

## 어류바이러스의 분자생물학적 연구 및 응용

최 태 진

부경대학교 미생물학과

## 서 론

최근의 어장의 황폐화와 수·해양 환경의 오염으로 인해 어획량은 수요에 못 미쳐 양식의 중요성이 더해가고 있다. 더욱이 최근 WTO 체제의 출범으로 인한 농·수산 시장의 개방화, 국제화에 따라 경쟁시장에서 자국의 농수산물 시장을 보호하고 고급 수산물을 안정적으로 확보하기 위하여 집약적 첨단기술개발에 의한 양식산업의 생산력 증대가 시급한 상황이다.

양식에 의한 수산물의 의존률이 높아짐에 따라 새로운 양식 어종이 개발되고 있으며 양식 기술 또한 빠르게 발전하고 있다 (표 1).

Table 1. Changes in annual production of cultured marine in Korea

Common name	Scientific name	Production*			
		1990	1994	1995	1996
Flounder	<i>Paralichthys olivaceus</i>	1,037	16,339	17,016	28,203
Yellow tail	<i>Seriola quinqueradiata</i>	462	963	272	1,395
Sea breams	<i>Pagrus major</i>	229	316	131	693
Rock fish	<i>Sebastes schlegeli</i>	386	4,406	10,410	22,569
Sea bass	<i>Lateolabrax japonicus</i>	391	830	432	1,402
Mullet	<i>Mugil cephalus</i>	-	-	-	1,011
Grouper	<i>Epinephelus septemfasciatus</i>	-	-	-	74
Others		152	283	472	1,446
<b>Total</b>		<b>2,656</b>	<b>22,499</b>	<b>28,733</b>	<b>56,789</b>

\* Metric

Data from National Fisheries Research and Development institute in 1997.

양식어류의 생산성 증대를 위해서는 양식기술 개발, 새로운 품종의 개발, 먹이 사료의 개발 외에 건강한 치어의 공급이 필요하다. 이러한 치어의 안정적 공급의 중요 장애 요인으로는 병에 의한 대량 폐사를 들 수 있다 (표 2).

어류에 질병을 일으키는 주요 병원균으로는 세균, 곰팡이 리케치아, 바이러스 등이 있는데 이들 중 바이러스는 증식과정에 기주체의 기작을 이용하기 때문에 다른

병원균들과는 달리 항생제를 이용한 치료법이 극히 제한되어 있는데 최근 국내에서도 많은 종류의 어류 바이러스가 보고되고 있다 (표 3, 4).

Table 2. Loss of marine fishes and shrimp due to diseases in Korea

Fish species	Production*	Loss*	Loss (%)
Flounder	109,713	11,720	10.7
Rock fish	103,180	4,365	4.2
Sea breams	8,228	896	10.9
Sea bass	9,990	479	4.8
Tiger puffer	70	0.5	0.7
Penaeid Shrimp	346,000	70,000	20.2
Others	4,534	125	3.1
<b>Total</b>	<b>581,715</b>	<b>87,585.5</b>	<b>15.1</b>

\* Numer of individuals  $\times$  1,000

Dats from National Fisheries Research and Development Institute in 1997.

Table 3. DNA virus diseases of cultured marine fish in Korea

Virus name	Abbreviation	Affected fish	Reference
<i>Herpesviridae</i> flounder herpesvirus	FHV	Japanese flounder	Oh (1991)
<i>Iridoviridae</i> lymphocystis disease virus	LCDV	Rock fish Flounder, Sea bass	Chun <i>et al.</i> (1988) Oh <i>et al.</i> (1999d)
red sea bream iridovirus	RSIV	Striped beakperch Sea breams Rock fish	Jung & Oh (1999) Oh <i>et al.</i> (1999c)
<i>Baculoviridae</i> white spot syndrom	WSBV	<i>Penaeus chinensis</i>	Kim <i>et al.</i> (1999)

바이러스의 진단 방법으로는 병징을 이용하는 방법, 조직병리학적 검사, 배양세포 접종에 의한 방법 등이 이용되어 왔으며 ELISA, Western blot, immunoblot, fluorescent antibody와 같은 분자생물학적 방법들도 이용되었다. 최근에는 중합효소 연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR)을 이용한 어류의 바이러스의 진단법이 시도되고 있는데 이 방법은 특이성과 감도가 뛰어나 새로운 진단 방법으로 널리 이용될 것으로 기대된다. 이 방법을 이용하기 위하여는 바이러스 유전자의 전부 또는 일부의 염기 서열을 알아야 한다는 제한 조건이 있으나 최근 들어 주요

