



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

돌돔과 참돔 면역유전자의 특징과 발현



2010년 8월

부경대학교 대학원

수산생명의학과

진 지 응

이학석사 학위논문

돌돔과 참돔 면역유전자의 특징과 발현

지도교수 정 현 도

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함.

2010년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

진 지 웅

진지웅의 이학석사 학위논문을 인준함

2010년 8월 25일

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함.



주심 이학박사 강주찬 (인)

위원 이학박사 김기홍 (인)

위원 이학박사 정현도 (인)

목 차

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	7
1. 실험어	7
2. 면역유전자의 cloning	7
2-1. Total RNA 분리	7
2-2. RT-PCR	8
2-3. Cloning	9
3. 면역유전자의 complete ORF 결정	10
3-1. Degenerated primer 결정	10
3-2. RACE-PCR	13
4. 면역유전자의 Genomic organization 분석	14
4-1. Total genomic DNA 분리	14
4-2. DNA walking	14
5. 염기서열 비교 분석	15
5-1. Mx gene의 비교	15
5-2. IL-8 gene의 비교	16
5-3 COX-2 gene의 비교	16
6. 면역유전자의 발현 분석	17
6-1. <i>In vivo</i> 상에서의 면역반응	17
6-2. 상대정량	18

III. 결 과	20
1. cDNA cloning과 염기서열 분석	20
1-1. Mx gene의 염기서열 분석	20
1-2. IL-8 gene의 염기서열 분석	28
1-3. COX-2 gene의 염기서열 분석	33
2. Genomic DNA의 cloning과 염기서열 분석	37
2-1. Mx gene의 비교	37
2-2. IL-8 gene의 비교	45
2-3. COX-2 gene의 비교	49
3. 염기서열의 비교분석	54
3-1. Mx gene의 비교	55
3-2. IL-8 gene의 비교	59
3-3. COX-2 gene의 비교	63
4. iridovirus 감염에 따른 면역반응 분석	67
IV. 고 찰	73
V. 요 약	82
VI. 감사의 글	84
VII. 참고문헌	85

Characterization and expression of immune genes in fishes, red sea
bream and rock bream

Ji Woong Jin

Department of Aquatic Life Medicine, The Graduate school,
Pukyong National University

Abstract

The type I interferon (IFN) system is one of the most important mechanisms for antiviral defence. In the type I IFN response, many IFN-related proteins are induced for establishing an antiviral state. As a one of the IFN-related protein, Mx protein have been shown to inhibit virus replication. While interleukin-1 is a important pro-inflammatory cytokines often used as markers of an activated inflammatory response. One of the genes regulated by IL-1 is IL-8, which is a member of the CXC chemokine family. Also increased IL-1 has been attributed to the induction of novel Cyclooxygenase (COX) isoform (COX-2), distinct from the well characterized constitutive activity (COX-1) and playing an important role in immune regulation. COX-2 enzyme is induced by

various inflammatory signals, including cytokines, growth factors, and lipopolysaccharide.

Iridovirus is a major fish pathogen in marine aquaculture of Asian countries including Korea. Despite of many species affected by this pathogenesis, little is known interaction between iridovirus and the fish immune system. Therefore, three important immune genes, Mx, IL-8 and COX-2 genes were cloned and sequenced in red sea bream and rock bream. Using degenerated primers designed from known sequences, a cDNA fragment was amplified by PCR and elongated by 5'- and 3'- RACE-PCR to give the full-length coding sequence. The length of cDNA of rsbMx1, rsbMx2, rsbIL8, rbIL8 and rsbCOX2 genes are 2381bp, 2889bp, 865bp, 888bp and 2528bp respectively and that translates into 628, 637, 100, 99 and 608 amino acids respectively. The rsbMx1 and rsbMx2 genomic sequence were found to span 12 exons separated by 11 introns. The rsbIL8 and rbIL8 genomic sequence were found to span 4 exons separated by 3 introns. The rsbCOX-2 genomic sequence were found to span 10 exons separated by 9 introns. Also we studied if the experimental infection of red sea bream and rock bream with iridovirus could affect the expression of inflammatory cytokines, such as IL-8, COX-2 and IL-1 β and an interferon-induced Mx genes. When injected with poly I:C, the Mx gene peak level of expressed immune genes in red sea bream and rock bream was day 1 post injection and the expression level of rsbMx1, rsbMx2 and rock bream Mx genes was similar about 22fold. While, when injected with iridovirus, the rsbMx1 and rsbMx2 genes reponse was peaking on day 3 and the expression level was about 88-fold and 208-fold respectively. However, rock bream Mx gene was peaking on day 7 and the level was about 33-fold

compared to β -actin. But, inflammatory cytokines, such as IL-8, COX-2 and IL-1 β genes expression was low compared with control.

Cloned and analyzed various immune genes in rock bream and red sea bream will help to understand defence mechanisms in fish after viral infection and will also support the development of the measures for treatment and prevention against viral infection.



I. 서 론

어류는 척추동물로서 대식세포의 탐식작용, 라이소자임 그리고 인터페론과 같은 비특이적인 면역과 항체와 같은 특이적인 면역의 조화에 의해 병원체의 침입을 막는다. 하지만 고등척추동물인 포유동물과는 달리 특이적인 면역 보다는 주로 비특이적인 면역에 더욱 많이 의존한다.

비특이적인 면역 단백질인 인터페론 (interferon, IFN)은 바이러스에 감염 시 분비되며 바이러스 감염을 막는데 중요한 역할을 한다 (C.E. Samuel, 2001). 인터페론은 3가지의 타입으로 나누어져 있으며 유전자 형태, 단백질 형태 그리고 기능에 의해 분류하였다. IFN- α 와 IFN- β 로 구성된 type I 인터페론은 대부분의 세포에서 분비되며 바이러스 감염을 막는 중요한 역할을 하는 반면, IFN- γ 인 type II 인터페론은 natural killer cell과 helper T cell에 의해 분비되며 interleukin-12 (IL-12), IL-18, mitogens 또는 항원에 의해 유도되어 대식세포의 활성을 촉진시킨다. 바이러스 감염에 대한 인터페론의 항바이러스 작용기전은 바이러스에 감염된 세포는 인터페론을 분비하게 되며 인접한 세포는 protein kinase R (PKR)을 생성하여 세포가 단백질을 생성하지 못하게 하거나 RNase L을 생성하여 RNA의 합성을 하지 못하게 함으로써 감염세포가 바이러스를 생산하지 못하도록 한다. 또한 인터페론은 인접세포에 Mx protein을 생성을 유도하여 항바이러스 작용을 한다 (Stephanie Johanna Dewitte-orr, 2006; Børre Robertsen, 2006).

type I 인터페론에 의해 유도되는 Mx protein은 항바이러스 단백질이다. Mx protein은 쥐의 influenza resistant line (A2G)에서 처음으로

발견 되었으며, 이름은 orthomyxovirus influenza A에 저항성이 있다고 해서 지어졌다 (J. Lindenmann, 1962). Mx protein은 high-molecular-weight GTPase 의 dynamin superfamily에 속한다. 최근에는 Mx gene의 sequence 분석을 통해 Mx protein이 3개로 이루어진 GTP-binding domain과 dynamin family signature가 있다는 것을 확인할 수 있었으며, 이것들은 강한 항바이러스 활성을 나타낸다. 또한 카복시 말단에 존재하는 leucine zipper motif는 Mx protein의 oligomerization 역할을 한다. 현재 어류에서 보고된 Mx gene은 European perch (*Perca fluviatilis*)를 처음으로 수년간 많은 연구를 통해서 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Atlantic salmon (*Salmo salar*), bastard halibut (*Paralichthys olivaceus*), gilthead seabream (*Sparus aurata*), channel catfish (*Ictalurus punctatus*), turbot (*Psetta maxima*), barred knifejaw (*Oplegnathus fasciatus*) 등의 많은 어류에서 보고되어 그 특징을 확인할 수 있다 (P Staeheli *et al.*, 1989; Trobridge GD & Leong JA, 1995; Trobridge GD *et al.*, 1997; Robertsen B *et al.*, 1997; Lee JY *et al.*, 2000; Tafalla C *et al.*, 2004; Plant KP & Thune RL, 2004; Abollo E *et al.*, 2005; Zenke K & Kim KH, 2008). 또한 최근 넙치에서 유래된 세포를 이용하여 *in vitro* 상에서 Mx protein은 hirame rhabdovirus (HRRV) 와 viral hemorrhagic septicemia (VHS)의 복제를 억제한다는 연구(Christopher Marlowe A. Caipanga *et al.*, 2003)와 Atlantic salmon에서 Mx isoform 중 Mx1은 infectious salmon anaemia virus (ISAV)와 infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)의 복제를 억제한다는 연구가 발표되었다 (R. Larsen *et al.*, 2004).

앞서 언급한 인터페론 외에도 비특이적 면역에 중요한 역할을 하는 interleukin은 대부분 염증을 유도하는 사이토카인(cytokine)으로 그 중에서 IL-1은 염증의 중요한 매개자로서 일반적으로 염증이 일어나는 동안 특징적으로 발현되는 다양한 유전자들을 지시하고 증가시킨다. 그리고 그것은 미생물의 침입, 염증, 면역학적 반응, 조직 상해 등에 대한 신체반응을 매개하는 중요한 역할을 한다. 또한 생물학적인 효과로는 열의 유도, 혈청에서 corticosteron levels의 증가 cytokine network의 활동을 유도하고 간에서 급성 반응을 유인하며 혈관의 endothelium의 활동을 일으킨다. 또한 다른 염증 cytokine인 IL-8은 IL-1에 의해 유도되는 여러 CXC chemokine 중 하나로서 다양한 세포에 의해 분비되며, 감염과 염증부위에 백혈구를 유도하여 외부침입을 방어하는 중요한 역할을 한다 (Laing & Secombes, 2004). 포유류의 IL-8 gene은 Glu-Leu-Arg로 이루어진 ELR motif를 가지며, 이것은 receptor를 인식하고 신호를 보내는데 꼭 필요하다 (Clark-Lewis *et al.*, 1991). 흥미롭게도 ELR motif는 백혈구를 유인하고 활성화시키는 다른 CXC chemokine의 거의 대부분에 존재하지만, 다른 기능을 하는 chemokine에는 전혀 존재하지 않는다. 어류에서는 haddock IL-8과 Atlantic cod IL-8을 제외한 대부분의 경골어류에서 incomplete ELR motif로 존재한다. 현재 어류에서 보고된 IL-8 gene은 haddock (*Melanogrammus aeglefinus*), Atlantic cod (*Gadus morhua*), black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*), bastard halibut, Japanese sea perch (*Lateolabrax japonicus*), Atlantic salmon, rainbow trout, common carp (*Cyprinus carpio*), Fugu rubripes (*Takifugu rubripes*)등의 많은 어류에서 보고되어 그 특징을 확인할 수 있다 (Corripio-Miyar *et al.*,

2007; Seppola M. *et al.*, 2008; Zhonghua C. *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2001; Fujiki *et al.*, 2003; Abdelkhalek NK *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2005; Laing *et al.*, 2002).

Prostanoids는 Cyclooxygenase (COX)라고 더 잘 알려진 PGHS에 의해 형성되며, arachidonic acid을 prostaglandin H₂로 변환시키는 촉매 작용을 한다 (Herschman, 2003). COX enzyme에는 COX-1, COX-2 그리고 COX-3 3가지가 알려져 있으며, COX-3는 COX-1의 splice variant로 frameshift mutation으로 인해 생겨 COX-1b 또는 COX-1 variant (COX-1v)라고 불리기도 한다 (Chandrasekharan NV *et al.*, 2002). 기본적으로 사람의 경우 COX-1과 COX-2는 amino acid가 서로 약 60-65% 일치하며 enzyme의 활성은 비슷하지만 조직에 따라 COX-1과 COX-2의 발현량은 다르다. COX-1은 위장관, 신장, 혈소판, 혈관내피세포 등 모든 조직에 항상 내재적으로 존재하는 constitutive enzyme이지만, COX-2는 정상세포에서는 존재하지 않다가 대식세포나 다른 염증부위에서 growth factor, cytokines 그리고 endotoxine 등과 같은 inflammation mediator에 의해서 합성이 유도되는 inducible enzyme이다 (B. Francesco *et al.*, 2005). 어류에서는 최근 rainbow trout 와 brook trout (*Salvelinus fontinalis*), Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*), mummichog (*Fundulus heteroclitus*), longhorn sculpin (*Myoxocephalus octodecemspinosus*), zebrafish(*Danio rerio*)등 몇몇 어류에서 COX-1과 COX-2 gene이 밝혀졌고 COX-2의 경우 사람과 같이 염증반응을 매개하는 유전자라고 보고되고 있다 (Ishikawa TO & Herschman HR., 2007; Roberts SB *et al.*, 2000; Havird JC *et al.*, 2008; Choe KP *et al.*, 2006; Havird JC

et al., 2008).

어류에서 비특이적인 방어 기작은 감염에 대한 저항성에 있어서 결정적인 역할을 하는 것으로 보여 진다. 그리고 long-time의 저항성은 CHNV와 VHSV에 감염된 어류에서 특이적인 cytotoxic T cells이 존재하는 것으로 증명되었기 때문에 (Boudinot P *et al.*, 2001; Somamoto T *et al.*, 2002) 항체보다도 세포성 factors에 의해 매개될 수 있을 것이다. 그러나 감염 후 짧게 유도되는 비특이적인 방어 기작이 감염의 결과를 결정한다. 그러므로 어떠한 비특이적인 방어기작이 바이러스의 감염으로 개시되는가를 결정하는 것은 바이러스에 대한 저항성에 있어 중요한 factor들을 이해하는 데에 중요하다고 볼 수 있다.

iridovirus는 전 세계적으로 다양한 양식 해산어 및 담수어에 경제적으로 심각한 손실을 야기 시키고 있으며, 현재 우리나라에서도 iridovirus에 의한 피해는 심각한 실정이다. 여러 어종에서 iridovirus에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있지만 효과적인 치료방법과 예방법이 될 수 있는 백신 개발을 위해서는 virus 뿐만 아니라 virus 감염에 따른 어체의 면역반응 또한 함께 연구되어야 한다. 따라서 본 연구는 인터페론에 의해 유도되는 항바이러스 단백질인 Mx protein 과 pro-inflammatory 단백질인 IL-8과 COX-2 gene의 cDNA와 genomic DNA sequence를 밝혀 GenBank에 등록되어 있는 여러 종의 gene과 비교하여 그 분자적인 특성을 분석하였다. 이들 유전자는 어류가 virus 감염을 이겨내는 데 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 한편 iridovirus는 Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (OIE, 2009)에 의하면 돌돔과 어류가 다른 어류에 비해 iridovirus에 더욱 sensitive 하며, 참돔 또한 sensitive 하다고 말하고 있다. 또한 참돔은 Inouye *et*

al. (1992)에 의해 iridovirus가 처음으로 분리된 어종이며, 민감하다고 알려져 있으며 대부분의 연구결과 참돔이 iridovirus에 의해 많은 폐사가 일어난다고 보고되고 있다 (Wang *et al.*, 2003; NAKAJIMA K *et al.*, 2001). 하지만 현재 우리나라 양식장에서는 iridovirus에 의해 돌돔은 해마다 많은 피해가 일어나고 있지만 (Jung and Oh, 2000), 참돔에서는 폐사가 거의 일어나지 않고 있다. 이러한 사실을 바탕으로 감수성의 차이를 보이는 두 어종 돌돔과 참돔에 iridovirus를 challenge하고 virus defence mechanism에 중요한 역할을 할 것으로 보이는 Mx, IL-8, COX-2, IL-1 β 유전자의 발현량을 비교하여 virus 감염 시 어류의 면역체계에 대한 기본지식을 확보하고자 하였다.



II. 재료 및 방법

1. 실험어

외관상 질병의 증세가 나타나지 않는 건강한 5~6g 되는 양식산 돌돔 (*Oplegnathus fasciatus*)과 5~7g 되는 참돔 (*Pagrus major*)을 거제와 통영의 양식장에서 구입하여 250ℓ 수조에서 1일 1회 사료 투여 및 사육 수 환수를 하며 $25\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 에서 2주간 순치 시킨 뒤 실험에 사용하였다.

2. 면역 유전자의 cloning

2. 1. Total RNA 분리

RNA 분리할 조직을 homogenation 하고 TRIzol 500 μl 를 첨가하여 pipetting한 후 실온에서 5분간 반응시켰다. 그 후 chloroform (Sigma-Aldrich) 100 μl 를 첨가하여 inverting해서 실온에서 10분간 반응 시켰다. 반응이 끝나면 4°C , 12,000g에서 15분간 원심분리하고, 상등액을 새 microtube로 옮겼다. 여기에 상등액과 동량의 isopropanol (Sigma-Aldrich)을 첨가하여 inverting한 후 실온에서 10분간 반응 시켰다. 그 반응 후 4°C , 12,000g 에서 10분간 원심 분리하여 상등액을

제거하고 70% ethanol을 첨가하여 다시 4℃, 7500g에서 5분간 원심 분리하여 상등액을 제거하였다. 그 침전물은 10분간 상온에서 자연 건조시켜 Nuclease-free water (Hyclone)로 현탁 한 뒤 사용 전 까지 -70℃에서 보관 하였다.

2. 2. RT-PCR

PCR tube에 reverse transcriptase 0.5 μ l, buffer 2 μ l, dNTP 2 μ l, Oligo(dT) primer 1 μ l, total RNA 1 μ g을 넣고 total volume이 10 μ l이 되게 Nuclease-free water을 첨가한 후, 42℃에서 60분, 99℃에서 5분간 반응 시켰다. 여기에서 만들어진 cDNA는 PCR 반응에서 template로 사용하였다. PCR amplification은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하였으며, PCR 조건은 95℃에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 95℃ 30초 denaturation, 55℃ 30초 annealing, 72℃ 30초 extension의 반응을 1 cycle로 하여 30 cycles를 반응시켰다. 그 후, 72℃에서 7분간 post-extension 시켰다. 증폭된 산물은 0.5 μ g/ml ethidium bromide (EtBr)가 첨가된 1% agarose gel을 완충액 0.5X TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)에 넣어 전기영동을 실시하여 확인하였다.

2. 3. Cloning

면역 유전자의 cloning은 TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 cloning 하였다. 우선 증폭된 DNA 4 μl 를 새 micro tube에 옮긴 후, salt solution 1 μl , distilled water 4 μl , TOPO^R vector 1 μl 를 첨가하여 상온에서 10분간 반응시켰다. 그 뒤에 competent cell (*E. coli* DH5 α -T1^R OR) 50 μl 를 첨가하여 ice에서 20분간 반응시키고, 42°C에서 30초간 heat-shock 시켰다. 바로 ice에 2~3분간 반응 후 SOC (Tryptone 20 g/L, Yeast extract 24 g/L, NaCl 0.5 g/L, 250 mM KCl 10 mg/L, 10 ml of a sterile solution of 1 M MgCl₂, 20 ml filter sterile 1 M glucose/L) 배지 250 μl 첨가하고, 37°C, 90분간 진탕 배양 시켰다.

배양액을 X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, Sigma, USA) 40 $\mu\text{g/ml}$ 과 Ampicillin 50 $\mu\text{g/ml}$ 가 첨가된 LB (Luria-Bertani, Difco, USA) 평판배지에 도말하여, 37°C에서 24 시간 동안 배양시켰다. 파란색과 흰색의 집락이 증식하는 것을 확인 하였고, 흰색으로 나타나는 집락을 선택하여 Ampicillin 50 $\mu\text{g/ml}$ 가 첨가된 LB broth에 접종 후, 37°C에서 24시간 배양하여, GeneAll[®] Plasmid SV Mini kit (GeneAll Biotechnology, Korea)를 이용하여 plasmid를 분리 하였다.

3. 면역유전자의 complete ORF 결정

3. 1. Degenerated primer의 제작

GenBank에 등록되어 있는 *Siniperca chuatsi* (AY392097), *Lates calcarifer* (AY821518) 그리고 *Sparus aurata* (AF491302)의 Mx gene의 mRNA sequence를 서로 비교하여 conserved 한 region을 찾아 degerated primer (dgpMx F, dgpMx R)를 제작하였고, IL-8은 *Acanthopagrus schlegelii* (DQ000611), *Gadus morhua* (AY614593), *Melanogrammus aeglefinus* (AJ566335), *Lateolabrax japonicus* (DQ855621) 그리고 *Paralichthys olivaceus* (AF216646)의 sequence를 비교하여 degerated primer (dgpIL8 F1,2,dgpIL8 R1,2)을 제작하였고 COX-2 gene는 *Oncorhynchus mykiss* (AJ238307), *Salvelinus fontinalis* (AF158373) 그리고 *Micropogonias undulatus* (AB292357)의 sequence를 비교하여 degerated primer (dgpCOX2 F, dgpCOX2 R)을 제작하여 Polyinosinic-polycytidylic acidsodium salt, γ -irradiated (Poly I:C, Sigma-Aldrich) 500 μ g/fish 또는 *Vibrio anguillarum* (PT493) 약 1.18×10^5 CFU/fishes를 복강 주사하여 24h 동안 자극시킨 돌돔과 참돔의 liver에서 분리한 RNA를 template로 하는 RT-PCR에 사용되었다.

Degenerated primer를 사용하여 RT-PCR을 한 결과 나타난 product를 cloning하고 sequencing하여 알게 된 각 유전자의 partial sequence에서 RACE-PCR을 하는데 필요한 primer를 제작하였고 제작한 primer를 Table 1과 Table 2에 나타내었다.

Table 1. Primers used for red sea bream immune gene cloning

Object	Gene	Name	Sequence (5' to 3') ^a
For partial cDNA cloning	Mx	Mx F	GCTGGAGGCGCTGTCAGG
		Mx R	CTTCAGGAGGTGGATGACCTC
	IL-8	IL8 F1	CTGCRMTGYCGCTGCATYS
		IL8 R1	TCARAGTKGCAATGATCTCRG
	COX-2	COX2 F	GCTGGGARGCCTATTCCAA
		COX2 R	TTGGTGAACGAMTCSACVAG
For full length of gene	Mx	5' RACE rsbMx first	GGACAATTTCAACCACCGTCTCTTCTGTGCC
		5' RACE rsbMx nested	GTCACAATGCCACTTCCTCTTGGCAGAGCC
		3' RACE rsbMx1 first	GCTGCCGCTGTCAAAGGCAACTCAT
		3' RACE rsbMx1 nested	CGGGAGCGGGTCGGGGATCAGTAAT
		3' RACE rsbMx2 first	CCTGTGGGCTCCAGACGCTCAACTCA
		3' RACE rsbMx2 nested	CCGGCATCGCCAGGGTGGCTGTAAA
	IL8	5' RACE rsbIL8 first	GCCTCGGGGTCCAGGCAAACCTCTT
		5' RACE rsbIL8 nested	GCGGCCGATGGGTTTGCTCTCTGTT
		3' RACE rsbIL8 first	AACAGAGAGCAAACCCATCGGCCGC
		3' RACE rsbIL8 nested	AAGAGGTTTGCTGGACCCCGAGGC
	COX-2	3' RACE rsbCOX2 first	CCTGTGGGTCCGGGATGAACTCTCT
		3' RACE rsbCOX2 nested	GGGGGAGGGTGCGCGTATAGTAGGA
		5' RACE rsbCOX2 first	GGGTGTGTGATGTGTTGAAGGAGGTC
		5' RACE rsbCOX2 nested	GCTGCTGTTCAACCAGCGCTTCCAG
For genomic walking	Mx	rsbMx1 UTR F	GTGTCCATTAGTTTAGT
		rsbMx1 UTR R	GCTCCTTTCACCCTGAACAC
		rsbMx2 UTR F	CCTGTGGGCTCCAGACGCT
		rsbMx2 UTR R	ACAACCTCCCCATACGCTGAC
	IL-8	rsbIL8 UTR F	GCAGCTGAACCAAGAAAAGG
		rsbIL8 UTR R	TCAGAGCAACTCCTGAATCC
	COX-2	rsbCOX2 UTR F	CTGAGCTTCAGAGCGACACA
		rsbCOX2 UTR R	CTGCACATTCTGCGACTGAT

^a Degenerated positions R:A/G, S:C/G, Y:C/T M:A/C K;G/T V:A/C/G

Table 2. Primers used for rock bream immune gene cloning

object	Gene	Name	Sequence (5' to 3')
For partial cDNA cloning	IL-8	dgpIL8 F2	GTGCTCCTGGCCCTCCTGA
		dgpIL8 R2	TCAGAGTGGCAATGATCT
For full length of gene	IL-8	5' RACE rbIL8 first	TGGCAATGATCTCAGTCTCCTCGCAGT
		5' RACE rbIL8 nested	GGCAGTGCATCTCCATTCCCAGACTTC
		3' RACE rbIL8 first	TGCATCCAGACAGAGAGCAAACCCATC
		3' RACE rbIL8 nested	TGCGAGGAGACTGAGATCATTGCCACT
For genomic walking	IL-8	rbIL8 UTR F	AACAGCAGAGCAAGAAAGCA
		rbIL8 UTR R	TCCTCTGGTATGGCATGTGA



3. 2. RACE-PCR (rapid amplification of cDNA ends-PCR)

GeneRacerTM Kit (Invitrogen)는 cDNA의 알고 있는 일부 염기서열을 이용하여 cDNA의 full-length 5'-과 3' ends를 밝혀서 돌돔과 참돔의 immune genes의 완전한 cDNA 염기서열을 결정하기 위해 사용되었다. 먼저 total RNA의 5'의 phosphates를 calf intestinal phosphatase (CIP)로 처리해서 제거한 뒤, 5' cap structure를 제거하기 위해 tobacco acid pyrophosphatase (TAP)를 처리해 주었다. T4 RNA ligase로 5' end에 GeneRacerTM RNA Oligo로 ligase 했다. ligated RNA는 GeneRacerTM RNA Oligo dT primer로 역전사 되었다. 5' end는 GeneRacerTM 5' primer와 gene specific first primer로 first PCR을 한 뒤, GeneRacerTM 5' nested primer와 gene specific nested primer로 nested PCR을 하였다. 3' end는 GeneRacerTM 3' primer와 gene specific first primer로 first PCR을 한 뒤, GeneRacerTM 3' nested primer와 gene specific nested primer로 nested PCR을 수행하였다.

