



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](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

면역자극물질과 이리도 바이러스 감염에
의한 돌돔 면역유전자의 발현



2009년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

김 주 헌

이 학 석 사 학 위 논 문

면역자극물질과 이리도 바이러스 감염에
의한 돌돔 면역유전자의 발현

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

김 주 현

김주현의 이학석사 학위논문을 인준함

2009년 2월 25 일



주 심 약 학 박 사 정 준 기 ㉠

위 원 이 학 박 사 강 주 찬 ㉠

위 원 이 학 박 사 정 현 도 ㉠

목 차

Abstract

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 실험어	4
2. 단일 세포현탁액의 준비	4
3. 면역유전자의 cloning	4
3. 1. Total RNA 분리	4
3. 2. RT-PCR	5
3. 3. Gel elution	6
3. 4. Cloning	6
4. 면역유전자의 complete ORF 결정	8
4. 1. Degenerated Primer 제작	8
4. 2. RACE-PCR	12
4. 3. Real time PCR	12
5. 면역유전자의 Genomic organization 분석	14
5. 1. Total genomic DNA 분리	14
5. 2. DNA walking	14
6. Immune genes 의 발현 분석	17
6. 1. 조직별 발현량 분석	17
7. Virus 감염에 따른 면역반응	18
7. 1. Iridovirus 의 감염에 대한 면역반응	18

7. 2. Nodavirus의 감염에 대한 면역 유전자 발현	18
8. 온도가 돌돔의 면역반응에 미치는 영향 분석	19
8. 1. 18℃ 와 25℃ 에서의 면역반응	19
II. 결 과	20
1. cDNA cloning 과 염기서열 분석	20
2. Genomic DNA cloning 과 염기서열 분석	29
3. 염기서열의 비교 분석	35
4. Immunostimulants 에 의한 Mx gene 과 Cox-2 gene의 발현 분 석	39
4. 1 . 조직별 발현량 분석	39
5. Virus의 감염에 대한 면역반응 분석	42
5. 1.온도에 따른 면역반응 분석	42
5. 2. Nodavirus 의 감염에 따른 면역유전자 발현 분석	47
IV. 고 찰	50
V. 요 약	58
VI. 감사의 글	60
VII. 참고문헌	62

Expression of immune genes in rock bream(*Oplegnathus fasciatus*) by
immunostimulants and iridovirus infection

Ju-Heon Kim

Department of Aquatic life medicine, Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

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. The type I interferon (IFN) system is one of the most important mechanisms for antiviral defense. In the type I IFN response, many IFN-related proteins are induced for establishing an antiviral state. Mx proteins have been shown to inhibit virus replication. Interleukin-1 β (IL-1 β) is a major mediator of inflammation and stimulates and enhances the expression of several genes that are characteristically expressed during inflammation. Increased IL-1 β 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 gene is induced by various inflammatory signals, including cytokines, growth factors, and lipopolysaccharide. Fish have a body temperature that is essentially the temperature of the surrounding water so that their entire physiology, including immune functions, is influenced by environmental temperature. We have studied two important innate immune genes, Mx gene and Cox-2 gene, were

cloned and sequence in rock bream. Expression of those two genes were analyzed in vivo condition stimulating with LPS and poly I:C .The effect of iridovirus infection on the expression of immune genes, IL-1 β , Mx and Cox-2 genes, in rock bream in laboratory were analyzed.

Studies in rock bream immune response after iridovirus and poly I:C injection at 18°C when compared to those responses at 25 °C. When rock bream was injected with LPS and poly I:C intraperitoneally, the peak level of expressed immune genes in head kidney cells and Liver cell was appeared at 1 day post injection. Moreover the levels of immune genes in rock bream infected with iridovirus was higher than that of non-infected rock bream, negative control. The iridovirus infected group had only small elevation in the expression of immune genes on day 1 and up-regulated 3 days post infection, and decreased thereafter. The susceptibility of fish to disease is partly dependent on their environment, in particular on water temperature. The pathological situation in fish depends both on temperature dependent immune system regulation and on pathogen growth. Lower water temperature caused a later increased level of Mx gene which peaked on 7 days post infection of iridovirus.

I. 서론

어류는 척추동물로, 무척추동물과 고도로 발달된 척추동물 사이에 위치한다. 대식구(macrophage)와 과립 백혈구에 의한 탐식작용과 같은 주로 무척추동물의 비특이적 면역 기전을 가지고 있으며, 또한 림프구(lymphocyte)에 의한 세포성·체액성 면역 기전을 가지고 있다. 어류는 포유동물과는 대조적으로 비특이적 면역반응이 우선적으로 작용을 하게 되며, 면역반응에 일부분이 되게 되는 것이다. 감염이 이루어지면, 비특이적 면역기전이 병원체에 대한 1차적인 방어를 하게 된다 (B. Magnado"lttir., 2006; Miodrag Belosevic *et al.*, 2005).

인터페론은 세포 안에서 바이러스가 증식하는 것을 막고, 이러한 생물에 대항해서 체내에서 빠르게 합성되는 매우 중요한 방어체계이다. 모든 척추동물은 인터페론을 생성하고 몇몇 무척추동물도 이것을 생성하는 것으로 보고되고 있다 (M. De Zoysa *et al.*, 2007). 인터페론은 세포가 바이러스나 그 밖의 외부물질에 의해 자극을 받을 때만 생성되지만, 바이러스의 증식을 직접 막지 못한다. 인터페론은 정상적으로 우리 체내에 존재하는 cytokine의 일종이며 단핵세포 및 B림파구에서 알파 인터페론이 섬유아세포에서는 베타인터페론이, T 림파구에서는 감마인터페론이 만들어지고 이들은 서로 다른 물리학적 성질 및 항원성을 가지고 있다. 바이러스 감염에 대한 인터페론의 항바이러스 작용기전은 인터페론이 숙주세포에 있는 인터페론 수용체에 결합되면 2,5-oligo(A) synthetase, protein kinase, Mx protein 등이 생성되어 세포내에서 바이러스의 증식과정 중 바이러스 RNA를 분해하거나 단백질의 합성을 억제함으로써 항바이러스 작용을 낸다 (Stephanie Johanna DeWitte-Orr, 2006; Børre Robertsen, 2006). 또한 인

터페론의 면역조절 작용으로 MHC class I의 발현을 증강시킴으로서 세포 독성 T세포로 하여금 감염된 세포를 파괴시키는데 중요한 역할을 하고 있다. 어류에서 Mx gene 은 포유류를 포함하여 어류에서 처음으로 perch (*Perca fluviatilis* L.) 에서 확인되었고, 수년간 많은 연구를 통해서 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) , Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) , Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) , fugu (*Takifugu rubripes*), gilthead sea bream (*Sparus aurata*), channel catfish (*Ictalurus punctatus*), orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*).등 많은 어류에서 cloning 되어 특징을 확인 할 수 있었다 (Y.C. Wu, S.C. Chi.,2007). 최근 넙치에서 Mx protein은 hirame rhadovirus 와 viral hemorrhagic septicemia 의 복제를 억제한다는 연구(Larsen R,Rokens TP *et al.*,2004)와 Atlantic salmon에서 Mx isoform 중 Mx1은 infectious pancreatic necrosis virus(IPN)의 복제를 억제 할 수 있다는 연구 발표가 보고 되고 있다.

Cox enzyme에는 2가지 종류의 동중효소가 존재하는 것이 알려져 각각 Cox-1, Cox-2 또는 PGH synthase-1, PGH synthase-2 라고 불린다. Cox-1 gene은 위장관, 신장, 혈소판, 혈관내피세포 등 모든 조직에 항상 내재적 구성성분으로(constitutive) 존재하는 Housekeeping gene이지만, Cox-2 gene은 정상적인 상태에서는 발현되지 않고, 염증자극, cytokine(IL-1), Growth factors 등의 자극에 의하여(induced) 염증조직, Synoviocyte, Macrophage 등에서 발현되는 immediate early gene이다. 실제로 Cox-2 는 monocytes와 fibroblasts같은 특정 세포유형에서 growth factor, cytokines 그리고 endotoxin등과 같은 inflammation mediator들에 의해서 합성이 유도되는 것으로 보고되고 있다 (F. Buonocore *et al.*, 2005). 최근 rainbow trout 와(Zou *et al.*, 1999), brook trout (Roberts *et*

al., 2000), zebrafish (Grosser *et al.*, 2002) 등 몇몇 어류에서 Cox-1, Cox-2 gene 이 밝혀졌다. 현재 여러나라 어류사이에서 빈번하게 iridovirus로 인한 유행성병이 출현 하였고, 여러 국가에서 양식 해산어와 담수 관상어에 감염되어 많은 경제적 손실을 발생시키고 있다. 특히 iridovirus는 한국의 양식어류인 rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) 에 심각한 피해를 입히고 있는 실정이다. 여러 어종에서 iridovirus에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있지만 효과적인 치료방법이 될 수 있는 vaccine 개발이 현재 이루어지 않고 있다. 효과적인 vaccine 개발을 위해서는 virus 뿐만 아니라 virus에 대한 어체 반응까지 연구되어야한다. 하지만 iridovirus에 가장 민감한 어류로 알려진 돌돔의 면역반응 정보는 아직 부족한 실정이다. 이에 본 연구에서는 돌돔에서 Mx gene 을 cloning하고 ,사이토카인의 한 종류인 염증 매개 물질 생산에 관여하는 효소인 cyclooxygenase-2 (Cox-2) 유전자의 cDNA 와 genomic DNA sequence를 밝혀서 그 분자적인 특성분석과 ,돌돔에 iridovirus를 challenge 한 후 Mx gene 과 Cox-2 gene 이 감염의 초기 단계에 어떻게 변화하는지 분석하여 돌돔의 면역체계에 대한 충분한 기본 지식을 확보하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어

외관상 질병의 증세가 나타나지 않는 건강한 100~200g 되는 양식산 돌돔 (*Oplegnathus fasciatus*) 개체들을 구입하여, 실험실의 2ton 수조에 수용하고, 7일간 25℃ 수온에 순치 시킨 뒤 실험에 사용하였다.

2. 단일 세포 현탁액의 준비

실험어에서 head kidney 조직을 적출하여 100 μ g/ml의 penicillin, 100 I.U./ml의 streptomycin이 첨가된 차가운 L-15 medium (Sigma-Aldrich)에 담근 뒤 멸균된 nylon mesh를 이용하여 단일 세포로 현탁하였다. 현탁액은 5,000 rpm에서 2분간 원심 분리하여 Hank's balanced salt solution (HBSS, Sigma-Aldrich)으로 세척한 다음 최종적으로 L-15 배지에 적정 농도로 현탁하였다.

3. 면역유전자의 cloning

3. 1. Total RNA 분리

24시간 동안 자극시킨 돌돔의 두신으로부터 단일세포를 분리하고 현탁액 5,000 rpm에서 2분간 원심 분리하고 상등 액을 제거한 후 cell pellet에

TRIzol 500 μ l를 첨가하여 pipetting한 후 실온에서 5분간 반응시켰다. 그 후 chloroform (Sigma-Aldrich) 100 μ l를 첨가하여 inverting해서 실온에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 4 $^{\circ}$ C, 12,000g에서 15분간 원심 분리하고, 상등 액을 새 microtube로 옮겼다. 여기에 상등액과 동량의 Isopropanol (Sigma-Aldrich)을 첨가하여 inverting한 후 실온에서 10분간 반응시켰다. 그 반응 후 4 $^{\circ}$ C, 12,000g에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고 70% ethanol을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C, 7500g에서 5분간 원심 분리하여 상등액을 제거하였다. 그 침전물은 10분간 상온에서 자연 건조시켜 Nuclease-free water (Hyclone)로 현탁한 뒤 사용 전까지 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

3. 2. RT-PCR

PCR tube 에 reverse transcriptase 0.5 μ l , buffer 2 μ l , dNTP 2 μ l ,Oligo(dt) primer 1 μ l , total RNA 1 μ g 을 넣고 total volum 이 10 μ l 이 되게 Nuclease-free water을 첨가한 후, 42 $^{\circ}$ C에서 60분 ,99 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응 시켰다. 여기서 만들어진 cDNA는 PCR 반응에서 template 로 사용하였다. PCR amplication은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler를 사용하였고 아래와 같은 방법으로 실시하였다. 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 M of each dNTP, 1 μ M 각 각 primer, 1 μ l cDNA 첨가한 후 , distilled water 사용하여 총 volume이 20 μ l 가 되게 하였다.

이 혼합액은 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 pre-denaturation 시키고, 95 $^{\circ}$ C , 30초 , 55 $^{\circ}$ C 30 초 , 72 $^{\circ}$ C 30 초, 30 cycle 동안 반응 하였고, 마지막으로72 $^{\circ}$ C for 7 분 (extension period) 반응 하였다. PCR 생성물은 1% agarose gel 상에서

전기영동을 실시하여 확인하였다.

3. 3. Gel elution

PCR 생성물은 GENEALL™ Plasmid DNA Preparation Kit (General biosystems)를 사용하여 정제하였다. 먼저 전기영동으로 확인된 band를 Cutting 하여 새 micro tube에 옮긴 후, GB buffer 300 μ l를 첨가하여 50℃에서 10분간 반응하여 gel을 녹였다. gel이 완전히 다 녹으면 그 mixture를 collection tube에 들어 있는 spin column에 옮겼다. 그 뒤, 12,000 rpm에서 1분간 원심 분리를 하고, column을 통과한 여과액은 제거하여 column만 collection tube에 넣었다. 다시 그 column에 NW buffer 700 μ l를 첨가한 후 12,000 rpm에서 30초간 원심 분리를 하고 column을 통과한 여과액은 제거하여 column만 collection tube에 넣었다. 12,000 rpm에서 2분간 원심 분리를 한 뒤 column만 새 micro tube에 옮긴 후 EB buffer 30 μ l를 넣어 1분간 반응시켰다. 그 뒤 12,000 rpm에서 1분간 원심 분리 하고 column은 제거하였다. 그리고 cloning을 하기 위해 정제한 DNA는 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다.

3. 4. Cloning

정제한 DNA는 TOPO-TA Cloning^R Kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 cloning하였다. 우선 정제한 DNA 4 μ l를 새 micro tube에 옮긴 후, salt solution 1 μ l, distilled water 4 μ l, TOPO^R vector 1 μ l를 첨가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 그 뒤에 competent cell (*E. coli* DH5 α -T1^R OR) 50 μ l를 첨가하여 ice에서 30분간 반응시키고, 42℃에서 40

초간 heat-shock을 주었다. heat-shock이 끝나고 즉시 ice에서 2~3분간 옮겼다가 SOC 배지 500 μ l를 첨가하여 37℃에서 90분간 진탕 배양시켰다. 배양액은 IPTG , X-Gal 40 μ g/ml, ampicillin 50 μ g/ml이 첨가된 LB plate에 도말하여 24시간 배양하였다. 그리고 blue와 white colonies가 자라는 것을 관찰하였다. 배양된 blue/white colonies 중에서 white colony를 취해, ampicillin 50 μ g/ml이 첨가된 LB broth에 접종한 뒤 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. plasmid는 GENEALL™ Plasmid DNA Preparation Kit (General biosystems)를 사용하여 다음과 같은 과정으로 분리하였다. 배양액을 새 micro tube에 옮기고 4℃, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리 후 상등의 배지 성분을 제거하고 균 pellet에 S1 buffer 250 μ l를 첨가하여 현탁시켰다. 그 후, S2 buffer 250 μ l를 첨가하여 inverting하여 혼합한 뒤 그 즉시 S3 buffer 350 μ l를 첨가하여 inverting하였다. 이 혼합액을 4℃, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하고 그 상등액을 collection tube에 들어 있는 spin column에 옮긴 후 30초간 12,000 rpm에서 원심 분리하였다. column을 통과한 여과액은 제거하고 column만 collection tube에 넣어 PW buffer 700 μ l를 첨가하였다. 12,000 rpm에서 30초간 원심 분리하여 column을 통과한 여과액은 제거하고 column만 collection tube에 넣은 후 다시 12,000 rpm에서 2분간 원심 분리를 하여 남은 액을 완전히 제거하였다. 그 뒤, column만 새 micro tube에 옮기고 EB buffer 30 μ l를 첨가하여 1분간 반응시킨 후, 12,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 column을 제거하였다. 그리고 분리한 plasmid DNA는 염기서열을 분석하는 데 사용하였다.

4. 번역유전자의 complete ORF 결정

4. 1. Degenerated Primer 제작

GenBank에 등록되어있는 *Siniperca chuatsi* (AY392097), *Lates calcarifer* (AY821518) *Sparus aurata* (AF491302) ,Mx gene 의 cDNA sequence 를 서로 비교하여 conserved 한 region을 찾아 degenerated primer (Mx F , Mx R)을 제작하였고, Cox-2 gene 은 *Oncorhynchus mykiss* (AJ238307), *Salvelinus fontinalis* (AF158373) 그리고 *Micropogonias undulatus* (AB292357) 의 Cox-2 cDNA sequence 를 비교하여 3개의 어종에서 나타나는 conserved 한 region을 찾아 degenerated primer (Cox F , Cox R) 을 제작하여, 돌돔의 head kidney cell에서 분리한 RNA를 template로 사용하여 RT-RCR 에 사용되었다. (Figure 1, Table 1).

