

종묘장 넙치 치어에서의 Iridovirus 감염

김태중 · 장은진 · 김종수¹ · 이재일*

전남대학교 수의과대학

¹전남생물산업연구센터

(게재승인: 2006년 1월 15일)

Iridovirus infection of cultured juvenile flounder (*Paralichthys olivaceus*) in nursery

Tae-Jung Kim, Eun-Jin Jang, Jong-Su Kim¹, Jae-Il Lee*

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

¹Jeonnam Biotechnology Research Center, Hwasum 519-805, Korea

(Accepted: January 15, 2006)

Abstract : Iridovirus is an icosahedral cytoplasmic double-stranded DNA virus with a genome size of 170-200kb. Outbreaks of fish iridovirus infection are characterized by their wide geographic distribution and broad host spectrum, especially in water temperatures of 25-27°C. Recently, the causative agent of high mortalities in flounder (*Paralichthys olivaceus*) was identified as fish iridovirus in Korea. Iridoviral infection repeatedly occurs in the same area for long periods, suggesting the possibility of viral infection in nursery. To examine this, the existence of iridovirus in juvenile flounders was detected by PCR using virus-specific primers. Antibodies induced against this virus were also examined using ELISA. As a result, juvenile fish in nursery were found to be previously infected with iridovirus, suggesting that proper prevention systems are required.

Key words : ELISA, iridovirus, PCR, recombinant protein

서 론

Iridovirus는 icosahedral cytoplasmic DNA virus로서 genome의 크기가 170-200 kb인 double-stranded DNA virus이다 [25]. 이 바이러스의 큰 특징인 약 50 kDa의 major capsid protein(MCP)은 바이러스감염을 일으키는 주된 polypeptide이고, virion protein의 약 45%를 구성한다 [23]. Iridoviridae family는 4개의 속, 즉 *Iridovirus*, *Chloririvirus*, *Ranavirus*, 그리고 *Lymphocystivirus*로 나뉘는데, 최근 iridovirus 사이의 유전학적 다양성을 진단하는 도구로 자주 사용되는 MCP 유전자 서열분석법 [23]을 이용하여 분석해 본 결과, fish iridovirus는 *Ranavirus* 속 또는 *Lymphocystivirus* 속과는 유전학적으로 많이 다르다는 것이 밝혀졌다 [4, 6].

Fish iridovirus는 넓은 지역분포와 숙주범위를 가지며 [10, 11], 보통 18-20°C에서 25-27°C로 수온상승이 되는 시기에 발병한다. 이 질병에 걸린 고기는 특별한 외부증상없이, 비정상적이고 무기력한 유영을 보이고, 2개월 동안 50-90%의 누적 치사율을 보인다 [24]. 조직병리학 적 소견의 경우 아가미, 신장, 심장, 간, 비장에서 비대 호염기세포가 보인다 [24]. Iridovirus는 자생어에서 수입 어 뿐 아니라, 자연어에서 양식어까지 [5, 17], 그리고 치어에서 성어까지 [13] 널리 퍼져 어류산업에 있어 큰 경제적 손실을 주고 있다.

우리나라의 경우 1998년 8-10월에 남해안지역의 양식 돌돔, *Oplegnathus fasciatus*의 대량폐사의 원인이 Red sea bream iridovirus(RSIV)와 유사한 iridovirus로 밝혀진 이후 [21], 다양한 종류의 양식어류에서 iridovirus 감염

*Corresponding author: Jae-Il Lee

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
[Tel: +82-62-530-2854, Fax: +82-62-530-2857, E-mail: jaeil@chonnam.ac.kr]

증이 발생하고 있다 [3, 7, 9]. 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 경우, 2003년 양식넙치 치어의 대량폐사 역시 RSIV와 유사한 iridovirus로 밝혀졌다 [3]. 이 감염증은 수온 23-26°C 사이에서 발생하였으며 1년생 뿐 아니라 2-3년생 어류도 폐사하여 막대한 손실을 입혔다.

