

흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)에서 분리된 WSSV의 전장유전체 분석

이아름* · 공경희** · 김휘진** · 오명주** · 김도형*** · 김종오*,****†† · 김위식**†

*부경대학교 해양수산생명과학부, **전남대학교 수산생명의학과,
부경대학교 수산생명의학과, *부경대학교 미생물학과

The complete genome sequence of a white spot syndrome virus isolated from *Litopenaeus vannamei*

A-reum Lee*, Kyoung-Hui Kong**, Hwi-Jin Kim**, Myung-Joo Oh**,
Do-Hyung Kim***, Jong-Oh Kim*,****†† and Wi-Sik Kim**†

*School of Marine and Fisheries Life Science, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

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

***Department of Aquatic life Medicine, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

****Department of Microbiology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea,

The full genome sequence of a Korean white spot syndrome virus (WSSV, isolate: WSSV-GoC18) is presented here. We obtained a total of 12,320,554 reads with 291,172 bases, 170 gene, and 170 coding DNA sequence, which were assembled in 1 contig. Phylogenetic analysis revealed that the WSSV-GoC18 was closely related to Chinese isolate (WSSV-PC) and distinctly different with previously reported a Korean isolate (WSSV K-LV1). The complete genome sequence of WSSV isolates will be of great help in molecular epidemiological studies, contributing to molecular diagnosis and disease prevention in shrimp aquaculture.

Key words: white spot syndrome virus, WSSV, complete genome sequence

서 론

흰반점병 (white spot disease, WSD)은 양식산 새우에 대량 폐사를 유발하는 바이러스성 질병으로 세계동물보건기구 (world organization for animal health, OIE)에서는 본 질병을 전염병으로 지정하

여 관리하고 있다 (OIE, 2021). 국내에서도 WSD를 제3종 전염병으로 지정하여 관리하고 있다 (MOF, 2021a). WSD의 원인 병원체인 흰반점바이러스 (white spot syndrome virus, WSSV)는 막대모양 (지름: 80-120 nm, 길이: 250-280 nm)의 외막을 가진 double-stranded DNA virus로서 *Nirmaviridae* 과, *Whispovirus* 속에 속한다 (OIE, 2021). WSD에 걸린 새우는 일반적으로 두흉갑에 흰반점이 관찰된다 (OIE, 2021). 양식장에서 WSD가 발생하게 되면 3-10일 사이에 90-100%의 폐사가 발생하기도 한다 (Lightner, 1996).

†Corresponding author: Wi-Sik Kim

Tel and Fax: +82-61-659-7177

E-mail: wisky@jnu.ac.kr

††Corresponding author: Jong-Oh Kim

Tel: +82-51-629-5614, Fax: +82-51-629-5619

E-mail: jokim@pknu.ac.kr

우리나라의 새우 양식산업은 대하 (*Penaeus chinensis*)를 중심으로 급속히 성장하였으나 1993년 이후부터는 WSD로 인한 대량 폐사로 인해 생산량이 급격히 감소하였다. 2003년부터는 WSD에 의한 피해를 줄이기 위해, 대하에 비해 WSD에 저항성이 강한 흰다리새우 (*Litopenaeus vannamei*)를 양식품종으로 대체하면서 새우 생산량은 증가하였다 (생산량: 약 8,100톤/2020년) (NIFS, 2018; MOF, 2021b). 하지만 WSD는 흰다리새우를 양식하는 과정에서 매년 발생하여 새우 양식산업을 위협하고 있다.

WSSV의 전장유전체는 한국을 비롯한 중국, 멕시코, 인도, 호주 등에서 보고한 바 있다 (Chai *et al.*, 2013; Rodriguez *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Oakey and Smith, 2018; Vinaya Kumar *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2022). 이들 정보는 유전자를 기반으로 한 검사법 개발, 재조합 단백질 생산, 유전형 분석, 병원체의 진화 등의 연구를 수행하는데 유용하게 사용될 수 있다. 이에 본 연구에서는 2018년도에 분리된 WSSV 분리주 (WSSV-GoC18)에 대한 유전 정보를 수집하기 위해, next generation sequencing (NGS)를 통해 전장유전체를 시퀀싱하였다.