Siniperca chuatsi atgaa cactctgaaccagcagt atgaggagaaggtgcg tc cctgcatt gacctcat tg ac 60
Lates calcariferc.....a.....a... 60
Sparus auratac.....c... 60

Siniperca chuatsi tctct ccgctct ctgggtgt ggagaaggac ttggctct gctgctatcgccgtgat tg ga 120
Lates calcarifert.....c.....c...g.....a... 120
Sparus aurataa...g.....g.....c.....c... 120

→ Mx F
Siniperca chuatsi gacca aagctcgggaagagct ccg gctggaggcgt gt caggggtggctctgcc aaga 180
Lates calcarifert..... 180
Sparus aurataa.....t.....g... 180

Siniperca chuatsi ggaag tggcatt gtgacaagat gtcctctcgaactgaa ga tgaagaga aagaaaga ag ga 240
Lates calcarifer 240
Sparus aurata ..g..c.....t.....a.....g..g... 240

Siniperca chuatsi gagga gtggtac ggaagat aagctaccagaacctga ga aagagata gaagaccc tg ca 300
Lates calcarifera.....g...c.....t...g 300
Sparus auratat.....g...c.....c.g..c....c... 300

Siniperca chuatsi gatgt ggagaaa aagatcag agaagctcag gatgaaat ggcggggtcggggtggg ga tc 360
Lates calcarifer c.....tc.....t..t..... 360
Sparus auratatc.....a..... 360

Figure. 1. Continued

Siniperca chuatsi agtgat gacctcat cagtctggagatcggctc tcctgggtgtt ccagacct gacctcat t 420
Lates calcariferc.....g.....c.....a.....t.....a 420
Sparus auratac.....a.....g.....g..... 420

Siniperca chuatsi gacctgcccggcat ccagagtggtgttaaagg gacaaccagagaacat tggggatca g 480
Lates calcarifer ...t...t.....g.....a.....t.....a...a... 480
Sparus auratag.....c...a...a... 480

Siniperca chuatsi ataaagagactgat ccagacgttcatcacaaaac aagaaacc atcagcct ggtggttgt t 540
Lates calcarifera.....a..g..... 540
Sparus aurataa.....a.....t..... 540

Siniperca chuatsi cca tgcacgtgg acatagca ac cacagagg ctttgaac atggcccagcgggtgga tcct 600
Lates calcariferg.....a...ga..... 600
Sparus aurata ...a.....g.....c...g.....a...gaa..... 600

Siniperca chuatsi gatggggagaggacttt gggtatct taaccaagc ctgatctgttggaacaggcacagaa 660
Lates calcarifera.....g..... 660
Sparus aurataa.....g.....gg 660

Siniperca chuatsi gacacagtgtggaaattgtccataatgagg tcatccacct gaagaagg gctacatgat c 720
Lates calcarifer ..g.....t..c...t..... 720
Sparus aurata ..g..g...t..c...c...c..... 720

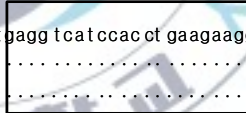

 ← MxR

Figure. 1. Continued

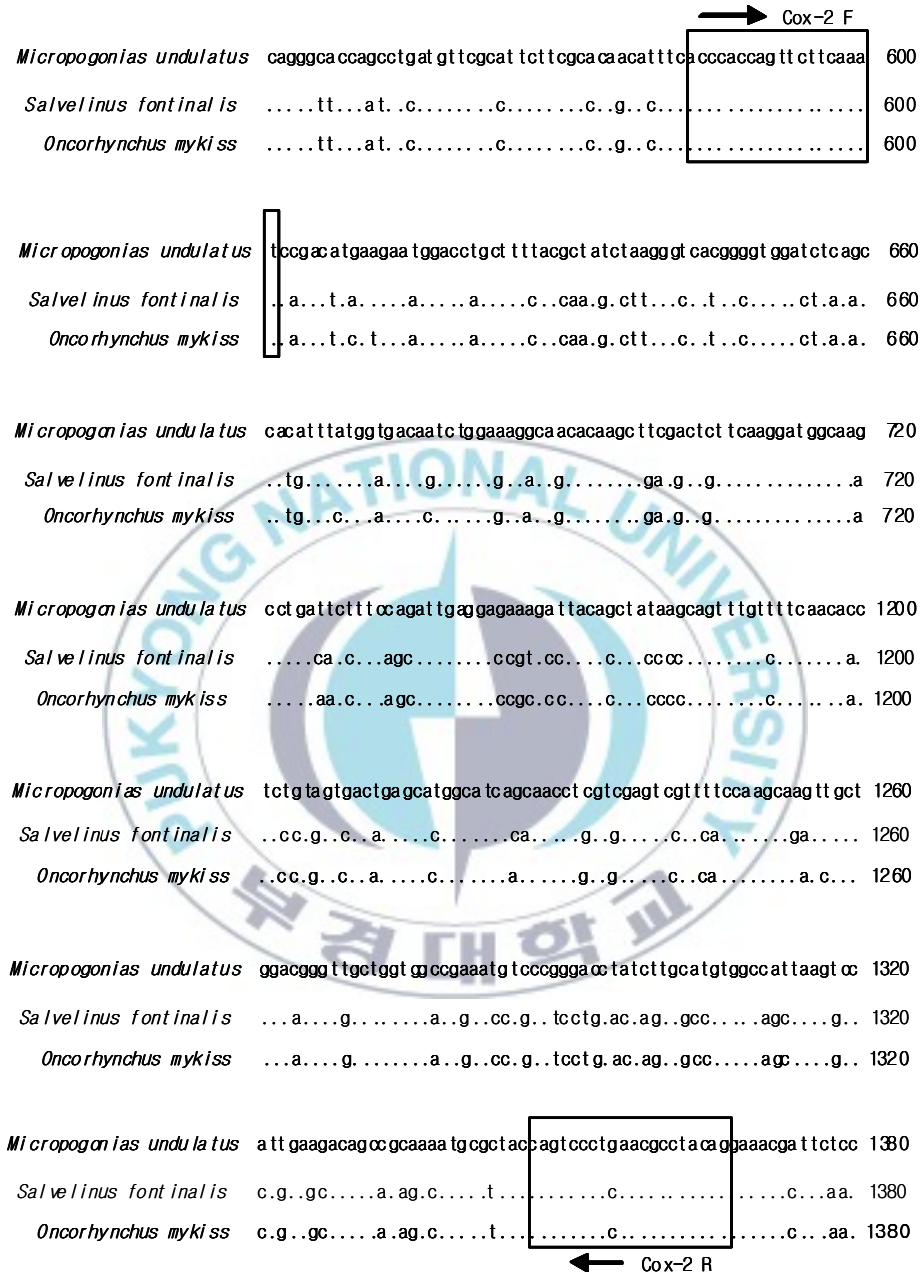


Figure. 1. Design of degenerated primer from Mx gene and Cox-2 gene sequences.

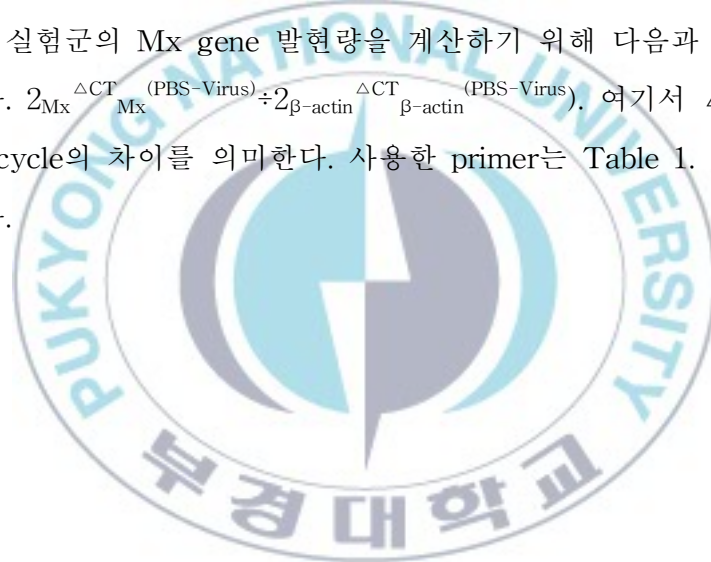
4. 2. RACE-PCR

FirstChoice RLM-RACE Kit(Ambion) 는 cDNA의 알고 있는 일부 염기 서열을 이용하여 cDNA의 full-length 5'-과 3'- ends를 밝혀서 돌돔의 Mx, Cox-2 gene의 완전한 cDNA 염기서열을 결정하기 위해 사용하였다. 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 GeneRacer™ RNA Oligo로 ligase했다. ligated RNA는 Random Decamer로 역전사되었다. 5' end는 5' RACE outer primer와 RACE 5' Mx R , RACE 5' Cox R로 first PCR을 한 뒤, 5' RACE inner primer와 RACE 5' Mx R (nested), RACE 5' Cox R(nested) 로 nested PCR을 하였다. 3' end는 RACE 3' Mx F , RACE 3' Cox F 와 3' RACE outer primer로 first PCR을 한 뒤, RACE 3' Mx F(nested,) RACE 3' Cox F(nested) 와 3' RACE inner primer로 nested PCR을 수행하였다. RACE-PCR을 수행 하여 얻은 products는 Plasmid DNA Preparation Kit로 gel elution 을 한 뒤, TOPO-TA Cloning^R Kit로 cloning하여 얻은 white colony를 ampicillin 50 μ g/ml이 첨가된 LB broth에 배양한 후 이 배양액에서 plasmid 를 분리하여 sequencing하였다. 사용한 primer는 Table 1. 에 나타내었다.

4. 3. Real time PCR

Real time PCR을 하기 위해서 10Xbuffer 2 μ l ,dNTP 2 μ l, 각각의 specific prime , Hot start Taq 및 앞서 합성한 cDNA 1 μ l와 EvaG reen 1

μl 가 사용되었고, 나머진 Nuclease-free water 를 이용하여 total volume $20\mu\text{l}$ 으로 Real time PCR을 실시하였다. RCR 혼합물은 95°C 에서 10분간 pre-denaturation 시킨 후, 95°C 에서 10초 denaturation 55°C 에서 15초 annealing, 72°C 에서 20초 extension의 반응을 40cycle 수행하였다. 40cycle 이 끝난 후 Delta Delta CT Relative Quantitation 법을 이용하여 β -actin에 따른 immune gene 의 상대적 발현량 을 보고자 하였다. PCR 이 끝난 후 각 유전자의 mRNA의 상대적 발현비는 delta delta C_T 방법의 사용하여 계산하였다. 예를 들면 대조군(PBS) 에 대한 Virus 자극을 준 실험군의 Mx gene 발현량을 계산하기 위해 다음과 같은 식을 이용하였다. $2^{\Delta C_T_{Mx}^{(PBS-Virus)}} \div 2^{\Delta C_T_{\beta-actin}^{(PBS-Virus)}}$. 여기서 ΔC_T 는 threshold cycle의 차이를 의미한다. 사용한 primer는 Table 1. 에 나타내었다.



5. 면역유전자의 Genomic organization 분석

5. 1. Total genomic DNA 분리

돌돔의 genomic DNA는 Accuprep^R Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer)를 사용하여 분리하였다. 먼저 돌돔의 spleen을 분리하여 약 50mg 정도로 잘게 자른 후 새 micro tube에 넣고 200 μ l의 L buffer를 넣은 다음 proteinase K 20 μ l를 넣고 섞어 준 후 56 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. 조직이 완전히 lysis되고 나면 B buffer 200 μ l를 첨가해서 잘 섞어 주고 60 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 micro tube에 isopropanol 100 μ l를 넣고 vortex한 뒤 binding column tube에 넣어 1분간 8,000 rpm에서 원심 분리해 여과액은 제거하고 W1 buffer 500 μ l를 넣어 1분간 8,000 rpm에서 원심 분리한 뒤 여과액은 제거했다. 여기에 W2 buffer를 500 μ l 첨가하고 위와 같이 원심 분리하여 여과액을 제거한 뒤 다시 2분간 원심 분리를 하였다. binding column tube를 새 micro tube에 넣고 EL buffer 200 μ l를 첨가하여 1분간 상온에서 방치한 뒤 8,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 elution 해서 사용 전까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

5. 2. DNA walking

앞에서 분리한 돌돔의 genomic DNA를 template로 하고 돌돔의 Mx, Cox-2 cDNA sequence를 기초로 하여 제작한 primers(Table 1)를 사용하여 PCR을 실시하였다,

PCR 혼합액은 PCR tube에 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM

MgCl₂, 0.0001% w/v gelatin, 0.5% Tween-20, 200μM의 각각의 dNTP, 1 μM의 각각의 forward와 reverse primer, 1.25U Taq DNA polymerase (Genecraft) 및 10ng의 genomic DNA를 template로 첨가한 후, sterile distilled water로 총 volume이 20μl가 되게 하였다.

PCR 혼합액은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하여, 94℃에서 3분간 pre-denaturation시킨 후, 94℃에서 30초 denaturation, 55℃에서 30초 annealing, 72℃에서 30초 extension의 반응을 1 cycle로 하여, 30 cycle을 반응시켰다. 그리고 72℃에서 7분간 post-extension time을 주었다.



Table 1 . Primers used for the expression of immune genes

Gene	Primer	Oligonucleotide sequence (5' →3')	objects
Mx	MxF	GCTGGAGGCGCTGTCAGG	cDNA cloning
	MxR	CTTCAGGAGGTGGATGACCTC	
Cox-2	Cox F	ACCCACCAGTTCTTCAAATC	
	Cox R	CTGTAGGCGTTGAGGGACTG	
Mx	3' Mx first primer	GTTCCAGACCTGACGCTCATTGACCTGTCCG	For RACE PCR
	3' Mx nested primer	CCATCAGCTTGGTGGTTGTTCATGCAACG	
	5' Mx first primer	GGACAATTCAACCACCGTCTCTTCTGTGCC	
	5' Mx nested primer	GTCACAATGCCACTTCTCTTGGCAGAGCC	
Cox-2	3' Cox-2 first primer	GGCTCTTCCAGACCTCACGGCTCATTTCTG	
	3' Cox-2 nested primer	GTCCAGGACCTATCATGTACGTGGCCATC	
	5' Cox-2 first primer	GAAGTGATATCCGCTCAGGTGCTGCACGTAG	
	5' Cox-2 nested primer	GAAGCGGTGAGAGTCAGGAACATGAGGAGG	
Cox-2	Cox F	ACCCACCAGTTCTTCAAATC	For genomic DNA PCR
	RBCoxR	TTGGTGAACGACTCCACAAG	
	GenomicCox 1F	GFACTGGAAGCCAGCACAT	
	GenomicCox 1R	AGATCTCTGTGGTGCCTGG	
β-actin	RBCoxF	GTCCGAGTTCAACACCTGT	For real time PCR
	GenomicCox 2R	CAAGCCAATACACAGCCTCA	
	RBβ-actin F	CAGGGAGAAGATGACCCAGA	
	RBβ-actin R	ACCGGAGTCCATGACGATAC	
IL-1β	RBIL-1βF	ATCTGGAGACGGTGGACAAC	For real time PCR
	RBIL-1βR	GCTGATGTACCACTCGCTGA	
Mx	RBMxF	GAGGCTGATCCAGAAGTTCATC	
	RBMxR	GATCAGGCTTGGTCAAGATACC	
Cox-2	RBCoxF	GTCCGAGTTCAACACCTGT	
	RBCoxR	TTGGTGAACGACTCCACAAG	

6. Immune genes 의 발현 분석

6. 1. 조직별 발현량 분석

PBS(0.1ml) 와 Polyinosinic-polycytidylic acidsodium salt, γ -irradiated (Poly I:C, Sigma-Aldrich) 500 μ g/fish , *E. coli*, serotype 0127:B8의 lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldric) 100 μ g/fish 를 복강 주사하여 24h 후에 liver, spleen , head kidney 조직을 분리하여 조직을 homogenation 하고 total RNA를 분리하여, 정량으로 맞춘 후 제작한 specific primer로 RT-PCR을 시행하여 Cox-2 gene , Mx gene의 발현을 분석하였다. 또한 housekeeping 유전자로써 β -actin gene에 대한 발현도 분석하였다. RT-PCR 로 만들어진 cDNA를 이용하여 real time PCR을 적용해 control group 에 대해서 experiment group에 대한 발현량을 delta delta Ct 방법을 이용해서 분석하였다.

7. Virus 감염에 따른 면역반응

7. 1. Iridovirus 의 감염에 대한 면역반응

돌돔에 sachun type iridovirus 100 μ g/fish를 복강 주사하여 1일, 3일, 7일 후에 liver를 분리하고, PBS를 주사한 정상 돌돔의 liver도 함께 분리 하였다. 조직을 homogenation 한 후 total RNA를 분리하고, 정량으로 맞춘 후 제작한 specific primer로 RT-PCR을 시행하여 IL-1 β , Cox-2 gene , Mx gene의 발현을 분석하였다. 그리고 Kosuke Zenke *et al.*, 2008 나와 있는 Mx 1, 3 primer 를 제작하여 virus 감염 에 의한 Mx 1, 2, 3 gene 의 발현량을 비교하였다. 또한 house keeping 유전자로써 β -actin gene에 대한 발현도 분석하였다. RT-PCR 로 만들어진 cDNA를 이용하여 real time PCR을 적용해 control group 에 대해서 experiment group 에 대한 발현량을 delta delta Ct 방법을 이용해서 분석하였다.

7. 2. Nodavirus의 감염에 대한 면역 유전자 발현

Nodavirus에 감염 된 능성어의 뇌로부터 분리 된 VNN 을 어체중 10 g~15g되는 돌돔에 1mg/fish 을 복강 주사하여 3일 후 Brain 과 Head kidney 를 분리하였다. Total RNA를 분리하고, 정량으로 맞춘 후 제작한 specific primer로 RT-PCR을 시행하여 IL-1 β , Cox-2 gene , Mx gene의 발현을 분석하였다. 또한 house keeping 유전자로써 β -actin gene에 대한 발현도 분석하였다. RT-PCR 로 만들어진 cDNA를 이용하여 real time PCR을 적용해 control group 에 대해서 experiment group 대한 발현량을

delta delta Ct 방법을 이용해서 분석하였다.

8. 온도가 돌돔의 면역반응에 미치는 영향 분석

8. 1. 18℃ 와 25℃ 에서의 면역반응

어체중 50~70g 되는 돌돔을 주사하기 전에 18℃ 와 25℃ 되는 환경에서 2주간 순치시켰다. 순치 된 돌돔을 PBS(0.1ml), poly I:C(500µg/fish) , iridovirus(100µg/fish) group 으로 나누어 공격 후 1, 3, 7 일 지나면 각 group에서 2마리씩 liver 를 분리하였다. 분리된 liver 로부터 Trizol 법을 이용하여 Total RNA를 분리하고, 정량으로 맞춘 후 제작한 specific primer로 RT-PCR을 시행하여 IL-1β, Cox-2 gene , Mx gene 의 발현을 분석하였다. 또한 house keeping 유전자로써 β-actin gene에 대한 발현도 분석하였다. RT-PCR 로 만들어진 cDNA를 이용하여 real time PCR을 적용해 control group 에 대해서 experiment group에 대한 발현량을 delta delta Ct 방법을 이용해서 분석하였다.

