



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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

구조유전자 (G gene, P gene)를
knockout 시킨 재조합 viral
hemorrhagic septicemia virus
(VHSV) 제작 및 특성



부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

박 지 선

이 학 석 사 학 위 논 문

구조유전자 (G gene, P gene)를
knockout시킨 재조합 viral
hemorrhagic septicemia virus
(VHSV) 제작 및 특성

지도교수 김 기 홍

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2015년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

박 지 선

박지선의 이학석사 학위논문을 인준함

2015년 2월 27일



위원장	이학박사	김도형 (인)
위원	이학박사	정현도 (인)
위원	이학박사	김기홍 (인)

목 차

Abstract	v
List of Tables	vii
List of Figures	viii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	6
1. rVHSV-ΔG	6
1-1. 세포 및 바이러스	6
1-2. T7 RNA polymerase (T7 RNAP)를 발현하는 EPC cell line 제작	7
1-3. VHSV G gene이 knock-out된 재조합 VHSV vector(pVHSV-ΔG) 제작	8
1-4. VHSV N, P, G, L gene을 발현하는 supporting plasmid 제작	8
1-5. VHSV G gene을 발현하는 cell line 제작	9
가. pcDNA3.1(+) vector를 이용한 VHSV G gene 발현 cell line 제작	9
나. phiC31 Integrase Vector System을 이용한 VHSV G gene발현 cell line 제작	10
다. EPC cell의 chromosome내 G gene 발현 cassette의 삽입확인	10
1-6. VHSV G gene의 expression level 비교 (RT-PCR)	11
1-7. VHSV G gene이 knock-out된 재조합 VHSV (rVHSV-ΔG) 제작 ..	12
가. rVHSV-ΔG 제작	12

나. VHSV G gene을 발현하는 두 가지 cell line에서의 cytopathic effect (CPE) 관찰	13
다. rVHSV-ΔG의 수집	13
1-8. rVHSV-ΔG의 확인 (RT-PCR)	14
1-9. G gene 발현정도에 따른 rVHSV-ΔG titer 비교확인 (plaque assay) ·	15
1-10. rVHSV-ΔG의 감염성 확인	15
가. rVHSV-ΔG의 접종	15
나. Plaque assay	16
다. Real-time PCR	16
1-11. In vivo 상에서의 rVHSV-ΔG safety 확인 (semi-quantitative RT-PCR)	17
2. rVHSV-P1, P2, P3	22
2-1. 세포 및 바이러스	22
2-2. T7 RNA polymerase (T7 RNAP)를 발현하는 EPC cell line 제작 ···	22
2-3. VHSV P gene이 knock-out된 재조합 VHSV vector (pVHSV-P1, P2, P3) 제작	23
2-4. VHSV N, P, L gene을 발현하는 supporting plasmid 제작	24
2-5. VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene을 발현하는 cell line 제작 ···	25
가. pcDNA3.1(+) vector를 이용한 VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene 발현 cell line 제작	25
나. phiC31 Integrase Vector System을 이용한 VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene발현 cell line 제작	26
다. EPC cell의 chromosome내 VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene 발현 cassette의 삽입확인	27
2-6. VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene의 expression level 비교 (RT-PCR)	27
2-7. VHSV P gene이 knock-out된 재조합 VHSV (rVHSV-P1, P2, P3) 제작	

.....	29
가. rVHSV-P1, P2, P3 제작	29
나. VHSV P gene을 발현하는 두 가지 cell line에서 rVHSV-P2, P3의 cytopathic effect (CPE) 관찰	29
2-8. rVHSV-P1, P2, P3의 확인 (RT-PCR)	30
2-9. rVHSV-P1, P2, P3의 확인 (plaque assay)	31
가. rVHSV-P1 의 titer 측정	31
나. P gene 발현 정도에 따른 rVHSV-P2, P3 titer 비교확인	31
2-10. VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene을 발현하는 cell line에서 rVHSV-P1, P2, P3의 감염성 확인	32
2-11. rVHSV-P1, P2, P3의 확인 (nucleotide sequence)	32
III. 결 과	36
1. rVHSV-ΔG	36
1-1. VHSV G gene을 발현하는 cell line의 제작 및 G gene expression level 비교분석	36
1-2. VHSV G gene이 knock-out된 재조합 VHSV (rVHSV-ΔG) 제작 및 확 인	41
가. rVHSV-ΔG 제작	41
나. VHSV G gene을 발현하는 두 가지 cell line에서의 cytopathic effect (CPE) 관찰 및 rVHSV-ΔG 생산 확인	41
1-3. rVHSV-ΔG의 감염성 확인	48
1-4. In vivo 상에서의 rVHSV-ΔG safety 확인	53
2. rVHSV-P1, P2, P3	55
2-1. VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene을 발현하는 cell line의 제작 및 VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene expression level 비교분석 ...	55

2-2. VHSV P gene이 knock-out된 재조합 VHSV (rVHSV-P1, P2, P3) 제작 및 확인	60
가. rVHSV-P1, P2, P3 제작	60
나. rVHSV-P1의 생산 확인	61
다. VHSV P gene을 발현하는 두 가지 cell line에서의 cytopathic effect (CPE)관찰 및 rVHSV-P2, P3 생산 확인	61
2-3. VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene을 발현하는 cell line에서 rVHSV-P1, P2, P3의 감염성 확인	71
2-4. rVHSV-P1, P2, P3의 nucleotide sequence 확인	73
IV. 고 찰	75
V. 요 약	79
VI. 감사의 글	81
VII. 참고문헌	83

**Generation and characterization of structural gene (G gene, P gene)
knockout recombinant viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)**

Ji Sun Park

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

Abstract

Generation of recombinant viruses lacking an essential gene for viral replication would be a way to produce safety-enhanced live viral vaccines. In the present study, we produced a recombinant viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) that lacks G gene or P gene in the genome using reverse genetics system, and analyzed the characteristics of the recombinant viruses. To produce a recombinant VHSV that lacks G gene in the genome (rVHSV-ΔG), we constructed a G gene-deleted recombinant VHSV vector and transfected to the cells expressing G protein by pcDNA3.1(+) plasmid. Using this system, although we could get the rVHSV-ΔG, the titer measured by plaque assay was too low to be used in other experiments despite lots of trials to increase viral titer. To solve this problem, we used phiC31 Integrase Vector System which inserts the expression cassette into the cell chromosome, and could produce rVHSV-ΔG with a higher titer. In the semi-quantitative RT-PCR analysis, the amount of expressed G gene in the cells having the expression cassette in the chromosome was clearly higher than cells with plasmids, suggesting that G protein expressing efficiency might be the cause of the different viral titers. Through in vitro and in vivo

experiments, the present rVHSV-ΔG could not produce infective viruses without trans-supply of G protein.

The P gene ORF contains 7 methionine codons including start codon in the same reading frame, and among them, we destroyed the first, second, and third methionine codon successively (change “ATG” to “TAG”) by site-directed mutagenesis, and named P1, P2, and P3, respectively. Recombinant VHSVs that could not express intact P protein (rVHSV-P1, -P2, and -P3) were successfully generated by trans-supply of the intact P protein. The rVHSV-Ps were not generated from cells expressing truncated P protein (P1, P2 or P3 protein), suggesting intact P protein is needed for infective virus production. However, interestingly, we isolated rVHSV-P1 that could produce infective viruses without P protein supply. The nucleotide sequence of the rVHSV-P1 revealed that a mutation occurred at the nucleotide 4 base before the second ATG codon, which changed isoleucine into methionine without frame shift, suggesting that strong selection pressure might exert on the mutation occurrences in the VHSV genome.

In conclusion, the present rVHSVs can infect cells only a single round and cannot spread to other cells because of lacking ability to express G or P protein, which can guarantee the safety of the recombinant virus-based vaccines. The availability of these recombinant viruses as attenuated viral vaccines will be evaluated in further studies.

List of Tables

Table 1. For construction of T7 RNA polymerase-expressing plasmids	19
Table 2. For construction of Supporting plasmids	19
Table 3-1. For construction of VHSV G gene expressing cell line	20
Table 3-2. For confirmation of integrated into a target genome	20
Table 4. For confirmation of VHSV G gene expression	20
Table 5. For confirmation of rVHSV-ΔG by RT-PCR	21
Table 6. For confirmation of rVHSV-ΔG by real-time PCR	21
Table 7. For confirmation of rVHSV-ΔG safety	21
Table 8. For construction of pVHSV-P1, P2, P3 by RT-PCR	34
Table 9. For construction of VHSV P gene expressing cell line	34
Table 10. For confirmation of rVHSV-P1, P2, P3	35
Table 11. For confirmation of rVHSV-P1, P2, P3 nucleotide sequence	35

List of Figures

figure 1. Map of constructed plasmid pCMV-G and pFC-CMV-G	38
figure 2. Integration of pFC-CMV-G plasmid into EPC cell chromosome	39
figure 3. Comparison of VHSV G protein expression level by RT-PCR	40
figure 4. Construction of the cDNA (pVHSV-ΔG)	44
figure 5. Comparison of the cytopathic effect (CPE) induced by infection of EPC cell line expressing VHSV G gene using pcDNA3.1(+) vector and phiC31 Integrase Vector System with rVHSV-ΔG	45
figure 6. Comparison of the virus titer measured through plaque assay by inoculation of EPC cell line expressing VHSV G gene with rVHSV- ΔG from different cell line	46
figure 7. Confirmaion of knock-out of G gene in rVHSV-ΔG by RT-PCR ..	47
figure 8. The cytopathic effect (CPE) induced by infection of EPC cell line expressing VHSV G gene with rVHSV-ΔG using phiC31 Integrase Vector System	50
figure 9. Verification of rVHSV-ΔG infectivity depending on supply of G	

gene by plaque assay	51
figure 10. Verification of virus particle formation depending on supply of G gene by real-time PCR	52
figure 11. In vivo safety confirmation of rVHSV-ΔG	54
figure 12. Map of constructed plasmid pCMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3) and pFC-CMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3)	57
figure 13. Integration of pFC-CMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3) plasmid into EPC cell chromosome	58
figure 14. Comparison of VHSV VP (VP0, VP1, VP2, VP3) protein expression level by RT-PCR	59
figure 15. Construction of the cDNA (pVHSV-P1, P2, P3)	64
figure 16. The cytopathic effect (CPE) induced by co-transfection of EPC cell line expressing T7 RNAP with plasmid expressing the N, P, L proteins and pVHSV-P1	65
figure 17. Plaque formation in VHSV P gene expression cells infected with 10^{-6} diluted rVHSV-P1	66
figure 18. Confirmaion of rVHSV-P1 by RT-PCR	67
figure 19. Comparison of the cytopathic effect (CPE) induced by infection of	

EPC cell line expressing VHSV P gene with rVHSV-P2, P3 using pcDNA3.1(+) vector and phiC31 Integrase Vector System	68
figure 20. Comparison of the virus titer measured through plaque assay by inoculation of EPC cell line expressing VHSV P gene with rVHSV-P2, P3 from different cell line	69
figure 21. Confirmaion of rVHSV-P2, P3 by RT-PCR	70
figure 22. Verification of rVHSV-P1, P2, P3 infectivity in EPC cell line expressing VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene using pcDNA3.1(+) vector and phiC31 Integrase Vector System	72
figure 23. Confirmation of nucleotide sequence of the pVHSV-P1, P2, P3	74

I. 서론

Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)는 외막을 가진 negative-sense single-stranded RNA virus로 genus *Novirhabdovirus*, family *Rhabdoviridae*에 속한다 (Lenoir and de Kinkelin, 1975; Walker et al., 2000; Tordo et al., 2005). 탄환형 모양을 하고 있으며 그 길이는 180nm이고 직경은 70nm로 virus genome은 11에서 12kb로 5개의 structural protein과 1개의 nonstructural protein으로 이루어져 있다. RNA genome은 nucleoprotein (N), polymerase-associated phosphoprotein (P)과 large RNA-dependent RNA polymerase (L)가 ribonucleoprotein complex (RNP)형태를 가지고 있으며 virus의 transcript와 replication에 필수적인 역할을 한다. 다른 structural protein인 matrix protein (M)은 바이러스의 assembly와 budding단계에서 virus의 외막 또는 RNP와 상호작용을 하며, glycoprotein (G)는 virus의 표면에 노출되어있어 바이러스의 부착과 cell안으로 들어가는 역할을 한다. 마지막으로 nonvirion protein (NV)은 Novirabdoovirus의 특징으로 G 유전자와 L 유전자 사이에 있으며, virus genome은 3'-N-P-M-G-NV-L-5'의 순서로 배열되어 있다 (Schütze et al., 1996, 1999; Estepa et al., 1999; Tordo et al., 2005).

Viral hemorrhagic septicemia disease (VHSD)는 viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)를 원인으로 하는 질병으로 주로 4℃에서 14℃의 저수온기에 전 세계적으로 담수 및 해수어류에 대량폐사를 일으킨다 (Schlotfeldt and Ahne, 1988; Schlotfeldt et al. 1991; Mortensen et al., 1999; Isshiki et al., 2003; Skall et al., 2005). 질병에 걸린 어류는 체색흑

화, 아가미와 지느러미의 출혈, 간 울혈, 비장과 신장의 비대, 복강 내 복수가 차는 등 증상을 나타낸다 (Ronald, 1978; Isshiki et al., 2001). 국내에서는 VHSV genotype IVa로 확인되었으며 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 양식장에서 대량폐사를 일으키는 주요 원인이다 (Kim et al., 2003, 2009). 따라서 넙치 양식 산업의 생산성 향상을 위하여 VHSD를 제어할 수 있는 효과적인 치료법 개발이 필요하다.

VHSV를 막아주는 효과적인 chemotherapeutic agent는 없기 때문에, 어류 양식장의 VHSD를 제어하기 위하여 subunit vaccine (Lorenzen et al., 1993; Lecocq-Xhonneux et al., 1994), naturally attenuated vaccine (Vestergaard-Jorgensen, 1976; de Kinkelin and Bearzotti-Le Berre, 1981; Adelman et al., 2008) 및 genetic vaccine (Heppell et al., 1998; Lorenzen et al., 1998, 1999, 2002; Byon et al., 2005, 2006; Chico et al., 2009;) 등 여러 가지 vaccine이 개발되어져 왔다. Live attenuated viral vaccine은 cell line으로 virus를 생산할 수 있고 humoral 과 cellular immunity를 유도하여 지속적인 면역을 유발할 수 있지만 virus의 병원성이 복귀될 가능성이 있기 때문에 위험성을 가지고 있다. 또한 inactivated vaccine은 virus particle의 replication이 불가능하여 감염성이 없기 때문에 안전성을 가지고 있긴 하지만 면역반응이 약하기 때문에 대부분의 어류백신은 adjuvant를 필요로 하고 (Thim et al., 2012). 그에 따른 부작용 과 (Midtlyng et al., 1996; Mutoloki et al., 2004; Evensen et al., 2005) 생산비가 증가한다는 단점을 가지고 있다. DNA vaccine은 면역반응과 기능적인 면에 대한 연구는 많이 수행되었지만 안전성에 대한 문제 때문에 상용화되지 못하고 있다 (Martinez-Lopez et al., 2013).

이러한 문제점을 보완하기 위하여 최근 reverse genetics 기술을 이용한 안전성을 가진 새로운 viral vaccine 연구가 수행되어지고 있다. Reverse

genetics system은 cell을 이용하여 virus genome의 complementary (cDNA)로부터 RNA virus를 만들어 내는 방법이다. 이는 T7 RNA polymerase (T7 RNAP)가 발현되는 cell line에 viral antigenome 전체를 encoding 하고있는 plasmid를 transfection한다. 이때 Hepatitis delta virus (HDV)의 self-cleaving ribozyme을 viral antigenome cDNA의 3' 말단에 달아줌으로써 스스로 3' 말단을 정밀하게 잘라낼 수 있도록 해준다. 따라서 reverse genetics system을 통하여 기능이 알려지지 않은 virus의 genome을 knock-out시킴으로써 그 기능을 분석할 수 있을 뿐만 아니라 virus genome상의 특정 유전자를 knock-out시키거나 mutation시킴으로써 약독화된 recombinant vaccine의 개발이 가능하다. 또한 높은 면역원성을 가지고 있어 humoral 과 cellular immunity을 효과적으로 유도할 수 있어 생백신으로 사용이 가능하고, 자연적인 감염경로로 백신을 투여할 수 있다는 장점이 있다. 최근 본 연구실에서는 VHSV genome내의 NV 유전자 대신에 EGFP (enhanced green fluorescent protein) 유전자를 포함하고 있는 재조합 VHSV (rVHSV-ΔNV-EGFP)를 제작하였고 넓치에 면역화 실험을 수행함으로써 높은 방어력을 유도하여 생약독화백신으로서의 가능성을 검증한 바 있다 (Kim et al., 2011; Kim and kim, 2011).

Glycoprotein (G)는 virus의 표면에 노출되어있어 cell membrane에 바이러스의 부착과 receptor-mediated endocytosis과정을 통하여 cell안으로 들어가는 역할을 한다 (Lecocq-Xhonneux et al., 1994; Estepa et al., 1999). G protein을 target으로 하여 neutralizing antibody와 protective antibody가 유도된다 (Lorenzen et al., 1990; Huang et al., 1994; Bearzotti et al., 1995). 또한 병원성과 연관이 있는 G protein의 일부 region을 mutation에 의하여 anti-G monoclonal antibody의 neutralizing 효과에 대한 저항성을 나타냄에 따라 G Protein이 VHSV의 병원성에 영향을 미침을 알 수 있다

(Seif et al., 1985; Prehaud et al., 1988; Bearzotti et al., 1995; Yves et al., 1999). 또한 VHSV의 nucleoprotein (N), Phosphoprotein (P) RNA-dependent RNA polymerase (L)은 ribonucleoprotein complex (RNP)의 형태를 가지며 이 세 가지 protein 사이에서 P는 L과 결합하여 proteolytic degradation으로부터 안정화를 시키고 (Emerson and Schubert, 1987; Canter and Perrault, 1996), nascent RNA의 효과적인 encapsidation을 위하여 새롭게 합성된 N과 복합체를 형성하며 (Davis et al., 1986; Masters and Banerjee, 1988; Peluso, 1988), virus의 RNA합성시 virus의 genome의 terminal sequence와 상호작용을 함으로써 (Keene et al., 1981; Isaac and Keene, 1982) RNA-dependent RNA polymerase complex에 필수적인 부분으로 virus의 transcription과 replication에 중점적인 역할을 한다 (Emerson and Yu, 1975; Pattnaik and Wertz, 1990). 따라서 본 연구에서는 VHSV genome내의 G gene을 knock-out시킨 재조합 VHSV (rVHSV-ΔG)와 P gene의 methionine을 종료코돈으로 치환하여 knock-out시킨 재조합 VHSV (rVHSV-P1, P2, P3)를 reverse genetics 기술을 이용하여 제작하였고 VHSV의 G gene과 P gene이 knock-out됨에 따라 cell안으로 한번 들어간 후 감염성을 가지는 virus를 생산할 수 없기 때문에 virus의 replication이 불가능하여 vaccine으로서의 안전성을 갖추고 있다. 따라서 본 연구를 통하여 면역 유도능력이 높은 생약독화 백신으로써의 가능성을 보는 연구의 바탕이 되고자 한다.

본 연구에서는 phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 VHSV G gene과 P gene을 발현하는 cell line을 제작하였다. ØC31 integrase는 bacteriophage ØC31의 genome에 sequence-specific하게 recombinase를 암호화 하고 있음으로써 attachment sites (att)라 불리는 34bp sequence를 recombination시킨다. serine integrase는 mammalian cell을 포함한 여러

종류의 cell type에 효과적으로 작동 한다 (Calos, 2006). ϕ C31 integrase에 의하여 donor plasmid의 attB site가 이와 유사한 sequence를 가진 target genome의 attP site에 integrated된다. 따라서 ϕ C31 integrase를 발현하고 있는 plasmid를 co-transfection시킴으로써 attB와 attP site의 융합이 일어나 VHSV G gene과 P gene이 포함되어있는 cloning vector가 EPC cell genome의 attP site로 integrated되어 VHSV G gene이 발현되는 cell line을 제작하였고 본 시스템을 이용하여 rVHSV- Δ G와 rVHSV-P1, P2, P3의 titer를 증가시킴으로써 추후 vaccine으로서의 극대화된 효과를 기대하고자한다.



