



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

영어에서의 SVCV 검출 및 새로운

주화세포에서의 배양 특성



2015년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

변 지 희

이 학 석 사 학 위 논 문

영어에서의 SVCV 검출 및 새로운

주화세포에서의 배양 특성

지도교수 정 현 도

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2015년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

변 지 희

변지희의 이학석사 학위논문을 인준함

2015년 2월 27일



위 원 장 이 학 박 사 김 기 홍 ①인

위 원 이 학 박 사 김 도 형 ①인

위 원 이 학 박 사 정 현 도 ①인

목 차

Abstract

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 바이러스 검출 및 분석	5
1.1. 감염어 조직 분리	5
1.2. 바이러스 RNA 분리	5
1.3. PCR	6
1.4. Cloning	8
1.5. 염기서열 분석과 계통수 제작	9
1.6. Real-time PCR	10
2. 바이러스 분리	11
2.1. 바이러스와 주화세포	11
3. 공격실험을 통한 폐사율 확인	12
3.1. 실험어와 바이러스	12
3.2. 잉어의 폐사율 확인	13
4. SVCV-K1의 배양 특성 및 감수성 증대	14
4.1. 바이러스와 주화세포	14
4.2. 자어세포와 지느러미세포의 초대 배양	15
4.3. 주화세포와 초대 배양 세포의 감수성 비교	16
4.4. 주화세포와 초대 배양 세포의 감수성 증대	17
5. 금붕어 지느러미와 향어 자어 유래의 주화세포 확립	18
5.1. 금붕어 지느러미세포와 이스라엘잉어 자어세포의 초대 배양 ..	18

5.2. GTF와 ICE cell의 배양	20
5.3. GTF와 ICE cell에 대한 SVCV의 감염성	21
5.3.1. 바이러스	21
5.3.2. GTF와 ICE cell에 대한 SVCV-K1 감염성 확인	22
5.3.3. GTF와 ICE cell에 대한 SFM 처리	23
5.3.4. GTF와 ICE cell의 바이러스 생산량 비교	24
III. 결 과	25
1. Spring viremia of carp virus의 identification	25
1.1. PCR amplification	25
1.2. SVCV의 계통발생학적 분석	27
2. SVCV의 분리	32
3. 비단잉어의 SVCV-K1에 대한 폐사율 확인	34
4. SVCV-K1의 배양 특성 및 감수성 증대	38
4.1. 주화세포와 초대배양 세포의 감수성 비교	38
4.2. 주화세포와 초대배양 세포의 감수성 증대	40
5. GTF와 ICE cell의 확립 및 SVCV-K1 배양 특성	42
5.1. GTF와 ICE cell의 확립	42
5.2. GTF와 ICE cell의 SVCV-K1에 대한 감염성 확인	47
5.3. SFM 처리	48
5.4. GTF와 ICE cell의 바이러스 생산량 비교	52
IV. 고 찰	54
V. 요 약	63
VI. 감사의 글	64
VII. 참고 문헌	66

Detected SVCV in carp and its culturing characteristics in new cell lines

Ji hee Byun

Department of Aquatic Life Medicine
Pukyong National University

Abstract

After mass mortality of domestic SVCV was detected from the surviving wild common carp, we analyzed molecular biologically through the detection of SVCV-K1 similar SVCV isolates from wild carp (*Cyprinus carpio*) of Cheongdo dam reservoir, North Gyeongsang Province. And we checked the this virus belongs to the subgroup I a and confirmed the pathogenecity by observed the CPE *in vitro* culture and cumulative mortality rate *in vivo* challenged with koi carp. Domestic detection of wild carp will SVCV in the first report, which is considered as a important virus in study of SVCV in domestic cyprinid fish.

In addition, in order to higher concentration of SVCV than EPC cell line, israel carp embryo cell and goldfish tail fin cell are established and compared with host cell lines. When inoculated with MEM used for SVCV-K1 on GTF and ICE cell developed in this study, we showed a similar maximum viral copy numbers of SVCV-K1 in the EPC. MEM medium in cell line was changed to serum free medium (SFM). Following inoculation with SVCV-K1 in SFM, CPE was observed in cell lines within 3 days. Certainly, utilization of SFM allowed us to increase

susceptibility of GTF, ICE and EPC cell lines to the inoculation of SVCV-K1 in SFM. The susceptibility of the SVCV-K1 in GTF, ICE cells was higher than EPC cell. Although known as the goldfish susceptible to the disease is caused by the SVCV since the disease was recorded in goldfish in a lake in Brazil in 1998, goldfish is lower susceptible to SVCV than carp. This results in higher sensitivity to SVCV-K1 in GTF cell derived from a goldfish than in EPC cell derived from carp is considered a very interesting point. Therefore, inoculation of SVCV-K1 in GTF, ICE cell and using SFM is thought to be higher applied to a variety of research and utilization of SVCV-K1.



I. 서론

Spring viremia of carp (SVC)는 잉어류의 가장 심각한 바이러스 질병 중 하나이다. SVC의 발생은 지속적인 경제적 손실뿐만 아니라 치어의 90% 정도를 폐사에 이르게 하며 (OIE, 2009), 특히 겨울철 수온이 낮은 유럽국가에서 심각한 피해를 야기시키고 있다. 이 질병의 원인체인 SVC 바이러스 (SVCV)는 Vesiculovirus 속, Rhabdoviridae에 속하며 (Ahne et al., 2002), 러시아 (Oreshkova et al., 1999), 미국 (Miller et al., 2007 ; Warg et al., 2007) 그리고 중국 (Teng et al., 2007 ; Zhang et al., 2009)에서 발견되어지고 있다. 현재 SVC는 잠재적인 해로운 영향과 분명한 위험 때문에 국제수역사무국에 의해 전염병 목록에 등재되어 있다 (Office International des Epizooties, OIE, 2009). 국내에서 현재까지의 SVC는 수산동물질병관리법에 의한 유일한 제 1종 법정전염병으로서 감염된 어류는 살처분 하여야 한다.

OIE 보고에 의하면 SVCV의 감염온도는 11~17℃이다. 10℃ 이하에서 SVCV는 드물게 발생하며 22℃ 이상에서는 연령이 높은 어류에서 드물게 폐사를 나타낸다 (Fijan, 1988). SVCV에 자연적으로 감염이 되는 어류 속수 종은 common carp (*Cyprinus carpio carpio*), koi carp (*Cyprinus carpio koi*), crucian carp (*Carassius carassius*), silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), bighead carp (*Aristichthys nobilis*), grass carp (white amur) (*Ctenopharyngodon idella*), goldfish (*Carassius auratus*), orfe (*Leuciscus idus*), and tench (*Tinca tinca*), bream (*Abramis brama*) (Basic et al., 2009; Dixon, 2008)과 인도의 잉어 종인 merigal (*Cirrhinus merigala* [= *C.cirrhosus*]), rohu (*Labeo*

rohita) and *catla* (*Catla catla* [= *Gibelion catla*]) (Haghighi Khiabani *et al.*, 2008) 등의 잉어과 어류가 있으며, Nile tilapia (*Sarotherodon niloticus*) (Soliman *et al.*, 2008) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Jeremic *et al.*, 2006; Haghighi Khiabani Asl *et al.*, 2008)도 보고된 바 있다. SVC에 감염된 어류의 임상증상은 안구 돌출, 아가미창백, 체표, 지느러미 기부, 복부 출혈을 나타내지만, 이러한 임상 증상이 SVC에 감염된 어류에게서 모두 일어나는 것은 아니다.

SVCV는 겨울철 수온이 낮을 때 일부 유럽국가에 한정되어 발생하였으나, 점차 대부분의 유럽국가와 벨라루스, 조지아, 리투아니아, 몰도바, 러시아, 우크라이나에서도 보고되었다. 1998년에 브라질의 금붕어에서, 2002년에 미국의 두 개 지역에서, 2006년에 캐나다에서 SVCV 발생이 보고되었다. 그리고 아시아 지역의 경우 2004년에 중국의 잉어에서 SVCV가 검출되었으나 아직 일본 및 국내에서는 발병 보고된 적이 없다.

SVCV의 grouping은 SVCV가 검출된 어종에 따라 genogroup I, III, II, IV로 나누어진다. genogroup I은 잉어, genogroup II는 초어, genogroup III는 northern pike, genogroup IV는 브라운 트라우트와 넓은 범위의 잉어과 어류에서 분리된 isolates가 속해있다. 그 중에서도 잉어에서 분리된 SVCV isolate는 지리적 분포에 따라 subgroup Ia, Ib, Ic, Id로 나누어지는데 Ia는 아시아, 잉글랜드, 미국, Ib는 몰도바, 우크라이나, Ic는 우크라이나, 러시아, Id는 영국의 SVCV isolate가 주로 속한다 (Stone *et al.* 2003).

SVCV의 *in vitro* 배양은 어류 유래의 세포에서 4 ~ 31℃의 범위에서 배양이 가능하다 (Ahne. 1973, Clark & Soriano. 1974). 핵 염색체의 변연화가 일어나고 세포가 용해되거나 형태학적으로 둥글게 되는 것과 같

은 세포변성효과 (CPE)는 온도와 사용하는 세포주에 따라 다양하게 나타나는데, *in vitro* 상에서 SVCV의 복제 적정온도는 20 ~ 25℃이며, epithelioma papillosum cyprini (EPC) cell line (Fijan *et al.*, 1983), the fathead minnow (FHM) cell line (ATCC CCL-42, Gravel & Malsberger, 1965) 그리고 carp leukocyte cultures (CLC, European collection of Cell Cultures 95070628, Faisal & Ahne, 1990)과 같은 잉어과 어류 유래의 초대배양 세포와 확립된 세포가 SVCV의 증식에 유리하다. 세포주를 이용하였을 때, 감염농도는 약 10^8 TCID₅₀ml⁻¹로 규칙적으로 나타난다.

SVCV의 예방은 겨울과 이른 봄에 사육밀도를 감소시켜서 바이러스의 확산을 줄이고, 수온을 19-20도씨 이상으로 올려주어 SVC 발생을 멈추게 하거나 예방할 수 있게 한다. 뿐만 아니라 안전하고 효과적인 백신을 사용할 수 있는데 현재는 이용할 수 있는 것이 없으나, 많은 불활화 백신, 생 약독화 백신, DNA백신 등이 연구되어지고 있다 (Dixon, 2008). 생백신을 잉어에 복강 내 또는 구강으로 vaccination을 실시함으로써 SVCV에 대한 잉어의 방어면역과 지속적인 면역을 획득해오고 있으며, 게다가 생 약독화 SVCV를 복강내 접종 또는 경구복용에 의해 vaccination 된 잉어는 재감염에 저항성이 생긴다. 2개의 SVCV strain을 불활화 시켜서 oil-adjuvanted 복강 내 접종은 1982년 동유럽에서 상용화되었지만, 오스트리아의 잉어 양식장에서 SVCV의 발생을 1% 미만으로 감소시켰다는 보고를 제외하고는 이 불활화 백신을 현장에서 적용 및 사용했다는 보고가 없다 (E. Gomez-Casado *et al.*, 2011). 1978~ 1984년 유럽에서 SVCV 불활화 백신이 연구되었지만, 바이러스의 activation에 관련된 문제와 법적인 문제 그리고 시장의 제한에 의해 상용화 되지 못했다. 따라서 백신에 대한 더 발전적인 연구가 필요한 실정이다.

본 연구에서는 국내의 대량폐사 후 살아남은 야생 잉어로부터 SVCV를 검출하였으며, 분리된 SVCV strain의 genotype을 확인하고, *in vivo* 상의 인위감염을 통한 누적폐사율과 *in vitro* 상에서의 CPE 확인을 통하여 병원성을 확인하였다. 또한 SVCV의 예방을 위한 백신에 사용할 고농도의 SVCV를 확보하기 위하여 금붕어 꼬리지느러미 및 이스라엘 잉어 자어 유래의 세포로부터 새로운 주화세포를 개발하여 SVCV 배양에 사용되는 기존 주화세포인 EPC cell line과 SVCV 배양을 비교하였다.



Ⅱ. 재료 및 방법

1. 바이러스 검출 및 분석

1.1. 감염어 조직 분리

2009년에 경상북도 청도 운문댐 저수지에서 원인미상의 대량폐사가 있었으며, 다음해 2010년 6월 외관상 질병의 증세가 보이지 않고, 폐사도 나타나지 않는 자연산 토종잉어 (*Cyprinus carpio*, B.W. $\pm 1\text{kg}$)를 채집하여, 토종잉어의 비장 조직을 분리하였다.

1.2. 바이러스 RNA 분리

Viral RNA 분리는 토종잉어에서 분리한 비장 조직으로부터 RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen Hiden, Germany)를 사용하여 제조사의 protocol에 따라서 RNA를 분리하여 최종 50 μl 의 RNase free water를 사용하여 현탁하였고, 분리한 RNA는 실험 전까지 -20°C 에 보관하였다.

1.3. PCR

cDNA 합성을 위하여 M-MLV reverse transcriptase 0.5 μ l (Promega), 5x buffer 2 μ l, dNTP 0.5 μ l, SVCV R2 primer 1 μ l, extracted total RNA 3 μ l를 넣고, total volume이 10 μ l가 되게 Nuclease-free water를 첨가한 후, 45 $^{\circ}$ C에서 60분, 99 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다. 여기서 만들어진 cDNA는 PCR 반응의 template로 사용하였다.

1-step PCR은 150mM Tris-HCl (pH8.75), 500mM KCl, 20mM MgCl₂, 1.0% Triton X-100, 10mM의 각각의 dNTP, 1 μ M의 primer set, 5U/ μ l Taq DNA polymerase (RBC, Korea) 및 template 1 μ l(cDNA)를 첨가한 후 DEPC water로 최종액의 volume이 20 μ l가 되도록 하였고, PCR amplification은 Applied Biosystems 2720 Thermal cycler를 사용하였다. PCR 혼합물은 95 $^{\circ}$ C에서 1분 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 1분 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 extension의 반응을 35cycle 수행한 후 72 $^{\circ}$ C에서 10분 post-extension 하였다.

2-step PCR은 총 반응액 20 μ l에 1-step PCR product 1 μ l를 template로 하여 1-step PCR 방법과 동일하게 시행하였다.

PCR 후 증폭 산물은 1X TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA)를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, 0.5 μ g/ μ l EtBr(Ethinium Bromide)이 첨가된 1% agarose gel (SeaKem® LE Agarose, CAMBREX Bio Science Rockland, Inc, USA) 상에서 전기영동한 후, UV 검출기 (Seoplin Scientific Co., Ltd., Korea)를 이용하여, 전기영동 상에서 검출되는 band의 길이를 관찰하여 바이러스를 확인하였다.

Table 1. PCR primers used in this study

Genomic region	Steps	Primers	Oligonucleotide sequence (5' to 3' direction)	Expected size of amplicons	Reference
G gene	1st	SVCV F1	TCTTGGAGCCAAATAGCTCARRTC	714 bp	Stone et al. (2003)
		SVCV R2	AGATGGTATGGACCCCAATACATHACNCAY		
	2nd	SVCV F1	TCTTGGAGCCAAATAGCTCARRTC	606 bp	
		SVCV R4	CTGGGGTTTCCNCCTCAAAGYTG Y		



1.4. Cloning

PCR 생성물은 GeneAll[®] Gel SV (GeneAll Biotechnology, Korea)를 이용하여 정제하였다. 정제물은 pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega, USA)를 사용하여 plasmid vector에 ligation을 시키고, competent cell (*E. coli* DH5 α -T1) 100 μ l를 첨가하여 얼음에서 20분간 반응시키고, 42 $^{\circ}$ C에서 40초간 heat-shock 시켰다. 바로 얼음에 2~3분간 반응시킨 후 SOC (Tryptone 20g/l, Yeast extract 24g/l, NaCl 0.5g/l, 250mM KCl 10mg/l, 10ml of a sterile solution of 1M MgCl₂, 20ml filter sterile 1M glucose/l) 배지를 250 μ l 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 90분간 배양시켰다.

