

양식새우(*Penaeus chinensis*)에서의 White Spot Baculovirus의 분리 및 특성

허문수[†] · 손상규* · 심두생* · 김진우* · 박명애* · 이주석*
최동림* · 정승희* · 김영진** · 오명주**

제주대학교 해양생산과학부, *국립수산진흥원, **여수대학교 어병학과

1993년부터 한국 서해안의 새우 양식장에서는 양식새우의 대량폐사가 일어났다. 외부증상은 두홍갑과 표피에 흰 반점이 나타났고 어류주화세포에는 배양되지 않았다. 열(50°C) 및 강산(pH 3)에는 쉽게 실패되었으나 강알칼리(pH 11)에는 내성이 강했다. 바이러스의 입자 형태는 Rod Shaped한 형태를 보였다. 바이러스 단백질의 분석결과는 Hypodermal Hematopoietic Necrosis Baculovirus(HHNBV)와 유사했고 바이러스 핵산분석 결과는 약 114kb로 Penaeid Acute Viremia(PAV)와 유사했다.

Key words : White spot, CPE, Rod shaped, dsDNA

우리나라 새우 양식산업은 서해안 지역을 중심으로 약 180여개소의 새우양식장에서 연간 2천여 톤의 새우를 생산하고 있으나 1993년 6~7월에 충남 태안 및 전북 고창지역에서 난치성 전염병이 처음 발병한 후 거의 해마다 양식산 새우를 대량 폐사 시키고 있고 피해지역도 점차 확산되고 있다(허 1997; 손 등 1998). 감염된 새우는 두홍갑 및 체표에 흰반점 증상이 나타나므로 병명을 일반적으로 white spot syndrome disease(WSSD)라고도 부르는데 이와 같은 증상으로 인한 새우 대량폐사는 아시아 전역에서 일어나고 있다(Haung *et al.*, 1994; Chou *et al.*, 1995; Lightner 1996). 그래서 일본에서는 새우 대량폐사 원인을 처음에는 RV-PJ(rod-shaped nuclear virus of *Penaeus japonicus*) 감염증이라 하였으나(Momoyama *et al.*, 1994) 그 후 井上等(1996)이 보리새우류의 급성 바이러스 혈증(penaeid acutes viremia: PAV)이라 하고 폐사 원인 바이러스를 PRDV(penaeid rod-shaped DNA virus)이라 하였으며(Inouye *et al.*, 1996), 중국에서는 이와 같은 새우질병을 explosive epidemic disease라 하고, 폐사원인 바이러스를 HHNBV라 하였다(Haung *et al.*, 1994). 따라서 본 연구에서는 우리나라 새우양식장에서 양

식산 새우를 대량폐사 시키는 원인을 정확히 규명하기 위해 감염된 새우로부터 바이러스를 분리하여 원인 바이러스의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

증상 및 행동유형

감염새우를 수집하여 외부 증상을 육안 및 현미경을 통하여 관찰하였고 바이러스 감염새우를 실험실 사육수조에 수용하여 행동유형을 관찰하였고 새우 양식장에서 직접 또는 어민과의 전화 면접을 통하여 행동유형을 조사하였다.

바이러스 분리

서해안 지역(경기 화성, 충남 태안, 전북 고창 및 부안, 전남 영광)의 새우양식장에서 발병한 양식산 대하를 1993년부터 현지에서 수집하여 실험에 사용할 때까지 -85°C에서 냉동 보관하였다.

냉동보관한 대하의 두홍부조직(간체장, 림프기관, 위, 심장 등)을 적출하여 유발에 넣고 10배량의 TN buffer(20 m Tris, 0.4 M NaCl, pH 7.4) 첨가해서 저온상태에서 마쇄한 후 7,000×g에서 15분간 원심분리(Sorvall RC5C)하여 상층액을 수확하였다. 수확한 상층액은 20,000×g에서 2시간 초원심분리(Beckman L₇)하여 pellet를 만든 다음,

[†]Corresponding author

3배량의 TNB로 재현탁해서 sucrose(20~50% w/w)농도구배에서 200,000×g로 3시간동안 초원심분리하여 바이러스를 분리하였다.

세포 배양

새우 대량폐사 원인 바이러스를 순수분리하기 위해 어류주화세포를 이용하여 세포 배양법으로 바이러스 배양을 시도하였다.

