



2015年 2月

碩士學位論文

규조류 *Chaetoceros salsugineum* 감염 nuclear inclusion virus (CsNIV)의 바이러스 유사입자 형성

朝鮮大學校 大學院

신재생에너지융합학과

金旻湜



규조류 *Chaetoceros salsugineum* 감염 nuclear inclusion virus (CsNIV)의 바이러스 유사입자 형성

Formation of virus-like particles of nuclear inclusion virus (CSNIV) of *Chaetoceros salsugineum*

2015年 2月 25日

朝鮮大學校 大學院

신재생에너지융합학과





金旻湜

규조류 *Chaetoceros salsugineum* 감염 nuclear inclusion virus (CsNIV)의 바이러스 유사입자 형성

指導教授 金時郁

이 論文을 工學碩士 學位申請 論文으로 提出함

2014年 10月

朝鮮大學校 大學院

신재생에너지융합학과





金旻湜

金旻湜의 碩士學位論文을 認准함

- 委員長 朝鮮大學校 教授 이 성 행 印
- 委員 朝鮮大學校 敎授 이 현 화 印
- 委員朝鮮大學校敎授 김 시 욱 印

2014年 11月





朝鮮大學校 大學院

TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS	Ι
LIST OF TABLES	
LIST OF FIGURES	IV
ABSTRACT	V

제 1 장 서 론	••• 1
제 1 절 연구배경	1
1. 적조현상	···· 1
2. 국내 적조발생 현황 및 생물종	···· 2
3. Chatoceros salsugineum nuclear inclusion virus (CsNIV)	6
제 2 절 연구목적	···· 7

제 2 장 실험 재료 및 방법
제 1 절 효소 및 시약
제 2 절 사용균주 및 플라스미드
제 3 절 재조합 DNA 제조
1. 유전자 합성
2. CsNIV 유전자 증폭
3. 유전자 단편 TA 클로닝
4. 플라스미드 정제 및 염기서열 확인
5. 제한효소 처리와 DNA 단편 분리
6. Ligation 및 형질전환
7. Competent cell 제조
8. 형질전환된 균체로부터 재조합 플라스미드 확인
9. SDS-PAGE를 이용한 단백질 발현 확인
제 4 절 CsNIV 캡시드 단백질 발현 및 정제
1. CsNIV 캡시드 단백질 발현
2. 온도 및 IPTG농도에 따른 최적발현 조건 탐색





3. Western blot analysis15
4. Cell free extract의 제조
5. Ni-NTA affinity column을 이용한 CsNIV 캡시드 단백질 정제 16
제 5 절 CsNIV VLPs의 조립
1. Dissociation과 reassociation 과정을 통한 self assembly 유도
2. Gell filtration chromatography를 이용한 VLP 조립 확인
3. CsNIV VLPs의 TEM 형태 관찰
제 6 절 FITC를 이용한 CsNIV 캡시드 단백질의 표지
제 7 절 CsNIV VLP의 숙주 특이적 흡착 관찰
제 3 장 결과 및 고찰
제 1 절 CsNIV 유전자 합성
제 2 절 CsNIV 유전자의 클로닝 및 발현
1. CsNIV 유전자의 클로닝
2. CsNIV 캡시드 단백질의 최적발현 조건 확립
제 3 절 CsNIV 캡시드 단백질 정제
제 4 절 CsNIV VLPs의 조립
1. Dissociation과 reassociation 과정을 통한 self-assembly 유도
2. Gell filtration chromatography를 이용한 VLP 조립 확인
3. CsNIV VLPs의 TEM 형태 관찰
제 5 절 FITC를 이용한 CsNIV 캡시드 단백질의 표지
제 6 절 CsNIV VLPs의 숙주 특이적 흡착 관찰
제 4 장 결론

참고문헌	36	3
------	----	---





LIST OF TABLES

Table	1.	Damage of marine livings by harmful algal bloom (HAB)1
Table	2.	Nationwide Statistical report of HAB damaged areas, economic
		losses and marine livings losses in South Korea from 1995-2014 $\cdots 4$
Table	3.	Conventional methods for controlling of HAB9
Table	4.	List of host specific viruses and their algal hosts9
Table	5.	List of algal host strains used in this study





LIST OF FIGURES

Fig. 1. Annual maps showing HAB damaged costal areas in South Korea. \cdots 5
Fig. 2. Diagrammatic representation of CsNIV ORFs
Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of PCR amplified products of codon
optimized CsNIV capsid gene21
Fig. 4. Schematic representation for construction of pET29b-CsNIV
Fig. 5. SDS-PAGE analysis of the recombinant CsNIV capsid protein
expressed in E. coli BL21(DE3) at different temperature. (A) 16°C, (B)
25°C and (C) 30°C
Fig. 6. Western blot analysis of recombinant CsNIV capsid protein expressed
in E. coli BL21(DE3) at different temperature
Fig. 7. Expression level of recombinant CsNIV capsid protein expressed in E.
coli BL21(DE3) at different IPTG concentration
Fig. 8. SDS-PAGE and western blot analysis of purified CsNIV capsid protein
obtained from Ni-NTA affinity column chromatography
Fig. 9. Gel filtration chromatogram of purified and self assembled
CsNIV-VLPs using FPLC packed with sephacryl S-500
Fig. 10. TEM analysis of self-assembled CsNIV-VLPs
Fig. 11. SDS-PAGE analysis of CsNIV capsid protein labelled with FITC 31
Fig. 12. Analysis of host specific binding of CsNIV VLPs labeled with FITC to
its host , C. salsuguneum. Non-host cells of Chaetoceros sp., C.
grailis, H. circularisquama HU9433-P, H. akashiwo were also
observed with Optical and fluorescent microscopy







ABSTRACT

Formation of virus-like particles of nuclear inclusion virus (CSNIV) of *Chaetoceros salsugineum*

Min Sik Kim Advisor : Prof. Kim, Si Wouk, Ph.D. Department of Renewable Energy convergence, Graduate School of Chosun University

Virus-like particles (VLPs) are non-infectious and immunogenic, virus-mimicking protein assemblies (including host specific binding abilities). The research on this area increasing rapidly towards drug delivery system (DDS), lipoparticle technology and vaccine candidates.

In the present study, the *Chaetoceros salsuginium* microalgal infecting *Chaetoceros salsugineum* nuclear inclusion virus (CsNIV) was used to produce VLP. The CsNIV is a 38nm icosahedral virus that replicates within the nucleus of *C. salsugineum*. The CsNIV capsid protein gene (1.2kb) was cloned into pEt 29b vector. The recombinant pET 29b-CsNIV plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3). The CsNIV capsid protein was purified using Ni-NTA affinity column chromatography using elution buffer (20mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 250mM imidazole, pH8.0). For further purification was performed in FPLC packed with Sephacryl S-500 resin. The purified VLPs was analysed using native-PAGE and the molecular weight of the VLP was found to be 46kDa. The CsNIV-VLPS was labelled with FITC by dissociation and reassociation process. The VPL and FITC combination was confirmed by 12% (w/v) SDS-PAGE and UV light.

Further experiments need to find out the host specificity of novel algicidal





compounds encapsulated with CsNIV-VLPs such as, HPLC analysis, FITC labelling, host specificity test against various diatoms. Therefore, we suggest that this study may help to produce an alternative, specific and highly effective bio-control tool to prevent the harmful algal bloom in marine waters.



제 1 장 서 론

제 1 절 연구배경

1. 적조현상

Collection @ chosun

매년 대부분의 연안국가에서는 식물 플랑크톤의 대량 번식으로 인해 바닷물의 색깔 이 적색, 황색, 적갈색 등으로 변색되는 적조현상 (Red tide)이 발생하여 사회적 및 경 제적으로 치명적인 피해를 입히고 있다. 적조는 해수에 N, P 등의 영양염류가 과잉 공 급되고 수온 및 일조량 등 미세조류가 증식하기에 적합한 환경일 때 대량번식하여 발 생하는 현상이다. 최근에는 적조로 인한 직·간접적 피해가 다발하고 있어 적조를 유해 조류의 대발생(Harmful Algal Blooms : HABs)의 의미로 사용한다^[1-2].

