

발간등록번호

11-1541000-001207-01

항원 고발현 식물세포를 이용한
해수어 이리도바이러스 경구백신 개발
(Development of an oral vaccine formulae
against fish iridovirus infection using recombinant
protein over-expressed by plant bioreactor)

전남대학교 수의과대학

농림수산식품자료실



0004565

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “항원 고발현 식물세포를 이용한 해수어 이리도바이러스 경구백신 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011 년 12월 19일

주관연구기관명 : 전남대학교

주관연구책임자 : 김 태 중

협동연구기관명 : 전주생물소재연구소

협동연구책임자 : 신 윤 지

협동연구기관명 : (주) 젠닥스

협동연구책임자 : 정 화 지

요 약 문

I. 제 목

항원 고발현 식물세포를 이용한 해수어 이리도바이러스 경구백신 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 현재까지의 재조합 단백질 유래의 재조합 백신은 고가의 동물세포 및 곤충세포 배양법이나 단순한 미생물 배양 (대장균 및 기타 세균등을 포함한 단핵세포 및 효모등의 진핵세포)을 통해 항원단백질을 준비하여 왔음
- 각각의 방법은 항원준비단계에서 다양한 조절 및 정제과정등의 절차로 인해 불편함과 비용의 문제를 안고 있었음
- 예방백신은 일부 극소수의 점안, 점막 백신을 제외하고 거의 대부분 주사를 이용하여 왔음.
- 어류의 백신은 개체예방의 개념이 아닌 집단예방의 대상으로써 개체별 주사 및 점막접촉등의 방법으로는 적용이 불가능한 분야임.
- 이를 극복하기 위해 식물 bio-reactor를 이용하여 저가, 대량생산, 무독성, edible, 그리고 진핵세포 유래의 well-folded and well-post-translational modified 단백질을 생산한다면 가격의 문제 및 효율 및 효용성의 문제를 모두 해결할 수 있음
- 또한 각종 탄수화합물의 복합체인 식물유래 항원은 정제단계없이 바로 사료화 단계에서 투입이 가능한 방법임.
- 또한 재조합 단백질 항원이 체내에서 소화되어 단순한 단백질 영양원으로 작용하지 않도록 특별히 고안된 chitosan formulation을 이용하여 재조합 단백질이 점막에서 항원으로 작용할 수 있도록 하는 독창성이 있음.
- 그리고 주사의 불편함이나 스트레스가 아닌 구강을 통한 점막백신을 실시하는 것으로 재조합 단백질 항원을 식물체에서 대량발현하고 이 항원을 immuno-stimulant인 chitosan formulation으로 coating하여 구강을 통해 백신을 전달하는 시스템을 개발하고자 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 해수어 이리도바이러스 국내 분리주의 분리 및 이를 이용한 국내발생 이리도바이러스의 구조단백질인 capsid 유전자 characterization
- 대장균 단백질 발현 system을 이용한 재조합 capsid 단백질의 생산 및 이를 이용한 항체생산
- 국내분리 이리도바이러스 세포배양을 통한 대량항원 준비
- 색소체 형질전환 기술을 활용하여 니코틴프리 담배에서 고효율의 항원단백질 생산
- (재)전주생물소재연구소에서 확보하고 있는 벼 현탁세포 특이적 발현 프로모터를 활용한 항원단백질 고생산 세포주의 개발
- 특히 현탁세포 특이적 발현 프로모터는 각종 단백질 발현에서 200 - 500 mg/L의 높은 수율을 확인하였으며 이를 활용한 산업화의 응용연구가 요구 됨
- chitosan formulae를 이용한 구강면역에 이은 혈중 항체가 유도 여부 확인 및 적정항원농도 및 delivery system 개발
- 야외형 이리도바이러스 공격접종에 대한 방어효과의 면역학적, 조직학적 검증

IV. 연구개발결과

- 해수어 이리도바이러스 국내 분리주의 분리를 실시하였고 구조단백질인 capsid 유전자의 characterization을 통해 국내분리주의 capsid 유전자좌상의 특성을 파악함
- capsid 유전자의 cloning을 통해 유전자를 확보하고 이를 대장균 단백질 발현 system을 이용한 재조합 capsid 단백질의 생산 및 이를 이용한 항체생산을 실시함
- capsid 유전자의 식물체 발현을 위해 벼의 codon usage 분석을 실시하고 이에 맞게 codon optimization을 실시함
- optimized된 capsid 유전자를 대량식물발현벡터 system인 pJKB13에 cloning하고 이를 rice callus에 gene gun을 통해 형질전환하고 유전자가 도입된 여부를 PCR 및 Northern blot으로 확인함
- 담배 샷소체내로의 형질전환을 위해 담배 codon usage에 맞도록 codon optimization을 실시하고 담배샷소체 형질전환 벡터 (TIA::RclpGAH)에 cloning하고 이를 이용하여 담배에 형질전환을 실시함
- 담배형질전환체의 형질전환 여부를 Southern blot 및 Northern blot으로 확인하여 형질전환체를 검증-선별함
- 재조합 항원의 항원성 평가 및 formulae 연구를 위해 chitosan resin을 생산하고 resin의 함량비를 screening함
- 재조합 항원에 대한 단클론항체 (3A1, 8F80, 11A40)를 생산하고 실험어에 사료 급이의 형태로 백신 formulae를 투여하여 항체생산 유도능을 확인함
- 재조합 항원과 선별된 chitosan formulae를 이용하여 소규모의 임상실험을 위해 세포주 (EPC cell line)를 확립하고 바이러스를 분리-준비함
- 항원단백질 고발현 rice 세포주를 선별하기 위해 mRNA 발현여부 확인을 통해 고발현 세포주를 확립함
- 항원 고발현 세포주의 현탁세포 배양을 위한 현탁세포 유도 및 이의 배양조건을 확립함
- Rclp promoter가 포함된 담배형질전환체를 제작하고 이를 GFP 단백질을 이용하여 선별함
- 선별된 형질전환체의 항원단백질 (capsid) 발현 여부를 genomic PCR 및 RT-PCR로 확인함
- chitosan resin 대량생산을 위한 batch system을 구축하고 이를 이용하여 소예산으로 대량의 resin을 생산할 수 있게 됨
- 소규모의 임상실험을 실시하기 위해 rice callus에서 발현된 재조합 단백질을 이용하여 해수어 치어를 대상으로 급이실험을 실시한 결과, 통계적으로 유의성있게 높은 항체가를 유도하였으며 공격접종에 대해 80-90%의 방어능을 보임
- 시제품의 보관-유효기간의 설정을 위해 장기간 보관 및 역가실험을 실시하여 6개월 이상 유의성분 변화 및 역가 변화가 없음을 확인함

- 재조합 항원을 고발현하는 pJKB5 및 pJKB13이 종자를 확보하기 위해 LMO 시설내에서 대량재배를 실시함
- 대규모 (5L)의 생물반응기에서의 배양조건을 확립하고자 bioreactor 최적조건 확립하였고 5L bioreactorso에서 rice callus suspension culture 조건을 확립하고 시제품을 준비함
- capsid 유전자로 형질전환된 담배 T1세대의 종자를 흑으로 순화하고 T2세대재의 식물체의 형질전환 여부를 genomic PCR로 확인함
- T2세대의 capsid 유전자 transcript 여부를 RT-PCR로 확인하고 단백질의 발현여부를 확인하였으나 담배잎에서의 capsid 단백질의 불완전성에 의해 western blot에서의 단백질 발현 확인은 되지 않음
- 핵형질전환 담배식물체에서의 mRNA 발현은 확인되었으나 단백질의 불안정성으로 인해 western blot에서 단백질의 발현은 확인이 되지 않음
- 담배에서의 capsid 단백질의 안정성이 문제가 되어 고구마 배양세포에서 단백질을 발현하기 위해 고구마 배양세포를 형질전환함
- 형질전환된 고구마 배양세포에서의 mRNA 발현은 house keeping gene인 actin등에 비해 약 .5-2배정도의 transcript를 발현함을 확인함
- 고구마 배양세포에서의 단백질 발현여부를 확인하기 위해 western blot을 실시한 결과, 소량의 단백질이 발현됨을 확인하였고 고발현 개체 선발을 위해 선별배양 실시중임

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 재조합 단백질을 발현하는 형질전환체 식물을 이용하여 최초로 구강백신의 가능성을 확인함
- 이를 이용하여 대량배양된 rice callus suspension culture 동결건조물을 이용하여 어류 이리도 바이러스 예방 및 면역증강용 사료개발을 실시할 예정
- chitosan resin을 함유한 형질전환 식물체 포함 구강백신의 모델을 최초로 설정함
- 기존의 식물체에서의 단백질 발현정도의 수준을 넘는 재조합 항원 고발현 식물체 system을 구축하였고 이를 이용하여 어류에 있어 구강백신의 실체화를 이룸
- 다른 바이러스성 질병들에 대한 연구의 응용이 가능해 짐으로써 바이러스성 어류질병에 대한 궁극적인 해결방안을 제시함
- 어류 사료생산회사와의 기술 이전 및 산업화를 실시할 예정임
- 그리고 이를 통한 어체의 단기간내 폐사율을 감소함으로써 양식농가의 지속적이면서 안정적인 생산이 가능해질 것으로 기대됨

SUMMARY

(영문 요약문)

- The characterization of fish iridoviral structural protein, major capsid protein, was performed by the isolation of virus, followed by the cloning and sequencing of that gene. As a result, domestic fish iridovirus isolate has some sequence variations though not significant. Using that genetic information, recombinant capsid protein was expressed from *E. coli*. After cloning the capsid gene into the prokaryotic expression vector (pRSET A), construct was transformed into optimal *E. coli* and the transformants were selected, followed by the expression of desired recombinant protein. After purification, rabbit polyclonal antibody was produced, which raised against recombinant capsid protein.
- Using codon usage analysis, capsid protein gene was modified and optimized to express recombinant protein from plant, rice callus and tobacco. Optimized gene was introduced to plant expression vector, pJKB13 and transformed into the rice callus using gene gun technology, followed by the confirmation of transformation by PCR & Northern blot.
- Additionally, optimized gene was also introduced to plant transformation vector, "TIA::RclpGAH" and transformed into tobacco. Transformant was confirmed also by Southern blot & Northern blot.
- For the evaluation of the antigenicity of recombinant capsid protein and formulae study, resin-formed chitosan formulae was produced and the optimal resin contents were screened. After the administration of the chitosan resin formulae into fish, antibody inducibility was evaluated using monoclonal antibodies, 3A1, 8F80, and 11A40. As a result, antibody against recombinant capsid protein in oral administrative formulae was successfully induced. For the protection study and small sized clinical test, fish cell-line (EPC cell) was stabilized and the wild-type fish iridovirus isolate was prepared.
- Foreign mRNA transcript of fish iridovirus capsid gene was detected from transformants and the over-expression line was selected and stabilized. After selection of the plant cell line, suspension culture induction and condition was prepared.
- Plans transformant containing Rclp promoter was selected and screened using GFP protein reporter system. And the expression of foreign capsid gene from the selected transformants were verified by RT-PCR.

- Mass production batch system for chitosan resin production was prepared and the actual production of the resin was done. Fish fed with rice callus transformant produced antibodies successfully and approx. 80-90% of fish were protected against viral challenge. Preservation and effectiveness tests for prototype product were performed and confirmed that product can be stored and was effective for at least 6 months.
- To secure the transformant seed, mass production of those was performed in LMO facilities. Mass culture condition in 5L bioreactor was stabilized and the prototype product was produced.
- T1 transformants tobacco was adapted into the soil, and the genomic verification of the T2 generation was successfully performed. Though expression of the foreign capsid transcript from tobacco leaves was detected and confirmed by RT-PCR, expression of the foreign protein was not detected by Western blot. This was thought to be the unstability of the foreign protein in tobacco. To overcome this, capsid gene was introduced to the sweet potato cells. The mRNA level of the desired transcript (capsid) was much higher than that of housekeeping gene (actin) and the expression of the foreign protein was confirmed by Western blot, which needs more selection steps to increase the protein expression level.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction-----11

Chapter 2. Present state of the technology of domestic & international field-----12

Chapter 3. Experimental contents and the results -----14

Chapter 4. Achievements and contribution of this research-----79

Chapter 5. Products of the research and the applicational plan---80

Chapter 6. New information acquired during the research-----82

Chapter 7. References-----82

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요-----	11
제 2 장	국내외 기술개발 현황-----	12
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과-----	14
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여-----	79
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획-----	80
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	82
제 7 장	참고문헌-----	82

제 1 장 연구개발과제의 개요

* 연구개발의 목적 및 필요성

현재까지의 재조합 단백질 유래의 재조합 백신은 고가의 동물세포 및 곤충세포 배양법이나 단순한 미생물 배양 (대장균 및 기타 세균등을 포함한 단핵세포 및 효모등의 진핵세포)을 통해 항원단백질을 준비하여 왔음

각각의 방법은 항원준비단계에서 다양한 조절 및 정제과정등의 절차로 인해 불편함과 비용의 문제를 안고 있었음

예방백신은 일부 극소수의 점안, 점막 백신을 제외하고 거의 대부분 주사를 이용하여 왔음.

어류의 백신은 개체예방의 개념이 아닌 집단예방의 대상으로써 개체별 주사 및 점막접촉등의 방법으로는 적용이 불가능한 분야임.

이를 극복하기 위해 식물 bio-reactor를 이용하여 저가, 대량생산, 무독성, edible, 그리고 진핵세포 유래의 well-folded and well-post-translational modified 단백질을 생산한다면 가격의 문제 및 효율 및 효용성의 문제를 모두 해결할 수 있음

또한 각종 탄수화합물의 복합체인 식물유래 항원은 정제단계없이 바로 사료화 단계에서 투입이 가능한 방법임.

또한 재조합 단백질 항원이 체내에서 소화되어 단순한 단백질 영양원으로 작용하지 않도록 특별히 고안된 chitosan formulation을 이용하여 재조합 단백질이 점막에서 항원으로 작용할 수 있도록 하는 독창성이 있음.

그리고 주사의 불편함이나 스트레스가 아닌 구강을 통한 점막백신을 실시하는 것으로 재조합 단백질 항원을 식물체에서 대량발현하고 이 항원을 immuno-stimulant인 chitosan formulation으로 coating하여 구강을 통해 백신을 전달하는 시스템을 개발하고자 함.

* 연구개발 내용 및 범위

- 해수어 이리도바이러스 국내 분리주의 분리 및 이를 이용한 국내발생 이리도바이러스의 구조단백질인 capsid 유전자 characterization.
- 대장균 단백질 발현 system을 이용한 재조합 capsid 단백질의 생산 및 이를 이용한 항체생산
- 국내분리 이리도바이러스 세포배양을 통한 대량항원 준비.
- 색소체 형질전환 기술을 활용하여 니코틴프리 담배에서 고효율의 항원단백질 생산
- (재)전주생물소재연구소에서 확보하고 있는 벼 현탁세포 특이적 발현 프로모터를 활용한 항원단백질 고생산 세포주의 개발
- 특히 현탁세포 특이적 발현 프로모터는 각종 단백질 발현에서 200 - 500 mg/L의 높은 수율을 확인하였으며 이를 활용한 산업화의 응용연구가 요구 됨
- chitosan formulae를 이용한 구강면역에 이은 혈중 항체가 유도 여부 확인 및 적정항원농도 및 delivery system 개발
- 야외형 이리도바이러스 공격접종에 대한 방어효과의 면역학적, 조직학적 검증

제 2 장 국내외 기술개발 현황

* 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

1. 국내 관련분야의 기술개발 현황

- 현재 국내에서도 식물경구백신에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는데 인간 질병에 대한 식물경구백신보다는 비교적 용이하고 기간이 짧게 소요되는 동물질병에 집중하는 경향을 보이고 있음
- 농촌진흥청 김종범 박사팀은 돼지 열병(돼지콜레라) 바이러스의 외피단백질 유전자를 사료 작물인 알파파에 형질전환하여 그 식물체를 먹인 돼지에 바이러스를 주사로 접종한 결과 돼지 콜레라가 발병하지 않았음을 보고하였음
- 단국대학교 황철호 교수팀에서는 돼지 설사병원균(돼지대장균 2종과 살모넬라 1종)에서 특이 유전자의 단백질을 생산하는 당근세포를 대량생산하여 당근을 먹인 돼지의 자돈에서 면역효과가 있음을 확인하였음
- 전북대학교 양문식 교수팀은 돼지 유행성 설사병 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus)에 대한 항원단백질을 발현하는 식물경구백신 개발을 하고 있음
- 인간의 질병에 대한 식물백신의 연구로는 한국생명공학연구원 김 현순 박사팀이 감자에 B형 간염 바이러스 표면 항원유전자와 치매 원인물질에 대한 유전자를 형질전환 시켜 식물경구백신 연구를 수행하고 있음
- 서울대학교 유한상 교수팀은 돼지흉막폐렴균 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)의 독소인 Apx를 발현하는 쌀 현탁배양을 통해 돼지호흡기예방용 식물백신을 개발하고 있음
- 국내에서는 유일하게 (주)젠다스의 정화지 박사팀은 능성어류에 감염하는 노다바이러스의 항원단백질을 이용한 어류에 대한 식물경구백신에 대한 연구를 수행하고 있음

2. 국외 관련분야의 기술개발 현황

가. 식물에서의 항원단백질의 고발현을 위한 기술개발은 여러해 동안 지속적으로 진행되었으며 특히 최근에 고효율 바이러스벡터를 이용한 연구 (Gleba 등, 2007)등에 의해 진보가 이루어짐 나. 지금까지 많은 연구자에 의해 식물에서 발현된 항원을 이용한 백신개발이 시도되었는데 그 예들을 살펴보면

- Chikwamba 등 (2002)은 E. coli heat labile toxin 항원을 옥수수에서 발현하였음
- Dus Santos 등 (2002, 2005)은 구제역 바이러스 (FMD)의 VP1 항원을 알팔파에서 발현하였음
- Tregoning 등 (2005)은 과상풍 독소를 담배 chloroplast를 이용하여 발현하였음
- Webster 등 (2006)은 홍역 바이러스 항원을 식물에서 발현하였음
- Guerrero-Andrade 등 (2006)은 옥수수에서 발현한 뉴캐슬 바이러스 항원의 면역학적 특성 확인함

* 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

- 1990년대 초반 식물에서의 항원단백질 발현에 관한 기술이 처음 소개되고 세계적으로 인식

된 이후 초기단계에서는 식물에서 발현된 항원을 발현 및 정제과정을 통해 주사 (parenteral route)를 통해 면역반응을 유도하는 실험이 주를 이루어 진행되어 왔다. 하지만 최근 고효율을 발현 시스템등의 개발로 인해 (Gleba 등, 2007) 식물에서 항원단백질의 발현종도를 매우 높이는 성과가 있었음.

- 식물 유래의 백신은 생산과 보관이 용이하고, 생산비가 저렴하며, 점막 및 전신면역 유도효과가 좋기 때문에, 특히 질병이 점막에 국한되어 있는 질환의 예방에 탁월하고, 항원단백질만을 사용하므로 재조합 백신과 동등한 안전성의 확보가 가능한 우수한 백신 형태이므로 개발에 성공만 한다면 매우 시장으로의 접근 및 시장에서의 활약이 기대되는 부분임.
- 현재 식물 유래 백신의 성공적 개발을 위한 최대 관건은 항원유전자 발현량의 획기적인 향상, 항원단백질 전달의 효율성 제고 및 경구투여 항원에 의한 tolerance 유발 가능성의 배제로 판단되고 있으며 본 연구진에서의 결과를 보면 위 3가지 주요쟁점사항을 극복할 수 있는 예를 만든 경우라 할 수 있음
- 또한 사람 및 산업동물, 특히 개나 돼지, 닭 등에서의 연구와 달리 어류의 백신은 개체별 백신접종이 거의 불가능한 분야이므로 항원의 경구백신의 개념을 도입한다면 매우 독자적이면서도 유일한 시스템을 구축할 수 있을 것으로 봄

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

* 연구내용 및 연구결과

1. 제1차년도 연구내용 및 연구결과
- 가. 제1세부과제 연구내용 및 연구결과

(1) 국내분리 이리도바이러스 세포배양을 통한 바이러스 준비

- Grunt fin (GF)세포를 이용한 바이러스 대량 증식 - 감염이 의심되는 개체 (아래 그림 1)로부터 신장과 비장을 적출하고 PBS로 적당량 재부유 후 이를 세절 (chopping)하고 8,000 rpm/10분 원심 분리하였음.

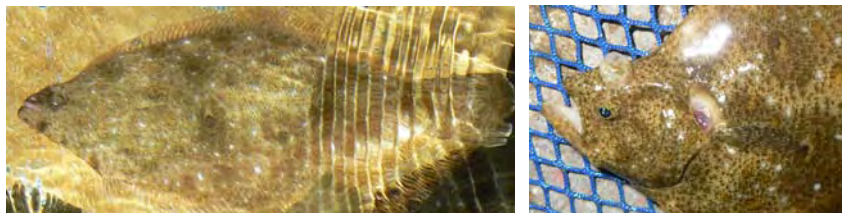


그림 1. 감염의심 넙치의 수조내 사진 (좌) 및 부검 전 사진(우), 아가미 및 안구에 이상을 보이는 개체를 선택하였음.

- 세절 후 0.45uM 및 0.2uM size의 syringe filter를 이용하여 세균 및 lxx 이물질을 filtration 하여 순수 바이러스 함유액만을 cel-line에 접종
- 이리도바이러스 배양액을 원심분리하여 cell debris를 제거한 다음 상층액에 PEG 8000을 7% 농도로 첨가하고 원심분리
- 침전물을 TNE (0.01M Trise base, 1 mM EDTA, 0.2 M NaCl, pH 7.4) 완충용액에 재현탁, 이를 sucrose gradient (25 ~ 60% continuous)상에서 Beckman L7 원심분리기를 사용하여 25,000 rpm으로 20시간, CsCl gradient (10 ~ 35%) 상에서 24시간 원심분리를 하여 바이러스를 순수 분리 실시

(2) 해수어 이리도바이러스 국내 분리주의 분리 및 이를 이용한 국내발생 이리도바이러스의 구조단백질인 capsid 유전자 characterization

- 2006년, 2007년 및 2008년도 해수어 (넙치)의 이리도 바이러스 유전자 분리: 2006년, 2007년 및 2008년도 넙치 감염 이리도 바이러스는 제주도 수산자원연구소 및 제주소재 양식장 (W사 및 C사)로부터 시료 (감염어체)를 공급받아 신장 및 비장에서 viral DNA를 직접 추출 후 PCR을 실시하여 유전자를 증폭하였음.
- 즉, 이를 위해 viral DNA isolation kit (DNA prepmate™, Bioneer)를 이용하여 DNA분리 후 이리도바이러스 특이 primer set를 이용하여 capsid 유전자를 증폭하였음 (그림 2)
- 대장균에서 재조합 단백질 발현을 위해 forward에 BamHI site 및 reverse에 HindIII enzyme site를 준비하였음
- Forward primer는 5'-TATA-GGATCC-ATGTCTGCGATCTCAGGTGC-3'로 (BamHI

년, nuc3: 2008년 분리주. 5곳의 SNP가 관찰됨

- 이중 가장 최근인 2008년도의 시료를 이용하여 pRSET vector cloning을 실시하였음. 즉, 2개의 제한효소인 BamHI과 HindIII를 이용하여 양쪽 말단을 sticky-ends로 만들고 pRSET vector 역시 같은 효소로 처리 후 T4 DNA ligase system을 이용하여 결합시켰다. 결합된 construct는 Ampicillin이 첨가된 LB agar plate에서 selection하였고 다시 LB broth에서 증균 배양한 다음 plasmid miniprep을 실시하였음.
- 분리된 construct (plasmid)는 cloning 여부를 위해 같은 제한효소로 처리하여 원하는 insert 크기 (약 1.3 kb)와 vector (dir 3 kb)의 size를 확인하였음 (그림 4)

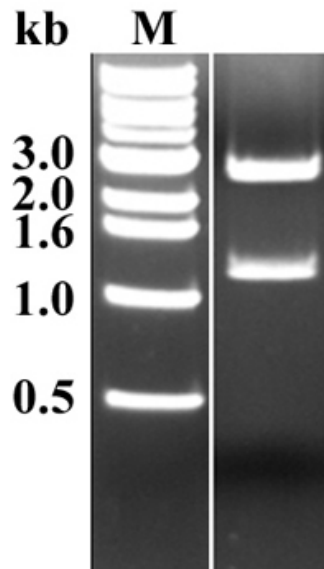


그림 4. pRSET vector에 cloning된 이리도 바이러스 capsid 유전자 확인을 위해 2개의 제한효소, BamHI과 HindIII로 처리 후 size를 확인한 그림.

- Vector내 삽입된 capsid 유전자가 on frame으로 삽입되었는지 알아보기 위해 sequencing을 한 결과, 원하는 frame으로 (frame shift)없이 잘 삽입되었음을 확인하였음.

(3) 대장균 단백질 발현 system을 이용한 재조합 capsid 단백질의 생산 및 이를 이용한 항체 생산

- Small scale expression을 위해 선택된 colony를 OD 0.5까지 broth 배양 후 IPTG를 최종농도 1mM로 맞추어 투여하여 단백질 발현을 유도하였음. 그 결과, 그림 5에서와 같이 기대되었던 size (약 52 kDa)의 단백질이 발현됨을 알 수 있었고 이를 대량 발현하여 Ni²⁺-charged affinity column (Probond, Bio-Rad)을 이용하여 분리하였음.

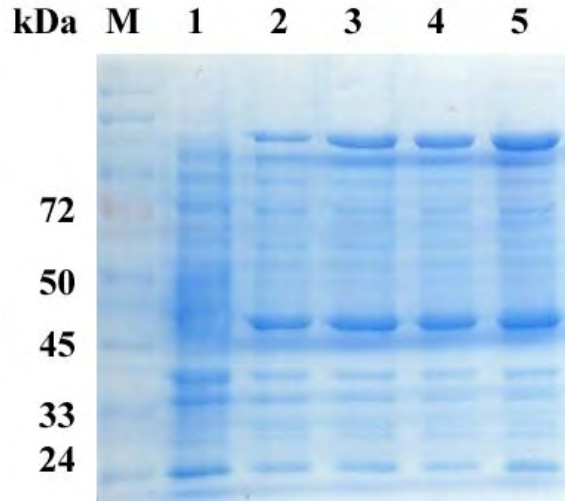


그림 5. IPTG를 투여하지 않은 비형질전환 대장균 (BL21)에 비해 (lane 1) IPTG 투여 후 (lane 2-5, 투여 후 1시간-4시간) 기대되는 크기 (52 kDa)의 재조합 단백질이 발현됨을 보여주는 그림. M: protein size marker.

