

한국에서 분리된 IHNV-PRT의 G protein의 유전자 클로닝과 염기서열 분석

김영조 · 허강준* · 박정우¹ · 박정문²

충북대학교 수의과대학 어류질병학연구소, ¹울산대학교 생명과학부 바이러스학교실,
²(주) 한국미생물연구소

무지개송어(*Salmo gairdnerii*) 등의 연어과 어류에서 발생하는 전염성 조혈기괴사증 바이러스 (infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)의 국내분리주인 IHNV-PRT의 특성을 규명하기 위하여 IHNV-PRT의 당단백질(glycoprotein)인 G를 암호화하고 있는 유전자의 일부를 PCR로 증폭한 후 cDNA를 클로닝하여 이들의 염기서열을 분석하였다. 이 PCR product는 442 bp의 크기이었다. IHNV-PRT의 G의 염기서열을 IHNV의 다른 strain과 비교분석한 결과 IHNV-RB-76, IHNV-RB, IHNV-LR-73, IHNV-K, IHNV-WRAC, IHNV-SRCV, IHNV-Col-85들의 G와 각각 95, 94, 94, 94, 94, 93, 93%의 상동성을 보였다. 그러나 넙치(*Paralichthys olivaceus*)로부터 분리된 fish rhabdovirus인 hirame rhabdovirus(HRV)의 G와는 81%의 상동성을 보였다. 이 결과로부터 IHNV의 G 유전자는 비록 HRV의 G유전자와 유사성은 높지 않지만, IHNV의 strain에 관계없이 유사하다는 것을 알 수 있다.

Key words □ Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), G gene, nucleotide sequence, PCR, primer

전염성 조혈기 괴사증 바이러스(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)는 연어 및 송어의 치어에 감염하여 질병을 일으키는 어류 rhabdovirus이다. 이 바이러스는 1969년에 처음으로 분리되어(1) IHNV로 명명된 이래, 북미 서부지역(2) 및 일본(2), 캐나다(3), 대만(4), 이탈리아(5), 그리고 프랑스(6) 등에서 분리되었으며, 매년 연어, 송어등의 연어과 어류양식에 큰 피해를 입히는 것으로 알려져 있다(2). 그리고 최근들어 우리나라에서도 대량폐사된 무지개송어(*Salmo gairdnerii*) 치어에서 IHNV가 분리됨으로서, IHNV가 우리나라에서 매년 발생하는 무지개송어 대량폐사의 원인인이 확인되었다(3).

IHNV의 경우 공식적으로 인정되는 표준형은 아직까지 정해진 바 없다. 그러나 Pilcher와 Fryer(2)는 여러 지역에서 분리된 IHNV들의 병독성이 각각 다름을 발견하고 여러 종류의 IHNV가 있을 수 있음을 시사하였다. 그 후 IHNV의 구조단백질이 5종류이고, 이들 각각의 분자량(L. polymerase. 150-190 kDa; G. surface glycoprotein. 67-80 kDa; N. nucleocapsid. 38-40 kDa; M1. matrix protein. 22 kDa; M2. matrix protein. 17-20 kDa)이 확인되면서(7, 8), 구조단백질의 분자량의 차이로부터 IHNV를 grouping하고자 하는 시도가 있었다. 그 결과(9), SDS-polyacrylamide gel 상에서 IHNV 구조단백질의 G와 N의 분자량의 차이를 기준으로 하여 세계 여러지역에서 분리된 71종류의 IHNV들을 5 types(electrophenotypes)으로 분류하였다. 그리고 Winton 등(10)은 중화역가가 있는 3종류의 monoclonal antibodies(MAbs)를 사용하여 세계 여러지역에서 분리된 12가

지의 IHNV들을 4종류의 group으로 분류하였고, 지역에 따라 서로 다른 group이 존재함을 확인하였다. 그러나 최근에 Engeling 등(11)이 한 종류의 IHNV에서 분리한 G protein을 물고기에 주입한 결과, 5 electrophenotypes 모두에 대한 protective immune response가 유도되었고, 또한 한 종류의 IHNV에 대한 polyclonal antibody가 5 electrophenotypes 모두를 중화시켰다고 발표하여 IHNV에 혈청형이 하나일 가능성이 높음을 나타내었다.

현재 IHNV에 의한 질병을 control하기 위하여 많은 연구가 행해지고 있다. IHNV 백신의 개발은 어류가 IHNV에 대하여 중화항체를 만든다는 보고(12)가 나온 이후 활발하게 진행되었다. 최근에는 IHNV 구조단백질 중 중화 epitope를 coding하는 유전자를 cloning한 후 *E. coli* 등의 미생물에서 비교적 저렴하게 대량생산을 할 수 있는 subunit 백신을 개발하고 있으며, 미국에서는 이미 IHNV의 백신개발이 완성단계에 있다(13-15).

