이 학 석 사 학 위 논 문

담수 관상어에서 분리한 iridoviruses의 분자생물학적인 특성



부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

남 정 희

이 학 석 사 학 위 논 문

담수 관상어에서 분리한 iridoviruses의 분자생물학적인 특성

지도교수 정 현 도

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2009년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

남 정 희

남정희의 이학석사 학위논문을 인준함

2004년 2월 25 일



목 차

I. 서 론1
Ⅱ. 재료 및 방법 ··································
1. 실험어5
1. 1. 담수 관상어5
1. 2. 해산어5
2. 바이러스6
2. 1. 담수 관상어 iridovirus strain6
2. 2. 해산어 iridovirus strain ············6
3. 바이러스의 핵산 분리9
4. 자연 감염된 담수 관상어 iridovirus의 특성9
5. 중합효소연쇄반응 (PCR)10
5. 1. Primers
5. 2. PCR amplification
5. 3. 담수 관상어에 자연 감염된 iridovirus를 검출하기 위한 PCR
amplification ····································
6. Cloning
7. 염기 서열 분석14
8. 교차 감염을 통한 PCR amplicon 분석15
9. Real-time PCR ·······16
9. 1. Primers
9. 2. Standard curve17
9. 3. Real-time PCR을 이용한 iridovirus의 정량18

Ⅲ. 결과 ···································
1. 담수 관상어와 해산어에서 분리한 iridovirus의 반복 서열 분석· 19
1. 1. PCR amplification 결과19
1. 1. 1. 담수 관상어에서 분리한 iridovirus의 반복 서열19
1. 1. 2. 해산어에서 분리한 iridovirus의 반복 서열23
2. 담수 관상어에서 분리한 iridovirus의 특정 부위에서 나타나는 반복
염기 서열의 다양성25
2. 1. RSCR-K2 region25
2. 2. IGR-RR region
3. 서로 다른 종에 iridovirus를 감염시켰을 때 나타나는 repeating
sequence의 특성38
3. 1. 담수 관상어 pearl gourami에서 분리한 iridovirus의 rock bream
감염에 따른 반복 서열의 변화 분석38
3. 2. 해산어인 rock bream에서 분리한 iridovirus의 pearl gourami
감 염에 따른 반복 서열의 변화 분석 ·························43
4. Iridovirus의 병원성과 repeating sequence의 다양성 사이의 관계 47
4. 1. repeating sequence의 다양성과 폐사율 사이의 관계 ············ 44
4. 2. Iridovirus 정량을 위한 standard curve 제작51
4. 3. repeating sequence의 다양성과 viral copy 수 사이의 관계 ···· 53
Ⅳ. 고찰 ···································
V. 요약 ···································
VI. 감사의 글 ···································
Ⅷ. 참고 문헌

Molecular characterization of iridovirus isolated from freshwater ornamental fish.

Jeong-Hee Nam

Department of Aquatic life medicine, Graduate School,

Pukyong National University

Abstract

In this study we investigated the molecular characterization of freshwater ornamental fish iridovirus (FOV), known as constraint in freshwater ornamental fish industries. Two iridovirus isolates, ISKNV-like iridovirus and IVS-1, were isolated from freshwater ornamental fish and rock bream (Oplegnathus fasciatus) respectively in Korea. I studied repeating sequence containd region (RSCR-K2) that belong to special genomic region of iridovirus, called K2 region and investigated intergenic region located between RAD 2 and RNRS region. Such as RSCR-K2 and intergenic region, named IGR-RR in this study carried many of repeating sequences. On the PCR for analysis of RSCR-K2 region, in genome of iridovirus obtained variable length of amplicons from a single infected fish. However, IGR-RR region in PCR targeted a IGR-RR region an intergenic region repeated carrying the highest frequency of repeating sequence in the genome of individual, this study obtained only a single length of amplicon. Multi size of amplicons appeared in RSCR-K2 region was derived from the deletion and addition of the repeating fragment of 32, 17, 13 amino acids which was came out much longer repeating sequence compared with that found in IGR-RR region. On the PCR for analysis of MCP, ATPase, *Pst* I, ORF-1 region, this study obtained only a single length of amplicon. So this study determined only RSCR-K2 region possess multi amplicons property. In challenge test, I challenged poly length polymorphism and single length polymorphism of RSCR-K2 even after cross infection to seawater fish, rock bream and freshwater ornamental fish, pearl gourami were not influenced to the pathogenicity of iridovirus from ornamental fish. In challenge test through third passage, band length polymorphism maintained except for first passage experimentation. Cumulative mortality compared with poly length polymorphism and single length polymorphism of RSCR-K2 region, were not significantly different.

In quantitative real-time PCR(qPCR) using SYBR Green for the quantitative detection of multi lengths of amplicons and single length of amplicon from ISKNV-like iridovirus. In quantitative PCR targeted MCP region, viral concentration in the infected tissue by an iridovirus carrying a multi length and single length of RSCR-K2 region were not significantly different.

I. 서 론

Family Iridoviridae는 어류 양식에 있어 심각한 경제적 손실을 일으키 고 있으며 지난 두 세기 동안 어류에 발생하는 중요한 병원체로 알려졌 다. (Jeffrey et al., 2006). Family Iridoviridae는 Iridovirus, Chloriridovirus, Ranavirus, Lymphocystivirus, 그리고 Megalocytivirus (Chinchar et al., 2005) 등 5개의 genera로 분류된다. Family Iridoviridae에서 새로운 genus인 Megalocytivirus가 밝혀진 kidney necrosis virus infectious spleen and (ISKNV)는 Megalocytivirus의 전형적인 종으로 간주되었다. (Chinchar et al., 2005) Mandarinfish ISKNV 이외에 megalocytiviruses는 red sea bream Pagrus major iridovirus (RSIV) (Nakajima and Kunita, 2005), rock bream Oplegnathus fasciatus iridovirus (RBIV) (Jung and Oh, 2000), RBIV IVS-1, sleepy disease virus (GSDIV), sea bass Lateolabrax sp. iridovirus (SBIV) (Jung et al., 1997), large yellow croaker Larimichthys crocea iridovirus (LYCIV) (Chen et al., 2003), Taiwan grouper iridovirus (TGIV) (Chao et al., 2004), and orange-spotted grouper Epinephelus coioides iridovirus (OSGIV) (Lu et al., 2005) 등 다양한 어종에서 분리된 iridovirus가 보고되고 있다.

또한 ISKNV-like iridoviruses는 red drum *Sciaenops ocellata* (Weng et al., 2002), murraycod *Maccullochella peelii peelii* (Lancaster et al., 2003), African lampeye *Aplocheilichthys normani* iridovirus, brown-spot grouper *Epinephelus tauvina* (Chua et al., 1994), turbot

Scophthalmusmaximus (Kim et al., 2005), dwarf gourami Colisa lalia (Paperna et al., 2001) 등에서 보고되고 있다.

Family *Iridoviridae*의 K2 region은 일정한 염기서열이 연속적으로 반복되는 repeating sequence가 많이 포함되어 있는 region으로 알려져 있으며 본 연구에서는 이 부위를 repeating sequence contained region (RSCR-K2)이라고 명명하였다. 이런 repeating sequence가 나타나는 현상은 Family *Iridoviridae* 뿐만 아니다. 현재 많은 연구에서 virus내 repeating sequence의 존재에 대해 보고되었다(Fischer *et al.*, 1988; Schnitzler and Darai, 1989; Webby and Kalmakoff, 1998).

그리고 poxvirus (Pickup et al., 1982), iridovirus (Schnitzler et al., 1987; Fischer et al., 1988), herpesvirus (Wadsworth et al., 1975) and retroviruses (Reddy et al., 1980) 같은 많은 DNA, RNA virus 가 repeating sequence를 가진다고 확인이 되었지만 repeating sequence의 기능에 대해서는 아주 적게 알려져 있다. 오직 virus가 복제 조절 기능에 중요하게 관여를 하는 것과 관련이 있을 것이라는 추측이 있을 뿐이다.

어류 virus에 있어서의 repeating sequence에 대한 보고는 herpesvirus에 속하는 Channel catfish virus (Rovin et al.), iridovirus에 속하는 LCDV-1 (Samalecos et al., 1986), CIV (Fischer et al., 1988), RSIV (Walker et al., 1980), ISKNV (He et al., 2001)가 보고되었으며 LCDV-C genome내에서 가장 넓고 집중된 repeating sequence가 보고되었다(Zhang et al., 2004). 하지만 어류 virus인 iridovirus에서는 아직까지 repeating sequence에 대한 기능이 알려져 있지 않으며 따라서 본 연구에서는 iridovirus의 repeating sequence의 기능에 관해 중점적으로 연구하였다.

사람에 대해 실험한 다른 연구에서는 repeating sequence가 인간 피부에 virulence를 일으키는 데 유리하게 작용한다는 보고가 있다(Moffat et al., 1998). Epstein-Barr virus (EBV) 그리고 Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) 같은 gammaherpesvirus에서는 repeating sequence가 latency amplification과 viral gene expression의 조절에 관여한다는 보고가 있다(Thakur et al., 2007).

He et al. (2002)에 따르면 genus Meglocytivirus에 속하는 ISKNV는 mandarinfish와 largemouth bass에 대해서만 병원성을 나타낸다고 하였지만, 최근 해산어에서 ISKNV와 유사한 증상을 유발하는 virus에 의한 감염이 보고되고 있으며 (Chen et al., 2003; Weng et al., 2002), ISKNV-like iridovirus는 양식 또는 자연산 해산어에서 2-step PCR 시 14.6 %의 검출율을 나타내었다 (Wang et al., 2007). 앞서 언급한 연구결과에서 해산어와 담수 관상어 대한 ISKNV-like iridovirus 감염의 위험성이 확인되었으나 sequencing이나 감염 실험을 통한 유전적 특징은 알려진 바가 없다. 그러므로 이런 ISKNV-like iridovirus의 유전적 특징을 비교함으로써 해산어와 담수 관상어에 대한 ISKNV-like iridovirus의 분석을 확실히 할 필요가 있다.

따라서 본 연구에서는 국내 담수 관상어 pearl gourami로부터 분리된 iridovirus strain 간의 분자생물학적인 방법을 이용하여 repeating sequence가 많이 존재한다고 알려진 RSCR-K2 region을 분석하였다. 먼저 i) iridovirus에 자연감염된 관상어의 염기 서열을 비교하기 위해 현재 분포되어 있는 담수 관상어 iridovirus의 DNA를 분리하였고 ii) 부위 별 repeating sequence의 차이점을 보기 위해 IVS-1과 PGIV-K1의 specific region인 RSCR-K2 부위와 IGR-RR 부위의 intra, inter간 repeating sequence를 비교하였으며 iii) 담수 관상어와 해산어에

PGIV-K1과 IVS-1을 각각 교차 감염시켰을 때 repeating sequence의 염기 서열에 변화가 있는지 알아보기 위한 실험을 하였다. 그리고 iv) 여러 번의 passage를 거친 실험에서 repeating sequence에 변화가 있는지 알아보기 위해 IVS-1과 PGIV-K1 두 strain을 pearl gourami와 rock bream에 각각 감염 시켜 repeating sequence를 분석하였다. 또한 v) PGIV-K1 repeating sequence가 병원성과 어떠한 관계를 가지는지 알아보기 위해 multi amplicon type과 single amplicon major type으로 나타난 PGIV-K1을 각각 감염시킨 rock bream과 pearl gourami에서 폐사율을 보았고 real time PCR을 이용하여 viral copy수를 비교하였다.



Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험어

1. 1. 담수 관상어

실험에 사용한 4종의 담수 관상어는 국내의 관상어 도매상에서 pearl gourami *Trichogaster leeri*, dwarf gourami *Colisa lalia*, silver gourami *Trichogaster microlepis*, blue gourami *Trichogaster trichopterus sumatranus*를 구입하였다. 각 어류는 각각 $40 \, \ell$ 수조 (해수 또는 담수)에서 1일 1회 사료 투여 및 사육수 환수를 하며 25 ± 0.5 °C에서 7일 동안순치시켰다. 실험어는 무게 3.0 ± 1.0 g으로 일정한 크기의 어류를 사용하였으며 어종은 실험하기 전 PCR test를 실시하여 1st PCR에서 음성 반응이 나온 어류를 실험어로 사용하였다.

1. 2. 해산어

해산어는 우리 나라 주요 양식 어종으로 rock bream *Oplegnathus* fasciatus을 통영과 남해의 양식장에서 구입하였고 위와 같은 방식으로 순치시켰으며 PCR test를 실시하여 1st PCR에서 음성 반응이 나온 어류를 실험어로 사용하였다.

2. 바이러스

2. 1. 담수 관상어 iridovirus strain

실험에 사용된 virus는 2004년에 국내 관상어 도매상에서 구입한 것 중 iridovirus의 전형적인 감염 증상을 보이는 pearl gourami *Trichogaster leeri* (b.w. 4.0±1.0 g)의 비장으로부터 virus를 분리, polymerase chain reaction (PCR)을 실시하여 product를 확인하였다. 확인된 PCR product를 이용하여 cloning하고 sequencing한 후, reference iridovirus sequences와 비교한 결과 reference iridovirus sequences와 비교하여 ISKNV-like strain으로 분류되었고, PGIV-K1 (Jeong *et al.*, 2003) (Table 1)이라 명명하였다.

