

중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR)법을 이용한 남해안 양식 해산어의 Red Sea Bream Iridovirus (RSIV) 보유상황 확인

오명주[†] · 정성주 · 김영진*

여수대학교 어병학과, *부산대학교 생물학과

해산어의 참돔이리도바이러스 (RSIV) 감염 상황을 조사하기 위한 진단법으로 중합효소연쇄반응법(PCR)을 확립하고 1998년 여름 통영을 중심으로 대량폐사가 일어난 남해안 지역의 돌돔, 참돔 및 조피볼락을 대상으로 RSIV의 검출을 행한 결과 남해안 전역의 RSIV 감염이 확인되어졌다.

Key words : RSIV, Iridovirus, PCR, Korea, Virus detection, Marine fish,

1998년 8월말에서 9월에 걸쳐 통영을 중심으로 남해안 각지의 양식 돌돔에서 대량 폐사가 발생했다. 감염증은 온도가 23~26°C사이에서 발생하였으며, 당년생 뿐만 아니라 2년생, 3년생 어류도 폐사하여, 막대한 경제적인 손실을 입혔다. 본 연구자들은 발병어의 채집을 통한 병리학적 검사와 전자현미경관찰 등의 결과를 토대로 폐사의 원인이 일본등의 참돔에서 보고되어진 (Nakajima and Sorimachi, 1994; Miyata *et al.*, 1997) 참돔이리도바이러스 (red seabream iridovirus, RSIV)일 가능성을 시사하였다 (Jung and Oh, 1999). 본 연구는 Miyata *et al.* (1997) 및 Kurita *et al.* (1998)이 행한 해산어 이리도바이러스 감염증의 원인 바이러스인 RSIV의 유전적 연구를 토대로 제안한 primer를 선택하여 제작하고 그를 이용한 중합효소연쇄반응법(PCR)에 의해 특이유전자를 검출함으로써 이 질병이 RSIV에 의한 것임을 확인함

과 동시에 본 바이러스의 남해안 해산어류에의 분포상황을 조사하여, 본 감염증의 현장 신속진단법

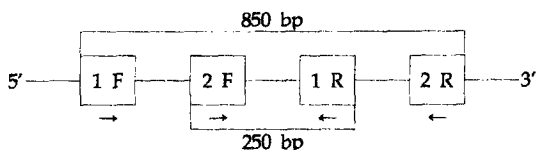


Fig. 1. Schematic illustration of the PCR amplification for RSIV gene detection.

Extracted Template DNA

Reaction Mix with

Each primer	100pM
dNTPs	0.2 mM
Taq polymerase	1unit
Magnesium chloride	1.5 mM
Template	10 ng

PCR amplification with

94°C, 30 sec - denaturation,
 58°C, 1min - annealing,
 72°C, 1min - extension
 for 30 cycles

Analysis of PCR amplified product

Electrophoresis in 1.5% agarose-
 TAE buffer (40mM Tris-asetate,
 1mM EDTA, pH 8.0) gel

Fig. 2. Procedures of PCR for the detection of RSIV DNA.

[†]Corresponding author

Table 1. PCR samples of cultured marine fish in a south coastal area of the Korean peninsula