일반적으로 적조현상이 발생하여 일어나는 피해는 해양생물 피해와 생산성 감소, 생 태계 구조와 기능변형, 연안환경의 미적가치 손상 그리고 식중독에 의한 인체 건강 피 해 등을 들 수 있다 (Table 1). 특히 수중의 산소 고갈로 인해 어류의 질식사를 유발 할 수 있고 어류의 아가미 부착으로 인한 호흡 방해, 조류의 내독소 분비에 의한 어패 류의 집단 폐사 등 수산자원의 폐사를 부르고 이들의 부패는 다시 환경을 악화하여 유 해조류 대발생을 유도하는 악순환을 반복하게 된다. 또한 해양세균의 조성과 분포가 달라지고 유기물이 과량을 분해될 때 일어나는 산소 소비로 인하여 해저에 빈산소와 무산소 현상을 초래하는 등 해양 생태계를 변형시킬 뿐만 아니라 바다색이 변하고 심 한 악취가 남으로써 심미적 가치를 상실 할 수 있으며 수산물 소비 위축뿐만 아니라 폐사된 어패류의 독화에 의해 식중독을 유발 할 수 있다. 이와 같은 적조 피해는 경제 적 손실을 초래 할 뿐만 아니라 인간의 해양활동을 위축시키고 있다^[3].



구분	피해양상	피해원인	초래현상
		적조생물의 독성물질 생산	Biotoxin 생산
	중독사	세균이 생산하는 독성물질	
		적조생물 등 유기물 분해 시 유독성분 생성	독성분해산물
		활성산소(ROS) 생성	효소변형, DNA손상, 세포손상
직접피해		동식물 부유생물의 호흡작용	수중 용존산소 소비
	질식	생물사체 분해시의 저층 용존산소 소비	무산소 수괴 형성
		아가미 폐색(Gill clogging)으로 호흡장애	Gas 교환기능 저하
		pH상승과 수중탄소의 증가로 생리장애	
		상대적 산소부족과 수질악화	
	아가미손상	적조생물 돌기물이 아가미에 손상	
		회유어 도피, 자원 가입량 감소, 재생산 부진	가입량 감소
		부착생물과의 경쟁, 해수교환 불량	성장둔화
간접피해	생산성감소	으기문 → 티전지서 새무사 벼하	갑각류, 패류
			→ 다모류
		환경질의 변화(점도, 탁도, 조도)	광합성 저하
	2차 피해	수산식품 가격하락, 해역 이용행위 감소	Halo effect
		식중독(마비성 및 설사성 식중독) 유발	건강 피해

Table 1. Damage of marine livings by harmful algal bloom (HAB)

2. 국내 적조발생 현황 및 생물종

우리나라에서의 적조현상은 1970년대 중반까지는 주로 진해만의 내만에서 규조류에 의해 여름철에 국부적으로 발생하였으나, 그 후 산업화로 인한 영양염류의 과다 유입 으로 해역에 부영양화가 진행되면서 발생규모와 건수는 해가 지남에 따라 대형화되었 다. 1980년대 중반 이후, 적조는 광역화, 장기화, 유독화 및 고밀도화되어 수산업에





많은 피해를 입혔고, 이로 인하여 심각한 문제로 인식되기 시작하였다 (Fig. 1). 적조 발생 및 그 피해는 1980년에는 3건에 불과하였으나 1981년에는 8건으로 늘어났고, 이후로도 매년 발생하여 크고 작은 피해를 발생시켰다. 1995년에는 55일간이나 발생 하여 어업피해액만 764억원에 달하였다. 1998년, 1999년, 2000년에는 피해액이 다소 감소하였으나 2001년에 41일간 84억원, 2002년에 57일간 49억원이 발생하였고, 2003년에는 215억원으로 전남 완도에서 강원도 삼척까지 확산되어 나타났다 ^[4-6] (Table 2).

전 세계적으로 적조를 일으키고 있는 종은 대략 200여종 정도로 현재까지 우리나라 에서 보고된 적조생물은 43종이 있으며, 그 중 4종은 담수종 또는 기수종이고 해수종 으로는 규조류 (Diatom)가 13종, 침편모조류 (Raphidophyceae)가 3종 그리고 편모조 류 (Flagellates)가 20종으로 알려져 있다. 특히 편모조류 중 3종은 수산생물을 직접적 으로 죽일 수 있는 강한 독성을 가지고 있다. 1980년대까지는 주로 규조류에 의해 적 조가 발생 하였고, 1982년도에는 규조류가 8건으로 38%, 편모조류가 7건으로 33%였 고 나머지는 혼합좋에 의해 적조가 발생하였다. 그러나 1985년도에 들어서는 규조류 가 6건으로 17%, 편모조류가 22건으로 65%, 그리고 나머지 4건이 혼합종에 의한 적 조였으며, 점차 독성을 가진 편모조류의 발생건수와 점유비율이 증가하였으며, 1995년 도부터는 Cochlodinium spp.에 의한 단독적조가 지속되고 있으며 장기화, 광역화의 특징을 갖고 있다. 이들 적조 생물 중 상습적으로 적조를 일으키는 원인생물로는 규조 류와 편모조류가 있으며, 우리나라 남해안에서 주로 발생하는 Cochlodinium은 와편모 조류에 속하며 다량의 점액질을 보유함으로써 이것이 어류의 아가미에 부착되어 어류 의 산소 교환 능력을 감소시켜 수산생물을 질식사시키는 것으로 밝혀져 있다. 발생 시 기는 7월에서 10월까지며 특히 9월에 집중적으로 발생하여 한 달 이상 지속되기도 하 였다. 또 Alexandrium tamarense는 남해안에서 이른 봄철에 출현하다가 여름철에는 휴면포자로서 저질중에서 생활하는 종으로 굴, 홍합 등 패류를 독화시켜 독화된 패류 를 사람이 먹으면 마비성 패독을 일으키는 종으로 보고되었고, Chattonella marina는 주로 하계에 남해안 연안에서 주로 출현하며 일본에서는 세토 내해 등지에서 자주 출 현하여 양식생물을 대량으로 치사시킨 바 있다. 편모조류 외에도 규조류 중 Chaetoceros의 몇몇 종들은 어류의 아가미에 부착하여 호흡을 방해함으로써 그들을 치사시킨다고 보고되고 있다 ^[38-39]. 따라서 유해한 영향을 미치는 적조 원인 생물종을 제어하는 새로운 기술 개발이 시급한 시점이다.





구분	최초 발생일	최초 발생지역	발생범위	지속일 (일)	최대밀도 (개체수/mL)	피해액 (억원)
1995	8.29	고흥	완도~강릉	54	30,000	764
1996	9.5	고흥, 여천	완도~기장	28	23,000	21
1997	8.25	고흥	완도~울진	29	20,000	15
1998	8.30	고흥	완도~거제	34	20,000	16
1999	8.11	고흥	완도~울진	54	43,000	3.2
2000	8.22	여수, 남해	고흥~기장	29	15,000	2.6
2001	8.14	여수	완도~삼척	42	32,000	84
2002	8.2	여수	완도~울진	55	30,000	49
2003	8.13	여수~남해	진도~강릉	62	48,000	215
2004	8.5	거제	완도~거제	30	5,800	1.2
2005	7.19	고흥	완도~거제	58	25,000	10.6
2006	8.6	여수	완도~남해	37	33,500	0.7
2007	7.31	고흥	완도~울진	50	32,500	115
2008	7.30	고흥	완도~울산	62	7,300	-
2009	10.28	여수	여수~통영	20	1,660	_
2010	9.17	통영	통영	3	1,300	-
2011	-	-	-	_	-	-
2012	7.27	고흥	완도~거제, 태안	75	23,000	44
2013	7.17	여수, 통영	고흥~양양	51	34,800	247
2014	7.31	고성	완도~삼척	75	20,000	53

Table 2. Nationwide Statistical report of HAB damaged areas, economic losses and marine livings losses in South Korea from 1995-2014^{[4].}







Fig. 1. Annual maps showing HAB damaged costal areas in South Korea [7].



3. Chaetoceros salsugineum nuclear inclusion virus (CSNIV)

Chaetoceros aenus는 중심류 센털돌말과의 기준속으로, 해산의 부유성 규조 중에 서 종류가 많다. 담수와 해수에서 가장 일반적이고 광범위하게 발견되는 규조류 그룹 으로 생태계의 1차 생산자로 알려져 있다. 해양생물에 영향으로는 C. convolutus, C. concavicornis를 비롯한 Chaetoceros속의 몇몇 좀 들은 어류의 아가미에 부착하여 호 흠을 방해함으로써 질식사 시킨다고 보고되고 있다. 현재까지 *Chaetoceros* aenus에 감염하는 네 종류의 DNA virus가 보고 되었으며. 공통적으로 핵에 감염하여 12~24 h 의 감염주기로 host cell lvsis를 통해 성숙한 virus 입자가 방출된다. 이때 방출되는 viron의 입자는 약 25~35 nm 정도의 크기를 갖는다. 본 연구에서 숙주로 사용한 C. salsugineum은 타원 기둥 모양으로 황갈색을 띄며 규산질로 된 단단한 껍질을 갖고 있다. 또한, 규조류의 가장 큰 특징인 각 세포끼리 옆면이나 모퉁이를 연결하여 군체 를 이룬다. Chaetoceros salsugineum nuclear inclusion virus (CSNIV)는 C. salsugineum에 특이적으로 감염하는 virus로, 38±3 nm의 직경을 가진 20면체 구조를 띄고 있다. Genome structure는 covalently closed circular ssDNA를 주형으로 이에 부분적으로 짧은 길이의 linear ssDNA와 dsDNA가 결합되어 있는 ssDNA + dsDNA 구조로 이루어져 있다. 이러한 특이적인 유전체 구조는 지금까지 보고된 어떠한 바이 러스와도 일치하지 않는다. CSNIV는 6개의 orf를 가지며 이 중 orf-3가 캡시드 단백 질을 암호화한다고 알려져 있다 (Fig. 2).



