

GOVP1200819468

최 종
연구보고서

Phage display법을 사용한 넙치 병원체의
단클론항체의 제조 및 이의 신속 진단에의 응용

Production of monoclonal antibodies against flounder
pathogens using phage displayed-library and their applications to
rapid screening of flounder pathogens

울산대학교 산학협력단

해양수산부

T0006022

최 종 보 고 서

Phage display법을 사용한 넙치 병원체의 단클론항체의
제조 및 이의 신속 진단에의 응용

Production of monoclonal antibodies against flounder
pathogens using phage displayed-library and their
applications to rapid screening of flounder pathogens

2008. 2

울산대학교

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “Phage display법을 사용한 넙치 병원체의 단클론항체의 제조 및 이의 신속 진단에의 응용” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 2 월 일

주관연구기관명 : 울산대학교

주관연구책임자 : 박 정 우

연 구 원 : 김 이 청

연 구 원 : 최 혜 승

연 구 원 : 김 영 권

연 구 원 : 도 정 완

연 구 원 : 김 명 석

연 구 원 : 문 창 훈

연 구 원 : 고 명 석

연 구 원 : 이 주 양

연 구 원 : 김 효 정

연 구 원 : 이 원 혁

요 약 문

I. 제 목

Phage display법을 사용한 낚치 병원체의 단클론항체의 제조 및 이의 신속 진단에의 응용

II. 연구개발의 목적 및 중요성

- 전 세계에 걸쳐 수산 양식이 급증함에 따라 바이러스, 세균, 기생충 등의 감염에 의한 대량폐사가 빈번하게 발생하여 수산 양식업의 발전에 큰 장애가 되고 있다.
- 우리나라의 경우도 양식어류에 질병의 발생이 급증하여 피해가 커지고 있는데, 특히 최근들어 외국으로부터의 양식어 수입 증가로 인하여 신종 병원체의 유입 및 이로 인한 새로운 질병의 발생이 늘어나는 추세이다.
- 따라서 우리나라 양식어류에 발생하는 병원체 감염에 의한 피해를 줄이기 위한 대책 마련이 시급한 상황이다. 이에 대한 대책으로, 양식어류에 존재하는 병원체를 정확하고 신속하게 진단하여 유입 및 확산을 방지하여야 하고 백신을 개발하여 질병 발생을 막아야 할 것이다.
- 그러나 이의 시행에 있어서 많은 문제가 있는데, 가장 큰 문제로는 양식어에 감염하는 병원체의 종류가 매우 많다는 것이다. 현재 매우 다양한 병원체들이 국내 양식 어류에서 발견 되었으며 외국의 경우 이외에 다양한 종류의 병원체들이 발견 되었고 또한 계속하여 새로운 병원체의 발견이 보고되고 있다.
- 현재 몇몇의 병원체에 대한 단클론항체가 제조되어 있다. 그러나 병원체에 의한 질병을 효과적으로 조절하기 위해서는 이들 모든 병원체들을 효과적으로 그리고 신속하게 진단하는 것이 필요한데, 현재까지 모든 병원체들을 신속 진단할 수 있는 진단법이 개발되어 있지 않고 특히 최근에 새로이 발견되는 병원체들에 대하여는 신속 진단법이 개발되기까지는 많은 시간이 소요된다. 따라서 그 기간동안에 아무 대책 없이 새로운 병원체가 국내로 유입되거나 이미 유입된 병원체들의 경우 국내의 양어장으로 급속히 확산되고 있

다.

- 그리고 백신의 경우, 바이러스에 대한 단클론항체들을 제조하여 이들 중 바이러스 중화 역가가 있는 것을 선별 후 이 항체가 잡는 바이러스 구조 단백질을 선별하여 백신 target으로 사용하여야 한다. 그러나 현재의 방식으로 단클론항체를 제조하는데에 적어도 4개월 이상이 필요하고 고도로 숙련된 사람이 필요함은 물론 세포 배양 등과 같이 비용이 많이 든다.
- 이와 같은 문제점들 때문에 현재 대부분 병원체에 대한 신속 진단 및 많은 바이러스의 백신 개발이 지연되고 있는 상황이다. 따라서 짧은 시간에 쉽고 효과적으로 병원체에 대한 단클론항체를 만드는 방법의 개발이 필요하다.
- 본 연구에서는 우리나라에서 가장 많이 양식되고 있는 넙치를 대상으로, 양식 넙체에 질병을 유발하는 병원체들에 대한 단클론항체를 약 20여일 만에 쉽고 빠르게 만들 수 있는 기술을 개발하고자 한다. 본 기술은 phage display를 사용한 기술로서 어류의 항체 유전자의 cDNA를 대상으로 phage-display library를 만든 다음 이를 사용하여 원하는 병원체에 대한 다양한 단클론항체들을 만들고자 한다.
- 이와 같이 제조한, 다양한 병원체들에 대한 단클론항체들을 사용하여 병원체들을 조기에 신속 진단할 수 있는 기술을 개발하고 또한 다양한 바이러스의 백신 대상 단백질을 신속하게 선별하여 여러 바이러스들에 대한 백신이 신속하게 개발될 수 있도록 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 첫째, phage display법을 사용하여 양식 어류의 다양한 병원체에 대한 단클론항체를 신속하게 제조하는 기술을 개발하고, 둘째, 양식 어류의 다양한 병원체에 대한 단클론항체를 사용하여 다양한 병원체를 동시에 진단하는 고효율 진단 기술을 개발하며, 셋째, 다양한 바이러스의 면역유도단백질 및 중화 epitope를 지니는 단백질들을 신속하고 고효율로 분석하는 기술을 개발하는 것을 목표로 하였다. 이와 같은 목표를 달성하기 위하여 수행한 연구 내용은 다음과 같다.

1. Mouse 항체 유전자를 대상으로 phage display library 제조

- 20 마리의 Balb/c mouse로 부터 spleen cell을 분리하여 이들을 섞은 후 mRNA를 추출

하였고 이로부터 cDNA를 합성

- Mouse의 모든 VH gene segment의 leader sequence를 포함하는 degenerated PCR primer (mouse VH back primers)와 mouse의 4개 JH gene segment 각각에 대한 4개의 PCR primer (mouse JH forward primers)를 사용하여 mouse heavy chain의 V region을 증폭
- Light chain의 경우 kappa (κ)와 lambda (λ) 중 repertoire가 많은 kappa chain만을 대상으로 PCR 증폭을 시도. Mouse의 모든 VK gene segment를 포함하는 degenerated PCR primer (mouse VK back primers)와 mouse의 5개 JK gene segment 각각에 대한 5개의 PCR primer (mouse JK forward primers)를 사용하여 mouse light chain의 V region을 증폭.
- 증폭된 VH와 VK gene fragment를 linker [(Gly₄-ser)₃]를 사용하여 VH-linker-VK의 형태로 연결하여 single chain Fv (scFv) gene으로 연결. 이와 같이 연결된 scFv gene을 template로 하고 VH back *Sfi*I primer와 JK forward *Not*I primer를 사용하여 PCR을 수행한 다음 이를 pCANTAB 5E phagemid vector의 *Sfi*I/*Not*I site에 cloning.
- scFv/pCANTAB 5E phagemid vector를 사용하여 E. coli TG1 strain을 transformation 시키고 여기에 M13 KO7 helper phage를 첨가하여 phage rescue를 시킴으로써 phage display library를 제조

2. 제조한 phage display library의 size 및 유의성 검증

- E. coli TG1 strain을 사용한 plaque assay를 통하여 library size 분석하여 10¹⁰PFU/ml 이상임을 확인.
- 양식 돌돔에서 분리된 E. tarda와 iridovirus를 항원으로 하여 scFv phage display library로부터 scFv 단클론항체를 제조. 이때 E. tarda 항원은 formalin으로 처리하여 죽인 항원을 사용하였으며 iridovirus는 major capsid protein (MCP) 유전자를 E. coli에서 발현시킨 재조합단백질을 항원으로 사용. 이들 항원을 대상으로 약 13일 만에 scFv 단클론항체가 제조됨을 확인.
- 원하는 scFv 항체를 display하고 있는 M13 phage를 E. coli HB2151 strain에 infection 시켜 soluble form의 scFv를 분리하였으며 이 항체를 사용하여 ELISA, Western blotting, 중화실험, immunohistochemistry 등에 적용 가능한지를 확인.

3. 기존에 보고된 넙치의 세균성 병원체들에 대한 scFv 단클론항체 제조

- 기존에 보고된 세균 수집: *Vibrio vulnificus*, *Streptococcus iniae*, *Edwardsiella tarda*, *Photobacterium damsela*
- 세균들의 배양 및 scFv screening을 위한 항원 준비 완료
- 세균들에 대한 scFv 단클론항체 제조 완료

- ELISA, western blotting, immunohistochemistry에 적합한 항체 선별
- 4. 기존에 보고된 넙치의 바이러스성 병원체들에 대한 scFv 단클론항체 제조**
- 기존에 보고된 바이러스 수집: Lymphocystis virus, marine birnavirus, HIRAME rhabdovirus, nodavirus, VHSV, iridovirus
 - scFv screening을 위한 바이러스들의 항원 준비 완료
 재조합단백질: marine birnavirus, nodavirus, iridovirus
 peptide 합성: lymphocystis virus, hIRAME rhabdovirus, VHSV
 - 바이러스들에 대한 scFv 단클론항체 제조 완료
 - ELISA, western blotting, immunohistochemistry, 중화실험에 적합한 항체 선별
- 5. 국내외에서 새로 발견되는 병원체들에 대하여 scFv 단클론항체 제조**
- 다음과 같은 병원체에 대한 항원 준비 완료
 외국에서 넙치에 감염하는 것으로 밝혀진 IPNV: VP2 및 VP3 재조합단백질 준비 완료
 우리나라에서 양식되는 넙치와 유사한 flounder에 감염하는 것으로 밝혀진 SFRV: peptide 합성 완료
 - scFv 항체 제조 완료
 - ELISA, western blotting, immunohistochemistry에 적합한 항체 선별
- 6. 제조한 scFv 단클론 항체를 사용하여 기존에 보고된 세균 및 바이러스들을 동시에 신속 진단하는 기술 개발**
- 지금까지 보고된 넙치의 병원성 세균 및 바이러스들을 동시에 screening할 수 있는 ELISA system 개발
 - 넙치 양식장에서 사육 중 질병에 걸린 넙치들을 대상으로 ELISA 키트 현장 적용 실험
 - 지금까지 보고된 넙치의 병원성 세균 및 바이러스들을 동시에 screening할 수 있는 ELISPOT 진단키트 개발
 - 넙치 양식장에서 사육 중 질병에 걸린 넙치들을 대상으로 ELISPOT 키트 현장 적용실험
- 7. 제조한 scFv 단클론 항체를 사용하여 기존에 보고된 넙치 바이러스의 면역유도단백질 및 중화 epitope를 지니는 단백질 확인**
- 지금까지 보고된 넙치의 바이러스들에 대하여 면역유도단백질과 중화 epitope의 분석 및 확인
 - 선별된 바이러스들의 단백질들을 대장균에서 발현시킨 후 넙치에 주사하여 실제 면역반응을 유발하는 지, 그리고 중화 항체를 유도하는 지 확인

IV. 연구개발결과

1. Mouse 항체 유전자를 대상으로 phage display library 제조

- 20 마리의 Balb/c mouse로 부터 spleen cell을 분리하여 이들을 섞은 후 mRNA를 추출하였고 이로부터 cDNA를 합성하였다.
- 합성된 cDNA를 대상으로 mouse의 heavy chain의 V gene segment (VH) 유전자들을 PCR을 통하여 증폭하였다. Mouse VH 유전자의 V gene segment의 모든 leader sequence를 포함하는 degenerated PCR primer인 VH back primer를 제조하였으며, 4종류의 J gene segment 각각에 대한 PCR primer인 JH forward primer를 제조하였다. 이와 같이 제조한 VH back primer와 JH forward primer를 사용하여 mouse VH 유전자를 증폭하였다.
- 역시 합성된 cDNA를 대상으로 mouse의 light chain의 V gene segment (VL) 유전자들을 PCR을 통하여 증폭하였다. Mouse kappa chain VL 유전자 V gene segment의 모든 sequence를 포함하는 degenerated PCR primer인 VK back primer를 제조하였으며, 5종류의 J gene segment 각각에 대한 PCR primer인 JH forward primer를 제조하였다. 이와 같이 제조한 VK back primer와 JK forward primer를 사용하여 mouse VK 유전자를 증폭하였다.
- 증폭한 mouse의 VH 및 VK 유전자를 linker [(Gly₄-ser)₃]를 사용하여 하나의 VH-linker-VL의 구조를 지니는 scFv gene으로 제조하였다. 제조한 VH-linker-VK의 구조를 지니는 scFv 유전자를 제한효소 SfiI과 NotI을 처리한 다음 역시 SfiI과 NotI으로 처리한 pCANTAB 5E phagemid vector에 cloning하였다.
- scFv/pCANTAB vector를 E. coli TG1에 transformation 시킨 후 여기에 M13 KO7 helper phage를 넣어 scFv를 M13 phage의 gene 3 에 display 된 형태로 발현 시켜 phage displayed library를 제조하였다.

2. 제조한 phage display library의 size 및 유의성 검증

- 본 연구에서 제조한 phage displayed scFv 항체 library의 정확한 repertoire는 알수 없다. 그러나 이 library를 구성하는 M13 phage의 titer를 측정함으로써 간접적으로 scFv library의 repertoire를 알 수 있다. 따라서 본 연구에서 제조한 library의 M13 phage를 10-fold dilution 방법을 통하여 titer를 확인한 결과 약 2×10^{10} /ml 임을 확인하였다.

- 이와 같이 제조한 phage displayed library를 사용하여 원하는 항원에 대한 단클론항체를 만들 수 있는지를 확인하였다.
- 먼저 본 연구의 항원으로서 *E. tarda*는 formalin으로 사멸시킨 whole bacteria를 사용하였다. 바이러스 항원으로는 iridovirus의 MCP 유전자를 prokaryotic expression vector인 pET28a에 cloning하여 이를 *E. coli* BL21 strain에서 발현시킨 recombinant MCP를 사용하였다.
- 이와 같이 준비한 항원을 사용하여 scFv 항체를 selection 하였다. 그 결과 항원과 결합하는 scFv를 발현하는 phage들을 선별하였다. 선별한 phage들을 *E. coli* HB2151 strain에 감염시켜서 soluble form의 scFv 항체를 만든 후 anti-E-tag 항체를 사용한 column으로 scFv를 순수분리 하였다.
- 이를 정리하면, 일단 phage displayed scFv library가 만들어지고 난 다음 이 library를 사용하여 특정 항원에 대한 scFv 항체를 만들기 까지 약 13일이 소요되었다. 이로부터 scFv library로부터 특정 항원에 대한 scFv를 신속하게 제조할 수 있음을 확인 할 수 있었다.

3. 기존에 보고된 낚치의 세균성 병원체들에 대한 scFv 단클론항체 제조

- 실제 낚치에서 분리된 다양한 병원성 세균들을 (*Vibrio vulnificus*, *Streptococcus iniae*, *Edwardsiella tarda*, *Photobacterium damsela*) 대상으로 scFv 단클론항체를 제조하였다. 이를 위하여 낚치 병원성 세균들을 formalin 처리하여 죽인 후 항원으로 사용하였다. 세균 항원이 coating된 배양 용기에 phage display library를 넣어 항원과 결합하는 scFv를 발현하는 phage를 선별하였다. 선별한 phage들 중 각 세균에 대하여 ELISA 값이 높은 clone 각각 3개씩을 선별하여 soluble form의 scFv를 제조하였다. 이후 anti-E-tag 항체를 사용한 column으로 scFv를 순수분리 하였다.
- 순수 분리한 scFv들을 대상으로 ELISA 및 ELISPOT 등을 수행하여 각 assay에 적합한지를 확인 하였다.

4. 기존에 보고된 낚치의 바이러스성 병원체들에 대한 scFv 단클론항체 제조

- 낚치에 감염하는 것으로 보고된 바이러스들을 대상으로 scFv 항체 제조를 위한 항원을 준비하였다. nodavirus coat protein, marine birnavirus VP2, iridovirus MCP 등은 *E. coli* 에서 발현시킨 재조합 단백질을 항원으로 사용하였으며, lymphocystis virus MCP, VHSV G, hirame rhabdovirus G 등은 항원성이 높을 것으로 예상되는 부위를 대상으로 peptide

를 합성하여 항원으로 사용하였다.

○ 바이러스 항원이 coating된 배양 용기에 phage display library를 넣어 항원과 결합하는 scFv를 발현하는 phage를 선별하였다. 선별한 phage들 중 각 바이러스에 대하여 ELISA 값이 높은 clone 각각 3개씩을 선별하여 soluble form의 scFv를 제조하였다. 이후 anti-E-tag 항체를 사용한 column으로 scFv를 순수분리 하였다.

○ 순수 분리한 scFv들을 대상으로 ELISA 및 ELISPOT 등을 수행하여 각 assay에 적합한지를 확인 하였다.

5. 국내외에서 새로 발견되는 병원체들에 대하여 scFv 단클론항체 제조

○ 앞에서 언급한 병원체들 외에 새로이 넓치에 감염하는 것으로 확인 된 IPNV 및 SFRV 등에 대하여도 scFv 항체를 제조하였다. IPNV의 경우 VP2의 재조합 단백질을 항원으로 사용하였으며, SFRV의 경우 L 유전자의 peptide를 합성하여 항원으로 사용하였다.