Nested PCR은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler를 사용하여, 94℃에서 2분간 pre-denaturation 시킨 후, 94℃ 30초 denaturation, 65℃ 30초 annealing, 68℃ 30초 extension의 반응을 1 cycle로 하여 25 cycles를 반응시켰다. 그리고 68℃에서 10분간 post-extension 시켰다.

RACE-PCR을 통하여 얻은 products는 TOPO-TA Cloning[®] Kit로 cloning하여 얻은 white colony를 ampicillin 50μg/ml이 첨가된 LB broth에 배양한 후 이 배양액에서 plasmid를 분리하여 sequencing 하였다.

4. 면역 유전자의 Genomic organization 분석

4. 1. Total genomic DNA 분리

돌돔과 참돔의 genomic DNA는 각 어류의 조직 약 10 mg을 AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 제조사의 protocol에 따라 최종 50 μ l의 elution buffer를 사용하여 total nucleic acids를 분리하였다. 분리한 DNA는 실험 전까지 -20℃에서 보관하였다.

4. 2. DNA walking

각 어류에서 분리한 genomic DNA를 template로 하고 cDNA의 sequence를 기초로 하여 제작한 primer (Table 1, 2)를 사용하여 PCR을 실시하였다. 이것은 full-length genomic DNA의 염기서열을 결정하고 exon과 intron의 위치를 확인하기 위하여 genomic DNA를 template로 하는 PCR에 사용되었다.

PCR 혼합액은 Microtube에 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% (w/v) gelatin, 0.5% Tween-20, 200 μ M의 각 각의 dNTP, 1 μ M의 각 각의 primer, 1.25 U AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) 및 template DNA로서 추출된 viral nucleic acids를 첨가한 후, distilled water로 PCR 혼합물 최종 volume이 20 μ l가 되게 하였다. PCR amplification은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer)를 사용하였으며,

PCR 조건은 94℃에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 94℃ 30초 denaturation, 55℃ 30초 annealing, 72℃ 30초 extension의 반응을 1 cycle로 하여 30 cycles를 반응시켰다. 그리고 72℃에서 7분간 post-extension 시켰다.

5. 염기서열의 비교 분석

5. 1. Mx gene의 비교

rsbMx1과 rsbMx2의 amino acid와 Genbank에 등록되어 있는 gilthead seabream (*Sparus aurata*, Mx1, AF491302; Mx2, FJ490555; Mx3, FJ652200; Mx4, FJ490556), barred knifejaw (*Oplegnathus fasciatus*, Mx1, EU807985; Mx2, EU807986; Mx3, EU807987), bastard halibut (*Paralichthys olivaceus*, AB110446), turbot (*Psetta maxima*, Mx1, AY635932; Mx2, AY635933), European seabass (*Dicentrarchus labrax*, AM228977), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Mx1, U30253; Mx2, U47945; Mx3, U47946), Atlantic salmon (*Salmo salar*, Mx1, BT043723; Mx2, NM_001123690; Mx3, NM_001123675), zebrafish (*Danio rerio*, NM_182942), channel catfish (*Ictalurus punctatus*, AY095349), human (*Homo sapiens*, BC032602), chicken (*Gallus gallus*, EU348752)의 Mx gene들을 BioEdit program과 GeneDoc software를 통해 비교해보았으며 Mega 4 software를 이용하여 phylogenetic tree로 나타내 보았다.

5. 2. IL-8 gene의 비교

rsbIL-8과 rbIL-8의 amino acid를 Genbank에 등록되어 있는 black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*, DQ00061), sea purch (*Lateolabrax japonicus*, DQ855621), Fugu rubripes (*Takifugu rubripes*, NM_001032587), bastard halibut (*Paralichthys olivaceus*, AF216646), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, AJ279069), Atlantic salmon (*Salmo salar*, NM_001140710), haddock (*Melanogrammus aeglefinus*, AJ566335), Atlantic cod (*Gadus morhua*, AY614593), common carp (*Cyprinus carpio*, AB470924), chicken (*Gallus gallus*, NM_205018), human (*Homo sapiens*, NM_000584)의 IL-8 gene과 BioEdit program과 GeneDoc software를 통해 비교해보았으며 Mega 4 software를 이용하여 phylogenetic tree로 나타내 보았다.

5. 2. COX-2 gene의 비교

rsbCOX-2 gene의 amino acid를 Genbank에 등록되어 있는 Atlantic croaker COX-2 (*Micropogonias undulatus*, AB292358) rock bream COX-2 (*Oplegnathus fasciatus*, FJ952157), longhorn sculpin COX-2b (*Myoxocephalus octodecemspinosus*, EU703783), mummichog COX-2 (*Fundulus heteroclitus*, AY532639), rainbow trout COX-2 (*Oncorhynchus mykiss*, NM_001124348), zebrafish COX-2a (*Danio rerio*, NM_153657), human COX-2 (*Homo sapiens*,

NM_000963), chicken COX-2 (*Gallus gallus*, NM_001167719), Atlantic hagfish COX-2 (*Myxine glutinosa*, EU703785), spiny dogfish (*Squalus acanthias*, AF420317), human COX-2 (NM_000962), longhorn sculpin COX-1a (EU703784), rainbow trout COX-1 (NM_001124361), Atlantic salmon COX-1 (BT045745), zebrafish COX-1 (NM_153656), mummichog COX-1b (EU703781), Atlantic croaker COX-1 (AB292358), longhorn sculpin COX-1b (EU703789).의 COX gene과 BioEdit program과 GeneDoc software를 통해 비교해보았으며 Mega 4 software를 이용하여 phylogenetic tree로 나타내 보았다.

6. 면역유전자의 발현분석

6. 1. *In vivo*상에서의 면역반응

순치된 돌돔과 참돔에 poly I:C 500 μ g/fish, sachun type iridovirus를 약 10^5 copies/fish를 복강에 주사하여 1일 3일 7일 후에 각각 3마리씩 해부하여 liver를 분리하고, control로서 MEM을 주사한 돌돔과 참돔도 3마리씩 liver도 함께 분리하였다. 조직을 homogenation한 후 total RNA를 분리하고, 1 μ g으로 맞춘 후 Oligo dT로 RT-PCR을 시행하여 cDNA를 얻어 Mx gene, IL-8, COX-2 gene, IL-1 β 의 발현을 서로 비교하였다.

6. 2. 상대정량

면역유전자를 상대정량적 분석을 위해 Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research, AUS)을 사용하였다. 0.2 ml microtube에 SensiMixPlus SYBR (Quantace, USA) 10 μ l, 1 μ M의 각각의 primer, template DNA로서 각 날짜별 cDNA를 첨가한 후, distilled water로 PCR 혼합물 최종 volume이 20 μ l가 되게 하였다. Real-time PCR의 조건은 95℃에서 10분간 반응한 후, 95℃ 10초, 55℃ 15초, 72℃ 20초의 반응을 1 cycle로 하여 40 cycles를 반응시켰다. 마지막 cycle 후에는 모든 반응물에 대하여 72℃부터 95℃까지의 영역에서 melting curve 분석을 실시하였다. immune gene의 발현량은 β -actin과 target gene의 비교에 따른 상대적 정량으로 비교하였다. immune gene의 계산법은 다음과 같다.

$$\Delta Ct = \text{target gene Ct} - \beta\text{-actin Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{iridovirus}} - \Delta Ct_{\text{control}}$$

$$\text{Gene expression} = E^{-\Delta\Delta Ct}$$

여기에서 Ct는 threshold cycle을 의미하며, E는 PCR의 efficacy이며 1.98 이하의 efficacy를 나타낸 sample은 사용하지 않았다. 사용한 primer는 Table 3. 에 나타내었다.

또한 β -actin의 비교 gene으로 다른 reference gene인 GAPDH를 사용하였다.

Table 3. Primers used in the study

Name	Sequence (5' to 3')	Size(bp)	Object
rsbB-actin F	GTGCCCATCTACGAGGGTTA	156bp	expression of
rsbB-actin R	CTCCTTAATGTCACGCACGA		
rbB-actin F	CAGGGAGAAGATGACCCAGA	154bp	β -actin
rbB-actin R	CATAGATGGGCACTGTGTGG		
rsbGAPDH F	GGTAAGCTGACAGGCATGG	154bp	expression of
rsbGAPDH R	TGTAACCCAGCACTCCCTTC		
rbGAPDH F	GTGTGTTCAACCACATCGAG	155bp	GAPDH
rbGAPDH R	AGGAAGCGTTGCTGACAACT		
rsbMx1 F	CGCTGTCAAAGGCAACTCAT	157bp	expression of
rsbMx1 R	CCAGAGAGCGGAGAGAGTCA		
rsbMx2 F	GCTCCAGACGCTCAACTCAT	141bp	Mx
rsbMx2 R	GGACGAACCCTCTCCTCATA		
rbMx F	GATCGCCTCTCCTGATGTTT	152bp	
rbMx R	ACCACCAAGCTGATGGTTTC		
rsbIL8 F	GAAGGTGGAGCTGATTCTCTG	155bp	expression of
rsbIL8 R	CTCAGCGTCTTCTGCTGTTG		
rbIL8 F	CCCTCCTGACCATCAGTGAA	152bp	IL-8
rbIL8 R	TGATCTCAGTCTCCTCGCAGT		
rsbCOX2 F	TTCTTCGCACAGCATTTAC	159bp	expression of
rsbCOX2 R	AAGCTTGCCATCCTTGAAGA		
rbCOX2 F	ACCTTGTGGAGTCGTTACAC	154bp	COX-2
rbCOX2 R	CATGGAGAATCGCTTCCTGT		
rsbIL1b F	GCGAGCAGAGGCACTTAGTC	142bp	expression of
rsbIL1b R	ACAGTTACGGCCTCAGCACT		
rbIL1b F	ATCTGGAGACGGTGGACAAC	142bp	IL-1 β
rbIL1b R	GCTGATGTACCAGTCGCTGA		

II. 결 과

1. cDNA cloning과 염기서열 분석

1. 1. Mx gene의 염기서열 분석

poly I:C로 24h 동안 자극한 참돔의 liver에서 total RNA를 분리하여 oligo dT로 RT-PCR을 한 뒤 sequence가 알려진 어류의 conserved region에서 제작한 degenerated primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 559 bp의 product를 얻을 수 있었다. 이 product를 TOPO-TA vector에 cloning 한 후 염기서열을 결정하였고 BLAST를 통해 확인해 본 결과 Mx gene임이 확인 되었다. Mx gene의 partial sequence를 이용하여 Mx gene의 full sequence를 결정하기 위해 RACE-PCR을 실시하였다. 5' RACE 결과 전기영동 상에서는 하나의 band로 보였으나 sequencing 결과 304 bp와 322 bp의 두개의 결과를 얻을 수 있었고 각각 rsbMx1, rsbMx2라고 명명하였다. 이러한 결과는 5' RACE-PCR에 사용한 primer가 두 유전자 모두에 conserved 하여 5' RACE-PCR 결과 rsbMx1과 rsbMx2 모두 detection 할 수 있었다. 5' RACE 결과를 기준으로 다시 3' RACE primer를 제작하여 3' RACE를 실시한 결과 각각 1925 bp와 2335 bp의 product를 얻을 수 있었으며 각각을 TOPO-TA vector에 cloning 한 후 염기서열을 결정하였다. 그 결과

2381 bp의 rsbMx1 gene과 2806 bp의 rsbMx2 gene의 full sequence를 얻을 수 있었으며 Mx gene에서 특이적으로 나타나는 motif인 dynamin family motif, GTP-binding domain 그리고 leucine zipper domain 이 존재하였다. 이러한 과정을 Fig. 1-2.에 도식화 하였으며, 그 결과 확인 된 Mx1 gene과 Mx2 gene의 full sequence는 Fig 3-4.에 나타내었다.



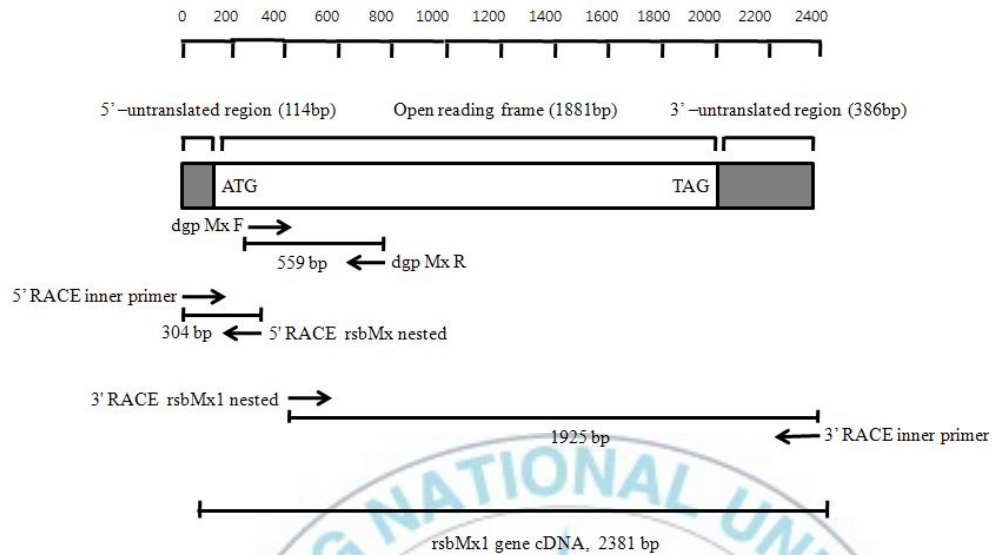


Fig. 1. A schematic illustration of the rsbMx1 cDNA cloning in res sea bream with position of the primers used in PCR and RACE-PCR (gray region : UTR)

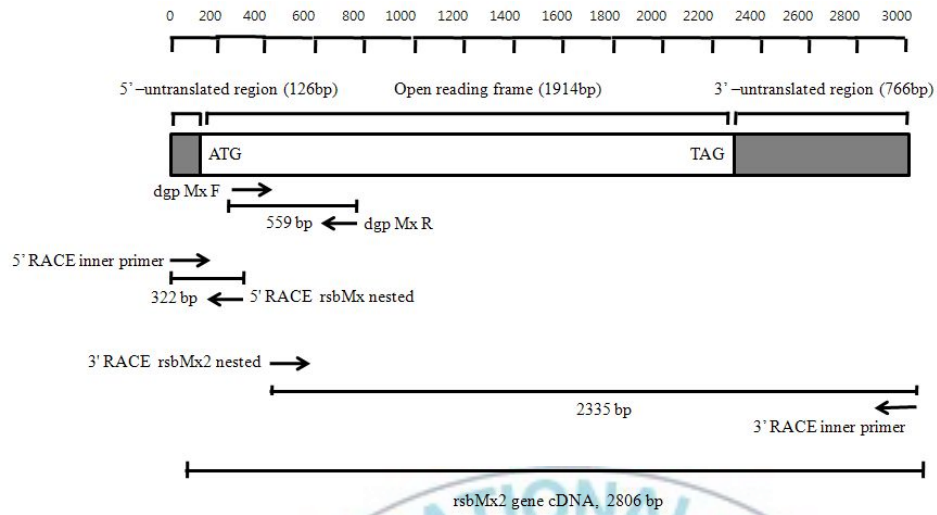


Fig. 2. A schematic illustration of the rsbMx2 cDNA cloning in res sea bream with position of the primers used in PCR and RACE-PCR (gray region : UTR)

AAAGTGTCCATTAGTTTAGTTTAGTGGGAAGCTGCTGCTGCTGAAGGCAAACTCATATCCAGCTGATTAGTTAGTCTCTCTACAC 80
ACAATTTCTTCACAGCAGACAAGAAGTGAGCAGCATGAACACTCTGAACCAGCAGTATGAGGAGAGGGTTCTGCTCCCTGCA 160
M N T L N Q Q Y E E R V R P C
TTGACCTCATTGACTCTCTCCGCTCTCTGGGGTAGAGAAGGACTTGGCCTGCCTGCTATCGCCGTGATCGGAGACCAA 240
I D L I D S L R S L G V E K D L A L P A I A V I G D Q
AGCTCGGGGAAGAGCTCTGTGCTGGAGGCGCTGTGAGGGTGGCTCTGCCGAGAGGAAGCGGCATTGTGACAAGATGTCC 320
S S G K S S V L E A L S G V A L P R G S G I V T R C P
TCTGGAAGTGAAGTGAAGAGAAAGAAGGAAGGAGAGAAATGGTACGGGAAGATAAGCTACAAGACTACGAGGAAGAGC 400
L E L K M K R K K E G E K W Y G K I S Y K D Y E E E
TAGAAGACCGTGCAGATGTGGAGGACAGCATTAGAGAAGCTCAGGATGACATAGCCGGGAGCGGGTCGGGGATCAGTAAT 480
L E D P A D V E D S I R E A Q D D I A G S G S G I S N
GAACTCATCAGTCTGGAGATCGCCTCTCTGATGTTCCAGACCTGACGCTCATTGACCTGCCCGGCATCGCCAGGGTGGC 560
E L I S L E I A S P D V P D L T L I D L P G I A R V A
TGTAAGGGGACAACAGAGGACATCGGAGACCAGATAAAGAGACTGATCCAGACGTTTCATCAAAAAACAAGAACTATCA 640
V K G Q P E D I G D Q I K R L I Q T F I K K Q E T I
GTTTGGTGGTGGTACCAAGCAACGTGGACATAGCAACCACAGAGGCTCTGAAGATGGCTCAGGAAGTGGATCCTGATGGA 720
S L V V V P S N V D I A T T E A L K M A Q E V D P D G
GGGAGGACTTTGGGTATCTTGACCAAGCCTGATCTCGTGGACAAGGCACAGAACAGAGCAGCGTTGACATCGTCCACAA 800
G R T L G I L T K P D L V D K G T E Q T T V D I V H N
TGAGGTATCCACCTGAAGAAGGGTACATGATCGTCAAGTGCAGGGGTGAGAAGGAGATCACAGAGAATGTGTCTCTTA 880
E V I H L K K G Y M I V K C R G Q K E I T E N V S L
CTGAGGCAACAAGAAGAGAGAAAGCCTTCTTCAAAGATCATGTGCATTTCCACATCTCTTTATGACGAAGGCCACGCCACT 960
T E A T R R E K A F F K D H V H F H I L Y D E G H A T
GTTCTAAATTAGCTGAAAACTCACACTTGAGCTGGTGCATCATATCCAGATGTCTCTGCCTCAACTGGAAGATCAGAT 1040
V P K L A E K L T L E L V H H I Q M S L P Q L E D Q I
TGAGAAAGAACTAGTACAGACTCGTGCAGAGCTGGAGAGATTAGGCGACGGACTTCCACCTGATGCAGCCGAGAGACTCG 1120
E K K L V Q T R A E L E R L G D G L P P D A A E R L
TCTTTCTCATTGATAGAGTGACAGCATTTACACAGGAGGCCATCAACCTCGCTACAGGGGAGGAAGTCAAAAGCCTCAAA 1200
V F L I D R V T A F T Q E A I N L A T G E E L K S L K
ATCTTTTCCGTACTAAGGCGAGTGTTTGACAGTGTGAAAGGGACCATAGATCAGTATGGGGTAAAAATCAACTGGAATAT 1280
I F S V L R R V F A V W K G T I D Q Y G V K F N W N I
TGAGAAACAGGTGGCTGAGTATGAGCGGAAGTACCGTGAAGAGAACTGCCGGGGTTCGTCAACTACAAGACCTTTGAGG 1360
E K Q V A E R K Y R G R E L P G F V N Y K T F E
GCATGGTCAAGGAGCAGATCAACAGCTGGAAGAGCCTGCTGTCTCTGAACTCAAGGAAGTATCAGAAATGTGAAGGAA 1440
G M V K E Q I K Q L E E P A V L K L K E V S E I V K E
GAGCTGTTTAAAGGTGGCAGAGCAGCTTTGTTGGATTCCCTCATCTCATCAGAATAGCTAAGATGAAGATTGAAGCCAT 1520
E L F K V A Q S S F V G F P H L I R I A K M K I E A I
CAGAAGGGAATGAGAGTACAGCAGAGTCCATGCTGACTCAGTTTAAAGTGGAGTCGATCGTTTACACTCAGGACA 1600
R K E N E S T A E S M L M T Q F K M E S I V Y T Q D

Fig. 3. Continued.

GCGCATACAGCAAGAAGTTAGGGAAGCGGAAGAGAGAACCTGAACCAAGTTAACAAATACAATAATGACAGTGTGGCCACC 1680
 S A Y S K K L G K R K R E P E P V N K Y N N D S V A T
 CTGATAGAGATGACCAACACCTTAAATCCTACTACCAATTGCTGGCAGGCGTCTGGCTGACCAGATCCCCCTGATGGT 1760
 L I E M T K H L K S Y Y Q I A G R R L A D Q I P L M V
 CCTCTACCAGATGGTGCAGGAGTTTACCATCCAGCTGCAGAGGGAGATGCTGCAGGTGATTGAGGACAAGGAGAAAATCG 1840
 L Y Q M V Q E F T I Q L Q R E M L Q V I Q D K E K I
 AGTCCCTGCTCGAAGAGGAGTCTGGCATCACAGTCAAGAGAATCAACCTTCAGAATCGCCAAGAGCGCCTGAGAAAAGGCA 1920
 E S L L E E E S G I T V K R I N Q N R Q E R R K A
 CGCGTGCTGTTGACGGACTTCAGTATGAACATATACAGCTTCAGCAAAACAACTGCAGTGTGAACAAGATTGTATTA 2000
 R V L T D F S M N Y S F S K T K Q C E Q D Y *
 GAAGAAGTGGATGACATATTATTATTATTAGGCTTTTGTTCGTTTTCTCATGTTTCATTAATGATTCCAAACTTGTA 2080
 TTTCTTATGCCAGTTTTCCATTCAATGGTCTTATTTCTGAATGACAAGCAACATACACTGTAGGGTATGTAAGGTCC 2160
 ACAAATATAGCAATCCTAAATACTGGCAATATATTCTTTGTAGTGTGTTGAGGTGAAAGGAGCCAGTTTGCTAAT 2240
 AAGCACATATAAGGTATACAGGTTGGTTGGTTAGTTCAGTGTTAATGACGTCAGCTGTTGGATAGGATGTGTGTTACGTA 2320
 TTGTGATGTCTGTAATACTATCTACTGAAATAAAATGAAAACATAAAAAAAAAAAAAA 2381

Fig. 3. Nucleotide sequence and translated amino acid sequence of red sea bream Mx1 gene. rsbMx1 gene showed the signature of the dynamin family (gray-boxed), the tripartite GTP-binding domain (boxed) and leucine zipper domain (shadowed). The start codon, stop codon and polyadenylation signal (AATAAA) are underlined.

