

## 국내 해산양식어 조피볼락에서 분리된 수생버나바이러스 GC-1의 VP2 발현

조성준\*, 성환우, 이윤정, 김재홍, 강신영<sup>1</sup>

국립수의과학검역원, <sup>1</sup>충북대학교 수의과대학

(게재승인: 2003년 8월 1일)

### Expression of VP2 of Aquatic Birnavirus GC-1 Isolated from Rockfish (*Sebastes schlegeli*), Rearing in Seawater in Korea

Seong-joon Joh\*, Haan-woo Sung, Yun-jeong Lee, Jae-hong Kim and Shien-young Kang<sup>1</sup>

Avian Disease Division, National Veterinary Research & Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

(Accepted: August 1, 2003)

**Abstract:** The VP2 gene of aquatic birnavirus, Korean isolate (GC-1) was cloned and expressed using the baculovirus expression system. The VP2 gene and VP2 partial gene, which contained a neutralizing epitope, were constructed for recombinant transfer vectors, for baculovirus expression. The expressed recombinant proteins were confirmed by indirect immuno fluorescence antibody (IFA), SDS-PAGE and Western blot. The level of expression was checked at regular time using IFA and Western blot. To measure the neutralizing activity of recombinant proteins against GC-1 strain, the antisera against recombinant proteins were produced by using guinea pigs. The result showed that the antisera neutralized the GC-1 strain. However, the neutralizing titer was higher in antisera against the VP2 gene expressed recombinant protein than that of VP2 partial gene recombinant protein.

**Key words:** aquatic birnavirus, GC-1, VP2, expression

## 서 론

국내 주요 양식해산어인 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*, 우럭)에서 분리된 수생버나바이러스 GC-1주는 버나바이러스과 (Family *Birnaviridae*), 수생버나바이러스속 (Genus *Aquabirnavirus*)에 속하는 RNA 바이러스이다 [1]. 버나바이러스과에는 연어과어류에서 주로 알려져 있는 전염성 췌장 괴사증 바이러스 (Infectious pancreatic necrosis virus, IPNV), 가금의 전염성 F낭병 바이러스 (Infectious bursal disease virus, IBDV)가 있으며 수생버나바이러스

속에는 주로 연어과어류에서 분리되는 IPNV와 IPNV 이외의 다양한 어종에서 분리되고 있는 수생버나바이러스가 있다 [9, 13, 15, 23]. 수생버나바이러스는 두 개의 분절로 구성된 이중 나선구조의 RNA를 가지고 있으며 정이십면체의 구조로서 엔벨롭을 지니지 않는 약 직경 60 nm의 바이러스이다 [23]. 수생버나바이러스 가운데 가장 많이 분리 보고된 IPNV의 RNA 분절은 두 개의 분절 가운데 작은 분절 (B)의 경우 약 2,900 bp의 길이를 지니며 약 90 kDa의 분자량을 지닌 잠정적 dsRNA polymerase인 VP1을 코딩하고 있으며, 반면 큰 분절 (분

\* Corresponding author: Seong-joon Joh  
Avian Disease Division, National Veterinary Research & Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea  
Tel: +82-31-467-1808, E-mail: johsj@nvrqs.go.kr

절 A)은 약 3,100 bp의 길이를 지니고 N-pVP2-NS-VP3-C의 순서로 구성된 polyprotein을 코딩하고 있다 [5]. VP2는 바이러스의 주요 캡시드 단백질로서 바이러스에 대한 특이 중화항체를 유도할 수 있는 항원부위를 지니고 있으며, VP3는 내부의 바이러스 캡시드 단백질로서 수생버나바이러스에 대한 공통항원을 지니고 있다 [11, 22]. 이 polyprotein은 번역 후 비구조 단백질 (nonstructural, NS)인 바이러스의 protease 작용에 의해 절단되어 각각의 전구체 VP2 (pVP2)와 VP3로 전환되며, pVP2는 더 절단되어 성숙한 VP2가 된다. 분절 A에는 이들 3 개의 단백질을 코딩하는 large open reading frame (ORF)과 더불어 17 kDa 크기의 단백질을 코딩하는 VP5로 알려져 있는 small ORF이 있는데 이 small ORF는 VP2 유전자의 5' 말단에 위치하고 있으며 그 기능에 대해서는 아직 완전하게 알려져 있지 않다 [10].

수생버나바이러스 GC-1주는 약 2,776 bp의 길이의 분절 B와 3,086 bp의 길이의 분절 A를 지니고 있으며, 분절 A의 전체 염기서열은 GenBank에 등록하였다(accession number: AY064396) [14].