○ 바이러스 항원이 coating된 배양 용기에 phage display library를 넣어 항원과 결합하는 scFv를 발현하는 phage를 선별하였다. 선별한 phage들 중 각 바이러스에 대하여 ELISA 값이 높은 clone 각각 3개씩을 선별하여 soluble form의 scFv를 제조하였다. 이후 anti-E-tag 항체를 사용한 column으로 scFv를 순수분리 하였다.

○ 순수 분리한 scFv들을 대상으로 ELISA 및 ELISPOT 등을 수행하여 각 assay에 적합한지를 확인 하였다.

6. 제조한 scFv 단클론 항체를 사용하여 기존에 보고된 세균 및 바이러스들을 동시에 신속 진단하는 기술 개발

6-1) 지금까지 보고 된 넓치의 병원성 세균 및 바이러스들을 동시에 screening할 수 있는 ELISA system 개발

○ 먼저 제조한 scFv 항체들이 자신의 항원 이외에 다른 항원들과 어느 정도 반응하는지를 분석하였다. 96-well ELISA plate에 각 병원체의 항원을 coating 한 후 제조한 scFv 들을 첨가하여 ELISA를 수행하였다. 이로부터 넓치 세균 및 바이러스 및 각 병원체마다 비교적 높은 specificity를 보이는 2개의 scFv clone들을 선별하여 이후의 ELISA를 사용한 신속 screening에 사용하였다.

○ 제조한 ELISA kit가 실제 양식 넓치의 병원체를 신속하게 진단할 수 있는지를 확인 하기 위하여 양식장에서 질병에 걸린 넓치를 대상으로 ELISA를 수행하였다. 이 결과

의 신빙성을 확인하기 위하여 classical methods를 사용하여 녀치의 병원체를 확인하였다. 본 연구에서 제조한 ELISA kit를 사용하여 screening한 결과 전반적으로 바이러스에 대한 scFv 항체들에서 ELISA 값이 약간 증가하였는데, 특히 marine birnavirus와 VHSV에 대한 scFv 항체에서 비교적 높은 ELISA 값이 나타났다. 이와 같은 결과는 PCR 및 nucleotide sequencing을 통한 분석 결과와 일치함을 확인할 수 있었다.

6-2) 지금까지 보고 된 녀치의 병원성 세균 및 바이러스들을 동시에 screening할 수 있는 ELISPOT 진단키트 개발

○ ELISA를 통하여 녀치의 각 병원체에 비교적 높은 specificity를 보였던 scFv 항체들을 사용하여 ELISPOT screening을 수행하였다. 앞의 ELISA screening 실험에서 사용하였던 녀치의 조직 lysate를 membrane에 직접 dotting 한 다음 여기에 scFv 항체들을 반응시키고 이어 E-tag에 대한 항체 (AP conjugated Ab)와 BCIP/NBP를 첨가하여 발색반응 시켰다. 그 결과 marine birnavirus와 VHSV에 대한 scFv 항체를 처리한 dot에서 비교적 진한 발색 반응을 나타내었다. 이와 같은 결과는 ELISA로 확인한 결과 및 PCR 결과와 일치하는 것이었다.

7. 제조한 scFv 단클론 항체를 사용하여 기존에 보고된 녀치 바이러스의 면역유도단백질 및 중화 epitope를 지니는 단백질 확인

7-1) 지금까지 보고 된 녀치의 바이러스들에 대하여 면역유도단백질과 중화 epitope의 분석 및 확인

○ 본 연구에 사용한 모든 바이러스 항원들에 대하여 scFv 항체를 찾을 수가 있었다. 이로부터 본 연구에서 사용한 녀치 바이러스의 단백질들은 모두 면역유도 특성을 지니는 것임을 확인할 수 있었다.

○ 녀치바이러스의 재조합 단백질 백신 제조에 있어서 면역유도 단백질 확인보다 더 중요한 것이 중화 epitope를 지니는 단백질의 확인이다. 본 연구에서 사용한 녀치 바이러스들의 단백질들에 중화 epitope가 있는지를 확인하기 위하여 중화 실험을 수행하였다. 먼저 본 실험에 사용한 녀치 바이러스들 중 nodavirus, marine birnavirus, IPNV, iridovirus 등을 대상으로 scFv 항체에 의한 중화 실험을 수행하였다. 그 결과 marine birnavirus와 IPNV에 대한 scFv에서 각각 중화 값을 보였다. 이 결과로부터 marine birnavirus VP2와 IPNV VP2가 중화 epitope를 지니는 단백질임을 확인할 수 있었으며, 특히 scFv MBVP2-1 및 IPNVVP2-2가 결합하는 epitope가 중화 epitope임을 확인할 수 있었다.

7-2) 선별된 바이러스들의 단백질들을 대장균에서 발현시킨 후 녀치에 주사하여 실제 면역 반응을 유발 하는 지, 그리고 중화 항체를 유도하는 지 확인

- 앞에서 확인한 바와 같이 중화 epitope를 지니는 것으로 확인된 nodavirus coat protein, marine birnavirus VP2, IPNV VP2 등이 실제 넙치에서 중화항체를 유도하는 지를 확인하였다. E. coli에서 발현한 recombinant protein들을 넙치 복강에 2회 주사한 다음 혈청을 채취하였다. 이들 넙치 혈청들을 대상으로 ELISA 및 중화 실험을 수행하여 바이러스 단백질들에 대한 항체 생성 여부 (면역유도 특성 확인) 및 바이러스에 대한 중화 항체 생성 여부를 측정하였다. 그 결과 nodavirus coat protein, marine birnavirus VP2, IPNV VP2 를 주사하여 얻은 넙치 혈청에 각각의 바이러스를 중화시키는 항체가 존재함을 확인 할 수 있었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

1. 현장보급방안

- 사용하기에 간편하고 저렴한 가격의 신속진단 키트를 개발하여 양식어민들이 사용하기에 편리하고 무리가 없게 함
- 연구소나 학교 등과 같이 비교적 전문 인력이 있고 기기가 갖추어진 연구소나 학교 등을 대상으로 정확도와 정량이 가능하면서 간편하게 사용할 수 있는 ELISA 법의 신속진단 키트를 개발하여 보급
- 위와 같은 진단 키트의 사용법을 책자로 만들어 양식어민들에게 배포하고 또한 적절한 기회에 직접 설명함으로써 사용법을 익히도록 함

2. 산업화계획방안

- 신속진단 키트: 제약회사와 제휴하여 보다 간편하고 싼 키트 개발하여 국내외에 판매
- 바이러스 재조합 단백질 백신: 본 연구 결과 얻어지는 중화 epitope 결과를 바탕으로 국립수산물과학원 및 제약회사와 공동으로 바이러스 재조합 단백질 백신 개발에 활용

3. 추가기술개발방안

- 본 연구가 성공적으로 마무리되어 scFv 단클론항체가 실용화 된 이후에도 넙치의 새로운 병원체가 발생하면 이들에 대하여도 단클론항체를 제조하여 진단키트에 추가
- 또한 새로운 바이러스가 발견되면 단클론항체를 제조후 신속하게 중화 epitope를 지니는 단백질을 확인하여 재조합단백질 백신이 개발될 수 있도록 유도함
- 본 연구 결과 개발되는 기술을 넙치 이외의 다른 어종에도 적용

4. 기술이전방안

- 관련 기술 및 단클론항체, 그리고 신속 진단키트들에 대한 특허를 출원하여 취득 한 후 국내외 제약회사 들에게 기술을 이전할 계획임

S U M M A R Y

I. Title

Production of monoclonal antibodies against flounder pathogens using phage displayed-library and their applications to rapid screening of flounder pathogens

II. Objectives and Significance

The continuing decline of ocean fisheries and rise of global fish consumption has driven rapid aquaculture growth over the last decade. However, the aquaculture has been severely damaged by epizootics caused by pathogens including viruses, bacteria, and parasites. Recently, in Korea, various kinds of pathogens have been introduced via import of live fish and widely spread through frequent transfer of the fish among fish farms. As a result, aquaculture has been severely damaged by large-scale mortality caused by various kinds of diseases. Thus, in order to protect the cultured fish from diseases caused by pathogens, it is very urgent to develop rapid screening method and efficient vaccines against fish pathogens.

Until now, a variety of bacteria, viruses and parasites have been identified as causative pathogens of epizootic among cultured fish. In addition, new pathogens have been reported to cause mass mortality. Monoclonal antibodies against fish pathogens have been proven to be useful for development of rapid screening kit and determination of vaccine target proteins. Many researchers have tried to produce monoclonal antibodies against fish pathogens. However, because the conventional method to produce monoclonal antibodies requires high cost and well-trained expert and takes very long time, monoclonal antibodies have been raised against only a few fish pathogens. Thus, a rapid, easy and cost-saving method is required to produce monoclonal antibodies against a variety of fish pathogens.

The purpose of this study is to develop an easy and rapid methods to produce monoclonal antibodies against flounder pathogens. In this study we developed phage-displayed scFv library from cDNA of mouse immunoglobulin genes. Using this

library, we selected scFv monoclonal antibodies against various kinds of bacteria and viruses pathogenic to flounder and developed ELISA and ELISPOT kit for rapid screening of flounder pathogens.

III. Content and Scope of the Study

This research project focuses on (1) the development of technique to produce monoclonal antibodies against flounder pathogens using phage-displayed scFv library, (2) the development of rapid screening kit for flounder pathogens using monoclonal antibodies and (3) the development of technique to determine immunogenic protein neutralizing epitope-containing protein among viral structural proteins using monoclonal antibodies.

1. Preparation of phage displayed scFv library from mouse immunoglobulin genes

- Extraction of mRNA from spleen cells of 20 mice and cDNA synthesis.
- Preparation of degenerated PCR primer containing all leader sequences of mouse VH gene segment (mouse VH back primers) and 4 mouse JH forward primers. Amplification of mouse heavy chain V region genes using these PCR primers.
- Preparation of degenerated PCR primer containing all sequences of mouse VK gene segment (mouse VK back primers) and 5 mouse JK forward primers. Amplification of mouse light chain V region genes using these PCR primers.
- Preparation of single chain Fv (scFv) genes (VH-linker-VK) by linking VH and VK gene fragment using linker [(Gly₄-ser)₃]. PCR amplification of these scFv genes using VH back *Sfi*I primer and JK forward *Not*I primer. Subcloning of the PCR products into *Sfi*I/*Not*I site of pCANTAB 5E phagemid vectore.
- Transformation of E. coli TG1 strain with scFv/pCANTAB 5E phagemid vector in the presence of M13 KO7 helper phage and preparation of phage displayed scFv library.

2. Confirmation of the titer of phage displayed scFv library

- Confirmation of phage displayed scFv library: more than 10¹⁰PFU/ml.
- Confirmation whether this library can be used to produce monoclonal antibodies against flounder pathgens, E. tarda and iridovirus (recombinant protein of MCP),

within 20days: Production of scFv monoclonal antibodies against these pathogens in 13 days.

- Production of soluble scFv monoclonal antibodies by infection of M13 phage into E. coli HB2151 strain. Determination of the availability of these scFv to ELISA, Western blotting, neutralization, and immunohistochemistry.

3. Production of scFv monoclonal antibodies against bacterial pathogens of flounder

- Collection of bacterial pathogens of flounder: *Vibrio vulnificus*, *Streptococcus iniae*, *Edwardsiella tarda*, *Photobacterium damsela*
- Antigen preparation for screening of scFv monoclonal antibodies
- Selection and production of scFv monoclonal antibodies against bacterial pathogens
- Determination of the availability of these scFv to ELISA, Western blotting, neutralization, and immunohistochemistry.

4. Production of scFv monoclonal antibodies against viral pathogens of flounder

- Collection of viruses infecting flounder: Lymphocystis virus, marine birnavirus, Hirame rhabdovirus, nodavirus, VHSV, iridovirus
- Antigen preparation for screening of scFv monoclonal antibodies:
 - Recombinant protein: marine birnavirus, nodavirus, iridovirus
 - Peptide synthesis: lymphocystis virus, hirame rhabdovirus, VHSV
- Selection and production of scFv monoclonal antibodies against viruses
- Determination of the availability of these scFv to ELISA, Western blotting, neutralization, and immunohistochemistry.

5. Production of scFv monoclonal antibodies against new pathogens of flounder

- Preparation of antigens
 - IPNV: recombinant protein of VP2 and VP3
 - SFRV: peptide synthesis from amino acid sequence of L protein
- Selection and production of scFv monoclonal antibodies against these antigens
- Determination of the availability of these scFv to ELISA, Western blotting, neutralization, and immunohistochemistry.

6. Development of rapid screening technique to detect bacterial and viral pathogens of flounder using scFv monoclonal antibodies

- Development of ELISA system for rapid screening of bacterial and viral pathogens of

flounder

- Application of this ELISA system to diseased flounder
- Development of ELISPOT system for rapid screening of bacterial and viral pathogens of flounder
- Application of this ELISPOT system to diseased flounder

7. Determination of immunogenic and neutralizing epitope-containing protein using scFv monoclonal antibodies

- Application of scFv monoclonal antibodies to determine immunogenic proteins and neutralizing epitope-containing proteins among viral structural proteins.
- Determination whether the selected viral protein can induce neutralizing antibodies in flounder.

IV. Results

1. Preparation of phage displayed library from mouse immunoglobulin genes

- mRNA was extracted from spleen cells of 20 mice and cDNA was synthesized.
- Mouse immunoglobulin heavy chain genes were amplified by PCR using cDNA from spleen cells as template with degenerated PCR primer containing all leader sequences of mouse VH gene segment (mouse VH back primers) and 4 mouse JH forward primers. Amplification of mouse heavy chain V region genes using these PCR primers.
- Mouse immunoglobulin light chain genes were amplified by PCR using cDNA from spleen cells as template with degenerated PCR primer containing all sequences of mouse VK gene segment (mouse VK back primers) and 5 mouse JK forward primers. Amplification of mouse light chain V region genes using these PCR primers.
- The amplified VH and VK genes were linked to a linker [(Gly₄-ser)₃] to make scFv gene with VH-linker-VL gene structure. These scFv genes were amplified by PCR using VH back *Sfi*I primer and JK forward *Not*I primer. The resultant PCR products were cut with *Sfi*I and *Not*I enzymes and then subcloned into the *Sfi*I/*Not*I site of

pCANTAB 5E phagemid vectore.

- E. coli TG1 cells were transformed with scFv/pCANTAB 5E phagemid vector in the presence of M13 KO7 helper phage to make scFv displayed phage library.

2. Confirmation of the titer of phage displayed scFv library

- It is impossible to determine the repertoire of antibodies in the phage displayed scFv library. However, we can tell the possible range of antibody repertoire by determining the titer of M13 phage in the library. Thus, we determined the titer of M13 phage in the library by 10-fold dilution methods and found that the titer is more than 2×10^{10} /ml.
- Next, we determined whether this library can be used to produce monoclonal antibodies against flounder pathogens. To do this, we used formalin-killed *E. tarda* and recombinant protein of iridovirus MCP as antigens. We selected several M13 phage with gene 3-displayed scFv monoclonal antibodies against these antigens. These phages were infected into E. coli HB2151 cells to produce soluble scFvs and the soluble scFvs were purified by affinity column using anti-E-tag monoclonal antibody. We found that it took about 134 days to produce scFv monoclonal antibodies against these antigens using phage displayed scFv library.
- We also determined whether the scFv monoclonal antibodies can be used to ELISA, Western blotting, neutralization, and immunohistochemistry.

3. Production of scFv monoclonal antibodies against bacterial pathogens of flounder

- We used the phage displayed scFv library to produce monoclonal antibodies against a variety of bacterial pathogens of flounder: *Vibrio vulnificus*, *Streptococcus iniae*, *Edwardsiella tarda*, *Photobacterium damsela*.
- The formalin-killed bacteria were coated on the surface of culture dish and incubated with phage displayed scFv library. After intensive washing out of the unbound phage, we selected M13 phage clones which bound tightly to the formalin-killed bacteria. These phages were infected into E. coli HB2151 cells to produce soluble scFvs and the soluble scFvs were purified by affinity column using anti-E-tag monoclonal antibody.

- We determined whether the scFv monoclonal antibodies can be used to ELISA, Western blotting, neutralization, and immunohistochemistry.

4. Production of scFv monoclonal antibodies against viral pathogens of flounder

- We also used the phage displayed scFv library to produce monoclonal antibodies against a variety of viral pathogens of flounder: Lymphocystis virus, marine birnavirus, Hiram rhabdovirus, nodavirus, VHSV, iridovirus
- In this study, we used two different types of viral antigens, recombinant protein expressed in *E. coli* and synthesized peptide.
 - Recombinant protein: marine birnavirus VP2, nodavirus coat protein, iridovirus MCP
 - Peptide synthesis: lymphocystis virus MCP, hiram rhabdovirus G, VHSV G
- The viral antigens were coated on the surface of culture dish and incubated with phage displayed scFv library. After intensive washing out of the unbound phage, we selected M13 phage clones which bound tightly to the viral antigens. These phages were infected into *E. coli* HB2151 cells to produce soluble scFvs and the soluble scFvs were purified by affinity column using anti-E-tag monoclonal antibody.
- We determined whether the scFv monoclonal antibodies can be used to ELISA, Western blotting, neutralization, and immunohistochemistry.

