

Polymerase Chain Reaction(PCR)을 이용한 Iridovirus의 검색

차승주 · 도정완 · 김현주 · 조화자 · 문창훈 · 박정민 · 박명애* ·
김수미* · 손상규* · 방종득* · 박정우†

울산대학교 생명과학부, *국립수산진흥원 병리과

PCR을 사용하여 양식 해산어에 iridovirus의 감염 여부를 신속히 진단하고자 하였다. 먼저 폐사를 유발하는 iridovirus의 genomic DNA를 pUC19 vector에 cloning한 후 이 clone들의 염기 서열을 GenBank의 염기 서열과 비교 분석하였다. 이들의 염기 서열을 기초로 하여 PCR primer를 제조한 후 PCR을 수행하였다. 정상적인 어류 세포에서는 DNA의 증폭이 일어나지 않았으나 iridovirus에 감염된 세포와 순수 분리된 iridovirus에서는 DNA의 증폭이 일어났다. 이로부터 짧은 시간 내에 폐사를 유발하는 iridovirus를 신속히 진단할 수 있음이 확인되었으며 이러한 PCR을 이용한 진단은 iridovirus의 감염을 확인할 수 있는 간단하고도 정확한 방법을 제공해준다.

Key words: Iridovirus, PCR, Diagnostic system

Iridovirus는 외막이 없는 DNA 바이러스로서 어류에 감염하여 질병을 유발한다. 어류에 감염하는 iridovirus에는 피부 종양을 유발하는 것(Lopez *et al.*, 1969)과 피부 종양 없이 폐사를 유발하는 것(Inouye *et al.*, 1992)의 두 종류가 있다. 피부 종양을 유발하는 iridovirus는 lymphocystis disease virus라고 부르는데, 전세계에 걸쳐 분포하며 넙치, 가자미 등의 다양한 어종에 감염하는 것으로 보고되어 왔다(Roberts, 1976; Schnitzler and Darai, 1989).

폐사를 유발하는 iridovirus의 경우, 1990년 이전까지는 세계 여러 지역에서 드물게 보고되었다(Laird and Bullock, 1969; Walker and Sherburne, 1977; Evelyn and Traxler, 1978; Reno *et al.*, 1978; Langdon *et al.*, 1986). 따라서 이 바이러스는 크게 주목을 받지 못하였으나 1990년부터 일본에서 양식중인 여러 종류의 해산어에 이 바이러스가 감염하여 대량 폐사를 유발하기 시작하였으며 홍콩, 싱가포르, 대만 등에서도 iridovirus의 감염에 의한 폐사가 발생하였다는 보고(Inouye *et al.*, 1992;

Chua *et al.*, 1994; Nakajima *et al.*, 1995)가 있는 후 관심이 집중되고 있다.

아직까지 iridovirus 감염성 질병에 대한 치료제 및 백신은 개발되어 있지 않다. 따라서 현재로서 iridovirus에 대한 대책으로서 가장 좋은 방법은 바이러스 감염을 조기에 발견하여 확산을 미리 방지하는 것이다. 그런데 이 방법이 효율적이기 위해서는 바이러스를 감염 초기에 진단할 수 있는 신속 진단 방법의 개발이 필수적이다. 종양을 유발하는 바이러스의 경우 외형상 증세가 바로 보이기 때문에 육안으로도 조기 진단이 가능하다. 그러나 폐사를 유발하는 iridovirus의 경우 뚜렷한 외부 증세없이 대량폐사를 유발하기 때문에 신속 진단법의 개발이 필요한 상황이다. 바이러스에 대한 신속 진단법으로는 FAT(Fluorescent antibody technique), ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 그리고 PCR(Polymerase chain reaction) 등이 있다. 이 중에 PCR법이 가장 감도가 높은 방법으로 알려져 있다. 따라서 PCR을 사용하여 폐사를 유발하는 iridovirus를 신속 진단하고자 하는 노력들이 있어왔다. Oshima 등(1996)은 모든 DNA 바이러스에 공통적으로 존재하는 ribonucleotide

