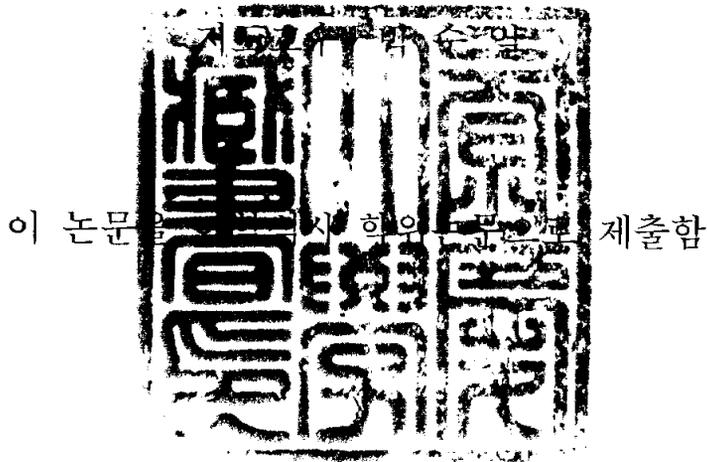


이학석사 학위논문

가물치, *Ophicephalus argus* 자어에서
분리한 Rhabdovirus



2004년 2월

부경대학교 대학원

어 병 학 과

홍 미 주

홍미주의 이학석사 학위논문을 인준함

2003년 12월 26일

주 심 약학박사 정준기 

위 원 이학박사 정현도 

위 원 농학박사 박수일 

목 차

목 차	i
Abstract	iii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 시험어	4
2. 바이러스 배양	4
2.1. 바이러스와 cell line	4
2.2. 바이러스 접종액의 준비	5
2.3. 바이러스의 배양	5
3. 전자현미경적 관찰	7
4. 가물치 자어 감염 Rhabdovirus isolates의 일반적 특성	7
4.1. 바이러스의 배양	7
4.2. 세포 감수성 시험	7
4.3. 바이러스의 물리 화학적 성상 시험	9
4.3.1. 바이러스의 핵산 결정	9
4.3.2. Lipid 용제 감수성 시험	9
4.3.3. 온도 안정성 시험	9
4.3.4. pH 감수성 시험	9
4.3.5. 온도에 따른 바이러스 증식능 시험	9
5. 가물치 자어 감염 Rhabdovirus isolates의 유전학적 특성	10
5.1. 감염 EPC cell line에서의 RNA 분리	10
5.2. single stranded cDNA의 합성	10
6. 가물치 자어 Rhabdovirus isolates의 구조단백질 및 항원 특성	14
6.1. 시험 바이러스	14
6.2. 바이러스의 분리 정제	14
6.3. 항체의 제작	15

6.4. SDS-PAGE Electrophoresis	15
6.5. Neutralization test	15
7. 가물치 자어 Rhabdovirus isolate (SKR-3)의 병원성 시험	16
7.1. 시험어	16
7.2. 바이러스 접종액의 제조	16
7.3. 어체의 크기별, 종류별 병원성 시험	17
7.4. 바이러스의 재분리	17
III. 결 과	18
1. 병어의 미생물학적 관찰	18
2. 바이러스의 분리 및 동정	18
2.1. 세포 배양법을 이용한 바이러스 분리	18
2.2. 바이러스 입자의 관찰	20
3. 가물치 자어에서 분리한 Rhabdovirus isolates의 일반 성상	22
3.1. 바이러스의 세포 감수성	22
3.2. 물리 화학적 성상	24
3.3. 바이러스의 온도에 따른 증식능 변화	27
4. 가물치 자어 Rhabdovirus isolates의 유전학적 특성	29
5. 가물치 자어 Rhabdovirus isolates의 구조 단백질과 항원 특성	30
5.1. 바이러스의 구조 단백질 구성	30
5.2. 중화항체시험	31
6. 가물치 자어에서 분리한 Rhabdovirus isolate (SKR-3)의 병원성	32
IV. 고 찰	36
V. 요 약	41
VI. 감 사 의 글	43
VII. 참 고 문 헌	44

Rhabdovirus isolated from the fry of Snakehead fish,

Ophicephalus argus

Mi-Ju Hong

Department of fish pathology, Graduate School,

Pukyong National University

Abstract

In May to June, 2003, happened a heavy mortality in the fry of snakehead fish, *Ophicephalus argus* in 15 to 30 days post hatching had broken out. The four strains of virus were isolated from diseased fish (SKR-1, 2, 3) and rearing water (SKR-4).

The virus cultured in *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line a typical bullet like a rhabdovirus shaped and an estimated size of 44×100 nm.

The virus isolates induced cytopathic effects in EPC cell line yielding a titer of $10^{7.0}$ TCID₅₀ ml⁻¹ at 25 °C. Other susceptible cell line to the virus was included chinook salmon and embryo (CHSE-214), but replication was not in fathead minnow (FHM). The optimum temperature for virus replication was 20 ~ 25 °C, but they could not replicate at 15 °C.

Virus isolates was inactivated when exposed to chloroform or heated to 56 °C. The optimum medium condition of pH was verified pH 7.2 for virus replication by the exposure test from pH 3 to pH 10 medium condition. The

virus isolates were divided into RNA virus because they did not affect the replication with IUdR condition.

Polyacrylamide gel electrophoresis demonstrated that all snakehead fish rhabdovirus present isolates were identical protein profiles. But those of other fish rhabdovirus such as the VHSV, IHNV and HIRRV were different from present isolates. Neutralization test with the anti-SKR-3 serum did not show cross-reaction among the other fish rhabdoviruses.

The virus isolate SKR-3 from snakehead fish showed high pathogenicity against fingerling of with total length of 3 cm, but did not in the larger size, total length 20 cm nor the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fingerlings.

These results lead us to the conclusion that the snakehead fish rhabdovirus from Korea suggested a new rhabdovirus as causing rhabdoviral infection in the snakehead fish fry.

I. 서 론

우리 나라에서 양식하고 있는 가물치는 진골어류, 농어목 (Percida), 가물치아목 (Channina), 가물치과 (Channidae), 가물치 (*Ophicephalus argus*)에 속한다. 가물치 양식이 내수면 양식 어류 총생산량 중에 차지하는 비중은 3.2 %에 불과하지만 어종별로 차지하는 중요성으로 볼 때 그 위치는 이스라엘 잉어, 송어, 잉어, 뱀장어, 가물치, 미꾸리 순으로 5위에 이르고 있다 (장 1993). 가물치의 양식장 분포는 김해 지방의 서부 낙동강 유역이 중심이 되어 전국적으로 확대 분포되었고 현재는 경기도 평택지방에서 가장 많은 양식이 이루어지고 있다 (장, 1993).

부산광역시 강서구 지역의 가물치 종묘생산 과정에서 2003년 5, 6월에 아가미 부위의 발적, 복부 발적 및 가슴지느러미 백탁 등의 증상을 나타내며 가물치의 대량 폐사가 일어났다. 이런 증상은 15 ~ 30일령의 가물치 자어에서 나타났으며, 이때의 수온은 25 °C 이상이였다. 질병에 걸린 가물치 자어의 폐사 원인을 알아보기 위해 세균 검사와 바이러스 검사를 실시하였다. 가물치 자어의 조직을 갈아서 TSA에 배양하였고, 바이러스 검사를 위해 어류 주화세포에 접종하였을 때 바이러스에 의한 세포 변성 효과 (cytopathic effect, CPE)를 관찰하여 바이러스성 질병으로 추정하고, 가물치 치어 조직 여과액을 접종한 어류 주화세포를 Transmission Electron Microscope (TEM)으로 관찰하였다. TEM의 관찰로 이 바이러스가 rhabdovirus의 형태를 띄고 있는 것을 확인하였다.

가물치에서 발병하는 바이러스성 질병은 1980년대 이후 동남 아시아 지역에서 주로 분리 보고되었다. 말레이시아의 epizootic ulcerative syndrome (EUS)에 감염된 striped snakehead, *Ophicephalus striatus*에서 rhabdovirus가 분리되었으

며 (Wattanavijarn et al., 1986a), 이 바이러스는 the ulcerative disease rhabdovirus (UDRV)로 동정되었다. 그리고 태국에서도 EUS와 관련하여 rhabdovirus와 birnavirus가 보고되었으며 (Frerichs et al., 1986; Hedrick et al., 1986; Wattanavijarn et al., 1986a; Wattanavijarn et al., 1986b; Kasornchandra et al., 1991) 여기서 보고된 rhabdovirus는 UDRV와 snakehead rhabdovirus (SHRV)로 동정되었다. 1994년에는 EUS에 감염된 가물치에서 birnavirus strains, reovirus and rhabdovirus isolates가 분리 보고되었다 (Roberts et al., 1994). 2000년 필리핀의 EUS에 감염된 snakeheads, *Ophicephalus striatus*에서 rhabdovirus의 특징이 연구되었지만, EUS와 그 병원체에 대해서는 아직 불명확한 점이 많은 단계에 있다 (Lio-Po et al., 2000).

보고된 바이러스들은 대부분 Family Rhabdoviridae에 속하는 ss RNA virus이며 bacilliform과 bullet 모양의 형태를 띄고 있다 (Essbauer et al., 2001). rhabdoviruses는 5개의 구조 단백질 (polymerase, L; glycoprotein, G; nucleocapsid, N; phosphoprotein, P; and matrix, M)을 가지고 있으며 (Ahne et al., 1989) 주요 어병 rhabdoviruses에는 infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV), hirame rhabdovirus (HIRRV), viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV), eel virus B12 (EEV-B12), eel virus C26 (EEV-C26), pike fry rhabdovirus (PFR), spring viraemia of carp virus (SVCV), eel virus American (EVA), SHRV, 및 UDRV등이 있다. 가물치에서 분리 보고된 rhabdovirus 중 SHRV와 UDRV는 각각 *Norvirhabdovirus* genus와 *Vesiculovirus* genus에 가까운 것으로 알려져 있지만 (van Regenmortel et al., 2000), 세포 감수성과 형태상으로 차이가 난다. SHRV의 경우 bacilliform을 나타내며, UDRV의 경우 bullet 형태를 나타낸다 (Lio-Po et al., 2000).