Fig. 2. Diagrammatic representation of CsNIV ORFs^[20].





제 2 절 연구 목적

현재 국내·외에서 연구되고 있는 적조방제 방법은 적조 회수 처리선이나 적조 방제막 및 초음파 등을 이용하는 물리적 방법, CuSO4 등과 같은 살조제 살포, 황토 그리고 오존 등을 이용한 화학적 방법과 천적 미생물을 이용한 생물학적 방법 등이 있다. 그 중 국내에서는 대체 적용기술 미확보로 인해 90년대 후반부터 황토살포법을 실시해 오고 있다^[31]. 황토의 콜로이드 입자와 적조생물의 응집·흡착반응을 통하여 적조생물 을 침전시키며 황토 중의 알루미늄 이온이 용출되어 적조생물의 세포를 파괴시키는 성 질을 이용한 방법으로 최근까지도 가장 효과적인 방법으로 시행되고 있는 실정이다. 그러나 이 방법은 뿌려진 황토가 다시 침강하여 바다 하층부의 산소를 고갈시켜 해저 생태계를 파괴하고 또 다른 환경문제를 야기할 가능성이 있을 뿐 아니라 황토살포 지 역에서의 빛 투과율을 떨어뜨려 그 지역의 수초 광합성 작용에 심각한 결과를 초래한 다. 또한, 정량화되지 않은 황토살포는 8.3인 해수의 pH를 살포 16시간 만에 7.8로 떨어뜨려 pH 저하로 인한 해수의 산성화를 보인다. 해마다 황토 살포량은 증가하였으 나, 어민 피해액을 줄이는 데는 기여하지 못하고 있는 실정으로 경제적 손실액도 급격 히 늘고 있는 추세이다. 따라서 적조 방제를 위한 새로운 기술 개발이 필요한 시점이 다^[7].

본 연구에서는 새로운 적조 방제 기술의 개발을 위해 숙주에 특이적으로 흡착하는 바 이러스의 특성을 이용하여 바이러스 캡시드 단백질을 이용한 Virus like particle (VLP) 을 형성하고자 하였다. 먼저 바이러스의 genome에서 캡시드 유전자를 클로닝하고 재 조합 대장균에서 발현시킨 후 VLP 형성을 유도하였다. VLP는 캡시드 단백질의 dissociation과 reassociation 과정을 통해 조립이 가능하며, VLP는 핵산을 포함하고 있지 않기 때문에 내부가 비어있으므로 특정 물질을 탑재할 수 있다. ^[23-24].

현재까지 보고된 해양 조류에 감염하는 바이러스는 40여종 미만에 불과하다 (Table. 0). 그 중 특히 적조현상을 일으킨다고 알려진 와편모조류(Dinophyta)와 규조류에 감 염하는 바이러스에 주목하였다. 본 연구실에서는 와편모조류인 *Heterocapsa circularisquama*에 감염하는 HcRNAV34의 발현, 정제를 통한 VLP 형성 후 숙주특이적 살조능을 성공적으로 확인한 바 있다. 본 연구에서는 규조류인 *C. salsugineum*에 감 염하는 CsNIV가 DNA virus로서, 선행 연구였던 RNA virus와 유사한 VLP를 형성하여 숙주특이성을 보이는지 확인하는데 초점을 두고 있다^[19-22]. 숙주 특이성을 나타내는





부위인 캡시드 단백질의 유전자를 대장균에서 클로닝 및 발현시키고 이를 정제한 후 self-assembly를 유도하여 VLPs의 숙주 특이적 흡착을 확인함으로써 적조유발 종의 특이적 살조 가능성을 확인하고자 하였다. 이는 친환경적인 생물학적 적조 방제 기술 개발에 목적을 두고 있으며, 나아가 본 연구에서의 원천기술로 나노입자의 생산 및 응 용을 통해 제약 및 화장품 산업에 널리 활용이 가능하고, 특히 바이러스 나노입자의 특이선택성을 활용하여 선택적 항암제 개발 및 진단법 향상 등에 적용이 가능 할 것으 로 예상된다 ^[11-16].





구분	적조방제 기술
	적조 회수 처리선 / 해면회수
놀니득 지나답	적조방제막
	화학약품 살포법
	초음파 및 오존처리법
화학적 처리법	점토흡착법
	전기분해에 의한 알칼리수 처리법
	전자빔조사법
싸므하저 키기버	천적을 이용한 제어
생물약약 서디법	적조제거효소에 의한 처리

Table 3. Conventional methods for controlling of HAB^[8]

Table 4. List of host specific viruses and their algal hosts [4]

바이러스	숙주	크기 (nm)	게놈
BtV	Aureococcus anophagefferens	140	dsDNA
CbV	Chrysochromlina brevifilum	145 ~ 170	dsDNA
CeV	Chrysochromlina ericina	160	dsDNA
CsNIV	Chaetoceros salsugineum	38	dsDNA
EhV	Emiliania huxleyi	170 ~ 200	dsDNA
HaNIV	Heterosigma akashiwo	30	모름
HaV	Heterosigma akashiwo	202	dsDNA
HaRNAV	Heterosigma akashiwo	25	ssRNA
HcRNAV	Heterocapsa circularisquama	30	ssRNA
HcV	Heterocapsa circularisquama	197	dsDNA
MpRNAV	Micromonas pusilla	50 ~ 60	dsRNA
MpV	Micromonas pusilla	115	dsDNA
PoV	Pyramimonas orientalis	180 ~ 220	dsDNA
PpV	Phaeocystis pouchetii	130 ~ 160	dsDNA
PgV	Phaeocystis globosa	모름	dsDNA





제 2 장 실험 재료 및 방법

제 1 절 효소 및 시약

유전자 재조합을 위해 사용한 *Nde*I, *Xho*I의 제한효소와 DNA ligase는 Takara 제품 을 이용하였다. PCR을 위한 primer는 Macrogen사에 의뢰하여 합성하였다. 재조합 대 장균에서 발현된 CsNIV 캡시드 단백질의 정제는 Ni sepharose[™] high performance (GE healthcare bio-sciences AB, England)와 Ni sepharose[®] CL-6B (Incospharm, korea)를 open column(Bio-Rad, USA)에 충진하여 사용하였다.

제 2 절 사용균주 및 플라스미드

본 연구에서 사용한 CsNIV 유전자는 Genbank의 유전자 정보을 바탕으로 캡시드 단 백질에 관여하는 orf-3 유전자를 대장균에서 발현 가능하도록 rare codon을 최적화시 켜 클로닝한 재조합 플라스미드를 유전자 증폭을 위한 주형 플라스미드로 사용하였다. 또한 형질전환을 위한 대장균으로는 BL21(DE3) 및 DH5α를 이용하였다. 그리고 클로 닝에는 pCR2.1 vector (invitrogen)와 단백질 발현을 위한 pET29b vector (BioLabs[®]) 를 사용하였다. 재조합 플라스미드가 도입된 대장균은 kanamycin (50 ሥg/㎡)이 첨가 된 LB 액체배지에서 37℃로 14~16 시간동안 배양하였다.





제 3 절 재조합 DNA 제조

1. 유전자 합성

본 실험은 Genbank[accession number; AB193315]로부터 CsNIV 캡시드 단백질에 관여하는 *orf*-3 유전자 정보를 바탕으로 대장균에서 발현 가능하도록 rare codon을 최적화시킨 캡시드 유전자 (1.2 kb)가 클로닝 된 pUC57-CsNIV를 얻었다 (Genscript).

