

국내의 양식산 무지개송어 성어로부터 분리된 IHNV의 G protein gene에 대한 연구

김기홍 · 김위식 · 김춘섭 · 김영진 · 정태성* ·
키타무라 신이치 · 정성주 · 오명주†
여수대학교 수산생명의학과, *경상대학교 수의학과

G protein gene of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) isolated from adult rainbow trout, *Salmo gairdneri* in Korea

Ki-Hong Kim, Wi-Sik Kim, Choon-Sup Kim, Young-Jin Kim, Tae-Sung Jung*,
Shin-Ichi Kitamura, Sung-Ju Jung and Myung-Joo Oh†

Department of Aqualife Medicine, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

*College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

An Infectious hematopoietic necrosis virus strain (IHNV-RTK) was isolated from cultured rainbow trout at Kumi in Korea during 2000 and 2001. In the RT-PCR amplification with the specific primer set designed from IHNV G protein region, a 540 bp PCR product was amplified from the RTK strain. The RTK strain showed higher sequence homology with the published IHNV G protein genes (RB-76, LR-73, Col-85, and Carson-89).

Key words : IHNV, Rainbow trout, PCR, G protein, Sequence

전염성 조혈기 괴사증 (infectious hematopoietic necrosis; IHN)은 연어과 어류에 유행하는 바이러스성 질병으로 특히 무지개송어의 치어기에 높은 폐사율을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이 질병의 원인 바이러스는 1969년에 처음 분리되어 (Wingfield *et al.*, 1969) IHNV로 명명되었으며 (Amend *et al.*, 1969), 1973년 이전에는 북미에서 주로 발생하였으나 지금은 전 세계적으로 확산되어 많은 피해를 초래하고 있다. 우리나라에서도 대량 폐사된 무지개송어 (*Salmo gairdneri*) 치어에서 IHNV가 분리됨으로써 IHNV가 우리나라에서 매년 발생하는 무지개송어 대량폐사의 원인체로 작용하고 있음이 확인되었다 (Park *et al.*, 1993). IHNV의 경우 공식적

으로 인정되는 표준형은 아직까지 정해진 바 없으며, Pilcher와 Fryer (1980)는 여러 지역에서 분리된 IHNV의 병원성의 차이점을 발견하고 여러 종류의 IHNV가 있음을 시사하였다. IHNV의 구조 단백질은 polymerase (L), surface glycoprotein (G), nucleocapsid (N), 그리고 matrix protein (M1, M2)으로 이루어져 있고 (Leong *et al.* 1981, Mcallister *et al.*, 1975), SDS-PAGE 상에서 IHNV의 구조단백질의 G와 N의 분자량의 차이를 기준으로 하여 세계 여러 지역에서 분리된 71종류의 IHNV들이 5 type으로 분류된 바 있다 (Hsu *et al.*, 1986). 지금까지 IHNV는 주로 치어시기에 높은 폐사율을 보이는 것으로 알려지고 있으나 최근 경상북도에 위치하고

†Corresponding Author : Myung-Joo Oh, Tel : 061-659-3173,
Fax : 061-659-3173, E-mail : ohmj@yosu.ac.kr

있는 무지개송어 양식장에서 치어시기를 경과 하여 1년-2년생의 성어기의 무지개송어에서 IHNV 감염에 의한 대량폐사가 발생하였고, 이러한 발병이 최근 2년간 계속해서 무지개송어 양식장에 확산되어지는 경향이 확인되었다 (Kim *et al.*, 2003). 본 연구를 통하여 이들 감염 양식장의 무지개송어에서 분리된 IHNV-RTK주의 G protein gene 분석을 행하고 기존에 보고된 IHNV와 차이점을 검토하고자 하였다.

본 실험에 사용한 바이러스는 2001년 3월 경북 구미 무지개송어 양식장에서 채집한 병어로 부터 신장조직을 HBSS로 10배 희석한 다음 균질화하고, 이를 0.45 μm filter로 여과하여 -80°C 에 보관하면서 사용하였으며, 편의상 이 분리주를 RTK라 명하기로 하였다. 비교실험을 위한 표준 IHNV 바이러스주로서는 일본 북해도의 chum salmon (*Oncorhynchus keta*)에서 분리된 IHNV-ChAb 균주를 일본 북해도대학의 요시미즈 교수로부터 분양받아 사용하였다. 무지개송어 시료에 대한 바이러스 검사를 위하여 chinook salmon embryo cell line (CHSE-214: Lannan *et al.*, 1984)을 사용하였고, 100 IU/ml의 penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 streptomycin, 10% FBS (Fetal bovine serum)를 첨가한 MEM (Eagle's minimum essential medium, Gibco)을 사용하여 배양하였다. 우선 CHSE-214 cell line을 24well plate에 단층 배양한 다음, 15°C 에서 6시간 동안 배양한 후 각 well에 50 μl 씩 접종한 뒤, 15°C 에 배양하면서 세포변성을 관찰하였다. RTK에 감염된 CHSE-214 세포의 배양액 200 μl 로부터 viral RNA extraction kit (Bioneer Co., Korea)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 oligo(dT)₁₅ primer 1 μl 와 함께 70°C 에서 5분간 변성시킨 후 즉시 얼음 위에서 냉각시키고, 여기에 reverse transcription mixture (50mM Tris-HCl, pH 8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂), 0.5mM dNTPs, 10mM DTT, 10 units reverse transcriptase (Promega Co.)를 넣어 전체 조성이 20 μl 가 되게 하였다. 역전사 반응은 42°C 에서 60분간 실시하였고 70°C 에

