

최종
연구보고서

양식 해산어류의 iridovirus 신속 진단기술 개발
Rapid diagnosis of iridovirus in cultured marine fish

연구기관
울산대학교

농림부



제출문

농 립 부 장관 귀하

본 보고서를 “양식 해산어류의 iridovirus 신속 진단기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 2. 6

주관연구기관명: 울산대학교

총괄연구책임자: 박 정 우

연 구 원: 김 진 우

연 구 원: 박 명 애

연 구 원: 허 문 수

연 구 원: 조 화 자

연 구 원: 도 정 완

연 구 원: 최 정 윤

협동연구기관명: 국립수산진흥원

협동연구책임자: 손 상 규

요 약 문

I. 제목

양식 해산어류의 iridovirus 신속 진단기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1980년대 이후로 남해안 일대를 중심으로 해산어 양식이 급속도로 증가하는 추세에 있다. 우리 나라는 여러 종류의 바이러스, 특히 iridovirus가 양식 해산어에 대량 폐사를 유발하고 있는 것으로 보고되는 일본에서 해산어 치어를 수입하여 양식을 하였다. 이로 미루어 볼 때, 우리나라에서 양식중인 해산어류에 iridovirus를 포함한 여러 종류의 바이러스가 감염되어 있을 확률이 매우 높다. 실제로 최근 몇 년 전부터 양식 중이던 능성어, 넙치, 복어, 방어 등의 해산어에 iridovirus 감염에 의한 것으로 추정되는 바이러스성 질병이 발생하여 대량폐사를 유발하고 있는 실정이다.

현재 어류바이러스에 대한 백신이나 치료제는 개발되어 있지 않다. 바이러스성 질병은 한번 발생하면 치료하기가 어려우며, 따라서 바이러스성 질병이 발생하였다면 그 사실을 조기에 알아내어 다른 정상적인 개체들과 격리시킴으로써 피해를 최소화시키는 것이 최선의 방법이다. 그러나 현재 질병 발생의 원인이 바이러스에 의한 것임을 확인하는 데에는 일주일 이상이 소요된다. 만약 바이러스에 의한 질병 발생시 이와 같은 기간동안 아무런 조치를 취하지 않고 방치해 둔다면 양식장 전체에 바이러스가 확산되어 결국은 양식어의 대부분이 감염된다. 이를 막는 최선의 방법으로는 바이러스를 조기에 진단하여 이의 확산을 미연에 방지하는 것이라 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 양식 해산어에 감염하는 iridovirus의 정확한 특성을 파악하고 또한 이 바이러스를 24시간

이내에 조기에 진단 할 수 있는 신속진단법을 개발하여 바이러스의 확산을 조기에 막아 바이러스 질병에 의한 피해를 최소화하는 것을 목적으로 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

최근 들어 일본과 우리 나라에서 양식중인 해산어에 iridovirus의 감염에 의한 폐사가 발생하여 양식어민들의 피해가 늘고 있는 상황이다. 본 연구에서는 첫째, 우리 나라 양식 해산어류에 감염하는 iridovirus의 분포 및 특성을 파악하고, 둘째, iridovirus를 신속진단 할 수 있는 기술을 개발하여 이 바이러스의 확산을 미연에 방지함으로써 양식어민들의 피해를 최소화하는 것을 목표로 하였다. 이와 같은 목표를 달성하기 위하여 수행한 연구 내용은 다음과 같다.

1. Iridovirus의 특성연구

가. Iridovirus의 분리 및 특성 연구

- 양식넙치에 종양을 유발하는 iridovirus와 양식 참돔 및 방어 등에 폐사를 유발하는 iridovirus를 분리하여 특성 확인.
- 제조한 단일클론항체들과 iridovirus에 감염된 해산어에서 채취한 항혈청을 사용한 Western blotting 실험을 통하여 iridovirus의 면역유도단백질을 확인.

나. Iridovirus의 감염 실태조사

- 양식넙치에 종양을 유발하는 iridovirus와 양식 참돔 및 방어 등에 폐사를 유발하는 iridovirus의 지역별 분포 확인.

2. ELISA 및 PCR을 사용한 신속진단법 개발

가. 단일클론항체 제조

- 우리 나라의 양식 해산어에서 분리된 iridovirus를 balb/c mouse에 면역시킨 다음의 spleen cell을 sp-2/0 myeloma cell과 fusion을 하여 hybridoma를 만들어 단일클론항체를 제조.
- 제조한 여러 종류의 단일클론항체들중 iridovirus에 specific한 clone 들을 선별하여 이후의 면역유도 단백질의 확인 및 ELISA를 사용한 iridovirus의 신속진단에 사용.

나. Iridovirus의 gene cloning

- Iridovirus에서 genomic DNA를 추출한 다음 restriction enzyme으로 절단하고 이를 plasmid vector에 ligation시킨 다음 E.coli에 transformation.
- 이들중 positive clone 들을 선별한 다음 nucleotide sequencing을 확인.
- 이 결과로부터 iridovirus의 PCR primer들을 제작하여 이후의 PCR을 사용한 iridovirus의 신속진단에 사용.

다. ELISA를 이용한 신속진단법 개발

- 앞서서와 같이 제조한 iridovirus에 대한 단일클론항체를 사용하여 ELISA를 수행하여 6시간 안에 iridovirus를 신속진단할 수 있는 방법을 확립.

라. PCR을 이용한 신속진단법 개발

- Iridovirus의 genomic DNA clone의 nucleotide sequence로부터 제조한 PCR primer를 사용하여 4시간 안에 iridovirus를 신속진단할 수 있는 방법을 확립.

마. 신속진단법의 현장적용

- 양식중인 해산어를 대상으로 ELISA와 PCR 법을 사용하여 iridovirus의 신속진단

여부를 적용.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발결과

가. Iridovirus의 특성연구

(1) Iridovirus의 분리 및 특성연구

- 양식넙치에 종양을 유발하는 iridovirus와 양식 참돔 및 방어 등에 폐사를 유발하는 iridovirus를 분리하여 특성을 확인하였다. 이 두 바이러스는 전자현미경으로 관찰한 결과 외형은 비슷하였다. 그러나 전기영동을 통하여 단백질 pattern을 분석한 결과 서로 다른 크기의 구조단백질을 지니고 확인되었다. 그리고 넙치에 종양을 유발하는 iridovirus의 경우 구조단백질을 분석한 결과 두 종류 이상이 존재함이 확인되었다.
- 제조한 단일클론항체들과 iridovirus에 감염된 해산어에서 채취한 항혈청을 사용한 Western blotting 실험을 통하여 iridovirus의 면역유도단백질을 확인하고 이들을 비교하였다. 그 결과 넙치에 종양을 유발하는 iridovirus의 경우 분자량 150 kDa의 구조단백질이 면역유도 특성이 있음이 확인되었다. 그리고 항체를 사용한 Western blotting 실험 결과 종양을 유발하는 iridovirus와 폐사를 유발하는 iridovirus의 구조단백질들은 서로 다른 항원성을 지니고 확인되었다.

(2) Iridovirus의 감염 실태조사

- 양식넙치에 종양을 유발하는 iridovirus와 양식 참돔 및 방어 등에 폐사를 유발하는 iridovirus의 지역별 분포를 확인하여 보았다. 그 결과 넙치에 종양을

유발하는 iridovirus는 우리 나라의 전역에 이미 퍼져 있으며 양식 넙치에 많은 피해를 주고 있음이 확인되었다.

- 참돔 및 방어 등에 폐사를 유발하는 iridovirus의 경우 1994년에 남해안 일대의 양식 해산어에 바이러스성 질병이 발생하였고 또한 이때 채취한 시료에서 iridovirus가 검출되었다. 그러나 그 이후에는 전혀 발병도 되지 않았고 또한 무작위로 재취한 시료에서도 검출되지 않았다.

나. ELISA 및 PCR을 사용한 신속진단법 개발

(1) 단일클론항체 제조

- 우리 나라의 양식 해산어에서 분리된 iridovirus를 balb/c mouse에 면역시킨 다음의 spleen cell을 sp-2/0 myeloma cell과 fusion을 하여 hybridoma를 만들어 단일클론항체를 제조하였다. 이를 면역유도 단백질의 확인 및 ELISA를 사용한 iridovirus의 신속진단에 사용하였다.

(2) Iridovirus의 gene cloning

- 초원심분리기를 사용하여 순수 분리한 iridovirus에서 genomic DNA를 추출한 다음 BamHI, EcoRI 그리고 PstI등의 restriction enzyme으로 절단하고 이를 pUC19 plasmid vector에 ligation시킨 다음 E.coli에 transformation 시켰다. Positive clone들중 insert size가 큰 것 6개를 선별한 다음 nucleotide sequencing을 확인하였다. 이 결과를 GenBank의 nucleotide sequence와 homology searching을 하여 비교하였으며 또한 iridovirus의 PCR primer들을 제작하여 이후의 PCR을 사용한 iridovirus의 신속진단에 사용하였다.

(3) ELISA를 이용한 신속진단법 개발

- 종양을 유발하는 iridovirus에 대한 단일클론항체중 항체 역가가 높은 clone을 사용하여 direct ELISA 법을 수행하였다. 정상적인 조직, 종양초기조직, 종양 말기 조직 등을 대상으로 ELISA를 수행한 결과 6시간 안에 종양조직에서만 색깔 반응을 보였다. 이로부터 6시간 안에 종양을 유발하는 iridovirus를 신속진단할수 있음을 확인하였다.

(4) PCR을 이용한 신속진단법 개발

- 폐사를 유발하는 iridovirus의 genomic DNA clone들의 nucleotide sequence를 기초로 하여 제조한 PCR primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. 정상적인 GF cells, iridovirus에 감염된 GF cells, 그리고 순수 분리된 iridovirus를 대상으로 PCR을 수행한 결과 정상적인 cell에서는 DNA 증폭이 일어나지 않았으나 iridovirus에 감염된 세포와 iridovirus에서는 원하는 DNA fragment의 증폭이 일어났다. 이로부터 4시간 안에 iridovirus를 신속진단할수 있음을 확인하였다.

(5) 신속진단법의 현장적용

- ELISA를 사용하여 양식넙치를 대상으로 종양을 유발하는 iridovirus의 신속진단 여부를 확인 한 결과 종양발생 초기에 신속진단이 가능하였다.
- PCR을 사용하여 폐사를 유발하는 iridovirus가 감염된 cells와 참돔을 대상으로 신속진단 여부를 확인 한 결과 신속진단이 가능함을 확인하였다.

2. 활용에 대한 건의

본 연구의 결과 종양을 유발하는 iridovirus는 이미 우리 나라 전역에 퍼져있음이 확인 되었다. 따라서 장기적인 안목에서 iridovirus-free한 해산어를 찾아 이를 양식장에 점차 보급하여 나아가는 것이 필요한데, 바이러스가 없는 양식장 혹은 해산어를 선

별하는 데에 본 연구에서 개발한 ELISA를 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

폐사를 유발하는 iridovirus는, 비록 1994년도 일시적으로 남해안 일부지역에서 폐사를 유발하였지만 현재에는 우리 나라 수계에 분포하지 않는 것으로 판단된다. 따라서 이 바이러스의 확산을 막기위하여는 이전에 발생하였던 지역을 정기적으로 검사하여 바이러스의 재발 여부를 확인하여야 한다. 또한 외국, 특히 일본으로부터 iridovirus가 유입되지 않도록 하는 것이 필요하다. 이러한 과정에서 iridovirus의 검색에 본 연구에서 개발한 PCR을 활용할 수 있을 것으로 생각된다..

SUMMARY

I. Title

Rapid diagnosis of iridovirus in cultured marine fish

II. Objective and Significance

Since 1980, the aquaculture of marine fish has rapidly expanded on the southern coast of Korea. The Korean fish farmer has imported seedstock of marine fish from Japan, where fish viruses, especially iridoviruses have been problematic to cultured marine fishes. Therefore, it is possible that the fish farms in Korea are contaminated by fish viruses, especially iridoviruses. Recently, iridoviral disease has occurred frequently among cultured marine fish and caused significant economic loss among highly valued fish species.

Until now, there is no commercially available vaccines and therapeutic agents to control the viral diseases in fishes and the only way of the control may be an early detection of the virus-infected fish and removal of them from farms. However, currently-used diagnostic procedure is time-consuming and may require more than one week to give an answer. One week is long enough for the virus to infect almost fish of a fish farm. Therefore the establishment of the rapid virus-detection technique is necessary to prevent expansion of viral diseases. The aim of this research project is to characterize the iridovirus isolated from cultured marine fish in Korea and to develop a rapid diagnosis technique for the iridovirus, which will prevent the iridoviral disease and minimize the loss of

the cultured marine fish from viral disease.

III. Content and scope of the study

Recently, iridoviral disease has occurred among cultured marine fishes and caused heavy loss of cultured fishes in Korea and Japan. This research project focuses on (1) the isolation and characterization of iridovirus from cultured marine fish in Korea and (2) the development of rapid diagnosis technique for the iridovirus to prevent the viral diseases and minimize the loss of the cultured fishes

1. Characterization of iridovirus

A. Isolation and characterization of iridovirus

- o Iridoviruses were isolated and characterized: one, causative agent of papilloma-like lesion and the other, causative agent of gross mortality to cultured marine fish.
- o The immunogenic proteins of the iridoviruses were identified by Western blotting using monoclonal antibodies and antisera obtained from virus-infected marine fish

B. Survey of the distribution of iridoviruses

- o The regional distribution of the iridoviruses among cultured marine fish was investigated: the causative agent of papilloma-like lesion and the causative

agent of gross mortality to cultured marine fish.

2. Development of rapid diagnosis technique by using ELISA and PCR

A. Preparation of monoclonal antibody

- o Monoclonal antibodies against iridoviruses were prepared by fusion between sp-2/0 myeloma cells and spleen cells of mouse immunized with iridovirus isolated from cultured marine fish in Korea.
- o Among the monoclones, the iridovirus-specific one was selected and used for other experiments including Western blotting and ELISA.

B. Genomic DNA cloning of iridovirus

- o Genomic DNA of iridovirus was extracted, cleaved with restriction enzymes, ligated into plasmid vector and transfected into E. coli.
- o The nucleotide sequences of the positive clones were identified.
- o Based on the nucleotide sequences, the PCR primers were prepared and used for PCR.

C. Development of rapid diagnosis technique by using ELISA

- o Iridoviral antigen was rapidly detected within 6 h by ELISA using monoclonal antibody.

D. Development of rapid diagnosis technique by using PCR

- o DNA fragment of iridoviral genome was amplified and identified within 4 h by PCR using PCR primer prepared from the nucleotide sequence of genomic DNA

clone.

E. Field application of the rapid diagnosis technique

- o ELISA and PCR were tested for their abilities of rapid-detection of iridoviruses in cultured marine fish.

IV. Results and suggestions for application

1. Results

A. Characterization of iridovirus

(1) Isolation and characterization of iridovirus

- o Two kinds of iridoviruses, the tumor-inducing and mortality-associated iridoviruses, were isolated and characterized. Electron microscopy of the two iridoviruses showed that they had the same morphology. However, the electrophoretical patterns of the structural proteins were different from each other. Moreover, there were more than two types in tumor-inducing iridovirus based on the protein patterns in SDS-PAGE.
- o The immunogenic proteins of iridovirus were identified by Western blotting using monoclonal antibody and fish immune sera and were compared between the tumor-inducing and mortality-associated iridoviruses. The results suggest that a 150 kDa structural protein of tumor-inducing iridovirus is immunogen and that the antigenicity of the structural proteins of the tumor-inducing iridovirus is different from that of mortality-associated iridovirus.

(2) Survey of the distribution of iridoviruses

- o The regional distribution of the iridoviruses was investigated among the cultured marine fish. The results suggest that the tumor-inducing iridovirus has been spread wide over almost aquaculture in Korea and caused economic loss in cultured marine fish.
- o In 1994, the mortality-associated iridovirus has been isolated from moribund fish cultured at southern coast of Korea. However, thereafter, there was no report on the iridoviral disease in cultured fish in Korea and we could not isolate any iridovirus from randomly-collected fish samples.

B. Development of rapid diagnosis technique by using ELISA and PCR

(1) Preparation of monoclonal antibody

- o A balb/c mouse was immunized with iridovirus isolated from cultured marine fish in Korea. The spleen cells from the immunized animal were fused with sp-2/0 myeloma cells and the resultant hybridomas were screened by ELISA to select hybridomas that produced iridovirus-specific monoclonal antibodies. The monoclonal antibodies were used for Western blotting and ELISA.

(2) Genomic DNA cloning of iridovirus

- o Genomic DNA was extracted from purified iridovirus, digested with BamHI, EcoRI and PstI, ligated into pUC19 plasmid vector and transfected into E. coli. Six clones with large insert DNA were selected and their nucleotide sequences were analyzed. The nucleotide sequences were compared with

sequences of other genes from the EMBL/GenBank databank. Based on the nucleotide sequences, PCR primers were prepared and used for PCR as a rapid iridovirus-detection technique.

(3) Development of rapid diagnosis technique by using ELISA

- o Direct ELISA was conducted to detect tumor-inducing iridovirus from fish tissues by using monoclonal antibody with high affinity against iridovirus. Among the normal, the early tumor and the late tumor tissues, only the tumor tissues showed positive result within 6 h. This result suggests that tumor-inducing iridovirus can be detected by ELISA within 6 h.

(4) Development of rapid diagnosis technique by using PCR

- o PCR was conducted to detect mortality-associated iridovirus from fish cells by using PCR primer prepared from nucleotide sequences of genomic DNA clones of mortality-associated iridovirus. While DNA was not amplified from the normal GF cells, DNA amplification was occurred from the iridovirus-infected GF cells and purified iridovirus within 4 h. This result suggests that mortality-associated iridovirus can be detected from virus-infected cells by PCR within 4 h.

(5) Field application of the rapid diagnosis technique

- o The rapid detection of tumor-inducing iridovirus from early tumor of cultured marine fish was possible by using ELISA.
- o The rapid detection of mortality-associated iridovirus from virus infected cells and fish was possible by using PCR.

2. Suggestions for application

The results of our research project suggest that tumor-inducing iridovirus has been spread wide all over the fish farms in Korea. Therefore, it is necessary to select iridovirus-free fish and this fish can be used as broodstock for aquaculture. The ELISA technique which is developed in our research project can be used to screen the iridovirus-free fish.

Even though the mortality-associated iridovirus has once emerged at the southern coast in 1994, there is no indication of the presence of this virus now in Korea. In order to prevent the recontamination of this virus in Korea, it is necessary to survey regularly the aquaculture which had experienced the iridoviral diseases before. In addition, the iridovirus should not be imported from foreign countries, especially Japan. The PCR technique which is developed in our research project can be used to screen the cultured fish for iridovirus.

CONTENTS

Summary (Korean).....	1
Summary (English).....	8
Chapter 1. Preface.....	19
Section 1. Objective and scope of the study.....	19
Chapter 2. Characterization of iridovirus.....	22
Section 1. Introduction.....	22
Section 2. Materials and Methods.....	24
1. Cell culture and viruses.....	24
2. Purification of viruses.....	24
3. Observation of tissue.....	24
4. Electron microscopy.....	25
5. Preparation of monoclonal antibody.....	25
6. ELISA.....	25
7. Electrophoresis.....	26
8. Western blots.....	26
9. Viral genomic nucleic acid.....	27
Section 3. Results and Discussions.....	27
1. Isolation and characterization of iridovirus.....	27
2. Survey of the distribution of iridoviruses.....	42
Chapter 3. Development of rapid diagnosis technique by using ELISA and PCR	45
Section 1. Introduction.....	45

Section 2. Materials and Methods.....	47
1. Cell culture and viruses.....	47
2. Purification of viruses.....	47
3. Preparation of monoclonal antibodies.....	48
4. ELISA.....	48
5. Extraction of viral genomic DNA.....	49
6. Genomic DNA cloning and nucleotide sequencing.....	49
7. PCR.....	49
Section 3. Results and Discussions.....	51
1. Preparation of monoclonal antibodies.....	51
2. Gene cloning of iridovirus.....	53
3. Development and application of rapid diagnosis technique by ELISA....	63
4. Development and application of rapid diagnosis technique by PCR.....	66
Reference.....	73

목 차

요약문.....	1
Summary.....	8
제1장 서론.....	19
제1절 연구개발의 목적과 범위.....	19
제2장 Iridovirus의 특성 연구.....	22
제1절 서론.....	22
제2절 재료 및 방법.....	24
1. 세포배양 및 바이러스.....	24
2. 바이러스의 분리.....	24
3. 조직관찰.....	24
4. 전자현미경관찰.....	25
5. 단일클론항체제조.....	25
6. ELISA.....	25
7. Electrophoresis.....	26
8. Western blots.....	26
9. Viral genomic nucleic acids의 준비.....	27
제3절 결과 및 고찰.....	27
1. Iridovirus의 분리 및 특성연구.....	27
2. Iridovirus의 감염실태조사.....	42
제3장 ELISA 및 PCR을 사용한 신속진단법 개발.....	45
제1절 서론.....	45
제2절 재료 및 방법.....	47
1. 세포배양 및 바이러스.....	47

2. 바이러스의 분리.....	47
3. 단일클론항체의 준비.....	48
4. ELISA.....	48
5. Viral genomic nucleic acids의 준비.....	49
6. Genomic DNA cloning 그리고 nucleotide sequencing.....	49
7. PCR	49
제3절 결과 및 고찰.....	51
1. 단일클론항체 제조.....	51
2. Iridovirus의 gene cloning.....	53
3. ELISA를 사용한 신속진단법의 개발 및 현장에의 적용.....	63
4. PCR을 사용한 신속진단법의 개발 및 현장에의 적용.....	66
참고문헌.....	73

제1장 서론

제1절 연구개발의 목적과 범위

최근 들어 세계 여러 지역에서 해산어 양식이 급속한 속도로 증가하는 추세에 있다. 이에 따라 양식 해산어에 전에는 없었던 새로운 질병이 발생하는가 하면 대량폐사도 빈번히 일어나고 있다. 이와 같은 물고기 대량폐사의 원인은 여러 가지가 있을 수 있는데, 가장 중요한 것 중의 하나로 바이러스가 있다. 실제로 양식중인 가자미 (Bloch *et al.*, 1991), 방어 (Inouye *et al.*, 1992; Nakajima & Sorimachi, 1994), 넙치 (Kimura *et al.*, 1986; Iida *et al.*, 1989), 복어 (Inoue *et al.*, 1986), 놀래기 (Yoshikoshi *et al.*, 1990), 그리고 농성어 (Sohn, 1992) 등의 해산어에서 바이러스가 분리되었다는 보고가 있으며 일본, 오스트레일리아, 타이티 그리고 노르웨이 등의 나라에서 해산어의 대량폐사에 의한 양식업계의 피해가 심각한 것으로 보고되고 있다.

