

2013年 8月

碩士學位論文

HcRNAV109 virus like particle의
자가조립 및 숙주 특이적 살조능을
이용한 유해 미세조류
*Heterocapsa circularisquama*의 제어

朝鮮大學校 大學院

環境工學科

오 혜 경

HcRNAV109 virus like particle의
자가조립 및 숙주 특이적 살조능을
이용한 유해 미세조류
*Heterocapsa circularisquama*의 제어

Self assembly of HcRNAV109 and controlling of harmful
microalgae, *Heterocapsa circularisquama*, by utilizing the
host specific algicidal activity

2013 年 8 月 23 日

朝鮮大學校 大學院

環 境 工 學 科

오 혜 경

HcRNAV109 virus like particle의
자가조립 및 숙주 특이적 살조능을
이용한 유해 미세조류
*Heterocapsa circularisquama*의 제어

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

2013 年 8 月

朝鮮大學校 大學院

環境工學科

오 혜 경

오혜경의 碩士學位論文을 認准함

委員長 朝鮮大學校 教授 이 인 화 印

委 員 朝鮮大學校 教授 박 윤 경 印

委 員 朝鮮大學校 教授 김 시 욱 印

2013 年 5 月

朝鮮大學校 大學院

TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS	I
LIST OF TABLES	V
LIST OF FIGURES	VI
ABSTRACT	IX
제 1 장 서 론	1
제 1 절 연구배경	1
제 2 절 연구목적	9
제 3 절 살조물질 TD49와 HcRANV VLP	13
제 2 장 실험 재료 및 방법	18
제 1 절 HcRANV109 VLP 유전자 클로닝	18
1. HcRANV109 VLP 유전자 합성	18
2. 플라스미드 및 제한효소	18
3. 사용 균주	18
4. Competent cell 제조	19
5. HcRANV109 VLP 유전자 클로닝	19
가. 시약 및 기기	19
나. HcRANV109 VLP 유전자 증폭	19
다. 유전자 단편 TA 클로닝	21
라. 플라스미드 정제 및 염기서열 확인	21
마. 제한효소 처리와 DNA의 분리	22
바. Ligation 및 형질전환	22
사. 형질전환된 균체로부터 플라스미드 확인	23
제 2 절 HcRANV109 VLP 단백질 발현	23
1. 시약 및 기기	23

2. SDS-PAGE를 이용한 단백질 발현 확인	23
3. Western blot을 이용한 단백질 확인	24
4. 온도에 따른 단백질 발현 조건 탐색	25
5. IPTG 농도에 따른 단백질 발현 조건 탐색	25
6. <i>E. coli</i> strain에 따른 단백질 발현 조건 탐색	26
7. 최적화 조건에서의 단백질 발현 유도 및 cell free extract 제조	26
제 3 절 HcRNAV109 VLP 단백질 정제	27
1. 시약 및 기기	27
2. Chitin affinity column을 이용한 재조합 pTXB1 HcRNAV109 VLP 단백질 정제	27
3. Ni-NTA affinity column을 이용한 HcRNAV109 VLP 단백질 정제	28
가. 재조합 pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP 단백질 정제	28
나. 재조합 pHCE IA HcRNAV109 VLP 단백질 정제	28
제 4 절 HcRNAV109 VLPs의 자가조립	29
1. Dialysis를 통한 자가조립 유도	29
2. HcRNAV109 VLP의 구조	29
제 5 절 HcRNAV109 VLP의 숙주 특이성	30
1. 시약 및 기기	30
2. HcRNAV109 VLP 단백질의 형광물질 FITC 표지	30
3. 형광 현미경을 통한 FITC-labeled HcRNAV109 VLP의 숙주 특이성 관찰	30
제 6 절 TD49 탑재 및 숙주 특이적 살조능	31
1. 시약 및 기기	31
2. HPLC 분석에 의한 cell free extract에 용해되어있는 TD49 탑재 HcRNAV109 VLP 단백질 정량 분석	31
3. Cell free extract에 용해되어 있는 TD49 탑재 HcRNAV109 VLP 단백질의 숙주 특이적 살조 효과	32

제 7 절 대량배양	33
1. 시약 및 기기	33
2. 대량배양	33
제 3 장 결과 및 고찰	34
제 1 절 HcRNAV109 VLP 유전자 합성	34
제 2 절 재조합 HcRNAV109 VLP 유전자 클로닝	36
제 3 절 재조합 HcRNAV109 VLP 단백질 발현	39
1. 온도에 따른 최적의 단백질 발현 조건 확립	39
2. IPTG 농도에 따른 최적의 단백질 발현 조건 확립	42
3. <i>E. coli</i> strain에 따른 최적의 단백질 발현 조건 확립	45
제 4 절 각 affinity chromatography를 이용한 HcRNAV109 VLP 단백질 정제	47
1. Chitin affinity column을 이용한 재조합 pTXB1 HcRNAV109 VLP 단백질 정제	47
2. Ni-NTA affinity column을 이용한 HcRNAV109 VLP 단백질 정제	49
가. 재조합 pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP 단백질 정제	49
나. 재조합 pHCE IA HcRNAV109 VLP 단백질 정제	52
제 5 절 자가 조립 유도를 통한 HcRNAV109 VLPs의 구조 관찰	54
제 6 절 HcRNAV109 VLP의 숙주 특이성	56
1. 형광물질 FITC가 표지된 HcRNAV109 VLP 단백질 확인	56
2. 형광 현미경을 통한 FITC-labeled HcRNAV109 VLP의 숙주 특이성 관찰	58
제 7 절 Cell free extract에 용해되어 있는 TD49 탑재 HcRNAV109 VLP 단백질의 숙주 특이적 살조 효과	61

제 8 절 대량배양	64
제 4 장 결 론	67
참고문헌	69

LIST OF TABLES

Table 1. Damage of marine organism by HABs	4
Table 2. History of HABs area, year, types of algae and number of harmful algal species identified in Korea seawater	5
Table 3. Viruses infectious to marine eukaryotic microalgal	12
Table 4. Harmful <i>H. circularisquama</i> strains, location and year of isolation in Japan seawater	16
Table 5. Primers used in this study	20
Table 6. <i>Heterocapsa circularisquama</i> and the other algal strains used in this study	59

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Annual HABs occurring marine areas in Korea	7
Fig. 2. Microalgal transients in marine area of Korea from the year of 1980 to 2012	8
Fig. 3. The chemical structure of TD derivative (A) and TD49 (B)	14
Fig. 4. Generation of dendrimer	14
Fig. 5. Schematic genome structure of HcRNAV34 and HcRNAV109 and the position of the primers	17
Fig. 6. Codon optimization of HcRNAV109 <i>orf-2</i> gene sequence from Genbank for expression in <i>E. coli</i>	35
Fig. 7. PCR product of codon optimized gene of HcRNAV109 (A) and fused gene of HcRNAV109-intein (B)	37
Fig. 8. Construction of pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP (I), pTXB1 HcRNAV109 VLP (II) and pHCE IA HcRNAV109 VLP (III)	38
Fig. 9. SDS-PAGE analysis of recombinant pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP (A), pTXB1 HcRNAV109 VLP (B) and pHCE IA HcRNAV109 VLP (C) protein expressed in <i>E. coli</i> BL21(DE3) at different temperatures 16°C (I), 18°C (II), 25°C (III), 30°C (IV), 37°C (V) and 40°C (VI)	40
Fig. 10. Western blot analysis of recombinant pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP (A), pTXB1 HcRNAV109 VLP (B) and pHCE IA HcRNAV109 VLP (C) protein expressed in <i>E. coli</i> BL21(DE3) at different temperatures 16°C (I), 18°C (II), 25°C (III), 30°C (IV), 37°C (V) and 40°C (VI)	41
Fig. 11. Expression level of the recombinant pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP (A) and pTXB1 HcRNAV109 VLP (B) protein expressed in <i>E. coli</i> BL21(DE3) at different IPTG concentrations	43
Fig. 12. Western blot analysis of the recombinant pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP (A) and pTXB1 HcRNAV109 VLP (B) protein expressed in <i>E. coli</i> BL21(DE3) at different IPTG concentrations	44
Fig. 13. Expression level of recombinant pHCE IA HcRNAV109 VLP protein in <i>E.</i>	

<i>coli</i> by SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis with different <i>E. coli</i> strains.	46
Fig. 14. Purification of the pTXB1 HcRNAV109 VLP protein using chitin affinity column chromatography	48
Fig. 15. Purification of the pET30a(+) HcRNAV109-intein fused VLP protein using Ni-NTA affinity chromatography	50
Fig. 16. Purification of the pET30a(+) HcRNAV109 VLP dissociated from fused protein through Ni-NTA affinity chromatography	51
Fig. 17. Purification of the pHCE IA HcRNAV109 VLP protein using Ni-NTA column chromatography	53
Fig. 18. The transmission electron micrograph of negative stained HcRNAV109 VLPs	55
Fig. 19. SDS-PAGE analysis of the pTXB1 HcRNAV109 VLP protein labeled with FITC	57
Fig. 20. Host specific binding of pTXB1 HcRNAV109 VLPs to its host, <i>H.</i> <i>circularisquama</i> HY9423, and its non-host, <i>H. circularisquama</i> HU9433-P, HA92-1, <i>H. akasiwo</i> and <i>C. marina</i> . Optical filter (A) and fluorescent micrographics red filter (B) and green (C)	60
Fig. 21. Host specific algicidal activity of HcRNAV109 VLPs dissolved in the cell free extract and encapsidated with TD49 on its host <i>H.</i> <i>circularisquama</i> HY9423 (A) and its non-host <i>H. circularisquama</i> HU9433-P (B) and <i>H. akasiwo</i> at 21°C for 7 h	62
Fig. 22. Host specific algicidal activity of HcRNAV34 VLPs used as a control, dissolved in cel free extract and encapsidated with TD49 on its host <i>H. circularisquama</i> HU9433-P (A) and its non-host <i>H.</i>	

	<i>circularisquama</i> HY9423 (B) and <i>H. akasiwo</i> at 21°C for 7 h	63
Fig. 23.	Plasmid activity (A) of <i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring recombinant HcRNAV109 VLP gene depending on the cell growth (B) cultivated in a 5 L fermenter	65
Fig. 24.	Expression level of recombinant pHCE IA HcRNAV109 VLP protein in <i>E. coli</i> BL21(DE3) cultivated in a 5 L fermenter by time course	66

Abstract

Self assembly of HcRNAV109 and controlling of harmful microalgae, *Heterocapsa circularisquama*, by utilizing the host specific algicidal activity

Oh Hye Gyung

Advisor : Prof. Si Wouk Kim, Ph. D

Department of Environmental Engineering,
Graduate School of Chosun University

Harmful algal blooms (HABs) are characterized by rapid and massive accumulation of certain types of microscopic algae and HABs are linked to significant socio-economic losses and can give extensive damages to the aquatic ecosystem, drinking water sources and human health by depleting the dissolved oxygen and blocking the sunlight, or producing toxins. Recombinantly expressed and purified VLPs of *Heterocapsa circularisquama* RNA virus (HcRNAV) can be used as a potent carrier for harmful algal bloom suppression. The HcRNAV strains were divided in two types: HcRNAV109 (CY-type) and HcRNAV34 (UA-type), based on their complementary strain-specific infectivity. Host specific attachment and cell destruction of HcRNAV109 VLPs against *H. circularisquama* strains were investigated under microscopy by encapsulating the particles with a novel algicidal substance, thiazolidinedione (TD49). The TD49 concentration was detected by HPLC analysis. The VLPs encapsidating TD49 specifically attached and destroyed

the cells of *H. circularisquama* HY9423, which are the hosts of the HcRNAV109 strains, but not the cells of HU9433-P and HA92-1, which is known as a host of HcRNAV34 virus. These results indicate that the recombinant VLPs have considerably high host specificity and are compatible with a common viral property of host specific infection. Therefore we suggest the possibility that VLPs encapsidated algicidal agents can be used as an alternative and highly effective bio-control tool to prevent a harmful algal blooming in the sea.

제 1 장 서 론

제 1 절 연구배경

지구 온난화로 인해 남극과 북극의 빙하가 녹으면서 해수의 해수면 증가, 해수 염 농도의 희석 및 해수의 수온이 상승하게 되었다. 또한 산업화 및 공업화에 의해 N, P 등의 영양분이 과다 유입되면서 해수의 부영양화 현상이 초래되었다. 이처럼 미세조류가 증식하기에 적합한 환경이 갖추어지게 되면 수중에 서식하는 미세조류가 다량 증식하게 되고 그 중 독성을 생성하는 유해 미세조류가 과다로 증식하여 육안으로 보았을 때 해수가 녹색, 갈색 또는 적색을 띄게 되는 현상을 유해조류 대발생 (Harmful Algal Blooms : HABs)라고 한다 ^[1-2].

유해조류 대발생으로 인해 나타나는 피해는 직접적인 피해와 간접적인 피해로 나눌 수 있다 (Table 1). 특히 수중의 산소 고갈로 인해 어류의 질식사를 유발할 수 있고 어류의 아가미 부착으로 인한 호흡 방해, 조류의 내독소 분비에 의한 어패류의 집단 폐사 등 수산자원의 폐사를 부르고 이들의 부패는 다시 환경을 악화하여 유해조류 대발생을 유도하는 악순환의 반복을 야기한다. 또한 해양세균의 조성과 분포가 달라지고 유기물이 과량으로 분해될 때 일어나는 산소 소비로 인하여 해저에 빈산소(hypoxia) 또는 무산소(anoxia) 현상을 초래하는 등 해양 생태계를 변형시킬 뿐만 아니라 바다색이 변하고 심한 악취가 남으로써 심미적 가치를 상실할 수 있으며 수산물 소비 위축뿐만 아니라 폐사된 어패류의 독화에 의해 식중독이 유발할 수 있다 ^[3].

우리나라에서 유해조류 대발생에 대한 과학적인 조사는 마산시 진동만에서 관찰된 1961년 이후에 시작되었다. 1963년 이후 경제개발 5개년을 시작으로 산업 및 도시폐수가 지속적으로 증가되어 우리나라 근해로 많은 양의 폐수가 배출되었다. 1970년대 중반까지는 주로 진해만 부근에서 규조류 (diatom)에 의하여 여름철에 국부적으로 발생하였다가 약 1주일 후에는 소멸하곤 하였으나 1978년에는 독성을 갖는 편모조류 (flagellate)에 의해 한산만과 거제만에서 약 27억 원의 피해를 입는 등 유해조류에 의한 피해가 발생하게 되었다. 국립수산과학원의 적조발생자료를 토대로 1980년 이후 유해조류 대발생의 발생해역과 원인 종을 분류한 결과

1981년에는 고농도의 와편모조류 (dinoflagellate), 특히 *Gymnodinium T-65* 에 의해 진해만, 마산만 등을 중심으로 7월부터 3개월간 장기적으로 지속되어 17억 원의 피해를 입게 되었다. 이후 진해만을 포함한 오염해역에서 원인 종에 관한 분류학적 연구, 생리학적 연구 등이 이루어졌다. 이처럼 1980년대에는 7월부터 9월 까지 진해만, 마산만등을 중심으로 *Gymnodinium T-65*, *Prorocentrum micans*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira* sp., *Microcystis* sp. 및 *Chaetoceros* 등에 의해 발생하였다. 1990년대에는 남해안과 동해안을 중심으로 *Heterosigma akasiwo*, *Cochlodinium polykrikoides*, *Ceratium furca*, *Prorocentrum* spp. 등에 의해 발생하였으며 특히 1995년에는 5월부터 10월 초까지 장기간 발생하였으며 그로 인해 761억 원의 막대한 피해를 입었다. 이후 2000년대에는 초반에 남해안과 동해안 중심에서 후반에는 서해까지 확산되었다. 주요 원인 종인 *C. polykrikoides*, *H. akasiwo*와 *Chattonella* sp. 등에 의해 2003년에는 215억 원, 2007년에는 100억 원의 피해가 발생하는 등 수산업의 피해가 꾸준히 발생하였고 2012년도에는 7월 후반부터 약 50일 동안 남해안과 동해안에서, 10월에는 24일 동안 서해안에서 발생하는 등 고밀도의 유해조류가 장기적으로 발생하면서 그 피해액이 막대할 것으로 예상된다 (Table 2). 이처럼 1980년대에 들어서는 연중 수온이 가장 낮은 겨울철을 제외하고는 매년 몇 개월간 장기적으로 발생하였으며 1990년대에는 남해안과 동해안, 2000년대에는 서해안까지 전 연안에서 수시로 광범위하게 번천되며 수산 자원에 막대한 영향을 끼쳐 지역 경제의 피해와 어장 환경을 혼란시키고 있다 (Fig. 1). 또한 1982년에는 30%의 규조류와 33% 편모조류와 37%의 혼합종에 의해 발생하는 등 1980년대에는 원생동물 외에도 라피도류, 남조류, 규조류, 와편모조류 및 편모조류 등 다양한 조류에 의한 유해조류의 대발생으로 우점종 혼합형 (bloom of mixture of species) 분류할 수 있다. 그러나 1990년도부터 와편모조류와 편모조류의 비중이 증가하게 되고 2000년대 이후부터 와편모조류인 *C. polykrikoides*가 지배적이었으며 특히 2012년도에는 유해조류 중 약 1%의 편모조류와 약 98%의 와편모조류에 의해 발생하게 되었다. 이처럼 국내의 유해조류 대발생이 우점종 혼합종에서 단독 우점종 (mono specific bloom)으로 종천이가 발생하였음을 알 수 있다^[4-9] (Fig. 2).

작년에는 또 다른 와편모조류인 *Alexandrium* spp.가 마산만과 진해만에서 7건

발생하였다. 이는 와편모조류의 다양한 유해 미세 종에 의한 유해조류 대발생의 가능성을 예상할 수 있다. 와편모조류는 장기간 고밀도로 발생하여 갑각류를 대량 폐사시킬 수 있는 맹독성을 갖는다. 그 중 1990년 초반부터 일본 및 홍콩 해역에서 발생하여 굴과 조개를 대량으로 폐사 시키는 매우 강한 독성을 갖는 와편모조류 *Heterocapsa circularisquama*의 발생 가능성에 초점을 두고 있다^[10-11]. 근래에 *Chattonella* spp.와 *Alexandrium* spp.의 증가 등 국내의 유해조류 대발생 현상이 내만성에서 외양성으로 증가 추세가 강하기 때문에 향후 출현 가능성이 높은 유해조류로 예상되고 있다.

Table 1. Damage of marine organism by HABs ^[3].

Division	Damage patterns	Damage cause	Causing symptoms
Direct damage	Death from poisoning	Production of toxin of harmful microalgae	Production of biotoxin
		toxic material production by bacteria	
		Production of toxic ingredients such as organism decomposition of HABs algae	Toxicity breakdown product , DNA damages, cell damage
	Suffocation	Production of oxygen free radical	Enzymic transformation,
		Respiration of plankton	Consuming of dissolved oxygen
		Consumption of dissolved oxygen by organism debris respiration	Development of anoxia ringleader
		breathing disorder by gil clogging	Fall of gas exchange roll
		physiological stress by increase of carbon and pH in seawater	
		Relative oxygen deficiency and deteriorating water quality	
	Gill damage	Gill damage by harmful microalgae salience	
Indirect damage	Productivity decline	migratory escape, depletion of resources and weak of reproduction	
		Poor of sea water exchange	biologic growth slowdown
		organic matter → exchange of benthic organism	shellfish, crustacea → Polychaeta
		Change of environment quality (clay, turbidity)	photosynthesis slowdown
	Secondary damage	Declining of sea food	Halo effect
		Food poisoning	Health damage

Table 2. History of HABS area, year, types of algae and number of harmful algal species identified in Korea seawater ^[8-9].

