

전염성 조혈기 괴사 바이러스(IHNV)의 항원 유도 단백질 특성

박명애, 손상규, 박정우*, 정영기**

국립수산진흥원 병리과, *울산대학교 미생물학과

**동의대학교 미생물학과

우리나라에 존재하며 외국에서 분리된 것과 다른 특성을 보이는 IHNV를 대상으로 하여 이 바이러스의 면역유도단백질을 확인하고자 하였다. 먼저 우리나라에서 분리된 4종류의 IHNV를 미국에서 분리된 3종류의 IHNV(OSV, SRCV 및 RB-76)와 SDS-PAGE상에서 구조단백질의 크기와 혈청학적 특성 등을 비교하였다.

그 결과 우리나라에서 분리된 4종류의 IHNV중 2종류(PRT, MRT)의 IHNV는 미국에서 분리된 IHNV와 차이가 있었으며 (Park *et al.*, 1993), IHNV-PRT를 대상으로 면역유도단백질을 확인하기 위해 IHNV-PRT에 대한 monoclonal antibodies(MAbs)를 만들었다.

이들 중 4종류의 hybridoma를 선택하여 hybridoma cell들이 분비하는 MAbs가 어떤 class인지를 ELISA실험을 통하여 확인한 결과 4종류 모두 IgG class에 속하는 것으로 확인되었다. 이와같이 만들어진 4종류의 MAbs가 IHNV-PRT 구조단백질들 중 어떤 것에 대한 것인지를 western blotting 실험을 통해 확인한 결과, 2종류의 MAbs는 G단백질과 특이성이 있는 것들이었고, 나머지 2종류는 G보다 조금 큰 size의 단백질에 대한 것들이었다.

다음은 IHNV-PRT에 감염된 무지개송어의 혈청을 뽑아 여기에 존재하는 IHNV-PRT에 대한 항체를 western blotting 방법으로 분석을 한 결과 G, M₁, M₂ 및 G 보다 조금 큰 size의 단백질에 대한 항체가 존재하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 IHNV-PRT의 구조단백질들 중 G, M₁, M₂ 및 G 보다 조금 큰 size의 단백질들이 면역 유도 특성이 있음을 확인할 수 있었다.

Key Words : Infectious hematopoietic necrosis virus(IHNV), monoclonal antibody, hybridoma, immunogen, western blotting.

전염성 조혈기 괴사 바이러스(IHNV)는 1960년대 처음으로 분리되어 (Wingfield *et al.*, 1969) IHNV로 명명된 (Amend *et al.*, 1969) 이래, 북미 서부지역에 널리 분포하며 매년 연어 및 송어치어에 큰 피해를 입히는 것으로 알려져 있었다. (Pilcher & Fryer, 1980). 그런데 최근 들어 우리나라에서도 대량 폐사된 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) 치어에서 IHNV가 분리됨으로써

IHNV도 매년 발생하는 무지개송어 대량폐사의 원인체가 임이 확인되었다.(Park *et al.*, 1993)

IHNV의 경우 공식적으로 인정되는 표준혈청형은 아직까지 정해진 바가 없다. 그러나, Pilcher & Fryer(1981)는 여러지역에서 분리된 IHNV들의 병원성이 각각 다름을 발견하고 여러 type의 IHNV가 있을 수 있음을 시사하였다. 그 후 IHNV의 구조단백질이 5종류이고 이

들 각각의 분자량이 (L, polymerase, 150-190 Kd ; G, surface glycoprotein, 67-80 Kd ; N, nucleocapsid, 38-40 Kd ; M₁, matrix protein, 22 Kd ; M₂, matrix protein, 17-20 Kd) 확인되면서 (McAllister & Wagner, 1975 ; Leong *et al.*, 1981), 구조단백질의 분자량의 차이로부터 IHNV를 grouping하고자 하는 시도가 있었다. 그 결과 Hsu 등 (1986)은 SDS-polyacrylamide gel 상에서 IHNV 구조단백질 G와 N의 분자량 차이를 기준으로 하여 세계 여러지역에서 분리된 71종류의 IHNV들을 5 types(electrophenotypes)으로 분류하였고, Winton 등 (1988)은 중화역가가 있는 3종류의 monoclonal antibodies(MABs)를 사용하여 IHNV의 혈청형을 알아보고자 하였다. 그 결과 세계 여러지역에서 분리된 12가지의 IHNV들을 4종류의 group으로 분류할 수가 있었는데, 역시 지역에 따라 서로 다른 group이 존재함이 밝혀졌다. 그러나, 최근에 Engelking 등 (1991)이 한 종류의 IHNV에서 분리한 G단백질을 물고기에 주입한 결과 5 electrophenotypes 모두에 대한 protective immune response가 유도되었고, 또한 한 종류의 IHNV에 대한 polyclonal antibody가 5 electrophenotypes 모두를 중화시켰다고 발표하여 IHNV에 혈청형이 하나일 가능성이 높음을 나타내었다.

