

어류 rhabdovirus의 신속 진단을 위한 oligonucleotide chip의 개발

1. Oligonucleotide chip의 probe 설계와 특이성 확인

김영주 · 강지희 · 김수미* · 박수일* · 이명숙
부경대학교 미생물학과, *부경대학교 수산생명의학과

서론

현재 어류 질병 바이러스를 검출해내기 위해 이용되는 PCR법이나 ELISA법 만으로는 신속성을 필요로 하는 바이러스 검출에서는 불리하다(Bruchhof *et. al.*, 1995). 따라서 기존의 유전자 진단법을 대체할 수 있고, 동시에 수백 개 이상의 유전자를 빠른 시간 내에 검색할 수 있는 DNA chip 기술을 이용하여 넙치, 돔 등의 해산어와 일부 연어과 어류에 질병을 일으키는 rhabdovirus를 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 저밀도 oligonucleotide chip을 개발하고자 한다(Chizhikov *et al.*, 2001).

Rhabdovirus 중 IHNV, HRV, VHSV, SVCV, Sea trout rhabdovirus 그리고 Snakhead rhabdovirus를 대상 바이러스로 선정하였다. 즉, rhabdovirus는 특이성을 가지는 6개로 구성된 구조단백질을 가지고 있어 이 단백질별로 3개씩의 oligo 형태의 probe를 선정할 수 있었다.

재료 및 방법

Gene bank를 이용하여 IHNV, HRV, VHSV, SVCV, Sea trout rhabdovirus 그리고 Snakhead rhabdovirus의 N, M1, M2, G, NV 그리고 L protein의 염기서열을 분석하였고, 이들 protein 별로 20mer의 probe를 3개씩 선정하였다. 염기서열 분석 프로그램으로 blast alignment을 통해 homology 판정을 하여 특이성을 검증하였다.

결과 및 요약

Fish rhabdovirus의 probe는 6개의 구조단백질의 염기서열을 분석하여, 단백질

Table 1. Oligonucleotide probe in rhabdovirus

Start	Length	Tm	GC%	Sequences	code protein
541	20	60.25	55.00	gtgcttagaccgacgacagaa	N protein
1095	20	59.96	55.00	accagacatgggtgaggaag	
337	20	60.02	45.00	aagcttgcagaaacgatcgt	
995	20	59.93	50.00	ccaagttccgatctccacat	G protein
1328	20	60.00	50.00	cagggatctccatcaggaaa	
1135	20	59.97	45.00	agtttcacgaaatggaacg	
225	20	59.94	60.00	ggaggagagctgtcaggatg	M1 protein
58	20	59.29	50.00	ctagaatcccgcctgaaaaa	
580	20	59.93	55.00	gaggtgagaacatggccat	
408	20	60.01	50.00	cacaggacggttcctgtttt	M2 protein
231	20	59.95	50.00	agagatggagttcggaagca	
153	20	60.89	55.00	ctctatgaatctggcggctg	
7613	20	60.01	50.00	gatcgagaccattgagggaa	L protein
4603	20	60.01	60.00	ccaagcgacgtagagagacc	
2146	20	59.99	50.00	acgtcaggaggcaaagagaa	

별로 20mer의 probe를 3개씩 선정하였고, 3개씩의 positive control과 negative control을 선정하여 총 96개의 probe를 선정할 수 있었다. Table 1은 IHNV의 단백질 별로 선정된 probe를 나타내었다. 이 probe를 blast alignment을 통해 특이성을 검증하였고, 선정된 probe는 95% 이상의 homology를 보여 각 선정된 probe들은 이 바이러스의 specific sequences임을 확인할 수 있었다.

참고문헌

- Bruchhof, B., Marquardt, O. and P. J. Enzmann. 1995. Differential Diagnosis of Fish Pathogenic Rhabdovirus by Reverse Transcriptase-Dependent Polymerase Chain Reaction. *J. Virol. Methods* 55: 111-119.
- Chizhikov V., A. Rasooly, K. Chumakov and D. D. Levy. 2001. Microarray Analysis of Microbial Virulence Factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(7): 3258-3263.