2. 2. 해산어 iridovirus strain

실험에 사용한 다른 iridovirus strain으로 2000년도에 우리나라 남해안 의 양식장으로부터 전형적인 iridovirus 감염 증상을 보이는 rock bream Oplegnathus fasciatus (b.w. 100.0±10.0 g)의 비장으로부터 virus를 분리, PCR amplification을 실시하여 PCR product를 확인하였다. 그리고 PGIV-1과 같은 방법으로 분석한 결과 RSIV Sachun strain으로 분류되었고, 이를 IVS-1 (Table 1)이라 명명하였다 (Jeong et al., 2006).

Iridovirus 감염 진단은 비장에서 조직병리학적 관찰을 통한 비정형 비대세포의 관찰과 함께 IV S11/IV S13R primer sets (Table 2)를 사용한

PCR 방법으로 band를 확인하였다. 어류에 대한 감염 실험은 PGIV-K1 과 IVS-1을 각각 10 마리의 rock bream 및 pearl gourami에 복강 주사를 하여 감염시켰으며, 감염 실험에 사용한 주사액은 다음과 같이 준비하였다. 전형적인 iridovirus 감염 증상을 보이는 감염어 pearl gourami와 rock bream 10 마리의 비장으로부터 10 volume PBS를 첨가해 homogenizer pestle로 마쇄시킨 후, 300 ×g 에서 5분간 원심 분리, 세포 debris의 pellet을 제거하여 상징액을 membrain filter (0.45 μm pore size)에 통과시킨 후, 실험 전까지 -80℃에서 보관하였다.



Table 1. Iridovirus strains used in this study

Iridovirus	Year	Fish		
strain	1 eai	Common name	Scientific name	
IVS-1	2000	Rock bream	Oplegnathus fasciatus	
PGIV-K1	2004	Pearl gourami	Trichogaster leeri	



3. 바이러스의 핵산 분리

감염어의 비장 조직 1 mg을 사용하였다. Viral DNA 분리에 사용한 kit 는 현재 시판되고 있는 AccuPrep[®] Genomic DNA Extraction Kit (K-3032, Bioneer)로, 제조사의 protocol에 따라 최종 50 μ 의 elution buffer를 사용하여 total nucleic acids를 분리하였다. 분리한 DNA는 실험 전까지 -20℃에서 보관하였다.

4. 자연 감염된 담수 관상어 iridovirus의 특성

2003~2007년까지 5년 동안 부산 시내 관상어 도매상의 담수 관상어를 대상으로 iridovirus에 감염된 관상어들의 염기 서열을 분석하였다. 실험어는 원산지인 Singapore로부터 도매상에 도착한지 1일 이내에 구입하여 외부 증상을 확인하고, 해부하여 내부 장기의 상태를 확인하였다. 내부 장기 중 비장조직으로부터 AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (K-3032, Bioneer)를 사용하여 total nucleic acid를 분리하고 IK2F/IK2R primer (Table 2)로 PCR amplification을 실시하여 iridovirus에 걸린 담수 관상어의 band pattern을 분석하였다. PCR amplification시 30cycle까지 실시하여 전기 영동 하였을 때 band 개수가 2개 이상인 것을 multi, 오직 1개의 band만 보이는 것을 single이라고 정의하였다.

5. 중합효소연쇄반응 (PCR)

5. 1. Primers

Table 2. PCR primers used in this study

Genomic region	Primers	Oligonucleotide sequence (5' to 3' direction)	Expected size of amplicons*	Reference	
MCP gene	M2F	GGCGGCGACAATGCCGTG	908 bp	Oshima <i>et al.</i> (1996)	
	M3R	ATAACGACCAGTTCAAAC	осс вр		
ATPase gene	A3F	CAAACCACAGCGCGGCAAGT	562 bp	Kurita <i>et al.</i>	
	A3R	AGTAGCGCACCATGTCCTCC	302 bp	(1998)	
Pst I	IPF	CTGCAGTTGCCGCTCAAAC	956bp	Miyata <i>et al.</i>	
	IPR	CTGTAGTGCAGACACATAC	обобр	(1997)	
ORF-1	НЈ1F	GTGTGGATGACATAAGTC	888 bp	In this study	
	HJ1R	GTCATGTTGCATGTATATG	000 pp	in this study	
RSCR-K2	IK2F	GTGCACAGTCGCAATAC	1556 bp	Jeong <i>et al</i> .	
	IK2R	CCATCTTTATAATAAACCAG	1000 bp	(2006b)	
IGR-RR	IG1F	CGGATGGCATTGTAGGC	1551bp	In this study	
	IG1R	ACAAAAGAGTCCGAGAGATC	10010p		

*based on the nucleotide sequence of IVS-1 isolate.

5. 2. PCR amplification

PCR amplification ← Applied Biosystems 2720 thermal cycler (ABI) 를 사용하였다. 0.2ml microtube에 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% (w/v) gelatin, 0.5% Tween-20, 200µM의 각각의 dNTP, 1μM의 각 각의 primer, 1.25 U AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) 및 template DNA로서 추출된 viral nucleic acids를 첨가한 후, 증류수로 PCR 혼합물 최종 volume이 50 μl가 되게 하였다. PCR 조건은 94℃에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 94℃ 30초 denaturation, 55°C 30초 annealing, 72℃ 30초 extension의 반응을 1 cycle로 하여 30 cycles를 반 응시켰다. 그 후, 72℃에서 7분간 post-extension 시켰다. 증폭된 산물은 0.5 μg/ml ethidium bromide (EtBr)가 첨가된 1% agarose gel을 완충액 0.5X TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)에 넣어 전기영 동을 실시하였다. Ultraviolet (UV)에서 나타나는 band를 관찰하여 증폭 여부 및 검출 한계를 확인하였다.

5. 3. 담수 관상어에 자연 감염된 iridovirus를 검출하기 위한 PCR amplification

담수 관상어에 자연 감염된 iridovirus를 검출하기 위해 2003~2007년까지 5년 동안 부산 시내 관상어 도매상의 담수 관상어를 대상으로 비장조직을 분리하였다. AccuPrep[®] Genomic DNA Extraction Kit (K-3032, Bioneer)를 사용하여 total nucleic acid를 분리하고 RSCR-K2부위를 target으로 하는 IK2F, IK2R primer를 사용하여 PCR을 실시하였다. 그리고 repeating sequence가 많다고 알려진 또 다른 부위인 IGR-RR region을 target으로 하는 E3, S16R primer를 사용하여 PCR을 실시하였



K2 region of iridovirus IVS-1

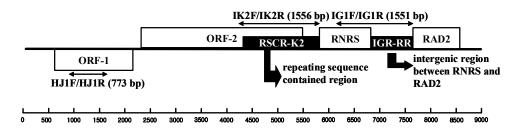


Fig. 1. Schematic illustration of the physical map of the K2 genomic region of the iridovirus IVS-1 isolate. The K2 genomic region of the iridovirus IVS-1 isolate is shown as a thick gray box. The position of the ORF-1, RSCR-K2, RNRS and RAD2 region is shown as a white box and RSCR-K2, IGR-RR is shown as a black box.



6. Cloning

PCR products는 GeneAll® ExpinTM Gel SV (GeneAll Biotechnology, Korea)를 사용하여 정제하였고, 정제된 DNA는 pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, USA)를 사용하여 ligation을 시킨 후, competent cell (*E. coli* DH5α-T1) 100μℓ를 첨가하여 얼음에서 20분간 반응시키고, 42℃에서 40초간 heat-shock 시켰다. 바로 얼음에 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℃, 90분간 진탕 배양시켰다.

배양액을 X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside, Sigma, USA) 40 μg/ml과 Ampicillin 50 μg/ml가 첨가된 LB (Luria-Bertani, Difco, USA) 평판배지에 도말하여, 37℃에서 24 시간 동안 배양시켰다. 파란색과 흰색의 집락이 증식하는 것을 확인하고 흰색으로 나타나는 집락을 선택하여 Ampicillin 50 μg/ml가 첨가된 LB broth에 접종 후, 37℃에서 24시간 배양하여, GeneAll® Plasmid SV Mini kit (GeneAll Biotechnology, Korea)를 이용하여 plasmid를 분리하였다.

7. 염기 서열 분석

분리된 plasmid로부터 Big Dye Terminator Cycle DNA Sequencing Kit

(ABI PRISM PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 삽입된 염기서열을 밝혔다. MCP gene, ATPase gene, ORF-1과 RSCR-K2 부위, IGR-RR 부위에 대한 각 iridovirus의 염기서열은 MACAW program (Version 2.0.5., National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 사용하여 비교하였다.

8. 교차 감염을 통한 PCR amplicon 분석

Rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) (b.w. 4.0±1.0 g), Pearl gourami (*Trichogaster leeri*) (b.w. 3.5±1.0g) 각각 10마리씩을 대상으로 iridovirus IVS-1과 multi, single의 band pattern을 보이는 PGIV-K1 감염 비장 조직 100 μg/fish의 농도로 복강 주사하였다. 모든 공격 실험에서의 감염어가 폐사한 직후, 폐사어의 어체중 (g)을 측정하고 곧바로 개복하여 비장을 적출한 다음 미량저울을 이용하여 비장무게 (mg)를 측정하였다. Spleen index는 아래의 식과 같이 비장 무게 (g)를 어체중 (g)으로 나눈 후 1000을 곱해주어 비장 무게를 mg 단위로 환산하여 산출하였다.

Spleen index =
$$\frac{\text{spleen weight (g)}}{\text{body weight (g)}} \times 1000$$

9. Real-time PCR

9. 1. Primers

Real-time PCR을 위한 primer sets는 MCP (Oshima, 1996) 부위에서 IVS-1과 PGIV-K1의 conserved region으로부터 제작하였으며 (Table 3), conventional PCR을 이용한 뚜렷한 양성 반응을 통해 디자인된 primer의 특이성을 확인하였다.



Genomic region	Primers Oligonucleotide sequence (5' to 3' direction)	Expected size of Reference amplicons*
MCP	RM6F GAAGTGGATGCGCACCTC	100.1
	RM6R CAAGATGATTGGCATGCG	163 bp In this study

^{*}based on the nucleotide sequence of IVS-1 isolate.

9. 2. Standard curve

Iridovirus IVS-1 isolate의 genomic DNA를 template로 RM6F/RM6R primer sets (Table 3)를 사용하여 PCR을 실시하였고, 생 product를 GeneAll[®] Expin Gel PCR SV kit(GeneAll Biotechnology, Korea)로 agarose gel로부터 분리·정제하였다. 정제된 DNA를 pGEM-T Easy vector (Promega, USA)에 ligation 하여 E. coli DH5a 균주에 cloning시켰다. Plasmid DNA는 GeneAll® Plasmid SV Mini kit (GeneAll Biotechnology, Korea)로 분리하였고, real-time PCR 을 위한 standard로서 사용하였다. Plasmid DNA의 copy 수를 정량하기 위하여 Quant-iTTM PicoGreen[®] dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 사용하였다. 그 과정은 양을 알고 있는 λ DNA를 단계 희석하여 100, 200, 300~1000 pg/μℓ에 이르기까지 10단계 의 sample을 만들었고, 이것을 standard로 사용하였다. Sample로는 앞서 분리한 plasmid DNA를 사용하였다. 단계 희석된 λ DNA의 값으로 직선 의 standard curve를 구한 다음, 이 standard curve에 sample인 plasmid DNA 양을 대입하여 정량하였다. Plasmid DNA의 분자량 (pg/μ) 과 plasmid DNA의 길이 (bp)를 곱하여 총 분자량을 구한 후, 각 염기쌍의 평균 무게 (660 Dalton)로 나누어 plasmid DNA의 mole 수를 산출하였 다. 구한 mole 수에 아보가드로 상수 (약 6.02 × 10²³)를 취하여 sample 인 plasmid DNA 1 μ 당 copy 수를 계산하였다. 이렇게 계산된 plasmid DNA를 $10^1 \sim 10^6 \text{ copy}/\mu$ 로 1/10씩 6단계로 희석하여 real-time PCR 시 standard curve를 구하는데 사용하였다. plasmid DNA는 실험할 때마다 새로 희석하여 사용하였다.

9. 3. Real-time PCR을 이용한 iridovirus의 정량

Iridovirus DNA의 정량을 위해 Rotor-GeneTM 6000 (Corbett Research, AUS)을 사용하였다. 0.2 ㎡ microtube에 증류수와 SensiMix*Plus* SYBR (Quantace, USA) 10 億, 1 μ M의 각각의 primer, template DNA로서 plasmid DNA 또는 추출된 viral nucleic acids를 참가한 후, PCR 혼합물의 최종 volume이 20 億가 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



Ⅲ. 결 과

1. 관상어와 해산어에서 분리한 iridovirus의 반복 서열 분석

1. 1. PCR amplification 결과

1. 1. 1. 담수 관상어에서 분리한 iridovirus의 반복 서열

본 실험에서 사용한 freshwater ornamental fish iridovirus의 염기서열 비교, 분석을 위해 conventional PCR을 실시하였다. 각각 다른 batch의 pearl gourami Trichogaster leeri, dwarf gourami Colisa lalia, silver gourami Trichogaster microlepis, blue gourami Trichogaster trichopterus sumatranus의 비장으로부터 분리한 DNA를 template로 IK2F/IK2R primer sets를 사용하여 PCR을 실시하였다. PCR amplification을 실시했을 때, RSCR-K2 region에서 amplicon의 major band가 하나 이상의 multi amplicons로 나타난 batch도 있었고 amplicon 의 major band가 하나인 single amplicon으로 나타난 batch도 있었다 (Fig. 2). Fig. 2의 (A), 1~8 sample들은 iridovirus에 자연 감염된 담수 관상어로 모두 다른 그룹들로 그룹간 비교했을 때 같은 amplicon size 나온 band들이 존재했으며, 서로 다른 그룹인 1, 2 그룹 내의 개체를 비

교한 결과 그룹 내에서도 그룹간과 같이 multi major band (MMB)가 나타나 그룹 간에서만 해당되는 현상이 아닌 것으로 나타났다 (Fig. 2(C, D)). (C), (D)에서 density가 낮게 나타난 600bp 정도의 band들은 비특이적인 band 였다. 그리고 가장 다양한 amplicon size를 가지는 (A)의 1번 sample은 다른 sample들의 amplicon size를 포함하고 있었다 (Fig. 2). sample 1~7은 모두 multi major band (MMB)로 나타났으며 sample 8은 single major band (SMB)로 나타났다. sample 8의 그룹 내 개체들을 분석한 결과 도무 SMB로 나타났다 (Fig. 2(E, F)). Lane 1은 가장 다양한 길이의 band pattern이 나타났으며 sequencing 결과 길이는 1504bp, 1357bp, 1201bp, 1018bp, 862bp로 나타났다(Fig. 2(A)). 각각의 길이를 비교 분석한 결과 repeating sequence의 addition/deletion에 따라 길이 차이를 보였다. 1504bp의 길이는 가장 많은 repeating sequence를 포함하고 있었으며 862bp는 repeating sequence가 가장 많이 deletion 된 현상을 보였다.

