

## White spot syndrome virus (WSSV)에 대한 단클론 항체 생산 및 특성 분석

공경희\* · 김춘섭\*\* · 김도형\*\*\* · 김위식\*†

\*전남대학교 수산생명의학과, \*\*주엔바이로젠, \*\*\*부경대학교 수산생명의학과

### Production and characterization of monoclonal antibodies against white spot syndrome virus (WSSV)

Kyoung-Hui Kong\*, Choon-Sup Kim\*\*, Kim Do-Hyung\*\*\* and Wi-Sik Kim\*†

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

\*\*Enbiogene, Yeosu 59771, Korea

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

White spot syndrome virus (WSSV) is a prevalent and virulent pathogen affecting cultured whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Korea. In this study, seven monoclonal antibodies (mAbs) (10A12, 16C3, 17G4, 21G5, 22C4, 23B6 and 24G6) were produced by using purified WSSV. The reactivity of these mAbs was analysed by Western blot (WB), indirect immunofluorescence (IIF), and lateral flow immunochromatographic assay (LFIA). WB analysis demonstrated that three mAbs (17G4, 22C4, and 23B6) reacted specifically to VP28 with an approximate molecular weight of 24 kDa, mAb 16C3 reacted with approximately 17 kDa. IIF analysis demonstrated specific fluorescence signals on gill tissues of WSSV-infected shrimp, with five mAbs (10A12, 16C3, 22C4, 23B6, and 24G6), pleopods from WSSV-infected shrimp were used for LFIA, where, two mAbs (21G5 and 22C4) exhibited positive reaction. In conclusion, it can be inferred that the mAbs usage and specificity depends on the nature of assay used for diagnosis.

**Key words:** white spot syndrome virus (WSSV), monoclonal antibody, Western blot (WB), indirect immunofluorescence (IIF), lateral flow immunochromatographic assay (LFIA)

흰반점병(white spot disease, WSD)은 한국, 일본, 중국, 동남아시아, 남아시아, 중동, 미국 등지의 갑각류, 특히 양식산 새우에서 발생하는 질병으로 보고되어 있다(WOAH, 2021). 양식장에서는 WSD가 발생하게 되면 수일 내에 양식 새우의 90% 이상이 폐사되기도 한다(NIFS, 2018). 우리나라에서는 1993

년부터 WSD에 의한 양식산 새우의 폐사가 발생하기 시작하였다(NIFS, 2018). 2006년부터는 WSD에 의한 피해를 줄이기 위해, 대하(*Fenneropenaeus chinensis*)에 비해 저항성이 강한 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)를 양식품종으로 대체하면서 생산량이 증가하였다(NIFS, 2018). 하지만 WSD에 의한 피해는 여전히 발생하고 있다(Kim *et al.*, 2012).

WSD의 원인 병원체인 흰반점바이러스(white spot syndrome virus, WSSV)는 *Nimaviridae*과 *Whispovi-*

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

rus 속에 속하는 외막을 가진 막대 모양의 바이러스로서, 6개의 주요 단백질(외막 단백질: VP28, VP19, 뉴클레오캡시드: VP664, VP26, VP24, VP15)과 약 300 kbp (dsDNA)의 핵산으로 구성되어 있다 (Lo *et al.*, 2011). WSSV를 검사하는 방법으로는 주로 분자생물학적 방법인 polymerase chain reaction (PCR) 또는 real-time PCR을 사용하고 있다(NIFS, 2021; WOA, 2021). 위의 방법들은 민감도와 특이도가 우수하다는 장점이 있으나, 전문적인 기술과 특수한 장비를 필요로 하므로 양식 현장에서 사용하기에는 한계가 있다. 항체를 기반으로 하는 lateral flow immunochromatographic assay (LFIA)는 현장에서 병원체를 신속히 검사할 수 있는 방법으로 전 세계적으로 사람, 가축 등에서 발생하는 질병의 원인체를 검사하는데 널리 사용되고 있다(Ngom *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2016; 2020; Kong *et al.*, 2021; Shyam *et al.*, 2022). 본 연구에서는 현장 검사용 WSSV LFIA 개발을 위한 기초연구로서 WSSV에 대한 단클론 항체(monoclonal antibody, mAb)를 생산하고자 한다.

