[UCI]I804:24011-200000263730

2013年 2月

碩士學位論文

와편모조류 *Heterocapsa circularisquama* HcRNAV34 virus like particle의 발현, 정제, 자가조립 및 숙주특이적 살조능

朝鮮大學校 大學院

環境工學科

朱炫燁

와편모조류 *Heterocapsa circularisquama* HcRNAV34 virus like particle의 발현, 정제, 자가조립 및 숙주특이적 살조능

Expression, purification, self assembly and host specific algicidal activity of virus like particle of *Heterocapsa circularisquama* HcRNAV34

2013年 2月 25日

朝鮮大學校 大學院

環境工學科

朱炫燁

와편모조류 *Heterocapsa circularisquama* HcRNAV34 virus like particle의 발현, 정제, 자가조립 및 숙주특이적 살조능

指導敎授　　金 時 郁

이 論文을 工學碩士 學位申請 論文으로 提出함

2012年　10月

朝鮮大學校 大學院

環境工學科

朱炫燁

朱炫燁의 碩士學位論文을 認准함

委員長　朝鮮大學校 敎授　이 인 화　印

委　員　朝鮮大學校 敎授　이 성 행　印

委　員　朝鮮大學校 敎授　김 시 욱　印

2012年　11月

朝鮮大學校 大學院

TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS ····· I
LIST OF TABLES ····· II
LIST OF FIGURES ····· III
ABSTRACT ····· IV

제 1 장 서 론 ····· 1
제 1 절 연구배경 ····· 1
제 2 절 연구목적 ····· 5

제 2 장 실험 재료 및 방법 ····· 8
제 1 절 효소 및 시약 ····· 8
제 2 절 사용균주 및 플라스미드 ····· 8
제 3 절 재조합 DNA 제조 ····· 9
1. 유전자 합성 ····· 9
2. HcRNAV34 유전자 증폭 ····· 9
3. 유전자 단편 TA 클로닝 ····· 9
4. 플라스미드 정제 및 염기서열 확인 ····· 10
5. 제한효소 처리와 DNA 단편 분리 ····· 10
6. Ligation 및 형질전환 ····· 11
7. Competent cell 제조 ····· 11
8. 형질전환된 균체로부터 재조합 플라스미드 확인 ····· 11
9. SDS-PAGE를 이용한 단백질 발현 확인 ····· 12
제 4 절 HcRNAV34 캡시드 단백질 발현 및 정제 ····· 13
1. HcRNAV34 캡시드 단백질 발현 ····· 13
2. 온도 및 IPTG농도에 따른 최적발현 조건 탐색 ····· 13
3. Western blot analysis ····· 13
4. Cell free extract의 제조 ····· 14
5. Chitin column을 이용한 HcRNAV34 캡시드 단백질 정제 ····· 14
6. *N*-terminal amino acid sequencing ····· 15

제 5 절 HcRNAV34 VLPs의 조립 ····· 16
1. Dissociation와 reassociation 과정을 통한 조립 ····· 16
2. HcRNAV34 VLPs의 구조 ····· 16
제 6 절 FITC를 이용한 HcRNAV34 캡시드 단백질의 표지 ····· 17
제 7 절 HcRNAV34 VLP의 숙주 특이성 관찰 ····· 17
제 8 절 HPLC를 이용한 HcRNAV34 VLP에 탑재된 TD49정량 분석 ····· 18
제 9 절 숙주에 대한 TD49가 탑재된 HcRNAV34 VLP의 살조 효과 ····· 18

제 3 장 결과 및 고찰 ····· 19
제 1 절 HcRNAV34 유전자 합성 ····· 19
제 2 절 HcRNAV34 유전자의 클로닝 및 발현 ····· 21
1. HcRNAV34 유전자의 클로닝 ····· 21
2. HcRNAV34 캡시드 단백질의 최적발현 조건 확립 ····· 24
제 3 절 HcRNAV34 캡시드 단백질 정제 ····· 28
1. Chitin column을 이용한 HcRNAV34 캡시드 단백질의 정제 ····· 28
2. *N*-terminal amino acid sequencing ····· 30
제 4 절 HcRNAV34 VLPs의 구조 ····· 32
제 5 절 FITC를 이용한 HcRNAV34 캡시드 단백질의 표지 ····· 34
제 6 절 HcRNAV34 VLPs의 숙주 특이성 관찰 ····· 36
제 7 절 HPLC를 이용한 HcRNAV34 VLPs에 탑재된 TD49정량분석 ····· 40
제 8 절 숙주에 대한 TD49가 탑재된 HcRNAV34 VLPs의 살조 효과 ····· 43

제 4 장 결론 ····· 45

참고문헌 ····· 47

LIST OF TABLES

Table 1. The main microalgal species which cause red tide in korea ····· 3
Table 2. Controlling methods and principles for harmful algal blooming ····· 7
Table 3. *Heterocapsa circularisquama* strains used in this study ····· 37
Table 4. TD49 concentration encapsulated in reassociated and its concomitant dissociated VLPs ····· 42

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Annual red tide incidents in korea caused by different algal species during 1980-2004 ····· 4
Fig. 2. ORF-2 gene sequence of HcRNAV34 capsid protein obtained from Genbank [accession number AB218608] and codon optimization for expression in *E. coli* ····· 20
Fig. 3. PCR product of codon optimized gene of HcRNAV34 ····· 22
Fig. 4. Construction of pTXB1-HcRNAV34 ····· 23
Fig. 5. SDS-PAGE analysis of the recombinant HcRNAV34 capsid protein expressed in *E. coli* at different temperature (A) 30°C, (B) 25°C and (C) 16°C ····· 25
Fig. 6. Effect of IPTG concentration on recombinant HcRNAV34 capsid protein expressed in *E. coli*; (A) 0.1 mM, (B) 0.5 mM and (C) 1 mM ····· 26
Fig. 7. Western blot analysis of recombinant HcRNAV34 capsid protein expressed in *E. coli* at different IPTG concentration ····· 27
Fig. 8. Purified HcRNAV34 capsid protein using chitin column chromatography ····· 29
Fig. 9. *N*-terminal amino acid sequencing of HcRNAV34 capsid protein ····· 31
Fig. 10. TEM analysis of reassociated HcRNAV34 VLPs visualized by negative staining (A) and Cryo-EM analysis from projection averages of negatively stained particles (B) ····· 33
Fig. 11. SDS-PAGE analysis of HcRNAV34 capsid protein labeled with FITC ····· 35
Fig. 12. Host specific binding of HcRNAV34 VLPs labeled with FITC to its host, *H. circularisquama* HU9433-P and HA92-1, under the observation with optical and fluorescent microscopy. Optical filter (A), red filter (B), and green filter (C) ····· 38

Fig. 13. Host specific binding of HcRNAV34 VLPs labeled with FITC to its non-host, *H. akashiwo, C. marina* and *H. circularisquama* HY9423, under the observation with optical and fluorescent microscopy. Optical filter (A), red filter (B), and green filter (C) ····· 39
Fig. 14. Detection of TD49 encapsulated in reassociated VLPs and dissociated VLPs after reassociation process. ····· 41
Fig. 15. Host specific algicidal effect of HcRNAV34 VLPs encapsulated with TD49 on its host *H. circularisquama* HU9433-P (A) and its non-host *H. circularisquama* HY9423 (B) at 20℃ for 2 hr and 3 hr ····· 44

ABSTRACT

Expression, purification, self assembly and host specific algicidal activity of virus like particle of *Heterocapsa circularisquama* HcRNAV34

Ju Sun Yi
Advisor : Prof. Kim, Si Wouk, Ph.D.
Department of Environmental Engineering,
Graduate School of Chosun University

Virus-like particles (VLPs) have received considerable attention for vaccine, drug delivery, gene therapy and material science applications. Especially, recombinantly expressed VLPs of HcRNAV (a single-standard RNA virus specifically infecting the dinoflagellate, *Heterocapsa circularisquama*) is considered as a novel potent carrier for harmful algal bloom. In the present study, HcRNAV34 VLPs were expressed in *E. coli* BL21(DE3) host system and the VLPs were purified using chitin-binding affinity column chromatography. A novel organic synthesized algicidal substance, thiazolidinedione (TD49), was encapsulated into HcRNAV34 VLPs by dissociation and reassociation processes and its encapsulation was detected by HPLC analysis. HcRNAV34 VLPs encapsulating TD49 specifically attached and destroyed the cells of *H. circularisquama* HU9433-P, which is the host of HcRNAV34 virus, but not the cells of *H. circularisquama* HY9423, which is the host of HcRNAV109 virus. These results indicate that HcRNAV34 VLPs have considerably high host specificity and is compatible with a common viral property of host specific infection. On the basis of above results, we suggest the possibility which to develop biological control method of harmful algal blooms using HcRNAV34 VLPs embedded with algicidal substances.

제 1 장 서 론

제 1 절 연구배경

우리나라 해역에서 발생하는 유해성 조류에 의한 적조는 1980년대 이후 해양환경 오염의 발생빈도와 기간이 늘어남에 따라 증가하고 있으며, 그 발생영역 또한 점차적으로 확대되어 사회·경제적인 문제로 대두되어지고 있다. 적조는 해수에 질소, 인 등과 같은 영양염류의 과잉공급, 일사량, 수온 등의 환경 조건이 적조유발 생물이 서식하기 적합한 조건일 때 유해 조류들의 대량 번식으로 인하여 발생하는 현상이다. 적조생물의 급속한 대량번식은 적조생물들의 호흡과 이들의 사체 분해시 수중의 많은 양의 용존산소를 소비함으로서 다른 수중생물의 생존을 어렵게 하고, 적조유발 유해성 조류로부터 유해물질 및 독소 등이 분비되어 어·패류 및 수중 서식 생물들을 폐사시키는 결과를 초래한다. 또한 이러한 유해물질 및 독소를 포함한 어·패류를 사람이 섭취하게 되면, 마비성·설사성 중독을 일으키는 등 사람의 건강까지도 위협하는 심각한 사회적 문제를 유발한다 [1-3].

1961년 진동만에서 발생한 적조는 우리나라에서 발견된 최초의 적조이며, 1963년 이후 경제개발 5개년을 시작으로 급격한 산업 활동 증가 및 몇몇 대도시들의 인구집중 현상으로 인해 산업 및 도시폐수가 지속적으로 증가되어 우리나라 근해로 많은 양의 폐수가 배출되었다. 배출된 많은 양의 폐수로 인하여 우리나라 해역의 부영양화가 점차적으로 심화되었으며, 이로 인한 부영양화는 녹조현상 뿐만 아니라 비교적 양식 및 어업양이 많은 우리나라 근해에서 심각한 적조현상까지 유발하였다. 이러한 적조현상은 1970년 중반까지만 해도 대부분 진해만에서 비교적 수온이 높은 여름철에 독성을 갖지 않은 규조류에 의하여 국소적으로 나타났으며, 발생기간 또한 약 1주일의 단기적조로 발생하였다. 하지만, 1980년대부터 발생하는 적조는 이전과는 달리 독성을 갖는 편모조류에 의하여, 연중 수온이 가장 낮은 겨울철을 제외한 나머지 기간 중 수개월동안 넓은 범위에서 발생하는 장기적조로 변천하였다 (Table 1). 1980년대까지만 해도 적조발생은 대부분 진해만 일대에서 한정적으로 발생하였으나, 1982년도 이후부터는 울산, 광양, 영일, 가막만 그리고 인천연안 등에 이르는 우리나라의 전 해역에서 발생하고 있으며, 그 규모 또한 점차 광범위해지고 있다 [4].

우리나라에서 적조를 일으키는 적조생물의 종류는 약 43종으로, 이 중에서 4종은 담수 내지는 기수종이며, 해수종으로는 규조류가 13종, 라피도조류가 3종 그리고 편모조류가 20종으로 구분되어져 있다. 또한 편모조류 중의 3종은 수중생물들을 직접적으로 죽일 수 있는 강한 독성을 가지고 있다. 이들 적조생물 중 식물성 플랑크톤으로서 상습적으로 적조를 일으키는 원인생물로는 규조류와 편모조류가 있으며, 우리나라의 적조는 1980년대까지만 해도 일부 폐쇄성 내만에서만 소규모 국부적으로 발생하였으나, 1989년부터는 강한 독성을 가진 유해조류에 의한 적조발생으로 어·패류의 집단폐사가 발생하여, 이로 인한 어·패류 양식장들의 대규모 재산피해로 까지 이어졌다.

