREATIC PARVOVIRUS (HPV) FROM FENNEROPENAEUS CHINENSIS Tae-Jin Choi ¹ , Subbiah Jeeva ¹ , Ju Hee Jung ¹ , Yong Seok Lee ² ¹ Department of Microbiology, Pukyong National University, Korea, South; ² Department of Parasitology, Inje University

<국제 학술대회 발표 예정 1>

2012년 국제학술대회 및 정기학술대회 Abstract 정보

- Abstract 수정 기간 : 2012년 3월 12일 월요일 ~ 2012년 6월 1일 금요일
- Abstract 파일 업로드 기간 : 2012년 3월 12일 월요일 ~ 2012년 6월 1일 금요일

수정

Abstract 정보

제출번호	0655
발표방법	Poster 발표
발표분야	Microbial Ecology and Diversity
Title	Development of a multiplex PCR system for the simultaneous detection of white spot syndrome virus and hepatopancreatic parvovirus infection
Author	TAE-JIN CHOI* ¹ , Subbiah JEEVA ¹ , Nam-II KIM ² ¹ Microbiology, Pukyong National University, Busan, 608-737, Korea. ² Molecular Science Division, Bioneer Corporation, Daejeon, 306-220, Korea.
Abstract	A multiplex PCR kit for simultaneous detection of white spot syndrome virus (WSSV) and hepatopancreatic parvovirus (HPV) was developed and field testing was conducted. A 604-bp target sequence was selected from the vp28 gene of WSSV. A primer set was developed to amplify a 338-bp DNA fragment at the junction of the NS2 and NS1 protein genes of HPV after alignment of eight sequences from different strains. Another internal positive control primer set produced a 139-bp PCR fragment from the β -actin gene by alignment of this gene from <i>Litopenaeus vannamei</i> , <i>Fenneropenaeus chinensis</i> , and <i>Penaeus monodon</i> . The detection limits, tested using purified plasmids, for WSSV and HPV were 21.4 and 19.0 copies, respectively. The optimum ratio for HPV, WSSV, and β -actin was 3:1:1, with an optimum annealing temperature of 57°C. Field test of the multiplex PCR with 170 <i>L. vannamei</i> individuals from 17 aquaculture farms showed 41.8% coinfection with WSSV and HPV, and 40.0% and 3.5% single infection with WSSV and HPV, respectively. No virus-free shrimp was found. Ten wild catch <i>F. chinensis</i> individuals showed 60% coinfection, and 40% were infected with HPV.
Keyword	Hepatopancreatic parvovirus; WSSV; Multiplex PCR;

2012년 국제학술대회 및 정기학술대회 Abstract 정보

Abstract 수정 기간 : 2012년 3월 12일 월요일 ~ 2012년 6월 1일 금요일

Abstract 파일 업로드 기간 : 2012년 3월 12일 월요일 ~ 2012년 6월 1일 금요일

수정

Abstract 정보

제출번호	0656
발표방법	Poster 발표
발표분야	Microbial Ecology and Diversity
Title	Development of two quantitative real-time PCR diagnostic kits for HPV isolates from Korea
Author	TAE-JIN CHOI* ¹ , Subbiah JEEVA ¹ , Nam-II KIM ² ¹ Dept. of Microbiology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea. ² Molecular Science Division, Bioneer Corporation, Daejeon, 306-220, Korea.
Abstract	<p>Viral pathogens, alongside other pathogens, have major effects on crustacean aquaculture. Hepatopancreatic parvovirus (HPV) is an emerging virus in the shrimp industry and has been detected in shrimp farms worldwide. The HPV genome has greater diversity than other shrimp viruses due to its wide host range and geographical distribution. Therefore, developing diagnostic tools is essential to detect even small copy numbers from the target region of native HPV isolates. We have developed two easy to use quantitative real-time PCR kits, called Green Star and Dual Star, which contain all of the necessary components for real-time PCR, including HPV primers, using the primers obtained from the sequences of HPV isolates from Korea and analyzed their specificity, efficiency, and reproducibility. These two kits could detect from 1 to 1×10^3 copies of cloned HPV DNA. The minimum detection limits obtained from HPV-infected shrimp were 7.74×10^1 and 9.06×10^1 copies in the Green Star and Dual Star assay kits, respectively. These kits can be used for rapid, sensitive, and efficient screening for HPV isolates from Korea before the introduction of postlarval stages into culture ponds, thereby decreasing the incidence of early development of the disease.</p>
Keyword	Real-time PCR kit; Hepatopancreatic parvovirus;