수생버나바이러스는 국내 해산어류에서 큰 피해를 일으키는 바이러스질병중의 하나로서 그 피해는 점점 증가추세에 있다. 따라서 본 질병에 대한 예방대책이 필요한 상황에 있다. 본 연구는 이에 대한 예방적 차원에서 국내 양식해산어 중에서 가장 많이 양식하고 있는 어종중의 하나인 조피볼락에서 분리한 수생버나바이러스를 이용하여 바이러스에 대한 중화항체를 유도할 수 있는 VP2 유전자를 발현시켜 재조합 백신의 개발을 위한 기초연구를 수행하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 바이러스 및 세포

본 실험에 사용한 수생버나바이러스 GC-1주는 전북 고창에서 양식 중이던 조피볼락으로부터 분리된 것으

로 물리화학적 및 혈청학적 성상을 조사 [19] 한 후 충북대학교 수의과대학 어병학교실에서 유지, 보관되고 있는 것을 사용하였다. GC-1주는 연어과어류 유래 세포인 Chinook Salmon Embryo-214 (CHSE-214) 세포를 이용하여 증식시켰으며 CHSE-214 세포는 10% 소태아혈청 (Fetal bovine serum: FBS, GibcoBRL, USA)이 함유된 Earle's minimal essential medium (EMEM, GibcoBRL) 배지를 사용하여 배양하였다.

### 바이러스 핵산 추출

GC-1주의 조직배양액으로부터 바이러스 RNA는 Chung 등 [32]의 방법을 응용하여 추출하였으며, DEPC (Diethyl pyrocarbonate, Sigma, USA)로 처리된 증류수에 용해시켜 -20°C에 보관하였다.

### Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

GC-1주의 VP2 유전자는 특이 primers를 이용하여 RT-PCR법으로 cDNA를 합성하고 증폭시켰다. VP2 특이 유전자는 GC-1의 전체염기서열을 참조하여 Table 1에서와 같이 제작하였다. VP2 유전자 전체를 증폭하기 위한 primer는 VP2 유전자 전체와 VP3 유전자의 N-말단 일부가 포함될 수 있도록 구성하였으며, 효율적인 크로닝을 위하여 전체 VP2 유전자를 두 부분으로 나누어 제작하였다. 또한 VP2 내의 중화 epitope 부위만 증폭하기 위한 VP2 일부 유전자의 증폭에는 단일 primer를 사용하였다. 모든 primer는 Forward primer의 5'-말단에 제한효소인 *Sma* I enzyme site (CCCGGG)를 그리고 reverse primer의 5'-말단에는 *Not* I enzyme site (GCGGCCGC)을 첨가하여 크로닝 작업을 용이하게 하였으며 증폭 효율을 높이기 위해 각 primer의 앞뒤에 두 개의 CC염기를 첨가하였다. RNA를 추출하여 변성시킨 뒤 31  $\mu$ l의 RNA를 cDNA 합성혼합물 (5 $\times$  1st buffer 10  $\mu$ l, 0.1 M

Table 1. Primers for cDNA synthesis and PCR amplification of the VP2 gene of GC-1 strain

Primer	Position	Sequence (5'→3')	Coding region
VP2/f1.F	117- 134	CC-CCCGGGATGAACACAACAAAGGCA**	
VP2/f1.R	1662-1683	GTCTTTGAGGTTGCGTGAGAG	VP2-NS-*pVP3
VP2/f2.F	1599-1619	GCAGCAGGAGGACGCTACT	
VP2/f2.R	2355-2369	CC-GCGGCCGCTTATCATCTGGCCATGGTGGC***	
VP2/p.F	573- 590	CC-CCCGGGAACACCAGCCAGTCACC**	*pVP2
VP2/p.R	1137-1151	CC-GCGGCCGCTTATCATCCAGGCACGTTGCC***	

\* partial region, \*\* *Sma* I site and \*\*\* *Not* I site

DTT 5  $\mu$ l, 10 mM dNTPs 2  $\mu$ l, RNasin 1  $\mu$ l 및 1  $\mu$ l Moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase, Promega)에 넣고 37°C에서 90분간 반응시켰다. 이와 같이 합성된 cDNA는 다음 단계의 PCR 반응에 필요한 주형으로 사용하였으며 PCR 반응은 다음과 같이 수행하였다. PCR 반응혼합물 (10  $\times$  PCR buffer [100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 1 mg/ml gelatin, pH 8.3] 5  $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 6  $\mu$ l, 10 mM dNTPs 1  $\mu$ l, 100 pmol/ $\mu$ l의 각 primer 1  $\mu$ l, 2.5 units Taq DNA polymerase I 1  $\mu$ l)에 15  $\mu$ l의 cDNA를 넣고 증류수를 가하여 총 50  $\mu$ l의 용량으로 맞추었다. PCR은 GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer)을 사용하여 수행하였으며 PCR 혼합물을 95°C에서 3분간 전 단계 변성을 시키고 그 후 95°C 1분간 변성반응, primer에 따른 54°C-58°C 1분간 연결반응 그리고 72°C 1분간 신장반응을 총 35회 시켰으며 최종적으로 72°C에서 3분간 신장반응을 시킨 후 PCR 반응을 종료시켰다. PCR 산물은 1.5% agarose gel로 전기영동을 실시하여 확인하였다.

