



저작자표시 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.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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

반복염기서열에 의한 넙치 이리도 바이러스의 다양성분석



2014년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

김 영 철

이 학 석 사 학 위 논 문

반복염기서열에 의한 넙치 이리도 바이러스의 다양성분석

지도교수 정 현 도

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함



2014년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

김 영 철

김영철의 이학석사 학위논문을 인준함.

2014년 2월



주 심 이 학 박 사 김 기 홍 (인)

위 원 이 학 박 사 강 주 찬 (인)

위 원 이 학 박 사 정 현 도 (인)

목 차

Abstract

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 바이러스 분석	4
1.1 바이러스 검출 및 분석	4
1.1.1 <i>Megalocytivirus</i> subgroup별 virus	4
1.1.2 검출 시료	4
1.2. 바이러스의 핵산 분리	7
1.3. PCR	8
1.3.1. Primers	8
1.3.2. PCR amplification	10
1.4. Cloning	11
1.5. 염기서열 분석 및 계통수 제작	12
1.6. Real-time PCR	13
2. PCR amplification 검증	15
2.1 각 polymorphic variant에 대한 PCR test	15
2.2. Polymorphic variants간의 concentration 차이 검증	16
2.3. Polymorphic variants에 대한 stability test	17
3. <i>in vivo</i> 공격실험	18
3.1. 실험어 및 virus	18
3.2. 교차공격실험과 passage 실험	19
3.3. Cohabitation 실험	20
4. <i>in vitro</i> 접종실험	21

4.1. 돌돔자어세포의 초대배양	21
4.2. Inoculation	22
III. 결 과	23
1. 이리도 바이러스의 반복서열 분석	23
1.1. <i>Megalocytiavirus</i> 의 polymorphism pattern 분석	23
1.2. 각 polymorphic variant에 대한 PCR test	26
1.3. Polymorphic variant간의 concentration 차이 검증	27
1.4. Polymorphic variants에 대한 stability test	38
2. Repeating sequence 및 Polymorphism 분석	29
3. 모니터링을 통한 FLIV isolates 분석	38
3.1. 국내외 양식해산어에서 분리된 FLIV isolates의 분석	38
3.2. 국내산 패류에서 분리된 FLIV isolates 분석	39
3.3. 계통수 분석	42
4. <i>in vivo</i> 공격실험	46
4.1. 교차공격 passage 실험	46
4.2. Cohabitation 실험	49
5. <i>in vitro</i> 접종실험	53
5.1. <i>in vitro</i> passage 실험	53
IV. 고 찰	57
V. 요 약	71
VI. 감사의 글	73
VII. 참고문헌	75

Characterization of polymorphism based on repeating sequence in flounder iridovirus

Young-Chul Kim

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

Abstract

We examined the various sizes of amplicon in PCR with a single set of primers derived from an open reading frame, ORF-2, in the megalocytivirus obtained from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) cultured in Korea. From sequence analysis of the multiple amplicons, we demonstrated the presence of distinct genomic polymorphisms in the ORF-2 gene with differing numbers of repetitive element of 60 amino acids or 69 amino acids. 2-step PCR with the cloned plasmid templates of three different sizes of produced amplicon and mixed templates of these three cloned plasmids did not produce any PCR product with a length different from the original templates. Moreover, we did not observe the disappearance of any different lengths of amplicon in PCR with isolated from tissue homogenate incubated more than 10 minutes. These results implied that the amplicons are not derived from artifacts of PCR and viral DNAs used as template are present in viral particles rather than as a naked nucleic acid. FLIV-1 after challenge experiments in two different host species, olive flounder and rock bream (*Oplegnathus fasciatus*), and in vitro inoculation experiment in primary rock bream embryo cell displayed the same feature of polymorphism in the ORF-2 gene as those in the original sample. In monitoring experiments, the same pattern of polymorphism in ORF-2 region were found in comparison of each other 14 FLIV isolates in marine fishes from 2003 to 2013. Additionally, from 2006 to 2009, 16 FLIV isolates obtained from shellfish known as a suspected reservoir of viruses released from

infected fish also showed the same polymorphism in ORF-2 region except 2 and 3 isolates showing a single and double bands respectively in gel electrophoresis after PCR. Based on the MCP gene sequences and characterized pattern of repeating sequence in ORF-2 region, FLIVs (14 and 16 isolates obtained from fish and shellfish of this study and reported from other laboratories respectively) were further grouped to 6 and 3 different sub-subgroups respectively (FLIV sub-subgroup 1-6, and FLIV-1, 2 and 3 type). Out of 30 isolates, 25 isolates were grouped in FLIV-1 type and assumed as major repeating sequence type in FLIVs in Korea. In comparison of these sub-subgroups distinguished by nucleotide sequence of different genomic region in FLIV, we found the relationship of groups between FLIV-1 type and FLIV sub-subgroup 1, 3, 5, 6 and FLIV-2 type and FLIV sub-subgroup 4, 5 and FLIV-3 type and FLIV sub-subgroup 2. Although TRBIV reported in China and CH-1 obtained from imported fish from China can be distinguished as a separated sub-subgroup 2, in FLIV-type grouping manner, TRBIV was a member of FLIV-2 type and different from CH-1 of FLIV-3 type. Consequently, fish can be infected by a single or multiple types of particle in FLIV, and the genomic polymorphism might be formed by replication of each different polymorphic type of viral particle that has the same potential to produce the viral genomic DNA for progeny virus.

I. 서 론

Family Iridoviridae는 세계적으로 많은 양식 해산어 또는 담수어에 있어 심각한 경제적 손실을 일으키고 있다. 현재 International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 는 Family Iridoviridae를 *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Ranavirus*, *Lymphocystivirus* 그리고 *Megalocyctivirus* 총 5속의 genera로 분류한다. 그 중, *Megalocyctivirus*는 1990년 일본의 red sea bream, *Pagrus major*로부터 RSIV (red sea bream iridovirus) 가 처음으로 알려진 후 (Inouye et al., 1992) 광범위한 어류 중에서 계속적으로 발견되었고, 이들은 *Megalocyctivirus* MCP gene의 계통분석에 의해 4개의 subgroups로 나뉜다. subgroup I 은 RSIV를 포함하고 있으며, subgroup II 는 국내 주요 병원체로서 매년 돌돔 등에 대량 폐사를 일으키는 RBIV (rock bream, *Oplegnathus fasciatus* iridovirus)를 포함하며 (Do et al., 2004) subgroup III 은 중국의 담수 식용어인 mandarin fish, *Siniperca scherzeri* 에서 분리된 ISKNV (Infectious spleen and kidney necrosis virus) 가 대표적이며, (He et al., 2001) subgroup IV 는 flat fish류인 넙치 (olive flounder, *Paralichthys olivaceus*) 와 turbot (*Scophthalmus maximus*) 으로부터 분리되며 TRBIV (turbot reddish body iridovirus) 가 대표적이다 (Shi et al., 2004).

Olive flounder에 발생하는 iridovirus는 세계적으로 국내에서만 FLIV 등이 보고되어 국내 넙치 양식장에 적지 않은 피해를 주고 있으며 (Do et al., 2005), 최근에는 양식 starry flounder, *Platichthys stellatus* 에서

도 발병하여 폐사를 일으켜 큰 피해를 일으켰다는 보고가 있다 (Won et al., 2013). 최근에는 olive flounder의 iridovirus 피해 보고가 거의 전무하고 이에 대한 연구 또한 다른 subgroup에 비해 활발하지 못한 실정이지만, 국내 양식넙치생산량만 보더라도 총 양식생산량의 약 20%를 차지하고 있고, 세계적으로도 flat fish의 양식생산량과 수입 수출량은 상당한 비율을 차지하고 있으므로 *Megalocytyivirus* subgroup IV 에 대한 연구는 중요하다고 할 수 있다 (Lei et al., 2005).

Family Iridoviridae의 바이러스는 DNA의 환상 변이와 최종 끝 부위가 반복되는 독특한 특성을 가진다. 이러한 반복서열은 LCDV-1, CIV, RSIV 등에서 보고된 바 있다 (Samalecos et al., 1986, Robin et al., 2000, Walker et al., 1980). 현재까지의 연구 추이를 본다면 다양한 subgroup에 대한 *Megalocytyivirus*의 비교에 있어 DNA 염기차이에만 치중되어 있고, 다양한 변이를 나타낼 수 있는 repeating sequence의 유전적 변화와 특성에 대한 비교연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 하지만 최근에 해산양식어와 담수관상어에 각각 폐사를 유발하는 RBIV (Rock bream iridovirus, subgroup II) 와 PGIV (Pearl gourami *Trichogaster leeri* iridovirus, subgroup III) 의 ORF-2 gene 내의 말단부에 위치한 repeat region인 K2 region의 염기서열 비교분석을 통하여 subgroup 간의 차이와 PGIV에서 나타나는 다양한 polymorphism 현상이 알려진 바 있다 (Kim et al., 2011).

따라서 본 연구는 넙치이리도바이러스 (FLIV, subgroup IV) 의 K2 region에서도 polymorphism 현상을 나타낼 것이라는 가설을 세우고 i) subgroup별 K2 region의 polymorphism 확인과 반복염기서열 분석, ii) K2 region의 유전적 분석을 통해 polymorphism 현상의 원인 분석, iii) 모니터링을 통해 다수의 검체를 분리하여 polymorphism을 분석, iv)

polymorphism현상을 host defense system에 대한 virus regulation이라 가정하고 *in vivo* 교차감염을 통한 변이 분석, v) host defense system이 없는 *in vitro* 접종 실험을 통한 변이를 분석하여 넵치이리도바이러스의 감염 특성과 *Megalocytivirus*의 polymorphism 특성을 subgroup별로 비교 분석하며 심도 있게 연구하고자 하였다.



II. 재료 및 방법

1. 바이러스 분석

1.1. 바이러스 검출 및 분석

1.1.1. *Megalocytivirus* subgroup별 virus

*Megalocytivirus*에 속하는 각 subgroup의 virus별로 K2 region에 대한 polymorphism을 확인하였다. 먼저 통영의 돌돔 (*Oplegnathus fasciatus*)에서 IVS-1 (subgroup II), 싱가포르에서 수입된 담수 관상어인 pearl gourami(*Trichogaster leeri*)에서 PGIV (subgroup III), 통영의 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서 FLIV-1 (subgroup IV)를 각각 분리하였다.

1.1.2. 검출 시료

본 연구는 2000-2013년의 국내외 해산어의 spleen과 2006~2013년의 국내산 패류의 midgut gland에서 핵산을 분리하여 PCR을 시행하였고, 검출된 검체에 대해 cloning과 sequencing을 시행하여 *Megalocytivirus* subgroup IV를 검출하였다 (Table 1).

Table 1-1. FLIV isolates in marine fishes

Isolates	Year/ Month		Region	Host	1 st PCR	2 nd PCR
CH-1	2003	03	중국	점농어 <i>Lateolabrax</i> sp.	-	+
FLIV-1	2006	10	경남 통영	넙치 <i>Paralichthys olivaceus</i>	+	NT*
12/07FLIV-ty	2007	12	경남 통영	넙치 <i>Paralichthys olivaceus</i>	+	NT*
05/08FLIVas-ty	2008	05	경남 통영	넙치 <i>Paralichthys olivaceus</i>	-	+
11/09FLIV-ph	2009	11	경북 포항	넙치 <i>Paralichthys olivaceus</i>	+	NT*
12/09FLIVas-ph		12	경북 포항	넙치 <i>Paralichthys olivaceus</i>	-	+
06/10RFIVas-ty	2010	06	경남 통영	조피볼락 <i>Sebastes schlegeli</i>	-	+
11/10FLIV-gi		11	부산 기장	넙치 <i>Paralichthys olivaceus</i>	+	NT*
08/11FLIV-ty	2011	08	경남 통영	넙치 <i>Paralichthys olivaceus</i>	+	NT*
08/11SCIVas-ty			경남 통영	쏨뱅이 <i>Sebastiscus marmoratus</i>	-	+
FLIV-2	2012	08	경북 포항	넙치 <i>Paralichthys olivaceus</i>	+	NT*
08/12SFIV-ph			경북 포항	강도다리 <i>Platichthys stellatus</i>	+	NT*
08/13FLIVas-ph	2013	08	경북 포항	넙치 <i>Paralichthys olivaceus</i>	-	+
08/13FLIVas-gi			부산 기장	넙치 <i>Paralichthys olivaceus</i>	-	+

*Not tested

Table 1-2. FLIV isolates in shellfishes

Isolates	Year/ Month		Region	Shellfish
10/09sfFLIVoy-jh	2009	10	울산 진하	참굴 <i>Crassostrea gigas</i>
03/10sfFLIVoy-jh	2010	03	울산 진하	참굴 <i>Crassostrea gigas</i>
03/10sfFLIVoy-ty			경남 통영	참굴 <i>Crassostrea gigas</i>
05/10sfFLIVoy-gw		05	부산 광안	참굴 <i>Crassostrea gigas</i>
05/10sfFLIVgo-ty			경남 통영	꼬막 <i>Tegillarca granosa</i>
05/10sfFLIVdm-ty			경남 통영	담치 <i>Mytilus edulis</i>
05/10sfFLIVba-gj			경남 거제	바지락 <i>Tapes philippinarum</i>
08/10sfFLIVoy-gw		08	부산 광안	참굴 <i>Crassostrea gigas</i>
08/10sfFLIVdh-nh			경남 남해	대합 <i>Donax trunulus</i>
11/10sfFLIVoy-jh		11	울산 진하	참굴 <i>Crassostrea gigas</i>
11/10sfFLIVoy-ty			경남 통영	참굴 <i>Crassostrea gigas</i>
11/10sfFLIVoy-gj			경남 거제	참굴 <i>Crassostrea gigas</i>
01/11sfFLIVoy-nh	2011	01	경남 남해	참굴 <i>Crassostrea gigas</i>
01/11sfFLIVgo-ty			경남 통영	꼬막 <i>Tegillarca granosa</i>
03/11sfFLIVoy-gs		03	경남 고성	참굴 <i>Crassostrea gigas</i>
09/11sfFLIVba-ss		09	충남 서산	바지락 <i>Tapes philippinarum</i>

1.2. 바이러스의 핵산 분리

감염어의 spleen 조직 10 mg 또는 패류의 midgut gland 조직 10 mg으로부터 AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer) 를 사용하여 제조사의 protocol에 따라 최종 100 μ l의 elution buffer를 사용하여 핵산을 분리하였다. 분리한 DNA는 실험 전까지 -20℃에서 보관하였다.



1.3. PCR

1.3.1. Primers

*Megalocytivirus*의 감염 확인을 위해 사용한 primer는 MCP gene을 검출하는 M1F/M1R primer set를 사용하였고, 그 중 1st PCR에서 검출되지 않은 sample에 대해서는 M2F/M2R primer set를 사용하여 nested PCR을 시행하여 확인하였다 (Table 2). 반복서열의 확인 및 구별을 위해 Jeong et al. (2006)가 제작한 K2 region의 IK2F, IK2R을 사용하여 PCR을 시행하였고, asymptomatic infection된 어류나 패류에 대해서는 이 부위에 대해 nested PCR을 시행하여 확인하였다 (Fig 1).

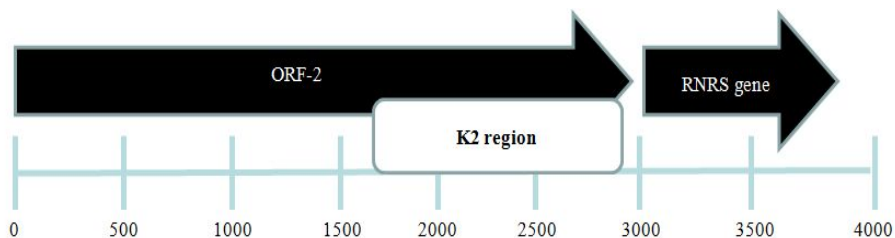


Fig 1. Schematic illustration of the K2 and IGR-RR regions of the iridovirus TRBIV (Accession Number GQ273492)

Table 2. PCR primer used in this study

Genomic region	Primers	Oligonucleotide sequence (5' to 3' direction)	Expected size of amplicons**	Reference
MCP gene	M1F	GAGAGACCCCAACACGAC	1220 bp	Oshima <i>et al.</i> (1996)
	M1R	ACCTGGTGGCTCCAGTGC		
	M2F	GGCGGCGACAATGCCGTG	908 bp	
ATPase gene	M2R	ATAACGACCAGTTCAAAC	562bp	Kurita <i>et al.</i> (1998)
	3F	CAAACCACAGCGCGGCAAGT		
	3R	AGTAGCGCACCATGTCCTCC		
K2 region	IK2F	GTGCACAGTCGCAATAC	1168bp	Jeong <i>et al.</i> (2006)
	IK2R	CCATCTTTATAATAAACCAG		
	IK3F	ATGTGCACAGTCGCAATACC	617bp	In this study
	IK3R	CTTTCCAGCTGCATGTTGAG		

*Real-time PCR primer sets

**based on the nucleotide sequence of FLIV-1-pp1.

1.3.2. PCR amplification

본 연구의 PCR은 0.2ml microtube에 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001%(w/v) gelatin, 0.5% Tween-20, 0.2 mM의 각 각의 dNTP, 1 μ M의 각각의 primer sets, 1.25 U AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) 및 template DNA로써 분리된 핵산을 첨가한 후, DEPC water로 PCR 혼합물의 최종량이 20 μ l가 되게 하였다. PCR amplification은 Applied Biosystems 2720 thermal cycler(ABI)를 사용하였으며, PCR 조건은 94°C에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C 30초 denaturation, 55°C 30초 annealing, 72°C 30초 extension하여 30cycles 반응시키고 cycle을 마친 후, 72°C에서 7분간 post-extension 시켰다. 증폭된 산물은 0.5 μ g/ml ethidium bromide (EtBr)가 첨가된 2% agarose gel (SeaKem[®] LE Agarose, CAMBREX bio Science Rockland, Inc, USA)을 완충액 0.5X TAE buffer(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)에 넣어 전기영동을 실시한 후, UV 검출기 (Seoulin Scientific Co., Ltd., Korea)를 이용하여 특이적 밴드를 관찰하였다. 1st PCR에서 negative의 결과가 나온 시료는 nested PCR을 즉시 시행하였다. 총 20 μ l의 반응액에 1st PCR product 1 μ l를 template으로 하고 앞서 설명한 PCR 방법과 동일하게 시행하여 nested PCR을 시행하였다.

