

Fetal bovine serum의 농도에 따른 infectious hematopoietic necrosis virus와 infectious pancreatic necrosis virus의 감염가 변화

김형준* · 박정수** · 권세련**, ***†

*VHS OIE 표준실험실, 국립수산물품질관리원

선문대학교 수산생명의학과, *유전체 기반 바이오IT 융합연구소

Effects of fetal bovine serum concentrations on viral infectivity titers of infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus

Hyoung Jun Kim*, Jeong Su Park** and Se Ryon Kwon**, ***†

*OIE reference laboratory for VHS, National Fishery Products Quality Management Services, Busan 49111, Korea

**Department of Aquatic Life Medical Sciences, Sunmoon University, Asan 31460, Korea

***Genome-based BioIT Convergence Institute, Asan 31460, Korea

Fetal bovine serum (FBS) is an essential element of cell growth and can also affect the viral replication. In this study, we tried to find out whether FBS concentration affects the viral infectivity titer of IHNV and IPNV. EPC cells were suspended with MEM supplemented with various concentrations of FBS (MEM0, MEM2, MEM5 and MEM10) and cultured in 96-well plate. Each virus was 10-fold diluted virus and inoculated in 96-well plate. The highest infectivity titer of IHNV was $10^{7.88}$ TCID₅₀/mL in 96-well plate using MEM5 and the lowest one was $10^{7.30}$ TCID₅₀/mL in 96-well plate using MEM10. The highest infectivity titer of IPNV was $10^{7.47}$ TCID₅₀/mL in 96-well plate using MEM5 and the lowest one was $10^{6.97}$ TCID₅₀/mL in 96-well plate using MEM10. This study showed that not only 0% FBS but 10% FBS leads low infectivity titer of IHNV and IPNV. Therefore, it is considered that the desirable concentration of FBS is 2% or 5% for measurement of infectivity titer of IHNV and IPNV.

Key words: IHNV, IPNV, FBS concentration, infectivity titer

전염성조혈기괴사증바이러스(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)는 Family *Rhabdovir-*

idae, Genus *Novirhabdovirus*에 속하며, 약 11kb의 negative-sense RNA를 가진 탄환모양의 외막이 있는 바이러스이다 (Tordo *et al.*, 2005). VHSV와는 핵산형과 구조단백질이 동일하나 혈청학적인 차이가 있다. 전염성체장괴사증바이러스(infectious

†Corresponding author: Se Ryon Kwon
Tel: +82-41-530-2289, Fax: +82-41-530-2917
E-mail: srkwon@sunmoon.ac.kr

pancreatic necrosis virus, IPNV)는 Family *Birnaviridae*에 속하며, double strand RNA genome을 가지며 외막이 없는 정 20면체의 형태를 하고 있는 바이러스이다(Reno, 1999).

현재 IHN을 진단하기 위한 방법으로서 세포배양법을 선행적으로 수행한 후 혈청학적 진단과 분자생물학적 진단을 수행하고 있다(OIE, 2018). 바이러스의 세포배양은 확정진단에 앞서 감염력 있는 바이러스의 배양을 통하여 바이러스의 존재를 확인함과 동시에 추가적으로 진행되는 혈청학적 및 분자생물학적 진단을 통한 확정진단을 수행하기 위한 전 작업으로서 중요한 의미가 있다. IHNV의 세포배양 시 10% fetal bovine serum (FBS)가 첨가된 배지를 사용하라고 명시되어 있는 반면, IPNV의 경우에 현재 OIE aquatic manual 목록에서는 빠져 있으나 이전의 Aquatic manual (OIE, 2009)에 의하면 2% FBS가 첨가된 배지를 사용하는 것으로 되어 있어 두 바이러스 간에 차이가 있다.