우리 나라에서의 가물치 질병은 그리 많은 수가 보고되어 있지 않은 실정이

다. 보고되어 있는 질병은 세균성 질병 (김 등, 1990; 김 등, 1991)과 진균성 질병 (전 등, 1991)에 관한 것이 있지만 바이러스에 관한 보고는 아직 되어 있지 않다. 따라서 다른 세균성, 진균성 질병에 관한 연구 외에도 가물치 바이러스성 질병에 관한 연구가 필요하다.

본 연구에서 분리한 가물치 자어 rhabdovirus는 기 보고되어 있는 Family Rhabdoviridae의 virus members와 비교하였을 때, 형태, 세포 감수성, 질병 발생 온도 등에서 차이가 났으며 가물치에서 기 분리된 UDRV와 SHRV와도 차이를 나타냈다. 따라서 새로운 종으로 여겨지는 가물치 자어에서 분리한 rhabdovirus의 특성에 관해 연구하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험어

2003년 5월부터 6월까지 부산광역시 명지 등에서 질병이 발생한 가물치 자어를 조사하여 특징적인 질병의 증상을 보이는 시료를 채집하였다. 조사 대상 병어는 아가미 부위 발적, 복부 발적 및 가슴지느러미 백탁 등의 증상을 나타내며 폐사하는 가물치 자어 이었다. 세균 검사를 위하여 Tryptic Soy Agar (TSA) 평판 배지에 병어를 0.1 % benzalkonium chloride saline solution으로 소독한 후 멸균 생리 식염수 (0.85 % NaCl in distilled water)에 행균 다음, 막자사발에서 갈아서 TSA에 접종하여 세균 배양을 시도하였다. 또한 자어의 곰팡이 및 기생충 관련 여부를 확인하기 위하여 현적 표본을 제작하여 검경하였다. 질병이 발생하는 시기의 수온은 25 ~ 28 °C 이었으며, 병어는 15 ~ 30일령된 가물치 자어 이었다. 이들 시료는 살아있는 상태로 관찰하였고 이후, -75 °C 초저온 냉동고에 보관하면서 각종 실험에 사용하였다.

2. 바이러스 배양

2.1. 바이러스와 cell line

바이러스의 동정 및 진단을 위한 reference virus로서 본 연구실이 보유하고 있던 IHNV, IPNV 및 VHSV를 사용하였다. 바이러스 배양에 사용한 어류 주화세포는 EPC와 CHSE-214 cell line이었으며, 세포 배양액은 10 % Fetal bovine serum (FBS)과 1 % Antibiotic-antimycotic (Gibco BRL)을 첨가한 Eagle's minimum essential medium (MEM)을 사용하였다.

2.2. 바이러스 접종액의 준비

시험어를 0.1 % benzalkonium chloride saline solution으로 소독한 후 멸균 생리 식염수에 헹군 다음, 정량하여 멸균한 유발에 넣고 마쇄한 다음 MEM을 1:10의 비율로 넣어 희석한 후 4 °C에서 10,000 × g, 10 분 동안 원심 분리하였다. 상장액만을 취하여 0.45 μm membrane filter로 여과한 것을 바이러스 접종 원액으로 사용하였다.

사육수는 0.22 μm membrane filter를 이용해 1 / 500배로 농축하여 0.45 μm membrane filter로 필터하여 접종원액으로 사용하였다.

2.3. 바이러스의 배양

단층 배양된 EPC 및 CHSE-214에 바이러스 접종액 300 μl를 접종하고 실온에서 30 분 동안 흡착시킨 후, 5 % FBS와 1 % antibiotic-antimycotic (Gibco BRL)을 첨가한 MEM을 넣고 20 °C에서 7일간 배양하면서 바이러스에 의한 세포 변성 효과 (cytopathic effect, CPE)를 관찰하였다. 실험에 사용한 바이러스주는 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Source of the virus isolates from the diseased snakehead fish, *Ophicephalus argus* and reference virus strains

Strain		Origin	
Present isolates	SKR-1	Snakehead fish	15 days Myongji, Pusan, 2003. May
	SKR-2	Snakehead fish	15 days Myongji, Pusan, 2003. June
	SKR-3	Snakehead fish	30 days Myongji, Pusan, 2003. June
	SKR-4	Snakehead fish rearing water	rearing water Myongji, Pusan, 2003. June
Reference strains	IHNV	Rainbow trout	Yangyang, 2003. Feb.
	VHSV (KR'01-1)	Olive flounder	Pohang, 2001. Sep.
	HIRRV	Black rockfish	Pohang, 2001. July
	IPNV	Rainbow trout	Yangyang, 2003. June

3. 전자현미경 관찰

자연 감염된 가물치 자어의 조직 마쇄 여과액을 접종한 EPC cell line을 2.5 % glutaraldehyde (pH 7.2, 4 °C)에 4시간 전고정하고 1 % osmium tetroxide (pH 7.2, 4 °C)에서 2시간 동안 후고정하였다. Alcohol 탈수 과정을 거쳐 propylene oxide로 치환한 후 EPON 혼합물로 열중합 처리를 하였다. 열중합된 시료를 ultramicrotome (LKB, Nova, Sweden)으로 0.5 ~ 1 μm 두께의 semithin section한 다음 toluidin blue로 단염색하여 관찰한 후 ultrathin section (60 ~ 90 nm)하였다. 이를 grid에 부착시켜 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과형 전자현미경 (JEM 1200-II, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

4. 가물치 자어 감염 Rhabdovirus isolates의 일반적 특성

4.1. 바이러스의 배양

EPC cell line에 감염어 유래의 바이러스 접종액을 접종하고 CPE가 확인되면 -75 °C에 동결하였다가 이를 다시 녹인 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 이를 바이러스 배양 성장 연구의 접종원액으로 사용하였다. 바이러스 배양액을 접종한 후에는 5 % FBS가 첨가된 MEM을 사용하였다. 바이러스 감염가는 TCID₅₀ (50 % tissue culture infectious dose) ml^{-1} 으로 나타냈다.

4.2. 세포 감수성 시험

바이러스의 세포 감수성 시험을 위해 사용한 어류 주화세포는 Table 2와 같이 CHSE-214, EPC 및 FHM 으로서 모두 3가지를 사용하였으며, 모든 주화세포는 10 % FBS와 1 % antibiotic-antimycotic (Gibco BRL)을 첨가한 MEM을 사용하여 배양하였다. 세포 감수성 시험에서는 모두 25 °C에서 7일간 배양하면서 CPE를 관찰하였다.

Table 2. List of fish cell lines used in this study

Cell lines	Origin	Temp. range of growth (°C)	References
CHSE-214	Chinook salmon, embryo	4 ~ 27	Fryer et al. (1965)
EPC	<i>Epithelioma papulosum cyprini</i>	15 ~ 33	Fijan et al. (1983)
FHM	Fathead minnow, pendance	0 ~ 36	Gravell and Malsberger (1965)

4.3. 바이러스의 물리 화학적 성상 시험

4.3.1. 바이러스의 핵산 결정

바이러스의 핵산 종류를 확인하기 위하여 Rovozzo and Burke (1973)의 방법에 따라 DNA 합성 저해제인 5'-iodo-2'-deoxyuridine (IUdR)에 대한 감수성 시험을 실시하였다. EPC cell line이 단층 배양된 96 well plate에 10^4 M IUdR 용액을 $100 \mu\text{l}$ 씩 분주한 다음, 단계 희석 ($10^{-2} \sim 10^{-9}$)한 바이러스액 $50 \mu\text{l}$ 씩을 첨가하여 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 7일간 CPE 유무를 관찰하고 감염가를 측정하였다.

4.3.2. Lipid 용제 감수성 시험

분리한 바이러스가 외막을 지녔는지의 여부를 조사하기 위하여 Feldman and Wang (1961)의 방법에 준하여 chloroform으로 감수성 시험을 실시하였다. 바이러스 접종원액 1 ml 과 chloroform 0.5 ml 을 혼합하여, 실온에서 10분 동안 진탕시킨 후, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 $1500 \times g$, 10분 동안 원심 분리하여 상정액만을 별도의 시험관에 넣고 10 배로 단계 희석하였다. 이 희석액을 EPC cell line이 단층 배양된 96 well plate에 well 당 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 7일간 배양하면서 CPE

형성 유무를 관찰하였다.

4.3.3. 온도 안정성 시험

분리한 바이러스의 온도에 대한 안정성 시험을 위하여 Rovozzo and Burke (1973)의 방법에 준하여 바이러스 접종원액을 56 °C에서 30분 동안 증탕 가온한 후, 단계 희석하여 EPC cell line이 단층 배양된 96 well plate에 100 μ l씩 접종하고 25 °C에서 7일간 배양하면서 CPE 형성 유무를 관찰하여 바이러스 감염가를 측정하였다.

4.3.4. pH 감수성 시험

분리한 바이러스의 pH 조건에 따른 안정성 시험은 Rovozzo and Burke (1973)의 방법에 준하여 실시하였다. pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 7.2, 7.6, 8.0, 9.0 그리고 10으로 조정된 MEM 여과액 1.8 ml에 바이러스 접종원액 0.2 ml을 각각 첨가하여 실온에서 3시간 동안 방치한 후, 단계 희석하여 단층 배양된 96 well plate에 100 μ l씩 접종하고 25 °C에서 7일간 배양하면서 CPE 형성 유무를 관찰하여 바이러스 감염가를 측정하였다.

