

발간등록번호

11-1543000-000659-01

효모 표면발현 및 분비 시스템을  
활용한 재조합 백신 생산 기반  
기술 개발

(Recombinant vaccine production by  
yeast expression platform technology)

한국생명공학연구원

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “효모 표면발현 및 분비 시스템을 활용한 재조합 백신 생산 기반기술 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014 년 10 월 22 일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 최 의 성

세부연구책임자 : 안 정 오

연 구 원 : 박 경 민

연 구 원 : 서 성 화

연 구 원 : 박 선 주

협동연구기관명 : (주)중앙백신연구소

협동연구책임자 : 유 성 식

# 요 약 문

## I. 제 목

효모 표면발현 및 분비 시스템을 활용한 백신 생산 기반기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

표면항원 백신 후보 유전자를 손쉽게 스크리닝 할 수 있는 signal trap 기술과 효모 고효율 발현시스템 기반기술을 활용하여 돈단독 및 돼지 쉰코바이러스에 대한 재조합 백신 발현기술을 개발하고 발효배양, 분리정제 공정 최적화 및 동물실험을 통한 평가를 통하여 고유한 고효율 백신 생산 기술을 확립함.

## III. 연구개발 내용 및 범위

돈단독 유발균 *Erysipelothrix* 균주를 대상으로 signal trap 기술을 사용하여 항원 백신 후보 유전자를 스크리닝하며 기존항원 SpaA의 면역원성을 증진시킬 수 있는 방법을 개발함. 전통적으로 재조합단백질 생산에 가장 많이 사용되어 온 효모 *Saccharomyces cerevisiae* 균주 및 발현율이 매우 우수한 새로운 효모균주 *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris* 균주를 활용하여 돈단독 및 돼지 쉰코바이러스 항원을 발현 시키고 전세포 (whole cell) 백신 개발을 시도함. 재조합 효모의 유전자 발현 최적화, 효모균주 발효배양 최적화 및 백신 분리정제 공정 최적화, VLP 형성 여부 등 생화학적 특성 평가 및 동물실험을 통한 백신 안전성 및 효능성을 평가.

## IV. 연구개발결과

돈단독 백신 개발을 위하여 signal trap 기술을 사용하여 *Erysipelothrix* 균주의 신규 항원을 스크리닝 하고 면역원성이 우수한 기존 항원 SpaA를 고정화하여 백신 효능을 증진 시키는 기술을 개발하고 국내 특허를 출원하였음. 돼지 쉰코바이러스 백신의 경우 capsid protein을 발현하는 재조합 효모 *Saccharomyces cerevisiae* 균주를 구축하여 세포내에서 면역원성에 중요한 virus-like particle을 효율적으로 형성함을 확인하였고 전세포를 백신으로 사용하는 새로운 기술을 개발하여 PCT 특허를 출원하였고 참여기업에 기술이전 하였음.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

돼지 쉰코바이러스 항원 단백질을 발현하는 재조합 효모 전세포를 백신으로 사용하는 새로운 기술을 개발하여 PCT 특허를 출원하였고 참여기업에 기술이전 하였으며 추후 임상시험을 수행하여 상품화를 진행할 계획임.

## SUMMARY

### **Title : Recombinant vaccine production by yeast expression platform technology**

The vaccine candidate genes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* were screened by signal trap methods. SpaA gene coding for a highly immunogenic surface protein of *Erysipelothrix rhusiopathiae* was expressed as a fusion protein with CBD (cellulose binding domain) in *Escherichia coli* and the protein was immobilized in cellulose containing matrix resulting in improved vaccine efficacy in an animal experiment. This technology was filed as a patent.

The capsid protein of porcine circovirus type 2 encoded by ORF2 was expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. The recombinant capsid protein was found to form virus-like particle, which is considered to be very important for proper immunogenicity. The recombinant capsid protein tended to aggregate during the isolation and purification procedures. Several different forms of the recombinant capsid protein including cell free extract and whole cell were scored for vaccine efficacy in animal experiments using guinea pigs and pigs. The recombinant whole cell expressing the capsid VLP was the most potent as a vaccine. International patent application was filed for this technology and the technology was licensed to the ChoongAng Vaccine Lab.. After further animal experiments with a larger scale, the technology is planned to be commercialized.

CONTENTS  
(영 문 목 차)

Chapter 1. Summary ..... 7

Chapter 2. State of the Art Report ..... 11

Chapter 3. Results ..... 14

Chapter 4. Attainment of Objectives ..... 116

Chapter 5. Achievements of Perspectives ..... 119

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	7
제 1 절	연구개발의 필요성 .....	7
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	11
제 1 절	돈단독 백신 .....	11
제 2 절	PCV-2 백신 .....	12
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	14
제 1 절	1차년도 연구결과 .....	14
제 2 절	2차년도 연구결과 .....	40
제 3 절	3차년도 연구결과 .....	70
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	116
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	119
제 1 절	연구개발 성과 .....	119
제 2 절	성과활용계획 .....	121

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

\* 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술

## 제 1 절 연구개발의 필요성

### 1. 백신 개발의 중요성

- 병원성 세균에 의한 동물 질병을 예방, 치료하는데 있어 대두되고 있는 **항생제 남용을 방지할 수 있는 가장 효율적인 대안이 백신**이라고 할 수 있으며 또한 최근 창궐하고 있는 **바이러스 질병을 예방할 수 있는 효율적인 백신** 개발도 시급히 요구되고 있다.
- 동물용 백신은 예방이 가능한 질병의 99%까지 발병률을 줄일 수 있는 비용 대비 효과가 가장 큰 의약품으로서 동물의 항생제 남용에 대한 국제적인 규제로 날로 그 중요도가 증가하고 있는 제약부문이다. 동물용 의약품 시장은 유럽, 북미, 남미, 그 외 시장 등으로 나눌 수 있으며 동물용 백신 시장은 그 중 24%를 차지하고 있다 (표 1 참조).
- 동물용 생물학적 제제 제품은 대상에 따라 porcine(돼지), bovine(소), poultry(닭), ovine(양), equine(말), 기타 백신 등으로 구분할 수 있으며 porcine(돼지), bovine(소), poultry(닭) 백신이 매년 증가하고 있는 추세이다 (표 2 참조).

표 1. 세계 동물약품 시장 분포 (2006E)

동물약품	시장 (%)
Parasiticides	29
<b>Vaccines</b>	<b>24</b>
Anti-infectives	16
Medicinal feed additives	13
Other pharmaceuticals	18
Total	100

Veterinary vaccines, Global industry analysts, Inc. 2010

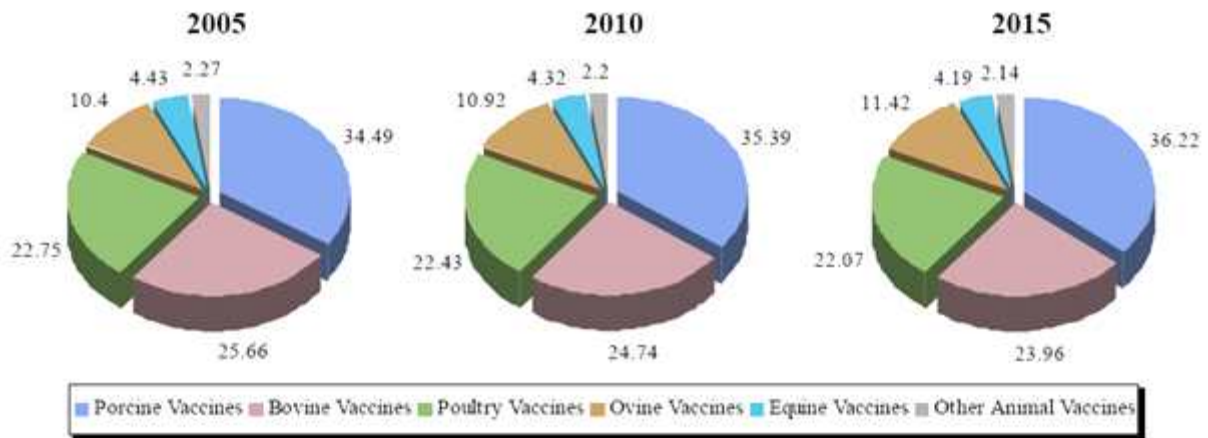


표 2. 동물백신시장

TABLE 23: World 11-Year Perspective for Livestock Vaccines by Product Segment – Percentage Breakdown of Dollar Sales for Porcine Vaccines, Bovine Vaccines, Poultry Vaccines, Ovine Vaccines, Equine Vaccines and Other Animal Vaccines Markets for Years 2005, 2010 & 2015

Product Segment	2005	2010	2015
Porcine Vaccines	34.49	35.39	36.22
Bovine Vaccines	25.66	24.74	23.96
Poultry Vaccines	22.75	22.43	22.07
Ovine Vaccines	10.40	10.92	11.42
Equine Vaccines	4.43	4.32	4.19
Other Animal Vaccines	2.27	2.20	2.14
<b>Total</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>

Data is reported at the Manufacturer's Level.



Veterinary vaccines, Global industry analysts, Inc. 2010

- 표 2에서 보여 주듯이, 양돈계가 가장 큰 동물백신시장을 형성하고 있다. 특히, 양돈업은 가장 큰 약재인 국제 곡물가격상승으로 인하여 생산비가 대폭 증가하였다. 따라서, 현재와 같은 고곡물가 시대에서는 사료 허실을 줄이고 효율을 극대화하는 것이 최선의 방법이다. 효율을 극대화하는 방안 중에 만성 소모성 질환에 의한 돼지의 높은 폐사율이나 유산을 감소하기 위한 효율적인 질병근절을 위해, 다양한 질병에 대한 면역자극효과가 뛰어나고 부작용이 적은 효과적인 백신개발이 절실히 필요한 실정이다.
- 본 연구에서는 양돈업계에서 시급히 필요로 하는 백신 중 현재 참여기업에서 전략적으로 개발하고자 하는 돼지 쉼코바이러스 관련질병 및 돈단독에 효과적인 서브유닛 백신을 개발하고자 한다. 이는 국내 동물용 백신 시장의 60% 이상을 차지하고 있는 다국적 기업들의 제품들과 비교하여 경쟁력 우위에 있는 제품을 출시하여 수입대체효과와

동남아 수출의 발판을 마련하게 될 것이다. 각 질병의 특징을 아래에 요약하였다.

### ○ 돼지 썩코바이러스관련 질병 (PCVAD)

- 1997년 국내 첫 발병 보고
- 2007년 연간 약 600만두 폐사, 양돈농가 약 2조원 손실 (한국농촌경제연구원)
- 2008년 백신 접종 : 베링거인겔하임 80%이상 점유
- 2010년 국내 돼지 썩코바이러스 백신 시장은 약 140억원
- 기술적으로 가장 우위에 있는 기업은 프랑스의 메리알로 PCV관련 많은 특허를 출원 등록한 상태이며, 베링거의 경우에는 Baculovirus에 ORF2를 발현하여 재조합단백질을 이용한 백신(Ciroflex<sup>®</sup>)을 상품화
- 포트닷지는 PCV-1 바이러스에 PCV-2의 ORF2을 발현하여 Chimera vaccine을 개발하였으며, 자돈에 2 ml 1회 접종 적용방법으로 상품화

### ○ 돈단독 (SE)

- **돈단독**은 돼지의 특수한 질병으로, *Erysipelothrix rhusiopathiae*에 의해 발병하며 급사, 파행, 다이아몬드 형태의 피부 병변을 일으키는 것으로 알려져 있음. 또한, 이 병의 급성형은 높은 사망율을 가져오며, 임신기간 중 언제든지 유산을 일으킴
- 이러한 돈단독은 1878년 코호가 폐혈증을 일으킨 생쥐에서 세균을 분리해 냄으로써 처음으로 질병의 실체가 밝혀져 1927년 미국의 South Dakota에서 심각한 발병이 보고되었음. 1937년에는 28개주에 발병을 일으켜 이 시기부터 경제적으로 중요한 질병으로 인식
- *E. rhusiopathiae* 는 돼지, 면양, 어린 양, 소, 오리, 칠면조, 인간을 비롯한 50종 이상의 척추동물과 무척추동물에서 병원성을 나타내는 그람-양성 세균임
- 국내 항생제 사용 규제에 의한 세균성 질환 우려로 백신 사용 증대가 예상됨

## 2. 서브유닛 백신 개발의 필요성

- 기존의 병원성 균주 자체를 이용하는 불활화 균체 백신(inactivated bacterin vaccine)의 경우 제조공정상 불필요한 균체조각(debris)이나 내독소 등이 포함된 상태로 접종시 발열, 통증 및 쇼크 등의 부작용을 일으키며, 병원성 균주의 확보의 어려움 (병원성 균주 배양시 고가의 배지 사용) 등 문제점을 가지고 있다.
- 병원균의 감염 및 임상증상의 전개와 관련한 병원성인자 (Pathogenic factors: 균체, 독소, 필러스, 협막 및 외막단백 등)만을 유전자 재조합 기술을 이용하여, 병원체가 아닌 다른 미생물로부터 생산 및 분리 정제하여, 백신의 구성항원으로 사용하는 차세대 재조합 서브유닛 백신 기술 (그림 1 참조)을 중점적으로 개발할 필요가 있으며 국내 고유한 유전공학 기술을 이용한 서브유닛 백신 개발로 국외 다국적기업과의 경쟁력을 확보할 필요가 있다.

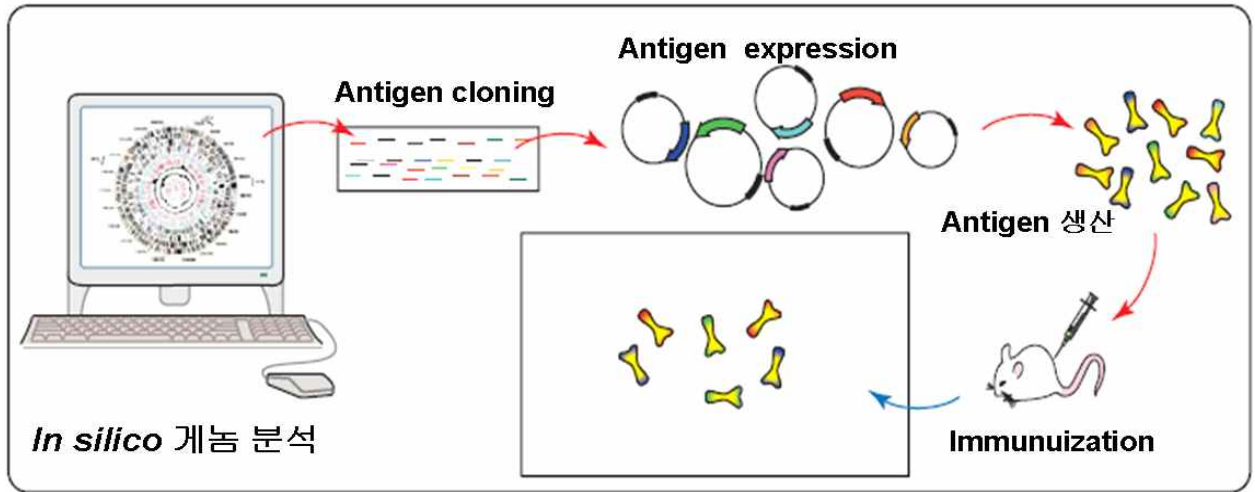


그림 1. 재조합 서브유닛 백신 기술

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절. 돈단독 백신

#### 1. 국내 기술 동향 및 수준

- *E. rhusiopathiae* 의 병원성인자로는, 병원성 균주의 부착 및 호스트균주로의 침투에 관여하는 Neuraminidase, 병원성은 적지만 capsule의 생산과 관계가 있는 **hyaluronidase, 표면단백질인 SpaA와 capsule**이 알려져 있다. 국내시장에 출시된 제품을 통해 국내 관련 기술을 분석해 보면, 국내 동물용 백신 회사에서는 현재 고전적인 방법으로 돈단독 균주만을 이용한 백신을 생산하고 있는 실정이다. 즉, 병원성균주인 *E. rhusiopathiae* 의 생균 또는 사균이 포함된 백신을 처녀돈 또는 경산돈에 접종하고 있다. 이러한 백신은 *E. rhusiopathiae*을 동물의 혈청이 첨가된 배지에서 배양하여 제조하고 있으나 배양된 균수가 적어 생산성이 낮으며, 값비싼 혈청의 사용으로 생산단가가 매우 높은 문제가 있다. 더불어, 세포자체를 항원으로 사용하기 때문에, 방어면역에 관련된 항원이외에 불필요한 다른 항원이 포함되어 면역반응을 저하시키거나 부작용을 일으킬 수 있다.

#### 2. 국외 기술 동향 및 수준

- 현재 국내 시장에 진출한 화이자, 인터벳과 같은 다국적 기업들의 관련 백신을 분석해 보면 돈단독질병예방을 위해, 필요항원만 발현 정제한 차세대 백신기술을 이용한 제품을 출시하여 50% 이상의 국내 시장 점유율을 올리고 있다.

제품명	제 조 사	2007년 판매액(백만원)	기술수준(항원 구성)
포실리스 2143	인터벳	1,480	- 서브유닛 백신으로 필요 항원만 발현 정제한 차세대 백신 - 국내 시장의 50% 이상을 점유
리터가드	화이자	808	
	기타	300	
소계		2,588	

돈단독 백신의 최근 국내 시장 규모는 다음 표와 같으며 참여기업이 국내기업 중 가장 높은 시장 점유율을 보이고 있으나 다국적기업의 서브유닛 백신에 대하여 열세를 보이고 있음.

#### 3. 미생물을 이용한 재조합 돈단독 백신 연구개발 동향

- 국내 시장뿐만 아니라 세계시장을 주도하고 있는 다국적 기업 (베링거인겔하임, 메리알, 인

## 돈단독 관련제품 국내시장규모(2010년)

**돼지 단독 관련 질환 백신 시장상황**

제품명	제 조 사	2010년 판매액 (백만원)	기술 수준(항원 구성)
돈열단독	중앙	1,030	◆ 국내 백신 - 고전적인 방법으로 항원 생산 - 돈단독 균주를 이용한 백신만 존재  ◆ 다국적 백신 - 서브유닛 백신으로 필요 항원만 발현 정제한 차세대 백신
돈단독, 단클	코미팜	794	
사우4, 돈단독	고려비엔피	745	
돈단독, 단클	녹수	688	
돈단독, 단클	대성	632	
기타 돈단독 관련 백신	다국적기업	420	
포실리스 2143 리터가드	다국적기업	2,081	
소계		6,390	

터벳, 화이자)의 돈단독 백신을 분석해 보면 유효 항원 단백질의 대량 발현 및 정제를 통한 제품화를 하고 있다.

- (주)중앙백신연구소는 대장균에서 발현된 돈단독 독소이드를 통해 재조합 단백질의 안전성과 유효성을 평가 확인한 바 있다 (2010. 지식경제부 지역연계기술개발사업).
- 대장균을 통한 대량 발현 방법은 이미 기 특허 등록이 되어 있기 때문에 특허 침해를 피할 수 있는 국내 유전공학 기술을 활용한 유효 항원 단백질의 대량 발현 정제 기술개발이 필요하다.

## 제 2 절. PCV-2 백신

### 1. 국내 기술 동향 및 수준

- 현재까지 국내 연구결과를 살펴보면 서울대학교의 채찬희교수 실험실에서는 돈파보 (Porcine parvo virus)와의 혼합백신을 개발하여 특허출원을 한 바 있다. 그럼에도 불구하고 백신개발이 어려운 이유는 곤충세포에서 Baculovirus에 PCV-2 ORF2 유전자를 발현하는 기술은 다국적기업들의 특허에 의하여 규제당하고 있는 실정이다. 또한 재조합 단백질의 발현과 분리 정제, 그리고 농축의 기술적 문제를 해결하고 백신개발을 하기 위하여 국내의 5개의 동물용 백신 제조업체에서도 막대한 예산을 투자하고 있다.
- (주)중앙백신연구소는 국외의 선진기술을 도입하기 위하여 해외 공동연구팀인 아이오와 주립대학 수의과대학 실험실과 돼지의 호흡기 질병의 여러 가지 원인체에 대하여 연구해 오고 있었으며, 많은 노하우가 축적되어 있는 상태에서 2006년 7월부터 미국 아이오와 대학의 윤경진 교수와 국제공동기술개발사업을 추진한 결과 여러 PCV-2 야외 분리

균주 중에서 증식성이 가장 뛰어난 Virus를 선발하고 고역가 배양기술을 확립, 안전성 및 효능 및 효과를 확인한 바 있고 PCV 전체 바이러스를 이용한 단일 백신을 특허 출원한 상태이다 (특허출원 : 10-2008-0065488 돼지 썬코바이러스 관련 질환을 예방하기 위한 PCV-2의 전체 바이러스를 포함하는 혼합백신).

## 2. 국외 기술 동향 및 수준

- 국외 기술현황을 살펴보면 기술적으로 가장 우위에 있는 기업은 프랑스의 메리알로 PCV관련 많은 특허를 출원 등록한 상태이며, 베링거의 경우에는 Baculovirus에 ORF2를 발현하여 재조합단백질을 이용한 백신(Ciroflex<sup>®</sup>)을 상품화 하였으며, 정제과정을 거쳐서 1 ml 1회 접종의 장점을 갖고 있다. 인터벳 역시 Baculovirus에 ORF2를 발현하여 재조합단백질을 이용한 백신을 개발하였으며 자돈에 3주 간격으로 2 ml 2회 접종하는 접종방법으로 설계되었다. 포트닷지는 PCV-1 바이러스에 PCV-2의 ORF2를 발현하여 Chimera vaccine을 개발하였으며, 자돈에 2 ml 1회 접종 적용방법으로 상품화 되어 있다. 이러한 상품 중에서 베링거의 Giroflex<sup>®</sup>만이 국내에서 인허가를 득하여 수입판매하고 있으며, 빠른 시간 내에 다른 제품들이 인허가를 득하리라 예상하고 있다. 위의 언급한 다국적 기업들 이외에도 동물용 백신에 관심이 있는 세계의 기업들이 PCVAD의 심각성을 인지하고 막대한 자본을 투자하여 백신을 개발한 상태이며, 보다 나은 제품을 개발하려고 연구하고 있다.

## 3. 미생물을 이용한 재조합 PCV-2 백신 연구개발 동향

- PCV-2 백신은 주로 Cap protein을 사용하여 개발되어 왔다. 대장균에서는 전체 유전자를 사용하여 발현시켰을 경우 발현율이 매우 저조하였으나 N-terminal에 위치한 NLS (nuclear localization signal) region 47개 아미노산 서열이 conformational epitope 형성에 특별히 필요하지 않은 점을 이용하여 NLS-deletion clone을 발현함으로써 발현율을 증진시키는 연구, viral protein 유전자의 rare codon을 대장균 선호 코돈으로 대체하여 발현율을 증가시키는 연구 등을 통하여 10 mg/L 수준의 생산성을 얻고 있으나 대장균에서 발현한 Cap protein은 virus-like particle (VLP)을 형성하지 않는 것으로 밝혀졌다. Insect cell에서는 VLP가 잘 형성되는 것으로 알려져 있는데 이는 VLP 형성에 NLS가 중요한 역할을 하는 것에 기인하는 것으로 추정되고 있다.
- 대장균에서 Cap protein의 NLS 존재에 의한 발현율이 저조한 단점과 NLS-deletion의 경우 VLP를 형성하지 못하는 단점을 해결하기 위하여 small ubiquitin-like modifier (SUMO)에의 융합 발현 등이 시도되고 있다.
- 효모를 이용한 발현의 경우 Cap protein 유전자를 효모 선호 코돈에 맞추어 합성한 후 *S. cerevisiae* 균주를 사용하여 재조합 발현하였을 때에 insect cell로부터 얻은 VLP와 유사한 형태를 보이는 VLP를 얻을 수 있는 것으로 보고되었다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절. 1차년도 연구결과

#### 제 1 세부과제 : 유효 항원 스크리닝 및 효모 발현 시스템 구축

##### 1. 돈단독 백신 후보 유전자 스크리닝

돈단독의 원인균인 *Erysipelothrix rhusiopathiae* 균주의 genomic DNA를 스크리닝에 사용하였다. signal trap 벡터에 사용된 유전자는 *Pseudoalteromonas atlantica* 의 beta-agarase I (AAA91888)으로, 세포외로 분비되어 agar 배지를 분해함으로써 콜로니 주변이 움푹 파이는 특성을 나타낸다. beta-agarase I의 signal sequence인 21개의 amino acid를 제거하고, promoter가 없는 YEGa-HIR525에 클로닝하여 plasmid를 구축하였다.

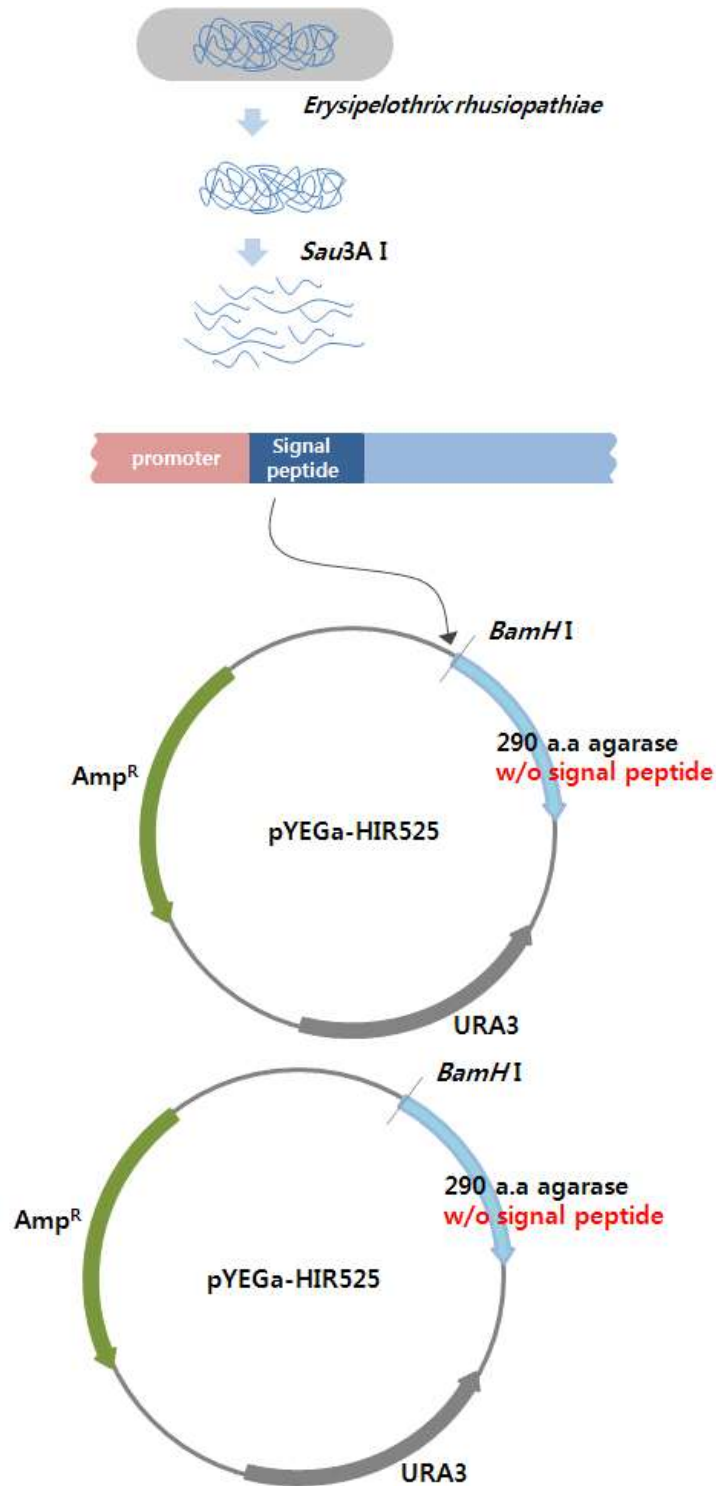
*E. rhusiopathiae* 균주의 genomic DNA를 *Sau3AI*으로 절단하고, 단편들을 agarase의 N 말단에 클로닝 하였다. 클로닝된 단편이 외부로 분비되거나 세포막에 존재하는 유전자의 promoter와 signal sequence를 포함한다면 agarase가 발현된 후 세포외로 분비되어 콜로니 주변이 함몰되는 것을 관찰할 수 있을 것이므로 이를 이용하여 분비되는 단백질을 선별하였다.

##### 가. Signal trap 벡터구축

클로닝에 사용한 primer는 아래와 같고, 제한효소로 절단된 genomic DNA가 어떤 reading frame으로도 발현이 될 수 있도록 agarase는 3가지 reading frame으로 클로닝 하였다.

Primer	Sequence (5'→3') <sup>a</sup>
290-Fr1-BamH1	agtcggatccgctgattggagctcttttagtatt
290-Fr2-BamH1	cagtggatccagctgattggagctcttttagtatt
290-Fr3-BamH1	tcagggatcccagctgattggagctcttttagtatt
290-R-SalI	tttgtcgacttactgggctttataaactcgtatccaatc

증폭된 agarase는 제한효소 *BamHI*과 *SalI*을 이용하여 벡터에 클로닝 하였고 구축된 벡터는 다음과 같다.



#### 나. 백신후보 스크리닝

*E. rhusiopathiae* 균주의 genomic DNA는 Wizard Genomic DNA Purification Kit (promega)를 이용하여 추출하고 *Sau3A I*으로 절단하였다. 절단된 단편은 promoter와 signal sequence를 모두 포함하고 있어야 하기 때문에 전기영동을 하여 약 200 bp - 1 kbp의 DNA 부분만을 잘라 gel extraction 하였다. 이 단편을 *BamHI*으로 자르고 CIAP를 처리한



signal trap 벡터에 클로닝 하고, 37°C에서 overnight으로 배양하여 콜로니 주변의 agar가 분해되어 함몰된 형질전환체를 선별하였다. 선별된 균을 배양하여 plasmid를 prep하고 클로닝된 단편의 염기서열을 분석하였다.

염기서열은 Blast를 통해 어떤 유전자가 클로닝 되었는지를 확인하고, SignalP 3.0으로 signal sequence의 유무를 살펴보았다. 그리고 PSORTb를 이용하여 발현된 protein의 세포내 localization을 예측하였다.

**Blast : genomic Blast with *Erysipelothrix rhusiopathiae* ATCC 19414**  
**Signal peptide prediction : SignalP 3.0**  
**Subcellular location prediction : PSORTb**

Protein	Cloning된 gDNA size	Signal peptide	Predicted subcellular location	Reliability score(s)	Blast	Identities
290Fr2_200~500	375bp	+	Extracellular	9.13	hypothetical cytosolic protein (600bp)	-181~192bp 100%
290Fr2_200~500	429bp	+	Extracellular	9.13	hypothetical protein (582bp)	-173~254bp 100%
290Fr2_500~1kb	681bp	+	CytoplasmicMembrane/ Extracellular	2.35/6.80	small conductance mechanosensitive ion channel (MscS) family transporter (816bp)	-130~550bp 100%
290Fr2_500~1kb	425bp	+	Extracellular	9.13	hypothetical protein (711bp)	-208~215bp 100%
290Fr3_500~1kb	847bp	+	Cell wall	9.52	sialidase A (Neuraminidase A) (3615bp)	-613~233bp 100%
290Fr3_500~1kb	932bp	+	Cytoplasmic /Extracellular	5.86/3.83	pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein (1698bp)	(-373, 559bp) 100%
290Fr1_500~1kb	657bp	+	CytoplasmicMembrane/ Extracellular	2.35/6.80	general glycosylation pathway protein (624bp)	(-381, 276bp) 100%

선별된 유전자는 7가지로 예측 프로그램을 사용하여 분석한 결과, 모두 signal sequence를 가지고 세포외로 분비되거나 세포막에 위치하는 단백질인 것으로 보인다. 이들이 항원단백질로써 항원성을 가지는지는 연구가 더 필요하지만, *P. atlantica*의 beta-agarase I을 이용한 signal trap 방법이 signal sequence를 가지는 단백질을 스크리닝 하는데 유용하게 사용될 수 있다는 것을 입증하였다.

## 2. PCV 백신 후보 유전자 ORF2 발현 카세트 제조

### 가. ORF2의 염기서열 최적화

Porcine circo virus의 capsid protein인 ORF2의 효모발현을 위해 codon을 *Saccharomyces cerevisiae*의 선호 codon으로 최적화하여 Bioneer사에 합성을 의뢰하였다. 합성된 유전자의 염기서열은 다음과 같다.

```
ATGACATATCCGCGTAGACGTTACAGAAGACGTAGACACAGACCAAGGTCGCATCTGGGCCAAATCCTACGCCGAAGACCTTGGCTTGTACAC
CCCAGACACAGATACAGATGGCGTAGGAAGAATGGAATATCAACACTAGACTATCAAGGACATTCGGATACACAATAAACGGACTACTGTG
AAAACGCCCTCTGGGCTGTTGATATGATGAGGTTTAATAATAAATGACTTCTACCCCGAGTGGAGGTTCTAACCAAGAAGTGTCCATTT
```

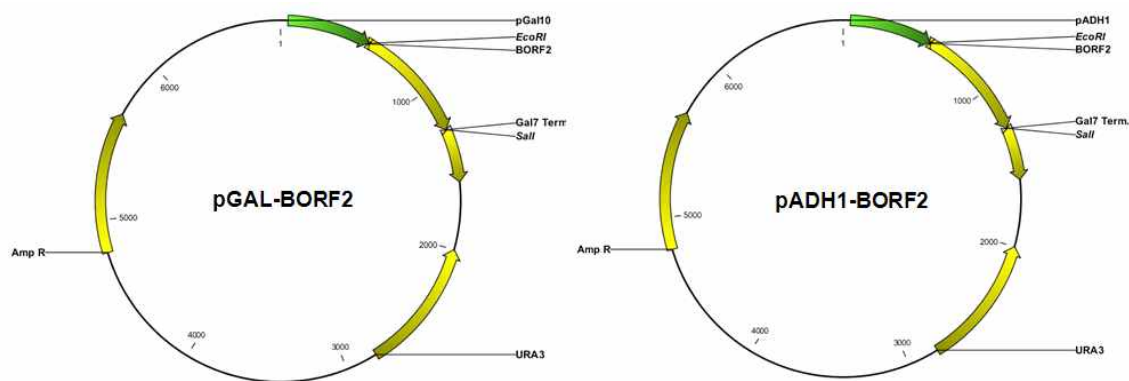
GAGTATTATAGAATTAGAAAAGTCAAGGTTGAGTTCTGGCCTTGTTCCTCCCAATAACGCAAGGAGATAGAGGTGTGGGTTCTTCTGCTGTAATT  
 TTGACGACAACCTTTGTCACTAAGGCCACAGCTCTCACTTATGACCCTTATGTTAACTACTCCTCAAGACATACTATCACTCAGCCATTTTCT  
 TACCATAGCAGATATTTACCCCAAAGCCTGTCTTAGACTCCACTATTGATTACTTTCAGCCTAATAATAAAAGAAATCAACTTTGGCTGCGA  
 TTGCAAACCACTGGTAATGTTGACCATGTTGGGTTGGGTACCGCATTTGAAAACCTCTATATACGATCAAGAATACAACATTAGGGTTACAATG  
 TATGTTTCAGTTCAGAGAATTAATTTAAAAGATCCACCTTTGAACCCTTAG

#### 나. ORF2 발현 확인을 위한 His tagging

합성된 유전자가 대장균과 효모에서 발현되는 것을 확인하기 위해서 pYEGa-HIR525의 GAL10, ADH1 promoter 뒤에 제한효소 *EcoRI*과 *SalI* site를 이용하여 클로닝 하였다. C-말단에 Histidine 6개를 첨가하였고, 유전자 증폭에 사용한 primer 서열은 다음과 같다.

EcoRI-PCV2-F	AATT GAATTC AAAAATGACATATCCGCGTAGACGT
SalI-His-ORF2-R	TAT GTCGAC <u>CTAGTGATGGTGATGGTGATG</u> AGGGTTCAAA GGTGGATCT

증폭된 유전자와 벡터는 제한효소 처리 후 대장균에 클로닝하여 염기서열을 확인하였으며, LiAc 방법을 이용하여 *Saccharomyces cerevisiae* 2805(Y2805) 균주에 형질전환 하였다. Uracil이 없는 배지(yeast nitrogen base 6.7 g/L, Ura drop out supplement 0.77 g/L, dextrose 20 g/L)에서 배양하여 형질전환체를 선별하고 PCR을 통해 목표유전자의 존재를 확인하였다. 아래는 구축된 plasmid map이다.

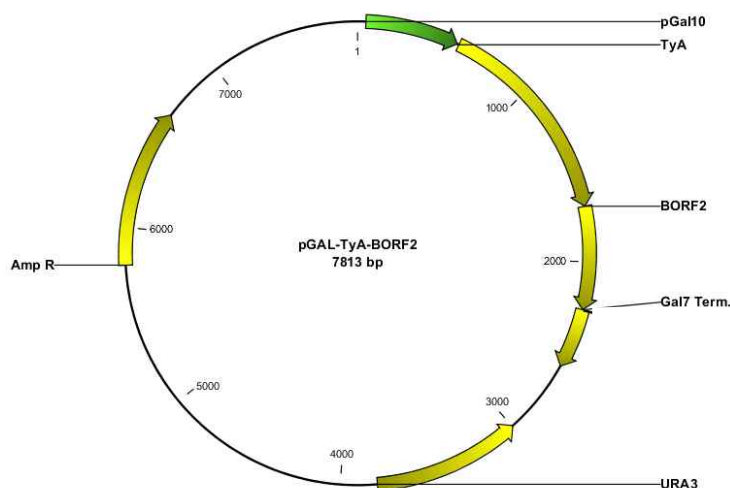


#### 다. TyA-ORF2 융합발현

TyA는 *Saccharomyces cerevisiae*의 transposable element로 과발현되는 경우 virus like particle(VLP)을 형성하는 것으로 알려져 있다. 그래서 ORF2의 VLP형성을 도와 줄 것으로 예상하고 TyA와 nuclear localization signal(NLS)을 제거한 ORF2를 융합발현 하였다.

Y2805 유래의 TyA와 NLS를 제거한 ORF2를 각각 PCR로 증폭한 뒤 overlap PCR을 통해서 두 fragment를 연결시켰다. PCR에 사용한 primer는 아래 표와 같고, YEGa-HIR525의 *EcoRI*, *SaI* site에 클로닝하였다. 구축된 plasmid는 위와 동일한 방법으로 Y2805에 형질전환하였다.

Ty1-F	atta gaattc aaaa atggaatcccaacaattatctc
Ty1-R	tttggttgatttcgtatagcgc
Ty1-PCV2	gcgctatacgaatacaacacaaa AGACTATCAAGGACATTCGGATAC
SaII-ORF2-R	aatt gtcgac CTAAGGGTTCAAAGGTGGATC

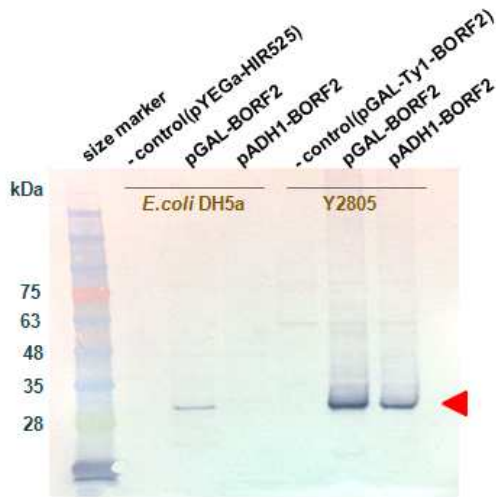


## 라. Western blot을 통한 발현확인

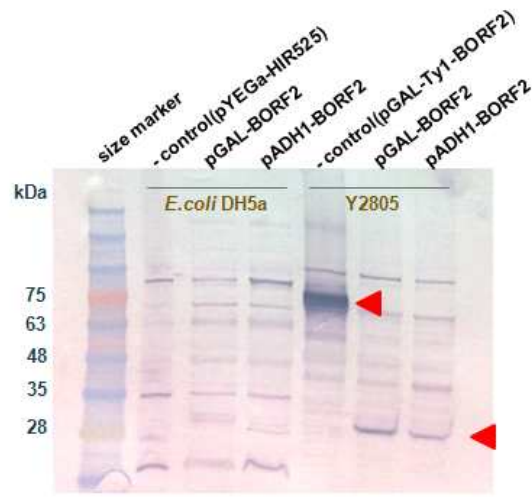
위에서 구축한 각각의 플라스미드를 가지는 재조합 대장균과 재조합 효모들에서 BORF2의 발현을 조사하였다.

형질전환된 대장균은 LB 배지에 접종하여 37°C에서 16시간 배양하였고, pGAL promoter를 가진 Y2805는 YPDG(yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, dextrose 10 g/L, galactose 10 g/L), pADH1-ORF2는 YPD(dextrose 20 g/L)에 접종하여 30°C에서 48시간 배양하였다. 배양한 cell은 centrifugation을 통해 회수하고, STES buffer(0.5 M NaCl, 0.2 M Tris-HCl pH7.6, 0.01 M EDTA, 1% SDS) buffer와 glass bead를 넣어 vortexing하여 파쇄하였다. centrifugation하여 상등액을 취한 후 SDS loading buffer를 첨가하여 5분간 끓이고, 4-20% gradient gel로 PAGE를 실시하였다. nitrocellulose membrane에 transfer하고, ORF2의 detection을 위해 anti-His antibody와 기니피그에서 만들어진 anti-ORF2 polyclonal antibody를 사용하였다. 그리고 alkaline phosphatase가 결합된 2차 antibody처리한 후, BCIP/NBT substrate solution을 이용하여 발색하였다.

[anti-his antibody]



[anti-ORF2 polyclonal antibody]



대장균의 경우 GAL10 promoter를 사용하는 경우 ORF2가 약하게 발현되는 것이 확인되었지만, ADH1의 경우는 발현이 되지 않았다. 반면, Y2805에서는 두 경우 모두 ORF2가 발현되었고 GAL10 promoter가 ADH1 promoter보다 발현양이 많은 것을 관찰할 수 있다. 그리고 TyA와 융합발현한 ORF2 역시 상당한 양이 발현되는 것을 확인하였다.

#### 마. Cellulose binding domain과 ORF2의 융합발현

Cellulose binding domain (CBD)는 다른 단백질과 융합발현 하였을 때 세포내에서 불용성의 particle을 형성할 수 있는 것으로 알려져 있어 이를 이용하여 virus-like particle과 유사한 기능을 기대하고 BORF2와 CBD와의 융합발현을 시도하였다,

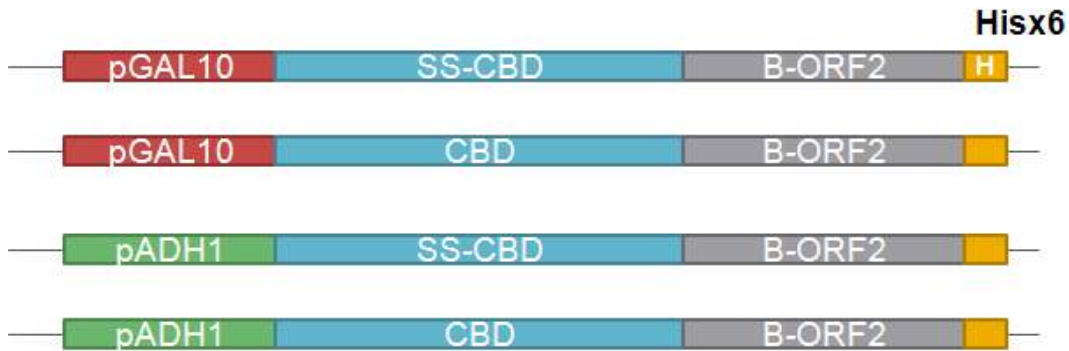
##### (1) CBD-ORF2 클로닝

CBD-ORF2 클로닝에 쓰인 primer는 다음과 같다.

ssCBD-EcoRI-F	aatt GAATTCATGATGGTTGCATG
CBD-EcoRI-F	aatt GAATTC ATGCAACAGACAGTCTGGGGTCA
CBD-R	AGAAGAAGGAGGTGGAGTAGC
CBD-BORF2	GCTACTCCACCTCCTTCTTCTAGACTATCAAGGACATTCG GATAC
SalI-ORF2-R	aatt gtcgac CTAAGGGTTCAAAGGTGGATC

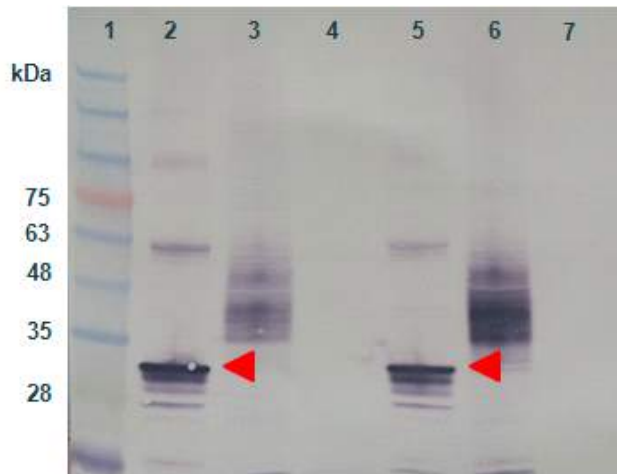
$\alpha$ -amylase의 signal sequence를 가짐으로써 세포 외로 분비되는 경우와 그렇지 않은 경

우로 융합발현을 시도하였다. CBD와 ORF2를 각각 증폭시킨 후 overlap PCR로 연결시키고, YEGa-HIR525의 *EcoRI*, *SaI* site에 클로닝 하였다. 구축된 plasmid는 위에서 언급한 방법으로 Y2805에 형질전환하였다.