배양액을 Ampicillin 50ug/ml과 X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, Sigma, USA) 40ug/ml이 첨가된 LB(Luria-Bertani, Difco, USA) 평판배지에 도말하여, 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양시켰다. 파란색과 흰색의 집락이 증식하는 것을 확인하고 흰색으로 나타나는 집락을 선택하여 Ampicillin 50ug/ml이 첨가된 LB broth에 접종한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양시킨 뒤 GeneAll[®] Plasmid SV mini kit (GeneAll Biotechnology, Korea)를 이용하여 plasmid를 분리하였다.

1.5. 염기서열 분석과 계통수 제작

분리된 plasmid로부터 Big Dye Terminator Cycle DNA Sequencing Kit (ABI PRISM PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 삽입된 염기서열을 밝혔다. Glycoprotein gene 부위에 대한 SVCV의 염기서열은 MACAW program (Version 2.0.5., National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 사용하여 비교하였다. 또한 본 연구에서 분리한 SVCV strain의 Glycoprotein gene과 33가지의 reference SVCV strains의 Glycoprotein gene을 Mega4 program (Version 4.0 R2., Based on CHAPM, USA)을 사용하여 계통수를 제작하여 계통발생학적으로 비교 및 분석하였다.



1.6. Real-time PCR

SVCV의 real-time PCR standard를 제조하기 위해서 SVCV에 감염된 잉어로부터 분리된 SVCV isolate의 cDNA를 template로 하여 Zhiqin Yue et al., 2008에서 보고된 SVCV-F(TGCTGTGTTGCTTGCACTTATYT)과 SVCV-R(TCAAACKAARGACCGCATTTTCG)을 사용하여 1-step PCR(30cycle)을 실시하였고, 생성된 PCR product (81bp)를 GeneAll® Gel SV (GeneAll Biotechnology, Korea)를 이용하여 agarose gel로부터 분리 및 정제하였다. 정제된 DNA를 pGEM-T Easy vector (Promega, USA)에 ligation한 후 *E. coli* DH5α균주에 transformation 시켰다. Plasmid DNA는 GeneAll® Plasmid SV Mini kit (GeneAll Biotechnology, Korea)를 이용하여 plasmid를 분리하였고, qPCR을 위한 standard로서 사용하였다.

준비된 standard DNA를 Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 무게를 측정하고, 이로부터 plasmid copy 값을 결정한 후 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^1$ (copies/ml)로 각각 10-fold 씩 단계 희석하여 표준검량곡선을 작성하는데 사용하였다.

SVCV의 정량적 분석을 위해 Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research, AUS)을 사용하여 real-time PCR을 실시하였다. TOPreal™ qPCR 2X PreMIX (SYBR Green with low ROX, Enzynomics) 10ul, 0.5pM of 각각의 primer 그리고 1ul의 template DNA를 첨가한 후, 최종 volume이 20ul가 되도록 하였다. Real-time PCR의 조건은 95℃에서 10분간 pre-denaturation 시킨 후, 95℃에서 10초 denaturation, 60℃에서 15초 annealing, 72℃에서 20초 extension의 반응을 1 cycle로 하여 40 cycle을 수행하였다.

2. 바이러스 분리

2.1. 바이러스와 주화세포

청도 운문댐에서 채집한 토종잉어의 비장 조직으로부터 분리하여 PCR amplification을 통하여 증폭 산물을 확인하고, 확인된 PCR 산물을 이용하여 cloning하고 sequencing한 후, reference SVCV sequences와 비교한 virus의 감염성을 확인하기 위해 감염 어류 비장 조직을 Minimum Essential Medium (MEM, Sigma-Aldrich)에 1:10 (w/v) 비율로 pestle로 마쇄한 후 4℃ 500 g에서 5분간 원심 분리 하였다. 그 후 상등액을 0.45 µm syringe filter를 통과시키고, 25 cm² tissue culture flask에서 배양된 epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell에 0.1 ml을 접종 후 20℃에서 배양하여 cytopathic effect (CPE) 여부를 관찰하였다.

3. 공격실험을 통한 폐사율 확인

3.1. 실험어와 바이러스

실험어는 비단잉어 (*Cyprinus carpio*, B.L. 3~4 cm)를 충청북도 진천의 양식장에서 구입하였다. 어류는 사료 투여 및 사육수조 환수를 하며 최종온도가 14℃가 되도록 2주일에 걸쳐서 순치시킨 후, SVCV F1/R2 primer와 SVCV F1/R4 primer sets를 이용한 PCR 방법으로 SVCV에 감염되지 않았음을 확인한 후, 공격실험에 사용하였다.

공격실험에 사용한 접종액은 토종잉어의 비장 조직은 감염실험을 하기에는 양이 너무 적고, 폐사 또한 없었으므로, SVCV에 감염된 토종잉어의 비장 조직을 EPC cell line에 접종하여 SVCV를 증폭한 후, 감염 실험 시 사용하였다.

3.2. 잉어의 폐사율 확인

최종온도가 14℃가 되도록 2주일에 걸쳐서 순치된 비단잉어에 SVCV를 100 µl씩 복강주사 하였으며 (5.0×10^7 viral copies/fish) 대조구에는 MEM을 동량 주사하였다. 각 농도별로 15마리씩 접종하였으며, 대조구는 10마리를 접종하였다. 접종한 어류는 14℃에서 매일 환수하여 사육하였다. 죽은 어류는 primer set SVCV F1/R2를 이용하여 PCR로 감염 여부를 확인하였다.

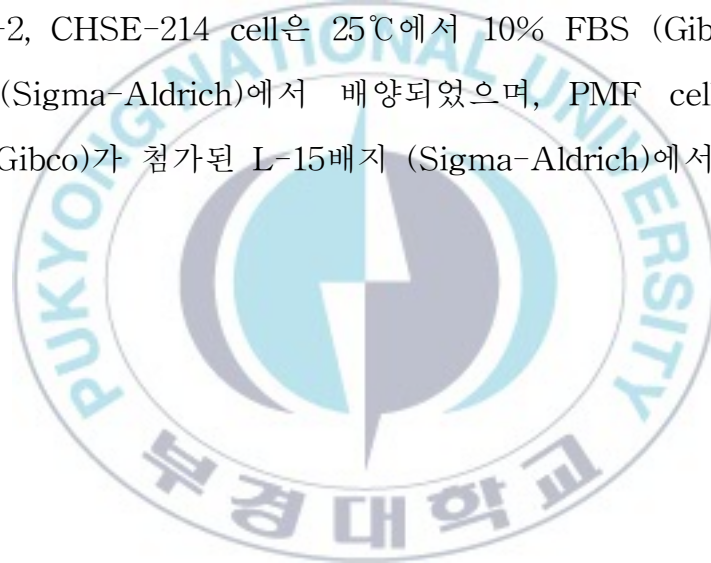


4. SVCV-K1의 배양 특성 및 감수성 증대

4.1. 바이러스와 주화세포

바이러스 배양을 위해 SVCV에 감염된 토종 잉어의 비장을 적출한 뒤 MEM (Sigma-Aldrich)과 10% (w/v) 비울로 마쇄하였다. 그리고 마쇄액은 4℃ 1,000g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 분리하였고, 100 µl의 상등액을 EPC cell에 접종하여 증식시킨 후 상등액을 0.2µm syringe filter를 통과시켜 획득하였으며, 사용 전까지 -80℃에서 보관하였다.

EPC, BF-2, CHSE-214 cell은 25℃에서 10% FBS (Gibco)가 첨가된 MEM배지 (Sigma-Aldrich)에서 배양되었으며, PMF cell은 25℃에서 10% FBS (Gibco)가 첨가된 L-15배지 (Sigma-Aldrich)에서 배양되었다.



4.2. 자어세포와 지느러미세포의 초대 배양

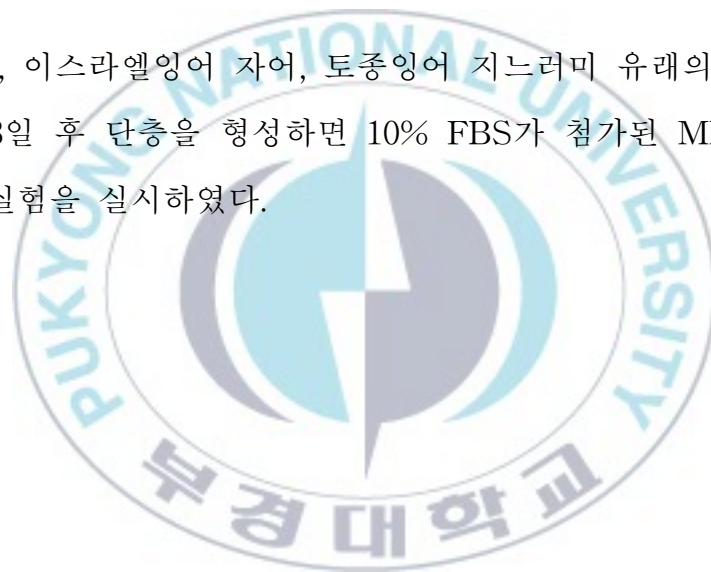
돌돔 (*Oplegnathus fasciatus*), 이스라엘잉어 (Israel carp, *Cyprinus carpio nudus*) 의 난을 통영과 밀양의 양식장에서 분양받았으며, 토종잉어는 충남 아산의 양식장에서 분양받았다. 돌돔의 난은 멸균된 해수로 충분히 washing한 뒤 22℃의 멸균해수에서 부화시켰다. 부화한 자어는 antibiotics and antimycotics (Gibco)가 포함된 MEM으로 3회 washing하였다. 이스라엘잉어의 난은 멸균된 담수로 충분히 washing한 뒤 22℃의 멸균 담수에서 부화시켰다. 부화한 자어는 10mg/ml 농도의 penicillin이 포함된 멸균 담수로 washing 하여 주었으며, antibiotics and antimycotics (Gibco)가 포함된 MEM으로 5회 washing 하였다. 그 후 자어는 mesh를 통과시켜 단일세포로 만들었다. 토종잉어 (4~5cm)는 멸균된 담수로 충분히 washing한 뒤 꼬리 지느러미를 적출하였다. 지느러미는 1mm²이하의 크기로 잘게 자른 뒤 antibiotics and antimycotics (Gibco)가 포함된 MEM으로 3회 washing 하였다. 세척된 지느러미는 0.25% trypsin-EDTA solution (Gibco)로 4℃에서 60분간 세포를 떼어내어 단일세포로 만들었으며, trypsin-EDTA solution 처리한 지느러미 조직 및 세포는 antibiotics and antimycotics (Gibco)가 포함된 MEM으로 5회 washing 하였다.

단일세포는 4℃ 500g에서 5분간 원심 분리하는 방법으로 5회 washing하였으며, 최종적으로 20% FBS가 포함된 MEM에 현탁하였으며, 25cm² tissue culture flask (Corning)에 접종하여 25℃에서 배양하였다. 배양 3일 후 자어세포는 단층을 형성하였으며, 이후 감염 실험을 실시하였다.

4.3. 주화세포와 초대 배양 세포의 감수성 비교

EPC cell, BF-2 cell, CHSE-214 cell 그리고 PMF cell은 5×10^5 cell을 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco)이 첨가된 MEM에 현탁한 뒤 25 cm² tissue culture flask (Corning)에 접종하여 25℃에서 배양하였다. 배양 3일 후 80%의 confluency를 나타낼 때 MEM을 이용하여 3회 washing하여 미 부착세포를 제거하고 5% FBS가 첨가된 MEM을 넣어 준 뒤 SVCV 상등액을 접종하였다. 접종 1, 3, 5 그리고 7일 후 배지 상등액을 sampling 하였고, -80℃에서 보관하였으며, 바이러스 정량에 사용하였다.

돌돔 자어, 이스라엘잉어 자어, 토종잉어 지느러미 유래의 초대배양 세포는 배양 3일 후 단층을 형성하면 10% FBS가 첨가된 MEM으로 교체하여 감염 실험을 실시하였다.



4.4. 주화세포와 초대 배양 세포의 감수성 증대

EPC cell, BF-2 cell, CHSE-214 cell 그리고 PMF cell과 이스라엘잉어 자어, 토종잉어 지느러미 유래의 초대배양 세포에 대한 SVCV의 감염성 증가를 위해 본 연구에서는 serum free medium (SFM)을 사용하였다. EPC cell, BF-2 cell, CHSE-214 cell 그리고 PMF cell과 이스라엘잉어 자어, 토종잉어 지느러미 유래의 초대배양 세포를 계대배양 후 25 cm² tissue culture flask에서 80% confluency를 나타날 때까지 배양한 후 성장 배지를 SFM으로 교체하였다. SVCV (1×10⁴ copies/flask)를 접종하였다. 바이러스 증가 확인을 위해 접종 0, 1, 3, 5 그리고 7일 후마다 배지의 상등액을 sampling 하였으며, 상등액에서 qPCR을 실시하여 바이러스를 정량하였다.



5. 금붕어 꼬리지느러미와 이스라엘잉어 자어 유래의 주화세포 확립

5.1. 금붕어 꼬리지느러미세포와 이스라엘잉어 자어세포의 초대 배양

건강한 금붕어 (goldfish, *Carassius auratus*) 치어 (1cm)를 충남 아산의 한 양식장에서 구입하였다. 구입한 금붕어는 멸균한 담수로 충분히 washing 한 후, 70% 에탄올로 체표면을 소독한 뒤 지느러미를 적출하였다. 지느러미는 1mm²이하의 크기로 잘게 자른 뒤 항생제 (penicillin, 200 IU/ml; streptomycin, 200 ug/ml)가 첨가된 Minimum Essential Medium (MEM, Sigma-Aldrich)로 3번 washing 하였다. 세척된 지느러미는 0.25% trypsin-EDTA solution (Gibco)로 4℃에서 60분간 세포를 떼어내었다. Trypsin-EDTA를 처리한 지느러미 조직 및 세포는 항생제 (penicillin, 200 IU/ml; streptomycin, 200 ug/ml)가 첨가된 MEM 배지 10ml를 첨가하고 4℃ 500g에서 5분간 원심 분리를 5회 실시하여 trypsin을 제거하였다. 세포는 다시 20% FBS (Gibco)와 항생제 (penicillin, 200 IU/ml; streptomycin, 200 ug/ml)가 첨가된 MEM 배지 5ml에 현탁한 뒤 Trypan blue 염색을 통해 살아있는 세포를 계수하여 세포 5×10⁵ cell을 25cm² tissue culture flask (Corning)에 접종하여 25℃에서 배양하였다. 금붕어 꼬리지느러미 세포는 25℃에서 배양되었으며, 배지는 3일에 한번 씩 교환하였다. 본 연구에서 40세대 이상 배양한 금붕어 꼬리지느러미 세포는 Goldfish Tail Fin (GTF) cell이라고 명명하였다.