<국내 특허 출원 완료 1>

관인생략	
출원번호통지서	
출원일자	2012.05.14
특기사항	심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(1)
출원번호	10-2012-0050715 (접수번호 1-1-2012-0381730-09)
출원인명칭	부경대학교 산학협력단(2-2004-016649-9) 외 1명
대리인성명	최규환(9-2005-001504-0)
발명자성명	최태진 김남일 박한오
발명의명칭	WSSV 및 HPV의 동시 진단용 멀티플렉스 프라이머 세트 및 이의 용도
특 허 청 장	

<국내 특허 출원 완료 2>

관인생략	
출원번호통지서	
출원일자	2012.05.14
특기사항	심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(2)
출원번호	10-2012-0050717 (접수번호 1-1-2012-0381745-83)
출원인명칭	부경대학교 산학협력단(2-2004-016649-9) 외 1명
대리인성명	최규환(9-2005-001504-0)
발명자성명	최태진 김남일 박한오
발명의명칭	HPV의 실시간 진단용 프라이머 세트 및 이의 용도
특 허 청 장	

*** 추가연구, 타연구에 활용 계획 등**

○ 본 연구과정에서 HPV의 VP 재조합 단백질에 대한 단클론 항체를 생산하는 세포주 10개를 확보하였다. 그러나 이들 단클론 항체는 항원의 유도에 사용된 항원에 대하여는 반응하나, 감염된 새우로부터 바이러스를 검출하지는 못하였다. 또한 단클론 항체를 이용한 진단 키트의 개발에는 연 6천만 원 이상의 연구비와 3년 정도의 연구 기간이 필요한 것으로 확인되어 추가적인 연구비가 확보될 경우 실제 양식어장에서 편리하게 사용할 수 있는 단클론 항체를 기초로 한 strip 형태의 진단 키트를 개발하고자 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

○ 태국 isolate 의 HPV와 monodon baculovirus (MBV) 를 발견하기 위해서 한 duplex real-time PCR assay 를 행했고 역학범위는 한 반응 당 1 to 1×10^8 copies이다. 이 duplex real-time PCR assay 말레이시아, 인도네시아 와 태국 isolate 에서 HPV를 발견할 수 있다. 이 duplex assay 통해서 말레이시아에서 수집한 39마리의 얼룩새우와 태국에서 수집한 30마리의 새우는 모두 다 HPV 와 MBV에 감염되었다. 하지만 인도네시아의 9마리 새우는 MBV에 감염되지 않았고 HPV에만 감염되었다 (Tang & Lightner, 2011).

○ 3가지의 새우를 감염시키는 바이러스, *PmDENV*, white spot syndrome virus (WSSV), yellow-head virus (YHV)를 동시의 진단하는 Multiplex real-time PCR 과 high-resolution melting (HRM) 의 분석연구도 개발되었다. 41개의 샘플 분석 결과는 각 WSSV 11 (26.83%), *PmDENV* 9 (21.95%), YHV 4 (9.76%) 감염 되었다. Multiplex real-time limit 진단 결과는 *PmDENV* 40fg, YHV 50fg, WSSV DNAs 200fg로 나왔다 (Panichareon *et al.*, 2011).

○ *PmDENV*의 재조합 캡시드 단백질이 monoclonal antibody (MAb)를 형성하는 것을 이용하여, Immuno diagnostic method (dot blot and Western blot techniques) 가 개발 되었다. 재조합 캡시드 단백질은 2개 부분으로 나누어 지는데, 그 때 GST fusion tag 와 함께 *PmDENV*-N 와 *PmDENV*-C terminals 가 형성되는데 이 두 가지 터미널에서 MAbs가 형성된다. *PmDENV*-N에서 형성된 MAbs 는 *PmDENV*-C 보다 효과적이고 *PmDENV*-N와 *PmDENV*-C의 MAbs가 같이 작용하였을 때 단일 MAb 만이 작용하였을 때 보다 2배 더 효과적이다 (Srisuk *et al.*, 2011).

