



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2015年 2月
碩士學位 論文

적조유발 편모조류
*Heterosigma akashiwo*에
감염하는 HaRNAV의
바이러스 유사입자 형성

朝鮮大學校 大學院

신재생에너지융합학과

정 해 광

적조유발 편모조류
*Heterosigma akashiwo*에
감염하는 HaRNAV의
바이러스 유사입자 형성

Formation of virus-like particles of HaRNAV
infecting *Heterosigma akashiwo*,
a flagellate causing harmful algal blooming

2015年 2月 25日

朝鮮大學校 大學院

신재생에너지융합학과

정 해 광

적조유발 편모조류
*Heterosigma akashiwo*에
감염하는 HaRNAV의
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

정 해 광

정해광의 工學碩士學位 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 教授 이 현 화 印

委 員 朝鮮大學校 教授 김 시 욱 印

2014年 11月

朝鮮大學校 大學院

TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS	I
LIST OF TABLES	III
LIST OF FIGURES	IV
Abstract	VIII
제 1 장 서 론	1
제 1 절 연구배경	1
1. 적조현상	1
2. 국외 적조 발생 및 피해 현황	3
3. 국내 적조 발생 및 피해 현황	4
제 2 절 연구목적	7
제 2 장 실험 재료 및 방법	11
제 1 절 HaRNAV VLP 유전자 클로닝	11
1. HaRNAV VLP 유전자 합성	11
2. 플라스미드 및 제한효소	11
3. 사용 배지 및 균주 배양 조건	13
4. Competent cell 제조	13
5. HaRNAV VLP 유전자 클로닝	14
가. 시약 및 기기	14
나. HaRNAV VLP 유전자 증폭	14
다. 유전자 단편 TA 클로닝	15
라. 플라스미드 정제 및 염기서열 확인	16
마. 제한효소 처리와 DNA 단편의 분리	16
바. Ligation 및 형질전환	17

사. 형질 전환된 균체로부터 플라스미드 확인	17
아. 균주의 보관	18
제 2 절 HaRNAV VLP 단백질 발현	18
1. HaRNAV VLP 단백질의 발현 및 정제를 위한 최적 배터 선정	18
2. 배양온도에 따른 단백질 발현 조건 탐색	18
3. IPTG 농도에 따른 단백질 발현 조건 탐색	19
4. 최적화 조건에서의 단백질 발현 유도 및 cell free extract 제조	19
5. SDS-PAGE를 이용한 단백질 발현 확인	20
제 3 절 HaRNAV VLP 단백질 분리/정제	20
1. TEV protease 정제	20
2. Affinity chromatography을 이용한 HaRNAV VLP 단백질 정제	21
가. 재조합 pCold-TF HaRNAV VLP 단백질 정제	21
나. TEV protease를 이용한 VLP 단백질의 정제	22
(1) TEV protease를 이용한 융합 단백질의 최적 Cleavage 조건 탐색	22
(2) TEV protease 처리 후 Ni-NTA을 이용한 VLP 단백질의 정제	22
3. Gel filtration을 이용한 HaRNAV VLP 단백질 정제	22
제 4 절 HaRNAV VLP의 자가조립	23
1. Dialysis를 통한 자가조립 유도	23
2. TEM 분석을 통한 HaRNAV VLP의 구조 확인	24
제 5 절 HaRNAV capsid protein 숙주 특이성	24
1. HaRNAV vp1, vp2, vp3 의 FITC 표지	24
가. HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3 각각에 FITC 표지	24
나. HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3의 자가 조립 유도 후 FITC 표지	24
2. 형광 현미경을 통한 FITC가 표지된 HaRNAV VLP의 숙주 특이성 관찰	25
가. HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3 각각의 숙주 특이성 관찰	25

나. HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3의 자가 조립 유도 후 숙주 특이성 관찰	25
제 3 장 결과 및 고찰	28
제 1 절 HaRNAV VLP 유전자 합성	28
제 2 절 재조합 HaRNAV VLP 유전자 클로닝	32
제 3 절 재조합 HaRNAV VLP 단백질 발현	34
1. HaRNAV VLP 단백질의 발현 및 정제를 위한 최적 배터 선정	34
2. 배양온도에 따른 최적의 단백질 발현 조건 확립	39
3. IPTG 농도에 따른 최적의 단백질 발현 조건 확립	41
제 4 절 HaRNAV VLP 단백질 분리/정제	43
1. TEV protease 정제	43
2. Affinity chromatography을 이용한 HaRNAV VLP 단백질 정제	44
가. 재조합 pCold-TF HaRNAV VLP 단백질 정제	44
나. TEV protease를 이용한 VLP 단백질의 정제	45
(1) TEV protease를 이용한 융합 단백질의 최적 Cleavage 조건 탐색	45
(2) TEV protease 처리 후 Ni-NTA을 이용한 VLP 단백질의 정제	46
3. Gel filtration을 이용한 HaRNAV VLP 단백질 정제	47
제 5 절 자가 조립 유도를 통한 HaRNAV VLP의 구조 관찰	50
1. Dialysis를 통한 자가 조립 유도	50
2. TEM 분석을 통한 HaRNAV VLP 구조 확인	52
제 6 절 HaRNAV VLP의 숙주 특이성	53
1. HaRNAV vp1, vp2, vp3 의 FITC 표지	53
가. HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3 각각에 FITC 표지	53
나. HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3의 자가 조립 유도 후 FITC 표지	54

2. 형광 현미경을 통한 FITC가 표지된 HaRNAV VLP의 숙주 특이성 관찰	55
가. HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3 각각의 숙주 특이성 관찰	55
나. HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3의 자가 조립 유도 후 숙주 특이성 관찰	57
 제 4 장 결 론	 59
 참고문헌	 61

List of Tables

Table 1. List of harmful algal species, syndrome and affected areas (data were collected from statistical analysis of HAB in various country)	2
Table 2. Physical, chemical and biological methods and mechanisms for control of HAB	8
Table 3. Classification of <i>H. akashiwo</i> RNA Virus	10
Table 4. List of plasmid used in this study	12
Table 5. List of <i>E. coli</i> host strain used in this study and its genotypes	13
Table 6. List of primers used in this study	15
Table 7. PCR mixture composition for amplification of HaRNAV vp	15
Table 8. Composition of F/2 algal culture medium (mg/ℓ)	27
Table 9. Host algal species used in this study	27

List of Figures

Fig. 1. The area damaged by harmful algal blooming in South Korea (1983~2010)	5
Fig. 2. Economic losses (fish/shellfish death) in the aquaculture industry caused by HABs in Korea over three decades	6
Fig. 3. Nationwide distribution of <i>H. akashiwo</i> causing HABs in South Korea (2001 to 2010)	9
Fig. 4. Electron micrography of HaRNAV particles (A), 3D structure of <i>H. akashiwo</i> RNA viral capsid proteins (B)	10
Fig. 5. Schematic representation of HaRNAV polyprotein containing VP1, VP2 and VP3	28
Fig. 6. Multiple sequence alignment of original and codon optimized HaRNAV vp1 (A), vp2 (B) and vp3 (C)	31
Fig. 7. PCR amplified product of codon optimized capsid gene (A) and cloned product of pCold-TF vector with capsid gene (B)	33
Fig. 8. Construction of pCold-TF vp1, pCold-TF vp2 and pCold-TF vp3	33
Fig. 9. Expression of recombinant pHCE-IA vp1, vp2 and vp3	36
Fig. 10. Expression of recombinant pET30a vp1, vp2 and vp3	36
Fig. 11. Expression of recombinant pET30a-Intein vp1, vp2 and vp3	37
Fig. 12. Expression of recombinant pGEX-4T-1 vp1, vp2 and vp3	37
Fig. 13. Expression of recombinant pMAL-c5x vp1, vp2 and vp3	38
Fig. 14. Expression of recombinant pET-SUMO vp1, vp2 and vp3	38
Fig. 15. Effect of temperature on the expression level of the recombinant pCold-TF vp1 (A), vp2 (B) and vp3 (C)	40
Fig. 16. Effect of IPTG concentration on expression of recombinant	

pCold-TF vp1, vp2 and vp3	42
Fig. 17. Purification of the TEV protease using Ni-NTA affinity chromatography	43
Fig. 18. Purification of the pCold-TF vp1 (A), pCold-TF vp2 (B) and pCold-TF vp3 (C)	45
Fig. 19. SDS-PAGE of TEV protease-cleaved proteins from fusion protein	46
Fig. 20. SDS-PAGE analysis of TEV protease treated capsid proteins after elution through Ni-NTA affinity chromatography	47
Fig. 21. Gel filtration chromatogram of vp1 (A), vp2 (B) and vp3 (C)	49
Fig. 22. SDS-PAGE analysis of individual fusion protein and mixture (pCOLD-TF vp1, pCOLD-TF vp2 and pCOLD-TF vp3) before and after TEV protease treatment	51
Fig. 23. Gel filtration chromatogram of fusion protein mixture (pCOLD-TF vp1, pCOLD-TF vp2 and pCOLD-TF vp3) after TEV protease treatment process	51
Fig. 24. SDS-PAGE analysis of high molecular weight peak samples obtained from FPLC gel filtration chromatography (fraction Nos. 15-20)	52
Fig. 25. Transmission electron microscopic analysis of negative stained HaRNAV VLPs. Self-assembled amorphous particles of HaRNAV VLPs. reassociation (A), dissociation/reassociation (B)	53
Fig. 26. SDS-PAGE (A) and SDS-PAGE - UV light (B) analysis of FITC labelled individual pCold-TF vp1, vp2 and vp3	54
Fig. 27. SDS-PAGE and SDS-PAGE - UV light analysis of FITC labelled pCold-TF vp1, vp2 and vp3 mixture	55
Fig. 28. Host specificity analysis of individual FITC labelled vp1, vp2 and vp3 against <i>H. akashiwo</i> (NEPCC 102) under fluorescence microscopy (a).	

No filter, (b). Red filter and (C). Green filter57

Fig. 29. Host specificity analysis of FITC labelled VLP against *H.akashiwo* (NEPCC 102) under fluorescence microscopy (a). No filter, (b). Red filter and (C). Green filter58

ABSTRACT

Formation of virus-like particles of HaRNAV infecting *Heterosigma akashiwo*, a flagellate causing harmful algal blooming

Jung Hae Gwang

Advisor : Prof. Kim Si Wouk, Ph.D.

Department of Renewable Energy Convergence

Graduate school of Chosun University

In order to control harmful algal bloom that causes red tide, we made an attempt to express and purify viral capsid protein genes from viruses, which isolated from harmful algae. The recombinantly expressed VLPs of HaRNAV (specifically infect and kill the flagellated *H. akashiwo*) is considered as algaecide. The HaRNAV is T-pseudo3 icosahedronal shape, which consists of three structural capsid proteins such as vp1, vp2 and vp3.

The structural gene sequences that encoding HaRNAV capsid proteins

were obtained from Genebank (NCBI). These sequences were chemically synthesized with *E. coli* codon preferences, then cloned into pUC57 vector and then expressed in *E. coli* BL21 (DE3) host. The VLP genes were cloned into various expression vectors such as pET30a, pET30a-intein, pTXB1, pGEX-4T-1, pMAL-c5x, pET-SUMO and pHCE-IA. These expression vectors possess few drawbacks during cloning, expression, purification and cleavage process. To avoid these problems, the VLPs-TEV protease genes were cloned into pCOLD-TF expression vector, which contains the following specialized genes such as 6xHis (Ni-NTA purification), TF chaperone (increase proper folding and increasing the solubility of the VLPs on N-terminal end) and also other protease genes (Thrombin, FactorXa, HRV3C protease). After cloning, the expression vector also containing TEV protease gene, which helps to cleave the desired VLPs from pCOLD-TF VLPs. The maximum HaRNAV capsid production was obtained at 15°C in 24h incubation. All the VLPs were purified using Ni-NTA affinity column chromatography. From the SDS-PAGE analysis, it was revealed that the expression systems are capable to produce significant level of VLPs. The molecular weight of TF-vp1, TF-vp2 and TF-vp3 was found to be 82, 72 and 77 kDa, respectively.

In addition, TEV protease was produced using recombinant *E. coli* grown at 37°C and then 0.3 mM IPTG induction was performed. Then the culture was grown at 16°C for 20h. After incubation, the supernatant was collected and used for TEV protease purification using Ni-NTA column and FPLC. The fractions obtained from FPLC were analyzed using 12% SDS-PAGE and the molecular weight of TEV protease was found to be 27 kDa. Finally, the protease was concentrated to 1 mg/ml and stored at

-80°C until further use.

To obtain the desired VLPs, the fusion protein (1 mg/ml) and TEV protease (1mg/ml) optimum ratio for vp1, vp2 and vp3 was found to be 200:1, 50:1 and 10:1, respectively. This mixture was incubated at 30°C for 2 h. After incubation, the products were analyzed using 12 % SDS-PAGE. From the results, it was confirmed that the pCOLD-TF vp1 was not completely cleaved. However, the latter two was completely cleaved under the optimum condition. In order to further purification, a number purification techniques were used including Ni-NTA affinity, size exclusion and ion exchange chromatography. The eluted samples were analyzed using 12% SDS-PAGE. From the results, it was observed that no significant and complete purification of VLP.

However, the Ni-NTA affinity chromatographically purified pCold-TF vp1, pCold-TF vp2 and pCold-TF vp3 fusion proteins eluted and dialysed to remove imidazole. All three fusion proteins were mixed to induce self-assembly of vp1, vp2 and vp3 under controlled conditions (fusion protein:TEV protease - 10:1). The formed fusion protein complex was treated with TEV protease at aforementioned conditions. Then the cleaved products were separated by FPLC using sephacryl S-500 packing column. The high molecular weight fractions were collected and analysed using 12% SDS-PAGE. These induced self-assembled VLPs morphology was found to be amorphous structures under TEM analysis.

To find out the host specificity binding efficiency of VLPs with host recognition site with the individual vp-FITC and self assembled VPLs-FITC were tested against various host species such as *Heterosigma akashiwo* (NEPCC 102), *Heterosigma akashiwo* (NEPCC 522), *Chattonella marina* (KMMCC579) and *Gyrodinium aurelum* (KMMCC 978).

The host specificity of FITC fluorescence labeled HaRNAV VLPs were analysed under fluorescence microscopy. From the individual vp-FITC host specificity analysis, there is no significant host binding efficiency was found. In addition, the induced and self-assembled VLPs-FITC also not found host specific binding with the aforementioned algal cells.

제 1 장 서 론

제 1 절 연구배경

1. 적조현상

적조 (red tide) 란 해양에서 식물성 플랑크톤이 번식하기에 알맞은 환경을 만나 대량 번식한 결과 이들이 가지고 있는 다양한 색소로 인하여 해수의 색깔이 변화하는 것을 말한다. 또한 물색이 변화되지 않는 낮은 유기물 농도에서도 발생하여 수산생물과 사람에게 피해를 주는 적조 현상을 유해적조대증식 (Harmful algal blooms, HABs)라고 한다^[1]. 일반적으로 하나 또는 소수의 식물성 플랑크톤 종이 포함되어 있으며 일부 적조는 색소 세포의 고밀도화에 따른 물의 변색에 의해 인식될 수 있다. 흔히 녹색, 갈색 또는 적색으로 변하게 될 때 녹조, 갈조, 적조라 부르며 통칭 적조라 부른다. 적조를 일으키는 생물은 편모조류 (Flagellates)나 규조류 (Diatom)가 대부분이나, 유글레나류 (Euglenoids)나 원생동물 (Protozoa)인 섬모충류 (Cibites)도 적조를 유발한다. 질소나 인과 같은 영양염류의 유입, 높은 일조량 그리고 잔잔한 물의 흐름 등에 의해 조류는 빠르게 증식한다. 적조를 일으키는 조류 중 특정 조류들은 다른 생물에 피해를 주는 독소를 생산하는 능력을 가지고 있으며 (Table 1.) 적조로 인한 피해는 다양하다^[1-3]. 적조 생물들이 가지고 있는 독소가 패류에 농축되어 이를 먹을 경우 마비현상이 나타나거나 심하면 사망하게 된다. 또한 독을 가진 플랑크톤에 의해 어류가 폐사하기도 하며, 적조 생물의 점액질이 어류의 아가미에 끼여 호흡장애를 유발하기도 한다. 그리고 표층수에서 이상 증식된 적조 생물들의 사체는 해저로 침강하여 분해되면서 많은 양의 용존산소를 일시에 소모하게 되므로 수온약층이 발달 한 여름철에는 저층수의 산소 고갈을 초래한다. 무산소 또는 저산소 환경은 어류와 저서생물에게 치명적이므로 저서생태계가 파괴될 뿐만 아니라 우리나라와 같이 양식장이 밀집되어 있는 지역에서는 양식생

물의 대량 폐사를 초래하기도 한다. 또한 먹이사슬을 통해 동물성 플랑크톤, 갑각류, 물고기, 조류, 포유동물 그리고 심지어는 인간의 삶에 직·간접적인 영향을 주고 있다^[2].

