

이학석사 학위논문

우리나라의 담수관상어에서 분리된
iridovirus의 특성

지도교수 정 현 도

이 논문을 이학석사 학위논문으로 출함



2005년 2월

부경대학교 대학원

어 병 학 과

김 호 열

김호열의 이학석사 학위논문을 인준함

2004년 12월 23일

주 심 약 학 박 사 정 준 기



위 원 농 학 박 사 허 민 도



위 원 이 학 박 사 정 현 도



목 차

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. Fish strain	4
1-1. Fish of iridovirus infection	4
1-2. 조직 병리학적 분석	4
2. PCR test	5
2-1. Primer 제작	5
2-2. Viral nucleic acids 분리	7
2-3 PCR amplification	8
3. Cloning	9
3-1. Gel elution	9
3-2. Cloning	10
3-3. Plasmid 분리	11
4. 염기서열 분석	12
5. FOV 감염 분포 조사	12
6. Challenge test	13
6-1. Virus strain	13
6-2. 실험어	13
6-3. 반수 치사 농도(LD ₅₀)	14

6-4. Cross challenge test	14
III. 결 과	15
1. Pearl gourami의 조직 병리학적 소견	15
2. Virus의 염기서열 비교	17
2-1. PCR 결과	17
2-2. 염기서열 비교	19
3. 담수관상어의 iridovirus 감염 분포 조사	30
3-1. 분기 및 지역별 pearl gourami의 iridovirus 분포 조사	30
3-2. 지역 및 어종별 iridovirus 감염 조사	32
4. 감수성 test	35
4-1. 만수 치사 농도	35
4-2. 담수관상어의 감수성 test	38
4-3. 해산어에 대한 감수성 test	38
4-4. 담수관상어에 대한 RSIV Sachun의 감수성 test	38
5. FOV 감염어의 조직병리학적 비교	42
6. RSIV Sachun 감염어의 조직병리학적 비교	46
IV. 고 찰	48
V. 요 약	56
V. 감사의 글	57
VI. 참고 문헌	58

Iridovirus isolated from the ornamental fishes in Korea

Ho youl Kim

Department of Fish Pathology, Graduate School

Pukyong National University

Abstract

In the survey of the samples infected by iridovirus, we found the natural outbreak of iridovirus disease in the ornamental fish, pearl gourami, *Trichogaster leeri*, in Korea. It was characterized by the appearance of enlarged cells and necrosis in the observation of the imprinted spleen cells under iridovirus. These pathological change was similar to the typical iridoviral disease signs reported previously in other laboratories. To determine the infection of iridovirus more accurately, PCR using 3 different primer sets for MCP, ATPase gene and ORF(open reading frame) 23 gene used for the diagnosis of iridovirus infection was done and found the produced fragments matched with the size of expectation. Cloned amplicons derived from the MCP gene and ATPase gene were sequenced and compared with those of other iridovirus strains. Partially determined nucleotide sequences of the MCP gene of the iridovirus isolated in this study was

appeared to be higher homology(99%) compared with that of ATPase gene(99%) using the nucleotide sequences of ISKNV as a reference sequences. We found the presence of iridovirus in 45 out of 63 fish samples of four different geographical source. Certainly, it is the first report of high level of iridovirus infection in various ornamental fishes. The purpose of this study was to evaluate the feasibility of monitoring freshwater ornamental fish viral contamination and obtaining viral contamination data over a period of a year for the main pathogenic iridoviruses.

In challenge experiment with the iridovirus isolated from the moribund of pearl gourami, it was confirmed that both freshwater fishes and marine fishes are susceptible and suggested the potential of the risk associated the transfer of iridovirus from the ornamental fishes to the marine culturing fishes

I. 서론

현재 국내 수산업의 대부분은 해산어를 대상으로 하고 있으며, 이에 대한 질병 연구도 활발히 진행되고 있다. 그러나 관상어를 비롯한 담수어에 대한 연구는 지극히 미비한 실정이며, 담수어에서 해산어로의 질병 전염의 가능성도 배제할 수 없다. 특히, 바이러스성 질병에 대한 연구는 해산어종들에서만 집중적으로 이루어지고 있으며, 최근 중국어나 일본 등으로부터의 수산물 수입에 따른 규제 대상 질병들에 대한 연구도 체계적으로 실행되고 있지만, 수입되는 관상용 열대 담수어종에 대해서는 질병에 대한 조사는 전무한 상황이다. 또한, 대형 할인마트, 수족관, 아쿠아리움 등의 증가와 더불어 그에 따른 관상어의 수요도 많아지게 되었고, 높은 가격의 어종들이 대부분인데 비해서, 질병에 의한 폐사가 발생했을 때 전문적인 연구에 의한 진단이나 대책 마련에 있어서는 매우 열악한 조건하에 있다. 그러므로 관상용 열대어에 대한 진단 및 질병 대책 마련은 매우 시급한 사안이라 할 수 있다.

국내의 양식 해산어에서 많은 피해를 입히고 있는 대표적인 바이러스성 질병은 iridovirus의 한 종인 red sea bream iridovirus (RSIV)라는 원인체에 의한 red sea bream iridoviral disease (RSIVD)로서 매우 급성적이고, 전염성이 강한 어류 질병으로 밝혀져 있다 (Inouye et al, 1992). 이러한 iridovirus의 분자생물학적인 진단을 위한 DNA fragment에 대한 분석은 상당 부분 연구되어 있으며, 진단을 위한 PCR 기법의 도입 또한 비교적 높은 수준으로 이미 개발되어 있다 (Tamai et al, 1997; Rodger et

al, 1997; Jeong et al, 2003). 또한 최근에 와서 MCP 유전자를 비롯한 전체유전자 map은 lymphocystis disease virus-1 (LCDV-1), RSIV, infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) 등 몇 가지의 iridoviruses에 대해서 밝혀져 있다 (Tidona&Darai 1997; He et al, 2001).

Sudthongkong et al. (2001)은 일본의 Dwarf gourami(*Colisa lalia*)와 African lampeye(*Aplocheilichthys normani*)를 대상으로 iridovirus의 병원성 실험을 보고한 바 있다. 이스라엘의 담수관상어 iridovirus에 대한 보고는 Paperna et al. (2002)에 의하여 이루어 졌는데 이들은 이스라엘의 gourami와 swordtail, platy, molie, scalare등의 여러 담수관상어에서 발생한 iridovirus를 전자현미경적으로 관찰하여 보고하였다. 이러한 외국의 담수관상어의 iridovirus 감염증에 대한 피해 보고에도 불구하고 우리나라의 담수관상어에 대한 iridovirus 감염증에 대한 연구 및 보고는 전무한 실정이다. 특히 우리나라의 담수관상어 시장은 동남아시아의 싱가포르에서 90%가량을 수입하고 있으며, 최근에는 중국에서도 담수관상어의 수입이 증대되고 있다.

최근 국내에서 유통되는 관상용 열대어의 대부분은 수입에 의존하고 있으며, 싱가포르를 비롯한 여러 나라에서 다양한 어종들이 질병 감염 상황에 대한 아무런 정보도 없이 국내로 유입되고 있다. 그러므로 위와 같은 해외의 담수어 iridovirus 감염 상황과 국내의 부분별한 관상어 수입 실태를 미루어 볼 때, 국내의 관상어에서도 상당한 수가 iridovirus에 감염되어 있을 거라고 추정되며, 이에 대한 iridovirus의 감염 분포를 파악하는

것이 우선적으로 실시되어야 할 것이다.

또한 최근의 RSIV간의 특성 비교 연구를 보면 1997년 Dr. Miyata (일본 Mie 대학)등이 대만의 농어, 홍콩의 점농어, 그리고 일본의 돌돔에서 분리한 iridoviruses의 genome을 제한효소 절단조각의 크기를 비교한 결과 GL pattern이 매우 유사하여 single origin에 대한 가능성을 제시하였다. 그러나 여러 다른 지역의 해산어에서 분리한 iridovirus virion들이 크기 등에서 모두 차이가 있는 것으로 알려져 있으며 (Hyatt et al, 2000), 담수어에서 나타나는 iridovirus는 해산어 iridovirus와 비교해볼 때, 더욱 많은 변이를 가지고 있을 거라고 추정된다.

본 연구에서는 i) 부산의 관상어도매상을 통해 담수관상어의 iridovirus 감염을 조직 병리학적으로 추정 진단 하였으며, ii) PCR기법과 virus DNA의 sequence를 통하여 iridovirus 감염을 확정 진단 하였다. 그리고 iii) 담수관상어를 대상으로 1년간 iridovirus 감염을 시기별, 지역별, 어종별로 조사하였으며, iv) 실험을 통해 분리한 담수관상어 iridovirus(FOV)와 해산어 iridovirus인 RSIV Sachun을 각각 담수관상어와 해산어에 공격실험을 하여, 각 virus strain에 대한 어류의 감수성 및 병원성을 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. Fish strain

1-1. Fish of Iridovirus infection

실험에 사용한 virus strains은 2004년 1월에 대가로 관상어 도매상에서 의뢰를 받은 담수관상어인 pearl gourami(*Trichogaster leerii*)를 사용하였다. 부화한지 3~5개월 가량된 치어로써 어체의 무게는 평균 4.5g(± 2)였으며, 어체의 길이는 전장 6cm(± 1)였다.

iridovirus의 감염을 조직 병리학적으로 관찰한 것으로 전형적인 iridovirus 감염증상을 보였으며(Oshima et al. 1996), Pearl Gourami(*Trichogaster leerii*)의 비장 및 신장에서 분리 하여 실험에 사용하였다.

1-2. 조직 병리학적 분석

관상어 도매상에서 의뢰 받은 pearl gourami(*Trichogaster leerii*)의 비장 조직을 slide glass에 imprinted하여 diff-quick(國制施藥株式會社-일본)으로 세포를 염색하여 광학현미경으로 비정형거대세포를 관찰하였다.

장기를 분리하여 약 5mm의 두께로 잘라 부완액(Bouin's solution), 10%중성 포르말린(BNF), zenker solution에 1차 고정하고, 24시간 동고정액에 2차 고정을 실시하였다. 2차 고정 후 24시간에 수세하고, 70%에서 100% 순차 농도 알코올에 탈수를 하였다. 자일렌(xylene) 투명화를 하여 파라핀 진화를 시키고, 파라핀 포매 후

microtome (Reichert-Jung 820, Leica)을 사용하여 약 $5\mu\text{m}$ 두께의 박편을 얻었다. 이를 H & E 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

2. PCR

2-1 Primer 제작

GenBank에 등록되어 있는 ISKNV 및 RSIV의 MCP gene, ATPase gene 등을 기초로 제작된 2개의 primer sets는 이전의 연구에서 ISKNV 및 RSIV를 검출하는데 사용되었으며 (Oshima et al. 1996, Kurita et al. 1998), 본 연구에서도 위와 같은 개의 primer sets를 사용하여, PCR amplification를 실시하였으며, RSIV Sachun과 FOV의 구별할 수 있는 primer를 임의로 제작하여, PCR amplification를 실시하였다 (Table 1).

Table 1. Expected size of the amplicons after PCR with different primers.

Genomic region	Primer	Oligonucleotide sequence (5' to 3' direction)	Expected size of amplicons	GenBank accession number	Reference
MCP gene	M1F	GCATGTATGCTGTTTAGACA	1830 bp	AB018418	Oshima et al. (1996)
	M1R	GAGCATCAAGCAGGCGATCT			
ATPase gene	A3F	CAAACCACAGCGCGCAAGT	563 bp	AB007367	Kurita et al. (1998)
	A3R	AGTAGCGCACCATGTCCTCC			
ORF23	S1F	GTGCACAGTCGCAATAC	1018 bp	AAL98747	In sturdy
	S1R	CCATCCTTTATAATAAACCAG			

2-2. Viral nucleic acids 분리

전형적인 iridovirus 감염증상을 보이는 어류의 비장 3mg을 PBS(phosphate buffer saline) buffer 380 μ l에 넣어 homogenizer로 조직을 분쇄하여, 20% SDS 10 μ l, 10mg/ml proteinase K 10 μ l를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 반응 시켰다. 위의 lysates에 동량의 phenol chloroform 400 μ l를 첨가하여 12,000RPM, 10분간 원심분리한 후, 상층의 DNA 용액을 새 microtube로 옮기는 과정을 2번 되풀이하여 DNA가 녹아 있는 수용액층을 단백질 성분과 분리하였다. 위의 상층의 DNA 용액에 2 volume ethanol과 0.3M sodium acetate를 넣고, inverting으로 혼합하여, -70℃에서 1시간동안 침전시켰다. 4℃, 12,000RPM, 10분간 원심 분리하여 상정액을 제거한 후, 70% ethanol 1ml를 첨가하여 다시 같은 방법으로 원심 분리하여 상정액을 제거하였다. DNA 침전물은 10분간 상온에서 자연 건조시켰으며, free RANase distilled water 50 μ l에 현탁 시켜서 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다.