II. 재료 및 방법

1. rVHSV-ΔG

1-1. 세포 및 바이러스

실험에 사용된 *epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell은 MycoZap™ Antibiotics (Lonza)와 10% fetal bovine serum (FBS, BI)이 첨가된 Leibovitz medium (L-15, Sigma)에서 배양하였다.

실험에 사용된 바이러스인 Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)는 경남 소재 넙치 양식장에서 VHS disease가 발생한 넙치로부터 분리한 VHSV KJ2008 strain으로 2% FBS와 antibiotics가 첨가된 L-15 medium을 사용하여 EPC cell에 접종하였다. 접종 후 15℃에 배양하였으며 광범위한 cytopathic effect (CPE)가 나타났을 때 상층액을 모아 4℃에서 4000g로 10분간 원심분리 하고 -80℃에 보관하여 추후 실험에 사용하였다.

1-2. T7 RNA polymerase (T7 RNAP)를 발현하는 EPC cell line 제작

Retroviral vector를 기반으로 하는 T7 RNAP 발현 시스템을 제작하기 위하여 Retroviral Gene Transfer and Expression kit (Clontech)를 사용하였다. pLNHX retroviral expression vector에 multiple cloning sites (MCS, *Xho I*-*Apa I*-*Xho I*-*Sal I*-*BamH I*-*HindIII*-*BglII*)를 삽입하여 pLNHX-MCS를 제작하였다. T7 RNAP gene을 발현하는 plasmid를 제작하기 위하여 E.coli BL21(DE3) 균주의 DNA로부터 *HindIII*와 *BamH I* enzyme site를 포함한 T7 RNAP ORF PCR fragment를 pGEM T-easy vector (Promega)에 cloning한 후, pcDNA3.1(+) vector (Invitrogen)에 Ligation하여 pCMV-T7 RNAP를 제작하였다 (Table 1). pCMV-T7 RNAP에 *BglII*와 *Sal I* enzyme 처리하여 cytomegalovirus (CMV) promoter와 bovine growth hormone (BGH) polyadenylation signal을 포함하는 cassette를 pLNHX-MCS에 ligation함으로써 pLNHX-pCMV-T7 RNAP를 제작하였다. GP2-293 cell을 10% FBS와 antibiotics가 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Sigma)에서 37°C, 5% CO₂조건으로 T₂₅ flask (6 × 10⁵ cells/ml)에 배양한 뒤 pLNHX-pCMV-T7 RNAP vector (5 µg)와 pVSV envelope vector (5 µg)를 FuGENE 6(Roche)를 이용하여 transfection하였다. Transfection 10시간 후 배지를 교환하여주고 48시간 후 T7 RNAP를 발현하는 recombinant retrovirus를 모아 polybrene (Sigma) 4 µg을 첨가한 배지를 사용하여 EPC cell에 접종하였다. 접종 24시간 후 G-418 (400 µg/ml)가 포함된 배지로 교환하여 selection하였다.

1-3. VHSV G gene이 knock-out된 재조합 VHSV vector (pVHSV-ΔG) 제작

미리 제작되어있던 pVHSV-wild를 이용하여 pVHSV-ΔG를 제작하였다. T7 RNAP promoter (P_{T7}), nucleoprotein (N), phosphorylated protein (P), matrix protein (M), glycoprotein (G), nonstructure protein (NV), large RNA-dependent RNA polymerase (L), hepatitis delta virus ribozyme (HdvRz) 및 T7 transcription termination sequence, multiple cloning sites (MCS, *Nae I*-*Age I*-*Sac II*-*Cla I*-*Nar I*-*Aat II*)가 cloning 되어져 있는 pGEM T-easy vector에 *Nae I*과 *Sac II* enzyme처리를 하여 P_{T7} , N, P, M을 포함하고 있는 fragment 1과 G를 포함하고 있는 fragment 2를 제거하였다. 제거된 자리에 P_{T7} , N, P, M, multiple cloning sites (MCS, *Nae I*-*Age I*-*Sac II*-*Cla I*-*Nar I*-*Aat II*)가 cloning 되어져 있는 pGEM T-easy vector에 마찬가지로 *Nae I*과 *Sac II* enzyme처리를 하여 P_{T7} , N, P, M을 포함하고 있는 fragment 1을 삽입하였고 그 vector를 pVHSV-ΔG라 명명하였다.

1-4. VHSV N, P, G, L gene을 발현하는 supporting plasmid 제작

재조합 VHSV를 제작하기 위해서는 VHSV의 N, P, G, L 단백질을 발현하는 supporting plasmid가 필요하다. pVHSV-wild를 template로 하여 각

각의 유전자에 따른 primer를 사용하여 PCR로 증폭하였다 (Table 2). PCR로 증폭된 각각의 유전자들은 pcDNA3.1(+) vector에 ligation 하여, 각각 pCMV-N, pCMV-P, pCMV-G, pCMV-L을 제작하였다.

1-5. VHSV G gene을 발현하는 cell line 제작

가. pcDNA3.1(+) vector를 이용한 VHSV G gene 발현 cell line 제작

VHSV G gene을 발현하는 plasmid를 제작하기 위하여 *Nhe I*와 *Hind III* enzyme site를 포함한 VHSV G gene ORF PCR fragment를 pGEM T-easy vector (Promega)에 cloning한 후, pcDNA3.1(+) vector (Invitrogen)에 ligation하여 pCMV-G를 제작하고 (Table 3-1), plasmid purification kit (QIAGEN)를 이용하여 pCMV-G plasmid를 추출 하였다. plasmid를 transfection하기 위하여 L-15 medium에 20mM HEPES와 10% FBS를 첨가한 배지로 35mm dish에 EPC cell (1×10^6 cells/ml)을 28℃에서 배양하고 FuGENE HD Transfection reagent (Promega)를 이용하여 pCMV-G (1 μ g)을 Transfection 하였다. 24시간 후 10% FBS와 antibiotics가 첨가된 L-15배지로 교환하여 주고 Transfection 3일 후 Trypsin-EDTA (gibco)처리하여 G-418 (400 μ g/ml)이 첨가된 배지로 T₂₅flask에 배양하여 selection하여 주었다.

나. phiC31 Integrase Vector System을 이용한 VHSV G gene발현 cell line 제작

G gene발현을 증가시키기 위해 phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 새로운 cell line을 제작 하였다. donor plasmid인 VHSV G gene을 발현하는 vector를 제작하기 위하여 *Nhe I*와 *HindIII* enzyme site를 포함한 VHSV G gene ORF PCR fragment를 pGEM T-easy vector(Promega)에 cloning한후, pFC-CMV-MCS-SV40-Kan/Neo에 Ligation하여 pFC-CMV-G를 제작하고 (Table 3-1), plasmid purification kit (QIAGEN)를 이용하여 pFC-CMV-G plasmid를 추출 하였다. plasmid를 transfection하기 위하여 L-15 medium에 20mM HEPES와 10% FBS를 첨가한 배지로 35mm dish에 EPC cell (1×10^6 cells/ml)을 28℃에서 배양하였다. pFC-CMV-G와 phiC31 integrase expression plasmid가 1:50비율이 되도록 하기 위하여 pFC-CMV-G plasmid (40ng), phiC31 integrase expression plasmid (1.96ug)를 FuGENE HD Transfection reagent (Promega)를 이용하여 Transfection 하였다. 24시간 후 10% FBS와 antibiotics가 첨가된 L-15배지로 교환하여 주고 Transfection 3일 후 Trypsin-EDTA (gibco) 처리하여 G-418 ($400 \mu\text{g/ml}$)이 첨가된 배지로 T₂₅flask에 배양하여 selection하여 주었다.

다. EPC cell의 chromosome내 G gene 발현 cassette의 삽입 확인

phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 제작한 VHSV G gene을

발현시킨 cell line에서 ϕ C31 integrase에 의하여 pFC-CMV-G의 attB site와 EPC cell의 attP site의 융합이 일어남으로써 EPC의 chromosome내로 삽입되어 졌는지 확인하기 위하여 attB gene을 포함하는 primer를 제작하였다 (Table 3-2). 이 primer를 사용하여 PCR로 증폭할 경우 pFC-CMV-G vector에서는 attB site가 증폭이 되지만 pFC-CMV-G vector를 Transfection시킨 cell line에서는 attB와 attP site의 융합이 일어남에 따라 EPC 의 chromosome내로 vector가 삽입되어졌기 때문에 증폭이 되지 않는다. 따라서 pFC-CMV-G vector는 plasmid purification kit (Qiagen)를 이용하여 plasmid를 추출한 후 PCR을 수행하였고 pFC-CMV-G vector를 Transfection 시킨 EPC cell line은 EXgeneTM Clinic SV mini (Gene All)를 사용하여 gDNA를 추출한 후 PCR을 수행하였다.

1-6. VHSV G gene의 expression level 비교 (RT-PCR)

VHSV G gene을 발현하는 두 가지 cell line인 pcDNA3.1(+) vector와 phiC31 Integrase Vector System을 이용한 cell에서의 G gene 발현 level을 비교하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. VHSV G gene을 발현하는 두 가지 cell에 Trypsin-EDTA (gibco)을 처리하여 모은 후 RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN)를 사용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA 1 μ g에 RNase free DNase (Promega) 처리 후 stop solution을 첨가하였다. cDNA를 합성하기 위하여 0.5 μ l Random primer (enzymomics)와

0.5 μl Oligo dT primer (enzymatics)를 첨가하여 80°C에서 5분간 반응시키고 2 μl dNTP (enzymatics), 5 $\times$ reaction buffer (Promega), 0.5 μl M-MLT Reverse Transcriptase (Promega), 0.25 μl RNase Inhibitor (Promega)를 첨가하여 42°C에서 60분간 반응시킨 후 95°C에서 10분간 반응시켰다. 합성된 cDNA를 template로 하여 VHSV-G specific gene primer를 이용하여 PCR 증폭하였다 (Table 4). PCR cycling 조건은 95°C에서 3분간 1cycle, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 30 cycle후 72°C 7분간 1cycle을 수행하였다. 또한 control로 EPC cell의 β -actin gene을 PCR로 증폭하였다 (Table 4). PCR cycling 조건은 95°C에서 3분간 1cycle, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 26 cycle 후 72°C 7분간 1cycle을 수행하였다. 이를 0.8% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

1-7. VHSV G gene이 knock-out된 재조합 VHSV (rVHSV- Δ G) 제작

가. rVHSV- Δ G 제작

T7 RNA polymerase를 발현하고 있는 EPC cell (1×10^6 cells/ml)을 L-15 medium에 20mM HEPES와 10% FBS를 첨가한 배지로 28°C에서 배양하고 EPC cell이 80% 정도 자랐을 때 pVHSV- Δ G (2 μg)과 pCMV-N (0.5 μg), pCMV-P (0.3 μg), pCMV-G (0.25 μg) 및 pCMV-L (0.2 μg)을 함께 FuGENE HD Transfection reagent (Promega)를 이용해 co-transfection하

였다. 28℃에서 12 시간 incubation 하고 이를 2% FBS가 첨가된 배지로 갈아준 뒤 15℃ 옮겨 배양하였다. 전반적인 cytopathic effect (CPE)가 관찰되었을 때 freeze-thawing 후 4000 g에서 10분간 원심분리 하였고, 이때 얻은 상층액을 P0라 하였다. P0를 다시 pcDNA3.1(+) vector를 이용한 VHSV G gene 발현 cell line에 접종하고 7일 후 얻은 상층액을 P1이라 하였다.

나. VHSV G gene을 발현하는 두 가지 cell line에서의 cytopathic effect (CPE) 관찰

pVHSV-ΔG와 pCMV-N, P, G, L을 co-transfection 하여 상층액 P0을 얻고 P0을 다시 pcDNA3.1(+) vector를 이용한 VHSV G gene 발현 cell에 접종하여 P1을 얻었다. pcDNA3.1(+) vector와 phiC31 Integrase Vector System을 이용한 G gene 발현 cell을 각각 35mm dish (8×10^5 cells/ml)에 28℃에서 배양한 후 2% FBS가 첨가된 배지로 갈아준 뒤 P1을 접종하여 15℃에서 cytopathic effect (CPE)를 관찰하였다.

다. rVHSV-ΔG의 수집

phiC31 Integrase Vector System을 이용한 G gene이 발현되는 cell (T₂₅ flask)을 28℃에서 배양한 후 2% FBS가 첨가된 배지로 갈아준 뒤 P1을 15℃에서 접종하고 5일 후 cytopathic effect (CPE)가 관찰되었을 때 4000 g에서 10분간 원심분리 하여 상층액 P2를 분주 후 -80℃에 보관하여 추후 실험에 사용하였다.

1-8. rVHSV-ΔG의 확인 (RT-PCR)

rVHSV-ΔG는 RT-PCR을 통하여 확인하였다. G gene이 knock-out된 PCR product의 size 확인을 위하여 wild type VHSV (wtVHSV)도 함께 RT-PCR을 수행하였다. wtVHSV stock과 rVHSV-ΔG 상층액 P2에서 TRIzol Reagent (invitrogen)를 사용하여 total RNA를 분리하였다. cDNA를 합성하기 위하여 0.5 μ l Random primer (enzymomics)와 0.5 μ l Oligo dT primer (enzymomics)를 첨가하여 80°C에서 5분간 반응시키고 2 μ l dNTP (enzymomics), 5 $\times$ reaction buffer (Promega), 0.5 μ l M-MLT Reverse Transcriptase (Promega), 0.25 μ l RNase Inhibitor (Promega)를 첨가하여 42°C에서 60분간 반응시킨 후 95°C에서 10분간 반응시켰다. cDNA를 template로 하여 VHSV N, P, M, G, NV, L의 specific gene primer를 이용하여 PCR 증폭하였다 (Table 5). 먼저 rVHSV-ΔG의 G gene이 없음을 확인하기 위하여 M에서 G (M-G), G에서 NV (G-NV)의 PCR을 수행하였고 또한 N에서 P (N-P), P에서 M (P-M), M에서 NV (M-NV), M에서 L (M-L), NV에서 L (NV-L)의 PCR을 수행함으로써 G gene이 knock-out PCR product의 size와 그 외 유전자를 확인하였다. 다음으로 wtVHSV도 동일한 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR cycling 조건은 95°C에서 3분간 1cycle, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 30 cycle후 72°C 7분간 1cycle을 수행하였다. 이를 0.8% agarose gel에 전기영동 하여 확인하였다.

1-9. G gene 발현정도에 따른 rVHSV-ΔG titer 비교 확인 (plaque assay)

rVHSV-ΔG의 상층액 P1을 pcDNA3.1(+) vector와 phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 제작한 VHSV G gene발현 cell에 접종 후 그 상층액을 이용하여 plaque assay를 수행하였다. phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 제작한 G gene 발현 cell을 35mm dish에 monolayer로 배양한 뒤 Virus stock을 10^{-3} 에서 10^{-5} 까지 단계 희석 후 접종하였다. 15°C에서 2시간동안 incubation 후 바이러스를 제거하고 plaquing medium (0.7% agarose, 2% FBS, antibiotics)을 깔아주었다. 10일 후 세포를 10% formalin으로 고정 후 10% crystal violet으로 30분간 염색하였다. 증류수로 세포를 수세하여 plaque-forming units (PFU)를 산출하였다.

1-10. rVHSV-ΔG의 감염성 확인

가. rVHSV-ΔG의 접종

EPC cell과 phiC31 Integrase Vector System을 이용한 G gene발현 cell을 각각 35mm dish (8×10^5 cells/ml)에 28°C에서 배양한 후 15°C로 옮겨 2% FBS가 첨가된 배지로 갈아준 뒤 rVHSV-ΔG (P2) 원액 100 μ l를 접종하고 2시간 후에 배지를 제거하여 하여주었다. PBS로 3회 washing 한 후 2% FBS가 첨가된 배지를 첨가하고 7일 동안 15°C에서 cytopathic effect

(CPE)를 관찰하였고 이 상층액을 모아 plaque assay와 real-time PCR 실험시 사용하였다.

나. Plaque assay

EPC cell과 phiC31 Integrase Vector System을 이용한 G gene발현 cell에 rVHSV-ΔG를 접종한 후 모아둔 상층액으로 plaque assay를 수행하였다. 먼저 rVHSV-ΔG를 G gene 발현 cell에 접종한 상층액으로 phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 제작한 G gene 발현 cell을 35mm dish에 monolayer로 배양한 뒤 Virus stock을 10^{-3} 에서 10^{-5} 까지 단계 희석 후 접종하였다. 또한 희석하지 않은 원액을 monolayer로 배양된 EPC cell에 접종하였다. 또한 rVHSV-ΔG를 EPC cell에 접종한 상층액의 희석하지 않은 원액을 monolayer로 배양된 EPC cell에 접종하였다. 15℃에서 2 시간동안 incubation 후 바이러스를 제거하고 plaquing medium (0.7% agarose, 2% FBS, antibiotics)을 깔아주었다. 10일 후 세포를 10% formalin으로 고정 후 10% crystal violet으로 30분간 염색하였다. 증류수로 세포를 수세하여 plaque-forming units (PFU)를 산출하였다.

다. Real-time PCR

EPC cell과 phiC31 Integrase Vector System을 이용한 G gene발현 cell에 rVHSV-ΔG를 접종한 후 모아둔 상층액의 titer를 realtime PCR로 측정하였다. 각각의 상층액 1ml에서 TRIzol Reagent (invitrogen)를 사용하여 total RNA를 분리하였다. cDNA를 합성하기 위하여 0.5 μ l Random

primer (enzymatics)와 0.5 μl Oligo dT primer (enzymatics)를 첨가하여 80°C에서 5분간 반응시키고 2 μl dNTP (enzymatics), 5 $\times$ reaction buffer (Promega), 0.5 μl M-MLT Reverse Transcriptase (Promega), 0.25 μl RNase Inhibitor (Promega)를 첨가하여 42°C에서 60분간 반응시킨 후 95°C에서 10분간 반응시켰다. cDNA를 template로 하여 VHSV P의 specific gene primer를 이용하여 real-time PCR (LightCycler 480II, Roche)을 수행하였다 (Table 6). Real-time PCR 조건은 95°C에서 15분간 1cycle, 95°C에서 10초, 60°C에서 10초, 72°C에서 10초씩 40 cycle후 마지막 cycle후에는 모든 반응물에 대하여 65°C부터 95°C까지 용융점 (melting temperature, T_m)분석을 수행하였다. Standard curve를 작성하기 위하여 VHSV P gene이 cloning 되어져 있는 pGEM T-Easy vector (Promega)를 이용하여 10^1 에서 10^8 copies/ml로 10배씩 단계 희석 후 real-time PCR을 수행하였다. 3반복 실험 후 결과 값을 나타내었다.

1-11. In vivo 상에서의 rVHSV- Δ G replication 확인 (semi-quantitative RT-PCR)

In vivo 상에서의 rVHSV- Δ G replication 확인을 위하여 넙치 치어 (7.5g)에 rVHSV- Δ G(P2)를 8×10^5 PFC/fish로 근육주사 하여 semi-quantitative reverse transcriptase (RT-PCR)을 수행하였다. 이때 실험어로 사용한 넙치는 VHSV 검사를 통하여 감염이 없는 것을 확인한 후 실험을 수행하였다. 실험어의 수온은 15°C로 유지하여 주었으며 바이러스 접종 후 12hr, 1, 2, 3, 5, 7, 14, 24day에 3마리씩 간, 신장, 비장, 근육을 분

리하여 TRIzol Reagent (invitrogen)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. cDNA를 합성하기 위하여 0.5 μ l Random primer (enzymatics)와 0.5 μ l Oligo dT primer (enzymatics)를 첨가하여 80℃에서 5분간 반응시키고 2 μ l dNTP (enzymatics), 5 $\times$ reaction buffer (Promega), 0.5 μ l M-MLT Reverse Transcriptase (Promega), 0.25 μ l RNase Inhibitor (Promega)를 첨가하여 42℃에서 60분간 반응 시킨 후 95℃에서 10분간 반응시켰다. 합성된 cDNA를 template로 하여 VHSV-M gene의 Forward primer와 NV gene의 Reverse primer 이용하여 PCR 증폭하였다 (Table 7). PCR cycling 조건은 95℃에서 3분간 1cycle, 95℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분씩 30 cycle후 72℃ 7분간 1cycle을 수행하였다. 또한 control로 넙치의 18s ribosomal RNA (rRNA)를 PCR로 증폭하였다 (Table 7). PCR cycling 조건은 95℃에서 3분간 1cycle, 95℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초씩 18 cycle후 72℃ 7분간 1cycle을 수행하였다. 이를 0.8% agarose gel에 전기영동 하여 확인하였다.