○ RNA interference (RNAi) technology는 비구조단백질 유전자(NS1) 과 구조단백질유전자 (VP) 에 해당하는 이중가닥 RNA (dsRNA) 계놈을 사용하여 *PmDENV* 를 억제했다. NS1 유전자의 dsRNA와 VP 유전자의 dsRNA 는 *PmDENV*의 확산을 억제할 수 있다. NS1 유전자의 dsRNA 는 VP 유전자의 dsRNA 보다 효과적이고, dsRNA-NS1 (800ng) 과 dsRNA-VP (800ng) 같이 사용 하였을 때 dsRNA-NS1 (800ng) 하나보다 효과적이다 (Attasart *et al.*, 2011).

제 7 장 참고문헌

- Anderson, I. G., Law, A. T., Shariff, M., & Nash, G. (1990). A parvo-like virus in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *55*(3), 447-449.
- Attasart, P., Kaewkhaw, R., Chimwai, C., Kongphom, U., & Panyim, S. (2011). Clearance of *Penaeus monodon* densovirus in naturally pre-infected shrimp by combined ns1 and vp dsRNAs. *Virus Research*, *159*(1), 79-82.
- Bonami, J. R. (2008). Shrimp Viruses. In B. W. J. Mahy & M. H. V. V. Regenmortel (Eds.). *Encyclopedia of Virology* (pp. 567-576). Oxford: Academic Press.
- Bonami, J. R., Mari, J., Poulos, B. T., & Lightner, D. V. (1995). Characterization of hepatopancreatic parvo-like virus, a second unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps. *Journal of general virology*, *76*(4), 813-817.
- Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R., & Phillips, M. (2004). Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. *RAP publication*, *10*, 92.
- Chen, D., Hanna, P., Altmann, K., Smith, A., Moon, P., & Hammond, L. (1992). Development of monoclonal antibodies that identify *Vibrio* species commonly isolated from infections of humans, fish, and shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(11), 3694-3700.
- Chen, Z., Wang, C., & Shih, H. (2002). An assay for quantification of white spot syndrome virus using a capture ELISA. *Journal of Fish Diseases*, *25*(4), 249-251.
- Chiang, H. C., & Lo, C. F. (1995). Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*, *23*, 165-173.
- Chong, Y., & Loh, H. (1985). Hepatopancreas chlamydial and parvoviral infections of farmed marine prawns in Singapore. *Singapore Veterinary Journal (Singapore)*.
- Couch, J. A. (1974). An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: Ultrastructure, prevalence, and enhancement. *Journal of Invertebrate Pathology*, *24*(3), 311-331.
- Dorak, M. T. (2006). *Real-time PCR*. (pp.1-24) New York: Taylor & Francis Group.
- Flegel, T. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*.
- Flegel, T. W. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*, *258*(1-4), 1-33.
- Gangnonngiw, W., Kiatpathomchai, W., Sriurairatana, S., Laisutisan, K., Chuchird, N., Limsuwan, C., & Flegel, T. W. (2009). Parvo-like virus in the hepatopancreas of

- freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* cultivated in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*, **85**(3), 167–173.
- Haq, M., Vignesh, R., & Srinivasan, M. (2012). Deep insight into white spot syndrome virus vaccines: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, **2**(1), 73–77.
- He, L., & Xu, H. (2011). Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Aquaculture*, **311**(1), 94–99.
- Hemauer, A., von Poblitzki, A., Gigler, A., Cassinotti, P., Siegl, G., Wolf, H., & Modrow, S. (1996). Sequence variability among different parvovirus B19 isolates. *Journal of general virology*, **77**(8), 1781.
- Inouye, K., Miwa, S., Oseko, N., Nakano, H., Kimura, T., Momoyama, K., & Hiraoka, M. (1994). Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathology*, **29**(2), 149–158.
- Jang, I., Suriakala, K., Kim, B., & Meng, X. (2008). Real-Time PCR Quantification of White Spot Syndrome Virus (WSSV) and Hepatopancreatic Parvovirus (HPV) Loads in Shrimp and Seawaters of Shrimp Ponds on the West Coast of South Korea. *Fisheries and Aquatic Sciences*, **11**(4), 195–204.
- Jang, I. K., Meng, X. H., Seo, H. C., Cho, Y. R., Kim, B. R., Ayyaru, G., & Kim, J. S. (2009). A TaqMan real-time PCR assay for quantifying white spot syndrome virus (WSSV) infections in wild broodstock and hatchery-reared postlarvae of fleshy shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture*, **287**(1–2), 40–45.
- Jang, I. K., Suriakala, K., Kim, J., Meng, X., & Choi, T.J. (2011). A TaqMan Real-Time PCR Assay for Quantifying Type III Hepatopancreatic Parvovirus Infections in Wild Broodstocks and Hatchery-Reared Postlarvae of *Fenneropenaeus chinensis* in Korea. *Journal of microbiology and biotechnology*, **21**(11), 1109.
- Jeeva, S., Kang, S.-W., Lee, Y.-S., Jang, I., Seo, H., & Choi, T.J. (2012). Complete nucleotide sequence analysis of a Korean strain of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Fenneropenaeus chinensis*. *Virus Genes*, **44**(1), 89–97.
- Khawsak, P., Deesukon, W., Chaivisuthangkura, P., & Sukhumsirichart, W. (2008). Multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of six viruses of penaeid shrimp. *Molecular and cellular probes*, **22**(3), 177–183.
- Kono, T., Savan, R., Sakai, M., & Itami, T. (2004). Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of virological methods*, **115**(1), 59–65.

- La Fauce, K. A., Elliman, J., & Owens, L. (2007). Molecular characterisation of hepatopancreatic parvovirus (PmergDNV) from Australian *Penaeus merguensis*. *Virology*, **362**(2), 397-403.
- La Fauce, K. A., Layton, R., & Owens, L. (2007). TaqMan real-time PCR for detection of hepatopancreatic parvovirus from Australia. *Journal of virological methods*, **140**(1), 10-16.
- Lightner, D. (1996). *A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp*. World Aquaculture Society.
- Lightner, D., & Redman, R. (1985). A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, **45**(1), 47-53.
- Lightner, D., Redman, R., Poulos, B., Mari, J., Bonami, J., & Shariff, M. (1994). Distinction of HPV-type viruses in *Penaeus chinensis* and *Macrobrachium rosenbergii* using a DNA probe. *Asian Fish Sci*, **7**, 267-272.
- Lightner, D. V. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, **106**(1), 110-130.
- Lightner, D. V., Redman, R. M., Moore, D. W., & Park, M. A. (1993). Development and application of a simple and rapid diagnostic method to studies on hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. *Aquaculture*, **116**(1), 15-23.
- Lo, C. F., Leu, J. H., Ho, C., Chen, C., Peng, S., Chen, Y., Chou, C., Yeh, P., Huang, C., & Chou, H. (1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*, **25**, 133-141.
- Loh, P. C. (1999). Shrimp Viruses. In G. Editors-in-Chief: Allan & G. W. Robert (Eds.). *Encyclopedia of Virology (Second Edition)* (pp. 1625-1635). Oxford: Elsevier.
- Loh, P. C., Tapay, L. M., Lu, Y., & Nadala, E. (1997). Viral pathogens of the penaeid shrimp. *Advances in virus research*, **48**, 263-312.
- Manivannan, S., Otta, S. K., & Karunasagar, I. (2002). Multiple viral infection in *Penaeus monodon* shrimp postlarvae in an Indian hatchery. *Diseases of Aquatic Organisms*, **48**(3), 233-236.
- Manjanaik, B., Umesha, K., & Karunasagar, I. (2005). Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) in wild shrimp from India by nested polymerase chain reaction (PCR). *Diseases of aquatic organisms*, **63**, 255-259.
- Muzyczka, N., Berns, K. I., Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2001). *Parvoviridae: the viruses and their replication*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Nimitphak, T., Kiatpathomchai, W., & Flegel, T. W. (2008). Shrimp hepatopancreatic parvovirus detection by combining loop-mediated isothermal amplification with a lateral flow dipstick. *Journal of virological methods*, **154**(1-2), 56-60.

