



## 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

고수율의 이리도 바이러스 생산을  
위한 *IN VITRO* 배양의 최적화



2015 년 2 월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

김 이 슬

이 학 석 사 학 위 논 문

고수율의 이리도 바이러스 생산을  
위한 *IN VITRO* 배양의 최적화

지도교수 정 현 도

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2015년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수산생명의학과

김 이 슬

김이슬의 이학석사 학위논문을 인준함.



위 원 장 이학박사 김 기 홍 (인)

위 원 이학박사 강 주 찬 (인)

위 원 이학박사 정 현 도 (인)

# 목 차

## Abstract

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| I. 서 론.....                                                 | 1  |
| II. 재료 및 방법.....                                            | 4  |
| 1. 초대배양.....                                                | 4  |
| 1.1. 자어세포의 초대배양.....                                        | 4  |
| 1.2. 지느러미 세포의 초대배양.....                                     | 5  |
| 1.3. 뇌세포의 초대배양.....                                         | 6  |
| 2. 바이러스와 주화세포.....                                          | 7  |
| 3. Viral DNA의 정량.....                                       | 9  |
| 4. 초대배양세포와 주화세포의 바이러스 감수성 비교.....                           | 10 |
| 4. 1. 초대배양세포와 주화세포의 IVS 감수성 비교.....                         | 10 |
| 4. 2. 다양한 바이러스들에 대한 감수성 확인.....                             | 11 |
| 5. 초대배양세포의 passage 에 따른 감염성 변화.....                         | 13 |
| 5. 1. RBE 와 RBF 의 세대 수 증가에 따른 IVS 감염성 변화.....               | 13 |
| 5. 2. 초대배양세포의 passage 에 따른 Megalocytivirus 의 감수성<br>변화..... | 14 |
| 6. IVS 에 감염된 돌돔의 지느러미 세포 초대배양 및 바이러스 역가<br>측정.....          | 15 |
| 7. 어류 유래 물질을 이용한 IVS-1 의 감염성 변화.....                        | 16 |
| 7.1 Tissue homogenate 와 serum 의 준비.....                     | 16 |
| 7.2 Tissue homogenate 와 serum 의 첨가를 이용한 주화세포 내              |    |

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| IVS-1 감염성 변화 .....                                                      | 17 |
| 8. IVS-1 에 대한 감수성 증가를 위한 tissue homogenate 와 serum<br>의 적정 농도의 설정 ..... | 18 |
| 8.1. IVS-1 감염 시 tissue homogenate 와 serum 의 적정 농도<br>설정 .....           | 18 |
| 8.2. IVS-1 감염 시 tissue homogenate 의 최적 조직의 확인 .....                     | 19 |
| <b>III. 결과</b> .....                                                    | 20 |
| 1. 초대 배양 세포와 주화세포의 IVS 감염성 비교 .....                                     | 20 |
| 1. 1. 자어세포와 지느러미세포, 뇌세포의 형태적 특징 .....                                   | 20 |
| 2. 초대배양세포와 주화세포에서의 IVS 배양특성 비교 .....                                    | 25 |
| 3. 초대 배양 세포와 주화세포에서의 바이러스 감수성 비교 .....                                  | 30 |
| 4. 초대배양세포의 passage 수 증가에 따른 바이러스 감수성의 변화 .....                          | 32 |
| 4.1. RBE 와 RBF 에서의 세대별 IVS 감염성 변화 .....                                 | 32 |
| 4.2 초대배양세포와 세대 수 증가에 따른 바이러스 감수성 비교 .....                               | 34 |
| 5. RBF 와 IVS 에 감염된 돌돔에서 얻은 I-RBF 에서의 IVS-1 배양<br>비교 .....               | 36 |
| 5.1. I-RBF cell 의 배양 .....                                              | 36 |
| 6. 주화세포의 IVS-1 감염의 효율성 증대를 위한 방법 .....                                  | 39 |
| 6. 1 배양 배지 내 tissue homogenate 와 serum 첨가에 따른<br>IVS-1 생산성 변화 분석 .....  | 39 |
| 6. 2. Tissue homogenate 와 serum 첨가량에 따른 감염성 차이 비교 .....                 | 41 |
| 6. 3. tissue homogenate 유래 장기에 따른 감염 분석 .....                           | 44 |

|                  |    |
|------------------|----|
| I V. 고 찰 .....   | 46 |
| V. 요 약 .....     | 52 |
| VI. 감사의 글 .....  | 53 |
| VII. 참고 문헌 ..... | 54 |



## Optimized in vitro culture system for high yield of iridovirus

Iseul Kim

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

### Abstract

Red sea bream iridovirus(RSIV) is a typical species of the genus *Megalocytivirus* in the family *Iridoviridae*. The genus *Megalocytivirus*, represented by red sea bream iridovirus (RSIV), the first identified and one of the best characterized megalocytiviruses, Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), the type species of the genus, and numerous other isolates, is the newest genus within the family *Iridoviridae*. Megalocytiviruses are important emerging pathogens in both freshwater and marine finfish aquaculture. However, a limited number of piscine cell lines are persistently susceptible to these viruses, which greatly limits the study of megalocytiviruses.

Cell lines are ideal tools for in vitro studies of cell-virus interactions, virus propagation, isolation and vaccine development. However, because of the issues related the sudden refracton of established cell lines against infection of iridovirus, we decided to start our experiments for culturing of iridovirus with primary culture from various organ(fry, fin, brain.) and fish species (rock bream, red sea bream, spotted parrot fish, black sea bream, olive flounder, Small yellow croaker fin, israel carp.). No morphological differences in progressing of subculture were detected depend upon the fish species. Following inoculation with IVS-1, Cytopathic effects (CPE) with

round, enlarged, shiny cells and aggregated cells were observed in various primary cells within 3 days. And CPE was observed daily after virus inoculation and viral replication efficiency was determined for six viruses. *In vitro* challenge experiments in cell lines with megalocytivirus sachun-1(IVS-1) showed lower replication compared with primary cultured cells. Primary cultured cells displayed a cytopathic effect and increased virus copy number inoculation with three Megalocytivirus, namely IVS-1, FLIV-1, PGIV-K1. And the rock bream embryonic cell has especially good potential for the replication of various fish viruses such as Ranavirus, Betanodavirus, Novirhabdovirus, Vesiculovirus. Thus primary cultured cells may be useful for studying a wide range of fish viruses. But their susceptibility to Megalocytivirus cultured *in vitro* condition was progressively declined and reached almost similar level to that found in fish cell lines (PMF, GF, BF-2). The IRBF cells derived from the fin tissue of rock bream that infected IVS-1 is persistently infected with IVS-1 and continually reached high viral titre

To improve quantification of very low levels of iridovirus in cell lines, we tested the ability of tissue homogenate and serum to enhance the sensitivity and replication of IVS-1. The virus titer of IVS-1 also enhanced by exposure of PMF, GF, BF-2 cells to 20µl/ml of tissue homogenate or serum from rock bream. But to added more than 20µl/ml of tissue homogenated was bad for cell condition as it decreases the virus propagation of IVS-1 in PMF, GF cells. The enhancing activity of tissue homogenate appeared to increase over time, indicating changes in viral copy population. It is suggested that the primary cultured fish cells could be used as a valuable tool for isolation and propagation of different iridoviruses. And these results suggest that addition tissue homogenate contribute to the replication and pathogenesis of IVS-1 to cell lines *in vitro*.

## I. 서론

Megalocytivirus는 아시아의 다양한 해산어 및 담수어에 큰 폐사를 일으켜 (Jung and Oh, 2000; He et al., 2001; Sudthongkong et al., 2002) 양식산업에 경제적으로 큰 손상을 일으킨다 (Kurita and Nakajima, 2012; Subramaniam et al., 2012). Megalocytivirus는 Iridoviridea에 속하며, Family Iridoviridae의 5개의 genus인 Iridovirus, Chloriridovirus, Ranavirus, Lymphocystivirus 그리고 Megalocytivirus로 분류된다 (Chinchar et al., 2005). Megalocytivirus의 경우 subgroup이 I-IV로 나누어 졌으나 현재는 subgroup I과 II를 genogroup I으로 하여 총 3group으로 나누는 경향이 있다. Megalocytivirus의 subgroup II에 속하는 Red sea bream iridovirus disease (RSIVD)는 1990년 일본에서 최초로 발병한 이후 (Inouye et al., 1992) 매년 발병지역이 확산되고 발병어종이 다양해지고 있다. 특히 RSIV와 같은 바이러스성 질병의 경우 다양한 국가에서 심각한 폐사를 일으키는 것으로 보고되어있다 (Anderson et al., 1993; Chua et al., 1994; Chou et al., 1998; Marcos-Lo'pez et al., 2011).

바이러스의 연구를 위해서는 효율적이며 지속적인 바이러스의 배양이 필수적이다. 바이러스의 배양은 바이러스에 감수성이 있는 동물에 바이러스를 직접 접종하여 감염 조직으로부터 바이러스를 재분리 하는 방법과 닭의 유정란 (embryonated eggs)을 이용하는 방법 그리고 flask내에서 동물의 조직을 배양하여 *in vitro*에서 바이러스를 배양하는 방법이 있다 (Katz and Webster, 1989). 바이러스 숙주가 되는 동물에 바이러스를 접종하여

배양하는 경우에는 숙주동물의 면역반응에 의한 바이러스의 증식저해 그리고 바이러스의 잠복과 같은 문제가 발생할 수 있으며 (Huang, 1973; Holland, 1964), 유전자 재편성 바이러스 (re-assortment virus)가 생성될 가능성 또한 배제할 수 없다(Webster et al., 1992). 그리고 유정란을 이용하여 바이러스를 배양하는 경우는 가격과 오염적인 측면에서 효율적이지만 숙주 및 온도범위의 제약이 있기 때문에 어류와 같은 변온동물에서 발병하는 바이러스의 경우에는 적용이 쉽지 않다. 따라서 어류 바이러스를 가장 효율적으로 배양하기 위해서는 바이러스에 감수성이 높은 동물의 조직을 이용하여 *in vitro* 배양을 실시하는 것이라 볼 수 있다. 동물 조직의 배양이 처음으로 고안된 이후 (Harrison, 1907) 계속적으로 동물 세포에 대한 연구가 발전되어 왔으며, 세포가 *In vitro* 내에서 죽지 않고 지속적으로 배양되기 위한 기술의 발전으로 인하여 형질 전환되지 않은 조직으로부터 계속적 세대를 거쳐 계대배양이 가능해졌다(Chang et al., 1982; Freshney, 1994; Klein et al., 1990; Steele et al., 1992; Wyllie et al., 1992). 이렇게 계속적 계대 배양이 가능한 세포를 세포주(Cell line)라고 하는데 이를 이용하여 많은 바이러스에 대하여 *in vitro*상에서 연구를 하는 것이 가능해졌다 (Enders et al., 1949).

그러나 Megalocytivirus의 경우, 같은 Iridoviridae에 속하는 Ranavirus와 달리 다양한 어류세포주에서 증식하지 못하고 적은 수의 세포주에서만 감수성을 나타낸다고 알려져 있다 (Pham et al., 2012; Zhang et al., 1999, Dong et al., 2008). 또한 알려진 세포주들도 대부분의 Megalocytivirus의 검출 및 배양에 적합하지 않으며, virus passage가 지남에 따라 감염 정도가 급격히 감소된다 (Chou et al. 1998; Imajoh et al., 2007; Nakajima and

Sorimachi, 1994). 따라서 고효율의 Megalocytivirus 배양에 있어 적합한 세포나 배양법개발 등과 같은 *in vitro* 배양의 최적화가 필요하다. 또한 아직 수생동물의 바이러스 숙주 범위와 숙주 이동에 대한 근본적인 메커니즘에 대한 연구가 부족하기 때문에 (Jancovich et al., 2010; Bandin and Dopazo, 2011) 연구의 기초가 될 수 있는 바이러스의 효율적 배양은 매우 중요하다고 볼 수 있으며, 이는 더 나아가 백신개발 등 많은 분야에 도움이 될 수 있다.

이전 연구결과를 통하여(진, 2014) Megalocytivirus 에 감수성이 다른 어종의 자어의 초대배양세포를 이용하여 RSIV의 고농도 배양이 가능함에 따라 본 연구에서는 자어 뿐 아니라 다양한 어종으로부터 얻은 자어 및 지느러미와 뇌 조직의 초대배양세포를 이용하여 Megalocytivirus에 대한 감염실험을 실시하였으며, 추가적으로 감염되는 종 특이성이 다른 여러 바이러스의 감염실험을 실시하였다. 또한 자어세포의 *in vitro* passage수의 증가에 따라 바이러스 감염력이 감소된다는 연구결과를 통하여 다른 조직으로부터 얻은 초대배양세포에서도 그러한 경향성을 보이는지 확인하였다. 또한 초대배양세포를 이용하여 고효율의 바이러스를 생산하는 방법은 물론, 기존에 Megalocytivirus에 대하여 감수성을 나타낸다고 알려져 있는 주화세포들에 대하여 더욱 더 효율적으로 바이러스를 배양할 수 있는 방법을 고안하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 초대배양

#### 1.1 자어세포의 초대배양

돌돔(rock bream, *Oplegnathus fasciatus*), 참돔 (red sea bream, *Pagrus major*), 강담돔 (spotted parrot fish, *Oplegnathus punctatus*), 감성돔 (black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*), 넙치(olive flounder, *Paralichthys olivaceus*)의 난을 통영과 여수의 종묘 배양장에서 분양받았다. 멸균된 해수를 사용하여 어류의 난을 충분히 washing 한 뒤 22℃의 멸균해수에서 부화시켰다. 부화한 자어는 antibiotics and antimycotics (Gibco)가 포함된 L-15(Sigma-Aldrich)으로 3 회 washing 하였다. 그 후 자어를 mesh 에 통과시켜 단일세포로 만들었다. 그렇게 만들어진 단일세포현탁액을 4℃ 500 g 에서 10 분간 원심 분리 후 세포 pellet 을 재부유하는 방법으로 3 회 washing 하였으며, 최종적으로 20% FBS (Gibco)와 항생제 (penicillin, 200 IU/ml; streptomycin, 200 µg/ml)가 첨가된 L-15 배지에 현탁하였다. 그 후 세포를 25cm<sup>2</sup> tissue culture flask (Corning)에 접종하였으며, 25℃에서 배양하였다. 배양 3 일 후 자어세포는 단층을 형성하였으며, 이후 감염 실험을 실시하였다. 초대배양 된 자어세포를 돌돔 자어세포 (RBE cell), 참돔 자어세포 (RSBE cell), 강담돔 자어세포(SPE), 감성돔 자어세포 (BSBE cell) 그리고 넙치 자어세포 (OFE cell)라고 명명하였다.