## (2) Western blot을 통한 발현확인

GAL10 promoter를 가지는 경우는 YPDG, ADH1 promoter를 가지는 경우는 YPD에 접종하여 30°C에서 48시간 배양하였고 signal sequence를 가지는 Y2805는 cell free extract와 아울러 배양 상등액 또한 Western blot을 실시하였다. antibody는 기니피그에서 생성된 anti-ORF2 polyclonal antibody를 사용하였다.



1. size marker
2. GAL-CBD-BORF2 , cell free ext
3. pGAL-ssCBD-BORF2 , cell free ext
- 4 pGAL-ssCBD-BORF2 , supernatant
5. ADH1-CBD-BORF2 , cell free ext
6. ADH1-ssCBD-BORF2 , cell free ext
7. ADH1-ssCBD-BORF2 , supernatant

위의 Western blot 결과를 보면, signal sequence를 가지는 경우는 세포내외에서 모두 발현이 되지 않았다. 반면 signal sequence를 가지지 않는 경우는 GAL10 promoter와 ADH1 promoter 모두 발현 되었으며, GAL10 promoter가 호모발현에 있어 더 적합한 promoter인 것으로 보였다.

## 바. Virus like particle 형성

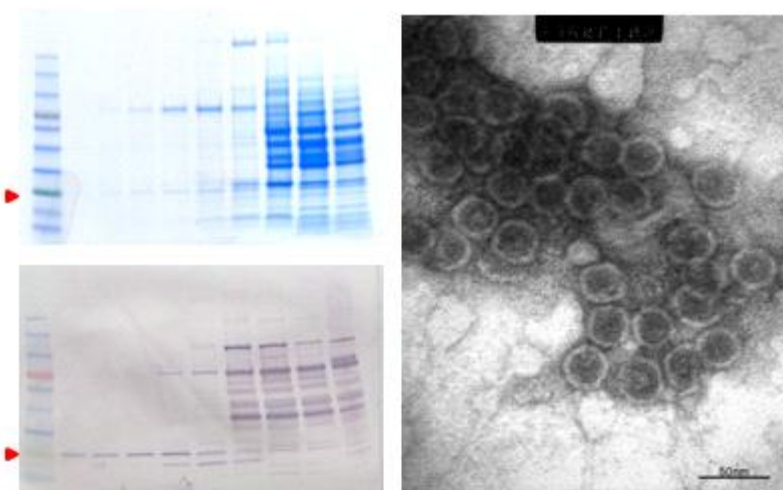
### (1) 배양 및 세포파쇄

다양하게 제조된 ORF2 발현 카세트 중에서 Western blot을 통해 호모발현이 효과적으로 잘 되는 것으로 보이는 네 가지 균주를 선별하였다. GAL-ORF2, pGAL-ORF2-His, pGAL-TyA-ORF2, pGAL-CBD-ORF2-His plasmid를 갖는 Y2805를 YPDG에서 30°C, 48시간 배양하였다. 13,000 rpm으로 10분간 원심분리 하여 cell을 회수하고, TEN buffer (10 mM Tris-HCl pH7.4, 2 mM EDTA, 140 mM NaCl)와 beads를 첨가하한 후 vortexing을 통해 cell을 파쇄 하였다. 파쇄액은 13,000rpm에서 20분간 원심분리 하여 상등액을 취하고 이를 ultracentrifugation에 사용하였다.

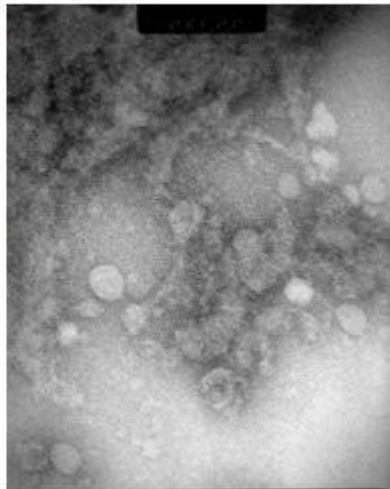
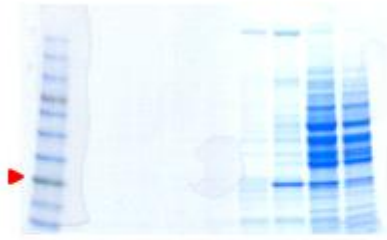
### (2) Ultracentrifugation 및 전자현미경 관찰

TEN buffer에 15, 25, 35, 45, 60% sucrose 용액을 만들고 centrifuge tube에 낮은 농도의 sucrose 용액부터 차례로 overlay하여 넣어 줌으로써 sucrose density gradient를 만든다. centrifuge tube의 상단에 위에서 준비한 cell free extract를 넣고, 36,000 rpm에서 4시간 동안 원심분리 하였다. 분리한 샘플은 1.5 ml씩 fraction을 나누고 SDS-PAGE와 Western blot을 실시하였다. 그리고 Western blot에서 ORF2의 밴드만 나타난 fraction을 모아 sucrose를 제거하고 농축하여 전자현미경으로 관찰하였다.

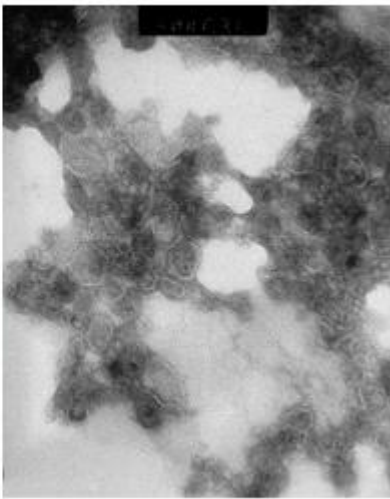
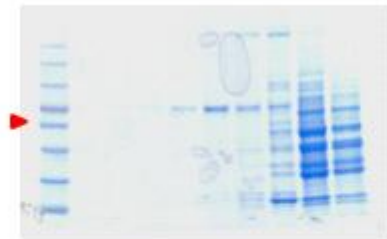
#### pGAL-BORF2



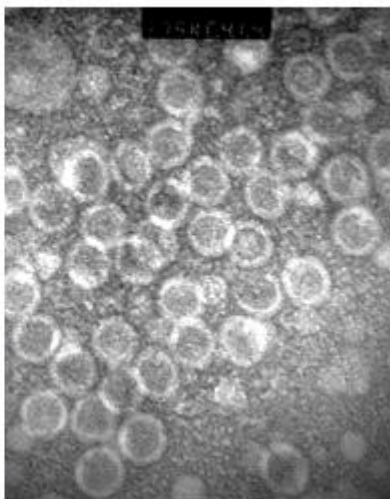
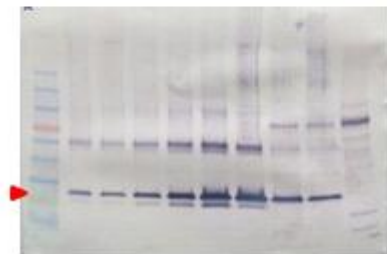
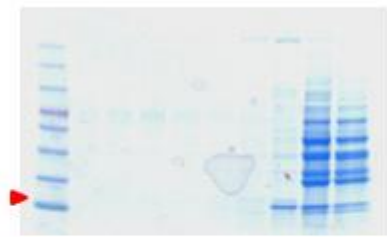
pGAL-BORF2-His



pGAL-Ty1-BORF2



pGAL-CBD-BORF2-His



위 전자현미경 사진을 보면, ORF2만 발현되는 경우 VLP가 형성되는 것을 관찰할 수 있다. 반면에 His tag이 존재하는 경우는 VLP가 형성되지 않는 것으로 보아 His tag이 VLP 형성을 방해하는 것으로 추측된다. VLP 형성에 도움을 줄 것이라 예상했던 TyA 융합발현은 VLP를 형성하지 못하였고, CBD와 융합발현한 경우는 His tag이 존재하지만 VLP를 잘 형성하는 것으로 관찰되었다.



## 제 2 세부과제 : 항원 생산 공정 개발

### 1. 실험실 규모에서의 재조합 항원 후보 단백질 생산공정 개발

가. CBD(cellulose-binding domain)을 융합파트너(fusion partner)로 사용하는 발현시스템 개발(그림 1)

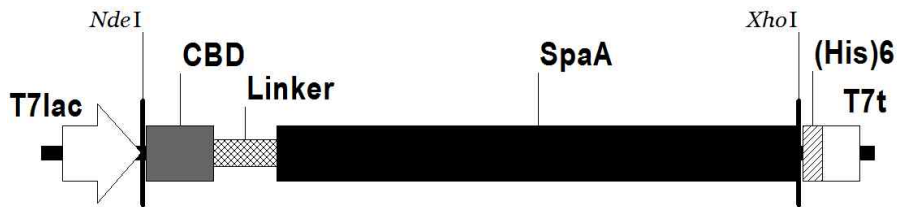
나. 항원단백질의 생산공정개발(그림 2)

-항원단백질 발현양: 세포내 총 단백질의 35.5%

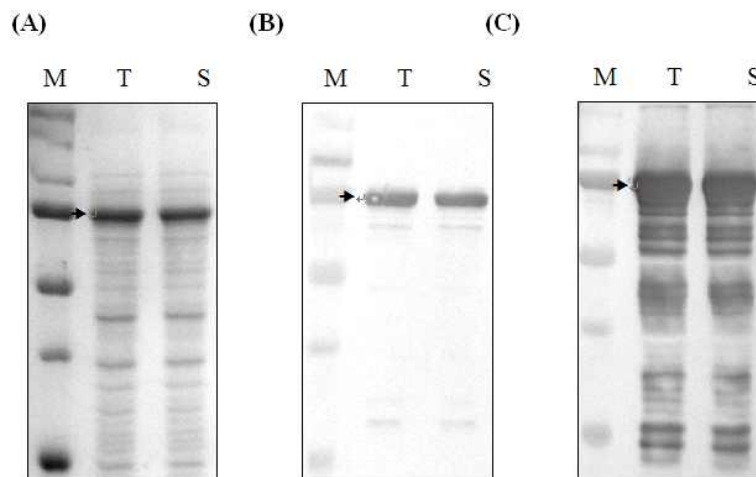
-항원단백질 발현농도: 5.325 g<sub>항원단백질</sub>/L

계산식=(30 g<sub>DCW</sub>/L(배양말기 세포농도)) \* 세포당 총단백질양 50% \* 총 단백질당 항원단백질 농도 35.5%

-항원단백질 발현형태: 수용성



**Fig. 1.** A schematic representation of the expression vector for CBD-SpaA-H6 fusion protein



**Fig. 2.** SDS-PAGE and western blot analysis of the CBD-SpaA-H6 expressed in *E.coli*BL21(*DE3*)/PKPM-CBD-SpaA-H6.

SDS-PAGE (A), Anti-histidine antibody (B), anti-serum derived from mouse inoculated with whole *S. rhusiopathiae*(C). Lane M; standard molecular weight marker, T; total cell lysates, and S;

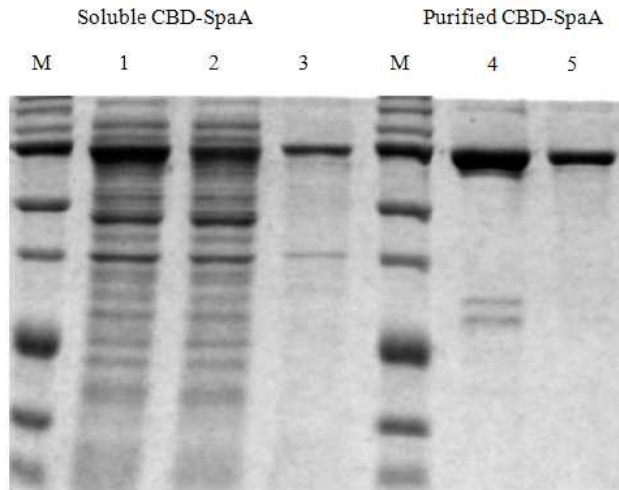
soluble fraction proteins

### 다. CBD를 affinity tag으로 사용하여 항원단백질 one-step 분리정제 공정개발

-CBD-SpaA-H6 융합단백질을 셀룰로오스 담체인 Avicel에 흡착 (그림 3 참조)

-Binding capacity of Avicel:  $1.92 \pm 0.001$  mg<sub>CBD-SpaA</sub>/g<sub>Avicel</sub>

-순도(Purity): 81%



**Fig. 3.** Immobilization of the CBD-SpaA-H6 on Avicel. Lane 1-3; soluble CBD-SpaA and lane4, 5; purified CBD-SpaA.

Lane M; stand molecular weight marker, lane1 and 4; crude CBD-SpaA, lane 2; unbound protein to Avicel, lane 3 and 5; immobilized CBD-SpaA on Avicel

### 라. 셀룰로오스 담체에 고정화된 항원단백질의 면역학적 활성 측정

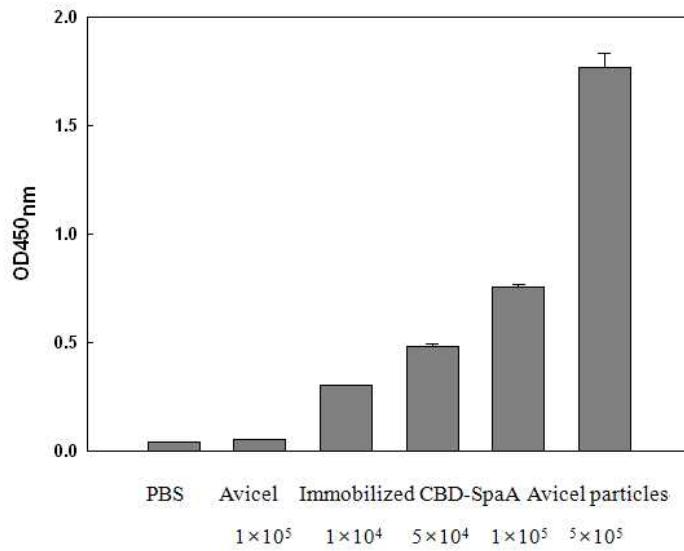
-돈단독 질병에 전염된 돼지로부터 채취한 혈청과 항원단백질의 항원항체반응 (그림 4)

-Confocal microscope로 Avicel에 고정화된 항원단백질의 면역능력여부 확인 (그림 5)

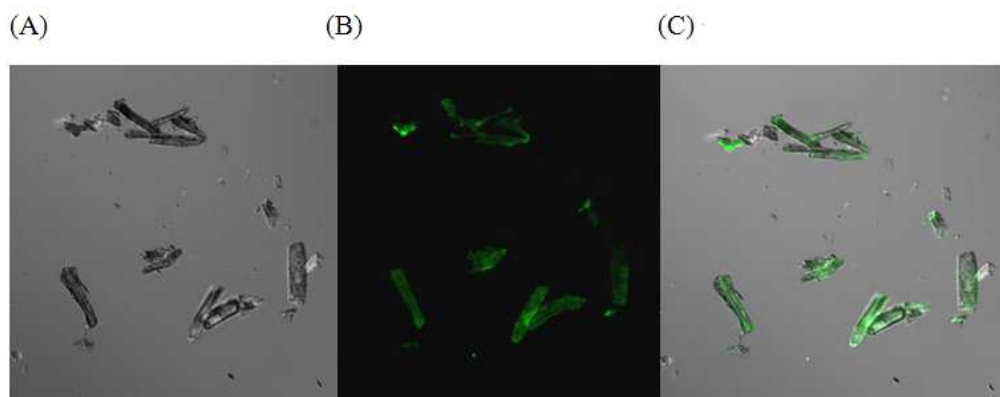
-저렴한 셀룰로오스 담체에 고정화된 항원단백질의 돈단독질병에 대한 방어능력 테스트 (그림 6)

-연구개발된 CBD를 돈단독질병예방 항원단백질인 SpaA의 발현은 종래의 기술과 비교하여 효과적인 항원고정화를 통해 항원의 안정성 및 생존율을 높여 효율적인 백신개발이 가능하였다. 이의 기술을 국내특허에 출원준비 중이다.

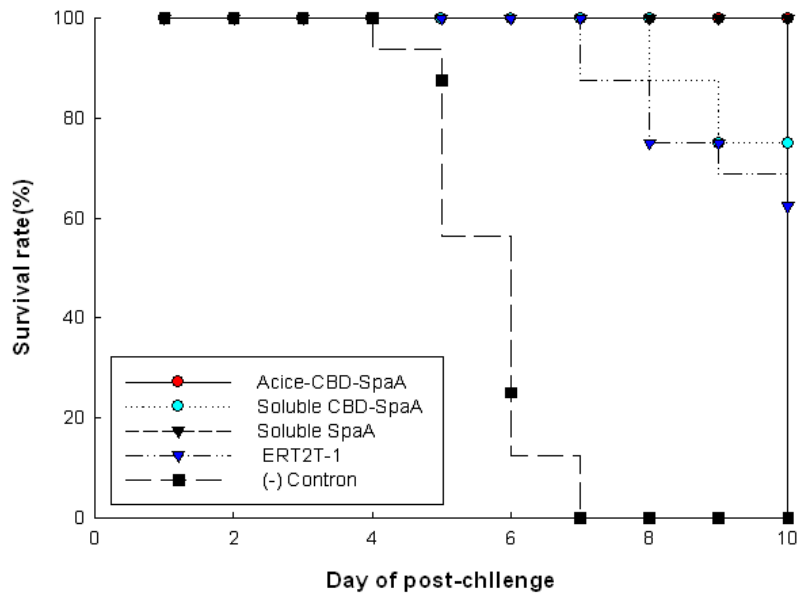
- cellulose 항원흡착 기술은 Spa와 같은 알려진 항원의 세포내 유합 발현으로서 분리정제 공정 개량 및 고정화를 통한 항원 안정성 개선의 개념이며 yeast cell surface display 기술은 분비 후 세포 표면발현의 서로 다른 개념이다.



**Fig. 4.** ELISA assay of the immobilized CBD-SpaA-H6 on Avicel.



**Fig. 5.** Confocal microscope images of the immobilized CBD-SpaA-H6 to Avicel. Purified CBD-SpaA protein was bound to Avicel and incubated with anti-Histidine antibody followed by goat anti-mouse IgG-FITC. Confocal microscope image indicates that CBD-SpaA protein was high binding affinity to Avicel. Differential interference contrast image(A), FITC fluorescence(B), and merging of the two split images(C).



**Fig. 6.** Cumulative mortality of immunized mice after challenge. Each group of mouse was immunized with immobilized CBD-SpaA on Avicel, soluble SpaA, soluble CBD-SpaA, and ERT2T-1. After 14 days, the mice were challenged with highly virulent *S. rhusiopathiae* and the survival was monitored for 10 days.

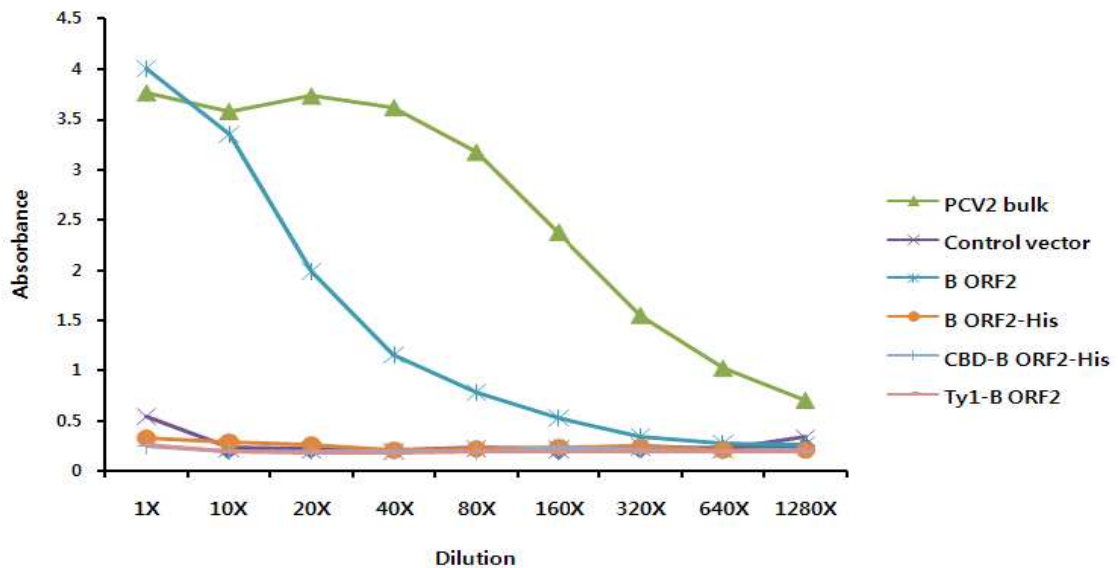
## 제 1 협동과제: 백신 효능 검정

### 1. 돼지의 돈단독 및 썬코바이러스의 재조합 항원 후보 선정

#### 가. 썬코바이러스의 항원 발현 재조합 균주 선정 및 면역원성 확인

##### (1) 재조합 PCV ORF2 항원량 결정 시험

기존의 연구 결과에 따라 돼지 썬코바이러스의 재조합 항원은 ORF2로 선정하였다. 선정된 ORF2을 효모에서 다양한 형태 (BORF2, BORF2-His, CBD-BORF2, Ty1-BORF2)로 발현하였다. 발현된 항원의 확인 및 정량을 위해서 SERELISA<sup>®</sup> PCV2 Ag Capture kit(Synbiotics)를 이용해 ELISA를 수행하였다. (주)중앙백신연구소의 돼지 썬코바이러스의 배양액( $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml)을 양성대조군으로, control vector를 음성대조군으로 사용하였다.



[Figure. 1] 재조합 PCV2 ORF2 항원 선별 ELISA 결과

ELISA 실험 결과 양성대조군으로 사용한 돼지 썬코바이러스 배양액( $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml)과 비교하였을 때 B-ORF2 발현 벡터의 발현량이 다른 그룹에 비해 현저히 많은 것을 관찰하였다.

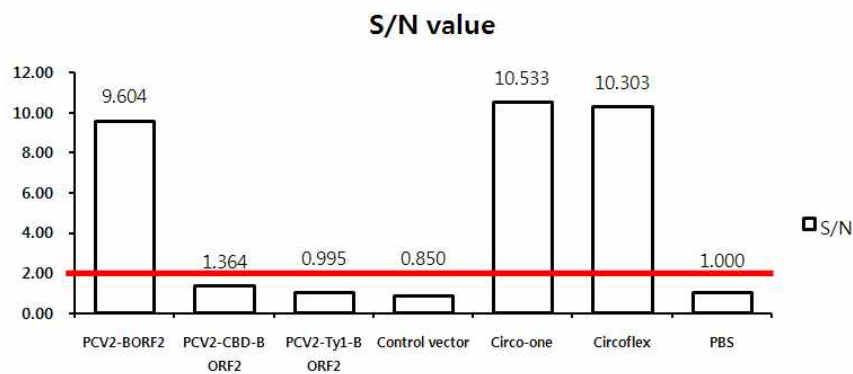
##### (2) 재조합 시험 백신 제작 및 면역원성 확인 시험

발현된 항원의 면역원성을 확인하기 위해 기너픽을 대상으로 동물 실험을 수행하였다. [Table 1]과 같이 재조합 단백질을 포함한 시험백신 4종을 제작하고 (주)중앙백신연구소의 돼지 썬코바이러스 백신 수이샷 Circo-one과 Boehringer Ingelheim사의 Circoflex를 양성대

조군으로, control vector와 PBS를 음성대조군으로 실험하였다. 각 시험 백신 그룹 당 10마리에 3주 간격으로 시험 백신을 복강에 2회 접종하였다. 2차 접종 2주 후 채혈하여 ELISA 검사 방법으로 항체가를 측정하여 면역원성을 확인하였다.

[Table. 1] 재조합 PCV 시험백신 조성

시험백신 \ 조성	1	2	3	4	5	6	7
	PCV2-BORF2	PCV2-CBD-B ORF2	PCV2-Ty1-B ORF2	Control vector	Circo-one (중양백신)	Circoflex (Boehringer)	PBS
PCV2-ORF2 (mg/ml)	16.2 ml	12.9 ml	15.3 ml	14 ml	-	-	-
백신 보조제	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	-	-	-
면역증강제	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	-	-	-
1X PBS	3.8 ml	7.1 ml	4.7 ml	6 ml	-	-	-
총 량	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml	-	-	-



[Figure. 2] 재조합 PCV2 시험백신 역가 측정 ELISA 결과

돼지 쉐코바이러스에 대한 면역형성 확인은 ELISA S/N 값이 >2.0을 초과하는 경우 양성으로 판단할 수 있다. 실험 결과 PCV2-B ORF2 시험백신은 상용화된 (주)중양백신연구소의 수이샷 Circo-one 제품과 Boehringer Ingelheim사의 Circoflex 제품과 거의 동등한 면역형성능이 있음을 확인할 수 있었다.

나. 돼지의 돈단독 재조합 항원 후보 선정 및 면역원성 확인

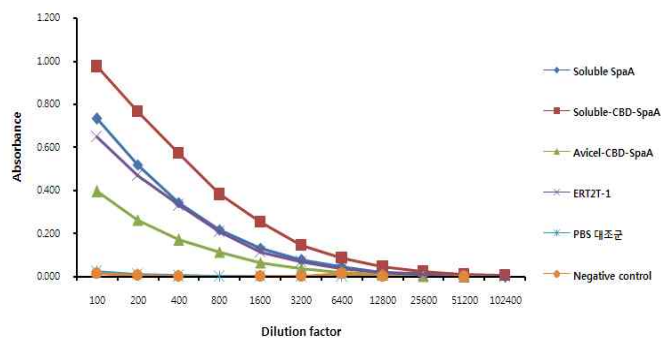
(1) 동물 실험을 통한 돈단독 재조합 단백질 시험백신의 후보 선정 및 항체 형성능 확인

돼지 단독 재조합 단백질(SpaA)의 면역원성 확인을 위하여 마우스를 대상으로 동물 실험을 수행하였다. 돈단독 재조합 단백질인 Soluble Spa A, Soluble CBD Spa A, Avicel CBD Spa A를 대상으로 [Table 2]와 같이 시험백신 3종을 제작하였고, (주)중앙백신연구소 돈단독 백신 수이샷 ERT2T-1을 양성 대조군으로, PBS를 음성대조군으로 실험하였다. 시험백신 각 그룹 당 15마리의 마우스에 기존백신을 1/100 희석하여 피하 접종하고 14일 후에 채혈하여 ELISA 검사 방법을 통해 항체가를 확인하였다.

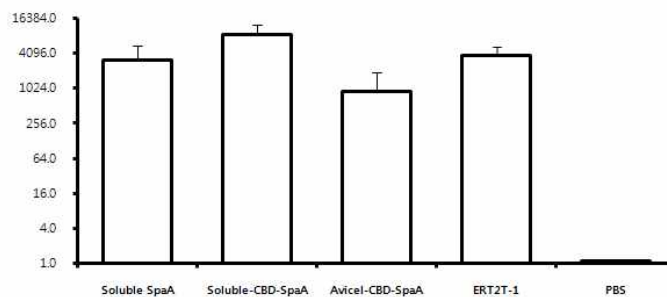
[Table 2] 돼지 단독 재조합 단백질 시험 백신 조성

시험백신 조성	1	2	3	4	5
	soluble SpaA	Soluble SpaA CBD	Avicel CBD SpaA	ERT2T-1	PBS 대조군
Spa A( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	20	20	20	100	-
adjuvant	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	-
총 량	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml

A.



B.

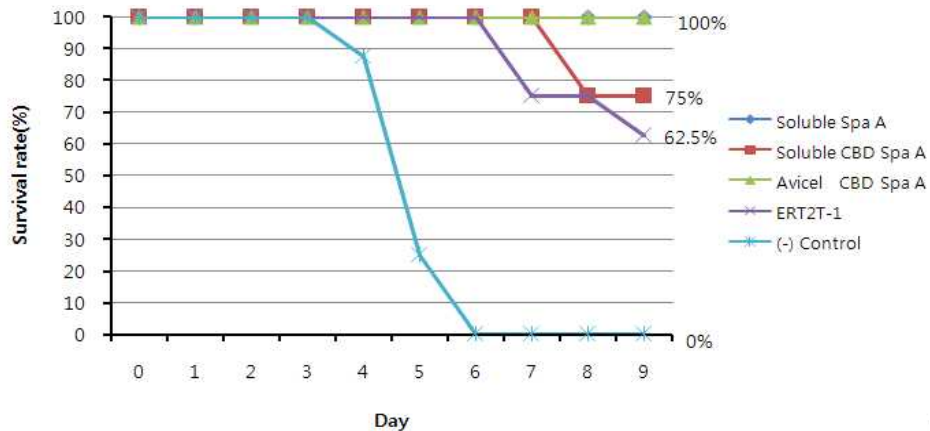


[Figure 3] 단독 재조합 단백질 시험백신 mouse 접종 후 ELISA 결과

시험 백신을 접종한 마우스의 항체 형성능을 확인하기 위한 ELISA 실험결과 Soluble-Spa A, Soluble-CBD-Spa A, ERT2T 백신, Avicel-CBD-Spa A의 순서로 항체가 높게 나왔다 (Fig 3.a). 하지만 GMT 값으로 환산하여(Sample/Negative=2) 그린 그래프 (Fig 3.b)를 보면 각 군별로 큰 차이를 보이지 않음을 알 수 있었다. ELISA 실험 결과 재조합 돼지단독 단백질(Spa A) 3종 시험백신 모두 상용화된 (주)중앙백신연구소 돈단독 백신 수이샷 ERT2T-1와 비교해서 거의 동등한 항체 형성능을 알 수 있었다.

(2) 동물 실험을 통한 돈단독 재조합 단백질 시험백신 효능 확인

3종의 시험백신의 효능평가를 위해 실험 동물 마우스를 대상으로 공격 접종 실험을 실시하였다. [Table 2]와 같이 시험백신을 제조하고 (주)중앙백신연구소의 돈단독 백신인 ERT2T-1을 양성으로, PBS를 대조군으로 하였다. 백신의 효능 차이를 분명히 확인하기 위해 기존백신을 검정 기준의 1/10인 1/100 희석하여 시험백신 각 그룹 당 15마리의 마우스에 피하 접종하고, 14일 후에 돈단독(100 LD/0.2 ml)을 피하에 공격 접종하여 10일간 생존여부를 관찰하였다.



[Figure. 4] 돼지 단독 재조합 단백질 시험백신 방어시험 결과

공격 접종 실험 결과 Soluble-SpaA와 Avicel-CBD-SpaA 두 가지 시험 백신이 100% 방어를 하였고, Soluble-CBD-SpaA는 75%, (주)중앙백신연구소의 ERT2T 백신은 62.5%를 방어하였다. 시험백신과 상용화된 백신의 효능 차이를 분명히 확인하기 위해 기존 검정기준보다 10배 더 희석된 백신 양으로 접종한 것을 감안할 때, 결과적으로 재조합 돼지단독 단백질 시험백신 3종 (Soluble-SpaA, Soluble-CBD-SpaA, Avicel-CBD-SpaA) 모두가 기존 백신 이상의 효능이 있음을 알 수 있었다.



## [제1협동과제] 지적사항2 추가 자료

### 1. 동물 세포 배양과 fermenter를 이용한 서브유닛 백신의 비교 table 작성

동물세포를 이용한 백신생산은 비교적 단가가 비싼 배양배지 및 동물세포배양기 등 생산비가 높으며, 또한 혈청배지에 포함된 다양한 이종단백질로 인하여 백신을 접종 시 이러한 이종단백질들에 의한 부작용 발생이 상존하고 있다. 유전공학기술을 이용한 미생물, 특히 인체에 안전하다고 알려진 GRAS (generally regarded as safe) 균주인 효모발현시스템을 이용한 백신생산 시에는 혈청배지를 사용하지 않아도 되며, 비싼 동물세포배양기 대신 미생물발효조를 이용할 수 있으며, 동물세포대비 단백질 발현양도 비교적 높은 편이다. 따라서 동물세포대신 효모를 이용한 백신생산 시 아래와 같은 이점을 기대할 수가 있다.

- 균체성장속도 및 단백질 발현양 증가로 인한 생산성 향상
- 값비싼 배지 및 동물세포배양기 미사용으로 인한 생산비 감축
- 혈청배지 미사용으로 인한 백신의 안전성 및 안정성 향상

[표] 재조합 단백질 생산 시스템의 비교

Characteristics	<i>E. coli</i>	Yeast/Fungi	Insect cells	Mammalian cells
• Cell growth	rapid(30 min)	rapid(90 min)	slow(18-24 h)	slow(24 h)
• Cost of growth medium	low	low	high	high
• Expression level	high	low to high	low to high	low to moderate
• Extracellular expression	secretion to periplasm	secretion to medium	secretion to medium	secretion to medium
• Protein folding	refolding usually required	proper folding	proper folding	proper folding
• Posttranslational modifications				
✓ N-linked glycosylation	none	high mannose	simple, no sialic acid	complex
✓ O-linked glycosylation	no	yes	yes	yes
✓ Phosphorylation	no	yes	yes	yes
✓ Acetylation	no	yes	yes	yes
✓ Acylation	no	yes	yes	yes

- 자료 : Nevalainen et al. *TRENDS in Biotechnology* 23, 468 (2005)

### 2. 돼지 썬코바이러스와 단독 백신에 대한 국가검정 기준 제시

<1-2-04-11 돼지 썬코바이러스 type2 불활화백신 검정기준>

이 기준은 돼지 썬코바이러스 type2 바이러스(PCV2: porcine circovirus type2)를 조직 배양

세포에 증식한 것을 불활화하여 제조한 백신의 검정기준이며 다음 항에 적합하여야 한다.

#### 가. 특성시험

액체로서 약간의 침전이 생길 수 있으나 흔들면 균등한 액체로서 이물, 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

#### 나. 무균시험

동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-06에 따른다.

#### 다. 수소이온농도시험

동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-03에 따라 검사한 결과 백신의 수소이온농도는 pH 6.0~8.0 이내에 있어야 한다.

#### 라. 방부제 정량시험

동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-09에 따라서 검사한 결과 formalin은 0.3% 이하, 치메로살 함량은 0.01% 이하이어야한다.

#### 마. 불활화 확인시험

##### (1) 시험재료

백신 2 ml를 2회에 걸쳐 동결 및 용해하고, 원심한 상층액을 투석막에 넣고 4℃에서 백신의 100배량 이상의 인산완충식염수(PBS: pH 7.2~7.4)에 하룻밤 투석한 것을 시험재료로 한다.

##### (2) 조직배양세포

돼지 초대 콩팥 세포 또는 PK-15세포를 조직배양용 flask(25 cm<sup>2</sup>)에 증식시킨다. 초대 배양세포는 4~7일간 배양된 세포를 사용하고 PK-15세포는 시험전에 써코바이러스 type1의 감염이 없음을 확인한다.

##### (3) 시험

증식된 세포에서 세포 배양액을 제거한 다음 1)의 시험재료 1 ml를 2)의 조직배양세포에 접종하고, 37℃에서 1시간 감각시킨다. 1시간 후 새로운 세포유지용 배지를 더하여 7일간 배양하면서 포변성효과를 확인한다. 상층액을 제거한 후 형광항체법을 이용하여 돼지써코바이러스 증식여부를 확인한다.

##### (4) 판정

돼지 초대 콩팥 세포 또는 PK-15 세포에서 돼지 써코바이러스에 의한 특이한 세포변성 효과(CPE) 또는 기타 바이러스에 의한 CPE가 인정되어서는안 된다. 또한 세포 상층액에서 닭, 돼지 혈구에 응집(HA)이 인정되어서는도안 된다.

#### 바. 안전시험

(1) 마우스 : 체중 15~20 g의 마우스 8마리를 준비하여, 8마리의 마우스 복강에 0.5 ml를

접종하고 7일간 관찰한다. 관찰기간동안 이상 없이 생존하여야 한다.

(2) 기니픽 : 체중 300~350 g의 기니픽 4마리를 준비하여, 2마리의 기니픽 근육 또는 피하에 2 ml를, 다른 2마리의 기니픽 복강에 2 ml를 접종하고 7일간 관찰한다. 관찰기간동안 이상 없이 생존하여야 한다.

(3) 돼지 : 과거 PCV2 관련 백신을 접종하지 않았으며, 관련 질병에 노출되지 않은 돼지 2마리를 이용한다. 모든 접종용일 경우는 2~4개월령에, 자돈접종용 제품일 경우 3~4주령에 백신의 2두분을 근육 접종한다. 접종 후 1~2시간 내에 과민반응이 없어야 하며, 21일간의 관찰하는 동안 주사부위 의 화농, 괴사, 발열 및 피부병변 등의 부작용이 없어야 한다. 제품의 특성에 따라 마우스와 기니픽에 대한 안전시험은 실시하지 않을 수 있다.

#### 사. PCV2 항원 함량시험

제품의 특성에 따라 항원함량을 생략할 수 있다

##### (1) 시험방법

ELISA법을 이용하여 제조회사의 제조방법에 따라 검사한다 (별첨1).

##### (2) 판 정

PCV2 항원은 2.1 log<sub>10</sub> ELISA unit/두분 이상이어야 한다.

#### 아. PCV2 항체 역가시험

제품의 특성에 따라 혈청역가시험을 생략할 수 있으며, 혈청역가시험은 ELISA법과 간접형광 항체 검사법 (IFA)을 실시한다.

##### (1) 시험방법

체중 300~350 g의 기니픽 10마리를 준비하여 8마리는 접종군, 2마리는 대조군으로 하여 접종군에는 피하로 1/2두분을 접종하고 3주후에 2마리의 대조군과 같이 채혈하여 IFA 항체가 또는 sandwich indirect ELISA로 항체를 측정한다. 제품의 특성에 따라 IFA 또는 흡광도 ELISA 측정 방법은 제조회사의 제조방법에 따를 수 있다 (별첨2).

##### (2) 판 정

ELISA 시험에서 항체역가는 접종군 평균 흡광도(O.D) 값(T)을 대조군 평균 흡광도(O.D.) 값(C)으로 나눈 T/C값이 2.0 이상이어야 하며, IFA 시험에서 접종군의 항체역가는 평균 128배 이상이어야 하며 대조군은 음성이어야 한다.

#### 자. 검정의 반복

“가”항에서 “아”항까지 그 결과를 판정하기 곤란할 때에는 해당 시험을 반복한다.

#### 별첨1) PCV2 항원함량시험

1. PCV2 항체(capture antibody)를 coating buffer에 희석하여 plate에 120  $\mu\text{l}$ /well씩 첨가한 다음 4°C에서 overnight (17~24시간)하여 준비한다.
2. 코팅 plate를 wash buffer로 세척하고 blocking 용액을 plate의 모든 well에 100  $\mu\text{l}$  넣는다.
3. 양성 대조군 항원(positive control antigen)을 꺼내어, 시험백신과 함께 아래에 plate 배열 순서와 같이 2개 column에 100  $\mu\text{l}$ /well 넣고 12번째 well까지 2진 희석한다.
4. 37°C에서 3시간 반응시킨 후 wash buffer로 1회 세척한다.
5. Antibody를 37°C 항온수조에서 1분정도 녹여 희석 후 100  $\mu\text{l}$ /well씩 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨다.
6. Wash buffer로 1회 세척한다.
7. TMB solution을 100  $\mu\text{l}$ 씩/well 넣고 20°C, 30분간 반응시킨다..
8. 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50  $\mu\text{l}$ /well를 넣고 반응을 정지시킨 후 405 nm파장과 630 nm에서 흡광도를 측정한다.

\* 기타 자세한 사항은 제조회사의 제조방법(비공개부표)를 참고한다.

#### 별첨2) ELISA에 의한 혈청 역가시험

1. Porcine circovirus type2 특이 항체를 5~10  $\mu\text{l}$ /ml로 coating buffer에 희석하여 100 $\mu\text{l}$ 씩 ELISA plate에 분주하고 37°C에서 2시간 흡착한다.
2. 항원이 흡착된 ELISA plate를 PBS-T로 3회 세척한다.
3. Blocking buffer 200  $\mu\text{l}$ 씩 모든 well에 넣고 37°C에서 2시간 반응시킨다.
4. Plate를 3회 세척한다.
5. Porcine circovirus 항원을 PBS로 10배~20배 희석한 뒤 모든 well에 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨다
6. Plate를 3회 세척한다.
7. 항원이 감작된 plate에 검사시료(혈청)을 dilution buffer를 이용하여 1:50으로 희석하여 well에 분주한 후 37°C에서 1시간 반응시킨다.
8. Washing buffer로 5회 세척하고 dilution buffer로 희석된 anti-GP IgG HRP conjugate를 100  $\mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 37°C에서 1시간 반응시킨다.
9. Plate를 5회 세척한다.
10. 100  $\mu\text{l}$  OPD substrate를 각 well에 분주하고 실온에서 10분간 반응시킨다.
11. 50  $\mu\text{l}$  stop solution을 첨가 한 후 492 nm에서 흡광도를 측정한다.

### <1-2-02-01 돼지 단독 불활화백신 검정기준>

이 기준은 돼지 단독(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)균을 순수 배양하여 얻은 균액을 불활화 하여 제조한 불활화백신의 검정기준이며 다음 항에 적합하여야 한다.

#### 가. 특성시험

액체로서 약간의 침전이 생길 수 있으나 흔들면 균등한 액체로서 이물, 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

#### 나. 무균시험

동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-06에 따른다.

#### 다. 수소이온농도시험

동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-03에 따라 검사한 결과 백신의 수소이온농도는 pH 6.0~8.0 이내에 있어야 한다.

#### 라. 방부제 정량시험

동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-09에 따라서 검사한 결과 포르말린 함량은 0.2% 이하, 치메로살 함량은 0.01% 이하이어야 한다.

#### 마. 안전시험

(1) **마우스** : 체중 15~20 g의 마우스 8마리를 준비하여, 8마리의 마우스 복강에 0.5 ml를 접종하고 7일간 관찰한다. 관찰기간동안 이상 없이 생존하여야 한다.

(2) **기니픽** : 체중 300~350 g의 기니픽 4마리를 준비하여, 2마리의 기니픽 근육 또는 피하에 2 ml를, 다른 2마리의 기니픽 피내에 0.1 ml를 접종하고 7일간 관찰한다. 관찰기간동안 이상 없이 생존하여야 한다.

(3) **돼지** : 체중 8~10 kg(4~6주령)의 건강한 돼지 2마리에 백신의 2두분을 근육 접종한다. 접종 후 1~2시간 내에 과민반응이 없어야 하며, 21일간의 관찰기간동안 주사부위의 화농 및 괴사 등의 부작용이 없어야 한다.

#### 바. 효력시험

마우스 또는 돼지를 이용한 공격접종시험으로 실시한다.

##### (1) 마우스

###### (가) 동물

체중 15~20 g의 마우스 20마리를 준비하여 15마리는 접종군으로 5마리는 대조군으로 사용한다.

###### (나) 시험

15마리의 마우스에 백신의 1/10두분을 피하에 접종하고 5마리의 마우스는 대조군으로 둔

다. 1차 접종 2주 후에 접종군과 대조군에 *E. rhusiopathiae* 100 LD50/0.2 ml을 각각 피하에 접종하고 10일간 관찰한다.

(다) 판정

접종군 마우스는 80% 이상 생존하고, 대조군 마우스는 100% 폐사하여야 한다.

## (2) 돼지

(가) 동물

체중 20 kg(6~8주령) 이하의 돼지 단독 항체 음성을 나타내는 돼지 10마리를 사용한다.

나) 시험

돼지 10마리 중 5마리는 백신 1두분을 근육 접종하고, 5마리는 대조로 생리식염수를 접종한다. 접종 3주 후에 백신군과 대조군에 병원성이 있는 *E. rhusiopathiae* (혈청형 2) 균주 0.1 ml을 피내에 공격 접종하고 주사부위에 돼지 단독의 전형적인 증상의 하나인 다이아몬드 피부 병변 형성여부를 7일간 관찰한다.

다) 판정

대조군은 80% 이상 피부 병변을 나타내어야 하고, 백신 접종군은 80% 이상 주사 부위에 병변이 없어야 한다.

## 사. 검정의 반복

“가”항에서 “바”항까지의 시험에서 그 결과를 판정하기 곤란할 때에는 해당시험을 반복한다.