2-3. PCR amplification

0.2ml의 microtube에 10mM Tris-HCL, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$, 0.0001% w/v gelatin, 0.5% Tween-20, 200uM 각각의 dNTP, 1uM 각각의 primer, 125U AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) 그리고 template DNA로써 추출한 viral nucleic acid 1ng을 첨가한 후, distilled water로 최종액 50 μ l가 되게 하였다. PCR 혼합물은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하여, 95 $^{\circ}C$ 에서 3분간 predenaturation 시킨 후, 95 $^{\circ}C$ 30초, 55 $^{\circ}C$ 30초, 72 $^{\circ}C$ 30초간 반응을 1cycle로 해서 30cycle을 반응시켰다. 그리고, cycle이 지난 뒤에는 72 $^{\circ}C$ 에서 7분간 extention time을 주었다.

PCR 생성물은 0.5 $\times$ TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA)에 담겨진, 0.5 μ l/ml EtBr (ethidium bromide)이 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기영동을 실시하여 UV(ultraviolet)에서 나타나는 band를 관찰하여 증폭 여부를 확인하였다.

3. Cloning

3-1. Gel elution

PCR 생성물을, Prep-A-Gene DNA purification kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 agarose gel로부터 분리·정제하였다.

먼저, 전기영동으로 확인된 DNA가 포함된 gel의 band를 절단하여 새 microtube에 옮긴 후, binding buffer(Cat. 732-6022) 500 μ l를 첨가하여 37℃에서 10분간 반응시켜 PCR 생성물이 들어있는 gel을 녹여 matrix(Cat. 732-6013) 15 μ l를 첨가하여 상온에서 5분간 반응시킨 후, 12,000 rpm, 1분간 원심 분리한다. Gel 성분이 포함된 상정액을 모두 제거하고, 다시 binding buffer(Cat. 732-6022) 375 μ l를 첨가하여, 같은 방법으로 원심분리하고, 상정액을 제거한다. 침전된 matrix에 washing buffer(Cat. 732-6024) 375 μ l를 첨가하여, 같은 방법으로 원심 분리하고 상정액을 제거하는 과정을 2회 거친 후, pellet을 실온에서 10분간 자연 건조시킨다. 건조시킨 침전물에 elution buffer 20 μ l를 첨가하여 현탁시킨 후, 37℃에서 10분간 반응시켰다. 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, DNA가 녹아 있는 상정액을 새 microtube로 옮겨, 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다.

3-2. Cloning

정제한 DNA를, TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 cloning시켰다. Elution 과정을 통해서 정제된 DNA 4 μ ℓ를 새 microtube로 옮긴 후, salt solution 1 μ ℓ, TOPO vector 1 μ ℓ, distilled water 4 μ ℓ를 첨가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 다음 competent cell (*E. coli* DH5 α -T1) 50 μ ℓ를 첨가하여 ice 내에서 20분간 반응시키고, 42℃에서 30초간 heat-shock 시켰다. 바로 ice에 2~3분간 반응 후 SOC 배지 250 μ ℓ 첨가하였으며, 다시 37℃에서 90분간 진탕 배양시켰다. 배양액을 X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, Sigma, USA) 40 μ g/ml과 Ampicillin 50 μ g/ml가 첨가된 Luria-Bertani 평판배지 (LB, Difco)에 도말하여, 37℃에서 24시간동안 배양시킨 후, 과란색과 흰색의 집락이 증식하는 것을 확인하고 흰색으로 나타나는 집락을 선택하였다.

3-3. Plasmid 분리

배양된 흰색의 집락을 취하여, Ampicillin이 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가된 LB broth (Difco)에 접종한 후 24시간동안 37°C 에서 배양하였다. 배양액 1.5ml 을 microtube에 옮기고, $12,000\text{ rpm}$, 4°C , 10분간 원심 분리하여 균을 모은 후, 상층의 배지 성분을 제거하였다. 균의 침전물에, $100\mu\text{l}$ ice-cold solution I (50mM glucose, 25mM Tris/Cl, pH 8.0, 10mM EDTA, pH 8.0)을 넣고, vortex를 사용하여 완전히 현탁시켰다. 현탁액에 $200\mu\text{l}$ 의 solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS)를 넣고, 5회 inverting하여 혼합한 후, ice에서 5분 동안 반응시켰다. $150\mu\text{l}$ ice-cold solution III (60ml 5M potassium acetate, 11.5 ml glacial acetic acid, 28.5ml distilled water)를 첨가하고, 5회 inverting 하여 혼합한 후, ice에서 5분간 반응시켰다. 반응액을 $12,000\text{ rpm}$, 4°C , 10분간 원심 분리하여 상층의 plasmid가 포함된 용액을 새 microtube에 옮겼다. Plasmid 용액에 동량의 Phenol : Chloroform : isoamylalcohol (24 : 25 : 1)을 넣고, vortex한 후, $12,000\text{ rpm}$, 4°C , 10분간 원심 분리하여, 상층의 DNA 용액을 새 microtube로 옮겼다. 2배 volume의 Ethanol과 0.3M Sodium acetate를 넣고, vortex로 혼합하여, -70°C 에서 1시간동안 침전시켰다. $12,000\text{ rpm}$, 4°C , 10분간 원심 분리하여 상정액을 완전히 제거한 후, washing 과정으로 70% Ethanol 1ml 을 첨가하고 $12,000\text{ rpm}$, 4°C , 10분 동안 원심 분리하여, 상정액을 완전히 제거한 후, 실온에서 10분간 자연 건조시켰다. 건조된 plasmid에 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase가 첨가된 TE buffer $50\mu\text{l}$ 를 넣어주어 pellet을 녹인 후, 사용 전까지 -20°C 에 보관하였다.

4. 염기 서열 분석

Big Dye Terminator Cycle DNA Sequencing Kit (ABI PRISM PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 분리된 plasmid 내에 insertion된 염기서열을 밝힌 후, 각각의 염기서열은 MACAW program (Version 2.0.5., National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 비교하였다. MCP gene의 염기서열을 토대로 Mega2 program (Version 2.3 R2., Based on CHAPM, USA)을 사용하여 계통수를 그렸다.

5. FOV 감염 분포 조사

2004년 한 해 동안 부산 시내 관상어 도매상을 대상으로 관상어를 대상으로 iridovirus의 감염 실태를 조사하였다 (Table 3). 실험어는 관상어 도매상에 도착 후 2일 이내 실험실에 가져와서 실험에 사용하였다.

first PCR test와 nested PCR test를 이용하여 iridovirus 감염을 조사하였으며, first PCR test에서 positive 반응을 나타내는 sample들은 모두 폐사가 일어난 것이며, 폐사어류 및 moribund stage에 있는 관상어로 test를 실시하였으며, 실험어는 한 group 당 10개체 이상을 실험하였으며, 한 group을 1회로 하여 한 group에 5마리 이상이 PCR test positive를 나타내면, 그 group은 positive로 계산 하였다. neted PCR test는 관상어 도매상에서 육안으로 관찰하여 이상이 없는 개체를 실험에 사용하였다. neted PCR test positive 반응을 나타내는 sample들은 한 group에서 2마리 이상 nested PCR positive 반응을 나타내는 것은 nested PCR positive로 기록을 하였다.

6. Challenge test

6-1. Virus strain

전형적인 iridovirus에 감염된 증상을 나타내는 pearl gourami(*Trichogaster leeri*)의 장기를 분리해 PCR test로써 iridovirus의 감염을 확인 한 후, 이 병어의 비장과 신장을 사용하였으며, 그 왜 기존에 있던 해산어 iridovirus strain 인 RSIV Sachun을 공격실험에 사용하였다.

6-2. 실험어

담수 실험어는 부산의 관상어도매상에서 건강한 어체를 구입하여 PCR test를 통해 negative 반응을 나타내는 것을 사용하였다. 해산어는 통영 및 거제도의 배양장에서 치어를 구입하여 PCR test를 거쳐 건강한 어체를 실험어로 사용하였다. 실험 전까지 모든 어체는 25℃를 유지하고, 1일 1회 사료를 주었다.

6-3. 반수 치사 농도(LD₅₀)

반수 치사 농도(LD₅₀)를 산출하기 위하여 모구 4개의 시험구를 설정하였으며, 시험에 사용한 virus 접종액은 1mg/ml, 10 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 0.001 μ g/ml의 량으로 15마리씩 pearl gourami(*Trichogaster leeri*)와 rock bream(*Oplegnathus fasciatus*)에 근육주사 하였다. 주사 후 14일 동안 5ℓ의 사육 수조 8개에 각각의 실험어를 순치하였으며, 사육수는 25℃(±0.5)를 실험이 끝날 때 까지 유지하였으며, 담수는 2~3일 수돗물을 폭기시켜 사용하였다. 사육하는 동안 사육수는 1일 1회 환수를 시켜주었으며, 환수 3시간 전에 사료를 경구 투여하였다. 실험하는 동안 감염증상을 보이는 어체 및 폐사어는 즉시 수조에서 제거하여, 실험에 사용하였다. LD₅₀은 14일 동안의 누적 폐사율을 기준으로 SPSSprogram(Version 10.0., SPSS Inc, USA) 을 사용하여 probit법으로 산출하였다.

6-4. Cross challenge 실험

위 농도별 공격실험을 기초로 pearl gourami에서 분리한 virus isolate를 담수관상어와 해산어에 10 μ g/ml의 농도로 근육주사 하였으며, 동량의 RSIV Sachun isolate를 담수관상어 및 해산어에 근육주사 하였다. 50ℓ의 사육 수조에 담수어와 해산어를 각각 순치하여 실험하였으며, 기타 조건은 위 농도별 실험과 동일하다.

III. 결과

1. 감염어의 병리 조직학적 소견

2004년 1월 관상어 도매상에서 의뢰 받은 pearl gourami(*Trichogaster leerii*)는 육안 적으로 체색 흑화를 나타내었다. 하지만 감염어에서 나타내는 비장 종대는 어체가 작을 뿐만 아니라, 비장의 크기 역시 작았기 때문에 정상 비장과 쉽게 구분 할 수 없었다. 분리 된 장기를 고정하여 광학현미경으로 관찰한 결과 간 조직에서 iridovirus의 전형적인 특징인 비정형거대세포가 관찰 되었다 (Fig 1).

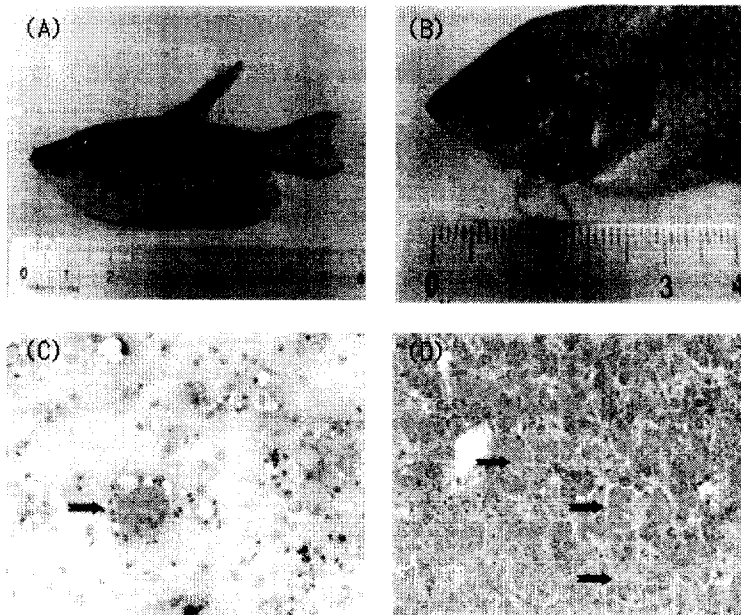


Fig 1. Naturnally Iridovirus-infected fish. (A) Pearl gourami showing the dark body coloration from a outbreak. (B) the spleen showed swelled (arrow). (C) The spleen imprint showing enlarged cell (diff-quick) ($\times 400$) (D) The liver of a pearl gourami from outbreak displays many enlarged cells in the pulps. Hematoxylin and Eosin (H & E) stain. ($\times 400$)

2. Virus의 염기서열 비교

2-1. PCR 결과

위의 조직 병리학적 분석을 토대로 iridovirus의 감염을 분자생물학적 조사를 위해 PCR amplification을 실시하였다. 이를 위한 primers는 이전에 RSIV를 검출하는데 사용되었으며(Oshima et al., 1998; Kurita et al., 1998, Jeong et al., 2003), GenBank에 등록되어 있는 ATPase gene, MCP gene, 등을 기초로 제작된 2개의 primer set과 본 실험에서 ORF 23(RSIV의 경우 ORF 2)을 검출 할 수 있는 Primer를 제작하여 실험에 사용하였다(Table 1).