이스라엘잉어 (Israel carp, *Cyprinus carpio nudus*)의 난을 밀양의 양식장에서 분양받았다. 이스라엘잉어의 난은 멸균된 담수로 충분히

washing한 뒤 22℃의 멸균 담수에서 부화시켰다. 부화한 자어는 10mg/ml 농도의 penicillin이 포함된 멸균 담수로 washing 하여 주었으며, antibiotics and antimycotics (Gibco)가 포함된 MEM으로 5회 washing 하였다. 그 후 자어는 mesh를 통과시켜 단일세포로 만들었다. 단일세포는 4℃ 500g에서 5분간 원심 분리하는 방법으로 5회 washing 하였으며, 최종적으로 20% FBS가 포함된 MEM에 현탁하였으며, 25cm² tissue culture flask (Corning)에 접종하여 25℃에서 배양하였다. 이스라엘 잉어 자어세포 (ICE cell)라고 명명하였다.



5.2. GTF와 ICE cell의 배양

초대 배양한 GTF와 ICE cell이 단층 (monolayer)을 형성하면, 세포는 0.5% trypsin-EDTA solution으로 세포를 떼어내었다. 떼어낸 세포는 MEM배지 10ml을 첨가하고 4℃ 500g에서 5분간 원심 분리하여 trypsin을 제거한 뒤 새롭게 계대배양하였다. 10세대 계대배양하였을 때 FBS의 농도는 15%로 감소시켜 배양하였다.

GTF와 ICE cell을 액체질소에서 장기간 보관하기 위해 75cm² tissue culture flask (Corning)에 단층을 형성하도록 배양하였다. 세포는 trypsin-EDTA를 이용하여 떼어내었으며, trypsin을 제거한 뒤 storage medium (CELLBANKERTM1, NIPPON ZENYAKU KOGYO CO., LTD.)으로 현탁하였다. 세포는 cryovials (Nalgen)에 분주하고 -20℃에서 overnight 한 뒤 -70℃에서 overnight한 후 액체질소에서 보관하였다. ICE cell과 GTF cell은 매번 10세대 계대배양 시 액체질소에 보관하였다.

GTF와 ICE cell의 revival을 확인하기 위해, 액체질소에 보관된 GTF와 ICE cell을 30℃에서 재빨리 녹인 후 20% FBS와 항생제가 첨가된 MEM배지에 현탁하였다. 세포는 4℃ 500g에서 5분간 원심 분리를 2회 실시하여 storage medium을 제거하였다. GTF와 ICE cell은 새로운 5ml의 MEM배지에 현탁하여 25cm² tissue culture flask에서 재배양하였다.

5.3. GTF와 ICE cell에 대한 SVCV의 감염성

5.3.1. 바이러스

바이러스 배양을 위해 SVCV에 감염된 토종 잉어의 비장을 적출한 뒤 MEM (Sigma-Aldrich)과 10% (w/v) 비울로 마쇄하였다. 그리고 마쇄액은 4℃ 1,000g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 분리하였고, 100 µl의 상등액을 EPC cell에 접종하여 증식시킨 후 상등액을 0.2µm syringe filter를 통과시켜 획득하였으며, 사용 전까지 -80℃에서 보관하였다.



5.3.2. GTF와 ICE cell에 대한 SVCV-K1 감염성 확인

GTF, ICE 그리고 EPC cell은 5×10^5 cell을 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco)이 첨가된 MEM에 현탁한 뒤 25 cm² tissue culture flask (Corning)에 접종하여 25℃에서 배양하였다. 배양 3일 후 80%의 confluency를 나타낼 때 MEM을 이용하여 3회 washing하여 미 부착세포를 제거하고 5% FBS가 첨가된 MEM을 넣어준 뒤 SVCV 상등액을 접종하였다. 접종 1, 3, 5 그리고 7일 후 배지 상등액을 sampling 하였고, -80℃에서 보관하였으며, 바이러스 정량에 사용하였다.



5.3.3. GTF와 ICE cell에 대한 SFM 처리

GTF와 ICE cell의 계대배양 후 25 cm² tissue culture flask에서 80% confluency를 나타날 때까지 배양한 후 성장 배지를 SFM으로 교체하였다. SVCV (1×10^4 copies/flask)를 접종하였다. 바이러스 증가 확인을 위해 접종 0, 1, 3, 5 그리고 7일 후 마다 배지의 상등액을 sampling 하였으며, 상등액에서 qPCR을 실시하여 바이러스를 정량하였다.



5.3.4. GTF와 ICE cell의 바이러스 생산량 비교

GTF, ICE 그리고 EPC cell의 cell 하나 당 바이러스 생산량을 비교하기 위해 GTF, ICE, EPC cell을 5×10^5 cells/flask로 접종한 뒤 5일간 배양하고, SVCV-K1을 1×10^2 copies/flask농도로 접종하여 주었다. 바이러스에 의해 CPE는 형성되고 cell lysis는 일어나기 전인 접종 후 2일 째에 cell counting과 qPCR을 통한 정량적 분석을 통해 intracellular viral particles와 released viral particles (total viral particles/total cell number)를 측정하였다.



Ⅲ. 결 과

1. spring viremia of carp virus의 identification

1.1. PCR amplification

청도 운문댐 저수지의 토종잉어의 SVCV에 대한 감염 진단을 위해 토종잉어의 비장으로부터 분리한 viral RNA 분리 및 cDNA 합성을 하였으며, cDNA를 template로 1-step PCR과 2-step PCR을 실시하였다. Glycoprotein gene 부분의 1-step PCR 결과, 1번 lane에서만 714 bp의 band가 나타났으며, 2-step PCR 결과, 1번, 2번 그리고 3번 lane에서 모두 606bp의 공통적인 band가 뚜렷하게 나타났다. (Fig. 1). Glycoprotein gene의 PCR 증폭 산물을 cloning 후 sequencing하여 비교한 결과, SVCV와 일치하였다.

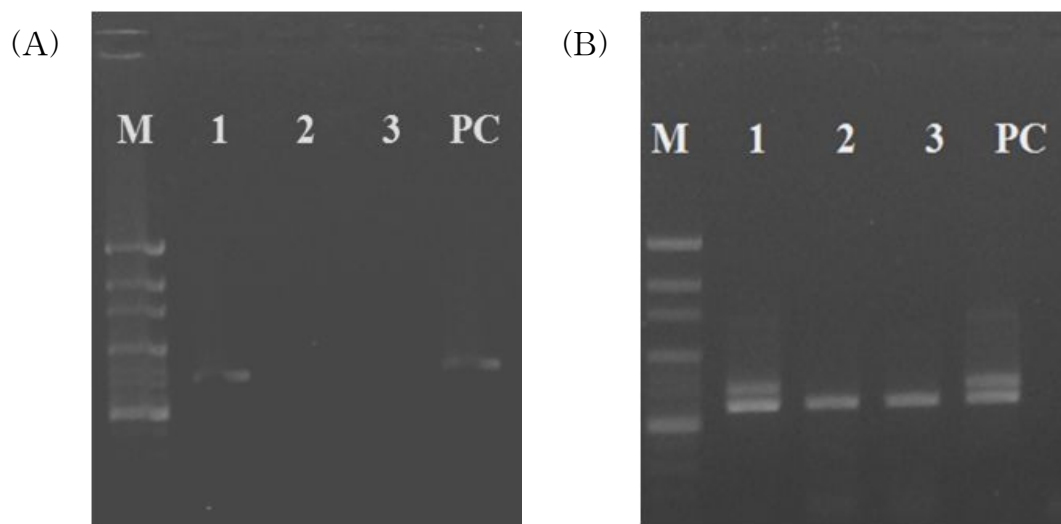


Fig. 1. Detection of the SVCV in three different individual common carp (*C. carpio*) by PCR with SVCVF1/R2, SVCVF1/SVCVR4 primer sets.. 1-step PCR amplification (A); 2-step PCR amplification (B). Lane 1, individual carp 1; lane 2, individual carp 2; lane 3, individual carp 3; PC, positive control; NC, negative control; M, 100bp DNA ladder.

1.2. SVCV의 계통발생학적 분석

본 연구에서 사용한 SVCV와 subgroup에 속하는 926, 2/90, P4, 880062를 사용하여 glycoprotein gene의 subgroup간 염기서열을 비교하고 (Fig. 2) homology를 분석한 결과, homology는 88.54%~97.27%의 차이를 보였으며, 그 중 subgroup I a가 97.27%로 가장 높았고, subgroup I c가 90.36%로 두 번째로 높아, figure. 2에서 subgroup I a로 분류한 결과와 유사한 결과를 보였다 (Fig. 3). 본 연구에서 분리한 SVCV의 glycoprotein gene sequence와 GenBank에 등재되어 있는 33종의 reference SVCV sequence를 D.M. Stone et al. (2003)의 연구 결과를 참조하여 계통발생학적으로 분류한 결과,, 본 연구에서 사용한 SVCV-K1는 genogroup I 의 subgroup I a에 속하였다 (Fig. 4).

SVCV-K1 ATC TGT CAC AAC AGT GTC AAA TAC TAA TTA CAA GGT AGT ACC CCA TTC TGT TCA TTT GGA
 926
 2/90 G. C. T. .A.
 P4 G. T. A. T. A..
 880062 G. T.G A. AN.

SVCV-K1 GCC GTA CGG AGG ACA CTG GAT CGA TCA TGA ATT CAA TGG GGG CGA ATG CAG AGA AAA AGT
 926 G.
 2/90 ... A. T. G.
 P4 ... A. T. T. G.
 880062 ... A. T. T. C. T.

SVCV-K1 GTG TGA AAT GAA AGG GAA CCA CTC TAT TTG GAT CAC AGA TGA GAC CGT GCA ACA TGA ATG
 926 G.
 2/90 ... C. T. A. G. ... G..
 P4 G. GT. A. G..
 880062 ... C. T. G. T. A. G. ... G..

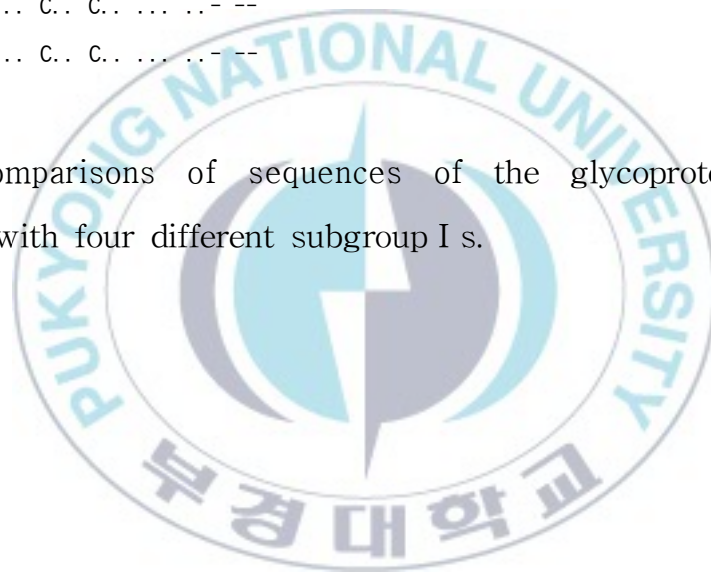

SVCV-K1 TGA AAA GCA CAT AGA GGA AGT TGA AGG AAT TAT GTA CGG GAA TGC TCC GAG AGG GGA TGC
 926 .A.
 2/90 ..C T. C. A. T. AG T..
 P4 C.C C. A. T. T.
 880062 ..C ... A. T. .N. A. .T ... A. T

SVCV-K1 ACT ATA TGT TAA CAA CTT TAT TAT AGA TAA ACA TCA TAG AGT ATA CAG ATT CGG AGG GTC
 926 .A. G. CA.A. G. ...
 2/90 .A. T. G G. G. TC. G. A..
 P4 .A. G. G. G. G. A..
 880062 .A. G. ..C G. G. A..

SVCV-K1 TTG TCG AAT GAA ATT CTG TGA TAA AGA TGG TAT AAA ATT CAC AAG AGG AGA CTG GGT AGA
 926G.
 2/90 ... A. A. G.
 P4 ... A G. TG.

880062	...	A	G.	...	A.	...	G.	G.	...	T.	...									
SVCV-K1	AAA	AAC	AGC	TGA	AAC	ATT	GAC	GAA	GAT	TTA	TGA	AAA	TAT	ACC	TGA	ATG	TGC	CGA	TGG	AAC
926	...	...	...	...	...	A.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T.	...	...	...	
2/90	G.	G.	...	G	...	A.	A.C	...	A.	C.	G.	...	AG	...	...	T.	...	...	...	
P4	G.	...	...	G	...	...	C T.	...	A.	C.	...	...	AG	...	...	T T.	...	...	...	
880062	G.	...	...	C.G	...	A.	A.C	...	C.	...	C.	G.	G.	A.	...	T T.	...	...	...	
SVCV-K1	GTT	GGT	ATC	TGG	TCA	CC-	---													
926	...	...	...	...	...	-	---													
2/90	...	...	C.	C.	...	-	---													
P4	T.	...	C.	C.	...	-	---													
880062	...	...	C.	C.	...	-	---													

Fig. 2. Comparisons of sequences of the glycoprotein gene of SVCV-K1 with four different subgroup I s.



SVCV-K1 (this study)	926 (AY842487.1)	2/90 (AJ538060.1)	P4 (AJ538074.1)	880062 (AJ538079.1)	
100	97.27	90.18	90.36	88.54	SVCV-K1
	100	89.27	89.47	88.20	926
		100	92.91	92.20	2/90
			100	91.64	P4
				100	880062

Fig. 3. Nucleotide sequence homology (%) of the glycoprotein gene of SVCV-K1 compared with four different subgroup I s.

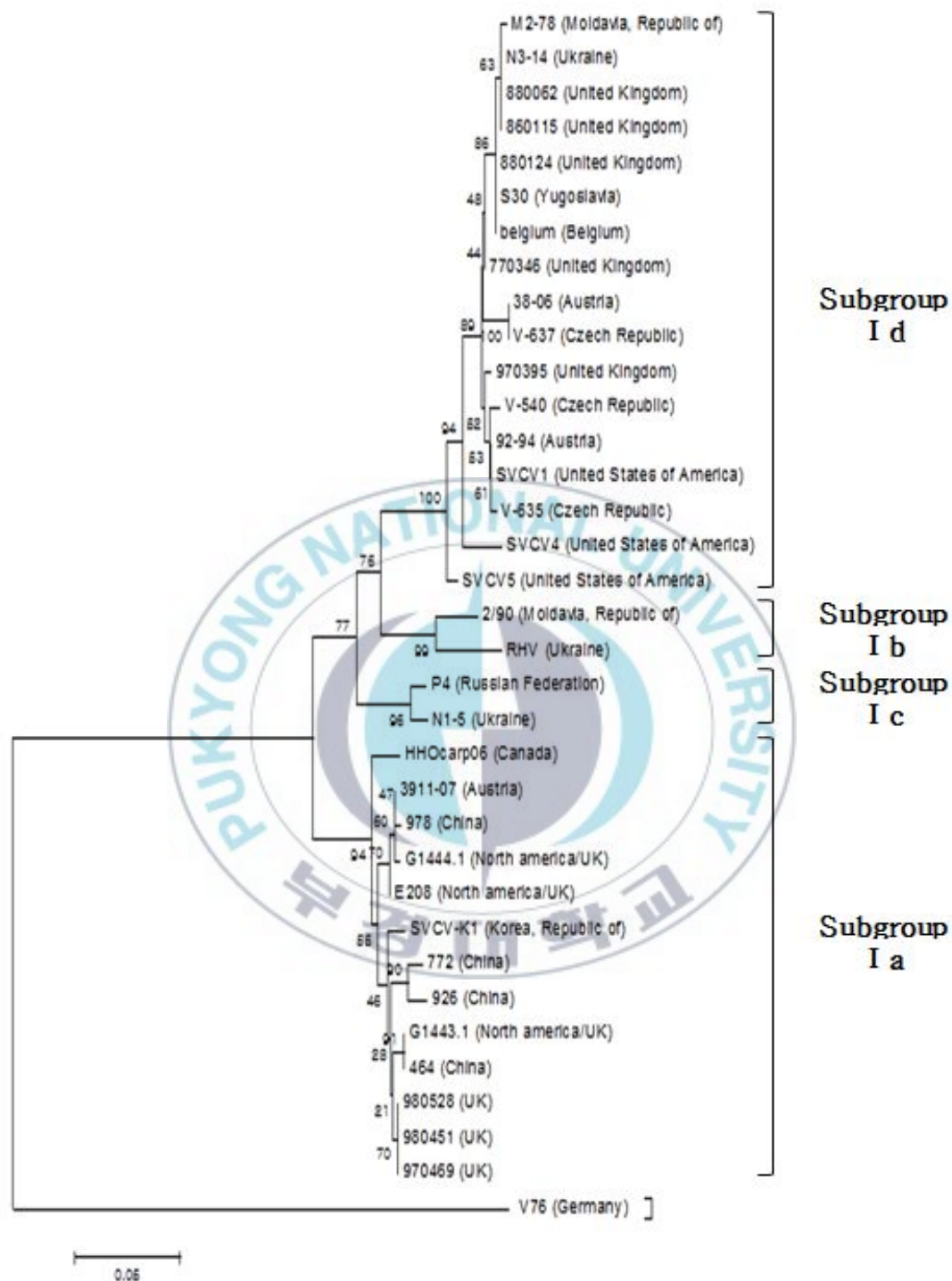


Fig. 4. Phylogenetic analysis of SVCV-K1 nucleotide sequence of glycoprotein genes.