## 3. 항원 종류별 시험 table 재작성

### 다. 제1 협동(중앙백신연구소)

(1) 돼지의 돈단독 및 썬코바이러스의 재조합 항원 후보 선정

(가) 썬코 바이러스의 항원 발현 재조합 균주 선정 및 면역원성 확인

② 재조합 시험 백신 제작 및 면역원성 확인 시험

[Table. 1] 재조합 PCV 시험백신 조성

시험백신	항원함량 및 혼합비율
PCV-1	PCV2-BORF2 total protein .....3mg/ml
	adjuvant* .....10%
	면역증강제 .....200µg/ml
PCV-2	PCV2-CBD BORF2 total protein .....3mg/ml
	adjuvant .....10%
	면역증강제 .....200µg/ml
PCV-3	PCV2-Ty1 BORF2 total protein .....3mg/ml
	adjuvant .....10%
	면역증강제 .....200µg/ml
PCV-4	Control vector total protein .....3mg/ml
	adjuvant .....10%
	면역증강제 .....200µg/ml
Circo-one	양성대조군 1 (중앙백신연구소)
Cricoflex	양성대조군 2 (베링거인겔하임)
PBS	음성대조군

\* adjuvant의 조성 비율은 자사 제품의 조성 비율을 토대로 함

(나) 돼지의 돈단독 재조합 항원 후보 선정 및 면역원성 확인

① 동물 실험을 통한 돈단독 재조합 단백질 시험백신의 후보 선정 및 항체 형성능 확인

[Table 2] 돼지 단독 재조합 단백질 시험 백신 조성

시험백신	항원함량 및 혼합비율
SpaA-1	Soluble SpaA .....20 $\mu$ g/ml adjuvant* .....30%
SpaA-2	Soluble SpaA CBD .....20 $\mu$ g/ml adjuvant .....30%
SpaA-3	Avicel-CBD SpaA .....20 $\mu$ g/ml adjuvant .....30%
ERT2T-1	양성대조군(중앙백신연구소)
PBS	음성대조군

\* adjuvant의 조성 비율은 자사 제품의 조성 비율을 토대로 함



## 제 2 절. 2차년도 연구결과

### 제 1 세부과제 : 유효 항원 스크리닝 및 효모 발현 시스템 구축

#### 1. 돈단독 항원 유전자 분비발현 및 표면 발현 시스템 구축

돼지에 돈단독을 일으켜 양돈업계에 매년 많은 피해를 주고 있는 *Erysipelothrix rhusiopathiae*의 surface protective antigen인 spaA를 사카로마이세스 세레비지에의 표면에 발현하였다. SpaA는 분비신호 서열을 제거한 89~431 a.a를 효모 선호코돈으로 최적화하여 Bioneer사에서 합성하였으며, 서열은 아래 서열번호 1에 표시하였다. 이를 효모 사카로마이세스 세레비지에 발현 벡터인 pYEGa-HIR525에 클로닝 하였으며, 대조군으로 SpaA만 발현하는 경우와, 표면발현을 위한 세포벽 부착 매개 단백질과 융합하는 경우로 구분하였다. 표면발현 시, 분비신호서열로 MFa를 사용하였고, 세포벽 부착을 위한 anchor motif로 *H. polymorpha*의 cell wall protein인 Cwp1을 SpaA의 C-말단에 연결하였다. 클로닝에 이용한 프라이머의 서열은 아래 표와 같으며, 구축된 SpaA 발현벡터의 모식도는 그림 1과 같다. 대조군은 SpaA를 증폭한 후에 제한효소 *EcoRI*과 *SaII*으로 잘라 같은 효소로 절단한 벡터에 삽입하였고, 표면발현 벡터는 SpaA를 증폭한 후 *XbaI/ClaI*으로 자르고 Cwp1은 *ClaI/SaII*으로 잘라, *XbaI/SaII*으로 자른 벡터에 3-pieces ligation으로 클로닝 하였다.

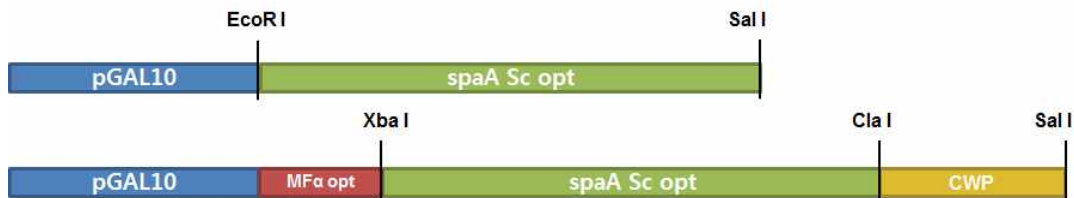
#### 【서열번호 1】

```
ggttaccaatcattcgaagccgtcaacgaggaaattaactctatcgtctccgaattgaaaaatgaggaatgtctctacaaat
attcatcacatgtttaacaatccatccagaacctggctactcgtatcggttataggtctttatgcaggatgctatgtactggag
aatttcgaacgtttgacaattcctgaattagatgaagcctatgttgacttgttggttaattatgaagtcaagcacagaatcttagt
aagtatgaggacaaaagtcaagggtagagcaccactagaagcattcatcgttccactgaggaacaggattagatctatgaacg
aaattgctgcagaagttaattatctgcctgaagctcatgaagatttctagtcagtgattcttcagagtacaacgacaaattgaat
aacattaattttgccttggttttaggcgtttccgaatttatcgactacaatagattagagaacatgatggagaaagagattcatcc
actttatttgaattgtacgcaatgaggcgttaacagacagatccaagtagttcgtgacgtctatcctaatttagaaagagctaac
gcagttgtcgaaagtcttaagacaattaaagatattaaacagcgtgagaagaaactacaagaattgttgagatttacattcaa
agatctggtgacgtaggaaaccagatgtcttacagagattcatcgaaaatatcagtcagttgttgatgaagagaagaataag
ctacaagactatcttgaaagtgatattttgatagctattcagtcgatggcgaaaagattagaaataaagagattaccttgatca
accgtgacgcttacttgcctatgatttacagagctcaatctatttcagagatcaagactatcagggccgacttagaatctttagta
aagagttttcagaatgaggaatctgactctaaagtgaacctgaatcaccagtcagggttgagaaacctgtcgataaagagaa
gcctaaggattaa
```

spaA opt-EcoRI	atat gaattc atgggttaccaatcattcgaagc
spaA opt-SaII	aatt gtcgac ttaatccttaggcttctctttatc
XbaI-spaA opt	atat tctagataagagaggttaccaa

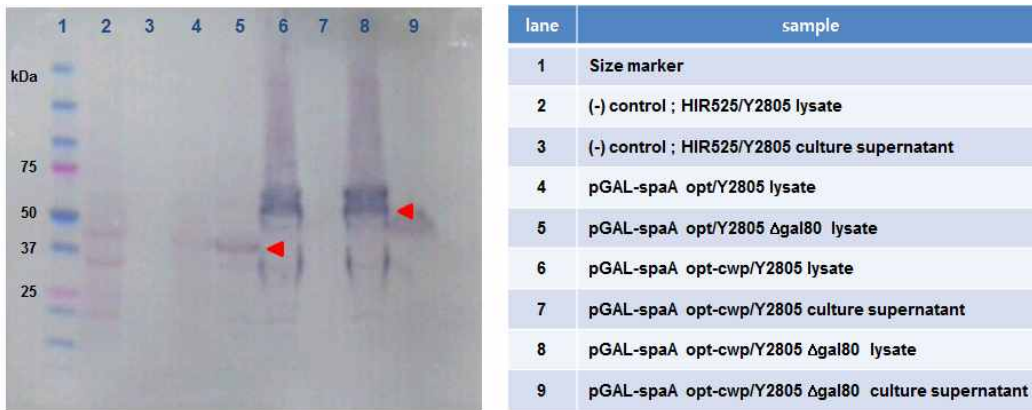
ClaI-spaA opt	aatt atcgat atccttaggcttctctttatc
ClaI-cwp1	atat atcgat ttctactctgctctgtacgag
SalI-cwp1	aatt gtcgac ttacataagaagaacggccattc

【그림 1】



구축된 벡터는 리튬/아세테이트 방법으로 Y2805와 Y2805 $\Delta$ gal80에 형질전환하고, UD 고체배지에서 선별하였다. 선별된 형질전환체는 UD 액체배지에서 초기 배양한 뒤 Y2805는 YPGlu1%Gal1% 배지에서, Y2805 $\Delta$ gal80은 YPGlu2%에서 48시간 본 배양을 하고, anti-spaA 항체를 이용하여 Western blot 분석을 실시하였으며 분석결과는 아래 그림 2에 나타내었다.

【그림2】



spaA : 343 a.a/ 40.234kDa  
spaA-cwp : 409 a.a/ 46.757 kDa  
MFa-spaA-cwp : 495 a.a/ 55.8kDa

실험 결과, SpaA만을 발현하는 대조군의 경우 Y2805 $\Delta$ gal80에서 SpaA가 발현되는 것을 확인할 수 있었고 분비 서열과 anchor motif를 사용한 표면발현의 경우는 lane9에서 볼 수 있듯이, Y2805 $\Delta$ gal80에서 소량 분비되는 것으로 나타났지만, 대부분의 SpaA는 분비되지 않고 세포에 결합한 형태로 보였다. 표면 발현된 SpaA는 계산된 분자량보다 큰 분자량을 보였고, 상당히 많은 단백질이 발현되는 것으로 나타났으며 세포표면발현을 확인하기 위한 추가실험을 진행 중에 있다.

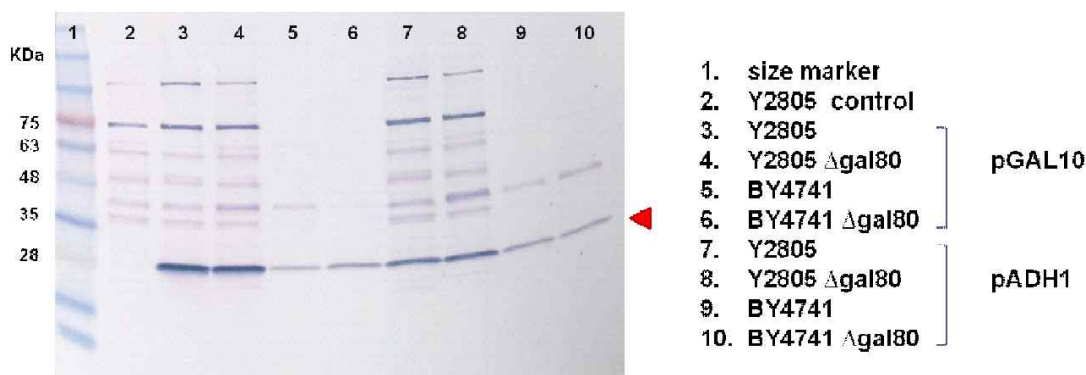
## 2. PCV2 ORF2의 사카로마이세스 세레비지에 균주에서 발현 최적화

이전 실험결과에서 발현율이 우수하였던 GAL10 프로모터의 경우 갈락토스 유발 프로모터로써 최적발현을 위해서는 배지 내에 글루코스가 존재하지 않아야 하는 조건과 갈락토스가 존재하여야 하는 조건을 모두 만족시켜야 하는데 갈락토스는 글루코스에 비하여 매우 비싼 탄소원이다. 본 연구팀은 값 비싼 갈락토스의 첨가 없이 글루코스만 사용하여도 GAL10 프로모터를 발현시킬 수 있는 사카로마이세스 세레비지에 gal80 결손주를 이용하여 재조합 단백질을 경제적으로 생산 할 수 있는 방법을 개발한 바 있으며 이 기술을 돼지 썬코 바이러스 PCV2의 백신 후보 단백질인 ORF2의 생산에 적용하였다.

재조합 발현백터의 최적의 발현이 가능한 균주를 선발하기 위해 사카로마이세스 세레비지에 Y2805, Y2805 $\Delta$ gal80, BY4741, 그리고 BY4741 $\Delta$ gal80 균주에 리튬/아세테이트 방법을 이용하여 형질전환 하였고, UD(Ura<sup>-</sup>, 글루코스 2%) 플레이트에서 배양한 후 PCR을 통해 형질전환체를 선별하였다. 효모는 UD액체배지 2ml에 단일집락을 접종하고, 30°C, 180 rpm에서 초기 배양한 후, 본 배양을 수행하였다. 본 배양은 Y2805와 BY4741의 경우는 YPGlu1%Gal1% 배지(2% 펩톤, 1% 효모추출물, 1% 글루코스, 1% 갈락토스), Y2805  $\Delta$ gal80, BY4741 $\Delta$ gal80의 경우는 YPGlu2%를 250 ml 배플 플라스크에 25 ml씩 분주한 뒤, 초기 배양한 균주를 OD<sub>600</sub>가 0.1이 되도록 접종하였고, 30°C, 180 rpm에서 교반하면서 48시간 배양하였다. Western blot 방법은, 배양액을 13,000 rpm에서 3분간 원심 분리하여 상등액은 제거하고, 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.0)를 배양액 부피의 1/4만큼 넣어 세포를 풀어준 뒤 같은 부피의 glass bead(425-600 $\mu$ m)를 첨가하여 5분간 vortexing함으로써 세포를 파쇄하였다. 세포파쇄 후 13,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 파쇄 되지 않은 세포와 세포파편을 제거하고 상등액에 SDS PAGE loading dye를 첨가하여 100°C에서 5분간 중탕하였다. 얼음에 박아 잠시 식힌 후 4-20% gradient gel에 loading하고 80V에서 전기영동을 실시하였다. Trans-Bolt<sup>TM</sup>Turbo(Bio-Rad)를 이용하여 나이트로셀룰로스 멤브레인에 반-건조법으로 단백질을 옮기고 TBS-T 완충액(20 mM Tris-HCl pH8.0, 137 mM NaCl, Tween 20 0.1%)에 탈지분유를 5%로 첨가하여 1시간 동안 blocking 하였다. 1차 항체를 1-2시간 정도 반응시키고 TBS-T 완충액으로 멤브레인을 씻은(5-10분씩 3회) 뒤 2차 항체를 넣어 1시간 반응시켰다. 그리고 TBS-T 완충액으로 멤브레인을 씻은(5-10분씩 3회) 뒤 2차 항체에 결합된 AP(alkaline phosphatase)의 기질로 BCIP/NBT Purple liquid(Sigma)를 첨가하고 5-10 분 정도 반응시켜 항체가 결합된 부위가 보라색 밴드로 나타나는 것을 관찰하였다.

분석 결과는 그림 3과 같다. 네 균주의 경우 모두 ORF2가 발현되었지만 BY4741균주보다는 Y2805균주에서, 그리고 ADH1 프로모터보다 GAL10 프로모터가 ORF2 발현양이 월등히 많은 것을 관찰할 수 있다. 따라서 사카로마이세스에서 PCV2 ORF2의 최적 발현을 위한 발현 프로모터로서 GAL10 프로모터를, 그리고 숙주세포로서 Y2805 $\Delta$ gal80를 선정하였다.

【그림 3】



### 3. PCV2 ORF2의 분비 발현 및 확인

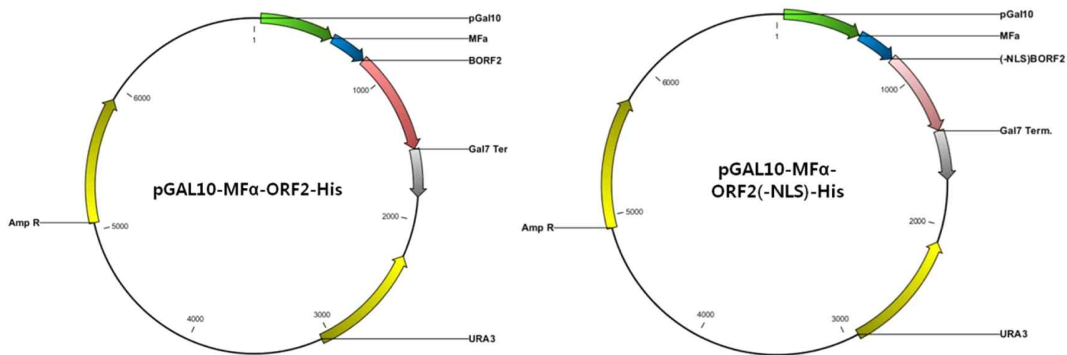
재조합 서브유닛 백신의 경우 세포 외 분비발현이 가능하다면 세포과쇄가 필요 없고 정제가 용이한 장점이 있다. 전통적으로 대장균에 비하여 효모는 안전성 등 다른 여러 장점과 더불어 단백질 분비기구가 발달되어 있어 분비발현에 적합하다. 따라서 ORF2를 효모 균주에서 분비발현을 시도하였다.

대장균에서는 전체 유전자를 사용하여 발현시켰을 경우 발현율이 매우 저조하였으나 아미노 말단에 위치한 NLS 구역 47개 아미노산 서열이 입체배좌 에피토프 형성에 특별히 필요하지 않은 점을 이용하여 NLS-결핍 클론을 발현함으로써 발현율을 증진시키는 연구가 보고된 바 있다. ORF2의 분비를 위해 사카로마이세스 세레비지에의 교배 인자 알파(mating factor alpha, MFα)의 신호 서열을 이용하였고, ORF2 전체서열을 발현하는 경우와 NLS를 제거한 경우로 벡터를 구축하였다. 사용한 프라이머는 아래 표 1과 같고, 효모 코돈으로 최적화한 합성서열을 주형으로 하여 PCR로 증폭한 후 *XbaI*과 *SalI*으로 절단하여 YEGα-HIR525의 *XbaI*, *SalI* site에 삽입하였다. 구축된 벡터의 모식도는 그림 4에 나타내었으며, 사카로마이세스 세레비지에 Y2805 균주에 리튬/아세테이트 방법을 이용하여 형질전환하였고, UD(Ura<sup>-</sup>, 글루코스 2%) plate에서 배양한 후 PCR을 통해 형질전환체를 선별하였다.

【표 1】

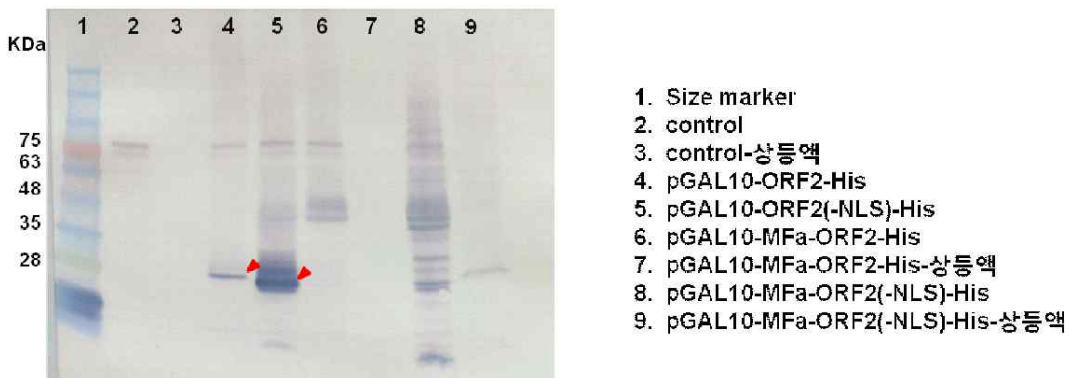
XbaI-ORF2	aatt tctaga taagagaatgacatatccgcgtagacgtt
XbaI-ORF2-NLS	aaaa tctaga taagagaagactatcaaggacattcggatac
SalI-His-ORF2-R	atat gtcgac ctagtgatggtgatggtgatg agggttcaaaggt ggatct

【그림 4】



UD 액체배지에서 초기 배양한 뒤 YPGlu1%Gal1% 배지에서 48시간 분 배양을 하고, anti-His 항체를 이용하여 Western blot 분석을 실시하였다. 분비발현을 위하여 MFa 분비 서열을 사용한 경우에도 NLS 존재 유무와 상관없이 ORF2는 배지로 분비되지 않을 뿐만 아니라 세포 내부에서도 발현되지 않았다(그림 5). 이는 아마도 분비기구를 통과하는 동안 제대로 folding하지 못한 ORF2가 분해된 것이 기인하는 것으로 잠정적으로 추정하였다. 한편 NLS가 없는 경우 (그림 5, lane 5) ORF2의 발현양이 상당히 증가한다는 사실을 확인할 수 있었다.

【그림 5】



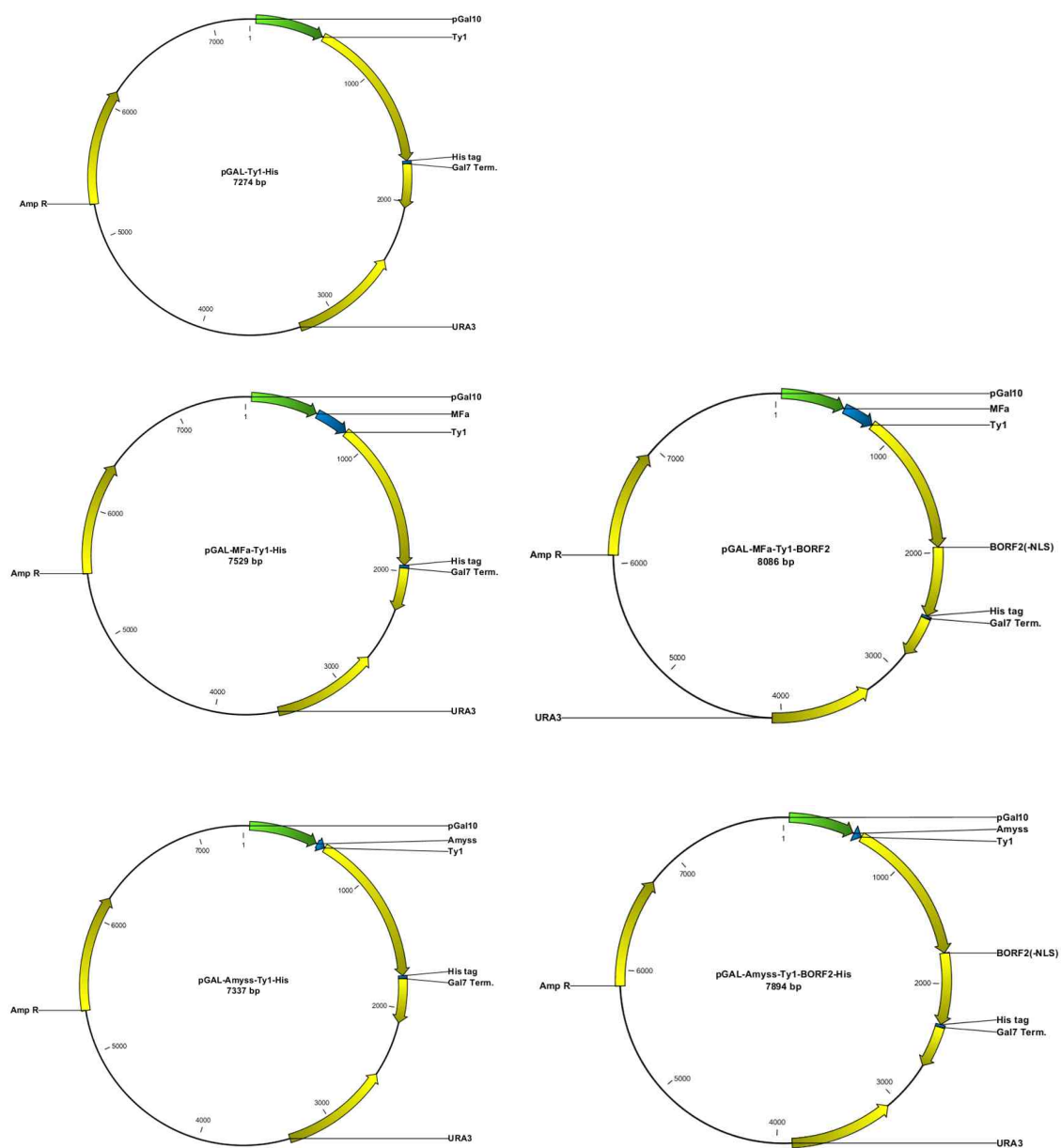
#### 4. Ty1과 융합한 ORF2의 분비발현 및 확인

효모 사카로마이세스가 가지고 있는 Ty1 단백질은 외래단백질과 융합발현 하였을 경우 virus-like particle을 형성하는 것을 도와주는 것으로 알려져 있다. 따라서 ORF2만을 분비 발현 하는 것과 동시에 Ty1과 융합된 ORF2의 분비발현 또한 확인하였다. 분비를 위한 신호서열로 교배인자 알파(MFa)와  $\alpha$ -amylase의 신호서열을 사용하였다. 발현백터의 구축 시, MFa의 경우는 Ty1과 ORF2는 overlap PCR로 연결시킨 후 *XbaI*과 *SalI*으로 잘라 pYEG-HIR525의 같은 제한 위치에 삽입하였다. 사용한 프라이머는 아래 표 2 와 같고 구축 된 백터의 모식도는 그림 6에 나타내었다.

【표 2】

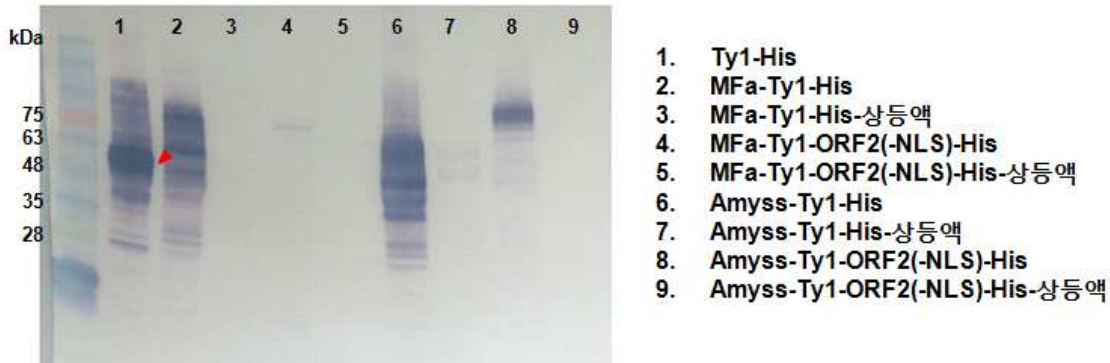
XbaI-Ty1	atat tctagataagaga atggaatcccaacaattatctc
Ty1-R	tttggttgatttcgtatagcgc
Ty1-R-His	aatt gtcgac ttagtgatggtgatggtgatg tttggttgatttcgtatagcgc
EcoRI-Amyss	aatt gaattc aaaa atgatggttgcattggtgtct
Amyss-R	gagataattgttgggattccat agctaattgctggagcagcta

【그림 6】



구축된 벡터는 리튬/아세테이트 방법으로 Y2805에 형질전환하고, UD 고체배지에서 선별하였다. 선별된 형질전환체는 UD 액체배지에서 초기 배양한 뒤 YPGlu1%Gal1% 배지에서 48시간 분 배양을 하고, anti-His 항체를 이용하여 Western blot 분석을 실시하였으며 분석 결과는 아래 그림 7에 나타내었다.

【그림 7】



대조군으로 사용하기 위해 Ty1만 발현시킨 경우 계산상의 크기는 43.2 kDa 이지만, 약간 더 큰 위치에서 관찰 되었다. MFa를 분비서열로 이용하였을 때는 Ty1만 발현시킨 경우 세포내에서는 발현이 되지만 세포 외로 분비되지 못하는 것으로 보이고, Ty1과 ORF2를 융합한 경우는 세포내에서 아주 적은 양이 발현되고, 역시 분비는 하지 못하는 것으로 나타났다.  $\alpha$ -amylase의 분비서열을 사용하였을 때 또한 세포내에서는 발현이 되지만 분비는 하지 못하는 것으로 확인 되었다. 따라서 ORF2는 단독적으로나 Ty1과의 융합의 경우나 모두 세포외로 분비되기는 어려운 것으로 나타났다. 따라서 이후 실험은 세포내 발현을 하기로 결정하였고 재조합 효모균주를 발효조를 사용하여 발효배양하고 효모전세포 (yeast whole cell), 세포파쇄액 등 동물실험을 위한 시료를 준비하였다.

## 5. 비전통 효모인 *Pichia pastoris* 균주와 *Hansenula polymorpha* 균주에서 PCV2 ORF2의 발현

전통적으로 재조합 단백질 생산에 가장 많이 사용되어 온 효모 *Saccharomyces cerevisiae* 균주뿐만 아니라 단백질 발현율이 매우 우수한 새로운 효모 균주인 *Pichia pastoris*와 *Hansenula polymorpha*에서도 PCV2 ORF2의 발현을 시도 하였다.

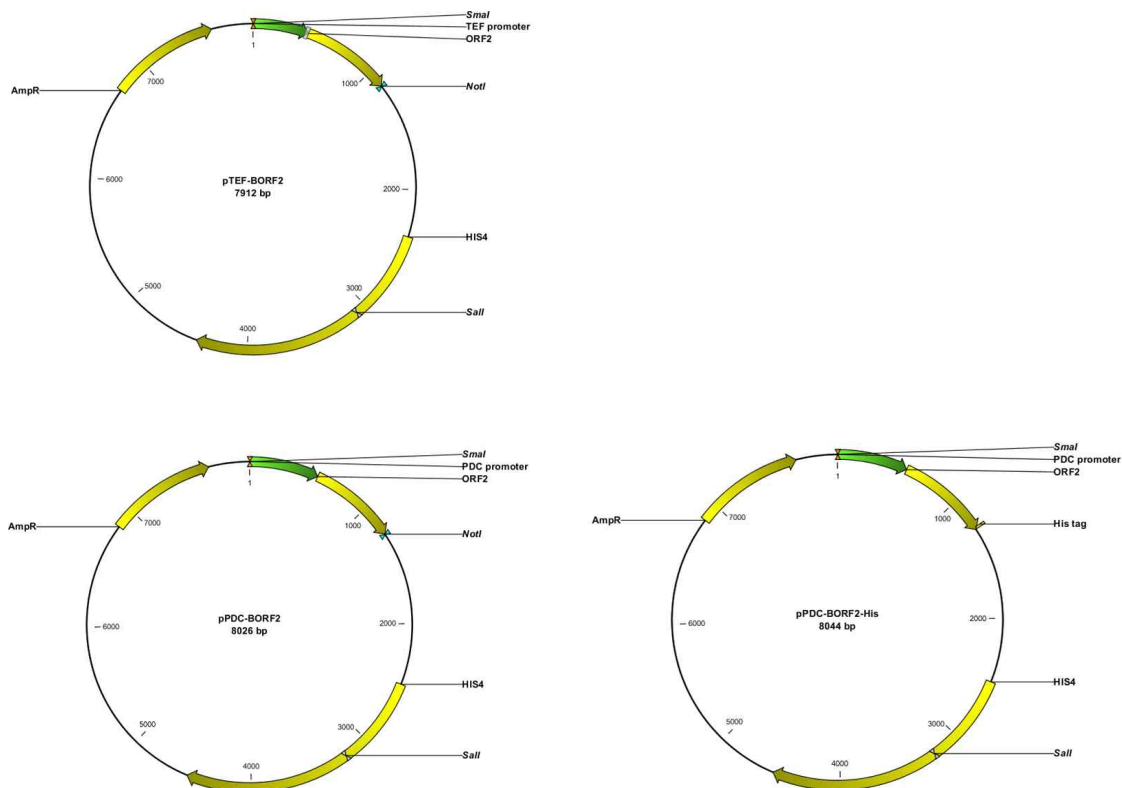
### 가. *Pichia pastoris*에서 PCV2 ORF2의 발현 및 확인

*Pichia pastoris* 균주는 표준균주인 GS115를 Invitron 사에서 구입하여 사용하였다. *Pichia pastoris* GS115에서 ORF2를 발현시키기 위한 프로모터로는 methanol을 inducer로 요구하

는 AOX 프로모터 대신 강력한 구성적 발현 (constitutive expression) 프로모터의 일종인 TEF promoter와 PDC promoter를 사용하여 클로닝을 실시하였다. 클로닝에 사용한 프라이머 서열은 아래 표와 같으며, promoter와 ORF2는 overlap PCR로 연결하였다. 벡터는 pPIC9을 backbone으로 사용하였고 제한효소 *Sma*I과 *Not*I 위치에 프로모터-목표유전자를 삽입하였다. 그리고 PDC promoter를 사용한 경우는 ORF2와 ORF2의 C-말단에 His tagging을 하는 두 가지로 벡터를 구축하였다(그림 8).

pTEF_F	aaaa cccggg gggatttaaataactgtcg
pTEF_R	attggcgaataactaaaatgtatgtag
pPDC_F	aaaa cccggg gggacaagcacacgattacc
pPDC_R	tgttgtgtactagctaattgattgatg
pTEF-BORF2	ctacatacatttttagttatctgccaat atgacttatccaagacgctcgttat
pPDC-BORF2	catcaatcaattagctagtacacaaca atgacttatccaagacgctcgttat
NotI-His-BORF2	aatt gcggccgc ttagtgatggtgatggtgatgggggttcaagggaggatcttt
NotI-BORF2	aatt gcggccgc ttacggggttcaagggaggatc

【그림 8】

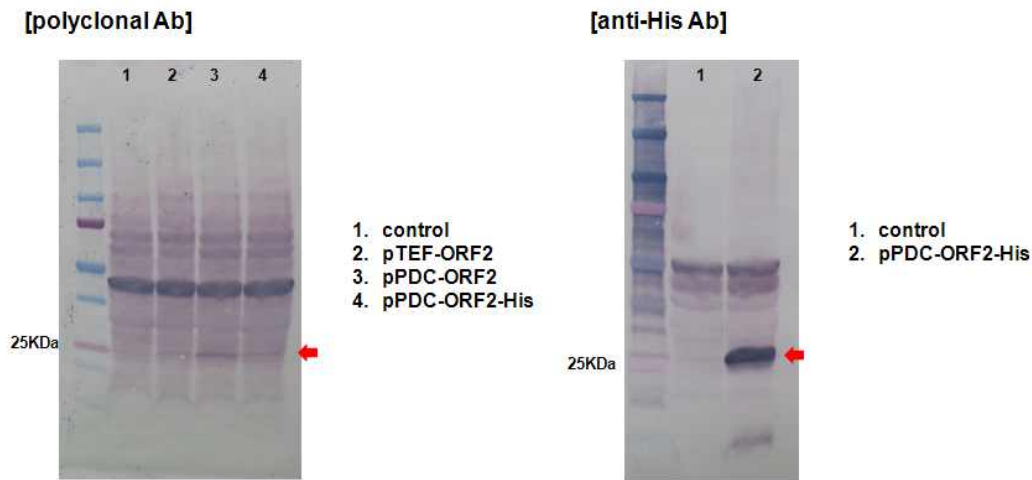


구축된 벡터는 제한효소 *Sa*I로 잘라서 선형 DNA 상태로 만들어 *P. pastoris* GS115에 리튬/아세트이트법으로 형질전환하였다. 형질전환 된 균체는 HG (histidine<sup>-</sup>, glycerol 2%) 고체배지에서 선별하였다. HG 액체배지에서 전배양을 한 후, YPGlu2%에 접종하여 48시간



배양하고 Western blot 분석을 실시하였다. 분석방법은 앞서 설명한 것과 동일한 방법으로 수행하였으며, 결과는 그림 9에 나타내었다.

【그림 9】



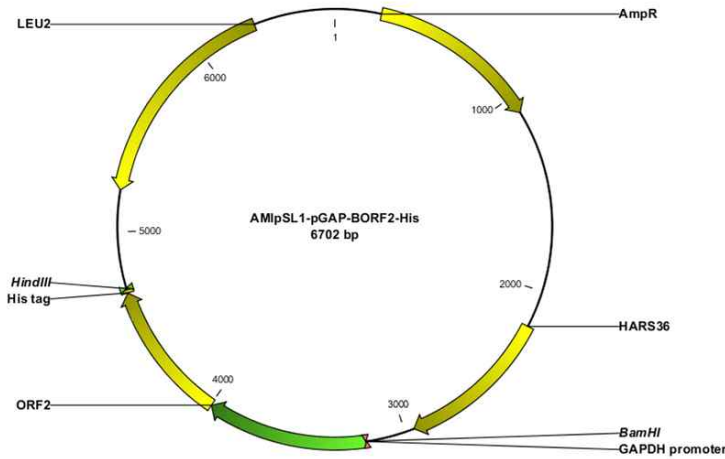
anti-ORF2 antibody를 사용한 경우 pTEF-ORF2, pPDC-ORF2, pPDC-ORF2- His 세 경우 모두 발현은 되지만, 매우 적은 양인 것처럼 보인다. 하지만 His tagging이 된 pPDC-ORF2-His의 경우, anti-His antibody를 사용하여 detection하면 두꺼운 밴드로 관찰되는 것으로 보아 *P. pastoris* GS115에서 ORF2가 발현은 잘 되지만 polyclonal antibody로 detection 하는데 있어 문제가 있는 것으로 추측된다. 이에 대한 원인을 찾고 해결하기 위한 연구를 더 진행할 계획이다.

#### 나. *Hansenula polymorpha*에서 PCV2 ORF2의 발현 및 확인

*Hansenula polymorpha* 균주는 *H. polymorpha* DL1-L( $\Delta$ leu2) 균주를 사용하였다. *H. polymorpha* DL1-L( $\Delta$ leu2) 균주에서 ORF2를 발현시키기 위해 *H. polymorpha*의 GAPDH promoter를 사용하였으며 발현 확인을 위해 C-말단에 His-tagging을 하고, *H. polymorpha* 균주의 발현벡터인 AMIpSL1 벡터에 클로닝 하였다. GAPDH promoter와 ORF2를 증폭하기 위해 사용한 프라이머는 아래 표와 같고, 각각을 증폭한 후 overlap PCR을 통해 두 단편을 연결하였다. 제한 효소 *Bam*H과 *Hind*III를 처리하고, 같은 효소를 처리한 AMIpSL1 벡터에 삽입하였다. 구축된 벡터의 모식도는 그림 10과 같다.

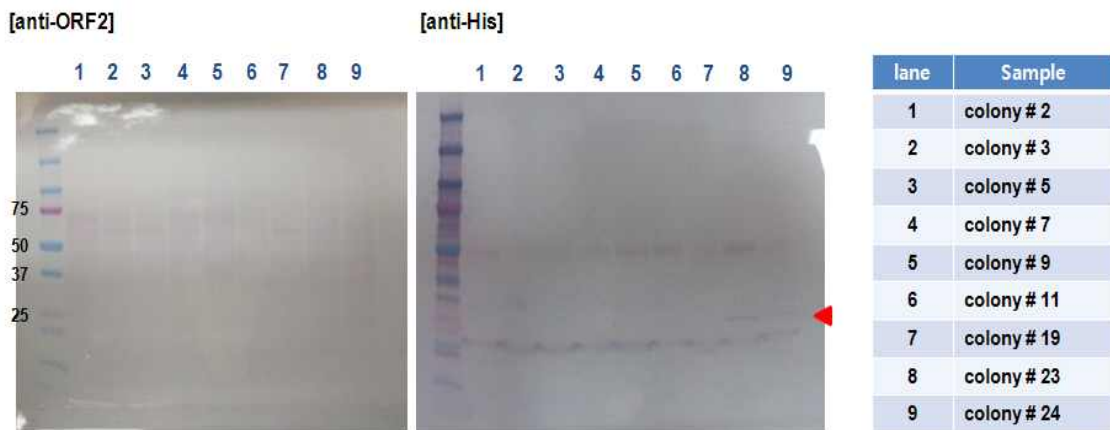
HpGAP-F	aatt ggatec cctttgctcaatgccgtttt
HpGAP-R	attgtttctatattatctttgtact
HpGAP-BORF	agtacaaagataaatatagaacaat atgacttatccaagacgtcg
Hind3-His-BORF2-R	atat aagctt ttagtgatggtgatggtgatg gggttcaagggaggatct

【그림 10】



리튬/아세이트법으로 *H. polymorpha* DL1-L 균주에 형질전환하고, LD (leucine-, glucose 2%) 고체배지에서 형질전환체를 선별하였다. AMIpSL1 플라스미드는 multicopy로 세포내에 도입되지만 모든 플라스미드를 다음 세대로 전달되는 것은 아니다. 세대를 거치면서 genomic DNA내로 삽입되며, 최대로 삽입되어 안정화가 되면 콜로니의 크기가 일정해진다. 따라서 여러 개의 백터가 도입은 되었지만 genomic DNA 내로 삽입되지 않는 상태로 존재하는 작은 콜로니를 선별하고, 이를 여러 차례 계대 배양하면서 크기가 더 커지고 일정해지는 콜로니를 선택하여 ORF2의 발현을 확인하였다.

【그림 11】



Western blot은 앞서 기술한 것과 동일한 방법으로 수행하였으며, 결과는 그림 11에 나타내었다. 결과를 보면, anti-ORF2 antibody를 사용한 경우는 ORF2가 detection되지 않는다. 하지만 anti-His antibody를 사용한 경우는 23, 24번 콜로니에서 약하지만 ORF2의 밴드가 관찰되는 것을 확인하였다. *P. pastoris*의 경우보다 ORF2의 발현양이 적어 추후 목표유

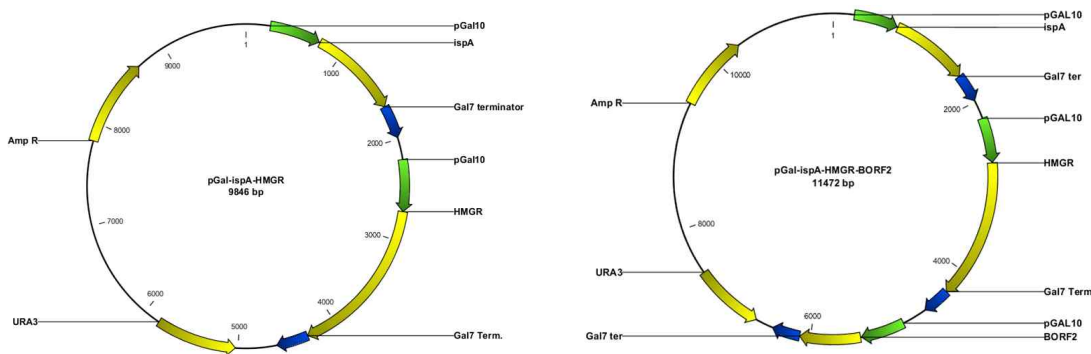
전자 발현 카세트를 genome에 multi-copy로 integration 된 균주를 개발할 필요가 있다. 또한 *P. pastoris*에서와 마찬가지로 ORF2가 polyclonal antibody로는 검출되지 않지만 anti-His antibody에서는 검출이 되는 문제가 있어 앞으로 더 많은 연구가 필요하다.

## 6. 스쿠알렌 생산균주에서 ORF2의 발현 및 확인

스쿠알렌은 식물이나 동물, 사람에게서 자연적으로 발견되는 물질로, 백신에 첨가하여 에멀전 상태로 존재할 때, 백신의 면역원성을 더욱 증가시켜주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구실에서는 사카로마이세스 세레비지에 균주에서 farnesyl diphosphate synthase인 *ispA*와 hydroxyl methylglutaryl CoA reductase인 *HMGR*을 동시발현시킴으로써 스쿠알렌이 생산되도록 균주를 개량하는 실험을 진행한 바 있다. 그래서 스쿠알렌을 생산하는 개량 효모 균주에 PCV2의 ORF2를 동시 발현시킴으로써 효모 전세포를 백신으로 접종하는 경우 adjuvant를 첨가하지 않아도 효과적인 면역유발을 할 수 있을 것이라 기대하고 실험을 진행하였다. 이전에 구축했던 pGAL-*ispA*/pGAL-*HMGR*1 벡터의 *NarI* 제한 위치에 GAL10-ORF2를 삽입하였다. 클로닝은 Clontech사에서 구입한 In-Fusion® Advantage PCR Cloning Kit를 사용하였으며, 방법은 매뉴얼을 따랐다. PCR에 사용한 프라이머는 아래 표와 같고, 구축한 벡터는 그림 12에 나타내었다.

clontech-F	GAATGGCGAATGGCGGGGATCCATCGCTTCGCTGATTAA
clontech-R	ATACCGCATCAGGCGACAATGAGCCTTGCTGCAACATCC

【그림 12】



구축된 벡터는 사카로마이세스 세레비지에 Y2805와 Y2805Δgal80 균주에 리튬/아세티트법으로 형질전환하고, UD 고체배지에서 형질전환체를 선별하였다. 형질전환체 중 Y2805는 YPDG, Y2805Δgal80은 YPD에서 48시간, 72시간 배양한 후, ORF2가 발현되었는지와 스쿠알렌이 얼마나 생산되었는지를 확인하였다. ORF2의 발현은 위에서 기술한 것과 동일한 방법으로 Western blot을 실시하였으며, 생산된 스쿠알렌은 Gas chromatography를 통해 분석하였다(그림 13).