†Corresponding author

reductase 유전자를 대상으로 하여 PCR법을 개발한 후, 이를 폐사를 유발하는 iridovirus의 신속진단에 적용하고자 하였다. 그러나 이 방법은 iridovirus 뿐만 아니라 모든 DNA virus를 검출하기 때문에 iridovirus만을 검출하는데에 사용하기에는 문제가 있다. 이후의 연구결과 폐사를 유발하는 iridovirus의 유전자의 partial sequence가 확인되었고 이를 기초로하여 PCR법이 개발되었다(Mao *et al.*, 1997; Miyata *et al.*, 1997). 그러나 이러한 방법들은 폐사를 유발하는 iridovirus의 genomic DNA의 염기 서열에 대한 충분한 자료가 확보되지 않은 상태에서 개발된 것이기 때문에 최선의 방법이라고 단정할 수가 없다.

한국의 경우 종양을 유발하는 iridovirus는 이미 넙치양식장 전역에 퍼져 있으나 폐사를 유발하는 iridovirus는 아직까지 한국에 퍼져 있지 않은 것으로 보고된다(Park *et al.*, 1998). 그러나 한국은 일본과의 양식어류의 교환이 매우 활발하기 때문에 일본에서 널리 퍼져 있는, 폐사를 유발하는 iridovirus가 한국에 감염될 가능성이 매우 높다. 따라서 폐사를 유발하는 iridovirus가 한국의 양식 해산어에 유입되어 퍼지는 것을 막기 위한 대책 마련이 시급한 상황인데, 본 연구에서는 폐사를 유발하는 iridovirus의 genomic DNA 일부를 cloning하여 염기서열을 확인 함으로써 폐사를 유발하는 iridovirus의 genomic DNA에 대한 자료를 확보하고자 한다. 그리고 이를 바탕으로하여 PCR(polymerase chain reaction)법을 개발하여 양식 해산어에 감염하는 iridovirus를 조기에 진단할 수 있는 신속 진단법을 개발하고자 한다.

재료 및 방법

세포배양 및 바이러스

Iridovirus의 숙주세포로서 GF(Grunt fin)를 사용하였다. 세포는 fetal bovine serum이 10% 첨가된 minimum essential medium(MEM)을 사용하여 25°C에서 배양하였다. 종양을 유발하는 iridovirus의 시료는 한국의 포항 부근에서 양식중인 넙치의 종양 조직에서 채취하였으며 폐사를 유발하는 iridovirus는 일본 수산청 양식연구소의 Dr. Nakajima로부터 구하였다. 종양을 유발

하는 iridovirus는 종양 조직을 다량으로 채취한 후 조직속의 바이러스를 실험에 사용하였다. 폐사를 유발하는 iridovirus의 경우 GF 세포에 접종하여 배양액에 존재하는 바이러스를 실험에 사용하였다.

바이러스의 순수분리

종양을 유발하는 iridovirus의 경우 종양조직을 TNE 완충용액(10 mM Tris, pH 8.0, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA)에서 homogenization한 후 3000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 취하였다. 폐사를 유발하는 iridovirus의 경우 배양액을 PEP-8000(7%, w/v)을 사용하여 바이러스를 농축한 다음 TNE 완충용액을 넣었다. 이와 같이 준비한 iridovirus 용액을 30% sucrose(w/w) cushion상에서 25000 rpm으로 120분 동안 원심분리를 하였다. 침전물을 TNE 완충용액으로 재현탁 시킨 다음 sucrose gradient(25-60% continuous)상에서 25000 rpm × 20시간, CsCl gradient(10-35%)상에서 30000 rpm × 24 시간의 연속적인 원심분리를 하여 iridovirus를 순수분리 하였다.