4.3.5. 온도에 따른 바이러스 증식능 시험

25 cm² tissue culture (T/C) flask에 단층 배양된 EPC cell line에 바이러스액을 접종 (MOI=0.01)하고 15, 20, 25, 30, 32 °C에서 배양하면서, 접종 후 7일간 매일 배양 상정액을 무균적으로 덜어내어 바이러스 titer를 측정하였다.

5. 가물치 자어 감염 Rhabdovirus isolates의 유전학적 특성

5.1. 감염 EPC cell line에서의 RNA 분리

감염 EPC cell line에서 total RNA의 분리는 acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform 추출 방법에 기초하여 TRIzol RNA (Gibco BRL)를 이용하여 추출하였다. 재료는 바이러스 접종액을 접종하여 CPE가 나타나기 시작하는 EPC cell line을 사용하였다. EPC cell을 모아 E-tube에 넣어 6,000×g로 5분간 원심 분리하여 상정액을 제거한 후, 1 ml의 TRIzol을 첨가하여 pipetting하여 EPC cell을 균질화시켰다. 균질액을 실온에서 5분간 방치한 후 chloroform 200 μ l를 넣고 완전히 혼합하여 실온에서 3분간 방치하였다. 이를 4 °C에서 12,000×g로 15분간 원심 분리하여 상정액을 새 E-tube에 옮기고 동량의 isopropanol을 넣은 다음 실온에서 10분간 방치한 후 4 °C에서 12,000×g로 15분간 원심 분리하여 상정액을 제거하였다. 이에 75 % ethanol 1 ml을 첨가하여 가볍게 vortex한 후 4 °C에서 7,500×g로 5분간 원심 분리하여 ethanol을 제거하였다. RNA pellet을 실온에서 5-10분간 자연 건조시킨 후, 30 μ l의 DEPC 처리수를 첨가하여 녹였다. 이렇게 추출된 RNA는 cDNA 합성에 사용하였다.

5.2. single stranded cDNA의 합성

추출한 total RNA 1 μ l와 0.5 μ g oligo(dT)₁₅ primer, 1 μ l PowerScript™ Reverse Transcriptase (Invitrogen)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성시 시약 조성은 Table 3과 같다.

가물치에서 분리한 바이러스를 동정하기 위하여 수종의 어병 바이러스를 특이적으로 검출할 수 있는 PCR primer를 사용하였다. Positive control로 β -actin을 사용하여 PCR을 하였다. 각각의 primer에 대한 정보는 Table 4와 같으며, Table 5와 같은 조건으로 PCR하였다. PCR에는 Accupower PCR primix[®]

(BIONEER)를 사용하였고, 이에 대한 정보는 Table 6에 나타낸 것과 같다. Thermal cycler (Perkin-Elmer 2400)를 사용하여 유전자를 증폭시켰으며 PCR 증폭 산물은 1.5 % agarose gel (in TBE buffer, 0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA)를 사용하여 전기 영동한 후 UV transilluminator 상에서 전기 영동상을 확인하였다.

Table 3. Reagents for reverse transcription (RT)

Reagent	Concentration	Working concentration
Oligo(dT) ₁₅ primer	500 ng	1 μ l
RNA sample	100 ~ 500 ng / μ l	1 μ l
RNase free water	-	9 μ l
5 \times First - Strand Buffer	-	4 μ l
dNTP mix	each 10 mM	2 μ l
DTT	100 mM	2 μ l
PowerScript RTase	-	1 μ l

Table 4. Primer sets used in this study for diagnosis of the isolated viruses

Virus	Primer sequence (name)	Products size (bp)
SHRV	5'-TGG ATG ACT TTG CCT ATC-3' (SHRg-F) ^a	509
	5'-TTG ACA GAC TTA AAA CGA C-3' (SHRg-R) ^a	
SVCV	5'-AGA TGG TAT GGA CCC CAA TAC ATH ACN CAY-3' (SVCg-F) ^b	714
	5'-TCT TGG AGC CAA ATA GCT CAR RTC-3' (SVCg-R) ^b	
VHSV	5'-ATG GAA ATG GAA CAC TTT TTT-3' (VG1) ^c	697
	5'-TGT GAT CAT GGG TCC TGG TG-3' (VD3) ^c	
IHNV	5'-ATG ATC ACC ACT CCG CTC ATT-3' (IG1) ^c	682
	5'-GAT TGG AGA TTT TAT CAA CA-3' (ID3) ^c	
HIRRV	5'-TAA ACC AAG GCC ATC TAC GC-3' (HRVn-F) ^d	462
	5'-CTT TTT GAC CAG AAG GCG AG-3' (HRVn-R) ^d	
β -actin	5'-ACT ACC TCA TGA AGA TCC TG-3' (AC-F) ^d	510
	5'-TTG CTG ATC CAC ATC TGC TG-3' (AC-R) ^d	

a, According to Hohnson et al. (1999).

b, According to Stone et al. (2003).

c, According to Miller et al. (1998).

d, According to GenBank.

Table 5. Reagents for PCR

Reagent	Concentration	Working concentration
Template DNA	500 ng / $\mu\ell$	1 $\mu\ell$
Primer(sense, antisense)	10 pmol / $\mu\ell$	each 1 $\mu\ell$
Taq polymerase	1 U	
dNTP mix	each 0.25 mM	
Tris-HCl	10 mM	premix
KCl	40 mM	
MgCl ₂	1.5 mM	
Stabilized dye	-	
DNA free water		to 20 $\mu\ell$

Table 6. Condition of reaction steps and PCR cycles

PCR Step	Temperature (°C)	Reaction Time	Cycle (s)
Pre-denaturation	94	5 min	1
Denaturation	94	30 sec	
Annealing	42	30 sec	30
Extention	72	30 sec	
Post-extension	72	7 min	1

6. 가물치 자어 Rhabdovirus isolates의 구조 단백질 및 항원 특성

6.1. 시험 바이러스

시험 바이러스는 가물치 자어에서 분리한 4개의 rhabdovirus isolates와 reference virus로서 IHNV, VHSV, HIRRV를 사용하였다. IHNV는 CHSE-214에 VHSV와 HIRRV는 EPC cell line에 배양하여 실험에 사용하였다.

6.2. 바이러스의 분리 정제

바이러스의 정제는 Nishizawa et al. (1991)의 방법에 준하였다. 즉 IHNV, VHSV, HIRRV 및 각각의 가물치 자어 rhabdovirus isolates를 150 cm² T/C flask에 접종하여 대량 배양하고 세포에 CPE가 나타났을 때 -75 °C의 초저온으로 세포를 동결하였다. 이를 녹인 다음 4,000 × g, 30분간 원심 분리하여 세포 잔유물을 제거한 후 상정액만을 취하고 여기에 7 % polyethylene glycol (PEG-6,000), 2.3 % NaCl을 첨가하여 4 °C에서 교반하면서 overnight하였다. 이를 20,000 × g, 40분간 원심 분리하여 얻은 pellet을 소량의 TNE buffer (0.01 M Tris HCl, 0.1 M NaCl, 0.001 M EDTA)에 재현탁한 다음 15 % sucrose cushion위에 중층하고 4 °C, 115,000 × g에서 1시간 초고속 원심 분리하여 바이러스 pellet을 얻었다. 이 pellet을 다시 TNE buffer에 재현탁하여 20, 35, 50 % sucrose discontinuous gradient 상에서 4 °C, 80,000 × g로 1시간 30분간 원심 분리하여 20과 35 % 경계 지점에 형성된 바이러스 band를 수확하였다. 이를 TNE buffer에 재현탁하여 115,000 × g에서 1시간 원심 분리하여 바이러스를 정제하였다. 최종 바이러스 농도는 흡광도 280 nm에서 측정하였다.

6.3. 항체의 제작

순수 분리한 가물치 자어 rhabdovirus isolate 중 대표 바이러스주인 SKR-3의 polyclonal 항체는 약 1.5 kg되는 New Zealand white rabbit를 사용하여 제작하였다. 면역에 사용한 항원 단백질의 양은 순수 분리한 바이러스를 200 μg 씩 사용하였으며 첫 번째 면역은 Freund's complete adjuvant (FCA)와 유화시킨 후 피하 주사하였고 두 번째 이후부터는 Freund's incomplete adjuvant (FIA)와 유화시킨 것으로 면역하였다. 이와 같은 방법을 사용하여 2주 간격으로 3회 주사한 후 전체혈하여 혈청을 분리하고 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서 실험에 사용하였다.

6.4. SDS-PAGE Electrophoresis

단백질의 전기 영동은 Laemmli (1970)의 방법에 따랐다. 농축 정제한 가물치 자어 rhabdovirus isolates 및 IHNV, VHSV, HIRRV를 5×SDS sample buffer (SDS, Tris, glycerol, 2-mercaptoethanol)와 혼합한 후 5분간 boiling하고 10,000 ×g에서 10초간 원심 분리한 다음 12 % polyacrylamide gel에 loading하여 60mA에서 1시간 전기 영동하였다. 그리고 Molecular weight marker로 low range SDS-PAGE standards(Bio-Rad)를 사용하였다. 완료된 gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 Coomassie destain 용액으로 탈색하여 band를 확인하였다.

6.5. Neutralization test

바이러스 중화시험은 Okamoto et al. (1983)의 방법에 따랐다. 약술하면, 제작한 anti-SKR-3 rabbit Ab를 FBS가 첨가되지 않은 MEM으로 2 fold 단계 희석한 다음 96 well plate에 50 μl 씩 넣고, 10^2 TCID₅₀ 50 μl^{-1} 의 농도로 희석시킨 4개의 가물치 자어 rhabdovirus isolates와 reference strain인 IHNV, HIRRV,

VHSV를 항혈청이 첨가된 96 well plate에 50 μ l씩 첨가하여 실온에서 1시간 동안 흔들면서 반응시켰다. 96 well plate에 단층 배양된 EPC cell line에 well 당 100 μ l씩 접종하고 25 $^{\circ}$ C에서 14일간 배양하면서 CPE를 관찰하였다. 항혈청의 중화 역가 (ND)는 10^2 TCID₅₀ well⁻¹의 바이러스를 중화시키는 항혈청의 종말 희석 배수의 역수로부터 구하였다.