우리나라 연도별 적조발생 건수를 보면 1980년대까지는 주로 독성이 없는 규조류에 의해 적조가 발생 하였으나, 1982년도에는 규조류가 8건으로 38% 그리고 편모조류가 7건으로 33%였고 나머지는 혼합종에 의해 적조가 발생하였다. 그러나 1985년도에 들어서는 규조류가 6건으로 17%, 편모조류가 22건으로 65%, 그리고 나머지 4건이 혼합종에 의한 적조였으며, 점차 독성을 가진 편모조류의 발생건수와 점유비율이 증가하였으며, 1995년도부터는 *Cochlodinium*에 의한 단독적조가 지속되고 있으며 장기화, 광역화의 특징을 갖고 있다 [5] (Fig. 1). 이후에도 적조의 출현 빈도가 증가하는 경향으로 가고 있으며, 적조를 일으키는 종이 점점 다양해지고 독성 또한 강해지고 있다.

차후 우리나라에 적조를 일으킬 예상 조류로는 맹독성 와편모조류 *Heterocapsa circularisquama, Alexandrium spp.* 와 고밀도 발생으로 어류를 대량폐사 시킬 수 있는 *Heterosigma akashiwo, Chattonella spp.* 등이다. 이 중에서도 특히 *Heterocapsa circularisquama*는 최근 일본 해역에서 적조를 일으키는 주된 종으로서, 그 독소는 주로 갑각류인 굴과 조개를 폐사시켜 양식업에 막대한 피해를 주고 있다. 아직 우리나라 해역에서 출현 되지는 않았지만 향후 출현 가능성이 높은 유해조류로 예상되고 있으며, 차후 우리나라 해역에서의 예상 적조 유발 유해조류에 대한 제어기술 개발이 시급하다.

Table 1. The main microalgal species which cause red tide in korea

year		microalgal species
Before 1980	Diatom	*Chaetoceros curvisetus, Skeletonema cf costatum, Thalassiosira rotula, Pseudonitzchia pungens*
1980-1990	Flagellates	*Gymnodinium sp, Prorocentrum spp. Heterosigma akashiwo, Noctiluca miliaris*
1990-2010	Dinoflagellates	*Cochlodinium polykrikoides, Chattonella spp. Katodinium glaucum, Alexandrium spp*

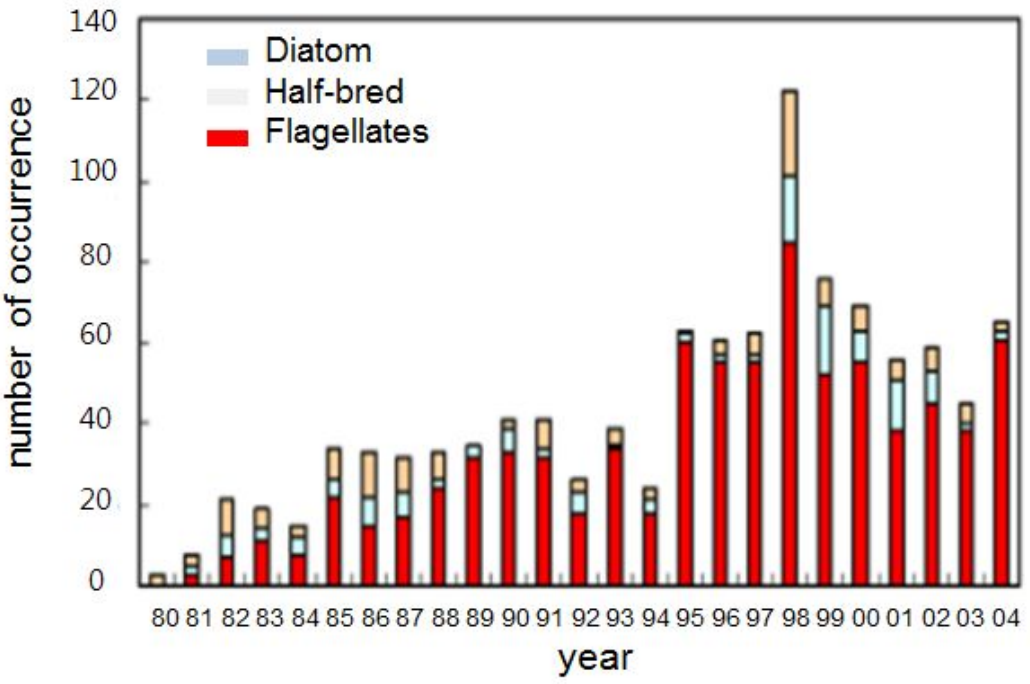

Fig. 1. Annual red tide incidents in korea caused by different algal species during 1980-2004 [5].

제 2 절 연구의 목적

기존에 연구되어진 적조를 방제하는 기술은 물리·화학적 및 생물학적 방제방법으로 크게 3종류로 분류 되고 있다 (Table 2). 그 중 대표적인 물리적인 방제기술로는 초음파를 이용하여 적조 원인생물의 세포를 파괴하는 방법과 적조 발생 수역에 고압의 오존을 투입함으로써 적조로 인한 독성을 중화시키는 방법이 있으나 두 방법 모두 실용화 단계에는 아직 이르지 못한 실정이다. 그리고 대표적인 화학적인 방제기술로는 화학약품인 황산구리 ($CuSO_4$), 이산화염소 (ClO_2), 시마진 (Simazine) 등을 살포하여 세포를 파괴하여 적조 유발 조류는 제어하는 방법이 있으나, 이 제어방법은 적조 원인생물 외에 다른 해양생물에게도 영향을 끼쳐 수중의 다른 생물에 대한 독성 및 부식의 측면에서 문제를 일으킬 수 있으며, 또한 효과가 일시적이기 때문에 반복적인 사용이 필요하며, 비교적 많은 양의 화학약품 투여에 따른 높은 투자비용이 요구된다. 마지막으로 생물학적인 방제 기술로는 주로 천적관계를 이용하여 유해조류를 제어하는 방법이 있으나, 적조 유발 유해 조류제어와 동시에 천적으로 사용되는 특정 종들의 증식 증대로 인한 생태계 교란을 야기하는 문제점을 가지고 있다. 이러한 여러 가지 방제기술 중 국내에서는 90년대 후반부터 '황토 살포법'을 실시해 오고 있다. 자연에서 생산되는 황토가 다른 방법에 비해 환경 친화적이며 우리나라 사람들의 황토에 대한 높은 인지도로 인해 매년 우리나라 해역에서 적조발생시 방제를 위해 사용하고 있지만, 담수나 바다에 뿌려진 황토는 과량의 중금속 이온 (M^{2+})을 포함하고 있어 저질층에 축적 및 생물학적 농축에 의해 인간을 포함한 어·폐류 등의 중독을 유발하고, 해수의 pH 변화 (산성화) 그리고 빛의 투과도 저하로 인한 식물성 플랑크톤과 같은 광합성 생물들의 생장 저해 등의 문제점들을 나타내고 있다. 또한, 황토와 함께 침전된 다양한 적조 유발 유해조류를 포함한 생명체 및 유기물 등의 부패로 인한 제 2의 환경문제들이 발생하고 있다 [1]. 따라서 적조 방제를 위한 새로운 기술 개발이 절실히 필요한 시점이다.

최근 바이러스를 이용한 drug delivery system에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 대부분의 바이러스를 이용한 drug delivery system에 관한 연구는 주로 의학적 목적으로 연구되고 있다 [6,7]. 본 연구에서는 이러한 바이러스를 이용한 drug delivery system의 원리를 응용하여 이를 새로운 적조 방제 기술을 위한 연구에 적용하였다.

Heterocapsa circularisquama RNA Virus34는 적조를 일으키는 유해 조류인 *H. circularisquama* HU9433-P와 HA92-1에만 특이적으로 감염하는 바이러스이다. 숙주 특이성을 나타내는 부위인 capsid protein을 대장균에서 클로닝 및 발현시키고 이를 정제한 후 wild type 바이러스의 모양과 특성이 유사한 Virus-like-particle (VLP)를 형성하고 VLP 형성과정 중 이미 개발된 당뇨병치료제로 부터 유래하여 낮은 독성을 갖는 유기화학합성 살조 물질인 thiazolidinedione (TD49)를 탑재하여 살조능을 시험하는 과정을 통해 drug carrier로서의 가능성을 탐색하고 개발하고자 한다. 이렇게 개발되어진 VLP에 살조 물질이 탑재된 복합체는 숙주에 대한 높은 특이성을 보임으로 소량의 처리만으로도 특정 유해조류만을 사멸시킬 수 있는 장점을 가진다.

본 연구는 유해조류를 제외한 다른 담수 및 해양생명체에 미치는 영향을 최소화하고, 적조 유발 유해조류에만 선택적으로 흡착하여 유해조류를 살조 시키는 획기적인 새로운 적조제어 기술개발에 목적을 두고 있다.

Table 2. Controlling methods and principles for harmful algal blooming

	method	principle	practice material
Physical methods	-isolation of HAB -sonication -ozone treatment -removal of organisms -electrolysis -yellow soil treatment	-block -cell lysis -neutralization -filtration,centrifugation -cell lethality -cohesion,sedimentation	-anti-HAB film -supersonic waves (160-400kHz) -ozone -centrifuge -acidic water sodiumhypochlorite -yellow soil
Chemical methods	-chemicals treatment -flocculant treatment	-lethality, destroy -agglutination, sedimentation	-copper sulfate, organic compound -ion salt,surfactant
Biological methods	-a natural enemy -algicidal substance -parasite -biological enzyme	-grazer -cytoclasis, lysis -parasitism -membrane lysis	-copepods, ciliate -polyuronides -cytophaga sp -mannosidase

제 2 장 실험 재료 및 방법

제 1 절 효소 및 시약

유전자 재조합을 위해 사용한 *Nde*I, *Sap*I, *EcoR*I의 제한효소와 DNA ligase는 Takara사의 것을 이용하였다. PCR을 위한 primer는 Bionics사에 의뢰하여 합성하였다. 재조합 대장균에서 발현된 HcRNAV34 캡시드 단백질의 정제는 BioLabs®사의 chitin bead를 Bio-Rad사의 open column에 충진하여 사용하였다.

제 2 절 사용균주 및 플라스미드

본 연구에서 사용한 HcRNAV34 유전자는 Genbank의 유전자 정보을 바탕으로 캡시드 단백질에 관여하는 *orf*-2 유전자를 대장균에서 발현 가능하도록 rare codon 최적화시켜 클로닝한 재조합 플라스미드를 유전자 증폭을 위한 주형 플라스미드로 사용하였다. 또한 형질전환을 위한 대장균으로는 BL21(DE3) 및 DH5α를 이용하였다. 그리고 클로닝에는 pCR2.1 vector (invitrogen)와 단백질 발현을 위한 pTXB1 vector (BioLabs®)를 사용하였다. 재조합 플라스미드가 도입된 대장균은 Ampicillin (100 ㎍/㎖)이 첨가된 LB 액체배지에서 37℃로 14~16 시간동안 배양하였다.

제 3 절 재조합 DNA 제조

1. 유전자 합성

Genbank[accession number; AB218608]로부터 HcRNAV34 캡시드 단백질에 관여하는 *orf*-2 유전자 정보를 바탕으로 대장균에서 발현 가능하도록 rare codon을 최적화시킨 캡시드 유전자 (1.1kb)가 클로닝 된 pUC57-HcRNAV34을 얻었다 (Genscript).

2. HcRNAV34 유전자 증폭

HcRNAV34 캡시드 단백질 유전자를 증폭하기 위해 5'-GGAATTCCATATGATGACCC GCCCGCTGGCACTGAC-3' (5'-*Nde*I froward)와 5'-GGTGGTTGCTCTTCCGCAAGC AGCCATCAGAGCCGG-3' (3'-*Sap*I reverse)의 primer를 제작하였다. 주형 플라스미드로 pUC57-HcRNAV34 사용하였으며, 총 반응액을 20 ㎕로 유전자 증폭을 수행하였다. 반응 조건은 94℃에서 5 분 동안 pre-annealing을 한 후, 94℃에서 30 초간, 62℃에서 30 초간, 72℃에서 40 초간 20 cycle를 실시하였고, 72℃에서 7 분 동안 extension 반응을 수행하였다. 반응혼합액의 조성은 10X PCR buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 9.0), 0.2 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 30~50 ng의 주형 플라스미드, 100 ng의 5'-*Nde*I과 3'-*Sap*I의 primer, 0.5 unit의 EX taq polymerase를 사용하였다. PCR의 최종 반응 생성물은 Gel extraction kit (Nucleogen)를 이용하여 정제하였다.