Viral genomic 핵산의 준비

순수 분리된 두 종류의 바이러스를 STE(0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)에 넣은 후, proteinase K(mg/ml)와 SDS(1%)를 첨가하여 60°C에서 60분간 반응시킴으로서 바이러스를 용해시켰다. Wizard genomic DNA purification kit(Promega)를 사용하여 viral genomic DNA를 추출한 다음 이후의 실험에 사용하였다. 폐사를 유발하는 iridovirus의 경우 10 µg의 genomic DNA를 EcoRI(10 units), SmaI(10 units), PstI(10 units) 혹은 BamHI(10 units) 등의 제한효소로 처리하였다. 그 결과 생긴 DNA fragment를 0.7% agarose gel 상에서 전기영동을 수행하여 genomic DNA의 잘려진 양상을 확인한 후, genomic DNA cloning에 사용하였다.

Viral genomic DNA cloning 및 염기서열 분석

앞에서와 같이 제한효소에 의해 잘려진 폐사를 유발하는 iridovirus의 genomic DNA 절편들을 pUC19 plasmid vector에 삽입시켰다. 이 plasmid

Table 1. PCR primers for the iridovirus gene

Primer		Oligonucleotide sequence (5' to 3' direction)	Size (bp) of expected DNA
IR-R38	sense	TTCACATGTGCTTCAGTAGCTATGA	330
	antisense	TCTGGTATATTCAATATGTAACGTT	
IR-R6	sense	GAAGTGTACCTTCTTGGCCTAAATT	300
	antisense	TCCAGGAATCTATGCTTCTGGTAT	

DNA를 *E. coli* DH10B에 electrophoration 시킨 후 IPTG와 x-gal이 포함되어있는 배지에서 배양하여 white colony를 선별하였다. Random labeling 방법으로 ³²P로 label한 viral DNA 절편을 DNA probe로 사용하여 colony blotting방법으로 viral gene을 지니는 것들을 선별하였다. 이와 같이 선별한 clone에 들어 있는 insert DNA의 염기서열을 기초 과학지원센터의 Automatic sequencer(ABI, USA)를 사용하여 분석하였다. Cloning된 DNA의 염기서열은 GenBank 상에 존재하는 다른 유전자들의 염기서열들과 비교 분석하였다.

PCR(polymerase chain reaction)

종양조직 및 GF 세포에 존재하는 iridovirus의 유전자를 검출하기 위하여 PCR을 수행하였다. PCR에 사용된 primer는 앞에서와 같이 확인된 genomic DNA clone의 염기서열로부터 합성하였다. 본 연구에 사용하기 위하여 제조한 primer는 Table 1과 같다.

PCR에 사용된 template는 녀치의 종양조직, GF 세포 그리고 순수 분리된, 폐사를 유발하는 iridovirus에서 추출한 genomic DNA를 사용하였다. 이와 같이 준비된 DNA에 PCR primer set, reaction buffer(20 mM Tris pH 8.3, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 10 mg/ml BSA), AmpliTaq DNA polymerase(Perkin-Elmer Cetus) 1 unit 등과 혼합한 다음 PCR을 수행하였다. PCR amplification은 pre-denaturation(94°C, 20 sec) 1 cycle, annealing(48°C, 5 sec), elongation(72°C, 10 sec), denaturation(94°C, 5 sec) 등의 35 cycles, 그리고 pro-elongation(72°C, 30 sec) 1 cycle을 기본으로 하는데 PCR primer의 종류에 따라 조건을 달리 하였다. 이와 같이 증폭된 PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동을 걸어 확인하였다.