현재 IHNV에 의한 질병을 control하기 위하여 많은 연구를 하고 있으나 아직까지 이용가능한 치료제나 백신은 개발되지 않고 있다. IHNV 백신의 개발은, 어류가 IHNV에 대하여 중화항체를 만든다는 보고(Amend & Smith, 1974)가 나온 이후 활발하게 진행되었다. 최근에는 IHNV 구조단백질 중 중화 epitope를 coding하는 유전자를 cloning한 후 *E. coli* 등의 미생물에서 비교적 저렴하게 대량생산을 할 수 있는 subunit 백신을 개발하고자 시도하고 있다. 미국에서 이미 IHNV의 백신개발이 완성단계에 있지만(Gilmore *et al.*, 1988 ; Engelking & Leong, 1989 ; Xu *et al.*, 1991)이 백신이 미국에서 분리된 한 strain(RB/76)을 사용하여 개발하였고 또한 IHNV가 지역에 따라 서로 다른 특성을 보인다는 점과 (Pilcher & Fryer, 1981 ; Hsu *et al.*, 1986 ; Winton *et al.*, 1988) 실제 우리나라에서 분리된 IHNV가 미국에서

분리된 것들과 혈청학적 특성 및 구조단백질의 size가 다르다는 점(Park *et al.*, 1993)을 감안할 때 미국에서 개발한 백신이 우리나라에 분포하고 있는 IHNV에 대하여 백신으로서의 높은 효과를 기대하기 어렵다. 따라서, 우리나라에서 분리된 IHNV를 사용한 백신의 개발이 필요한 상황인데, 본 연구에서는 우리나라에서 분리된 IHNV의 면역유도단백질들을 확인하여 IHNV의 subunit 백신을 개발하는데 필요한 자료를 얻고자 한다.

재료 및 방법

1. 세포 배양 및 바이러스

IHNV의 숙주세포로서 CHSE-214(Chinook Salmon Embryos ; Lannan *et al.*, 1984) cell line을 사용하였으며, MABs 제조에 사용할 myeloma cell은 SP-2/O를 사용하였다. CHSE-214 세포는 fetal bovine serum (Flow Lab. USA)이 10% 첨가된 minimum essential medium(MEM)을 사용하여 20°C에서 배양하였다. 그리고, SP-2/O세포는 fetal bovine serum(Hyclone, USA)이 10% 첨가된 RPMI-1640을 사용하여 CO₂ incubator (5% CO₂, 37°C)에서 배양하였다. IHNV를 접종한 세포의 경우 16°C에서 배양하였다. 실험에 사용할 바이러스는 우리나라의 양식어류에서 분리된 IHNV중 우리나라에만 존재하는 것으로 확인된 strain(PRT strain, Park *et al.*, 1993)을 선택하여 실험하였다.

2. 바이러스의 순수분리

숙주세포인 CHSE-214에 바이러스를 접종한 후 세포가 모두 파괴되었을 때(바이러스 접종 후 약 7일째) 배양액을 모았다. 배양액을 400×g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 cell debris를 제거한 후 PEG-6000을 7%(W/V) 되게 첨가하였다. 이 용액을 4°C에서 16시간 동안 stirring한 다음 6000×g, 4°C에서 30분간 원심분리하여 침전물을 모았다. 소량의 TNE buffer(0.01M Tris, pH 8.0, 0.1M NaCl, 0.001M EDTA)를 사용하여 침전물을 녹인 후 sucrose step gradient (50%, 35% and 20% sucrose-TNE) 상에서 80000×g, 90분간 원심분리를 하였다.