RSCR-K2 부위를 제외한 다른 부위에서도 band pattern이 다양하게 나타나는지 알아보기 위해 ATPase region, *Pst* I region, ORF-1 region, MCP gene 부분의 PCR을 실시하였다. 그 결과 (A)부터 (D)까지 각각 572bp, 908bp, 563bp, 959bp로 single major band가 뚜렷하게 나타났다 (Fig. 3).

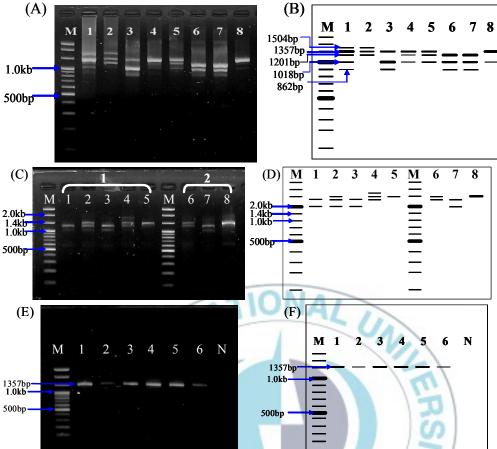


Fig. 2. Detection of iridovirus from ornamental fish by PCR amplification with IK2F/IK2R primers. Gel electrophoresis (A), (C), (E) and its diagram of band pattern (B), (D), (F) are showing variable length of amplicons produced in PCR specific to RSCR-K2 region. (A) Inter variation appeared variable length of amplicons including multi major bands and single major band; (B) Lane 1~5 and 6~8 were individural number of lane 1 and 2 of (A), respectively; (C) Lane $1\sim6$ were individual number of lane 8 of (A) single length of amplicon was produced. All of (A) samples were different Lanel. pearl gourami(Singapore); 2. pearl gourami(Singapore); 3.pearl gourami(China); 4.pearl gourami(China); 5.silver gourami(Singapore); 6.blue gourami(Singapore); 7. blue gourami(Singapore); gourami(Singapore). All the sample were different batchs, respectively. (C) and (D) contained single length of amplicon was produced. All of (C) samples were same batch. Lane 1 to 7; pearl gourami(Singapore); N, negative control; M, 100 bp DNA ladder.

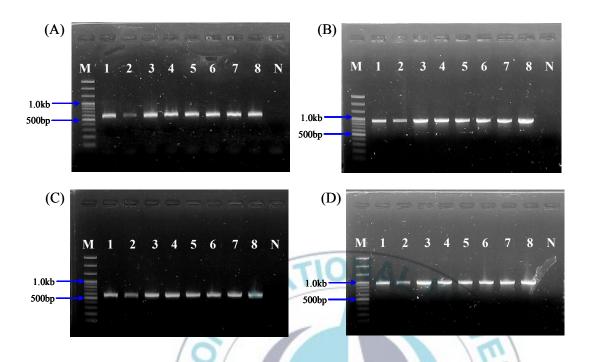


Fig. 3. Detection of iridovirus from ornamental fish by PCR amplication with other region. (A) ATPase gene; (B) *Pst* I region; (C) ORF-1 region; (D) MCP region. All the samples identical with (A) of Fig. 2. M, 100 bp DNA ladder.

1. 1. 2. 해산어에서 분리한 iridovirus의 반복 서열

앞서 실험한 바와 같이 freshwater ornamental fish에서 분리한 iridovirus의 RSCR-K2 부위를 PCR한 결과 amplicon이 다양한 길이의 multi major band (MMB)로 나타나는 것을 볼 수 있었다. 해산어에서 분리한 iridovirus에서도 위와 같이 RSCR-K2 부위에서 amplicon이 다양하게 나타나는지 알아보기 위해 똑같은 조건으로 PCR을 실시하였다. IK2F/IK2R primer를 사용하여 실시한 결과 모두 single major band (SMB)로 나타난 것이 확인되었다 (Fig. 4). RSCR-K2 부위를 제외한 다른 부위에서도 band pattern이 다양하게 나타나는지 알아보기 위해 ATPase region, Pst I region, ORF-1 region, MCP gene, 부분의 PCR을 실시하였다. 그 결과 모두 single major band로 뚜렷하게 나타났다.



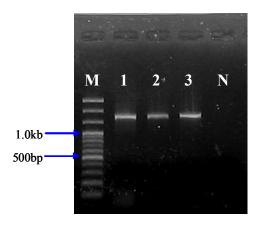


Fig. 4. Single major band was appeared in iridovirus obtained from naturally infected marine fish in RSCR-K2 region. M, 100 bp DNA ladder; N, negative control. All the samples were taken from different

batches.

2. 담수 관상어에서 분리한 iridovirus의 특정 부위에서 나타나는 반복 염기 서열의 다양성

2. 1. RSCR-K2 region

본 연구에서는 관상어에서 분리한 iridovirus의 그룹간 그리고 그룹 내 sequencing을 비교 분석하였다. 비교 분석에 사용한 부위는 RSCR-K2 부위로 Family Iridoviridae에서 repeating과 deletion이 많이 존재한다고 그룹간에는 다양한 어종의 관상어로부터 분리한 알려진 부위이다. iridovirus의 RSCR-K2 부위를 sequencing하여 비교하였다. (Fig. 5, 6) 결과 서로 다른 종에서 같은 길이의 amplicon size를 보이는 경우도 있 었고 다른 길이의 amplicon size를 보이는 경우도 있었다. 자연 감염된 담수 관상어에서 분리한 iridovirus의 RSCR-K2 부위 내 repeating sequence는 32, 17, 13 amino acids의 세 가지 unit로 나타났으며, 같은 국가에서 들어 온 sample이라도 repeating의 빈도 수에 차이가 있었다. sample 1을 기준으로 했을 때 repeating sequence가 더해지고 빠짐에 따 라 전체 base pair길이가 달라졌다(Fig. 5). 32, 17 amino acids로 구성된 repeating sequence는 0~200 amino acids 사이에서만 repeating과 deletion이 반복되었으며, 이 사이에서 32 amino acids는 모든 sample에 서 하나 이상 나타났다. 13 amino acids는 repeating sequence이긴 하지 만 모든 sample에서 나타났으며 repeating이 되는 위치 또한 변화가 없 었다. amplicon length의 pattern은 1504bp, 1357bp, 1201bp, 1045bp, 1018bp, 862bp로 6가지가 나타났으며 가장 많은 비중을 차지하는 amplicon size는 1018bp인 것으로 나타났다. 1018bp amplicon size는 mandarin fish에서 발견된 ISKNV와 같은 길이로 나타났다(Fig. 6). 그 룹 내에서 가장 다양한 band pattern을 보이는 fig. 2의 (A), lane 1의 amplicon을 이용하여 sequencing을 비교, 분석하였다. 1∼5 번이 이에 해당되는 sequence 결과이며 그림에서 repeating 부위가 빠진 빈 공간은 deletion 부위이다 (Fig. 5).





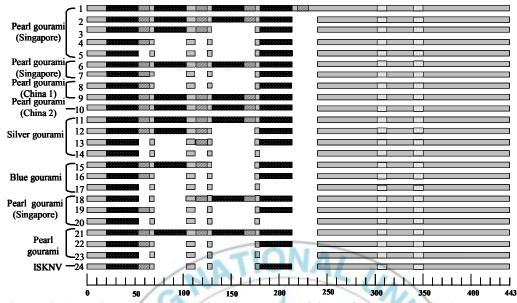


Fig. 5. Schematic presentation of sequence in RSCR-K2 region of freshwater ornamental fish iridovirus detected by IK2F/IK2R, variable length of RSCR-K2 region appeared in infection by a single iridovirus strain. The length of repeating regions that 32, 17, 13 amino acids respectively. Lane 1~ 5. 5 amplicons produced in PCR with the DNA template obtained from a single pearl gourami(Singapore) infected by iridoviruses; 6~7. 2 amplicons produced in PCR with the DNA template obtained from a single pearl gourami(Singapore) infected by iridoviruses; 8~9. 2 amplicons produced in PCR with the DNA template obtained from a single pearl gourami(China 1) infected by iridoviruses; 10. 1 amplicon produced in PCR with the DNA template obtained from a single pearl gourami(China 2) infected by iridoviruses; 11~14. 4 amplicons produced in PCR with the DNA template obtained from a single silver gourami(Singapore) infected by iridoviruses; 1 5~17. 3 amplicons produced in PCR with the DNA template obtained from a single blue gourami(Singapore) infected by iridoviruses; 18~20. 3 amplicons produced in PCR with the DNA template obtained from a single pearl gourami(Singapore) infected by iridoviruses; 21~23. 3 amplicons produced in PCR. with the DNA template obtained from single dwarf gourami(Singapore) infected by iridoviurses; 24. Sequence of RSCR-K2 region in ISKNV.

Table 4. Comparison of multi amplicons size inter and intra naturally infected ornamental fish

fish number	fish species	amplicon length of infected fish				total No.of	
number	_	1504bp	1357bp	1201bp	1018bp	862bp	amplicon
1	pearl gourami	+	+	+	+	+	5
2	pearl gourami	+	+	+	-	-	3
3	pearl gourami	=	+	-	+	+	3
4	pearl gourami	-	+	-	+	-	2
5	silver gourami	-	+	+	+	-	3
6	blue gourami	-	-	+	+	+	3
7	blue gourami	-	ATI	O _N	1 /+	+	3
8	pearl gourami	/	AAI	-	14/	1	2
total No.	of amplicon	2	5	6	7	4	8



2. 2. IGR-RR region

앞서 한 실험에서 자연 감염된 담수 관상어에서 분리한 iridovirus의 RSCR-K2 부위를 PCR한 결과 다양한 길이의 amplicon이 detection되는 것을 확인하였다. 본 실험에서는 Fig. 2의 sample들로 RSCR-K2 region 외에 intergenic region인 IGR-RR region을 조사하였다. IGR-RR region 은 RNRS region과 RAD2 사이에 있는 intergenic region으로 이 부위 역시 repeating 현상이 많이 일어난다고 알려져 있는 부위로 RSCR-K2 부위와 비교해 repeating 현상이 어떻게 달라지는지 조사해보기 위해 실 험을 하였다. IG1F/IG1R primer를 이용해 PCR한 결과 RSCR-K2 region과는 달리, 그룹간에는 amplicon의 길이가 달라 variation이 있는 것으로 나타났지만 그룹 내에서는 multi major band가 아닌 single major band로 나타나 variation이 없는 것으로 나타났다 (Fig. 6). Silver gourami의 intergenic region 길이는 447bp, pearl gourami (Singapore) 은 452bp, pearl gourami (China 1)는 451bp, pearl gourami (China 2)는 452bp로 나타났다. Repeating sequence 또한 RSCR-K2 부위의 길이와 비교했을 때 길이가 짧은 것으로 나타났다. 가장 짧은 repeating unit으 로는 ACAGGCCT와 GACGCG의 base pair로 구성된 unit으로 나타났다 (Fig. 7). 가장 긴 repeating unit으로는 silver gourami는 49bp, pearl gourami (Singapore) 44bp, pearl gourmi (China 1) 80bp, pearl gourami (China 2) 51bp로 나타났다 (Table 5).

자연 감염된 해산어에서 분리한 iridovirus의 IGR-RR region도 담수 관상어 iridovirus와 같은 양상을 보이는지 확인하기 위해 시험한 결과 해산어 iridovirus는 담수 관상어 iridovirus와 달리 그룹간에는 모두 같 은 길이의 amplicon으로 나타났으며 그룹 내에서는 담수 관상어 iridovirus와 같이 모두 single major band로 같은 결과를 보였다 (Fig. 8).



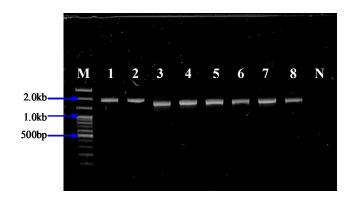


Fig. 6. Repeat sequence of IGR-RR region with iridovirus in naturally infected freshwater ornamental fish appeared single amplicon. Each sample in lane $1\sim8$ is corresponding to that of Fig. 2(A). M, 100 bp DNA ladder; N, negative control.