Table 1. For construction of T7 RNA polymerase-expressing plasmids

Name of primer		Sequence (5' to 3')
pCMV-T7	F	AAGCTT CGGCACGATTATAGGAATTTTC
	R	GGATCC TTACGCGAACGCGAAGTCCG
pLNHX-MCS	F	TCGAAGATCTAAGCTTGGATCCGTCGACCTCGAGGGGCCC
	R	GATCGGGCCCCTCGAGGTCGACGGATCCAAGCTTAGATCT

(Bolded nucleotides indicate restriction enzyme sites)

Table 2. For construction of Supporting plasmids

Name of primer		Sequence (5' to 3')
pCMV-N	F	GGATCC CGGCACTTAAGTAGCAAAAAGTTT
	R	GCGGCCG CTCCTTTTCTATCTATATGAGTTATGAGA
pCMV-P	F	AAGCTT CGGCACGATTATAGGAATTTTC
	R	GCGGCCG CTTTCTTTCTATCTATACGATGTGTTGTG
pCMV-G	F	GCTAGC ATGGAATGGAATACTTTTTTCTTGGTG
	R	GGATTCT CAGACCATCTGGCTTCTGGAGAACTG
pCMV-L	F1	AAGCTT TGGCACTTTTGTTGTTTGTAGTC
	R1	GCGGCCG CACTAGTGGGCCCTGGTCGTGTG
	F2	ACTAGT TCCTTACTTCGGGACTCAGACCAAACC
	R2	GCGGCCG CGCTTTTTTTCAATCTAGTTGAGGAACAAG

(Bolded nucleotides indicate restriction enzyme sites)

Table 3-1. For construction of VHSV G gene expressing cell line

Name of primer		Sequence (5' to 3')
pCMV-G	F	GCTAGC ATGGAATGGAATACTTTTTTCTTGGTG
pFC- CMV-G	R	GGATTCTC AGACCATCTGGCTTCTGGAGAACTG

(Bolded nucleotides indicate restriction enzyme sites)

Table 3-2. For confirmation of integrated into a target genome

Name of primer		Sequence (5' to 3')
pFC-CMV-MCS-attB	F	GCAATTGTTGTTGTAACTTGTTTATTG
	R	GACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTC

Table 4. For confirmation of VHSV G gene expression

Name of primer		Sequence (5' to 3')
EPC	F	AAGGAGAAGCTCTGCTATGTGGCT
β -actin	R	AAGGTGGTCTCATGGATACCGCAA
VHSV G	F	CTTATCTTAACCATCTCATTACCAACATGG
	R	TCAGACCATCTGGCTTCTGGAGAACTGCTG

Table 5. For confirmation of rVHSV-ΔG by RT-PCR

Name of primer		Sequence (5' to 3')
M-G	VHSV M 128 F	CCAGGTCGATAAGATCTGCATG
	VHSV G 23 R	GCTTTTTTATGATGATGACCAGAATCACC
G-NV	VHSV G 251 F	ATCTTCCGTTATCAGTCACCAGCGT
	VHSV NV 146 R	CTCTGAGACTCTAGAAAGAGTTGTCT
N-P	VHSV N 634 F	GCCATGGGGGCGTTGAGG
	VHSV P ORF R	CTACTCCAACCTTGTCCTCACTCCGC
P-M	VHSV P 120 F	GGGTCCTCCAAACAGAAGCCAAGCCCCAAG
	VHSV M ORF R	CTACCGGGGTCGGACAGAGGGGGTTC
M-NV	VHSV M 128 F	CCAGGTCGATAAGATCTGCATG
	VHSV NV ORF R	TCATGGGGGAGATTTCGGAGCCATTC
M-L	VHSV M 128 F	CCAGGTCGATAAGATCTGCATG
	VHSV L 170 R	AGATGGACTATCTGATACTGCTTGGT
NV-L	VHSV NV ORF F	AAGGAGAAGCTCTGCTATGTGGCT
	VHSV L 401 R	TTCTGACTTTCTAGGGTGACCTCTC

Table 6. For confirmation of rVHSV-ΔG by real-time PCR

Name of primer		Sequence (5' to 3')
VHSV P	F	CAACGCTCGAGGAGATCATT
real-time	R	GGGACAGCTTGATACGTCTTAG

Table 7. For confirmation of rVHSV-ΔG safety

Name of primer		Sequence (5' to 3')
OF-18S	F	CAAGACGGACGAAAGCGAAAGCAT
	R	TGGCATCGTTTACGGTCGGAATA
M-NV	VHSV M 128 F	CCAGGTCGATAAGATCTGCATG
	VHSV NV 146 R	CTCTGAGACTCTAGAAAGAGTTGTCT

2. rVHSV-P1, P2, P3

2-1. 세포 및 바이러스

실험에 사용된 *epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell은 MycoZap™ Antibiotics (Lonza)와 10% fetal bovine serum (FBS, BI)이 첨가된 Leibovitz medium (L-15, Sigma)에서 배양하였다.

실험에 사용된 바이러스인 Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)는 경남 소재 넙치 양식장에서 VHS disease가 발생한 넙치로부터 분리한 VHSV KJ2008 strain으로 2% FBS와 antibiotics가 첨가된 L-15 medium을 사용하여 EPC cell에 접종하였다. 접종 후 15℃에 배양하였으며 광범위한 cytopathic effect (CPE)가 나타났을 때 상층액을 모아 4℃에서 4000g로 10분간 원심분리 하고 -80℃에 보관하여 추후 실험에 사용하였다.

2-2. T7 RNA polymerase (T7 RNAP)를 발현하는 EPC cell line 제작

재조합 VHSV의 promoter인 T7 promoter를 작동시키기 위하여 T7 RNA polymerase를 발현하는 EPC cell을 제작하였다. T7 RNAP gene을 발현하는 plasmid를 제작하기 위하여 E.coli BL21(DE3) 균주의 DNA로부터 *HindIII*와 *BamHI* enzyme site를 포함한 T7 RNAP ORF PCR

fragment를 pGEM T-easy vector (Promega)에 cloning한 후, pcDNA3.1(+) vector (Invitrogen)에 Ligation하여 pCMV-T7 RNAP를 제작하였다 (Table 1). plasmid purification kit (QIAGEN)를 이용하여 pCMV-T7 RNAP plasmid를 추출 하였다. plasmid를 transfection하기 위하여 L-15 medium에 20mM HEPES와 10% FBS를 첨가한 배지로 35mm dish에 EPC cell (1×10^6 cells/ml)을 28℃에서 배양하고 FuGENE HD Transfection reagent (Promega)를 이용하여 pCMV-T7 RNAP (1 μ g)을 Transfection 하였다. 24시간 후 10% FBS와 antibiotics가 첨가된 L-15배지로 교환하여 주고 Transfection 3일 후 Trypsin-EDTA(invitrogen)처리하여 G-418 (400 μ g/ml)이 첨가된 배지로 T₂₅flask에 배양하여 selection하여 주었다.

2-3. VHSV P gene이 knock-out된 재조합 VHSV vector (pVHSV-P1, P2, P3) 제작

미리 제작되어있던 pVHSV-wild를 이용하여 pVHSV-P1, P2, P3를 제작하였다. T7 RNAP promoter (P_{T7}), nucleoprotein (N), phosphorylated protein (P), matrix protein (M), glycoprotein (G), nonstructure protein (NV), large RNA-dependent RNA polymerase (L), hepatitis delta virus ribozyme (HdvRz) 및 T7 transcription termination sequence, multiple cloning sites (MCS, *Nae I* -*Age I* -*Sac II* -*Cla I* -*Nar I* -*Aat II*)가 cloning되어져 있는 pGEM T-easy vector에 VHSV P gene의 첫 번째 methionine을 종료코돈으로 치환한 primer로 site-directed mutagenesis

(SDM)기법을 이용하여 첫 번째 methionine이 종료코돈으로 치환된 재조합 VHSV vector (pVHSV-P1)를 제작하였다. pVHSV-P1을 template로 하여 VHSV P gene의 두 번째 methionine을 종료코돈으로 치환한 primer로 SDM기법을 이용하여 첫 번째와 두 번째 methionine이 종료코돈으로 치환된 재조합 VHSV vector (pVHSV-P2)를 제작하였다. pVHSV-P2을 template로 하여 VHSV P gene의 세 번째 methionine을 종료코돈으로 치환한 primer로 SDM기법을 이용하여 첫 번째 두 번째와 세 번째 methionine이 종료코돈으로 치환된 재조합 VHSV vector (pVHSV-P3)를 제작하였다 (Table 8). SDM 수행시 PCR cycling 조건은 95℃에서 3분간 1cycle, 95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 68℃에서 15분간 12 cycle을 수행한 후 *Dpn I* enzyme 처리를 하여 원하는 부위가 mutation된 plasmid를 얻었다.

2-4. VHSV N, P, L gene을 발현하는 supporting plasmid 제작

재조합 VHSV를 제작하기 위해서는 VHSV의 N, P, L 단백질을 발현하는 supporting plasmid가 필요하다. pVHSV-wild를 template로 하여 각각의 유전자에 따른 primer를 사용하여 PCR로 증폭하였다 (Table 2). PCR로 증폭된 각각의 유전자들은 pcDNA3.1(+) vector에 ligation 하여, 각각 pCMV-N, pCMV-P, pCMV-L을 제작하였다.

2-5. VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene을 발현하는 cell line 제작

가. pcDNA3.1(+) vector를 이용한 VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene 발현 cell line 제작

VHSV P gene의 첫 번째, 두 번째, 세 번째, 네 번째 methionine을 시작으로 하는 VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene이 발현되는 cell을 제작하였다. VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene을 발현하는 plasmid를 제작하기 위하여 *Nhe I*과 *EcoR I* enzyme site를 포함한 VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene ORF PCR fragment를 pGEM T-easy vector (Promega)에 cloning한 후, pcDNA3.1(+) vector (Invitrogen)에 ligation하여 pCMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3)를 제작하고 (Table 9), plasmid purification kit (QIAGEN)를 이용하여 pCMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3) plasmid를 추출하였다. plasmid를 transfection하기 위하여 L-15 medium에 20mM HEPES와 10% FBS를 첨가한 배지로 35mm dish에 EPC cell (1×10^6 cells/ml)을 28℃에서 배양하고 FuGENE HD Transfection reagent (Promega)를 이용하여 pCMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3) ($1\mu\text{g}$)을 Transfection 하였다. 24시간 후 10% FBS와 antibiotics가 첨가된 L-15배지로 교환하여 주고 Transfection 3일 후 Trypsin-EDTA (gibco)처리하여 G-418 ($400\mu\text{g/ml}$)이 첨가된 배지로 T₂₅flask에 배양하여 selection하여 주었다.

나. phiC31 Integrase Vector System을 이용한 VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene발현 cell line 제작

VHSV P gene의 첫 번째, 두 번째, 세 번째, 네 번째 methionine을 시작으로 하는 VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene이 발현되는 cell을 phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 제작하였다. donor plasmid인 VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene을 발현하는 vector를 만들기 위하여 제작해 두었던 pCMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3)에 *Nhe I*와 *EcoR V* enzyme 처리를 한 후, pFC-CMV-MCS-SV40-Kan/Neo에 ligation하여 pFC-CMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3)를 제작하고, plasmid purification kit (QIAGEN)를 이용하여 pFC-CMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3) plasmid를 추출 하였다. plasmid를 transfection하기 위하여 L-15 medium에 20mM HEPES와 10% FBS를 첨가한 배지로 35mm dish에 EPC cell (1×10^6 cells/ml)을 28℃에서 배양하였다. pFC-CMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3)와 phiC31 integrase expression plasmid가 1:50비율이 되도록 하기 위하여 pFC-CMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3) plasmid (40ng), phic31 integrase expression plasmid (1.96ug)를 FuGENE HD Transfection reagent (Promega)를 이용하여 Transfection 하였다. 24시간 후 10% FBS와 antibiotics가 첨가된 L-15배지로 교환하여 주고 Transfection 3일 후 Trypsin-EDTA (gibco) 처리하여 G-418 ($400 \mu\text{g/ml}$)이 첨가된 배지로 T₂₅flask에 배양하여 selection하여 주었다.

다. EPC cell의 chromosome내 VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene 발현 cassette의 삽입확인

phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 제작한 VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene을 발현시킨 cell line에서 ϕ C31 integrase에 의하여 pFC-CMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3)의 attB site와 EPC cell의 attP site의 융합이 일어남으로써 EPC의 chromosome내로 삽입되어 졌는지 확인하기 위하여 attB gene을 포함하는 primer를 제작하였다 (Table 3-2). 이 primer를 사용하여 PCR로 증폭할 경우 pFC-CMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3) vector에서는 attB site가 증폭이 되지만 pFC-CMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3) vector를 Transfection시킨 cell line에서는 attB와 attP site의 융합이 일어남에 따라 EPC의 chromosome내로 vector가 삽입되어졌기 때문에 증폭이 되지 않는다. 따라서 pFC-CMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3) vector는 plasmid purification kit (Qiagen)를 이용하여 plasmid를 추출한 후 PCR을 수행하였고 pFC-CMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3) vector를 Transfection 시킨 EPC cell line은 EXgeneTM Clinic SV mini (Gene All)를 사용하여 gDNA를 추출한 후 PCR을 수행하였다.

2-6. VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene의 expression level 비교 (RT-PCR)

VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene을 발현하는 두 가지 cell line인 pcDNA3.1(+) vector와 phiC31 Integrase Vector System을 이용한 cell에서

의 P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene 발현 level을 비교하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene을 발현하는 두 가지 cell에 Trypsin-EDTA (gibco)을 처리하여 모은 후 RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN)를 사용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA 1 μ g에 RNase free DNase (Promega) 처리 후 stop solution을 첨가하였다. cDNA를 합성하기 위하여 0.5 μ l Random primer (enzymomics)와 0.5 μ l Oligo dT primer (enzymomics)를 첨가하여 80°C에서 5분간 반응시키고 2 μ l dNTP (enzymomics), 5 $\times$ reaction buffer (Promega), 0.5 μ l M-MLT Reverse Transcriptase (Promega), 0.25 μ l RNase Inhibitor (Promega)를 첨가하여 42°C에서 60분간 반응 시킨 후 95°C에서 10분간 반응시켰다. 합성된 cDNA를 template로 하여 VHSV-P (VP0, VP1, VP2, VP3) specific gene primer를 이용하여 PCR 증폭하였다. PCR cycling 조건은 95°C에서 3분간 1cycle, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 30 cycle후 72°C 7분간 1cycle을 수행하였다. 또한 control로 EPC cell의 β -actin gene을 PCR로 증폭하였다 (Table 9). PCR cycling 조건은 95°C에서 3분간 1cycle, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 26 cycle후 72°C 7분간 1cycle을 수행하였다. 이를 0.8% agarose gel에 전기영동 하여 확인하였다.

2-7. VHSV P gene이 knock-out된 재조합 VHSV (rVHSV-P1, P2, P3) 제작

가. rVHSV-P1, P2, P3 제작

T7 RNA polymerase를 발현하고 있는 EPC cell (1×10^6 cells/ml)을 L-15 medium에 20mM HEPES와 10% FBS를 첨가한 배지로 28°C에서 배양하고 EPC cell이 80% 정도 자랐을 때 pVHSV-P1, P2, P3 ($2\mu\text{g}$)과 pCMV-N ($0.5\mu\text{g}$), pCMV-P ($0.3\mu\text{g}$), pCMV-L ($0.2\mu\text{g}$)을 함께 FuGENE HD Transfection reagent (Promega)를 이용해 co-transfection하였다. 28°C에서 12 시간 incubation 하고 이를 2% FBS가 첨가된 배지로 갈아준 뒤 15°C 옮겨 배양하였다. 전반적인 cytopathic effect (CPE)가 관찰되었을 때 freeze-thawing후 4000 g에서 10분간 원심분리 하였고, 이때 얻은 상층액을 S0이라 하였다. S0를 다시 pcDNA3.1(+) vector를 이용한 VHSV P gene 발현 cell line에 접종하고 7일 후 얻은 상층액을 S1라 하였다. rVHSV-P1의 경우 S1을 VHSV P gene 발현 cell line 접종하여 한번더 passage를 수행하였고 7일후 얻은 상층액을 S2라 하였다.

나. VHSV P gene을 발현하는 두 가지 cell line에서 rVHSV-P2, P3의 cytopathic effect (CPE) 관찰

rVHSV-P2, P3와 pCMV-N, P, L을 co-transfection 하여 S0을 얻고 S0을 다시 pcDNA3.1(+) vector를 이용한 VHSV P gene 발현 cell에 접종

하여 S1을 얻었다. pcDNA3.1(+) vector와 phiC31 Integrase Vector System을 이용한 P gene발현 cell을 각각 35mm dish (8×10^5 cells/ml)에 28°C에서 배양한 후 2% FBS가 첨가된 배지로 갈아준 뒤 S1을 접종하여 15°C에서 cytopathic effect (CPE)를 관찰하였다.

2-8. rVHSV-P1, P2, P3의 확인 (RT-PCR)

VHSV P gene이 knock-out된 재조합 VHSV (rVHSV-P1, P2, P3)는 RT-PCR을 통하여 확인하였다. rVHSV-P1, P2, P3 (S1)에서 TRIzol Reagent (invitrogen)를 사용하여 total RNA를 분리하였다. cDNA를 합성하기 위하여 0.5 μ l Random primer (enzymomics)와 0.5 μ l Oligo dT primer (enzymomics)를 첨가하여 80°C에서 5분간 반응시키고 2 μ l dNTP (enzymomics), 5 $\times$ reaction buffer (Promega), 0.5 μ l M-MLT Reverse Transcriptase (Promega), 0.25 μ l RNase Inhibitor (Promega)를 첨가하여 42°C에서 60분간 반응시킨 후 95°C에서 10분간 반응시켰다. cDNA를 template로 하여 VHSV N, P, M, G, NV, L의 specific gene primer를 이용하여 PCR 증폭하였다 (Table 10). N에서 P (N-P), P에서 M (P-M), M에서 G (M-G), G에서 NV (G-NV), NV에서 L (NV-L)의 PCR을 수행함으로써 여러 가지 유전자 발현을 확인하였다. PCR cycling 조건은 95°C에서 3분간 1cycle, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 30 cycle 후 72°C 7분간 1cycle을 수행하였다. 이를 0.8% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

2-9. rVHSV-P1, P2, P3의 확인 (plaque assay)

가. rVHVS-P1 의 titer 측정

rVHSV-P1 (S2)의 titer를 측정하기 위하여 phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 제작한 P gene 발현 cell을 35mm dish에 monolayer로 배양한 뒤 Virus stock을 10^{-5} 에서 10^{-7} 까지 단계 희석 후 접종하였다. 15°C에서 2시간동안 incubation 후 바이러스를 제거하고 plaquing medium (0.7% agarose, 2% FBS, antibiotics)을 깔아주었다. 7일 후 세포를 10% formalin으로 고정 후 10% crystal violet으로 30분간 염색하였다. 증류수로 세포를 수세하여 plaque-forming units (PFU)를 산출하였다.

나. P gene 발현 정도에 따른 rVHSV-P2, P3 titer 비교확인

rVHSV-P2, P3 (S1)을 pcDNA3.1(+) vector와 phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 제작한 VHSV P gene발현 cell에 접종 후 그 상층액을 이용하여 plaque assay를 수행하였다. phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 제작한 P gene 발현 cell을 35mm dish에 monolayer로 배양한 뒤 Virus stock을 10^{-3} 에서 10^{-5} 까지 단계 희석 후 접종하였다. 15°C에서 2시간동안 incubation 후 바이러스를 제거하고 plaquing medium (0.7% agarose, 2% FBS, antibiotics)을 깔아주었다. 10일 후 세포를 10% formalin으로 고정 후 10% crystal violet으로 30분간 염색하였다. 증류수로 세포를 수세하여 plaque-forming units (PFU)를 산출하였다.

2-10. VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene을 발현하는 cell line에서 rVHSV-P1, P2, P3의 감염성 확인

VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene을 발현하는 cell line에 rVHSV-P1, P2, P3을 접종하여 cytopathic effect (CPE)를 관찰하기 위하여 control로 EPC cell을 사용하고, pcDNA3.1(+) vector와 phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 만든 VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene을 발현하는 cell을 28℃에서 35mm dish에 (8×10^5 cells/ml) 배양하였다. 15℃에서 각각의 cell에 rVHSV-P1, P2, P3을 접종시키고 14일 뒤 CPE를 관찰하였다.