1.4. Cloning

PCR products는 2% agarose gel에 전기영동 후, band를 구분 절제한 후, GeneAll® Expin™ Gel SV (GeneAll Biotechnology, Korea)를 사용하여 정제하였고, 정제된 DNA는 pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, USA)를 사용하여 plasmid vector에 ligation을 시킨 후, competent cell (*E. coli* DH5α-T1) 100μl를 첨가하여 ice에서 30분간 반응시키고, 42℃에서 40초간 heat-shock을 준 뒤, 즉시 ice에서 3분간 반응 후 SOC broth (Tryptone 20 g/L, Yeast extract 24 g/L, NaCl 0.5g/L, 250 mM KCl 10 mg/L, 10 ml of a sterile solution of 1 M MgCl₂, 20 ml Filter sterile 1 M glucose/L)를 250 μl 첨가하고, 37℃, 90분간 진탕 배양시켰다. 배양액을 Ampicillin 50 μg/ml과 X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside, sigma, USA) 40 μg/ml이 첨가된 LB (Luria-Bertani, Difco, USA) 평판배지에 도말하여, 37℃에서 18시간 동안 배양시켰다. 푸른색과 흰색의 집락이 증식하는 것을 확인하고 흰색으로 나타나는 colony를 선택하여 Ampicillin 50 μg/ml가 첨가된 LB broth에 접종 후, 37℃에서 18시간 배양하여 GeneAll® Plasmid SV mini kit (GeneAll Biotechnology, Korea)를 이용하여 plasmid를 분리하였다.

1.5. 염기서열 분석 및 계통수 제작

분리된 plasmid를 Big Dye Terminator Cycle DNA Sequencing Kit (ABI PRISM PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 삽입된 염기서열을 밝혔다. K2 부위에 대한 각 iridovirus의 염기서열은 MACAW program (Version 2.0.5., National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 사용하여 비교, 분석하였다.

또한, 본 연구에서 국내외 어패류 검체를 통해 분리한 총 31가지의 virus isolates와 각각 1종씩의 *Megalocytiavirus* subgroup별 reference iridovirus의 MCP gene을 Mega4 program (Version 4.0 R2., Based on CHAPM, USA)을 사용하여서 phylogenetic tree를 제작하여 계통발생학적으로 비교, 분석하였다.

1.6. Real-time PCR

*Megalocytivirus*의 real-time PCR을 통한 정량적 분석을 실시하기 위해서 MCP gene이 cloning된 plasmid를 사용하여 standard curve를 제작하였으며 방법은 다음과 같다. *Megalocytivirus*의 real-time PCR standard를 제조하기 위해서 *Megalocytivirus*에 감염된 넙치로부터 분리된 FLIV-1 isolate의 genomic DNA를 주형으로 qM1F (5'-GGC GAC TAC CTC ATT AAT GT-3')와 qM1R (5'-CCA CCA GGT GGT TAA ATG-3') primer set를 사용하여 qPCR을 시행하였다. 준비된 standard plasmid DNA를 Quanti-TTM Picogreen[®] dsDNA reagent and Kits (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 농도를 측정하고 이로부터 plasmid copy를 결정한 후 $2 \times 10^7 \sim 2 \times 10^1$ copy로 각각 10-fold 씩 단계 희석하여 표준검량곡선을 작성하는데 사용하였다. 그리고 바이러스의 정량적 분석을 위해 Rotor-GeneTM 6000 (Corbett Research, AUS)을 사용하여 real-time PCR을 실시하였다. real-time PCR을 실시하기 위한 조건은 10×buffer 2 μ l, 200 μ M의 각각의 MC1F/MC1R primer, Hot star Taq (HS prime Taq DNA polymerase, Genet Bio, Korea) 및 10-fold 단계 희석된 standard plasmid 또는 template를 0.2 ml tube에 분주한 후, 최종적으로 EvaGreen (Biotium, Korea) 1 μ l를 첨가하였다. real-time PCR은 95℃에서 10분간 pre-denaturation 시킨 후, 95℃에서 10초 denaturation, 55℃에서 15초 annealing, 72℃에서 20초 extention의 반응을 1 cycle로 하여 40 cycle 수행하였다.

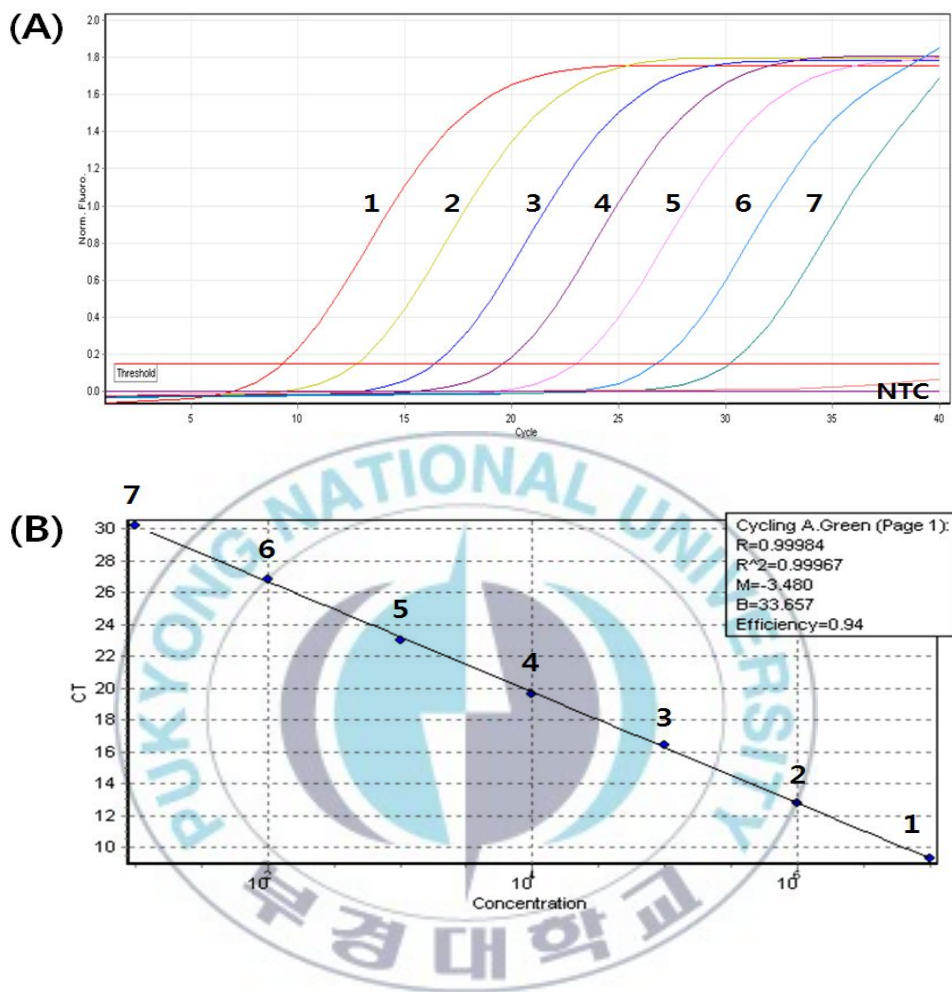


Fig 2. (A) Amplification plot of real-time PCR of the positive plasmid DNA with different copy number. Lane 1-7, with serially diluted plasmid DNA prepared from 1.0×10^7 to 1.0×10^1 copies/ μl ; NTC, no template control (B) Standard curve showing a linear relationship between positive plasmid concentration and cycle threshold number

2. PCR amplification 검증

2.1 각 polymorphic variant에 대한 PCR test

Cloning을 통해 plasmid에 FLIV-1-pp1, FLIV-1-pp2, FLIV-1-pp3의 amplicon을 각각 삽입하였고, 이를 template으로 IK2F/IK2R primer set로 PCR하여 하나의 variant에서 정확히 그에 맞는 size의 single band pattern이 나타나는지 확인하였다. 그리고 3가지 variants plasmid를 모두 혼합 후에 이를 template으로 IK2F/IK2R primer를 이용하여 PCR을 하였을 때, 정확히 3가지 amplicon만이 증폭이 되어 나타나는지 확인하였다. 또한 Iridovirus가 검출되지 않은 넙치 spleen 조직과 굴의 midgut gland의 homogenates를 K2에서 나타나는 variants인 FLIV-pp1, FLIV-pp2, FLIV-pp3 각각이 cloning된 plasmid와 혼합한 후, AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer)를 이용하여 핵산을 분리하고 IK2F/IK2R primer를 이용하여 PCR을 하였을 때, 정확히 각각의 검체에 일치하는 amplicon만이 증폭이 되어 single band pattern으로 나타나는지 확인하였다.

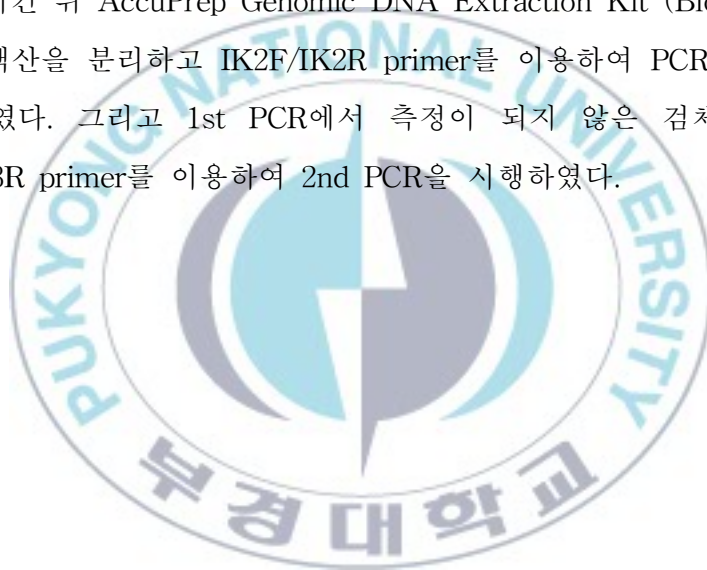
2.2. Polymorphic variants간의 concentration 차이 검증

Cloning된 variants의 plasmid DNA를 Quanti-T™ Picogreen® dsDNA reagent and Kits (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 동일한 copy값으로 각각 희석하였고, 이를 동일한 비율로 혼합하여 PCR을 하여 동일한 band density를 보이는 지 확인하였다. 그리고 variants간의 양적차이를 확인하기 위해 가장 진한 band density를 보였던 FLIV-pp1의 plasmid의 copy값을 고정하고 FLIV-pp2와 FLIV-pp3 plasmid를 2-fold 단계희석하여 2^6 희석배수까지 준비한 후, 각각의 검체를 모두 혼합하여 PCR을 통해 band density를 확인하였다.



2.3. Polymorphic variants에 대한 stability test

각각의 검출된 polymorphic variants가 viral particle로 생성이 되는지 확인하기 위해 stability test를 시행하였다. Real-time PCR을 이용하여 copy값이 측정된 FLIV-1 DNA와 cell에서 배양된 FLIV-1 상등액을 $1.0E+06$ copies/ml의 동일한 농도로 희석한 후, 각각 감염되지 않은 돌돔 spleen 조직의 homogenates에 혼합하여 1분과 10분의 시간동안 실온에 방치시킨 뒤 AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer)를 이용하여 핵산을 분리하고 IK2F/IK2R primer를 이용하여 PCR을 하여 측정을 하였다. 그리고 1st PCR에서 측정이 되지 않은 검체에 대해선 IK3F/IK3R primer를 이용하여 2nd PCR을 시행하였다.



3. *in vivo* 공격 실험

3.1. 실험어 및 virus

실험어는 우리나라의 주요 해산 양식 어종인 돌돔 (*Oplegnathus fasciatus*), 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)를 통영의 양식장에서 각각 구입하였고, 각 어류는 각각 40 ℓ 수조에서 1일 1회 사료 투여 및 사육수 환수를 하며 $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 에서 7일간 순치시켰다. 모든 어종은 M1F/M2R primer와 M2F/M2R primer sets (Table 2)를 사용한 PCR 방법으로 iridovirus에 감염되지 않음을 확인한 후, 공격실험에 사용하였다. 공격실험에 사용한 접종액은 FLIV-1과 IVS-1에 각각 감염된 넙치와 돌돔 비장을 100 mg/ml의 농도로 균질화한 뒤에 0.45 μl syringe filter에 통과시킨 후, real-time PCR을 이용하여 모두 $1.0\text{E}+06$ copies/ml의 동일한 농도로 희석하여 사용하였고 남은 바이러스 접종액은 -80°C 에 보관하였다.

3.2. 교차공격실험과 passage 실험

반복서열분석을 통해 분류된 변이주 간의 병원성의 차이를 확인하기 위해 다른 반복서열을 보이는 두 *Megalocyttivirus*인 IVS-1과 FLIV-1을 각각 넙치와 돌돔에 공격실험을 실시하였다. 어종별로 폐사율 측정 그룹, 감염율 측정 그룹으로 나누어 각각 10마리씩 배치시키고, 접종액 0.1 ml 을 어체 복강에 injection을 하였으며 $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 의 수온에서 사육수를 매일 환수하면서 감염율 측정 그룹은 14일 동안, 폐사율 측정 그룹은 24일 동안 진행하였다. Sampling된 검체에 대하여 PCR을 이용하여 바이러스 감염을 확인한 후 polymorphism pattern 변화에 대한 분석과 동시에 폐사율, 감염율도 측정하였다. 또한 동일한 방법으로 3회의 passage 실험을 연속으로 진행하여 polymorphism pattern 변화를 분석하였다. 3번째 passage에서 분리된 FLIV의 sequencing을 통해 K2 region의 염기서열변화를 측정하였다.

3.3. Cohabitation 실험

넙치 donor group, 넙치 recipient group 그리고 돌돔 recipient group 각 10마리씩 하나의 150 l 수조에 모두 배치하고 FLIV-1 접종액을 넙치 donor에 0.1 ml씩 복강주사를 한 후, $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 의 수온에서 사육수를 매일 환수하면서 24일 동안 cohabitation 실험을 진행하였다. 3일마다 환수하기 직전에 사육수를 sampling 하였고 실험종료일에 모든 group을 sampling하여 polymorphism pattern을 분석하고 감염율과 폐사율을 측정하였다.



4. *in vitro* 접종 실험

4.1. 돌돔자어세포의 초대배양

전라남도 여수의 양식장에서 구입한 돌돔 (*Oplegnathus fasciatus*)의 수정란을 멸균된 해수로 충분히 세척한 뒤 22℃의 멸균해수에서 부화시켰다. 부화한 자어는 100× antibiotics and antimycotics (Gibco)가 포함된 Minimum Essential Medium (MEM, Sigma-Aldrich)에서 washing 후, mesh를 이용하여 단일세포로 만들었다. 4℃ 500 g에서 10분간 원심분리를 통해 단일세포 이외의 물질을 washing하는 작업을 3회 반복하였고, 최종적으로 10% Fetal Bovine Serum (Gibco)가 포함된 MEM 배지에 현탁하였다. Tryphan blue 염색을 통해 세포를 계수한 뒤 세포 10⁶ cell을 25cm² tissue culture flask (Corning)에 주입하여 25℃에서 배양하였다. 배양 3일 후 돌돔자어세포 (RBE cell)은 monolayer를 형성하였으며, 즉시 감염실험을 실시하였다.

4.2. Inoculation

넙치 비장에서 분리한 FLIV-1과 돌돔 비장에서 분리한 IVS-1 0.1 ml 을 각각 RBE cell에 접종하였으며 9일 동안 배양 후, CPE와 polymorphism pattern을 분석하였다. 또한 첫 번째 passage 후 배양된 바이러스 상등액을 회수하고 이를 10배 희석 후 새롭게 초대 배양한 RBE cell에 0.1 ml을 접종하였다. 이러한 과정을 3회 연속으로 반복하여 polymorphism pattern과 염기서열을 분석하였다.



III. 결 과

1. 이리도 바이러스의 반복서열 분석

1.1. *Megalocytivirus*의 polymorphism pattern 분석

각 subgroup의 virus에 대해 PCR을 시행한 결과, 비교적 conserve한 부위인 MCP, ATPase gene에서는 각 subgroup마다 모두 동일한 크기의 single band를 나타냈다 (Fig. 3). 하지만 K2 region에서는 IVS-1에서만 single band pattern을 나타냈고, PGIV-SP, FLIV-1은 multiple band pattern을 나타냈으며 증폭된 amplicon의 크기도 subgroup별로 각각 다르게 나타났다 (Fig. 4(A)). FLIV-1에서 클로닝을 통해 1168 bp, 988 bp, 781 bp 크기의 3가지 variants를 얻을 수 있었고, 염기서열 분석을 한 결과 중간 부분 염기서열의 addition 또는 deletion 때문에 각 크기가 다르게 보이는 3가지 DNA임을 확인하였다 (Fig. 4(B)). 이러한 FLIV-1에서 보이는 3가지 amplicon을 각각 FLIV-1-pp1, FLIV-1-pp2, FLIV-1-pp3로 명명하였고 특징적으로 band density는 FLIV-1-pp1이 FLIV-1-pp2, FLIV-1-pp3보다 다소 진한 양상을 보였다.

