

명태(*Gadus chalcogrammus*) 수정란에서 신경괴사증바이러스 (nervous necrosis virus) 모니터링

남우화·이종혁·김미리·장수림·윤도현·서주영*·권오남**·김정호†

강릉원주대학교 해양자원육성학과, *강원도 한해성 수산자원센터, **강원양식생물연구원(주)

Monitoring of nervous necrosis virus in fertilized eggs of walleye pollock (*Gadus chalcogrammus*)

U-Hwa Nam, Jong-Hyuk Lee, Mi-Ri Kim, Su-Rim Jang, Do-Hyun Yoon,
Joo-Young Seo*, O-Nam Kwon** and Jeong-Ho Kim†

Department of Marine Bioscience, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea

*Gangwon Cold Sea Fisheries Resources Center, Goseong, 24747, Korea

**GABI Co. Ltd., Gangneung, 25435, Korea

We previously monitored nervous necrosis virus (NNV) in brain samples of artificially produced walleye Pollock (*Gadus chalcogrammus*) seedlings, with a low prevalence (1.8%, 1/55) but no clinical symptoms. Given that this virus is considered one of the most serious viral threats for almost all marine aquaculture fish species and characterized by both vertical and horizontal transmission, it would be interesting to monitor NNV in the fertilized eggs as well. We collected fertilized walleye pollock eggs from the farms located in Goseong during January to March, 2017. Approximately 50 mg of eggs were periodically taken from 4 each different batches, and 37 different pooled sample sets in total were made during sampling period. RNA was extracted from the eggs by using Trizol and cDNA was synthesized for RT-PCR for detecting NNV. Primers and PCR conditions are the same as previously described. As a result, NNV was not detected from any of the sample sets by one step PCR (0%, 0/37), suggesting NNV may not be a threat in walleye pollock aquaculture in Korea at present time. However, continuous monitoring for NNV should be conducted because introducing a new species into aquaculture industry involves potentials of disease outbreak and NNV is already known to cause outbreaks in gadoid fishes.

Key words: walleye pollock, *Gadus chalcogrammus*, nervous necrosis virus, NNV.

명태(*Gadus chalcogrammus*)는 대구목(order Gadiformes) 대구과(family Gadidae)에 속하는 한해성 어류이며, 북태평양 해역에 광범위하게 서식하고

있다. 한반도 해역은 북서태평양에서 명태 분포의 남방 한계선으로 알려져 있으며 명태는 동해의 수심 200~350 m에 주로 분포하는 것으로 추정된다 (Kang and Kim, 2015; 강 등, 2013). 명태는 우리나라에서 경제적, 문화적으로 매우 중요한 어종이며 19세기 초부터 이미 중요한 먹거리로 간주되어 어

†Corresponding author: Jeong-Ho Kim
Tel: +82-33-640-2851, Fax: +82-33-640-2340
E-mail: jhkim70@gwnu.ac.kr

획량이 1930년대에는 연평균 30만 톤 정도였으나 이후 급속히 감소하여 70년대에는 7만 톤, 2000년대에 들어서는 거의 자취를 감추었다 (Kang and Kim, 2015).

최근 명태의 인공종묘 생산이 성공하면서 자연산 명태의 자원량을 회복하기 위해 인공 종묘를 방류하고 있으며, 가시적인 성과를 보이고 있다 (Seo and Kwon, 2017). 그러나 아직까지 명태의 생존율에 영향을 줄 수 있는 다양한 감염성 질병에 관한 연구가 충분하지 않아 방류 이후의 생존율을 예측하기 쉽지 않은 실정이다. 남 등 (2017)은 부화 후 양성 중인 명태에서 어병 바이러스를 모니터링 하였으며, viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) 및 nervous necrosis virus (NNV)를 일부 개체에서 PCR법으로 검출하였다. 그러나, NNV에 감염된 1개체를 제외하고는 모두 two-step PCR법으로 검출이 되었으며, 바이러스의 감염이 의심되는 대량 폐사는 발생하지 않아 바이러스의 역가는 매우 낮은 것으로 추정하였다.