Year	Sea area of occurrence	Class	Major harmful species (count)
1981	마산만, 가조도, 행암만, 웅동만, 부산남항, 당동만, 진동만	Dinoflagellate	<i>Gymnodinium T- '65</i> (53), <i>Prorocentrum</i> spp (3)
	광도만, 견내량, 고현만, 행암만, 당동만	Diatom	<i>Skeletonema costatum</i> (21)
1985	북신만, 마산만, 행암만, 고현만, 원문만, 진동만	Dinoflagellate	<i>Gymnodinium spleudens</i> (7), <i>Prorocentrum minimum</i> (6), <i>Nitzschia</i> sp. (1), <i>Prorocentrum dentatum</i> (2)
	마산만, 행암만	Raphidophyceae	<i>Thalassiosira</i> sp.(2)
	광도만, 고성만, 마산만, 행암만, 온산만, 고현만, 진해만, 원문만, 돌산도 광양만	Diatom	<i>Chaetoceros</i> spp. (4), <i>Skeletonema costatum</i> (14)
1988	목포, 청하면, 온산만, 행암만, 마산만, 통영, 가조도, 거제, 거제시 남부면, 팔미도	Dinoflagellate	<i>Coccolodinium</i> (7), <i>Prorocentrum micans</i> (4), <i>Prorocentrum minimum</i> (2) (1), <i>Gymnodinium spleudens</i> (1)
	마산만, 온산만, 다대도	Flagellate	<i>Heterosigma akasiwo</i> (3)
	웅동만, 마산만, 당동만, 진동만, 고현만, 칠천수도, 통영, 인천 팔미도	Diatom	<i>Skeletonema</i> (7)
	광양만, 남해군 남면, 장승도읍 옥포만	Cyanophyta	<i>Microcystis</i> sp. (3)
	인천	Ciliophora	<i>Mesodinium</i> (1)
1993	홍성, 진동만, 북신만, 해운대, 진해만, 거제, 행암만, 통영, 전남 여천, 남해 미조면, 강진만, 사랑도, 오비도	Dinoflagellate	<i>Coccolodinium polykrikoides</i> (11), <i>Noctiluca scintillans</i> (5), <i>Prorocentrum</i> sp.(4), <i>Ceratium furca</i> (3)
	원문만, 마산만	Flagellate	<i>Heterosigma akasiwo</i> (3), <i>Eurepiella</i> sp. (1)
	원문만	Diatom	<i>Skeletonema costatum</i> (4)
1995	완도, 여자만, 고흥, 경주-포항, 삼척시-울산, 제주도, 남해 남면, 돌산, 포항, 통영, 화양면, 행암만, 장좌도,	Dinoflagellate	<i>Coccolodinium polykrikoides</i> (38), <i>Ceratium furca</i> (33), <i>Noctiluca scintillans</i> (1), <i>Gymnodinium sanguineum</i> (3)

Table 2. Continous

Year	Sea area of occurrence	Class	Major harmful species (count)
	울산, 부산기장, 자란만, 여수, 강진만, 사랑도, 진동만	Flagellate	<i>Heterosigma akasiwo</i> (12). <i>Eutreptiella gymnastica</i> (1)
	영산강	Diatom	<i>Thalassioaira mala</i> (1)
	군산항	Ciliophora	<i>Mesodinium rubrum</i> (1)
2001	수영강, 진해만, 통영, 거제시, 광양만, 진동만, 마산만, 행암만	Dinoflagellate	<i>Cochlodinium polykrikoides</i> (10), <i>Prorocentrum micans</i> (6), <i>Eutrpt</i> (4), <i>Ceratium furca</i> (4)
	형산강, 포항, 울산, 온산만, 부산, 행암만, 마산만, 진동만	Flagellate	<i>Heterosigma akasiwo</i> (14), <i>Cryptomonas</i> sp. (1)
	보령, 여수, 수영강 하구	Diatom	<i>Thalassiosira</i> sp. (1), <i>Skeletonema</i> sp. (7)
	보령	Ciliophora	<i>Mesodinium burum</i> (1)
2007	울진, 영덕, 포항, 경주, 울주, 미조면, 사랑도, 고성군, 여수, 장흥, 완도, 고흥-여수, 고흥-보물바다	Dinoflagellate	<i>Cochlodinium polykrikoides</i> (16)
	태안, 천수만-태안외해역, 태안-남면, 비인만	Raphidophyceae	<i>Chattonella globosa</i> (4)
2010	수영만, 마산만, 진동만, 진해만, 행암만, 통영, 여수-통영, 고흥-여수, 완도, 울릉도연안	Dinoflagellate	<i>Cochlodinium polykrikoides</i> (10), <i>Prorocentrum minimum</i> (5), <i>Gymno</i> <i>Prorocentrum</i> <i>dentatum</i> (3), <i>Ceratium furca</i> (2), <i>Alexandrium</i> <i>Noctiluca scintillans</i> (1)
	천수만, 여수, 남해군	Flagellate	<i>Heterosigma akasiwo</i> (6)
	서천, 군산시, 남해군	Diatom	<i>Chattonella antiqua</i> (5), <i>Chattonella curvisetus</i> (2), <i>Skeletonema</i> <i>co</i>
2012	장흥-완도, 외나로도, 남도, 고흥 내나로도동-외나로도, 여여수 남면-돌산, 경남 거제-다대만, 통영-연대도, 진해만, 포항, 남해, 미조면, 가조도, 충남 태안-보령-서천, 비인만, 비인만-군산, 안면도	Dinoflagellate	<i>Cochlodinium polykrikoides</i> (72), <i>Alenxandrium</i> sp. (7), <i>Prorocentrum</i> <i>Ceratium furca</i> (2)
	마산만, 진해만, 거제, 비인만	Flagellate	<i>Heterosigma akawiso</i> (4)

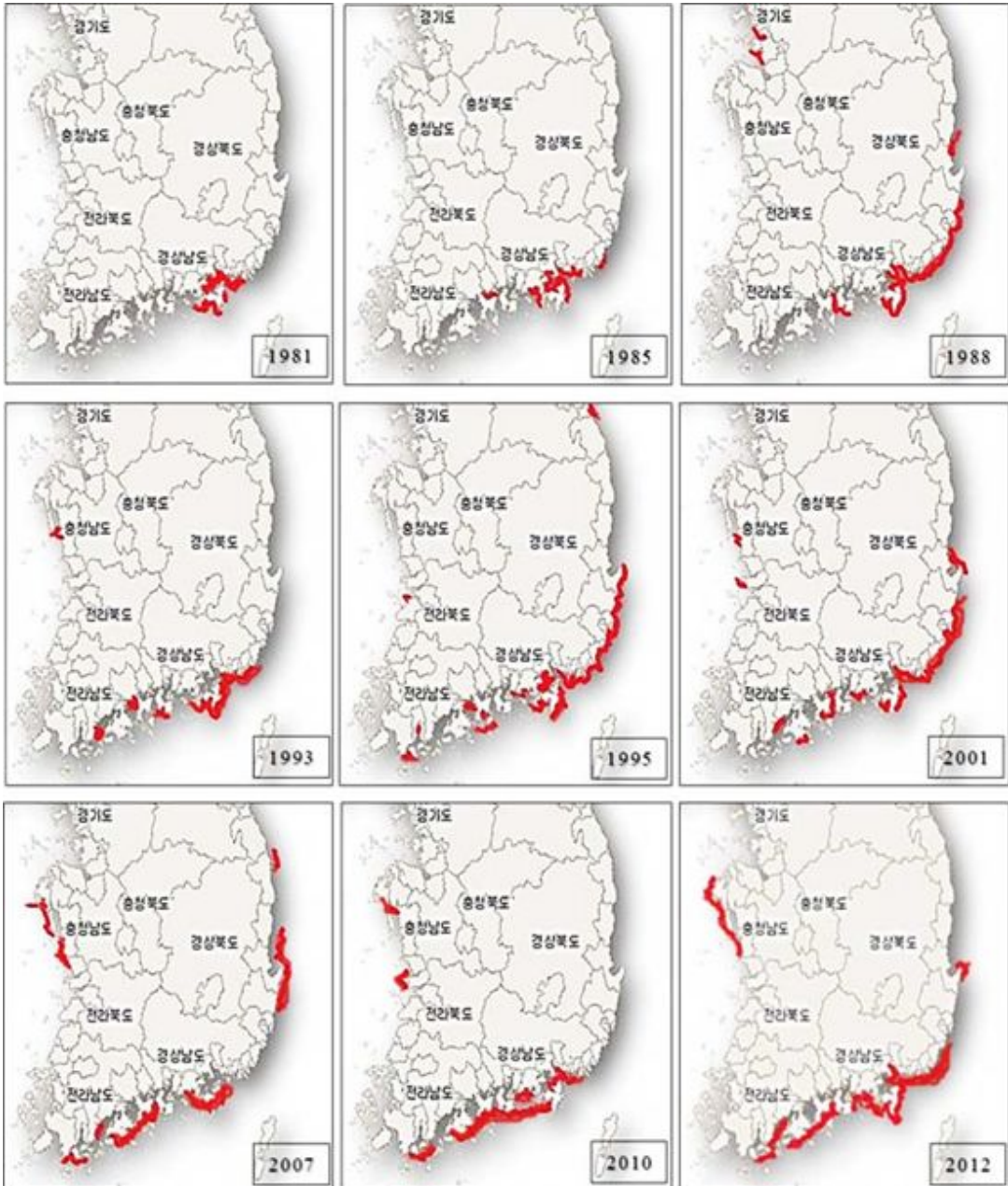


Fig 1. Annual HABs occurring marine areas in Korea [8-9].

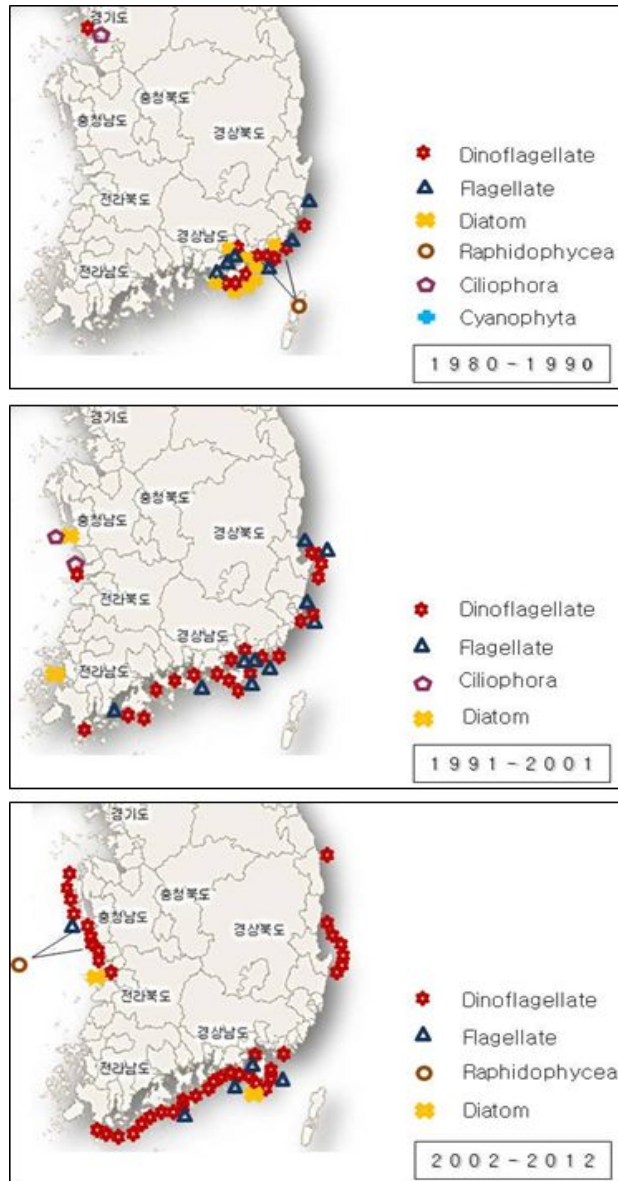


Fig 2. Microalgal transients in marine area of Korea from the year of 1980 to 2012 ^[8-9].

제 2 절 연구목적

국내에서는 유해조류 대발생 빈도가 잦아지고 이로 인한 심각한 수산피해가 야기되는 등 환경과 인간 건강에 위해를 끼치고 있다. 또한 앞으로는 강한 독성을 갖는 유해한 미세조류들로 인한 유해조류 대발생 가능성을 볼 때 이를 제어할 수 있는 혁신적인 기술이 시급히 요구된다. 현재 연구된 대표적인 방제 기술은 생물학적 방법, 이화학적 및 물리적 방법이 있다. 먼저 생물학적인 방제기법은 해양 생물 간의 상호작용을 이용한 방법으로서 적조 유발 유해조류 제어와 동시에 천적으로 사용되는 특정 종들의 증식 증대로 인한 생태계 교란을 야기하는 문제점을 가지고 있다. 이화학적 방법은 황산구리 (CuSO_4), 시마진 (Simazine) 또는 유기 화합물 등의 화학약품을 살포하는 방법이다. 그 중 비용이 가장 저렴하여 널리 이용되는 황산구리는 다른 무해 생물에 영향을 끼쳐 수중의 다른 생물에 대한 독성 및 부식의 측면에서 문제가 초래될 수 있으며 대규모 살포하였을 경우 지속성이 없고 유해조류의 대발생시 수반되는 높은 알칼리성 환경 조건하에서는 황산구리가 불안정해지기 때문에 비경제적인 한계점을 가지고 있다. 마지막으로 물리적 방법으로는 유해 미세조류를 흡착, 응집하거나 부상 분리 장치에 의해 회수하는 해면 회수 및 침강법, 오존을 투입하여 유해 미세조류의 독성을 중화 시키는 오존 처리법과 초음파 (160-400 kHz)로 적조원인생물의 세포를 파괴하는 초음파 처리법이 있으나 바다에 산소의 양이 기하급수적으로 많아지면서 바다 생물에 위험을 줄 수 있어 아직 실용화단계에는 이르지 못하고 있는 실정이다^[12-13]. 이처럼 다양한 방제 기술 중 국내에서는 대부분 황토(점토)살포법이 적용되고 있다. 1996년부터 시·도에서는 황토살포에 대한 효과를 보게 되면서 사업을 추진하고 있다. 이는 황토 입자 사이의 빈 공간이 불순물(오염물질)을 흡착 분해해서 산소를 풍부하게 하고 원적외선을 방출하는데 이는 유해조류 대발생을 일으키는 유해 미세조류의 먹이가 되는 인 성분을 황토 입자 사이의 공간이 흡착해 바다 속으로 가라앉도록 하는 것이다. 유해조류 대발생시 선박에서 황토를 바다에 직접적으로 대량 투입하기 때문에 황토 살포 효과도 떨어지고 사업비용 증가뿐만 아니라 저층에 많은 양의 황토가 축적되어 생태계에 악영향을 미칠 수도 있다. 또한 수산피해가 예상되는 해역에만 살포하는 것이 아니라 비교적 넓은 바다를 대상으로 살포하고 있어 그 문제

는 더 크다. 가두리 내의 양식 생물이 폐사되었을 경우에는 단시간 내에 부패되어 양식생물의 연쇄적인 폐사와 2차 수질오염 문제를 야기한다. 그러므로 최단 시간 내에 폐사어를 가두리로부터 제거해야만 하는 데 현재 어업인의 수동 작업으로 이루어지기 때문에 많은 시간과 인력이 소요되는 비효율성을 갖는다. 이러한 방법들은 잠재적으로 심각한 환경적인 문제를 초래할 수 있다. 그러므로 유해조류 대발생을 방제하기 위한 새로운 기술 개발이 절실히 필요하다^[14].

본 연구에서는 해양 생태계에 미치는 독성 영향을 최소화하고 2차 오염이 없는 자연생태 조화형, 환경 친화적이며 선택적으로 영향을 미치는 유기 화학 합성 살조물질을 개발하고 이를 선택적으로 자기 숙주에만 전달하기 위해 일종의 운반체로서 VLP (Virus like particle)을 이용하고자 한다.

바이러스의 유전정보를 담고 있는 DNA/RNA를 보호하는 단백질 구조체인 바이러스 캡시드에 대한 연구는 현재 많은 분야에서 그 기초 연구가 진행 중에 있다. 바이러스 캡시드는 일정한 나노크기와 균일한 형태, 견고한 구조 및 외부와 연결되는 나노기공을 가지는 단백질 구조체로 이루어져 있어 핵산이 제거된 바이러스 캡시드 빈 내부 공간의 이용에 대한 기초 연구가 진행되고 있다. 일련의 보고에 따르면 어떤 바이러스들은 세포 표면에 과발현 되어 있는 수용체들에 대해서 특이적이면서도 자연적인 친화력을 지니기 때문에 이들 바이러스 유래의 캡시드 입자를 대량생산하여 봉입물질의 수송체로 이용하면 선택성을 증진시킬 수 있다^[15-16].

따라서 이 연구의 목적은 숙주 특이적인 바이러스의 캡시드 단백질 유전자를 대장균에서 대량 발현하여 나노 캡시드 입자를 생산한 후 조류를 치사시키는 물질을 주입한 나노캡시드입자를 이용하여 유해조류를 방제하는데 있다. 일반적으로 해수 1 ml에는 100 만 개에 이르는 바이러스가 존재한다고 알려져 있다. 또한 해양 적조 원인 생물이 소멸하는 기간에 뚜렷이 나타나는 현상으로 적조생물에 특이한 바이러스의 증가가 관찰됨으로써 이들 바이러스를 응용한 적조퇴치의 가능성을 열어 놓았다. 특히 플랑크톤의 바이러스는 대발생 (bloom)이 일어나 생물량 (biomass)이 최고조일 때 숙주세포를 용해시켜 간접적으로 에너지와 영양물질 그리고 유기물의 흐름을 교란하기도 한다. 이처럼 바이러스에 의한 살조 기술 연구의 중요성이 새롭게 인지되고 있다. 국내에서도 적조 제어 기법에 대한 다양한 접근이 시도되고 있으나 바이러스를 응용하는 시도는 아직 이루어지고 있지 않다.

2006년까지 보고된 해양 조류를 감염시키는 20여종 미만의 바이러스 중 맹독성을 갖는 *Heterocapsa circularisquama* 미세조류를 숙주으로써 감염하는 바이러스 캡시드 단백질을 대량생산하여 HcRNAV의 VLP에 살조물질 (TD49)를 탑재시켜 숙주에 특이적으로 감염시켜 사멸시키고자한다^[17] (Table 3). 이는 해양뿐만 아니라 담수의 녹조류 및 광범위한 유해생물체 방제에도 사용될 수 있으며 환경생태를 파괴하지 않는 융합기술 (바이오-나노-환경)을 접목한 유해조류 대발생을 방제할 수 있는 기술을 개발하는 것이다.

Table 3. Viruses infectious to marine eukaryotic microalgae ^[17].

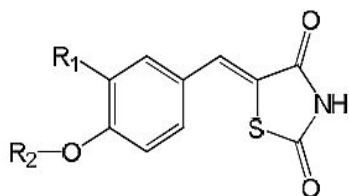
Virus	Host	Size (nm)	Genome
BtV	<i>Aureococcus anophagefferens</i>	140	dsDNA
CbV	<i>Chrysochromlina brevifilum</i>	145–170	dsDNA
CeV	<i>Chrysochromlina ericina</i>	160	dsDNA
EhV	<i>Emiliana huxleyi</i>	170–200	dsDNA
HaNIV	<i>Heterosigma aakashii</i>	30	not found
HaV	<i>Heterosigma akashiwo</i>	202	dsDNA
HaRNAV	<i>Heterosigma akashiwo</i>	25	ssRNA
HcRNAV	<i>Heterocapsa circularisquama</i>	30	ssRNA
HcV	<i>Heterocapsa circularisquama</i>	197	dsDNA
MpRNAV	<i>Micromonas pusilla</i>	50–60	dsDNA
MpV	<i>Micromonas pusilla</i>	115	dsDNA
PoV	<i>Pyramimonas orientalis</i>	180–220	dsDNA
PpV	<i>Phaeocystis pouchetii</i>	130–160	dsDNA
PgV	<i>Phaeocystis globosa</i>	not found	dsDNA

제 3 절 살조물질 TD49와 HcRNAV VLP

1. 살조물질 TD49

기존에 알려진 살조제 (algicide)는 무기금속화합물인 copper sulfate (CuSO_4)와 유기화합물인 diuron (N' -(3,4-Dichlorophenyl)-N,N-dimethyl-Urea)은 일부 유해조류에 대한 살조 효능을 보이나 환경 오염문제와 유해조류에 대한 작용 선택성이 결여된 화합물이다^[9-10]. 또한 일반적으로 화학적 방식의 유해조류 대발생의 방제는 간혹 바람직하지 못한 독성에 의해 제한될 수 있다. 본 연구에서는 선택적으로 영향을 미치는 algicidal 화학물질을 적용하여 의학용 제제로 안정성이 검증된 당뇨병 치료제로 사용되는 TD (Thiazolidinedione)계열 화합물을 합성하여 유기화학합성 살조물질 TD49 (5-(3-chloro-4-(cyclohexyloxy)benzylidene)thiazolidine-2,4-dione)를 사용하였다 (Fig. 3). TD49의 분자량은 337.83 g/mol로 무극성 분자이며 독성이 낮고 0.8 mg/ml의 낮은 용해도를 갖는 난용성 분자로 DMSO에 녹는다^[18-20]. 난용성 고체분자 TD49의 용해도를 향상시키기 위해 친수성 고분자인 덴드리머를 사용하였다. 덴드리머 나노캐리어는 의약 연구 분야에서 적용되고 있는 화학 센서, 약물 송달 캐리어로 투여경로에서 캐리어로서의 역할이 검증되고 있다. 이는 수많은 가지로 이루어진 고분자 구조로 소수성의 내부 공간과 아민기 ($-\text{NH}_2$)로 인한 친수성의 외부 표면을 가진 나노캐리어는 소수성으로 인해 수용액에 대한 용해도가 낮은 물질을 소수성 친화력을 이용하여 용해도를 개선시킬 수 있다 (Fig. 4). 덴드리머의 구조적 성분은 다관능기 (multi-functional group)을 가지는 중심핵 (core), 가지 단위 (dendron) 그리고 표면 그룹 물질 (surface)로 고분자 가지의 합성수에 따라 G0에서 G7으로 구분할 수 있다^[21]. 그 중 G2 덴드리머가 incorporation된 TD49는 3.26 kDa의 TD49-G2 complex로 4% 메탄올이 포함된 증류수에 용해되어 유해 조류에 대한 살조물질로서 보다 더 높은 효율을 기대할 수 있다.

(A)



(B)

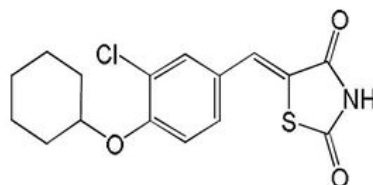


Fig. 3. The chemical structure of TD derivative (A) and TD49 (B) ^[18-20].