5. Production of scFv monoclonal antibodies against new pathogens of flounder

- Recently, several reports suggested that IPNV and SFRV could be the possible causative agent of mass mortality in cultured flounder. Thus, we prepared scFv monoclonal antibodies against these viral pathogens. To produce scFv monoclonal antibodies, we prepared a recombinant VP2 protein of IPNV and synthesized peptides from amino acid sequences of SFRV L protein.
- The viral antigens were coated on the surface of culture dish and incubated with phage displayed scFv library. After intensive washing out of the unbound phage, we selected M13 phage clones which bound tightly to the viral antigens. These phages were infected into *E. coli* HB2151 cells to produce soluble scFvs and the soluble scFvs were purified by affinity column using anti-E-tag monoclonal antibody.

- We determined whether the scFv monoclonal antibodies can be used to ELISA, Western blotting, neutralization, and immunohistochemistry.

6. Development of rapid screening technique to detect bacterial and viral pathogens of flounder using scFv monoclonal antibodies

- Before using these scFv monoclonal antibodies to rapid screening kit, we, first, determined the cross-reactivities of the scFv monoclonal antibodies with other pathogens than themselves. Each scFv monoclonal antibodies were incubated with every antigens of flounder pathogens in 96-well ELISA plate and the cross-reactivities of the scFv were determined by ELISA. From the ELISA results, we selected 2 scFv clones mostly specific to each flounder pathogen and used them for development of rapid screening kit.
- We applied the scFv monoclonal antibodies to detect causative agent of mortality in flounder. Tissue lysates from diseased flounder were coated on the surface of 96-well ELISA plate (for ELISA) or dotted on the surface of membrane (for ELISPOT). After blocking unbound free surface with BSA, scFv monoclonal antibodies were added to the tissue lysates. The reaction between antigen in the tissue lysates and scFv monoclonal antibodies were determined by sequential adding of HRP-conjugated antibody and substrate. RNA was extracted from the same tissues and PCR (and nucleotide sequencing) was conducted to confirm the causative agent.
- Both ELISA and ELISPOT showed positive signal at the wells or dots which were incubated with scFv monoclonal antibodies against marine birnavirus and VHSV. The PCR and nucleotide sequencing showed that the tissues contained genes of marine birnavirus and VHSV. These data suggest that ELISA system and ELISPOT system using scFv monoclonal antibodies can be used for rapid screening for pathogens of flounder.

7. Determination of immunogenic and neutralizing epitope-containing protein using scFv monoclonal antibodies

- We used the scFv monoclonal antibodies to determine immunogenic and neutralizing epitope-containing proteins among structural proteins of viral pathogens of flounder. Basically all the viral antigens used in this study were recognized by scFv monoclonal antibodies in the phage display library. This suggests that all the antigens have

immunogenicity. Next, we did neutralization test to determine whether the scFv monoclonal antibodies can neutralize viral infectivity and found that scFv monoclonal antibodies against marine birnavirus VP2 and IPNV VP2 neutralize respective viral infection. These data suggest that marine birnavirus VP2 and IPNV VP2 are neutralizing epitope-containing proteins and that the epitopes recognized by these scFv monoclonal antibodies are neutralizing epitopes.

- To confirm whether the marine birnavirus VP2 and IPNV VP2 are immunogenic and induce neutralizing antibodies in flounder, we injected flounder intraperitoneally twice with the recombinant VP2 proteins of these viruses. At 30 days after injection, we collected sera from the flounder and determined antibody titer and neutralizing activity within the sera by ELISA and neutralization test, respectively. We found that flounder sera contained neutralizing antibodies against marine birnavirus and IPNV.

V. Suggestions for Application

1. Supply to fish farms

- Development of convenient and low-price rapid screening kit which can be easily applicable to the fish farms
- Development of convenient and more accurate rapid screening kit which can be easily applicable by experts in research center or institutes.
- Preparation of instruction manual and providing it to the fish farmer

2. Industrialization

- Rapid screening kit: marketing of the rapid screening kit by technical tie-up with pharmaceutical company
- Recombinant protein vaccine: application of the neutralizing epitope-containing protein to develop recombinant protein vaccine against viral diseases by technical tie-up with pharmaceutical company

3. Additional development

- Periodical screening for the introduction of new pathogens of flounder and, in case of appearance of new pathogens, production and addition of the new scFv monoclonal

antibodies to the current rapid screening system.

- Application of the new scFv monoclonal antibodies to select neutralizing epitope-containing protein among the proteins of the new pathogens.
- Making an attempt to apply the techniques to other cultured fish

4. Technology transfer

- Patent pending and technology transfer to pharmaceutical companies

CONTENTS

Submission letter.....	1
Summary (Korean).....	2
Summary (English).....	12
Contents (English).....	21
Contents (Korean).....	24
Chapter 1. Introduction.....	27
Section 1. Technical aspect.....	27
Section 2. Economical and industrial aspects.....	31
Section 3. Social and cultural aspects.....	32
Chapter 2. The present status of technological development.	34
Section 1. The present status of foreign countries.....	34
Section 2. The present status of Korea.....	36
Section 3. The prospects for the future	38
Chapter 3. Content and Result of the Study.....	40
Section 1. Materials and Methods.....	40
1. Development of phage displayed scFv library.....	40
2. Determination of the size of the phage displayed scFv library.....	40
3. Validation of phage displayed scFv library.....	41
4. Production of scFv monoclonal antibodies against bacterial pathogens of flounder.....	41
5. Production of scFv monoclonal antibodies against viral pathogens of flounder.....	42
6. Production of scFv monoclonal antibodies against new pathogens of flounder.....	42
7. Development of rapid screening technique using ELISA.....	43
8. Development of rapid screening technique using ELISPOT.....	44
9. Analysis of immunogenic and neutralizing epitope-containing protein among viral proteins.....	44
Section 2. Contents of the Study.....	45

1. Preparation of phage displayed scFv library from mouse immunoglobulin genes	45
2. Confirmation of the titer of phage displayed scFv library.....	45
3. Production of scFv monoclonal antibodies against bacterial pathogens of flounder.....	46
4. Production of scFv monoclonal antibodies against viral pathogens of flounder.....	46
5. Production of scFv monoclonal antibodies against new pathogens of flounder.....	46
6. Development of rapid screening technique to detect bacterial and viral pathogens of flounder using scFv monoclonal antibodies.....	46
7. Determination of immunogenic and neutralizing epitope-containing protein using scFv monoclonal antibodies.....	47
Section 3. Results.....	48
1. Preparation of phage displayed scFv library from mouse immunoglobulin genes	48
2. Confirmation of the titer of phage displayed scFv library.....	54
3. Production of scFv monoclonal antibodies against bacterial pathogens of flounder.....	59
4. Production of scFv monoclonal antibodies against viral pathogens of flounder.....	61
5. Production of scFv monoclonal antibodies against new pathogens of flounder.....	67
6. Development of rapid screening technique to detect bacterial and viral pathogens of flounder using scFv monoclonal antibodies.....	70
7. Determination of immunogenic and neutralizing epitope-containing protein using scFv monoclonal antibodies.....	75
Chapter 4. The Attainment of Objectives.....	79
Section 1. Objectives of the Study.....	79
1. Ultimate Objective.....	79
2. Details of Objectives.....	80
3. Points of rate.....	81
Section 2. The Attainment of Objectives.....	81
1. Preparation of phage displayed scFv library from mouse immunoglobulin genes	81
2. Confirmation of the titer of phage displayed scFv library.....	82
3. Production of scFv monoclonal antibodies against bacterial pathogens	

of flounder.....	82
4. Production of scFv monoclonal antibodies against viral pathogens of flounder.....	82
5. Production of scFv monoclonal antibodies against new pathogens of flounder.....	82
6. Development of rapid screening technique to detect bacterial and viral pathogens of flounder using scFv monoclonal antibodies.....	83
7. Determination of immunogenic and neutralizing epitope-containing protein using scFv monoclonal antibodies.....	83
Section 3. Rate of Attainment.....	84
 Chapter 5. Application	85
Section 1. Supply to fish farms.....	85
Section 2. Industrialization.....	85
Section 3. Additional development.....	85
Section 4. Technology transfer.....	85
 Chapter 6. References.....	87

목 차

제출문.....	1
요약문.....	2
Summary.....	12
Contents.....	21
목차.....	24
제 1 장 연구개발과제의 개요.....	27
제 1 절 기술적 측면.....	27
제 2 절 경제.산업적 측면.....	31
제 3 절 사회.문화적 측면.....	32
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	34
제 1 절 국외 관련 기술의 현황 및 문제점.....	34
제 2 절 국내의 관련 기술 현황 및 문제점.....	36
제 3 절 앞으로의 전망.....	38
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	40
제 1 절 연구수행 방법.....	40
1. 항체 유전자의 phage display library 제조.....	40
2. 제조한 phage display library의 size 분석.....	40
3. 제조한 phage display library의 유의성 검증.....	41
4. 기존에 보고된 넙치 병원성 세균들에 대한 scFv 단클론항체 제조.....	41
5. 기존에 보고된 넙치 바이러스에 대한 scFv 단클론항체 제조.....	42
6. 국내외에서 새로이 보고되는 병원체에 대한 scFv 단클론항체 제조.....	42
7. ELISA를 사용한 신속진단기술 개발.....	43
8. ELISPOT를 사용한 신속진단 기술 개발.....	44
9. 바이러스의 면역유도 단백질 및 중화 epitope 분석.....	44
제 2 절 연구수행 내용.....	45
1. Mouse 항체 유전자를 대상으로 phage display library 제조.....	45
2. 제조한 phage display library의 size 및 유의성 검증.....	45
3. 기존에 보고된 넙치의 세균성 병원체들에 대한 scFv 단클론항체 제조.....	46
4. 기존에 보고된 넙치의 바이러스성 병원체들에 대한 scFv 단클론항체 제조.....	46

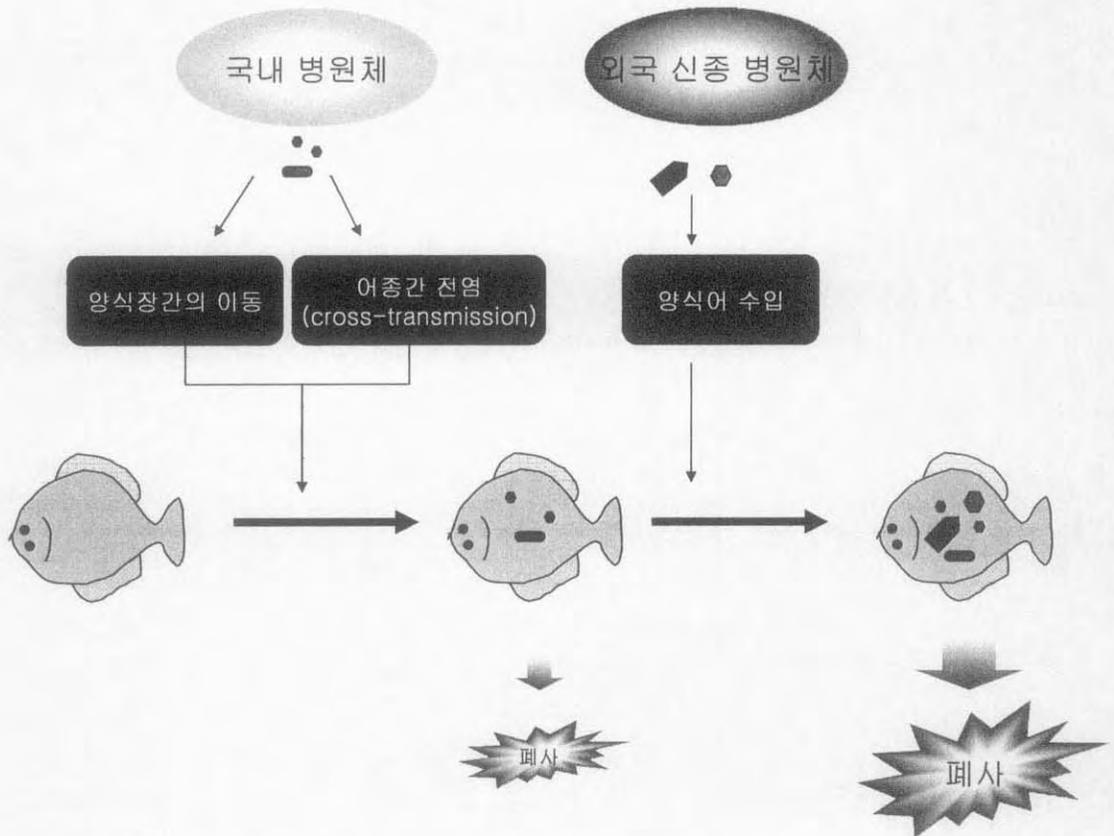
5. 국내외에서 새로 발견되는 병원체들에 대하여 scFv 단클론항체 제조.....	46
6. 제조한 scFv 단클론항체를 사용하여 기존에 보고된 세균 및 바이러스들을 동시에 신속진단하는 기술 개발.....	46
7. 제조한 scFv 단클론항체를 사용하여 기존에 보고된 넓치 바이러스의 면역유도단백질 및 중화 epitope를 지니는 단백질 확인.....	47
제 3 절 연구 결과.....	48
1. Mouse 항체 유전자를 대상으로 phage display library 제조.....	48
2. 제조한 phage display library의 size 및 유의성 검증.....	54
3. 기존에 보고된 넓치의 세균성 병원체들에 대한 scFv 단클론항체 제조.....	59
4. 기존에 보고된 넓치의 바이러스성 병원체들에 대한 scFv 단클론항체 제조.....	61
5. 국내외에서 새로 발견되는 병원체들에 대하여 scFv 단클론항체 제조.....	67
6. 제조한 scFv 단클론항체를 사용하여 기존에 보고된 세균 및 바이러스들을 동시에 신속진단하는 기술 개발.....	70
7. 제조한 scFv 단클론항체를 사용하여 기존에 보고된 넓치 바이러스의 면역유도단백질 및 중화 epitope를 지니는 단백질 확인.....	75
제 4 장 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	79
제 1 절 연구개발 목표 및 평가의 착안점.....	79
1. 연구개발 목표.....	79
2. 연차별 연구개발 목표와 내용.....	80
3. 평가의 착안점	
제 2 절 연구개발 목표의 달성도.....	81
1. Mouse 항체 유전자를 대상으로 phage display library 제조.....	81
2. 제조한 phage display library의 size 및 유의성 검증.....	82
3. 기존에 보고된 넓치의 세균성 병원체들에 대한 scFv 단클론항체 제조.....	82
4. 기존에 보고된 넓치의 바이러스성 병원체들에 대한 scFv 단클론항체 제조.....	82
5. 국내외에서 새로 발견되는 병원체들에 대하여 scFv 단클론항체 제조.....	82
6. 제조한 scFv 단클론항체를 사용하여 기존에 보고된 세균 및 바이러스들을 동시에 신속진단하는 기술 개발.....	83
7. 제조한 scFv 단클론항체를 사용하여 기존에 보고된 넓치 바이러스의 면역유도단백질 및 중화 epitope를 지니는 단백질 확인.....	83
제 3 절 상기 평가의 착안점에 따른 달성도에 대한 자체평가.....	84
제 5 장 연구개발결과의 활용계획.....	85

제 1 절 현장보급 방안.....	85
제 2 절 산업화 계획 방안.....	85
제 3 절 추가기술 개발 방안.....	85
제 4 절 기술이전 방안.....	85
제 6 장 참고문헌.....	87

