

## In vitro 조건에 따른 molecular adjuvant의 նււււ, *Paralichthys olivaceus* 면역유전자 자극 효과

권문경† · 황지연 · 서정수 · 정승희  
(국립수산과학원)

### Effect of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*, Immune Genes Stimulation by Molecular Adjuvant in Vitro Culture Condition

Mun-Gyeong KWON† · Jee-Youn Hwang · Jung-Soo SEO · Sung-Hee JUNG  
(National Fisheries Research & Development Institute)

#### Abstract

Adjuvant is an immune enhancer commonly used during vaccination to enhance the host immune response. In the present study, we produced the several recombinant protein from immune related gene of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Especially, to produce the soluble type of recombinant protein, we constructed the MBP (Maltose binding protein) fusion G-CSF (Granulocyte colony stimulating factor) recombinant protein among the flounder immune related genes. To verify the immune stimulatory effect and safety of this recombinant protein (rPoGCSF), expression changes of several immune genes were tested using quantitative real-time PCR method with gene specific primer from flounder head kidney leukocytes. As a result, we confirmed that the rPoGCSF has an ability of immune stimulatory effect, also it has broad range of pH and temperature.

**Key words :** Molecular adjuvant, G-CSF, Immune stimulatory effect

#### I. 서론

우리나라 양식 산업은 과학기술의 발달과 함께 꾸준히 발전하여 왔으나, 최근 다양한 질병 감염에 의해 양식 산업의 생산성은 감소하고 있는 추세이다. 국내 대표적 양식 품종인 넙치는 양식 초기에는 고수온기에 병원체의 단독감염이 주를 이루었으나 최근에는 수온과 상관없이 연중 다양한 병원체가 혼합감염의 형태로 질병을 일으키고 있다. 수산생물은 질병 발생 시 축산동물과 달리 물을 통한 전염속도가 빠르기 때문에, 단시간에

대량 폐사를 유발한다. 이러한 질병으로 인한 폐사를 막기 위하여 사용되는 수산용 항생제는 내성균 유발뿐만 아니라 수서생태계를 오염시킨다 (Kwon et al., 2014). 수산동물의 질병발생을 예방하기 위해서는 양식장 환경 개선 등의 외부적 요인도 중요하겠지만 근본적으로는 사람과 마찬가지로 수산용 백신의 개발 및 보급으로 항생제 사용을 줄이고 안전한 식품을 생산하는 것이 최선의 방법으로 생각되고 있다(Jeong et al., 2006).

전 세계적으로 양식 산업에 심각한 피해를 입히는 대표적인 세균성 질병은 에드워드 (Edwardsiellosis),

† Corresponding author : 051-720-2490, mgkwon@korea.kr

\* 이 논문은 국립수산과학원(R2015068)의 지원에 의해 연구되었음.

연쇄구균 (Streptococcosis), 비브리오균 감염증 (Vibriosis)을 들 수 있다(Sun et al., 2011). 이러한 질병을 예방하기 위하여 국내에서도 다양한 불활화 백신이 개발되어 양식현장에서 사용되고 있으나 백신효능을 높이고 지속 기간을 늘리기 위한 추가접종으로 어민들에게 많은 경제적 부담을 주고 있다.

백신은 병인이 분명하게 알려져 있는 하나의 질병에 대해서만 특이적 면역반응을 증강시킴으로 단순감염 보다는 복합감염이 일어나기 쉬운 어류 질병을 예방하는데 있어 한계를 가지고 있다. 이러한 이유로 백신에 대한 개선이 꾸준히 요구되어왔고, 그런 요구의 대안으로 각종 생리활성물질들을 이용하여 어류의 면역반응을 활성화함으로써 복합적인 어류질병 감염에 대한 저항성을 증강시켜줄 수 있는 백신 면역보조제 (adjuvant) 개발의 필요성이 대두되었다.

백신의 면역보조제, 즉 adjuvant는 라틴어의 'Adjuvare'라는 말에서 기원되었으며 '도와준다'는 의미를 가지고 있다 (Cox and Coulter 1997). 현재까지 백신 면역보조제로 이용되어 온 aluminum hydroxide gel 혹은 mineral oil emulsion과 같은 adjuvant들은 체액성 면역뿐만 아니라 세포 매개성 면역반응을 증가시킨다고 보고되었으나, 여러 가지 부작용이 나타나 인간에게는 사용이 금지되어 백신의 효과 증대를 위한 새로운 adjuvant 개발이 시급하게 되었다 (Altman and Dixon, 1989). 포유류에서는 새로운 adjuvant의 개발을 위해서 면역과 관련 있는 다양한 유전자들로부터 재조합 단백질을 제작하여 adjuvant로서의 효능에 대한 연구가 이루어졌다. 이러한 adjuvant들을 genetic 혹은 molecular adjuvant라고 칭하고 있다 (Scheerlinck, 2001). 어류에서는 그러나 백신의 효능 증강을 위한 molecular adjuvant의 연구가 초기 단계라고 말할 수 있다.