Table 4. RNA virus diseases of cultured marine fish in Korea

Virus name	Abbreviation	Affected fish	Reference
<i>Birnaviridae</i> infectious pancreatic necrosis virus	IPNV	Japanese flounder	Sohn <i>et al.</i> (1995) Oh <i>et al.</i> (1997)
marine birnavirus	MABV	Rock fish Japanese flounder Rock fish, Sea bass	Seo <i>et al.</i> (1998) Oh <i>et al.</i> (1999a,b)
<i>Rhabdoviridae</i> hirame rhabdovirus	HIRRV	Japanese flounder	Oh <i>et al.</i> (1997)
nubchi rhabdovirus	NRV	Japanese flounder	Oh & Choi (1998)
<i>Nodaviridae</i> striped jack nervous necrosis virus	SJNNV	Sevenband grouper	Sohn <i>et al.</i> (1998)

어류 바이러스의 유전자 염기서열이 밝혀지고 있고 반응을 억제하는 시료에 포함된 불순물을 제거하는 방법들이 개발되고 있어 이 방법의 적용이 확대될 것으로 기대된다.

원인 바이러스에 대한 정확한 진단에 의하여 바이러스의 유입을 막고 병든 어류를 폐기하여 병의 전파를 억제하는 방법 이외에 바이러스를 예방하는 방법으로는 예방백신이 있다. 사람이나 동물의 경우에는 바이러스의 존재가 밝혀지기 이전에 이미 이 방법이 이용되었으나 어류 바이러스의 경우 백신으로 이용할 바이러스의 대량분리가 이루어지지 못하여 이용이 제한되어 왔다. 그러나 최근 들어 분자 생물학적 기법이 도입되어 바이러스 유전자가 클론됨으로서 이들 유전자들을 대장균을 이용하여 이것을 백신으로 이용하려는 연구가 외국에서는 활발하게 진행되고 있다. 국내의 경우 오랜 어류 양식의 역사와 새로운 양식 기술의 발달에도 불구하고 바이러스의 분자생물학적 연구와 백신 개발에 대한 연구는 극히 제한되어 있다.

본 발표에서는 넙치에 발생하는 주요 바이러스의 하나인 hirame rhabdovirus (HIRRV) 유전자의 분자 생물학적 연구 및 이를 이용한 백신개발에 대하여 발표하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 바이러스

본 실험에 사용된 hirame rhabdovirus (HIRRV CA-9703 strain)는 1997년 통영의 양식장의 병든 넙치 신장에서 분리된 것을 사용하였다.

### 증식 및 분리

75cm<sup>2</sup> plastic tissue culture flasks (Sarstedt)에서 배양된 RTG-2 세포에

MOI=0.01-0.001로 바이러스를 접종하였고 15°C에서 증식하였다. 7일 후 또는 세포의 lysis가 보인 후, 배양액을 4,000×g에서 10분간 원심분리한 후, 상층액에 7%(w/v) polyethylene glycol (PEG-6000)을 첨가하여 혼합액을 4°C에서 천천히 흔들어 주었다. 6,000×g에서 30분간 원심분리하여 침전물은 TNE buffer (0.01M Tris.Cl, pH 8.0, 0.1M NaCl, 0.001M EDTA)에 녹였다. 시료를 20%, 30%, 50% sucrose discontinuos gradient로 80,000×g에서 90분간 원심분리하여 바이러스 band를 분리하였다. 분리된 viral particles는 115,000×g에서 60분간 원심분리하여 침전물은 TNE buffer에 녹이고 -80°C에 사용하기 전까지 보관하였다. 정제된 바이러스는 SDS-PAGE 분석을 하였다.