Table 1. List of harmful algal species, syndrome and affected areas (data were collected from statistical analysis of HAB in various country)^[26]

Causative Organism	Syndrome	Affected Areas
<i>Alexandrium</i> spp.	Paralytic shellfish poisoning (PSP)	U.S. west coast including Alaska, New England coastal states, Canada, Chile, Brazil, Europe, South Africa, Asia, Australia, New Zealand
<i>Dinophysis</i> spp.	Diarrhetic shellfish poisoning (DSP)	Europe, Japan, Atlantic Canada, South Africa, Chile, Thailand, New Zealand, Australia
<i>Gambierdiscus toxicus</i>	Ciguatera fish poisoning (CFP)	Hawaii, Gulf of Mexico, Puerto Rico, Caribbean, Australia, many Pacific islands
<i>Gymnodinium catenatum</i>	Paralytic shellfish poisoning (PSP)	U.S. west coast, New England coastal states, Canada, Chile, Brazil, Europe, South Africa, Asia, Australia, New Zealand
<i>Karenia brevis</i> and <i>Karenia brevisulcatum</i>	Neurotoxic shellfish poisoning (NSP)	U.S. Gulf coast, New Zealand
<i>Karlodinium veneficum</i>	fish kills	U.S. mid Atlantic coast, US southeast coast, US Gulf coast, Australia, South Africa
<i>Prorocentrum lima</i>	Diarrhetic shellfish poisoning (DSP)	Europe, Japan, Atlantic Canada, South Africa, Chile, Thailand, New Zealand, Australia
<i>Protoperdinium crassipes</i>	Azaspiracid shellfish poisoning (AZP)	England, Scotland, Ireland, France, Spain, Morocco, Norway
<i>Pyrodinium bahamense</i> var. <i>compressum</i>	Paralytic shellfish poisoning (PSP)	U.S. west coast including Alaska, New England coastal states, Canada, Chile, Brazil, Europe, South Africa, Asia, Australia, New Zealand
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Fish kills	South Korea, Puget Sound, British Columbia, Chile, Scotland, Spain, Japan, China, Tasmania, New Zealand
<i>Karlodinium veneficum</i>	fish kills	U.S. mid Atlantic coast, US southeast coast, US Gulf coast, Australia, South Africa

2. 국외 적조 발생 및 피해 현황

수십 년 전에 상대적으로 적은 국가가 HABs에 의해 영향을 받는 것으로 나타났지만 지금은 대부분의 국가들의 연안에 광범위한 지역에 걸쳐 HABs에 대한 위협을 받고 있다^[3]. 이들 해역에서 적조를 일으키는 원인 생물을 보면 일본연안에서는 *Karenia mikimotoi*, *Noctiluca scintillans*, *Chattonella antiqua* 그리고 *Heterosigma akashiwo*, 동남아 연안수역에서는 *Gymnodinium aureolum* 그리고 북아메리카 연안에서는 *Karenia brewis*, *H. akashiwo* 등이 고밀도 적조를 일으킴으로써 국가별 수산업 및 생태계에 막대한 피해를 발생시키고 있다.

1994년 남아프리카의 서쪽 해안에 있는 St. Helena Bay에서 *Prorocentrum micans* 와 *Ceratium furca* 종의 대량번식으로 인해 수중의 용존 산소량 저하와 황화수소의 생성으로 인한 어류의 폐사가 발생하였다. 일본에서는 1960년대부터 세토내해에서 적조피해가 빈발하였고 1970년대와 1980년대에는 세토내해를 중심으로 연간 200~300여건의 적조가 발생하였으며 90년대에는 100여건의 적조가 발생하고 있다. 수산피해를 가장 많이 일으키는 적조생물은 편모조류인 *Chattonella*와 *Gymnodinium*종이며 *Cochlodinium* 종이 2000년 일본 구마모토현에서 39억 9천만 엔의 수산피해를 일으켰다. 미국의 경우, 캘리포니아 연안 및 멕시코만에서 여름철에 적조현상을 일으키는 주요 원인생물은 와편모조류 (Dinophyta)에 속하는 *Gymnodinium* spp.이다. 특히 1988년부터 어류폐사와 함께 인체에 피해 (호흡기 장애)를 일으키는 *Pfiesteria piscicida*이 출현하여 사회적 문제가 되었다. 중국의 경우 1990년 6월 후지안성 웨이토우만 연안에서 *Cochlodinium* sp.에 의한 적조가 발생하였으며 1988년 홍콩에서 *k. mikimotoi*의 발생으로 2000 억원 이상의 대규모 피해가 발생한 것으로 보고되었다. 또한 인도네시아와 말레이시아 등 동남아시아 국가 연안에서도 패독 적조생물에 의한 적조 발생과 중독사고가 발생하고 있으며, 2005년 이후부터는 필리핀 등 연안에서도 *Cochlodinium polykrikoides*에 의한 적조가 발생하여 수산피해를 일으키고 있는 실정이다. 세계 연안 국가들은 연안환경과 수산생물 그리고 인간의 건강을 적조현상과 패독 현상으로부터 지키기 위해 다양한 조사와 연구를 실시하고 있으며 막대한 수산피해를 일으키는 적조의 발생 기구

구명과 방제기술 개발을 위해 활발한 연구가 진행되고 있다.

3. 국내 적조 발생 및 피해 현황

우리나라에서는 1960년대부터 시작된 산업 활동의 증가와 경제 발달에 따라 연안 수역이 부영양화 됨으로써 1980년대 이후로 식물플랑크톤의 대량발생에 의한 적조현상의 빈도가 두드러지게 증가해왔다^[4]. 적조는 연안 환경 및 생태계에 대한 악영향, 심미적 불쾌감 등을 초래할 뿐만 아니라, 90년대 이래로 적조의 주원인생물이 수산생물과 인간에 유해 유독한 외편모조류로 변화되면서 양식장 등 수산업에 큰 피해를 입혀왔다^[10] (Fig 2.)

지난 5년 동안 연평균 960만 톤의 어류가 양식되었는데 양식장 중 75%는 수산양식장, 25 %는 내륙 양식장으로 구성되어 있고 주로 조피볼락 (rockfish), 참돔 (red sea bream), 가자미 (flatfish), 감성돔 (black porgy) 그리고 파랑비늘돔 (돌돔, parrot fish)가 양식되고 있다. 1981년 HABs에 의한 첫 번째 어류 폐사가 보고되었고 이 때 주 발생 종은 *K. mikimotoi*로 보고되었으며, 약 18억 원의 손실을 입었고 뒤따라 1992년 *Gyrodinium sp.* 에 의해 약 54억 원의 손실을 입었다. 특히, 1995년 *C. polykrikoides*에 의한 적조는 그 해 양식되는 어류의 10 %에 손실을 입혔고 764 억원의 기록적인 수산피해를 입히면서, 매년 여름 우리나라 남해안에서 발생하고 있다. 비록 2008 ~ 20011년 까지 국내의 현저한 피해는 없었지만, 무독성 외편모조류인 *Akashiwo sanguinea*는 2011년 11월 남동부 해안의 100 km² 면적에 3000 cells/ml로 최대 발생했다. *A. sanguinea*는 5월부터 12월에 걸쳐 주로 남해안에 발생하며 2011년의 발생은 지난 10년간 최대로 기록되었다. 다음 해인 2012년, 7월 27일부터 통영시 미륵도 서남측 해역과 전남 붓돌바다 북부해역에서 발생한 것을 시작으로 *C. polykrikoides*에 의한 적조는 10월 24일까지 3달가량 확산되어 우리나라 연안 양식업에 큰 피해를 입혔다. 우리나라의 지역별 적조발생 현황을 살펴보면 주로 여수-통영-거제지역의 남해안에서 유해성 적조가 발생하고 있다 (Fig 1). 남해안은 바닷물이 잔잔하고 수중이 안정되었으며 낙동강 등의 지상에서 고농도의

유기 물질이 유입돼 적조가 발생하기 좋은 조건을 갖추고 있기 때문이다. 또한 산업공단이 많이 들어서 있으며 이로 인해 수질 오염 및 부영양화가 가속화되고 해수 온도가 20℃ 정도에 이르며 수심이 얇고 섬들이 많아 해류의 영향을 적게 받기 때문에 적조현상이 주로 발생한다. 반면 동해안은 수심이 깊고 먼 바다의 물과 가까운 바닷물의 교류가 빠르는데다 수온이 낮은 이유로 남해안에 비해 자주 발생하지 않는 편이다. 하지만, 최근 해수온도 상승으로 간헐적으로 적조현상이 나타난다.

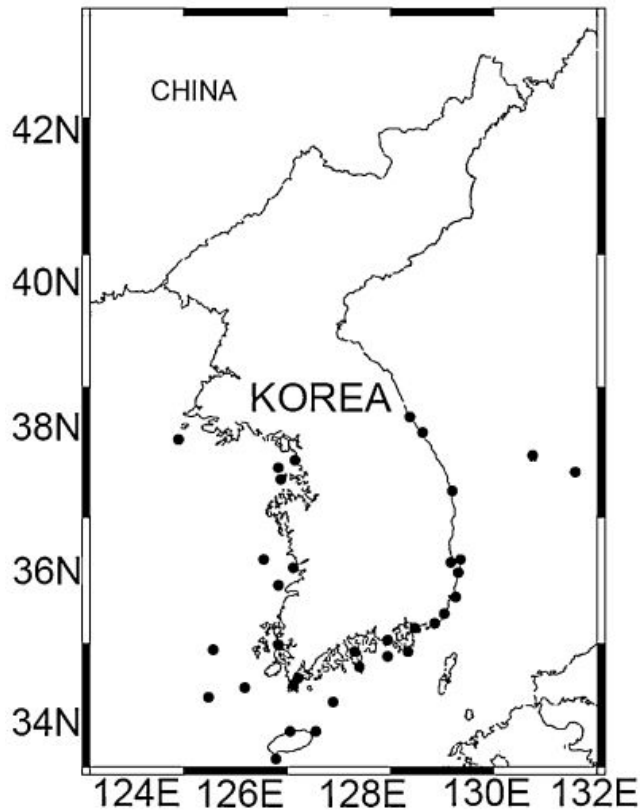


Fig. 1. The area damaged by harmful algal blooming in South Korea (1983~2010)^[4].

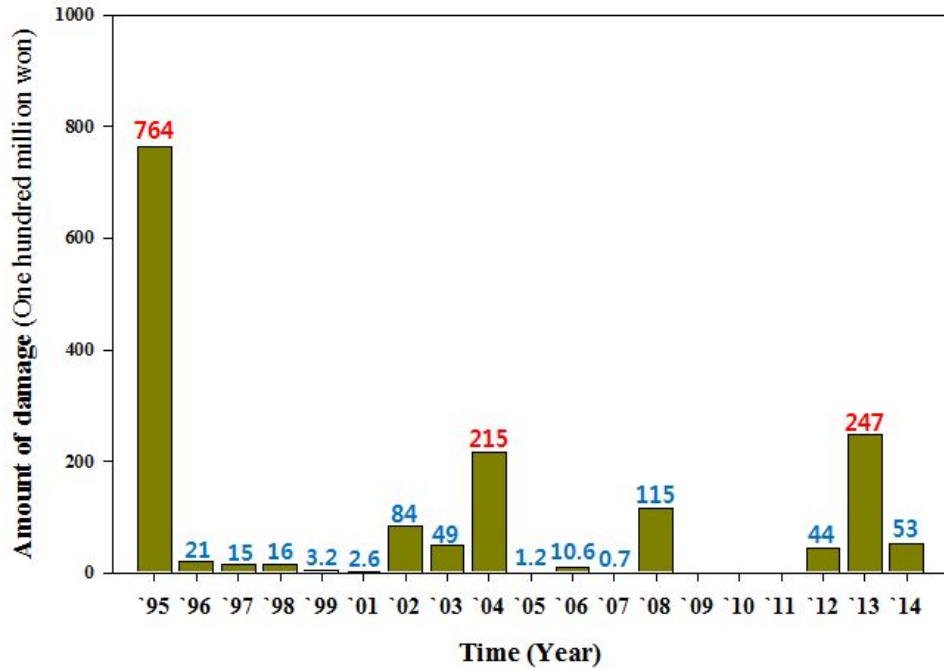


Fig. 2. Economic losses (fish/shellfish death) in the aquaculture industry caused by HABs in Korea over three decades ^[4].

제 2 절 연구목적

적조현상을 제어하기 위한 방법으로 다양한 물리적, 화학적, 생물학적 제어 기술들이 존재한다^[5-8] (Table. 2). 우리나라에서는 적용된 일부 적조 완화 기술 중에서도 황토는 실용적인 최고의 방법으로 인식되어 1996년부터 황토 살포를 시작하였다. 하지만 황토에는 여러 미량 금속이 함유되어있어 오히려 적조 증식을 촉진할 수 있다는 문제와 황토가 바다 밑에 쌓이면서 펄이 숨 쉬지 못해 산소 부족으로 인한 어패류의 폐사 가능성, 또 조류 및 다양한 유기물이 흡착된 황토가 침전되어 부패되는 등 2차 오염을 일으킬 수 있다는 문제가 제기되고 있다^[8-9]. 최근 위와 같은 유해조류제어 방법들에 대한 다양한 한계를 극복하기 위해 본 연구에서는 조류에 감염하는 바이러스를 이용하여 담수 및 해양생태계에 전혀 영향을 미치지 않으면서 식물성 플랑크톤 가운데 적조를 유발하는 유해조류에만 선택적으로 흡착하여 살조시키는 생물학적 방법을 이용해 유해조류를 효과적으로 제어하고자한다^[21]. 바이러스의 capsid 단백질만을 발현시켜 정제한 VLP는 바이러스의 유전정보가 제거되어 숙주 내에서 분열이 불가능하기 때문에 지속적인 감염성을 갖지 못하고 질병을 유발할 수 없다. 또 VLP는 백신으로 응용 할 수 있고 VLP의 경우 genome이 제거된 형태이기 때문에 이 빈 공간에 다른 특정한 물질을 탑재 할 수 있어 drug delivery carrier로서의 기능을 할 수도 있다^[11-12].

본 연구에 사용한 조류 *H. akashiwo*는 Raphidophyceae(침편모조강)에 속하는 황갈색의 소형 편모조류로 적조를 일으키는 종이다^[12]. 우리나라에서는 자주 발생하지 않지만 급성 또는 만성 독성을 가지고 있어 어패류의 폐사를 야기하는 종이기 때문에 연구가 필요하다. *Heterosigma akashiwo* RNA virus는 유해조류 *H. akashiwo*에 특이적으로 감염하는 바이러스로 capsid 단백질이 소단위인 vp1, vp2 그리고 vp3 3개로 정20면체 구조를 이루고 있다^[14-17] (Fig. 4). 본 연구는 HaRNAV의 capsid 단백질을 *Escherichia coli*를 이용하여 발현 및 정제하고 각 소단위의 숙주 인지 부위 확인하고자 한다. 또한 자가 조립 등 특성을 파악하고 capsid 단백질 내부에 화학 물질을 탑재하는 drug delivery carrier로서의 역할을 할 수 있게 함으로써 유해

조류를 제외한 다른 해양환경이나 생명체에 미치는 영향을 최소화 하고 적조 유발 유해조류에만 선택적으로 흡착하는 기술을 개발하는데 목적을 두고 있다.

Table 2. Physical, chemical and biological methods and mechanisms for control of HAB

	method		mechanism
physical methods	removal of organisms		filtration, skimming, centrifugation
	Ultrasound		cell lysis
	electrolysis		cell lethality
	Ozonation		neutralization
	clay	bentonite	flocculation, sedimentation
kaolinite			
zeolite			
chemical methods	algicides		biocide
	alum		flocculation (phosphorus control)
	barley straw		release of inhibitory compounds
	polyaluminum chloride		flocculation (phosphorus control)
Biological methods	Bacterial pathogen		high host specificity, rapid proliferation of pathogen
	parasite		high host specificity, rapid proliferation of pathogen
	Grazers		moderate specificity, natural predator
	algicidal bacteria		direct physical contact, leading to cell lysis release of algicidal compounds

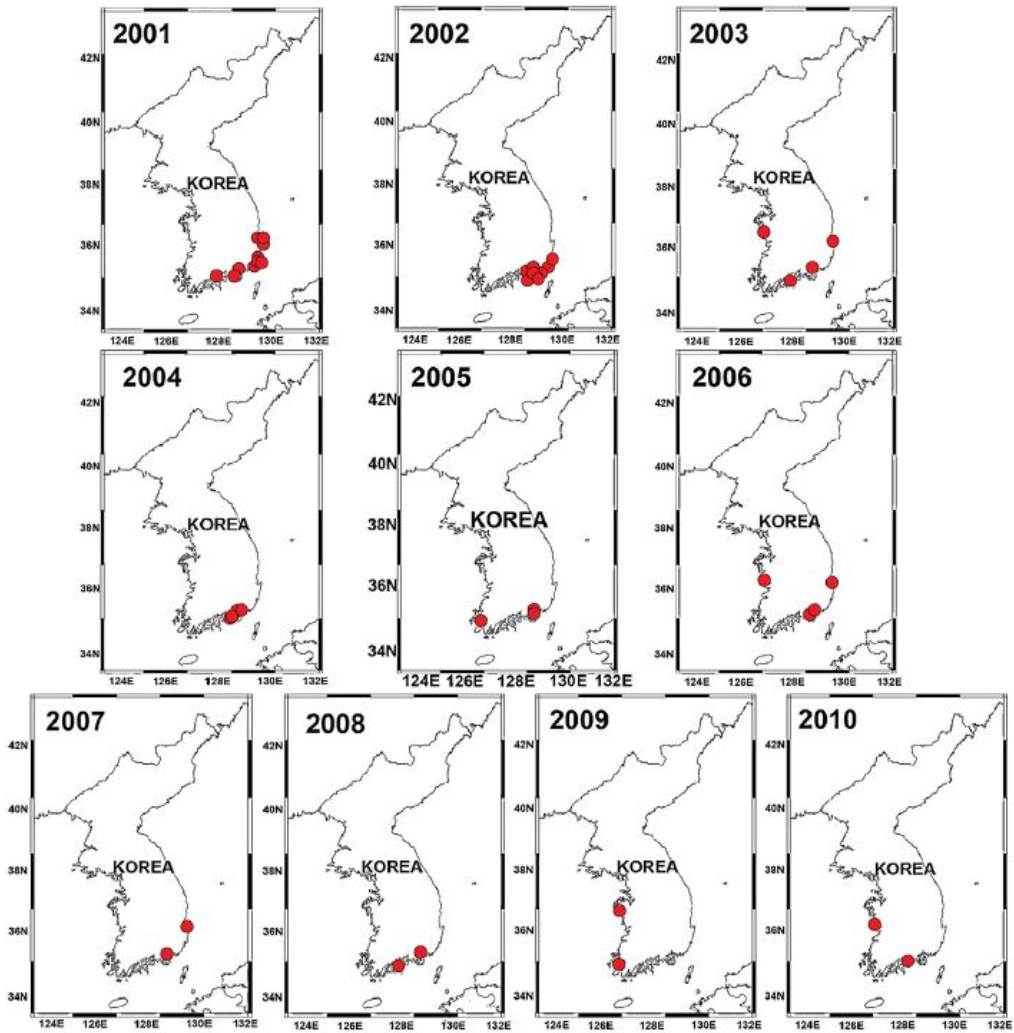


Fig. 3. Nationwide distribution of *H. akashiwo* causing HABs in South Korea (2001 to 2010)^[10].

