

이학석사 학위논문

DNA nucleotide sequences 특성 분석에
의한 Red Sea bream Iridoviruses의 비교

지도교수 정 현 도



이 논문을 인용한 문헌으로 제출함

2003년 2월

부경대학교 대학원

어 병 학 과

정 준 범

정준범의 이학석사 학위논문을 인준함

2002년 12월 26일

주 심 이학박사

강 주 찬



위 원 농학박사

박 수 일



위 원 이학박사

정 현 도



목 차

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. Fishes of RSIV infection	4
2. PCR	5
2-1. Primers 제작	5
2-2. Viral nucleic acids 분리	6
2-3. PCR amplification	7
3. Cloning	8
3-1. Gel elution	8
3-2. Cloning	9
3-3. Plasmids 분리	10
4. 염기서열 분석	12
5. Pst I fragment 분석	12
5-1. 다른 primer를 사용한 PCR	12
5-2. Pst I fragment의 전체 cloning	12
6. RSIV variants 구별	13
6-1. Primers 제작	13
6-2. PCR amplification	13
7. Multiplex PCR	13
III. 결 과	14
1. RSIV isolates 염기서열 비교	14
1-1. PCR 결과	14
1-2. RSIV isolates 염기서열 비교	16
2. Pst I fragment 분석	20

2-1. 다른 primer를 사용한 PCR 결과	20
2-2. Pst I fragment의 전체 cloning	23
3. RSIV의 variants	27
4. Discriminative PCR	31
4-1. Preparation of discriminative primers	31
4-2. Multiplex PCR	34
IV. 고 찰	37
V. 요 약	43
VI. 감사의 글	44
VII. 참고 문헌	45

Comparison of Red Sea bream Iridoviruses by the characterization of DNA nucleotide sequences

Joon-Beom Jeong

Department of Fish Pathology, Graduate School,

Pukyong National University

Abstract

The nucleotide sequences of DNA fragments amplified by polymerase chain reaction (PCR) from four different genomic regions of eleven red sea bream iridoviruses (RSIVs) isolated from different species of fishes, different areas and in different years in Korea were compared with the reported reference sequences. We could figure out that three RSIV variants were distributed in the aquatic farms of Korea. One isolate, RSIV Namhae, showed 100% homology to the reference sequences, another two isolates, 2000~2001 RSIV China, showed 93.1~98.3% homology with reference sequences, the other eight isolates, which appeared to contain identical nucleotide sequences, showed 96.6~98.7% homology with reference sequences depending upon the target regions for PCR gene amplification. However, differences in nucleotide sequences were not apparent between the RSIVs isolated in different locations, in different years or in different host species. The lowest degree of DNA homology with reference sequences was found in the *Pst*I fragment. We found that the presence of a RSIV not detectable with one of the primers reported previously based on the *Pst*I fragment. We designed a new primers that can discriminate different RSIV variants depend upon the variation of nucleotide sequences in the region of *Pst*I fragment. When we used the primers derived from

the variable regions, NF and CR, specific the RSIV Namhae and RSIV China respectively, different size of PCR amplicon were obtained depend upon the type of RSIV variants. Additionally, multiplex PCR with the combined primers, it was possible to discriminate the types of variants depend upon the size of PCR amplicons, depend upon the DNA nucleotide sequence variation of RSIV *Pst* I fragment.

I. 서 론

Red sea bream iridoviral disease (RSIVD)는 iridovirus에 의해서 발생하는 질병이다. 그 원인 virus는 1990년에 일본의 참돔 (red sea bream, *Pagrus major*)에서 처음 검출되었다고 해서, red sea bream iridovirus (RSIV)라고도 불리고 있으며 (Inouye et al., 1992), 이 질병의 발생으로 인해서 우리 나라의 양식 산업에서도 매년 심각한 경제적 손실이 야기되고 있다.

Iridoviruses는 크기가 큰 icosahedral cytoplasmic deoxyriboviruses로서 현재까지 알려진 subfamily는 최소 5개이며, 여기에는 Iridovirus, Chloroiridovirus, Ranavirus, Lymphocystis virus 그리고 Goldfish virus 1-like viruses 등이 속한다. 전자의 2 그룹은 무척추동물 그리고 후자의 3 그룹은 척추동물의 iridoviruses가 포함된다 (Webby & Kalmakoff., 1998). 유전자 크기는 100 내지 210 Kbp 의 크기로 단일 직선의 double-stranded DNA 형태로 되어 있으며, 끝 부분에 많은 반복 DNA 염기서열을 갖는다고 알려져 있다 (Bugert et al., 1993; Schnitzels & Darai., 1989; Fisher et al., 1988; Schnitzler et al., 1987). 지난 몇 년간 이 viruses는 생태적 그리고 경제적인 측면에서의 중요성 때문에 전 세계의 주목을 받아 오고 있다. 그러나, 몇몇 iridoviruses에서만 major capsid protein (MCP) gene 등의 비교에 관한 연구가 일부 되어 있고 (Webby & Kalmakoff., 1998; Mao et al., 1996; Stohwasser et al., 1993; Schnitzler & Darai., 1993), RSIV 등에서는 아직 유용 가능한 DNA 염기배열에 대한 정보가 부족한 실정이다. 전체 genome이 밝혀져 있는 것은 현재 lymphocystis disease virus (LCDV)와 frog virus 3 (FV3), infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) 등의 iridoviruses가 있다 (Tidona & Darai., 1997; Mao et al., 1996; He et al., 2001).

RSIV에 감염된 어류는 일반적으로 행동이 둔해지고, 심한 빈혈, 아가미의 점상출혈, 비장 종대 등의 증상을 보이며, Giemsa solution으로 염색시에, 조직병리학적으로 비장, 신장, 간 그리고 아가미 등의 조직에서 비대해진 세포들을 관찰할 수가 있다 (Oshima et al., 1996).

이 virus의 생물학적이고, 생리화화적인 특성은 Nakajima et al. (1994)에 의해 보고되었

으며, 이 질병을 진단하는 방법으로서 monoclonal antibody를 이용한 immunofluorescence (IF) test를 제시하였다 (Nakajima et al., 1995). 그러나, 질병의 초기에 virus를 검출할 수 있는 방법이 필요하였고, polymerase chain reaction (PCR) 기법이 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)와 같은 면역학적인 기법보다 감수성이 더 높다는 것을 알았다 (Stoeckl et al., 1989; van der Ryst et al., 1996; Poiesz et al., 1997).

Iridovirus의 분자생물학적인 진단을 위한 DNA fragment에 대한 분석은 많이 되어 있으며, 진단을 위한 PCR 기법의 도입 등도 비교적 높은 수준으로 개발되어 있다 (Tamai et al., 1997; Rodger et al., 1997). 더구나 최근에는 일본에서 RSIV의 전제 DNA 염기서열 결정에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

PCR 기법은 virus에 의한 질병을 검출하는데 있어서, 신속하고 감수성이 높지만, 특이적인 primers를 요구한다. Virus의 genomes는 변하기 쉽기 때문에, conserved regions를 찾아서 염기서열을 많이 비교하는 것이 바람직하다 (Rodriguez et al., 1992). RSIV의 많은 유전자와 DNA 염기배열 순서가 이 질병의 진단 또는 다른 iridoviruses들과의 연관성 분석을 위하여 연구되었는데, Tamai et al. (1997)은 FV3 (*Ranavirus*)와 insect iridescentvirus 6의 genomes에서 높은 conserved regions을 이용하여 primers를 제작하였고, iridovirus의 검출에 적용할 수 있다는 것을 알았다. Oshima et al. (1996)은 RSIV의 ribonucleotide reductase small subunit (RNRS) gene을 encoding하는 DNA를 cloning하였고, PCR 기법을 이용하여 RSIV의 감염증상이 나타나기 전에도 RSIV를 검출할 수 있다는 것을 증명하였다 (Oshima et al., 1998). Kurita et al. (1997)은 RSIV의 부분적 genomic library로부터 다른 iridoviruses의 유전자들과 높은 homologies를 갖는 4개의 clones을 얻었다. 이 clones들은 FV3의 adenosine triphosphatase (ATPase) gene, LCDV의 DNA dependent RNA polymerase (DdRP)에 있는 최대 subunit gene, FV3의 MCP gene 그리고 herpes viruses의 DNA polymerase (DPOL) gene들과 DNA 염기배열 순서에서 높은 유사성을 나타내었다. 이와 같이, 유전자 염기배열 순서를 바탕으로 하여 design된 PCR용의 primer sets는 RSIV에 감염된 세포로부터 추출된 DNA를 target로 하

여 유전자 증폭을 실시하였을 때, 정확하게 기대하였던 특이적인 PCR 조각을 생성함을 확인할 수 있었다 (Kurita et al., 1997; Oshima et al., 1996). 또한 Kurita et al. (1998)은 부작위적으로 cloning된 RSIV의 *Pst* I restriction fragment에 대하여 PCR 유전자 증폭 실험을 하였을 때, 특이적인 반응이 나타나 본 질병을 진단할 수 있는 새로운 genomic region으로 제시하였다. 한편, 여러 지역에서 분리된 RSIV들을 비교하기 위한 연구에서 Miyata et al. (1997)은 PCR의 특이성과 products 크기 비교 실험에 의하여 RSIV들의 origin이 하나일 가능성을 제시한 바 있다. 그리고, gene cluster 형태로 존재할 가능성이 높은 DPOL gene의 3' end 부위 염기배열과 RSIV에서 현재 알려져 있는 여러 유전자들간의 구조적인 배열형태 (genomic structure), 그리고 다른 iridovirus가 갖는 반복 염기배열의 특성에 (Schnitzler & Darai., 1987, 1989) 대비한 RSIV의 repeating sequences의 특성 등에 대한 정확한 정보는 전혀 알려져 있지 않아 이 질병의 근원적인 이해를 가로막고 있다.

현재, 우리 나라에서는 Jung & Oh (2000)가 RSIV에 감염된 세포를 조직 병리학적으로 관찰하였으며, Kim et al. (2002)은 우리 나라 남해안 일대에서 RSIV의 감염증상을 나타내는 4 어종으로부터 virus를 분리하여 RSIV *Pst* I fragment 일부분에서 각각 비교해 본 결과, 염기배열 특성이 서로 매우 유사하게 나타났다고 보고한 바 있다. 우리 나라에서 나타나는 RSIV에 대한 연구는 1998년 이후부터 보고되었으며 (Sohn et al., 2000; Jung & Oh., 2000; Kim et al., 2002), DNA 염기배열 특성에 의해 RSIVs를 비교하는 연구는 아직 부족한 실정이다.

본 연구에서는 i) 우리 나라에서 나타나는 RSIV isolates의 염기배열상의 특성을 비교하고, ii) 그 특성을 바탕으로 우리 나라에서 나타나는 RSIV variants를 조사하여, iii) 다른 나라에서 나타나는 RSIVs와는 염기배열상에서 어떤 차이를 보이는지 조사하고, iv) PCR 기법을 이용하여 RSIVs를 구별하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. Fishes of RSIV infection

실험에 사용한 virus strains는 1998년에서 2001년까지 우리 나라의 여러 양식장에서 RSIV의 전형적인 감염 증상을 보이는 4 어종들과 중국에서 수입한 점농어의 비장에서 분리된 것을 사용하였다 (Table 1).