20%와 35%의 sucrose층 사이에 존재하는 바이러스 밴드를 취하여 $115,000\times g$ 에서 30분간 원심분리를 하여 바이러스를 침전시켰다. 침전된 바이러스를 소량의 TNE buffer로 재현탁시킨 후 sucrose continuous gradient(5%-30%)상에서 $48,000\times g$, 30분간 원심분리를 하였다. 형성된 바이러스 밴드를 취한 후 $115,000\times g$, 30분간 원심분리를 하여 침전시켰다. 바이러스 침전물을 소량의 TNE buffer에 재현탁시킨 후 다음 실험에 사용하거나 $-20^{\circ}C$ 에 보관하였다.

3. Hybridoma

Balb/c mouse에 바이러스 단백질을 Freund complete adjuvant와 emulsification 시킨 후 주사하였고, 두번째 이후부터는 Freund incomplete adjuvant에 emulsification 시킨 후 주사하였다. 마지막 주사시 바이러스 단백질은 adjuvant를 사용하지 않고 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 fusion시켰다. fusion된 세포를 fetal bovine serum이 15% 첨가된 HAT media ($0.1mM$ hypoxanthine, $4\times 10^{-4}mM$ aminopterin, $1.6\times 10^{-3}mM$ thymidine in DMEM)에 suspension시킨 후 96 well plate에 $0.2mL$ 씩 넣었다. 약 3주 동안 5일마다 새 HAT media로 갈아주고 다시 1주일 동안 aminopterin이 없는 HT media로 갈아주었다. 이후 배양액을 취하여 ELISA로 IHNV에 대한 항체를 내는 hybridoma를 골라내었다. 이것들을 다량배양하여 두번 이상 cloning한 후 액체질소에 보관하였다. 일부세포를 취하여 pristane(2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecane)을 처리한 Balb/c의 복강에 주사하였다. 이 mouse에서 복수를 취하여 높은 역가의 MAb를 얻었다.

4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

무지개송어에 단백질을 면역시켜 얻은 혈청내에 존재하는 항체의 양을 측정하고 또한 fusion하여 얻은 hybridoma 중 바이러스에 대한 항체를 만드는 clone을 scree-

ning하기 위하여 ELISA를 사용하였다.

coating buffer($0.5M$ carbonate-bicarbonate, pH 9.6)에 단백질을 $1\mu g/mL$ 농도가 되도록 준비한 후 ELISA용 96 well plate에 넣어 $4^{\circ}C$ 에서 16시간 동안 coating하였다. plate를 PBS로 washing한 후 1% BSA-PBS(1% BSA in PBS) 용액을 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시킴으로서 blocking하였다. plate를 PBS-Tween 20(0.05% Tween 20 in PBS)으로 washing한 후 각 well에 적절하게 희석된 혈청을 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. PBS-Tween을 사용하여 plate를 3번 washing한 후 alkaline phosphatase가 붙어 있는 second antibody를 첨가하였다. 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후 PBS-Tween으로 3번 washing하고 substrate ($1mM$ of p-nitrophenyl phosphate/ mL of 9.7% diethylamine, pH 9.8)를 넣었다. 상온에서 30분간 반응시킨 후 $3M$ NaOH 용액 $50\mu l$ 씩을 넣어 반응을 중지시킨 후 $405nm$ 에서 OD값을 측정하였다.

5. 바이러스 단백질의 전기영동

바이러스 단백질의 전기영동은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 행하였다. 순수분리된 바이러스를 동량의 SDS-sample buffer와 섞은 후 2분간 끓였다. 이것을 10% polyacrylamide slab gel에 loading한 후 $150V$ 에서 전기영동을 하였다. gel을 고정한 후 coomassie blue를 사용하여 단백질을 염색하였다. 바이러스 단백질의 분자량은 표준단백질의 이동거리와 비교하여 결정하였다.

6. Western blotting assay

MAbs 혹은 polyclonal antibodies가 바이러스의 어느 단백질에 대한 것인지를 알기 위하여 western blotting 실험을 하였다. 순수분리된 바이러스를 SDS-PAGE gel 상에서 전기영동을 한 후 다시 transfer buffer ($25mM$ Tris, pH 8.3, $192mM$ glycine, 20% methanol)를 사용하여 $40mA$ 에서 16시간 동안 전기영동함으로써 gel에 있는 단백질 band를 nitro cellulose(NC) paper에 옮겼다. NC paper를 PBS로 washing한 후 1% PBS-BSA 용액에 1시간 동안 담가두어 blocking 시켰다. NC paper를 PBS-Tween 20(0.05%)으로 적당히 희석시킨

anti-virus serum에 넣어 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. PBS-Tween으로 NC paper를 washing한 후 alkaline phosphatase가 붙어 있는 second antibody와 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. PBS-Tween으로 washing한 다음 BCIP/NBT phosphatase substrate(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate sodium salt 0.15mg/ml, p-nitro blue tetrazolium chloride 0.3mg/ml in carbonate buffer (0.1M NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, pH 9.8))를 첨가하였다. 상온에서 15분 동안 발색시킨 후 증류수로 washing하여 반응을 중지시켰다.