## 1.2 지느러미 세포의 초대배양

돌돔, 참돔, 넙치, 참조기(Small yellow croaker fin, *Larimichthys polyactis*), 이스라엘잉어(israel carp, *Cyprinus carpio nudus*)를 통영과 여수의 양식장에서 분양받았다. 어체를 멸균된 해수로 세척 한 후 70% 에탄올로 체표면을 소독한 뒤 지느러미를 적출하였다. 지느러미는 멸균된 가위를 이용하여 1 mm<sup>2</sup> 이하의 크기로 잘게 자른 뒤 항생제 (penicillin, 200 IU/ml; streptomycin, 200 µg /ml)가 첨가된 Hank's balanced salt solution (HBSS, Sigma-Aldrich)로 3 번 washing 하였다. 세척된 지느러미는 0.25% trypsin-EDTA solution (Gibco)로 4℃에서 60 분간 세포를 떼어내었다. Trypsin-EDTA 를 처리한 지느러미 조직 및 세포는 20% FBS 와 항생제 (penicillin, 200 IU/ml; streptomycin, 200 ug/ml)가 첨가된 L-15 배지 10 ml 을 첨가하고 4℃ 500 g 에서 10 분간의 원심분리를 3 번 반복하여 trypsin 을 제거하였다. 세포는 다시 20% FBS 와 항생제 (penicillin, 200 IU/ml; streptomycin, 200 µg /ml)가 첨가된 L-15 배지 5 ml 에 현탁 한 뒤 25cm<sup>2</sup> tissue culture flask 에 접종하였다. 각 어체의 지느러미 세포는 25℃에서 배양되었다.

### 1.3 뇌세포의 초대배양

돔돔과, 참조기의 어체를 멸균된 해수로 세척하였다. 그 뒤 70% 에탄올로 두부를 소독하고 멸균한 해부기를 이용해 뇌를 적출하였다. 그 후 뇌 조직을 mesh 에 통과시켜 단일세포로 만들었다. 그렇게 만들어진 단일세포현탁액을 4℃ 500 g 에서 10 분간 원심 분리 후 세포 pellet 을 재 부유하는 방법으로 3 회 washing 하였으며, 최종적으로 20% FBS 와 항생제 (penicillin, 200 IU/ml; streptomycin, 200µg/ml)가 첨가된 L-15 배지에 현탁하였다. 그리고 25cm<sup>2</sup> tissue culture flask 에 접종 후 배양하였다. 각각의 초대배양 된 뇌 세포는 25℃에서 배양되었다.



## 2. 바이러스와 주화세포

2000 년도 9 월, 국내 남해안의 양식장에서 megalocytivirus 감염증상을 나타내는 돌돔의 비장에서 분리한 megalocytivirus sachun-1 (IVS-1) strain 을 돌돔 치어에 복강 주사하여 임상 증상의 확인 후 비장조직을 분리하였다 (Jeong et al., 2003). 어체의 IVS-1 감염의 확인은 major capsid protein (MCP) gene 에 conserved 한 부위를 target 으로 제작된 M2F (5'- GGC GGC GAC AAT GCC GTG -3')와 M2R (5'- ATA ACG ACC AGT TCA AAC -3') primer set 를 이용하여 PCR 을 실시하여 감염을 확인하였다 (Oshima et al. 1996). 바이러스 배양을 위해 돌돔 비장으로부터 분리한 IVS-1 를 L-15 (Sigma-Aldrich)과 10% (w/v) 비율로 마쇄 후 PMF 에서 배양하여 주었다. 또한 다른 바이러스들도 IVS-1 과 마찬가지로 병어로부터 바이러스를 분리한 후 주화세포를 통해 바이러스를 증폭시켜 얻었다 (Table 1.). 이렇게 얻은 바이러스는 감염실험을 위해 -80℃에서 보관 하여주었다.

본 실험에 사용된 세포주인 PMF, GF, HINAE, E-11 cell은 10% FBS 가 첨가된 L-15 배지에서, BF-2, CHSE-214, EPC는 10% FBS가 첨가된 Eagle's Minimum Essential Medium (MEM, Sigma-Aldrich) 배지 (Sigma-Aldrich)에서 각각 배양하였다. CHSE-214와 HINAE의 경우 20℃, 나머지 주화세포들은 25℃ 에서 배양하였다.

Table 1. Sources of fish viruses used to test the virus susceptibility

| s/<br>No | Virus                    | genus                  | Growth cell lines | Viruses used in this study            |
|----------|--------------------------|------------------------|-------------------|---------------------------------------|
| 1        | IVS-1 (subgroup II)      | <i>Megalocutivirus</i> | PMF               | Isolated from rock bream (2000)       |
| 2        | FLIV-1 (subgroup IV)     | <i>Megalocutivirus</i> | GF                | Isolated from olive flounder(2006)    |
| 3        | PGIV K-1 (subgroup III)  | <i>Megalocutivirus</i> | PMF               | Isolated from pearl gurami (2004)     |
| 4        | FV3 (amphibian subgroup) | <i>Ranavirus</i>       | CHSE-214          | Isolated from frog,(2012)             |
| 5        | RGNNV (group VI)         | <i>Betanodavirus</i>   | E-11              | Isolated from spotted sea bass (2010) |
| 6        | VHSV                     | <i>Novirhabdovirus</i> | HINAE             | Isolated from olive flounder          |
| 7        | SVCV (subgroup Ia)       | <i>Vesiculovirus</i>   | EPC               | Isolated from koi (2014)              |

No. 1,2,3,4,5 viruses cultured at 25°C

No. 6,7 viruses cultured at 20°C

### 3. Viral DNA 의 정량

IVS-1 의 viral DNA 는 GeneAll® Exgene™ Tissue SB mini kit (GeneAll)을 이용하여 정해진 protocol 데로 분리하였다. 그 후 분리된 viral DNA 는 absolute quantitative PCR (qPCR)법으로 정량하였고, 이를 위해 LightCycler 480 II (Roche)를 이용하였다. Absolute qPCR 은 TOPreal™ qPCR 2X PreMIX (SYBR Green with low ROX)(Enzynomics) 10 µl, 각각의 primer(Table 2.) 0.5 pM 그리고 1 µl 의 template DNA 를 첨가한 후, 최종 volume 이 20 µl 가 되도록 하여 실시하였다. qPCR 의 조건은 95℃에서 15 분간 반응한 후, 95℃ 10 초, 60℃ 15 초, 72℃ 20 초의 반응을 1 cycle 로 하여 40 cycles 를 반응시켰으며, 마지막 cycle 후에는 모든 반응물에 대하여 72℃부터 95℃까지의 영역에서 melting curve 분석을 실시하였다. Standard 의 제작은 IVS viral DNA 를 template 로 하여 MCP gene 을 target 으로 한 primer set 인 qM1F(5'-GGC GAC TAC CTC ATT AAT GT-3')와 qM1R (5'-CCA CCA GGT CGT TAA ATG A-3')을 사용하여 얻은 141 bp 의 product 를 TOPO-TA vector (Invitrogen)에 삽입하여 *Escherichia coli* DH5α에 형질전환 시킨 뒤 대량 배양한 다음 재 조합된 plasmid 를 재 분리하여 사용하였다. 재 조합된 plasmid 는 10-fold dilution 을 실시하여 standard curve 를 작성하는데 사용하였다 ( $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^1$  copies/µl).

## 4. 초대배양세포와 주화세포의 바이러스 감수성 비교

### 4.1 초대배양세포와 주화세포의 IVS-1 감수성 비교

IVS-1 에 대하여 초대배양세포와 주화세포의 감수성을 비교하기 위한 실험을 실시하였다. 초대배양세포의 경우 참돔, 돌돔, 강담돔, 감성돔, 넙치의 자어세포와 참돔, 돌돔, 넙치, 지느러미 세포, 돌돔의 뇌세포를 사용하였다. 주화세포는 PMF, GF, BF-2 를 사용하였다. 초대배양세포와 각각의 주화세포가 25cm<sup>2</sup> tissue culture flask 에서 세포층이 80-90%의 confluence 를 나타낼 때까지 배양 한 뒤 초대 배양세포와 주화세포가 배양 된 25cm<sup>2</sup> tissue culture flask 를 HBSS 를 이용해 2-3 회 washing 해 주었다. 그 뒤 초대 배양세포 및 주화세포의 배지를 기존에 배양하던 배지 (L-15, MEM)로 교체한 후, 배지 내 FBS(Gibco)의 농도를 5% 로 낮추어주었다. 그리고 IVS 0.1 ml ( $5 \times 10^7$ copies/ml) 을 접종하여 접종 7 일 후 배양액의 viral DNA 의 분리 후 absolute qPCR 을 실시하여 배양된 viral DNA 의 양을 정량하였다.

## 4.2 다양한 바이러스들에 대한 감수성 확인

초대배양세포와 주화세포에서 IVS-1 뿐 아니라 다양한 바이러스 접종 시 배양 특성을 확인하기 위하여 병원성을 일으키는 target 이 다른 7 가지 바이러스에 대하여 실험을 실시하였다 (Table 1). 본 실험을 위해 참돔, 돌돔, 넙치의 자어와 참돔, 돌돔, 넙치, 향어, 참조기의 지느러미, 돌돔과 참조기 뇌의 초대배양세포를 사용하였다. 각각의 초대배양세포들은 모두 2 번의 passage.를 거치기 이전의 세포를 사용 하였으며, 주화세포는 PMF, GF, BF-2, E-11, EPC, CHSE-214, HINAE 를 사용하였다. 각각의 세포를 25cm<sup>2</sup> tissue culture flask (Corning)에서 세포층이 80-90%의 confluence 를 나타낼 때까지 배양 해 준 뒤 초대 배양세포 및 PMF, GF, HiHINAE, E-11 는 5% FBS(Gibco) 가 첨가된 L-15 배지 (Sigma-Aldrich)로, BF-2, EPC, CHSE-214 는 5% FBS (Gibco)가 포함된 MEM 5ml 으로 교체하여 주었다. 그리고 배양된 세포가 있는 25cm<sup>2</sup> tissue culture flask 에 각각의 총 7 가지의 바이러스 0.1ml 을 접종 해 주었다. Megalocytivirus, Ranavirus, VNNV 는 25℃, VHSV 와 SVCV 는 20℃에서 배양을 해 주었으며, 7 일후의 배양액을 이용하여 배양을 확인하였다. 바이러스의 배양 확인에 사용한 primer 는 다음의 표에 나타내었다. (Table 2.) VHSV 의 경우 0 일째와 7 일째의 바이러스 배양 상등액을 추출하여 RT-PCR 을 실시한 후 gel 전기영동을 이용한 밴드의 차이를 통해 배양을 확인하였으며 나머지 바이러스의 경우 q-RT PCR 을 통한 정량적 분석을 실시하여 바이러스의 증가를 확인하였다.

Table 2. Oligonucleotide primers used in this study

| Virus           | Genomic region    | Primers      | Oligonucleotide sequence<br>(5' to 3' direction)       | Object     | Size  |
|-----------------|-------------------|--------------|--------------------------------------------------------|------------|-------|
| Megalocytivirus | MCP gene          | qM1F<br>qM1R | GGCGACTACCTCATTAATGT<br>CCACCAGGTCGTTAAATGA            | qPCR       | 141bp |
| Ranavirus       | MCP gene          | F<br>R       | CAT CCG GAT CCA CCA ATT<br>ACG ATG AGG GCG TAC TTT     | qPCR       | 139bp |
| VNNV            | capsid<br>protein | F<br>R       | TGC CAA ATG GTG GGA AAG<br>TTG TTG CCG ACA CAC AGG     | qPCR       | 126bp |
| VHSV            | G gene            | dF<br>dR     | CAC AGA TCA CYC AAM GAC C<br>RTG ATC ATG DGT YCT GGT G | 1-step PCR | 638bp |
| SVCV            | G gene            | F<br>R       | GCTGTGTTGCTTGCACTTATYT<br>TCAAACKAARGACCGCATTTTCG      | qPCR       | 80bp  |

## 5. 초대배양세포의 passage 에 따른 감염성 변화

### 5.1 RBE 와 RBF 의 세대 수 증가에 따른 IVS-1 감염성 변화

초대 배양한 RBE 의 passage 수가 증가할수록 다양했던 cell 의 형태가 단일하게 변화하고 감염성이 줄어든다는 실험 결과(진, 2014)를 바탕으로 Embryo cell 에 대한 실험과 상대적으로 초대배양세포 시기의 형태학적 세포의 다양성이 적은 지느러미 세포간에 세포의 passage 수에 따른 감염성의 차이가 있는지 알아보하고자 하였다. 세포의 passage 수에 IVS-1 의 감염성 변화를 확인하기 위하여 초대배양세포 RBE 와 RBF 의 계대 배양을 실시 하였다. 계대 배양은 세포가 단일층(monolayer)을 형성하면 (약 배양 5-7 일 후) 0.5% trypsin-EDTA 를 처리하여 떼어낸 후 10ml 의 HBSS 에 재 부유시켰다. 그 후 4℃ 500 g 에서 10 분간 원심 분리하여 washing 을 하였으며, 1:4 비율로 10% FBS 가 포함된 L-15 배지에서 배양하였다. 이러한 방법으로 0, 1, 3, 6, 그리고 12 번 계대 배양한 RBE cell 과 RBF cell 에 IVS 0.1 ml ( $5 \times 10^7$  copies/ml) 을 접종하였다. 바이러스 접종 7 일 후 상등액 100ul 을 sampling 하여 viral DNA 의 분리 후 absolute qPCR 을 이용하여 viral copy number 를 결정하였다..

## 5.2. 초대배양세포의 passage 에 따른 Megalocytivirus 의 감수성 변화

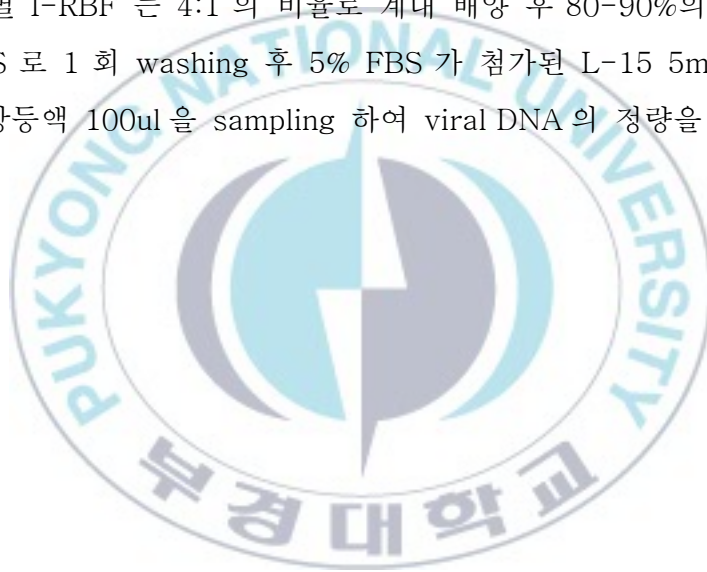
다양한 어종의 초대 배양 세포가 passage 를 계속적으로 거쳐가며 Megalocytivirus 에 대한 감수성이 어떻게 변화하는지 확인하기 위하여 본 실험을 진행하였다.

본 실험은 Megalocytivirus 에 대하여 감수성이 각기 다른 어종인 돌돔, 넙치, 참조기, 이스라엘 잉어에 대해 각각의 passage 를 3 번 이하로 거친 자어, 지느러미, 뇌의 초대 배양 세대와 수회 passage 를 거친 세포를 비교하였다. 각각의 세포를 25cm<sup>2</sup> tissue culture flask (Corning)에서 세포층이 80-90%의 confluence 를 나타낼 때까지 배양 해 준 뒤 5% FBS(Gibco) 가 첨가된 L-15 배지 (Sigma-Aldrich)를 각각 5ml 넣어주었다. 그리고 각각의 Megalocytivirus, 즉 IVS-1, FLIV-1, PGIV-K1 ( $5 \times 10^7$  copies/ml) 을 0.1 ml 접종하여 주었다. 바이러스 접종 7 일 후 상등액 100ul 을 sampling 하여 viral DNA 의 분리 후 absolute qPCR 을 이용하여 viral copy number 를 결정하였다.