Table 1. Used fishes of RSIV infection in the study

Year	Area	Common name	Scientific name
2001	China	Sea perch	<i>Lateolabrax</i> sp.
2000	China	Sea perch	<i>Lateolabrax</i> sp.
2000	Sachun	Rock bream	<i>Oplegnathus fasciatus</i>
1999	Namhae	Sea perch	<i>Lateolabrax</i> sp.
1999	Nam-young	Sea perch	<i>Lateolabrax</i> sp.
1999	Nam-young	Black porgy	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>
1999	Kojedo	Yellow tail	<i>Seriola quinqueradiata</i>
1999	Punguri	Yellow tail	<i>Seriola quinqueradiata</i>
1999	Dongwon	Rock bream	<i>Oplegnathus fasciatus</i>
1999	Tongyoung	Rock bream	<i>Oplegnathus fasciatus</i>
1998	Sungji	Rock bream	<i>Oplegnathus fasciatus</i>

2. PCR

2-1. Primers 제작

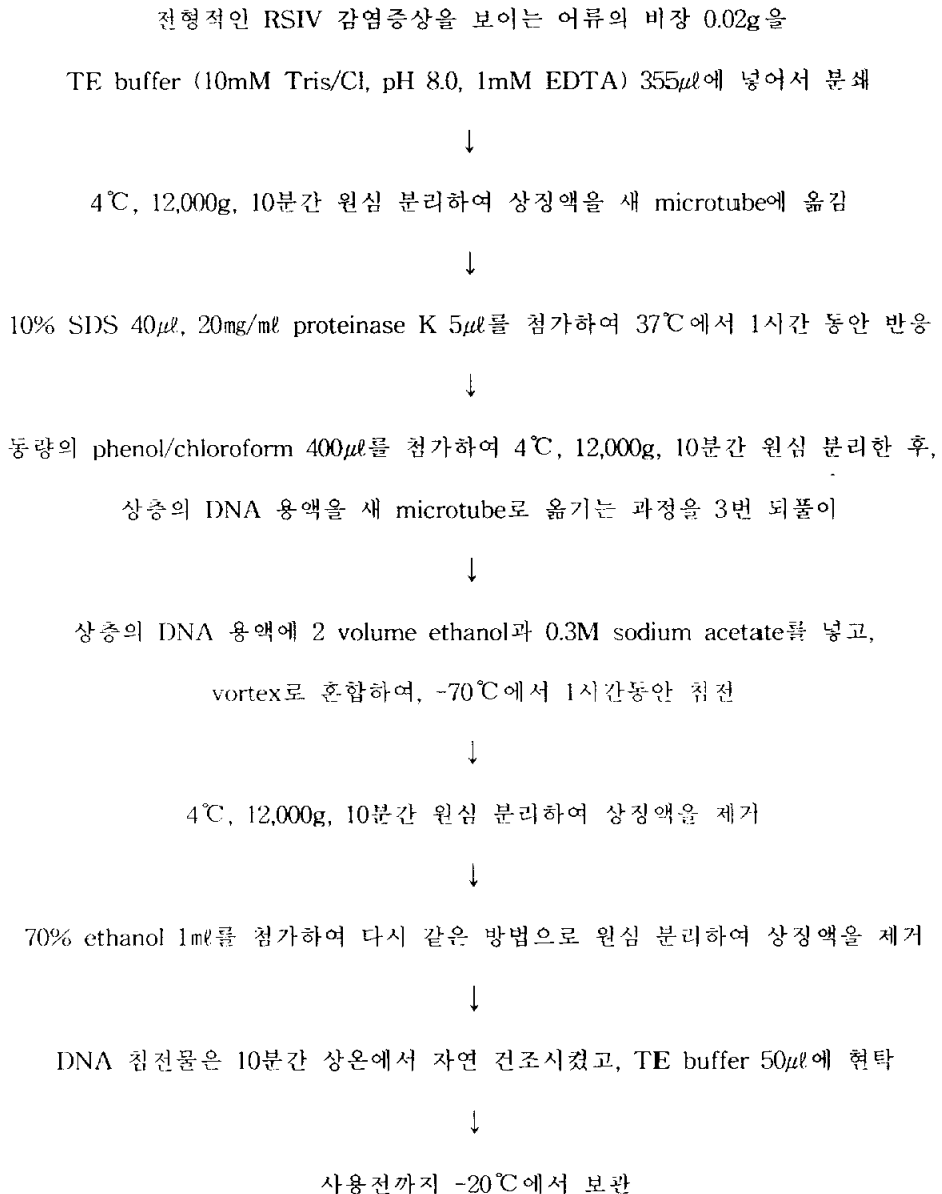
GenBank에 등록되어 있는 RSIV의 RNRS gene, *Pst* I fragment, ATPase gene 그리고 DPOL gene 등을 기초로 제작된 4개의 primer sets는 이전의 연구에서 RSIV를 검출하는데 사용되었으며(Oshima et al., 1988; Kurita et al., 1988). 본 연구에서도 위와 같은 4개의 primer sets를 사용하여, PCR amplification를 실시하였다 (Table 2).

Table 2. Reported genomic regions used for the diagnosis of RSIV infection with PCR method

Genomic region	Primer	Oligonucleotide sequence (5' to 3' direction)	Expected size of amplicons	GenBank accession number	Reference
RNRS gene	VF	GCATGTATGCTGTTTAGACA	187 bp	AB018418	Oshima et al. (1996)
	VR	GAGCATCAAGCAGGCGATCT			
<i>Pst</i> I fragment	2F	TACAACATGCTCCGCCAAGA	563 bp	AB006951	Kurita et al. (1998)
	2R	GCGTTAAAGTAGTGAGGGCA			
ATPase gene	3F	CAAACCACAGCGCGGCAAGT	563 bp	AB007367	Kurita et al. (1998)
	3R	AGTAGCGCACCATGTCTCTCC			
DPOL gene	4F	CGGGGGCAATGACGACTACA	567 bp	AB007366	Kurita et al. (1998)
	4R	CCGCCTGTGCCTTTTCTGGA			

2-2. Viral nucleic acids 분리

Viral nucleic acids 분리는 phenol/chloroform 방법을 사용하였으며, 아래와 같이 실시하였다.



2-3. PCR amplification

PCR amplification은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer)를 사용하였으며, 아래와 같은 방법으로 실시하였다.

PCR 혼합물은 0.2ml용 microtube에
10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% w/v gelatin,
0.5% Tween-20, 200μM 각각의 dNTP, 1μM 각각의 primer, 1.25U AmpliTaq DNA
polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), template DNA로서 추출한 viral
nucleic acids 1ng을 첨가한 후, distilled water로 최종액 50μl가 되게 함



94℃에서 3분간 predenaturation 시킴



94℃ : 30초	} 30cycles 반응
55℃ : 30초	
72℃ : 30초	



72℃에서 7분간 반응 (extention time)



PCR 생성물은 0.5×TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA)에 담겨진, 0.5μg/ml

EtBr (ethidium bromide)이 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기영동을 실시