2018년 8월 전라북도에서 위치한 양식장으로부터 WSSV에 감염된 흰다리새우를 채집하였다. 채집한 새우의 아가미를 phosphate buffer saline (PBS: 0.13 M NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄) 완충용액으로 1:20 (0.05 g/ml)가 되게 혼합하여 마쇄한 후, 4°C에서 2,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액을 분리한 후, 0.45 µm syringe filter로 여과하여 WSSV 접종물 (분리주명: WSSV-GoC18)을 제작하였다. WSSV는 감염실험을 통해 대량으로 수집되었고, sucrose 농도 구배를 통해 정제되었다. 감염실험은 여수에 위치한 양식장으로부터 분양받은 WSSV의 감염 이력이 없는 흰다리새우 (평균 체중: 16±1 g) 1,000 마리에 2×10⁴ copies/100 µl의 WSSV를 각각 근육내에 접종한 후 10톤 수조에서 (수온: 24-26°C) 7일간 사육하였다. WSSV 접종 2일부터 빈사 상태의 새우로부터 항응고제가 (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM EDTA.Na₂, pH 7.3) (Vargas-Albores

et al., 1998) 함유된 주사기를 통해 혈림프를 취해 -80°C에 보관하였다. 바이러스를 정제하기 위해 혈림프를 13,000 rpm으로 20분간 (4°C) 원심분리하여 상층액을 분리한 후, 15,500 rpm으로 2시간 (4°C) 동안 초원심을 실시한 후 pellet을 PBS로 부유시키고, 1,000 kDa dialysis membrane을 사용하여 PBS로 투석하였다. 투석된 바이러스를 step sucrose gradient [25%, 35%, 50%, 60% sucrose 용액(w/w)] 위에 넣은 후 30,000 rpm으로 2시간 동안 초원심을 실시한 후, 35%와 50% 경계 지점에서 바이러스를 취해 PBS로 현탁하여 30,000 rpm으로 2시간 동안 초원심 분리하였다. 원심분리 후 얻어진 pellet은 PBS로 재현탁하여 -80°C에 보관하였다.

WSSV의 전장유전체를 분석하기 위해, 정제된 바이러스로부터 phenol과 chloroform을 사용하여 DNA를 추출한 후 (Kim *et al.*, 2005), Illumina platform sequencer (Illumina, USA)를 이용하여 시퀀싱을 실시하였다. 시퀀싱을 위한 DNA library는 Tru Seq nano DNA kit (Illumina, USA)를 사용하여 실시하였고, 어댑터 시퀀스와 저품질 reads (Q<20)는 NGS 데이터 분석의 정확도에 영향을 미칠 수 있기 때문에 Trimmomatic (v0.36)를 사용하여 제거하였다 (Bolger *et al.*, 2014). 필터링된 reads는 SPAdes 3.13 (Bankevich *et al.*, 2012)를 사용하여 다양한 k-mer로 de novo assembly를 수행하였으며 가장 잘 조합된 시퀀스 세트를 결정하였다. Prodigal (Hyatt *et al.*, 2010), RNAmmer (Lagesen *et al.*, 2007) 및 Aragorn (Laslett and Canback, 2004) software를 사용하여 coding DNA sequence (CDS), rRNA, 및 tRNA 유전자에 주석을 달았으며, Prokka (v1.14.6) software (Seemann, 2014)를 사용하여 단백질 유전자의 위치를 예측하였고, BLAST 분석을 통해 단백질의 기능을 식별하였다. 또한, 분석된 전장유전체 서열이 기존에 보고된 WSSV 분리주들과 어떠한 유전적 차이를 나타나는지 확인하기 위하여 GenBank에 등록된 7개 WSSV 분리주들의 전장유전체 데이터를 확보한 후 (Table 2) 이를 이용하여 phylogenetic analysis를 수행하였다. Phylogenetic analysis는 MEGA11 (v.11.0.8) (Tamura *et al.*, 2021)에 포함되어 있는 Clustal W multiple alignment를 실시하여 상동성을 비교한 후, neighbor-joining method (1,000

bootstrap replicates)을 사용하여 phylogenetic tree를 제작하였다.