우리 연구팀은 이전 연구에서 바이러스성출혈성패혈증바이러스(viral haemorrhagic septicaemia virus, VHSV)의 증식에 대해 FBS가 미치는 영향에 대해 조사한 바 있다. 그 연구 결과에 따르면 FBS가 포함되지 않은 배지에서는 바이러스의 증식이 좋지 않았던 반면, FBS를 최종 농도 2%, 5% 그리고 10%가 되게끔 포함시킨 배지에서의 바이러스의 증식은 서로간에 유의적인 차이가 없을 정도로 높은 바이러스 감염가를 나타내었다(Kim *et al.*, 2018). VHSV의 증식 차이를 알아보기 위해 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀)를 측정된 실험에서 2% FBS가 포함된 배지를 사용되었는데 그 이유는 10% FBS가 포함된 배지에 세포를 현탁하여 96-well plate를 만든 것보다 2% FBS가 포함된 배지에 현탁한 세포로 준비한 96-well plate에서 더 높은 감염가를 나타내는 것을 확인하였기 때문이었다.

따라서 본 연구에서는 IHNV와 IPNV의 infectivity titer를 측정하는 실험에서 다양한 농도의 FBS가 포함된 배지를 사용하여, 바이러스의 감염가 측정 결과에 어떠한 영향을 주는지 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

바이러스의 배양을 위해 epithelioma papulosum cyprinid (EPC) 세포를 10% FBS와 1% antibiotic-antimycotic agent (Gibco)가 첨가된 minimum essential medium (MEM) 배지로 계대·배양하였다. IHNV는 RtWanju09 분리주(Kim, 2010)를, IPNV는 VR-299 (ATCC)를 사용하였다. 농도에 따른 바이러스의 감염가 차이를 비교하기 위해 1% antibiotic-antimycotic agent (Gibco)가 첨가된 minimum essential medium (MEM) 배지에 0, 2, 5 및 10%의 농도로 FBS (Gibco)를 첨가한 후 각각의 배지를 MEM0, MEM2, MEM5 및 MEM10으로 하고 실험에 사용하였다.

바이러스 감염가 측정을 위해 EPC 세포를 trypsin-EDTA (Gibco)로 박리시키고 MEM에 현탁한 후 2000xg에서 원심분리하고 MEM0로 다시 현탁하는 과정을 2회 반복하였다. 원심분리로 형성된 세포 pellet을 MEM0, MEM2, MEM5 및 MEM10으로 각각 다시 현탁하고 96-well plate에 접종한 후 15°C에서 하루 동안 배양하였다. 각 배지로 준비된 96-well plate에 IHNV와 IPNV를 10⁻¹ ~ 10⁻¹⁰까지 10단계 희석한 후 50 µL씩 접종하였다. 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀)을 결정하기 위해 15°C에서 14일 동안 cytopathic effect (CPE)를 관찰하였다. 각 바이러스의 감염가 측정 실험은 3반복으로 수행되었다.

결과 및 고찰

바이러스의 분리 및 증식에 사용되는 주화세포를 배양할 때 보통 10%의 FBS가 첨가된 배지를 사용하지만, 연구자에 따라 2% FBS가 첨가된 배지를 사용하는 경우도 있다(Moreno *et al.*, 2014). FBS는 주화세포의 배양을 위해 배지에 첨가되는 성분으로서 풍부한 성장 인자와 낮은 gamma-globulin 함량을 가지고 있기 때문에 세포의 성장에 필수적인 요소이다(Gstraunthaler, 2003). 따라서 배지 내의 FBS 농도가 세포의 영양 상태에 영향을 미치기 때문에 바이러스의 감염가에도 차이를 나타낼 수 있다. 우리는 이전 실험에서 FBS가 포함되지

많은 배지를 사용했을 때 VHSV의 증식이 현저히 낮아지는 것을 확인하였다(Kim *et al.*, 2018). 이처럼 바이러스 증식에 대해 FBS의 농도가 영향을 미치기 때문에, 바이러스의 감염가를 확인하는 실험 시 배지에 첨가하는 FBS 농도에 대해서도 조사할 필요가 있다고 생각되었다.