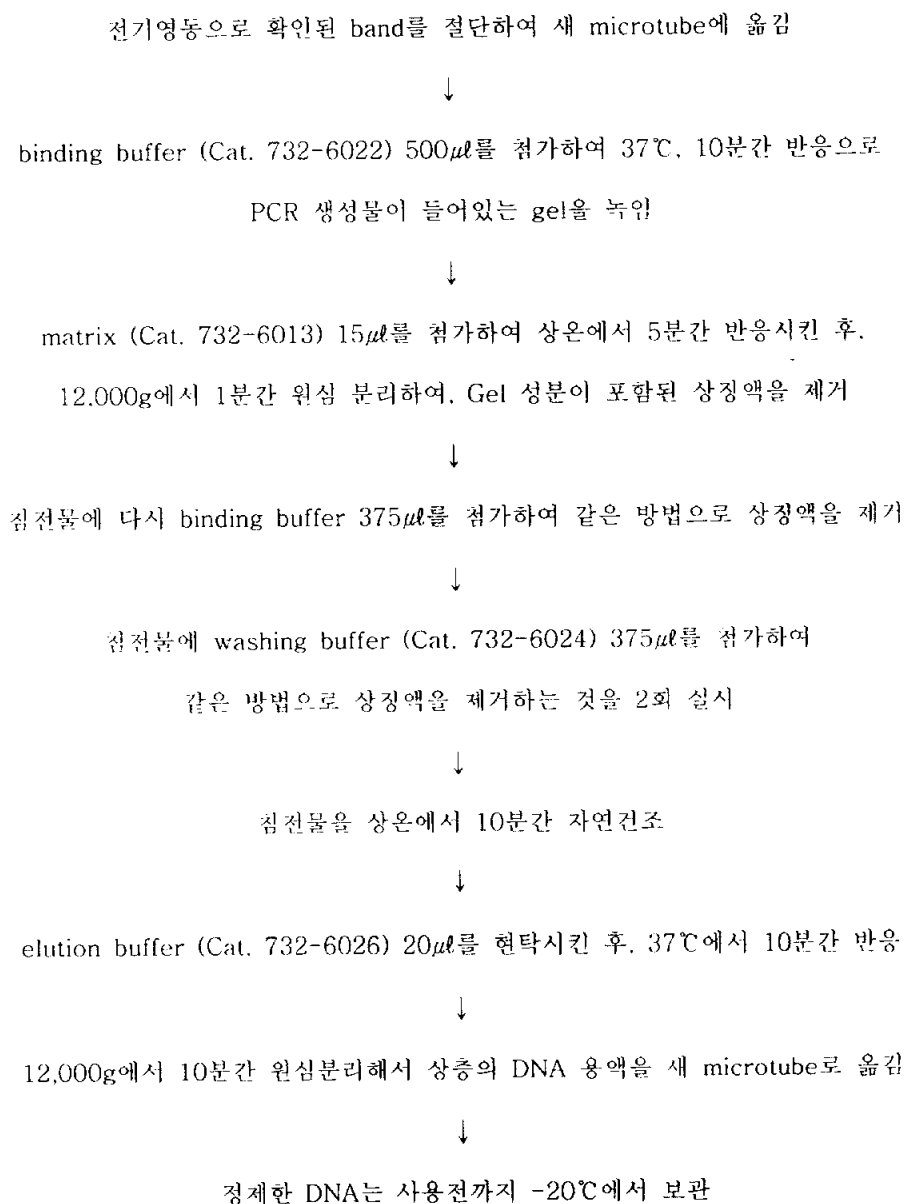


UV(ultraviolet)에서 나타나는 band를 관찰하여 증폭 여부를 확인

3. Cloning

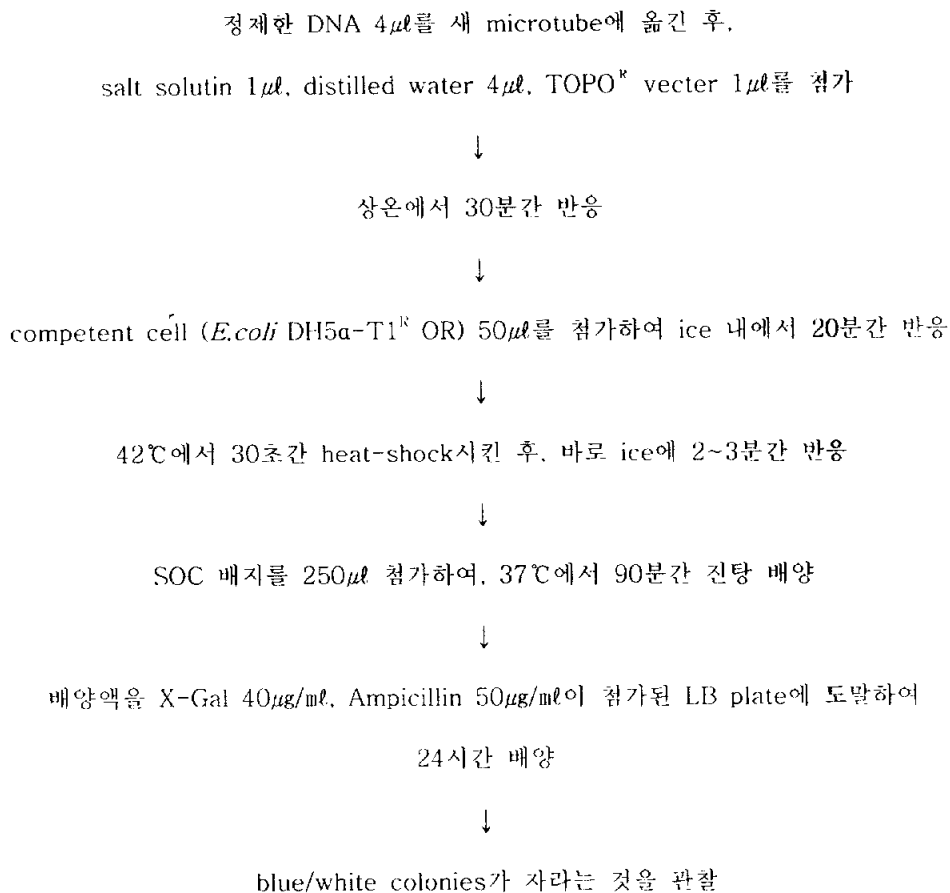
3-1. Gel elution

PCR 생성물은 Prep-A-Gene[®] DNA purification kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정제하였으며, 아래와 같은 방법으로 실시하였다.



3-2. Cloning

정제한 DNA는 TOPO-TA Cloning[®] Kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 cloning시켰으며, 아래와 같은 방법으로 실시하였다.



3-3. Plasmids 분리

Plasmids 분리는 alkaline lysis 법을 사용하였으며, 아래와 같은 방법으로 실시하였다.

배양된 blue/white colonies 중 insertion이 이루어진 white colony를 취하여,

Ampicillin 50 μ g/ml이 첨가된 LB broth에 접종한 후, 18시간 배양



배양액 1.5ml을 새 microtube에 옮기고,

4℃, 12,000g, 10분간 원심 분리하여 균을 침전시킨 후, 상정액을 제거



침전된 균에 100 μ l ice-cold solution I (50mM glucose, 25mM Tris/Cl, pH 8.0, 10mM

EDTA, pH 8.0)을 넣고, vortex를 사용하여 완전히 현탁



200 μ l solution II (0.2N NaOH, 1% SDS)를 넣고, 5회 invert mixing하여 혼합한 후,

ice 내에서 5분간 반응



150 μ l ice-cold solution III (60ml 5M potassium acetate, 11.5ml glacial acetic acid,

28.5ml distilled water)를 넣고, 5회 invert mixing하여 혼합한 후, ice 내에서 5분간 반응



4℃, 12,000g, 10분간 원심 분리하여, 상층의 plasmid 용액을 새 microtube에 옮김



Plasmid 용액과 동량의 phenol/chloroform을 넣고, vortex한 후, 4℃, 12,000g, 10분간

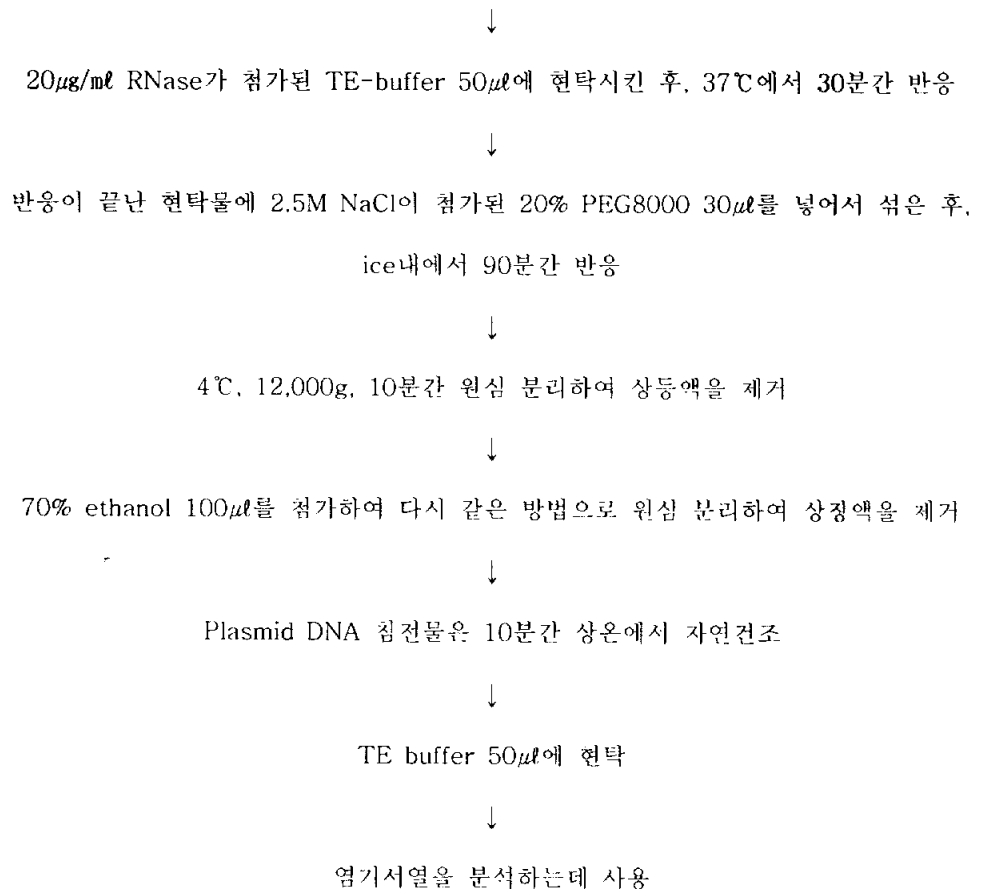
원심 분리하여, 상층의 DNA 용액을 새 microtube에 옮김



DNA 용액에 2 volume ethanol을 넣어서 섞은 후, -70℃에서 1시간동안 침전



4℃, 12,000g, 10분간 원심 분리하여 상정액을 제거한 후, 10분간 상온에서 자연건조



4. 염기서열 분석

분리한 plasmid로부터 Big Dye Terminator Cycle DNA Sequencing Kit (ABI PRISM, PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 insertion된 fragment의 염기서열을 밝혔다. 총 11개의 RSIV samples에서 밝혀진 RNRS gene, *Pst* I fragment, ATPase gene 그리고 DPOL gene 등 4부위 각각의 염기서열은 MACAW program (Version 2.0.5, National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 사용하여 비교하였다.

5. *Pst* I fragment 분석

5-1. 다른 primer를 사용한 PCR

RSIVs의 *Pst* I fragment 부분에 대해서 앞 실험에서 비교하지 않은 부위에 위치한 1F primer (Kurita et al., 1998)를 사용하여 PCR을 실시하고자 하였다. 대표되는 3개의 RSIV isolates 각각에 대해서, 1F-2R primer set를 사용하여 PCR을 실시하였고, 다시 1F-1R primer set를 사용하여 semi-nested PCR을 실시하여, 전기영동상의 결과를 관찰하였다. PCR amplification은 앞에서 설명한 2-3과 같은 방법으로 실시하였다.

5-2. *Pst* I fragment의 전체 cloning

RSIVs의 *Pst* I fragment 부위 전체를 분석하기 위해, *Pst* I fragment 양 끝쪽으로부터 TF(5'-CTGCAGTTGCCGCTCAAAC-3'), TR(5'-CTGCAGTGCAGACACATAC-3') primers를 제작하여 PCR을 실시하였고, PCR 생성물을 정제하여 cloning시킨 후, plasmid를 분리하여 염기배열을 분석하였다. 위의 과정들은 앞에서 설명한 2-3, 3, 4의 방법과 동일하게 실시하였다.

6. RSIV variants 구별

6-1. Primers 제작

RSIV의 *Pst* I fragment 부위에서, RSIVs 사이에 가장 variable한 부위들을 primer sequences로 사용해서 NF(5'-TGGCTCATCTATGTCATC-3') primer, CR(5'-CTGACTGTGGCGATGCACG-3') primer를 제작하였다.

6-2. PCR amplification

대표되는 RSIV variants의 viral DNA를 각각의 template으로 사용하고, NF-2R, 2F-CR 등 2개의 primer sets를 각각 사용하여 PCR을 실시하였으며, 전기영동상의 결과를 관찰하였다. 그리고, 대표되는 RSIV variants의 *Pst* I fragment 전체를 cloning시킨 transformant로부터 분리한 plasmid DNA를 각각의 template으로 사용하고, 위와 같은 2개의 primer sets를 각각 사용하여 PCR을 실시하였다. PCR amplification은 앞에서 설명한 2-3과 같은 방법으로 실시하였다.

7. Multiplex PCR

대표되는 RSIV variants의 viral DNA를 각각의 templates으로 사용하고, 2F-2R-NF-CR 등 4개의 primers를 한번에 사용한 multiplex PCR을 실시하였다. 0.5μM primers를 사용했으며, 그 외의 과정은 앞에서 설명한 2-3과 같은 방법으로 실시하였다. 그리고, 대표되는 RSIV variants의 *Pst* I fragment 전체를 cloning시킨 transformant로부터 분리한 plasmid DNA를 각각의 template으로 사용하여, 위와 동일한 방법으로 PCR을 실시하였다.

III. 결 과

1. RSIV isolates 염기서열 비교

1-1. PCR 결과

1998년에서 2001년까지 우리 나라 남해안 일대의 여러 양식장에서 RSIV의 전형적인 감염증상을 보이는 어종들과 중국에서 수입한 점농어의 비장으로부터 11종류의 viral DNA를 분리하여 (Table 1), 염기서열상의 특성을 조사하였다. PCR amplification을 위한 primers는 이전에 RSIV를 검출하는데 사용되었으며 (Oshima et al., 1988; Kurita et al., 1988), GenBank에 등록되어 있는 RNRS gene, *Pst*I fragment, ATPase gene 그리고 DPOL gene 등을 기초로 제작된 4개의 primer sets를 사용하였다 (Table 2). Fig. 1은 11개의 RSIV samples 중에서 RSIV Sachun에서 분리한 DNA를 template으로 사용하고, 4개의 primer sets를 각각 사용하여 PCR amplification을 실시했을 때, 전기영동상의 결과를 나타낸 것이다. Lane 1~4에서는 각각 187 bp, 563 bp, 563 bp 그리고 567 bp의 특이적인 bands가 명확하게 나타났다. 11개의 RSIV isolates 전부에 대해서 같은 방법을 적용하여 총 44개의 특이적인 PCR 생성물을 얻을 수 있었다.