정제된 WSSV로부터 DNA를 추출한 후 Illumina platform sequencer로 분석한 결과, 15,356,094개의 raw read (2,318,770,194개의 염기)가 생성되었다 (Table 1). 분석의 편향을 줄이기 위해 Trimmomatic (v0.36)을 사용하여 어댑터 시퀀스와 저품질 reads를 제거한 결과, 12,320,554개의 filtered read (1,855,024,882개의 염기)를 확보하였다 (Table 1). SPAdes를 사용하여 de novo assembly를 수행한 결과에서는 291,172개의 염기의 단일 contig (sequencing depth 6,349X)가 얻어졌다 (Table 1). WSSV-GoC18는 이중가닥의 원형 게놈으로 84,116개의 A (29%), 87,969개의 T (30%), 59,919개의 G (20%), 59,968개의 C (21%)의 염기를 가지며, 총 G+C 함량은 41.09%로 나타났다 (GenBank no.: ON457602). 기존에 보고된 7개의 WSSV 분리주들의 염기서열의 길이와 G+C 함량은 각각 280,591-309,286 bp와 40.8-41%으로 본 연구에서 분석된 WSSV-GoC18와 유사한 결과를 나타내었다 (Table 2). 2011년 국내에서 분리된 WSSV K-LV1 (염기서열: 295,884 bp, G+C 함량: 40.9%)과 비교했을 때, WSSV-GoC18의 전장유전체 서열이 WSSV K-LV1보다 3,712 bp 짧았으며, G+C 함량이 0.19% 높은 것으로 나타났다. Prodigal와 Prokka (v1.14.6) software를 사용하여 coding DNA sequence (CDS)와 유전자의 위치를 예측한 결과, WSSV-GoC18 전장유전체 서열에는 총 170개의 CDS가 존재하였고, 74개 (44%)는 forward 방향으로, 96개 (56%)는 reverse 방향으로 암호화

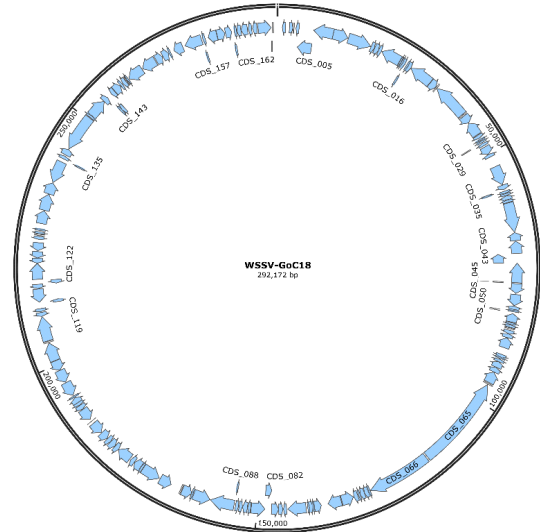


Fig. 1. Circular map of the WSSV-GoC18 genome. CDSs transcribed in the forward direction are indicated by clockwise arrows, and CDSs transcribed in the reverse direction are indicated by counterclockwise arrows.

되어 있었다 (Fig. 1). 또한, 이들 CDS의 BLAST를 분석한 결과, 169개의 CDS는 기존에 알려진 단백질로 annotation 되었으나 1개의 CDS (CDS 169)는 알려진 단백질과 상동성을 나타내지 않았다 (data not shown). 총 8개 분리주의 전장유전체를 이용한 phylogenetic tree를 분석한 결과에서는 WSSV-GoC18은 중국에서 분리된 WSSV PC 분리주와 가장 가까운 거리에 위치하였으며, 국내 분리주인 WSSV K-LV1과는 차이를 보였다 (Fig. 2). 이상의 결과로 국내에는 유전적으로 차이를 보이는 WSSV

