

# 신경괴사증바이러스(nervous necrosis virus, RGNNV genotype)에 대한 단클론 항체 생산

김위식 · 김시우 · 오명주\*

전남대학교 수산생명의학과

## Production of Monoclonal Antibodies Against Nervous Necrosis Virus (NNV, RGNNV genotype)

Wi-Sik Kim, Si-Woo Kim and Myung-Joo Oh\*

Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

We developed and subsequently characterized mouse monoclonal antibodies (MAbs) against nervous necrosis virus (NNV, RGNNV genotype). We established six hybridoma clones secreting MAbs against NNV antigen: 2B1, 2B11, 2C12, 13C1-1, 13C1-2 and 14D11. All six MAbs belonged to the IgG2a isotype with a kappa light chain and their reactivity recognized against the 41 kDa coat protein of NNV by Western blot analysis. The affinity constants of the six MAbs were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). All six MAbs reacted with two NNV isolates (SgNag05 and Gemunodo06), while no reactivity was observed with five known fish viruses, namely marine birnavirus, infectious pancreatic necrosis virus, viral hemorrhagic septicemia virus, hiram rhabdovirus, and infectious hematopoietic necrosis virus. Moreover, high ELISA optical density (OD) values (0.87-1.42) were observed in the brain tissues of NNV-infected sevenband grouper, while low OD values (less than 0.12) were recorded in the brain tissues of uninfected fish. These results suggest that these six MAbs are highly competent and useful for the detection of NNV with the RGNNV genotype.

Key words: Nervous necrosis virus (NNV), RGNNV genotype, Monoclonal antibody

### 서론

바이러스성신경괴사증(viral nervous necrosis, VNN)은 전 세계적으로 50종 이상의 어류에서 발생하는 질병으로 보고되어 있다(OIE, 2017). VNN은 주로 자어나 치어에 발생하지만 능성어(*Epinephelus septemfasciatus*), 대서양 가자미(*Hippoglossus hippoglossus*), 유럽 농어(*Dicentrarchus labrax*)에서는 성어에서도 발생하여 대량폐사를 유발한다(OIE, 2017). 병어는 신경세포의 이상으로 인한 이상 유영(힘없이 유영하거나 선회 등의 비정상적인 유영 행동)이 나타나며, 병리조직학적으로 척수, 척수 신경절, 뇌 및 망막의 신경조직에 공포변성이 나타난다(Egusa et al., 2006; OIE, 2017).

VNN의 원인 병원체인 신경괴사증바이러스(nervous necrosis virus, NNV)는 외막이 없는 정 20면체의 RNA 바이러스로서(크기, 약 30 nm) 노다바이러스과(*Nodaviridae*) 베타노다바

이러스속(*Betanodavirus*)에 속한다(Schneemann et al., 2005).

NNV는 5개의 유전자형[striped jack NNV (SJNNV) type, tiger puffer NNV (TPNNV) type, barfin flounder NNV (BFNNV) type, red-spotted grouper NNV (RGNNV) type 및 turbot NNV (TNV) type]으로 구분되는데(Johansen et al., 2004; Nishizawa et al., 1997), 국내에서 검출되는 NNV는 RGNNV type, SJNNV type 및 BFNNV type에 속한다고 보고되어 있다(Cha et al., 2007; Gomez et al., 2008; Kim et al., 2012; Kim et al., 2017; Nam et al., 2017; Won et al., 2017). 국내에서 보고되는 NNV의 대부분은 RGNNV genotype에 속하며, 다양한 종류의 양식 어류뿐만 아니라 패류와 자연산 어류에서 검출된다.

NNV를 검사하는 방법으로는 어류주화세포를 이용한 분리 배양법, 유전자를 이용한 분자생물학적 방법[reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), real time PCR], 항체를 이용한 면역학적인 방법(enzyme-linked immunosorbent

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0328>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 51(3) 328-331, June 2018

Received 15 May 2018; Revised 8 June 2018; Accepted 14 June 2018

\*Corresponding author: Tel: +82. 61. 659. 3173 \$ Fax: +82. 61. 659. 3173

E-mail address: ohmj@jnu.ac.kr

assay (ELISA)] 등이 사용되고 있다(OIE, 2017). 이들 검사방법 중, RT-PCR과 분리배양법은 국내에서 NNV를 검출하거나 분리하는데 주로 사용되고 있다. 그러나 면역학적인 방법은 NNV에 대한 특이 항체가 보급되어 있지 않아 사용되지 않고 있다. 본 연구에서는 양식 현장에서 신속한 진단에 용이하게 적용될 수 있는 면역학적 진단법의 개선과 보급을 위한 목적으로 NNV에 대한 단클론 항체(monoclonal antibody, MAb)를 제작한 후 항체의 특성을 평가하였다.