**VP2 유전자 발현**

VP2 유전자 발현은 베콜로바이러스 발현체계를 이용하여 수행하였으며 크로닝을 위하여 pCR2.1 (Invitrogen, USA) 벡터를 사용하였고 발현벡터로는 pAcGP67A (Phamingen, USA)를 사용하였다. 베콜로바이러스는 AcMNPV (*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus)를 사용하였고 바이러스를 증식시키기 위해 곤충 세포인 Sf 9 (*Spodoptera frugiperda*) 세포를 사용하였으며 세포의 증식에는 Grace's insect cell culture medium (GibcoBRL, USA)을 사용하였다.

VP2 전체유전자는 부분적으로 증폭된 두 개의 증폭 산물을 크로닝하여 *Nhe* I 제한효소 절단 부위에 두 증폭산물을 연결시키고 발현벡터의 *Sma* I 과 *Not* I 제한효소 부위에 삽입하여 재조합 유전자를 완성하였으며 pVP2/f로 명명하였다. VP2 부분유전자는 단일 증폭산물로 크로닝하고 발현벡터의 *Sma* I 과 *Not* I 제한효소 부위에 삽입하여 재조합 유전자를 완성하였으며 pVP2/p로 명명하였다. 재조합 유전자의 베콜로바이러스내 transfection은 BacPAK Baculovirus expression system (Clontech, USA)을 사용하였으며 transfection 과정은 제조사의 숙식을 따랐다. Transfection 후 CPE가 나타난 Sf 9 세포의 배양액은 4°C에 보관하면서 사용하였다.

재조합 유전자의 확인은 재조합 바이러스의 DNA를 추출한 후 PCR을 이용하여 확인하였으며, 재조합 단백질 발현은 기니피 유래 GC-1주의 항혈청을 이용한 IFA 법으로 확인하였다. IFA는 멸균된 커버슬립위에 배양된

Sf 9 세포에 재조합 바이러스를 m.o.i 0.1이 되도록 접종하여 배양한 후 아세톤으로 고정시키고 FITC가 표식되어 있는 goat anti-guinea pig IgG (Sigma, USA)로 염색하였다. 발현된 재조합 단백질의 특성은 SDS-PAGE 및 Western blot을 이용하여 확인하였다.

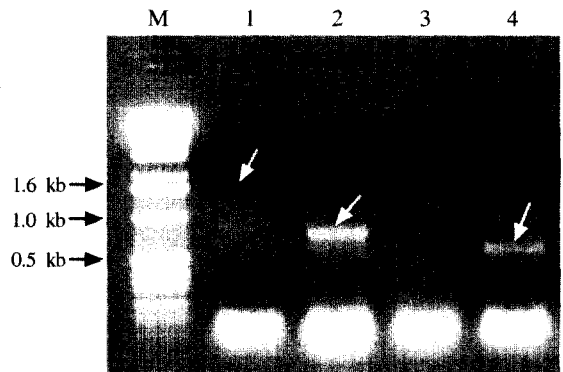
**재조합 단백질의 항혈청 제작**

발현된 재조합 단백질에 대한 항혈청은 초음파로 파쇄한 재조합 바이러스가 감염된 세포의 상층액을 4주령된 기니피의 대퇴부 근육에 접종시켜 생산하였다. 3주간격으로 3회 접종하였으며 최종 역가를 확인하고 전체 혈하여 항혈청을 생산하였다. 재조합 단백질에 대한 항혈청의 역가는 상기의 IFA법으로 확인하였으며 항혈청의 GC-1주에 대한 중화능력은 혈청중화시험을 이용하여 실시하였다.

**결 과**

**RT-PCR**

수생버나바이러스 GC-1주에서 추출한 RNA를 VP2 특이 primer를 이용하여 VP2 전체유전자는 두 부분으로 나누어 RT-PCR을 실시하였으며 그 결과 1.6 kb와 0.8 kb 크기의 유전자 산물이 증폭되었음을 확인할 수 있었고 VP2 부분유전자는 0.6 kb 크기의 유전자 산물이 증폭되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).