- 대량 발현을 통해 대장균 유래 재조합 단백질 발현하고 Probond affinity column을 이용하여 재조합 단백질을 순수분리한 결과, 발현전 시료는 단백질이 분리되지 않는 반면, 발현 후 시료에서는 순수한 단백질이 분리됨을 알 수 있었음 (그림 6)

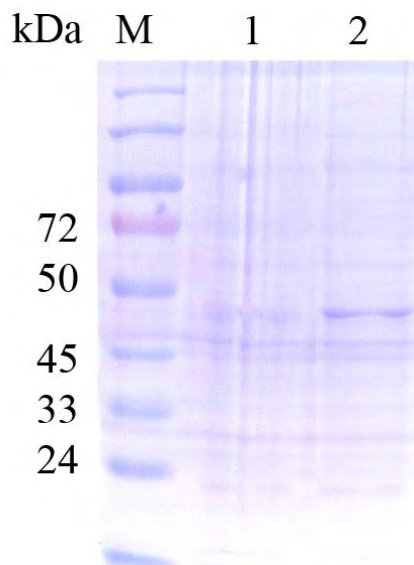


그림 6. Affinity column을 이용한 순수분리 결과, IPTG로 발현유도한 시료 (lane2)에서만 단백질이 순수분리됨을 보여주는 그림. M: protein size marker.

- 순수분리된 재조합 단백질을 이용하여 항체를 생산하였음. 항체생산에는 2개월령 NZ white rabbit을 이용하였음. 즉, 순수분리된 재조합 단백질 200ug을 PBS에 희석 후 Freund's complete adjuvant 200uL와 혼합하여 1회 priming을 실시하고 다시 매 2주 후 총 2번 Freund's incomplete adjuvant와 혼합한 vaccine formulae를 boosting 하고 2번째 boosting 후 7일째 토끼의 혈액을 약 500uL 채취하여 혈중 항체가를 측정하였음.

- 혈중 항체가 측정을 ELISA법을 이용하였음. 즉, 재조합 항원을 1 μ g/mL로 binding buffer에 녹여 준비하고 이를 96-well ELISA plate에 90 μ L씩 overnight incubation하여 coating하였음. 다음 단계로 진행할때마다 매번 PBS-T (PBS+0.05% Tween 20) 100 μ L로 washing한다. Coating 후 1% BSA 용액으로 4시간 blocking하고 1차항체로 면역된 토끼의 혈청을 (1:100 희석), 2차항체로는 goat anti-rabbit IgG-HRP conjugated (1:1000희석, Pierce, USA)를 사용하였음. 발색제로는 ABST 용액 (Serotec, USA)를 사용하였음. 음성대조군은 면역이전의 토끼 혈청을 사용하였고, 항원대조군은 재조합 capsid 단백질 항원 대신 BSA를 사용하였음. 발색반응 후 10분째 405nm에서 spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였음.
- 그 결과는 다음 표 1과 같다. 즉, 재조합항원 (이리도바이러스 capsid 단백질)에 대한 항체가 통계적으로 매우 유의있게 유도되었음을 확인할 수 있었음.

표 1. 각 그룹별 항체가 측정결과.

그룹	접종군	음성대조군	항원대조군
평균 OD	0.907*	0.229	0.380
표준편차	0.077	0.095	0.140

* $P < 0.01$

나. 제2세부과제 연구내용 및 연구결과

(1) 유전자 합성 및 발현 벡터 구축

(가) 식물 codon으로 최적화된 유전자의 합성

① 이리도바이러스 코돈 분석 및 최적화 설계

돌돔유래 이리도 바이러스 (RBIV; Rock Bream Irido virus) 캡시드 단백질 유전자의 codon usage를 분석한 결과를 그림 1에 나타내었음. 본 연구에서 사용 예정인 벼의 codon usage 중에서 각 아미노산에 해당되는 codon 중에서 사용 빈도가 매우 낮아 벼에서 단백질로의 전환이 낮을것으로 판단된 codon은 전체 codon 454개 중에서 231개 해당되어 전체 codon중 약 50.8%에 해당되었음. 또한, 벼에서에서 유전자의 발현과 안정성에 영향을 주는 trouble sequence인 ATTTA(RNA destabilizing sequence), GCAG(3'-Intron splice recognition sequence), CACCAGATGGGAGTAGA (Polymerase II termination sequence)등이 존재하여 mRNA가 합성된 이후에 분해될 가능성이 매우 높아 효율적으로 단백질의 합성이 어려울 것으로 판단되었음.

이러한 분석을 기초로 하여 벼에서 효율적으로 작용 가능한 염기서열을 설계하였으며 이리도 바이러스 캡시드 단백질 유전자 염기 사용빈도 분석결과를 표 1에, 이리도 바이러스 캡시드 단백질 유전자 코돈 사용빈도 분석결과를 표 2에 나타내었음. 또한, 이러한 분석 결과를 바탕으로 합성한 염기서열을 그림 6에 나타내었음.

② 이리도바이러스 항원유전자 합성

최적화된 이리도 바이러스 캡시드 단백 (IV-opt)의 coding sequences는 1383bp 이고 이를 합성하기 위하여 전체 염기 서열에서 500bp 씩 3등분 (3개의 fragments)으로 나누어 유전자 합성을 하였음. 유전자 합성을 위해 80-mer의 oligonucleotide (primer set)를 제작 하였고 (표 ③ 본 연구팀에서 구축한 overlap-PCR 방법을 이용하여 합성하였으며 합성 개요를 그림 3에 나타내었음. 먼저 단편 1, 2, 3 각각을 상기의 프라이머를 이용하여 합성을 하였으며 이를 각각 T-vector에 도입하여 염기서열을 확인하였고(그림 3) 설계한 염기서열과 일치한 클론을 선발 하여 2차 합성을 실시하여 합성 한 후에 이를 T-vector에 도입한 후에 염기서열을 확인하여 설계한 염기서열과 일치하는 1380bp의 유전자를 확보하였음(그림 4). 이리도 바이러스 캡시드 단백 유전자가 벼 내부의 소포체 (endoplasmic reticulum)내에 targetting 하고 retention 할 수 있도록 ER-retention signal 인 KDEL 염기서열을 붙였고, 벼에서의 유전자 발현 중지 코돈으로의 치환과 KpnI 제한효소 자리를 3'-region 에 PCR을 이용하여 합성하였음. 또한 벼의 현탁세포(당 결핍조건)에서 보다 효율적인 이리도 바이러스 캡시드 단백 유전자의 분비를 위해 본 연구팀에 의하여 고발현 능력이 확인된 벼의 현탁세포(당 결핍조건) 특이적 3D RAmy signal peptides sequences를 합성한 유전자의 5'-region에 overlap-PCR을 이용하여 합성하였음(그림 5). 최종 완성된 유전자의 염기서열을 확인하여 설계 염기서열과 일치함을 확인하였으며 야생형 유전자와의 상동성을 확인하였음(그림 6).

(나) 현탁세포 특이적 고발현 프로모터를 이용한 식물발현벡터 제작

① 항원유전자 발현벡터 구축

IV-opt유전자의 벼 현탁세포 고발현 system을 이용한 발현 벡터 구축을 위해 본 연구팀에 의하여 고발현 능력이 확인된 벼의 현탁세포(당 결핍조건) 특이적 고발현 promoter인 RAmy 3D promoter와 mRNA의 분해를 억제하는 기능의 3D RAmy 5'UTR(terminator 포함)이 있는 식물 발현 벡터에 클로닝 하고 정확한 클로닝 여부는 제한효소 (*Bam*HI/*Kpn*I) 등을 통한 유전자 mapping을 통해 확인(그림 7)하여 pJKB13를 완성(그림 8)하였으며, 본 발현벡터는 하이그로마이신을 선발 마커로하여 형질전환 캘러스를 선발 할 수 있도록 하였음.

(2) 식물체 형질전환

(가) 유전자총을 이용하여 항원유전자를 포함하는 발현벡터의 형질전환

성숙된 벼 종자의 배로부터 유도된 캘러스 조직을 신선한 N6Co-culture 배지에 계대 배양 하여 배 발생 캘러스의 발달을 유도하였으며 이 캘러스에 유전자 총을 이용하여 pJKB13 plasmid DNA를 벼에 도입시켰다. 형질전환은 pJKB13 plasmid DNA (10ug)을 미리 준비해둔 microcarrier (금 입자; gold particle) 에 2.5M CaCl₂, 0.1M spermidine 용액을 이용하여 코팅 하여 사용하였음. 형질전환 시키고 24시간 후에 벼 캘러스를 Co-culture 배지에서 hygromycin

이 포함된 선발배지 (N6SE)로 옮겨 암조건 (25℃) 에서 배양하였음. 매 3주 간격으로 신선한 배지로 옮겨 명조건 (25℃) 계대배양 하였고, 항생제를 포함하는 배지에서 성장하는 22 line의 켈러스를 선발하였으며 유전자도입 및 발현여부를 확인하기 위하여 증식배지에서 증식하였음 (그림 9).

(나) 형질전환체의 분자생물학적 분석

① Genomic DNA PCR을 이용한 유전자 도입 확인

하이그로마이신을 포함하는 배지에서 선발한 22 line의 형질전환 켈러스의 유전자 도입여부를 확인하기 위하여 Genomic DNA PCR을 실시하였음. Genomic DNA PCR을 실시하기 위하여 선발배지 (N6SE)에서 선발한 켈러스(0.3g)로부터 genomic DNA를 추출하였음. Genomic DNA는 lysis buffer [NaCl (6M), SDS (20%), proteinase K(400ug/mL), RNase(10mg/mL)]로 켈러스 조직을 lysis 시킨 후, phenol/chloroform 으로 처리하고, 에탄올에 씻어 말린 후, 증류된 물에 녹여 추출하였음. Genomic DNA 농도를 측정하여 200ng/uL를 genomic DNA PCR에 사용하였음. 유전자 도입여부를 확인하기 위하여 IV-opt 유전자를 증폭 할 수 있는 forward primer로 IV-opt-F1 (5'-ATG TCT GCC ATC TCA GGT GCC AAC-3')와 reverse primer로 IV(opt)F3-r2 (5'-GGT ACC TCA TCA CAA CTC GTC-3')를 사용하였고, denature는 95℃/1분, annealing은 60℃/1분, polymerization 72℃/1분 씩 30회 반복하였음. PCR products는 1% agarose gel에서 확인하였음(그림 10). Genomic DNA PCR을 실시한 결과 유전자가 도입되지 않은 대조구에서는 항원 유전자에 해당하는 유전자의 증폭이 확인되지 않았으나 형질전환 된 켈러스에서는 항원유전자인 IV-opt유전자의 증폭이 확인되어 항원유전자가 선발된 형질전환 켈러스에 안정적으로 도입되었음을 확인하였음.

② IV-opt 항원유전자의 발현확인

형질전환 켈러스에서 항원 유전자인 Iv-opt 유전자가 정상적으로 발현하는 지를 확인하기 위하여 Northern blot analysis를 통해 확인하였음 (그림 11). Total RNA 추출은 형질전환 켈러스를 당 결핍 조건으로 만들어 5일 동안 배양하여 항원 단백질의 고발현을 유도한 후 켈러스 내의 total RNA만을 추출하였음. 이를 nitro-cellulose membrane에 전이시킨 후, a-32p-dCTP 동위원소를 붙인 RBIV 유전자를 probe로 하여 Northern blot analysis를 수행하였음. Northern blot analysis를 수행한 결과 유전자가 도입되지 않은 대조구에서는 항원 유전자에 해당하는 mRNA의 확인되지 않았으나 형질전환 된 켈러스에서는 항원유전자인 IV-opt유전자로 판단되는 시그널이 확인되어 증폭이 확인되어 항원유전자가 선발된 형질전환 켈러스에 mRNA로 발현되고 있음을 확인하였음. 본 Northern blot analysis를 수행한 결과를 바탕으로 형질전환 켈러스 8번과 11번 및 15번을 항원 유전자 고발현세포주로서 선발하였음. 현재 고생산 세포주를 이용하여 차기년도 계획인 Western blot analysis를 앞당겨 수행하고 있음.

5' ATG TCT GCA ATC TCA GGT GCG AAC GTA ACC AGT GGG TTC ATC GAC ATC TCC GCG 9 18 27 36 45 54
63 72 81 90 99 108
TTT GAT GCG ATG GAG ACC CAC TTG TAT GGC GGC GAC AAT GCC GTG ACC TAC TTT
117 126 135 144 153 162
GCC CGT GAG ACC GTG CGT AGT TCC TGG TAC AGC AAG CCG CCC GTC ACC CTA TCA
171 180 189 198 207 216
AAA CAG ACT GGC CAT GCT AAT TTC GGC CAG GAG TTT AGT GTG ACT GTG GCA AGG
225 234 243 252 261 270
GGT GGC GAC TAC CTC ATT AAT GTG TGG CTG CGT GTT AAG ATC CCC TCC ATC ACG
279 288 297 306 315 324
TCC AGC AAG GAG AAC AGC TAC ATT CGC TGG TGT GAT AAT TTG ATG CAC AAT CTA
333 342 351 360 369 378
GTT GAG GAG GTG TCG GTG TCA TTT AAC GAC CTG GTG GCA CAG ACC CTG ACC AGC
387 396 405 414 423 432
GAG TTC CTT GAC TTT TGG AAC GCC TGC ATG ATG CCT GGC AGC AAA CAA TCT GGC
441 450 459 468 477 486
TAC AAC AAG ATG ATT GGC ATG CGC AGC GAC CTG GTG GGC GGT ATC ACC AAC GGT
495 504 513 522 531 540
CAG ACT ATG CCC GCC GCC TAC CTT AAT TTG CCC ATT CCC CTG TTC TTT ACC CGT
549 558 567 576 585 594
GAC ACA GGC CTT GCA TTG CCT ACT GTG TCT CTG CCG TAC AAT GAG GTG CGC ATC
603 612 621 630 639 648
CAC TTC AAG CTG CGG CGC TGG GAG GAC CTG CTC ATC AGC CAG AGC ACC CAG GCC
657 666 675 684 693 702
GAC ATG GCC ATA TCG ACT GTC ACC CTG GCT AAC ATT GGC AAT GTA GCA CCC GCA
711 720 729 738 747 756
CTG ACC AAC GTG TCC GTG ATG GGC ACC TAC GCT GTA CTG ACA AGT GAG GAG CGT
765 774 783 792 801 810
GAG GTT GTG GCC CAG TCT AGC CGT AGC ATG CTC ATT GAG CAG TGT CAG GTG GCG
819 828 837 846 855 864
CCT CGT GTG CCT GTC ACA CCC GTA GAC AAT TCC TTG GTG CAT CTC GAC CTG AGG
873 882 891 900 909 918
TTC AGT CAC CCT GTG AAG GCC TTG TTC TTT GCA GTC AAG AAT GTC ACT CAC CGC
927 936 945 954 963 972
AAC GTG CAA AGC AAT TAC ACC GCG GCC AGC CCC GTG TAT GTC AAC AAC AAG GTG
981 990 999 1008 1017 1026
AAT CTG CCT TTG CTG GCC ACC AAT CCC CTG TCC GAG GTG TCG CTC ATT TAC GAG
1035 1044 1053 1062 1071 1080
AAC ACC CCT CGG CTC CAC CAG ATG GGA GTA GAC TGC TTC ACA TCT GTC GAC CCC
1089 1098 1107 1116 1125 1134
TAC TAC TTT GCG CCC AGC ATG CCT GAG ATG GAT GGT GTT ATG ACC TAC TGT TAT
1143 1152 1161 1170 1179 1188
ACG CTG GAC ATG GGC AAT ATC AAC CCT ATG GGC TCG ACC AAC TAC GGC CGC CTG
1197 1206 1215 1224 1233 1242
TCC AAC GTC ACC CTG TCA TGT AAG GTG TCG GAC AAT GCC AAG ACC ACC GCG GCG
1251 1260 1269 1278 1287 1296
GGC GGT GGA GGC AAC GGC ACC GGC TAC ACG GTC GCC CAA AAG TTT GAA CTG GTC
1305 1314 1323 1332 1341 1350
GTT ATT GCA GTC AAC CAC AAC ATC ATG AAG ATT GCT GAC GGC GCT GCA GGC TTC
1359
CCT ATC CTG TAA 3'

Red letter : 식물에서 codon usage가 가장 낮은 코돈

ATTTA : RNA destabilizing sequence

GC AG : 3'-Intron splice recognition sequence

CAC CAG ATG GGA GTA GA : Polymerase II termination sequence

그림 1. 돌돔유래 이리도 바이러스 캡시드 단백 유전자 분석

표 1. 돌돔유래 이리도 바이러스 캡시드 단백 유전자 염기 사용빈도 분석

Base	Original seq. count (%)	Optimized seq. count (%)
A	299 (21.95)	312 (22.55)
C	395 (29.00)	421 (30.44)
G	355 (26.06)	359 (25.95)
T(U)	313 (22.98)	291 (21.04)

표 2. 돌돔유래 이리도 바이러스 캡시드 단백 유전자 코돈 사용빈도 분석

Codon	Original seq. count (%)	Optimized seq. count (%)	Codon	Original seq. count (%)	Optimized seq. count (%)
TTT-Phe	9 (1.98)	2 (0.43)	TAT-Tyr	3 (0.66)	1 (0.21)
TTC-Phe	9 (1.98)	17 (3.68)	TAC-Tyr	15 (3.30)	17 (3.68)
TTA-Leu	0 (0.00)	0 (0.00)	TAA-***	1 (0.22)	0 (0.00)
TTG-Leu	7 (1.54)	11 (2.38)	TAG-***	0 (0.00)	0 (0.00)
TCT-Ser	5 (1.10)	7 (1.51)	TGT-Cys	4 (0.88)	1 (0.21)
TCC-Ser	8 (1.76)	13 (2.81)	TGC-Cys	2 (0.44)	5 (1.08)
TCA-Ser	4 (0.88)	6 (1.30)	TGA-***	0 (0.00)	2 (0.43)
TCG-Ser	5 (1.10)	2 (0.43)	TGG-Trp	5 (1.10)	5 (1.08)
CTT-Leu	3 (0.66)	1 (0.21)	CAT-His	2 (0.44)	4 (0.86)
CTC-Leu	6 (1.32)	19 (4.12)	CAC-His	7 (1.54)	5 (1.08)
CTA-Leu	2 (0.44)	0 (0.00)	CAA-Gln	3 (0.66)	2 (0.43)
CTG-Leu	20 (4.40)	7 (1.51)	CAG-Gln	10 (2.20)	11 (2.38)
CCT-Pro	10 (2.20)	6 (1.30)	CGT-Arg	7 (1.54)	0 (0.00)
CCC-Pro	11 (2.42)	0 (0.00)	CGC-Arg	6 (1.32)	9 (1.95)
CCA-Pro	0 (0.00)	5 (1.08)	CGA-Arg	0 (0.00)	0 (0.00)
CCG-Pro	2 (0.44)	12 (2.60)	CGG-Arg	2 (0.44)	1 (0.21)
ATT-Ile	9 (1.98)	4 (0.86)	AAT-Asn	15 (3.30)	6 (1.30)
ATC-Ile	11 (2.42)	17 (3.68)	AAC-Asn	18 (3.96)	27 (5.85)
ATA-Ile	1 (0.22)	0 (0.00)	AAA-Lys	2 (0.44)	3 (0.65)
ATG-Met	18 (3.96)	18 (3.90)	AAG-Lys	12 (2.64)	12 (2.60)
ACT-Thr	6 (1.32)	4 (0.86)	AGT-Ser	5 (1.10)	0 (0.00)
ACC-Thr	22 (4.84)	16 (3.47)	AGC-Ser	13 (2.86)	12 (2.60)
ACA-Thr	4 (0.88)	10 (2.16)	AGA-Arg	0 (0.00)	3 (0.65)
ACG-Thr	3 (0.66)	6 (1.30)	AGG-Arg	2 (0.44)	4 (0.86)
GTT-Val	5 (1.10)	4 (0.86)	GAT-Asp	3 (0.66)	6 (1.30)
GTC-Val	11 (2.42)	10 (2.16)	GAC-Asp	16 (3.52)	14 (3.03)
GTA-Val	5 (1.10)	0 (0.00)	GAA-Glu	1 (0.22)	4 (0.86)
GTG-Val	23 (5.06)	30 (6.50)	GAG-Glu	16 (3.52)	14 (3.03)
GCT-Ala	5 (1.10)	12 (2.60)	GGT-Gly	6 (1.32)	4 (0.86)
GCC-Ala	13 (2.86)	17 (3.68)	GGC-Gly	21 (4.62)	19 (4.12)
GCA-Ala	9 (1.98)	1 (0.21)	GGA-Gly	2 (0.44)	8 (1.73)
GCG-Ala	8 (1.76)	5 (1.08)	GGG-Gly	1 (0.22)	0 (0.00)

표 3. 이리도 바이러스 캡시드 단백 유전자 (IV-opt) 합성을 위한 primer set

No	Name	Length	Sequence
1	IV(opt)-F1	80mer	5'-ATGTCTGCCATCTCAGGTGCCAACGTGACCTCAGGCTTTATTGACATCTC TGCATTCGATGCGATGGAGACTCACTTGTA-3'
2	IV(opt)-R1	80mer	5'-CTGTACCATGAGCTCCTCACGGTCTCGCGAGCGAAGTAGGTCACGGCGTT ATCGCCTCCGTACAAGTGAGTCTCCATCGC-3'
3	IV(opt)-R2	80mer	5'-CTGAACTCCTGGCCGAAGTTAGCATGGCCAGTCTGTTTGGAGAGTGTAC TGGAGGCTTGCTGTACCATGAGCTCCTCAC-3'
4	IV(opt)-R3	80mer	5'-GGGATCTTCACGCGGAGCCACACGTTGATGAGGTAATCGCCTCCTCTAGCC ACTGTCACGCTGAACTCCTGGCCGAAGTT-3'
5	IV(opt)-R4	80mer	5'-TTGTGCATCAAGTTGTGCGACCAGCGAATGTAGCTGTTCTCCTTGCTGGA CGTGATCGACGGATCTTCACGCGGAGCCA-3'
6	IV(opt)-R5	80mer	5'-TCGCTGGTGAGTGTCTGAGCGACGAGGTCGTTGAAGCTCACTGAGACTTC CTCCACGAGATTGTGCATCAAGTTGTCGCA-3'
7	IV(opt)-R6	80mer	5'-TTGTTGTAGCCAGACTGTTTGCTTCCAGGCATCATGCACGCATTCCAGAA GTTCGAGAACTCGCTGGTGAGTGTCTGAGC-3'
8	IV(opt)-R7	80mer	5'-GCAGGCATGGTTTGACCATTGGTGATTCGGCCCACCAGATCAGAGCGCAT GCCAATCATCTTGTGTAGCCAGACTGTTT-3'
9	IV(opt)-F2	80mer	5'-AATGGTCAAACCATGCCTGCCGTTACCTCAACCTGCCGATTCCGCTGTTT TTCACACGCGACACAGGCTCGCCTTGCC-3'
10	IV(opt)-R8	80mer	5'-TCCTCCCAGCGCCTCAACTTGAAGTGGATTCTCACCTCGTTGTATGGCAGG CTCACTGTCGGCAAGGCGAGGCTGTGTC-3'
11	IV(opt)-R9	80mer	5'-TTGGCGAGGGTGACGGTGGAGATGGCCATGTCGGCCTGAGTAGACTGGCT GATCAAGAGGTCCTCCCAGCGCCTCAACTT-3'
12	IV(opt)-R10	80mer	5'-AACACGGCGTATGTGCCATCACGGACACGTTGGTCAACGCTGGCGCCACA TTGCCGATGTTGGCGAGGGTGACGGTGGGA-3'
13	IV(opt)-R11	80mer	5'-CACTGTTTCGATCAGCATGGACCTGGAAGACTGAGCAACGACCTCGCGTTC CTCGCTCGTCAACACGGCGTATGTGCCCAT-3'
14	IV(opt)-R12	80mer	5'-AAGTCAAGATGGACCAAGGAGTTGTCAACTGGAGTCACCGGCACTCTTGG AGCAACCTGGCACTGTTCGATCAGCATGGA-3'
15	IV(opt)-R13	80mer	5'-TTGCGATGCGTCACGTTCTTCACGGCGAAGAACAACGCCTTCACAGGATG GGAGAACCTCAAGTCAAGATGGACCAAGGA-3'
16	IV(opt)-F3	80mer	5'-AACAAACAAGGTGAACCTCCCGTTGCTCGCCACCAATCCGCTGTCTGAAGTC TCACTCATCTACGAGAACACACCTCGCCT-3'
17	IV(opt)-R14	80mer	5'-GGGAGGTTACCTTGTGTTGACATACACCGGTGAGGCAGCGGTGTAGTT GGATTGGACGTTGCGATGCGTCAAGTTCTT-3'
18	IV(opt)-R15	80mer	5'-ATGCTCGGAGCGAAGTAGTACGGATCGACGGAGGTGAAGCAGTCCACGCC CATCTGGTGGAGGCGAGGTGTGTTCTCGTA-3'
19	IV(opt)-R16	80mer	5'-GGATTGATGTTGCCATGTCGAGCGTGTAGCAGTAGGTCATAACACCATC CATCTCAGGCATGCTCGGAGCGAAGTAGTA-3'
20	IV(opt)-R17	80mer	5'-TCGGACACCTTACAGGAGAGGGTCACGTTGGAGAGCCGGCCGTAGTTGGT CGAGCCCATCGGATTGATGTTGCCATGTC-3'
21	IV(opt)-R18	80mer	5'-TGGGCGACCGTGTAGCCTGTGCCGTTGCCTCCTCCTCCGGCAGCTGTGTC TTGGCGTTGTTCGGACACCTTACAGGAGAG-3'
22	IV(opt)-R19	80mer	5'-GCTCCGTCGGCGATCTTCATGATGTTGTGGTTACGGCGATCACCACCAGC TCGAACTTCTGGGCGACCGTGTAGCCTGT-3'
23	IV(opt)-R20	63mer	5'-GGTACCTCATCAAACTCGTCTTTGAGGATCGGGAAGCCAGCAGCTCCGT CGGCGATCTTCAT-3'