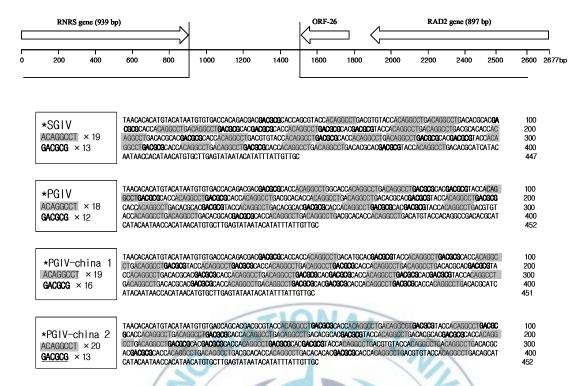


Fig. 7. Nucleotide sequence of the IGR-RR region in the genome of the naturally infected ornamental fish iridoviruses. Each samples (A), (B), (C), (D) are corresponding to those of lane 5, 1, 3, 4 of Fig. 6.

Table 5. Direct(>12bp) repeating sequences of the IGR-RR DNA region in the genome of naturally infected ornamental fish.

(A)

subsequence	Number of			Position in IRN region					
(5' to 3'in IRN region)	repeats	(nucleotides)	1	2	3	4	5	6	
GTACCACAGGCCTGACGCGCACCACAGGCCTGACAGGCCTG ACGCGCAC	2	49	239-287	293-341					
GACGCGCACCACAGGCCTGACAGGCCTGACGCGCACGACG CG	2	42	99-140	252-293					
ACAGGCCTGACACGCACGACGCCACACGGCCTGAC	2	38	82-119	199-236					
ACAGGCCTGACGCGCACCACAGGCCTGACAGGCCTGAC	3	38	244-281	298-335	325-362				
ACAGGCCTGACGCGCACGACGCGTACCACAGGCCTGAC	2	38	145-182	271-308					
GACGCGCACCACAGGCCTGACAGGCCTGACGCGCAC	2	36	99-134	306-341					
ACCACAGGCCTGACAGGCCTGACACGCACGACGCG	2	35	70-104	340-374					
ACCACAGGCCTGACGTGTACCACAGGCCTGAC	2	32	52-83	223-254					
GACGCGCACCACAGGCCTGACAGGCCTGAC	2	30	99-128	333-362					
CGCACGACGCGTACCACAGGCCTGACA	2	27	157-183	364-390					
CGCACGACGCGCACCACAGGCCTGAC	2	26	94-119	130-155					
CGCACGACGCGTACCACAGGCCTGAC	2	26	283-308	364-389					
ACCACAGGCCTGACAGGCCTGACGC	4	25	106-130	169-193	259-283	313-337			
GTACCACAGGCCTGACAGGCCTGAC	2	25	68-92	167-191	-				
ACCACAGGCCTGACAGGCCTGAC	6	23	70-92	106-128	169-191	259-281	313-335	340-3	
ACAGGCCTGACGCGCACGACGCG	2	23	118-140	145-167		10			
ACAGGCCTGACACGCACGACGCG	2	23	199-221	352-374	_	111			
GACGCGCACCACAGGCCTGAC	5	21	135-155	216-236	252-272	306-326	333-353		
ACCACAGGCCTGACGCGCAC	3	20	142-161	241-260	295-314	1	-1		
ACCACAGGCCTGACACGCA	2	19	196-214	376-394	100	1	1	\	
GCGTACCACAGGCCTGACG	2	19	48-66	291-309	The same	1	111	1	
GCGTACCACAGGCCTGAC	3	18	48-65	165-182	372-389	1	177	1	
GTACCACAGGCCTGACG	2	17	50-66	239-255			-		
GTACCACAGGCCTGACA	2	17	68-84	374-390			110		
ACAGGCCTGACGCGCAC	6	17	118-134	145-161	244-260	271-287	298-314	325-34	
ACAGGCCTGACACGCA	3	16	82-97	352-367	379-394	1		- 1	
CACCACAGGCCTGACA	5	16	105-120	195-210	258-273	312-327	339-354	/	
ACCACAGGCCTGACG	4	15	52-66	142-156	223-237	295-309		/	
ACCACAGGCCTGACA	9	15	70-84	106-120	169-183	196-210	223-236	259-2	
1	1		313-327	340-354	376-390	1	/		
CACCACAGGCCTGAC	3	15	141-155	195-209	222-236				
ACCACAGGCCTGAC	13	14	52-65	70-83	106-119	142-155	169-182	196-2	
			223-236	259-272	241-254	295-308	313-326	340-3	
			376-389						
ACGACGCGCACCA	4	13	35-47	97-109	133-145	214-226			
ACAGGCCTGACGC	4	13	145-157	181-193	244-256	298-310			

Silver gourami of lane 5 of Fig. 2(A)

subsequence	Number of	Length			Position	in IRN region		
(5' to 3'in IRN region)	repeats	(nucleotides)	1	2	3	4	5	6
CGCACGACGCGTACCACAGGCCTGACGCGCACCACAG GCCTGAC	2	44	82-125	172-215				
ACAGGCCTGACGCGCACGACGCGTACCACAGGCCTGAC G	2	39	70-108	259-297				
ACAGGCCTGACACGCACGCGTACCACAGGCCTGAC	2	38	160-197	205-242				
ACAGGCCTGACACGCACGACGCGCACCACAGGCCTGA C	2	38	232-269	313-350				
ACCACAGGCCTGACAGGCCTGACACGCACGACGCG	2	35	148-182	301-335				
ACCACAGGCCTGACGCGCACCACAGGCCTGACGC	2	34	94-127	112-145				
ACCACAGGCCTGACGCGCACCACAGGCCTGAC	2	32	112-143	184-215				
ACAGGCCTGACGCACACCACAGGCCTGACA	2	30	133-162	349-378				
GCACCACAGGCCTGACAGGCCTGACGC	2	27	56-82	335-361				
GACGCGCACCACAGGCCTGACGCGCAC	2	27	105-131	249-275				
CGCACGACGCGTACCACAGGCCTGACG	2	27	172-198	271-297				
CGCACGACGCGTACCACAGGCCTGAC	3	26	82-107	217-242	271-296			
ACCACAGGCCTGACACGCACGCG	2	26	202-227	229-254				
CACCACAGGCCTGACAGGCCTGAC	3	24	57-80	147-170	336-359			
ACCACAGGCCTGACAGGCCTGAC	3	23	58-80	301-323	337-359			
GACGCGCACACAGGCCTGACGC	2	23	123-145	249-271				
ACAGGCCTGACACGCACGACGCG	4	23	160-182	205-227	232-254	313-335		
CACCOCCACCACACCCCTCACA		22	105 216	220.251				
GACGCGCACCACAGGCCTGACA	2	22	195-216	330-351	220.240			
ACGACGCGCACCACAGGCCTG	3	21	35-55	247-267	328-348			
GACGCGCACCACAGGCCTGAC	5	21	105-125	123-143	195-215	249-269	330-350	
GTACCACAGGCCTGACACGCA	2	21	227-247	380-400		B		
ACCACAGGCCTGACGCGCAC	3	20	94-113	184-203	256-275	Un	1	
GACGCGCACCACAGGCCTG	4	19	37-55	105-123	123-141	195-213		
ACCACAGGCCTGACACGCA	2	19	202-220	382-400		1 9		\ _
TGTACCACAGGCCTGACA	2	18	298-315	379-396	The	1	-	1
GCACCACAGGCCTGACA	2	17	56-72	200-216	100		100	1
ACAGGCCTGACGCGCAC	4	17	70-86	97-113	115-131	187-203	18.	- 1
GTACCACAGGCCTGACA	2	17	227-243	299-315				1
GCACCACAGGCCTGAC	4	16	56-71	110-125	128-143	254-269	100	
CACCACAGGCCTGACA	5	16	57-72	147-162	201-216	363-378	336-351	7
GTACCACAGGCCTGAC	5	16	92-107	182-197	281-296	299-314	380-395	-
	-	-			-	_	/	-
ACCACAGGCCTGACGC	3	16	94-109	130-145	184-199	-		
ACAGGCCTGACACGCA	3	16	160-175	385-400	313-328	-/-	1	/
ACCACAGGCCTGACA	8	15	58-72	148-162	202-216	229-243	301-315	
15	0		337-351	364-378	382-396	3	/	
	1	200		- 4	68	32		
CACCACAGGCCTGAC	5	15	111-125	147-161	129-143	255-269	363-377	
ACCACAGGCCTGACG	4	15	112-126	130-144	256-270	283-297		
GCACCACAGGCCTG	2	14	42-55	56-69				
ACCACAGGCCTGAC	14	14	58-71	94-107	112-125	130-143	148-161	184-19
		. *	202-215	229-242	256-269	283-296	301-314	337-35
			364-377	382-395				
			304-3//	304-393				
CACCACAGGCCTG	3	13	43-55	147-159	363-375			
	7	13	70-82	97-109	116 127	122 146	107 100	259-27
ACAGGCCTGACGC	,	13	70-82	97-109	115-127	133-145	187-199	239-21

Pearl gourami(Singapore) of lane 1 of Fig. 2(A)

subsequence	Number of	Length			Position	Position in IRN region			
(5' to 3'in IRN region)	repeats	(nucleotides)	1	2	3	4	5	6	
ACAGGCCTGACACGCACGACGCGCACCACAGGCCTGAC AGGCCTGACGCGCACGACGCGCACCACAGGCCTGACG CGCAC	2	80	203-282	302-381					
GACGCGTACCACAGGCCTGACGCGCACCACAGGCCTG ACAGGCCTGACGC	2	51	67-117	112-162					
ACAGGCCTGACGCCACACAGGCCTGACAGGCCTGAC	3	38	77-114	122-159	149-186				
GACGCGCACCACAGGCCTGACAGGCCTGACGCGCAC	3	36	130-165	220-255	319-354				
ACCACAGGCCTGACAGGCCTGACACGCACGACGCG	2	35	164-198	290-324					
ACCACAGGCCTGACGCGCACCACAGGCCTGACA	3	33	74-106	119-151	362-394				
GACGCGCACCACAGGCCTGACAGGCCTGACGCG	3	33	85-117	220-252	319-351				
ACAGGCCTGACGCGCACCACAGGCCTGACA	2	30	149-178	365-394					
GACGCGCACCACAGGCCTGACAGGCCTGAC	3	30	157-186	220-249	319-348				
CGCACGACGCGTACCACAGGCCTGACA	2	27	188-214	278-304					
CGCACGACGCCACACAGGCCTGAC	4	26	215-240	251-276	314-339	350-375			
GCACGACGCGTACCACAGGCCTGAC	3	25	63-87	189-213	279-303				
ACCACAGGCCTGACAGGCCTGAC	4	23	92-114	137-159	290-312	326-348			
ACAGGCCTGACACGCACGACGCG	2	23	176-198	203-225					
ACAGGCCTGACGCGCACGACGCG	3	23	239-261	266-288	338-360				
GACGCGCACCACAGGCCTGACA	3	22	220-241	373-394	319-340				
GACGCGCACCACAGGCCTGAC	6	21	85-105	130-150	157-177	256-276	355-375	373-393	
GACGCGTACCACAGGCCTGAC	3	21	112-132	193-213	283-303				
ACCACAGGCCTGACGCGCAC	3	20	74-93	263-282	119-138	_			
ACCACAGGCCTGACACGCA	2	19	200-218	380-398	//	-			
ACAGGCCTGACGCGCAC	8	17	77-93	122-138	149-165	239-255	266-282	365-381	
/3			338-354	-		1/2	-1		
CACCACAGGCCTGACA	7	16	46-61	91-106	136-151	163-178	226-241	325-340	
/ 0 /	- 60	6	379-394			1	100		
ACAGGCCTGACACGCA	3	16	176-191	383-398	302-317	1	page	\	
CACCACAGGCCTGAC	3	15	46-60	262-276	361-375		200		
ACCACAGGCCTGACA	8	15	47-61	92-106	137-151	164-178	200-214	290-304	
×			326-340	380-394			2		
ACGACGCGCACCAC	5	14	35-48	218-231	254-267	317-330	353-366		
ACCACAGGCCTGAC	13	14	47-60	74-87	92-105	119-132	137-150	164-177	
			200-213	227-240	263-276	290-303	326-339	362-375	
/,	191	20	380-393	S. B.	N	-			
ACAGGCCTGACGCG	5	14	77-90	104-117	122-135	266-279	365-378		