2. CsNIV 유전자 증폭

CSNIV 캡시드 단백질 유전자를 증폭하기 위해 5'-TTTTCATATGGCACGCAAAAAAT CCACGCCG-3' (5'-*Nde*I froward)와 5'-TTTTCTCGAGGCCGCCGCCCGTTTTTTGAC G-3' (3'-XhoI reverse)의 primer를 제작하였다. 주형 플라스미드로 pUC57-CSNIV를 사용하였으며, 총 반응액을 20 #로 유전자 증폭을 수행하였다. 반응 조건은 95℃에서 5 분 동안 pre-annealing을 한 후, 95℃에서 1 분, 60℃에서 1 분, 72℃에서 5 분간 20 cycle를 실시하였고, 72℃에서 5 분 동안 extension 반응을 수행하였다. 반응혼합 액의 조성은 10X PCR buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH9.0), 0.2 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 30~50 ng의 주형 플라스미드, 100 ng의 5'-*Nde*I과 3'-XhoI의 primer, 0.5 unit의 EX taq polymerase를 사용하였 다. PCR의 최종 반응 생성물은 Gel extraction kit (Nucleogen)를 이용하여 정제하였 다.

3. 유전자 단편 TA 클로닝

pCR 2.1 Vector와 insert DNA를 1:1의 몰수비로 넣어 주었고, 10X ligation buffer (300 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP, pH7.8)와 T4 DNA ligase 1 unit을 첨가하여 총 반응액을 10 μl로 한 후 상온에서 3 시간 동안 반응시켜 ligation 하였다. Inoue방법에 따라 제조한 DH5α competent cell 200 μl에 ligation 한 DNA 10 μl를 첨가하여 30 분 동안 얼음에 방치한 후 42℃에서 70 초 동안 heat shock을 준 후, 다시 3 분 동안 얼음에 정치하였다. LB 액체배지 800 μl를 첨가한





되, 37℃에서 30 분 동안 배양하였다. 이렇게 형질전환 된 대장균을 X-gal과 IPTG가 포함되어있는 kanamycin (50 µg/㎡)이 첨가된 1.5% LB 고체배지에 평판도말 하여 3 7℃에서 14~16 시간동안 배양한 후, 생성된 white colony만을 선별하여 DNA 서열을 분석하였다 (MACROGEN).

4. 플라스미드 정제 및 염기서열 확인

Alkaline lysis 방법을 사용하여 플라스미드를 분리하였다^[17]. 지수성장기 말기에 들 어선 배양액 1 째 을 micro centrifuge tube에 넣고 원심분리한 후 상등액을 제거하였 다. 침전물을 20 mg/m² RNase A가 녹아있는 resuspension buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH8.0) 250 #²을 넣어 현탁하였다. 현탁액에 lysis buffer (200 mM NaOH, 1% SDS) 250 #²을 첨가한 후 상온에서 5 분간 방치하였다. 반응이 끝난 후 precipitation buffer (5 M potassium acetate 60 ㎡, glacial acetic acid 11.5 ㎡, distilled water 28.5 ㎡) 350 #²을 첨가하여 3~4회 조심스럽게 흔들어 혼합시킨 후 12,000 x g에서 15 분 동안 원심분리하였다. 원심분리가 끝난 상등액은 silica membrane column에 옮긴 후 12,000 x g에서 1 분 동안 원심분리하여 DNA를 column에 결합시켰다. 이 후 700 #²의 washing buffer (95% ethanol)를 주입하고 상 온에서 1분간 방치한 후 12,000 x g에서 1 분간 원심분리를 한 후 다시 12,000 x g 에서 2 분간 원심분리하여 남아있는 에탄올을 완전히 제거하였다. 35 #²의 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0)를 첨가하고 상온에서 1 분 정도 방치한 후 에 column에 결합된 플라스미드를 분리하였다. 그 후 정제된 플라스미드의 DNA 염기 서열을 분석하였다 (MACROGEN).

5. 제한효소 처리와 DNA 단편 분리

TA 클로닝을 통해 선별된 CsNIV 플라스미드와 단백질발현 vector인 pET29b에 제한 효소 XhoI을 넣고 37℃에서 2 시간 반응시켜 자른 후 Clean-up Kit (Nucleogen)을 이용하여 순수한 DNA절편을 회수하였다. 또한 다시 *Nde*I 제한효소를 처리하여 37℃ 에서 2 시간 반응시켰다. 각각의 제한효소로 처리된 vector와 insert DNA를 1% (w/v) agarose gel에서 전기영동하였다. gel로부터 vector와 insert DNA 부분을 잘라내어, Gel extraction kit (Nucleogen)를 사용하여 gel로부터 원하는 DNA 단편을 회수하였





6. Ligation 및 형질전환

pET29b vector와 CsNIV insert DNA을 1:2의 몰수비로 넣어주고, 10X ligation buffer (300 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP, pH7.8) 1 unit과 T4 DNA ligase 1 unit을 첨가하여 총 반응액을 10 #2로 한 후 4℃에서 20 시 간 동안 반응시켜 ligation 하였다. 그 후 Inoue법에 따라 제조한 competent cell 200 #2에 ligation 된 DNA 10 #2를 첨가하고 얼음에 30 분간 방치한 후 42℃에서 55 초 동안 heat shock을 준 다음 다시 얼음 속에서 3 분간 방치하였다. 여기에 800 #2 LB 액체배지를 넣어준 후 37℃에서 40 분간 배양한 다음 원심분리하여 상등액 900 #2을 제거하였다. 형질전환 된 cell 100 #2을 kanamycin (50 #g/m2)이 첨가된 Agar 1.5% (w/v) LB에 도말하여 37℃에서 16 시간 동안 배양한 후 형질전환 된 대장균을 선별하 였다.

7. Competent cell 제조

Competent cell은 Inoue법에 따라 제조하였다^[18]. 5 째의 LB 액체배지에 대장균 BL21(DE3) 단일 콜로니를 접종하여 37℃에서 12~14 시간 동안 배양하였다. 배양된 균체를 200 째의 LB 액체배지에 0.1%를 접종하였고, O.D. (optical density) 600 nm 의 파장에서 흡광도가 0.4~0.6로 될 때까지 배양하였다. 이 후 배양액을 얼음에서 10 분간 방치한 후 12,000 x g에서 15 분간 원심분리하였다. 회수한 균체에 67 째의 TB buffer (10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂, pH6.8)를 첨가하 여 재현탁 후 같은 조건으로 원심분리하였다. 최종적으로 16 째의 TB buffer와 1.2 째 의 DMSO를 첨가하여 혼합한 후 100 ∰씩 멸균된 micro centrifuge tube에 넣어 -8 0℃에 보관하였다.

8. 형질전환 된 균체로부터 재조합 플라스미드 학인

재조합 플라스미드의 분리는 alkaline lysis 방법을 사용하여 분리하였다. 분리한 재 조합 플라스미드를 2 unit의 제한효소 NdeI으로 37℃에서 1 시간 반응시켜 자른 후





1% (w/v) agarose gel에서 전기영동하여 재조합 DNA의 크기를 확인하였다. 형질전환 된 플라스미드 DNA를 선별하여 pET29b-CsNIV로 명명하였다.

9. SDS-PAGE를 이용한 단백질 발현 확인

재조합 단백질의 발현여부를 확인하기 위해 12% (w/v) SDS-PAGE (sodium dodecyl -sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 확인하였다. 발현 이 유도된 배양액을 원심분리하여 상등액을 제거하였고 회수된 균체의 10배 용량의 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0.5% Triton X - 100, pH8.0)로 현탁 시킨 후 sonicator (SONIFIER 250, Branson)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄용액은 4℃ 에서 15,000 x g, 40 분간 원심분리하여 얻은 상등액을 cell free extract로 간주하고, 균체는 파쇄 전에 넣었던 동일용량의 buffer로 재현탁시켜 insoluble fraction으로 간주 하였다. 단백질의 정량을 위해 BSA (Bovine serum albumin)으로 표준 곡선을 작성하 였고, 표준곡선 흡광도의 범주를 벗어나지 않도록 분석하고자하는 단백질 시료를 희석 한 후 595 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. Bradford 방법으로 정량한 sample 을 5분간 끓인 후 12% (w/v) SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다. 전기영동이 끝난 gel은 staining solution (0.1% coomassie blue R-250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid)로 염색하였고, destaining solution (40% methanol, 10% glacial acetic acid, 50% distilled water)으로 탈색한 후 단백질의 발현여부를 확인하였다.