AAACACTTCAGCATCTGCTCCTGTGGGCTCCAGACGCTCACCTCATCCAGTCCATACAACCTCATATCCAGTGTTTTAG 80
 TCCTTCTTAAACACAATTTCTTCACAGCAGACAAGAAGTGAGCAGCATGAACAGTCTGAACCAGCAGTATGAGGAGAGGG 160
 M N S L N Q Q Y E E R
 TTCGTCCTGCAATTGACCTCATTGACTCTCTCCGCTCTCTGGGGTAGAGAAGGACTTGGCGCTGCCTGCTATCGCCGTG 240
 V R P C I D L I D S L R S L G V E K D L A L P A I A V
 ATCGGAGACAAAGCTCGGGGAAGAGCTCTGTGCTGGAGCGCTGTGAGGGTGGCTTGCAGAGAGGAAGCGGCATTGT 320
 I G D Q S S G K S S V L E A L S G V A L P R G S G I V
 TACAAGATGTCCTCTCGAACTGAAGATGAAGAGAAAGAAGGAGAGGAGTGGTATGGAAGATAAGCTACCAGGACC 400
 T R C P L E L K M K R K K E G E E W Y G K I S Y Q D
 ACGAGGAAGAGCTGGATGACCTCGCATGTGGAGAAAAAGATTGAGAAGCTCAGGATGAATGGCCGGGGTCGGGGTG 480
 H E E E L D D P A D V E K K I R E A Q D E M A G V G V
 GGGATCAGTGATGACCTCATCAGTCTGGAGATCGCCTCTCCTGATGTTCCAGACCTGACGCTCATTGACCTGCCCGCAT 560
 G I S D D L I S L E I A S P D V P D L T L I D L P G I
 CGCCAGGGTGGCTGTAAAGGACAACCAGAGAACATCGGAGACCAGATCAAGAGACTGATCCAGAAGTTATCACAAGAC 640
 A R V A V K G Q P E N I G D Q I K R L I Q K F I T R
 AAGAACTATCAGCTTGGTAGTTGTTCCAAGCAACGTGGACATAGCAACCACAGAGGCTCTGAAGATGGCTCAGGAAGTG 720
 Q E T I S L V V V P S N V D I A T T E A L K M A Q E V
 GATCCTGATGGAGAGAGGACTTTGGGTATCTTGACCAAGCCTGATCTGGTGGACAAAGGCACAGAGGAGATGGTGGTTGA 800
 D P D G E R T L G I L T K P D L V D K G T E E M V V D
 CATCGTCCACAATGAGGTATCCACCTGAAGAAGGCTACATGATCGTCAAGTGCAGGGGTGAGAAGGAGATCACAGAGA 880
 I V H N E V I H L K K G Y M I V K C R G Q K E I T E
 AGGTGTCTCTTACTGAAGCAACAGAAAGAGAGAAAGCCTTCTTGAAGGTGATGTGATTTTACACTCTCTACAATGAC 960
 K V S L T E A T E R E K A F F E G H V H F H T L Y N D
 GGCCACGCCACTGTTCTAACTGGCTGAGAACTCACACTTGAGCTGGTGCATCATTGAGAAATCCCTGCCTCGACT 1040
 G H A T V P K L A E K L T L E L V H H I E K S L P R L
 GGAAGAGCAGATAGAGGAGAACTAGCACAGACTCGTGCAGAGCTCGATAGATACGGCAATGGACCTCCACCTGATTGAG 1120
 E E Q I E E K L A Q T R A E L D R Y G N G P P P D S
 CTGAGAGAGTCGTCTTCTTATTGACAAAGTGACAGCTTTCACTCAGGATGCCATCAGTCTGACCACAGGAGAAGAGCTC 1200
 A E R V V F F I D K V T A F T Q D A I S L T T G E E L
 AAGTGTGGAGACAGACTTAACATCTTTTCTACACTCAGAAGCGAGTTTCAAGAGTGGATTGTCCATCTGGACCGCTCGGG 1280
 K C G D R L N I F S T L R S E F R K W I V H L D R S G
 ACATAACTTTAACGAGAGGATTGAGAAAGAGGTGGAGGAGTATGAAGAGAGGTACCGTGGAAGAGAACTGCCAGGCTTCA 1360
 H N F N E R I E K E V E E Y E E R Y R G R E L P G F
 TCAACTACAAGACCTTTGAGTTTATGGTCAAGGAGCAGATCAAACAGCTGGAAGAACCAGCTGTCAAGAGACTCAAAGAC 1440
 I N Y K T F E F M V K E Q I K Q L E E P A V K R L K D
 ATAGGAGATGCTGTTAGGAAGGTGTTATACAGCTGGCCAGAGTAGCTTTGCTGGACTTCTAACCTTGTAACAAACAGC 1520
 I G D A V R K V F I Q L A Q S S F A G L P N L V K T A
 CAAGGCAAGATCGAAGCCATAAAGCAAGAAAAGGAGTCTACTGCTGAATCTATGCTGAGAACCAGTTCAAGATGGAGC 1600
 K A K I E A I K Q E K E S T A E S M L R T Q F K M E

Fig. 4. Continued.

TGCTTGTTTACTCTCAGGACAGGACCTACAGCAGCAGTTTGAGTGACTGCAAGAGAGAGGAGGACGAGGAGGAGGAG 1680
 L L V Y S Q D R T Y S S S L S D C K R E E E D E E E E
 AAGAAAGACAAACGGCATGGCCACCCAAACCTTAAATGCCGGCAGTGTCAATTAGTCAGTGGACTGTTGTGCACCGCAG 1760
 K K D K R H G H P N L K M P A L S I S Q W T V V H R R
 GGATAATCATGCAACACTGAAGGAGTTGATGCTGCACCTTAATCGTATTACAAAATTGCCAGCCAGCGTCTGGCTGATC 1840
 D N H A T L K E L M L H L K S Y Y K I A S Q R L A D
 AGATACCGCTGGTGATCCGCTACCAGATGTTGCAGGAGTCTGCTGTCCAGCTGCAGAGGGAGATGCTGCAGGTGCTTCAG 1920
 Q I P L V I R Y Q M L Q E S A V Q L Q R E M L Q V L Q
 GACGAGGAGAATTACAGAGTCTTGCTGAAGGAGGATTTTACATCGGCAGCAAGAGGGCTGCTTTGCAAAGTCGCCTCAA 2000
 D E E N S E V L K E D F D G S K R A A Q S R L K
 ACGCCTCACGAAGGCCCGTGCCTACCTGGCGGAGTTCTAGAGGGGTCAAGGCCGACAGAATGAGATTACTGGACCTCT 2080
 R T K A R A Y A E F *
 TTCATAGGTCAAATAGCACAGAACAGCAGTGGTTGTAGGATTATTATACTGTTGTTTGTACTATGTCCTGGTCAGCGTAT 2160
 GGGGAGTTGTTTAAACGTAATATGCACTGTCTGCTATTTACACATCACAAAATCATTATAGGAGGAGATTATA 2240
 GGAACATACTGTGAAGTCTCATACCAAGTTTCTGAGATATCAATAGTTTACTTCCAGTGAATATTACCATTTTTTAAAT 2320
 CACTTTAAAGGCATTAAGGTTTTTAAAGGTGCACGAGACAGTTTGGGGGAGAACTTTAATCAGAAAAGAAAGATCTTC 2400
 ATTGACTGACAAAACAAAATAACAATCTTTTTATGACTGAATAAACATACTGTCTTAAAGGACACACAATTTCTGTC 2480
 CTGTTTCACTTTGTTTATATTGGCGGACCTGCCACCTTTCTAGCTTCAACAGTGTTCGGGACCTTATTTTCCTCTG 2560
 AGAACACTTTGTTTATTCAGTTAGGGGAAAAAATAATTTTCAGAGTTTGCATTCTTACCTCACCAATATTTTAAATGTG 2640
 AAAATTCTGAGTCTTAATATCTTACCAAACTACATTGTGCACTTTAAAGTGACGCTTAATGTATTTTCAGACTTAAAAAT 2720
 GATCCATGTGCATATTTTTATATTGTTCAAATATAAATGTTTGAATAAAGAAGATATTTTGCTTGAAAAAAAAAAAAA 2800
 AAAAAA 2806

Fig. 4. Nucleotide sequence and translated amino acid sequence of red sea
 bream Mx2 gene. rsbMx2 gene showed the signature of the dynamin family
 (gray-boxed), the tripartite GTP-binding domain (boxed) and leucine zipper
 domain (shadowed). The start codon, stop codon and polyadenylation signal
 (AATAAA) are underlined.

1. 2. IL-8 gene의 염기서열 분석

IL-8 gene은 inflammation mediate gene이기 때문에 효과적으로 염증반응을 일으킬 것으로 생각되는 어류 병원세균인 *Vibrio anguillarum* 을 약 1.18×10^5 CFU/fish 의 농도로 참돔과 돌돔에 복강 주사하여 24 동안 자극하였다. 주사한 참돔과 돌돔의 liver에서 total RNA를 분리하여 Mx gene과 유사한 방법으로 degenerated primer를 사용하여 참돔과 돌돔에서 각각 168 bp와 175 bp의 sequence를 알 수 있었고 각각을 sequencing 하였다. 또한 BLAST를 통해 확인 한 결과 두 유전자 모두 IL-8 gene임을 확인 할 수 있었다. partial sequence를 이용하여 IL-8의 full sequence를 결정하기 위해 RACE-PCR을 실시하였다. 5' RACE 결과 참돔과 돌돔에서 각각 329 bp와 321 bp의 sequence를 알 수 있었다. 3' RACE에서는 참돔과 돌돔에서 각각 449 bp와 493 bp의 sequence를 알 수 있었다. 그 결과 860 bp의 참돔 IL-8 gene과 888 bp의 돌돔 IL-8 gene의 full sequence를 얻을 수 있었으며, 이것들은 CXC chemokine인 IL-8에서 특이적으로 나타나는 ELR-CXC motif가 발견할 수 있었다. 따라서 두 유전자를 각각 rsbIL-8과 rbIL-8이라 명명하였다. 이러한 과정을 Fig. 5-6.에 도식화 하였으며, 그 결과 확인 된 rsbIL-8 과 rbIL-8 gene의 full sequence는 Fig 7-8.에 나타내었다.

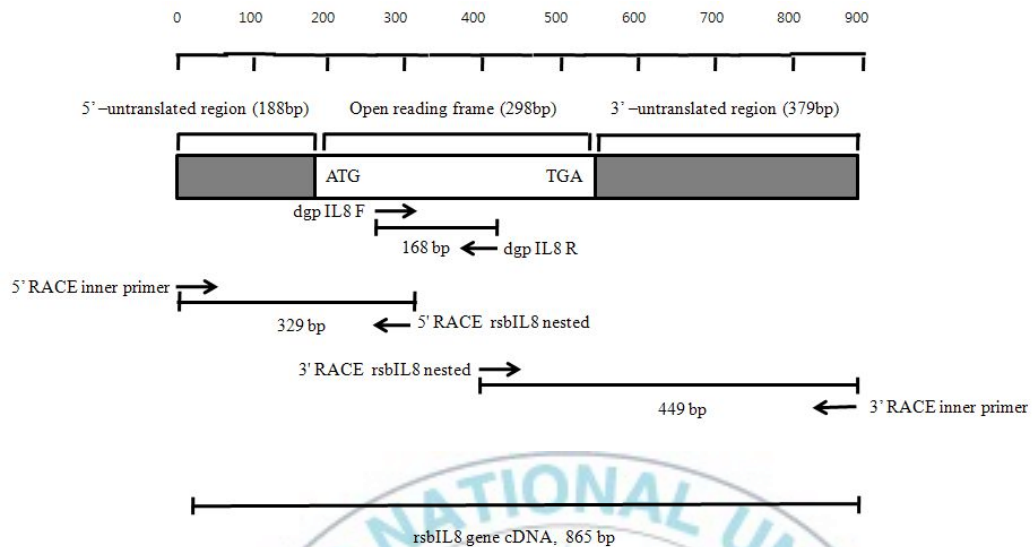


Fig. 5. A schematic illustration of the rsbIL-8 cDNA cloning in res sea bream with position of the primers used in PCR and RACE-PCR (gray region : UTR)

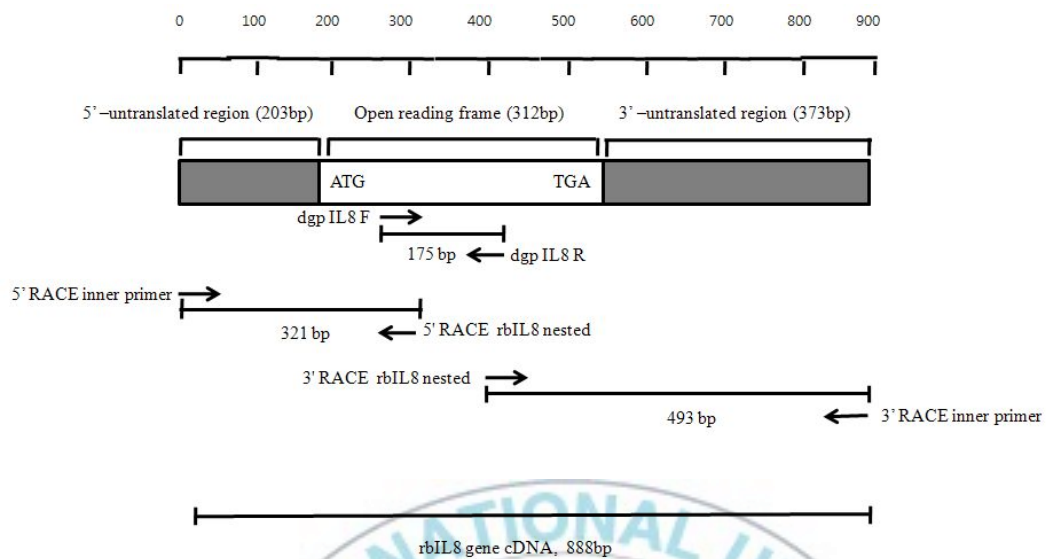


Fig. 6. A schematic illustration of the rbIL-8 cDNA cloning in rock bream with position of the primers used in PCR and RACE-PCR (gray region : UTR)

```

GAAATATTCAAACAGCAGAGCGAGAAGGCAGCTGAACCAAGAAAAGGAAAAGCTGAGGAGAGAGGAACTAAGCAAAAG 80
AAAAAGCTGAACGAGAAACATCTTCTTTGCTTTACTTCATCAGACAACCTTTCTGAAAGACGCTCTTATTCTTTAGTGTT 160
AATTGTTGAGAGTTTGTAAAAGGCACAATGATGAGCAGCAGAGTCTTCGTTATCTCTATTGTGGGGCTCCTGGCCTTCC 240
      M M S S R V F V I S I V G L L A F

TCGCCATCAGTGAAGCGATGAGTCTGAGAAGCCTGGGAGTGGAGCTGCACTGCCGCTGCATCCAAACAGAGAGCAAACT 320
L A I S E A M S L R S L G V E L H C R C I Q T E S K P

ATCGGCCGCCACATTGAGAAGGTGGAGCTGATTCCTGCTAACTCCCACTGCGAGGAGACTGAGATCATTGCCACTCTGAA 400
I G R H I E K V E L I P A N S H C E E T E I I A T L K

GAGGACAGGCCAAGAGGTTTGCCTGGACCCCGAGGCTCCCTGGGTGAAGAAAGTGATTGAGAAGATCATGTCCAACAGCA 480
R T G Q E V C L D P E A P W V K K V I Q K I M S N S

GAAGACGCTGAGCAGACTGGATGAGATGTGCTTCATGAGACTGAGCCATTTACTGGATCGACCAAGAAAACCAAGACC 560
R R R *

AAAAAGTATTGATGAGCTGATTTGATATGGCTCATTTTTTAATGTCCAATCATCTGTTGAAAATGACAACAGATTCTAC 620
CCGCTCAGAGTATGTTTGTATCAAAACATGTTATTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATT 700
TTATGTGTGTTACTGTTCTATAACTTATATCTTAAAAATATTTATTGGTGATTATGAAACATAAATGTATCTGGAATC 800
TGGATTGAGGAGTTGCTCTGACAATCTATTGATTAATAAAGAAGTACACATGAAAAAAAAAAAA 865

```

Fig. 7. Nucleotide sequence and translated amino acid sequence of red sea bream IL-8 gene. rsbIL8 protein showed the signature of the incomplete ELR-CXC motif (gray-boxed). The start codon, stop codon and polyadenylation signal (AATAAA) are underlined.

```

GAGATTCAAACAGCAGAGCAAGAAAGCAGCTGAACCAAGAAAAGGAAAAGTAGCGGAGAGAGGAACTGAGTGAAAGAAG 80
AGAGAAGAAAAAAGACCATCTTTTACCTTCACACAACGCTTCAGGCTTCATCAGGCAGCTTTCTGAAGGACATTC 160
CTATCCTTTAGTGTAAGTGTTCAGAAATTTCTGAAAGACAAAATGATGAGCAGCAAGTTATCGTCATCTCTGTCGTGG 240
      M M S S K V I V I S V V

TGCTCCTGGCCTTCCTGGCCATCAGTGAAGGGATGAGTCTGAGAAGTCTGGGAATGGAGATGCACTGCCGCTGCATCCAG 320
V L L A F L A I S E G M S L R S L G M E M H C R C I Q

ACAGAGAGCAAACCCATCGGCCGCCACATCGGGAAGGTGGAGCTAATTCCTGCCAACTCCCACTGCCGAGGAGACTGAGAT 400
T E S K P I G R H I G K V E L I P A N S H C E E T E I

CATTGCCACTCTGAAAAAGACAGGCCAAGAGGTTTGCTGGACCCCGAGGCTCCCTGGGTGAAGAAAGTGATTAAGGCCGA 480
I A T L K K T G Q E V C L D P E A P W V K K V I K A

TCATGAACAACAGAAGTCGCTGAACAGACCGGGAGAGATGTGTTTCATGAGCCTTAGCTGCTCATAACAGATGAAAAGT 560
I M N N R S R *

ACCAAAAAGTATTTGTTGGTGATGATAACGTCATCACATGCCATACCAGAGGACCACTTAATGTTGGATCAACTGTTG 640
AAAATAACAACAGAATGTATCCATGTATGTTGTATCAACATGTTATTTATTACCAAGTCTGTGCTTGTGTTGTATGTC 720
ACTTATGTGCATTACTATATAAATTAATGTTTAACATATTTATGATGATTTATGAGATGTAATGTATCCAGATT 800
CAGTTGTTTATCTCTGCTGACAATCTACTGATCAATAAAAAAGTTGATGTGAAATTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 876

```

Fig. 8. Nucleotide sequence and translated amino acid sequence of rock bream IL-8 gene. rbIL8 protein showed the signature of the incomplete ELR-CXC motif (gray-boxed). The start codon, stop codon and polyadenylation signal (AATAAA) are underlined.

1. 3. COX-2 gene의 염기서열 분석

COX-2 역시 inflammation mediate gene으로 알려져 있기 때문에 효과적으로 염증반응을 일으킬 것으로 생각되는 어류 병원세균인 *V. anguillarum*을 약 1.18×10^5 CFU/fish 의 농도로 참돔의 복강 주사하여 24 동안 자극하였다. 주사한 참돔에서 total RNA를 분리하여 Mx gene과 유사한 방법으로 degenerated primer를 사용하여 871bp의 sequence를 알 수 있었으며, BLAST를 통해 확인해본 결과 COX-2 gene임을 확인할 수 있었다. partial sequence를 이용하여 COX-2 gene의 full sequence를 결정하기 위해 RACE-PCR을 실시하였다. 5' RACE 결과 519 bp의 sequence를 알 수 있었고, 3' RACE에서는 2335bp의 sequence를 알 수 있었다. 그 결과 참돔 COX-2 gene의 full sequence를 얻을 수 있었으며, COX gene에서 특이적으로 나타나는 haem-binding sites 와 기능적으로 중요한 amino acid인 cyclooxygenase active site, N-glycosylation site 그리고 peroxidase activity site를 확인 할 수 있었다. 또한 COX-1과 COX-2를 구분하는 amino acid인 Arg-502과 Val-512을 확인 할 수 있었다. 따라서 이 gene을 rsbCOX-2라 명명하였다. 이러한 과정을 Fig. 9에 도식화 하였으며, 그 결과 확인 된 rsbCOX-2의 full sequence는 Fig. 10에 나타내었다.

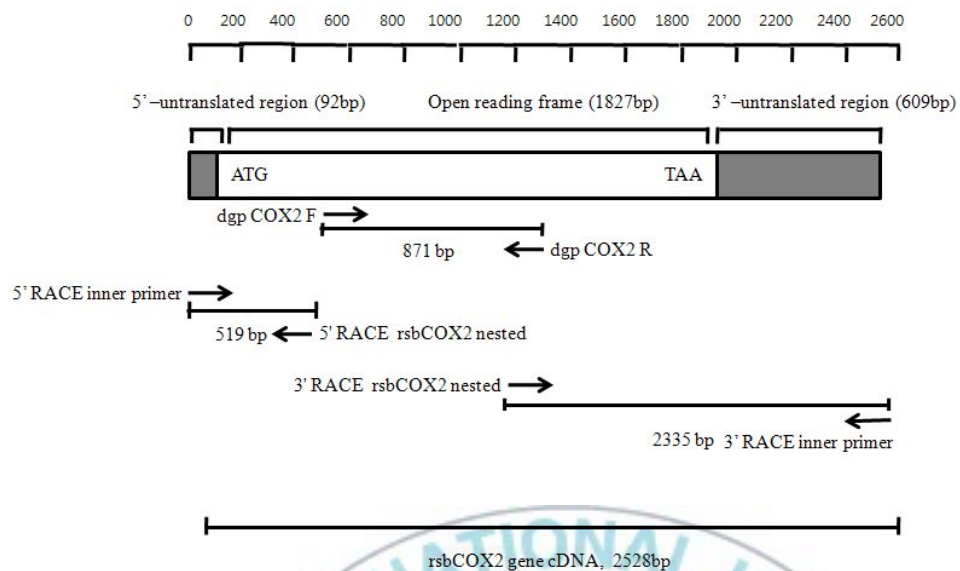


Fig. 9. A schematic illustration of the rsbCOX-2 cDNA cloning in red sea bream with position of the primers used in PCR and RACE-PCR (gray region : UTR)

GAAAATTCAGACTCTCTCTGAGCTTCAGAGCGACACGAGGGAGAGAGAGACAGGAAGCACAAGAAGGTCCGGCAA 80
 AGTCTTTGGAGTATGAACAGGCTCACATTTGCGGTTTCTCTCGGCGCTGGGGTTTCTCGTCTGCGCAGCTGGTAACCC 160
 M N R L T F A V F L S A L G F L V C A A G N P
 ATGTTGCTCAGAGCCATGCCAGAACAGGGCGTATGCACTGCGCTTGGATCAGATAATTATGAGTGTGACTGCACGCGGA 240
 C C S E P C Q N R G V C T A L G S D N Y E C D C T R
 CAGGATATCGTGGACAAAAGTGCACAACACCTGAGTTCCTCACCTGGCTCAAAGTATCCCTGAAGCCTTCGCCAACACT 320
 T G Y R G Q N* C T T P E F L T W L K V S L K P S P N T
 GTCCACTACATTCTACCCACTTTAAGGACTTCTGGAACATCATCAACAACATCTCATTCTCAGGGATGCCATCATGAG 400
 V H Y I L T H F K D F W N I I N N I S F L R D A I M R
 ATATGTGTTGACATCTCGATCCCATGATTGATAGTCTCCAACCTTTCAATGCGGATTATGGTTACAAAAATTGGGAAG 480
 Y V L T S R S H M I D S P P T F N A D Y G Y K N W E
 CCTATTCCAACCTCTCTACTATACGCGCACCCCTCCCGCTGTGCCGAGGATTGCCAACCCCTATGGGAGTAGAAGGT 560
 A Y S N* L S Y Y T R T L P P V P E D C P T P M G V E G
 AAAAAGGAGTTACCTGATGCTAAAATACTGGCTGAGAAGCTTCTTATGAGAAGAGAGTTCATCCCGACCCACAGGGCAC 640
 K K E L P D A K I L A E K L L M R R E F I P D P Q G T
 CAGCCTGATGTTTGCACTTTCGCACAGCATTTACCCACCAATTTCTCAAATCTGATATGAAGAGAGGACCTGCTTTTA 720
 S L M F A F F A Q* H F T H* Q F F K S D M K R G P A F
 CTGCAGCTCAAGGCCACGGGTTGACCTCAGCCACATTTATGGAGACAACCTGGTCAGGCAACACAAGCTCAGACTCTTC 800
 T A A Q G H G V D L S H I Y G D N L V R Q H K L R L F
 AAGGATGGCAAGCTTAAACACCAGATCTGGACGGAGAAATGTATCCCCGACAGTAAAGGAAGTTGGCGCTGAAATGCA 880
 K D G K L K H Q I L D G E M Y P P T V K E V G A E M H
 CCACCTCTCAGCTTCCCGACGCTTACCGCTTCGCGTGGGCCACGAGGCGTTCCGGCTGGTCCCGGCTGATGATGT 960
 H P P H V P D A Y R F A V G H E A F G L V P G L M M
 ACGCCACCATCTGGCTACGGGAACACAATCGGGTGTGTGATGTGTTGAAGGAGGTCCACCCGACTGGGATGACGAGAGG 1040
 Y A T I W L R E H N R V C D V L K E V H P D W D D E R
 CTCTCCAGACCACACGCTCATTTCTGATCGGTGAGACCATCAAGATTGTCATCGAGGACTACGTGCAGCATCTGAGCGG 1120
 L F Q T T R L I L I G E T I K I V I E D Y V Q H L S G
 CTACAACTTCAAGCTTAAGTTGACCCCGAGCTGGCTGTTACCAGCGCTTCCAGTACCAGAACCGCATCGCATCCGAGT 1200
 Y N F K L K F D P E L A V H Q R F Q Y Q N R I A S E
 TCAACACCTGTACCACTGGCACCCGCTGATGCCTGATAGTTTCCACATTGAGGAGAAAGAATACAGTTATAAAGAGTTC 1280
 F N T L Y* H W H* P L M P D S F H I E E K E Y S Y K E F
 GTCTTCAACACGTCTGTAGTGACTGAGCACGGCATCAGCAACCTTGTGGAGTCGTTTTCCAAGCAGATCGCTGGACGGGT 1360
 V F N* T S V V T E H G I S N L V E S F S K Q I A G R V
 TGCCGGTGGCCGAAATGTCCAGGACATCATGTACGTGGCCATCAAGTCCATTGAAAAAGCAGAAAAATGCGCTACC 1440
 A G G R N V P G P I M Y V A I K S I E N S R K M R Y
 AGTCTCTGAATGCCTACAGGAAGCGATTCTCCTTGAAGCCCTACAGCTCCTTTGAAGACATGACAGGAGAGAAAGAAATG 1520
 Q S L N A Y R K R F S L K P Y S S F E D M T G E K E M
 GCCGCAGTGCTGGAGGAGATGTATGGACACATCGACGCTATGGAGCTCTACCCGGGTCTGCTGGTGGAGAAACCCAGGGA 1600
 A A V L E E M Y G H I D A M E L Y P G L L V E K P R* E

Fig. 10. Continued.