## 재료 및 방법

본 연구에서는 붉바리(*Epinephelus akaara*)로부터 분리한 SgNag05 분리주(RGNNV genotype)를 실험용 바이러스로 사용하였다(Oh et al., 2012). NNV의 배양과 정제는 Gye and Nishizawa (2016)와 Gye et al. (2018)의 방법에 따라 실시하였다. NNV를 SSN-1 세포에 접종하여 배양한 후 4°C에서 12,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 배양액내의 세포 잔유물질을 제거한 상층의 부유액을 채취하였다. 채취된 상층액은 10<sup>6</sup>의 분획분자량의 biotech cellulose ester membrane이 들어 있는 투석튜브(Spectrum Laboratories, USA)를 사용하여 15 mM Tris-HCl (pH 8.0)로 10일간 투석한 후, Hi-trap Q column을 이용한 이온교환크로마토그래피(GE Healthcare, USA)와 고속단백질액체크로마토그래피(ÅKTAprime plus system, GE Healthcare, USA)를 사용하여 NNV 정제를 실시하였다. NNV 투석액을 column에 넣고 15 mM Tris-HCl (pH 8.0)이 들어있는 500, 600, 700, 1000 mM의 NaCl 용액을 사용하여 1 mL 씩 추출한 후, 700 mM의 NaCl 추출물을 사용하여 centrifugal ultrafiltration (10<sup>4</sup> 분획분자량, Vivaspın, Sartorius, Germany)으로 농축하였다.

NNV에 대한 MAb는 Gye et al. (2018)의 방법에 따라 제작하였다. 정제된 NNV (약 20 µg)와 complete Freund's adjuvant (Gibco, USA)를 동량으로 섞어 BALB/c 마우스의 복강에 1차 접종한 후, 정제된 NNV (약 20 µg)를 사용하여 7일 간격으로 2회 접종하였다. 최종 면역 후 3일째, 마우스로부터 비장을 분리한 후 polyethylene glycol (Roche, Germany)을 사용하여 myeloma 세포(SP2/0-Ag14)와 융합시킨 후 fetal bovine serum 이 10% 첨가된 hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) 배지로 suspension 시킨 후 96 well plate에 분주하여 37°C로 설정된 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 양성 hybridoma는 정제된 NNV를 사용하여 ELISA로 선별하였고 3회 이상 제한 희석법으로 클로닝하였다. ELISA는 정제된 바이러스액을 96 well plate에 50 µL (200 ng/well)씩 분주하여 4°C에서 overnight 한 후 뒷부분에 설명된 방법에 따라 실시하였다. 선별된 MAb의 isotyping은 pierce rapid ELISA mouse MAb isotyping kit (Thermo, USA)를 사용하여 결정하였다.

본 연구에서 제작된 MAb와 정제된 NNV, NNV (분리주, SgNag05와 Gemunodo06)에 감염된 SSN-1 세포와 정상 SSN-

1 세포를 사용하여 Laemmli (1970)과 Towbin et al. (1979)의 방법에 따라 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)와 Western blotting을 실시하였다. 정제된 NNV를 12% polyacrylamide gel에 loading 한 후 30 mA에서 전기영동을 하였다. 전기영동 종료 후 gel을 coomassie brilliant blue를 사용하여 염색하였다. Western blot은 전기영동한 NNV를 nitrocellulose membrane (Bio-Rad, USA)에 옮긴 후, 본 연구에서 제작한 MAb (1차 항체)와 alkaline phosphatase (AP)가 붙어 있는 goat anti-mouse IgG (Sigma, USA, 2차 항체)로 반응시키고 AP가 붙어 있는 substrate kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 발색하였다. 양성대조구로 본 연구실에서 보유하고 있는 항 NNV 토끼 항체를 사용하였다.