본 연구에서는 어류에서 기존의 aluminum hydroxide gel 혹은 mineral oil emulsion adjuvant 보다 더욱 효과적이고, 효율적이며 생체 내에서

부작용이 없는 안전한 molecular adjuvant의 개발을 위하여 넙치로부터 유용한 면역관련 분자들을 클로닝 하였고, 이들로부터 재조합단백질을 제작하였다. 제작된 재조합단백질들을 이용하여 넙치의 백혈구를 자극하여 면역능 유도를 조사하였다. 뿐만 아니라, pH 및 온도에 따른 재조합단백질의 안정성을 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 넙치 면역 관련 유전자 클로닝 및 재조합 단백질 제작

1) 넙치 면역 관련 유전자의 클로닝과 재조합 단백질의 유도

넙치로부터 molecular adjuvant를 제작하기 위하여 넙치 면역관련 후보 유전자로는 TNF- $\alpha$ , G-CSF, IL-1 $\beta$ , CD40를 선정하였으며, 이들의 유전자의 정보는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 GenBank database에 이미 등록되어 있는 유전자들을 선정하여 이번 연구에 이용하였다. 각 유전자들의 ORF를 증폭시키기 위해 5'에는 EcoR I과 3'에는 Xho I 효소가 인식하는 염기를 추가하여 primer를 제작하였다(<Table 1>). 제작된 primer를 이용하여 PCR로 증폭시킨 후 gel extraction을 통하여 각 면역유전자들을 추출한 뒤 pET 22b vector에 cloning을 하였다. Cloning 이후 각 유전자의 삽입 여부와 amino acid의 서열에 mutation 여부를 sequencing을 통해 확인한 후에 각각의 넙치 면역유전자들이 삽입된 pET 22b vector를 E. coli BL21 (DE3)에 transformation하였다. 0, 0.1, 0.5 mM로 준비된 IPTG (isopropyl-D-thiogalactoside)를 transformation된 E. coli BL21에 첨가하여 37°C에서 4시간동안 배양하여 넙치 면역 관련 유전자 재조합단백질의 발현을 유도하였다.

2) Soluble form 재조합 단백질 제작 및 정제  
4가지의 넙치 면역관련 유전자 재조합단백질

<Table 1> Oligonucleotide primer

Object	Gene	Sequence (5'-3')	
Quantitative real-time PCR	IL-1 $\beta$ (BAB86882)	F: TCCACCAGATCAGTTCAGCA R: GAGAAGAAGCTTTGCGGTTGC	
	IL-6 (ABB90401)	F: CTCAGCAAGGAGGCTTGTC R: CTTGATGAGGCCGATCAGT	
	TLR2 (BAD01044)	F: CTCCACAACTGACCCACCT R: CTCCAGAGTTTTGGGCAGAC	
	TLR3 (BAD01045)	F: ACCGACGAGCTGTCTCCTTA R: CTCTCGTCTGCTTGGTCCTC	
	TNF (BAA94969)	F: CACATCATCATCCCACAGAG R: CGTGAAGAGCCATACCTGT	
	GCSF (BAE16320)	F: GCAGTTACCGGCTAATCCAA R: TAGCATGTGGCCTAGCTCCT	
	NKEF (AAY25400)	F: CCACTGGACTTCACCTTCGT R: TGCTTACGTGGTGTGTTGGT	
	Beta-actin	F: TTTCCCTCCATTGTTGGTGC R: GCGACTCTCAGCTCGTTGTA	
	Construction of Recombinant protein	CD40 (BAC87848)	F: ggcgggcgGAATTCATGCTCCTGTTTCATGGTGGTG R: ggcgggcgGAATTCACACTGTCCATTGTCACTGA
		TNF (BAA94969)	F: ggcgggcgGAATTCATGTGTAAGGTGCTGGGGGGC R: ggcgggcgCTCGAGAAGTGCAAAGACACCGAAGA
IL-1 $\beta$ (BAB86882)		F: ggcgggcgGAATTCATGGAATCCAAGATGGAATGC R: ggcgggcgCTCGAGACTCTGATGCTGGATGTTGAA	
GCSF (BAE16320)		F: ggcgggcgGAATTCGACGACGACGACAAGATGGACTC TGAGACAGT R: ggcgggcgCTCGAGGCGTGCAGGTGCAGCTCGGCG	

제작 후보군 중에서 G-CSF를 선정하여 fusion partner로 MBP (Maltose binding protein, 40 kDa)를 G-CSF의 N-말단에 붙여서 cloning 하였고 상술한대로 IPTG를 첨가하여 재조합단백질의 발현을 유도하였다. 발현이 유도된 G-CSF 재조합단백질은 MBP affinity resin을 이용하여 정제하였다.