2. Genomic DNA의 cloning과 염기서열 분석

2. 1. Mx gene의 염기서열분석

rsbMx1과 rsbMx2의 cDNA 염기서열을 바탕으로 5'-end와 3'-end의 untranslated region과 Mx gene의 중간부분에 각각 primer를 제작하여 참돔의 liver에서 분리한 DNA를 template로 해서 genomic DNA에 대한 PCR을 실시하였다. 그 결과 rsbMx1의 genomic DNA 4930 bp를 확인 할 수 있었으며, 총 12개의 exon과 11개의 intron으로 구성됨을 확인 할 수 있었고, rsbMx2의 genomic DNA 4399 bp를 확인 할 수 있었으며, rsbMx2와 마찬가지로 12개의 exon과 11개의 intron을 확인 할 수 있었다. 또한 모든 exon과 intron 사이에는 splicing motif (GT/AG)를 확인 할 수 있었다. 또한 rsbMx1을 target으로 하는 UTR 부위에 만들어진 primer를 참돔 cDNA를 template로 해서 PCR을 실시한 결과 2218 bp의 product를 얻을 수 있었으나 sequencing 결과 2218 bp의 rsbMx1과 926 bp를 얻을 수 있었으며, 확인해 본 결과 rsbMx1의 splicing variants임을 알 수 있었으며, rsbMx1s이라고 명명하였다. 그 결과 확인 된 rsbMx1, rsbMx1s 그리고 rsbMx2의 full sequence는 Fig. 11-12에 나타내었으며, Fig. 13은 도식화 하여 나타내었다.

AAAGTGTCCATTTAGTTTTAGTGCAGGAGCTGCTGTGCTCAAAGGCAACTCATATCCAGCTGATTTAGTCCTTCTACAC 80
ACAATTTCTTCACAGCAGACAAGAAGTGAGCAGCATGAACACTCTGAACCAGCAGTATGAGGAGAGGGTTCGTCCCTGCA 160
M N T L N Q Q Y E E R V R P C
TTGACCTCATTGACTCTCTCCGCTCTCTGGGGTAGAGAAGGACTTGGCGCTGCCTGCTATCGCCGTGATCGGAGACCAA 240
I D L I D S L R S L G V E K D L A L P A I A V I G D Q
AGCTCGGGGAAGAGCTCTGTGCTGGAGCGCTGTGAGGGTGGCTCTGCCGAGAGGAAGCGT GAGTTATTCCTAAACGC 320
S S G K S S V L E A L S G V A L P R G S
TCTTTTGTGTGCCTTTTACCTAATAGGCTAACTAAAAATACACAGTTTTTACAACAATGATCTCAACAATGTCACAAAA 400
CATCACTTTATTCATTTATTTATTTGTTGTTGTTGTTTATGTATTTGTTTATTTGCGTTTTCTGTGCGTCCAGGG 480
ACCTTCAGTGATGTCATTCTCAATTCATTTTTTTCTTAAAGGATTAAGGATAAGGATAAGGAGGAATAAATCAAT 560
CAACTTTCACTAATAACCAACTTAAACAAAAATGTTCAAAAAAATAATCAGTCTGGCAGTTTAATTGTATGAAATCC 640
ATCAAAATTTCTGTAATCTCTGTCAAATCACAGACAGAAAAGGCCAATAATCAACCAAGTTTGACCATATAATTTATCAT 720
TTGATTTATATTCAGTATAGAATTAATGTGATATACTTAAATATACGAGATACACATACACTACCAGCTGTAATGAA 800
ACACTGTGTGGGACTCGGTGGTCGTTTTTCACTTTCTTCAAATGTCCCTTCTGACATGCCTGTTTTGGGTTTGTGAG 880
AAGTTGTTCAAGTATCCAATTTCTCCAAGTATACTGGATTTCAAAAAATTTGTATCGTACGCTTTTTTGTATTCAAGC 960
G
ATTGTGACAAGATGTCCTCTGGAAGTGAAGATGAAGAGAAAGAGGAGAGAAATGGTACGGGAAGATAAGTACAA 1040
I V T R C P L E L K M K R K K E G E K W Y G K I S Y K
AGACTACGAGGAAGAGCTAGAAGACCCCTGCAGATGTGGAGGACAGCATTAGAGAAGGTAGAGTAACTGCATTGTTAAAT 1120
D Y E E E L E D P A D V E D S I R E
GTCACATATTAAGACACATTAAGATATTATTTGCTTTTCACTCATCAGTACTTCATCTTCTCATGTTTACACCAAGCTC 1200
TCTCCCTCCAGCTCAGGATGACATAGCCGGGAGCGGGTCGGGATCAGTAATGAACATCATCAGTCTGGAGATCGCCTCTC 1280
A Q D D I A G S G S G I S N E L I S L E I A S
CTGATGTTCCAGACCTGACGCTCATTGACCTGCCCGGCATCGCCAGGGTGGCTGTAAAGGACAACAGAGGACATCGGA 1360
P D V P D L T L I D L P G I A R V A V K G Q P E D I G
GACCAGGTATGGAGTACTTTGAGTCTGATTAATATATCTTGACAGCACTTGGATGGGTGCCATGAAATCGGATACAAAC 1440
D Q
AGTTGTGGTTCTCGAACAATGAATCCTAATGACTTTGGTGGTCCCGAATATAGTCCCGGCTCACAGGTCACATTTGTG 1520
TGCTTCAGTTAGGCTGACACTGAGGCTACCAAGTGGATCTAGTCATGAGCAGGGCTTTTTTAAAGCTTCTAACTCTTCACT 1600
TAGCCCTGGAAGTAACACTGGGTAAGGCTACTTTAGTCCGTTAGATAATTAAGTGGACATGCTAACGGTTGTAGCTTAAG 1680
TCAGAGCAATAAAAAACAGTGTAATTCAGTCTCATATATTGACTCCACGTTCAATGCAATGATGCCTCTAAATATAGCT 1760
CCATGCACTCAGCTTAAACATGTGGGCAAAACCGTAATTTGACAGCCTTACCATGCTAAGTTAGTTGCTATGCTATGACT 1840
GGACAGTCACTGTCCAGTGGAAGGATCTAGCAAATGTTAGTTGCTCACAAGATACTTGAATAACTGAAATGGCTAATCC 1920
ATTAATATTTGCACAATGATTTGCTCCATTATATCCACCCAAACTGTATTTCTCTGGTGTGTAATGACTATTACAGG 2000
ACAGTTAAAGGTGGTGTAGATTTCTAATGTGTTTCATTCGTGATTTGATTACAACAGACAGTGGTATTGATAATGGT 2080
GCAGATTATCACTTAATTATGGATTACATTTTCAAGATAAGAGACTGATCCAGAGCTTCATCAAAAAACAAGAACTAT 2160
I K R L I Q T F I K K Q E T I

Fig. 11. Continued.

CAGTTTGGTGGTGGTACCAAGCAACGTGGACATAGCAACCACAGAGGCTCTGAAGATGGCTCAGGAAGTGGATCCTGATG 2240
 S L V V V P S N V D I A T T E A L K M A Q E V D P D
 GAGGGAGGACTTTGGGTAATAGAGCTGATTTTGAAAAGGGCAACCTTGCCAAGTTACTTTATATAGTTCACTGTTTG 2320
 G G R T L
 TCTTCTCTCTCTTGGTATCTTGACCAAGCCTGATCTCGTGGACAAAGGCACAGAACGACGCGTTGACATCGTCCA 2400
 G I L T K P D L V D K G T E Q T T V D I V H
 CAATGAGGTCATCCACCTGAAGAAGGGCTACATGATCGTCAAGTGCAGGGGTCAGAAGGAGATCACAGAGAATGTGTCTC 2480
 N E V I H L K K G Y M I V K C R G Q K E I T E N V S
 TTACTGAGGCAACAAGAAGAGAGAAAGCCTTCTTCAAAGATCATGTGCATTTCAGTAAGTTCATTCTCTGTTAACA 2560
 L T E A T R R E K A F F K D H V H F H
 GTGATTTTAACAGGTTGTGTAGCTGGTACTCAGTAACCTTTTATTTTGTGTCAGCATTCTTTATGACGAAGGCCACGCC 2640
 I L Y D E G H A
 ACTGTTCTAAATTAGCTGAAAACTCACACTTGAGCTGGTGCATCATATCCAGTTAAATACTTCTTGGTGCTTCAGTTT 2720
 T V P K L A E K L T L E L V H H I Q
 CACAGTTCGCTACGGACCACTTTACCCACTTCATGCGTTAAAGTTTTGGCCCTGTGTGATTTGTAGATGCTCTGCCTCA 2800
 M S L P Q
 ACTGGAAGATCAGATTGAGAAGAACTAGTACAGACTCGTGCAGAGCTGGAGAGATTAGGCGACGGAATTCACCTGATG 2880
 L E D Q I E K K L V Q T R A E L E R L G D G L P P D
 CAGCCGAGAGACTCGTCTTTCTATTGATGTGAGTTCACTACAGTAGCTGGCACTTCTCACACTCACAAAATACTGCGCC 2960
 A A E R L V F L I D
 GCCTAACTAAGAACCTTGAAAATAATTTCCCTCTTCTGTTATCTGATCCTGTTATATTTTACAGAGTGACAGCATT 3040
 R V T A F
 ACACAGGAGGCCATCAACCTCGCTACAGGGGAGGAACCTCAAAGCCTCAAAATCTTTCCGTAATAAGGCGAGTGTTC 3120
 T Q E A I N L A T G E E L K S L K I F S V L R R V F A
 AGTGTGGAAGGGACCATAGATCAGTATGGGTAAAAATGTAAGTGCATCGACATCTCAGTCATTATATCACTTTTGATGT 3200
 V W K G T I D Q Y G V K
 CTTTGTGTTGCCCTCAGTGCTACAAAACCTGTTATATGTAAAGTTAACTATTAAGTAAGGTTGTAATGTTGTTTATTA 3280
 ATGCCATCTCCTTATTGATACGTAAAAAGCAGAATCTTACACAGAGATAAACAAAACAATCATTTCCGACCCAACGAAC 3360
 ATTTTTAAATGACTGATTGACAGTCACGATAATGTTTTAAGGAAAAGAGATTATCAGTTACAGTATGTTATCAGTATGA 3440
 CCTTTACGTTTTACTCCAGATTGCTTTAATGACCACTATAACGAAGTTTTGACTTACTTCTCTCTTCTCAAATTCATC 3520
 CCTACTGCAGTCAACTGGAATATTGAGAAACAGGTGGCTGAGTATGAGCGGAAGTACCGTGGAAGAGAACTGCCGGGTT 3600
 F N W N I E K Q V A E Y E R K Y R G R E L P G F
 CGTCAACTACAAGACCTTTGAGGGCATGGTCAAGGAGCAGATCAAAACAGCTGGAAGAGCCTGCTGTCCTGAAACTCAAG 3680
 V N Y K T F E G M V K E Q I K Q L E E P A V L K L K
 AAGTATCAGGCATGTCTTAAATACGTAGTCCATTTGAGTTATTATTTGATCTTGTGTTGTTACACTGTGTCTGATTTTG 3760
 E V S
 TTTTGTGTTTTCTTTTGAAGAAATTGTGAAGGAAGAGCTGTTTAAGGTGGCAGAGCAGCTTTGTTGGATTCCCTCATCT 3840
 E I V K E E L F K V A Q S S F V G F P H L
 CATCAGAATAGCTAAGTGCCATTTTCGTTATCCGTTGCCGTACTGCTGTATACATATGAATAACATTGTTGAATATTT 3920
 I R I A K

Fig. 11. Continued.

ACTGACGTGTAATAAATGTTGCTGTCCTTTAGATGAAGATTGAAGCCATCAGAAAGGAGAATGAGAGTACAGCAGAGTCC 4000
 M K I E A I R K E N E S T A E S
 ATGCTGATGACTCAGTTTAAGATGGAGTCGATCGTTTACACTCAGGACAGCGCATACAGCAAGAAGTTAGGGAAGCGGAA 4080
 M L M T Q F K M E S I V Y T Q D S A Y S K K L G K R K
 GAGAGAACTGAACCAAGTTAACAATAACAATAATGACAGTGTGGCCACCCTGATAGAGATGACCAAACACCTTAAATCCT 4160
 R E P E P V N K Y N N D S V A T L I E M T K H L K S
 ACTACCAAGTAAGTCTAATTTTCTGCTGTACATTTTCTAATACAACACACATTTTGAATACAGGGTCGGAATGTTTT 4240
 Y Y Q
 TTTTGAAGATTTAGGGGCCAGGGCCACCCAGGCACCCCTTCAGGACAAACCCTGCAAATAACATCAGATCTTGTCTCAT 4320
 TCTCATCAGATACAGACATTTTCTTATTGTTAGAGTAACCTGGGTGAATGTGACATATACAGATACAGCTTTGCGTTAC 4400
 TTTCTCCTTTCTCACCACAGATTGCTGGCAGGCGTCTGGCTGACCAGATCCCCCTGATGGTCTCTACCAGATGGTGCA 4480
 I A G R R L A D Q I P L M V L Y Q M V Q
 GGAGTTTACCATCCAGCTGCAGAGGGAGATGCTGCAGGTGATTGAGGACAAGGAGAAATCGAGTCCCTGCTCGAAGAGG 4560
 E F T I Q L Q R E M L Q V I Q D K E K I E S L L E E
 AGTCTGGCATCAGATCAAGAGAATCAACCTTCAGAATCGCCAAGAGCGCCTGAGAAAGGCACGCGTGCTGTTGACGGAC 4640
 E S G I T V K R I N L Q N R Q E R L R K A R V L L T D
 TTCAGTATGAACATATACAGCTTCAGCAAAACAAAACCTGAGTGTGAACAAGATTTGTATTAGAAGAAGTGGATGACATA 4720
 F S M N I Y S F S K T K L Q C E Q D L Y *
 TTATTATTATTTAGGCTTTTTGTTCTGTTTTCTCATGTTTCATTAAATGATTCCAACTTGATTTCTTATGCCAGTTTT 4800
 CCCATTCAATGGTCTTATTTCTGAATGACAAGCAACATACACTGTAGGGTATGTAAGGTCCACAAAATATAGCAATCCT 4880
 AAATACTGGCAATATATTATTTGTAGTGTTCAGGGTGAAAGGAGC 4930

Fig. 11. Compiled full-length rsbMx1 gene sequence. Exon regions underlined are derived from the cDNA sequence. The splicing motifs (GT/AG) are shadows.

GGCACAGAGGAGATGGTGGTTGACATCGTCCACAATGAGGTATCCACCTGAAGAAGGGCTACATGATCGTCAAGTGCCG 2320
G T E E M V V D I V H N E V I H L K K G Y M I V K C R

GGGTCAGAAGGAGATCACAGAGAAGGTGTCTTCTACTGAAGCAACAGAAAGAGAAAGCCTTCTTGAAGGTCATGTGC 2400
G Q K E I T E K V S L T E A T E R E K A F F E G H V

ATTTTCAGTAAGTTCATTCTTTGGGTAATTTAGCAAATACTTTTCATGGTGATTACCAAAGCTGTGATTTTATACTC 2480
H F H

AGTGGCTTTATATTCTTGCTGTAGCACTCTCTACAATGACGGCCACGCCACTGTTCTAACTGGCTGAGAACTCACAC 2560
T L Y N D G H A T V P K L A E K L T

TTGAGCTGGTGCATCACATTGAGGTAGATTCTTGCTTTGTGACCGTAACAGTTTACTATACGTTACTTTGTTGACTTTAG 2640
L E L V H H I E

TTGTTTAAGTTTGTACTTAAACAACAATTCAATTCTGATTGCAAGAAATCCCTGCCTGACTGGAAGAGCAGATA 2720
K S L P R L E E Q I

GAGGAGAACTAGCAGAGCTCGTGACAGCTCGATAGATACGGCAATGGACCTCCACTGATTGAGCTGAGAGAGTCGT 2800
E E K L A Q T R A E L D R Y G N G P P P D S A E R V V

CTTCTTCATTGAGGTGAGTACCCTCAATGTTTCATATCATTTCCCTGGCTACAGAGACAAAAGCTCACCACCAATATGAAT 2880
F F I D

TTGTCTTTGAGTATTTTTAAATAAACATAAAACACCTGTAACATCTGTTTCTGCTGTCATGTGTGCTACAGAAAGTG 2960
K V

ACAGCTTTCACTCAGGATGCCATCAGTCTGACCACAGGAGAAGAGCTCAAGTGTGGAGACAGACTTAACATCTTTTCTAC 3040
T A F T Q D A I S L T T G E E L K C G D R L N I F S T

ACTCAGAAGCGAGTTTCAGGAAGTGGATTGTCCATCTGGACCGCTCGGGACATAACTGTAAGTGTATCATTGATCTGGTC 3120
L R S E F R K W I V H L D R S G H N

TACAGCTGTCCATCAGCAGGACGCTAAATATATGTTTGTATTTCTGTTAACGAGAGGATTGAGAAAGAGGTGGAGGA 3200
F N E R I E K E V E E

GTATGAAGAGAGGTACCGTGAAGAGAACTGCCAGGCTTCATCAACTACAAGACCTTTGAGTTTATGGTCAAGGAGCAGA 3280
Y E E R Y R G R E L P G F I N Y K T F E F M V K E Q

TCAAACAGCTGGAAGAACCAGCTGTCAAGAGACTCAAAGACATAGGAGGTATAAGATTGGATGTATGCCAGGCTTAATGT 3360
I K Q L E E P A V K R L K D I G

GTTTTCTCTGTTGCACACACTTTCTTTTGTATCATACAACCACAGTGACGGACTCAGTAGACTTCAAGTTGCTGTAAC 3440
TTCTTGTTTTTGTCTTTCTTTCTGATGCTGTTAGGAAGGTGTTTCATACAGCTGGCCAGAGTAGCTTTGCTGGACTTCCTA 3520
D A V R K V F I Q L A Q S S F A G L P

ACCTTGTAAGAACAGCCAAGGTAGCCATCATCCAAGAGTTTGATAGTGCCAGATAGTCACTGTTGGTATTTTGACTCTCA 3600
N L V K T A K

AAATTTAATCTGCGTATTTTTTACCCTTAGGCAAGATCGAAGCCATAAGCAAGAAAGGAGTCTACTGCTGAATCTATG 3680
A K I E A I K Q E K E S T A E S M

CTGAGAACCCAGTTCAAGATGGAGCTGCTTGTTTACTCTCAGGACAGGACCTACAGCAGCAGTTTGAGTGACTGCAAGAG 3760
L R T Q F K M E L L V Y S Q D R T Y S S S L S D C K R

AGAGGAGGAGGACGAGGAGGAGGAGAAGAAAGACAAACGGCATGGCCACCCAAACCTTAAATGCCGGCACTGTCAATTA 3840
E E E D E E E E K K D K R H G H P N L K M P A L S I

Fig. 12. Continued.

GTCAGTGGACTGTTGTGCACCGCAGGGATAATCATGCAACACTGAAGGAGTTGATGCTGCACCTTAAATCGTATTACAAA 3920
 S Q W T V V H R R D N H A T L K E L M L H L K S Y Y K
GTAAGTTTAAATTTAGAGGGATGATTCATGATCATAAACAGGGACAGAAAGTTTAGGCAGAGGTTACACATTTTCAATA 4000
 ACGGCTCTTGCTGTCAAACCTTTCTCTCCTTTTCTCTATTCAGATTGCCAGCCAGCGTCTGGCTGATCAGATACCGCTG 4080
 I A S Q R L A D Q I P L
 GTGATCCGCTACCAGATGTTGCAGGAGTCTGCTGTCCAGCTGCAGAGGGAGATGCTGCAGGTGCTTCAGGACGAGGAGAA 4160
 V I R Y Q M L Q E S A V Q L Q R E M L Q V L Q D E E N
 TTCAGAGGTCTTGCTGAAGGAGGATTTTGACATCGGCAGCAAGAGGGCTGCTTTGCAAAGTCGCCTCAAACGCCTCACGA 4240
 S E V L L K E D F D I G S K R A A L Q S R L K R L T
 AGGCCCGTGCGTACCTGGCGGAGTTCTAGAGGGGGTCAAGGCCCGACAGAATGAGATTACTGGACCTCTTTCATAGGTCA 4320
 K A R A Y L A E F *
AATAGCACAGAACAGCAGTGGTTGTAGGATTATTATACTGTTGTTGTACTATGTCCTGGTCAGCGTATGGGAGTTGT 4399

Fig. 12. Compiled full-length rsbMx2 gene sequence. Exon regions underlined are derived from the cDNA sequence. The splicing motifs (GT/AG) are shadows.



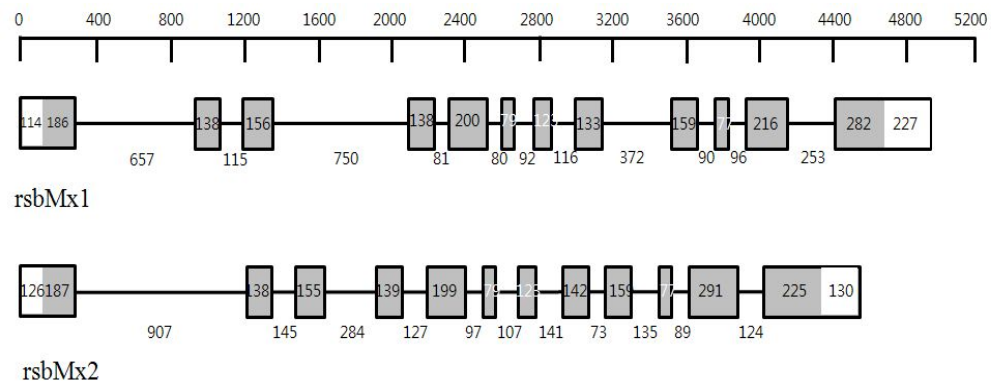


Fig. 13. Genomic structures of the rsbMx1 and rsbMx2. Exon are shown as grey boxes with sizes (in base pairs) given inside, while horizontal lines represents introns with their nucleotide lengths provided below. The untranslated region is indicated with boxes.

2. 2. IL-8 gene의 염기서열 분석

rsbIL-8과 rbIL-8 gene의 cDNA 염기서열을 바탕으로 5'-end와 3'-end의 untranslated region에 각각 primer를 제작하여 참돔과 돌돔의 liver에서 분리한 DNA를 template로 해서 genomic DNA에 대한 PCR을 실시하였다. 그 결과 참돔과 돌돔의 IL-8 gene에서 각각 1288 bp와 1093 bp의 sequence를 알 수 있었으며, 4개의 exon과 3개의 intron으로 구성됨을 확인할 수 있었다. 또한 모든 exon과 intron 사이에는 splicing motif (GT/AG)를 확인 할 수 있었다. 그 결과 확인 된 rsbIL-8과 rbIL-8의 full sequence는 Fig. 13-14에 나타내었으며, Fig. 15은 도식화 하여 나타내었다.