제작된 MAb의 반응 특이성을 조사하기 위해 RGNNV genotype에 속하는 2개의 NNV 분리주(SgNag05, 10<sup>8.55</sup> TCID<sub>50</sub>/mL와 Gemunodo06, 10<sup>8.3</sup> TCID<sub>50</sub>/mL), 5종류의 어류바이러스[바이러스성출혈성패혈증바이러스(viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV: 10<sup>8.05</sup> TCID<sub>50</sub>/mL), 넙치랩도바이러스(hirame rhabdovirus, HIRRV: 10<sup>8.3</sup> TCID<sub>50</sub>/mL), 전염성조혈기괴사증바이러스(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV: 10<sup>7.3</sup> TCID<sub>50</sub>/mL), 전염성췌장괴사증바이러스(infectious pancreatic necrosis virus, IPNV: 10<sup>9.55</sup> TCID<sub>50</sub>/mL), 해양버나바이러스(marine birnavirus, MABV: 10<sup>9.3</sup> TCID<sub>50</sub>/mL)], NNV(분리주: Yeosu08)에 감염된 능성어의 뇌조직 마쇄액(3개체, 10<sup>8.55-8.8</sup> TCID<sub>50</sub>/mL) 및 정상 능성어의 뇌조직 마쇄액을 사용하여 Jeong et al. (2017)의 방법에 따라 ELISA를 실시하였다. 바이러스 배양액과 뇌조직 마쇄액을 증류수로 320배 희석하여 96 well ELISA microplates (Greiner bioone, Germany)에 각각 50 µL씩 분주한 후 37°C에서 overnight하여 항원을 코팅하였다. T-PBS [0.05% tween-20/PBS (v/v)]로 3회 세정한 후, 5% skim milk를 380 µL씩 분주하여 25°C에서 1시간 동안 blocking하였다. 1차 항체로는 본 연구에서 제작한 MAb를 50 µL씩 분주하였으며, 2차 항체는 horseradish peroxidase (HRP)가 표식되어 있는 goat anti-mouse IgG serum (Youngin, Korea)을 5% skim milk로 1,000배 희석하여 well 당 50 µL씩 분주였다. ELISA 발색액(100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM citric acid, 1 mg/mL o-phenylenediamine, 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)을 각 well에 50 µL씩 분주하여 발색하였다. 각 well에 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 50 µL씩 넣어 발색 반응을 중지시킨 후 microplate photometer (Multiskan, USA)로 492 nm에서 흡광도(optical density, OD)값을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

본 연구에서는 RGNNV genotype에 속하는 NNV에 대한 MAb를 생산하고자 하였다. 정제한 NNV를 사용하여 SDS-PAGE를 실시한 결과, 약 41 kDa의 분자량이 확인되었다(data not shown). 베타노다바이러스의 캡시드는 42 kDa의 단일 구

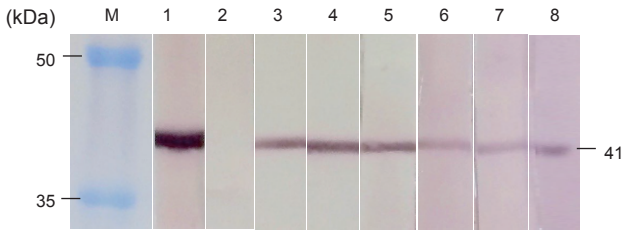


Fig. 1. Western blot analysis using purified NNV and six monoclonal antibodies (MAbs). M, molecular marker; 1, anti-NNV polyclonal antibody (positive control); 2, 2% skim milk (negative control); 3, MAb 2B1; 4, MAb 2B11; 5, MAb 2C12; 6, 13C1-1; 7, 13C1-2; 8, 14D11. NNV, nervous necrosis virus.

조 단백질로 구성되어 있어(Schneemann et al., 2005), 본 연구에서 정제된 NNV의 SDS-PAGE의 결과는 기존에 보고된 결과와 거의 유사하였다.

정제된 NNV를 마우스에 면역시킨 후 마우스의 비장조직과 myeloma 세포를 융합시켜 hybridoma를 제작하였다. Hybridoma로부터 생성되는 항체를 ELISA법으로 선별한 후, 제한 희석법으로 3회 클로닝하여 최종적으로 6개의 MAb를 선별하였다(2B1, 2B11, 2C12, 13C1-1, 13C1-2, 14D11). 6개의 MAb와 정제된 NNV를 사용하여 Western blot을 실시한 결과, 6개 MAb 모두 NNV의 구조 단백질을(41 kDa) 인식하였다(Fig. 1). NNV (SgNag05와 Gemunodo06)에 감염된 SSN-1 세포와 정상 SSN-1 세포에 대한 MAb의 반응을 조사한 결과에서는 6개 MAb 모두 NNV에 감염된 SSN-1 세포에서만 41 kDa에서 밴드가 관찰되었다(data not shown). 이상의 결과, 제작된 6개의 MAb는 Western blot에서 NNV에 특이적으로 반응하는 것이 확인되었다.