7. 가물치 자어 Rhabdovirus isolate (SKR-3)의 병원성 시험

7.1. 시험어

병원성 시험에는 가물치와 나일틸라피아를 사용하였다. 평균 체장이 3 cm (30~40 일령)와 20 cm (3~4 월령) 크기의 부산 강서구 지역의 양식장에서 건강한 가물치, *Ophicephalus argus*를 분양 받아서 실험에 사용하였고, 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus*는 부경대학교 양어장에서 평균 체장 2 cm 크기를 분양 받아 사용하였다. 모든 시험어는 1주일간 실험실에서 순치하여 사용하였다. 병원성 시험을 하는 동안 20 l 수조에서 사육하며, 1일 1회 환수하고 실험 기간 동안 먹이는 공급하지 않았다.

7.2. 바이러스 접종액의 제조

가물치 자어 조직 마쇄 여과액을 EPC cell line에 접종하여 25 $^{\circ}$ C에서 7일간 배양한 계대 2대째의 SKR-3 배양액을 모든 병원성 시험에 사용하였다. 바이러스의 접종에 의해 CPE가 나타났을 때 T/C flask를 동결한 후 다시 녹여서 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 바이러스 접종 원액으로 사용하였으며, 바이러스 titer를 TCID₅₀ ml⁻¹로 산출하였다. 접종 원액을 FBS가 첨가되지 않은 MEM으로 10 fold 단계 희석하여 병원성 시험에 사용하였다.

7.3. 어체의 크기별, 종류별 병원성 시험

가물치에 대한 어체 크기별 병원성 시험을 위하여 평균 체장 3 cm (30~40 일령)의 소형어와 20 cm (3~4 월령) 크기의 중형어를 사용하였다. 50 ℓ 사각 수조에 소형어는 10마리씩 중형어는 5마리씩 수용하였다.

소형어는 크기가 작아서 주사를 할 수 없어 침지법으로 감염시켰으며 5 ℓ의 사육수에 바이러스 농도를 10^4 TCID₅₀ ml⁻¹이 되게 조정한 후 가물치를 3시간 동안 침지한 다음 새로운 사육수로 환수하여 14일간 누적 폐사율을 조사하였다.

중형어는 복강 주사법을 이용하였으며 10^5 , 10^3 TCID₅₀ ml⁻¹로 조정한 바이러스 접종액을 0.1 ml씩 복강에 주사하여 14일간 누적 폐사율을 조사하였다.

틸라피아의 병원성은 침지 감염법으로 감염시켰으며 5 ℓ의 사육수에 바이러스 농도를 10^4 , 10^3 , 10^2 TCID₅₀ ml⁻¹이 되게 조정한 후 틸라피아를 3시간 동안 침지한 다음 새로운 사육수로 환수하여 14일간 누적 폐사율을 조사하였다.

모든 공격 시험의 온도는 28 °C에서 실시하였다.

7.4. 바이러스의 재분리

각종 병원성 시험에서 폐사한 어류는 폐사 직후 세균 배양 및 기생충 관찰을 실시하였고 조직 마쇄 여과액을 제작하여 EPC cell line에 접종하여 원인 바이러스의 재분리를 시도하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 병어의 미생물학적 관찰

2003년 5, 6월 부산 강서구 지역의 가물치 종묘 생산 과정에서 아가미 부위 발적, 복부 발적 및 가슴지느러미 백탁의 특징적인 증상을 나타내며 대량 폐사하는 질병이 발생하였다. 이들 병어에서 기생충은 검출되지 않았고 소수의 *Aeromonas* sp.가 검출되었다.

질병이 발생한 시기의 수온은 종묘를 하우스에서 사육하고 있었기 때문에 주로 25 ℃ ~ 30 ℃ 범위의 비교적 높은 온도인 것으로 나타났다.

2. 바이러스의 분리 및 동정

2.1. 세포 배양법을 이용한 바이러스 분리

병어의 조직 여과 마쇄액을 EPC 와 CHSE-214 cell line에 접종하여 관찰한 결과 EPC cell line에서는 3일째부터 세포가 구형화되기 시작하였으며 이들 세포가 모이는 현상을 관찰할 수 있었지만 CHSE-214 cell line에서는 EPC cell line에 비해 약한 CPE 반응을 보였다(Fig. 1). 이러한 CPE 현상은 VHSV, IHNV 및 HIRRV를 EPC cell line에 접종했을 때와 매우 유사하였다.

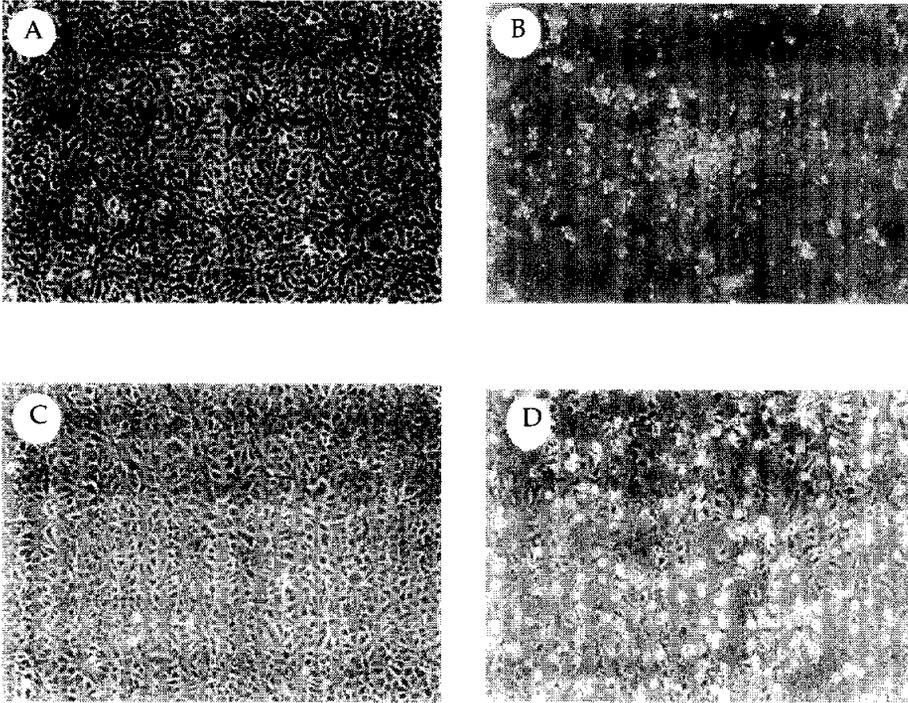


Fig. 1. Cytopathic effect in EPC cell line and CHSE-214 cell line inoculated with the snakehead fish rhabdovirus isolate (SKR-3). A, normal EPC cell line; B, SKR-3 infected EPC cell line; C, normal CHSE-214 cell line; D, SKR-3 infected CHSE-214 cell line.

2.2. 바이러스 입자의 관찰

조직 여과 마쇄액을 접종한 EPC cells을 전자 현미경으로 관찰한 결과 rhabdovirus의 전형적인 형태인 한쪽 끝이 둥글고 한쪽은 평평한 모양의 탄환형 바이러스 입자가 다수 관찰되었다 (Fig. 2). 이들 바이러스 입자의 크기는 직경 44 ± 5 nm, 길이 100 ± 5 nm로 측정되었다.

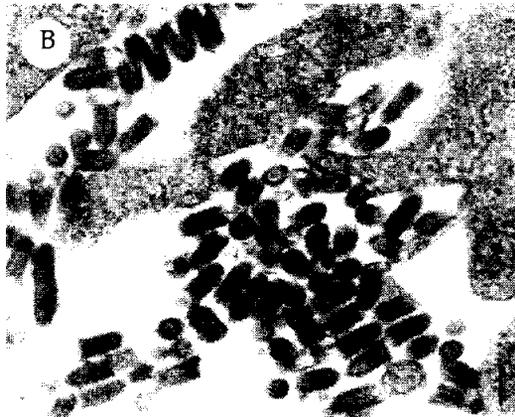
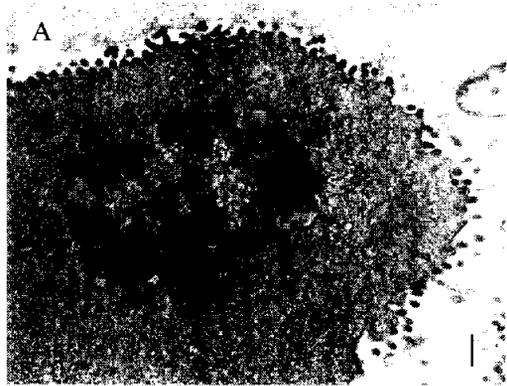


Fig. 2. Electron micrograph of the snakehead fish rhabdovirus isolate (SKR-3) infected cells, after three days culturing at 20 °C. A, Virus particles in the EPC cells \times 12000. Bar = 500 nm; B, Virus particles in EPC cells \times 50000. Bar = 100 nm.

3. 가물치 자어에서 분리한 Rhabdovirus isolates의 일반 성상

3.1. 바이러스의 세포 감수성

양식 가물치 자어에서 분리한 rhabdovirus isolates의 각종 어류 주화 세포에 대한 감수성 시험 결과, 25 °C에서 7일간 배양한 EPC, CHSE-214 모두에서 CPE가 관찰되었으나 FHM에서는 CPE가 관찰되지 않았다. 시험에 사용한 어류 주화 세포 중 EPC cell line에서 가장 높은 감수성을 확인할 수 있었고 시험 대상 바이러스 사이의 감염가는 Table 7과 같다. EPC cell line에서는 $7.0 \text{ TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$ (SKR-3)이었고 두 번째로 좋았던 CHSE-214에서는 $4.5 \text{ TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$ (SKR-2)이었다.