Fish	Scientific name	Area and Date	Sample
1. Red sea bream	<i>Pagrus major</i>	Dolsan, 24. Jul. 1998	1 year, Sp+Kd
2. Red sea bream	<i>Pagrus major</i>	Namhae, 3. Sep. 1998	1 year, Sp
3. Red sea bream	<i>Pagrus major</i>	Gumundo, 5. May 1998	1 year, Sp
4. Red sea bream	<i>Pagrus major</i>	Tongyoung, 25. Aug. 1998	1 year, Sp
5. Striped beakperch	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Tongyoung, 25. Aug. 1998	1 year, Sp
6. Striped beakperch	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Namhae, 3 Sep. 1998	1 year, Sp
7. Striped beakperch	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Yosu, 30. Aug. 1998	1 year, Sp
8. Rock fish	<i>Sebastes schiegeli</i>	Yosu, 9. Jun. 1998	1 year, Sp
9. Rock fish	<i>Sebastes schiegeli</i>	Namhae, 15. May 1998	1 year, Sp
10. Red sea bream	<i>Pagrus major</i>	Tongyoung, 29. Aug. 1998	2 years, Sp
11. Red sea bream	<i>Pagrus major</i>	Namhae, 3, Sep. 1998	2 years, Sp
12. Striped beakperch	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Tongyoung, 25. Aug. 1998	2 years, Sp
13. Striped beakperch	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Tongyoung, 25. Aug. 1998	3 years, Sp
14. Striped beakperch	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Tongyoung, 29. Aug. 1998	2 years, Sp
15. Striped beakperch	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Yosu, 30. Aug. 1998	2 years, Sp

Table 2. Primers used for PCR amplification of RSIV gene

Primer	Sequence	Products
IRD-1F	5'-CTC-AAA-CAC-TCT-GGC-TCA-TC-3'	848bp
IRD-2R	5'-GCG-TTA-AAG-TAG-TGA-GGG-CA-3'	
IRD-2F	5'-TAC-AAC-ATG-CTC-CGC-CAA-GA-3'	248bp
IRD-1R	5'-GCA-CCA-ACA-CAT-CTC-CTA-TC-3'	

의 확립과 방역대책수립의 기초자료로 사용하고자 한다.

1998년 여름철을 중심으로 원인 불명의 폐사가 일어났던 경남 통영 연안의 양식 돌돔과 참돔, 경남 남해도 일원의 돌돔, 참돔 및 조피볼락, 전남 여수 관내 거문도, 돌산도 등의 도서에서 양식 중 이던 참돔, 돌돔, 조피볼락을 대상으로 조사하였다 (Table 1). 병어의 비장과 신장을 채취하여 High pure PCR template preparation kit(Boehringer mannheim)를 사용하여 DNA를 추출하고, PCR primer는 RSIV genomic DNA의 부분서열로부터 디자인된 2세트의 primer(IRD-1F/1R과 2F/2R)를 한국바이오니아(주)에 합성의뢰하여 사용하였으며, 검출 감도를 높이기 위해 1F/2R과 2F/1R primer를 세트로 하여 netsted PCR을 실시하였다(Table 2 and Fig. 1). PCR 증폭반응은 100 pM의 각 primer와 0.2 mM dNTPs, 1 U Taq DNA polymerase, 1.5 mM MgCl₂이 포함된 혼합물에 10 ng의 template를 첨가하여 실시하였다. 반응조건은 우

선 94°C에서 30초간 변성, 58°C에서 1분간 결합, 72°C에서 1분간 신장시키는 조건으로 30 cycle을 진행하였다. 반응산물은 1.5 % agarose gel을 이용

Fig. 3. Detection of RSIV genomic DNA from red sea bream tissues and tissue culture fluids by PCR amplification. M, DNA molecular weight marker; NS, amplified DNA from non-infected red sea bream spleen; VS and VK, amplified DNA from infected red sea bream spleen and kidney; NC, amplified DNA from tissue culture fluids of non-infected red sea bream spleen; KC and SC, amplified DNA from infected red sea bream kidney and spleen culture fluids.

Fig. 4. Detection of RSIV naturally infected with RSIV. M, DNA molecular weight marker; lane 1-15, amplified DNA from marine fishes (see Table 1).