2-11. rVHSV-P1, P2, P3의 확인 (nucleotide sequence)

rVHSV-P1, P2, P3가 원하는 위치의 methionine이 종료코돈으로 바뀌었는지 알기 위하여 nucleotide sequence 분석을 통하여 확인하였다. rVHSV-P1은 S2에서 rVHSV-P2, P3는 S1에서 TRIzol Reagent (invitrogen)를 사용하여 total RNA를 분리하였다. cDNA를 합성하기 위하여 0.5 μ l Random primer (enzymatics)와 0.5 μ l Oligo dT primer (enzymatics)를 첨가하여 80℃에서 5분간 반응시키고 2 μ l dNTP (enzymatics), 5 $\times$ reaction buffer (Promega), 0.5 μ l M-MLT Reverse Transcriptase (Promega), 0.25 μ l RNase Inhibitor (Promega)를 첨가하

여 42℃에서 60분간 반응 시킨 후 95℃에서 10분간 반응시켰다. cDNA를 template로 하여 VHSV N gene에서 P gene의 specific primer로 PCR로 증폭하였다 (Table 11). PCR cycling 조건은 95℃에서 3분간 1cycle, 95℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분씩 30 cycle후 72℃ 7분간 1cycle을 수행하였다. PCR fragment를 pGEM T-easy vector (Promega)에 cloning한 후 nucleotide sequence 분석을 수행하였다.



Table 8. For construction of pVHSV-P1, P2, P3 by RT-PCR

Name of primer		Sequence (5' to 3')
pVHSV-P 1sdm	F	TAGACTGATATTGAGATGAGTGAATCATTGGTCCTGTCTC
	R	GAGACAGGACCAATGATTCATCTCAATATCCTA
pVHSV-P 2 sdm	F	CACATAGACTGATATTGAGTAGAGTGAATCATTGGTCCTG
	R	CAGGACCAATGATTCATCTACTCAATATCAGTCTATGTG
pVHSV-P 3 sdm	F	TGGGGAGAATCGAGCCAAGTAGGGGGCCCTCCTAGAGTCT
	R	AGACTCTAGGAGGGCCCCCTACTTGGCTCGATTCTCCCA

Table 9. For construction of VHSV P gene expressing cell line

Name of primer		Sequence (5' to 3')
pCMV-VP0	F	GCTAGCGCC ACCATGACTGATATTGAGATG
pCMS-VP1	F	GCTAGCGCC ACCATGAGTGAATCATTGGTC
pCMV-VP2	F	GCTAGCGCC ACCATGGGGGCCCTCCTAGAG
pCMV-VP3	F	GCTAGCGCC ACCATGAGAGGAGAAGGAGCG
pCMV-VP R	R	GAATTC CTACTCCAACCTTGTCCTCAACTCCGC
EPC β -actin	F	AAGGAGAAGCTCTGCTATGTGGCT
	R	AAGGTGGTCTCATGGATACCGCAA

(Bolded nucleotides indicate restriction enzyme sites)

Table 10. For confirmation of rVHSV-P1, P2, P3

	Name of primer	Sequence (5' to 3')
N-P	VHSV N 634 F	GCCATGGGGGCGTTGAGG
	VHSV P ORF R	CTACTCCAACCTTGTCCTCACTCCGC
P-M	VHSV P 394 F	TGGGGAGAATCGAGCCAAGATGGGGGCCC
	VHSV M ORF R	CTACCGGGGTCTGGACAGAGGGGGTTC
M-G	VHSV M 128 F	CCAGGTCGATAAGATCTGCATG
	VHSV G 650 R	GCCTTGACCACCCTGTGATCATGTGTC
G-NV	VHSV G 898 F	CTTATCTTAACCATCTCATTACCAACATGG
	VHSV NV 146 R	CTCTGAGACTCTAGAAAGAGTTGTCT
NV-L	VHSV NV ORF F	AAGGAGAAGCTCTGCTATGTGGCT
	VHSV L 401 R	TTCTGACTTTCTAGGGTGACCTCTC

Table 11. For confirmation of rVHSV-P1, P2, P3 nucleotide sequence

	Name of primer	Sequence (5' to 3')
N-P	VHSV N 634 F	GCCATGGGGGCGTTGAGG
	VHSV P ORF R	CTACTCCAACCTTGTCCTCACTCCGC

Ⅲ. 결 과

1. rVHSV-ΔG

1-1. VHSV G gene을 발현하는 cell line의 제작 및 G gene expression level 비교분석

VHSV G gene이 발현되는 cell line을 제작하기 위하여 pcDNA3.1(+) vector와 phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 G gene 발현 vector를 제작하였고 (fig. 1), 두 가지 vector (pCMV-G, pFC-CMV-G)를 EPC cell에 Transfection하여 VHSV G gene이 발현되는 cell line을 제작하였다.

phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 제작한 VHSV G gene을 발현시킨 cell line이 ϕ C31 integrase에 의하여 pFC-CMV-G의 attB site와 EPC cell의 attP site의 융합이 일어남으로써 EPC의 chromosome내로 삽입되어 졌는지 확인하기 위하여 attB gene을 포함하는 primer를 제작하여 각각 plasmid와 cell genomic DNA를 template로 하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 pFC-CMV-G vector에서는 attB site가 증폭이 되지만 (약 580bp) pFC-CMV-G vector를 transfection시킨 cell line에서는 attB와 attP site의 융합이 일어남에 따라 EPC 의 chromosome내로 vector가 삽입

되어졌기 때문에 증폭이 되지 않음을 확인하였다 (fig. 2).

pcDNA3.1(+) vector와 phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 제작한 cell line의 G protein expression level을 비교하기 위하여 두 가지 cell line으로부터 total RNA를 분리하여 RNase-free DNase 처리 후 G specific primer로 RT-PCR을 수행하였다. 또한 control로 EPC cell의 β -actin gene을 PCR로 증폭하였다. 그 결과 pcDNA3.1(+) vector를 이용한 것보다 phiC31 Integrase Vector System을 이용한 cell line에서 의 PCR밴드(약 620bp)가 더 진한 것으로 보아 phiC31 Integrase Vector System을 이용한 cell line에서 G gene이 더 많이 발현되고 있음을 확인하였다 (fig. 3).



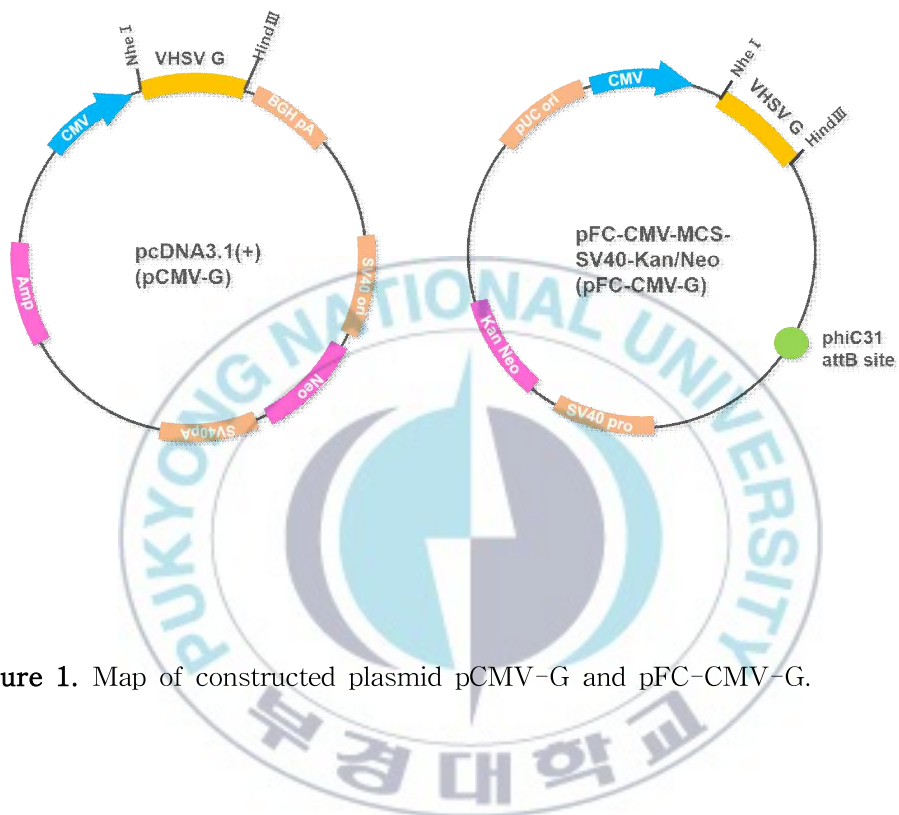


figure 1. Map of constructed plasmid pCMV-G and pFC-CMV-G.

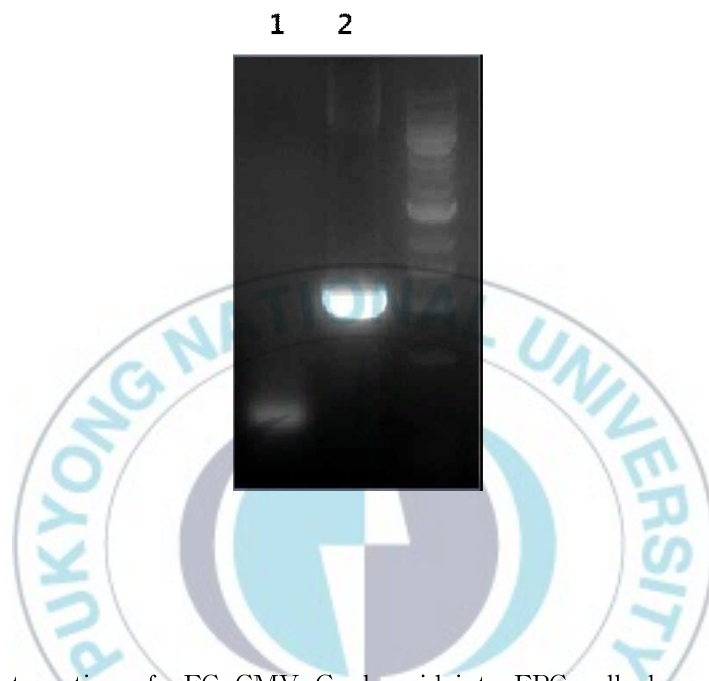


figure 2. Integration of pFC-CMV-G plasmid into EPC cell chromosome. After co-transfection of EPC cell with pFC-CMV-G and ϕ C31 integrase expression plasmid, incorporation of plasmid into cell chromosome was confirmed by PCR using attB primers after extraction of genomic DNA from cells. Line 1 : absence of amplicaion. Line 2 : attB positive control using pFC-CMV-G plasmid (580 bp).

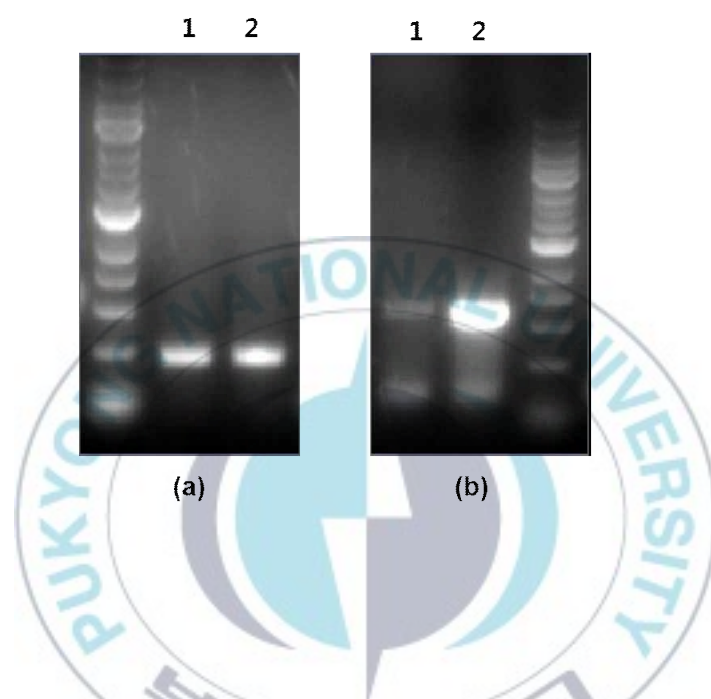


figure 3. Comparison of VHSV G protein expression level by RT-PCR. Each of total RNA was extracted from EPC cell line expressing VHSV G gene using pcDNA3.1(+) vector and phiC31 Integrase Vector System. Lane 1 : VHSV G protein expression using pcDNA3.1(+) vector. Lane 2 : VHSV G gene expression using phiC31 Integrase Vector System. (a) β -actin gene of EPC cell. (b) VHSV G protein expression level using phiC31 Integrase Vector System was higher than VHSV G protein expression level using pcDNA3.1(+) vector.

1-2. VHSV G gene이 knock-out된 재조합 VHSV (rVHSV-ΔG) 제작 및 확인

가. rVHSV-ΔG 제작

VHSV G gene이 knock-out된 재조합 VHSV (rVHSV-ΔG)를 제작하기 위하여 본 연구실에서 제작한 pVHSV-wild에 제한효소 (*Nae I*, *Sac II*)를 이용하여 P_{T7}, N, P, M을 포함하고 있는 fragment 1과 G를 포함하고 있는 fragment 2를 제거 하였다. 제거된 자리에 P_{T7}, N, P, M을 포함하고 있는 fragment 1을 삽입함으로써 VHSV G gene이 knock-out된 mutant cDNA clone (pVHSV-ΔG)을 제작하였다 (fig. 4). T7 RNAP가 발현되는 EPC cell에 pVHSV-ΔG와 VHSV N, P, G, L supporting plasmid를 co-transfection하여 cytopathic effect (CPE)가 나타나는 것을 관찰하였다.

나. VHSV G gene을 발현하는 두 가지 cell line에서의 cytopathic effect (CPE) 관찰 및 rVHSV-ΔG 생산 확인

pVHSV-ΔG와 pCMV-N, P, G, L을 T7 RNAP가 발현되는 cell에 co-transfection 하여 상층액 P0을 얻고 P0을 다시 pcDNA3.1(+) vector를 이용한 VHSV G gene발현 cell에 접종하여 P1을 얻었다. G gene의 발현 level이 virus titer에도 영향을 미치는지 알아보기 위하여 pcDNA3.1(+) vector와 phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 제작한 VHSV G gene발현 cell에 각각 P1을 접종하여 5일후 cytopathic effect (CPE)를 관

찰하였다. 그 결과 pcDNA3.1(+) vector를 이용한 것보다 G gene의 발현 level이 높은 phiC31 Integrase Vector System을 이용한 cell에서 더 많은 CPE가 나타남을 관찰하였다 (fig. 5).

두 종류의 G gene 발현 cell (P1)을 접종한 후 얻은 상층액의 virus titer를 비교하기 위하여 G gene이 발현되는 cell에서 plaque assay를 실시하여 plaque-forming unit (PFU)를 산출하였다. 그 결과 pcDNA3.1(+) vector를 이용한 G gene발현 cell에 P1을 접종한 결과 titer가 2×10^4 pfu/ml로 측정되었고, phiC31 Integrase Vector System을 이용한 G gene발현 cell에 P1을 접종한 결과 더 많은 plaque이 형성되어 titer가 8×10^5 pfu/ml로 측정되었다 (fig. 6). 따라서 phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 VHSV G gene의 발현 level이 높아짐에 따라 rVHSV-ΔG의 titer도 증가함을 알 수 있다.

최종적으로 만들어진 rVHSV-ΔG (P2)가 목적인대로 만들어졌는지 확인하기 위하여 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였다. G gene이 knock-out된 PCR product의 size 확인을 위하여 wild type VHSV (wtVHSV)도 함께 RT-PCR을 수행하였다. 먼저 rVHSV-ΔG는 M에서 G (M-G), G에서 NV (G-NV)의 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 밴드가 나오지 않은 것으로 보아 G gene이 없음을 확인하였고 또한 N에서 P (N-P, 약 1.2kb), P에서 M (P-M, 약 1.1kb), M에서 NV (M-NV, 약 850bp), M에서 L (M-L, 약 1kb), NV에서 L (NV-L, 약 770bp)의 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 G gene이 knock-out된 PCR product의 size와 그 외 유전자를 확인하였다. wild type VHSV는 M에서 G (M-G, 약 590bp), G에서 NV (G-NV, 약 1.5kb)의 primer를 이용하여 PCR을 수

행한 결과 G gene이 포함된 PCR product의 size를 확인하였고 또한 N에서 P (N-P, 약 1.2kb), P에서 M (P-M, 약 1.1kb), M에서 NV (M-NV, 약 2.4kb), M에서 L (M-L, 약 2.5kb), NV에서 L (NV-L, 약 770bp)의 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 G gene이 포함된 PCR product의 size와 그 외 유전자를 확인하였다 (fig. 7). 이로부터 최종적으로 만들어진 rVHSV-ΔG (P2) 가 목적인대로 제작되었음을 확인하였다.



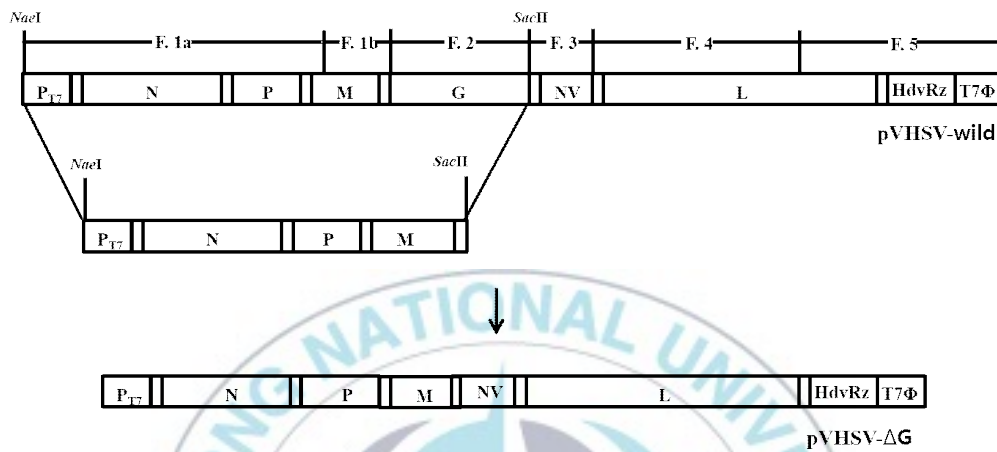


figure 4. Construction of the cDNA (pVHSV-ΔG). The pVHSV-ΔG was generated by replacement of the fragment 1(P_{T7}, N, P, M) and fragment 2 (G) in the pVHSV-wild with the fragment 1 (P_{T7}, N, P, M) using *Nae I* and *Sac II* restriction enzyme sites.

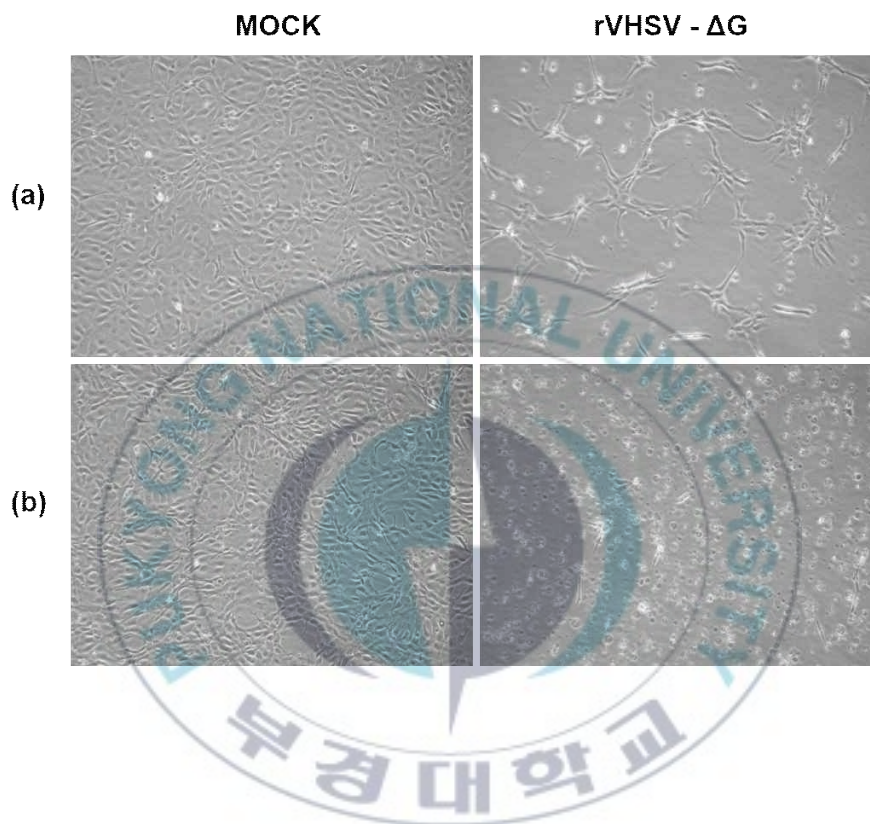


figure 5. Comparison of the cytopathic effect (CPE) induced by infection of EPC cell line expressing VHSV G gene using pcDNA3.1(+) vector and phiC31 Integrase Vector System with rVHSV-ΔG. After 5 days, the CPE was more evident in EPC cell line expressing VHSV G gene using phiC31 Integrase Vector System (b) compared with the EPC cell line expressing VHSV G gene using pcDNA3.1(+) (a). The control cells showed no CPE.