Pearl gourami(China 1) of lane 3 of Fig. 2(A)

subsequence	Number of	Length			Position in	IRN region		
(5' to 3'in IRN region)	repeats	(nucleotides)	1	2	3	4	5	6
GACGCGTACCACAGGCCTGACGCGCACCACAGGCCTG ACAGGCCTGACGC	2	51	33-83	78-128				
ACAGGCCTGACACGCACGACGCGCACCACAGGCCTGA CAGGCCTGACGC	2	49	169-217	286-334				
ACAGGCCTGACGCGCACCACAGGCCTGACAGGCCTGAC	3	38	43-80	88-125	115-152			
GACGCGCACCACAGGCCTGACAGGCCTGACGCGCAC	2	36	96-131	186-221				
ACCACAGGCCTGACAGGCCTGACACGCACGACGCG	2	35	130-164	274-308				
GACGCGCACCACAGGCCTGACAGGCCTGACGCG	2	33	51-83	186-218				
ACCACAGGCCTGACGTGTACCACAGGCCTGACA	2	33	256-288	364-396				
GACGCGCACCACAGGCCTGACAGGCCTGACGC	3	32	51-82	96-127	303-334			
GACGCGCACCACAGGCCTGACAGGCCTGAC	3	30	123-152	186-215	303-332			
GCACGACGCGTACCACAGGCCTGACG	2	26	29-54	245-270				
CGCACGACGCGTACCACAGGCCTGAC	2	26	154-179	244-269				
CGCACGACGCGCACCACAGGCCTGAC	3	26	181-206	217-242	298-323			
GCACGACGCGTACCACAGGCCTGAC	2	25	29-53	155-179				
CACGACGCGCACCACAGGCCTGACG	2	25	219-243	354-378				
CACGACGCGCACCACAGGCCTGAC	3	24	183-206	354-377	300-323			
ACCACAGGCCTGACAGGCCTGAC	5	23	58-80	103-125	193-215	274-296	310-332	
ACAGGCCTGACACGCACGACGCG	2	23	142-164	169-191				
ACAGGCCTGACGCGCACGACGCG	2	23	205-227	232-254				
GACGCGTACCACAGGCCTGACG	2	22	78-99	249-270		-		
GACGCGCACCACAGGCCTGAC	5	21	51-71	96-116	123-143	222-242	357-377	
GACGCGTACCACAGGCCTGAC	2	21	78-98	159-179		111	10	
GTACCACAGGCCTGACACGCA	2	21	164-184	380-400		~	1	
ACCACAGGCCTGACGCGCAC	3	20	40-59	85-104	229-248	1	5	1
ACAGGCCTGACGCGCAC	5	17	43-59	88-104	115-131	164-180	205-221	232-248
GTACCACAGGCCTGACA	1	17	272-288				7	3
GTACCACAGGCCTGAC	5	16	38-53	83-98	254-269	272-287	380-395	3
CACCACAGGCCTGACA	6	16	57-72	102-117	129-144	192-207	309-324	336-351
ACAGGCCTGACACGCA	3	16	142-157	286-301	385-400	/	7	/
ACCACAGGCCTGACAC	3	16	166-181	337-352	382-397		7/	
ACCACAGGCCTGACG	05	15	40-54	85-99	229-243	256-270	364-378	
ACCACAGGCCTGACA	9	15	58-72	103-117	130-144	166-180	193-207	274-288
		-	310-324	337-351	382-396			
CACCACAGGCCTGAC	3	15	228-242	336-350	363-377			
ACCACAGGCCTGAC	14	14	40-53	58-71	103-116	130-143	193-206	310-323
			337-350	85-98	256-269	166-179	229-242	364-377
			274-287	382-395				
ACAGGCCTGACGCG	4	14	43-56	70-83	88-101	232-245		

Pearl gourami(China 2) of lane 4 of Fig. 2(A)

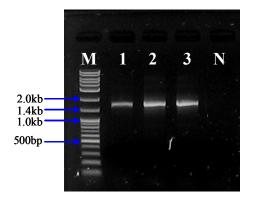


Fig. 8. Repeat sequence of IGR-RR region with iridovirus in naturally infected marine fish appeared single amplicon. Each sample in lane $1\sim3$ is corresponding to that of Fig. 4. M, 1.0 kb DNA ladder. N,



3. 서로 다른 종에 iridovirus를 감염시켰을 때 나타나는 repeating sequence의 특성

3. 1. 담수 관상어 pearl gourami에서 분리한 iridovirus의 rock bream 감염에 따른 반복 서열의 변화 분석

본 실험에서는 자연 감염된 담수 관상어의 spleen 조직을 공격 실험에 사용하였다. 자연 감염된 담수 관상어 중에서 가장 다양한 multi major band를 나타내는 Fig. 2 (A) 1번 sample과 single amplicon pattern을 나타내는 (E)의 1번 sample을 공격 실험에 사용하였다. Rock bream과 pearl gourami에 각각 challenge하여 band pattern을 보았다 (Fig. 9). 그 결과 multi major band를 공격하였을 때 rock bream과 pearl gourami 모두에서 multi major band가 나타났으며, single major band를 나타내 는 virus를 공격하였을 때에도 band pattern 현상이 그대로 유지되었다. A, B, C, D 그룹의 폐사율은 모두 100%로 나타났다. 폐사율이 100%로 나타난 rock bream과 pearl gourami의 band pattern은 모두 공격한 sample인 original과 같은 pattern으로 나왔다 (Fig. 9). 본 실험에서는 passage를 거쳐도 multi major band pattern 현상이 유지되는지 알아보 기 위해 rock bream에 passage를 거친 공격 실험을 통해 확인하였다. 하나의 그룹에서 band pattern이 각각 다르게 나온 두 sample을 rock bream에 공격한 결과 개체 내 3마리 모두 공격한 sample과 같은 band pattern을 보였으며 폐사율은 100%였다 (Fig. 10-1). 다른 그룹의 sample도 이와 같은 결과를 보이는지 rock bream에서 재실험을 하였다. 가장 다양한 길이의 band pattern을 보이는 2번 sample을 두 번째 passage 공격 실험에 사용, 두 번째 passage의 4번 sample을 세 번째 passage에 사용하여, 총 세 번의 passage를 거친 공격 실험을 하였다. 그 결과 첫 번째 passage에서는 band pattern이 다양하게 나타났으나 두 번째, 세 번째 passage에서는 band pattern 현상이 그대로 유지 되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 10-2). 첫 번째 passage에서의 폐사율은 60%로 나타났으며, 두 번째와 세 번째 passage의 폐사율은 모두 100%로 나타났다.





Fig. 9. Pattern of RSCR-K2 region variation after in vivo passage in rock bream and pearl gourami. Lane 1, 2; PGIVs obtained from pearl gourami in natural condition as shown in the lanes 1 of Fig. 2(A), and 1 of Fig. 2(C). (A) and (B); PGIV DNA obtained from rock bream and pearl gourami respectively after challenging with PGIV of lane 1. (C) and (D); PGIV DNA obtained from rock bream and pearl gourami respectively after challenging with PGIV of lane 2. M, 100 bp DNA ladder.

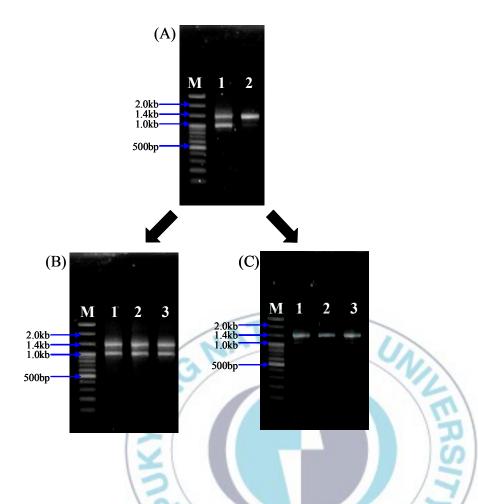


Fig. 10–1. Band pattern of passaged samples in rock bream. (A); PGIVs obtained from pearl gourami in natural condition in single batch. (B); Lane 1 of (A) challenged in vivo first passage in rock bream. (C); Lane 2 of (A) challenged in vivo first passage in rock bream. M, 100 bp DNA ladder.

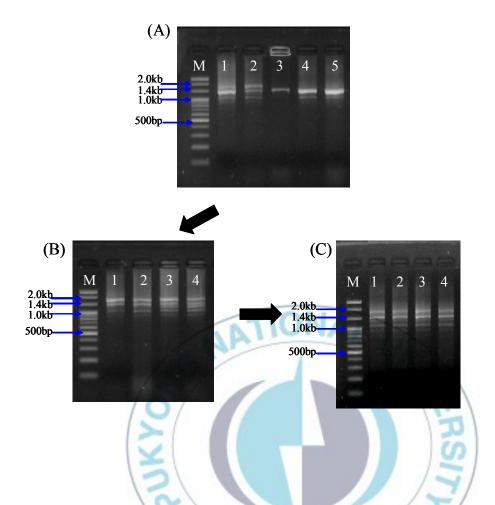


Fig. 10-2. Band pattern of passaged samples in rock bream. (A) is first passaged sample, (B) is second passaged sample and (C) is third passaged sample. Lane 1 of (A), (B) and (C) is challenging sample used passage and number is individual number. M, 100 bp DNA ladder.

3. 2. 해산어인 rock bream에서 분리한 iridovirus의 pearl gourami 감염에 따른 반복 서열의 변화 분석

앞선 실험에서 담수 관상어에 감염된 iridovirus를 각각 해산어인 rock bream과 pearl gourami에 감염시켰을 때 다양한 길이의 amplicon을 확인하였다. 본 실험에서는 해산어에 자연 감염된 iridovirus (IVS-1)를 rock bream과 pearl gourami에 공격하였을 때에도 다양한 길이의 amplicon이 나타나는지 확인해 보았다. 앞서 한 실험과 같이 RSCR-K2 부위를 detection한 결과 해산어에서는 담수 관상어 iridovirus와는 다르게 일정한 길이의 single amplicon을 유지하였다 (Fig. 11).





Fig. 11. Amplicon of single length appeared in IVS. Lane 1, 2 IVS obtained from rock bream in natural condition and used challenge experiment. (A), IVS obtained from rock bream was used to challenge experiment to rock bream. (B), IVS obtained from rock bream was used to challenge experiment to pearl gourami. M, 100 bp DNA ladder.

Table 6. Nucleoeide length and band number of cross infected rock bream and pearl gourami (refered to Fig. 10-2, 11-1).

fish species	amplicon type of appeared by type		passage	mortality	variation of amplicon
	challenged iridovirus	in dead fish			individual dead fis
	PGIV multi	multi	original	40%	variable
			1st passage	60%	same with origina
rock bream			2nd passage	100%	same with origina
(Oplegnathus fasciatus)			3rd passage	100%	same with origina
	PGIV single 1	single	1st passage	100%	same with origina
	PGIV single 2	single	1st passage	100%	same with origina
	PGIV single 3	single	1st passage	100%	same with origina
	IVS-1	single	1st passage	100%	same with origina
	PGIV multi	multi	original	40%	variable
pearl gourami	N X		1st passage	100%	same with origina
P 80	13				
(Trichogaster leeri)	101				7
	PGIV single 1	single	1st passage	100%	same with origina
	PGIV single 2	single	1st passage	100%	same with origina
	PGIV single 3	single	1st passage	100%	same with origina
	IVS-1	single	1st passage	100%	same with origina
lulti single i	1. single 2.	single 3	showed	amplicons	of (1504)

Multi, single 1, single 2, single 3 showed amplicons of (1504bp, 1357bp, 1201bp, 1018bp, 862bp), (1357bp), (1201bp), (1018bp) respectively.



Fig. 11–1. Amplicon of single major band appeared in PGIVs. Lane 1, 4, 7 of PGIVs obtained from pearl gourami in natural condition and used challenge experiment. Lane 2, 3, 5, 6, 8, 9 are challenged individual dead fish of single 1, single 2, single 3 respectively. M, 100 bp DNA ladder.

4. Iridovirus의 병원성과 repeating sequence의 다양성 사이의 관계

4. 1. Repeating sequence의 다양성과 폐사율 사이의 관계

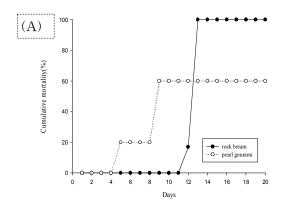
앞서 실험한 바와 같이 IVS-1과 PGIV의 공격 실험을 통해 교차 감염에서의 rock bream과 pearl gourami의 폐사율을 비교하였고, PGIV 공격실험 내에서 multi band와 single band와의 병원성 차이를 확인하기 위해 폐사율을 비교하였다. 그 결과, IVS에서는 rock bream이 pearl gourami보다 훨씬 높은 폐사율을 보였으며, PGIV에서는 multi band pattern이 single band pattern보다 높은 폐사율을 보였다. IVS-1의 공격실험 결과 rock bream 100%, pearl gourami 60%의 누적 폐사율을 보였다. PGIV multi band는 rock bream과 pearl gourami 모두에서 100%의 누적 폐사율을 보였으며 PGIV single band는 rock bream에서 70%, pearl gourami에서 89%의 폐사율을 보였다 (Fig. 12).

IVS-1을 rock bream에 감염시켰을 때 에는 12일째부터 폐사가 일어나기 시작하여 감염 후 13일째 100% 폐사하였고, pearl gourami에 감염시켰을 때에는 5일째부터 16일째까지 60%의 누적 폐사율을 나타내었다 (Fig. 12A).

PGIV multi amplicon을 rock bream에 감염시켰을 때에는 8일째부터 폐사가 일어나기 시작하여 13일째 100% 폐사하였고, pearl gourami에 감염시켰을 때에는 4일째부터 폐사가 일어나 5일째 100% 폐사하였다. PGIV single amplicon을 rock bream에 감염시켰을 때에는 10일째부터

폐사가 일어나 21일째 70% 폐사하였고, pearl gourami에 감염시켰을 때에는 4일째부터 폐사가 일어나 5일째 89%의 누적 폐사율을 나타내었다 (Fig. 12B,C). 돌돔에서 분리한 iridovirus의 amplicon band pattern은 각 sample 모두 처음 주사한 sample과 일정하게 나타나는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 13).





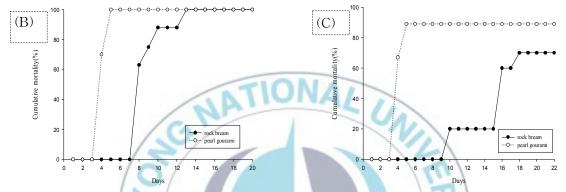


Fig. 12. Cumulative mortality (%) of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) and pearl gourami (*Trichogaster leeri*) challenged with iridovirus IVS-1 or PGIV, respectively. (A). IVS-1, (B). PGIV multi type and (C). PGIV single type challenged.