## 6. IVS 에 감염된 돌돔의 지느러미 세포 초대배양 및 바이러스 역가 측정

IVS-1 을 돌돔에 인위감염 시키기 위하여,  $5 \times 10^5$  copies/ml 의 IVS-1 0.1ml 을 juvenile 기의 돌돔 복강에 주사한다. 그 후 계속적으로 관찰 후 임상증상을 보이는 돌돔을 사용하여 2.2 의 방법으로 지느러미 세포의 초대배양을 실시한다. 그 후 25cm<sup>2</sup> tissue culture flask (Corning) 80-90%의 confluence 를 나타낸 세포를 I-RBF (IVS-Rock bream fin) 로 명명하였다. 본 실험은 trail 1, trail 2 로 나누어 진행하였다.

각각의 세대별 I-RBF 는 4:1 의 비율로 계대 배양 후 80-90%의 confluence 를 나타내면 HBSS 로 1 회 washing 후 5% FBS 가 첨가된 L-15 5ml 을 채워 주었다. 7 일 배양 후 상등액 100ul 을 sampling 하여 viral DNA 의 정량을 실시하였다.



## 7. 어류 유래 물질을 이용한 IVS-1 의 감염성 변화

### 7.1 Tissue homogenate 와 serum 의 준비

외관상 질병의 증세가 보이지 않는 양식산 돌돔 (B.W.  $20 \pm 5$ cm) 의 조직과 혈액을 이용하여 tissue homogenate 와 serum 을 얻었다. 먼저, 분리한 비장, 간, 신장조직을 pestle 을 HBSS 에 1:10 (w/v) 비율로 마쇄하였다. 그 후  $4^{\circ}\text{C}$  3,500rpm 에서 10 분간 원심 분리 하였다. 그 후 상등액을  $0.45\ \mu\text{m}$  syringe filter 를 통과시켜 tissue homogenate 를 만들어 주었다. 어류의 serum 은 미부정맥에서 채취한 혈액을  $4^{\circ}\text{C}$  3,500rpm 에서 10 분간 원심 분리 하였다. 그 후 상등액, 즉 serum 부분을  $0.45\ \mu\text{m}$  syringe filter 를 통과시킨 후 감염 실험 시 사용하였다.



## 7.2 Tissue homogenate 와 serum 의 첨가를 이용한 주화세포 내 IVS-1 감염성 변화

본 실험을 위하여 PMF, GF, BF-2 cell 을 10% FBS 가 첨가된 배양배지 내에서 각각 80-90% confluence 를 나타낼 때까지 배양하였다. 5%의 FBS 가 첨가된 배지로 교체해 주고 IVS-1 0.1ml ( $5 \times 10^7$  copies/ml) 을 접종하여 주었다. 이때 7.1 에서 준비해놓은 tissue homogenate 과 serum 0.1ml (10mg/flask of tissue, 100 $\mu$ l/flask of serum)을 virus 와 함께 접종하여주어 최종적으로 배지 내 첨가물의 농도가 2%가 되게 해 주었다. 7 일 배양 후 100ul 을 sampling 하여 viral DNA 정량을 실시하였다.



## 8. IVS-1 에 대한 감수성 증가를 위한 tissue homogenate 와 serum 의 적정 농도의 설정

### 8.1. IVS-1 감염 시 tissue homogenate 와 serum 의 적정 농도 설정

주화 세포 내의 IVS-1 감염 시 tissue homogenate 와 serum 을 첨가 하여 줄 때, IVS-1 의 감수성을 높이는 최적의 농도를 찾기 위해 농도 별 감염실험을 실시해 주었다. PMF, GF cell 을 10% FBS 가 첨가된 배양배지 내에서 각각 80-90% confluence 를 나타낼 때까지 배양하였다. Tissue homogenate(10mg/ml) 과 serum 을 각각 10, 100, 250, 500  $\mu$ l 을 IVS-1 0.1ml ( $5 \times 10^7$  copies/ml) 과 함께 접종 해 주었다. 최종적으로 flask 내 첨가물의 농도가 0, 2, 20, 50, 100 $\mu$ l/ml 이 되었다. 7 일 배양 후 100  $\mu$ l 을 sampling 하여 viral DNA 정량을 실시하여 IVS-1 배양에 최적의 tissue homogenate 과 serum 농도를 확인하였다.

## 8. 2. IVS-1 감염 시 tissue homogenate 의 최적 조직의 확인

어류 주화세포인 PMF 와 GF 를 사용하여 어류의 복강 내 가장 많은 부분을 차지하는 간과 비장, 신장의 조직을 이용하여 tissue homogenate 가 감염에 미치는 영향을 비교 분석하였다. 각각의 장기를 이용한 tissue homogenate 의 제작은 7.1 의 방법과 동일하게 실시하였다. 본 실험을 위하여 PMF, GF cell 을 10% FBS 가 첨가된 배양배지 내에서 각각 80-90% confluence 를 나타낼 때까지 배양하였다. 그 뒤 5%의 FBS 가 첨가된 배지로 교체해 주고 IVS-1 0.1ml ( $5 \times 10^7$  copies/ml) 을 접종하여 주었다. 그리고 바이러스와 함께 간과 비장, 신장의 조직의 tissue homogenate 를 0.1 ml (최종 flask 내 농도 20 $\mu$ l/ml) 접종하였다. 7 일 배양 후 100 $\mu$ l 을 sampling 하여 viral DNA 정량을 실시하였다.



### III. 결과

#### 1. 초대 배양 세포와 주화세포의 IVS 감염성 비교

##### 1.1 자어세포와 지느러미세포, 뇌세포의 형태적 특징

현미경을 통하여 초대 배양된 자어세포의 형태를 살펴 보았을 때 epithelial-like, fibroblast-like, 그리고 neuron-like cell과 같은 다양한 모습의 세포가 관찰되었다. (Fig.1-1) 초대 배양된 지느러미세포와 뇌세포의 경우 epithelial-like cell과 fibroblast-like cell이 대다수를 차지하고 있어서 자어세포에 비하여 상대적으로 형태적으로 적은 종류의 세포가 자라는 것이 관찰되었다. (Fig.1-2, 1-3).

각각의 세포를 서로 다른 유래 어종으로부터 동일한 부위를 사용하여 초대배양을 실시하여 얻은 경우 형태상의 차이는 확인할 수 없었기 때문에 초대배양세포 형태 관찰을 통한 유래어종의 구분은 불가능 하였다.

계대 배양을 실시하는 경우 다양한 형태의 세포가 관찰되는 초대배양세포와 달리 계대 배양 수가 증가할수록 점점 단일세포의 형태를 보이는 것을 관찰할 수 있었다. (Fig.2)

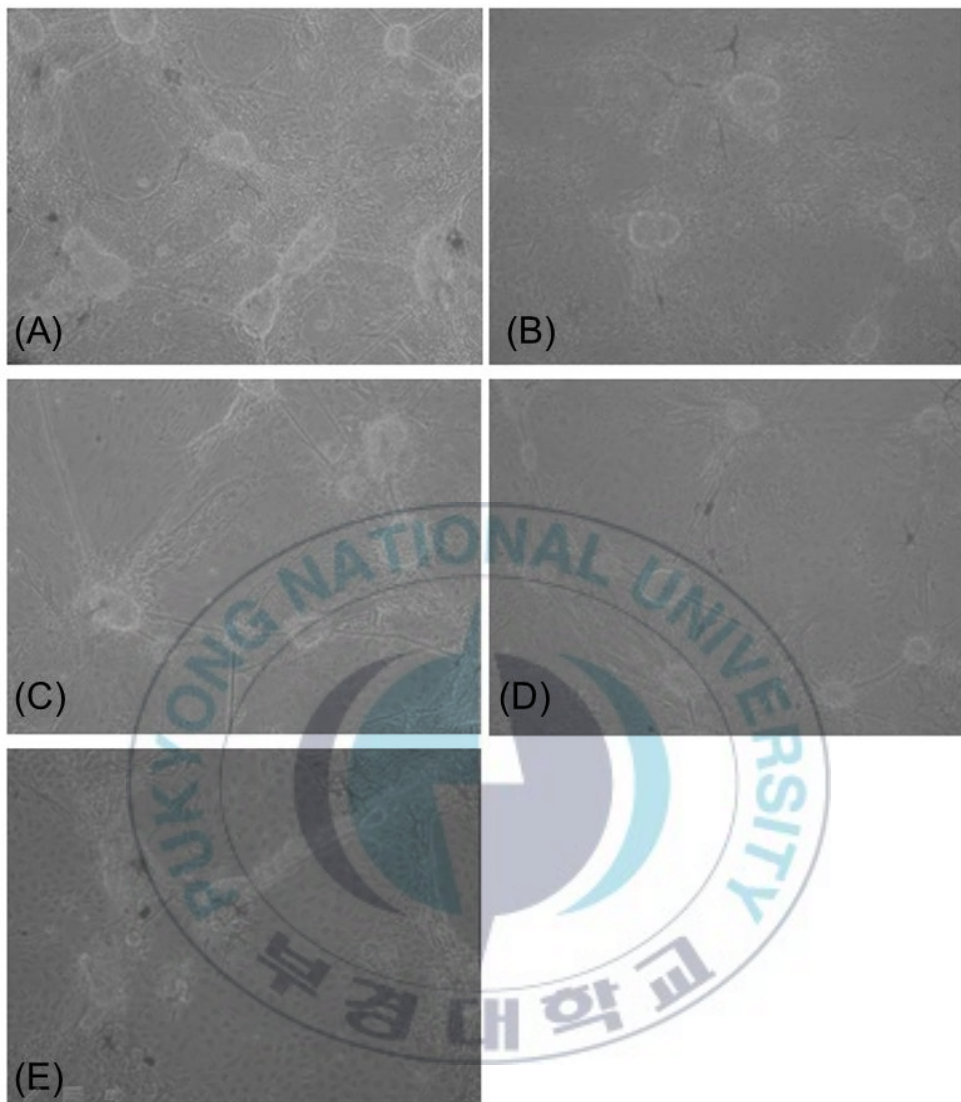


Fig. 1-1. Monolayer of the primary embryo cells cultured for 7days. (A) Rock bream (*O. fasciatus*), (B) Red sea bream (*P. major*), (C) Black sea bream (*A. schlegelii*), (D) Spotted parrot fish (*O. punctatus*), (E) Olive flounder (*P. olivaceus*).

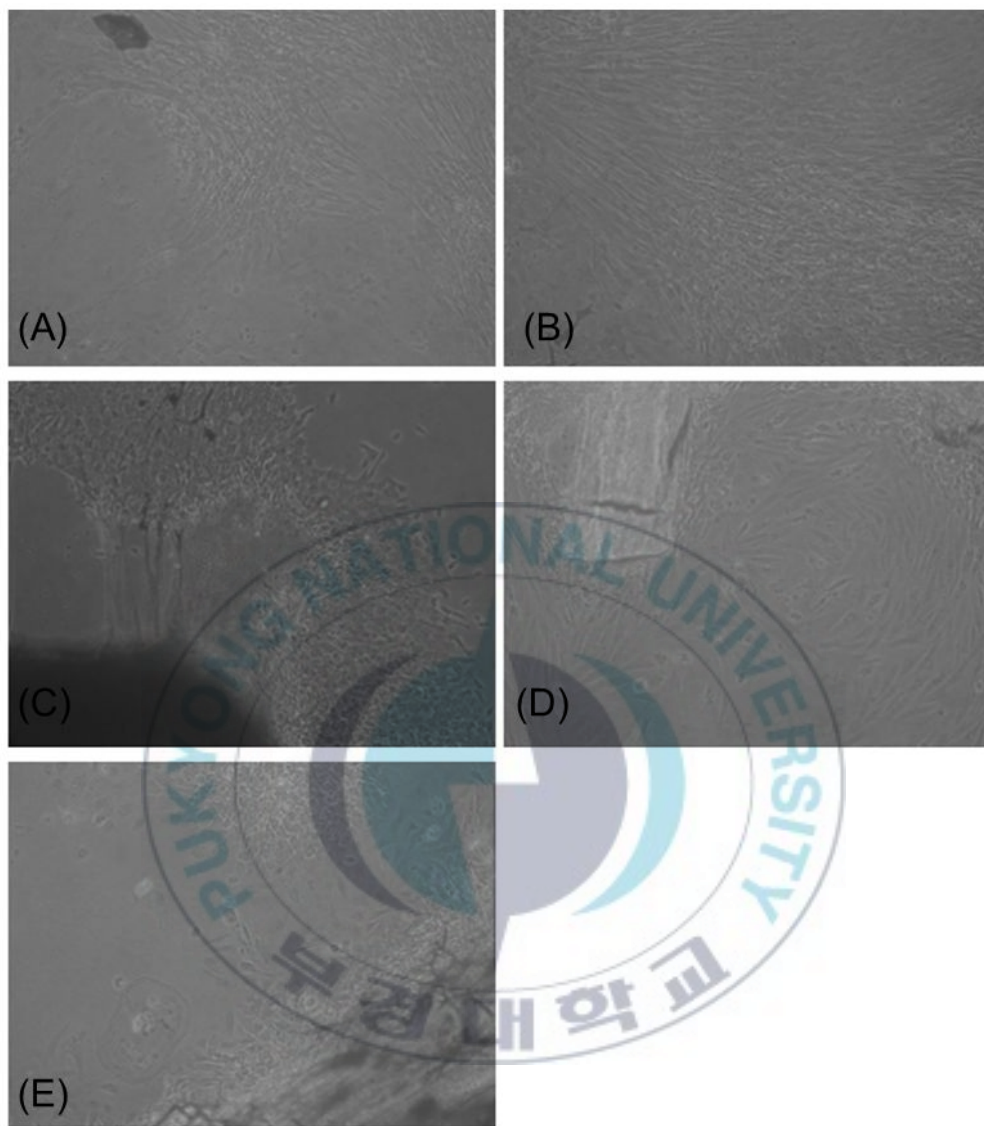


Fig. 1-2. Monolayer of the primary fin cells cultured for 7days. (A) Rock bream (*O. fasciatus*), (B) Red sea bream(*P. major*), (C) Olive flounder (*P. olivaceus*), (D) Israel carp (*C. carpio nudus*), (E) Small yellow croaker (*L. polyactis*)