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 $MgCl_2$, 100 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7.8)와 T4 DNA ligase 1 unit을 첨가하여 총 반응액을 10 ㎕로 한 후 상온에서 3 시간 동안 반응시켜 ligation 하였다. Inoue방법에 따라 제조한 DH5α competent cell 200 ㎕에 ligation 한 DNA 10 ㎕를 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 ㎕를 첨가한 뒤, 37℃에서 30 분 동안 배양하였다. 이렇게 형질전환 된 대장균을 X-gal과

IPTG가 포함되어있는 ampicillin (100 ㎍/㎖)이 첨가된 1.5% LB 고체배지에 평판도말하여 37℃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 [8]. 지수성장기 말기에 들어선 배양액 1 ㎖을 micro centrifuge tube에 넣고 원심분리한 후 상등액을 제거하였다. 침전물을 20 ㎎/㎖ RNase A가 녹아있는 resuspension buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) 250 ㎕을 넣어 현탁하였다. 현탁액에 lysis buffer (200 mM NaOH, 1% SDS) 250 ㎕을 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 ㎕을 첨가하여 3~4회 조심스럽게 흔들어 혼합시킨 후 12,000 x *g*에서 15 분 동안 원심분리하였다. 원심분리가 끝난 상등액은 silica membrane column에 옮긴 후 12,000 x *g*에서 1 분 동안 원심분리하여 DNA를 column에 결합시켰다. 이 후 700 ㎕의 washing buffer (95% ethanol)를 주입하고 상온에서 1분간 방치한 후 12,000 x *g*에서 1 분간 원심분리를 한 후 다시 12,000 x *g*에서 2 분간 원심분리하여 남아있는 에탄올을 완전히 제거하였다. 35 ㎕의 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0)를 첨가하고 상온에서 1 분 정도 방치한 후에 column에 결합된 플라스미드를 분리하였다. 그 후 정제된 플라스미드의 DNA 염기서열을 분석하였다 (MACROGEN).

5. 제한효소 처리와 DNA 단편 분리

TA 클로닝을 통해 선별된 HcRNAV34 플라스미드와 단백질발현 vector인 pTXB1에 제한효소 *Sap*I을 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 회수하였다.

6. Ligation 및 형질전환

pTXB1 vector와 HcRNAV34 insert DNA을 1:1의 몰수비로 넣어주고, 10X ligation buffer (300 mM Tris-HCl, 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7.8) 1 unit과 T4 DNA ligase 1 unit을 첨가하여 총 반응액을 10 ㎕로 한 후 상온에서 3 시간 동안 반응시켜 ligation 하였다. Inoue방법에 따라 제조한 competent cell 200 ㎕에 ligation 된 DNA 10 ㎕를 첨가하고 얼음에 30 분간 방치한 후 42℃에서 70 초 동안 heat shock을 준 다음 다시 얼음 속에서 3 분간 방치하였다. 여기에 800 ㎕ LB 액체배지를 넣어준 후 37℃에서 30 분간 배양한 다음 원심분리하여 상등액 900 ㎕을 제거하였다. 형질전환 된 cell 100 ㎕을 ampicillin (100 ㎍/㎖)이 첨가된 1.5% LB 고체배지에 평판도말하여 37℃에서 배양한 후 형질전환 된 대장균을 선별하였다.

7. Competent cell 제조

Competent cell은 Inoue법에 따라 제조하였다 [9]. 5 ㎖의 LB 액체배지에 대장균 BL21(DE3) 단일 콜로니를 접종하여 37℃에서 12~14 시간 동안 배양하였다. 배양된 균체를 200 ㎖의 LB 액체배지에 0.1%를 접종하였고, OD (optical density) 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.4~0.6로 될 때까지 배양하였다. 이 후 배양액을 얼음에서 10 분간 방치한 후 12,000 x *g*에서 15 분간 원심분리하였다. 회수한 균체에 67 ㎖의 TB buffer (10 mM PIPES, 15 mM $CaCl_2$, 250 mM KCl, 55 mM $MnCl_2$, pH 6.8)를 첨가하여 재현탁 후 같은 조건으로 원심분리하였다. 최종적으로 16 ㎖의 TB buffer와 1.2 ㎖의 DMSO를 첨가하여 혼합한 후 200 ㎕씩 멸균된 micro centrifuge tube에 넣어 -70℃에 보관하였다.

8. 형질전환 된 균체로부터 재조합 플라스미드 확인

재조합 플라스미드의 분리는 alkaline lysis 방법을 사용하여 분리하였다. 분리한 재조합 플라스미드를 2 unit의 제한효소 *Nde*I으로 37℃에서 1 시간 반응시켜 자른 후 1% (w/v) agarose gel에서 전기영동하여 재조합 DNA의 크기를 확인하였다. 형질전환 된 플라스미드 DNA를 선별하여 pTXB1-HcRNAV34로 명명하였다.

9. SDS-PAGE를 이용한 단백질 발현 확인

재조합 단백질의 발현여부를 확인하기 위해 12% SDS-PAGE (sodium dodecyl -sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 확인하였다. 발현이 유도된 배양액을 원심분리하여 상등액을 제거하였고 회수된 균체의 7배 용량의 column buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.5)로 현탁시킨 후 sonicator (SONIFIER 250, Branson)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄용액은 4℃에서 12,000 x *g*, 40 분간 원심분리하여 얻은 상등액을 cell free extract로 간주하고, 균체는 파쇄 전에 넣었던 동일용량의 buffer로 재현탁시켜 pellet fraction으로 간주하였다. 단백질의 정량을 위해 BSA (Bovine serum albumin)으로 표준 곡선을 작성하였고, 표준곡선 흡광도의 범주를 벗어나지 않도록 분석하고자하는 단백질 시료를 희석한 후 595 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. Bradford 방법으로 정량한 sample을 5분간 끓인 후 12%의 SDS-PAGE gel에 loading 하여 150 V에서 1 시간 30 분 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 staining solution (0.1% coomassie blue R-250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid)로 염색하였고, destaining solution (30% methanol, 10% glacial acetic acid, 60% distilled water)으로 탈색한 후 단백질의 발현여부를 확인하였다.

제 4 절 HcRNAV34 캡시드 단백질의 발현 및 정제

1. HcRNAV34 캡시드 단백질 발현

HcRNAV34 캡시드 단백질의 발현 및 정제를 위해 선별된 pTXB1-HcRNAV34 재조합 플라스미드를 포함한 대장균 BL21(DE3)을 ampicillin (100 ㎍/㎖)이 포함된 LB 액체배지에서 전 배양하였다. ampicillin (50 ㎍/㎖)이 포함된 500 ㎖ LB 액체배지에서 전 배양액을 1% 접종하였고, 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.4~0.6으로 될 때까지 배양한 다음 0.1 mM의 isopropyl-2-d-thiogalactopyranoside (IPTG)를 첨가하여, 16℃에서 20 시간 동안 HcRNAV34 캡시드 단백질의 발현을 유도하였다.

2. 온도와 IPTG농도에 따른 최적발현 조건 탐색

HcRNAV34 캡시드 단백질의 최적발현 조건을 찾기 위해 발현온도와 배양시간을 조절하였다. pTXB1-HcRNAV34 재조합 플라스미드를 포함한 대장균을 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.5로 될 때까지 배양한 후 0.1 mM의 IPTG를 첨가하여 30℃에서 3 시간, 25℃에서 14 시간, 16℃에서 20 시간동안 각각 배양하였다. 단백질의 발현여부는 SDS-PAGE analysis를 이용하여 확인하였다. 또한 최적의 발현을 보이는 온도 조건에서 발현유도물질인 Isopropyl-2-d-thiogalactopyranoside를 다양한 농도 (0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM)로 조절하여 발현을 유도한 후 SDS-PAGE analysis통해 확인하였고, 추가적으로 western blot analysis를 수행하여 발현여부를 재확인하였다.

3. Western blot analysis

HcRNAV34의 antibody는 정제된 HcRNAV34 캡시드 단백질을 항원으로 사용하여 rabbit에 주입하고, 정제된 항체를 (Younginfrontier co. korea) 이용하여 western blot analysis를 수행하였다. 확인하고자하는 단백질을 12% SDS-PAGE gel를 내린 후 Nylon membrane에 semi-dry transfer system (Southam Warwickshire CV33 0HP, ENGLAND)을 이용하여 100 mA에서 2 시간 동안 transfer하였다. western blot에는 TBS-T buffer (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.1% Tween20, pH 7.5)를 사용하

였다. 단백질이 transfer 된 membrane을 blocking reagent (5% skim milk가 포함된 TBS-T)에서 1 시간 동안 blocking한 후, membrane을 washing solution (TBS-T buffer)으로 30 분씩 2번 세척하였다. 1차 항체 (HcRNAV34 polyclonal antibody)는 10 ㎖의 TBS-T buffer에 1:5000의 비율로 희석하여 membrane에 넣은 후 1 시간 동안 반응시켰다. 반응 후 membrane은 washing solution으로 30 분간 2번 세척하였고, Anti-rabbit Alkaline phosphatase가 conjugation 되어있는 2차 항체를 10 ㎖의 TBS-T solution에 1:5000의 비율로 희석하여 1 시간 동안 상온에서 반응한 후, 다시 washing solution으로 30 분간 2번 세척하였다. 세척된 membrane에 검출용액 (BCIP 250 ㎎/㎖, NBT 50 ㎎/㎖, 100 mM Tris-HCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 7.5) 5㎖을 넣은 후 발색반응을 관찰하였다.

4. Cell free extract의 제조

pTXB1-HcRNAV34 재조합 플라스미드를 포함하고 있는 대장균을 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.5로 될 때까지 배양한 후 0.1 mM의 IPTG를 첨가하여 16℃에서 20 시간 동안 배양한 후 원심분리하였다. 회수된 균체를 column buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.5)로 2회 세척한 후 원심분리하여 다시 균체를 회수하였다. 회수된 균체 5 g에 7배 용량의 column buffer를 넣어 재현탁 시킨 후, 1 unit DNaseI 와 1 mM PMSF를 첨가하여 얼음에서 1 시간 방치한 후 sonicator (SONIFIER 250, Branson)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄용액은 원심분리 (15,000 x *g*, 1 시간 30 분, 4℃)한 후 얻어진 상등액을 cell free extract로 사용하였다.

5. Chitin column을 이용한 HcRNAV34 캡시드 단백질 정제

HcRNAV34 캡시드 단백질의 정제는 open column (5㎖, Bio-Rad)에 chitin bead (BioLabs®)를 충진하여 정제하였다. chitin column에 column의 10배 용량인 50 ㎖의 column buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.5)를 1 ㎖/min으로 흘려보내 column을 평형화하였다. 이 후 column에 20 ㎖의 soluble fraction을 0.5 ㎖/min의 유속으로 흘려보내 fusion protein을 chitin cloumn에 결합시켰고, 그 후 2 ㎖/min의 유속으로 column의 20배 용량인 100 ㎖의 column buffer를 흘려주어 washing 하였다. 최종적으로 68 kDa의 fusion protein이 결합된 chitin column에 50

mM DTT가 포함된 column buffer를 column의 3배 용량인 15 ㎖을 3 ㎖/min으로 흘려준 후 상온에서 2 일 동안 정치하였다. 그 후 chitin cloumn에 column buffer를 2 ㎖/min의 유속으로 흘려보내 주어 chitin column으로부터 38 kDa의 HcRNAV34 캡시드 단백질을 분리 정제하였다.

6. *N*-terminal amino acid sequencing

분리 정제된 38 kDa의 HcRNAV34 캡시드 단백질의 아미노산 서열을 확인하기 위해 12% SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동한 후, semi-dry transfer system (Southam Warwick shire CV33 0HP, ENGLAND)을 이용하여 PVDF membrane에 transfer하였다. 그 후 PVDF membrane을 Coomassie Blue Reagent (1.2 g coomassie brilliant blue R 250, 400 ㎖ methanol, 600 ㎖ distilled water)로 염색하여 38 kDa의 캡시드 단백질을 확인한 후 그 부분을 잘라내어 한국 기초과학지원 연구원에 *N*-terminal amino acid sequencing을 의뢰하였다. 사용한 분석기는 Procise 491 HT protein sequencer를 사용하였다.