Table 3. Classification of *H. akashiwo* RNA Virus

Group	Group IV (ssRNA positive-strand viruses)
Order	<i>Picornavirales</i>
Family	<i>Marnaviridae</i>
Genus	<i>Marnavirus</i>
Species	<i>Heterosigma akashiwo</i> RNA virus (HaRNAV)

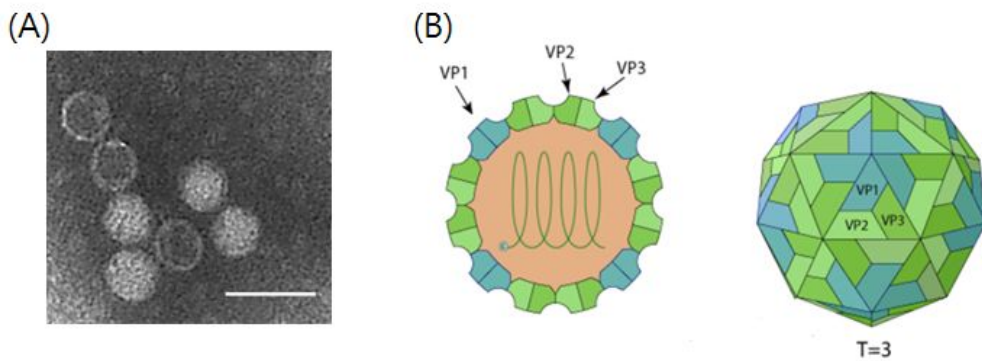


Fig. 4. Electron micrography of HaRNAV particles (A), 3D structure of *H. akashiwo* RNA viral capsid proteins (B).

(non-enveloped, T-pseudo3 icosahedral capsid, ~25nm in diameter and composed of 60 trimers of VP1-VP2-VP3 proteins)

제 2 장 실험 재료 및 방법

제 1 절 HaRNAV VLP 유전자 클로닝

1. HaRNAV VLP 유전자 합성

본 연구에 사용된 HaRNAV 유전자는 유해조류인 *H. akashiwo*에 감염하는 *H. akashiwo* RNA virus의 capsid protein 유전자로서 유전자 합성을 통해 확보하였다 (Genscript, USA). *E. coli* 내의 재조합 단백질 발현을 향상시키기 위해 염기서열을 변경하여 rare codon을 최적화한 vp1 (807 bp), vp2 (555 bp) 그리고 vp3 (789 bp) capsid gene이 클로닝된 pUC57 vp1, pUC57 vp2 그리고 pUC57 vp3을 얻었다.

2. 플라스미드 및 제한효소

유전자 클로닝을 위해 사용한 제한효소는 10 units의 *XhoI*, *NdeI*, *XbaI* 그리고 *EcoRI* (Thermo, USA)을 사용하였고, 클로닝을 위한 vector로 pCR2.1 vector (Invitrogen, USA)를 사용하였다. 또, 단백질 발현을 위해 단백질 발현 벡터 pCold-TF (TAKARA, JAPAN) 플라스미드를 사용하였다.

Table 4. List of plasmid used in this study

Description	Genotype	Source
pET30a(+)	Km ^r ; T7 promotor, lacI, C-terminal His-tag coding sequence, pBR322 origin	Novagen
pTXB1	Amp ^r ; T7 promotor, lacI, C-terminal Intein-tag coding sequence, M13 origin	Biolabs
pMAL-c5x	Amp ^r ; Tac promotor, lacI, N-terminal MBP-tag, Factor Xa protease site coding sequence, pBR322 origin	Biolabs
pGEX-4T-1	Amp ^r ; Tac promotor, lacI, N-terminal GST-tag coding sequence, pBR322 origin	GE healthcare
pHCE IA	Amp ^r ; T7 promotor, lacI, C-terminal His-tag coding sequence	Bioleaders
pCold-TF	Amp ^r ; cspA promotor, lacI, N-terminal TEE, His-tag, Trigger Factor, HRV 3C, Thrombin, Factor Xa protease site coding sequence, ColE1 origin	TAKARA
pCold-TF vp1	pCold-TF :: NdeI, XhoI fragment containing TEV protease gene, HaRNAV vp1	This study
pCold-TF vp2	pCold-TF :: NdeI, XhoI fragment containing TEV protease gene, HaRNAV vp2	This study
pCold-TF vp3	pCold-TF :: NdeI, XhoI fragment containing TEV protease gene, HaRNAV vp3	This study

3. 사용 배지 및 균주 배양 조건

E. coli 는 Luria-Bertani (LB) 액체배지 또는 1.5% agar를 첨가한 고체 배지를 사용하여 배양하였으며 고체배지는 37°C에서, 액체배지는 37°C, 200rpm 조건에서 배양하였다. 항생제는 균주가 포함하는 plasmid에 따라 ampicillin (100µg/ml)을 사용하였다. DNA 조작 및 형질전환을 위해 사용된 숙주는 *E. coli* DH5α를 사용하였고 단백질 발현을 위해 *E. coli* BL21 (DE3)를 사용하였다.

Table 5. List of *E. coli* host strain used in this study and its genotypes

Description	Genotype	Source
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ Φ80 Δ lacZM15 (lacZYA-orgF) U169 deoR recA1 endA1 hsd R17 phoA supE44kλ-thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen (USA)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) λ (DE3)	Novagen (Germany)

4. Competent cell 제조

Competent cell은 Inoue법에 따라 제조하였으며 제조과정은 다음과 같다^[23]. 5 ml의 LB medium에 *E. coli* BL21 (DE3) 단일 콜로니를 접종하여 12 시간 동안 37°C에서 전배양 하였으며 200 ml의 LB medium에 배양액 1% (v/v)를 접종한 후 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.6이 될 때 까지 동일한 조건에서 배양하였다. 이후 배양액을 ice 상에 10 분간 방치한 후 12,000 × g에서 15 분 동안 원심분리 하였다. 회수된 균체에 67 ml의 TB buffer (10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl 그리고 pH6.8)를 첨가하여 재현탁 한 후 12,000 × g에서 15 분 동안 원심분리 하였다. 최종적으로 16 ml의 TB buffer와 1.2 ml의 DMSO를 첨가하여 혼합한 후 *E. coli* strain으로 사용하였고 멸균된 eppendorf tube에 200 µl 씩 분주하여 -80°C에 보관하였다.

5. HaRNAV VLP 유전자 클로닝

가. 시약 및 기기

Ligation을 위해 T4 DNA ligase(Termo fisher scientific, USA)를 사용하였고 PCR 증폭을 위해 Ex. taq polymerase (1000 units, Takara JAPAN)를 사용하였다. Primer는 Macrogen사에 의뢰하여 합성하였으며 유전자 증폭을 위해 핵산 증폭기 GenePro (Bioer Technology CO.,LTD, USA)를 이용하였다.

나. HaRNAV VLP 유전자 증폭

클로닝에 필요한 DNA 단편을 획득하기 위해 PCR을 수행하였다. 주형 플라스미드로 pUC57 vp1, pUC57 vp2 그리고 pUC57 vp3을 사용하여 총 반응액을 20 μ l로 유전자 증폭을 수행하였다. 발현백터인 pCold-TF의 값비싼 protease 자리를 대체하고 직접 정제 가능한 TEV protease를 사용하기 위해 TEV protease gene과 ggsg linker gene을 primer에 추가하여 제작하였다. 반응 조건은 다음과 같다. 94 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 pre-annealing을 한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초간, 62 $^{\circ}$ C에서 30초간, 72 $^{\circ}$ C에서 40초간 20cycle를 실시하였고, 72 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 final extension 반응을 수행하였다. PCR 최종 반응 생산물은 전기영동을 통해 얻은 gel extract를 P&C Multiple Elution Kit (Biosolution, Korea)을 사용하여 gel로부터 원하는 DNA 단편을 정제하였다.

Table 6. List of primers used in this study

Oligonucleotide	Nucleotide sequence (5'→3')
pCold-TF vp1-F	CATATGGGCGGCTCTGGCGAAAACCTTGTATTTCCAGAGCATG GAAATTATTAGCGAAAGTGGTGCG (NdeI)
pCold-TF vp1-R	GCTCTAGAGCTTACGTCGGGGCCGGGGAGGCACC (XbaI)
pCold-TF vp2-F	CATATGGGCGGCTCTGGCGAAAACCTTGTATTTCCAGAGCATG GATGGCGACCTGGCAAGCATCCTG (NdeI)
pCold-TF vp2-R	GCTCTAGAGCTTACGTCGAGGTCGGCAGGTACAG (XbaI)
pCold-TF vp3-F	CATATGGGCGGCTCTGGCGAAAACCTTGTATTTCCAGAGCATG CGCCCG (NdeI)
pCold-TF vp3-R	GCTCTAGAGCTTAGGTTGACACAAAGCGATTTTCC (XbaI)

Table 7. PCR mixture composition for amplification of HaRNAV vp

PCR mixture	
template DNA	1 μ l
forward primer (10 pmol)	2 μ l
reverse primer (10 pmol)	2 μ l
10 × buffer	2 μ l
dNTP	1 μ l
Ex. taq polymerase	1 μ l
dH ₂ O	11 μ l
Total	20 μl

다. 유전자 단편 TA 클로닝

pCR 2.1 vector 와 insert DNA를 1:1 몰수비로 넣어 주었고, 10 × ligation buffer (300 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10mM ATP, pH7.8) 와 T4 DNA ligase 1 unit을 첨가하여 총 반응액을 10 μ l로 한 후 상온에서 4 시간 동안 반응시켜 ligation 하였다. Inoue 방법에 따라 제조한 DH5a competent cell

200 μ l에 ligation 한 DNA 10 μ l를 첨가하여 30 분 동안 얼음에 방치한 후 42°C에서 70 초 동안 heat shock을 준 후, 다시 3 분 동안 얼음에 정지하였다. LB 액체배지 800 μ l를 첨가한 뒤, 37°C에서 30 분 동안 배양하였다. 원심분리를 통해 상등액 800 μ l를 제거하고 X-gal과 IPTG을 넣어 ampicillin (100 μ g/ml)이 첨가된 1.5% LB 고체배지에 평판도말 하였다. 그리고 37°C에서 14 시간 동안 배양한 후 생성된 white colony만을 선별하였다.

라. 플라스미드 정제 및 염기서열 확인

플라스미드 분리 및 정제는 alkaline lysis 방법을 이용하였다^[24]. 지수성장기 말기에 들어선 배양액 5 ml을 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전물은 20 mg/ml RNaseI 이 녹아있는 resuspension buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH8.0) 250 μ l을 넣어 현탁한 후 lysis buffer (200 mM NOH, 1% SDS) 250 μ l을 첨가하여 5분 동안 상온에 방치하였다. 그 후 precipitation buffer (5 M potassium acetate 60 ml, glacial acetic acid 11.5 ml, distilled water 28.5 ml) 350 μ l을 첨가하여 위, 아래로 부드럽게 혼합시킨 후 15 분간 12,000 \times g에서 원심분리 하였다. 이를 통해 얻은 상등액을 silica membrane column tube에 옮긴 후 1 분 동안 12,000 \times g에서 column에 binding 시켰다. 700 μ l의 washing buffer (95% ethanol)을 주입하여 12,000 \times g에서 1 분간 원심분리 후 membrane에 남아있는 ethanol을 제거하기 위해 2 분간 다시 원심분리 하였다. 최종적으로 50 μ l의 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA pH8.0)를 주입 한 후 2 분간 방치하고 12,000 \times g에서 2 분간 원심분리를 통해 membrane column에 결합한 DNA 플라스미드를 용리하였다. 각각의 정제된 DNA는 EcoRI을 처리한 후 1% (w/v) agarose gel에서 전기영동을 통하여 DNA를 확인한 다음 염기서열 분석을 의뢰하였다 (Macrogen Inc, Korea).

마. 제한효소 처리와 DNA 단편의 분리

TA클로닝을 통해 선별된 HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3 플라스미드와 단백질

발현 vector인 pCold-TF에 제한효소 NdeI을 넣고 37°C에서 2 시간 반응시켜 자른 후 Clean-up kit (Nucleogen)을 이용하여 순수한 DNA절편을 회수하였다. 또한 다시 XbaI 제한효소를 처리하여 37°C에서 2 시간 반응시켰다. 각각의 제한효소로 처리된 vector와 insert DNA를 1% (w/v) agarose gel에서 전기영동 하였다. gel로부터 vector와 insert DNA 부분을 잘라내어 P&C Multiple Eution Kit를 이용하여 원하는 DNA 단편을 회수하였다.

바. Ligation 및 형질전환

pCold-TF vector와 HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3 insert DNA를 1:3의 몰수비로 넣어주고 10 × 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 μl로 한 후 상온에서 4 시간 동안 반응시켜 ligation 하였다. Inoue방법에 따라 제조한 competent cell 200 μl에 ligation된 DNA 10 μl를 첨가하고 얼음에 30 분 동안 방치한 후 42°C에서 70 초 동안 heat shock을 준 후, 다시 3 분 동안 얼음에 정지하였다. LB 액체배지 800 μl를 첨가한 뒤, 37°C에서 30 분 동안 배양하였다.

사. 형질 전환된 균체로부터 플라스미드 확인

Alkaline lysis 방법으로 형질 전환된 대장균을 플라스미드 분리 및 정제 후 제한효소를 처리하여 특정 DNA를 확인하였다. pCold-TF vp1, pCold-TF vp2 그리고 pCold-TF vp3 플라스미드는 각각 제한효소 NdeI을 넣고 37°C에서 2 시간 반응시켜 자른 후 65°C에서 5 분간 처리하여 제한효소 활성을 제거하고 다시 XbaI 제한효소를 처리하여 37°C에서 2 시간 반응시켰다. 제한효소로 처리된 DNA를 1% (w/v) agarose gel에서 전기영동하여 제조합 DNA를 확인하였다. 제조합된 플라스미드 DNA를 선별하여 pCold-TF vp1, pCold-TF vp2, 그리고 pCold-TF vp3로 명명하였다.

아. 균주의 보관

형질전환이 확인된 균주는 적절한 항생제가 포함된 LB배지에 접종하여 37°C에서 14 시간 배양하였다. 멸균한 stock tube에 균주배양액 700 μ l와 40% (v/v) glycerol 700 μ l을 넣은 후 vortexing하고 -80°C deep freezer에 보관하였다.

제 2 절 HaRNAV VLP 단백질 발현

1. HaRNAV VLP 단백질의 발현 및 정제를 위한 최적 벡터 선정

HaRNAV 캡시드 단백질을 이루는 vp1, vp2 그리고 vp3의 발현 및 정제를 위해 다양한 벡터 (pHCE-IA, pET30a, pET30a-Intein, pTXB1, pGEX-4T-1, pMAL-c5x, pET28a-SUMO, pCold-TF)를 사용하였다. pHCE-IA는 항시발현 벡터로 IPTG(isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside) (SIGMA, USA)같은 Inducer가 필요 없어 형질전환 된 대장균을 37°C, 200 rpm에서 8 시간 배양하였고 pET30a, pET30a-Intein, pET28a-SUMO, pTXB1, ppMAL-c5x는 형질전환 된 대장균을 37°C, 200 rpm에서 배양하여 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.4 ~ 0.6 에 도달하면 0.3 mM의 IPTG 를 첨가한 후 16°C에서 22시간 배양하였다. 또 pGEX-4T-1은 Induction 후 18°C에서 20시간 배양, pCold-TF는 Induction 후 15°C에서 24시간 배양하였다. 여러 가지 벡터 중 단백질의 용해도와 정제과정을 고려하여 최적의 벡터를 선정하였다.

2. 배양온도에 따른 단백질 발현 조건 탐색

pCold-TF HaRNAV 단백질의 최적 발현 조건을 찾기 위해 배양 온도와 시간에 따른 단백질 발현을 관찰하였다. 먼저 형질전환 된 대장균을 37°C, 200 rpm에서 배양하여 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.4 ~ 0.6 에 도달하면 0.3 mM의 IPTG

(isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside) (SIGMA, USA)를 첨가한 후 pCold-TF 벡터의 특성인 cold shock 최적 조건을 탐색하기 위해 13°C에서 26 시간, 15°C에서 24 시간, 17°C에서 22 시간, 20°C에서 18 시간 동안 발현을 유도하였다. 단백질의 발현 여부는 12% (w/v) SDS-PAGE analysis를 통해 확인하였고 그 중 가장 안정적으로 발현이 확인되는 조건을 온도 및 배양 시간에 따른 최적의 단백질 발현 조건으로 결정하였다.

3. IPTG 농도에 따른 단백질 발현 조건 탐색

최적화된 배양 시간과 온도 조건에서 발현 유도물질인 IPTG의 농도에 따른 발현양을 확인하였다. pCold-TF HaRNAV 플라스미드를 포함한 대장균을 37°C, 200 rpm에서 배양하여 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.4 ~ 0.6 에 도달하면 0.1 mM, 0.2mM, 0.3 mM, 0.4 mM, 0.5 mM 의 IPTG를 각각 주입하여 발현을 유도하였다. 발현 여부는 12% (W/V) SDS-PAGE 분석을 통해 확인하였고 그 중 가장 효율적으로 발현된 조건을 IPTG 농도에 따른 최적의 단백질 발현 조건으로 결정하였다.

4. 최적화 조건에서의 단백질 발현 유도 및 cell free extract 제조

제조함 pCold-TF HaRNAV VLP는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ampicillin이 포함된 LB medium에서 12 시간 동안 37 °C, 200 rpm에서 전배양하였다. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ampicillin이 포함된 1 ℓ 의 LB 액체배지에서 1 %의 전배양액을 접종 한 후 600nm의 파장에서 흡광도가 0.4 ~ 0.6로 도달할 때 까지 37 °C, 200 rpm으로 배양하였다. 그리고 0.3 mM의 IPTG를 첨가하여 15 °C, 200rpm에서 24 시간 동안 발현을 유도한 후 15000 rpm에서 30 분간 원심분리 하였다. 회수된 균체를 PBS buffer로 2회 세척한 후 원심분리하여 다시 균체를 회수하였다. 회수된 균체 3 g에 10 배 용량의 Lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, pH 8.0)를 넣어 재현탁 시킨 후, 1 unit DNaseI 와 1 mM PMSF를 첨가하여 얼음에서 30 분 방치한

후 sonicator (SONIFIER250, Branson)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄용액은 원심분리 (15000 rpm, 30분, 4℃)한 후 얻어진 상등액을 cell free extract로 사용하였다.