바이러스 배양에 사용한 어류주화세포는 CHSE-214, RTG-2, EPC, FHM, 및 BF-2이며, 이들 어류주화세포는 DMEM 기본배지에 10% FBS(Gibco), 10 mM glutamine(Gibco), 100 IU/ml penicillin 및 streptomycin(Sigma)을 첨가한 배지로 배양하였다. 단층배양된 어류 주화세포에 바이러스에 감염된 새우 두흉부조직의 마쇄 여과액을 접종한 후 20°C에서 1주일간 배양하고 세포변성효과(CPE)가 나타나지 않으면 명목계대(blind passage)를 2회 실시하여 바이러스를 배양하였다.

바이러스액 제조

마쇄한 두흉부 조직을 원심분리후 수획한 상층액을 0.45 μm membrane filter(Corning)로 여과해서 -85°C에 냉동 보관하면서 각종 실험용 바이러스액으로 사용하였다.

열 안정성

바이러스액 5 ml를 넣은 실험관에 멸균해수 5 ml를 넣고 잘 흔든 후 50°C로 조정된 항온수조에서 30분간 방치하여 열(50°C)에 대한 새우 바이러스의 안정성을 시험하였다.

강산 및 강알칼리 감수성

pH 3과 11로 조정된 멸균해수 100 ml를 넣고 3시간 동안 정치하여 강산(pH 3)이나 강알칼리(pH 11)에 대한 새우 바이러스의 감수성을 시험하였다.

에테르 감수성

바이러스액 4 ml가 들어 있는 시험관에 에틸 에테르 1 ml를 첨가하고 4°C에서 18시간동안 진탕한 후 에테르에 대한 새우 바이러스의 감수성을 시험하였다.

바이러스 접종 및 병원성

열, 강산, 강알칼리 및 에테르 처리한 새우 바이러스액 전량을 해수가 들어있는 20 l 아크릴 수조에 각각 넣고 건강한 대하치하(평균체중 0.5 g) 10 미씩을 수용한 다음, 수온 25±0.5°C에서 10일간 새우배합사료(천하제일사료)를 소량씩 급이 하면서 새우 폐사유무를 관찰하였으며, 시험기간동안 수질 악화를 방지하기 위해 매일 사육수량의 10%정도를 환수하였다. 그리고 사육수조에 바이러스액을 처리하지 않고 첨가한 감염구와 바이러스액을 첨가하지 않은 미감염구를 각각 감염 대조구와 미감염 대조구로 설정하였다.

바이러스 입자 관찰

바이러스 감염으로 인해 두흉갑 및 체표에 흰반점을 형성한 대하의 두흉부조직을 2.5% glutaraldehyde 액으로 24시간동안 전 고정하고 실온에서 2시간동안 1% osmium tetroxide 액으로 고정하였다. 이어서 알코올계열로 탈수하여 푸로필렌옥사이드로 치환하고 Epon 812로 열중합해서 초미세절편기(Reichert-Jung)로 박절(60~90 mm)하여 grid에 붙이고 uranyl acetate and lead citrate로 이중염색해서 투과전자현미경(Hitachi H-7100)으로 바이러스 입자형태를 관찰했다.

바이러스 구조단백 분석

새우감염 바이러스의 구조단백 분석을 위한 전기영동은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 실시하였다. 즉 농축, 정제된 새우감염 바이러스를 동량의 SDS-sample buffer(2.3% SDS: 0.05 mM Tris, pH6.8: 10% glycerol(w/v): 5% 2-mercaptoethanol)와 혼합하여 끓는 물에 2분간 처리하고 10,000×g에서 10초간 원심분리 하여 시료를 준비하였다. 준비된 시료를 10% polyacrylamide gel에 loading하여 200 volt로 3시간 정도 전기영동한 다음 coomassie blue R-250으로 염색하고 탈색하고 탈색액(50% methanol: 10% acetic acid)으로 탈색하였다. 바이러스 단백질의 분자량은 표준단백질의 이동거리와 비교하여 결정하였다.

바이러스 핵산 분석

새우감염 바이러스의 핵산을 분석하기 위해 바이러스 농축액 100 μl에 reaction buffer 10 μl (10 mM Tris pH 6.7, 5 mM EDTA pH 8.0 and

Fig. 1. External signs of naturally infected fresh shrimp (*Penaeus chinensis*). Diseased shrimp showed reddish discoloration of body, antenna and appendage.