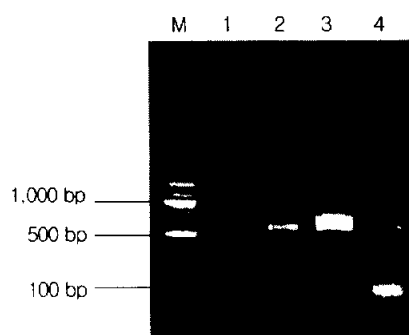


Fig. 1. Detection of the DNA isolated from RSIV Sachun by PCR with different RSIV specific primers. Lane 1, primers against RNRS gene; lane 2, primers against *Psi* I fragment; Lane 3, primers against ATPase gene; Lane 4, primers against DPOL gene; M, 100bp DNA ladder.

1-2. RSIV isolates 염기서열 비교

PCR 생성물은 각각을 모두 정제하여 cloning 시킨 후, insertion된 부위의 염기서열을 밝혀서 서로 비교하였다. Table 3은 RNRS gene, *Pst*I fragment, ATPase gene 그리고 DPOL gene 등 4 부위에 대한 11개의 RSIV isolates의 염기서열을 GenBank에 등록되어 있는 RSIV Ehime-1과 비교하여, 그 유사성을 percentage로 나타낸 것이다. RSIV Namhae (Sea perch)는 4부위 모두에서 RSIV Ehime-1과 100%의 homology를 나타내었고, RSIV Sachun (Rock bream), RSIV Namyong (Sea perch), RSIV Namyong (Black porgy), RSIV Kojedo (Yellow tail), RSIV Punguri (Yellow tail), RSIV Dongwon (Rock bream) 그리고 RSIV Sungji (Rock bream) 등 7개의 isolates는 서로 동일하였으며, RSIV Ehime-1과의 homology는 96.6~98.3%로 나타났다. RSIV Tongyoung (Rock bream)은 위의 7개 isolates와 비교시에 단지 1개의 nucleotide sequence만이 다르게 나타났다. 2000년도와 2001년도의 RSIV China (Sea perch)는 서로 동일하였으며, RSIV Ehime-1과의 homology는 93.1~98.3%로 나타났다 (Table 3). Fig. 2는 RNRS gene, *Pst*I fragment, ATPase gene 그리고 DPOL gene 등의 4부위에서, 11개의 RSIV isolates 중 대표적인 세 가지 RSIV isolates의 염기서열을 비교한 것이다. 4 부위 중에서 *Pst*I fragment 부위에서 가장 많은 variation을 보였으며, *Pst*I fragment가 open reading frame (ORF)인지의 여부를 알 수 없었기 때문에, amino acid로 변환시켰을 때의 차이는 나타낼 수 없었다.

Table 3. Percentage similarities of the DNA nucleotides (amino acids) between the four different genomic regions of RSIVs isolated in Korea and China to reference iridovirus, RSIV Ehime-1

RSIV isolates	Fish	Year	Homology with RSIV Ehime-1 isolate (%)			
			RNRS gene	<i>Pst</i> I fragment	ATPase gene	DPOL gene
Namhae	Sea perch	1999	100(100)	100	100(100)	100(100)
Sachun	Rock bream	2000	97.9(97.9)	96.6	98.7(100)	98.3(98.9)
Namyoung	Sea perch	1999	97.9(97.9)	96.6	98.7(100)	98.3(98.9)
Namyoung	Black porgy	1999	97.9(97.9)	96.6	98.7(100)	98.3(98.9)
Kojedo	Yellow tail	1999	97.9(97.9)	96.6	98.7(100)	98.3(98.9)
Punguri	Yellow tail	1999	97.9(97.9)	96.6	98.7(100)	98.3(98.9)
Dongwon	Rock bream	1999	97.9(97.9)	96.6	98.7(100)	98.3(98.9)
Tongyoung	Rock bream	1999	97.9(97.9)	96.6	98.5(99.4)	98.3(98.9)
Sungji	Rock bream	1998	97.9(97.9)	96.6	98.7(100)	98.3(98.9)
China	Sea perch	2001	93.8(96.2)	93.1	96.0(100)	98.3(98.9)
China	Sea perch	2000	93.8(96.2)	93.1	96.0(100)	98.3(98.9)

* RNRS gene

N	aatggcaacaacacggtgtcaggatgatgcgcatacaatcatactctgatgccgttgacattgagacagcgttcttccgagagggcactgaa	90
S	C..t.....■.....■.....a.....g..t.....a..	90
C	■.....■.....a.....g..t.....a..	90
N	gacacccttacttgaatgaatagtgacagtatgaaactgtatatacagtttgttg	146
S		146
C	C.....■.....C.....	146

* *Pst* I fragment

N	ggctgttgcgtgcgttgaccaacaatcttcacatccgtctctcgaggtagcccgagctgagggaggcgtcgtgtgttcgatttcca	90
S	a.....t.....	90
C	C.....g.....a.....C.....	90
N	gggtatagaaggagggtggcgtgagtagacgccacagtcagcaacagaagaagtagcagggtcgccattgctcatgtagctatgattcaca	180
S	a..C..t.....a.....t.....g.....t.....	180
C	g___a.....C.....aa.....g....g....C..t...	180
N	gtagtcacctatgacatgaggatattcaaatittttatacaagtaaaagatgttcactgtgcttgagataggagatgtgttggtgctagt	270
S	a.....	270
C	tg....g.....t.....c.....	270
N	gtcgcgtgacgacatacgtgtgatgtacaacggtgacccgggacaatctgtggcgttaactaataccaccagaggggtgttcacggttac	360
S	a.....a.....a.....	360
C	C.....ca.....C.....g..g..C.....a.....a.....C.....C...	360
N	cgcgggtgcctgacaacgcgggattatgagacattgcgcagggtgtcttatagtcgcagccagattttcgggttcacgggtgcgtgtgcctat	450
S	t..t.....t.....g.....	450
C	g.....C.....a.....g..g.....C.....C...	450
N	tacactgatcccccagacatgtcacaagatggatttgtcaattaccaggacatgggcacgcacattggcttc	523
S	a.....	523
C	C.....a.....	523

Fig. 2. Comparative analysis of the DNA nucleotides (amino acids) between the four different genomic regions of RSIVs isolated in Korea and China. Identical residues and gaps are represented as dots and dashes, respectively. Except for the *Pst* I fragment, the boxes represent nucleotide that induced the substitution of amino acid. N,RSIV Namhae; S,RSIV Sachun; C,RSIV China.

* ATPase gene

N	cggtgctaatacaaatctatcattgcagccaagcggcacataattcctgccgcggtagtgatcaggctccgaggaggccaaccacttct	90
S	c.....g.....	90
C	c..g..c.....g.....	90
N	acagcaagctattgcctaactgttttgtgtacaacaagtttgacgctgacattatcacacgcgtcaagcagcgacagctggcactaaaga	180
S	g.....	180
C	c.....c.....c.....c.....t.....t.....	180
N	atgtggaccctgagcactcgtggctcatgttgatctttgacgactgcatggataacgcccaagatgtttaatcacgagccgctcatggacc	270
S		270
C	.c.....c.....	270
N	tgttcaagaatggcgctcactggaaatgttctggtcataatagcttcacagtacataatggatttgaatgccagccctgaggtgttgtatag	360
S	c.....c.....	360
C	c..t.....c..c.....c.....	360
N	acggtaictttttatttacagaaacaagccagacatgtgtggacaagatttacaacagtttgggggcaacataccaaagcagacatttc	450
S	.t.....c.....	450
C	g.....c.....	450
N	acacgttgatggaaaaggttacacaggatcacacatgcttatatattgacaacacaaccaccaggcagaagtg	523
S	a..	523
C	c.....c.....	523

* DPOL gene

N	tactcggccgcgaagctgattgagaaagccgctcatctctcaagacggtggtggcgctaccatttgttacggcgacaccgactcatgc	90
S	g...	90
C	g...	90
N	tacatacagctgggccacgaccgcgcatcactcgatgaactgtggcagatggctgtaaacgccagtgacactgtgtcggcctctctttgag	180
S	t.....	180
C	t.....	180
N	cggccgggtgcgcctcgagtttgacgagtgcatctacaccaagttcatcatcttcaccaagaacggttatgtgtacagggcatttcacacgc	270
S		270
C		270
N	gacggcaagcagcgaacaggcagcaaggggtgcatgttgtccagacgtgacagcgccatgtgtgccagaaacacgtatgcagcaatcatg	360
S	c.....g.....	360
C	..t.....c.....g.....	360
N	agtcaatccttgaggggtctgcagatgtgccattcattgctgtgcgcatgatgcacgacatgatgataccgggagcgcttcaagatgac	450
S	..c.....■.....■.....	450
C	..c.....■.....■.....	450
N	gactttgtgctgacaagagtggtgcaggatatcggaatggggacgacacaaccacggctcgtacaaagttaggaa	527
S	t.....	527
C	t.....	527

Fig. 2. – Continued.

2. *Pst*I fragment 분석

2-1. 다른 primer를 사용한 PCR 결과

RNRS gene, *Pst*I fragment, ATPase gene 그리고 DPOL gene 등의 4 부위에서, 대표되는 세 가지 RSIV variants의 염기서열을 서로 비교해 보았을 때, *Pst*I fragment 부위에서 가장 많은 차이를 나타내었다. *Pst*I fragment 부위에서는 보고된 바 있는 4개의 primers가 있고, 앞에서 염기서열을 밝힌 부위는 2F-2R primer set를 사용한 결과이다 (Fig. 3). 세 가지 RSIV variants의 DNA 각각에 대해서 1F-2R primer set를 사용하여 PCR을 실시한 후, 다시 1F-1R primer set를 사용하여 semi-nested PCR을 실시한 결과, RSIV Namhae와 RSIV Sachun에서는 1F-2R, 1F-1R primer sets를 사용한 두 가지 경우 모두에서 각각 848 bp, 570 bp의 특이적인 bands를 보였지만, RSIV China에서는 두 가지 경우 모두에서 band가 나타나지 않았다 (Fig. 4).

* *Pst* I fragment

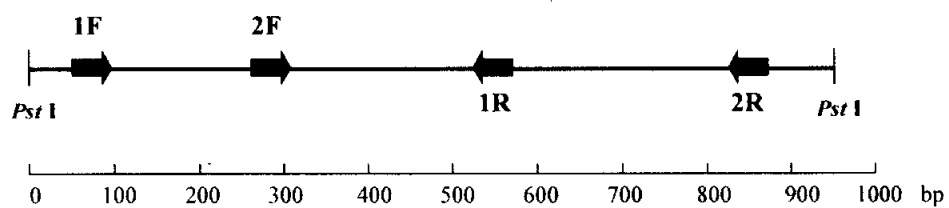


Fig. 3. Positions of the reported PCR primers against *Pst* I fragment of RSIV.

( . sense primer;  , antisense primer)

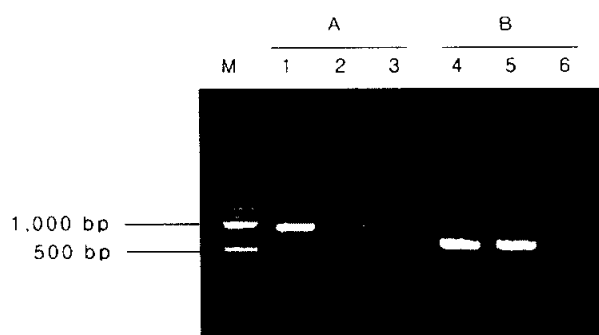


Fig. 4. Amplification of DNA of RSIVs using PCR (A) and semi-nested PCR against the amplicon of the first PCR (B) with primers, 1F-2R and 1F-1R respectively, based on the nucleotide sequence of the *Pst* I fragment. Lane 1 and 4, DNA of RSIV Namhae; Lane 2 and 5, DNA of RSIV Sachun; Lane 3 and 6, DNA of RSIV China; M, 100bp DNA ladder.