그러나 한국에서 분리된 IHNV는 외국에서 분리된 IHNV strain들과 혈청학적 특성 및 구조단백질의 size(3)에 있어서 약간 차이가 있어, 본 연구에서는 기존의 미국에서 개발되고 있는 백신이 우리나라에서 분리된 IHNV에 대하여 백신으로서의 효과를 기대할 수 있는지를 알아보기 위하여, IHNV-PRT의 특성을 보다 명확히 규명하고 구조단백질 중 G의 cDNA를 클로닝하여 그 유전자들의 염기서열을 분석하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 바이러스

IHNV의 숙주세포로서 CHSE-214(Chinook salmon embryos)

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 82-0431-261-2617, Fax : 82-0431-261-3246
E-mail . gjheo@cbucc.chungbuk.ac.kr

cell line을 사용하였다. 세포는 fetal bovine serum (FBS)이 10%, 그리고 streptomycin(50 mg/l, GibcoBRL, USA)과 gentamycin(80 mg/l, GibcoBRL, USA)이 첨가된 Eagles' minimum essential medium(EMEM, Sigma, USA)을 사용하여 18°C에서 배양하였다. 실험에 사용한 바이러스는 무지개송어에서 분리된 IHNV-PRT(3)을 선택하여 실험하였다.

Total RNA의 추출

Guanidium thiocyanate-acid phenol-chloroform 법을 사용하여 RNA를 추출하였다. 단일층(monolayer)으로 자란 CHSE-214 세포에 IHNV-PRT를 감염시켰다. 감염 후 25시간째에 media를 제거하고 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 후, denaturing solution(4M guanidium thiocyanate, 0.5% SDS, 25 mM sodium citrate pH 7.0, 0.1 M 2-mercaptoethanol)을 첨가하여 세포를 용해시켰다. 여기에 sodium acetate(pH 4.0)를 0.2M이 되도록 첨가한 후 denaturing solution과 동량의 acidic phenol-chloroform-isoamyl alcohol(125:24:1)을 첨가하였다. 그리고 원심분리한 후 상층액을 취하였다. 99% ethanol로 RNA를 침전시킨 후 diethylpyrocarbonate(DEPC)로 처리한 물로 녹였다.

cDNA의 합성

Polymerase chain reaction(PCR)을 위한 cDNA는 SUPERSCRIPT™ II RNase H Reverse Transcriptase(GibcoBRL, USA)를 사용하여 합성하였다. Kit를 이용한 cDNA합성은 GibcoBRL사의 protocol(Lot No. HKJ406)에 준하여 수행하였다. 즉, nuclease free tube에 total RNA, oligo(dT) 15, 그리고 sterile distilled water를 넣고 섞은 후, 70°C에서 10분간 denaturation시켰다. 여기에 상온에서 5×First Strand Buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂], 0.1M DTT, 그리고 10 mM dNTP mix를 넣고 잘 섞은 후 42°C 에서 2분간 반응시켰다. 200U의 SUPERSRIPT™ II 를 넣고 잘 섞어준 다음 42°C에서 50분간 반응시켰다. 반응 후 70°C에서 15분간 heat-inactivation시켰다. 그리고 RNase H(2 units)를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다.

PCR

IHNV의 G유전자의 클로닝과 이들 유전자의 비교 분석실험에 사용할 DNA fragment의 합성을 위하여 RT-PCR을 수행하였다. PCR을 위한 primer는 이미 보고된 바 있는 IHNV-WRAC의 염기서열을 바탕으로 제작하였다(Table 1.). 제조한 cDNA에 0.5 U의 Taq polymerase(대한메디칼시스템), 5 pmole의 sense와 antisense primer, 2 mM dNTP, 그리고 10×reaction buffer를 넣고 DNA를 증폭시켰다. DNA 증폭은 Fast Thermal Cycler(

대한메디칼시스템)을 사용하였으며, 94°C(3 sec), 46°C(1 sec), 그리고 72°C(8 sec)의 순서로 35 cycle을 수행하였다. 증폭된 cDNA는 클로닝과 염기서열 분석에 사용하였다.

coli DH5α의 형질전환

RT-PCR로 증폭시킨 PCR product를 T4 DNA ligase [(3 Weiss units/l), Promega, USA]를 사용해 pGEM-T Easy Vector에 ligation시켰다. 이 vector construct를 이용해서 *E.coli* DH5 α를 형질전환시켰다. 즉, competent cell과 vector construct를 섞은 후 얼음에서 30분간 방치 하였다. 그리고 42°C에서 1분 동안 반응시킨 후 얼음에서 2분 동안 반응시켰다. 그리고 이것을 S.O.C. 액체배지에서 배양시켰다(150 rpm, 1.5 hr, 37 °C).