- Panichareon, B., Khawsak, P., Deesukon, W., & Sukhumsirichart, W. (2011). Multiplex real-time PCR and high-resolution melting analysis for detection of white spot syndrome virus, yellow-head virus, and *Penaeus monodon* densovirus in penaeid shrimp. *Journal of virological methods*, *178*(1 - 2), 16-21.
- Pantoja, C., & Lightner, D. (2000). A non-destructive method based on the polymerase chain reaction for detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, *39*(3), 177-182.
- Pantoja, C., & Lightner, D. (2001). Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of penaeid shrimp by in situ hybridization at the electron microscope level. *Diseases of Aquatic Organisms*, *44*(2), 87-96.
- Park, J., Lee, Y., Lee, S., & Lee, Y. (1998). An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. *Diseases of Aquatic Organisms*, *34*, 71-75.
- Phromjai, J., Boonsaeng, V., Withyachumnarnkul, B., & Flegel, T. (2002). Detection of hepatopancreatic parvovirus in Thai shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization, dot blot hybridization and PCR amplification. *Diseases of aquatic organisms*, *51*(3), 227-232.
- Phromjai, J., Sukhumsirichart, W., Pantoja, C., Lightner, D., & Flegel, T. (2001). Different reactions obtained using the same DNA detection reagents for Thai and Korean hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, *46*(2), 153-158.
- Poulos, B. T., Lightner, D. V., Trumper, B., & Bonami, J. R. (1994). Monoclonal Antibodies to a Penaeid Shrimp Parvovirus, Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV). *Journal of Aquatic Animal Health*, *6*(2), 149-154.
- Rai, P., Safeena, M. P., & Karunasagar, I. (2011). Complete nucleic acid sequence of *Penaeus stylirostris* densovirus (*Pst*DNV) from India. *Virus Research*.
- Rosenberry, B. (2004). *World shrimp farming 2004*. Shrimp News International, San Diego, California, USA.
- Safeena, M. P., Tyagi, A., Rai, P., & Karunasagar, I. (2010). Complete nucleic acid sequence of *Penaeus monodon* densovirus (*Pm*DNV) from India. *Virus Research*, *150*(1-2), 1-11.
- Sithigorngul, W., Rukpratanporn, S., Sittidilokratna, N., Pecharaburanin, N., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., & Sithigorngul, P. (2007). A convenient immunochromatographic test strip for rapid diagnosis of yellow head virus infection in shrimp. *Journal of virological methods*, *140*(1 - 2), 193-199.
- Song, Y., Lee, S., Lin, Y., & Chen, C. (1992). Enzyme immunoassay for shrimp vibriosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, *14*(1), 43-50.
- Srisuk, C., Chaivisuthangkura, P., Sukhumsirichart, W., Sridulyakul, P., Longyant, S., Rukpratanporn, S., & Sithigorngul, P. (2011). Improved immunodetection of *Penaeus*