제 4 절 CsNIV 캡시드 단백질의 발현 및 정제

1. CsNIV 캡시드 단백질 발현

CsNIV 캡시드 단백질의 발현 및 정제를 위해 선별된 pET29b-CsNIV 재조합 플라스 미드를 포함한 대장균 BL21(DE3)을 kanamycin (50 µg/mℓ)이 포함된 LB 액체배지에서 전 배양하였다. kanamycin (50 µg/mℓ)이 포함된 500 mℓ LB 액체배지에서 전 배양액 을 1% 접종하였고, 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.4~0.6으로 될 때까지 배양한 다 음 0.5 mM의 isopropyI-2-d-thiogalactopyranoside (IPTG)를 첨가하여, 16℃에서 20 시간 동안 CsNIV 캡시드 단백질의 발현을 유도하였다.

2. 온도와 IPTG농도에 따른 최적발현 조건 탐색

CsNIV 캡시드 단백질의 최적발현 조건을 찾기 위해 발현온도와 배양시간을 조절하 였다. pET29b-CsNIV 재조합 플라스미드를 포함한 대장균을 600 nm의 파장에서 흡광 도가 0.5로 될 때까지 배양한 후 0.5 mM의 IPTG를 첨가하여 30℃에서 3 시간, 25℃ 에서 14 시간, 16℃에서 20 시간동안 각각 배양하였다. 단백질의 발현여부는 SDS-PAGE analysis를 이용하여 확인하였고 추가적으로 western blot analysis를 수 행하여 발현여부를 재확인하였다. 또한 최적의 발현을 보이는 온도 조건에서 발현유도 물질인 IsopropyI-2-d-thiogalactopyranoside를 다양한 농도 (0 mM, 0.1 mM, 0.3 mM, 0.5 mM)로 조절하여 발현을 유도한 후 SDS-PAGE analysis통해 확인하였다.

3. Western blot analysis

12% (w/v) SDS-PAGE gel를 내린 후 Nylon membrane에 semi-dry transfer system (Southam Warwickshire CV33 0HP, ENGLAND)을 이용하여 150 mA에서 1 시간 15분 동안 transfer하였다. western blot에는 TBS-T buffer (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.1% Tween20, pH7.5)를 사용하였다. 단백질이 transfer 된 membrane을 blocking reagent (5% skim milk가 포함된 TBS-T)에서 상온으로 1 시 간 동안 blocking한 후, membrane을 washing solution (TBS-T buffer)으로 15 분씩





3번 세척하였다. 1차 항체 (Monoclonal Anti-polyHistidine)는 10 ㎡의 TBS-T buffer 에 1:5000의 비율로 희석하여 membrane에 넣은 후 상온에서 1 시간 동안 반응시켰 다. 반응 후 membrane은 washing solution으로 15 분간 3번 세척하였고, Anti-mouse Alkaline phosphatase가 conjugation 되어있는 2차 항체를 10 ㎡의 TBS-T solution에 1:5000의 비율로 희석하여 1 시간 동안 상온에서 반응한 후, 다시 washing solution으로 15 분간 3번 세척하였다. 세척된 membrane에 검출용액 (BCIP 250 mg/ml, NBT 50 mg/ml, 100 mM Tris-HCI, 5 mM MgCl₂, pH7.5) 5㎡을 넣은 후 발색반응을 관찰하였다.

4. Cell free extract의 제조

pET29b-CsNIV 재조합 플라스미드를 포함하고 있는 대장균을 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.5로 될 때까지 배양한 후 0.5 mM의 IPTG를 첨가하여 16℃에서 20 시간 동안 배양한 후 원심분리하였다. 회수된 균체를 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0.5% Triton X - 100, pH8.0)로 2회 세척한 후 원심분리하여 다시 균체를 회수하였다. 회수된 균체 4 g에 10배 용량의 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0.5% Triton X - 100, pH8.0)로 재현탁 시킨 후, 1 unit DNaseI 와 1 mM PMSF를 첨가하여 얼음에서 30 분 방치한 후 sonicator (SONIFIER 250, Branson)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄용액은 원심분리 (15,000 x *g*, 40 분, 4℃)한 후 얻어진 상 등액을 cell free extract로 사용하였다.

5. Ni-NTA affinity column을 이용한 CsNIV 캡시드 단백질 정제

CSNIV 캡시드 단백질의 정제는 open column (10째, Bio-Rad)에 Ni-NTA resin (Ni sepharose[®] CL-6B)을 충진하여 정제하였다. Ni-NTA resin에 column의 10배 용량인 50 째의 distilled water 및 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0.5% Triton X - 100, pH8.0)를 흘려보내 column을 평형화하였다. 이 후 column에 40 째 의 soluble fraction을 흘려보내 캡시드 융합 단백질을 Ni-NTA resin에 결합시켰고, 그 후 column의 20배 용량인 200 째의 washing buffer(50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 50mM Imidazole, pH8.0)를 흘려주어 washing 하였다. 그 후 Ni-NTA resin에 Elution buffer(50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 250mM Imidazole, pH8.0)를 흘려보





내 주어 Ni-NTA resin으로부터 46 kDa의 CsNIV 캡시드 단백질을 분리 정제하였다.

제 5 절 CsNIV 캡시드 단백질의 조립

1. Dissociation과 reassociation 과정을 통한 self-assembly 유도

분리 정제된 CsNIV 캡시드 단백질 2 mg/ml을 2X dissociation buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM DTT, 20 mM EDTA, pH8.0)와 1:1의 비율로 상온 에서 1 시간 반응하여 CsNIV 캡시드 단백질을 dissociation시켰다. 그 후 dissociation 된 CsNIV 캡시드 단백질을 cut-off 10 k dialysis cassette (thermo)에 넣은 후 reassociation buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH8.0)로 4℃ 에서 2 일 동안 dialysis과정을 통해 CsNIV 캡시드 단백질을 조립시켜 CsNIV VLPs를 형성하였다.

2. Gel filtration chromatography를 이용한 VLP 조립 확인

Reassociation buffer로 dialysis를 통해 자가조립을 유도한 CsNIV VLP를 확인하기 위하여 FPLC (Bio-Rad) 기기에 Hiprep 16/60 saphacryl S-500 HR column (GE healthcare)을 결합하여 분석하였다. 20% (v/v) ethanol이 들어있는 column을 0.2 M NaOH로 0.5 째/min의 유속으로 120 ml 흘려주어 washing 하였으며, 이후 distilled H2O로 0.5 ml/min의 유속으로 120 ml 흘려주어 다시 washing하였다. 그리고 reassociation buffer (20 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 8.0)로 1.0 ml/min의 유속으로 240 ml 흘려주어 평형화 시킨 후 1 ml (2 mg/ml)의 sample을 injection 하였다. Injection 후 1.0 ml/min의 유속으로 reassociation buffer를 180 ml 흘려주었다. 처음 void volume 40 째을 제외하고 Fraction size를 2째로 하여 총 70 개의 fraction을 받으면서 그래프의 변화를 관찰하였다. 사용 후 column은 0.2 M NaOH와 distilled H₂O로 다시 washing 한 후 20% (v/v) ethanol을 채워 4 °C cold room에서 보관 하였다.





3. CsNIV VLPs의 TEM 형태 관찰

정제된 46 kDa의 CsNIV 캡시드 단백질 2 mg/ml을 2X dissociation buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM DTT, 20 mM EDTA, pH8.0)와 1:1의 비율로 상온 에 1 시간 반응시킨 후 cut-off 10 k dialysis cassette (thermo)에 넣어 reassociation buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH8.0)로 4°C 에서 2 일 동안 dialysis과정을 통해 CsNIV VLPs의 조립을 유도하였다. Gel filtration chromatography를 통해 조립되었다고 판단되는 CsNIV VLPs fraction을 한국 기초과 학지원 연구원 전자현미경부 현재경 박사님에게 TEM와 Cryo-EM을 통한 구조분석을 의뢰하였다.

제 6 절 FITC를 이용한 CsNIV 캡시드 단백질의 표지

CsNIV 캡시드 단백질 2 mg/ml에 2X dissociation buffer (20 mM Tris-HCI, 300 mM NaCl, 10 mM DTT, 20 mM EDTA, pH8.0)와 1:1의 비율로 상온에서 1 시간 반 응시킨 후에 100 mM FITC 100 μl 주입하였다. 그 후 10 K dialysis cassette (thermo)에 넣어 reassociation buffer (20 mM Tris-HCI, 300 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH8.0)로 4℃에서 2 일 동안 dialysis를 통해 CsNIV VLPs에 FITC를 표지 하였 다. 반응이 끝난 후 남아있는 잔여 FITC 제거를 위해 3.5 k centricon (sartorius)을 이용하여 농축하였다. FITC가 표지된 CsNIV VLPs를 12% (w/v) SDS-PAGE gel에 전 기영동을 수행한 후 UV lamp를 비춰 FITC의 형광을 확인하였다.