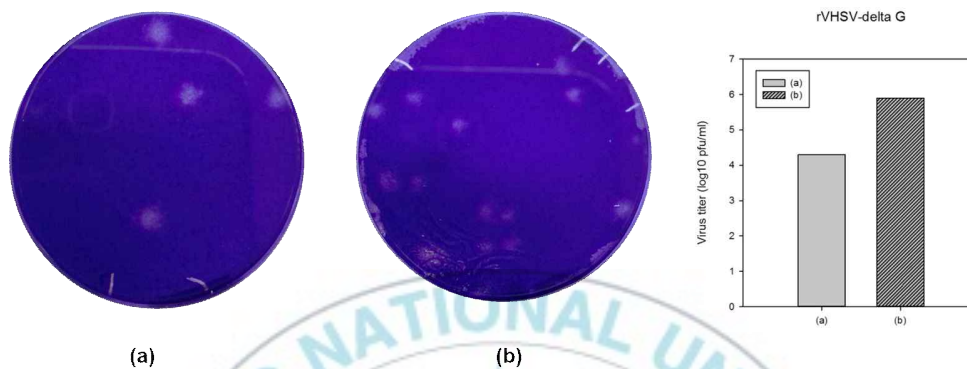


figure 6. Comparison of the virus titer measured through plaque assay by inoculation of EPC cell line expressing VHSV G gene with rVHSV-ΔG from different cell line. Cells were cultured in medium containing 0.7% agarose, fixed at 10 days post-infection, and stained with crystal violet. (a) Plaque is formed with 10^{-3} rVHSV-ΔG diluted inoculation from EPC cell line expressing VHSV G gene using pcDNA3.1(+) vector. (b) Plaque is formed with 10^{-4} rVHSV-ΔG diluted inoculation from EPC cell line expressing VHSV G gene using phiC31 Integrase Vector System. The more G protein expression level showed in phiC31 Integrase Vector System, the higher virus titer was observed.

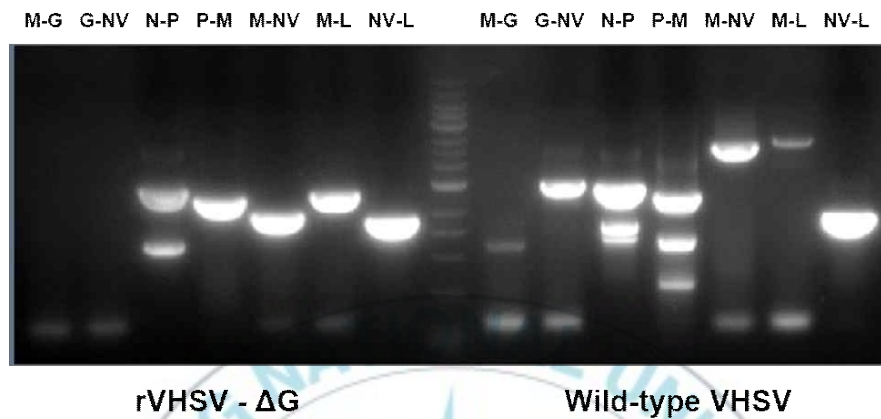


figure 7. Confirmaion of knock-out of G gene in rVHSV-ΔG by RT-PCR. To confirmation the knock-out of G gene in rVHSV-ΔG, PCR product size were compared to wild-type VHSV. Viral genomic RNA was extracted from rVHSV-ΔG and wild-type VHSV, it was amplified by RT-PCR with specific N, P, M, G, NV, L primers. M-G and G-NV genes were not amplified in the rVHSV-ΔG, but M-G (590bp) and G-NV (1.5kb) genes were amplified in the wild-type VHSV. The knock-out of G gene in rVHSV-ΔG reduced the size of M-NV (850bp) and M-L (1kb) genes against the M-NV (2.4kb) and M-L (2.5kb) genes in the wild-type VHSV. N-P (1.2kb), P-M (1.1kb) and NL-L (770bp) genes were amplified in the rVHSV-ΔG and wild type VHSV.

1-3. rVHSV-ΔG의 감염성 확인

EPC cell과 phiC31 Integrase Vector System을 이용한 G gene발현 cell에 rVHSV-ΔG (P2) 원액 100 μ l를 2시간동안 접종한 후 배지를 제거하고 PBS로 washing 하여 2% FBS가 첨가된 배지로 교환하여 7일후 cytopathic effect (CPE)를 관찰하였다. 그 결과 phiC31 Integrase Vector System을 이용한 G gene발현 cell에서는 CPE가 나타난 반면 EPC cell에서는 CPE가 나타나지 않음을 확인하였다 (fig. 8).

rVHSV-ΔG를 G gene 발현 cell에 접종한 상층액으로 phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 제작한 G gene 발현 cell과 EPC cell에서 plaque assay를 수행하고, 또한 rVHSV-ΔG를 EPC cell에 접종한 상층액으로 EPC cell plaque assay를 실시하여 G gene을 공급하여 줄때와 공급하지 않았을 때 그 감염성의 차이를 비교하기 위하여 plaque-forming unit (PFU)를 산출하였다. 그 결과 EPC cell에서는 두 종류의 상층액 모두 plaque이 형성되지 않았고, rVHSV-ΔG를 G gene 발현 cell에 접종한 상층액으로 G gene 발현 cell에 plaque assay를 실시하였을 때 virus titer는 8.5×10^5 pfu/ml로 나타났다 (fig. 9). 따라서 G gene이 공급된 cell에 virus를 접종한 경우에만 감염성을 가지는 virus가 생산되어짐을 확인하였다.

rVHSV-ΔG를 EPC cell과 phiC31 Integrase Vector System을 이용한 G gene발현 cell에 접종한 상층액의 titer를 측정하기 위하여 total RNA를 분리한 후 cDNA를 합성하여 합성하여 real-time PCR을 수행하였다. 그 결과 EPC cell에 접종한 상층액의 경우 8.2×10^7 copies/ml로 측정되었고, G gene발현 cell에 접종한 상층액의 경우 5×10^8 copies/ml로 측정되었다. 따

라서 G gene의 공급 없이도 virus particle이 형성됨을 확인하였다. Standard curve는 VHSV P gene이 cloning 되어져 있는 pGEM T-Easy vector (Promega)를 이용하여 10^1 에서 10^8 copies/ml로 10배씩 단계 희석하여 작성하였다 (fig. 10).



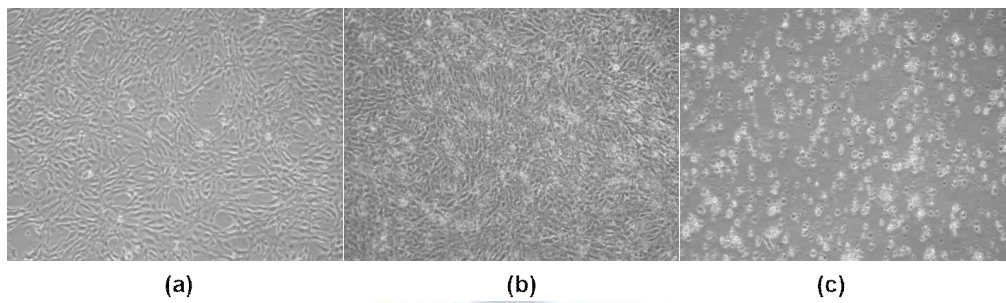


figure 8. The cytopathic effect (CPE) induced by infection of EPC cell line expressing VHSV G gene with rVHSV- Δ G using phiC31 Integrase Vector System (c). But the EPC cell inoculated with rVHSV- Δ G showed no CPE (b). The control cells showed no CPE (a).



figure 9. Verification of rVHSV-ΔG infectivity depending on supply of G gene by plaque assay. (a) plaque formation in EPC cell line expressing G gene inoculated with rVHSV-ΔG replicated from G gene expression cell. (b), (c) The EPC cells infected with rVHSV-ΔG replicated from G gene expression cell and EPC cell didn't forming any plaque. Cells were cultured in medium containing 0.7% agarose. fixed at 10 days post-infection, and stained with crystal violet. The rVHSV-ΔG could not produce infective viruses without supply of G protein.

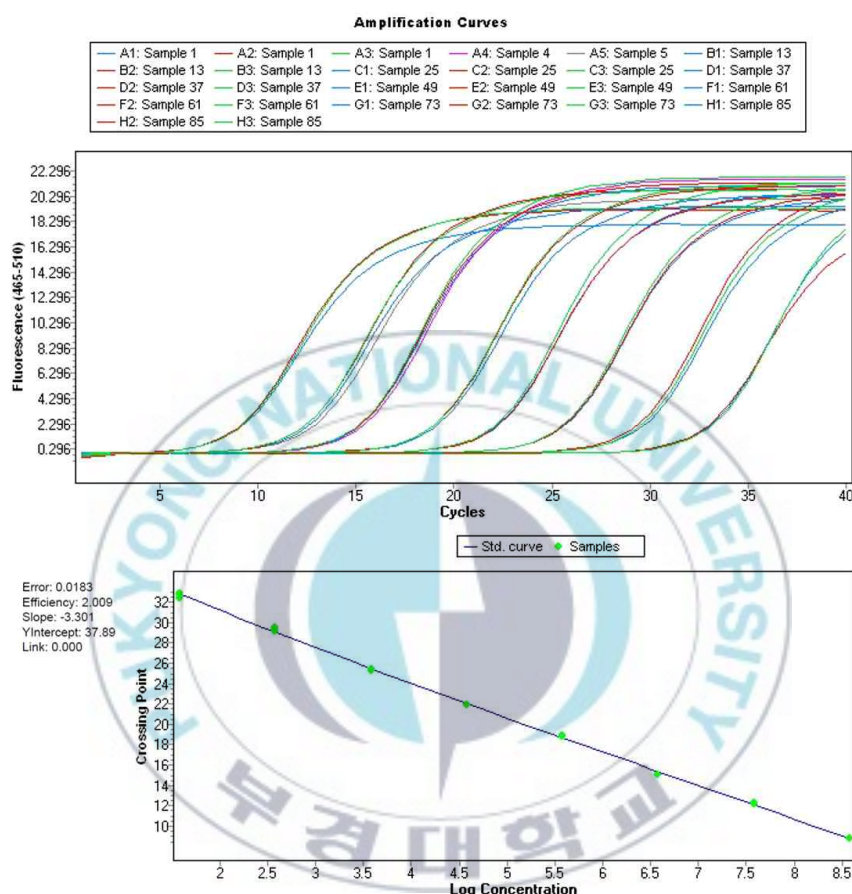


figure 10. Verification of virus particle formation depending on supply of G gene by real-time PCR. The virus titer (8.2×10^7 copies/ml) was measured by inoculation of EPC cell line expressing G gene with rVHSV- Δ G. The virus titer (5×10^8 copies/ml) was measured by inoculation of EPC cell with rVHSV- Δ G. Viral genomic RNA extracted from rVHSV- Δ G was amplified with specific P primers. Standard curve was constructed with 10^1 to 10^8 10 folded dilution of T-easy vector harbouring VHSV P gene. The rVHSV- Δ G could produce virus particle without supply of G protein.

1-4. In vivo 상에서의 rVHSV-ΔG safety 확인

In vivo 상에서의 rVHSV-ΔG replication 확인을 위하여 넙치 (7.5g)에 rVHSV-ΔG (P2) 원액으로 근육주사 후 12hr, 1, 2, 3, 5, 7, 14, 24day에 3 마리씩 간, 신장, 비장, 근육을 분리하여 VHSV-M gene에서 NV gene의 primer를 이용하여 semi-quantitative RT-PCR로 확인하였고, 18s rRNA도 함께 PCR을 수행하였다. 그 결과 G gene을 제외한 M에서 NV gene을 증폭한 size (약 640bp)임을 확인하였고, 간을 제외한 신장, 비장, 근육 조직에서 virus의 replication을 확인하였다. 신장과 비장에서는 시간이 지남에 따라 virus가 줄어들어 24일째는 virus가 거의 검출되지 않음을 알 수 있었고, 근육에는 24일째에도 바이러스가 검출됨을 확인하였다 (fig. 11).

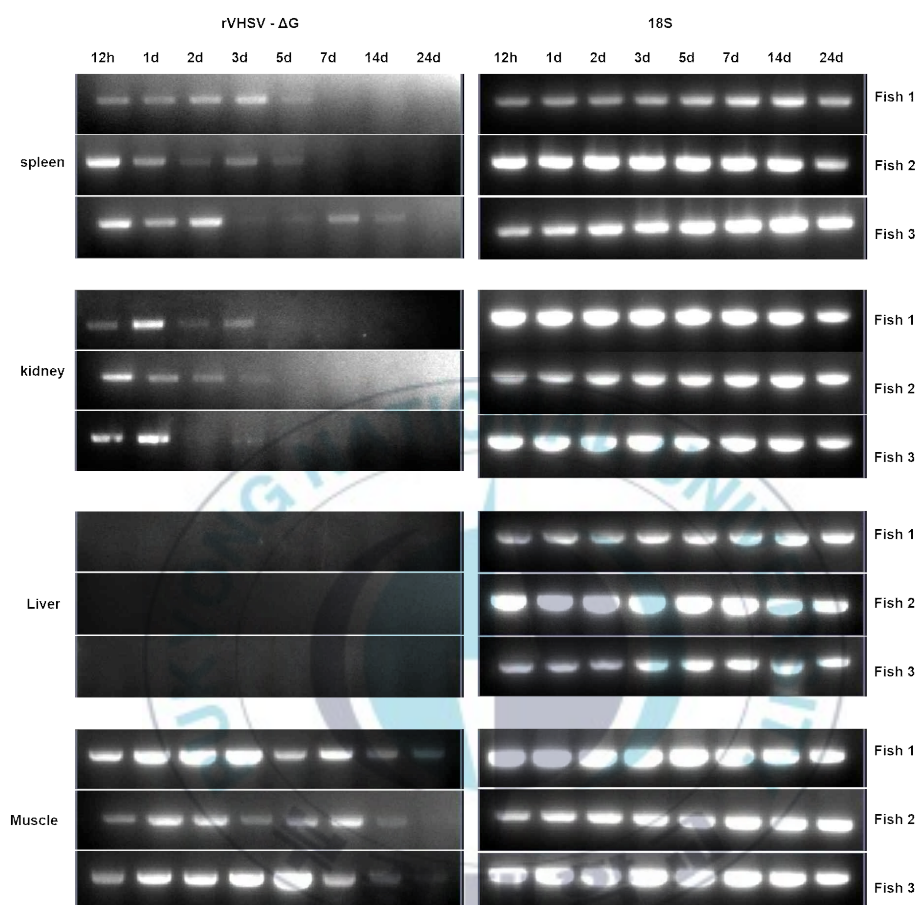


figure 11. In vivo safety confirmation of rVHSV-ΔG. Olive flounder reared at 15°C were intramuscularly infected with undiluted stock of rVHSV-ΔG. At various time points (12h, 1d, 2d, 3d, 5d, 7d, 14d, 24d) post injection, the spleen, kidney, liver, muscle were sampled from 3 fish, and analyzed the amplification of transcripts corresponding to VHSV M-NV gene and olive flounder's 18S ribosomal RNA gene by semi-quantitative RT-PCR.

2. rVHSV-P1, P2, P3

2-1. VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene을 발현하는 cell line의 제작 및 VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene expression level 비교분석

VHSV P gene의 첫 번째, 두 번째, 세 번째, 네 번째 methionine을 시작으로 하는 VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene이 발현되는 cell line을 제작하기 위하여 pcDNA3.1(+) vector와 phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene 발현 vector를 제작하였고 (fig. 12), 두 가지 vector (pCMV-VP0, VP1, VP2, VP3, pFC-CMV-VP0, VP1, VP2, VP3)를 EPC cell에 Transfection하여 VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene이 발현되는 cell line을 제작하였다.

phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 제작한 VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene을 발현시킨 cell line이 ϕ C31 integrase에 의하여 pFC-CMV-VP0, VP1, VP2, VP3의 attB site와 EPC cell의 attP site의 융합이 일어남으로써 EPC의 chromosome내로 삽입되어 졌는지 확인하기 위하여 attB gene을 포함하는 primer를 제작하여 각각 plasmid와 cell genomic DNA를 template로 하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 pFC-CMV-VP0, VP1, VP2, VP3 vector에서는 attB site가 증폭이 되지만 (약 580bp) pFC-CMV-VP0, VP1, VP2, VP3 vector를 transfection시킨

cell line에서는 attB와 attP site의 융합이 일어남에 따라 EPC 의 chromosome내로 vector가 삽입되어졌기 때문에 증폭이 되지 않음을 확인 하였다 (fig. 13).

pcDNA3.1(+) vector와 phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 제작한 cell line의 P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene expression level을 비교하기 위하여 두 가지 cell line으로부터 total RNA를 분리하여 RNase-free DNase 처리 후 P specific gene primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 또한 control로 EPC cell의 β -actin gene을 PCR로 증폭하였다. 그 결과 pcDNA3.1(+) vector를 이용한 것보다 phiC31 Integrase Vector System을 이용한 cell line에서 의 PCR밴드(VP0 약 670bp, VP1 약 650bp, VP2 약 350bp, VP3 약 300bp)가 더 진한 것으로 보아 phiC31 Integrase Vector System을 이용한 cell line에서 P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene이 더 많이 발현되고 있음을 확인하였다 (fig. 14).

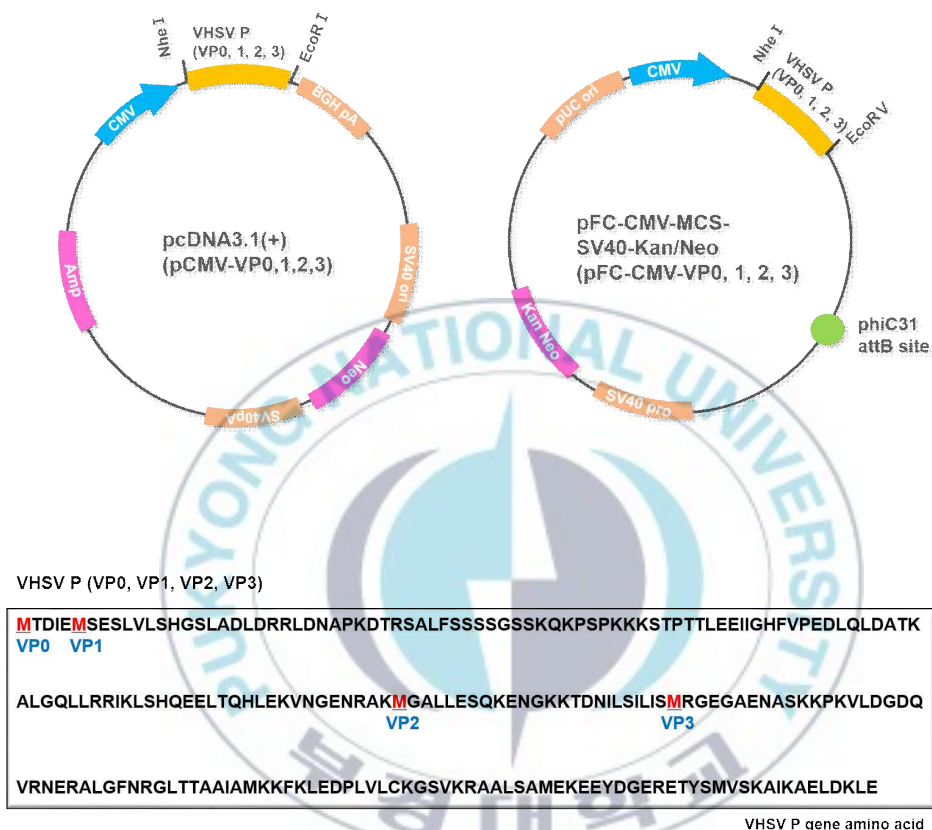


figure 12. Map of constructed plasmid pCMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3) and pFC-CMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3).