바이러스성 질병은 다른 질병과는 달리 한번 발생하면 치료하기가 어렵다. 따라서 바이러스성 질병을 조절하는 가장 좋은 방법으로서는 백신 등을 사용하여 바이러스에 의한 질병 발생을 미리 예방하는 것이다. 그리고 만약 바이러스성 질병이 발생하였다면 그 사실을 조기에 알아내어 다른 정상적인 개체들과 격리시킴으로서 확산되는 것이 피해를 최소화시키는 것이 최선의 방법이다. 그러나, 현재, 어류 바이러스에 대한 백신이 개발된 것이 전혀 없는 상태이기 때문에 바이러스성 질병의 예방을 위한 효과적인 조치를 하기 어렵다. 물론 IPNV (Nagy & Dobos, 1987; Lawrence *et al.*, 1989)와 IHNV (Gilmore *et al.*, 1989; Xu *et al.*, 1991)의 경우 백신 개발을 위한 연구가 상당히 진전된 상태이지만 아직 실용화되지는 않는다. 또한 양식 해산 어류에 질병이 발생하였을 때 그 병원체를 신속 진단하는 방법들이 개발되어 있지 않다. 따라서 질병 발생의 원인

이 바이러스에 의한 것임을 확인하는 데까지는 2-3일에서 일주일 이상이 소요된다. 만약 바이러스에 의한 질병 발생시 이와 같은 기간동안 아무런 조치를 취하지 않고 방치해 둔다면 양어장 전체에 바이러스가 확산되어 결국은 양식어의 대부분이 피해를 입는 결과를 낳게 된다. 따라서 보다 정확하고 신속하게 바이러스를 진단 할 수 있는 방법의 개발이 필요한데, 지금까지 개발된 방법 중 FAT (Fluorescent antibody technique), ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)와 PCR (Polymerase chain reaction) 등이 24시간 안에 바이러스를 정확하게 진단 할 수 있는 방법들로 알려져 있다.

우리 나라에서의 해산어 양식은 1980년대 이후로 급진적으로 증가하기 시작하여 현재에는 남해안 전 해안과 동해안 일부의 지역에서 해산어 양식이 성행하고 있다. 그 결과 해산어 양식업은 우리 나라 국민들의 식생활에 있어서 고급 해산어 단백질의 대중화에 큰 기여를 하고 있으며 또한 해산어 양식을 통하여 농어민들의 소득이 증대되어 농어민들의 생활에 안정을 기할 수 있게 되었다. 그러나 최근 들어 이들 양식 해산어류에 바이러스성 질병이 발생하여 대량폐사에 의한 어민들의 손실이 커짐에 따라 농어민들이 받는 경제적인 타격이 커지게 되었다. 이와 같이 피해가 발생하는 이유는 우리 나라에 아직 해산어류에 발생하는 질병의 정확한 통계 자료가 없으며 또한 이를 조기에 진단 할 수 있는 방법을 개발하지 못하였기 때문에 병원체에 의한 질병 발생시 이를 조절하지 못하기 때문이다. 이와 같은 대량폐사는 주로 치어기에 많이 발생하여 종묘의 부족이 야기되고 부족한 종묘는 일본 등의 외국에서 수입해 오는 경우가 종종 발생하게 된다. 그 결과 외국에 비하여 양식어의 단가가 비싸게 되어 외국 양식업자와의 경쟁에 매우 불리한 입장에 놓인 상황이다. 따라서 이 상태로 농수산물 시장이 개방되면 우리 나라의 양식업은 대부분이 경쟁력을 상실하여 큰 피해를 입을 것으로 생각된다.

우리 나라에서의 물고기 바이러스에 대한 연구는 1982년부터 시작되었는데, 우리나라에서 양식되는 여러 종류의 물고기에서 여러 번에 걸쳐 IPNV를 분리하여 무지개송어 대량폐사의 원인체로서 규명한 바 있다 (Hah *et al.*, 1984; Hedrick *et al.*, 1985; Park *et al.*, 1989). 또한 1991년 초에는 대량폐사가 발생한 무지개송어 치어에서 IHNV

가 분리되어 IHNV도 무지개송어 대량폐사의 원인체임을 밝혀 내었으며 (Park et al., 1993). 그리고 최근 몇년전부터 양식 중이던 해산어인 능성어 (Sohn, 1992), 넙치 (Sohn et al., 1995) 등의 해산어에서 발생한 대량폐사에서 바이러스를 분리한바 있다.

Iridovirus는 정 20면체의 모양을 지닌 DNA virus로서 양식중인 방어 (Inouye et al., 1992; Nakajima & Sorimachi, 1994), 농어 (Langdon et al., 1986), 철갑상어 (LaPatra et al., 1994) 등에 감염하여 많은 피해를 주고 있는 바이러스로 보고되고 있다. 특히 일본에서 양식중인 방어의 경우 iridovirus 감염에 의한 질병으로 인하여 치어 및 성어 60%가 폐사 되는 피해를 입는 것으로 보고되고 있다 (Inouye et al., 1992). 우리나라의 경우 iridovirus가 양식 해산어에 대량 폐사를 유발하고 있는 일본에서 넙치, 방어, 복어, 능성어 등의 해산어를 수입하여 해산어 양식을 시작하였고, 또한 수시로 일본으로부터 해산어의 치어를 수입하여 왔다. 이로 미루어 볼 때, 우리나라에서 양식중인 해산어류에 iridovirus가 감염되어 있을 확률이 매우 높다. 실제로 몇년전, 양식 중이던 참돔 및 방어 등의 해산어에 바이러스성 질병이 발생하여 대량폐사가 발생하였는데, 병중세로 판단하였을 때 iridovirus에 의한 것으로 생각되었다 (Sohn & Park personal communication). 따라서 본 연구에서는 우리나라의 양식 해산어에 감염하는 iridovirus의 특성을 조사하고 ELISA 및 PCR을 사용한 신속진단법을 개발하여 이 바이러스의 확산을 조기에 막음으로써 양식어민들의 피해를 최소화시키고자 한다. 그리고 여기에서 얻어지는 결과들은 이후에 iridovirus의 백신 개발에 필요한 기초 자료들이 될 수 있다.

제2장 Iridovirus의 특성 연구

제1절 서론

Iridovirus는 정 20면체의 모양을 지닌 DNA virus로서 세포질에서 증식하는 특성을 지닌다. 이 바이러스의 family에는 4개의 genera가 있는데, 곤충에 감염하는 type 1과 2 (Iridovirus 와 Chloriridovirus), 양서류에 감염하는 type 3 (Ranavirus), 그리고 어류에 감염하는 type 4 (Lymphocystisvirus) 등이 그것들이다. 어류에 감염하는 iridovirus의 대표적인 바이러스로써 lymphocystisvirus가 있다. 이 바이러스는 어류에 감염하여 어체의 피부세포의 비대증을 유발하여 결과적으로 papilloma-like tumor를 유발한다 (Lopez *et al.*, 1969). Lymphocystisvirus는 전 세계에 걸쳐 다양한 종류의 어종에 감염하여 tumor를 유발하는 것으로 보고되고 있는데 특히 넙치와 가자미류에 질병의 발생 빈도가 높다. 따라서 lymphocystisvirus에 대한 연구는 주로 넙치와 가자미에 감염하는 바이러스를 주 대상으로 삼아 왔는데, 이들 바이러스의 genomic DNA를 추출하여 제한효소로 잘라본 결과 넙치에 감염하는 lymphocystisvirus와 가자미에 감염하는 lymphocystisvirus는 서로 다른 digestion pattern을 보임이 확인되었다. 이로부터 lymphocystisvirus를 2종류의 strain으로 구분하고 있는데, 넙치에 주로 감염하는 것은 strain 1, 그리고 가자미에 주로 감염하는 것을 strain 2로 명명하였다 (Schnitzler & Darai, 1989).

최근 들어, 어류에 감염하는 iridovirus로써 lymphocystis와는 다른 병리학적인 특성을 보이는 바이러스가 발견되었다. 이 바이러스는 어체의 피부에 종양을 유발하지 않고 반면에 비장, 신장, 간, 심장 등에 비대세포를 유발하며 폐사를 유발시키는 병리적인 특성을 지니고 있다 (Inouye *et al.*, 1992). 이 바이러스의 genomic DNA에 대한 분석결과가 거의 없어 lymphocystisvirus와의 연관관계는 정확하게 알 수 없다. 그러

나 이 바이러스의 genomic DNA fragment에 대한 clone의 염기서열은 (Miyata *et al.*, 1997) lymphocystisvirus와는 유사도가 매우 낮은 것으로 나타났다. 이와 같이 병리학 적 특성과 genomic DNA의 특성이 다른 것으로부터 어류에 감염하여 폐사를 유발하는 iridovirus는 tumor를 유발하는 iridovirus인 lymphocystisvirus와는 다른 종임이 제시되고 있다. 어류에 폐사를 유발하는 iridovirus는 여러 종류의 양식 어류에 감염하는 것으로 알려져 있는데, 양식 방어 (Inouye *et al.*, 1992; Nakajima & Sorimachi, 1994), 농어 (Langdon *et al.*, 1986), 철갑상어 (LaPatra *et al.*, 1994) 등에 감염하여 많은 피해를 주고 있다. 특히 일본에서 양식중인 방어의 경우 iridovirus 감염에 의한 질병으로 인하여 치어 및 성어 60%가 폐사 되는 피해를 입는 것으로 보고되고 있다 (Inouye *et al.*, 1992).

우리 나라의 경우 1964년부터 해산어 양식을 시작하여 현재에는 남해안 일대를 중심으로 해산어 양식이 성행되고 있는 실정이다. 양식되는 해산어는 넙치가 전체의 약 70 %를 차지하고 있으며 이외에도 참돔, 방어, 농성어, 도미 복어 등 다양한 종류들이 있다. 이들 해산어 양식은 일본에서 해산어를 수입하여 해산어 양식을 시작하였고, 또한 수시로 일본으로부터 해산어의 치어를 수입하여 왔다. 이로 미루어 볼 때, 우리나라에서 양식중인 해산어류에 일본에서 질병을 유발하고 있는 iridovirus가 감염되어 있을 확률이 매우 높다. 실제 넙치의 경우 iridovirus의 감염에 의한 피부종양이 발생하여 많은 피해가 발생한다는 양식업자들의 보고가 있었다. 그리고 양식 중이던 참돔 및 방어 등의 해산어에 바이러스성 질병이 발생하여 대량폐사가 발생하였는데, 병증세로 판단하였을 때 iridovirus에 의한 것으로 생각되었다 (Sohn & Park personal communication). 따라서 본 연구에서는 우리나라의 양식 해산어에 감염하는 iridovirus의 특성을 조사하고 이들의 분포 상황을 조사하고자 한다.

제2절 재료 및 방법

1. 세포배양 및 바이러스

Iridovirus의 숙주세포로서 CHSE-214 (Chinook Salmon Embryos), FHM (Fathead minnow), GF (Grunt fin)를 사용하였다. 세포는 fetal bovine serum이 10% 첨가된 minimum essential medium (MEM)을 사용하여 CHSE-214와 FHM은 20°C에서, 그리고 GF는 25°C에서 배양하였다. Iridovirus 시료는 종양에 걸린 넙치와 폐사가 일어난 참돔, 방어 등의 조직에서 취하였다.

2. 바이러스의 순수분리

종양 조직 혹은 죽어 가는 해산어의 신장, 간장 조직을 TNE 완충용액 (0.01 M Tris, pH 8.0, 0.1 M NaCl, 0.001 M EDTA)에서 homogenization한후 3000 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 상등 액을 취하여 30 % sucrose (w/w) cushion상에서 25000 rpm에서 120 분 동안 원심분리를 하였다. 침전물을 TNE 완충용액으로 재현탁 시킨 다음 sucrose gradient (25 - 60 % continuous)상에서 25000 rpm x 20 시간, CsCl gradient (10 - 35 %)상에서 30000rpm x 24 시간의 연속적인 원심분리를 하여 iridovirus를 순수분리 하였다.

3. 조직관찰

종양조직 혹은 죽어 가는 해산어의 신장, 간장 등의 조직을 10% 포르말린에 고정하였다. 파라핀 포매법에따라 alcohol (70-100%)로 탈수과정을 거친 다음 toluene 용액에 시료를 1시간씩 3회 담근 후 파라핀으로 침투 시켰다. 파라핀 절편을 4 μ m 두께로 제작한 후 hematoxylin-eosin염색과 pyronin methyl green 염색을 하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

4. 전자현미경 관찰

종양조직 혹은 죽어 가는 해산어의 신장, 간장 등의 조직을 2.5% glutaraldehyde (pH 7.2, 4°C)에 4시간 전 고정하고 1% osmium tetroxide (pH 7.2)로 실온에서 2시간동안 후고정 하였다. Alcohol로 탈수하여 propyleneoxide로 치환한 후 EPON 혼합물로 열 중합 처리를 하였다. 열 중합 처리된 시료를 ultramicrotome (LKB, Nova, Sweden)으로 60-90 nm씩 자르고 grid에 부착하여 uranyl acetate로 염색한 후 투과 전자현미경 (JOEL 1200 EX-2)으로 virus입자를 관찰하였다.

5. 단일클론항체 제조

순수 분리된 바이러스를 Balb/c mouse의 복강에 5 µg씩 주사를 함으로써 면역을 시켰다. 첫 번째 면역은 단백질을 Freund complete adjuvant와 emulsification 시킨 후 복강에 주사함으로서 행하였고 두 번째 이후부터는 Freund incomplete adjuvant와 emulsification 시킨후 주사하였다. 이와 같은 방식으로 4번을 주사한후 마지막 주사시 단백질을 adjuvant를 사용하지 않고 정맥주사를 하여 면역 시켰다. Balb/c mouse에 마지막 정맥주사를 한 후 4일째에 spleen을 취하였다. Spleen cell과 SP-2/0 myeloma cell을 10:1 비율로 섞은 후 PEG 용액 (45% PEG-1500, 5% DMSO, 50% serum-free DMEM)을 사용하여 fusion 시켰다. Fusion된 세포를 fetal bovine serum이 15% 첨가된 HAT media (0.1 mM hypoxanthine, 4×10^{-4} mM aminopterin, 1.6×10^{-2} mM thymidine in DMEM)에 suspension 시킨후 96 microwell plate에 0.2 ml씩 넣었다. 약 3주동안 5일마다 새 HAT media로 갈아주고 다시 1주일동안 aminopterin이 없는 HT media로 갈아주었다. 이후 배양액을 취하여 ELISA로 iridovirus에 대한 항체를 내는 hybridoma를 골라내었다.

6. ELISA

Iridovirus에 대한 단일클론항체를 내는 hybridoma를 선별하기 위하여 ELISA를

수행하였다. Coating buffer (0.5 M carbonate-bicarbonate, pH 9.6)에 순수 분리된 바이러스를 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도가 되도록 준비한 후 ELISA용 96 well plate에 넣어 4°C에서 16시간동안 coating하였다. Plate를 PBS로 washing한 후 1% BSA-PBS (1% BSA in PBS) 용액을 첨가하여 상온에서 1시간동안 반응시킴으로서 blocking하였다. Plate를 PBS-Tween 20 (0.05% Tween 20 in PBS)으로 washing한 후 각 well에 적절하게 hybridoma의 배양액을 넣고 상온에서 2시간동안 반응시켰다. PBS-Tween을 사용하여 plate를 3번 washing한 후 alkaline phosphatase가 붙어 있는 second antibody를 첨가하였다. 상온에서 2시간동안 반응시킨후 PBS-Tween으로 3번 washing하고 substrate (1 mg of p-nitrophenyl phosphate/ml of 9.7% diethylamine, pH 9.8)를 넣었다. 상온에서 30분간 반응시킨후 3 M NaOH용액 50 μl 씩을 넣어 반응을 중지 시킨 다음 405 nm에서 OD값을 측정하였다.

7. Electrophoresis

단백질의 전기영동은 Laemmli (1970)의 방법에 따라 행하였다. 순수 분리된 바이러스를 10% polyacryamide slab gel에 loading한 후 150V에서 전기영동을 하였다. Gel을 고정한 후 coomassie blue를 사용하여 단백질을 염색하였다. 바이러스 단백질의 분자량은 표준단백질의 이동거리와 비교하여 결정하였다.

8. Western blots

순수 분리된 바이러스를 SDS-PAGE gel 상에서 전기영동을 한 후 다시 transfer buffer (25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM glycine, 20% methanol)를 사용하여 40 mA에서 16 시간동안 전기영동 함으로서 gel에 있는 단백질 band를 nitro cellulose (NC) paper에 옮겼다. NC paper를 PBS로 washing한후 1% PBS-BSA 용액에 1 시간동안 담가 두어 blocking 시켰다. NC paper를 PBS-Tween 20 (0.05%)으로 적당히 희석시킨 단일클론항체 (혹은 어류혈청)에 넣어 상온에서 2시간동안 반응 시켰다. PBS-Tween으로 NC paper를

washing한후 alkaline phosphatase가 붙어 있는 second antibody와 상온에서 2 시간동안 반응 시켰다. PBS-Tween으로 washing한 다음 BCIP/NBT phosphatase substrate (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate sodium salt 0.15 mg/ml, p-nitro blue tetrazolium chloride 0.3 mg/ml in carbonate buffer (0.1 M NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, pH 9.8))를 첨가하였다. 상온에서 15분 동안 발색 시킨후 증류수로 washing하여 반응을 중지 시켰다.

9. Viral genomic nucleic acids의 준비

순수 분리된 virus를 STE (0.1M NaCl, 20mM Tris-HCl, 1mM EDTA)에 현탁을 시킨후 proteinase K와 SDS를 첨가하여 (1mg/ml, 1% respectively) 60°C에서 60분간 반응시킴으로서 바이러스를 깬다. Wizard genomic DNA purification kit (Promega)를 사용하여 viral genomic DNA를 추출하였다. 이와 같이 하여 준비한 viral genome의 종류를 확인하기 위하여 DNase I, RNase H, S1 nuclease를 처리한 다음 핵산의 잘라지는 양상을 관찰하였다. 또한 gene cloning하기 위한 준비단계로써 viral genome을 EcoR I, Sma I, Pst I과 BamH I 등으로 잘라 pattern을 확인 하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. Iridovirus의 분리 및 특성연구

Iridovirus는 DNA virus로써 외막이 없고 숙주세포의 세포질에서 증식을 하는 바이러스를 통칭하여 말한다. Iridovirus는 넙치, 가자미, 틸라피아 등의 해산어에 감염하여 종양을 유발하는 것으로 알려져 있었다 (Lopez *et al.*, 1969; Schnitzler & Darai, 1989). 그런데 최근 들어 Iridovirus는 미국, 일본 등에서 양식중인 방어

(Inouye *et al.*, 1992; Nakajima & Sorimachi, 1994), 농어 (Langdon *et al.*, 1986), 철갑상어 (LaPatra *et al.*, 1994) 등의 해산어에 iridovirus가 감염하여 종양을 유발하지 않은 상태로 이들 양식어류들을 폐사 시킴이 확인되었다. 이와 같이 서로 다른 병원성을 보이는 iridovirus가 같은 type의 것들인 지 아니면 연관 관계가 먼 서로 다른 type의 것인 지는 아직은 확인되지 않았다.

우리 나라에서 양식되는 해산어에서도 위에서 언급한 두종류의 iridovirus에 의한 감염증세가 모두 발견되어 본 연구진은 서로 다른 병원성을 보이는 두종류의 iridovirus 모두를 분리하여 특성을 확인 하고자 하였다.

먼저 우리 나라에서 양식되는 넙치에 발생한 종양 (Fig. 1)을 시료로 하여 바이러스를 분리하여 특성 확인을 하였다. 일반적으로 종양은 어체의 바깥부분에 발생하였는데, 주로 지느러미부분에 집중되어 있으며 경우에 따라서는 체표와 입 주위에서도 발생하였다. 피부에 발생한 종양은 양성 종양으로써 양식넙치를 폐사 시키지는 않았다. 그러나 종양이 심하게 발생하고 또한 종양에 상처가 난 개체의 경우 2차 감염과 빈혈로 인하여 죽는 경우도 발생하였다. 피부종양 부위의 조직을 관찰하기 위하여 절편을 제작하여 현미경으로 관찰하여 보았다. 그 결과 iridovirus에 감염된 세포의 전형적인 특징인 거대세포들(lymphocystis)이 관찰되었다 (Fig. 2). 다음으로 종양에 존재하는 거대세포의 내부를 절편을 전자현미경으로 관찰한 결과 세포질에서 직경 200 nm 정도의 외막이 없는 바이러스 입자들이 관찰되었다 (Fig. 3). 이 바이러스의 특성을 정확하게 확인하기 위하여 바이러스 입자들을 sucrose 상에서 초원심분리를 통하여 순수분리 한 후 전기영동으로 바이러스의 핵산 및 구조 단백질의 특성을 확인하여 보았다. 먼저 이 바이러스의 핵산이 어떤 종류인지를 확인 하고자 추출한 바이러스 핵산을 DNaseI, S1 nuclease 그리고 RNase를 처리하였다. 그 결과 이 바이러스의 핵산은 DNaseI에는 잘렸으나 S1 nuclease와 RNase에는 전혀 잘리지 않았다 (Fig. 4). 이 결과로부터 이 바이러스의 핵산은 dsDNA임을 확인 할 수 있었다. 그리고 SDS-PAGE를 통하여 이 바이러스의 구조단백질을 분석한 결과 약 30 개의

구조단백질들을 지니고 있음이 확인되었다 (Fig. 5). 이상의 결과들은 우리 나라의 양식 넙치에 종양을 유발하는 병원체가 iridovirus임을 말하여 준다. 그런데 이 바이러스의 구조단백질을 pattern을 SDS-PAGE로 분석한 결과로부터 우리 나라에 분포하고 있는 종양 유발 iridovirus에는 서로 다른 구조단백질 pattern을 지니는 두 group이 존재함이 확인 되었다 (Fig. 5). 이전의 보고 (Schnitzler & Darai, 1989)에서도 종양을 유발하는 iridovirus에 2종류의 strain이 있음이 보고 되었다. 즉, 넙치에 감염하는 strain 1과 가자미에 감염하는 strain 2로 구분이 되었다. 그러나 본 연구 결과에 따르면 우리 나라의 넙치에 감염하는 iridovirus에 단백질 pattern이 다른 두종류가 존재함이 확인 되었다.