한편 iridovirus 감염증은 이전 발생지역에서 지속적으로 발병하는 특징을 보이는 바, 발병이 입식 전 종묘장에서부터 iridovirus에 감염되었는지 아니면 양식장에서 감염되었는지 알아 볼 필요가 있겠다고 할 수 있다.

Iridovirus 감염을 알아보기 위한 진단법으로 cell culture [14], immunofluorescence assay [13], PCR [15-17]등이 연구되었는데, 본 실험에서는 정확한 감염의 여부를 알아보기 위하여 RSIV MCP에 대한 PCR 방법에 의해 직접 MCP 유전자를 검출함과 함께, MCP를 대장균 발현 system을 이용하여 재조합 단백질로 발현하고 이 단백질에 대한 항체의 존재여부를 ELISA 방법으로 알아봄으로써 간접적인 진단을 병행하여 실시하여 보았다. 이를 통하여 종묘장내 넙치 치어에서의 iridovirus 감염 상황을 조사함으로써, iridovirus 감염증에 대한 방역대책 수립과 백신적용의 기초자료로 사용하고자 한다.

재료 및 방법

시험어 및 DNA 준비

2005년 8월 전북 K 지역의 종묘장으로부터 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 치어(2개월령, 체장: 7-10 cm)를 20개체를 채집하여 시험에 사용하였다. 각 개체별로 비장과 간을 적출한 다음 조직 1g당 lysis buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8; 20 mM NaCl, 2% SDS, 10 mM EDTA, pH 8; proteinase K 100 µg/ml) [24]를 1ml씩 첨가하고 미세수술용 가위로 조직을 세절한 뒤 56°C에서 3시간동안 용해시켰다. DNA 추출은 Sambrook 등 [19]에 준하여 phenol/chloroform 방법을 실시하였다. Genomic DNA는 TE buffer(10mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 7.5)에 녹여 50 ng/µl의 농도로 맞춘 후, PCR template로 사용하였다.

PCR 반응(polymerase chain reaction)

Primer는 GenBank에 등록되어 있는 RSIV MCP (AY310918) [23]를 이용해서 *Bam*HI site(underlined)를 포함하는 5'-primer(5'-TATAGGATCCATGTCTGCGA TCT CAGGTCG-3')와 *Hind*III site(underlined)를 포함하는 3'-primer(5'-TGTGAAGCTTTTACAGGATAGGGAAGC CTG-3')를 제작하여 사용하였다. PCR조건은 2 µl DNA와 10X reaction buffer 5 µl의 각 primer(50 pM) 1 µl, 10 mM dNTPs(각 2.5 mM) 5 µl, 5U Ex Taq™ DNA

polymerase(Takara, Japan) 1 µl을 혼합한 후, 총 50 µl이 되도록 DW를 첨가시켰다. 이를 PTC-100(MJ Research, USA)을 이용해 95°C 5분간 incubation 시킨 후 95°C/40s denaturation, 55°C/40s annealing, 72°C/2 min extension을 30회 반복수행한 후 72°C에서 5분간 다시 extension을 실시하였다. 증폭된 반응생성물은 1.0%(w/v) agarose gel에서 전기영동한 후 DNA 크기를 비교하였다. PCR로 증폭된 생성물을 1.0% agarose gel에서 gel-cut 후 PCR purification kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 순수분리하고 이를 pGEM-T easy vector(Promega, USA)에 삽입하여 cloning 하였다. 이 construct를 *E. coli* JM109에 형질전환시켜 배양시킨 후, QIAprep Spin Mini Kit (Qiagen, Germany)을 이용하여 DNA plasmid를 추출하였다. 준비된 construct plasmid내에 원하는 크기의 insert가 삽입되었는지 알아보기 위하여 제한효소 *Eco*RI (Promega, USA)를 이용하여 restriction study를 하였다. 그리고 이 construct를 ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열을 GenBank에 등록된 RSIV 유전자들과 염기서열을 비교분석하였다.