Fig. 2는 위의 병리조직학적으로 iridovirus에 감염된 것으로 추정되는 pearl gourami(*Trichogaster leerii*)의 spleen에서 분리된 virus의 DNA를 template로 사용하고, 3개의 primer sets를 각각 사용하여 PCR amplification을 실시했을 때, 전기영동상의 결과를 나타낸 것이다. Lane1과 2는 563 bp lane, 3과 4는 1830bp의 특이적인 bands가 명확하게 나타났다. lane 5 와 6은 S1F, S1R의 primer sets을 사용하여 나타난 band로써 lane5는 2031bp, lane 6은 1018의 다른 크기의 band가 관찰되었다. 그리고 장기별로 간과 아가미, 신장을 같은 방법으로 분석한 결과 위와 같은 PCR 생성물을 얻을 수 있었다.

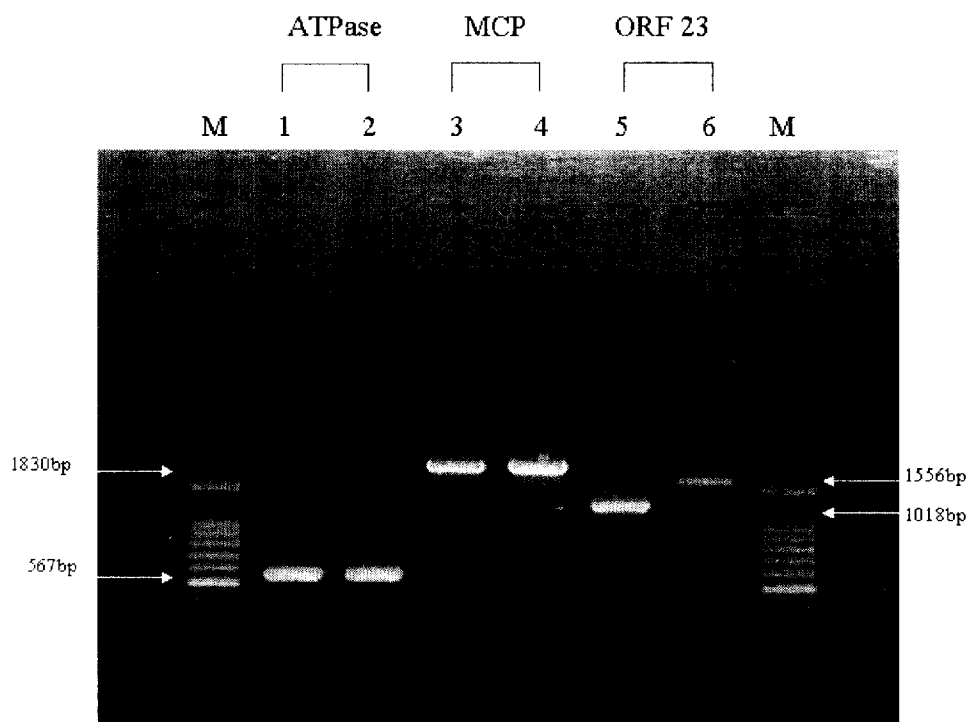


Fig. 2. PCR diagnostic assay for iridoviruses in pearl gourami. 1, 3 and 5; Naturally infected pearl gourami. 2, 4 and 6; RSIV Sachun isolate. M; 100 bp DNA ladder.

2-2. 염기서열 비교

각각의 PCR 생성물을 모두 정제하여 cloning 시킨 후, plasmid에 insertion된 부위의 염기서열을 밝혀서 비교하였다(Fig.3). Table 2는 pearl gourami(*Trichogaster leeri*)에서 분리된 viral DNA의 염기서열을 GenBank에 등록되어 있는 iridovirus의 ATPase gene과 MCP gene과 비교하여, 그 유사성을 percentage로 나타낸 것이다. ISKNV, DGIV의 경우 MCP gene과 ATPase gene 모두 FOV와 99%이상의 유사하였으며, LMBV, GV6의 경우는 FOV와 60%이하의 유사성을 나타내었다. 그 외 해수어 유래 iridovirus의 DNA sequence 역시 FOV와 90%이상의 유사성을 나타내었다.

K-1 region(Joeng et al., 2003)은 RSIV의 경우 DPOL(DNA polymerase) gene에서 RNRS(ribonucleotide reductase small subunit) gene사이의 ORF 1과 Pst1(Kurita et al., 1998) 그리고 ORF 2를 포함하고 있는 5508bp의 nucleotide sequence이며, ISKNV의 경우 DPOL과 RNRS gene사이의 ORF 20과 ORF 23을 포함한 부위를 말한다. RSIV와 ISKNV의 K-1 region에 있는 deletion과 variation이 많은 부분인 RSIV의 ORF 2 부분, 다시 말해 ISKNV의 ORF 23 부분과 RNRS gene 사이에서 S1F와 S1R PCR primer를 제작하여 pearl gourami(*Trichogaster leeri*)의 viral DNA로 PCR을 실시하였다. 그 결과 1018 bp의 위치에 명확한 band가 형성되었으며, RSIV Sachun과 구분되는 FOV의 band를 얻을 수 있었다(Fig 2). ISKNV의 ORF 23에 해

당하는 부위와 RSIV Sachunr의 ORF 2에 해당하는 부위의 DNA의 염기서열을 FOV와 비교한 결과 ISKNV와는 99%이상 유사하였으며, RSIV Sachun과는 82%가량 유사하였다.

담수관상어에서 분리한 FOV의 염기서열과 이전에 보고된 iridovirus strain들의 염기서열을 비교한 결과 ISKNV와 가장 유사하였다(Table. 2).

Fig. 3은 MCP gene을 계통수로 나타낸 그림이다. 계통수에서 나타나듯이 FOV가 ISKNV와 상당히 유사하며, 이전에 보고된 DGIV와 ALIV와도 상당히 비슷하다는 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

MCP gene

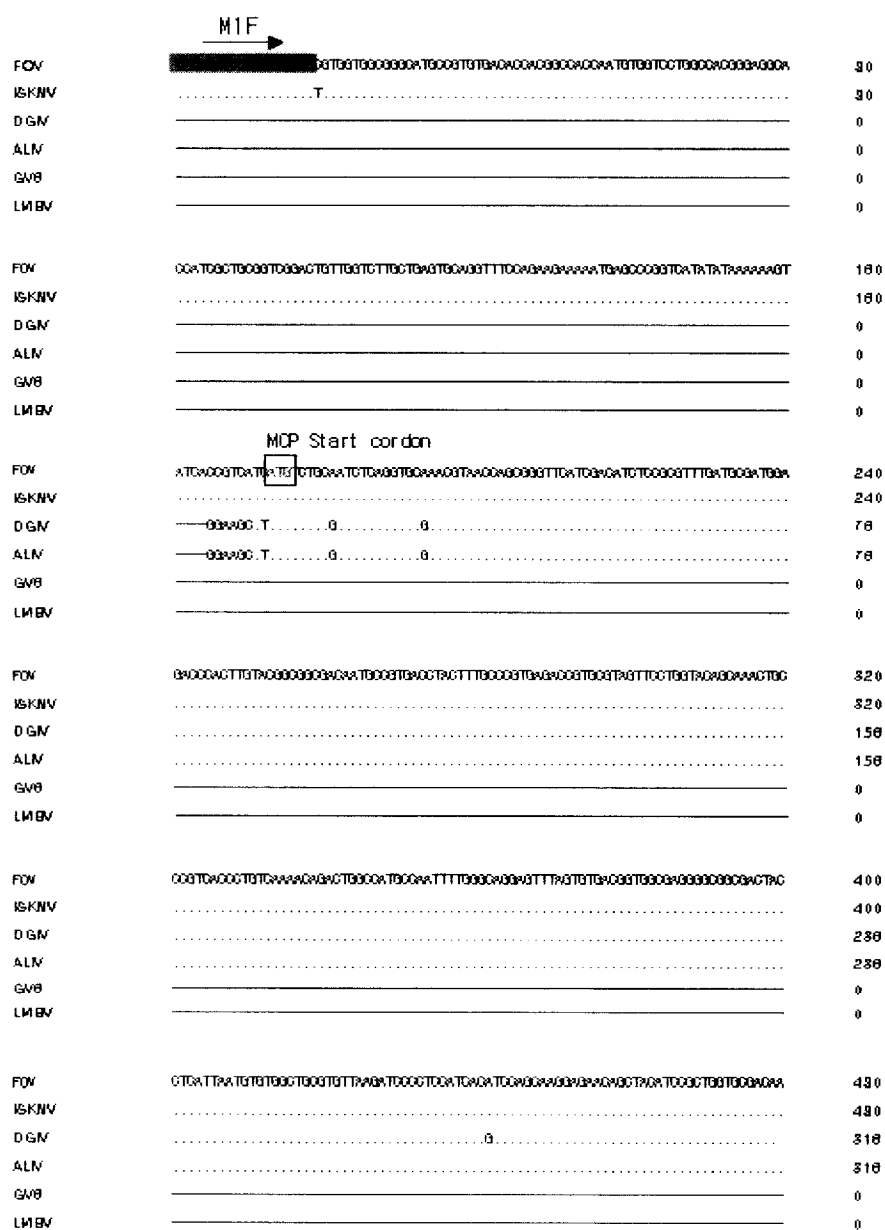


Fig. 3. Comparative analysis of the DNA nucleotide between the two different genomic region of iridovirus isolated from pearl gourami. Identical residues and gaps are represented as dots and dashes, respectively.

Continue

FOV	TCCTGATGGACAACTCTATGAGGGAGGTGTGGGTGTGATTTTAAAGACCTGGTGGGACAGACCGCTACGGAGGGAGTTGGCTT	580
ISKINV		580
DGM		598
ALN		598
GVB		0
LMBV		0
FOV	ACCTTCGGAGCGCTGGCATGATGGCGGGGAGCAAGACGCTGGCTTACAGCAAGATGATTTGGCATGGGGAGGGACCTGGTG	640
ISKINV		640
DGM		478
ALN		478
GVB		0
LMBV		0
FOV	GGCGGGATGACGAGCGGGCAACTATGGCGGGGCTCTACCTTAACTTTGGCGATTGGCGCTCTTCTTTACCGGTGACACGGG	720
ISKINV		720
DGM	TGG.....	558
ALN		558
GVB		0
LMBV		0
FOV	CGTGGGGTTGGCTACCGGTGTCTCTGGGTACAGAGGTGGGGATGGCTTTCAAGCTGGGGGGCTGGGAGGACCTGGCTCA	800
ISKINV		800
DGM		638
ALN		638
GVB		0
LMBV		0
FOV	TGAGCGAGAGGAGGAGGGCGAGATGGGCAATGAGAGGTGACCGCTGGCTACAGATTGGCAATGTAGAGCGCGGACGTGAGCG	880
ISKINV	C.....	880
DGM	C.....	718
ALN	C.....	718
GVB		0
LMBV		0
FOV	AAATGTGTCTGTGATGGGACCTTACCGCTGTACTGAGAGCGAGAGAGGTGAGGTGGTGGGGGAGCTGTAGTGTGTAGCATGGCT	960
ISKINV		960
DGM	T.....	798
ALN	T.....	798
GVB		0
LMBV		0

Continue

FOV	GAATTGAAGATGTCAGGTTGGGCGCCCGTGTGGCGGTGAAGCGCGGAGAGATTCCTTTGGTGAATCTGAAGCTGAAGTTGA	1040
ISKINV		1040
DGM		378
ALN		378
GVB		0
LWIBV		0
FOV	GTACCGCGGTGAAGCGCTTGTCTTTTGAAGTAAAGAGGTGAAGCGCGGAGAGATTCCTTTGGTGAATCTGAAGCTGAAGTTGA	1120
ISKINV		1120
DGM	GGA...	958
ALN		958
GVB	— G.A..C.....A.G..ATG..GC.....A...CTTC...GAGGTG...T.....TGC.T..C.	78
LWIBV	—————A.....AGAAA—..GC.GT..GGT.GA.AAG..TGA..CTACTT..TTT.GT.A.AG—AGATT.—.	83
FOV	CGCGT—GTATGTGAAGAGAGGTGAATCTGAAGTTGAAGCGCGGAGAGATTCCTTTGGTGAATCTGAAGCTGAAGTTGA	1194
ISKINV	—.....	1194
DGM	—.....	1030
ALN	—.....	1030
GVB	CGT.GA...GG....C...CGTGA...CGCG...GATG...—..AAG...C...GG...GG.G...	153
LWIBV	—GG...TGGT—TTAGC..A.....TAG.GCT.....A..AA.T—..T.GTAG.C..GCTT..GGAG.	131
FOV	GAGAGAGAGCGGTGGGCTGAAGAGATGGAGATGA—CTACTTGAATCTGTGAAGCGCGGTACTTCTGAAGCGAGATG	1273
ISKINV	—.....	1273
DGM	—.....	1109
ALN	—.....	1109
GVB	...A.....A.AA.....C.G.C.....C.—G...A.T.GCTG...GC.G...GG...A...GA...TC...C	233
LWIBV	GG.CTTTT..GTAG.AG.G.C.AG.TC...C.ACT.TG.G..CA...TCT..G.TGGT...—GAA.AG...TGAAT	208
FOV	CGTGAAGTGAATGGTGTATGAAGCTACTGCTATAGCTTTGAAGATGGAGATATGAAGCGGTGGTGTGAAGCGAGTGAAG	1353
ISKINV		1353
DGM		1139
ALN		1139
GVB	...A..TC..CGAGC...GGAGAGCT.....GT...G..CG.GAG.C...GAGG.CCG.C...ATCC..A..C.....T....	313
LWIBV	TAAAGTGT.GC...CGAGAGATT...AG...A.AGG...AGC.TGA.ATGG.CGA...AT.TC—A.GG..A.—GATT.	230
FOV	CGCGGTGTGAAGGTGAAGCGGTGTGAAGTGAAGTGTGAAGCGGTGAAGCGGTGAAGCGGTGAAGCGGTGAAGCGGTGAAGCGGT	1432
ISKINV		1432
DGM		1283
ALN		1283
GVB	TA.A...A.....C...G.A.—A.C..C.CCG...C.GTG.G...CGCG..GG...C..A..A..C..A..GT...AA.	391
LWIBV	TG..AGGAG.GG..ACTGT.G.TGA.C.AG..TTGA.G.GG.GG.GTTT..C...TG.TTTGCT..AT.GCT.GA..G.—	358