## 2. In vitro 조건에 따른 molecular adjuvant의 백혈구 면역유전자 자극능 조사

1) G-CSF 재조합단백질(rPoGCSF)의 농도별 자극에 따른 두신백혈구의 면역관련 유전자의 발현량 조사

넵치 두신에서 percoll(Sigma-Aldrich Co., USA)을 이용하여 넵치 두신으로부터 백혈구를 분리한 후 넵치 재조합단백질(rPoGCSF)을 10, 1, 0.1  $\mu$ g/mL의 농도로 첨가하여, 1, 3, 6, 12, 24시간 자극하였다. 자극한 백혈구로부터 RNA purification kit (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 total RNA를 분리하였으며, cDNA를 합성하기 위하여, 추출한 total RNA는 Recombinant DNase I-RNase free kit (TaKaRa, Japan)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 DNase를 처리하였다. 그 후, cDNA synthesis kit (Stratagene, LaJolla, CA, USA)를 사용하여 DNase를 처리한 total RNA

를 cDNA로 합성시켰다.

시간별 자극에 대한 넙치 면역관련 유전자들의 발현 정도를 알아보기 위해, 합성된 cDNA template 1  $\mu$ l와 forward primer, reverse primer 각각 1  $\mu$ l씩, SYBR Green I (TaKaRa, Japan) 12.5  $\mu$ l, PCR grade water 9.5  $\mu$ l를 혼합하여 total volume 25  $\mu$ l이 되도록 한 후 Thermal Cycler DICE Real-Time System (Takara)을 이용하여 quantitative real-time PCR을 수행하였다. 넙치의 면역관련 유전자는 G-CSF, TNF- $\alpha$ , NKEF, TLR2, TLR3, IL-1 $\beta$ , IL-6를 선정하였으며, 이들의 specific primer들을 이용하여 rPoGCSF의 농도 별/시간별 자극에 따른 발현 변화를 확인하였다. 이번 연구에 이용된 각 유전자의 specific primer 들은 <Table 1>에 열거하였다.

3) rPoGCSF 안정성 조사-I : pH 처리에 따른 면역관련 유전자의 발현 유도능 조사

Molecular adjuvant로 이용될 rPoGCSF의 pH 조건에 따른 활성 변화 조사는 rPoGCSF (100  $\mu$ g/mL)를 pH 2, 4, 6, 8, 10, 12에서 24시간 노출시킨 후 실험에 사용하였다. 각 조건에서 노출된 rPoGCSF를 넙치 백혈구와 1시간, 3시간, 12시간, 24시간 반응시킨 후 quantitative real-time PCR법을 이용하여 면역관련 유전자인 IL-1 $\beta$ 와 TNF의 발현량을 조사하였다.

4) rPoGCSF 안정성 조사-II : 온도 처리에 따른 면역관련 유전자의 발현 유도능 조사

Molecular adjuvant로 이용될 rPoGCSF의 온도별 조건에 따른 활성 변화 조사를 수행하기 위하여 rPoGCSF (100  $\mu$ g/mL)를 10, 20, 25, 30, 35 및 42°C에서 24시간 노출시킨 후 실험에 사용하였다. 각 조건에서 노출된 rPoGCSF는 pH조건별 자극과 같은 방법으로, 넙치 백혈구와 1시간, 3시간, 12시간, 24시간 반응시킨 후 quantitative real-time PCR법을 이용하여 IL-1 $\beta$ 와 TNF의 발현량을 조사하였다.

### 3. 통계처리

결과의 통계 처리는 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 평균간의 유의성을 SPSS Version 10 (SPSS, Michigan Avenue, Chicago, IL, USA, 1997) program을 사용하여 95 %수준에서 검정하였다.

## Ⅲ. 결과 및 고찰

### 1. 넙치 면역 관련 유전자 재조합 단백질 제작 및 정제

1) 넙치 면역관련 유전자 재조합 단백질 제작

TNF (Tumor Necrosis factor)- $\alpha$ 는 17 kDa의 단백질로서, 엔도톡신(endotoxin), 염증반응 매개체 (inflammatory mediators) 혹은 IL-1과 같은 사이토카인(cytokine)에 의해 자극받은 다양한 종류의 세포로부터 합성되어진다(Camussi et al., 1991). 넙치에서도 Hirono et al. (2000)에 의해 TNF- $\alpha$ 가 최초로 클로닝 되었고, 그 후 넙치에서 다양한 TNF superfamily 들이 동정되었으며, 그들의 분자생물학적 특성과 발현분석을 통해 포유류에서 보고되어진 TNF- $\alpha$ 와 유사한 기능을 할 것으로 보고되어졌다(Hirono et al., 2000; Park et al., 2003).