GAAATATTCAAACAGCAGAGCGAGAAGGCAGCTGAACCAAGAAAAGGAAAAGCTGAGGAGAGAGGAACTAAGCAAAAG 80
AAAAAGCTGAACGAGAAACATCTTCTTGCTTTACTTCATCAGACAACCTTCTGAAAGACGCTCTTATTCTTTAGTGTT 160
AATTGTTGCAGAGTTTGTAAAAGGCACAATGATGAGCAGCAGAGCTTCGTTATCTCTATTGTGGGGCTCCTGGCCTTCC 240
M M S S R V F V I S I V G L L A F

TCGCCATCAGTGAAGGTAAGATCTCGCTATTCGAACTCTCACTACTTTACCACATTCTGTTGTCAGTGCATCAAGAGTCA 320
L A I S E

TGAGTATAGACTGTTGCACTTTGTGACCATGTGACACCTGTCTCCTAACAGCGATGAGTCTGAGAAGCCTGGGAGTGGAG 400
A M S L R S L G V E

CTGCACTGCGCTGCATCCAAACAGAGAGCAAACTATCGGCCGCCACATTGAGAAGGTGGAGCTGATTCTCTGCTAACTC 480
L H C R C I Q T E S K P I G R H I E K V E L I P A N S

CCACTGCGAGGAGACTGAGATCATGTAGGACCTGATTTCAAAAACCTCATCCCTGATGGTGTGATACTTTGAGAGTTTG 560
H C E E T E I I

TCGTCAACCACTTATCAACTGTTCTGACTGTTTCTCGCTTGGTGTTCAGTGCCACTCTGAAGAGGACAGGCCAAGAGGT 640
A T L K R T G Q E V

TTGCTTGGACCCCGAGGCTCCCTGGGTGAAGAAAGTGATTGAGAAGATCATGTCCAAGTAAGTACAGGTCAAACATACAG 720
C L D P E A P W V K K V I Q K I M S N

TATAAGGGCACCCAAACACACTTATAGTCTACTTTTCTTAACTGCATAATGTGACAGAAAATGCCAGCGTTCCCTTTGA 800
TACACACATTAACCTCTCTTTCTGTTCTTTTTCAGCAGCAGAAGACGCTGAGCAGACTGGATGAGATGTGCTTCATG 880
S R R R *

AGACTGAGCCATTTACTGGATCGACCAAAGAAAACCAAAGACCAAAAAGTATTGATGAGCTGATTTGATATGGCTCATTT 960
TTTAATGTCCCAATCATCTGTTGAAAATGACAACAGATTCTACCCGCTCAGAGTATGTTTGTATCAAACATGTTATTTAT 1040
TATTATTATTATTATTATTATTATTATGTTTGTATGTCGCTTATGTGTGTTACTGTTCTATAACTTATATCTTAAAA 1120
ATATTTATTGGTGATTTATGAAACATAAATGTATCTGGAATCTGGATTGAGGAGTTGCTCTGA 1184

Fig. 14. Compiled full-length rsbIL-8 gene sequence. Exon regions underlined are derived from the cDNA sequence. The splicing motifs (GT/AG) are shadows.

GAGATTCAAACAGCAGAGCAAGAAAGCAGCTGAACCAAGAAAAGGAAAAGTAGCGGAGAGAGGGAAGTGAAGTAAAAGAAG 80
AGAGAAGAAAAAAGACCATCTTTTACCTTTCACACAACGCTTCAGGCTTCATCAGGCAGCTTTCTGAAGGACATTC 160
CTATCCTTTAGTGTAACCTGTTGCAGAAATTTCTGAAAGACAAAATGATGAGCAGCAAAAGTTATCGTCATCTCTGTCGTGG 240
M M S S K V I V I S V V
TGCTCCTGGCCTTCCTGGCCATCAGTGAAGGTAAAGATTATTTTGTATTCTGCAATTGAACGTAACATTATTGAGCCATT 320
V L L A F L A I S E
TATCAAGTTACTATCTATTCACTGTTGCATTTGAGCTGTCACTACTGTGCACATTCTGCTGCCTCTTTCTCATTGCA 400
TCAACAGTTATTAACGCAGCACTATTGCACCTTGTGACCACATGTGACTCCTGTCTCCTCACAGGGATGAGTCTGAGAAG 480
G M S L R S
TCTGGGAATGGAGATGCACTGCCGCTGCATCCAGACAGAGAGCAAAACCCATCGGCCGCCACATCGGGAAGGTGGAGCTAA 560
L G M E M H C R C I Q T E S K P I G R H I G K V E L
TTCTGCCAACTCCCACTGCGAGGAGACTGAGATCATGTAAAGACCTCATTTTGAAGCCTTCATCCATCGAGAAAGTGT 640
I P A N S H C E E T E I I
GATGTTGAAACGTTTTGAGATGCCATGCCACTTGTGGTTTCGGCATGAGGTCTAGTCTACTTGTCTGACTGCATCTC 720
TTGTCGCTTGCTTGGTGTGCAAGTGCCACTCTGAAAAAGACAGGCCAAGAGGTTTGCCTGGACCCCGAGGCTCCCTGGGT 800
A T L K K T G Q E V C L D P E A P W V
GAAGAAAGTGATTAAGGCGATCATGAACAAGTAAGTACAGGTCAATCAGACAGTATAAGGTCCTCAAACCTCAATAGTCT 880
K K V I K A I M N N
ACTTTTCAGGATTTAACTGGATAACGTAACAGAAAATGTTCACTTCTGATACACATATTAATTATTCTTTTCTGTTTCTTT 960
TCTCTGCAGCAGAAGTCGCTGAACAGACCGGGAGAGATGTGTTTCATGAGCCTTAGCTGCTCATAAACAGATGAAAAGTA 1040
R S R *
CCAAAAAGTATTTGTTGGTGATGATAACGTCATCACATGCCATACCAGAGGA 1093

Fig. 15. Compiled full-length rbIL-8 gene sequence. Exon regions underlined are derived from the cDNA sequence. The splicing motifs (GT/AG) are shadows.

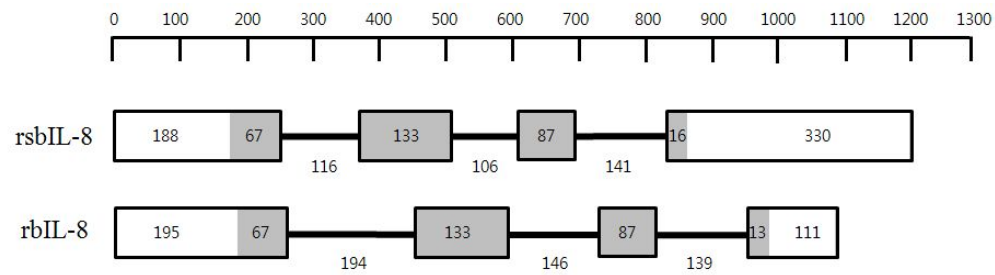


Fig. 16. Genomic structures of the *rsbIL-8* and *rbIL-8*. Exon are shown as grey boxes with sizes (in base pairs) given inside, while horizontal lines represents introns with their nucleotide lengths provided below. The untranslated region is indicated with boxes.



2. 3. COX-2 gene의 염기서열 분석

rsbCOX-2gene의 cDNA 염기서열을 바탕으로 5'-end와 3'-end의 untranslated region에 각각 primer를 제작하여 참돔의 liver에서 분리한 DNA를 template로 해서 genomic DNA에 대한 PCR을 실시하였다. 그 결과 4596bp의 genomic sequence를 알 수 있었으며, 10개의 exon과 9개의 intron으로 구성됨을 확인할 수 있었다. 또한 모든 exon과 intron 사이에는 splicing motif (GT/AG)를 확인 할 수 있었다. 그 결과 확인 된 rsbCOX-2 gene의 full sequence는 Fig. 17에 나타내었으며, Fig. 18은 도식화 하여 나타내었다.



GAAATTCAGACTCTCTCTGAGCTTCAGAGCGACACACGAGGAGAGGAGAGACAGGAAGCACAAGAAGTCCGGCAA 80
 AGTCCTTTGGAGTATGAACAGGCTCACATTTGCGGTTTCTCTCGGCGCTGGGGTTTCTCGTCTGCGCAGCTGGTAAGTC 160
 M N R L T F A V F L S A L G F L V C A A
 TTTGAAAGCTTAAACAGAAGACAGAAGAAGAAGCGCGGTGTTAATATGTCTAAAGTTCTGTTGTCGTTTTAGGATTTTA 240
 TTATTTTGAAGTATAATGACACTAAAAAAGTTTATAACTATGTCTTATTTTCTGAGATGTATGATCCTGTTATG 320
 CTGAGGCTTTTCTAACACATTTGTGTTGGTATCGGGTGAAGTGAATCCTAATAACCGCTGTTGTTACCTGTGACAGGT 400
 G
 AACCCATGTTGCTCAGAGCCATGCCAGAACAGGGCGTATGCACTGCGCTTGGATCAGATAATTATGAGTGTGACTGCAC 480
 N P C C S E P C Q N R G V C T A L G S D N Y E C D C T
 GCGGACAGGATATCGTGGACAAAATGCAACAACAGTAAGTCTGAATGAAACACATGAGGTGGAATAAATTAGGATGT 560
 R T G Y R G Q N C T T
 ATTTGTTGCTGTGGTTATTCAATAACTCATTTCTTCTTGGCCGTTACAGCTGAGTTCTCACCTGGCTCAAAGTATC 640
 P E F L T W L K V S
 CCTGAAGCCTTCGCCAACACTGTCCACTACATTCTCACCCACTTTAAGGACTTCTGGAACATCATCAACAACATCTCAT 720
 L K P S P N T V H Y I L T H F K D F W N I I N N I S
 TTCTCAGGGATGCCATCATGAGATATGTGTTGACATGTAAGTGTTCCTTCCAGGCAAAATGAGAACATGTTTTGGAA 800
 F L R D A I M R Y V L T
 ACTGCTTCATACAAATCAAATAATTTGTACAGAACCAGTGGGAGTGTTCCTTACTAATAATTCAATGTTTTCTCTCTAGC 880
 S
 TCGATCCACATGATTGATAGTCTCCAACCTTTCAATGCGGATTATGGTTACAAAAATGGGAAGCCTATTCCAACCTCT 960
 R S H M I D S P P T F N A D Y G Y K N W E A Y S N L
 CCTACTATACGCGCACCCCTCCCCCTGTGCCGAGGATTGCCAACCCCTATGGGAGTAGAAGGTGAGTACGCTTTCTCT 1040
 S Y Y T R T L P P V P E D C P T P M G V E
 GCCTCAGGAGAACCAGTTTCTCAGATTCTTGATACTGAGCAAGAGTGACTTGGCCCCATTACATCACAATGAAATGAT 1120
 CCCCTCTGTCGATTAAGAGAGTTCAAATGTGCTGATGGAACACAGCAAAACCTGCCCGAGCAAGCCAAACTAAAAGAG 1200
 ACGAAACCAGTTTGTGTTGTTTTCCTTTTTTTAGCTTTAAGAATTTACAGTGAAAGCAAACTCTCATTATAACGTTG 1280
 AGTCACCTAAATGTGTTTATCCAAGTGAAGTGTCTTGATTCTGGATTATAATCTTGATGCTGATTTTCCCCCAGGT 1360
 G
 AAAAAGAGTTACCTGATGCTAAAATACTGGCTGAGAAGCTTCTTATGAGAAGAGAGTTATCCCGGACCCACAGGGCAC 1440
 K K E L P D A K I L A E K L L M R R E F I P D P Q G T
 CAGCCTGATGTTTGCACTTTCGACACAGCATTTACCCACCAATTCTTCAAATCTGATATGAAGAGAGGACCTGCTTTTA 1520
 S L M F A F F A Q H F T H Q F F K S D M K R G P A F
 CTGCAGCTCAAGGCCACGGGTAAAGCACAGCACATCTCAAGCAACATCAGATTTGAGTTAAGAATAGAGACAACCTGTG 1600
 T A A Q G H G
 AATGAATAATTTATTAACAATACAACATCTTTGTGCTTTCAGGTTGACCTCAGCCACATTTATGGAGACAACCTGGTCAG 1680
 V D L S H I Y G D N L V R
 GCAACACAAGCTCAGACTCTTCAAGGATGGCAAGCTTAAACACCAGGTATGAGAAGAGACAGCTGTAGTTTAAACAGCCG 1760
 Q H K L R L F K D G K L K H Q
 AACACTTCAAGCCACACAAGTGTCTAACAGATGCTTCTCTTTCGTAACCTCTGCAATCCTGGACGGAGAAATGTATC 1840
 I L D G E M Y
 CCCCGACAGTAAAGGAAGTTGGCGTGAAATGCACCACCTCTCACGTTCCCGACGCTTACCGCTTCGCCGTGGGCCAC 1920
 P P T V K E V G A E M H H P P H V P D A Y R F A V G H

Fig. 17. Continued.

GAGGCGTTCCGGCTGGTCCCCGGCTGATGATGTACGCCACCATCTGGCTACGGGAACACAATCGGGTGTGTGATGTGT 2000
 E A F G L V P G L M M Y A T I W L R E H N R V C D V L
 GAAGGAGGTCCACCCGACTGGGATGACGAGAGGCTCTCCAGACCACACGCTCATTCTGATCGGTGAGTTGATGAAAC 2080
 K E V H P D W D D E R L F Q T T R L I L I
 TGAGAAATGTTTTGAAACATTCGGCTGGGAAATGAAAGTCGAAATAACAACGAAAAAGGCATGTGATTCACCTTGTCATGG 2160
 TGCTCATATAGTTACACGGGAGTTAAGAAAAGAGGAAGTTGTACTTTTATTTTGGTAATCATCTACTTGCAAGCACGTT 2240
 GCACACAGTGGAGGATTAAGCTCTGCTGTGTTGAAAGATATGAGGAAGAGGAAATGTTAGTTTTCCATTGCAGGGCTT 2320
 CACTGCACGTTTACAAACAATTACAGTCAATCAGAATAATAATTTGTGTCTGATATGGATACTTAGAACTATTTAAATG 2400
 ACATCTTCTCCTCTCACTGATTGAAAAGGTTGACTGTAGACACAAGCTGTCTCTAAACCACTGAAAAGTTATTCTTA 2480
 GTCTACATACACATGATATTTCCACATTACACTGTGAAAGTTGTATATTGATCCTTGATTGGCTTAGGTTTCTAGTGTCA 2560
 AACACACACATTGAACCTGAAACATTCAAGTTAAATAACAAAAAGCAATGTATACTACATTATGTTAAATACTTAATC 2640
 ATTTGCTCTGCAAGGTGAGACCATCAAGATTGTCATCGAGGACTACGTGCAGCATCTGAGCGGCTACAACTTCAAGCTTAA 2720
 G E T I K I V I E D Y V Q H L S G Y N F K L K
 GTTCGACCCCGAGCTGGCTGTTCCACGCGCTTCCAGTACCAGAACCGCATCGCATCCGAGTTCAACACCCTGTACCACT 2800
 F D P E L A V H Q R F Q Y Q N R I A S E F N T L Y H
 GGCACCCGCTGATGCCTGATAGTTTCCACATTGAGGAGAAAGAATACAGTTATAAGAGTTTCGTCTTCAACACGCTGTGA 2880
 W H P L M P D S F H I E E K E Y S Y K E F V F N T S V
 GTGACTGAGCACGGCATCAGCAACCTTGTTGGAGTCTGTTTCCAAGCAGATCGCTGGACGGTAAAGAACAGTTTGAGCTGT 2960
 V T E H G I S N L V E S F S K Q I A G R
 TGTAGCAGCATTTCAATTTAGACCGTAACACTCTGATCACTTGAAGGCAGATTAACAGCTTTCCATTCAATTTATTTAGG 3040
 TTGCCGGTGGCCGAAATGTCCAGGACCTATCATGTACGTGGCCATCAAGTCCATTGAAAATAGCAGAAAAATGCGCTAC 3120
 V A G G R N V P G P I M Y V A I K S I E N S R K M R Y
 CAGTCTCTGAATGCCTACAGGAAGCGATTCTCCTTGAAGCCCTACAGCTCCTTTGAAGACATGACAGGTGAGACGAAGTC 3200
 Q S L N A Y R K R F S L K P Y S S F E D M T
 AAGATGACTAACCAAGCCTAATTTTTCAGGGGAAAGGTTGACATCAGAAGATTAGTAAACAGTTATTATTAACATGAA 3280
 GTGAAAGGAAATCTCACCTCAGTCCAAATTAATTTCTGTTATTAATAGCATTGTGAGGAATTTAATGCGAGCCTGAAAA 3360
 ACATGCCAGATCGAAGCTGATGTCATAGATGACTTATTATTAAGAAATACTTTAGACCCACTTTTATTTCCCAGCAGC 3440
 TTTAAGGTTAGGAATTTATTTGCACGACTCTAAGAACCAGATGTACATTTCTGCTTGAGATAGTGAAGCAAATTGTCA 3520
 TCACAAGAGAGCAAGACATAAACAGACAAGTAAGACCTCCTGCTTCAGAGGAGAGGATTTAAAGTTTACAAGAAAGGAGG 3600
 ACTTAACGTTGATTAATAAATACTGTGATGCATGAGGACAGAAAGTATTAAGTTGAGAGAGAAAGAGGAAGGAGGG 3680
 TAGAAACAAGAAGAGAGATTGTGTTATCTTTTATTTGCTGGATCTGAATCAGTCAAAACACTGAGCTCATATTTAGACT 3760
 AGCAAGCTTTTGCAAGCTTTGCAGCTGCTGAGAGAGCGAGAGAGAAACGCCAGACAAAACCTAAACACCCCTTCTTT 3840
 GTGTTCCCTCAGGAGAGAAAGAAATGGCCGAGTCTGGAGGAGATGTATGGACACATCGACGCTATGGAGCTCTACCCGG 3920
 G E K E M A A V L E E M Y G H I D A M E L Y P
 GTCTGCTGGTGGAGAAACCCAGGGAAACGCCATCTTTGGGAAACAATGGTGGAGATGGGGGCCCCCTTTCTCCCTCAAA 4000
 G L L V E K P R E N A I F G E T M V E M G A P F S L K
 GGCTTGATGGGAAACCCCATTTGCTCCCCGAGTACTGGAAGCCGAGCACGTTCCGAGGCACCGTGGGCTTCGACATCGT 4080
 G L M G N P I C S P E Y W K P S T F G G T V G F D I V
 CAACACTGCCTCCCTGCAGAGGCTCGTCTGCAATAACGCGAATGGACCCTGTCCCGTGGCATCCTTTACGTCGCCGACG 4160
 N T A S L Q R L V C N N A N G P C P V A S F H V P D
 TTAAAGAGACGGGCTCCATGATCATCAACTCGAGTACATCCAACACGAGCAGTGATATCAACCAACAGTCATTCTA 4240
 V K E T G S M I I N S S T S N S R S S D I N P T V I L

Fig. 17. Continued.

AAAGAAAGGACTACTGAGCTCTAATTTGTATTATTTCTCTAACTTTATTATAAATGTATTTATTTATTTATTTTA 4320
 K E R T T E L *

TATTTATTTTCCTATATTTATATGAGAAATTGGAAAGTAGATTTTTTATAGGTGATTTTGTATATTTATGACTGGCAAT 4400
CAAGAACAAAAGTCTGTGGATGTGTCTATTTATTGAAAGATTCATTGTTTTATAAATTATTGTCACAGTAATGACCTCAG 4480
TCACTACAACCTTAATACTTGAAGGTTAGTTTACAGTTTCAACTACTTGGTAGGTACATTATACTTGGTAAATGTA 4560
TGTTCACTAACAGTTTATCAGTCGCAGAATGTGCAG 4596

Fig. 17. Compiled full-length rsbCOX-2 gene sequence. Exon regions underlined are derived from the cDNA sequence. The splicing motifs (GT/AG) are shadows.



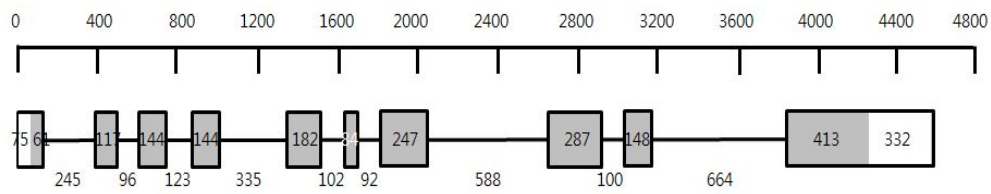


Fig. 18. Genomic structures of the rsbCOX-2. Exon are shown as grey boxes with sizes (in base pairs) given inside, while horizontal lines represents introns with their nucleotide lengths provided below. The untranslated region is indicated with boxes.



3. 염기서열의 비교 분석

3. 1. Mx gene의 비교

모든 어류의 Mx gene은 dyanamin family motif와 GTP-binding site 그리고 leucine zipper domain이 존재하였으며 (Fig. 20), BioEdit program을 이용하여 비교해 보았을 때 rsbMx1은 gilthead seabream Mx1과 78.1%로 가장 높게 나타났고 종간에 40~78.1%의 identity를 보였다. rsbMx2는 Eropean seabass Mx와 94.7%로 가장 높게 나타났으며, 42.9~94.7%의 identity를 보였다. 또한 rsbMx1과 rsbMx2간의 identity는 70.3%로 나타났다 (Table 4). 한편 barred knifejaw의 3개의 Mx gene의 identity는 74.3~88.8%로 나타났다 (Zenke K & Kim KH, 2008). 따라서 Mx gene의 identity는 종에 의존하기보다는 여러 가지 type의 Mx gene이 존재한다고 추측 할 수 있었으며, rsbMx1과 rsbMx2는 다른 type의 Mx gene이라고 추측할 수 있었다. Phylogenetic tree에서도 rsbMx1과 rsbMx2 gene이 유전적으로 차이가 남을 확인 할 수 있었다 (Fig. 19).

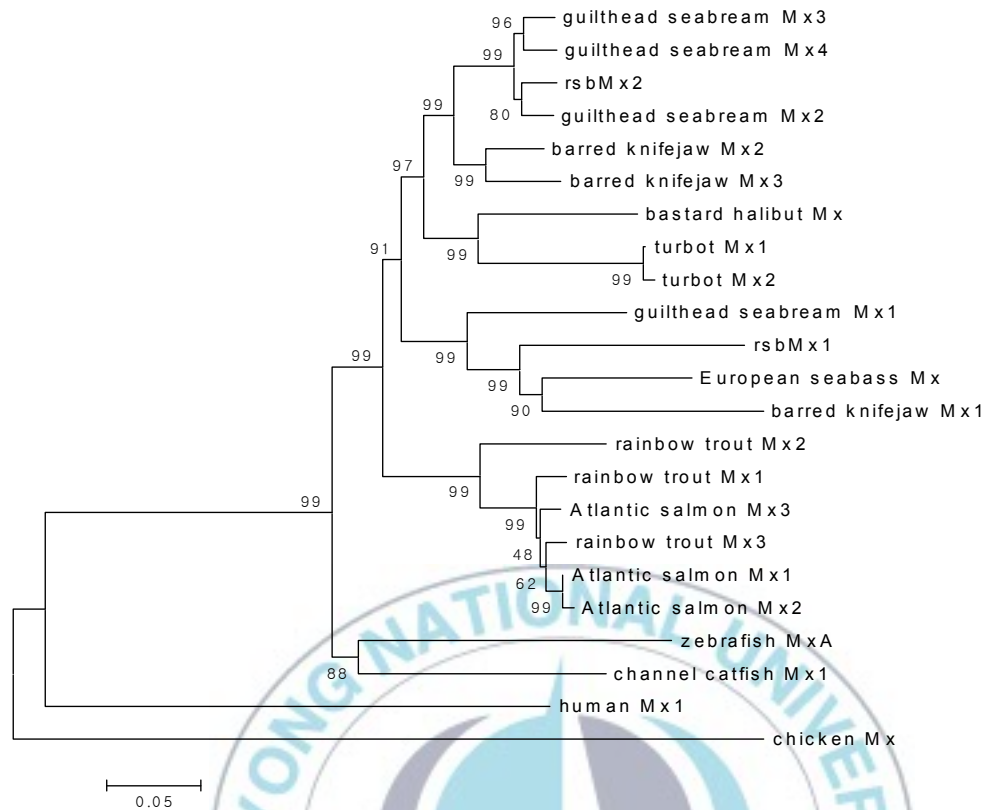


Fig. 19. Phylogenetic tree showing the relationship between different Mx amino acid sequences. The GenBank accession numbers of the Mx genes are as follows : gilthead seabream Mx3, FJ652200; gilthead seabream Mx4, FJ490556; gilthead seabream Mx2, FJ490555; barred knifejaw Mx2, EU807986; barred knifejaw Mx3, EU807987; bastard halibut Mx, AB110446; turbot Mx1, AY635932; turbot Mx2, AY635933; gilthead seabream Mx1, AF491302; European seabass Mx, AM228977; barred knifejaw Mx1, EU807985; rainbow trout Mx2, U47945; rainbow trout Mx1, U30253; Atlantic salmon Mx3, NM_001123675; rainbow trout Mx3, U47946; Atlantic salmon Mx1, BT043723; Atlantic salmon Mx2, NM_001123690; zebrafish MxA, NM_182942; channel catfish Mx1, AY095349; human Mx1, BC032602; chicken Mx, EU348752.