제 1 장 연구개발과제의 개요

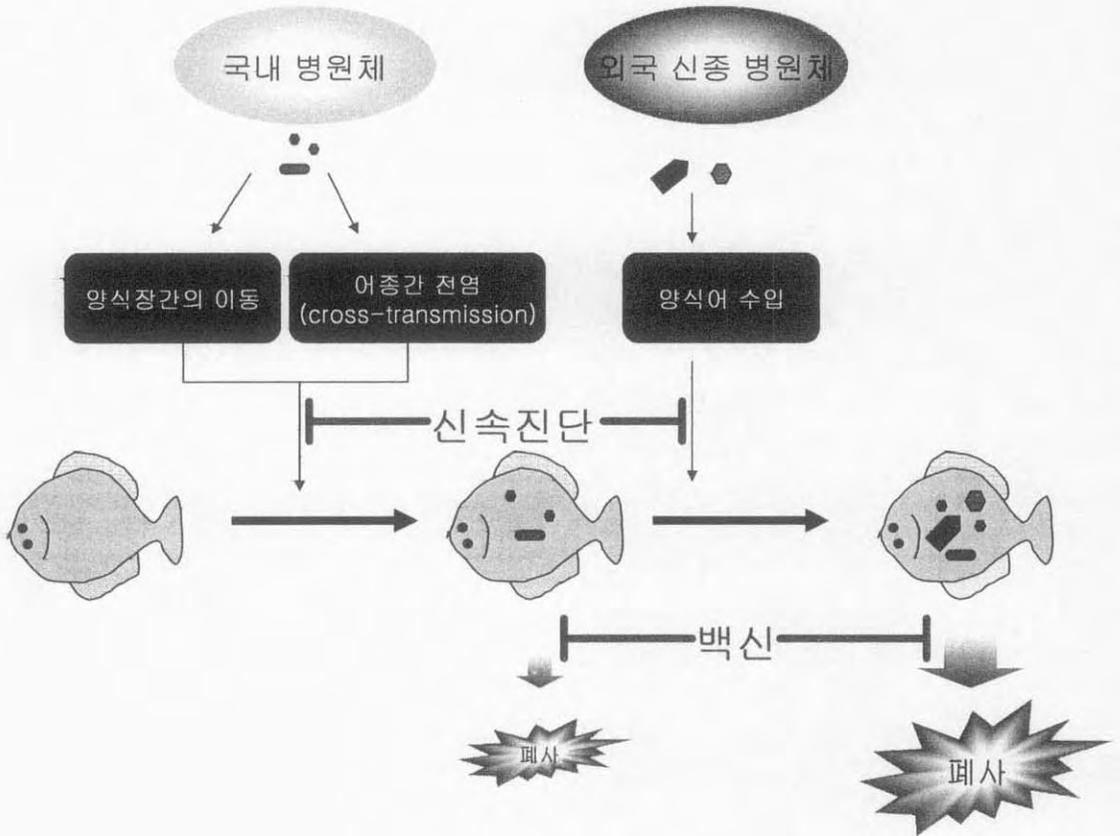
제1절 기술적 측면

- 어류는 단백질 공급원으로서 인간이 섭취하는 동물 단백질의 약 16%를 차지하고 있으며 이중 80%는 바다에서 어획된 것이다 (FAO, 1999). 그러나 수산 자원의 고갈로 인하여 바다에서 어획된 것만으로는 증가하는 단백질 수요를 충족시킬 수 없는 상황이 되었다. 따라서 부족한 어류 단백질을 충족시키기 위한 수산 양식업은 식품관련 산업 중 전 세계적으로 가장 가장 빠르게 성장하는 산업이 되었다 (James et al., 2001).
- 그러나 수산 양식이 급증함에 따라 바이러스, 세균, 기생충 등의 감염에 의한 대량폐사가 빈번하게 발생하여 수산 양식업의 발전에 큰 장애가 되고 있다. 수산양식의 전문 보험사인 SMMI (Sunderland Marine Mutual Insurance)의 보고서에 따르면 영국과 아일랜드에서 1998년 발생한 어류 폐사의 23%가 바이러스 감염에 의한 것이었다 (IntraFish). 그리고 노르웨이의 경우 IPNV한 종류 바이러스에 의하여 양식 연어류는 매년 6천만 달러 정도의 손실을 입고 있다 (Christie, 1997). 또한, 양식새우의 바이러스 감염에 의한 피해액은 중국 1조 3천억 원 (1993), 태국 6,500억원 (1996), 에콰도르 4,000억원 (1999)에 달하고 있다(CP Group (Thailand) Shrimp Culture Newsletter March 2000).
- 우리나라의 경우도 양식어류에 질병의 발생이 급증하여 피해가 커지고 있는데, 특히 최근들어 외국으로부터의 양식어 수입 증가로 인하여 신종 병원체의 유입 및 이로 인한 새로운 질병의 발생이 늘어나는 추세이다.
- 또한 국내의 양식업자들 사이에 치어 등의 양식어 이동이 빈번하게 이루어져 한 지역에서 발생한 질병이 순식간에 전국에 퍼져가고 있으며, cross-species transmission 현상에 의하여 한 종의 어류에만 감염하던 병원체가 다른 종의 어류에도 감염하여 현재는 종 특이적인 현상이 사라지고 거의 모든 양식어종에 거의 모든 종류의 기생충, 세균 및 바이러스들이 감염하는 상황이 되었다.



- 따라서 우리나라 양식어류에 발생하는 병원체 감염에 의한 피해를 줄이기 위한 대책 마련이 시급한 상황이다.
- 그 대책으로는 다음과 같은 것을 들 수 있다.
 - 1) 외국으로부터의 병원체 유입 차단.
 - 2) 국내 양식장 사이의 병원체 확산 방지
 - 3) 기존 병원체들에 대한 백신 개발
- 위 대책 중 병원체 유입 및 확산 방지는 단기적인 대책으로 양식어류에 존재하는 병원체를 정확하고 신속하게 진단하여 유입 및 확산을 방지하여야 하고 백신 개발의 경우 장기적인 대책으로 중요 병원체의 순서로 백신을 개발하여 질병 발생을 막아야 할 것이다.
- 그러나 이의 시행에 있어서 많은 문제가 있는데, 가장 큰 문제로는 양식어에 감염하는 병원체의 종류가 매우 많다는 것이다. 예를 들어 양식 넙치의 경우 herpesvirus, marine birnavirus, hirame rhabdovirus, VHSV, iridovirus, nodavirus, lymphocystis virus,

aquareovirus 등의 바이러스들, E. tarda, Flexibacter, V. anguillarum, V. ichthyenteri, S. iniae, S. parauberis, L. garvieae 등의 세균들과 같이 매우 다양한 병원체들이 국내 양식업에서 발견 되었으며 외국의 경우 이외에 다양한 종류의 병원체들이 발견 되었고 또한 계속하여 새로운 병원체의 발견이 보고 되고 있다.

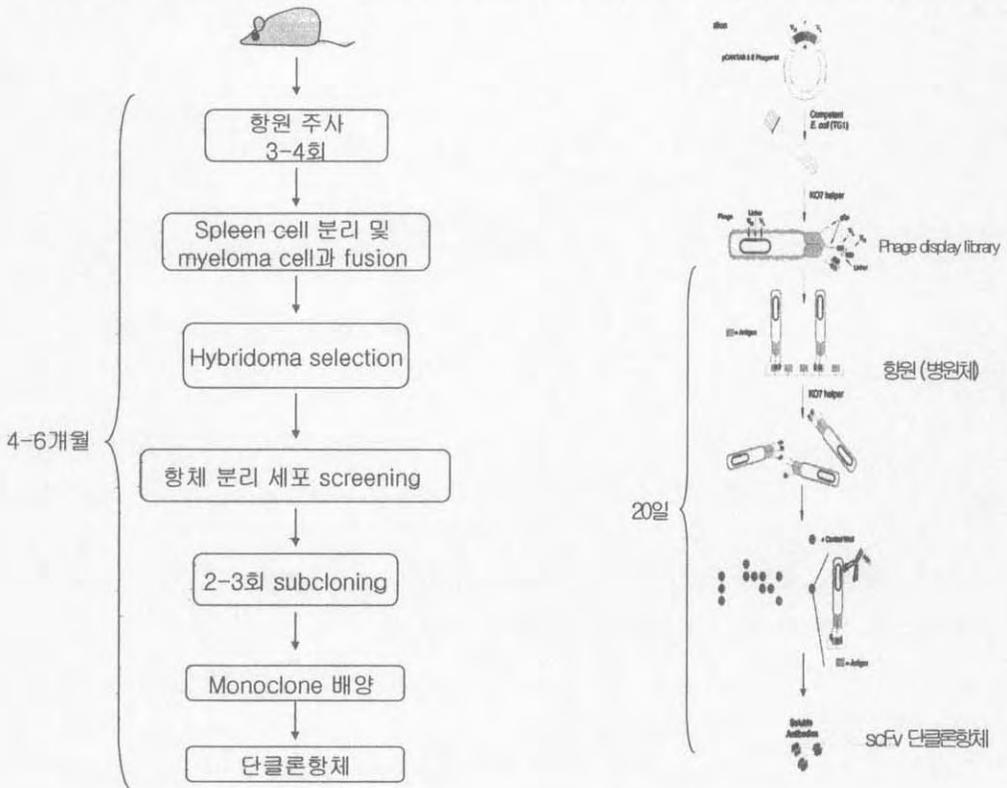


○ 현재 몇몇의 병원체에 대한 단클론항체가 제조되어 있다. 그러나 병원체에 의한 질병을 효과적으로 조절하기 위해서는 이들 모든 병원체들을 효과적으로 그리고 신속하게 진단하는 것이 필요한데, 현재까지 모든 병원체들을 신속 진단할 수 있는 진단법이 개발되어 있지 않고 특히 최근에 새로이 발견되는 병원체들에 대하여는 신속 진단법이 개발되기까지는 많은 시간이 소요된다. 따라서 그 기간동안에 아무 대책 없이 새로운 병원체가 국내로 유입되거나 이미 유입된 병원체들의 경우 국내의 양어장으로 급속히 확산되고 있다.

○ 그리고 백신의 경우, 특히 바이러스 백신의 경우 백신 개발의 중요한 factor가 바이러스의 구조 단백질들 중 백신 대상 단백질을 선정하는 것이다. 기존의 방법은 바이러스에

감염된 어류에서 생성하는 항체를 분석하여 이를 바탕으로 바이러스의 구조단백질들 중 면역유도단백질을 확인하고 또한 바이러스에 대한 단클론항체들을 제조하여 이들 중 바이러스 중화 역가가 있는 것을 선별 후 이 항체가 잡는 바이러스 구조 단백질들을 선별하는 방법을 사용한다. 이 방법은 매번 양식어를 사육하여 실험을 하여야 하고 이 과정 중에 사육 조건에 따라 결과의 편차가 크기 때문에 정확한 결과를 얻기까지는 많은 시간이 필요하다. 또한 단클론항체를 제조하는데 적어도 4개월 이상이 필요하고 고도로 숙련된 사람이 필요함은 물론 세포 배양 등과 같이 비용이 많이 든다.

- 이와 같은 문제점들 때문에 현재 대부분 병원체에 대한 신속 진단 및 많은 바이러스의 백신 개발이 지연되고 있는 상황이다. 따라서 짧은 시간에 쉽고 효과적으로 병원체에 대한 단클론항체를 만드는 방법의 개발이 필요하다.
- 본 연구에서는 양식어류에 질병을 유발하는 병원체들에 대한 단클론항체를 약 20여 일 만에 쉽고 빠르게 만들 수 있는 기술을 개발하고자 한다. 본 기술은 phage display 를 사용한 기술로서 어류의 항체 유전자의 cDNA를 대상으로 phage-display library를 만든 다음 이를 사용하여 원하는 병원체에 대한 다양한 단클론항체들을 만들고자 한다.



- 이와 같이 제조한, 다양한 병원체들에 대한 단클론항체들을 사용하여 병원체들을 조기에 신속 진단할 수 있는 기술을 개발하고 또한 다양한 바이러스의 백신 대상 단백질들을 신속하게 선별하여 여러 바이러스들에 대한 백신이 신속하게 개발될 수 있도록 한다.

제2절 경제·산업적 측면

- 인구가 증가하고 어족자원이 고갈되어 감에 따라 양식업의 중요성이 부각되어가고 있다. 또한 최근 들어 새로운 해양법이 적용되고 그 결과 각 나라마다 배타적 보호수역이 늘어남에 따라 양식업의 중요성이 더욱더 증가해 가고 있다. 따라서 세계 각국에서 양식업의 활성화를 위하여 많은 노력들을 기울이고 있다.
- 우리나라의 경우 삼면이 바다로 둘러싸여 있다. 따라서 질병 및 기타 관리를 철저히 하는 경우 수산양식업이 크게 발전할 수 있는 가능성이 매우 높다. 실제 우리나라에서 다양한 어종을 양식하고 있다. 그 결과 농어민의 소득 증대에 큰 기여를 하는 한편 일반 국민들의 식생활에 있어서 고급 단백질의 대중화에 큰 기여를 하고 있다.
- 그러나 현재 우리나라의 수산 양식에 있어서 다음과 같은 문제점이 있다.
 - 1) 병원체 감염 등에 의한 대량 폐사에 의한 양식어민들의 피해
 - 2) 질병 치료를 위한 항생제 사용 등으로 인하여 양식어의 품질 저하
 - 3) 국내 시장 규모가 작기 때문에 양식 규모가 기업화 되지 못하고 따라서 효율적인 운영이 어려우며, 수익면에서 문제가 있음
- 따라서 양식업이 영세성을 면치 못하고 반복되는 폐사 발생으로 인하여 어민들의 손실이 커짐에 따라 농어민들이 받는 경제적인 타격이 막대하여 농어촌 지역의 발전에 악영향을 주고 있다. 또한 질병에 의한 폐사 때문에 발생한 부족한 만큼의 치어를 매년 외국에서 수입하기 때문에 우리나라의 전체 무역 수지에 있어서도 좋지 않은 영향을 미치고 있으며 이것이 새로운 병원체의 유입원이 되기도 한다.
- 따라서 병원체 감염에 의한 폐사를 줄이고 더불어 어민 소득의 증대를 위하여 병원체 감염에 의한 질병의 확산을 막고 백신의 개발을 통한 질병의 예방은 반드시 이루어져야 할 필요한 사업이라고 할 수 있다.

- 만약 질병 확산 방지 및 백신을 통한 질병이 예방되는 경우 항생제를 사용하지 않은 고품질의 어류를 원하는 만큼 생산 할 수 있게 될 수 있다. 고품질의 어류를 생산하는 경우 이의 판매 시장을 국내에 국한하지 않고 세계 시장에 수출함으로써 시장 규모를 획기적으로 늘림으로써 국내 수산 양식업의 규모를 늘림에 따라 기업화가 가능하고 또한 효율적인 운영을 통하여 수익을 획기적으로 늘릴 수 있게 된다.
- 예로써 노르웨이의 경우 질병의 효과적인 조절 및 백신을 사용한 질병 예방을 통하여 항생제를 사용하지 않은 고품질의 연어를 생산하여 연어의 10% 이하만 자국 내에서 소비 되고 90% 이상을 수출하고 있다.
- 따라서 병원체 감염에 의한 폐사를 줄이고 더불어 어민 소득의 증대를 위하여 병원체 감염에 의한 질병의 확산을 막고 백신의 개발을 통한 질병의 예방은 반드시 이루어져야 할 필요한 사업이라고 할 수 있다. 이를 위해서 다양한 병원체에 대하여 신속하고 효과적으로 진단 할 수 있는 기술의 개발이 필요하고 또한 다양한 병원체에 대한 백신의 신속한 개발이 필요하다.
- 본 연구에서 개발하고자 하는 “phage display를 사용한 단클론항체의 신속 제조 기술”은 바이러스, 세균, 기생충 등에 대한 단클론 항체를 신속하게 제조할 수 있는 기술로서 다양한 병원체에 대한 신속진단 기술 개발 및 백신 개발에 필수적인 기술이다. 본 기술을 사용하여 질병의 확산을 막음과 동시에 예방이 이루어지면 양식규모를 대형화하여 고품질의 양식어를 일본 등의 외국에 수출함으로써 국가 경제에 기여함은 물론 양식어민들의 소득 증대에도 크게 기여할 수 있다.

제3절 사회·문화적 측면

- 최근 WTO 체제의 출범으로 농수산물의 시장이 개방되어 수산 양식업도 국제 경쟁력을 키워야 한다. 또한 세계 주요 각국이 배타적 경제수역을 선포함에 따라 어획량에 제한이 가해지고 이와 더불어 어민들의 소득이 감소하게 되었다.
- 이에 대한 타개책 중의 하나로 기르는 어업인 양식업의 중요성이 더욱더 부각되는 상황이다.

- 우리나라에서도 다양한 어종을 대상으로 양식을 하고 있다. 그러나 우리나라의 연어류 양식은 외국에 비하여 경쟁력이 떨어지는 상황이다. 아직 양식 어류에 발생하는 질병에 대한 대책 마련이 되어 있지 않은 상황이다. 현재 다양한 종류의 병원체에 국내 양식장에 널리 퍼져 있으며 이들에 의한 질병의 발생 시 이를 조절하지 못하고 대량 폐사가 발생함은 물론이고 살아남은 어류도 표준상태가 되어 정상적인 성장을 하지 못하고 발육 부진의 상태가 된다.

- 그 결과 양식어민들이 큰 피해를 입음은 물론 양식어의 단가가 올라가게 되어 외국산 양식어와의 가격 경쟁에서 뒤지게 된다. 또한 항생제, 화학약품 등의 과다 사용으로 인하여 고품질의 양식어 생산이 이루어지지 않게 되었으며, 그 결과 외국에의 수출은 물론 국내의 소비자들에게도 선호도가 떨어져 양식어의 판로에 제한요인이 되고 그 결과 양식업의 규모가 늘어나지 못하는 중요한 요인이 되어 왔다. 따라서 우리나라의 수산양식업은 경쟁력을 잃고 퇴보하는 상황이다.

- 따라서 양식어류에 막대한 피해를 주고 있는 병원체의 확산을 막고 이들에 대한 백신을 개발하여 이들에 의한 질병을 퇴치함으로써 우리 양식업을 경쟁력 있는 산업으로 키워 놓을 필요가 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황 및 과학기술정보

제1절 국외의 관련 기술의 현황 및 문제점

○ 세계 여러 나라에서 양식어류에 질병을 유발하는 병원체, 특히 세균과 바이러스에 대한 신속 진단법 개발과 백신 개발을 위하여 많은 노력을 기울여 왔다.

○ 신속진단:

- 대부분의 세균 및 바이러스에 대하여 PCR을 사용한 신속 진단법이 개발되어 있음
- 특정 target 병원체의 존재 유무에 대하여 PCR을 수행하는 경우 신속한 결과를 얻을 수 있다는 장점이 있음
- 그러나 증세만으로 발생한 질병의 원인체를 예측할 수 없는 경우 PCR을 사용한 진단에 있어서 다음과 같은 문제점들이 있음

1) RNA 추출 및 cDNA 합성 등의 전처리 과정이 필요

2) 처음에 외부 증세만으로 어떤 병원체인지를 예측할 수 없는 경우 다양한 병원체들을 대상으로 하는 PCR을 수행하여야 하는데, 다양한 병원체에 대하여 PCR 조건이 다른 경우가 많아서 다양한 병원체에 대하여 동시에 PCR을 수행하는 것이 어려움. 따라서 신속 진단이 이루어 지지 않고 많은 시간이 소요되는 경우가 많음.