2018년 8월 전라북도에 위치한 양식장으로부터 WSSV에 감염된 흰다리새우(약 15 g)를 채집하였다. 채집한 새우의 아가미를 phosphate buffer saline (PBS: 0.13 M NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 완충용액으로 1:20 (0.05 g/ml)이 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 준비하였다. WSSV는 감염 실험을 통해 대량으로 수집되었고, sucrose 농도 구배를 통해 정제되었다. 감염 실험은 여수에 위치한 양식장으로부터 분양받은 WSSV의 감염 이력이 없는 흰다리새우(평균 체중: 16±1 g) 1,000 마리에 2×10<sup>4</sup> copies/100 µl의 WSSV를 각각 근육 내에 접종한 후 10톤 수조에서(수온: 24-26°C) 7일간 사육하였다. WSSV 접종 후, 빈사 상태의 새우가 관찰되면 채집하여 항응고제(450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM EDTA.Na<sub>2</sub>, pH 7.3) (Vargas-Albores *et al.*, 1998)가 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 부유 후 1,000 kDa dialysis membrane (Spectra/Por, USA)을 사용하여 PBS로 투석하였다. 투석된 바이러스를 step sucrose gradient [20%, 35%, 50%, 60% sucrose 용액(w/w)] 위에 넣은 후 30,000 rpm으로 2시간(4°C) 동안 초원심을 실시한 후, 35%와 50% 경계 지점에서 바이러스를 취해 PBS로 현탁하여 30,000 rpm으로 2시간(4°C) 동안 초원심분리하였다. 원심분리 후 얻어진 pellet은 PBS로 재현탁하여 -80°C에 보관하였다.

WSSV에 대한 mAb는 Kim *et al.* (2018)의 방법에 따라 제작하였다. 정제한 WSSV(약 100 µg)와 complete freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, USA)를 동량으로 섞어 BALB/c 마우스의 복강에 1차 접종한 후, 2주 후에 동일한 WSSV(약 100 µg)를 사용하여 2차 접종하였다. 2차 접종 1주 후에 동일한 WSSV(약 100 µg)를 사용하여 3차 면역하였다. 최종 면역 3일 후 마우스의 비장 조직을 분리한 후 PEG-1,500 (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 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다(Liddell and Cryer, 1991). 양성 hybridoma는 정제한 WSSV를 항원으로 사용하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법으로 선별하였고 3회 이상 제한 희석법으로 클로닝 하였다. 선별된 mAb의 isotyping은 Pierce rapid ELISA mouse mAb isotyping kit (Thermo, USA)를 사용하여 결정하였다. 본 연구는 전남대학교 동물실험윤리위원회의 승인(No. CNU IACUC-YS-2017-2)을 받아 진행하였다.

제작한 mAb의 특성을 확인하기 위해 Western blot (WB), indirect immunofluorescence (IIF)와 LFIA를 실시하였다. WB는 Jeong *et al.*, (2017) 방법에 준해 정제한 WSSV를 사용하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시한 후, 본 연구에서 제작한 7종의 mAb (10A12, 16C3, 17G4, 21G5, 22C4, 23B6, 24G6)를 사용하여 반응시켰다. IIF는 감염 실험을 통해 얻은 WSSV에