### 클로닝 및 염기서열 분석

#### Cloning of 3' region by poly(A) tailing

Genomic RNA의 3'말단을 클로닝하기 위해 poly(A) tail은 poly (A) polymerase를 사용하여 합성하였다. Tailing은 2 $\mu$ l의 5× reaction buffer (100mM Tris.Cl, pH7.0, 250mM KCl, 3.5mM MnCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 50 $\mu$ g/ml acetylated BSA, 50% glycerol), 100mM의 ATP 0.5 $\mu$ l, RNase (40u/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ l, poly (A) polymerase 1 $\mu$ l (Amersham, yeast) 그리고 10ng의 정제된 HIRRV genomic RNA로 혼합된 10 $\mu$ l의 poly (A) tailing mixture에서 반응하였다. Reaction mixture는 5분간 37°C에서 처리하고 phenol:chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1)로 추출하였다. 말린 RNA은 20 $\mu$ l reverse transcription reaction mixture에 녹였다.

#### RT-PCR

RT-PCR에 사용된 primer는 발표된 HIRRV의 일본 strain의 일부 염기 서열을 참고하여 제작하였다. 정제된 RNA는 4 $\mu$ l의 5× reaction buffer (250mM Tris.Cl, pH8.3, 250mM KCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5mM spermidine, 50mM DTT) 0.5 $\mu$ l의 RNasin (40u/l) 1mM dNTP, 0.5 $\mu$ l의 AMV RTase (10u/ $\mu$ l) 그리고 antisense primer 0.5 $\mu$ l을 혼합한 20 $\mu$ l reverse transcription mixture에 녹였다. Reaction mixture는 25°C에서 10분간 반응시키고 42°C에서 60분간 반응하였다. 합성된 cDNA template는 5 $\mu$ l의 10×buffer (100mM Tris.Cl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 0.2mM dNTP, 0.5 $\mu$ l의 Taq DNA polymerase (5u/ $\mu$ l) 그리고 50pmole sense primer를 혼합한 30 $\mu$ l PCR mixture를 첨가하여 증폭하였다. PCR 반응조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation하고 94°C에서 1분간 denaturation, 50°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1.5분간 extension을 40cycles 하고 72°C에서 7분간 post-extension을 하였다. PCR product는 1% agarose gel 전기영동하여 확인하였다.

#### Cloning of 5' trailer region

Genomic RNA의 5'말단을 클로닝하기 위해 poly(c) tail은 TdT(Terminal

Deoxynucleotidyl Transferase)를 사용하여 합성하였다. RT-PCR과 같은 방법으로 cDNA를 합성하였다. Tailing은  $2\mu\text{l}$ 의  $5\times$  reaction buffer (50mM Cacodylate buffer(pH6.8), 5mM  $\text{CoCl}_2$ , 0.5mM DTT), 20mM의 CTP  $1\mu\text{l}$ , TdT( $20\text{u}/\mu\text{l}$ )  $2\mu\text{l}$ , (Promaga) 그리고 cDNA template로 혼합된  $10\mu\text{l}$ 의 poly (C) tailing mixture에서 반응하였다. Reaction mixture는 1시간  $37^\circ\text{C}$ 에서 처리하고 phenol:chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1)로 추출하였다. 말린 반응물은  $50\mu\text{l}$ 의 second synthesis reaction mixture에 녹인 다음 PCR 반응을 수행하였다.

### 제조합 Glycoprotein의 발현

HIRRV G protein의 C-terminal 절반을 Glutathione-S-transferase (GST)와의 fusion 단백질로 대량발현하기 위하여 expression vector pGEX4T-1에 HIRRB g protein 유전자의 C-terminus 부분을 subcloning하여 BL21 (DE3) *E.coli* strains에 형질전환하였다. 이렇게 만들어진 pGEXHRG' clone은 HIRRV G protein을 대량 발현하기 위해서 이용하였다. pGEXHRG' 클론으로 형질전환 된 *E.coli*를 ampicillin ( $50\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 함유된 LB배지에 접종하고  $\text{OD}_{600}=0.5$ 가 될 때까지 배양하여 1mM IPTG로 induction시킨 다음 배양하였다. 각 세포들을 원심분리하여 모으고 pellet을 sample loading buffer에 녹이고  $100^\circ\text{C}$ 에서 5분간 끓인 다음 얼음에서 냉각시켰다. 식힌 sample을 12.5% SDS-PAGE gel 과 2.5% acrylamide stacking gel을 이용하여 SDS-PAGE 분석을 수행하였다. 전기영동 후, gel을 coomassie brilliant blue로 염색하였고 단백질의 분자량은 broad range size marker (Bio-Rad)와 비교하여 결정하였다.