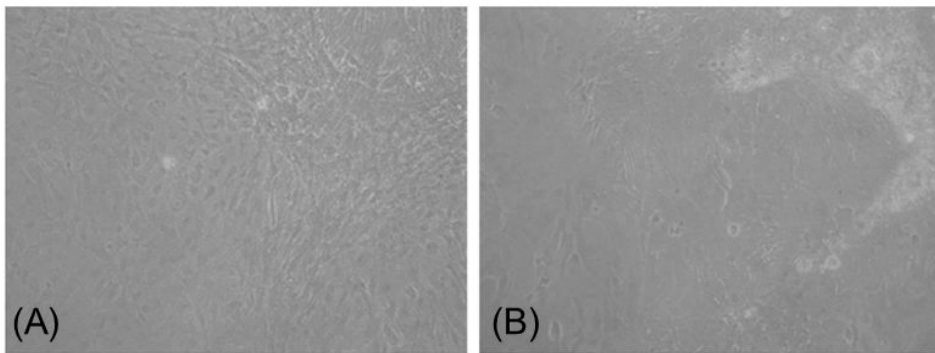


Fig. 1-3. Monolayer of the primary brain cells cultured for 7days. (A) Rock bream (*O. fasciatus*), (B) Small yellow croaker (*L. polyactis*)



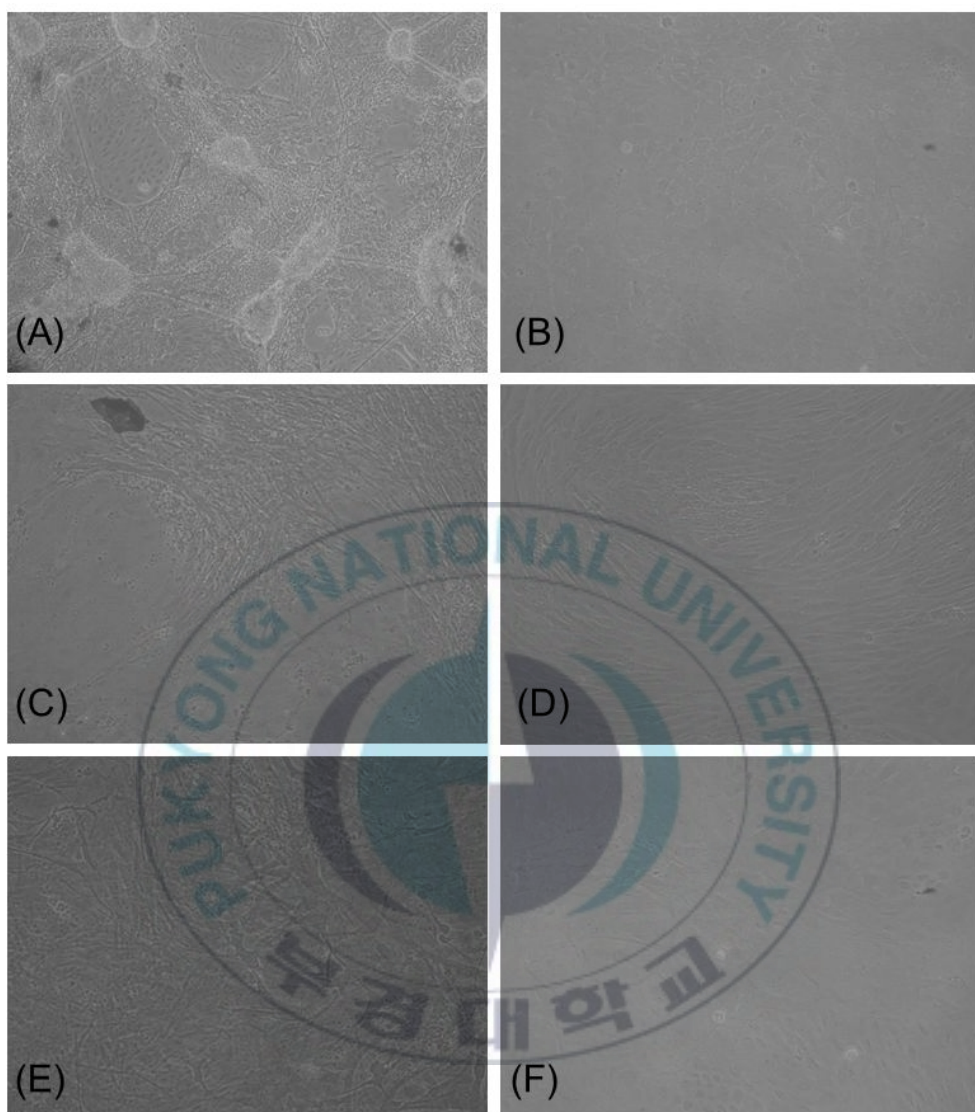


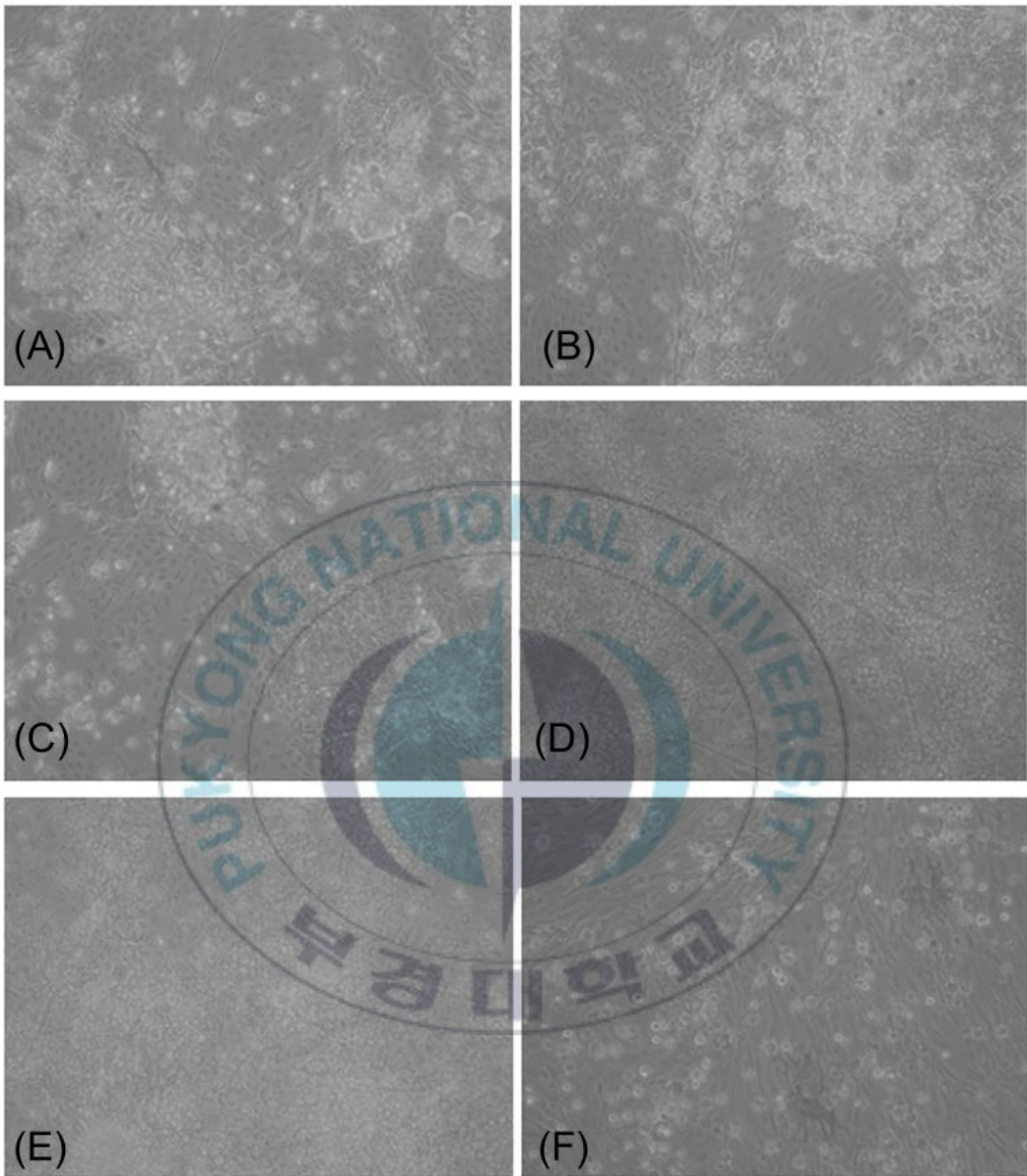
Fig 2. Monolayer of the primary rock bream (*O. fasciatus*) cell. (A) Embryo cells formed at 0 passage; (B) after 9th passage. (C) Fin cells formed at 0 passage; (D) after 9th passage, (E) brain cells at 0 passage, (F) after 9th passage.

## 2. 초대배양세포와 주화세포에서의 IVS 배양특성 비교

Megalocytivirus 에 대한 감염이 보고된 바가 있는 어종을 이용하여 초대배양을 실시하였으며 각각에 대해 IVS-1 의 감염력을 비교하였다. 자어세포 (RBE, RSBE, SPFE, BSBE, OFE cell)와 지느러미세포 (RBF, RSBF, OFF), 뇌세포(RBB) 의 IVS-1 에 대한 감수성을 확인하기 위해서 PMF 에서 배양한 IVS-1( $5 \times 10^7$  copies/ml) 을 0.1 ml 접종해 준 뒤 7 일 후의 virus copy 값을 비교하였다. 대조구로는 PMF, GF cell 과 BF-2 cell 을 사용하였다.

각각의 초대배양세포에서는 세포의 유래어종과 기관에 상관없이 바이러스 접종 3 일 이후 Megalocytivirus 의 특징인 이형비대세포(CPE)가 관찰되었다. 접종 7 일 후에는 많은 수의 CPE 가 관찰되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3-1). 주화세포인 PMF 와 GF cell 에서도 CPE 가 관찰되었으나 초대배양세포에 비하여 매우 적은 수가 관찰되는 것을 확인하였다 (Fig. 3-2.).

접종 후 7 일째 상등액에 있는 viral DNA 를 real-time PCR 을 이용하여 정량적 분석을 실시한 결과, 초대배양세포의 경우에는 평균적으로 IVS-1 이 약 14,100 배 증가하였는데, 자어세포의 경우 최종적으로 평균  $1.69 \times 10^{10}$  copies/ml, 지느러미와 뇌세포의 경우  $1.13 \times 10^{10}$  copies/ml 의 viral copy 값을 보였다. 현미경 관찰 시 자어세포와 지느러미 세포, 뇌세포에서 보이는 형태학적 차이와 무관하게, 또한 각 어종에서의 Megalocytivirus 에 대한 감수성 차이와 상관없이 모든 초대배양세대의 세포에서 많은 값의 viral copy 값의 증가를 보였으며 이는 주화세포에서의 viral copy 값의 증가와 상당한 차이를 보였다. (Fig. 4)



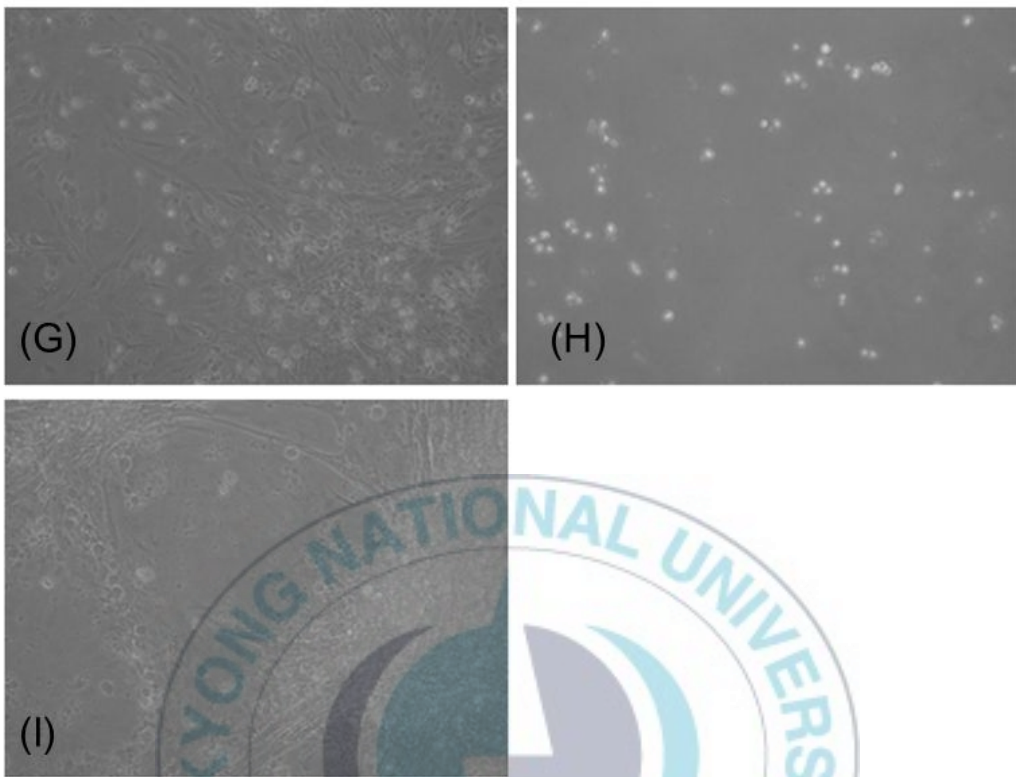


Fig. 3-1. Cytopathic effects of IVS-1 in various fish primary cells at passage 0. (A) Rock bream embryo (*O. fasciatus*), (B) Red sea bream embryo(*P. major*), (C) Black sea bream embryo(*A. schlegelii*), (D) Spotted parrot fish embryo (*O. punctatus*), (E)Olive flounder embryo (*P. olivaceus*), (F) Rock bream fin (*O. fasciatus*), (G) Red sea bream fin(*P. major*), (H) Olive flounder fin(*P. olivaceus*), (I) Rock bream brain( *O. fasciatus*). Primary cultured cells with a large vacuole are observed.