서 5분간 처리하여 잔존 효소활성을 제거하였으며, 이와 같은 처리로 얻어진 cDNA를 PCR의 주형으로 이용하였다. PCR primer는 IHNV의 G protein을 대상으로 Miller 등 (1998)에 의하여 제안된 primer set (IG1, ID3, ID4)를 사용하였으며, 1 step PCR 반응은 100pM의 primer (IG1: 5'-ATG-ATC-ACC-AAC-TCC- GCT-CAT-T-3'; ID3: 5'-GAT-TGG-AGA-TTT-TAT-CAA-CA-3'), 0.2mM dNTPs, 1U Taq DNA polymerase, 그리고 2.5mM MgCl₂이 포함된 혼합물에 합성된 cDNA 1 μl 를 첨가하여 실시하였다. 반응조건은 우선 95°C 에서 45초간 변성시키고, 50°C 에서 45초간 annealing 반응을, 72°C 에서 1분간 extension 반응을 시켜 총 30 cycle동안 진행하였으며, 72°C 에서 5분간 post-extension을 실시하여 반응을 마무리하였다. 얻어진 첫 번째 PCR 산물에 대해 실시된 nested PCR은 ID4 (5'-CTC-TGG-ACA-AGC-TCT-CCA- AGG-3')와 ID3 primer를 사용하여 같은 조건으로 반응시켰다. 증폭된 최종 PCR 산물은 1.5% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시한 후 확인하였다. Agarose gel 상에서 확인된 PCR 산물에 대해 Gel Extraction Kit (QIAGEN Co.)를 이용하여 회수하였다. 염기서열 분석을 위한 시료의 반응은 50ng의 template DNA, 3.2pmol의 primer (ID3 or ID4), 그리고 8 μl 의 Terminator RR mixture (Applied Biosystems Co.)를 각각 넣어 잘 혼합하고, 멸균된 증류수를 첨가하여 최종 20 μl 의 조성으로 실시하였다. 반응조건은 96°C 에서 10초간, 50°C 에서 5초간, 60°C 에서 4분간 반응을 진행하여 총 25 cycle 동안 실시하였으며, 반응산물에 대해 증류수 80 μl , 3M NaOAc 10 μl , 그리고 95% EtOH 250 μl 를 첨가하여 혼합한 다음, 12000 rpm에서 30분간 원심분리를 실시하여 시료를 회수하고, 70% EtOH로 수세한 뒤 자연건조 시켰다. 건조된 시료에 대해 template suppression reagent (TSR) 25 μl 를 첨가하고 95°C 에서 2분 30초간 반응시킨 다음, 즉시 얼음 위에서 냉각시킨 후 ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Co.)로 염기서열을

확인하였다. 확인된 염기서열에 대해서는 Blast (GenBank, NCBI) 등을 이용하여 분석하였다.

RTK에 감염된 CHSE-214 세포의 배양액으로부터 추출된 RNA를 역전사 시켜 얻어진 cDNA를 PCR의 주형으로 이용하여 실시한 PCR 반응으로 증폭된 산물의 확인을 위해 agarose gel 상에서 전기영동을 실시한 후, UV-transilluminator 상에서 확인한 결과, 양성 대조구로 사용된 IHNV-ChAb와 같은 크기인 약 540 bp 크기의 특이 밴드를 확인할 수 있었다 (Fig. 1). PCR 반응으로 확인된 특이 밴드가 실제로 IHNV의 유전자를 가지고 있는지를 확인하기 위하여 우선

특이 밴드로부터 회수한 증폭 산물을 sequencing한 결과 약 540개의 염기서열이 확인되어졌고, 이를 Blast (GenBank, NCBI)를 이용하여 분석한 결과, 기존에 등재되어 있는 IHNV strain인 RB-76, LR-73, Col-85 그리고 Carson-89 strain (Nichol *et al.*, 1995) 등의 G protein 영역의 유전자와 94~96%의 높은 유사성을 가지고 있음이 확인되었다 (Table 1).