1% SDS)와 proteinase K(20 mg/μl) 15 μl를 넣고 혼합하여 55°C에서 2시간동안 전처리 하였다. phenol/chloroform으로 바이러스 핵산을 추출하고, 1/10의 3 M 초산암모늄과 2배량의 무수에탄올을 첨가하여 -20°C에 보관하면서 핵산을 침전시킨다. 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 핵산을 모았다. 모아진 핵산은 TE buffer로 녹여서 실험에 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다. 바이러스 핵산은 상법에 따라 *BamH I*, *EcoR I*, *Hind III* 등의 제한효소를 이용하여 전체 길이를 확인하였다. TE에 녹인 바이러스 핵산 10 μl를 eppendorf tube에 넣고 각 tube에 제한효소 1 unit, 10×reaction buffer를 넣은 후 37°C에서 2시간동안 반응시킨 다음 1% agarose gel로 50 volts에서 2시간동안 전기영동하였다. 바이러스 핵산 band는 UV light상에서 확인하였다.

결과 및 고찰

외부증상 및 감염새우 행동유형

바이러스에 감염된 대하는 먹이를 거의 먹지 않고 새우양식장 수면이나 가장자리를 힘없이 유영하다가 정지해서 단기간내 대량폐사한다. 감염된 대하는 육안적으로 보면 체색, 안테나, 꼬리 및 유영지가 붉게 되고 발병이 진행됨에 따라 체색은 점차 퇴색되면서 안테나는 부러진다(Fig. 1).

특히 본 바이러스병에 감염된 대하는 특징적으로 두홍갑 및 체표의 큐티클층에 크기가 1~2 mm 정도인 흰반점(white spot)을 형성하여 육안적으로

Fig. 2. White spot symptoms of naturally infected fresh shrimp (*Penaeus chinensis*).

쉽게 관찰된다(Fig. 2). 현미경으로 보면 흰반점은 국화꽃 모양을 하고 있다. 그렇지만 이러한 증상은 바이러스 감염초기 단계에서는 거의 나타나지 않을 뿐만 아니라 경우에 따라서는 폐사가 일어나지 않은 양식장의 건강한 새우에서도 가끔 관찰되기 때문에 흰반점 형성 유무로서 새우 바이러스 감염 상태를 정확히 진단에는 다소 문제가 있다고 생각된다.

바이러스 물리화학적 특징

원인 바이러스를 순수분리하기 위해 어류주화세포를 이용하여 세포배양법으로 바이러스 배양을 시도하였으나 Table 1에서와 같이 실험에 사용한 어류주화세포에서는 세포변성효과(CPE)가 전혀 나타나지 않아, 바이러스 순수배양이 불가능하였다. 새우 바이러스의 물리·화학적 특성을 알기 위해 바이러스액을 열, 강산, 강알카리 및 에테르 처리하여 새우 병원성시험을 통해서 시험한 결과, Table

Table 1. Susceptibility of fish cell lines to white spot baculovirus(WSBV)

Cell lines	Incubation temp. (°C)	No. of blind passage	CPE
RTG-2	20	2	-
CHSE-214	20	2	-
	25	2	-
EPC	20	2	-
	25	2	-
FHM	20	2	-
	25	2	-
BF-2	20	3	-
	25	2	-

Table 2. Effect of physical and chemical treatments on the pathogenicity of WSBV

Treatments	No. of shrimp tested	No. of shrimp deid	Mortality (%)
Ether, 18 hrs	10	0	0
Sea water, 18 hrs (control)	10	10	100
pH 3, 3 hrs	10	0	0
pH 11, 3 hrs	10	9	90
pH 7, 3 hrs (control)	10	10	100
50°C, 30 min	10	0	0
4°C, 30 min (control)	10	10	100

Fig. 3. Electron microscopy of the lymphoid organ of naturally infected fresh shrimp (*Penaeus chinensis*).

2에서와 같이 에테르를 처리한 새우 바이러스는 병 원성을 상실하여 시험기간동안 폐사가 전혀 일어나지 않았지만, 대조구에서는 100%로 나타났다. 石井(1973)에 의하면 일반적으로 외막을 갖는 바이러스는 지질 용해제인 에테르나 클로로포름등에 쉽게 실활되므로, 본바이러스 입자도 외막을 갖고 있다.

바이러스 입자형태

바이러스에 감염된 새우의 림프기관(lymphoid organ) 및 위 큐티클 상피세포의 핵내에는 다수의 바이러스 입자가 전자현미경으로 관찰된다(Fig 3). 전자현미경에 의한 바이러스 입자(virion)는 간상 바이러스로서 크기가 $250 \sim 300 \times 50 \sim 70$ nm이며 nucleocapsid와 envelope로 구성되어 있다.

Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins. Lane 1: Standard molecular weight marker. Lane 2: Viral protein.