2-2. *Pst* I fragment의 전체 cloning

Pst I fragment의 양 끝쪽 부위로부터 각각 TF primer와 TR primer를 제작하여 세 가지 RSIV variants의 DNA 각각에 대해서 PCR을 실시하였다 (Fig. 5). 그 결과 세 가지 RSIV variants 모두 959 bp 위치에서 명확한 bands를 형성하였다 (Fig. 6). Fig. 7은 세 가지 RSIV variants의 전체 *Pst* I fragment 염기서열을 비교한 것이며, GenBank에 등록되어 있는 RSIV Ehime-1과 염기배열을 비교했을 때, RSIV Namhae는 앞의 결과와 마찬가지로 100%의 homology를 나타내었고, RSIV Sachun은 96.9%, RSIV China는 93.4%의 homology를 나타내었다.

* *Pst* I fragment

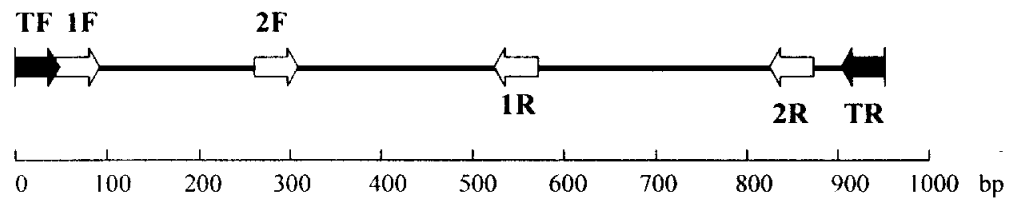


Fig. 5. Positions of the primers based on different parts of *Pst* I fragment in RSIV.

( , sense primer;  , antisense primer)

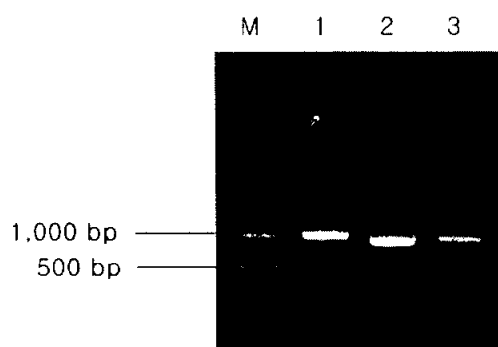


Fig. 6. Amplification of DNA of RSIVs using PCR with TF, TR primers. Lane 1, DNA of RSIV Namhae; Lane 2, DNA of RSIV Sachun; Lane 3, DNA of RSIV China; M, 100bp DNA ladder.

		TF →	IF →		
N	actctggctcatctatgtcatcgttagctgctccattccgctgcccccatcgtcaagcagtgtagccggtggaataacattat				100
S	g.....a.....c.....				97
C	c.a.agg.....a.....				100
N	cggctgtctgttggcagctcacatgagacacctacacaaggctgactgtcagatgagatgcggctggcgtggcatgtgacggtctgcacagggtagggttt				200
S	t.....				197
C	c.....a.....c..c.....a.....				200
N	cagcttgatgacagacaagatggtagccgtcatacagcaccactccatgcttcaggacttcactgctgttgcggcctacatggaccacctggccatgtaca				300
S					297
C	l.a.....c.....g.....c.....				300
		2F →			
N	acatgctccgccaagagcgctgtgctgtcgcttgaccaacaactcttcacatccgtctctcgaggtagcccgagctgaggggtggctcgtctggttgtcga				400
S	a.....t.....c.....				397
C	c.....g.....a.....c.....				400
N	tttccaggttatagaagggtggtagcgtgagtagcagccacagtagcaggaagtagcagggtagccattgctcatgtagctatgattcacagtag				500
S	a..c..t.....a.....t.....g.....g.....t.....				497
C	gca.....c.....aa.....g.....g.....c..t.....				497
			← IR		
N	tcacctatgacatgaggatattcaaaattttatacaagtaaaagatgttactgtgcttggataggagatgtgttggtgctagtgtgcggtgacgaca				600
S	a.....				597
C	tg.....g.....t.....c.....				597
N	tacgtgtgatgtacaaccgtgacccgggacaaatctgtggcgttaactaataccaccagagggtagtgcacgggttacgcgggtgacctgacaacggcgaatta				700
S	t.....g.....a.....t.....t.....				697
C	ca.....c.....g..g.c.....a.....a.....c.....c..g.....c.....a.....				697
N	tgagacatggcgaggtgtcttatagtcgcagccagattttgggttcacggctgcgtgtgcctattacactgatccaccagacatgtcacagaatgga				800
S	t.....g.....g.....c.....				797
C	g..g.....c.....				797
			← 2R		
N	tttgtcaattaccaggacatgggcacgcacatggcttggccctcactactttaacggagccgcaaatgcgggtgggttaactacgcccgaagagaactca				900
S	a.....t.....g.....				897
C	c.....a.....t.....c.....				897
			← TR		
N	totcatccgggggtgcgcctcaaccaatgacaatcatcgt				959
S					956
C	g.....				956

Fig. 7. Comparison of the nucleotide sequences of the *Pst* I fragment of RSIVs. Identical residues and gaps are represented as dots and dashes, respectively. Newly designed and previously used primers by Kurita et al.(1998) are boxed in black and white colors, respectively. N, RSIV Namhae; S, RSIV Sachun; C, RSIV China.

3. RSIV의 variants

세 가지 RSIV variants의 *Pst* I fragment 부위를 비교하여 variation이 많이 나타나는 2 부위들로부터, RSIV Namhae에만 특이적으로 binding할 수 있는 NF primer, RSIV China에만 특이적으로 binding할 수 있는 CR primer를 각각 제작하였다 (Fig. 8). Fig. 9는 세 가지 RSIV variants의 각 DNA를 template으로 사용하고, NF-2R, 2F-CR primer sets 각각을 사용하여 PCR을 실시하였을 때, 전기영동상에서 나타난 결과이다. 세 가지 RSIV variants 중에서 NF-2R primer set를 사용하였을 경우는 RSIV Namhae에서만 859 bp 위치에서 band가 나타났으며, RSIV Sachun과 RSIV China에서는 band가 나타나지 않았다. 2F-CR primer set를 사용하였을 경우는 RSIV China에서만 144 bp위치에서 band가 나타났으며, RSIV Namhae와 RSIV Sachun에서는 band가 나타나지 않았다. Fig. 10은 세 가지 RSIV variants의 각 *Pst* I fragment 전체가 insertion된 transformant로부터 분리한 plasmid DNA를 각각의 template으로 사용하고, 위와 같은 primer sets 각각을 사용하여 PCR을 실시한 후, 전기영동시킨 것이다. 그 결과 viral DNA를 template으로 사용했을 경우와 동일한 bands만이 나타났다.

NF →

N	ctgcagttgccgctcaaacactc	gtagtcgtccattccgctgcccccatcgtcaagcagtgtaggggtggagtaacattat	100
S	g.....	a.....	97
C	c..a..agg.....	a.....	100
N	ccgtgtctgttggcagctcacatgagacacctacacaaggctgactgtcagatgagatcgccgtggcggtggcatgtgacggtctgcacagggtaggttt	200	
S	t.....		197
C	c.....	a.....c..c.....a.....	200
N	cagcttgatgacagacaagatggtagcgtcatagcaccactccatgcttcaggacttcactgctgttgcggcctacatggaccacctcgccatg	300	
S			297
C	t..a.....	c.....g.....	300
2F →			
N	acatgctccgccaagagggcgtgtgtgtgtgtgtgaccaaacaatcttcacatccgtctctcgaggtaccccgagctgaggggtggtcgtgtgtgtgtcga	400	
S	a...c..t.....	a.....t.....c.....	397
C	c.....g.....	c.....	400
N	tttccaggttatagaagggtgggtggcgtgagtagcagccacagtcagcaacagaagaagtagcagggtcgccaattgctcatgtagctatgattcacagtag	500	
S	a...c..t.....	a.....t.....g.....t.....	497
C		c.....aa.....g.....g.....c..t.....	497
← TR			
N	tcacctatgacatgaggatattcaaaattttatatacaagtaaaagatgttcactgtgcttgagataggagatgtgttggtgctagtgtcggtgacgaca	600	
S	a.....	a.....	597
C	tg.....g.....	t.....c.....	597
N	tacgtgtgatgtacaaccgtgaccggggaacatctgtggcgttaactaataccaccagaggggtgtgtcacgggtacccgggtgcctgacaaacgggattta	700	
S	a.....	a.....	697
C	ca.....c.....g..g.c.....a.....a.....c.....c..g.....c.....a.....	697	
N	tgagacattgcgcagggtgtcttatatgtcgagccagatttttcgggttcacgggtgcgtgtgcctattacactgatcccccagacatgtcacaagatgga	800	
S	t.....g.....		797
C	g..g.....c.....c.....		797
← 2R			
N	tttgtcaattaccaggacatgggcacgcacattggcttctgccctcactactttaaccgagcgcaaatgccggtgggttaactacggccgaagagaactca	900	
S	a.....	t.....g.....	897
C	c.....a.....	t.....c.....	897
N	tctcatccgggggtcgccctcaaccaatgacaatcatcgtgtatgtgtctgcactgcag	959	
S			956
C	g.....		956

Fig. 8. Primers design for discrimination of the different types of RSIVs found in Korea. Comparison of the nucleotide sequences was based on the *Pst* I fragment in the genomic regions of RSIV. Identical residues and gaps are represented as dots and dashes, respectively. Newly designed and previously used primers are boxed in black and white colors, respectively. N, RSIV Namhae; S, RSIV Sachun; C, RSIV China.

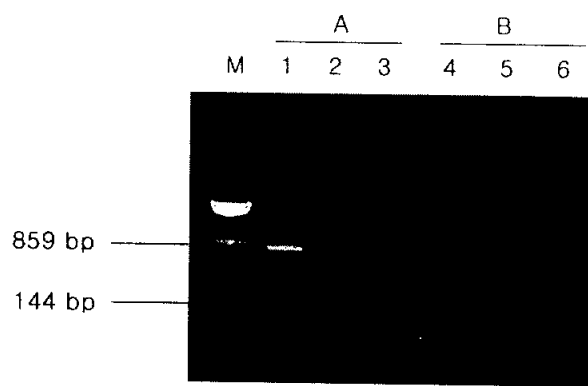


Fig. 9. Detection of genomic DNA of RSIVs by PCR with different primers based on the variation of DNA nucleotide sequences appeared in the *Pst* I fragment. A, Product of RCR gene amplification with primers NF and 2R; B, Product of RCR gene amplification with primers 2F and CR; Lanes 1 and 4, DNA of RSIV Namhae; lanes 2 and 5, DNA of RSIV Sachun; lanes 3 and 6, DNA of RSIV China; M, 100bp DNA ladder.