### 발현된 단백질의 정제

pGEXHRG' 클론을 가지는 *E.coli*를 ampicillin( $100\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 함유된 LB배지 20ml에 배양하였고 새로운 배지에 접종하여  $\text{OD}_{600}=0.5$ 가 될 때까지 배양하였다. 1mM IPTG로 induction을 하고 6시간 동안 계속 배양하였다. 배양된 세포를 3,500rpm에서 20분간 원심분리하여 pellet은 lysis buffer I [10mM Tris-HCl(pH8.0), 200mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glycerol, 1mM DTT, 1mM PMSF] 15ml에 녹여 혼합물을 Vibra Cell<sup>®</sup>로 2분간 50% output으로 sonication하였다. 혼합물을  $4^\circ\text{C}$ 에서 5분간 8,000rpm으로 원심분리하고 pellet을 lysis buffer II [lysis buffer I, lysozyme( $200\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 0.1% Triton X-100, deoxycholic acid( $1\text{mg}/\text{ml}$ )] 20ml에 풀어 얼음에 30분간 incubation시하였다. 그리고 8,000rpm에서 5분간 원심분리하여 pellet을 lysis buffer III [lysis buffer I, 0.1% Triton X-100, deoxycholic acid ( $1\text{mg}/\text{ml}$ )] 20ml에 녹이고 다시 8,000rpm에서 5분간 원심분리하여 pellet을 lysis buffer으로 씻어 내고 재원심분리하여 lysis buffer 5ml에 pellet을 풀었다. 이 sample을 sample loading buffer [1mM EDTA, 250mM Tris-Cl(pH 6.8), 4% SDS, 2%  $\beta$  Mercaptoethanol, 0.2% bromophenyl blue, 50% Glycerol]를 섞어 10분

간 끊이고 얼음에 냉각시켰다. 식힌 sample를  $12,000 \times g$ 로 원심분리하고 상등액을 취하여 10% SDS-PAGE gel에 전기영동하였다. 전기영동 후, 0.3M  $\text{CuCl}_2$ 로 염색하여 발현된 band를 자르고 electro-separation system (S&S Elutrap, Schleicher & Schuell)으로 Glycoprotein을 분리하였고 Bradford assay로 정량하였다.

### vaccine 처리

약 300마리의 넙치 치어를 대조군과 처리군으로 사용하였다. 사용된 넙치 치어는 평균 체중이 1.79 g(전장 $5.4 \pm 0.3$ cm)의 넙치 치어를 5 l 유수식사육조에서 고압 모래여과수로 사육하였다. 침지에 의한 면역화는 0.3 l의 여과수에 GST-G fusion protein을 최종농도가  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ (low dose),  $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ (high dose)가 되도록 부유시킨 후 통기하면서 각각 7분간 침지하였고, 대조군은 여과해수에 10분간 침지하였다. 침지 후, 30일이 경과한 날에 처리군 2그룹과 대조군 1그룹을 각각 3그룹으로 나누었다. 나누어진 3그룹중 한 그룹에는 HIRRV를 복강주사( $10^{5.3}$ TCID<sub>50</sub>/1ml/fish)하였고, 다른 그룹에는 HIRRV를 침지( $10^{5.5}$ TCID<sub>50</sub>/ml, 1hr immersion)하였고, 나머지 그룹은 HBSS를 복강주사 하였다.

### 감염된 물고기에서 HIRRV를 RT-PCR로 확인

Challenge과정에서 죽은 물고기가 HIRRV에 감염되어 죽었는지를 알아보기 위해서 죽은 물고기는 바로  $-80^\circ\text{C}$ 에 보관하였다. 일부 감염된 병어는 체표나 아가미의 충혈, 복부 팽만, 근육 내출혈 등의 증상을 눈으로 확인할 수 있다. 죽은 물고기 중에서 이러한 뚜렷한 증상을 나타내는 물고기를 제외하고 외관상 병징이 불분명한 물고기의 신장을 추출하여 Trizol (Gibco BRL)에 의해 분리한 total RNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR은 forward primer인 EXPG (5' - gagctcatatgattaccttc - 3')와 reverse primer인 HRG-C (5' - tatctaggatcctagaggtaag - 3')를 이용하여 앞에서 설명한 방법으로 수행하였다.