Fig. 20. Continued.

Fig. 20. Multiple amino acid sequence alignment of different Mx genes. Shading was performed using the conserved mode (black, dark grey, light grey shading set to 100%, 80% and 60% amino acid conservation, respectively). Gaps are shown as dashes. The GenBank accession numbers of the Mx genes are as follows : gsbMx1, AF491302; gsbMx2, FJ490555; gsbMx3, FJ652200; gsbMx4, FJ490556; rbtMx1, U30253; rbtMx2, U47945; rbtMx3, U47946; bhMx, AB110446.



Table 4. Amino acid identity of rsbMx1 and rsbMx2 with other known Mx genes.

	rsbMx1 ^a	rsbMx2	esbMx	gsbMx1	gsbMx2	bhMx	rbtMx1	Chicken Mx	Human Mx1
rsbMx1		70.3 (69.6) ^b	76.4 (68.8)	78.1 (77.8)	70.4 (69.5)	67.7 (71.8)	70.3 (68.2)	40.0 (51.0)	50.3 (56.2)
rsbMx2			73.7 (61.0)	81.0 (68.7)	94.7 (71.8)	81.3 (71.8)	80.0 (67.6)	42.9 (52.8)	53.3 (55.7)
esbMx				75.6 (71.6)	73.5 (69.3)	70.1 (65.6)	72.3 (61.5)	56.1 (54.8)	50.7 (57.1)
gsbMx1					82.9 (83.4)	76.8 (73.1)	76.7 (65.8)	41.8 (50.7)	53.8 (54.6)
gsbMx2						80.9 (72.8)	79.5 (64.2)	42.5 (49.6)	53.2 (52.4)
bhMx							77.9 (69.6)	41.5 (51.4)	52.4 (56.9)
rbtMx1								43.3 (51.2)	52.3 (57.8)
Chicken Mx									45.0 (56.0)
Human Mx1									

^a esbMx (European seabass), gsbMx (gilthead seabream), bhMx (bastard halibut), rbtMx (rainbow trout).

^b nucleotide identity

3. 2. IL-8 gene의 비교

BioEdit program을 이용하여 비교해 보았을 때 rsbIL-8 gene은 black porgy IL-8 gene과 90%로 가장 높게 나타났으며, 전체적으로 34.7~90%의 identity를 나타냈다. rbIL-8 gene은 rsbIL-8과 86.0%로 가장 높게 나왔으며, 전체적으로 34.7~86.0%의 identity를 나타냈다 (Table 5). IL-8에서 나타는 ELR motif는 포유류의 경우 Glu-Leu-Arg로 이루어진 반면 어류에서는 다양한 형태로 존재하였는데 특히 rsbIL-8과 rbIL-8은 각각 Glu-Leu-His와 Glu-Met-His의 형태로 이루어져 있음을 확인 할 수 있었다 (Fig 22). 어류에서는 haddock와 Atlantic cod를 제외한 모든 경골어류에서 ELR-motif가 다른 형태로 존재하였다.



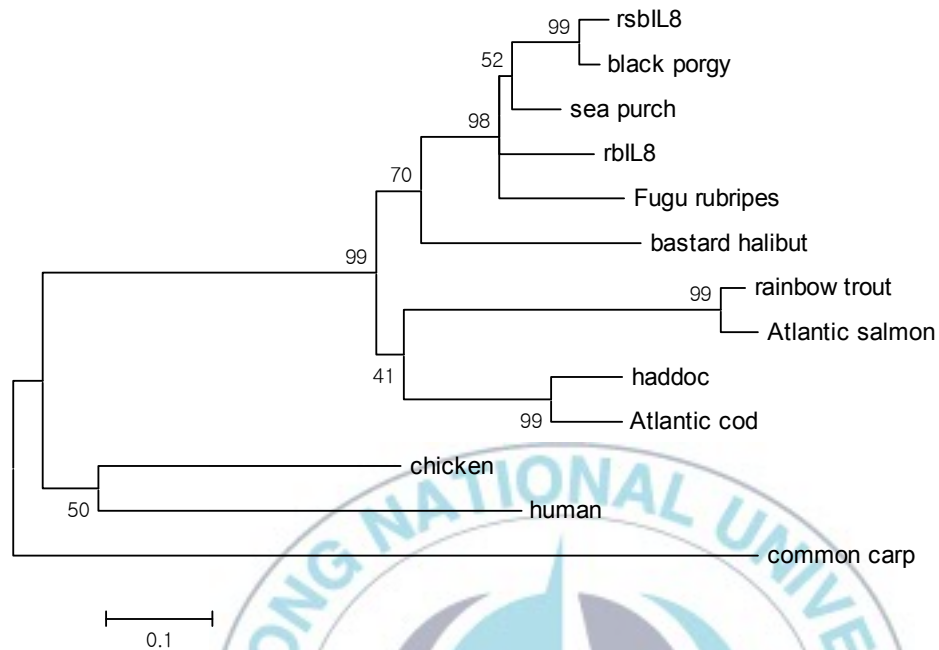


Fig. 21. Phylogenetic tree showing the relationship between different IL-8 amino acid sequences. The GenBank accession numbers of the IL-8 genes are as follows : black porgy, DQ00061; sea purch, DQ855621; Fugu rubripes, NM_001032587; bastard halibut, AF216646; rainbow trout, AJ279069; Atlatic salmon, NM_001140710; haddoc, AJ566335; Atlantic cod, AY614593; chicken, NM_205018; human, NM_000584; common carp, AB470924.

ELRCYC

```

rsbIL8      : --MSSRVFVISTVGLLESLAISEAMSLRSLGVELHCRCIQTESREIGRETEKVELIPANSHCEETEIIA : 68
rbIL8       : --MSSKVIIVISVVLLSLAISECMSLRSLGMEHCRCIQTESREIGRETEKVELIPANSHCEETEIIA : 68
black porgy : ---MSSRVFVATVGLLESLAISEA---SLGVELHCRCIQTESREIGRETEKVELIPANSHCEETEIIA : 63
sea purch   : --MSSRVIVISTVGLLESLAITEGMSLRSLGVELHCRCIQTESREIGRETEKVELIPANSHCEETEIIA : 68
Fugu rubripes : ---MCSRVLITSTVLLASLAISNMSLRSLGVEHCRCIQTESREIGRETEKVELIPANSHCEETEIIA : 67
bastard halibut : ---MSSRVIVAVMVLLESLAISEAVSLRSLGSLHCRCIETESREIGRYTKSVEIHSPNSHCDKTEIIA : 67
haddock     : MKMTSGKIPHSSLLVLLVLLITTEGKSLRGLGMEHCRCIQTESREIGRETEKMEIIPANSHCEESEIIA : 70
Atlantic cod : MKMTSGKIPHSSLLVLLVLLITTEGKSLRGLGMEHCRCIQTESREIGRETEKLEIIPANSHCEETEIIA : 70
rainbow trout : ---MSIRMSASLVVLLVLLITTEGMSLRGMCADLCRCIETESREIGRLHKVEMFPPSSHCRDTEIIA : 67
Atlantic salmon : ---MSIRMSASLVVLLVLLITTEGMSLRGMCADLCRCIETESREIGRLHKVEMFPPSSHCRDTEIIA : 67

rsbIL8      : TLKRTGGEVCLDPEAPWVKVVIQIMNSNR----- : 100
rbIL8       : TLKRTGGEVCLDPEAPWVKVVIKIMNNRSR----- : 99
black porgy : TLKRTGGEVCLDPEAPWVKVVIKILSNARR----- : 94
sea purch   : TLKRTGGEVCLDPEAPWVKVVIKILSNRTP----- : 99
Fugu rubripes : TLMSCGGEVCLDPEAPWVKVVIKIMSSRQR----- : 98
bastard halibut : TLKRTGGEVCLDPEAPWVKVVIKILSRRLSRWREMGSEAV : 109
haddock     : TLKRTGGEVCLDPEAPWVKVVIKIMSSRRR----- : 101
Atlantic cod : TLKRTGGEVCLDPEAPWVKVVIKIMSSRRH----- : 101
rainbow trout : TISMSCGEICLDVSAPWVKVVIKIMLNNK----- : 97
Atlantic salmon : TISMSCGEICLDVSAPWVKVVIKIMLNNK----- : 97

```

Fig. 22. Multiple amino acid sequence alignment of different IL-8 genes. Shading was performed using the conserved mode (black, dark grey, light grey shading set to 100%, 80% and 60% amino acid conservation, respectively). Gaps are shown as dashes. The GenBank accession numbers of the IL-8 genes are as follows : black porgy, DQ00061; sea purch, DQ855621; Fugu rubripes, NM_001032587; bastard halibut, AF216646; rainbow trout, AJ279069; Atlatic salmon, NM_001140710; haddock, AJ566335; Atlantic cod, AY614593.

Table 5. Amino acid identity of rsbIL-8 and rbIL-8 with other known IL-8 genes.

	Rock bream	Red sea bream	Black porgy	Sea perch	Bastard halibut	Fugu rubripes	Rainbow trout	chicken	human
Rock bream		86.0 (76.6) ^a	77.8 (74.9)	85.9 (75.7)	62.7 (68.0)	79.8 (64.8)	56.6 (61.5)	42.5 (47.5)	34.7 (41.3)
Red sea bream			90.0 (86.3)	87.0 (73.0)	64.5 (64.9)	82.0 (65.4)	55.0 (61.8)	40.6 (46.1)	34.7 (38.1)
Black porgy				82.8 (71.1)	60.6 (64.8)	75.5 (63.9)	53.1 (59.9)	41.0 (46.0)	39.0 (38.3)
Sea perch					63.6 (64.8)	81.8 (66.1)	60.6 (59.9)	41.5 (43.8)	36.6 (37.4)
Bastard halibut						62.4 (61.1)	51.4 (60.3)	34.5 (48.7)	37.3 (41.3)
Fugu rubripes							57.1 (59.1)	37.1 (47.5)	34.0 (39.7)
Rainbow trout								40.0 (48.3)	38.0 (40.6)
chicken									48.1 (52.5)

^a nucleotide identity

3. 3. COX-2 gene의 비교

BioEdit program을 이용하여 비교해 보았을 때 rsbCOX-2 gene은 rock bream COX-2 gene과 90.6%로 가장 높은 identity를 나타냈었으며, COX-2 gene에서는 63.3~90.6%의 identity를 나타내었다 (Table 6). COX-1과 COX-2 gene 모두 cyclooxygenase active site, N-glycosylation site, peroxidase activity 그리고 haem-binding site를 가지지만 COX-2의 substrate binding channels로 Arginine과 Valine을 가지며, inducible enzyme이라는 차이를 보인다. 본 연구에서 inducible enzyme임을 확인 할 수 없었지만 substrate binding channels인 Arg-502과 Val-512을 확인 할 수 있었으며 (Fig. 24), Phylogenetic tree를 이용하여 COX-1과 COX-2를 명확히 구분 할 수 있었다 (Fig. 23). 또한 COX-2는 다른 Mx gene이나 IL-8에 비해 포유류와 매우 높은 identity를 확인 할 수 있었다 (Table 6).

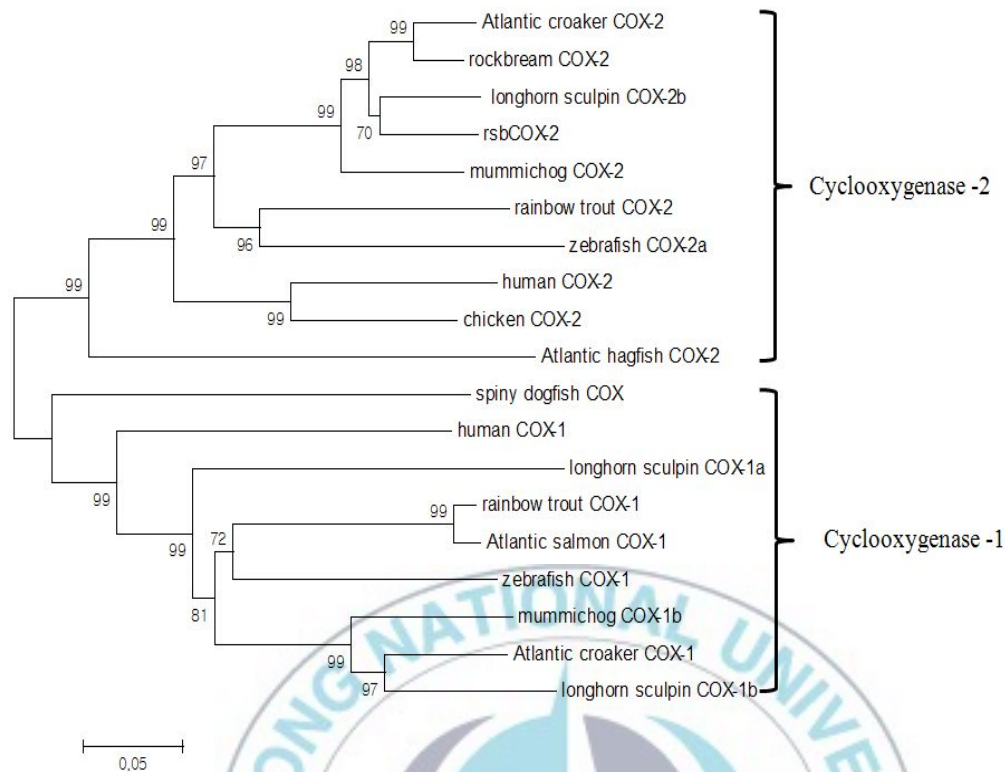


Fig. 23. Phylogenetic tree showing the relationship between different COX-2 amino acid sequences. The GenBank accession numbers of the COX-1 and COX-2 genes are as follows : Atlantic croaker COX-2, AB292358; rockbreem COX-2, FJ952157; longhorn sculpin COX-2b, EU703783; mummichog COX-2, AY532639; rainbow trout COX-2, NM_001124348; zebrafish COX-2a, NM_153657; human COX-2, NM_000963; chicken COX-2, NM_001167719; Atlantic hagfish COX-2, EU703785; spiny dogfish, AF420317; huaman COX-2, NM_000962; longhorn sculpin COX-1a, EU703784; rainbow trout COX-1, NM_001124361; Atlantic salmon COX-1, BT045745; zebrafish COX-1, NM_153656; mummichog COX-1b, EU703781; Atlantic croaker COX-1, AB292358; longhorn sculpin COX-1b, EU703789.

redseabream : MNRLTFAVFLAAGSLV--AGNACG--PCNKGVCFAAGSDNYECDCTRTGFGGNCNCTPEFLTWIKILKPSNTVHYLTHFGKFW : 88
rockbreem : MNRLTFAVFLAAGSLV--AGNACG--PCNKGVCFAAGSDNYECDCTRTGFGGNCNCTPEFLTWIKILKPSNTVHYLTHFGKFW : 88
Atlantic croaker : MNRLTFAVFLAAGSLV--AGNACG--PCNKGVCFAAGSDNYECDCTRTGFGGNCNCTPEFLTWIKILKPSNTVHYLTHFGKFW : 88
mummichog : MNRLTFAVFLAAGSLV--AGNACG--PCNKGVCFAAGSDNYECDCTRTGFGGNCNCTPEFLTWIKILKPSNTVHYLTHFGKFW : 90
rainbow trout : MNRLTFAVFLAAGSLV--AGNACG--PCNKGVCFAAGSDNYECDCTRTGFGGNCNCTPEFLTWIKILKPSNTVHYLTHFGKFW : 88
Atlantic hagfish : MTSEVFLVLCMAVFEAGA-AAALDAGGSSPCENKGVGVSLGFENYECDCTRTGFGGNCNCTPEFLTWIKILKPSNTVHYLTHFGKFW : 89

redseabream : NIINISFLRPGIMVILTRSHMISPPPTNADYEVSNENAYSNIYYTRLEPVPDCTPTMGVVGKRLPDAVLEKLMRSEFIF : 178
rockbreem : NIINISFLRPGIMVILTRSHMISPPPTNADYEVSNENAYSNIYYTRLEPVPDCTPTMGVVGKRLPDAVLEKLMRSEFIF : 178
Atlantic croaker : NIINISFLRPGIMVILTRSHMISPPPTNADYEVSNENAYSNIYYTRLEPVPDCTPTMGVVGKRLPDAVLEKLMRSEFIF : 178
mummichog : NIINISFLRPGIMVILTRSHMISPPPTNADYEVSNENAYSNIYYTRLEPVPDCTPTMGVVGKRLPDAVLEKLMRSEFIF : 180
rainbow trout : NIINISFLRPGIMVILTRSHMISPPPTNADYEVSNENAYSNIYYTRLEPVPDCTPTMGVVGKRLPDAVLEKLMRSEFIF : 178
Atlantic hagfish : SLVNRAAFLLRRFVNRHVMEFHMVSSPPTYNADYEVSNENAYSNIYYTRLEPVPDCTPTMGVVGKRLPDAVLEKLMRSEFIF : 179

redseabream : DPQGTSLMAFFAACHFHQFFKSAMRGPAFTVIRGHGVDLSHYGCINVRQHKRLRLEKDGKLRVGLDGEVYPTVKEVGAEHMYPPFV : 268
rockbreem : DPQGTSLMAFFAACHFHQFFKSAMRGPAFTVIRGHGVDLSHYGCINVRQHKRLRLEKDGKLRVGLDGEVYPTVKEVGAEHMYPPFV : 268
Atlantic croaker : DPQGTSLMAFFAACHFHQFFKSAMRGPAFTVIRGHGVDLSHYGCINVRQHKRLRLEKDGKLRVGLDGEVYPTVKEVGAEHMYPPFV : 268
mummichog : DPQGTSLMAFFAACHFHQFFKSAMRGPAFTVIRGHGVDLSHYGCINVRQHKRLRLEKDGKLRVGLDGEVYPTVKEVGAEHMYPPFV : 270
rainbow trout : DPQGTSLMAFFAACHFHQFFKSAMRGPAFTVIRGHGVDLSHYGCINVRQHKRLRLEKDGKLRVGLDGEVYPTVKEVGAEHMYPPFV : 268
Atlantic hagfish : DPQGTSLMAFFAACHFHQFFKSAMRGPAFTVIRGHGVDLSHYGCINVRQHKRLRLEKDGKLRVGLDGEVYPTVKEVGAEHMYPPFV : 269

redseabream : EDARFVAVGHEFGLVPGLLMYTITWLEHNRVCDVLEHHEWDDERLFTQLRLILIGETIKIVIEDYVQHLSCGYNEHLKFDPELAVHC : 358
rockbreem : EDARFVAVGHEFGLVPGLLMYTITWLEHNRVCDVLEHHEWDDERLFTQLRLILIGETIKIVIEDYVQHLSCGYNEHLKFDPELAVHC : 358
Atlantic croaker : EDARFVAVGHEFGLVPGLLMYTITWLEHNRVCDVLEHHEWDDERLFTQLRLILIGETIKIVIEDYVQHLSCGYNEHLKFDPELAVHC : 358
mummichog : EDARFVAVGHEFGLVPGLLMYTITWLEHNRVCDVLEHHEWDDERLFTQLRLILIGETIKIVIEDYVQHLSCGYNEHLKFDPELAVHC : 360
rainbow trout : EDARFVAVGHEFGLVPGLLMYTITWLEHNRVCDVLEHHEWDDERLFTQLRLILIGETIKIVIEDYVQHLSCGYNEHLKFDPELAVHC : 358
Atlantic hagfish : EDARFVAVGHEFGLVPGLLMYTITWLEHNRVCDVLEHHEWDDERLFTQLRLILIGETIKIVIEDYVQHLSCGYNEHLKFDPELAVHC : 359

redseabream : EFQYNRIASFNNLYHHHLLPDSFHEEENYTHQEVNLSVTHHGISLVESFQAGRVAGGNVPCINVAHRSIENSRMR : 448
rockbreem : EFQYNRIASFNNLYHHHLLPDSFHEEENYTHQEVNLSVTHHGISLVESFQAGRVAGGNVPCINVAHRSIENSRMR : 448
Atlantic croaker : EFQYNRIASFNNLYHHHLLPDSFHEEENYTHQEVNLSVTHHGISLVESFQAGRVAGGNVPCINVAHRSIENSRMR : 448
mummichog : EFQYNRIASFNNLYHHHLLPDSFHEEENYTHQEVNLSVTHHGISLVESFQAGRVAGGNVPCINVAHRSIENSRMR : 450
rainbow trout : EFQYNRIASFNNLYHHHLLPDSFHEEENYTHQEVNLSVTHHGISLVESFQAGRVAGGNVPCINVAHRSIENSRMR : 448
Atlantic hagfish : EFQYNRIASFNNLYHHHLLPDSFHEEENYTHQEVNLSVTHHGISLVESFQAGRVAGGNVPCINVAHRSIENSRMR : 449

redseabream : YQSLNAYRFPFSLMYYSFEDLTGTEMAALAEMLCHIDAMELYGLLVEKPRNAIFGETMVEMGAPFSKGLMGNFICSPFYWPST : 538
rockbreem : YQSLNAYRFPFSLMYYSFEDLTGTEMAALAEMLCHIDAMELYGLLVEKPRNAIFGETMVEMGAPFSKGLMGNFICSPFYWPST : 538
Atlantic croaker : YQSLNAYRFPFSLMYYSFEDLTGTEMAALAEMLCHIDAMELYGLLVEKPRNAIFGETMVEMGAPFSKGLMGNFICSPFYWPST : 538
mummichog : YQSLNAYRFPFSLMYYSFEDLTGTEMAALAEMLCHIDAMELYGLLVEKPRNAIFGETMVEMGAPFSKGLMGNFICSPFYWPST : 540
rainbow trout : YQSLNAYRFPFSLMYYSFEDLTGTEMAALAEMLCHIDAMELYGLLVEKPRNAIFGETMVEMGAPFSKGLMGNFICSPFYWPST : 538
Atlantic hagfish : YQSLNAYRFPFSLMYYSFEDLTGTEMAALAEMLCHIDAMELYGLLVEKPRNAIFGETMVEMGAPFSKGLMGNFICSPFYWPST : 539

redseabream : FGGVGFILVNTASLRIVCNVVGSCFVAFSEVPELWKTGSMIINSSTCHRSSDINATVIRETSEL : 608
rockbreem : FGGVGFILVNTASLRIVCNVVGSCFVAFSEVPELWKTGSMIINSSTCHRSSDINATVIRETSEL : 608
Atlantic croaker : FGGVGFILVNTASLRIVCNVVGSCFVAFSEVPELWKTGSMIINSSTCHRSSDINATVIRETSEL : 608
mummichog : FGGVGFILVNTASLRIVCNVVGSCFVAFSEVPELWKTGSMIINSSTCHRSSDINATVIRETSEL : 610
rainbow trout : FGGVGFILVNTASLRIVCNVVGSCFVAFSEVPELWKTGSMIINSSTCHRSSDINATVIRETSEL : 607
Atlantic hagfish : FGGVGFILVNTASLRIVCNVVGSCFVAFSEVPELWKTGSMIINSSTCHRSSDINATVIRETSEL : 610

Fig. 24. Multiple amino acid sequence alignment of different COX-2 genes. Shading was performed using the conserved mode (black, dark grey, light grey shading set to 100%, 80% and 60% amino acid conservation, respectively). Gaps are shown as dashes. The GenBank accession numbers of the COX-2 genes are as follows : rockbreem, FJ952157; Atlantic croaker COX-2, AB292358; mummichog COX-2, AY532639; rainbow trout COX-2, NM_001124348; Atlantic hagfish COX-2, EU703785.

Table 6. Amino acid identity of rsbCOX-2 with other known COX-2 genes.