EPC cell에서는 접종 후 3일째부터 세포의 구형화를 특징으로 하는 CPE가 나타나기 시작하여 5일이 지난 후 배양 세포가 탈락하는 현상을 볼 수 있었다.

Table 7. Susceptibility of the fish cell lines to snakehead fish rhabdovirus isolates

Virus isolates	Cell line	Mean virus titer ($\text{Log}_{10} \text{TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$)
SKR-1	EPC	$10^{3.67}$
	CHSE-214	$10^{2.2}$
	FHM	-
SKR-2	EPC	$10^{3.77}$
	CHSE-214	$10^{4.5}$
	FHM	-
SKR-3	EPC	10^7
	CHSE-214	$10^{2.2}$
	FHM	-
SKR-4	EPC	$10^{3.56}$
	CHSE-214	10^2
	FHM	-

Incubation for 7 days at 25 °C.

3.2. 물리 화학적 성상

가물치 자어로부터 분리된 rhabdovirus isolates의 물리 화학적 성상을 조사한 결과는 Table 8과 같다.

본 rhabdovirus isolates의 핵산 종류를 확인하기 위한 IUdR 반응 시험의 결과 rhabdovirus isolates는 모두 IUdR의 처리에 대한 영향을 받지 않았으므로 이들 바이러스는 모두 RNA를 핵산으로 지니는 것으로 확인할 수 있었다. 같은 RNA virus인 IHNV, VHSV, IPNV 역시 IUdR 처리에 영향을 받지 않았다.

본 rhabdovirus isolates의 외막 존재 여부를 조사하기 위한 chloroform 감수성 시험에서는 envelope이 없는 대조 바이러스인 IPNV는 chloroform 처리 virus 감염가에 아무런 영향을 주지 않는데 반하여, envelope이 있는 IHNV, VHSV와 마찬가지로 분리 rhabdovirus isolates는 chloroform 처리에 의하여 감염력이 완전히 소실되는 것으로 나타났다. 위의 결과에 따라 본 rhabdovirus isolates는 모두가 envelope을 가지는 것으로 판단된다.

열에 대한 안정성 시험 결과, 가물치 자어에서 분리한 본 rhabdovirus isolates는 열에 불안정하여 56 °C에서 바이러스가 완전히 불활화되는 것을 알 수 있었다.

pH에 대한 안정성 시험 결과, rhabdovirus isolates는 pH 7.2에서 가장 좋은 활성을 가지는 것으로 나타났고, 산성 (pH 4, 5, 6)에는 비교적 안정한 반면 알칼리 조건 (pH 8, 9, 10)에서는 불안정하였다 (Fig. 3).

Table 8. Biochemical and biophysical characteristics of the rhabdovirus isolates

Virus isolate	Virus titer ($\text{Log}_{10} \text{TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$)		
	IUdR (10^{-3} M)	Chloroform (50 %)	Heat (56 °C)
SKR-1 ^a	5.67	0	0
SKR-2 ^a	5.77	0	0
SKR-3 ^a	7.0	0	0
SKR-4 ^a	5.56	0	0
Reference virus			
IHNV ^a	5.5	0	NT
VHSV ^a	8.3	0	NT
IPNV ^b	6.7	6.7	NT

^a, tested on EPC cell line ; ^b, tested on CHSE-214 cell line ; NT, not tested.

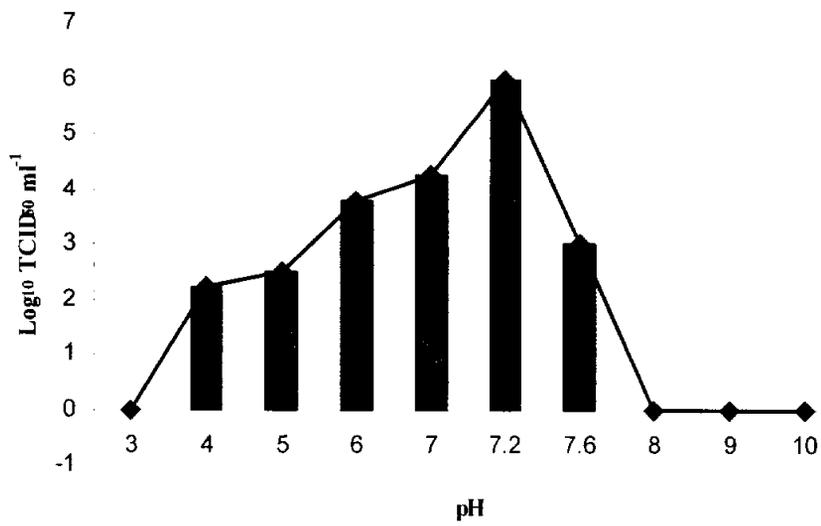


Fig. 3. Replication of snakehead fish rhabdovirus isolate (SKR-3) in EPC cell line incubated at different pH.

3.3. 바이러스의 온도에 따른 증식능 변화

가물치 자어에서 분리한 rhabdovirus isolate (SKR-3)의 배양 온도에 따른 바이러스 증식 속도 및 역가를 비교한 결과는 Fig. 4와 같다. 본 rhabdovirus isolate를 EPC cell line에 15, 20, 25, 30, 32 °C의 온도 조건으로 각각 배양하였을 때, 20 °C와 25 °C 범위 내에서는 빠르게 증식하였지만 15 °C에서는 증식할 수 없음을 알 수 있었다. 30 °C와 32 °C에서는 바이러스의 증식 속도 및 역가는 비교적 낮았지만 증식하였고 바이러스의 역가가 7일째 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 바이러스의 증식 속도는 20 °C와 25 °C에서 비슷하였지만 바이러스 역가는 25 °C에서 더 높았다.

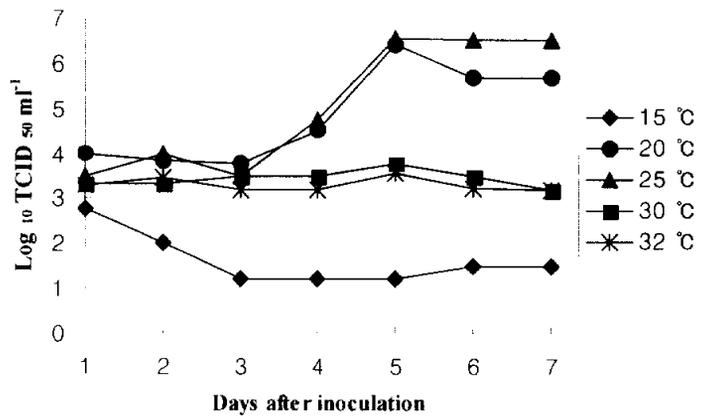


Fig. 4. Replication of snakehead fish rhabdovirus isolate (SKR-3) in EPC cell line incubated at five different temperatures.

4. 가물치 자어 Rhabdovirus isolates의 유전학적 특성

가물치 자어 조직 마쇄 여과액을 EPC cell line에 접종한 것에서 RNA를 추출하여 cDNA로 변환시킨 후 Table 4의 primer를 사용하여 RT-PCR을 실시한 결과는 Fig. 5와 같다. 사용한 primer에 대하여 가물치 자어 rhabdovirus isolates는 모두 negative한 것으로 나타났다. 하지만 positive control로 사용한 β - actin primer에 대해서는 510 bp에서 밴드가 나타났다.

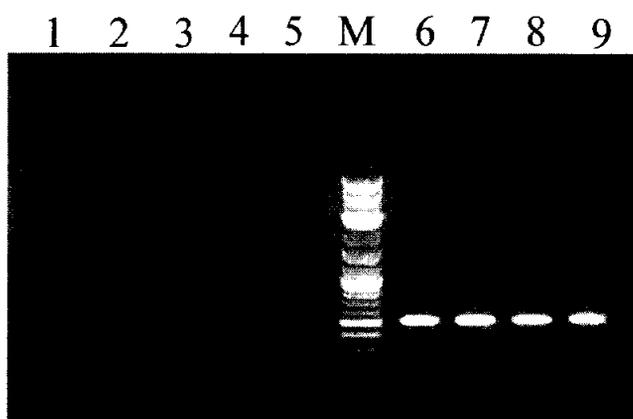


Fig. 5. Detection of snakehead fish rhabdovirus isolates by RT-PCR. M, DNA molecular weight marker (1 Kb plus ladder); lane 1, RT-PCR product using a SHRV specific primer; lane 2, SVC specific primer; lane 3, VHSV specific primer; lane 4, IHNV specific primer; lane 5, HIRRV specific primer; lane 6, 7, 8, 9, β - actin primer.

5. 가물치 자어 Rhabdovirus isolates의 구조 단백질과 항원 특성

5.1. 바이러스의 구조 단백질 구성

바이러스의 구조 단백질을 분석하기 위하여 농축 정제한 바이러스를 불연속 12 % SDS-PAGE로 전기 영동하여 나타난 band를 standard marker protein (Fermentas)과 비교해 본 결과는 Fig. 6과 같다. 분자량은 약 80, 50, 38, 28 kDa 부근에 major band가 관찰되었으며, 이는 각각 Glycoprotein G, Nucleoprotein N, Matrix protein M1, Matrix protein M2 protein의 분자량에 해당된다 (lane 1 ~ 4). 가물치 자어에서 분리한 rhabdovirus isolates는 모두 동일한 protein pattern을 보였으나, reference virus인 IHNV, VHSV, HIRRV는 protein pattern과는 상이하였다 (lane, IHNV, HIRRV and VHSV).