【그림 13】



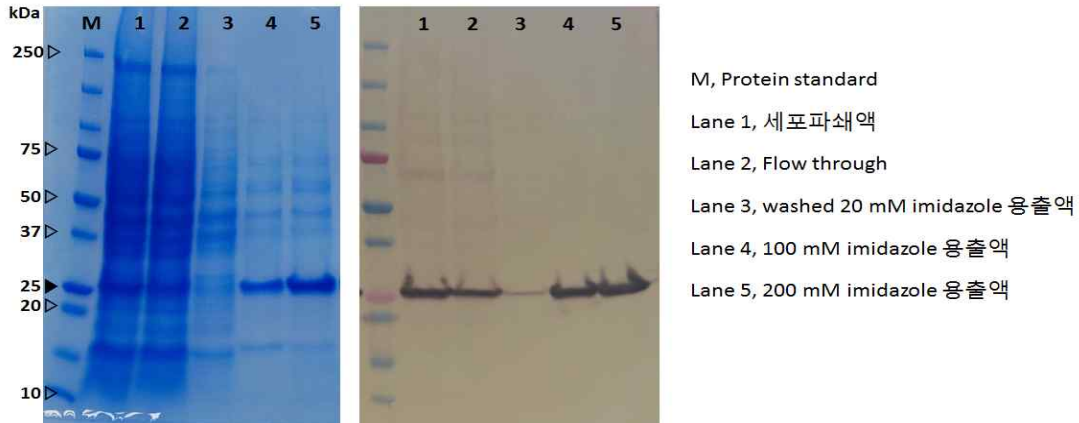
결과를 보면, 대조군인 *ispA*와 HMG1만 발현시킨 경우 48시간 배양 시 0.93 g/L, 72시간 배양 시 0.85 g/L의 스쿠알렌을 생산하는 것으로 분석 되었다. *ispA*, HMG1과 ORF2를 동시 발현한 경우는 Y2805에서 0.5 g/L의 스쿠알렌이 생산되었으며, ORF2를 발현하기 전에 비해 절반 정도로 감소하였다. 반면, Y2805Δgal80 균주는 스쿠알렌을 생산하지 못하였고 스쿠알렌을 생산하는 Y2805균주의 경우는 스쿠알렌을 생산하지 못하는 Y2805Δgal80균주에 비해 ORF2의 발현양이 다소 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

## 7. 사카로마이세스 세레비지에 Y2805의 PCV2 ORF2의 발현양 결정

사카로마이세스 세레비지에 균주내에서 VLP 형태로 존재할 것으로 추정되는 ORF2를 발현하는 재조합 효모의 세포파쇄액을 준비하고 다양한 chromatography를 사용하여 정제를 시도하였으나 세포파쇄 후 VLP가 안정적으로 유지되지 않고 침전되는 문제가 관찰되었고 VLP의 chromatography 상의 anomalous behaviour로 인하여 정제가 어려운 것으로 나타났다 (자료 미제시). 통상의 chromatography를 통한 정제가 어려운 문제로 인하여 표문물질로 사용할 고순도 ORF2로 His tagging 되어 있는 ORF2를 정제하여 사용하기로 하였다. 사카로마이세스 세레비지에서 발현되는 PCV2 ORF2의 정확한 정량을 위해 먼저 C-말단에 His-tagging 된 ORF2를 단백질 변성조건에서 Ni-NTA affinity chromatography로 정제하였다. 사카로마이세스 세레비지에 Y2805에 pGAL- ORF2-His 백터를 도입한 후 배양하였다. 배양은 초기배양과 본 배양으로 구분하며, 초기배양에는 UD(Yeast Nitrogen Base 6.7 g/L, uracil dropout supplement 0.77 g/L, glucose 20 g/L) 액체배지를 사용하였다. UD 액체배지 2 ml에 단일집락을 접종하고 30°C, 180 rpm에서 16 시간 배양 후 본 배양을 하였다. 본 배양은 YPGlu1%Gal1% 액체배지를 이용하였다. 배양은 250 ml Flask 4개에 액체배지 25 ml 씩 분주한 뒤 초기 배양 한 균주를 1%가 되도록 접종하여 30°C, 180 rpm에서 48 시간 배양하였다. 배양액 100 ml을 8,000 rpm, 10분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 0.5 M NaCl과 8 M urea를 포함하는 20 mM sodium phosphate (pH 7.4) 완충액을 20 ml 넣고 균

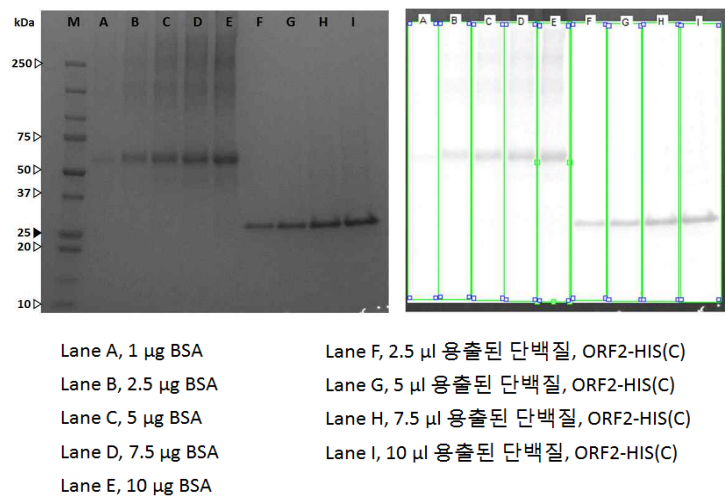
체를 풀어준 뒤 glass bead를 첨가하여 20 분간 파쇄 하였다. 파쇄액은 10,000 rpm으로 20 분간 원심분리하고 상등액을 Ni-NTA affinity chromatography 정제에 사용하였다. His-tagging된 ORF2 단백질은 200 mM imidazole을 포함하는 완충액 (200 mM sodium phosphate buffer pH7.4, 0.5 M NaCl 그리고 8 M urea)으로 용출하였다 (그림 14).

【그림 14】



용출된 단백질은 bovine serum albumin (BSA)를 standard로 하여 농도를 측정하였다. 기준인 BSA와 용출된 단백질을 희석하여 SDS-PAGE를 실시한 후, UVIB and MAX, optical density 1D program을 사용하여 단백질 band의 density를 측정하였다(그림 15).

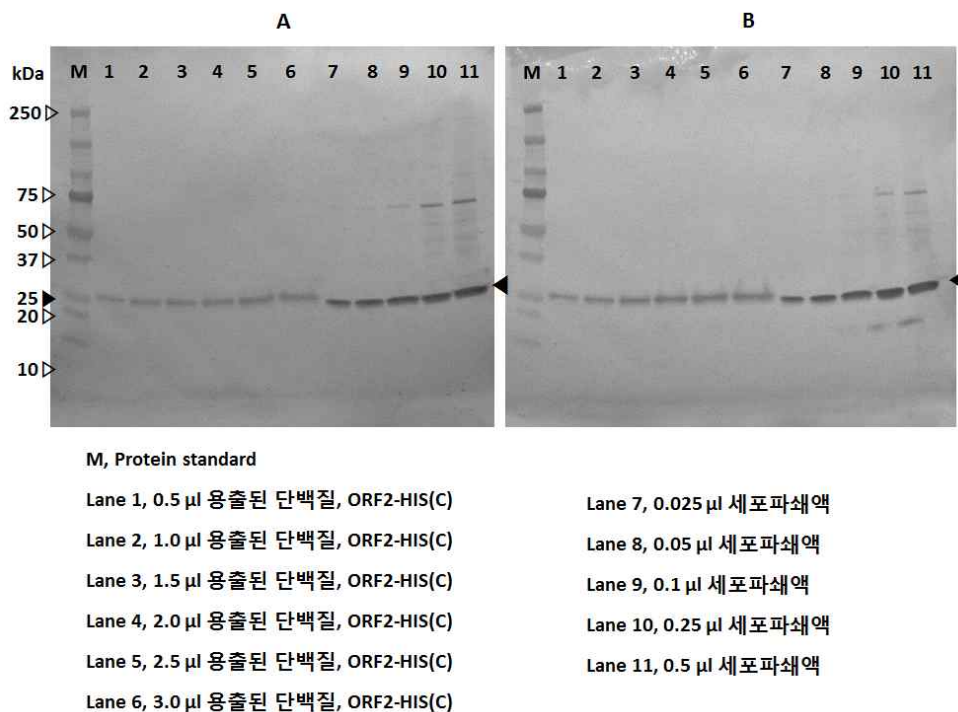
【그림 15】



용출된 단백질의 농도는 세 번의 반복 실험으로 측정하였으며 평균 0.462 mg/ml의 농도로 계산되었다. 농도가 확인된 His-tagging 된 ORF2를 standard로 하여 Y2805의 ORF2 발현양을 분석하였다. 배양은 His-tagging 된 PCV2 ORF2와 동일하게 하며 48 시간 배양한 Y2805의 흡광도 A<sub>600</sub> 값은 24.2로 측정되었다. 배양액 1 ml을 13,000 rpm에서 1 분간 원심분리 하여 균체를 회수하였다. 200  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl (pH7.5)를 넣어 세포를 풀어준 뒤 glass bead를 첨가하여 10분 동안 파쇄하였다. 여기에 3:1의 비율로 SDS loading sample buffer를 넣고 100°C 5분간 중탕하였다.

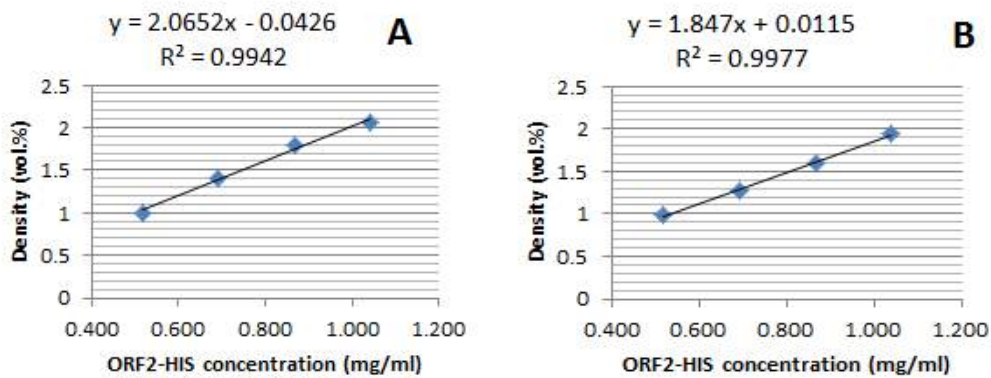
standard인 His-tagging 된 ORF2와 ORF2를 포함한 Y2805 세포파쇄액을 희석하여 4-20% gradient gel에 로딩하고 80V에서 전기영동 하였다. Trans-Bolt™Turbo (Bio-Rad)를 이용하여 나이트로셀룰로스 멤브레인에 반-건조법으로 단백질을 옮기고 TBS-T 완충액 (20 mM Tris-HCl pH8.0, 137 mM NaCl, Tween 20 0.1%) 에 탈지분유를 5%로 첨가하여 1시간 동안 blocking하였다. 1차 항체를 2 시간 반응시키고 TBS-T 완충액으로 멤브레인을 씻은(5분씩 3회) 뒤 2차 항체를 넣어 1시간 반응시켰다. 그리고 2차 항체에 결합된 AP(alkaline phosphatase)의 기질로 BCIP/NBT Purple liquid(Sigma)를 첨가하고 5-10분 정도 반응시켜 항체가 결합된 부위가 보라색 밴드로 나타나는 것을 UVIBand MAX, optical density 1D program을 사용하여 density를 측정하였다(그림 16).

【그림 16】



Y2805 세포파쇄액 내의 ORF2농도는 두 번의 반복실험을 통해 측정하였다. His-tagging 된 ORF2의 density 값과 단백질 농도를 그래프로 나타내어 density를 이용한 세포파쇄액의 ORF2 농도를 계산 할 수 있는 수식을 얻었다(그림 17). 결정계수 R<sup>2</sup>의 값이 0.9 이상이므로 수식에 대한 값은 유효성을 가진다. 수식으로 계산한 Y2805 세포파쇄액의 단백질 농도를 표 3에 나타내었다.

【그림 17】



【표 3】

A	ORF2-HIS						ORF2 세포파쇄액				
Loading (μl)	0.5	1	1.5	2	2.5	3	0.025	0.05	0.1	0.25	0.5
Sample (μl)	0.375	0.750	1.125	1.500	1.875	2.250	0.01875	0.0375	0.075	0.1875	0.375
Protein concentration (mg/ml)	0.173	0.347	0.520	0.693	0.866	1.040	<b>0.607</b>	<b>0.864</b>	<b>1.113</b>	<b>1.246</b>	<b>1.382</b>
Density (vol. %)	0.838	1	1.005	1.407	1.787	2.071	1.212	1.742	2.257	2.53	2.811

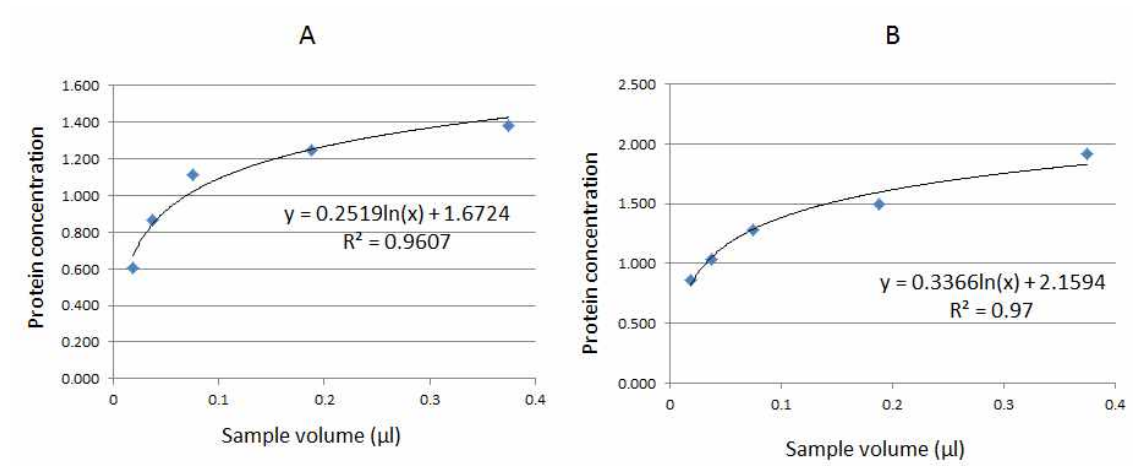
  

B	ORF2-HIS						ORF2 세포파쇄액				
Loading (μl)	0.5	1	1.5	2	2.5	3	0.025	0.05	0.1	0.25	0.5
Sample (μl)	0.375	0.750	1.125	1.500	1.875	2.250	0.01875	0.0375	0.075	0.1875	0.375
Protein concentration (mg/ml)	0.173	0.347	0.520	0.693	0.866	1.040	<b>0.862</b>	<b>1.032</b>	<b>1.286</b>	<b>1.492</b>	<b>1.915</b>
Density (vol. %)	0.833	1	0.99	1.27	1.599	1.947	1.604	1.918	2.387	2.767	3.548

위에서 얻은 Y2805 세포파쇄액의 ORF2 단백질 농도와 density 값을 아래 그림 18의 로 그 그래프로 나타내어 ORF2의 농도를 계산 할 수 있는 수식을 얻었다. 결정계수인 R<sup>2</sup>의 값이 0.9 이상이므로 계산된 ORF2 농도 값은 유효성을 가진다. 효모내에서 발현되는 ORF2의

농도는 평균 0.385 mg/ml로 계산되었으며 이는 실험에 사용된 균체 전체 전체 단백질의 8.8%에 해당하는 양이다.

【그림 18】





## 제 2 세부과제 : 항원 생산 공정 개발

### 1. ORF2를 발현하는 재조합 사카로마이세스 세레비지에 균주의 발효조를 사용한 발효 배양

현재까지의 연구결과 PCV2 ORF2를 사카로마이세스에서 재조합 발현하는데 있어서 분비발현은 매우 낮았으므로 세포내 발현을하기로 결정하고 재조합 효모균주를 발효조를 사용하여 발효배양하고 효모전세포 (yeast whole cell), 세포파쇄액 등 동물실험을 위한 시료를 준비하였다.

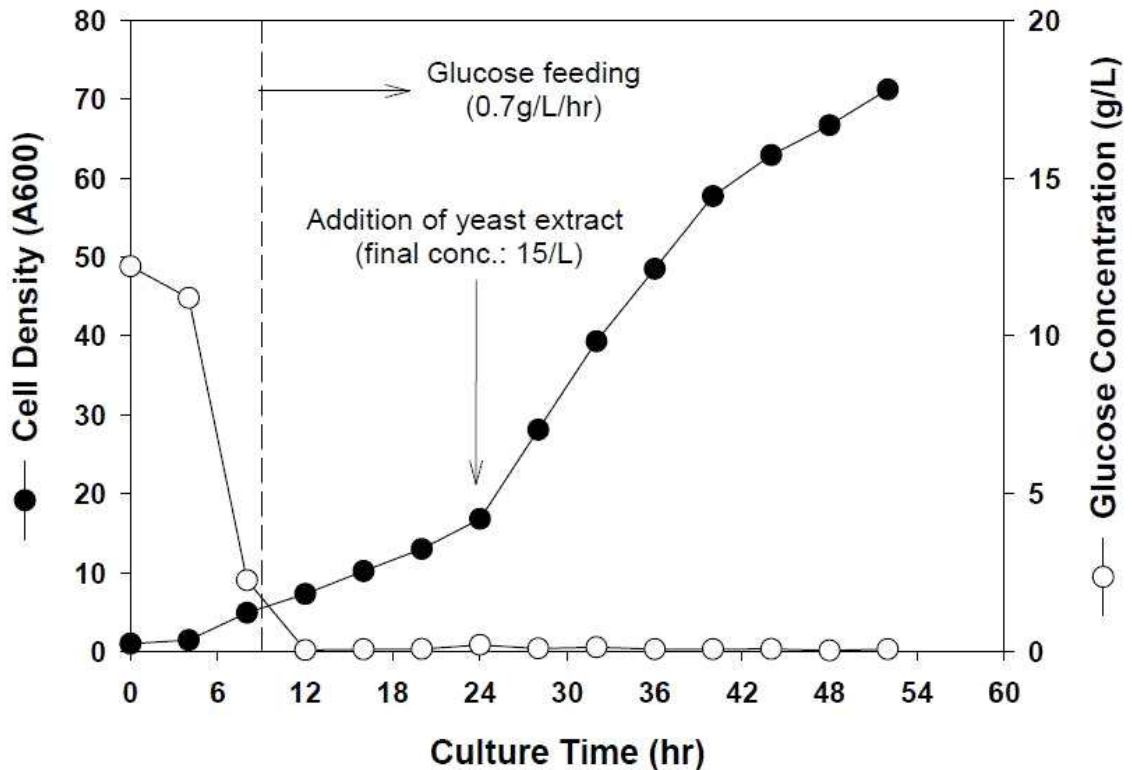
썬코바이러스 백신의 효과 확인을 위한 실험동물인 기니피그 실험과 목적 동물인 돼지를 사용한 동물시험을 위해 ORF2를 발현하는 재조합 효모 균주를 발효 배양하였다. 위의 실험들 중에서 가장 우수한 것으로 나타난 유전자발현 플라스미드/효모숙주세포 조합인 pGAL10-ORF2 / Y2805 $\Delta$ gal80 균주를 사용하여 5L 발효기에서 유가식 배양을 하였다. 아래 표 1은 유가식 배양 시 사용된 배지 조성을 나타낸 것이다.

【표 1】

전 배양 배지		본 배양 배지		공급 배지	
성분	농도(g / L)	성분	농도(g / L)	성분	농도(g / L)
포도당	20	포도당	15	포도당	600
효모추출액	10	MgSO <sub>4</sub>	2	-	-
펩톤	20	효모추출액	20	-	-
-	-	펩톤	10	-	-
-	-	(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	20	-	-
-	-	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7	-	-

유가식 배양은 24% 암모니아수를 이용하여 pH를 6.0으로, 배양 중에 온도는 30℃로 유지시켰다. 균체의 성장은 점차적으로 증가하여 OD<sub>600</sub> 71까지 도달하였다(그림 1). 배양 후 세포를 회수한 후 Homogenizer를 이용하여, 1,000 bar에서 4회 세포파쇄를 수행하였고 세포파쇄액을 준비하였다.

【그림 1】

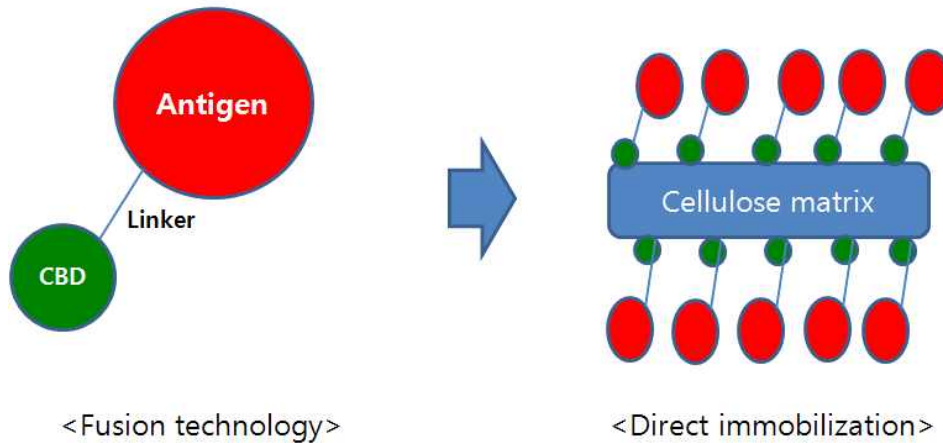


## 2. 실험실 규모에서의 셀룰로우스 결합단백질의 부착된 항원 후보단백질 생산공정 개발

대장균에서 재조합 단백질 (예: 항원단백질(Antigen))을 발현시에, 활성형 형태의 단백질은 거의 용해성, 즉, 수용성 형태로 발현이 된다. 이 경우에 2,000가지 이상의 대장균 자체 단백질과 목적 단백질을 고순도로 분리 및 정제가 어려운 문제점이 있다. 따라서, 이 문제점을 극복하고, 서브유닛 단백질의 안정성 및 면역원성을 극대화하기 위하여, 당해연도에서는 5L jar fermentation를 통해서 생산된 항원단백질에 불용성 담체인 셀룰로우스 (Cellulose)에 결합력이 우수한 CBD (Cellulose-binding domain)을 결합하여, 융합단백질 (Fusion protein) 형태로 발현시켜, 이를 셀룰로우스 담체에 항원을 고정화하는 공정을 개발하였다(그림 2 참조).

본 연구결과에 따른 항원성 단백질 고정화를 통해 제조된 돈단독 백신은 항원 정제 단계가 따로 필요 없으므로 제조 방법이 간단하며, 항원 고정화시 면역 반응 능력이 향상되는 효과를 제공한다.

## Antigen immobilization



【그림 2】 바인딩 단백질이 결합된 항원단백질의 고정화 시스템

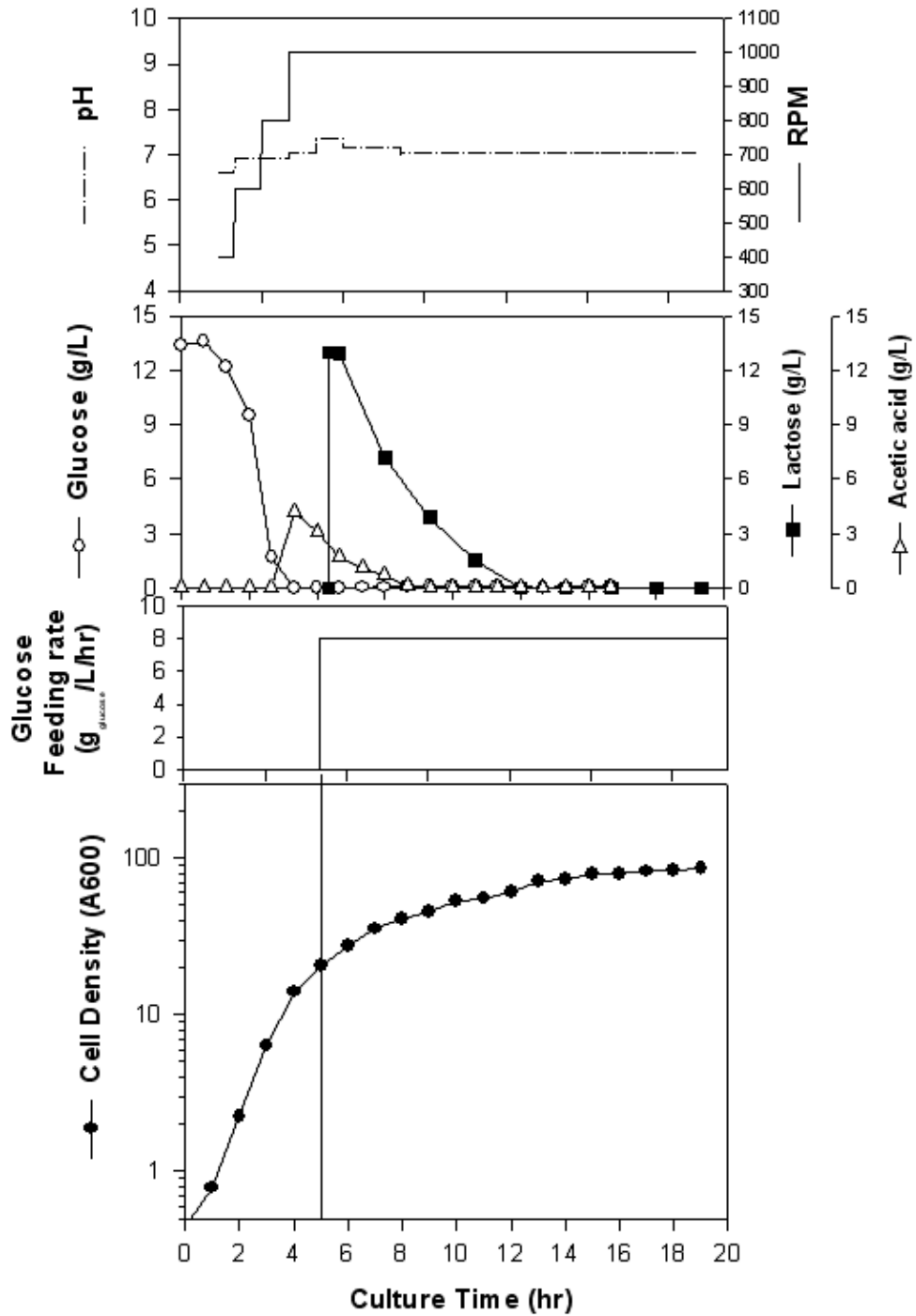
### 가. 5 L jar fermentor를 이용한 CBD-SpaA 융합단백질 생산공정 개발

CBD-SpaA의 융합단백질의 과발현을 위하여 재조합 대장균 BL21(DE3)/pKPM-CBD-Lk-SpaA-H6를 이용하여 5 L jar fermentor를 이용한 유가식 배양을 수행하였다. 배지조성은 표 2에서 처럼 기질의 포도당 농도를 30 g/L로 하고, 이 포도당이 다 고갈되어, pH, DO가 급격하게 증가하는 시점에서 대체 유도물질인 lactose의 20 g을 일시적으로 공급함과 동시에 고농도의 포도당 (glucose)이 함유된 공급배지를 공급하였다. 배지조성은 표 3에 나타냈고, 배양온도와 pH 등의 배양조건은 회분식 배양과 동일하게 수행하였다. 배양결과는 그림 3에 그래프로 나타냈고, 배양 후 CBD-SPaA의 발현율과 농도는 표 3에 나타내었다.

【표 2】 CBD-SpaA의 생산을 위한 유가식 배양에 사용된 배지조성

성분	초기배지 (g/l)	첨가배지 (g/l)
Glucose	30	600
Lactose	-	10
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	3	-
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1	-
Yeast extract	20	-
Caseine Peptone	10	-
NaCl	0.5	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	-
Kanamysin	0.05	-
Trace element	1ml/l	-

\*Trace element : 8.4 g of FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 2.4 g of ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.48 g of CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 13.2 g of CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 2.4 g of MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.24 g of Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.48 g of CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.06 g of K<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · XH<sub>2</sub>O in 1 liter of 1 M HCl



【그림 3】 재조합 대장균 BL21(DE3)/pKPM-CBD-Lk-SpaA-H6의 유가식 배양 결과

【표 3】 발현된 CBD-SpaA의 정량

수용성 단백질 중 CBD-SpaA의 발현량	35%
배양말기 cell density	84.5 OD
배양말기 cell weight(g <sub>DCW</sub> )	30.4 g/L
총단백질농도	15.21 g/L
CBD-SpaA 발현양 (g/L)	5.32 g/L

나. 실험실 규모 CBD를 affinity tag으로 사용하여, 항원단백질 one-step 분리정제공정개발

용해성 CBD-SpaA는 아비셀에 흡착공정을 수행하였고, 바인딩 능력은 순도 81%를 가지는 1.92±0.001 mg CBD-SpaA/gAvicel로 측정되었다. 본 연구에서는 SpaA의 수용성 형태의 발현을 유지하고 이 단백질을 셀룰로오스 담체인 아비셀에 흡착시킴으로써 CBD-SpaA 융합 단백질이 높은 순도를 유지하면서 쉽게 정제가 이루어짐을 알 수 있다. 용해성 CBD-SpaA 단백질 정제 후, 정제 CBD-SpaA (순도 85.1%)의 아비셀 고정화 능력은 순도 94%를 가지는 3.11±0.015 mg CBD-SpaA/gAvicel로 측정되었다 (표 4). 본 연구에서의 CBD-SpaA 융합 단백질은 분자량이 77.8 kDa 로 그 크기가 크에도 불구하고 아비셀에 잘 결합함을 알 수 있다. 본 연구의 아비셀에 고정화된 CBD-SpaA 단백질은 용해성 형태로 발현되므로 활성형 단백질로 바로 이용할 수 있는 장점이 있다.

【표 4】 CBD-SpaA의 아비셀 결합 능력

구분	용해성 CBD-SpaA	정제 CBD-SpaA
CBD-SpaA/g <sub>Avicel</sub>	1.92 ± 0.01 mg	3.11 ± 0.015 mg
순도(Purity)	81 %	94%

## 제 1 협동과제 : 백신 효능 검정

### 1. 사카로마이세스 세레비지에 균주에서 발현된 PCV2 ORF2의 다양한 제제 형태 시험 백신 제조 및 기니피그를 이용한 면역원성 조사

사카로마이세스 세레비지에 균주에서 발현시킨 ORF2가 항원으로서 역할을 할 수 있는지 평가하기 위하여 기니피그에 접종하여 항체가 생성되는지를 확인하였다. 이 때 세포파쇄 유무, 정제를 위한 히스티딘 표지의 유무 또는 NLS 포함 여부 등 유전자 조작에 따른 비교평가를 하였다. 특히 세포벽 파쇄가 어려운 효모의 단점을 극복하기 위해서, 재조합 단백질을 발현하는 효모 균주를 파쇄하지 않고 효모 전세포를 항원으로 즉시 사용 가능한지 알아보기 위하여 ORF2가 발현되는 것을 확인한 효모 균주를 파쇄하지 않고 전세포를 열-불활성화 처리구와 포르말린-불활성화 처리구로 나누어 시험백신을 제조하였다.

ORF2를 발현하는 Y2805 $\Delta$ gal80 균주를 배양하고 원심분리 후 얻은 균체(whole yeast cell)를 OD<sub>600</sub>값을 토대로 균수를 추정 (1 OD = 2x10<sup>7</sup>/ml)하여 2x10<sup>9</sup>/ml이 접종될 수 있도록 균체 농도를 맞추어 시험백신을 제작하였으며 효모 균체의 불활성화를 위하여 두 가지 방법을 사용하였다. 먼저 열-불활성화는 균체를 60℃에서 2 시간 처리 후 -20℃에서 보관하여 사용하였고, 포르말린-불활성화는 0.2% 포르말린 농도로 실온에서 72시간 처리 후 균체를 배지에 도말하여 효모가 자라지 않는 것을 확인한 후 사용하였다.

또한, 세포 내에 발현된 ORF2를 균체로부터 얻기 위하여 homogenizer를 사용하여 1000 bar에서 4번 통과 시켜 세포파쇄액을 제조하였다. ORF2 세포파쇄액(ORF2 세포파쇄물), 세포파쇄액을 0.2 마이크론 멤브레인 필터로 세포 찌꺼기를 제거한 경우 (ORF2 (MF)), ORF2의 아미노말단 47개 아미노산 NLS 서열을 제거한 경우 (ORF2(-NLS)), 그리고 ORF2의 카르복시 말단에 히스티딘-표지되어 있는 경우 (ORF2(+His))의 4가지 시험백신도 제조하였다. 제조한 시험 백신의 종류와 접종량 및 항원보조제를 포함하는 백신 조성 등 시험백신 생산 내역은 아래 표 1에 표시하였다.

【표 1】

	시험백신1	시험백신2	시험백신3	시험백신4	시험백신5	시험백신6	시험백신7
	ORF2 효모 (열-사멸 화)	ORF2 효모 (포르말린- 불활성화)	ORF2 효모 (세포 파쇄물)	ORF2 (MF)	ORF2 (-NLS)	ORF2 (+ His)	양성대조 균
조 성	2x10 <sup>9</sup> cells/ml	2x10 <sup>9</sup> cells/ml	2 mg/ml	0.6mg/ml	2 mg/ml	2 mg/ml	-
보조제	수산화 알루미늄 젤						-
비고	열-사멸된 효모 전세포	포르말린- 사멸된 효모 전세포	세포 파쇄물	MF-처리 세포 파쇄물	NLS- 결핍 ORF2 세포 파쇄물	히스티딘 표지된 ORF2 세포 파쇄물	Circoflex

해당 항원 후보들을 이용하여 상업적으로 사용되고 있는 PCV2 백신 (Circoflex)를 양성 대조군으로 하여 면역원성을 조사하였다. 시험백신은 양성대조군 구성과 동일하게 조합하여 시험백신을 제작하였고, 제작한 시험백신으로 기니피그에 접종 후 채혈하여 혈청을 분리, 얻어진 혈청에 대하여 ELISA를 실시하여 면역원성을 비교하였다.

실험동물은 기니피그이며, 기니피그 당 1회 접종량은 1 ml으로 조절하여 6종 시험백신 외에 베링거 인겔하임사의 Circoflex를 양성대조군으로, PBS를 음성대조군으로 추가적으로 실험하였다. 주입은 피하 주입으로 각 그룹당 8마리씩 접종하여 3주 후 혈액을 채혈하여 혈청 분리 및 56℃에서 30분간 비동화하여 ELISA를 수행하였다. ELISA는 Ab detection Sandwich indirect ELISA로서 JBT사에서 구입한 단일클론 항체를 1 ug/ml로 맞추어 사용하였고 PCV2 ORF2 항원은 베링거 인겔하임사에서 구입한 원액을 20배 희석하여 사용하였고 혈청 시료는 50배 희석하여 사용하였다. PCV2 특이 항체 코팅은 37℃에서 2시간, blocking은 37℃에서 2시간, PCV2 항원 coating은 37℃에서 1시간, 검체 반응은 37℃에서 1시간, conjugate 반응은 37℃에서 1시간, Substrate는 실온 암소 조건에서 10분간 반응시켰고 Stop Solution을 가한 후 O.D<sub>450</sub>값을 측정하였다 (표 2).

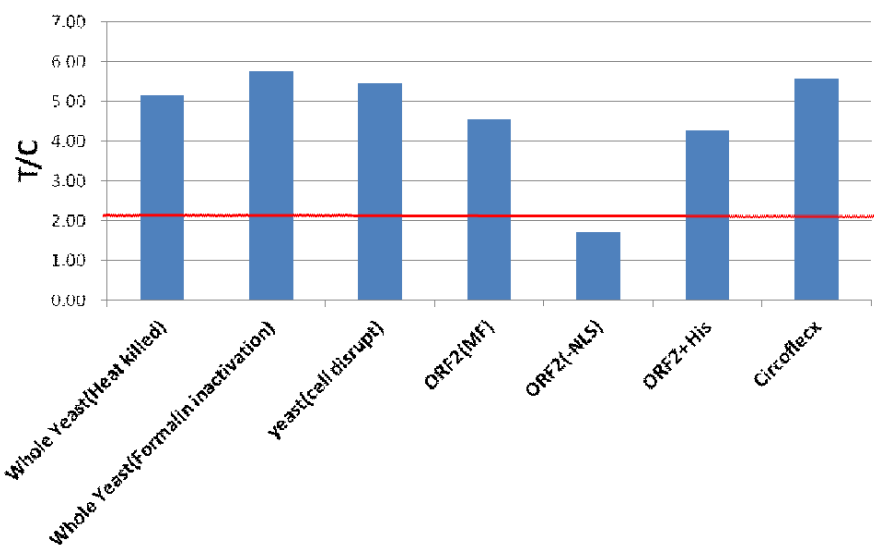
【표 2】

	시험 백신1	시험 백신2	시험 백신3	시험 백신4	시험 백신5	시험 백신6	시험 백신7	음성 대조군
	ORF2효모 (열-사멸)	ORF2 효모 (포르말린 불활성화)	ORF2 효모 (세포파쇄 물)	ORF2 (MF)	ORF2 (-NLS)	ORF2 +His	Circoflex (양성 대조군)	-
시료 1	2.36	2.37	2.09	1.58	0.44	1.72	1.96	0.34
시료 2	2.23	2.22	2.33	2.53	0.89	1.02	2.31	0.48
시료 3	1.96	2.32	2.39	2.37	0.66	1.59	2.24	
시료 4	1.94	2.59	1.84	1.46	0.73	2.63	2.34	
시료 5	2.01	2.09	2.40	2.55	0.87	1.15	2.47	
시료 6	1.96	2.56	2.53	1.22	0.86	2.45	2.52	
시료 7	2.32		2.23	2.02	0.61	2.16	2.10	
시료 8			2.18	1.19	0.56	1.28	2.36	
평균	2.11	2.36	2.25	1.87	0.70	1.75	2.29	0.41
T / C	5.15	5.76	5.49	4.55	1.71	4.28	5.58	

표 2의 실험에서 얻은 결과인 T/C value (접종군 평균/대조군 평균)을 그림 1에 나타내었다.



【그림 1】



T/C 값이 2.0 이상일 때 양성 판정을 하게 되며 평균값을 비교한 결과 효모 전세포를 사용한 시험백신 1과 2 그리고 효모 균체 파쇄 후 얻은 세포 벽을 포함하는 세포 파쇄액인 시험백신 3이 양성대조군과 거의 유사한 결과를 보여 재조합 백신 항원으로서 긍정적인 결과를 얻었다. 이러한 결과는 효모 전세포 성분이 항원 보조제와 같은 역할을 한다는 선행 연구 결과와도 일치한다. 전세포를 사용하는 경우 열-불활성화, 포르말린-불활성화 등 전처리 방법에 따른 면역원성 차이는 보이지 않았다. 멤브레인 필터로 세포찌꺼기를 제거한 MF의 경우 다소 낮은 면역원성은 접종량이 다소 낮은데 기인하는 것으로 보이며 히스티딘 표지된 용합 단백질을 항원으로 하는 시험백신의 경우 히스티딘-표지 용합에 따른 입체 장애에 의한 항체의 결합에 대한 영향이 있을 것으로 추정되었다. 한편 아미노말단 NLS가 결합된 ORF2(-NLS)경우는 면역원성에 커다란 영향을 미치지 않는다는 보고와 달리 음성의 결과 값을 보여 백신후보로서 적합하지 않은 것으로 나타났다.

## 2. 사카로마이세스 세레비지에 균주에서 발현된 ORF2의 목적동물 돼지 자돈을 사용한 면역원성 조사

썬코바이러스 백신의 실제 목적동물인 돼지를 실험동물로 사용하여 PCV2 ORF2의 3가지 형태의 시험백신을 제조하여 면역원성을 조사하였다. 시험백신은 실험방법 5-1에 기술한 방법으로 준비한 재조합 효모 균체, 세포파쇄액 및 멤브레인 여과를 거친 세포파쇄액(MF)을 아래 표 3에 표시한 바와 같이 준비하여 접종하였다.

【표 3】

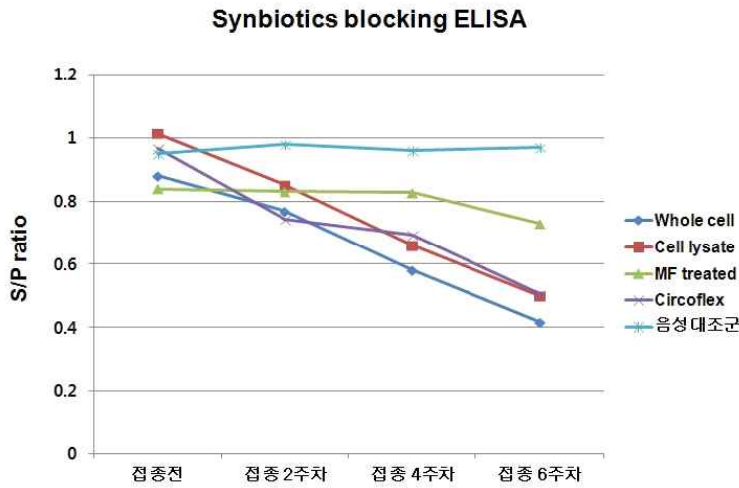
조성	백신 1	백신 2	백신 3	백신 4
효모 발현 PCV ORF2	효모 균체	세포 파쇄액	MF 처리균	양성대조군 (Circoflex)
	효모 균체 흡광도 기준	전체 단백질 기준	전체 단백질 기준	
접종량	2x10 <sup>9</sup> cells/ml	2.2 mg/ml	1.0 mg/ml	
항원보조제	수산화 알루미늄 젤			

동물시험은 그룹별로 3두의 10~12주령 육성돈에 2 ml씩 근육접종 하여 6주간 실험하였고 양성대조군으로 Circoflex 사용하여 1 ml 근육접종 하였다. Synbiotics mono blocking ELISA 방법으로 면역원성을 나타내는 S/P 값의 변화의 추이 결과는 표 4에 표시하였고 그 평균값을 그림 에 나타내었다. Circo-flex와 유사한 추이를 보이고 있어 효모 발현 PCV ORF2는 백신으로서의 효력이 있다고 판단된다. 특히 MF를 처리를 거친 시험백신, 세포파쇄액, 전세포 (whole cell)의 순서대로 항체가가 높아짐을 보였고 특히 전세포 백신의 경우에 가장 높은 항체가를 보였다.

【표 4】

그룹	개체번호	접종 1주 전	접종 2주 후	접종 4주 후	접종 6주 후
		S/P	S/P	S/P	S/P
시험백신1 전세포	1	0.94	0.55	0.59	0.41
	2	0.88	1.01	0.5	0.32
	3	0.82	0.75	0.66	0.52
	평균	0.88	0.77	0.58	0.42
시험백신2 세포 파쇄물	1	1.05	0.84	0.84	0.67
	2	0.96	0.91	0.8	0.5
	3	1.03	0.8	0.34	0.33
	평균	1.01	0.85	0.66	0.5
시험백신3 MF 처리된 세포 파쇄물	1	0.65	0.71	0.81	0.7
	2	0.96	0.92	0.73	0.54
	3	0.91	0.87	0.95	0.95
	평균	0.84	0.83	0.83	0.73
양성대조군 (Circoflex)	1	1.04	0.76	0.7	0.5
	2	1	0.75	0.67	0.48
	3	0.86	0.72	0.71	0.54
	평균	0.97	0.74	0.69	0.51
음성대조군	1	0.95	0.98	0.96	0.97

【그림 2】



### 3. ORF2/squalene 동시 생산 효모 전세포와 ORF2-Ty1 융합발현 효모 전세포의 실험 동물 (기니픽)에서의 항원성 평가

상기 실험동물과 목적동물에서 효능이 입증된 효모 전세포 형태로 ORF2의 3가지 종류의 재조합 발현 균주를 통해 항원량 결정시험과 백신보조제 효능 확인시험을 수행하였다. 즉, ORF2만을 생산하는 균주를 대조군으로 하고 ORF2+squalene 동시생산 균주와 ORF2-Ty1 융합발현 균주의 시험백신을 제조하고 실험동물인 기니픽에 접종하여 얻은 혈청으로 ELISA를 수행하였다.

【표 5】

구성	vac1	vac2	vac3	vac4	vac5	vac6	vac7	vac8	vac9	vac10
항원	효모발현PCV-ORF2 전세포				PCV-ORF2 squalene 동시발현 전세포			PCV-ORF2 + Ty1 전세포	circoflex	무접종군
항원량	2x10 <sup>7</sup> /ml	2x10 <sup>8</sup> /ml	2x10 <sup>9</sup> /ml	2x10 <sup>9</sup> /ml	2x10 <sup>7</sup> /ml	2x10 <sup>8</sup> /ml	2x10 <sup>9</sup> /ml	2x10 <sup>9</sup> /ml		
백신 보조제	유	유	유	무	무	무	무	무		
비고	항원량 결정시험 cell wall의 면역증강 효과				항원의 효능확인 항원량 결정시험			항원의 백신효능확인	양성 대조군	음성 대조군

기준에 기니픽과 돼지에서 시험한 전세포의 균수는  $2 \times 10^9/\text{ml}$  이며, 이를 기준으로 하여 10배, 100배 희석하여 각각  $2 \times 10^8/\text{ml}$ ,  $2 \times 10^7/\text{ml}$ 를 시험하였다. 효모 사카로마이세스 세레비지에 균주에서 PCV ORF2와 squalene을 동시에 생산하는 균주와 ORF2-Ty1 융합발현 균주의 항원성 시험과 항원량 결정시험을 동시에 진행하였다. 전세포의 불활화는 포르말린을 0.2% 실온에서 일주일간 처리하였다.

동물시험은 기니픽으로 하여, 기니픽 당 1회 접종량은 1 ml로 조절하여 8종의 시험백신 외에 Boehringer Ingelheim사의 Circo-flex를 양성대조군으로, 무접종 균을 음성대조군으로 추가적으로 실험하였다. 전체 10 그룹이며, 각 그룹당 10 마리로하여 subcutaneous infection(피하주사) 접종하고 5 마리는 3 주차 채혈하고, 나머지 5 마리는 5 주차에 채혈하였다. 채혈한 혈액은 혈청 분리 및  $56^\circ\text{C}$ 에서 30 분간 비동화하여 ELISA를 수행하였다. ELISA는 Ab detection sandwich indirect ELISA 방법으로 수행하였다.