Iridovirus optimized PCR

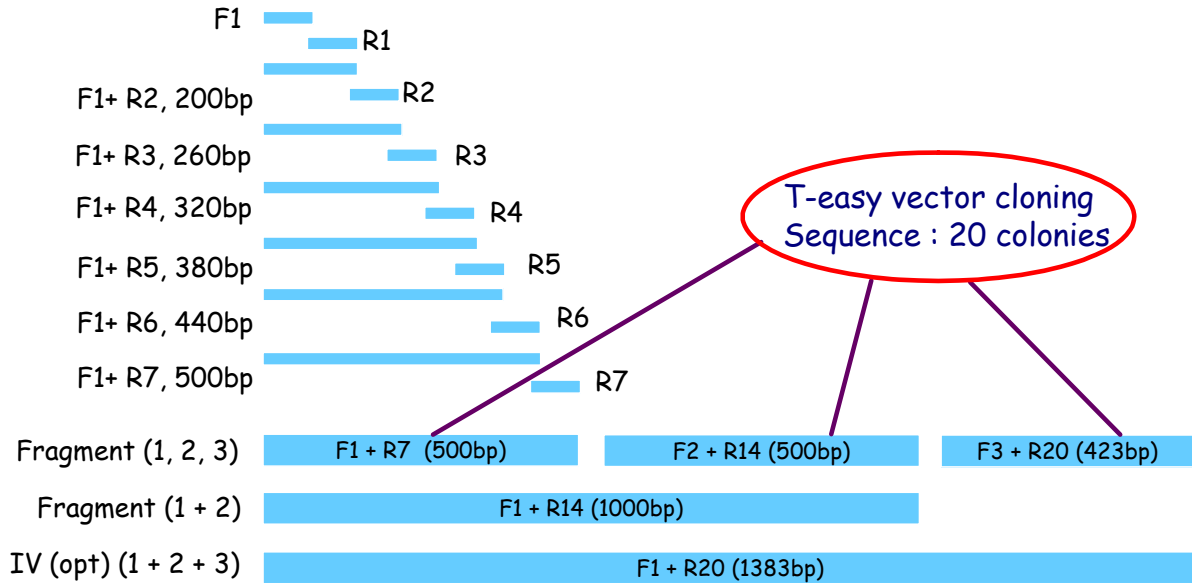


그림 2. IV-opt over-lap PCR 모식도

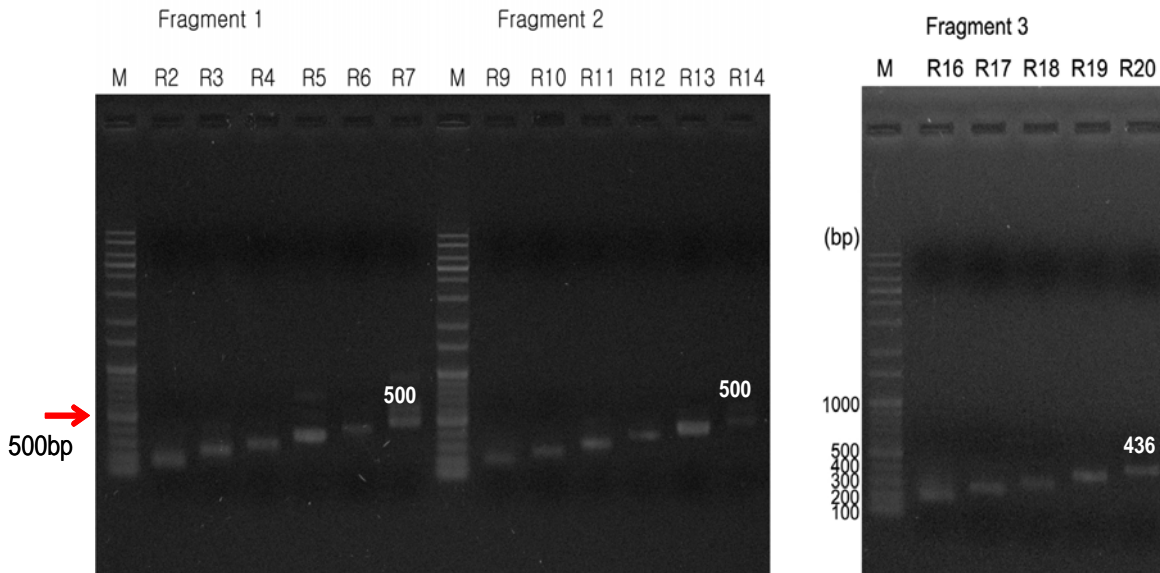
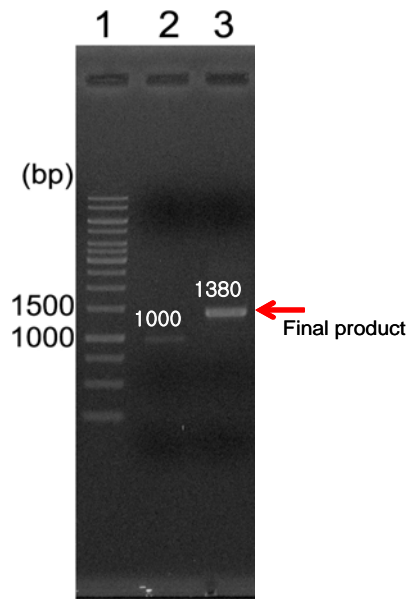


그림 3. IV-opt over-lap PCR

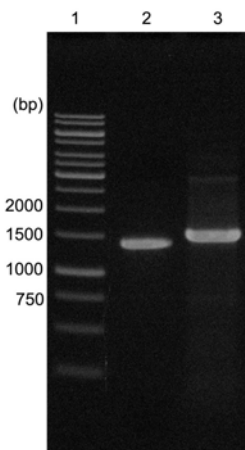


lane 1: 1kb DNA ladder (size marker)

lane 2: fragment 1+fragment 2 (1000bp)

lane 3: fragment 1+fragment 2+fragment 3 (1380bp)

그림 4. IV-opt 2차 over-lap PCR products



lane 1: 1kb DNA ladder (size marker)

lane 2: IV-opt_(KDEL-KpnI) (1380bp)

lane 3: 3Ds.p-IV-opt_KDEL-KpnI (1527bp)

그림 5. 3Ds.p와 IV-opt 유전자 합성 agarose gel 확인


```

1      10      20      30      40      50      60      70
5' ATGCTGCAATCTCAGGTGCGAACGTAACCAAGTGGGTTTCATCGACATCTCCGCGTTTGATGCGATGGAGA
*****
5' ATGCTGCCATCTCAGGTGCCAACGTGACCTCAGGCTTTATTGACATCTCTGCATTGATGCGATGGAGA
1      10      20      30      40      50      60      70

71     80     90     100    110    120    130    140
CCCCTTGTATGGCGGCGACAATGCCGTGACCTACTTGGCCGTGAGACCGTGCCTAGTTCCTGGTACAG
* ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****
CTCACTTGTACGGAGGCGATAACGCCGTGACCTACTTCGCTCGCGAGACCGTGAGGAGCTCATGGTACAG
71     80     90     100    110    120    130    140

141    150    160    170    180    190    200    210
CAAGCCGCCCGTACCCTATCAAAACAGACTGGCCATGCTAATTCGGCCAGGAGTTTGTGTGACTGTG
***** ** ** ** ** ** ***** ***** ***** ***** *****
CAAGCTCCAGTGACACTCTCAAACAGACTGGCCATGCTAATTCGGCCAGGAGTTCAGCGTGACAGTG
141    150    160    170    180    190    200    210

211    220    230    240    250    260    270    280
GCAAGGGTGGCGACTACCTCATTAAATGTGTGGCTGCGTGTTAAGATCCCCTCCATCACGTCCAGCAAGG
** ** ** ***** ***** ** ***** ** ***** ** ***** *****
GCTAGAGGAGGCGATTACCTCATCAACGTGTGGCTCCGCGTGAAGATCCCCTCGATCACGTCCAGCAAGG
211    220    230    240    250    260    270    280

281    290    300    310    320    330    340    350
AGAACAGCTACATTGCGTGGTGTGATAATTTGATGCACAATCTAGTTGAGGAGGTGTCGGTGTCAATTA
***** ***** ** ** ***** ***** ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
AGAACAGCTACATTGCGTGGTGCACAACCTTATGATGCACAATCTCGTGGAGGAAGTCTCAGTGAGCTTCAA
281    290    300    310    320    330    340    350

351    360    370    380    390    400    410    420
CGACCTGGTGGCACAGACCCTGACCAGCGAGTTCCCTTGACTTTTGAACGCCTGCATGATGCCTGGCAGC
***** ** ** ***** ** ***** ***** ***** ** ***** *****
CGACCTCGTCCGCTCAGACTCACCAGCGAGTTTCTCGACTTCTGGAATGCGTGCATGATGCCTGGAAGC
351    360    370    380    390    400    410    420

421    430    440    450    460    470    480    490
AAACAATCTGGCTACAACAAGATGATTGGCATGCGCAGCGACCTGGTGGCGGTATCACCACCGGTCAGA
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
AAACAGTCTGGCTACAACAAGATGATTGGCATGCGCTCTGATCTGGTGGCGGAATCACCACCGGTCAAA
421    430    440    450    460    470    480    490

491    500    510    520    530    540    550    560
CTATGCCCGCCGCTACCTTAATTTGCCATTCCCCTGTTCTTTACCCGTGACACAGGCCTTGCAATGCC
* ***** ***** ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** *****
CCATGCCTGCCGCTTACCTCAACCTGCCGATTCCGCTGTTCTTACACGCGACACAGGCCTCGCCTTGCC
491    500    510    520    530    540    550    560

561    570    580    590    600    610    620    630
TACTGTGTCTCTGCCGTACAATGAGGTGCGCATCCACTTCAAGCTGCGGCGCTGGGAGGACCTGCTCATC
** ** ***** ***** ***** * ***** ***** ***** ***** *****
GACAGTGAGCCTGCCATACAACGAGGTGAGAATCCACTTCAAGTTGAGGCGCTGGGAGGACCTTGTATC
561    570    580    590    600    610    620    630

631    640    650    660    670    680    690    700
AGCCAGAGCACCCAGGCCGACATGGCCATATCGACTGTCACCCTGGCTAACATTGGCAATGTAGCACCCG
***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
AGCCAGTCTACTCAGGCCGACATGGCCATCTCCACCGTCACCCTCGCCAACATCGGCAATGTGGCGCCAG
631    640    650    660    670    680    690    700

701    710    720    730    740    750    760    770
CACTGACCAACGTGTCCGTGATGGGCACCTACGCTGTACTGACAAGTGAGGAGCGTGAGGTTGTGGCCCA
* ***** ***** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ** **
CGTTGACCAACGTGTCCGTGATGGGCACATACGCCGTGTTGACGAGCGAGGAACCGGAGGTCGTTGCTCA
701    710    720    730    740    750    760    770

```

그림 6. 이리도 바이러스 캡시드 단백질 유전자 코돈 사용빈도 분석

```

771      780      790      800      810      820      830      840
GTCTAGCCGTAGCATGCTCATTGAGCAGTGTGAGGTGGCGCCTCGTGTGCCTGTCACACCCGTAGACAAT
**** * * ***** ** ** ***** ***** ** * * ***** ** ** * * *****
GTCTTCCAGGTCCATGCTGATCGAACAGTGCCAGGTTGCTCCAAGAGTGCCGGTGACTCCAGTTGACAAC
771      780      790      800      810      820      830      840

841      850      860      870      880      890      900      910
TCCTTGGTGCATCTCGACCTGAGGTTGAGTCCACCTGTGAAGGCCTTGTCTTTGAGTCAAGAATGTCA
***** ***** ** ***** ** ***** ***** ** ***** ** ** ***** ** *
TCCTTGGTCCATCTTGACTTGAGGTTCTCCATCCTGTGAAGGCCTTCTTCTTCGCCGTGAAGAACGTGA
841      850      860      870      880      890      900      910

911      920      930      940      950      960      970      980
CTCACCGCAACGTGCAAAGCAATTACACCGCGGCCAGCCCCGTGTATGTCAACAACAAGTGAATCTGCC
* * ***** ** ** ***** ***** ** * ***** ***** ***** ** **
CGCATCGCAACGTCCAATCCAATACTACACCGCTGCCTCACCGGTGTATGTCAACAACAAGTGAACCTCCC
911      920      930      940      950      960      970      980

981      990      1000      1010      1020      1030      1040      1050
TTTGCTGGCCACCAATCCCCTGTCCGAGGTGTCGCTCATTTACGAGAACACCCCTCGGCTCCACCAGATG
***** ***** ***** ** ** * ***** ***** ***** ***** *****
GTTGCTCGCCACCAATCCGCTGTCTGAAGTCTCACTCATCTACGAGAACACACCTCGCCTCCACCAGATG
981      990      1000      1010      1020      1030      1040      1050

1051      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
GGAGTAGACTGCTTACATCTGTCGACCCCTACTACTTTGCGCCAGCATGCCTGAGATGGATGGTGTTA
** ** ***** ** ***** ** ***** ** * ***** ***** *****
GGCGTGGACTGCTTACCTCCGTCGATCCGTAATACTTCCGCTCCGAGCATGCCTGAGATGGATGGTGTTA
1051      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120

1121      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190
TGACCTACTGTTATACGCTGGACATGGGCAATATCAACCCTATGGGCTCGACCAACTACGGCCGCTGTC
***** ** ***** ***** ***** ** ***** ***** ***** *****
TGACCTACTGCTACACGCTCGACATGGGCAACATCAATCCGATGGGCTCGACCAACTACGGCCGCTCTC
1121      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190

1191      1200      1210      1220      1230      1240      1250      1260
CAACGTACCCTGTCATGTAAGGTGTCGACAAATGCCAAGACCACCGCGGGCGGGTGGAGGCAACGGC
***** ***** ** ***** ***** ***** ** * * * * *****
CAACGTACCCTCTCCTGTAAGGTGTCGACAAACGCCAAGACGACAGCTGCCGGAGGAGGCAACGGC
1191      1200      1210      1220      1230      1240      1250      1260

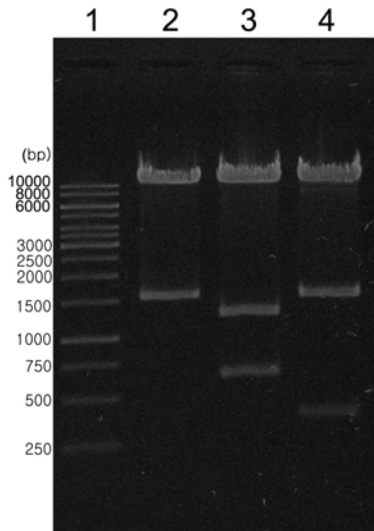
1261      1270      1280      1290      1300      1310      1320      1330
ACCGGCTACACGGTCGCCCCAAAAGTTGAACTGGTCGTTATTGCAGTCAACCACAACATCATGAAGATTG
** ***** ***** ***** ** ***** ** * * * * ***** *****
ACAGGCTACACGGTCGCCCCAGAAGTTGAGCTGGTGGTATCGCCGTGAACCACAACATCATGAAGATCG
1261      1270      1280      1290      1300      1310      1320      1330

1331      1340      1350      1360
CTGACGGCGCTGCAGGCTTCCCTATCCTGTAA 3'
* ***** ***** ***** ***** **
CCGACGGAGCTGCTGGCTTCCCGATCCTCAA 3'
1331      1340      1350      1360

```

upper line : original sequence
lower line : Optimized sequence

그림 6. 이리도 바이러스 캡시드 단백질 유전자 코돈 사용빈도 분석(계속)



lane 1: 1kb DNA ladder (size marker)
 lane 2: pJKB12/ BamHI+KpnI (1527bp)
 lane 3: pJKB12/ Sall+EcoRI (607bp, 1220bp)
 lane 4: pJKB12/ PstI+EcoRI (335bp)

그림 7. 식물 발현 벡터 클로닝 제한 효소 확인 (pJKB13)

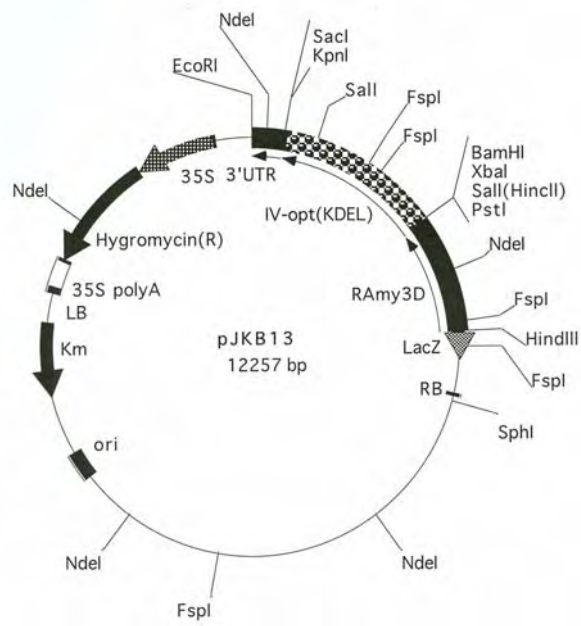


그림 8. pJKB13 map

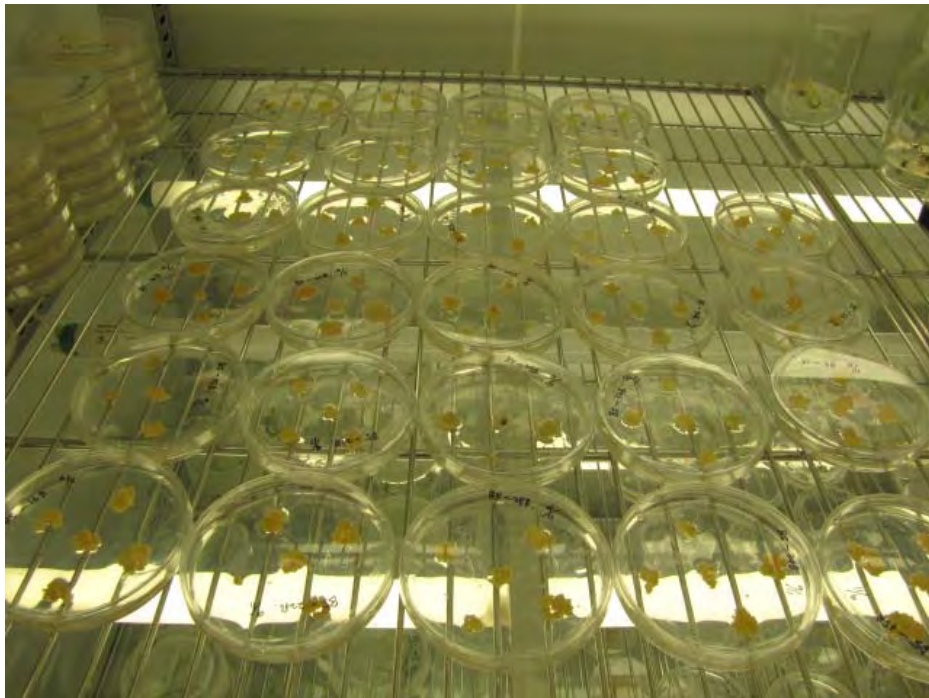
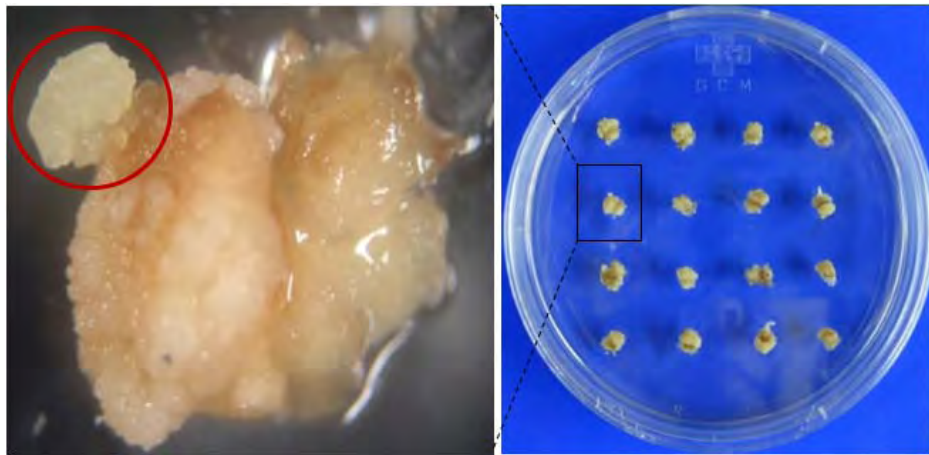
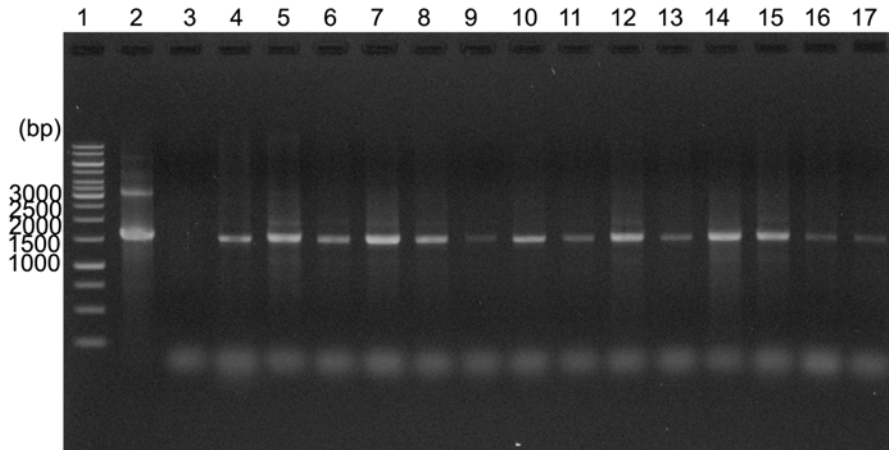


그림 9. pJKB13을 이용한 벼의 형질전환



lane 1: 1kb DNA ladder (size marker)
 lane 2: positive control (pJKB5 plasmid DNA PCR), 1527bp
 lane 3: negative control (pJKN75 형질전환 켈러스)
 lane 4-17: pJKB13 형질전환 켈러스

그림 10. Genomic DNA PCR을 이용한 형질전환 켈러스의 유전자 도입확인



PC: positive control
 NC: negative control (pJKN75 형질전환 켈러스)
 lane 1 - 12: 형질전환 켈러스

그림 11. Northern blot analysis를 이용한 형질전환 켈러스의 유전자 발현확인

다. 제3세부과제 연구내용 및 연구결과

(1) 이리도바이러스 캡시드 단백질의 색소체내 최적발현 조건 탐색

(가) 캡시드 단백질 유전자 코돈 최적화

- 외래단백질 발현을 극대화시킬 수 있도록 식물 색소체 유전자 전사과정에 맞도록 염기서열을 변환하고자 하였음. 전남대로부터 제공받은 이리도바이러스 캡시드 유전자를 Graphical codon usage analyser program과 <http://www.kazusa.or.jp/codon>의 database를 활용하여 염기서열을

담배 색소체의 코돈에 맞게 최적화하였음.

- 코돈이 최적화된 이리도바이러스 캡시드 유전자는 overlap extension PCR기법을 응용하여 합성하였음 (그림 1). 약 40 bp 길이로 Forward 방향의 48개의 프라이머와, Forward 프라이머와 약 15bp정도 겹치도록 Reverse 방향으로 48개의 프라이머를 작성하였음. 24개의 프라이머 조합 (F1~F12, R1~R12)으로 95°C 5분간 predenaturation; 30cycles의 95°C 20초 denaturation; 51°C 15초 annealing; 72°C 30초 extension; 그리고 95°C 5분 final extension조건으로 PCR을 수행하여 약 370bp ~ 380bp 길이의 block1을 만들었음 (1st step). 똑같은 조건으로 block2, 3, 4를 만든 후 4개의 PCR 반응산물들을 gel elution 한 후 동량의 비율로 혼합하여 template를 준비하였음.

- 1,405 bp의 전장 클론을 만들기 위해 template 2ul, 10pmole 농도의 F1, R48 프라이머 각각 1ul, 2.5mM dNTPs 2ul, pyrobest DNA polymerase 0.3ul (takara), 10 x PB buffer 2.5ul를 넣고 총 반응액이 25ul 되게 만들어서 95°C 5분; 30cycle의 95°C 30초, 50°C 30초, 72°C 1분 30초 ; 95°C 5분의 조건으로 2nd PCR을 수행하였음 (2nd step).

- 최종 증폭된 산물을 gel-elution한 후, pGEM T-easy 벡터로 클로닝하여 염기서열을 분석 확인하였음.

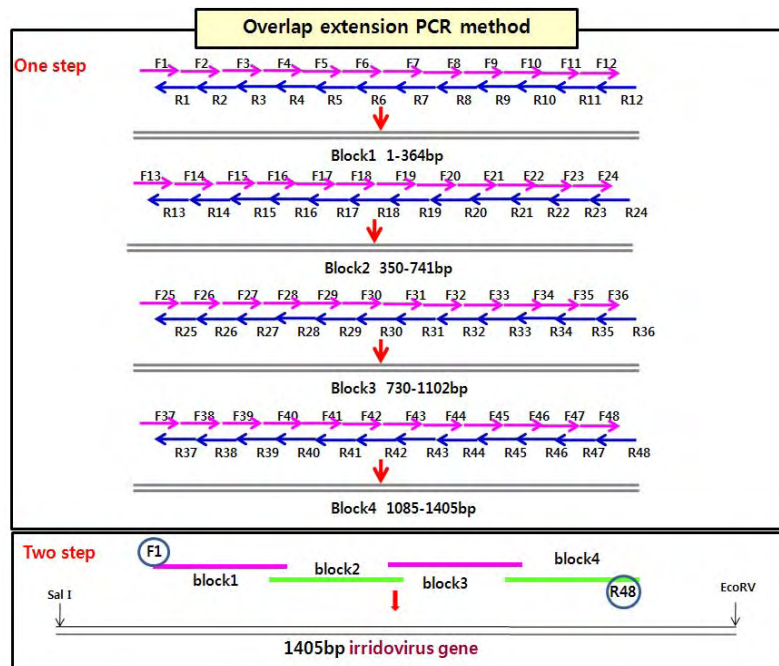


그림 1 . Overlap extension PCR method for gene synthesis

(나) Rclp promoter 색소체 형질전환 벡터 제작

- 코돈 최적화된 이리도바이러스 캡시드 유전자를 rclp promoter가 포함된 색소체 형질전환

기본벡터인 TIA::RclpGAH로 도입하였음 (그림 2).

- 먼저 기본벡터인 TIA::RclpGAH로부터 mGFP부분을 제거하기 위해 DNA를 제한효소 PstI로 자른 후 Klenow 효소 처리를 하였음. 처리한 반응물을 SalI 제한효소로 자른 다음 Phenol/Chloroform 및 에탄올 정제를 하여 벡터를 준비하였음.

- pGEM T-easy 벡터내의 이리도바이러스 캡시드 유전자는 EcoRV와 SalI 제한효소로 처리한 후 gel purification kit (Bioneer)을 사용하여 분리하였음.

- 분리된 이리도바이러스 캡시드 유전자를 DNA Ligation kit-Mighty mix (Takara)를 이용하여 mGFP가 제거된 TIA::RclpGAH 벡터(SalI/PstI*)자리로 subcloning한 후 *E.coli* 내로 도입하여 TIARclpGAH::iridoVirus를 제작하였음 (그림 3).