Continue

FOV	TCGGCTACAGGTGGGCGAAAGTTTGAAGTGGTGGTTATTTGGTGTACAGCAGACATCATAGAGATTGGTACGGGG	1511
ISKNV		1511
DGM		1347
ALN		1347
GVB	..T..G...CAGG.....AG..CG..CA.....C.G...CA.....T...CGGG...CATGA.....T	470
LMIBV	—G.....CA.....G.GGGCA..GG..ATGGG...AT..AGAGCA..G..TTGG.....GT..GG..TC..G..TGA..T—G	427
MCP Termination codon		
FOV	CGCGAGGCTTCGGTATGGTGTAACTATGGATTGGCGGGTGTGTCTGGTAACTATGTGGAGGGGTGTGTGGTGAATTGG	1592
ISKNV		1592
DGM	G..AT..GGG.....	1370
ALN	G..AT..GGG.....	1370
GVB	GAAG...A.....A.....A.....G..ATTTTT..CA..GGAAAGT...T..TD...—T..A...G...G...G...GAT	542
LMIBV	..GG..CGGGGCA..G...AA..C..G...—GGT..GG..T...T..GGG..G..AAAA..G...TGTG..T—T..G..G..GGG...—	495
FOV	GGCGATAGGCTATGGAGGGCATGGCTGGGTTAGCTTGGGGCGAGGTGTGTGTGTGTGGGGAGTGTGTATAGAGATGGGG	1071
ISKNV		1071
DGM		1370
ALN		1370
GVB	...AA...AAAG...A..GT..TGG..T..TGGTGG..AAAG...T..TTT.....	530
LMIBV		495
FOV	CAGCACTATGGGTTTATGTATCAATGGTGGATCAATGGCTGGGACAGAGCAATGTATGTGTGTGTATAGCAAGGGATGGCA	1751
ISKNV		1751
DGM		1370
ALN		1370
GVB		530
LMIBV		495
FOV	AGTATTTATAGTGTGTGTATAGGTTGGGGGATGTGTGGGGTGTGTCTTATGTGTGAGGCTTCAGG	1330
ISKNV	G.....	1330
DGM		1370
ALN		1370
GVB		530
LMIBV		495

M1R

ATPase gene

Continue

FOV	 CAAGCTACAGCCBCCAAAGTGGTGCTAATCAAATCTATCATTGGGACCAGGCGGCACATAATTCCCGGGCCGTCGTGA	80
ISKNV		80
DGM		80
AUV	A.....C..G..A....	80
LMBV	A.....C..G..A....	80
FOV	TATCGGGCTCGAGGAGGCCAAGCACTTCTACAGCAAGCTGTTGGCTAACTGCTTTGTGTACAACAAGTTTGACGCCGAC	160
ISKNV		160
DGM		160
AUV	A.....T.....T....	160
LMBV	A.....T.....T....	160
FOV	ATTATCACACGTGTCAAGCAGCGACAGCTGGCATTAAAGAAAGTGGACCCGAGCACTGGTGGCTCATGTTGATCTTTGA	240
ISKNV		240
DGM		240
AUV	C.....G...G...C.....T.....T.....	240
LMBV	C.....G...C.....T.....T.....	240
FOV	CGACTGCATGGATAAGCCAGGATGTTTAAACAGAGGCCGTCATGGACCTGTTCAAGAAGCGGCGTCATTGGAAATGTTT	320
ISKNV		320
DGM		320
AUV	C.....C	320
LMBV	C.....C	320
FOV	TGGTCATAATAGCCTCACAGTACATCATGGACTTGAACGCCAGCGCTGAGGTGTTGTATAGACGGTGTCTTTATTACAA	400
ISKNV		400
DGM		400
AUV	T.....T.....T.....T...A.....	400
LMBV	T.....T.....T.....T...A.....	400
FOV	GAAACAAAGCCAGACATGTGTGGACAAGATTTACAACAGTTTGGGGGCAACATACCCAAAGCAGACATTTACACATTGAT	480
ISKNV		480
DGM	A.....	480
AUV	A.....G....	480
LMBV	A.....G....	480
FOV	GGAGAGGTTTACACAGGATCACACATGCTTATACATTGACAAACAAACCCAGGCAGAAATGGGACACATGCTGCTACTC	563
ISKNV	A.....	563
DGM	A.....	563
AUV	...A.....T.....	563
LMBV	...A.....T.....	563

ORF 23 gene

[illegible]

Fig. 4. Comparative analysis of the nucleotide sequences of the ORF 23 of iridovirus isolated from pearl gourami. Identical residues and gaps are represented as dots and dashes, respectively.

RSV Sachin	CGGAGAGCTGAGGCGAGGCGGAGCGTACGATTTGTGGCAGTGTGTACAGAGCGCTGAAAGAGAGCGCGCTGAAAGAG	373
FOV	AA...GAGG...GAGG...T...TG...CGT...AC...C—C...A...CG...CA...T...A...CT—	485
ISKNV	AA...GAGG...GAGG...T...TG...CGT...AC...C—C...A...CG...CA...T...A...CT—	485
RSV Sachin	CGTCAAGAGAGCGAGCGCGCGAGAGAGAGATGGCGCTATTGTGGCAGTGTGTACAGAGCGCTGAAAGAGAGCGAG—CGCGTGGC	950
FOV	—...TG...A...A...—...C...TA...—...A...A...T—	553
ISKNV	—...TG...A...A...—...C...TA...—...A...A...T—	553
RSV Sachin	TGACAGAGTGAAGCGCGCGAGAGAGATGAGGTACGCTGTGTACGAGTGTGTACAGAGCGCTGAAAGAGAGCGCGCGCTGCTGGCGC	1030
FOV	—G...C...C...T...C...—...G...—...GAG...—...G...—	609
ISKNV	—G...C...C...T...C...—...G...—...GAG...—...G...—	609
RSV Sachin	GTGAGGAGTACGAGCGCTGGCGTGGAGAGATGAGGTGTGTGTGAGAGAGAGTACTGTGTGGAGAGAGTGAAGATGATGTGC	1110
FOV	...A...G...—...A...C...—	633
ISKNV	...A...G...—...A...C...—	633
RSV Sachin	AGCTTGTGTGAGATTGGGGGTATGAGAGAGAGGTGTGTGTGTGGAGATTGTGATTGGGTGTGTGGATGTGTGGCGCTGGA	1190
FOV	...C...—...C...—	763
ISKNV	...C...—...C...—	763
RSV Sachin	TTTATATATTTGGTATATATAGGGCATGTGTTTTTGGTTTTTACCGCGTGTGGTGAATATATATTTACTATC—TGAAGC	1267
FOV	—...G...—...GAG...—	343
ISKNV	—...G...—...GAG...—	343
ORF23 termination codon		
RSV Sachin	ATGTTGTCTACTC—TACTGGCTGGCATATATATGATTTGATCTTTTGTGCTGTGGCTAG—TGGTGTATATGATTT	1344
FOV	—...A...GAG...—...GTC—...A...G...—...GT...AC...AGCA...TGA...A...GA...—...CTA...C...C...A	907
ISKNV	—...A...GAG...—...GTC—...A...G...—...GT...AC...AGCA...TGA...A...GA...—...CTA...C...C...A	907
RSV Sachin	TGAGATATTTGATCTTTTGTGCTGATGTTTTGATATAGCATATACTTTTACATCTTTTGGCTGGTTTATATAGAGATGAGAT	1423
FOV	...CTAG...A...ACT...GAG...GC...A...—...T...—	933
ISKNV	...CTAG...A...ACT...GAG...GC...A...—...T...—	933
RSV Sachin	GGTATGTGCTGATCTTTTGTGCTGTGGCTGATGTTGTGTATATCTTTTGAATATATGATCTTTTGTGCTGTGTGTGGGT	1503
FOV	—...TA...C...A...—...—	965
ISKNV	—...TA...C...A...—...—	965
RSV Sachin	GTTTTGAATAGCATATACTTTTACATC—TTTGGC	1556
FOV	—...A...—...A...G...TT—	1013
ISKNV	—...A...—...A...G...TT—	1013

ORF23 termination codon

SIR

NRNS gene start codon

Table. 2. Percentage of nucleotide and amino acid sequence identity of the major capsid protein and ATPase gene of Pearl gourami iridovirus compared to fifteen other iridoviruses.

	Virus*	Nucleotide (Amino acid)	
		ATPase	MCP
Fresh water fish	ISKNV	99.8 (100)	99.6 (99.5)
	DGIV	92.2 (100)	98.2 (99.3)
	ALIV	95.7 (98.9)	98.4 (99.5)
	GV6	none none	57.0 (52.1)
	DFV	none none	57.0 (52.1)
	LMBV	95.9 (99.4)	52.9 (26.9)
Sea water fish	SBIV	95.3 (99.4)	94.4 (98.4)
	GSDIV	95.9 (99.4)	94.4 (98.4)
	FLIV	none none	93.7 (98.0)
	RSIV	94.8 (98.9)	94.5 (98.3)
	Sachun	95.3 (99.3)	94.5 (98.2)
	Namhae	95.9 (98.9)	94.5 (98.0)
	CH-1	96.0 (98.3)	93.8 (98.2)
Amphibian	TFV	63.2 (52.6)	93.8 (46.5)
	FV3	62.9 (46.2)	93.8 (46.5)

none: Not published in GenBank.

* ISKNV, infected spleen kidney necrosis virus; DGIV, dwarf gourami iridovirus; african lampeye iridovirus, GV6, guppy iridovirus; DFV, doctorfish virus; LMBV, large mouse bass ranavirus; seabass iridovirus; GSDIV, grouper sleepy disease iridovirus; korean flounder iridovirus; RSIV, red sea bream iridovirus; Sachun, red sea bream iridovirus sachun; Namhae, red sea bream iridovirus namhae; CH-1, red sea bream iridovirus CH-1; TFV, tadpole edema virus; FV3, frog virus 3

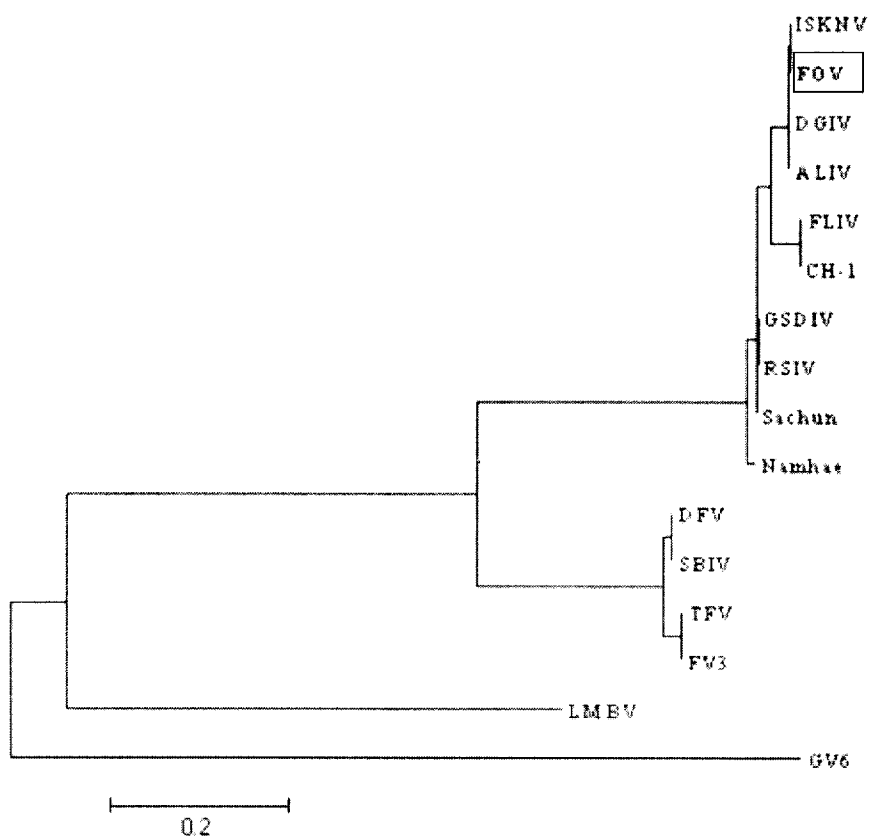


Fig. 3. Cladogram and test of alternative hypotheses estimated from DNA sequences of MCP gene.