다음으로 양식 방어의 치어에 폐사를 유발하는 iridovirus를 분리하였다. 1994년도 우리 나라 남해안 일대에서 양식 증이던 방어 및 참돔의 치어에 iridovirus 감염증을 보이며 대량폐사가 발생하였다. 이들 치어의 일부는 일본에서 수입한 것이며 나머지 일부는 우리 나라에서 부화시킨 것들이었다. 폐사된 어체의 신장, 간 등의 조직을 취한 후 이들 조직의 추출물을 GF, FHM, CHSE-214 등의 세포에 접종을 하였다. 그 결과 세포에 iridovirus에 의한 CPE가 관찰되었다 (Fig. 6). 이후 이 바이러스를 양식 방어 및 참돔에 재감염 시킨 결과 안구가 돌출 되고 체표가 검어지며 죽는 증세가 관찰되었다. 죽은 개체의 신장, 간 등의 조직을 절편 하여 현미경으로 관찰한 결과 Fig. 7에서와 같이 비장 조직에 iridovirus감염된 세포의 전형적인 특징인 거대세포들이 확인 되었다. 거대세포의 내부를 전자현미경으로 관찰한 결과 Fig. 1에서와 같은 형태의 iridovirus가 세포질에서 관찰되었다 (Fig. 8). 이 결과로부터 1994년 남해안 일대에 발생하였던 방어 및 참돔의 폐사는 iridovirus에 의한 것임이 확인 되었다.

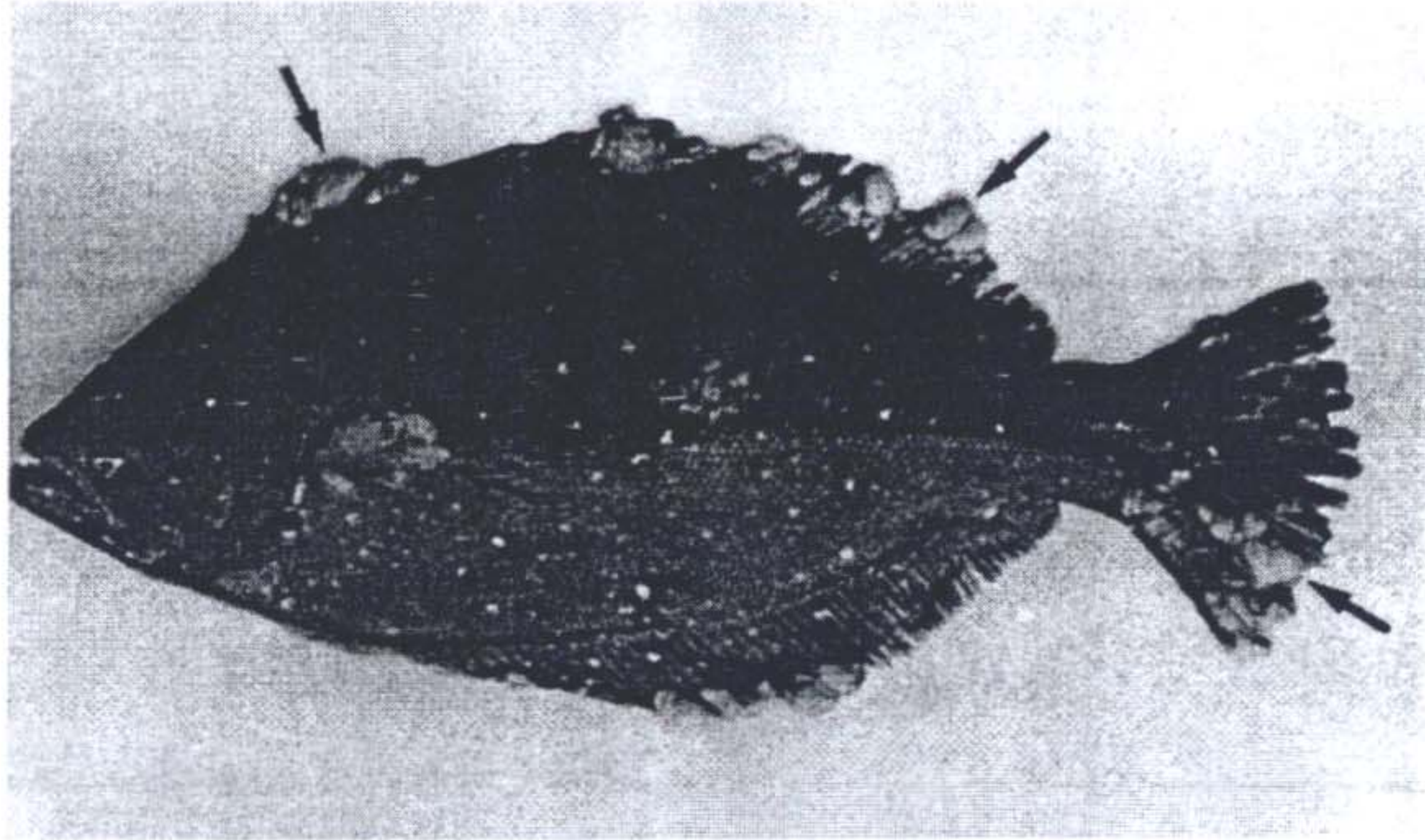


Fig. 1. A photograph of diseased flounder. Arrows indicate the benign papilloma-like lesions developed on the body surface of the flounder.

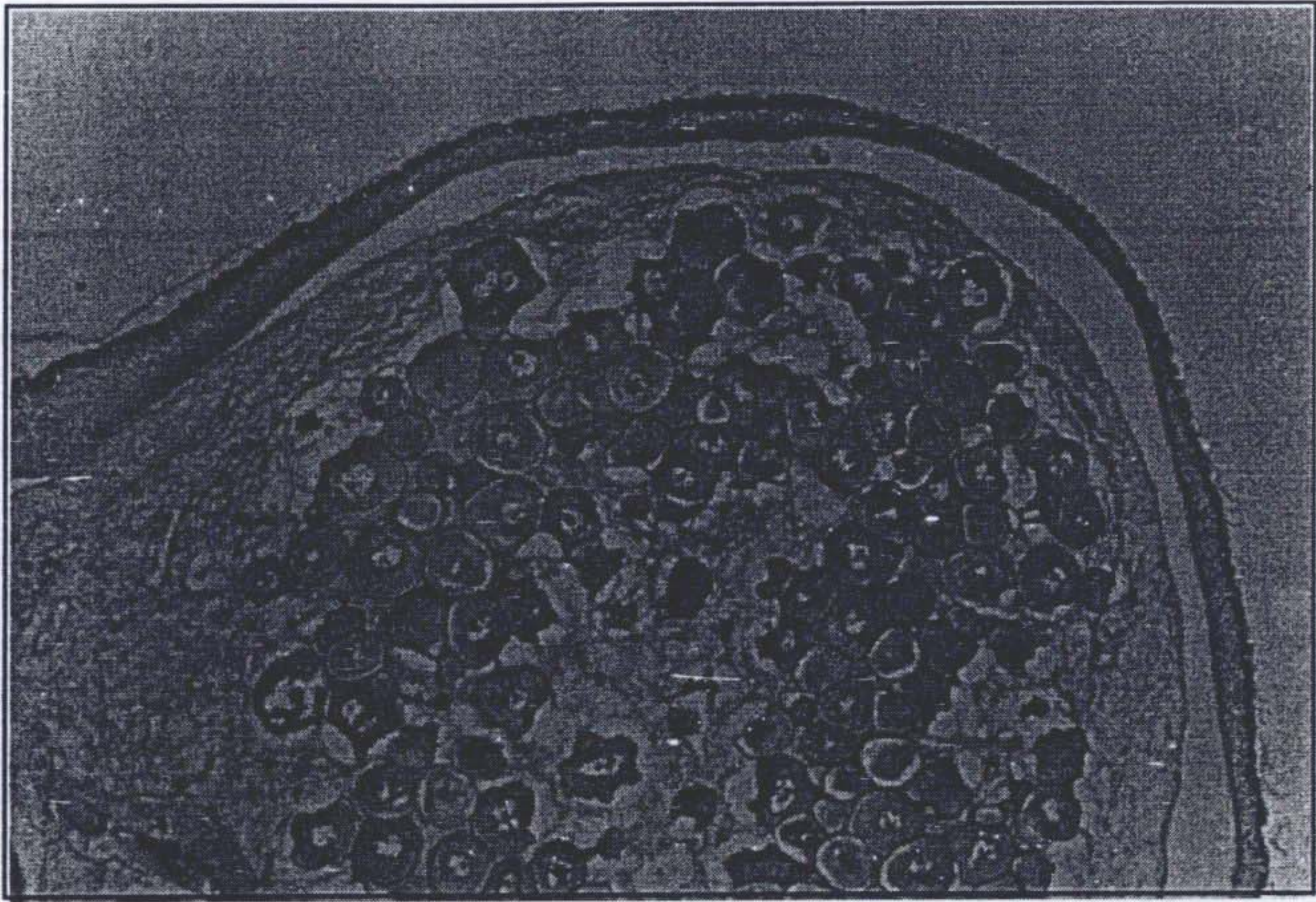


Fig. 2. Lymphocystis cells in the benign papilloma-like lesions as shown in Fig. 1. H-E stain.

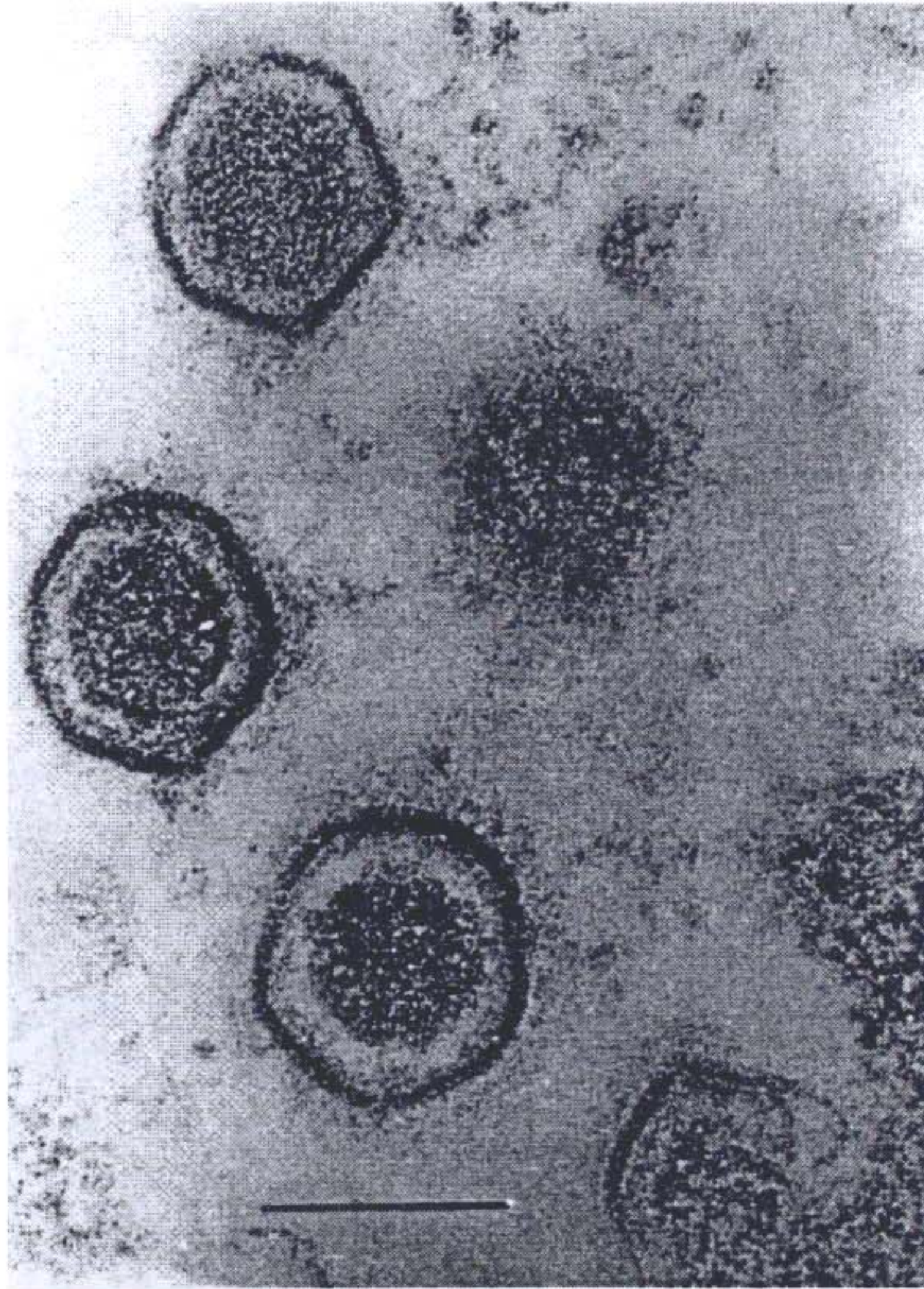


Fig. 3. Electron microscopy of iridoviruses in the lymphocystis cells of the papilloma-like lesions of a flounder. Bar, 250 nm.

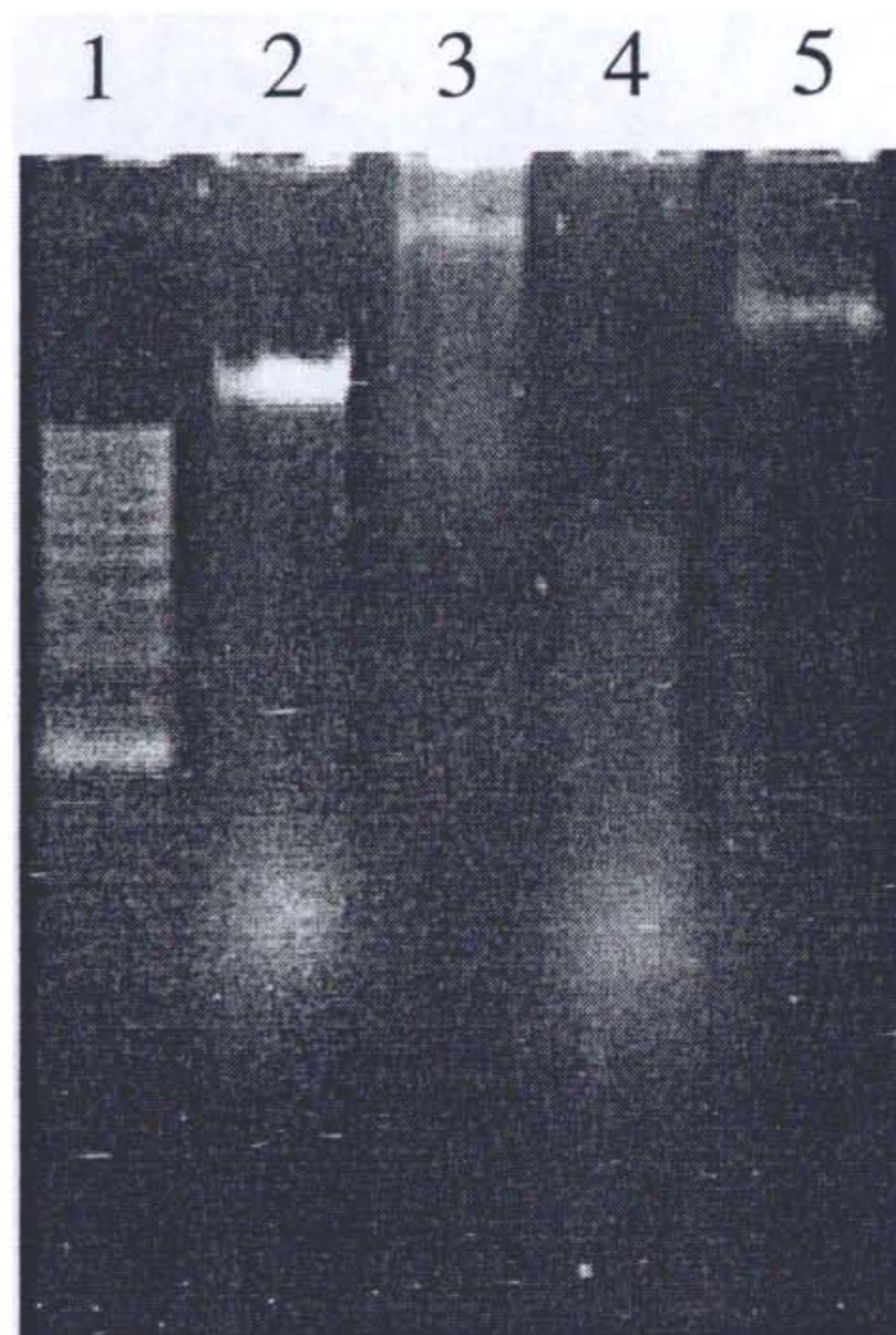


Fig. 4. Nuclease digestion of genomic DNA of iridovirus. The genomic DNA was digested with (lane 3) RNaseH, (lane 4) DNaseI and (lane 5) S1 nuclease and then analyzed by electrophoresis on 1 % agarose gel. Lane 1, DNA ladder marker; lane 2, intact genomic DNA.