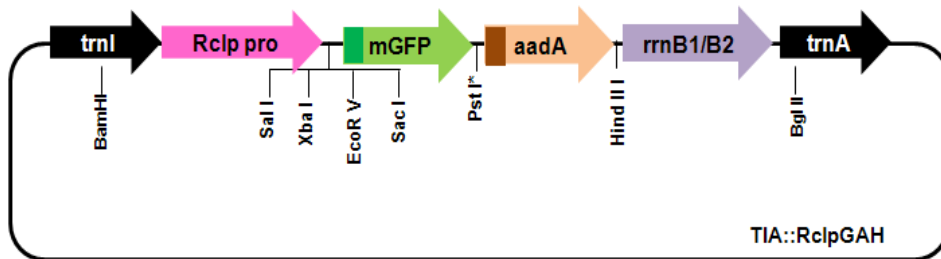


그림 2 . 니코틴프리 담배 색소체 형질전환 기본 카세트 벡터

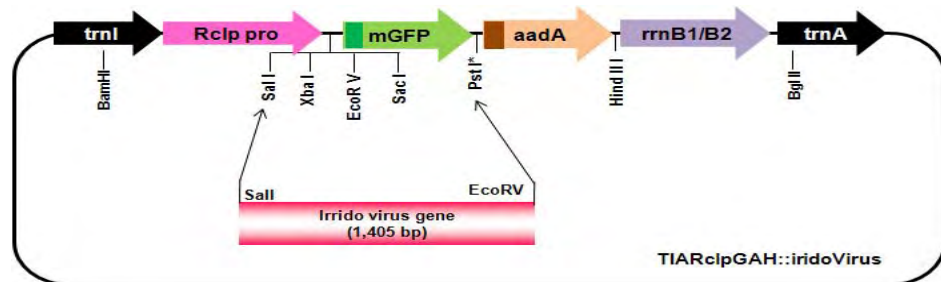


그림 3 . 니코틴프리 담배 색소체를 활용한 이리도바이러스 예방 백신생산용 벡터

(다) Rclp promoter 니코틴프리 담배 색소체 형질전환체 생산

① 형질전환체 생산

항원 단백질을 발현할 담배는 사료형태로 직접 제공되므로 니코틴이 함유되어 있지 않은 담배를 사용하였음. 항생제가 첨가되지 않은 MS 배지에서 발아 후 5주 이상 기내에서 배양된 담배 잎을 Rmop 배지 위에서 치상한 후 Bio-Rad 사 PDS-1000 기종을 사용하여 형질전환을 시행하였음. CaCl₂와 spermidine을 사용하여 형질전환 plasmid 벡터를 0.6um gold particle로 coating 하였음. 무균 상태 chamber 내 vaccum은 28 in.Hg, 압력은 1100 psi, 거리는 9cm로 하여 배지 위에 치상된 담배 잎에 bombarding 하였음. Bombardment된 담배 잎을 2일간 동일 배지에 배양한 후, 5mm X 5mm 절단하여 Rmop sp 선발배지에서 6-7주 배양하여 저항성 shoot을 유도하였음.

Spectinomycin 저항성 배지에서 유도된 shoot는 3mm X 3mm 크기로 절단하여 동일

한 선발배지에서 재분화를 통하여 저항성 shoot을 다시 유도하였음. 이와 같이 선발 배지에서 재분화를 반복하여 도입된 유전자의 homoplasmy를 높여주었음.

② 색소체 형질전환체 검증

㉠. 선발배지에서 선발한 색소체 형질전환체의 PCR 분석

- 항생제 첨가 배지에서 재분화된 식물체가 목표의 유전자가 도입된 형질전환체인지를 확인하기 위하여 각 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 벡터 특이적인 trnIF3와 trnAR1 primer로 PCR을 수행하였음 (그림 4).

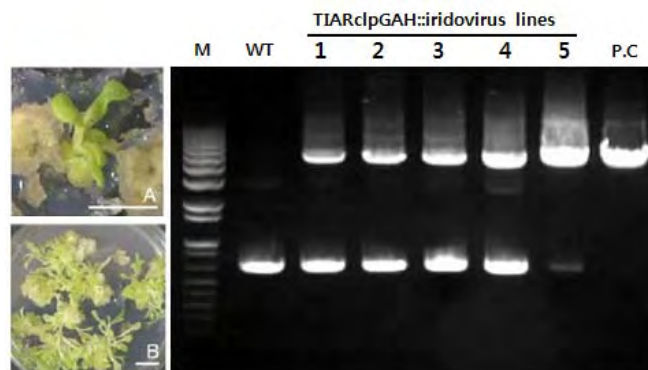


그림 4. 재분화된 색소체 형질전환체의 PCR 검증

㉡ Southern blot 분석

- 식물체에서 엽록체의 homoplasmy 상태를 확인하기 위하여 trnA 유전자를 probe로 이용하여 southern 분석을 수행하였음. 그 결과, 야생형에서는 0.88kb에서 DNA 밴드가 검출이 된 반면, 형질전환체에서는 목표의 유전자가 도입된 것을 나타내는 4.5kb에서 DNA 밴드가 검출이 되었음 (그림 5). 이들 결과는 재분화된 형질전환 식물체의 엽록체 게놈 전체에 목표 유전자가 도입된 상태로 전환이 되었다는 homoplasmy 상태를 의미한다.

- Southern 분석을 위한 total genomic DNA는 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)를 사용하여 추출하였음. 추출한 DNA 4ug을 BamHI 및 Bgl II 으로 처리하여 1% agarose gel에 전기영동하여 분리한 후 Zeta-Probe GT blotting membrane (Bio-Rad)에 blotting시켰다. Probe의 준비는, trnA를 포함하는 DNA 단편을 [α - 32 P]dCTP로 표식하여 준비하였음. Prehybridization과 Hybridization 은 7% (w/v) SDS를 포함하는 0.25M sodium phosphate buffer (pH 7.2)를 사용하여 65°C에서 overnight으로 수행했다. 반응이 끝난 membrane은 5% (w/v) SDS를 포함한 20mM sodium phosphate buffer (pH 7.2)로 65°C에서 30분간 세척하고 3시간 노출시켰다.

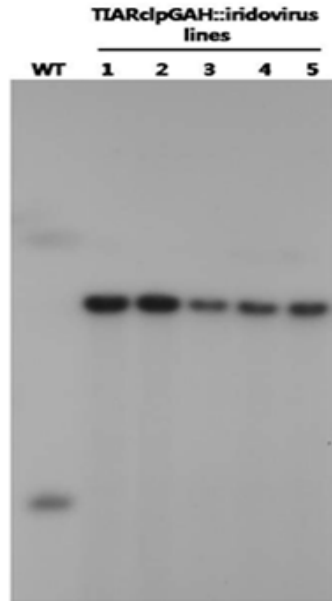


그림 5. 색소체 형질전환체의 Southern blot 분석

㉔ Northern blot 분석

- 한편, 유전자의 도입이 확인된 형질전환 식물체에서, 도입한 이리도바이러스캡시드 유전자의 발현을 알아보기 위하여 5개의 독립개체를 선발하여 northern 분석을 수행하였음 (그림 6). 그 결과, 형질전환체에서 이리도바이러스 캡시드유전자의 발현을 확인할 수 있었음.
- Northern 분석을 위한 total RNA는 TRIzol Reagent (Invitrogen)를 사용하여 추출하였음. 추출한 RNA 2ug을, 5.1% (v/v) formaldehyde를 첨가한 1.2% agarose gel에 전기영동하여 분리한 후 Zeta-Probe GT blotting membrane (Bio-Rad)에 전사시켰다.
- Probe의 준비는, 1,405 bp의 이리도바이러스 유전자를 PCR로 증폭한 후 [α -³²P]dCTP로 표식하여 준비하였음. Prehybridization과 Hybridization 은 7% (w/v) SDS를 포함하는 0.25M sodium phosphate buffer (pH 7.2)를 사용하여 65°C에서 overnight으로 수행했다. 반응이 끝난 membrane은 5% (w/v) SDS를 포함한 20mM sodium phosphate buffer (pH 7.2)로 65°C에서 30분간 washing 한 후 30분간 exposure 시켰다.

(라) 신규 색소체 발현 프로모터 및 종결자 확보 및 검증

① 신규색소체 발현 프로모터 및 종결자 도입된 벡터 제작

- 신규 색소체 발현 프로모터 및 종결자 확보를 위해 효모 유래의 Gal10 프로모터와 GAL7 종결자가 삽입된 TIA::GalGAG 벡터를 제작하였음 (그림 7).

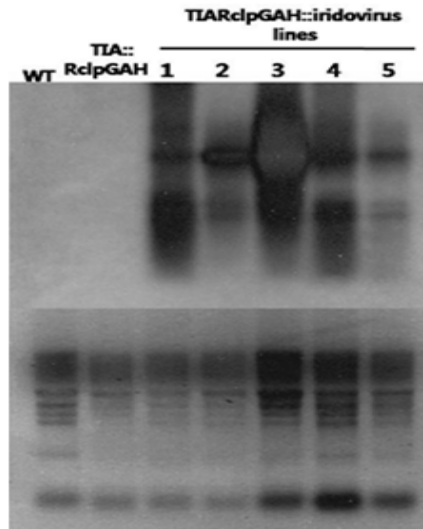


그림 6. 색소체 형질전환체의 Northern blot 분석

② 신규 색소체 발현 형질전환체 제작

- TIAGalGAG 벡터를 Qiagen사의 Plasmid midi Kit으로 고농도의 Plasmid를 추출한 뒤 0.6um gold particle로 코팅한 후 니코틴프리담배에 Bio-Rad 사 PDS-1000을 사용하여 색소체 형질전환을 수행하였음. 담배 색소체로의 도입과정은 상기 언급한대로 실시하였음.

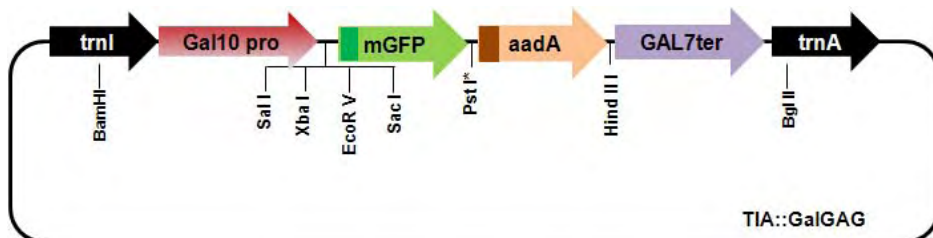


그림 7. 신규 색소체 형질전환용 벡터 제작

③ 신규색소체 형질전환체 검증

- Homoplasmy 수준을 높이기 위하여 항생제 첨가배지에서 3회 재분화 반복 과정을 거친 10개의 독립된 개체를 선별하였음. Genomic DNA를 추출 후 벡터 특이적인 trnIF3와 trnAR1 primer로 사용하여 PCR을 수행한 결과 10개의 TIA::GalGAG 신규 색소체 형질전환체임이 검증되었음 (그림 8).

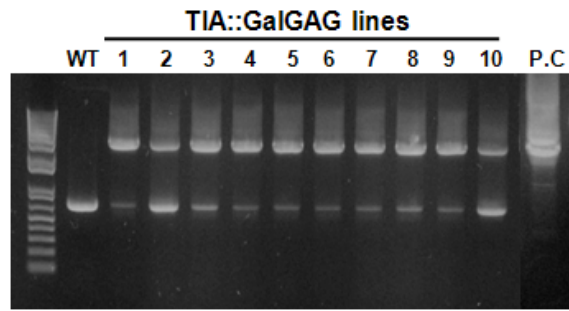


그림 8. TIA::GalGAG 신규색소체 형질전환체의 PCR 검증

2. 제2차년도 연구내용 및 연구결과
 가. 제1세부과제 연구내용 및 연구결과

(1) 항원 coating 및 adjuvant formulae를 위한 chitosan screening

- 이리도 바이러스 capsid 항원을 발현하는 형질전환 식물체 실험 이전에 formulation 연구를 통해 넵치가 식물체 포함 사료에 대해 급이반응을 보이는지에 대한 사전 실험을 실시하였음. 이를 위해 이전 연구결과에 의해 chitosan formulae는 chitosan (low molecular weight, Aldrich) 0.125g을 2% acetic acid에 녹인 다음 이를 overnight incubation하여 완전히 녹인다. 매우 점조성을 띄는 이 용액을 결정화 하기 위해 15% TTP (sodium triphosphate, Sigma)를 5ml 준비하고 액상의 chitosan 용해물 25ml을 천천히 첨가하면서 stirring을 실시하였음. 결정이 생기기 시작하면 약 6시간 방치 후 원심 (3000 rpm/10분)을 실시하여 resin (결정상태의 chitosan)을 확보하고 여기에 PBS 5ml을 부어 재확산 시킨 다음 sonication (Sonic & Materials)을 실시하여 결정을 미세화 하였음. 미세화된 결정을 다시 원심분리하여 pellet만을 확보하고 이를 formulae를 위한 기초 resin으로 사용하였음.
- 이 결정화된 resin은 최종농도 약 0.5 - 1% 범위내에서 adjuvant로서의 기능이 있음을 밝힌 바, 이를 근거로 다음과 같이 formulation을 준비하였음.

표 1. 쌀배아 및 담배와의 혼합을 위한 기초 formulation 구성비

group	항원 formulae	사료와 식물체의 혼합비	실험 넵치수
1	chitosan resin 15 μ l+PBS 85 μ l	사료 80%+쌀배아 20%	5
2	chitosan resin 30 μ l+PBS 70 μ l	사료 80%+쌀배아 20%	5
3	chitosan resin 15 μ l+PBS 85 μ l	사료 90%+쌀배아 10%	5
4	chitosan resin 30 μ l+PBS 70 μ l	사료 90%+쌀배아 10%	5
5	chitosan resin 15 μ l+PBS 85 μ l	사료 80%+담배 20%	5
6	chitosan resin 30 μ l+PBS 70 μ l	사료 80%+담배 20%	5
7	chitosan resin 15 μ l+PBS 85 μ l	사료 90%+담배 10%	5
8	chitosan resin 30 μ l+PBS 70 μ l	사료 90%+담배 10%	5
9	chitosan resin 15 μ l+PBS 85 μ l	사료 100%	5
10	chitosan resin 30 μ l+PBS 70 μ l	사료 100%	5
11	PBS 100 μ l	사료 100%	5

* group 9, 10은 chitosan-only control로 사용되었고 group 11은 비접종군 control로 사용되었음.

- 실험어는 전라남도 진도의 치어 종묘장에서 구입하여 사용하였는데 일반적으로 체장 약 5cm의 개체들을 사용하였음.
- 사료는 실험어가 입식 후 본 사료 (식물체나 chitosan이 첨가되지 않은)에 적응하는 날을 기준으로 약 5-7일 후 급이하였고 매일 2회, 개체당 본 사료 2개씩이 급이되도록 조정하였음. 급이는 총 1주일간 실시하였으며 각 group별 tank에서의 잔류 사료의 개수를 측정함으로써 급이 거부반응 정도를 계측하였음.
- 수온은 면역반응 유도를 위해 23-25 $^{\circ}$ C를 유지하였고 염도유지는 인공해수용 염분인

Oceanic Natural Sea salt mix (Oceanic systems, TX, USA)를 첨가하여 염도를 유지하였음.

- 급이 결과, 모든 실험군에서 식이 거부반응 없이 급이가 이루어져 식물체 성분을 첨가함으로 인해 급이에는 문제가 없음을 확인하였음.



(2) 선발된 chitosan candidate를 이용한 면역효과 검증

- 실험의 정확도를 높이기 위해 재조합 이리도 capsid 단백질에 대한 단클론 항체를 준비하였음. 즉, 1차년도에 순수분리된 재조합 항원을 이용하여 마우스에 접종-hybridoma fusion - 선별 - ELISA titer screening 등의 과정을 거쳐 항체가가 가장 높게 나타나는 3개의 hybridoma cell-line을 확보하였음 (단클론항체 생산과정 기술 생략). 이 단클론항체의 특성을 알아보기로 재조합 단백질 항원과 ELISA를 통한 선별 이후 Western blot을 이용하여 항원-항체반응 양상을 재검하였음.
- 재조합 항원을 SDS-PAGE 전개 후 PVDF membrane에 transfer 후 1차 항체로 먼저 3개의 clone (각각 3A1, 8F80, 11A40)을 MEM 배지에서 배양한 상층액 (단클론항체 원액) 10배 희석액을 준비하여 사용하였고 2차항체는 goat anti-mouse IgG HRP (Pierce)를 사용하였음. 그 결과는 아래 그림 1과 같다.

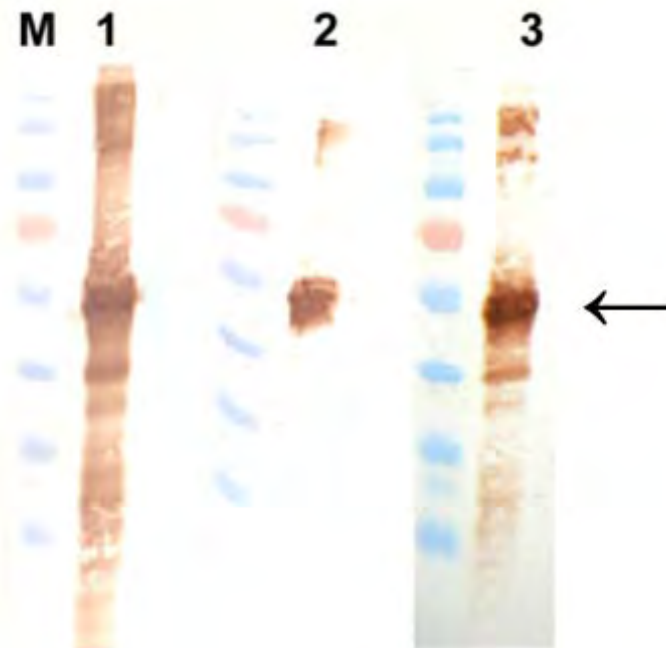


그림 1. 3종의 단클론항체를 이용하여 실시한 Western blot 결과 그림. 실험 결과, 모든 클론이 재조합 단백질에 대한 강한 항원-항체 반응을 보여주는 그림. M: protein size marker, Lane 1: 3A1, lane 2: 8F80, lane 3: 11A40. 화살표: 약 52 kDa의 이리도 바이러스 capsid 단백질

- 위 실험 결과를 토대로 형질전환 식물체를 이용한 항원성 유도 실험의 기초 자료로 1차년도에 대장균에서 생산한 재조합 이리도 capsid 항원을 이용하여 사료 내 항원존재에 따른 항체 유도능을 검사하였음.
- 즉, 위의 formulation 구성비에서 chitosan과 식물체의 혼합물에 재조합 이리도 capsid 단백질을 10 μ l (항원 stock 1 mg/ml를 사용함)를 추가로 첨가하여 실험에 공하였음.
- 사료의 급여는 1주일간 항원 함유사료 급여 후 1주일간 일반사료 급여를 3번 반복하고 마지막 급여 5일 후 모든 개체를 희생하여 채혈을 실시하여 재조합 항원에 대한 항체 (IgM) 생성 여부를 ELISA로 확인하였음.

표 2. 쌀배아 및 담배와 chitosan의 혼합물에 투여된 항원의 formulation 구성비

group	항원 formulae	사료와 식물체의 혼합비	재조합 항원	실험 넘치수
1	chitosan resin 15 μ l+PBS 75 μ l	사료 80%+쌀배아 20%	10 μ l	5
2	chitosan resin 30 μ l+PBS 75 μ l	사료 80%+쌀배아 20%	10 μ l	5
3	chitosan resin 15 μ l+PBS 75 μ l	사료 90%+쌀배아 10%	10 μ l	5
4	chitosan resin 30 μ l+PBS 75 μ l	사료 90%+쌀배아 10%	10 μ l	5
5	chitosan resin 15 μ l+PBS 75 μ l	사료 80%+담배 20%	10 μ l	5
6	chitosan resin 30 μ l+PBS 75 μ l	사료 80%+담배 20%	10 μ l	5
7	chitosan resin 15 μ l+PBS 75 μ l	사료 90%+담배 10%	10 μ l	5
8	chitosan resin 30 μ l+PBS 75 μ l	사료 90%+담배 10%	10 μ l	5
9	chitosan resin 15 μ l+PBS 85 μ l	사료 100%	0	5
10	chitosan resin 30 μ l+PBS 70 μ l	사료 100%	0	5
11	PBS 100 μ l	사료 100%	0	5

* group 9, 10은 chitosan-only control로 사용되었고 group 11은 비접종균 control로 사용되었음.

- 최종 접종 5일후 채혈하여 혈청을 분리하고 이를 ELISA의 1차 항체로 사용하였음. ELISA를 위해 coating buffer 90 μ l에 재조합 MCP 항원을 첨가하여 최종농도가 1 μ g/90 μ l가 되도록 항원 coating을 실시하고 1% BSA로 blocking하였음. 2차 항체는 Anti-flounder IgM monoclonal antibody (Aquatic Diagnostic Ltd, UK)를 사용하였음. 3차항체는 goat anti-mouse IgG HRP (Pierce)를 사용하였음. 반응 후 ELISA reader를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하여 OD값에 따른 변화로 항체 생성능을 간접 측정하였음.
- 실험 결과로 나타난 평균 OD값과 그에 따른 표준편차값은 아래 표와 같다.

표 3. 재조합 항원에 대한 넘치의 항체가 비교

group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
mean	0.355	0.151	0.436	0.115	0.328	0.08	0.221	0.069	0.072	0.082	0.083
SD	0.002	0.01	0.005	0.01	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

- 위 결과를 one-way analysis of variance (ANOVA, Graphad)를 Dunnet multiple comparisons test

법으로 분석하여 OD값 사이의 통계적 유의성을 확인하였음. 그 결과, 6번 group만 제외하고 모두 control에 비해 통계적으로 유의성 있게 높은 ($P < 0.01$) 항체 생성능을 보여 chitosan formulae를 첨가하면 adjuvant로써 매우 좋은 효과가 있음을 보여주었음.

- 6번 group에서 의미있는 항체가 나오지 않는 것은 실험의 특성상 비특이적인 음성반응으로 판단된다.

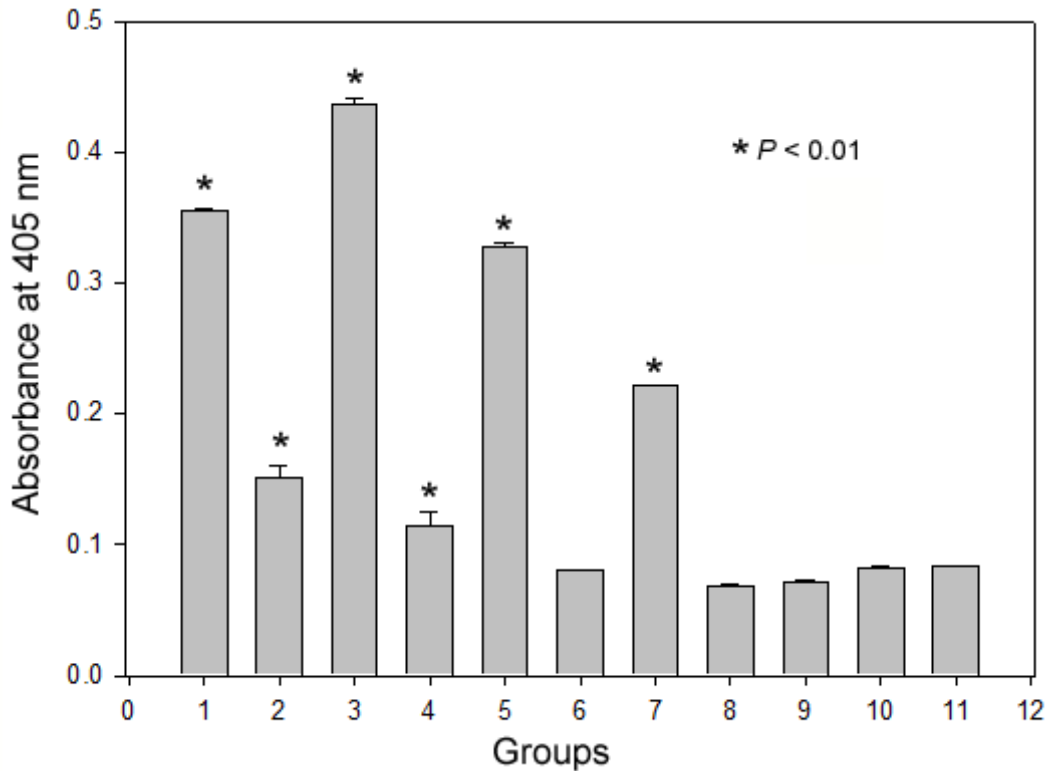


그림 2. 표 3의 결과를 도식화 한 그림.

(3) 재조합 항원 및 chitosan formulae를 이용한 소규모 oral vaccine 임상실험 및 바이러스배양액을 이용한 challenge study

- 바이러스 배양을 위해 먼저 이리도 바이러스에 감염이 의심되는 개체를 준비하였음. 제주도 "A" 연구소의 도움을 받아 이리도 감염 의심 개체를 확보한 후 일반 바이러스 분리법을 이용하여 바이러스 분리를 실시하였음.
- 먼저 의심개체의 간, 신장, 비장을 채취하고 여기에 적량의 PBS를 첨가 후 이것을 Tissue grinder (Ultra-Turrax, IKA-Werke, Germany)를 이용하여 세절하여 조직을 분쇄하였음. 기본 원심으로 약 12,000 rpm/5min 원심을 실시하여 cell debris 및 기타 불순물을 제거하고 0.45um 및 0.2um filter를 이용하여 바이러스 이외의 미생물을 제거하였음.
- 일단 바이러스의 존재를 확인하기 위하여 이리도바이러스 특이 프라이머를 이용하여 PCR을 먼저 실시하였음. 즉, 추출액으로부터 DNA를 추출하여 1차년도에 사용한 이리도특이 primer set를 이용하여 PCR을 수행하였음. 그 결과, 아래 그림 3와 같이 시료에서 양성반응을 얻을 수 있었음.