3. 담수관상어의 iridovirus 감염 분포 조사

3-1. 분기 및 지역별 pearl gourami의 iridovirus 분포 조사

2003년 12월부터 2004년 10월 까지 부산의 담수 관상어 도매상들로부터 실험어를 구입하여 실험을 실시하였다. 외국에서 수입된 관상어의 경우 공항에서 도매상으로 가져온 지 2일 내에 실험어를 구입하여 실험을 실시하였으며, 그 외 국내에서 양식된 관상어는 노포동 고속버스 터미널에서 도매상으로 가져온 지 2일 이내에 실험어를 구입하여 PCR test를 실시하였다. 분기별로 pearl gourami(*Trichogaster leeri*)를 도매상에서 구입하여 실험을 실시였다.

Pearl gourami sample은 1년간 총 17회에 걸쳐 관상어 도매상에서 실험어를 구입하여 3회 1st PCR positive 반응을 나타내었으며, 11회 nested PCR positive 반응을 나타내었다. 1st PCR test를 한 결과 1분기에 경기도에서 2번의 1st PCR positive 결과가 나왔으며, 각각 75%~80%가량의 폐사율을 나타내었다. 그리고 중국에서 3분기 1st PCR test에서 한 번 positive를 나타내었다.

nested PCR test의 경우 경기도 지역의 경우 1분기와 2분기에 한 번씩 negative를 나타내었으며, 싱가포르의 경우 2분기에 한 번 PCR negative를 나타내었다. 그 외 1분기 경기도 지역에서 3 group, 2분기 싱가포르 수입산에서 2group, 3분기 싱가포르에서 2 group 과 경기도와 중국에서 각각 1 groupe 씩, 4분기 경기도와 싱가포르에서 각각 1 group 씩 nested PCR positive 반응을 나타내었다.(Table. 3)

Table 3. Detection of iridovirus in pearl gourami by seasonal groups.

Month	Area	Number	1st PCR	Nested PCR
Jan~Mar	Kyunggi-do	6	2	3
Apr~Jun	Kyunggi-do	1	0	0
	Singapore	3	0	2
Jul~Sep	Kyunggi-do	1	0	1
	Singapore	2	0	2
	China	2	1	1
Oct~Dec	Kyunggi-do	1	0	1
	Singapore	1	0	1
Total		17	3	11

3-2. 지역 및 어종별 iridovirus 감염 조사

pearl gourami(*Trichogaster leeri*)와 같은 방법으로 실험어를 가져와서 실험을 하였다.

총 63회에 걸쳐 담수관상어 sample을 도매상으로부터 구입하여, PCR test에 사용하였다. 그 중 5회 1st PCR test positive 반응을 나타내었으며, 45회 nested PCR test positive 반응을 나타내었으며, 나머지 13회는 PCR test negative 반응을 나타내었다.

경기도, 밀양, 싱가포르, 중국 모두 1st PCR test positive를 나타내는 어류가 있었으며, 경기도와 중국의 경우 모두 pearl gourami에서 나타났으며, 밀양의 경우 blue gourami 였고, 싱가포르의 경우 silver gourami였다. 다시 말해 PCR 1st 반응을 보이는 실험어의 경우 gourami sp. 였다. 다른 어종에서는 nested PCR을 실시하였을 때 positive 반응을 나타내었다(Table 4). 14종의 어류에 대해 PCR test를 한 결과 대부분의 담수관상어에서 nested PCR test positive 반응을 나타낸 반면, 3종류의 담수관상어에서 PCR test negative 반응을 나타내었다. 다시 말해 plesco 일명 비파라고 불리는 메기과 담수관상어와 난태생 송사리과의 african lampeye(*Aplocheilichthys normani*)와 swordtail(*Xiphophorus helleri*)에서는 PCR negative 반응을 나타내었다.(Table. 5)

Table 4. Detection of iridovirus in freshwater ornamental fish by regional groups

Area	Number	1st	nested
Kyunggi-do	16	2	8
Milryang	8	1	6
Singapore	37	1	30
China	2	1	1
Total	63	5	45

Table 5. Detection of iridovirus in freshwater ornamental fishes.

Fish	Scientific name	Number	1st PCR	Nested PCR
Pearl gourami	<i>Trichogaster leeri</i>	17	3	11
Silver gourami	<i>Trichogaster microlepis</i>	10	1	8
Blue gourami	<i>Trichogaster trichopterus sumatranus</i>	5	1	4
Dwar gourami	<i>Colisa lalia</i>	6	0	6
Platy	<i>Xiphophorus maculatus</i>	6	0	5
Molie	<i>poecilia sphenopsx</i>	4	0	4
Angelfish	<i>Pterophyllum eimekei</i>	2	0	1
Guppy	<i>Lebistes reticulatus</i>	3	0	2
Plecos	<i>Hypostomus plecostomus</i>	2	0	0
Oscar	<i>Astronotus ocellatus</i>	2	0	2
African lampeye	<i>Aplocheilichthys normani</i>	1	0	0
Smatra	<i>Puntius tetrazona</i>	1	0	1
Swordtail	<i>Xiphophorus helleri</i>	2	0	0
Neontetra	<i>Hyphessobrycon innesi</i>	2	0	1
Total		63	5	45

4. 감수성 test

4-1. 반수 치사 농도(LD₅₀)

담수관상어인 pearl gourami(*Trichogaster leerii*)와 우리나라 양식어 중 해산어 iridovirus의 피해가 가장 많은 rock bream(*Oplegnathus fasciatus*)을 대상으로 pearl gourami(*Trichogaster leerii*) 감염어의 비장을 분쇄하여 공격실험을 실시하였다. 농도는 1mg/fish, 10 μ g/fish, 0.1 μ g/fish, 0.001 μ g/fish의 4가지 농도로 실시하였다. Pearl gourami의 경우 공격실험 6일째부터 폐사가 일어났으며, 15일 까지 폐사가 완료 되었다. 가장 저농도인 0.001 μ g/fish의 경우 폐사가 일어나지 않았다.

담수관상어 뿐만 아니라, 해산어인 rock bream(*Oplegnathus fasciatus*)에서도 감수성을 나타내었으며, 가장 저 농도인 0.001 μ g/fish에서 pearl gourami(*Trichogaster leerii*)는 감수성을 나타내지 않은 반면, 해산어인 rock bream(*Oplegnathus fasciatus*)의 경우 20일 까지 60%의 폐사를 보였다(Fig. 7).

SPSS 10.1 program을 사용하여 pearl gourami와 rock bream의 LD₅₀을 계산하였다. 그리고 어체 1g 무게 당 LD₅₀을 계산한 결과 rock bream이 pearl gourami보다 약 7배가량 FOV에 감수성이 높았다(Table 6).

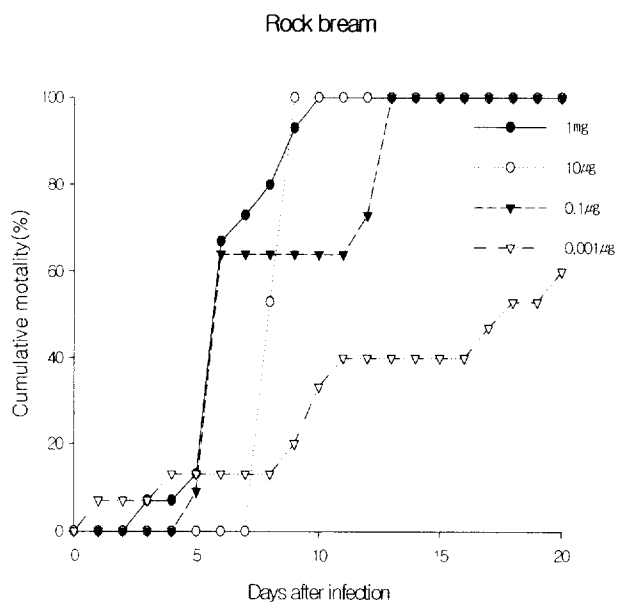
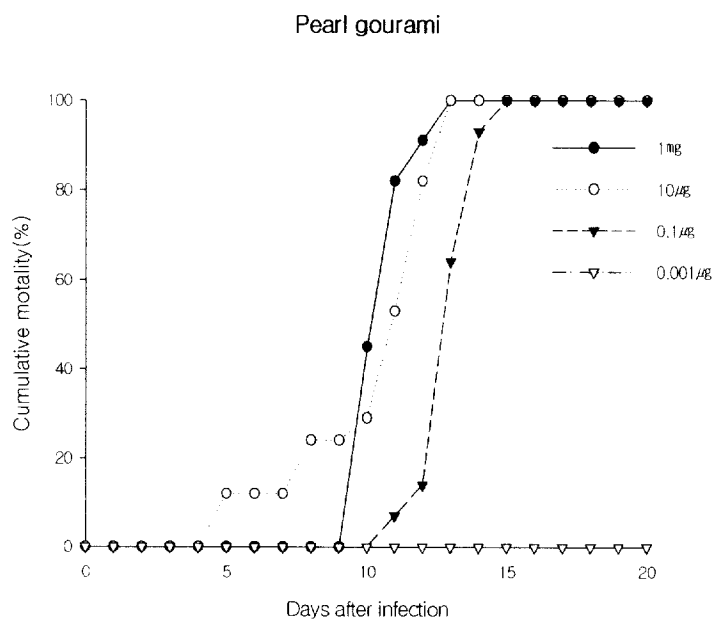


Fig. 7. Cumulative mortality of pearl gourami *Trichogaster leeri*, and rockbream *Oplegnathus fasciatus*, infected by muscular injection with different dosages of FOV

Table. 6. 50% lethal dose infection*(LD₅₀) of the FOV in pearl gourami and rock bream

Fish strain	Scientific name	Weight	LD ₅₀	
Pearl gourami	<i>Trichogaster leeri</i>	4,5g(±2)	$3.3 \times 10^{-1} \mu\text{g/fish}$	$7.5 \times 10^{-2} \mu\text{g/g}$
Rock bream	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	10g(±2)	$9.7 \times 10^{-2} \mu\text{g/fish}$	$9.7 \times 10^{-3} \mu\text{g/g}$

4-2. 담수관상어의 감수성 test

위 실험을 토대로 담수관상어에 FOV를 각각 10 μ g/fish로 근육 주사하였다. FOV는 pearl gourami보다 dwarf gourami에 병원성이 높았으며, blue gourami와 silver gourami는 pearl gourami와 비슷한 누적 폐사율을 나타내었다. 다른 종의 담수관상어의 경우 pearl gourami 보다 강한 병원성을 나타내었다(Fig. 8).

