

Marine birnavirus (MABV)에 대한 단클론 항체 생산

공경희 · 오명주 · 김위식[†]

전남대학교 수산생명의학과

Production of monoclonal antibodies against marine birnavirus

Kyoung-Hui Kong, Myung-Joo Oh and Wi-Sik Kim[†]

Department of Aqualife Medicine, College of Fisheries and Ocean Science,
Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

We developed and subsequently characterized mouse monoclonal antibodies (mAbs) against marine birnavirus (MABV). Eight hybridoma clones secreting mAbs against MABV were established. All eight mAbs (8G6, 11C3, 15E3, 17H6, 32A6, 35A7, 38B5, and 47E3) were reacted with viral protein 3 of MABV in MABV-infected CHSE-214, whereas, no reactivity was observed in normal CHSE-214 by western blot analysis. Moreover, these eight mAbs were strongly reacted with MABV, and no cross-reactivity has been observed against other five fish viruses (hirame rhabdovirus, infectious hematopoietic necrosis virus, nervous necrosis virus, spring viraemia of carp virus, and viral hemorrhagic septicemia virus), although five mAb (11C3, 15E3, 17H6, 32A6, and 38B5) reacted with both MABV and infectious pancreatic necrosis virus by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). These results indicate that the mAbs can be of value in MABV detection.

Key words: Olive flounder, marine birnavirus, MABV, monoclonal antibody

Marine birnavirus (MABV)는 양식산 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 및 방어(*Seriola quinqueradiata*) 치어에 대량 폐사를 유발할 뿐만 아니라 다양한 해산어류에 감염되는 병원체로 알려져 있다(Sorimachi and Hara, 1985; Kusada *et al.*, 1989; Issshiki *et al.*, 2004; Yun *et al.*, 2008). 국내에서 MABV는 1995년 넙치 치어에서 처음 분리된 이후, 넙치 치어뿐만 아니라 성어에서도 검출되고 있다(Sohn *et al.*, 1995; Oh *et al.*, 1999a; 2000; Jung *et al.*, 2008). Jang (2019)은 2014-2017년 넙치 종묘장과 양성장을 대상으로 바이러스 검사를 실시한 결과, 종묘장

에서는 34/167 마리(20.3%)에서 [6/18 종묘장(33.3%)], 양성장에서는 324/1,276 마리(25.4%)에서 [15/16 양성장(93.8%)] MABV가 검출되어, 국내 넙치 양식장에서는 MABV의 감염이 만연되어 있음이 확인되었다. Oh *et al.*, (2006)은 넙치 미성어에 MABV와 세균(*Edwardsiella tarda* 또는 *Vibrio harveyi*)이 혼합 감염되면 세균의 단독 감염보다 폐사율이 높아진다고 보고하여, 넙치 양식장에서는 치어기 뿐만 아니라 미성어기 및 성어기에도 MABV 감염에 의한 주의가 요구된다.

MABV를 검사하는 방법으로는 어류 주화세포를 사용한 분리배양법과 reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)이 주로 사용되고 있다(Oh *et al.*, 1999b; Munro and Midtlyng 2006;

[†]Corresponding author: Wi-Sik Kim
Tel and Fax: +82-61-659-7177
E-mail: wisiky@jnu.ac.kr

Jung *et al.*, 2008). 이들 방법들은 민감도와 특이도가 우수하다는 장점이 있으나, 검사를 위해 전문 인력과 특수한 장비가 필요로 하므로 현장에서 사용하기에는 한계가 있다. 측방 유동 면역 크로마토그래피법(lateral flow immunochromatographic assay, LFIA)은 항원-항체 반응을 기반으로 하는 현장검사용 방법으로 작동법이 간편하다는 장점이 있어, 현재 다양한 종류의 병원체들을 현장에서 검사하기 위해 널리 사용되고 있다(Wong and Tse, 2008; Huang *et al.*, 2016; Banerjee and Jaiswal, 2018). 본 연구에서는 LFIA 기반 MABV 현장검사용 키트 개발을 위한 기초연구로서 MABV에 대한 단클론 항체(monoclonal antibody, mAb)를 생산하고자 한다.