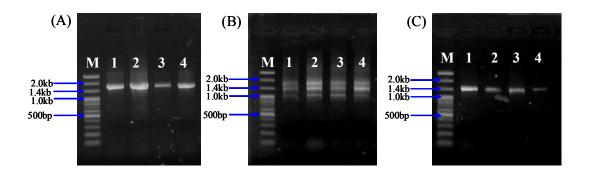


Fig. 13. Each sample in (A), (B), (C) are corresponding to that of (A), (B), (C) of Fig. 12, respectively. Lane 1 of (A), (B), (C) used challenge experiment and $2\sim4$ samples are individual dead fish.



4. 2. Iridovirus 정량을 위한 standard curve 제작

Iridovirus gene이 포함되어 있는 plasmid DNA를 1.5×10^8 copies/ μ l 부터 1.5×10^4 copies/ μ l에 이르기까지 1/10씩 5단계로 희석하여 real-time PCR을 실시하여 Fig. 13과 같은 standard curve를 구하였다. 그 결과, 각 plasmid DNA의 copy 수와 threshold cycle (C_T) 값 사이에는 좋은 상관관계를 보였으며 ($r^2=0.99$), standard curve의 기울기도 -2.938로 확인되었다 (Fig. 13). negative control은 product를 생성하지 않았다. 이에 이것을 iridovirus 정량 분석을 위한 standard curve로 사용하였다 (Fig. 14).



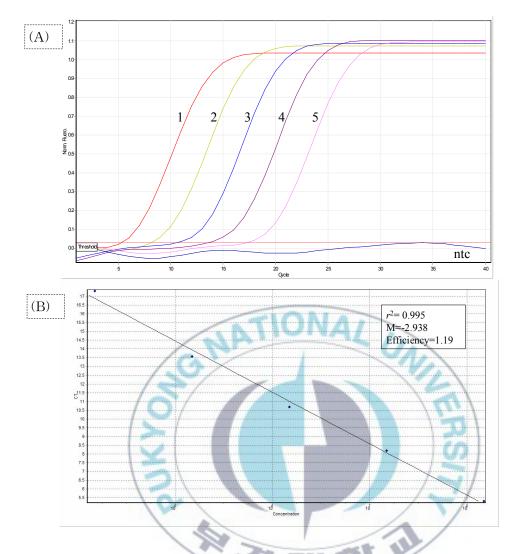
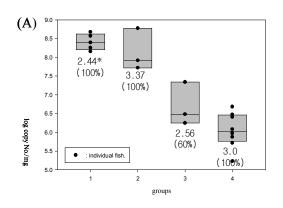


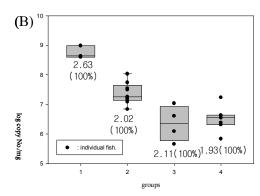
Fig. 14. (A) Amplification plot of real-time PCR of the positive plasmid DNA with different copy number. Lane 1–5, with serially-diluted plasmid DNA prepared from 1.5×10^8 to 1.5×10^4 copies/ $\mu\ell$; ntc, no template control. (B) Standard curve showing a linear relationship between positive plasmid concentration and cycle threshold number.

4. 3. Repeating sequence의 다양성과 viral copy 수 사이의 관계

multi band pattern과 single band pattern의 감염 실험 결과 가장 높은 폐사율을 나타낸 juvenile rock bream을 대상으로 감염어의 조직별 실제 viral copy 수를 정량하고자 하였다. IVS-1을 감염시킨 moribund 상태의 rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) (b.w. 11.0±3.0 g) 개체 3마리의 비장 조직 1 mg으로부터 AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (K-3032, Bioneer)를 이용, viral DNA를 분리하였고, PCR amplification을 실시하여 양성반응을 확인하였다. 양성반응을 확인한 viral NA에 대하여 real-time PCR을 실시하여 viral copy 수를 구하였다. 그 결과 multi major band가 single major band에 비해 평균 viral copy 수가 10배정도 높았다 (Fig. 15).

MMB와 SMB의 viral copy 수와 폐사율 관계를 봤을 때 폐사율이 높다고 해서 viral copy수가 높은 것은 아니었다. 따라서 폐사율과 viral copy수는 크게 상관관계가 없는 것으로 나타났다 (Table 7).





- * : Spleen index of challenged fish with PGIVs.
- (): Mortality of challenged fish with PGIVs.

Fig. 15. Comparison of viral copy numbers with PGIVs for different batchs in rock bream. (A), multi amplicons appeared each other groups; (B), single amplicons appeared each other groups.

Table 7. Relation of between viral copy number and mortality

	fish	type	No.of fish	Copy No./µl	spleen index	Cumulative mortality	average of copy No		
group 1	rock bream	multi	1	6.48E+00	2.62	60%	6.91E+00		
group1	TOCK DICAIII	mun	2	7.34E+00	3.53	0078	0.91E+00		
group2 rock bream	multi	1	8.78E+00	5.02	100%	8.25E+00			
group2	group2 rock bream	mun	2	7.72E+00	2.3	10076	8.23E+00		
			1	8.16E+00	1.51				
			2	8.40E+00	1.42				
group3	rock bream	multi	3	8.57E+00	1.3	100%	8.41E+00		
			4	8.68E+00	4.46				
			5	8.26E+00	3.5				
			1	5.22E+00	4.00				
			2	6.41E+00	4.50				
			3	5.88E+00	2.70				
group4	rock bream	multi	4	5.72E+00	2.50	100%	6.00E+00		
			5	5.98E+00	2.50				
			6	6.68E+00	3.20	8 4			
			7	6.08E+00	3.60	1/1			
			1	8.99E+00	4.26	1000/	0.015.00		
group1	roup1 rock bream	am single	2	8.64E+00	2.10	100%	8.81E+00		
	/-	1	8.04E+00	2.74					
		10	2	7.55E+00	1.62	1.	1		
		10	3	7.50E+00	1.10		11.		
group2	rock bream	single	4	7.19E+00	3.55	100%	5.66E+00		
		1	5	7.74E+00	1.94		CO		
		-	6	6.85E+00	1.32		2		
		10	7	7.21E+00	1.96		7		
		10	1	6.61E+00	1.07				
		10	2	7.04E+00	2.86				
		1	3	4.70E+00	1.28	1	/		
group3	rock bream	single	4	4.66E+00	0.92	100%	5.66E+00		
			5	5.67E+00	3.62	0: "			
			6	4.87E+00	1.79				
			7	6.10E+00	3.23				
			1	6.61E+00	2.6				
			2	7.04E+00	1.3				
			3	4.70E+00	1.5				
group4	rock bream	single	4	4.66E+00	1.3	100%	5.66E+00		
*		-	5	5.67E+00	1.6				
			6	4.87E+00	2.6				
			7	6.10E+00	2.6				

Ⅳ. 고 찰

현재 담수 관상어에서 ISKNV-like virus가 분리된 이후 담수 관상어에 대한 iridovirus 감염증에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 담수어 의 iridoviruses는 해산어의 경우와 마찬가지로 많은 관상어에 피해를 주 는 것으로 알려져 있고 이것은 관상어 iridovirus 연구에 있어서 주요한 strain으로 사료된다. (Sudthongkong et al., 2001, He et al., Paperna et al., 2002). 또한 이러한 담수 관상어의 수입이 증가함에 따라 담수어와 해산어 사이의 교차 감염에 대한 위험성도 증가하고 있다. 현재 다양한 종류의 iridovirus가 발견되고 있고, 담수 관상어 iridovirus에 대한 위험 성도 증가하고 있지만 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 또한 iridovirus의 single strain이 새로운 형태 또는 type으로 진화 발전해 나 가는 것을 구명하고자 하는 유전적 연구는 전혀 되어 있지 않고 동일한 iridovirus가 여러 다른 host에서 어떠한 특징을 가지고 replication하고 있으며 어떻게 새로운 type으로 변화해 나갈 수 있는지에 대한 연구 또 한 전혀 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구는 환경 또는 종간의 차 이가 큰 열대 담수어에서 분리한 iridovirus는 해산어 iridovirus에 비해 더 높은 유전적 variation이 있을 것이라는 추정 하에 담수 관상어 iridovirus의 유전적 특징을 밝힌 데에 의미가 있다고 할 수 있다.

본 연구에서는 부산의 관상어 도매상에서 폐사가 일어난 담수 관상어를 분석하여 ISKNV-like virus에 감염된 것을 확인하였다. 그리고 감염된 관상어들의 PCR amplicon band pattern과 염기서열을 분석하였다. 그리 고 공격 실험을 통해 이러한 다양한 band pattern들이 유지되는지 확인 하였고 real time PCR을 통해 ISKNV-like virus의 양적 비교를 분석하였다.

먼저 자연 감염된 관상어에서 분리한 iridovirus의 DNA로 RSCR-K2 부위를 detection하는 primer를 이용해 PCR하여 진단하고 전기영동으로 확인한 결과 amplicon의 길이가 하나가 아닌 다양한 길이로 나타난 것을 확인할 수 있었다. 그리고 이런 현상들이 다른 여러 batch에서도 확인되 었다. amplicon의 major band가 한 개 이상으로 나타나는 multi major band (MMB)의 그룹도 있었지만 한 그룹 내에서 각각의 개체가 모두 한 개의 major band를 나타내는 single major band(SMB)를 가지는 경 우도 있었다 (Fig. 2). 국가별로 비교했을 때 visible band 수는 싱가폴산 의 경우 5개, 중국산의 경우는 3개로 싱가폴산이 중국산에 비해 variation이 많았으며, 같은 중국산의 경우라도 major band의 density 차 이가 있었다. 어종별로 비교했을 때 amplicon band 길이 상에는 차이가 있었으나 모두 가장 다양한 amplicon을 나타내는 lane 1에 포함되었다 (Fig. 2). 자연감염된 관상어에서 분리한 iridovirius를 모두 sequencing 한 결과 1,504bp, 1,357bp, 1,201bp, 1,018bp, 862bp의 sequence를 확인할 수 있었으며 모두 ISKNV-like iridovirus임이 확인되었다. 자연 감염된 관 상어에서 분리한 iridovirus의 repeating sequence는 모두 세 가지로 나 타났으며 32, 17, 13 amino acids가 확인되었다. 이 중 Fig. 5의 1번 sample인 pearl gourami (Sinagapore)에서 분리한 DNA에서 나타나는 repeating sequence는 다른 sample들의 repeating sequence와 비교했을 때 17 amino acids가 더 포함되어 있었다. sample 1에서 하나의 17 amino acids가 더 포함된 sequence의 앞쪽으로는 7 amino acids, 뒤쪽 으로는 25개의 amino acids가 더 추가되어 있었으며 이 amino acids는

다른 sample에서도 나타났지만 repeating sequence는 아니었다 (Fig. 5). 가장 길이가 긴 sample이 repeating sequence를 더 많이 가지고 있었으 며, 따라서 amplicon의 길이가 더 길어질수록 더 많은 repeating sequence를 가질 것으로 생각된다. IVS-1에서도 repeating sequence가 발견되긴 하지만 repeating unit과 빈도가 ISKNV, PGIV와 많이 달랐다. 다른 연구에서 repeating sequence의 길이가 많이 보고 되었는데 ranavirus에 속하는 GIV의 repeating sequence는 1,533bp로 지금까지 보 고된 iridoviridae repeating sequence 중에서 가장 긴 길이로 판명되었 다. GIV의 repeating sequence는 ranavirus에서 보다 recombination과 genomic rearrangement를 일으킨다는 보고가 있다 (Tsai et al., 2004). LCDV-C에서는 repeating sequence가 66bp로 구성 되어 있고 6개의 nucleotide가 처음 7번의 반복내에서 변화가 일어난다 는 보고가 있다. 이와 비교했을 때 본 실험의 repeating sequence는 염 기서열 상에서의 변화는 없었다. 다른 virus에서의 repeatinge sequence 길이는 CIV는 16bp, ISKNV 496bp의 길이로 존재하는 것으로 알려졌으 며 기능이나 특징은 밝혀져 있지 않다(Tsai et al., 2004).

amplicons의 길이가 짧아짐에 따라 repeating sequence의 deletion 현상이 자주 보였으며 가장 긴 길이의 amplicon은 repeating sequence가 가장 많이 addition 된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 repeating sequence가 RSCR-K2 부위만 일어나는 현상인지 확인하기 위해 다른 부위를 detection하는 primer를 사용하여 MCP, *Pst* I, ATPase, ORF-1 부위를 PCR한 결과 모두 single major band로 나타났다 (Fig. 3).