결과 및 고찰

Iridovirus의 유전자 cloning

본 연구에서는 양식 해산어에 폐사를 유발하는 iridovirus에 대한 대책 마련의 일환으로 PCR을 사용한 신속 진단법을 개발하고자 하였다. 아직까지 한국의 양식 해산어에는 폐사를 유발하는 iridovirus가 널리 감염되어 있지 않은 것으로 보고된다(Park *et al.*, 1998). 그러나 이 바이러스가 일본에서는 양식 해산어에 많은 피해를 입히고 있기 때문에 한국에 유입되어 피해를 유발할 가능성이 매우 높다. 따라서 본 연구에서는 일본에서 분리된, 폐사를 유발하는 iridovirus를 대상으로 하여 이를 신속 진단할 수 있는 PCR법을 개발하여 일본으로부터의 iridovirus 유입을 막고자 하였다. 먼저 PCR에 사용할 DNA primer를 준비하기 위하여 iridovirus의 유전자를 cloning하였다. Sucrose gradient 상에서 초원심분리하여 폐사를 유발하는 iridovirus를 순수 분리한 다음 iridovirus의 genomic DNA를 추출하였다. 제한효소에 의한 DNA의 절단 양상을 알아보기 위해 iridovirus의 genomic DNA를 여러 종류의 제한효소로 처리하였다. 그 결과 *EcoRI*과 *BamHI*으로 절단하였을 때 500 bp-2,000 bp 크기의 DNA fragment가 많이 나타났다. 따라서 iridovirus의 genomic DNA를 *EcoRI*과 *BamHI*으로 절단한 다음 역시 *EcoRI*과 *BamHI*으로 절단한 pUC19 plasmid vector에 삽입시켜 cloning하였다. Cloning된 insert DNA의 크기를 알아보기 위하여 각 clone들을 *PvuII* 제한효소로 절단한 다음 이를 agarose gel에 전기영동한 결과 다양한 크기의 insert DNA들이 확인되었다. 이들 중 insert DNA의 크기가 큰 것 2개를 선별하여 각각 IR-R6과 IR-R38이라고 명명한 다음 이들의 염기서열을 분석하였으며 얻어진 염기서열 결과를 GenBank 상에 존재하는 기존의 유전자 서열

들과 유사성을 비교하였다(Fig. 1, 2).

Table 2에서와 같이 IR-R6은 *M. capricolum*의 CONTIG MC362 DNA 그리고 IR-38은 *Caenorhabditis elegans* cosmid F09C12 등과 가장 높은 유사성을 보였다. 이와 같은 결과는 의외의 결과로서 cloning된 유전자들이 폐사를 유발하는 iridovirus의 유전자가 아닌 다른 유전자들과 유사성이 높은 것으로 나타났다. 이는 지금까지 폐사를 유발하는 iridovirus가 가지고 있는 유전자 중에 major capsid protein, RNA polymerase II, ribonucleotide reductase 등의 극히 적은 수의 유전자들에만 염기서열이 확인되었고 나머지 대부분 유전자들의 서열은 보고된 바가 없기 때문이라고 생각된다. 실제 본 연구진이 cloning한 유전자들의 homology searching 결과를 자세하게 분석하여 보면 IR-R6은 650 bp의 염기서열 중 가장 유사도가 높게 나온 gene과 249 bp 부분에서 60%의 동일성(identity)을 나타내었다(Fig. 1). 그리고 IR-R38은 549 bp의 염기서열 중 가장 유사도가 높다고 분석

된 gene과 71 bp 정도 부분만 약 80% 정도의 동일성을 보였다(Fig. 2). 현재 종양을 유발하는 iridovirus의 genomic DNA의 모든 염기서열은 이미 보고된 바 있다(Tidona & Darai, 1997). 그러나 본 연구에서 확인한 폐사를 유발하는 iridovirus의 두 개의 genomic DNA clone의 염기서열은 종양을 유발하는 iridovirus의 염기서열과 전혀 유사성이 없었다. Mao 등(1997)과 Miyata 등(1997)도 폐사를 유발하는 iridovirus의 genomic DNA의 일부분을 cloning하여 염기서열을 보고한 바 있는데, 그 염기서열은 종양을 유발하는 iridovirus의 genomic DNA의 염기서열과 비교한 결과 유사성이 전혀 없음을 확인할 수 있었다. 이로부터 이들 2종류의