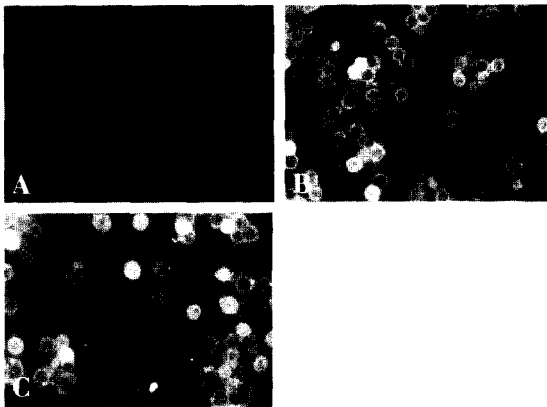
**Fig. 1.** PCR amplification of VP2s cDNAs. M; 1.0 kb marker, 1; VP2/f1, 2; VP2/f2, 3; VP2/f1-2, 4; VP2/p.

**VP2 유전자 발현 및 발현 단백질의 확인**

재조합 VP2 유전자는 재조합 유전자가 삽입된 베콜로바이러스를 Sf 9 세포에 접종한 후 CPE가 나타난 세포로부터 DNA를 추출 후 PCR을 실시하여 확인하였으

며 그 결과 전체유전자는 1.6 kb와 0.8 kb 크기의 PCR 산물을, 부분유전자는 0.6 kb 크기의 PCR 산물을 확인할 수 있었다.

발현된 재조합 단백질을 기니픽에서 제조한 GC-1의 항혈청을 이용하여 IFA법으로 확인하였으며 (Fig. 2), 재조합 바이러스 감염 후 VP2 전체 재조합 단백질은 24 시간부터 96시간까지, 부분 재조합 단백질은 36시간부터 48시간까지 비교적 뚜렷한 형광을 관찰할 수 있었다 (Table 2).



**Fig. 2.** Confirmation of expressed recombinant protein by IFA. Mock and recombinant virus infected Sf 9 cells were reacted with GC-1 specific anti-GP serum. A, mock infected Sf 9 cell, B, Sf 9 cells infected with rVP2/f, C, Sf 9 cell infected with rVP2/p.

**Table 2.** Detection of expressed rVP2 in recombinant baculovirus infected Sf 9 cells by IFA

Time after infection with recombinat baculovirus in Sf 9 cells	6h	12h	24h	36h	48h	72h	96h
Mock	-	-	-	-	-	-	-
rVP2/f	-	-	+	+	++	+++	+++
rVP2/p	-	-	-	+	+	±	-

+, The fluorescence intensity is one-fold.

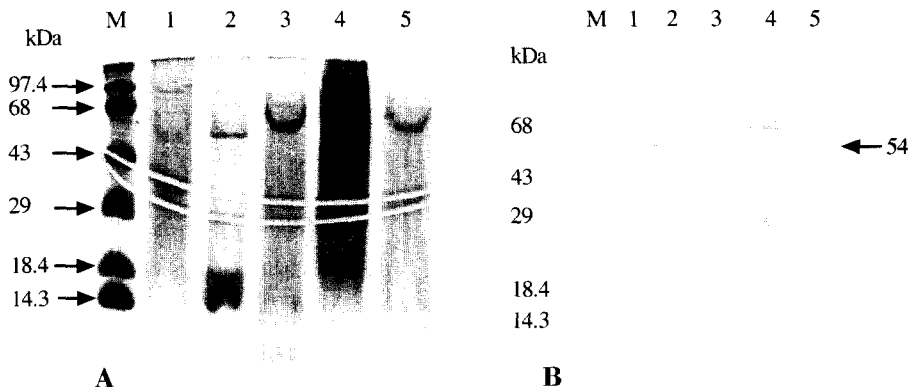
++, The fluorescence intensity is two-folds.

+++, The fluorescence intensity is three-folds.

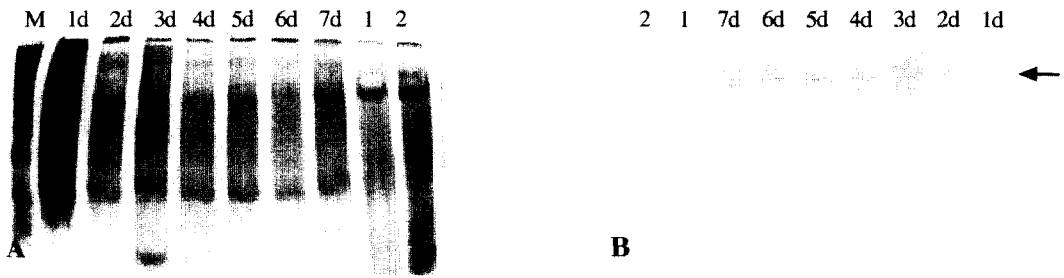
±. The fluorescence intensity is weak.