CD40 (Cluster of Differentiation 40)은 TNF (tumor necrosis factor) receptor (TNFR) superfamily의 일원으로서, B세포(B cells), 수지상세포(dendritic cells), 내피세포(endothelial cells), 섬유아세포(fibroblasts), 상피세포(epithelial cells) 등과 같은 다양한 세포에서 발현하는 것으로 보고되어왔다(Park et al., 2005). 면역반응을 유발하는 대표적인 항원 수용체로서, 넙치에서는 Park et al.(2005)에 의해 처음 보고 되었으며, 이들의 기능 또한 항원 수용체로서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어왔다.

IL-1 $\beta$  (Interleukin 1 $\beta$ )는 염증반응을 일으키는 대표적인 사이토카인으로서 이들의 기능은 매우 다양한 것으로 알려져 있다(Dinarelli, 1997). 특히

넙치에서는 다양한 연구자들에 의해 이들의 기능이 분석되어왔고, 특히 넙치에서는 cDNA microarray 기법을 통해 이 IL-1 $\beta$ 의 면역반응 유도능이 분석되기도 하였다(Emmadi et al., 2005).

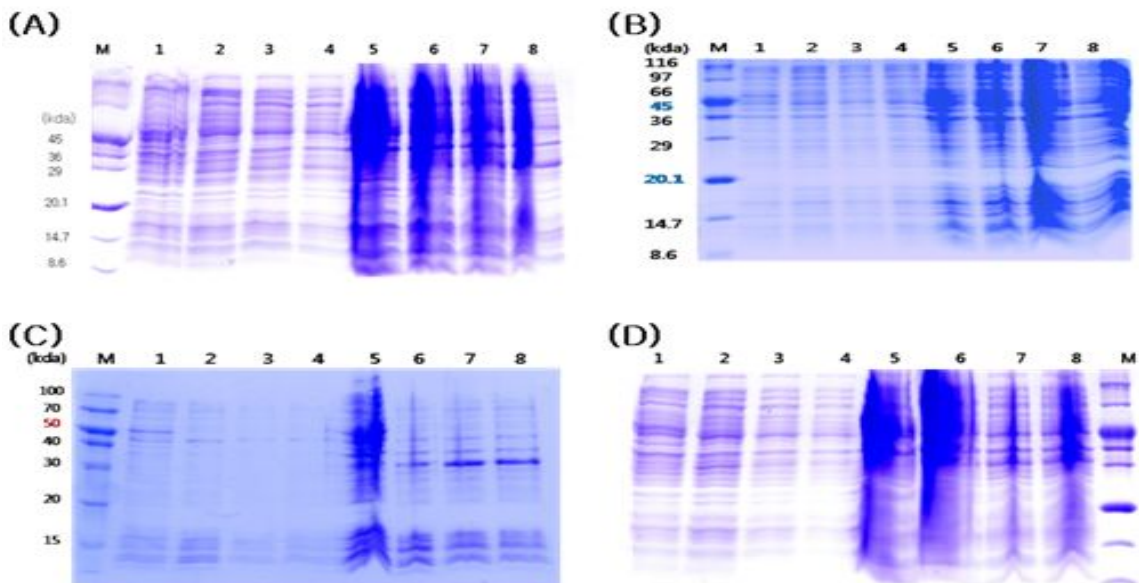
G-CSF (Granulocyte colony stimulating factor)는 glycoprotein cytokine으로서, 식세포성 호중구(phagocytic neutrophils)의 조혈작용(hematopoiesis)에 중요한 역할을 하며, 호중구를 토대로 한 면역 반응에 중추적인 기능을 하는 것으로 보고되었으며, 다양한 어류에서도 이들의 존재가 보고되었다(Nam et al., 2009).

이번 연구에서는 넙치의 중요 면역관련 유전자로 알려진 TNF- $\alpha$ , CD40, IL-1 $\beta$ 와 G-CSF의 molecular adjuvant로의 가능성 및 활용을 조사하기 위하여 재조합단백질 제작을 시도하였다. 하지만 SDS-PAGE 분석 결과, TNF- $\alpha$  (약 26 kDa), CD40 (약 33 kDa), IL-1 $\beta$  (약 30 kDa)와 G-CSF

(약 25 kDa)는 pellet에서만 발현이 확인되어 모든 재조합단백질은 insoluble form으로 발현이 되었다([Fig. 1]).