본 연구에서는 RNRS와 RAD2 사이에 위치하는 intergenic region (IGR-RR)의 repeating sequence에 대해서도 분석하였다. 이 부위 또한

RSCR-K2 부위와 같이 repeating sequence가 많이 존재한다고 알려진 부위이다. 가장 길이가 긴 repeating sequence의 unit를 비교한 결과 silver gourami는 49bp, pearl gourami (Singapore)는 44bp, pearl gourami (China 1)는 80bp, pearl gourami (China 2)는 51bp로 나타났다 (Table. 5) 가장 짧은 repeating sequence unit를 비교한 결과 4개의 sample 모두 같은 sequence를 가진 unit을 보였으며 그 길이는 8bp, 6bp 로 나타났다. 다른 iridovirus strain 에서도 IGR-RR region의 repeating sequence가 존재하였으며 가장 긴 repeating sequence의 길이는 ISKNV 59bp, Lymphocystis virus 53bp, RSIV 61bp, IVS-1 80bp, RBIV 48bp, CH-1 93bp 였다 (data not shown). 다른 연구에서 intergenic region의 다양하게 나타나는 이유로 대부분의 이런 repeating sequence? repeating sequence는 짧고 불완전한 palindromes를 가지고 있으며, sequence의 길이가 다양한 hairpin을 형성하기 때문이라고 보고하고 있 다 (Tsai et al., 2004). 본 연구에서 IGR-RR region의 그룹 내 amplicon 은 SMB로 나타났으며, 그룹간에도 amplicon의 길이 차이는 있지만 모 두 SMB로 나타났다. 따라서 repeating sequnece가 multi amplicons로 나타나는 현상은 RSCR-K2 region만의 특성으로 여겨진다.

이런 repeating sequence가 나타나는 원인에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없지만 어떤 환경적 변화에 의한 virus의 regulation 기작으로 나타나는 것이라고 추측된다. 사람에 대해 실험한 다른 연구에서는 repeating sequence가 인간 피부에 virulence를 일으키는 데 유리하게 작용한다는 보고가 있다(Moffat *et al.*, 1998). Epstein-Barr virus (EBV) 그리고 Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) 같은 gammaherpesvirus에서는 repeating sequence가 latency amplification과

viral gene expression의 조절에 관여한다는 보고가 있다(Thakur *et al.*, 2007).

지금까지 연구되어진 iridovirus의 특성을 분석하여 보면, 유전자의 끝 부분 근처에 많은 repeating sequence를 가지고 있으며 이러한 sequence 는 virus의 genomic DNA variation 형성에서 가장 먼저 target이 되는 부분으로 알려져 있다 (Schnitzler et al., 1987; Fisher et al., 1988; Bugert et al., 1993). 게다가 Bahr 등(1999) 등의 연구에 의하면 Herpesvirus를 포함한 많은 double stranded DNA virus의 genome에서 특이적인 현상은 DNA polymerase gene 근처에 많은 유전자가 cluster 형태로 존재한다고 밝혔다. 이러한 보고들은 iridovirus의 genome에서 DNA polymerase gene의 proximal region 근처에 virus의 structural 유 전자들과 terminal region들이 존재할 수 있으며, 결과 이 부위는 nucleotide variation과 함께 structural 또는 nonstructural 부위에 있는 nonessential region들이나 repeating sequence들의 addition 또는 deletion이 많이 나타날 것으로 추정된다. 어류 virus에 있어서의 repeating sequence에 대한 보고는 herpesvirus에 속하는 Channel catfish virus (Rovin et al), iridovirus에 속하는 LCDV-1 (Samalecos et al., 1986), CIV (Fischer et al., 1988), RSIV (Walker et al.,1980), ISKNV (He et al., 2001)가 보고되었으며 LCDV-C genome내에서 가장 넓고 집중된 repeating sequence가 보고되었다(Zhang et al., 2004).

본 연구에서는 rock bream과 pearl gourami에서의 공격 실험을 통해 이런 multi amplicons의 band pattern 변화와 repeating sequence의 변화 를 알아보고자 하였다. 자연감염 된 pearl gourami에서 multi major band와 single major band pattern을 보이는 각각의 비장 조직을 공격

실험에 사용하였고 그 결과 band pattern 현상이 그대로 유지되는 것을 확인하였다 (Fig. 9). 돌돔에서 첫 번째 passage 실험 결과 모두 공격한 sample과 같은 pattern의 band가 나왔으며(Fig. 10-1), 반복 실험으로 세 번의 passage를 통한 공격 실험에서는 첫 번째 passage를 제외한 두 번 째, 세 번째 passage에서는 band pattern 현상이 그대로 유지되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 10-2). 첫 번째 passage에서는 폐사율이 60%로 나타났으며 두 번째, 세 번째 passage에서는 폐사율이 100%에 달하였다. 따라서 virus와 host의 관계로 봤을 때 host가 virus에 저항성이 없는 경 우, 즉 폐사율이 100%가 되면 band pattern 현상이 공격한 sample과 같 은 pattern으로 나타나며 host가 virus에 저항해 virus가 replication을 하 는 것에 방해를 받게 될 경우, 즉 폐사율이 낮으면 공격한 sample과는 다른 band pattern인 여러 형태의 band pattern으로 나타날 수 있다고 추정한다. rock bream에서의 폐사율은 대부분 100%로 나타나지만, 첫 번째 passage의 경우는 특이한 경우로 60%로 나타나 다양한 pattern을 나타냈다 (Fig. 10-2). 원래의 PGIV는 single major band로 나타나지만 multi major band는 virus가 host에 대항해 생존하기 위해 replication하 는 과정에서 여러 multi band로 복제를 한다고 생각된다. 하지만 multi major band와 single major band가 동일한 viral load인지, 동일하다면 환경에 의해 변화했는지, 이 또한 공격 실험을 통해 여러 번의 passage 를 거쳐 band pattern을 확인하는 과정이 필요하다.

혹시 host의 특성 때문인지 확인하기 위해 같은 iridovirus strain인 IVS-1을 rock bream과 pearl gourami에 cross infection한 결과 여전히 SMB type, PGIV는 MMB type으로 동일하게 나타났다 (Fig. 11). 또한 IVS-1에 자연감염 된 sample 분석 결과 PGIV와 달리 band 간

variation이 없었으며 rock bream과 pearl gourami에 실시한 공격 실험 에서도 band 간 variation이 없이 일정한 single band pattern을 유지하 였다. passage를 거친 실험에서 band pattern 현상이 변화하는지 알아보 기 위해 실험한 결과 세 번의 passage를 거친 실험에서도 rock bream, pearl gourami 모두에서 일정한 SMB을 유지하는 것이 확인되었다. 따라 서 host의 특성에 의한 것이 아니라 virus에 의존적인 것이라 생각된다. 본 실험에서는 공격 실험을 통해 band pattern 뿐만 아니라 폐사율도 보았다. 폐사율에서는 IVS-1를 공격하였을 때 rock bream은 100%의 폐 사율을 보이고 pearl gourami는 60%의 폐사율을 보였다. 따라서 해산어 에서 유래한 IVS-1이 rock bream에 sensitive 한 것으로 여겨진다. 담수 관상어 iridovirus 내에서 band pattern에 따른 폐사율을 비교한 결과는 multi amplicons를 공격한 batch가 rock bream과 pearl gourami에서 100%를 보이는 반면 single amplicon을 공격한 batch는 rock bream에서 70%, pearl gourami에서는 89%의 폐사율을 보였다. 이로 보아 MMB와 SMB의 병원성에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 즉, virus가 생존 하기 위한 기작으로 multi란 형태로 복제하게 되더라도 원래의 single major band와 폐사율에서는 큰 차이가 없다는 것을 확인할 수 있었다. repeating sequence가 병원성에 관여한다는 보고는 수두와 대상포진을 일으키는 herpesvirus인 varicella-zoster virus (VZV)에서 보고된 바가 있다. 이 연구에서 repeating sequence를 포함하고 있는 ORF 14 부위는 glycoprotein C를 encoding하는 부위로 glycoprotein C가 VZV의 독성에 결정적인 역할을 할 것이라고 보고하고 있다 (Sauerbrei et al., 2007).

iridovirus의 질병을 진단하는데 있어 monoclonal antibody를 이용한 immunofluorescence (IF) test (Nakajima *et al.*, 1995)와 같은 면역학적

기법과 현미경적 기법, 분자생물학적 진단법 특히 초기에 viruses를 검출 할 수 있는 Polymerase Chain Reaction (PCR) 기법이 보편화되어 사용되고 있다(Tamai et al., 1997; Rodger et al., 1997, Jeong et al., 2003). 하지만 PCR 기법은 iridovirus의 검출 유무만 판별할 수 있을 뿐 감염된 조직 내 viral particles의 양을 측정하는 정량적인 진단이 불가능하다. 최근 간편하고 빠르며, viral particles의 정량적인 진단이 가능하다. 그리고 conventional PCR과 달리 실시간 자동화 시스템을 갖고 있어서 많은 수위 sample을 짧은 시간에 진단할 수 있는 장점을 가지고 있다. real-time PCR을 이용하여 본 연구에서는 비장 내의 iridovirus를 검출함과 동시에 정량적 분석을 시도하였다.

iridovirus의 RSCR-K2 부위는 variation이 많기 때문에 real-time PCR에 사용한 primer로는 conserve한 부위인 MCP region을 사용하였다. real-time PCR의 copy 수 분석에는 각각 폐사율이 높았던 multi amplicons와 single amplicon에 감염된 rock bream의 비장 1mg을 kit 분리하여 copy 수를 분석하였다. 본 연구에 사용한 plasmid는 DNA의 copy 수와 threshold cycle (C_T) 값 사이에 좋은 상관관계를 보였다(r²=0.99). real-time 실험 결과 copy수는 single major band group이 6.84E+00, multi major band group이 7.10E+00 으로 MMB가 10배 정도 높았다 (Fig. 15). 앞서 말한 바와 같이 multi amplicons로 나타나는 현상이 virus가 replication하는 과정에서 일어나는 repeating과 deletion 현상 때문이라고 하였다. 하지만 multi amplicons와 single amplicon사이의 viral copy수에 따른 연구는 좀 더 많은 sample들을 가지고 더 연구해 볼 필요가 있다.

본 연구에서는 담수 관상어의 분자 생물학적인 특성을 연구하였다.

conventional PCR을 통해 담수 관상어의 band pattern과 sequencing을 확인하였으며, rock bream과 pearl gourami에서 공격 실험을 통해 band pattern 현상과 repeating sequence의 frequency정도를 보았다. 그리고 real-time PCR을 통한 실험에서는 multi amplicons와 single amplicon사이의 viral DNA 정량 분석을 비교하였다. 하지만 cell line을 통한 in vitro 실험에서는 아직 확인된 바가 없다. 따라서 in vitro 실험에서도 담수 관상어에서 분리한 iridovirus를 공격 실험하여 in vivo와 같이 실험결과가 나올 것인가에 대해서 더 연구해 봐야 할 것이다. 본 연구는 담수 관상어의 iridovirus 분자생물학적 분석 비교는 무역을 통한 iridovirus의 교차 감염성과 위험성을 시사하는 바가 크다. 또한 담수 관상어 내에서의 정량적 분석에 관한 연구로는 최초이며 앞으로 담수 관상어 iridovirus의 진단과 연구에 대한 방향을 제시할 것으로 기대한다.



V. 요 약

본 연구에서는 담수 관상어 산업에 심각한 경제적 손실을 일으키는 iridoviurs의 교차 감염성 및 정량적 분석을 하고자 하였다. 자연 감염된 담수 관상어와 해산어로부터 각각 ISKNV-like iridovirus와 IVS-1을 분 리하였고, RSCR-K2 부위의 band pattern 분석한 결과 해산어에서 분리 된 IVS-1은 band가 1개인 single major band (SMB)를 보이는 반면, 담 수 관상어에서 분리된 iridovirus는 band가 2개 이상인 multi major band (MMB)가 나타났다. 담수 관상어 iridovirus (FOV)를 sequencing 한 결과 156bp, 183bp의 repeating sequence가 확인되었다. 그리고 RSCR-K2 부위에서는 repeating sequence의 addition/deletion현상에 의 해 amplicon이 multi 길이로 나타나는 것이 확인되었다. Repeating sequence가 많이 존재한다고 알려진 다른 부위 intergenic region (IGR-RR)을 분석한 결과 inter간의 band 길이는 달랐지만 intra 간에는 모두 SMB로 나타나는 것을 확인했다. 을 또 다른 부위인 MCP, ATPase, Pst I, ORF-1 부위를 확인한 결과 MMB 현상은 보이지 않았 다. 따라서 이런 현상은 RSCR-K2 만의 특이적인 현상인 것으로 보여진 다. 자연 감염에 나타난 MMB와 SMB의 비장 조직을 rock bream과 pearl gourami에 공격 실험한 결과 band pattern 현상이 그대로 유지됐 으며 rock bream에 세 번의 passage를 걸친 공격 실험에서 첫 번째 passage를 제외한 두 번째, 세 번째 passage에서는 band pattern 현상이 그대로 유지되는 것을 확인할 수 있었다. MMB와 SMB으로 공격 실험 한 폐사율 결과는 MMB는 rock bream과 pearl gourami 모두에서 100% 의 폐사율을 보였으며 SMB에서는 rock bream은 70%, pearl gourami에서는 89%의 폐사율을 보였다. 이는 교차 감염성의 위험성이 매우 크다는 것을 나타내고 있다. real time PCR 결과에서는 MMB와 SMB를 나타내는 rock bream의 비장 조직 1mg을 분리하여 분석하였으며 그 결과 viral copy 수는 MMB group이 7.10E+00, SMB group이 6.84E+00으로 10배 높았다. 이것은 담수 관상어에서 분리된 iridovirus의 감염성과 repeating sequence를 밝힌 최초의 연구이며, viral copy수를 이용한 정량적 분석은 앞으로 담수 관상어 iridovirus의 진단에 방향을 제시할 것으로 기대된다.