IHNV의 감염가 측정 결과 MEM5로 EPC 세포를 현탁하여 96-well plate를 만든 경우에 $10^{7.88}$ TCID₅₀/mL라는 가장 높은 감염가를 나타내었고 MEM2를 사용한 경우에도 $10^{7.88}$ TCID₅₀/mL의 높은 감염가를 보였다(Fig. 1). 반면 MEM0과 MEM10을 사용한 경우의 감염가는 각각 $10^{7.38}$ TCID₅₀/mL과 $10^{7.30}$ TCID₅₀/mL로서 낮았다. Kim *et al.* (2018)에서 VHSV를 배양할 경우에는 MEM0 이외에 MEM2, MEM5 및 MEM10 간의 감염가 차이는 없었다고 보고하였으나, 본 실험에서 IHNV의 감염가 측정에서는 MEM10에서 가장 낮은 감염가를 나타낸 것에서 두 결과 간에 차이가 있었다. 다양한 동물 유래의 normal serum 내에 influenza virus의 증식을 방해하는 inhibitor가 존재한다는 것을 밝힌 연구들이 있다(Pritchett and Paulson, 1989; Ryan-Poirier *et al.*, 1991; Hartley *et al.*, 1992). 그 연구 결과들에 따르면 소 혈청에는 β inhibitor가 함유되어 있고 말과 기니피그 혈청에는 $\alpha 2$ -macroglobulin과 glycoprotein inhibitor가 포함되어 있어서 influenza virus의 infectivity와 hemagglutinating activity를 방해한다고 보고한 바 있다. 따라서 본 연구에서 10%의 FBS가

포함된 배지에서 바이러스의 감염가가 낮아진 것은 혈청 내에 존재하는 다양한 inhibitor에 의한 것일 가능성이 있다. 한편 IPNV는 MEM2에서 감염가가 $10^{7.47}$ TCID₅₀/mL로서 가장 높았고 MEM0를 사용한 경우 $10^{6.97}$ TCID₅₀/mL이라는 가장 낮은 감염가를 보였다(Fig. 1).

EPC 세포는 다양한 FBS 농도를 첨가한 모든 배지에서 잘 성장하였고 감염가 측정을 위한 14일간의 관찰기간 동안 탈락하지 않았다. MEM0를 사용한 경우에는 96-well plate에 접종한 지 1~2일 사이에는 세포의 부착 및 분열상태가 좋지 않다가 시간이 지나면서 다른 농도구와 거의 차이가 없을 정도로 잘 성장하였다(Fig. 2). 단계 희석한 IHNV를 접종한 경우 MEM0에서는 MEM2와 MEM5에 비해 plaque의 크기가 다소 작았고 MEM10에서는 바이러스의 농도가 낮을 경우 전형적인 CPE 관찰이 되지 않았다. IPNV를 접종한 MEM0에서는 plaque의 크기가 작고 세포가 부스러지는 듯한 관찰상을 보였다. MEM2와 MEM5에서는 MEM0와 MEM10에 비해 CPE 관찰이 용이하였다(Fig. 2).

본 연구 결과와 Kim *et al.* (2018)의 연구 결과를 통하여 FBS가 세포의 성장뿐 아니라 어류 주요 바이러스인 VHSV, IHNV 및 IPNV의 증식 및 감염가에도 영향을 미치는 것을 확인하였다. FBS가 전혀 첨가되지 않은 MEM0에서 바이러스 감염가가 낮아지는 것뿐만 아니라 일반적으로 세포를 배양할 때 사용하는 10%의 FBS 농도에서도 낮은 감염가