NNV는 일본의 양식산 흑점줄전갱이(*Pseudocaranx dentex*)에서 처음 발견, 보고되었으며(Mori et al., 1992), 전 세계적으로 양식산 해산어류에 감염하여 척추 만곡, 선회 유영, 체색 흑화 등을 특징으로 하는 바이러스성 신경 괴사증(viral nervous necrosis, VNN)을 유발, 대량 폐사를 일으키는 등 심각한 피해를 주고 있다(Doan et al., 2017). 우리나라에서는 능성어(*Hyporthodus septemfasciatus*)를 비롯, 넙치(*Paralichthys olivaceus*), 황점볼락(*Sebastes oblongus*), 홍민어(*Sciaenops ocellatus*) 등에서 NNV 감염에 의한 폐사가 보고되어 있다(Oh et al., 2005). NNV는 감염된 친어를 통해 수정란, 자어에도 전염되는 수직 전파가 흑점줄전갱이, 노랑가자미(*Verasper moseri*) 등에서 알려져 있으며, 따라서 VNN의 확산을 막기 위해서는 일상적인 방역 대책은 물론 수정란의 소독 및 친어의 바이러스 검사도 필요하다(김 등, 2017). 본 연구에서는 명태에서 얻어낸 수정란을 정기적으로 채집하여 NNV의 감염 여부를 PCR법으로 확인해 보았다.

강원도 한해성 수산자원센터에서 사육하고 있던 명태 성어로부터 수정란을 채집하였다. 2017년 1월부터 4월까지 명태 친어가 수용된 수조 4개에

서 자연 산란이 이루어졌으며 수조 별로 부상란을 각각 매회 소량 채집하여 그 중 50 mg을 Eppendorf tube에 수용하였다. 이를 1 set로 간주하였으며 채집한 수정란은 즉시 -20°C에 냉동 보관하였다. 10일 간격으로 한 set씩 수집하여 총 37 set를 이후의 실험에 사용하였다(Table 1).

제작한 시료를 Trizol (Invitrogen, USA) 450 ul와 함께 microtube (Eppendorf, Germany)에 넣고 2,820 ×g에서 30초간 균질화하였다. 여기에 chloroform (Sigma, USA) 100 ul를 첨가, 4°C, 13,250×g의 조건에서 10분간 원심분리하였다. 분리된 상등액을 새로운 microtube에 옮겨 넣고 2배 부피의 Isopropanol alcohol을 첨가한 후 4°C, 13,250×g에서 15분간 원심 분리하고 상등액을 제거하여 pellet을 얻었다. pellet은 70% ethanol로 세척한 후, DEPC-DW 20 ul (Bioneer, Korea)를 첨가하여 cDNA 제작에 사용하였다. 추출한 total RNA는 Nano drop (Thermo, Japan)을 사용, 1 ug/ul로 정량한 후 Random Primer (Roshe, Germany)를 1 ul 넣고, 65°C에서 10분간 변성시키고 즉시 얼음 위에서 냉각시켰다. 여기에 50 nM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs, 10 mM DTT, 10 unit reverse transcriptase (Bioneer, Korea)를 첨가하여 42°C에서 1시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 이후, 95°C에서 5분간 처리하여 남아있는 효소 활성을 제거

Table 1. Sampling information on the fertilized eggs of walleye pollock

Date	A tank (set)	B tank (set)	C tank (set)	D tank (set)
2017 Jan	01~10	-	1	-
	11~20	-	1	-
	21~31	1	1	1
Feb	01~10	-	1	1
	11~20	1	1	1
	21~31	1	1	-
Mar	01~10	1	1	-
	11~20	1	1	-
	21~31	1	1	1
Apr	01~10	1	1	-
	11~20	1	1	-
	21~31	1	1	-
Total	9	12	12	4

하고 얻어낸 산물을 사용하여 RT-PCR (reverse-transcriptase PCR)을 수행, 증폭산물의 유무를 확인하였다. 실험에 사용한 primer 설계 및 RT-PCR 조건은 Cha et al. (2007)의 방법을 따랐으며 Table 2에 나타내었다.

총 37 set의 시료에 대해 one-step PCR을 실시한 결과 양성 시료는 발견되지 않았다. Two-step PCR을 실시한 결과, 전체의 5.4% (2/37 set)의 시료에서 양성반응이 확인되었으며 검출된 양성시료는 2 set 모두 B tank에서 샘플링된 시료였다(Table 3). two-step PCR에서 양성반응을 나타낸 시료는 시퀀싱을 시도하였지만 band가 지나치게 흐려 시퀀싱이 불가능하였다(data not shown).