Ⅲ. 결과

1. cDNA cloning 과 염기서열 분석

돌돔 두신에서 total RNA 추출하여 reverse transcription 한 뒤 *Siniperca chuatsi* (AY392097), *Lates calcarifer* (AY821518), *Sparus aurata* (AF491302), *Paralichthys olivaceus* (AB110446)의 Mx gene sequence를 비교해서 제작한 degenerated primer (MxF, MxR)를 사용하여 PCR 한 결과 559bp의 product를 얻을 수 있었다. 이 product를 gel 상에서 elution을 한 다음 TOPO-TA vector에 cloning 한 후 염기서열을 결정하였다. Cox gene은 *Oncorhynchus mykiss* (AJ238307), *Salvelinus fontinalis* (AF158373), *Micropogonias undulatus* (AB292357) cyclooxygenase gene의 cDNA sequence를 서로 비교하여 degenerated primer를 사용하여 PCR 실시 결과 891bp의 product를 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 염기서열은 Mx gene과 같은 방법으로 확인하였다. cDNA의 5'과 3' end를 밝혀 돌돔 Mx gene과 Cox-2 gene의 완전한 cDNA 염기서열을 결정하기 위해 RACE-PCR을 실시하였다 (Fig. 3). RACE-PCR을 수행하여 얻은 product를 gel 상에서 elution을 한 다음 TOPO-TA vector에 cloning 한 후 염기서열을 결정하였다. 3'RACE 한 결과 얻은 partial sequence를 NCBI에 등록하였다. (Accession number FJ155359 : Mx protein, FJ155356 : Cox-2 gene) 그리고 degenerated primers와 그 RT-PCR로 생성된 product, RACE-PCR에 사용된 primers와 RACE-PCR에 의해 얻은 products를 Fig. 4-5.에 도식화하였다. 그 결과 확인된 Mx gene과 Cox-2 gene의 전체 sequence를 Figure 6-7에 나타내었다.

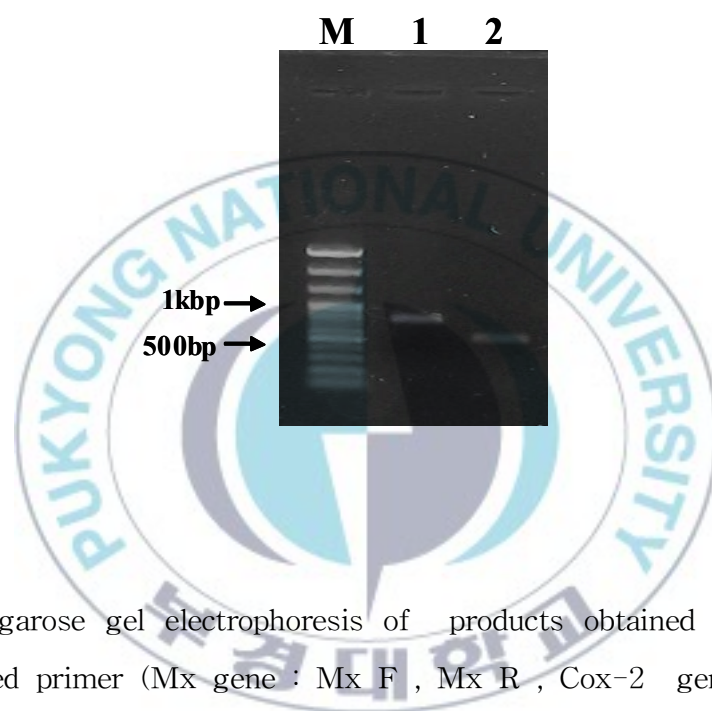


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of products obtained by set of degenerated primer (Mx gene : Mx F , Mx R , Cox-2 gene: Cox-2F, Cox-2R) designed against conserved region. Lane 1. Cox-2 gene ; lane 2. Mx gene.

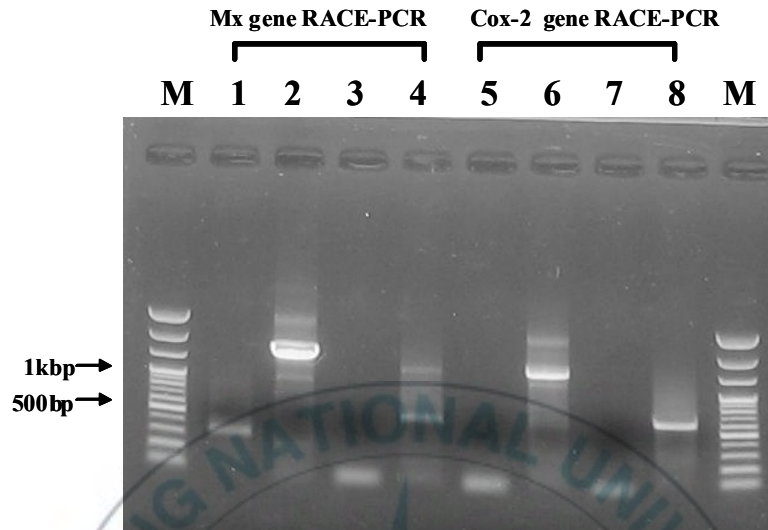


Fig. 3. RACE-PCR with various specific designed from the partially determined cDNA sequences of Mx and Cox-2 gene. Lane 1, 3'end Mx gene first PCR product(3'RACE Outer Primer, RACE 3'MxF); lane 2, 3'end Mx gene nested PCR product(3'RACE Inner Primer, RACE 3'MxF(nested)); lane 3, 5'end Mx gene first PCR product(5'RACE Outer Primer, RACE 5'MxR); lane 4, 5'end Mx gene nested PCR product(5'RACE Inner Primer, RACE 5'MxR(nested)); lane 5, 3'end Cox-2 gene first PCR product(3'RACE Outer Primer, RACE 3'CoxF); lane 6, 3'end Cox-2 gene nested PCR product(3'RACE Inner Primer, RACE 3'CoxF(nested)); lane 7, 5'end Cox-2 gene first PCR product(5'RACE Outer Primer, RACE 5'CoxR); lane 8, 5'end Cox-2 gene nested PCR product(5'RACE Inner Primer, RACE 5'Cox-2 R(nested)) .

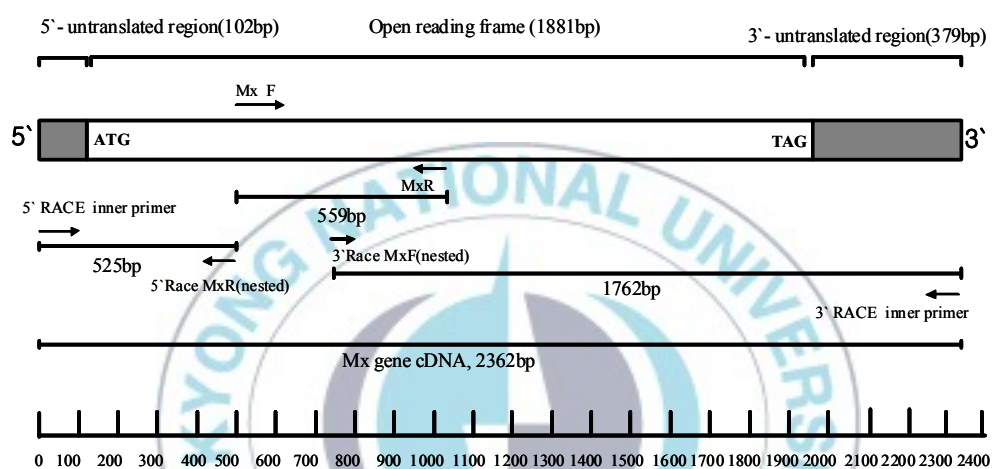


Fig. 4. A schematic illustration of the Mx cDNA cloning in rock bream with position of the primers used in PCR and RACE- PCR (gray regions : UTR)

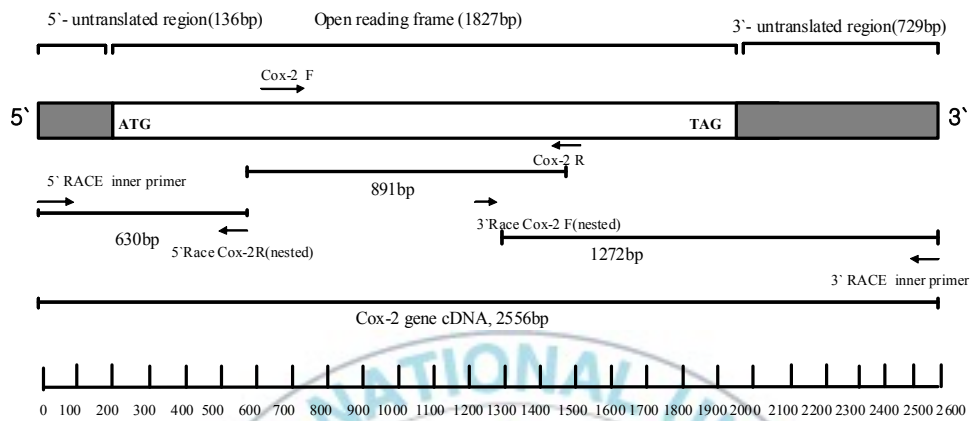


Fig. 5. A schematic illustration of the Cox-2 cDNA cloning in rock bream with position of the primers used in PCR and RACE- PCR (gray regions : UTR)

AAACAAAACGCTGAAGTACCCGCAGTTTGGATCTGTGCTACTGCAGACAGAGCTCATTTCACTATTCTTTTTTTCTTTA 80
 AAACAGACAAGAAGTCTTCATCATGAACACTCTGAATCAACAGTATGAGGAGAAAGTGCCTCCCTGCATTGACCTCATTG 160
 M N T L N Q Q Y E E K V R P C I D L I
 ACTCTCTCGCTCTCTGGGTGTAGAGAAGGACTTGGCTCTGCCTGCTATCGCCGTGATTGGAGACCAAAGCTCGGGGAAG 240
 D S L R S L G V E K D L A L P A I A V I G D Q S S G K
 AGCTCCGTGTTGGAGGCGCTGTGAGGGTGGCTCTGCCAAGAGGAAGTGGCATTGTGACAAGATGTCCTCTCGAACTGAA 320
 S S V L E A L S G V A L P R G S G I V T R C P L E L
 GATGAAGAGAAAGAAAGAGGAGAGGAGTGGTACGGAAAGATAAGCTACCAGAACTTTGAGGAAGAGATAGAAGACCCCTG 400
 K M K R K K E G E E W Y G K I S Y Q N F E E E I E D P
 CAGATGTGGAGAAAAAGATTAGAGAAGCTCAGGATGAAATGCCGGGGTGGGGTGGGGATCAGTGATGACCTCATCAGT 480
 A D V E K K I R E A Q D E M A G V G V G I S D D L I S
 CTGGAGATCGCCTCTCCTGATGTTCCAGACCTGACGCTCATTGACCTGTCGGGCATGCCAGGGTGGCTGTAAAGGGACA 560
 L E I A S P D V P D L T L I D L S G I A R V A V K G Q
 ACCAGAGAACATTGGAGATCAGATAAAGAGGCTGATCCAGAAGTTCATCACAACAAGAAACCATCAGCTTGGTGGTTG 640
 P E N I G D Q I K R L I Q K F I T K Q E T I S L V V
 TTCCATGCAACGTGGACATAGCAACACAGAGGCTTTGAACATGGCCAGCAGGTGGATCCTGATGGAGAGAGGACTTTG 720
 V P C N V D I A T T E A L N M A Q Q V D P D G E R T L
 GGTATCTTGACCAAGCCTGATCTGGTGGACAAAGGCACAGAAGAGACGGTGGTTGAAATTGTCCATAATGAGTCATCCA 800
 G I L T K P D L V D K G T E E T V V E I V H N E V I
 CCTGAAGAAGGGCTACATGATCGTCAGGTGCAGGGGTGAGAAGGATCACAGAGAAGGTGTCTCTTACTGAAGCAATAG 880
 H L K K G Y M I V R C R G Q K E I T E K V S L T E A
 AAAGAGAGAAAGCCTTCTTCAACGATCATGTGTATTTCCACGCTCTCTACAACGACGGTCATGCTACTGTTCTAGACTG 960
 I E R E K A F F N D H V Y F H A L Y N D G H A T V P R
 GCTGAGAAACTCACCTTGAGCTGGTGCATCATATTGAGAAATCTCTGCCTCGACTGGAAGAGCAGATAGAGGAGAACT 1040
 L A E K L T L E L V H H I E K S L P R L E E Q I E E
 AGCAGAGACTCAGGCAGAGCTGGAGAGATATGGCACTGGACCCCATCTGACACAGCTGAGAGACTCGTCTTCCTCATTG 1120
 K L A Q T Q A E L E R Y G T G P P S D T A E R L V F L
 ATAAAGTGACGGCATTCACTCAGGATGCCATCAGTCTGCCTGCAGGAGAGGAAGTCAAGTGTGGAGACAGGCTCAACATC 1200
 I D K V T A F T Q D A I S L P A G E E L K C G D R L N
 TTTTCTACGCTCAGAAGAGAGTTTGGGAAGTGAACGCCACCTGGACCGCTCAGGAGAAAACTTTAACAAGAGGATTGA 1280
 I F S T L R R E F G K W N A H L D R S G E N F N K R I
 GAGAGGGGTGGAGGAATATGAAGAGATGTACCGTGAAGAGAACTGCCGGGCTTCATCAACTACAAGACGTTTGAGGGCA 1360
 E R G V E E Y E E M Y R G R E L P G F I N Y K T F E G
 TGGCCAAGGACCAGATCAAACAGCTGGAAGAACCAGCTGTCAAGAGTCTTAAGGACGTAGGAGATGCTGTTAGGAAGATG 1440
 M A K D Q I K Q L E E P A V K S L K D V G D A V R K M
 TTCATACAGCTGGCCACGGTAGCTTCTCTGGATATCCCAACCTCATGAAAACGCCAAGGCAAAGATCGAAGCCATTAA 1520
 F I Q L A H G S F S G Y P N L M K T A K A K I E A I
 GCAAGAAAAAGAGTCCACTGCTGAATCCCTGCTGAGAACCCAGTTCAAGATGGAGTTGCTTGTGTACTCCAGGACAGGA 1600
 K Q E K E S T A E S L L R T Q F K M E L L V Y S Q D R
 CCTACAGCAGCAGTTTGAAGTACAGTAAGAGAGAGGAGGATGAGAAGGATGACAAGCAGAAAAAGCTTAATATTTTCATGAA 1680
 T Y S S S L S D S K R E E D E K D D K Q K S L I F H
 GAAAGGAGTATTGTGACAGCATGGATAATCATGCAACACTTCAGGAGCTGATGTTGCACCTTAATCATATTACAGGAT 1760
 E E R S I V Y S M D N H A T L Q E L M L H L K S Y Y R

TGCCAGCCAGCGTCTAGCTGACCAGATCCCGCTGGTGATCCGCTACCAGATGTTGCAGGAGTCTGCCATCCATCTGCAGA 1840
 I A S Q R ■ A D Q I P ■ V I R Y Q M ■ Q E S A I H ■ Q
 GGGAGATGCTGCAGGTGCTTCAGGACAAGGAGAATTTGGAGTTCTTGCTGAAGGAGGACTTTGACTTTGGCAGCAAGAGG 1920
 R E M ■ Q V ■ Q D K E N ■ E F L L K E D F D F G S K
 GCTGCTTTGCAGAGTCGCCTCAAACGCCTCAGGCAGGCCCGCGCATACCTGGTGGAGTTCTAGAAAGAGTTCAAGGCCTGA 2000
 R A A L Q S R L K R L R Q A R A Y L V E F *
 CAGCATGATCTTGTTTTTAAAGCTGTCACATACATTCATGGTTGTGGAGTGAGTATACTATTTGTCACATTGGGTATTGA 2080
 ATGTAGAATCGATATGTAAGTTATCTATTTGATGTGACAGCTAAATCAGAACATGTCATCAGCATAAGTCTACTATAC 2160
 CTCTTTCATTTGTCAAGTACAGTTCAACTGTGGTTGTAGGATTGTTATACTATTTTTTTTAAATATGTCCAGAGTAGAA 2240
 TGGACAGATCTGCTTTAGATGTAAACAGCTTAGTCAGAACAGGTCAACAGGTCAAAGGTCAAGTAGTTTCAAATGTACTGTA 2320
 ATATCTACTCCTATTATCATTAAAAAATGTCTAAGGCACTC 2362

Fig. 6. Nucleotide sequence and translated amino acid sequence of rock bream Mx gene. Rock bream Mx protein showed the signature of the dynamin family at amino acid positions LPRGSGIVTR, the tripartite GTP-binding domain at amino acid positions EA, DLSG ,TKPD, Shadowed leucine acids show the leucine zipper domain. Do not contain any of the common polyadenylationsignals (AATAAA), potential glycosylation sites.

AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGATTCAAACCTTTGAACAGCGAAGCGACACAACTGCGGAGGAGAGGAGAAA 80
CAGAGAGAGAGAGAGAGAAGGAGGACAAAAAGAACTTCTGACAAAGTCTTTGGAGTATGAACAACTCACATTTGCAGTT 160
M N K L T F A V
TTCTCTTGGCACTGGGTTTTCTGTCTGCGAAGCTGGTAACCCATGTTGCGCCGAACCATGTCAGAACAAAGGCGTTTG 240
F L L A L G F L V C E A G N P C C A E P C Q N K G V C
CACATCGCTCGGGGAGAGAACTACGAGTGTGACTGCACACGCACAGGTATTTGGACAAAAGTGCACAACGCCTGAGT 320
T S L G A E N Y E C D C T R T G Y F G Q N C T T P E F
TCCTCACTGGCTCAAAATTACCTGAAGCCGTCCCCAACACAGTCCACTACCTCCTCACCACCTTCAAGGGCTTCTGG 400
L T W L K I T L K P S P N T V H Y L L T H F K G F W
AACATCGTCAACAACATCTCATTTCTCAGGGATGGTATCATGACATATGTGCTGACATCTCGATCCACATGATTGATAG 480
N I V N N I S F L R D G I M T Y V L T S R S H M I D S
TCGCCCCACTTTCAATGCGGATTATAGTTACAAATGCTGGGAGGCTATTCCAACCTTTCTACTATACAGCACCTCC 560
P P T F N A D Y S Y K C W E A Y S N L S Y Y T R T L P
CCCCTGTGCCTAAAGATTGTCCAACCCCATGGGAGTAGTAGTAAAAAGGAGCTGCTGATGCTAAGGTACTGGCTGAG 640
P V P K D C P T P M G V V G K K E L P D A K V L A E
AAGCTTCTGGTGAGAAGACAGTTTATCCCGGACCCACAGGGACACAGCTGATGTTGCGATTCTTGCACAAACATTTAC 720
K L L V R R Q F I P D P Q G T S L M F A F F A Q H F T
CCACCATGTTCTTCAAATCTGATATGAAGAAAGGACCTGCTTTACCGTTGCTAAAGGTACAGGGGTGGACCTCAACCACA 800
H Q F F K S D M K K G P A F T V A K G H G V D L N H
TTTATGGAGACAGCTGGAGAGGACAGCAAGCTCAGACTCTTAAGGACGGCAAGCTTAAATATCAGATCCTGGATGGA 880
I Y G D S L E R Q H K L R L L K D G K L K Y Q I L D G
GAGGTGTACCCCCAACAGTAAAGGAAGTGGGCGTTGACATGCACTACCGTCTCATGTTCTGACTCTCACCCTTCGC 960
E V Y P P T V K E V G V D M H Y P P H V P D S H R F A
TGTGGGCCACGAGGCCTTCGGCCTGGTCCCCGGCCTGATGATGTACGCCACCATCTGGCTACGGGAACACAACCGGGCGT 1040
V G H E A F G L V P G L M M Y A T I W L R E H N R A
GTGACGTGCTGAAGGAGGTCCACCTGACTGGGACGACGAAAGGCTCTTCCAGACCTCAGGGCTATTCTGATTGGAGAG 1120
C D V L K E V H P D W D D E R L F Q T S R L I L I G E
ACCATCAAGATCGTGATCGAGGACTACGTGCAGCACCTGAGCGGATATCACTTCAAGCTCAAGTTTGACCCGAGCTGCT 1200
T I K I V I E D Y V Q H L S G Y H F K L K F D P E L
CTTCAACACGCGCTTCCAGTACCAGAACCGCATTGCGTCCGAGTTCAACACCGTGTACCACTGGCACCCGCTGATGCCTG 1280
L F N Q R F Q Y Q N R I A S E F F N T L Y* H W H* P L M
ATTCTTTCCACGTTGAGGAGCAGGATTACAGCTATAACAGTTTGTCTTCAACACCTCTGTGGTGACCGAGCACGGCATC 1360
P D S F H V E E Q D Y S Y K Q F V F N* T S V V T E H G I
AGCAACCTTGTGGAGTCGTTACCAACACAGATCGCTGGACGGGTTGCAGGTGGCCGAAATGTCCAGGACCTATCATGTA 1440
S N L V E S F T N Q I A G R V A G G R N V P G P I M
CGTGGCCATCAAGTCTATTGAAAACAGCCGACAGATGCGCTACCACTCTCTGAACGCTACAGGAAGCGATTCTCCATGA 1520
Y V A I K S I E N S R Q M R Y Q S L N A Y R K R F S M
AGCCCTACAGTTCTTTTGAAGACATGACAGGAGAGAAAGAAATGGCCGAGTACTCGAGGAGATGTACGGACACATCGAC 1600
K P Y S S F E D M T G E K E M A A V L E E M Y G H I D
GCTGTGGAGCTCTACCCGGGTCTGCTGGTGGAGAAACCCAGGCCTAACGCCATCTTTGGGAGACCATGGTGGAGATGGG 1680
A V E L Y P G L L V E K K P R P N A I F G E T M V E M
GGCCCCCTTCTCCCTCAAGGGCTTAATGGGAAACCCCATCTGCTCCCCGGAGTACTGGAAGCCAGCACATTCGGAGGCA 1760
G A P F S* L K G L M G N P I C S P E Y W K P S T F G G

GGGAACGCGTTTCT 2666

GGGAACGCGTTTCT 2666

2. Genomic DNA cloning 과 염기서열 분석

돌돔의 Mx gene 과 Cox-2 gene cDNA 염기서열을 바탕으로 돌돔의 비장에서 분리한 DNA를 template로 해서 genomic DNA에 대한 PCR을 실시하였다. Cox-2 gene 의 경우 Cox 1F-RBCoxR , Genomic CoxF-Genomic CoxR , RBCoxF-Genomic Cox2R primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과 Genomic CoxF-Genomic CoxR primer 를 이용하여 PCR한 결과 band를 얻을 수 없었으며, Cox 1F-RBCoxR , RBCoxF-Genomic Cox2R primer 이용하여 1448bp, 2220bp 로 2개의 products를 얻을 수 있었다 (Fig. 8). 그 products를 elution하여 cloning한 후 plasmid를 분리하여 sequencing하였다. 그 결과 돌돔의 Cox-2 gene genomic DNA의 전체 염기서열을 결정할 수 있었다. exon과 intron을 구분하기 위해 cDNA의 염기서열과 genomic DNA의 염기서열을 비교한 결과 돌돔의 Cox-2 gene genomic DNA organization은 전체 4196bp로 6개의 exon과 5개의 intron으로 구성되어 있는 것을 확인하였다 (Fig. 9). 같은 방법으로 돌돔의 Mx gene의 cDNA의 염기서열과 genomic DNA의 염기서열을 비교한 결과 돌돔의 Mx gene genomic DNA organization은 전체 3155bp로 8개의 exon과 7개의 intron으로 구성되어 있는 것을 확인하였다 (Fig. 10).

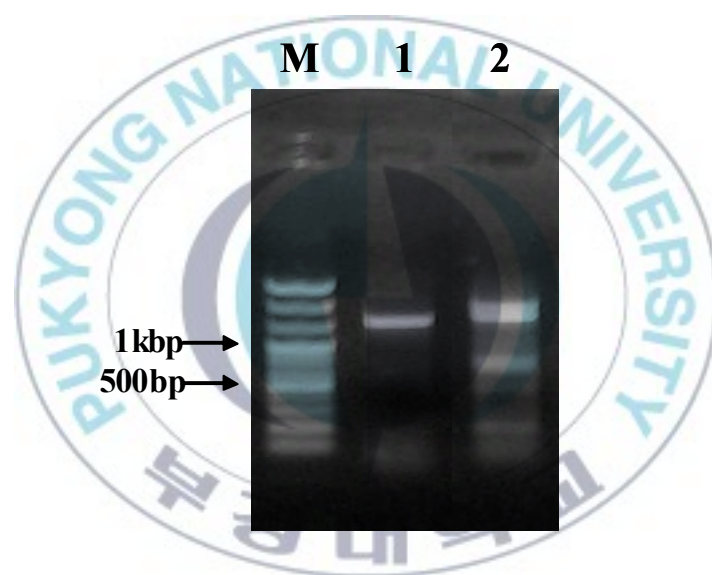


Figure. 8. Agarose gel electrophoresis of the amplicons produced in PCR with specific primers and the genomic DNA as template.

Lane 1. Cox 1F-RBCoxR ; lane 2. RBCoxF-Genomic Cox2R

M, 100-bp DNA ladder.

AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGATTCAAACCTTTGAACAGCGAAGCGACACAACCTGCGGAGGAGAGGAGAAA 80
CAGAGAGAGAGAGAGAAGGAGGACAAAAGAAGCTTCTGACAAAGTCTTTGGAGTATGAACAACTCACATTTGCAGTT 160
M N K L T F A V
TTCCTCTTGGCACTGGGTTTTCTTGCTGCGAAGCTGGTAACCCATGTTGCGCCGAACCATGTCAGAACAAGGGCGTTTG 240
F L L A L G F L V C E A G N P C C A E P C Q N K G V C
CACATCGCTCGGGGAGAGAACTACGAGTGTGACTGCACACGCACAGGGTATTTTGGACAAAAGTGCACAACGCCTGAGT 320
T S L G A E N Y E C D C T R T G Y F G Q N C T T P E F
TCCTCACCTGGCTCAAAATTACCTGAAGCCGTCCCCAACACAGTCCACTACCTCCTCACCCTTCAAGGGCTTCTGG 400
L T W L K I T L K P S P N T V H Y L L T H F K G F W
AACATCGTCAACAACATCTCATTTCTCAGGGATGGTATCATGACATATGTGCTGACATCTCGATCCACATGATTGATAG 480
N I V N N I S F L R D G I M T Y V L T S R S H M I D S
TCCGCCACTTTCAATGCGGATTATAGTTACAATGCTGGGAGGCTATTCCAACCTTTCTACTATACACGCACCTCC 560
P P T F N A D Y S Y K C W E A Y S N L S Y Y T R T L P
CCCTGTGCTAAAGATTGTCCAACCCCATGGGAGTAGTAGGTAAAAGGAGCTGCCTGATGCTAAGGTACTGGCTGAG 640
P V P K D C P T P M G V V G K K E L P D A K V L A E
AAGCTTCTGGTGAGAAGACAGTTTATCCCGGACCCACAGGGCACCAGCCTGATGTTGCGATTCTTCCGACAACATTTTAC 720
K L L V R R Q F I P D P Q G T S L M F A F F A Q H F T
CCACCAGTTCTTCAAATCTGATATGAAGAAAGGACCTGCTTTTACCGTTGCTAAAGGTACCGGGTAAAGCACAGCAGATT 800
H Q F F K S D M K K G P A F T V A K G H G
TCAAGCCCCATCAGATTTTGGTCAGGAAAGAGAGACAAAGAATCGTTTGTTAAAAATACAGCATGTGCTCATGGTGTGT 880
TTTTGCTCCAGGTGGACCTCAACCACATTTATGGAGACAGCCTGGAGAGGCAGCACAAGCTCAGACTCTTAAAGGACGG 960
V D L N H I Y G D S L E R Q H K L R L L K D
CAAGCTTAATATCAGGTATGAGAAGAGACAGATGTTGAGCAGTTTAAACAGCCAAATGCTTCAGACCACACAAGTGTCT 1040
G K L K Y Q
AACGGTGTCTTCTCTCTGATACTCTGCAGATCCTGGATGGAGAGGTGTACCCCCAACAGTAAAGGAAGTGGGCG 1120
I L D G E V Y P P T V K E V G
TTGACATGCACTACCCTCCTCATGTTCTGACTCTCACCCTGCTGCTGGGCCACGAGGCTTCCGCTGGTCCCCGGC 1200
V D M H Y P P H V P D S H R F A V G H E A F G L V P G
CTGATGATGTACGCCACCATCTGGCTACGGGAACACAACCGGGTGTGTGACGTGCTGAAGGAGGTCCACCCTGACTGGGA 1280
L M M Y A T I W L R E H N R A C D V L K E V H P D W D
CGACGAAAGGCTCTTCCAGACCTCACGGCTCATTCTGATTGTTGAGTTTACAAGATTCTGACAGCTGCACAAAACCTTTG 1360
D E R L F Q T S R L I L I G
AAAACATTGCTCTATTGTATTTGCTGGGAAAATAAAGTAAATAATGACAAGAGAGCCAAATAGTTACCATGGGAGTTA 1440
TGAAAAGAGGAAGTTGTACTTTTTATTTCTGTAATCAGCTACTAGCAACCGTATTGCACACTGCAGATCATTTGAGCTCT 1520
ACTGTGAGAAACAGGATTTACTGACTGATGTGAGAAAGAGGAAATGTTTGACTTCACTGCCTGACGTCAAACACTACAG 1600
CCAAAACAATCTAAAGATCCCTCCACACATGTTTAAAGACATATGAAATACACTGCTTGAATAATAATTTGCGTCTGAT 1680
ATTGATTTTCCACAAAAAGCAAACACTTAAAAATTTTAAACTACATGTACTTCTCTCACTCGTTGAAAAATACAG 1760
AATCTTTATCAAAAGTTTAAATGCTGGACACAAGAGGTCTCCTAATCACTGAACAGTTTATTCTCAATGTATGTGAAC 1840
TTTAAACATCTATAATATCTGCATTACATAAAATATTTGATCATTTGCTGCGAGGAGAGACCATCAAGATCGTGATCGA 1920
E T I K I V I E
GGACTACGTGCAGCAGCTGAGCGGATATCACTTCAAGCTCAAGTTTGACCCCGAGCTGCTCTTCAACCAGCGCTTCCAGT 2000
D Y V Q H L S G Y H F K L K F D P E L L F N Q R F Q Y

ACCAGAACCGCATTGCGTCCGAGTTCAACACCCTGTACCACTGGCACCCCTGATGCCTGATTCTTTCCACGTTGAGGAG 2080
 Q N R I A S E F F N T L Y H W H P L M P D S F H V E E
CAGGATTACAGCTATAACAGTTTGTCTTCAACACCTCTGTGGTGACCGAGCACGGCATCAGCAACCTTGTGGAGTCGTT 2160
 Q D Y S Y K Q F V F N T S V V T E H G I S N L V E S F
CACCAACCAGATCGCTGGACGGGTAAGAGCTGTTTGAGCTGTCTAGCAGCACTTAGATTCAGATTGTGACACCAAGTGTT 2240
 T N Q I A G R
 GCTTTAAGGCTGATTTACTGACTTCCCATTCATTTCTTTTAGGTTGCAGGTGGCCGAAATGTCCAGGACCTATCATGT 2300
 V A G G R N V P G P I M
ACGTGGCCATCAAGTCTATTGAAAACAGCCGACAGATGCGCTACCAAGTCTCTGAACGCCTACAGGAAGCGATTCTCCATG 2360
 Y V A I K S I E N S R Q M R Y Q S L N A Y R K R F S M
AAGCCCTACAGTTCTTTTGAAGACATGACAGGTGAGACGAAGTCAAGATCATTACAAAGCCTAATACTTGCAAGGTGGAA 2440
 K P Y S S F E D M T
 AGGATGACGGCAGGAGATTAGTGAAGATGTTATTATCAACATGAAATGAAAGGAAATGTTGCCTCAGGCCAAATTATAGT 2520
 TGCATTATTAATAGCATTGTTATGAGCTGATTGCAGGAATAAAAACACACCCAGCTGCCACAGATCAAAGCTTGTGTG 2600
 ATAGATTACTTATTAAGGAAATGGTTTGGACTCAGCTCTAGTCCCCAGCAGCTTGGAGGTTAGGAATTTATTTCC 2680
 GTGACTCTTAAGACCAGATGTTCACTTCGTCTTGAGACAGTGTAAAGCAGATTGTCTACAGAGAGCAAGACATAAACA 2760
 GACAAGAGAGGCCTCCTGCTTCAGAGGAGAAGATTTAAATTCGCAAGATAAGAGGATTTAATATCAAAAATACTGTG 2840
 ATGTATGTATGAGGAGAGGAAATATCAGTGTGTGTGTGTATGCTTGTAAGAGAGACATGAATGAGAAGGAAGTGAAG 2920
 ACAGAAAGAGATCATTTTTATCTACCATTTGCTGGATTTGAATCAGTCAAAACACAGAGCTCATATTTAGACTAGCAGC 3000
 AAGCTTTGCAGCTGCTGAGCCAGCAAGAGAAGCCAGATTGAGGCGCTAACCAAACTATTTCTCCTCTGTGTTACTCAG 3080
GAGAGAAAGAAATGGCCGAGTGCTCGAGGAGATGTACGGACACATCGACGCTGTGGAGCTTACCCGGGCTGCTGGTG 3160
 G E K E M A A V L E E M Y G H I D A V E L Y P G L L V
GAGAAACCCAGGCCCTAACGCCATCTTTGGGAGACCATGGTGGAGATGGGGGCCCTTTCTCCCTCAAGGGCTTAATGGG 3240
 E K K P R P N A I F G E T M V E M G A P F S L K G L M
AAACCCATCTGCTCCCGGAGTACTGGAAGCCAGCACATTCGGAGGCAGCGTGGGCTTCGACATCGTCAACACCGGCT 3320
 G N P I C S P E Y W K P S T F G G S V G F D I V N T A
CCCTGCAGAGGCTCGTCTGCAATAACGTCCGCGGCCCTGTCCCGTGGCATCCTTTCATGTGCCGACGTTAAAGACACA 3400
 S L Q R L V C N N V R G P C P V A S F H V P D V K D
GGCTCCATGATCATCAACTCAAGCACGTCCCACTCGCGCAGCAGTGATATCAACCCACAGTCATTTGAAAGAAAGGAC 3480
 T G S M I I N S S T S H S R S S D I N P T V I L K E R
TACTGAGCTTTAATTTTTGTATTATTTCTTAGGTTCTTTTTTAATATATGTAATTTATTTATTTATTTATTTTGTATTTA 3560
 T T E L *
TTGTCCCATATTTATGACATAACATGAGAAAGTGAACACAGAGTTTTTTTTATATGTAATTTTGTATGTTTTGTCTGA 3640
TTATCGAACAAAGTCTGTGGTTGTGTTTATTTATTGAAAGATTGTTATTATAAGTTATTGTTCCAGTAATGACCTCAGT 3720
CAGTGCAACTTGATACTTGAAGTTGGTTTATAGTTTCAACTGCATAGTACGTACATTACACTTCTAATGTAATAATAT 3800
GTTTCATTCAATTGTGCGGCTGCCCCAGTGACACACAGAGATCTGTTTTGCAGACAGCGATTGAGTAGCACATCAGTAGTA 3880
ATGTTGCGCAGTGAACCTAACGACTGATCTCTTGATCTAATGTAACACACAGTAAAGTGCAATTCCTGTTTCAGTATTGTT 3960
TACTGATGTTTTTCTTCTTGAGGCTGTGATTGGCTTGGGTAATTTGAAATGACATGAATAACCCCTGAGTTTAAAGCTGC 4040
ACTGTTGTTTAAACTGTACTGTTGTTCTGTAGAAATTGTATCATTGAGTTATATAGGCTTAACAAAGCCATGCAGTTTC 4120
TTAGTTTGTCTCAATGCCTATTGACTTGCAAGGTTGACACTAATAATGCTACCAGAAAATGGAACGCGTTTCT 4196

Figure. 9. Compiled full-length rock bream Cox-2 gene sequence.

Exon regions underlined are derived from the cDNA sequence.