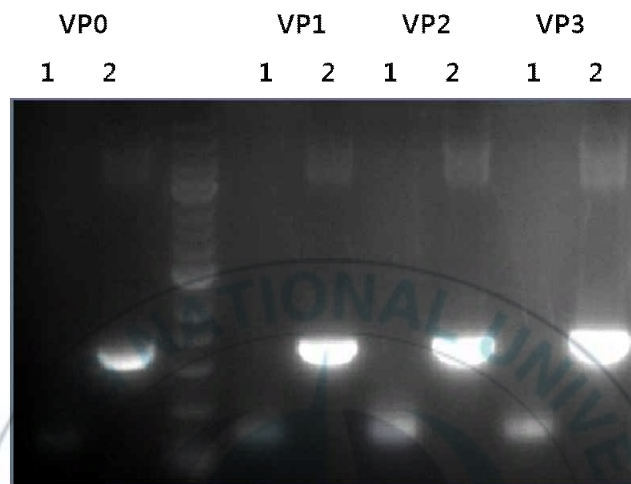


figure 13. Integration of pFC-CMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3) plasmid into EPC cell chromosome. After co-transfection of EPC cell with pFC-CMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3) and ϕ C31 integrase expression plasmid, incorporation of plasmid into cell chromosome was confirmed by PCR using attB primers after extraction of genomic DNA from cells. Line 1 : absence of amplicaion. Line 2 : attB positive control using pFC-CMV-P (VP0, VP1, VP2, VP3) plasmid (580 bp).

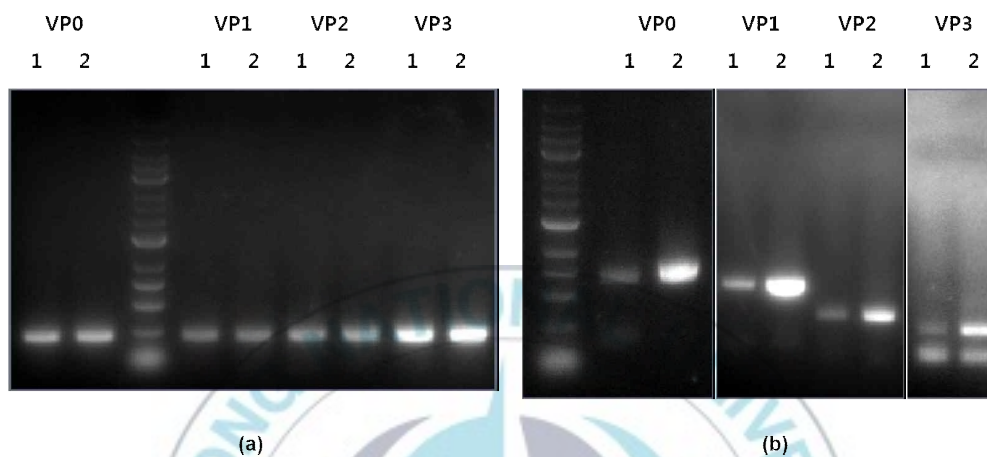


figure 14. Comparison of VHSV VP (VP0, VP1, VP2, VP3) protein expression level by RT-PCR. Each of total RNA was extracted from EPC cell line expressing VHSV VP (VP0, VP1, VP2, VP3) gene using pcDNA3.1(+) vector and phiC31 Integrase Vector System. Lane 1 : VHSV VP (VP0, VP1, VP2, VP3) protein expression using pcDNA3.1(+) vector. Lane 2 : VHSV VP (VP0, VP1, VP2, VP3) gene expression using phiC31 Integrase Vector System. (a) β -actin gene of EPC cell. (b) VHSV VP (VP0, VP1, VP2, VP3) protein expression level using phiC31 Integrase Vector System was higher than VHSV VP (VP0, VP1, VP2, VP3) protein expression level using pcDNA3.1(+) vector.

2-2. VHSV P gene이 knock-out된 재조합 VHSV (rVHSV-P1, P2, P3) 제작 및 확인

가. rVHSV-P1, P2, P3 제작

VHSV P gene이 knock-out된 재조합 VHSV (rVHSV-P1, P2, P3)를 제작하기 위하여 본 연구실에서 제작한 pVHSV-wild에 VHSV P gene의 첫 번째 methionine을 종료코돈으로 치환한 primer로 site directed mutagenesis (SDM)기법을 이용하여 첫 번째 methionine이 종료코돈으로 치환된 재조합 VHSV vector (pVHSV-P1)를 제작하였다. pVHSV-P1을 template로 하여 VHSV P gene의 두 번째 methionine을 종료코돈으로 치환한 primer로 SDM기법을 이용하여 첫 번째와 두 번째 methionine이 종료코돈으로 치환된 재조합 VHSV vector (pVHSV-P2)를 제작하였다. pVHSV-P2을 template로 하여 VHSV P gene의 세 번째 methionine을 종료코돈으로 치환한 primer로 SDM기법을 이용하여 첫 번째 두 번째와 세 번째 methionine이 종료코돈으로 치환된 재조합 VHSV vector (pVHSV-P3)를 제작하였다 (fig. 15). T7 RNAP가 발현되는 EPC cell에 pVHSV-P1, P2, P3와 VHSV N, P, L supporting plasmid를 co-transfection하여 cytopathic effect (CPE)가 나타나는 것을 관찰하였다.

나. rVHSV-P1의 생산 확인

pVHSV-P1와 pCMV-N, P, L을 T7 RNAP가 발현되는 cell에 co-transfection 하여 며칠 후 CPE가 나타나는 것을 관찰하였고 (fig. 16), VHSV P gene발현 cell에 접종하여 rVHSV-P1 (S2)을 제작하였다.

생산된 rVHSV-P1 (S2)가 감염성이 있는 바이러스인지, titer는 얼마나 되는지를 P gene이 발현되는 cell에서 plaque assay를 실시하여 plaque-forming unit (PFU)를 산출하였다. 그 결과 8×10^7 pfu/ml로 나타났다 (fig. 17).

최종적으로 만들어진 rVHSV-P1가 목적인대로 만들어졌는지 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. N에서 P (N-P, 약 1.2kb), P에서 M (P-M, 약 890bp), M에서 G (M-G, 약 1.1kb), G에서 NV (G-NV, 약 770bp), NV에서 L (NV-L, 약 770bp)의 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 PCR product로부터 여러 가지 유전자 발현을 확인하였다 (fig.18). 이로부터 최종적으로 만들어진 rVHSV-P1이 목적인대로 제작되었음을 확인하였다.

다. VHSV P gene을 발현하는 두 가지 cell line에서의 cytopathic effect (CPE)관찰 및 rVHSV-P2, P3 생산 확인

pVHSV-P2, P3와 pCMV-N, P, L을 T7 RNAP가 발현되는 cell에 co-transfection 하여 상층액 S0을 얻고 S0을 다시 pcDNA3.1(+) vector를

이용한 VHSV P gene발현 cell에 접종하여 S1을 얻었다. P gene의 발현 level이 virus titer에도 영향을 미치는지 알아보기 위하여 pcDNA3.1(+) vector와 phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 제작한 VHSV P gene발현 cell에 각각 S1을 접종하여 10일후 cytopathic effect (CPE)를 관찰하였다. 그 결과 pcDNA3.1(+) vector를 이용한 것보다 P gene의 발현 level이 높은 phiC31 Integrase Vector System을 이용한 cell에서 더 많은 CPE가 나타남을 관찰하였다 (fig. 19).

두 종류의 P gene 발현 cell에 rVHSV-P2, P3 (S1)을 접종한 후 얻은 상층액의 virus titer를 비교하기 위하여 P gene이 발현되는 cell에서 plaque assay를 실시하여 plaque-forming unit (PFU)를 산출하였다. 그 결과 rVHSV-P2는 pcDNA3.1(+) vector를 이용한 P gene발현 cell에 S1을 접종했을 때 1.1×10^3 pfu/ml로 측정되었고, phiC31 Integrase Vector System을 이용한 P gene발현 cell에 S1을 접종했을 때 더 많은 plaque이 형성되어 2.8×10^4 pfu/ml로 측정되었다. 또한 rVHSV-P3는 pcDNA3.1(+) vector를 이용한 P gene발현 cell에 S1을 접종했을 때 7.5×10^2 pfu/ml로 측정되었고, phiC31 Integrase Vector System을 이용한 P gene발현 cell에 S1을 접종했을 때 더 많은 plaque이 형성되어 2.1×10^4 pfu/ml로 측정되었다 (fig. 20). 따라서 VHSV P gene의 발현 level이 높아짐에 따라 rVHSV-P2, P3의 titer도 증가함을 알 수 있다.

rVHSV-P2, P3가 목적한대로 만들어졌는지 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. N에서 P (N-P, 약 1.2kb), P에서 M (P-M, 약 890bp), M에서 G (M-G, 약 1.1kb), G에서 NV (G-NV, 약 770bp), NV에서 L (NV-L, 약 770bp)의 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 PCR product로부터 여러

가지 유전자 발현을 확인하였다 (fig. 21). 이로부터 최종적으로 만들어진 rVHSV-P2, P3 (S2) 가 목적인대로 제작되었음을 확인하였다.



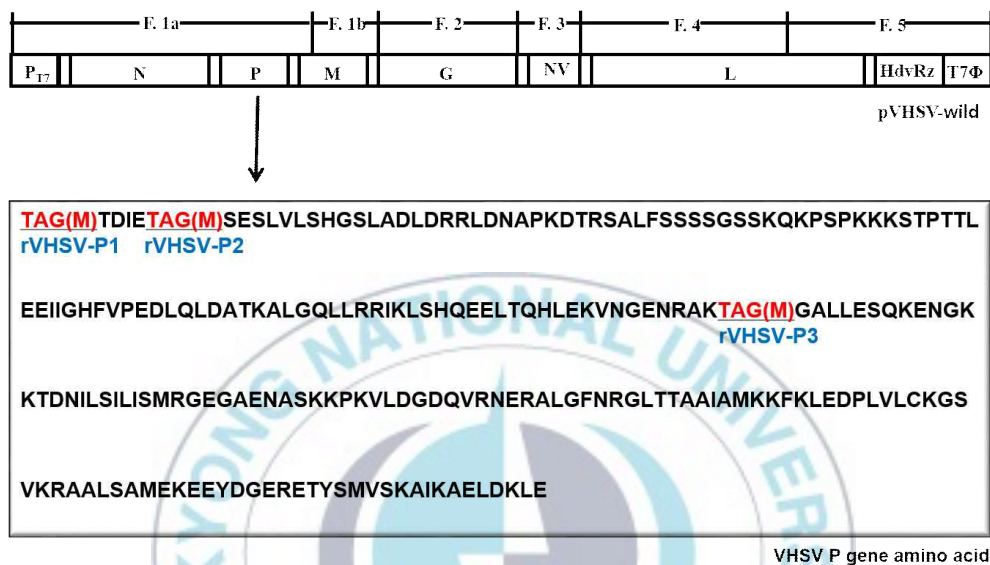


figure 15. Construction of the cDNA (pVHSV-P1, P2, P3). The pVHSV-P1 was generated by replacement of the first methionine of VHSV P gene in the pVHSV-wild with the stop codon (TAG), the pVHSV-P2 was generated by replacement of the first and second methionine of VHSV P gene in the pVHSV-P1 with the stop codon (TAG), and the pVHSV-P3 was generated by replacement of the first, second and third methionine of VHSV P gene in the pVHSV-P2 with the stop codon (TAG) using site-directed mutagenesis (SDM).

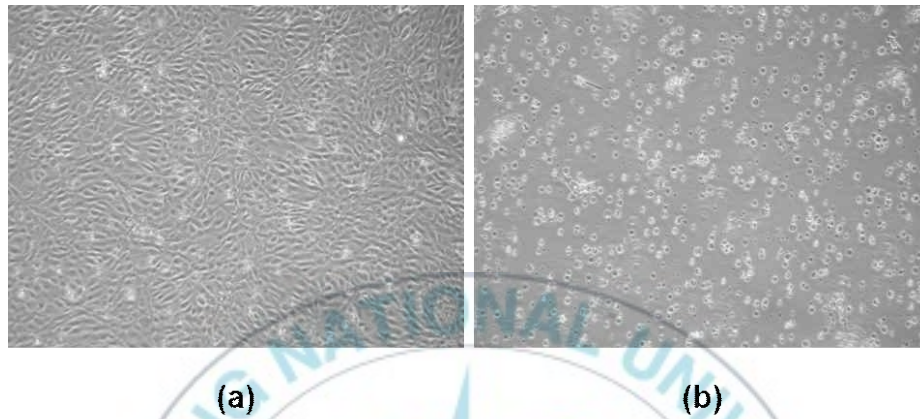


figure 16. The cytopathic effect (CPE) induced by co-transfection of EPC cell line expressing T7 RNAP with plasmid expressing the N, P, L proteins and pVHSV-P1 (b). EPC cell line expressing T7 RNAP transfected with the plasmid showed CPE, but the control cells (a) showed no CPE.



figure 17. Plaque formation in VHSV P gene expression cells infected with 10^{-6} diluted rVHSV-P1. Cells were cultured in medium containing 0.7% agarose, fixed at 7 days post-infection, and stained with crystal violet.

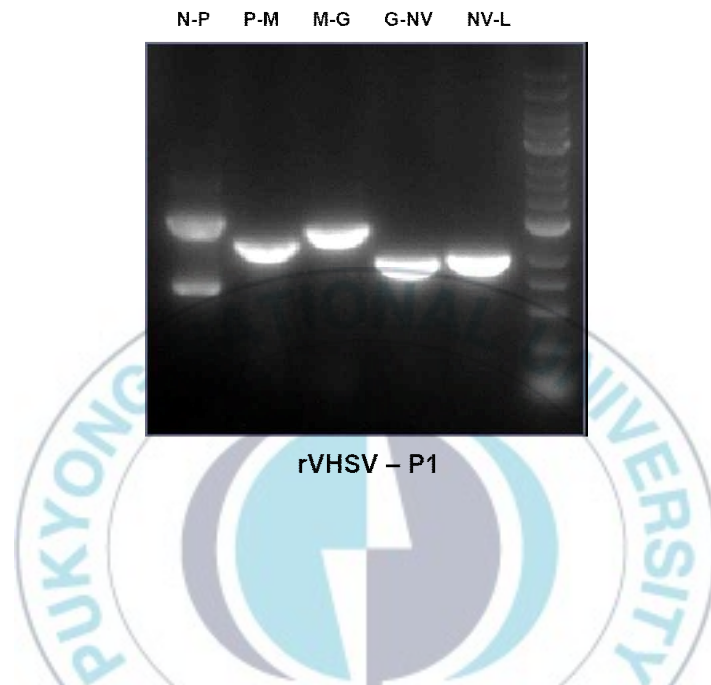


figure 18. Confirmaion of rVHSV-P1 by RT-PCR. Viral genomic RNA extracted from rVHSV-P1 was amplified by RT-PCR with specific N, P, M, G, NV, L primers. N-P (1.2kb), P-M (890bp), M-G (1.1kb), G-NV (770), NV-L (770bp) genes were amplified in the rVHSV-P1.

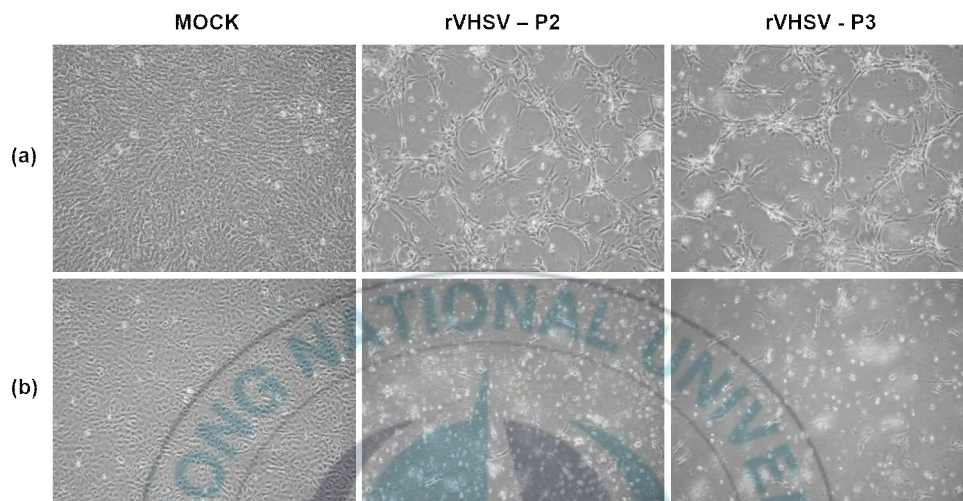


figure 19. Comparison of the cytopathic effect (CPE) induced by infection of EPC cell line expressing VHSV P gene with rVHSV-P2, P3 using pcDNA3.1(+) vector and phiC31 Integrase Vector System. After 10 days, the CPE was more evident in EPC cell line expressing VHSV P gene using phiC31 integrase vector system (b) compared with the EPC cell line expressing VHSV P gene using pcDNA3.1(+) (a). The control cells showed no CPE.

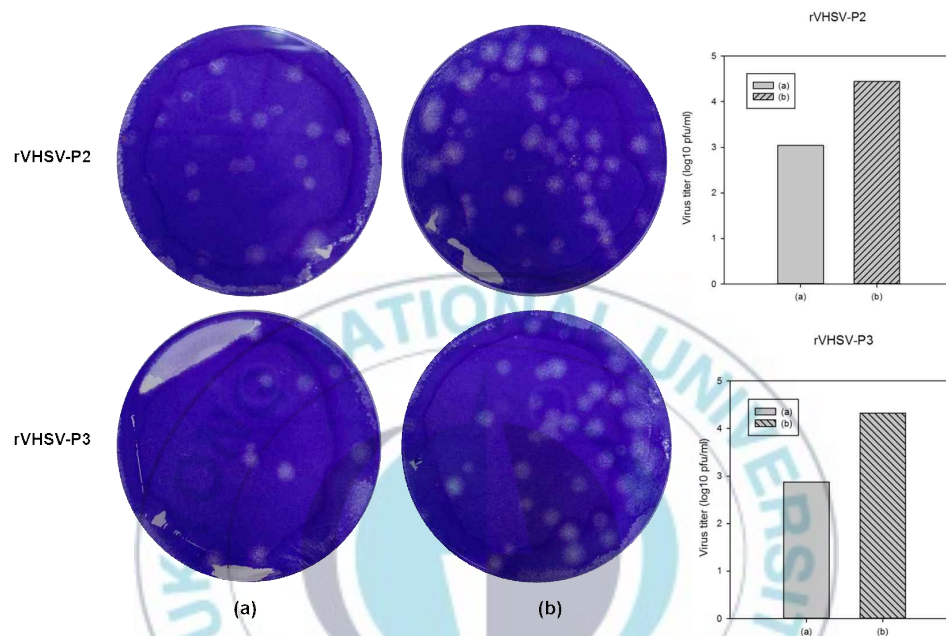


figure 20. Comparison of the virus titer measured through plaque assay by inoculation of EPC cell line expressing VHSV P gene with rVHSV-P2, P3 from different cell line. Cells were cultured in medium containing 0.7% agarose, fixed at 10 days post-infection, and stained with crystal violet. Plaque is formed with 10^{-1} rVHSV-P2, P3 diluted inoculation from EPC cell line expressing VHSV P gene using pcDNA3.1(+) vector. (b) Plaque is formed with 10^{-2} rVHSV-P2, P3 diluted inoculation from EPC cell line expressing VHSV P gene using phiC31 Integrase Vector System. The more P protein expression level showed in phiC31 Integrase Vector System, the higher virus titer was observed.