2. SVCV의 분리

토종잉어의 비장 조직으로부터 분리하여 PCR amplification을 통하여 증폭 산물을 확인한 virus의 감염성을 확인하기 위해 감염 어류 비장 조직을 1:10 (w/v) 비율로 마쇄하여 얻은 상등액 0.1 ml을 EPC cell에 접종한 결과, EPC cell는 SVCV 접종 8일 후부터 SVCV감염 시 전형적으로 나타나는 cytophatic effect (CPE)가 보이기 시작하였다 (Fig. 5). CPE가 관찰된 세포와 상등액은 4℃ 500g에서 5분간 원심 분리한 후 상등액을 획득하여 바이러스를 분리하였다.



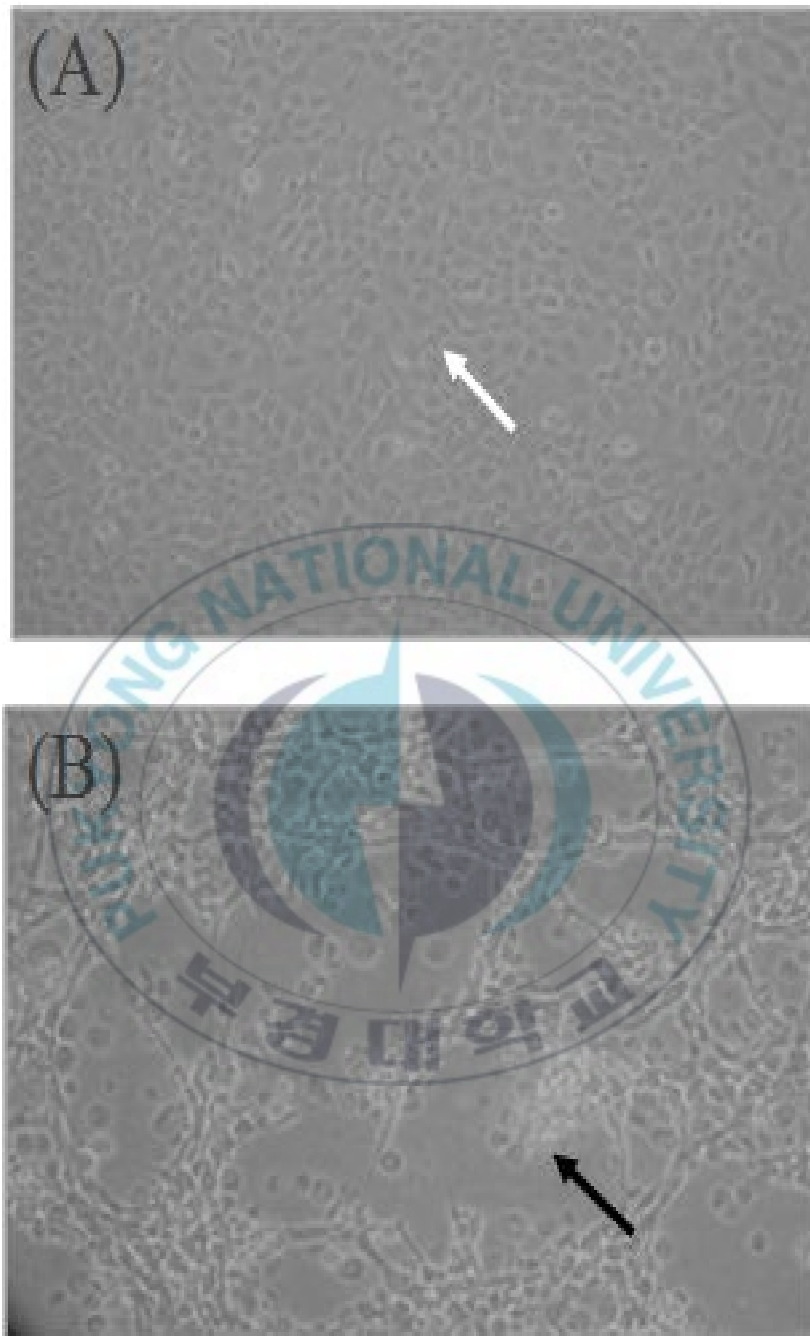


Fig. 5. Cytopathic effects (CPE) of SVCV-K1 in EPC cell. Control cells (A); infected EPC with SVCV-K1 (B).

3. 비단잉어의 SVCV-K1에 대한 폐사율 확인

비단잉어(B.L. 3~4 cm)의 폐사는 14℃에서 접종(5×10^7 copies/fish) 후 5일째부터 폐사가 일어나기 시작했으며 폐사한 비단잉어는 체표 출혈, 복강 출혈과 같은 SVCV 감염 시 나타나는 전형적인 증상을 보였으며 (Fig. 6), 마지막 폐사가 나타난 접종 후 20일째에 63% 폐사하는 결과를 나타냈으며 (Fig. 7). 비단잉어의 폐사율은 SVCV의 접종 농도가 감소해감에 따라 폐사가 늦게 일어나는 것뿐만 아니라 누적폐사율이 점점 감소하는 경향을 나타내었다 (Data not shown). 폐사한 비단잉어의 신장과 간에서 Glycoprotein gene을 target으로 한 1-step PCR에서 모두 양성인 결과를 보여주었다. 그리고 대조구의 경우 폐사를 보이지 않았으며, 1-step PCR에서 음성인 결과를 보여주었다 (Fig. 8).



Fig. 6. External signs of dead fish showing hemorrhages on abdominal region.

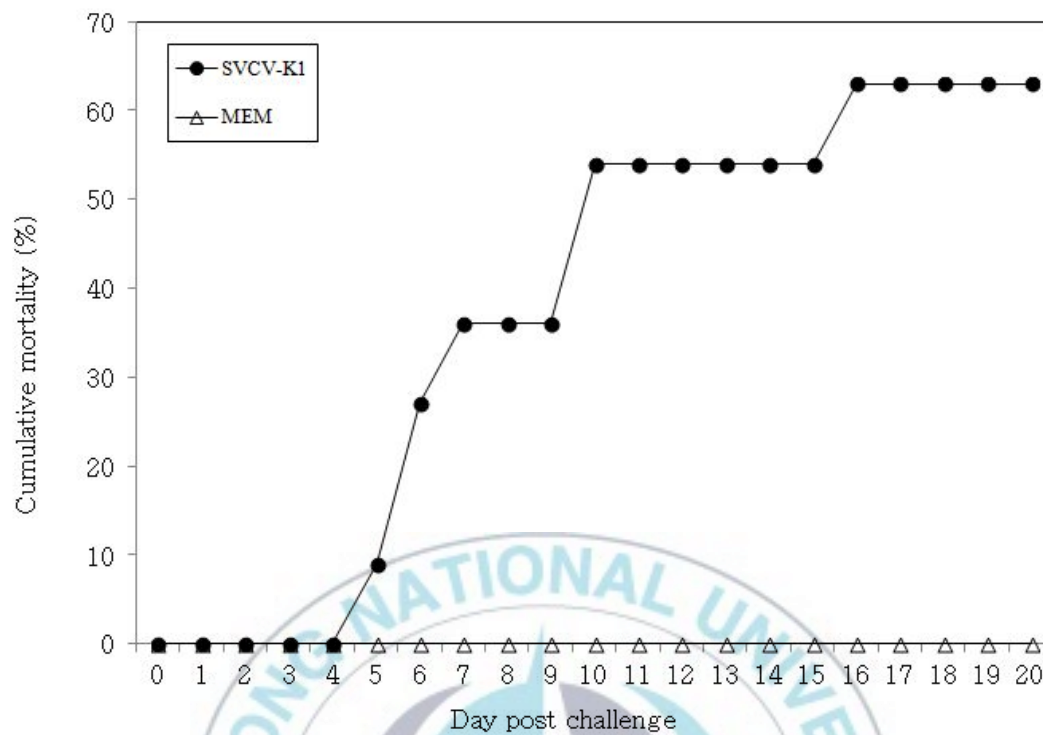


Fig. 7. Cumulative mortality of koi carp challenged with SVCV (5×10^7 copies/fish).

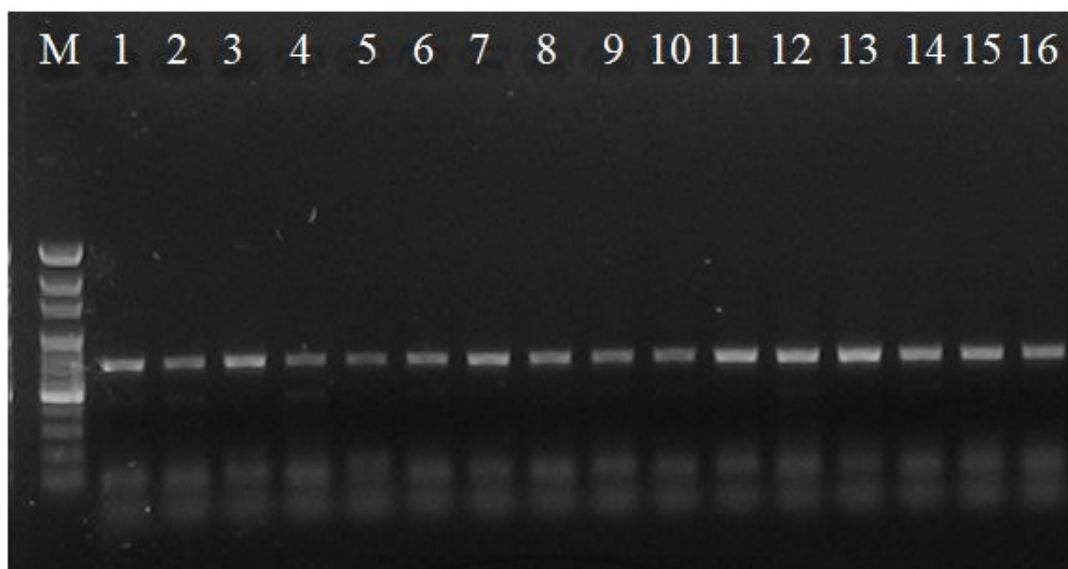


Fig. 8. Detection of SVCV in 8 koi carp (*C. carpio*) by PCR. Lane 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, kidney; lane 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, liver; M, 100bp DNA ladder.

4. SVCV-K1의 배양 특성 및 감수성 증대

4.1. 주화세포와 초대배양 세포의 감수성 비교

주화세포와 초대배양 세포의 SVCV-K1에 대한 감수성을 비교하기 위해 기존의 SVCV 배양 주화 세포인 EPC와 기타 주화 세포인 BF-2, PMF, CHSE-214 cell과 돌돔 자어, 이스라엘잉어 자어, 토종잉어 지느러미 유래의 초대배양 세포에 SVCV-K1 (1.0×10^4 copies/flask)을 접종하였다. 접종 3일 후 EPC, BF-2와 돌돔 자어, 이스라엘잉어 자어, 토종잉어 지느러미 유래의 초대배양 세포는 cytopathic effect (CPE)를 보였으며, Viral copy number는 접종 후 지속적으로 증가하여 처음 접종한 바이러스 (1.0×10^4 copies/flask)에 비해 EPC는 3,860배 증가하여 최대 바이러스 농도가 3.86×10^7 copies/ml로 나타났으며, BF-2는 2,500배 증가하여 2.50×10^7 copies/ml, 돌돔 자어 초대배양 세포는 2,620배 증가하여 2.62×10^7 copies/ml, 이스라엘잉어 자어 초대배양 세포는 2,900배 증가하여 2.90×10^7 copies/ml, 토종잉어 지느러미 초대배양 세포는 1260배 증가하여 1.26×10^7 copies/ml로 나타났으나, PMF와 CHSE-214의 경우 CPE도 관찰되지 않았으며, 뚜렷한 바이러스 수의 증가도 확인할 수 없었다 (Fig. 9).

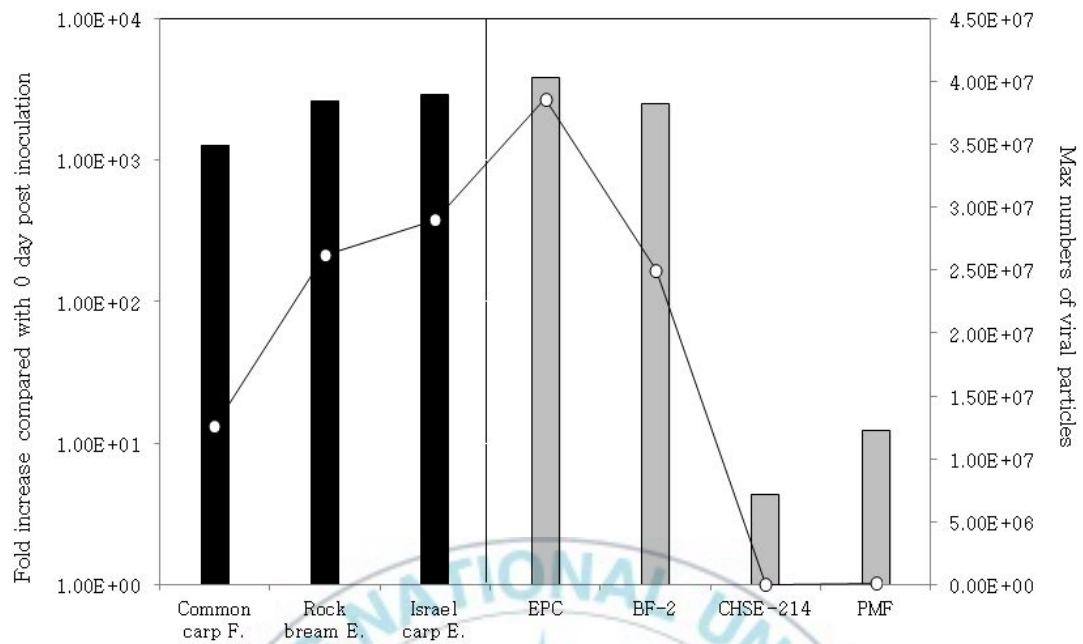


Fig. 9. Culturing of SVCV-K1 in MEM in primary cultured cells and established cell lines. Bar graph indicates fold increase compared with 0 day post inoculation, line graph indicates max numbers of viral particles.