결 과

1. 바이러스

실험에서 사용한 바이러스는 우리나라에 분포하는 것들 가운데 외국에서 이미 분리된 것과 다른 특성이 지닌 것을 선택하여 사용하고자 하였다. 우리나라에서 분리된 4종류의 IHNV들(PRT, YRT, MRT 및 SCS)을 미국에서 분리된 3종류의 IHNV strain(OSV, SRCV 및 RB-76)들과 SDS-PAGE를 통하여 비교하여 보았다. 그 결과 먼저 미국에서 분리된 3종류의 IHNV strain들은 모두 같은 크기의 단백질을 지니는 것으로 나타났으나 N단백질만은 3종류의 strain간에 그 크기가 서로 달랐다. 즉 SRCV의 N 단백질이 가장 컸고 다음으로 OSV, 그리고 RB-76이 가장 작은 N 단백질을 지녔다. 이와 비교하였을 때 우리나라에서 분리된 4종류의 바이러스는 모두 RB-76 strain과 같은 크기의 N 단백질을 지니는 것으로 나타났다. 그러나, IHNV의 구조단백질들 중의 하나인 M₂ 단백질은 바이러스간에 그 크기가 조금씩 달랐다. 즉, YRT와 SCS는 RB-76을 포함한 미국에서 분리된 3종류의 strain들과 같은 크기의 M₂ 단백질을 지니는데 반하여 PRT와 MRT 등 2종류의 M₂ 단백질은 미국에서 분리된 3종류의 strain 어느 것보다도 같지 않았다. 이상의 결과로부터 우리나라에서 분리된 4종류의 IHNV들 중 PRT와 MRT가 미국에서 분리된 IHNV와 다른 특성이 있는 것으로 밝혀져 이중 PRT를 앞으로의 실험에 사용

하였다. 항체를 사용한 중화실험 결과도 PRT가 미국에서 분리된 3종류의 strain들과 혈청학적으로 다른 특성이 있음이 밝혀졌었다.(Park *et al.* 1993).

2. Hybridoma 준비

우리나라에서 분리된 IHNV 중 PRT strain을 항원으로 하여 이에 대한 MAbs를 만드는 hybridoma를 만들었다. 그 결과 그림 1의 A, B, C 및 D와 같은데, A는 세포융합을 하여 96 well plate에 넣은 직후 관찰한 결과이다. 현미경상에서 수많은 세포들이 관찰되었는데, 많은 세포들이 살아 있었으나 세포들이 각각 하나씩 떨어져 있었다. B는 세포융합후 2일이 지난 후 관찰한 결과이다. 세포융합한 첫날에 비하여 전체적으로 세포의 수는 감소하였다. 그러나, 화살표로 표시한 것과 같이 몇몇 세포(hybridoma)가 살아남아 분열한 결과 4개의 세포가 모여 있는 것들이 관찰되었다. C는 3일째에 관찰한 결과로서 hybridoma가 더 분열을 하여 6-8개의 세포가 모여 있는 것들이 관찰되었고 이후 시간이 지남에 따라 세포수가 더욱 증가하여 1주일째(D)에 가서는 분열한 세포의 군집이 관찰되었다. 즉 시간이 지남에 따라 세포 융합이 일어나지 않은 세포들은 분열을 하지 못하고 점점 죽어갔고 이들 죽은 세포들은 feeder cell로 넣은 macrophage에 의해 제거되어 사라져 갔으며 반면에 세포 융합이 일어난 hybridoma들은 분열을 하여 그 수가 점점 증가하였다.

3. Hybridoma 선택 및 cloning

세포융합에 의하여 만들어진 hybridoma들 중 IHNV-PRT에 대한 항체를 분비하는 것을 ELISA 실험을 통하여 선택하였다.