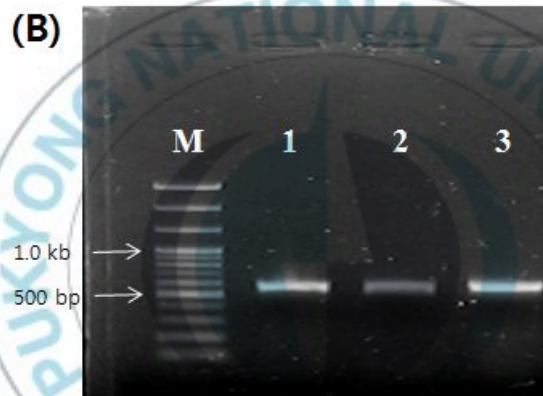
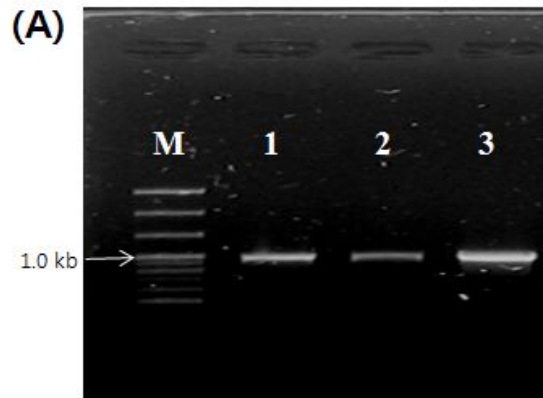
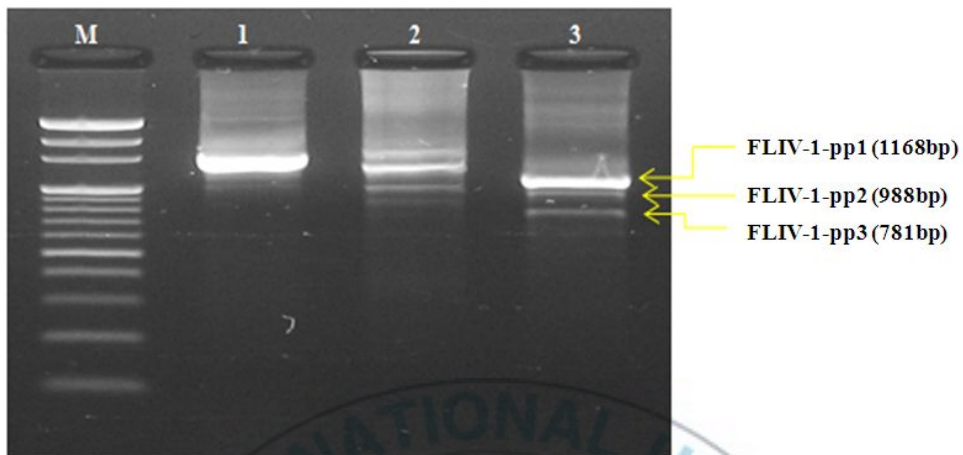


Fig 3. Detection of different iridovirus by PCR amplification with conserved region. (A) MCP gene; (B) ATPase gene. All the samples identical. Lane 1 : IVS-1 (subgroup II); lane2 : PGIV (subgroup III); lane 3 : FLIV-1 (subgroup IV)

(A)



(B)

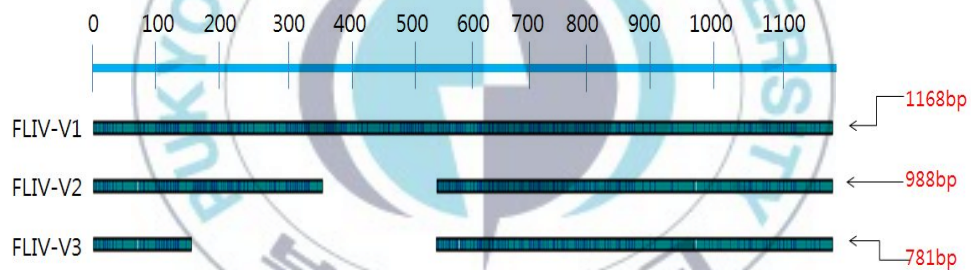


Fig. 4. Detection of iridovirus from cultured flounder by PCR amplification with K2 region. Sample of (A) Lane 1 : IVS-1 (subgroup II); lane2 : PGIV (subgroup III); lane 3 : FLIV-1 (subgroup IV); (B) Schematic illustration of FLIV-1-pp1, FLIV-1-pp2 and FLIV-1-pp3.

1.2. 각 polymorphic variant에 대한 PCR test

FLIV-1-pp1, FLIV-1-pp2, FLIV-1-pp3 각각을 cloning한 plasmid를 PCR을 하였고, 전기영동을 통해 amplicon을 분석한 결과 FLIV-1-pp1, FLIV-1-pp2, FLIV-1-pp3 모두 크기에 맞는 single band만이 생성된 것을 확인하였다 (Fig. 5). 또한 모든 plasmid를 혼합한 sample의 PCR 결과에서는 FLIV-1 DNA의 PCR결과에서 보이는 multiple band와 동일한 크기의 3가지 band 모두 증폭된 것을 확인할 수 있었다. 또한 넙치 spleen과 굴의 midgut gland 조직에 의한 PCR 오류를 검증하기 위해 조직 homogenates를 각각의 plasmid와 혼합하여 바이러스 검출과정과 동일한 방법으로 핵산분리 후 PCR을 한 분석에서도 앞선 실험과 동일한 결과를 확인할 수 있었다.

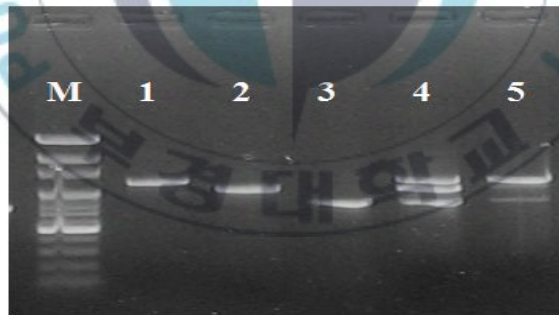


Fig 5. PCR to plasmid cloned with repeating sequences. Lane 1 : FLIV-1-pp1; Lane 2 : FLIV-1-pp2; Lane 3 : FLIV-1 -pp3; Lane 4 : Mixed sample with pp1, pp2 and pp3; Lane 5 : Genomic DNA of FLIV-1

1.3. Polymorphic variants간의 concentration 차이 검증

각각의 단일 FLIV-1-pp1, FLIV-1-pp2, FLIV-1-pp3 plasmid를 동일 copy값으로 희석한 뒤에 모두 혼합하여 PCR한 결과 서로 거의 동일한 band density를 보이며 multiple band를 나타내는 것을 확인하였다 (Fig. 6). pp1의 copy값은 고정시키고 pp2, pp3의 copy값을 2-fold dilution하여 희석시킨 플라스미드의 혼합 sample에 대해 PCR을 시행한 결과 FLIV-1-pp1과 FLIV-1-pp2, FLIV-1-pp3간의 band density 비율의 차이가 pp2, pp3의 희석배수에 따라 차이가 나는 것을 확인할 수 있었고, 이에 따라 FLIV-1에서 보이는 pp1, pp2, pp3간의 band density 차이의 원인은 PCR로 인한 interaction이 아니라 viral DNA의 concentration 차이임을 확인하였다.

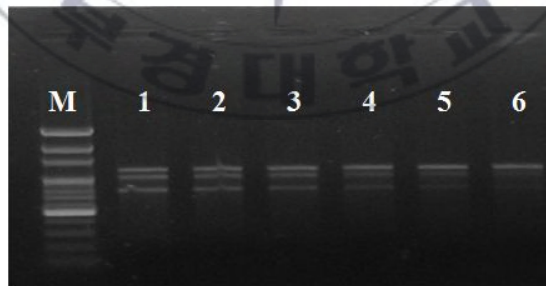


Fig. 6. Comparisons of concentration after PCR mixed with each polymorphic variants. Lane 1. pp1+(pp2+pp3); Lane 2~6 are mixed about pp1 and 2-fold dillutions of (pp2+pp3).

1.4. Polymorphic variants에 대한 stability test

FLIV-1 DNA와 cell에서 배양된 virus 상등액을 감염되지 않은 돌돔 spleen 조직 homogenates와 혼합하여 PCR을 하여 stability test를 실시한 결과, DNA와 혼합된 검체는 1st PCR 모두 detection되지 않았고, 2nd PCR 결과에서도 전혀 detection할 수 없었다 (Fig. 7). 반면에 DNA가 아닌 viral particle과 혼합한 검체에서는 뚜렷한 밴드를 나타냈다. 이로써 생성된 3가지 pp1, pp2, pp3 모두 host 조직 내에서 replication할 때, DNA로만 존재하는 것이 아니라 virus particle을 형성함을 확인하였다.

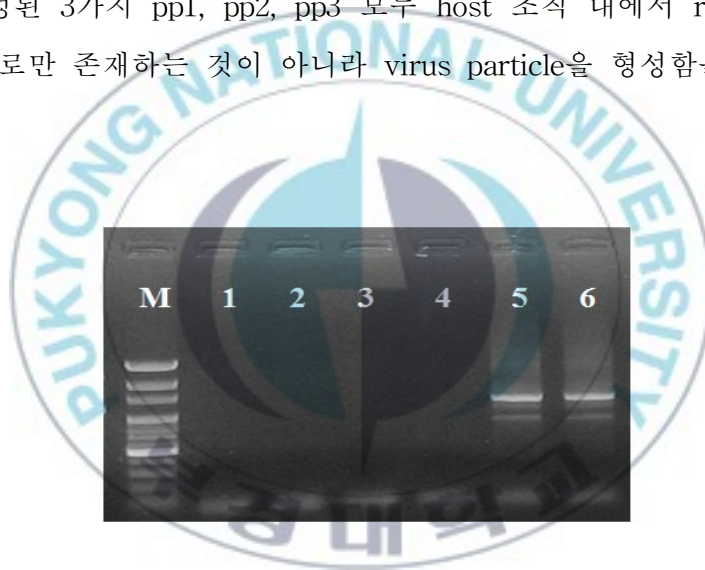


Fig. 7. PCR of Mixed homogenates and FLIV-1 DNA or FLIV-1 virus. Lane 1,2 : 1st PCR detection of mixed homogenates and FLIV-1 DNA during 1minutes and 10minutes; Lane 3,4 : 2nd PCR detection of mixed homogenates and FLIV-1 DNA during 1minutes and 10minutes; Lane 5,6 : 1st PCR detection of mixed homogenates and FLIV-1 virus during 1minutes and 10minutes

2. Repeating sequence 및 polymorphism 분석

본 연구는 국내외 해산어와 패류에서 분리한 FLIV isolates의 그룹 간 그리고 그룹 내의 K2 region 염기서열의 구조와 repeating sequence (RS)를 비교, 분석하였다. 분리한 모든 isolates의 K2 region에서 나타나는 polymorphic particles에 대한 분석을 위해 총 3가지 major multiple amplicons를 sequencing 하였고 이를 통해 pp1, pp2, pp3 각각의 염기서열 구조를 분석했다 (Fig. 8). Repeating sequence는 69 aa (amino acids) (F1) 과 60 aa (F2) 의 2가지 아미노산 서열이 확인되었고 deletion되는 repeating region 보다 앞선 부위에 43 aa (F0) 가 존재했으며, 이러한 아미노산 서열이 동일하게 F1과 F2내에도 있음을 확인하였다. 모든 strain의 pp1을 분석한 결과, variable한 minor RS에 의하여 separation 되는 RS fragment의 배열에 따라 3가지 polymorphic type으로 나눌 수 있었다. 각각의 type에 대해 가장 큰 length의 polymorphic particle 1 (pp1)을 분석한 결과, FLIV-1-pp1은 F0-F1-F2 그리고 FLIV-2-pp1은 F0-F2-F2, CH-1-pp1은 F0-F2-F1 순으로 배열됨을 확인하였고 reference sequence인 TRBIV (GQ273492)는 F0-F2-F2 순으로 배열되어 국내의 FLIV-2-pp1과 같은 시퀀스임을 확인하였고 이는 여러 particles 중 하나의 particle만 확인한 것일 수 있다. 모든 FLIV isolates에서 나타나는 pp1, pp2, pp3을 각각 분석한 결과, repeating region이 존재하여 그 부위의 deletion (또는 addition) 에 의해 length의 차이를 보이고 있음을 확인하였다. FLIV-1 (polymorphic type 1)의 경우 pp1은 F0-F1-F2, pp2는 F0-F1, pp3는 F0, FLIV-2 (polymorphic type 2)의 경우 pp1은 F0-F2-F2, pp2는 F0-F2, pp3는 F0, CH-1 (polymorphic type

3)의 경우 pp1은 F0-F2-F1, pp2는 F0-F2, pp3는 F0의 배열로 이루어져 있음을 확인하였다. 다시 말하면, 모든 type에서의 pp2는 pp1에 비하여 F1 또는 F2의 deletion, pp3는 F0만 존재하며 F1, F2모두 deletion된 형태의 DNA를 포함하는 viral particle임을 확인할 수 있었다. 특이적으로 중국에서 발견된 CH-1 isolate의 모든 polymorphic particles와 중국 turbot에서 분리되었다고 보고된 TRBIV에서만 F0 내 minor deletion (3 aa) 이 나타나고 있음을 볼 수 있어 이러한 특징은 국내에서는 나타나지 않고 중국에서만 나타나는 것으로 추정된다. 그러므로 이러한 중국 strains의 3 aa minor deletion을 제외하고는 F0와 후반부 아미노산 서열은 deletion되지 않고 오직 F1과 F2만 major deletion이 나타나는 것을 확인하였으나, 모든 K2 region의 deletion은 코돈의 배열에 맞게 3n nucleotides로 나타나 본 연구의 결과는 PCR오류가 아님을 확실하게 재 확인할 수 있었다. 또한 PCR 후 나타나는 amplicon의 전기영동 band pattern 확인만으로는 FLIV의 polymorphic type을 구별해낼 수 없기 때문에 이를 위해선 sequencing을 통한 분석만이 가능함을 확인하였다.

본 연구에서는 각 subgroup별 repeat region 특성 비교로 범위를 확장시켜 모니터링 과정에서 분리한 다양한 subgroup의 iridovirus isolates와 genbank의 reference sequence을 이용해 *Megalocytivirus* ORF-2 repeating region 내의 RS와 polymorphism pattern을 분석하였다 (Fig. 9). 앞서 시행한 subgroup IV의 분석과 함께 Subgroup I은 하나의 isolates와 3가지의 reference sequence (AB104413, AY779031, AF506370), subgroup II는 18 isolates와 3가지의 reference sequence (KC244182, AY894343, AY532606), subgroup III는 7 isolates와 1가지의 reference sequence (AF371960)를 아미노산 서열로 변환하여 분석한 결과는 다음과 같다. 먼저 모든 subgroup별 repeating region에 대해 비교

분석한 결과, major RS moiety 출현이후의 부위부터 (F0 of Fig. 9-1) minor RS moiety와 함께 보다 다양한 repeating region을 형성함을 확인할 수 있었다. 전반부의 빨간색 박스로 표시된 minor RS moiety인 TTTVA는 major RS moiety 사이에서 2~4회 P와 T로 이루어진 다양한 moieties에 의하여 분리되어 있었고 후반부의 노란색 박스로 표시된 major RS moiety는 subgroup간에 유사함을 확인하였다. F0 바로 다음에 위치한 repeating region의 각 RS fragment는 subgroup I, II, III에 3가지 (F1~F3), subgroup IV에 2가지 (F1~F2)가 존재했으며 서로 다양하게 arrange 되어 polymorphic particles를 형성하고 있었고, subgroup별 각각의 RS moiety는 서로 유사하긴 하나 다소 차이를 보였다. Subgroup 별 부분적인 moiety의 similarity를 분석하기 위해 각 subgroup에서 시퀀스가 대체적으로 변화가 많지 않은 representative RS fragment를 선정하였다. Subgroup I, II, IV는 F1, III는 F2의 major RS moiety를 선정하여 subgroup 내 fragment간의 similarity를 분석한 결과 subgroup I은 90.48-100%, subgroup II는 92.5-95%, subgroup III는 70-95%, subgroup IV는 97.67-100%로 다양하게 나타났다. subgroup IV의 fragment간 차이가 가장 작았고, subgroup III가 가장 컸다. 또한 각 subgroup 별 representative RS fragment간의 similarity를 분석한 결과는 subgroup I, II 97.5%, subgroup I, III 97.5%, subgroup I, IV 90.7%, subgroup II, III 100%, subgroup II, IV 88.37%, subgroup III, IV 83.72%로 나타났으며 subgroup IV의 이러한 similarity의 큰 차이가 낮은 병원성의 특징과 관계있을 것으로 추정된다. 특징적으로 EEDEYDCPEYE 아미노산 서열은 모든 subgroup의 major RS moiety 내에 동일하게 존재함을 확인할 수 있었고 이의 기능에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

subgroup I, II는 분리한 모든 isolates에서 F0-F1-F2-F3 순의 한 가지 배열의 particle만을 확인할 수 있었고 reference sequence의 분석에서도 동일한 결과를 확인할 수 있어 polymorphism 현상이 나타나지 않는 것으로 추정된다. 이와는 반대로 subgroup III, IV에서는 모든 isolates에서 deletion에 의해 다양한 시퀀스 배열을 지닌 polymorphic particles가 detection 되었고 또한 각 isolates마다 이러한 polymorphic particles 생산에 의하여 다양한 polymorphic type으로 나타남을 확인하였다 (Fig. 9-2). 따라서 subgroup I, II는 연도별, 지역별 RS차이가 거의 없으며 multiple particles 양상을 보이는 polymorphism이 발견되지 않는 것으로 보아 evolution 또는 change가 host나 환경에 따라 급격하게 변화하지 않는 것으로 추정된다. 다만 subgroup II의 분석에 있어서 reference sequence인 RBIV-KOR-TY1 (AY532606)의 F3가 deletion된 F0-F1-F2 배열이 genbank에 등재된 것으로 보아 single pattern을 보이는 subgroup II에서도 polymorphism의 가능성이 존재할 수 있다는 것을 완전히 배제할 수는 없다. 이와는 달리 subgroup III는 분리한 isolates와 reference sequence 모두 F0, F1, F2, F3의 조합으로 이루어진 다양한 7가지의 polymorphic type이 검출되었고 single pattern부터 multiple pattern까지 다양하게 나타났으며, subgroup IV도 분리한 isolates와 reference sequence 모두 F0, F1, F2의 조합으로 이루어진 비교적 제한적인 3가지의 polymorphic type이 검출되었다. 이를 통해 subgroup I, II와는 달리, subgroup III, IV의 ORF-2 gene은 지역별로 다양한 polymorphism을 나타내는 것으로 보아 viral DNA의 evolution 또는 change가 비교적 쉽게 일어날 수 있는 것으로 추정되며 이러한 ORF내의 repeating region에서 나타나는 sequence의 addition 또는 deletion현상은 생리적 의미를 부여할 수 있는 가능성을 충분히 가지는 변화로 추

정된다.