제작된 MAb의 특이도를 조사하기 위해 6종의 어류바이러스, NNV에 감염된 능성어의 뇌조직 마쇄액 및 정상 뇌조직 마쇄액을 항원으로 사용하여 ELISA를 실시하였다(Fig. 2, 3). 6종의 어류바이러스에 대해서는 6개의 MAb 모두 NNV (SgNag05와 Gemunodo06)에 강하게 반응(OD, 0.88-1.42)하였고, 5종의 어류바이러스(MABV, IPNV, VHSV, HIRRV, IHNV)에는 반응하지 않았다(OD, 0.06 이하) (Fig. 2). 뇌조직 마쇄액의 경우, 6개의 MAb 모두 NNV에 감염된 뇌조직 마쇄액에 강하게 반응(OD, 0.87-1.42)하였고, 정상 능성어의 뇌조직 마쇄액에는 반응하지 않았다(OD: 0.12 이하) (Fig. 3). 이상의 결과, 제작된 6개의 MAb는 ELISA에서 NNV에 특이적으로 반응하는 것이 확인되었다. 제작된 MAb의 isotyping을 분석한 결과, 6개 항체 모두 H chain은 IgG2a, L chain은 kappa로 확인되었다(data not shown).

본 연구에서는 RGNNV genotype에 속하는 SgNag05 분리주를 사용하여 MAb를 제작한 결과, 총 6개의 MAb를 생산하였다. 6개의 MAb는 NNV의 구조 단백질(41 kDa)을 인식하였고,

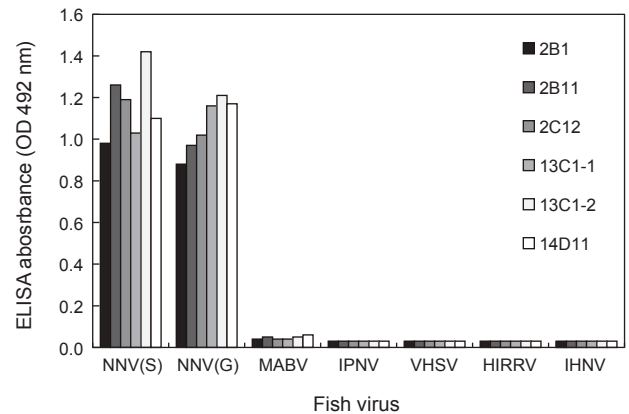


Fig. 2. ELISA analysis using six fish viruses (NNV, nervous necrosis virus; MABV, marine birnavirus; IPNV, infectious pancreatic necrosis virus; VHSV, viral hemorrhagic septicaemia virus; HIRRV, hiram rhabdovirus; IHNV, infectious hematopoietic necrosis virus) and six monoclonal antibodies (2B1, 2B11, 2C12, 13C1-1, 13C1-2 and 14D11). NNV (S), NNV SgNag05 isolate; NNV (G), NNV Gemunodo06 isolate.

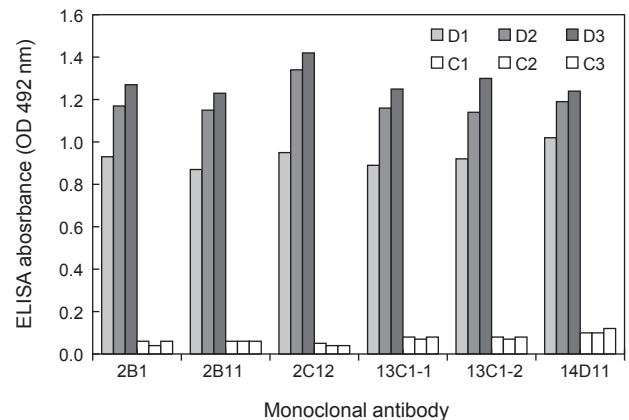


Fig. 3. ELISA analysis using brain tissues of NNV-infected sevenband grouper (D1,  $10^{8.55}$  TCID<sub>50</sub>/mL; D2,  $10^{8.55}$  TCID<sub>50</sub>/mL; D3,  $10^{8.8}$  TCID<sub>50</sub>/mL) and uninfected sevenband grouper (C1, C2 and C3) and six monoclonal antibodies (2B1, 2B11, 2C12, 13C1-1, 13C1-2 and 14D11).