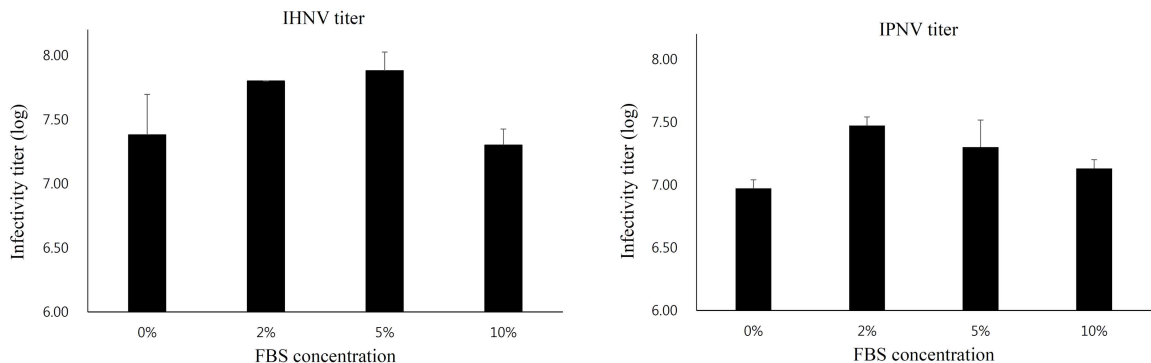


Fig. 1. Infectivity titers of infectious hematopoietic necrosis virus (IHN) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in EPC cells which were prepared in 96-well plate using minimum essential medium (MEM) supplemented with 0, 2, 5 and 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum). TCID₅₀, 50% tissue culture infectious dose.

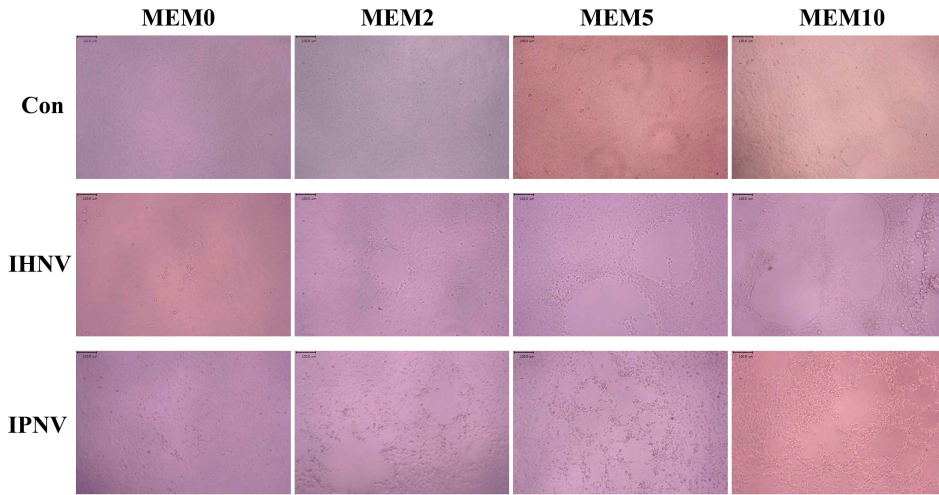


Fig. 2. Epithelioma papillosum cyprinid (EPC) cells inoculated with 10^4 -fold diluted infectious hematopoietic necrosis virus (IHN) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Cells were prepared in 96-well plate using minimum essential medium (MEM) supplemented with 0, 2, 5 and 10% (v/v) FBS (MEM0, MEM2, MEM5 and MEM10, respectively) and observed at 6 d after viral inoculation. Bar=100μm.

를 보인 것은 흥미로운 결과라고 할 수 있겠다. 즉 VHSV, IHN 및 IPNV의 배양 및 감염가 측정에서 FBS가 10% 포함된 배지를 사용하는 것은 오히려 바이러스의 증식을 저하시킬 수 있으며 실제 감염가보다 낮게 나오게 하는 결과를 초래할 수 있다. 따라서 2% 또는 5%의 FBS가 포함된 배지를 배양 및 감염가 측정 실험에 사용하는 것이 바람직하다고 사료된다. 본 연구의 결과는 우리나라의 어류에 발병하는 주요 RNA 바이러스의 배양연구를 위한 기초지식을 제공하고 있으며 실험방법의 표준화 필요성을 제시하고 있다.