### SDS-PAGE와 Western blot을 이용한 재조합 단백질의 특성 확인

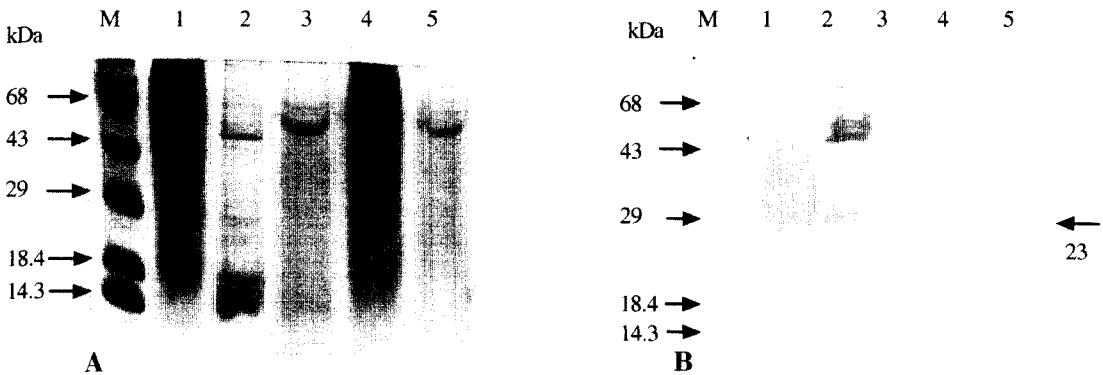
VP2 전체유전자를 발현시킨 재조합 단백질은 약 54 kDa 크기의 단백질 분획으로 나타났으며 (Fig. 3) 시간대 별로 관찰한 재조합 단백질 분획은 재조합 바이러스 감염 후 2일부터 나타나기 시작하여 7일까지 관찰되었다 (Fig. 4). VP2 부분유전자를 발현시킨 재조합 단백질은 29 kDa 보다는 작고 18.4 kDa 보다는 큰 위치에서 2일부터 나타나기 시작하여 3일까지 관찰되었다 (Fig. 5 and 6).



**Fig. 3.** Analysis of expressed recombinant full VP2 protein (rVP2/f) by SDS-PAGE (A) and Western blot (B). M, protein marker; 1, rVP2/f infected Sf 9 cell lysate; 2, GC-1 infected CHSE-214 cell lysate; 3, AcMNPV (wild type baculovirus) infected Sf 9 cell lysate; 4, mock infected CHSE-214 cell lysate; 5, mock infected Sf 9 cell lysate.



**Fig. 4.** Analysis of expressed recombinant full VP2 protein (rVP2/f) with time by SDS-PAGE (A) and Western blot (B). M, protein marker; 1, mock infected Sf 9 cell lysate; 2, AcMNPV (wild type baculovirus) infected Sf 9 cell lysate; 1d-7d, rVP2/f infected Sf 9 cell lysate.



**Fig. 5.** Analysis of expressed recombinant partial VP2 protein (rVP2/p) by SDS-PAGE (A) and Western blot (B). M, protein marker; 1, rVP2/p infected Sf 9 cell lysate; 2, GC-1 infected CHSE-214 cell lysate; 3, AcMNPV (wild type baculovirus) infected Sf 9 cell lysate; 4, mock infected CHSE-214 cell lysate; 5, mock infected Sf 9 cell lysate.



**Fig. 6.** Analysis of expressed recombinant partial VP2 protein (rVP2/p) with time by SDS-PAGE (A) and Western blot (B). M, protein marker; 1, mock infected Sf 9 cell lysate; 2, AcMNPV (wild type baculovirus) infected Sf 9 cell lysate; 1d-7d, rVP2/p infected Sf 9 cell lysate.

**IFA를 이용한 재조합 단백질로부터 생산한 항혈청의 확인**

재조합 단백질에 대한 항혈청의 역가는 모두 IFA법

으로 확인하였다 (Fig. 7). 재조합 단백질 항혈청의 GC-1주에 대한 중화능력 시험을 실시한 결과 GC-1주에 대한 중화능이 있음을 확인하였다.

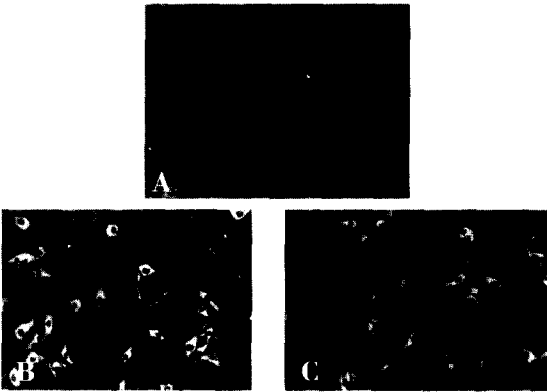


Fig. 7. IFA assay with anti-rVP2s serum against GC-1. GC-1 infected in CHSE-214 cells were reacted with control guinea pig normal serum (A), 1:100 diluted guinea pig anti-rVP2/f serum (B) and 1:100 diluted guinea pig anti-rVP2/p serum (C).