【표 6】 채혈 3주차 ELSIA 결과

	혈청 1	혈청 2	혈청 3	혈청 4	혈청 5	평균OD	T/C값	판정
vac 1	3.437	3.354	3.250	3.173	3.437	3.330	7.00	양성
vac 2	3.241	3.212	2.924	3.172	3.206	3.151	6.63	양성
vac 3	2.964	3.183	3.041	3.260	3.255	3.141	6.60	양성
vac 4	3.310	3.194	3.215	3.222	3.283	3.245	6.82	양성
vac 5	0.956	0.485	1.184	0.906	0.587	0.824	1.73	음성
vac 6	3.432	2.371	2.777	3.201	3.355	3.027	6.37	양성
vac 7	3.425	3.297	3.030	3.194	3.271	3.243	6.82	양성
vac 8	3.390	3.468	3.407	2.907	3.440	3.322	6.99	양성
양성대조군	2.886	3.305	3.001	2.846	2.976	3.003	6.32	양성
음성대조군	0.449	0.502				0.476		

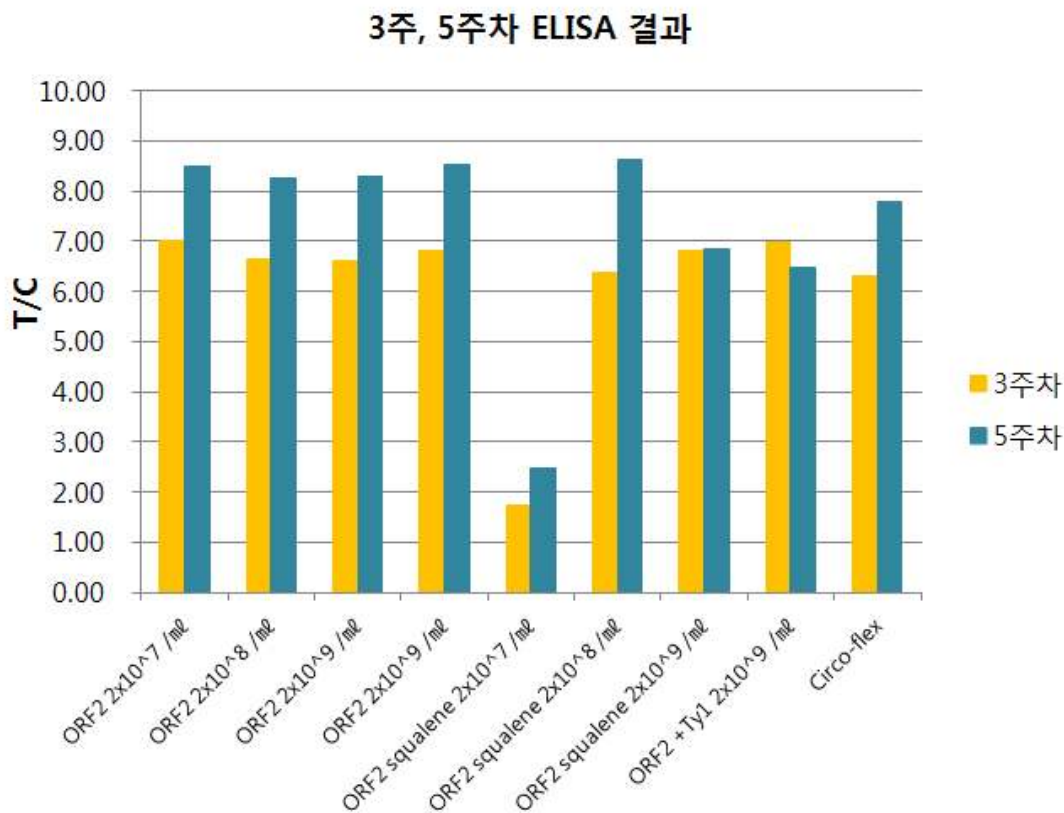
\* 양성 기준은 T/C값이 2.0 이상

【표 7】 채혈 5주차 ELISA 결과

	혈청 1	혈청 2	혈청 3	혈청 4	혈청 5	평균OD	T/C값	판정
vac 1	3.444	3.445	3.394	3.346	3.374	3.401	8.49	양성
vac 2	3.416	3.220	3.430	3.421	3.078	3.313	8.27	양성
vac 3	3.331	3.202	3.410	3.333	3.318	3.319	8.29	양성
vac 4	3.419	3.501	3.462	3.469	3.212	3.413	8.52	양성

vac 5	0.932	0.759	0.594	2.186	0.489	0.992	2.48	양성
vac 6	3.442	3.442	3.461	3.488		3.458	8.63	양성
vac 7	2.921	2.369	2.990	2.793	2.618	2.738	6.84	양성
vac 8	2.763	2.462	2.760	2.413		2.600	6.49	양성
양성대조군	3.259	3.131	3.027	3.206	2.967	3.118	7.79	양성
음성대조군	0.354	0.447				0.401		

【그림 3】



Ab detection Sandwich indirect ELISA 방식으로 혈청시험한 결과, 효모에서 발현한 균주 모두 양성대조군인 circo-flex와 비슷한 수준 혹은 그 이상의 효능을 보였다. PCV ORF2가 발현된 전세포 그룹(vac1~vac4)에서는 백신보조제 유무 및 항원량에 따른 차이가 없이 일정수준의 양성 T/C 값을 보였다. 그동안 시험백신에 넣어준 항원량이 과량인 것으로 판단된다. PCV ORF2와 Squalene를 동시발현한 그룹(vac5~vac7)은 항원량이 가장 적은 2x10<sup>7</sup>/ml(OD기준) 그룹에서 3주차 음성 결과를 나타냈으며, 5주차에서 양성으로 전환되었다. PCV ORF2에 비하여 상대적으로 PCV ORF2-squalene 동시생산 항원량이 적은 것이 원인으로 생각된다. ORF2+Ty1 항원역시 다른 시험군과 비슷한 수준의 양성반응을 보였다.

시험결과 그룹별 ELISA T/C값이 모두 높게 나타나 항원량에 따른 항체가 비교가 어렵게 되었으나 기존 시험백신 기준량이던 2x10<sup>9</sup>/ml 보다 100배 낮은 2x10<sup>7</sup>/ml의 항원량을 넣어

도 양성대조군 만큼 항체가 형성되는 것을 확인하였으므로 향후 백신에 투입될 항원량을 줄일 수 있을 것으로 보인다. 또한 효모 전세포에는 면역증강 역할을 하는 cell wall이 포함되어 있기 때문에 백신보조제를 넣지 않은 그룹에서도 양성결과를 얻을 수 있었던 것으로 추정되었다.

# 제 3 절. 3차년도 연구결과

## 제 1 세부과제

### 1. Signal trap 방법을 활용한 돈단독 신규 항원의 스크리닝

새로운 효율적인 백신 후보를 선별함에 있어서 원인균의 genome sequence database가 알려진 경우 genomics 혹은 proteomics 기법을 사용하여 cell wall 단백질이나 cell membrane 단백질, 혹은 분비 단백질 등 백신 후보 단백질 유전자를 유추하는 것이 가능하나 검정해야할 후보가 매우 많고 genome sequence가 알려지지 않은 경우 균체 배양 후 실제 후보 단백질들을 분리정제 하여 해당 유전자를 클로닝 하는데 많은 노력이 요구된다.

돈단독증 원인균에 대한 백신의 경우 원인균의 genome sequence는 알려져 있으나 역시 수많은 후보 유전자를 발현하여 검정해야 하는 문제를 가지고 있다.

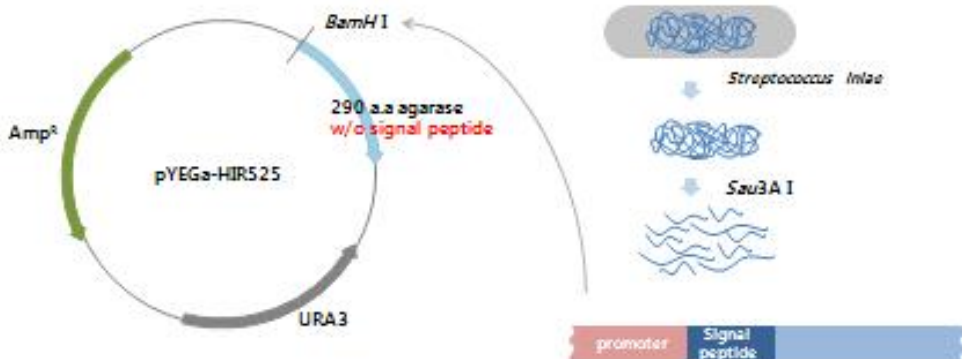
따라서 signal trap과 같은 초고속 스크리닝 시스템이 요구되며 본 연구팀에서는 agar를 분해하는 활성을 가지는 agarase 유전자의 5'-region에 DNA library를 구축하였을 때 분비 또는 세포 표면에 targeting 되는 표면항원 클론들만 agar 분해 활성 표현형을 보이는 점을 이용하여 후보 유전자를 클로닝 할 수 있는 "signal trap" 시스템을 구축하였다 (그림 1 참조).

【그림 1】

#### Application of 290a.a agarase in the screening of secretion sequences

290a.a agarase : *Pseudoalteromonas atlantica*, beta-agarase I

290-Fr1-BamH1 : agtc **ggatcc** gctgattggagctctttagtatt  
290-Fr2-BamH1 : cagt **ggatcc** agctgattggagctctttagtatt  
290-Fr3-BamH1 : tcag **ggatcc** cagctgattggagctctttagtatt



위의 agarase를 사용한 signal trap을 사용하여 돈단독 원인균 *E. rhusiopathiae* 균주의 DNA library를 구축하여 agar 배지를 분해하는 clone을 총 7개 확보하여 염기서열을 분석한 결과를 아래에 표시하였다.

**1. general glycosylation pathway protein** (624bp) locus\_tag= HMPREF0357\_10927

gtgaataaattatagaggaaatttctaaagagagtattagattttgttctttcttagttgggattatattactatcaccagtattagtaattgttagtgta  
gttgggggaatatttctaaaaggaacccatttttctacaagaagacctggtaagaatggtaaaatattcaaatataaaaatttagaacgatga  
gcaatgaaaaagatgataacggtaatttactacctgcgatgaaagacttattccttaggaaagttttaagatcaacatctatcgatgaattacc  
gaacttttaacatactaaaaggagatattgcaattgttgccacgtccattactaccaagatcttccgttatacaatagtaacaaaaagaag  
acatgatatttacctgattgacaggatattgctcaagttcatggacgaaatgatattgattggagtaaacgattagcattggatgtttggtatgtg  
ataattgttctttgtactagattgtaaaattttatataaacggtacttgaatttttaaacgcatggaattacatcaacaacgcgggacaacatt  
atgacggagtttaaggagacgaaaattag

translation : 207aa, 23.6 kDa, pI : 9.47

MNKLYRKF~~LR~~VLD~~FL~~SLVGIILLSPVLVIVSVVGGIFLKG~~NP~~FLQERPGKNGKIFKLIKFR~~MS~~NEKDDNGNLLPADERLIPY~~GK~~FLR  
STSIDELPEL~~FN~~ILKGDMAIVGPRLLPKYLPLYNSEQ~~RR~~HDILPGLTGYAQVHGRNDIDW~~SK~~RRLALD  
VWYVDNCSFVLDCKIFIKTVL~~VIF~~KRDGITSTNAGQTFMTEFKGDEN"

**2. sialidase A : neuraminidase** : locus\_tag= ERH\_0299

atgagaggggtatttaaattgaagaaaataagtaacatttctgctgcttcttactgtattgggtatttagtctttaccaagttctatctttgctat  
gaatgatctaaatcttaatgacctacttaagggagaaggctgctgatatttccgaccattatcacacatcaagaatttaaccaaggttccttaa  
ccttacgtttccgttctgaatcactatccagtgatcttactgactgtttcaatatcaaacgcaaatttgaaaacaactatttgcgctttactatcaaa  
acagtaccgtaagcttgcaattcagagatgaaaccggcaacatattatcaatactcgggcacaagtaccagcttgccaacgcaaact  
ggcacaccgttaccgttttaaatcatggaaatcgtgttgaaatatatgcagatggaatcttactgcatccaagataatattgattcacgaaaatcc  
aatctttaccttgaatcgtatgaaactgggtggcgttgacgctttaaagggtgaaaacttatggccttttagtgggaaaatttctcctaaccctaa  
cgatgacatcctcgatgctgataccattaaaactgcataacgacactgcttcaactgttgatccatcgacttcagaagcaattgagctctatgca  
ccgggacaagatggcagtaaaaactaccgcatccaagtcttctacaacgcaagatgggaccgtcttagctgcatgataaacgtattaccat  
caagcagactggggaatatcgatattcgaatccgtagaagtcaagacagcggtaaaacatggctgataccgaagtattattgatctaaagtc  
agatccaaatgatctcaggaaaatgtaatacgaactatcaagttccgattctcattgatgaggcaatggcacaagataaccgtaattggacg  
tatctatcttttagtctgatatttccagaatcacgtggattcttagtgccaaatgaagaccaagactttggtaaccttatgtaaccaagaagat  
ggtaccatattgttctgaaaggtactgatggcaaaaaatattacgcaaaagctgatggaaccgtatttgatctaaatactgatattcatcacgaatta  
ccgtgttcttagaatctgagaaaggcatgcctttcaatgatcttggtagctttatgaagggtgatacgtatgtgggaaatctacctaagaaaa  
gtcctctacgattcgtcaaacgcttattatggttaaccattcagatgatgacggcacaacatggctatcaccatgatattacaccacaagtca  
aagcggattggatgagttcattggaacgggtccgggtgtggattcaacttaaaaatggcgaacttgcttcccgtttaccataactaacgctca  
tggtggaattcacaatctacatcaatgatcaaaagtgccgatggtattacatggcataaaacggaatcactcaatgacaatcgtaaacttaacggtc  
aagttttaaattctaaaaccttaataacggcgggtcattggtaactgaatctcaagtggtccaacttaataatggaacctgaaacaattgacgca  
aatgtatccggaaaagtgtttaggtacttcttatgataatggagaaacctgggagaatgatcttgaacacttccaattaccgatgtttactaca  
aatgtccgccctacattataacatgaaggtaagagatatcttactgcaaatccaaatggtcctaaacgtaccaatggggctgtgaaactgctc  
aagttttagaagggtgaacgtctcgtacttcttcaatcgcataatgcaagtggaattacgagtacaatgtggttcaaccacttctgatggacatt  
tcggcttaattgatgaacataaaaaacgtaaaacggggataatattgctgatgatgtttaaagcgttctcctttgaagatttaggtgtcaagatacc



tcaagtctaagtcttgatattcaggatcctatcttgaaatcaaactcgataaggcttaattcctagttcaaacttaacgttaacgtataatacaactca  
aacaacaaaaccgaaacgtgttgatacgaacacattacgcttaacttagcagaaccgctcaccatttcaatggatttactgaagggtatcttgaa  
acattgatggaaaagcactcaatattgcaataaacaaggcttgatgaatcgcttgaaacacttaagcccttgatgttgaaaacttagaccaa  
gtgtgaaggatgcagcggatcaactgattaccaagcagaactcttaagtataatccctttaccatcggtgatttcatcaacaaattcatgcaatg  
attggtgagattgatccaactacattccaaactcaatggttgatgtaacggcatcaagtcaagaagatgaaaagggaatacacaagtagaagggt  
cccatcggttagccttgatggagaccaagctctctggcactccaaatgggggtgataagaaccgcccatttgatgtaacgggttcgttccatca  
tgacatggttgatgtaacgcttgacctatctaccagcgaacacggaaccccttaatgggtgctgcacagaatatcaaatcttaggtaaatgggcat  
gcaccacttcatgttctcaatgaaggaacccttgatacaaaccttacaagaaaataatcacgcttgaggatgctcatgtggatacactgatcttaa  
agttgtgaaaggcttgaaaactatggaaatgctgcgaaattaccctgcatggaaaaacgtatcgctgcacctcttgattattcaagcttaataca  
gtacttaaacacttgaaaactacaacaaagtctttataccgaagcaagtttaaaccttacttgaaataaagaaaagcctatgagcttctcgat  
aactcagaacaacacaggaaatgattgatgaaatggttataaacctcaatgaattcatcaataatctcgagtaagcaactatacttagattcatta  
cgtctgaaattcaagaggtgaaagattatgatacacttgattggctctctacacacagacaaggtacaggctgtttatgatgctcttgattca  
gcaaagcactgctcaaacgccagcttcagtttagaagtcttcaagctctacaccaaacgaagctcagattaagaagccattgaatcctt  
ggactcagccgttagaggttaagcaaacgtgaggtgaaacagaggaaccatcaaatctgatgaaaacatcacacctccaatcgtagatccaa  
aaccggatcggattctcaaaaactgaaactccagatagcaatactgaagacagtgctcaatttcacctaccgacaaaaccgatgtaacacttc  
ctaaaacagagacaagctgttctggattatcggacttggtatgctgtatccctatggtgtttgtgatttttaaacgaaaacaataa

translation : 1,204 aa, 133.8 kDa, pI: 4.86

MRGVFKLKKISNIFVLLTLVLGLISLPSSIFAMNDLNLNDLHLKGEADISDHLSHIKNFQGSLLRFRSELSLSSDIT  
ALFSISNANLENNYFALYYQNSTGKLGIEFRDETGHIIINTSGTSTQLANANWHTVTVLNHGNRVEIYADGILLASQDNIDFTKIQSL  
PWNRMKLGVARLKGENLWPFSGKISSLNLTHTDILDVDITKTLHNDTASTVDPSTSEAIELYAPGQDGSKNYRIPSLTTQDGTVLA  
AIDKRITHQADWGNIDIAIRRSQDSGKTWSDTEVIIDLKSDPNVSEQENVNTNYQSSAFLIDAMAQDNRNRIYLLVDMFPESRG  
FFSVQNEQDFGQPYVTKEDGTHIVLKGTDGKKYAKADGTVFDLNTDIITNYRVVLESEKGMFPNDLGLDLYEGDITYVGNILKK  
SPLRIRQTAYLWLTHSDDDGQTWSSPHDITPQVKADWMQFIGTGPVGIQLKNGELAFPIYHTNRHGGNSQSTSMIKSADGIT  
WHKTESLNDNRNFGQVLNSKTLNNGALVTESQVVQLNNGTLKQFARNVSGKVLVGTSDYDNGETWENDLETPITDVYSQ  
MSALHYNHEGKEYILLANPNGPKRTNGAVKLLQVLEGERLVLLSNTHMQSGNYEYVQPLPDGHFGLMYEHKKPENGDNMS  
MMFKRFSFEDLGVKDTSSLSLDIQDYLEIKSDKALIPSSNLTYNTTQTKPKRVDTNLTFRNLAEPVTLNGFTEGYLETLDGKALNIA  
NKQGLDESLETALKALDFENLAPSVKDAADQLITKAELSDNPFITGDFIQIHAMIGAIPTYIPNSMFDVTASSQEDEKNTQVEGP  
IGLAFDGDPTFWHSKWGDKNPPFDVTVSFHDMVFNALTYLPRQDGLNGVVTEYQILGKLGDAPLHVLEGTLDNLTKKIIT  
FEDAHVDTLIFKVVKGLENYGNAAEITLHGKTYRAPLDYSSLNQVLKLTENYNSLYTEASFKPLLELKEKAYELLDNSETTQEMIDEMV  
INLNEFINNLELSNYTLDSLRLKIQEVEDYMNTLDLALYTQTSVQAVYDALDSAKALLQTPRFSFRSLFKASTPNEAQIKEAIESLDSAVR  
GLSKREVETEESNPDENITPPIVDPKPDTSQKPEPDSNTEDSAQISPTDKDVTLPKGTQAVSFGFIGLm<sup>l</sup>VSLCGFVIFKRKQ.

### 3. hypothetical cytosolic protein : locus\_tag= ERH\_0130

atgcttagtactgtttggaggagatgctcatgaagaactaataaagaagaattattcttagtatttctgataattgttgatgcatgcatgctata  
ttacttagttacattgatgctgggtgagagctcctcaagaattcctatagagatggaaactatattgtgggaacagatttagatccaggagaatataatgcttca  
cggatcaagaaggctatttgaataaagaatcaaaatcattcacagattaagagcaacgacaatttfaaagggaattcaattatcatttaaatgagaatg  
aagtaattgaggttcaagagcacttatataatccttatatagcttcgacagaactcaagcctcaagcagatggcatgataagattggggaacatttagatgctg  
gaacgtataaataaactgaattaagtggttattatgaaatcacacatcgtccgatcataatgctcagcatattcttgagaataataatttaccggatcagat  
tacgatttatgtaaggacggggagatctaaa  
acttaattcagccttgattctgaaacgacctatcataa

translation : 199 aa, 22.6 kDa, pI: 4.51

m<sup>l</sup>STVWEEMSMKETKKIKRRIILSIFVLIVACACLYLVTFDAGESPQEFPEYSGNYIVGTDLDPGEYm<sup>l</sup>LTDQEGYFEI  
RNQNSSQIKSNDNFKGNISITLNEVEIEVSRALIYPYIASPELKPQADGMYKIGEHL DAGTYKLTLSGYYEITSSD

HNVDILENNNFTDTVTIYVKDGEYLKLSALILERPSS.

#### 4. small conductance mechanosensitive ion channel (MscS) family transporter

: NC\_015601, locus\_tag= ERH\_0358

atggaaaatcatatattatTTTTGAAAACCGATTGTTTACGTTGATAAGCATTGCATTAACGCTGCTATTGTGTTGTGATTGTCGAGTCATACGTAAGAAGTTAA  
TAAAATTGAAAATAAGTACCCTGGGAACAACAACGAAGTATACCAATCATTCAAGAACACTGGTGTATGTTGTTATTTCAATGCGTTATCATAATTT  
AGAACCAATTGGATTGGATACAAAACCGATTCTGCGGTACACAAGTATTGGAAGTGTGCGGTAGGGTTGGTGCACAACAAGTAAAGGATGCATTAATG  
GATCTTATTCTATCTGAGAATCAATTAATGTTGGTGTATGGTTTCGTTGTCAGATGTGACAGGAACGGTTGAAGACATCACATTACGTCACGCGTTACGCAA  
TGGCCTGTATGGGAAGGTTTATATACACCAATGGTGTAGATAAGATGGTTACAAATATGCGAAAGAGTATATGTTGCGGTTGCAATGTACCGTTCCTACG  
ATAAAGATCTGGATACTATTTAGAAGTTTAAATGATACCGTGAACACTACCAAAATCCGGTTCAATCATGCAGGCACCAAGTTGACAGGGTGTACAGAAT  
ATGAGGAAAGCTCATAAATATACGGATTACATGAAAACGTATGTGGTAAGAATTGGCGGTGAACGCGATCTGCGACGTGTTATTCTATGCATTGAG  
GCATGATATTTCACTACCATTCCAACCGTACTGTTATGTTGAACAAGATTTATCCAAGT

translation : 271 aa, 30.5 kDa, pl: 6.18

MENILFFEKPIVLRLLISIALTLIVFVIVRIRSLIKIENKVPLGKQQRVTYPIISRTLIVYVYFIAFIIILETIGLDTKPILAVTSIGSVAVGFGA  
QQLVKDVIINGFFILSENQFNVDVVSLSLSDVTGTVEDITLRTRLRNGTDGKVIIPNNGEIKMVTNMSKEYMFAVNVNVPVPYDKDL  
TILEVLNDTVKHQNPQSIMQAPVQGVTEYEESLNIRITCKTYVGKNWAVERDLRRVIIYALEAHDISLFPTRTVYVEQDLSN.

#### 5. hypothetical protein HMPREF0357\_1207 : locus\_tag= ERH\_1503

atgaagcaacacagtaaaaggtctaccatTTTTATATTAATCTTCACTTACAACCTTGAGTGTAGGTGGTTTTTGGCTACCGTGCATACCAATCAAAAACAAGTATT  
GATGGTGGTACTACAAGCGAGAACAGTTTTATCACTTCGCAAAAATGCAACGGAATATCAAAAAGAAGTCTATAAGGAAGTACCTCGAACTAAAGAA  
GATCCAAGGGATGATAAAGTAATCTCAGAGCTGATCGCTCAAACTTTGCTGCTGTTTTATACATGGACCAATAAGTTGCGTTAACGATGTAGGTGGAATGC  
AGTATATCATAAGGACCTCGACTGGTTTATGGACAAGCGCTGGATCTTCTATAATGATATGCGTACTACAAGAAAAGGGAAGTGTAGACCAACACT  
GAAGTACTCATCATCAAGCAAGTGTAAAAAAGATAAGTTAGTTTAAATAGAACAAAGAAGATGAGTTGGTACGCTGAAGATGGTACGGTTAATACGGTTA  
CCAAGATGTGGAACGCACCACTCCAGTATATCGTGTCTGATTACATGGAAATCAAAAGACTCAGATGTTTAAATGTTCTGAGTTCAACAGAAAGCAGATATT  
TATGTAACGAAAGATGAAGATGGATTGATTAATCATGGAGGTAGACGATGGCCAAGTCAAGAACAACAACAACTAA

translation : 236 aa, 27.2 kDa, pl: 4.83

MKQHSKGLTIFILISLTLVSGGFFAYRAYQSKTSIDGGTSENSFYSLRKNATEYQKELYKELTSKLEDPRDDKVIS  
ELIAQNFVADFYTWTKLRFNDVGGMQYIHKDLDWVYGGALDFTYNDMRYEKEGKLDQTLVTSSSASAKKDKLVLIEQEDEL  
VTLEDGTVNTVTNDVERTIPVYRVSITWKYKDSVDLVNVSEFQQKADIYVTKDEDGLYSIMEVDDGQVKETT.

#### 6. hypothetical protein HMPREF0357 : locus\_tag= ERH\_1567

atgaaacgtctaagttctgttttagttttatgtcttttaacaggggtgtgcaaaagactccagaagaacctgaagtcattaaaccaccctggaatccttgaacc  
attgtgtttaaattaggaggtaagattatcaactctgtatctatcaaaacgttatttgaagatggttgggagccaactacagatattgattccataaaccttgcctc  
caatagttatacagacggatattgctttacgtaaaagatgtaataattttggattgcatTTTTCAATGCCGAGATGAGGAAAACTTTAGAAGAACGCTTGTG  
CATCAATAAGTGCAGAGAATCGGAGTCTATTACGATGATCCGGTTGATATTGTTGTGATGAAGGGATTTCAATGATACACCTAAAGAACAATCATTGAGC  
AATTAGGTGAATTAAGGAAGATGAGAATGCCGATTTAAAAACATAACATTTGAGCACATAAAAAAGCTAAGAGTACTTCAAGTTGATGTTGATTGAGC  
ACGATGGAATATATTGAATAACTAATTATCGAAAACCGATTCAAGTAA

translation : 193 aa, 22.2 kDa, pl: 4.64

MKRLSSVLVLLIITGCAKTPPEPEVIKPPVNTFETIVFKLGGKDYQLPVSYQTLFEDGWEPTDIDSITLASNSYTDGY  
ALRKDRNIIWIAFFNAADEEKLEETLVASISAENRESYYDDPVDIVVHEGISFDTPKEQIEQLGEFKEDENARFKNIT  
FEHNKAKSTFKFDVDSGRMEYIEITNYRKPIQ.

#### 7. pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein

: locus\_tag= ERH\_0304

atgagtaaaagaatattaattgttggaggggtagctggaggtgctcagttgcagctcgttctgctgcaagatgaacatgCGGAAGTCATTATGTTGAACGC  
GGACCGAATGTGCTCTCAAACCTGTGCTTACCCTAAGTGGCATTGTGCATCAAGTGTGACTAGTCTTAATGACACCAGAACAAATTAATAAACA

atataacatcattgcacgcacaagcactgaagttctaaaaaataatcgtgatcgaaaactgtaacggttaaaaatctgaaaccggggaagaatggatga  
agcatatgacaagcttcttatcaccaggagcaagtgcattttaccacgcagatcgaaggcgttgacggtgataatgtctttaccgtacgtaatgttgcgaca  
ftaaaaaattaacggacatcgtcaacaacaatattgaaacattaccggtgttggtgggtgattatcgggtgtgaagttgcggaacttgcgtcatgcag  
gtaaaaacgtaacacttgggaagcaattgatcaaatcatgagtcattcgactatgatatggcacaagtactacataaagaatgatggatcacggcattaa  
cctgattctgggtgatggcgftaagaagattacagaacaagtggtgaactgggttcaggaacaatcttagaatccgggtgcagttgtaatggcaatcgggtgtg  
cacctgaaacaagcttgcgaaagctgcagatctgaaatcgggtgttacaggtggaatfaagttgatcacaattacctacaatgataaaaacatttatgca  
gtgggtgatgcgattgaagttctcatcaaatcacacataaaccaacacgcttgcacttcaggtctgctcaacgtaacgacgtgcagccgagatcatatgt  
atggaattcctataacaataaaggtgttggatcatatgtgtcaagtattgacttaaatgctgctcaaccgggtcttaatgaaaaaatggcaaaggctaa  
cggttcgattatgacttgtttacattatccctggtgataaagttggattaatgccagatgcaaatccaatgcactttaactcttattgaaatccaacaggttaatt  
actgggtgcacaagcaatcgtaagggaatgtgataaacgtattgatgtgattgcgacaatgattcaaatgggtggaactcttgaagatcttaagaagtt  
gaattatgctatgcaccaccatttggtagcggtaaaagatgctgtgaatcatgcagcgttgttggftaaacctcttaccgggtcgttcaaccaagttctgtaacgca  
agttcgtgaattgtagagtcgaatgatgatattatagatgttcgtaagaacatgaatgacattaaagtcacctatcaatgcagtaaatattcattaagccaa  
attcgtgatcgttggatgaaattctacagataaacctgtatattacactgctgttaagccaacggtcacaatgctgtaatggcacttcaaaccttggtttga  
taatgtgattaatattcaggatcatatcttggatctgtgtttatgaatacttaatgatcaagtcacaggccgtgataaaatcgttacagaatacaactftaacta  
a

translation : 565 aa, 61.5 kDa, pI: 5.37

MSKRLIVGGVAGGASVAARVRRQDEHAEVIMFERGPNVVSFNSCALPYHLSGIVASSDDLVLMTPEQFKKQYNIARTSTEVKINR  
DAKTVTVKNLETGEEMDEAYDKLVLSPGASAILPRISIEGVDGDNVFTVRNVVDIKKLNHIVNNNIENITVVGGGFIGVEVAENLR  
HAGKNVTLVEAIDQIMSPFDYDMAQVLHKEMMDHGINLILGDGVKKITETSVELSGTILESGAVVMAIGVAPETSLAKAADLEIG  
VTGGIKVDHNYLTNDKNYAVGDAIEVFHQITHKPTLALAGPAQRQARAAADHMYGIPHNNKGVVGSVCVQVFDLNAASTGL  
NEKMAKANGFDYDFVYIIPGDKVGLMPDANPMHFLLFEYPTGKLLGAQAIGKGNVDKRIDVIATMIQMGGTLEDLKEVELCYAP  
PFGTAKDVVNHAALVGLNLLYGRFNQVPVTQVRELVESNACIIDVREEHEYALSHLINAVNIPLSQIRDRLDEIPTDKPVYLHCRSSQR  
SYNAVMAQLNLGFDNVINISGSYLGICVYEYFNDQVTGRDKIVTEYNFN.

(밑줄 : KEX2 cleavage site, 빨간색 : N-glycosylation site)

이들 염기서열이 코딩하는 단백질의 similarity를 분석한 결과 모두 cell membrane, cell wall, 및 분비단백질로 밝혀졌다 (표 1 참조).

【표 1】

## Application of 290 a.a agarase in the screening of secretion sequences

Blast : genomic Blast with *Erysipelothrix rhusiopathiae* ATCC 19414

Signal peptide prediction : SignalP 3.0

Subcellular location prediction : PSORTb

Protein	Cloning cDNA size	Blast peptide	Predicted subcellular location	Reliability score(s)	Blast	Identifies
200Fr1_500~1kb #1	667bp	+	Cytoplasmic/Membrane/ Extracellular	2.35/6.80	general glycosylation pathway protein (624bp)	(- 381, 276bp) 100%
200Fr3_500~1kb #1	847bp	+	Cell wall	9.52	sialidase A (Neuraminidase A) (3616bp)	-613~233bp 100%
200Fr2_200~500 #1	376bp	+	Extracellular	9.13	hypothetical cytosolic protein (600bp)	-181~102bp 100%
200Fr2_500~1kb #1,3	681bp	+	Cytoplasmic/Membrane/ Extracellular	2.35/6.80	small conductance mechanosensitive ion channel (MscB) family transporter (816bp)	-130~660bp 100%
200Fr2_500~1kb #2	426bp	+	Extracellular	9.13	hypothetical protein (711bp)	-208~216bp 100%
200Fr2_200~500 #2	429bp	+	Extracellular	9.13	hypothetical protein (682bp)	-173~264bp 100%
200Fr3_500~1kb #2	932bp	+	Cytoplasmic/ Extracellular	5.86/3.83	pyridine nucleotide-disulfide oxidore- ductase family protein (1698bp)	(- 373, 550bp) 100%

다음으로 이들 유전자의 전체 ORF를 확보하여 pET30a(+) 벡터에 클로닝하여 (그림 2) 대장균 BL21 균주에서 발현 시킨 후 total cell lysate를 준비하여 SDS-PAGE로 분석한 결과 그림 3과 같이 단백질 밴드를 확인할 수 있었다.

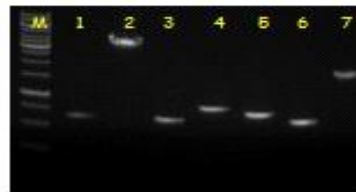
【그림 2】

### 돈단독 양원후보 cloning : pET30a(+)

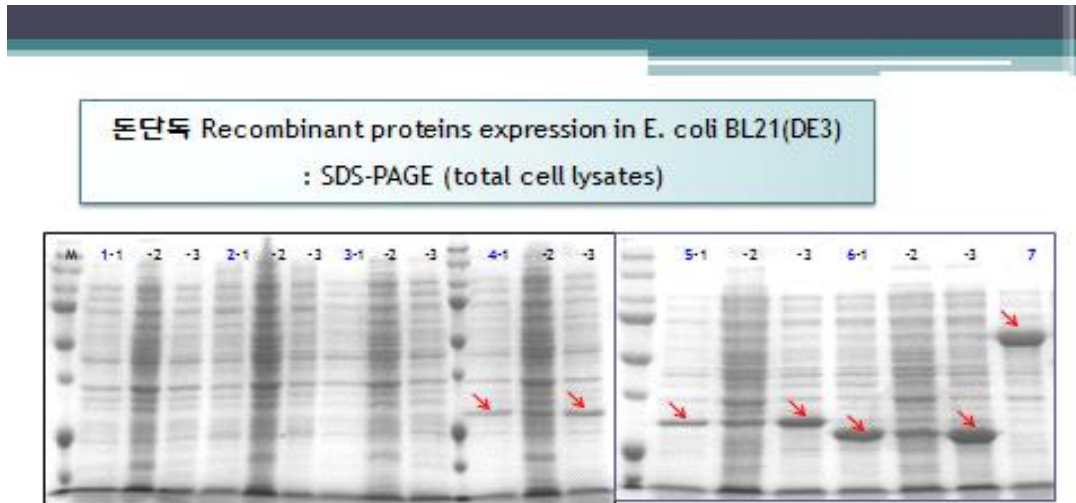
#### Infusion cloning Primers (Nde I /Xho I)

돈단독 1 (624bp)	F: 5'- TAAGAAGGAGATATACATATG_aataaattatatagaaa R: 5'- GTGGTGGTGGTGGTG<u>CTCGAG</u>_attttcgtctccttaaac
돈단독 2 (3,615bp)	F: 5'- TAAGAAGGAGATATACATATG_agaggggtattttaaattgaag R: 5'- GTGGTGGTGGTGGTG<u>CTCGAG</u>_ttgttttcgttttaaaaatcac
돈단독 3 (600bp)	F: 5'- TAAGAAGGAGATATACATATG_etttagtaactgttttgggagg R: 5'- GTGGTGGTGGTGGTG<u>CTCGAG</u>_tgatgatggctgttcaag
돈단독 4 (816bp)	F: 5'- TAAGAAGGAGATATACATATG_gaaaatcatcattattttt R: 5'- GTGGTGGTGGTGGTG<u>CTCGAG</u>_gttggataaaattgttc
돈단독 5 (711bp)	F: 5'- TAAGAAGGAGATATACATATG_aagcaacacagtaaggtc R: 5'- GTGGTGGTGGTGGTG<u>CTCGAG</u>_gitttctgtttctttgac
돈단독 6 (582bp)	F: 5'- TAAGAAGGAGATATACATATG_aaacgtctaaagttctgtt R: 5'- GTGGTGGTGGTGGTG<u>CTCGAG</u>_ctgaatcggttttcagat
돈단독 7 (1,698bp)	F: 5'- TAAGAAGGAGATATACATATG_agtaaaagaatatttaattg R: 5'- GTGGTGGTGGTGGTG<u>CTCGAG</u>_gttaaagttgtattctgtaac

#### PCR products

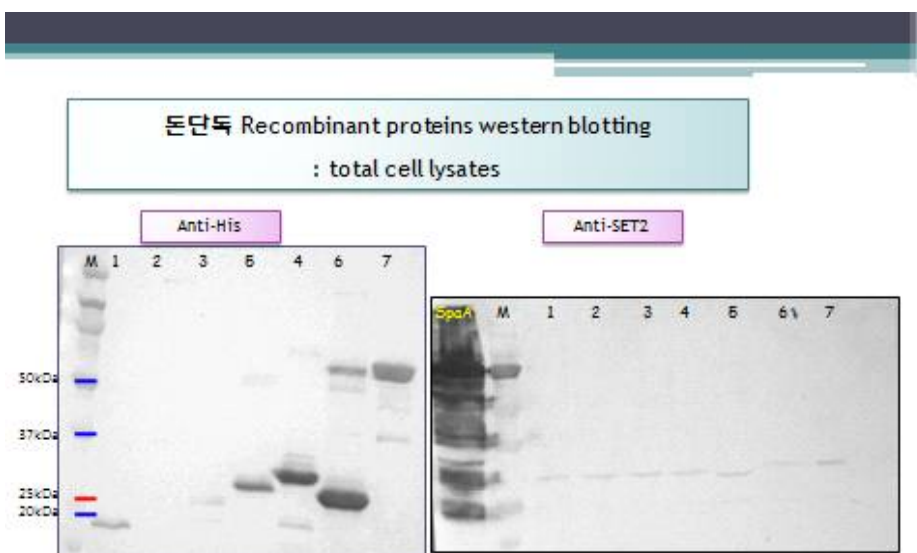


【그림 3】



확인된 단백질 밴드를 anti-His antibody와 돈단독 균주에 대한 항혈청을 각각 사용하여 Western blot을 수행한 결과를 그림 4에 나타내었다. Western blot 분석결과 2, 3 번 lane의 경우 단백질 발현이 매우 저조한 것으로 나타났고 4, 5, 6, 7 번 lane 의 경우 강한 발현을 확인 할 수 있었다. 그러나 이들 밴드는 예상과 달리 항혈청과 반응하지 않았으며 이는 일부 저조한 단백질 발현에 기인할 수도 있을 것으로 추정되나 추후 좀 더 많은 스크리닝 작업이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

【그림 4】



## 2. 재조합 효모 균주의 transcriptome 분석

### 가. ORF2 과발현 조건에서 사카로마이세스 세레비지에 microarray 분석

Microarray는 두 가지 목적을 위해 수행하였다. 먼저, 사카로마이세스 세레비지에 Y2805  $\Delta gal80$  균주에서 PCV-2의 ORF2가 발현될 때 up 또는 down regulation 되는 유전자를 탐색함으로써 ORF2 발현에 어떤 유전자가 영향을 미치는지를 알아보고자 하였다. 이는 ORF2의 발현량을 증가시키기 위한 균주 개량의 정보로 활용할 수 있기 때문이다. 두 번째로, ORF2가 발현되는 효모를 경구용 백신으로 활용하기 위해 효모가 돼지의 위장 내에서 잘 disruption 될 수 있도록 세포벽을 개량할 필요가 있다. 이러한 목적으로 산성 환경에서 발현이 저해되는 효모의 유전자를 찾아 이 유전자의 프로모터를 세포벽을 구성하는 유전자에 도입하여 효모를 경구 투여하였을 때 낮은 pH의 위장 내에서 세포벽을 구성하는 유전자의 발현이 저해되도록 하여 효모의 세포벽이 쉽게 disruption 되도록 하고자 하였다.

ORF2를 발현하지 않는 사카로마이세스 세레비지에 Y2805  $\Delta gal80$ 을 대조군으로 하여 pGAL10-ORF2 발현 vector를 가진 균주와 5 L 발효조에서 배양하였다. 배양은 YPGlu2% (yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, glucose 20 g/L) 배지를 사용하였고, 30°C에서 pH 5.5를 유지하면서 배지내의 glucose가 고갈되면 glucose 600 g/L, yeast extract 15 g/L을 feeding해 주었다.

48시간 배양 후 sampling을 하고 RNeasy Mini Kit(Qiagen)를 이용하여 total RNA를 prep하였다. 방법은 kit에서 제공하는 매뉴얼을 따랐으며 추출한 RNA는 GenoCheck사에 보내 RNA 양과 purity 등을 확인한 뒤 Affymetrix yeast genome 2.0 array를 사용하여 분석을 실시하였다. 각 샘플은 3개씩 준비하여 반복 실시하였다.

사카로마이세스 세레비지에 내에서 ORF2를 발현시킴으로써 발현이 저해되거나 증가하는 유전자를 분석한 경우 ORF2가 발현되지 않는 사카로마이세스 세레비지에 Y2805  $\Delta gal80$  균주를 대조군으로 하여 발현 증가율이 7배 이상 되는 유전자들을 표 2에 나타내었고, 발현이 약 1/5로 줄어드는 유전자들을 표 3에 표시하였다.