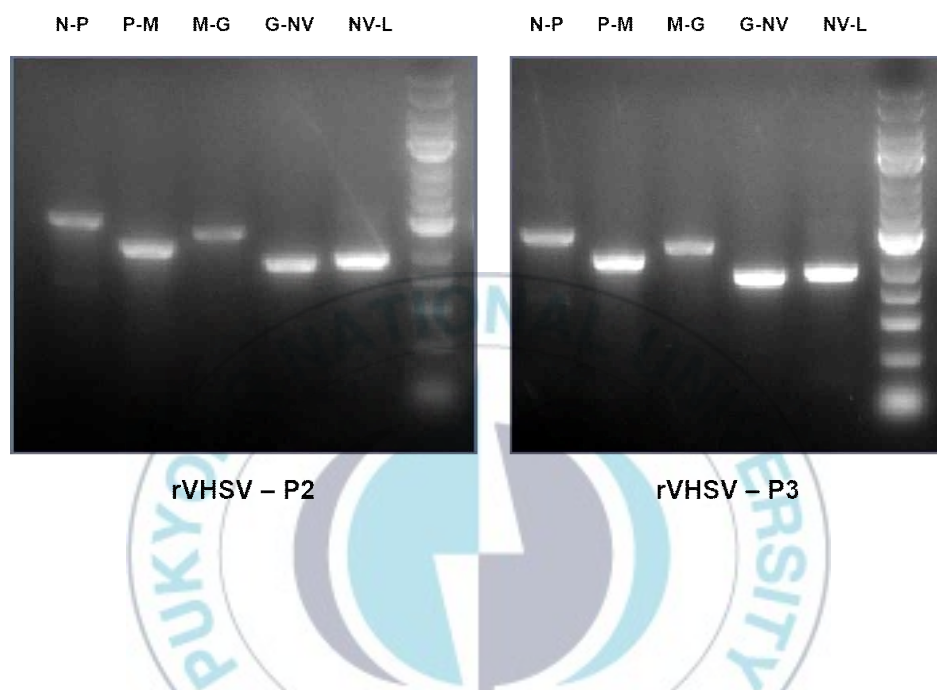


figure 21. Confirmaion of rVHSV-P2, P3 by RT-PCR. Viral genomic RNA extracted from rVHSV-P2, P3 was amplified by RT-PCR with specific N, P, M, G, NV, L primers. N-P (1.2kb), P-M (890bp), M-G (1.1kb), G-NV (770), NV-L (770bp) genes were amplified in the rVHSV-P2, P3.

2-3. VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene을 발현하는 cell line에서 rVHSV-P1, P2, P3의 감염성 확인

pcDNA3.1(+) vector와 phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 만든 VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene을 발현하는 cell line과 control인 EPC cell에 rVHSV-P1, P2, P3을 접종하여 14일 뒤 cytopathic effect (CPE)를 관찰하였다. 그 결과 rVHSV-P1은 pcDNA3.1(+) vector와 phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 만든 VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene을 발현하는 cell line과 control인 EPC cell에서 모두 cytopathic effect (CPE)를 관찰하였다. rVHSV-P2, P3은 pcDNA3.1(+) vector와 phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 만든 VHSV P (VP0) gene을 발현하는 cell line에서만 cytopathic effect (CPE)가 나타났고, pcDNA3.1(+) vector와 phiC31 Integrase Vector System을 이용하여 만든 VHSV P (VP1, VP2, VP3) gene을 발현하는 cell line과 control인 EPC cell에서는 cytopathic effect (CPE)가 나타나지 않았다 (fig. 22) 따라서 rVHSV-P2, P3은 VP1, VP2, VP3 발현 cell에서는 virus를 생산하지 못하며 P gene이 공급된 cell에 virus를 접종한 경우에만 감염성을 가지는 virus가 생산되어짐을 확인하였다.. 반면 rVHSV-P1은 P gene의 공급 없이도 감염성을 가지는 virus가 형성됨을 확인하였다.

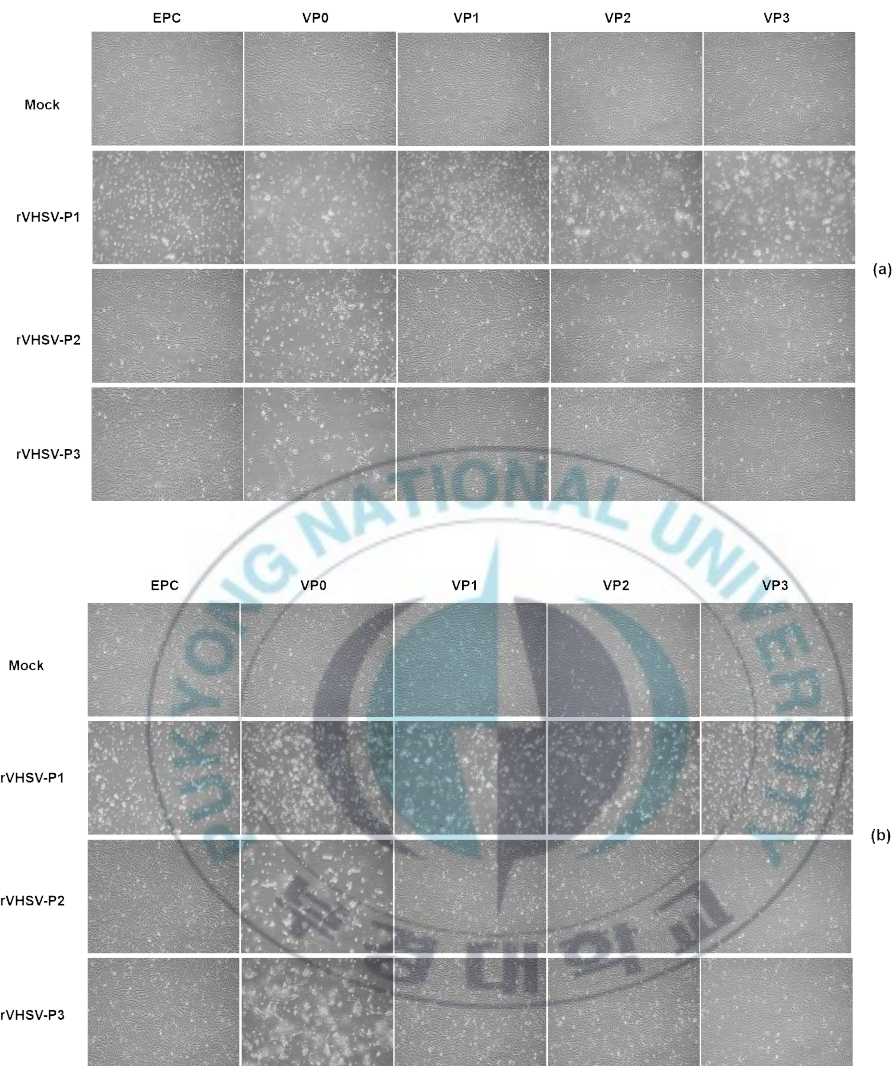


figure 22. Verification of rVHSV-P1, P2, P3 infectivity in EPC cell line expressing VHSV P (VP0, VP1, VP2, VP3) gene using pcDNA3.1(+) vector (a) and phiC31 Integrase Vector System (b). The CPE was observed in any cell line inoculated with rVHSV-P1, and in EPC cell line expressing VHSV P gene inoculated with rVHSV-P2, P3. The rVHSV-P2, P3 were not generated from cells expressing truncated P protein (VP1, 2, 3), suggesting intact P protein is needed for infective viruses production. However, we isolated rVHSV-P1 that could produce infective viruses without P protein supply.

2-4. rVHSV-P1, P2, P3의 nucleotide sequence 확인

rVHSV-P1, P2, P3가 원하는 위치의 methionine이 종료코돈 (TAG)으로 바뀌었는지 알기 위하여 rVHSV-P1, P2, P3의 stock으로부터 N gene에서 P gene의 primer로 RT-PCR을 수행하고 PCR product를 pGEM T-easy vector에 cloning하여 nucleotide sequence 분석을 통하여 확인하였다. 그 결과 rVHSV-P1는 원래 목적인 대로라면 P gene의 첫 번째 시작코돈인 methionine이 종료코돈으로 바뀌어 있어야 하지만, P gene의 첫 번째 시작코돈인 methionine이 종료코돈으로 바뀔과 동시에 두 번째 ATG codon의 4개 nucleotide앞에서 mutation이 일어나(T→G) isoleucine이 methionine으로 바뀌어 있음을 확인하였다. rVHSV-P2는 목적인대로 P gene의 첫 번째와 두 번째 methionine이 종료코돈으로 바뀌었고, rVHSV-P3도 목적인대로 P gene의 첫 번째와 두 번째 그리고 세 번째 methionine이 종료코돈으로 바뀔을 확인하였다 (fig. 23).

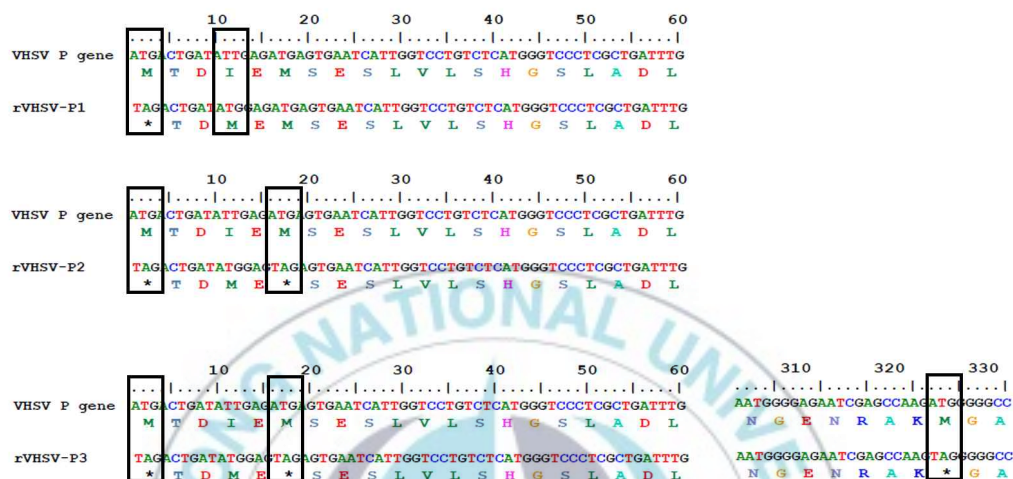


figure 23. Confirmation of nucleotide sequence of the pVHSV-P1, P2, P3. The first methionine of P gene was replaced with the stop codon (TAG) in rVHSV-P1, but there was mutation of nucleotide 4 base before the second ATG codon (T→G), which changed isoleucine into methionine without frame shift, suggesting that strong selection pressure might exert on the mutation occurrences in the VHSV genome. In rVHSV-P2, the first and second methionine of p gene was replaced with the stop codon (TAG). In rVHSV-P3, the first, second and third methionine of p gene was replaced with the stop codon (TAG).

IV. 고 찰

Virus의 envelope protein인 G gene은 virus의 표면에 노출되어있어 cell membrane에 바이러스의 부착과 cell안으로 들어가는 역할을 하고 (Lecocq-Xhonneux et al., 1994; Estepa et al., 1999), P gene은 virus의 transcription과 replication에 중점적인 역할을 한다 (Emerson and Yu, 1975; Pattnaik and Wertz, 1990). 따라서 본 연구에서는 reverse genetics 기술을 이용하여 VHSV genome내의 G gene과 P gene을 knock-out시킴으로써 안전성을 갖춘 재조합 VHSV (rVHSV-ΔG, rVHSV-P1, P2, P3)를 생산하였다. VHSV genome내의 NV 유전자 대신에 EGFP (enhanced green fluorescent protein) 유전자를 포함하고 있는 재조합 VHSV (rVHSV-ΔNV-EGFP)를 제작하였고 넓치에 면역화 실험을 수행함으로써 높은 방어력을 유도하여 생약독화백신으로서의 가능성을 검증한 바 있으며 (Kim et al., 2011; Kim and kim, 2011), 또한 어류에서 reverse genetics system을 이용하여 재조합 SHRV (Johnson et al., 2000, Alonso et al., 2004), IHNV, VHSV (Biacchesi et al., 2000, 2002, 2010; Romero et al., 2005; Ammayappan et al., 2010a, 2010b)를 제작하고 이를 백신으로 사용하기 위한 연구 논문들이 발표되었다.

본 연구에서는 pcDNA3.1(+) plasmid를 이용하여 VHSV G gene과 P gene이 발현되는 cell line에 rVHSV-ΔG와 rVHSV-P2, P3 의 virus passage를 수행하였으나 plaque assay를 통하여 virus titer를 측정한 결과 매우 낮은 titer가 측정되었다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 phiC31 integrase vector system을 이용하여 EPC cell의 chromosome내 VHSV G

gene과 P gene을 발현하는 cell line을 제작하였고 RT-PCR를 통해 확인하여본 결과 phiC31 Integrase Vector System을 이용한 cell line에서 G gene과 P gene의 발현 level이 더 높았고 virus titer도 마찬가지로 증가함을 확인하였다. phiC31 Integrase Vector System을 사용하여 cell에서 VHSV G gene과 P gene의 transcription level이 높아짐에 따라 titer를 증가시킴으로써 추후 vaccine으로서의 극대화된 효과를 기대하고자 한다.

Rhabdovirus인 rabies virus (RV)에서 G gene 이 없는 재조합 RV는 G gene의 공급 없이도 virus particle이 형성되긴 하지만, G gene을 공급하여 줄 경우 budding efficiency가 약 30배 증가한다는 연구 결과가 있다 (mebatsion et al., 1996; Finke and Conzelmann, 2005). 본 연구에서는 rVHSV-ΔG를 EPC cell과 G gene이 발현되는 cell에 2시간동안 접종한 후 배지를 제거하고 washing하여 다시 새 배지를 넣어준 후 일주일동안 배양하여 모은 상층액으로 plaque assay와 real-time PCR을 수행하였다. rVHSV-ΔG를 G gene이 공급되는 cell에 접종한 후 plaque assay를 수행하였을 때 G gene이 공급된 cell에서는 plaque이 형성되었으나 EPC cell에는 plaque이 형성되지 않았고 마찬가지로 rVHSV-ΔG를 EPC cell에 접종한 후 plaque assay를 수행하였을 때 EPC cell에는 plaque이 형성되지 않았다. 반면 real-time PCR에서는 rVHSV-ΔG를 G gene이 발현되는 cell과 EPC cell에 접종했을 때 그 titer는 큰 차이가 없었는데 이 결과를 통하여 rVHSV-ΔG는 G gene의 공급 없이 virus의 particle이 형성되긴 하지만 감염성을 가지고 있지 않음을 확인하였다. 또한 rVHSV-ΔG를 G gene이 공급되는 cell에 접종한 후 real-time PCR과 plaque assay로 그 titer를 비교하였을 때 real-time PCR의 titer가 plaque assay의 titer보다 높게 측정되었다. 따라서 G gene이 공급됨으로써 감염성을 가지는 virus particle은 plaque assay로 그 titer가 측정되었고, real-time PCR에서 G gene이 없어

감염성이 없는 virus도 함께 그 titer가 측정됨으로써 plaque assay보다 높은 virus titer를 나타낸 것이라 생각되어진다. 따라서 VHSV도 RV와 마찬가지로 G gene의 공급 없이 virus particle이 형성되긴 하지만 G gene이 공급되지 않음으로 인하여 감염성은 가지고 있지 않다고 생각되어진다.

In vivo 상에서의 rVHSV-ΔG replication 확인에서는 신장과 비장에서는 시간이 지남에 따라 virus가 줄어들었지만, 근육에는 24일째에도 바이러스가 검출됨을 확인하였다. 그 이유는 plaque assay로 titer를 측정한 후 titer가 높지 않아서 virus를 회석하지 않고 원액을 사용하여 in vivo replication test를 수행하였는데 추후 real-time PCR로 확인하여 보니 plaque assay의 결과보다 높은 virus titer가 측정되었고 마찬가지로 넙치에도 많은 양의 virus가 들어가 근육에 잔류한 것이라 생각되어진다.

RNA virus의 polymerase는 proofreading 기능을 가지고 있지 않으며, 유전적 변화를 가지는 새로운 virus를 계속적으로 생산해낸다 (Santiago et al., 2005). 그러므로, RNA virus는 생존을 위하여 nucleotide sequence에 매우 높은 비율로 mutation을 일으킨다 (Holland et al., 1982; Domingo and Holland, 1997; King et al., 2000). rVHSV-P2, P3는 P gene이 감염성을 가진 virus를 생산하기 위하여 P protein의 공급이 필요함을 확인하였다. 하지만 rVHSV-P1의 경우 P protein의 공급 없이도 virus가 생산되었는데 이는 rVHSV-P1의 nucleotide sequence를 분석하여본 결과 P gene의 두 번째 ATG codon으로부터 4개 nucleotide 앞에서 mutation이 일어나(T→G) isoleucine이 methionine으로 바뀔을 확인하였다. 이로 인하여 네 번째 amino acid가 시작코돈이 되어 P protein의 공급 없이도 감염성을 가진 virus가 생산되었으리라 생각되어진다. Rhabdovirus의 P gene은 N-terminal domain, central domain, C-terminal domain으로 나뉘어져 있으며, N-terminal domain의 phosphorylation은 virus의 transcription과 성

장에 필수적인 역할을 한다 (Das and Pattnaik, 2004; Longyun et al., 2013). 이를 좀 더 분석하기 위하여 실험결과에는 나타나지 않았지만 재현성 실험을 수행하였다. pVHSV-P1를 transfection을 한 후 이 상층액 (S0)을 VHSV P gene이 발현되는 cell에서 passage를 수행하고 그 상층액 (S1)을 P gene이 발현되는 cell과 EPC cell에 접종한 결과 두 cell에서 모두 CPE가 나타남을 확인하였다 (S2). 상층액 S1과 S2의 nucleotide sequence 분석을 실시한 결과 S1에서는 10개중 약 5개정도만 네 번째 amino acid가 시작코돈으로 바뀌어 있음을 확인하였으며 S2에서는 전부다 네 번째 amino acid가 시작코돈으로 mutation됨을 확인하였다. 이 결과로 미루어 보았을 때 cell에 연속적으로 passage를 수행함에 따라 네 번째 amino acid가 시작코돈으로 바뀌어 있는 강력한 virus가 선택적으로 증식되는 것으로 생각되어진다. 또한 rVHSV-P1의 plaque assay 분석 결과 다른 재조합 virus보다 높은 titer가 측정되었는데 이도 마찬가지로 mutation이 일어남에 따라 wild-type VHSV와 비슷한 titer로 측정되었으리라 생각된다.

결론적으로 제작한 재조합 VHSV는 cell에 한번 감염된 후 G protein과 P protein이 공급되지 않기 때문에 다른 cell에 감염되지 못하여 감염성을 가진 virus를 생산해 내지 못하며 이로 인하여 virus의 replication이 불가능해짐에 따라 vaccine으로서의 안전성을 갖추었다. 따라서 본 연구를 통하여 생약독화 백신으로서의 가능성을 보는 연구에 바탕이 되고자 한다.

V. 요약

Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)는 우리나라를 비롯한 세계적으로 담수 및 해수어류에 대량폐사를 일으키는 주요 원인으로 양식 산업에 막대한 피해를 일으킨다. Virus의 envelope protein인 G gene은 virus의 표면에 노출되어있어 cell membrane에 바이러스의 부착과 cell안으로 들어가는 역할을 하고, P gene은 virus의 transcription과 replication에 중점적인 역할을 한다. 따라서 본 연구에서는 역유전학기술 (reverse genetics system)을 이용하여 VHSV genome내의 structural protein인 G gene과 P gene을 knock-out시킨 재조합 VHSV를 생산하고 그 특성을 알아보고자 하였다.