## 고 찰

본 실험에서는 baculovirus 발현시스템을 이용하여 GC-1주의 VP2 유전자를 두 가지 형태로 발현시켰다. 즉, VP2 전체를 포함하는 전체유전자와 VP2 유전자 내의 중화 epitope이 존재하는 곳으로 알려져 있는 일부분만의 유전자를 발현시켰으며 각각 pVP2/f 및 pVP2/p 발현 vector를 작성하였다. pVP2/f transfer vector는 VP2, NS 및 VP3의 N-말단 부위의 일부가 포함되도록 작성하였으며 pVP2/p transfer vector는 Sato 등 [18]이 제작한 transfer vector를 부분 변경하여 삽입 유전자의 말단에 stop codon을 첨부함으로써 중화 epitope 부위만 발현되도록 작성하였다. 발현 vector는 ATG codon과 polyhedrin leader 간의 간격이 가까울수록 발현되는 단백질의 양이 증가된다는 보고 [20]에 따라 표적 유전자를 pAcGP67A transfer vector의 multicloning site 중 polyhedrin promoter 부위에 근접한 *Sma* I과 *Not* I 사이에 삽입시켜 작성하였다.

Western blot을 이용하여 GC-1주의 VP2 전체유전자와 VP2 부분유전자가 발현된 재조합 단백질을 조사한 결과 VP2 전체 재조합 단백질의 경우 43 kDa과 68 kDa 사이에서 68 kDa에 좀더 가깝게 위치해 있는 단백질 분획을 관찰할 수 있었다. Western blot에서 나타나는 수생 버나바이러스의 단백질 분획의 크기에 대하여 Dobos와 Roberts [6]는 IPNV의 단백질 중 VP2는 분자량이 54 kDa이며 VP3는 31 kDa과 29 kDa의 크기로 나타난다고 보고하였으며 Christie 등 [2]과 Estay 등 [7]은 IPNV의 VP2는 50-54 kDa의 크기를 갖는다고 보고하였다. 이러

한 보고들에 의하면 Western blot에서 보이는 GC-1주의 VP2 전체 재조합 단백질은 43 kDa과 68 kDa 크기의 사이에서 50-54 kDa 사이의 크기를 가지는 단백질임을 알 수 있었다. 또한 GC-1주의 VP2 분획은 2개로 나타났는데 이들 분획은 pVP2와 VP2로 추정되었다. 이러한 것은 IPNV의 경우에서도 보고되었으며 [4, 169], 일본의 방어에서 분리된 Y-6주에서도 [2] 단백질 분획의 윗부분에서 나타나는 분획은 pVP2이며 60-62 kDa의 크기이며 아래에서 나타나는 분획은 VP2 분획으로서 52-54 kDa의 크기를 갖는 것으로 보고되었다.

VP2 부분 재조합 단백질의 경우 18.4 kDa과 29 kDa 사이에서 29 kDa과 근접한 위치에서 단백질 분획을 관찰할 수 있었는데 GC-1주와 같은 중화 epitope 부위를 발현시킨 Sato 등 [21]은 발현된 재조합 용합단백질 속에 23 kDa의 분자량을 갖는 재조합 단백질이 포함되어 있음을 보고함으로써 이와 같은 크기의 유전자를 발현시킨 GC-1주의 VP2 부분 재조합 단백질의 분자량도 23 kDa의 크기인 것으로 추정되었다.

Western blot을 이용하여 시간대 별로 재조합 단백질의 발현을 확인한 결과 VP2 전체 재조합 단백질은 재조합 바이러스 감염 후 2일부터 발현되기 시작하여 7일까지 관찰되었으며 VP2 부분 재조합 단백질은 2일부터 관찰되기 시작하여 3일까지 단백질 분획이 나타났다. 이와 같은 결과는 IFA 시험에서 나타난 VP2 전체유전자와 VP2 부분유전자의 발현 양상과 유사한 결과를 나타냈다. Sato 등 [18]은 단백질의 발현 상태를 배지에 protease inhibitor를 넣은 것과 넣지 않은 것의 비교에서 protease inhibitor를 넣은 배지의 곤충세포에서는 발현된 단백질을 잘 관찰할 수 있었으나 protease inhibitor를 넣지 않은 배지에서는 관찰이 어렵다고 보고하였다. 그 이유는 곤충세포에서 유리되는 protease에 의해 발현된 단백질이 분해되기 때문인 것으로 해석하였다. 따라서 VP2 전체유전자에서 발현된 재조합 단백질이 VP2 부분 유전자에서 발현되는 재조합 단백질보다 세포 내에서 오래 관찰되는 이유 중의 하나는 세포 내에서 유리되는 protease에 대해 상대적으로 더 안정된 단백질로 구성되기 때문일 것으로 추정되며 이러한 현상은 발현되는 단백질의 양에 의해서도 차이가 있을 수 있다고 생각한다. 또한 세포 밖의 배지에도 재조합 단백질이 포함되어 있을 것으로 추정되어 배지에서 발현된 단백질을 확인하고자 하였으나 농축하지 않은 상태에서는 발현된 단백질의 분획을 관찰하기 어려웠다.