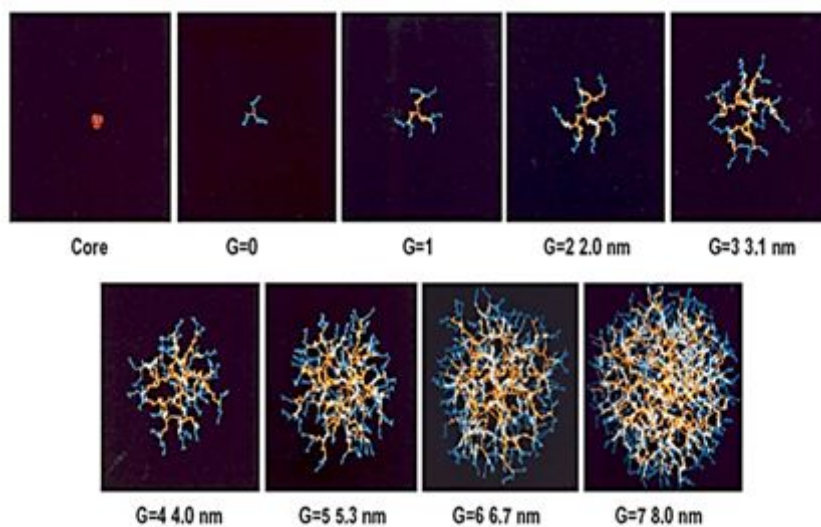


Fig. 4. Graphical presentation of PAMAM dendrimers from core to generation G=7 showing the linear increases in diameter and exponential growth of the number of surface groups ^[21].

2. HcRNAV VLP

*H. circularisquama*는 유해조류 대발생의 원인종으로 알려져 있으며 이들이 생성하는 독소에 의해 조개류가 폐사되어 수산 양식업에 막대한 손해를 입히는 와편모조류 (dinoflagellate)에 속하는 강한 독성을 가진 유해 미세조류 중 하나이다. 이 미세조류는 바이러스에 의해 감염되는데 정이십면체의 HcV와 HcRNAV로 분리된다. HcV는 double strand DNA를 게놈으로 하며 HcRNAV는 34 nm±2의 single strand RNA를 게놈으로 한다. 그 중 HcRNAV는 *H. circularisquama* 개체군의 동태를 통제할 수 있는 캐리어로써 숙주 특이적인 감염을 하는 특성을 가지고 있다. HcRNAV의 숙주들은 CY-type과 UA-type으로 나뉜다. 일본 해안에서 isolation된 CY-type strain, *H. circularisquama* HY9423와 *H. circularisquama* HCLG-1를 특이적으로 감염하는 바이러스는 HcRNAV109이며 UA-type strain, *H. circularisquama* HU9433-P와 *H. circularisquama* HA92-1를 특이적으로 감염하는 바이러스는 HcRNAV34이다 (Table 4) [21]. HcRNAV는 핵산의 단일 분자를 갖는 4.4 kb의 ssRNA 게놈으로 HcRNAV109와 HcRNAV34 게놈의 염기서열은 97%의 homology를 갖는다 [22-24] (Fig. 5). 이 유전자가 갖는 두 개의 *orf*는 polyprotein을 암호화하는 *orf-1*과 major capsid protein을 암호화하는 *orf-2*이다. 모든 바이러스는 그들의 구성 물질을 생산하게 하는 유전물질을 가지고 있는데 (DNA 혹은 RNA) 캡시드 (또는 VLP)라 불리는 단백질 외피는 캡소머 (capsomer)라 불리는 소단위 복합체가 유전물질 주위에 일정한 배열로 구성되는 것이다. 캡시드 유전자를 클로닝 및 단백질 발현을 통해 HcRNAV VLP 구조를 유도하기 위해 캡시드 단백질 유전정보를 갖는 *orf-2*를 대장균에서 캡시드 단백질 발현을 위해 rare codon을 제거하여 codon optimization하였다. HcRNAV VLP 단백질은 33 nm의 직경을 갖으며 유사한 trimer 구조 180개로 이루어진 정이십면체의 구조로 경제적이며 안정적으로 효율적인 결합방식이다 [25-26]. 그 중 HcRNAV109 캡시드 단백질을 통해 자가 조립을 유도하여 형성된 HcRNAV109 VLP를 캐리어로 살조물질 TD49를 탑재하여 *Heterocapsa circularisquama* HY9423을 숙주로 특이적으로 감염하여 살조 효과를 보이는지에 대한 연구를 수행하였다 [27-44].

Table 4. Harmful *H. circularisquama* strains, location and year of isolation in Japan seawater ^[23].

Strain	Origin	
	Location	Isolation
<i>Heterocapsa circularisquama</i> HU9433-P	Uranouchi Bay (Kochi Prefecture)	Dec 1994
<i>Heterocapsa circularisquama</i> HA92-1	Ago Bay (Mie Prefecture)	Jun 1992
<i>Heterocapsa circularisquama</i> HCLG-1	Gokasho Bay (Mie Prefecture)	Aug 1999
<i>Heterocapsa circularisquama</i> HY9423	Yatsushiro Kai (Kumamoto Prefecture)	Sep 1994

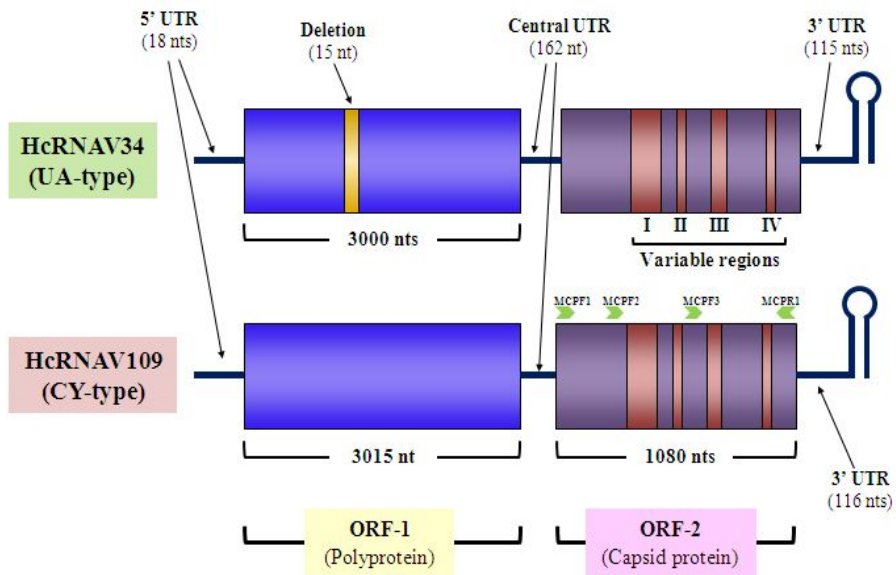


Fig. 5. Schematic genome structure of HcRNAV34 and HcRNAV109 and the positions of the primers ^[24].

제 2 장 실험 재료 및 방법

제 1 절 HcRNAV109 VLP 유전자 클로닝

1. HcRNAV109 VLP 유전자 합성

본 연구에서 사용된 HcRNAV109 [accession number; AB218609.1] 유전자는 유해 조류인 *Heterocapsa circularisquama*에 감염하는 HcRNAV109 VLP 유전자 (*orf-2*)로서 유전자 합성을 통해 확보하였다 (Genscript, USA). *E. coli* 내의 재조합 단백질 발현을 향상시키기 위해 염기서열을 변경하여 희귀 코돈을 최적화 한 1.1 kb의 HcRNAV109 VLP 캡시드 유전자가 클로닝 된 pUC57 HcRNAV109를 얻었다.

2. 플라스미드 및 제한효소

유전자 클로닝을 위해 사용한 제한효소는 10 units의 Nde I, sap I (Lgu I), Hind III, Xho I 그리고 EcoR I (Thermo, USA)을 사용하였고 클로닝을 위해 pCR2.1 벡터 (Invitrogen®, USA)를 사용하였다. 클로닝 벡터로는 pCR2.1 벡터를 사용하였으며, 단백질 발현 벡터는 pTXB1 (BioLabs®, England), pHCE 1A (쥬바이 오리더스 한국생명공학연구원, Korea) 그리고 pET-30a(+) (Novagen Inc, Germany) 플라스미드를 사용하였다. 대장균 내의 재조합 플라스미드 pTXB1 HcRNAV109와 pHCE 1A HcRNAV109는 100 µg/ml의 ampicillin, pET-30a(+) HcRNAV109-intein은 50 µg/ml의 kanamycin이 첨가된 Luria-bertani (LB) medium에서 14 시간 동안 37°C에서 전배양하였다.

3. 사용 균주

DNA 조작 및 형질전환을 위해 사용된 숙주는 *E. coli* DH5α를 사용 하였고 단백질 발현을 위해 *E. coli* BL21(DE3)를 사용하였다. 재조합 pHCE 1A HcRNAV109 VLP 단백질의 *E. coli* strain에 따른 발현양을 비교하기 위해 BL21(DE3), TOP10, DH5α, ER2566, XL1-Blue, MG1655 및 rpoS⁻[45]를 사용하였다.

4. Competent cell 제조

Competent cell은 Inoue법에 따라 제조하였으며 제조과정은 다음과 같다^[46]. 5 ml의 LB medium에 *E. coli* BL21(DE3) 단일 콜로니를 접종하여 12 시간 동안 37°C에서 전배양 하였으며 200 ml의 LB medium에 배양액 1%를 접종한 후 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.6이 될 때까지 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 MnCl₂, pH 6.8)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. HcRNAV109 VLP 유전자 클로닝

가. 시약 및 기기

Ligation을 위해 T4 DNA ligase (Thermo fisher scientific, USA) 효소를 사용하였고 PCR 증폭을 위해 LA taq polymerase (5 units, Takara Inc, USA)를 사용하였다. Primer는 Bionics사에 의뢰하여 합성하였다. 그리고 유전자 증폭에 사용하였던 핵산증폭기는 GenePro (Bioer Technology CO.,LTD, USA)를 이용하였다.

나. HcRNAV109 VLP 유전자 증폭

HcRNAV109 유전자 증폭을 위한 주형 플라스미드는 7,800 bp의 pUC57 HcRNAV109와 7,633 bp의 재조합 pTXB1 HcRNAV109 VLP를 사용하였다. 먼저 pUC57 HcRNAV109를 주형으로 증폭시킨 유전자는 단백질 발현 벡터 pTXB1과 pHCE IA과의 재조합을 위한 주형 플라스미드이며 pTXB1 HcRNAV109MF 주형으로 증폭시킨 유전자는 단백질 발현 벡터 pET30a(+)과의 재조합을 위한 주형 플라스미드다. 유전자 증폭을 위해 제작된 primer는 다음과 같다 (Table 5). 유전자 증폭에 사용된 반응 혼합액의 조

성은 10 × Taq™ reaction buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9.0), 0.2 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 30~50 ng template DNA, 100 ng 의 5'-forward와 3'-reverse primer 그리고 2.5 units Taq™ DNA polymerase (5 units, Takara Inc, USA)를 사용하였다. pTXB1 발현 벡터에 클로닝 할 HcRNAV109 유전자를 증폭하기 위한 반응 조건은 94°C에서 5 분 동안 pre-heating 후 94°C에서 30 초간, 56°C에서 30 초간, 72°C에서 40 초간 30 cycles을 진행하였고 72°C에서 5 분 동안 final extension 과정을 수행하였다. 총 반응액은 20 μl에서 수행하였다. pHCE IA 발현 벡터에 클로닝 할 HcRNAV109 유전자를 증폭하기 위한 반응 조건은 94°C에서 5 분 동안 pre-heating 후, 94°C에서 30 초간, 62°C에서 30 초간, 72°C에서 40 초간 25 cycles 진행한 후 final extention 과정을 72°C에서 5 분 동안 20 cycles을 진행하였으며 총 반응액은 20 μl에서 수행하였다. 또한 pET30a(+) 발현 벡터에 클로닝할 HcRNAV109-intein 유전자의 증폭을 위한 반응 조건은 94°C에서 5 분 동안 pre-heating 후 94°C에서 30 초간 62°C에서 30 초간 72°C에서 40 초간 25 cycles을 진행한 후 72°C에서 5 분 동안 final extension 과정을 수행하였다. 총 반응액은 20 μl에서 수행하였다. PCR 최종 반응 생산물을 gel extract kit (Nucleogen, Korea)를 사용하여 gel로부터 원하는 DNA 단편을 정제하였다.

Table 5. Primers used in this study.

No	Construction	Name	Sequence (5' → 3')
1	pTXB1	5' - Nde I forward	5' GGA ATT CCA TAT GAT GAC CCG CCC GCT GGC TCT GAC 3'
	HcRNAV109 VLP	3' - Sap I reverse	5' GGT GGT TGC TCT TCC GAC TCA GGC AGC CAT CGC CGG 3'
2	pHCE IA	5' - Nde I forward	5' C CAT ATG ACC CGC CCG CTG GC 3'
	HcRNAV109 VLP	3' - Hind III reverse	5' CCC AAG CTT TTA TGC AGC CAT CAA TGC TGG 3'
3	pET30a(+)	5' - Nde I forward	5' C CAT ATG ACC CGC CCG CTG GC 3'
	HcRNAV109 -intein VLP	3' - Xho I reverse	5' CTC GAG AGC TTG GCT GAC GAA GTT CGT G 3'

다. 유전자 단편 TA 클로닝

TA 클로닝을 위해 pCR2.1 벡터와 insert DNA를 1 : 1의 몰수비로 첨가하였으며 1 unit의 T4 DNA ligase와 10 × ligation buffer (300 mM Tris-HCl buffer, 100 mM MgCl₂, 100 mM, 20 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7.8)을 첨가하여 총 반응액 10 μl를 14°C에서 20 시간 동안 반응시켜 ligation 하였다. Target gene을 선별하기 위해 미리 제조한 200 μl의 *E. coli* DH5α와 ligation이 진행된 10 μl의 gene fragment를 첨가한 후 ice 상에 30 분 동안 정치하였다. 그 후 42°C에서 45 초 동안 heat shock 후 다시 2 분 동안 ice 상에 정치하였다. 1,000 μl의 LB medium을 첨가하여 37°C에서 30 분 동안 shaking incubation하였다. 형질전환된 gene을 선별하기 위해 Incubation 된 cell을 ampicillin (100 μg/ml) 과 kanamycine (50 μg/ml)이 첨가된 1.5% (W/V) LB agar plate에 도말하여 37°C에서 14 시간 동안 배양하였다.

라. 플라스미드 정제 및 염기서열 확인

플라스미드 분리 및 정제는 alkaline lysis 방법을 이용하였다^[47]. 지수성장기 말기에 들어선 배양액 5 ml를 eppendorf tube에 넣고 원심 분리 한 후 상등액을 제거하고, 침전물은 20 mg/ml의 RNase I이 녹아있는 resuspension buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) 200 μl를 이용하여 현탁한 후 lysis buffer (200 mM NaOH, 1% SDS) 250 μl를 첨가하여 5 분 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 μl를 첨가하여 위, 아래로 부드럽게 혼합시킨 후 15 분간 12,000 × g에서 원심분리 하였다. 이를 통해 얻은 상등액은 silica membrane column tube에 옮긴 후 1 분 동안 12,000 × g에서 column에 binding 시켰다. 700 μl의 washing buffer (95% ethanol)를 주입하여 12,000 × g에서 1 분간 원심분리 후 membrane에 남아있는 ethanol을 제거하기 위해 2 분간 다시 원심 분리 하였다. 최종적으로 30 μl의 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0)를 주입 한 후 3 분간 방치하고 12,000 × g에서 3 분간 원심분리를 통해 membrane column에 결합한 DNA 플라스미드를 용리하였다. 정제된 DNA는 EcoR I을 사용하여 1.5% (W/V) agarose gel에서 전기영동을 통하여 각 DNA를 확인한 후 염기서열 분석을 의뢰하였다 (Macrogen Inc, Korea).

마. 제한효소 처리와 DNA 분리

TA 클로닝을 통해 선별된 HcRNAV109 VLP 플라스미드와 세 종류의 발현 벡터는 각각의 제한효소를 처리하였다. 먼저 발현 벡터 pTXB1 플라스미드와 선별된 HcRNAV109 VLP 플라스미드는 Sap I (Lgu I)을 사용하였고 발현 벡터 pHCE IA 플라스미드와 선별된 HcRNAV109 VLP 플라스미드는 Hind III를 사용하였으며 발현 벡터 pET30a(+) 플라스미드와 선별된 HcRNAV109 VLP 플라스미드는 Xho I의 제한 효소를 처리하기 위해 37°C에서 2 시간 동안 반응시켰다. 1.5% (W/V) agarose gel을 통한 전기영동으로 확인된 DNA는 clean-up kit (Nucleogen, Korea)를 이용하여 순수한 DNA 절편을 회수하였다. 그 후 세 종류의 발현 벡터와 선별된 HcRNAV109 VLP 플라스미드는 Nde I을 처리하기 위해 37°C에서 2 시간 동안 반응시켰다. 1.5% (W/V) agarose gel을 통한 전기영동으로 발현 벡터와 insert DNA로 선별된 HcRNAV109 VLP 플라스미드는 확인하였다. pTXB1, pHCE IA, pET30a(+) 플라스미드는 clean-up kit (Nucleogen Biotechnology, USA)를 통해 순수한 DNA 단편을 회수하였고 insert DNA는 gel로부터 insert DNA 부분만을 잘라 Gel extraction kit (Biosolution, Korea)를 이용하여 원하는 DNA 단편을 회수하였다.

바. Ligation 및 형질전환

Ligation을 위하여 벡터와 insert DNA를 1 : 2의 몰수비로 넣어주고 1 unit의 T4 DNA ligase와 10 × ligation buffer (300 mM Tris-HCl buffer, 100 mM MgCl₂, 100 mM , 20 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7.8)를 첨가한 총 반응액 10 µl를 4°C에서 20 시간 동안 반응시켜 ligation 하였다. 그 후 형질전환을 위해 미리 제조한 200 µl의 *E. coli* BL21(DE3) competent cell에 ligation 한 DNA 10 µl를 첨가한 후 ice 상에 30 분간 방치하였다. 그다음 42°C에서 45 초 동안 heat shock을 준 다음 다시 ice 상에 2 분 동안 방치하였다. 여기에 1000 µl LB medium을 넣어준 후 37°C에서 30 분간 배양한 다음 원심분리하여 상등액 1000 µl를 제거하였다. 형질 전환된 cell은 1.5% (W/V) LB agar medium에 도말한 후 37°C에서 14 시간 동안 배양하였다. 형질 전환된 균주를 선별하기 위해 발현 벡터가 저항성을 갖는 항생제를 agar medium에 첨가하였다. 먼저 pTXB1 플라스미드는 50 µg/ml의 ampicillin, pHCE IA 플라스미드는 100 µg/ml의 ampicillin 그리고 pET30a(+) 플라스미드는 50 µg/ml의

kanamycine을 첨가하였다.

사. 형질 전환된 균체로부터 플라스미드 확인

Alkaline lysis 방법으로 형질 전환된 대장균을 플라스미드 분리 및 정제 후 제한효소를 처리하여 특정 DNA를 확인하였다. pTXB1 HcRNAV109 플라스미드는 Nde I 과 Sap I (Lgu I), pHCE IA HcRNAV109 플라스미드는 Nde I 과 Hind III 그리고 pET30a(+)-intein HcRNAV109 플라스미드는 Nde I 과 Xho I 을 혼합한 뒤 37°C에서 2 시간 동안 반응시킨 다음 1.5% (W/V) agarose gel을 이용한 전기영동으로 플라스미드를 확인하였다. 위 과정을 통해 형질 전환된 플라스미드 DNA를 선별하여 pTXB1 HcRNAV109 VLP, pHCE IA HcRNAV109 VLP 그리고 pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP로 명명하였다.

제 2 절 HcRNAV109 VLP 단백질 발현

1. 시약 및 기기

단백질 발현 유도물질로 isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) (SIGMA, USA)를 사용하였고 단백질 파쇄를 위해 sonicator (SONIFIER250, Branson 및 SONICS, Vibracell)를 사용하였다. Western blot은 semi-dry transfer system (Southam Warwickshire CV33 OHP, ENGLAND)을 사용하였고 1차 항체는 HcRNAV109의 *orf-2* 유전자가 91%의 homology를 갖는 HcRNAV34 VLP 항체를 사용하였다. 단백질 정제 후 획득한 HcRNAV34 VLP 단백질을 항원으로 사용한 후 rabbit에 주입하여 정제된 항체를 사용하였다 (Youngin frontier co. Korea). 2차 antibody는 Anti-Rabbit IgG (SIGMA, USA)를 사용하였다. 특정 단백질을 확인하기 위해 BCIP[®] /NBT-Blue liquid (100 mM Tris-HCl, BCIP 250 mg/ml, NBT 50 mg/ml, 5 mM MgCl₂, pH 7.5)를 사용하였다.