제 5 절 HcRNAV34 캡시드 단백질의 조립

1. Dissociation와 reassociation 과정을 통한 조립

분리 정제된 HcRNAV34 캡시드 단백질 1 ㎎/㎖을 2X dissociation buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM DTT, 20 mM EGTA, pH 8.0)와 1:1의 비율로 상온에서 1 시간 반응하여 HcRNAV34 캡시드 단백질을 dissociation시켰다. 그 후 dissociation 된 HcRNAV34 캡시드 단백질을 cutoff 10 k dialysis cassette (thermo)에 넣은 후 reassociation buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM $CaCl_2$, pH 8.0)로 4℃에서 2 일 동안 dialysis과정을 통해 HcRNAV34 캡시드 단백질을 조립시켜 HcRNAV34 VLPs를 형성하였다.

2. HcRNAV34 VLPs의 구조

정제된 38 kDa의 HcRNAV34 캡시드 단백질 1 ㎎/㎖을 2X dissociation buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM DTT, 20 mM EGTA, pH 8.0)와 1:1의 비율로 상온에 1 시간 반응시킨 후 cutoff 10 k dialysis cassette (thermo)에 넣어 reassociation buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM $CaCl_2$, pH 8.0)로 4℃에서 2 일 동안 dialysis과정을 통해 HcRNAV34 VLPs를 조립하였다. 조립된 HcRNAV34 VLPs를 한국 기초과학지원 연구원 전자현미경부 현재경 박사님에게 TEM와 Cryo-EM을 통한 구조분석을 의뢰하였다.

제 6 절 FITC를 이용한 HcRNAV34 캡시드 단백질의 표지

HcRNAV34 캡시드 단백질 1 ㎎/㎖에 2X dissociation buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM DTT, 20 mM EGTA, pH 8.0)와 1:1의 비율로 상온에서 1 시간 반응시킨 후에 100 mM FITC 100 ㎕ 주입하였다. 그 후 3.5 K dialysis cassette (thermo)에 넣어 reassociation buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM $CaCl_2$, pH 8.0)로 4℃에서 2 일 동안 dialysis를 통해 HcRNAV34 VLPs에 FITC를 표지 하였다. 반응이 끝난 후 남아있는 잔여 FITC 제거를 위해 3.5 k centricon (sartorius)을 이용하여 농축하였다. FITC가 표지된 HcRNAV34 VLPs를 12% SDS-PAGE gel에 전기영동 내린 후 UV-visible를 비춰 FITC의 형광을 확인하였다.

제 7 절 HcRNAV34 VLP의 숙주특이성 관찰

HcRNAV34 VLP의 숙주 특이성 관찰을 위해 숙주인 *H. circularisquama* HU9433-P, HA92-1와 숙주가 아닌 *H. circularisquama* HY9423, *H. akashiwo*, *C. marina* 등의 5 종의 조류를 사용하였다. FITC가 표지된 HcRNAV34 VLPs 100 ㎕를 조류배양액 약 400 ㎕에 넣어주어 1:4의 비율로 반응시켰다. FITC가 표지된 HcRNAV34 VLPs와 조류의 접촉횟수를 늘리기 위해 교반기를 이용하여 3 시간 동안 천천히 교반하였다. 반응이 끝난 후 1300 rpm에서 3 분간 원심분리한 후 상등액을 제거하고 f/2 배지 500 ㎕를 넣어 2 번의 washing 과정을 거쳐 잔여 FITC를 제거하였다. 그 후 조류를 다시 f/2 배지 100 ㎕에 재현탁하여 형광현미경을 통해 숙주에 대한 HcRNAV34 VLPs의 숙주특이성을 관찰하였다. 먼저 가시광선영역을 통해 조류의 모양을 확인한 후 형광영역을 통해 숙주에 FITC가 표지된 HcRNAV34 VLPs의 녹색형광을 나타내는지 관찰하였다.

실험에 사용된 해수조류배지인 f/2 배지의 조성은 다음과 같다. (L 당); 75 mg $NaNO_3$, 5.65 mg $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 4.16 mg Na_2 EDTA, 3.15 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.01 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.022 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 180 mg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.01 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.022 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.18 mg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.006 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.0005 mg Cyanocobalamin (Vitamin B12), 0.1 mg Thiamine HCl (Vitamin B1), 0.0005 mg Biotin [39].

제 8 절 HPLC를 이용한 HcRNAV34 VLP에 탑재된 TD49 정량분석

HcRNAV34 VLPs에 탑재되는 유기합성 살조 물질 thiazolidinedione (TD49)를 정량하기위해 Agilent사의 1200 series HPLC를 이용하여 분석하였다. Diode Array Detector (DAD)와 Agilent Zorbax SB C-18 column을 사용하였으며, 분석시 column 온도는 30℃로 하였다. 이동상으로는 (A) 10% ACN (acetonitrile), 0.1% TFA (trifluoroaceticacid)와 (B) 100% ACN (acetonitrile), 0.1% TFA (trifluoroaceticacid)를 이용하여 linear gradient (0~3 분 A 100%, 3~33 분 A 100%→0%, 33~40 분 A 0%)를 걸어주었다. 유량은 1.0 ㎖/min로 조절하였고, UV검출 파장은 TD49의 흡광도인 320 nm의 조건에서 분석하였다. 또한 TD49를 탑재한 HcRNAV34 VLPs를 dissociation buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM DTT, 10 mM EDTA, pH 8.0)로 dialysis 함으로써 VLPs를 분해하여 TD49가 VLPs 안으로 탑재되는 것인지 VLPs 표면에 붙어있는 것인지 TD49농도분석을 통해 확인해보았다.

제 9 절 숙주에 대한 TD49가 탑재된 HcRNAV34 VLP의 살조 효과

HcRNAV34 VLPs의 숙주에 대한 살조 효과 관찰을 위해 숙주인 *H. circularisquama* HU9433-P와 숙주가 아닌 *H. circularisquama* HY9423을 사용하였다. TD49가 탑재된 HcRNAV34 VLPs 100 ㎕를 조류배양액 약 400 ㎕에 넣어주어 1:4의 비율로 반응하였다. 그 후 조류와 TD49가 탑재된 HcRNAV34 VLPs의 접촉 횟수를 늘리기 위해 교반기를 이용하여 3 시간 동안 천천히 교반하였다. 반응이 끝난 후 1300 rpm에서 3 분간 원심분리한 후 상등액을 제거하고 f/2 배지 500 ㎕를 넣어 2 번의 washing 과정을 거친 후 다시 f/2 배지 100 ㎕에 재현탁하여 광학현미경을 통해 숙주에 대한 HcRNAV34 VLPs의 살조 효과를 관찰하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 HcRNAV34 캡시드 단백질 유전자 합성

와편모조류 *H. circularisquama*에 감염하는 RNA 바이러스인 HcRNAV34는 4.4 Kb의 genome을 가지고 있으며, 두 개의 ORF는 RNA polymerase (*orf*-1)와 캡시드 단백질 (*orf*-2)로 발현된다. Genbank [accession number; AB218608]로부터 그 중 캡시드 단백질을 암호화하는 *orf*-2 유전자 정보를 바탕으로 대장균에서 발현이 가능하도록 전체 유전자의 약 10% 정도를 차지하는 rare codon인 Arginine (CGA, CGG, AGG, AGA), Glycine (GGA, GGG), Leucine (CUA), Proline (CCC) 각각을 Arginine (CGT, CGC), Glycine (GGT, GGC), Leucine (CTG), Proline (CCG)로 바꾸어 codon optimization 시킨 후 합성하였다. 합성된 1.1 kb의 HcRNAV34 캡시드 유전자가 클로닝 된 pUC57-HcRNAV34를 Genscript사로부터 받았다 (Fig. 2).

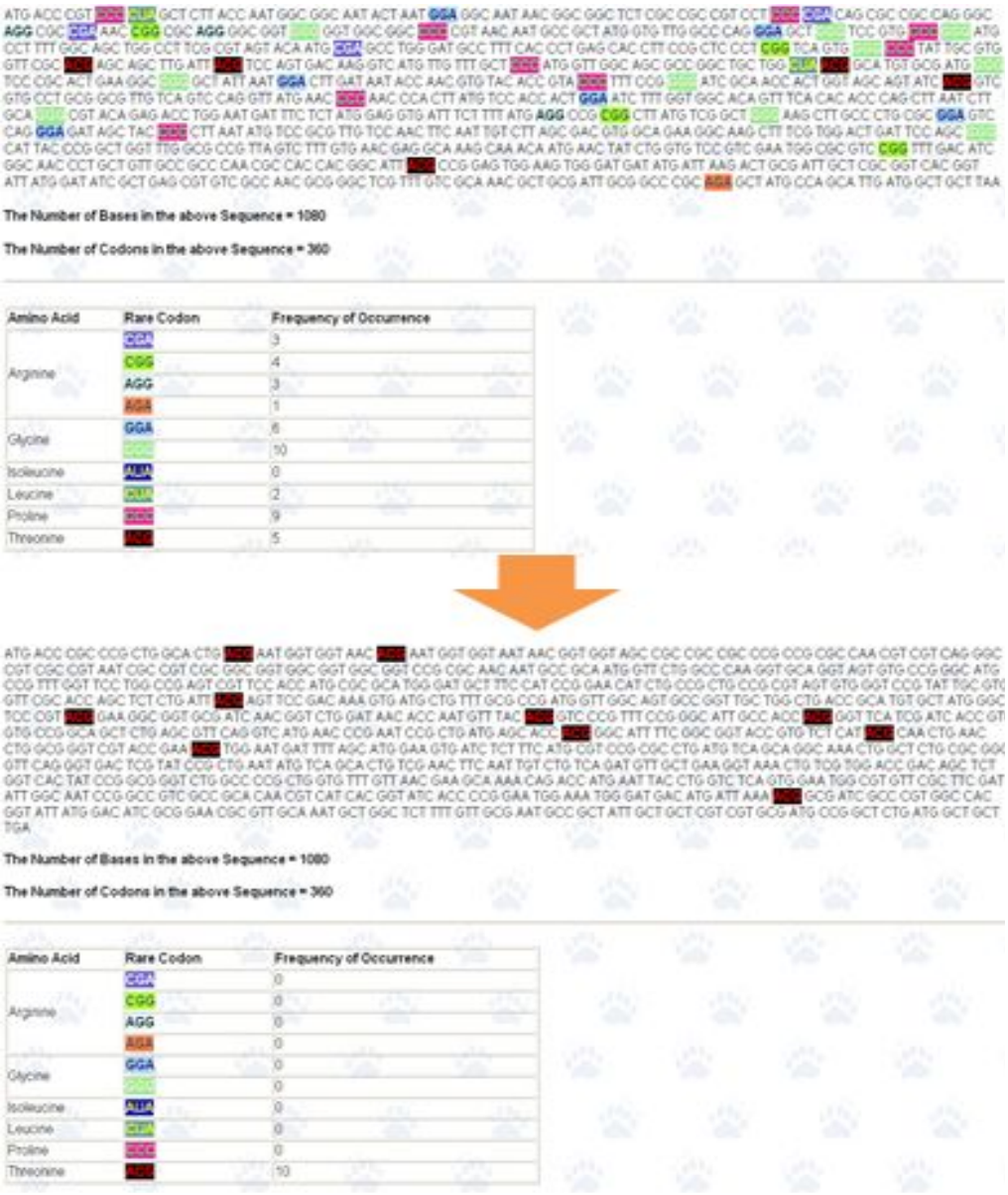

Fig. 2. ORF-2 gene sequence of HcRNAV 34 capsid protein obtained from Genbank [accession number AB218608] and codon optimization for expression in *E. coli.*

제 2 절 HcRNAV34 유전자의 클로닝 및 발현

1. HcRNAV34 유전자의 클로닝

pUC57-HcRNAV34 플라스미드를 주형 플라스미드로 PCR반응을 수행하여 HcRNAV34 캡시드 단백질 유전자를 대량 증폭하였다. 1%의 agarose gel에서 1.1 kb의 HcRNAV34 캡시드 단백질 유전자 단편을 확인하였다 (Fig. 3). Clean up을 통해서 순수하게 얻은 1.1 kb의 DNA 단편을 pCR2.1 vector에 클로닝하여 얻어진 재조합 플라스미드는 염기서열 분석을 의뢰 (MACROGEN)하여 HcRNAV34 유전자의 염기서열을 확인하였다. 이렇게 확인된 HcRNAV34 유전자는 5'-*Nde*I 과 3'-*Sap*I 말단에 있는 제한효소를 이용하여 자른 후 대장균에서 발현이 가능하며 intein tag가 포함된 pTXB1 vector에 ligation을 수행하였다 (Fig. 4). 이렇게 만들어진 재조합 플라스미드는 대장균 BL21(DE3)에 heat shock 방법을 이용하여 형질전환하였다.