신경괴사증바이러스는 크게 4종류의 유전형 (SJNNV; Striped Jack nervous Necrosis Virus, TPNNV; Tiger Puffer nervous Necrosis Virus, BFNNV; Barfin Flounder nervous Necrosis Virus, RGNNV; Red-spotted Grouper nervous Necrosis Virus)으로 나뉘며, 국내에서는 이 중 RGNNV와 SJNNV의 감염에 의한 발병이 보고되어 있다 (Oh et al., 2005; 원 등, 2017). 4종류의 유전형 중 BFNNV는 Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), barfin flounder (*Verasper moseri*) 이외에 대구과 어류(e.g., Atlantic cod (*Gadus morhua*), Pacific cod (*Gadus macrocephalus*), haddock (*Melanogrammus aeglefinus*)) 등 냉수성 어종에서 보고되고 있는 유전형이다(Doan et al., 2017; Gagné et al., 2004; Johnson et al., 2002; Mori et al., 2003). 국내에서는 남 등(2017)에 의해 양성

중인 명태에서 BFNNV가 one-step PCR 법으로 검출이 된 바 있다. 하지만, 검출율이 매우 낮았고 (1/55, 1.8%), 감염이 의심되는 임상증상을 보이는 개체와 폐사 개체는 발견되지 않았다고 하였다. 본 연구에서는 이들 친어로부터 얻은 수정란에서 NNV 검출을 시도하였으며 그 결과 NNV는 one-step PCR 법으로 검출되지 않았다(0/37, 0%). 남 등 (2017)은 명태 친어 시료에서 검출된 바이러스의 역가 및 활성 등은 바이러스 분리를 시도하지 않아 알 수 없으며, 바이러스 양성 개체의 캐리어 가능성 확인이 필요하다고 서술하였다. 본 연구에서는 one-step PCR에서 모든 시료가 음성을 나타내어 바이러스 분리를 시도하지 않았다. 또한 이들 수정란에서 부화된 치어를 일부 채집하여 분석한 결과 역시 NNV는 전혀 검출되지 않아(data not shown), 현재 국내에서 양식하고 있는 명태에서 NNV 감염에 의한 폐사는 발생하지 않는 것으로 추정된다.

명태는 최근 완전 양식에 성공하였으며 아직까지는 감염성 질병이 원인으로 의심되는 대량 폐사는 보고된 바 없다. 감염성 질병에 의한 폐사는 어류 양식의 생산량에 영향을 줄 수 있는 요인 중의 하나이며, 따라서 새로운 어종 양식 기술을 개발, 확립하는데 있어서도 감염성 질병에 대한 정보는 반드시 필요하다. 새로운 양식 어종의 경우에는 일반적으로 이러한 정보의 양이 많지 않으며 대부분 예측이 곤란하다. 또한, 병원체와 숙주의 관계라는 관점에서 볼 때에 새로운 어종을 도입하여 대량으로 양식하는 경우 병원체의 대량 증식 혹은 대규모

Table 2. Oligonucleotide primers and PCR conditions for detecting NNV described by Cha et al. (2007)

Primer sets	sequences	PCR conditions
Noda-full-F Noda-full-R	TAATCCATCACCGCTTTGCAATCAC TTCAAATTGGTCATCAACGATACGCACT	1 cycle of 94°C for 5 min; 35 cycles of 92°C for 30 s, 60°C for 1 min, and 72°C for 1 min; and 1 cycle of 72°C for 5 min.
Noda-partial-F Noda-partial-R	CTGGGACACGCTGCTAGAAAT CGACACGTTGACCACATCAG	

Table 3. Detection rates of NNV in walleye pollock egg

Virus	Detection rate (%) (No. of positive set / No. of pooled set)	
	one-step RT-PCR	two-step RT-PCR
NNV	0 (0/37)	5.4 (2/37)

의 발병을 유발할 가능성이 있어(Lafferty et al., 2015) 지속적이고 장기적인 질병 모니터링을 통해 많은 정보를 축적할 필요가 있다. 특히, 수종의 대구과 어류에서 NNV의 감염에 의한 폐사가 이미 보고된 바 있어(Doan et al., 2017), 명태의 경우에도 지속적인 NNV의 모니터링이 필요할 것으로 생각된다.