제 7 절 CsNIV VLP의 숙주특이적 흡착 관찰

CsNIV VLP의 숙주 특이성 관찰을 위해 숙주인 *C. salsuguneum*과 숙주가 아닌 *Chaetoceros* sp., *Chaetoceros grailis*, *H. circularisquama* HU9433-P, *H. akashiwo* 등의 5 종의 조류를 사용하였다. FITC가 표지된 CsNIV VLPs 100 μ (1 mg/ml)를 조 류배양액 약 400 μ 에 넣어주어 1:4의 비율로 반응시켰다. FITC가 표지된 CsNIV VLPs와 조류의 접촉횟수를 늘리기 위해 교반기를 이용하여 3 시간 동안 천천히 교반







하였다. 반응이 끝난 후 1,660 x g에서 3 분간 원심분리한 후 상등액을 제거하고 f/2 배지 500 # 에를 넣어 2 번의 washing 과정을 거쳐 잔여 FITC를 제거하였다. 그 후 조 류를 다시 f/2 배지 50 # 에 재현탁하여 형광현미경을 통해 숙주에 대한 CsNIV VLPs 의 숙주특이성을 관찰하였다. 먼저 가시광선영역을 통해 조류의 모양을 확인한 후 형 광영역을 통해 숙주에 FITC가 표지된 CsNIV VLPs의 녹색형광을 나타내는지 관찰하였 다.

실험에 사용된 해수조류배지인 f/2 배지의 조성은 다음과 같다. (L 당); 75 mg NaNO₃, 5.65 mg NaH₂PO₄·2H₂O, 4.16 mg Na₂ EDTA, 3.15 mg FeCl₃·6H₂O, 0.01 mg CuSO₄·5H₂O, 0.022 mg ZnSO₄·7H₂O, 0.01 mg CoCl₂·6H₂O, 180 mg MnCl₂·4H₂O, 0.01 mg CuSO₄·5H₂O, 0.022 mg ZnSO₄·7H₂O, 0.01 mg CoCl₂·6H₂O, 0.18 mg MnCl₂·4H₂O, 0.006 mg Na₂MoO₄·2H₂O, 0.0005 mg Cyanocobalamin (Vitamin B12), 0.1 mg Thiamine HCl (Vitamin B1), 0.0005 mg Biotin ^[39].





제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 CsNIV 캡시드 단백질 유전자 합성

규조류 *C. salsuguneum*에 감염하는 DNA 바이러스인 CsNIV는 6.0 Kb의 genome을 가지고 있으며, 6개의 *orf*가 보고되었고, 이 중 CsNIV의 캡시드 단백질을 암호화 한다 고 알려진 *orf*-3가 대장균을 이용한 expression system에 의해 발현 가능하다는 것이 확인되었다. 즉, Genbank [accession number; AB193315]로부터 그 중 캡시드 단백 질을 암호화하는 *orf*-3 유전자 정보를 바탕으로 대장균에서 발현이 가능하도록 codon optimization 시킨 후 합성하였다. 합성된 1.2 kb의 CsNIV 캡시드 유전자가 클 로닝 된 pUC57-CsNIV를 Genscript사에서 구입하였다.

제 2 절 CsNIV 유전자의 클로닝 및 발현

1. CsNIV 유전자의 클로닝

pUC57-CsNIV 플라스미드를 주형 플라스미드로 PCR반응을 수행하여 CsNIV 캡시드 단백질 유전자를 대량 증폭하였다. 1% (w/v)의 agarose gel에서 1.2 kb의 CsNIV 캡 시드 단백질 유전자 단편을 확인하였다 (Fig. 3). Clean up을 통해서 순수하게 얻은 1.2 kb의 DNA 단편을 pCR2.1 vector에 클로닝하여 얻어진 재조합 플라스미드는 염기 서열 분석을 의뢰 (MACROGEN)하여 CsNIV 유전자의 염기서열을 확인하였다. 이렇게 확인된 CsNIV 유전자는 5'-NdeI 과 3'-XhoI 말단에 있는 제한효소를 이용하여 자른 후 대장균에서 발현이 가능하며 His tag가 포함된 pET29b vector에 ligation을 수행하 였다 (Fig. 4). 이렇게 만들어진 재조합 플라스미드는 대장균 BL21(DE3)에 heat shock 방법을 이용하여 형질전환하였다.









Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of PCR amplified products of codon optimized CsNIV capsid gene.



Fig. 4. Schematic representation for construction of pET29b-CsNIV.





2. CsNIV 캡시드 단백질의 최적발현 조건 확립

pET29b-CSNIV 재조합 플라스미드가 포함된 대장균 BL21(DE3)에서의 CSNIV 캡시 드 단백질 발현을 확인하였다. 14~16 시간으로 배양한 전 배양액을 1% 접종하여 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.5로 될 때까지 배양한 다음 0.5 mM의 IPTG를 첨가 한 후 최적의 발현온도를 확인하기 위하여 30℃에서 3 시간, 25℃에서 14 시간, 16℃ 에서 20 시간의 조건으로 각각 배양하였다. 이렇게 얻어진 배양액을 원심분리 하여 균 체를 회수하고 lysis buffer를 이용하여 현탁하였다. 현탁액은 Sonicator을 이용하여 파쇄한 후 원심분리기를 이용하여 cell debris와 supernatant fraction을 분리하였다. 이렇게 분리한 각 fraction을 12% (w/v) SDS-PAGE를 통해서 발현유무와 solubility를 확인하였고 western blot analysis를 수행하여 재확인한 결과 모든 온도조건에서 발현 되는 것을 확인할 수 있었고 그 중 16℃에서 배양하였을 때 30℃, 25℃에 비해 발현 된 단백질의 solubility와 발현량이 증가함을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). Western blot analysis를 수행하여 재확인한 결과에서도 마찬가지로 16℃에서 배양하였을 때 단백질 의 solubility와 발현량이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6).

다음으로는 이렇게 얻어진 온도와 시간 조건에서 발현유도물질인 IPTG 농도에 따른 CsNIV 캡시드 단백질의 발현율을 관찰하였다. IPTG농도 (각각, 0, 0.1, 0.3, 0.5 mM) 를 처리하여 발현을 유도한 후 12% (w/v) SDS-PAGE를 통해 발현량을 확인하였다 (Fig. 7). 그 결과 0.3 mM의 이상의 IPTG 농도에서 발현량이 더 이상 증가하지 않음 을 확인하여 0.3mM의 IPTG를 최적 발현 조건으로 결정하였다.







Fig. 5. SDS-PAGE analysis of the recombinant CsNIV capsid protein expressed in *E. coli* BL21(DE3) at different temperature. (A) 16°C, (B) 25°C and (C) 30°C. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, Control (BL21(DE3) lysate); lane 2, soluble fraction; lane 3, pellet.







Fig. 6. Western blot analysis of recombinant CsNIV capsid protein expressed in *E. coli* BL21(DE3) at different temperature. (A) 16°C, (B) 25°C and (C) 30°C. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, Control (BL21(DE3) lysate); lane 2, soluble fraction; lane 3, pellet.







Fig. 7. Expression level of recombinant CsNIV capsid protein in *E. coli* BL21(DE3) at different IPTG concentration. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, Control (BL21(DE3) lysate); lane 2, No IPTG induction; lane 3, 0.1mM IPTG; lane 4, 0.3 mM IPTG; lane 5, 0.5 mM IPTG.





제 3 절 CsNIV 캡시드 단백질 정제

IPTG에 의해 발현이 유도된 재조합 대장균을 획득하여 cell free extract를 제조하였 다. 회수된 cell free extract로부터 CsNIV 캡시드 단백질을 정제하기위해 open column (5째, Bio-Rad)에 Ni-NTA resin (Ni sepharose[®] CL-6B)를 충진한 후 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0.5% Triton X - 100, pH8.0)를 흘려주어 resin을 평형화하였다. 그 후 cell free extract를 흘려준 후 washing buffer(50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 50mM Imidazole, pH8.0)를 이용해 washing하여 46 kDa의 캡시드 융합 단백질을 resin에 결합시켰다. 그 후 Elution buffer(50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 250mM Imidazole, pH8.0)를 흘려보내 Ni-NTA resin에 결합된 46 kDa의 CsNIV 캡시드 단백질을 분리 정제하였다. 각각의 단계를 거쳐 정제된 CsNIV 캡시드 단백질은 12% (w/v) SDS-PAGE와 western blot analysis를 이용하여 확인하 였다 (Fig. 8).