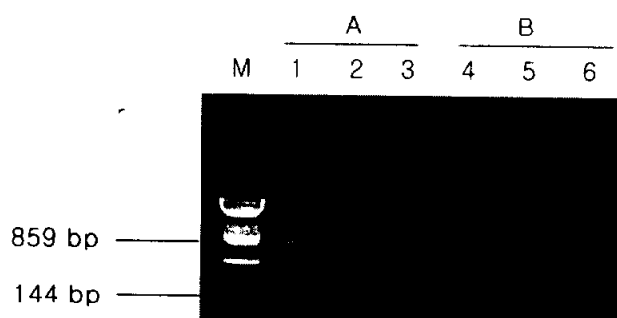


Fig. 10. Detection of the cloned *Pst* I fragment of RSIVs by PCR with different primers based on the variation of DNA nucleotide sequences appeared in the *Pst* I fragment. A, Product of RCR gene amplification with primers NF and 2R; B, Product of RCR gene amplification with primers 2F and CR; Lanes 1 and 4, DNA of RSIV Namhae; lanes 2 and 5, DNA of RSIV Sachun; lanes 3 and 6, DNA of RSIV China; M. 100bp DNA ladder.

4. Discriminative PCR

4-1. Preparation of discriminative primers

NF와 CR primers는 각각 RSIV Namhae와 RSIV China에만 특이적으로 binding한다는 것을 앞의 실험에서 증명하였으며, 2F와 2R primers는 이전에 보고된 primers로서, 세 가지 RSIV variants 모두에 binding한다는 것을 역시 앞의 실험에서 증명하였다 (Fig. 11). Table 4는 세 가지 RSIV variants의 각 DNA를 template으로 사용하고, NF-2F-CR-2R 등 4개의 다른 primers를 동시에 사용한 multiplex PCR을 실시하였을 경우 나타날 수 있는 PCR 생성물의 수와 크기를 미리 계산한 것이다.

* *Pst* I fragment

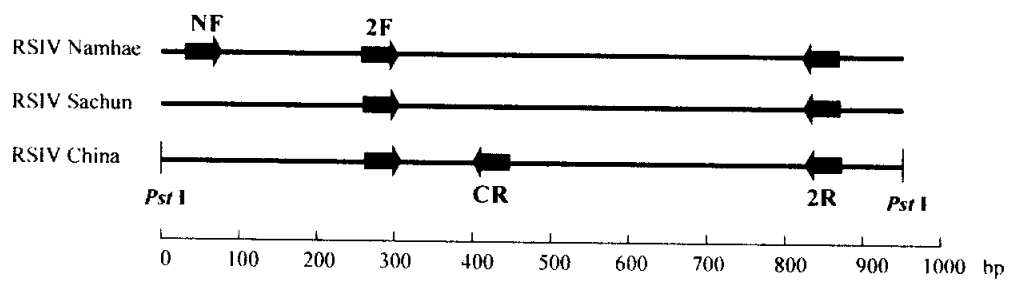


Fig. 11. Strategy to discriminate the different types of RSIVs by multiplex PCR.

( , sense primer;  , antisense primer)

Table 4. Expected size of the amplicons after multiplex PCR with the mixed four different primers

Type	Number of PCR product	Involved primers	Expected size of amplicons
RSIV Namhae	2	NF, 2R	859 bp
		2F, 2R	563 bp
RSIV Sachun	1	2F, 2R	563 bp
RSIV China	2	2F, 2R	560 bp
		2F, CR	144 bp

4-2. Multiplex PCR

세 가지 RSIV variants의 각 DNA를 template으로 사용하고, NF-2F-CR-2R 등 4개의 다른 primers를 동시에 사용하여 multiplex PCR을 실시한 결과를 전기 영동상에서 관찰하였다 (Fig. 12). RSIV Namhae에서는 859 bp, 563 bp 위치에서, RSIV Sachun에서는 563 bp 위치에서만, 그리고 RSIV China에서는 560 bp, 144 bp 위치에서 bands가 각각 나타났다. Fig. 13은 세 가지 RSIV variants의 각 *Pst* I fragment 전체가 insertion된 transformant로부터 분리한 plasmid DNA를 각각의 template으로 사용하고, 위와 같은 4개의 primers를 사용하여 multiplex PCR을 실시한 후 전기 영동시킨 것이다. 그 결과, viral DNA를 template으로 사용했던 경우와 동일한 bands만이 나타났다.

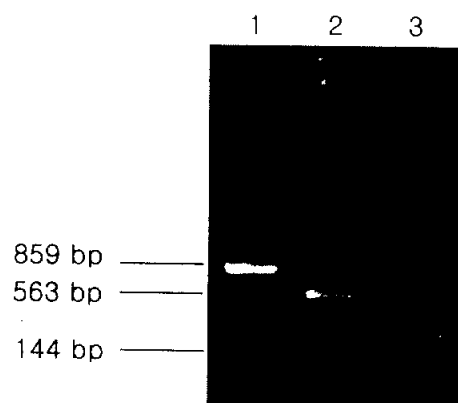


Fig. 12. Amplification of DNA of RSIVs using multiplex PCR. Lanes 1, DNA of RSIV Namhae; lanes 2, DNA of RSIV Sachun; lanes 3, DNA of RSIV China.

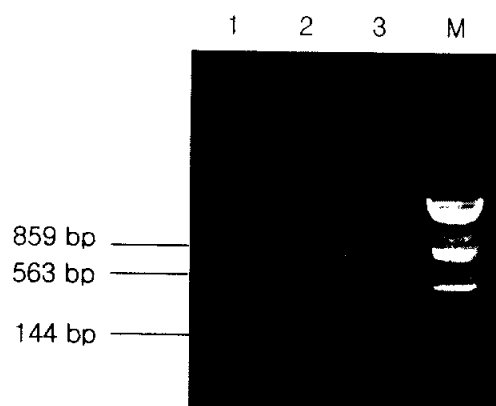


Fig. 13. Amplification of the cloned *Pst* I fragment of RSIVs using multiplex PCR. Lanes 1, DNA of RSIV Namhae; lanes 2, DNA of RSIV Sachun; lanes 3, DNA of RSIV China; M, 100bp DNA ladder.

IV. 고 찰

여러 다른 연구실에서 개별적인 cloning에 의해 밝혀진 RSIV의 gene들이 virus의 genome에서 어떠한 orientation 또는 location/distance 로서 배치되어 있는가 하는 구조적인 형태에 대한 연구는 부족한 실정이며, 여러 다른 genomic 부위에서 나타날 수 있는 RSIVs 간의 차이를 보다 정밀하게 비교할 수 있는 DNA 염기배열 수준에서의 연구도 아직 되어 있지 않다. 또한, 우리 나라에서 나타나는 RSIV에 대한 연구는 1998년 이후로 보고되고 있으나 (Sohn et al., 2000; Jung & Oh., 2000; Kim et al., 2002), 어떠한 유형의 RSIVs가 존재하는지 그리고 여러 유형의 RSIVs가 존재한다면 우리나라에서 주로 분포하는 RSIV의 유형은 어떤 것인지에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 1998년부터 2001년까지 우리 나라의 여러 양식장에서 RSIV의 전형적인 증상을 보이는 어류들을 채집하여 (Table 1), 이전에 일본에서 RSIV를 검출하는데 사용되었던 4개의 primer sets를 (Oshima et al., 1996; Kurita et al., 1998) (Table 2) 사용한 PCR test를 통해서, RSIV의 검출이 가능하다는 것을 확인하였다 (Fig. 1). 총 11개의 RSIV isolates 모두에서 명확한 PCR bands를 얻을 수 있었지만, 그 viruses가 모두 동일한지 아니면 어떤 차이가 있는지에 대해서는 PCR test 결과만으로는 확인할 수 없었다. 그래서, RSIVs간의 차이가 나타나는지에 대해서 좀 더 정밀하게 분석하고자, 얻어진 PCR 생성물들로부터 DNA 염기배열의 특성을 조사하여 각각을 비교해 보았다. 비교한 4 부위 모두에서 동일한 염기배열을 가지는 isolates가 많았지만, 반면에 아주 높은 variation을 보이는 isolates도 존재하고 있었다. DNA 염기배열 상에서의 변화를 기준으로 우리 나라에서 나타난 11 RSIV isolates를 비교하였을 때, 뚜렷한 차이를 보이는 세 가지 유형의 RSIV variants로 분류할 수 있었다 (Table 3). 이러한 세 가지 RSIV variants가 이전에 보고된 적이 있는지 여부를 알기 위해서 GenBank database에 동일한 염기배열이 등록되어 있는지를 조사하였는데, 일본에서 Oshima et al. (1996), Kurita et al. (1998)에 의해 보고된 RSIV Ehime-1과 본 연구에서 밝힌 RSIV Namhae variant가 4 부위 모두에서 100% 일치한다는 것을 알게 되었다. 그리고, RSIV Namhae variant를 제외한 나머지 두 가지의 RSIV variants는 이전에 보고된 적

이 없는 새로운 유형의 RSIVs라는 것을 알 수 있었다. 그 중 한 가지는 RSIV Tongyoung의 ATPase gene 부위에서 DNA nucleotide 1개가 다르게 나타난 것을 제외하고는, 7개의 isolates가 서로 동일하게 나타난 RSIV Sachun variant이었고, 나머지 한 가지는 2000년도와 2001년도의 수입산 점농어에서 나타난 RSIV China variant이었다. 이로 미루어 볼 때, 우리 나라에서 나타나는 RSIVs의 대부분은 RSIV Sachun variant라는 것을 확인할 수 있었다.

Miyata et al. (1997)은 대만의 농어, 홍콩의 점농어, 그리고 일본의 돌돔에서 분리한 iridoviruses의 genome을 제한효소 절단부위 비교에 의하여 비교한 결과 매우 유사하여 single origin 의 가능성을 제시하였다. 또한 여러 다른 연구에서도 iridovirus의 질병 특성은 매우 유사한 것으로 나타났지만, 여러 다른 지역에서 분리한 virion들이 크기 등에서는 모두 차이가 있는 것으로 알려져 있다 (Hyatt et al., 2000). 본 연구에서는 5년에 걸쳐서 우리 나라 여러 지역의 양어장에서 발생한 RSIVs와 중국으로부터의 수입어종에서 나타난 RSIV의 염기배열을 비교하여 세 가지의 RSIV variants를 발견할 수 있었으며, RSIV variants의 발생에 영향력을 가질 수 있는 factors를 여러 각도에서 분석해 보았다. 그리고, 지역적인 차이, 어종간 차이 또는 시기적인 차이 등의 factors는 RSIV variants의 발생에 있어서 어떠한 변화도 일으키지 않는다는 것을 알 수 있었다.