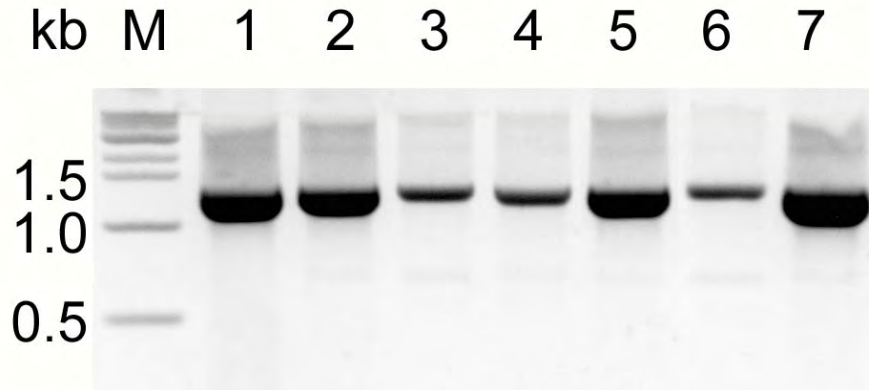


그림 3. 넙치 조직으로부터 추출된 DNA에서의 이리도 바이러스 양성 검출을 위한 PCR. 기대되는 크기의 band (dir 1.3 kb)가 생성되었음을 보여주는 그림. M: 1 kb size marker, Lane 1-2: kidney, 3-4: liver, 5-6: spleen, 7: positive control

- 바이러스 분리를 위한 세포주는 EPC cell line (ATCC, USA)을 이용하였음. 먼저 EPC cell 을 EMEM media를 이용하여 6-well microplate에 seeding 후 배양하여 70% confluency가 되도록 배양하고 여기에 바이러스 추출액을 각각 200 μ l 및 300 μ l씩 접종하고 약 7일간 관찰하였음.
- 그 결과 아래 그림 4와 같이 약 6일째부터 주로 kidney에서 분리된 추출액으로부터 CPE (cytopathic effect)가 관찰되었음

그림 4. EPC cll-line의 CPE로부터 분리된 DNA sample에서 증폭된 이리도바이러스 capsid 유전자. M: 1 kb size marker, Lane 1: 시료, lane 2: positive control

나. 제2세부과제 연구내용 및 연구결과

(1) 고발현 식물세포주 선발

(가) 항원단백질 고발현 세포주의 선발

① 식물 codon으로 최적화된 이리도바이러스 항원유전자가 삽입된 (IV-opt, sMCP) 벼 형질 전환체 개발

이리도 바이러스의 항원 유전자 (sMCP, 1383bp)는 식물에서 발현하기에 최적의 코돈으로 합성되었음. 합성된 항원 유전자에 있는 anchor region (1~63염기, 1282~1383염기)이 제외된 이리도 바이러스 항원 유전자 (1215bp)의 5'region에 RAmy3D signal peptide를 첨가하고, 3'region에 Endoplasmic Reticulum retention signal peptide (KDEL)를 첨가하여 식물 발현벡터내로 삽입하였음. 식물발현벡터는 벼 현탁세포를 당 결핍조건에서 배양할 때 목적 유전자를 특이적으로 고발현 시키는 promoter로 알려진 RAmy3D promoter와 3'UTR이 포함되어 있다 (그림 1, 1차년도 결과 보고 완료).

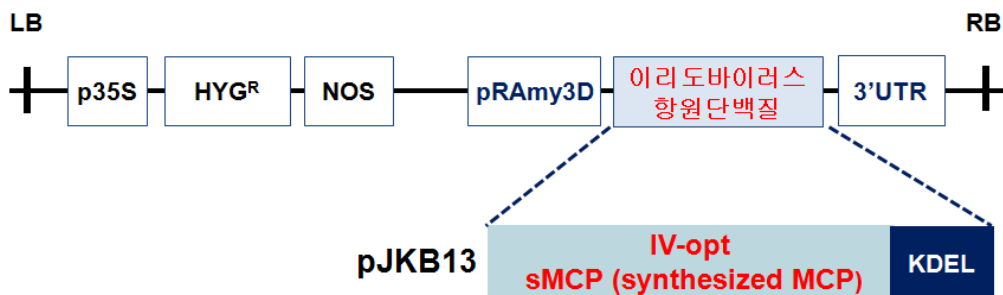


그림 1. 벼 현탁세포 발현용으로 제작된 이리도 바이러스 항원 유전자 지도

② 항원 단백질 고발현 세포주의 선발

상기 유전자 발현벡터를 벼 callus에 형질전환 하여 얻어진 형질전환체로부터 Northern blot 분석을 수행한 결과 #2, #3, #6 그리고 #7의 4개 세포주에서 이리도 바이러스의 항원 유전자 mRNA가 가장 높은 수준으로 발현됨을 확인 하였음 (그림 2, 1차년도 결과 보고 완료).



그림 2. pJKB13 형질전환 세포주의 Northern blot 분석 결과

(나) 돌돔 유래 이리도 바이러스 항원 유전자 (original MCP) 형질전환체 개발

① 이리도 바이러스 항원 유전자 발현 벡터 제작

이리도 바이러스 항원 유전자를 식물 codon으로 변형시키지 않고 본래의 염기서열을 유지한 상태에서 발현시켜 식물 codon으로 변형시킨 경우와의 발현 차이를 비교하고자 하였음. 돌돔 유래 이리도 바이러스의 항원 유전자 (MCP, 1362bp)는 전담대에서 제공받는 유전자원을 그대로 사용하였으며, 벼에서 고 분비를 유도하는 것으로 확인된 RAmy3D signal peptide (3Dsp) 를 5'region에 첨가하고, 3'region에는 Endoplasmic Reticulum retention signal peptide 인 KDEL sequence 를 첨가하여 최종 1524bp의 염기서열을 확보 하였으며, 이를 위해 사용한 primer list는 표 1에 나타내었음. 식물에서 이리도바이러스 항원 유전자를 발현시키고자, 상기의 MCP 유전자를 포함한 발현벡터를 제작하였음. 식물발현벡터에는 RAmy3D promoter와 3'UTR terminator가 포함되었으며, selection marker로는 hygromycin phosphotransferase gene (HYG^R) 유전자를 사용하였고, 이 벡터를 pJKB5라 명명 하였음 (그림 3).

표 1. signal peptide와 KEDL 부착을 위한 primer list

No	Name	Length	Sequence (5'-3')
1	3Dsp F(BamH1)	23mer	TTGGATCCATCAGTAGTGGTTAG
2	3Dsp-RBIV-F	33mer	CAAGCCCAGGTCCTCTCTGCAATCTCAGGTGCG
3	RBIV-R(KDEL)	39mer	GGTACCTCAGAGCTCGTCCTTCAGGATAGGGAAGCCTGC

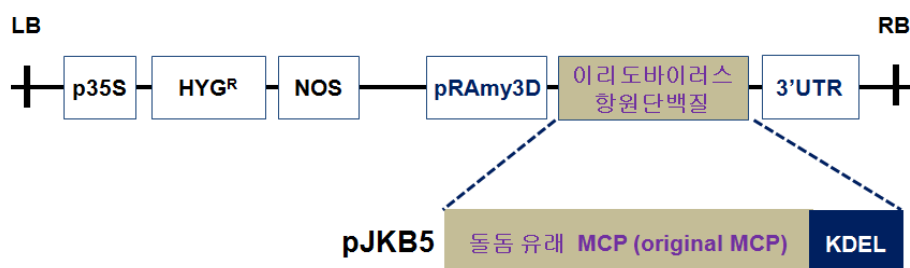


그림 3. 벼 현탁세포 발현용으로 제작된 돌돔 유래 이리도 바이러스 항원 유전자 지도

② 유전자총을 이용하여 항원유전자를 포함하는 발현벡터의 형질전환

벼 종자로부터 7일간 배 발생 캘러스를 유도한 후, 순수한 캘러스 조직만을 분리하여 co-culture 배지로 옮겨 하루 동안 배지에서 배양하였음. 이 캘러스에 유전자총 (Bombardment)을 사용하여 pJKB5 plasmid DNA를 벼에 도입하였음. 이 후 5일간 co-culture 배지에서 암조건 (25℃)에서 배양 한 후, hygromycin이 포함된 선발배지로 옮겨 25℃에서 16시간 명배양 후 8시간 암배양 하였음. 3주 후에 항생제를 포함하는 배지에서 성장하는 10 line의 캘러스를 확보하였고, 발현 여부를 확인하기 위하여 증식배지에서 배양 하였음 (그림 4).

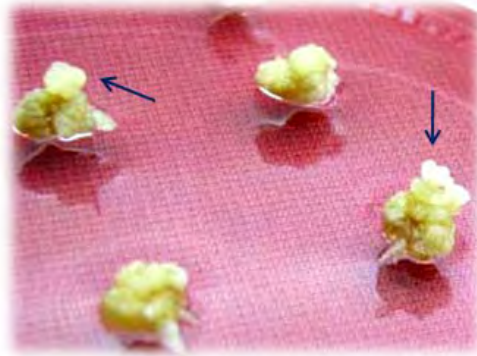


그림 4. 이리도 바이러스 항원 유전자 발현벡터 (pJKB5)의 형질전환 캘러스

③ 형질전환체의 분자생물학적 분석

항원 유전자의 식물체내 도입 여부를 확인하기 위하여, 형질전환체 선별을 위해 hygromycin에 저항성을 보인 callus로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR을 수행하였음. Genomic DNA PCR에 사용된 primer는 forward primer로 3Dsp-RBIV-F, 5'-CAAGCCCAGGTCCTCTCTGCAATCTCAGGTGCG-3'이고, reverse primer로 RBIV-R(KDEL), 5'-GGTACCTCAGAGCTCGTCCTTCAGGATAGGGAAGCCTGC-3' 이었음. PCR 실험은 95℃에서 1분 denature, 60℃에서 1분 annealing, 72℃에서 1분 extension 하여 30회 반복하는 조건으로 수행하였음. 1% agarose gel에서 1524bp의 PCR product를 확인하였음. 그 결과 형질전환 callus 10개 line을 확보하였고, pJKB5 형질전환체라고 명명하였음 (그림 5). PCR로 유전자 도입이 확인된 10개의 callus를 액체 배지에 접종하여 25℃에서 110 rpm 으로 현탁배양세포를 만들었음.

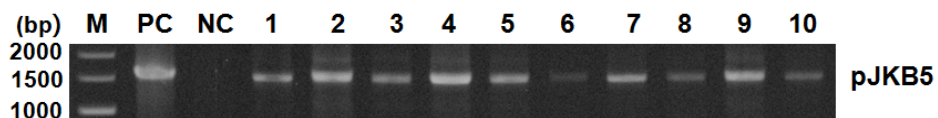


그림 5. pJKB5 형질전환체의 Genomic DNA PCR 확인 결과

이렇게 확보된 pJKB5 형질전환 세포주내 이리도 바이러스 항원 단백질의 mRNA 발현 정도를 알아보기 위하여 Northern blot 분석을 수행하였음 (그림 6). Northern blot 분석 결과,

pJKB5 형질전환체 #1, #2, #4, #6, #8의 5개 세포주에서 mRNA가 발현되는 것을 확인하였음.

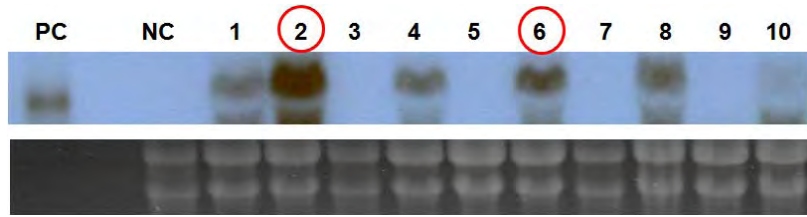


그림 6. pJKB5 형질전환 세포주의 Northern blot 분석 결과

(다) 이리도 바이러스 항원 단백질 고발현 세포주 선발

① 하이브리도마 세포주 선발

이리도바이러스 단백질발현 여부를 확인하기 위한 단클론항체를 생산할 수 있는 3종의 하이브리도마 세포주 11A40, 3A1 그리고 8F80를 전남대학교로 부터 제공 받았다. 하이브리도마 세포주는 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 배양하였음. 3종의 하이브리도마 세포주 중에서 항원-항체 반응이 가장 좋은 세포주를 선발하고, 식물유래 이리도 바이러스 항원과의 반응여부를 확인하기 위하여, 대장균에서 생산한 재조합 이리도 바이러스 항원과 베타 겔러스에 식물발현벡터만 형질전환 된 negative control 인 NC (pMYN75) 겔러스 추출 단백질, 그리고 pJKB13의 #3번의 callus에서 추출한 단백질을 이용하여 Western blot analysis를 수행하였음. 먼저 각각의 단백질을 12% SDS-PAGE gel에서 전기영동 한 후, polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane에 electrotransfer하였음. 5% skim milk solution으로 4℃에서 12시간동안 blocking 한 후, 3종의 하이브리도마 배양액을 1/5로 dilution 하여 넣은 후, 실온에서 3시간 동안 반응시켰다. Goat anti-mouse IgG AP conjugate 항체를 이용하여 실온에서 2시간 반응 후, NBT/BCIP solution으로 발색을 수행 하였음. 그 결과 8F80 하이브리도마 세포주의 경우, 재조합 이리도 바이러스 항원 뿐만 아니라 NC 그리고 식물발현 이리도 바이러스 항원 단백질 모두와 반응하지 않는 것으로 확인 되었음. 3A1 하이브리도마의 경우, 조합 이리도 바이러스 항원과 반응하며, 식물발현 항원과는 반응하지 않았다. 반면에 11A40 하이브리도마 세포주에서 생산한 단클론 항체의 경우, 재조합 이리도 바이러스 항원과도 반응하여, 식물발현 이리도 바이러스 항원과도 매우 잘 반응하는 것으로 확인되었음 (그림 7). 이결과를 통하여 11A40를 주 하이브리도마 세포주로 확정 하였음.

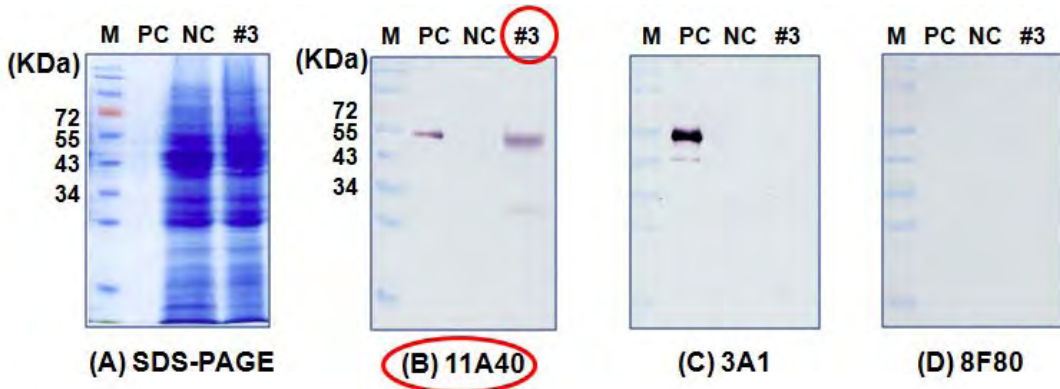


그림 7. 이리도 바이러스 항원 단백질에 대한 하이브리도마의 western blot 결과

Western blot 분석 결과, 항체로 사용한 11A40 하이브리도마의 항원 특이성은 높으나, 항원에 결합하는 능력이 낮은 것으로 판단되어 항원 단백질에 대한 결합능력을 높여 보고자 ascite fluid를 분리하였음. 1마리의 Balb/c (4주령, 마우스)에 PRISTANE (sigma, P9622)를 주사하고 7일 후에 11A40 (2×10^6) 하이브리도마 세포를 마우스 복강에 주사하고, 2주 후에 마우스 ascite fluid 20 mg을 분리 하였음. 분리한 ascite fluid가 항체로서 결합능력이 향상되었는지 확인하고자 western blot 분석을 수행하였음. 단백질 시료는 11A40 하이브리도마로 발현이 확인된 pJKB13-#3 형질전환체 캘러스 단백질을 사용하였음. 이리도 바이러스 항원에 대한 ascite fluid 역시 항원 특이성은 비교적 높으나, 11A40 하이브리도마의 결합력이 낮은 만큼 ascite fluid에서도 항원 결합력은 크게 향상되진 않았다. 1:200과 1:500으로 희석한 결과에서는 단백질 발현이 검출되었고, 500보다 높은 희석배율에서는 단백질이 검출되지 않았다 (그림 8).

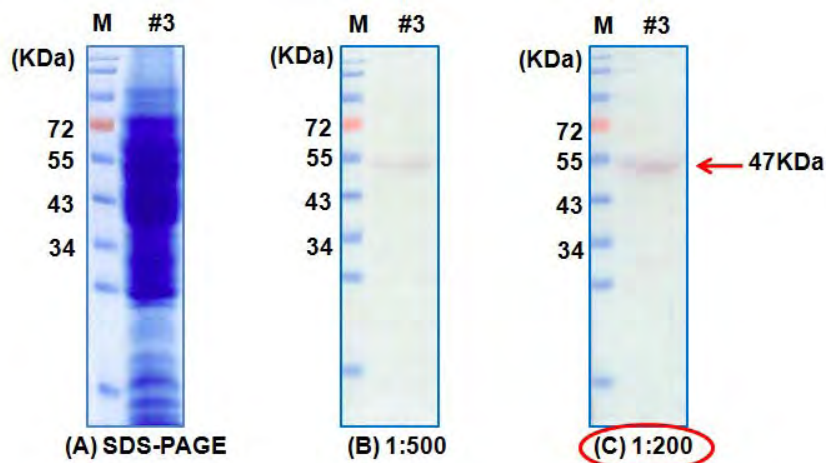


그림 8. 11A40 ascite fluid를 사용한 pJKB13 형질전환 캘러스의 western blot 결과

② Western blot 분석을 이용한 이리도 바이러스 고발현 세포주 선발

선정된 11A40 하이브리도마에서 생산된 단클론 항체를 사용하여 Northern blot에서 발

현이 강하고, 현탁 배양세포의 상태가 좋은 세포주에서의 단백질 발현 여부를 확인하고자 하였다. pJKB13의 경우 #3과 #6 세포주를 선택 하였다. 각각의 현탁배양 세포를 sucrose가 포함된 배지에서 7일 동안 배양 한 후, 무균상태에서 진공 펌프를 이용하여 현탁배양 세포만을 harvest 하였다. 5g (fresh cell weight)의 세포를 sucrose가 제거된 50 ml의 현탁배양 배지에 접종 하여, 5일간 배양하였다. 배양 5일 후, 0.5g (fresh cell weight)의 cell을 취하여, LN2와 막자사발을 이용하여 갈아서 그 powder를 500 μ l의 protein extraction buffer로 추출 후, 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm으로 30분간 원심 분리한 상등액을 얻었다. 그 상등액을 단백질 정량을 통하여 각각 500 ug의 total protein을 12% SDS-PAGE gel에서 전기영동 하였다. Positive control (PC)은 대장균 유래의 이리도 바이러스 항원 단백질을 사용하였고, negative control (NC)은 상기의 N75 현탁배양 세포의 단백질을 추출하여 사용하였다. SDS-PAGE 후에, 단백질을 PVDF membrane으로 electrotransfer 한 후, 11A40 ascite fluid를 1:200으로 사용하여, 일련의 과정을 거쳐 Western blot 분석을 수행하였다. 그 결과 #3, #6 세포주에서 모두 band가 검출되었는데 positive control (PC)는 original MCP 단백질로 anchor region을 포함하여 52 KDa 이고, 형질전환체의 sMCP는 코돈 최적화를 통해 합성한 단백질이며 anchor region이 제외되어 그 크기가 감소된 47 KDa에서 band를 보였다. 이에 예상 크기에서 진한 band를 보인 pJKB13-#3을 고발현 세포주로 선발하였다 (그림 9).

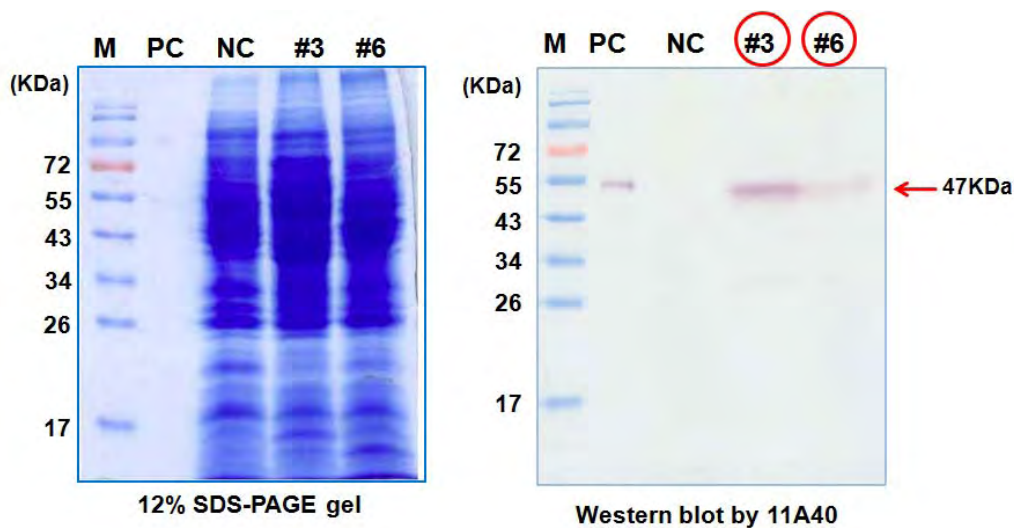


그림 9. pJKB13 형질전환 세포주의 Western blot 분석 결과

pJKB5의 경우도 마찬가지로 #2와 #6번의 현탁배양 세포를 sucrose가 제거된 배지에서 배양하여 이리도 바이러스 항원 단백질의 발현을 유도한 후, 현탁배양 세포로부터 단백질을 추출하여 pJKB13에서 수행한 것과 동일한 방법으로 SDS-PAGE와 Western blot 분석을 수행하였다. 그 결과 #####에서 매우 희미한 band가 검출되었고, 이를 통하여 pJKB5에서의 이리도 바이러스 항원 단백질이 매우 약하게 발현됨을 확인 할 수 있었음 (그림 10).

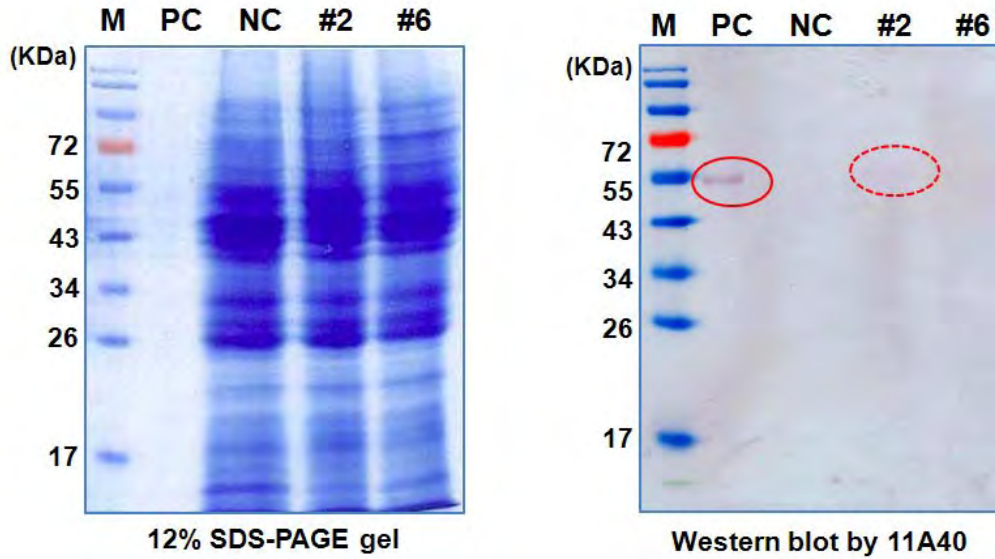


그림 10. pJKB5 형질전환 세포주의 Western blot 분석 결과

pJKB13의 #3, #6, #7번과 pJKB5의 #1, #2, #4, #6 형질전환 세포주의 Western blot 분석 결과를 통하여, 식물 유래 코돈 최적화를 통해 합성한 이리도 바이러스 항원 단백질 (sMCP, pJKB13)의 발현량이 코돈 최적화를 하지 않은 이리도 바이러스 항원 단백질 (original MCP, pJKB5)의 발현량보다 월등하게 높음을 확인 할 수 있었음 (그림 11).

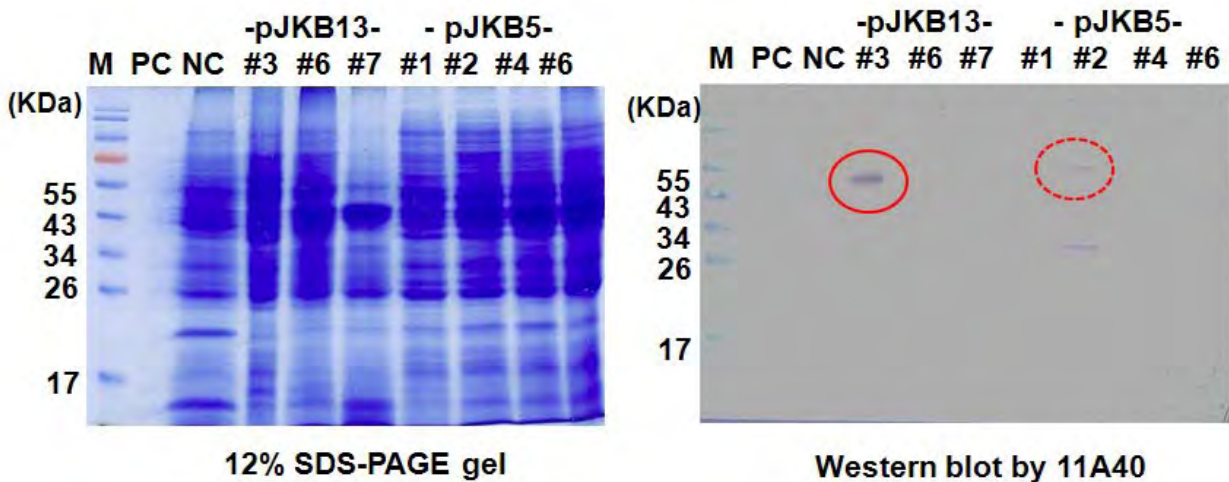


그림 11. pJKB13과 pJKB5 형질전환 세포주에서의 발현량 비교

(2) 고발현 세포주의 현탁세포 유도 및 배양 조건 확립

(가) 항원단백질 고발현 세포주를 이용하여 현탁세포 유도

Western blot 분석을 통하여 이리도 바이러스 항원 단백질의 고발현이 확인된 세포주 pJKB13-#3을 대량배양 하기 위하여, 현탁배양 세포를 300 ml flask 수준에서 1L, 2L flask로

scale up을 하기 위한 조건을 수립하였음. 벼 현탁배양 세포는 28℃, 110rpm으로 24시간 암배양 하였음 (그림 12).