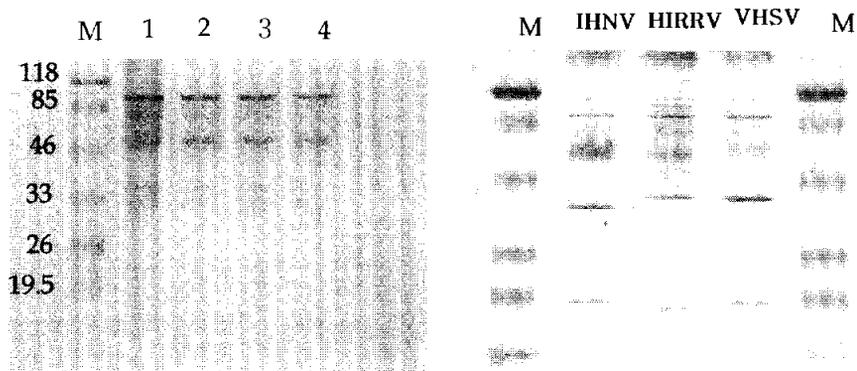


Fig. 6. SDS-polyacrylamide gel (12 %) electrophoresis pattern of the structural protein of snakehead fish rhabdovirus isolates. The proteins were stained with coomassie brilliant blue R-250. Snakehead fish rhabdovirus isolates : 1, SKR-1 ; 2, SKR-2 ; 3, SKR-3 ; 4, SKR-4 .

5.2. 중화 항체 시험

가물치 자어 rhabdovirus isolate (SKR-3)에 대해 제작한 polyclonal rabbit antibody가 중화 항체로서 작용할 수 있는지의 여부를 neutralization titer로 확인한 결과는 Table 9에 나타내었다.

Table 9. Neutralization tests of rhabdovirus isolates from snakehead fish, *Ophicephalus argus* with anti-rhabdovirus isolate (SKR-3) serum

Virus isolate	Virus titer ^a	Neutralization titer of antiserum ^b
SKR-1	2.8	160
SKR-2	2.4	80
SKR-3	2.0	160
SKR-4	2.55	160
IHNV	2.8	<20
VHSV	2.55	<20
HIRRV	3.05	<20

^a, Log₁₀ TCID₅₀ well⁻¹.

^b, Reciprocal of maximum dilution of antiserum to neutralize 2.0 log₁₀ TCID₅₀ of virus.

6. 가물치 자어에서 분리한 Rhabdovirus isolate (SKR-3)의 병원성

가물치 소형어와 중형어에 대한 공격 시험의 결과는 Table 10과 Table 11에 나타냈다. 소형어의 경우 10^4 TCID₅₀ ml⁻¹로 침지하였을 때, 100 %의 폐사율을 나타냈지만 중형어에서는 폐사 개체가 나타나지 않았다. 폐사한 소형어에서는 간의 발적이 특징적으로 관찰되었다 (Fig. 7). 가물치에서 분리되었던 *Aeromonas* sp.의 병원성 시험에서도 병원성이 없는 것으로 확인되었다.

틸라피아에 대한 공격 시험의 결과는 Table 12에 나타내었다. 10^4 , 10^3 및 10^2 TCID₅₀ ml⁻¹로 침지한 틸라피아에서는 폐사가 나타나지 않았지만 체내에서 바이러스를 재분리할 수 있었으므로 틸라피아가 이 바이러스에 대해 감수성을 가지는 것으로 생각되었다.

시험에 사용한 모든 어체의 폐사어에서 가물치 자어 rhabdovirus isolate를 재분리 할 수 있었으나 세균등 다른 병원체는 검출되지 않았다.

Table 10. Pathogenicity of SKR-3 on the snakehead fish, *Ophicephalus argus* by immersion infection

Total Length (cm)	Dosage (TCID ₅₀ / ml)	No. of tested fish	No. of died fish	Mortality (%)	Test period (days)
3±1	10 ⁴	10	10	100	14
Control ^a	-	10	0	0	14

Fish was infected by immersion method at 28 ± 1 °C.

^a, Challenged with only MEM.

Table 11. Pathogenicity of SKR-3 on the snakehead fish, *Ophicephalus argus* by intraperitoneal injection

Total Length (cm)	Dosage (TCID ₅₀ / g fish)	No. of tested fish	No. of died fish	Mortality (%)	Test period (days)
20±5	10 ³	5	0	0	14
	10 ⁵	5	0	0	14
Control ^a	-	5	0	0	14

Fish was injected intraperitoneally at 28 ± 1 °C.

^a, Challenged with only MEM.

Table 12. Pathogenicity of SKR-3 on the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* challenged by immersion infection with the viral titer of 10^2 , 10^3 , 10^4 , TCID₅₀ ml⁻¹

Immersion dosage (TCID ₅₀ ml ⁻¹)	No. of tested fish	No. of died fish	Mortality (%)	Test period (days)
SKR-3 10^2	10	0	0	14
10^3	10	0	0	14
10^4	10	0	0	14
Control ^a	10	0	0	14

^a, Immersion with only MEM.

Fish was infected by immersion method at 28 ± 1 °C.



Fig. 7. The clinical signs of the artificially infected snakehead fish, *Ophicephalus argus* with SKR-3 by immersion infection at 28 °C.

IV. 고 찰

본 연구에서는 가물치 종묘 생산 과정에서 대량 폐사가 일어난 가물치 자어에서 분리한 rhabdovirus isolates에 대하여 여러 가지 바이러스학적 특성을 조사하였다. 그 내용은 가물치 자어 rhabdovirus isolates의 배양 성상, 물리화학적 성상, 구조 단백질의 구성, 중화 항체 시험 등과 같은 바이러스학적 특성을 비롯하여 가물치에 대한 바이러스의 병원성을 가물치 크기에 따라 시험하였고, 틸라피아를 이용하여 어종에 따른 병원성을 시험하였다. 그리고 유전자 특성에 대하여 조사하였지만, 본 분리 바이러스에 맞는 primer를 찾을 수 없어 유전자 배열을 밝혀내지는 못하였다.

가물치에서 분리되는 rhabdovirus는 UDRV와 SHRV의 두 종류가 알려져 있다. 두 바이러스는 전자 현미경 관찰에서 형태의 차이가 나타난다. 즉, SHRV는 양끝이 모두 둥근 형태인 bacilliform 이며, UDRV의 경우 한쪽은 둥글고 밑바닥은 평평한 전형적인 탄환모양의 rhabdovirus이다 (Lio-Po et al., 2000). 본 연구에서 사용한 rhabdovirus isolates의 전자 현미경적 관찰에서는 UDRV를 비롯한 다른 어류 유래 rhabdovirus와 비슷한 모양의 전형적인 탄환 모양인 것으로 관찰되었다.

그리고 이들 바이러스에 대해 감수성이 있는 어류 주화세포에도 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 먼저 UDRV의 경우 Atlantic salmon (AS), BF-2, FHM, Striped snakehead (SSN-1), Blotched snakehead (BSN), Red snakehead (RSN), 그리고 Climbing perch (CP) cell lines에서 감수성을 나타냈지만, CHSE-214, RTG-2, EPC, Nile tilapia (ONP), Grass carp (GCP) cell lines에서는 감수성을 나타내지 않는 것으로 밝혀져 있다 (Frerichs et al., 1989). 또 하나의 가물치 유

래 rhabdovirus인 SHRV는 SSN-1, RSN, Snakeskin gourami (SGP), Snakeskin gourami from the same batch of fish as SGP (SGP-2), CP, BF-2, AS, EPC cell lines에서 감수성이 있는 것으로 알려져 있다 (Lilley et al., 1994). 그리고 이들 주화세포에 대한 감수성에 상당한 차이가 있는 것으로 보고되어 있다. 예를 들면 UDRV의 경우 Lio-Po et al. (2000)의 경우 BF-2 cell line에서 10^6 TCID₅₀ ml⁻¹으로 높았고, CHSE-214 cell line에서도 10^3 TCID₅₀ ml⁻¹의 감수성을 가지는 것으로 보고한 반면, Frerichs et al. (1989)은 BF-2 cell line에서 10^4 TCID₅₀ ml⁻¹의 감수성을 가진다고 하였고, CHSE-214 cell line에서는 감수성을 나타내지 않는다고 보고하였다. 이와 같이 세포에 대한 감수성은 바이러스 isolates에 따라 다소 차이가 있는 것으로 생각된다. 본 연구에서 분리한 가물치 자어 rhabdovirus isolates는 EPC cell line에서 감수성이 $10^{7.0}$ TCID₅₀ ml⁻¹으로 매우 높았고, 다음으로 CHSE-214 cell line에서 $10^{4.5}$ TCID₅₀ ml⁻¹으로 나타났으며, FHM에서는 감수성이 없는 것으로 조사되었다.

Lio-Po et al. (2000)에 따르면 가물치에서 분리한 rhabdovirus는 지질 용매, 강알칼리 조건 및 56 °C 이상의 고온에서는 쉽게 불활화되지만, 강산성 (pH 3)에서는 안정하다고 하였다. 본 연구에서 사용한 가물치 자어 rhabdovirus isolates도 물리화학적 성상에서 이와 유사한 성질을 나타내었다. 본 연구에서는 지질 용매와 56 °C의 고온에서 쉽게 불활화되었지만, 강산성 (pH 3)과 알칼리 조건 (pH 8, 9, 10)에서도 불활화되는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만 대부분의 rhabdovirus가 산성 상태 (pH 3)에서는 불활화된다고 보고되어 있다 (Ahne et al., 1989).