앞의 결과를 종합하여 분석한 결과, subgroup별 ORF-2 gene의 polymorphism pattern을 통해 single pattern을 나타내는 subgroup I, II와 multiple pattern을 나타내는 subgroup III, IV를 grouping할 수 있었고, 이러한 분류는 ORF-2 gene의 subgroup간 homology 분석을 통해서도 확인할 수 있었다 (Table 3). K2 region은 RS moiety의 deletion으로 인하여 homology를 측정할 수 없었기 때문에, K2 region을 제외시킨 ORF-2 gene N-terminal region의 subgroup별 homology를 분석한 결과, major capsid protein에서의 homology는 subgroup간 96.55~98.28%로 그다지 큰 차이를 보이지 않는 반면에 ORF-2 gene N-terminal region의 homology는 82.08~95.42 %로 상당한 차이를 보였으며 그 중 subgroup I과 subgroup II가 95.42%로 가장 높았고 subgroup III와 subgroup IV가 85.20%로 2번째로 높아, K2 region의 polymorphism pattern에 의해 2 group으로 분류한 결과와 유사한 결과를 보였다. 따라서 본 연구에서는 subgroup I, II를 Low various polymorphism group, subgroup III, IV를 High various polymorphism group으로 분류하였고 이는 subgroup간의 진화, 발전적 차이의 가능성을 보여주는 결과라 할 수 있겠다.

		43 aa	5 aa	5 aa	5 aa	43 aa		
FLIV-1-pp1	LPT	EPEHEEEEEEEEDCCEVEEETTSAPTTVPPPKRECKKK	TTTTTT	TTTVA	TTTTTT	TTTVA	EPEHEEEEEEEEDCCEVEEETTSAPTTVPPPKRECKKK	120
FLIV-1-pp2	LPT	EPEHEEEEEEEEDCCEVEEETTSAPTTVPPPKRECKKK	TTTTTT	TTTVA	TTTTTT	TTTVA	EPEHEEEEEEEEDCCEVEEETTSAPTTVPPPKRECKKK	110
FLIV-1-pp3	LPT	EPEHEEEEEEEEDCCEVEEETTSAPTTVPPPKRECKKK	-----	-----	-----	-----	69 aa-Deletion	41
FLIV-2-pp1	LPT	EPEHEEEEEEEEDCCEVEEETTSAPTTVPPPKRECKKK	-----	-----	-----	-----	69 aa-Deletion	111
FLIV-2-pp2	LPT	EPEHEEEEEEEEDCCEVEEETTSAPTTVPPPKRECKKK	-----	-----	-----	-----	69 aa-Deletion	101
FLIV-2-pp3	LPT	EPEHEEEEEEEEDCCEVEEETTSAPTTVPPPKRECKKK	-----	-----	-----	-----	69 aa-Deletion	41
CH-1-pp1	LPT	EPEHEEEEEEEEDCCEVEEETTSAPTTVPPPKRECKKK	-----	-----	-----	-----	69 aa-Deletion	107
CH-1-pp2	LPT	EPEHEEEEEEEEDCCEVEEETTSAPTTVPPPKRECKKK	-----	-----	-----	-----	69 aa-Deletion	98
CH-1-pp3	LPT	EPEHEEEEEEEEDCCEVEEETTSAPTTVPPPKRECKKK	-----	-----	-----	-----	69 aa-Deletion	38
TRBIV(GQ273492)	LPT	EPEHEEEEEEEEDCCEVEEETTSAPTTVPPPKRECKKK	TTTTTT	TTTVA	TTTTTT	TTTVA	EPEHEEEEEEEEDCCEVEEETTSAPTTVPPPKRECKKK	108
		5 aa	5 aa	5 aa	43 aa	11 aa		
FLIV-1-pp1	TTTVA	TTTTTT	TTTVA	TTTTTT	TTTVA	TTTTTT	TTTVA	232
FLIV-1-pp2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	69 aa-Deletion	172
FLIV-1-pp3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	69 aa-Deletion	103
FLIV-2-pp1	TTTVA	TTTTTT	TTTVA	TTTTTT	TTTVA	TTTTTT	TTTVA	223
FLIV-2-pp2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	69 aa-Deletion	163
FLIV-2-pp3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	69 aa-Deletion	172
CH-1-pp1	TTTVA	TTTTTT	TTTVA	TTTTTT	TTTVA	TTTTTT	TTTVA	227
CH-1-pp2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	69 aa-Deletion	160
CH-1-pp3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	69 aa-Deletion	100
TRBIV(GQ273492)	TTTVA	TTTTTT	TTTVA	TTTTTT	TTTVA	TTTTTT	TTTVA	220
		11 aa						
FLIV-1-pp1	AAGKPMPEAPQH	VERAPPAAPSQTEAPQHKVPVATVVHTPERATPTSQNEVPVVKQSTGEEEDDVHLGD	IGMKGGLSMGI	VI	GSCMVAAAF	IMFAI	IGHLFFRFRTRCGQYDTTTEP*	352
FLIV-1-pp2	AAGKPMPEAPQH	VERAPPAAPSQTEAPQHKVPVATVVHTPERATPTSQNEVPVVKQSTGEEEDDVHLGD	IGMKGGLLMGI	VI	GSCMVAAAF	IMFAI	IGHLFFRFRTRCGQYDTTTEP*	292
FLIV-1-pp3	AAGKPMPEAPQH	VERAPPAAPSQTEAPQHKVPVATVVHTPERATPTSQNEVPVVKQSTGEEEDDVHLGD	IGMKGGLLMGI	VI	GSCMVAAAF	IMFAI	IGHLFFRFRTRCGQYDTTTEP*	223
FLIV-2-pp1	AAGKPMPEAPQH	VERAPPAAPSQTEAPQHKVPVATVVHTPERATPTSQNEVPVVKQSTGEEEDDVHLGD	IGMKGGLLMGI	VI	GSCMVAAAF	IMFAI	IGHLFFRFRTRCGQYDTTTEP*	343
FLIV-2-pp2	AAGKPMPEAPQH	VERAPPAAPSQTEAPQHKVPVATVVHTPERATPTSQNEVPVVKQSTGEEEDDVHLGD	IGMKGGLLMGI	VI	GSCMVAAAF	IMFAI	IGHLFFRFRTRCGQYDTTTEP*	283
FLIV-2-pp3	AAGKPMPEAPQH	VERAPPAAPSQTEAPQHKVPVATVVHTPERATPTSQNEVPVVKQSTGEEEDDVHLGD	IGMKGGLLMGI	VI	GSCMVAAAF	IMFAI	IGHLFFRFRTRCGQYDTTTEP*	223
CH-1-pp1	AAGKPMPEAPQH	VERAPPAAPSQTEAPQHKVPVATVVHTPERATPTSQNEVPVVKQSTGEEEDDVHLGD	IGMKGGLLMGI	VI	GSCMVAAAF	IMFAI	IGHLFFRFRTRCGQYDTTTEP*	347
CH-1-pp2	AAGKPMPEAPQH	VERAPPAAPSQTEAPQHKVPVATVVHTPERATPTSQNEVPVVKQSTGEEEDDVHLGD	IGMKGGLLMGI	VI	GSCMVAAAF	IMFAI	IGHLFFRFRTRCGQYDTTTEP*	280
CH-1-pp3	AAGKPMPEAPQH	VERAPPAAPSQTEAPQHKVPVATVVHTPERATPTSQNEVPVVKQSTGEEEDDVHLGD	IGMKGGLLMGI	VI	GSCMVAAAF	IMFAI	IGHLFFRFRTRCGQYDTTTEP*	220
TRBIV(GQ273492)	AAGKPMPEAPQH	VERAPPAAPSQTEAPQHKVPVATVVHTPERATPTSQNEVPVVKQSTGEEEDDVHLGD	IGMKGGLLMGI	VI	GSCMVAAAF	IMFAI	IGHLFFRFRTRCGQYDTTTEP*	340

Fig. 8. Comparisons of repeating sequences of K2 region in FLIV viral gene.

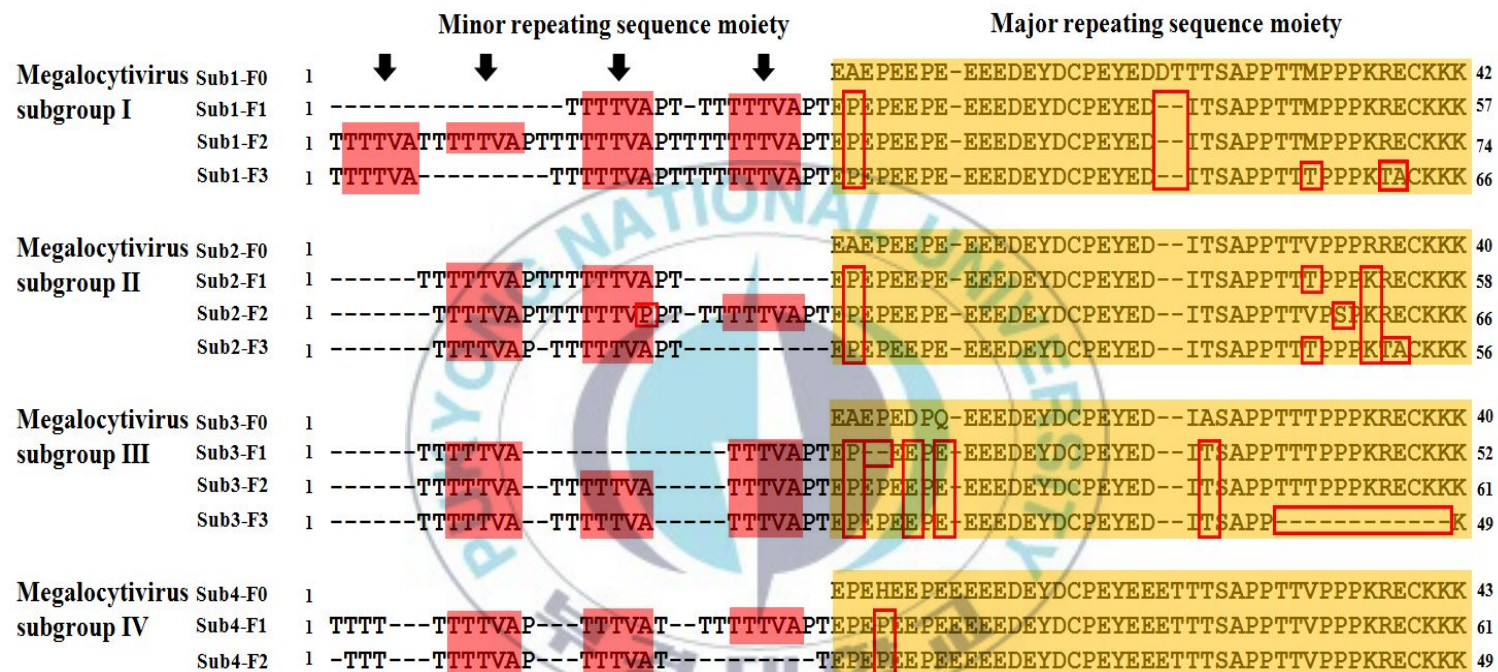


Fig. 9-1. Comparisons of repeating sequences of K2-region in megalocytivirus subgroups.

	Low various polymorphism group		High various polymorphism group									
	Subgroup I	Subgroup II	Subgroup III							Subgroup IV		
			Type 1	Type 2	Type 3	Type 4	Type 5	Type 6	Type 7	Type 1	Type 2	Type 3
pp1	F0>F1>F2>F3	F0>F1>F2>F3	F0>F1>F2>F1>F3	F0>F1>F2>F1	F0>F1>F2>F1	F0>F1>F2>F1	F0>F1>F2>F1	F0>F1>F1	F0>F2>F1	F0>F1>F2	F0>F2>F2	F0>F2>F1
pp2			F0>F1>F2>F1	F0>F1>F2	F0>F1	F0>F1		F0>F1	F0>F1	F0>F1	F0>F2	F0>F2
pp3			F0>F1>F2	F0>F2	F0			F0		F0	F0	F0
pp4			F0>F1	F0								
pp5			F0									
Reference sequence	RSIV (AB104413) F0>F1>F2>F3	RBIV-KOR-TY1 (AY532606) F0>F1>F2	ISKNV (AF371960) F0>F1							TRBIV (GQ273492) F0>F2>F2		

Fig. 9-2. Comparisons of polymorphism of K2-region in megalocytivirus subgroups.

Table 3-1. Homology of N-terminal region of ORF-2 amino acids among *Megalocytivirus*

	RSIV	RBIV	ISKNV	FLIV
RSIV	100%	95.42%	83.75%	82.18%
RBIV		100%	83.60%	82.08%
ISKNV			100%	85.20%
FLIV				100%

Table 3-2. Homology of major capsid protein among *Megalocytivirus*

	RSIV	RBIV	ISKNV	FLIV
RSIV	100%	98.28%	98.28%	97.54%
RBIV		100%	97.54%	96.55%
ISKNV			100%	97.78%
FLIV				100%

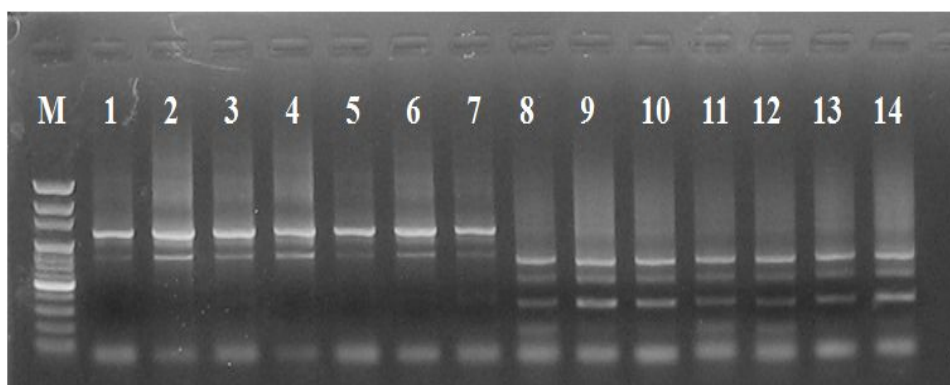
3. 모니터링을 통한 FLIV isolates 분석

3.1. 국내외 양식해산어에서 분리된 FLIV isolates의 분석

2003~2012년의 병원체 감염이 의심되는 어류에 대한 진단의뢰시료와 일부 모니터링 연구를 통해 국내의 동해와 남해지역의 해산어에서 14종의 FLIV isolates를 분리할 수 있었다 (Table 1). 이를 K2 region에 대해 PCR을 한 결과, 1st PCR에서 detection 되는 검체가 7종, 2nd PCR에서 detection 되는 검체가 7종이며 모든 검체에서 pp1, pp2, pp3가 모두 존재하는 multiple amplicon을 호가인할 수 있었고 band density 패턴도 모두 유사함을 확인하였다. 또한 batch 내의 각 individual fish에 대한 virus분석에서도 pattern은 모두 동일함을 확인하였다 (Fig. 10). 이를 종합적으로 분석했을 때, 해산어에서 분리한 모든 FLIV isolates는 FLIV-1과 같은 polymorphism pattern을 나타냈으며 또한 band density도 동일하게 pp1이 pp2, pp3에 비해 다소 진한 양상을 나타내는 것을 확인하였다. 하지만 band density는 감염어의 virus에 대한 1st PCR의 결과와 비교했을 때, pp1의 특이적인 density 양상은 보이지 않았다. 감염어는 모두 flat fish 류 였으며 강도다리 (*Platichthys stellatus*) 감염어에서 분리된 08/13FLIVas-gi을 제외하면 14종의 isolates 모두 넙치였다. 하지만 건강어 분석에서는 특이적으로 flat fish 외에도 쏨뱅이 (*Sebastiscus marmoratus*), 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*) 그리고 점농어 (*Lateolabrax* sp.)에서 분리가 되었으며 염기서열 분석 결과 숙주에 따른 MCP gene의 변이는 크게 없었다.

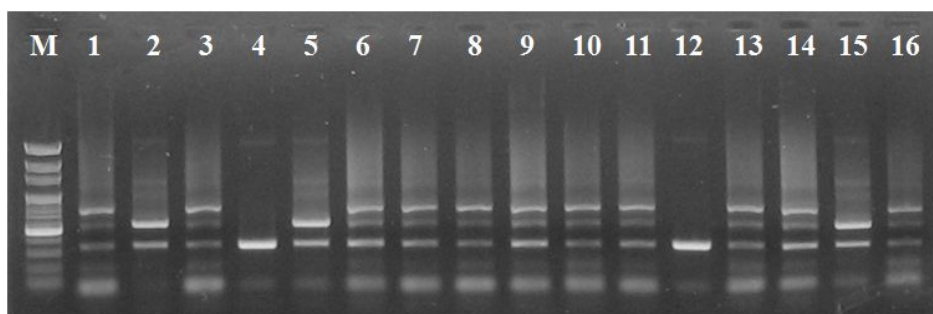
3.2. 국내산 패류에서 분리된 FLIV isolates 분석

2009년부터 2013년까지 monitoring한 382 batch의 패류를 MCP gene에 대해 PCR을 하여 monitoring에 대해 분석한 결과, *Megalocytivirus*는 모두 80 batch에서 detection 되어 20.94%의 detection률을 보였으며 그 중 FLIV isolates는 16종이 detection 되어 총 4.88%의 detection률을 보였다 (Table 2). 이를 통해 패류에서 발견되는 *Megalocytivirus* 중에서 FLIV가 detection되는 비율이 20%임을 알 수 있다. 그리고 이러한 16종의 FLIV isolates에 대해 nested PCR을 통해 K2 region을 확인한 결과, 몇 가지 sample에서 감염된 넙치에서 발견된 바이러스 polymorphism pattern과 다른 양상을 나타냈다 (Fig. 11). 11종의 sample은 감염된 넙치에서 발견된 바이러스와 동일한 패턴을 나타냈지만 2종의 sample은 single band를 나타냈고 3종의 sample에서는 double band pattern을 확인할 수 있었다. 이처럼 다양한 패턴을 보이는 밴드 모두 FLIV-1의 amplicon에 모두 포함되는 amplicon임을 확인할 수 있었다. 이는 각각의 pp1, pp2, pp3 DNA를 가진 virus particle이 해수로 release되어 이동하다가 패류의 filter feeding에 의해 섭취되어 중장선에 존재하게 되는 것으로 pp1, pp2, pp3 virus가 각각 따로 host를 감염시킬 수 있음을 의미한다. 어류와 패류에서 발견된 FLIV isolates간에는 특별히 MCP의 염기서열 차이를 확인할 수 없었고, 또한 패류 종의 차이에 대한 염기서열 차이도 확인할 수 없었다.