【 2】

Index	Probe Set ID	Description	GeneSymbol	Accession_ID	B2/gal80 intensity	p-value[B2 vs gal80]
440	1770142_at	orotidine-5-phosphate decarboxylase	URA3	NM_001178836	392.621	0.00114
26	1769349_s_at	Identified by expression profiling and mass spectrometry	GYP1	NM_001184662	128.043	0.0175
5257	1779372_at	Essential protein involved in karyogamy during mating and in spindle pole body duplication during mitosis localizes to the half-bridge of the spindle pole body interacts with Spc72p during karyogamy also interacts with Cdc31p	KAR1	NM_001183026	33.1465	0.0000207
1976	1773145_s_at	TyA Gag protein; the main structural constituent of virus-like particles (VLPs)	CLB6	NM_001181434	19.3455	0.000218
4850	1778593_at	Hypothetical ORF	YPT52	NM_001179805	16.1981	0.017
4974	1778824_at	Hypothetical ORF	MTR4	NM_001181482	16.1296	0.0164
4531	1778021_at	Hypothetical ORF	VPS51	NM_001179813	13.7505	0.00277
1749	1772720_at	Mitochondrial translation initiation factor 2	IFM1	NM_001183277	13.6751	0.000462
5243	1779348_at	Aurora kinase involved in regulating kinetochore-microtubule attachments associates with Sli5p which stimulates Ipl1p kinase activity and promotes its association with the mitotic spindle potential Cdc28p substrate	IPL1	NM_001184023	13.1012	0.0155
5134	1779133_at	Protein that functions in a complex with Kef1p to negatively regulate mitotic exit interacts with Tem1p and Lte1p; localizes to regions of polarized growth potential Cdc28p substrate	KEL2	NM_001181367	12.3803	0.000174
1352	1771931_at	Minus-end-directed microtubule motor that functions in mitosis and meiosis localizes to the spindle pole body and localization is dependent on functional Cik1p required for nuclear fusion during mating; potential Cdc28p substrate	KAR3	NM_001184238	12.2592	0.0000653
1533	1772278_at	Synaptonemal complex (SC) protein that connects homologous chromosomes partially during zygotene and entirely during pachytene potential Cdc28p substrate	ZIP1	NM_001180593	12.0985	0.000753
27	1769350_at	vegetative interaction with Kar3p	VIK1	NM_001184067	10.5199	0.00854
1612	1772446_at	RNA-Binding Suppressor of PAS kinase	RBS1	NM_001180249	10.2469	0.00104
4858	1778608_at	Hypothetical ORF	YOM40	NM_001182711	10.0715	0.000214
5043	1778958_at	Putative ubiquitin-specific protease	UBP16	NM_001183886	9.94315	0.0063
728	1770725_at	Kinesin motor protein involved in mitotic spindle assembly and chromosome segregation	CIN8	NM_001178876	9.82405	0.00466
3403	1775861_at	Protein that acts as an adaptor between Myo4p and the She2p-mRNA complex; part of the mRNA localization machinery that restricts accumulation of certain proteins to the bud; also required for cortical ER inheritance	SHE3	NM_001178478	9.47188	0.00223
5008	1778888_at	Product of gene unknown	TID3	NM_001179492	9.32877	0.0115
2663	1774467_at	Transcription factor IIIA (TFIIIA) with putative Zn-fingers	PZF1	NM_001184283	9.23802	0.0254
3205	1775493_at	appears to be required for the completion of nuclear membrane fusion and may play a role in the organization of the membrane fusion complex	KAR5	NM_001182563	9.22545	0.0134
1692	1772612_at	checkpoint gene involved in permitting entry into mitosis depending upon the assembly state of microtubules	BU81	NM_001181317	9.19853	0.000505
2507	1774146_at	Subunit of the NuA4 histone acetyltransferase complex	NAM9	NM_001182974	8.59168	0.0182
5332	1779515_at	Protein of unknown function that localizes to the nuclear side of the spindle pole body and along short spindles; forms a complex with Spc105p	APA2	NM_001180840	8.56581	0.00698
4983	1778840_at	Histone methyltransferase with a role in transcriptional elongation methylates a lysine residue of histone H3; associates with the C-terminal domain of Rpo21p; histone methylation activity is regulated by phosphorylation status of Rpo21p	SET2	NM_001181601	8.41458	0.00318
4848	1778591_at	Anchorage subunit of a-agglutinin of a-cells highly O-glycosylated protein with N-terminal secretion signal and C-terminal signal for addition of GPI anchor to cell wall linked to adhesion subunit Aga2p via two disulfide bonds	AGA1	NM_001183221	8.31236	0.0114
2650	1774433_at	Component of the GARP (Golgi-associated retrograde protein) complex Vps51p-Vps52p-Vps53p-Vps54p which is required for retrograde transport to the late Golgi; potentially phosphorylated by Cdc28p	VPS54	NM_001180335	8.20717	0.000119
5212	1779284_at	Specific translational activator for the COX1 mRNA also influences stability of intron-containing COX1 primary transcripts; located in the mitochondrial inner membrane	PET309	NM_001181954	8.10925	0.0000672
5001	1778879_at	coiled-coil protein involved in spindle-assembly checkpoint	MAD1	NM_001180951	7.97357	0.0109
1820	1772853_at	Low-affinity Fe(II) transporter of the plasma membrane	FET4	NM_001182832	7.80428	0.0279
4931	1778753_at	Identified by gene-trapping microarray-based expression analysis and genome-wide homology searching	CDC5	NM_001184613	7.79279	0.0186
5496	1779819_at	Actin-related protein. Part of the carboxypeptidase Y pathway.	ARP5	NM_001182898	7.63957	0.000418
3883	1776774_at	Involved in mitotic induction	CLB2	NM_001184216	7.560473	0.0504
1177	1771588_at	Protein required for normal transcription at several loci including HTA2-HTB2 and HHF2-HHT2 but not required at the other histone loci; functionally related to Spt10p	SPT21	NM_001182685	7.43086	0.00309
1136	1771518_at	Nucleolar protein required for 60S ribosomal subunit biogenesis	NOP8	NM_001183358	7.42491	0.0144
3880	1776770_at	protein of unknown function	BRE5	NM_001183228	7.35012	0.000752
4986	1778850_at	Protein implicated in polar growth functionally redundant with Boi2p; interacts with bud-emergence protein Bem1p; contains an SH3 (src homology 3) domain and a PH (pleckstrin homology) domain	BOI1	NM_001178325	7.10788	0.0269
4924	1778739_at	Protein of unknown function found in the cytoplasm and the nucleus; potential Cdc28p substrate	SPS4	NM_001183735	7.014873	0.0545

【 3】

Index	Probe Set ID	Description	GeneSymbol	Accession_ID	B2/gal80 intensity	p-value[B2 vs gal80]
1224	1771692_at	Third minor isozyme of pyruvate decarboxylase	PDC6	NM_001181216	0.05362	0.00793
358	1769997_at	Putative permease member of the allantate transporter subfamily of the major facilitator superfamily; mutation confers resistance to ethionine sulfide	SEO1	NM_001178208	0.06043	0.00202
1835	1772880_at	Protein of unconfirmed function involved in pyridoxine metabolism; expression is induced during stationary phase; forms a putative glutamine amidotransferase complex with Ssn1p with Ssn1p serving as the glutaminase	SNO1	NM_001182595	0.11175	0.0138
1103	1771460_at	Resistance to Sphingoid long-chain base. Putative transporter or flippase that translocates LCBs from the cytoplasmic side toward the extracytoplasmic side of the membrane.	RSB1	NM_001183468	0.12439	0.000619
3054	1775231_at	Meiosis-specific protein that localizes to chromosomes preventing synapsis between nonhomologous chromosomes and ensuring synapsis between homologs; complexes with Mnd1p to promote homolog pairing and meiotic double-strand break repair	HOP2	NM_001180898	0.13124	0.00693
4751	1778404_at	Hypothetical ORF	ZRC1	NM_001182752	0.13182	0.0443
3726	1776471_at	Involved in repression along with Mig1p of SUC2 (invertase) expression by high levels of glucose; binds to Mig1p-binding sites in SUC2 promoter	MIG2	NM_001181074	0.13351	0.00115
5295	1779450_at	Hypothetical ORF	PHO91	NM_001183191	0.14378	0.00664
2220	1773613_at	Plasma membrane transporter that transports tetra- and pentapeptides and glutathione; member of the OPT family	OPT1	NM_001181645	0.14406	0.0118
3822	1776664_at	dihydroxyacetone kinase	DAK2	NM_001179914	0.14499	0.0157
4213	1777388_at	Sulfur Transfer	STR3	NM_001181049	0.15045	0.00616
4205	1777376_at	Functions in transport of small peptides into the cell	PTR2	NM_001179883	0.15482	0.0093
2443	1774026_at	high affinity methionine permease	MUP1	NM_001181184	0.15957	0.00564
339	1769955_at	Cytosolic catalase T has a role in protection from oxidative damage by hydrogen peroxide	CTT1	NM_001181217	0.163	0.000303
4237	1777445_at	putative membrane protein	FLO1	NM_001178236	0.1673	0.00592
1876	1772958_at	The authentic non-tagged protein was localized to the mitochondria	SCM4	NM_001181181	0.16816	0.0084
3327	1775720_at	Homeodomain-containing transcriptional repressor binds to Mcm1p and to early cell cycle boxes (ECBs) in the promoters of cell cycle-regulated genes expressed in M/G1 phase; expression is cell cycle-regulated; potential Cdc28p substrate	YOX1	NM_001182385	0.18937	0.00228
5020	1778914_at	Hypothetical ORF	JJJ2	NM_001181593	0.18968	0.0221
5608	1780044_at	Ribonucleotide-diphosphate reductase (RNR) large subunit; the RNR complex catalyzes the rate-limiting step in dNTP synthesis and is regulated by DNA replication and DNA damage checkpoint pathways via localization of the small subunits	RNR3	NM_001179416	0.19467	0.00242
1646	1772517_at	Transcription factor. Multicopy suppressor of snf1 mutation. Key regulator of stress-responsive gene expression.	MSN4	NM_001179628	0.19609	0.00831
3783	1776596_at	subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex required for the catabolism of glycine to 510-methylene-THF; expression is regulated by levels of levels of 510-methylene-THF in the cytoplasm	GCV1	NM_001180327	0.19692	0.000853
3635	1776294_at	Protein of unknown function with similarity to hexose transporter family members expression is induced by low levels of glucose and repressed by high levels of glucose	HXT8	NM_001181647	0.20283	0.00445
3310	1775697_at	Hypothetical ORF	FRE4	NM_001183241	0.21373	0.0027
526	1770317_at	plasma membrane-bound exporter involved in the detoxification of excess spermidine	TPO1	NM_001181848	0.21412	0.0045
4675	1778270_at	Site-specific endonuclease required for gene conversion at the MAT locus (homothallic switching) through the generation of a ds DNA break; expression restricted to mother cells in late G1 as controlled by Swi4p-Swi6p Swi5p and Ash1p	HO	NM_001180287	0.21503	0.03
5547	1779922_at	subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex required for the catabolism of glycine to 510-methylene-THF; expression is regulated by levels of levels of 510-methylene-THF in the cytoplasm	GCV2	NM_001182695	0.21804	0.0031
5036	1778950_at	catalyzes the CTP-mediated phosphorylation of dolichol the terminal step in dolichyl monophosphate (Dol-P) biosynthesis. required for viability normal rates of lipid intermediate synthesis protein N-glycosylation.	SEC59	NM_001182509	0.21876	0.000241
5242	1779344_at	alcohol dehydrogenase isoenzyme V	ADH5	NM_001178493	0.21967	0.00703
4694	1778296_at	Appears to be a structural component of the chitin synthase 3 complex	MDM12	NM_001183261	0.2293	0.000751
5268	1779399_at	S-adenosylMethionine Permease	SAM3	NM_001184088	0.23401	0.00548
5523	1779866_at	Aspartic protease attached to the plasma membrane via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor	YPS3	NM_001182008	0.23839	0.00806
1056	1771373_at	involved in spore development	SPS100	NM_001179269	0.23922	0.000244



#### 나. 사카로마이세스 세레비지에 내에서 ORF2의 발현 증가를 위한 균주개량

사카로마이세스 세레비지에 내에서 ORF2 발현시 발현양이 변화하는 유전자들은 역으로 그들 유전자의 발현감소 또는 증가가 ORF2의 발현에 영향을 미칠수 있음을 확인하고자 하였다.

Microarray 분석결과, 사카로마이세스 세레비지에 내에서 ORF2 발현 시에 발현 증가율이 7배 이상 되는 유전자들을 참고로 하여 19 개의 유전자를 후보군으로 결정하였다(표 4). PCV-2의 ORF2를 발현하는 사카로마이세스 세레비지에 BY4741을 대조군으로 하여 후보군 유전자를 제거한 각각의 BY4741 gene disruption mutants에서의 ORF2 발현의 증감정도를 비교하였다.

【표 4】

	GeneSymbol	Systematic Name	Mutant type	Description
1	KAR1	YNL188W	DAmP	Protein involved in karyogamy and spindle pole body duplication
2	YPT52	YKR015C	Knock out	Putative protein of unknown function
3	MTR4	YJL049W	Knock out	Putative protein of unknown function
4	VPS51	YKR023W	Knock out	Putative protein of unknown function
5	IFM1	YOL023W	Knock out	Mitochondrial translation initiation factor 2
6	IPL1	YPL209C	DAmP	Aurora kinase subunit of the conserved chromosomal passenger complex
7	KEL2	YGR238C	Knock out	Protein that negatively regulates mitotic exit
8	KAR3	YPR141C	Knock out	Minus-end-directed microtubule motor
9	ZIP1	YDR285W	Knock out	Transverse filament protein of the synaptonemal complex
10	VIK1	YPL253C	Knock out	Protein that forms a complex with Kar3p at the spindle pole body
11	RBS1	YDL189W	Knock out	Protein of unknown function
12	TOM40	YMR204C	Knock out	Peripheral membrane protein of peroxisomes involved in peroxisomal inheritance
13	UBP16	YPL072W	Knock out	Deubiquitinating enzyme anchored to the outer mitochondrial membrane
14	CIN8	YEL061C	Knock out	Kinesin motor protein
15	SHE3	YBR130C	Knock out	Protein adaptor between Myo4p and the She2p-mRNA complex
16	TID3	YIL144W	DAmP	Component of the kinetochore-associated Ndc80 complex
17	PZF1	YPR186C	DAmP	Transcription factor IIIA (TFIIIA)
18	KAR5	YMR065W	Knock out	Protein required for nuclear membrane fusion during karyogamy
19	BUB1	YGR188C	Knock out	Protein kinase involved in the cell cycle checkpoint into anaphase

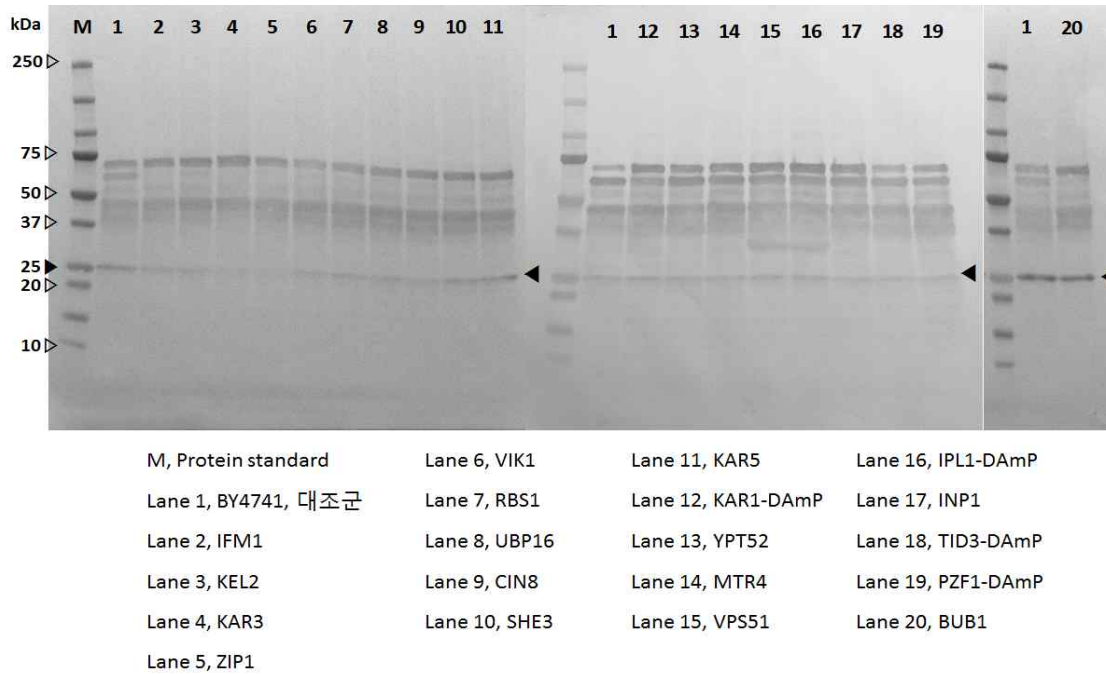
KAR1, IPL1, TID3 그리고 PZF1 유전자의 BY4741 gene disruption mutants는 mRNA 전사 수준을 4-10배 줄여 유전자 발현양을 감소시킨 Thermo Scientific Open Biosystems의 “Decreased Abundance by mRNA Perturbation (DAmP) approach.” Collection (CAT# YSC5059)을 사용하였다. 나머지 15개의 유전자는 Thermo Scientific Yeast Knockout (YKO) Collection (CAT# YSC1053)을 사용하였다.

배양은 BY4741은 YPGlu1%Gal1%(yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, glucose 10 g/L, galactose 10 g/L) 배지를 사용하였고 gene disruption mutant는 YPGlu1%Gal1% + G418 (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 사용하였다. 30°C, 180 rpm에서 48시간동안 교반하면서 배양하였다. 배양액 1 ml을 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하여 균체를 회수 한 후, 50 mM Tris/HCl (pH7.4) 200  $\mu\text{l}$ 를 넣어 세포를 풀어준 뒤 glass bead를 첨가하여 10분 동안 파쇄하였다. 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 파쇄되지 않은 세포와 세포파편을 제거하고 상등액을 취하여 PCV-2의 ORF2 분석에 사용하였다.

ORF2의 발현확인에는 PCV-2 polyclonal antibody를 이용한 Western blot을 사용하였으며 단백질의 정량은 Bio-rad protein assay를 이용한 Bradford 방법을 사용하였다. 동일한 양의 단백질에 포함된 ORF2를 비교하기 위해서 각각 70  $\mu\text{g}$  단백질을 포함하는 무세포 추출물에 SDS-PAGE loading dye를 3:1의 비율로 첨가하여 100°C에서 5분간 중탕하였다. 얼음에 박아 잠시 식힌 후 4-20% gradient gel에 loading하고 80V에서 전기영동을 실시하였다. Trans-Bolt™ Turbo(Bio-Rad)를 이용하여 나이트로셀룰로스 멤브레인에 반-건조법으로 단백질을 옮기고 TBS-T 완충액(20 mM Tris-HCl pH8.0, 137 mM NaCl, Tween 20 0.1%)에 skim milk를 5%로 첨가하여 1시간 동안 blocking하였다. 1차 항체를 2시간 반응시키고 TBS-T 완충액으로 멤브레인을 씻은(5분씩 3회) 뒤 2차 항체를 넣어 1시간 반응시켰다. 그리고 2차 항체에 결합된 AP(alkaline phosphatase)의 기질로 BCIP/NBT Purple liquid(Sigma)를 첨가하고 5-10분 정도 반응시켜 항체가 결합된 부위가 보라색 밴드로 나타나는 것을 관찰하였다.

Western blot 결과는 그림 5에 나타내었다. 다른 돌연변이체들에 비해서 KAR3, VIK1 그리고 ZIP1 유전자가 파괴된 돌연변이체에서의 ORF2가 약하게 발현되는 것을 확인하였다. 따라서 KAR3, VIK1 그리고 ZIP1의 유전자가 ORF2와 함께 과발현 될 시에 ORF2의 발현이 증가할 수 있는 가능성이 있을 것으로 추정하였다.

【그림 5】



다음으로는 ORF2의 발현정도가 대조군에 비해 상대적으로 적은 KAR3, VIK1 그리고 ZIP1 유전자를 ORF2와 함께 발현하도록 하여 ORF2의 발현이 증가하는지를 확인하였다.

사용한 프라이머는 표 5와 같고, 사카로마이세스 세레비지에 Y2805의 genomic DNA를 주형으로 하여 PCR로 증폭한 후 KAR3 유전자는 *MunI*과 *SaI*으로 절단하고 VIK1 유전자는 *EcoRI*과 *SaI*으로 절단하여 동일한 제한효소로 절단한 발현벡터 YEGα-HIR525에 삽입하였다. 또한 ZIP1 유전자의 경우, 증폭된 유전자 산물을 *SphI*과 *SaI*으로 절단하고 *SacI*과 *SphI*을 인식부위를 가지는 GAL10 프로모터를 절단하여 *SacI*과 *SaI*으로 절단한 발현벡터 YEGα-HIR525에 삽입하였다.

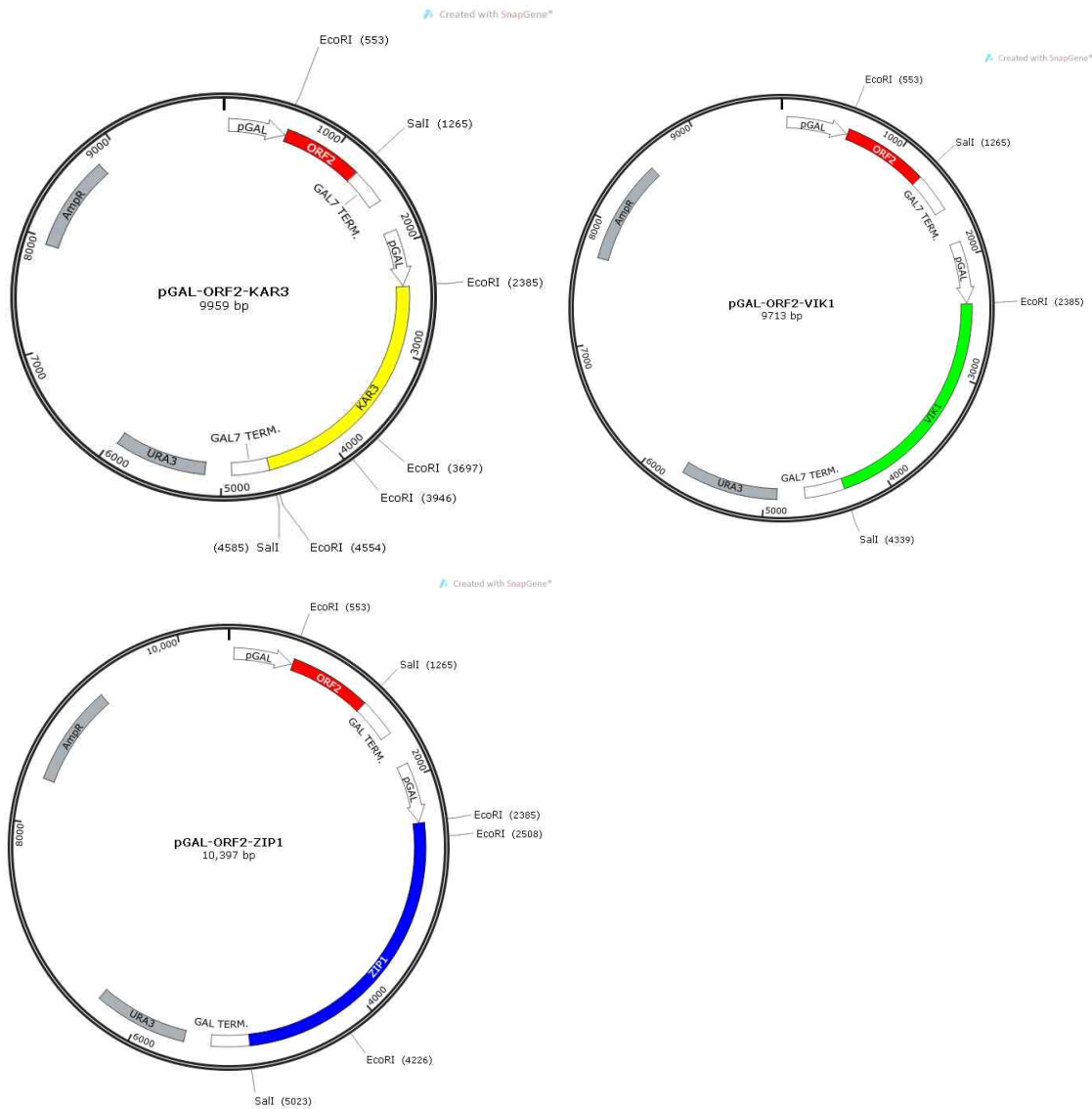
【표 5】

VIK1-EcoRI-F	TATA GAATTC AAAA ATGGCGTCACAGCAAAAAC
VIK1-SaI-F	TATA GTCGAC TTA AGTGAGCTTTTTCTTTCTTTTAC
KAR3-MunI-F	TATA CAATTG AAAA ATGGAATCACTTCCACGTAC
KAR3-SaI-R	TATA GTCGAC TCA TTTTCTACTAACCAATCTGGT
pGAL10-SacI-F	TATC GAGCTC GGTACCCGGG
pGAL10-SphI-R	AATA GCATGC TTGAATTTTCAAAAATTCTTACT
ZIP1-SphI-F	ATAT GCATGC AAAA ATGTCAAACCTTTTTTAGAGATAG
ZIP1-SaI-R	TTAA GTCGAC CTA TTTCTTCTCCTTTTCTTG

위의 KAR3, VIK1 그리고 ZIP1을 발현하는 벡터를 주형으로 GAL10 프로모터를 포함한 유전자를 PCV-2의 ORF2를 발현하는 벡터로 co-expression 시켰다. 벡터의 모식도는 그림 6에 나타내었으며, 사카로마이세스 세레비지에 Y2805 균주에 형질전환하였고, UD(Yeast

Nitrogen Base 6.7 g/L, uracil dropout supplement 0.77 g/L, glucose 20 g/L) 고체배지에서 배양한 후 PCR을 통해 형질전환체를 선별하였다.

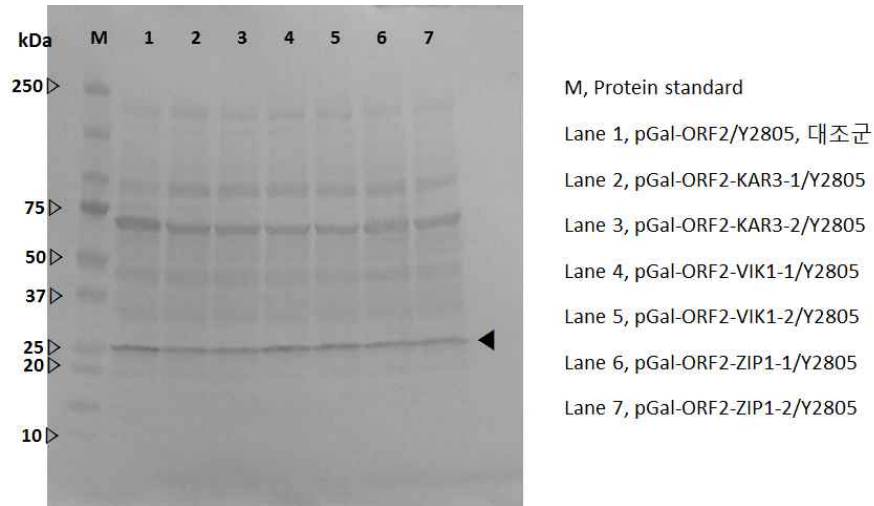
【그림 6】



Y2805내에서 ORF2가 효율적으로 발현 되는지를 확인하기 위해 배양 후 Western blot을 실시하였다. UD 액체배지 2 ml에 단일 집락을 접종하고, 30°C, 180 rpm에서 초기 배양한 후, 본 배양을 수행하였다. 본 배양은 YPGlu1%Gal1% 액체배지를 2 ml씩 분주한 뒤, 초기 배양한 균주를 1% 되도록 접종하였고, 30°C, 180 rpm에서 교반하면서 48 시간 배양하였다. ORF2의 확인은 gene disruption mutant때의 방법을 동일하게 사용하였다. 각 벡터 당 두 개의 형질전환체에 대하여 Western blot을 실시하였고 결과는 그림 7에 나타내었다. 동일양의 단백질내에서 ORF2 발현양을 비교한 결과, 대조군으로 사용한 ORF2만을 발현하는 벡터를 포함한 Y2805에서의 발현양에 비하여 KAR3, VIK1 그리고 ZIP1과 ORF2를 함께 발현하는 벡터를 포함한 Y2805에서의 발현양이 커다란 차이를 보이지는 않았으나 VIK1의 경우

다소 증가한 밴드 시그널을 보였다. 따라서 KAR3, VIK1 그리고 ZIP1 유전자가 발현되지 않거나 발현이 억제될 경우, ORF2의 발현양은 현저히 감소하지만, 이들 유전자의 과발현은 ORF2의 발현양의 증가에는 커다란 영향을 미치지 않음을 알게 되었다.

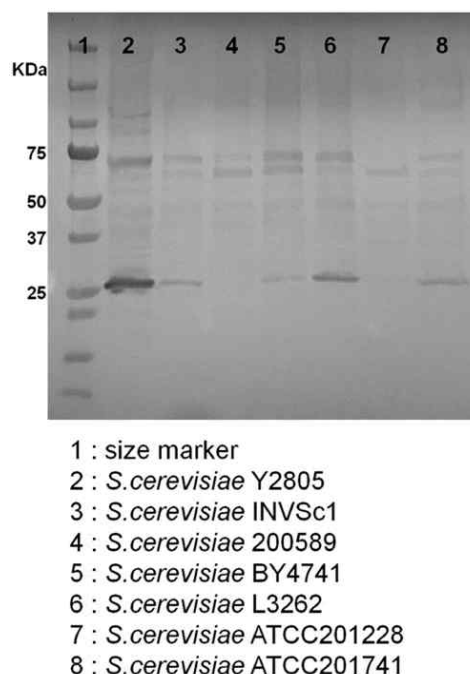
【그림 7】



### 3. 유전자 발현 최적 숙주세포의 선발

발현율이 우수한 것으로 나타난 GAL10프로모터를 이용하여 추가적으로 재조합 발현에 많이 사용되고 있는 다양한 사카로마이세스 세레비지에 균주에 ORF2를 도입하고 발현양을 비교해 보았다. 발현 벡터는 위에서 구축한 pGAL10-ORF2를 사용하였으며 사카로마이세스 세레비지에 Y2805와 비교하기 위해 사용한 균주는 INV Sc1, ATCC200589, BY4741, L3262, ATCC201228, ATCC201741 이다. 형질전환과 배양 방법은 상기 기술한 것과 동일하게 수행하였고, 동일한 양의 시료를 분석에 사용하여 Western blot을 실시하였다. 분석 결과는 그림 8과 같고 UVIBand MAX, 1차원 광학 밀도 프로그램 (optical density 1D program, UVIBand Max사)을 이용하여 ORF2의 발현양을 비교 분석하였다.

【그림 8】



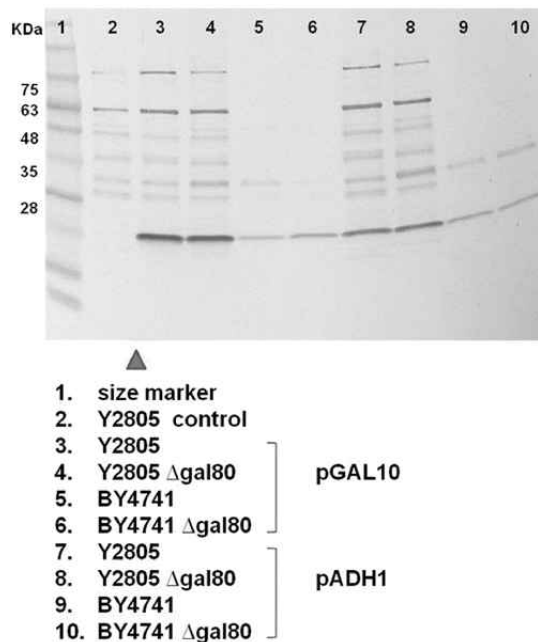
ATCC200589 균주에서는 ORF2가 발현되지 않았으며 ATCC201228 또한 발현양이 미미하였다. 나머지 균주들은 Y2805 균주에서 발현된 ORF2의 양을 100으로 하여 비교하였을 때, INV Sc1은 19.7%, BY4741은 15.0%, L3262는 40.0%로 나타났으며 ATCC201741은 20.4%인 것으로 관찰되었다. 이와 같이 균주별로 ORF2의 발현양이 상당히 차이가 크음을 알 수 있었고 Y2805균주가 가장 우수한 것으로 나타났다.

앞선 실험에서 발현율이 우수하였던 GAL10 프로모터의 경우 갈락토스 유발 프로모터로서 최적발현을 위해서는 배지 내에 글루코스가 존재하지 않아야 하는 조건과 갈락토스가 존재하여야 하는 조건을 모두 만족시켜야 하는데 갈락토스는 글루코스에 비하여 매우 비싼 탄소원이다. 본 연구팀은 값 비싼 갈락토스의 첨가 없이 글루코스만 사용하여도 GAL10 프로모터를 발현시킬 수 있는 사카로마이세스 세레비지에 GAL80 결핍주를 이용하여 재조합 단백질을 경제적으로 생산 할 수 있는 방법을 개발한 바 있다(이스트 GAL80 결핍주를 이용한 재조합 단백질의 생산 방법 국내등록 특허 제10-0947376호, 2010.3.5.)).

GAL80 결핍주에서 ORF2의 발현 양상을 조사하기 위해서, 재조합 발현벡터의 최적의 발현이 가능한 균주를 선발하기 위해 위에서 가장 발현율이 우수했던 사카로마이세스 세레비지에 Y2805, Y2805 $\Delta$ gal80 및 발현율이 저조했던 BY4741, 그리고 BY4741 $\Delta$ gal80 균주에 pGAL10-ORF2를 사용하여 리튬/아세테이트 방법을 이용하여 형질전환 하였고, UD(yeast nitrogen base 6.7 g/L, uracil dropout supplement 0.77 g/L, glucose 20 g/L) 고체배지에서 배양한 후 PCR을 통해 형질전환체를 선별하였다. 효모는 UD액체배지 2 ml에 단일집락을 접종하고, 30°C, 180 rpm에서 초기 배양한 후, 본 배양을 수행하였다. 본 배양은 Y2805와 BY4741의 경우는 YPGlu1%Gal1% (yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, glucose 10 g/L,

galactose 10 g/L)배지, Y2805 $\Delta$ gal80, BY4741 $\Delta$ gal80의 경우는 YPGlu2%(yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, glucose 20 g/L) 배지를 250 ml 플라스크에 25 ml씩 분주한 뒤, 초기 배양한 균주를 OD<sub>600</sub>가 0.1이 되도록 접종하였고, 30°C, 180 rpm에서 교반하면서 48시간 배양하였다. Western blot 방법은 상기 기술한 것과 동일하며, 분석 결과는 그림 9와 같다. 4가지 균주의 경우, 모두 ORF2가 발현되었지만 BY4741균주보다는 Y2805균주에서, 그리고 ADH1 프로모터보다 GAL10 프로모터가 ORF2 발현양이 월등히 많은 것을 관찰할 수 있었다.

【그림 9】



#### 4. 표면 발현 최적화

##### 가. spaA의 클로닝 및 발현 확인

돈단독(Erysipelas)은 돼지에서 흔하게 발병하는 급성 및 만성 감염병으로서 *Erysipelothrix rhusiopathiae*의 감염에 의해 발생한다. 인체에 무해한 GRAS 미생물로 식품 및 의약품 생산에 안전한 숙주세포로 인증된 효모를 이용한 subunit vaccine 개발을 위해 highly immunogenic antigen인 surface protective protein A(spaA)를 효모의 표면에 발현시켰다. 우선 spaA의 signal peptide를 제외한 부분을 효모 선호코돈에 맞게 합성하였다 (Bioneer사, 서열 1).

[서열 1]

GGTTACCAATCATTTCGAAGCCGTCAACGAGGAAATTA ACTCTATCGTCTCCGAATTGA  
AAAATGAGGGAATGTCTCTACAAAATATTCATCACATGTTTAAACAATCCATCCAGAA  
CCTGGCTACTCGTATCGGTTATAGGTCTTTTATGCAGGATGCTATGTACTTGGAGAA  
TTTCGAACGTTTGACAATTCCTGAATTAGATGAAGCCTATGTTGACTTGTTGGTTAA  
TTATGAAGTCAAGCACAGAATCTTAGTAAAGTATGAGGACAAAGTCAAGGGTAGAGC  
ACCACTAGAAGCATTCATCGTTCCTACTGAGGAACAGGATTAGATCTATGAACGAAATT  
GCTGCAGAAGTTAATTATCTGCCTGAAGCTCATGAAGATTTCCCTAGTCAGTGATTCT  
TCAGAGTACAACGACAAATTGAATAACATTAATTTTGCCTTGGGTTTAGGCGTTTCC  
GAATTTATCGACTACAATAGATTAGAGAACATGATGGAGAAAGAGATTCATCCACTT  
TATTTGGAATTGTACGCAATGAGGCGTAACAGACAGATCCAAGTAGTTCGTGACGTC  
TATCCTAATTTAGAAAAGAGCTAACGCAGTTGTCGAAAAGTCTTAAGACAATTAAGAT  
ATTAACAGCGTGAGAAGAACTACAAGAATTGTTGGAGATTTACATTCAAAGATCT  
GGTGACGTTAGGAAACCAGATGTCTTACAGAGATTCATCGGAAAATATCAGTCAGTT  
GTTGATGAAGAGAAGAATAAGCTACAAGACTATCTTGAAAGTGATATCTTTGATAGC  
TATTCAGTCGATGGCGAAAAGATTAGAAAATAAGAGATTACCTTGATCAACCGTGAC  
GCTTACTTGTCCATGATTTACAGAGCTCAATCTATTTTCAGAGATCAAGACTATCAGG  
GCCGACTTAGAATCTTTAGTAAAGAGTTTTTCAGAATGAGGAATCTGACTCTAAAGTT  
GAACCTGAATCACCAGTCAAGGTTGAGAAACCTGTGATAAAGAGAAGCCTAAGGATT  
AATAG

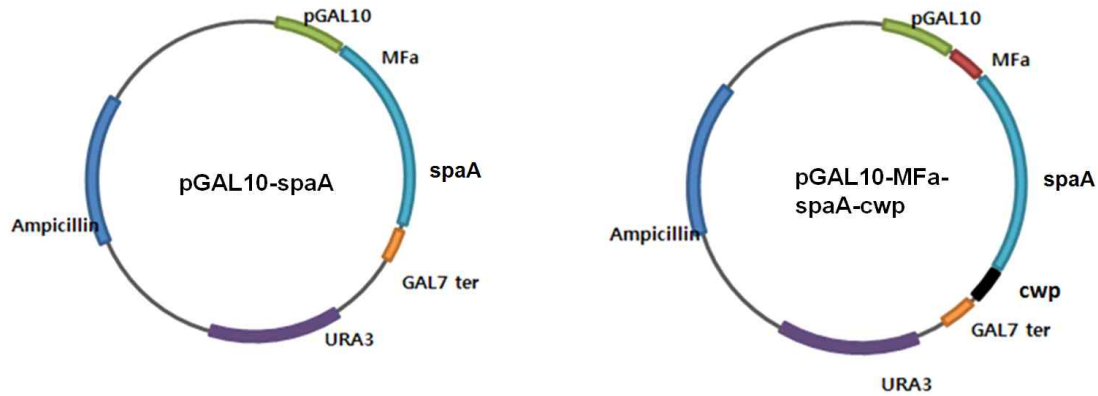
그리고 합성한 spaA가 효모에서 발현이 잘 되는지 확인하기 위해, 세포 내와 세포 표면에 발현될 수 있도록 두 가지 형태로 벡터를 구축하였다. 클로닝에 사용한 프라이머의 서열은 다음과 같다.

spaA opt-EcoRI : ATATGAATTCATGGGTTACCAATCATTTCGAAGC  
spaA opt-Sall : AATTGTCGACTTAATCCTTAGGCTTCTCTTTATC  
spaA opt-XbaI : ATATTCTAGATAAGAGAGGTTACCAA  
spaA opt-ClaI : AATTATCGATATCCTTAGGCTTCTCTTTATC

세포 내 발현을 위해서는 YEG $\alpha$ -HIR525 벡터의 GAL10 promoter 뒤인 EcoRI/Sall site에 클로닝 하여 pGAL10-spaA로 명명하였고, 세포 표면 발현을 위해서는 spaA 앞에는 MF $\alpha$ , 뒤에는 *Hansenula polymorpha*의 cell wall protein anchor가 결합되도록 클로닝 하여 pGAL10-MF $\alpha$ -spaA-cwp로 명명하였으며 구축된 벡터의 모식도는 그림 10과 같다.

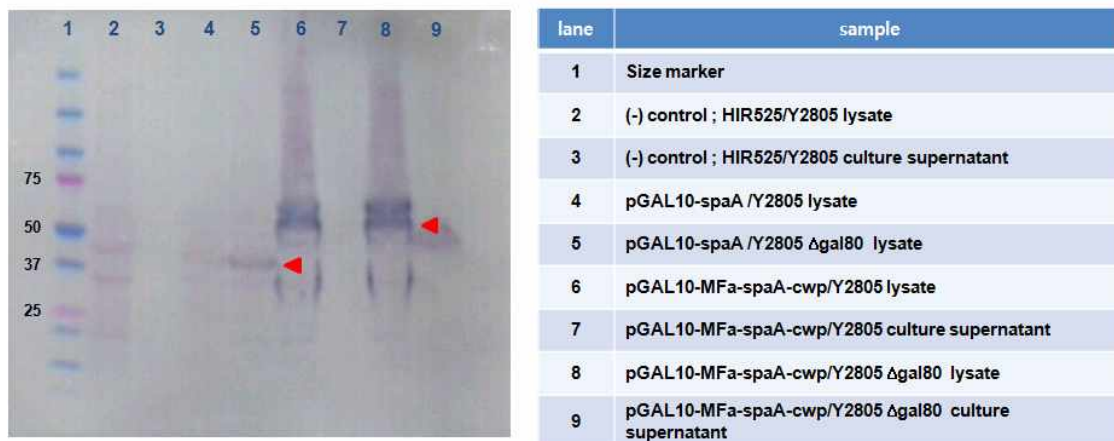


【그림 10】



시퀀싱을 통해 클로닝된 spaA의 서열을 확인한 뒤 구축된 벡터는 리튬/아세트이트 방법으로 Y2805와 Y2805Δgal80에 형질전환하고, UD 고체배지에서 선별하였다. 선별된 형질전환체는 UD 액체배지에서 초기 배양한 뒤 Y2805는 YPGlu1%Gal1% 배지에서, Y2805Δgal80은 YPGlu2%에서 48시간 분 배양을 하고, 돈단독균에 vaccination된 mouse의 혈청을 primary antibody로 하여 Western blot 분석을 실시하였으며 분석결과는 아래 그림 11에 나타내었다.

【그림 11】



spaA : 343 a.a/ 40.234kDa  
 spaA-cwp : 409 a.a/ 46.757 kDa  
 MFa-spaA-cwp : 495 a.a/ 55.8kDa

결과를 보면, 세포내 발현의 경우 Y2805와 Y2805 $\Delta$ gal80 두 균주에서 발현이 되지만 Y2805보다 Y2805 $\Delta$ gal80에서 발현양이 더 많은 것을 확인할 수 있다. 그리고 세포 표면 발현의 경우는 Y2805와 Y2805 $\Delta$ gal80 두 균주 모두 발현이 우수하며, 배양 상등액에서는 SpaA가 관찰되지 않는 것으로 보아 세포 안이나 세포 표면에 위치할 것이라 예상된다.

#### 나. E2의 클로닝 및 발현 확인

돼지열병바이러스(CSFV)는 돼지에 classical swine fever를 일으킴으로써 전 세계적으로 큰 경제적 손실을 야기하고 있다. CSFV의 envelop glycoprotein인 E2를 효모 *S. cerevisiae*에 도입하여 항원으로 이용하기 위해 유전자를 효모 선호코돈으로 바꾸어 Bioneer사에서 합성하였다(서열 2).

[서열 2]

```

ATGAGATTGGCATGTAAAGAAGATTATCGTTACGCATTGAGTTCAACTAATGAAATT
GGTTTGTGGGAGCAGGTGGTCTTACAACCTACCTGGGAAGAGTATAATCACGATTTG
CAACTAAATGATGGTACAGTTAAGGCTATTTGTGTAGCTGGTTCCTTTAAGATAACT
GCCCTAAATGTGGTGTCTAGGAGGTAAGTACTTAGCTAGCTTGCATAAAGAAGCCTTACCA
ACTTCCGTTACTTTTCGAACTTTTGTGGTGGTACTAATCCATCAACTGAAGAGATG
GGTGATGACTTTGGCTTTGGCTTGTGTCCATTCGACACAAGTCCAGTTGTAAAAGGT
AAATATAATACAACCTCTATTAAATGGATCAGCTTTCTACTTAGTTTGTCCAATAGGA
TGGACTGGTGTATTGAGTGTACCGCGGTTTCTCCAACCTACTTTGAGAACCGAAGTC
GTAAAGACTTTTCAGAAGAGACAAACCGTTTCCACATAGGATGGATTGCGTCACAACCTA
CAGTAGAGAACGAAGATTTATTTTATTGTAACCTGGGGAGGTAACCTGGACTTGTGTTA
AAGGAGAGCCAGTGGTTTATGCTGGTGGCCTTGTTAAACAATGCAGATGGTGC GGTT
TCGATTTTAAACGAACCTGATGGTTTGCCACACTATCCAATCGGAAAGTGCATTTTGG
CTAACGAGACTGGATACAGAATAGTTGACTCTACAGATTGTAATAGAGATGGTGTGTG
TAATTAGTACTGAAGGCTCACATGAATGTTTAATCGGTAATACCACTGTCAAAGTAC
ATGCTTCCGACGAACGTTTAGGACCAATGCCATGTAGACCAAAAAGAGACTGTCTCGTC
TGAAGGTCCAGTTAGGAAGACGTCTTGCACATTTAACTATGCAAAGACTTTGAAGAA
TAAATACTATGAGCCACGTGATAGTTATTTTCAGCAATACATGTTGAAAGGTGAATA
TCAGTACTGGTTCGACTTGGATGTTACAGATCGACATTCTGACTATTTTGCCGAATA
ATAG

```

E2가 효모에서 발현이 잘 되는지 확인하기 위해, 세포 내와 세포 표면에 발현될 수 있도록 두 가지 형태로 벡터를 구축하였다. 클로닝에 사용한 프라이머의 서열은 다음과 같다.

```

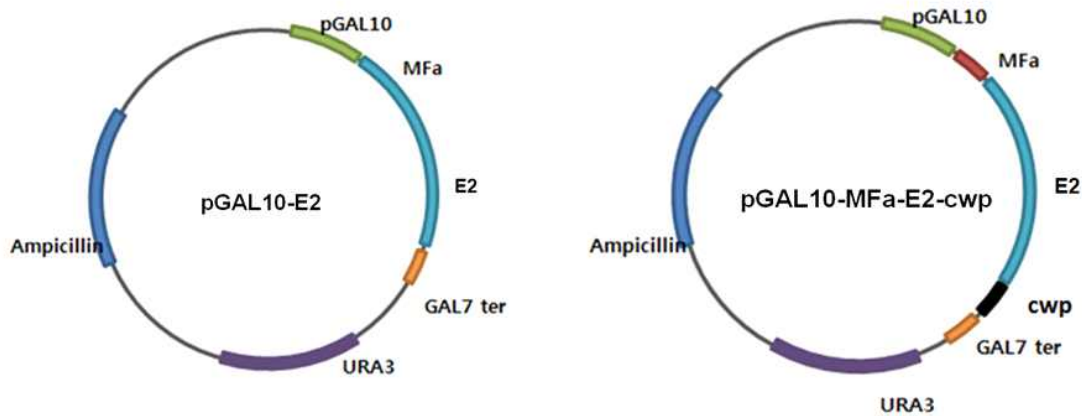
E2 opt-EcoRI : ATATGAATTCATGAGATTGGCATGTAAAGAAG
E2 opt-SalI : AATTGTCGACTTATTCGGCAAATAGTCAGAATG
E2 opt-XbaI : ATATTCTAGATAAGAGAATGAGATTGG

```

E2 opt-ClaI : AATTATCGATTTTCGGCAAATAGTCAGAATG

세포 내 발현은 GAL10 promoter 뒤에 클로닝 하여 pGAL10-E2로 명명하였고, 세포 표면 발현은 E2 앞에는 MFa, 뒤에는 *Hansenula polymorpha*의 cell wall protein anchor가 결합되도록 클로닝 하여 pGAL10-MFa-E2-cwp로 명명하였다 (그림 12 참조).