Fig. 8. SDS-PAGE and western blot analysis of purified CsNIV capsid protein obtained from Ni-NTA affinity column chromatography. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, Control (BL21(DE3) lysate); lane 2, soluble fraction; lane 3, fusion protein bound to Ni-NTA resin; lane 4, purified CsNIV capsid protein; lane 5, Western blot of purified CsNIV-VLP.





제 4 절 CsNIV 캡시드 단백질의 조립

1. Dissociation과 reassociation 과정을 통한 self-assembly 유도

분리 정제된 CsNIV 캡시드 단백질 2 mg/ml을 2X dissociation buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM DTT, 20 mM EDTA, pH8.0)와 1:1의 비율로 상온 에서 1 시간 반응하여 CsNIV 캡시드 단백질을 dissociation시켰다. 그 후 dissociation 된 CsNIV 캡시드 단백질을 cut-off 10 k dialysis cassette (thermo)에 넣은 후 reassociation buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH8.0)로 4℃ 에서 2 일 동안 dialysis과정을 통해 CsNIV 캡시드 단백질을 조립시켜 CsNIV VLPs를 형성하였다.

2. Gel filtration chromatography를 이용한 VLP 조립 확인

Reassociation buffer로 dialysis를 통해 자가조립을 유도한 CsNIV VLP를 확인하기 위하여 FPLC (Bio-Rad) 기기에 Hiprep 16/60 sephacryl S-500 HR column (GE healthcare)을 결합하여 분석하였다. 20% (v/v) ethanol이 들어있는 column을 0.2 M NaOH로 0.5 째/min의 유속으로 120 ml 흘려주어 washing 하였으며, 이후 distilled H2O로 0.5 ml/min의 유속으로 120 ml 흘려주어 다시 washing하였다. 그리고 reassociation buffer (20 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 2 mM CaCl2, pH8.0)로 1.0 ml/min의 유속으로 240 ml 흘려주어 평형화 시킨 후 1 ml (2mg/ml)의 sample을 injection 하였다. Injection 후 1.0 ml/min의 유속으로 reassociation buffer를 180 ml 흘려주었다. 처음 void volume 40 째을 제외하고 Fraction size를 2째로 하여 총 70 개의 fraction을 받으면서 그래프의 변화를 관찰하였다. 그 결과 fraction NO. 16~23 에서 캡시드 단백질과는 다른 사이즈의 peak를 확인 할 수 있었다.









Fig. 9. Gel filtration chromatogram of purified and self assembled CsNIV VLPs using FPLC packed with sephacryl S-500.

3. CsNIV VLPs의 TEM 형태 관찰

정제된 46 kDa의 CsNIV 캡시드 단백질 1 mg/ml을 2X dissociation buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM DTT, 20 mM EDTA, pH 8.0)와 1:1의 비율로 상온에 1 시간 반응시킨 후 cut-off 10 k dialysis cassette (thermo)에 넣어 reassociation buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 8.0)로 4°C 에서 2 일 동안 dialysis과정을 통해 CsNIV VLPs의 조립을 유도하였다. Gel filtration chromatography를 통해 조립되었다고 판단되는 CsNIV VLPs fraction을 TEM 현미경 을 통해 형태 분석하였다. 조립된 CsNIV VLPs를 negative staining 하여 TEM으로 촬 영한 결과 약 25 nm의 규칙적인 구형 또는 타원형 모양을 가진 VLPs들이 형성되는 것을 확인하였다 (Fig. 10).







Fig. 10. TEM analysis of self-assembled CsNIV VLPs.

제 5 절 FITC를 이용한 CsNIV 캡시드 단백질의 표지

CsNIV 캡시드 단백질 2 mg/ml에 2X dissociation buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM DTT, 20 mM EDTA, pH8.0)를 1:1의 비율로 첨가하여 상온에서 1 시간 반응시킨 후에 100 mM FITC 100 μl 주입하였다. 그 후 10 K dialysis cassette (thermo)에 넣어 reassociation buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH8.0)로 4℃에서 2 일 동안 dialysis를 통해 CsNIV 캡시드 단백질에 FITC를 표지하였다. FITC가 표지된 CsNIV 캡시드 단백질을 12% (w/v) SDS-PAGE를 내린 후 UV를 비춰 FITC의 형광을 확인한 결과 46 kDa의 CsNIV 캡시드 단백질에서 녹색 형광이 관찰되는 것을 확인하였다 (Fig. 11).







Fig. 11. SDS-PAGE analysis of CsNIV capsid protein labelled with FITC. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, purified CsNIV capsid protein; lane 2, CsNIV capsid protein labelled with FITC illuminated under UV illumination.





제 6 절 CsNIV VLP의 숙주 특이적 흡착 관찰

CSNIV VLP의 숙주 특이성 관찰을 위해 숙주인 *C. salsuguneum*과 숙주가 아닌 *Chaetoceros* sp., *C. grailis*, *H. circularisquama* HU9433-P, *H. akashiwo* 등의 5 종의 조류를 사용하였다 (Table 5). FITC가 표지된 CSNIV VLPs 100 μ (1 mg/ml)를 조류배양액 약 400 μ 에 넣어주어 1:4의 비율로 반응시켰다. FITC가 표지된 CSNIV VLPs와 조류의 접촉횟수를 늘리기 위해 교반기를 이용하여 3 시간 동안 천천히 교반 하였다. 반응이 끝난 후 1300 rpm에서 3 분간 원심분리한 후 상등액을 제거하고 f/2 배지 500 μ 를 넣어 2 번의 washing 과정을 거쳐 잔여 FITC를 제거하였다. 그 후 조 류를 다시 f/2 배지 50 μ 에 재현탁하여 형광현미경을 통해 숙주에 대한 CSNIV VLPs 의 숙주특이성을 관찰하였다. 먼저 가시광선영역을 통해 조류의 모양을 확인한 후 형 광영역을 통해 숙주에 FITC가 표지된 CSNIV VLPs의 녹색형광을 나타내는지 관찰하였 다. 그 결과 숙주가 아닌 *Chaetoceros* sp., *C. grailis*, *H. circularisquama* HU9433-P, *H. akashiwo*뿐만 아니라 숙주인 *C. salsugineum*에서도 녹색형광을 관찰 하지 못해 CSNIV VLPs의 숙주특이성을 확인하지 못하였다 (Fig. 12).

Table	5.	List	of	algal	host	stains	used	in	this	study	

Strain	Viral infectivity
C. salsuguneum	CsNIV
Chaetoceros sp.	-
C. grailis	-
<i>H. circularisquama</i> HU9433-P	HcRNAV34
H. akashiwo	HaRNAV

-not determined







Fig. 12. Analysis of host specific binding of CsNIV VLPs labeled with FITC to its host, *C. salsuguneum*. Non-host cells of *Chaetoceros* sp., *C.grailis*, *H. circularisquama* HU9433-P and *H. akashiwo* were also observed with optical and fluorescent microscopy.





제 4 장 결론

- CsNIV 캡시드 단백질에 관여하는 orf-3 유전자 정보를 바탕으로 대장균에서 발현 가능하도록 rare codon을 최적화시켜 유전자 합성을 하였다. 재조합에 필요한 유 전자 증폭은 pUC57-CsNIV를 주형 플라스미드로 사용하여 pET29b에 클로닝하였 다.
- 2. CsNIV 캡시드 유전자의 최적 발현조건은 0.3mM IPTG를 첨가한 후 16℃에서 20 시간 발현을 유도 하였을 때로, 46 kDa의 수용성 CsNIV 캡시드 단백질을 가장 많 이 얻을 수 있었다.
- 3. 재조합 pET29b-CsNIV에서 발현된 수용성 단백질은 Ni-NTA affinity chromatography를 통해 정제하였다.
- 4. Dissociation과 reassociation 과정을 통해 Self-assembly를 유도한 CsNIV 캡시드 단백질을 FPLC를 통해 확인한 결과, VLPs를 형성한 것으로 보이는 거대 분자의 peak를 확인하였다.
- FPLC를 통해 분리한 CsNIV VLPs fraction을 전자현미경으로 관찰한 결과 약
 25nm의 규칙적인 구형 또는 타원형 모양을 가진 VLPs들이 형성되는 것을 확인하였다.
- 6. CsNIV VLPs의 숙주 특이성을 확인하기 위해 self-assembly를 유도하는 동안 FITC 를 표지하여 SDS-PAGE를 통해 UV영역에서 녹색형광을 확인하였고, FITC가 표지 된 CsNIV VLPs를 이용하여 숙주 특이성을 관찰한 결과 숙주가 아닌 Chaetoceros sp., C. grailis, H. circularisquama HU9433-P, H. akashiwo뿐만 아니라 숙주인 C. salsugineum에서도 숙주 특이성을 확인하지 못하였다. 숙주인 C.salsugineum



의 상태가 좋지 않아 CsNIV VLPs의 숙주특이적 흡착을 확인하지 못하였다. 따라서 fresh한 숙주를 새로 분양받아 숙주특이성을 다시 확인하는 추가 실험이 필요하다.