2. SDS-PAGE를 이용한 단백질 발현 확인

재조합 VLP 단백질의 과발현 여부는 12% (W/V) SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) gel을 통해 확인하였으며 발현이 유도된 배양액을 모으기 위해 원심분리를 통해 상등액을 제거한 후 PBS를 통해 불순 단백질을 제거했다. 그 후 단백질 파쇄를 위해 재조합 pTXB1 HcRNAV109 VLP 단백질은 column buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 사용하였고 재조합 pHCE IA HcRNAV109 VLP 단백질은 buffer A (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 8 M Urea, pH 8.0)를 통해 denaturation 시켰으며 재조합 pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP 단백질은 lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0)를 사용하였다. 각각의 버퍼를 통해 균체를 현탁 시킨 후 ice상에 30 분 간 방치 후 sonicator를 이용해 파쇄 하였다. 이때 pTXB1 HcRNAV109 VLP 단백질과 pHCE IA HcRNAV109 VLP 단백질은 SONIFIER250를 사용하였고 pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP 단백질은 SONICS를 사용하였다. 파쇄된 용액은 12,000 × g 에서 30 분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 cell free extract로 간주하고 cell down된 균체는 파쇄 전에 넣었던 동량의 buffer로 재현탁시켜 insoluble fraction 으로 판단하였다. 단백질의 정량을 위하여 BSA (Bovine serum albumin)으로 표준 곡선을 작성하였고 측정하고자 하는 단백질 시료는 표준곡선 흡광도의 범주를 벗어나지 않도록 희석한 후 595 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. Bradford 방법으로 정량한 단백질은 5 분간 끓인 후 160 V에서 1 시간 15 분 동안 전기영동 하였다. 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 발현 여부를 확인하였다.

3. Western blot을 이용한 단백질 확인

먼저 단백질을 분리하기 위해 12% (W/V) SDS-PAGE gel을 내린다. Semi-dry transfer system에 transfer buffer (20 mM Glycine, 25 mM Tris, 20% Methanol)가 흡수된 3M paper를 올린 후 nylon membrane을 얹고 SDS-PAGE gel을 올려둔 후 3M paper로 gel을 덮었다. 100 mA에서 2 시간 동안 transfer 한 다음 membrane을 blocking reagent (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 5% skim milk,

pH 7.5)로 1 시간 동안 상온에서 반응시킨 후 washing solution인 TBS-T buffer (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5)로 15 분 동안 3 번 세척하였다. 1차 항체인 HcRNAV34 polyclonal antibody와 TBS-T buffer를 1 : 5,000의 비율로 희석하여 1 시간 동안 상온에서 반응시켰다. Washing solution을 통해 15 분 동안 3 번 세척한 후 Anti-rabbit Alkaline phosphate가 conjugation 되어있는 2차 항체와 TBS-T solution을 1 : 5,000의 비율로 희석하여 4 시간 동안 상온에서 반응한 후 다시 washing solution으로 15 분간 3 번 세척했다. 마지막으로 검출용액 BCIP®/NBT-Blue liquid 4 mL을 세척된 membrane에 발색 시켜 특정 단백질 발현 여부를 확인 하였다.

4. 온도에 따른 최적의 단백질 발현 조건 탐색

HcRNAV109 VLP 단백질의 최적 발현 조건을 찾기 위해 발현온도와 배양 시간에 따른 단백질 발현을 관찰하였다. 먼저 재조합 pTXB1 HcRNAV109 VLP와 재조합 pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP를 포함한 대장균을 37°C에서 배양하여 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.5에 도달하면 0.2 mM의 isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG)를 첨가한 후 재조합 pTXB1 HcRNAV109 VLP는 30°C에서 7 시간, 25°C에서 12 시간, 16°C에서 22 시간 동안 각각 발현을 유도하였으며 pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP는 30°C에서 7 시간, 25°C에서 12 시간, 18°C에서 18 시간 동안 발현을 유도하였다. 한편 pHCE 1A HcRNAV109 VLP는 상시 발현 하는 벡터의 특성에 의해 40°C에서 5 시간, 37°C에서 7 시간, 30°C에서 9 시간 동안 각각 발현을 유도하였다. 단백질의 발현 여부는 12% (W/V) SDS-PAGE gel 및 Western blot을 통해 확인하였고 그 중 가장 안정적으로 발현이 확인되는 조건을 온도 및 배양 시간에 따른 최적의 단백질 발현 조건으로 결정하였다.

5. IPTG 농도에 따른 최적의 단백질 발현 조건 탐색

최적화된 배양 시간과 온도 조건에서 발현유도물질인 IPTG를 이용해 농도에 따른 발현양을 확인하였다. 상시 발현 벡터인 pHCE 1A에 재조합 된 HcRNAV109 VLP를 제외한 재조합 pTXB1 HcRNAV109와 pET30a(+) HcRNAV109 플라스미드를 포함한 대장

균에서는 37°C에서 배양하여 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.5로 도달할 때 IPTG 농도를 0.05 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 그리고 0.3 mM을 주입한 후 발현을 유도한다. 발현 여부는 12% (W/V) SDS-PAGE gel 및 Western blot을 통해 확인하였고 그 중 가장 효율적으로 발현된 조건을 IPTG 농도에 따른 최적의 단백질 발현 조건으로 결정하였다.

6. *E. coli* strain에 따른 최적의 단백질 발현 조건 탐색

발현유도물질이 요구되지 않는 pHCE IA 벡터를 이용한 재조합 pHCE IA HcRNAV109 플라스미드를 포함한 대장균에서 다른 종류의 *E. coli* strain에 따른 발현양을 확인하였다. BL21(DE3), TOP10, DH5 α , ER2566, XL1-Blue, MG1655 및 rpoS-를 사용하였으며 각각의 *E. coli* strain을 사용해 형질전환 한 후 단백질 발현을 위해 37°C에서 7 시간 동안 각각 배양한 후 12% (W/V) SDS-PAGE gel 및 Western blot을 통해 확인하였고 그 중 가장 효율적으로 발현된 조건을 *E. coli* strain에 따른 최적의 단백질 발현 조건으로 결정하였다.

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

유전자 클로닝을 통해 선별된 재조합 pTXB1 HcRNAV109 VLP는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ampicillin이 포함된 LB medium에서 12 시간 동안 37°C에서 전배양 하였다. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ampicillin이 포함된 500 ml의 LB 액체배지에서 1%의 전배양액을 접종 한 후 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.5로 도달할 때 까지 37°C에서 200 rpm (LAB PARTNERS, USA, 이하상동)으로 배양한 후 0.1 mM의 IPTG를 첨가하여 16°C, 180 rpm에서 22 시간 동안 발현을 유도하였다. 재조합 pHCE IA HcRNAV109 VLP는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ampicillin이 포함된 LB medium에서 12 시간 동안 37°C에서 전배양 하였다. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ampicillin이 포함된 500 ml LB 액체배지에서 1%의 배양액을 접종 한 후 600 nm의 파장에서 흡광도가 2.8-3.0으로 도달할 때까지 37°C에서 200 rpm으로 배양하였다. 마지막으로 재조합 pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 kanamycin이 포함된 LB medium에서 10 시간 동안 37°C에서 전배양 하였다.

그 후 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Kanamycin이 포함된 LB medium에서 1%의 전배양액을 접종 한 후 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.5로 도달할 때 까지 37°C에서 220 rpm으로 배양한 후 0.2 mM의 IPTG를 첨가하여 18°C, 180 rpm에서 18 시간 동안 발현을 유도하였다.

제 3 절 HcRNAV109 VLP 단백질 정제

1. 시약 및 기기

단백질 정제를 위해 Chitin bead (New england biolabs Inc, England), Ni sepharose™ high performance (GE healthcare Bio-sciences AB, England), Ni sepharose® CL-6B (incospharm, Korea)와 Open column (Bio-Rad, USA)을 사용하였다. 또한 DTT (SIGMA, USA)와 정제된 단백질의 dialysis를 위해 Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette G2 (Thermo, USA)를 사용하였다.

2. Chitin affinity column을 이용한 재조합 HcRNAV109 VLP 단백질 정제

pTXB1 HcRNAV109 VLP 단백질은 chitin affinity column chromatography를 이용해 정제하였다. 먼저 chitin bead를 10 ml의 open column에 충전 한 후 column buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 이용해 안정화하였다. 그 후 cell free extract를 0.5 ml/min의 유속으로 흘려주며 binding 시켰다. Washing을 위해 column의 30배 용량을 column buffer를 이용해 2 ml/min의 유속으로 흘려주었다. 이후 HcRNAV109 fusion protein이 binding된 resin에 50 mM Dithiothreitol (DTT)가 포함된 column buffer를 이용해 column의 3배 용량을 3 ml/min로 흘려준 후 상온에서 30 시간 동안 정치하였다. 최종적으로 50 mM DTT에 의해 cleavage된 HcRNAV109 VLP 단백질은 column buffer를 이용해 2 ml/min의 유속으로 흘려보내주어 분리 정제하였다.

3. Ni-NTA affinity column을 이용한 HcRNAV109 VLP 단백질 정제

가. 재조합 pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP 단백질 정제

pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP 단백질을 Ni-NTA column chromatography를 이용해 정제하였다. 먼저 Ni-NTA resin (Ni sepharose[®] CL-6B)를 5 ml의 open column에 충전 한 후 resin의 10배 용량의 distilled water 및 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0)를 이용해 안정화 하였다. 안정화된 resin에 cell free extract를 흘려주며 binding 시켰다. 그 후 crude extract를 제거하기 위해 column의 10배 용량의 distilled water를 흘려준 후 HcRNAV109 fusion protein을 얻기 위해 동량의 washing buffer (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole, pH 8.0)를 이용해 흘려주었다. 이후 elution buffer (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 200 mM Imidazole, pH 8.0)을 흘려보내주어 column에 binding된 HcRNA109 fusion protein을 정제한 후 두 종류의 tag (intein 및 his tag)을 cleavage하기 위해 100 mM DTT를 첨가하여 21°C에서 11 시간 동안 정치하였다. 12% (W/V) SDS-PAGE gel을 통해 단백질과 tag의 cleavage를 확인 한 후 DTT 및 imidazole을 제거하기 위해 cut off 3.5 k dialysis cassette에 넣은 후 lysis buffer를 이용해 dialysis 과정을 수행하였다. 최종적으로 Ni-NTA column에 흘려주며 resin에 affinity를 갖는 tag는 resin에 binding 되고 HcRNAV109 VLP 단백질은 분리 정제 하였다.

나. 재조합 pHCE IA HcRNAV109 VLP 단백질 정제

재조합 pHCE IA HcRNAV109 VLP 단백질은 Ni-NTA affinity chromatography를 이용해 정제하였다. 8M Urea가 포함된 buffer A (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 8 M Urea, pH 8.0)로 현탁하여 denaturation을 유도한 후 파쇄 하였다. 5 ml의 open column에 Ni-NTA resin (Ni sepharose[™] high performance)을 충전 한 후 lysis buffer를 이용해 안정화하였다. 안정화된 column에 cell free extract를 흘려주며 binding 시켰다. Washing을 위해 column의 10배 용량의 buffer B (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazole, pH 8.0)를 흘려주었다. 최종적으로

buffer C (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 200 mM Imidazole, pH 8.0)를 흘려보내 주어 column에 binding된 pHCE IA HcRNAV109 VLP 단백질을 분리 정제하였다.

제 4 절 재조합 HcRNAV109 VLP의 자가 조립

1. Dialysis를 통한 자가 조립 유도

재조합 pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP 단백질을 컬럼 정제를 통해 HcRNAV109 VLP 단백질을 획득 한 후 고농도의 imidazole을 제거하고 자가 조립을 유도하기 위해 cutoff 3.5 k의 dialysis cassette에 넣어 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0)로 4°C에서 3 일 동안 dialysis 과정을 수행하였다. 재조합 pHCE IA HcRNAV109 VLP 단백질은 8 M의 Urea가 포함된 buffer에 의해 denaturation된 단백질의 형태를 갖추고 있다. 컬럼 정제 후 획득한 HcRNAV109 VLP 단백질의 refolding을 유도하기 위해 cut off 7 k의 dialysis cassette를 이용하여 dialysis buffer (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl) solution에 Urea 농도를 4 M → 2 M → 0.5 M → 0 M로 제조한 pH 8.0의 buffer에서 dialysis 과정을 수행 하였다.

2. TEM 분석을 통한 HcRNAV109 VLPs 구조

분리 정제된 38 kDa의 HcRNAV109 VLP 단백질을 조건에 따른 dialysis 과정을 통해 자가 조립을 유도하였다. HcRNAV109 VLP이 일정한 VLP 구조를 형성하는지 확인 하기 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 HcRNAV109 VLP의 숙주 특이성

1. 시약 및 기기

형광물질 Fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma, USA)가 표지된 HcRNAV109 VLP 단백질의 숙주 특이적 형광을 확인하기 위해 형광 현미경 (OPTINITY, China)을 사용하였고 centricon (Thermo, USA)을 통해 FITC가 표지된 단백질을 농축시키기 위해 Mega17R centrifuge (HANIL, Korea)를 사용하였다.

2. HcRNAV109 VLP 단백질의 형광물질 FITC 표지

정제 과정을 통해 얻은 pTXB1 HcRNAV109 VLP 단백질에 FITC를 표지하기 위해 1 mg/ml의 VLP 단백질과 2 x dissociation buffer (20 mM Tris-HCl, 0.3 mM NaCl, 10 mM DTT, 20 mM EGTA, pH 8.0)를 1 : 1의 비율로 상온에서 1 시간 동안 locking 한 후 100 mM FITC 100 μ l를 주입하였다. 그 후 HcRNAV109 VLP에 표지되지 않은 FITC를 제거하기 위해 cut off 3.5 k dialysis cassette를 이용하여 re-association buffer (20 mM Tris-HCl, 0.5 mM NaCl, 20 mM CaCl₂, pH 8.5)로 4°C에서 3 일 동안 dialysis 하였다. 그 후 제거되지 않은 잔여 FITC를 해결하기 위해 3.5 k 의 centricon을 이용하여 Mega17R에서 12,000 rpm으로 4°C에서 12 분 동안 농축하였다. 마지막으로 단백질에 FITC의 표지 여부를 확인하기 위해 HcRNAV109 VLP를 12% (W/V) SDS-PAGE gel에 내린 후 UV-visible lamp를 비춰 형광을 확인하였다.

2. 형광 현미경을 통한 FITC-labeled HcRNAV109 VLP의 숙주 특이성 관찰

HcRNAV109 VLP의 숙주 특이적 반응을 확인하기 위해 FITC가 표지된 HcRNAV109 VLP에 숙주와 비(非)숙주를 각각 반응시켰다. 먼저 HcRNAV109의 숙주인 *H. circularisquama* HY9423과 HcRNAV34의 숙주인 *H. circularisquama* HU9433-P 및 HA92-1과 *H. akasiwo*, *Chattonella marina*를 비(非)숙주로 사용하였다. 형광 현미

경을 통해 반응하기 전 조류의 상태를 확인한 후 FITC가 표지된 HcRNAV109 VLP와 각 조류를 1 : 4의 비율로 차광 하에 교반기를 통해 접촉을 유도하였다. 상온에서 3 시간 동안 반응시킨 후 $1,660 \times g$ 에서 3 분간 원심분리를 통해 상등액을 제거한 다음 잔여 FITC를 제거하기 위해 멸균된 f/2 배지 500 μ l를 사용하여 $1,660 \times g$ 에서 3 분간 2 번 원심분리 후 상등액을 제거하였다. 최종적으로 얻은 각각의 조류는 f/2 배지 100 μ l를 재현탁하여 형광 현미경을 통해 숙주 특이성을 관찰하였다.

본 실험에 사용된 해수조류배지인 f/2 배지의 조성은 다음과 같다. (L 당); 75 mg NaNO₃, 5.65 mg NaH₂PO₄ · 2H₂O, 4.16 mg Na₂EDTA, 3.15 mg FeCl₃ · 6H₂O, 0.01 mg CuSO₄ · 5H₂O, 0.022 mg ZnSO₂ · 7H₂O, 0.01 mg CoCl₂ · 6H₂O, 180 mg MnCl₂ · 4H₂O, 0.006 mg Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.0005 mg Cyanocobalamin (VitamnB12), 0.1 mg ThiamineHCl (VitamineB1), 0.0005 mg Biotin^[48].

제 6 절 TD49 탐재 및 숙주 특이적 살조능

1. 시약 및 기기

TD49의 정량을 위해 1200 series HPLC (Agilent, USA)를 사용하였고 단백질의 숙주 특이적 살조 효과를 관찰하기 위해 광학 및 형광 현미경 (OPTINITY, China)을 사용하였다.

2. HPLC 분석에 의한 cell free extract에 용해되어있는 TD49 탐재 HcRNAV109 VLP 단백질 정량 분석

pET30a(+) HcRNAV109 플라스미드가 포함된 대장균을 발현 후 얻은 cell free extract에 탐재된 유기합성 살조물질인 TD49를 정량하기 위해 1200 series HPLC를 사용하여 분석하였다. Control은 pET30a(+) vector를 배양 한 후 얻은 cell free extract를 사용하였다. TD49를 반응시킨 후 cut off 10 k dialysis cassette를 이용해 4°C에서 2 일 동안 dialysis하였다. Diode Array Detector (DAD)와 Agilent

Zorbax SB C-18 column을 사용하였으며, 분석시 column 온도는 30°C로 하였다. 이 동상으로는 (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 ml/min로 조절하였고, UV 검출 파장은 TD49의 흡광도인 340 nm의 조건에서 dialysis 과정 후 TD49 농도를 분석하였다.

3. Cell free extract에 용해되어 있는 TD49 탑재 HcRNAV109 VLP 단백질의 숙주 특이적 살조 효과

정제되지 않은 HcRNAV109 VLP 수용성 단백질이 숙주에 특이적으로 살조 효과를 보이는지 관찰하기 위해 살조물질 TD49를 탑재한 후 HcRNAV109 VLP의 숙주와 비(非)숙주를 반응시켜 관찰하였다. 여기서 다른 조류를 숙주로 갖는 HcRNAV34 VLP 단백질 또한 특이적 살조 효과를 보이는지 비교 실험을 위해 동시에 관찰하였다. 발현된 pET30a(+) HcRNAV109 VLP 단백질을 파쇄하여 얻은 cell free extract에 TD49를 처리하여 위 아래로 교반을 통해 반응을 촉진하였다. 그 후 10 k의 dialysis cassette에 주입하여 re-association buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM CaCl₂, pH 8.5)로 차광 하에 4°C에서 3 일 동안 dialysis 하였다. 그 다음 pET30a(+) HcRNAV34 VLP와 pET30a(+) HcRNAV109 VLP 각각 200 µl와 유해 조류가 배양된 배양액 200 µl를 주입하여 1 : 1의 비율로 반응하였다. 실험에 사용된 유해조류는 HcRNAV109 VLP의 숙주인 *H. circularisquama* HY9423와 비(非)숙주인 *H. circularisquama* HU9433-P 및 *H. akasiwo*를 사용하였으며 HcRNAV34 VLP는 숙주인 *H. circularisquama* HU9433-P와 비(非)숙주인 *H. circularisquama* HY9423 과 *H. akasiwo*를 사용하였다. 반응 후 1 시간 간격으로 샘플링하여 광학 현미경을 통해 숙주 특이적 살조 효과를 관찰하였다.

제 7 절 대량배양

1. 시약 및 기기

재조합 HcRANV109 VLP를 대량으로 발현하기 위해 KF 5 ℓ fermentor (KoBiotech, Korea)를 사용하였고 tryptone이 첨가된 M9 최소배지에 사용된 시약은 CaCl_2 (Junsei, Japan), Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl, NH_4Cl , MgSO_4 , Glucose (DAEJUNG, Korea)와 trypton (BD, USA)을 사용하였다.

2. 대량배양

재조합 pHCE 1A HcRANV109 플라스미드가 포함된 대장균을 대량으로 발현하기 위해 5 ℓ 용량의 배지를 사용하였다. 배지 조성은 M9 최소 배지에 0.01% trypton을 첨가하였다. 먼저 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 ampicillin을 주입한 후 1%의 전배양액을 접종하였다. 그 후 37°C에서 200 rpm으로 24 시간동안 일정양의 공기를 주입하며 연속배양하였다. 2 시간 간격으로 샘플링하여 600 nm의 파장에서 흡광도를 확인하였고 단백질 발현 여부를 확인하기 위해 12% (W/V) SDS-PAGE gel 및 Western blot을 통해 확인하였다. 또한 재조합 pHCE 1A HcRANV109 VLP 플라스미드를 확인하기 위해 플라스미드 분리 정제를 한 후 1 시간 동안 Nde I을 반응한 후 1.5% (W/V) agarose gel을 이용한 전기영동으로 플라스미드를 확인하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 HcRNAV109 VLP 유전자 합성

HcRNAV109는 유독종인 와편모조류 *H. circularisquama*를 감염시키는 RNA 바이러스인 4.4 kb의 genome으로 ssRNA 유전자를 사용하였다. 이 유전자가 갖는 두 개의 ORF는 polyprotein을 암호화 하는 *orf-1*과 major capsid protein을 암호화하는 *orf-2*이다. 이 중 *orf-2* 유전자 정보는 Genbank [accession number; AB2186089.01]를 통해 확보하여 대장균에서 발현이 가능하도록 유전 정보를 최적화시켰다. 희귀 코돈 염기서열은 Arginine (CGA, CGG, AGG, AGA), Glycine (GGA, GGG), Isoleucine (AUA), Leucine (CUA), Proline (CCC)이며 전체 유전자의 약 10%를 차지한다. 이들을 Arginine (CGT, CGC), Glycine (GGT, GGC), Leucine (CTG), Proline (CCG), Threonine (ACG)의 염기서열로 변경하여 합성함으로써 코돈을 최적화 하였다. 최적화된 1.1 kb의 합성 HcRNAV109 VLP는 Genescript사로부터 클로닝 된 pUC57 HcRNAV109를 확보하였다 (Fig. 6.).