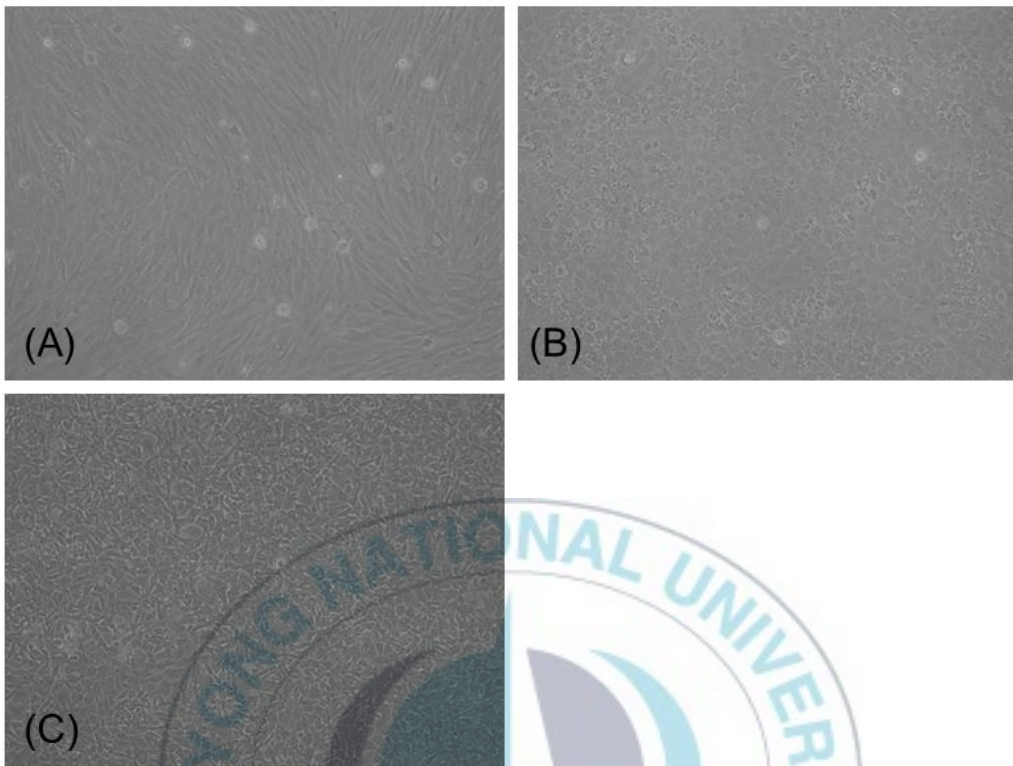


Fig. 3-2. Cytopathic effects of IVS-1 in various fish cell lines. (A)PMF, (B)GF, (C) BF-2

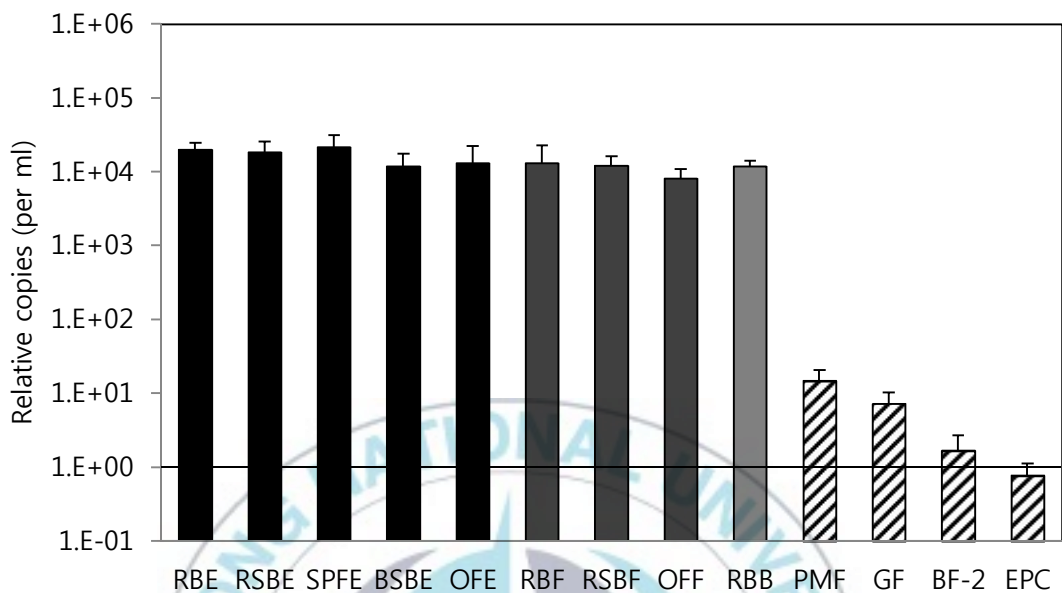


Fig. 4. Differential susceptibility of primary and established fish cells to IVS-1 infection. Virus titer in supernatant of primary embryo cell (■), fin cell (■), brain cell (■) infected with IVS-1 were increased about  $1 \times 10^4$  copies/ml compare with 0day. IVS-1 replication titer of cell lines (▨) were lower than primary cells.

### 3. 초대 배양 세포와 주화세포에서의 바이러스 감수성 비교

초대배양세포에서 IVS-1에 대한 감수성이 높은 것이 *Megalocytivirus*만의 특징인지 확인하기 위하여 바이러스의 감수성이 다른 어종들로부터 얻은 여러 초대 배양세포들(돌돔, 참돔, 넙치의 자어세포 및 지느러미세포와 참조기와 향어의 지느러미세포)과 주화세포(PMF, GF, BF-2, E-11, EPC, HINAE)에 대하여 다양한 바이러스들(*Megalocytivirus*, VNNV, VHSV, SVCV, *Ranavirus*)에 대한 감수성을 확인 해 보았다.

3세대 이전의 대부분의 초대배양세포에서는 몇몇을 제외하고 IVS-1 뿐 아니라 다른 *Megalocytivirus*인 FLIV-1과 PGIV-K1에 대하여 1,000배 이상의 높은 감수성을 나타내었다. FLIV의 경우 평균  $5.77 \times 10^9$  copies/ml, PGIV-K1의 경우  $3.18 \times 10^9$  copies/ml의 농도로 배양됨에 따라 초대배양세포를 이용한 고농도의 바이러스 생산은 IVS-1 뿐 아니라 다른 subgroup에 속하는 FLIV-1과 PGIV-K1에서도 가능함을 확인하였다. 또한 *Megalocytivirus* 뿐 아니라 *Ranavirus*, VNNV, VHSV, SVCV 또한 초대배양세포 유래 어종이 해당바이러스에 감수성이 적거나, 없다고 하더라도 초대배양세포에서는 바이러스의 배양이 이루어짐을 확인 할 수 있었다. (Table 3)

Table 3. Susceptibility of various cells to the infection of fish virus.

| group               | species              | Megalocytivirus |       |      | Ranavirus | VNNV  | SVCV | VHSV* |
|---------------------|----------------------|-----------------|-------|------|-----------|-------|------|-------|
|                     |                      | IVS-1           | FLIVm | PGIV | FV3       | RGNNV |      | G IVa |
| primary embryo cell | Red sea bream        | +++             | +++   | +++  | ++        | ++    | +    | +     |
|                     | Rock bream           | +++             | +++   | +++  | +++       | +++   | +    | +     |
|                     | Olive flounder       | +++             | NT    | NT   | NT        | NT    | NT   | NT    |
| primary Fin cell    | Red sea bream        | +++             | +++   | ++   | NT        | NT    | NT   | NT    |
|                     | Rock bream           | +++             | +++   | +++  | NT        | NT    | NT   | NT    |
|                     | Olive flounder       | +++             | +++   | +++  | ++        | NT    | NT   | NT    |
|                     | Israel carp          | ++              | ++    | +    | ++        | +     | +    | NT    |
|                     | Small yellow croaker | +               | +++   | +    | +++       | +     | ++   | NT    |
|                     |                      |                 |       |      |           |       |      |       |
| Primary brain cell  | Rock bream           | +++             | ++    | ++   | +++       | NT    | NT   | NT    |
|                     | Small yellow croaker | +               | +     | +    | +++       | NT    | NT   | NT    |
| cell line           | PMF                  | +               | +     | ±    | -         | -     | -    | -     |
|                     | GF                   | ±               | ±     | -    | -         | +     | +    | -     |
|                     | BF-2                 | ±               | -     | -    | NT        | +     | +    | NT    |
|                     | E-11                 | -               | NT    | NT   | NT        | +++   | NT   | NT    |
|                     | EPC                  | NT              | NT    | NT   | +         | NT    | +++  | +     |
|                     | CHSE-214             | -               | -     | -    | ++        | +     | NT   | NT    |
|                     | HINAE                | NT              | +     | +    | ++        | NT    | NT   | +     |

; NT, not tested

A dash indicates that virus was not increased.

Increased folds of viral copies (log) ; (±) <1 ; 1<(+)<2; 2<(++)<3; 3<(+++)

\*RT-PCR analysis of virus in various cells at the indicated times after VHSV inoculation. The transcription of G gene were detected (+), non-detected (-)

## 4. 초대배양세포의 passage 수 증가에 따른 바이러스 감수성의 변화

### 4.1 RBE와 RBF에서의 세대별 IVS 감염성 변화

초대배양세포와 주화세포에서의 Megalocytivirus에 대한 감염력의 차이가 주화세포가 passage를 많이 거쳤기 때문인지 확인하기 위하여 초대배양세포의 passage 횟수에 따른 IVS-1의 감수성 차이를 확인 하였다.

RBE와 RBF의 세대변화에 따른 감수성의 차이를 비교하기 위해서 passage를 거치지 않은 초대 배양된 세포, 그리고 passage를 1, 3, 6, 12번을 거쳐 배양된 각각의 RBE와 RBF cell에 IVS-1을 접종하여 주었다.

0 passage를 거친 초대배양세대의 세포에서는 RBE, RBF cell 모두 바이러스 배양 후 7일째 다수의 CPE를 관찰 할 수 있었으나, passage 수가 계속적으로 증가함에 따라 세포에 나타나는 CPE의 수 또한 감소함을 확인 할 수 있었다. (Fig. 4) 또한 CPE의 감소와 더불어 접종 7일 후의 viral copy number 역시 계속적으로 감소하는 모습을 보였다. 0 passage의 RBE, RBF cell에서 IVS의 접종 시 평균적으로 28,300배가 증가하여 최종적으로  $2.83 \times 10^{10}$  copies/ml의 농도를 나타내었으나, 3-6 회의 passage를 거치면서 급격히 virus 배양 정도가 감소하여 12 passage 이후 배양한 상등액에는 평균적으로 5배 정도의 증가( $5 \times 10^6$  copies/ml)만 확인할 수 있었다. RBE와 RBF 12번의 passage를 거치면서 초대 배양 세대의 세포와 달리 바이러스 감수성이 낮아져 최종 viral copy number는 초대배양세포와 비교해 평균 5,660배 이상 크게 감소하였다 (Fig. 5).

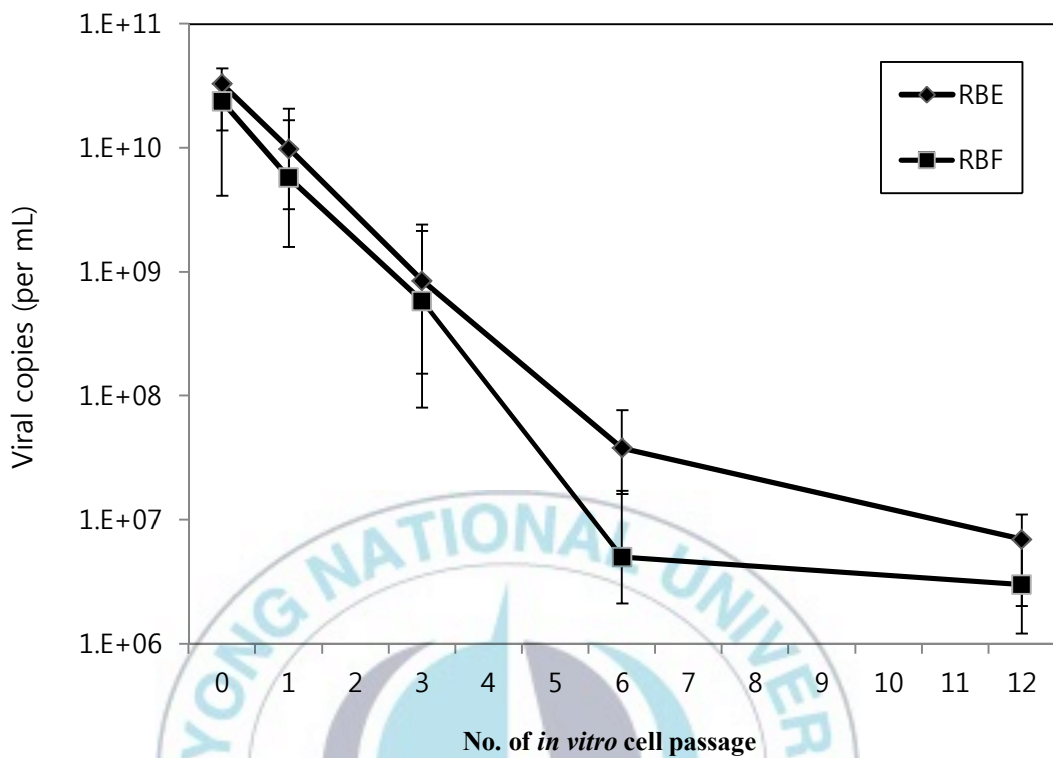


Fig. 5. Replication of IVS-1 on primary rock bream (*O. fasciatus*) embryo cell and fin cell passaged serially.

## 4.2 초대배양세포와 세대 수 증가에 따른 바이러스 감수성 비교

배양세포의 passage 수가 증가할수록 IVS-1 에 대한 감수성이 낮아지는(Fig 3.1) 현상이 IVS-1 뿐 아니라 다른 subgroup 에 속하는 Megalocytivirus 에 나타나는지 확인해 보았다. 여러 어종의 다른 passage 의 지느러미 세포를 사용하여 Megalocytivirus 에 속하는 FLIV 와 PGIV 에 대해 감염실험을 실시하였다. IVS 의 경우 2 번의 passage 를 지난 돌돔의 지느러미 세포에서 평균적으로 약 2,800 배 가 증가하였으나 10 회의 passage 후에는 10 배 이하로 거의 자라지 않는 모습을 보였다. 담수어인 이스라엘잉어에서도 3 번의 passage 를 거친 지느러미 세포에서 약 180 배의 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었으나 10 회의 passage 후 약 30 배의 증가만을 나타냄을 확인하였다. FLIV 의 경우 돌돔과 넙치의 초대배양세포에서도 평균 1040 배 이상 증가 할 뿐 아니라 3 번의 passage 를 거친 참조기 지느러미 세포에서도 370 배 이상 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 10 번의 passage 를 거친 후 FLIV 뿐아니라 모든 Megalocytivirus 에 대한 감수성이 약 70 배 이하로 낮아지는 결과를 보였다. PGIV 의 경우 넙치의 지느러미 세포에서 약 2200 배의 증가를 보였으나 passage 를 수회 거친 후 약 30 배의 증가를 보였다. 다른 어체로부터 얻은 지느러미세포에서도 비슷한 양상을 보임을 확인할 수 있었다. (Table 4.)

돌돔의 자어세포와 지느러미세포의 *in vitro* passage 가 증가함에 따라 IVS-1 의 감염성이 낮아지는 결과는 IVS-1 에 대한 감수성이 높지 않은 다른 어종에서 유래한 세포에서도 나타남을 확인하였으며 이러한, cell passage 증가에 따른 감염성의 변화는 Megalocytivirus 의 다른 subgroup 에 속하는 바이러스에서도 나타남을 확인하였다.

Table 4. Susceptibility of different generation fish fin cells to the infection of Megalocytivirus.

| group  | species              | passage | Megalocytivirus |        |         |
|--------|----------------------|---------|-----------------|--------|---------|
|        |                      |         | IVS-1           | FLIV-1 | PGIV-K1 |
| Embryo | Rock bream           | 2       | +++             | +++    | +++     |
|        |                      | 10      | +               | -      | -       |
|        | black sea bream      | 2       | +++             | +++    | +++     |
|        |                      | 10      | -               | -      | -       |
| Fin    | Rock bream           | 2       | +++             | +++    | +++     |
|        |                      | 10      | ±               | -      | -       |
|        | Olive flounder       | 2       | +++             | +++    | +++     |
|        |                      | 7       | +               | +      | +       |
|        | Israel carp          | 3       | ++              | +      | +       |
|        |                      | 10      | +               | +      | +       |
|        | Small yellow croaker | 3       | +               | +++    | ++      |
|        |                      | 10      | -               | -      | -       |
| Brain  | Rock bream           | 2       | +++             | +++    | ++      |
|        |                      | 7       | +               | +      | -       |
|        | Small yellow croaker | 3       | +               | +      | +       |
|        |                      | 7       | -               | -      | -       |

A dash indicates that virus was not increased.