요 약

2017년 1월에서 4월까지 강원도 고성에서 사육 중인 명태 친어로부터 수정란을 채집하여 신경괴사증바이러스(nervous necrosis virus, NNV)의 검출을 시도하였다. 매 회 50 mg씩 수정란을 채집하여 이를 1 set로 간주하였으며 총 37 set를 제작하였다. RNA를 추출하고 cDNA를 합성하여 NNV를 대상으로 reverse transcriptase PCR을 실시하였다. 그 결과, one-step PCR법으로는 37 set의 시료가 모두 음성이었으며, two-step PCR법으로는 5.4% (2/37)의 시료가 양성을 나타내었다. 그러나, band의 농도가 매우 낮아 시퀀싱은 불가능하였다. 본 연구의 결과 및 이전 연구의 결과로부터 현재 국내에서 양식하고 있는 명태에서 NNV 감염에 의한 폐사는 발생하지 않는 것으로 추정된다. 하지만, 지속적인 모니터링 및 양성 개체 출현 시 바이러스 분리의 시도 등은 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2017년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원(과제번호: 2015-0586)의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

- Cha, S.J., Do, J.W., Lee, N.S., An, E.J., Kim, Y.C., Kim, J.W. and Park, J.W.: Phylogenetic analysis of betanodaviruses isolated from cultured fish in Korea. *Dis. Aquat. Org.* 77:181-189, 2007.
- Doan, Q.K., Vandeputte, M., Chatain, B., Morin, T. and Allal, F.: Viral encephalopathy and retinopathy in aquaculture: a review. *J. Fish Dis.* 40: 717-742, 2017.
- Gagné, N., Johnson, S.C., Cook-Versloot, M., MacKinnon, A.M. and Olivier G.: Molecular detection and characterization of nodavirus in several marine fish species from the northeastern Atlantic. *Dis. Aquat. Org.* 62: 181-189, 2004.
- Johnson, S.C., Sperker, S.A. and Leggiadro, C.T.: Identification and characterization of a piscine neuropathy and nodavirus from juvenile Atlantic cod from the Atlantic Coast of North America. *J. Aquat. Ani. Health* 14: 124-133, 2002.
- Kang, S.K. and Kim, S.A.: What caused the collapse of walleye pollock population in Korean waters ? *KMI Int. J. Maritime Affairs and Fisheries* 7: 43-58, 2015.
- Lafferty, K.D., Harvell, C.D., Conrad, J.M., Friedman, C.S., Kent, M.L., Kuris, A.M., Powell, E.N., Rondeau, D. and Saksida, S.M.: Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 7: 471-6, 2015.
- Mori, K., Nakai, T., Muroga, K., Arimoto, M., Mushiike, K. and Furusawa, I.: Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology* 187: 368-371, 1992.
- Mori K., Mangyoku, T., Iwamoto, T., Arimoto, M., Tanaka, S. and Nakai T.: Serological relationships among genotypic variants of betanodavirus. *Dis. Aquat. Org.* 57: 19-26, 2003.
- Oh, M.J., Jung, S.J. and Kitamura, S.I.: Comparison of the coat protein gene of nervous necrosis virus (NNV) detected from marine fishes in Korea. *J. World. Aquaculture Soc.* 36: 223-227, 2005.
- Seo, J.Y. and Kwon, O.N.: Naturally collection and development until yolk absorption of domestic walleye pollock *Theragra chalcogramma* fertilized eggs and larvae. *J. Kor. Academia-Industrial Coop. Soc.* 18: 49-54, 2017.
- 강수경, 박정호, 김수암: 1970-1990년대 동해에서 어획된 명태(*Theragra chalcogramma*)의 체장에 따른 체급별 어획 마릿수 추정. *한국수산과학회지* 46: 445-453, 2013.
- 김시우, 김위식, 서한길, 김경민, 오명주: 신경괴사증 바이러스(Nervous Necrosis Virus, NNV) 모니터링을 통한 무감염 능성어(*Hyporthodus septemfasciatus*) 친어의 선발. *한국수산과학회지* 50: 527-533, 2017.
- 남우화, 전찬혁, 서현준, 최다영, 서주영, 권오남, 김위식, 김정호: 양성 중인 명태의 바이러스 모니터링. *한국어병학회지* 30: 1-9, 2017.

원경미, 이정태, 조미영, 김명석, 김나영, 정승희, 이남
실: 겨울철 양식 능성어의 바이러스성 뇌망막증
(VER) 감염 사례. 한국어류학회지 29: 157-164,
2017.

Manuscript Received : Apr 28, 2018

Revised : May 7, 2018

Accepted : May 7, 2018