	Red sea bream	Rock bream	Atlantic croaker	Mummi chog	Rainbow trout	Longhorn sculpin	Atlantic hagfish	chicken	human
Red sea bream		90.6 (82.4) ^a	89.6 (80.5)	88.5 (72.8)	72.9 (65.9)	89.8 (81.5)	63.3 (63.1)	74.0 (45.8)	72.0 (42.6)
Rock bream			94.4 (83.9)	88.0 (74.3)	74.2 (66.3)	90.3 (82.4)	64.4 (61.6)	73.3 (46.0)	72.2 (43.7)
Atlantic croaker				63.2 (72.7)	73.2 (65.8)	87.8 (78.4)	64.0 (61.7)	72.4 (45.3)	70.9 (42.7)
Mummi chog					75.0 (66.4)	87.4 (73.6)	63.2 (60.4)	73.3 (47.9)	72.0 (45.3)
Rainbow trout						75.3 (67.3)	61.5 (61.5)	69.7 (48.0)	70.6 (44.4)
Longhorn sculpin							62.5 (61.7)	72.2 (45.4)	71.2 (42.7)
Atlantic hagfish								64.6 (41.5)	62.4 (39.2)
chicken									81.6 (61.9)

^a nucleotide identity

4. iridovirus 감염에 대한 면역반응 분석

돌돔과 참돔에 각각 MEM, poly I:C 500 μ g/fish 그리고 iridovirus 약 10^5 copies/fish를 복강 주사하여 1일, 3일, 7일 후에 liver를 분리하여 Mx, IL-8, COX-2, IL-1 β gene의 발현을 분석하였으며, 폐사율 또한 비교하였다. 그 결과 참돔은 12일째 폐사가 일어나서 15일째 까지 최종 폐사율이 20%에 그쳤고 돌돔은 7일째부터 폐사가 일어나기 시작해서 10일째 100% 폐사하였다 (Fig. 25). 면역반응은 poly I:C 접종 시 rsbMx1과 rsbMx2는 각각 약 21배와 19배정도의 발현을 나타냈으며 그 결과는 19개 발현한 rock bream Mx gene과 유사하였다 (Fig. 26). 또한 발현량은 control 그룹과 비교하여 통계적으로 차이를 나타내었다. iridovirus를 참돔에 주사하였을 경우 rsbMx1은 3일째 약 88배 정도 증가하였으며 rsbMx2 역시 208배 정도로 크게 증가하였으며 7일째에는 다소 감소한 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 26). 그러나 rock bream Mxgene의 경우 3일째 까지 큰 변화를 보이지 않다가 7일째에 약 33배 정도 증가한 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 26). 한편 다른 immune gene인 IL-8, COX-2 그리고 IL-1 β gene은 control과 비교하여 차이를 보이지 않았다 (Fig. 27).

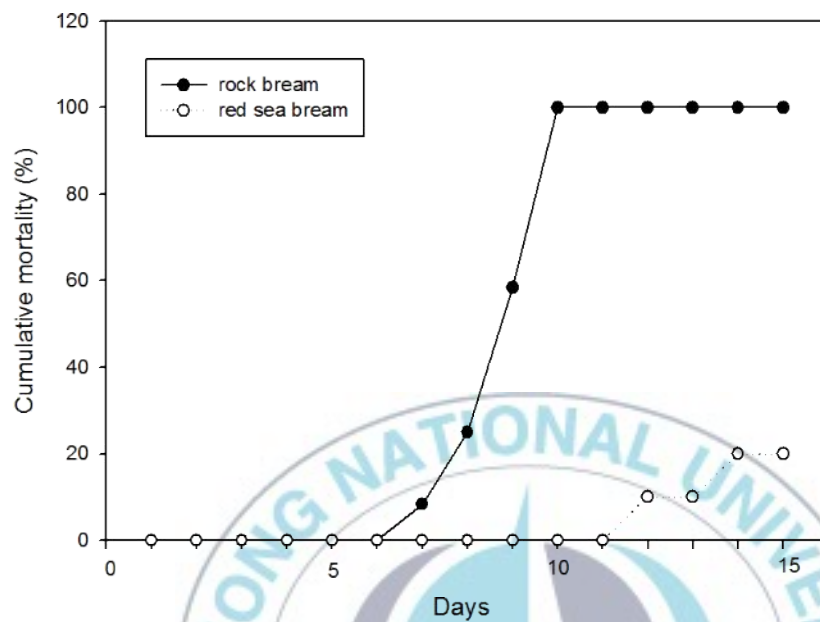


Fig. 25. Cumulative mortality of red sea bream (*Pagrus major*) and rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) challenged with iridovirus.

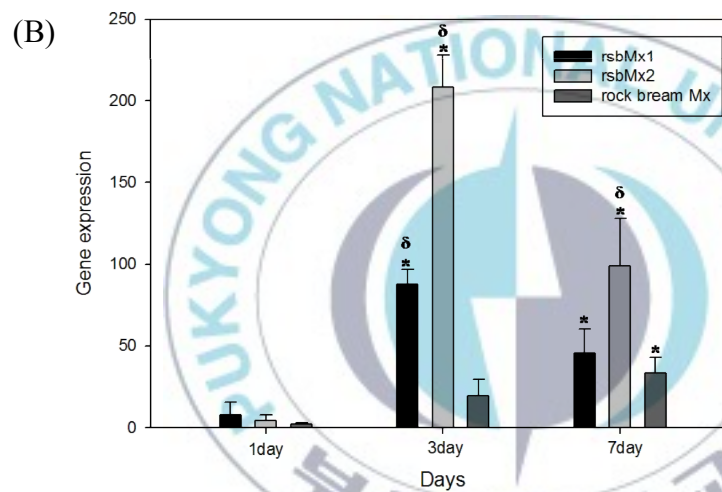
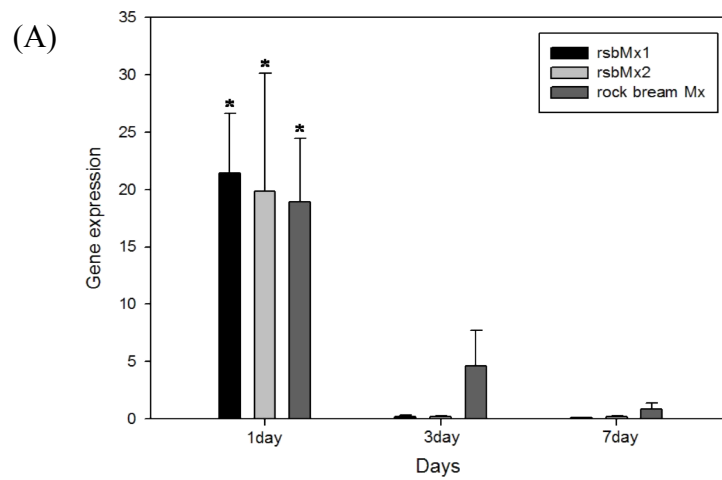


Fig. 26. Expression level of the Mx genes in red sea bream and rock bream relative to controls. injected with poy I:C (A), injected with iridovirus (B). The data are normalized relative to the expression of β -actin and analysed using the $\Delta\Delta C_t$ method. *Depicts statistical significance between challenged fish versus control fish ($P < 0.05$). δ Denotes statistical significance between red sea bream and rock bream ($P < 0.05$).

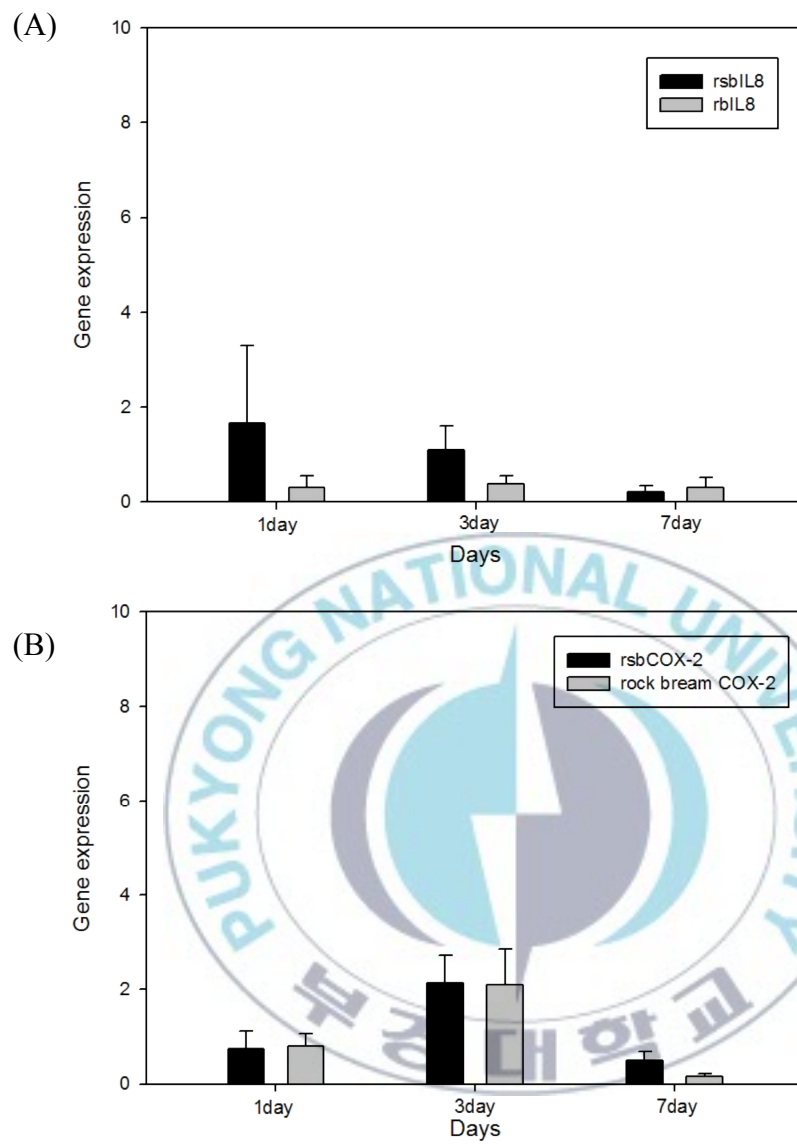


Fig. 27. Continued.

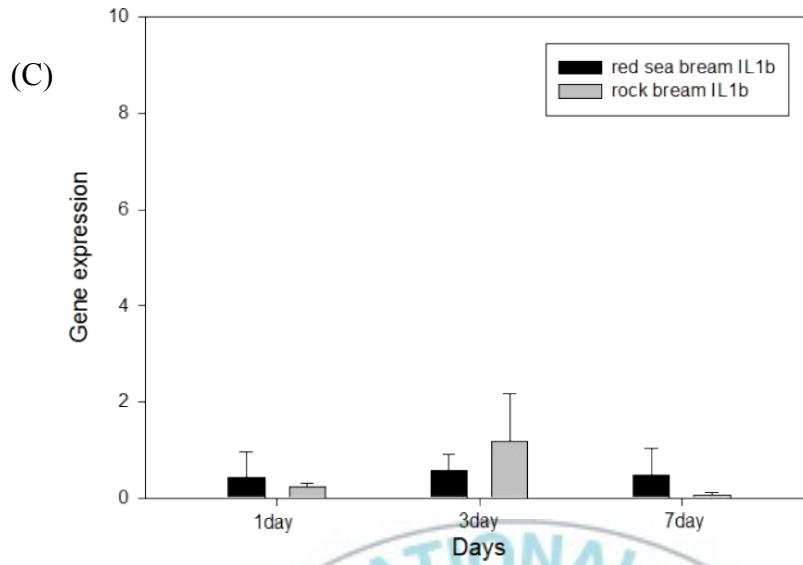


Fig. 27. Expression level of the IL-8, COX-2, IL-1 β genes in red sea bream and rock bream relative to controls. IL-8 gene (A), COX-2 gene (B) and IL-1 β gene (C). The data are normalized relative to the expression of β -actin and analysed using the $\Delta\Delta C_t$ method. *Depicts statistical significance between challenged fish versus control fish ($P < 0.05$). $^{\delta}$ Denotes statistical significance between red sea bream and rock bream ($P < 0.05$).

Table 7. Expression level and Ct value of the immune genes in red sea bream and rock bream.

Species	Gene	Sampling time	Ct value	- $\Delta\Delta Ct$	Expression level
Red sea bream	Mx1	Day 1	21.2 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.1	5.8 $\pm$ 1.9
		Day 3	17.7 $\pm$ 0.5	6.5 $\pm$ 0.3	88.1 $\pm$ 6.5
		Day 7	18.5 $\pm$ 0.3	5.4 $\pm$ 0.4	45.6 $\pm$ 9.7
	Mx2	Day 1	21.5 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 1.5
		Day 3	16.9 $\pm$ 0.4	7.7 $\pm$ 0.5	208.4 $\pm$ 14.4
		Day 7	18.9 $\pm$ 0.6	6.6 $\pm$ 0.3	99.1 $\pm$ 10.9
	IL-8	Day 1	27.5 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.1
		Day 3	28.0 $\pm$ 0.4	0.0 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.3
		Day 7	27.0 $\pm$ 0.3	-2.3 $\pm$ 0.7	0.21 $\pm$ 0.1
	COX-2	Day 1	26.4 $\pm$ 0.6	-0.5 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.3
		Day 3	25.3 $\pm$ 0.8	1.1 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.5
		Day 7	27.0 $\pm$ 0.3	-1.1 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.1
	IL-1 β	Day 1	26.6 $\pm$ 0.5	-2.1 $\pm$ 1.8	0.4 $\pm$ 0.4
		Day 3	28.7 $\pm$ 0.6	-0.8 $\pm$ 0.6	0.5 $\pm$ 0.3
		Day 7	28.1 $\pm$ 0.2	-1.1 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.1
Rock bream	Mx	Day 1	22.7 $\pm$ 0.8	1.3 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.3
		Day 3	19.8 $\pm$ 0.4	4.2 $\pm$ 0.3	19.5 $\pm$ 7.0
		Day 7	19.2 $\pm$ 0.3	5.0 $\pm$ 0.3	33.4 $\pm$ 6.8
	IL-8	Day 1	28.7 $\pm$ 0.1	-1.9 $\pm$ 0.7	0.31 $\pm$ 0.2
		Day 3	28.2 $\pm$ 0.5	-1.5 $\pm$ 0.9	0.37 $\pm$ 0.1
		Day 7	29.7 $\pm$ 0.9	-1.9 $\pm$ 1.1	0.31 $\pm$ 0.2
	COX-2	Day 1	27.0 $\pm$ 0.6	-0.4 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.2
		Day 3	25.6 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.7
		Day 7	28.3 $\pm$ 0.5	-2.6 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.1
	IL-1 β	Day 1	29.6 $\pm$ 0.7	-2.0 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.1
		Day 3	27.5 $\pm$ 0.6	-0.1 $\pm$ 1.0	1.2 $\pm$ 0.9
		Day 7	29.6 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 0.8	0.0 $\pm$ 0.1

IV. 고 찰

iridovirus는 전 세계적으로 많은 양식어종에 큰 피해를 주고 있으며, 우리나라에서는 참돔과 돌돔에 감염되어 경제적으로 큰 손실을 야기시키고 있다. 하지만 iridovirus에 대한 치료법이나 대책은 전무한 실정이다. iridovirus의 예방법이나 치료대책을 세우기 위해서는 viruses 자체에 대한 연구뿐만 아니라 감염에 의한 어체의 반응도 함께 연구되어야 한다. 참돔에서 면역 유전자에 관한 연구는 MHC class II B (Chen SL *et al.*, 2006)에 대한 연구 등이 보고되어 있으며, 돌돔에서는 IL-1 β (이, 2006), Mx gene (Zenke K & Kim KH, 2009)등에 관한 연구가 되어 있으나 언어과 어류에 비해 많이 부족하다.

본 연구에서는 iridovirus 감염을 막는데 중요한 역할을 할 것으로 생각되는 참돔의 Mx1, Mx2, IL-8 그리고 COX-2 gene 과 돌돔의 IL-8 gene의 full sequence를 cloning 하고 이들 면역 유전자들이 iridovirus 감염 시 어떻게 변화하는 분석하여 돌돔과 참돔의 면역 초기반응을 비교해보고자 하였다. 먼저 면역 유전자의 full sequence를 밝히기 위해 Genbank에 등록되어 있는 다른 어류들의 Mx, IL-8 그리고 COX-2 gene을 비교하여 conserved 되어있는 부위를 증폭할 수 있는 각각의 degenerated primer를 제작하여 poly I:C 또는 어류병원 세균인 *V. anguillarum*으로 자극한 참돔과 돌돔의 liver에서 분리한 total RNA를 template로 RT-PCR을 한 결과 참돔에서는 Mx gene으로 추정되는 559 bp, IL-8 gene으로 추정되는 168 bp, 그리고 COX-2 gene으로 추정되는 871 bp의 product를 얻을 수 있었으며 돌돔은 IL-8 gene으

로 추정 되는 175 bp의 product를 얻을 수 있었다. 이 product를 sequencing하여 이미 알려져 있는 다른 종의 유전자들과 비교하였을 때 높은 identity를 가지고 있는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 각각의 유전자를 rsbMx, rsbIL-8, rsbCOX-2 그리고 rbIL-8라 명명하였다.

각각의 유전자의 full sequence를 밝히기 위해 5'-과 3'- ends를 각각 RACE-PCR하였는데 흥미롭게도 rsbMx gene의 5' RACE-PCR 결과에서 304 bp와 322 bp의 두 개의 sequencing 결과를 확인 할 수 있었고 두 결과 모두 Mx gene임을 BLAST를 통해 확인 할 수 있었다. 따라서 각각을 rsbMx1과 rsbMx2라 명명하고 각각 RACE-PCR을 실시하였다. RACE-PCR 결과 rsbMx1의 cDNA는 총 2381 bp로 114 bp의 5' UTR region, 1881 bp의 ORF 그리고 386 bp의 3' UTR로 구성되어 있었고 (Fig. 1), rsbMx2의 cDNA는 총 2806 bp로 126 bp의 5' UTR region, 1914 bp의 ORF 그리고 766 bp의 3' UTR로 구성되어 있었다 (Fig. 2). rsbIL-8은 총 865 bp로 188 bp의 5' UTR region, 298 bp의 ORF 그리고 379 bp의 3' UTR로 구성되어 있었으며 (Fig. 5), rsbCOX-2는 총 2528 bp로 92 bp의 5' UTR region, 1827 bp의 ORF 그리고 609 bp의 3' UTR로 구성되어 있었으며 (Fig. 9), rbIL-8은 총 888 bp로 203 bp의 5' UTR region, 312 bp의 ORF 그리고 373 bp의 3' UTR로 구성되어 있었다 (Fig. 6). 그리고 translated ORF는 각각 627, 637, 99, 609 그리고 104개의 amino acids를 가지고 있었다. 또한 모든 유전자의 3' UTR에서 inflammatory molecule instability motif (ATTTA), polyadenylation signal (AATAAA)과 함께 polyadenylated tail이 포함되어 있었다 (Fig. 3-4; Fig. 7-8; Fig. 10). inflammatory molecule instability motif는 RNA의 변성과 관련이 있고

(Sachs, A. B., 1993), 염증 매개자를 coding하는 유전자에서 전형적으로 나타나는데 (Caput *et al.*, 1986), 이것은 이 유전자가 생물학적으로 기능을 가지고 있다는 것을 의미한다.

Mx gene은 특징적으로 3개의 GTP binding motifs, dynamin family signature 그리고 leucine zipper motifs를 가지는데 rsbMx1과 rsbMx2에서도 AIAVIGDQSS GKSSVLEA, DLPG, TKPD의 GTP binding motifs와 LPRGSGIVTR의 dynamin family signature 그리고 일정한 간격의 leucine으로 이루어진 leucine zipper motifs가 확인 되었다 (Fig. 3-4). mouse Mx1은 nuclear localization signal (NLS, KKRRK)이 존재하며 이것은 Mx protein이 핵에도 존재할 수 있도록 하며 mouse Mx1 protein이 influenza virus를 저해하는데 필요하다 (P. Staeheli, 1986; T. Zürcher, 1992). 어류에서는 rainbow trout Mx2에 NSL이 있지만 (Leong JC *et al.*, 1998), rsbMx1과 rsbMx2는 NSL이 존재하지 않았다. gilthead sea bream에서는 4개의 Mx gene이 보고되어 있으며, rock bream, rainbow trout 그리고 Atlantic salmon은 3개가 보고 되어 있으며, 대부분의 Mx gene은 inducible 하지만 Atlantic salmon Mx1과 rock bream Mx1은 constitutive하게 발현한다고 보고되었다 (Kibenge MJ *et al.*, 2005; Zenke K & Kim KH, 2009). 이러한 보고는 Mx gene이 항바이러스 기능뿐만 아니라 다른 기능도 있다는 추측이 가능하다. 본 연구에서는 참돔에서 2개의 Mx gene을 발견하였으며, 두 Mx gene 모두 inducible 하게 발현함을 확인 할 수 있었다.

IL-8 gene은 Glu-Leu-Arg로 이루어진 ELR motif 와 Cys-X-Cys로 이루어진 CXC motif를 가진다. 그 중에서도 포유류 IL-8의 ELR motif

는 receptor를 인식하고 신호를 보내는데 꼭 필요하다 (Clark-Lewis *et al.*, 1991). ELR motif는 백혈구를 유인하고 활성화시키는 다른 CXC chemokine의 거의 대부분에 존재하지만, 다른 기능을 하는 chemokine에는 전혀 존재하지 않는다. 이것은 ELR motif가 염증반응을 수행하는데 있어 매우 중요한 역할을 하는 것을 의미한다. 그러나 haddock와 Atlantic cod를 제외한 대부분의 경골어류는 incomplete ELR motif를 갖는다 (Fig. 17). 따라서 경골어류의 IL-8은 포유류의 IL-8에 비해 기능이 떨어진다고 (Strieter RM *et al.*, 2006; Laing KJ & Secombes CJ, 2004; Baggiolini M *et al.*, 1997). 본 연구에 밝힌 rsbIL-8의 ELR motif는 Glu-Leu-His로 이루어졌으며, rbIL-8은 Glu-Met-His로 이루어져 참돔과 돌돔은 IL-8 gene 모두 incomplete ELR motif로 존재함을 확인 할 수 있었다 (Fig. 7-8).

prostaglandin H synthases 또는 prostaglandin endoperoxide synthases로 알려진 PGHS는 Cyclooxygenase (COX)라고 더 잘 알려져 있으며, myeloperoxidase superfamily의 지방산 oxygenases이다. 그 중 COX-2는 IL-1 β 에 의해 유도되는 inflammatory gene이다. COX gene은 cyclooxygenase active site, N-glycosylation site, peroxidase activity 그리고 haem-binding site가 존재하며 COX-2 gene은 COX-1과 달리 substrate binding channels 로 Arginine과 Valine을 가지며, inducible enzyme이라는 차이를 보인다. 본 연구에서 밝힌 rsbCOX-2 gene의 inducible enzyme임을 확인 할 수 없었지만 COX gene에서 나타나는 cyclooxygenase active site (Tyr-374, His-377, Ser-519), the N-glycosylation site (Asn-56, 133 and 399) 그리고 peroxidase activity (Gln-192, His-196)의 site와 두개의

haem-binding site를 확인 할 수 있었으며, COX-2에서만 특징적으로 나타는 substrate binding channels인 Arg-502과 Val-512을 확인 할 수 있었다 (Fig. 10). 또한 amino acid를 이용한 phylogentic tree를 통해 COX-2임을 확인 할 수 있었다 (Fig. 18).

각 유전자들의 genomic organization을 알아보기 위해 5' UTR region을 forward로 하고 3' UTR region을 reverse로 하는 primer를 제작하여 모든 유전자의 genomic DNA의 full sequence를 확인 하였다. 그 결과 rsbMx1과 rsbMx2는 12개의 exon과 11개의 intron으로 구성되어 있었다 (Fig. 13). 하지만 human MxA는 앞의 4개의 exon은 non-coding되어 17개의 exon을 가지고 있으며 (Tahzi-Ahnini *et al.*, 2000), mouse Mx1 gene은 첫 번째 exon이 non-coding된 14개의 exon을 가지고 있다 (Hug *et al.*, 1988). human과 mouse의 Mx gene은 첫 번째 exon에서의 추가적인 splicing의 결과 exon의 수가 증가 하였다. 그리고 rsbMx1과 rsbMx2의 intron은 73에서 907 bp 였으며, 이것은 346에서 5,659 bp인 human MxA보다 작았다 (Tahzi-Ahnini *et al.*, 2000). 그 결과 rsbMx1과 rsbMx2 gene은 총 33 kb인 human MxA보다 약 6.6배 정도 작았다. 어류에서 보고된 Mx gene을 살펴보면 mandarin fish Mx gene은 6개의 exon (B. J. Sun & P. Nie., 2004), rock bream Mx1과 Mx2 gene은 11개의 exon, Mx3는 12개의 exon (Zenke K & Kim KH, 2009), pufferfish Mx는 12개의 exon (Yap WH *et al.*, 2003)을 가는 등 다양했다. rsbIL-8과 rbIL-8은 4개의 exon과 3개의 intron으로 구성되어 있었으며 (Fig. 16), 포유류와 어류 대부분의 CXC chemokine은 rsbIL-8과 rbIL-8과 같이 4개의 exon을 가졌으나, common carp CXC chemokine은 3개의 exon을 가지고 있

었다 (Ram Savana *et al.*, 2003). rsbCOX-2는 10개의 exon과 9개의 intron으로 구성되어있었으며 (Fig. 18), human COX-2, zebrafish COX-2b 그리고 rainbow trout COX-2a 역시 10개의 exon과 9개의 intron으로 구성되어있다 (Herschman *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2007; Ishikawa & Herschman, 2007).