Oshima et al. (1996)은 thimidine kinase, DPOL 그리고 RNRS gene 등이 DNA viruses 사이에서 강하게 conserve되어 있다고 보고하였다. 본 연구에서 RNRS gene, *Pst* I fragment, ATPase gene 그리고 DPOL gene 등의 4부위에서, 11개의 RSIV isolates 중 대표적인 세 가지 RSIV variants의 염기서열을 비교했을 때, 각각의 부위는 특이적인 결과를 나타내었다 (Fig. 2). RNRS gene 부위에서는 RSIV Namhae와 RSIV Sachun이 서로 비슷하게 나타났고, RSIV China는 다른 두 RSIV isolates와 비교시에 염기배열간의 차이를 많이 보였다. *Pst* I fragment 부위에서는 가장 많은 염기배열간의 차이가 나타났으며, 특이한 점은 RSIV China에서 연속되는 3개의 염기배열이 빠진 부위를 한 군데 발견할 수 있었다. 그리고, *Pst* I fragment가 open reading frame (ORF)인지의 여부를 알 수 없었기 때문에, amino acid 배열로 변환시켰을 때의 variation은 나타낼 수 없었다. ATPase gene

부위에서는 염기배열간의 차이가 많이 나타났지만, amino acid 배열로 변환시켜서 비교했을 경우, 세 가지 RSIV variants가 모두 100% 일치하였다. DPOL gene 부위에서는 4 부위 중에서 염기배열간의 차이가 가장 적게 나타났으며, RSIV Sachun과 RSIV China는 서로 동일하게 나타났다.

대표되는 세 가지 RSIV variants의 염기배열을 4 부위에서 서로 비교해 보았을 때, *Pst* I fragment 부위에서 가장 많은 variation을 보였고, 본 연구에서 염기배열을 비교하는데 사용한 2F-2R 구간을 제외한 *Pst* I fragment의 다른 부위에서도 마찬가지로 많은 variation이 나타날 것으로 추정되었다. Fig. 3에서와 같이 *Pst* I fragment에는 이전에 RSIV의 검출에 사용된 4개의 primers가 있으며 (Kurita et al., 1998), 이것은 RSIV Namhae와 동일한 RSIV Ehime-1을 기초로 해서 제작된 primers이다. RSIV Namhae와 나머지 두 RSIV variants는 본 연구에서 염기배열을 비교한 *Pst* I fragment 일부 부위에서 아주 높은 variation을 나타내었기 때문에, 보고된 4개의 primers 중에서 RSIV Sachun 또는 RSIV China의 DNA에 대해 binding할 수 없는 primer가 존재할 가능성이 크다고 생각되었다. 그래서, 본 연구에서 밝힌 세 가지 RSIV variants 각각에 대해서, 4개의 primers가 각각 binding할 수 있는지를 조사하였다. 2F, 2R primers는 앞 실험에서 11 RSIV isolates 모두에 대해서 특이적인 증폭이 가능하다는 것을 증명한 바 있기 때문에, 1F-2R primer set를 사용하여 PCR을 실시한 후, 다시 1F-1R primer set로써 semi-nested PCR을 실시하여 primers와 RSIV variants 간의 variation을 확인하고자 하였다. RSIV Namhae와 RSIV Sachun에서는 두 경우 모두에서 명확한 bands를 보였지만, RSIV China에서는 band가 나타나지 않았다 (Fig. 4).

이전에 다른 실험실에서 보고된 바 있는 primers를 사용하여 PCR을 실시하였을 때, RSIV China에서만 band가 나타나지 않았던 원인을 찾고자, 세 가지 RSIV variants에 대한 *Pst* I fragment 전체의 염기배열을 밝히기로 하였다. 그래서, *Pst* I fragment의 양 끝쪽으로부터 TF primer와 TR primer를 각각 제작하였고 (Fig. 5), 세 가지 RSIV variants 모두에 대해서 959 bp 위치에서 명확한 PCR 생성물들을 얻을 수 있었다 (Fig. 6). 또한, 본 연구에서 제작한 위의 primer set는 우리 나라에서 나타나는 세 가지 유형의 RSIV variants 모

두에 대해서 검출이 가능하였기 때문에, RSIV의 검출에 있어서도 유용하게 사용될 수 있다고 여겨진다. 1F-2R, 1F-1R primer sets를 사용하였을 때, RSIV China에서만 band가 나타나지 않았던 원인은 *Pst* I fragment 전체의 염기배열을 밝힘으로써 알 수 있었다. RSIV China의 염기배열과 비교했을 때, 대응하는 1F primer의 3' end 부위에서 집중적으로 5개의 염기배열이 달랐기 때문에 1F primer가 RSIV China의 DNA에 binding할 수 없도록 되어 있었다 (Fig. 7). 그리고, 2F, 1R, 2R 등 나머지 3개의 primers는 세 가지 RSIV variants를 검출하는데 있어서, 아무런 문제가 없다는 것도 알 수 있었다. 이전에 RSIV를 검출하는데 사용된 primers 중에서 우리 나라에서 나타나는 어떤 유형의 RSIV를 검출할 수 없는 primer가 존재하며, 그것을 현재까지 알지 못한 채 사용해 왔다는 사실은 양식 산업에서 치명적인 피해를 유발할 소지가 있었으며, 실험실에서는 연구 발전에 큰 지해를 가져왔을 가능성도 배제할 수 없다. 그러므로, 앞으로 우리나라에서 나타나는 RSIV의 검출을 위한 PCR 과정에서, 1F primer를 사용하는 것은 제외되어야 할 것이다.

Pst I fragment에서 특이한 점은 연속되는 3개의 nucleotide sequence가 빠져 있는 부위를 RSIV Sachun과 RSIV China에서 각각 한 군데씩 발견할 수 있었고, 그 부위들에 인접해 있는 염기배열에서도 역시 많은 차이가 나타난다는 것을 알았다. 이와 같은 variation이 높게 나타나는 부위로부터 세 가지 RSIV variants 중 한 가지 RSIV variant에만 특이적으로 binding할 수 있는 primer를 제작한다면, PCR 기법을 사용하여 RSIV variants를 충분히 구별할 수 있을 거라 생각되었다. 그래서, 위와 같은 부위들로부터 특정한 RSIV variant에만 binding할 수 있는 NF, CR primers를 각각 제작하였고 (Fig. 8), 의도했던 대로 세 가지 RSIV variants는 특이적인 primers를 사용한 PCR 기법으로 구별할 수가 있었다 (Fig. 9). Viral DNA를 template으로 사용한 경우, virus의 감염정도에 따른 viral DNA의 밀도 차이에 의해서 PCR 결과가 달라질 수도 있기 때문에, 그러한 원인에 따른 변수를 줄이고자 하였다. 그래서, 세 가지 RSIV variants의 각 *Pst* I fragment가 insertion된 transformant로부터 충분한 양의 plasmid DNA를 분리하여 각각의 template으로서 PCR을 실시하였고, viral DNA를 template으로 사용했던 경우와 마찬가지로의 결과를 얻어낼 수 있었다. 그러므로, 앞 실험의 결과에서 viral DNA의 밀도 차이에 의한 변수는 없었다는 것을

증명할 수 있었다 (Fig. 10).

현재까지, RSIVs 간의 차이를 DNA 염기배열 수준에서 비교한 연구는 아직 되지 않았으며, 더구나 우리나라에서 나타나는 RSIVs에 대해서는 염기배열에 대한 연구가 더욱 미흡한 실정이다. 본 연구에서 밝힌 특정한 RSIV variant에만 binding할 수 있는 primers는 그러한 의미에서 큰 의의를 가질 수 있다. 염기배열을 밝혀서 RSIV variant를 구별해내는 과정들을 생략하고, PCR 기법만을 사용하여 우리 나라에서 나타나는 RSIV variant를 구별할 수 있다는 것은 양식현장에 접목시키거나 또는 RSIV를 연구하는 출발단계에 있어서 시간적, 경제적으로 많은 효과를 가져올 것으로 기대된다.

RSIV의 감염 여부를 확인하는 첫 번째 PCR test와 RSIV variant를 구별하기 위한 두 번째 PCR test는 그 과정들을 한 번의 PCR test로 단축시켜줌으로써, 더욱 간편하고 경제적으로 수행할 수 있을 것이라 생각되었다. 그래서, *Pst*I fragment 부위로부터 RSIV의 감염 여부를 확인할 수 있는 2F, 2R primers와 RSIV variant를 구별할 수 있는 NF, CR primers를 합쳐서 NF-2F-CR-2R 등 4개의 다른 primers를 동시에 사용하는 multiplex PCR을 시도하였다. NF와 CR primers는 각각 RSIV Namhae와 RSIV China에만 특이적으로 binding한다는 것을 앞의 실험에서 증명하였으며, 2F와 2R primers는 이전에 보고된 primers로써, 세 가지 RSIV variants 모두에 binding한다는 것을 역시 앞의 실험에서 증명하였다 (Fig. 11). Multiplex PCR 생성물들은 RSIV Namhae의 경우, 859 bp, 563 bp 위치에서, RSIV Sachun의 경우, 563 bp 위치에서만, 그리고 RSIV China의 경우, 560 bp, 144 bp 위치에서 각각 bands가 나타날 것이라고 예상하였다 (Table 4). Fig. 12에서와 같이 세 가지 RSIV variants의 각 DNA를 template으로 사용하여 multiplex PCR을 실시하였을 때, 의도했던 대로 결과를 얻을 수 있었다. RSIV variants 모두에서 560~563 bp 위치에 band가 나타났으며, 이 band로써 RSIV에 감염되었다는 사실을 알 수 있었다. 또한, RSIV Namhae는 859 bp 위치에 band가 한 개 더 나타났고, RSIV Sachun은 오직 563 bp 위치에만 band가 나타났으며, RSIV China는 144 bp 위치에 band가 한 개 더 나타났다. 이와 같이, multiplex PCR을 실시하였을 경우 한 번의 PCR을 실시함으로써 RSIV의 감염 여부를 확인할 수 있었으며, 동시에 PCR 생성물의 수와 위치에 의해서 RSIV variant의 구별까지 가능

하다는 것을 확인할 수 있었다. 앞의 실험과 마찬가지로, viral DNA를 template으로 사용한 경우에 나타날 수 있는 viral DNA의 밀도 차이에 의한 변수가 없었다는 것을 증명하고자, 세 가지 RSIV variants의 각 *Pst*I fragment가 insertion된 transformant로부터 충분한 양의 plasmid DNA를 분리하여 각각의 template으로서 PCR을 실시하였고, viral DNA를 template으로 사용했던 경우와 마찬가지로의 결과를 얻어낼 수 있었다 (Fig. 13).

본 연구에서는 우리 나라에서 나타나는 RSIVs의 염기배열을 밝혀서 그 유형들을 세 가지로 분류하였으며, multiplex PCR을 실시하여 한 번의 PCR로써 RSIV의 감염여부를 밝히고, 동시에 RSIV variant를 구별하는데 성공하였다. RSIVs에 대한 연구는 이러한 결과를 바탕으로 더욱 발전되리라 여겨지며, 우리 나라에서 나타나는 RSIV variants 각각의 병원성에 대한 앞으로의 연구는 밝혀진 염기배열상의 variations와 연관시켜서 이루어져야 할 것이다.