Increased folds of viral copies (log) ; (±) <1 ; 1<(+)<2; 2<(++)<3; 3<(+++)

## 5. RBF 와 IVS 에 감염된 돌돔에서 얻은 I-RBF cell 에서의 IVS-1 배양 비교

### 5.1 I-RBF cell 의 배양

돌돔에 IVS-1 을 인위감염 시킨 후, 먹이를 먹지 않고 체색이 흑화되며 안구 충혈이 되는 등의 전형적인 임상증세를 보이는 어체의 지느러미를 사용하여 초대배양을 실시하였으며, 그 후 배양 세포의 세대별 바이러스 증가량을 확인하였다

IVS 에 감염된 돌돔에서 얻은 지느러미세포 (I-RBF) 에서는 별도의 바이러스 접종이 없음에도 불구하고, 초대세대부터 CPE 가 관찰되었다 (Fig. 6C.).

IVS-1 에 감염 되지 않은 건강한 어체를 사용하여 세포배양을 한 경우, 세대별 감염실험을 실시 하였을 때 passage 수가 증가할수록 viral copy number 의 감소와 함께 CPE 가 점점 적게 관찰되는 모습이 확인된 것과 달리 I-RBF 는 계속적으로 passage 수가 증가하여도 CPE 가 계속적으로 관찰되었다. (Fig. 6D) 또한 각각 다른 trail 에서의 viral copy number 역시 감소하지 않고 평균  $4.28 \times 10^9$  copies/ml 의 농도로 지속적으로 배양되는 모습을 확인 할 수 있었다. (Fig. 7.) 하지만 다른 초대배양세포들과 마찬가지로, 첫번째 실험에 의한 IRBF-Trail 1 의 경우 16 세대, IRBF-Trail 2 의 경우 7 세대가 되었을 때 더 이상 세포 성장이 이루어지지 않았다.

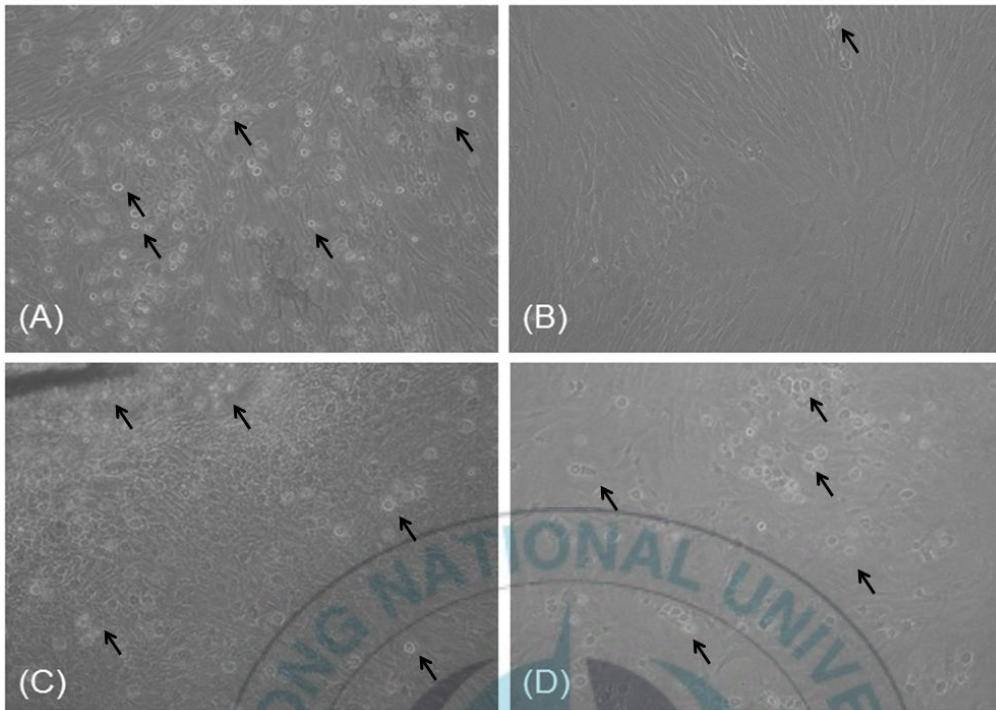


Fig. 6. Cytopathology of RBF and I-RBF cells infected with IVS-1. RBF at 0 passage (A) and 12 passage (B), I-RBF at 0 passage(C) and 12 passage (D),

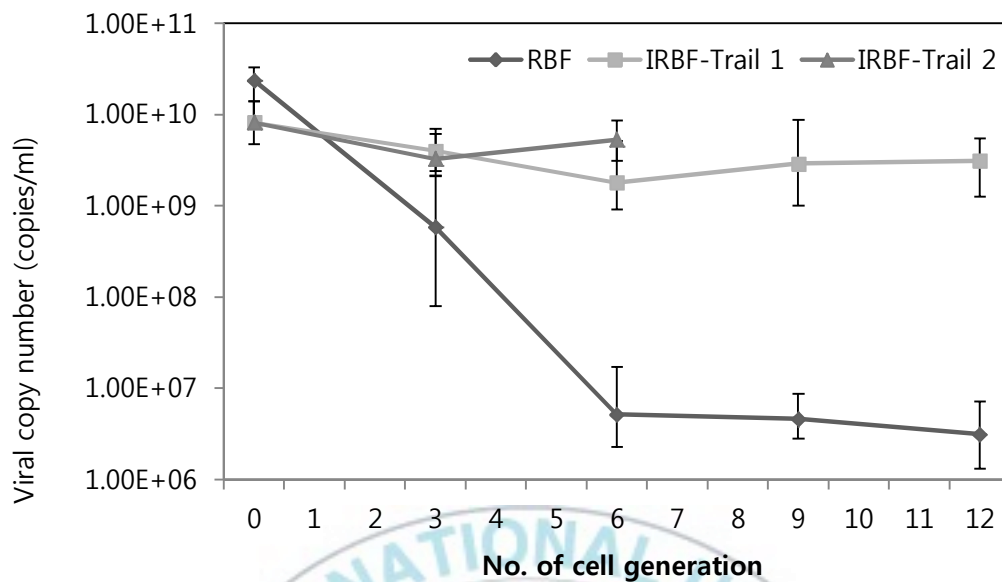


Fig. 7 . Comparison of the viral supernatant between RBF and I-RBF.

## 6. 주화세포의 IVS-1 감염의 효율성 증대를 위한 방법

### 6. 1. 배양 배지 내 tissue homogenate 와 serum 첨가에 따른 IVS-1 생산성 변화 분석

tissue homogenate 와 serum 을 첨가하여 주었을 때 주화세포의 IVS-1 에 대한 감염성에 영향을 주는지 확인 하기 위하여 IVS-1 접종시 0.1 ml 의 tissue homogenate 와 serum 을 첨가하여 주었다. 7 일 후의 상등액을 분석한 결과 PMF 에 경우 IVS-1 감염 실험 시 기존엔 평균 15 배 ( $1.5 \times 10^7$  copies/ml)가 증가하지만 tissue homogenate 를 첨가하여 줄 경우 약 290 배( $2.9 \times 10^8$  copies/ml), serum 의 경우 약 360 배( $2.9 \times 10^8$  copies/ml)가 증가함을 확인하였다. GF cell 의 경우 7 배 ( $7 \times 10^6$  copies/ml)이 증가폭이 tissue homogenate 와 serum 을 첨가함으로 각각 213 배( $2.13 \times 10^8$  copies/ml)와 254 배( $2.54 \times 10^8$  copies/ml)의 증가를 확인하였다. 바이러스의 증폭이 거의 일어나지 않는 BF-2 cell 도 24 배( $2.4 \times 10^7$  copies/ml) 이상 증가함을 확인하였다 (Fig. 8.).

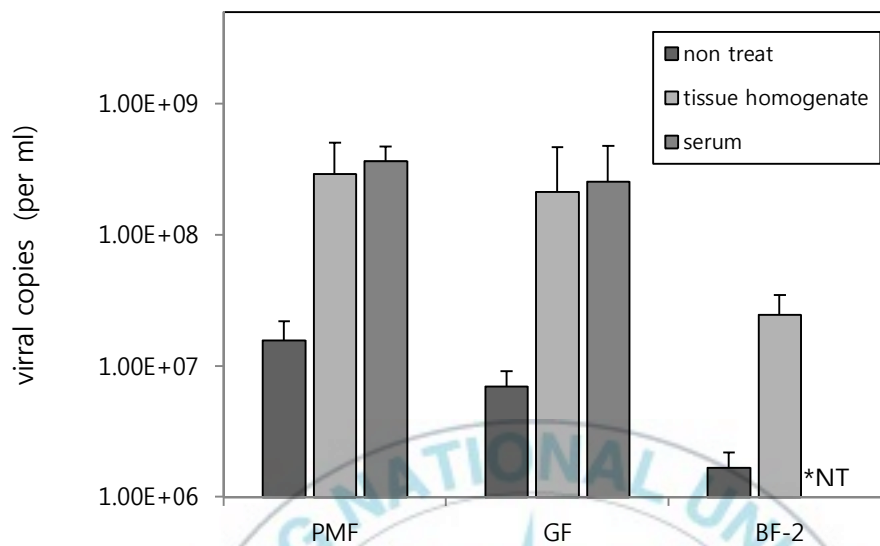


Fig. 8. Enhanced virus propagation of IVS-1 using addition tissue homogenate and serum in three fish cell lines

\*NT; Not tested

## 6. 2. Tissue homogenate 와 serum 첨가량에 따른 감염성 차이 비교

Tissue homogenate 와 serum 첨가량과 IVS-1 배양의 상관관계에 대해 확인하는 실험을 실시하였다. 각각의 flask 내 tissue homogenate 와 serum 을 각각 10, 100, 250, 500 $\mu$ l 로(최종적으로 flask 내 tissue 의 양은 1, 10, 25, 50mg 가 존재) IVS-1 0.1ml 과 함께 첨가한 후 7 일 후의 상등액의 바이러스 양을 확인하였다. 그 결과 20 $\mu$ l/ml 의 tissue homogenate 또는 serum 을 첨가하여 주었을 때 가장 바이러스가 많이 증가하여 최적 첨가량임을 확인하였다. 그러나 20 $\mu$ l/ml 이상의 농도를 첨가하여주는 경우 오히려 바이러스의 증가가 저해됨을 확인하였다(Fig. 9.). 현미경 관찰 시 아무것도 처리하지 않았을 때 보다 homogenate 또는 serum 을 넣었을 때 세포상에 CPE 가 더 많이 관찰되었다. 그러나 첨가물의 양이 20 $\mu$ l/ml 이상인 경우 세포 변성을 나타냄을 확인하였으며 (Fig. 10.) 이는 바이러스 증폭 저해의 원인이 될 수 있을 것이라 생각된다.

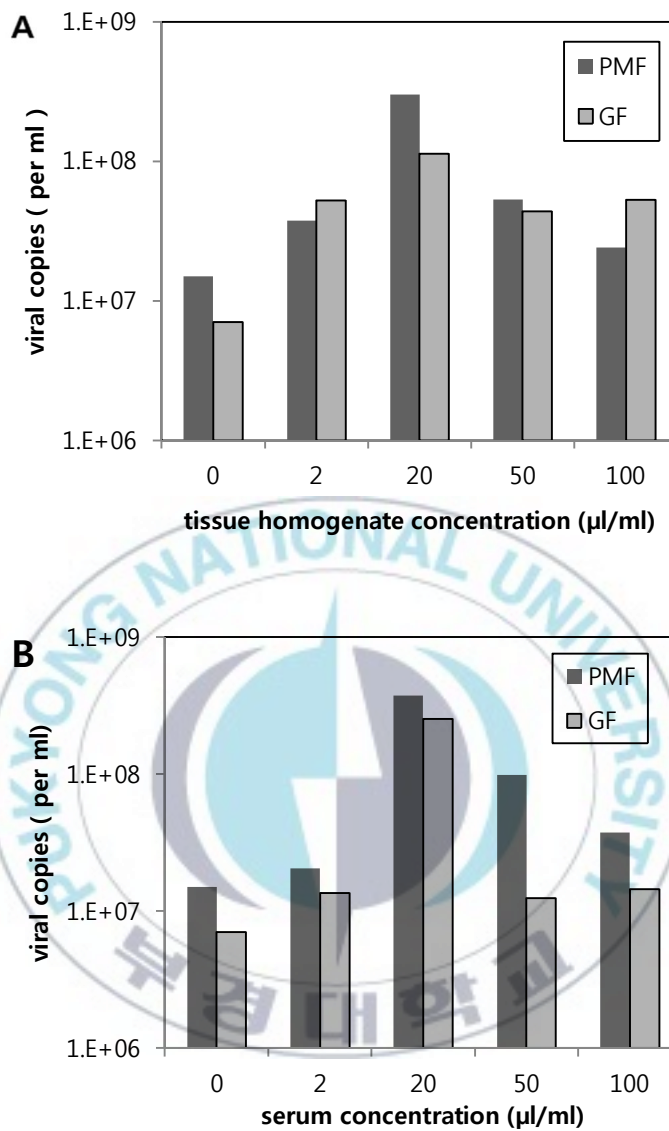


Fig. 9. Comparison of IVS-1 production for different tissue homogenate and serum concentrations in PMF & GF cell. (A) tissue homogenate (10mg/ml), (B) serum

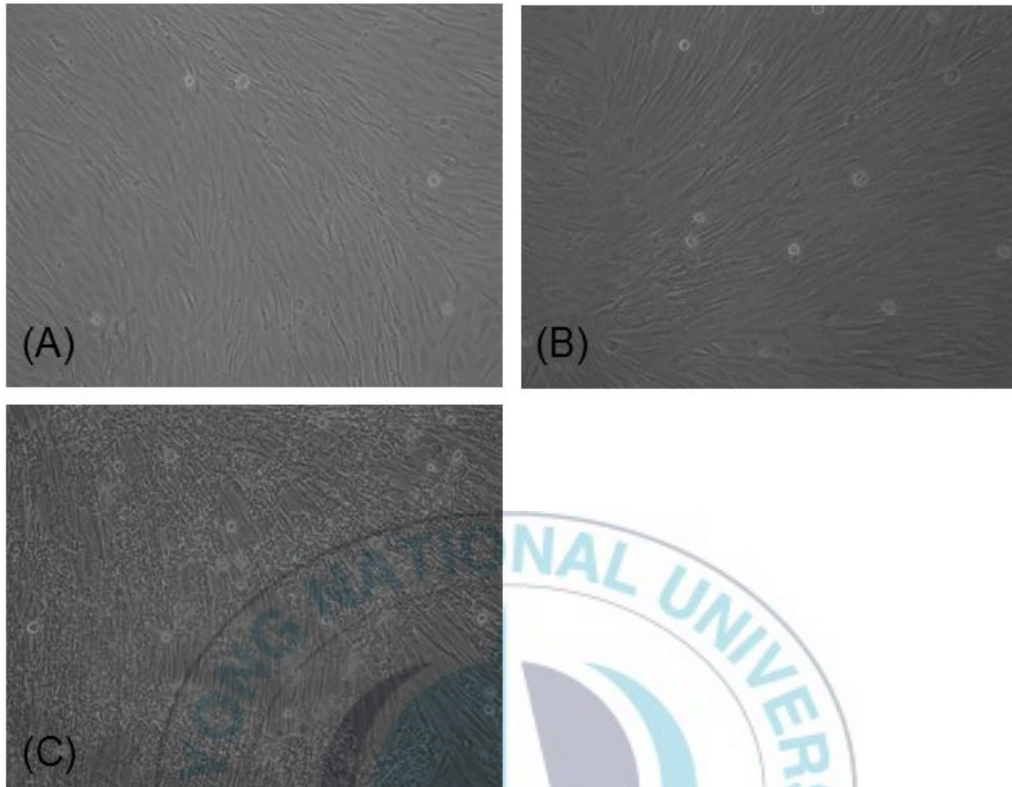


Fig. 10. Cytopathic effects of IVS-1 on PMF cell cultures in L-15 media supplemented with different concentration of tissue homogenate. . (A) Normal inoculation, virus only, (B) 20µl/ml of tissue homogenate, (C) 100µl/ml of tissue homogenate.