5. SDS-PAGE를 이용한 단백질 발현 확인

단백질의 발현 확인과 정제 확인, 단백질을 이용한 실험의 결과 확인을 위하여 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 실시하였다. 단백질의 정량을 위하여 BSA (Bovine serum albumin)으로 표준곡선을 작성하였고 측정하고자 하는 단백질 시료는 표준곡선 흡광도의 범주를 벗어나지 않도록 희석한 후 595 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. Bradford 방법으로 정량한 단백질 sample에 5 × sample buffer를 섞어 주고 100 °C에서 5분간 반응시킨 후 3분 동안 얼음에 방치하였다. 그리고 160 V에서 1 시간 15 분 동안 전기영동을 하였다. SDS-PAGE를 통해 전개된 단백질은 Staining solution (0.1% Coomassie blue R-250, 45% Methanol, 10% Glacial acetic acid)로 1~2 시간 염색하였고 destaining solution (30% Methanol, 10% Glacial acetic acid, 60% Distilled water)으로 4 시간 탈색한 후 단백질의 발현 여부를 확인하였다.

제 3 절 HaRNAV VLP 단백질 분리/정제

1. TEV protease 정제

protease에 의한 Fusion protein의 cleavage를 위해 FPLC (AKTA)를 이용하여 TEV protease (Addgene)를 정제 하였다. TEV protease는 His6-tag를 가지고 있기 때문에 affinity chromatography를 이용하였다. Open column (Bio-Rad, USA)에 20% (v/v) EtOH로 보관된 Ni-NTA resin (Qiagen, Germany)을 resin volume 10배의 distilled H₂O, lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, pH8.0) 및 binding buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 10 mM Imidazole, pH8.0)로 안정화 하였다. sonicator를 이용하여 cell을 파쇄 후 원심분리 (15000 rpm 30min)하여

얻은 상등액을 gravity를 이용하여 3회 흘려주어 binding 시키고 FPLC (BioRAD, USA)를 이용하여 10 mM에서 500 mM 까지 Imidazole gradient를 이용하여 washing 및 Elution 하였다. 그 후 Imidazole 제거와 protease의 안정화를 위해 Spectra/Por[®] 2 Dialysis membrane (Spectrum[®] Laboratories, USA)을 이용해 Dialysis (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, pH7.5)를 수행하였다. 12 % (W/V) SDS-PAGE를 통해 TEV protease를 확인였고 단백질을 정량적으로 확인하기 위해 Bradford reagent (Sigma, USA)를 이용해 595 nm에서 농도를 측정하였다. 보관을 위해 최종농도 1mg/ml로 50 mM Tris HCl, 5 mM DTT, 50% (v/v) glycerol, 0.1% (v/v) Triton X100, pH7.5 buffer에 -80℃에서 보관하였다.

2. Affinity chromatography를 이용한 HaRNAV 캡시드 단백질 정제

가. 재조합 pCold-TF HaRNAV 캡시드 융합단백질 정제

pCold-TF vp1, pCold-TF vp2, pCold-TF vp3 각각의 융합단백질을 affinity chromatography법으로 정제하였다. 20%(v/v) EtOH에 보관된 Ni-NTA resin을 resin volume 10 배의 distilled H₂O, lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, pH8.0) 및 binding buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 10 mM Imidazole, pH8.0)로 안정화 하였다. 안정화 된 resin에 cell free extract를 gravity를 이용해 3회 흘려주어 binding 시키고 crude extract를 제거하기 위해 resin volume의 10배로 washing buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 20 mM imidazole, pH8.0)를 흘려주었다. 마지막으로 Elution buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 250 mM imidazole, pH8.0) 로 Elution하였다. 그 후 12% (w/v) SDS-PAGE를 통해 각각 fusion 단백질을 확인할 수 있었고 단백질을 정량적으로 확인하기 위해 Bradford reagent (Sigma, USA)를 이용해 595 nm에서 농도를 측정하였다.

나. TEV protease를 이용한 순수 캡시드 단백질의 정제

(1) TEV protease를 이용한 용합 단백질의 최적 cleavage 조건 탐색

용합단백질에서 캡시드 단백질을 분리하기 위해 TEV protease를 이용하였다. Protease에 의한 효율적인 cleavage 조건을 찾기 위해 반응 농도, 시간, 온도에 변화를 주어 실험을 하였다. 반응시킬 단백질의 농도를 1 mg/ml로 맞추고 1 ml을 분취하여, 즉 1 mg의 단백질에 직접 정제한 1 mg/ml TEV protease를 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μ l 첨가하여 4 °C에서 1, 2, 4, 8, 20 시간, 25 °C에서 1, 2, 4, 8, 20 시간, 30 °C에서 1, 2, 4, 8, 20 시간, 37 °C에서 1, 2, 4, 8, 20 시간으로 변화를 주어 최적 조건을 확인하였다.

(2) TEV protease 처리 후 Ni-NTA를 이용한 캡시드 단백질의 정제

용합단백질을 protease와 반응 시킨 후 12% (w/v) SDS-PAGE를 통해 cleavage를 확인하였다. imidazole 제거를 위한 Dialysis를 하기 전 전처리 과정으로 Spectra/Por[®] 2 Dialysis membrane을 distilled H₂O에 15 분간 2 회 반응시키고 activation된 membrane에 sample을 주입하였다. 그 후 Dialysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, pH8.0)에 넣어 4 시간, 8 시간, 24 시간 buffer change를 해주었다. 이 과정을 통해 imidazole을 제거하고 His₆-tag가 달려있는 TF와 TEV protease를 resin에 다시 흘려줌으로써 Target 단백질, 즉 HaRNAV VLP 단백질을 얻을 수 있었다.

3. Gel filtration을 이용한 HaRNAV 캡시드 단백질 정제

pCold-TF 벡터 시스템을 이용해 발현된 fusion 단백질을 protease와 반응 시킨 후 혼합된 단백질을 분자 크기별로 분리정제 하기 위해 FPLC (BioRAD, USA), Sephacryl S-100 (GE healthcare, England) 컬럼을 사용 하였다. 컬럼의 안정화를 위해 distilled H₂O를 1 ml/min의 유속으로 컬럼의 10배 volume washing하고 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, pH8.0)로 컬럼의 3 volume만큼 흘려주어 안정화 시켰다. injection 후 처음 void volume 30 ml을 흘려주고 Fraction size를 3 ml로 하여 120 ml까지 총 40개의 fraction을 받았다. 각 peak의 단백질을 확인하기

위해 12% (w/v) SDS-PAGE를 통해 각 peak별 단백질을 확인할 수 있었고 단백질을 정량적으로 확인하기 위해 Bradford reagent (Sigma, USA)를 이용해 595 nm에서 농도를 측정하였다.

제 4 절 HaRNAV VLP 자가 조립

1. Dialysis를 통한 자가 조립 유도

캡시드 단백질을 이루는 소단위인 capsomer간 서로 상호작용하려는 성질을 이용하여 VLP 형성을 유도하기 위해 각 Elution한 Fusion 단백질을 혼합 후 TEV protease를 30 °C에서 24 hr 반응시켰다^[17]. 12% (w/v) SDS-PAGE를 통해 Fusion 단백질의 cleavage를 확인하고 reassociation buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 2 mM CaCl₂, pH8.0)로 Dialysis (Spectra/Por[®] 2 Dialysis membrane)를 수행하였다^[22]. Dialysis를 통해 자가 조립을 유도한 VLP 단백질을 FPLC를 이용한 gel filtration으로 분리하였다. 20% (v/v) EtOH에 보관된 Sephacryl S-500 컬럼 (GE healthcare Bio-sciences AB, England)을 0.6 ml/min의 유속으로 컬럼의 5 volume만큼 distilled H₂O로 washing하고 reassociation buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 2 mM CaCl₂, pH8.0)로 컬럼 volume의 5 배 흘려주어 안정화시켰다. injection 후 처음 void volume 40 ml을 흘려주고 Fraction size를 2 ml로 하여 180 ml까지 총 70개의 fraction을 받았다. 각 peak의 단백질을 확인하기 위해 12% (w/v) SDS-PAGE를 통해 각 peak별 단백질을 확인할 수 있었고 단백질을 정량적으로 확인하기 위해 Bradford reagent (Sigma, USA)를 이용해 595 nm에서 농도를 측정하였다.

2. TEM 분석을 통한 HaRNAV VLP의 구조 확인

Dialysis를 통해 자가 조립을 유도한 HaRNAV 캡시드 단백질이 일정한 구조를 형성하는지 확인하기 위해 TEM 분석을 의뢰하였다. TEM 분석은 Anthanum

hexaboride (Lab6) gun이 갖춰진 Tecnai G2 Spirit electron microscope (FEI Co., USA)를 사용하였으며 Ultrascan 4000 charge-coupled device (CCD) camera (Gatan Inc., USA)를 통해 이미지를 수집하였다 (한국기초과학연구원).

제 5 절 HaRNAV VLP의 숙주 특이성

1. HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3 단백질에 대한 FITC 표지

(1) HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3 단백질 각각에 FITC 표지

Affinity chromatography를 통해 정제한 HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3 각각의 단백질에 FITC (Fluorescein isothiocyanate) (Sigma, USA)를 표지하기 위해 1 mg/ml의 단백질과 100 mM FITC 100 μ l를 주입하여 1 시간 동안 상온에서 반응시켰다. 그 후 HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3 단백질에 표지되지 않은 FITC를 제거하기 위해 cut off 10k의 dialysis cassette를 이용하여 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, pH8.0)로 4°C에서 2 일 동안 dialysis 통해 vp1, vp2 그리고 vp3 단백질에 FITC를 표지하였다. 반응이 끝난 후 남아있는 잔여 FITC 제거를 위해 10k centricon(PALL, USA)를 이용하여 농축하였다. FITC가 표지된 HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3 단백질을 12%(w/v) SDS-PAGE 전기영동 한 후 UV를 비춰 FITC의 형광을 확인하였다.

(2) HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3의 자가 조립 유도 후 FITC 표지

Dialysis를 통해 자가 조립을 유도하고 TEM 분석으로 확인된 무정형의 VLP 단백질에 FITC를 표지하였다. 1 mg/ml의 단백질과 100 mM FITC 100 μ l를 주입하여 1 시간 동안 상온에서 반응시켰다. 그 후 VLP 단백질에 표지되지 않은 FITC를 제거하기 위해 cut off 10k의 dialysis cassette를 이용하여 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, pH8.0)로 4°C에서 2 일 동안 dialysis 통해 VLP 단백질에 FITC를 표지하였다. 반응이 끝난 후 남아있는 잔여 FITC 제거를 위해 10k

centricon(PALL, USA)를 이용하여 농축하였다. FITC가 표지된 VLP 단백질을 12%(w/v) SDS-PAGE 전기영동 한 후 UV를 비취 FITC의 형광을 확인하였다.

2. 형광 현미경을 이용한 FITC 표지 HaRNAV VLP의 숙주 특이성 관찰

가. HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3 단백질 각각의 숙주 특이성 관찰

캡시드 단백질을 이루는 소단위인 vp1, vp2 그리고 vp3가 각 소단위만으로 숙주와 반응하는지, 그렇다면 숙주와 인지하는 소단위는 무엇인지 알아보기 위해 Ni-NTA column을 이용해 정제한 각각의 FITC가 표지된 pCold-TF vp1, pCold-TF vp2 그리고 pCold-TF vp3에 유해조류를 반응하여 숙주 특이성을 관찰하였다. *H. akashiwo* NEPCC 102, *H. akashiwo* NEPPCC 522 숙주 조류와 *C. marina* KMMCC 579, *G. aurelum* KMMCC 978의 비 숙주 조류를 사용하였다. FITC가 표지된 pCold-TF vp1, vp2 그리고 vp3을 각 조류와 1 : 4의 비율로 차광하에 교반기를 통해 접촉을 유도하였다. 상온에서 3 시간 동안 반응시킨 후 1600 × g에서 3 분간 원심분리를 통해 상등액을 제거한 다음 잔여 FITC를 제거하기 위해 멸균된 F/2 배지 500 μl를 사용하여 1600 × g에서 3 분간 2 번 원심분리 후 상등액을 제거하였다. 마지막으로 F/2 배지 100 μl로 재현탁하여 형광 현미경(OPTINITY, China)을 통해 숙주 특이성을 관찰하였다.

나. HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3의 자가 조립 유도 후 숙주 특이성 관찰

TEM 분석을 통해 관찰된 무정형의 입자가 숙주특이성을 가지는지 확인하기 위해 FITC가 표지된 VLP 단백질에 유해조류를 반응하여 숙주 특이성을 관찰하였다. *H. akashiwo* NEPCC 102, *H. akashiwo* NEPPCC 522 숙주 조류와 *C. marina* KMMCC 579, *G. aurelum* KMMCC 978의 비 숙주 조류를 사용하였다. FITC가 표

지된 VLP 단백질을 각 조류와 1 : 4의 비율로 차광 하에 교반기를 통해 접촉을 유도하였다. 상온에서 3 시간 동안 반응시킨 후 $1600 \times g$ 에서 3 분간 원심분리를 통해 상등액을 제거한 다음 잔여 FITC를 제거하기 위해 멸균된 F/2 배지 $500 \mu l$ 를 사용하여 $1600 \times g$ 에서 3 분간 2 번 원심분리 후 상등액을 제거하였다. 마지막으로 F/2 배지 $100 \mu l$ 로 재현탁하여 형광 현미경 (OPTINITY, China)을 통해 숙주 특이성을 관찰하였다.

Table 8. Composition of F/2 algal culture medium (mg/ℓ)

Components	Amounts
NaNO ₃	75
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	5.65
Na ₂ EDTA	4.16
FeCl ₃ ·6H ₂ O	3.15
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01
ZnSO ₂ ·7H ₂ O	0.022
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.01
MnCl ₂ ·4H ₂ O	180
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.006
Cyanocobalamin	0.0005
Thiamine HCl	0.1
Biotin	0.0005

Table 9. Host algal species used in this study

Strain	Source
<i>H. akashiwo</i> (NEPCC 102)	North East Pacific Culture Collection (University of British Columbia, Canada)
<i>C. marina</i> (KMMCC 579)	Korea Marine Microalgae Culture Center
<i>G. aurelum</i> (KMMCC 978)	Korea Marine Microalgae Culture Center

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 HaRNAV VLP 유전자 합성

HaRNAV는 유해조류인 *Heterosigma* 를 감염시키는 RNA 바이러스로 8.6 kb 길이의 ssRNA 바이러스이다. 이 유전자는 한 개의 polyprotein으로 발현되고 capsid protein gene (vp1, vp2 그리고 vp3)등을 암호화하고 있다. (Fig. 5) HaRNAV VLP는 3 가지의 capsomer (vp1, vp2 그리고 vp3)로 이루어져 있어 GenScript를 통해 대장균에서 발현이 가능하도록 유전 정보를 최적화 (Fig. 6)하여 HaRNAV VLP 단백질이 cloning된 pUC57 vp1, vp2 그리고 vp3를 확보하였다.



Fig. 5. Schematic representation of HaRNAV polyprotein containing VP1, VP2 and VP3^[14].

(A)

Optimized	7	GAAATTATTAGCGAAAGTGGTGC GGACCCGACCCTGGTCTGAGTGACGCCCGATGACC
Original	7	GAGATTATATCGGAAAGCGGTGCAGATCCAACCTTAGTTTTATCGGATGCACCGATGACT
Optimized	67	GAA GGCAATGTTGAT TCCCGTGTG GACGAAGTGGTTTTTGGTGAAACGGTCGTGAGCTTC
Original	67	GAAGGAAACGTGGATAGTCGTGTGGATGAGGTTGTGTTTGGGGAAACAGTGGTGAGTTTT
Optimized	127	CGTACCCTGCTGAAACGCTATAACCTGAGCTACGGTTTTTCTCCGACGATTGATGCAGGC
Original	127	AGAACGCTGCTCAAGAGGTACAATCTCAGTTATGGATTTTCTCCAACAATTGACGCTGGT
Optimized	187	GCTAACTCTCTGAATCGTTATAACCATCAGCTCTTCCCGCCGTACCGTGGTGCAATGGAT
Original	187	GCAAACCTCGCTCAACAGGTACACAATATCTAGTTTTCCGCCATATCGAGGAGCCGTGGAT
Optimized	247	GGTGTCTCGGACACGTATAACTACGCGTGCCATACCTGTGAATCACCTGGCCCGTGT
Original	247	GGCGCAAGAGACACGTACAATTATGCGTGCCACACTTGTCTCAATCACTTAGCTCCGTGT
Optimized	307	TTTCTGGTTATCGTGGCGGTATTCGCCATAAATTCGTTTCAATGAGTCCGATTGCTCC
Original	307	TTCTTGGTTATCGTGGAGGAATTCGCCACAAGTTCGTACATATGAGCCCGATTGCTCT
Optimized	367	GGTCTGCTGGCCGCAAGCCTGGTAAC T CAGGTCCGTGGGCATTACGTATAATCATGAT
Original	367	GGTTGTGGCGCAAGTCTGGGAAACAGTGGCCCTAGTGAATTACCTATAACCACGAC
Optimized	427	GTCTACGACATGGGCAACGGTGTGACCTTTGTTTATAATGCGAGCGAAGGTGTT CAGGAT
Original	427	GTTTATGACATGGGAAACGGAGTAACCTTTGTGTATAACCGCTCGGAGGAGTTCAGAT
Optimized	487	AATCCGTGGCGTGGTCTGAGCGGTACC GCACTGACCCGCTACCAATCAA CCGGTGCTG
Original	487	AATCCTTGGCGCGTCTGTCTGGTACAGCACTGACCCCAAGCACAATCAACCCGTGCTC
Optimized	547	GAAGTTGAAGTCCCGCATTATACGAGTCGTAAATACGTTT CACACCCGCTCCTTCGGCACC
Original	547	GAGGTGGAAGTGCCGATTATACGAGCCGCAAATATGTGCACACGGAAGTTTGGCACA
Optimized	607	GAAACGCTGGTTGCGGAAACCGCCAAAAACGTCAGTTC CGCGCA CCGTCAATTAATATC
Original	607	GAGACGCTTGTGGCAGAAACAGCGAAAAACGCTCAAGTCGCGCGCCGTCGATTAACATT
Optimized	667	TCGATGTTTGTCCGTCAGTGACCGGTCACTTTCGGTCTGGATTTCTGTGTCGATCGGC
Original	667	TCTATGTTTGCGCCCTCCGTGACTGGTCATTTCCCTGTGCTCGATTTTGTGAGCATTGGG
Optimized	727	GAAGACTTCAACCTGCTGTATTTTATTTGTACCCCGCTGATTTACCGTGGTGCCTCCCGG
Original	727	GAGGATTTCAATTGCTGTATTTTATTTGTACTCCTCTATTATATCGCGGAGCTTCTCCA
Optimized	787	GCCCCGACG
Original	787	GCTCCCACT