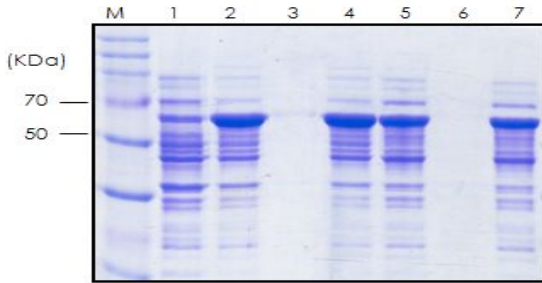
2) Soluble form 재조합 단백질 제작 및 정제

Insoluble form으로 발현된 4가지의 면역유전자 재조합단백질 중에서 G-CSF를 선정하여 E. coli BL21 (DE)에서 안정적으로 soluble form으로 발현시키기 위하여 fusion partner로 MBP를 G-CSF의 N-말단에 붙여서 재 클로닝을 수행하였으며, IPTG 유도를 통해 25°C에서 soluble form의 재조합단백질(rPoGCSF)이 생산되는 것을 확인할 수 있었다([Fig. 2]). 특히, E. coli BL21 (DE)에서 rPoGCSF를 발현 시킨 후, 이 단백질의 정제는 MBP affinity resin을 이용하여 정제되었으며, 10 mM maltose가 들어간 elution buffer로 elution 하였을 때 충분한 양이 정제되었다([Fig. 2]).



[Fig. 1] Recombinant protein expression in olive flounder of TNF- $\alpha$  (A, 26 kDa), CD40 (B, 33 kDa), IL-1 $\beta$  (C, 30 kDa) and G-CSF (D, 25 kDa).

M, marker; Lane 1, 0 mM IPTG, Supernatant; Lane 2, 0.1 mM IPTG, Supernatant; Lane 3, 0.5 mM IPTG, Supernatant; Lane 4, 1.0 mM IPTG, Supernatant; Lane 5, 0 mM IPTG, Pellet; Lane 6, 0.1 mM IPTG, Pellet; Lane 7, 0.5 mM IPTG, Pellet; Lane 8, 1.0 mM IPTG, Pellet.

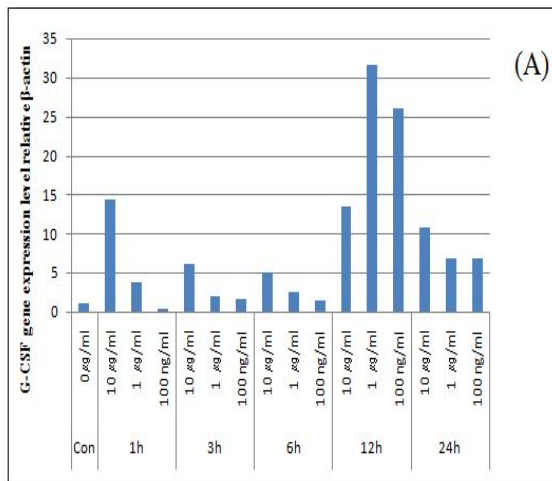


[Fig. 2] Protein expression using *E. coli* BL21 pET22b. expression system of G-CSF (65 kDa). M, marker; 1, Uninduction Total; 2, 37°C-Induction Total; 3, 37°C-Induction insoluble; 4, 37°C-Induction soluble; 5, 25°C-Induction Total; 6, 25°C-Induction insoluble; 7, 25°C-Induction soluble.

## 2. In vitro 조건에 따른 molecular adjuvant의 백혈구 면역유전자 자극능 조사

1) rPoGCSF의 농도별 자극에 따른 두신백혈구에서 면역관련 유전자의 발현변화 조사

① G-CSF: 1  $\mu\text{g/ml}$ , 12시간에 가장 높은 발현량을 나타내었으며, 10, 1, 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별 자극에 대해 농도가 높을수록 발현량이 높아지는 경향을 나타내어 G-CSF 재조합 단백질의 활성화에 의해 G-CSF 유전자의 발현량이 증가한 것으로 판단된다. ([Fig. 3A])



② TNF- $\alpha$ : 시간이 경과함에 따라 발현량이 증가하는 경향을 보였으며, 1, 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별 자극에 대해 발현량이 높아지는 경향을 나타내었다 ([Fig. 3B]).

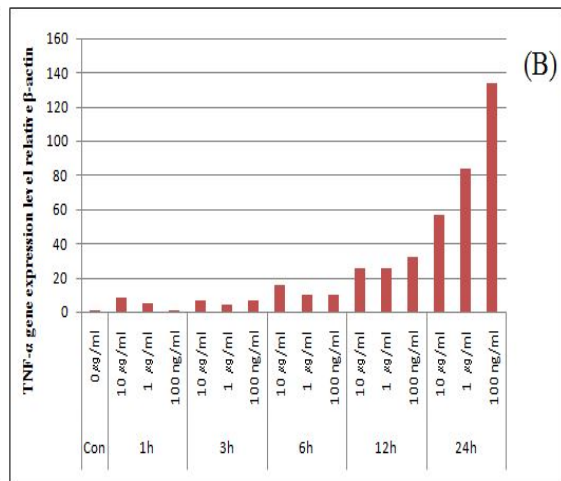
③ TLR2: 자극 후 12시간이 경과함에 따라 발현량이 증가하는 경향을 보였다 ([Fig. 3C]).