AAACAAAACGCTGAAGTACCCGCAGTTTGGATCTGTGCTACTGCAGACAGAGCTCATTTCACTATTCCTTTTTTCTTTA 80
AAACAGACAAGAAGTCTTCATCATGAACACTCTGAATCAACAGTATGAGGAGAAAGTGCCTCCCTGCATTGACCTCATTG 160
M N T L N Q Q Y E E K V R P C I D L I
ACTCTCTCGCTCTCTGGGTGTAGAGAAGGACTTGGCTCTGCCTGCTATCGCCGTGATTGGAGACCAAAGCTCGGGGAAG 240
D S L R S L G V E K D L A L P A I A V I G D Q S S G K
AGCTCCGTGTTGGAGGCGCTGTGAGGGGTGGCTCTGCCAAGAGGAAGTGGCATTGTGACAAGATGTCCTCTCGAACTGAA 320
S S V L E A L S G V A L P R G S G I V T R C P L E L
GATGAAGAGAAAGAAAGAGGAGAGGAGTGGTACGGAAAGATAAGCTACCAGAACTTTGTGGAAGAGATAGAAGACCCCTG 400
K M K R K K E G E E W Y G K I S Y Q N F E E E I E D P
CAGATGTGGAGAAAAGATTAGAGAAGGTACAGTATACAGCTTTCTCAAATGTCACTATCAAAAGCCAAGTATTGAAGGA 480
A D V E K K I R E
GCTACTGAAGTGTITTAGGTTTCAGTGATCAGCACTTCCATCCTTTGTAATCAGCATACATCATGCTCTCTCTCCAGC 560
TCAGGATGAAATGGCCGGGTGGGGTGGGGATCAGTGATGACCTCATCAGTCTGGAGATCGCCTCTCTGATGTTCCAG 640
A Q D E M A G V G V G I S D D L I S L E I A S P D V P
ACCTGACGCTCATTGACCTGTCCGGCATCGCCAGGGTGGCTGTAAGGGACAACCAGAGAACATTGGAGATCAGGTATGA 720
D L T L I D L S G I A R V A V K G Q P E N I G D Q
TTGTTCAAGTGTCCCAAAACACGCTGTGAGCAGCCTCACAGCAAGGCTACAAACATTCACTCCTGTAATATTCACTCATC 800
ATGTCAATAGACAACTACTACTATTGATAGTTGTACAACCTTATACTTATGTAACAATGAATTCATGCTTTCAGAT 880
AAAGAGGCTGATCCAGAGTTTCATCACAACCAAGAAACCATCAGCTTGGTGGTTGTTCCATGCAACGTGGACATAGCAA 960
I K R L I Q K F I T K Q E T I S L V V V P C N V D I A
CCACAGAGGCTTTGAACATGGCCAGCAGGTGGATCCTGATGGAGAGAGGACTTTGGTAAATAGAGCTGCTTTAGAAA 1040
T T E A L N M A Q Q V D P D G E R T L
GGGGCCACATGGCCAAGTTGCTTGAAGTTTATAGATAGTCACTGTCTGCTTGTCTTCTTCTCAGGTATCTTGACCAAGC 1120
G I L T K
CTGATCTGGTGGACAAAGGCACAGAGAGAGCGGTGGTGAATTTGCCATAATGAGGTCACTCCACCTGAAGAAGGGCTAC 1200
P D L V D K G T E E T V V E I V H N E V I H L K K G Y
ATGATCGTCAGGTGCAGGGGTGAGAAGGATCACAGAGAAGGTGTCTTACTGAAGCAATGAAAGAGAGAAAGCCTT 1280
M I V R C R G Q K E I T E K V S L T E A I E R E K A
CTTCAACGATCATGTGTATTTCCAAGTAAGTTAATTCTTTTGGGAATTGTGTAATAATTGTAACATAATATTTATGTGG 1360
F F N D H V Y F
TAAAGTGTGTCAGGTTGTGAGCATGTACTCAGTAACCTTTTATTCTTGCTGTAGCGCTCTCTACAACGACGGTCATG 1440
H A L Y N D G H
CTACTGTTCTAGACTGGCTGAGAACTCACCTTGAGCTGGTGCATCATATTGAGTATTGAGGTGAATGTATCTTATTT 1520
A T V P R L A E K L T L E L V H H I
CTTTACCTTAACAATTCACTGTATAAATTATGATTAGTCACCTTCGCTGTAAGGTTTTGACCTCTGTGTGATTGCAGAA 1600
ATCTCTGCCTCGACTGGAAGAGCAGATAGAGGAGAACTAGCACAGACTCAGGCAGAGCTGGAGAGATATGGCACTGGAC 1680
E K S L P R L E E Q I E E K L A Q T Q A E L E R Y G
CCCCATCTGACACAGCTGAGAGACTCGTCTTCTCATTGATAAAGTGACGGCATTCACTCAGGATGCCATCAGTCTGCCT 1760
T G P P S D T A E R L V F L I D K V T A F T Q D A I
GCAGGAGAGGAACCTAAGTGTGGAGACAGGCTCAACATCTTTTCTACGCTCAGAAGAGAGTTTGGGAAGTGAACGCCCA 1840
S L P A G E E L K C G D R L N I F S T L R R E F G K W N
CCTGGACCGCTCAGGAGAAACTGTGAGTGTATCATTTTGTCTCAGGTCTACAGCCGTCCATCAGCAGGACTCTGAAATAA 1920
A H L D R S G E

TATGTTTGTGTTGCAGTTAACAAGAGGATTGAGAGAGGGGTGGAGGAATATGAAGAGATGTACCGTGGAAGAGAACTG 2000
 N F N K R I E R G V E E Y E E M Y R G R E L
CCGGGCTTCATCAACTACAAGACGTTTGAGGGCATGGCCAAGGACCAGATCAAACAGCTGGAAGAACCAGCTGTCAAGAG 2080
 P G F I N Y K T F E G M A K D Q I K Q L E E P A V K S
TCTTAAGGACGTAGGAGATGCTGTTAGGAAGATGTTTCATACAGCTGGCCACGGTAGCTTCTCTGGATATCCCAACCTCA 2160
 L K D V G D A V R K M F I Q L A H G S F S G Y P N L M
TGAAAACCGCCAAGGCAAGATCGAAGCCATTAAGCAAGAAAAAGAGTCCACTGCTGAATCCCTGCTGAGAACCCAGTTC 2240
 K T A K A K I E A I K Q E K E S T A E S L L R T Q F
AAGATGGAGTTGCTTGTGTACTCCAGGACAGGACCTACAGCAGCAGTTTGAGTGACAGTAAGAGAGAGGAGGATGAGAA 2320
 K M E L L V Y S Q D R T Y S S S L S D S K R E E D E K
GGATGACAAGCAGAAAAGCTTAATATTTTCATGAAGAAAGGAGTATTGTGTACAGCATGGATAATCATGCAACACTTCAGG 2400
 D D K Q K S L I F H E E R S I V Y S M D N H A T L Q E
AGCTGATGTTGCACCTTAAATCATATTACAGGGTAAAGTTTAAATTTAGGAGGATGATTGATGAACACAACATGACAGGTT 2480
 L M L H L K S Y Y R
 TAGACAGAGGGTGTGTTTTCAATAATTCGCCTTGTCTGTCAAACCTTTTTTTCCTTTGTCTCTCTCCAGATTGCCAGC 2560
 I A S
CAGCGTCTAGCTGACCAGATCCCGCTGGTGATCCGCTACCAGATGTTGCAGGAGTCTGCCATCCATCTGCAGAGGGAGAT 2640
 Q R L A D Q I P L V I R Y Q M L Q E S A I H L Q R E M
GCTGCAGGTGCTTCAGGACAAGGAGATTGGAGTCTTGCTGAAGGAGGACTTTGACTTTGGCAGCAAGAGGGCTGCTT 2720
 L Q V L Q D K E N L E F L L K E D F D F G S K R A A
TGCAGAGTCGCCTCAAACGCCTCAGGCAGGCCCGGCATACCTGGTGGAGTTCTAGAAGAGTTCAAGGCCTGACAGCATG 2800
 L Q S R L K R L R Q A R A Y L V E F *
ATCTTGTGTTTTTAAGCTGTCACATACATTATGGTTGTGGAGTGAGTATACTATTTGTCACATTGGGTATTGAATGTAGA 2880
ATCGATATGTAAAAGTTATCTATTTGATGTGACAGCTAAATCAGAACATGTCATCAGCATAAGTCTACTATACCTCTTTC 2960
ATTTGTCAAGTACAGTTCAACTGTGGTTGTAGGATTGTTATACTATTTTTTTTTTAATATGTCCAGAGTAGAATGGACAG 3040
ATCTGCTTTAGATGTAACAGCTTAGTCAGAACAGGTCAACAGGTCAAAGGTCAAGTCTAGTTTCAAATGTACTGTAATATCTA 3120
CTCCTATTATCATTAAAAAATGTCTAAGGCACTC 3155

Figure. 10. Compiled full-length rock bream Mx gene sequence.

Exon regions underlined are derived from the cDNA sequence

3. 염기서열의 비교 분석

돌돔의 Mx gene 과 Cox-2 gene cDNA 와 GenBank에 등록되어 있는 sea bass , rainbow trout, flounder , rat, human 의 Mx gene, Cox-2 gene cDNA 아미노산을 MEGA 4 program을 사용하여 비교해 보았을 때 Mx gene의 경우 sea bass와의 amino acid identity 가 91% 가장 높았으며 Cox-2 의 경우 sea bass와의 amino acid identity 가 73% 를 나타내었다 그리고 rock bream 과 서로 다른 어종간의 amino acid identity 는 50%~ 70% 의 분포를 나타내었다. 일반적으로 rock bream을 포함한 다른 어류들의 Mx gene과 Cox-2 gene cDNA sequence에서 포유류와는 낮은 amino acid identity 를 나타내는 경향이 있었다 (Table 2-3 , Fig. 11-12).

Table 2. Amino acid sequence homology of rock bream Mx gene with other known Mx gene sequences.

	Rock bream	Sea bass	Chinese perch	Lates calcarifer	Flounder	Seabream	Grouper	Rainbow trout	Mouse Mxl	Rat Mxl	Hman MxA
Rock bream		91	89	87	80	79	86	82	52	52	56
Sea bass			91	89	84	81	87	84	51	52	57
Chinese perch				87	81	79	88	83	51	52	57
Lates calcarifer					83	81	87	83	51	51	56
Flounder						81	81	77	50	51	55
Seabream							79	76	53	52	57
grouper								80	51	51	56
Rainbow trout									52	51	55
Mouse Mxl										78	66
Rat Mxl											68
Hman MxA											

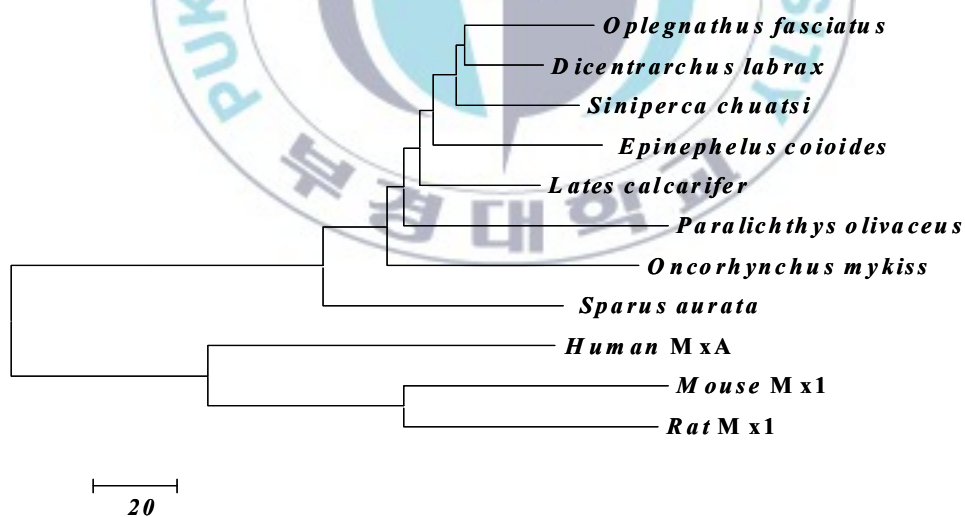


Fig. 11. Phylogenetic tree showing the relationship between the rock bream Mx gene amino acid sequence with other known Mx gene amino acid sequences.

Table 3. Amino acid sequence homology of rock bream Cox-2 gene with other known Cox-2 gene sequences.

	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	<i>Fundulus heteroclitus</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>C.Porcellus</i> (pig)	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (rabbit)	<i>Rattus norvegicus</i> (rat)
<i>Oplegnathus fasciatus</i>		87	73	74	71	72	71
<i>Fundulus heteroclitus</i>			72	74	70	72	72
<i>Dicentrarchus labrax</i>				74	71	71	71
<i>Oncorhynchus mykiss</i>					71	69	70
<i>C.Porcellus</i> (pig)						87	86
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (rabbit)							88
<i>Rattus norvegicus</i> (rat)							



Fig. 12. Phylogenetic tree showing the relationship between the rock bream Cox-2 gene amino acid sequence with other known Cox-2 gene amino acid sequences.

Table 4. Comparison of sequence identity between rock bream Mx gene and the Mx gene of other species.

Species	NCBI accession no.	Protein region compared	% identity
Sea bass	AY42496	1-626	91
Chinese perch	AY392097	1-626	89
Lates calcarifer	AY821518	1-626	87
Flounder	AB110446	1-626	80
Seabream	AF491302	1-626	79
Grouper	AY574372	1-626	86
Rainbow trout	U47946	1-626	82
Mouse Mx1	M21117	8-626	52
Rat Mx1	X52711	7-626	52
Hman MxA	M30817	2-626	59

Table 5. Comparison of sequence identity between rock bream Cox-2 gene and the Cox-2 gene of other species.

Species	NCBI accession no.	Protein region compared	% identity
Mummichog	AY532939	1-608	87
Sea bass	AY42496	1-608	73
Rainbow trout	U47946	1-608	74
Pig	Y07896	1-608	71
Rabbit	U97696	1-608	72
Rat	U03389	5-608	71

4. Immunostimulants 에 의한 Mx gene 과 Cox-2 gene 의 발현 분석

4. 1. 조직별 발현량 분석

100g~150g 의 돌돔에 LPS(100 μ g/fish) 와 Poly I:C(500 μ g/fish)을 복강 주사하여 여러 조직을 이용하여 면역 유전자 발현을 비교 분석해 본 결과 Poly I:C 에 의해서 유도되는 Mx gene의 경우 아무런 자극을 받지 않은 control group 에 비해 LPS 로 자극시킨 경우보다 Poly I:C 로 자극시킨 경우 4.6 배와 16.6 배로 4배 정도 높은 발현을 나타내었으며, Cox-2 gene의 경우 control group 보다 2배 정도로 발현하였으며, Cox-2 gene 역시 두 group에서 뚜렷한 차이를 관찰 할 수 없었다 (Fig. 13, 15). Poly I:C 에 의해 유도된 Mx 1, 2, 3 gene을 conventional PCR 을 통해 비교한 결과 Mx 2 유전자는 Poly I:C 로 자극한 후 control 에 비해 1일 째 가장 많이 유도되었으며, 시간이 지날수록 감소되었다. Mx 3 유전자는 자극 후 1일 째 발현되긴 하였지만, Mx 1, 2, 3 유전자 중에 가장 작게 발현되었다. Mx 1 유전자의 경우 시간에 따른 유전자 발현 차이를 알 수 없었다 (Fig. 14).

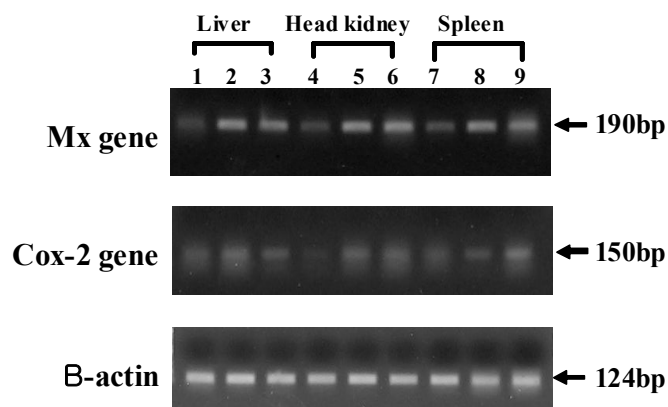


Fig. 13. Expression of immine genes in rock bream different organs injected immunostimulants intraperitoneally. Lanes 1, 4 , 7 , PBS ; lanes 2, 5 , 8 , stimulated with poly I:C (500 μ g/0.1ml) ; lanes 3 , 6, 9, stimulated with LPS (100 μ g/0.1ml).

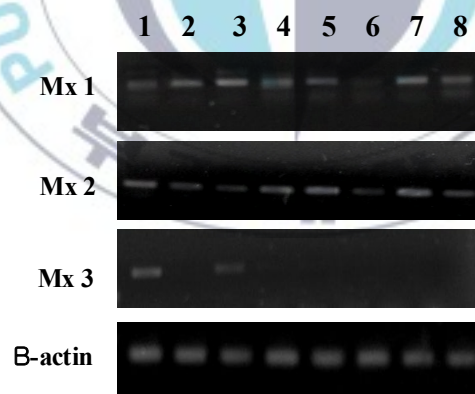


Fig. 14. Mx1, Mx2 and Mx3 isoforms expression in liver cells stimulated for different periods of time with Poly I:C Lanes 1-2, PBS ; lanes 3-4, 1 day ; lane 5-6, 3 days ; lane 7-8, 7 days.