하여 확인하였다(Fig. 2). Jung and Oh(1999)의 연구에 의하여 이리도바이러스의 감염이 확인되어진 바이러스 감염 양성 확인어의 비장, 신장 샘플 및 배양 바이러스액을 이용하여 사용 primer의 검출특이성을 확인한 결과(Fig. 3) 사용 primer는 바이러스 양성어 비장, 신장 샘플 및 감염어 배양액을 이용한 PCR 결과 정상어 비장세포 및 그 접종 배양액을 사용한 것에서의 결과와 비교하여 볼 때 목표로 하였던 크기인 250 bp의 산물이 감염어 유래의 샘플에서만 증폭되어짐이 확인되어 직접 어체의 조직을 이용한 RSIV의 특이적 검출법으로 사용할 수 있는 것으로 판단되어 동일한 조건의 반응을 통한 채집어의 RSIV 감염 유무를 확인하는 방법으로 채택하였다. 본 조사에서 대상으로 한 어체 샘플로부터의 RSIV 특이 유전자의 검출 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 조사에 사용한 어종은 돌돔, 참돔 및 조피볼락으로 3종류의 해산 양식어에서 흔히 본 바이러스의 감염이 확인되었으며, 지역으로 나누어 보았을 때에도 경남의 통영 및 남해 일원의 양식장, 전남 여수 일원의 양식장에서 5월과 6월의 참돔 폐사 조사구를 제외하고 모든 조사어체에서 RSIV가 특이적으로 검출되어졌다.

지역에 따라 그리고 시기에 따라 각각의 조사 어체가 포함되었던 양식장의 폐사의 정도 및 규모에는 차이를 감안하더라도 우리나라 남해안의 양식산 돌돔, 참돔 및 조피볼락의 폐사에 본 바이러스가 관여하고 있음을 본 조사를 통하여 확인할 수 있었다. 본 바이러스의 숙주역이 참돔에만 국한되지 않고 돌돔 및 조피볼락에서도 검출되는 점 과, 남해안의 특정지역에서만 검출되어지지않고 경남 및 전남을 포함하는 매우 넓은 지역에서 한달여의 동일시기에 발생하였던 점으로부터 본 바이러스는 이미 전 연안의 어장에서 출현할 수 있고, 바이러스의 증식 조건과 양식장의 환경조건에 따라 상시 발생할 수 있는 질병으로 판단되어 그 대책의 수립이 필요하다고 생각되어진다. 따라서 본 연구에서 제안한 RSIV 검출법 및 감염 상황을 기초로 지속적인 바이러스 감염동태 연구가 필요하며, 질병 발생시의 환경조건 및 본 바이러스의 생물학적 특성과의 연계를 통한 현장 방역법 개발에 관한 연구를 행하고자 한다.

참고문헌

- Jung, S.J., and Oh, M.J.: Iridovirus infection associated with high mortality in a south coastal area of the Korean peninsula. *J. Fish Dis.*, in press.
- Kurita, J., Nakajima, K., Hirono, I., and Aoki, T.: Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream Iridovirus (RSIV), *Fish Pathol.*, 33(1), 17-23, 1998.
- Miyata, M., Matsuno, K., Jung, S.J., Danayadol, Y., and Miyazaki, T.: Genetic similarity of iridoviruses from Japan and Thailand. *J. Fish Dis.*, 20, 127-134, 1997.
- Nakajima, K., and Sorimachi, M.: Biological and physicochemical properties of iridovirus isolated from cultured Sea Bream. *Fish Pathol.*, 29(1), 29-33, 1994.

Detection of RSIV (Red Sea Bream Iridovirus) in the Cultured Marine Fish by the Polymerase Chain Reaction

Myung-Joo Oh, Sung-Joo Jung and Young-Jin Kim*

Department of Fish Pathology, Yosu National University

**Department of Biology, Pusan National University*

Occurrences of red sea bream iridovirus disease (RSIVD) in cultured marine fishes were investigated. The infection was detected by the polymerase chain reaction (PCR) used to amplify the red sea bream iridovirus (RSIV). The RSIV infection was widely distributed in fish culture farm around the south coastal area of the Korean peninsula.

Key words : RSIV, Iridovirus, PCR, Korea, Virus detection, Marine fish