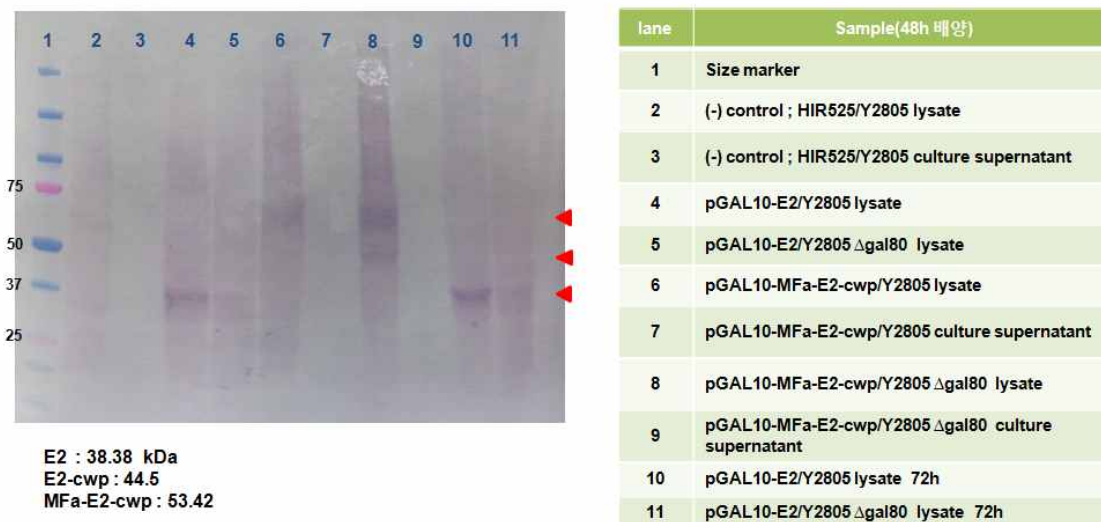
【그림 12】



시퀀싱을 통해 클로닝된 E2의 서열을 확인한 뒤 구축된 벡터는 리튬/아세테이트 방법으로 Y2805와 Y2805 $\Delta$ gal80에 형질전환하고, UD 고체배지에서 선별하였다. 선별된 형질전환체는 UD 액체배지에서 초기 배양한 뒤 Y2805는 YPGlu1%Gal1% 배지에서, Y2805 $\Delta$ gal80은 YPGlu2%에서 48시간 본 배양을 하고, anti-CSFV 혈청을 이용하여 Western blot 분석을 실시하였으며 분석결과는 아래 그림 13에 나타내었다.

【그림 13】

[primary Ab : E2 monoclonal Ab, secondary Ab : anti-mouse, AP]



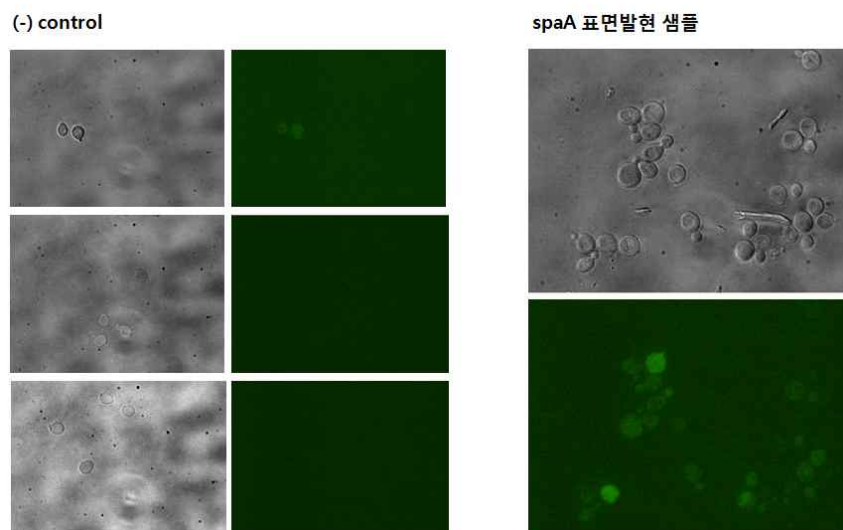
결과를 보면, 세포 내와 표면 모두 발현이 되는 것을 확인할 수 있다. 세포 내 발현의 경우는 Y2805에서 발현이 더 우수하고, 표면 발현에서는 Y2805Δgal80이 더 우수한 것을 볼 수 있다. 하지만 표면 발현된 E2의 경우, 배양 상등액에서는 E2가 관찰되지 않지만 예상되는 크기(44.5 KDa)보다 더 큰 위치에서 밴드가 관찰되므로 glycosylation 여부 등을 포함하여 E2가 표면에 위치하고 제대로 발현된 것이 맞는지 좀 더 자세히 확인해 볼 계획이다.

#### 다. 효모에서 발현된 spaA와 E2의 표면 발현 확인

*S. cerevisiae*에서 발현된 spaA와 E2가 세포의 표면에 위치하는지를 확인하기 위해, 형광 표지 인자인 phycoerythrin이 결합된 secondary antibody를 이용한 형광현미경 관찰을 실시하였다.

먼저 음성 대조군으로 pYEGa-HIR525/Y2805와 분석시료인 pGAL10-MFa-spaA opt-cwp/ Y2805, pGAL10-MFa-E2 opt-cwp/Y2805를 UD 액체배지에서 초기 배양한 뒤 YPGlu1%Gal1% 배지에서 48시간 동안 본 배양을 한다. 배양액 200 ml을 10,000 rpm으로 원심 분리하여 배양한 세포를 회수하고 증류수로 3회 씻어 주었다. TBST buffer에 skim milk를 5%로 첨가하여 회수한 세포에 1 ml 넣어주고 현탁 한 후 약 한 시간정도 교반하면서 blocking을 실시하였다. TBST buffer로 3-5회 가량 씻어주고, 3,000 rpm으로 원심 분리하여 세포를 가라앉힌다. 5% skim milk를 첨가한 TBST buffer에 1차 antibody가 500배 희석되도록 넣어주고, blocking한 세포에 1 ml 첨가하여 1-2시간 교반하여 준다. TBST buffer로 3-5회 가량 씻어 1차 antibody를 제거해 주고, 3,000 rpm으로 원심분리하여 세포를 가라앉힌다. 동일한 방법으로 phycoerythrin이 결합된 2차 antibody를 처리하고 1시간 뒤 TBST buffer로 3-5회 가량 씻고 3,000 rpm으로 원심 분리하여 세포를 가라앉힌다. 회수한 세포를 소량의 buffer에 조심스럽게 현탁시키고, 슬라이드 글라스에 한 방울 떨어뜨려 커버 글라스를 덮고 형광현미경(488 nm)으로 관찰하였다. 결과는 아래 그림 14와 같다.

【그림 14】



결과를 보면, E2는 음성 대조군과 표면 발현 시료 모두 형광이 관찰되지 않았다. 발현된 E2가 세포의 표면에 존재하지 않거나, 1차 antibody가 제대로 binding하지 못해서일 것이라 추측된다. 반면 spaA는 음성 대조군에서는 형광이 관찰되지 않지만 표면발현 시료에서는 녹색의 형광이 관찰되는 것으로 보아 발현된 spaA가 효모의 표면에 위치한다는 것을 확인할 수 있었다.

#### 라. E2와 spaA의 동시발현

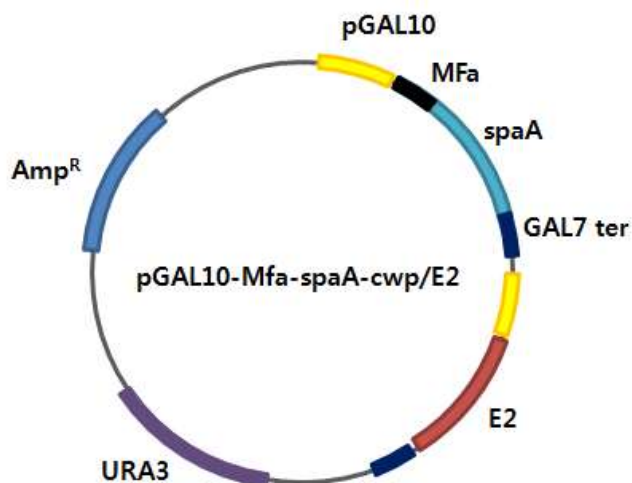
돈단독과 돼지열병을 동시에 예방하는 백신을 개발하기 위해 돈단독의 antigen인 spaA와 돼지열병 바이러스의 E2를 동시에 발현시키는 효모 균주를 개발하였다. spaA는 표면발현이 제대로 된다는 것을 확인하였기 때문에 spaA는 표면에, 그리고 E2는 세포내에 발현하도록 하는 벡터를 구축하였다.

pGAL10-E2-GAL7 terminator 까지 증폭하여 pGAL10-MFa-spaA-cwp 벡터의 Nar I 부위에 삽입하였다. 유전자 증폭에 사용한 프라이머의 서열은 다음과 같으며, In-fusion advantage PCR cloning kit (clontech)의 매뉴얼에 따랐다. 구축된 벡터의 모식도는 그림 15와 같다.

F: gaatggcgaatggcg gggatccatcgcttcgctgattaa

R: ataccgcatcaggcg acaatgagccttgctgcaacatcc

【그림 15】



벡터 구축 후 시퀀싱을 통해 E2의 서열을 확인하였으며, 리튬/아세테이트 방법으로 Y2805와 Y2805Δgal80에 형질전환하고, UD 고체배지에서 선별하였다.

## 제 2 세부과제

### 1. ORF2 VLP의 분리 및 안정화

사카로마이세스 세레비지에에서 발견되는 다른 단백질로부터 ORF2의 바이러스-유사입자(VLP)를 분리하기 위하여 황산암모늄과 폴리에틸렌글리콜6000(PEG6000)을 이용한 침전법을 실시하였다. 또한 황산암모늄, NaCl, glucose, 폴리솔베이트20 (Tween 20) 그리고 폴리솔베이트80 (Tween 80)을 첨가물로 하여 ORF2 VLP의 안정성을 확인하였다.

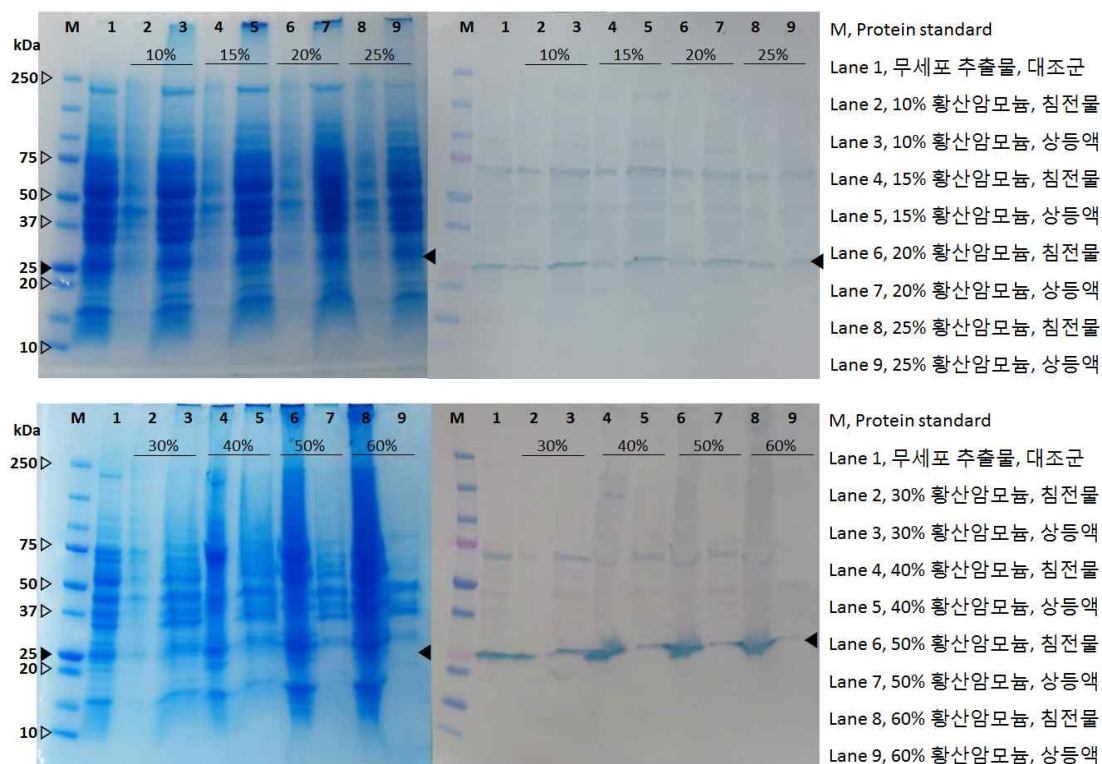
#### 가. 황산암모늄 침전을 이용한 ORF2 VLP의 분리

ORF2를 발현하는 Y2805 $\Delta$ gal80 균주의 무세포추출물 1 ml에 황산암모늄 가루를 아래와 같이 첨가한 후, 2시간 동안 교반하여 반응시켰다.

황산암모늄 %	0	10	15	20	25	30	40	50	60
황산암모늄 mg	0	56	84	114	144	176	214	313	390

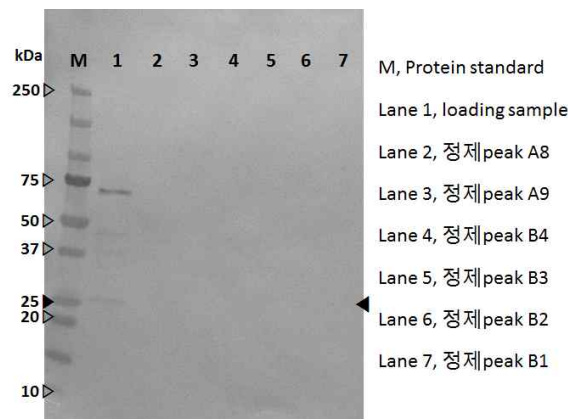
반응물은 13,000 rpm에서 10 분 동안 원심분리하여 침전물과 상등액으로 분리하였으며 침전물은 50 mM Tris/HCl (pH7.4) 200  $\mu$ l를 넣어 풀어준 뒤 ORF2 VLP의 분리분석에 사용하였다. VLP 분리는 SDS-PAGE와 Western blot을 이용하여 확인하였으며 그 결과는 그림 1에 나타내었다.

【그림 1】



SDS-PAGE에서 황산암모늄을 40% 첨가했을 시에 과반의 단백질이 침전되었고 Western blot에서 황산암모늄을 30% 첨가했을 시에 ORF2가 침전됨을 확인하였다. 따라서 황산암모늄 30% 반응물의 침전을 통해서 ORF2 VLP를 일부 분리가 가능하다. ORF2의 순수분리를 위해서 황산암모늄 30% 로 침전한 단백질을 50 mM Tris/HCl (pH7.4)를 넣어 풀어준 뒤 크기-배제 크로마토그래피(Size-Exclusion Chromatography, SEC)을 실시하였다. SEC 결과 얻어진 정제물은 Western blot을 이용해 확인했으며 결과는 그림 2에 나타냈다.

【그림 2】



SEC 실시 결과, 로딩샘플부터 ORF2 VLP가 많은 양이 소실되었으며 전혀 분리정제가 되지 않았다. 이는 SEC 로딩시에 사용하는 주사기 필터 멤브레인에 ORF2 VLP가 흡착한 것으로 추측되어진다.

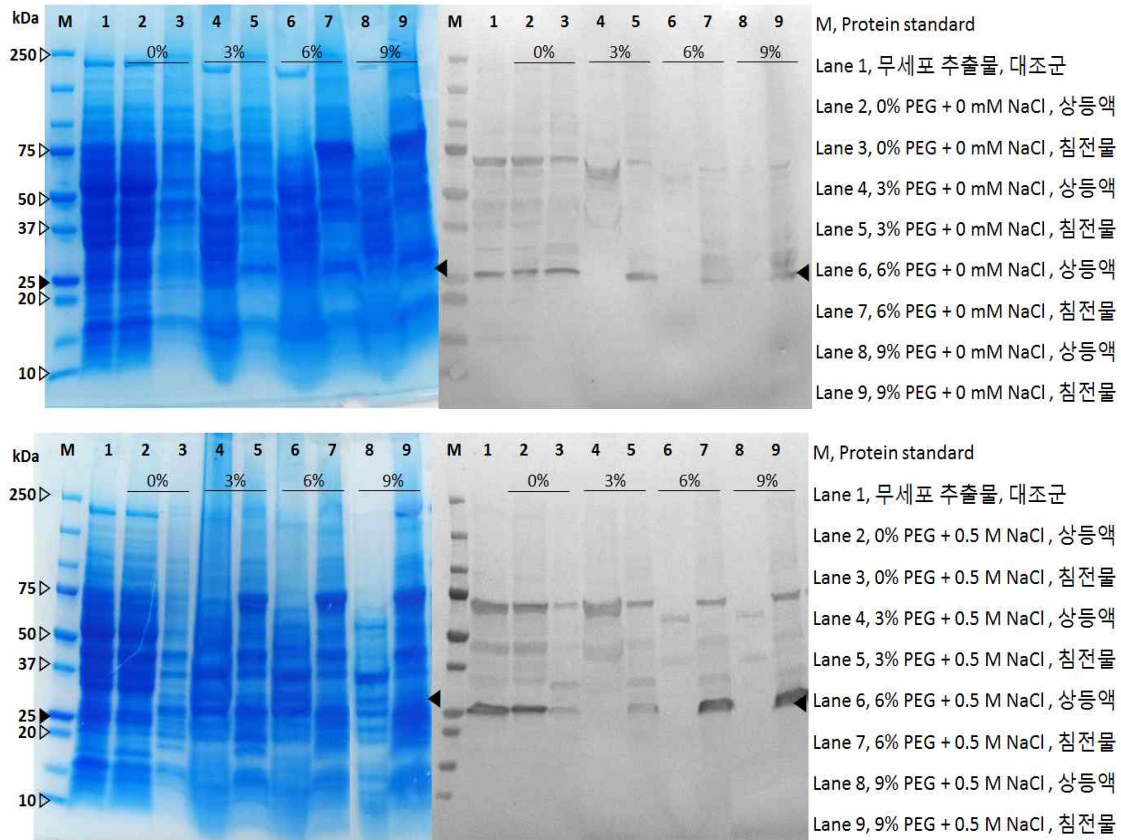
#### 나. PEG6000를 이용한 ORF2 VLP의 분리

ORF2를 발현하는 Y2805Δgal80 균주의 무세포추출물 1 ml에 PEG6000과 NaCl을 아래와 같이 첨가한 후, 1 시간 동안 교반하여 반응시켰다.

PEG6000 %	0		3		6		9	
NaCl M	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5

반응물은 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 침전물과 상등액으로 분리하였으며 침전물은 50 mM Tris/HCl (pH7.4) 200 μl를 넣어 풀어준 뒤 ORF2 VLP의 분리분석에 사용하였다. VLP 분리는 SDS-PAGE와 Western blot을 이용하여 확인하였으며 그 결과는 그림 3에 나타내었다.

【그림 3】



3% PEG 첨가한 침전물과 6% PEG와 0.5 M NaCl첨가한 침전물 그리고 9% PEG에 0.5 M NaCl을 첨가한 침전물에서 ORF2가 대부분 확인되었다. 그러나 ORF2 외의 다른 단백질 또한 다량 존재하고 4°C에서 냉장보관 시 침전물이 생겨 ORF2 분리정제에는 적합하지 않았다.

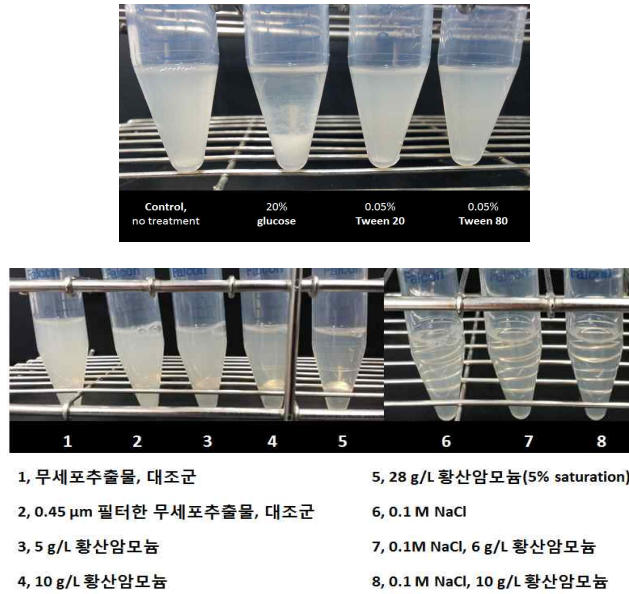
#### 다. VLP 안정화

ORF2을 포함하는 Y2805Δgal80의 무세포추출물은 짧은 시간 안에 침전되어 ORF2의 정제 및 보관에 어려움이 있다. 이를 보완하기 위해서 황산암모늄, NaCl, glucose, 폴리솔베이트20 (Tween 20) 그리고 폴리솔베이트80 (Tween 80)을 첨가물로 하여 ORF2 VLP의 안정성을 확인하였다.

ORF2를 발현하는 Y2805Δgal80 균주의 무세포추출물 2 ml에 20% glucose, 0.05% Tween 20 그리고 0.05% Tween 80을 첨가하여 4°C에서 12일간 냉장보관 후 무세포추출물의 변화를 관찰하였다. 또한 5 g/L, 10 g/L 그리고 28 g/L(5% saturation)의 황산암모늄을 첨가한 무세포추출물과 0.1 M NaCl을 추가로 첨가한 무세포추출물을 7일간 4°C에서 냉장보관 후 무세포추출물의 변화를 관찰하여 그림 4에 나타내었다.



【그림 4】

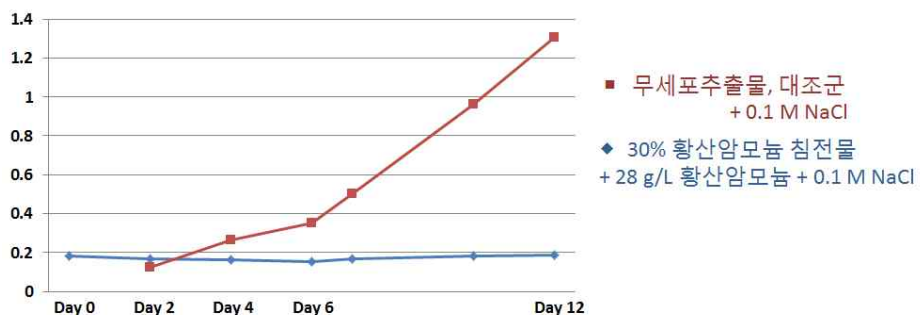


아무 것도 첨가하지 않은 대조군 무세포추출물과 0.05% Tween20 그리고 0.05% Tween80을 첨가한 무세포추출물은 유사한 혼탁도를 보였으며 20% glucose는 침전반응을 일으키는 것으로 확인되었다. 따라서 이들 첨가물은 ORF2 VLP 안정화에 적합하지 않다.

10 g/L, 28 g/L 황산암모늄을 첨가한 무세포추출물과 0.1 M NaCl을 넣어준 무세포추출물에서 침전반응이 일어나지 않고 혼탁도 또한 증가하지 않아 ORF2 VLP의 응집반응을 지연시키는 것으로 확인하였다.

황산암모늄과 NaCl이 ORF2 VLP의 응집반응을 지연시키는 것을 수치적으로 확인하기 위해서 무세포추출물과 황산암모늄 침전물의 흡광도  $A_{660nm}$ 를 측정하여 그림 5의 그래프로 나타내었다.

【그림 5】



0.1 M NaCl을 첨가한 무세포추출물은 시간이 경과함에 따라서 혼탁도가 급격히 증가하는 것으로 보이나 28 g/L 황산암모늄을 첨가한 30% 황산암모늄침전물은 혼탁도의 변화가 거의 없음을 알 수 있다. 이는 다른 기타의 단백질의 존재유무가 영향을 미쳤을 수도 있으나, 그림 4의 결과에서도 보았듯이 황산암모늄의 첨가가 ORF2의 응집반응을 지연시켜 ORF2의 안정화에 영향을 미친다는 결론을 내릴 수 있다. 그러나 다음 정제 단계를 위한 필터과정에서 필터의 멤브레인에 ORF2가 흡착되는 단점은 극복하지 못했다. 따라서 황산암모늄을 이용한 안정화도 육안에 의한 것 일뿐 결국은 필터과정에서 문제가 발생하여 근본적인 ORF2의 안정화는 해결하지 못하였다.

## 2. 대장균에서 MBP-tagging을 활용한 ORF2 표준품의 분리정제

### 가. ELISA용 PCV ORF2 제조

#### (1) 대장균에서의 ORF2 발현시스템 구축

대장균에서의 ORF2 발현시키고자 하는 노력은 계속되고 있으나 단백질 불안정으로 발현과 동시에 쉽게 aggregation되는 문제 때문에, ORF2를 fusion protein으로 발현하여 순수 분리하는 방법으로 발현 시스템을 구축하였다. ORF2 N-terminal 부분에 maltose binding protein과 protease인 TEV 인식서열이 fusion된 MBP:TEV:ORF2 형태의 발현단백질을 pET28b 벡터에 클로닝하였다(그림 6).

【그림 6】



- T7 : T7 promoter, T7t: terminator, H6: 6xHistidine tag,
- MBP : maltose-binding domain
- ENLYFQ: TEV protease의 절단부분
- Expression system : pET28b
- Strain : *E. coli* BL21(DE3) or *E. coli* MG1655(DE3)

#### (2) 대장균에서의 ORF2 발현

본 실험에 사용된 발현 벡터인 pET28b는 T7 promoter에 의해 발현이 조절되는데 T7 promoter는 bacteriophage T7의 RNA polymerase에 특이적으로 발현되는 promoter sequence이다. BL21(DE3) 균주는 lac promoter에 T7 polymerase를 가지고 있어 lactose, IPTG등을 사용하여 lac promoter를 induction시키면 T7 polymerase가 만들어지고 이 T7 pol이 발현 벡터의 T7 promoter에 작용하여 재조합 된 단백질 유전자를 발현시키게 되는 원리이다. 고가의 IPTG 대신 lactose를 inducer로 사용할 수 있으며 feeding이 필요 없는

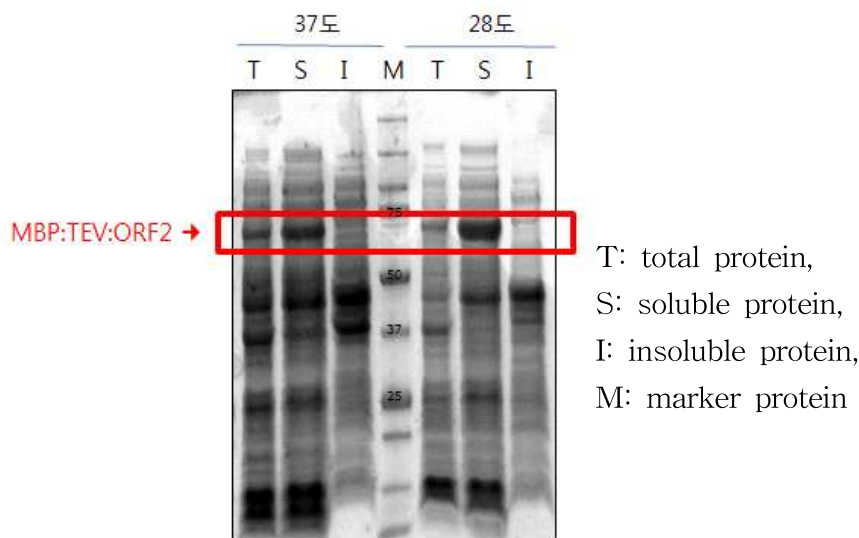
auto-induction system(표 1)을 이용하여 발현을 유도하였고, 단백질의 안정성을 위하여 발현 온도를 28℃, 37℃ 두 조건을 시행한 결과 28℃에서 더 많은 수용성 단백질로 발현됨을 확인하였다(그림 7).

【표 1】

Auto-induciton 배지조성

Media	g/L
Glucose	0.5
Glycerol	3
<b>Lactose</b>	<b>2</b>
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.15
Yeast extract	10
Tryptone	16
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.3
Trace element(mL)	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.8
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -12H <sub>2</sub> O	7.1

【그림 7】



### (3) 대장균에서 ORF2의 생산공정개발

재조합 ORF2 단백질을 대량으로 생산하기 위하여 5 L 발효조를 이용하였다. 전 배양은 200 ml LB broth로 flask로 수행하였고, 본 배양의 배지조성은 표2와 같으며, 조업부피 2.5 L, 28℃, 1 vvm, 1000 rpm (용존산소량 20% 유지), 초기 pH 7.0의 조건으로 수행하였다. pH는 24% 액체암모니아수를 사용하여 조정하였으며, 초기 당 소진 후 시간 당 4 g/L로 6시간 동안 연속적으로 공급한 후, 공급속도를 6 g/L/hr으로 증가하여 계속 공급하였다. 24

시간 배양 후 155 O.D.에 해당하는 균체를 얻었다(그림 8). 추후 ORF2 단백질의 정제를 위하여, 배양액을 8,000 rpm, 10분 4°C의 조건으로 원심 분리하였고, 상등액을 제거하고 재조합 단백질이 발현된 세포만을 얻었다.

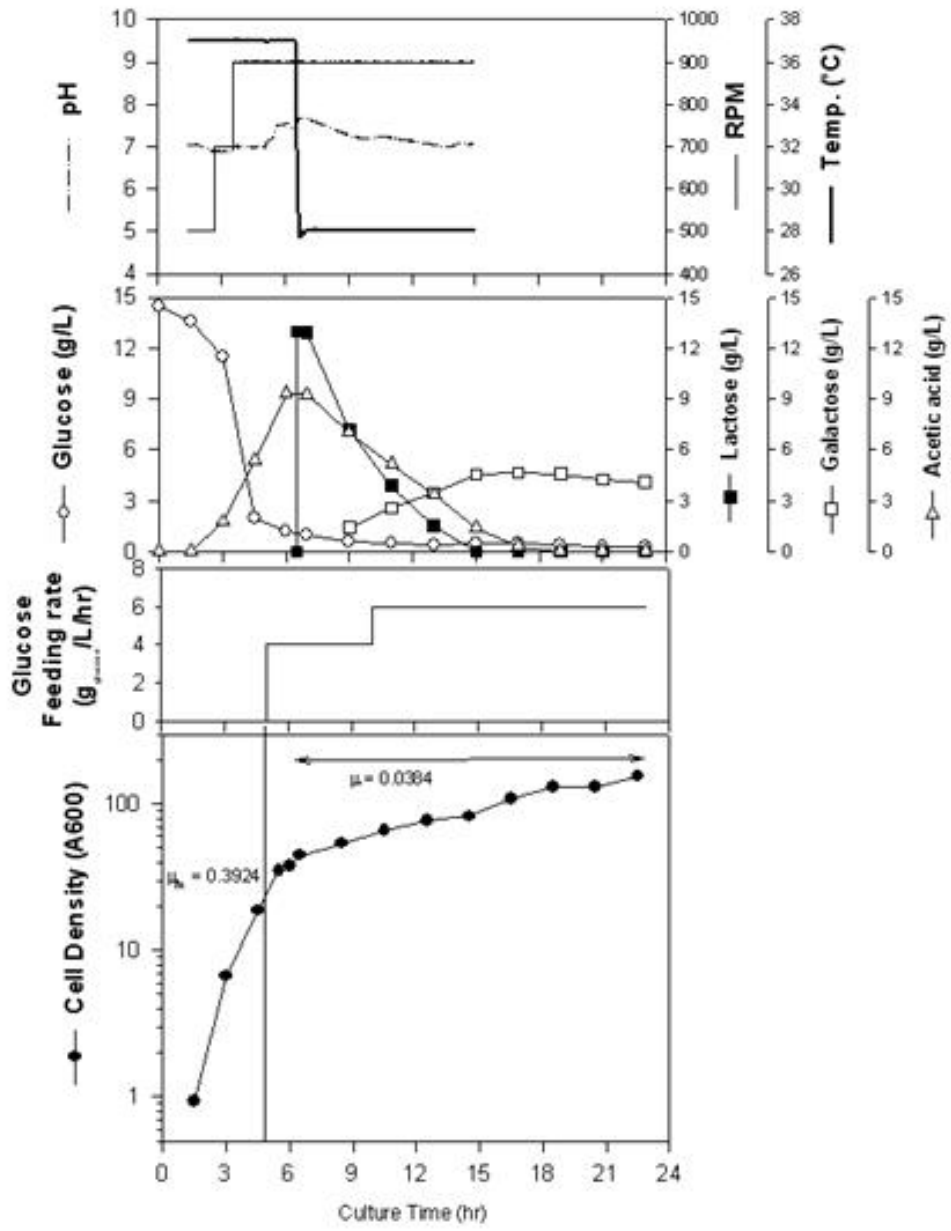
이를 단백질 정제를 위한 버퍼에 (20 mM Sodium phosphate, 500 mM NaCl, pH7.4) 녹인 후 초음파 분쇄기로 세포를 파쇄하여 수용성 단백질이 포함된 균체파쇄물(cell lysate)을 얻었다. 또한 2시간마다 샘플링으로 얻은 세포를 SDS-PAGE 이용하여 단백질이 발현되었음을 확인하였다(그림 9).

**【표 2】**

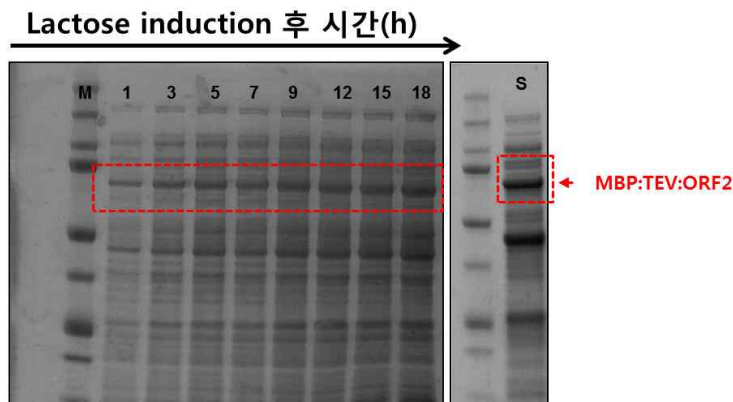
5L 발효조를 위한 ORF2 발현 재조합 균주의 배양을 위한 배지조성

Media	g/L
Glucose	25
Lactose	20
Glycerol	30
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.15
Yeast extract (공업용)	20
Casein peptone (공업용)	15
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8
Trace element(mL)	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.6
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -12H <sub>2</sub> O	4.4

【그림 8】



【그림 9】



수용성 단백질 중 MBP:TEV:ORF2의 발현량	약 18 %
총 단백질농도	약 26 g/L
<b>MBP:TEV:ORF2 발현양 (g/L)</b>	<b>약 4.68 g/L</b>

#### (4) ORF2 단백질 정제

##### (가) Ni affinity chromatography

발현 벡터 내 Histidine tag이 target 단백질 앞뒤에 존재하므로 MBP:TEV:ORF정제는 histidine-tagged protein purification 방법을 사용하였다. 대량 단백질 정제를 위하여 AKTA FPLC를 사용하여 150 ml의 cell lysate를 로딩하였고, 5 ml HisTrap FF resin을 이용하였다. 초기 equilibrium을 위하여 A buffer (lysis buffer, 20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl(pH 7.4)) 3 CV를 흘려주고 resin 세척을 위하여 같은 방법으로 진행하였다. sample을 5ml/min으로 주입하여 resin에 binding 시키고, (이 때 cell lysate 농도가 진하여 다시 sampling 하여 재사용하였다.) A buffer (lysis buffer, 20mM sodium phosphate, 500 mM NaCl (pH 7.4)) 10 CV로 washing 해준다. B buffer (elution buffer, 20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 500mM Imidazole (pH 7.4))를 이용하여 step gradient (2.5, 5, 10, 100 % 각 5CV)로 elution하여 정제된 단백질 3.5 g/L를 얻었다 .

##### (나) TEV protease에 의한 융합파트너(Fusion tag) 제거

특이서열을 인지하는 프로테아제(protease) 중인 하나인 TEV 프로테아제를 이용하여, 융합단백질 형태에서 순수한 ORF2 분리를 위한 반응기작은 그림 10에 나타내었다. 우선, TEV에 의한 융합파트너 제거를 위한 반응 최적조건을 찾기 위한 실험을 진행하였다. 여기서 사용한 TEV 단백질은 직접 생산하여 사용하였다. 알려져 있는 TEV 최적 반응은 융합

단백질과 융합단백질 1/10 농도의 TEV를 섞고 37°C에서 1시간 반응시키는 것이나, ORF2의 불안정성 때문에 천천히 반응이 일어나도록 4°C 12시간 반응을 유도하였다. 그 결과 예상대로 37°C에서의 반응이 빨랐으나 높은 aggregation을 때문에 4°C 12시간 반응으로 더 높은 농도의 ORF2를 얻을 수 있었다(그림 11).

【그림 10】

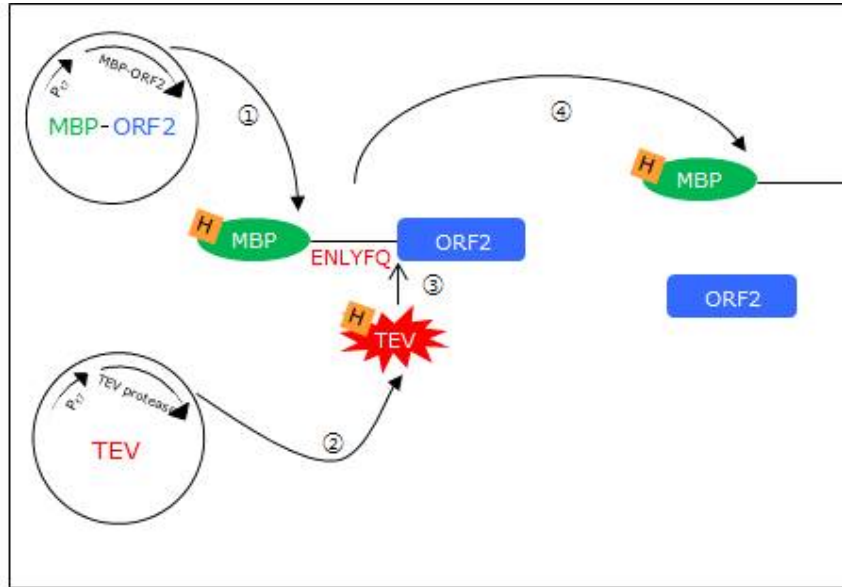
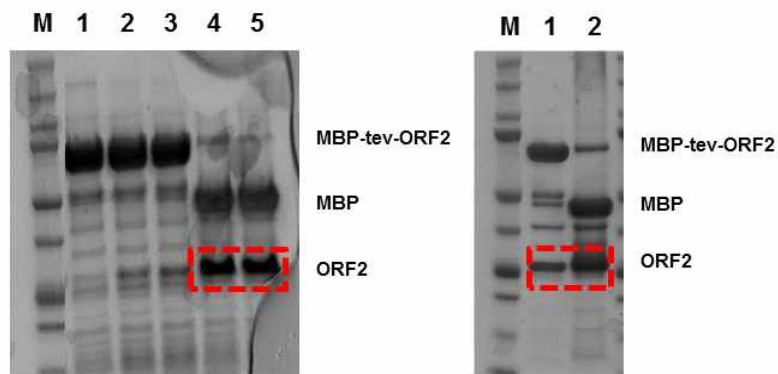


그림 10. MBP:TEV:ORF2와 TEV 반응 기작

【그림 11】



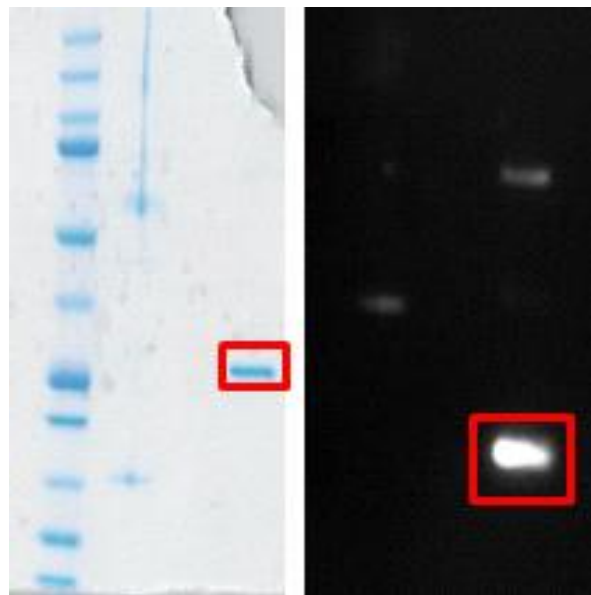
1. 정제된 MBP-TEV
2. WTTEV-반응 전
3. OTOTV 반응 전
4. WTTEV 4도 O/N
5. OTTEV 4도 O/N

1. 반응 전
2. 37도 1시간

### (다) ORF2 순수분리

그림 10에서처럼 TEV와 반응한 MBP:TEV:ORF2는 MBP:TEV, TEV, ORF로 각각 분리된 채로 존재하게 된다. 순수하게 ORF2만 분리하기 위하여 다양한 방법으로 실험을 진행하였다. ORF2와 MBP의 IP값의 차이를 이용하여 분리하는 방법인 ion, anion exchange chromatography를 이용하였으나 계속적으로 aggregation이 일어나 고농도의 ORF2를 얻을 수가 없었다. 특히 FPLC의 경우 로딩된 샘플이 희석이 되어 그 양이 더 적을 수 밖에 없어, open Column을 이용하여 nickle NTA resin으로 흘려줘 flow through로 순수 ORF2를 얻을 수 있었다 (0.32 g/L, 순도 90% 이상).

【그림 12】



### 3. 500리터 발효조를 이용한 PCV-2 ORF2의 대량 발효 생산 및 최종 발현량 결정

#### 가. 500리터 발효조를 이용한 PCV-2 ORF2의 대량 발효 생산

위에서 정제된 ORF2를 standard로 하여 pGAL10-ORF2/Y2805Δgal80에서 발현된 ORF2의 발현양을 분석하였다. 발현양은 플라스크배양과 발효조배양으로 나누어 확인하였다.

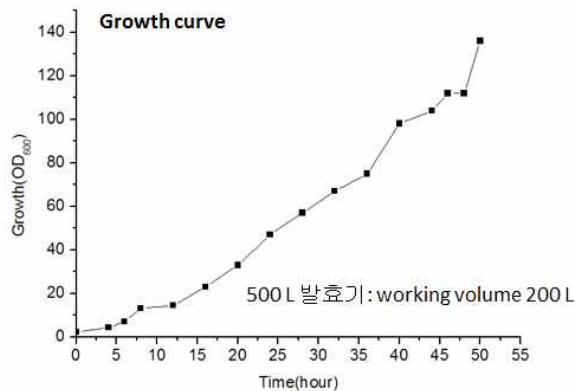
플라스크배양은 초기배양과 본 배양으로 구분하며, 초기배양에는 UD(Yeast Nitrogen Base 6.7 g/L, uracil dropout supplement 0.77 g/L, glucose 20 g/L) 액체배지를 사용하였다. UD 액체배지 2 ml에 단일집락을 접종하고 30℃, 180 rpm에서 16 시간 배양 후 본 배양을 하였다. 본 배양은 YPGlu2%(yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, glucose 20 g/L.) 액체배지를 이용하였다. 배양은 250 ml Flask에 25 ml 씩 분주한 뒤 초기 배양 한 균주를 1%



가 되도록 접종하여 30°C, 180 rpm에서 48 시간 배양하였다. 배양한 pGAL10-ORF2/Y2805  $\Delta gal80$ 의 흡광도  $A_{600}$  값은 14.4 로 측정되었다. 배양액 1 ml을 13,000 rpm에서 1 분간 원심분리 하여 균체를 회수하였다. 200  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl (pH7.5)를 넣어 세포를 풀어준 뒤 glass bead를 첨가하여 10 분 동안 파쇄 하였다. 여기에 3:1의 비율로 SDS loading sample을 넣고 100°C에서 5 분간 중탕하였다.

발효조배양은 500 L 발효조에서 유가식 배양을 하였다. 유가식 배양은 24% 암모니아수를 이용하여 pH를 6.0으로, 배양 중에 온도는 30°C로 유지시켰다. 균체의 성장은 점차적으로 증가하여 흡광도  $A_{600}$  136까지 도달하였다(그림 13). 흡광도  $A_{600}$ 을 30으로 맞추어 플라스크 배양액과 동일한 방법으로 시료를 준비하였다.

【그림 13】

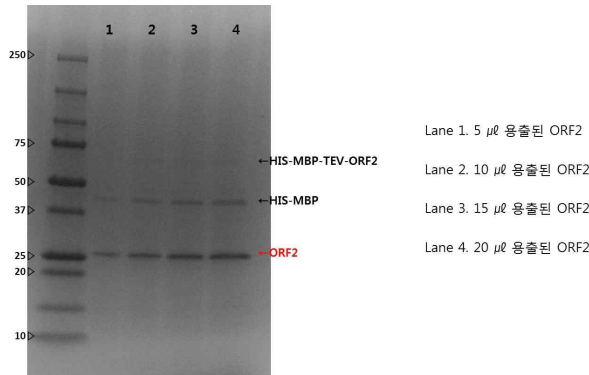


#### 나. ORF2 발효 생산성 분석

효모에서 재조합 발현 시 순수분리 및 정제가 매우 어려운 것으로 나타난 ORF2 단백질의 정량법을 개발하기 위하여 먼저 대장균에서 가용발현과 affinity purification이 가능하도록 발현백터 pET-HIS-MBP-TEV-ORF2를 제조하고 대장균에서 발현하여 Ni-affinity chromatography를 통하여 정제한 시료를 표준품으로 사용하였다.

imidazole에 의하여 용출된 fraction은 ORF2와 함께 HIS-MBP-TEV-ORF2와 HIS-MBP를 포함하며 농도는 BSA를 standard로 하여 BCA protein assay로 측정한 결과 용출된 전체 단백질 농도는 150  $\mu$ g/ml의 농도로 계산되었다. 순수 ORF2의 농도를 계산하기 위해 SDS-PAGE를 실시한 후, UVIBand MAX, optical density 1D program을 사용하여 전체 단백질에서 ORF2가 차지하는 비율을 측정하였다.(그림 14) 5, 10, 15 그리고 20  $\mu$ l의 용출된 단백질을 로딩하여 각각의 density를 측정한 결과 4개의 시료 모두에서 순수한 ORF2는 65%인 것으로 계산되었다.