넙치로부터 분리한 MABV(분리주: NC-1, Gen Bank NO. AY283784)를 사용하여 mAb를 제작하였다. MABV를 chinook salmon embryo (CHSE-214) 세포에 접종하여 대량으로 배양한 후 4°C에서 12,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 세포 잔여물을 제거한 후 상층액을 분리하였다. MABV의 농축은 Jeong *et al.* (2017)의 방법에 따라 실시하였다. 분리된 바이러스 상층액에 polyethylene glycol (PEG)-6000 (Sigma-Aldrich, USA)과 NaCl을 각각 7.5% (w/v), 2.3% (w/v)로 첨가한 후 4°C에서 overnight 하였다. PEG가 처리된 바이러스 배양액을 4°C에서 12,000 rpm으로 30분간 원심분리한 후, pellet을 phosphate buffer saline (PBS: 0.13 M NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄) 완충용액으로 현탁하였다. 현탁액은 30,000 rpm에서 2시간 동안 초원심을 실시한 후 pellet을 PBS로 재부유시켜 바이러스를 농축하였다.

MABV에 대한 mAb는 Kim *et al.* (2018)의 방법에 따라 제작하였다. 농축한 MABV(약 100 µg)와 complete freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, USA)를 동량으로 섞어 BALB/c 마우스의 복강에 1차 접종한 후, 2주 후에 동일한 MABV(약 100 µg)를 사용하여 2차 면역하였다. 최종 면역 3일 후 마우스의 비장 조직을 분리한 후 PEG-1500 (Roche, Germany)을 사용하여 myeloma cell (SP2/0Ag14)과 융합시킨 후 fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA)이 10% 첨가된 hypoxanthine-aminopterin-thymidine

(HAT) 배지 (Gibco, USA)로 현탁시킨 후 96 well plate에 분주하여 37°C로 설정된 CO₂ 배양기에서 배양하였다(Liddell and Cryer, 1991). 양성 hybridoma는 농축한 MABV를 항원으로 사용하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법으로 선별하였고 3회 이상 제한 희석법으로 클로닝 하였다. 선별된 mAb의 isotype은 Pierce rapid ELISA mouse mAb isotyping kit (Thermo, USA)를 사용하여 결정하였다.

제작한 항체의 MABV 인식 부위를 확인하기 위해 농축한 MABV, MABV에 감염된 CHSE-214와 정상 CHSE-214를 사용하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)와 western blot을 실시하였다(Laemmli, 1970; Towbin *et al.*, 1979). 농축한 MABV를 12% polyacrylamide gel에 loading 한 후 30 mA에서 전기영동하였다. 전기영동 종료 후 gel을 0.2% coomassie brilliant blue R-250 (Wako, Japan)으로 염색하였다. Western blot은 전기영동 한 gel (항원: MABV에 감염된 CHSE-214와 정상 CHSE-214)을 nitrocellulose membrane (Bio-Rad, USA)에 blotting 한 후, 본 연구에서 제작한 mAb (1차 항체)와 alkaline phosphatase (AP)가 붙어있는 goat anti-mouse IgG serum (novus, USA, 2차 항체)으로 반응시키고 발색제[100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ (pH 9.5) 20 ml, NBT (75 mg/ml 4-nitrotetrazolium blue chloride) 90 µl, BCIP (50 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine salt/dimethyl-formamide) 70 µl]로 발색하여 육안으로 확인한 후, 발색 정지액(1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl)을 첨가하였다. MABV에 감염된 세포는 24 well tissue culture plate (Nunc, Denmark)에 단층으로 배양된 CHSE-214에 MABV를 접종한 후 3일째 배양액을 제거하고 Hank's balanced salt solution (HBSS) (Gibco, USA)로 세포를 3회 수세한 후, SDS-sample buffer 1 ml를 첨가하여 세포를 lysis 시킨 후 100°C에서 3분간 열처리하여 준비하였다. 정상 세포도 위와 동일한 방법으로 제작하였다.

제작한 mAb의 특이도를 분석하기 위해 7종의 어류 바이러스 상층액을 사용하여 Kong *et al.* (2019) 방법에 준해 ELISA를 실시하였다. 7종의 어

류 바이러스[MABV ($10^{9.3}$ tissue culture infective dose (TCID₅₀/ml), 전염성췌장괴사증바이러스(infectious pancreatic necrosis virus, IPNV: $10^{9.55}$ TCID₅₀/ml), 넙치랍도바이러스(hirame rhabdovirus, HIRRV: $10^{8.3}$ TCID₅₀/ml), 전염성조혈기괴사증바이러스(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV: $10^{7.3}$ TCID₅₀/ml), 신경괴사증바이러스(nervous necrosis virus, NNV: $10^{8.05}$ TCID₅₀/ml), 잉어봄바이러스(spring viraemia of carp virus, SVCV: $10^{7.55}$ TCID₅₀/ml), 바이러스성출혈성폐혈증바이러스(viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV: $10^{9.3}$ TCID₅₀/ml)]를 증류수로 320배 희석하여 96 well ELISA plate (Greiner bioone, Germany)에 각각 50 μ l씩 분주한 후 37°C에서 overnight 하여 항원을 코팅하였다. T-PBS [0.05% Tween-20/PBS (v/v)]로 3회 세정한 후, 5% skim milk를 380 μ l씩 분주하여 25°C에서 1시간 동안 blocking 하였다. 1차 항체로는 본 연구에서 제작한 mAb를 50 μ l씩 분주하여 25°C에서 1시간 동안 반응시켰고, 2차 항체는 horseradish peroxidase (HRP)가 표식되어 있는 goat anti-mouse IgG serum (Youngin, Korea)을 5% skim milk로 1,000배 희석하여 50 μ l/well 분주하였다. ELISA 발색액 [tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution] (Surmodics, USA)을 50 μ l/well 분주하여 30 분간 발색한 후 1N H₂SO₄를 50 μ l/well 넣어 발색