	1	2	3	4	5
Viral isolates (fish)	FLIV-1	12/07FLIV-ty	10/09FLIV-ph	11/10FLIV-gi	08/11FLIV-ty
	6	7	8	9	10
	FLIV-2	08/12SFIV-ph	CH-1	08/13FLIVas-ph	11/09FLIVas-ph
	11	12	13	14	15
	06/10RFIVas-ty	08/11SCIVas-ty	05/08FLIVas-ty	08/13FLIVas-gi	

Fig. 10. Polymorphism of FLIV isolates in fish. Lane 1~7 : 1st PCR detection of FLIVs isolated from infected fish. Lane 8~14 : 2nd PCR detection of FLIVs isolated from asymptomatic infected fish.



	1	2	3	4	5
	11/09sfFLIVoy-jh	03/10sfFLIVoy-jh	03/10sfFLIVoy-ty	05/10sfFLIVoy-gw	05/10sfFLIVgo-ty
	6	7	8	9	10
Virus isolates	05/10sfFLIVdm-ty	05/10sfFLIVba-gj	08/10sfFLIVoy-gw	08/10sfFLIVdh-nh	11/10sfFLIVoy-jh
(Shellfish)	11	12	13	14	15
	11/10sfFLIVoy-ty	11/10sfFLIVoy-gj	01/11sfFLIVoy-nh	09/11sfFLIVba-ss	03/11sfFLIVoy-gs
	16				
	01/11sfFLIVgo-ty				

Fig. 11. Polymorphism of FLIV isolates in shellfish. Lane 1~11 : 2nd PCR detection of FLIVs isolated from shellfish.

3.3. 계통수 분석

본 연구에서 분리한 30종의 FLIV isolates의 MCP gene sequence와 Genbank에 등재되어 있는 16종의 reference iridovirus sequences를 비교, 분석한 결과 FLIV에 대해서 6가지 sub-subgroup으로 나눌 수 있었으며 (Fig. 12) sub-subgroup 1에는 01/11sfFLIVgo-ty, 06/10RFIVas-ty, 08/10sfFLIVdh-nh, 11/10sfFLIVoy-gj, 05/10sfFLIVgo-ty, 03/10sfFLIVoy-ty, 11/10sfFLIVoy-ty, 08/11SCIVas-ty, 08/11FLIV-ty, FLIV-1, 03/11sfFLIVoy-gs, 05/10sfFLIVba-gj로 12종, sub-subgroup 2에는 CH-1으로 1종, sub-subgroup 3에는 05/10sfFLIVdm-ty으로 1종, sub-subgroup 4에는 12/09FLIVas-ph, FLIV-2, 08/13FLIVas-ph로 2종, sub-subgroup 5에는 08/12SFIV-ph, 08/10sfFLIVoy-gw, 10/09sfFLIVoy-jh, 11/10FLIV-gi, 11/09FLIV-ph, 03/10sfFLIVoy-jh, 11/10sfFLIVoy-jh, 09/11sfFLIVba-ss로 8종, 마지막으로 sub-subgroup 6에는 05/10sfFLIVoy-gw, 12/07FLIV-ty, 01/11sfFLIVoy-nh, 05/08FLIVas-ty, 08/13FLIVas-gi로 5종의 FLIV isolates가 계통적으로 분류가 되었다. 또한 함께 분석한 16종의 reference sequence에 대해 계통적 분석을 한 결과, sub-subgroup 1에는 FLIV-EJ (AY633987), sub-subgroup 2에는 TRBIV (GQ273492), TRBIV-R603 (HM596017), sub-subgroup 3에는 FLIV-JJ (AY633988), FLIV-PH (AY633992), FLIV-JHJ (AY633991), FLIV-JSY (AY633989), FLIV-SS (AY633983), FLIV-JJY (AY633990), TBIV (AY590687), sub-subgroup 4에는 FLIV-DS2 (AY633981), FLIV-WD1 (AY633986), FLIV-WD2 (AY633988), sub-subgroup 5에는 FLIV-DS1 (AY633980), FLIV-YG (AY633984), sub-subgroup 6에는 FLIV-MI (AY633982)로 분류되었다. 이는 지리적으로 유의적인 결과를 나타냈는데 sub-subgroup 1은 남해, sub-subgroup 2는 중국, sub-subgroup 3는 주로 제주도,

sub-subgroup 4, 5는 주로 동해, sub-subgroup 6는 동해와 남해에서 분리된 검체로 각각 분류가 되고, 특히 중국과 국내의 virus sequence가 구별이 가능함을 확인하였다 (Table 4). 또한 MCP gene 분류에 대해 각 검체의 polymorphism pattern을 비교한 결과, 유의성이 있음을 확인하였다. FLIV-1 type은 sub-subgroup 1, 3, 5, 6으로 분류된 총 25종의 검체, FLIV-2 type은 sub-subgroup 4의 3종의 검체와 sub-subgroup 5의 서해에서 분리한 시료인 09/11sfFLIVba-ss까지 총 4종의 검체, CH-1 type은 sub-subgroup 2의 1종의 검체로 분류할 수 있었다. 지역적인 특성 외에 host별로 차이는 확인할 수 없었고, 연도별로 동일한 지역의 시료는 sequence의 변이가 크게 없음을 확인하였다.



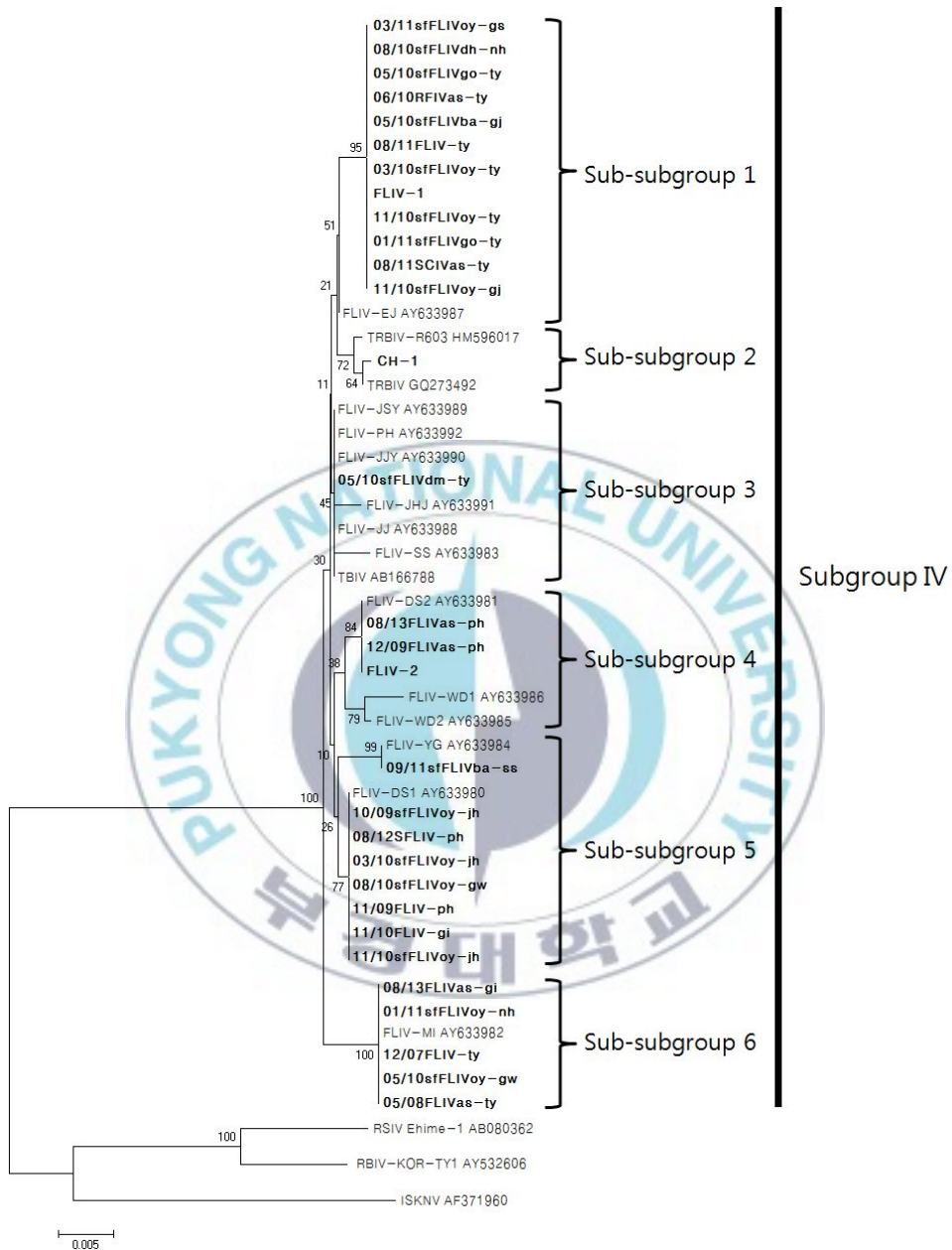


Fig. 12. Phylogenetic analysis of nucleotide sequence of major capsid protein (MCP) gene. The numbers indicate the percentage bootstrap support for each node from 1000 replicates.

Table 4. Distribution of FLIV isolates

	Sub-subgroup 1	Sub-subgroup 2	Sub-subgroup 3	Sub-subgroup 4	Sub-subgroup 5	Sub-subgroup 6
Isolates	01/11sfFLIVgo-ty (S)**	CH-1 (China)	05/10sfFLIVdm-ty (S)**	12/09FLIVas-ph (E)*	08/12SFIV-ph (E)*	05/10sfFLIVoy-gw (E)*
	06/10RFIVas-ty (S)**			FLIV-2 (E)*	08/10sfFLIVoy-gw (E)*	12/07FLIV-ty (S)**
	08/10sfFLIVdh-nh (S)**			08/13FLIVas-ph (E)*	10/09sfFLIVoy-jh (E)*	01/11sfFLIVoy-nh (S)**
	11/10sfFLIVoy-gj (E)*				11/10FLIV-gi (E)*	05/08FLIVas-ty (S)**
	05/10sfFLIVgo-ty (S)**				11/09FLIV-ph (E)*	08/13FLIVas-gi (E)*
	03/10sfFLIVoy-ty (S)**				03/10sfFLIVoy-jh (E)*	
	11/10sfFLIVoy-ty (S)**				11/10sfFLIVoy-jh (E)*	
	08/11SCIVas-ty (S)**				09/11sfFLIVba-ss (W)***	
	08/11FLIV-ty (S)**					
	FLIV-1 (S)**					
	03/11sfFLIVoy-gs (S)**					
	05/10sfFLIVba-gj (E)*					
Reference gene	FLIV-EJ (E)*	TRBIV (China)	FLIV-JJ (J)****	FLIV-DS2 (E)*	FLIV-DS1 (E)*	FLIV-MI (E)*
		TRBIV-R603 (China)	FLIV-PH (E)*	FLIV-WD1 (E)*	FLIV-YG (W)***	
			FLIV-JHJ (J)****	FLIV-WD2 (E)*		
			FLIV-JSY (J)****			
			FLIV-SS (E)*			
			FLIV-JJY (J)****			
			TBIV (J)****			

* Isolates from East sea

** Isolates from South sea

*** Isolates from West sea

**** Isolates from Jeju island

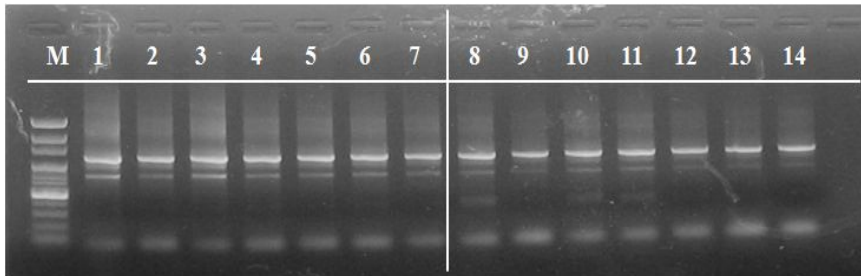
4. *in vivo* 공격 실험

4.1. 교차공격 passage 실험

본 연구는 Rock bream과 olive flounder에 각각 FLIV-1, IVS-1를 challenge하여 K2 region에 대한 polymorphism pattern, 폐사율 그리고 viral kinetics를 보았다. 먼저 PCR을 통해 subgroup IV인 FLIV-1은 돌돔에, subgroup II인 IVS-1은 넙치에 대해 감염성을 나타낸다는 것을 확인하였다. 그리고 FLIV-1의 rock bream에 대한 공격실험과 IVS-1의 olive flounder에 대한 공격실험 모두 polymorphism pattern은 원 sample의 양상과 차이 없이 그대로 유지되는 것으로 나타났다 (Table 5). 또한 IVS-1을 넙치와 돌돔에 시행한 공격실험에서도 IVS-1는 접종했던 sample과 같이 single band pattern을 보여 변화 없음을 확인하였다 (Fig 13(B)).

본 실험에서는 몇 회의 passage를 거처도 polymorphism pattern이 변화 없이 유지되는지 분석하기 위해 rock bream과 olive flounder에 대해서 연속해서 passage 공격실험을 실시하였다 (Fig 13(A)). 3회까지 실시한 passage실험에서 rock bream, olive flounder 모두 폐사는 없었고, polymorphism pattern도 변함없이 original sample과 동일한 양상을 나타냈다. Repeating sequence의 단기적인 변이에 대한 분석을 위해 3rd passage 실험에서 분리된 viral DNA의 K2 region에 대한 시퀀스를 분석한 결과 original sequence와 비교했을 때 repeating sequence에 대한 변이는 없음을 확인하였다.

(A)



(B)

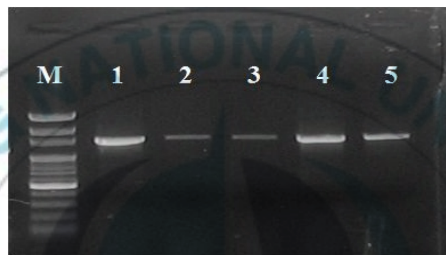


Fig. 13. Polymorphism of *in vivo* passage. (A) Lane 1~7 : Passage test samples of FLIV-1 in flounder. Lane 1 : FLIV-1; Lane 2, 3 : 1st passage test samples; Lane 4, 5 : 2nd passage test samples; Lane 6, 7 : 3rd passage test samples. Lane 8~14 : Passage test samples of FLIV-1 in rock bream; Lane 8 : FLIV-1; Lane 9, 10 : 1st passage test samples; Lane 11, 12 : 2nd passage test samples; Lane 13, 14 : 3rd passage test samples. (B) Lane 1 : IVS-1; Lane 2,3. *in vivo* 1st passage Samples of IVS-1 in flounder; Lane 4,5. *in vivo* passage Samples of IVS-1 in rock bream

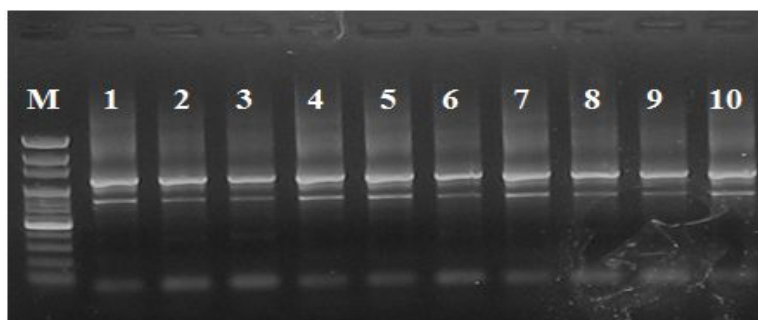
Table 5. Results of *in vivo* passage

Fish species	Amplicon pattern	Passage	Detection rate	Mortality	Variation of polymorphism
Olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	FLIV (multiple)	Original	100%	0%	Not changed
		1st passage	100%	0%	Not changed
		2nd passage	100%	0%	Not changed
		3rd passage	100%	0%	Not changed
Rock bream (<i>Oplegnathus fasciatus</i>)	IVS (single)	1st passage	100%	0%	Not changed
	FLIV (multiple)	Original	100%	0%	Not changed
		1st passage	100%	0%	Not changed
		2nd passage	100%	0%	Not changed
		3rd passage	100%	0%	Not changed
	IVS (single)	1st passage	100%	100%	Not changed

4.2. Cohabitation 실험

본 실험은 실제 현장과 유사한 환경을 만들어주어 실험하기 위해 Olive flounder를 donor group으로 설정하여 FLIV-1을 injection하고 recipient group으로 또 다른 olive flounder와 rock bream을 설정하여 cohabitation을 통한 감염확인파 donor, recipient 그리고 사육수의 FLIV에 대한 polymorphism pattern을 비교, 분석하였다. donor group, recipient group 모두 폐사는 일어나지 않았고, recipient에 대한 FLIV-1의 cohabitation을 통한 감염은 olive flounder, rock bream 모두에서 확인할 수 있었으며 polymorphism pattern의 변화는 없었다 (Table 6). 1st PCR에서의 recipient에 대한 FLIV 검출률은 olive flounder가 80%, rock bream이 30%로 나타났고, 나타나지 않은 sample에 대해 2nd PCR을 시행한 결과 모두 검출되었다 (Fig. 14). 사육수도 3일 간격으로 sampling을 하였고 그 결과는 실험 시작 후 12일부터 검출되기 시작하여 18일까지 확인되었으며 동일한 polymorphism pattern을 확인할 수 있었다 (Fig. 14). 또한 염기서열 분석을 통해 변이가 없음을 확인하였다.