Table 1. Raw and filtered data stats

a. Raw and filtered data stats						
	Total read bases	Total reads	GC (%)			
Raw data	2,318,770,194	15,356,094	41.29			
Filtered data	1,855,024,882	12,320,554	41.09			
b. Genome annotation summary						
Sample	Contigs	Bases	Gene	CDS*	tRNA	rRNA
WSSV-GoC18	1	291,172	170	170	0	0
	Num of A	Num of T	Num of G		Num of C	
	84,116	87,969	59,919		59,968	

*CDS: coding DNA sequence

Table 2. WSSV genome information used in this study

Accession number	Isolate name	Country of origin	Host species	Date collected	Sequence length	Predicted CDS*	GC (%)	Reference
NC003225	WSSV CN01	China	<i>Marsipenaeus japonicus</i>	1994	309,286 bp	177	40.90%	(Li <i>et al.</i> , 2017)
KU216744	WSSV MEX2008	Mexico	<i>Litopenaeus vannamei</i>	2008	300,087 bp	184	41.00%	(Rodriguez <i>et al.</i> , 2016)
JX515788	WSSV K-LV1	South Korea	<i>L. vannamei</i>	2011	295,884 bp	515	40.90%	(Chai <i>et al.</i> , 2013)
MG702567	WSSV IN_AP4RU	India	<i>L. vannamei</i>	2013	280,591 bp	442	40.80%	(Vinaya Kumar <i>et al.</i> , 2018)
MH090824	WSSV-EC-15098	Ecuador	<i>L. vannamei</i>	2015	288,997 bp	150	40.92%	(Restrepo <i>et al.</i> , 2018)
KX686117	WSSV PC	China	<i>Procambarus clarkii</i>	2015	300,223 bp	191	41.00%	(Jiang <i>et al.</i> , 2017)
MF768985	WSSV-AU	Australia	<i>Penaeus monodon</i>	2016	285,973 bp	904	41.00%	(Oakey <i>et al.</i> , 2018)
ON457602	WSSV-GoC18	South Korea	<i>L. vannamei</i>	2018	292,172 bp	170	41.09%	This study

*CDS: coding DNA sequence

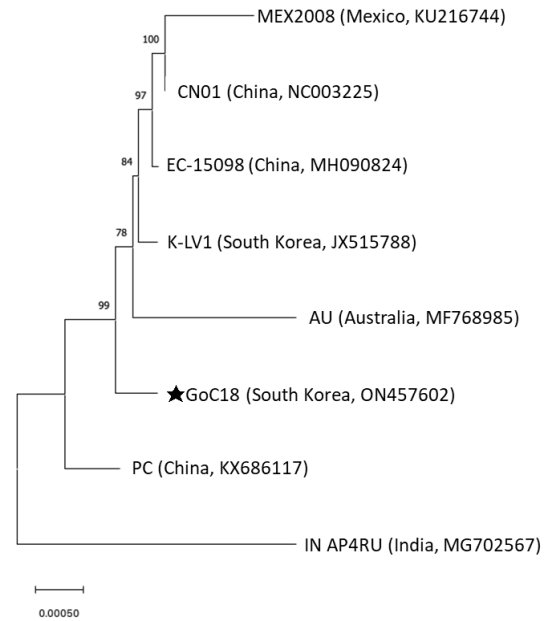


Fig. 2. Phylogenetic analysis of WSSV complete sequence. Phylogenetic tree was constructed by Neighbour Joining (NJ) method using MEGA 11.0.8 software. The number at each node indicates the percentage of bootstrapping after 1000 replicate.

분리주들이 존재하는 것이 확인되었다.

감사의 글

이 논문은 2019년도 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임 (20190392, 수산생물 검역용 신속 및 정밀진단 기술 개발).

References

- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Pribelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A. and Pevzner, P.A.: SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.*, 19: 455-477. 2012.
- Bolger, A.M., Lohse, M. and Usadel, B.: Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30: 2114-2120. 2014.