Major HcRNAV109 <i>orf-2</i> gene	<p>ATGACC CGT CCC CUA GCTCTTACCAATGGCGCAATACTAAT GG GGCAATAACGGCTCTCGCCCGCTCCT CCC CGA CAGCGCCGCCAGGGC AGG CGT CGA AAC GG CGC AGG GGCGGC GG TGGCGGC CCC CGTAAC AATGCGGCTATGGTGTGGCCAG GG AGCT GG TCCGTG CCC ATGCTTTTGGCAGCTGGCTTTCGG TAGTTCAAT GG CAAGCCTGGGATGCCTTCAACCTGAGCACCTTCGGCTCCCT GG TCAGTG CCC TATTG CGTGGTTC CC AGC AGCTTGATC AGG TCCAGCGACAAGGTCATGTTGTTTGGCT CCC AGG GTTGGCGACGA CGGCTGCTGGCT AGC TCATGT CTG TCCCGCACCGAA GG GCTATTAAT GG A CAAGATAAT ACCAACTTGACACCGTA CCC CTTCG ATTGCAACCACTGGTAGCGCTATC AGG GTCGTGCTGCGGGG TTGTAGTCCAGGTTATGAAC CCC AACCCACTTATGTCCACCACT GG ATCTTTGGTGGCAGAGTTTACACA CCCAGCTTAATCTTGCA CGT ACAGAGACCTGGAATGATTCGCT AGG GAGGTGATTTCTTTTATG AGG CC GGG CTTATGTCGGCT AA GCTTGGCTGCGC GG GTCCAG GG ATAGCTAC CCC CTTAATATGTCGGC GTTGTC AA CTCAATTGTGTCCACGACGTGACAGCAGACAAGCAT AGG TGACTGATTACGCC TC TCA CCCGACTGGTTGGCGCCG AUA GTCTTTGTGAACGAGGCAAAGCAAACAATGAACACTATCTGGTGTCTGTGCA ATGGCGCGT GGG TTGACATCGGCAACCTGTGTTGCCCGCCACCGCCACCAACCGCAT AGG CCGGAGTG GAAAGTGGGATGATATGATTAAGACTGCAATGTCTCGCGGTACGGTATTAGGATATCGCTGAGCGTGTGTGCCA AC GGG GCTCGTTTGGCCGAAACGCTGTGGTTGCGGCCCGC AGG CTATGCCAGCATTGATGGCTGCTTAA</p> <p>The number of the above sequence = 1,080 The number of codon in the above sequence = 360</p>	
Major HcRNAV109 <i>orf-2</i> gene after codon optimization	<p>ATGACC CGC CGTGGCTCTG AGG AATGGTGGTAAT AGG AATGGTGGTAAACAATGGTGGTCCC GCCCGCTC CGCCCGCCCAACGCCGTCAAGGCCGTTCGCGTAATCGCCGTCCGCGCGGTGGCGGTGGCGGTCCGCGCAAC AATGCCGCAATGGTCTGGCACAGGGTGC TGGTAGCGTGCCGGGCATGCCGTTTGGTAGCTGGCCGTCTCGTA GCTCTATGCAAGCGTGGGACGCCCTCCATCCGGAACATCTGCCCGTGCCGTTCTGTGGGTCCGTAITGGGT GGTTCCGACCAAGTCCCTGAT AGG TCATCGGATAAAGTATGCTGTTGCCCGGACCGTTGGCGATACGGT TGTCTGGTGAACCTCATGTGGTCTGGGTAGCCGTACCGAAGGCGGTGCAATCAACGGTCAGGATAACACCAAT CTGTACACCGTTCGCTGCCGGGTATGCCACCACCGGTAGTGCATCACCGTCGTGCCGGCAGCTCTGTCCG TTCAGGTCAATGAACCCGAATCCGCTGATGTCAAC AGG GGCATTTTCCGCGGTACCGTTTCGCA AGG CAACT GAACCTGGCCGGTTCGTACCGAA AGG TGGAAATGATTTGCAACCGGAAGTATCAGCTTCATGCGTCCGCGCT GATGAGCGCGGGCAAACCTGGCTCTGCGCGCGCTTCAAGGTGACAGCTATCCGCTGAATATGAGTCTCTGT CCACTTTAATGTGTTTATGATGTACCCGGGCAAAACACACCTGGAC AGG GATTATGACGGCTTTTACCGCA CCGGTCTGGCTCCGATTGTTGCTGTTAACGAAGCGAAACAG AGG ATGAATTACCTGGTCAAGCGTGGAAATGGC GTGTTCCGCTTTGATATCGGTAATCCGGCCGTCCGCCACAACGCTCATACCGGTATCACCCCGGAATGAAATG GGATGACATGATTA AGG GCAATCGCTCGTGGCCACGGTATATGGATATCGCGGAACCGTGTGGCAATGCC GGTTCGTTTGCCGCAATGCTGTGGTGGCTGCTCGTCTGCTATGCCGCGATGGCTGCTGCA</p> <p>The number of the above sequence = 1,085 The number of codon in the above sequence = 361</p>	
<p style="text-align: center;">Major HcRNAV109 <i>orf-2</i> gene Major HcRNAV109 <i>orf-2</i> gene after codon optimization</p>		
Amino acid	Rare codon Frequency of occurrence	Rare codon Frequency of occurrence
Arginine	CGA 2	CGA 0
	CGG 4	CGG 0
	AGG 4	AGG 0
	AGA 0	AGA 0
Glycine	GGA 7	GGA 0
	GGG 11	GGG 0
Isoleucine	AUA 1	AUA 0
Leucine	CUA 2	CUA 0
Proline	CCC 9	CCC 0
Threonine	ACG 8	ACG 9

Fig. 6. Codon optimization of HcRNAV109 *orf-2* gene sequence from Genbank for expression in *E. coli*.

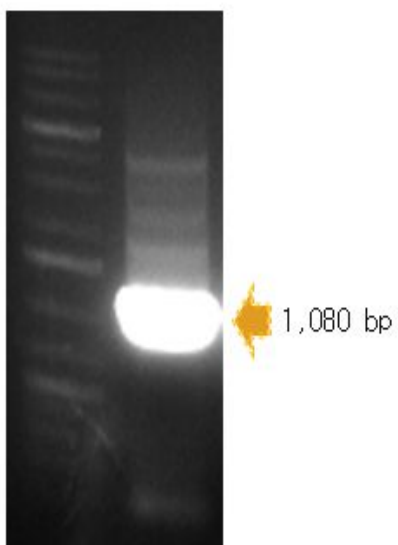
제 2 절 재조합 HcRNAV109 VLP 유전자 클로닝

유전자 클로닝을 위해 pUC57 HcRNAV109 주형 플라스미드와 pTXB1 HcRNAV109 주형 플라스미드로부터 HcRNAV109 캡시드 유전자를 증폭하기 위해 PCR 반응을 수행하였다. 수용성 단백질 유도 및 단백질 정제 효율을 향상시키기 위하여 HcRNAV에 intein tag가 결합된 유전자를 확보하기 위하여 재조합 pTXB1 HcRNAV109 플라스미드를 주형으로 하여 PCR 반응을 수행하였다.

그 결과 1.5% (W/V) agarose gel을 이용한 전기영동으로 확인한 결과 1,085 bp의 HcRNAV109 유전자와 1,679 bp의 HcRNAV109 유전자 단편을 확인하였다 (Fig. 7.). 각각의 PCR product를 clean up 한 후 DNA 단편은 pCR 2.1 벡터를 통해 TA 클로닝을 수행하였다. 그 후 염기서열 분석을 의뢰하여 HcRNAV109 및 HcRNAV109-intein 유전자 서열을 재확인하였다.

염기서열 분석을 통해 선별된 유전자는 대장균에서 발현 가능한 세 종류의 발현 벡터를 사용하였다. 증폭된 1,085 bp의 HcRNAV109 주형 플라스미드를 클로닝 할 pTXB1 플라스미드 (5' -Nde I, 3' -Sap I)와 pHCE IA 플라스미드 (5' -Nde I, 3' -Hind III)를 사용하였고 1,679 bp의 HcRNAV109 주형 플라스미드를 클로닝 할 pET30a(+) 플라스미드 (5' -Nde I, 3' -xho I)를 사용하였다. 염기 서열을 확인한 pCR2.1 벡터에 클로닝 된 HcRNAV109와 세 종류의 발현 벡터는 제한효소를 처리한 후 각각의 발현 벡터와 HcRNAV109 VLP 유전자를 ligation 하였다. 이렇게 재조합된 플라스미드는 *E. coli* strain BL21(DE3) 대장균에 heat shock 방법을 이용하여 형질전환을 수행하였으며 이를 pTXB1 HcRNAV109 VLP, pET30a(+) HcRNAV109 VLP, pHCE IA HcRNAV109 VLP로 명명하였다 (Fig. 8.).

(A)



(B)

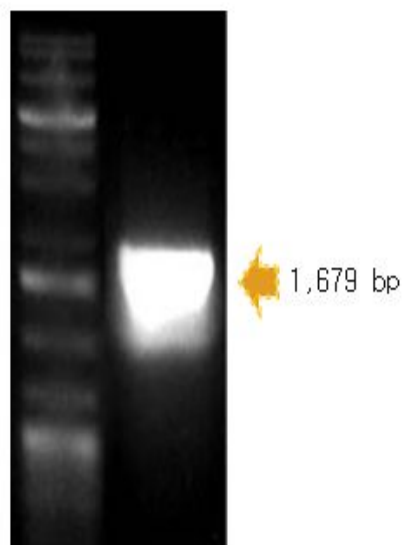


Fig.7. PCR product of codon optimized gene of HcRNAV109 (A) and fused gene of HcRNAV109-intein (B).

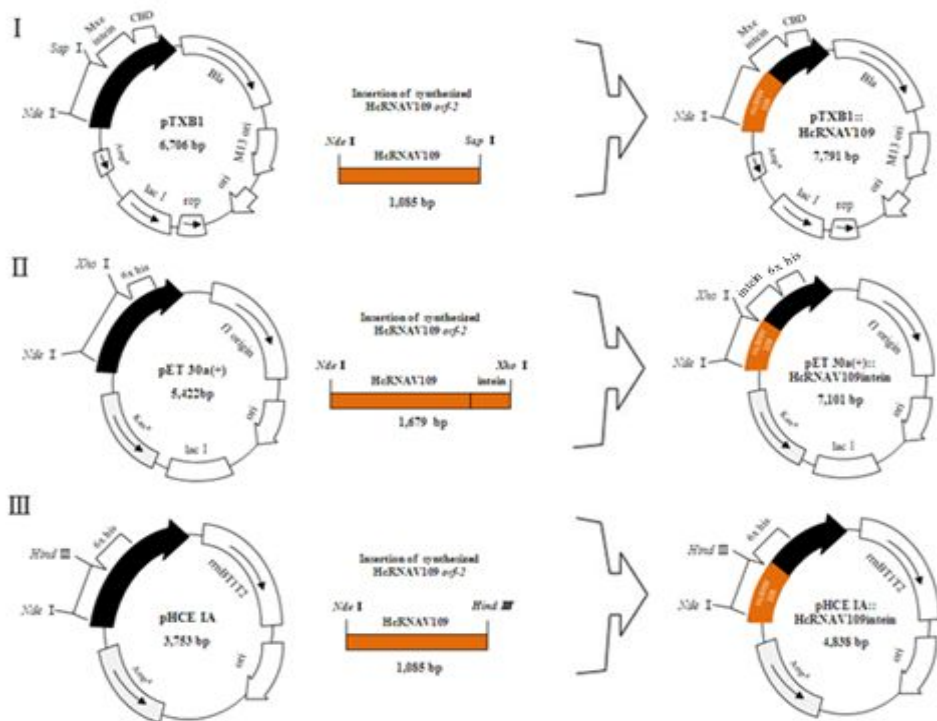


Fig. 8. Construction of pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP (I), pTXB1 HcRNAV109 VLP (II) and pHCE IA HcRNAV109 VLP (III).

제 3 절 재조합 HcRNAV109 VLP 단백질 발현

1. 온도에 따른 최적의 단백질 발현 조건 확립

재조합 플라스미드를 포함한 대장균에서 최적의 단백질 발현 조건을 확립하기 위해 다른 온도 조건에서 발현을 유도하였다. 먼저 대장균 BL21(DE3)내의 재조합 pTXB1 HcRNAV109 VLP에서는 30℃에서 8 시간, 18℃에서 18 시간, 16℃에서 20 시간, 재조합 pET30a(+) HcRNAV109-intein에서는 30℃에서 8 시간, 25℃에서 12 시간, 18℃에서 18 시간, 재조합 pHCE IA HcRNAV109에서는 40℃에서 4 시간, 37℃에서 8 시간, 30℃에서 6 시간의 조건으로 각각 발현을 유도하였다. 먼저 1%의 전배양액을 접종한 뒤 재조합 pTXB1 HcRNAV109 VLP 및 pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP는 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.5가 될 때 2 mM의 IPTG를 첨가하였고 재조합 pHCE IA HcRNAV109 VLP는 자가 발현이 가능한 발현 벡터에 의해 단백질 발현유도 물질을 첨가하지 않았다.

단백질의 발현 유무를 확인하기 위해 단백질 파쇄를 한 후 원심분리를 통하여 얻은 cell free extract를 soluble fraction으로 간주하고 down된 cell을 insoluble fraction으로 간주한 후 12% (W/V) SDS-PAGE gel 및 Western blot을 통해 확인하였다 (Fig. 9-10).

그 결과 66 kDa의 pTXB1 HcRNAV109 VLP 단백질은 모든 온도에서 발현함을 확인할 수 있었으나, 그 중 수용성 단백질의 형태는 16℃ 온도 조건에서 확인할 수 있었다. 61.5 kDa의 pET30a(+) HcRNAV109 VLP 단백질 역시 모든 온도 조건에서 발현함을 확인할 수 있었다. 그 중 16℃ 및 18℃ 온도 조건에서 수용성 단백질의 형태를 확인할 수 있었고 두 온도 조건에서 발현량의 차이가 없었음을 판단하여 18℃를 최적의 발현온도로 판단하였다. 그리고 38 kDa의 pHCE IA HcRNAV109 VLP 단백질은 37℃ 온도 조건에서 단백질이 발현함을 확인할 수 있었으나 이는 불용성 단백질의 형태로 확인되었다.

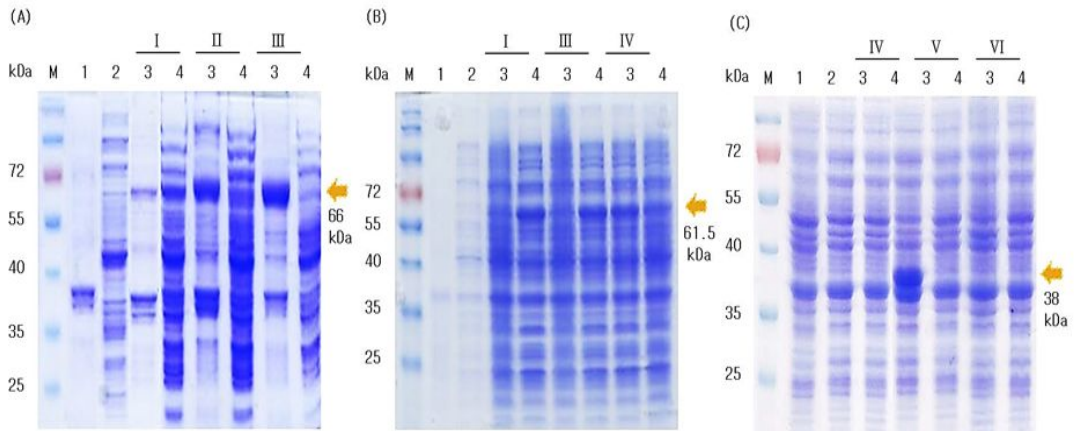


Fig. 9. SDS-PAGE analysis of recombinant pTXB1 HcRNAV109 VLP (A), pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP (B) and pHCE IA HcRNAV109 VLP (C) protein expressed in *E. coli* BL21(DE3) at different temperatures 16°C (I), 18°C (II), 25°C (III), 30°C (IV), 37°C (V) and 40°C (VI). Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, only BL21(DE3), lane 2, before induction, lane 3, insoluble fraction, lane 4, soluble fraction.

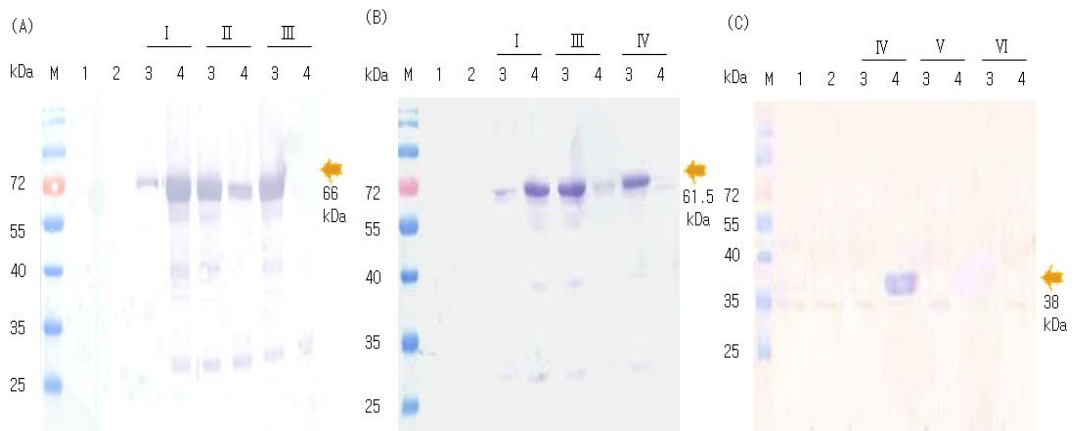


Fig. 10. Western blot analysis of recombinant pTXB1 HcRNAV109 VLP (A), pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP (B) and pHCE IA HcRNAV109 VLP (C) protein expressed in *E. coli* BL21(DE3) at different temperatures 16°C (I), 18°C (II), 25°C (III), 30°C (IV), 37°C (V) and 40°C (VI). Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, only BL21(DE3), lane 2, before induction, lane 3, insoluble fraction, lane 4, soluble fraction.

2. IPTG 농도에 따른 최적의 단백질 발현 조건 확립

재조합 플라스미드를 포함한 대장균에서 최적화된 온도와 발현시간 조건에서 발현유도물질 IPTG의 농도에 따른 단백질 발현율을 비교할 수 있었다. *E. coli* BL21(DE3)내의 재조합 pTXB1 HcRNAV109 VLP와 pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP는 0.05 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.3 mM의 IPTG를 처리하여 발현을 유도하였다. 1%의 전 배양을 접종한 배양액이 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.5로 될 때까지 배양한 다음 각각의 농도별 IPTG를 접종한 다음 pTXB1 HcRNAV109 VLP는 16℃에서 21 시간동안 pET30a(+) HcRNAV109 VLP는 18℃에서 18 시간 발현을 수행하였다.

12% (W/V) SDS-PAGE gel을 통해 확인한 결과 66 kDa의 pTXB1 HcRNAV109 VLP 단백질은 모든 IPTG 농도에서 발현을 확인할 수 있었고 0.1 mM의 IPTG를 최적의 발현 조건으로 결정하였다. 61.5 kDa의 pET30a(+) HcRNAV109 VLP 단백질도 모든 IPTG 농도에서 발현을 확인할 수 있었으며 0.2 mM의 IPTG를 최적의 발현 조건으로 결정하였다. 이는 Western blot을 통해 IPTG 농도 증가에 따른 발현양을 알 수 있었다 (Fig. 11-12).

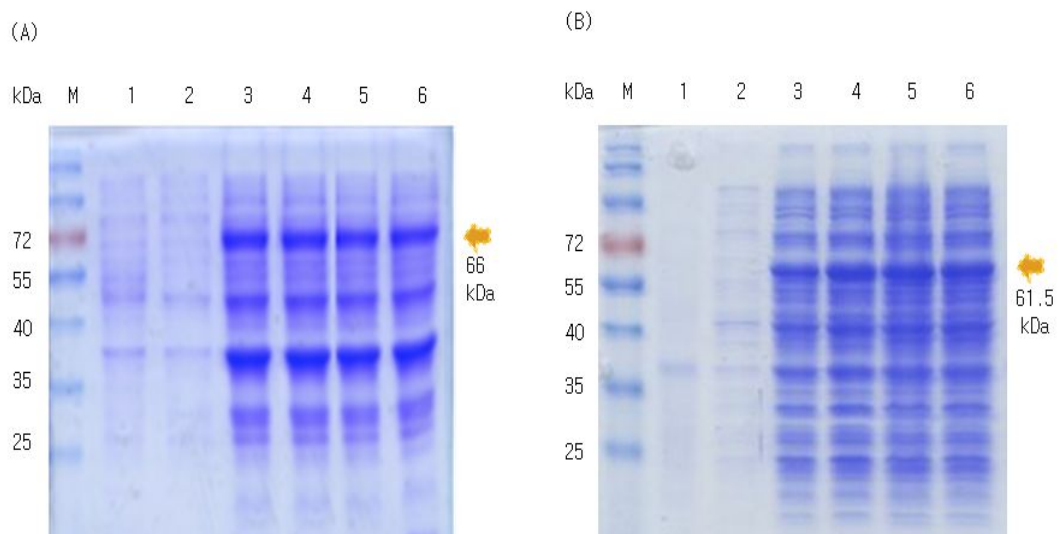


Fig. 11. Expression level of the recombinant pTXB1 HcRNAV109 VLP (A) and pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP (B) protein expressed in *E. coli* BL21(DE3) at different IPTG concentrations. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, only BL21(DE3), lane 2, before induction, lane 3, 0.05 mM, lane 4, 0.1 mM, lane 5, 0.2 mM, 0.3 mM .