국내의 무지개송어양식이 이루어진 1970년대 이후로 현재에 이르기 까지 수정란의 공급을 일본 및 미국, 유럽 등지에 의존해온 탓으로 국내 양식산 무지개송어에 각종 바이러스가 존재할 가능성은 매우 높다. Kim 등 (2003)에 따르면 2000년 12월 국내 충북 제천의 양식장에서 VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus)의 감염에 따른 특이적인 증상을 수반하며 폐사된 무지개송어 성어의 감염 원인체가 IHNV이었음을 확인하여 보고하였는데, 본 연구를 통하여 이들로부터 분리된 IHNV-RTK strain과 치어기의 연어과 어류에만 폐사를 일으키는 것으로 보고되어져 있는 기존의 IHNV와의 분자생물학적인 수준에서의 차이점을 기대하고 G protein gene 염기서열을 분석하여 기존의 IHNV strain과 비교하였으나 큰 차이점이 없는 것으로 확인되어진 점에서 본 연구에서 대상으로 삼지 않은 구성 protein의 염기서열을 대상으로 한 분자생물학적인 비교가 행해져야하며, 나아가 이들 상이한 병변을 나타내는 IHNV의 차별화를 위한

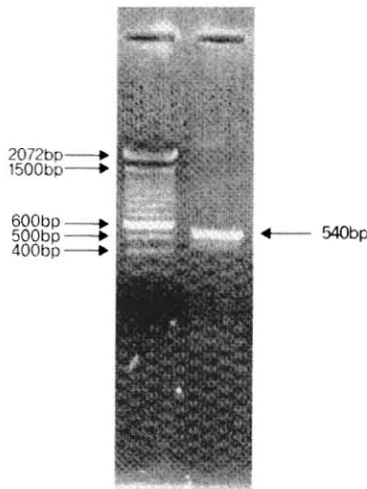


Fig. 1. Electrophoretic analysis for the amplicans by RT-PCR. M : Marker, lane 1 : IHNV-ChAb, Lane 2 : IHNV-RTK.

Table 1. The nucleotide sequence identities of G protein of IHNV-RTK with other IHNV

Carson : IHNV-carson-89 strain, Col-85 : IHNV-Col-85 strain, LR-73 : IHNV-LR-73 strain, RB : IHNV-RB-76, RTK : a isolate from kumi in Korea

	RTK	RB-76	LR-73	Col-85	Carson-89
RTK	100%	96%	96%	94%	96%
RB-76		100%	98%	97%	99%
LR-73			100%	98%	98%
Col-85				100%	97%
Carson-89					100%

primer의 선발을 위한 추가 연구가 필요한 것으로 판단되어졌다.

참 고 문 헌

- Amend, D. F., Yasutake, W. T. and Mead R. W. : A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon. *Trans. Am. Fish. soc.*, 98 : 796~804. 1969.
- Hsu, Y. L., Engelking, H. M. and leong, J. C. : Occurrence of different types of infectious hematopoietic necrosis virus in fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52 : 1353-1361, 1986.
- Kim, K. H., Kim, W. S., Kim, Y. J., Jung, S. J., Jung, T. S. and Oh, M. J. : Isolation and characterization of infectious hematopoietic necrosis virus causing high mortality in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Fish Pathol.*, 15 : 81-90, 2003.
- Leong, J. C., Hsu, Y. L. Engelking, H. M. and Mulcahy, D. : Strains of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) may be identified by structural protein difference. *Dev. Biol. Stand.*, 49, 43-55, 1981.
- Mcallister, P. E. and Wanger. R. P. : Structural proteins of two rhabdovirus. *J. virol.*, 15, 733-738, 1975.
- Miller, T. A., Rapp, J., Wastlhuber, U., Hoffmann, R. W. and Enzmann, P.-J. : Rapid and sensitive reverse transcriptase polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells. *Dis. Aquat. Org.*, 34: 13-20, 1988.
- Nichol, S. T., Rowe, J. E. and Winton, J. R. : Molecular epizootiology and evolution of the glycoprotein and non-virion protein genes of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. *Virus Res.*, 38 (2-3), 159-173, 1995.
- Park, M. A., Shon, S. G., Lee, S. D., Chun, S. K., Park, J. W., Fryer, J. L. and Hah, Y. C. : 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 L a review through 1978. Part I : Disease of proven viral ethiology. *CRC Crit Rev. Microbiol.*, 7 : 287~364. 1980.
- Wingfield, W. H., Fryer, J. L. and Pilcher, K. S. : Properties of the sockeye salmon virus (Oregon strain). *Proc. Soc..Exp. Biol. Med.*, 130, 1055-1059, 1969.
- Wolf, K. : Fish viruses and fish viral diseases. Cornell University Press. New York, 83~109, 217~242, 1988.

Manuscript Received : September 8, 2003

Revision Accepted : November 4, 2003

Responsible Editorial Member : Kwan-Ha Park
(Kunsan Univ.)