을 중지시키고, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

농축한 MABV를 사용하여 SDS-PAGE를 실시한 결과, 약 49 kDa과 29 kDa의 분자량이 확인되었다(Fig. 1a). Park (2004)의 연구에서는 MABV(분리주: NC-1)의 구조 단백질은 약 52 kDa [viral protein (VP) 2]과 29-31 kDa (VP3)으로 보고하였다. 본 연구의 SDS-PAGE 패턴은 Park, 2004의 결과와 유사하였다.

농축한 MABV를 마우스에 면역시킨 후 마우스의 비장 조직과 myeloma 세포를 융합시켜 hybridoma를 제작하였다. Hybridoma로부터 생성되는 항체는 ELISA법으로 선별한 후, 제한 희석법으로 3회 클로닝하여 최종적으로 8개의 mAb를 선별하였다(8G6, 11C3, 15E3, 17H6, 32A6, 35A7, 38B5, 47E3). 선별된 8개의 mAb의 isotype을 분석한 결과, 8개의 mAb의 heavy chain은 모두 IgG1로 나타났다. 5개 mAb (8G6, 15E3, 32A6, 35A7, 47E3)와 3개 mAb (11C3, 17H6, 38B5)의 light chain은 각각 kappa와 lambda로 나타났다(data not shown).

본 연구에서 제작한 8개의 mAb와 MABV에 감염된 CHSE-214와 정상 CHSE-214를 사용하여 western blot을 실시한 결과, 8개의 mAb 모두 MABV에 감염된 CHSE-214에서만 반응하였고(약 29 kDa에서 밴드가 관찰됨)(Fig. 1b), 정상 CHSE-214에는 반응하지 않았다(data not shown). 이상의 결과, 제작

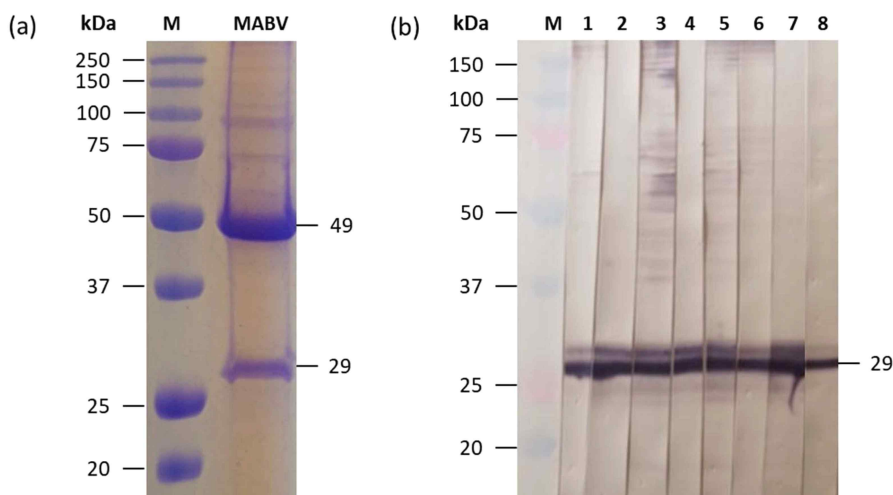


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of concentrated MABV (a), and western blot analysis using MABV-infected CHSE-214 (b). M: molecular marker, 1-8: mAbs (8G6, 11C3, 15E3, 17H6, 32A6, 35A7, 38B5, and 47E3).