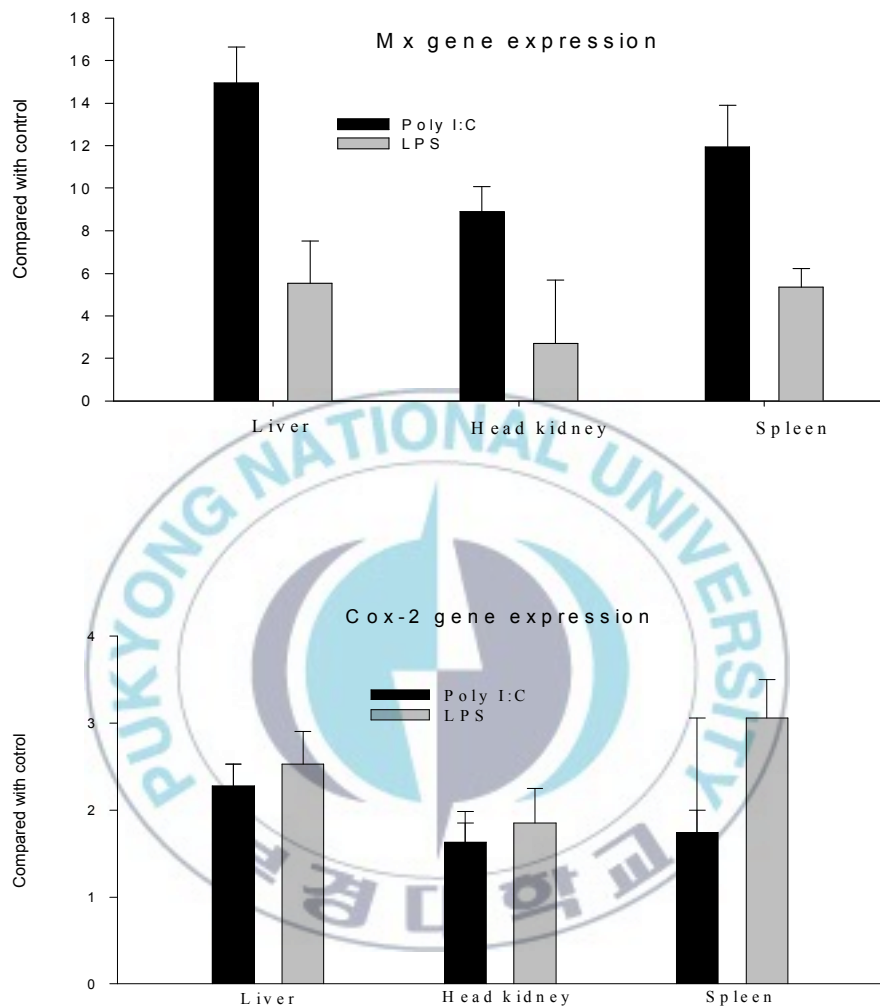


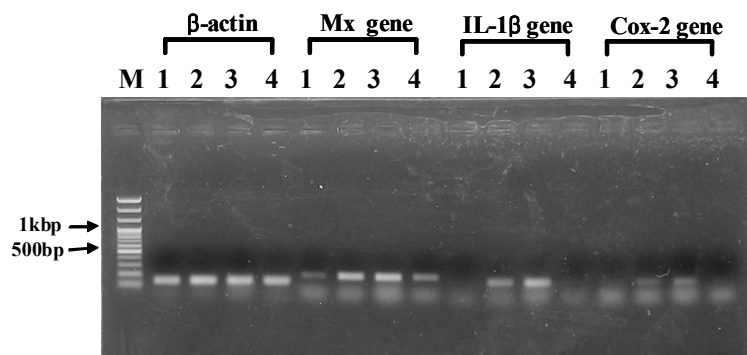
Fig. 15.. Expression levels of Mx and Cox-2 genes using Q-PCR in different organs of rock bream following immunostimulants. Ct value of each gene by real-time PCR was compared with the corresponding Ct value in cells of fish injected PBS.

5. Virus의 감염에 대한 면역반응 분석

5. 1. 온도에 따른 면역반응 분석

Iridovirus 의 특성상 적온인 25~26℃보다 낮은 수온에서는 낮은 병원성을 지니는 점과, 적온이외의 수온이 면역반응에 미치는 관계를 알아보하고자 하였다. Iridovirus의 적온인 25℃ 에서는 감염 후 평균 7일이 지나면 폐사는 일어나지만 iridovirus의 감염력이 낮아지는 18℃에서 감염 후 15일 이상이 지난 후 처음 폐사가 일어났다. 이런 결론을 바탕으로 25℃와 18℃ 환경에서 돌돔에 iridovirus를 인위감염 시킨 후 1일, 3일, 7일 째 virus copy number를 real time PCR 을 이용하여 확인한 결과 25℃ 에서는 iridovirus를 감염 후 spleen 조직에서 1일째 1.47 E+02 viral copies/mg of infected tissue 로 시작하여 감염 후 7일째 2.55 E+07 viral copies/mg of infected tissue 로 virus copy number는 빠르게 증가하였지만, 18℃ 에서는 감염 후 1일째 6.12 E+01 viral copies/mg of infected tissue 로 시작하여 감염 후 7일째 1.79 E+02 viral copies/mg of infected tissue 로 25℃에 비해 바이러스가 천천히 증식하는 것을 확인하였다. 25℃에서는 감염 후 3일째 IL-1 β gene, Mx gene, Cox-2 gene은 control group 에 비해 15배, 20배, 10배 로 가장 높은 발현을 보였다. 18℃에서는 감염 후 7일째 가장 높은 값을 보였으며, IL-1 β gene, Mx gene, Cox-2 gene 순으로 control 에 비해 9배, 13배, 2배의 fold 값을 확인하였다 (Fig. 16~17, Table 6~7). Virus 감염에 의한 Mx 1, 2, 3 gene 의 발현량 비교 결과 감염 후 3일째 가장 높은 발현을 보였으며, Mx 2 가 Mx 1, 2, 3 gene 중에 virus 감염에 의해서 가장 많은 양이 유도 되었다 (Fig. 18).

(A)



(B)

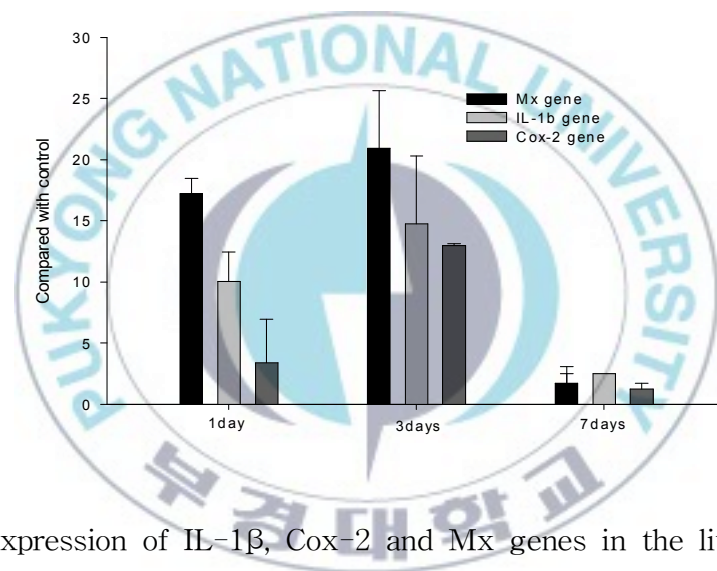


Fig. 16. Expression of IL-1 β , Cox-2 and Mx genes in the liver cells of rock bream infected iridovirus at 25°C (A) Agarose gel electrophoresis of products obtained by conventional PCR. Lane 1. PBS injection; lanes 2. 1 day after iridovirus injection ; lane 3. 3 days after iridovirus injection; lane 4. 7 days after iridovirus injection. M,100-bp DNA ladder (B) Real time PCR results for immune genes expression level in the liver of infected rock bream. Ct value of each gene by real-time PCR was compared with the corresponding Ct value in cells of fish injected PBS.

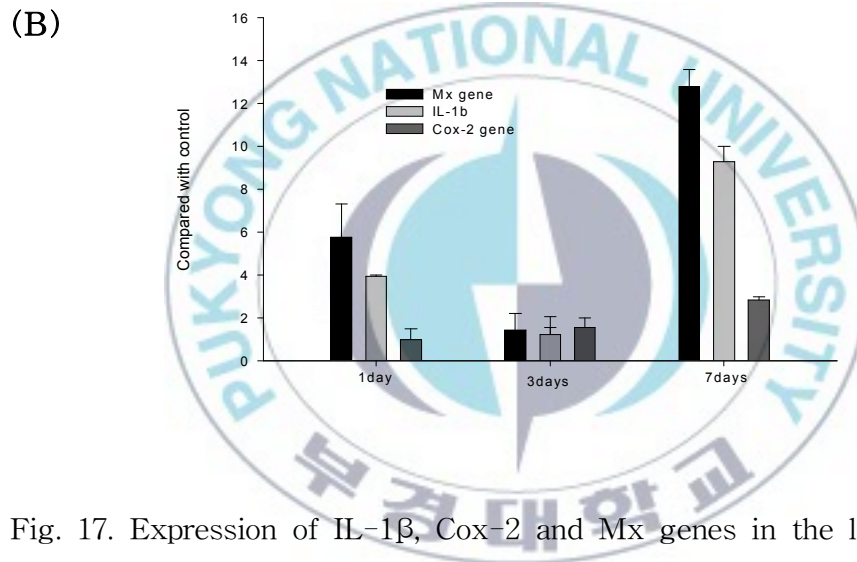
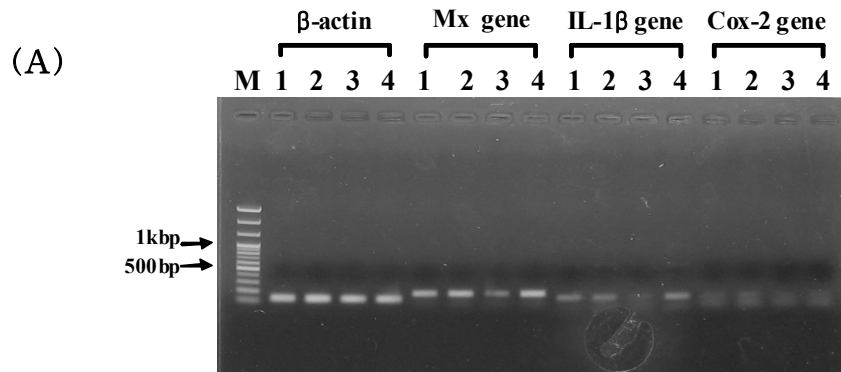


Fig. 17. Expression of IL-1 β , Cox-2 and Mx genes in the liver cells of rock bream infected iridovirus at 18°C (A) Agarose gel electrophoresis of products obtained by conventional PCR. Lane 1. PBS injection; lane 2. 1 day after iridovirus injection.; lane 3. 3 days after iridovirus injection; lane 4. 7 days after iridovirus injection. M,100-bp DNA ladder (B) Real time PCR results for immune genes expression level in the liver of infected rock bream. Ct value of each gene by real-time PCR was compared with the corresponding Ct value in cells of fish injected PBS.

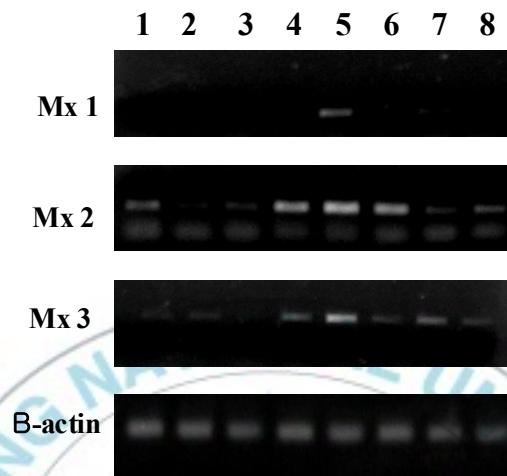


Fig. 18. Expression of Mx1, Mx2 and Mx3 isoforms in liver cells from to indiviual fish infected with iridovirus Lanes 1-2, PBS injection; lanes 3-4, 1 day after iridovirus injection ; lane 5-6, 3 days after iridovirus injection; lane 7-8, 7 days after iridovirus injection.

Table 6. Viral copy number in various infected tissue(1mg) of infected rock bream by iridovirus.

Water temperature	Sampling time	Viral copies./mg of infected tissue					
		Spleen		Head Kidney		Liver	
		Meac C _t value	Number of viral particle	Meac C _t value	Number of viral particle	Meac C _t value	Number of viral particle
18 °C	Day 1	31.74	6.12E+01	31.16	8.83E+01	31.81	5.85E+01
	Day 3	32.15	4.74E+01	31.14	8.93E+01	31.05	9.48E+01
	Day 7	30.04	1.79E+02	30.78	1.19E+02	30.56	1.29E+02
25 °C	Day 1	30.35	1.47E+02	29.36	2.73E+02	29.98	1.94E+02
	Day 3	25.03	4.02E+03	28.74	1.15E+03	29.11	9.48E+02
	Day 7	13.65	2.55E+07	16.4	1.29E+07	18.38	9.67E+06

Table 7. Innate immune response in liver cells of rock bream after iridovirus injection at 25°C and 18°C (referenced by figure 16–17).

Water temperature	Sampling time	Gene	Treatment	Fold expression	PCR	Meac C _t value	Number of viral particle
18 °C	Day 1	IL-1 β	Iridovirus	3.96	-	31.7	6.12E+01
		Cox-2		1			
		Mx		5.76			
	Day 3	IL-1 β		1.23	-	32.15	4.74+E+01
		Cox-2		1.55			
		Mx		1.43			
	Day 7	IL-1 β		9.28	-	30.04	1.79+E02
		Cox-2		2.83			
		Mx		13.6			
25 °C	Day 1	IL-1 β	Iridovirus	10.05 $\pm$ 2.14	-	30.35	1.47E+02
		Cox-2		6.95 $\pm$ 3.55			
		Mx		18.46 $\pm$ 1.24			
	Day 3	IL-1 β		14.77 $\pm$ 5.52	-	25.03	4.02E+03
		Cox-2		12.96 $\pm$ 0.17			
		Mx		20.94 $\pm$ 1.66			
	Day 7	IL-1 β		2.48 $\pm$ 1.84	+	13.65	2.55E+07
		Cox-2		1.74 $\pm$ 0.49			
		Mx		3.07 $\pm$ 0.68			

5. 2. Nodavirus 의 감염에 따른 면역유전자 발현 분석

돌돔에 Nodavirus(VNN) 와 iridovirus 를 감염 시킨 결과 iridovirus에 감염 된 돌돔은 감염 후 10일 이후부터 폐사가 일어나기 시작하다 감염 후 15일 쯤 되는 날 100%의 폐사를 보였지만 , VNN virus를 감염 시킨 돌돔의 경우 감염 후 15일째 까지 10%의 폐사를 보였다. VNN virus를 감염 후 20일째 까지 살아남은 돌돔의 brain을 통해 VNN virus를 분리 한 결과 50% 이상 PCR positive 결과를 나타내었다(Fig. 19~20). 예비실험을 통해 병원성 차이를 확인하였고, 면역반응분석을 위해 돌돔에 iridovirus와 VNN 을 인위감염 시킨 후 3일째 돌돔의 뇌 조직을 이용해 virus 감염 여부를 확인한 결과 2마리중 1마리는 PCR positive , 나머지 한 마리는 PCR negative 결과를 보였다(Fig. 21). 면역반응 분석은 2마리 조직을 합하여 이루어졌다. 그 결과 특히 Mx gene의 경우 VNN virus 의 target organ 인 brain 조직을 이용했을 경우 control group에 비해 100배 정도 높은 발현량을 보였으며, 이것은 iridovirus 감염 후 3일째의 나타나는 20배 보다 5배 정도 높은 fold값으로 확인되었다. Real time PCR 과 conventional PCR 을 이용한 발현량 결과를 Fig. 22. 에 나타내었다.

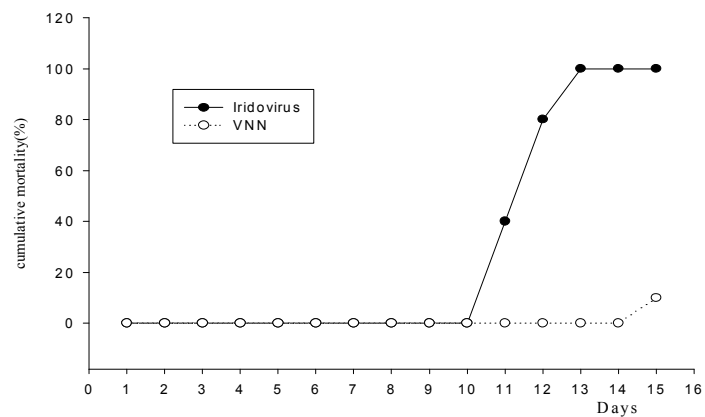


Fig. 19. Cumulative mortality(%) of rock bream(*Oplegnathus fasciatus*) challenged with iridovirus and VNN.

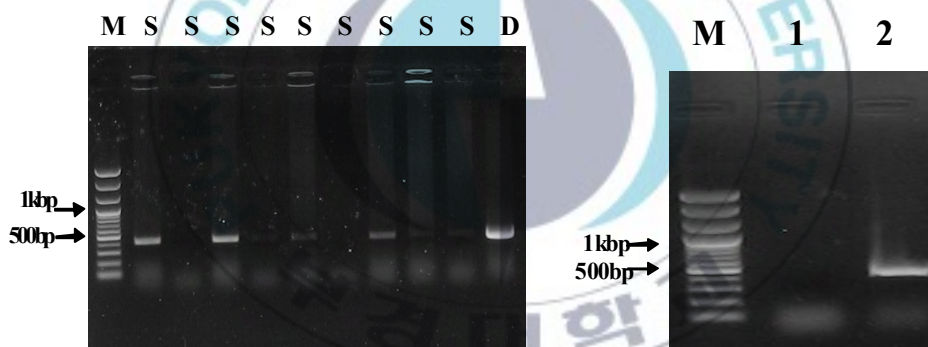
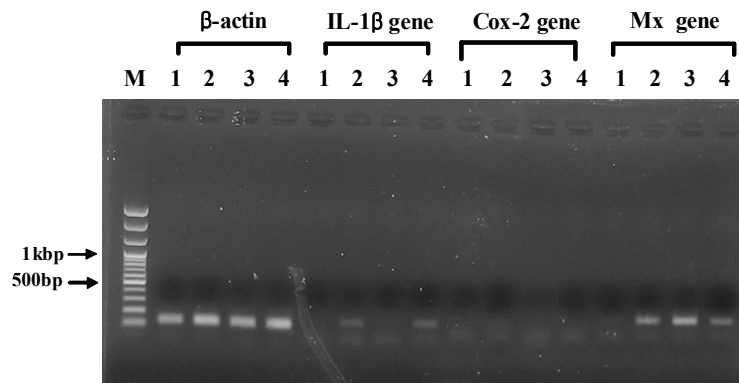


Fig. 20. Detected of nodavirus in brain tissue from rock bream at 20days post infection. S: Sampled at 20 days post infection. D: Dead fish at 15 days post infection. M, 100-bp DNA ladder.

Fig. 21. Detect of nodavirus in brain tissue from to individual fish at 3days post infection. M, 100-bp DNA ladder.