## 결과 및 고찰

### 바이러스의 특성

RTG-2 세포에 감염한 HIRRV의 바이러스 입자는 bullet-shaped 입자 형태이다. HIRRV는 150-200nm 길이와 직경이 80nm이다. Electron dense core로 둘러싼 bullet shaped virus는 관찰되었고 또한 fuzzy fringe도 관찰되었다. 바이러스 입자 주로 세포내부에서 관찰되었으며 세포막으로부터 budding하고 있는 바이러스도 발견되었다 (Fig. 1). 이러한 형태는 rhabdoviridae의 바이러스 특징을 나타낸다. 비록 sample은 일반적인 방법으로 fixation과 embedding 하지 않았지만, 바이러스의 형태는 다른 연구 보고와 같이 관찰할 수 있었다.



Figure 1. Electron micrograph of an ultrathin section showing large numbers of bullet-shaped virus particles in rainbow trout gonad (RTG-2) cells infected with the isolated virus.

HIRRV의 구조 단백질의 SDS-PAGE 결과는 그림 2에 보이는 바와 같이 약 160kDa L protein, 55kDa G protein, 45kDa N protein, 26kDa M1 protein 그리고 22kDa M2 protein의 5개의 단백질이 HIRRV virion에 함유되어 있다. HIRRV CA-9703 strain 구조 단백질의 수와 크기는 다른 rhabdoviruses (Schutze, *et al.*, 1995)와 비슷하다.

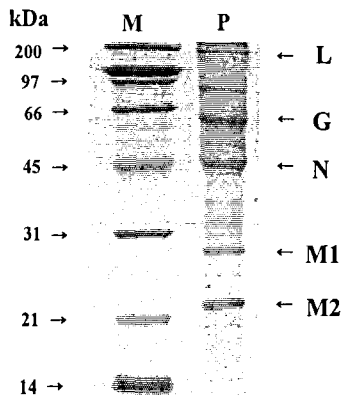


Figure 2. Structural Proteins of HIRRV

### Genome 구조

그림 3에서 3'에서 5' orientation으로 HIRRV negative strand genome을 나타내었다. HIRRV의 genome은 모두 11034개의 염기로 구성되어 있다. Genome의 3' 말단으로부터 3' leader, nucleocapsid protein gene, 2개의 matrix protein genes, G protein gene, polymerase protein gene이 배열되어 있으며 이들은 그림 3에 L, N, M1, M2, G, NV 그리고 L 로 표시되어 있다.

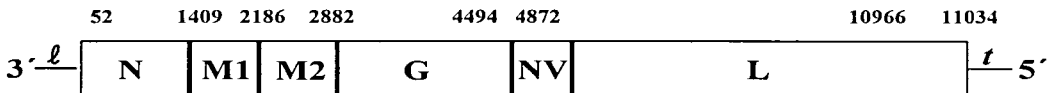


Figure 3. Structure of HIRRV genome

3' leader 는 genome 3' 쪽 말단으로부터 61bp까지이며 HIRRV와 IHNV의 3 leader sequence homology는 53%였다. HIRRV 3' leader의 polyadenylation signal 은 IHNV의 경우와는 다르게 다른 gene junction과 비슷하였다.

Nucleocapsid (N) gene은 genome의 3' 말단으로부터 167 - 1408에 위치하며 62 - 1345까지 1209bp로 구성되어 있는 하나의 open reading frame (ORF)을 포함하고 있다. 이 ORF로부터 392 아미노산으로 되어 있는 45kDa 크기 N protein이 coding되어 있다. HIRRV와 다른 rhabdovirus 아미노산 염기서열을 비교한 결과 아미노산 identities는 약 20-30%였지만, HIRRV와 IHNV의 아미노산 염기서열 비교에서는 67%의 높은 identity를 나타내었다.

M1 gene은 genome의 3' 말단으로부터 1409 - 2180에 위치하며 1445 - 2128까지 772bp로 구성되어 있는 하나의 ORF를 포함하고 있다. 이 ORF로부터 227 아미노산으로 되어 있는 26kDa 크기 M1 protein이 coding되어 있다. HIRRV와 VHSV의 아미노산 염기서열을 비교한 결과 아미노산 similarity는 45%였지만, HIRRV와 IHNV의 아미노산 염기서열 비교에서는 81.5%의 높은 isimilarity를 나타내었다.