본 연구에서는 VHSV G gene을 knock-out시킨 재조합 VHSV vector (pVHSV-ΔG)와, VHSV P gene의 ORF에 시작코돈을 포함한 7개의 methionine중 첫 번째, 두 번째 그리고 세 번째 methionine codon을 site-directed mutagenesis (SDM)기법으로 종료코돈으로 바꾸어 P gene을 knock-down시킨 재조합 VHSV vector (pVHSV-P1, P2, P3)를 제작하였다. T7 RNAP가 발현되는 EPC cell에 pVHSV-ΔG, pVHSV-P1, P2, P3와 VHSV N, P, G, L supporting plasmid를 co-transfection함으로써 VHSV G gene과 P gene이 knock-out된 재조합 VHSV (rVHSV-ΔG, rVHSV-P1, P2, P3)를 제작하였다. pcDNA3.1 plasmid를 이용하여 VHSV G gene과 P gene이 발현되는 cell line에 rVHSV-ΔG와 rVHSV-P1, P2, P3의 virus passage를 수행하였으나 plaque assay를 통하여 virus titer를 측정한 결과 매우 낮은 titer가 측정되었다. 이러한 문제를 해결하기 위하

여 phiC31 integrase vector system을 이용하여 EPC cell의 chromosome내 VHSV G gene과 P gene을 발현하는 cell line을 제작하였고 RT-PCR를 통해 확인하여본 결과 phiC31 integrase system을 이용한 cell line에서 G gene과 P gene의 발현 level이 더 높았고 virus titer도 마찬가지로 증가함을 확인하였다. 따라서 phiC31 Integrase Vector System을 사용하여 cell에서 VHSV G gene과 P gene의 transcription level이 높아짐에 따라 titer도 함께 증가함을 확인하였다. 또한 in vitro와 in vivo 실험을 통하여 G와 P protein의 공급 없이는 감염성을 가진 virus particle이 생산되지 않음을 확인하였다.

rVHSV-P2, P3는 VP1, 2, 3 protein을 발현시킨 cell에서는 CPE가 나타나지 않았지만 VP0 protein을 발현시킨 cell에서만 CPE가 나타난 것으로 보아 P gene이 감염성을 가진 virus를 생산하기 위하여 P protein의 공급이 필요함을 확인하였다. 하지만 rVHSV-P1의 경우 P protein의 공급 없이도 virus가 생산되었는데 이는 rVHSV-P1의 nucleotide sequence를 분석하여본 결과 P gene의 두 번째 ATG codon으로부터 4개 nucleotide 앞에서 mutation이 일어나 (T→G) isoleucine이 methionine으로 바뀔을 확인하였다. 이로 인하여 네 번째 amino acid가 시작코돈이 되어 P protein의 공급 없이도 감염성을 가진 virus가 생산되었으리라 생각되어 지고, 결국 mutation이 일어난 강력한 virus가 선택적으로 증식됨을 확인하였다.

결론적으로 제작한 재조합 VHSV는 cell에 한번 감염된 후 G protein과 P protein이 공급되지 않기 때문에 감염성을 가진 virus를 생산해 내지 못하며 이로 인하여 virus의 replication이 불가능해짐에 따라 vaccine으로서의 안전성을 갖추었다. 따라서 본 연구를 통하여 생약독화 백신으로서의 가능성을 보는 연구에 바탕이 되고자 한다.

VI. 감사의 글

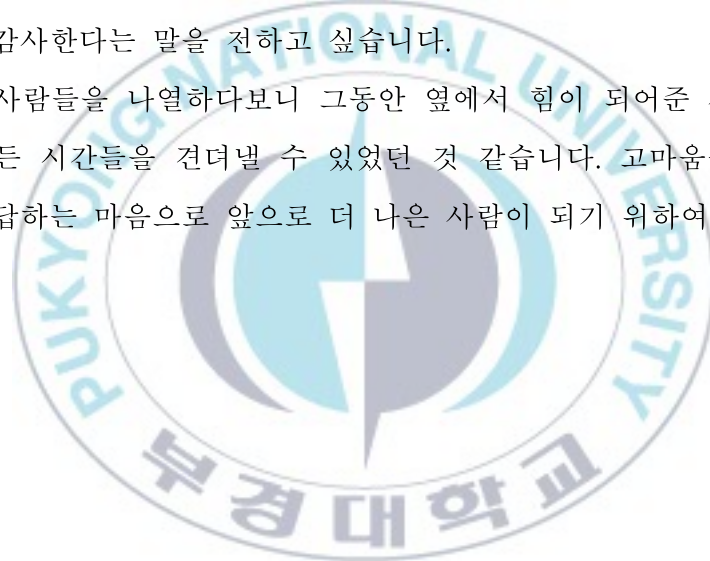
석사학위논문을 마무리하기 까지 제게 격려와 응원을 해주신 분들께 이 지면을 빌어 감사의 말씀을 전하고자 합니다. 먼저 힘들 때마다 자식을 바라보는 눈으로 제게 가장 큰 힘을 주신 김기홍 교수님께 감사의 말씀 올립니다. 교수님의 관심으로 그동안 분자질병공학 실험실에서 많은 것들을 배우고 어려운 상황을 극복하며 성장해 나갈 수 있었습니다. 또한 바쁘신 와중에도 논문을 지도하고 검토하여 주신 김도형 교수님과 정현도 교수님께도 감사드리며, 박수일 교수님과 허민도 교수님, 정준기 교수님, 강주찬 교수님께도 감사드립니다.

4년 동안 같은 공간에서 실험실 생활을 하며 즐거운 일과 힘든 일을 함께 격은 실험실원들에게도 감사의 마음을 전합니다. 먼저 학부생시절부터 실험을 가르쳐 주시고 한국에 계실 때나 미국에 계실 때나 변함없이 저의 질문에 항상 웃으며 대답해주신 민선언니와 힘들어 보일 때면 맛있는 밥과 커피를 사주시며 제 얘기를 들어주시던 예재오빠 그리고 무언가 막혀 질문을 할 때면 해결책을 주시고 고기와 술로 위로를 해주시던 승혁오빠에게 감사드립니다. 지친 마음으로 학과사무실에 찾아갈 때면 웃음으로 반겨주신 선영언니와 간식거리를 챙겨주시며 위로의 말씀을 잊지 않으셨던 성미언니, 브런치를 함께하며 언제나 저의 수다를 즐겁게 들어준 우리언니, 자주보진 못하지만 연락하면 언제라도 치킨과 맥주를 사주시며 이야기를 들어주시는 병철오빠에게도 감사드립니다. 함께 울고 웃으며 힘들 때나 기쁠 때나 항상 함께하며 서로에게 가장 큰 버팀목이 되어준 대학원 동기 수진이와 지애 그리고 매일 티격태격하지만 말하지 않아도 마음을 알 것 같은

소중한 준성에게도 평소 하지 못했던 고맙다는 말을 전합니다. 실험실 생활을 함께 오래하진 못했지만 영어를 가르쳐 주며 큰 도움을 주었던 나 집과 배를 타고 한국에 올 때면 연락을 잊지 않으시던 경수오빠, 장난기 가득한 얼굴로 웃음을 주던 외강내유 소리에게도 고맙다는 말을 전합니다.

오랜 시간동안 곁에서 함께해준 대한오빠, 밖에서나 언제나 얘기를 잘 들어주던 소중한 인연인 지희, 멀리 있지만 보고싶은 베프 희경이, 15년 동안 옆에 있어 준 봉구에게 옆에 있는 것만으로 큰 힘이 되어주어 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 마지막으로 저를 믿어주시는 부모님과 가족들에게 사랑하고 감사한다는 말을 전하고 싶습니다.

고마운 사람들을 나열하다보니 그동안 옆에서 힘이 되어준 사람들이 있었기에 힘든 시간들을 견뎌낼 수 있었던 것 같습니다. 고마움을 기억하고 은혜에 보답하는 마음으로 앞으로 더 나은 사람이 되기 위하여 노력하겠습니다.



VII. 참고문헌

- A. Martinez-Lopez, P. Encinas, P. García-Valtanen, E. Gomez-Casado, J. M. Coll, A. Estepa., (2013). Improving the safety of viral DNA vaccines: development of vectors containing both 5' and 3' homologous regulatory sequences from non-viral origin. *Microbiol Biotechnol.*, 97, 3007 - 3016.
- Adelmann M, Köllner B, Bergmann SM, Fischer U, Lange B, Weitschies W, et al., (2008). Development of an oral vaccine for immunisation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against viral haemorrhagic septicaemia. *Vaccine.*, 26, 837-44.
- Alonso M, Kim CH, Johnson MC, Pressley M, Leong JC., (2004). The NV gene of snakehead rhabdovirus (SHRV) is not required for pathogenesis, and a heterologous glycoprotein can be incorporated into the SHRV envelope. *J Virol.*, 78, 5875-5882.
- Ammayappan A, Kurath G, Thompson TM, Vakharia VN., (2010b). A reverse genetics system for the Great Lakes strain of viral hemorrhagic septicemia virus: the NV gene is required for pathogenicity. *Mar Biotechnol.*, 13(4), 672-683.

Ammayappan A, LaPatra SE, Vakharia VN., (2010a). A vaccinia virus-free reverse genetics system for infectious hematopoietic necrosis virus. *J Virol Methods.*, 167, 132–139.

Bearzotti M, Monnier AF, Vende P, Grosclaude J, Kinkelin P, Benmansour A., (1995). The glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV): antigenicity and role in virulence. *Veterinary Research.*, 26, 413–22.

Bearzotti M, Monnier A. F., Vende P., Grosclaude J., de Kinkelin P., Benmansour, A., (1995). Antigenicity and role in pathogenicity of the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV), a fish rhabdovirus. *Veterinary Research.*, 26, 413±422.

Biacchesi S, Béarzotti M, Bouguyon E, Brémont M., (2002). Heterologous exchanges of the glycoprotein and the matrix protein in a Novirhabdovirus. *J Virol.*, 76, 2881–2889.

Biacchesi S, Lamoureux A, Merour E, Bernard J, BrémontM., (2010). Limited interference at the early stage of infection between two recombinant novirhabdoviruses: viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus. *J Virol.*, 84, 10038 - 10050.

Biacchesi S, Thoulouze MI, Bearzotti M, Yu YX, Brémont M., (2000). Recovery of NV knockout infectious hematopoietic necrosis virus expressing foreign genes. *J Virol.*, 74, 11247–11253.

Byon JY, Ohira T, Hirono I, Aoki T., (2005). Use of a cDNA microarray to study immunity against viral hemorrhagic septicemia (VHS) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.*, 18, 135–47.

Byon JY, Ohira T, Hirono I, Aoki T., (2006). Comparative immune responses in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* after vaccination with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) recombinant glycoprotein and DNA vaccine using a microarray analysis. *Vaccine.*, 24, 921–30.

Calos, M., (2005). phiC31 integrase system for gene therapy. *CurrGene Ther.*, 6(6), 633–45.

Canter, D. M., J. Perrault., (1996). Stabilization of vesicular stomatitis virus L polymerase protein by P protein binding: a small deletion in the C-terminal domain of L abrogates binding. *Virology.*, 219, 376 - 386.

Chico V, Ortega-Villaizan M, Falco A, Tafalla C, Perez L, Coll J, et al., (2009). The immunogenicity of viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV) DNA vaccines can depend on plasmid regulatory sequences. *Vaccine.*, 27, 1948–58.

Das SC, Pattnaik AK., (2004). Phosphorylation of vesicular stomatitis virus phosphoprotein P is indispensable for virus growth. *J. Virol.*, 78, 6420 - 6430.

Davis, N. L., H. Arnheiter, G. W. Wertz., (1986). Vesicular stomatitis virus N and NS proteins form multiple complexes. *J. Virol.*, 59, 751 - 754.

de Kinkelin P, Bearzotti-Le Berre M., (1981). Immunization of rainbow trout against viral haemorrhagic septicaemia (VHS) with a thermoresistant variant of the virus. *Dev Biol Stand.*, 49, 431-9.

E. Domingo and J. J. Holland., (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Microbiol.*, 51, 151 - 78.

Emerson, S. U., and Yu, Y., (1975). Both NS and L proteins are required for in vitro RNA synthesis by vesicular stomatitis virus, *J. Virol.*, 15, 1348-1356.

Emerson, S. U., M. Schubert., (1987). Location of the binding domains for the RNA polymerase L and the ribonucleocapsid template within different halves of the NS phosphoprotein of vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 5655 - 5659.

Estepa A, Fernandez-Alonso M, Coll JM., (1999). Structure, binding and neutralization of VHSV with synthetic peptides. *Virus Res.*, 63, 27–34.

Evensen Ø, Brudeseth B, Mutoloki., (2005). The vaccine formulation and its role in inflammatory processes in fish effects and adverse effects. *Developmental Biology.*, 121, 117-25.

Heppell J, Lorenzen N, Armstrong MK, Wu T, Lorenzen E, Einer-Jensen K, et al., (1998). Development of DNA vaccines for fish: vector design, intra muscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicaemia virus genes as model. *Fish Shellfish Immunol.*, 8, 271-86.

Holland, J., K. Spindler, F. Horodyski, E. Grabau, S. Nichol, and S. Vande Pol., (1982). Rapid evolution of RNA genomes. *Science.*, 215, 1577-1585.

Huang C, Chien M, Landolt M, Winton J., (1994). Characterization of the infectious haematopoietic necrosis virus glycoprotein using neutralizing monoclonal antibodies. *Diseases of Aquatic Organisms.*, 18, 29-35.

I. King Jordan, Ben A. Sutter IV, and Marcella A. McClure., (2000). Molecular Evolution of the Paramyxoviridae and Rhabdoviridae Multiple Protein-Encoding P Gene. *Mol. Biol. Evol.*, 17(1), 75 - 86.

Isaac, C. L., and J. D. Keene., (1982). RNA polymerase associated interactions near template promoter sequences of defective interfering particles of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.*, 43, 241 - 249.

Isshiki T, Nagano T, Miyazaki T., (2003). Susceptibility of various marine fish species to viral hemorrhagic septicemia virus isolated from Japanese flounder. *Fish Pathol.*, 38, 113–115.

Isshiki T., Nishizawa T., Kobayashi T., Nagano T., and Miyazaki T., (2001). An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis. Aquat. Org.*, 47, 87-99.

Johnson MC, Simon BE, Kim CH, Leong JC., (2000). Production of recombinant snakehead rhabdovirus: the NV protein is not required for viral replication. *J Virol.*, 74, 2343–2350.

Keene, J. D., B. J. Thornton, S. U. Emerson., (1981). Sequence-specific contacts between the RNA polymerase of vesicular stomatitis virus and the leader RNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78, 6191 - 6195.

Kim M.S., and Kim K.H., (2011). Protection of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) by immunization with NV gene knockout recombinant VHSV. *Aquaculture.*, 314, 39-43.

Kim SM, Lee JI, Hong MJ, Park HS, Park SI., (2003). Genetic relationship of the VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. J Fish Pathol., 16, 1-12.

Kim WS, Kim SR, Kim D, Kim JO and others., (2009). An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. Aquaculture., 296, 165-168.

Lecocq-Xhonneux F, Thiry M, Dheur I, Rossius M, Vanderheijden N, Martial J, et al., (1994). A recombinant viral haemorrhagic septicaemia virus glycoprotein expressed in insect cells induces protective immunity in rainbow trout. J Gen Virol., 75, 1579-87.

Lecocq-Xhonneux, F., Thiry, M., Dheur, I., Rossius, M., Vanderheijden, N., Martial, J. & de Kinkelin, P., (1994). A recombinant viral haemorrhagic septicaemia virus glycoprotein expressed in insect cells induces protective immunity in rainbow trout. Journal of General Virology., 75, 1579-1587.

Lenoir G., de Kinkelin P., (1975). Fish rhabdoviruses: comparative study of protein structure. J Virol., 16, 259-262.

Longyun Chen, Shengwei Zhang, Amiya K. Banerjee, Mingzhou Chen., (2013). N-Terminal Phosphorylation of Phosphoprotein of Vesicular Stomatitis Virus Is Required for Preventing Nucleoprotein from Binding to Cellular RNAs and for Functional Template Formation J. Viro., 87(6), 3177.

Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, Heppell J, Wu T, Davis HL., (1998). Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination. Fish Shellfish Immunol., 8, 261-70.

Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, Heppell K, Davies HL., (1999). Genetic vaccination of rainbow trout against viral haemorrhagic septicaemia virus: small amounts of plasmid DNA protect against a heterologous serotype. Virus Res., 63, 19-25.

Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, LaPatra SE., (2002). DNA vaccines as a tool for analysing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout. Fish Shellfish Immunol., 12, 439-53.

Lorenzen N, Olesen NJ, Jorgensen PEV, Etzerodt M, Holtet TL, Thogersen HC., (1993). Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the glycoprotein gene of VHS virus, and immunization of rainbow trout with the recombinant protein. J Gen Virol., 74, 623-30.

Lorenzen N, Olesen NJ, Jørgensen PEV., (1990). Neutralization of Egtved virus pathogenicity to cell cultures and fish by monoclonal antibodies to the viral G protein. *Journal of General Virology.*, 71, 561-7.

Masters, P. S., A. K. Banerjee., (1988). Resolution of multiple complexes of phosphoprotein NS with nucleocapsid protein N of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.*, 62, 2651 - 2657.

Mebatsion T, König M, Conzelmann KK., (1996a). Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. *Cell.*, 84, 941 - 951.

Midtlyng PJ, Reitan LJ, Lillehaug A, Ramstad A., (1996). Protection, immune responses and side effects in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vaccinated against furunculosis by different procedures. *Fish and Shellfish Immunology.*, 6, 599-613.

Min Sun Kim, Dong Soo Kim, Ki Hong Kim., (2011). Generation and characterization of NV gene-knockout recombinant viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) genotype IVa. *Diseases of aquatic organisms.*, 97, 25 - 35.

Mortensen HF, Heuer OE, Lorenzen N, Otte L, Olesen NJ., (1999). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild

marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea. *Virus Res.*, 63, 95–106.

Mutoloki S, Alexandersen S, Evensen Ø., (2004). Sequential study of antigen persistence and concomitant inflammatory reactions relative to side effects and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following intraperitoneal injection with oil adjuvanted vaccines. *Fish and Shellfish Immunology.*, 16, 633–44.

Pattnaik, A. K., and Wertz, G. W., (1990). Replication and amplification of defective interfering particle RNAs of vesicular stomatitis virus in cells expressing viral proteins from vectors containing cloned cDNAs, *J. Virol.*, 64, 2948–2957.

Peluso, R. W., (1988). Kinetic, quantitative, and functional analysis of multiple forms of the vesicular stomatitis virus nucleocapsid protein in infected cells. *J. Virol.*, 62, 2799 - 2807.

Prehaud, C., Coulon, P., Lafay, F., Thiers, C. & Flamand, A., (1988). Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence. *Journal of Virology.*, 62, 1±7.

Romero A, Figueras A, Tafalla C, ThoulouzeMI, Bremont M, Novoa B., (2005). Histological, serological and virulence studies on rainbow trout experimentally infected with recombinant infectious hematopoietic necrosis viruses. *Dis Aquat Org.*, 68, 17–28.

Ronald A.R., (1978). The reappearance of the specialty devoted to infectious disease. *Can Med Assoc J.*, 119, 843.

S. Finke · K.-K. Conzelmann., (2005). Recombinant Rhabdoviruses: Vectors for Vaccine Development and Gene therapy. *CTMI.*, 292, 165–200.

Santiago F. Elena and Rafael Sanjua., (2005). Adaptive Value of High Mutation Rates of RNA Viruses: Separating Causes from Consequences. *J Virol.*, p. 11555 - 11558.

Schlotfeldt HJ, Ahne W, Vestergard-Jorgensen PE, Glende W., (1991). Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*) a natural outbreak. *Bull Eur Assoc Fish Pathol.*, 11(3), 105–107.

Schlotfeldt HJ, Ahne W., (1988). Epizootics in brown trout (*Salmo trutta fario*) caused by VHSV-F1. *J Appl Ichthyol.*, 4, 147–148.

Schütze H, Enzmann PJ, Mundt E, Mettenleiter TC., (1996). Identification of the non-virion (NV) protein of fish rhabdoviruses viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious haematopoietic necrosis virus. *J Gen Virol.*, 77, 1259–1263.

Schütze H, Mundt E, Mettenleiter TC., (1999). Complete genomic sequence of viral haemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus Genes.*, 19, 59–65.

Seif, I., Coulon, P., Rollin, P. E. & Flamand, A., (1985). Rabies virulence : effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *Journal of Virology.*, 53, 926±934.

Skall HF, Olesen NJ, Møllergaard S., (2005). Viral hemorrhagic septicemia virus in marine fish and its implications for fish farming a review. *J Fish Dis.*, 28, 509–529.

Thim HL, Iliev DB, Christie KE, Villoing S, McLoughlin MF, Strandkog G, et al., (2012). Immunoprotective activity of a salmonid alphavirus vaccine: comparison of the immune responses induced by inactivated whole virus antigen formulations based on CpG class B oligonucleotides and poly I:C alone or combined with an oil adjuvant. *Vaccine.*, 30, 4828–34.

Tordo N, Benmansour A, Calisher C, Dietzgen RG and others., (2005). Family Rhabdoviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds) Virus taxonomy. 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, London., p 623–653.

Vestergaard-Jorgensen PE., (1976). Partial resistance of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to viral haemorrhagic septicaemia (VHS) following exposure to nonvirulent Egtved-virus. Nord Vet Med., 28, 570–1.

Walker PJ, Benmansour A, Dietzgen R, Fang RX and others., (2000). Family Rhabdoviridae. In: Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB and others (eds) Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Academic Press, San Diego, CA., p 563–583.

Yves Gaudin, Pierre de Kinkelin, Abdenour Benmansour., (1999). Mutations in the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus that affect virulence for fish and the pH threshold for membrane fusion. Journal of General Virology., 80, 1221 - 1229.