대부분의 어류 rhabdovirus인 VHSV, IHNV 및 HRV 등은 냉수성 어류에서 분리되어 성장 적온이 20 °C 이하인 것으로 알려져 있고, 그 외에 SVCV, PFRV, UDRV 및 SHRV와 같은 온수성 어류 유래 rhabdovirus는 20 °C 이상에

서 잘 증식한다고 알려져 있다 (Ahne et al., 1989). 하지만 Kasornchandra et al. (1992)와 Lio-Po et al. (2000)의 연구에 따르면 가물치에서 분리한 UDRV를 SHS cell line에 배양하면 15 °C ~ 37 °C에서 증식하고 15 °C ~ 30 °C에서 잘 자라고 15 °C에서 가장 잘 자란다고 하였다. 이때의 SHS cell line에서의 virus titer는 10^7 TCID₅₀ ml⁻¹이었다. 이와 유사하게 본 연구의 EPC cell line에서 배양 특성은 20 °C와 25 °C에서 가장 잘 자랐으나, 30 °C와 32 °C에서는 잘 증식하지 못했으며 15 °C에서는 증식을 하지 못하였다. 25 °C에서의 EPC cell line에서의 virus titer는 10^7 TCID₅₀ ml⁻¹이었다. 이를 통해 가물치 자어 rhabdovirus isolate 가 온도 의존성 증식을 하는 것으로 조사되었다.

Johnson et al. (1999)은 warm water fish rhabdovirus인 SHRV의 G protein 의 특성에 관한 연구에서 SHRV가 Novirhabdoviruses인 VHSV, IHNV, HIRRV 와 가장 유사한 amino acid 배열을 보고하였다. 그리고 SHRV의 G gene을 이용한 phylogenetic tree를 분석하여 Novirhabdovirus genus에 속한다고 보고하였다. 하지만 가물치의 다른 rhabdovirus인 UDRV의 유전자에 대한 연구 결과는 아직 보고된 것이 없다. 따라서 본 연구에서는 분리한 가물치 자어 rhabdovirus isolates를 유전학적으로 연구하기 위하여 SHRV의 G protein gene 을 이용하여 제작된 primer로써 RT-PCR을 실시하였지만 SHRV의 gene은 우리가 보고한 rhabdovirus isolates와 일치하지 않아서 band를 확인할 수 없었다. 그리고 다른 warm water fish rhabdovirus인 SVCV의 G protein gene을 이용하여 제작된 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시하였지만 역시 band를 확인할 수 없었다. 위와 같은 결과를 통해 본 연구에서 분리한 가물치 자어 rhabdovirus isolates는 지금까지 보고된 rhabdovirus와 유전적으로 차이가 있는 rhabdovirus 로 생각된다.

가물치 rhabdovirus는 5개의 구조 단백질로 이루어져 있는데 RNA

dependent RNA polymerase (L), transmembrane envelope glycoprotein (G), nucleocapsid protein (N), matrix protein M1과 M2로 구성된다 (Wagner et al., 1972; Lenoir & de Kinkelin 1975; McAllister & Wagner 1975; Kasornchandra et al., 1992; Lilley et al., 1994). 가물치 rhabdovirus에 대한 구조 단백질의 분자량은 연구자나 종류에 따라 분자량이 약간씩 차이가 있다. 각각의 구조 단백질에 대한 분자량은 UDRV의 경우 G, N, M protein이 각각 71, 53, 22 kDa의 구조 단백질을 가지는 것으로 연구되어 있고 (Kasornchandra et al., 1992; Lilley et al., 1994), SHRV는 G, N, M1, M2가 각각 68, 42, 26.5, 20 kDa으로 구성되며 이것은 67, 40.5, 28, 22.5, kDa를 나타내는 IHNV, 72, 42, 26.5, 22 kDa를 나타내는 VHSV, 60, 40.5, 28, 22.5 kDa를 나타내는 HIRRV와 유사한 구조 단백질 형태를 나타낸다고 알려져 있다 (Wagner et al., 1972; Lenoir & de Kinkelin 1975; McAllister & Wagner 1975; Kasornchandra et al., 1992; Isshiki et al., 2001). 본 연구에서는 가물치 자어에서 분리되는 rhabdovirus isolates의 구조 단백질의 전기 영동상을 조사한 결과 12 % SDS gel 상에서 G, N, M1 및 M2는 각각 80, 50, 38, 28 kDa 정도인 것으로 확인되었으며 가물치에서 분리한 rhabdovirus isolates 사이에는 차이가 없이 모두 동일한 profile임을 확인할 수 있었다. 그리고 구조 단백질이 다른 가물치 rhabdoviruses인 UDRV, SHRV 뿐만 아니라 어류 rhabdovirus와 크기에서 차이가 있음을 알 수 있다. 위와 같이 구조 단백질 분석을 통해 본 연구에서 사용한 가물치 자어 rhabdovirus isolates가 다른 종류의 rhabdovirus일 것으로 추정된다.

Frerichs et al. (1989)과 Lilley et al. (1994)은 UDRV와 다른 Family Rhabdoviridae에 속하는 바이러스인 VHSV, IHNV, SVCV, RFRV, EVA, EVX, Perch Rhabdovirus (PRV)에 대한 중화 항체에 대해 보고하였다. 이들 바이러스에서는 모두 교차 반응이 일어나지 않았다. 본 연구에서도 VHSV, IHNV,

HIRRV에 대해 교차 반응이 일어나지 않았고 가물치 자어 rhabdovirus isolates에 대해서 비교적 높은 중화 항체가를 나타내었다. 하지만 이것이 실제로 가물치에 대해서 특히 자어기에 rhabdovirus에 대한 protection에 관여할 지에 대해서는 검토가 필요하다.

EUS와 관련하여 보고된 바이러스성 질병은 cold-water disease (Lio-Po et al., 2000)로 10월부터 3월까지 발병하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 분리된 바이러스는 25 °C ~ 30 °C 사이의 비교적 높은 수온에서 발병하여 분리되었으며, 바이러스 증식도 20 °C와 25 °C에서 가장 활발하였으며, 15 °C에서는 거의 증식을 하지 못하였다. 병원성도 이와 유사한 온도에서 가장 높을 것으로 여겨지며, 28 °C에서 실시한 가물치에 대한 병원성 시험에서 가물치 치어 (30~40 일령)에서 100 %의 폐사를 유발하며 병원성이 있는 것으로 확인할 수 있었다. 하지만 3~4 월령의 가물치에서는 폐사를 일으키지 못했다. 하지만 바이러스는 재분리되었기 때문에 불현성 감염 상태로 존재한다고 볼 수 있어 질병을 유발할 수 있을 것으로 생각된다. 그리고 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus*를 이용한 병원성 시험에서도 폐사를 유발하지 않지만 불현성 감염 상태를 유지하는 것으로 조사되었다. 하지만 Lio-Po et al. (2000)의 연구에서는 EUS에 감염된 snakehead fish, *Ophicephalus striatus*에서 분리한 UDRV의 병원성 시험에서는 병원성을 나타내지 못한다고 보고하였으며, 특히 EUS 감염에서 분리된 virus 등이 병원성과 관련하여 보고된 적은 없다.

위와 같은 결과들을 토대로 분석한 결과 본 연구에서 분리한 가물치 자어 rhabdovirus isolates는 가물치에서 보고되어 있는 UDRV, SHRV 및 보고되어 있는 어류 rhabdovirus와는 다른 Family Rhabdoviridae에 속하는 새로운 virus로 생각되며, 이 바이러스에 대한 유전자 연구가 더 필요할 것으로 여겨진다.

V. 요약

2003년 5-6월에 걸쳐 가물치, *Ophicephalus argus*가 종묘 생산 과정에서 가슴 지느러미 백탁과 아가미 부위 발적을 특징으로 하는 질병이 발생하여 대량 폐사를 유발하였다. 가물치 자어에 대량 폐사를 일으킨 질병의 원인체를 밝히기 위해 여러 가지 진단법을 사용하여 4개의 rhabdovirus isolates를 분리하였다.

본 연구에서 원인체로 밝힌 가물치 자어 rhabdovirus isolates의 특성을 조사하기 위하여 다음과 같은 연구를 수행하였다. rhabdovirus isolates는 바이러스 입자의 전자현미경 관찰, 물리 화학적 성상 연구, SDS-PAGE를 통한 구조 단백질 분석 및 인위 감염 시험에 의한 병원성 시험 등을 실시하였다.

본 시험에서 분리된 가물치 자어 rhabdovirus isolates는 총알 모양의 rhabdovirus로 EPC, CHSE-214 cell lines에 감수성을 가지고, EPC cell line에서 25 °C에 10^7 TCID₅₀ ml⁻¹의 역가를 가졌으며, 20와 25 °C에서 가장 잘 증식하지만 15 °C에서는 거의 증식하지 못하였다. 그러나 FHM cell line에서는 증식하지 않았다.

물리 화학적 특성 조사 결과 56 °C에서 불활화되어 열에 불안정하고 pH 7.2에서 가장 높은 역가를 나타냈으며 알칼리 상태에서보다는 산성 상태에서 더 안정한 RNA virus임을 알 수 있었다.

구조 단백질 분석 결과, 본 rhabdovirus isolates가 모두 동일한 바이러스라는 것을 알 수 있었고 VHSV, IHNV 및 HIRRV와 같은 다른 어류 rhabdovirus와 비교하였을 때 profiles에서 차이가 나는 것을 알았다. 본 rhabdovirus isolates 중 대표주로 선정된 isolate (SKR-3)의 항혈청을 이용한 중화 항체 시험 결과 다른 rhabdovirus와 교차 반응을 확인할 수 없었다.

가물치를 이용한 병원성 시험을 통해 본 rhabdovirus isolates가 자어기의 가물치에는 병원성이 나타났으며 그 이후에는 불현성 감염 상태로 존재하는 것을 알 수 있었다. 그리고 다른 담수 어종인 틸라피아, *Oreochromis niloticus*에 대해서도 병원성을 나타내지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 본 연구에서 분리한 가물치 자어의 rhabdovirus isolates는 가물치 자어기에 병원성을 나타내는 새로운 rhabdovirus로 판단된다.

