H-6

양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*에서 분리된 림포시스티스 바이러스의 genomic DNA 분석과 PCR을 이용한 바이러스 검출

김수미 · 박수일 · 손상규* · 박명애*
부경대학교 · *국립수산진흥원

서론

*Iridoviridae*과에 속하는 lymphocystis disease virus(LDV)는 비교적 큰 20면체 DNA 바이러스이며(Murphy *et al.*, 1995), 림포시스티스병(lymphocystis disease, LD)을 유발하는 원인체로서 140여종 이상의 해수 및 담수 어종에서 보고된 바 있다(Wolf *et al.*, 1966). 우리 나라의 경우, 주요 양식 어종인 넙치에 주로 감염되어 2차 감염과 빈혈 및 합병증 등에 의해 폐사를 유발할 뿐만 아니라 상품성을 저하시킴으로서 경제적 손실을 야기한다.

LDV는 geno type이 다른 FLDV-1과 FLDV-2가 존재한다고 알려져 있다(Darai, 1986; Schnizler and Darai, 1989). European flounder에서 분리한 FLDV-1의 genome DNA의 전체 염기 배열이 밝혀져 있으며(Tidona and Darai, 1997), Chinese flounder에서 분리된 LDV의 일부 유전자 배열이 GeneBank 상에 등재되어 있으나(Xu *et al.*, 1999), 우리 나라의 양식 넙치에서 분리되는 LDV의 유전자는 기존의 보고와 상당한 차이가 있는 것으로 나타났다.

본 연구에서, gene cloning을 통하여 우리 나라에서 분리되는 LDV의 유전자 분석을 실시함으로서 LDV의 정확한 유전 정보를 밝히고 기존의 보고와 이를 비교 분석하였다. 또한, 본 연구의 유전 정보를 이용한 감도 높은 LDV 검출법(PCR)을 고안하여 육안적으로 감염이 확인되지 않는 내부 장기에서 LDV를 검출하였다.

재료 및 방법

실험어 : 실험어로서는 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 사용하였으며 감염어의 lymphocystis cell(LC)를 분리하여 -80 ℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

바이러스의 분리 : Darai *et al.*(1983)의 방법에 따라 sucrose gradient(25~60%)상에서 초고속 원심 분리하여 바이러스 밀도차에 의한 분리법을 이용하였다.

Viral genomic DNA cloning : 바이러스의 DNA는 DNAzol(GibcoBRL)을 이용하여 분리하였고 Hind III로 genomic DNA를 절단하여 pGEM 4Z vector에 연결 시켜 *E. coli* (DH 4α)에서 transformation하여 gene cloning하였다.

DNA sequencing : Sanger *et al.* (1977)의 방법에 따라 automatic sequencer (ABI

version 3.2, USA)로 sequencing을 실시하였다.

염기 서열 비교 분석 : Genetyx program과 NCBI에서 제공되는 BLAST program으로 이미 밝혀져 있는 바이러스의 염기 배열과의 상동성을 비교 분석하였다.

PCR을 이용한 LDV 검출 : 감염어 및 정상어의 내부 장기에서 DNA를 추출하여 3sets의 특이 primer로 PCR함으로서 바이러스 검출 여부를 조사하였다.

결과 및 요약

감염 세포에서 분리한 바이러스로부터 DNA를 추출하여 genomic DNA library를 제작하였다. Hind III로 절단한 LDV의 DNA 단편을 vector에 삽입시켜 얻은 재조합된 plasmid에서 2,586 bp의 바이러스 DNA를 확인할 수 있었고 이를 분석한 결과, G+C 함량이 32.68 %의 major capsid protein(MCP) gene으로 확인되었다. 이 염기 배열을 기보고된 LDV의 염기 배열과 비교해 보았을 때, complete FLDV-1 DNA, FLDV-1 MCP gene 및 Chinese flounder LDV partial MCP gene과 각각 78 %, 75 %, 99.9 %의 상동성을 나타내었다.

PCR법으로 넙치의 LDV를 검출하기 위하여, 본 연구에서 분석한 염기 배열을 기초로 3 가지 특이 primer sets(MCP, preMCP, postMCP primer)를 설계하였으며 이들 각각의 primer는 LDV의 DNA를 특이적으로 증폭시킬 수 있었다. LDV에 감염되어 체표 등에 LC를 형성한 넙치와 그렇지 않은 어류의 장기 조직을 검사 대상으로 PCR을 수행한 결과, LC가 확인되는 감염어의 경우 LC 뿐만 아니라 간, 신장, 비장, 아가미 등에서도 바이러스를 검출할 수 있었으며 육안적으로 감염이 확인되지 않는 넙치의 내부 장기에서도 바이러스가 검출되었다. 본 연구의 PCR법은 10 pg 이하의 LDV DNA까지 검출 가능한 것으로 조사되어 sensitivity가 매우 높아 감염어의 내부 장기뿐만 아니라 정상 넙치의 LDV 감염 여부를 screening하는데 있어도 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

참고 문헌

Murphy, F. A., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo and M. D. Summers (1995). Virus taxonomy. In *Sixth report of the international committee on taxonomy of virus*. Wien and New York, Springer-Verlag.

Schnitzler, P. and G. Darai (1993). Identification of the gene encoding the major capsid protein of fish lymphocystis disease virus. J. Gen. Virol., 74, 2143-2150.

Tidona, A. G. and G. Darai (1997). The complete DNA sequence of lymphocystis disease virus. Virol., 230, 207-216.

Xu, H. T., C. A. Piao, Z. L. Jiang and W. X. Wang (1999). Partial sequence analysis of the major capsid protein gene of Chinese flounder lymphocystis disease virus. Unpublished, http://www.ncbi.nlm.nih.gov.