4-3. 해산어에 대한 감수성 test

해산어에 위와 같이 FOV를 각각 10 μ g/fish로 근육 주사하였다. FOV는 담수관상어에서 분리된 virus임에도 불구하고 해산어인 rock bream(*Oplegnathus fasciatus*)과 spotted sea bass(*Lateolabrax maculatus*) 그리고 red seabream(*Pagrus major*)에 높은 누적 폐사율을 나타내었다. FOV를 근육주사한지 3일째부터 폐사를 나타내어 10일 만에 100% 폐사를 나타내었다.(Fig. 8)

4-4. 담수관상어에 대한 RSIV Sachun의 감수성 test

해산어종인 돌돔에서 분리한 RSIV Sachun을 담수관상어에 10 μ g/fish로 근육 주사하였다. 실험어종 모두 병원성을 나타내었으며, 특히 pearl gourami의 경우 RSIV Sachun에 높은 감수성을 나타내었다. 그 외 대부분의 담수관상어는 FOV와 RSIV Sachun에 비슷한 누적 폐사율을 기록하였다.(Fig. 9)

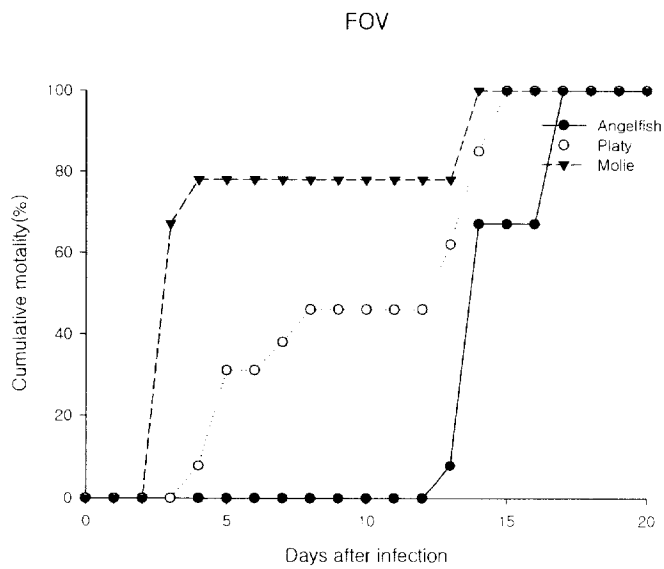
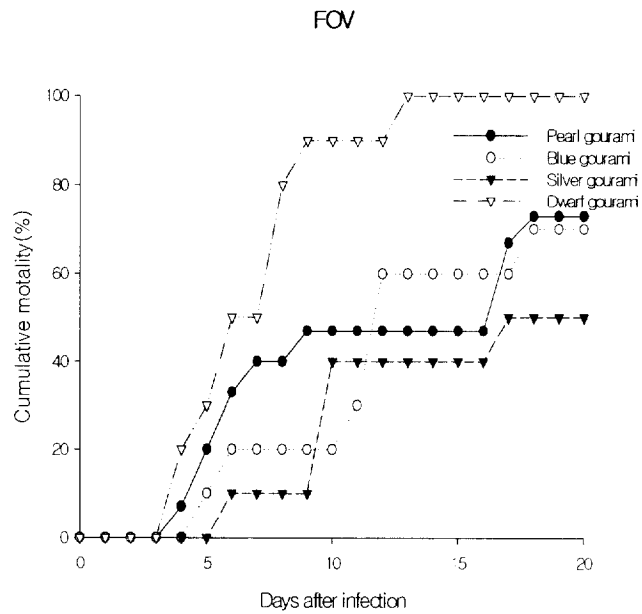
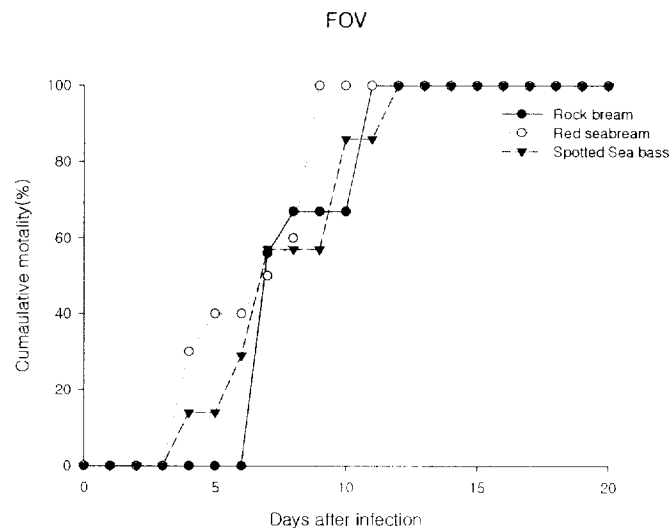


Fig. 8. Pathology of the FOV in 9 teleost species. A; Gourami sp. B; Freshwater ornamental fish C; seawater fish

Continue



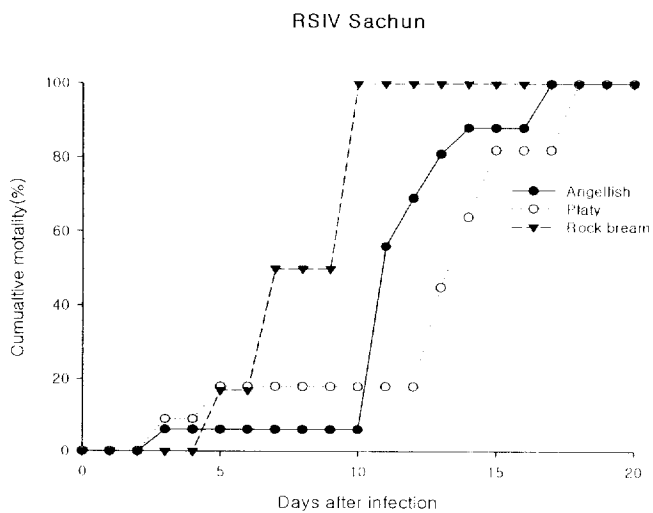
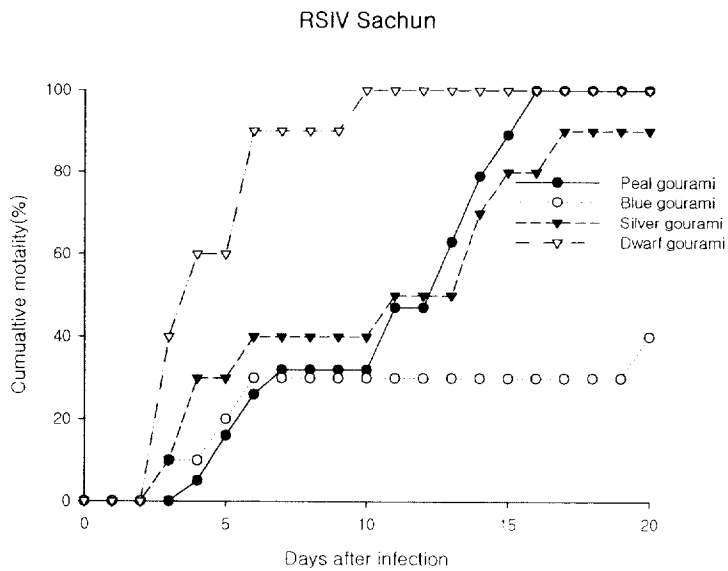


Fig. 9. Pathology of the RSIV Sachun in 6 fish species at freshwater ornamental fish.

5. FOV 감염어의 조직병리학적 비교

pearl gourami와 rock bream은 육안으로 관찰하면, 감염어는 비감염어에 비해 체색흑화가 뚜렷하게 나타났으며, 비감염어에 비해 비장이 상당히 비대해진 것을 알 수 있었으며, 비장의 색깔 역시 창백해져 있었다(Fig. 10). 비대해진 장기를 imprinting하여 diff-quick염색법으로 염색하여 광학현미경으로 관찰한 결과 비대세포가 다수 관찰 되었으며, 조직을 H & E 염색한 결과 역시 거대세포를 관찰할 수 있었으며, 비장세포의 핵이 붕괴되어 세포내의 핵이 관찰되지 않으며, 세포가 전체적으로 basophilic 하였다(Fig. 11). rock bream(*Oplegnathus fasciatus*) 역시 이와 같은 증상을 관찰 할 수 있었으며, 비장비대 및 거대세포 역시 관찰 할 수 있었다.(Fig. 12)

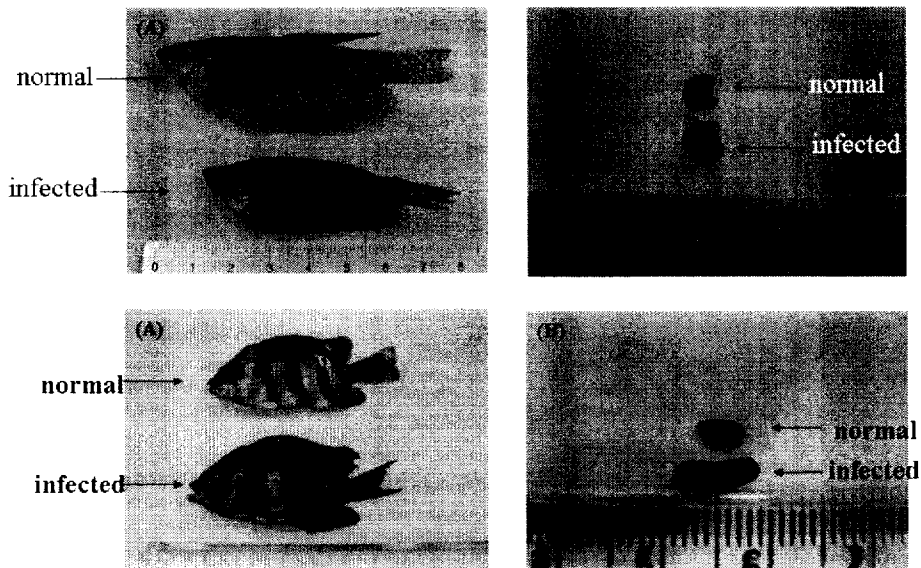


Fig 10. Artificially iridovirus-infected pearl gourami and rock bream. (A) Pearl gourami showing the dark body coloration from a outbreak. (B)The spleen showing swelled and pale tissue coloration from an artificial infection. (C) Rock bream showing the dark body coloration from a outbreak. (D)The spleen showing swelled and pale tissue coloration from an artificial infection.

FOV

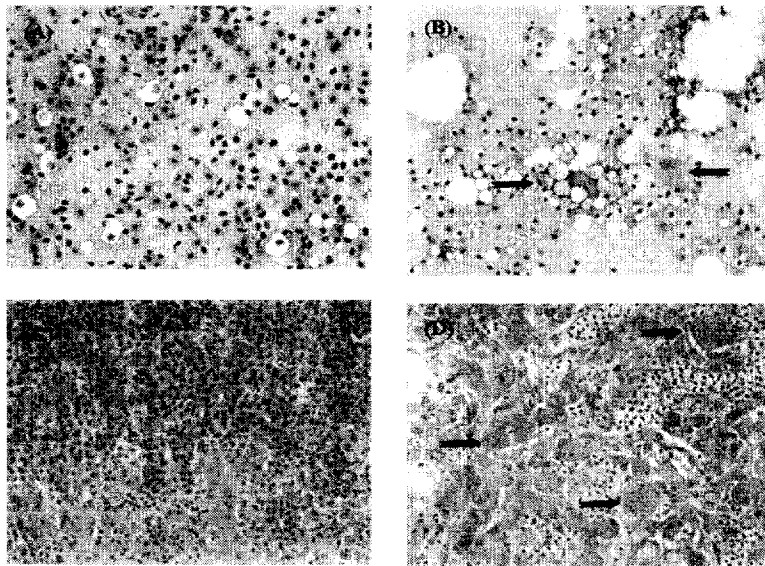


Fig 11. Artificially iridovirus-infected pearl gourami. (A) The normal spleen was imprinted (B)The spleen imprint showing enlarged cell (arrow) (diff-quik) ($\times 200$) ($\times 400$) (C)The spleen of a normal pearl gourami (D)The spleen of a pearl gourami from outbreak displays many enlarged cells in the pulps (arrow). Hematoxylin and Eosin (H&E stain) ($\times 400$).

FOV

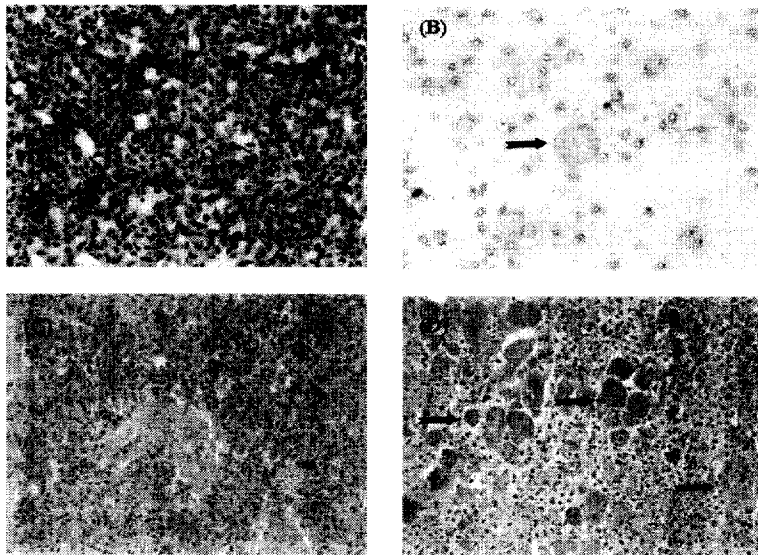


Fig 12. Artificially iridovirus-infected rock bream. (A) The normal spleen was imprinted (B)The spleen imprint showing enlarged cell (arrow) (diff-quik) ($\times 200$) ($\times 400$) (C)The spleen of a normal pearl gourami (D)The spleen of a pearl gourami from outbreak displays many enlarged cells in the pulps (arrow). Hematoxylin and Eosin (H&E stain) ($\times 400$).