(B)

Optimized	7	GATGGCGACCTGGCAAGCATCCTGTCTCGTCCGACCCCGCTCTTTACCGATACCTGGAAA
Original	7	GATGGTGATTTGGCTTCTATTTTGTCTCGACCCACTCGGGTCTTTACTGACACATGGAAA
Optimized	67	CCGGCACCAACTTCTACCAAGCAAGCAACATCTGGAAATCATTTCGAATGATGACACG
Original	67	CCTGGCACCAACTTTTACCAAGCTTCCAATATTGGAAAAGCTTTTGAACGACGATACG
Optimized	127	ATTGTGGATAAAAATCTCGCATTTTCGCACGTCTGCGCGGCAAAAATGGTGGTTCTGTCTGCTG
Original	127	ATCGTCGATAAAAATAAGCCATTTTGCCCGTTTGCCTGGGAAAATGGTTGTGCGCCTTCTT
Optimized	187	ATTAACGGCAATAGTATGTATTACGGTAAACTGGTTATGCACTATTCCCCGTTTGGCGAG
Original	187	ATCAATGGCAACTCAATGTACTATGGCAAACCTTGTATGCATTATTCCGCCATTGCTCAA
Optimized	247	GTCGATGACGTGTACACCGTTAGCTCTGTCCCGGATCCGGCCGAATGGATTGAGATCATG
Original	247	GTAGATGACGTGTACACGGTATCTTCGGTGCCTGATCCTGCAGAATGGATACAGATCATG
Optimized	307	CAAAAACCGCATGTCTCTTTTCGATGCAACCACGACCCAGGGTGCTACGATGGAACTGCCG
Original	307	CAGAAAACACACGTGTCTTTTGATGCTACAACGACAACAGGGGGCAACCATGGAAATGCCT
Optimized	367	ATGCTGCTGCCGAACGATTGGATTGACCTGACCGATGAAACATGATCGCCCGCCTGGGC
Original	367	ATGCTTTTGCCTAACGATTGGATTGATCTCACAGATGAAGATATGATCGCGCGCTTGGGT
Optimized	427	ACCCTGTATATTTCATGATCTGAACACGCTGGAAACACGCGAATGCCGGTACCGACGAACTG
Original	427	ACGCTGTACATACATGATCTGAACACGTTGGAGCACGCCAATGCCGGCACAGATGAATTG
Optimized	487	ACCGTGACCCTGGTTGCGTGGATGGAAAGATGTTGAACTGTACCTGCCGACCTCGACG
Original	487	ACGGTCACGCTAGTGGCGTGGATGGAAAGACGTTGAGTTGTATCTACCCACTTCTACA

(C)

Optimized	7	CGCCCGCCGCTGCTGGGTGCGCCGGAACCGTTCGTGCGCGTTACCTGTGCTCCCTGGCT
Original	7	CGACCTCCTTTATTAGGGGCACCTGAACCGTTCGTTCTCGCTACCTCAGTTCCTTGCA
Optimized	67	AATTGTGATG TCCCG GAA ACCGTC CAAAAAATTT CA ATGACCGGCGCCAGGA AGTCTGC
Original	67	AATTGTGATGTGCCTGAAACGGTTCAAAAAATTTCCATGACCGGGCGCCAGGAAGTGTGT
Optimized	127	GTG GATAGCTCTCCG CTGGCATTGAT ACGGGTGACGAACTGCAACTGGCG AAA CTGGT G
Original	127	GTGGACTCGAGCCCTCTGGCATTGATACTGGAGATGAGTTGCAGTTGGCCAAATTAGTG
Optimized	187	GGCAAAGAGGT TAT CTGACCAGTTTACCTGGACCCGTC AA CTCGTGGATGGCAA
Original	187	GGTAAAGAGGGTATTTGACCAC TTTACTTGGGATCCATCAATCTTGTGACGGCAAG
Optimized	247	CTGATGGAC TCGGTGT TA ACCCGATGTACCATTGTCCGTCGACC CGAAT ACCGTGGC
Original	247	CTGATGGACTTTGGAGTGAACCC TATGTACCATTGCCCCAGCACTACGAATACGGGTGCA
Optimized	307	TATGCG CTGACGCCGCTGGCATACTTTAGCCAGCCGTTCCGCT TATGG CGTGGCTCTATT
Original	307	TATGCGCTAACTCCGTTGGCTTATTTTAGCCAACTTTTAGGTATTGGCGAGGATCTATC
Optimized	367	AAATACCGTTTTGAAGTGGTGGCCTCCGCATTCACCGTGGTCGTCTGCGTGT CGTGTGG
Original	367	AAGTACAGGTTTGGAGTTGTTGCTTCGGCATTTCACCGGGCAGGCTTCGCGTAGTGTGG
Optimized	427	GAT CCGGTTC TGTAT AGTCTGGACGCA CCGTT TAACCAGAATTTCTCCGTTGCTCTGGAT
Original	427	GATCCTGTACTGTATTCTCTCGATGCACCTTTCAACCAAAAAATTTAGTGTGTTGCTTGGAC
Optimized	487	ATTGCTGAA CAACGCGACTTCACCGTGGTTGTTCCG TATGGCGCCG CA CAG CCGTACCTG
Original	487	ATTGCTGAACAGCGCGATTTTACTGTGGTAGTGCCGATGGCGCTGCTCAGCCTTATCTG
Optimized	547	GAAACACGCGTGTCCGGAAAGATGGCGTCATCTATGGTAGCCTGTACAGTTCCGTGGAT
Original	547	GAGAACTAGGGTGCTGAGGACGGTGCATCTATGGGTCTTTGTACTCGTCAGTGGAC
Optimized	607	GAAG CAAGACAACGCA ATCTGG CTATTATGTTCTGAACGAACTGTCA ACCAT CAAA
Original	607	GAAGCCCAAGATAATGGAA ACTGGCAATCATGGTGTGAATGAGCTGTCCACAATAAAG
Optimized	667	AACTCGGCG AAAA TGTGGTTTATGTTAATGTCTACGTGTCTGCCG TGAT GA CTTT CGT
Original	667	AATTCTGCCGAAAA TGTGTGTACGTGAACGTGTATGT CAGCGCAGGAGACGATTTCCGC
Optimized	727	GTGGCTATGCCG TGT GCGGAAAAATTATG AAAA TCGCTTTGTGTCAACC
Original	727	GTTGCCATGCCTTGTGCAGAGAAAA TAATGGAGAATCGCTTTGTTTCCACG

Fig. 6. Multiple gene sequence alignment of original and codon optimized HaRNAV vp1 (A), vp2 (B) and vp3 (C).

제 2 절 재조합 HaRNAV VLP 유전자 클로닝

pCold-TF vector를 선택하기 이전에 pET30a(+), pET30a(+)-intein, pHCE-IA, pMAL-c5x, pGEX-4T-1 그리고 pTXB1 등 많은 발현 벡터를 사용해 보았지만 단백질이 발현되지 않거나, 불용성 단백질로의 발현 등 단백질 발현의 문제와 정제 / 분리의 문제로 인해 최종적으로 pCold-TF vector를 발현 벡터로 이용하게 되었다^[18-19]. 유전자 클로닝을 위해 pUC57 vp1, pUC57 vp2 and pUC57 vp3 주형 플라스미드로부터 HaRNAV 캡시드 유전자를 증폭하기 위해 PCR 반응을 수행하였다. 1% (w/v) agarose gel을 이용한 전기영동으로 확인한 결과 vp1, vp2 그리고 vp3 각각 844 bp, 592 bp, 826 bp의 유전자 단편을 확인하였다(Fig. 7(A)). 각각의 PCR product를 gel extract한 후 pCR2.1 vector를 통해 TA 클로닝을 수행하였다. 그 후 *E. coli* DH5a에 형질전환 시켜 white / blue colony 선별을 통해 ligation을 확인하였고 plasmid prep을 이용하여 pCR2.1 vp1, vp2 그리고 vp3 플라스미드를 얻을 수 있었다. 제한효소 EcoRI을 이용하여 유전자 단편을 재확인 하였고 염기서열 분석을 의뢰하여 HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3의 유전자 서열을 확인하였다(Fig. 7(B)).

염기서열 분석을 통해 선별된 유전자는 제한효소 (5' NdeI, 3' XbaI)를 처리한 후 발현벡터인 pCold-TF에 ligation 하였다. 이렇게 재조합된 플라스미드는 *E. coli* strain BL21(DE3) 대장균에 heat shock을 이용하여 형질전환을 수행하였으며 이를 pCold-TF vp1, pCold-TF vp2 그리고 pCold-TF vp3이라 명명하였다. (Fig. 8)

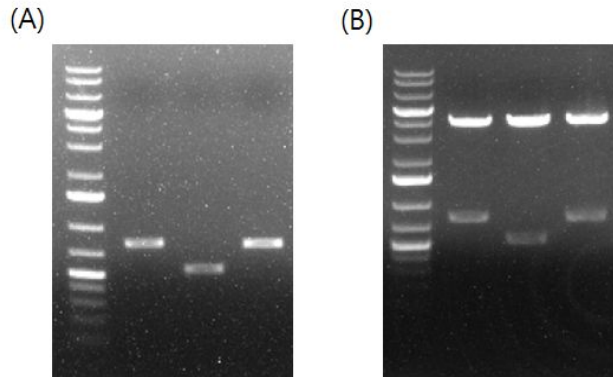


Fig. 7. PCR amplified product of codon optimized capsid gene (A) and cloned product of pCold-TF vector with capsid gene (B). Symbol: M, marker; lane 1, vp1; lane 2, vp2; and lane 3, vp3.

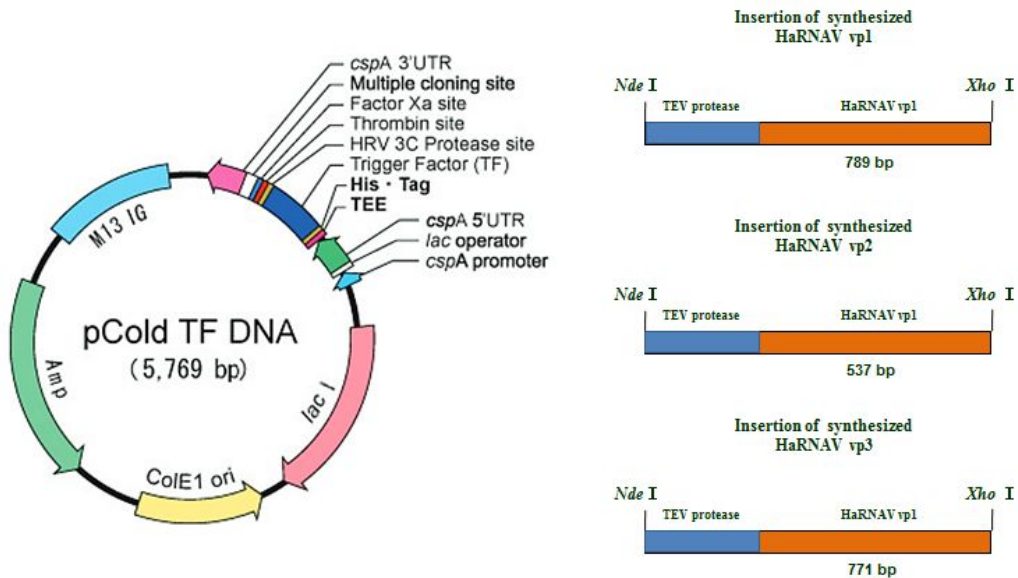


Fig. 8. Construction of pCold-TF vp1, pCold-TF vp2 and pCold-TF vp3.

제 3 절 재조합 HaRNAV VLP 단백질 발현

1. HaRNAV VLP 단백질의 발현 및 정제를 위한 최적 벡터 선정

HaRNAV 캡시드 단백질을 이루는 vp1, vp2 그리고 vp3의 발현 및 정제를 위해 다양한 벡터 (pHCE-IA, pET30a, pET30a-Intein, pTXB1, pGEX-4T-1, pMAL-c5x, pET-SUMO, pCold-TF)를 사용하였다. pHCE-IA는 항시발현 벡터로 IPTG(isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside) (SIGMA, USA)같은 Inducer가 필요없어 형질전환 된 대장균을 37°C, 200 rpm에서 8 시간 배양하였고 pET30a, pET30a-Intein, pET28a-SUMO, pTXB1, ppMAL-c5x는 형질전환 된 대장균을 37°C, 200 rpm에서 배양하여 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.4 ~ 0.6 에 도달하면 0.3 mM의 IPTG 를 첨가한 후 16°C에서 22시간 배양하였다. 또 pGEX-4T-1은 Induction 후 18°C에서 20시간 배양, pCold-TF는 Induction 후 15°C에서 24시간 배양하였다.

HaRNAV 캡시드를 구성하는 vp1, vp2 그리고 vp3를 여러 가지 벡터에 클로닝하여 발현 및 정제 가능 여부를 확인한 결과 pTXB1은 vp1, vp2 그리고 vp3가 모두 발현되지 않았다. pHCE-IA에서는 vp1을 제외한 vp2, vp3는 발현이 되지 않았고 vp1은 불용성 상태로 발현되어 pellet에 존재하였다. pET30a에서는 vp3는 발현이 되지 않았고 vp1, vp2가 발현되었으나 불용성 상태로 발현되어 1% (v/v) sarkosyl 을 사용하여 Ni-NTA resin을 통해 정제가 가능하였으나 강력한 계면활성제인 sarkosyl 때문에 resin의 상태가 나빠져 pET30a을 사용할 수 없었다. pMAL-c5x에서는 vp3만을 클로닝 하여 발현을 확인하고 정제를 시도하였으나 Factor Xa를 이용한 융합 단백질의 절단 후 Target단백질의 분리정제가 되지 않아 이용할 수 없었고 pET30a-Intein 같은 경우 pET30a의 불용성 문제를 극복하고자 pET30a 벡터의 C 말단에 Intein tag gene을 넣어 클로닝 하였다. 여전히 vp3는 발현되지 않았지만 pET30a와 달리 용해성이 증가하여 상등액에서 확인할 수 있었지만 정제 시 Elution된 단백질에 DTT 처리를 하여도 Target단백질과 Intein tag가 절단되지 않

아 이용할 수 없었다. pGEX-4T-1은 vp1, vp2 그리고 vp3 모두 발현이 확인되었으나 불용성 상태로 pellet에서 확인되어 1% (v/v) sarkosyl을 이용하여 용해성을 증가시켜 정제하였으나 융합 단백질에 Thrombin 처리 후 분리 정제가 되지 않아 사용할 수 없었다. pET-SUMO에서는 SUMO 단백질을 이용하여 용해성의 증가시키려고 하였으나 vp2, vp3 경우에는 발현이 되지 않았고 발현된 vp1은 불용성 상태로 확인되었다. 마지막으로 pCold-TF를 이용하였을 때 vp1, vp2 그리고 vp3 모두 발현이 되었고 매우 용해성이 높았으며 발현된 단백질의 양 또한 매우 많았다. 여러 가지 벡터를 이용한 결과 최종적으로 pCold-TF 벡터를 이용하여 vp1, vp2 그리고 vp3 캡시드 단백질을 발현 및 정제하였다.

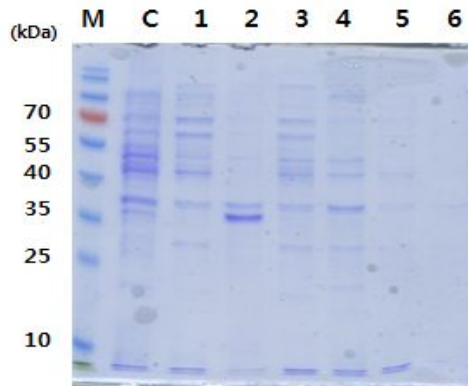


Fig. 9. Expression of recombinant pHCE-IA vp1, vp2 and vp3. Symbol: M. molecular marker; C, (control) BL21 (DE3); lane 1, vp1 supernatant; lane 2, vp1 pellet; lane 3, vp2 supernatant; lane 4, vp2 pellet; lane 5, vp3 supernatant; lane 6, vp3 pellet.

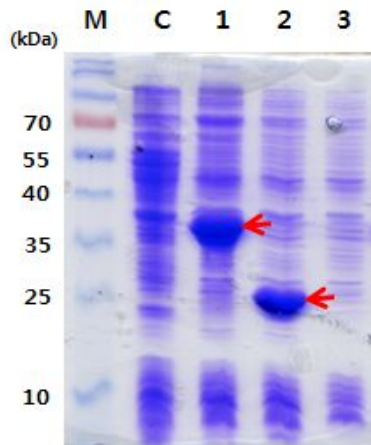


Fig. 10. Expression of recombinant pET30a vp1, vp2 and vp3. Symbol: M. molecular marker; C, (control) BL21 (DE3); lane 1, vp1 lysate; lane 2, vp2 lysate; lane 3, vp3 lysate.

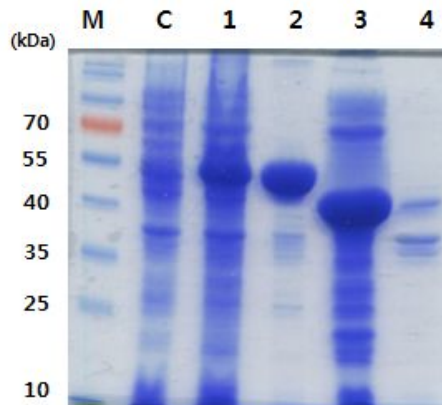


Fig. 11. Expression of recombinant pET30a-Intein vp1, vp2 and vp3. Symbol: M. molecular marker; C, (control) BL21 (DE3); lane 1, vp1 supernatant; lane 2, vp1 pellet; lane 3, vp2 supernatant; lane 4, vp2 pellet.