Fetal bovine serum (FBS)는 세포의 성장에 필수적인 요소이므로 바이러스의 증식에도 영향을 미칠 수 있다. 본 연구에서는 바이러스의 감염가 측정 결과에 대해 FBS가 어떠한 영향을 주는지 알아보고자 하였다. IHN와 IPNV의 감염가를 측정하는 실험에서 다양한 농도의 FBS가 포함된 MEM 배지(MEM0, MEM2, MEM5, MEM10)를 사용하여 96-well plate를 준비한 후 단계 희석된 바이러스를 접종하여 감염가를 비교하였다. IHN의 감염가 측정 결과 MEM5를 사용한 경우 $10^{7.88}$ TCID₅₀/mL라는 가장 높은 감염가를 나타내었고 MEM10을 사용한 경우에는 가장 낮은 감염가($10^{7.30}$ TCID₅₀/

mL)를 보였다. 한편 IPNV는 MEM2에서 $10^{7.47}$ TCID₅₀/mL로 가장 높은 감염가를 보였고 MEM0를 사용한 경우 $10^{6.97}$ TCID₅₀/mL이라는 가장 낮은 감염가를 보였다. 본 연구 결과로부터 MEM0에서만 아니라 일반적으로 세포를 배양할 때 사용하는 10%의 FBS 농도에서도 바이러스 감염가가 낮아진다는 것을 알 수 있었다. 따라서 2% 또는 5%의 FBS가 포함된 배지를 감염가 측정 실험에 사용하는 것이 바람직하다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2017년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2017R1D1A1A09000992).

References

- Gstraunthaler, G.: Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. ALTEX. 20:275-281, 2003.
- Hartley, C.A., David, C. Jackson, D.C. and Anders, E.M.: Two Distinct Serum Mannose-Binding Lectins Function as Inhibitors of Influenza Virus: Identification of Bovine Serum Inhibitor as Conglutinin.

- J. Virol. 66: 4358-4363, 1992.
- Kim, H.J.: Phylogenetic analysis of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) isolated from cultured rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Korea. J. Fish. Pathol. 23:1-8, 2010.
- Kim, J.H., Park, J.S., Kwon, S.R., Kim, S.H. and Kim, H.J.: Effects of fetal bovine serum concentration on the propagation of Korean viral haemorrhagic septicaemia virus in an epithelioma papulosum cyprini cell line. Korean J. Fish. Aquat. Sci. 51:42-46, 2018.
- Moreno, P., Oliveira, J.G., Labella, A., Cutrin, J.M., Baro, J., Borrego, J.J. and Dopazo, C.P.: Surveillance of viruses in wild fish populations in areas around the Gulf of Cadiz (South Atlantic Iberian Peninsula). Appl. Environ. Microbiol. 80: 6560-6571, 2014.
- OIE (World Organization for Animal Health): Infectious pancreatic necrosis. Manual of diagnostic tests for aquatic animals [Internet], 2009.
- OIE (World Organization for Animal Health): Viral haemorrhagic septicaemia. Manual of diagnostic tests for aquatic animals [Internet], 2018.
- Pritchett, T. J., and Paulson, J.C.: Basis for the potent inhibition of influenza virus infection by equine and guinea pig a2-macroglobulin. J. Biol. Chem. 264: 9850-9858, 1989.
- Reno, P.W.: Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. In: Fish Diseases and Disorders. Vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, pp.1-55. Edited by Woo, P.T.K. and Bruno, D.W., . CABI Publishing, Wallingford, UK, 1999.
- Ryan-Poirier, K., and Kawaoka, Y.: Distinct glycoprotein inhibitors of influenza A virus in different animal sera. J. Virol. 65: 389-395, 1991.
- Tordo, N., Benmansour, A., Calisher, C., Dietzgen, R.G., Fang, R.X., Jackson, A.O., Kurath, G., Nadin-Davis, S., Tesh, R.B. and Walker, P.J.: Family Rhabdoviridae. In Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 623-644. Edited by Fauquet, C., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L.A., Academic Press, San Diego, CA, 2005.

Manuscript Received : Nov 25, 2018

Revised : Dec 5, 2018

Accepted : Dec 5, 2018