3) 비특이적인 PCR 산물이 나올 가능성이 있기 때문에 sequencing 등의 확인 작업이 필요한 경우가 많은데 이 경우 많은 노력과 시간이 소요됨

4) 세균의 경우 혈청형에 따라 병원성에 차이가 나는 경우가 많은데, PCR 결과 만으로는 혈청형을 알기가 어려움. 따라서 단클론항체를 사용한 혈청형 분석이 필요함

- 이와 같은 이유 때문에 실제 질병이 발생하였을 때 대부분의 경우 세균성인지 바이러스성인지를 실험 통해 확인 하고 세균인 경우 API 등의 test를 통하여 Genus 등을 확인 후 PCR을 수행하는 경우가 대부분임. 그리고 바이러스로 확인되는 경우 PCR을 수행하는 데, 바이러스로 확인이 되기까지는 세포 접종 후 CPE 확인 이라는 오랜 절차가 필요함.

- 따라서 다양한 병원체에 높은 특이성을 지니는 단클론항체를 사용하여 신속하게 병원체를 진단할수 있는 system의 개발이 필수적임

○ 백신 개발:

- 세균의 경우 대부분의 병원성 세균에 대한 백신이 개발되어 있으며 실용화되어 있거나 실용화를 위한 준비를 하는 단계이다.
- 바이러스의 경우 크기가 작은 바이러스들에 대한 재조합 백신개발이 진행되어 왔음
 - 1) IPNV의 경우 제약회사 Intervet에서 VP2를 이용한 재조합 백신을 개발하여 시판 중에 있으며 AlphaPharma에서 IPNV의 약독화 백신을 시판 중에 있음
 - 2) IHNV의 경우 미국 오레곤 주립대의 Leong 박사팀이 envelope glycoprotein인 G를 사용한 재조합 백신 및 DNA 백신을 개발하였으나, 상품화되지 못했음
 - 3) Nodavirus의 경우 노르웨이의 제약회사 AlphaPharma에서 capsid protein을 대상으로 한 재조합 백신을 만들어 현장 실험 중임.
- 그러나 Iridovirus, lymphocystis virus, herpesvirus, ISAV (orthomyxovirus) 등과 같이 거대한 바이러스의 경우 백신 대상 단백질의 선정에 어려움이 있어 백신 재조합 백신 개발의 진행에 어려움이 있음.
- Iridovirus의 경우 일본의 Nakagima 박사팀이 바이러스 입자를 포르말린으로 사멸시킨 백신을 개발하였으나 제조 단가가 매우 비싸기 때문에 실용화에 문제가 있음
- ISAV의 경우 AlphaPharma 등에서 불활성화된 바이러스를 사용한 백신을 개발, 그러나 제조단가가 비싸서 실용화에 어려움
- 따라서 효과적이며 실용적인 바이러스의 백신 개발이 신속하게 진행되기 위해서는 어류 바이러스들의 면역유도단백질 및 중화 epitope를 지니는 단백질의 신속한 분석이 필수적임

○ Phage display library를 사용한 단클론항체 제조

- 이와 같이 다양한 어류 병원체에 대한 신속 진단 및 백신 개발을 위해서는 병원체에 대한 단클론 항체가 필수적임
- 현재 전세계적으로 생쥐를 사용한 단클론항체의 제조 기술은 널리 보편화되어 있음. 따라서 어류 병원체에 대한 많은 단클론항체들이 제조되어 있음. 그러나 생쥐를 사용하여 단클론항체를 제조하는 데에는 세포배양, 세포융합, 오랜 기간 동안의 selection 과정 등이 기술이 필요하다.
- 또한 이 과정을 수행하는 데에 적어도 4-6개월이라는 기간이 필요하고, 또한 이 기간 동안 지속적으로 세포를 배양하여야 하기 때문에 인력 및 제조비용이 많이 요구되기 때문에 다양한 병원체들에 대하여 손쉽게 단클론항체를 만들어내지 못하고 있음. 특히 새롭게 발견되는 병원체들에 대하여 신속하게 단클론항체를 만들 수 없기 때문에 신속진단이 어렵게 되고 그 결과 새로운 질병이 아무 대책 없이 확산되는 결과가 발생함
- 따라서 보다 손쉽고 빠르게 다양한 병원체에 대한 단클론항체를 제조하기 위한 방법들을 개발하고자 노력하고 있다.

- 사람이나 생쥐 등의 경우 항체 유전자의 분석이 이미 완료되어 있으며 이를 바탕으로 항체의 유전자를 M13 phage의 표면에 항체를 발현시키는 방법인 phage display법을 사용하여 library를 만든 후 이로부터 원하는 항원에 대한 단클론항체를 20일 정도안에 빠르고 쉽게 만드는 법을 개발하여 사용하고 있음.
- 어류의 경우 넙치 및 무지개송어 등이 항체 유전자의 분석이 완료 되었으나 아직 phage display법을 사용한 library 제작 및 이를 사용한 단클론항체 생산은 시도되지 않았음

제2절 국내의 관련 기술 현황 및 문제점

- 우리나라 역시 양식어류에 질병을 유발하는 병원체, 특히 세균과 바이러스에 대한 신속 진단법 개발과 백신 개발을 위하여 많은 노력을 기울여 왔다.
- 신속진단
 - 외국과 거의 유사한 상황임
 - 현재 대부분 세균 및 바이러스에 대한 PCR 진단이 가능함
 - 특정 target 병원체의 존재 유무에 대하여 PCR을 수행함으로써 신속 진단이 가능하나 증세만으로 발생한 질병의 원인체를 예측할 수 없는 경우 앞에서 언급한 외국의 경우와 같이 PCR을 사용한 진단에 있어서 문제점을 안고 있음
 - 따라서 단클론항체를 사용하여 다양한 병원체를 대상으로 동시에 신속 진단하는 기술의 개발이 필요한 상황임
- 백신개발
 - 세균의 경우 국립수산과학원 등에서 *V. anguillarum*, *E. tarda*, *Streptococcus* 등에 대한 백신을 개발하였음. 그리고 다른 세균들에 대하여 계속하여 백신을 개발하고 있음
 - 바이러스의 경우 본 연구팀과 국립수산진흥원에서 주로 진행하여 왔음. 국립수산진흥원의 경우 iridovirus의 사멸화 백신을 개발하여 백신효과 실험 중에 있으며 본 연구진과 공동으로 iridovirus의 재조합단백질 백신 개발을 진행 중임.
 - 본 연구팀은 IHNV, IPNV, marine birnavirus 등의 구조단백질들중 면역유도 특성이 있는 단백질을 최초로 확인하여 보고한 바 있으며 (Lee et al., 1996; Park & Jeong, 1996; Ristow et al., 2000; Moon et al., 2004) 이를 바탕으로 DNA 백신 및 재조합 단백질 백신을 개발하여 백신효과 실험 중에 있음
 - 그러나 다른 여러종류의 바이러스, 특히 크기가 큰 바이러스들에 대한 재조합 단백

질 백신 개발관련 연구는 백신 대상 단백질 선정에 어려움이 있어 진행이 느린 상황임

- 따라서 단클론항체를 사용하여 바이러스 단백질들 중 면역유도 특성이 있는 것과 중화 epitope를 지니는 것들을 선별하여 이들을 대상으로 백신을 개발할 필요성이 있음

○ Phage-display library를 사용한 단클론항체 제조

- 국내의 경우 단클론항체를 제조하는 방법으로써 생쥐를 사용하여 단클론항체를 제조하는 방법은 널리 보편화 되어 있음.
- 실제 본 연구진도 바이러스 및 어류 항체에 대한 단클론항체를 제조하여 여러 실험에 사용한바 있음 (Lee et al., 1996; Bang et al., 1996; Cho et al., 1997 & 2002).
- 그러나 시간, 비용 등의 앞에서 언급한 문제점들 때문에 다양한 병원체에 대한 단클론항체를 효과적으로 제조하고 있지 못하고 있음. 따라서 국내의 어류 질병의 진단 및 백신 관련 연구의 활성화를 위해서는 단클론항체를 쉽고 빠르게 제조할 수 있는 기술이 필요한 상황임
- 어류 항체 연구와 관련하여 본 연구진이 최초로 넙치의 항체 유전자를 클로닝하여 보고한 바 있음 (Bang et al., 1996; Lee et al., 2001).
- 또한 M13 phage를 사용하여 대상 유전자를 phage display시키는 법은 국내에서도 보급되어 있으며 본 연구진도 사람의 항체 유전자의 phage display library를 제조하여 이로부터 원하는 단클론항체를 선별 및 분리하는 기술을 확보하여 이를 사용한 연구 결과를 보고한 바 있음 (Lee et al., 2004; Son et al., 2004)
- 따라서 phage display library를 사용하여 어류 병원체에 대한 단클론항체 제조를 쉽고 빠르게 제조하는 데에 필요한 기술은 이미 본 연구진이 확보한 상황이다.
- 본 연구진이 보유한 기술들 중 본 연구의 진행에 필요한 기술들은 아래의 표1 과 같다.

표 1. 본 연구계획과 관련하여 본 연구진이 보유한 기술

보유기술	보유 중인 기술 내용	비고 (주요 발표 논문)
Phage display library	<ul style="list-style-type: none"> - 항체 scFv의 phage display library 제조 기술 - M13 phage에 scFv 항체 발현 기술 - 항원에 specific한 scFv 단 클론 선별 기술 - E. coli에서 scFv 항체 단백질 발현 기술 - scFv 항체의 affinity 및 specificity 분석 기술 	<p>J. Immunological Methods (2004) 286: 187-201</p> <p>J. Immunotherapy (2004) 27(3): 201-210</p>
어류 항체 유전자	<ul style="list-style-type: none"> - 어류 항체 유전자 library 제조 기술 - 어류 항체 유전자 클로닝 및 분석 기술 - mouse 항체 유전자 분석 기술 	<p>Dis. Aquat. Org. (1996) 26: 197-203</p> <p>Fish & Shellfish Immunol. (2001) 11: 537-540</p> <p>European J. Immunogenetics (2002) 29:449-452</p>
바이러스	<ul style="list-style-type: none"> - 세포배양 및 바이러스 분리 기술 - 바이러스 유전자 분석 기술 - 바이러스 immunogenic protein 분석 기술 - 중화 epitope를 지니는 단백질 분석 기술 - 재조합 단백질 백신 제조 기술 - DNA 백신 제조 기술 	<p>Fish Pathology (1985) 20: 463-468</p> <p>J. Fish Diseases (1993) 16: 471-478</p> <p>Fish Pathology (1995) 30: 279-280</p> <p>J. General Virology (1996) 77: 1731-1737</p> <p>Fish & Shellfish Immunol. (1996) 6: 207-219</p> <p>BBRC (1997) 233: 316-319</p> <p>Dis. Aquat. Org. (2000) 42: 163-172</p> <p>J. Biol. Chem. (2002) 277: 41489-41496</p> <p>Dis. Aquat. Org. (2003) 53: 11-13</p> <p>Archives of Virology (2004) in press</p> <p>Virology (2004) (accepted)</p>
세균	<ul style="list-style-type: none"> - 세균의 분리 동정 기술 - 단클론항체를 사용한 혈청형 분석 기술 	<p>J. Wildlife Diseases (1988) 24: 364-365</p>
신속진단	<ul style="list-style-type: none"> - ELISA를 사용한 신속진단 기술 - ELISPOT을 사용한 신속진단 기술 - PCR을 사용한 신속진단 기술 - Immuno-PCR을 사용한 신속진단 기술 	<p>Dis. Aquat. Org. (1996) 26: 197-203</p> <p>J. Fish Pathol. (1998) 11: 43-50</p> <p>J. Fish Pathol. (1998) 11: 61-67</p>
기타	Balb/c mouse를 사용한 단클론항체 제조 기술	J. General Virology (1996) 77: 1731-1737

제3절 앞으로 전망

- 현재 우리나라의 수산양식업은 국가 전체의 경제에 있어서 차지하는 비중이 매우 미약하다. 그러나 전 세계적으로 보았을 때 양식 관련 산업은 그 시장 규모가 매우 크며 점점 커가는 추세에 있다. 우리나라가 삼면이 바다로 둘러싸인 입지 조건을 감안한다면 양식업이 지금보다 훨씬 더 큰 산업으로 발전할 가능성이 높으며, 그 결과 국가 경제의 한 부분을 담당할 수 있는 중요한 산업이 될 수 있다.

- 그러나 수산양식업의 발전을 위하여 반드시 해결하여야 할 문제점이 병원체 감염에 의

한 폐사이다. 양식 어류의 병원체 감염에 의하여 발생하는 질병에 대한 대책을 마련하지 않고 방치하여 두는 경우 우리나라의 양식업은 외국과의 경쟁력을 잃게되고 따라서 자생력을 잃게 될 것이다. 이는 우리나라의 양식어민들의 소득 감소 및 농어민 경제에의 타격일 뿐만이 아니고 우리나라에서 소비되고 있는 어류의 고급 단백질을 모두 외국에서 수입해야하는, 국가 경제에도 큰 부담이 될 수 있다.

- 따라서 이에 대한 대비책이 필요한데, 본 연구의 결과 양식 어류의 다양한 병원체에 대한 신속 진단 법이 개발되고 또한 백신 개발이 이루어져서 양식업자에게 보급되면 우리나라의 양식업자들의 피해를 크게 줄임은 물론 외국업자들과의 경쟁에서 우위를 점할 수 있게 된다. 그리고 백신처리결과 항생제를 사용하지 않은 고품질의 어류를 대량으로 생산할 수 있게 되면 외국에 수출도 가능하여 농어민의 소득 증대와 더불어 양식업이 국가 경제의 주요 산업으로 발전하는 데에 기여할 수 있게된다. 또한 본 연구 결과 다양한 종류의 병원체들에 대한 단클론항체를 제작하여 진단 키트가 개발되는 경우 이를 외국에 수출도 가능할 것으로 판단된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 연구수행 방법

1. 항체 유전자의 phage display library 제조

Balb/C mouse 20마리 이상으로부터 비장세포를 취하여 total RNA를 추출한 후 total RNA에서 cDNA를 합성한다. IMGT (<http://imgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoire/Proteins>) 및 GenBank에 있는 mouse의 VH 및 VL 염기서열을 바탕으로 PCR primer를 design한다. VH의 경우 첫 번째 V gene segment의 서열을 바탕으로 Up primer (VH-UP)를 제조하고 4개의 J gene segment 모두에 대하여 Down primer들을 (VH-DOWN) 제조한다. VL의 경우 역시 첫 번째 V_k 및 V_λ gene segment를 바탕으로 Up primer (V_{Lk}-UP 및 V_{Lλ}-UP)들을 제조하고 5개의 J_k gene segment 및 5개의 J_λ gene segment 모두에 대한 Down primer들을 (V_{Lk}-DOWN 및 V_{Lλ}-DOWN) 제조한다. 제조한 PCR primer들을 VH-UP::VH-DOWN, V_{Lk}-UP::V_{Lk}-DOWN, V_{Lλ}-UP::V_{Lλ}-DOWN의 조합으로 하여 PCR을 수행한다.

PCR 결과 증폭된 VH 및 VL 유전자를 Linker와 섞은 후 다시 PCR을 수행한다. 이때 Up primer로는 VH-UP의 5'-동 부분에 SfiI을 붙인 것을, 그리고 Down primer로는 V_{Lk}-DOWN 및 V_{Lλ}-DOWN에 NotI을 붙인 것을 사용하여 PCR을 수행하여 VH-Linker-VL과 같은 fusion gene을 제조한다.

이와 같은 과정을 거쳐 제조된 VH-Linker-VL PCR 산물을 SfiI과 NotI으로 절단한 다음 pCANTAB 5E phagemid vector의 SfiI-NotI site에 ligation 시킨다. VH-Linker-VL이 들어있는 pCANTAB phagemid vector를 E. coli TG1 strain과 M13 KO7 helper phage를 사용하여 M13 phage에 rescue 시킨 다음 phage display library를 제조한다.

2. 제조한 phage display library의 size 분석

본 연구의 성공 여부를 결정짓는 중요한 요소 중에 하나로 library의 size를 들 수 있다. Library가 충분히 크지 않으면 이후에 다양한 병원체에 대한 단클론항체를 제조할 때 affinity가 높은 것이 나오지 않을 수 있다. 따라서 매번 library를 제조한 다음 반드시 size를 check한다.

M13 phage에 rescue 시켜 제조한 phage display library를 10-fold serial dilution 시킨 다음 각각을 E.coli TG1 strain에 감염 시킨 후 plaque assay를 통하여 PFU를 구함으로서 titer를 확인 한다. 적어도 10¹² PFU/ml 이상이 되는 지를 확인 하고 이보다 미흡할 경우 library를 다시 제조한다.

3. 제조한 phage display library의 유의성 검증

Phage display library의 size가 충분히 큰 것이 확인 되면 이를 사용하여 다양한 병원체에 대한 단클론항체를 제조하기에 앞서 병원성 세균과 바이러스 하나씩을 대상으로 약 20일 정도안에 affinity가 높은 단클론항체가 제조되는 지를 확인 한다. 이 목적을 위하여 우선적으로 *E. tarda*와 iridovirus를 사용한다.