### 6.3 tissue homogenate 유래 장기에 따른 감염 분석

이러한 결과가 첨가하는 조직, 즉 spleen 의 특이성이 있는지 확인하기 위하여 간과 신장을 추가적으로 실험을 실시하였다. 그 결과 비장이 아닌 간, 신장의 tissue homogenate 를 첨가하여준 경우에도 기존 주화세포 감염 시 얻은 결과보다 높은 값을 얻을 수 있었다. 정량적 분석 결과 평균적으로 200 배 이상( $2.16 \times 10^8$  copies/ml)의 바이러스 증가 값을 보임을 확인하였다. (Fig. 11.). 따라서 Tissue homogenate 가 IVS-1 의 감염력을 높여줌에 있어서 신장, 간, 비장의 조직간에 큰 차이는 없는 것으로 확인되었다.



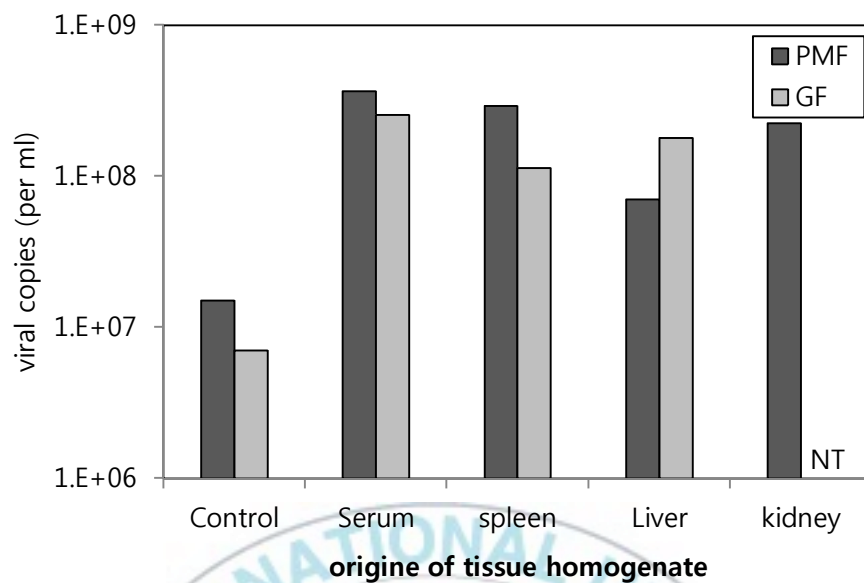


Fig. 11. Comparison of IVS-1 production for different organ tissue homogenate and serum in PMF & GF cell.

\*NT; Not tested

## IV. 고찰

바이러스의 분리나 증폭, 그리고 진단 또는 숙주간의 상호작용에 대한 연구를 하기 위해서는 적합한 주화세포의 개발과 바이러스의 배양법이 필수적이다. 하지만, 많은 연구에서 말하듯 Megalocytivirus의 배양에 적합한 주화세포는 거의 드물다.

RSIV에 대하여 감수성을 지닌 어류주화세포는 BF-2 (bluegill fry-2) (Wolf and Quimby, 1966), CRF-1 (clonal red sea bream fin-1) (Imajoh et al., 2007), GF (grunt fin) (Clem et al., 1961), KRE (grouper) (Chou et al., 1998), and SK (seabass kidney) (Khongpradit et al., 2003), MFF-1 (mandarin fish fry) (Dong et al. 2008) 등이 보고되어 있다. 그러나 바이러스 배양 시 BF-2 and KRE의 경우 viral passage가 증가할수록 바이러스의 replication이 감소하는 것으로 알려져 있으며(Chou et al. 1998; Imajoh et al. 2007; Nakajima and Sorimachi, 1994), KCF-1(koi fin)에서도 비슷한 경향성을 보인다는 연구 결과가 있다 (Dong et al. 2011). 이러한 연구들을 통해 고수율의 이리도 바이러스 생산을 위한 in vitro 배양의 최적화가 필요하다고 생각하여 본 연구를 진행하였다.

RSIV가 참돔에서 최초로 발견된 이후(Nakajima et al., 1994), 돌돔과 강담돔이 포함된 genus Oplegnathus는 가장 RSIV에 대하여 감수성이 높은 어종이라고 보고되었다. (Kurita and Nakajima, 2012) 감성돔의 경우 폐사는 거의 일어나지 않으나 nested PCR을 통해서만 검출되었다는 보고가 있다. (Jeong et al., 2003). 넙치의 경우 우리나라에서는 turbot reddish body iridovirus (TRBIV) type의 megalocytivirus가 검출되어 높은 폐사를 확인하였고 이후 flounder iridovirus (FLIV)라 명명하였다 (Do et al., 2005). 하지만 아직 RSIV type에 의한 폐사는 아직 보고된 바가 없다. PGIV의 경우 ISKNV type과 유사한 바이러스로서 담수관상어인 pearl gourami로부터 분리되었으며, 돌돔에서 실험적으로 높은 폐사율을 나타냄을 확인하였다 (조, 2008) 그리고 이러한 Megalocytivirus의 감염에 대하여 해산어인 참조기와 담수어인 이스라엘 잉어에서는 아직 감염이 보고가 된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는

Megalocytivirus에 대해 감수성이 각각 다른 어종인 어종인 돌돔, 참돔, 강돔, 감성돔, 넙치와 감염에 대한 보고가 없는 어종인 참조기와 이스라엘 잉어를 사용하여 초대 배양을 실시하였으며, 초대 배양 시 자어와 지느러미, 뇌를 이용하여 각각 사용하여 초대배양세포의 기원 조직이 다르게 해 주었다. 초대 배양된 자어세포는 epithelial-like, fibroblast-like 그리고 neuron-like cell이 함께 배양됨을 보아 매우 다양한 형태의 세포가 자람을 확인하였으나, 초대 배양된 지느러미세포와 뇌세포는 epithelial-like, fibroblast-like cell이 함께 배양됨을 확인할 수 있었는데 자어세포에 비해 단순한 세포의 형태를 보였다. 그리고 각각의 초대배양세포는 광학현미경상으로는 유래어종의 구분이 불가능 하였다(Fig. 1.). 자어와 지느러미, 뇌 초대 배양에서 자어세포의 경우 다른 두 세포에 비해 Flask내 세포의 수가 매우 빠른 속도로 증가하는 것이 관찰되며, 뇌세포의 경우 동일한 confluence 까지 도달하기 까지 더 오랜 배양 시간이 소요되었다. 그리고 각각의 세포들은 수회의 passage를 거치면서 형태적으로 단일화 되는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 2.) .

Megalocytivirus 가 세포에 감염이 되면 세포가 커지면서 동그래지는 형태의 CPE 가 확인되는데(Dong et al. 2008; Imajoh et al. 2007; Nakajima and Sorimachi 1994), 실험 결과 자어세포 (RSBE, SPFE, BSBE 그리고 OFE cell), 지느러미세포(RSBF, RBF, OFF) 및 뇌세포 (RBB) 의 IVS-1 의 감염 실험 시 자어세포와 지느러미세포, 뇌세포 모두에서 접종 3 일째 둥글며 반짝이는 Megalocytivirus 에서 특징적인 CPE 가 관찰되었으며 7 일째에는 다수의 CPE 가 관찰되었다 (Fig. 3.). 또한 정량적 분석을 통하여 바이러스 접종 7 일 후 상등액 내 IVS-1 이 초기 농도에 비해 평균적으로  $14100$  배가 증가됨에 따라 최종적으로 평균  $1.41 \times 10^{10}$  copies/ml 을 나타내었다. 초대배양세포를 통한 고농도의 바이러스 생산은 IVS-1 뿐 아니라 같은 megalocytivirus 에 속하는 FLIV-1, PGIV-K1 에 대하여 동일한 양상을 보였으며 같은 Iridoviridae 에 속하는 Ranavirus 또한 높은 수준의 바이러스 배양이 이루어짐을 확인 할 수 있었다. Megalocytivirus 와 달리 Ranavirus(FV-3)의 경우 넓은 범위의 포유류, 양서류, 어류 세포주에서 CPE 가 관찰된다고 알려져있는데 (Chinchar., 2002; Chinchar and Mao, 2000; Willis et al.,

1985) 초대배양세포에서도 배양이 효율적으로 일어났으며 또한 다양한 담수어와 해산어에서의 감염이 보고된 바이러스인 VNNV 는 물론 상대적으로 숙주의 범위가 좁은 해산어 바이러스인 VHSV 와 담수어 바이러스인 SVCV 또한 초대배양세포의 origin 과 상관없이 배양됨을 확인 할 수 있었다.

이 흥미로운 결과를 통하여 초대 배양 세포에서의 형태학적 세포 종류의 차이가 될 수 있는 유래 조직의 차이나 유래 어종의 감수성과는 상관없이 또한 숙주의 범위가 넓고 배양이 잘되는 바이러스는 물론 Megalocytivirus 와 같이 상대적으로 배양이 잘 안 되는 바이러스도 초대배양 세포를 이용하는 경우 배양이 잘 됨을 확인할 수 있었다. 특히 rock bream 의 초기배양세포는 대부분의 바이러스에 대한 감수성이 높음을 확인하였다. 여러 바이러스와 Non-host species 의 다양한 주화세포를 이용한 감염실험은 많이 이루어 지고 있으며, iridovirus 에 속하는 GIV 가 non-host species 에서 자란다거나 또 다른 바이러스들이 다양한 주화세포에 감염이 된 보고도 있으나 (Chang et al., 2001; Kang et al., 2003; Pham et al., 2012) 초대배양세포에 대해서는 아직 많은 연구가 부족한 실정이다. 유래어종의 *in vivo* 와 *in vitro* 내의 바이러스 감수성 차이가 존재하며, 초대배양세포는 담수어 해산어의 바이러스의 구분 없이 다양한 바이러스에 대한 감수성을 가지게 되는 것으로 보여진다. 또한 이는 Megalocytivirus 만의 특징이기 보다는 초대배양세포가 가지는 특징이라 생각 된다.

고수율의 바이러스 획득이 가능한 초대배양세포의 상태는 passage 를 거치면서 바이러스 감수성이 낮아지며, IVS-1 의 경우 12 번의 passage 후에는 10 배 이하의 바이러스 증폭만이 일어남을 확인하였다. (Fig. 5.) 또한 CPE 의 수 도 감소함을 확인 할 수 있었다(Fig. 6A, 6B.). 이러한 현상은 같은 Megalocytivirus 에 속하는 다른 subgroup 의 바이러스에서 전반적으로 나타났다(Table 4.) . 즉 subgroup 사이에는 초대배양세포간의 배양에 있어 자어세포, 지느러미세포, 뇌세포 모두 큰 차이 없이 배양이 잘 되었으나 주화세포에서는 virus replication 에대한 지원이 잘 되지 않았다. 세포의 바이러스 방어 기작에 있어 homeostasis 가 매우 중요하며 또한 각각의 defence mechanism 의 cooperation action 이 중요하다. 그러나

초대배양세포는 세포가 in vivo 의 환경에서 in vitro 로 전환됨에 따라 이러한 방어기작들이 불완전 할 것으로 생각 되며 그로 인해 다양한 바이러스에 대한 감수성이 높아져 결국 고 수율의 Megalocytivirus 생산이 가능 할 것으로 생각된다. 또한 초대배양세포의 바이러스 생산성이 높은 이유로는 초대배양상태의 다양한 stage 의 세포종류의 존재일 것이라는 점도 배제 할 수 없다. 이러한 다양한 세포들이 시간이 지나면서 종류가 점점 줄어들어 단일화되고, 결국엔 주로 바이러스의 감염이 잘 이루어지지 않는 세포들이 남게 될 것으로 추측된다. 세포확립 연구에 있어 chromosome 숫자의 변화를 확인 하는 등의 방법을 통하여 유전적 변화, 세포의 안정화나 단일화를 나타 내듯, 점점 passage 를 거쳐 다양한 세포종류의 초대배양세포는 점점 단일화 됨을 알 수 있다.

한편 감염어를 이용하여 초대배양을 실시한 경우 수회의 passage 를 거쳐도 virus DNA 는 일정하게 고농도를 유지하였는데 (Fig. 7.)이는 세포의 passage 수에 따른 바이러스 감수성 차이와의 상관관계보다는 감염된 어체를 이용하여 얻은 배양 세포 자체가 지니는 intracellular virus 가 다음 passage 의 virus 증폭에 영향을 주는 것으로 생각되며, IVS-1 에 감염된 어체를 사용하여 비장과 신장으로 초대배양을 실시한 경우에도 높은 바이러스 titer 를 얻을 수 있었지만 3 세대 이상 자라지 못하였다(data not shown.).