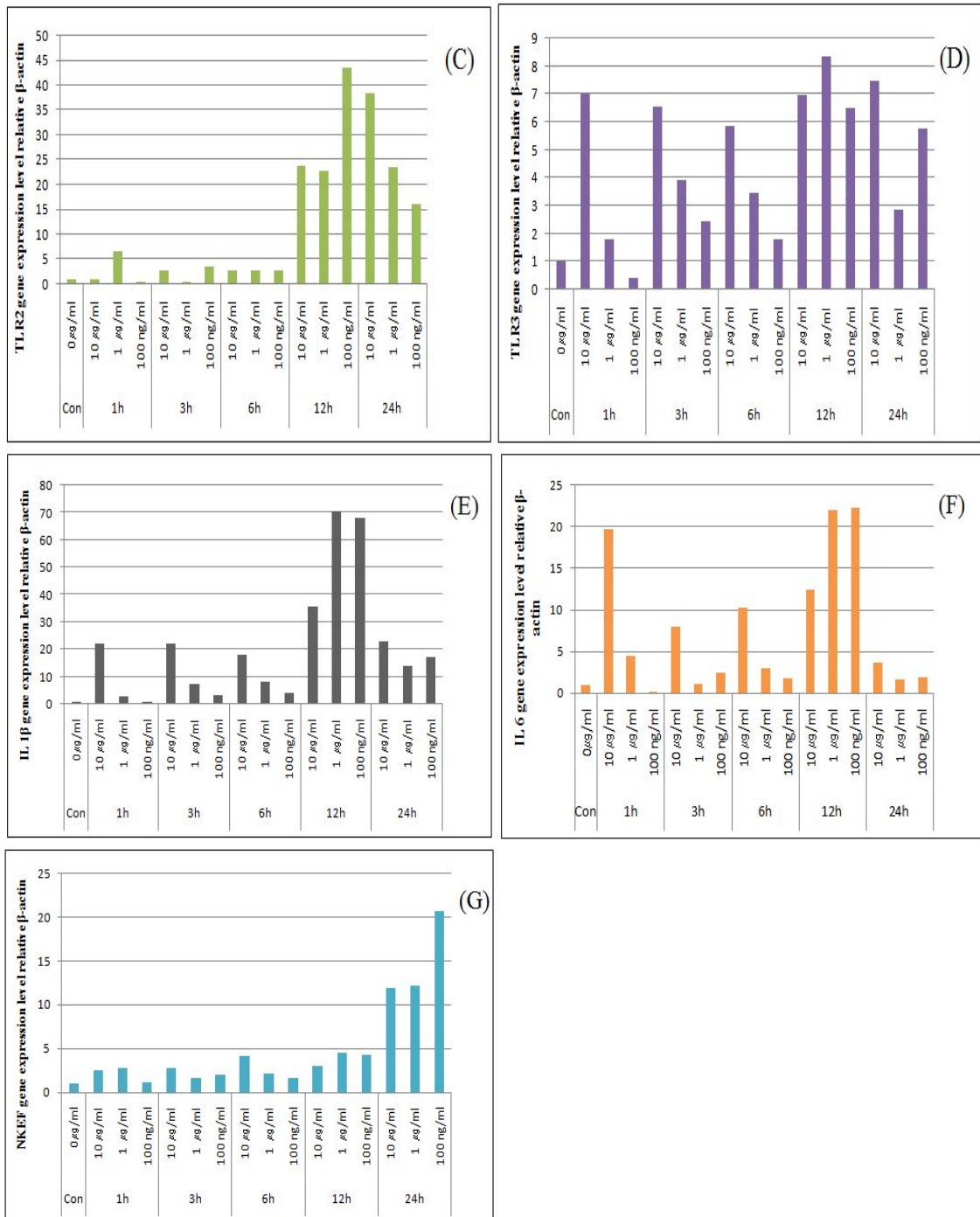
④ TLR3: 시간이 경과함에 따라 발현량이 증가하는 경향을 보였으며, 10, 1, 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별 자극에 대해 농도가 높을수록 발현량이 높아지는 경향을 나타내어 G-CSF 재조합 단백질에 의해 TLR3 유전자의 발현량이 증가한 것으로 판단된다([Fig. 3D]).

⑤ IL-1 $\beta$ : 자극 6시간까지는 10, 1, 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별 자극에 대해 농도가 높을수록 발현량이 높아지는 경향을 나타내었으며, 12시간째에 가장 높은 발현을 보였다 ([Fig. 3E]).