감염된 새우와 미감염 새우의 아가미를 사용하였다. 새우의 아가미를 4% paraformaldehyde에 고정 후, frozen section compound (FSC22, Leica, Germany)로 포매하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 동결하였다. 동결된 블록은  $4\ \mu\text{m}$ 로 박절하였고, cold acetone ( $-20^{\circ}\text{C}$ )을 사용하여 20분간 고정한 후 PBS로 3회 세정하였다. 1차 항체로는 본 연구에서 제작한 7종의 mAb (10A12, 16C3, 17G4, 21G5, 22C4, 23B6, 24G6)를  $50\ \mu\text{l}$ 씩 분주하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 반응시켰고, 2차 항체는 fluorescein (FITC)가 표식되어 있는 goat anti-mouse IgG serum (novus, USA)으로 반응시킨 후, 형광현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다. LFIA는 Shyam *et al.*, (2020) 방법에 따라 제작하였다. 4종의 mAb (16C3, 17G4, 21G5, 22C4) ( $1\ \text{mg/ml}$ )를 각각 금 나노 입자에 축합시켜 골드 패드를 제작하였으며, 또한 test line에 각각 분주하여 LFIA strip을 제작하였다. 검체 시료로는 감염 실험을 통해 얻은 WSSV에 감염된 새우와 미감염 새우의 유영각을 sample buffer (EnBioGene, Korea)로 1:100 ( $50\ \text{mg}/5\ \text{ml}$ )이 되게 혼합하여 마쇄한 후, 상층액  $100\ \mu\text{l}$ 를 LFIA 투입구를 떨어뜨려 10분 후 반응을 확인하였다. 위의 3개의 실험에서 강한 양성반응은 ++, 약한 양성반응은 +, 음성은 -로 표시하였다.

정제한 WSSV를 마우스에 면역시킨 후 마우스의 비장 조직과 myeloma cell을 융합시켜 hybrid-

oma를 제작하였다. 제작한 hybridoma로부터 생성되는 항체를 ELISA법으로 선별한 후, 제한 희석법으로 3회 클로닝하여 최종적으로 7개의 mAb를 선별하였다(10A12, 16C3, 17G4, 21G5, 22C4, 23B6, 24G6). 선별된 7개의 mAb의 isotyping을 분석한 결과, 17G4의 heavy (H) chain은 IgG1, 2개의 mAb (21G5, 23B6)의 H chain은 IgG2a, 4개 mAb (10A12, 16C3, 22C4, 24G6)의 H chain은 IgG2b로 나타났으며, light chain은 모두 kappa를 인식하는 것으로 확인되었다(Table 1).

정제한 WSSV를 사용하여 SDS-PAGE를 실시한 결과, 17, 22, 24, 48, 68, 82 및 98 kDa에서 밴드가 관찰되었다(Fig. 1a). 특히, 17, 22와 24 kDa에서 강한 밴드가 관찰되었다. Rajendran *et al.* (2004)은 WSSV(한국 분리주)를 사용하여 정제한 결과, 18, 23.5, 27 kDa에서 강한 밴드가 관찰된다고 보고하였다. 이는 본 연구의 결과와 유사하였다.

제작한 7개의 mAb의 특성을 확인하기 위해 WB를 실시한 결과, 3개의 mAb (17G4, 22C4, 23B6)는 약 24 kDa을 강하게 인식하였고, 1개의 mAb (16C3)는 약 17 kDa을 강하게 인식하였으며, 3개의 mAb (10A12, 21G5, 24G6)는 어떠한 반응도 관찰되지 않았다(Table 1, Fig. 1b). WSSV의 VP28에 대한 재조합 단백질 (rVP28: 23 kDa)을 항원으로 사용하여 ELISA를 실시한 결과에서는 3개의 mAb (17G4, 22C4, 23B6)는 rVP28을 강하게 반응하였고, 나머

Table 1. Characterization of 7 monoclonal antibodies (mAbs) to WSSV with Western blot (WB), indirect immunofluorescence (IIF) and lateral flow immunochromatographic assay (LFIA)

Monoclonal antibody	Isotype	WSSV detection methods				
		WB (kDa)	IIF		LFIA	
			PS <sup>a</sup>	NS <sup>b</sup>	PS <sup>c</sup>	NS <sup>d</sup>
10A12	IgG2b, $\kappa$	<sup>c</sup> -	+	-	NT	NT
16C3	IgG2b, $\kappa$	++ (17)	+	-	-	-
17G4	IgG1, $\kappa$	++ (24)	-	-	-	-
21G5	IgG2a, $\kappa$	-	-	-	++	-
22C4	IgG2b, $\kappa$	++ (24)	++	-	+	-
23B6	IgG2a, $\kappa$	++ (24)	+	-	NT	NT
24G6	IgG2b, $\kappa$	-	+	-	NT	NT