재조합 단백질 발현용 construct

재조합 단백질의 생산 및 순수분리는 김 등 [1] 및 Kim and Lee [8]에 준하여 실시하였다. 즉, pGEM-T easy에 cloning된 capsid 유전자를 2가지 제한효소(*Bam*HI + *Hind*III)로 처리한 다음 양쪽 끝을 sticky ends로 만들었다. 여기에 단백질에 hexahistidine-tag를 fusion시키는 기능이 있는 대장균 발현용 vector인 pRSET(Invitrogen, USA) [22]를 같은 효소로(*Bam*HI + *Hind*III) 처리하여 T4 DNA ligase(Promega, USA)를 이용하여 insert와 vector를 ligation 하였다. 이 construct를 JM109에서 증균 후 insert 존재 및 open reading frame의 shift 여부를 sequencing을 통해 재확인 하였다. 확인된 construct는 단백질 발현용 대장균 BL21(DE3)pLysS에 형질전환시켜 IPTG를 첨가하여 단백질을 발현하고 hexahistidine에 결합하는 Ni²⁺-charged resin을 이용하는 Probond(Invitrogen, USA) purification kit를 이용하여 denaturing condition에서 단백질을 순수분리 하였다. 순수분리된 단백질은 ELISA study에서 iridovirus capsid protein에 대한 항체의 존재 여부를 알아보기 위한 항원으로 사용되었다.

ELISA

ELISA는 Seferian과 Martinez [20]에 준하여 실시하였다. 즉 96-well plates(Maxisorp, Nunc, Denmark)에 재조합 capsid 단백질을(1 µl/well/90 µl) coating 하고 1% skim milk가 들어있는 PBS로 blocking 한 다음 PBST

(PBS + 0.05% Tween-20, pH 7.4)로 3회 washing 하였다. 치어로부터 혈액을 채취하여 총 20개의 혈청 시료(1차 항체)를 준비하고 이를 1:100으로 희석하여 사용하였다. 2차항체로는 mouse anti-flounder immunoglobulin monoclonal antibody(경상대학교 수의과대학 정태성 교수)를 1:100으로 희석하여 사용하였고 3차항체로는 goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase-conjugated(Pierce, USA)를 1:500으로 희석하여 사용하였다. 각 반응은 모두 90 µl의 항체액을 사용하였고 반응은 모두 37°C에서 1시간동안 반응하였고 PBST로 3회 washing 하였다. Negative control로는 각 단계의 항체를 하나씩 제거한 시료 및 기질용액을 첨가한 well의 값을 이용하여 이들의 평균값을 이용하였다. 3차항체의 존재를 알아보기 위한 발색반응으로는 ABST 기질용액 [0.1 M citric acid buffer, pH 4.0 10 ml; ABTS stock solution(ABTS 100 mg in 4.5 ml DW) 250 µl; H₂O₂ 50 µl]을 사용하였고 반응 15분 후 흡광도 405 nm에서 ELISA reader(Multiskan EX, Thermo LabSystems, USA)를 이용하여 발색정도를 측정하였다. 결과는 평균 ± 표준편차(SD)로 나타내었고 Student's *t*-test를 이용하여 검증하였으며, *p* < 0.01을 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

PCR 반응

각 넘치의 비장 및 간에서 분리된 DNA를 template로 이용하여 RSIV MCP-specific primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과, 모든 시료에서 예상되는 크기의(1362 bp) 반응생성물이 증폭되었고 20개의 시료 중 1번 시료의 결과를 그림 1에 나타내었다. 이 PCR 생성물이 조사대상인 iridovirus의 capsid 유전자인지를 알아보기 위한 sequencing을 위하여 cloning vector에 cloning하였다.