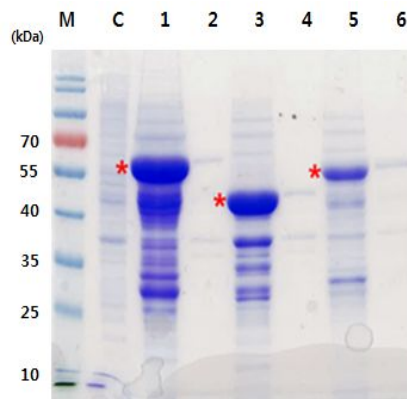


Fig. 12. Expression of recombinant pGEX-4T-1 vp1, vp2 and vp3. Symbol: M. molecular marker; C, (control) BL21 (DE3); lane 1, vp1 supernatant; lane 2, vp1 pellet; lane 3, vp2 supernatant; lane 4, vp2 pellet; lane 5, vp3 supernatant; lane 6, vp3 pellet.

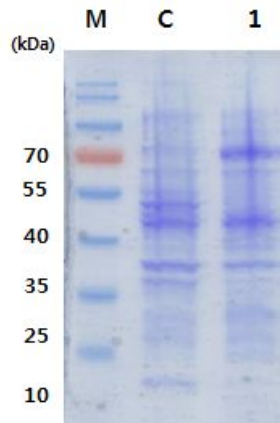


Fig. 13. Expression of recombinant pMAL-c5x vp1, vp2 and vp3. Symbol: M. molecular marker; C, (control) BL21 (DE3); lane 1, vp3 lysate.

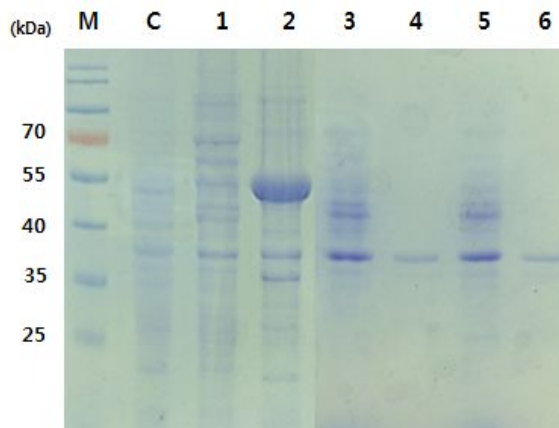


Fig. 14. Expression of recombinant pET-SUMO vp1, vp2 and vp3. Symbol: M. molecular marker; C, (control) BL21 (DE3); lane 1, vp1 supernatant; lane 2, vp1 pellet; lane 3, vp2 supernatant; lane 4, vp2 pellet; lane 5, vp3 supernatant; lane 6, vp3 pellet.

2. 배양온도에 따른 최적의 단백질 발현 조건 확립

재조합 플라스미드를 포함한 대장균에서 최적의 단백질 발현 조건을 확립하기 위해 다른 온도 조건에서 발현을 유도하였다. 각각 pCold-TF vp1, pCold-TF vp2 그리고 pCold-TF vp3으로 형질전환 된 대장균은 pCold-TF 특성인 cold shock을 주기위해 induction 후 15 °C에서 24시간, 20 °C에서 18 시간, 25 °C에서 9 시간 동안 비교적 낮은 온도에서 발현을 유도하였다. 먼저 1%의 전배양액을 접종한 뒤 재조합 pCold-TF HaRNAV VLP는 600nm의 파장에서 흡광도가 0.4 ~ 0.6이 될 때 0.3 mM의 IPTG를 첨가하였다. 단백질의 발현 유무를 확인하기 위해 sonicator를 이용해 단백질을 파쇄한 후 원심분리를 통하여 얻은 cell free extract와 precipitation된 cell을 12 % (W/V) SDS-PAGE를 통하여 확인하였다. 그 결과 pCold-TF vp1, pCold-TF vp2 그리고 pCold-TF vp3 각각 82 kDa, 72 kDa, 77 kDa로 발현함을 확인할 수 있었고 cell의 solubility와 proper folding을 위해 최종적으로 15 °C 조건을 최적의 배양온도로 판단하였다. (Fig. 15)

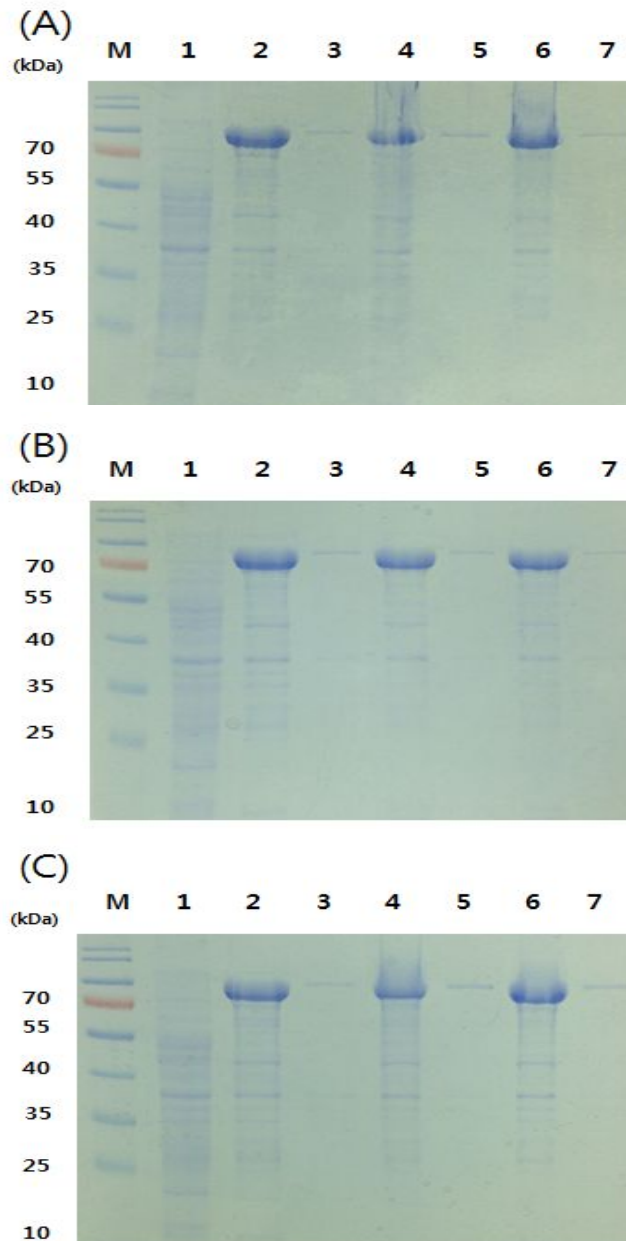


Fig. 15. Effect of temperature on the expression level of the recombinant pCold-TF vp1 (A), vp2 (B) and vp3 (C). Symbol: M. molecular marker; lane 1, (control) BL21 (DE3); lane 2, 15°C supernatant; lane 3, 15°C pellet; lane 4, 20°C supernatant; lane 5, 20°C pellet; lane 6, 25°C supernatant; lane 7, 25°C pellet.

3. IPTG 농도에 따른 최적의 단백질 발현 조건 확립

제조합 플라스미드를 포함한 대장균에서 최적화된 온도와 발현시간 조건에서 발현유도물질 IPTG의 농도에 따른 단백질 발현율을 비교하였다. 각각 0.1 mM, 0.3 mM, 0.5 mM, 1 mM의 IPTG 농도로 처리하였다. 1%의 전배양을 접종한 배양액이 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.4 ~ 0.6이 될 때까지 배양한 다음 각각의 농도 조건별로 IPTG를 접종하여 최적화된 온도 15 °C, 200 rpm에서 24 시간동안 발현을 유도하였다. 12% (W/V) SDS-PAGE를 통해 확인한 결과 pCold-TF vp1, pCold-TF vp2 그리고 pCold-TF vp3 각각 82 kDa, 72 kDa, 77 kDa에서 발현을 확인할 수 있었고 발현율, 경제성 등을 고려하여 0.1 mM IPTG 농도를 최적의 발현 조건으로 결정하였다. (Fig. 16)

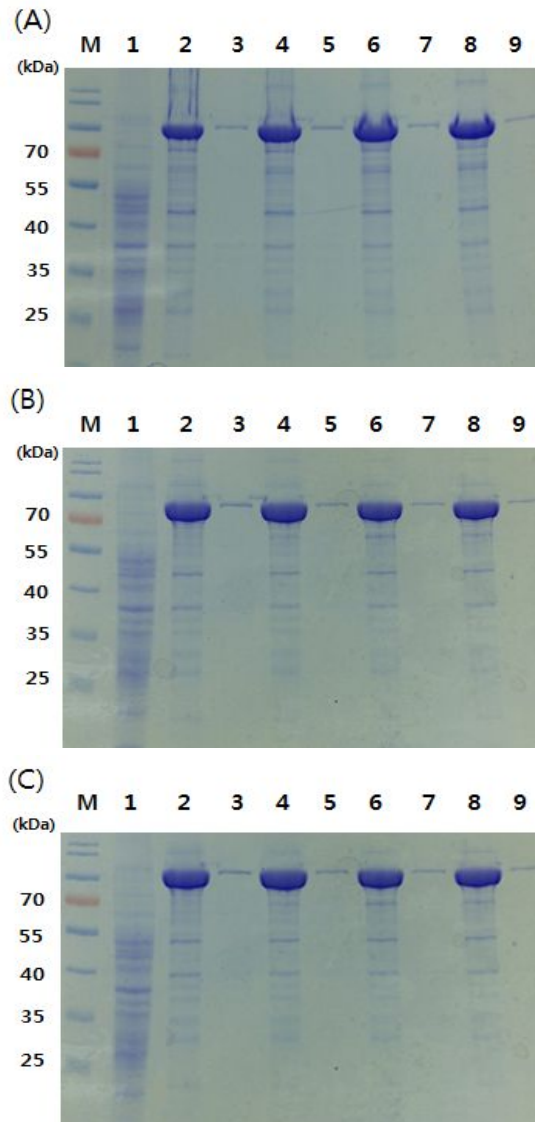


Fig. 16. Effect of IPTG concentration on the expression of recombinant pCold-TF vp1, vp2 and vp3. Symbol: M, molecular marker; lane 1, (control) BL21 (DE3); lane 2, 0.1 mM IPTG supernatant; lane 3, 0.1 mM IPTG pellet; lane 4, 0.3 mM IPTG supernatant; lane 5, 0.3 mM IPTG pellet; lane 6, 0.5 mM IPTG supernatant; lane 7, 0.5 mM IPTG pellet; lane 8, 1 mM IPTG Supernatant; lane 9, 1 mM IPTG pellet.

제 4 절 HaRNAV VLP 단백질 분리/정제

1. TEV protease 정제

protease에 의한 Fusion protein의 cleavage를 위해 FPLC를 이용하여 TEV protease (Addgene)를 정제 하였다. 20 % EtOH에 보관된 Ni-NTA resin을 resin volume 10배의 distilled H₂O, lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, pH 8.0) 및 binding buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 10 mM Imidazole, pH 8.0) 로 안정화 하였다. sonicator를 이용하여 cell을 파쇄 후 원심분리 (15000 rpm 30min)하여 얻은 상등액을 gravity를 이용하여 3회 흘려주어 binding 시키고 FPLC (BioRAD, USA)를 이용하여 10 mM에서 500 mM 까지 Imidazole gradient를 이용하여 washing 및 Elution 하였다. 그 후 Imidazole 제거와 protease의 안정화를 위해 Spectra/Por[®] 2 Dialysis membrane을 이용해 Dialysis (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7.5)를 수행하였다. 12 % (W/V) SDS-PAGE를 통해 TEV protease를 확인한 결과 약 27 kDa의 TEV protease를 확인하였다. (Fig. 17)

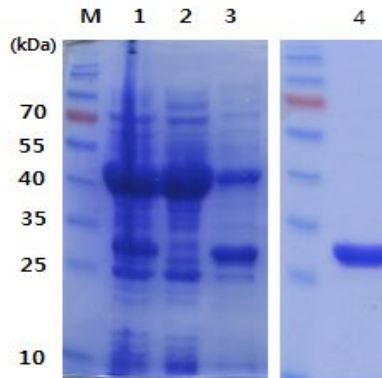


Fig. 17. Purification of the TEV protease using Ni-NTA affinity chromatography. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, Lysate; lane 2, flow through after resin binding; lane 3, TEV protease bound to Ni-NTA resin; lane 4, Elution.

2. Affinity chromatography을 이용한 HaRNAV 캡시드 단백질 정제

가. 재조합 pCold-TF HaRNAV 캡시드 융합 단백질 정제

최적의 단백질 발현 조건에서 획득한 pCold-TF vp1, vp2 그리고 vp3의 단백질을 획득하여 sonication을 이용하여 파쇄하고 원심분리를 통해 얻은 cell free extract를 affinity chromatography resin Ni-NTA agarose를 이용하여 정제하였다. 20 % EtOH에 보관된 Ni-NTA resin을 resin volume 10배의 distilled H₂O, lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, pH 8.0) 및 binding buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 10 mM Imidazole, pH 8.0)로 안정화 하였다. 안정화 된 resin에 cell free extract를 gravity를 이용해 3회 흘려주어 binding 시키고 crude extract를 제거하기 위해 resin volume의 10배로 washing buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0)를 흘려주었다. 마지막으로 elution buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0) 로 elution 하였다. 그 후 12 % (W/V) SDS-PAGE를 통해 pCold-TF vp1, pCold-TF vp2 그리고 pCold-TF vp3 각각 85 kDa, 56 kDa, 81 kDa 크기의 융합 단백질을 확인하였다 (Fig. 18).

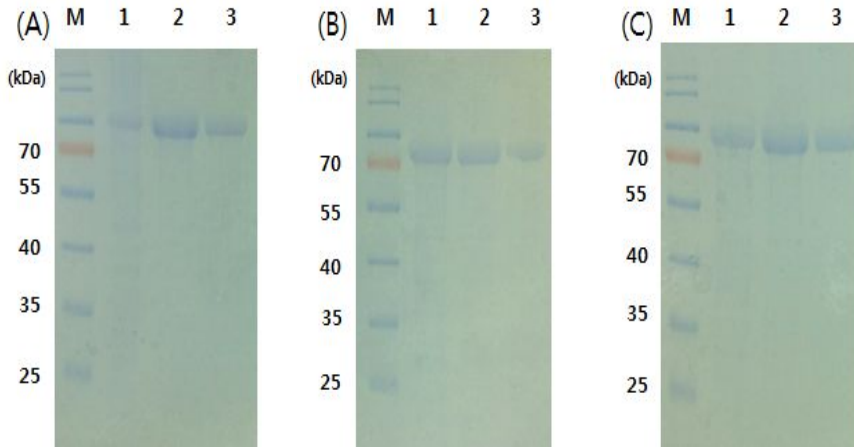


Fig. 18. Purification of the pCold-TF vp1 (A), pCold-TF vp2 (B) and pCold-TF vp3 (C) fusion protein. Symbol: M, Molecular maker; lane 1, lysate; lane 2, resin binding protein; lane 3, eluted protein.

나. TEV protease를 이용한 순수 캡시드 단백질의 정제

(1) TEV protease를 이용한 융합 단백질의 최적 절단 조건 탐색

단백질 용액 내 단백질 농도를 1 mg/ml로 맞추고 1 ml을 분취한 후 위 실험에서 직접 정제한 1 mg/ml TEV protease를 각각 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μ l 첨가하였다. 각 반응용액을 14, 30 그리고 37 $^{\circ}$ C에서 1, 2, 4, 8, 20 시간으로 변화를 주면서 반응시킨 후 12 % (W/V) SDS-PAGE를 이용해 융합 단백질의 cleavage를 확인하였다. Protease와 반응하며 일어나는 aggregation, cleavage을 등을 고려하여 최적 조건으로 30 $^{\circ}$ C에서 2 시간동안 반응시키고, TEV protease의 농도는 pCold-TF vp1은 단백질 1 mg당 TEV protease 5 μ g (g 비율 200 :1), pCold-TF vp2은 단백질 1 mg당 TEV protease 20 μ g (g 비율 50 :1), 그리고 pCold-TF vp3은 단백질 1 mg당 TEV protease 100 μ g (g 비율 10 :1)을 처리하는 것이 가장 좋은 것으로 확인하였다(Fig. 19).

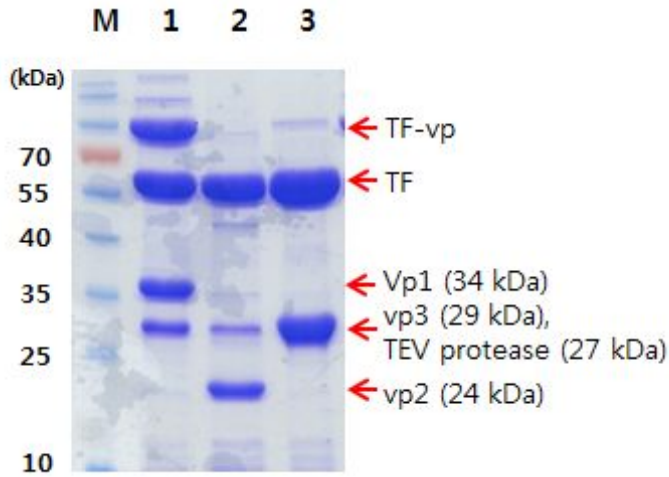


Fig. 19. SDS-PAGE of TEV protease-cleaved proteins from fusion protein.
Symbol: M. molecular marker; lane 1, vp1; lane 2, vp2; and lane 3, vp3

(2) TEV protease 처리 후 Ni-NTA를 이용한 VLP 단백질의 정제

융합 단백질을 protease로 cleavage한 후 dialysis를 통해 imidazole을 제거하였고, His₆-tag가 달려있는 TF와 TEV protease를 resin에 다시 흘려주었다. 그리고 elution된 sample을 12 % (W/V) SDS-PAGE를 이용해 target 단백질, 즉 HaRNAV capsid 단백질 vp1, vp2 그리고 vp3을 얻을 수 있었다(Fig. 20).