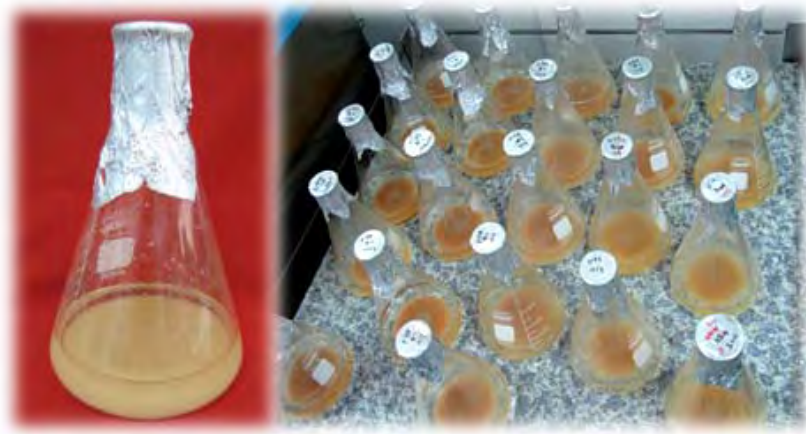


그림 12. pJKB13과 pJKB5 형질전환체 켈러스의 현탁세포 배양

(나) 최적 현탁배양조건 확립함

(3). 어류 경구투여용 식물 현탁세포 생산

(가) 2L 규모의 생물반응기를 이용한 경구투여용 식물현탁세포 생산

실험 동물 항원성 검정을 위한 세포주로 선발된 pJKB13-#3의 벼 켈러스를 어류 (넙치)에 경구 투여하여 이리도 바이러스 항원 단백질 (sMCP)의 항원성 검정을 위해서는 다량의 항원 단백질 (sMCP)이 요구된다. pJKB13-#3 벼 현탁세포의 대량 배양을 위하여 현재 air-bubble type bioreactor의 운용기술을 확립하였음. 현재 pJKB13-#3 벼 켈러스는 bioreactor (생물반응기)에 적용하기 위한 배양 중이다. (그림 13).



그림 13. 생물반응기를 이용한 경구투여용 식물현탁세포 생산

(나) 생물반응기를 이용하여 생산한 식물현탁세포의 생산

10L 생물반응기에 2L의 배지를 넣고, 100g (fresh cell weight)의 pJKB13-#3를 접종하

면, 배양 7일 후에 약 300g (fresh cell weight)의 세포로 증식하게 됨을 확인 하였음. 이를 이용하여 10L 생물반응기 4개를 이용하여 생산한 pJKB13-#3 헌탁배양 세포 약 1.2Kg (fresh cell weight)을 확보 하였고, 이들 중 일부는 동결건조 과정이 진행중 이다.

다. 제3세부과제 연구내용 및 연구결과

(1) Rclp promoter 색소체 형질전환체 제작

(가) 이리도바이러스 캡시드 유전자의 GFP operon 및 fusion 형질전환 벡터 제작

- 전년도에 제작한 rclp promoter가 포함된 색소체 형질전환 기본벡터(TIArclp::synIR1, 그림 1A)에 추가로 GFP가 operon 타입으로 연결된 TIArclp::synIR2와 fusion 타입으로 연결된 TIArclp::synIR3를 각각 추가 제작하였음.

- TIArclp::synIR2는 기본벡터인 TIArclp::synIR1로부터 mGFP유전자 (stop 코돈 포함) 이후에 anchor가 제거된 full-length의 이리도캡시드 유전자(start 코돈 포함)를 연속하여 제작하였음 (그림 1B).

- TIArclp::synIR3는 TIArclp::synIR1의 mGFP유전자에서 stop 코돈을 제거한 후 6개의 His tag를 링크시켜 full-length의 이리도캡시드 유전자(start 코돈 포함)가 연결된 벡터를 제작하였음 (그림 1C).

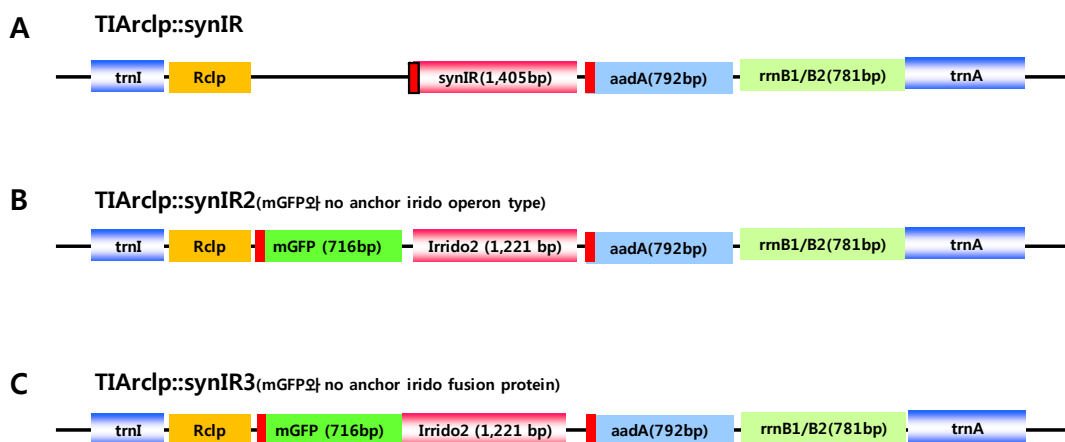


그림 1. 이리도바이러스 캡시드 유전자의 GFP operon 및 fusion 형질전환 벡터 제작

(나) 이리도바이러스 캡시드 유전자의 색소체 형질전환담배 개발

항생제가 첨가되지 않은 MS 배지에서 발아 후 5주 이상 기내에서 배양된 담배 잎을 Rmop 배지 위에서 치상한 후 Bio-Rad 사 PDS-1000 기종을 사용하여 형질전환을 시행하였음. CaCl₂ 와 spermidine을 사용하여 형질전환 plasmid 벡터를 0.6 um gold particle로 coating 하였음. 무균 상태 chamber 내 vacuum은 28 까지 올리고, 압력은 1100 psi, 거리는 9cm로 하여 배지 위에 치상된 담배 잎에 bombarding 하였음. Bombardment된 담배 잎을 2일간 동일 배지에 배양한 후, 5mm X 5mm 절단하여 Rmop sp 선발배지에서 6-7주 배양하여 저항성 shoot을 유도 하였음. Spectinomycin 저항성 배지에서 유도된 shoot는 3mm X 3mm 크기로 절단하여 동일한 선발배지에서 재분화를 통하여 저항성 shoot을 다시 유도하였음. 이와 같이 선발 배지에서

재분화를 반복하여 도입된 유전자의 homoplasmy를 높여주었음.

(다) 이리도바이러스 캡시드 유전자 색소체 형질전환담배 GFP 활성검증

항생제 첨가 배지에서 재분화된 식물체가 목표의 유전자가 도입된 형질전환체인지를 확인하기 위하여 GFP 형광분석을 수행하였음. GFP가 포함되지 않은 TIArcIp::synIR1 형질전환체의 경우 콘트롤인 samsun 식물체와 형질전환체 사이에 형광차이가 없었음 (그림 2A). GFP 단백질이 operon 타입으로 발현하는 TIArcIp::synIR2 형질전환체의 경우 그림 2B에서 보여지는 것처럼 samsun 식물체에 비해 강한 형광을 볼 수 있었음. 이리도 캡시드 단백질과 GFP가 fusion 단백질로 발현되는 TIArcIp::synIR3 형질전환체의 경우 GFP가 단독으로 발현하는 TIArcIp::synIR2 형질전환체에 비해서는 약하지만 콘트롤과 비교하여 뚜렷이 구별되는 형광을 확인하였음 (그림 2C).

A



B



C



그림 2. 이리도바이러스 캡시드 유전자 형질전환담배의 GFP 활성

(라) 이리도바이러스 캡시드 유전자 형질전환담배 genomic DNA PCR 검증

GFP 형광분석방법의 추가로 형질전환체를 검증하기 위하여 각 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 벡터내 trn 유전자 특이적 primer로 PCR을 수행하였음. 이리도바이러스 캡시드 유전자가 단독으로 발현하는 TIArclp::synIR1 형질전환체의 경우 총 11개의 형질전환체가 선발되었음. 이리도 유전자가 GFP 단백질과 operon 또는 fusion 타입으로 발현하는 TIArclp::synIR2와 TIArclp::synIR3 형질전환체는 각각 3개와 18개체가 선발되었음 (그림 3).

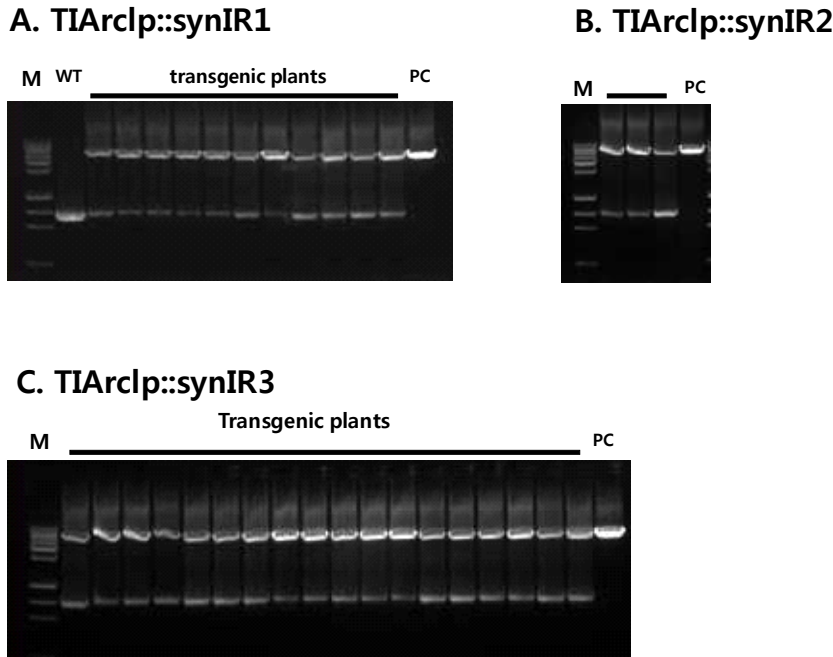


그림 3. 이리도바이러스 캡시드 유전자 형질전환담배의 genomic DNA PCR 검증

(마) 형질전환담배에서 이리도바이러스 캡시드 유전자의 transcript 검출

GFP 형광분석과 genomic DNA PCR로 확인된 형질전환체들을 대상으로 total RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후 PCR을 수행하였음. 이리도바이러스 캡시드 유전자 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 결과 대부분의 형질전환체에서 이리도바이러스 캡시드 유전자의 transcript가 검출되었음 (그림 4). 따라서 이리도바이러스 캡시드 유전자가 담배에서 RNA 수준으로 문제없이 발현되는 것을 확인하였음.

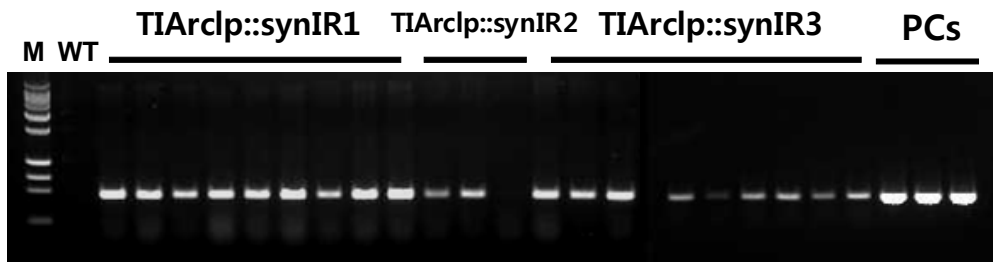


그림 4. 이리도바이러스 캡시드 유전자 형질전환 담배의 RT-PCR 분석

(2) CaMV 35S promoter 핵형질전환체 제작

(가) 이리도바이러스 캡시드 유전자의 핵형질전환 벡터제작

- 이리도바이러스 캡시드 유전자의 담배 핵형질전환체를 개발하기위한 벡터를 제작하였음. pHC30 벡터골격에 이리도바이러스 캡시드 유전자가 CaMV35 프로모터와 Nos 터미네이터 조절하에 발현되도록 그림 5와 같은 벡터를 제작하였음.

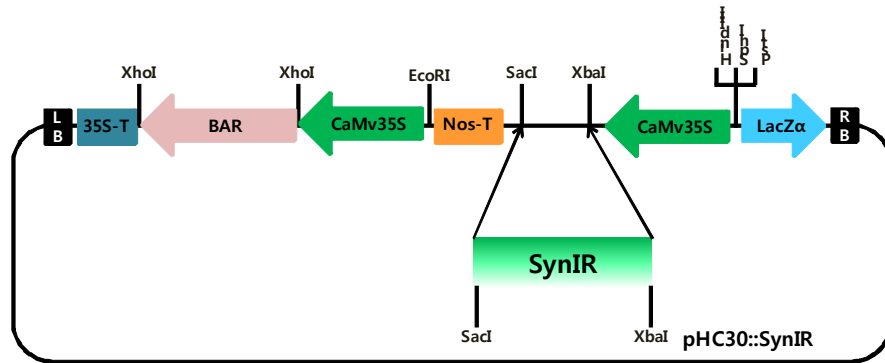


그림 5. 이리도바이러스 캡시드 유전자의 핵형질전환 벡터

(나) 이리도바이러스 캡시드 유전자의 핵형질전환 담배식물체 개발

이리도바이러스 캡시드 유전자가 담배 핵게놈으로 도입되어 발현되는 형질전환체를 제조하고자 하였음. 담배 코돈에 맞게 최적화하여서 염기서열을 확인 한 후 선발마커로서 bar 유전자를 사용하여 형질전환용 최종벡터 pHC30::synirido를 제작하였음. pHC30::synirido 벡터를 아그로박테리움-매개 진공 침윤법에 따라 5~6주 된 무균배양된 담배유식물체의 위에서부터 3~4번째 잎을 사용하였음. 아그로박테리움과 공동배양 후 잎 절편체를 멸균된 paper로 닦은 후, Murashige & Skoog Shoot Multiplication Medium B배지에서 3일동안 암배양하였음. 공동배양 3일 후 distilled water로 아그로박테리움을 씻어준 후 Murashige & Skoog Shoot Multiplication Medium B배지에 phosphinothricin 항생제가 포함된 선발배지에서 3~4주동안 명배양하였음. 3주 간격으로 새로운 배지로 계대배양하였으며, 선발배지에서 유도된 shoot는 뿌리 유도를 위해 MS배지로 옮겨 약 2~3주후 화분으로 옮겨 순화시켜 재배하였음.

(다) 이리도바이러스 캡시드 유전자 핵형질전환 담배식물체 genomic DNA PCR 검증

형질전환체를 검증하기위하여 각 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 pHC30 벡터 특이적인 primer로 PCR을 수행하였음. 또한 형질전환 매개체로 사용한 Agrobacterium 오염을 확인하기위해 Agrobacterium specific primer를 이용하여 PCR을 수행하였음. 그림 6 결과에서 보듯이 이리도 유전자가 삽입된 걸로 확인된 개체 중 1번과 8번에서 Agrobacterium이 오염되었음이 확인되었음. 따라서 최종적으로 그림 6A에 붉은 원으로 표시된 형질전환 라인(3, 4, 6, 10, 11)을 선발하여 이후의 실험을 실시하였음.

질이 발현되는지 확인하기 위해 각 형질전환체로부터 단백질을 추출하여 GFP antibody를 이용하여 ELISA 분석을 수행하였음. Wild type인 samsun과 nicotine-free 품종에서는 GFP antibody에 대한 signal이 거의 없었지만 각각의 형질전환체의 GFP signal을 rmp (tobacco 16S rDNA gene promoter)와 rclp (rice clp gene promoter) 형질전환체와 비교할 때 비슷하거나 (line # NF 2.1.2, SS 3.3.1), 약간 낮았다 (line # NF 1.4.1, NF 2.1.4, SS 2.2.3, SS 2.5.1, SS 2.4.1).

본 연구결과를 토대로 효모의 gal10 프로모터가 담배 색소체에서도 constitutive하고 강하게 발현됨이 확인되어 식물의 색소체에서 대상유전자를 발현시키는데 유용하게 사용될 수 있는 프로모터임이 증명되었음.

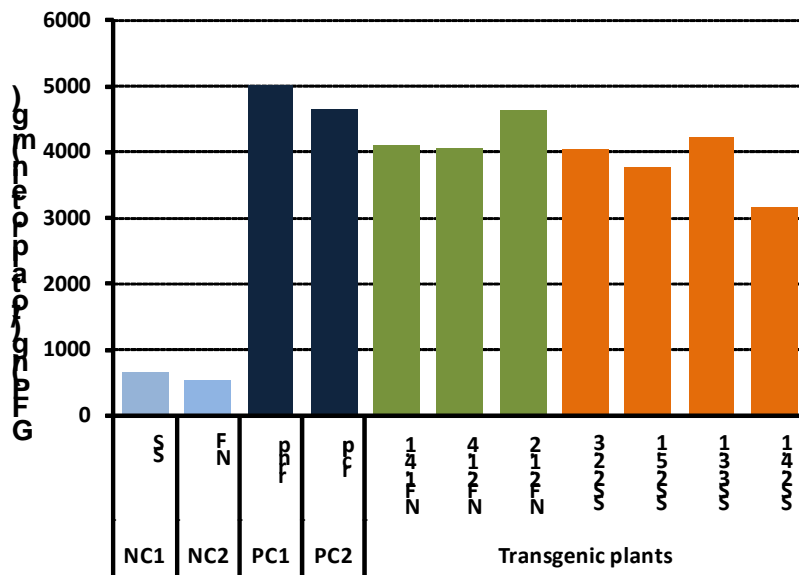


그림 8. Gal10 프로모터 형질전환 담배의 GFP ELISA 분석

3. 제3차년도 연구내용 및 연구결과
 가. 제1세부과제 연구내용 및 연구결과

(1) chitosan 대량생산을 위한 batch production system 준비

(가) 최적의 chitosan candidate의 대량생산 및 이를 이용한 사료준비

- 2차년도의 결과를 바탕으로 chitosan formulae는 chitosan (low molecular weight, Aldrich)을 이용한 resin 형태의 formulae를 준비하였고 이를 이용하여 용이하게 대량의 resin formulae를 준비함
- 이 결정화된 resin은 최종농도 약 0.5 - 1% 범위내에서 adjuvant로서의 기능이 있음을 밝힌 바, 이를 근거로 사료와 혼합을 통한 formulation을 대량 준비하였음.
- 대략의 환산을 통해 계산한 바, chitosan resin 약 5ml suspension (가격으로 환산할 경우 약 100원 이하의 비용이 소용됨)으로 치어 (2-3cm 기준) 약 100마리분의 사료를 준비할 수 있는 것으로 확인 됨.

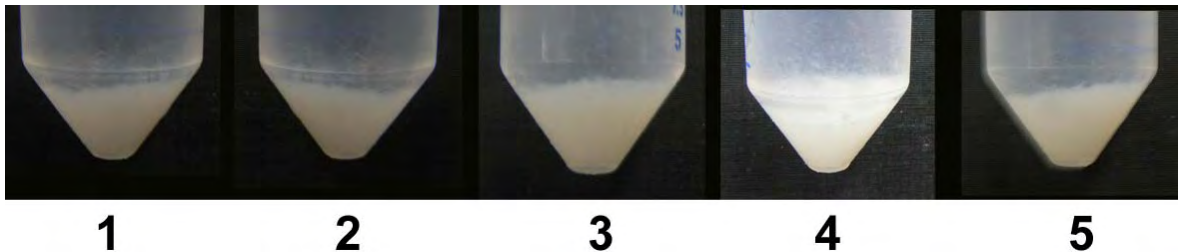


그림 1. 치어 (2-3cm 기준) 약 100마리분의 사료를 생산하는데 소비되는 chitosan resin의 양 (tube당 약 5ml). 5회에 걸쳐 준비된 resin의 양이 고르게 생산됨을 보여주는 그림. Lane1-5: 각각의 batch에 의해 생산된 resin의 양.

(나) 소규모의 임상실험 실시

- 소규모의 임상실험 실시시를 위해 다음과 같이 실험을 준비함.
- 먼저 항원 고발현된 rice callus 현탁배양액 동결건조분말 (이후 배양액)내의 재조합 항원의 농도측정을 위해 Western blot을 실시함. 즉, 대장균에서 발현-분리된 재조합항원을 standard로 삼고 배양액내의 재조합 항원의 농도를 측정함
- 먼저 아래 그림 2와 같이 /1000, /500, /100, /50의 희석으로 standard를 준비하고 시료를 /50, /20, /10, /5의 비율로 희석한 다음 2X sample buffer와 혼합 후 시료를 준비함.
- 그 후, 10% SDS-PAGE에서 전개하고 PVDF membrane으로 transfer하고 1차 항체 (항-irido capsid Ab) 및 2차항체 (Goat anti-mouse IgG-HRP conjugated)를 반응하고 그 발색정도를 densitometer로 측정하여 농도를 환산하였음. 그 결과, 배양액에서는 301.6ug of rMCP / 0.1g 배양액의 농도로 항원이 발현됨을 확인함

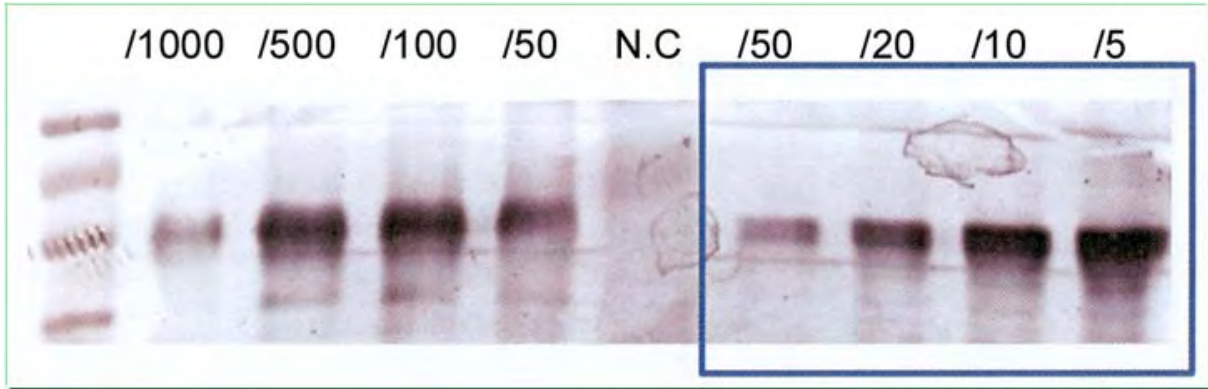


그림 2. 배양액에서 발현된 재조합 항원의 농도를 측정하기 위해 실시한 Western blot의 결과. Boxed: 대장균에서 발현 및 순수분리한 재조합 capsid 단백질 standard.

- 이 결과를 기준으로 배양액 시료 10%를 기준으로 1ug/어체중량 10g의 농도가 되도록 사료를 준비한 다음 아래 표 1과 같이 항원이 고발현된 배양액을 혼합, 준비하여 급이실험을 실시하였음.
- 실험에 사용된 치어는 돌돔 3-5cm 체장으로 실험 전 임의로 치어를 선별하여 간 및 비장에서 PCR을 실시하여 이리도바이러스에 감염되지 않은 개체를 사용하였고 추가로 혈청내 항이리도바이러스 항체의 존재 여부도 screening하여 실험에 공하였음



표 1. 경구투여된 배양액내의 항원에 의해 어체로부터 항체생성이 유도되는지 알아보기 위한 실험

Groups	Formulae	Trial number (fish)
#1	Rice callus (W/T) 10% (-) control	10
#2	Callus (transformant) sample total 10%	10
#3	Callus (transformant) sample total 30%	10

- 급이 종료 후 돌돔치어를 희생하여 채혈한 다음 혈청내 항체의 생성여부를 ELISA로 측정함. 즉, 대장균에서 준비한 재조합항원을 1ug/90ul/well의 농도로 준비하여 항원을 96-well plate에 coating 후 돌돔의 혈청을 1차항체로, mouse anti-bream IgM를 2차항체로, 그리고 goat anti-mouse IgG-HRP conjugated를 3차항체로 하여 ELISA를 실시함.
- 그 결과, 아래 그림 3과 같이 통계적으로 유의성있게 항체가가 상승함을 보여줌.

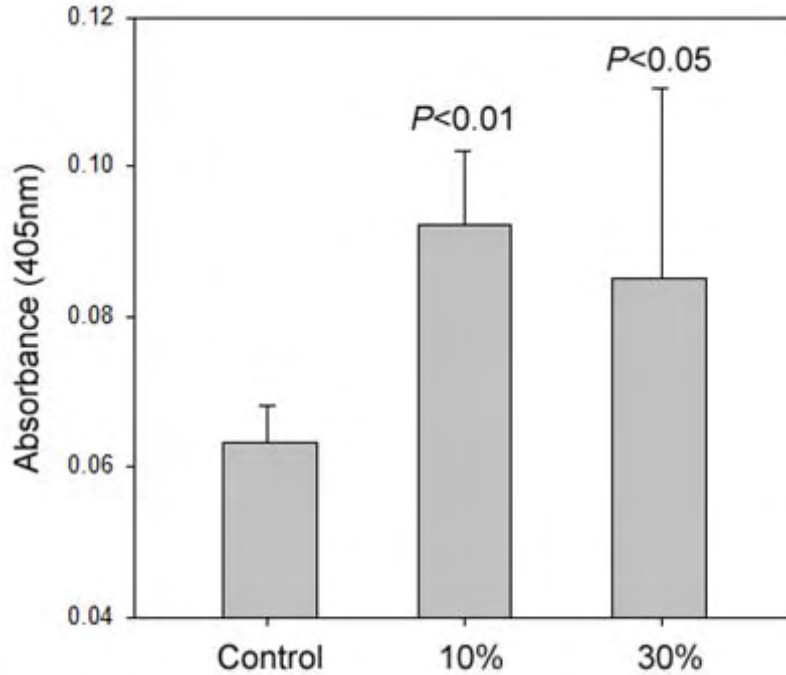


그림 3. 항원고발현된 배양액을 급이한 후 어체내에서 항체 생성여부를 확인한 ELISA 결과를 도식화. 10% 투여군과 30% 투여 실험군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의성있게 ($P<0.01$, 0.05) 증가함을 보여주는 그림.

- 통계적으로는 유의성있게 항체가 상승하였으나 그 증가정도가 다소 약함으로 인해 이리도바이러스 공격접종에서는 모든 개체가 방어능을 보이지 못하였음. 즉, 3개의 group에 이리도바이러스를 1×10^6 virus copy/ml/tank의 농도로 감염시키고 1주일간 치사율을 측정함. 그 결과, 3개의 group에서 모두 100% 치사율을 보여 방어능이 이루어지지 않음을 알 수 있었음.