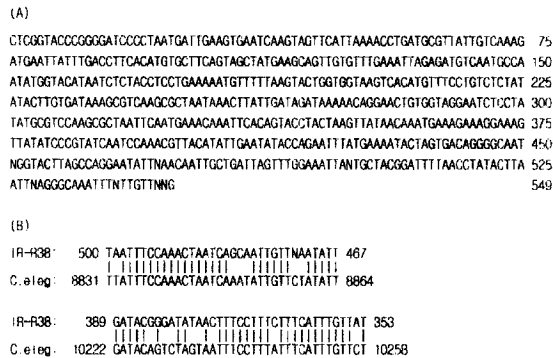


Fig. 1. (A) The nucleotide sequences of the clone IR-R38 and (B) comparison of the nucleotide sequences of IR-R38 with those of *C. elegans* cosmid F09C12.

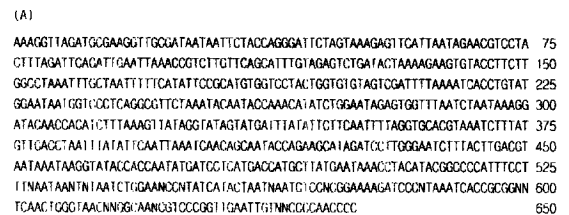


Fig. 2. (A) The nucleotide sequences of the clone IR-R6 and (B) comparison of the nucleotide sequences of IR-R6 with those of *M. capricolum* DNA for CONTIG MC362.

Table 2. Results of searching nucleotide sequence databases

Clones	Databases sequences producing high similarity	GenBank accession No
IR-R38	1. <i>Caenorhabditis elegans</i> cosmid F09C12	U28929
	2. <i>Arabidopsis thaliana</i> genomic DNA	AB006696
	3. orf {clone FB7-4} [<i>Nicotiana tabacum</i> ...]	S44872
	4. Human BAC clone GS039E22	AC002428
IR-R6	1. <i>M. capricolum</i> DNA for CONTIG MC362	Z33268
	2. <i>A. synechocyst</i> sp. PCC6803 complete	D64006
	3. <i>Mycoplasma genitalium</i> rRNA 16S rRNA	U39693
	4. <i>Plasmodium falciparum</i> DNA	AL008976

iridovirus가 다른 특성을 지닌 바이러스임을 확인할 수 있었으며 이 결과는 Do 등(1998)이 항체를 사용하여 Western blotting 실험 결과와 일치하는 것으로 두 종은 다른 종임을 나타내준다. 본 연구에서 확인한, 폐사를 유발하는 iridovirus의 genomic DNA clone들이 어떤 유전자인지는 다른 여러 사람들의 연구결과가 모아진 다음에야 정확하게 알 수 있을 것으로 생각된다.

PCR을 이용한 신속 진단 및 현장에의 적용

Iridovirus clone들의 염기서열로부터 PCR primer를 제조한 다음 이를 사용한 PCR을 수행하였다. 이 primer를 사용하여 합성되는 PCR 산물의 예상 크기는 재료 및 방법의 Table 1에서 알 수 있듯이 IR-R38은 330 bp 그리고 IR-R6는 300 bp 정도이다. PCR의 template로는 정상적인 어류세포에서 추출한 DNA, 종양을 유발하는 iridovirus의 DNA 그리고 폐사를 유발하는 iridovirus의 DNA, 그리고 폐사를 유발하는 iridovirus가 감염된 세포의 DNA 등의 4종류를 사용하였다. IR-R38로부터 제조한 PCR primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과