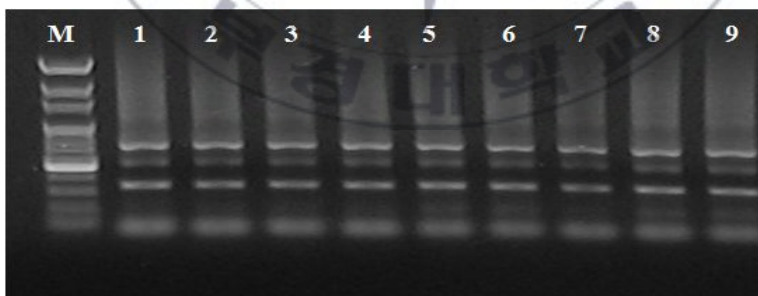
(A)



(B)



(C)



(D)

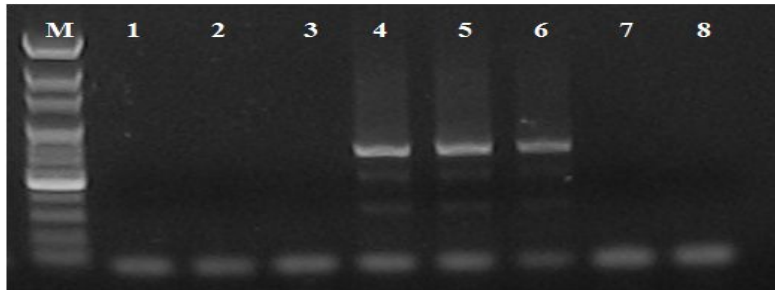


Fig. 14. Polymorphism of FLIV-1 about Cohabitation test. (A) 1st PCR results of flounder donors inoculated FLIV-1; (B) 1st PCR results of recipient fishes. Lane 1~10. Flounder recipients; Lane 11~20 Rock bream recipients. (C) 2nd PCR results of (B) samples of no detection. Lane 1,2 : Flounder recipients; Lane 3~9 : Rock bream recipients. (D) Polymorphism of sea water of cohabitation. Lane 1~8 : 3, 6, 9, 12, 24, 28 days post inoculation.

Table 6. Results of cohabitation test

Fish species		Detection rate		Mortality	Variation of polymorphism
		1st PCR	2nd PCR		
Olive flounder <i>(Paralichthys olivaceus)</i>	Donor	10/10 (100%)	NT*	0%	Not changed
	Recipient	8/10 (80%)	2/2 (100%)	0%	Not changed
Rock bream <i>(Oplegnathus fasciatus)</i>	Donor	10/10 (100%)	NT*	0%	Not changed
	Recipient	3/10 (30%)	7/7 (100%)	0%	Not changed

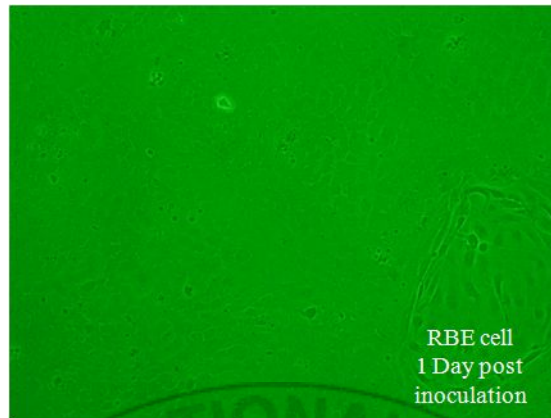
*Not tested

5. *in vitro* 접종 실험

5.1. *in vitro* passage 실험

Rock bream embryonic cell에 FLIV-1과 IVS-1을 inoculation하여 polymorphism pattern의 변화를 분석하였다. Cell에 inoculation을 하고 난 후, 3일째부터 FLIV-1, IVS-1 모든 실험 group에서 이형적으로 비대해지는 CPE (Cytopathic effect)가 나타나기 시작했고 9일까지 그 수가 전체적으로 증가하며 세포를 사멸시켰으며 (Fig. 15) Polymorphism pattern은 변화 없이 그대로 유지되며 증가하면서도 pp1, pp2, pp3 각각이 같은 농도의 비율로 replication하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig 16). 본 연구에서는 *in vitro* 내에서 몇 회의 passage를 거처도 polymorphism pattern이 변화 없이 유지되는지 분석하기 위해 FLIV-1을 Rock bream embryonic cell에 대해 3회의 연속적인 passage 접종실험을 하였다. 그 결과, 3회 passage 실험 모두 FLIV-1의 polymorphism pattern은 original sample과 다름없이 그대로 유지되는 것을 확인할 수 있었다 (Table 7). 이도 *in vivo* passage 실험과 마찬가지로 Repeating sequence의 변이에 대한 분석을 위해 3rd passage에서 분리된 FLIV-1 DNA의 K2 region에 대해 시퀀스를 분석한 결과 original sequence와 동일함을 확인하였다.

(A)

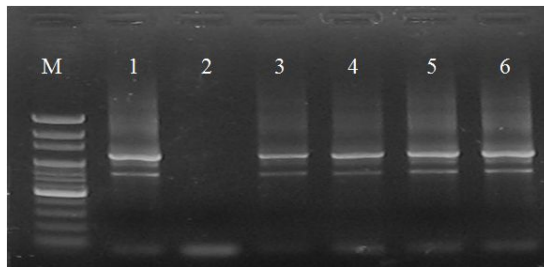


(B)



Fig. 15. Cytopathic effect of RBE cell. (A) RBE cell inoculated FLIV-1 on 1day post inoculation; (B) RBE cell inoculated FLIV-1 on 7days post inoculation.

(A)



(B)



Fig. 16. Polymorphism of *in vitro* passage. (A) Lane 1 : FLIV-1; Lane 2~6 : 1, 3, 5, 7, 9 days post inoculation. (B) Lane 1 : FLIV-1; Lane 2,3 : Polymorphism of 1st passage; Lane 3,4 : Polymorphism of 2nd passage; Lane 5,6 : Polymorphism of 3rd passage

Table 7. Results of *in vitro* passage test

Cell	Amplicon pattern	Passage	Variation of polymorphism
RBE cell (Primary cultured rock bream embryo cell)	FLIV (multiple)	Original	Not changed
		1st passage	Not changed
		2nd passage	Not changed
		3rd passage	Not changed



IV. 고 찰

Family *Iridoviridae* Genus *Megalocyttivirus*는 1990년 RSIV (Red sea bream iridovirus)가 처음으로 분리되어 보고된 이후, 다양한 host range의 해산양식어와 담수관상어에서 많은 연구가 활발히 진행되고 있다. 하지만 국내 양식생산량의 20% 이상을 차지하는 주요 양식어종인 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 등의 flatfish에 감염되어 상당한 경제적 손실을 발생시키는 이리도바이러스인 FLIV (*Megalocyttivirus* subgroup IV)에 대한 연구는 비교적 활발하게 이루어지지 않고 있는 실정이다. Subgroup IV는 중국에서 flatfish인 turbot (*Scophthalmus maximus*)의 이리도바이러스 감염증에 대해 최초로 보고된 이후로 (Shi et al., 2004), 국내에서도 넙치에서 TRBIV와 같은 subgroup IV에 속하는 FLIV의 감염에 의하여 80% 이상의 폐사를 보인다는 보고가 있으며 (Do et al., 2005), 최근에는 양식 강도다리에서의 감염보고도 이루어지고 있다 (Won et al., 2013). 그러나 실제 현장에서는 대부분의 감염에서 비교적 낮은 폐사율을 보이는 것으로 나타나고 있다. 그러나 이러한 보고 외에 넙치 이리도바이러스의 repeat region에서 나타나는 polymorphism의 연구와 바이러스 single isolate이 새로운 형태 또는 type으로의 진화, 발전에 대해 분석하는 유전적 연구는 많이 부족한 실정이다.

최근 subgroup III에 속하는 PGIV (Pearl grouper iridovirus)에 대한 연구에서 반복염기 배열에 따라 다양한 viral particles가 형성되는 것이 보고된 바 있으며, 그 원인은 다양한 sub-viral strain의 multiple

infection에 의한 것이라고 추정할 바 있다 (Kim et al., 2011). 이는 pearl gourami 등의 담수 관상어가 여러 지역에서 생산된 후 싱가포르에서 혼합 집하되므로, 다양한 지역에서 감염된 어류에 다양한 viral particles가 집하 tank내로 유출된 후 건강어류에 감염이 되고 이는 multiple viral particles의 감염형태로 나타난 것이라는 추정이다. 그러나 집하 및 이동이 적은 양식 중에 있는 어류에서도 동일한 추정이 적용되는지는 현재까지 비교 검토된 바 없다. 그러므로 본 연구에서는 subgroup IV의 major strain인 FLIV에서도 다양한 반복서열에 의한 multi-type viral particle를 생성하는 subgroup III와 같은 특성을 나타내는지, 그리고 그 특성은 무엇인지를 밝히고자 하였다. 이를 위해 본 연구는 일정한 기간 동안 국내외에서 얻은 해산어와 국내산 패류를 이용하여 넙치이리도바이러스에 대한 모니터링을 실시하였고, 이를 통해 분리한 isolates에 대해 repeat region의 특이적인 polymorphism pattern과 계통 발생학적인 분석 연구를 실시하고, 또한 공격 접종실험을 통해 그 변화를 분석함으로써, 이리도바이러스 polymorphism 현상의 유전적 특성을 밝혔다는 데에 의미가 있다고 할 수 있다.

본 연구는 국내 통영 넙치양식장의 감염어에서 FLIV-1을 분리하였고 검출된 virus에서 ORF (open reading frame)의 3'-말단부위에 존재하는 repeat region인 K2 region의 특이적인 polymorphism 현상을 확인하였으며, 이에 대해 클로닝을 실시하였고 시퀀스를 비교, 분석하였다 (Fig 4). 앞서 Kim et al. (2011)은 담수관상어에 발생하는 이리도바이러스 감염증의 원인체인 PGIV (Pearl gourami (*Trichogaster leeri*) iridovirus, subgroup III)의 K2 region에서 나타나는 polymorphism 현상에 대해 보고한 바 있었고, 본 연구에서 이를 subgroup IV인 FLIV에 적용시켜

확인한 것이다. 각 multiple major amplicon의 시퀀스를 분석한 결과 1168bp, 988bp, 781bp 3가지 시퀀스를 얻을 수 있었고, 각각의 시퀀스를 FLIV-1-pp1 (JF918538), FLIV-1-pp2 (JF918539), FLIV-1-pp3 (JF918540)라고 명명하고 NCBI genbank에 등록하였다. pp1, pp2, pp3 각각은 모두 FLIV-1 K2 region의 시퀀스였고, 시퀀스 중간부분의 deletion에 의해 크기가 달라진 3가지 DNA였으며, 따라서 K2 region의 polymorphism 현상은 동일한 부위의 서로 다른 크기를 가진 Polymorphic variants 3종이 한꺼번에 나타나는 것임을 확인하였다.

이러한 polymorphism 현상에 대해 몇 가지 검증이 필요했다. 먼저 repeat region을 template으로 하는 PCR은 Taq polymerase 오류로 인해 다양한 크기의 multiple amplicon을 생성할 수 있기 때문에 pp1, pp2, pp3 amplicon 각각을 플라스미드에 삽입한 뒤, 그것을 template으로 하여 PCR을 하였다. 그 결과, pp1, pp2, pp3 각각 각자의 size에 맞게 single band로 나타나 PCR의 오류는 아님을 확정지었다 (Fig. 5). 다음으로는 polymorphic variants가 모두 viral particle로써 존재하는지 또는 일부가 particle을 형성하지 못하고 naked nucleic acid로만 존재하는지를 확인하기 위해 stability test를 진행하였고 그 결과 pp1, pp2, pp3 모두 viral particle임을 확인할 수 있었다 (Fig. 6). 마지막으로 전기영동 결과를 보면 pp1이 가장 진한 amplicon density를 나타내는 패턴을 관찰할 수가 있는데, 이러한 현상이 polymorphic variants 각각의 concentration 차이인지 서로간의 interaction에 의한 PCR 결과인지를 확인하기 위해 각각을 삽입한 플라스미드를 동일한 농도로 혼합한 후, 그것을 template으로 PCR을 시행한 결과 모두 동일한 비율의 multiple amplicon을 확인할 수 있었다. 그러므로 이를 통해 이러한 band density pattern이

concentration의 차이임을 확정지을 수 있었다. 종합해서 정리해보면 FLIV-1은 host에 감염을 일으킨 후, concentration의 차이를 보이는 pp1, pp2, pp3 viral particles가 replication 되며, 이들은 모두 PCR을 통해 detection 가능 한 것으로 결론지을 수 있었다.

Repeating sequence (RS)는 진화 발전에 대한 연구, 그리고 유전자 마커로서의 활용도가 굉장히 높다. Human gene을 포함한 다양한 종의 진핵세포 gene 내의 TRS (tandem repeat sequence)는 유전자 감식, 친자 확인, 원산지 또는 품종확인 등의 유전자 마커로 활용 되고 있고, virus gene 내의 TRS는 viral genotyping 등에 활용된다 (Rita et al., 2010). 해수 바이러스는 새우의 대량폐사를 유도하는 WSSV (White spot syndrome virus)가 ORF 내의 광범위한 TRS가 보고되어 PCR-genotyping에 활용될 뿐만 아니라 ancestor virus의 연구와 바이러스의 해역 이동에 대한 연구에서도 이용되고 있다 (Dieu et al., 2004). 하지만 본 연구에서 확인한 viral gene의 ORF 내 repeat region에서 나타나는 polymorphism에 대한 보고, 다시 말해 virus 유전 연구에서 RS의 addition 또는 deletion에 의한 multiple viral particles의 생성에 대한 보고는 최초이며, 이러한 polymorphism은 바이러스의 진화 발전적 분석 연구에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 iridovirus의 ORF-2 gene의 repeating sequence를 분석 또는 repeating sequence에서 나타나는 특이적인 polymorphism의 pattern을 활용하여 지역적으로 grouping이 가능한 지, 또한 유전자 마커로써 바이러스의 source를 파악하는데 활용 가능한 지에 대해 분석하기 위해 2003년부터 2013년까지 국내외 해산어류와 국내 패류에 대한 모니터링 분석을 실시하였다. 해산어류는 주로 감염진단의뢰를 받은 시료에

서, 패류는 정기적인 sampling을 통해 얻은 시료에서 바이러스를 분리하여 모니터링을 실시하였다. 해산어의 경우 감염되어 증상을 보이는 경우와 비증상적 감염인 경우를 확인하기 위해 1st PCR과 nested PCR 결과를 모두 확인하였고 (Table 1-1), 패류에서 detection 되는 경우는 host에서부터 해수로 release된 virus가 근처 해역에 있던 패류의 filter-feeding에 의해 섭식되는 virus를 확인하는 것으로써, 이를 detection하기 위해 패류의 midgut gland을 분리하여 nested PCR로 확인하였다 (Table 1-2). 해산어류에서 14종, 패류에서 16종, 총 30종의 FLIV isolates를 분리할 수 있었고, 모니터링의 결과 패류 총 328 batches 중 80 batches의 시료에서 *Megalocytivirus*를 detection하여 *Megalocytivirus* 검출율은 24.39%로 나타났으며, 그 중 16 batches에서 FLIV isolates를 detection 하여 총 FLIV 검출율은 4.88%, *Megalocytivirus* 중 FLIV 검출율은 20%로 나타났다. 30종의 FLIV isolates 모두 MCP gene에 대해서 sequencing을 실시하여 분석하였으며, 16종의 reference sequence를 포함시켜 계통수를 제작하였다 (Fig. 12). 계통수를 분석한 결과, 6가지 sub-subgroup으로 나눌 수 있었고 모두 지역적 유의성을 보임을 확인할 수 있었다 (Table 4). 하지만 검출된 검체의 host별 차이는 확인할 수 없었고, 특히 해산양식어와 패류에서 분리한 바이러스간의 염기서열 차이도 나타나지 않음을 확인할 수 있었으며 또한 동일한 지역에서 검출된 virus isolates의 연도별 변이도 거의 일어나지 않음을 확인할 수 있었다. 그리고 시기별로 확인하였을 때, 양식장에 FLIV 감염이 일어나기 전에 근처 해역의 패류에서 먼저 detection되거나 감염이 일어나고 난 후, 근처 해역의 패류에서 계속 detection이 되는 양상을 확인할 수 있었다. 2009년 10월의 울산 진하리

참굴의 10/09sfFLIVoy-jh와 2009년 11월 포항 넙치양식장의 감염어의 11/09FLIV-ph의 관계를 보면 한 달 앞서 참굴에서 detection이 되었고, 또한 2010년 8월 부산광역시 광안리 참굴의 08/10sfFLIVoy-gw와 2010년 11월 부산광역시 기장군의 넙치양식장의 감염어의 10/10FLIV-gi, 2011년 3월 경상남도 고성 참굴의 03/11sfFLIVoy-gs와 2011년 8월 경상남도 통영의 넙치양식장의 감염어의 08/11FLIV-ty에서도 역시 몇 달 앞서 이리도 바이러스를 detection하고 있는 것을 확인할 수 있다. 2009년 11월 포항 넙치의 감염어에서부터 2010년 3월 진하 참굴의 03/10sfFLIVoy-jh까지 동일한 FLIV isolate가 계속 발견되고 있어 바이러스의 발생 후에도 계속 인근 해역의 패류에 남아있을 수 있음을 확인할 수 있었다. 이는 패류가 virus의 carrier로서의 가능성을 시사하는 결과이다. 이에 대해선 계속적으로 추가적인 연구를 통해 장기간 분석할 필요가 있다.