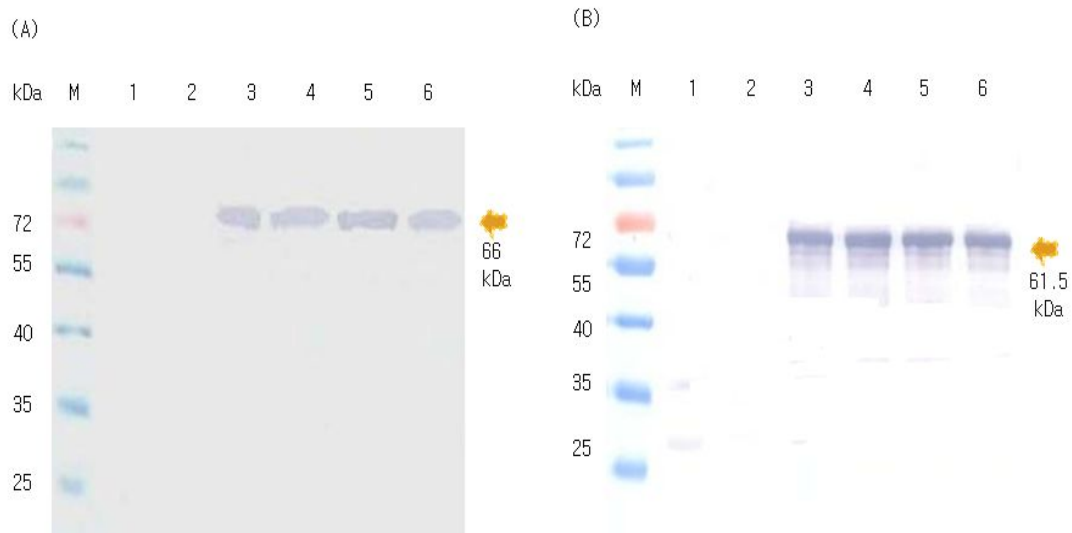


Fig. 12. Western blot analysis of the recombinant pTXB1 HcRNAV109 VLP (A) and pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP (B) protein expressed in *E. coli* BL21(DE3) at different IPTG concentrations. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, only BL21(DE3), lane 2, before induction, lane 3, 0.05 mM, lane 4, 0.1 mM, lane 5, 0.2 mM, 0.3 mM .

3. *E. coli* strain 종류에 따른 최적의 단백질 발현 조건 확립

자가 발현 벡터인 pHCE IA를 이용한 재조합 플라스미드 pHCE IA HcRNAV109 VLP를 포함한 대장균에서 다른 종류의 *E. coli* strain에 따른 형질전환 후 단백질 발현을 통해 발현양을 비교할 수 있었다. *E. coli* strain은 BL21(DE3), DH5 α , TOP10, ER2566, XL1-Blue, MG1655 그리고 *rpoS*-를 사용하였다. 먼저 형질전환을 위해 각각의 *E. coli* strain competent cell 200 μ l에 재조합 플라스미드 1 μ l를 주입하여 ampicillin (100 μ g/ml)이 포함된 1.5% (W/V) LB agar medium에 도말한 후 생성된 콜로니를 전배양 하였다. 단백질 발현을 위해 1% 전배양을 접종한 후 37 $^{\circ}$ C에서 7 시간 동안 단백질 발현을 유도하였다.

12% (W/V) SDS-PAGE gel을 통해 확인한 결과 단백질 발현은 DH5 α , TOP10, MG1655 및 *rpoS*-의 *E. coli* strain에서는 발현을 확인할 수 없었으나 BL21(DE3), XL1-BLUE 및 ER2566에서는 발현을 확인할 수 있었다. 그 중 BL21(DE3)에 의한 발현양이 가장 높음을 알 수 있었고 Western blot을 통해 발현양을 확인할 수 있었다 (Fig. 13).

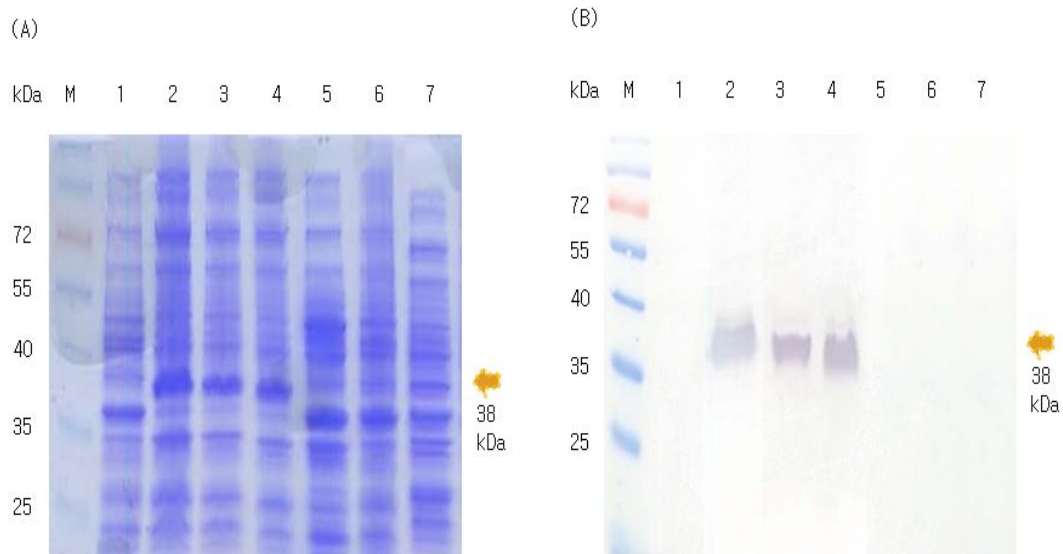


Fig. 13. Expression level of recombinant pHCE IA HcRNAV109 VLP protein in *E. coli* by SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis with different *E. coli* strains. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, only BL21(DE3), lane 2, before induction, lane 3, BL21(DE3), lane 4, XL1-Blue, lane 5, ER2566, lane 6, MG1655, lane 7, rpoS-.

제 4 절 각 affinity chromatography를 이용한 HcRNAV109 VLP 단백질 정제

1. Chitin affinity column을 이용한 재조합 HcRNAV109 VLP 단백질 정제

최적의 단백질 발현 조건에서 획득한 pTXB1 HcRNAV109 VLP 단백질을 파쇄하여 얻은 cell free extract를 회수하여 chitin affinity column chromatography를 통해 정제하였다. 10 ml의 chitin bead가 충전된 open column을 column buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 이용해 안정화하였다. 안정화 된 column에 단백질의 binding을 위해 cell free extract를 0.5 ml/min의 유속으로 흘려 준 후 단백질이 충분히 column에 binding 할 수 있도록 4°C에서 12 시간 동안 locking하였다. 2 ml/min의 유속으로 300 ml의 washing buffer를 흘려준 후 chitin bead에서 66 kDa의 fusion protein을 얻을 수 있었다. Fusion protein에 chitin affinity를 갖는 intein tag를 분리하기 위해 50 mM의 DTT 30 ml을 3 ml/min의 유속으로 흘려준 후 30 시간 동안 상온에 정치하였다. 그 후 column buffer를 통해 38 kDa의 HcRNAV109 VLP 단백질을 분리 정제하였다.

그 결과 단백질을 파쇄하여 66 kDa의 수용성 단백질을 확인할 수 있었고 column에 washing buffer를 흘려줌으로써 fusion protein이 binding 되었음을 알 수 있었다. 또한 50 mM의 DTT를 처리한 후 30 시간 동안 방치한 결과 intein tag가 제거된 38 kDa의 단백질의 정제를 12% (W/V) SDS-PAGE gel과 Western blot을 통해 확인하였다 (Fig. 14).

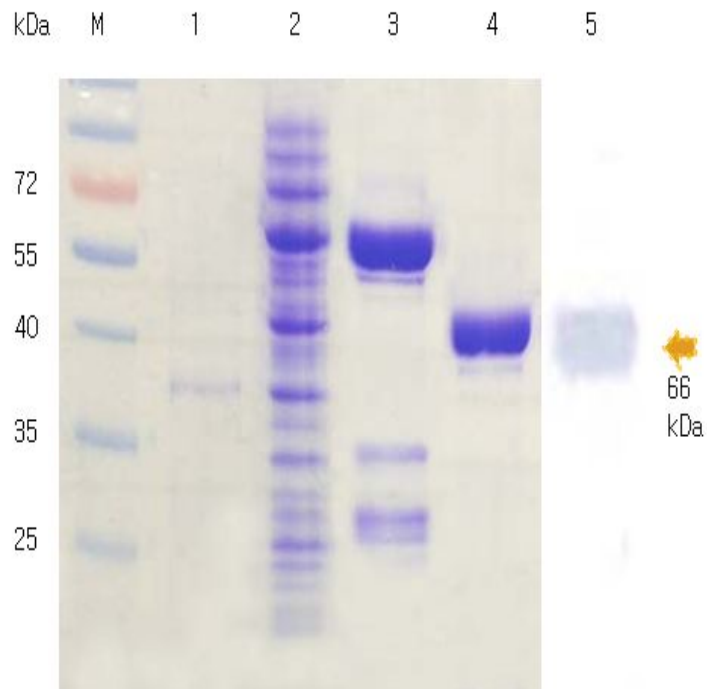


Fig. 14. Purification of the pTXB1 HcRNAV109 VLP protein using chitin affinity column chromatography. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, only BL21(DE3), lane 2, soluble fraction, lane 3, fusion protein bound to chitin resin, lane 4, purified HcRNAV109 VLP protein by 50 mM DTT treatment, lane 5, Western blot analysis of purified HcRNAV109.

2. Ni-NTA affinity column을 이용한 HcRNAV109 VLP 단백질 정제

가. 재조합 pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP 단백질 정제

최적의 단백질 발현 조건에서 획득한 pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP 단백질을 파쇄하여 얻은 cell free extract를 회수하여 Ni-NTA affinity column chromatography를 통해 정제하였다. 5 ml의 Ni-NTA resin이 충전된 open column을 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0)를 이용해 안정화하였다. 그 후 cell free extract를 충분히 binding 시키기 위해 4°C에서 3 시간 동안 locking하였다. cell free extract를 흘려준 후 column에 존재하는 crude extract를 제거하기 위해 100 ml의 distilled water를 흘려준 후 61.5 kDa의 fusion protein을 얻기 위해 50 ml의 washing buffer (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazole, pH 8.0)를 흘려주었다. Elution buffer (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 200 mM Imidazole, pH 8.0)를 이용해 column에 binding된 61.5 kDa의 HcRNAV109-intein VLP 단백질을 분리 정제하였다. 그 후 38 kDa의 HcRNAV109 VLP 단백질을 얻기 위해서 분리 정제된 샘플에 100 mM의 DTT를 첨가하여 21°C에서 11 시간 동안 정치하였다.

그 결과 38 kDa의 HcRNAV109 VLP 단백질과 28 kDa의 tag (intein 및 his tag)가 cleavage 되었음을 확인하였고 DTT와 imidazole을 제거하기 위해 cut off 3.5 k dialysis cassette를 이용해 4°C에서 12 시간 동안 dialysis 한 다음 cleavage된 tag (intein 및 his tag)를 제거하기 위해 Ni-NTA column에 흘려준 후 확인한 결과 38 kDa의 단백질의 정제를 12% (W/V) SDS-PAGE gel과 Western blot을 통해 확인하였다 (Fig. 15-16).

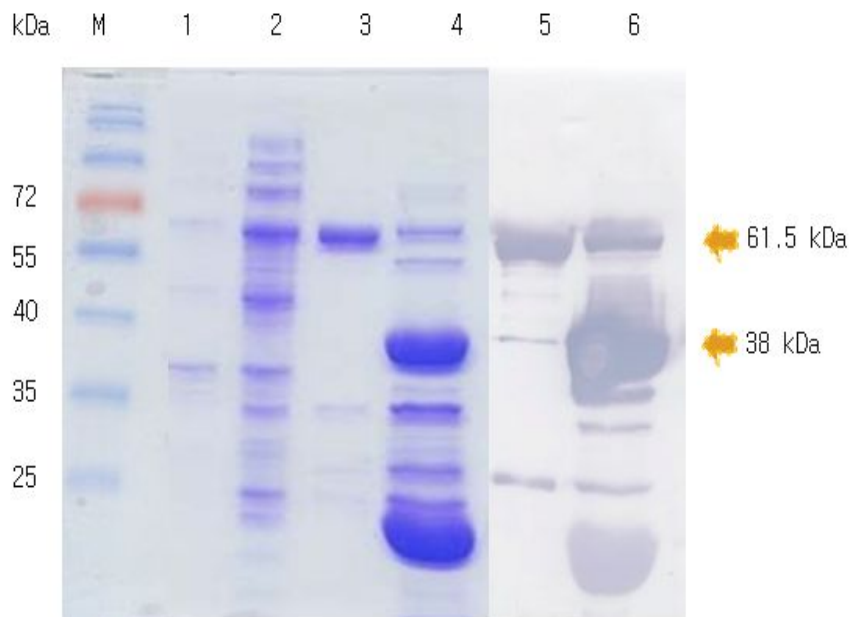


Fig. 15. Purification of the pET30a(+) HcRNAV109-intein fused VLP protein using Ni-NTA affinity chromatography. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, only BL21(DE3), lane 2, soluble fraction, lane 3, purified HcRNAV109-intein fused VLP protein, lane 4, HcRNAV109 VLP protein after 100 mM DTT treatment for 11 h at 21°C, lane 5, Western blot analysis of purified HcRNAV109-intein VLP protein, lane 6, Western blot analysis of HcRNAV109 VLP protein after 100 mM DTT treatment.

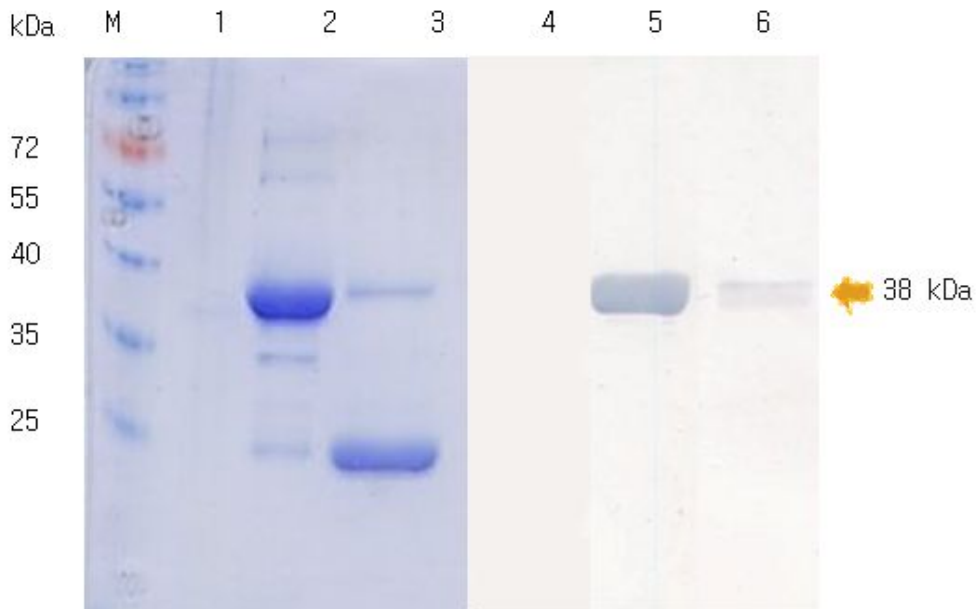


Fig. 16. Purification of the pET30a(+) HcRNAV109 VLP dissociated from fused protein through Ni-NTA affinity chromatography. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, SDS-PAGE analysis of only BL21(DE3), lane 2, SDS-PAGE analysis of HcRNAV109 after Ni-NTA column pass, lane 3, SDS-PAGE analysis of his-intein tag bound to Ni-NTA resin, lane 4, Western blot analysis of only BL21(DE3), lane 5, Western blot analysis of HcRNAV109 after Ni-NTA column pass, lane 6, Western blot analysis of his-intein tag bound to Ni-NTA resin.

나. 재조합 pHCE 1A HcRNAV109 VLP 단백질 정제

최적의 단백질 발현 조건에서 획득한 pHCE 1A HcRNAV109 VLP 단백질의 수용성 유도 및 단백질 정제를 위해 8M Urea가 포함된 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 8 M Urea, pH 8.0)로 현탁하여 denaturation을 유도한 후 파쇄하여 얻은 cell free extract를 회수하였고 Ni-NTA affinity column chromatography를 통해 정제하였다. 5 ml의 Ni-NTA resin이 충전된 open column을 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0)를 이용해 안정화하였다. 안정화된 column에 cell free extract를 흘려준 후 column에 충분히 binding 할 수 있도록 4°C에서 14 시간 동안 교반하였다. 38 kDa의 단백질을 얻기 위해 50 ml의 buffer B (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazole, pH 8.0)을 통해 washing 한 후 buffer C (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 200 mM Imidazole)를 흘려보내주어 column에 binding된 38 kDa의 HcRNAV109 VLP 단백질을 분리 정제하였다.

그 결과 38 kDa의 수용성 단백질을 획득하였고 250 mM의 imidazole을 이용한 단백질 정제를 통해 38 kDa의 단백질을 얻을 수 있었으며 12% (W/V) SDS-PAGE gel과 Western blot을 통해 확인하였다 (Fig. 17).

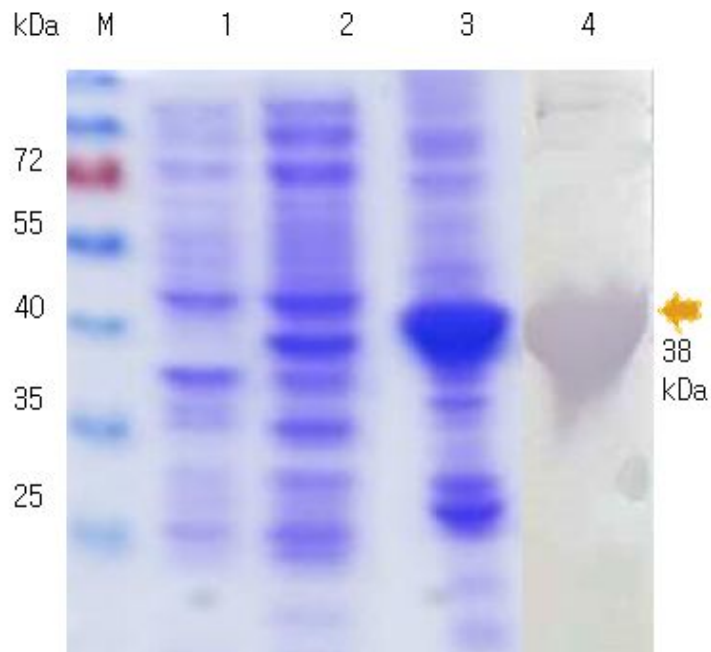


Fig. 17. Purification of the pHCE IA HcRNAV109 VLP protein using Ni-NTA column chromatography. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, only BL21(DE3), lane 2, total protein expressed in *E. coli* BL21(DE3), lane 3, purified HcRNAV109 VLP protein, lane 4, Western blot of purified HcRNAV109 VLP protein.

제 5 절 자가 조립 유도를 통한 HcRNAV109 VLP의 구조 관찰

재조합 pET30a(+) HcRNAV109-intein VLP 단백질을 분리 정제 과정을 통해 획득한 38 kDa의 HcRNAV109 VLP가 자가 조립을 통해 일정한 VLP가 형성되는지 확인하기 위해 dialysis를 수행하였다. Cut off 3.5 k의 dialysis cassette에 정제된 샘플을 넣은 후 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0)을 이용해 4°C에서 3 일 동안 dialysis를 진행하였다. 그리고 재조합 pHCE IA HcRNAV109 VLP 단백질을 분리 정제 과정을 통해 획득한 38 kDa의 HcRNAV109 VLP가 자가 조립을 통해 일정한 VLP가 형성되는지 확인하기 위해 dialysis를 수행하였다. 8M Urea에 의해 denaturation된 단백질의 refolding을 유도하기 위해 8 M의 고농도 Urea가 포함된 버퍼에서 4 M → 2 M → 0.5 M로 희석한 후 최종적으로 Urea가 포함되지 않은 lysis buffer로 dialysis 하였다. Cut off 7 k의 dialysis cassette를 사용하여 dialysis 과정을 수행하여 자기조립을 통한 VLP 형성을 유도하였다.