정상적인 세포에서 추출한 DNA와 종양 유발 iridovirus에서는 PCR 산물을 얻을 수 없었으나 폐사를 유발하는 iridovirus에서는 약 330 bp 정도의 PCR 산물이 합성되었다(Fig. 3). IR-R6의 경우 정상세포의 DNA에서는 PCR 산물이 합성되지 않았으나 폐사를 유발하는 iridovirus의 DNA와 이 바이러스에 감염된 세포 DNA에서는 PCR 산물이 합성되었다(Fig. 4). 이 결과로부터 본 연구에서 cloning한 iridovirus의 genomic DNA clone들의 염기서열이 iridovirus의 유전자가 아닌 다른 유전자와 homology가 가장 높은 것으로 나왔지만 iridovirus gene의 clone이 맞음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과가 나온 이유는 역시 앞에서 설명하였듯이 폐사를 유발하는 iridovirus의 대부분 유전자가 아직 cloning되지 않았기 때문에 GenBank상에 등록되어 있지 않아서 나타난 것으로 생각된다. 그리고 IR-R6의 경우 폐사를 유발하는 iridovirus 뿐만 아니라 종양을 유발하는 iridovirus에서도 PCR 산물이 합성되었다. 유전자의 염기서열의 분석결과 이들 두 종류의 iridovirus가 유사성이 거의 없음과 PCR 산물의 양이 매우 적

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of the PCR products. Genomic DNAs were extracted from (lane 1) mortality-associated iridovirus; (lane 2) tumor-inducing iridovirus; (lane 3) normal GF cells; and (lane 4) mortality-associated iridovirus-infected GF cells. Specific gene fragments of these DNAs were amplified by PCR with primer derived from the clone IR-R38. The PCR products (330 bp) were analyzed by agarose gel electrophoresis. DNA size markers (kb) are indicated on the left.

Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of the PCR products. Genomic DNAs were extracted from (lane 1) mortality-associated iridovirus; (lane 2) tumor-inducing iridovirus; (lane 3) normal GF cells; and (lane 4) mortality-associated iridovirus-infected GF cells. Specific gene fragments of these DNAs were amplified by PCR with primer derived from the clone IR-R6. The PCR products (300 bp) were analyzed by agarose gel electrophoresis. DNA size markers (kb) are indicated on the left.

은 것으로부터 종양을 유발하는 iridovirus에서 나온 PCR 산물은 non-specific 반응의 결과라고 생각된다. 따라서 본 연구에서 사용한 iridovirus의 두 set의 PCR primer들 중 IR-R6는 폐사를 유발하는 iridovirus의 신속진단에 사용하기가 적합하지 않으나 IR-R38은 적합한 것으로 확인되었다.