<sup>a,c</sup>PS, positive sample (gills<sup>a</sup> or pleopods<sup>c</sup> of WSSV-infected whiteleg shrimp)

<sup>b,d</sup>NS, negative sample (gills<sup>b</sup> or pleopods<sup>d</sup> of WSSV-non infected whiteleg shrimp)

<sup>e</sup>++, strong immunoreactivity; +, weak immunoreactivity; -, negative; NT, not tested

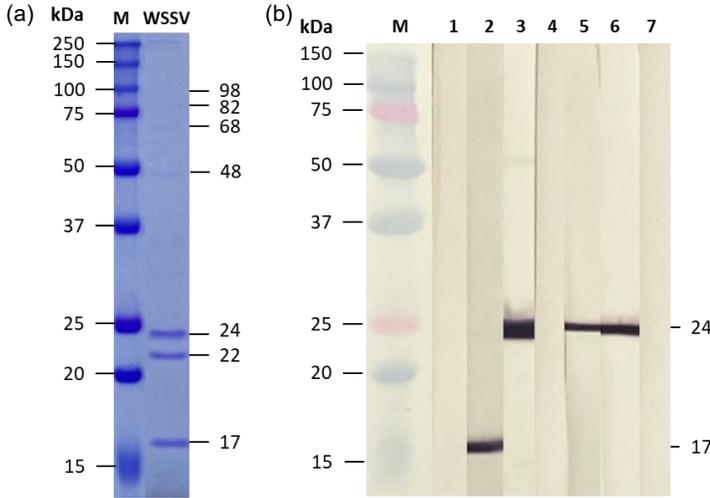


Fig. 1. SDS-PAGE and Western blot analysis. (a) SDS-PAGE analysis of purified WSSV. M: molecular marker. (b) Western blot analysis using purified WSSV and seven monoclonal antibodies (mAbs, 1: 10A12, 2: 16C3, 3: 17G4, 4: 21G5, 5: 22C4, 6: 23B6, 7: 24G6).

지 4개의 mAb (10A12, 16C3, 21G5, 24G6)는 반응하지 않았다(data not shown). 이상의 결과로 mAb 17G4, 22C4 및 23B6은 VP28을 인식하는 것으로 사료된다. WSSV의 VP19는 SDS-PAGE 상에서 약 18 kDa에 위치하고 강한 밴드를 보이기 때문에 (Tsai *et al.*, 2000), mAb 16C3은 VP19를 인식하는 것으로 추정된다.

제작한 7개의 mAb와 WSSV에 감염된 새우와

미감염 새우의 아가미를 사용하여 IIF를 실시한 결과, 5개의 mAb (10A12, 16C3, 22C4, 23B6, 24G6)는 WSSV에 감염된 아가미 조직의 핵내봉입체에 반응하였고(Table 1, Fig. 2a), 2개의 mAb (17G4, 21G5)는 어떠한 반응도 관찰되지 않았다. 특히, mAb 22C4는 다른 4개의 mAb (10A12, 16C3, 23B6, 24G6)보다 강한 양성반응을 보였다. WSSV 미감염 새우의 아가미 조직에서는 7개의 mAb 모두 반응하지