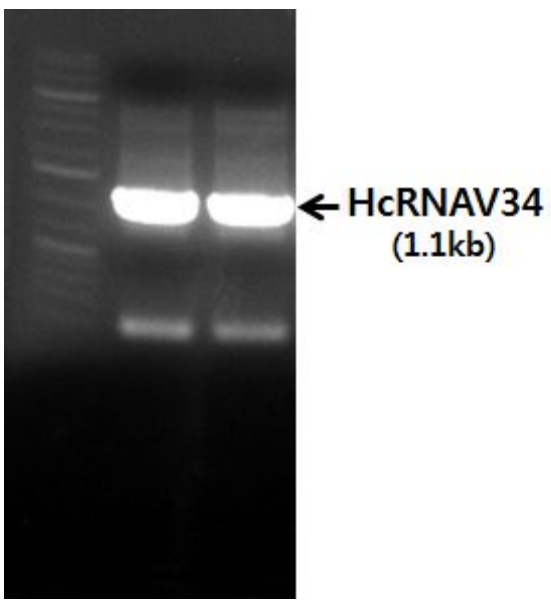

Fig. 3. PCR product of codon optimized gene of HcRNAV34.

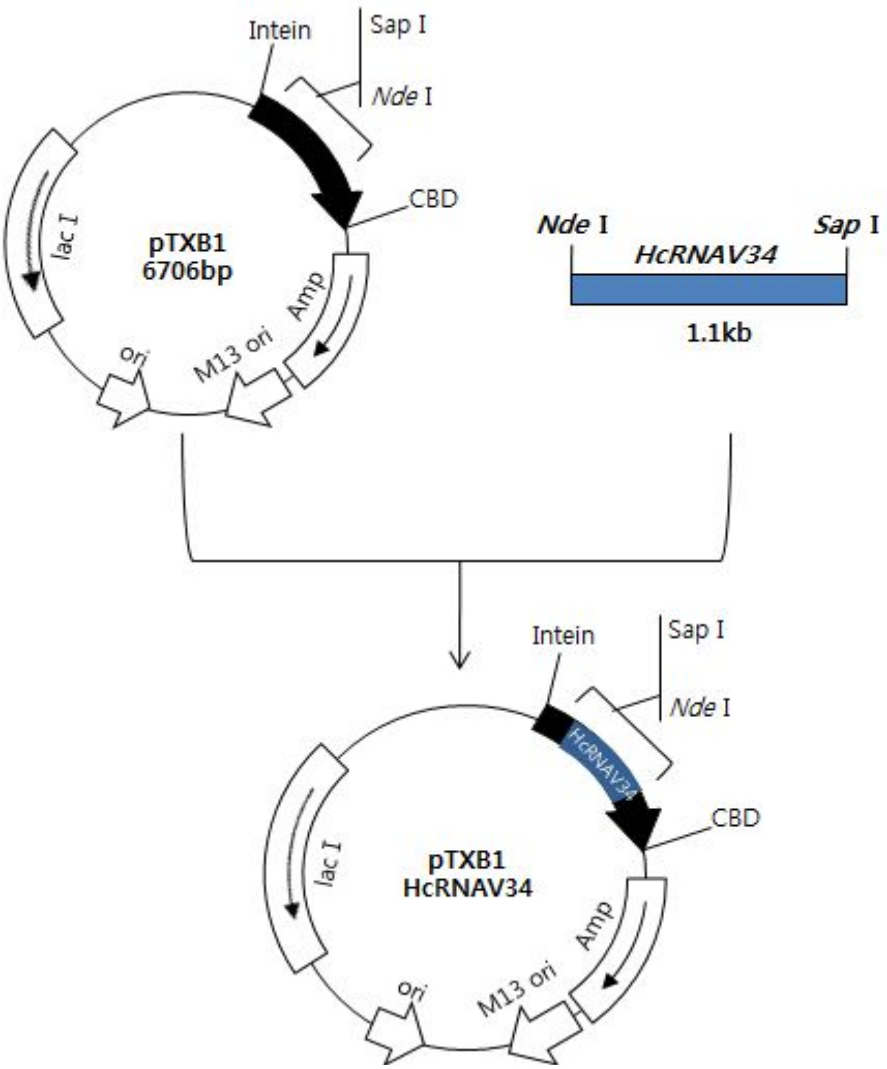

Fig. 4. Construction of pTXB1-HcRNAV34.

2. HcRNAV34 캡시드 단백질의 최적발현 조건 확립

pTXB1-HcRNAV34 재조합 플라스미드가 포함된 대장균 BL21(DE3)에서의 HcRNAV34 캡시드 단백질 발현을 확인하였다. 14~16 시간으로 배양한 전 배양액을 1% 접종하여 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.5로 될 때까지 배양한 다음 1 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 균체를 회수하고 column buffer를 이용하여 현탁하였다. 현탁액은 Sonicator을 이용하여 파쇄한 후 원심분리기를 이용하여 cell debris와 supernatant fraction을 분리하였다. 이렇게 분리한 각 fraction을 12% SDS-PAGE gel을 통해서 발현유무와 solubility를 확인하였다. 그 결과 모든 온도조건에서 발현되는 것을 확인할 수 있었고 그 중에 16℃에서 배양하였을 때 30℃ 혹은 25℃에 비해서 발현된 단백질의 solubility가 증가되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

다음으로는 이렇게 얻어진 온도와 시간 조건에서 발현유도물질인 IPTG 농도에 따른 HcRNAV34 캡시드 단백질의 발현율을 관찰하였다. IPTG농도 (각각, 0.1, 0.5, 1 mM)를 처리하여 발현을 유도한 후 12% SDS-PAGE gel을 통해 발현량을 확인하였다 (Fig. 6). 그 결과 0.1 mM의 IPTG에서도 0.5 mM이나 1 mM을 처리했을 때와 유사한 발현량을 확인하였다. 또한 IPTG 농도에 따른 HcRNAV34 캡시드 단백질의 발현량을 western blot analysis를 수행하여 발현 여부을 재확인한 결과 IPTG의 농도차이에 따른 발현량이 큰 차이가 나지 않음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 7).

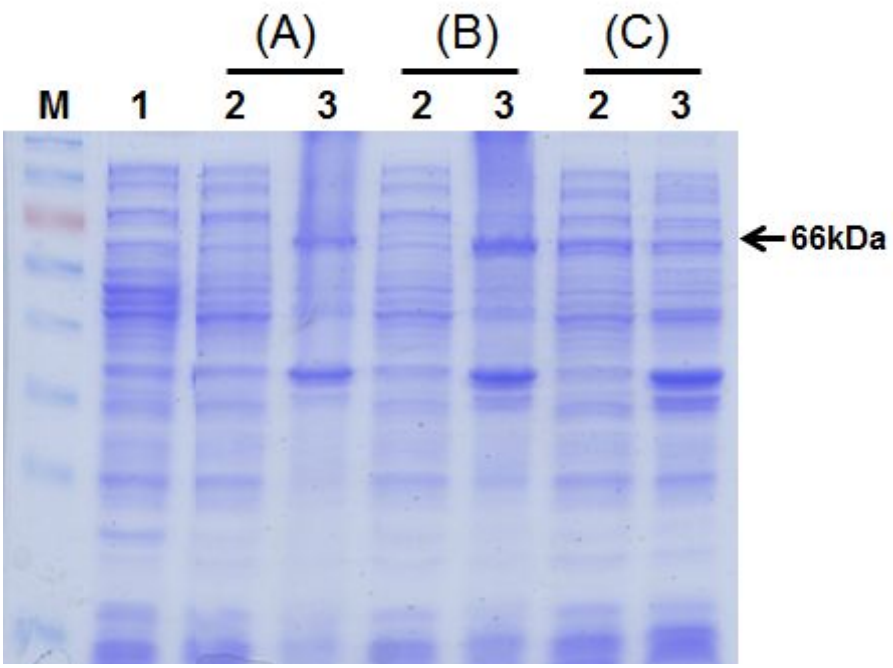

Fig. 5. SDS-PAGE analysis of the recombinant HcRNAV34 capsid protein expressed in *E. coli* at different temperature (A) 30°C, (B) 25°C and (C) 16°C. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, cell free extract; lane 2, soluble fraction; lane 3, pellet.

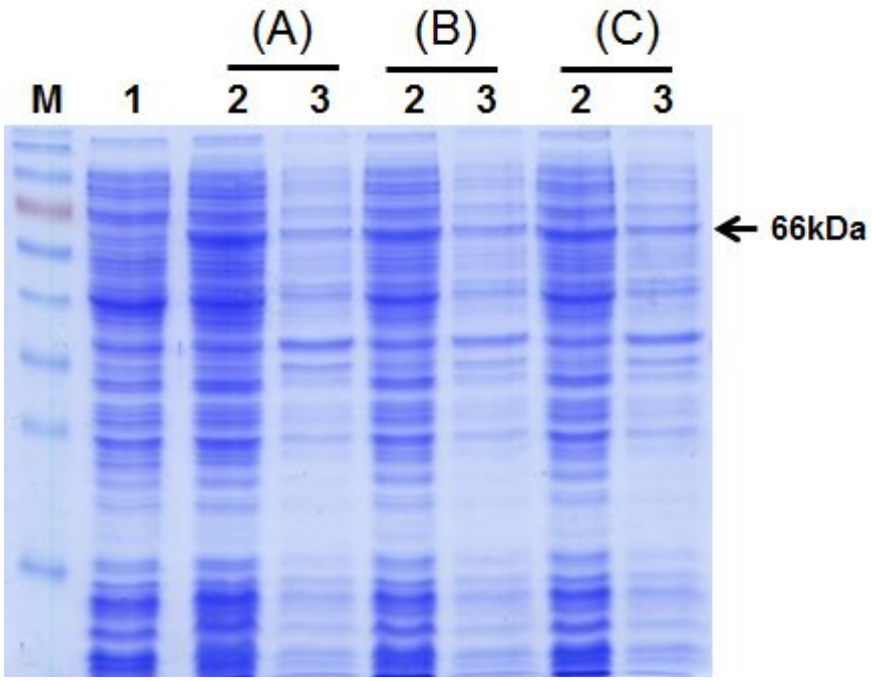

Fig. 6. Effect of IPTG concentration on recombinant HcRNAV34 capsid protein expressed in *E. coli* ; (A) 0.1 mM, (B) 0.5 mM and (C) 1 mM. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, cell free extract; lane 2, soluble fraction; lane 3, pellet fraction.

Fig. 7. Western blot analysis of recombinant HcRNAV34 capsid protein expressed in *E. coli* at different IPTG concentration. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, 0 mM IPTG; lane 2, 0.1 mM IPTG; lane 3, 0.5 mM IPTG; and lane 4, 1 mM IPTG.

제 3 절 HcRNAV34 캡시드 단백질 정제

IPTG에 의해 발현이 유도된 재조합 대장균을 획득하여 cell free extract를 제조하였다. 회수된 cell free extract로부터 HcRNAV34 캡시드 단백질을 정제하기위해 open column (5㎖, Bio-Rad)에 chitin bead (Biolabs®)를 충진한 후 2 ㎖/min의 유속으로 column buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.5)를 흘려주어 chitin column을 평형화하였다. 그 후 cell free extract를 0.5 ㎖/min의 유속으로 흘려준 후 column buffer를 이용해 3 ㎖/min의 유속으로 washing하여 68 kDa의 fusion protein을 chitin column에 결합시켰다. 50 mM DTT가 포함된 column buffer를 흘려준 다음 상온에서 2 일 동안 방치한 후 chitin column에 결합된 38 kDa의 HcRNAV34 캡시드 단백질을 분리 정제하였다. 각각의 단계를 거쳐 정제된 HcRNAV34 캡시드 단백질은 12% SDS-PAGE gel를 이용하여 확인하였다 (Fig. 8).