4.2. 주화세포와 초대배양 세포의 감수성 증대

본 연구에서는 주화세포와 초대배양 세포의 SVCV-K1에 대한 감염성을 증가시키고자 SFM을 사용하였다. EPC, BF-2, PMF, CHSE-214 cell과 돌돔 자어, 이스라엘잉어 자어, 토종잉어 지느러미 유래의 초대배양 세포를 10% FBS가 첨가된 MEM배지로 3일간 배양 후, SFM으로 교체한 후 같은 농도의 SVCV-K1 (1.0×10^4 copies/flask)을 접종하였다. 그 결과 MEM 배지 사용 시와 유사한 CPE가 관찰되었으며, 초기에 접종한 바이러스 농도에 비해 EPC는 평균 53,700배 증가하여 5.37×10^8 copies/ml로 가장 높은 바이러스 농도를 로 증가하였으며, BF-2는 7,350배 증가하여 7.35×10^7 copies/ml, 이스라엘잉어 자어 초대배양 세포는 6,780배 증가하여 6.78×10^7 copies/ml, 토종잉어 지느러미 초대배양 세포는 3,420배 증가하여 3.42×10^7 copies/ml로 나타났으며, CHSE-214의 경우 139배 증가하여 1.39×10^6 copies/ml로 MEM을 사용하여 접종하였을 때 보다 증가하였다. 하지만 PMF는 CPE도 관찰되지 않았으며, 뚜렷한 바이러스 수의 증가도 확인할 수 없었다 (Fig. 10).

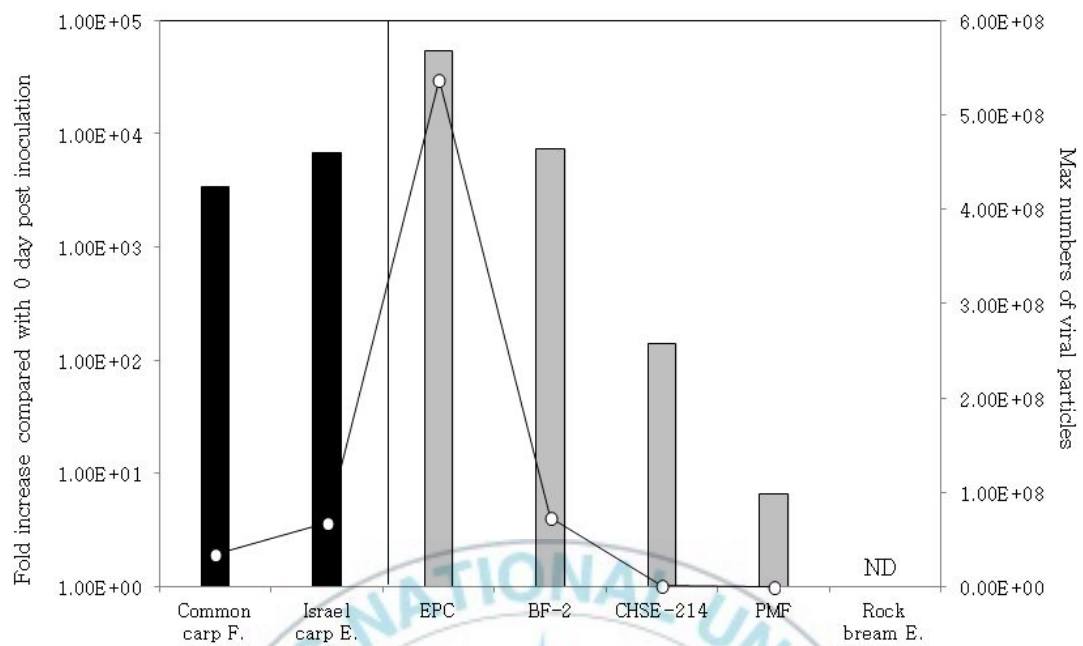


Fig. 10. Culturing of SVCV-K1 in SFM in primary cultured cells and established cell lines. Bar graph indicates fold increase compared with 0 day post inoculation, line graph indicates max numbers of viral particles.

5. GTF와 ICE cell의 확립 및 SVCV-K1 배양 특성

5.1. GTF와 ICE cell의 확립

GTF cell은 2013년 6월에 초대 배양을 시작하여 현재까지 40세대 이상을 계대배양 하였다. 6세대의 금붕어꼬리지느러미 세포인 GTF는 epithelial-like cell과 fibroblast-like cell이 함께 자라는 것으로 보였으나 (Fig. 11b), 14세대 이후의 금붕어꼬리지느러미 세포는 양극 혹은 다극성이며, 가늘고 긴 형상을 가지고, 기질에 부착하여 성장하는 fibroblast-like cell의 형태만이 나타났다 (Fig. 11c). ICE는 2012년 6월에 초대 배양을 시작하여 현재까지 50세대 이상을 계대배양 하였다. 44세대의 이스라엘잉어 자어 세포는 더 규칙적인 면적을 가지는 다각형이며, 분산된 세포들이 기질에 부착하여 성장하는 epithelial-like cell의 형태를 보였다 (Fig. 12c). 액체질소에 보관하였던 10~30세대의 금붕어 꼬리지느러미 세포와 10~50세대의 이스라엘잉어 자어 세포는 3~5일 배양 후 100%의 confluency를 보였으며, 이후는 보관 전의 증식속도를 보였다.

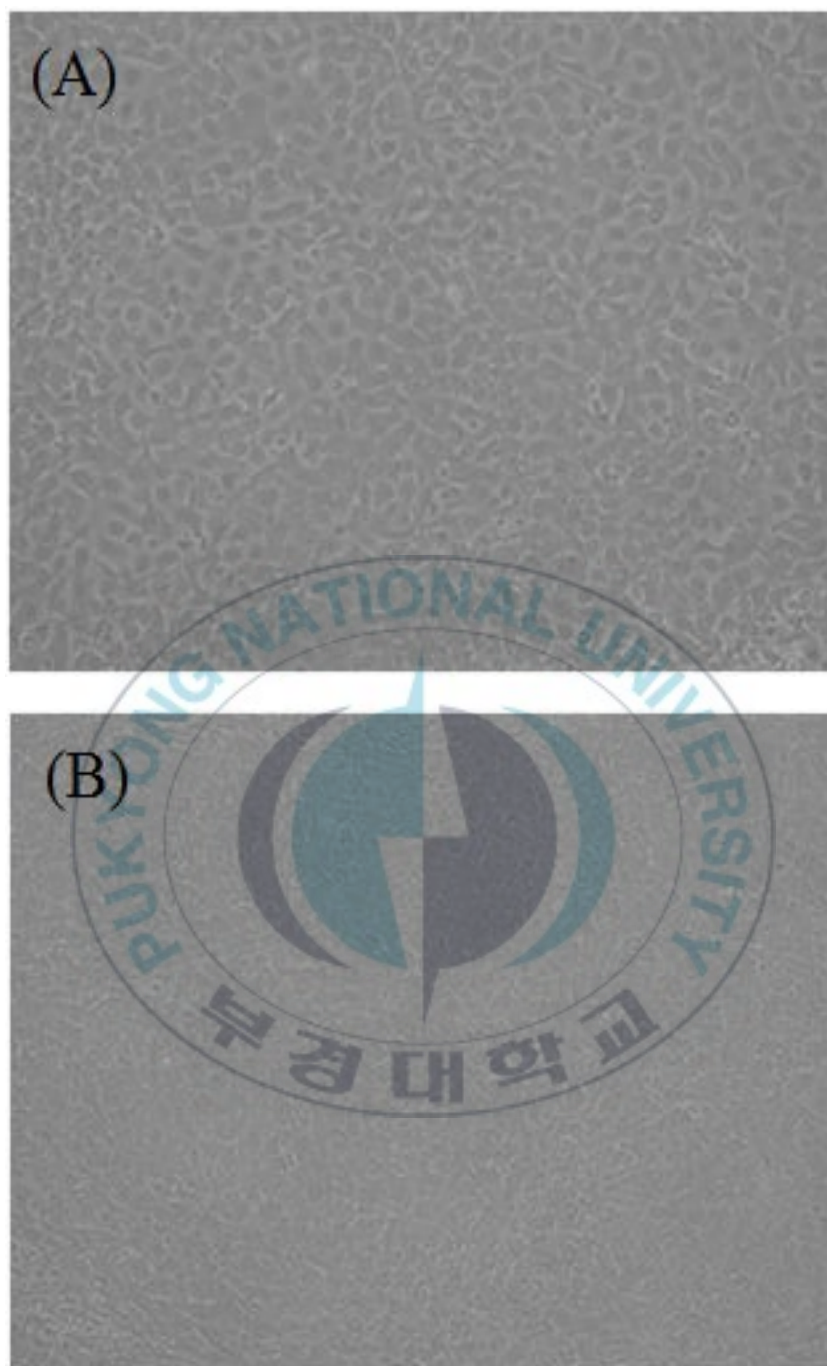


Fig. 11. Continued.



Fig. 11. Morphology of a confluent monolayer of Goldfish tail fin cell at generation 0 (A); 6 (B); 14 (C).

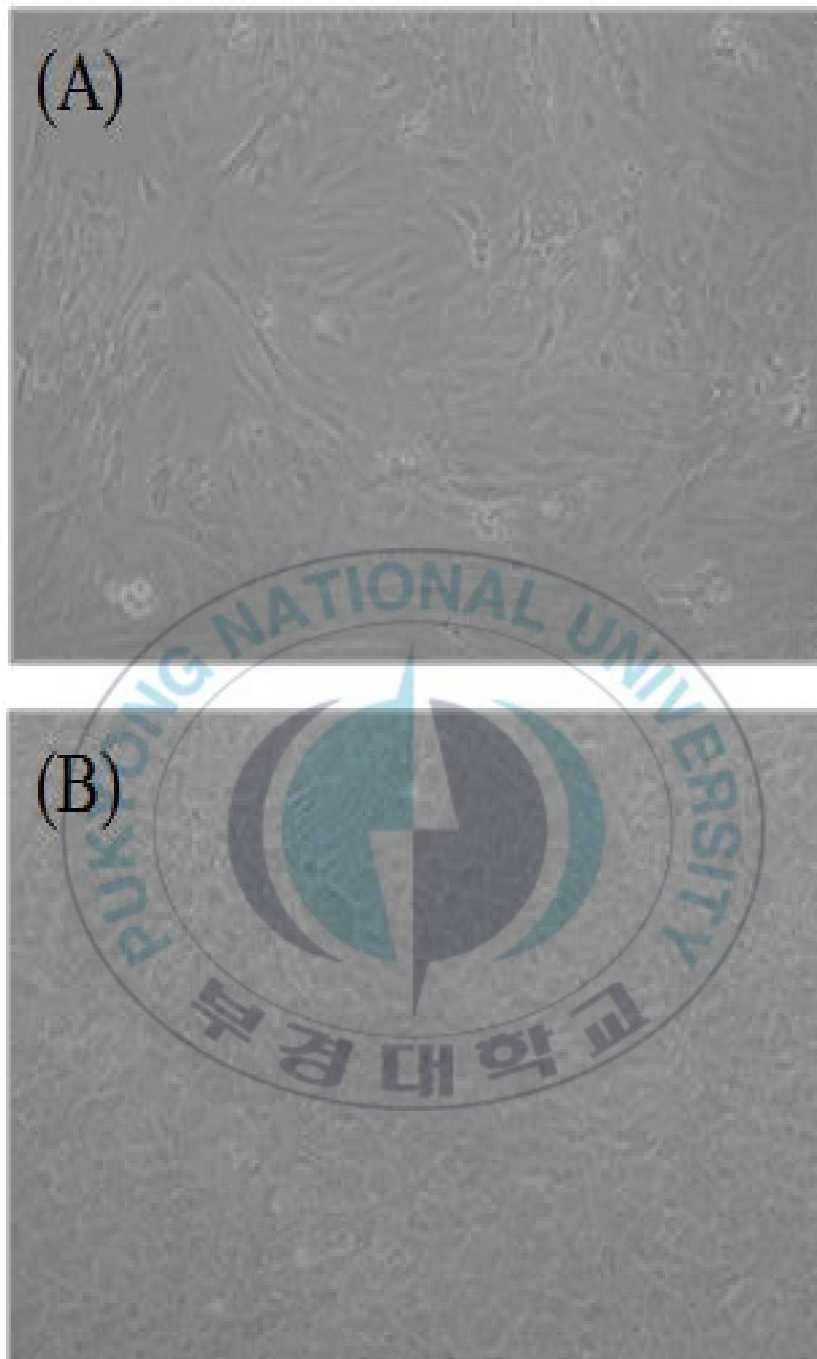


Fig. 12. Continued.

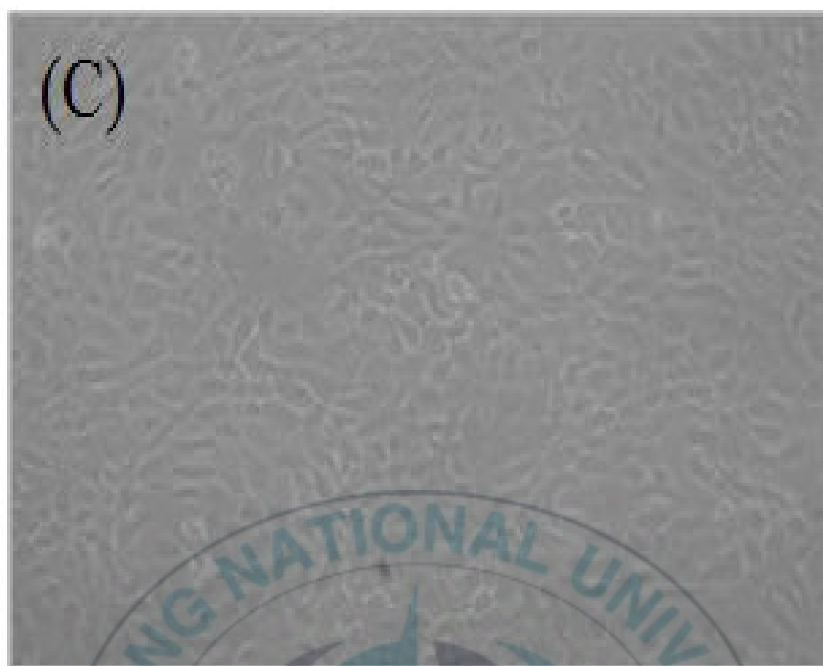
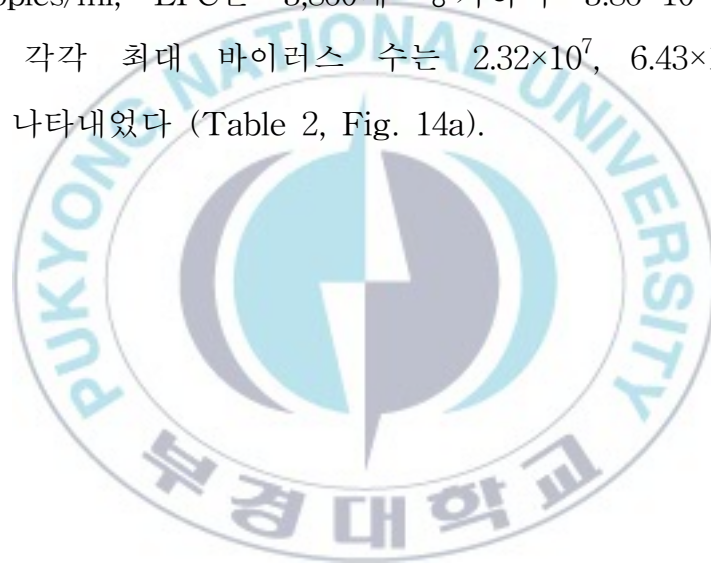


Fig. 12. Morphology of a confluent monolayer of Israel carp embryo cell at generation 0 (A); 33 (B); 44 (C).