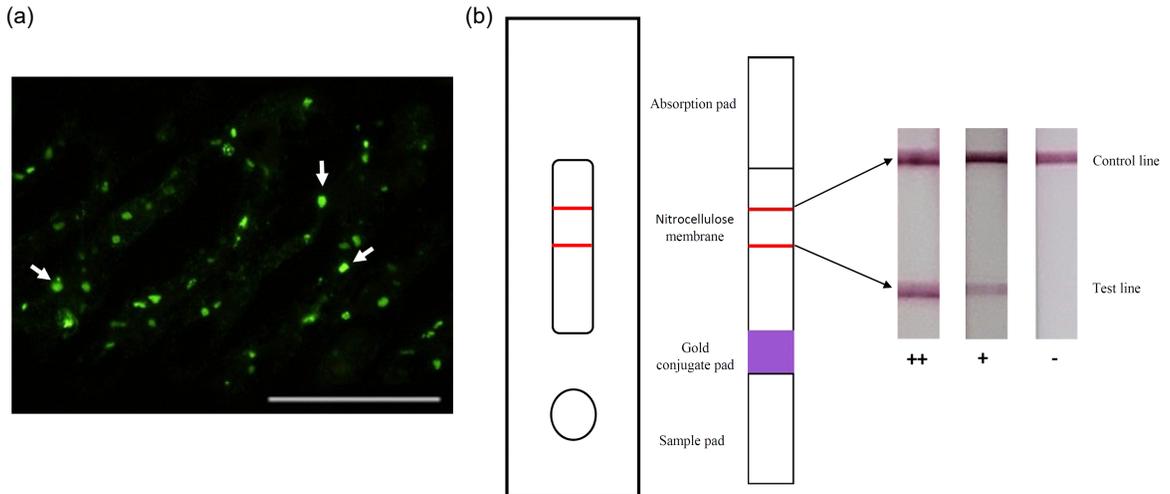


Fig. 2. Indirect immunofluorescence (IIF) and lateral flow immunochromatographic assay (LFIA) analysis. (a) IIF analysis with gill tissue of WSSV-infected whiteleg shrimp (arrow: intranuclear inclusion body). bar=50  $\mu$ m. (b) LFIA with pleopods of WSSV-infected whiteleg shrimp. ++: strong immunoreactivity, +: weak immunoreactivity, -: negative.

않았다.

제작한 4개의 mAb와 WSSV에 감염된 새우와 미감염 새우의 유영각을 사용하여 LFIA를 실시한 결과, mAb 21G5는 강한 양성반응을 보였고, mAb 22C4는 약한 양성반응을 보였으며, 2개의 mAb (16C3, 17G4)는 음성을 보였다(Table 1, Fig. 2b). WSSV 미감염 새우의 유영각에서는 모두 반응하지 않았다.

본 연구에서는 WSSV에 특이적으로 반응하는 7개의 mAb를 생산하였다. WB에서 4개의 mAb (16C3, 17G4, 22C4, 23B6)는 WSSV의 VP28 또는 VP19 (추정)를 강하게 인식하였다(Table 1, Fig. 1b). IIF에서 mAb 22C4는 양성 시료에 강한 반응을 보였고, 4개의 mAb (10A12, 16C3, 23B6, 24G6)는 약한 반응을 보였다. 이중 mAb 10A12와 24G6은 WB에서 음성반응을 보였으나 IIF에서는 양성반응을 보였다. LFIA에서는 WB와 IIF에서 음성을 보인 mAb 21G5에서 양성 시료에 강한 반응을 보였고, WB와 IIF에서 강한 반응을 보인 22C4는 약한 반응을 보였다. 더욱이 WB 또는 IIF에서 양성을 보였던 mAb (16C3과 17G4)는 LFIA에서 음성반응을 보였다. 이상의 연구 결과, 제작된 mAb는 검사 방법에 따라 반응에 확연한 차이를 보여, 검사 방법별로 각기 다른 mAb가 유용하게 사용될 수 있음이 확인되었다. 검사하는 방법에 따라 항원의 형태는 달라질 수 있다. WB는 항원을 제작할 때 음이온성의 계면활성제(SDS)와 환원제 2-mercaptoethanol 등을 가하여 끊이게 되기 때문에 단백질이 변성된다(김과 장, 2008). 따라서 항체는 non-linearized 단백질에 있는 짧은 아미노산의 linear segment를 인식하게 된다(Kurien *et al.*, 2011). IIF는 항원을 paraformaldehyde로 고정하였다. Aldehydes는 단백질을 가교시켜 고정하기 때문에 항체가 인식하는 항원성이 소실되기도 한다(김과 장, 2008). 이러한 이유로 인해 일부 IIF에서 양성을 보인 항체가 WB에서 음성으로 나타나는 것으로 사료된다. WB와 IIF에서 항원과 항체의 반응 시간은 약 1시간인 반면, LFIA는 10분 이내에 완료된다. 이에 따라 LFIA에 사용되는 항체는 항원에 대한 친화력이 매우 우수하고 아주 짧은 시간 내에 항원 항체 반응이 완료되어야 한다. 이러한 이유로 인해 일부

mAb는 WB와 IIF에 양성을 보였으나 LFIA에서 음성을 나타내는 것으로 사료된다. 더불어 LFIA에 강한 반응을 보인 항체는 다른 검사법에서 음성으로 나타났다. 이는 LFIA 개발에 필요한 항체를 선별할 때, 특정 검사법에 강한 반응을 보인 항체와 더불어 반응이 약하거나 없는 항체도 선택하는 것이 더 좋은 방안이 될 수 있다.