세포융합을 한지 20일 정도가 지난 후 hybridoma cell들이 자라고 있는 A, B 두개의 96 well plate 각각에서 세포배양액 일부씩을 취하여 여기에 존재하는 anti-IHNV-PRT 항체의 양을 ELISA 실험을 행하여 측정하였다. OD₄₉₅의 값을 측정한 결과 각 well마다 그 값에 많은 차이가 있었는데, 적게는 0.013 그리고 많게는 0.192의 값을 보였다. 이들 중 OD₄₉₅의 값이 0.100 이상이고

Fig. 1. Photomicrographs of cultures after cell fusion. Spleen cells obtained from mouse immunized with IHN-V-PRT were fused with SP-2/0 myeloma cells by using polyethylene glycol to make hybridoma. Hybridoma cells were cultured and were observed with the aid of microscope at A) 0, B) 2 days, C) 3 days, and D) 7days. H indicates the hybridoma cells.

또한 분열상태가 양호한 4개의 well을 택하여, 선택된 4 종류의 hybridoma들을 monoclon으로 만들기 위하여 각각을 재료 및 방법에 기술한 dilution법을 사용하여 cloning하였다. 각 cloning된 세포들이 자란 후 위에서와 마찬가지로 방법으로 ELISA법을 사용하여 anti-IHN-V-PRT항체를 분비하는 세포를 선택하였는데, 각각에서 OD₄₀₅값이 높고 분열상태가 양호한 것을 하나씩 골랐다. 그리고, 같은 방법으로 하여 이들 cloning된 4종류의 monoclonal hybridoma들을 배양하여 배양액을 취함으로써 IHN-V-PRT에 대한 MAbs를 얻었다.

4. monoclonal antibody의 class 확인

Mouse에는 IgM, IgG, IgA, IgD 그리고 IgE 등의 5 가지 class들이 존재한다. 따라서, mouse의 B cell에서 유래된 MAbs가 이들 중 어떤 class인지를 확인할 필요가 있었다. 따라서 anti-mouse IgM과 anti-mouse IgG를 사용한 ELISA방법을 사용하여 4종류 MAbs의 class를 확인하였다. 그 결과 그림 2에서 나타난 바와 같이 4종류의 MAbs 모두 IgG class에 속함이 확인되었다.

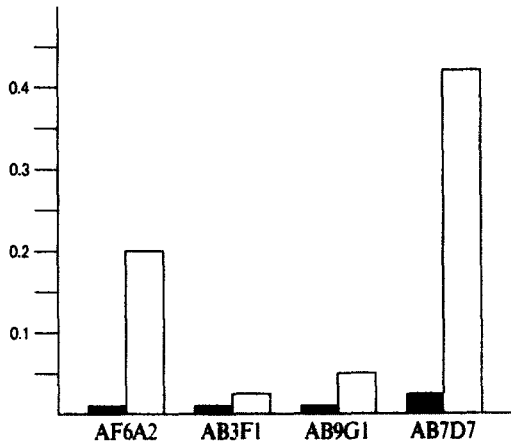


Fig. 2. Identification of the class of monoclonal antibody. Four kinds of monoclonal antibodies were coated onto ELISA plate and incubated with goat anti-mouse IgM(■) and goat anti-mouse IgG(□) conjugated with alkaline phosphatase. Then PNPP substrate was added and the OD₄₀₅ was measured.

Fig. 3. Western blot IHNV-PRT with monoclonal antibodies. Purified IHNV-PRT was analysed on 10% SDS-PAGE gel and the proteins on acrylamide gel were transferred onto NC papers. The NC papers were incubated with monoclonal antibodies ; 1) AB3F1 ; 2) AB9G1 ; 3) AF6A2 ; 4) AB707.

5. Western blotting

실험에 사용한 IHNV-PRT의 구조단백질들 중 어느 것이 면역유도단백질인지를 확인하기 위하여 western blotting 실험을 하였다. 실험에는 세포융합을 통하여 얻은 4종류의 MAbs와 IHN virus에 감염되었다가 살아남은 무지개송어에서 뽑은 혈청을 사용하였다.