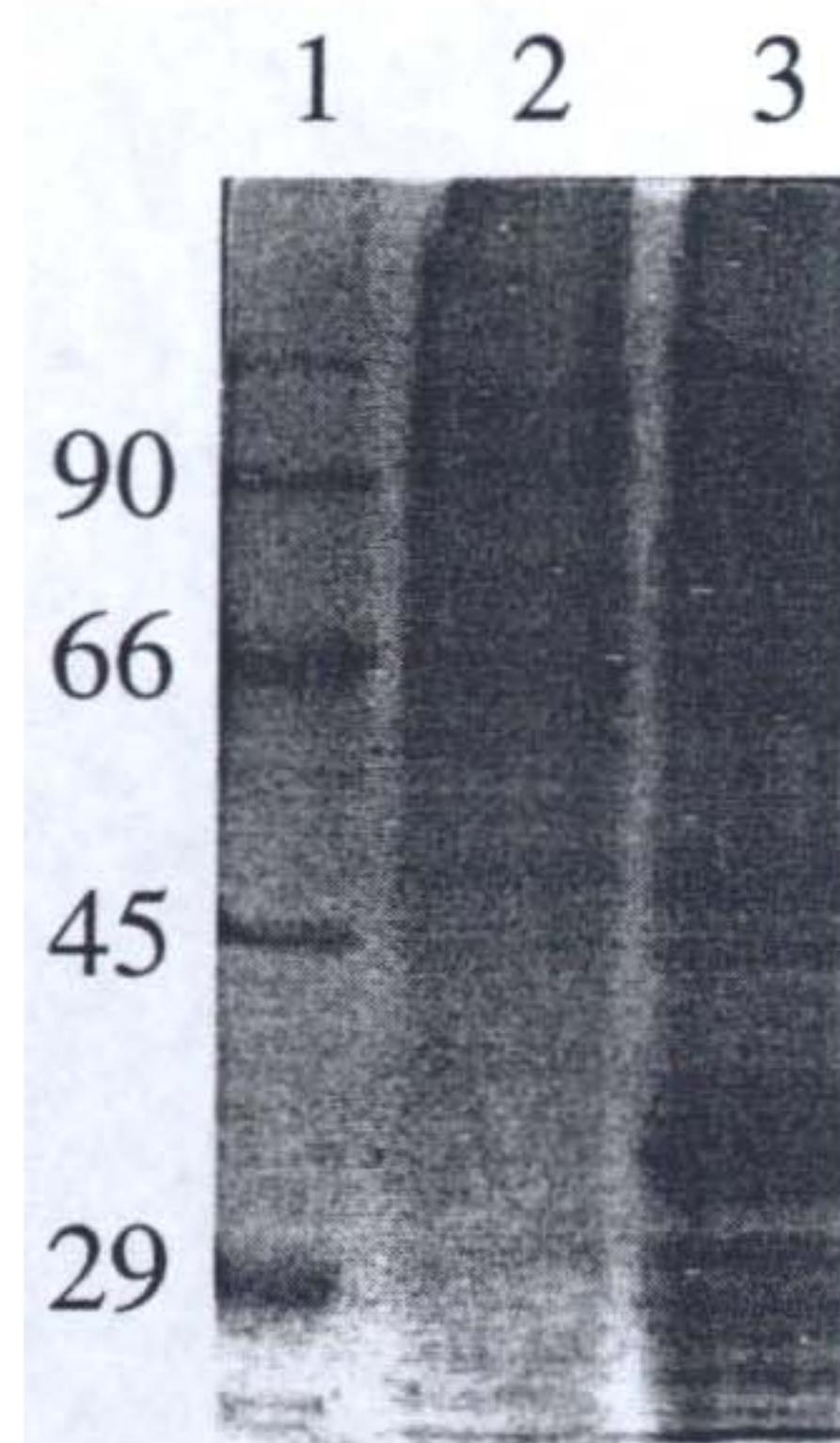
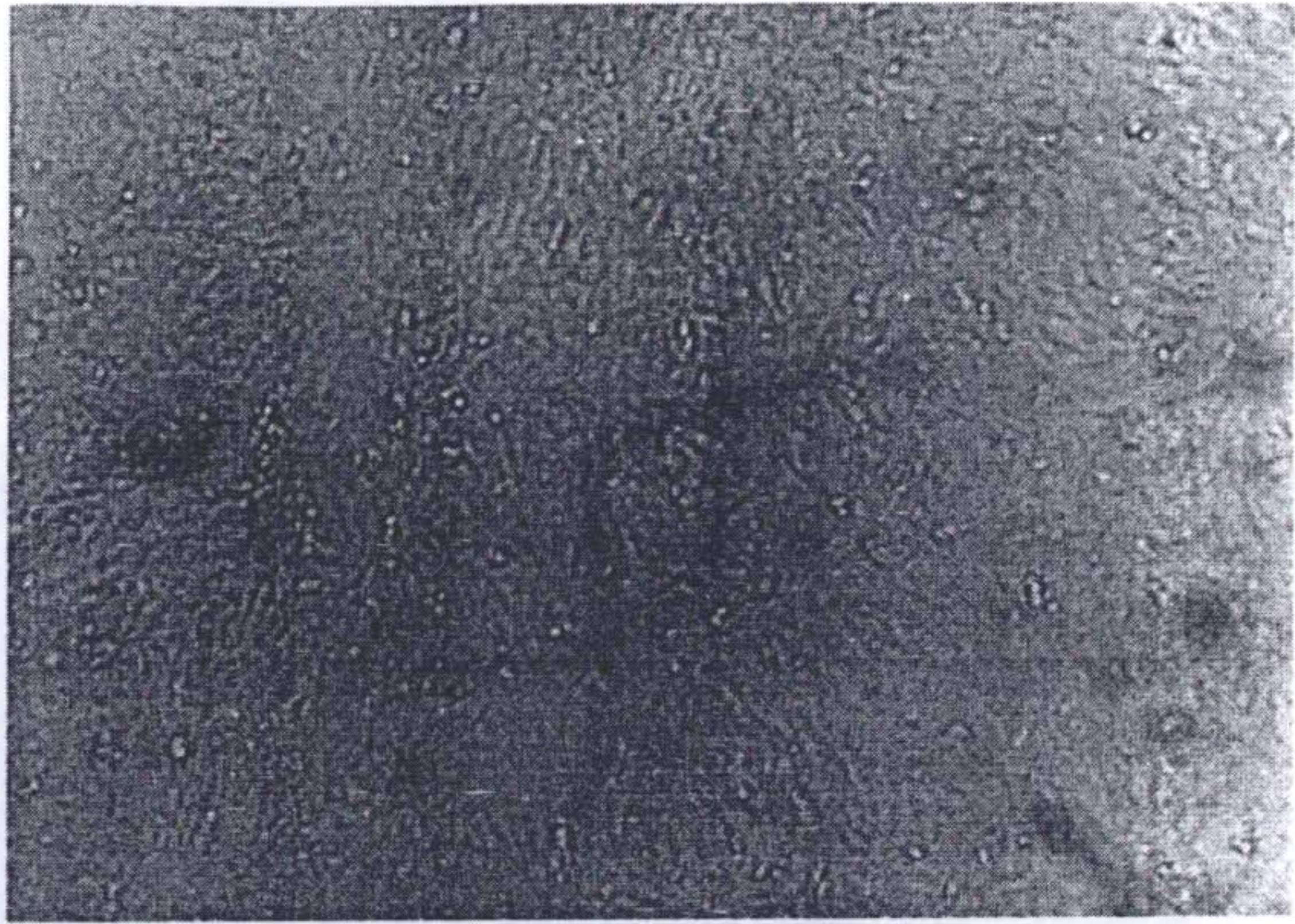


Fig. 5. Comparisons of the structural polypeptides of iridoviruses. Iridoviruses were isolated from the papilloma-like lesion of flounders collected from aquacultures located at Southern (lane 2) and Southeastern (lane 3) parts of Korean peninsular. Polypeptides of purified iridoviruses were analyzed on 10 % SDS-PAGE. The polypeptides on the gel were visualized by coomassie blue staining. Lane 1, molecular weight size marker.

A

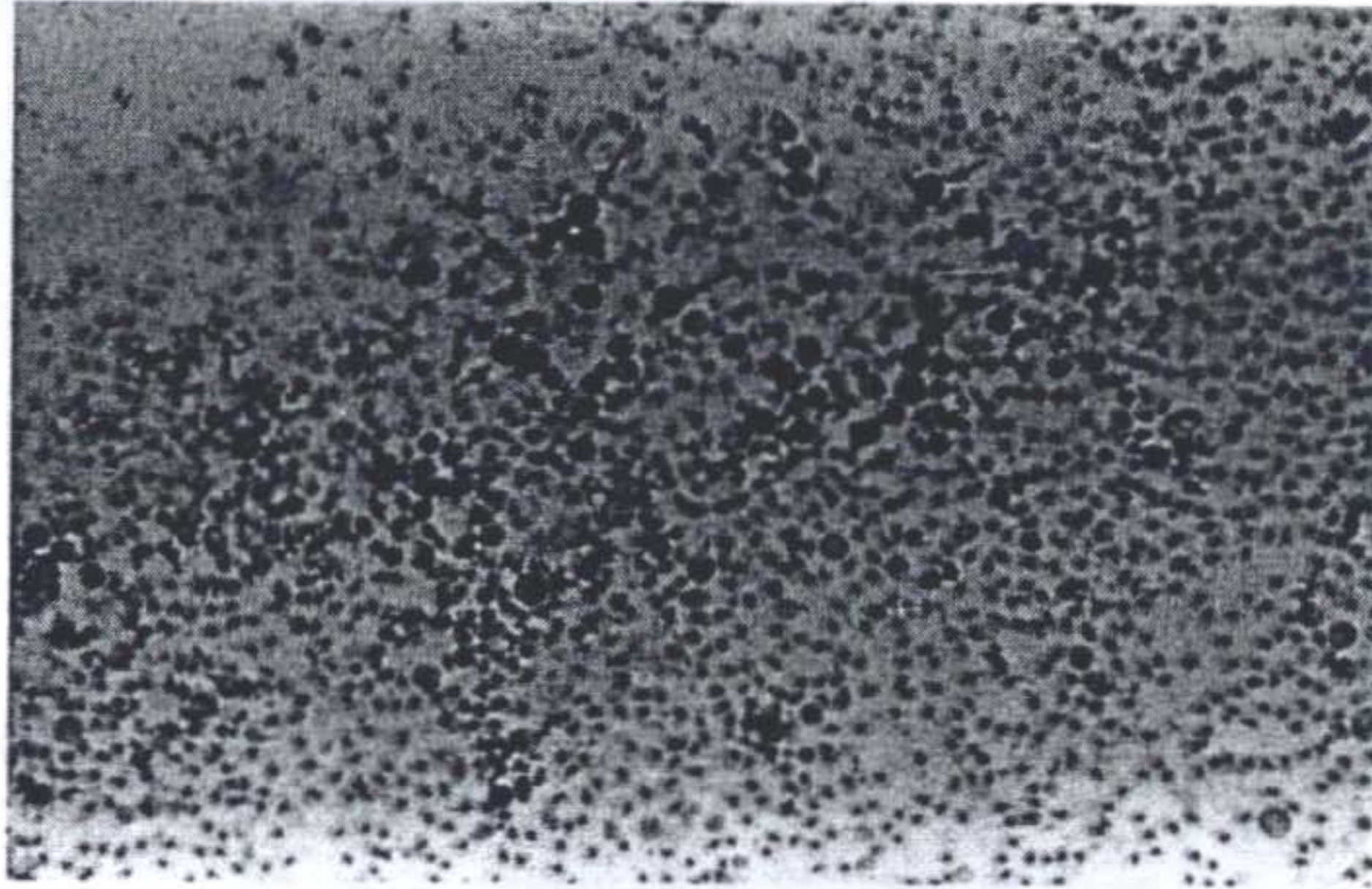


B



Fig. 6. Light microscophs of GF cells. (a) Mock-infected cells and (b) iridovirus-infected cells.

A



B

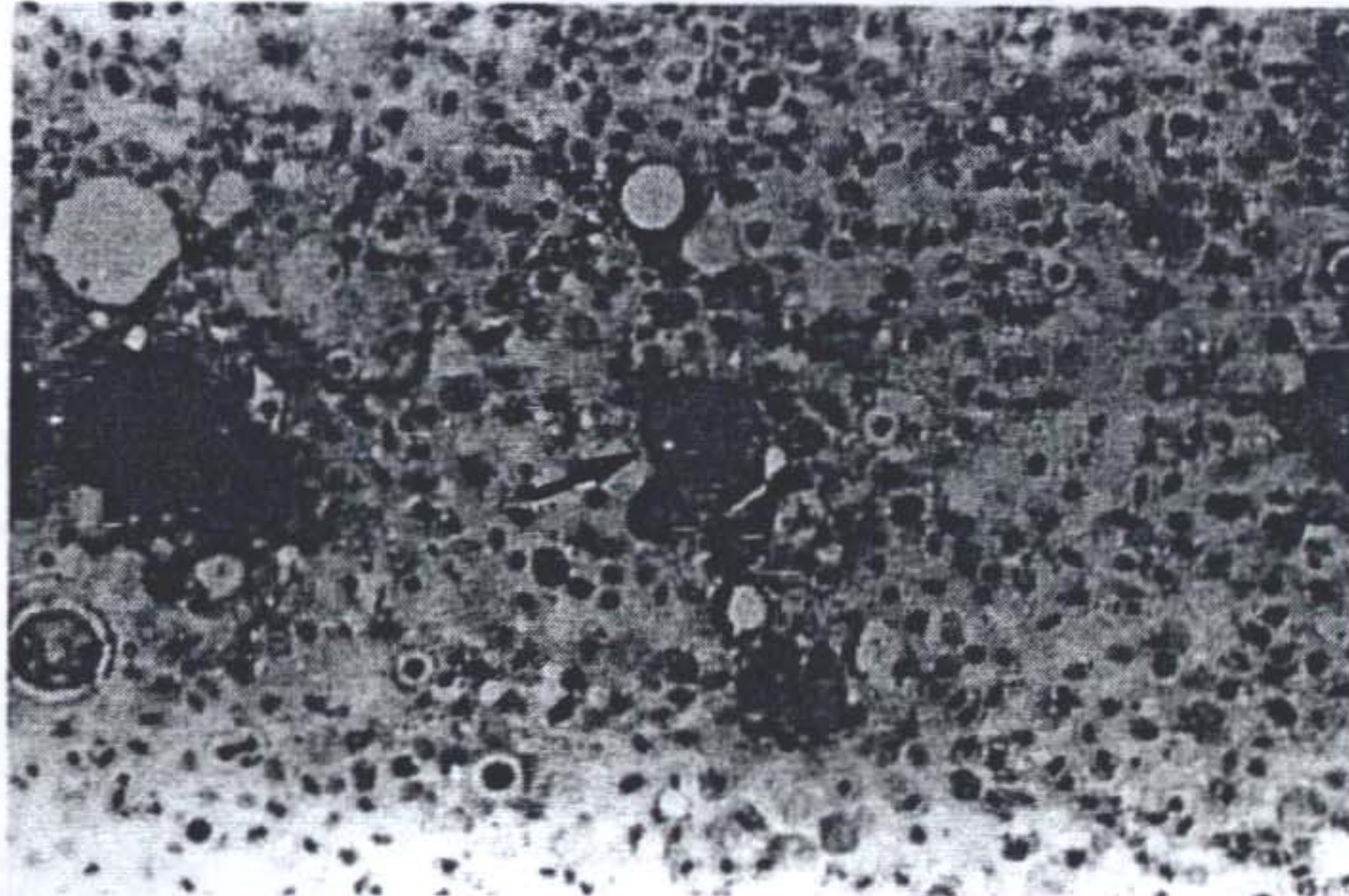


Fig. 7. Photograph of virus-infected cells in the spleen. Arrows indicate heteromorphous balloon cells. A, 10X; B, 40X.

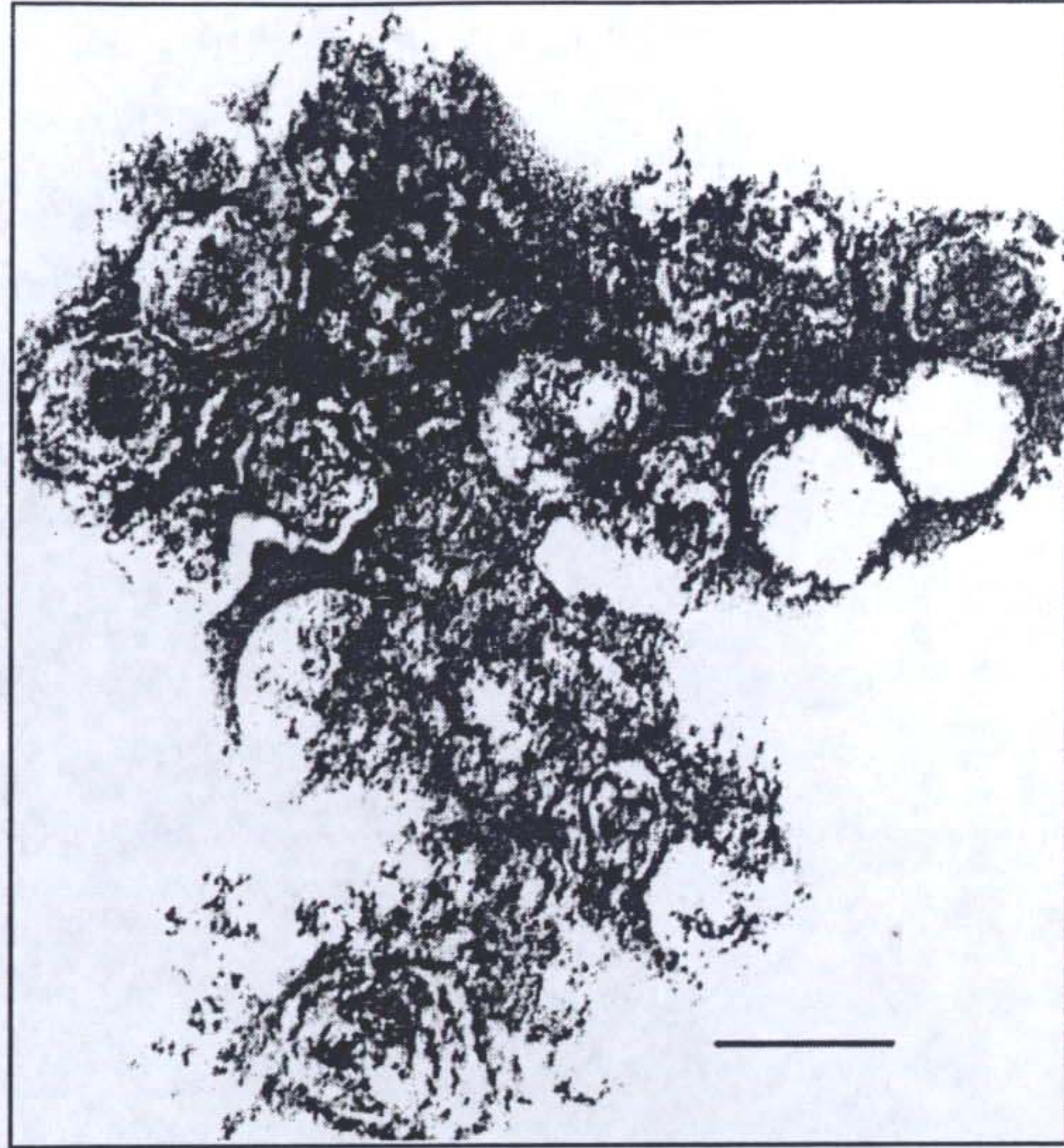


Fig. 8. Electron microscopy of red sea bream iridovirus in the kidney of the virus-infected red sea bream. Bar, 250 nm.

우리 나라에서 분리된 종양을 유발하는 iridovirus와 폐사를 유발하는 iridovirus가 같은 특성을 지니고 있는지의 여부를 확인하기 위하여 비교실험을 수행하였다. 먼저 각 바이러스들을 순수 분리한 다음 SDS-PAGE를 통하여 구조단백질들의 pattern을 비교하여 보았다. 그 결과 이들 두 바이러스는 서로 다른 구조단백질을 지니고 있음이 확인 되었다 (Fig. 9). Iridovirus는 앞에서 설명한 바와 같이 약 30 종류의 구조 단백질들을 지니고 있다. 이들중 어느 것이 면역 유도 특성이 있는 지를 확인하기 위하여 단일클론 항체들과 (제 3장에서 설명) iridovirus에 감염된 넙치의 혈청을 사용한 Western blotting 실험을 수행하였다. 먼저 단일클론 항체의 경우 분자량 150 kDa의 단백질과 반응을 하는 것이 관찰되었다. 이로부터 이 구조 단백질이 면역 유도 특성이 있음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 10). 그러나 이 결과는 mouse의 면역 반응을 유도하는 단백질을 말하는 것으로써 실제 해산어에서는 어떤 구조단백질이 면역 유도 특성이 있는 지를 확인 할 필요가 있었다. 따라서 iridovirus 에 감염된 넙치의 혈청을 사용한 Western blotting을 수행하여 확인 한 결과 iridovirus의 구조단백질들 중 분자량 150 kDa, 66 kDa, 45 kDa 등의 세종류 단백질이 넙치에서 면역 유도 특성이 있음이 확인되었는데 이중 150 kDa 단백질이 가장 강한 반응을 보였다 (Fig. 10). 이 결과는 이후에 iridovirus에 대한 vaccine을 개발하고자 할 때 대상 단백질을 결정할 수 있는 중요한 정보를 제공하여 준다.

다음으로 종양을 유발하는 iridovirus에 대한 단일클론항체가 폐사를 유발하는 iridovirus와도 반응을 할 수 있는지를 Western blotting을 통하여 확인하였다. 그 결과 이 단일클론항체가 폐사를 유도하는 iridovirus와는 반응하지 않음이 확인 되었다 (Fig. 11). 이상의 결과들로부터 해산어에 종양을 유발하는 iridovirus와 폐사를 유발하는 iridovirus는 서로 다른 특성을 지니고 있음이 확인 되었다.

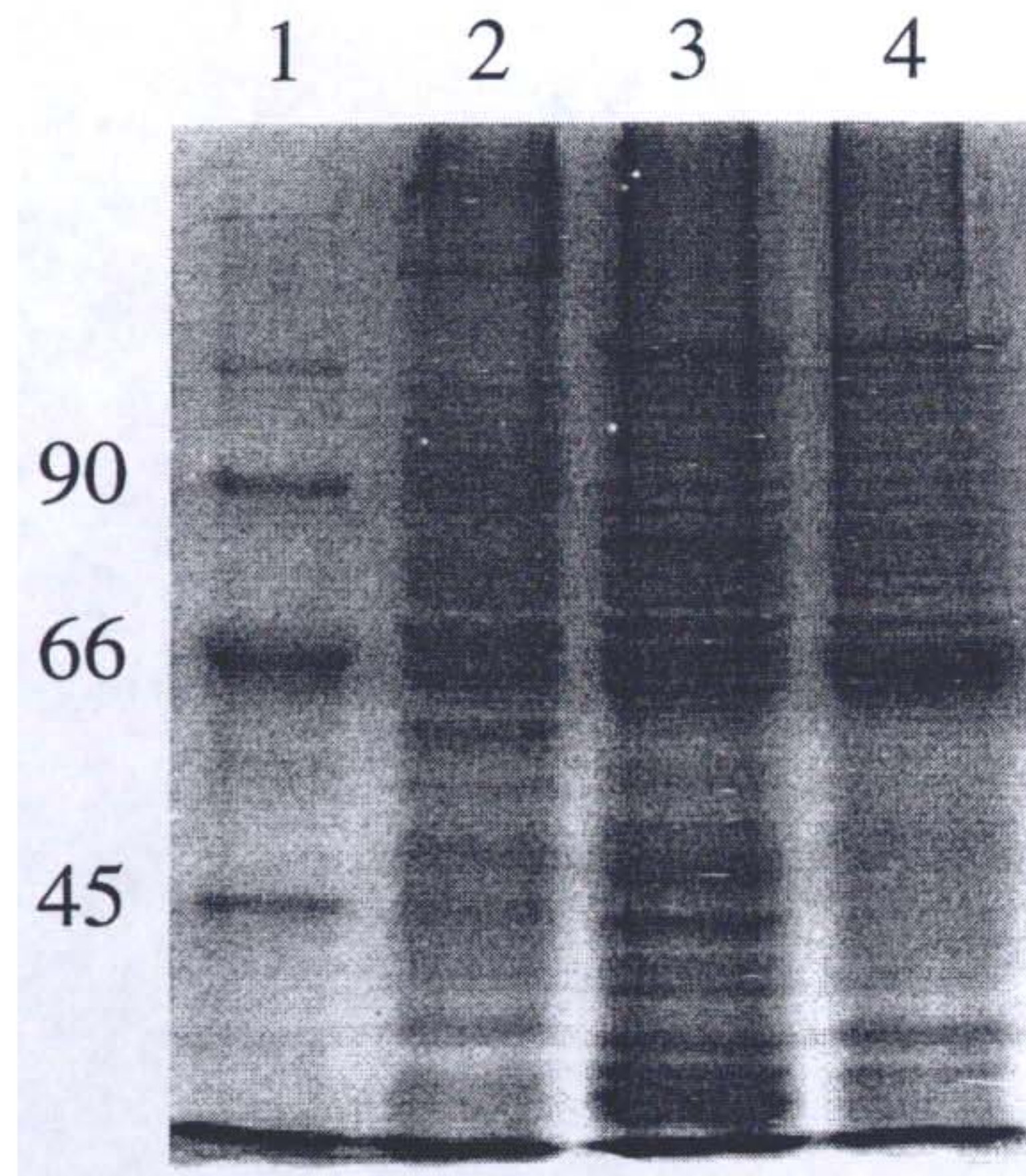


Fig. 9. Comparison of the structural polypeptides of tumor-inducing iridovirus and mortality-associated iridovirus. Polypeptides of purified iridovirus were analyzed on 10 % SDS-PAGE. The polypeptides on the gel were visualized by coomassie blue staining. Lane 1, protein size marker; lane 2, mortality-associated iridovirus; lane 3, tumor-inducing iridovirus collected at Southeastern coast of Korea; lane 4, tumor-inducing iridovirus collected at Southern coast of Korea.