## 검사의 글

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

## References

- 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.
- Huang, Y., Xu, T., Wang, W., Wen, Y., Li, K., Qian, L. and Liu, G.: Lateral flow biosensors based on the use of micro- and nanomaterials: a review on recent developments. *Microchim. Acta*, 187: 70, 2020.
- 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.
- Kim, J.W., Lee, H.N., Jee, B.Y., Woo, S.H., Kim, Y.J. and Lee, M.K.: Monitoring of the mortalities in the aquaculture farms of South Korea. *J. Fish Pathol.*, 24(3): 271-277, 2012.
- 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., Jeong, H.N., Shyam, K.U., Oh, M.J., Kim, C.S., Kim, H.J. and Kim, W.S.: Development and validation of a lateral flow immunochromatographic assay for specific detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV, genotype IVa) in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 537: 736491, 2021.
- Kurien B.K., Dorri, Y., Dillon, S., Dsouza, A. and

- Scofield, R.H.: An overview of Western blotting for determining antibody specificities for immunohistochemistry. *Single transduction immunohistochemistry*, pp. 55-67, Kalyuzhny, A.E., Humana Press, New York, 2011.
- Liddell, J.E. and Cryer, A.: A practical guide to monoclonal antibodies, pp. 90-104, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1991.
- Lo, C.P., Aoki, T., Bonami, J.R., Flegel, T., Leu, J.H., Lightner, D.V., Söderhäll, K., Walker, P.J., Wang, H.C., Xun, X., Yang, F. and Vlak, J.M.: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier/Academic Press, London, pp. 229-234, 2011.
- National institute of fisheries science (NIFS): Standard manual of whiteleg shrimp culture. 2018.
- National institute of fisheries science (NIFS): Manual of diagnostic tests for aquatic life. 2021.
- Ngom, B., Guo, Y., Wang, X. and Bi, D.: Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397: 1113-1135, 2010.
- Rajengran, K.V., Mukherjee, S.C., Vijayan, K.K., Jung, S.J., Kim, Y.J. and Oh, M.J.: A comparative study of white spot syndrome virus infection in shrimp from India and Korea. *J. Invertebr. Pathol.*, 84: 173-176, 2004.
- Shyam, K.U., Jeong, H.N., Oh, M.J., Kim, C.S. and Kim, W.S.: Development of a lateral flow immuno-chromatographic strip assay for the detection of nervous necrosis virus (NNV, RGNNV genotype). *Aquaculture*, 520: 734944, 2020.
- Shyam, K.U., Kim, H.J., Oh, M.J., Kim, C.S., Kim, D.H. and Kim, W.S.: Antibody-based lateral flow chromatographic assays for detecting fish and shrimp pathogens: A technical review. *Aquaculture*, 558: 738345, 2022.
- Tsai, J.H., Wang, H.C., Leu, J.H., Hsiao, H.H., Wang, A.H.-J., Kou, G.H. and Lo, C.F.: Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. *J. Virol.*, 78: 11360-11370, 2004.
- 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. *Aquac. Res.*, 29: 549-553, 1998.
- WOAH. Manual of Diagnostic tests for Aquatic Animals. White spot syndrome virus (WSSV); Office International des Epizooties: Paris, France, 2021.
- 김승호, 장규태: 단백질실험노트 (하), pp.17, pp.129, 개정 3판, 월드사이언스, 서울, 2008.

---

Manuscript Received : Nov 13, 2022

Revised : Nov 29, 2022

Accepted : Dec 05, 2022