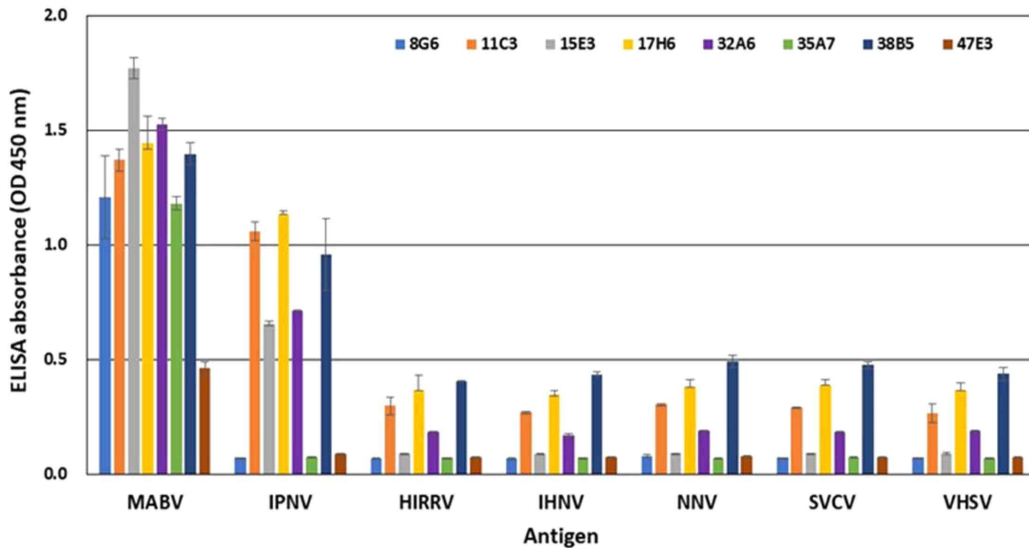


Fig. 2. Specificity analysis of eight monoclonal antibodies (8G6, 11C3, 15E3, 17H6, 32A6, 35A7, 38B5, and 47E3) using ELISA against seven fish viruses (MABV, IPNV, HIRRV, IHN, NNV, SVCV, and VHSV).

된 8개의 mAb는 MABV에 감염된 CHSE-214에서 MABV만을 특이적으로 반응(인식부위: VP3)하는 것이 확인되었다.

mAb의 특이도를 조사하기 위해 7종의 어류 바이러스(MABV, IPNV, HIRRV, IHN, NNV, SVCV, VHSV)를 항원으로 사용하여 ELISA를 실시하였다(Fig. 2). 8개의 mAb는 MABV에서 높은 OD값(0.46-1.77)을 보였고, 5종의 어류 바이러스(HIRRV, IHN, NNV, SVCV, VHSV)에는 낮은 OD값(0.07-0.5)을 나타내었다. 이중 5개의 mAb (11C3, 15E3, 17H6, 32A6, 38B5)는 MABV보다 OD값이 낮지만 IPNV에도 반응하였다(OD값: 0.66-1.13). mAb 8G6과 35A7은 MABV에 강하게 반응하였고(1.18-1.2), 다른 6종의 어류 바이러스에는 전혀 반응하지 않았다(0.08 이하). mAb 47E3은 MABV에서 다소 낮은 OD값(0.46)을 보였으나, 다른 6종의 어류 바이러스에는 반응하지 않았다(0.09 이하). mAb 15E3과 32A6은 MABV에 강한 반응(1.53-1.77)을 보였고 IPNV에도 반응(0.66-0.71)하였으나, 다른 5종의 어류 바이러스에는 반응하지 않았다(0.19 이하). 3개의 mAb (11C3, 17H6, 38B5)는 MABV (1.37-1.44), IPNV (0.96-1.13) 및 다른 5종의 어류 바이러스 (0.26-0.49)에도 반응하였다. 하지만 5종의 어류 바이러스에

대해 OD값은 항원이 다름에도 불구하고 거의 유사하므로, 이는 바이러스에 대한 특이적인 반응은 아닌 것으로 사료된다. 이상의 결과, 8개의 mAb는 ELISA에서 MABV에 강하게 반응하는 것을 확인하였다. 하지만 이중 5개의 mAb (11C3, 15E3, 17H6, 32A6, 38B5)는 MABV뿐만 아니라 IPNV에도 반응하는 것이 확인되었다. IPNV는 MABV와 동일한 *Aquabirnavirus* 속에 속하는 바이러스로서 anti-MABV mAb는 IPNV 분리주들에 대해 교차반응이 나타날 수 있다고 보고되어 있어(Nakajima and Sorimachi, 1996; Park, 2004), 위의 반응들은 교차반응으로 사료된다. 본 연구를 통해 MABV를 인식하는 총 8개의 mAb를 제작할 수 있었다. 이들 mAb는 향후 LFIA 기반 MABV 현장검사용 키트 개발에 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2017년도 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 ‘수산동물 바이러스 전염병 진단용 항체 생산(20150259)’ 연구임.