6. RSIV Sachun 감염어의 조직병리학적 비교

pearl gourami와 rock bream의 비대해진 비장조직을 imprinting하여 diff-quick염색법으로 염색하여 광학현미경으로 관찰한 결과 FOV에 감염된 어체의 비장세포와 마찬가지로 비대세포가 다수 관찰 되었으며, 비장조직을 H & E 염색한 결과 역시 거대세포를 관찰할 수 있었으며, 비장세포의 핵이 붕괴되어 세포내의 핵이 관찰되지 않으며, 세포가 전체적으로 basophilic 하였다. rock bream(*Oplegnathus fasciatus*) 역시 이와 같은 증상을 관찰 할 수 있었으며, 비장비대 및 거대세포 역시 관찰 할 수 있었다.(Fig. 13)

RSIV Sachun

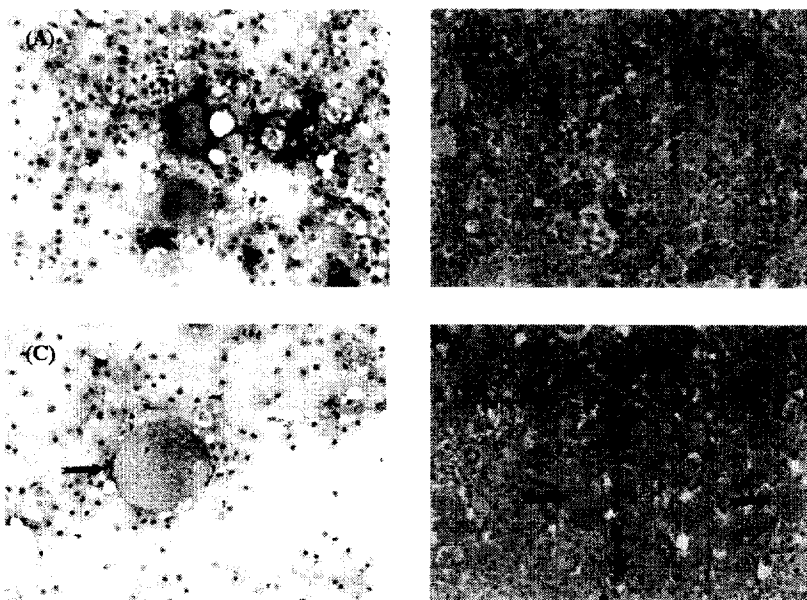


Fig 13. Artificially iridovirus-infected pearl gourami and rock bream. (A) The spleen imprint showing enlarged cell of a rock bream (arrow) (diff-quik) ($\times 400$). (B) The spleen of a rock bream from outbreak displays many enlarged cells in the pulps (arrow). Hematoxylin and Eosin (H&E stain) ($\times 400$). (C) The spleen imprint showing enlarged cell of a pearl gourami (arrow) (diff-quik) ($\times 400$). (D) The spleen of a rock bream from outbreak displays many enlarged cells in the pulps (arrow). Hematoxylin and Eosin (H&E stain) ($\times 400$).

IV. 고찰

담수 관상어에서 Lymphocytis virus(LCDV) (Rasin 1927)에 대한 보고가 처음 이루어진 이래 담수관상어에 대한 iridovirus 감염증에 대한 연구가 활발히 이루어져 왔다. 특히 외래 담수 관상어의 iridovirus 감염증에 대한 연구는 지난 몇 년간 캐나다와 미국, 동남아시아등의 여러지역에서 보고되어져 왔으며, 그 피해 또한 심각하다고 한다.

Paperna et al. (2001)은 일본의 Dwarf gourami(*Colisa lalia*)와 African lampeye(*Aplocheilichthys normani*)를 대상으로 iridovirus의 병원성 실험을 보고한 바 있다. 이스라엘의 담수관상어 iridovirus에 대한 보고는 Sudthongkong et al. (2002)에 의하여 이루어 졌는데 이들은 이스라엘의 gourami와 swordtail, platy, molie, scalare등의 여러 담수관상어에서 발생한 iridovirus를 전자현미경적으로 관찰하여 보고하였다. 이러한 외국의 담수관상어의 iridovirus 감염증에 대한 피해 보고에도 불구하고 우리나라의 담수관상어에 대한 iridovirus 감염증에 대한 연구 및 보고는 전무한 실정이다. 특히 우리나라의 담수관상어 시장은 동남아시아의 싱가포르에서 90%가량을 수입하고 있으며, 최근에는 중국에서도 담수관상어의 수입이 증대되고 있다.

본 실험실에서는 부산의 대가로 관상어 도매상에서 대량 폐사가 일어난 관상어종의 하나인 Pearl gourami(*Trichogaster leerii*)의 의뢰를 받아 처음 실험을 하였으며, 이 대상어는 전형전적인 iridovirus 감염증의 증세를 보였으며, 간조직을 H & E 염색을 하여 조직병리학적으로 관찰한 결과 iridovirus 조직에서 감염증의 증대한 진단기준의 하나인 비대세포가 관찰되었다. 명확한

iridovirus 감염증 확인을 위해 이전 일본에서 RSIV 검출에 사용되었던 2 sets의 primer를 사용하여 PCR test를 실시하여 PCR 생성물을 얻을 수 있었다. 그러나 이 결과만을 가지고 iridovirus 감염증이라는 확실한 증거라 판단 할 수 없었다. 그래서 보다 정밀한 분석을 하기 위해서 PCR 생성물들로부터 DNA 염기배열의 특성을 조사하여 기존에 연구된 담수관상어 iridovirus와 비교 분석을 실시하였다(Fig. 2). 그 결과 기존의 mandarin fish(*Siniperca chuatsi*)에서 분리된 ISKNV와 dwarf gourami에서 분리된 DGIV의 경우 structure gene인 ATPase gene과 MCP gene은 pearl gourami(*Trichogaster leerii*)에서 분리된 virus인 FOV의 염기서열과 매우 유사하였다.

현재까지 연구되어진 iridovirus의 특성을 분석하여 보면, 유전자의 끝 부분 근처에 많은 repeating sequence를 가지고 있으며 이러한 sequences는 바이러스의 genomic DNA variation 형성에서 가장 먼저 target이 되는 부분으로 알려져 있다 (Schnitzler et al, 1987; Fisher et al, 1988; Bugert et al, 1993) 더구나 Bahr 등(1999)에 의하면 Herpesvirus를 포함한 많은 double stranded DNA virus의 genome에서 특이적인 현상은 DNA polymerase gene 근처에 많은 유전자가 cluster 형태로 존재하고 있다는 것이다. 이러한 보고들이 의미하는 것은 iridovirus의 genome에서도 DNA polymerase gene의 proximal region 근처에 밀집된 바이러스의 structural 유전자들과 terminal region들이 존재할 수 있으며, 그 결과 이 근처는 당연히 nucleotide variation과 함께 structural 또는 nonstructural 부위에 있는 nonessential region들이나 repeating sequence들의 insertion 또는 deletion이 강하게 나타날 것으로 추정되어 진다. 본 연구에서는 iridovirus의 nucleotide sequence

중 deletion과 insertion이 강하게 나타나는 부위인 ORF23 gene과 ORF23과 RNRS gene사이의 non structure gene을 비교 분석하였다. 그 결과 ORF 23 gene 뿐만 아니라 ORF23과 RNRS gene 사이의 non structure gene 역시 99%의 상동성을 보였다(Fig 5). 다시 계통수를 통하여 각 iridovirus 종과 FOV를 비교 분석한 결과 이전 연구에서 보고 된 담수 iridovirus인 ISKNV와 매우 유사한 것으로 나타났다. 위의 염기서열 분석과 계통수 분석을 통하여 본 실험실에서 분리한 FOV는 담수관상어 iridovirus의 하나인 ISKNV와 분자생물학적으로 매우 유사한 특징을 가지고 있었다.

Pearl gourami(*Trichogaster leerii*)의 경우 원산지가 동남아시아이므로 이는 pearl gourami(*Trichogaster leerii*)에서 분리된 FOV가 수입 혹은 다른 경로를 통해서 우리나라에 유입되었다고 추정 할 수 있다.

이번 연구에서는 위의 상기 사실을 토대로 2004년 한 해 동안 부산의 관상어 도매상을 대상으로 담수관상어의 지역 및 시기별 iridovirus의 감염 실태를 조사 하였다(Table 3). test 방법은 PCR 법을 사용하였으며, 1 step PCR과 함께 2 step PCR 법인 nested PCR을 병행하여 실시하였다. Carrier는 병원체를 체내에 보유하면서 병적 증세에 대해 외견상 또는 자각적으로 아무런 증세가 나타나지 않는 것을 말하며, nested PCR 법을 이용하여 담수관상어에 있어 carrier stage에 있으면서 병원성을 나타내지 않는 어류를 조사 하였다. 2 step nested PCR의 경우 Target DNA가 극미량으로 존재하더라도 식별할 수 있는 PCR 법으로 virus의 carrier type 연구에 많이 이용되고 있다. 그러나 Target DNA 의 극미량의 차이에서 PCR positive와 negative 반응이 결정되며, 그 외 PCR inhibitor등의 기타 다른 요인에 의해 PCR negative 반응을

보인다. 본 연구에서는 위의 2 step nested PCR의 특징을 고려하여 한 그룹의 test sample에서 20%의 nested PCR positive 반응을 나타내면, 그 그룹은 nested PCR positive로 판단하였다.

이번 조사에 나타난 결과 1월에서 3월 사이인 1/4분기의 1 step PCR test에 많은 수의 담수관상어가 PCR test에 positive 반응을 보였으며, 실험의 대부분이 gourami sp. 이었다. 또한 1 step PCR positive 반응을 나타낸 대부분의 실험어에서 자연폐사가 일어났다. 담수관상어의 대부분은 열대어류로써 사육시 25℃의 수온을 유지시켜 주어야 한다. 따라서 담수 관상어에 있어서의 iridovirus 감염은 본 조사에서 나타난 것과 같이 시기와는 무관하게 나타난다고 볼 수 있다.

지역적으로 싱가포르와 중국에서 수입된 어종과 우리나라의 경기도와 밀양에서 사육된 어종에서 역시 1 step PCR test positive 결과를 확인 할 수 있었다. 이는 iridovirus 감염증이 지역적 특성과는 상관없이 세계 각 지역에서 발생한다고 볼 수 있지만, 실험 대상어종이 동남아시아가 원산지 이며, 친어를 싱가포르에서 수입하여 치어를 부화 및 배양하는 우리나라의 관상어종 양식 실태와 이전의 외국에서의 보고들에 비추어보면, iridovirus 감염증은 지역적으로 동남아 지역에서 담수관상어 iridovirus가 유입어 세계 여러 지역으로 확산되는 것으로 추정된다. 2 step nested PCR test의 결과 gourami sp. 는 물론 대부분의 여러 담수관상어에서 nested positive 반응을 보였으며, 대상어의 폐사는 미비하였다. 이 결과 대부분 carrier 형태로 iridovirus를 가지고 있다고 볼 수 있으며, 어떠한 요인에 의해 iridovirus가 발병하는 것으로 추정된다.

관상어들은 그 용도에 따른 특성상 (시각적 효과), 한 가지 어종만을 수조에

넣어서 키우는 것보다 한 수조에 여러 어종들을 같이 넣어서 키우는 경우가 더 많다. 더욱이 담수어에서 분리한 iridovirus가 해산어에 대해서 감수성을 가진다면, 그것은 관상어 시장에만 국한된 문제가 아니라, 국내의 수산 양식업계 전체에 문제를 야기할 소지를 가지게 된다. 현재 국내의 양식 해산 어에서 많은 피해를 입히고 있는 대표적인 바이러스성 질병은 iridovirus의 한 종인 red sea bream iridovirus (RSIV)라는 원인 체에 의한 red sea bream iridoviral disease (RSIVD)로서 매우 급성 적이고, 전염성이 강한 어류 질병으로 밝혀져 있다 (Inouye 등, 1992). 특히, ISKNV의 경우 담수어인 mandarin fish에서 많은 폐사를 발생하였으며, He et al (2002)는 여러 담수어와 해산어에 ISKNV의 공격 실험을 통하여 실험 해산어에는 ISKNV의 감염성을 확인하지 못하였으며, 담수어인 mandarin fish(*Siniperca chuatsi*)와 large mouse bass(*Micropterus salmonides*) 그리고 중국산 잉어인 초어(*Ctenopharyngodon idella*)등에 감염성이 있다고 보고한 바 있으며, 그 외에도 dwarf gourami iridovirus (DGIV), African lampeye iridovirus (ALIV), cichlid iridovirus, guppy iridovirus, angelfish iridovirus, swordtail iridovirus, platy iridovirus, mollies iridovirus 등과 같이 iridovirus가 해외의 여러 담수어종에 감염된다는 보고가 있었다 (Armstrong&Ferguson 1989; Anderson 등, 1993; Hedrick&McDowell 1995; Rodger 등, 1997; Sudthongkong 등, 2002).