.

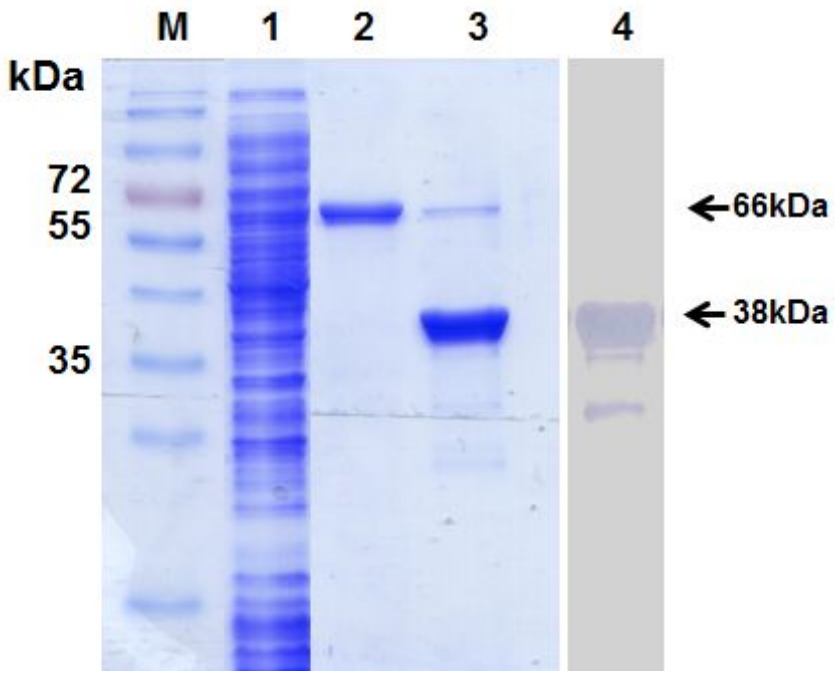

Fig. 8. Purified HcRNAV34 capsid protein using chitin column chromatography. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, cell free extract; lane 2, fusion protein bound to chitin resin; lane 3, purified HcRNA34 capsid protein (0.02㎎); lane 4, Western blot analysis of HcRNA34 VLP antibody.

2. *N*-terminal amino acid sequencing

분리 정제된 38 kDa의 HcRNAV34 캡시드 단백질의 아미노산 서열을 확인하기 위해 12% SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동한 후, semi-dry transfer system (Southam Warwick shire CV33 0HP, ENGLAND)을 이용하여 PVDF membrane에 transfer하였다. 그 후 PVDF membrane을 Coomassie Blue Reagent (1.2 g coomassie brilliant blue R 250, 400 ㎖ methanol, 600 ㎖ distilled water)로 염색하여 38 kDa의 캡시드 단백질을 확인한 후 그 부분을 잘라내어 한국기초과학지원 연구원에 *N*-terminal amino acid sequencing을 의뢰하였다. amino acid sequencing 결과 첫 번째 아미노산 M: methionine, 두 번째 T: threonine, 세 번째 R: arginine, 네 번째 P: proline, 다섯 번째 L: leucine, 여섯 번째 A: alanine으로 *N* 말단의 6개 아미노산 서열이 일치하는 것을 확인하였다 (Fig. 9).

HcRNAV34 amino acid sequence:

MTRPLALTNGGNTNGGNNGGSRRRPPRQRRQGRRRNRRRGGGGGGPRNNAAMVLAQGAGSVPGMPFGSWPSRSTMRA
WDAFHPEHLPLPRSVGPYCVVRTSSLITSSDKVMLFAPMVGSAGCWLTACAMGSRTEGGAINGLDNTNVYTVPFPGIATTGSS
ITVVPAALSVQVMNPNPLMSTTGIFGGTVSHTQLNLAGRTETWNDFSMEVIMRPRLMSAGKLALRGVQGDSYPLNMSALSNF
NCLSDVAEGKLSWTDSSGHYPAGLAPLVFVNEAKQTMNYLVSVEWRVRFDIGNPAVAAQRHHGITPEWKWDDMIKTAIARGH
GIMDIAERVANAGSFVANAAIAARRAMPALMAA

***N*-terminal amino acid sequencing Result**

M: methionine
T : threonine
R: arginine
P: proline
L: leucine
A: alanine

Fig. 9. *N*-terminal amino acid sequencing of HcRNAV34 capsid protein.

제 4 절 HcRNAV34 VLPs의 구조

정제된 38 kDa의 HcRNAV34 캡시드 단백질 1 ㎎/㎖을 2X dissociation buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM DTT, 20 mM EGTA, pH 8.0)와 1:1의 비율로 상온에 1 시간 반응시킨 후 cutoff 10 k dialysis cassette (thermo)에 넣어 reassociation buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM $CaCl_2$, pH 8.0)로 4℃에서 2 일 동안 dialysis과정을 통해 HcRNAV34 VLPs를 조립하였다. 조립된 HcRNAV34 VLPs를 한국 기초과학지원 연구원 전자현미경부 현재경 박사님에게 TEM과 Cryo-EM 현미경을 통한 구조분석을 의뢰하였다. 조립된 HcRNAV34 VLPs를 negative staining 하여 TEM으로 촬영한 결과 규칙적인 모양의 VLPs들이 형성되는 것을 확인하였고, 정확한 구조를 분석하기 위해 negatively stained particles을 Cryo-EM을 통해 projection averages 하여 분석한 결과 대부분 육면체의 규칙적인 크기의 VLPs가 형성되는 것을 확인하였다 (Fig. 10).

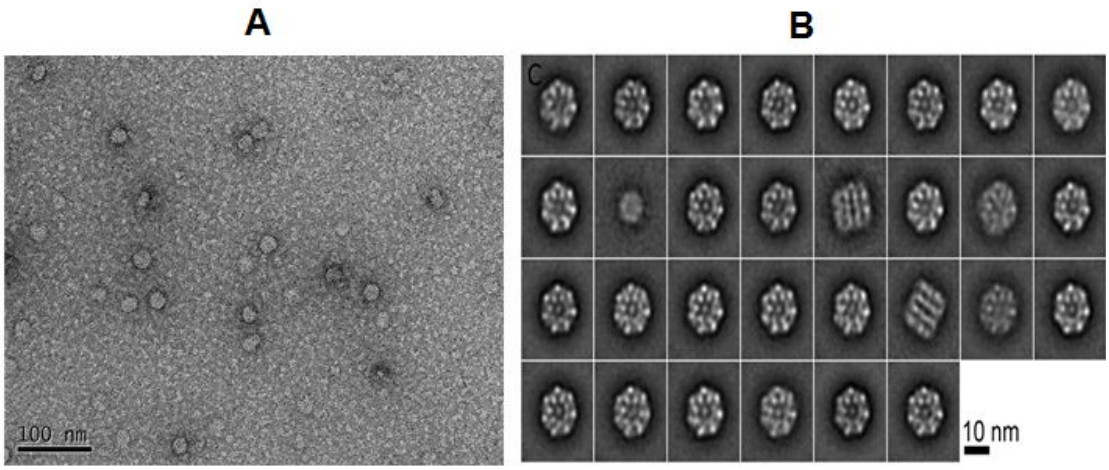

Fig. 10. TEM analysis of reassociated HcRNAV34 VLPs visualized by negative staining (A) and Cryo-EM analysis from projection averages of negatively stained particles (B).

제 5 절 FITC를 이용한 HcRNAV34 캡시드 단백질의 표지

HcRNAV34 캡시드 단백질 1 ㎎/㎖에 2X dissociation buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM DTT, 20 mM EGTA, pH 8.0)를 1:1의 비율로 첨가하여 상온에서 1 시간 반응시킨 후에 100 mM FITC 100 ㎕ 주입하였다. 그 후 3.5 K dialysis cassette (thermo)에 넣어 reassociation buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM $CaCl_2$, pH 8.0)로 4℃에서 2 일 동안 dialysis를 통해 HcRNAV34 캡시드 단백질에 FITC를 표지하였다. FITC가 표지된 HcRNAV34 캡시드 단백질을 12% SDS-PAGE gel을 내린 후 UV를 비춰 FITC의 형광을 확인한 결과 38 kDa의 HcRNAV34 캡시드 단백질에서 녹색형광이 관찰되는 것을 확인하였다 (Fig. 11).

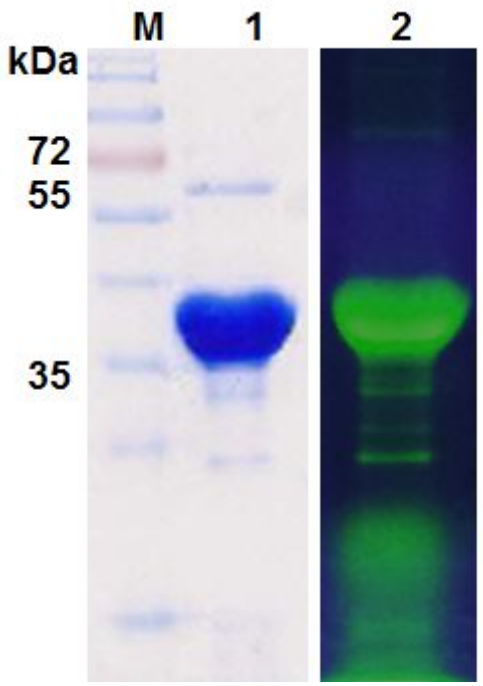

Fig. 11. SDS-PAGE analysis of HcRNAV34 capsid protein labeled with FITC. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, purified HcRNAV34 capsid protein; lane 2, HcRNAV34 capsid protein labeled with FITC illuminated with UV lamp.

제 6 절 HcRNAV34 VLP의 숙주 특이성 관찰

HcRNAV34 VLPs의 숙주 특이성 관찰을 위해 숙주인 *H. circularisquama* HU9433-P, HA92-1와 숙주가 아닌 *H. akashiwo, C. marina, H. circularisquama* HY9423등의 5종의 조류를 사용하였다 (Table 3). FITC가 표지된 HcRNAV34 VLPs 100 ㎕를 조류배양액 약 400 ㎕에 넣어주어 1:4의 비율로 반응시켜주었다. HcRNAV34 VLPs와 조류의 접촉 횟수를 늘리기 위해 교반기를 이용하여 3 시간 동안 천천히 교반하였다. 반응이 끝난 후 1300 rpm에서 3 분간 원심분리한 후 상등액을 제거하여 f/2 배지 500 ㎕를 넣어 2번의 washing 과정을 거쳐 잔여 FITC를 제거 하였다. 그 후 조류를 다시 f/2 배지 100 ㎕에 재현탁하여 형광현미경을 통해 숙주에 대한 HcRNAV34 VLPs의 숙주특이성을 관찰하였다. 먼저 가시광선영역을 통해 조류의 모양을 확인한 후 형광영역을 통해 조류에 FITC가 표지된 HcRNAV34 VLPs가 녹색 형광을 나타내는지 관찰하였다. 그 결과 숙주인 *H. circularisquama* HU9433-P 와 HA92-1에서는 녹색형광이 관찰되었고, 숙주가 아닌 *H. akashiwo*, *C. marina, H. circularisquama* HY9423에서는 녹색형광이 관찰되지 않았다 (Fig. 12, 13).