먼저 배양 용기에 대상 병원체를 coating한다. 이후 M13 phage를 넣고 반응 시킨 후 항원에 붙지않는 phage를 세척하여 제거하는 과정을 10회 이상 반복한다. 다음으로 항원에 붙어있는 M13 phage에 *E.coli* TG1 strain을 첨가하여 infection 시킨 후 infection된 *E.coli*를 agar plate에 접종하여 plaque를 형성시킨다. 각각 형성된 plaque를 96 well plate의 각각 well에 접종한다. *E.coli*를 배양하면서 배양액에 방출되어 나오는 M13 phage들 중 항원에 specific한 항체를 display하는 phage를 M13 specific 항체를 사용한 ELISA를 통하여 선별한다.

선별된, 항체를 display하는 M13 phage를 다시 *E.coli* HB2151 strain에 infection 시켜 배양한다. pCANTAB 5E phagemid vector의 VH-Linker-VL fusion gene 다음에는 Amber stop codon이 있다. *E.coli* TG1 strain에는 Amber stop codon을 억제하는 suppressor tRNA가 존재하여 Amber stop codon이 작동하지 못하고 VH-Linker-VL fusion gene이 M13 phage의 gene3에 연결된 채로 발현되어 M13 phage에 display된다. 그러나 *E.coli* HB2151 strain suppressor tRNA가 존재하지 않기 때문에 Amber stop codon이 작동하여 VH-Linker-VL fusion gene이 M13에 display되지 않고 대신 soluble한 형태로 분비 된다. 따라서 VH-Linker-VL fusion gene을 포함하는 M13 phage를 *E.coli* HB2151에 배양함으로써 병원성 세균 및 바이러스에 대한 soluble한 scFv 단클론항체를 제조할수 있다.

제조된 scFv 단클론항체의 C-terminal에는 E-tag이 존재한다. 따라서 anti-E-Tag 항체를 사용하여 scFv 단클론항체를 분리한 다음 이 항체가 병원성 세균 혹은 바이러스에 대하여 specific하게 반응하는 지를 ELISA, ELISPOT, Western blotting, immunohistochemistry, 중화실험 등을 통하여 확인 한다.

4. 기존에 보고된 넓치 병원성 세균들에 대한 scFv 단클론항체 제조

국내 양식 넓치에서 분리된 *E. tarda*, *Flexibacter maritimus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ichthyenteri*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis*, *Lactococcus garvieae* 등을 대상으로 scFv 단클론항체를 제조한다. 국내에서 분리된 세균들을 국립수산과학원 병리연구팀으로부터 분양을 받은 후 이를 TSA 혹은 BHI 배지 등에 배양한다. 배양하여 얻은 각각의 세균들을 freeze & thawing을 반복한 후 sonication을 통하여 깬 다음 이를 배양용기에 coating한다. 앞서서와 같이 phage display library를 넣어 반응 시킨 후 항원에 붙지않는 phage를 세척하여 제거하는 과정을 10회 이상 반복한다. 다음으로 항원에 붙어있는

M13 phage에 E.coli TG1 strain을 첨가하여 infection 시킨 후 infection된 E.coli를 agar plate에 접종하여 plaque를 형성시킨다. 각각 형성된 plaque를 96 well plate의 각각 well에 접종한다. E.coli를 배양하면서 배양액에 방출되어 나오는 M13 phage들 중 항원에 specific한 항체를 display하는 phage를 M13 specific 항체를 사용한 ELISA를 통하여 선별한다.

선별된, 항체를 display하는 M13 phage를 다시 E.coli HB2151 strain에 infection 시켜 배양함으로써 soluble한 scFv 단클론항체를 제작한다. 이와같이 제조된 soluble scFv 단클론항체의 C-terminal에는 E-tag이 존재하는 데, anti-E-tag 항체를 사용하여 ELISA, ELISPOT, Western blotting, immunohistochemistry를 수행하여 각 세균마다 여러종류의 scFv 단클론항체를 제조한다.

5. 기존에 보고된 넙치 바이러스에 대한 scFv 단클론항체 제조

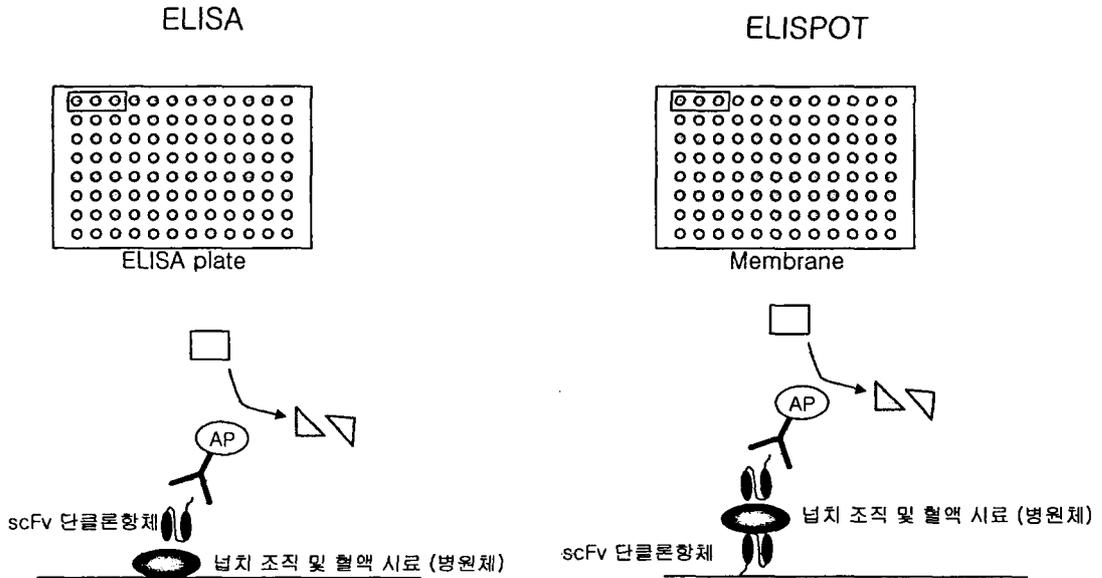
국내 양식 넙치에서 분리된 바이러스들인 Herpesvirus, marine birnavirus, lymphocystis virus, HRV, nodavirus, VHSV, iridovirus 등을 대상으로 scFv 단클론항체를 제조한다. 현재 본 연구진은 국내에서 분리된 marine birnavirus, lymphocystis virus, nodavirus, iridovirus 등을 보유하고 있으며 나머지 바이러스들은 국립수산과학원의 병리 연구팀으로부터 분양받는다. 이 바이러스들을 각각에 적합한 세포주에 배양을 하여 바이러스를 모은다. Lymphocystis virus의 경우 lymphocystis 질병에 걸린 조직으로부터 직접 모은다. 이와같이 모아진 바이러스들은 CsCl 및 sucrose를 사용한 초원심분리법을 사용하여 분리한다. 분리한 바이러스를 배양용기에 coating하고 여기에 phage display library를 넣어 반응 시킨 후 항원에 붙지않는 phage를 세척하여 제거하는 과정을 10회 이상 반복한다. 다음으로 항원에 붙어있는 M13 phage에 E.coli TG1 strain을 첨가하여 infection 시킨 후 infection된 E.coli를 agar plate에 접종하여 plaque를 형성시킨다. 각각 형성된 plaque를 96 well plate의 각각 well에 접종한다. E.coli를 배양하면서 배양액에 방출되어 나오는 M13 phage들 중 항원에 specific한 항체를 display하는 phage를 M13 specific 항체를 사용한 ELISA를 통하여 선별한다.

선별된, 항체를 display하는 M13 phage를 다시 E.coli HB2151 strain에 infection 시켜 배양함으로써 soluble한 scFv 단클론항체를 제작한다. 이와같이 제조된 soluble scFv 단클론항체들을 대상으로 ELISA, ELISPOT, Western blotting, immunohistochemistry, 그리고 중화실험을 수행하여 각 바이러스마다 여러종류의 scFv 단클론항체를 제조한다.

6. 국내외에서 새로이 보고 되는 병원체에 대한 scFv 단클론항체 제조

본 연구에서 개발하는 phage display library의 가장 중요한 장점 중에 하나는 affinity가 높은 단클론항체를 20일 정도의 시간 안에 높은 효율로 만드는 것이다. 만약 국내외에서 넙치의 새로운 병원체에 대한 보고가 있으면 이를 분양받아서 배양한 후 앞에서와 같

은 방법으로 scFv 단클론항체를 제조한다.



7. ELISA를 사용한 신속진단 기술 개발

지금까지 보고된 넙치의 세균성 및 바이러스성 병원체, 그리고 새로이 보고되는 병원체 모두를 동시에 신속 진단 가능한 ELISA 신속진단 기술을 개발한다. 이 기술의 기본 개념은 다음과 같다. 먼저 진단 대상 넙치의 신장 및 비장 등의 조직 및 환부 부분을 마쇄한 다음 ELISA plate에 coating한다. 혹은 진단 대상 넙치의 혈액을 채취하여 ELISA plate에 coating 한다. 앞에서와 같이 제조한 넙치의 다양한 병원체들에 대한 scFv 단클론항체를 처리하는데, 결과의 유의성을 높이기 위하여 각 항체마다 3개의 well에 처리한다. 이후 항원에 붙지않은 scFv 단클론항체를 washing한 다음 scFv의 C-terminal에 존재하는 E-tag을 인지하며 alkaline phosphatase (AP) 효소가 붙어있는 anti-E-tag-AP를 처리한다. 기질 (PNPP)을 처리하여 발색 반응이 일어난 다음 405 nm에서 OD값을 측정하여 분석한다.

이와 같은 방식의 신속진단 기술이 유의성 있게 진단하는 지를 확인하기 위하여 각 항체들의 특이성 및 sensitivity를 분석한다. 먼저 다양한 병원체 및 정상 넙치 조직세포 등을 대상으로 ELISA를 수행하여 제조한 scFv 단 클론항체의 specificity를 분석한다. 만약 특정 병원체에 대한 scFv 단클론항체가 병원체에 특이한 반응을 보이지 않는 경우 새로 scFv 단클론항체를 제조하여 그 병원체 특이 단클론항체를 확보한다. 다음으로 각각의 병원체에 대하여 어느 정도의 양이 존재할 때부터 검출이 가능한

지의 sensitivity를 확인 한다. 즉 각각의 병원체를 serial dilution 한 다음 이를 대상으로 ELISA를 수행하여 어느정도의 양이 존재할 때 유의성 있는 ELISA 값이 나오는 지를 확인 한다. 만약 sensitivity가 낮은 scFv 단클론항체가 발견되면 이에 대한 scFv 단클론항체를 다시 제조한다.

위에서와 같이 각 단클론항체들의 specificity 및 sensitivity가 확인된 후에는 실제 넓치에 병원체를 감염 시킨 다음 일정 시기별로 조직 및 혈액 시료를 취하여 ELISA를 수행한다. 그 결과 개발한 진단 기술이 병원체에 특이성이 있는지를 분석한다. 또한 병원체 감염 후 질병 증세가 전혀 나타나지 않는 초기부터 증세가 심할 때까지 일정 시간 간격으로 시료를 채취하여 ELISA를 수행 함으로써 어느 시기부터 진단이 가능한 지를 확인 한다.

8. ELISPOT를 사용한 신속진단 기술 개발

scFv 단클론항체를 사용한 신속 진단법이라는 면에서는 앞에서 언급한 ELISA와 유사하다. 그러나 ELISA가 ELISA reader라는 기계를 사용하여 분석하는 반면 ELISPOT 기술은 육안으로 판별하는 보다 간편한 방식이다. 기본 원리를 간단히 설명 하면 다음과 같다. 먼저 membrane에 다양한 넓치 병원체에 대한 scFv 단클론항체를 coating한다. 여기에 진단 대상 넓치의 조직 및 혈액 시료를 첨가하여 반응 시킨다. 여러번 washing 하여 붙지 않은 물질들을 제거한 다음 다시 병원체에 specific한 scFv 단클론항체를 첨가한다. 이때 결과의 유의성을 높이기 위하여 각 단클론항체당 3개의 well을 처리한다. 이어서 E-tag을 인지하며 alkaline phosphatase (AP) 효소가 붙어있는 anti-E-tag-AP를 처리한다. 기질 (BCIP/NBT)을 처리하여 발색 반응을 시킨 후 육안으로 반응을 확인한다.

이와 같은 방식의 신속진단 기술이 유의성 있게 진단하는 지를 확인하기 위하여 ELISA에서와 같이 각 항체들의 특이성 및 sensitivity를 분석한다.

9. 바이러스의 면역유도 단백질 및 중화 epitope 분석

넓치에 감염하는 바이러스들에 대하여 재조합단백질 백신을 개발하기 위해서는 면역 유도단백질 및 중화 epitope를 지니는 단백질을 확인 하여야 한다. 앞에서와 같이 제조한 바이러스들의 scFv 단클론항체들을 사용하여 이를 분석한다.

먼저 면역유도 단백질의 확인은 Western blotting법을 사용하여 수행한다. 분석하고자 하는 바이러스를 순수 분리한 다음 바이러스 단백질을 SDS-PAGE로 분리한다. Gel 상에 분리된 단백질들을 membrane으로 옮긴 후 앞에서 제조한 scFv 단클론항체를 반응 시키고 이후 E-tag을 인지하며 alkaline phosphatase (AP) 효소가 붙어있는 anti-E-tag-AP를 처리한다. 기질 (BCIP/NBT)을 처리하여 발색 반응을 시켜 확인한다. 이 결과로부터 바이러스 단백질들 중 항체와 반응하는 단백질을 확인할 수 있다.

다음으로 이와 같이 바이러스의 특정 단백질과 결합 하는 것이 확인된 단클론항체들을 사용하여 바이러스 중화 실험을 수행한다. 즉 바이러스와 단클론항체를 반응 시킨 후 이를 세포주에 접종하여 CPE의 진행 정도를 분석하여 중화 역가를 분석한다.

제2절 연구수행 내용

1. Mouse 항체 유전자를 대상으로 phage display library 제조

- 20 마리의 Balb/c mouse로 부터 spleen cell을 분리하여 이들을 섞은 후 mRNA를 추출 하였고 이로부터 cDNA를 합성하였다.
- Mouse의 모든 VH gene segment의 leader sequence를 포함하는 degenerated PCR primer (mouse VH back primers)와 mouse의 4개 JH gene segment 각각에 대한 4개의 PCR primer (mouse JH forward primers)를 사용하여 mouse heavy chain의 V region을 증폭하였다.
- Light chain의 경우 kappa (κ)와 lambda (λ) 중 repertoire가 많은 kappa chain만을 대상으로 PCR 증폭을 시도하였다. Mouse의 모든 VK gene segment를 포함하는 degenerated PCR primer (mouse VK back primers)와 mouse의 5개 JK gene segment 각각에 대한 5개의 PCR primer (mouse JK forward primers)를 사용하여 mouse light chain의 V region을 증폭하였다.
- 증폭된 VH와 VK gene fragment를 linker [(Gly₄-ser)₃]를 사용하여 VH-linker-VK의 형태로 연결하여 single chain Fv (scFv) gene으로 연결하였다. 이와 같이 연결된 scFv gene을 template로 하고 VH back *Sfi*I primer와 JK forward *Not*I primer를 사용하여 PCR을 수행한 다음 이를 pCANTAB 5E phagemid vector의 *Sfi*I/*Not*I site에 cloning하였다.
- scFv/pCANTAB 5E phagemid vector를 사용하여 E. coli TG1 strain을 transformation 시키고 여기에 M13 KO7 helper phage를 첨가하여 phage rescue를 시킴으로써 phage display library를 제조하였다.

2. 제조한 phage display library의 size 및 유의성 검증

- E. coli TG1 strain을 사용한 plaque assay를 통하여 library size 분석하여 10¹⁰PFU/ml 이상임을 확인하였다.
- 양식 넓치에서 분리된 E. tarda와 iridovirus를 항원으로 하여 scFv phage display library로부터 scFv 단클론항체를 제조하였다. 이때 E. tarda 항원은 formalin으로 처리하여 죽인 항원을 사용하였으며 iridovirus는 major capsid protein (MCP) 유전자를 E. coli에서 발현 시킨 재조합단백질을 항원으로 사용하였다. 이들 항원을 대상으로 약 13일 만에 scFv 단

클론항체가 제조됨을 확인하였다.

- 원하는 scFv 항체를 display하고 있는 M13 phage를 E. coli HB2151 strain에 infection 시켜 soluble form의 scFv를 분리하였으며 이 항체를 사용하여 ELISA, Western blotting, 중화실험, immunohistochemistry 등에 적용 가능한지를 확인하였다.