- monodon* densovirus with monoclonal antibodies raised against recombinant capsid protein. *Aquaculture*, **311**(1-4), 19-24.
- Sritunyalucksana, K., Srisala, J., McColl, K., Nielsen, L., & Flegel, T. W. (2006). Comparison of PCR testing methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp. *Aquaculture*, **255**(1), 95-104.
- Sukhumsirichart, W., Attasart, P., Boonsaeng, V., & Panyim, S. (2006). Complete nucleotide sequence and genomic organization of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of *Penaeus monodon*. *Virology*, **346**(2), 266-277.
- Sukhumsirichart, W., Kiatpathomchai, W., Wongteerasupaya, C., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T., Boonseang, V., & Panyim, S. (2002). Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection in *Penaeus monodon* using PCR-ELISA. *Molecular and cellular probes*, **16**(6), 409-413.
- Sukhumsirichart, W., Wongteerasupaya, C., Boonsaeng, V., Panyim, S., Sriurairatana, S., Withyachumnarnkul, B., & Flegel, T. (1999). Characterization and PCR detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. *Diseases of aquatic organisms*, **38**(1), 1.
- Takahashi, Y., Fukuda, K., Kondo, M., Chongthaleong, A., Nishi, K., Nishimura, M., Ogata, K., Shinya, I., Takise, K., & Fujishima, Y. (2003). Detection and prevention of WSSV infection in cultured shrimp. *Asian Aquacult. Mag*, 25-27.
- Tan, L., Soon, S., Lee, K., Shariff, M., Hassan, M., & Omar, A. (2001). Quantitative analysis of an experimental white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Penaeus monodon* Fabricius using competitive polymerase chain reaction. *Journal of Fish Diseases*, **24**(6), 315-323.
- Tan, Y., Xing, Y., Zhang, H., Feng, Y., Zhou, Y., & Shi, Z. L. (2009). Molecular detection of three shrimp viruses and genetic variation of white spot syndrome virus in Hainan Province, China, in 2007. *Journal of Fish Diseases*, **32**(9), 777-784.
- Tang, K., Pantoja, C., & Lightner, D. (2008a). Nucleotide sequence of a Madagascar hepatopancreatic parvovirus (HPV) and comparison of genetic variation among geographic isolates. *Diseases of aquatic organisms*, **80**, 105 - 112.
- Tang, K. F. J., & Lightner, D. V. (2011). Duplex real-time PCR for detection and quantification of monodon baculovirus (MBV) and hepatopancreatic parvovirus (HPV) in *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **93**(3), 191-198.
- Tang, K. F. J., Pantoja, C. R., & Lightner, D. V. (2008b). Genetic diversity of HPV Parvovirus *Global aquaculture advocate*(11), 79-80.
- Truyen, U., Gruenberg, A., Chang, S. F., Obermaier, B., Veijalainen, P., & Parrish, C. R. (1995). Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *Journal of virology*, **69**(8), 4702.

- Tsai, J. M., Shiau, L. J., Lee, H. H., Chan, P., & Lin, C. Y. (2002). Simultaneous detection of white spot syndrome virus (WSSV) and Taura syndrome virus (TSV) by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **50**(1), 9-12.
- Van der Velden, V., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., & Van Dongen, J. (2003). Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*, **17**(6), 1013-1034.
- Van Hulten, M. C. W., Witteveldt, J., Peters, S., Kloosterboer, N., Tarchini, R., Fiers, M., Sandbrink, H., Lankhorst, R. K., & Vlak, J. M. (2001). The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*, **286**(1), 7-22.
- Walker, P. J., & Mohan, C. (2009). Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impact and the effectiveness of health management strategies. *Reviews in Aquaculture*, **1**(2), 125-154.
- Wang, X., & Zhan, W. (2006). Development of an immunochromatographic test to detect White Spot Syndrome Virus of shrimp. *Aquaculture*, **255**(1), 196-200.
- Wilcox, B. A., & Gubler, D. J. (2005). Disease ecology and the global emergence of zoonotic pathogens. *Environmental Health and Preventive Medicine*, **10**(5), 263-272.
- Xie, Z., Pang, Y., Deng, X., Tang, X., Liu, J., Lu, Z., & Khan, M. I. (2007). A multiplex RT-PCR for simultaneous differentiation of three viral pathogens of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, **76**(1), 77.
- Yang, B., Song, X. L., Huang, J., Shi, C. Y., & Liu, L. (2007). Evidence of existence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp cultured in China. *Veterinary microbiology*, **120**(1), 63-70.
- Yang, B., Song, X. L., Huang, J., Shi, C. Y., Liu, Q. H., & Liu, L. (2006). A single step multiplex PCR for simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Journal of Fish Diseases*, **29**(5), 301-305.
- Yu, C. I., & Song, Y. L. (2000). Outbreaks of Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Fish pathology*, **35**(1), 21-24.
- Yuan, L., Zhang, X., Chang, M., Jia, C., Hemmingsen, S. M., & Dai, H. (2007). A new fluorescent quantitative PCR-based in vitro neutralization assay for white spot syndrome virus. *Journal of virological methods*, **146**(1-2), 96-103.
- Zhan, W. B., Wang, Y. H., Fryer, J. L., Yu, K. K., Fukuda, H., & Meng, Q. X. (1998). White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China. *Journal of Aquatic Animal Health*, **10**(4), 405-410.