염기서열분석(sequencing)

넘치의 비장으로부터(Fig. 1, Lane 1) PCR에 의해 증폭된 1362 bp의 반응생성물을 pGEM-T easy cloning vector에 cloning하였다. 이후 plasmid DNA를 miniprep 하여construct 내에 원하는 insert가 삽입되었는지를 알아보기 위하여 제한효소 *EcoRI*를 이용하여 insert 삽입 여부를 알아보았다(Fig. 2). 그리고 이 plasmid를 이용하여 sequencing을 실시하였다. 이 결과를 GenBank에 등록된 RSIV의 capsid 유전자 서열과 homology를 비교한 결과, 넘치에서 얻어진 PCR생성물은 RSIV의 MCP cDNA gene과 99.49% 상동성을 보였다(1355 bp/1362 bp). 이로써 입식 전 종묘장내의 치어에 이미 iridovirus가 감염되어 있음을 알 수 있었다.

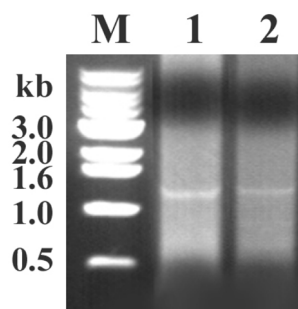


Fig. 1. The major capsid protein (MCP) gene of fish iridovirus was amplified using MCP-specific primers. Genomic DNA from spleen (lane 1) and liver (lane 2) of juvenile olive flounder was used as a template. M: 1 kb size marker.

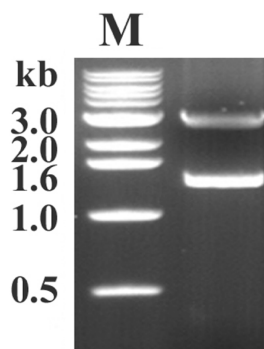


Fig. 2. Iridovirus capsid gene (1.3 kb) was cloned into the pGEM-T easy (3 kb) cloning vector as described in the Materials and methods. Clone containing iridovirus capsid gene was digested with a restriction enzyme (*EcoRI*), generating two (3 kb+1.3 kb) restriction fragments. M: 1 kb size marker.

ELISA

Iridovirus의 capsid protein을 재조합단백질로 발현한 결과, 형질전환 이전의 대장균 시료인 control(Fig. 3, lane 1)에서는 나타나지 않는 50 kDa 크기의 단백질(Fig. 3, Lane 2)이 발현되었으며, 순수분리 결과, 다른 단백질의 오염이 없음을 확인하였다(Fig. 3, Lane 3). 이를 항원으로 사용하여 iridovirus의 감염 여부를 간접적으로 알아본 ELISA 실험 결과, 실험군 전체의 시료들은(Fig. 4, black; 평균 OD = 0.6, SD = 0.11) negative control(Fig. 4, grey; 평균 OD = 0.07, SD = 0.008)에 비해, 통계적으로 높은 수치를 나타내었다(*p* < 0.01). 이로써 종묘장 치어에서의 iridovirus 감염을 재확인 할 수 있었다.

고 찰

Iridovirus는 한국내 여러 지역과 다양한 어종에 전파

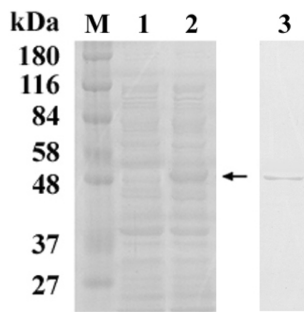


Fig. 3. The SDS-PAGE analysis of the recombinant capsid protein produced by *E. coli*. Lane 1: 10 μ l aliquot of culture lysate of BL21(DE3)pLysS prior to induction, lane 2: 1 h after IPTG induction. After induction, the expression of a recombinant protein (arrowed, corresponds to 50 kDa of recombinant RBIV capsid protein) is markedly increased. Purified recombinant protein without contamination was recovered using a Ni^{2+} -charged resin affinity column after preparing the samples by denaturing condition. M: molecular markers.