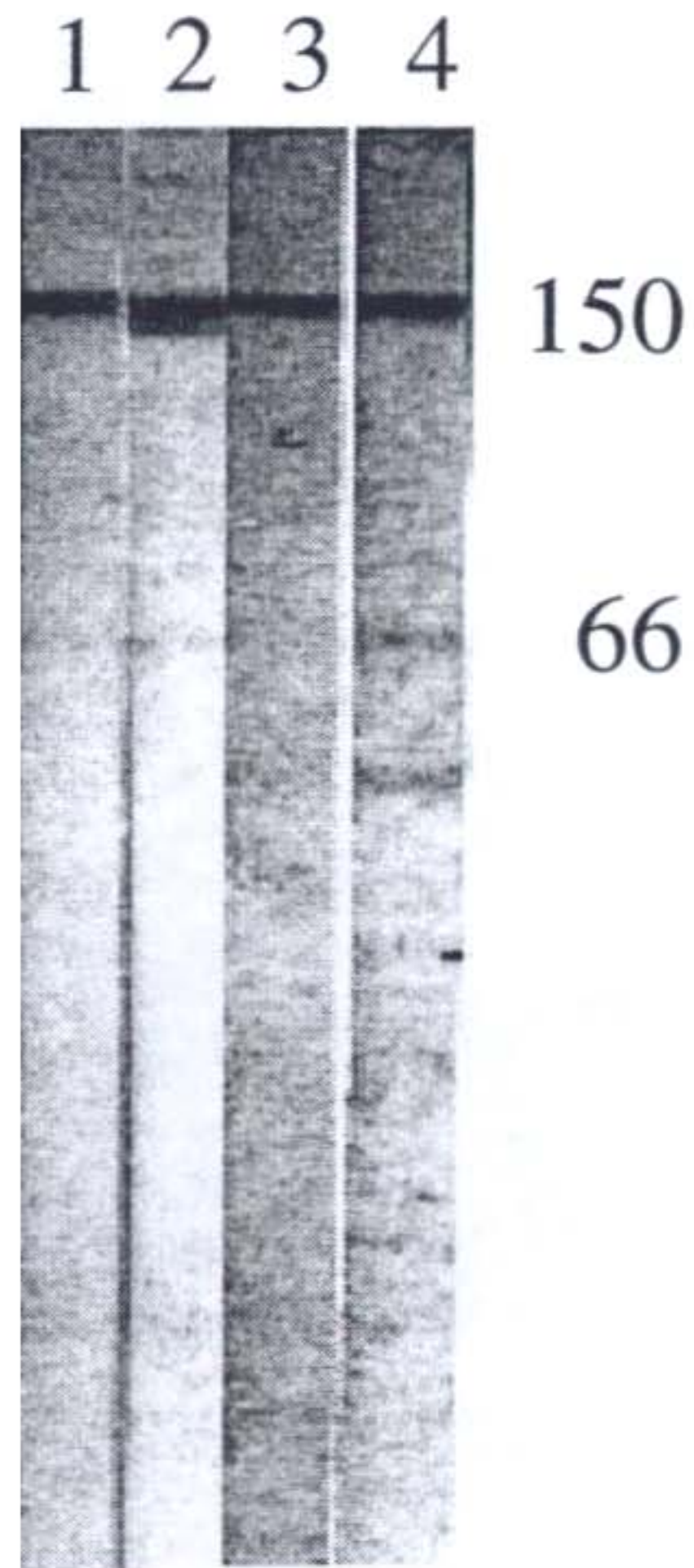


Fig. 10. Reactivities of antibodies against viral polypeptides. Purified virions were analyzed on 10 % SDS-PAGE and polypeptides on the gels were transferred onto NC papers. The NC papers were incubated with (lane 1) monoclonal antibody IR-AA3, (lane 2) monoclonal antibody IR-BE4, and (lane 3 and 4) antisera obtained from diseased flounder with the papilloma-like lesions.

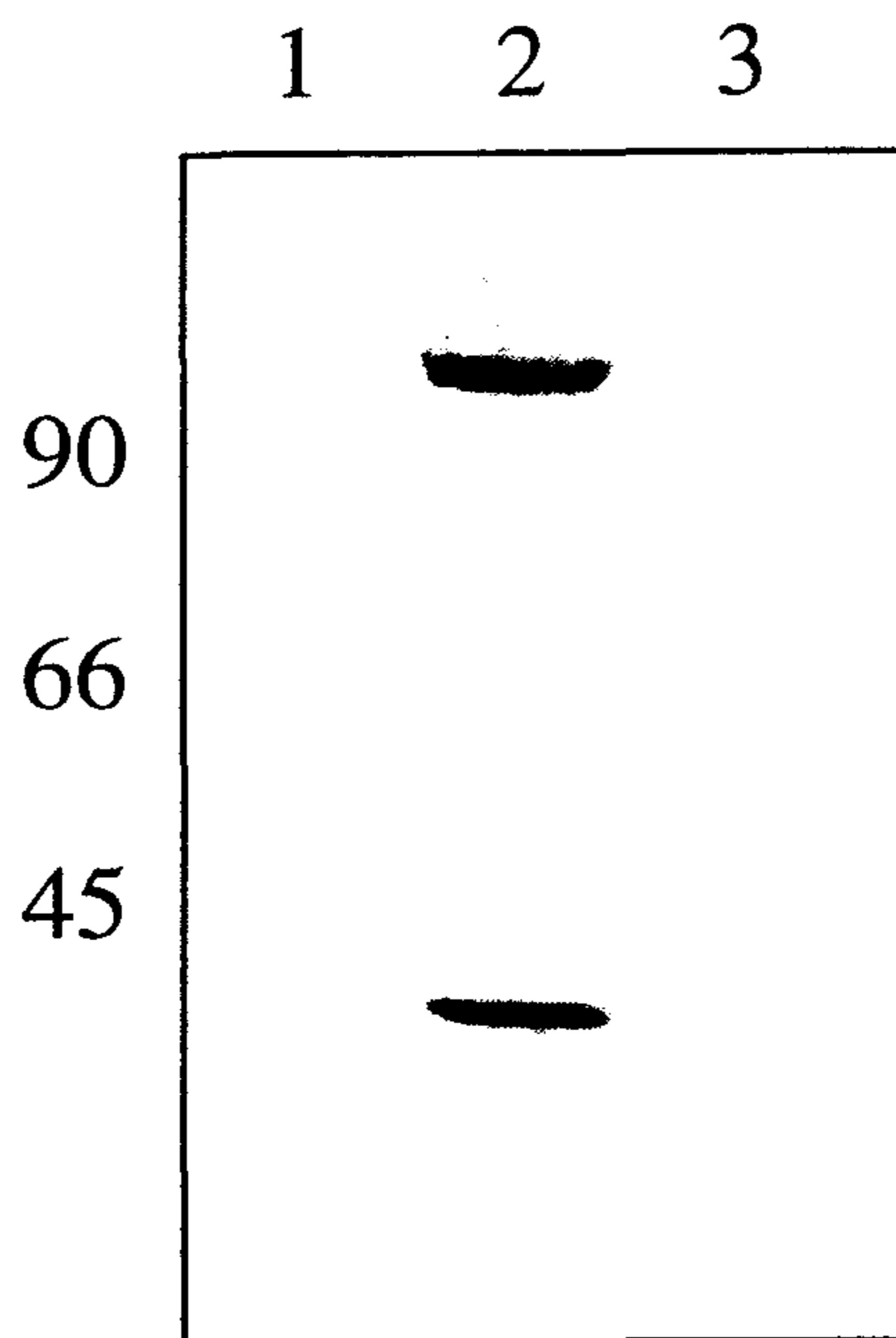


Fig. 11. Cross-reactivities of monoclonal antibody. Purified virions were analyzed on 10 % SDS-PAGE and polypeptides on the gels were transferred on to NC papers. The NC papers were incubated with monoclonal antibody AA3. Lane 1, mortality-associated iridovirus; lane 2, tumor-inducing iridovirus collected at Southeastern coast; lane 3, tumor-inducing iridovirus collected at Southern coast.

2. Iridovirus의 감염 실태조사

본 연구기간인 2년동안 우리 나라의 양식 해산어에 감염하는 iridovirus의 감염실태를 조사하였다. 자료의 정확성을 기하기 위하여 시간이 많이 걸리더라도 예전의 방식에 따라 조사하였다. 즉 종양을 유발하는 iridovirus의 경우 아직까지 배양된 세포에서 증식이 잘 안되기 때문에 세포에의 접종하여 확인하는 방법을 사용하지 않았다. 이 바이러스 감염에 의한 종양은 육안 관찰이 용이하므로 우선 병리현상을 관찰하였고 육안 관찰로 판단이 어려운 경우는 조직을 염색하여 관찰하였다. 폐사를 유발하는 iridovirus의 경우 세포에 접종시 증식이 가능하므로 세포에 접종하여 세포병리현상 (CPE)을 관찰하고 필요한 경우 핵산관찰 혹은 염색하여 관찰하였다.

해산어에 종양을 유발하는 iridovirus의 경우, 포항에서부터 여수 등에 이르는 우리나라의 남해안 일대와 제주도 등에 존재하는 대부분의 양식 해산어, 특히 넙치에 종양을 유발하였다. 이는 우리나라의 대부분 넙치 양식장이 iridovirus에 감염되어 있음을 말하여 준다. 실제, 우리나라의 대부분의 넙치 양식장의 경우 매년 수온이 낮은 늦가을부터 초봄까지 iridovirus 감염에 의한 종양의 발생하고 있는 상황이다. 이와 같은 종양으로 인한 해산어의 폐사율은 매우 낮으며 종양이 발생한 어체의 경우 수온을 올려주면 종양이 자연 치유되는 특성을 보이고 있다. 따라서 종양으로 인한 대량 폐사는 발생하지 않는 것으로 보고된다. 그러나 종양에 걸린 기간동안 성장이 느리고 또한 종양에서 치유가 된 어체의 경우 외견상 상품 가치가 떨어져 양식어민들의 경제적인 손실이 발생하고 또한 만약 이를 사람이 먹었을 경우 인체에 어떠한 영향을 미칠지 아직 연구된 자료가 없어 이 부분의 연구가 필요한 실정이다.

방어, 참돔 등의 해산어에 감염하여 폐사를 유발하는 iridovirus의 경우 일본에서는 많은 양식장에 감염되어 있고 또한 매년 많은 피해를 주고 있는 것으로 보고된다 (Inouye *et al.*, 1992). 우리나라의 경우 본 연구가 진행중인 조사기간 동안에는

iridovirus에 의한 피해 사례를 보고 받지 못하였고 또한 여러 번에 걸친 조사 결과 iridovirus를 검출하지 못하였다. 그러나 1994년 남해안의 양식장에서 폐사한 양식 방어 등의 조직을 세포에 접종한 결과 iridovirus에 의한 CPE가 보였고 이를 재 접종하였을 때에도 똑같은 CPE가 발생하였다. 이 결과로부터 1994년 남해안 일대의 일부 양식장에 iridovirus가 감염되었음을 확인 할 수 있었다 (Table 1). 따라서 이미 우리 나라 양식 해산어도 이 바이러스에 감염된 것으로 판단된다. 그리고 우리나라에서 양식되는 방어 및 참돔이 일본에서 수입된 것이며 또한 현재에도 일본과 양식 어종의 교역이 활발하게 이루어지고 있음을 감안 할 때 일본에서의 경우와 같이 iridovirus가 퍼질 가능성이 매우 높다. 따라서 폐사를 유발하는 iridovirus의 실태 조사 및 외국, 특히 일본으로부터의 iridovirus유입을 막도록 각별한 노력을 기울여야 할 것으로 생각된다.

Table 1. 1994년도 양식 해산어의 폐사유발 iridovirus 감염실태 조사결과

시료명	어종	체중(g)	Iridovirus 검출여부	비고
ND	참돔	170-210	미검출	
HG	방어	90-160	미검출	
YH	방어	5-9	미검출	
DH	방어	46-67	미검출	
WB	방어	77-130	미검출	
YJ	우럭	56-74	검출	
HB	농어	4-15	미검출	
KR	방어	65-95	미검출	
HS 1	방어	37-50	검출	
HS 2	방어	45-72	미검출	
GJ	방어	46-78	검출	
KL	방어	84-103	미검출	
SW	방어	38-66	미검출	
WD	방어	51-81	미검출	
YK	방어	21-30	미검출	
HY	방어	25-35	미검출	
Jp 1	방어	35-60	미검출	
Jp 2	방어	30-45	미검출	
Jp 3	방어	28-45	검출	
Jp 4	방어	45-74	검출	
Jp 5	방어	48-56	검출	
Jp 6	방어	45-79	검출	

제3장 ELISA 및 PCR을 사용한 iridovirus 신속진단법 개발

제1절 서론

최근들어 양식 해산어에 바이러스 감염에 의한 질병이 발생하여 양식장에 경제적인 손실을 주고 있다. 이중에 하나로 iridovirus가 있다. Iridovirus는 외막이 없는 DNA 바이러스로써 어류에 감염하여 세포 비대증을 유발하여 질병을 유발한다. 어류에 감염하는 iridovirus에는 피부종양을 유발하는 것과 피부종양 없이 폐사를 유발하는 것의 두 종류가 있다. 피부종양을 유발하는 iridovirus는 전세계에 걸쳐 분포하며 다양한 어종에 감염하는데, 넙치와 가자미 등에 주로 감염하는 것으로 보고된다 (Roberts, 1976; Schnitzler & Darai, 1989). 이 바이러스에 감염되는 경우 대량폐사는 일어나지 않지만 양식어류의 판매가 불가능하여 양식업에 많은 경제적인 손실을 주고 있다.

폐사를 유발하는 iridovirus의 경우, 1990년 이전까지는 세계 여러지역에서 드물게 보고 되었다 (Laird & Bullock, 1969; Walker & Sherburne, 1977; Evelyn & Traxler, 1978; Reno *et al.*, 1978; Langdon *et al.*, 1986). 따라서 이 바이러스는 크게 주목을 받지 못하였다. 그러나 1990년에서부터 일본에서 양식중인 여러 종류의 해산어에 이 바이러스가 감염하여 대량폐사를 유발하기 시작하였으며 홍콩, 싱가포르, 대만 등에서도 iridovirus의 감염에 의한 폐사가 발생하였다 (Inouye *et al.*, 1992; Chua *et al.*, 1994; Nakajima *et al.*, 1995).

우리 나라에서의 해산어 양식은 1980년대 이후로 급진적으로 증가하기 시작하여 현재에는 남해안 전 해안과 동해안 일부의 지역에서 해산어 양식이 성행하고 있다. 그런

데 최근들어 이들 양식 해산어류에 바이러스성 질병이 발생하여 대량폐사가 발생하고 있다. 우리 나라에서의 물고기 바이러스에 대한 연구는 1982년부터 시작되었는데, 우리 나라에서 양식되는 여러 종류의 물고기에서 여러 번에 걸쳐 IPNV를 분리하여 무지개송어 대량폐사의 원인체로서 규명한 바 있다 (Hah *et al.*, 1984; Hedrick *et al.*, 1985; Park *et al.*, 1989). 또한 1991년 초에는 대량폐사가 발생한 무지개송어 치어에서 IHNV가 분리되어 IHNV도 무지개송어 대량폐사의 원인체임을 밝혀 내었으며 (Park *et al.*, 1993). 그리고 최근 몇년전부터 양식 중이던 해산어인 능성어 (Sohn, 1992), 넙치 (Sohn *et al.*, 1995) 등의 해산어에서 발생한 대량폐사에서 바이러스를 분리한 바 있다. 이외에도 넙치에 iridovirus가 감염하여 종양을 유발하는 것으로 보고되고 있으며 또한 최근에 일본에서 널리 발생하고 있는 것과 유사하게 iridovirus 감염에 의한 양식 해산어의 폐사도 보고되고 있다.

바이러스성 질병은 다른 질병과는 달리 한번 발생하면 치료하기가 어렵다. 따라서 바이러스성 질병을 조절하는 가장 좋은 방법으로는 백신 등을 사용하여 바이러스에 의한 질병 발생을 미리 예방하는 것이다. 그러나 현재, iridovirus를 비롯하여 어류 바이러스에 대한 백신이 개발된 것이 전혀 없는 상태이기 때문에 바이러스성 질병의 예방을 위한 효과적인 조치를 하기 어렵다. 따라서 현재로서 취할 수 있는 최선의 방법은 양식어류에 바이러스가 감염되지 않도록 하는 것이다. 그리고 만약 바이러스성 질병이 발생하였다면 그 사실을 조기에 알아내어 다른 정상적인 개체들과 격리시킴으로써 확산되는 것이 피해를 최소화시키는 것이 최선의 방법이다. 그러나 아직까지 어류바이러스를 신속 진단하는 방법들이 개발되어 있지 않다. 따라서 질병 발생의 원인이 바이러스에 의한 것임을 확인하는 데까지는 2-3일에서 일주일 이상이 소요된다. 만약 바이러스에 의한 질병 발생시 이와같은 기간동안 아무런 조치를 취하지 않고 방치해 둔다면 양어장 전체에 바이러스가 확산되어 결국은 양식어의 대부분이 피해를 입는 결과를 낳게 된다. 따라서 보다 정확하고 신속하게 바이러스를 진단 할 수 있는 방법의 개발이 필요한데, 지금까지 개발된 방법 중 FAT (Fluorescent antibody technique),

ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)와 PCR (Polymerase chain reaction) 등이 24시간 안에 바이러스를 정확하게 진단 할 수 있는 방법들로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 ELISA와 PCR 법을 사용하여 양식 해산어에 감염하는 iridovirus를 조기에 진단이 가능한 신속진단법을 개발 하고자 한다.

제2절 재료 및 방법

1. 세포배양 및 바이러스

Iridovirus의 숙주세포로서 CHSE-214 (Chinook Salmon Embryos), FHM (Fathead minnow), GF (Grunt fin)를 사용하였다. 세포는 fetal bovine serum이 10% 첨가된 minimum essential medium (MEM)을 사용하여 CHSE-214와 FHM은 20°C에서, 그리고 GF는 25°C 에서 배양하였다. Iridovirus 시료는 종양에 걸린 넙치와 폐사가 일어난 참돔, 방어 등의 조직에서 취하였다.

2. 바이러스의 순수분리

종양 조직 혹은 죽어 가는 해산어의 신장, 간장 조직을 TNE 완충용액 (0.01 M Tris, pH 8.0, 0.1 M NaCl, 0.001 M EDTA)에서 homogenization한후 3000 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 상등액을 취하여 30 % sucrose (w/w) cushion상에서 25000 rpm 에서 120 분 동안 원심분리를 하였다. 침전물을 TNE 완충용액으로 재현탁 시킨 다음 sucrose gradient (25 - 60 % continuous)상에서 25000 rpm x 20 시간, CsCl gradient (10 - 35 %)상에서 30000rpm x 24 시간의 연속적인 원심분리를 하여 iridovirus를 순수분리 하였다.

3. 단일클론항체 제조

순수 분리된 바이러스를 Balb/c mouse의 복강에 5 μ g씩 주사를 함으로써 면역을 시켰다. 첫 번째 면역은 단백질을 Freund complete adjuvant와 emulsification 시킨후 복강에 주사함으로서 행하였고 두 번째 이후부터는 Freund incomplete adjuvant와 emulsification 시킨후 주사하였다. 이와같은 방식으로 4번을 주사한후 마지막 주사시 단백질을 adjuvant를 사용하지 않고 정맥주사를 하여 면역 시켰다. Balb/c mouse에 마지막 정맥주사를 한 후 4일째에 spleen을 취하였다. Spleen cell과 SP-2/0 myeloma cell을 10:1 비율로 섞은 후 PEG 용액 (45% PEG-1500, 5% DMSO, 50% serum-free DMEM)을 사용하여 fusion 시켰다. Fusion된 세포를 fetal bovine serum이 15% 첨가된 HAT media (0.1 mM hypoxanthine, 4×10^{-4} mM aminopterin, 1.6×10^{-2} mM thymidine in DMEM)에 suspension 시킨후 96 microwell plate에 0.2 ml씩 넣었다. 약 3주동안 5일마다 새 HAT media로 갈아주고 다시 1주일동안 aminopterin이 없는 HT media로 갈아주었다. 이후 배양액을 취하여 ELISA로 iridovirus에 대한 항체를 내는 hybridoma를 골라내었다.