본 연구에서 추가적으로 감염력이 낮은 주화세포의 감염력을 높여주기 위하여 어류 유래 첨가물로서 돌돔의 spleen tissue homogenate 와 serum 을 첨가하여 주었다. 그 결과 어류 주화세포인 PMF 와 RSIV 가 자란다고 보고는 되어있으나 바이러스의 증가가 낮은 GF, BF-2 모두에서 기존의 바이러스 증가량 보다 더 많은 양의 바이러스가 증폭됨을 확인 할 수 있었다. 기존의 감염실험 시 어류주화세포(PMF, GF, BF-2) 에서의 바이러스가 평균 8 배 ( $7.89 \times 10^8$  copies/ml) 증가한 것에 비하여 tissue homogenate 와 serum 을 첨가해 주는 경우 각각 약 180 배 ( $1.76 \times 10^8$  copies/ml), 310 배( $3.1 \times 10^8$  copies/ml, BF-2 제외.) 정도 증가가 된 것을 확인할 수 있었다. 또한 여러 농도의 tissue homogenate 와 serum 을 이용해 첨가량에 의한 바이러스 증폭의 경향성을 보려고 하였으며, 결과 20 $\mu$ l/ml 의 tissue

homogenate 또는 serum 의 농도로 첨가해주는 것 이 최적의 조건이었다. 또한 현미경을 통해 주화세포의 IVS-1 감염실험을 관찰 하였을 때 homogenate 또는 serum 을 첨가한 경우 세포상에 CPE 의 수가 기존의 감염에 비해 더 많이 증가함을 확인 할 수 있었다. 하지만 첨가물의 농도가 증가함에 따라 세포변성이 일어나는 것을 확인할 수 있었으며, (Fig. 10.), 이는 과량의 tissue homogenate 또는 serum 첨가 시 바이러스 증폭 저해의 원인이 될 수 있을 것이라 생각된다. 또한 추가적으로 비장 외에 간과 신장을 이용하여 IVS-1 감염실험을 실시하였으며 그 결과 두 조직 모두 바이러스를 증가시키는데 도움을 주는 것을 확인하였다. 이러한 결과들은 초기배양세포를 사용하는 경우에 비해 낮은 바이러스 역가를 나타내었지만, 감염능이 낮은 주화세포의 감염력을 간단히 높힐 수 있는 방법으로 실험실에서 유용하게 사용될 것으로 생각된다. 현재 tissue homogenate 와 serum 이 in vitro 상에서 주화세포의 바이러스 배양을 도와주는 기작은 정확히 밝혀지진 않았다. 이러한 첨가물의 효과가 유래 장기에 따른 차이가 크지 않은 것을 보았을 때, 이러한 배지 내 첨가물들이 IVS-1 의 물리적 흡착에 의한 penetration 를 쉽게 해 주는 역할을 함으로 PEG 를 이용하여 바이러스 감염을 증가시키듯 (Batts and Winton 1989) 어떠한 성분들이 바이러스 감염 시 작용하여 일정량의 viral replication 을 도와준다고 생각되어지나 과량을 첨가할 경우 세포의 형태가 변하는 점, 혈청의 경우 바이러스 감염단계에서 도움을 준다고 알려져 있고, GF cell 에서 RSIV 배양을 위해 사람의 serum 이 요구된다는 보고(Wen, 2008) 도 있는 만큼 biological factor 로서 작용할 수 있다는 점도 무시할 수 없기 때문에 조금 더 연구가 필요하다.

결론적으로 본 연구를 통해 초대배양세포는 *in vitro* 내에서 배양이 힘들다고 알려진 Megalocytivirus 는 물론, 여러 바이러스들에 대한 바이러스의 고효율적 증폭이 가능함을 발견하였다 또한 초대 배양세포가 *in vitro* 내에서 passage 가 증가함에 따라 Megalocytivirus 생산성도 점점 낮아짐을 확인할 수 있었다. 하지만 감염어를 이용하여 초대배양을 하는 경우 계속적으로 고농도의 바이러스를 얻을 수 있음을 확인하였다. 또한 상대적으로 감수성이 낮은 주화세포를 이용하였을 때

어류유래물질인 tissue homogenate 또는 serum 을 첨가할 경우 더 높은 바이러스 증가 값을 보였다. 본 실험의 결과를 통하여 고농도의 바이러스를 이용한 백신의 개발 또는 진단, 연구 등 여러 분야에 이용할 수 있을 것으로 기대된다



## V. 요약

Megalocytivirus 는 우리나라 및 전세계의 해산어 담수어에서 발생하는 중요한 병원체이다. 그러나 *in vitro* 내에서 바이러스를 배양할 수 있는 주화세포가 적으며, *in vitro* 내에서 계속적으로 viral passage 를 거칠 경우 점점 titre 가 줄어드는 문제가 있다. 본 연구에서는 어류의 초대배양세포를 이용하여 Megalocytivirus 의 다른 subgroup 에 속한 바이러스인 IVS-1, FLIV-1, PGIV K-1 을 이용한 감염실험을 실시하였으며 그 결과 매우 고농도의 바이러스를 얻을 수 있었다. 그 뿐 아니라 숙주가 상대적으로 다양한 바이러스인 VNNV 와 Ranavirus, 그리고 다양하지 않은 해산어 바이러스인 VHSV 와 담수어 바이러스인 SVCV 에 대한 감염실험을 추가로 실시하였을 때 바이러스에 대한 감수성이 다른 어종의 초대배양 세포라 하더라도 배양이 지원됨을 확인 할 수 있었다. 이를 통해 초대배양세포는 유래 어종 또는 유래장기와 상관없이 다양한 바이러스에 대한 replication 이 활발히 일어나는 것을 확인하였다. 그리고 초대배양세포가 passage 를 계속 거쳐갈수록 Megalocytivirus 에 대한 감수성이 점점 낮아짐을 확인할 수 있었다. 또한 감염어를 이용하여 초대배양을 실시하는 경우 세포의 passage 와 상관없이 계속적으로 고농도의 바이러스 replication 이 일어남을 확인하였다. 감염성이 낮은 주화세포의 IVS-1 의 감염성을 높일 수 있는 방법으로 어류유래물질인 tissue homogenate 와 serum 을 사용하였으며 이로 인해 어류주화세포(PMF, GF, BF-2) 에서 IVS-1 이 평균 8 배 배 ( $8 \times 10^6$  copies/ml) 증가한 것에 비하여 tissue homogenate 와 serum 을 첨가해 주는 경우 각각 약 180 배 ( $1.76 \times 10^8$  copies/ml), 310 배( $3.1 \times 10^8$  copies/ml, BF-2 제외.) 정도 증가되었다. 이러한 어류유래물질은 간단하게 실험실 내에서 어류주화세포의 Megalocytivirus 에 대한 감수성을 높일 수 있는 방법이라 생각된다.

## VI. 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 대학원 생활 동안 연구에 매진할 수 있도록 아낌없는 격려와 열정적인 가르침으로 이끌어주신 존경하는 정현도 지도교수님께 깊은 감사의 마음을 드립니다. 그리고 저의 논문이 발전할 수 있도록 바쁘신 와중에도 기꺼이 소중한 조언을 아끼지 않으신 김기홍 교수님, 강주찬 교수님과 학부 과정부터 석사과정에 이르기까지 끊임없이 격려해주시고 조언해주신 박수일 교수님, 정준기 교수님, 허민도 교수님, 김도형 교수님도 감사드립니다.

실험실에 들어와 지금까지 오랜 시간 함께 하면서 많은 추억과 경험을 쌓을 수 있게 도와준 진단생화학실험실 선, 후배님들께도 감사함을 전하고 싶습니다. 그리고 서로 힘들 때마다 보듬어주고 힘이 되어준 동기들인 우주선배, 지희, 민지, 서경이에게도 고마움을 전하고 싶습니다. 그리고 마지막까지 실험실 생활을 함께해 준, 실험실에 들어와 모르는 게 많았던 저에게 많은 도움을 주신 영철선배, 즐거운 실험실 생활을 하도록 도와준 재찬선배, 그리고 준규, 해성이, 형율이, 보경이, 민경이에게도 고맙다고 말하고 싶습니다. 힘들 때 힘이 되어주고 부르면 달려오는 사랑하는 친구들과 날 항상 재미있게 해주는 귀여운 내 동생, 마지막으로 제가 최종적으로 석사 학위를 마치기까지 물심양면으로 도움을 주신 존경하는 부모님 너무 감사하고 사랑합니다.

## VII. 참고문헌

- Anderson, I. G., Prior, H. C., Rodwell, B. J. and Harris, G. O. 1993. Iridovirus-like virions in imported dwarf gourami (*Colisa lalia*) with systemic amoebiasis. *Australian Veterinary Journal*, 70, 66–67
- Bandin, I., Dopazo, C.P., 2011. Host range, host specificity and hypothesized host shift events among viruses of lower vertebrates. *Vet. Res.* 42 (1), 67.
- Batts WN, Winton JR. 1989. Enhanced detection of infectious hematopoietic necrosis virus and other fish viruses by pretreatment of cell monolayers with polyethylene glycol. *J Aquat Anim Health* 1, 284–290
- C.M. Wen, C.W. Lee, C.S. Wang, Y.H. Cheng, H.Y. Huang, 2008, Development of two cell lines from *Epinephelus coioides* brain tissue for characterization of betanodavirus and megalocytivirus infectivity and propagation *Aquaculture* 278 ; 14–21
- Chang S.F., Ngoh G.H., Kueh L.F.S., Qin Q.W., Chen C.L., Lam T.J. & Sin Y.M., 2001. Development of a tropical marine fish cell line from Asian seabass (*Lateolabrax niloticus*) for virus isolation. *Aquaculture*. 192, 133–145.
- Chang, S.E., Keen, J., Lane, E.B. and Taylor-Papadimitriou, J. 1982. Establishment and characterization of SV-40 transformed human breast epithelial cell lines. *Cancer Research* 42, 2040–2053
- Chinchar, V. G. 2002. Ranaviruses (family Iridoviridae): Emerging cold-blooded killers. *Arch. Virol.* 147:447–470
- Chinchar, V. G., and Mao, J. 2000. Molecular diagnosis of iridovirus infections in coldblooded animals. *Sem. Avian Exotic Pet Med.* 9:27–35.
- Chinchar, V.G., Essbauer, S., He, J.G., Hyatt, A., Miyazaki, T., Seligy, V., Willims, T., 2005. Iridoviridae. In: *Virus Taxonomy: 8th Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Elsevier, London, England, pp. 163–175

- Chou, H.-Y., Hsu, C.-C. and Peng, T.-Y. 1998. Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephalus* sp.) in Taiwan. *Fish Pathology*, 33, 201–206.
- Chua, F. H. C., Ng, M. L., Ng, K. L., Loo, J. J. and Wee, J. Y. 1994. Investigation of outbreaks of a novel disease, 'Sleepy Grouper Disease', affecting the brown-spotted grouper (*Epinephelus tauvina* Forskal). *Journal of Fish Diseases*, 17, 417–427
- Clem LW, Moewus L and Sigel MM. 1961. Studies with cells from marine fish in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*. 108:762–766.
- Do JW, Cha SJ, Kim JS, An EJ, Lee NS, Choi HJ, Lee CH, Park MS, Kim Jw, Kim YC and Park JW. 2005. Phylogenetic analysis of the major capsid protein gene of iridovirus isolates from cultured flounders *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Dis Aquat Org*. 64: 193-200.
- Dong C, Weng S, Shi X, Xu X, Shi N, He J (2008) Development of a mandarin fish *Siniperca chuatsi* fry cell line suitable for the study of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). *Virus Res* 135:273–281
- Enders, J.F., Weller, T. H. & Robbins, F. C. 1949. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissue. *Science*, 109, 85-7
- Freshney, I. 1994 *Culture of Animal Cells; A Manual of Basic Techniques*. Alan R. Liss, New York.
- Harrison, R.G 1907. Observation on the living developing nerve fiber. *Proceeding of the Society of Experimental Biology and Medicine* 4, 140
- He JG, Deng M, Weng SP, Li Z and others. 2001. Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology* 291: 126–139
- Holland JJ. 1964. Inhibition of host cell macromolecular synthesis by high multiplicities of poliovirus under conditions preventing virus synthesis. *J Mol Biol*. 8: 578-581.
- Huang AS. 1973. Defective-interfering viruses. *Ann rev microbiol*. 27: 101-117.

- Imajoh M, Ikawa T and Oshima S. 2007. Characterization of a new fibroblast cell line from a tail fin of red sea bream, *Pagrus major*, and phylogenetic relationships of a recent RSIV isolate in Japan. *Virus Research*. 126: 45-52.
- Inouye K, Yamano K, Maeno Y, Nakajima K, Matsuoka M, Wada Y and Sorimachi M. 1992. Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol*, 27: 19-27
- Jancovich, J.K., Bremont, M., Touchman, J.W., Jacobs, B.L., 2010. Evidence for multiple recent host species shifts among the Ranavirus (Family Iridoviridae). *J. Virol.* 84(6), 2636–2647.
- Jeong JB, Jun LJ, Yoo MH, Kim MS, Komisar JL and Jeong HD. 2003. Characterization of the DNA nucleotide sequences in the genome of red sea bream iridoviruses isolated in Korea.
- Jung SJ and Oh MJ. 2000. Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* (Temmincket Schlegel), in southern coastal areas of the Korean peninsula. *J Fish Dis* 23: 223-226.
- Kang M S, Oh M J, Kim Y J, Kawai K and Jung S J, 2003. Establishment and characterization of two new cell lines derived from flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel), *Journal of Fish Diseases* 26, 657–665
- Katz JM and Webster RG. 1989. Efficacy of inactivated influenza A virus (H3N2) vaccines grown in mammalian cells or embryonated eggs. *J Infect Dis.* 160: 191-8.
- Khongpradit, R., Supamattaya, K., Kasornchandra, J., Phromkunthong, W., 2003. Establishment of a cell line from kidney of seabass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 25, 29–39.
- Klein, B., Pastink, A., Odijk, H., Westerveld, A. and van der Eb, A.J. 1990. Transformation and immortalization of diploid xeroderma pigmentosum fibroblast. *Experimental Cell Research* 191, 256-262
- Kurita J and Nakajima K. 2012. Megalocytiviruses. *Viruses*. 4:521-538.

- Marcos-Lopez, M., Feist, S.W., Hicks, R., Noguera, P.A., 2011. Systemic megalocytivirus infection in the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 31(6), 227–234.
- Nakajima K and Sorimachi M. 1994a. Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.* 29: 29-33.
- Nakajima K and Sorimachi M. 1994b. Production of monoclonal antibodies against red sea bream iridovirus. *Fish Pathol.* 30:47-52
- Pham Phuc H., Lai Yu-Shen, Lee Frank Fang-Yao, Bols Niels C., Chiou Pinwen P., 2012. Differential viral propagation and induction of apoptosis by grouper iridovirus (GIV) in cell lines from three non-host species. *Virus Research.* 167, 16–25
- Steele, M.P., Levine, R.A., Joyce-Brady, M. and Brody, J.S. 1992. A rat alveolar type II cell line developed by adenovirus 12SE1A gene transfer. *American Journal of Respiration and cell Molecular Biology* 6, 50-56.
- Subramaniam, K., Shariff, M., Omar, A.R., Hair-Bejo, M.. 2012. Megalocytivirus infection in fish. *Rev. Aquaculture* 4: 221–233
- Sudthongkong C, Miyata M and Miyazaki, T. 2002. Iridovirus disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lampeye and dwarf gourami. *Dis Aquat Org.* 48: 163-173
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM and Kawaoka Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 56: 152-179. *Microbiological Reviews.* 56:152-179
- Willis, D. B., and Granoff, A. 1985. Trans-activation of an immediate-early frog virus 3 promoter by a virion protein. *J. Virol.* 56:495–501.
- Wolf K and Quimby MC. 1962. Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science.* 135: 1065-1066

Wyllie, F.S., Bond, J.A., Dawson, T., White, D., Davies, R. and Wynford-Thomas, D. 1992. A phenotypically and karyotypically stable human thyroid epithelial line conditionally immortalized by the SV 40 Large T antigen. *Cancer Research* 52, 2938-2945

Zhang QY, Li ZQ, Gui JF .1999 Studies on morphogenesis and cellular interactions of *Rana grylio* virus in an infected fish cell line. *Aquaculture* 175:185–197

조혜진, 2008. 해산어와 담수관상어에 대한 iridovirus 의 교차 감염성 및 정량적 분석. 부경대학교 대학원 이학석사 학위논문.

진지웅, 2014. Megalocytivirus 의 in vitro 배양 특성과 vaccine 개발. 부경대학교 대학원 이학박사 학위논문.