⑥ IL-6: 자극 6시간까지는 10, 1, 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별 자극에 대해 농도가 높을수록 발현량이 높아지는 경향을 나타내었으며, 12시간째에 가장 높은 발현을 보였다.(Fig. 3F)

⑦ NKEF: 시간이 경과함에 따라 발현량이 증가하는 경향을 보였으며, 10, 1, 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별 자극에 대해 농도가 높을수록 발현량이 높아





[Fig. 3] Expression level of olive flounder immune related gene after stimulated by rPoGCSF(1, 3, 6, 12, 24hr). (A) G-CSF; (B) TNF; (C) TLR2; (D) TLR3; (E) IL-1 $\beta$ ; (F) IL-6; (G) NKEF



지는 경향을 나타내어 G-CSF 재조합 단백질에 의해 NKEF 유전자의 발현량이 증가한 것으로 판단된다(Fig. 3G).

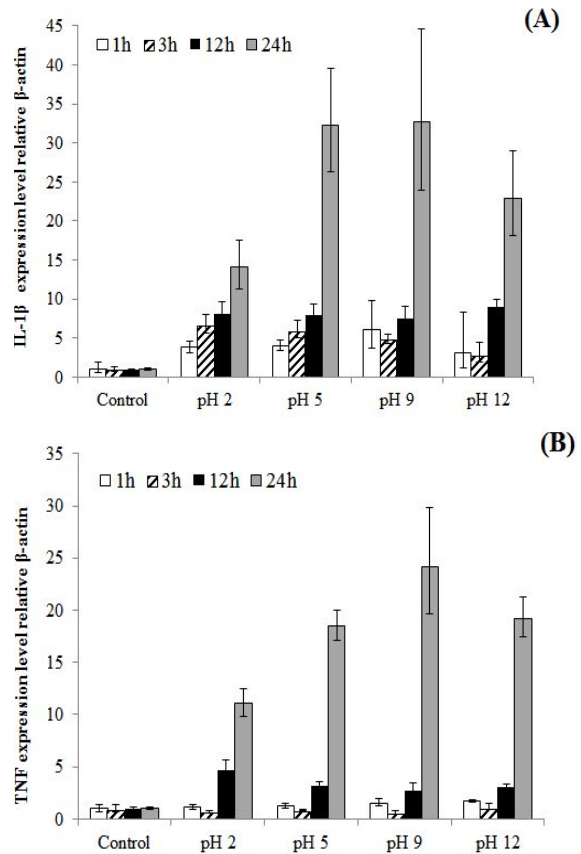
2) rPoGCSF의 pH별 처리에 따른 면역관련 유전자의 발현 유도능 조사 rPoGCSF를 pH 2, 4, 6, 8, 10, 12에서 24시간 처리 후 넙치 백혈구를 자극하여 IL-1 $\beta$ 와 TNF 발현량을 조사하였다. IL-1 $\beta$  발현량은 pH 조건별로 차이가 보이지 않았으나, 처리시간이 길어질수록 증가하여 24시간째 모든 실험구가 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다. pH 6과 pH 10 실험구에서 처리 24시간째 대조구의 각각 32.3배와 32.7배로 가장 높은 발현량을 나타내었다(Fig. 4A). 넙치 백혈구의 TNF 발현량은 자극 3시간까지는 대조구와 유사한 발현량을 나타내었으나, 12시간째 다소 높은 발현량을 나타내었다. 자극 24시간째 모든 온도에서 대조구에 비하여 유의적으로 높은 발현량을 나타내었다( $p < 0.05$ , [Fig. 4B]).

IL-1 $\beta$ 와 TNF의 발현량은 자극 시간별로 차이는 있었으나, 조사한 모든 pH 조건에서 자극하지 않은 대조구에 비하여 높은 발현량을 보여 넓은 pH 범위에서 안정하였다. 넙치 체액의 pH를 고려 시 adjuvant로서 높은 활성을 나타낼 수 있으며, 산성에서도 안정하므로 경구백신의 adjuvant로 사용이 가능할 것으로 판단되었다.

3) rPoGCSF의 온도별 처리에 따른 면역관련 유전자의 발현 유도능 조사

rPoGCSF를 10, 20, 25, 30, 35, 42 $^{\circ}$ C에서 24시간 처리 후 넙치 백혈구를 자극하여 IL-1 $\beta$ 와 TNF 발현량을 조사하였다. IL-1 $\beta$  발현량은 처리 24시간째 모든 실험구에서 대조구에 비하여 유의적으로 높은 값을 나타내었으며, 특히 20 $^{\circ}$ C와 25 $^{\circ}$ C 실험구는 다른 온도구의 24시간째 발현량에 비하여 유의적으로 높은 발현을 나타내었다( $p < 0.05$ , [Fig. 5A]).