4. ELISA

해산어 조직내의 iridovirus 검출을 위하여 ELISA법을 사용하였다. Coating buffer (0.5 M carbonate-bicarbonate, pH 9.6)에 순수 분리된 바이러스 혹은 조직 추출액을 1 μ g/ml 농도가 되도록 준비한 후 ELISA용 96 well plate에 넣어 4°C에서 16시간동안 coating하였다. Plate를 PBS로 washing한 후 1% BSA-PBS (1% BSA in PBS) 용액을 첨가하여 상온에서 1시간동안 반응시킴으로서 blocking하였다. Plate를 PBS-Tween 20 (0.05% Tween 20 in PBS)으로 washing한 후 각 well에 적절하게 희석된 단일클론항체를 넣고 상온에서 2시간동안 반응시켰다. PBS-Tween을 사용하여 plate를 3번 washing한 후 alkaline phosphatase가 붙어 있는 second antibody를 첨가하였다. 상온에서 2시간동안 반응시킨후 PBS-Tween으로 3번 washing하고 substrate (1 mg of p-nitrophenyl

phosphate/ml of 9.7% diethylamine, pH 9.8)를 넣었다. 상온에서 30분간 반응시킨후 3 M NaOH용액 50 μ l씩을 넣어 반응을 중지시킨 다음 405 nm에서 OD값을 측정하였다.

5. Viral genomic nucleic acids의 준비

순수 분리된 virus를 STE (0.1M NaCl, 20mM Tris-HCl, 1mM EDTA)에 현탁을 시킨후 proteinase K와 SDS를 첨가하여 (1mg/ml, 1% respectively) 60°C에서 60분간 반응시킴으로서 바이러스를 깬다. Wizard genomic DNA purification kit (Promega)를 사용하여 viral genomic DNA를 추출하였다. 이와 같이 하여 준비한 viral genome의 종류를 확인하기 위하여 DNase I, RNase H, S1 nuclease를 처리한 다음 핵산의 잘라지는 양상을 관찰하였다. 또한 gene cloning하기 위한 준비단계로써 viral genome을 EcoR I, Sma I, Pst I과 BamH I 등으로 잘라 pattern을 확인하였다.

6. Viral genomic DNA cloning 그리고 nucleotide sequencing

앞에서와 같은 방법을 사용하여 준비한 viral DNA fragment들을 pUC19 plasmid vector에 insertion시켰다. 이 plasmid DNA를 E. coli DH10B에 electrophoration 시킨후 IPTG와 x-gal이 포함되어있는 배지에서 배양하여 white colony를 선별하였다. Random labeling 방법으로 32 P-label한 viral DNA fragment를 DNA probe를 사용하여 colony blotting방법으로 viral gene을 지니는 것들을 selection하였다. 이와 같이 선별한 clone에 들어 있는 insert DNA의 염기서열을 기초과학지원센터의 Automatic sequencer (ABI, USA)를 사용하여 Sanger 등 (1977)의 방법으로 분석하였다. Cloning된 DNA의 염기서열은 GenBank 상에 존재하는 다른 gene들의 염기서열들과 비교 분석하였다.

7. PCR

조직에 존재하는 iridovirus의 유전자를 검출하기 위하여 PCR 수행하였다. PCR에

사용할 primer는 앞에서와 같이 확인된 genomic DNA clone의 염기 시열로부터 합성하였다. 본 연구에 사용하기 위하여 제조한 primer는 Table 2와 같다.

Table 2. PCR primer used in this research project

Primer		Oligonucleotide sequence (5' to 3' direction)	Size (bp) of expected DNA
IR-R17	sense	GGTGTAATTTCAATATTTAACTCT	280
	antisense	CATTTAATTTATCTAATATAGTACT	
IR-R2	sense	TGGAAGTATGCTAACTTTTTCTCCA	265
	antisense	AATCCGTGAATATTACGGTGCGAGA	
IR-R38	sense	TTCACATGTGCTTCAGTAGCTATGA	330
	antisense	TCTGGTATATTCAATATGTAACGTT	
IR-R4	sense	CTGGAAGTATCCTAACTTTTTCTCC	280
	antisense	GCAAGATTTTTATTAATCCGTGAAT	
IR-R6	sense	GAAGTGTACCTTCTTGGCCTAAATT	300
	antisense	TCCCAGGAATCTATGCTTCTGGTAT	

PCR에 사용할 template는 해산어의 조직, 배양세포 그리고 순수 분리된 iridovirus에서 추출한 genomic DNA를 사용하였다. 이와 같이 준비된 DNA에 PCR primer set, reaction buffer (20 mM Tris pH 8.3, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 % Triton X-100, 10 mg/ml BSA), AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer Cetus) 1 unit 등과 혼합을 한 다음 PCR을 수행하였다. PCR amplification 은 pre-denaturation (94 °C, 20 sec) 1 cycle, annealing (48 °C, 5 sec), elongation (72 °C, 10 sec), 그리고 denaturation (94 °C, 5 sec) 등의 35 cycles, 그리고 pro-elongation (72 °C, 30 sec) 1 cycle을 기본으로 하는데 PCR primer의 종류에 따라 조건을 조금씩 바꾸었다. 이와 같이 증폭된 PCR 산물은 1.2 % agarose gel에서 전기영동을 걸어 확인하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 단일클론항체 제조

Iridovirus를 신속 진단하는 한 방법인 ELISA에 사용할 단일클론 항체를 제조하였다. Sucrose gradient상에서 초원심분리를 하여 iridovirus를 순수 분리한 다음 이를 항원으로 하여 balb/c mouse에 면역 시킨후 이 동물의 B 세포를 SP-2/0 myeloma 세포와 fusion을 하여 hybridoma를 만들었다. 이 세포들의 배양액에 존재하는 iridovirus에 대한 항체의 양을 ELISA실험을 통하여 확인한 결과 Table 3에서와 같았다. 이들 중 ELISA titer가 0.8 이상으로 나온 13개의 clone들을 선별하여 subcloning함으로써 iridovirus에 대한 단일클론 항체를 만들었다.

이 항체들은 종양을 유발하는 iridovirus를 항원으로 하여 만들어진 것들이다. 따라서 이를 사용하여 향후 종양 유발 iridovirus의 신속진단을 위한 ELISA에 사용 할 수 있다. 그러나 이 항체들이 폐사를 유발하는 iridovirus에도 적용 가능한 지의 여부는 알 수가 없었다. 따라서 이들 단일클론 항체들이 폐사 유발 iridovirus와도 반응 할 수 있는지를 ELISA실험을 통하여 확인하여 보았다. 그 결과 지금까지 제조한 13개의 단일클론항체 모두 폐사유발 iridovirus와는 반응을 하지 않았다.

Table 3. Screening of the hybridomas by ELISA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.000	0.032	█	0.093	0.110	0.094	0.005	0.129	█	0.104	0.128	0.111
B	0.005	0.203	0.206	0.598	0.091	0.088	0.106	0.089	0.154	0.088	0.081	0.078
C	0.052	0.078	0.090	0.094	0.131	0.089	0.080	0.164	0.083	0.091	0.120	0.312
D	0.010	0.081	0.086	0.084	0.337	0.139	0.087	0.144	0.092	0.093	0.091	0.077
E	0.019	0.082	0.158	0.116	0.149	0.087	0.088	0.102	0.086	0.079	0.079	0.084
F	0.006	0.099	0.122	0.087	0.090	0.136	0.097	0.107	0.077	0.199	0.088	█
G	0.042	0.125	0.593	0.082	0.088	0.088	0.150	0.605	0.191	0.083	0.084	0.121
H	0.078	0.085	0.503	0.723	0.142	0.085	0.079	0.101	0.086	0.099	█	0.075

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.078	0.060	0.072	0.028	0.034	0.067	0.000	0.066	0.268	0.128	0.131	0.166
B	0.215	0.445	0.123	0.126	0.056	0.177	0.006	0.110	0.095	0.017	0.004	0.063
C	0.194	0.189	0.111	0.103	0.000	0.128	0.129	0.055	0.196	0.059	0.142	0.130
D	0.141	0.187	0.071	0.217	0.046	0.141	0.114	0.089	█	0.167	0.188	0.095
E	0.206	0.175	0.111	█	0.179	0.145	0.104	0.163	0.205	0.159	0.151	0.117
F	0.173	0.093	0.318	0.249	0.146	0.123	0.097	0.182	0.136	0.160	0.191	0.177
G	0.145	0.162	0.171	0.073	0.159	0.066	0.196	0.372	0.221	0.270	0.089	0.502
H	█	0.173	0.172	0.472	0.060	0.235	0.148	0.201	0.210	0.011	0.204	0.174

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.111	0.334	0.110	0.113	0.162	0.092	0.288	0.300	0.022	0.103	0.204	0.399
B	0.101	0.165	0.155	0.075	0.124	0.000	0.258	0.267	0.052	0.154	█	0.204
C	0.276	0.172	0.093	█	0.206	0.098	0.076	0.094	0.126	█	0.132	0.110
D	0.412	0.236	0.107	█	0.103	0.047	0.109	0.332	0.206	0.193	0.205	0.170
E	█	0.163	0.071	0.215	0.059	0.077	0.101	0.330	0.128	0.064	0.124	0.116
F	0.321	0.269	0.288	0.237	█	0.013	0.094	0.267	0.107	0.182	0.140	0.014
G	0.433	0.197	0.224	0.171	0.076	0.093	0.118	0.164	0.033	0.098	0.059	0.066
H	0.372	0.333	0.090	0.105	0.155	0.050	0.216	0.191	0.294	0.165	0.116	0.118

The numbers represent the ELISA titers.

2. Iridovirus의 gene cloning

Iridovirus를 신속 진단하는 한 방법인 polymerase chain reaction (PCR)에 사용할 DNA primer를 준비하기 위하여 iridovirus의 gene을 cloning 하였다.

Sucrose gradient 상에서 초원심분리하여 폐사를 유발하는 iridovirus를 순수 분리한 다음 iridovirus의 genomic DNA를 추출하였다. Iridovirus의 genomic DNA를 여러 종류의 제한효소로 절단하여 보았다. 그 결과 Fig. 12에서와 같이 EcoRI과 BamHI으로 절단하였을 때 가장 좋은 결과가 나왔다. 따라서 iridovirus의 genomic DNA를 EcoRI과 BamHI으로 절단한 다음 역시 EcoRI과 BamHI으로 절단한 pUC19 plasmid vector에 ligation 시켜 cloning하였다. Cloning된 insert DNA의 size를 확인하기 위하여 각 clone들을 PvuII 제한효소로 절단한 다음 이를 agarose gel에 전기영동한 결과 Fig. 13와 같이 다양한 크기의 insert DNA들이 확인 되었다. 이들중 insert DNA의 size가 큰 것 5개를 선별하여 각각 IR-R6, IR-R4, IR-R17, IR-R2, IR-R38 라고 명명한 다음 이들의 nucleotide sequence를 확인하였다. Nucleotide sequence 결과를 GenBank상에 존재하는 기존의 gene sequence들과 homology를 비교한 결과 Table 4와 같은 결과가 나왔다. Table 4에서 알 수 있듯이 IR-R6은 *M. capricolum*의 CONTIG MC362 DNA, IR-R4는 *Staphylococcus aureus* type 8 capsule의 gene, IR-R17은 *S. pombe* chromosome 1 cosmid DNA, IR-R2는 *E. caballus* mRNA for lymphocyte, 그리고 IR-R38은 *Caenorhabditis elegans* cosmid F09C12 등과 가장 높은 homology를 보였다. 이와같은 결과는 이외의 결과로서 cloning된 유전자들이 폐사를 유발하는 iridovirus의 유전자가 아닌 다른 유전자들과 homology가 높은 것으로 나타났다. 이는 지금까지 폐사를 유발하는 iridovirus 유전자 30개 이상 중에 major capsid protein, RNA polymerase II, ribonucleotide reductase 등의 극히 적은 수의 gene들만 nucleotide sequence가 확인되었고 나머지 대부분 gene들의 sequence는 보고된 바가 없기 때문이라고 생각된다. 실제 본 연구진이 cloning한 gene들의 homology searching 결과를 자세하게 분석하여 보면 Fig. 14-18 에

서와 같이 IR-R6를 제외한 나머지 4개의 clone들은 homology가 가장 높다고 나온 gene들과 nucleotide sequence의 일치 정도가 매우 낮았다. 즉 5개의 clone 각각 약 500 bp 정도의 염기서열을 확인하여 GenBank에 homology 비교분석을 하여 보았다. 그 결과 IR-R6는 500 bp정도의 염기서열중 가장 유사도가 높게 나온 gene과 249 bp부분에서 60%의 일치도 (identity)를 어느 정도 유사한 것으로 생각되었다. 그러나 나머지 clone들은 500 bp의 염기서열중 가장 유사도가 높다고 분석된 gene들과 70-90 bp 정도 부분만 약 60 % 정도의 유사도가 있었다. 본 연구에서 cloning한 폐사를 유발하는 iridovirus의 genomic DNA clone들이 어떤 유전자 인지의 확인은 다른 여러 사람들의 연구결과가 모아진 다음에 가능할 것으로 생각된다.

Table 4. Results of searching nucleotide sequence databases.

Clones	Databases sequences producing high similarity	GenBank accession No
IR-R6	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>M. capricolum</i> DNA for CONTIG MC362 2. <i>A. synechocyst</i> sp. PCC6803 complete 3. <i>Mycoplasma genitalium</i> rRNA 16S rRNA 4. <i>Plasmodium falciparum</i> DNA 	<p>Z33268 D64006 U39693 AL008976</p>
IR-R4	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Staphylococcus aureus</i> type 8 capsule 2. <i>Drosophila melanogaster</i> G protein 3. <i>Plasmodium falciparum</i> DNA 4. <i>Exoneura bicolor</i> mitochondrial ribosome 	<p>U73374 M80494 AL008974 L22906</p>
IR-R17	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>S. pombe</i> chromosome 1 cosmid 2. Simian immunodeficiency virus protein 3. Fission yeast <i>ndk1</i> gene for nucleosome 4. <i>Buchnera aphidicola</i> genomic fragment 	<p>Z98601 U86638 D63678 AF008210</p>
IR-R2	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>E. caballus</i> mRNA for lymphocyte 2. <i>P. falciparum</i> (FAF-2) mRNA 3. <i>Drosophila melanogaster</i> G protein 4. <i>Staphylococcus aureus</i> type 8 capsule 	<p>X66862 X75787 M80494 U73374</p>
IR-R38	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Caenorhabditis elegans</i> cosmid F09C12 2. <i>Arabidopsis thaliana</i> genomic DNA 3. orf {clone FB7-4} [<i>Nicotiana tabacum</i>...] 4. Human BAC clone GS039E22 	<p>U28929 AB006696 S44872 AC002428</p>

1 2 3 4 5

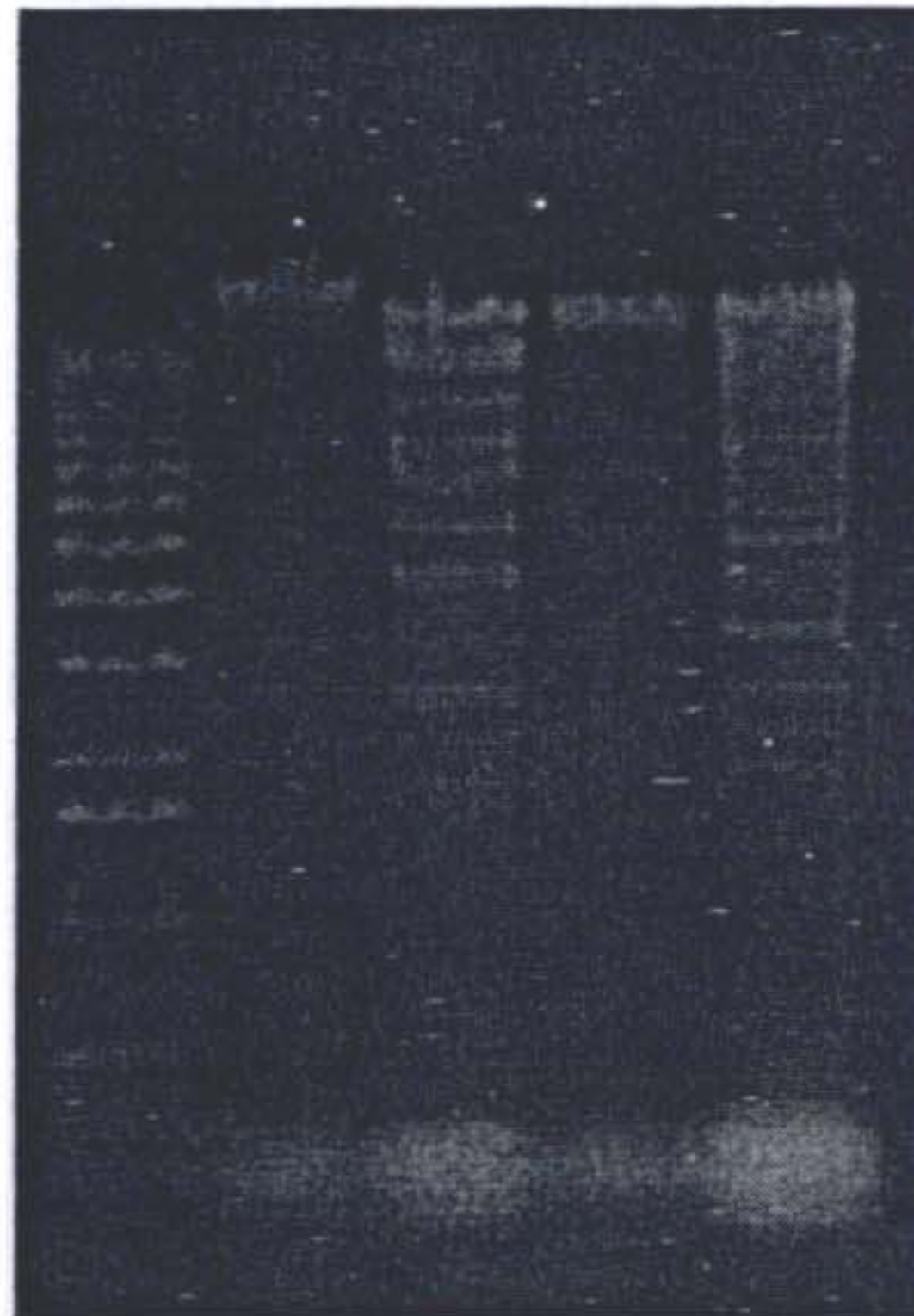


Fig. 12. Restriction endonuclease digestion of tumor-inducing iridovirus genomic DNA. Viral DNA was digested with (lane 3) EcoRI, (lane 2) PstI, and (lane 3) BamHI and then analyzed by electrophoresis on 1 % agarose gel. Lane 1, DNA ladder marker; lane 2, intact genomic DNA.

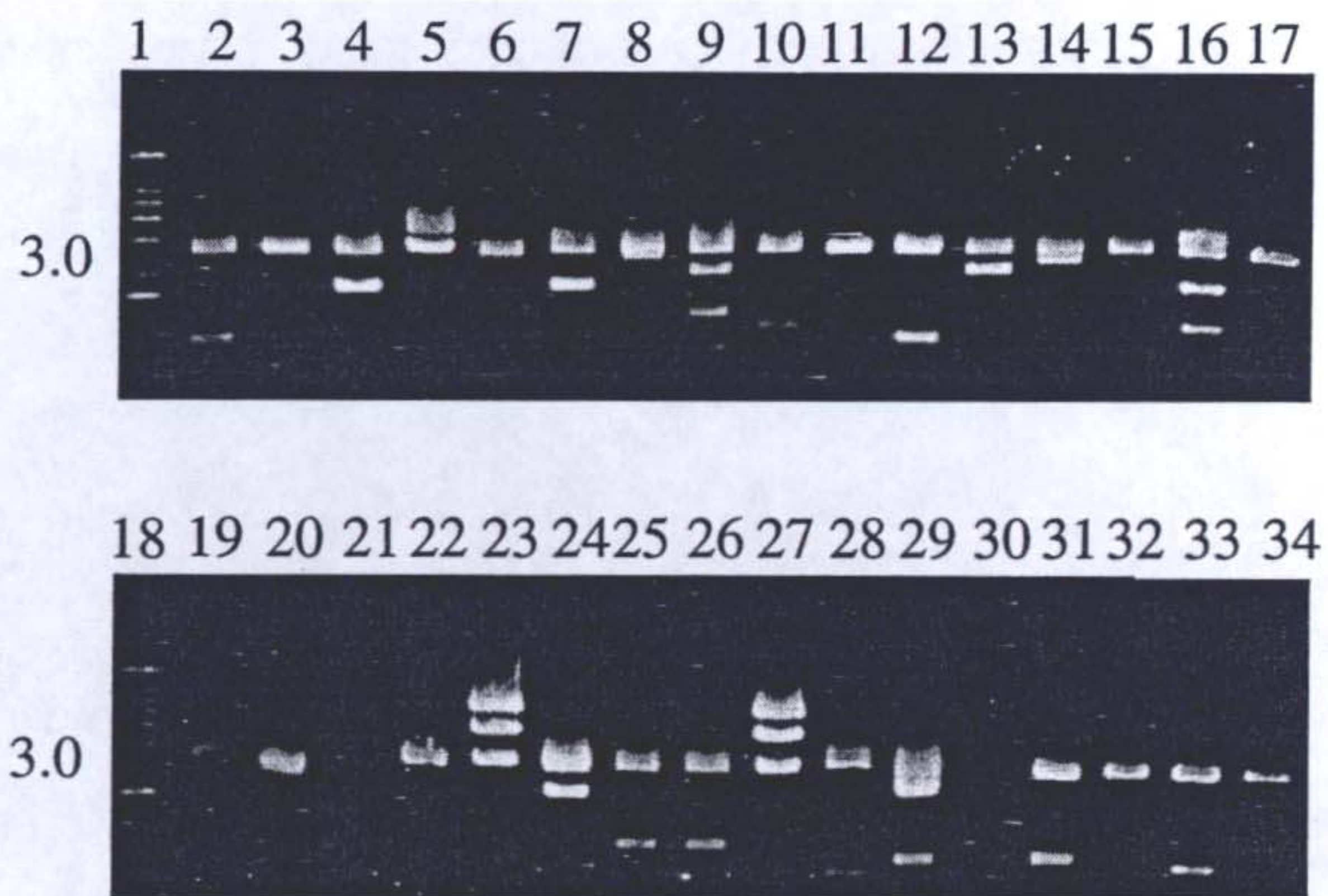


Fig. 13. Agarose gel electrophoresis of cloned DNA after digestion with restriction enzyme, PvuII. Genomic DNA of iridovirus was digested with EcoRI and BamHI and was cloned into pUC19 plasmid vector. The clones were digested with PvuII and analyzed by agarose gel electrophoresis. Lane 1 and 18, DNA ladder marker; lane 2-17 and 19-34, iridovirus genomic DNA clones.