(다) 중대규모의 임상2차 실험 실시

- 이에 더 고농도의 항원을 급이함으로써 항체를 상승시켜 방어능을 보일 수 있도록 2차 실험을 준비함
- 즉, 아래 표 2와 같이 formulae를 준비하여 급이를 실시함

Groups	Formulae	Trial number (fish)
#1	Callus (transformant) sample total 10%	10
#2	Callus (transformant) sample total 20%	10
#3	Callus (transformant) sample total 30%	10
#4	Rice callus (W/T) 10%	10
	(-) control	

- 이때의 항원농도는 10%를 기준으로 이전의 실험의 3배 농도에 준하게 준비함. 즉, 배양액 시료 10%를 기준으로 3ug/어체중량 10g의 농도가 되도록 사료를 준비한 다음 항원이 고발현된 배양액을 혼합, 준비하여 급이실험을 실시하였음
- 급이 후 항체가 측정은 동일한 방법으로 실시하였음. 그 결과, 아래 그림 4와 같이 통계적으로 유의성있게 항체가가 상승함을 볼 수 있었음

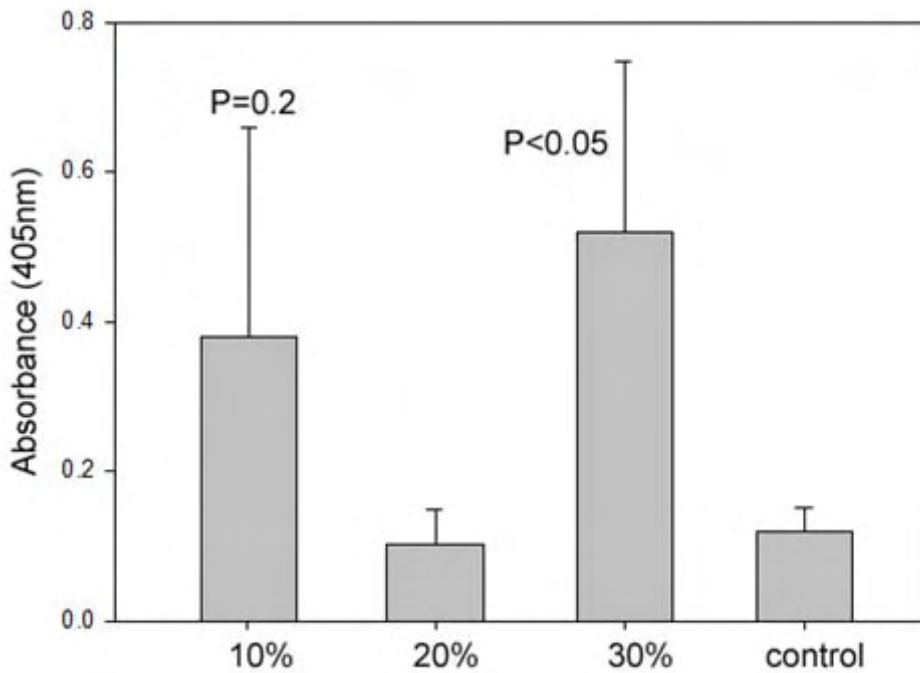


그림 4. 항원고발현된 배양액을 급이한 후 어체내에서 항체 생성여부를 확인한 ELISA 결과를 도식화. 10% 투여군과 30% 투여 실험군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의성있게 ($P=0.2$ 또는 <0.05) 증가함을 보여주는 그림.

- 같은방법으로 4개의 group 개체들에 대해 공격접종을 실시하고 누적치사율을 조사함. 그 결과, 아래의 표 3과 같이 항체가가 형성된 group (#1과 #3)에서 통계적으로 유의성있게 방어능을 보여줌.

표 4. Viral challenge 후 각 group별 누적치사율의 비교.

Groups	Survivors after challenge
	(1×10^6 virus copy/ml/tank)
#1	8/10*
#2	0/10
#3	9/10*
#4 (control)	0/10

* two-sided P value < 0.001 on Fisher's exact test.

(2) 시제품 생산을 위한 보관-유효기간 설정

- 항원 고발현 배양액은 이미 기 동결건조된 터이라 그 보관성이 다른 formulae에 비해 월등히 우수할 것으로 예상됨. 실제 그 보관 기간에 준한 재조합 항원의 농도를 개월별로 조사하여 그 유효성을 확인함
- 즉, 1ml conical tube에 배양액을 담고 냉장보관 상태로 6개월 보관하고 매월 시료를 채취하여 유효항원농도의 변화추이를 관찰함
- 그 결과, 아래 표 5와 같이 통계적으로 전혀 유의성없게 항원의 농도가 일정수준으로 유지됨을 알 수 있었음

표 5. 냉장보관 기간별 시료내 (배양액) 재조합 항원의 농도변화

	1개월	2개월	3개월	4개월	5개월	6개월
항원농도	311ug/0.1g	306ug/0.1g	299ug/0.1g	303ug/0.1g	307ug/0.1g	297ug/0.1g
비교 (통계적 유의성)	없음	없음	없음	없음	없음	없음

나. 제2세부과제 연구내용 및 연구결과

(1) 항원 고발현 식물세포의 대량 배양

(가) 항원 고발현 식물세포의 재분화 및 순화

이리도바이러스 고발현 세포주의 항원성이 확인된 pJKB5 (original MCP)와 pJKB13 (sMCP)의 종자를 확보하기 위하여 형질전환 캘러스로부터 재분화를 유도하였음. 재분화에 사용된 MSRE 배지에는 MS salt, MS vitamin, 50g/L의 sucrose, 20g/L의 sorbitol, 2mg/L의 Kinetin, 0.1mg/L의 NAA 와 16g/L의 agar가 포함되어있다. 상기의 배지에 형질전환 캘러스를 4주 ~ 6주정도 배양하면 캘러스로부터 잎이 분화하게 되고 (그림 1 A), 이를 MS salt, MS vitamin와 30g/L의 sucrose와 3g/L의 agar가 포함된 MSR로 옮겨주면 뿌리가 생성되게 된다 (그림 1 B). 뿌리의 형성이 확인되면, 기내 배양하던 벼로부터 배지와 agar를 완전히 제거하고 순화 과정을 거친 후, 종자 확보를 위하여 LMO 시설로 지정받은 온실에서 대량 재배하였음 (그림 1 C).

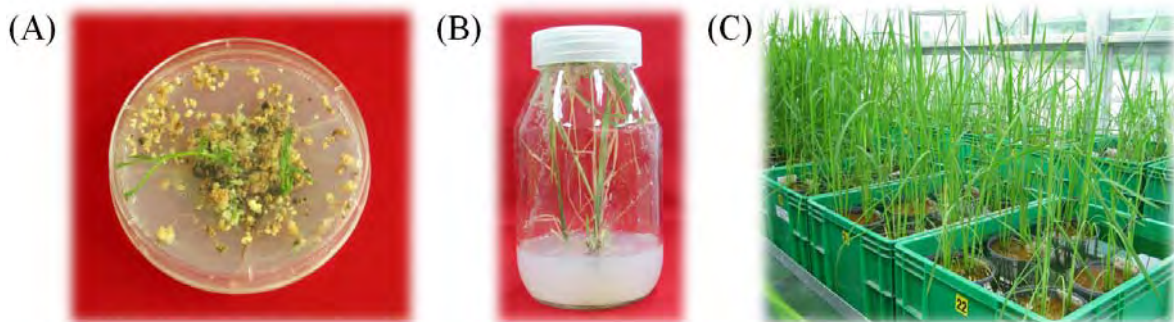


그림 1. 형질전환 캘러스의 재분화 및 순화

(나) 5L 규모의 생물반응기 최적조건 확립

이리도바이러스 항원단백질 발현 세포주인 pJKB5 (original MCP)와 pJKB13 (sMCP)의 항원단백질 발현 비교 실험 결과를 통하여, 식물유래 코돈 최적화를 통해 합성한 이리도바이러스 항원 유전자가(sMCP) 포함된 pJKB13-4b cell line의 발현량이 월등히 높다는 것을 확인 하였었음 (2차년도에 결과보고 완료). 그러므로 목적동물의 경구투여를 위한 대량배양으로는 pJKB13-4b cell line과 Negative control로 사용될 N75 (empty vector만 형질전환시킨 cell line)의 두가지 cell line을 선별하였음. 본 연구에서 사용한 대량배양 시스템으로는 최대 10L용량에 working volume 5L인 balloon type bubble 바이오리액터를 사용하였음 (그림 2).



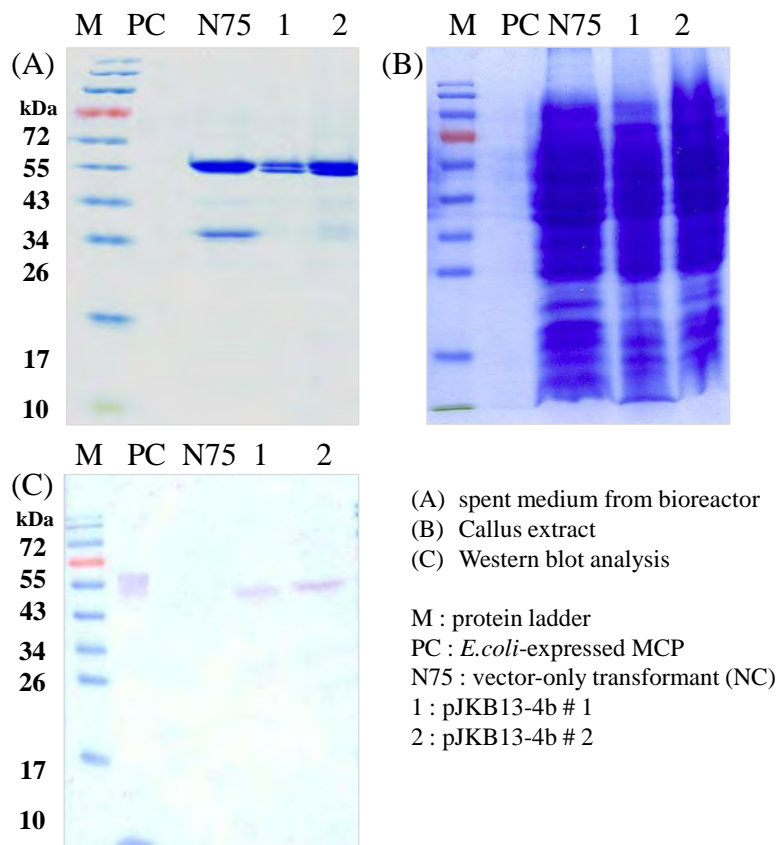
(그림 2) Balloon type bubble 바이오리액터

본 연구에서 선택한 balloon type bubble 바이오리액터에서 벼현탁배양 세포의 배양 조건과 항원단백질 발현 조건을 확립하기 위하여, pJKB13-4b와 N75 현탁배양 세포를 1 L flask에서 working volume 300 ml로 배양하여 30g의 biomass를 확보하여 바이오리액터에 접종하였음. 접종 후 7일째, 배양액과 벼 현탁배양 세포를 수거하여, 배양 배지는 진공펌프를 이용하여 제거하고, 벼 현탁세포의 fresh cell weight (FCW)를 측정된 결과 평균적으로 약 250g/batch 였으며, 이는 7일 동안 8배 이상의 biomass가 증가하는 결과임을 확인 하였음. 바이오리액터에서 이리도바이러스 항원단백질의 발현이 유도 되는지를 확인하기 위하여, 상기의 방법으로 seed culture 한 벼 세포를 각각 2개의 바이오리액터에 접종하여 sucrose가 포함된 N6+S growth 배지에서 7일 동안 배양하고, 무균상태에서 바이오리액터로부터 배지를 완벽하게 제거한 후, 2 L의 sucrose가 제거된 N6-S를 넣고 7일 동안 추가 배양 하는 2-step culture 를 수행 하였음.

벼 세포를 N6-S 배지에서 배양하게 되면 벼에 존재하는 RAmy3D promoter에 의하여 α -amylase의 발현이 유도되게 되는데 이는 SDS-PAGE 상에서 과발현 되는 44kDa과 46kDa

의 두 band로 확인할 수 있으며, 이를 통하여 본 연구에서 사용된 RAmy3D promoter에 의해 발현이 유도되는 항원단백질의 발현 또한 예측할 수 있게 된다. 따라서 RAmy3D promoter의 발현 여부를 확인하기 위하여 먼저 1 mL의 배양액을 수거하여 4°C, 12,000 rpm으로 10분간 원심분리 한 후, 50 μ l의 상등액을 취하여 SDS-PAGE를 수행하였음. 그림 3 (A)에서 볼 수 있듯이, N75와 2개의 pJKB13-4b 바이오리액터에서 모두 α -amylase의 과발현이 확인되었으며, 이를 통하여 RAmy3D promoter가 작동 했음을 확인할 수 있었음.

이리도바이러스 항원단백질의 발현을 확인하기 위하여, N6-S 배지에서 배양한 배양 세포 1g을 액체질소와 막자사발을 이용하여 분쇄하고, protein extraction buffer로 단백질을 추출한 후 500 μ g의 단백질을 사용하여 12% SDS-PAGE gel에서 전기영동을 하였음 (그림 3 B). Positive control (PC)은 대장균 유래의 이리도바이러스 항원 단백질을 사용하였고, negative control (NC)로는 N75를 사용하였음. SDS-PAGE 후에 PVDF membrane에 단백질을 transfer 한 후, 11A40 단클론항체를 사용하여 Western blot analysis를 수행하였음. 그 결과 2개의 pJKB13-4b 바이오리액터에서 모두 이리도바이러스 항원단백질이 확인 되었음 (그림 3C). 이를 통하여 본 연구에 사용된 balloon type bubble 바이오리액터와 2-step culture 방법으로 배양한 현탁세포 배양의 biomass를 확보할 수 있음과 동시에, 이리도바이러스 항원단백질의 안정적인 발현 또한 이뤄질 수 있음을 확인하였음.



(그림 3) 바이오리액터를 이용한 항원단백질 생산

(다) 5L 바이옱렉터를 이욱한 경구투여용 식물 현탁세포 배양

바이옱렉터를 이욱한 목적동물 경구투여용 벼 현탁세포의 대량 배양 방법은 다음과 같다. 먼저 N75와 pJKB13-4b 두가지 cell line을 300 mL과 1 L flask에 배양하여 seed culture 를 한 후, 이를 바이옱렉터에 접종하여 scale up을 수행하였음. 7일 배양후에 1개의 바이옱렉터를 3개의 바이옱렉터로 나누어 다시 7일 ~ 10일간 배양하여 biomass를 충분히 확보 하였음. 7일 후, 바이옱렉터로부터 무균상태로 N6+S 배지를 제거하고, 2 L의 N6-S 배지를 부어 7일 동안 배양하여 이리도바이러스 항원단백질의 발현을 유도하였음. 항원 단백질 발현 여부는 N6-S 배지 첨가 7일 후 배양액을 취하여 SDS-PAGE 수행하여 α -amylase의 과발현 양상을 관찰함으로써 확인 하였음. 항원단백질 발현이 확인된 벼 현탁세포는 동결건조기를 이욱하여 동결건조 후 사용하기 전까지 -70°C에 보관 하였음 (그림 4).

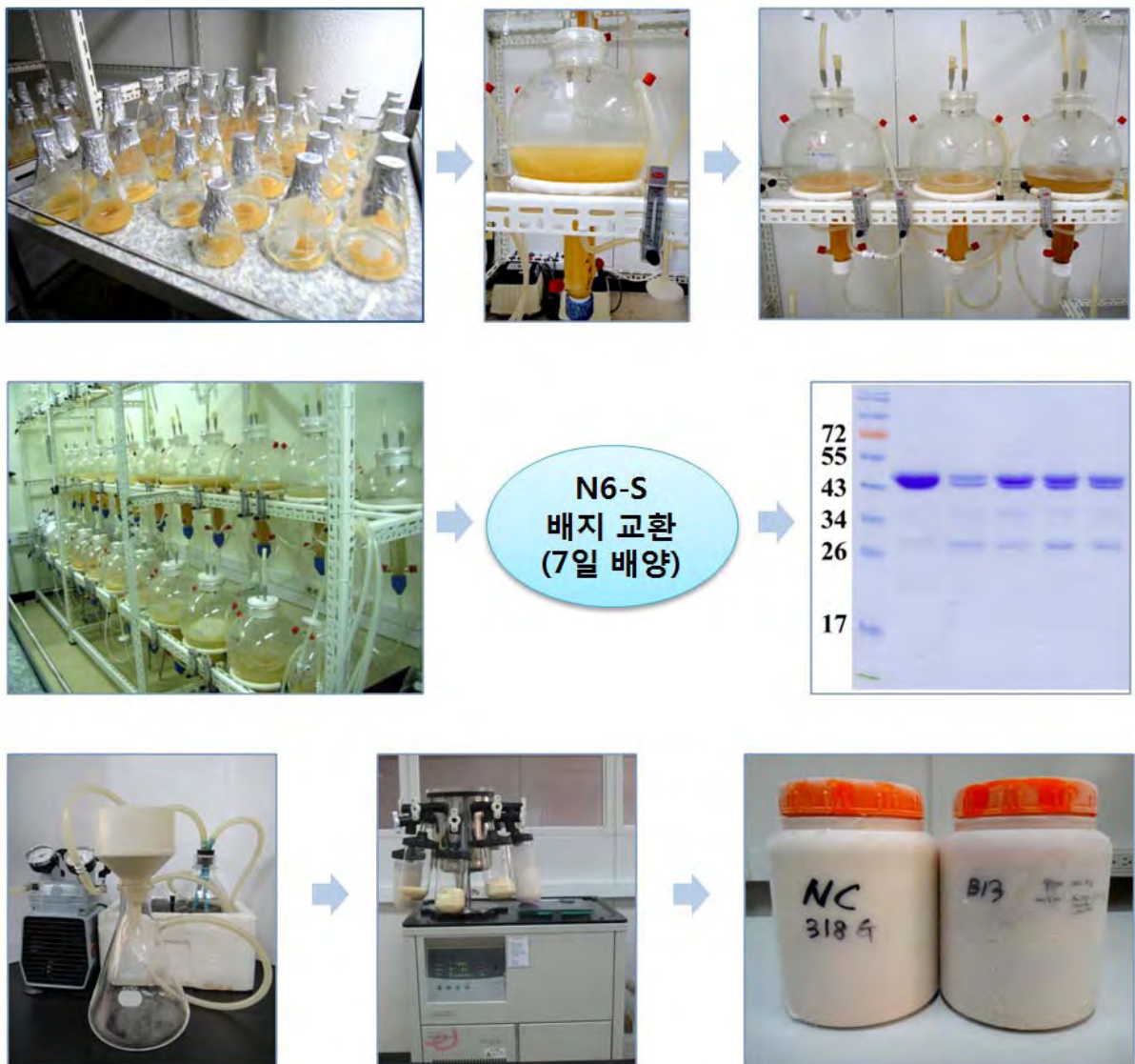


그림 4. 바이옱렉터를 이욱한 벼 세포 현탁배양 모식도

상기의 과정을 이용하여 목적동물에 경구투여용으로 사용될 N75와 pJKB13-4b 2가지 cell line을 대량 배양 하였고, 그 내용을 Table 1에 나타내었음.

Table 1. 바이오리액터를 이용한 이리도바이러스 항원단백질 고발현 세포주 대량 배양

- 바이오리액터를 이용한 이리도바이러스 항원단백질 고발현 세포주의 대량배양-1

일 시	Cell line	바이오리액터 배양기 수	FCW	SDS-PAGE
2011.5.2	N75	2	720g	
2011.5.4	pJKB13-4b	2	560g	
2011.5.8	pJKB13-4b	5	1343g	
2011.5.11	pJKB13-4b	3	875g	
2011.5.18	pJKB13-4b	3	924g	
	N75	2	571g	

• 바이옱렉터를 이용한 이리도바이러스 항원단백질 고발현 세포주의 대량배양-2

일 시	Cell line	바이옱렉터 배양기 수	FCW	SDS-PAGE
2011.5.29	N75	3	336g	
2011.6.5	N75	2	541g	
2011.6.14	pJKB13-4b	2	505g	
	N75	3	899g	
2011.6.28	pJKB13-4b	4	1305g	
2011.7.4	N75	4	1144g	

• 바이옱렉터를 이용한 이리도바이러스 항원단백질 고발현 세포주의 대량배양-3

일 시	Cell line	바이옱렉터 배양기 수	FCW	SDS-PAGE
2011.7.11	pJKB13-4b	2	496g	
2011.7.22	N75	3	732g	
2011.7.29	pJKB13-4b	1	240g	
2011.8.16	pJKB13-4b	2	498g	
2011.8.19	N75	3	768g	

• 바이옱렉터를 이용한 이리도바이러스 항원단백질 곁발현 세포주의 대량배양-4

일 시	Cell line	바이옱렉터 배양기 수	FCW	SDS-PAGE
2011.8.28	N75	5	976g	
2011.9.15	N75	2	592g	
2011.9.28	pJKB13-4b	3	611g	
2011.9.30	N75	4	1035g	
2011.10.2	N75	3	743g	

• 바이오리액터를 이용한 이리도바이러스 항원단백질 고발현 세포주의 대량배양-5

일 시	Cell line	바이오리액터 배양기 수	FCW	SDS-PAGE
2011.10.7	pJKB14 -4b	3	672g	
2011.10.18	N75	5	1148g	
2011.10.20	pJKB14 -4b	4	998g	
2011.10.24	N75	2	475g	
2011.10.27	pJKB14 -4b	4	1054g	

• 바이오투액터를 이용한 이리도바이러스 항원단백질 고발현 세포주의 대량배양-6

일 시	Cell line	바이오투액터 배양기 수	FCW	SDS-PAGE
2011.11.1	pJKB14-4b	2	413g	
2011.11.6	pJKB14-4b	3	686g	

본 연구팀에서 바이오투액터 배양을 통해 확보된 목적동물 경구투여용 벼 현탁세포의 fresh cell weight은 N75의 경우 10.68kg을, pJKB13-4b의 경우 11.18kg 임을 확인하였음.

다. 제3세부과제 연구내용 및 연구결과

(1) 이리도바이러스 캡시드 유전자 형질전환담배 genomic DNA PCR 검증

- GFP 형광분석방법의 추가로 형질전환체를 검증하기위하여 각 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 벡터내 trn 유전자 특이적 primer (trnIF3, trnAR1)로 PCR을 수행하였음. 이미 이전 연구에서 이리도바이러스 캡시드 유전자가 단독으로 발현하는 TIArclp::synIR1 형질전환체의 경우 총 11개의 형질전환체가 선발되었음. 이리도 유전자가 GFP 단백질과 operon 또는 fusion 타입으로 발현하는 TIArclp::synIR2와 TIArclp::synIR3 형질전환체는 각각 3개와 18개체가 선발되었음.

- 또한, T1세대에서 선발된 형질전환 담배식물체로부터 종자를 받아 항생제 선발을 거쳐 후으로 순화시킨 T2 식물체의 genomic DNA를 이용하여 PCR한 결과 한 라인에 적어도 5개 이상씩 개체를 보유하였음 (그림 1).

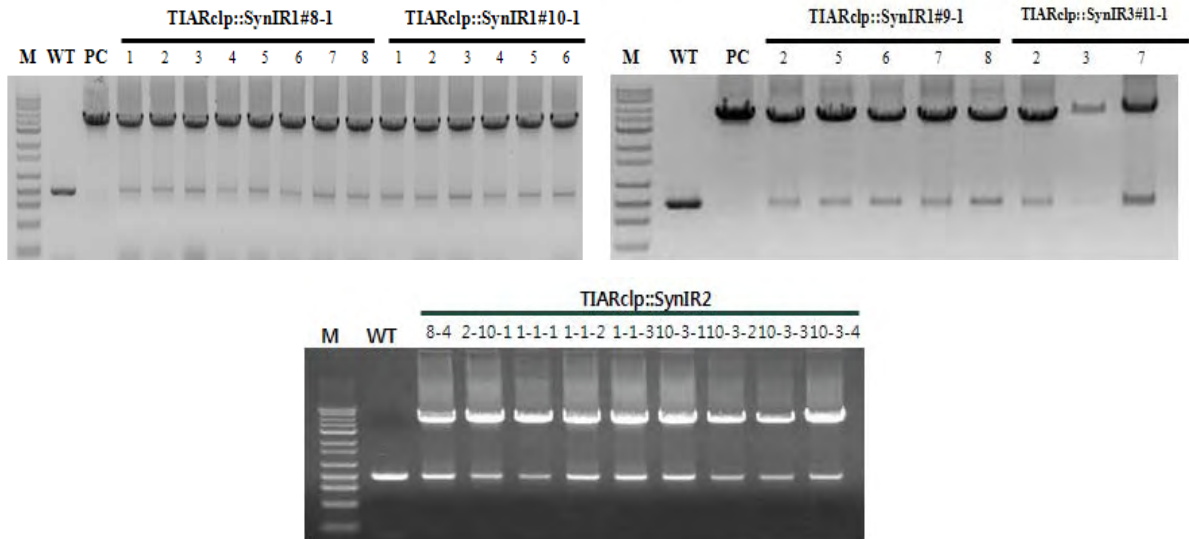


그림 1. 이리도바이러스 캡시드유전자 형질전환담배여부 검증 (T2세대)

(2) 형질전환담배에서 이리도바이러스 캡시드 유전자의 transcript 검출

- GFP 형광분석과 genomic DNA PCR로 확인된 형질전환체들을 대상으로 목표 유전자의 RNA 수준을 확인하고자 각 식물체로부터 total RNA를 추출하였음. 추출한 RNA를 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성한 후 이리도 바이러스에 specific한 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였음. 이리도바이러스 캡시드 유전자 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 결과 대부분의 T1세대의 담배형질전환체에서 이리도바이러스 캡시드 유전자의 transcript가 검출되었음.
- 또한, T2세대의 담배형질전환체에서 이리도 바이러스 캡시드 유전자가 RNA 수준에서 어느 정도 발현하는지 여부를 확인하기 위해 RT-PCR을 수행해본결과 형질전환체의 독립적인 라인들이 항상 발현하는 actin 유전자의 프라이머를 가지고 PCR을 한 결과와 비교했을때보다 2배이상 발현됨을 확인할 수 있었음 (그림 2).
- 따라서 이리도바이러스 캡시드 유전자가 담배에서 RNA 수준으로 문제없이 발현되는 것을 확인하였음.