(A)



(B)

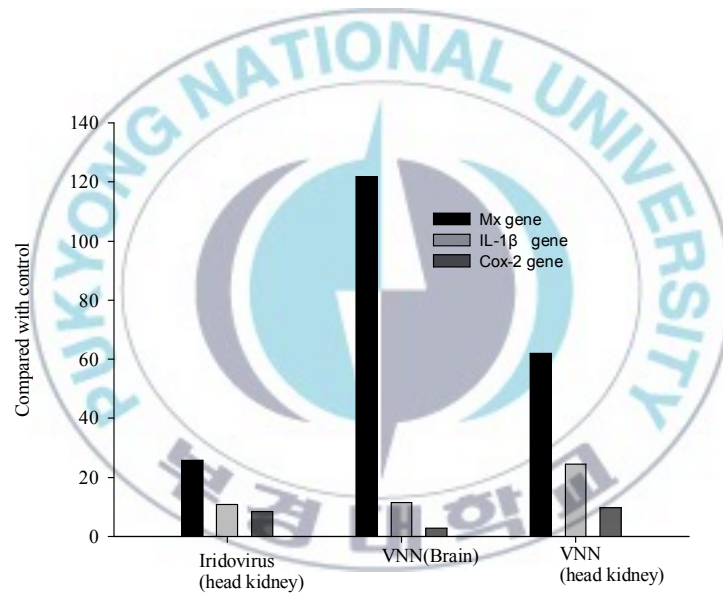


Fig. 22. Expression of IL-1 β , Cox-2 and Mx gene in the brain and head kidney of infected iridovirus and VNN. (A) Agarose gel electrophoresis of products obtained by conventional PCR. Lanes. 1, PBS; lanes 2, iridovirus(head kidney); lanes 3, VNN (brain); lanes 4, VNN(head kidney) (B) Real time PCR results for immune genes expression level in the head kidney and brain of infected rock bream

IV. 고찰

Iridovirus 는 우리나라 양식어종인 돌돔과 참돔에 감염되어 큰 경제적 손실을 야기 시키고 있다. 하지만 많은 연구는 진행 되고 있지만 확실한 vaccine 개발이 되지 않는 실정이다. Iridovirus vaccine 개발을 위해서는 viruses 자체에 대한 연구 뿐 아니라 iridovirus 감염에 의한 어체의 반응 까지 연구되어야 한다. 이리도 바이러스의 최대 감염 대상어종인 돌돔에서는 아직까지 바이러스에 대한 어류의 면역반응에서 매우 중요한 역할을 하는 유전자들에 대한 연구가 이, 2004등 돌돔의 IL-1 β gene 과 최근 발표된 Kosuke Zenke *et al.*, 2008 등이 있다. 따라서 본 연구에서는 또다른 돌돔의 면역유전자인 Mx gene 과 Cyclooxygenase-2 유전자들을 cloning 하고 이들 면역 관련 유전자들이 어떻게 변화하는지를 분석하여 iridovirus 감염에 의해 돌돔에서 일어나는 초기 면역반응을 알아보고자 하였다. Mx gene 과 Cox-2 gene 의 염기서열을 밝히기 위해 Genbank 에 등록되어 있는 다른 어류들의 Mx gene과 Cox-2 gene을 비교하여 conserve되어 있는 부위를 증폭하는 degenerated primer를 제작하여 돌돔의 head kidney cells에서 분리한 total RNA를 template로 RT-PCR을 한 결과, 559bp 와 891bp의 product를 얻을 수 있었고, 이것을 sequencing 하여 이미 알려져 밝혀진 다른 종의 Mx gene 과 Cox-2 gene과 비교 하였을 때 높은 homology를 가지는 것을 확인하여 이 product는 Mx gene 과 Cox-2 이라는 것을 증명할 수 있었다. Mx gene과 Cox-2 gene의 전체 sequence는 RACE PCR을 통해 두 개 유전자의 전체 cDNA 염기서열을 확인할 수 있었다. 돌돔의 전체 Mx cDNA는 2362bp 로 102bp 의 5'UTR 과 1881bp의 ORF, 379bp의 3' UTR로 구성되어 있었다. 돌돔 Mx gene

의 amino acid 를 보면 tripartite GTP-binding motif, dynamin family signature 와 leucine zipper motif 가 포함되어 있었다(Fig). Cox-2 cDNA는 2556bp로 136bp의 5' UTR 과 1827bp의 ORF, 729bp의 3' UTR 로 구성되어 있었다. 3' UTR에는 6개의 RNA instability motifs(ATTA) 와 polyadenylation signal (AATAAA) 이 poly (A) tail 의 27bp 위에 위치하고 있었다. Tomo-o Ishikawa *et al.*,에서 설명하고 있는 것을 바탕으로 돌돔의 Cox-2 gene의 amino acid 를 살펴 본 결과 haem-binding sites(T I W L R E H N R A), cyclooxygenase active site (Tyr, His, Ser), N-glycosylation site(Asn) 가 확인 되었다. Cox enzyme 에는 2가지 종류의 동종효소가 존재하는 것이 알려져있다. Cox-1 gene 은 constitutive 존재하는 Housekeeping gene이지만, Cox-2 gene은 정상적인 상태에서는 발현되지 않고, 염증자극, cytokine(IL-1), Growth factors 등의 자극에 의하여 발현되는 immediate early gene이다. 본 연구에서 밝힌 Cox gene의 경우 *Micropogonias undulatus* , *Fundulus heteroclitus*, *Oncorhynchus mykiss* Cox-2 gene 와 비교하였을 때 90 % , 87 % , 77% 로 homology 를 나타내는 것을 알 수 있었으며. 그에 반해 Cox-1 gene과 비교하였을 때 63%, 64%, 64% 로 Cox-2 gene과 높은 homology를 나타내는 것을 알 수 있었다. 그리고 constitutive Cox-1 과 달리 돌돔의 Cox gene의 경우 LPS ,Poly I:C 나 virus 자극 후 유전자가 발현이 되었 으며, PBS 자극 시 유전자가 발현이 되지 않았다. 이러한 점을 미루어 본 연구에서 밝힌 돌돔의 Cox gene은 Cox-2 gene 이라고 예상 할 수 있었다. 연구가 진행되는 도중에 돌돔의 Mx gene을 1, 2, 3 으로 구별하는 연구가 발표되었다(Kosuke Zenke *et al.*, 2008). 본 연구에서 밝힌 Mx gene 은 Mx 1, 2, 3 유전자의 nucleotide 비교 결과 Mx 2와 일치하는 것을 알 수 있었다. cloning 을 통해 밝혀진 두 개의 유전자의 염기서열을 바탕으로

돌돔의 Mx gene과 Cox-2 gene 특이적인 primer를 제작하여 면역유전자 발현 분석에 사용되었다.

면역자극물질인 Poly I:C 와 LPS 로 24h동안 자극 시켜 돌돔의 liver, head kidney , spleen cells에서의 발현을 분석한 결과 Mx gene의 경우 모든 조직에서 LPS 자극에 의해 유전자의 발현이 유도되긴 하였지만, Poly I:C 로 자극했을 경우 LPS 와 비교했을 때 Poly I:C 에 의해 유도된 Mx gene 은 control group 에 비해 16배 , LPS 에 의해 유도된 Mx gene 은 4배로 LPS group 에 비해 Poly I:C 의 자극에 의해 유도 된 Mx gene 이 4배 정도 높은 발현을 보였다. 이러한 결과는 T. Matsuyama *et al.* 2007 ; Y.-M. Chen *et al.* 2006 에 나와 있는 LPS가 세포구성성분인 세균을 감염시켰을 때 Mx gene의 유도를 확인할 수 없었으며, 오히려 세균에 의해서 Mx gene의 발현이 억제된다고 발표한 것과 차이를 보이고 있었다. M.K. Purcell *et al.*, 2006; Hee jae lee *et al.*, 2007 에 따르면 Poly I:C LPS 의 경우 결합하는 TLR에 따라서 신호 전달경로에 차이를 보이기 때문에 IL-1 β 와 Cox-2 gene의 경우 dsRNA와 LPS를 처리하였을 때 서로 다른 발현량을 보인다는 결과를 나타내고 있었지만 본 연구 결과 두 가지의 자극 물질에 대해서 IL-1 β gene과 Cox-2 gene 이 발현되긴 하였지만 두 group 간의 차이를 확실히 볼 수 없었다.

돌돔에 직접적인 피해를 주고 있는 이리도 바이러스 감염에 대한 어체반응은 A. SIWICKI *et al.*, 1999, 2001에서 설명하고 있는 iridovirus 에 대한 cell-mediated immunity 연구 외에 많이 알려져 있지 않다. 그래서 본 연구에서는 이리도 바이러스 감염에 의한 돌돔의 면역유전자 반응의 알아보고자 하였다. Virus의 경우 어체 안에서 복제 할 수 있는 온도를 가지고 있는데 그 이외의 온도가 되면 virus의 복제가 늦어지거나 일어나지 않아서 어체에 대한 병원성을 가지지 않는다 (M. Sano *et al.*, 2009). 18℃와

25℃ 환경에서 돌돔에 iridovirus 를 감염 시킨 후 1일, 3일, 7일째 sampling 하여 온도에 따른 virus copy number 를 분석한 결과 이리도 바이러스 적온인 25℃에서는 시간이 경과 할수록 7일 째 spleen 조직에서 2.55E+07 viral copies./mg infected tissue 로 감염 후 1일째 1.47E+02 viral copies./mg infected tissue 와 비교했을 때 보다 빠른 속도로 증가한 반면 18℃에서는 시간이 경과 할수록 7일 째 spleen 조직에서 1.79E+02 viral copies./mg infected tissue 로 1일째와 비교했을 때 많은 차이를 보이지 않았다 이 결과로 18℃에서 이리도 바이러스 복제 속도가 늦어진다는 것이 확인되었고, 이리도바이러스 복제속도가 늦어지는 저온과 이리도 바이러스 적온에 있어서 이리도 바이러스 감염에 의한 돌돔의 특이적 면역유전자 발현을 분석해보고자 하였다. Y.-M. Chen et al. 2006에서 nordavirus 감염에 있어서 감염 후 24h 째 Mx gene 이 증가하다가 3일째 가장 높은 발현을 보인다고 나타내었으며 대부분 연구 결과 이와 같은 현상을 보이고 있으며, 7일 이후가 되면 virus에 의해 어체의 폐사가 일어나면서 early stage immune gene의 경우 감소하는 현상을 보인다고 하지만 virus가 어체에 남아있으면서 계속하여 인터페론 생산을 유도하면서 Mx gene 이 증가한다는 연구가 발표되기도 하였다 (K. Lockhart *et al.*, 2004). 본 연구 결과는 25℃ 에서는 감염 후 7일째 되는 날부터 계속해서 폐사가 일어났으며, 3일째 가장 높은 발현을 보이다가 시간이 지나면서 면역유전자는 감소하는 현상을 보였다. 이것은 Poly I : C group의 경우 자극 후 1일 째 가장 높은 반응을 보인다는 결과와 다르게 나타났다. M.K. Purcell *et al.*, 2004에서 이러한 현상은 poly I:C group의 경우 자극 후 1일째 anti-viral activity 나 inflammatory response 가 유도 되지만 virus의 경우 host 안에서 virus replication 의 속도가 차이가 나기 때문에 두 group에서 면역유전자의 발현이 자극 시간에 따라 차이가 나타나는 것이라고 설명하

고 있다. . 이러한 결과는 Mx gene 과 Cox-2 gene의 경우 early stage immune gene 이라는 특징을 가지고 있으며, 어체가 바이러스에 의해 폐사가 일어나기 시작하는 시기에는 이러한 면역유전자가 관여하지 않거나 innate immune response 보다는 acquired immune response 가 보다 중요하게 작용하는 것으로 사료되어진다(M.K. Purcell *et al.*, 2004). 18℃에서는 감염 후 7일 까지는 폐사가 일어나지 않았으며 면역유전자의 경우 7일째 가장 많은 양이 발현되었다. 저온의 경우 viral copy number 가 증가하기 시작하는 7일째 면역유전자의 발현이 가장 높은 결과가 나왔으며 이것은 virus의 복제 속도가 늦어짐으로 어체가 바이러스에 의해 자극을 받아서 여러 가지 cytokine 생산 시기가 늦어진 것이 아닌 가 사료되어진다. Kosuke Zenke *et al.*, 2008 에 나와있는 Mx 1, 3 을 detection 할 수있는 specific primer 를 제작하여 본 연구에서 제작한 Mx 2 primer 와 함께 사용하여 Poly I:C 자극 과 virus 감염에 의한 돌돔의 Mx 1, 2, 3 유전자 간의 발현량 차이를 알아보려고 하였다. Kosuke Zenke *et al.*, 2008 에 따르면 Mx 1 유전자의 경우 constitutive 하게 발현 하는 것 같다고 예상하고 있었다. 본 연구 결과 Poly I:C 에 의해 유도된 Mx 1 , 2, 3 의 발현량은 Mx 3 의 경우 poly I:C 자극 후 1일째 만 발현되었으며, Mx 2 유전자는 시간이 지남에 따라 계속적으로 발현하는 경우도 있었지만 1일째 가장 많이 발현되다가 시간이 지날 수록 감소하는 현상을 보였으며, Mx1 유전자의 경우 시간에 따른 발현량의 차이를 나타내지 않았다. Fig. 18. 에 나타나 있는 연구결과에 따르면 virus 감염 후 3일 째 되는 날 만 Mx 1 유전자가 유도되는 것을 확인 할 수 있었다. 굳이 Mx 1, 2, 3의 유전자 발현량을 비교하자면 본 연구 결과에 따르면 Mx 2 유전자가 가장 많이 발현되는 것을 알 수 가 있는데 이러한 문제는 돌돔의 Mx 1, 2, 3 과의 기능적 분석과 함께 추후 연구가 되어야 한다고 생각되어 진다. Seung Ju

Cha *et al.*, 2007 돌돔에서 VNN virus가 분리되어 진다고 기술 되어있다. Iridovirus 는 DNA virus 이지만 VNN virus 는 RNA virus 로 DNA virus 와 RNA virus 간의 면역유전자 발현차이와 돌돔에 있어서 병원성의 차이를 보이는 iridovirus 와 VNN virus를 이용하여 두 virus 간의 어체 반응에 대해서 분석해보고자 하였다. VNN 을 인위감염시킨 돌돔의 경우 15일째 까지 10% 폐사를 보였으며, 감염 후 20일째 나머지 살아있는 돌돔 brain 을 통해서 VNN virus 분리한 결과 50% 이상 VNN virus 가 살아있는 돌돔에서 확인되었다. PCR 을 통한 VNN virus 분리 결과 50% 이상 positive 를 나타냈기 때문에 VNN을 인위감염시킨 돌돔을 20일 이상 살펴 보았으며 폐사가 일어날 것이라고 예상되지만, iridovirus 와의 병원성 차이를 확인하였기 때문에 감염 후 20일째 살아있는 돌돔 brain 통해 VNN virus를 확인하였다. 이러한 예비실험을 통해 병원성의 차이를 알 수 있었으며, 돌돔에 iridovirus와 VNN 을 감염 시킨 후 3일째 되는 날 brain 과 head kidney 을 이용하여 면역유전자를 분석하였다. virus 감염 후 3일째 2마리씩 분석하였는데 virus 감염 여부의 PCR 결과 VNN 을 감염시킨 돌돔 2마리중 1마리는 PCR positive 결과를 보였으며 나머지 한 마리는 negative 결과를 나타내었다. 면역반응 분석은 2마리 조직을 모두 합하여 이루어졌다. 면역유전자의 발현 분석결과 IL-1 β gene 과 Cox-2 gene의 경우 iridovirus와 발현량에 있어서 차이를 관찰 할 수 없었지만 VNN virus를 감염시킨 돌돔의 brain을 통해 Mx gene 의 발현을 확인한 결과 iridovirus 보다 5배 이상의 높은 발현을 보였다. 다른 연구에서는 이런 현상을 asymptomatic carrier 상태라고 설명하면서 이런 현상이 나타나는 이유가 Mx gene 과 같은 인터페론 유전자의 많은 발현에 의한 것이라고 설명하고 있다 (L. Poisa-Beiro *et al.*, 2008). K. Lockhart *et al.*, 에 따르면 IPN virus 에 대해 carrier stage에 있는 무지개송어의 경우 IPN virus

가 host에 대해서 아무런 역할을 하지 않기 때문에 Mx gene 의 발현이 전혀 되지 않는다고 설명하고 있다.

모든 실험에서 면역유전자 발현량을 conventional PCR Real time PCR 을 통해서 분석하였다. 정확한 발현량을 알아보기 위해 real time PCR 을 이용해서 자극을 받지 않는 PBS group 또는 normal group 을 발현량을 '1' 로 보았을 때 자극을 받은 experiment group의 면역유전자 발현량 C_T 값의 비교에 의해 알아보는 방법인 delta delta C_T method 방법을 이용해서 발현량의 차이를 정확한 숫자로 알 수 있었다. 이러한 방법은 각 sample 마다 β -actin gene 의 값을 보정해주기 때문에 굳이 mRNA 의 양을 맞춰 줄 필요가 없고, standard curves 가 필요하기 않아서 편리한 점도 있었지만, 면역유전자의 fold 값의 변화가 calibration 하는 control group 에 의해서 결정되는 문제점을 가지고 있었다(Kenneth J. Livak *et al.*, 2001). 본 연구에서 사용하는 계산법에 있어서 control group 이 가장 중요한 요소로 작용하기 때문에 control group 이 어체 자체의 상태, 환경, 실험하는 도중의 자극 에 의해 영향을 받아서 발현된다는 문제가 있었기 때문에 실험에 들어가기 전에 아무런 자극을 주지 않은 5마리의 돌돔의 liver cells 을 분리하여 5마리의 평균을 구하여 control group으로 사용하였다. Conventional PCR 의 경우 30 cycles로 수행했을 때 control 과 자극을 준 sample에서 같은 양의 product가 얻어졌다. 그래서 Scapigliati *et al.*, 2001에서 설명하는 방법을 통해 cycle 수를 30cycles에서 27cycles 로 조절해서 확인한 결과 자극을 시키지 않는 group과의 차이를 확인 할 수 있었다.

본 연구는 돌돔을 이용하여 여러 가지 면역 자극물질과 virus 감염실험을 통해 돌돔에서 일어나는 면역반응을 확인하였다. Real time PCR 을 사용하여 group 간의 C_T value 차이에 의해서 정확한 수치로 발현량을 알

수 있었다. 이러한 돌돔의 면역자극물질과 virus 감염에 의한 염증 유전자 및 interferon response의 분석은 어류의 면역학적 연구나 돌돔의 또 다른 유전자 분석연구에 있어서 기초적인 연구 자료로 사용될 것으로 사료된다.