또한 K2 region에 대해서도 모든 FLIV isolates를 분석하였고, 그 결과 패류에서 분리된 몇몇 검체를 제외한 모든 검체에서 pp1, pp2, pp3를 모두 포함한 polymorphism을 확인할 수 있었다 (Fig. 10, Fig. 11). 이를 모두 sequencing하였고, 비교 확인한 결과 총 3가지 type의 polymorphism이 존재함을 확인할 수 있었다. 중국에서 CH-1 type, 국내에서 FLIV-1와 FLIV-2 type, 총 3가지 type을 확인하였고, 이들 염기서열을 아미노산으로 변환시킨 후 비교 분석한 결과 각 pp1, pp2, pp3간의 amplicon 크기 차이는 RS fragment의 deletion (또는 addition)에 의한 것이었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 8). Repeating sequence는 60 aa(amino acids)와 69aa 2가지가 존재했으며, pp1의 경우를 type별로 분석해보면 CH-1 type은 60 aa, 69 aa순으로, FLIV-1 type은 69 aa, 60

aa 순으로, FLIV-2 type은 60 aa, 60 aa순으로 RS fragment가 반복되고 있었다. 그리고 또한 CH-1 type의 경우 K2 region의 초반부에 3 aa의 deletion이 존재했는데, 이는 TRBIV (Accession no. GQ273492)에서도 나타나는 것으로 보아 중국에서 발생하는 FLIV의 지역적 특성인 것으로 보인다. 그리고 RS moiety 가 다양하게 RS 내에 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

또한 MCP gene 분류에 대해 각 검체의 polymorphism pattern을 비교한 결과, 서로 상관관계가 있음을 확인하였다. FLIV-1 type은 sub-subgroup 1, 3, 5, 6으로 분류된 총 25종의 검체, FLIV-2 type은 sub-subgroup 4의 3종의 검체와 sub-subgroup 5의 서해에서 분리한 시료인 09/11sfFLIVba-ss까지 총 4종의 검체, CH-1 type은 sub-subgroup 2의 1종의 검체로 분류할 수 있었다. 이는 염기서열과 polymorphism pattern 분석은 iridovirus의 국가 간의 검역과 해석을 통한 바이러스의 지역적 이동 관측에 활용될 수 있음을 보여주는 결과이고, 패류의 모니터링을 통한 방역시스템을 구축하여 바이러스 이동을 예측하고 전염을 방지하는데 활용할 수 있을 것으로 예상된다.

ORF 내의 RS의 addition과 deletion은 유전자 발현과 직결되므로 그 기능에 대한 연구가 중요하다. 인간에게 수두와 대상포진을 발병시키는 herpesvirus인 VZV (varicella-zoster virus)에서는 glycoprotein C를 coding하는 ORF-14 gene 내의 RS가 pathogenicity에 관여한다고 보고되었고 (Sauerbrei et al., 2007), gammaherpesvirus인 EBV, KSHV 내에 존재하는 RS는 latency amplification, viral gene expression 조절에 관여한다고 보고된 바 있다 (Thakur et al., 2007). 어류 바이러스에 대해서도 herpesvirus인 CCV (channel cat fish virus), iridovirus인 LCDV-1

(Lymphocystis disease virus), CIV (Chilo iridescent virus), GIV (Grouper iridovirus) 내의 RS가 보고되었으며 (Robin et al., 2000; Fischer et al., 1988; Samalecos et al., 1986; Tsai et al., 2004), GIV의 RS는 높은 recombination과 genomic rearrangement 유발한다고 보고된 바 있다.

본 연구에서 분석한 K2 region은 Iridovirus의 Laminin type epidermal growth factor like (LE) protein을 coding하는 ORF-2 gene 말단의 repeat region이다. 세포에서의 laminin은 cell adhesion, growth migration, 그리고 differentiation을 중재하는 basement membrane 생성에 주요요소로 작용하고, 이를 바탕으로 viral DNA에 암호화 된 LE protein은 viral host specificity와 replication 속도와도 관련이 있을 것이라 추정된다 (Do et al., 2005). 또한 cell-to-cell spread에 관여하여 antibody등의 host 면역반응으로부터 progeny virus를 보호하면서 viral replication을 할 수 있기 때문에 이는 viral pathogenicity와도 연관된 gene으로 생각된다. 따라서 이리도 바이러스의 ORF-2 gene의 말단에 존재하는 repeat region인 K2의 polymorphism 현상을 통한 진화적 변이에 대한 연구는 상당히 중요하다고 할 수 있다.

현재까지는 repeating sequence의 polymorphism 현상이 나타나는 원인에 대한 정확한 원인은 밝혀진 바가 없지만, 환경적 변화에 따라 virus는 그에 빠르게 적응하기 위해 genetic regulation이 필요하고 그 결과로 polymorphism이 나타나는 것으로 가정하였다. 그래서 host defense system에 초점을 두어 바이러스를 단기간에 다른 환경에서 replication 유도 했을 때, polymorphism pattern의 변화가 나타나는 지, 또한 그 변화로 인해 병원성의 차이를 보이는 지를 분석하기 위해 in

vivo와 in vitro passage 실험을 실시하였다. 먼저 넙치와는 다른 host defence system을 갖는 돌돔에 대해 in vivo 교차감염실험을 진행하였고 그 결과 돌돔에 대한 FLIV-1의 감염성을 확인하였다 (Table 5). 그리고 polymorphism pattern의 변화와 병원성의 변화를 보고자 3회의 passage 실험을 실시했고, 마지막 passage 실험에서 분리된 바이러스에 대해 sequencing을 실시하여 염기서열변화도 분석하였다. 그 결과 polymorphism pattern의 변화는 나타나지 않았고, 염기서열도 변화 없이 처음과 동일함을 확인할 수 있었으며 모든 실험어는 폐사를 보이지 않았다. 그리고 감염실험을 실제 현장에서의 감염경로와 동일하게 실험하기 위해 cohabitation test를 실시하였다 (Table 6). 그 결과, 넙치와 돌돔 recipients에서 각각 80%, 30%의 감염율을 확인하였고, 1st PCR에서 검출되지 않은 검체는 모두 nested PCR에서 확인되었다. Polymorphism pattern은 넙치, 돌돔 recipients에서 분리된 바이러스 모두 동일한 패턴을 나타냈으며 nested PCR에서 검출된 검체 역시 동일한 패턴을 확인할 수 있었다 (Fig. 14). 실험 중, 해수 중에 release된 바이러스를 검출하기 위해 3일마다 sampling을 실시하고 PCR을 통해 확인하였는데 접종 후 12일부터 18일까지 검출이 됨을 확인하였고, 그 이후에는 검출할 수 없었다. 이는 감염 후 약 12일부터 해수 중에 많은 양의 virus가 release되기 시작하고 약 21일부터는 어느 정도 host가 면역적으로 극복해낸 것으로 파악되며, 21일부터 24일까지 recipients의 어체는 감염이 되었는데 해수에서 detection이 안되는 것으로 보아 약 24일까지는 바이러스가 감염부터 많은 양의 virus를 release하기까지 시기적으로 미치지 못했던 것으로 추정된다. 한편, 양식 현장에서 폐사를 일으켰던 FLIV-1을 실험적 환경에서 넙치에 접종하였지만 특이하게도 모든 실험에서 폐사가 전

혀 나타나지 않았는데, 이러한 실험적 환경에서 넘치가 폐사하지 않는 현상에 대해서는 다른 논문에서도 보고한 바 있으며 (Kim et al., 2005), 이에 대해선 추가적인 연구가 필요할 것이다. 추정하건데, FLIV 감염은 넘치의 어체를 면역적으로 상당히 약화시키고, 거기에 밀식 등의 양식 현장 환경에서 가해지는 스트레스 또는 다른 병원체의 2차 감염과 같은 2차적인 요인으로 인해 폐사가 일어나는 것으로 보여진다.

또한 본 연구는 host defense system이 제거된 in vitro 환경에서의 감염 시 polymorphism pattern의 변화가 나타나는지에 대해 분석하기 위해 돌돔자어초대배양세포 (RBE cell) 에 접종실험을 진행하였고 그 결과 FLIV-1의 감염성을 확인할 수 있었으며 (Fig. 15), 배양액을 sampling하여 K2 region에 대해 PCR한 결과 polymorphism pattern은 동일한 appearance rate를 보이며 증가함을 확인하였다 (Fig. 16). 이어 polymorphism pattern의 변화를 분석하기 위해 3회의 passage 실험을 진행하였고 이도 또한 in vivo passage 실험과 동일하게 polymorphism pattern 변화와 염기서열의 변화 모두 나타나지 않았다 (Table 7). *In vivo*, *in vitro* 접종 실험결과를 종합해서 분석한 결과, host defence system과 같은 바이러스의 환경적 변화는 단기적으로 polymorphism에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 확인이 되었고, 이러한 polymorphism 현상은 virus에 의존적이며, 각 virus의 특성인 것으로 추정된다.

본 연구에서는 이러한 이리도바이러스의 polymorphism 현상이 나타나는 이유와 기능을 분석하기 위해 *Megalocytivirus*의 전체로 확장시켜 subgroup별 K2 region의 repeating sequence와 polymorphism pattern을 비교 분석하였다 (Fig. 9). 본 연구실에서 분리한 다양한 *Megalocytivirus* isolates에 대해 분석한 결과, RSIV isolates (subgroup

I) 과 RBIV isolates (subgroup II) 에 대해 분석한 결과 모두 single band pattern을 나타내는 것을 확인하였지만, (Data not shown) PGIV isolates (subgroup III) 에서는 앞서 보고된 결과와 동일하게 아주 다양한 multiple band pattern을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. PGIV isolates의 polymorphism은 본 연구에서 확인한 FLIV isolates와 multiple major band가 나타난다는 점에서는 동일하지만 multiple major band가 아주 다양한 패턴으로 나타난다는 점에서는 차이가 있었고 이는 virus에서의 LE protein 기능과 함께 추정했을 때, 아마도 host specificity에 대한 진화 발전적인 측면에서 생성된 각 subgroup의 특징으로 추정된다. 이러한 *Megalocytivirus* K2 region의 polymorphism 현상의 특징을 subgroup별로 분류할 수가 있는데, 크게 Single band pattern을 보이는 subgroup I, II를 Low Various Polymorphism (LVP) type으로, multiple band pattern을 보이는 subgroup III, IV를 High Various Polymorphism (HVP) type으로 나눌 수가 있다. 말단에 위치하는 K2 region을 제외한 ORF-2 gene region의 homology는 LVP type인 RSIV와 RBIV가 95.42%로, 다른 subgroup간의 homology가 82~85% 내외인 것을 보았을 때 굉장히 서로간의 유사성이 높는데 이러한 subgroup간의 차이는 subgroup별 MCP gene 간의 homology가 96~98% 정도로 약 2%의 차이를 보이는 것과 비교해 보았을 때 다소 큰 차이랄 수 있다 (Table 3). 이에 따라 LVP type에 속하는 RSIV와 RBIV는 host specificity의 측면에서 굉장히 유사하고, HVP type에 속하는 PGIV와 FLIV의 감염 가능 숙주와는 크게 차이가 있다는 것을 보아 이러한 polymorphism 현상은 ORF-2 gene의 기능과 연관성이 있을 것이라 추정한다.

담수관상어는 세계적으로 매우 다양한 어종이 존재하며 종간의 차이가 상당히 크며 판매를 위해 서로 집하되거나 사육수가 혼합되게 되는데, 이 과정에서 바이러스는 다양한 종의 담수관상어를 오랜 기간 동안 옮겨 다니며 replication할 수 있게 된다. Subgroup III virus가 다양한 polymorphism pattern을 보이는 이유는 바이러스가 광범위한 종에 대한 host specificity에 적응하기 위해, 또는 host defense system을 보다 빠르게 이겨내기 위해 생성된 viral gene의 진화적 변화라 추정된다. Subgroup IV virus는 자연 상태에서 flatfish종에만 병원성을 나타내는 제한적인 host specificity와 pathogenicity를 보이는 데, 이도 항상 동일하고 일정한 polymorphism pattern을 보이는 현상과 연관이 있을 것이라 추정된다.

Repeating sequence를 분석한 결과에서 *Megalocytivirus*의 subgroup 모두 major RS moiety가 정확히 동일하게 반복되어 연결되고 있는 것은 아니라 조금씩의 아미노산 배열 차이가 있는 것으로 확인되고, minor RS moiety는 동일하게 반복되나 T, P와 같은 아미노산이 삽입되거나 손실되어 다양한 크기의 fragment가 생성되는 것으로 보인다. 그리고 직접적으로 알 수는 없지만 FLIV isolates에서 pp1과 pp2, pp3와의 양적차이를 보이는 결과를 보아 repeating sequences의 반복 횟수는 replication 또는 cell-to-cell spread 속도와 연관성이 있을 가능성도 있다.

항상 동일한 polymorphism pattern을 보이는 viral replication 특성에 대해 몇 가지 의문점이 들었고, 이에 본 연구는 i) 모든 variants가 일정한 비율로써 함께 particles group을 이루어 존재하다가 host에 전부 동시에 감염이 된다는 가설, ii) 다양한 polymorphic variants가 각각 viral particle로 존재하며 이들이 host에 복합감염이 되어 나타난 결과라

는 가설, 그리고 iii) 하나 또는 둘 이상의 polymorphic variants가 host에 감염이 되어 replication을 할 때, addition과 deletion에 의해 모든 variants의 progeny virus가 항상 일정한 비율을 이루며 생성된다는 가설, 총 3가지의 가설을 설정했다. 본 연구에서는 패류에서 검출된 virus 중 single 또는 double pattern의 polymorphism을 보이는 5가지 시료의 결과를 확인할 수 있었고 (Fig. 11) 이를 통해 FLIV polymorphic variants는 particles group을 형성하지 않고 각각이 따로 host를 감염시킬 수 있음을 확인할 수 있었으며, 감염어 검체에서 분리한 모든 FLIV isolates가 동일한 polymorphism pattern을 나타내는 것으로 보아, polymorphism 현상을 설명하는데 제 3가설이 논리적으로 적합하다고 추론할 수 있었다. 왜냐하면 모든 polymorphic variants가 한꺼번에 동일한 비율을 보이면서 하나의 host에 감염되는 것은 사실상 불가능하기 때문이다. Kim et al (2011)은 PGIV (subgroup III)에서 polymorphism을 보이는 현상에 대해 본 논문에서 제시한 제 2가설로 추정할 바 있다. 하지만 PGIV는 제한적인 host specificity를 보이는 FLIV와는 달리 광범위한 담수어 종에 감염성을 보이며, 또한 전 세계적으로 수출되며 혼합 집하가 되기 때문에 다양한 종에 감염이 활발히 이루어졌을 것이며, 이로 인해 아주 다양한 변이를 보이게 되는 것으로 추정된다.

제 3가설을 확정짓기에는 다소 실험적 근거가 부족하였기 때문에, 추가적인 실험을 진행하였다. Single 과 double band pattern의 polymorphism을 보이는 FLIV isolates가 detection되는 패류의 midgut gland 조직을 이용하여 RBE cell에 직접 inoculation을 한 후 배양하여 polymorphism pattern을 분석하려 했으나 low viral copy값과 오랜 보관 기간 탓에 바이러스 배양을 성공하지 못했다. (data not shown) 따라서

이 가설을 명확하게 확정짓기 위해서는 새로운 시료 확보와 추가적인 연구가 필수적이다.

본 연구는 i) FLIV에서 나타나는 polymorphism에 대해 분석하였고 ii) 몇 년에 걸친 상당한 기간 동안의 바이러스 monitoring을 통해 MCP gene에 대한 계통수 분석과 K2 region에 대한 연도별, 지역별 그리고 host 별 polymorphism pattern 분석, iii) 이들의 변이를 관찰하기 위해 host의 면역 inhibition에 초점을 두어 in vivo, in vitro passage를 진행하여 변화를 분석하였으며, iv) *Megalocytivirus* K2 region에서 보이는 특이적인 subgroup별 polymorphism 현상에 대해 분석하고 이를 바탕으로 논리적인 추론을 통해 새로운 이론을 제시하였다. 하지만 추가적인 연구를 통해 가설을 확립할 필요가 있으며, ORF-2 gene에 대한 정확한 기능과 그 말단부에서 나타나는 polymorphism의 기능 또한 추가적인 연구가 필요할 것이다. 또한 장기간의 passage 연구를 통해 이리도 바이러스에 대한 진화 발전적 분석연구가 필요할 것이다. 본 연구에서는 패류의 방역산업의 bioindicator로서의 가능성을 제시하였고, polymorphism pattern을 이용해 검역에 활용할 수 있음을 시사하였다. 또한 본 연구에서 제시한 가설은 바이러스 repeat region의 분석연구에서 아직 알려진 바 없는 이론이며 이를 통해 앞으로 이리도바이러스를 진화적 연구모델로 하여 바이러스의 진화적 연구 방향을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

V. 요약

Family *Iridoviridae* Genus *Megalocytivirus*에 속하는 FLIV (flounder iridovirus, subgroup IV)는 ORF-2 gene의 말단부에 위치한 K2 region에서 multi-length band가 나타나는 특이한 polymorphism 현상을 보인다. 먼저 이를 검증한 결과 detection한 multi-length band 모두 각각 viral particles를 이루고 있는 polymorphic variants임을 확인하였다. 많은 시료를 통해서 이러한 polymorphism 현상을 확인하기 위해 국내외 해산양식어류와 패류에 대해 monitoring을 실시하였고, 분리된 30종의 FLIV에 대해 MCP gene의 계통수 분석과 repeating sequence 분석, 그리고 polymorphism 분석을 실시하였다. 그 결과 연도별로 지역적인 유의성을 보였으며 MCP gene에 대해 6가지 sub-subgroup으로 나눌 수 있었고 또한 pp1의 repeating sequence의 반복 패턴에 따라 3가지 type으로 나눌 수 있었으며 polymorphism pattern은 모든 검체에서 3개의 visible band를 보이는 것을 확인하였다. 접종 실험을 통한 polymorphism 변화를 확인하기 위해 *in vivo*에서의 교차감염 passage 실험과 *in vitro* passage 실험을 시행하였다. FLIV-1을 넙치와 돌돔에 대해 총 3회의 passage 실험을 한 결과, 패턴의 변화는 없음을 확인하였고, cohabitation을 통한 교차감염 실험에서도 같은 결과를 나타냈다. RBE (Rock bream embryo) cell을 이용한 *in vitro* passage에서도 3회의 passage 모두 패턴의 변화 없이 동일한 결과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구는 모든 결과를 종합하여 분석하였을 때, 항상 동일한 band density비율을 보이는 polymorphism을 확인할 수 있었지만, 특이적으로 패류에서는 single 또는 double pattern을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 어떤 하나 또는 두 가지 polymorphic variants가 감염되더라도 항상 일정한 progeny polymorphic variants를 생성한다는 가설을 제시할 수 있었다.