NNV와 NNV에 감염된 뇌조직 마쇄액에 특이적으로 반응하였으며, SSN-1 세포, 5종의 어류바이러스(MABV, IPNV, VHSV, HIRRV, IHNV) 및 정상 능성어의 뇌조직 마쇄액에는 반응하지 않았다. 본 연구에서는 붕마리로부터 분리한 일본 분리주(SgNag05)를 사용하여 MAb를 제작하였으나 제작된 MAb는 SgNag05뿐만 아니라 RGNNV genotype에 속하는 국내 능성어 분리주(Gemunodo06와 Yeosu08; Kim et al., 2012)에도 강하게 반응하였다. 이상의 결과, 제작된 MAb는 Western blot과 ELISA에서 RGNNV genotype에 속하는 NNV 분리주들을



검출하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다. NNV는 3개의 혈청형(serotype)으로 구분된다(OIE, 2017). A형에는 SJNNV genotype의 NNV, B형에는 TPNNV genotype의 NNV, C형에는 BFNNV와 RGNNV genotype의 NNV가 속한다. 따라서 향후 연구로서 본 연구에서 제작된 MAb를 사용하여 serotype이 다른 NNV 분리주에 대한 반응을 조사해야 할 것이다.

## 사 사

본 연구는 2017년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행되었습니다(수산동물 바이러스 전염병 진단용 항체 생산).

## References

- Cha SJ, Do JW, Lee NS, An EJ, Kim YC, Kim JW and Park JW. 2007. Phylogenetic analysis of betanodaviruses isolated from cultured fish in Korea. *Dis Aquat Org* 77, 181-189. <https://doi.org/10.3354/dao01840>.
- Egusa S, Wakabayashi H and Muroga K. 2006. Infectious and parasitic diseases of fish and shellfish. Life Science Publishing Co., Seoul, Korea. 84-89.
- Gomez DK, Baek GW, Kim JH, Choresca Jr CH and Park SC. 2008. Molecular detection of betanodavirus in wild marine fish populations in South Korea. *J Vet Diagn Invest* 20, 38-44. <http://dx.doi.org/10.1177/104063870802000107>.
- Gye HJ and Nishizawa T. 2016. Purification of nervous necrosis virus (NNV) particles by anion-exchange chromatography. *J Virol Method* 238, 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.10.001>.
- Gye HJ, Park MJ, Kim WS, Oh MJ and Nishizawa T. 2018. Heat-denaturation of conformational structures on nervous necrosis virus for generating neutralization antibodies. *Aquaculture* 484, 65-70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.10.034>.
- Jeong HN, Jang MS, Oh MJ and Kim WS. 2017. Production of monoclonal antibodies against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV, genotype IVa) from olive flounder. *J Fish Pathol* 30, 149-154. <http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2017.30.2.149>.
- Johansen R, Sommerset I, Tørud B, Korsnes K, Hjortaa MJ, Nilsen F, Nerland AH and Dannevig BH. 2004. Characterization of nodavirus and viral encephalopathy and retinopathy in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J Fish Dis* 27, 591-601. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00581.x>.
- Kim CS, Kim WS, Nishizawa T and Oh MJ. 2012. Prevalence of viral nervous necrosis (VNN) in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* farms. *J Fish Pathol* 25, 111-116. <http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2012.25.2.111>.
- Kim YC, Kwon WJ, Min JG, Jeong MG and Jeong HD. 2017. Utilization of two serially connected PCR assay for detection and type-discrimination of betanodaviruses in shellfish. Korean federation of fisheries science and technology societies international conference 2017. Abstract, Ann Meet. *J Fish Pathol*, 195.
- Laemli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Nam UH, Jeon CH, Seo HJ, Choi DY, Seo JY, Kwon ON, Kim WS and Kim JH. 2017. Monitoring of viruses in cultured walleye pollock *Gadus chalcogrammus*. *J Fish Pathol* 30, 1-9. <http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2017.30.1.001>.
- Nishizawa T, Furuhashi M, Nagai T, Nakai T and Muroga K. 1997. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein genes. *Appl Environ Microbiol* 63, 1633-1636.
- Oh MJ, Takami I, Nishizawa T, Kim WS, Kim CS, Kim SR and Park MA. 2012. Field tests of poly(I:C) immunization with nervous necrosis virus (NNV) in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, (Thunberg). *J Fish Dis* 35, 187-191. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01334.x>.
- OIE (Office International des Epizooties). 2017. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. Viral encephalopathy and retinopathy. Retrieved from [http://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmlfile=chapitre\\_viral\\_encephalopathy\\_retinopathy.htm](http://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmlfile=chapitre_viral_encephalopathy_retinopathy.htm). Pdf on May 8, 2017.
- Schneemann A, Ball LA, Delsert C, Johnson JE and Nishizawa T. 2005. Family *Nodaviridae*. Virus taxonomy: Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U and Ball LA, eds. Elsevier/Academic Press, London, UK, Fauquet 869-872.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4354.
- Won KM, Lee JT, Cho MY, Kim MS, Kim NY, Jung SH and Lee NS. 2017. A case study of mortality caused by viral encephalopathy and retinopathy (VER) in cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* during Winter. *K J Ichthyol* 29, 157-164.