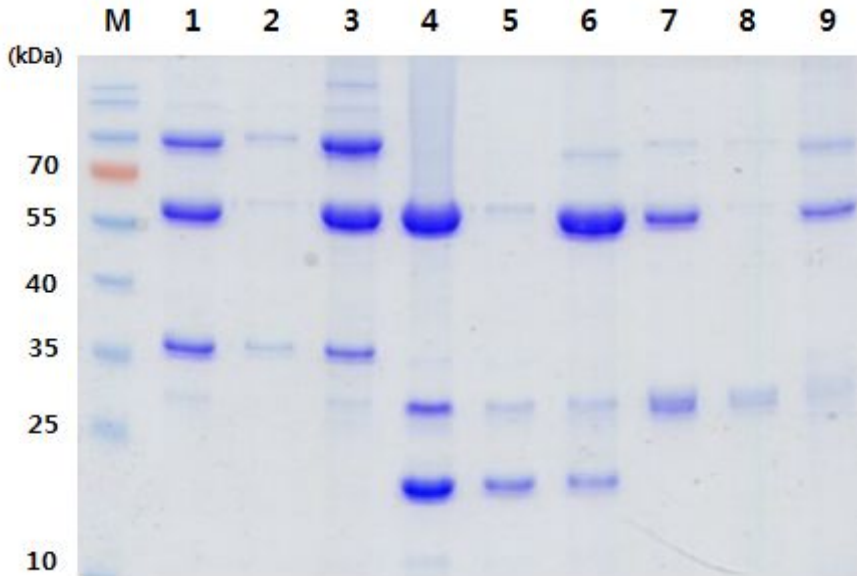


Fig. 20. SDS-PAGE analysis of TEV protease treated capsid proteins after elution through Ni-NTA affinity chromatography. Symbol: M, molecular maker; lane 1, vp1 after dialysis; lane 2, vp1 elution; lane 3, vp1 resin after elution; lane 4, vp2 after dialysis; lane 5, vp2 elution; lane 6, vp2 resin after elution; lane 7, vp3 after dialysis; lane 8, vp3 elution; lane 9, vp3 resin after elution.

3. Gel filtration을 이용한 HaRNAV 캡시드 단백질 정제

pCold-TF vp1, pCold-TF vp2 그리고 pCold-TF vp3 각각의 발현된 용합 단백질을 TEV protease로 절단시킨 후 단백질 sample을 분자량 크기별로 분리정제 하기 위해 Sephacryl S-100 (GE healthcare, England) column을 사용하여 FPLC (BioRAD, USA) 하였다. Column의 안정화를 위해 distilled H₂O를 1 ml/min의 유속으로 column의 10배 volume으로 washing하고, lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, pH 8.0)를 column의 3배 volume만큼 흘려주어 안정화 시켰다. Injection 후 처음 void volume 30 ml을 흘려주고 fraction volume을 3ml로 하여 120 ml까지 총 40개의 fraction을 받았다. 각 peak에 포함된 단백질 구성을 확인하

기 위해 12 % (W/V) SDS-PAGE로 각 peak별 단백질을 확인할 수 있었고, 단백질을 정량적으로 확인하기 위해 Bradford reagent (Sigma, USA)를 이용해 595 nm에서 농도를 측정하였다. 단백질 elution pattern 확인 결과 vp1, vp2 그리고 vp3 모두 major한 peak가 2개 나타났는데 첫 번째 peak에서는 여러 단백질이 혼합된 형태, 그리고 두 번째 peak에서는 TF 단백질만이 확인되는 것으로 보아 vp만의 분리가 이루어지지 않는 것을 확인하였다. (Fig. 21.).

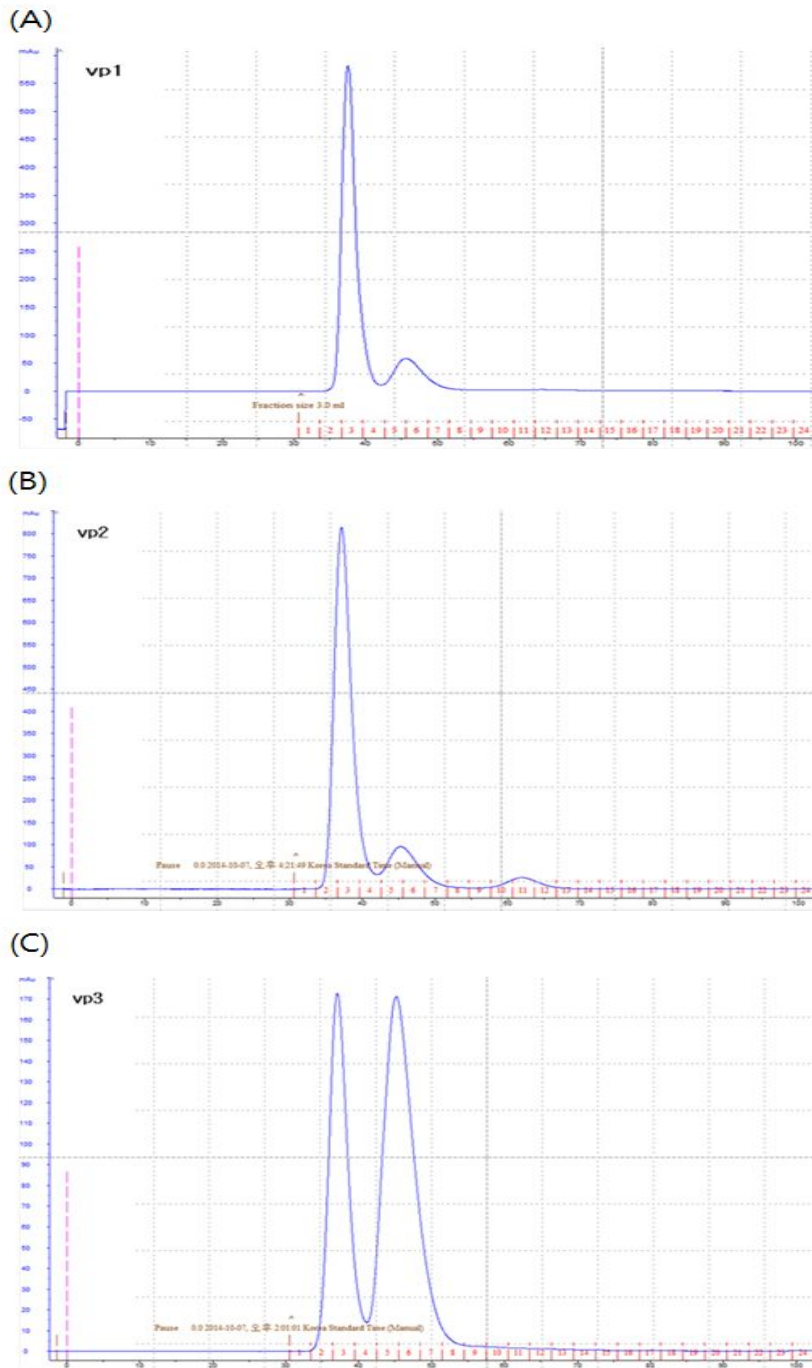


Fig. 21. Gel filtration chromatogram of vp1 (A), vp2 (B) and vp3 (C).

제 5 절 자가 조립 유도를 통한 HaRNAV VLP의 구조 관찰

1. Dialysis를 통한 자가 조립 유도

캡시드 단백질을 이루는 소단위인 capsomer간 서로 상호작용하려는 성질을 이용하여 VLP 형성을 유도하기 위해 각 Elution한 융합 단백질을 혼합 후 TEV protease를 30 °C에서 24 hr 반응시켰다. 12% (w/v) SDS-PAGE를 통해 융합 단백질의 cleavage를 확인하고 reassociation buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 8.0)로 Dialysis (Spectra/Por[®] 2 Dialysis membrane)를 수행하였다 (Fig. 22). Dialysis를 통해 자가조립을 유도한 VLP 단백질을 FPLC를 이용하여 gel filtration으로 분리하였다. 20 % EtOH에 보관된 Sephacryl S-500 컬럼 (GE healthcare Bio-sciences AB, England)을 0.6 ml/min의 유속으로 컬럼의 5 volume 만큼 distilled H₂O로 washing하고 reassociation buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 8.0)로 컬럼 volume의 5배 흘려주어 안정화시켰다. injection 후 처음 void volume 40 ml을 흘려주고 Fraction size를 2ml로 하여 180 ml까지 총 70 개의 fraction을 받았다. 각 peak의 단백질을 확인하기 위해 12 % (W/V) SDS-PAGE를 통해 각 peak별 단백질을 확인한 결과 첫 번째 peak 에서 덜 잘린 pCold-TF vp1, vp2 그리고 vp3, 단백질이 확인되었다. Fraction No. 11 ~ 15, 16 ~ 22을 각각 농축하였다. 정량적으로 확인하기 위해 Bradford reagent (Sigma, USA)를 이용해 595 nm에서 농도를 측정하였다 (Fig. 24).

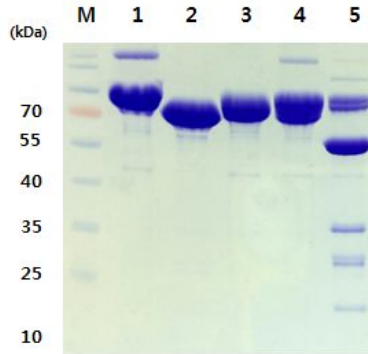


Fig. 22. SDS-PAGE analysis of individual fusion protein and mixture (pCOLD-TF vp1, pCOLD-TF vp2 and pCOLD-TF vp3) before and after TEV protease treatment. Symbol: M, Molecular maker; lane 1, pCold-TF vp1; lane 2, pCold-TF vp2; lane 3, pCold-TF vp3; lane 4, mixture; lane 5, mixture after TEV protease treatment.

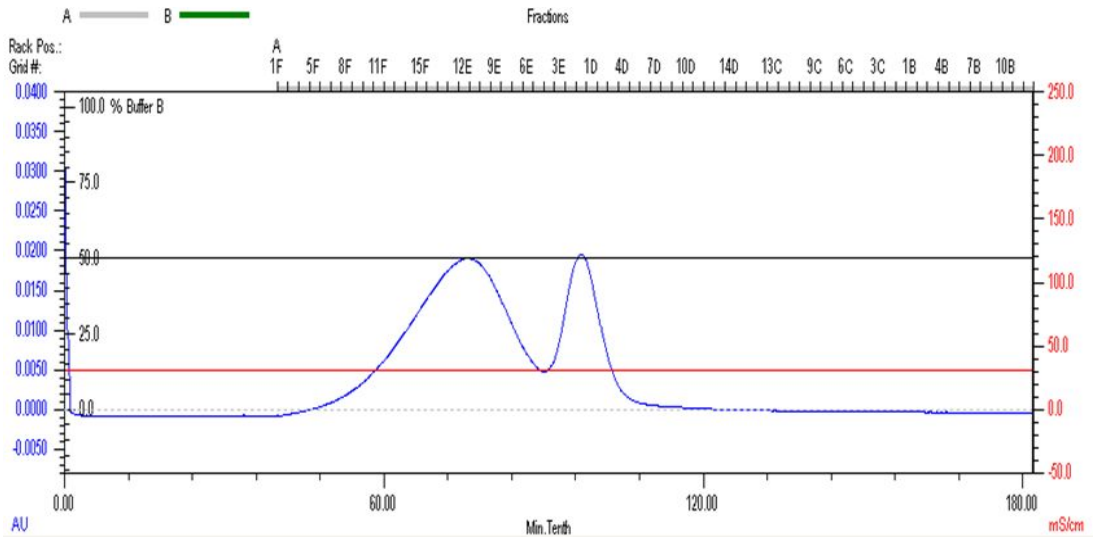


Fig. 23. Gel filtration chromatogram of fusion protein mixture (pCOLD-TF vp1, pCOLD-TF vp2 and pCOLD-TF vp3) after TEV protease treatment process.



Fig. 24. SDS-PAGE analysis of high molecular weight peak samples obtained from FPLC gel filtration chromatography (fraction Nos. 15-20).

Symbol: M, molecular maker; lane 1, vp1, vp2 and vp3 mixture.

2. TEM 분석을 통한 HaRNAV VLP 구조 확인

Dialysis를 통해 자가 조립을 유도한 HaRNAV 캡시드 단백질이 일정한 구조를 형성하는지 확인하기 위해 TEM 분석을 의뢰하였다. TEM 분석은 Anthanum hexaboride (Lab6) gun이 갖춰진 Tecnai G2 Spirit electron microscope (FEI Co., USA)를 사용하였으며 Ultrascan 4000 charge-coupled device (CCD) camera (Gatan Inc., USA)를 통해 이미지를 수집하였다 (한국기초과학연구원).

TEM 분석 결과 각각의 용합 단백질을 섞고 TEV protease 처리 후, dissociation / reassociation 과정을 통해 자가 조립을 유도한 sample에서 모양이 일정하지 않은 부정형의 particle이 형성됨을 관찰되었고 reassociation 과정만을 통해 자가 조립을 유도한 sample에서는 여러 단백질이 서로 붙어 연결되어있는 형태가 관찰되었다 (Fig. 25).

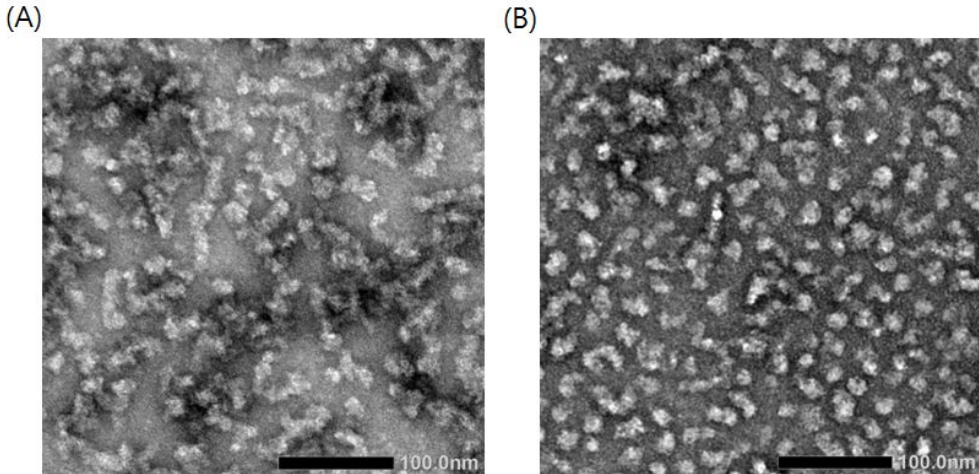


Fig. 25. Transmission electron microscopic analysis of negative stained HaRNAV VLPs. Self-assembled amorphous particles of HaRNAV VLPs. reassociation (A), dissociation/reassociation (B).

제 6 절 HaRNAV VLP의 숙주 특이성

1. HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3의 FITC 표지

가. HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3 각각에 FITC 표지

Affinity chromatography를 통해 정제한 HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3 각각의 단백질에 FITC를 표지하기 위해 1 mg/ml의 단백질과 100 mM FITC 100 μ l를 주입하여 1 시간 동안 상온에서 반응시켰다. 그 후 HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3 단백질에 표지되지 않은 FITC를 제거하기 위해 cut off 10 k의 dialysis cassette를 이용하여 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, pH 8.0)로 4 °C에서 2 일 동안 dialysis 통해 vp1, vp2 그리고 vp3 단백질에 FITC를 표지하였다. 반응이 끝난 후 남아있는 잔여 FITC 제거를 위해 10 k centricon(PALL, USA)를 이용하여 농축하였다. FITC가 표지된 HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3 단백질을 12 %

SDS-PAGE 전기영동 한 후 UV를 비취 FITC의 형광을 확인하였다. 그 결과 pCold-TF vp1, vp2 그리고 vp3 각각 34 kDa, 24 kDa, 29 kDa의 단백질을 확인할 수 있었고 정제 시 분리가 되지 않은 다른 단백질들도 함께 녹색 형광이 관찰되는 것을 확인되었다 (Fig. 26).

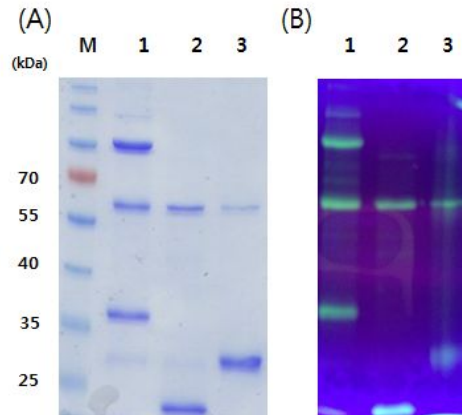


Fig. 26. SDS-PAGE (A) and SDS-PAGE - UV light (B) analysis of FITC labelled individual pCold-TF vp1, vp2 and vp3.

Symbol: M, molecular maker; lane 1, vp1; lane 2, vp2; lane 3, vp3.

나. HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3의 자가 조립 유도 후 FITC 표지

Dialysis를 통해 자가 조립을 유도하고 TEM 분석으로 확인된 무정형의 VLP 단백질에 FITC를 표지하였다. 1 mg/ml의 단백질과 100 mM FITC 100 μ l를 주입하여 1 시간 동안 상온에서 반응시켰다. 그 후 VLP 단백질에 표지되지 않은 FITC를 제거하기 위해 cut off 10k의 dialysis cassette를 이용하여 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, pH8.0)로 4°C에서 2 일 동안 dialysis 통해 VLP 단백질에 FITC를 표지하였다. 반응이 끝난 후 남아있는 잔여 FITC 제거를 위해 10k centricon(PALL, USA)를 이용하여 농축하였다. FITC가 표지된 VLP 단백질을 12%(w/v) SDS-PAGE 전기영동 한 후 UV를 비취 FITC의 형광을 확인하였다. 그

결과 vp1, vp2 그리고 vp3 단백질에서 녹색 형광을 확인할 수 있었고 기타 다른 단백질들도 함께 확인되었다 (Fig. 27).