TEM 분석을 위해 샘플을 negative staining 후 확인한 결과 33 nm의 HcRNAV109 VLP가 형성되는 것을 확인하였다 (Fig. 18).

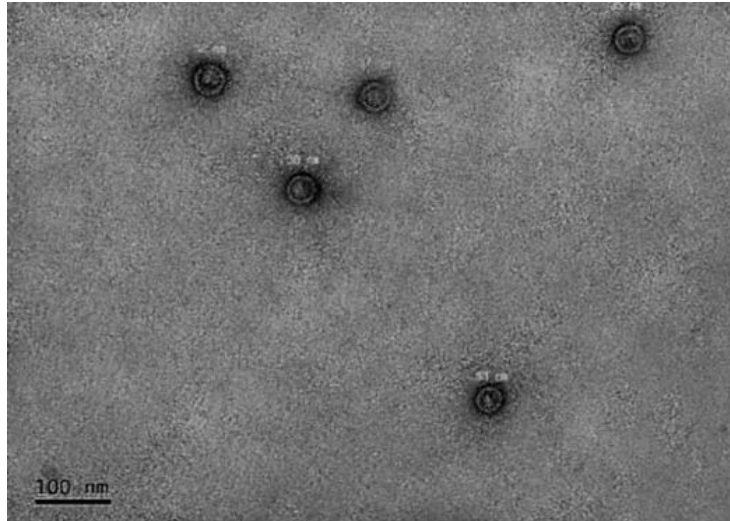


Fig. 18. The transmission electron micrograph of negative stained HcRNAV109 VLPs. The self-assembled HcRNAV109 VLPs are show as the homogenous spherical particles with 33 nm diameter. The VLPs were expressed using pET30a(+) HcRNAV109 VLP (A) and pHCE IA HcRNAV109 VLP (B) protein.

제 6 절 HcRNAV109 VLP의 숙주 특이성

1. 형광 물질 FITC가 표지된 HcRNAV109 VLP 단백질 확인

재조합 pTXB1 HcRNAV109 VLP 단백질을 정제 하여 얻은 1 mg/ml의 HcRNAV109 VLP 단백질에 5 mM DTT를 첨가하여 상온에서 1 시간 동안 dissociation 반응을 하였다. 100 mM의 FITC 100 μ l를 주입하여 30 분 동안 locking을 통해 단백질과의 반응을 촉진하였다. 그 다음 Cut off 3.5 k의 dialysis cassette를 이용해 4°C에서 3 일 동안 차광하에 buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8.5)로 dialysis 하였다. Dialysis 후 3.5 k의 centricon으로 표지되지 않은 FITC는 제거하고 정제된 HcRNAV109 VLP를 농축한 후 FITC가 표지되었는지 확인하기 위해 12% (W/V) SDS-PAGE gel을 내린 후 UV-visible lamp를 통해 관찰하였다. 그 결과 38 kDa의 HcRNAV109 VLP 단백질에서 녹색형광이 관찰되는 것을 확인하였다 (Fig. 19).

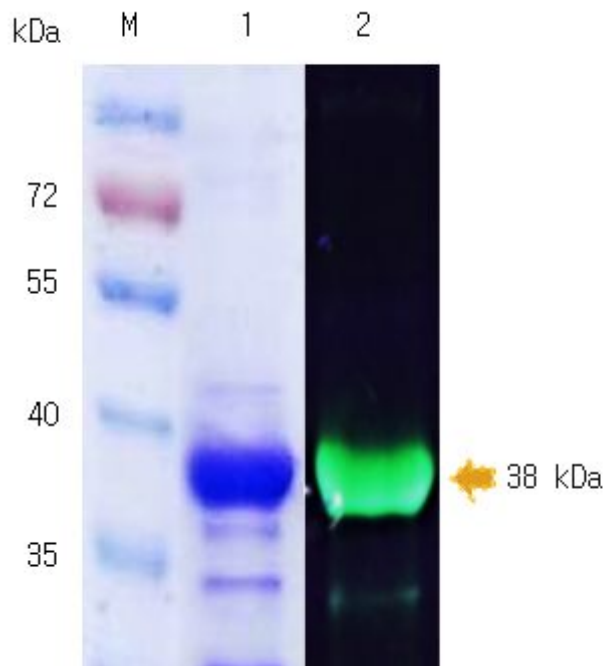


Fig. 19. SDS-PAGE analysis of the pTXB1 HcRNAV109 VLP protein labeled with FITC. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, purified HcRNAV109 VLP protein, lane 2, HcRNAV109 VLP protein labeled with FITC illuminated with UV-visible lamp.

2. 형광 현미경을 통한 FITC-labeled HcRNAV09 VLP의 숙주 특이성 관찰

HcRNAV109 VLP가 숙주에 특이적으로 감염하는지 확인하기 위해 재조합 FITC가 표지된 pTXB1 HcRNAV109 VLP에 유해 미세조류를 반응 하여 숙주에 대한 특이성을 보이는지에 대한 실험을 하였다. 먼저 *H. circularisquama* HY9423 숙주 미세조류와 *H. circularisquama* HU9433-P, HA92-1, *H. akashiwo* 및 *C. marina*의 비(非)숙주 미세조류를 통해 반응하였다 (Table 6). FITC가 표지된 pET30a(+) HcRNAV109 VLP 단백질과 각각의 유해 미세조류를 반응 시킨 후 조류배양배지 f/2를 사용하여 표지되지 않은 FITC를 제거한 다음 형광 현미경을 관찰하였다.

그 결과 먼저 가시광선 영역에서 건강한 조류가 가지는 클로로필을 이용해 red filter에서 적색을 띠는 것을 확인함으로써 실험에 사용된 유해 미세조류의 상태를 확인할 수 있었다. 형광물질 FITC의 발광에 의해 나타나는 green filter에서 HcRNAV109 VLP의 숙주인 *H. circularisquama* HY9423는 녹색 형광을 띄었으며 비(非)숙주인 *H. circularisquama* HU9433-P와 HA92-1, *H. akashiwo* 및 *C. marina*에서는 녹색 형광을 띄지 않음을 관찰할 수 있었다. 형광물질 FITC가 표지됨으로서 관찰되는 형광을 통해 HcRNAV109 VLP는 숙주에 특이적으로 감염하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 20).

Table 6. *Heterocapsa circularisquama* and the other algal strains used in this study.

Strain	Viral infectivity	Reference
<i>H. circularisquama</i> HY9423	HcRNAV109	[17]
<i>H. circularisquama</i> HU9433-P	HcRNAV34	[17]
<i>H. circularisquama</i> HA92-1	HcRNAV34	[17]
<i>Heterosigma akasiwo</i>	-	[40]
<i>Chattonella marina</i>	-	

- not determined

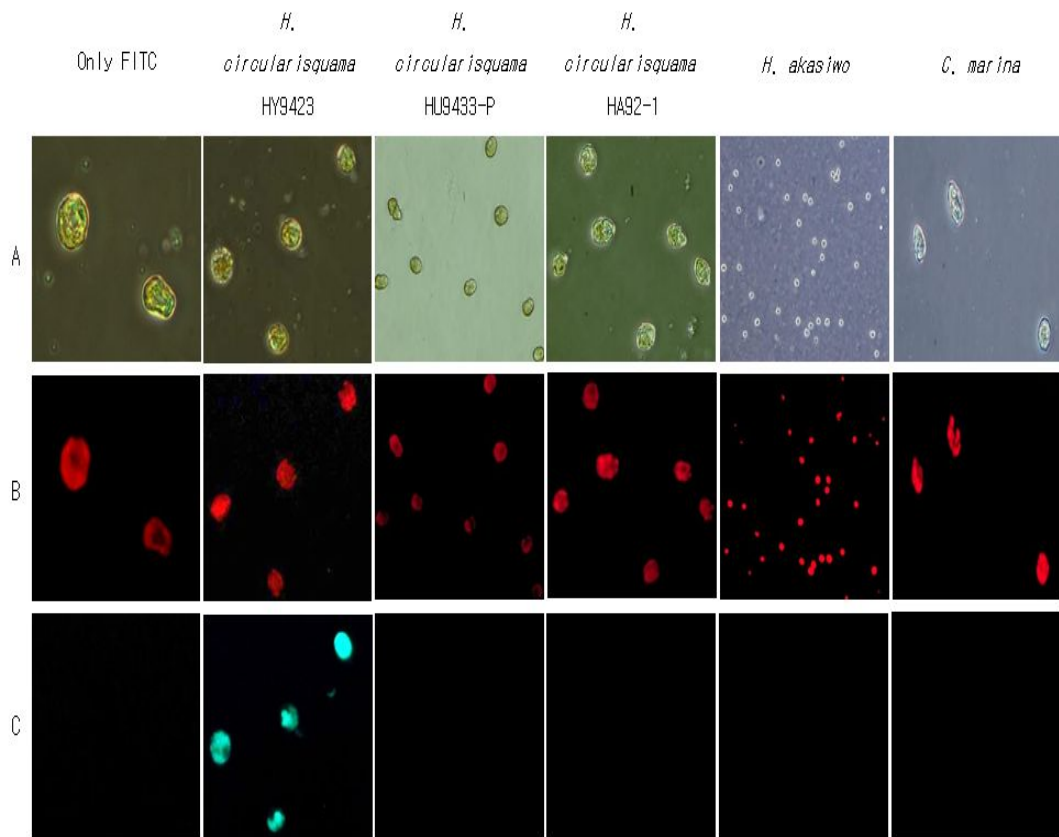


Fig. 20. Host specific binding of pTXB1 HcRNAV109 VLPs to its host, *H. circularisquama* HY9423, and its non-host, *H. circularisquama* HU9433-P, HA92-1, *H. akasiwo* and *C. marina*. Optical filter (A) and fluorescent micrographics red filter (B) and green (C). After incubation HcRNAV109 VLPs labeled with FITC at R/T for 3 h, the microalgae were washed 2 times with f/2 medium and visualized by fluorescent microscopy.

제 7 절 Cell free extract에 용해되어 있는 TD49 탑재 HcRNAV109 VLP 단백질의 숙주 특이적 살조 효과

단백질 발현된 pET30a(+) HcRNAV109 VLP에 살조물질을 탑재하여 숙주에 특이적인 살조 효과를 관찰하였다. 먼저 HPLC 분석을 통해 TD49 농도를 정량한 후 미세 조류와 반응한 결과 HcRNAV109 VLP의 숙주인 *H. circularisquama* HY9423은 시간이 경과함에 따라 조류의 사멸율이 서서히 증가하다가 5 시간 이후 사멸율이 급격히 증가하면서 8 시간 경과 후에는 90% 이상의 사멸율을 확인하였다. 비(非)숙주인 *H. circularisquama* HU9433-P에서는 8 시간 경과 후에는 전체 조류의 약 10%의 조류가 사멸하는 것을 관찰할 수 있었으나 *H. akasiwo*는 8 시간 경과 후에도 조류의 사멸이 관찰되지 않았다 (Fig. 21).

또한, pET30a(+) HcRNAV34 VLP도 동일한 방법으로 살조물질을 탑재한 후 숙주 특이적 살조 효과를 관찰한 결과 HcRNAV34 VLP의 숙주인 *H. circularisquama* HU9433-P에서는 1 시간 이후 급격하게 사멸율이 증가하다가 7 시간 이후 전멸하였다. 비(非)숙주인 *H. circularisquama* HY9423에서는 사멸율이 관찰되지 않다가 약 6 시간부터 8 시간 경과 후에는 전체조류의 약 5%가 사멸하는 것을 관찰할 수 있었다. *H. akasiwo*는 8 시간 경과 후에도 조류의 사멸이 관찰되지 않았다. 이를 통해 숙주에 특이적으로 살조 효과가 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 22).

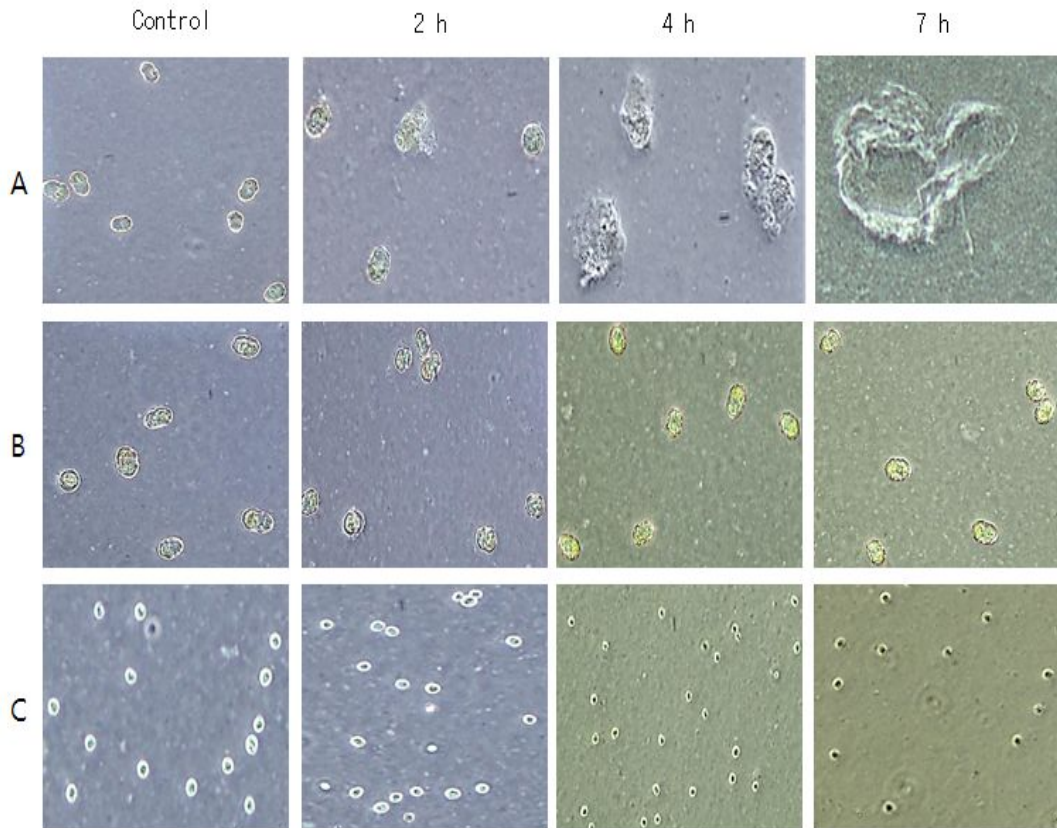


Fig. 21. Host specific algicidal activity of HcRNAV109 VLPs dissolved in the cell free extract and encapsidated with TD49 on its host *H. circularisquama* HY9423 (A) and its non-host *H. circularisquama* HU9433-P (B) and *H. akasiwo* at 21°C for 7 h.

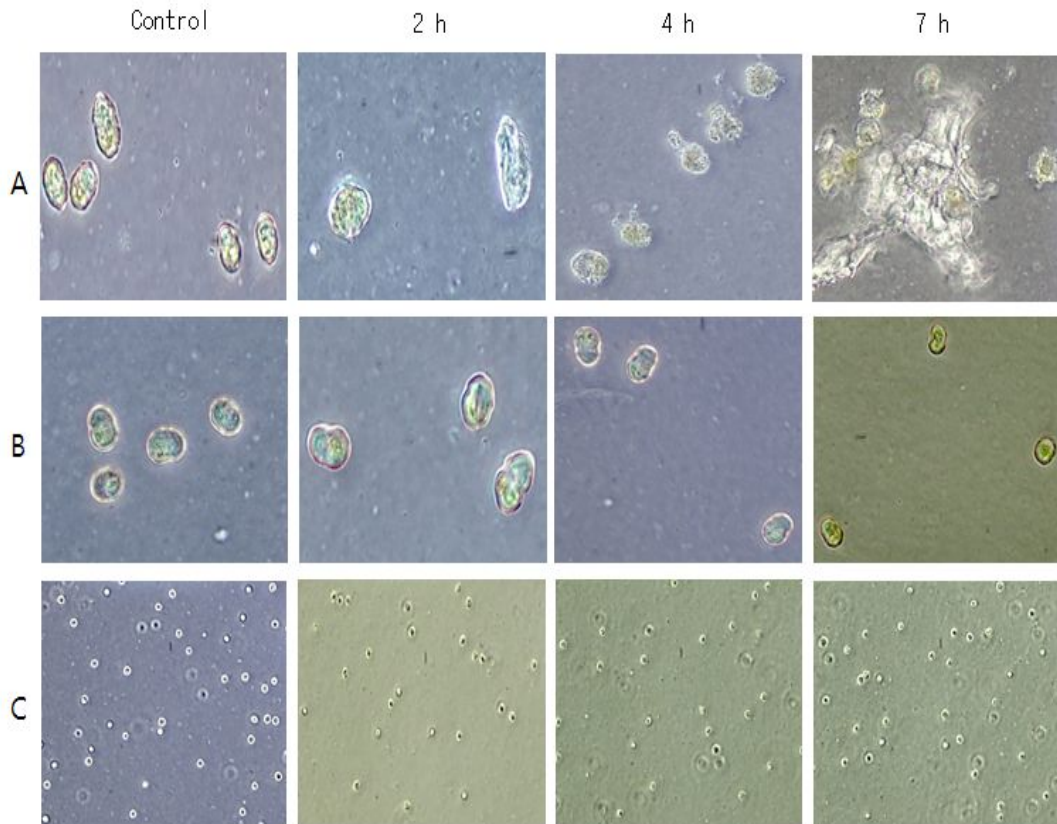


Fig. 22. Host specific algicidal activity of HcRNAV34 VLPs used as a control, dissolved in cel free extract and encapsidated with TD49 on its host *H. circularisquama* HU9433-P (A) and its non-host *H. circularisquama* HY9423 (B) and *H. akasiwo* at 21°C for 7 h.

제 8 절 대량배양

pHCE IA HcRNAV109 VLP 단백질의 대량생산 시스템을 구축하기 위해 M9 최소배지에 0.01% trypton을 첨가한 5 l의 배지에 1%의 전배양액을 접종한 다음 200 rpm, 37°C에서 일정 양의 공기를 주입하며 24 시간 동안 배양하였다. 샘플링은 2 시간 간격으로 진행하였다.

그 결과 배양 2 시간 후의 600 nm 파장에서 흡광도는 0.17을 나타내었고 8 시간 후에는 2.7의 흡광도를 나타내는 등 24 시간 동안 지속적으로 흡광도 값이 증가하였으며 최종적으로 배양 24 시간에는 4.4의 흡광도를 보였다 (Fig. 23-B). 단백질의 발현을 확인하기 위해 12% (W/V) SDS-PAGE gel과 Western blot을 통해 확인할 수 있었고 플라스미드의 존재 여부를 확인하기 위해 4 시간 간격으로 샘플링하여 플라스미드 분리 및 정제를 수행한 후 1.5% (W/V) agarose gel을 이용한 전기영동을 통해 확인하였다 (Fig. 23-A) (Fig. 24).

그 결과 배양 시간이 경과할수록 흡광도 값이 증가하였고 단백질 발현양은 배양 후 8 시간이 경과하였을 때 최대의 발현양을 확인할 수 있었다. 그러나 배양 14 시간 이후 발현양은 급격하게 감소하였다. 그 이유를 분석하기 위해 플라스미드 분리 정제를 통해 확인한 결과 시간이 경과함으로써 플라스미드의 농도는 동일하게 확인되었으며, 이는 발현양이 현저하게 감소하게 된 원인은 플라스미드의 소실에 의한 것이 아님을 확인할 수 있었다.

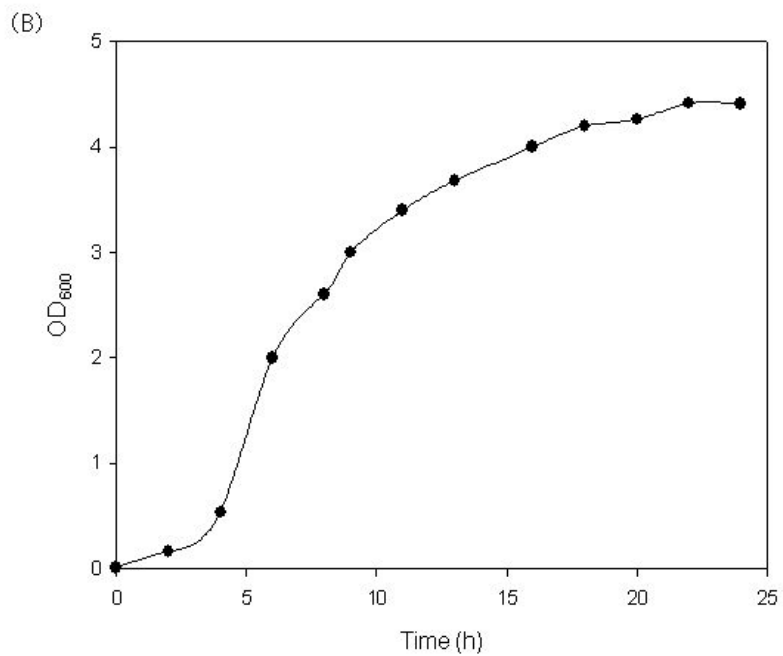
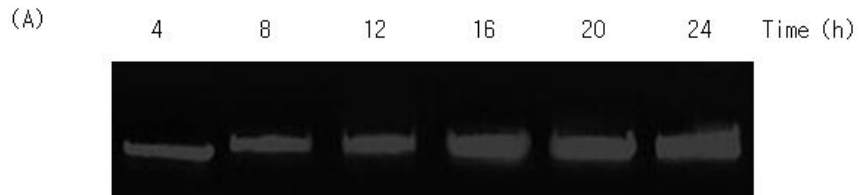


Fig. 23. Plasmid activity (A) of *E. coli* BL21(DE3) harboring recombinant HcRNAV109 VLP gene depending on the cell growth (B) cultivated in a 5 L fermenter. The culture conditions were as follows: incubation temperature at 37°C, agitation speed 200 rpm.