M2 gene은 genome의 3' 말단으로부터 2181 - 2881에 위치하며 2234 - 2815까지 701bp로 구성되어 있는 하나의 ORF를 포함하고 있다. 이 ORF로부터 193 아미노산으로 되어 있는 22kDa 크기 M2 protein이 coding되어 있다. HIRRV와 VHSV의 아미노산 염기서열을 비교한 결과 아미노산 similarity는 57%였지만, HIRRV와 IHNV의 아미노산 염기서열 비교에서는 86%의 높은 similarity를 나타내었다.

G gene은 genome의 3' 말단으로부터 2882 - 4493에 위치하며 2924 - 4450까지 701bp로 구성되어 있는 하나의 ORF를 포함하고 있다. 이 ORF로부터 508 아미노산으로 되어 있는 55kDa 크기 G protein이 coding되어 있다. HIRRV와 VHSV의 아미노산 염기서열을 비교한 결과 아미노산 identity는 39%였지만, HIRRV와



IHNV의 아미노산 염기서열 비교에서는 74%의 높은 identity를 나타내었다.

NV gene은 genome의 3' 말단으로부터 4494 - 4871에 위치하며 4528 - 4763까지 112bp로 구성되어 있는 하나의 ORF를 포함하고 있다. 이 ORF로부터 111 아미노산으로 되어 있는 12kDa 크기 NV protein이 coding되어 있다. HIRRV와 VHSV의 아미노산 염기서열을 비교한 결과 아미노산 identity는 38%였지만, HIRRV와 IHNV의 아미노산 염기서열 비교에서는 54%의 identity를 나타내었다.

L gene은 genome의 3' 말단으로부터 4872 - 10966에 위치하며 4947 - 10907까지 5961bp로 구성되어 있는 하나의 ORF를 포함하고 있다. 이 ORF로부터 아미노산으로 되어 있는 224.5kDa 크기 L protein이 coding되어 있다. HIRRV와 VHSV의 아미노산 염기서열을 비교한 결과 아미노산 identity는 59%였지만, HIRRV와 IHNV의 아미노산 염기서열 비교에서는 84%의 높은 identity를 나타내었다.

### Gene junctions

HIRRV의 genome에 coding되어 있는 6개의 유전자는 gene junction이라는 conserved sequence로 분리되어 있다 (Fig. 4). Gene junction은 5'쪽에는 polyadenylation signal로 작용하는 것으로 여겨지는 transcription termination sequence (AGATAGAAAAAAAA 또는 GGACAGAAAAAAAA; region A in Fig. 4), transcript에 포함되어 있지 않은 T 또는 C (region B)의 1개의 염기로 되어 있는 gene spacer, 그리고 다음 유전자의 transcription initiation 부위를 포함하고 있다.

<b>3' leader</b>	<b>GGACAGAAAAAAAA</b>	<b>T</b>	<b>GGCAC</b>	<b>N</b>
<b>N</b>	<b>AGATAGAAAAAAAA</b>	<b>T</b>	<b>GGCAC</b>	<b>M1</b>
<b>M1</b>	<b>AGATAGAAAAAAAA</b>	<b>T</b>	<b>GGCAC</b>	<b>M2</b>
<b>M2</b>	<b>AGATAGAAAAAAAA</b>	<b>T</b>	<b>GGCAC</b>	<b>G</b>
<b>G</b>	<b>AGATAGAAAAAAAA</b>	<b>C</b>	<b>GGCAC</b>	<b>NV</b>
<b>NV</b>	<b>AGATAGAAAAAAAA</b>	<b>T</b>	<b>GGCAC</b>	<b>L</b>
<b>L</b>	<b><u>AGATACAAAAAAAA</u></b>	<b><u>C</u></b>	<b><u>GACAC</u></b>	<b>5' tailer</b>
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	

\* **A** : the putative polyadenylation sequence  
**B** : the gene spacer,  
**C** : the putative transcription initiation sequence