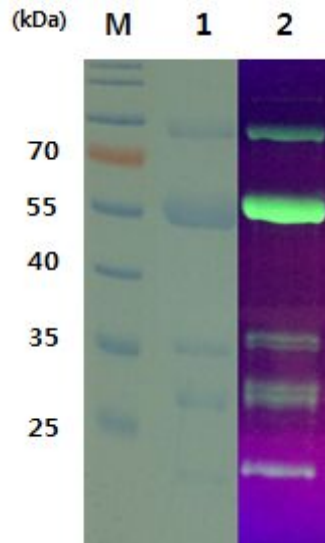


Fig. 27. SDS-PAGE and SDS-PAGE - UV light analysis of FITC labelled pCold-TF vp1, vp2 and vp3 mixture.

Symbol: M, molecular maker; lane 1, SDS-PAGE; lane 2, SDS-PAGE - UV.

2. 형광 현미경을 통한 FITC가 표지된 HaRNAV VLP의 숙주 특이성 관찰

가. HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3 각각의 숙주 특이성 관찰

캡시드 단백질을 이루는 소단위인 vp1, vp2 그리고 vp3가 각 소단위만으로 숙주와 반응하는지, 그렇다면 숙주와 인지하는 소단위는 무엇인지 알아보기 위해 Ni-NTA column을 이용해 정제한 각각의 FITC가 표지된 pCold-TF vp1, pCold-TF vp2 그리고 pCold-TF vp3에 유해조류를 반응하여 숙주 특이성을 관찰

하였다. *H. akashiwo* NEPCC 102, *H. akashiwo* NEPPCC 522 숙주 조류와 *C. marina* KMMCC 579, *G. aurelum* KMMCC 978의 비 숙주 조류를 사용하였다. FITC가 표지된 pCold-TF vp1, vp2 그리고 vp3을 각 조류와 1 : 4의 비율로 차광 하에 교반기를 통해 접촉을 유도하였다. 상온에서 3 시간 동안 반응시킨 후 1600 × g에서 3 분간 원심분리를 통해 상등액을 제거한 다음 잔여 FITC를 제거하기 위해 멸균된 F/2 배지 500 μ l를 사용하여 1600 × g에서 3 분간 2 번 원심분리 후 상등 액을 제거하였다. 마지막으로 F/2 배지 100 μ l로 재현탁하여 형광 현미경을 통해 숙주 특이성을 관찰하였다. 건강한 조류는 클로로필 a로 인해 red filter에서 적색 형광으로 확인할 수 있고 FITC가 결합된 vp1, vp2 그리고 vp3는 각각이 숙주 특이성이 있을 시 green filter에서 녹색 형광으로 발광하기 때문에 녹색 형광의 발광 유/무에 따른 숙주 특이성을 확인하였다. green filter에서 각 소단위들의 숙주 특이성 확인 결과 녹색 형광을 띄지 않아 각각의 소단위들은 숙주에 대한 특이성을 가지 않는다는 것을 확인하였다 (Fig. 28).

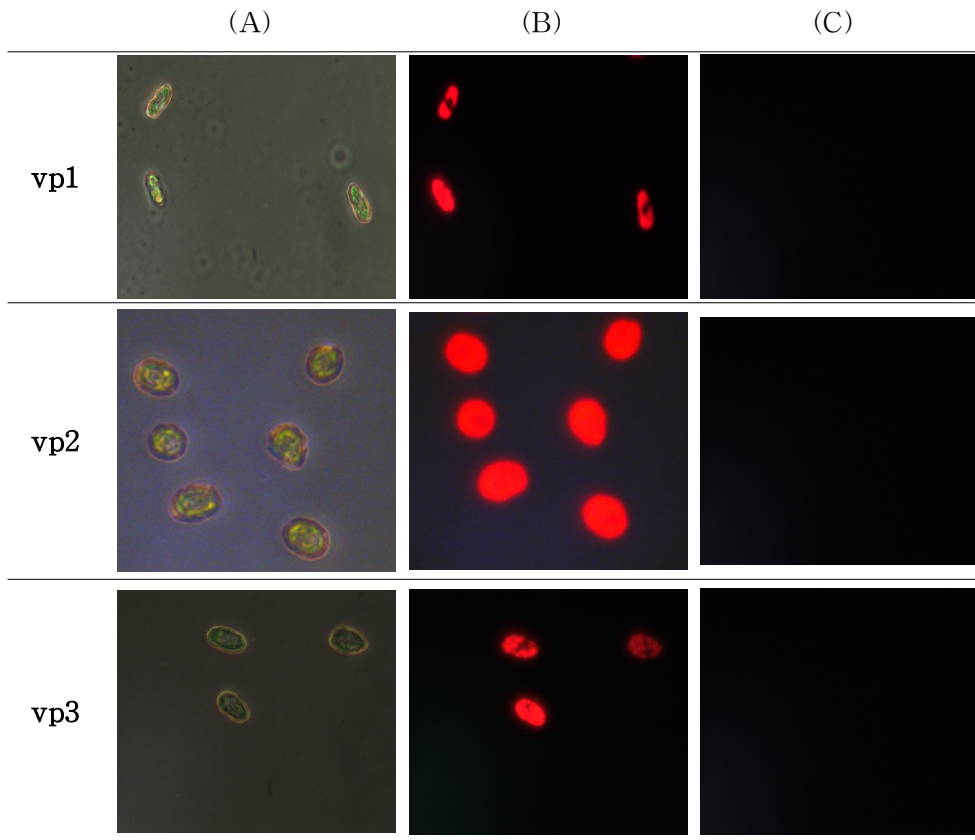


Fig. 28. Host specificity analysis of individual FITC labelled vp1, vp2 and vp3 against *H. akashiwo* (NEPCC 102) under fluorescence microscopy (a). No filter, (b). Red filter and (C). Green filter.

나. HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3의 자가 조립 유도 후 숙주 특이성 관찰

TEM 분석을 통해 관찰된 무정형의 입자가 숙주특이성을 가지는지 확인하기 위해 FITC가 표지된 VLP 단백질에 유해조류를 반응하여 숙주 특이성을 관찰하였다. *H. akashiwo* NEPCC 102, *H. akashiwo* NEPPCC 522 숙주 조류와 *C. marina* KMMCC 579, *G. aurelum* KMMCC 978의 비 숙주 조류를 사용하였다. FITC가 표

지된 VLP 단백질을 각 조류와 1 : 4의 비율로 차광 하에 교반기를 통해 접촉을 유도하였다. 상온에서 3 시간 동안 반응시킨 후 1600 × g에서 3 분간 원심분리를 통해 상등액을 제거한 다음 잔여 FITC를 제거하기 위해 멸균된 F/2 배지 500 μl를 사용하여 1600 × g에서 3 분간 2 번 원심분리 후 상등액을 제거하였다. 마지막으로 F/2 배지 100 μl로 재현탁하여 형광 현미경 (OPTINITY, China)을 통해 숙주 특이성을 관찰하였다. 그 결과 숙주 조류 *H. akashiwo* NEPCC 102, *H. akashiwo* NEPCC 522를 포함한 비 숙주 조류 *H. circularisquama* HU9433-P, *C. marina* 모두 녹색형광이 관찰되지 않았다 (Fig. 29).

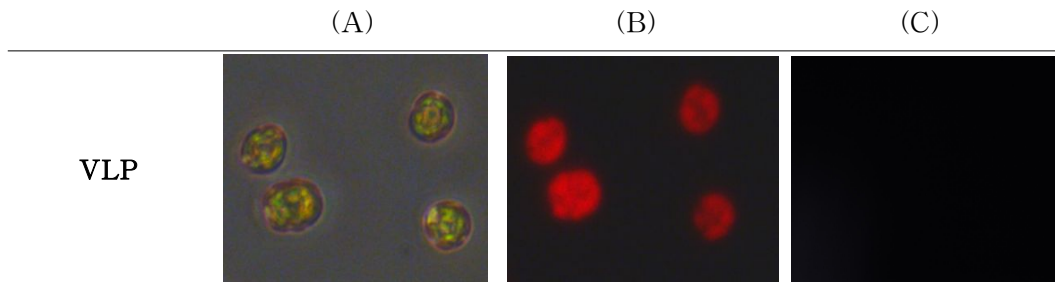


Fig. 29. Host specificity analysis of FITC labelled VLP against *H. akashiwo* (NEPCC 102) under fluorescence microscopy (a). No filter, (b). Red filter and (c). Green filter.

제 4 장 결 론

1. Genescript를 통해 확보한 HaRNAV vp1, vp2 그리고 vp3의 유전자 정보를 대장균 내에서 단백질 발현을 위해 rare codon을 최적화시켜 유전자 합성을 하였다. 재조합에 필요한 유전자 증폭은 pUC57 vp1, pUC57 vp2 그리고 pUC57 vp3를 주형 플라스미드로 사용하였고 primer 제작 시 각 단백질 염기서열의 N말단에 TEV protease 유전자를 넣어 합성하였다. 그 이후 단백질 발현 벡터인 pCold-TF에 클로닝 하여 발현 및 정제하였다. 초기에 pET30a, pET30a-Intein, pGEX-4T-1, pMAL-c5x, pTXB1, pHCE-IA, pET-SUMO 벡터를 이용하였으나 발현, 정제의 문제로 최종적으로 pCold-TF를 선택하였다.
2. 재조합 pCold-TF vp1, pCold-TF vp2 그리고 pCold-TF vp3의 최적발현 조건 탐색 결과 0.1 mM의 IPTG 첨가한 후 15°C에서 24 시간 배양하였을 때 각각 82, 72, 77 kDa의 수용성 융합 단백질을 얻을 수 있었다.
3. 재조합 pCold-TF vp1, pCold-TF vp2 그리고 pCold-TF vp3에서 발현된 수용성 융합 단백질은 Ni-NTA affinity chromatography를 이용하여 1차 정제 하였고 TEV protease를 이용해 융합 단백질을 분리, Dialysis를 통한 Imidazole 제거 후 Ni-NTA affinity chromatography로 2차 정제 하였다. SDS-PAGE 확인 결과 vp 단백질과 TF, TEV protease가 서로 어떠한 상호작용을 하거나 단백질 구조상의 문제로 인해 여전히 분리가 되지 않았다. 단백질을 분리/정제하기 위한 다른 방법으로 gel filtration (sephacryl S-100)을 이용하였으나 이 또한 분리가 되지 않았다.
4. 캡시드 단백질의 소단위인 vp1, vp2 그리고 vp3의 자가 조립 가능성을 염두하여 pCold-TF vp1, pCold-TF vp2 그리고 pCold-TF vp3 각각의 융합 단백질을 섞은 후 TEV protease 처리하고 Dissociation/Reassociation buffer로 Dialysis하면

서 자가 조립을 유도하였다. gel filtration (sephacryl S-500) 결과, VLP 분자량의 peak를 확인하였다.

5. 자가 조립 유도한 단백질의 TEM 의뢰 결과 reassociation만을 거친 경우 단백질들끼리 서로 엉킨 형태를 관찰할 수 있었고 dissociation / reassociation을 한 경우 크기와 모양이 불규칙한 무정형의 입자들을 관찰할 수 있었다. 완벽한 VLP의 형성이 아닌 여러 contamination된 단백질들의 복합체라고 보여진다.
6. Ni-NTA affinity chromatography를 이용하여 캡시드 단백질 소단위인 vp1, vp2 그리고 vp3 각각에 형광물질 FITC를 표지하여 숙주 특이성을 관찰하였다. 그 결과 vp1, vp2 그리고 vp3 모두 숙주인 *H. akashiwo* NEPCC 102, *H. akashiwo* NEPCC 522에서 녹색 형광이 보이지 않는 것으로 보아 소단위만으로는 숙주 특이성을 가지지 않는 것을 확인하였다.
7. 자가 조립 유도 단백질의 FITC 실험 결과, 숙주인 *H. akashiwo* NEPCC 102, *H. akashiwo* NEPCC 522를 포함하여 비 숙주인 *C. marina*, *G. aurelium*에서도 FITC에 의한 녹색 형광이 관찰되지 않았다. 이 결과로 보아 정상적인 형태의 VLP가 만들어지지 않았거나, 혹 VLP가 정상적으로 만들어졌어도 그 농도가 너무 낮아 조류와 반응하여 녹색 형광이 관찰되지 않았다고 판단된다.
8. 캡시드 단백질의 소단위인 vp1, vp2 그리고 vp3를 이용해 정20면체의 VLP를 만들기 위해서는 각 소단위의 높은 정제도가 요구어진다는 것을 확인하였다. 그렇기 때문에 다른 발현 및 정제 시스템을 이용하여 vp1, vp2 그리고 vp3를 정제하고, VLP 형성 및 살조물질 탑재 등 추가적인 실험이 필요하다고 판단된다.

참 고 문 헌

1. Kevin, G., Sellner., Gregory, J.D., Gary, J.K. **2003**. Harmful algal blooms: causes, impacts and detection, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 30, 383-406.
2. Moore, S.K., Trainer, V.L., Mantua, N.J., Parker, M.S., Laws, E.A., Backer, L.C., Fleming, L.E. **2008**. Impacts of climate variability and future climate change on harmful algal blooms and human health, *Environmental Health*, 7, S4.
3. Glibert, P.M., Anderson, D.A., Gentien, P., Granéli, E., Sellner, K.G. **2005**. The global, complex phenomena of harmful algal blooms. *Oceanography*, 18(2), 136 - 147.
4. Park, T.G., Lim, W.A., Park, Y.T., Lee, C.K., Jeong, H.J. **2013**. Economic impact, management and mitigation of red tides in Korea. *Harmful Algae*, 30S, S131-S143.
5. Diane, P., Simon, A., Parsons., Bruce, J., Stuart, H., Andrew, C., Anna, W., Michael, C., Barry, H., Adam, E. **2013**. Experiences of algal bloom control using green solutions barley straw and ultrasound, an industry perspective. *Water and Environment Journal*, 27, 148 - 156.
6. Yu, Guozhong., Zhao, Chengmei., Liu, Bing., Li, Qingfei., Gao, Hui. **2013**. Removal of algae from raw water by ultrasonic irradiation and flocculation: A pilot scale experiment. *Journal of Environmental Biology*, 34, 331-335.
7. Xavier, Mayali., Farooq, Azam. **2004**. Algicidal bacteria in the sea and their

- impact on algal blooms. *J.Eukaryot Microbiol*, 51(2), 139-144.
8. Sengco, M.R., Anderson, D.M. **2004**. Controlling harmful algal blooms through clay flocculation. *J Eukaryot Microbiol*, 51(2), 169-72.
 9. 박치현, 이병호. 적조 방제용 황토살포가 연안 저서생태계에 미치는 영향. *한국환경과학회지*, 제15권(제11호), 1035~1043.
 10. Jeong, H.J., Yoo, Y.D., Lim, A.S., Kim, T.W., Lee, K.T., Kang, C.K. **2013**. Raphidophyte red tides in Korean waters. *Harmful Algae*, 305, 541-552.
 11. Yujie, M., Roeland, J.M., Nolte, J., Cornelissen, J.L.M. **2012**. Virus-based nanocarriers for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 811-825.
 12. Fuxiao, Liu., Shengqiang, Ge., Lin, Li.a., Xiaodong, Wua., Zengshan, Liu., Zhiliang, Wang. **2012**. Virus-like particles: potential veterinary vaccine immunogens. *Research in Veterinary Science*, 93, 553-559.
 13. Khan, S., Arakawa, O., Onoue, Y. **1997**. Neurotoxins in a toxic red tide of *Heterosigma* (Raphidophyceae) in Kagoshima Bay, Japan. *Aquaculture Research*, 28, 9-14.
 14. Lang, A.S., Culley, A.I., Suttle, C.A. **2004**. Genome sequence and characterization of a virus (HaRNAV) related to picorna-like viruses that infects the marine toxic bloom-forming alga *Heterosigma akashiwo*. *Virology*, 320, 206 - 217.

15. Tai, Vera., Lawrence, J.E., Lang, A.S., Chan, A.M., Culley, A.I., Suttle, C.A. **2003**. characterization of HaRNAV, a single-stranded RNA virus causing lysis of *heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *J. Phycol*, 39, 343 - 352.

16. Nagasaki, K., Tarutani, K., Yamaguchigrowth, M. **1999**. Characteristics of Heterosigma Virus and Its Possible Use as a Microbiological Agent for Red Tide Control, *Environ. Microbiol*, 65(3), 898.

17. Lawrence, J.E., Chan, A.M., Suttle, C.A. **2001**. A novel virus (haniv) causes lysis of the toxic bloom-forming alga *heterosigma akashiwo* (raphidophyceae). *J. Phycol*, 37, 216-222.

18. Hagan, M.F., Chandler, David. **2006**. Dynamic Pathways for Viral Capsid Assembly. *Biophysical Journal*, 91, 42-54,

19. Waugh, D.S. **2005**. Making the most of affinity tags. *TRENDS in Biotechnology*, 23, 6.

20. Kim, E.K., Moon, J.C., Lee, J.M., Jeong, M.S., Oh, C.S., Ahn, S.M., Yoo, Y.J., Jang, H.H. **2012**. Large-scale production of soluble recombinant amyloid-b peptide 1 - 42 using cold-inducible expression system. *Protein Expression and Purification*. 86, 53-57.

21. Kang, B.S., Eom, C.Y., Kim, W.D., Kim, P.I., Ju, S.Y., Ryu, J.W., Han, G.H., Oh, J.I., Cho, H., Baek, S.H., Kim, G.D., Kim, M.J., Hyun, J.K., Jin, E.S., Kim, S.W. **2014**. Construction of target-specific virus-like particles for the

- delivery of algicidal compounds to harmful algae. *Environ Microbiol*, 10.1111, 1462-2920.
22. Mateu, M.G. **2011**. Virus engineering: functionalization and stabilization. *Protein, Protein Engineering, Design & Selection*, 24(1 - 2), 53 - 63.
23. Chuan¹, Y.P., Fan¹, Y.Y., Lual, L.H.L., Middelberg, A.P.J. **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.
24. Nina, Irwin., Kaaren A, Jansse. **2011**. Molecular Cloning. chapter 1, protocol 24.
25. Kado, C.I., Liu, S.T. **1981**. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid. *J. Bacteriol*, 145, 1365-1373.
26. <http://www.who.edu/redtide/species/by-name>, May 16, **2013**.