먼저 MAbs를 사용하여 western blotting을 행한 결과 2종류 MAbs의 경우 IHNV-PRT의 G단백질을 인지하였고 나머지 2종류는 G보다 조금 작은 단백질을 인지하였다. 이 결과로부터 IHNV-PRT의 구조단백질들 중에 G 그리고 G보다 조금 큰 size의 단백질이 면역유도단백질임이 확인되었다.(그림 3)

다음으로 무지개송어 혈청을 사용하여 실험을 한 결과 G, M₁, M₂ 그리고 G보다 조금 큰 단백질에 대한 항체가 생성된 것으로 나타나, 이들이 면역유도 단백질임을

Fig. 4. Immunological response of rainbow trouts against IHNV. IHNV polypeptides were fractionated on 10% SDS-polyacrylamide gels. The blots were incubated with immune sera obtained from rainbow trout(A, Dongbang ; B, Injae) that survived natural infection of IHNV and were further incubated with rabbit anti-rainbow trout IgM and goat anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate, and were developed with BCIP/NBT.

확인하였다. 그리고, 이들 단백질들 중에 M_2 의 band가 가장 진하게 형성된 것으로 보아 M_2 에 대한 항체가 가장 많이 생성된 것으로 나타났으며, 다음으로 M_1 , G보다 조금 큰 단백질, 그리고 마지막으로 G 단백질에 대한 항체가 가장 적게 생성된 것으로 나타났다.(그림 4)

고 찰

MAb와 polyclonal antibody를 사용하여 IHNV의 면역유도단백질을 확인하였다. IHNV에 대한 MAb를 만들기 위하여, 먼저 순수분리된 IHNV를 Balb/c mouse에 면역을 시킨 다음 spleen cell을 취하여 SP-2/0 myeloma 세포와 fusion시킴으로써 hybridoma를 만들었다. 이중 IHNV에 대한 항체를 분비하는 hybridoma를 찾아 cloning과정을 거쳐 monoclonal을 만들었다. 이렇게 하여 4개의 clone을 만들어 이로부터 MAbs를 준비하였다. Western blotting방법을 사용하여 이들 항체가 IHNV의 구조단백질들 중 어느것에 대한 항체인지를 확인하였다. 그 결과, 두개의 MAbs는 G 단백질에 대한 항체이었고 나머지 2개는 G보다 조금 큰 size의 단백질에 대한 항체이었다. 이 결과로부터 IHNV의 5 구조단백질 중 G, 그리고 G와 비슷한 크기의 단백질이 면역유도단백질임이 확인되었다.

다음으로 IHNV에 감염된 무지개송어에서 생성되는 polyclonal antibody를 사용하여 western blotting함으로써 실제 무지개송어가 인지하는 IHNV의 면역유도단백질을 알아 보았다. 그 결과, 무지개송어는 L과 N 단백질을 제외한 나머지 3종류의 단백질에 대하여 항체를 생성하였다. 즉, 무지개송어에서는 G, M_1 그리고 M_2 가 면역유도특성을 지녔는데, G보다는 M_1 이, M_1 보다는 M_2 가 더 많은 항체를 유도하였다. 그리고, IHNV의 G 단백질보다 조금 크거나 작은 단백질에 대하여도 항체가 생성되었는데, 그 양이 G에 대한 것보다 많았다. 이상의 결과로부터 IHNV의 5종류 구조단백질중 G, M_1 , M_2 그리고 G보다 조금 크거나 작은 것들이 면역유도의 특성을 지니는 단백질들임을 알 수 있었고, 이들 면역유도단백질들 중 M_2 의 항원성이 가장 높았고 다음으로 M_1 , G