IPNV의 VP2 내에는 여러 곳에 N-linked glycosylation 추정부위가 존재하고 있으며 [3, 10] GC-1주의 VP2내에도 6곳의 N-linked glycosylation 추정부위가 있다. 그러

나, 실제로 바이러스의 단백질이 생산될 때 N-linked glycosylation이 일어나는지에 대해서는 이견이 있다. Perez 등 [17]은 glycosylation 억제물질인 tunicamycin을 처리하여 IPNV의 VP2가 N-linked glycosylation되는지 여부를 조사한 결과, 전혀 영향을 받지 않는다고 보고하였고 Hjalmarsson 등 [12]은 세포에 따라서 glycosylation 여부에 차이가 있으며 CHSE-214나 RTG-2 세포에 IPNV를 배양하였을 경우에 IPNV의 VP2는 N-linked glycosylation이 일어나지 않고 O-linked glycosylation이 일어난다고 보고하였다. GC-1주의 경우, VP2 전체유전자를 발현시킨 재조합 단백질은 Western blot 분석에서 GC-1주의 VP2 분획인 50-54 kDa 위치보다 조금 위쪽의 위치에 나타나 glycosylation이 되어있는 것으로 추정되나 glycosylation의 종류는 추후 확인이 필요할 것으로 사료된다.

재조합 단백질로 생산한 항혈청에 대하여 Frost 등 [8]은 *E. coli* 발현시스템을 이용하여 발현시킨 재조합 VP2가 바이러스 중화능력은 낮았지만 효과적인 방어능력이 있는 것으로 보고하였으며 Sato 등 [18]은 일본 해산어인 방어에서 분리된 YAV주의 VP2 중화 epitope을 baculovirus 발현시스템을 이용하여 발현시킨 재조합 단백질이 중화항체와 반응함을 확인하였다. 재조합 단백질의 항혈청은 GC-1주에 대하여 2차 접종 후부터 모두 부스터효과가 인정되었으며 중화능의 비교에서 VP2 전체 재조합 단백질에 대한 항혈청이 VP2 부분 재조합 단백질에 대한 항혈청보다 GC-1주에 대한 중화능이 높게 나타났다. 이것은 VP2 전체 재조합 단백질 여러 곳의 중화 epitope에 의한 중화능력의 증대효과가 나타난 것과 재조합 단백질의 발현 후 3차 구조로의 접힘 과정에서 나타난 차이일 것으로 추정한다. 본 연구에서 생산한 재조합 단백질이 백신으로서의 사용 가능성을 확인하기 위해서는 재조합 단백질이 어체 내에서 수생버나바이러스를 중화할 수 있는 생체면역원성이 있는지, 그리고 효과적인 방어효과를 나타낼 수 있는지에 관한 실험이 추후 수행되어야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

GC-1주의 VP2 전체유전자와 VP2 부분유전자를 baculovirus 발현시스템을 이용하여 발현시키고 발현된 재조합 단백질의 성상을 조사한 결과 VP2 전체유전자를 발현시킨 재조합 단백질은 약 54 kDa, VP2 부분유전자를 발현시킨 재조합 단백질은 약 23 kDa의 분자량의 단백질을 확인하였다.

시간대별로 발현되는 재조합 단백질을 관찰한 결과 VP2 전체유전자를 발현시킨 단백질이 VP2 부분유전자를

발현시킨 단백질보다 더 오랫동안 발현됨을 확인하였다.

VP2 전체유전자와 VP2 부분유전자를 발현시킨 재조합 단백질을 이용하여 생산한 항혈청은 모두 GC-1주에 대한 중화능력을 가지고 있었으며 VP2 전체유전자를 발현시킨 재조합 단백질을 이용하여 생산한 항혈청이 VP2 부분유전자를 발현시킨 재조합 단백질을 이용하여 생산한 항혈청보다 중화능력이 더 높게 나타났다.