참고문헌

1. http://portal.nfrdi.re.kr/redtide/webpage/tide/tide_01_01.jsp

2. Kim, H.G., (1997) Recent harmful algal blooms and mitigation strategies in Korea. *Ocean. Res.* **19**,185-192.

3. 김학균, (2007) 유해 적조 피해 발생과 대책, *Korean society of hazard mitigation.* pp.10.

4. 류정곤, 황기형, 김귀영, 김숙양, 박영태, (2004) 적조방제용 황토살포의 효과분 석 및 개선방안에 관한 연구. 국립수산과학원 .pp.6-11.

5. 박주석, (1995) 적조 및 오염현상과 대책. 한국환경과학회. pp.21.

6. 송병주, (2006) 한국 적조관리체제의 운영 실태와 발전방향에 관한 연구

7. <u>http://portal.nfrdi.re.kr/redtide/webpage/movie/movie_01_01.jsp</u>

8. 강호, (2008) A Feasibility Study for Red Tide Control by Electron Beam Irradiation.

9. Dedeo, M.T., Finley, D.T., Francis MB., (2011) Viral capsids as selfassembling templates for new materials. *Prog Mol Biol Transl Sci.* **103**, 353-392.

10. Baines JD., (2011) Herpes simplex virus capsid assembly and DNA packaging: a present and future antiviral drug target. *Trends Microbiol.* **19**, 606–613.

11. Kim, Y.M., Wu, Y., Ding, T. U., Ghodake, G.S., Kin, S. W., Jin, E.S., and Cho, H., (2010) Thiazolidinediones as a Novel Class of Algicides Against Red Tide Harmful Algal Species. *Appl. Biochem. Biotechnol, 162,*





2273-2283

12. Kim, Y.M., Wu, Y., Dong, T.U., Jung, S. G., Kim, S.W., Cho, H., and Jin, U.S., (2012) Algicidal activity of thiazolidinedione derivatives against harmful algal blooming species. *Mar. Biotechnol.* 14, 322-322

13. 백승호, 신현호, 장민철, 김시욱, 손문호, 조훈, 김영옥., (2012) Algicidal Effects of a Newly Developed Thiazolidinedione Derivative, TD49, on Dinoflagellate *Akashiwo sanguinea. Ocean. Res,* 34(2), 125-135

14. Poo, H.Y., Song, J.J., Hong, S.P., Choi, Y.H., Yun, S.W., Kim, J.H., Lee, S.C., Lee, S.G., Sung, M.H., (2002) Novel high-level constitutive expression system, pHCE vector, for a convenient and cost-effective soluble production of human tumor necrosis factor- α . *Biotechnology* Letters. 24: 1185-1189

15. Cabanne, C., Noubhani, A.M., Hocquellet, A., Dole, F., Dieryck, W., Santarelli, X., Purification and on-column refolding of EGFP overexpressed as inclusion bodies in Escherichia coli with expanded bed anion exchange chromatography. *Journal of Chromatography B*, 818 : 23-27

16. Jeong, K.J., Choi, J.H., Yoo, W.M., Keum, K.C., Yoo, N.C., Lee, S.Y., and Sung, M.H., (2004) Constitutive production of human leptin by fed-batch culture of recombinant *rpoS- Escherichia coli. ELSEVIER.* Vol 36, Issue 1, 150-156

17. kado, C.I., Liu, S.T., (1981) Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid. *The Journal of Bacteriology*. **145**, 1365-1373.

18. Nina, Irwin., Kaaren A, Janssen., (2011) Molecular Cloning. chapter 1, protocol 24.

19. (2011) Isolation and Characterization of a Single-Stranded DNA Virus





Infecting Chaetoceros Iorenzianus Grunow

20. (2009) Characterization of the *Chaetoceros salsugineum* nuclear inclusion virus coat protein gene

21. (2005) Previously Unknown Virus Infects Marine Diatom

22. (2012) Overexpression, purification and characterization of *Chaetoceros* salsugineum nuclear inclusion virus capsid gene

23. Rhee, J. K., M. Hovlid, J. D. Fiedler, S. D. Brown, F. Manzenrieder, H. Kitagishi, C. Nycholat, J. C. Paulson, and M. G. Finn.. (2011) Colorful virus-like particles: fluorescent protein packaging by the Qbeta capsid. *Biomacromolecules.* 12:3977-3981.

24. Brasch, M., A. de la Escosura, Y. Ma, C. Uetrecht, A. J. Heck, T. Torres, and J. J. Cornelissen., (2011) Encapsulation of phthalocyanine supramolecular stacks into virus-like particles. *J Am Chem Soc.* 133:6878-6881.

25. Bruinsma, R. F., W. M. Gelbart, D. Reguera, J. Rudnick, and R. Zandi., (2003) Viral self-assembly as a thermodynamic process. *Phys Rev Lett* 90:248101.

26. Chuan, Y. P., Y. Y. Fan, L. H. Lua, and A. P. Middelberg., (2010) Virus assembly occurs following a pH- or Ca2+-triggered switch in the thermodynamic attraction between structural protein capsomeres. *J R Soc Interface* 7:409-421.

27. Lavelle, L., M. Gingery, M. Phillips, W. M. Gelbart, C. M. Knobler, R. D. Cadena-Nava, J. R. Vega-Acosta, L. A. Pinedo-Torres, and J. Ruiz-Garcia., (2009) Phase diagram of self-assembled viral capsid protein polymorphs. *J Phys Chem* B 113:3813-3819.





28. Mauracher, C. A., S. Gillam, R. Shukin, and A. J. Tingle., (1991) pH dependent solubility shift of rubella virus capsid protein. *Virology* 181:773-777.

29. Newcomb, W. W., F. L. Homa, D. R. Thomsen, Z. Ye, and J. C. Brown., (1994) Cell-free assembly of the herpes simplex virus capsid. *J Virol* 68:6059-6063.

30. Ruigrok, R. W., E. A. Hewat, and R. H. Wade. (1992) Low pH deforms the influenza virus envelope. *J Gen Virol* 73 (Pt 4):995-998.

31. Han, M. Y., (2001) A theoretical consideration of algae removal with clays. *Microchemical Journal* 68. 157-161.

32. Hardy, E., E. Martinez, D. Diago, R. Diaz, D. Gonzalez, and L. Herrera. (2000) Large-scale production of recombinant hepatitis B surface antigen from Pichia pastoris. *J Biotechnol* 77:157-167.

33. Ishizu, K. I., H. Watanabe, S. I. Han, S. N. Kanesashi, M. Hoque, H. Yajima, K. Kataoka, and H. Handa., (2001) Roles of disulfide linkage and calcium ion-mediated interactions in assembly and disassembly of viruslike particles composed of simian virus 40 VP1 capsid protein. *J Virol* 75:61-72.

34. Giannini, S. L., E. Hanon, P. Moris, M. Van Mechelen, S. Morel, F. Dessy, M. A. Fourneau, B. Colau, J. Suzich, G. Losonksy, M. T. Martin, G. Dubin and M. A. Wettendorff., (2006) Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine* 24:5937–5949.

35. Man CHANG, W.-S. K., Jin-Hwan Lee. 1995. Phytoplankton Blooms in the Coastal Waters of Korea - Red Tides in Masan and Chinhae Bays.





Ocean Research 17(2) ; 137-156

36. Nagasaki, K., (2008) Dinoflagellates, Diatoms, and Their Viruses. *The Journal of Microbiology* Vol. 46, No. 3.

37. Nagasaki, K., (2010) Isolation of viruses infecting photosynthethic and nonphotosynthetic protisis. *MAVE* 92-101.

- 38. P. J. Harrison, P. A. Thompson, M. Guo, F. J. R. Taylor, (1993) Effects of light, temperature and salinity on the growth rate of harmful marine diatoms, *Chaetoceros convolutus* and *C. concavicornis* that kill netpen salmon. *Journal of Applied Phycology* 5: 259–265
- 39. M. L. kent, J. N. C. whyte, C. LaTrace, (1995) Gill lesions and mortality in seawater pen-reared Atlantic salmon Salmo salar associated with a dense bloom of *Skeletonema costatum* and *Thalassiosira* species. *Dis Aquat Org.* Vol. 22: 77-81