그리고 다른 종의 Mx, IL-8 그리고 COX-2 gene의 amino acid와 본 연구에서 밝힌 유전자들의 amino acid를 비교하여 phylogenetic tree로 나타내어 보았는데, 그 결과 rsbMx1 gene은 European seabass Mx, gilthead seabream Mx1 그리고 barred knifejaw Mx1과 가장 유사하였다. rsbMx2는 gilthead seabream Mx2, Mx3, Mx4와 가장 유사하였다 (Fig. 17). rsbIL-8은 black porgy IL-8과 가장 유사하였으며 rbIL-8은 rsbIL-8과 가장 유사하였다 (Fig. 21). rsbCOX-2는 longhorn sculpin COX-2b와 가장 유사하였다 (Fig. 23). 또한 유전자 구조가 비슷한 종들은 서로 가까이에 위치한 것을 확인 할 수 있었고 어류는 포유류는 상당한 차이를 보였다. 따라서 이 phylogenetic tree는 어류의 면역유전자의 진화에 있어서 중요한 의미를 부여할 것으로 사료된다.

돌돔과 참돔에 직접적인 피해를 주고 있는 iridovirus 감염에 대한 어체반응에 대한 논문은 Siwicki AK *et al* (1999, 2001) 의해 보고된 iridovirus에 대한 sheatfish의 macrophage respiratory burst 와 leukocyte의 mitogen에 관한 연구 외에 연구된 것이 많지 않다. 따라서 본 연구는 iridovirus에 감염에 따른 돌돔과 참돔의 iridovirus 감염시 면역반응의 차이를 비교하고자 하였다. 돌돔과는 iridovirus에 가장 민감하다고 보고되고 있다 (OIE, Manual of Diagnostic Tests for

Aquatic Animals, 2009). 하지만 참돔은 Inouye *et al.* (1992)에 의해 iridovirus가 처음으로 분리된 어종이며, 민감하다고 알려져 있으며 대부분의 연구결과 참돔이 iridovirus에 의해 많은 폐사가 일어난다고 보고되고 있다 (Wang *et al.*, 2003; NAKAJIMA K *et al.*, 2001). 하지만 현재 우리나라에서 돌돔은 iridovirus에 의해 해마다 많은 피해가 일어나고 있지만 (Jung and Oh, 2000), 참돔에서는 iridovirus에 의한 폐사가 거의 일어나지 않으며, 실제 본 실험실에서도 challenge 결과 20% 정도의 폐사율로 100% 폐사한 돌돔에 비해 매우 낮은 폐사율을 보였다 (Fig. 25). 따라서 돌돔과 참돔의 iridovirus 감염에 따른 면역반응의 차이를 비교는 iridovirus defence mechanism 이해하는데 도움이 될 것이다. 폐사율을 살펴보면 참돔은 12일째 폐사가 일어나서 15일째 까지 최종 폐사율이 20%에 그쳤고 돌돔은 7일째부터 폐사가 일어나기 시작해서 10일째 100% 폐사하였다 (Fig. 25). 한편 돌돔과 참돔의 면역반응은 iridovirus와 poly I:C를 challenge하고 1일 3일 7일째 sampling하여 그 결과를 qRT-PCR하여 상대정량으로 분석해 보았다. poly I:C 접종 1일째 rsbMx1과 rsbMx2는 각각 약 21배와 19배정도로 가장 높은 발현을 나타냈으며, rock bream Mx gene 역시 1일째 약 19배 정도로 가장 높은 발현 양상을 나타냈다. 또한 접종 1일째 3개의 Mx gene의 발현량은 control과 비교하여 통계적으로 유의한 값을 나타내었고 돌돔과 참돔간의 Mx gene의 발현의 차이는 없었다 (Fig. 26). 이러한 결과는 S. R. Saint-Jean & S. I. Pérez-Prieto (2006)의 brown trout poly I:C를 접종 시 2일째에 최고치를 보인다는 결과와 유사하며, W.D. Eaton *et al.* (1990) 역시 rainbow trout에서 poly I:C 주사 후 24시간 후 항바이러스 활성을 보인다고 보고하였다. immuno-stimulant로써 poly I:C에

대한 연구는 거의 대부분 연어과 어류에 집중되어 있으며 연어과 어류는 저수온에서 주로 서식하기 때문에 돌돔과 참돔같이 고수온에 서식하는 어류에 대해서도 더 많은 연구가 필요하다. 반면 iridovirus를 주사하였을 경우 rsbMx1은 3일째 약 88배정도 증가하였으며, rsbMx2 역시 208배 정도로 크게 증가하였지만 7일째에는 다소 감소한 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 26). rock bream Mx gene의 경우 3일째 까지 큰 변화를 보이지 않다가 7일째에 약 33배 정도 증가한 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 26). rock bream Mx gene 역시 iridovirus challenge 시 7일째 높은 발현을 하였지만, red sea bream Mx gene에 비하여 3일째 7일째 모두 낮은 발현은 확인 할 수 있었다. 유사한 결과로 L. Poisa-Beiro *et al.* (2007)에 의하면 VNN에 높은 감수성을 보이는 seabass와 주로 asymptomatic carrier로서 감염되는 seabream 사이의 Mx gene의 발현량 비교시 seabream에서 1300정도 더 높게 발현하며 Mx gene의 높은 발현으로 인해 asymptomatic carrier상태가 된다고 보고하였다. 본 실험 역시 돌돔에서 분리된 sachun type iridovirus에 20%정도의 낮은 폐사율을 보인 참돔은 3일째 Mx gene이 돌돔에 비해 높게 발현 하였다. 또한 생존한 참돔에서 iridovirus가 검출되지 않았다 (data not shown). 따라서 돌돔과 참돔의 iridovirus에 대한 감수성의 차이를 보이는 데는 red sea bream Mx gene의 높은 발현이 하나의 중요한 factor로 작용한다는 것을 확인 할 수 있었다. inflammation mediate gene인 IL-8, COX-2 그리고 IL-1 β gene은 control과 비교에서 뿐만 아니라 돌돔과 참돔의 비교에서도 유의한 발현을 확인 할 수 없었다 (Fig. 27). Ray CA *et al.* (1992) 역시 cowpoxvirus는 IL-1 β converting enzyme을 억제하는 유전자가 있어 virus가 염증반응을 억

제한다고 보고하였다. 그러나 M. K. Purcell *et al.* (2004)에 의하면 무지개송어에 IHNV를 challenge 하였을 때 3일째에 IL-1 β 와 IL-8 gene의 발현이 크게 증가한다는 보고와 함께 L. Poisa-Beiro *et al.* (2007)에 의하면 VNN은 sea bass의 inflammatory cytokine의 발현을 증가시킨다는 본 연구 결과와는 큰 차이를 보이고있다. 이러한 결과들은 어류의 virus 감염에 따른 염증반응의 차이는 virus에 의한 차이라고 생각되어지며, iridovirus는 염증반응을 억제한다고 추측할 수 있다. 이러한 연구 결과들은 iridovirus 감염에 대한 어류의 방어기작을 이해하는데 도움이 될 것이며, 향후 iridovirus의 치료법이나 예방법을 연구하는데 기초적인 연구 자료로 사용될 것으로 사료된다.



V. 요약

참돔과 돌돔에서 iridovirus 감염 시 pro-inflammation gene인 IL-1 β 와 IL-1 β 에 의해 유도되는 chemokine인 IL-8 그리고 COX-2 gene과 interferon에 의해 유도되는 Mx gene의 발현량의 차이를 qRT-PCR의 상대정량을 이용하여 비교하여 보았으며, 아직 염기서열이 분석되지 않은 참돔의 Mx, IL-8 그리고 COX-2 gene과 돌돔의 IL-8 gene의 full sequence를 분석하였다. rsbMx1, rsbMx2, rsbIL-8, rbIL-8 그리고 rsbCOX-2 gene의 cDNA의 전체 염기서열은 각각 2381 bp, 2806 bp, 865 bp, 888bp 그리고 2528bp 이며, rsbMx1과 rsbMx2 gene은 114bp의 5' UTR, 1881 bp의 ORF 그리고 126 bp의 3' UTR, 1914bp의 ORF 그리고 766 bp의 UTR로 구성되어 있으며, 12개의 exon과 11개의 intron으로 구성되어있었다. rsbIL-8 과 rbIL-8 gene은 188 bp의 5' UTR, 298 bp의 ORF 그리고 379 bp의 3' UTR과 203 bp의 5' UTR, 312 bp ORF 그리고 373 bp의 3' UTR로 구성되어 있으며, 4개의 exon과 3개의 intron으로 구성되어있었다. rsbCOX-2 gene은 92 bp의 5' UTR, 1827 bp의 ORF 그리고 609 bp의 3' UTR로 구성되어 있으며, 10개의 exon과 9개의 intron으로 구성되어있었다. 또한 iridovirus 감염에 따른 민감어와 둔감어의 immune gene의 발현을 알아보기위해 참돔과 돌돔에 iridovirus와 immuno stimulant인 poly I:C를 challenge하고 1일, 3일, 7일째 immune gene의 발현을 비교하여 보았다. 그 결과 참돔과 돌돔에서 poly I:C를 주사하였을 경우 1일째 rsbMx1, rsbMx2 그리고 rockbreem Mx gene이 각각 약 21.5, 19.8

그리고 19배 증가하여, 두 어종모두 비슷하게 증가하였다. 반면 iridovirus를 challenge 하였을 때는 3일째 rsbMx1와 rsbMx2 gene은 최고치를 보였으며 각각 약 88, 208배 증가하였으며, rockbrear Mx gene은 7일째 약 33배증가한 것을 확인 할 수 있었다. 하지만 IL-8, COX-2 그리고 IL-1 β gene의 발현은 확인 할 수 없었다. 이러한 어류 면역유전자 분석과 iridovirus 감염에 대한 면역유전자 발현 분석은 향후 iridovirus의 치료법이나 예방법을 연구하는데 기초적인 연구 자료로 사용될 것으로 사료된다.



VI. 감사의 글

새롭고 낯선 환경에서 시작한 지난 2년 동안의 대학원 생활이 이 논문과 함께 작은 결실을 맺을 수 있게 되었습니다. 돌아보면 그 동안 참으로 많은 분들의 도움으로 지금의 제가 있을 수 있었기에 그분들께 감사의 마음을 전하고자 합니다.

제 논문이 완성되기 까지 세심한 지도를 해주시고 부족한 저를 잘 이끌어주시는 정현도 지도교수님께 감사의 말씀을 올립니다. 그리고 바쁜 신 중에도 부족한 제 논문에 관심을 가져주시고 많은 지도와 조언을 해주신 강주찬 교수님과 김기홍 교수님께 감사드리며, 늘 따뜻한 웃음으로 관심과 격려주신 박수일 교수님, 정준기 교수님, 허민도 교수님께도 감사드립니다.

그리고 멀리서도 항상 깊은 애정으로 믿고 지켜봐주시고 항상 좋은 조언을 해주시는 김은희 교수님께 이 자리를 빌어 감사를 드립니다.

작지만 소중한 저의 논문이 완성될 수 있기까지는 진단생화학 실험실의 많은 선·후배님께도 감사드립니다. 저에게 항상 많은 가르침과 좋은 본보기를 보여주신 준범이형과 려진이 누나에게 먼저 감사드립니다. 저와 함께 실험실 생활은 한 영진이, 정희, 주현이, 기원이, 윤준이 다들 어색했던 나에게 편하게 대해줘서 너무 고마웠고 나와 동고동락 하는 광일이, 기택이, 이제 대학원에 갈 회경이, 그리고 우리 학부생들 우섭이, 다진이, 여은이에게도 감사드립니다. 그리고 실험실 선배님들 경현이형, 명석이형, 우열이형, 순범이형, 신후형, 재훈이형, 지윤이 누나, 대심이 누나, 영화 누나, 지효누나, 현정이 누나, 윤경이 누나에게도 감사드립니다.

마지막으로 항상 격려해주시고 묵묵히 지켜봐 주시는 아버님과 어머님에게 진심으로 존경과 감사의 말씀을 올립니다.

VII. 참 고 문 헌

- Abdelkhalek NK, Komiya A, Kato-Unoki Y, Somamoto T, Nakao M. Molecular evidence for the existence of two distinct IL-8 lineages of teleost CXC-chemokines. *Fish Shellfish Immunol.* 2009 Dec;27(6):763-7. Epub 2009 Aug 21.
- Abollo E, Ordás C, Dios S, Figueras A, Novoa B, Molecular characterisation of a turbot Mx cDNA. *Fish Shellfish Immunol.* 2005 Aug;19(2):185-90.
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B: Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997, 15:675-705.
- Børre Robertsen, The interferon system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology* Volume 20, Issue 2, Feb 2006, pp. 172-191
- Boudinot P, Boubekour S, Benmansour A., Rhabdovirus infection induces public and private T cell responses in teleost fish. *J Immunol.* 2001 Dec 1;167(11):6202-9.
- B. J. Sun and P. Nie, Molecular cloning of the viperin gene and

its promoter region from the mandarin fish *Siniperca chuatsi*.
Veterinary Immunology and Immunopathology Volume 101,
Issues 3-4, October 2004, Pages 161-170.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J,
Elton TS, Simmons DL (October 2002). "COX-3, a
cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other
analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression".
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (21): 13926-31.
doi:10.1073/pnas.162468699

Chen, L., He, C., Baoprasertkul, P., Xu, P., Li, P., Serapion, J.,
Waldbieser, G., Wolters, W., Liu, Z., 2005. Analysis of a catfish
gene resembling interleukin-8: cDNA cloning, gene structure,
and expression after infection with *Edwardsiella ictaluri*. Dev.
Comp. Immunol. 29, 135--142.

Chen SL, Zhang YX, Xu MY, Ji XS, Yu GC, Dong CF., Molecular
polymorphism and expression analysis of MHC class II B gene
from red sea bream (*Chrysophrys major*). Dev Comp Immunol.
2006;30(4):407-18. Epub 2005 Jul 6.

Choe KP, Havird J, Rose R, Hyndman K, Piermarini P, Evans DH.,
COX2 in a euryhaline teleost, *Fundulus heteroclitus*: primary

sequence, distribution, localization, and potential function in gills during salinity acclimation. J Exp Biol. 2006 May;209(Pt 9):1696-708.

Christopher Marlowe A. Caipanga, Ikuo Hironoa, Takashi Aoki, *In vitro* inhibition of fish rhabdoviruses by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* Mx. Virology Volume 317, Issue 2, 20 December 2003, Pages 373-382.

Clark-Lewis, I., Schumacher, C., Baggiolini, M. & Moser, B. (1991). Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH₂-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. J. *biol. Chem.*, 266,23,128-23,134.

Corripio-Miyar, Y., Bird, S., Tsamopoulos, K., Secombes, C.J., 2007. Cloning and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, IL-1 beta and IL-8, in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). Mol. Immunol. 44, 1361-1373.

C. E. Samuel, Antiviral actions of interferons. Clin Microbiol Rev 14 (2001) (4), pp. 778-809.

C.S. Wang, H.H. Shih, C.C. Ku and S.N. Chen, Studies on epizootic

iridovirus infection among red sea bream, *Pagrus major* (Temminck and Schlegel), cultured in Taiwan, J. Fish Dis. 26 (2003), pp. 127–133.

D. CAPUT, B. BEUTLERU, K. HARTOG, R. THAYER, S. BROWN-SHIMER, AND A. CERAMI, Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammator mediators, Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 83, pp. 1670–1674, March 1986 Biochemistry.

Francesco Buonocorea, Elisa Randellia, Daniela Casania, Massimo Mazzinia, Irene Cappucciob, Chris J. Secombesc, Giuseppe Scapigliatia, cDNA cloning and expression analysis of a cyclooxygenase-2 from sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) after vaccination. Aquaculture Volume 245, Issues 1–4, 4 March 2005, Pages 301–310.

Fujiki, K., Gauley, J., Bols, N.C., Dixon, B., 2003. Genomic cloning of novel isotypes of the rainbow trout interleukin-8. Immunogenetics 55, 126– 131.

Havird JC, Miyamoto MM, Choe KP, Evans DH., Gene duplications and losses within the cyclooxygenase family of teleosts and other chordates. Mol Biol Evol. 2008 Nov;25(11):2349–59. Epub

2008 Aug 21.

Herschman HR. 2003. Historical aspects of COX-2: Cloning and characterization of the cDNA, protein and gene. In: Harris RE, editor. COX-2 blockade in cancer prevention and therapy. Clifton, NJ: Jumana Press. pp 13--32.

Hug H, Costas M, Staeheli P, Aebi M, Weissmann C (1988) Organization of the murine Mx gene and characterization of its interferon- and virus-inducible promoter. Mol Cell Biol 8:3065-.3079.

Ishikawa TO, Herschman HR., Two inducible, functional cyclooxygenase-2 genes are present in the rainbow trout genome. J Cell Biochem. 2007 Dec 15;102(6):1486-92.

J. Lindenmann, Resistance of mouse to mice adapted influenza A virus. Virology 16 (1962) 203e204.

Kibenge MJ, Munir K, Kibenge FS., Constitutive expression of Atlantic salmon Mx1 protein in CHSE-214 cells confers resistance to infectious salmon anaemia virus. Virol J. 2005 Aug 26;2:75.

Laing, K.J., Secombes, C.J., 2004. Chemokines. Dev. Comp. Immunol. 28, 443-460.

Laing, K.J., Zou, J.J., Wang, T., Bols, N., Hirono, I., Aoki, T., Secombes, C.J., 2002. Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dev. Comp. Immunol. 26, 433-444.

Lee, E.Y., Park, H.H., Kim, Y.T., Choi, T.J., 2001. Cloning and sequence analysis of the interleukin-8 gene from flounder (*Paralichthys olivaceus*). Gene 274, 237-243.

Lee JY, Hirono I, Aoki T, Cloning and analysis of expression of Mx cDNA in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Dev Comp Immunol. 2000 Jun;24(4):407-15.

Leong JC, Trobridge GD, Kim CH, Johnson M, Simon B. Interferon-inducible Mx proteins in fish. Immunol Rev 1998;166:349-63.

L. Poisa-Beiro, S. Dios, A. Montes, R. Aranguren, A. Figueras, B. Novoa, Nodavirus increases the expression of Mx and inflammatory cytokines in fish brain, Molecular Immunology 45 (2008) 218-225.

Maureen K. Purcell, , a, Gael Kurathb, Kyle A. Garverc, Russell P. Herwiga and James R. Wintonb, Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination. Fish & Shellfish Immunology Volume 17, Issue 5, November 2004, Pages 447-462.

NAKAJIMA K, KURITA J, ITO T, INOUE K, SORIMACHI M, Red sea bream iridoviral disease in Japan. Bulletin of National Research Institute of Aquaculture, VOL.;NO.Supplement 5;PAGE.23-25(2001).

Plant KP, Thune RL, Cloning and characterisation of a channel catfish (*Ictalurus punctatus*) Mx gene. Fish Shellfish Immunol. 2004 Mar;16(3): 391-405.

P. Staeheli, O. Haller, W. Boll, J. Lindenmann, C. Weissmann, Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus, Cell 44 (1986) 147e158.

P. Staeheli, Y X Yu, R Grob, and O Haller, A double-stranded RNA-inducible fish gene homologous to the murine influenza

virus resistance gene Mx. Mol Cell Biol. 1989 July; 9(7): 3117–3121.

Ram Savana, Tomoya Konoa, Azumi Amanb and Masahiro Sakai, Isolation and characterization of a novel CXC chemokine in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Molecular Immunology Volume 39, Issue 13, March 2003, Pages 829–834.

Ray CA, Black RA, Kronheim SR, Greenstreet TA, Sleath PR, Salvesen GS, Pickup DJ, Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. Cell. 1992 May 15;69(4):597–604.

Robertsen B, Trobridge G, Leong JA, Molecular cloning of double-stranded RNA inducible Mx genes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Dev Comp Immunol. 1997 Sep-Oct;21(5):397–412.

Roberts SB, Langenau DM, Goetz FW., Cloning and characterization of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 from the brook trout ovary. Mol Cell Endocrinol. 2000 Feb 25;160(1-2):89–97.

R. Larsen, T.P. Rokenes, B. Robertsen, Inhibition of infectious

pancreatic necrosis virus replication by Atlantic salmon Mx1 protein. J. Virol. 78 (2004) 7938e7944.

Sachs, A. B., 1993. RNA degradation in eukaryotes. Cell, 74, 413.

Seppola M, Larsen AN, Steiro K, Robertsen B, Jensen I, Characterisation and expression analysis of the interleukin genes, IL-1 β , IL-8 and IL-10, in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Mol Immunol. 2008 Feb;45(4):887-97. Epub 2007 Sep 17.

Siwicki AK, Pozet F, Morand M, Volatier C, Terech-Majewska E., Effects of iridovirus-like agent on the cell-mediated immunity in sheatfish (*Silurus glanis*)--an in vitro study. Virus Res. 1999 Sep;63(1-2):115-9.

Somamoto T, Nakanishi T, Okamoto N., Role of specific cell-mediated cytotoxicity in protecting fish from viral infections. Virology. 2002 May 25;297(1):120-7.

Stephanie Johanna Dewitte-orr, A study of innate antiviral mechanisms using fish cell lines. University of Waterloo, degree of Doctor of Philosophy in Biology, 2006.

Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA: Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer* 2006, 42:768-78.

Sylvia Rodríguez Saint-Jean, and Sara I. Pérez-Prieto, Effects of salmonid fish viruses on Mx gene expression and resistance to single or dual viral infections. *Fish & Shellfish Immunology* Volume 23, Issue 2, August 2007, Pages 390-400.

S. Graham, A.H. Jeffries and C.J. Secombes, A novel assay to detect macrophages bactericidal activity in fish. Factors influencing the killing of *Aeromonas salmonicida*, *J Fish Dis* 11 (1988), pp. 389-396.

S.J. Jung and M.J. Oh, 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.* 23 (2000), pp. 223-226.

Ishikawa T, Griffin KJP, Banerjee U, Herschman HR. 2007. The zebrafish genome contains two inducible functional cyclooxygenase-2 genes. *Biochem Biophys Res Commun* 352:181--187.

Tahzi-Ahnini R, Giovine FS di, McDonagh AJG, Messenger AG,

Amadou C, Cox A, Duff GW, Cork MJ (2000) Structure and polymorphism of the human gene for the interferon-induced p78 protein (MX1): evidence of association with alopecia areata in the Down syndrome region. Hum Genet 106:639–645.

Trobridge GD, Chiou PP, Leong JA, Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells. J Virol. 1997 Jul;71(7):5304–11.

Trobridge GD, Leong JA, Characterization of a rainbow trout Mx gene. J Interferon Cytokine Res. 1995 Aug;15(8):691–702.

T. Zürcher, J. Pavlovic, P. Staeheli, Nuclear localization of mouse Mx1 protein is necessary for inhibition of influenza virus, J. Virol. 66 (1992) 5059–5066.

W.D. Eaton, Anti-viral activity in four species of salmonids following exposure to poly inosinic:cytidylic acid. Dis Aquat Organ 9 (1990), pp. 193–198.

Yap WH, Tay A, Brenner S, Venkatesh B., Molecular cloning of the pufferfish (*Takifugu rubripes*) Mx gene and functional characterization of its promoter. Immunogenetics. 2003

Jan;54(10):705-13. Epub 2003 Jan 9.

Zenke K, Kim KH, Molecular cloning and expression analysis of three Mx isoforms of rock bream, *Oplegnathus fasciatus*. Fish Shellfish Immunol. 2009 Apr;26(4):599-605. Epub 2008 Oct 4.

Zhonghua C, Chunpin G, Yong Z, Kezhi X, Yaou Z. Cloning and bioactivity analysis of a CXC ligand in black seabream *Acanthopagrus schlegelii*: the evolutionary clues of ELR+ CXC chemokines. BMC Immunol. 2008 Nov 7;9:66.