- Chai, C.Y., Yoon, J., Lee, Y.S., Kim, Y.B. and Choi, T.J.: Analysis of the complete nucleotide sequence of a white spot syndrome virus isolated from pacific white shrimp. *J. Microbiol.*, 51: 695-699. 2013.
- Hyatt, D., Chen, G.L., LoCascio, P.F., Land, M.L., Larimer, F.W. and Hauser, L.J.: Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC bioinformatics*, 11: 119. 2010.
- Jiang, L., Xiao, J., Liu, L., Pan, Y., Yan, S. and Wang, Y.: Characterization and prevalence of a novel white spot syndrome viral genotype in naturally infected wild crayfish, *Procambarus clarkii*, in Shanghai, China. *VirusDis.*, 28: 250-261. 2017.
- Kim, W.S., Oh, M.J., Jung, S.J., Kim, Y.J. and Kitamura, S.I.: Characterization of an iridovirus detected from cultured turbot, *Scophthalmus maximus* in Korea. *Dis. Aquat. Org.*, 64: 175-180, 2005.
- Lagesen, K., Hallin, P., Rødland, E.A., Stærfeldt, H.H., Rognes, T. and Ussery, D.W.: RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA gene. *Nucleic Acids Res.*, 35: 3100-3108. 2007.
- Laslett, D. and Canbak, B.: ARAGON, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.*, 32: 11-16. 2004.
- Lee, D., Yu, Y.B., Choi, J.H., Jo, A.H., Hong, S.M., Kang, J.C. and Kim, J.H.: Viral shrimp diseases listed by the OIE: A review. *Viruses*, 14, 585, 2022.
- Li, F., Gao, M., Xu, L. and Yang, F.: Comparative genomic analysis of three white spot syndrome virus isolates of different virulence. *Virus Genes*, 53: 249-258. 2017.
- Lightner, D.V.: A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. 1996.
- Ministry of oceans and fisheries (MOF): Survey on the current status of the seafood production and distribution industry in 2020. 2021b.
- Ministry of oceans and fisheries (MOF). Aquatic life disease control Act. 2021a.
- National institute of fisheries science (NIFS). Standard manual of whiteleg shrimp culture. 2018.
- Oakey, H.J. and Smith, C.S.: Complete genome sequence of a white spot syndrome virus associated with a disease incursion in Australia. *Aquaculture*, 484: 152-159. 2018.
- Office International des Epizooties (OIE): Infection with white spot syndrome virus. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. 2021.
- Restrepo, L., Reyes, A., Bajiña, L., Betancourt, I. and Bayot, B.: Draft genome sequence of a white spot syndrome virus isolate obtained in Ecuador. *Genome Announc.*, 6: e00605-18. 2018.
- Rodriguez-Anaya, L.Z., Gonzalez-Galaviz, J.R., Casillas-Hernandez, R., Lares-Villa, F., Estrada, K., Ibarra-Gamez, J.C. and Sanchez-Flores, A.: Draft genome sequence of white spot syndrome virus isolated from cultured *Litopenaeus vannamei* in Mexico. *Genome Announc.*, 4: e01674-15. 2016.
- Seemann, T.: Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30: 2068-2069, 2014.
- Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S.: MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol.*, 38: 3022-3027. 2021.
- Vargas-Albores, F., Hinojosa-Baltazar, P., Portillo-Clark, G. and Magallón-Barajas, F.: Influence of temperature and salinity on the yellowleg shrimp, *Penaeus californiensis* Holmes, prophenoloxidase system. *Aquaculture Res.*, 29: 549-553. 1998.
- Vinaya Kumar, K., Shekhar, M.S., Otta, S.K., Karthic, K., Ashok Kumar, J. Gopikrishna, G. and Vijayan, K.K. First report of a complete genome sequence of white spot syndrome virus from India. *Genome Announc.*, 6: e00055-18. 2018.

Manuscript Received : May 30, 2022

Revised : Jun 07, 2022

Accepted : Jun 08, 2022