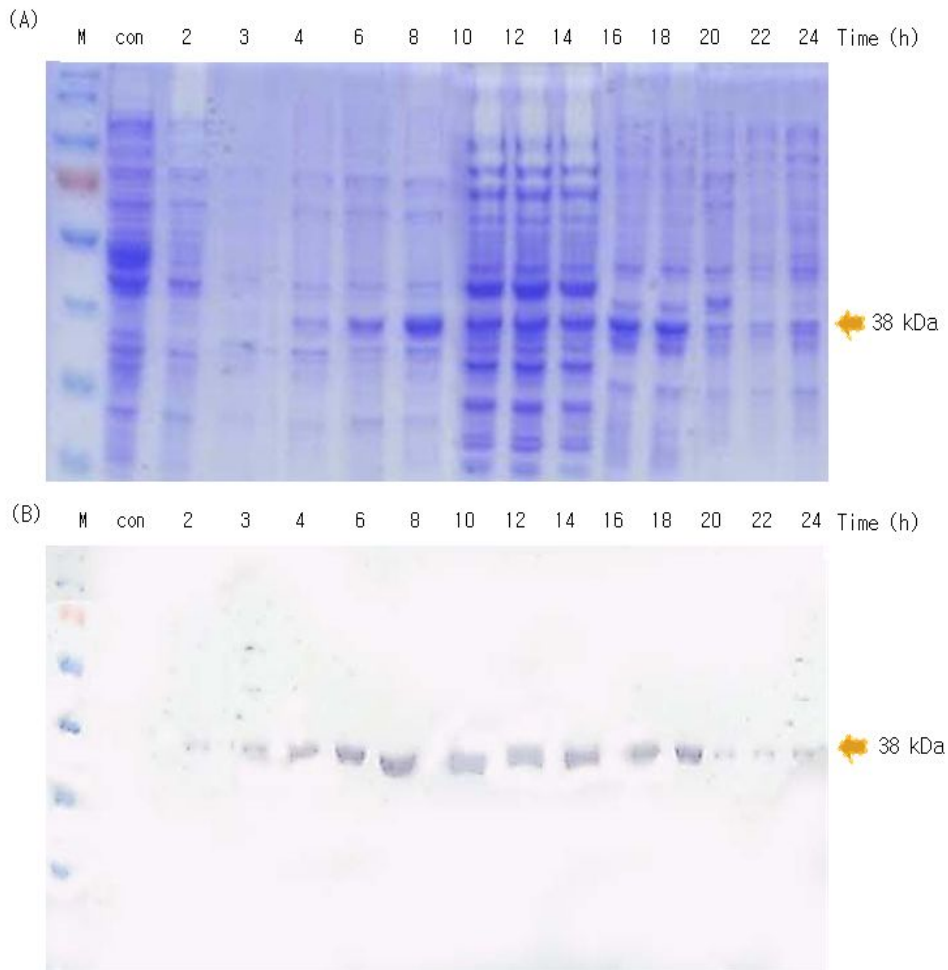


Fig. 24. Expression level of recombinant pHCE IA HcRNAV109 VLP gene in *E. coli* BL21(DE3) cultivated in a 5 L fermenter by time course. SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis. Symbol: M, molecular weight marker; control, BL21(DE3).

제 4 장 결 론

1. Genbank를 통해 확보한 HcRNAV 109의 *orf-2* 유전자 정보를 대장균 내에서 단백질 발현을 위해 10%의 rare codon을 모두 최적화 시켜 유전자 합성을 하였다. 재조합에 필요한 유전자 증폭은 pUC57 HcRNAV109와 pTXB1 HcRNAV109를 주형 플라스미드로 사용하였으며 단백질 발현 벡터인 pTXB1, pET30a(+), pHCE 1A에 클로닝 하였다. 그 외 pBAD, pTYB21, pGEX 등의 다양한 발현벡터 시스템을 이용하였으나 최종적으로 pTXB1 HcRNAV109 VLP, pET30a(+), HcRNAV109 VLP 그리고 pHCE 1A HcRNAV109 VLP가 발현 및 정제에 적합함을 확인하였다.
2. 재조합 pTXB1 HcRNAV109 VLP는 0.1 mM의 IPTG를 첨가한 후 16°C에서 22 시간 동안 단백질 발현을 유도한 결과 66 kDa의 수용성 pTXB1 HcRNAV109 VLP 단백질을 얻을 수 있었고, 재조합 pET30a(+), HcRNAV109-intein VLP는 0.2 mM IPTG를 첨가한 후 18°C에서 18 시간 동안 단백질 발현을 유도한 결과 61.5 kDa의 수용성 pET30a(+), HcRNAV109-intein VLP 단백질을 얻을 수 있었다. 또한 재조합 pHCE 1A HcRNAV109 VLP는 37°C에서 7 시간 단백질 발현을 유도한 결과 38 kDa의 불용성 pHCE 1A HcRNAV109 VLP 단백질을 얻을 수 있었다.
3. 재조합 pTXB1 HcRNAV109 VLP에서 발현된 수용성 단백질은 chitin affinity chromatography를 통해 정제 하였고, 재조합 pET30a(+), HcRNAV109-intein VLP에서 발현된 수용성 단백질 및 재조합 pHCE 1A HcRNAV109 VLP에서 발현된 불용성 단백질은 Ni-NTA affinity chromatography를 통해 정제하였다. 그 중 pHCE 1A HcRNAV109 VLP 불용성 단백질은 denaturation 방법을 이용하여 정제하였다.
4. 재조합 pET30a(+), HcRNAV109 VLP 단백질을 분리 정제 한 후 dialysis를 통해 일정한 자가 조립을 통한 VLP를 유도하였고 전자 현미경을 통해 관찰한 결과 약 33 nm의 직경을 갖는 VLP들의 형성을 확인하였다.
5. 재조합 pHCE 1A HcRNAV109 VLP 단백질 변성을 이용하여 분리 정제 한 후

dialysis를 통해 단계적으로 Urea 농도를 낮추면서 refolding을 유도하였다. 그 후 전자 현미경을 통해 관찰한 결과 약 33 nm의 직경을 갖는 VLP들의 형성을 확인하였다.

6. 재조합 pET30a(+) HcRNAV109 VLP 단백질을 분리 정제 한 후 5 mM의 DTT를 통해 dissociation을 유도한 후 형광물질 FITC를 표지하여 숙주 특이성을 관찰한 결과 숙주인 *Heterocapsa circularisquama* HY9423에서만 형광물질의 표지에 의한 녹색형광이 관찰됨으로서 HcRNAV109 VLP가 숙주에 특이성을 가지는 것을 확인하였다.
7. 재조합 pET30a(+) HcRNA109 VLP 플라스미드가 포함된 대장균을 발현 한 후 회수한 cell free extract에 살조물질인 TD49를 탑재하여 숙주 특이적 살조능을 관찰한 결과 숙주인 *Heterocapsa circularisquama* HY9423은 7 시간 후 전멸하였다. 비(非)숙주인 *Heterocapsa circularisquama* HU9433-P는 8 시간 경과 후 10%의 사멸율을 관찰하였고 *Heterosigma akasiwo*는 영향을 받지 않는 것을 확인하였다. 또한 control로써 재조합 pET30a(+) HcRNA34 VLP 플라스미드가 포함된 대장균을 발현 한 후 회수한 cell free extract에 살조물질인 TD49를 탑재하여 숙주 특이적 살조능을 관찰한 결과 숙주인 *Heterocapsa circularisquama* HU9433-P는 7 시간 후 전멸하였다. 비(非) 숙주인 *Heterocapsa circularisquama* HY9423은 8 시간 경과 후 5%의 사멸율을 관찰하였고 *Heterosigma akasiwo*는 영향을 받지 않는 것을 확인하였다.
8. 자가 발현이 가능한 재조합 pHCE 1A HcRNAV109로부터 HcRNAV109 VLP 단백질의 대량생산을 위한 발현 조건을 확립하기 위하여 0.01% trypton이 첨가된 M9 최소배지 5 l를 이용하여 배양하였다. 일정한 공기를 주입하며 200 rpm, 37°C에서 단백질 발현을 유도한 결과 배양 후 8 시간이 경과하였을 때 최적의 단백질 발현량을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. <http://www.whoie.edu/redtide/page.do/pid=9257>
2. Kim, H.G. 1997. Recent Harmful Algal Blooms and Mitigation Strategies in Korea. *Ocean. Res.*, 19, 185-192.
3. 김학균. 2007. 유해 적조 피해 발생과 대책, *Korean society of hazard mitigation*. pp.10.
4. Nam, H.J., Hong, J.S. and Seong, Y.J. 2012. The Algicidal Activity of *Pseudoalteromonas* sp. NH-12 against the Toxic Dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *J. Environ. Agric.*, **31**, 175-184.
5. Anderson, D.M. 1997. Turning back the harmful red tide, *Nature*. **388**. 513-514.
6. Anderson, D.M. 2009. Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs), *Ocean Coastal Management*, **52**, 342-347.
7. Boesch, D.F., Anderson D.M., Horner R.A., Shumway, S.E., Tester, P.A. and Whittedge, T.E. 1997. Harmful Algal Blooms in Coastal Waters: Options for Prevention, Control and 12. Mitigation, NOAA Coastal Ocean Program Decision Analysis Series No. 10. NOAA Coastal Office. Silver Spring., MD. p. 46.
8. www.nfrdi.re.kr/page?id=kr_index.
9. 서영상, 임월애, 조은섭. 2013. (2010, 2011, 2012년도)한국연안의 적조발생 상황 = Harmful algal blooms in Korean coastal waters in 2010, 2011, 2012, 국립수산과학원

10. Wada, K., Kimura, K., Hasegawa, A., Fukuyama, K. and 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.
11. Iwataki, M., Wong, M.W. and Fukuyo, Y. 2007. New record of *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) from Hong kong. *Fisher science*, **68**, 1161-1163.
12. Archambault, M.C., Bricelj, V.M., Grant J. and Anderson, D.M. 2004. Effects of suspended and sediment calls on juvenile hard clays on juvenile harl clams, *Mar Biol*, **144**, 553-565.
13. Aguzzi, C., Cerezo, P., Viseras, C., and Caramella, C. 2007. Use of clays as drug delivery systems: possibilities and limitations, *Appl. Clay Sci*, **36**, 22-36.
14. 류정곤, 황기형, 김귀영, 김숙양, 박영태. 2004. 적조방제용 황토살포의 효과 분석 및 개선방안에 관한 연구. 국립수산과학원, pp.6-9.
15. Kim, J.H., Jang, H. H., Ryou, S.M., Kim, S., Bae, J., Lee, K. and Han, M.S. 2010. A functionalized gold nanoparticles-assisted universal carrier for antisense DNA, *Chem Commun (Camb)*, **46**, 4151-4153.
16. Chen, F., Suttle, C.A. 1995. Amplication of DNA-polymerase gene fragments from viruses infecting microalgae, *Appl. Environ. Microbial*, **61**, 1274-1278.
17. Nagasaki K. 2008. Dinoflagellates, diatoms, and their viruses. *J.*

Microbiol, **46(3)**, 235-43.

18. Kim, Y.M., Wu, Y., Duong, T. U., Ghodake, G.S., Kim, S. W., Jin, E. S. and Cho, H. 2010. Thiazolidinediones as a Novel Class of Algicides Against Red Tide Harmful Algal Species. *Appl. Biochem. Biotechnol*, **162**, 2273-2283.

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

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

21. Svenson, S., Tomalia, D. A. 2005. Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field. *Adv Drug Deliv Rev*, **57**, 2104-2105.

22. Matsuyama, Y. 1999. Harmful effect of Dinofalgellate *Heterocapsa circularisquama* on Shellfish Aquaculture in Japan. *JARQ*, **33**, 283-293.

23. Nagasaki, K., Tomaru, Y., Nakanishi, K., Hata, N., Katanozaka, N. and Yamaguchi, M. 2004. Dynamics of *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) and its viruses in Ago Bay, Japan. *Aquat Microb Ecol*, **34**, 219-226.

24. Nagasaki, K., Shirai, Y., Takao, Y., Mizumoto, H., Nishida, K. and Tomaru, Y. 2005. Comparison of Genome Sequences of Single-Stranded RNA V bniruses Infecting the Bivalve-Killing Dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 8888-8894.

25. Tomaru, Y., Katanozaka, N., Nishida, K., Shirai, Y., Tarutani, K., Yamaguchi, M. and Nagasaki, K. 2004. Isolation and characterization of two distinct types of HcrNAV, a single-stranded RNA virus infecting the bivalve-killing microalga *Heterocapsa circularisquama*. *Aquat Microb Ecol*, **34**, 207–218
26. Miller, J.L., Woodward, J., Chen, S., Jaffer, M., Weber, B., Nagasaki, K., Tomaru, Y., Wepf, R., Roseman, A., Varsani, A. and Sesell, T. 2011. Three-dimensional reconstruction of *Heterocapsa circularisquama* RNA virus by electron cryo-microscopy. *J. Gen. Virol*, **92**, 1960–1970.
27. Han, T., Kang, S.H., Park, J.S., Lee H.K. and Brown, M.T. 2008. Physiological responses of *Ulva pertusa* and *U. armoricana* to copper exposure. *Aquat Toxicol*, **86**, 176–1184.
28. Mizumoto, H., Tomaru, Y., Takao, Y., Shirai, 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. Virol*, **81**, 1372–1378.
29. Goldmann, C., Stolte, N., Nisslein, T., Hunsmann, G., Lüke, W. and Petry, H. 2000. Packaging of small molecules into VP1-virus-like particles of the human polyomavirus JC virus. *J. Virol. Methods*, **90**, 85–90.
30. Horiguchi, T. 1995. *Heterocapsa circularisquama* sp. nov. (Peridinales, Dinophyceae): A new marine dinoflagellate causing mass mortality of bivalves in Japan. *Phycol. Res*, **43**, 129–136.
31. Fleming, L.E., Jerez E., Stephan, W.B., Cassedy, A., Bean, J.A., Reich

- A., Kirkpatrick, B., Backer, L., Nierenberg, K., Watkins, S., Hollenbeck, J. and Weisman, R. 2007. Evaluation of harmful algal blooms outreach activities. *Mar Drugs*, **5(4)**, 208–216.
32. Kim, H.G. 2006. Mitigation and controls of HABs. *Ecological Studies*, **189**, 327–338.
33. Nagasaki, K., Tomaru, Y., Takao, Y., Nishida, K., Shirai, Y., Suzuki, H. and Nagumo, T. 2005. Previously unknown virus infects marine diatom. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 3528–3535.
34. Wu, Y.Z. 2012. Expression of self-assembled of *Heterocapsa circularisquama* RNA virus-like particles synthesized in *Pichia pastoris*. *Chines science Bulletin*, **57**, 3288–3293.
35. Salunke, D.M., Caspar, D.L. and Garcea, R.L. 1989. Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophys*, **56**, 887–900.
36. Chong, S., Mercha, 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 cleavage affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene*, **192**, 271–281.
37. Tarutani, K., Nagasaki, K., Itakura, s. and Yamaguchi, M. 2001. Isolation of a virus infecting the novel shellfish-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Aquat Microb Ecol*, **23**, 103–111.
38. Damayanti, T.A., Nagano, H., Mise, K., Furusawa, I. and Okuno, T. 2002.

Positional effect of deletions on viability, especially on encapsidation, of brome mosaic virus D-RNA in barley protoplasts. *Virology*, **293**, 314-319.

39. Nagasaki, K., Tomaru, Y., Katanozaka N., Yamanaka S., Tanabe H., Tanabe H. and Yamaguchi, M. 2003. Growth characteristics and intra-species host specificity of a large virus infecting the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Appl Environ Microb Ecol*, **34**, 219-226.

40. Tai, V., Lawrence, J.E., Lang, A.S., Chan, A.M., Culley, A.I. and Suttle, C.A. 2003. Characterization of HaRNAV, a single-stranded RNA virus causing lysis of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *J. Phycol*, **39**, 343-352.

41. Van Etten J.L., Meints, R.H. 1991. Giant viruses infecting algae. *Annu Rev Microbiol*, **53**, 447-494.

42. Van Etten J.L., Lane, L.C. and Meints R.H. 1991. Viruses and virus like particles of eukaryotic algae. *Microbiol Rev*, **55**, 586-620.

43. Monera, O.D., Kay, C.M. and Hodges, R.S. 1994. Protein denaturation with guanidine hydrochloride or urea provides a different estimate of stability depending on the contributions of electrostatic interactions. *Protein Sci*, **3**, 1984-1991.

44. Reisser, W. 1993. Viruses and virus-like particles of freshwater and marine eukaryotic algae—a review. *Arch Protistenkd*, **143**, 257-265.

45. Jeong, K.J., Choi, J.H., Yoo, W.M., Keun, K.C., Yoo, N.C., Lee, S.Y. and Sung, M.H. 2004. Constitutive production of human leptin by fed-batch

culture of recombinant rpoS- *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, **36**, 150-156.

46. Nina, Irwin., Kaaren A, Jansse. 2011. *Molecular Cloning*. chapter1, protocol 24.

47. Kado, C.I., Liu, S.T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid. *J. Bacteriol*, **145**, 1365-1373.

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

감사의 글

석사학위 논문을 마무리하며 짧게나마 감사의 마음을 표현합니다.

먼저 지도 교수님이신 김 시욱 교수님께 감사드립니다. 연구에 지칠 때마다 교수님께서 보여주시는 열정이 더 노력해야겠다는 원동력이 되었고 더욱 책임감을 갖고 임할 수 있었던 것 같습니다. 바쁘신 와중에도 학위논문 심사 및 지도를 해주신 이 인화 교수님과 박 윤경 교수님 감사합니다. 박 윤경 교수님께서 해주신 말씀 잊지 않고 열심히 하겠습니다. 많은 격려와 위로가 되었습니다. 그리고 김 원덕 박사님, 고 영중 박사님과 즐겁게 임할 수 있게 해주셨던 김평일 박사님께도 감사의 마음을 전합니다. 일년 반 동안 꾸준히 옆에서 하나하나 가르쳐 주시면서도 스스로 생각하고 고민할 수 있도록 도와주셨던 김 현주 박사님께 감사드립니다. 이년 반 동안 언제나 왜 안될까를 생각해야 했던 저에게 묵묵히 또는 다독이며 이해해주시는 박사님 덕분에 꾸준히 해나갈 수 있었습니다.

조 재훈 선배님을 비롯하여 격려해주신 연구실 선배님들 감사합니다. 목표를 두고 연구 중인 학생들도 노력하는 만큼 성과가 있었으면 좋겠고 앞으로도 멋진 연구원이 되어있을 것 같은 것 같은 근호오빠, 귀환오빠 감사드립니다. 많은 힘이 되 준 오 유미 언니도 고맙고 끝까지 힘내라며 응원해준 사라와 지은이, 민아, 보미, 여미, 정병, 준크, 진호에게도 고맙다고 전하고 싶습니다. 옆에서 많은 힘이 되었습니다. 마지막으로 가장 큰 위로가 되었던 언니 그리고 표현은 못하시지만 안쓰러워 하시면서도 묵묵히 기다려주신 부모님 감사합니다.

서면으로나마 감사의 마음을 표현할 수 있어서 다행입니다. 결과에 상관없이 기쁜 마음으로 감사의 글을 쓸 수 있는걸 보니 이년 반이라는 시간을 헛되이 보내지는 않은 것 같습니다. 오롯이 노력한 만큼 돌아올 거라는 생각 하나로 석사과정을 보내면서 분명히 스스로에게도 어떤 경험이 되었을 것이고 후에 그것이 좋은 경험으로 남을 수 있도록 책임감을 갖고 노력하는 연구원이 되고 싶습니다.

모두 감사합니다.

저작물 이용 허락서

학 과	환경공학과	학 번	20117087	과 정	석사
성 명	한글 오혜경	한문 吳 漣 京	영문 Oh Hye Gyung		
주 소	광주광역시 북구 동림동 우미아파트 26-1번지				
연락처	e-mail : bravomylife3 @ gmail.com				
논문제목	HcRNAV109 virus like particle의 자가조립 및 숙주 특이적 살조능을 이용한 유해 미세조류 <i>Heterocapsa circularisquama</i> 의 제어				
	Self assembly of HcRNAV109 and controlling of harmful microalgae, <i>Heterocapsa circularisquama</i> , by utilizing the host specific algicidal activity				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 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 편집과 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 3 개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1 개월 이내에 대학에 이를 통보함
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함

동의여부 : 동의() 반대(○)

2013 년 6 월

저작자 : 오혜경 (인)

조선대학교 총장 귀하