Figure 4. Structure of HIRRV gene junction

### 백신 치료효과

*E. coli*에서 발현된 HIRRV G fusion protein을 정제하여 5mg/ml의 stock을 얻었다. 효과적인 백신의 양을 알아보기 위해서 Engelking(1989)등이 사용한 농도의 중

간 값인  $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 Low dose로 그리고 Gilmore(1988)등이 사용한 농도 값보다 큰  $300\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 High dose로 사용하였다. 단순히 누적폐사율을 볼 때 고백신을 처리한 것이 저백신을 처리한 것보다 2배정도 높은 효과를 나타내었다. 백신을 처리하지 않은 경우에는 복강주사와 침지접종에서 각각 47%와 20%의 폐사율을 보였으나 고농도 백신처리구에서는 폐사율이 7%, 0%이었고 저농도 백신처리구에서는 20%와 0%로 나타났다. 죽은 물고기가 바이러스 감염에 의하여 죽은 것인지를 확인하기 위하여 죽은 물고기 조직에서 total RNA를 추출하여 G gene에 specific한 primer EXPG와 HRG-C를 가지고 RT-PCR를 실시하였다. 그 결과 고백신 처리군에서 죽은 물고기에서 바이러스에 의한 것이 확실하지만 저백신 처리군에서 죽은 물고기의 경우 6마리 중 2마리가 바이러스에 의해 죽었으며, 4마리가 죽은 원인은 알 수 없다. 이와 같은 결과로 볼 때 HIRRV G fusion protein을 침지법에 대한 백신으로 사용할 때  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로도 충분히 면역화 시킬 수 있음을 알 수 있었다. 본 실험에서는 바이러스 challenge는 복강주사인 경우  $10^{5.3}\text{TCID}/1\text{ml}$ 의 농도로 침지의 경우  $10^{5.5}\text{TCID}/\text{ml}$ 농도로 감염시켜 그 결과를 조사하였다. 이러한 바이러스의 농도는 자연상태에서의 바이러스의 농도보다 훨씬 높은 것이기 때문에, 실제 양식장 환경에서는 저농도 백신의 경우에도 예방효과가 있을 것으로 여겨지며 이를 위해서는 저 백신의 경우 바이러스 농도를 달리하여 접종한다면 백신으로서의 효과는 알아볼 수 있을 것이다.

### 참고문헌

- Banerjee, A. K. & D. Chattopadhyay. (1990). Structure and function of the rna polymerase of vesicular stomatitis virus. *Advances in virus research* 38 : 99 - 124.
- Choi, T. -J., Wagner, J. D. & A. O. Jackson. (1994). Sequence analysis trailer region of Sonchus Yellow net Virus genomic RNA. *Virology* 202 : 33 - 40.
- Deering, R. E., Arakawa, C. K., Oshima, K. H., ÓHara, P. J., & J. R. Winton. (1991). Development of a biotinylated DNA probe for detection and identification of infectious hematopoietic necrosis virus. *Diseases of aquatic organisms* 11: 57 - 65.
- Engelking, H. M. & J. C. Leong. (1989). Glycoprotein from hematopoietic necrosis virus (IHNV) induces protective immunity against five IHNV types1. *Journal of animal health* 1: 291 - 300.
- Engelking, H. M. & J. C. Leong. (1989). The glycoprotein infectious hematopoietic necrosis virus elicits neutralizing antibody and protective responses. *virus Research* 13: 213 - 230.