Table 3. *Heterocapsa circularisquama* strains used in this study

Strain	Viral infectivity	References
H. circularisquama HU9433-P	HcRNAV34	[14]
H. circularisquama HA92-1	HcRNAV34	[14]
H. circularisquama HY9423	HcRNAV109	[14]
H. akashiwo[a]	-	
Cattonella marina[a]	-	

-not determined

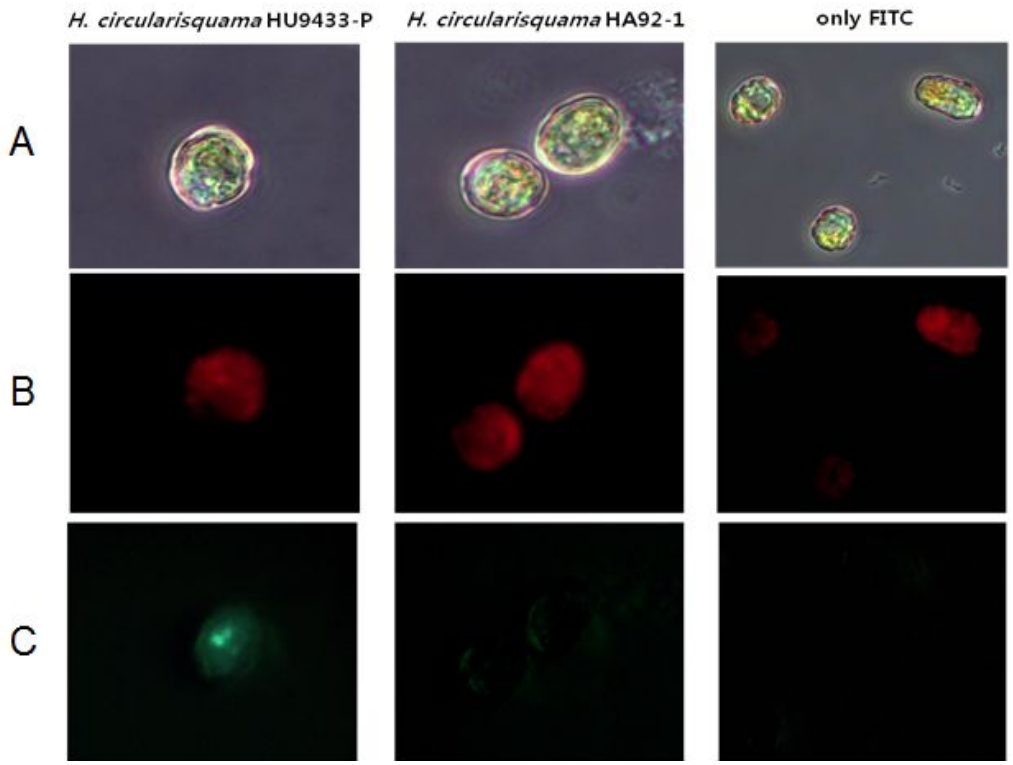

Fig. 12. Host specific binding of HcRNAV34 VLPs labeled with FITC to its host, *H. circularisquama* HU9433-P and HA92-1, under the observation with optical and fluorescent microscopy. Optical filter (A), red filter (B), and green filter (C).

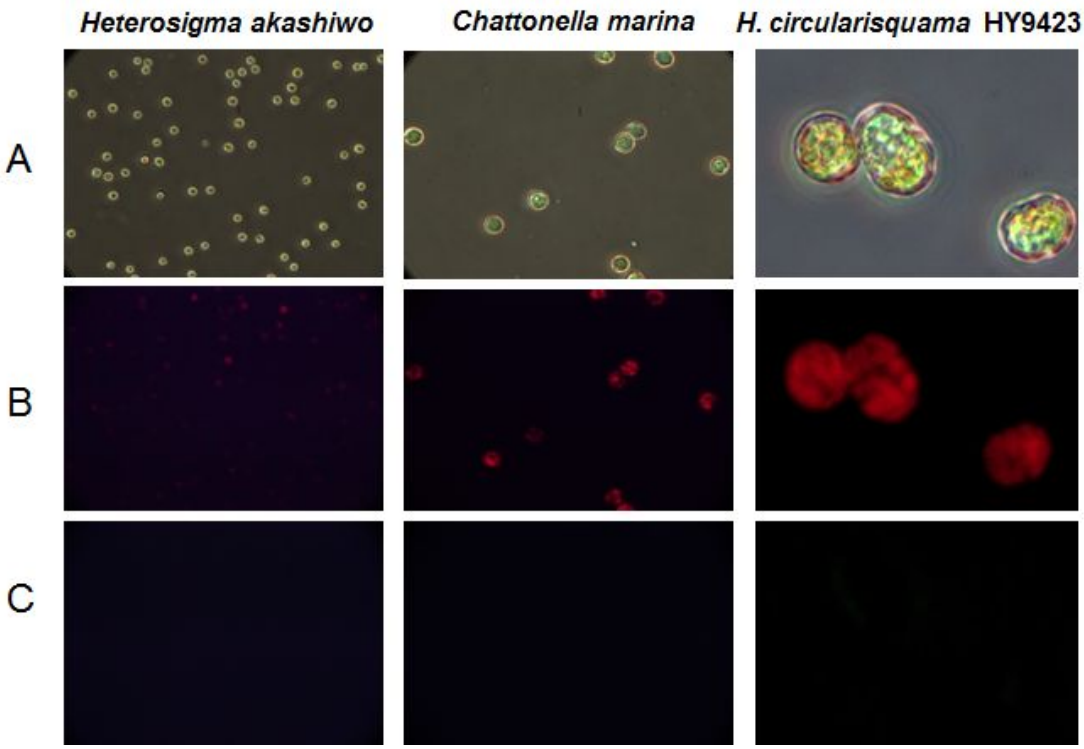

Fig. 13. Host specific binding of HcRNAV34 VLPs labeled with FITC to its non-host, *H. akashiwo, C. marina* and *H. circularisquama* HY9423, under the observation with optical and fluorescent microscopy. Optical filter (A), red filter (B), and green filter (C).

제 7 절 HPLC를 이용한 HcRNAV34 VLP에 탑재된 TD49 정량분석

HcRNAV34 VLPs에 탑재되는 유기합성 살조 물질인 thiazolidinedione (TD49)를 정량하기 위해 Agilent사의 1200 series HPLC를 이용하여 분석하였다. Diode Array Detector (DAD)와 Agilent Zorbax SB C-18 column을 사용하였으며, column 온도 30℃, UV검출 파장은 320 nm의 조건으로 분석하였다. 이동상으로는 (A) 10% acetonitrile, 0.1% trifluoroaceticacid와 (B) 100% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid를 이용하여 linear gradient (0~3 분 A 100%, 3~33 분 A 100%→0%, 33~40 분 A 0%)를 걸어주었다. 유량은 1.0 ㎖/min로 조절하였다 (Fig. 14). 그 결과 초기에 넣어준 TD49 농도 대비 약 44 % 정도가 HcRNAV34 VLPs에 탑재되는 것으로 분석되었다. 또한 TD49를 탑재한 HcRNAV34 VLPs를 dissociation buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM DTT, 10 mM EGTA, pH 8.0)을 이용하여 TD49가 탑재된 VLPs를 다시 분해시킴으로써 TD49가 VLPs의 표면에 붙어있는 것인지 VLPs안으로 탑재되는지 확인한 결과 탑재된 TD49의 농도와 다시 분해 후 TD49의 농도가 확연한 차이가 나타남으로 대부분의 TD49가 VLPs 안으로 탑재되는 것을 확인하였다 (Table 4).

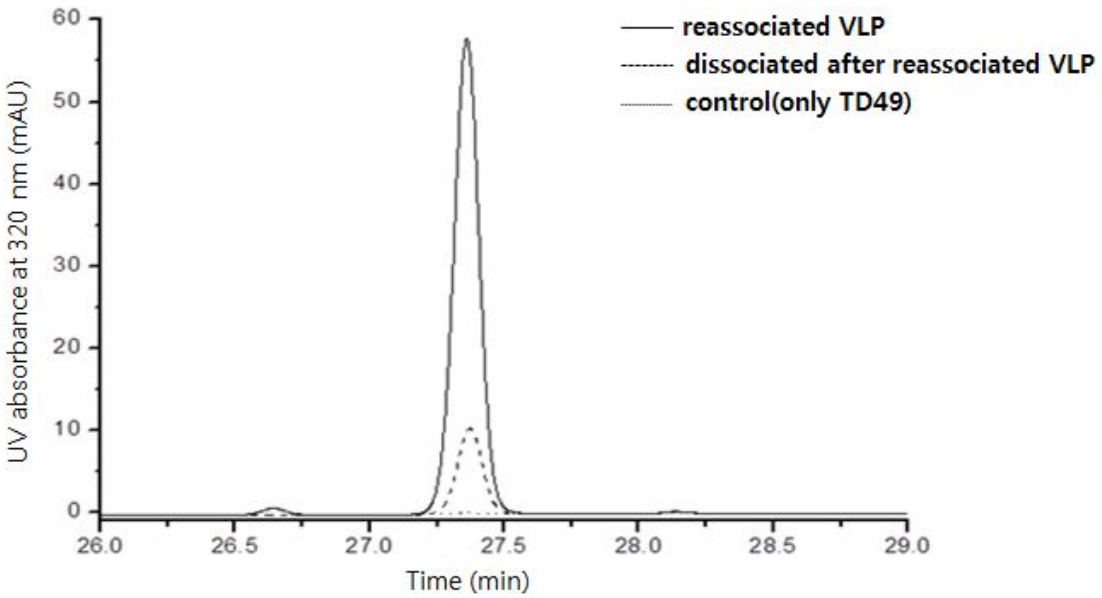

Fig. 14. Detection of TD49 encapsulated in reassociated VLPs and dissociated VLPs after reassociation process.

Table 4. TD49 concentration encapsulated in reassociated and its concomitant dissociated VLPs

Sample	Concentration (μM)	Recovery (%)
Only TD49 167μM (blank)	ND	0
TD49 encapsulated in complete VLPs	73.7±2.7	44.1±1.6
TD49 attached in dissociated VLPs	10.2±1.1	6.1±0.7

제 8 절 숙주에 대한 TD49가 탑재된 HcRNAV34 VLP의 살조 효과

HcRNAV34 VLPs의 숙주에 대한 살조 효과 관찰을 위해 숙주인 *H. circularisquama* HU9433-P와 숙주가 아닌 *H. circularisquama* HY9423을 사용하였다. TD49가 탑재된 HcRNAV34 VLPs 100 ㎕를 조류배양액 약 400 ㎕에 넣어주어 1:4의 비율로 반응시켜 주었다. 조류와 TD49가 탑재된 HcRNAV34 VLPs의 접촉 횟수를 늘리기 위해 교반기를 이용하여 3 시간 동안 천천히 교반하였다. 반응이 끝난 후 1300 rpm에서 3 분간 원심분리한 후 상등액을 제거하고 f/2 배지 500 ㎕를 넣어 2번의 washing 과정을 거친 후 다시 f/2 배지 100 ㎕에 재현탁하여 광학현미경을 통해 숙주에 대한 HcRNAV34 VLPs의 살조 효과를 관찰하였다. 그 결과 숙주인 *H. circularisquama* HU9433-P은 HcRNAV34 VLPs에 탑재된 살조 물질로 인해 대부분이 사멸하는 것이 관찰되었고, 반면에 HcRNAV34 VLPs의 숙주가 아닌 *H. circularisquama* HY9423에는 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다 (Fig. 15).

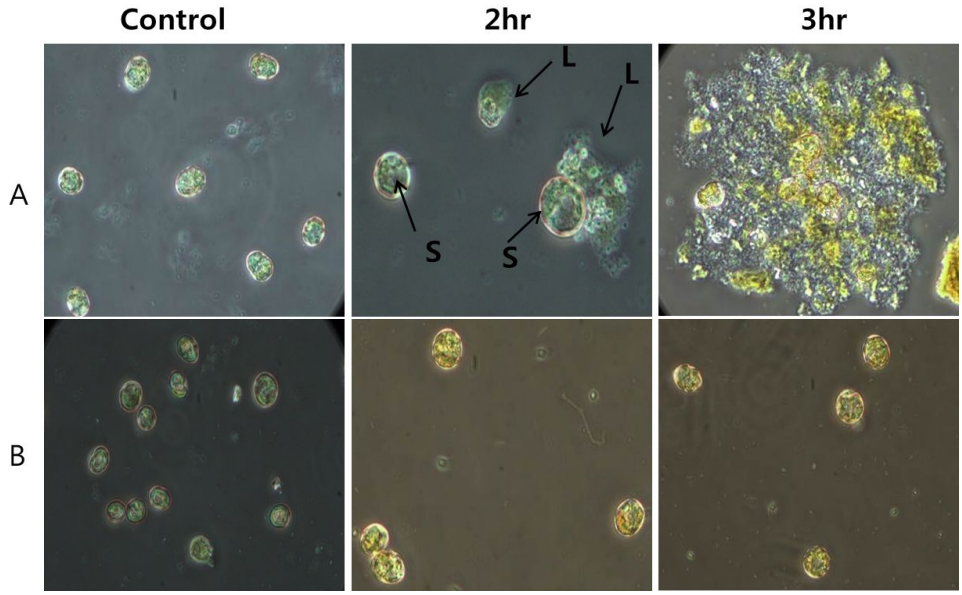

Fig. 15. Host specific algicidal effect of HcRNAV34 VLPs encapsulated with TD49 on its host *H. circularisquama* HU9433-P (A) and its non-host HY9423 (B) at 20℃ for 2 hr and 3 hr.