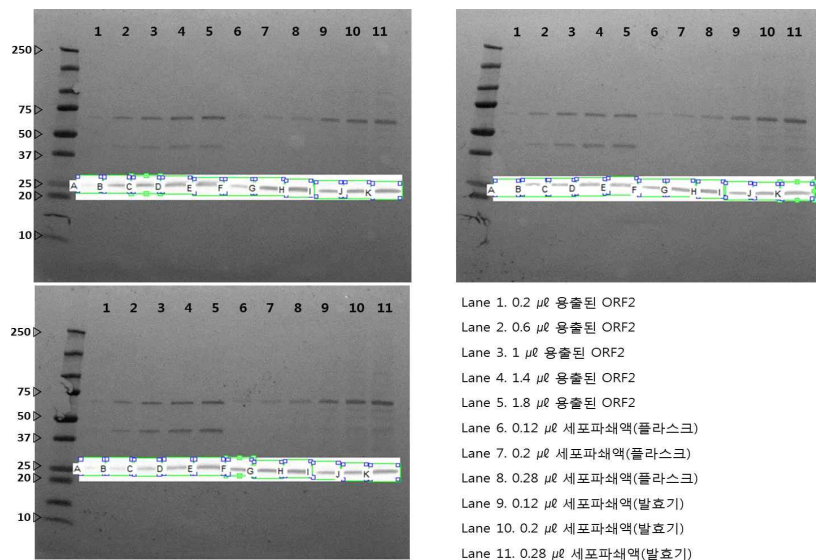
【그림 14】



Western blot과 densitometry를 이용한 정량을 위하여 ORF2 standard와 ORF2이 발현된 pGAL10-ORF2/Y2805 $\Delta$ gal80 세포파쇄액을 희석하여 4-20% gradient gel에 로딩하고 80V에서 전기영동 하였다. Trans-Bolt™ Turbo (Bio-Rad)를 이용하여 나이트로셀룰로스 멤브레인에 반-건조법으로 단백질을 옮기고 TBS-T 완충액(20 mM Tris-HCl pH8.0, 137 mM NaCl, Tween 20 0.1%)에 skim milk를 5%로 첨가하여 1 시간 동안 blocking하였다. 1차 항체를 2 시간 반응시키고 TBS-T 완충액으로 멤브레인을 씻은(5분씩 3회) 뒤 2차 항체를 넣어 1 시간 반응시켰다. 그리고 2차 항체에 결합된 AP(alkaline phosphatase)의 기질로 BCIP/NBT Purple liquid(Sigma)를 첨가하고 5-10 분 정도 반응시켜 항체가 결합된 부위가 보라색 밴드로 나타나는 것을 UVIBand MAX, optical density 1D program을 사용하여 density를 측정하였다. Gel로부터 membrane으로 transfer 후 gel에 남아 있는 단백질은 거의 없었으므로 transfer 효율은 거의 100%에 달하는 것으로 나타났다.

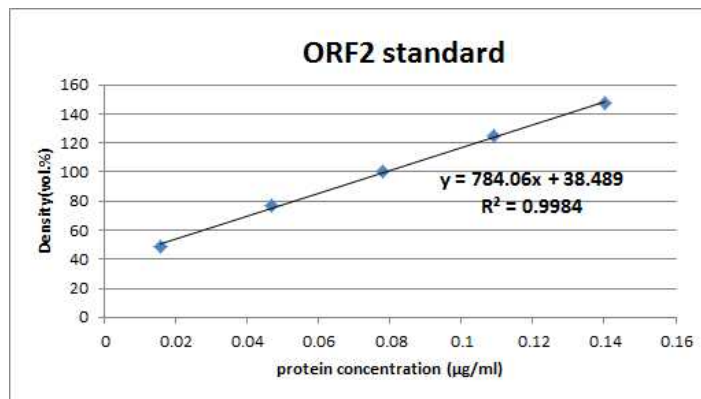
pGAL10-ORF2/Y2805 $\Delta$ gal80 세포파쇄액 내의 ORF2농도 측정은 세 반복으로 실험하였다(그림 15).

【그림 15】



정제한 ORF2의 density 값과 단백질 농도를 그래프로 나타내어 density를 이용한 세포 파쇄액의 ORF2 농도를 계산 할 수 있는 수식을 얻었다.(그림 16)

【그림 16】



결정계수 R2의 값이 0.9 이상이므로 수식에 대한 값은 유효성을 가진다. 수식으로 계산한 pGAL10-ORF2/Y2805Δgal80 세포파쇄액의 ORF2 단백질 농도는 플라스크배양시료와 발효조배양시료 각각 평균  $0.137 \pm 0.020$  mg/ml 과  $0.130 \pm 0.009$  mg/ml로 계산되었다.

ORF2의 발효 생산성을 알아보기 위해서 먼저 OD값, 균수(cell number), 그리고 건조 균체량의 관계식을 구하였다. 배양액을 OD 1.0이 되도록 맞춘 뒤 적절한 배수로 희석하고 100 µl를 YPGlu2% 고체배지에 도말하여 균수를 측정하였으며 3반복 실험에서  $2.01 \pm 0.23 \times 10^7$  cell/OD의 값을 얻었다. 건조 균체량은 50 ml 배양액에서 얻은 균체를 무게가 더 이상 줄지 않을 때까지 건조 시킨 후 구하였으며 3반복 실험에서  $0.312 \pm 0.005$  g/L/OD의 값을 보였다.

따라서 위 관계식에 의하여 건조균체 1 g 당 ORF2의 함량을 계산하여 보면 플라스크 배양액(OD=14.4)의 건조 균체량은 4.493 g/L이고 ORF2의 양은 0.137 g/L이므로 이는 3.0%에 해당하는 것으로 계산된다. 이 값은 최근 사카로마이세스 세레비지에를 사용하여 ORF2를 발현한 문헌 (Vaccine 27:5781-5790 (2009) 상의 값 0.33%의 약 10배에 달하는 높은 값을 알 수 있다.

총 단백질을 기준으로 한 생산성도 구하였다. 세포파쇄액의 전체 단백질 농도는 BSA를 standard로 하여 BCA protein assay로 측정하였다. 플라스크배양 세포파쇄액과 발효조배양 세포파쇄액은 각각 평균 1.603 mg/ml과 2.560 mg/ml으로 계산되었다. 따라서 ORF2은 세포파쇄액 전체 단백질의 약 8.55%와 5.08%의 비율로 포함되어 있음을 알 수 있다.

## 제 1 협동과제

### 1. 효모에서 발현된 spaA의 시험백신 제조 및 마우스를 이용한 면역원성 조사

사카로마이세스 세레비지에 균주에서 발현시킨 spaA의 면역원성을 확인하기 위해 아래와 같은 방법으로 시험백신을 제조하여 동물실험(마우스)에서 확인하였다.

spaA를 발현하는 Y2805 $\Delta$ gal80 균주를 배양하고 원심분리 후 OD<sub>600</sub>값을 측정하였다. spaA를 이용한 실험백신은 두 가지 형태 즉, 균체(whole yeast cell)를 이용한 시험백신과 균체를 파쇄한 형태의 시험백신을 제조하여 동물에서의 면역원성을 확인하였다. 균체(whole yeast cell)를 이용한 시험백신은 균체의 비활성화를 위해 0.2% 포르말린을 처리하여 실온에서 72시간 동안 반응하고 균체 배지에 도말하여 비활성화를 확인 후 제조에 사용하였다. 균체 파쇄된 항원을 이용한 시험백신은 발현된 spaA를 균체로부터 얻기 위해 homogenizer로 1000bar에서 4번 통과시켜 세포 파쇄액을 얻고 항원의 비활성화를 위해 0.2% 포르말린을 처리하여 실온에서 72시간 동안 반응하고 균체 배지에 도말하여 비활성화를 확인 후 제조에 사용하였다. Whole yeast를 이용한 시험백신의 균주농도는 측정된 OD<sub>600</sub>값을 토대로  $2 \times 10^8$ /ml (1 OD =  $2 \times 10^7$ /cell) 로 제조하였으며 파쇄한 항원은 단백질 정량을 하여 농도를 측정하여 제조하였다. 시험균은 효모 전세포인 시험백신 1과 spaA 세포파쇄물의 농도가 다른 시험백신 2, 3 이며 양성대조군으로 ERT2T를 사용하였고, 음성대조군은 무접종군으로 하였다. 시험백신 생산내역은 아래 표 1에 나타내었다.

【표 1】

	시험백신1	시험백신2	시험백신3	시험백신4	시험백신5
구성	spaA 효모 전세포	spaA 효모 세포파쇄물	spaA 효모 세포파쇄물	양성대조군	음성대조군
	$2 \times 10^8$ cell/ml	20 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ g/ml	ERT2T	-
보조제	수산화 알루미늄 겔			-	-

제조한 시험백신을 체중 15~20g의 마우스에 각 그룹별로 15마리씩 백신의 1/10두분인 0.2ml을 피하에 접종하고, 무 접종군 5마리를 음성대조군으로 사용하였다. 백신을 접종한 지 2주 후에 접종군과 대조군에 *E. rhusiopathiae*을 100 LD<sub>50</sub>/0.2ml을 피하에 공격접종한 다음 10일간 임상증상을 관찰하였다.

【표 2】

	시험백신1	시험백신2	시험백신3	시험백신4	시험백신5
구성	spaA 효모	spaA 효모	spaA 효모	양성대조군	음성대조군

	전세포	세포파쇄물	세포파쇄물		
접종방법	피하	피하	피하	피하	-
마리 수	15	15	15	15	5
시험결과 (생존율)	0/15 (0%)	8/15 (53%)	12/15 (80%)	15/15 (100%)	0/5 (0%)

공격 접종 후 백신의 효능성은 국가 검정기준인 대조군 100% 폐사, 접종군 80%이상 생존으로 확인하였다. 효모 전세포를 이용한 백신은 100% 폐사하였으며 세포 파쇄 항원을 이용한 백신은 백신 2번에서 53%, 백신 3번에서 80%의 생존율을 보였다. 세포 파쇄 항원의 결과는 함유된 단백 항원의 양에 따라 방어능이 다르게 나타나는 것을 확인하였으며 이를 통해 항원 함량의 증가에 대한 면역원성을 확인할 수 있었다.

## 2. 효모에서 동시발현된 spaA 및 E2 시험백신 제조 및 실험동물을 이용한 면역원성 조사

사카로마이세스 세레비지에 균주에 두가지 항원을 도입하여 한번에 두가지 질병을 예방하고자 돼지열병바이러스(Classical swine fever)의 envelop glycoprotein인 E2와 돈단독(Erysipelas)의 면역원성 항원인 surface protective protein A(spaA)를 동시에 발현시켰다. 사카로마이세스 세레비지 균주에서 발현시킨 spaA와 E2의 면역원성을 확인하기 위하여 아래와 같은 방법으로 시험백신을 제조하여 동물실험(마우스, 기니픽)에서 spaA와 E2를 동시에 발현하는 Y2805 $\Delta$ gal80 균주를 배양하고 원심분리 후 OD<sub>600</sub>값을 측정하였다. 시험백신은 앞선 spaA 단독 시험과 마찬가지로 두가지 형태인 균체(whole yeast cell)를 이용한 시험백신과 균체를 파쇄한 형태의 시험백신으로 제조하여 동물에서의 면역원성을 확인하였다. 균체(whole yeast cell)를 이용한 시험백신은 균체의 비활성화를 위해 0.2% 포르말린을 처리하여 실온에서 72시간 동안 반응하고 균체 배지에 도말하여 비활성화를 확인 한 후 제조에 사용하였다. 균체 파쇄된 항원을 이용한 시험백신은 발현된 spaA-E2 항원단백질을 균체로부터 얻기 위하여 homogenizer로 1000bar에서 4번 통과시켜 세포 파쇄액을 얻고 항원의 비활성화를 위해 0.2% 포르말린을 처리하여 실온에서 72시간 동안 반응하고 균체 배지에 도말하여 비활성화를 확인 후 제조에 사용하였다. Whole yeast cell을 이용한 시험백신의 균주농도는 측정된 OD<sub>600</sub>값을 토대로  $2 \times 10^9 / \text{ml}$  ( $1 \text{ OD} = 2 \times 10^7 / \text{cell}$ )로 제조하였으며 파쇄한 항원은 단백질 정량을 하여 농도를 측정한 다음 제조하였다.

시험군은 효모 전세포인 시험백신 1과 세포파쇄액인 시험백신 2이며, 양성대조군으로 CSFV E2, spaA에 대한 양성대조군으로는 ERT2T를 사용하였다. 음성대조군은 무접종군으로 하였다. 시험백신 생산내역은 아래 표 3에 나타내었다.

【표 3】

	시험백신1	시험백신2	시험백신3	시험백신4	시험백신5
구성	spaA-E2 효모전세포	spaA-E2 세포파쇄액	양성대조군1	양성대조군2	음성대조군
	2x10 <sup>9</sup> /ml	1mg/ml	CSFV E2	ERT2T	-
보조제	수산화 알루미늄 겔	-	-	-	-

spaA에 대한 시험은 체중 15~20g의 마우스에 각 그룹별로 10마리씩 백신의 1/10두분인 0.2ml을 피하에 접종하고, 무 접종군 5마리를 음성대조군으로 사용하였다. 백신을 접종한 지 2주 후에 접종군과 대조군에 *E. rhusiopathiae*을 100 LD<sub>50</sub>/0.2ml을 피하에 공격접종한 다음 10일간 임상증상을 관찰하였다.

【표 4】

	시험백신1	시험백신2	시험백신3	시험백신4	시험백신5
구성	spaA-E2 효모전세포	spaA-E2 세포파쇄액	양성대조군1 (CSFV E2)	양성대조군2 (ERT2T)	음성대조군
접종방법	피하	피하	-	피하	-
마리 수	10	10	-	10	5
시험결과 (생존율)	1/10 (10%)	5/10 (50%)	-	10/10 (100%)	0/5 (0%)

공격 접종 후 백신의 효능성은 국가검정기준인 대조군 100% 폐사, 접종군 80% 이상 생존으로 확인하였다. 효모 전세포를 이용한 백신은 10%의 생존율을 보였고 세포 파쇄 항원을 이용한 백신은 50%의 생존율을 보였다. 이는 spaA 단독 시험에 비하여 30% 낮은 수치이다. spaA와 E2의 동시발현으로 인한 각 target protein의 함량이 다소 낮아 나타난 결과로 보여진다. 항원단백질의 양을 증가시킨다면 충분히 백신으로서의 효능이 있다고 보여진다.

E2에 대한 시험은 제조한 시험백신을 체중 300~350g의 기니픽에 각 그룹별로 5마리씩 백신의 1두분씩 2주 간격으로 2회 근육 접종하고, 무 접종군 2마리를 음성대조군으로 사용하였다. 2차 접종 2주 후 채혈하여 얻은 혈청은 혈청을 분리 및 56℃에서 30분간 비동화하여 ELISA를 수행하였다. ELISA는 Antibody detection blocking ELISA로서 IDEXX사에서 구입하여 사용하였다. 검체반응은 37℃에서 2시간, conjugate 반응은 실온에서 30분, substrate는 실온 암소 조건에서 10분간 반응시켰고 stop solution을 가한 후 OD 450nm 값

을 측정하였다.

【표 5】

	시험백신1	시험백신2	시험백신3	시험백신4	시험백신5
구성	spaA-E2 효모전세포	spaA-E2 세포파쇄액	양성대조군1 (CSFV E2)	양성대조군2 (ERT2T)	음성대조군
시료 1	0.961	0.878	0.713	-	0.983
시료 2	0.905	0.916	0.566	-	0.935
시료 3	0.887	1.008	0.815	-	
시료 4	0.918	0.921	0.571	-	
시료 5	0.923	0.893	0.827	-	
평균	0.918	0.923	0.6984	-	0.94
Blocking rate	2.0%	1.5%	25.5%	-	0%

CSFV blocking ELISA 방법으로 면역원성을 나타내는 blocking rate 결과는 표 5에 표시하였다. Blocking rate이 40% 이상이면 양성판정되는데 spaA-E2 동시발현 효모전세포와 세포파쇄액에서 모두 음성결과를 나타내었다. 양성대조군에서도 낮은 결과를 보였는데 이는 본 시험법이 CSFV E2 재조합백신의 효능을 검증하기에는 적절한 방법이 아닌 것으로 판단된다.

### 3. 효모 발현 PCV ORF2에 관한 시험

#### 가. 시험백신 대량생산

시험백신	항원함량 및 혼합비율	분병수량 2ml/두분
314TMX 01	Yeast PCV ORF2 ..... $2 \times 10^8$ CFU/ml Adjuvant ..... 30%	500병

#### (1). 특성시험

##### (가) 시험방법

동물용 생물학적제제 일반 시험법에 따라 시험한다.

##### (나) 시험결과

일반 시험법에 의한 검사 결과 액체로서 정치하면 백신 내용물의 침전이 생기나 흔들면 쉽게 균등액이 되며 소분된 내용물의 성상이 균일하고 이물과 이취가 없었다.

**(2). 무균시험**

**(가) 시험방법**

동물용 생물학적제제 일반 시험법에 따라 검사를 실시하였다. 시험백신을 Nutrient agar (NA), Nutrient broth(NB), Fluid thioglycolate medium(Thio)에 각각 2개의 시험관에 접종하여 22℃와 37℃에서 14일간 배양하면서 잡균의 혼입 여부를 관찰하였다.

**(나) 시험결과**

시험한 결과 아래와 같이 어떠한 잡균의 혼입도 인정되지 않았다.

시험백신	22℃			37℃			비고
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio	
314TMX 01	-*	-	-	-	-	-	

\* - : 배양 세균이 없음

**(3) 불활화 확인시험**

**(가) 시험방법**

불활화된 균체와 재조합 균주 배양액을 selection agar에 접종하고 37℃에서 24~48시간 배양하여 집락형성을 관찰하였다.

**(나) 시험결과**

불활화 확인시험에서 어떠한 집락도 형성되지 않았다.

시험백신	시험재료	배양방법	시험결과	비고
314TMX 01	Chocolate agar	37℃, 24~48시간	집락형성(-)	
대조균	Chocolate agar	37℃, 24~48시간	집락형성(-)	

**(4) 방부제 정량시험**

**(가) 시험방법**

동물용 생물학적제제 일반 시험법에 의한 검사에 따라 시험백신에 포함되어 있는 포르말린 함량을 schiff 시약을 이용한 비색법으로 측정하였다.

**(나) 시험결과**

시험백신의 방부제 정량시험 결과 아래와 같이 0.2% 이하를 나타내었다.



시험백신	추세선 수식 (Linear)	OD <sub>520</sub> (x값)	희석배수	포르말린 농도 (%)	관정기준	판정
	y=0.0112x +					
314TMX 01	0.0006 R <sup>2</sup> =0.9952	0.100	100배	0.17	≤0.2%	적합

## 나. 실험동물에 대한 시험백신의 안전성 및 면역원성 시험

### (1) 실험동물에 대한 안전성 시험

#### (가) 시험방법

체중 15~20g의 마우스 8마리를 준비하여, 8마리의 마우스 복강에 0.5ml를 접종하고 7일간 관찰한다. 또한 체중 300~350g의 기니픽 4마리를 준비하여, 2마리의 기니픽은 근육 또는 피하에 2ml을, 다른 2마리의 기니픽 피내에 0.1ml를 접종하고 7일간 관찰한다.

#### (나) 시험결과

안전시험 결과 접종 후 7일간의 임상증상을 관찰한 결과 부작용 없이 모두 생존하였다.

Group	동물	접종부위 및 접종량	관찰기간	생존수/전체수	임상관찰결과
314TMX 01	마우스	복강, 0.5ml	7일	8/8	이상없이 생존
	기니픽	피하, 2.0ml	7일	2/2	이상없이 생존
		피내, 0.1ml	7일	2/2	이상없이 생존

### (2) 실험동물에 대한 PCV 면역원성 시험

#### (가) 기니픽 시험

체중 300~350g의 기니픽을 시험군에 6마리 배정하여 1/2두분(1.0ml)을 피하에 접종하고 3주 후 무접종 대조군 4마리와 함께 채혈하여 ELISA로 혈청역가시험을 실시한다.

#### (나) PCV 시험결과

기니픽 실험결과, 시험백신 314TMX 01은 검정기준인 T/C값 2.0이상임을 확인하였다.

Group	O.D.1	O.D.2	평균 OD값	T/C (Test OD/Control OD)
TMX 01	1	0.994	0.930	4.04
	2	0.720		
	3	0.971		
	4	0.730		
	5	1.335		
	6	0.973		
대조군	C13	0.195	0.230	/
	C14	0.231		
	C15	0.329		
	C16	0.184		

**다. 목적동물에 대한 시험백신의 안전성 및 면역원성 시험**

**(1) 목적동물에 대한 안전성 시험**

**(가) 시험방법**

과거 관련 질병에 노출되지 않은 5~7주령 돼지 2 마리에 백신의 2 부분 (4ml)을 근육 접종하고 21일간 임상증상을 관찰하였다.

**(나) 시험결과**

안전시험 결과 접종 후 21일간의 임상증상을 관찰한 결과 주사부위의 화농, 괴사, 발열 및 피부병변 등의 부작용 없이 모두 생존하였다.

Group	구분	접종수	접종부위 및 접종량	관찰기간	임상관찰결과
TMX 01	vaccination	2	근육, 4ml	21 days	이상없이 생존
PBS	Control	1	근육, 4ml		이상없이 생존

**(2) 목적동물에 대한 효력시험**

**(가) 시험방법**

목적동물에서의 면역원성을 확인하기 위하여 5주령의 건강한 자돈을 13마리 선정하여 5마리의 자돈에 1부분인 2ml을 접종하고 접종 2주차와 3주차에 각각 채혈하여 Porcine Circovirus에 대한 ELISA를 수행하였다.

**(나) PCV 시험결과**

접종 전부터 모체이행항체로 인해 항체가가 양성이었으나, 1차 접종 2주후에 음성대조군과는 달리 시험군에서 항체가가 상승하는 것을 확인하였다.

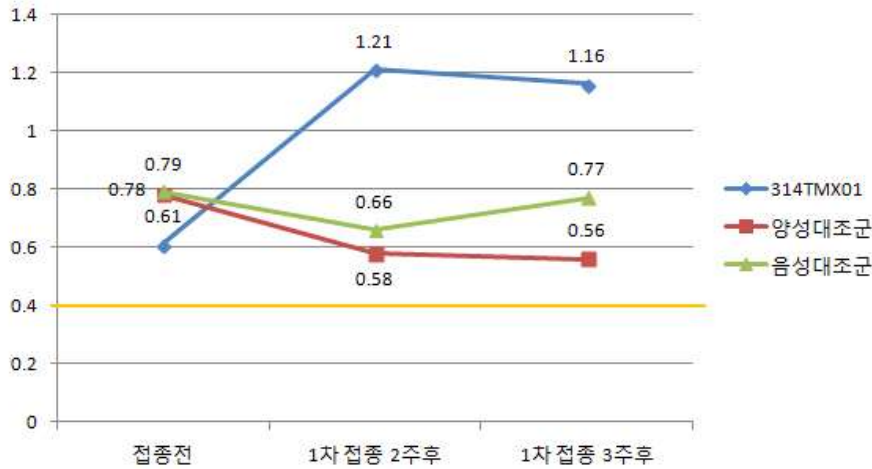
Group		PCV-2 ELISA S/P ratio (JENOBIOTECH)		
		접종전	1차 접종 2주후	1차 접종 3주후
314TMX 01	51	0.41	1.10	1.17
	52	0.59	1.54	1.40
	53	0.91	1.05	0.89
	54	0.45	1.41	1.34
	55	0.68	0.97	1.00
양성대조군	61	0.51	0.32	0.35
	62	1.36	0.74	0.56
	63	0.52	0.68	0.72
	64	0.72	0.57	0.59
음성대조군	65	0.99	0.63	0.69
	66	0.60	0.49	0.60
	67	0.78	1.08	1.35
	68	0.78	0.44	0.42

\* S/P ratio가 0.4이상이면 양성, 0.3이상 0.4미만이면 의양성, 0.3미만이면 음성으로 판독

Group		Average S/P ratio (JENOBIOTECH)		
		접종전	1차 접종 2주후	1차 접종 3주후
314TMX 01		0.61	1.21	1.16
양성대조군		0.78	0.58	0.56
음성대조군		0.79	0.66	0.77

돼지 쉰코바이러스 백신의 경우 실험동물인 기네피에서는 양성 전환이 뚜렷이 보이는 반면, 목적동물인 돼지에서는 기존의 항체로 말미암아 백신에 의한 항체 전환을 관찰하기가 쉽지 않지만, 이번 시험 백신의 경우 음성 대조군과 양성 대조군인 다국적 기업의 백신보다 양성 전환 양상이 보다 분명한 것을 알 수 있었다. 그렇기 때문에 실제로 야외 현장에서의 다수의 목적 동물 임상 시험을 통해서 백신의 안전성과 효능성을 입증하게 될 것이다(그림1).

【그림 1】



## <추가 수정 보완 자료>

### 1. 전세포 백신개발의 안전성에 대한 언급

현재 개발하고자 하는 백신은 전세포를 이용한 사독백신을 개발하고자 함. 따라서 불활화 처리하지 않은 항원과 백신을 위한 불활화 항원에 대한 안전성 확인을 위해 아래 시험을 진행하였음.

#### 가. 전세포 항원의 안전성 시험

##### (1) 실험동물에 대한 안전성 시험

##### (가) 시험방법

체중 15~20g의 마우스를 10마리 준비하여, 각 그룹당 5마리씩 백신 용량의 1/4 두분인 0.5ml를 피하에 접종하고 7일간 생존여부를 관찰한다.

##### (나) 시험결과

안전시험 결과 접종 후 7일간의 임상증상 관찰한 결과 불활화된 전세포 시험백신은 부작용 없이 생존하였다. 불활화제를 처리하지 않은 그룹1은 안전시험결과 마우스에서 100% 폐사하였고, 불활화제를 처리한 그룹2은 100% 생존하여 전세포를 이용한 사독불활화 백신에 대한 안전성에는 이상이 없을 것으로 판단된다.

Group	접종부위	접종량	관찰기간	생존수/전체수
1 yeast	피하	0.5ml	7일	0/5
2 yeast inactivation	피하	0.5ml	7일	5/5

그림1. 시험백신 2를 접종한 결과(마우스)



(2) 목적동물에 대한 안전성 시험

(가) 시험방법

체중 8~10kg(4~6주령)의 건강한 돼지 2마리에 백신의 2두분을 근육접종하고 21일간 관찰하였다.

(나) 시험결과

안전시험 결과 접종 후 21일간 주사부위의 화농, 괴사, 발열 및 피부병변등의 부작용이 확인되지 않았으며 100% 모두 생존하였다.

Group	접종부위	접종량	관찰기간	생존수/전체수
1 yeast inactivation	근육	4ml	21일	2/2

2. 안정성 자료에 대한 공신력이 있는 평가기관에 수행한 인정서 제시등이 필요함  
사후 임상적용에 대한 연구 계획이 필요함, 수정보완 되어야함

3. 연구 기간의 단축으로 인한 상용화에 대한 연구 내용에 대한 계획을 확인하기 어려우나 실용화를 위한 구체적인 실행 계획의 기술이 필요함

동물용 의약품의 백신개발은 그림2와 같은 절차를 통해 이루어지며, 임상시험계획서의 검토 및 승인, 그리고 허가서류를 검토하여 최종 신규백신의 허가는 모두 농림축산검역본부에서 관할하고 있음. 현재 중앙백신연구소에서는 개발된 전세포를 이용한 신규백신에 대한 임상시험계획서를 작성하여 11월 중 제출 예정임. 임상시험 승인 검토는 3개월 소요, 임상시험 6개월 이상 소요, 허가서류 작성 3개월 소요, 허가서류 검토 3개월 소요로 현시점으로부터 백신 출시까지는 총 15개월이 소요되어 2016년 상반기가 될 것으로 예상됨.

신규백신이 허가 승인 되어 제품으로 출시되기 전의 개발단계에서는 검역본부에서 승인된 시험방법에 따라 자사에서 시험을 진행하고, 신규백신으로 제품이 출시된 이후에는 자검 후 검역본부에서 백신에 대한 최종 평가 시험을 통해 신규 백신에 대한 최종평가를 하도록 되어있음.



그림2. 신규백신의 허가 절차

#### 4. 동물에서의 부작용 실험과 효모로 만든 백신의 안전성 실험을 추가하는 것이 필요함.

효모를 이용한 안전성 실험은 효모가 포함된 다가 백신을 통해 진행 할 예정이며 위 절차에 맞게 진행이 될 것으로 전망됨

본 실험은 최종 결정된 adjuvant, 결정된 항원 함량을 조합해서 실험 진행예정임. 동물에서의 부작용 실험과 효모로 만든 백신의 안전성 실험은 위 보고서에 일부 첨가 되었으며 (최종보고서 112~113 page) 차 후 백신 허가를 진행하면서 좀 더 구체적인 실험을 진행 할 수 있을 것이라 사료됨. 실험동물에서의 추가적인 안전성 실험과 목적동물에서의 세부적인 병변, 체중, 온도, 식별, 임상 scoring, 조직 병변에 대한 부분은 차 후 허가를 위한 실험을 진행하면서 확인 할 수 있을 것으로 사료됨.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012)	제1세부과제 : 유효항원 스크리닝 및 효모발현 시스템 구축	돈단독 백신 후보 유전자 스크리닝	100	돈단독 원인균 <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> 균 주의 genomic DNA library를 signal trap 백터에 구축하여 유효항원을 스크리닝하고 서열분석을 통하여 돈단독 백신 후보 유전 자를 선별
		PCV 백신 후보 유전자 ORF2 발현 카세트 제조	100	PCV 백신 후보 유전자 ORF2를 효모 최적 코돈으로 합성하고 His, CBD, Ty1 등과의 융합발현을 시도하였으며 단백질 발현과 전 자현미경을 통해 VLP 형성을 확인
	제2세부과제 : 항원 생산 공정 개발	실험실 규모에서의 재조합 항원 후보 단백질 생산공정 개발	100	-CBD(cellulose-binding domain) 융합발현 시스템개발 -유가식 배양공정을 통한 항원단백질 생산 공정 개발
		실험실 규모에서의 재조합 항원 후보 단백질 분리정제공정 개발	100	-CBD를 affinity tag으로 사용한 항원단백 질 one-step 분리정제공정 개발 -항원단백질을 셀룰로오즈 담체에 고정화 하는 기법을 돈단독질병예방을 위한 백신 에 적용
	협동과제 : 백신 효능 검정	동물 실험을 통한 유효 항원 선발 시험	100	마우스, 기니픽을 통한 재조합 항원의 면역 원성 및 안정성 확인
		백신 보조제 비교시험 및 선발	100	항원과 백신 보조제의 제제화 실험

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2013)	제1세부과제 : 유효항원 스크리닝 및 효모발현 시스템 구축	돈단독 항원 유전자 효모발현 시스템구축	100	돈단독 원인균 <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> 균주의 표면항원 SpaA를 효모 세포표면 부착매개 단백질 Cwp1과 융합하여 사카로마이세스 세레비지에에서 발현하고 세포부착을 확인함.
		PCV 백신 유전자 발현 시스템 구축	100	- PCV 백신 유전자 ORF2를 효모 최적코돈으로 합성하고 발현 최적화를 위한 숙주세포 및 프로모터를 확정하였고 분비발현 가능성을 조사하였으며 His, Ty1 등과 융합발현. - <i>S. cerevisiae</i> 뿐만 아니라 <i>Pichia pastoris</i> 및 <i>Hansenula polymorpha</i> 등 비전통 효모에서 ORF2 유전자 발현율을 조사. - Molecular adjuvant 역할을 하는 스쿠알렌을 ORF2와 동시에 생산하는 사카로마이세스 세레비지에 균주를 구축 - ORF2를 순수 정제하여 재조합 효모에서 생산되는 ORF2의 정량법 확립
	제2세부과제 : 항원 생산 공정 개발	실험실 규모 재조합 항원 단백질의 생산공정 확립	100	-유가식 배양공정을 통한 재조합 효모 및 재조합 대장균 항원 단백질 생산공정 개발 -재조합 효모를 통한 항원단백질 생산 및 분리정제 공정 개발 (발효→원심분리(세포회수)→Homogenization(세포파쇄)→원심분리)
		동물실험을 위한 재조합 항원 단백질의 생산	100	-실험실 규모 (5 리터) 발효조를 사용하여 재조합 효모 균체를 수득하고 homogenization 후 cell free lysate를 제조하여 whole cell과 함께 동물 시험을 위해 협동기관에 공급 -실험실 규모(5 리터) 발효조를 이용하여, CBD가 부착된 SpaA (돈단독 항원단백질)를 생산하여, 셀룰로오즈 담체에 결합된 항원단백질을 협동기관에 공급
	협동과제 : 백신 효능 검증	시험 백신 제 제화	100	- Heat inactivation과 formalin 처리를 통한 백신의 불활성화 시험 수행 - 백신 제제화를 위하여 백신보조제 및 면역증강제를 포함하는 시험백신을 제조
		백신의 안전 성 및 유효 성 평가	100	- Yeast 정제 수준(whole cell, cell disupt, Membrane filtration)에 따른 백신의 안전성 및 유효성 시험 실시 - 실험동물(기니피)에서 항원 및 항원량 결정시험 수행 - 목적동물(돼지)에서 면역원성 지속기간 확인을 위해 3주 및 5주차 채혈, ELISA 실시



구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2014)	제1세부과제 : 유효항원 스크리닝 및 효모발현 시스템 구축	유전자 발현 최적화	100	- 돈단독 원인균의 Signal trap library를 구축하고 7종의 clone을 스크리닝하여 발현 후 항혈청과의 반응성을 조사 - ORF2를 과발현하는 효모 숙주세포에서 발현량이 증감하는 유전자를 microarray를 통하여 도출하고 이들의 결손 시와 과발현 시 ORF2의 발현량에 미치는 영향을 조사 - ORF2 유전자 발현의 최적 효모 숙주세포를 선별하고 최적 프로모터를 선정
		표면 발현 최적화	100	- spaA와 E2를 각각 분비발현 및 표면발현하고 형광현미경 등을 통하여 표면발현을 확인함. SpaA+E2 동시발현도 수행
	제2세부과제 : 항원 생산 공정 개발	파일럿 스케일에서 의 생산공정 개발	100	- 500리터 발효조를 사용하여 ORF2를 발효 생산한 후 대장균에서 순수 분리정제한 표준품을 사용하여 정량적 생산성을 분석
		파일럿 스케일에서 의 분리정제 공정 개발	100	- 효모에서 생산된 ORF2 VLP의 분리 및 안정화를 수행하였으며 대장균에서 MBP-tagging을 통한 가용발현 및 순수분리 공정을 개발하고 표준품을 제조
	협동과제 : 백신 효능 검증	시험 백신 대량생산	100	- 돼지 500두분의 시험백신을 제조하고 특성시험, 무균시험, 불활화 확인시험, 방부제 정량시험 등을 수행
		시험 백신의 목적동물 안 전성 및 효능 성 시험	100	- SpA 및 E2의 효모표면발현 시 면역원성을 마우스를 사용하여 조사 - ORF2 시험백신의 실험 동물에 대한 안전성 시험 및 면역원성 시험, 그리고 목적동물에 대한 안전성 시험 및 효력 시험을 수행

# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 제 1 절 연구개발 성과

- 돈단독증 세균의 신규 항원 동정은 실패하였으나 면역원성이 높은 항원의 고정화를 통한 백신 제조방법을 개발하고 국내특허를 출원하였음
- 돼지 썬코바이러스 항원 단백질을 발현하는 재조합 효모 전세포를 백신으로 사용하는 새로운 기술을 개발하여 PCT 특허를 출원하였고 참여기업에 기술이전 하였음
- 논문 게재 및 특허 출원, 등록 실적은 아래와 같음

구분	(예시)특허		(예시)신품종				(예시)유전자원 등록	(예시)논문		기타
	출원	등록	품종 명칭 등록	품종 생산 수입 판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	목표	1								
	달성	1	1					1		
2차 년도	목표	1						1		
	달성	2						1		
3차 년도	목표	1	1					1		
	달성	1	1							
계	목표	3	1					2		
	달성	4	2					2		

### 1. 논문 게재 실적

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내 외 구분	SCI 구 분
		주저자	교신저 자	공동저자				
2012	Direct lactic acid fermentation of Jerusalem artichoke tuber extract using <i>Lactobacillus paracasei</i> without acidic or enzymatic inulin hydrolysis	Hwa-Young Choi	Eui-Sung Choi	Hee-Kyoung Ryu, Kyung-Min Park, Eun Gyo Lee, Hongweon Lee, Seon-Won Kim	Bioresource Technology	114:745-747	국외	SCI
2012	Soluble expression of OmpA from <i>Haemophilus parasuis</i> in <i>Escherichia coli</i> and its protective effects in the mouse model infection	Ahn, Jungoh	Hongweon Lee	Minhee Hong, Sungsik Yoo, Eungyo Lee, Hoeun Won, Injoong Yoon, Joon-Ki Jung	J Microbiol. Biotechnol.	22: 1307-1309	국내	SCI

2. 특허 출원 및 등록 실적

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록 연도	특허명	등록인	등록국	등록 번호
2014	Porcine circovirus subunit vaccine using yeast whole cells and the method of production thereof	한국생명공학연구원, (주)중앙백신연구소	PCT	PCT/KR2014/002002	2014	Yeast variant and method of producing squalene using the same	한국생명공학연구원	미국	US 8,679,804
2013	재조합 효모 전세포 (yeast whole cell)을 이용한 돼지 썬코바이러스 (PCV-2) 서브유닛 백신과 그의 생산 방법	한국생명공학연구원, (주)중앙백신연구소	한국	10-2013-0025823	2012	효모변이주 및 이를 이용한 스쿠알렌의 생산방법	한국생명공학연구원	한국	10-2012-1137026
2012	항원성 단백질을 고정화를 통한 돈단독 백신 제조방법	한국생명공학연구원, (주)중앙백신연구소	한국	10-2012-0156944					
2012	효모변이주 및 이를 이용한 스쿠알렌의 생산방법	한국생명공학연구원	미국	13/460,244					

3. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해년도 징수액	향후 징수액	합계
-	72,000,000원	총매출 3%	72,000,000원

## 제 2 절 성과활용계획

### 1. 추가연구, 타연구에 활용 계획

PCV 관련 질병은 경제적인 손실성 파급성이 크며 농가의 조기 진단 및 대처가 중요한 질병이다. 현재 PCV관련 질병의 PCV 항원 진단을 위해 PCR method, ELISA method, SN method, IFA method, real time PCR, IPMA method등이 사용되고 있다. 본 연구에서는 면역원성이 확인된 재조합 항원 생산기술을 확립하였으며 생산된 항원의 정제 기술을 확립하였다. 정제된 항원은 여러 방법 중 ELISA method에 활용 가능성이 가장 클 것으로 사료된다. 따라서 정제된 항원을 이용한 ELISA method 확립을 통해 circovirus 관련 질병의 진단법 확립 및 백신한 목적동물에서의 면역원성 확인을 위해 활용 할 계획이다.

#### 가. ELISA KIT의 개발

- 1) Kit 개발을 위한 혈청 선정
- 2) 항원 coating 농도 결정시험
- 3) ELISA buffer 결정시험
- 4) 혈청 희석농도 결정시험
- 5) Conjugate 농도 결정시험
- 6) cut-off 결정시험
- 7) 개발된 kit와 상용화 kit 비교 시험

본 연구를 통해 개발된 항원을 이용하여 두 가지 형태의 백신개발에 활용 할 수 있을 것이라 기대된다. 본 연구를 통해 개발된 항원을 이용한 다가 접종 백신과 whole yeast를 활용 할 수 있는 경구용 백신의 가능성 또한 사료첨가제의 보조제로서의 가능성을 확인 할 계획이다.

#### 가. 실험동물에서의 면역원성 확인실험

##### 나. 실험동물에서의 Whole yeast 용량별 면역능 확인 실험

다. 경구백신 제제화 , 접종용 다가 백신의 제제화 및 사료 제제화를 통한 면역적 반응성 확인 실험

라. 최종 결정된 formula를 통한 목적동물에서의 확인 실험

## 2. 실용화 · 산업화 계획(기술실시)

### 1) 산업화 추진 계획

2014년	백신 제제화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 농장에서 요구되는 백신 조합의 조사</li> <li>- 조사된 백신 조합을 토대로 다가 실험백신 생산</li> <li>- 다가 백신의 제제화를 통해 면역 간섭 확인 및 효능성 확인</li> <li>- 함유 함량 및 adjuvant 선정 등 백신의 최적화 조건 확립</li> <li>- 확립된 백신을 이용한 실험동물 실험</li> </ul>
	진단 및 면역능 확인을 위한 진단법 확인	<p>ELISA method 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 단백질 정제의 최적화 확립을 통해 진단법의 오차를 최소화</li> <li>- 정제된 단백질을 이용한 ELISA method 확립</li> <li>- 확립된 ELISA method를 이용한 다량의 sample test</li> </ul>
2015년	백신의 목적동물 실험	<p>실험동물에서 확립된 백신의 소규모 목적동물에서의 효능성 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 소규모의 목적동물에서의 면역적 반응 확인 실험</li> <li>- 소규모 목적동물에서의 안전성 실험</li> <li>- 소규모 목적동물에서의 백신 안정성 실험</li> </ul> <p>임상 승인을 통한 대규모 농장 실험</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 소규모 농장 실험 종료 후 임상 승인을 득한 후 농장의 섭외</li> <li>- 섭외된 농장들을 통해 농장에서의 실질적인 임상 효능성 확인 및 실험적인 효능성 확인</li> <li>- 농장 실험을 토대로 자료를 확보하고 제품 허가를 위한 자료로 활용</li> </ul>
2016년	백신 허가	<p>백신 허가를 위한 자료 준비 및 허가 진행</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 임상 실험을 통한 자료 정리</li> <li>- 추가적인 필요 자료의 수집 및 실험</li> <li>- 축적된 자료를 통한 허가서류 제출</li> </ul>
2017년	국내 출시 전 홍보마케팅 전략	<p>백신 허가 전 야외 농장 실험자료를 이용한 마케팅 전략 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 세미나 참석을 통해 개발 백신의 간접적 홍보</li> <li>- 관련 학회(양돈 수의사회, 양돈 연구회 등)에 실험자료를 활용한 포스터 게재 및 세미나 준비</li> </ul> <p>백신 허가 완료 후 대규모 판매 전략 수립</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 백신 홍보를 위한 세미나 준비</li> <li>- 각종 대중 매체(축산신문, 축산 경제 신문) 및 잡지를 통한 백신의 대대적 홍보</li> <li>- 판매 후 소비자 충족도 확인을 위한 설문지 작성 및 활용</li> </ul> <p>소비자 인 농장주를 위한 세미나 준비 및 지역별 설명회 개최</p>

2) 사업화추진 전략

(단위 : 억원)

년도	사업목표	사업화 과제	사업화 품목	투자계획				생산 계획	판매계획		
				인건비	재료비 및 설비투자비	경상운영비	계		매출(억원)	수출(억원)	계
2016년	품목허가 취득	*야외농장시험 후 효능평가 (항체가 확인시험 및 목적동물 공격접종시험)		1.3	3.0	0.3	4.6		-	-	-
2017년	제품생산 및 국가검정합격, 국내판매, 해외등록진행	*제품의 대량생산 *최초 생산 Lot.의 자가검정합격 *국가검정합격 *국내판매개시 *국내마케팅기획/실행 *해외등록서류(영문)진행		1.1	2.7	0.3	4.1		30	-	30
	국내판매/해외등록준비	*해외(동남아)등록(베트남,태국,필리핀)							-	-	-
2018년	국내판매/해외판매	국내 판매 및 동남아 판매							35	-	35

3) 시장진입 및 마케팅 계획

① 세미나

- 주요인사 세미나 : 신문/잡지사 기자단, 사료회사 직원, 컨설팅 수의사, 대리점주 대상으로 한 세미나 개최
- 대리점/농장별 세미나 : 전국 50여개 주요대리점 판매직원 대상, 지역내 대규모 양돈사 양가 대상
- 권역별 농가대상 세미나 : 야외필드시험을 시행했던 기업농가의 연계세미나, 지역내 양돈사양가 대상

② 학회

- 양돈수의사회 포럼, 연례세미나 발표
- IPVS 세계양돈수의사대회 야외필드시험 관련자료 논문제출

### ③ ON/OFF 홍보활동

#### ○ Off-line을 통한 대대적 홍보

- 신문 : 축산신문, 축산경제신문, 농수축산신문, 양돈타임즈
- 잡지 : 피그앤포크, 현대양돈, 월간친환경축산, 양돈위생
- 내용 : 마이코-X 광고 및 특징점, 필드데이터 및 효능에 대해 기고문, 제품출시 홍보자료 활용

#### ○ On-line을 통한 홍보

- 회사 인터넷 홈페이지내 신제품 배너광고와 모바일앱 제작을 통해 스마트폰을 이용한 신제품 출시에 대한 홍보
- 신문/잡지사에서 운용하는 인터넷 홈페이지활용 홍보(신제품/기고문 등)
- 회사에 확보된 양돈농가 이메일주소록과 휴대폰 전화번호를 통한 자료와 홍보문자 발송

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.