5.2. GTF와 ICE cell의 SVCV-K1에 대한 감염성 확인

GTF와 ICE cell의 SVCV-K1에 대한 감염성을 알아보기 위해, 본 연구에서 확립한 GTF, ICE, 그리고 기존의 SVCV 배양 주화 세포인 EPC cell에 SVCV-K1 (1.0×10^4 copies/flask)을 접종하였다. 접종 3일 후 GTF, ICE, EPC cell은 cytopathic effect (CPE)를 보였다 (Fig. 13). Viral copy number는 접종 후 지속적으로 증가하여 처음 접종한 바이러스 (1.0×10^4 copies/flask)에 비해 GTF는 평균 2,020배 증가하여 평균 최대 바이러스 수는 2.02×10^7 copies/ml, ICE는 5,630배 증가하여 5.63×10^7 copies/ml, EPC는 3,860배 증가하여 3.86×10^7 copies/ml을 나타냈으며, 각각 최대 바이러스 수는 2.32×10^7 , 6.43×10^7 , 7.18×10^7 copies/ml을 나타내었다 (Table 2, Fig. 14a).



5.3. SFM 처리

GTF와 ICE cell의 SVCV-K1에 대한 감염성을 증가시키고자 SFM을 사용하였다. GTF, ICE 그리고 EPC cell을 10% FBS가 첨가된 MEM배지로 3일간 배양 후, SFM으로 교체한 후 같은 농도의 SVCV-K1 (1.0×10^4 copies/flask)을 접종하였다. 그 결과 MEM 배지 사용 시와 유사한 CPE가 관찰되었으며, 초기에 접종한 바이러스 농도에 비해 평균 438,000배 증가하여 평균 최대 바이러스 수가 4.38×10^9 copies/ml로 나타났고, ICE는 224000배 증가하여 2.24×10^9 copies/ml, EPC는 53,700배 증가하여 5.37×10^8 copies/ml을 나타냈으며, 각각 최대 바이러스 수는 6.55×10^9 , 3.78×10^9 , 8.00×10^8 copies/ml을 나타냈다 (Table 2, Fig. 14a). 이를 EPC cell에서의 SVCV-K1 증가값을 기준으로 GTF와 ICE cell에서의 SVCV-K1 증가값을 비교해 본 결과, GTF와 ICE cell은 EPC cell 보다 각각 평균 8.16배, 4.17배 더 높게 증가하였다 (Fig. 14b).

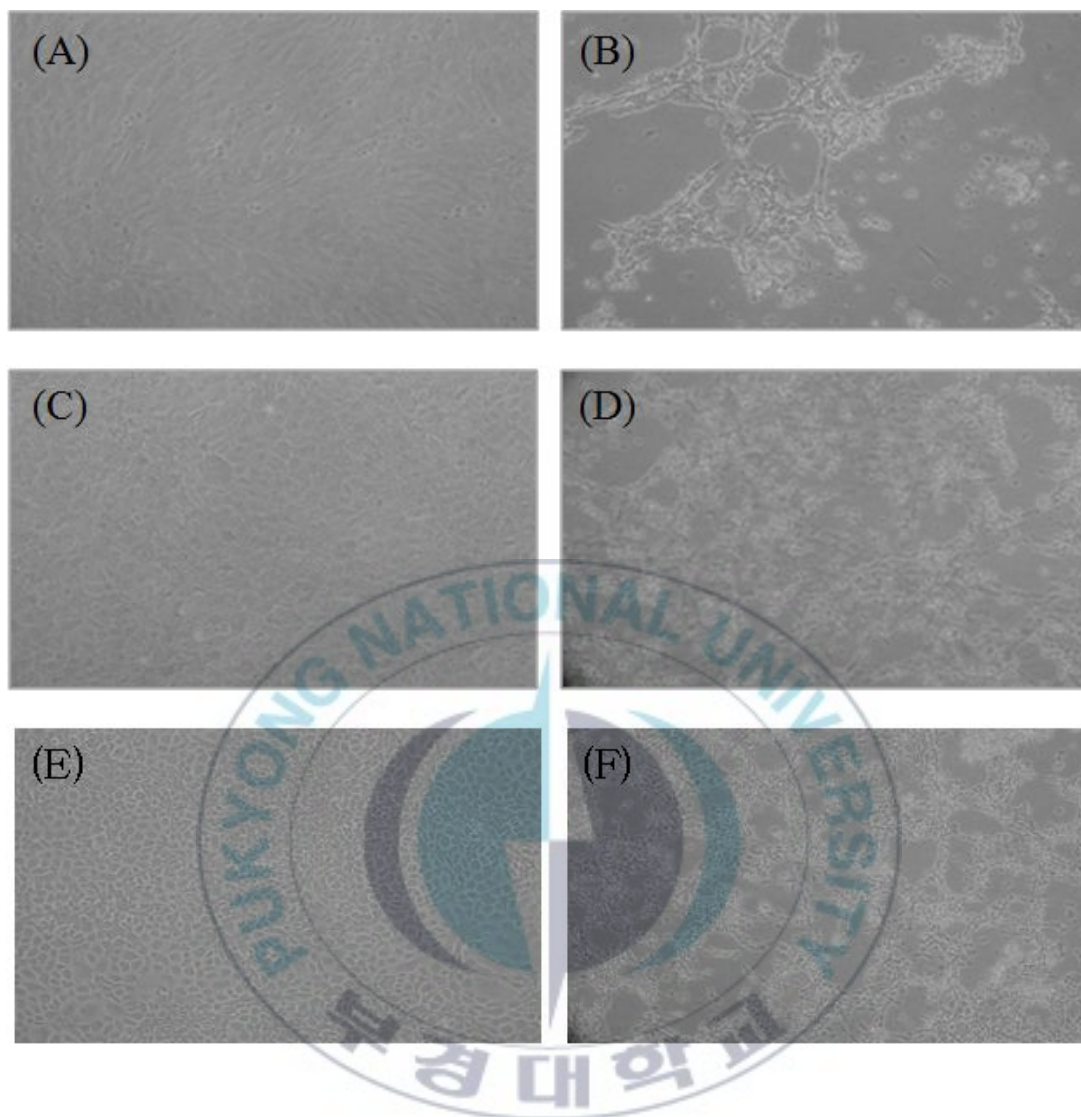


Fig. 13. Cytopathic effects of the various cells infected with SVCV-K1 using MEM. Normal GTF cell (A), infected GTF cell (B), normal ICE cell (C), infected ICE cell (D), normal EPC cell (E), infected EPC cell (F).

Table 2. Comparison of viral copy numbers of GTF, ICE and EPC cells inoculated by SVCV-K1 (1.00E+04 copies/ml).

Media	Cell	Average of Increased folds (Max/Initial numbers of viral particles)	Average of max viral copies/ml	Maximum viral copies/ml
MEM	GTF	2.02E+03	2.02E+07	2.32E+07
	ICE	5.63E+03	5.63E+07	6.43E+07
	EPC	3.86E+03	3.86E+07	7.18E+07
SFM	GTF	4.38E+05	4.38.E+09	6.55E+09
	ICE	2.24E+05	2.24.E+09	3.78E+09
	EPC	5.37E+04	5.37.E+08	8.00E+08

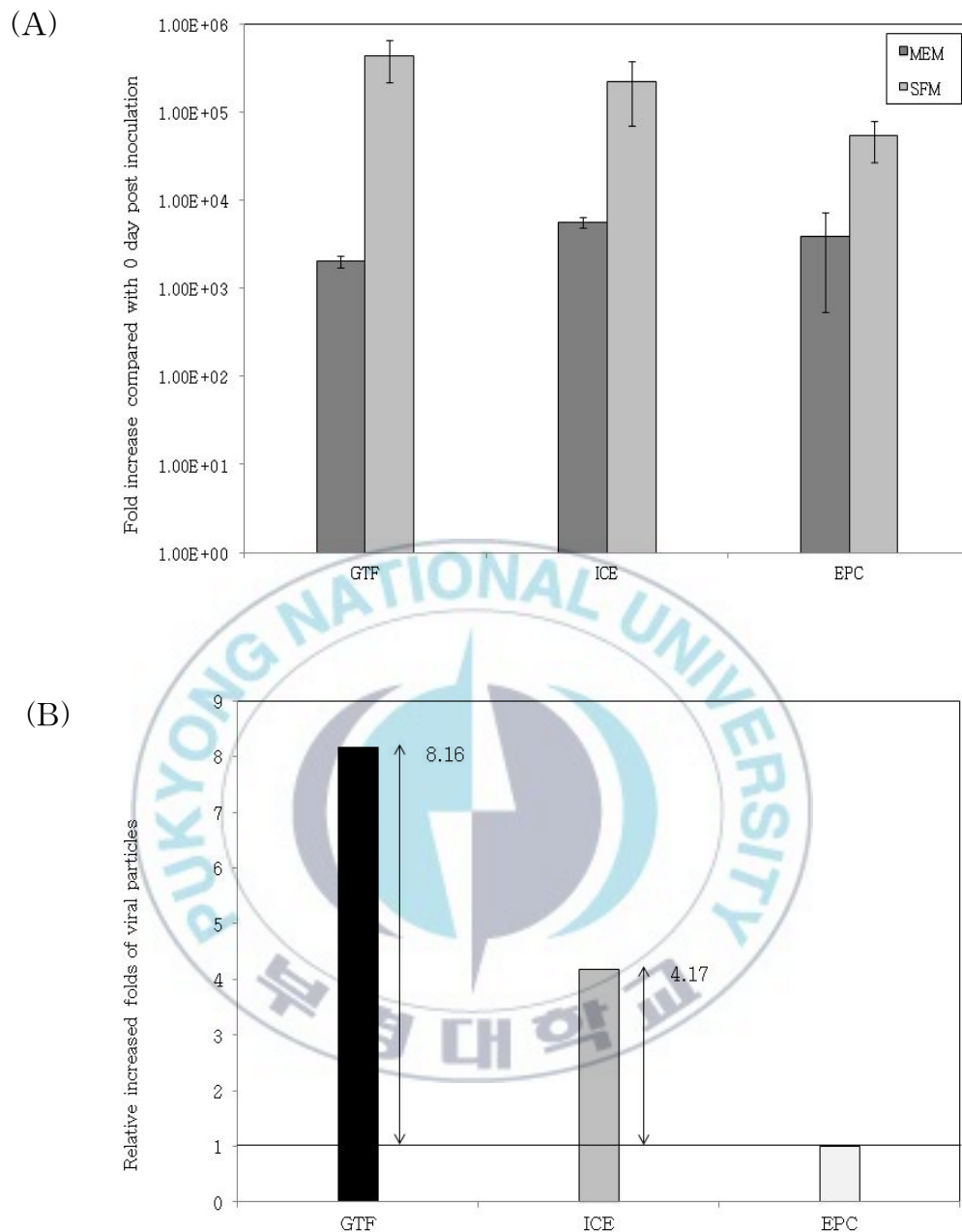


Fig. 14. Culturing of SVCV-K1 in GTF, ICE and EPC cells. Increased folds of viral particles (Max/Initial numbers of viral particles) (A), Relative increased folds of maximum viral particles in GTF, ICE and EPC cell challenged with SVCV K-1 in SFM (B).

5.4. GTF와 ICE cell의 바이러스 생산량 비교

GTF, ICE 그리고 EPC cell의 바이러스 생산량을 비교하기 위해 SVCV-K1을 1×10^2 copies/flask 농도로 접종하여 주고, 정량적 분석을 통해 intracellular viral particles와 released viral particles를 측정하였다. 그 결과 GTF는 한 개의 cell 내에 1.79×10^6 copies/cell, ICE는 1.02×10^6 copies/cell, EPC는 4.10×10^5 copies/cell을 가지고 있어 GTF와 ICE는 EPC 보다 각각 4.37배, 2.49배 높은 intracellular viral particles를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 GTF는 한 개의 cell이 1.35×10^1 copies/cell, ICE는 1.67×10^1 copies/cell, EPC는 2.89 copies/cell을 방출하여 GTF와 ICE는 EPC 보다 각각 4.67배, 5.78배 높은 released viral particles를 가지는 것을 확인하였다 (Table 3).

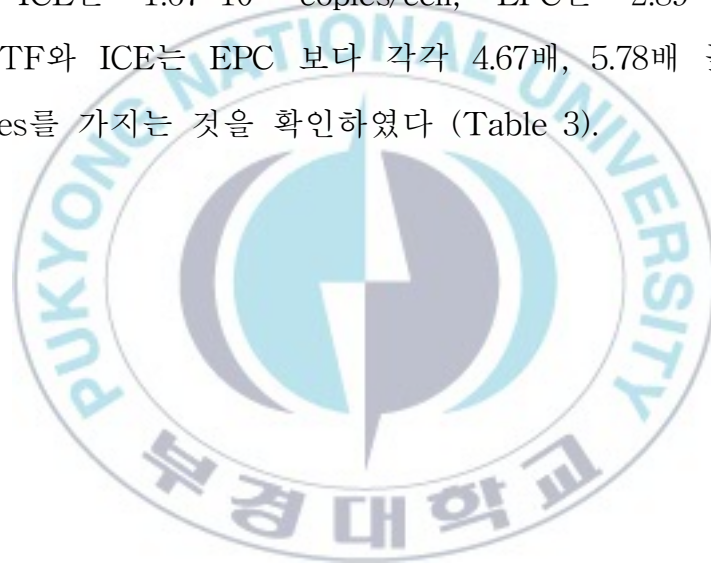


Table 3. Comparison of intracellular viral particles and released viral particles of GTF, ICE and EPC cells inoculated by SVCV-K1 (1.00E+02 copies/ml).

Cell	Total viral particles (copies/flask)	Total cell number (cells/flask)	Released viral particles/cell	Intracellular viral particles/cell
GTF	3.23E+04	1.20E+04	1.35E+01	1.79E+06
ICE	3.67E+06	1.10E+06	1.67E+01	1.02E+06
EPC	1.48E+06	2.56E+06	2.89E+00	4.10E+05

IV. 고 찰

본 연구에서는 경상북도 청도 운문댐 저수지의 자연산 토종잉어 (*Cyprinus carpio*)로부터 분자생물학적인 분석을 통해 아시아의 SVCV isolates와 유사한 SVCV-K1을 분리하였다. 국내의 자연산 토종잉어에서 SVCV의 분리는 처음 보고된 것이며, 이는 국내 잉어과 어류의 SVCV 연구에 있어서 중요한 바이러스로 사료된다.