References

- Banerjee, R. and Jaiswal, A.: Recent advances in nanoparticle-based lateral flow immunoassay as a point-of-care diagnostic tool for infectious agents and diseases. *Analyst.*, 143: 1970-1996, 2018.
- Huang, X., Aguilar, Z.P., Xu, H., Lai, W. and Xiong, Y.: Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: a review. *Biosens. Bioelectron.*, 75: 166-180, 2016.
- Isshiki, T., Nagano, T., Kanehira, K. and Suzuki, S.: Distribution of marine birnavirus in cultured marine fish species from Kagawa Prefecture, Japan. *J. Fish Dis.*, 27: 89-98, 2004.
- Jang, M.S.: The status of viral hemorrhagic septicemia (VHS) occurrence in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) farms of Korea. Ph.D. Thesis, Chonnam national university, Korea, 2019.
- Jeong, H.N., Jang, M.S., Oh, M.J. and Kim, W.S.: Production of monoclonal antibodies against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV, genotype IVa) from olive flounder. *J. Fish Pathol.*, 30: 149-154, 2017.
- Jung, S.J., Kim, S.R., Joung, I.Y., Kitamura, S.I., Ceong, H.T. and Oh, M.J.: Distribution of marine birnavirus in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Access. Microbiol.* 46: 265-273, 2008.
- Kim, W.S., Kim, S.W. and Oh, M.J.: Production of monoclonal antibodies against nervous necrosis virus (NNV, RGNNV genotype). *J. Fish Aquat.*, 328-331, 2018.
- Kong, K.H., Oh, M.J., Jang, M.S., Kim, C.S. and Kim, W.S.: Development of monoclonal antibodies against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV, genotype IVa), the causative agent of VHS. *J. Fish Pathol.*, 32: 59-67, 2019.
- Kusuda, R., Kado, K., Takeuchi, Y. and Kawai, K.: Characteristics of two virus strains isolated from young Japanese flounder. *Suisanzoushoku*, 37: 115-120, 1989.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- Liddell, J.E. and Cryer, A.: A practical guide to monoclonal antibodies, pp. 67-88, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1991.
- Munro, E.S. and Midtlyng, P.J.: Fish diseases and disorders, Volume 3: viral, bacterial and fungal infections, pp. 1-65, 2nd ed., CABI, London, 2006.
- Nakajima, K. and Sorimachi, M.: Production of monoclonal antibodies against yellowtail ascites virus. *J. Fish Dis.*, 19: 161-166, 1996.
- Oh, M.J., Jung, S.J. and Kim, H.R.: Biological and serological characteristics of birnavirus isolated from cultured Japanese flounder in 1999. *J. Fish Pathol.*, 12: 56-62, 1999a.
- Oh, M.J., Jung, S.J. and Kim, Y.J.: Detection of birnavirus from cultured marine fish using polymerase chain reaction (PCR). *J. Fish Pathol.*, 12: 49-55, 1999b.
- Oh, M.J., Jung, S.J., Kim, Y.J., Kim, H.R., Jung, T.S. and Yeo, I.K.: The screening of marine birnavirus (MABV) infected in brood stocks of flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 13: 53-59, 2000.
- Oh, M.J., Kim, W.S., Kitamura, S.I., Lee, H.K., Son, B.W., Jung, T.S. and Jung, S.J.: Change of pathogenicity in olive flounder *Paralichthys olivaceus* by co-infection of *Vivrio harveyi*, *Edwardsiella tarda* and marine birnavirus. *Aquaculture*, 257: 156-160, 2006.
- Park, S.C.: Production and characterization of monoclonal antibody against marine birnavirus. Yeosu national university, Korea, 2004.
- Sohn, S.G., Park, M.A., Do, J.W., Choi, J.Y. and Park, J.W.: Birnavirus isolated from cultured flounder in Korea. *Fish Pathol.*, 30: 279-280, 1995.
- Sorimachi, M. and Hara, H.: Characteristics and pathogenicity of a virus isolated from yellowtail fingerlings showing ascites. *Fish Pathol.*, 19: 231-238, 1985.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 4350-4354, 1979.
- Wong, R. and Tse, H.: Lateral flow immunoassay. Humana Press, New York. Springer, 2008.
- Yun, H.M., Kim, S.R., Lee, W.L., Jung, S.J. and Oh, M.J.: Detection of marine birnavirus (MABV) from marine fish in the southern coast of Korea. *J. Aquaculture*, 21: 13-18, 2008.

Manuscript Received : Nov 18, 2020

Revised : Nov 26, 2020

Accepted : Nov 27, 2020