보다 조금 큰 것, 마지막으로 G 단백질의 항원성이 가장 낮음을 알 수 있었다. 이 결과를 앞의 MAbs를 사용하여 얻은 결과와 비교하여 볼 때 G와 G보다 조금 큰 것이 면역유도단백질이라는 점은 일치한다. 그러나, MAb를 사용하였을 때는 나타나지 않던 M_1 과 M_2 가 polyclonal antibody를 사용하였을 때 면역유도의 특성이 있는 것으로 나타난 사실은 두 실험 결과가 일치하지 않는다. 먼저 두 실험 결과가 일치하는 두 단백질의 경우, IHNV-PRT strain의 G 단백질이 면역유도단백질이라는 결과는 G 단백질이 IHNV의 최외곽성분인 envelope에 존재하는 glycoprotein이라는 사실로부터 당연한 결과로 생각되어지며 IHNV의 다른 strain의 경우에서도 G 단백질이 면역유도단백질로서 역할을 한다는 보고가 있었다. 그런데 G보다 조금 큰 size의 단백질이 면역유도단백질이라는 결과는 특이하였다. 지금까지의 보고에 따르면 이 위치에 IHNV의 구조단백질로서 보고된 것이 없었고 따라서 이 단백질이 면역유도의 특성이 있다는 사실이 보고된 바가 없었다. 그러나, 두 실험 모두에서 같은 결과가 나온 것으로 보아 IHNV를 이루는 단백질임이 확실하다고 생각된다. 이 단백질이 정확히 어떤 특성의 것인지 현재로서는 알 수가 없지만 G 단백질의 precursor일 가능성이 높은 것으로 생각된다. 다음으로 MAb를 사용한 실험에서는 나타나지 않다가 polyclonal antibody를 사용하였을 때만 면역유도특성이 나타난 M_1 과 M_2 의 경우 이와 같은 결과가 나타난 이유는 다음의 두 가지가 있을 수 있다. 첫째, mouse와 무지개송어의 면역체계, 즉 항원을 인지하는 특이성에 약간의 차이가 있어 그 결과 무지개송어는 M_1 과 M_2 를 인지하는데 반하여 mouse는 인지하지 못하기 때문일 수가 있다. 실제 많은 경우에 있어서 같은 항원을 주사하였을 경우 종에 따라 반응하는 정도가 다름이 발견되고 있다. 두번째의 이유로 mouse도 M_1 , M_2 를 항원으로 인지를 하여 면역반응을 보였는데, 실험에서 선택한 4종류의 hybridoma에는 이들 단백질을 인지하는 것이 없었기 때문일 수가 있다. 이것이 맞는지의 여부는 현재로서는 알 수가 없고 이를 확인하기 위하여는 더 많은 hybridoma를 만들어 조사를 해 보아야 한다. 위의 두가지 이유 중 어느 것이 되었든

지 물고기는 M₁, M₂를 항원으로 인지를 하였고 이들의 항원성은 G단백질 보다 더 높음을 나타내었다. 실제 IHNV중으로부터 살아남은, 다른 사람들의 보고에서도 G 이외에 M₁에 대한 항체가 생성되어 있음이 발견되기도 하였다.(Mourich & Leong, 1991; Ristow *et al.*, 1992). 이러한 결과는 앞으로 IHNV에 대한 백신을 개발하고자 할 때 중요한 정보를 제공하여 주는 것인데, G, M₁, M₂ 그리고 G보다 조금 큰 단백질 등이 백신개발 가능한 단백질이며 이들 가운데 M₁, M₂가 유력한 후보가 될 수 있음을 말하여 주는 것이다. 이전까지 IHNV백신의 개발은 G 단백질을 대상으로만 이루어져 왔는데 (Kurath *et al.*, 1985; Koener *et al.*, 1990; Gilmore *et al.*, 1988; Engelking & Leong, 1989; Xu *et al.*, 1991), 본 실험의 결과에 따르면 M₁ 혹은 M₂를 대상으로 하여 백신을 개발하는 것이 바람직하리라고 생각된다.