VI. 감사의 글

제가 이 논문을 쓸 수 있게 지금까지 많은 관심과 사랑으로 지도해주신 박수일 교수님께 감사드립니다. 바쁘신 와중에도 논문을 지도해주신 정준기 교수님과 정현도 교수님께 감사드립니다. 그리고 항상 관심 가져 주신 허민도 교수님, 김기홍 교수님, 강주찬 교수님께 감사드립니다.

국립수산과학원 병리연구과 김진우 과장님과 김이청 연구관님, 그리고 늘 관심을 보내주시던 최혜승, 이주석, 지보영 연구사님과 함께 동해수산연구소 방종득 과장님, 권문경 연구사님, 진해 내수면 연구소의 조미영 연구사님께 감사드립니다. 어려운 시기에 항상 격려를 해주신 수산 기술관리소의 이재일, 박헌식, 황미혜 선배님, 국립수산물품질검사원에서 일하면서도 항상 관심을 가져주셨던 이상운, 손영찬, 강민진, 성명희 선배님께 감사드립니다.

실험실에서 지금까지 부족한 저를 지도하시느라 고생하신 김수미 박사님께 정말 감사드립니다. 저에게 학부 때부터 많은 실험을 가르쳐 주신 원경미 선배님, 실험실의 큰오빠로 항상 버팀목이 되어주신 이덕찬 선배님, 우승호 선배님, 멀리 외국에서 저를 격려해주셨던 김도형 선배님, 이진희 선배님, 한현자 선배님, 지금은 한국에 계신 박찬일 선배님과 저에게 항상 관심을 가져 주셨던 인천해양과학고등학교의 이창훈 선생님께 감사드립니다. 그리고 저와 함께 힘든 시기를 함께 했던 최현숙 선배님과 김현정 학형님, 이찬열, 최광진 선배님, 김은전, 오영은, 최정현, 손새봄, 김윤희, 정영은, 김유정 후배님께 감사드립니다.

함께 생활하지는 않았지만, 밖에서 힘들어하던 저를 격려해주던 우리 동기 김진희, 장연화 학형님께 감사드리고, 대학원 과정을 함께한 김영화, 이대심, 이은혜, 송승엽, 최혜정 학형님과 우리 98 동기들 모두 감사드립니다. 그리고 저의 항상 큰 힘이 되어주던 친구 이사내에게도 감사의 말을 전합니다.

마지막으로 지금까지 올 수 있도록 저를 믿어주시고 힘든 일이 있을 때 버팀목이 되어주셨던 저의 아버지, 어머니 그리고 저의 언니에게 진심으로 감사드립니다.

VII. 참고 문헌

- Ahne W. and E. Kurstak (1989). Viruses of Lower Vertebrates. Springer-Verlag pp:317-332.
- Bjorkulund Harry V., Keith H. Higman and Gael Kurath (1996). The glycoprotein genes and gene junctions of the fish rhabdoviruses spring viremia of carp virus and hirame rhabdovirus : analysis of relationships with other rhabdoviruses. Virus Research 42:65-80.
- Essbauer S. and W. Ahne (2001). Viruses of Lower Vertebrates. Journal of Veterinary Medicine Series B 48:403-475.
- Feldman H. and S. Wang (1961). Sensitivity of varoius viruses to chloroform. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 106:736-738.
- Fijan N., D. Sulimanvic, M. Bearzotti, D. Muzinic, L. O. Zwillnberg, S. Chilmoneczk, J. F. Vautherot and P. de Kinkelin (1983). Some properties of the *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. Annual of Virology (Inst. Pasteur) 134 E:207-220.
- Frerichs G. N., S. D. Millar and R. J. Roberts (1986). Ulcerative rhabdovirus in fish in South-East Asia. Nature 17:322.
- Frerichs G. N., B. J. Hill and K. way (1989). Ulcerative disease rhabdovirus: cell-line susceptibility and serological comparison with other fish rhabdoviruses. Journal of Fish Diseases 12:51-56.
- Frerichs G. N., S. D. Millar and Supranee Chinabut (1993). Clinical response

- of snakeheads (*Ophicephalus striatus*) to experimental infection with snakehead fish rhabdovirus and snakehead cell line retrovirus. *Aquaculture* 116:297-301.
- Fryer J. L., A. Yushua and K. S. Pilcher (1965). The in vitro cultivation of tissue and cells of Pacific salmon and steelhead trout. *Annals of the New York Academy of Sciences* 126:566-586.
- Gravell M. and R. G. Malsberger (1965). A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Annals of the New York Academy of Sciences* 126:555-565.
- Hedrick RP., W. D. Eaton, J. L. Fryer, W. G. Groberg and S. Boonyaratpalin (1986). Characteristics of a birnavirus isolated from cultured sand goby *Oxyeleotris marmoratus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 1:219-225.
- Isshiki Tadashi, Toyohiko Nishizawa, Tatsuya Kobayashi, Taizou Nagano and Teruo Miyazaki (2001). An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Diseases of Aquatic Organisms* 47:87-99.
- Johnson Mare C., Joseph M. Maxwell, Philip C. Loh and Jo-Ann C. Leong (1999). Molecular characterization of the glycoproteins from two warm water rhabdoviruses : snakehead rhabdovirus (SHRV) and rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS) / spring viremia of carp virus (SVCV). *Virus Research* 64:95-106.
- John, K. Riji, M. Rosalind George, R. H. Richards and G. N. Frerichs (2001). Characteristics of a new reovirus isolated from epizootic ulcerative syndrome infected snakehead fish. *Diseases of Aquatic Organisms*

46:83-92.

- Kasornchandra J., C. N. Lannan, J. S. Rohovec and J. L. Fryer (1991). Characterization of a rhabdovirus isolated from the snakehead fishes (*Ophicephalus striatus*). In: Fryer JL (ed) Proceedings from the Second International Symposium of Viruses of Lower Vertebrates. Oregon State University Press, Corvallis, Oregon, p 175-182.
- Kasonchandra J., H. M. Engelking, C. N. Lannan, J. S. Rohovec and J. L. Fryer (1992). Characteristics of three rhabdoviruses from snakehead fish *Ophicephalus striatus*. Diseases of Aquatic Organisms 13:89-94.
- Kasornchandra, J., P. Caswell-Reno, C. N. Lannan and J. L. Fryer (1992). Development and Characterization of Monoclonal Antibodies against the Snakehead Rhabdovirus. Journal of Aquatic Animal Health 4:286-291.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Lenoir G. and de Kinkelin P. (1975). Fish rhabdoviruses: comparative study of protein structure. Journal of Virology 16:259-262.
- Lilley J. H. and G. N. Frerichs (1994). Comparison of rhabdoviruses associated with epizootic ulcerative syndrome (EUS) with respect to their structural proteins, cytopathology and serology. Journal of Fish Diseases 17:513-522.
- Lio-Po G. D., Garth S. Traxler, Lawrence J. Albright and Eduardo M. Leano (2000). Characterization of a virus obtained from snakeheads *Ophicephalus striatus* with epizootic ulcerative syndrome (EUS) in the Philippines. Diseases of Aquatic Organisms 43:191-198.

- McAllister P. E. and Wagner R. R. (1975). Structural proteins of two salmonid rhabdoviruses. *Journal of Virology* 15:733-738.
- Nishizawa T., M. Yoshimizu, J. R. Winton and T. Kimura (1991). Comparison of genome size and synthesis of structural proteins of hirame rhabdovirus, infectious hematopoietic necrosis virus, and viral hemorrhagic septicemia virus. *Fish Pathology* 26:77-81.
- Okamoto N., T. Sano, R. P. Hedrick and J. L. Fryer (1983). Antigenic relationship of selected strains of infectious pancreatic necrosis virus and European eel virus. *Journal of Fish Diseases* 6:19-25.
- van Regenmortel, M. H. V., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle and R. B. Wickner (2000). *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, New York, NY.
- Roberts R. J., G. N. Frerichs, K. Tonguthai and S. Chinabut (1994). Epizootic ulcerative syndrome of farmed and wild fishes. In: Muir JF, Roberts RJ (eds) *Recent advances in aquaculture, Vol 5*. Blackwell Science, Oxford. p207-239.
- Rovozzo G. C. and C. N. Burke (1973). *A manual of basic virological techniques*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
- Stone D. M., W. Ahne, K. L. Denham, P. E. Dixon, C. T.-Y. Liu, A. M. Sheppard, G. R. Taylor and K. Way (2003). Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups. *Diseases of*

Aquatic Organisms 53:203-210.

Wagner R. R., Prevec L., Brown F., Summers D. F., Sokol F. and MacLeod R. (1972). Classification of rhabdovirus proteins: a proposal. Journal of Virology 10:1228-1230.

Wattanavijarn W., J. Tangtronpiros and K. Wattanadorn (1986a). Viruses of ulcerative diseased fish in Thailand, Burma, and Laos. In : First International Conference on the Impact of Viral Diseases on the Development of Aisan Countries. WHO. (Abstract) p. 121.

Wattanavijarn W., S. Wattanodorn, P. Hunnak, J. Tangtrongpiros and R. Rattanaphani (1986b). Viruses of ulcerative diseased fish. Electron Microscopy Society 3:20-23.

Wolf K. and M. C. Quimby (1966). Lymphocystis virus isolation and propagation in centrachid fish cell lines. Science 151:1004-1005.

김봉석, 이택열, 이훈구 (1991). 자연 감염된 출혈성 궤양증 양식가물치의 병리 조직학적 연구. 한국수산학회 1991년도 추계학술발표회.

김영자, 성희경, 이훈구, 박이현, 조극래 (1990). *Edwardsiella tarda*에 의한 가물치 복수증에 관한 연구. 한국수산학회지 23:353-360.

장계남 (1993). 담수어 양식. 오성출판사 107-146.

전순배, 배석, 민홍규 (1991). 가물치 양식어장에서 진균성새병과 관련된 *Saprolegnia diclina* 의 발생상황. 한국어병학회지 4:95-99.