V. 요 약

RSIVs의 염기배열을 서로 비교한 결과, 우리 나라에서 나타나는 RSIVs에서 3가지 RSIV variants를 찾아낼 수 있었다. 11개의 RSIV isolates의 염기배열을 GenBank에 등록되어 있는 RSIV Ehime-1과 비교하였을 때 서로 많은 variation을 나타낸 RSIV Namhae, RSIV Sachun 그리고 RSIV China는 각각 100%, 96.6~98.7% 그리고 93.1~98.3%의 유사성을 나타내었다. 그리고, 지역적인 차이, 어종간 차이 그리고 시기적인 차이 등의 factors는, RSIV의 variation에 있어서, 어떤 영향도 나타내지 않았다. RNRS gene, *Pst*I fragment, ATPase gene 그리고 DPOL gene 등의 4 부위에서, 세 가지 RSIV variants의 염기배열을 서로 비교해 보았을 때, *Pst*I fragment 부위에서 가장 많은 차이를 나타내었다. 전체 *Pst*I fragment 염기배열을 비교하였으며, 연속되는 3개의 nucleotide sequence가 빠진 부위를 RSIV Sachun과 RSIV China에서 각각 한 군데씩 발견할 수 있었고, 그 부위들에 인접해 있는 염기서열에서도 많은 차이가 나타났다. 그래서, 이 부위들을 이용하여 RSIV variants를 구별하고자, RSIV Namhae와 RSIV China에만 각각 특이적으로 binding할 수 있는 NF primer와 CR primer를 제작하였다. 그리고, 제작한 2개의 primers가 각각의 RSIV variant에만 특이적으로 binding하는지를 알아보기 위해서, 세 가지 RSIV variants의 각 DNA를 template으로 사용하고, NF-2R, 2F-CR primer sets 각각을 사용하여 PCR을 실시한 결과, 이러한 2개의 primer sets를 사용하여 RSIV variants를 구별할 수 있었다. Multiplex PCR은 *Pst*I fragment 부위에서 제작한 NF-2F-CR-2R 등 4개의 다른 primers를 동시에 사용하여 실시하였으며, 한 번의 PCR로써 RSIV의 감염여부를 확인함과 동시에 RSIV variant까지 구별할 수가 있었다.

VI. 감사의 글

연구에 대한 열정만은 누구에게도 뒤지지 않을 거라고 다짐하며 시작한 것이 벌써 2년이 지났습니다. 부족하나마 이러한 결실을 얻을 수 있게 된 것은 많은 분들의 격려와 도움으로 가능했다는 것을 알기에 그분들께 고마운 마음을 전하고자 합니다. 때론 나태해지려는 모습에 꾸짖음으로, 어려운 일에 직면했을 때는 특유의 추진력으로 몸소 모범을 보이시고, 언제나 부족한 저에게 아낌없는 가르치심과 깊은 배려로 성장할 수 있게 도와주신 정현도 지도 교수님께 무한한 감사를 드립니다. 그리고 바쁘신 와중에도 논문 심사를 위해 따뜻한 충고와 격려로 지도해 주신 강주찬 교수님과 박수일 교수님께 감사드리며, 늘 편안한 웃음과 관심으로 격려해 주신 정준기 교수님, 허민도 교수님, 김기홍 교수님께도 감사드립니다.

부족하지만 저의 소중한 논문이 완성되기까지는 진단생화학 실험실 선·후배님들의 도움이 컸습니다. 먼저 항상 실험실 생활을 같이하며, 힘들 때는 따뜻한 위로를 보내주고, 작지만 힘들게 얻은 결과에는 함께 기뻐해주며, 더 열심히 해야 되겠다는 마음을 계속해서 상기시켜준 사랑하는 러진이에게 깊은 감사를 드립니다. 그리고 각자의 업무에 충실하면서도, 충고와 격려를 아끼지 않으며 자신의 일처럼 물심양면으로 도와주신 박정현, 홍수희, 김광규, 이남철, 황은아, 김명석, 박준효, 김종영 선배님들과 우열이, 영재, 쥬영이, 영이에게도 진심어린 감사를 드립니다. 그리고 항상 밝은 얼굴로 활기찬 실험실 분위기를 만들어준 재훈이, 순범이, 호열이, 신후, 대심이, 영파, 지효, 영아, 윤경이, 현정이 등 실험실 후배님들에게도 고마운 마음을 전합니다.

연구에 필요한 자료를 채집하는데 자신의 일처럼 많은 관심을 보이시며 도와주신 재상이영, 연비 누나, 율라 누나, 문흠이, 영기 그리고 양어장에 종사하시는 많은 분들께도 깊은 감사를 드리며, 대학원 생활을 함께하며 서로에게 힘이 되고 도와준 정수영, 재범이, 전수, 찬휘, 갑민이, 재혁아, 소정에게도 감사를 드립니다. 그리고 연구를 하다 어려운 일에 직면할 때면, 바쁘신 중에도 조언을 아끼지 않으신 수미 누나와 생물공학과 김부상 선배님께도 진심어린 감사를 드립니다. 서로의 길은 다르지만 우정을 함께 한 태영이, 찬열이에게도 고마운 마음을 전하며, 따뜻한 배려와 관심으로 지켜봐주신 초읍동 가족분들께도 깊은 감사를 드립니다.

마지막으로, 지금까지 힘든 내색 하나 없이 저를 믿음과 사랑으로 지켜봐 주시고 공부할 수 있는 용기를 주신 할머니님, 부모님, 형들, 형수님들과 동생을 비롯한 저의 가족들에게 부족하나마 이 논문을 바칩니다.

그리고, 이 논문의 끝은 또 다른 시작을 의미하기에 더욱 열심히 생활할 것을 다짐하며, 이 글을 마칩니다.

VII. 참고 문헌

- Bugert, J. J., Raab, K., Rosen-Wolff, A., Janssen, W. and Darai, G., 1993. Determination of the position of the boundaries of the terminal repetitive sequences within the genome of molluscum contagiosum virus type I by DNA nucleotide analysis. *Virology* 192, 391-396.
- Fischer, M., Schnitzler, P., Scholz, J., Rosen-Wolff, A., Delius, H. and Darai, G., 1988. DNA nucleotide sequence analysis of the PvuII DNA fragment L of the genome of insect iridescent virus type 6 reveals a complex cluster of multiple tandem, overlapping and interdigitated repetitive DNA elements. *Virology* 167, 497-506.
- He, J. G., Deng, M., Weng, S. P., Li, Z., Zhou, S. Y., Long, Q. X., Wang, X. Z. and Chan, S. M., 2001. Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology* 291, 126-139.
- Hyatt, A. D., Gould, A. R., Zupanovic, Z., Cunningham, A. A., Hengstherger, S., Whittington, R. J., Kattenbelt, J. and Coupar, B. E., 2000. Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Arch. Virology* 145, 301-331.
- Inouye, K., Yamano, K., Maeno, Y., Nakajima, K., Matsuoka, M., Wada, Y. and Sorimachi, M., 1992. Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathology* 27, 19-27 (in Japanese with English abstract).
- Jung, S. J. and 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 Diseases* 23, 223-226.
- Kim, Y. J., Jung, S. J., Choi, T. J., Kim, H. R., Rajendran, K. V. and Oh, M. J., 2002.

- PCR amplification and sequence analysis of irido-like virus infecting fish in Korea. J. Fish Dis. 25, 121-124.
- Kurita, J., Nakajima, K., Hirono, I. and Aoki, T., 1997. Molecular sequence analysis and PCR diagnosis of red sea bream iridovirus. NRIA International Workshop; new approach to viral diseases of aquatic animals, Kyoto. 119-123.
- Kurita, J., Nakajima, K., Hirono, I. and Aoki, T., 1998. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV). Fish Pathol. 33, 17-23.
- Mao, J., Tham, T. N., Gentry, G. A., Aubertin, A. and Chinchar, V. G., 1996. Cloning, sequence analysis, and expression of the major capsid protein of the iridovirus frog virus 3. Virol. 216, 431-436.
- Miyata, M., Matsuno, K., Jung, S. J., Danayadol, Y. and Miyazaki, T., 1997. Genetic similarity of iridoviruses from Japan and Thailand. J. Fish Dis. 20, 127-134.
- Nakajima, K. and Sorimachi, M., 1994. Biological and Physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. Fish Pathol. 29, 29-33.
- Nakajima, K., Maeno, Y., Fukudome, M., Fukuda, Y., Tanaka, S. and Sorimachi, S., 1995. Immunofluorescence test for the rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using monoclonal antibody. Fish Pathol. 30, 115-119.
- Oshima, S., Hata, J., Segawa, C. and Hirasawa, N., 1996. A method for direct DNA amplification of uncharacterized DNA viruses and for development of a viral polymerase chain reaction assay: application to the red sea bream iridovirus. Anal. Biochem. 242, 15-19.

- Oshima, S., Hata, J., Hirasawa, N., Ohtaka, T., Hirono, I., Aoki, T. and Yamashita, S., 1998. Rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using the polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.* 32, 87-90.
- Poiesz, B. J., Dube, S., Jones, B., Bryz-Gornia, V., Dean, M. T., Spicer, T., Hengst, J., Sayre, K., Esteban, E. and Ferrer, J. F., 1997. Comparative performances of enzyme-linked immunosorbent, western blot, and polymerase chain reaction assays for human T-lymphotropic virus type II infection that is endemic among Indians of the Gran Chaco region of South America. *Transfusion* 37, 52-59.
- Rodger, H. D., Kobs, M., Macartney, A. and Frerichs, G. N., 1997. Systemic iridovirus infection in freshwater angelfish, *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein). *J. Fish Dis.* 20, 69-72.
- Rodriguez, A., Martinez-Salas, E., Dopazo, J., Davila, M., Saiz, J. C. and Sobrino, F., 1992. Primer design for specific diagnosis by PCR of highly variable RNA viruses: typing of foot-and-mouth disease virus. *Virol.* 189, 363-367.
- Schnitzler, 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.
- Schnitzler, P. and Darai, G., 1989. Characterization of the repetitive DNA elements in the genome of fish lymphocystis disease viruses. *Virol.* 172, 32-41.
- Schnitzler, P. and Darai, G. 1993. Identification of the gene encoding the major capsid protein of fish lymphocystis disease virus. *J. Gen. Virol.* 74, 2143-2150.
- Sohn, S. G., Choi, D. L., Do, J. W., Hwang, G. Y. and Park, J. W., 2000. Mass mortalities of cultured striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* by iridoviral infection. *J. Fish Pathol.* 13(2), 121-127 (in Korean with English abstract).

- Stoeckl, E., Barrett, N., Heinz, F. X., Banekovich, M., Stingl, G., Guggenberger, K., Dorner, F. and Kunz, C., 1989. Efficiency of the polymerase chain reaction for the detection of human immunodeficiency virus type (HIV-1) DNA in the lymphocytes of infected persons: comparison to antigen-enzyme-linked immunosorbent assay and virus isolation. *J. Med. Virol.* 29, 249-255.
- Stohwasser, R., Raab, K., Schnitzler, P., Janssen, W. and Darai, G., 1993. Identification of the gene encoding the major capsid protein of insect iridescent virus type 6 by polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* 74, 873-879.
- Tamai, T., Tsujimura, K., Shiragata, S., Oda, H., Noguchi, T., Kusuda, R., Sato, N., Kimura, S., Katakura, Y. and Murakami, H., 1997. Development of DNA diagnostic methods for the detection of new fish iridoviral diseases. *Cytotechnology* 23, 211-220.
- Tidona, C. A. and Darai, G., 1997. The complete DNA sequence of lymphocystis disease virus. *Virol.* 230, 207-216.
- Van der Ryst, E., Smith, M. S. and Visagie, H. M., 1996. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the diagnosis of HTLV-I infection. *J. Infect.* 32, 109-112.
- Webby, R. J. and Kalmakoff, J., 1998. Sequence comparison of the major capsid protein gene from 18 diverse iridoviruses. *Arch. Virol.* 143, 1949-1966.