먼저 2009년에 청도 운문댐 저수지의 자연산 토종잉어에 대량폐사가 있었으나 그 당시에는 감염 진단을 하지 못하였다. 다음해인 2010년 6월에 외관상 질병의 증세가 보이지 않고, 폐사도 나타나지 않는 자연산 토종잉어를 다량 채집하였고 그 중에서 3개의 시료를 무작위로 선택하여 SVCV에 대한 감염 진단을 실시하였다. 그 결과 세 개의 시료 중에서 한 시료에서 1-step PCR에서 707bp의 band를 나타내어 positive가 나왔으며, 또한 2-step PCR에서는 세 시료 모두에서 606bp의 band가 검출되었다. 이는 또한 무작위로 세 마리를 대상으로 감염 진단을 했음에도 세 시료에서 모두 SVCV가 검출되었다는 것은 임상증상을 나타내거나 폐사를 일으킬 감염의 정도는 아니나 SVCV가 이 지역에 만연해 있다고 추측해 볼 수 있다. 이와 비슷한 보고는 2002년 미국에서 SVCV로 15000마리의 비단잉어가 폐사하였고, 이 때문에 시설에 있는 다른 어류도 전량 안락사 되었다. 하지만 1년 후 모니터링 결과 건강한 어류에서 SVCV가 검출된 바 있다. 그리고 2011년, 2012년에 청도 운문댐에서 30마리 가량을 sampling 하여 검사하였을 때 1-step PCR에서 negative가 나왔다. 이것은 바이러스가 carrier 상태에서 expression 되지 않았으며, 계속 clearance가 일어나고 있었다고 추측해 볼 수 있다. 2002년부터

2003년까지 2개년에 걸쳐 낚시터 방류용 어류를 대상으로 RT-PCR을 실시하여 SVCV의 감염여부를 조사한 결과 negative를 보였으나, 2-step PCR에서는 2002년 5월에 채집한 시료는 100%로, 2003년 2월에는 33%, 4월에는 43%로 SVCV와 동일한 band가 검출되었다는 보고가 있다 (조미영 *et al.*, 2004). SVCV는 잉어 친어에서 무증상으로 persistent 상태로 감염될 수 있으며 (Békési & Csontos, 1985), 보유 숙주는 SVCV의 carrier 상태로 있는 양식산이나 자연산 어류뿐만 아니라 감염에서 살아남은 어류와 잉어를 포함한다 (Pfeil-Putzien 1977, Ahne, 1985a, Peters & Neukirch, 1986). SVCV는 일반적으로 SVC 감염에서 살아남거나 수온이 20℃이상인 여름에 검사된 어류에서는 분리될 수 없다. 무증상의 carrier 상태의 어류에서 SVCV가 분리된 보고는 봄에 샘플링된 친어의 생식액을 조직배양 하였을 때 SVCV가 검출되었다는 보고가 있다 (Bekesi and Csontos, 1985). 하지만 carrier 상태의 어류에서 PCR에 의하여 SVCV가 검출되는 것에 관한 연구는 없는 실정이다 (Goodwin, A.E. 2009).

계통발생학적 분석을 통해 SVCV-K1이 아시아의 isolates가 속하는 subgroup I a에 속한다는 것을 확인하였고, subgroup I a에 속하는 영국의 isolate의 경우 중국에서부터 수입된 어류에서 검출된 isolate이다. 이를 통해 국내에는 아직 유럽 국가들이 속하는 다른 subgroup의 isolate는 유입되지 않은 것으로 판단되어 진다. 따라서 subgroup I a 이외의 국외의 다른 subgroup의 유입의 예방을 위해 다른 subgroup에 대한 백신 개발 또는 국내형 백신의 다른 subgroup의 SVCV와의 교차반응의 확인 등의 대처가 필요할 것으로 사료된다.

조미영 *et al.*, 2004의 낚시터 방류용 어류의 잉어봄바이러스(SVCV) 진단에 관한 보고에서 검사시료의 조직을 마쇄하여 EPC 및 FHM cell

line에 접종하여 20℃에서 배양하였을 때, 세포배양에서 병원성이 확인되지 않았다고 보고한 바 있다. 하지만 본 실험의 토종잉어 시료의 비장을 마쇄하여 EPC cell line에 접종하여 20℃에서 배양하였을 때, MEM을 접종한 정상세포에서는 CPE가 관찰되지 않았지만, SVCV를 접종한 세포에서는 8일째에 CPE가 관찰되어 세포배양에서의 병원성을 확인하였다. 이를 통해 임상증상도 없었고, 폐사도 나타내지 않았던 상태였음에도 아직까지 바이러스가 살아있다는 것을 확인할 수 있었다.

또한 비단잉어에 SVCV-K1을 인위감염 시켰을 때 폐사된 대부분의 어체에서 체표 출혈, 복강 출혈과 같은 SVCV 감염 시 나타나는 전형적인 증상을 보였으며, 접종 후 5일 제부터 폐사가 진행되어 접종 후 20일째에는 63%의 폐사에 도달하여 명확한 병원성을 보여주었다. SVCV에 의한 폐사는 본 실험에서 실험어로서 사용한 1년 이하의 비단잉어와 같은 어린 잉어에서는 70% 이상의 폐사를 나타낸다고 한다 (Ahne *et al.*, 2002). 하지만 보통 1~40%의 폐사를 일으키며, 미국의 경우 SVC 발생으로 인해 20%의 폐사율을 나타냈다고 보고된 바 있다.

SVCV 질병을 진단하는 데 있어 polymerase chain reaction (PCR) 방법이 보편화되어 사용되고 있다. 하지만 PCR 방법은 SVCV의 검출 유무만 판별할 수 있어, 최근 간편하고 빠른 PCR 방법인 qPCR 방법이 SVCV의 검출에 적용되었다 (Zhiqin Yeu *et al.*, 2008). 따라서 본 연구에서는 qPCR을 이용하여 SVCV를 검출함과 동시에 정량적 분석을 실시하였다. 하지만 대부분의 문헌에서 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀)를 사용하여 SVCV의 titer를 측정하고 있어 TCID₅₀를 이용한 SVCV titer와 qPCR을 이용한 SVCV titer를 비교한 문헌을 통해, TCID₅₀에 비해 qPCR에서의 SVCV titer가 약 100배 가량 높게 검출됨을 참고하였다 (Nian Zhi Z hang., 2009). 본 실험에서의 세포에 바이러

스를 접종했을 때의 바이러스 농도와 비교를 위해 현재 SVCV를 배양하기 위한 가장 적합한 세포는 *epithelioma papillosum cyprini* (EPC) cell line (Fijan et al. 1983), the fathead minnow (FHM) cell line (ATCC CCL-42, Gravell & Malsberger 1965) 등의 어류 유래의 주화세포를 사용하여 배양한다. 이러한 주화세포들을 사용 시, SVCV의 감염 titer는 10^8 TCID₅₀ml⁻¹로 나타난다고 알려져 있는데 이를 qPCR을 이용했을 시 10^{10} copies/ml로 나타날 것이라고 예상할 수 있다. 하지만 본 실험에서 EPC cell에 MEM 배지를 사용하여 SVCV-K1을 1×10^4 copies/flask로 접종하였을 때 최고 4.78×10^7 copies/ml으로 증가하였다. 이러한 차이는 SVCV titer가 10^8 TCID₅₀ml⁻¹로 나타난다고 보고된 문헌들의 경우 SVCV-K1과 다른 subgroup에 속하는 유럽의 SVCV isoates를 사용하였으나 Nian Zhi Z hang., 2009에서 사용한 SVCV isolates는 SVCV-K1과 같은 subgroup에 속하는 중국의 isolates를 EPC cell과 grass carp ovary (CO) cell에 접종하였으며, 이 때 CO cell에서의 SVCV 감염은 EPC cell에서보다 더 높은 감수성을 나타내어 10^4 TCID₅₀ml⁻¹의 virus titer를 나타냈다. 약 10^6 copies/ml이라고 예상할 수 있고 이는 본 실험에서의 SVCV 농도와 비슷한 것을 확인할 수 있었다. 결론적으로 SVCV titer는 cell line과 식균농도 그리고 Lab에 따라서 차이가 나며 그 범위는 대략 $10^6 \sim 10^{10}$ copies/ml로서 생각할 수 있다.

SVCV의 예방은 겨울과 이른 봄에 사육밀도를 감소시켜서 바이러스의 확산을 줄이고, 수온을 19-20도씨 이상으로 올려주어 SVC 발생을 멈추게 하거나 예방할 수 있게 한다. 뿐만 아니라 안전하고 효과적인 백신을 사용할 수 있는데 현재는 이용할 수 있는 것이 없으나, 많은 불활화 백신, 생 약독화 백신, DNA백신 등이 연구되어지고 있다 (Dixon, 2008). 1978~ 1984 년 유럽에서 연구 되었지만, 바이러스의 activation에 관련된

문제와 법적인 문제 그리고 시장의 제한에 의해 상용화 되지 못했다. 효과적인 백신 개발을 위해서는 어류가 항원을 인식하고 강력한 항체를 생성할 수 있어야 하며, 항원의 농도는 항체의 titer를 결정하는 중요한 요소이다 (Yamashita et al., 2009). 특히 어류와 같은 하등척추동물의 경우 항원을 인식하는 능력이 포유류에 비해 낮기 때문에 높은 titer의 항원이 백신의 효과를 증대시키는데 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 따라서 국내의 잉어과 어류 양식 산업의 경제적 손실을 줄이기 위하여 앞으로 발병 우려가 있는 본 연구에서 검출 및 분리한 한국형 SVCV인 SVCV-K1에 대한 백신의 개발이 이루어져야 할 것이다. 하지만 EPC cell에서의 SVCV 농도는 불활화 백신의 농도로서 비교적 낮다고 판단되어 초대배양세포를 사용 시 IVS-1의 감염력이 증가한다는 보고 (Ji Woong Jin, 2014)를 참고하여 감수성이 다른 어종인 돌돔 자어, 이스라엘잉어 자어, 토종잉어 지느러미를 사용하여 초대 배양을 실시하였으며, host cell line인 EPC와 BF-2, CHSE-214, PMF cell과 함께 SVCV-K1에 대한 감수성을 비교해 보았다. 접종 3일 후 EPC, BF-2와 돌돔 자어, 이스라엘잉어 자어, 토종잉어 지느러미 유래의 초대배양 세포는 cytopathic effect (CPE)를 보였으며, 초기 접종한 농도 (1.0×10^4 copies/flask)에서 EPC는 최대 바이러스 농도가 3.86×10^7 copies/ml로 나타났다으며, BF-2는 2.50×10^7 copies/ml, 돌돔 자어 초대배양 세포는 2.62×10^7 copies/ml, 이스라엘잉어 자어 초대배양 세포는 2.90×10^7 copies/ml, 토종잉어 지느러미 초대배양 세포는 1.26×10^7 copies/ml로 나타났다으나 PMF와 CHSE-214의 경우 CPE도 관찰되지 않았으며, 뚜렷한 바이러스 수의 증가도 확인할 수 없었다 (Fig. 9). 이를 통해 초대 배양 세포에서 SVCV-K1에 대한 감수성은 어종에 따른 SVCV의 감수성과는 상관없이 모든 어종의 초대 배양 세포에서 모두 초기 접종 바이러스에

비해 1,000배 이상의 증가를 보여주었으나 host cell line인 EPC cell과 비슷한 바이러스 농도를 나타내었다. 바이러스 접종 시 SFM을 사용하여 VERO cell에 rabies virus를 접종하였을 때 바이러스의 복제를 증가시키며 (Frazzati-Gallina *et al.*, 2001), C8H와 GR tumor cell에 SFM을 사용하여 mouse mammary tumor virus를 접종하면 serum이 첨가된 배지와 비교했을 때 더 높은 titer의 바이러스를 획득할 수 있으며 (Richard *et al.*, 1976) 그리고 PMF cell에 SFM 사용 시 IVS-1의 감염력이 증가한다는 보고가 있다 (Ji Woong Jin, 2014). 이를 참고하여 본 연구에서는 주화세포와 초대배양 세포의 SVCV-K1에 대한 감염성을 증가시키고자 SFM을 사용하였다. EPC, BF-2, PMF, CHSE-214 cell과 돌돔 자어, 향어 자어, 토종잉어 지느러미 유래의 초대배양 세포를 SFM으로 교체한 후 같은 농도의 SVCV-K1 (1.0×10^4 copies/flask)을 접종한 결과 MEM 배지 사용 시와 유사한 CPE가 관찰되었으며, EPC는 5.37×10^8 copies/ml, BF-2는 7.35×10^7 copies/ml, 이스라엘잉어 자어 초대배양 세포는 6.78×10^7 copies/ml, 토종잉어 지느러미 초대배양 세포는 3.42×10^7 copies/ml로 증가하였다 (Fig. 10). EPC cell의 경우 MEM을 사용하여 접종하였을 때보다 SVCV-K1의 최대 바이러스 농도가 10배 이상 증가하였으나 BF-2와 다른 초대배양 세포들은 MEM을 사용하였을 때와 비슷한 감염성을 나타내었다.

본 연구에서는 금붕어 꼬리 지느러미와 이스라엘 잉어 자어 세포에서 유래된 GTF와 ICE cell를 확립하였다. GTF cell은 초대 배양일로부터 1년 이상 그리고 40회 이상 계대 배양을 실시하였으며, 형태적으로 fibroblast-like cell이었다 (Fig. 11c). ICE cell은 초대 배양일로부터 2년 이상 그리고 50회 이상 계대 배양을 실시하였으며, 형태적으로 epithelial-like cell의 형태를 보였다 (Fig. 12c). GTF cell의 경우 주화세

포로 확립되었다고 판단하기에는 계대배양 횟수가 적지만 ICE cell과 마찬가지로 현재까지 빠르고 지속적인 성장을 보이고 있으므로 주화세포로 확립되었다고 판단된다. 이스라엘 잉어 유래의 주화세포는 현재까지 연구된 바 없으며, 금붕어 세포 유래의 주화세포의 확립을 위한 많은 시도들이 있었지만 대부분 초대배양 세포에 국한되었다 (Wang et al., 1995, Akimoto et al., 2000, Li & Fukuda. 2003, Kondo & Watabe. 2004). 그리고 현재 상용화되어 있는 주화세포는 금붕어 지느러미 세포 유래의 CAR cell line (ATCC No. CCL-71)가 있다. 또한 금붕어 근육과 부레 세포를 사용한 goldfish muscle (GFM) cell과 goldfish swim bladder (GFSB) cell (Luc Rougee et al., 2007). 본 실험에서 확립한 GTF cell과 마찬가지로 금붕어 꼬리지느러미 세포를 사용한 goldfish tail fin (GFTF) cell (W Yan et al., 2011)이 있다. 이 GFTF cell에 $2.67 \log \text{TCID}_{50} \text{ ml}^{-1} \text{SVCV}$ 를 접종하였을 때 $8.5 \log \text{TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$ 로 증가하였으나 GFTF cell의 경우 SVCV와 Channel catfish virus (CCV)을 접종하였을 때 초기 접종 농도에서 host cell line에서의 감염성과 GFTF cell에서의 감염성의 차이가 SVCV와 CCV가 비슷한데도 특히 CCV에 관한 감수성에 주목하고 있다.