제 4 장 결론

1. *H. circularisquama* RNA virus 34 유전자 정보를 바탕으로 대장균에서 발현가능하도록 전체 유전자에 약 10%의 rare codon 최적화시켜 유전자 합성을 하였다.

2. HcRNAV34 캡시드 단백질의 최적발현 조건을 탐색한 결과 16℃에서 0.1 mM의 IPTG를 첨가하여 발현을 유도하였을 때 가장 안정적으로 발현되었다.

3. 조립된 HcRNAV34 VLPs의 구조를 전자 현미경을 통해 관찰한 결과 육면체의 규칙적인 모양의 VLPs들이 형성되는 것을 확인하였다.

4. FITC가 표지된 HcRNAV34 VLPs를 이용하여 숙주 특이성을 관찰한 결과 숙주인 *H. circularisquama* HU9433-P, HA92-1에서만 FITC의 형광인 녹색형광이 관찰됨으로 HcRNAV34 VLPs가 숙주에 특이성을 가지는 것을 확인하였다.

5. Dissociation과 reassociation 과정을 통해 초기 넣어준 농도 대비 약 44%의 TD49가 HcRNAV34 VLPs에 탑재되는 것을 HPLC 분석을 통해 확인하였다.

6. TD49가 탑재된 VLPs를 다시 dissociation buffer에 넣어 dialysis 함으로써 VLPs를 분해한 후 TD49의 농도를 분석한 결과 10 μM로 VLPs에 탑재된 TD49 농도인 73 μM와 큰 차이를 보이므로 대부분의 TD49는 VLPs의 표면이 붙는 것이 아닌 VLPs안의 탑재된다는 것을 확인하였다.

7. TD49가 탑재된 HcRNAV34 VLPs를 조류와 반응시킨 결과, 숙주인 *H. circularisquama* HU9433-P는 대부분이 사멸되는 것이 관찰되었고, 숙주가 아닌 *H. circularisquama* HY9423는 전혀 영향을 받지 않는 것으로 관찰되어 HcRNAV34 VLPs는 숙주만을 선택적으로 살조 시키는 것을 확인하였다.

8. 본 연구 결과들을 바탕으로 유해조류에 감염하는 바이러스를 이용하여 유해조류만을 선택적으로 살조시켜 적조를 제어하는 새로운 생물학적 방제기술의 가능성을 확인 할 수 있었다.

참고문헌

1. Nam, H.J., Hong, J.S., Seong, Y.J., (2012) The Algicidal Activity of *Pseudoalteromonas sp*. NH-12 against the Toxic Dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *J. Environ. Agric.* **31**,175-184.

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

3. Park, Y.T., Park, J.B., Chung, S.Y., Song, B.C., Lim, W.A., Kim, C.H., Lee, W.J., (1998) Isolation of marine bacteria killing red tide microalgae, Isolation and algicidal properties of Micrococcus sp. LG possessing killing activity for harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides. J. Korean Fish. Soc.* **31**, 767-773.

4. 박주석, (1995) 적조 및 오염현상과 대책. 한국환경과학회. pp.1-2.

5. 류정곤, 황기형, 김귀영, 김숙양, 박영태, (2004) 적조방제용 황토살포의 효과분석 및 개선방안에 관한 연구. 국립수산과학원 .pp.6-9.

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

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

8. 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.

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

10. Kim, P.G., Park, M.E., Sung, K.Y., Jang, Y.N., (2006) A study of removal property of harmful algal blooms by Hwangto and oriental mineral medicines. *J. Miner. Soc.*19, 277-289.

11. 김학균, (2007) 유해 적조 피해 발생과 대책. Korean society of hazard mitigation. pp.7-21.

12. Horiguchi, T., (1995) *Heterocapsacircularisquama*sp.nov.(Peridiniales, Dinophyceae): a new marine dinoflagellate causing mass mortality of bivalves in Japan. *Phycol. Res.* 43, 129-136.

13. Mizumoto, H., Tomaru, Y., Takao, Y., Shira, Y., and Nagasaki, K., (2007) Intraspecies host specificity of a single-stranded RNA virus infecting a marine photosynthetic protist is determined at the early steps of infection. *J. Viro.* 81, 1372-1378.

14. Nagasaki, K., Shirai, Y., Takao, Y., Mizumoto, H., Nishida, K., and Tomaru, Y., (2005) Comparison of Genome Sequences of Single-Stranded RNA Viruses Infecting the Bivalve-killing Dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama. Appl. Environ. Microbio.* 71, 8888-8894.

15. Tomaru, Y., Mizumoto, H., and Nagasaki, K (2009) Virus resistance in the toxic bloom-forming dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* to single-stranded RNA virus infection. *Environ. Microbio.* 11, 2915-2923.

16. Tomaru, Y., Hata, N., Masuda, T., Tsuji, M., Igata, K., Masuda, Y., (2007) Ecological dynamics of the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* and its infectious viruses in different locations of western Japan. *Environ. Microbio.* 9, 1376-1383.

17. Goldmann, C., Stolte, N., Nisslein, T., Gerhard Hunsmann, Lüke, W., Petry, H. (2000) Packaging of small molecules into VP1-virus-like

particles of the human polyomavirus JC virus. *J Virol. Methods.* **90**, 85-90.

18. Mach H, Volkin D.B, Troutman R.D, Wang B, Luo Z, Jansen K.U, Shi L (2006) Disassembly and reassembly of yeast-derived recombinant human papillomavirus virus-like-particles (HPV VLPs). *J. Pharm. Sci.* **95**, 2195-2206.

19. Minten, I.J., Hendriks, L.J. A., Nolte, R.J. M., and Cornelissen, J.J. L. M. (2009) Controlled encapsulation of multiple proteins in virus capsids. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 17771-17773.

20. Chong, S., Mersha, F.B., Comb, D.G., Scott, M.E., Landry, D., Vence, L.M., Perler, F.B., Benner, J., Kucera, R.B., Hirvonen, C.A., Pelletier, J.J., Paulus, H. and Xu, M.-Q., (1997) Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene.* **192**, 271-281.

19. Tomaru, Y., Takao, Y., Suzuki, H., Nagumo, T., Koike, K., and Nagasaki, K., (2011) Isolation and characterization of a single-stranded DNA virus infecting *Chaetoceros lorenzianus* Grunow. *Environ. Microbio.* **77**, 5285-5293.

21. Nagasaki, K., Tarutani, K., and Yamaguchi, M., (1999) Growth characte ristics of *Heterosigmaakashiwo* virus and its possible use as a micro biological agent for red tide control. *Environ. Microbiol.* **65**, 898-902.

22. Nagasaki, K., Tomaru, Y., Nakanishi, K., Katanozaka, N., and Yamaguchi, M., (2004) Dynamics of *Heterocapsacircularisquama* (Dinophyceae) and its viruses in AgoBay, Japan. *Aquat. MicrobEco.* **34**, 219-226.

23. Vigerust, D.J., Shepherd V.L., (2007) Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends. Microbio.* **15**, 211-218.

24. Tomaru, Y., and Nagasaki, K., (2004) Widespread occurrence of viruses lytic to the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* along the western coast of Japan. *Plankton. BiolEco.* **51**, 1-6.

25. Thomas, R., Grimsley, N., Escande, M., Subirana, L., Derelle, E., and Moreau, H., (2011) Acquisition and maintenance of resistance to viruses in eukaryotic phytoplankton populations. *Environ. Microbio.***13**,1412-1420.

26. Nagasaki, K., (2008) Dinoflagellates, diatoms, and their viruses. *J. Microbio.* **46**, 235-243.

27. Sengco, M.R., Anderson, D.M., (2004) Controlling harmful algal blooms through clay flocculation. *J. Eukaryot. Microbio.* **51**, 169-172.

28. Nagasaki, K., Tomaru, Y., Takao, Y., Nishida, K., Shirai, Y., Suzuki, H., and Nagumo, T., (2005) Previously unknown virus infects marine diatom. *Environ. Microbio.* **71**, 3528-3535.

29. Kim, C.H., J.B., (1997) Harmful and toxic red tide algal development and toxins production in Korean coastal waters. *The Korean Journal of Phycology*. **12**, 269-276.

30. Shirota, A., (1989) Red tide problem and countermeasures. *J. Aquat. Fish Techno.* **1**, 195-223.

31. Tenney, M.W., Echelberger, W.F., Schuessler, R.G., and Pavoni, J.L., (1969) Algal flocculation with synthetic organic polyelectrolytes. *Microbio.* **18**, 965-971.

32. Shi, S., Tang, D., Liu, Y., (2009) Effects of an algicidal bacterium *Pseudomonas mendocina* on the growth and antioxidant system of *Aphanizomenon flos-aquae*. *Curr. Microbio.* **59**, 107-112.

33. Ivrahim, A.M. M., (2007) Review of the impact of the harmful algae blooms and toxins on the world economy and human health. *Egypt. J aqua. research.* **33**, 210-223.

34. Tomaru, Y., Shirai, Y., and Nagasaki, K., (2008) Ecology, physiology and genetics of a phycodnavirus infecting the noxious bloom-forming raphidophyte *Heterosigma akashiwo*. *Fisheries. Science.* **74**, 701-711.

35. Kim, Y.M., Wu, Y., Duong, T.U., Jung, S.G., Kim, S.W., Cho, H., Jin, C.H., (2012) Algicidal activity of thiazolidinedione derivatives against harmful algal blooming species. *Mar. Biotechnol*. **14**, 312-322.

36. Sridhar, P., Namasivayam, C., and Prabhakaran, G., (1988) Algae flocculation in reservoir water. *Biotechnol. Bioengineer.* **32**, 345-347.

37. Kang, Y.H., Kim, J.D., Kim, B.H., Kong, D.S., and Han, M.S., (2005) Isolation and characterization of a bio-agent antagonistic to diatom, *Stephanodiscushantzschii*. *J. Appl. Microbio.* **98**, 1030-1038.

38. Imai, I., Itakura, S., Matsuyama, Y., and Yamaguchi, M., (1996) Selenium requirement for growth of a novel red tide flagellate, *Chattonellaverruculo sa* (Raphidophyceae),inculture. *FishSci.* **62**, 834-835.

39. Guillard, RRL., Ryther, J.H., (1962) Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* (Cleve) Gran. *J. Micro. biol.* **8**, 292-39.

40. Watkins S.M., Reich A, Fleming L.E., Hammond, R. (2008) Neurotoxic shellfish poisoning. *Mar Drugs.* **6**, 431-455.

41. Bai, S.J., Huang, L.P., Su, J.Q., Tian, Y., and Zheng, T.L. (2011) Algicidal effects of a novel marine actinomycete on the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Curr Microbiol* . **62,** 1774-1781.

42. Wada K, Kimura K, Hasegawa A, Fukuyama K, Nagasaki K. (2012) Establishment of a Bacterial Expression System and Immunoassay Platform for the Major Capsid Protein of HcRNAV, a Dinoflagellate -Infecting RNA Virus. *Microbes Environ.* **27**, 483-489

저작물 이용 허락서

학 과	환경공학과	학 번	20117088	과 정	석사
성 명	한글: 주 선 이 한문 : 朱 烗 烯 영문 : Ju Sun Yi				
주 소	광주광역시 남구 봉선1동 라인하이츠 111동1012호				
연락처	E-MAIL : 651-2096@hanmail.net				
논문제목	한글 :**와편모조류 *Heterocapsa circularisquama* HcRNAV34 virus like particle의 발현, 정제, 자가조립 및 숙주특이적 살조능**				
	영어 :Expression, purification, self assembly and host specific algicidal activity of virus like particle of *Heterocapsacircularisquama* HcRNAV34				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의( ) 반대(O)

2013 년 2 월

저작자: 주 선 이 (인)

조선대학교 총장 귀하