Ⅵ. 감사의 글

대학원 진학에 고민을 했던 때가 엊그제 같은데 이렇게 논문을 마무리 짓고 있는게 참 기분이 이상합니다. 정말 시원 섭섭하다는 말이 딱 어울리네요. 그동안 참 힘들었던 일도 많았지만 배울 점도 많았던 시간들이었습니다. 석사 생활에 힘이 되주신 모든 분들에게 감사드립니다. 무엇보다도 부족한 저를 잘 이끌어주시고 세심하게 지도해 주신 정현도 지도교수님께 감사의 말씀을 올립니다. 단어 하나하나 세심하게 지도해주시고 논문의 완성도를 높여주신 박수일 교수님, 병리에 관해 언제나 가꺼이 지도해 주신 허민도 교수님과 수산생명의학과의 학생으로써 배워야 할 많은 지식을 가르쳐주신 정준기 교수님, 강주찬 교수님, 김기홍 교수님께도 깊은 감사의 말씀을 전합니다.

저에게 있어서 진단방에서 보낸 3년 간의 시간들은 잊지 못할 소중한 추억이었습니다. 볼 때 마다 조언을 아끼지 않았던 명석 선배님, 따뜻하게 후배들을 챙겨주시는 영이언니, 바쁘신 검사원 일에도 불구하고 꼼꼼히 챙겨주시는 준효선배, 그리고 실험이 어려울 때 마다 항상 해결점을 찾아주시고 제가 살아가는 목표의 이상형이 되주신 작은 선생님 준범 선배, 항상 따뜻하게 품어주신 우리실험실 여왕님 려진 언니, 오실 때 마다 실험실 분위기를 즐겁게 만들어주시는 우열선배, 회식 때마다 어김없이 가로 본능을 행하시는 신후 선배, 저의 논문을쓰는데 초석을 닦아주신 호열 선배, 까칠 하시자만 이것 저것 많이 챙겨주시는 순범 선배, 베스킨 라빈스 맨 재훈 선배, 실험의 기론을 가르쳐 주신 지효언니, 늘 따뜻한 웃음으로 반겨주신 대심언니, 재치와 입담으로 웃음을 주신 영화언니, 볼 때 마다 후배들을 반갑게 맞아주시는 현정언니, 이야기 할 때 마다 따뜻하게 대해주신 윤경언니, 멀리서 항상 후배들을 응원해주시는 지윤언니, 제 실험에 항상 신경써주고 물어보는 질문에 열심히 대답해주신 밀양 연구사 혜진언니, 조교 활동으로 바쁘신 와중에도 이것저것 많이 챙겨주시는 소혜언니에게 감

사드립니다. 저의 석사 생활을 늘 걱정하시고 정신적으로 힘이 되주신 나의 부모님, 까칠해도 동생 잘 챙겨주는 울오빠 정말 감사합니다. 힘든 실험실 생활에서 가장 많이 힘이 되어 주고 온갖 나의 짜증 다 받아준 소중한 친구 주헌이, 그 동안 방장하느라 수고 많았어. 우린 잘 될거라 나는 믿는다! 그리고 하는 행동만으로도 나에게 웃음을 줬던 모사의 달인 기원이, 살 빠져서 완전 예뻐진 지적쟁이 영진이, 입만 안 열면 멋있는 광일선배, 실험실의 유일한 연예인 젊은 송대관 지응이 오빠, 유일한 같은 AB형으로 나의 남친 만들기에 힘써준 윤준이, 군대에서 열심히 훈련중인 귀여운 막내 우섭이, 애교로 선배들을 즐겁게 해주는 효선이, 그리고 앞으로 실험실 들어올 막내 기택이에게도 감사드립니다.

같이 힘든 논문 작업을 했던 주은이언니, 미영언니에게도 감사드립니다. 다른 방 이지만 놀러오셔서 즐거움을 주신 은혜언니, 학부 때 늘 챙겨주신 철규선배, 기준선배, 경민선배 감사드립니다. 그리고 같이 전과해서 고생한 지현이, 앞으로 대학원 오게 될 지원이(잘 해낼거라 믿어), 산소재 공학부에 있을 때부터 함께 했던 우리 오합지졸 효진이, 진주, 진경이, 소은이, 정윤이 모두 고마워! 논문 쓴다고 자주 못봐도 늘 이해했던나의 베스트 프렌드 지영이, 민균이, 민아, 선진이, 태경이, 그리고 힘든 고3생활 같이 견뎌냈던 여고시절 친구들, 태희, 영애, 명희 모두 나의 푸념 들어줘서 너무 고마워! 중학교 때 찬란한 추억을 만들어준 친구들 재훈이, 민화, 지영이, 민지, 은주 모두 고마워!

그리고 오늘의 내가 있기까지 도움을 주신 많은 분들게 깊은 감사의 말씀을 드립니다.

Ⅶ. 참고 문헌

- A. Sauerbrei., R. Zell., P. Wutzler., 2007. Analysis of repeat units in the R2 region among different Oka Varicella–Zoster virus vaccine strains and wild-type strains in Germany. Virol, 5, 40–44.
- Bahr, U., Springfeld, C., Tidona, C. A., Darai, G., 1999. Structural organization of a conserved gene cluster of Tupaia herpesvirus encoding the DNA polymerase, glycoprotein B, a peobable processing and transport protein, and the major DNA binding protein. Virus RE 60, 123–135.
- Bugert, J. J., Raab, K., Rosen—Wolff, A., Janssen, W. and Darai, G., 1993. Determination of the position of the boundaries of terminal repetitive sequences within the genome of molluscum contagiosum virus type I by DNA nucleotide analysis. Virol. 192, 391–396.
- Chao, C.-B., Chen C.-Y., Lai, Y.-Y., Lin, C.-S., Huang, H.-T., 2004. Histological, ultrastructural, and *in situ* hybridization study on enlarged cells in grouper *Epinephelus hybrids* infected by grouper iridovirus in Taiwan (TGIV). Dis. Aqua. Org. 58, 127–142.
- Chen, X.H., Lin, K.B. and Wang, X.W., 2003. Outbreaks of an iridovirus disease in maricultured large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), in China. J. Fish Dis. 26, 615–619 (Short communication).

- Chinchar, G., Essbauer, S., He, J.G., Hyatt, A., Miyazaki, T., 2005. Family iridoviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A., editors. Virus taxonomy classification and nomeclature of viruses eight report of the international committee on the taxonomy of viruses. San Diego: Academic Press, 145–161.
- Chua, F.H.C., Ng, M.L., Ng, K.L., Loo, J.J., Wee, J.Y., 1994. Investigation of outbreaks of a novel disease, 'sleepy grouper disease', affecting the brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina* Forskal. J. Fish Dis. 17, 417–427.
- Fischer, M., Schnitzler, P., Scholz, J., Rosen-Wolff, A., Delius, H., Darai, G., 1988. DNA nucleotide sequence analysis of the *Pvu* II DNA fragment L of the genome of insect iridescet virus type 6 reveals a complix cluster of multiple tandom, overlapping and interdigitated repetitive DNA elements, Virology 291, 126–139.
- Goldberg, T.L., Coleman, D.A., Grant, E.C., Inendino, K.R., Philipp, D.P., 2003. Strain variation in an emerging iridovirus of warm-water fishes. J. Virol. 77, 8812-8818.
- He, J.G., Deng, M., Weng, S.P., Li, Z., Zhou, S.Y., Long, Q.X., Wang, X.Z., Chan, S.M., 2001. Complete genome analysis of the mandarinfish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus.
- He, J.G., Zeng, K., Weng, S.P., Chan, S.M., 2002. Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). Aquaculture.

- 204, 11-24.
- Jeffrey Go,, Malcolm Lancaster., Kylie Deece., Om Dhungyel., Richard Whittington., 2005. The molecular epidemiology of iridovirus in Murray cod (Maccullochella peelii peelii) and dwarf gourami (Colisa lalia) from distant biogeographical regions suggests a link between trade in ornamental fish and emerging iridoviral diseases.
- Jeong, J.B., Kim, H.Y., Kim, K.H., Chung, J.K., Komisar, J.L., Jeong, H.D., 2006a. Molecular comparison of iridoviruses isolated from marine fish cultured in Korea and imported from China. Aquaculture. 255, 105–116.
- Jung SJ., Oh MJ., 2000. 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, 223 226.
- Lancaster, M.J., Williamson, M.M., Schroen, C.J., 2003. Iridovirus-associated mortality in farmed Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*). Aust. Vet. J. 81, 633-634 (Short contributions).
- Lu L, Zhou SY, Chen C, Weng SP, Chan SM, et al. 2005, Complete genome sequence analysis of an iridovirus isolated from the orange-spotted grouper, Epinephelus coioides. Virol 339, 81 00.
- Nagendra. N., Thakur., Susanne E.G., Beatrix.S., Klaus. F., Andreas. W., Heiko. A., 2007, A gammagerpesviral internal repeat contributes to latency amplification. Pros. 10, 1371–1372

- Nakajima, K., Sorimachi, M., 1994. Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. Fish Pathol. 29, 29–33.
- Nerland, A.H., Skaar, C., Eriksen, T.B., Bleie, H., 2007. Detection of nodavirus in seawater from rearing facilities for Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* larvae. Dis. Aqua. Org. 73, 201–205.
- Moffat J.F., Zerboni L., Kinchington P.R., Grose C., Kaneshima H., Arvin A.M., 1998. Attenuation of the vaccine Oka strain of varicella–zoster virus virulence demonstrated in the SCIDhu mouse. J Virol, 72, 965–974.
- Oshima, S., Hata, J., Hirasawa, N., Ohtaka, T., Hirono, I., Aoki, T., Yamashita, S., 1998. Rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using the polymerase chain reaction. Dis. Aquat. Org. 32, 87–90.
- Pallister, J., Gould, A., Harrison, D., Hyatt, A., Jancovich, J., Heine, H., 2007. Development of real-time PCR assays for the detection and differentiation of Australian and European ranaviruses. J. Fish Dis. 30, 427-438.
- Paperna, I., Vilenkin, M., de Matos, A.P., 2001. Iridovirus infections in farm-reared tropical ornamental fish. Dis. Aquat. Org. 48, 17-25.
- Pickup, D.J., Bastia, D., Stone, H.O., Joklik, W.K., 1982. Sequence of terminal regions of cowpox virus DNA; arrangement of repeated and unique sequence elements. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79, 7112–7116.

- Qi-Ya Zhang., Feng X., Jian X., Zheng-Qiu L., Jian-Fang G., 2004. Complete genome sequence of lymphocystis disease virus isolated from China. Virol, 13, 6982-6994.
- Reddy, E.P., Smith, M.J., Canaani, E., Robbins, K.C., Tronick, S.R., Zain, S., Aaronson, S.A., 1980. Nucleotide sequence analysis of the transforming region and large terminal redundancies of Moloney murine sarcomavirus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77, 5234–5238.
- Robin L., Stingley., Wayne L., Gray., 2000. Transcriptional regulation of the channel catfish virus genome direct repeat region. Virol, 81, 2005–2010.
- Samalecos, C. P. 1986. Analysis of the structure of fish lymphocystis disease virions from skin tumors of *Pleuronectes*. Arch. Virol, 91, 1–10.
- Schnizler, P., Delius, H., Scholz, J., Touray, M., Orth, E. and Darai, G., 1987. Identification and nucleotide sequence analysis of the repetitive DNA element in the genome of fish lymphocystis disease virus. Virol, 161, 570–578.
- Sudthongkong, C., Miyata, M., Miyazaki, T., 2002a. Iridovirus disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lampeye and dwarf gourami. Dis. Aquat. Org. 48, 163–173.
- Tamai T., Tsujimura K., Shiragata S., Oda H., Noguchi T., Kusuda R., SatoN., Kimura S., Katakura Y., and Murakami H., 1997.

 Development of DNA diagnostic methods for the detection of new

- fish iridoviral disease. Cytotechnology. 23, 211-220.
- Tsai C-T., Ting J-W., Wu M-H., Wu M-F., Guo I-C. and Chang C-Y., 2004. Complete Genome Sequence of the Grouper Iridovirus and comparison of genomic organization with those of other Iridoviruses. 13, 2010–2023.
- Wadsworth, S., Jacob, R,J., Roizman, B., 1975. Anatomy of herpes virus DNA. Size, composition and arrangement inverted terminal repetition. J. Virol. 15, 1487–1497.
- Walker, D.P., and B.J. Hill. 1980. Studies on the culture assay of infectivity and some *in vitro* properties lymphocystis virus. J. Gen. Virol, 51, 385-395.
- Wang, X.-W., Ao, J.-Q., Li, Q.-G., Chen, X.-H., 2006. Quantitative detection of a marine fish iridovirus isolated from large yellow croaker, Pseudosciaena crocea, using a molecular beacon. J. Virol. Methods. 133, 76-81.
- Wang, Y.Q., Lu, L., Weng, S.P., Huang, J.N., Chan, S.-M., He, J.G., 2007. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of a marine fish infectious spleen and kidney necrosis virus-like (ISKNV-like) virus. Arch. Virol. 152, 763-773.
- Weng, S.P., He, J.G., Zeng, K., Huang, Z.J., 1998. Infectious spleen and kidney necrosis virus infection in *Siniperca chuatsi* (Basileusky)-histopathology and relationship with HB, RBC, and WB C. Journal of South China Normal University, Natural Science, Suppl. 82, 71–79 (in Chinese, with English abstract).

- 김호열, 2005. 우리나라의 담수 관상어에서 분리된 iridovirus의 특성. 부경대학교 대학원 이학석사 학위논문.
- 류지효, 2006. 해산어 및 담수 관상어 감염 iridovirus의 정량적 특성 분석. 부경대학교 대학원 이학석사 학위논문.
- 조혜진, 2008. 해산어와 담수 관상어에 대한 iridoviruses의 교차 감염성 및 정량적 분석. 부경대학교 대학원 이학석사 학위논문.