따라서 본 실험에서 관찰한 결과에 의하면 새우 바이러스는 감염된 세포의 핵내에서 증식함으로 인해 바이러스 핵산은 DNA인 것으로 생각되며, baculovirus와 본 바이러스를 비교하면 BP, MBV 및 PBV 바이러스는 감염세포중에서 다각체라 불리워지는 특이한 포매체(inclusion body)를 형성하지만 BMNV와 YBV 바이러스는 포매체를 형성하지 않는다. 따라서 포매체를 형성하지 않은 본 바이러스는 BMNV와 YBV 바이러스와 유사하지만 이들 바이러스와는 바이러스 입자크기에 차이가 있었다.

바이러스 구조단백 및 핵산분석

SDS-PAGE법으로 새우 바이러스의 구조 단백질 을 분석한 결과 분자량 14에서 190KDa의 범위내에 약 21개의 단백질 band가 확인되었는데, 이는 HHNBV 바이러스의 구조 단백질과 아주 유사하다

이러스는 WSBV로서 일본 보리새우양식장에서 분리된 새우류 급성 바이러스 혈증(PAV)의 원인 바이러스인 PRDV와 아주 유사한 바이러스로 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 1995년도 농림수산부에서 시행한 현장애로과제의 연구비 지원으로 수행되었으므로 감사의 마음을 전합니다.

참고문헌

Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of viral nucleic acids. Lane M: λ -Hind III marker.

(Huang *et al.*, 1995)(Fig 4). 그리고 새우 바이러스의 total DNA를 Bam HI로 digestion하여 확인한 결과 새우 바이러스의 핵산 크기는 약 114kb였다(Fig 5). 지금까지 보고된 자료에 의하면 일본서 보리새우를 대량폐사시키는 새우류 급성 바이러스 혈증(PAV)의 원인 바이러스인 PRDV의 핵산의 크기는 163kb 정도이고(Inouye *et al.*, 1996), 동남아시아 지역에서 홍다리얼룩새우(*Penaeus monodon*)를 대량 폐사시키는 SEMBV(systemic ectodermal and mesodermal baculovirus)의 핵산 크기는 약 168kb로(Wongteerasupaya *et al.*, 1995) 이들 두 종류의 바이러스에 비해 본 실험에 사용한 바이러스의 핵산 크기는 약간 적지만 일반적으로 baculovirus의 핵산크기가 90~230 kb임을 감안하면 baculovirus의 일종으로 생각된다. 우리나라 새우양식장에서 분리된 새우 바이러스의 외막(envelop)이 있으면서 포매체(inclusion body)를 형성하지 않는 간상 바이러스로서, 바이러스 입자(viron)의 크기는 ultrathin section 상에서 250~300×50~70 nm였고, 바이러스의 구조단백은 분자량이 14에서 190 kDa 범위내에 약 21개의 단백질 band로 구성되어 있으며, total DNA의 크기는 약 114 kb였다. 따라서 이상의 실험결과에 의하면 우리나라에서 분리된 바

- Birnboim, H. C. and Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research*, 7, 1513, 1979.
- Chen, S-N., Chi, S-C. Kou, G-H. and Liao, I-C. Cell culture from tissues of grass prawn, *Penaeus monodon*, *Fish Pathology*, 21(3), 161-166, 1986.
- Chou, H. Y., Huang, C. Y. Wang, C. H., Chiang, H. C. and Lo, C. F. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Disease of Aquatic Organisms*, 23, 165-173, 1995.
- Fulks, W. and Main, K. L. Introduction. In : *Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*. The Oceanic Institute, p. 5, 17, 43, 51, 1992.
- Hu, K., Wang, L., Duan, Y. and Zhang, S. Studies on cell culture from the hepatopancreas of the oriental shrimp, *Penaeus orientalis* Kishinouye. *Asian Fisheries Science*, 3, 299-307, 1990.
- Huang, J. X., Yu, J., Song and Yang, C. Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis-pathology of the shrimp explosive epidemic disease. *Yellow Sea Fishery research Institute, Qingdao, P. R. Cina*, 16, 1-10, 1994. 149-158(in Japanese).
- Inouye, K., Yamano, K., Ikeda, N., Kimura, T., Nakano, H., Momoyama, K., Kobayashi, J. and Miyajima, S. The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes *Penaeus Acute Viremia*(PAV). *Fish Pathology*, 31(1), 39-45, 1996.
- Kimura, T, H. Nakano, K. Momoyama, K. Yamano and K. Inoute. 1995. Purification of the rod-shaped nuclear virus(RV-PJ) form kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathology*, 30(4), 287-288.
- Lightner, D. V. A *Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Disease of Cultured Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, 359, pp.1996.
- Liu, R. Y. Shrimp mariculture studies in China. In: G. L.