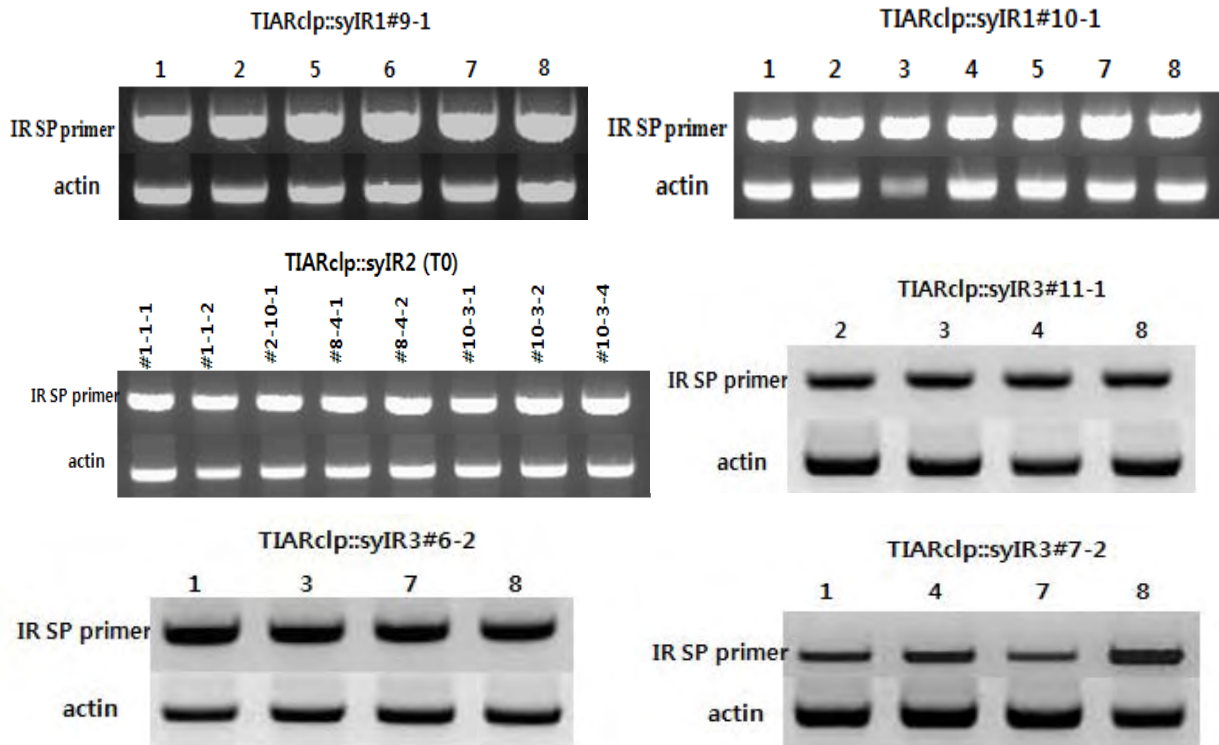
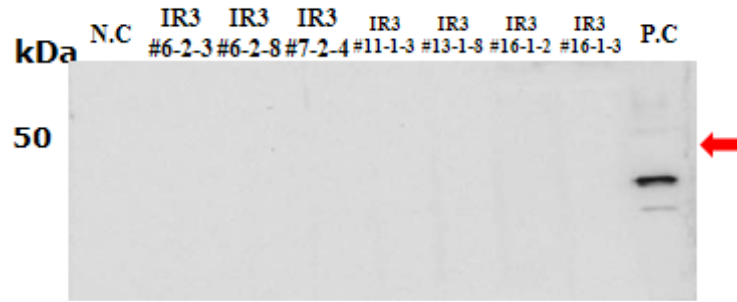


그림 2. 이리도바이러스 캡시드 유전자 형질전환 담배의 RT-PCR 분석 (T2세대)

(3) 색소체 형질전환체의 단백질 발현분석

- RT-PCR로 이리도바이러스 항원단백질의 transcript가 발현되는 식물체를 선발한 후 목표의 유전자가 단백질 level에서 발현하는지를 확인하기 위하여 western blot을 수행하였음.
- 식물체 잎에서 단백질 extraction buffer로 총 단백질을 추출하여 SDS-PAGE gel에 loading 한 후 0.2 μ m immun-blotTMPVDF membrane(Bio-Rad)에 transfer하여 5% skim milk로 blocking하고 1차 항체로는 (그림 3A) GFP 항체를 1:3000으로 희석하여 사용하였고, (그림 3B) 이리도바이러스 항원단백질의 항체를 1:200으로 희석하여 사용하였으며, 2차 항체로는 Goat anti-mouse HRP-labeled를 1:5000의 농도로 사용하였음.
- Chemiluminescent substrate인 supersignal westpico (Thermo scientific)로 반응 시킨 후 chemidocTMXRS+(Bio-Rad)를 통해서 확인하였음. 대장균에서 발현시켜 정제한 대조구 (PC, irido antigen)에서는 signal이 보였지만 이리도바이러스 항원단백질 색소체 형질전환체의 샘플에서는 signal이 보이지 않았음.
- 이는 담배식물체에서 이리도바이러스 항원단백질 transcript가 translation되어 단백질이 만들어지나 불안정하여 protease에 의해 쉽게 분해되거나 또는 western blot에 사용한 일차항체의 항체가 낮은 이유 때문일 것으로 생각됨.

A. GFP antibody



B. Irido antibody

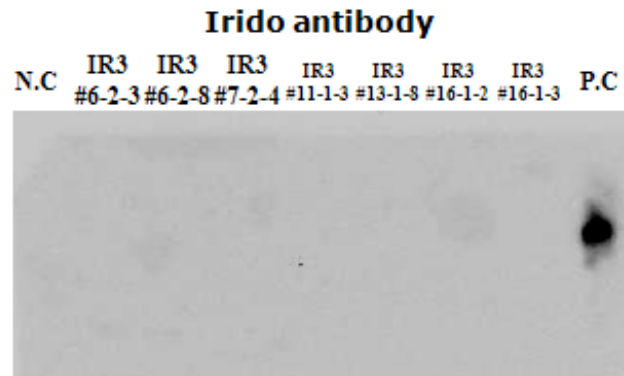


그림 3. 이리도바이러스 캡시드 유전자 형질전환 담배의 단백질 발현 분석

(4) 이리도바이러스 캡시드 유전자의 핵형질전환 담배식물체 단백질발현확인.

- 핵형질전환 담배식물체에서의 단백질발현은 상기 언급한대로 총 단백질을 추출하여 western blot을 실시함으로써 확인하였음.
- 대장균에서 발현시켜 정제한 대조구 (PC, irido antigen)에서는 signal이 보였지만 이리도바이러스 항원단백질 색소체 형질전환체의 샘플에서는 signal이 보이지 않았음 (그림 4).

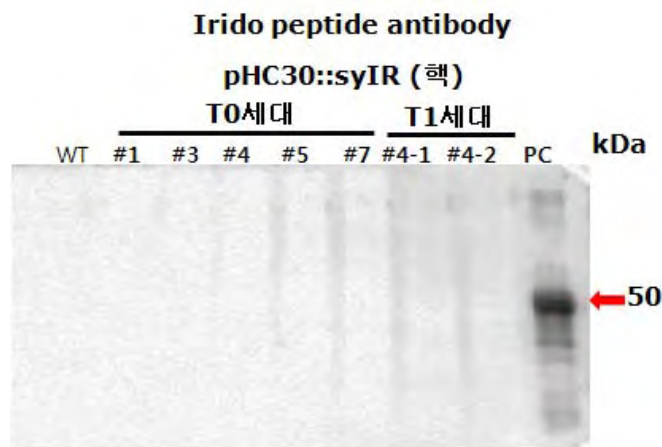


그림 4. 이리도바이러스 캡시드 유전자의 핵형질전환 담배의 단백질 발현 분석

(5) 고구마 배양세포에 이리도 바이러스 형질전환 및 발현 분석

- 본 연구에서는 담배 색소체를 활용하여 이리도바이러스 예방백신생산을 목적으로 연구를 수행하였음. 그러나 담배 색소체 형질전환체와 핵 형질전환체에서 transcription level과 단백질 level을 분석한 결과 transcription 발현은 확인되었으나 단백질 signal은 확인할 수 없었음. 대체 방안으로 이리도바이러스 유전자를 고구마 배양세포 캘러스에 형질전환하여 transcription 및 단백질 발현여부를 확인하고자 하였음.

가. 고구마 배양세포의 *Agrobacterium* 형질전환

- 이리도바이러스 유전자를 고구마 배양세포에 *Agrobacterium*을 이용하여 형질전환하였음.

- *Agrobacterium*을 200 μ M acetosylingone이 첨가된 YEP broth에 28 $^{\circ}$ C o/n으로 키운 후 3000 rpm, 20분동안 cell down 시켰다. cell을 100 μ M acetosylingone이 첨가된 MS1D 액체배지에 현탁시킨 후, 고구마 두 품종 울미와 황미를 현탁용액에 넣고 30분동안 암배양하였음. 암배양후 1분간 sonication처리즉시 petri dish에 캘러스에 과다하게 묻은 용액들을 제거하고 10 mg/ml acetosylingone이 첨가된 MS1D 고체배지에 2일동안 25 $^{\circ}$ C 암배양하였음. 이틀후, 멸균수로 3회 washing 후 항생제가 포함된 MS1D 고체배지에 한달정도 배양하였음.

- 고구마 배양세포의 항생제 선발은 1차당 20~25일정도 시간이 소요되며, 적어도 10차정도 항생제 선발이 이루어졌을때 homoplasmy를 얻을 수 있다고 함..

- 현재, 고구마 배양세포의 항생제 선발은 5차~6차까지 진행된 상태이며, 아직 heteroplasmy라 생각되어짐.

나. 형질전환 고구마 배양세포에서 RNA 발현 분석

- 형질전환한 고구마 배양세포로부터 이리도바이러스 유전자의 transcript를 확인하기 위하여 각 캘러스로부터 total RAN를 추출하여 cDNA를 합성한 후 이리도바이러스 유전자에 특이적인 프라이머로 PCR을 수행하였음 (그림 5)

- 이리도바이러스 유전자가 삽입된 고구마 배양세포에서의 transcript의 발현은 항시발현하는 actin 유전자의 프라이머를 가지고 PCR을 한 결과와 비교했을때 1.5~2배정도 발현이 강함을 확인할 수 있었음.

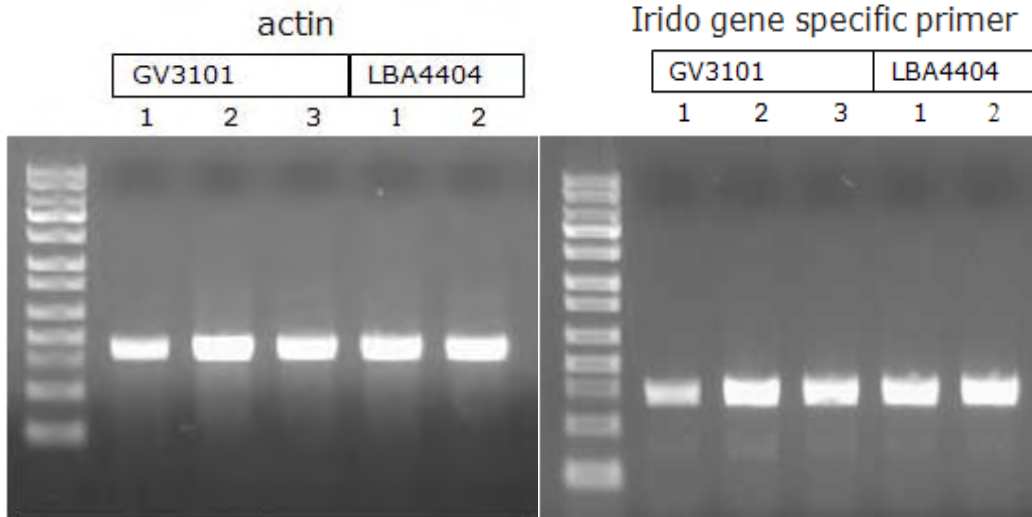


그림 5. 형질전환 고구마 배양세포에서의 RNA 발현 확인

다. 형질전환 고구마 배양세포에서 단백질 발현 분석

- 각 켈러스에서 RNA 수준이 높은 몇 개의 라인을 선발하여 이리도바이러스 항체를 이용하여 western blot으로 항원단백질의 발현을 확인하고자 하였음. 형질전환 고구마 켈러스를 단백질 extraction buffer로 총 단백질을 추출하여 SDS-PAGE gel에 loading 한 후 0.2 μ m immun-blotTMPVDF membrane(Bio-Rad)에 transfer하여 5% skim milk로 blocking하고 1차 항체로는 이리도바이러스 항원단백질의 항체를 1:200으로 희석하여 사용하였으며, 2차 항체로는 Goat anti-mouse HRP-labeled를 1:5000의 농도로 사용하였음 (그림 6).

- 단백질 signal을 확인한 결과 50 kDa의 위치에서 원하는 밴드를 확인할 수 있었음. 그러나 아직 고구마 배양세포의 항생제 선발은 5차~6차까지만 진행된 상태이며, heteroplasmy 상태이기에 선명한 밴드를 확인할 수 없을뿐더러, 발현 양 조차 약한 것 같아 항생제 선발이 좀 더 필요할 것으로 보여지며, 앞으로 항생제 선발에 대한 시간소요가 더 필요할 것으로 보여짐.

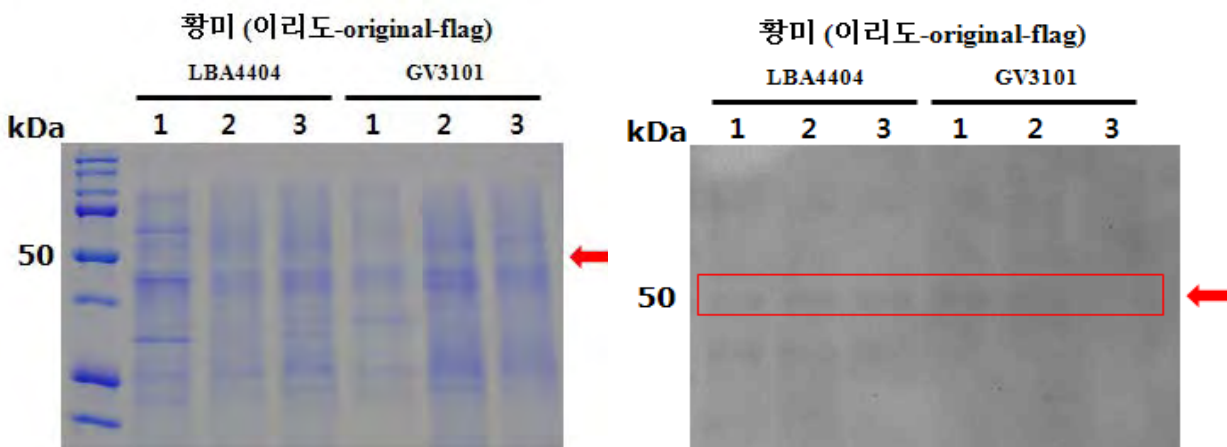


그림 6. 형질전환 고구마 배양세포에서의 단백질 발현 확인

(6) Viral expression을 이용한 이리도바이러스 항원단백질 생산

- 색소체 및 핵 형질전환체 제작과정은 형질전환부터 유전자가 고정된 세대를 얻기까지 최소 1년 이상이 소요됨. 그러나 viral expression을 이용한 단백질 생산 방법은 목표 단백질이 식물체에서 성공적으로 발현되는 지 여부를 단기간 내에 확인이 가능할 뿐만 아니라 단백질 생산 과정도 단축할 수 있는 장점이 있음.

- 실제로 Fraunhofer, USA 에서는 molecular farming을 통한 단백질 생산에 viral expression system을 통한 transient gene expression 방법을 사용하고 있으며 실제로 형질전환식물체 보다 더 많은 단백질을 생산하는 것으로 보고하고 있음.

- 따라서 본 연구에서도 *Nicotiana benthamiana* 잎에서 transient expression 방법으로 T7 프로모터를 이용한 viral expression system을 도입하여 이리도바이러스의 항원단백질을 발현하고자 하였음.

- 항원단백질의 발현여부를 쉽게 확인하기 위하여 이리도바이러스 항원단백질의 C-terminus에 FLAG tag을 도입한 유전자와 도입하지 유전자를 pfu을 이용한 PCR로 클로닝하였음. PCR로 증폭된 이리도바이러스 항원단백질 유전자를 *NcoI*과 *HindIII* 제한효소를 이용하여 pUC18 벡터로 도입하였음. 이리도바이러스 항원단백질 유전자와 함께 pUC18벡터에 들어있는 viral expression 구성요소인 TGB2, TGB3, CP 단백질을 함께 최종벡터 (pGD-AltMV)에 도입하기 위하여 *XmaI*과 *XbaI* 제한효소로 절단하였음. Viral expression 벡터인 pGD-AltMV 벡터도 같은 제한 효소인 *XmaI*과 *XbaI* 으로 절단 한 후 gel purification kit (Bioneer)로 정제하였음. 정제한 TGB2-TGB3-Noda-CP DNA fragment를 T4 DNA ligase (ELPIS)로 pGD-AltMV 벡터에 도입하여 최종 viral expression 벡터인 pGD-AltMV::Noda와 pGD-AltMV::Noda-FLAG 를 제작하였음 (그림 7).

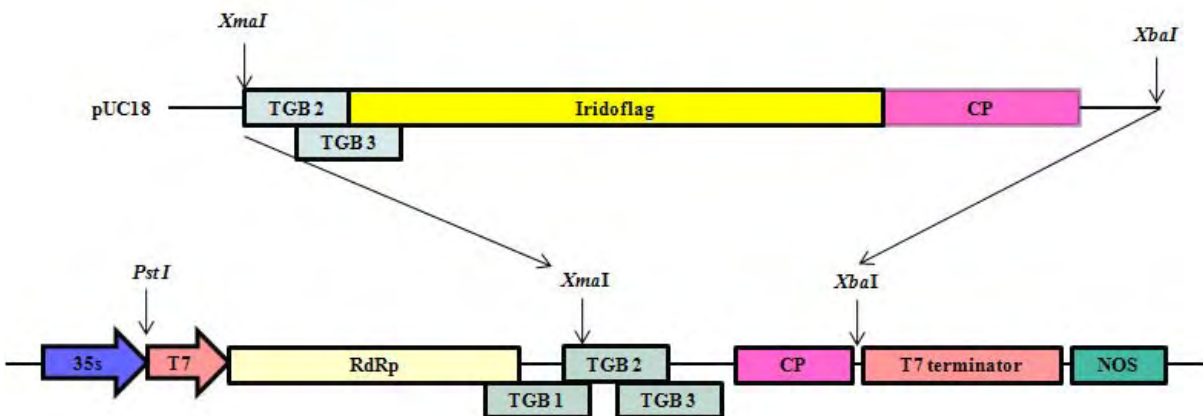


그림 7. 이리도바이러스 Viral expression 벡터

가. Viral expression 벡터를 활용한 Transient *Agrobacterium*-infiltration assay

- 콜로니 PCR을 통하여 유전자 및 벡터의 도입이 확인된 *Agrobacterium*을 키워서 infiltration buffer에 O.D600 = 1.0으로 cell 농도를 맞춘 후 3-4주 된 *Nicotiana Benthamiana* 잎 뒷면에 이리도바이러스 유전자가 삽입되어있는 *Agrobacterium*을 주사기를 사용하여 접종하였

음. 주사기 끝을 잎의 뒷면에 살짝 찌른 다음 용액이 퍼지는 것을 눈으로 확인해가며 천천히 균을 접종한 후 5일째, 12일째 샘플링을 하여 RNA 발현 (그림 8) 및 단백질 발현을 분석함으로써 이리도바이러스 항원단백질의 발현을 확인하였음.

나. infiltration한 후 RNA 수준 및 단백질에서의 발현 분석

- *Nicotiana Benthamiana*의 담배잎에 infiltration한 후 5일째, 12일째 되는 날 샘플링한 담배잎을 액체질소에 곱게간 후, total RNA를 추출하였음. 추출한 RNA를 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성한 후 이리도 바이러스에 specific한 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였음. 항상 발현하는 actin 유전자의 프라이머를 가지고 PCR을 한 결과와 비교했을때보다 2배이상 발현됨을 확인할 수 있었음 (그림 8).

- 그러나, 앞에서의 결과와 동일하게 담배 색소체 형질전환체와 핵 형질전환체, 그리고 고구마 배양세포에서의 단백질 발현이 되지 않았던 결과와 유사하게 infiltration한 후 담배잎을 단백질 extraction buffer로 총 단백질을 추출한 후 western blot을 시행해본 결과, 아무런 signal을 확인할 수 없었음.

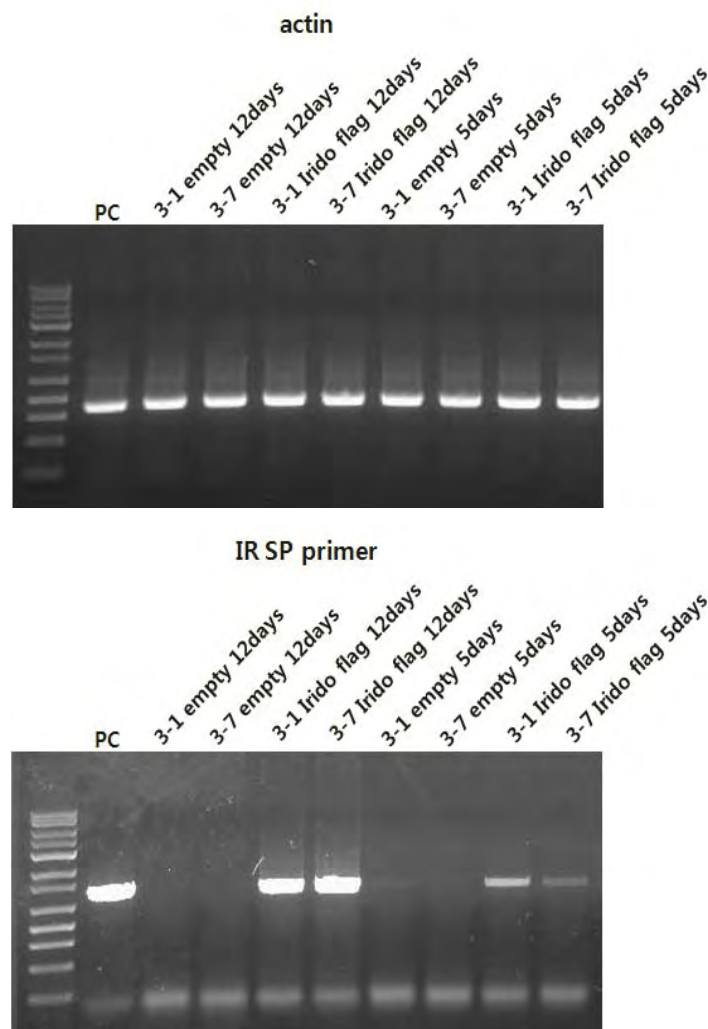


그림 8. 형질전환 고구마 배양세포에서의 RNA 발현 확인

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 식물경구백신을 이용하여 목적 동물, 특히 어류에 있어서의 효능을 확인 한 최초의 사례로 판단되며, 현재 가축질병위주의 식물경구백신 연구분야가 어류용 경구백신 으로 확대 할 수 있는 사례가 될 것 임
- 어류에 다양한 바이러스성 질병이 발병하고 있고 그에 대한 백신이 거의 전무한 상태에서 본 기술의 개발을 통한 다양한 어류바이러스성 질병에 대한 응용으로 미개척분야에서의 지 대한 경제적, 학문적 응용이 이루어 지리라 기대됨
- 해당과제의 목적인 바를 모두 성실히 달성하였으며 추가적인 연구도 실시되어 다양한 접목 이 가능하게 되었음

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

* 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

- (주) 젠닥스의 주관으로 기 개발된 기술의 산업화를 추진할 것임. 이를 위하여 제주도내 펠렛사료 공장과의 기술협약 및 기술이전등을 실시할 예정이며 기술이전에 따른 제품의 생산을 기대해 봄

* 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

- 논문투고는 연차별로 목표한 바에 의해 지속적으로 투고하였으며 최종기술 부분도 현재 투고중임
- 지적재산권 확보를 위해 연구기관별 조율중임
- 발표제목 : Codon-optimized expression of fish iridovirus capsid protein in yeast and its application as a vaccine candidate [2010. 10. 3-5. 4th Vaccine and ISV Annual Global Congress, 오스트리아 비엔나]
- 발표제목 : Expression of major capsid protein in suspension-cultured rice cells to develop edible vaccine against rock bream iridovirus [2010. 8. 22-27. 국제면역학회 ICI2010, 일본 고베]
- 발표제목 : Production of Major Capsid Protein in Suspension-cultured Rice Cells to Develop Edible Vaccine Against Rock Bream Iridovirus [2010. 10. 7-9. 한국생물공학회 추계학술대회, 인천]
- 발표제목: Oral immunization of fish using recombinant major capsid protein with chitosan resin formulae [2011. 10. 2-4. 5th Vaccine and ISV annual global congress, 미국 시애틀]
- 특허출원: 해수어 이리도 바이러스 항원성 펩타이드 및 이를 이용한 이리도바이러스 예방용 백신. 출원번호: 2009-0093996.

* 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

- 현재 본 연구팀에 의해 다른 방식 (고구마 현탁세포에서의 단백질 발현)의 단백질 발현 시스템에 개발중임
- 담배를 활용한 이리도 바이러스 캡시드 단백질 발현은 RNA 수준에서는 확인되었으나 단백질은 확인할 수 없었음.
- 배양세포에서 발현이 더 좋을 수 있으므로 현재 고구마 배양세포를 이용하여 이리도 바이러스 캡시드 단백질을 발현시켜 보기 위한 연구를 수행 중임.
- 본 연구의 결과는 어류 바이러스 단백질을 발현시키기 위한 연구에 귀중한 자료로 사용될 수 있을 것임.
- 노다 바이러스 단백질은 담배 엽록체에서 잘 발현되므로 (타과제 연구 결과) 이리도 바이러스 단백질의 어떠한 특징이 발현을 어렵게 만드는지 연구해 볼 가치가 있음. 이러한 추가 연구를 통해 어류 바이러스 단백질의 발현을 최적화하는 방법을 찾을 수 있을 것임.

- 이 기술은 이리도 바이러스 및 어류 노다바이러스등에 기술이 접목될 것임
- 식물경구백신 용 세포의 다량생산체계의 확립이 필요하며 이에 대한 연구를 진행
- 효율적인 경구투여를 위한 제제화 및 경구투여 프로그램 연구가 필요함

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

특이사항 없음

제 7 장 참고문헌

Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr Opin Biotechnol* 18:134 - 141, 2007.

Chikwamba R, Cunnick J, Hathaway D, McMurray J, Mason H, & Wang K. A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Transgenic Res* 11: 479 - 493, 2002.

Dus Santos MJ, Wigdorovitz A, Trono K, R'ios RD, Franzone PM, Gil F, Moreno J, Carrillo C, Escribano JM, Borca MV. A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus (FMDV) peptide-based vaccine in transgenic plants. *Vaccine* 20:1141 - 1147, 2002.

Dus Santosa MJ, Carrillo C, Ardila F, R'ios RD, Franzone P, Piccone ME, Wigdorovitz A, Borca MV. Development of transgenic alfalfa plants containing the foot and mouth disease virus structural polyprotein gene P1 and its utilization as an experimental immunogen. *Vaccine* 23: 1838 - 1843, 2005.

Tregoning JS, Clare S, Bowe F, Edwards L, Fairweather N, Qazi O, Nixon PJ, Maliga P, Dougan G, Hussell T. Protection against tetanus toxin using a plant-based vaccine. *Eur. J. Immunol.* 35: 1320 - 1326, 2005.

Webster DE, Smith SD, Pickering RJ, Strugnell RA, Drye IB, Wesselingh SL. Measles virus hemagglutinin protein expressed in transgenic lettuce induces neutralising antibodies in mice following mucosal vaccination. *Vaccine* 24: 3538 - 3544, 2006.

Guerrero-Andrade O, Loza-Rubio E, Olivera-Flores T, Fehe'rvá'ri-Bone T, Go'mez-Lim MA. Expression of the Newcastle disease virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies. *Transgenic Res* 15:455 - 463, 2006.