## 참고문헌

1. Brown, F. The classification and nomenclature of viruses; summary of results of meeting of the International Committee on Taxonomy of Virus in Sendai. September 1984. Intervirology 1986, **25**, 141-143.
2. Christie, K. E., Havastein, L. S., Djupvik, H. O., Ness, S. and Endresen, C. Characterization of a new serotype of infectious pancreatic necrosis virus isolated from Atlantic salmon. Arch. Virol. 1988, **103**, 167-177.
3. Chung, H. K., Lee, S. H., Lee, H. H., Lee, D. S. and Kim, Y. S. Nucleotide sequence analysis of the VP2-NS-VP3 genes of infectious pancreatic necrosis virus DRT strain. Mol. Cells 1994, **4**, 349-354.
4. Crane, M. J., Smith, P. H., William, L. M., Hyatt, A. D., Eaton, L. M., Gould, A., Handlinger, J., Kattenbelt, J. and Gudlovs, N. First isolation of an aquatic birnavirus from farmed and wild fish species in Australia. Dis. Aquat. Org. 2000, **43**, 1-14.
5. Dobos, P., Hallett, B. J., Kells, D. T. C., Becht, H. and Teninges, D. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. J. Virol. 1979, **32**, 593-605.
6. Dobos, P. and Roberts, T. E. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus: a review. Can. J. Microbiol. 1983, **29**, 377-384.
7. Estay, A., Farias, G., Soler M. and Kuznar, J. Further analysis on the structural proteins of infectious pancreatic necrosis virus. Virus Res. 1990, **15**, 85-96.
8. Frost, P., Borsheim, K. and Endresen, C. Analysis of the antibody response in Atlantic salmon against recombinant VP2 of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Fish Shellfish Immunol. 1998, **8**, 447-456.
9. Hah, Y. C., Hong, S. W., Kim M. H., Fryer, J. L. and Winton, J. R. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from gold fish *Carassius auratus* and

- chum salmon *Oncorhynchus keta* in Korea. Kor. J. Microbiol. 1984, **22**, 85-90.
10. **Havarstein, L. S., Kalland, K. H., Christie, K. E. and Endresen, C.** Sequence of the large double-stranded RNA segment of the N1 strain of infectious pancreatic necrosis virus: a comparison with other Birnaviridae. J. Gen. Virol. 1990, **71**, 299-308.
  11. **Heppell, J., Tarrab, E., Berthiaume, L., Lecomte, J. and Arrella, M.** Characterization of the small open reading frame on genome segment A of infectious pancreatic necrosis virus. J. Gen. Virol. 1995, **76**, 2091-2096.
  12. **Hjalmarsson, A., Carlemalm, E. and Everitt, E.** Infectious pancreatic necrosis virus: identification of a VP3-containing ribonucleoprotein core structure and evidence for O-linked glycosylation of the capsid protein VP2. J. Virol. 1999, **73**, 3484-3490.
  13. **Isshiki, T., Nagano, T. and Suzuki, S.** Infectivity of aquabirnavirus strains to various marine fish species. Dis. Aquat. Org. 2001, **46**, 109-114.
  14. **Joh, S. J.** Molecular characterization of a Korean aquatic birnaviral GC-1 strain isolated from rockfish (*Sebastes schlegeli*). 충북대 박사학위 논문, 2003.
  15. **Lo, C. F., Hong, Y. W., Huang S. Y. and Wang, C.** The characteristics of the virus isolated from the gill of clam *Meretrix lusoria*. Fish Pathol. 1988, **23**, 147-154.
  16. **Macdonald, R. and Dobos, P.** Identification of the proteins encoded by each genome segment of infectious pancreatic necrosis virus. Virol. 1981, **114**, 414-422.
  17. **Perez, L., Chiou, P. P. and Leong, J. A. C.** The structural proteins of infectious pancreatic necrosis virus are not glycosylated. J. Virol. 1996, **70**, 7247-7249.
  18. **Sato, H., Emoto, E., Kamata, T., Mori, H., Kamei, K., Kitaoka, A., Takano, R., Nakajima, K., Inui, Y., Kudo, K. and Hara, S.** Cloning and expression of yellowtail ascite virus segment A. Arch. Virol. 1999, **144**, 1405-1413.
  19. **Seo, J. J., Heo, G. J. and Lee, C. H.** Characterization of aquatic birnavirus isolated from rockfish *Sebastes schlegeli* cultured in Korea. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 1998, **18**, 87-92.
  20. **Summers, M. D. and Smith, G. E.** A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station 1987, pp.5-8.
  21. **Suzuki, S., Asakura, K. and Kusuda, R.** Production kinetics of antigenicity and serological analysis of viral polypeptide of yellowtail ascites virus. Fish Pathol. 1995, **30**, 209-214.
  22. **Tarrab, E., Berthiaume, L., Grothe, S., O'Connor-McCourt, M., Heppell, J. and Lecomte, J.** Evidence of a major neutralizable conformational epitope region on VP2 of infectious pancreatic necrosis virus. J. Gen. Virol. 1995, **76**, 551-558.
  23. **Wolf, K.** Fish Viruses and Fish Viral Diseases, pp. 115-157, Cornell University Press, Ithaca and London, 1988.