사 사

이 논문은 1993년도 농림수산부에서 실시한 특정연구 개발사업 및 한국 학술 진흥 재단의 공모 과제 연구비에 의하여 연구되었음

참 고 문 헌

- Amend, D. F., W. T. Yasutake, and R. W. Mead : A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 98 : 796~804, 1969.
- Amend, D. F., and L. Smith : Pathophysiology of infectious hematopoietic necrosis diseases in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) : early changes in blood and aspects of the immune response after injection of IHNV virus. *J. Fish. Res. Board Can.* 31 : 1371~1378, 1974.
- Engelking, H. M., J. B. Harry, and J. C. Leong : Comparison of representative strains of infectious hematopoietic necrosis virus by serological neutralization and cross-protection assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 1372~1378, 1991.
- Engelking, H. M., and J. C. Leong : The glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus elicits neutralizing antibody and protective responses. *Virus Res.* 13(3) : 213~230, 1989.
- Gilmore, R. D., H. M. Engelking, D. S. Manning, and J. C. Leong : 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, 1988.
- Hsu, Y. L., H. M. Engelking, and J. C. Leong : Occurrence of different types of infectious hematopoietic necrosis virus in fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 : 1353~1361, 1986.
- Koener, J. F., and J. C. Leong : Expression of glycoprotein gene from fish rhabdovirus gene by using baculovirus vector. *J. Virol.* 64(1) : 428~430, 1990.
- Kurath, G., K. G. Ahern, G. D. Pearson, and J. C. Leong : Molecular cloning of the six mRNA species of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. *J. Virol.* 53(2) : 469~476, 1985.
- Kurath, G., and J. C. Leong : Characterization of infectious hematopoietic necrosis virus mRNA species reveals a nonvirion rhabdovirus protein. *J. Virol.* 53(2) : 462~468, 1985.
- Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)* 227 : 680~685, 1970.
- Lannan, C. N., J. R. Winton, and J. L. Fryer : Fish cell lines : Establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro* 20 : 671~676, 1984.
- Leong J. C., Y. L. Hsu, H. M. Engelking, and D. Mulcahy : Strains of infectious hematopoietic necrosis(IHNV) virus may be identified by structural protein differences. *Dev. Biol. Stand.* 49 : 43~55, 19

81.

- Mourish, D. V., and J. C. Leong** : Mapping of the immunogenic regions of the IHNV glycoprotein in rainbow trout and mice. pp.93~100 in : Proceeding of the Second International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates. Oregon State University Printing, Corvallis, Oregon. 1991.
- McAllister, P. E., and R. P. Wangner** : Structural proteins of two rhabdoviruses *J. Virol.* 15 : 733~738, 1975
- Park, M. A., S. G. Sohn, S. D. Lee, S. K. Chun, J. W. Park, J. L. Fryer and Y. C. Hah** : Infectious hematopoietic necrosis virus from salmonids cultured in Korea. *J. Fish Dis.* 16 : 471~478, 1993.
- Pilcher, K. S., and J. L. Fryer** : The viral diseases of fish : a review through 1978. Part I : Diseases of proven viral ethiology. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 7 : 287~364, 1980.
- Ristow, S. S., J. de Avila, S. E. Lapatra, and K. A. Lauda** : Detection and characterization of rainbow trout antibody against infectious hematopoietic necrosis virus. *Diseases of Aquatic Organisms*. Submitted, 1992.
- Wingfield, W. H., J. L. Fryer, and K. S. Pilcher** : Properties of the sockeye salmon virus (Oregon strain). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130 : 1055~1059, 1969.
- Winton, J. R., C. K. Arakawa, C. N. Lannan, and J. L. Fryer** : Neutralizing monoclonal antibodies recognize antigenic variants among isolates of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.* 4 : 199~204, 1988.
- Xu, L., D. V. Mourich., H. M. Engelking, S. Ristow, J. Arnzen, and J. C. Leong** : Epitope mapping and characterization of infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein. using fusion proteins synthesized in *E. coli*. *J. Virol.* 65(3) : 1611~1615, 1991.

Characterization of Immunogens of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Isolated in Korea

Myoung Ae PARK, Sang Gyu SOHN, Jeong Woo PARK*
and Young Kee JEONG**

National Fisheries Research and Development Agency, Kyoungnam, 626-900, Korea

**Department of Microbiology, College of Natural Science, University of Ulsan,*

Kyoungnam, 600-749, Korea

***Department of Microbiology, College of Natural Science, University of Donggeui,
Pusan, 614-010, Korea*

To identify the immunogens of a PRT strain of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) isolated from cultured fish in Korea (Park *et al.*, 1993), a panel of 4 monoclonal antibodies (MAbs) against IHNV-PRT strain and two polyclonal antisera from rainbow trout survived IHN disease were prepared. Proteins of purified IHNV-PRT strain were analysed on 10% SDS-PAGE and transferred onto NC paper and were incubated with the antibody solutions. With the polyclonal antibodies, four bands (M_1 , M_2 , G and 90Kd) were detected and the band density was in the order of $M_2 > 90Kd > M_1 > G$. However, with the MAbs, only two bands (G and 90Kd) were detected. The origin of 90Kd protein was not clear but maybe cell. All the results represented that among the five proteins of IHNV-PRT strain (Park *et al.*, 1993), M_2 , M_1 and G proteins were immunogens and M_2 protein was the strongest one.

Key Words : Infectious hematopoietic necrosis virus(IHNV), monoclonal antibody, hybridoma, immunogen, western blotting