본 연구의 결과 PCR을 사용하여 폐사를 유발하는 iridovirus를 신속 진단 할 수 있었다. 이 방법은 폐사를 유발하는 iridovirus가 외국에서 한국에 유입되어 한국의 양식장에 확산 되는 것을 막는데 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 1995년도 농림수산부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- Chua, I. H. C., Ng, M. L., Ng, K. L., Loo, J. J. and Wee, J. Y.: Investigation of outbreaks of a novel disease, sleepy grouper disease, affecting the brown spotted grouper, *Epinephelus tauvina* Forskal. *J. Fish Dis.*, 17: 417-427, 1994.
- Do, J. W., Cha, S. J., Kim, H. J., Cho, W. J., Mun, C. H., Park, J. M., Park, M. A., Sohn, S. G., Bang, J. D. and Park, J. W.: Comparisons of immunological characteristics of iridoviruses isolated from cultured marine fish in Korea. *J. Fish Pathol.*, 1998 (submitted)
- Evelyn, T. P. T. and Traxler, G. S.: Vial erythrocytic necrosis: natural occurrence in Pacific salmon and experimental transmission. *J. Fish Res. Bd. Can.*, 35: 903-904, 1978.
- Inouye, K., Yamano, K., Maeno, Y., Nakajima, K., Matsuoka, M., Wada, Y. and Sorimachi, M.: Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, 27: 19-27, 1992.
- Laird, M. and Bullock, W. L.: Marine fish hematozoa from new Brunswick and New England. *J. Fish Res. Bd. Can.*, 26: 1075-1102, 1969.
- Langdon, J. S., Humphrey, J. D. and Williams, L. M.: First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from redbfin perch, *Pecca fluviatilis* L. *J. Fish Dis.*, 9: 263-268, 1986.
- Lopez, D. M., Sigel, M. M., Beashley, A. R. and Dietrich, L. S.: Biochemical and morphological studies of lymphocystis disease. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 31: 223-236, 1969.
- Mao, J., Hedrick, R. P. and Chinchar, V. G.: Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. *Virology*, 229(1): 212-220, 1997.
- Miyata, M., Matsuno, K., Jung, S. J., Danaydol, Y. and Miyazaki, T.: Genetic similarity of iridoviruses from Japan and Thailand. *J. Fish Dis.*, 20: 127-134, 1997.
- Nakajima, K., Maeno, Y., Fukudome, M., Fukuda, Y., Tanaka, S., Matsuoka, S. and Sorimachi, M.: Immunofluorescence test for the rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using monoclonal antibody. *Fish Pathol.* 30: 115-119, 1995.
- Oshima, S., Hata, J., Segawa, C., Hirasawa, N. and Yamashita, S.: 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(1): 15-19, 1996.
- Park, M. A., Sohn, S. G., Cha, S. J., Kim, H. J., Do, J. W. and Park, J. W.: Isolation and identification of iridoviruses from cultured marine fish in Korea. *J. Fish Pathol.*, 1998 (submitted)
- Reno, P. W., Philippon-Fried, M., Nicholson, B. L. and Sherburne, S. W.: Ultrastructural studies of piscine erythrocytic necrosis (PEN) in Atlantic herring (*Clupea harengus harengus*). *J. Fish Res. Bd. Can.*, 35: 148-154, 1978.
- Roberts, R. J.: Experimental pathogenesis of lymphocystis in the plaice (*Pleuronectes platessa*). *In Wildlife Diseases*, Page, L. A., Plenum, London, 1976.
- Schnitzler, P. and Darai, G.: Characterization of the repetitive DNA elements in the genome of fish lymphocystis disease virus. *Virology*, 172: 32-41, 1989.
- Tidona, C. A., and Darai, G.: The complete DNA sequence of lymphocystis disease virus. *Virology*, 230: 207-216, 1997.
- Walker, R. and Sherburne, S. W.: Piscine erythrocytic necrosis virus in Atlantic cod, *Gadus morhua*, and other fish: ultrastructure and distribution. *J. fish Res. Bd. Can.*, 34: 1188-1195, 1997.

Rapid Diagnosis of Iridovirus Infection by Polymerase Chain Reaction

**Seung-Ju Cha, Jeong-Wan Do, Hyun-Ju Kim, Wha-Ja Cho,
Chang-Hoon Mun, Jeong-Min Park, Myoung-Ae Park*, Su-Mi Kim*,
Sang-Gyu Sohn*, Jong-Deuk Bang* and Jeong-Woo Park**

Department of Biological Science, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea

**Pathology Division, National Fisheries Research and Development Agency, Kijang, Pusan, 629-900, Korea*

For rapid detection of iridovirus infection, a PCR-based diagnostic method was developed. The genomic DNA from mortality-associated iridovirus was cloned into pUC19 vector. The nucleotide sequences of these clones were compared with sequences of other genes from EMBL/GenBank databank. Based on the nucleotide sequences, PCR primers were prepared and used for PCR. The DNA amplification did not occur from the normal fish cells. In contrast, DNA was amplified from the iridovirus-infected fish cells and purified iridovirus. These results suggest that mortality-associated iridovirus can be detected from virus-infected cells within short time and this PCR-based diagnostic system provides a simple and accurate method for detecting the presence of iridovirus infection.

Key words: Iridovirus, PCR, Diagnostic system