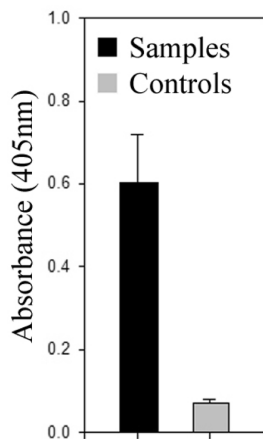


Fig. 4. The results of the ELISA study for a comparison of the fish immunoglobulin titers. The sera (diluted 1 : 100) were used as the primary antibodies from the juvenile flounders (2 months old). A statistically significant increase ($p < 0.01$) was observed in serum samples, indicating the infection of iridovirus in juvenile fish, which were cultured in nursery. Black (left): fish serum samples, grey (right): controls.

되어있다 [2]. Iridovirus 감염증은 특별한 외부증상없이 치사율이 높고 [12, 24], 여러 종류의 어류 및 다양한 연령에서 [5, 13, 17, 18] 발생하기 때문에 한국 내 양식어류산업에 큰 피해를 주고 있다. Iridovirus 감염 발생은 수온과 상당히 관련되었기에 [24] 우리나라에서는 5-8월내에 많이 발생한다.

이 질병에 대한 방역과 백신접종계획을 세우기 위해서는 어류 성장단계 중 어느 시기에 주로 virus에 노출되어 감염되는지 알아야 하기에 본 실험을 실시해 본 결과, 전북 K 지역 종묘장으로부터 유래되는 치어에는 이미 iridovirus가 감염이 되어 있는 것으로 나타났다. 넙치와 돌돔을 주로 양식하는 서남해안 일대에서의 iridovirus의 감염증에 의한 대량 폐사의 원인으로 수온이 높은 서남해안 일대 바닷물의 오염을 들 수 있고, 오염된 바닷물 재순환으로 인한 종묘장 치어들의 감염, 또한 입식 후 바닷물을 통한 이웃 양식장으로의 iridovirus의 전파를 들 수 있겠다. 이러한 iridovirus의 확산에 대해 현재까지 뚜렷한 방역대책이 없는 것이 사실이며, 이러한 이유로 iridovirus 감염에 대한 대책은 거의 전무하다고 할 수 있다. 하지만 종묘장내 넙치치어에서 철저한 바닷물 소독 등으로 iridovirus의 감염을 막고, 감염 여부를 본 실험에서 확립된 방법들을 이용하여 확인하며, 양식장으로의 입식 전에 양식장의 청소와 철저한 소독을 한다면 virus 증식을 막을 수 있을 것으로 예상된다. 또한, 서남해안 일대의 바닷물이 이미 오염되었기에, 입수 전 치어상태에서의 백신접종을 통해서만 백신효과를 기대할 수 있겠다.

본 실험에서는 한정된 지역, 한정된 어종과 수를 가지고 했기 때문에, iridovirus의 전체 방역과 백신에 적용할 수는 없겠지만, 이를 기초자료로 활용하여 iridovirus 감염과 전파를 막을 수 있는 보다 체계적인 대책을 수립하는데 기여하고자 한다.

감사의 글

본 실험을 위해 단클론항체를 제공해 주신 경상대학교 수의과대학 정태성 교수님께 감사의 말씀을 전합니다.

참고문헌

1. 김태중, 이봉주, 이재일. 대장균에서 홍파페렴균 독소 Apx I과 Apx II의 대량발현. 대한수의학회지 2005, **45**, 185-189.
2. Do JW, Cha SJ, Kim JS, An EJ, Park MS, Kim JW, Kim YC, Park MA, Park JW. Sequence variation in the gene encoding the major capsid protein of Korean fish iridoviruses. Arch Virol 2005, **150**, 351-359.
3. Do JW, Moon CH, Kim HJ, Ko MS, Kim SB, Son JH, Kim JS, An EJ, Kim MK, Lee SK, Han MS, Cha SJ, Park MS, Park MA, Kim YC, Kim JW, Park JW. Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus. Virology 2004, **325**, 351-363.