VI. 감사의 글

매일 매일을 고민하며, 연구하며, 그리고 조금씩 조금씩 배우면서 정말 많은 것을 얻을 수 있었던 2년이었습니다. 이제 와서 되돌아보니 꽤 성장한 나 자신의 모습을 볼 수 있었고, 감회가 느껴지네요. 저를 격려해주시며 조언과 충고를 아끼지 않았던 많은 분들께 감사의 인사 올립니다.

가장 먼저 제가 하고자 하는 일을 모두 믿어주시고 격려해 주신 가족에게 감사하다는 말 꼭 전하고 싶습니다. 힘들고 어려운 상황에도 항상 행복한 가정을 지켜주신 아버지 어머니, 미국이라는 타지에서 열심히 공부하는 동생 모두 사랑합니다.

연구실에 들어와 석사 졸업까지 3년 동안, 저는 지도교수이신 정현도 교수님께 정말 많은 것을 배웠습니다. 멘토로서 엄하게 혼도 내시고 또 가끔씩 격려로 북돋아주신 덕분에 여기까지 성장할 수 있었던 것 같습니다. 아직까지 갈 길은 멀고 부족하지만 진정한 연구자에 대한 자세를 가르쳐주신 정현도 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 바쁘신 와중에도 제 논문이 완성되기까지 많은 관심과 조언을 주셨던 김기홍 교수님과 강주찬 교수님께 감사드리며, 학부과정부터 석사과정까지 인성과 수산생명의학 분야의 지식에 대해 많은 것을 경험하고 깨우치게 해주신 박수일 교수님, 정준기교수님, 허민도 교수님 그리고 김도형 교수님께도 심심한 감사의 말씀 드립니다.

학부 4학년부터 함께 했던 진단생화학실험실 선배님들과 후배님들께도 감사의 마음 전합니다. 정말 이렇게 매년 얼굴 보며 후배를 격려해 주시는 선배님들의 한마디의 말씀이 얼마나 힘이 되는지 모릅니다. 가장 먼저 든든한 방장으로 서 3년 동안 저에게 많은 힘이 되준 지웅이 형, 정말 감사드리고요. 저에게 가장 큰 결심을 하게 해주신 준범 선배, 려진 선배, 이경 선배, 광일 선배, 기택 선배께도 감사의 말씀 먼저 드립니다. 선배님들의 조언 아니었으면, 실험실 들어와서 이렇게 좋은 인연 만들지 못했을 것이고, 이렇게 좋은 길을 건지 못했을 것이라 생각합니다. 그리고 실험실에서 요즘은 말을 잘 안 듣지만 그래도 선배라고 이쁜 짓하는 이슬이, 엉뚱하지만 생각이 깊은 지희, 항상 열심히 해서 고마운 서경이, 믿음직한 민지한테도 고맙고 동갑이지만 잘 따라주고 힘을 준 우주에게도 고맙다는 말 전하고 싶습니다. 요것들아 앞으로 더 잘해라. 그리고 이제 석사들어가는 재찬이, 니가 제일 문제다. 잘해라 그리고 고맙다. 막내 준규도

열심히 하길 바란다. 그리고 만날 때 마다 힘이 되는 조언을 해주셨던 경현선배, 수희선배, 명석선배께 감사드리고, 영재선배, 호열선배, 신후선배, 순범선배, 지윤선배, 영화선배, 대심선배, 윤경선배, 지호선배, 현정선배, 민수선배, 소혜선배께도 감사의 말 전합니다. 그리고 실험실의 일용할 양식을 자주 가져다주시고 후배에게 신경 많이 써주셨던 재훈선배와 윤준선배, 기원선배, 영진선배, 정희선배, 주현선배, 효선선배 그리고 회경이에게도 감사드립니다. 제일 좋은 행님, 우열선배께는 항상 감사하고 그리고 좋아한다고 말씀드리고 싶어요. 그리고 박사과정 동기 혜진 선배께도 정말 감사드리고 앞으로 잘 해봅시다.

멀리 제주도에도 있지만 저의 모든 일에 응원해 준 동재 선배, 매년 부산 올 때 마다 챙겨주시고 항상 선배답게 조언해주셔서 진심으로 감사드립니다. 정말 동재선배만큼 믿고 따를 수 있는 좋은 형은 없는 것 같습니다. 평생 잘해주십시오 행님. 그리고 옥현햄 수지, 재원햄 다희, 혜인이 준영이 항상 오래가길 바라고 모두 파이팅 넘치게 하면 다 잘 될 거라고 믿습니다. 파이팅. 멀리서도 신경써준 영빈이에게도 고맙다고 꼭 전하고 싶고, 석사 발표를 같이 마친 아란이에게 수고했다고 말하고 싶습니다. 든든한 동기 보성이도 열심히 해서 꼭 꿈을 이루길 기원합니다.

돌아보면 학부 1학년 때부터 석사과정까지 동아리 생활이며, 실험실에서 실험하며 매학기 거의 방학 없이, 공휴일 없이 6년 이상을 진짜 매일 학교에 등교했던 것 같습니다. 이렇게 열정적으로 연구를 할 수 있었던 건, 우리 락밴드 매니아 덕분인 것 같습니다. 락 스피릿이 항상 저에게 든든한 힘이 됩니다. 그리고 우리 밴드 RUN 멤버들 재승햄, 규동햄, 임또햄, 거의 해체단계지만 꼭 다시 합쳤으면 좋겠네요. 보고싶습니다. 햄들.

우리 약국개업하신 석문이, 영국 롤스로이스에서 일만하고 있는 지훈이, 대기업 때려치고 나온 홍진, 미국 갔다온 형준아, 미국인 여친이랑 결혼할 정진이 모두 다 각자의 자리에서 최고가 되길 바랄게. 친구들아.

마지막으로 저에게 제일 조언을 가장 아낌없이 퍼부어주시는 사랑하는 지은이에게 매일 조언 퍼부어주셔서 감사하다고 전하고 싶습니다. 서로에게 가장 큰 힘이 되어주었고, 혼자였으면 할 수 없었던 일도 많이 이루어낸 것 같습니다. 오랜 기간 동안 곁에 있어줘서 감사했고, 앞으로 더 성숙하자.

앞으로도 모두의 조언과 격려에 힘입어 더욱 더 발전하는 인간이 되겠습니다. 감사합니다.

VII. 참 고 문 헌

- A. Sauerbrei., R. Zell., P. Wutzler., 2007. Analysis of repeat units in the R2 region among different Oka Varicella-Zoster virus vaccine strains and wild-type strains in Germany. *Virol*, 5, 40-44.
- Bahr, U., Springfield, C., Tidona, C. A., Darai, G., 1999. Structural organization of a conserved gene cluster of Tupaia herpesvirus encoding the DNA polymerase, glycoprotein B, a peobable processing and transport protein, and the major DNA binding protein. *Virus RE* 60, 123-135.
- Bugert, J. J., Raab, K., Rosen-Wolff, A., Janssen, W. and Darai, G., 1993. Determination of the position of the boundaries of terminal repetitive sequences within the genome of molluscum contagiosum virus type I by DNA nucleotide analysis. *Virol.* 192, 391-396.
- Chao, C.-B., Chen C.-Y., Lai, Y.-Y., Lin, C.-S., Huang, H.-T., 2004. Histological, ultrastructural, and *in situ* hybridization study on enlarged cells in grouper *Epinephelus hybrids* infected by grouper iridovirus in Taiwan (TGIV). *Dis. Aqua. Org.* 58, 127-142.
- Chen, X.H., Lin, K.B. and Wang, X.W., 2003. Outbreaks of an iridovirus disease in maricultured large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), in China. *J. Fish Dis.* 26, 615-619 (Short communication).
- Chinchar, G., Essbauer, S., He, J.G., Hyatt, A., Miyazaki, T., 2005.

- Family iridoviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A., editors. Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses eight report of the international committee on the taxonomy of viruses. San Diego: Academic Press, 145-161.
- Chua, F.H.C., Ng, M.L., Ng, K.L., Loo, J.J., Wee, J.Y., 1994. Investigation of outbreaks of a novel disease, 'sleepy grouper disease', affecting the brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina* Forskal. J. Fish Dis. 17, 417-427.
- Dieu, B.T.M., Marks, H., Siebenga, J.J., Goldbach, R.W., Zuidema, D., Duong, T.P., Vlak, J.M., 2004. Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam, Journal of General Virology, 85, 3607 - 3618
- Do, J.W., Moon, C.H., Kim, H.J., Ko, M.S., Kim, S.B., Son, J.H., Kim, J.S., An, E.J., Kim, M.K., Lee, S.K., Han, M.S., Cha, S.J., Park, M.S., Park, M.A., Kim, Y.C., Kim, J.W., Park, J.W., 2004. Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus. Virol. 325, 351-363.
- Do, J.W., Cha, S.J., Kim, J.S., An, E.J., Lee, N.S., Choi, J.H., Lee, C.H., Park, M.S., Kim, J.W., Kim, Y.C., Park, J.W., 2005. Phylogenetic analysis of the major capsid protein gene of iridovirus isolates from cultured flounders *Paralichthys olivaceus* in Korea. Dis. Aqua. Org. 64, 193-200
- Fischer, M., Schnitzler, P., Scholz, J., Rosen-Wolff, A., Delius, H.,

- Darai, G., 1988. DNA nucleotide sequence analysis of the *Pvu* II DNA fragment L of the genome of insect iridescet virus type 6 reveals a complex cluster of multiple tandem, overlapping and interdigitated repetitive DNA elements, *Virology* 291, 126-139.
- Goldberg, T.L., Coleman, D.A., Grant, E.C., Inendino, K.R., Philipp, D.P., 2003. Strain variation in an emerging iridovirus of warm-water fishes. *J. Virol.* 77, 8812-8818.
- He, J.G., Deng, M., Weng, S.P., Li, Z., Zhou, S.Y., Long, Q.X., Wang, X.Z., Chan, S.M., 2001. Complete genome analysis of the mandarinfish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus.
- He, J.G., Zeng, K., Weng, S.P., Chan, S.M., 2002. Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). *Aquaculture*. 204, 11-24.
- Inouye, K., Yamano, K., Maeno, Y., Nakajima, K., Matsuoka, M., Wada, Y., Sorimachi, M., 1992. Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.* 27, 19-27 (in Japanese with English abstract).
- Jeffrey, Go., Malcolm, Lancaster., Kylie, Deece., Om, Dhungyel., Richard, Whittington., 2005. The molecular epidemiology of iridovirus in Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) and dwarf gourami (*Colisa lalia*) from distant biogeographical regions suggests a link between trade in ornamental fish and emerging iridoviral diseases.

- Jeong, J.B., Kim, H.Y., Kim, K.H., Chung, J.K., Komisar, J.L., Jeong, H.D., 2006. Molecular comparison of iridoviruses isolated from marine fish cultured in Korea and imported from China. *Aquaculture*. 255, 105-116.
- Jun, L.J., Jeong, J.B., Kim, J.H., Nam, J.H., Shin, K.W., Kim, J.K., Kang, J.C., Jeong, H.D., 2009. Influence of temperature shifts on the onset and development of red sea bream iridoviral disease in rock bream *Oplegnathus fasciatus*. *Dis. Aqua. Org.*, 84, 201-208.
- Jung, S.J., Oh, M.J., 2000. Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel) in southern coastal areas of the Korean Peninsula. *J Fish Dis* 23, 223 - 226.
- Kim, W.S., Oh, M.J., Jung, S.J., Kim, Y.J., Kitamura, S.I., 2005. Characterization of an iridovirus detected from cultured turbot *Scophthalmus maximus* in Korea, *Dis. Aqua. Org.*, 64, 175-180.
- Kim, K.I., Nam, J.H., Jeong, J.B., Jin, J.W., Kim, D.H., Jun, L.J., Kim, J.K., Jeong, H.D., 2011. Polymorphism in an open reading frame, ORF-2, in the Megalocytivirus of freshwater ornamental fishes, *Aquaculture*, 317, 20-26.
- Lancaster, M.J., Williamson, M.M., Schroen, C.J., 2003. Iridovirus-associated mortality in farmed Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*). *Aust. Vet. J.* 81, 633-634 (Short contributions).
- Lei, J., Ma, A., Chen. C., Zhuang. Z., 2005. The present status and

- sustainable development of turbot (*Scophthalmus maximus* L) cultured in China, Eng, Sci, (CHN) 7(5), 30-35.
- Lu, L., Zhou, SY., Chen, C., Weng, SP., Chan, SM., et al., 2005. Complete genome sequence analysis of an iridovirus isolated from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Virol* 339, 81 - 00.
- Nagendra, N., Thakur., Susanne, E.G., Beatrix.S., Klaus. F., Andreas. W., Heiko, A., 2007. A gammagerpesviral internal repeat contributes to latency amplification. *Pros.* 10, 1371-1372
- Nakajima, K., Sorimachi, M., 1994. Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.* 29, 29-33.
- Nerland, A.H., Skaar, C., Eriksen, T.B., Bleie, H., 2007. Detection of nodavirus in seawater from rearing facilities for Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* larvae. *Dis. Aqua. Org.* 73, 201-205.
- Moffat, J.F., Zerboni, L., Kinchington, P.R., Grose, C., Kaneshima, H., Arvin A.M., 1998. Attenuation of the vaccine Oka strain of varicella-zoster virus virulence demonstrated in the SCIDhu mouse. *J Virol*, 72, 965-974.
- Oshima, S., Hata, J., Hirasawa, N., Ohtaka, T., Hirono, I., Aoki, T., Yamashita, S., 1998. Rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using the polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.* 32, 87-90.
- Pallister, J., Gould, A., Harrison, D., Hyatt, A., Jancovich, J., Heine,

- H., 2007. Development of real-time PCR assays for the detection and differentiation of Australian and European ranaviruses. *J. Fish Dis.* 30, 427-438.
- Paperna, I., Vilenkin, M., de Matos, A.P., 2001. Iridovirus infections in farm-reared tropical ornamental fish. *Dis. Aquat. Org.* 48, 17-25.
- Pickup, D.J., Bastia, D., Stone, H.O., Joklik, W.K., 1982. Sequence of terminal regions of cowpox virus DNA; arrangement of repeated and unique sequence elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 7112-7116.
- Qi-Ya, Zhang., Feng, X., Jian, X., Zheng-Qiu, L., Jian-Fang, G., 2004. Complete genome sequence of lymphocystis disease virus isolated from China. *Virology*, 13, 6982-6994.
- Reddy, E.P., Smith, M.J., Canaani, E., Robbins, K.C., Tronick, S.R., Zain, S., Aaronson, S.A., 1980. Nucleotide sequence analysis of the transforming region and large terminal redundancies of Moloney murine sarcomavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 5234-5238.
- Robin L., Stingley., Wayne L., Gray., 2000. Transcriptional regulation of the channel catfish virus genome direct repeat region. *Virology*, 81, 2005-2010.
- Rita G., Marcelo D.V., Marthieu L., Kevin J.V., 2010. Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences, *Annu. Rev. Genet.* 44, 445-77
- Samalecos, C. P., 1986. Analysis of the structure of fish lymphocystis

- disease virions from skin tumors of *Pleuronectes*. Arch. Virol, 91, 1-10.
- Schnizler, P., Delius, H., Scholz, J., Touray, M., Orth, E. and Darai, G., 1987. Identification and nucleotide sequence analysis of the repetitive DNA element in the genome of fish lymphocystis disease virus. Virol, 161, 570-578.
- Shi CY, Wang YG, Yang SL, Huang J, Wang QY ,2004. The first report of an iridovirus-like agent infection in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in China. Aquaculture, 236, 11 - 25
- Sudthongkong, C., Miyata, M., Miyazaki, T., 2002a. Iridovirus disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lampeye and dwarf gourami. Dis. Aquat. Org. 48, 163-173.
- Tamai T., Tsujimura K., Shiragata S., Oda H., Noguchi T., Kusuda R., SatoN., Kimura S., Katakura Y., and Murakami H., 1997. Development of DNA diagnostic methods for the detection of new fish iridoviral disease. Cytotechnology. 23, 211-220.
- Tsai C-T., Ting J-W., Wu M-H., Wu M-F., Guo I-C. and Chang C-Y., 2004. Complete Genome Sequence of the Grouper Iridovirus and comparison of genomic organization with those of other Iridoviruses. 13, 2010-2023.
- Wadsworth, S., Jacob, R.J., Roizman, B., 1975. Anatomy of herpes virus DNA. Size, composition and arrangement inverted terminal repetition. J. Virol. 15, 1487-1497.
- Walker, D.P., and B.J. Hill. 1980. Studies on the culture assay of

- infectivity and some *in vitro* properties lymphocystis virus. J. Gen. Virol, 51, 385-395.
- Wang, X.-W., Ao, J.-Q., Li, Q.-G., Chen, X.-H., 2006. Quantitative detection of a marine fish iridovirus isolated from large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*, using a molecular beacon. J. Virol. Methods. 133, 76-81.
- Wang, Y.Q., Lu, L., Weng, S.P., Huang, J.N., Chan, S.-M., He, J.G., 2007. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of a marine fish infectious spleen and kidney necrosis virus-like (ISKNV-like) virus. Arch. Virol. 152, 763-773.
- Weng, S.P., He, J.G., Zeng, K., Huang, Z.J., 1998. Infectious spleen and kidney necrosis virus infection in *Siniperca chuatsi* (Basileusky)-histopathology and relationship with HB, RBC, and WB C. Journal of South China Normal University, Natural Science, Suppl. 82, 71-79 (in Chinese, with English abstract).
- Won, K.M., Cho, M.Y., Jee, B.Y., Myeong, J.I., Kim, J.W., 2013. The first report of Megalocytivirus infection on farmed starry flounder, *Platichthys stellatus*, in Korea
- 조혜진, 2008. 해산어와 담수 관상어에 대한 iridoviruses의 교차 감염성 및 정량적 분석. 부경대학교 대학원 이학석사 학위논문.
- 남정희, 2009. 담수 관상어에서 분리한 iridoviruses의 분자생물학적인 특성, 부경대학교 대학원 이학석사 학위논문.