3. 기존에 보고된 넙치의 세균성 병원체들에 대한 scFv 단클론항체 제조

- 기존에 보고된 세균 수집: *Vibrio vulnificus*, *Streptococcus iniae*, *Edwardsiella tarda*, *Photobacterium damsela*
- 세균들의 배양 및 scFv screening을 위한 항원 준비 완료
- 세균들에 대한 scFv 단클론항체 제조 완료
- ELISA, western blotting, immunohistochemistry에 적합한 항체 선별

4. 기존에 보고된 넙치의 바이러스성 병원체들에 대한 scFv 단클론항체 제조

- 기존에 보고된 바이러스 수집: Lymphocystis virus, marine birnavirus, Hiramere rhabdovirus, nodavirus, VHSV, iridovirus
- scFv screening을 위한 바이러스들의 항원 준비 완료
재조합단백질: marine birnavirus, nodavirus, iridovirus
peptide 합성: lymphocystis virus, hiramere rhabdovirus, VHSV
- 바이러스들에 대한 scFv 단클론항체 제조 완료
- ELISA, western blotting, immunohistochemistry, 중화실험에 적합한 항체 선별

5. 국내외에서 새로 발견되는 병원체들에 대하여 scFv 단클론항체 제조

- 다음과 같은 병원체에 대한 항원 준비 완료
외국에서 넙치에 감염하는 것으로 밝혀진 IPNV (McAllister et al., 1984; Crane et al., 2000): VP2 및 VP3 재조합단백질 준비 완료
우리나라에서 양식되는 넙치와 유사한 flounder에 감염하는 것으로 밝혀진 SFRV (Mork et al., 2004): peptide 합성 완료
- scFv 항체 제조 완료
- ELISA, western blotting, immunohistochemistry에 적합한 항체 선별

6. 제조한 scFv 단클론 항체를 사용하여 기존에 보고된 세균 및 바이러스들을 동시에 신속 진단하는 기술 개발

- 지금까지 보고된 넙치의 병원성 세균 및 바이러스들을 동시에 screening할 수 있는 ELISA system 개발
- 넙치 양식장에서 사육 중 질병에 걸린 넙치들을 대상으로 ELISA 키트 현장 적용 실험

- 지금까지 보고 된 넙치의 병원성 세균 및 바이러스들을 동시에 screening할 수 있는 ELISPOT 진단키트 개발
 - 넙치 양식장에서 사육 중 질병에 걸린 넙치들을 대상으로 ELISPOT 키트 현장 적용실험
- 7. 제조한 scFv 단클론 항체를 사용하여 기존에 보고된 넙치 바이러스의 면역유도단백질 및 중화 epitope를 지니는 단백질 확인**
- 지금까지 보고 된 넙치의 바이러스들에 대하여 면역유도단백질과 중화 epitope의 분석 및 확인
 - 선별된 바이러스들의 단백질들을 대장균에서 발현시킨 후 넙치에 주사하여 실제 면역반응을 유발 하는 지, 그리고 중화 항체를 유도하는 지 확인

제3절 연구결과

1. Mouse 항체 유전자를 대상으로 phage display library 제조

- 본 연구의 1차년도의 주요 내용은 생쥐 항체의 유전자들을 pCANTAB phagemid vector에 cloning한 다음 이를 M13 phage의 gene3에 발현되게 함으로서 생쥐항체의 phage displayed library를 제조하는 것이다 (그림 1).

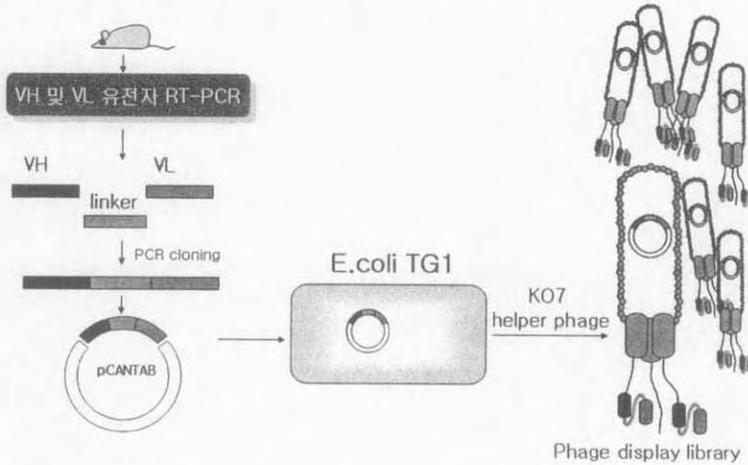


그림 1. 생쥐 항체 유전자를 대상으로 phage displayed library 제조 과정 모식도

- 이를 위하여 20 마리의 Balb/c mouse로 부터 spleen cell을 분리하여 이들을 섞은 후 mRNA를 추출하였고 이로부터 cDNA를 합성하였다.
- 합성된 cDNA를 대상으로 mouse의 heavy chain의 V gene segment (VH) 유전자들을 PCR을 통하여 증폭하였다. Mouse의 VH 유전자는 크게 V, D, J의 3개의 gene segment로 이루어져 있다 (그림 2). V gene segment의 종류는 수백종류이며 J는 4종류이다. 이들 V, D, J의 조합으로 생성되는 VH 유전자 모두를 증폭하기 위하여 V gene segment의 모든 leader sequence를 포함하는 degenerated PCR primer인 VH back primer를 제조하였다. 그리고 4종류의 J gene segment 각각에 대한 PCR primer인 JH forward primer를 제조하였다 (그림 3).

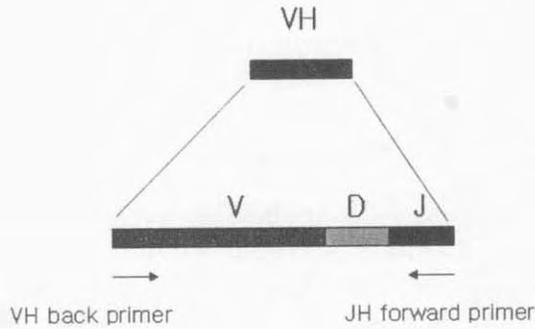


그림 2. VH 유전자의 구성도 및 PCR primer

Mouse VH Back

- MuVH1B : 5'-GAG GTG CAG CTT CAG GAG TCA GG
- MuVH2B : 5'-GAT GTG CAG CTT CAG GAG TCR GG
- MuVH3B : 5'-CAG GTG CAG CTG AAG SAG TCA GG
- MuVH4/6B : 5'-GAG GTY CAG CTG CAR CAR TCT GG
- MuVH5/9B : 5'-CAG GTY CAR CTG CAG CAG YCT GG
- MuVH7B : 5'-GAR GTG AAG CTG GTG GAR TCT GG
- MuVH8B : 5'-GAG GTT CAG CTT CAG CAG TCT GG
- MuVH10B : 5'-GAA GTG CAG CTG KTG GAG WCT GG
- MuVH11B : 5'-CAG ATC CAG TTG CTG CAG TCT GG

Mouse JH Forward

- MuJH1F : 5'-TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC
- MuJH2F : 5'-TGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT GCC
- MuJH3F : 5'-TGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT CCC
- MuJH4F : 5'-TGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT TCC

그림 3. Mouse VH 유전자 증폭에 사용한 PCR primer들

- 이와 같이 제조한 VH back primer와 JH forward primer를 사용하여 mouse VH 유전자를 증폭하였다. 그 결과 그림 4에서와 같이 mouse VH 유전자를 (그림 4, lane H) 증폭할 수 있었다.

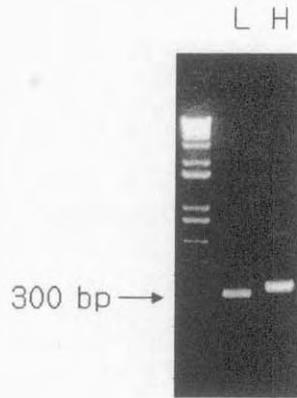


그림 4. Mouse 항체유전자의 VH 및 VL PCR 증폭 결과

- 역시 합성된 cDNA를 대상으로 mouse의 light chain의 V gene segment (VL) 유전자들을 PCR을 통하여 증폭하였다. mouse의 light chain에는 lambda와 kappa chain이 있는데, lambda chain의 경우 그 repertoire가 매우 적기 때문에 kappa만을 대상으로 PCR 증폭을 수행하였다. Mouse의 VL 유전자는 크게 V와 J의 2개의 gene segment로 이루어져 있다 (그림 5). V gene segment의 종류는 수백종류이며 J는 5종류이다. 이들 V-J의 조합으로 생성되는 VH 유전자 모두를 증폭하기 위하여 V gene segment의 모든 sequence를 포함하는 degenerated PCR primer인 VK back primer를 제조하였다. 그리고 5종류의 J gene segment 각각에 대한 PCR primer인 JH forward primer를 제조하였다 (그림 6).

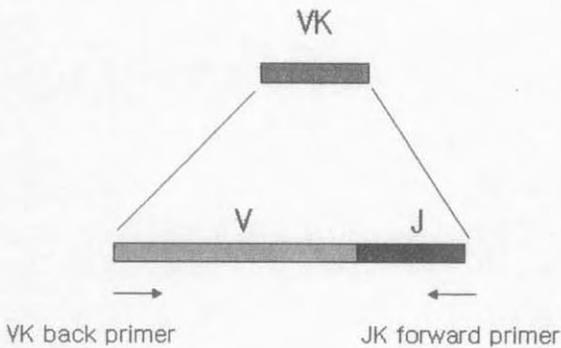


그림 5. VK 유전자의 구성도 및 PCR primer

Mouse VK Back

MuVK1B : 5'-GAC ATT GTG ATG WCA CAG TCT CC
MuVK2B : 5'-GAT GTT KTG ATG ACC CAA ACT CC
MuVK3B : 5'-GAT ATT GTG ATR ACB CAG GCW GC
MuVK4B : 5'-GAC ATT GTG CTG ACM CAR TCT CC
MuVK5B : 5'-SAA AWT GTK CTC ACC CAG TCT CC
MuVK6B : 5'-GAY ATY VWG ATG ACM CAG WCT CC
MuVK7B : 5'-CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT CC
MuVK8B : 5'-TCA TTA TTG CAG GTG CTT GTG GG

Mouse JK Forward

MuJK1F : 5'-TTT GAT TTC CAG CTT GGT GCC TCC
MuJK2F : 5'-TTT TAT TTC CAG CTT GGT CCC CCC
MuJK3F : 5'-TTT TAT TTC CAG TCT GGT CCC ATC
MuJK4F : 5'-TTT TAT TTC CAA CTT TGT CCC CGA
MUJK5F : 5'-TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC AGC

그림 6. Mouse VK 유전자 증폭에 사용한 PCR primer들

- 이와 같이 제조한 VK back primer와 JK forward primer를 사용하여 mouse VK 유전자를 증폭하였다. 그 결과 그림 4에서와 같이 mouse VK 유전자를 (그림 4, lane L) 증폭할 수 있었다.
- 앞서서와 같이 증폭한 mouse의 VH 및 VK 유전자를 linker [(Gly₄-ser)₃]를 사용하여 하나의 scFv gene으로 제조하였다 (그림 7). Linker를 VH 및 VL과 overlap되게 제조한 다음 (그림 7), SfiI 제한효소 site를 지나는 VH back SfiI primer 그리고 NotI 제한효소 site를 지나는 JK forward NotI primer를 사용하여 PCR을 수행함으로써 VH-linker-VL의 구조를 지나는 scFv를 제조하였다. 이때 사용한 VH back SfiI primer는 앞서서와 같이 heavy chain의 V gene segment 모두를 증폭할 수 있는 primer 조합을 사용하였으며, JK forward NotI primer는 light chain의 5개 J gene segment 모두를 증폭할 수 있는 primer를 사용하였다 (그림 8).

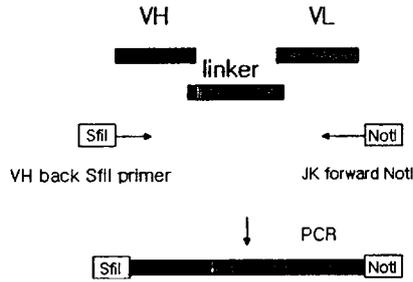


그림 7. VH-linker-VL의 구조를 지니는 scFv gene 제작 구성도

Mouse VH Back Sfi1

MouVH1BSfi1 : 5'-ACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGG
MouVH2BSfi1 : 5'-ACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGATGTGCAGCTTCAGGAGTCRGG
MouVH3BSfi1 : 5'-ACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGAAGSAGTCAGG
MouVH4/6BSfi1: 5'-ACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTTCAGCTGCARCARTCTGG
MouVH5/9BSfi1: 5'-ACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTTCARCTGCAGCAGYCTGG
MouVH7BSfi1 : 5'-ACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGARGTGAAGCTGGTGGARTCTGG
MouVH8BSfi1 : 5'-ACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTTTCAGCTTCAGCAGTCTGG
MouVH10BSfi1: 5'-ACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAAGTGCAGCTGKTGGAGWCTGG
MouVH11BSfi1: 5'-ACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGATCCAGTTGCTGCAGTCTGG

Mouse JK Forward Not1

MouJK1FNot1 : 5'-GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCTTTGATTTCCAGCTTGGTGCCTCC
MouJK2FNot1 : 5'-GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCTTTTATTTCCAGCTTGGTCCCCC
MouJK3FNot1 : 5'-GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCTTTTATTTCCAGTCTGGTCCCATC
MouJK4FNot1 : 5'-GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCTTTTATTTCCAACITTTGTCCCCGA
MouJK5FNot1 : 5'-GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCTTTCAGTCCAGCTTGGTCCCAGC

그림 8. VH-linker-VL scFv gene 제작에 사용한 PCR primer들

- 이와 같은 primer들을 사용하여 증폭한 결과 그림 9에서의 같이 VH-linker-VL의 구조를 지니는 PCR 산물을 얻을 수 있었다.



그림 9. VH-linker-VK의 구조를 지니는 scFv 유전자 PCR 증폭 결과

- 이와같이 제조한 VH-linker-VK의 구조를 지니는 scFv 유전자를 제한효소 SfiI과 NotI을 처리한 다음 역시 SfiI과 NotI으로 처리한 pCANTAB 5E phagemid vector에 cloning하였다.

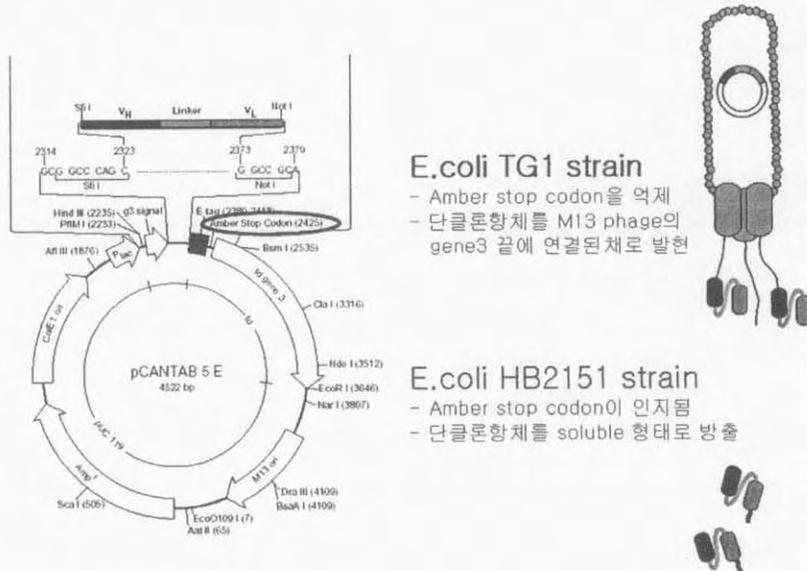


그림 10. Phagemid pCANTAB 5E의 구조 및 scFv gene cloning 모식도

- pCANTAB 5E phagemid vector에 cloning된 scFv gene은 그림 10에서와 같이 M13 phage의 gene 3에 연결된 형태인 fusion gene으로 발현된다. 그러나 cloning한 scFv gene과 M13 phage의 gene 3 사이에는 amber stop codon이 존재한다. 따라서 scFv/pCANTAB을 amber stop codon을 억제하는 E. coli TG1 strain에 넣으면 scFv-gene 3의 fusion 단백질이 만들어져 M13 KO7 helper phage를 첨가하는 경우 scFv가 M13 phage의 tail에 붙어서 발현된다. 반면에 이 vector를 amber stop codon이 인지되는 E. coli HB2151 strain에 넣

으면 scFv 만 독자적으로 발현되어 soluble한 형태의 scFv가 만들어 진다.

- 이 단계에서는 scFv/pCANTAB vector를 E. coli TG1에 transformation 시킨 후 여기에 M13 KO7 helper phage를 넣어 scFv를 그림 10에서와 같이 M13 phage의 gene 3 에 display 된 형태로 발현 시켜 phage displayed library를 제조하였다.