TNF 발현량은 모든 실험구에서 처리 12시간까

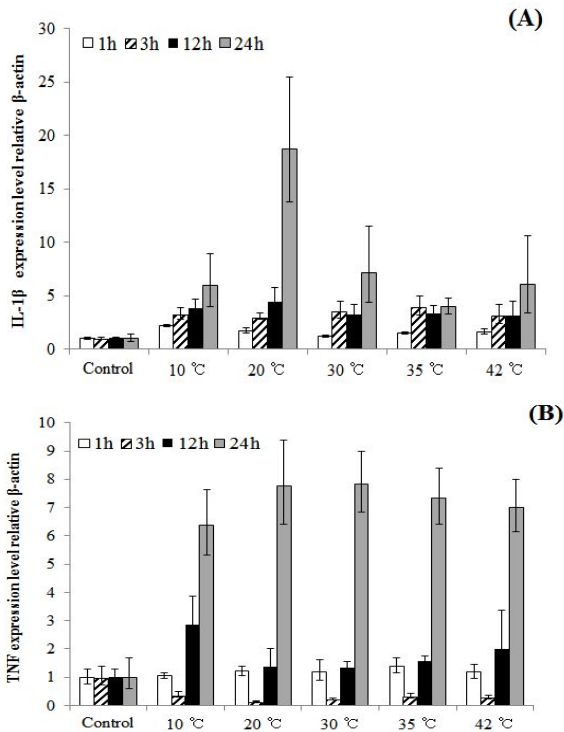


[Fig. 4] Expression level of IL-1 $\beta$  and TNF after stimulated by rPoGCSF at different pH. (A) IL-1 $\beta$ ; (B) TNF.

지는 대조구와 유사한 경향을 나타내었으나 24시간째는 대조구에 비하여 유의적으로 높은 발현을 나타내었다. 특히 25 $^{\circ}$ C 실험구는 다른 실험구의 24시간째 발현량에 비하여 유의적으로 높은 발현을 나타내었다( $p < 0.05$ , [Fig. 5B]).

IL-1 $\beta$ 와 TNF의 발현량은 자극 시간별로 차이는 있었으나, 조사한 모든 온도조건에서 자극하지 않은 대조구에 비하여 높은 발현량을 보여 온도에 안정하여 넙치 사육 수온 및 백신 접종 시기인 20~25 $^{\circ}$ C에서 가장 높은 활성을 나타내므로 adjuvant로 사용 시 효능이 높을 것으로 판단되었다.





[Fig. 5] Expression level of IL-1 $\beta$  and TNF after stimulated by rPoGCSF at different temperature. (A) IL-1 $\beta$ ; (B) TNF.

## References

Altman, A. & Dixon, F. J.(1989). Immunomodifiers in vaccines. *Advances in Veterinary Science & Comparative Medicine* 23, 301~341.

Camussi, G. · E. Albano · C. Tetta, & F. Bussolino (1991). The molecular action of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Eur. J. Biochem.* 202:3.

Cox, J. C. & Coulter, A. R.(1997). Adjuvants-a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15, 248~56.

Emmadi, D. · Iwahori, A. · Hirono, I. & Aoki, T. (2005). cDNA microarray analysis of interleukin-1 $\beta$ -induced Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* kidney cells. *Fisheries Science.* 71, 519~530.

Hirono, I. · Nam, B. H. · Kurobe, T. & Aoki, T. (2000). Molecular cloning, characterization, and

expression of TNF cDNA and gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J Immunol*, 165, 4423~4427.

Jeong, Y. U. · Kang, C. Y. · Kim, M. J. · Heo, M.S. · Oh, D. C. & Kang, B. H.(2006). Characterization of Streptococcosis occurrence and molecular identification of the pathogens of cultured flounder in Jeju island, *The Korean Journal of Microbiology*, 42, 199~204.

Kwon, M. G. · Hwang, J. Y. · Jung, S. H.(2014) The efficacy and safety on combination vaccines: *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae* and *S. parauberis*, in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *The Journal of Fisheries and Marine Sciences Education.* 26, 1193~1200.

Nam, B. H. · An, G. H. · Baek, G. W. · Kim, M. C. · Kim, J. W. · Park, H. J. · Lee, D. C. & Park, C. I.(2009). Molecular cloning and expression of cDNAs for two distinct granulocyte colony stimulating factor genes from black rockfish *Sebastes schlegelii*. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 360~364.

Park, C. I. · Hirono, I. · Hwang, J. Y. · Aoki, T.(2005). Characterization and expression of a CD40 homolog gene in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Immunogenetics.* 57, 682~689.

Park, C. I. · Kurobe, T. · Hirono, I. & Aoki, T.(2003). Cloning and characterization of cDNAs for two distinct tumor necrosis factor receptor superfamily genes from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Dev Comp Immunol.* 27, 365~375.

Scheerlinck, J. Y.(2001). Genetic adjuvants for DNA vaccines. *Vaccine* 19, 2647~2656.

Sun, Y. · Liu, C. S. & Sun, L.(2011). A multivalent killed whole-cell vaccine induces effective protection against *Edwardsiella tarda* and *Vibrio anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology* 31, 595~599.

- Received : 09 September, 2015
- Revised : 07 October, 2015
- Accepted : 12 October, 2015