(A)

```
AAAGGTTAGATGCGAAGGTTGCGATAATAATTCTACCAGGGATTCTAGTAAAGAGTTCATTAATAGAACGTCCTA 75
CTTTAGATTCAGATTGAATTAACCGTCTTGTTTCAGCATTGTAGAGTCTGATACTAAAAGAAGTGTACCTTCTT 150
GGCCTAAATTTGCTAATTTTTCATATTCCGCATGTGGTCCTACTGGTGTGTAGTCGATTTTAAAATCACCTGTAT 225
GGAATAATGGTCCCTCAGGCGTTCTAAATACAATACCAAACATATCTGGAATAGAGTGGTTTAATCTAATAAAGG 300
ATACAACCACATCTTTAAAGTTATAGGTATAGTATGATTTATATTCTTCAATTTTAGGTGCACGTAATCTTTAT 375
GTTACCTAATTTATATTCAATTAATCAACAGCAATACCAGAAGCATAGATCCTTGGGAATCTTTACTTGACGT 450
AATAAATAAGGTATAACCACCAATATGATCCTCATGACCATGCTTATGAATAAACCTACATACGGCCCCATTTCTT 525
TTNAATAANTNTAATCTGGAANCCNTATCATACTAATNAATCTCCNCGGAAAAGATCCCNTAAATCACCGCGGNN 600
TCAACTGGGTAACNNGGCAANCGTCCCGGTTGAATTGTNNCCCCAACCCC 650
```

(B)

```
IR-R6: 411 TTGCTGTTGATTTAATTGAATATAAATTAGGTGAACATAAAGATTTACGTGCACCTAAAA 352
      | |||| | ||||| | ||| |||| ||| ||||| | | | | |
M. cap: 8 TAGCTGCTATGTTAATTAGAGATAGATTAAGAATATAAAATTGAAGACAAAACCATTG 67

IR-R6: 351 TTGAAGAATATAAATCATACTATACTATAACTTTAAAGATGTGGTTGTATCCTTTATTA 292
      || ||||| || | | | || | || | || | || | || | || |
M. cap: 68 TTAAAGAATATGATGCTGATGATGTGTGAAAACTAAAACTTTAAAGTTAGTTATGCTG 127

IR-R6: 291 GATTAAACCACTCTATTCCAGATATGTTTGGTATTGTATTTAGAACGCCTGAGGGACCAT 232
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
M. cap: 128 CATTAAACCACTCTATTCCTGATGCATTTGGAATTTTAGTTCAAACCTCCTAATGGTAATA 187

IR-R6: 231 TATTCCATACAGGTGATTTTAAAATCGACTACACACCAGTAGGACCACATGCGGAATATG 172
      | || | ||||| ||||| ||||| | |||| | ||||| ||||| |||||
M. cap: 188 TTTTTTCAACAGGAGATTATAAATTTGACTGATCACCCTAGGACATTTTGCTGAACTTA 247

IR-R6: 171 AAAAATTAG 163
      |||||
M. cap: 248 CTAAATTAG 256
```

Fig. 14. (A) The nucleotide sequences of the clone IR-R6 and (B) comparison of the nucleotide sequences of IR-R6 with those of *M. capricolum* DNA for CONTIG MC362.

(A)

```
CAATCATACTAAAAGGGGGAAAAGGATTTGGTAACAACCGCCGTTTGTGCAATAATGCTTTTTTCACCTATTTTC 75
TACTCCTGGAAGTATGCTAACTTTTTCTCCAATCCAACAACCATTTCTAATTATAATTGATTTTGCAGTTAGGGG 150
CTGTTTATTATATGAATCATAGTTTACAGGATCAATCCCATGTGACTCAGTAGTGAATAAAACATCTGATGCTAT 225
TAAGCAATCTTCTTCTATAATCAAATCTGTAGCCACCAAGAATGTACACCTATTACCAATAACAACATTTTCTCC 300
AATGAATAAATTTGGATTATATCTCGCACCGTAATATTCACGGATTAATAAAAATCTTGCATCAGTTCCTATTTG 375
AATATTACTTTTTAATGTGATGTTTTTAGTGTATTAAATTTTTGCTCTTTTACCAATTACAATTTTTCTACTTCC 450
TTTTAAAATAAAATNATAAAGATATATNGGATGATAGATAAATGTCNTANAAATTTAATTATCCTTTCCNNTTTG 525
GCCNAATTNTNGTC 539
```

(B)

```
IR-R4: 131 TTATAATTAGAAATGGTTGTTGGATTGGAGAAAAAGTTAGCATACTTCCAGGAGTAGAAA 72
      | | ||| | ||| | ||||| ||| ||| | |||||
S. aur: 10551 TCAAATAGGGAATTATAGTTGGATTGGAATGAACTCAGTTATATTACCAGGAGTAGAAT 10610

IR-R4: 71 TAGGTGAAAAAAGCATTATTG 51
      | | ||| | | ||| | |
S. aur: 10611 TGGGGGAACATACAATTGTAG 10631
```

Fig. 15. (A) The nucleotide sequences of the clone IR-R4 and (B) comparison of the nucleotide sequences of IR-R4 with those of *S. aureus* type 8 capsule gene.

(A)

```
AGTATTTTCACCTACAACCTAACTGATATTATTTAATTTATTTGGTGTCACTTGTGCCTTATTATGTGTTGGTGT 75
AATTTAATATTTAAACTCTTTTGACTATAAGGTAAATTAAGCACAACCTGAGTTATTAGCAAGTAGTTCATCAAAT 150
GGGAATGTCACCTACTTGGTTATCTTGATTTTAAATAGATACATTACTTAATGAATTATCACTGCTTAGTACAATA 225
TTTTTAACAAAACGTATTTGATAGGTCTTAGTACTATTATCTTCAGCACTTACCTTGAATGTGATGGTTGGGTCT 300
AAGCCACCTTCACCATTGTAAGTAAGTACTATATTAGATAAATTAATGTANATTCTAGTACTTGTTTATCCCGT 375
GTTTNTAAAGTTCAATGTCGACTTAACATTTGAAATGGACTTGTACTGTNATTCTACTAAATAATCCGTACCATC 450
TCCTTTATANACATATTTNGACATNAAAATNTTGTGATGGAAAGAATAAANTCCTNTNCTTAAAAGGNCATCNTA 525
AANTTTT 532
```

(B)

```
IR-R17: 29 TTATTTAATTTATTTGGTGTCACTTGTGCCTTATTATGTGTTGGTGTAAATTTCAATATTT 88
      ||| || | | ||||| | ||| || ||| ||| || || || ||| |||||
S. pombe: 27864 TTAATTGAAAAATTTGGTAGTTCTTGAGCTTTAGTATTAATTATCGTTTGTTTAATATTT 27923

IR-R17: 89 AAACCTCTTTGACTATAAGGTAAATTAAGCACAACCTGA 126
      |||| | | ||| ||| ||||| | | | ||
S. pombe: 27924 AAACATTCGATAGTATGAGGCCAATTAATAAAAAGCAGA 27961
```

Fig. 16. (A) The nucleotide sequences of the clone IR-R17 and (B) comparison of the nucleotide sequences of IR-R17 with those of *S. pombe* chromosome 1 cosmid.

(A)

```
CTCGGTACCCGGGGATCCCCTAATGATTGAAGTGAATCAAGTAGTTCATTAACCTGATGCGTTATTGTAAAGA 75
TGAATTATTTGACCTTCACATGTGCTTCAGTAGCTATGAAGCAGTTGTGTTTGAATTAGAGATGTCAATGCCAA 150
TATGGTACATAATCTCTACCTCCTGAAAAATGTTTTTAAGTACTGGTGGTAAGTCACATGTTTCCTGTCTCTATA 225
TACTTGTGATAAAGCGTCAAGCGCTAATAAACTTATTGATAGATAAAAACAGGAAGTGTGGTAGGAATCTCCTAA 300
TGCCTCCAAGCGCTAATTCAATGAAACAAATTCACAGTACCTACTAAGTTATAACAAATGAAAGAAAGGAAAGTT 375
ATATCCCGTATCAATCCAAACGTTACATATTGAATATACCAGAATTTATGAAAATACTAGTGACAGGGGCAATNG 450
GTACTIONAGTCCAGGAATATTNAACAATTGCTGATTAGTTTGGAAATTANTGCTACGGATTTTAACTATACTTAA 525
TTNAGGGCAAATTTNTTGTNNG 548
```

(B)

```
IR-R38: 500 TAATTTCCAACTAATCAGCAATTGTTNAATATT 467
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
C. eleg: 8831 TTATTTCCAACTAATCAAATATTGTTCTATATT 8864
```

```
IR-R38: 389 GATACGGGATATAACTTTCCTTTCTTTTCATTTGTTAT 353
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
C. eleg: 10222 GATACAGTCTAGTAATTTTCCTTTATTTTCATTTGTTCT 10258
```

Fig. 18. (A) The nucleotide sequences of the clone IR-R38 and (B) comparison of the nucleotide sequences of IR-R38 with those of *C. elegans* cosmid F09C12.

3. ELISA를 이용한 신속진단법 개발 및 현장에의 적용

본 연구에서 제조한 단일클론 항체를 사용하여 ELISA를 수행함으로써 iridovirus를 신속 진단 하고자 하였다. 먼저 본 연구팀이 제조한 단일클론항체의 iridovirus에 대한 특이성을 확인하고자 하였다. 이를 위하여 정상적인 해산어에서 조직세포를 취하고 또한 iridovirus에 감염되어 병 증세를 뚜렷하게 보이는 해산어에서 역시 조직을 취하였다. Lysis buffer를 사용하여 세포의 lysate를 얻은 다음 여기에 존재하는 총 단백질의 양을 측정하였다. 정상적인 어체의 시료와 iridovirus 감염된 어체의 시료에서 각각 동일한 양의 lysate를 취한 다음 이를 2배씩 희석하여 ELISA plate에 넣었다. 이들을 단일클론항체들을 사용하여 ELISA를 수행함으로써 각 단일클론항체의 iridovirus에 대한 특이성을 확인하였다. 본 연구에서 제조한 단일클론항체들중 역가가 높은 3종류인 AA3, BE4 그리고 CE1를 우선적으로 사용하였다. 그 결과 실험에 사용한 3종류의 단일클론항체 모두 정상적인 어체와는 반응을 하지 않고 iridovirus에 감염된 시료에만 특이하게 반응을 하였다 (Fig. 19). 본 ELISA의 수행에는 약 6시간 정도만 소요되었는데, 이로부터 본 연구에서 제조한 단일클론항체들이 iridovirus의 신속진단용으로 사용 가능함을 확인할 수 있었다.

다음으로 ELISA를 사용한 진단법이 iridovirus감염후 어느 정도의 시기에서 검출이 가능한지를 확인하고자 하였다. 이 실험을 위하여 iridovirus가 감염되어 있는 양식장의 해산어중 겉으로 보기에 정상적으로 보이는 것들과 초기증세를 보이는 것들을 대상으로 단일클론항체를 사용한 ELISA 실험을 수행하였다. 그 결과 Table 5와 같았다. 즉 일단 초기증세를 보이는 것들은 모두 ELISA 반응에서 양성반응이 나왔다. 그리고 겉으로 보기에 정상적인 것으로 보이는 시료 6마리 중에 2마리에서 양성 반응이 나왔다. 이로부터 본 연구에서 제조한 단일클론항체를 사용한 ELISA 법은 적어도 초기증세를 보이는 어체에 있어서 신속 진단이 가능한 것으로 확인 되었다.

Table 5. Iridovirus detection from cultured flounder by ELISA

Number	Fish	Body weight	External symptom	ELISA test
1	Flounder	550 g	Normal	Negative
2	"	500 g	"	Negative
3	"	600 g	"	Positive
4	"	700 g	"	Positive
5	"	670 g	"	Negative
6	"	650 g	"	Negative
7	"	550 g	Early phase of tumor	Positive
8	"	600 g	"	Positive
9	"	680 g	"	Positive
10	"	650 g	"	Positive
11	"	550 g	Late phase of tumor	Positive
12	"	650 g	"	Positive
13	"	580 g	"	Positive

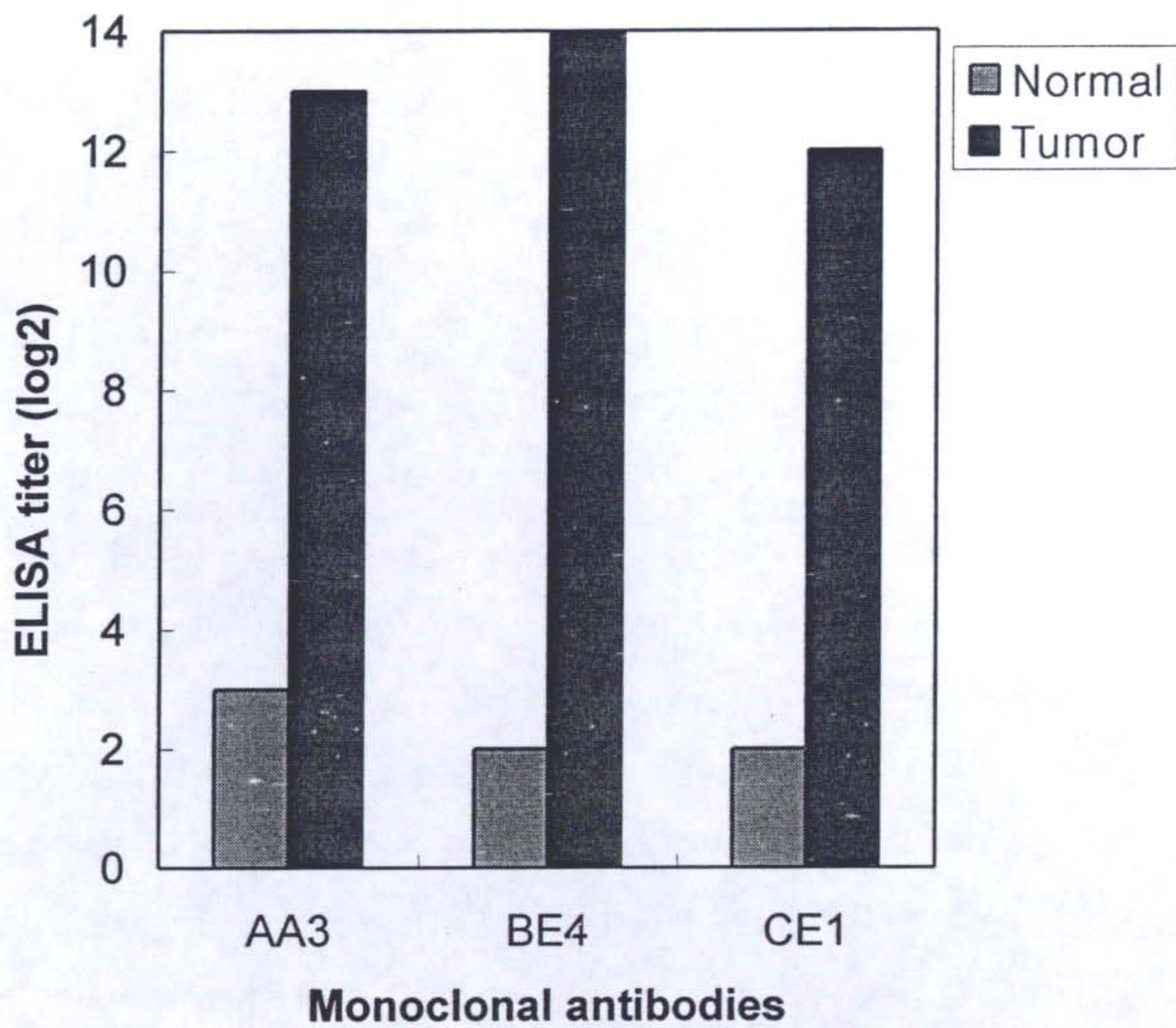


Fig. 19. Reactivities of monoclonal antibodies with tissue extracts of fish. Normal tissues and tumor tissues were collected from cultured normal flounder. The tissue extracts were tested for the reactivities with three monoclonal antibodies by ELISA.

4. PCR을 이용한 신속진단법 개발 및 현장에의 적용

앞에서 설명한 iridovirus의 clone들의 nucleotide sequence로부터 PCR primer를 제조한 다음 이를 사용한 PCR을 수행하였다. 이 primer를 사용하여 합성되는 PCR product의 예상 size는 재료 및 방법의 표 2에서와 같이 약 300 bp 정도이다. PCR의 template으로써 정상적인 어류세포에서 추출한 DNA, 종양을 유발하는 iridovirus의 DNA 그리고 폐사를 유발하는 iridovirus의 DNA, 그리고 폐사를 유발하는 iridovirus가 감염된 세포의 DNA 등의 4종류를 사용하였다. 그 결과 Fig. 20-24과 같았다. 먼저 IR-R4의 경우 iridovirus와 바이러스 감염된 세포의 DNA에서 PCR 결과가 나왔지만 정상적인 세포에서도 PCR 결과가 나왔다 (Fig. 20). 이로부터 IR-R4의 PCR primer는 iridovirus의 진단에 적합하지 않은 것으로 판단된다. 이와같은 결과가 나온 이유는 아직 정확하게 알 수 없다. 다만 IR-R4가 세포의 유전자에서 유래된 것이거나 아니면 세포와 바이러스 모두가 공통으로 지니는 conserved gene일 가능성이 있다. 다음으로 IR-R4에서 유래된 PCR primer를 제외한 4종류의 모두를 제외한 모두 정상적인 세포에서 추출한 DNA에서는 PCR product가 나타나지 않았으며 폐사를 유발하는 iridovirus에서는 모두 약 300 bp 정도의 PCR product가 합성되었다 (Fig. 21-24). 이 결과로부터 본 연구에서 제조한 이들 4종류의 PCR primer들은 폐사를 유발하는 iridovirus의 진단에 사용할 수 있음을 말하여 준다. 그리고 또한 본 연구에서 cloning한 iridovirus의 genomic DNA clone들의 nucleotide sequence가 iridovirus 유전자가 아닌 다른 유전자와 homology가 가장 높은 것으로 나왔지만 iridovirus gene의 clone이 맞음을 나타낸다. 이와같은 결과가 나온 이유는 역시 앞에서 설명하였듯이 iridovirus의 대부분 유전자가 아직 cloning되지 않았기 때문에 GenBank상에 등록되어 있지 않아서 나타난 것으로 생각된다. 그리고 IR-R6의 경우 폐사를 유발하는 iridovirus 뿐만 아니라 종양을 유발하는 iridovirus에서도 PCR 결과가 나왔다 (Fig. 24). 이와같은 결과가 나온 이유는 IR-R6 clone의 gene이 두 종류의 바이러스 사이에 conserved 되어 있음을 나타낸다. 또한 IR-R6는 두종류 바이러

스 모두의 진단에 사용 가능함을 말하여 준다. 그리고 PCR 결과로부터 두종류의 바이러스는 비록 IR-R6부분은 유사한 유전자를 지니고 있을지라도 나머지 4종류의 clone들에 해당하는 유전자들은 서로 다름을 알 수 있었다. 이 결과는 앞의 항체를 사용한 Western blotting 실험 결과와 같이 판단하였을 때 두 종은 다른 종임을 알 수 있었다.

위의 PCR을 수행하여 agarose gel electrophoresis를 통하여 결과를 얻기까지 3-4시간이면 충분하다. 따라서 PCR을 사용한 iridovirus의 신속 진단이 가능한 것으로 판단된다.

본 연구에서는 해산어에 감염하여 질병을 유발하는 iridovirus를 신속진단할수 있는 ELISA와 PCR법을 개발하였다. 이 방법을 사용하여 기존에 널리 퍼져있는 종양을 유발하는 iridovirus가 더 확산되는 것을 막고 또한 아직까지 우리 나라에 확산되어 있지 않은, 폐사를 유발하는 iridovirus가 외국에서 유입되는 것을 막는데 활용하여 양식 해산어에 발생하는 피해를 최소화하는 것이 필요하다.