형질전환 개체의 분석

형질전환된 세포를 ampicillin(100 g/ml, Sigma, USA)이 포함된 LB배지(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1.5% agar)에 도말한 후 37°C에서 하루 동안 배양하였다. 생성된 colony들 중 G gene을 포함하는 것을 선별하기 위해 LB 액체 배지에서 다시 배양한(37°C, 12 hr) 후 alkaline lysis방법으로 plasmid를 분리하였다. 분리된 plasmid DNA를 Pvu II(10 U/l)으로 절단하여 insert의 존재 유무 및 크기를 확인하였다. Insert의 크기는 1% agarose gel 상에서 DNA ladder marker의 이동거리와 비교하여 결정하였다.

염기서열 분석

DNA 염기서열 분석은 울산대학교의 기초과학지원센터의 automatic DNA sequencer(Applied Biosystem, Inc., USA)를 사용하여 수행하였다. DNA 염기서열과 이로부터 유추한 아미노산 서열을 비교분석 하기 위해서 Genbank database, CLUSTAL W program을 사용하였다. 비교분석에 사용한 유전자들은 다음과 같다; IHNV-RB-76(L40880), IHNV-RB(M16023), IHNV-LR-73(L40877), IHNV-K(X73872), IHNV-WRAC(L40882), IHNV-SRCV(L40881), IHNV-Col-85(L40874), hiram rhabdovirus (U24073).

결과 및 고찰

PCR을 이용한 IHNV G 유전자의 증폭

CHSE-214 세포에 IHNV-PRT를 감염시킨 후 25시간 췌에 guanidium-thiocyanate-acid phenol-chloroform법을 사용하여 RNA를 추출하였다. 그리고 SUPERSRIPT™ II RNase H-reverse transcriptase(GibcoBRL, USA) 를 사용하여 cDNA를

Table 1. PCR primer of G protein of IHNV-PRT

Primers	Sequences	Prospected size of PCR product
G-sense	5'-AAAGCTTACCTCTTTGTTGATAAAA-3'	442 bp
G-antisense	5'-TGGATCCCTCGTCCACAGCGACCGT-3'	

- necrosis virus by serological neutralization and cross-protection assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1372-1378.
12. Amend, D.F. and L. Smith. 1974. Pathophysiology of infectious hematopoietic necrosis disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): Early changes in blood and aspect of the immune response after injection of IHNV virus. *J. Fish. Res. Board Can.* **31**, 1371-1378.
 13. Gilmore, R.D., H.M. Engelking, D.S. Munning, and J.C. Leong. 1998. Expression in *E. coli* of an epitope of the glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus protect against viral challenge. *Bio. Technology* **6**(3), 85-90.
 14. Engelking, H.M. and J.C. Leong. 1989. The glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus elicits neutralization antibody and protective responses. *Virus Res.* **13**(3), 213-230.
 15. Xu, L., D.V. Mourich, H.M. Engelking, S. Ristow, J. Arnszen, and Z.C. Leong. 1991. Epitope mapping and characterization of infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein using fusion protein synthesized in *E. coli*. *J. Virol.* **65**(3), 1611-1615.
 16. Wolf, K. 1988. Fish viruses and fish viral diseases. p 83-114. Cornell University Press. New York.
 17. Koener, J.F., C.W. Passavant, G. Kurath, and J. Leong. 1987. Nucleotide sequence of a cDNA clone carrying the glycoprotein gene of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. *J. Virol.* **61**(5), 1342-1349.
 18. Hedrick, R.P., W.D. Eaton, J.L. Fryer, Y.C. Hah, J.W. Park, and S.W. Hong. 1985. Biochemical and serological properties of birnaviruses isolated from fish in Korea. *Fish Pathology* **20**, 463-468.

(Received July 15, 1999/Accepted August 31, 1999)

ABSTRACT : Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the G protein of a Korean Isolate of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus

Young-Jo Kim, Gang-Joon Heo, Jeong-Woo Park¹, and Jeong-Moon Park² (Department of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, ¹Department of Biological Science, University of Ulsan, Ulsan 680-749, ²Korea Microbiological Lab., LTD., Siheung 429-450)

To characterize the Korean isolate of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV-PRT), a partial DNA fragment G gene of the IHNV-PRT was amplified by RT-PCR, cloned into pGEM-T easy vector and analyzed for nucleotide sequences. The size of the PCR product was about 442 bp. The nucleotide sequence homologies of the G gene of IHNV-PRT were 95%, 94%, 94%, 94%, 93%, 93%, respectively, with those of foreign isolates of IHNV, IHNV-RB-76, IHNV-LR-73, IHNV-K, IHNV-WRAC, IHNV-SRCV, IHNV-Col-85. However, it showed 81% homology with that of other fish rhabdovirus, hiramé rhabdovirus (HRV). From the results of deduced amino acid sequence homology analysis, G protein of IHNV-PRT showed 96% homologies with those of foreign isolates of IHNV but 89% homology with that of HRV. These results indicated that, even though G gene of IHNV-PRT showed low homology with that of HRV, it was highly conserved among different strains of IHNV.