- Rogers, R. Day and A. Lim(Editor), Proceedings of the First International Conference on Warm Water Aquaculture-Crustacea. Brigham Young University, Hawaii Campus, Laie, HI, pp. 82-87, 1983.
- Momoyama, K., Hiraoka, M., Nakoano, H., Koube, H., Inouye, K. and Oseka, N. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: histopathological studies. *Fish Pathology*, 29, 141-148 (in Japanese), 1994.
- Momoyama, K., Hiraoka, M., Inouye, K., Kimura, T. and Nakano, H. Diagnostic techniques of the rod-shaped nuclear virus infection in the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, 30(4), 263-269, 1995.
- Nakano, H., Koube, H., Umezawa, S., Momoyama, K., Hiraoka, M., Inouye, K. and Oseko, N. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp in Japan in 1993 : epizootiological survey and infection trials. *Fish Pathol.*, 29, 135-139, 1994 (in Japanese).
- Shariff, M. and Subasinghe, R. P. Major diseases of cultured shrimp in Asia : An overview. In : fulks W. and K. L. Main (Editors), *Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, The Oceanic Institute, pp. 43-51, 1992.
- Takahashi, Y., Itami, T., Kondo, M., Maeda, M., Fujii, R., Tomonaga, S., Supamattaya, K. and Boonyaratpalin, S. Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Fish Pathol.*, 29(2), 121-125, 1994.
- Toullec, J. Y., Crozat, Y., Patrois, J. and Porcheron. P. Development of primary cell cultures from the penaeid shrimps *Penaeus vannamei* and *P. indicus*. *J. Crust. Biol.*, 16, 643-649, 1996.
- Wang, C. H., Lo, C., Leu, F. J. H., Chou, C. M., Yeh, P. Y., Hou, H. Y., Tung, M. C., Chang, C. F., Su, M. S. and Kou, G. H. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Organisms*, 23, 239-242, 1995.
- Wang, K. *Penaeid Culture*. China Aquaculture Company, Beijing, China, 1983.
- 挑山和夫. 消毒剤によるバキユロウイルス性中腸腺壊死症(BMN)ウイルスの不活化効果. *魚病研究*, 24(1), 47-49, 1989.
- 挑山和夫. バキユロウイルス性中腸腺壊死症ウイルスバキユロウイルス 性中腸腺壊死症(BMN)ウイルスエテル, 食鹽濃度およびpHに對する抵抗性. *魚病研究*, 24(3), 175-177, 1989.
- 挑山和夫. 紫外線, 日光, 熱および乾燥によるバキユロウイルス性中腸腺 壊死症(BMN)ウイルスの不活化. *魚病研究*, 24(2), 115-118, 1989.
- 挑山和夫. バキユロウイルス性中腸腺壊死症ウイルス(BMN)感染組織 および海水中での活性維持. *魚病研究*, 24(3), 179-181, 1989.
- 挑山和夫, 平岡三登里, 中野平二, 河邊 博・井上 潔・大迫典久. 1993年に西日本で發生した養殖クルマエビの大量死: 病理組織觀察. *魚病研究*, 29(2), 141-148, 1994.
- 허문수. 양식새우 *Penaeus chinensis*와 *Penaeus japonicus*의 바이러스성 질병. 부산대학교 박사학위논문, 1997.

Isolation and Characterization of White Spot Syndrome Baculovirus in Cultured Penaeid Shrimp (*Penaeus chinensis*)

**M-S Heo, S-G Sohn*, D-S Sim*, J-W Kim*, M-A Park*, S-H Jung*,
J-S Lee*, D-L Choi*, Y-J Kim** and M-J Oh****

Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

**National Fisheries Reserch & Development Institute, Pusan 629-900, Korea*

***Department Fish Patholgy, Yosu National University*

Beginning in the summer of 1993, a serious mortality among cultured penaeid shrimp occurred in the western sea of Korea. The typical sign of this disease was white spots inside the surface of the carapace. Cytopathic effect (CPE) were not observed by virus in CHSE-214, RTG-2, but not by pH 11. A non-occluded rod-shaped form virus was observed by electron microscopy in the lymphoid organ. The virion was bacilliform virus and surrounded by a virion envelope. Its virion protein was found to be similar to hypodermal and hematopoietic necrosis virus (HHNBV) by analysis of virion proteins in SDS-PAGE. The genome of virus is double stranded DNA molecule whose full length was about 114kb. It was similar to penaeus acute viremia (PAV) of Japan.

Key words : White spot, CPE, Rod-shaped, dsDNA