- Gilmore, R. D. Jr., Emgelking, H. M., Manning, D. S. & J. C. Leong. (1988). Expression in *E.coli* of an epitope of the glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus protects against viral challenge. *Bio/technology* 6: 295 - 300.
- Hill, B. J. (1975). Physico-chemical and serological characterization of five rhabdoviruses infecting fish. *Journal of general virology* 27: 369 - 378.
- Kimura, T., Yoshimizu, M. & S. Gorie. (1986). A new rhabdovirus isolated in Japan from cultured hirame (Japanese flounder) *Paralichthys olivaceus* and *ayu plecoglossus altivelis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 1 : 209 - 217.
- Kleid, D. G., Yansura, D. & B. Small. (1981). Cloned viral protein vaccine for Foot-mouth Disease: responses in cattle and swine. *Science* 214 : 1125 - 1129.
- Koonin, E. V. (1991). The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive stranded RNA viruses. *J Gen Virol* 72 : 2197 - 2206
- Kurath, G. & J. C. Leong. (1985). Characterization of Infectious hematopoietic Necrosis Virus mRNA species reveals a Nonvirion Rhabdovirus protein. *J Virol* 53 (2) : 462 - 468.
- Kurath, G., Ahern, K. G., Pearson, G. D. & J. C. Leong. (1985). Molecular cloning of six mRNA species of Infectious hematopoietic Necrosis virus, a Fish Rhabdovirus, and gene order determination by R-Loop mapping. *Journal Virology* 53 (2) : 469 - 476.
- Leong, J. C., Anderson, E., Bootland, L., Chen, L., Chiou, P.-W., Drolet, B., Engelking, H. M., Mason, C., Mourich, D., Trobridge, G. & M. Wilson. (1992). Molecular and biotechnological approaches to the control of viral diseases in fish. *Published as proceedings of the third pacific Rim Biotechnology conference* 19 - 21.
- Manning, D. S. & J. C. Leong. 1990. Expression in *Escherichia coli* of the Large Genomic Segment of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Virology* 1779: 16 - 25.
- Mcdonald, G. A., Anacker, R. L. & K. Garjian. (1987). Cloned gene of *Rickettsia rickettsii* surface antigen: Candidate vaccine for Rocky Mountain Spotted Fever. *Science* 235 : 83 - 85.
- Munn, C. B. (1994). The use of recombinant DNA technology in the development of fish vaccines. *Fish & Shellfish Immunology* 4 : 459 - 473.
- Mun, C.-H., et al. (1998). Molecular cloning and nucleotide sequence of the N protein of a Korean isolate of infectious hematopoietic necrosis virus. *The*

- korean journal of Microbiology* 34 (1~2) : 69 - 73.
- Nishizawa, T., Yoshimizu, M., Winton, J., Ahne, W. & T. Kimura. (1991). Characterization of structural proteins of *hirame rhabdovirus*, HRV. *Diseases of Aquatic Organisms* 10 : 167 - 172.
- Oberg, L. A., Wirkkula, J., Mourich, D. & J. C. Leong. (1991). Bacterially expressed nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus augments protective immunity induced by the glycoprotein vaccine in fish. *Journal of virology* 65 (8) : 4486 - 4489.
- Oh, M. J. & T. -J. Choi. (1998). A new rhabdovirus (HRV-like) isolated in Korea from cultured Japanese flounder *paralichthys olivaceus*. *Journal of Fish Pathology* 11 (2) : 129 - 136.
- Oh, M. J., Choi, T. -J. & et. al. (1997). Effects of environmental seawater on the infectivities of HRV (*rhabdovirus olivaceus*), FBV (*flounder birnavirus*) and RVS (*retrovirus of salmonid*). *Journal of Fish Pathology* 10 (2) : 165 - 176.
- Oh, H. K. (2000). Sequence analysis of the 3' half of the hirame rhabdovirus (HIRRV) RNA genome. *Pukyong National University*.
- Poch, O., Blumberg, B. M., Bougueleret, L. & N. Tordo. (1990). Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *Journal of general virology* 71 : 1153 - 1162.
- Schütze, H., Enzmann, P.-J., Kuchling, R., Mundt, E., Niemann, H. & T. C. Mettenleiter. (1995). Complete genomic sequence of the fish rhabdovirus infectious haematopoietic necrosis virus. *Journal of general virology* 76 : 2519 - 2527.
- Schütze, H., Mundt, E. & T. C. Mettenleiter. (1999). Complete genomic sequence of Viral hemorrhagic Septicemia Virus. *Virus Genes* 19 (1) : 59 - 65.
- Tordo, N., de Haan, P., Goldbach, R. & O. Poch. (1992). Evolution of negative-stranded RNA genomes. *Seminars of Virology* 3 : 431 - 357.
- Winton, J. R. (1997). Immunization with viral antigens: infectious haematopoietic necrosis. *Development Biology standard* 90 : 211 - 220.
- Xu, L., Mourich, D. V., Engelking, H. M., Ristow, S., Arnzen, J. & J. C. Leong. (1991). Epitope mapping and characterization of the infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein, using fusion proteins synthesized in *Escherichia coli*. *Journal of virology* 6 (53) : 1611 - 1615