

넙치의 스쿠티카충의 원인종인 *Miamiensis avidus*에 대한 제조합 백신의 개발과 효능

송준영 · 강현실 · Shin-Ichi Kitamura · 오명주 · 이제희 · 정성주
전남대학교 수산생명의학과, 제주대학교 해양생물공학과

서론

스쿠티카충은 우리나라의 대표적 양식 어류인 넙치에 빈번하게 발생하며, 아가미, 체표와 지느러미에 기생하여 조직이 붕괴되며, 증상이 진행되면 근육이 노출되고 뇌와 각종 내장기관에까지 침투하여 조직의 괴사를 일으킨다. 스쿠티카충을 구제하기 위하여 포르말린이 주로 사용되고 있으나 200 ppm 이상의 스쿠티카충을 구제할 수 있는 농도는 넙치에 심한 스트레스를 주며, 체내에 침투하고 있는 충은 구제가 불가능하다. 또한 어류질병의 치료목적으로 사용되는 약제와 약품의 인체에의 안정성과 환경에의 부하가 문제시되면서 어류 스스로의 면역체계를 이용한 백신의 개발과 사용에 대한 관심과 필요성이 대두되고 있다. 스쿠티카충은 이분열로 증식하므로 생활사에 따라 항원단백질이 변화하지 않으며, *in vitro*에서의 대량 배양이 가능하여 백신으로서의 효능이 검증되면 대단위의 적용이 용이한 이점이 있다. 본 연구에서는 넙치의 스쿠티카충의 원인종인 *Miamiensis avidus*에 대한 제조합 백신 제조를 위해 항원유전자의 염기서열을 규명하고, 항원유전자를 발현벡터에 삽입하여 *E. coli*에서 발현시킨 다음, 넙치에서 공격감염과 ELISA 항체가 분석을 통해 백신의 효능을 알아보았다.

재료 및 방법

· 제조합 단백질 백신제조를 위한 항원 유전자의 규명: 항원유전자를 규명하기 위해 스쿠티카충에서 mRNA를 분리하여 cDNA library를 제조한 다음, EST 염기서열을 확인 및 분석하고 백신 후보클론의 5' 말단의 염기서열을 확인하였다.

· 항원 단백질의 *E. coli*에서의 발현: 항원 유전자를 발현벡터에 클로닝하고 *E. coli*에서 발현시켜 순수 항원단백질을 분리 정제하였다.

· 공격 감염을 통한 백신 효능 실험: 백신 10 $\mu\text{g}/\text{fish}$, 50 $\mu\text{g}/\text{fish}$, 0 $\mu\text{g}/\text{fish}$ (감염 대조구)을 처리한 넙치 20마리를 각 수조에 분주하고 준비한 스쿠티카충을 각각 3.96×10^4 cells의 농도로 침지하여 공격감염하였다.

· 항체가 확인: ELISA를 이용하여 항체가를 확인하기 위해, 스쿠티카충의 초음파처리 한 액을 코팅 원충액으로 희석하여 96 well plate에 100 μl 씩 첨가한 후 1시간 반응시키고,

여기에 면역시킨 넙치에서 얻은 혈청을 10배 희석액부터 2단계 희석하여 반응시키고, anti-flounder IgM monoclonal antibody와 반응시켰다. Peroxidase conjugated anti-mouse goat serum을 첨가하여 반응시킨 후 발색하여 492 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 요약

· 항원 단백질의 아미노산 서열 및 항원단백질의 유전자 확인: 항원단백질의 N-terminal 아미노산 서열을 확인하고 EST에서 얻은 클론과 비교하여 full-length 항원 유전자를 확인하였다.

· 재조합 항원 단백질의 분리: 재조합 항원 단백질의 생산을 위해 pMAL-c2x 벡터의 EcoRI과 HindIII 사이트에 항원유전자를 클로닝하여 발현하였다. 발현된 재조합 단백질을 pMAL 단백질 정제 시스템을 이용하여 정제하고 western blot으로 발현단백질의 항원성을 확인하였다.

· 공격 감염을 통한 효능 실험: 백신 10 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 접종구의 폐사율은 10%이고, 백신 50 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 접종구의 폐사율은 15%, 백신을 처리하지 않은 실험구의 폐사율은 60%로 백신처리에 의해 폐사율이 현저히 경감되었다.

· ELISA 항체가 실험: 백신처리한 어체에서 취한 혈청의 항체가 대조구보다 높게 나와 백신에 대해 효과적으로 항체가 생성되어 있음을 알 수 있었다.

참고문헌