V. 요약

본 연구에서는 돌돔의 면역유전자인 Mx gene 과 Cyclooxygenase-2 유전자들을 cloning 하고 이들 면역 관련 유전자들이 어떻게 변화하는지를 분석하여 면역자극물질과 iridovirus 감염에 의해 돌돔에서 일어나는 초기 면역반응을 알아보고자 하였다. 면역자극제로 알려져 있는 Poly I:C 와 LPS를 돌돔에 자극시켜 여러 조직을 통해 면역 유전자의 발현을 관찰 하였다. Mx2의 경우 LPS 보다 Poly I:C에 의해서 더 많이 유도 된다는 것을 알 수 있었다. Sachun type IVS-1 과 능성어 폐사체의 brain으로부터 분리된 VNN virus 를 사용하여 real time PCR과 conventional PCR 을 통해서 면역반응을 분석한 결과 iridovirus의 경우 돌돔의 폐사가 일어나기 시작하는 7일 이후 부터는 면역유전자의 발현이 감소되었으며, VNN 을 돌돔에 공격했을 때는 폐사가 거의 일어나지 않았으며, 인터페론 관련유전자인 Mx2 의 경우 iridovirus를 감염시킨 group에 비해 높은 발현량을 보였다. 같은 실험일 경우라도 아무런 자극을 주지 않는 group의 발현정도에 의해서 발현량의 값(value) 차이를 보이긴 했지만 증가와 감소하는 경향은 같은 것을 확인하였다. Virus의 replication 속도와 Mx gene 유전자와 염증관련 유전자(IL-1 β , Cox-2) 의 발현관계를 알아보기 위해서 먼저 18 $^{\circ}$ C, 25 $^{\circ}$ C 환경에서 virus 공격실험을 실시하였다. 그 결과 25 $^{\circ}$ C에서 감염 후 7일째부터 폐사가 일어나기 시작하였고, spleen 조직을 이용한 copy number 분석 결과 2.55E+07 viral copies/mg of infected tissue 를 나타냈으며, 18 $^{\circ}$ C에서는 감염 후 7일째 까지 폐사는 일어나지 않았으며, spleen 조직을 이용한 copy number 분석 결과 1.79 E+02 viral copies/mg of infected tissue로 virus 의 복제가 천천히 일어나는 것을 확인하였다.

25℃의 경우 면역유전자 분석결과 7일째 감소하는 현상을 보여지만 18℃에서는 오히려 7일째 증가하는 결과를 보였다. Virus copy number 는 18℃에서는 크게 차이나지 않았지만, 25℃에서는 시간이 지날수록 증가하는 경향을 확인하여, 온도별 virus replication 속도를 확인할 수 있었으며, 늦은 속도로 복제되는 온도에서는 면역유전자가 느리게 발현을 하는 것을 알 수 있었다. 이러한 돌돔의 면역자극물질과 virus 감염에 의한 염증 유전자 및 interferon response의 분석은 어류의 면역학적 연구나 돌돔의 또 다른 유전자 분석연구에 있어서 기초적인 연구 자료로 사용될 것으로 사료된다.



VI. 감사의 글

많은 세월이 흘렀고, 그동안 많은 일이 있었습니다. 저는 못할 줄 알았지만 주변 분들의 도움으로 여기 까지 왔습니다. 저의 실험에 소중한 의미를 부여해 주시고 사람이 살아가는 방법을 또 다른 면에서 가르침을 주신 정현도 지도교수님, 선생님이 해주신 소중한 말씀 가슴 깊이 간직하겠습니다. 인사드릴 때 마다 항상 너그럽게 웃어주시던 정준기 교수님, 강주찬 교수님 빠쁘신 와중에서도 논문 봐 주신다고 수고 하셨습니다. 예의와 범절을 다시 한 번 깨닫게 해주신 박수일 교수님, 실험 잘하고 있냐고 관심 가져주신 김기홍 교수님, 대학원 생활하면서 실험도 중요하지만 지도교수님과의 대화의 중요성을 거듭 강조하신 허민도 교수님 모든 교수님께 감사의 말씀을 전합니다.

실험실을 선택하면서 아무런 정보도 없이 진단방을 선택하였지만 저는 제 선택에 후회하지 않습니다. 3년동안 실험실 생활 하면서 또 다른 가족을 얻었습니다. 제주도에 계신 아빠를 가슴에 품고 사는 귀여운 민혁이 아버지 준범선배 감히 말씀드리겠습니다. 저는 선배가 너무 자랑스럽습니다. 침착함 과 노련함 모든 면을 닮고 싶었던 려진선배 저의 고민을 자신의 고민보다 더 걱정해주시고 신경써주신 점 잊지 않겠습니다. 철없는 후배 바로 잡아주시느라 수고하셨습니다. 같이 얘기하다보면 마음을 편하게 해 주시는 소혜선배 논문 쓴다고 고생한다고 챙겨주시거 너무 감사합니다. 한라산 정상 정복 잊지 않으셨죠!! 실험 가르쳐 주신다고 저 때문에 고생하신 혜진 선배 졸업하시고 공부한다고 고생하셨는데 지금의 결과로 힘들었던 모든 일이 잊어졌으면 좋겠습니다. 나와는 많은 점이 다르지만 나를 잘 이해해 주는 정희, 밤새 논문 쓰고 실험하고 나 혼자였으면 못했을 꺼야 누구보다 열심히 했으니깐 앞으로 좋은 일이 있을 꺼 라고 믿어. 그동안 고생 많았어 !! 여자들의 수다에 절대 빠지지 않는 광일선배 비가 쏟아지는 날에도 채집 다니신다고 고생 했어요 항상 고마워하는 거 알죠 작은 얼굴과 섹시함이 매력인 기원이, 나의 피부와 헤어 담당 기원이 진단방 방장 파이팅이야~!! 잔소리 하면서 다 챙겨주는 영진이 살은 이제 그만 빼도 될 거 같아!! 다들 조금만 더 힘내!!!! 이제 드니

어 대학원 입학하는 윤준이 넌 잘 할 꺼야 들어보지도 못한 전라도 사투리로 나를 웃겨준 지웅이 오빠, 실험 도와주신거 너무 고마워요 진단방 막둥이 곧 들어올 기택이 환영한다. 어디서든 진단방 잊지 않는 착한 효선이, 아직 군대에 있을 우섭이 다들 모두 감사 드립니다. 사회초년생의 무지함을 깨닫게 해주신 명석선배, 저를 믿고 실험을 맡겨 주신 우열선배 실험실 분위기를 한번 썩 전환시켜 주시는 신후선배, 순범선배, 후배의 장난에도 웃으면서 넘어 가주셨던 호열 선배, 갑작스런 즉석만남 제안으로 한번 썩 놀라게 했던 재훈선배 실험실 오실 때 마다 아이스크림 사준신거 잘 먹었습니다. 저를 처음으로 예쁘다고 해주신 영화선배 (저 기억하고 있어요 !!) 인형 같은 예쁜 현지 어머니 대심선배, 엉뚱한 매력녀 현정선배, 고등학교 선배님 윤경선배 (사는 동네가 가까워서 너무 좋았어요), 항상 진지한 지효선배 에게도 감사드립니다. 2년 동안 고생하신 석사 동기 미영선배, 주은이 언니, 기준선배 다들 수고 많으셨습니다. 벌써 아들의 어머니가 된 나의 친구 수지, 힘들 때 도움이 되고 싶었지만 옆에 있어주는 거 밖에 할 수가 없어서 항상 미안하고 예쁜 예준이 건강하게 키워줘서 고마워. 그리고 힘들 때 마다 불쑥 전화해서 고민 털어 놓으면 잘 받아주는 대학교 친구 민정이, 선주 각자 하는 일 다 잘되길 바랄게. 석사생활 하면서 바쁠 때 잘 만날 수 없었지만 항상 나의 자리를 남겨뒀던 친구들, 뭐든지 열심히 하는 주년이, 멧쟁이 혜영이, 내가 빼뺏어 질 때마다 바로 잡아 줬던 미정이, 이제 벌써 두 아이의 엄마가 되어 버린 현정이, 내가 배울 점이 많은 같은 동네 친구 선미, 생각보다 효자인 국진이 드라이브로 친구의 답답한 마음을 풀어주는 영훈이 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

가장 큰 힘이 되었던 우리 가족들 막내딸이라고 힘든 거 한 번 내색안하시고 억지부리고 짜증내는 거 받아주시는 우리 아빠, 공부도 물론 잘하면 좋고 중요하지만 사람이 먼저 되라고 말씀해주시는 우리 엄마, 나의 정신적 지주 우리 언니 그리고 주현이 대학가는 거까지 보신다고 항상 말씀하시던 이제는 먼 곳에 계신 어린 시절 나를 키워주신 할머니 무뚝뚝한 면이 많아서 표현하지 못했지만 진심으로 사랑합니다.

이것이 끝이 아닌 것 을 알기에 모든 분들의 진심어린 가르침 깊이 새겨서 성장하겠습니다.

VII. 참고문헌

- A. Cuesta., C. Tafalla., 2009. Transcription of immune genes upon challenge with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in DNA vaccinated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vaccine.*, 27, 280-289.
- A.K. Siwicki., F. Pozet., M. Morand., C. Volatier., E.Terech-Majewska., 1999. Effects of iridovirus-like agent on the cell-mediated immunity in sheatfish (*Silurus glanis*) – an in vitro study. *Virus Research.*, 63, 115 - 19.
- A. Siwicki., F. Pozet., M. Morand., E. Terech-Majewska D. Bernard., 2001. Pathogenesis of Iridovirus: *In Vitro* Influence On Macrophage Activity and Cytokine-Like Protein Production In Fish. *ACTA VET. BRNO.*, 70, 451 - 56.
- BLY, J. E. AND CLEM, L. W., 1992. Temperature and teleost immune functions. *Fish Shellfish Immunol.*, 2, 159-171.
- Bergljot Magnadottir., 2006. Innate immunity of fish. *Fish & Shellfish Immunology.*, 20, 137-151.
- B.J. Sun., M.X. Chang., Y. Song., W.J. Yao., P. Nie., 2007. Gene structure and transcription of IRF-1 and IRF-7 in the mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology.*, 116, 26 - 6.
- C. Tafalla., V. Chico., L. Pérez., J.M. Coll., A. Estepa., 2007. In vitro

- and in vivo differential expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx isoforms in response to viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) G gene, poly I:C and VHSV. *Fish & Shellfish Immunology.*, 23, 210-221.
- Caroline le morvan., Danielle troutaud., Pierre deschaux., 1998. Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. *The Journal of Experimental Biology.*, 201, 165 - 68.
- Christopher Marlowe A. Caipang., Natasha Hynes., Jumroensri Puangkaew., Monica F. Brinchmann., Viswanath Kiron., 2008. Intraperitoneal vaccination of Atlantic cod, *Gadus morhua* with heat-killed *Listonella anguillarum* enhances serum antibacterial activity and expression of immune response genes. *Fish & Shellfish Immunology.*, 24, 314-322.
- C. J. SECOMBES., L. J. HARDIE., G. DANIELS., 1996. Cytokines in fish: an update. *Fish & Shellfish Immunology.*, 6, 291-04
- Dae-Sim Lee., Su Hee Hong., Hyun-Jeong Lee., Lyu Jin Jun., Joon-Ki Chung., Ki Hong Kim., Hyun Do Jeong., 2006. Molecular cDNA cloning and analysis of the organization and expression of the IL-1 β gene in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology.*, 143, 307 - 314.
- Debbie A. Plouffe., Patrick C. Hanington., John G. Walsh., Elaine C. Wilson., Miodrag Belosevic., 2005. Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation.*, 12, 266 - .277.
- F. Acosta., A. Petrie., K. Lockhart., N. Lorenzen., A.E. Ellis., 2005.

- Kinetics of Mx expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to VHS-DNA vaccination. Fish & Shellfish Immunology., 18, 81-89.
- Francesco Buonocore., Elisa Randelli., Daniela Casani., Massimo Mazzini., Irene Cappuccio., Chris J. Secombes., Giuseppe Scapigliati., 2005. cDNA cloning and expression analysis of a cyclooxygenase-2 from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) after vaccination. Aquaculture., 245, 301 - 310.
- Grant d. trobridge., Pinwen p. chiou., Jo-ann c. leong., 1997. Cloning of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and Characterization of Trout Mx Protein Expression in Salmon Cells. Journal of virology, 5304 - 311.
- Grosser T., Yusuff S., Cheskis E., Pack, M.A., FitzGerald G.A., 2002. Developmental expression of functional cyclooxygenases in zebrafish. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 99, 8418-8423.
- Hee jae lee., Pil-jae kong., Sang-hyun lee., Oh-yoon kwon., Wan-joo chun., Sung-soo kim., 2007. Differences between lipopolysaccharide and double-stranded RNA in innate immune responses of BV2 microglial cells. Intern. J.Neuroscience., 117, 885-894.
- I. Salinas., K. Lockhart., T.J. Bowden., B. Collet., C.J. Secombes., A.E. Ellis., 2004. An assessment of immunostimulants as Mx inducers in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr and the effect of temperature on the kinetics of Mx responses. Fish & Shellfish Immunology., 17, 159-170.
- Jensen I., Albuquerque A., Sommer AI., Robertsen B., 2002. Effect of

- poly I:C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon. *Fish Shellfish Immunol.*, 13(4), 311-26.
- Jun ZOU., Norman F. NEUMANN., Jason W. HOLLAND., Miodrag BELOSEVIC., Charles CUNNINGHAM., Christopher J. SECOMBES., Andrew F. ROWLEY., 1999. Fish macrophages express a cyclooxygenase-2 homologue after activation. *Biochem. J.*, 340, 153 - 159.
- Kenneth J. Livak., Thomas D. Schmittgen., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *METHODS.*, 25, 402-408.
- K. Lockhart., A.J.A., McBeath., B. Collet., M. Snow., A.E. Ellis., 2007. Expression of Mx mRNA following infection with IPNV is greater in IPN-susceptible Atlantic salmon post-smolts than in IPN-resistant Atlantic salmon parr. *Fish & Shellfish Immunology.*, 22, 151-156.
- K. Lockhart., S.K. Gahlawat., D. Soto-Mosquera., T.J. Bowden., A.E. Ellis., 2004. IPNV carrier Atlantic salmon growers do not express Mx mRNA and poly I:C-induced Mx response does not cure the carrier state. *Fish & Shellfish Immunology.*, 17, 347-352.
- Kosuke Zenke., Ki Hong Kim., 2008. Molecular cloning and expression analysis of three Mx isoforms of rock bream, *Oplegnathus fasciatus*. *Fish and Shellfish Immunology.*
- L. Poisa-Beiro., S. Dios., A. Montes., R. Aranguren., A. Figueras., B. Novoa., 2008. Nodavirus increases the expression of Mx and

- inflammatory cytokines in fish brain . Molecular Immunology., 45, 218-225.
- Mahanama De Zoysa., Hyun-Sil Kang., Young-Bo Song., Youngheun Jee., Young-Don Lee., Jehee Lee., 2007. First report of invertebrate Mx: Cloning, characterization and expression analysis of Mx cDNA in disk abalone (*Haliotis discus discus*). Fish & Shellfish Immunology., 23, 86-96
- Martin K. Raida., Kurt Buchmann, 2008. Development of adaptive immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) surviving an infection with *Yersinia ruckeri*. Fish & Shellfish Immunology, 1 - .9.
- Maureen K. Purcell., Gael Kurath., Kyle A. Garver., Russell P. Herwig., James R. Winton., 2004. Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination. Fish & Shellfish Immunology., 17, 447-462.
- Maureen K. Purcell., Kelly D. Smith., Alan Aderem., Leroy Hood., James R. Winton., Jared C. Roach., 2006. Conservation of Toll-like receptor signaling pathways in teleost fish. Comparative Biochemistry and Physiology, Part D., 1, 77- 88.
- Motohiko Sano., Takafumi Ito., Tomomasa Matsuyama., Chihaya Nakayasu., Jun Kurita., 2009. Effect of water temperature shifting on mortality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* experimentally infected with viral hemorrhagic septicemia virus. Aquaculture., 286, 254-258.

- Pierre Boudinot., Samia Salhi., Mar Blanco., Abdenour Benmansour., 2001. Viral haemorrhagic septicaemia virus induces *vig-2*, a new interferon responsive gene in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology.*, 11, 383 - 397.
- Øyvind Haugland., Jacob Torgersen., Mohasina Syed., Øystein Evensen., 2005. Expression profiles of inflammatory and immune related genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at early time post vaccination. *Vaccine.*, 23, 5488-5499.
- Øyvind Kileng., Marthe Iren Brundtland., Børre Robertsen., 2007. Infectious salmon anemia virus is a powerful inducer of key genes of the type I interferon system of Atlantic salmon, but is not inhibited by interferon. *Fish & Shellfish Immunology.*, 23, 378-389.
- Roberts S.B., Langenau D.M., Goetz F.W., 2000. Cloning and characterization of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 from the brook trout ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 160, 89- 97
- Rolando Pakingking Jr., Yasushi Okinaka., Koh-Ichiro Mori., Misao Arimoto., Kiyokuni Muroga., Toshihiro Nakai., 2004. In vivo and in vitro analysis of the resistance against viral haemorrhagic septicaemia virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) preceedingly infected with aquabirnavirus. *Fish & Shellfish Immunology.*, 17, 1-11.
- Sylvia Rodríguez Saint-Jean., Sara I. Pérez-Prieto., 2007. Effects of salmonid fish viruses on Mx gene expression and resistance to single or dual viral infections. *Fish & Shellfish Immunology.*, 23, 390-400.

- Tomo-o Ishikawa., Harvey R. Herschman., 2007. Two Inducible, Functional Cyclooxygenase-2 Genes are Present in the Rainbow Trout Genome. *Journal of Cellular Biochemistry.*, 102, 1486-1492.
- Tomomasa Matsuyama., Atushi Fujiwara., Chihaya Nakayasu., Takashi Kamaishi., Norihisa Oseko., Ikuo Hirono., Takashi Aoki., 2007. Gene expression of leucocytes in vaccinated Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) during the course of experimental infection with *Edwardsiella tarda*. *Fish & Shellfish Immunology.*, 22, 598-607.
- Y.C. Wu., S.C. Chi., 2007. Cloning and analysis of antiviral activity of a barramundi (*Lates calcarifer*) Mx gene. *Fish & Shellfish Immunology.*, 23, 97-108.
- Young-Mao Chen., Yong-Lin Su., John Han-You Lin., Huey-Lang Yang., Tzong-Yueh Chen., 2006. Cloning of an orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) Mx cDNA and characterisation of its expression in response to nodavirus. *Fish & Shellfish Immunology.*, 20, 58-71.
- 이현정, 2006. 돌돔의 Interleukin-1 β 유전자의 특성 분석과 이리도바이러스의 감염에 대한 면역반응