4. **He JG, Deng M, Weng SP, Li Z, Zhou SY, Long QX, Wang XZ, Chan SM.** Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology* 2001, **291**, 126-139.
5. **Hedrick RP, McDowell TS.** Properties of iridoviruses from ornamental fish. *Vet Res* 1995, **26**, 423-427.
6. **Hyatt AD, Gould AR, Zupanovic Z, Cunningham AA, Hengstberger S, Whittington RJ, Kattenbelt J, Coupur BE.** Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Arch Virol* 2000, **145**, 301-331.
7. **Jung SJ, Oh HJ.** Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel), in southern coastal areas of the Korean peninsula. *J Fish Dis* 2000, **23**, 223-226.
8. **Kim TJ, Lee JI.** Cloning and expression of genes encoding transferrin-binding protein A and B from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Protein Expr Purif* 2006, **45**, 235-240.
9. **Kim YJ, Jung SJ, Choi TJ, Kim HR, Rajendran KV, Oh MJ.** PCR amplification and sequence analysis of irido-like virus infecting fish in Korea. *J Fish Dis* 2002, **25**, 121-124.
10. **Matsuoka S, Inouye K, Nakajima K.** Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral disease from 1991 to 1995. *Fish Pathol* 1996, **31**, 233-234.
11. **Miyata M, Matsuno K, Jung SJ, Danayadol Y, Miyazaki T.** Genetic similarity of iridoviruses from Japan and Thailand. *J Fish Dis* 1997, **20**, 127-134.
12. **Nakajima K, Inouye K, Sorimachi M.** Viral diseases in cultured marine fish in Japan. *Fish Pathol* 1998, **33**, 181-188.
13. **Nakajima K, Maeno Y, Yokoyama K, Kaji C, Manabe S.** Antigen analysis of red sea bream iridovirus and comparison with other fish iridoviruses. *Fish Pathol* 1998, **33**, 73-78.
14. **Nakajima K, Sorimachi M.** Biological and physicochemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol* 1994, **29**, 29-33.
15. **Oh MJ, Jung SJ, Kim YJ.** Detection of RSIV (Red Sea Bream Iridovirus) in the cultured marine fish by the polymerase chain reaction. *J Fish Pathol* 1999, **12**, 66-69.
16. **Oshima S, Hata J, Hirasawa N, Ohtaka T, Hirono I, Aoki T, Yamashita S.** Rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using the polymerase chain reaction. *Dis Aquat Organ* 1998, **32**, 87-90.
17. **Oshima S, Hata J, Segawa C, Hirasawa N, Yamashita S.** A method for direct DNA amplification of uncharacterized DNA viruses and for development of a viral polymerase chain reaction assay: application to the red sea bream iridovirus. *Anal Biochem* 1996, **242**, 15-19.
18. **Rodger HD, Kobs M, Macartney A, Frerichs GN.** Systemic iridovirus infection in freshwater angelfish, *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein). *J Fish Dis* 1997, **20**, 69-72.
19. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
20. **Seferian PG, Martinez ML.** Immune stimulating activity of two new chitosan containing adjuvant formulations. *Vaccine* 2000, **19**, 661-668.
21. **Sohn SG, Choi DL, Do JW, Hwang JY, Park JW.** Mass mortalities of cultured striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* by iridoviral infection. *J Fish Pathol* 2000, **13**, 121-127.
22. **Studier FW, Moffatt BA.** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 1986, **189**, 113-130.
23. **Sudthongkong C, Miyata M, Miyazaki T.** Viral DNA sequences of genes encoding the ATPase and the major capsid protein of tropical iridovirus isolates which are pathogenic to fishes in Japan, South China Sea and Southeast Asian countries. *Arch Virol* 2002, **147**, 2089-2109.
24. **Wang CS, Shih HH, Ku CC, Chen SN.** Studies on epizootic iridovirus infection among red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel), cultured in Taiwan. *J Fish Dis* 2003, **26**, 127-133.
25. **Williams T.** The iridoviruses. *Adv Virus Res* 1996, **46**, 345-412.