Klinger et al(2004)는 자연적으로 iridovirus에 감염된 gourami 속과 Ramirez dwarf cichlids(*Apistogramma ramirezi*)와 angelfish(*Pterophyllum scalare*)등의 담수관상어류로부터 분리된 iridovirus를 다시 담수관상어류에 공

격실험을 하여 재감염 실험을 한 결과 실험어들은 모두 iridovirus에 감염성을 나타내지 않는다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 pearl gourami(*Trichogaster leerii*)에서 분리된 FOV의 병원성을 알아보기 위해서 전형적인 iridovirus 감염증이 나타나며, PCR test 결과 positive 반응을 나타내는 pearl gourami(*Trichogaster leerii*)의 장기를 분쇄하여 100배씩 단계 희석하여 건강한 pearl gourami(*Trichogaster leerii*)와 해산어 iridovirus에 감수성이 강한 rock bream(*Oplegnathus fasciatus*)에 근육 주사를 하여 농도별로 감염 test를 실시하였다. pearl gourami의 경우 최저 농도의 경우 폐사가 일어나지 않았으며, rock bream(*Oplegnathus fasciatus*)의 경우는 최저농도에서 폐사가 60%였다(Fig. 7). 실험을 통해 담수관상어에서 분리된 virus isolate임에도 불구하고 해산어인 돌돔에 병원성을 나타내며, 그 병원성이 담수어보다 높다는 것을 알 수 있었다.

위 농도별 test를 근거로 gourami sp. 외 이전에 보고된 담수관상어와 해산어종을 대상으로 감수성 test를 하였으며, 이전 연구에서 사용하였던 해산어 iridovirus strain의 하나인 RSIV Sacuun과 동일한 실험을 실시하였으며, test 상의 virus isolate 간의 농도차를 줄이기 위해서 PCR 기법을 이용하여 동량의 virus양을 challenge하였다. 그 결과 감수성의 차이는 있지만, 토착어종인 참봉어를 제외한 두 virus strain 모두 담수어와 해산어 모두에 병원성을 나타내었다(Fig. 8). 이는 각 지역에서 발견되고 있는 iridoviruses가 생태적인 관점에서 단일 source일 가능성을 제시하고 있다(Miyata et al. 1997; Jung&Oh 2000).

본 연구에서는 우리나라에 나타나는 iridovirus에 감염된 담수관상어에 대한

최초의 보고로써, 수입 경로를 통한 iridovirus의 국내로의 유입을 제시하였으며, pearl gourami(*Trichogaster leeri*)와 돌돔에 있어서 LD₅₀을 계산하여 담수어와 해산어의 담수관상어 iridovirus의 감수성의 차이를 비교하였으며, 담수관상어 iridovirus와 해산어 iridovirus의 cross challenge를 통하여 담수와 해수간의 각 virus의 전염 가능성을 제시하였다.

현재까지 국내의 관상용 열대 담수어 질병에 대한 체계적인 연구는 아주 미흡한 실정이며, 더욱이 관상어를 수입할 때의 질병 여부 검사도 전혀 이루어지지 않고 있다. 본 연구는 이와 관련하여 국내의 관상어 질병 연구에 대한 시발점의 역할을 할 수 있을 거라고 여겨지며, 국내의 여러 관상어종에서 iridovirus의 분포 현황과 종류를 파악하고 보고된 iridoviruses와의 비교를 통해서, 이러한 virus가 수입으로 인해 전파된 것인지 여부를 판단하는데 많은 도움이 될 것이다. 또한 국가간의 관상어 무역에 있어서 더 많은 정보를 가짐으로써, 비교 우위에 설 수 있도록 도와줄 것이다.

Iridovirus의 변이주 분석을 위해서는 특정 DNA 부위에서의 염기배열 variation과 함께 DNA의 insertion 또는 deletion 존재의 가능성에 대한 연구도 이루어져야 한다. 현재까지 연구되어진 iridovirus의 특성을 분석하여 보면, 유전자의 끝 부분 근처에 많은 repeating sequence를 가지고 있으며 이러한 sequences는 바이러스의 genomic DNA variation 형성에서 가장 먼저 target이 되는 부분으로 알려져 있다 (Schnitzler et al, 1987; Fisher et al, 1988; Bugert et al, 1993). 더구나 Bahr 등(1999)에 의하면 Herpesvirus를 포함한 많은 double stranded DNA virus의 genome에서 특이적인 현상은 DNA polymerase gene 근처에 많은 유전자가 cluster 형태로 존재하고 있다는 것

이다. 이러한 보고들이 의미하는 것은 iridovirus의 genome에서도 DNA polymerase gene의 proximal region 근처에 밀집된 바이러스의 structural 유전자들과 terminal region들이 존재할 수 있으며, 그 결과 이 근처는 당연히 nucleotide variation과 함께 structural 또는 nonstructural 부위에 있는 nonessential region들이나 repeating sequence들의 insertion 또는 deletion 이 강하게 나타날 것으로 추정되어 진다. 이러한 분석은 iridovirus의 특성 이해와 향후의 감염 예방책 마련에 중요한 지식일 것이며, 또한 해산어와 담수어 iridoviruses 사이에서 높은 가능성이 부각되고 있는 변이주들의 genomic divergency에 대한 비교 분석은 수산업 분야에서 많은 문제를 일으키고 있는 iridovirus의 발달과 변화에 대하여 분자 level에서의 추적이 이루어질 수 있을 것이다.

V. 요약

현재까지 국내의 관상용 담수 열대어 질병에 대한 체계적인 연구는 미흡한 실정이다. 본 연구는 대량 폐사를 보이는 Pearl Gourami를 조직병리학적으로 관찰하고, PCR 기법으로 확인 한 결과 iridovirus 감염증인 것을 알 수 있었다.

이 virus의 structure gene인 MCP gene과 ATPase gene을 분석하여 기존의 ISKNV gene과 비교한 결과 99%의 homology을 보였다. 또한 none structure gene 역시 99%의 homology를 보여 한국의 담수관상어에서도 ISKNV에 의한 대량 폐사가 있음을 알 수 있었다. FOV(freshwater ornamental fishes virus)를 농도별로 근육 주사하여 virus의 반수치사농도를 구하였으며, 담수관상어와 해산어에 공격실험을 하여 그 병원성을 확인한 결과, 담수관상어에서 분리된 virus 임에도 해산어에 병원성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 반대로 해산어 iridovirus인 RSIV Sachun을 사용하여 똑같은 조건 하에 공격실험을 한 결과 담수관상어 역시 폐사를 일으키는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 일련의 실험들을 미루어 볼 때 담수어 iridovirus가 바다로 유입되면 해산어 양식장에 많은 피해를 입힐 수 있다는 것을 확인 할 수 있었다.

담수 관상어의 iridovirus 감염 실태를 조사하기 위하여 어종별, 지역별로 2004년 한 해 동안 test한 결과 대부분의 담수관상어에서 carrier 형태로 iridovirus를 가지고 있는 것을 알 수 있었으며, 담수관상어에 대한 iridovirus 감염위험은 항상 존재하며, 본 연구를 통해 관상어 수입에 있어서의 철저한 규제가 필요할 것으로 여겨진다.

Ⅵ. 감사의 글

세월이 어찌나 빠른지 입학이 어제 같이 느껴지는데 벌써 졸업입니다. 2년간의 대학원 생활은 저에게 참 많은 일들이 있었습니다. 기쁜 일 슬픈 일 아쉬웠던 일들 모두 저 이 모든 일들 주위에는 항상 저를 지켜보고 도와주신 많은 분들이 있었습니다. 2년간 많은 것들을 가르쳐 주셨으며, 저의 잘 못을 꾸짖어 주시고 때로는 자상한 말들로 타일러 주시며 항상 바른 길을 인도하여 주셨던 지도 교수님이신 정현도 교수님 정말 감사드립니다. 그리고 바쁘신 와중에도 저의 부족한 논문을 검토해 주시고, 좋은 말씀해 주신 정준기 교수님과 허민도 교수님 감사드립니다. 또, 항상 부족한 제자에게 많은 가르침을 주신 박수일 교수님, 김기홍 교수님, 강주찬 교수님께도 감사의 말씀을 올립니다.

제가 논문을 무사히 쓰고, 2년간 즐겁게 학교생활을 하고, 대학원 석사과정을 이수할 수 있었던 것은 다름 아닌 진단생화학 실험실 가족 모두의 덕택입니다. 언제나 실험실의 만형으로 실험실을 이끌어 가시는 준범 형님, 언제나 좋은 본보기가 되어 주시는 광규 형님과 남실 누나, 그리고 밖에서 우리를 챙겨주신 수희 누나, 은아 누나, 병석 형님, 경엽 형님, 종영 형님, 영이 누나, 주영 누나, 우열 형님, 영재 형님, 성현 형님 감사드립니다. 그리고 저에게 농어를 구해주기 위해 검역소에서 고생을 하신 준효 형님 진심으로 감사드립니다. 그리고 실험실 선배처럼 때로는 친구처럼, 혹은 학교 후배로써 많은 도움을 준 려진, 대심, 영화 실험 할 때 열심히 나를 도와준 지효 실험하라 실험실 살림하라 언제나 바쁜 현정이 힘든 수조실 일들을 돕주게 잘 해주었던 상훈, 영수 그리고 민수 언제나 실험실에 웃음이 되어 주는 혜진이와 소혜에게 감사의 말씀을 전합니다. 그리고 10년을 옆에 있으면서 나의 부족한 부분과 잘 못된 부분을 일깨워 주고 나를 도와주었던 순범이와 재훈이 그리고 신후 다른 실험실에 있지만 마음은 언제나 곁에 있는 것 같은 상환 형, 세련이 그리고 모든 96 동기들에게 감사의 마음을 전합니다.

지난 2년간 다른 실험실에서 각자의 실험을 하며, 많은 도움을 받았던 2003년 대학원 동기 은혜, 성미, 유화, 혜정, 나영에게 감사의 마음을 전합니다.

그리고 지금의 논문이 나올 수 있게 도와주신 석형 형님과 대가로 관상어의 사장 감사드립니다. 내 소중한 친구 선준, 성진, 기용 그리고 태훈 형님 또 다른 나를 찾을 수 있게 해준 MBC 야구 가족 모두에게 감사의 마음을 전합니다. 그리고 부족한 나에게 든든한 버팀목이 되어 준 큰누나, 큰자형, 둘째 누나, 둘째 자형, 막내 누나, 막내자형 정말 감사합니다.

그리고 못난 아들을 믿고 지금까지의 나를 있게 해주신 아버지 어머니 정말 감사합니다. 작은 결실이지만 저의 2년간의 노력이 담긴 논문을 사랑하는 가족과 나의 소중한 사람들 모두에게 바칩니다.

VII. 참고 문헌

- Anderson, I. G., Prior, H. C., Rodwell, B. J., Harris, G. O., 1993.
Iridovirus-like virions in imported dwarf gourami (*Colisa lalia*) with
systemic amoebiasis. Aust Vet J. 70, 66-67.
- Armstrong, R. D., Ferguson, H. W., 1989. Systemic viral disease of the
chromide cichlid *Etroplus maculatus*. Dis aquat Org. 7, 155-157
- 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 Res 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 te terminal
repetitive sequences within the genome of mollusum contagiosum
virus type I by DNA nucleotide analysis. Virol. 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. Virol. 167, 497–506.

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 mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. Virology 291, 126–139.

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.

Hedrick, R. P., McDowell, T. S., 1995. Properties of iridoviruses from ornamental fish. Vet Res 26, 423–427.

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. Virol. 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 Pathol. 27, 19–27 (in Japanese with

English abstract).

- Jeong, J. B., Jun, L. J., Yoo, M. H., Kim, M. S., Komisar, J. L., Jeong, H. D., 2003. Characterization of the DNA nucleotide sequences in the genome of red sea bream iridoviruses isolated in Korea. *Aquaculture*, 220, 119–133.
- 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 Dis.* 23, 223–226
- 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.
- 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.
- 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.

- Paperna, I., M., V. and Matos, A., P., A., 2001. Iridovirus infections in farm-reared tropical ornamental fish. *Dis Aquat Org.* 48, 17–25.
- 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.
- Rasin, K., 1927. Príspevek k pathogenesi Lymphocytis johnstonei Woodcock. I. Biologické spisy Vysoké Zverolekarské Brno. 6, 11–38(Biological Abstract 1931, No. 24008).
- 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.
- Sudthongkong Chaiwud, Myata Masato, Miyazaki Teruo. 2002 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., 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. *Viol.* 230, 207–216.

Webby, R. J. and Kalkmakoff, J., 1998. Sequence comparison of the major capsid protein gene from 18 diverse iridoviruses. *Arch. Virol.* 143, 1949–1966.