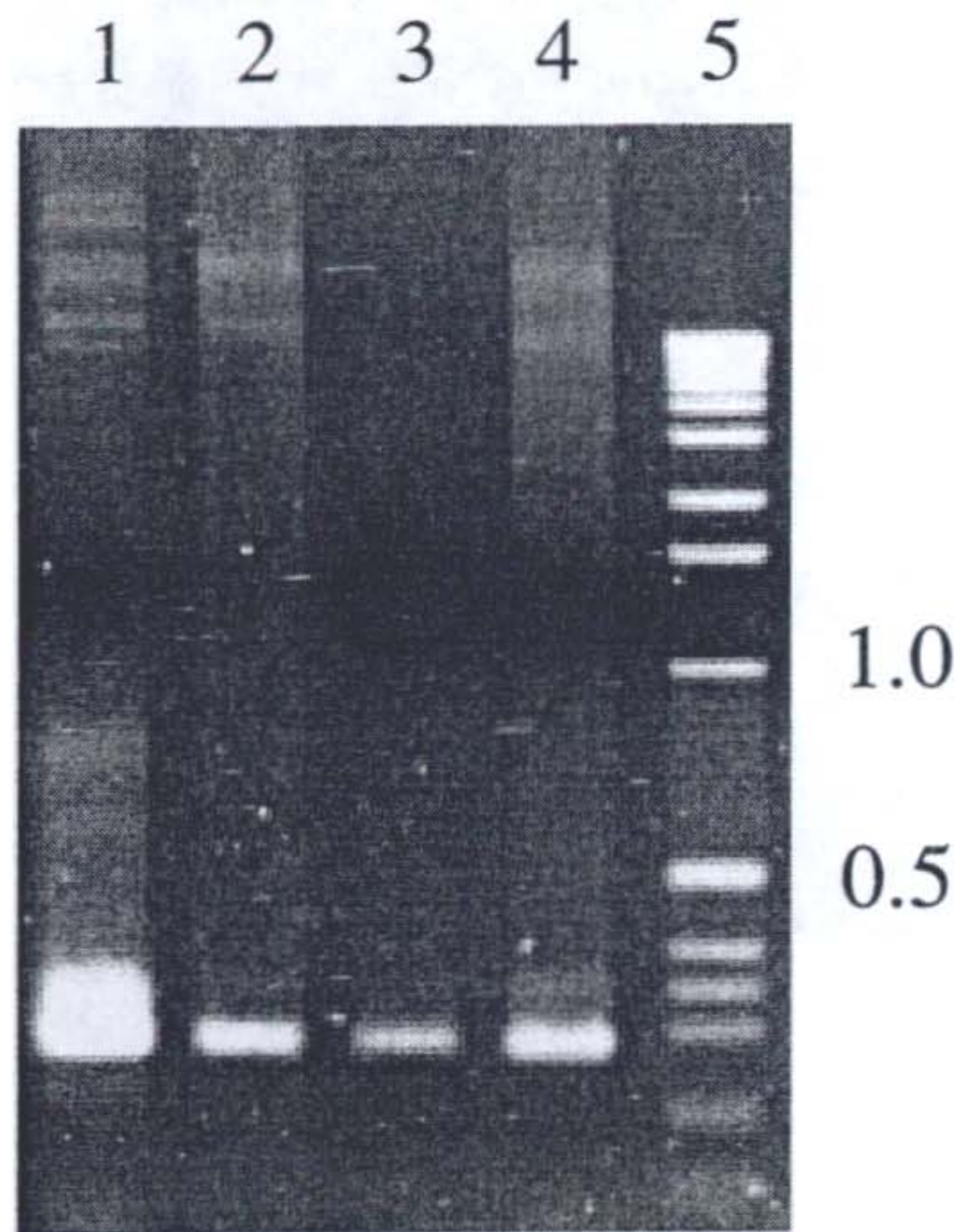


Fig. 20. Agarose gel electrophoresis of the PCR products. Genomic DNAs were extracted from (lane 1) mortality-associated iridovirus, (lane 2) tumor-inducing iridovirus, (lane 3) normal GF cells, and (lane 4) mortality-associated iridovirus-infected GF cells. Specific gene fragments of these DNAs were amplified by PCR with primer derived from the clone IR-R4. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. Lane 5, DNA ladder marker.

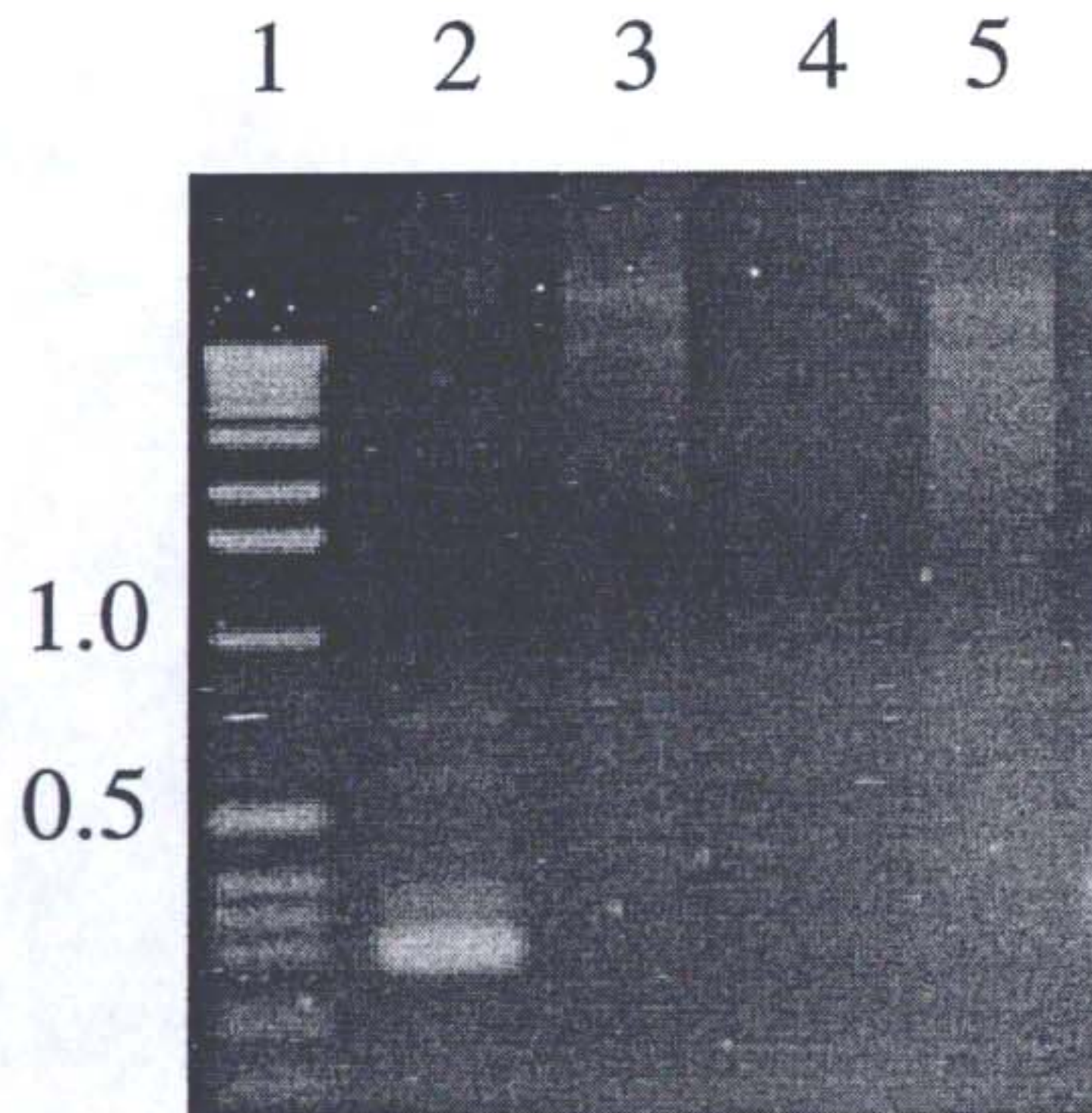


Fig. 21. Agarose gel electrophoresis of the PCR products. Genomic DNAs were extracted from (lane 2) mortality-associated iridovirus, (lane 3) tumor-inducing iridovirus, (lane 4) normal GF cells, and (lane 5) mortality-associated iridovirus-infected GF cells. Specific gene fragments of these DNAs were amplified by PCR with primer derived from the clone IR-R2. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. Lane 1, DNA ladder marker.

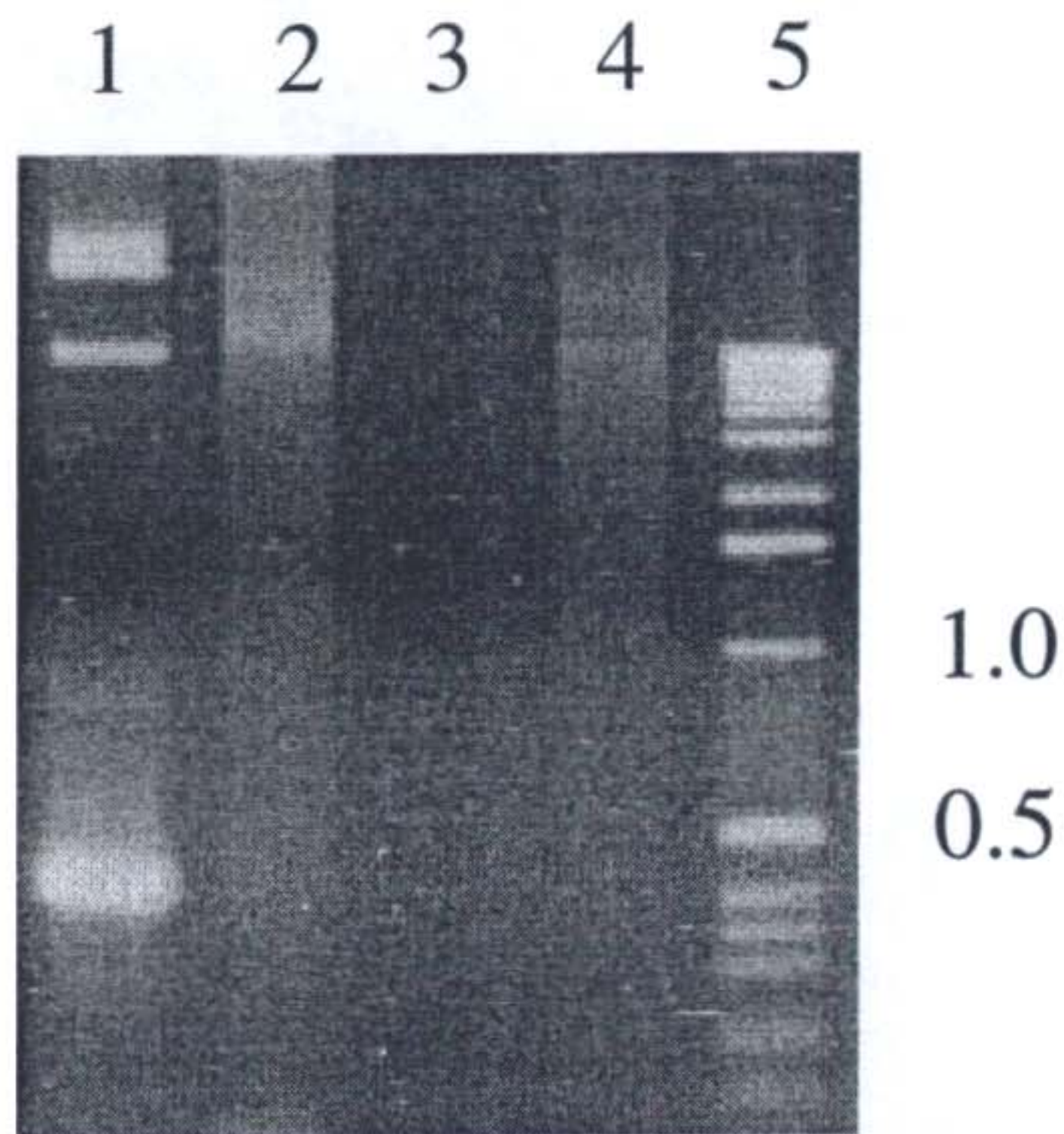


Fig. 22. Agarose gel electrophoresis of the PCR products. Genomic DNAs were extracted from (lane 1) mortality-associated iridovirus, (lane 2) tumor-inducing iridovirus, (lane 3) normal GF cells, and (lane 4) mortality-associated iridovirus-infected GF cells. Specific gene fragments of these DNAs were amplified by PCR with primer derived from the clone IR-R17. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. Lane 5, DNA ladder marker.

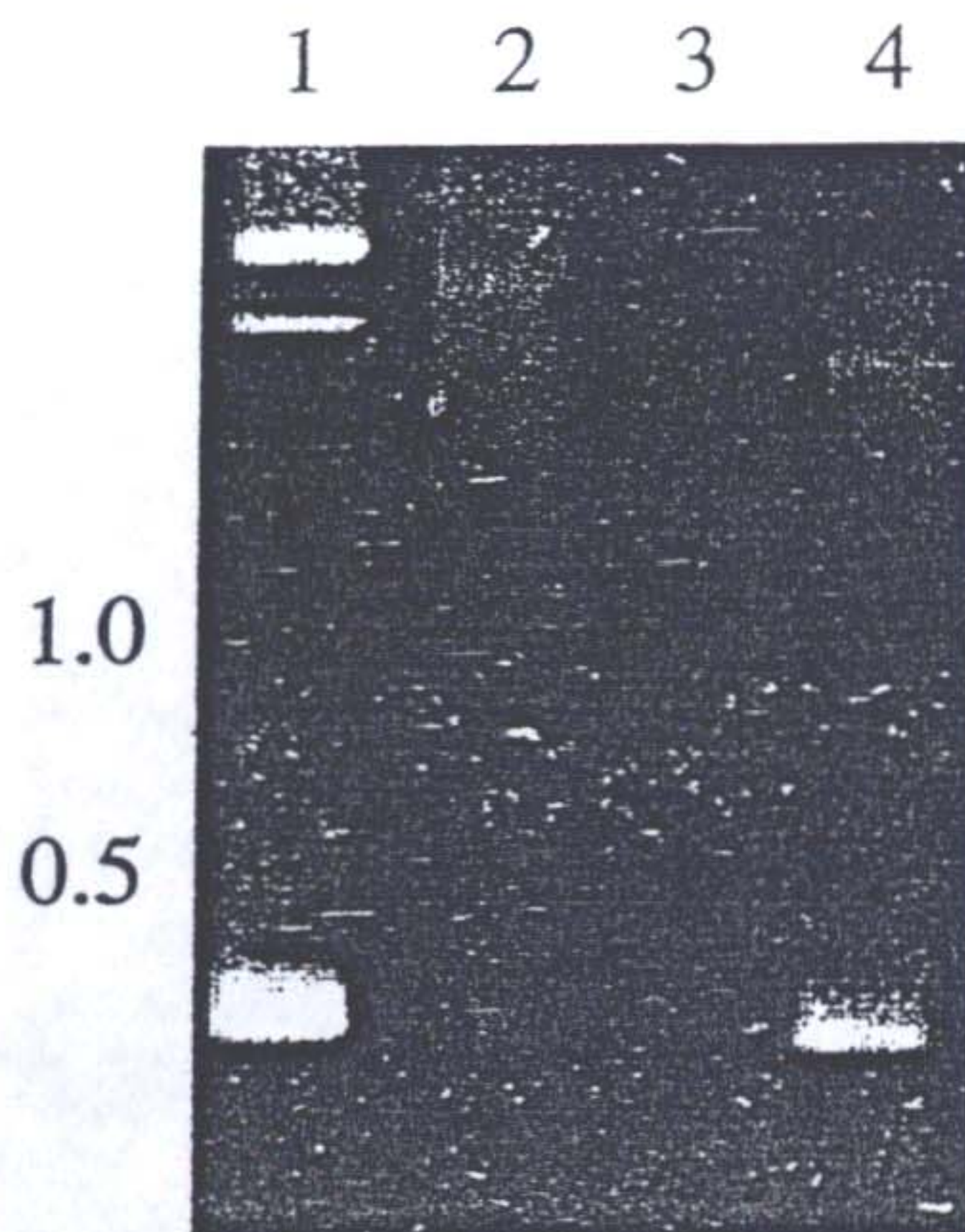


Fig. 23. Agarose gel electrophoresis of the PCR products. Genomic DNAs were extracted from (lane 1) mortality-associated iridovirus, (lane 2) tumor-inducing iridovirus, (lane 3) normal GF cells, and (lane 4) mortality-associated iridovirus-infected GF cells. Specific gene fragments of these DNAs were amplified by PCR with primer derived from the clone IR-R38. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. DNA size markers are indicated on the left.



Fig. 24. Agarose gel electrophoresis of the PCR products. Genomic DNAs were extracted from (lane 1) mortality-associated iridovirus, (lane 2) tumor-inducing iridovirus, (lane 3) normal GF cells, and (lane 4) mortality-associated iridovirus-infected GF cells. Specific gene fragments of these DNAs were amplified by PCR with primer derived from the clone IR-R6. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. DNA size markers are indicated on the left.

참고문헌

Bloch, B., K. Gravningen and J. L. Larsen, 1991. Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Dis. Aquat. Org.* **10**: 65-70.

Chua, I. H. C., M. L. Ng, K. L. Ng, J. J. Loo, and J. Y. Wee. 1994. Investigation of outbreaks of a novel disease, sleepy grouper disease, affecting the brown spotted grouper, *Epinephelus tauvina* Forskal. *J. Fish Dis.* **17**: 417-427.

Evelyn, T. P. T., and G. S. Traxler. 1978. Viral erythrocytic necrosis: natural occurrence in Pacific salmon and experimental transmission. *J. Fish Res. Bd. Can.* **35**: 903-904.

Gilmore, R. D., H. M. Engelking, D. S. Manning, and J. C. Leong. 1988. Expression in *E. coli* of an epitope of the glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus protect against viral challenge. *Bio/Technology.* **6**(3): 85-90.

Hah, Y. C., S. W. Hong, M. H. Kim, J. L. Fryer, and J. R. Winton. 1984. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from gold fish (*Carassius auratus*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in Korea. *KOR. J. Microbiol.* **22**(2):85-90.

Hedrick, R. P, W. D. Eaton, J. L. Fryer, Y. C. Hah, J. W. Park, and S. W. Hong. 1985. Biochemical and serological properties of birnaviruses isolated from fish in Korea. *Fish Pathol.* **20**(4):463-468.

Iida, Y., K. Masumura, T. Nakai, M. Soromachi and H. Matsuda. 1989. A viral disease in larvae and juveniles of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquat. Anim. Health.* **1**: 7-12

Inoue et al., 1986. *Fish Pathol.* **21**(2): 129-130

Inouye, K., K. Yamano, Y. Maeno, K. Nakajima, M. Matsuoka, Y. Wada, and M. Sorimachi. 1992. Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Gyobyō Kenkyū.* **27**(1): 19-27.

Kimura, T., M. Yoshimizu, and S. Gorie. 1986. A new rhabdovirus isolated in Japan from cultured hirame (Japanese flounder) *Paralichthys olivaceus* and ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Org.* **1**: 209-217.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Laird, M., and W. L. Bullock. 1969. Marine fish hematozoa from new Brunswick and New England. *J. Fish Res. Bd. Can.* **26**: 1075-1102.

Langdon, J. S., J. D. Humphrey and L. M. Williams. 1986. First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from redfin perch, *Perca fluviatilis* L. *J. Fish Dis.* **9**: 263-268.

LaPatra, S. E., J. M. Groff, G. R. Jones, B. Munn, T. L. Patterson, R. A. Holt, A. K. Hauck, and R. P. Hedrick. 1994. Occurrence of white sturgeon iridovirus infections among cultured white sturgeon in the Pacific Northwest. *Aquaculture.* **126**: 201-210.

Lawrence, W. R., E. Nagy, R. Duncan, P. Krell, and P. Dobos. 1989. Expression in *E. coli* of the major outer capsid protein of infectious pancreatic necrosis virus. *Gene.* **79**: 369-374.

Lopez, D. M., M. M. Sigel, A. R. Beashley, and L. S. Dietrich. 1969. Biochemical and morphological studies of lymphocystis diseases. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* **31**: 223-236.

Miyata, M., K. Matsuno, S. J. Jung, Y. Danayadol, and T. Miyazaki. 1997. Genetic similarity of iridoviruses from Japan and Thailand. *J. Fish Dis.* **20**: 127-134.

Nagy, E., and P. Dobos. 1987. Epitope mapping of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) polypeptides using monoclonal antibodies. VII. International Congress of Virology, Edmonton, Canada. Abstracts. OP 25.2, p. 311.

Nakajima, K., and M. Sorimachi. 1994. Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish pathol.* **29**(1): 29-33.

Nakajima, K., Y. Maeno, M. Fukudome, Y. Fukuda, S. Tanaka, S. Matsuoka, and M. Sorimachi. 1995. Immunofluorescence test for the rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using monoclonal antibody. *Fish Pathol.* **30**: 115-119.

Park, J. W., J. J. Lee, G. Jeong, and Y. C. Hah. 1989. Characterization of the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolated from pen-cultured rainbow trout in Korea. *KOR. J. Microbiol.* **27**(3):225-230.

Park, M. A., S. G. Sohn, J. W. Park, and Y. K. Jeong. 1994. Characterization of infectious hematopoietic necrosis virus isolated in Korea. *J. Fish Pathol.* **7**(1): 13-22.

Park, M. A., S. G. Sohn, S. D. Lee, S. K. Chun, J. W. Park, J. L. Fryer and Y. C. Hah. 1993. Infectious Hematopoietic Necrosis Virus from salmonids cultured in Korea. *J. Fish Dis.* **16**:471-478

Reno, P. W., M. Philippon-Fried, B. L. Nicholson, and S. W. Sherburne. 1978. Ultrastructural studies of piscine erythrocytic necrosis (PEN) in Atlantic herring (*Clupea harengus harengus*). *J. Fish Res. Bd. Can.* **35**: 148-154.

Roberts, R. J. 1976. Experimental pathogenesis of lymphocystis in the plaice

- (Pleuronectes platessa). In *Wildlife Diseases*, ed. I. A. Page. London: Plenum.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **74**: 5463-5467.
- Schnitzler, P., and G. Darai. 1989. Characterization of the repetitive DNA element in the genome of fish lymphocystis disease viruses. *Virology* **172**: 32-41
- Sohn, S. G. 1992. An infectious grouper virus (IGV) causing outbreaks of disease to the grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. Ph.D. thesis. National Fisheries University of Pusan.
- Sohn, S. G., M. A. Park., J. W. Do., J. Y. Choi., and J. W. Park. 1995. Birnavirus isolated from cultured flounder in Korea. *Fish Pathol.* **30(4)**: 279-280.
- Walker, R., and S. W. Sherburne. 1977. Piscine erythrocytic necrosis virus in Atlantic cod, *Gadus morhua*, and other fish: ultrastructure and distribution. *J. Fish Res. Bd. Can.* **34**: 1188-1195.
- Xu, L., D. V. Mourich., H. M. Engelking, S. Ristow, J. Arnzen, and J. C. Leong. 1991. Epitope mapping and characterization of infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein, using fusion proteins synthesized in *E. coli*. *J. Virol.* **65(3)**: 1611-1615.
- Yoshikoshi, K., and K. Inoue. 1990. Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus*. *J. Fish Dis.* **13**: 69-77.