GTF와 ICE cell에 MEM 배지를 사용 시 SVCV-K1을 접종을 하였을 때 접종 후 3일 후에 CPE가 관찰되었고 (Fig. 13), 바이러스 (1.0×10^4 copies/flask)에 비해 GTF는 평균 2,020배 증가하여 평균 최대 바이러스 수는 2.02×10^7 copies/ml, ICE는 5,630배 증가하여 5.63×10^7 copies/ml, EPC는 3,860배 증가하여 3.86×10^7 copies/ml을 나타냈으며, 각각 최대 바이러스 수는 2.32×10^7 , 6.43×10^7 , 7.18×10^7 copies/ml을 나타내어 (Table 2, Fig. 14a) GTF cell, ICE cell, EPC cell에서 모두 SVCV-K1에 대한 비슷한 감염성을 나타내었다. GTF와 ICE cell에서 SFM에서 SVCV-K1

을 배양 시 바이러스 감염력을 EPC와 비교해보았다. 초기 접종량 (1.0×10^4 copies/flask)에 비해 각각 평균 438,000배, 224,000배 증가하여 평균 maximum viral copy number은 각각 4.38×10^9 , 2.24×10^9 copies/ml copies/ml로 나타났으며, EPC cell에서는 53,700배 증가하여 5.37×10^8 copies/ml을 나타냈다. 각각 최대 바이러스 수는 6.55×10^9 , 3.78×10^9 , 8.00×10^8 copies/ml을 나타냈다(Table 2, Fig. 14a). SVCV-K1의 증가값을 EPC cell에서의 증가값과 비교해 보았을 때 8.16배, 4.17배 더 높게 증가하였다 (Fig. 14b). 따라서 SFM을 사용 시 GTF와 ICE cell이 비슷한 SVCV-K1에 대한 감염력을 보이며, 이는 기존 주화 세포인 EPC cell에 비해 높다.

GTF, ICE와 EPC cell에 5×10^5 cells/flask 농도로 cell을 주입하여 배양한 후 80% confluency를 차지할 때 SVCV-K1을 접종하였으나 이때 cell 수에 차이가 날 것이라 판단하여 GTF, ICE 그리고 EPC cell의 하나의 cell이 생산하는 바이러스 양을 비교하기 위해 SVCV-K1을 lysis되는 cell의 수를 줄이기 위해 1×10^2 copies/flask 농도로 접종하여 주고, 정량적 분석을 통해 intracellular viral particles와 released viral particles를 측정하였다. 그 결과 GTF는 한 개의 cell 내에 1.79×10^6 copies/cell, ICE는 1.02×10^6 copies/cell, EPC는 4.10×10^5 copies/cell을 가지고 있어 GTF와 ICE는 EPC 보다 각각 4.37배, 2.49배 높은 intracellular viral particles를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 GTF는 한 개의 cell이 1.35×10^1 copies/cell, ICE는 1.67×10^1 copies/cell, EPC는 2.89 copies/cell을 방출하여 GTF와 ICE는 EPC 보다 각각 4.67배, 5.78배 높은 released viral particles를 가지는 것을 확인하였다 (Table 3). 특히 GTF의 경우 육안상으로 더 높은 비율의 confluency를 보이지만 cell 수는 더 작은 것으로 보아 수차례의

계대배양을 통해 위축되었을 가능성이 큰 EPC에 비해 cell의 크기가 크다고 보여지며, cell의 cytoplasm 내에 더 많은 바이러스를 축적할 수 있다고 생각된다. 이를 통해 MEM을 사용하여 SVCV-K1을 접종하였을 때 SVCV-K1이 GTF, ICE, EPC가 비슷한 바이러스 농도로 증가하고, SFM을 사용하였을 때는 GTF와 ICE가 EPC보다 높게 나타나는 결과가 cell 수를 맞춰서 접종한다면 EPC보다 GTF와 ICE에서 더 효율적인 SVCV-K1의 배양이 가능할 것으로 생각된다. 금붕어는 브라질에서 SVCV에 의한 질병이 발생한 이래로 SVCV에 감수성이 있는 어종으로 알려져 있으나 잉어가 SVCV의 주요한 감수성 어종이며, 잉어 세포 유래의 EPC cell에서 보다 금붕어 세포 유래의 GTF cell에서 SVCV-K1의 감수성이 더 높다는 점은 매우 흥미로운 점이라고 생각되며, 이를 통해 GTF cell과 SFM의 사용은 SVCV-K1의 다양한 연구를 하는데 적용 및 활용도가 높을 것으로 생각된다.

V. 요약

본 연구에서는 경상북도 청도 운문댐 저수지의 자연산 토종잉어 (*Cyprinus carpio*)로부터 분자생물학적인 분석을 통해 아시아의 SVCV isolates와 유사한 SVCV-K1을 분리하였고, SVCV-K1이 subgroup I a에 속하는 것을 확인하였다. 또한 *in vitro*상에서의 CPE 확인과 *in vivo*상에서의 인위감염을 통한 누적폐사율 확인을 통해 병원성을 확인하였다. 국내의 자연산 토종잉어에서 SVCV의 분리는 처음 보고된 것이며, 이는 국내 잉어과 어류의 SVCV 연구에 있어서 중요한 바이러스로 사료된다.

본 연구에서 개발한 GTF와 ICE cell에 MEM 배지를 사용 시 SVCV-K1을 접종을 하였을 때 EPC에서의 SVCV-K1과 비슷한 증가값을 나타내었다. 이를 SFM을 사용 시 GTF와 ICE cell이 비슷한 SVCV-K1에 대한 감염력을 보이며, 이는 기존 주화 세포인 EPC cell에 비해 높게 나타났다. 금붕어는 브라질에서 SVCV에 의한 질병이 발생한 이래로 SVCV에 감수성이 있는 어종으로 알려져 있으나 잉어가 SVCV의 주요한 감수성 어종이며, 잉어 세포 유래의 EPC cell에서 보다 금붕어 세포 유래의 GTF cell에서 SVCV-K1의 감수성이 더 높다는 점은 매우 흥미로운 점이라고 생각되며, 이를 통해 GTF cell과 SFM의 사용은 SVCV-K1의 다양한 연구를 하는데 적용 및 활용도가 높을 것으로 생각된다.

VI. 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 대학원 생활 동안 연구에 매진할 수 있도록 아낌없는 격려와 열정적인 가르침으로 이끌어주신 존경하는 정현도 지도 교수님께 깊은 감사의 마음을 드립니다. 그리고 저의 논문이 발전할 수 있도록 바쁘신 와중에도 기꺼이 소중한 조언을 아끼지 않으신 김기홍 교수님, 김도형 교수님께 깊이 감사드립니다. 학부 과정부터 석사과정에 이르기까지 끊임없이 격려해주시고 조언해주신 박수일 교수님, 정준기 교수님, 허민도 교수님, 강주찬 교수님께도 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 우주선배, 이슬, 민지, 서경이 에게도 고마움을 전하고 싶습니다. 그리고 실험실에 처음 들어와 모르는 게 너무 많았던 저에게 많은 도움을 주신 영철선배, 마지막까지 즐거운 실험실 생활을 하도록 도와준 재찬선배, 준규, 해성이, 형율이, 보경이, 민경이 에게도 고맙다고 말하고 싶습니다.

신입생 때부터 지금까지 즐거움을 주며 함께해주고 함께한 추억이 아주 많은 우리 주니어 미주, 선정이, 지애, 서경이, 그리고 나의 대학원생활에서 절대 빠뜨릴 수 없을 정도로 항상 서로 다독여주고 옆에서 응원해주고 같이 스트레스도 많이 풀러 다녔던 지선이언니, 초등학교 때부터 지금까지 특별히 즐거운 곳을 가지 않아도 그냥 얘기만 해도 진심을 털어놓을 수 있는 규비, 이제 곧 멋진 선생님이 될 나의 영원한 일인자 경은이, 요즘 단톡방으로 연락도 자주하고 고등학교 때 못지않게 초등학교 때 함께한 기억도 선명한 문영이와 신애, 그리고 앞으로 함께할 시간이 더 많고 그 시간이 더 기대되는 해성이, 이 모두에게 고마움을 전하고 사랑한다고 말하고 싶습니다.

그리고 그 어떤 말로도 형용할 수 없을 만큼 나에게 매우 소중하고 내가 가장 사랑하고 존경하는 우리 아빠, 엄마! 감사하고 사랑합니다. 앞으로 더 자랑스러운 딸이 될 수 있도록 할게요 ^_^. 대학교 때부터 떨어져 지내서 항상 매우 보고 싶고 매일 같이 얘기하고 싶은 언니도 고맙고 사랑해. 그리고 우리 끼끼도 오래오래 건강했으면 좋겠고 사랑해♥~



VII. 참고 문헌

- Ahne W., Bjorklund H.V., Essbauer S., Fijan N., Kurath G. & Winton J.R., 2002. Spring viremia of carp (SVC). Dis. aquat. Org. 52, 261 - 272.
- Ahne W., 1973. Zellkulturen aus verschiedenen Süßwasserteleosteeergeweben und Untersuchungen über die Ätiologie der Schwimmblasenentzündung der Karpfen. PhD thesis, Ludwig-Maximilians Universität, Munich.
- Ahne W., Kurath G. & Winton J., 1998. A ribonuclease protection assay can distinguish spring viremia of carp virus from pike fry rhabdovirus. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 18, 220 - 224.
- Ahne W., 1985. *Argulus foliaceus* L. and *Piscicola geometra* L. as mechanical vectors of spring viraemia of carp virus (SVCV). J. Fish Dis. 8, 241 - 242.
- Békési L, Csontos L., 1985. Isolation of spring viraemia of carp virus from asymptomatic broodstock carp, *Cyprinus carpio* L. J. Fish Dis. 8, 471 - 472.
- Clark HF, Soriano EZ., 1974. Fish rhabdovirus replication in non-piscine cell culture: new system for the study of rhabdovirus-cell interaction in which the virus and cell have different temperature optima. Infect Immun. 10, 180 - 188.
- Dixon P.F., 2008. Virus diseases of cyprinids. In: Fish Diseases, Vol. 1. Eiras J.C., Segner H., Wahli, T. & Kapoor, B.G. eds. Science

- Publishers, Enfield, New Hampshire, USA. 87 - 184.
- E. Gomez-Casado, A. Estepa, J.M. Coll., 2011. A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines Vaccine, 29 (March (15)), 2657 - 2671.
- Faisal M, Ahne W., 1990. A cell line (CLC) of adherent peripheral blood mononuclear cells of a normal common carp (*Cyprinus carpio*). Dev Comp Immunol. 14, 255 - 260.
- Fernandez RD, Yoshimizu M, Kimura T, Ezura Y., 1993. Establishment and characterization of seven continuous cell lines from freshwater fish. J Aquat Animal Health. 5, 137-147.
- Fijan N, Sulimanović O, Bearzotti M, Muzinić D, Zwillenberg LO, Chilmonczyk S, Vautherot JF, de Kinkelin P., 1983. Some properties of the *epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. Ann Inst Pasteur Virol. 134E, 207 - 220.
- Frazzati-Gallina NM, Paoli RL, Mourao-Fuches RM, Jorge SAC and Pereira CA., 2001. Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. J Biotechnol. 92, 67 - 72.
- Goodwin, A.E., 2009. Spring Viremia of Carp Virus (SVCV): Global Status of Outbreaks, Diagnosis, Surveillance, and Research. The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh. 61(3), 180-187.
- Gravell M, Malsberger RG., 1965. A permanent cell line from fathead minnow (*Pimephales promelas*). Ann NY Acad Sci. 126, 555 - 565.
- Hay R, Caputo J, Chen TR, Macy M, McClintock P, Reid Y, eds., 1992. ATCC catalogue of cell lines and hybridomas, 7th ed.

- Rockville, MD: American Type Culture Collection.
- Ji Woong Jin., 2014. Development of a RSIVD vaccine with in vitro cultural characteristics of megalocytivirus.
- Matsumoto J, Ishikawa T, Masahito P, Takayama S., 1980. Permanent cell lines from erythrophoromas in goldfish (*Carassius auratus*). J Natl Cancer Inst. 64, 879-890.
- Miller O, Fuller FJ, Gebreyes WA, Lewbart GA and others., 2007. Phylogenetic analysis of spring viremia of carp virus reveals distinct subgroups with common origins for recent isolates in North America and the UK. Dis Aquat Org. 76, 193 - 204.
- Nian Zhi Zhang, Li Feng Zhang, Yi Nan Jiang, Ting Zhang, Chun Xia., 2009. Molecular Analysis of Spring Viraemia of Carp Virus in China: A Fatal Aquatic Viral Disease that Might Spread in East Asian. PLoS one.
- OIE. Office International des Epizooties Manual of diagnostic for Aquatic Animals, Spring Viremia of Carp. OIE; 2012. Chapter 2.1.4.
- Oreshkova SF, Shchelkunov IS, Tikunova NV, Shchelkunova TI, Puzyrev AT, Ilyichev AA., 1999. Detection of spring viremia of carp virus isolates by hybridization with nonradioactive probes and amplification by polymerase chain reaction. Virus Res. 63, 3 - 10.
- Peters F, Neukirch M., 1986. Transmission of some fish pathogenic viruses by the heron, *Ardea cinerea*. J Fish Dis. 9, 539 - 544.
- Pfeil-Putzien C., 1977. New results in diagnosis of spring viremia of

- carp caused by experimental transmission of *Rhabdovirus carpio* with carp louse (*Argulus foliaceus*). Bull Off Int Épizoot. 87, 457.
- Richard FB, Larry OA and Donald LF., 1976. Propagation of mouse mammary tumor cell lines and production of mouse mammary tumor virus in a serum-free medium. In Vitro. 12, 558-563.
- Rougée L, Ostrander GK, Richmond RH, Lu Y., 2007. Establishment, characterization, and viral susceptibility of two cell lines derived from goldfish *Carassius auratus* muscle and swim bladder. Dis Aquat Organ. 77(2), 127-35.
- Shima A, Nikaido O, Shinohara S, Egami N., 1980. Continued in vitro growth of fibroblast-like cells (RBCF-I) derived from the caudal fin of the fish, *Carassius auratus*. Exp Geront 15, 305-314.
- Stone D.M., Ahne W., Denham K.D., Dixon P.F., Liu C.T.Y., Sheppard A.M., Taylor G.R. & Way K., 2003. Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups. Dis. Aquat. Org. 53, 203 - 210.
- Teng Y., Liu H., LV J.Q., Fan W.H., Zhang Q.Y. & Qin Q.W., 2007. Characterization of complete genome sequence of the spring viremia of carp virus isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) in China. Arch. Virol. 152, 1457 - 1465.
- Warg JV, Dikkeboom AL, Goodwin AE, Snekvik K, Whitney J., 2007. Comparison of multiple genes of spring viremia of carp viruses isolated in the United States. Virus Genes. 35, 87 - 95.
- Wolf K, Mann JA., 1980. Poikilotherm vertebrate cell lines and

- viruses: a current listing for fishes. In Vitro. 16, 168-179.
- Yan W, Nie P, Lu Y., 2011. Establishment, characterization and viral susceptibility of a new cell line derived from goldfish, *Carassius auratus* (L.), tail fin. J Fish Dis. 34(10), 757-68.
- Yue Z, Teng Y, Liang C, Xie X, Xu B, et al., 2008. Development of a sensitive and quantitative assay for spring viremia of carp virus based on real-time RTPCR. J Virol Methods. 152, 43 - 48.
- 조미영, 김명석, 도정완, 박명애., 2003. RT-PCR에 의한 낚시터 어류의 잉어봄바이러스(SVCV) 진단. 국립수산물과학원 사업보고서.
- 조혜진, 2006. 해산어와 담수관상어에 대한 iridoviruses의 교차 감염성 및 정량적 분석. 부경대학교 대학원 이학석사 학위논문.