2. 제조한 phage display library의 size 및 유의성 검증

- 일반적으로 mouse의 항체 유전자 repertoire는 약 10^{10} 이상으로 알려져 있다. 따라서 scFv 항체의 경우 적어도 10^{10} 이상이 되어야 다양한 항원들에 대하여 specific한 항체를 제조할 수 있다. 본 연구에서 제조한 phage displayed scFv 항체 library의 정확한 repertoire는 알수 없다. 그러나 이 library를 구성하는 M13 phage의 titer를 측정함으로써 간접적으로 scFv library의 repertoire를 알 수 있다. 따라서 본 연구에서 제조한 library의 M13 phage를 10-fold dilution 방법을 통하여 titer를 확인한 결과 약 $2 \times 10^{10}/\text{ml}$ 임을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 제조한 phage displayed library의 M13 phage titer가 적어도 mouse 항체 유전자의 repertoire보다 큼을 확인 하였다.
- 이와 같이 제조한 phage displayed library를 사용하여 원하는 항원에 대한 단클론항체를 만들 수 있는 지를 확인하였다. 항원으로는 양식 넙치에서 분리한 E. tarda와 iridovirus 등의 2종류를 사용하였다. 이 항원들에 대하여 단클론항체를 20일 안에 신속하게 제조할 수 있는지, 그리고 이와 같이 신속하게 제조된 단클론항체가 항체를 사용한 다양한 assay 들 중 어느 assay에 적용 가능한 지를 확인하였다.
- 먼저 본 연구의 항원으로서 E. tarda는 formalin으로 사멸시킨 whole bacteria를 사용하였다. E. tarda에 대한 항체를 제조하였을 때 항체의 주 용도가 세균의 검출 및 혈청형 분석이기 때문에 세균의 lysate 보다는 whole bacteria를 사용하여 표면 항원에 대한 항체를 제조하는 것이 좋다고 판단을 하였다. 따라서 양식 넙치에서 분리한 E. tarda를 TSA 배지에서 overnight 배양한 다음 formalin을 0.3% 처리하여 죽인 후 항원으로 사용하였다.
- 본 연구의 바이러스 항원으로 사용한 iridovirus는 양식 넙치에서 분리한 iridovirus를 사용하였는데, 이 바이러스의 MCP 유전자를 prokaryotic expression vector인 pET28a에 cloning하여 이를 E. coli BL21 strain에서 발현시킨 recombinant MCP를 사용하였다. Iridovirus의 MCP로 transformation된 E. coli BL21 strain을 IPTG 존재하에 배양하여 recombinant MCP를 대량으로 발현 시킨 후 cell을 sonication을 통하여 깎아서 cell lysate를 얻었다. 이와 같이 준비한 cell lysate를 SDS-PAGE를 통하여 발현을 확인한 결과 그림 11에서와 같이 MCP가 major 단백질로 발현됨이 확인되었다 (그림 11, W lane). E.

coli cell lysate로부터 MCP를 분리하기 위하여 Nickel column을 사용한 affinity column chromatography 방법으로 soluble form의 MCP를 분리하고자 시도하였다. 그러나 합성된 MCP가 대부분 insoluble한 inclusion body를 형성하여서 nickel column을 사용한 MCP 분리에는 실패하였다. 따라서 다음 방법으로써 cell lysate를 SDS-PAGE로 분리한 다음 MCP를 gel에서 분리하는 방법을 수행하였다. 그 결과 그림 11에서와 같이 MCP를 분리할 수 있었다 (그림 11, lane P1 & P2).

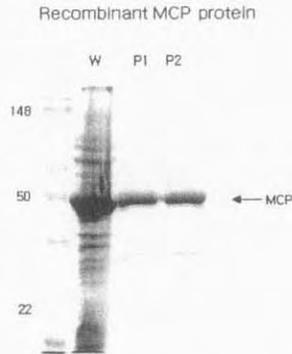


그림 11. Iridovirus의 recombinant MCP SDS-PAGE 결과. W, whole cell lysate; P1 & P2, gel elution을 통하여 분리한 recombinant MCP.

- 앞에서와 같이 준비한 항원을 사용하여 scFv 항체를 selection 하였다. 즉 그림 12에서와 같이 먼저 배양 dish에 항원을 coating한 다음 phage displayed library를 첨가하여 반응시키고 20회 이상을 washing하여 항원과 결합하지 않은 phage들을 제거하였다. 항원에 붙은 phage에 E. coli TG1 strain을 첨가하여 infection 시킨 다음 ampicillin이 첨가된 배지에 E. coli 배양하며 colony를 형성 시켰다.

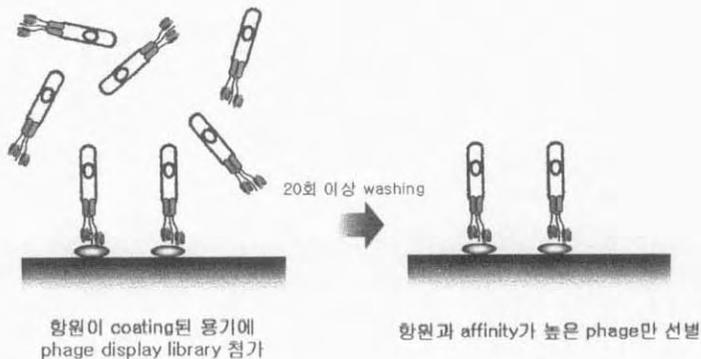


그림 12. 항원에 specific한 scFv를 발현하는 phage 선별과정 모식도

- 이후 형성된 각 colony 들을 96 multiwell plate의 각 well에 배양하였다. 여기에 M13 KO7 helper phage를 첨가하여 phage를 rescue 시킨 다음 항원이 coating된 ELISA plate에 phage를 옮겨 넣고 M13 phage에 대한 항체를 사용하여 항원과 결합하는 scFv를 발현하는 phage를 선별하였다. 그 결과 그림 13에서의 같이 여러 개의 well에서 positive 결과가 나와서 항원과 결합하는 scFv를 발현하는 phage들을 선별하였다.

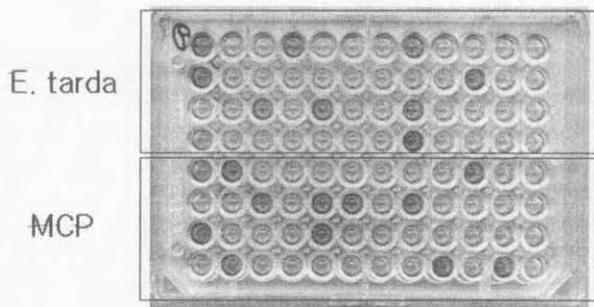


그림 13. E. tarda 및 iridovirus MCP와 결합하는 scFv 항체를 발현하는 phage의 ELISA 선별 결과

- 선별한 phage들중 E. tarda 및 iridovirus MCP에 대하여 ELISA 값이 높은 clone 각각 2개씩을 선별하여 soluble form의 scFv를 제조하였다. M13 phage에 display된 scFv 항체의 soluble form 제조는 그림 10에서의 같이 M13 phage를 E. coli HB2151 strain에 감염시켜서 제조하였다. 즉 E. coli HB2151 strain은 pCANTAB vector에 cloning한 scFv와 gene3의 사이에 존재하는 amber stop codon을 인지하기 때문에 scFv 단독으로 발현시킴으로써 soluble form의 scFv 항체를 만든다.
- 이와 E. coli에서 만든 scFv form의 항체를 affinity column을 사용하여 순수분리하였다. 즉 E. coli를 깨서 periplasm에 존재하는 scFv 항체를 순수분리 하였는데, scFv 항체의 c-terminal 부분에 E-tagging 되어 있기 때문에 anti-E-tag 항체를 사용한 column으로 scFv를 순수분리 할 수 있었다 (그림 14).

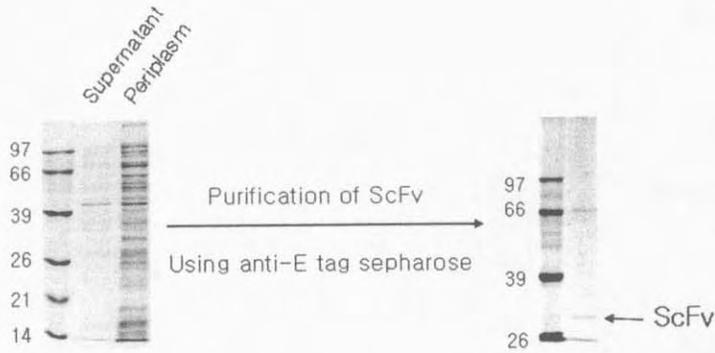


그림 14. Anti-E-tag sepharose를 사용한 affinity column으로 periplasm에 존재하는 scFv 항체의 순수분리.

- 이와 같은 방법으로 *E. tarda*에 대한 scFv 항체 2종류, iridovirus MCP에 대한 scFv 항체 2종류를 분리하여 SDS-PAGE를 통하여 확인한 결과 그림 15와 같았다.



BSA control:
 BSA-1: 0.125 ug/ul
 BSA-2: 0.0625 ug/ul
 BSA-3: 0.03125 ug/ul
 BSA-4: 0.015625 ug/ul
 BSA-5: 0.0078125 ug/ul

그림 15. *E. tarda* 및 iridovirus MCP에 대한 scFv 항체 분리. 1 및 2, *E. tarda*에 대한 scFv 항체; 3 및 4, iridovirus MCP에 대한 scFv 항체

- 지금까지의 결과를 정리하여 보면 일단 phage displayed scFv library가 만들어지고 난 다음 이 library를 사용하여 특정 항원에 대한 scFv 항체를 만들기 까지 약 13일이 소요되었다. 따라서 애초에 계획하였던, library로부터 20일 안에 항체를 제조한다는 목표가 이루어졌음을 확인하였다.

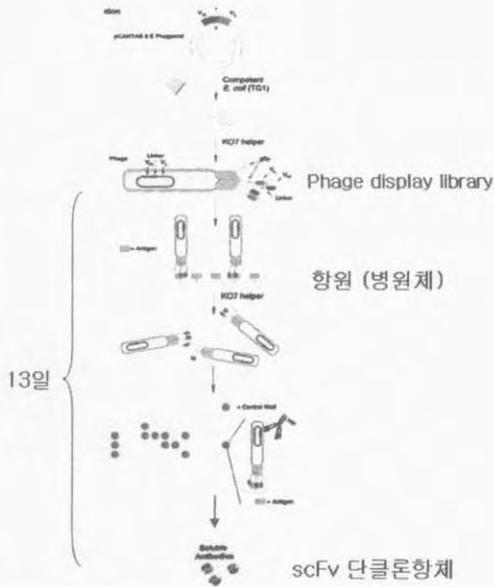


그림 16. Phage displayed scFv library를 사용한 scFv 항체 제조과정 및 제조에 소요된 기간

- 이와 같이 약 13일만에 제조된 scFv 항체가 ELISA, Western blotting, 중화실험, immunohistochemistry 등에 적용 가능한지를 확인하였다. 현재까지의 실험결과 ELISA 및 western blotting에는 적용 가능함을 확인 하였다. 그리고 바이러스의 중화 activity가 약 하지만 존재함도 확인 하였다. 그리고 제조된 scFv 항체를 ELISA를 통하여 특이성을 확인 한 결과 E. tarda 항체는 iridovirus의 MCP와 E. coli에 대하여 전혀 반응을 하지 않으며 반면에 iridovirus MCP에 대한 항체는 E.tarda 및 E. coli와 반응하지 않음을 확인하였다. 이로부터 본 연구에서 제조한 항체의 특이성이 있음을 확인하였다.

- 이상에서와 같이 본 연구 1년차의 연구 결과 일단 phage displayed scFv library를 만들어 놓으면 항원에 대한 항체를 약 13일 정도안에 만들 수 있음이 확인 되었다. 향후 본 연구에서 제조되는 항체를 사용하여 양식어류에 감염하는 병원성 세균 및 바이러스의 신속 진단에 활용할 계획이다. 이를 위하여 각 항원에 대하여 더많은 종류의 항체를 제조할 필요가 있으며, 또한 다양한 종류의 세균 및 바이러스들을 대상으로 specificity test를 수행하여 효과적인 진단이 이루어 질 수 있는 scFv 항체의 선별이 필요하다. 그리고 본 연구에서 phage displayed scFv library의 titer가 약 $2 \times 10^{10}/\text{ml}$ 정도인데, 이를 더 높여서 항원에 특이성 및 affinity가 더 높은 항체의 제작이 가능하도록 할 필요가 있다.

3. 기존에 보고된 넙치의 세균성 병원체들에 대한 scFv 단클론항체 제조

가. 기존에 보고된 세균 수집 및 scFv screening을 위한 항원 준비

- scFv 항체 제조용으로 사용할 세균들은 국립수산물과학원 병리연구팀으로부터 분양 받았다. 분양받은 세균들은 양식넙치의 대표적인 병원성 세균인 *S. iniae* 및 *E. tarda*, 그리고 양식 넙치에 감염하여 질병을 유발할 가능성이 높은 세균인 *V. vulnificus*, *P. damsela* 등이었다. 이 세균들을 대상으로 본 연구에 사용한 strain들은 다음의 표2와 같다.

표2. 본 연구에 사용한 세균들

Species	strain
<i>Streptococcus iniae</i>	FP2031
<i>Streptococcus iniae</i>	FP4150
<i>Edwardsiella tarda</i>	FP4102
<i>Photobacterium damsela</i>	
<i>Vibrio vulnificus</i>	FP1017
<i>Vibrio vulnificus</i>	FP1019 (Biotype 2)
<i>Vibrio vulnificus</i>	FP1021 (Biotype 1)
<i>Vibrio vulnificus</i>	FP1022 (ATCC 27562)

- 이와 같은 세균들을 formalin으로 사멸시킨 whole bacteria를 사용하였다. 세균들에 대한 항체를 제조하였을 때 항체의 주 용도가 세균의 검출 및 혈청형 분석이기 때문에 세균의 lysate 보다는 whole bacteria를 사용하여 표면 항원에 대한 항체를 제조하는 것이 좋다고 판단을 하였다. 따라서 세균들을 TSA 배지에서 overnight 배양한 다음 formalin을 0.3% 처리하여 죽인 후 항원으로 사용하였다. Formalin 처리하여 죽인 세균을 PBS로 3회 washing 한 다음 OD₆₀₀에서 1.0 되게 맞추는 후 배양용기에 coating하였다.

나. 세균들에 대한 scFv 단클론항체 제조

- 세균 항원이 coating된 배양 용기에 본 연구의 1년차에서와 같이 제조한 phage display library를 넣어 반응 시킨 후 20회 이상을 washing하여 항원과 결합하지 않은 phage들을 제거하였다. 항원에 붙은 phage에 *E. coli* TG1 strain을 첨가하여 infection 시킨 다음 ampicillin이 첨가된 배지에 *E. coli*를 배양하며 colony를 형성 시켰다.
- 이후 형성된 각 colony 들을 96 multiwell plate의 각 well에 배양하였다. 여기에 M13 KO7 helper phage를 첨가하여 phage를 rescue 시킨 다음 항원이 coating된 ELISA plate에 phage를 옮겨 넣고 M13 phage에 대한 항체를 사용하여 항원과 결합하는 scFv를 발현하

는 phage를 선별하였다.

- 선별한 phage들 중 각 세균에 대하여 ELISA 값이 높은 clone 각각 3개씩을 선별하여 soluble form의 scFv를 제조하였다. M13 phage에 display된 scFv 항체의 soluble form 제조는 M13 phage를 *E. coli* HB2151 strain에 감염시켜서 제조하였다. 즉 *E. coli* HB2151 strain은 pCANTAB vector에 cloning한 scFv와 gene3의 사이에 존재하는 amber stop codon을 인지하기 때문에 scFv 단독으로 발현시킴으로써 soluble form의 scFv 항체를 만든다.
- 이와 같이 *E. coli*에서 만든 scFv form의 항체를 affinity column을 사용하여 순수분리 하였다. *E. coli*를 깨서 periplasm에 존재하는 scFv 항체를 순수분리 하였는데, scFv 항체의 c-terminal 부분에 E-tagging 되어 있기 때문에 anti-E-tag 항체를 사용한 column으로 scFv를 순수분리 할 수 있었다.
- 이와 같은 방법으로 순수분리한 scFv들 중 각 세균에 대한 것 하나씩을 선정하여 SDS-PAGE를 통하여 확인한 결과 그림 17과 같았다.

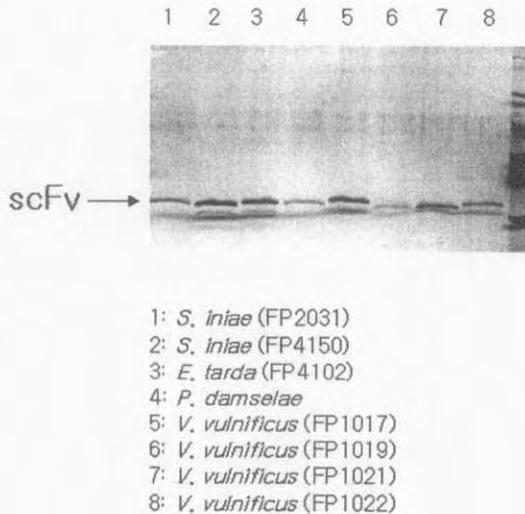


그림 17. 순수분리된, 각 세균들에 대한 scFv 항체들의 SDS-PAGE.

다. ELISA, western blotting, immunohistochemistry에 적합한 항체 선별

- 본 연구의 목표는 앞에서와 같이 제조한 scFv 항체를 사용하여 넓치 병원체를 신속 진단 할 수 있는 ELISA 키트 및 ELISPOT 키트를 개발하는 것이기 때문에 앞에서 선별한 scFv 항체 중 ELISA, ELISPOT 등에 적합한 것들을 선별할 필요가 있었다. 따라서 각 세균들

에 대한 scFv 들을 대상으로 ELISA 및 ELISPOT 등을 수행하여 각 assay에 적합함을 확인 하였다. 그리고 본 연구의 3차년도에 각 병원체의 immunogenic protein을 선별하는 내용이 포함되어 있는데, 이를 위하여 western blotting에 적합함도 확인 하였다.

4. 기존에 보고된 넙치의 바이러스성 병원체들에 대한 scFv 단클론항체 제조

가. 기존에 보고된 바이러스 수집 및 scFv screening을 위한 항원 준비

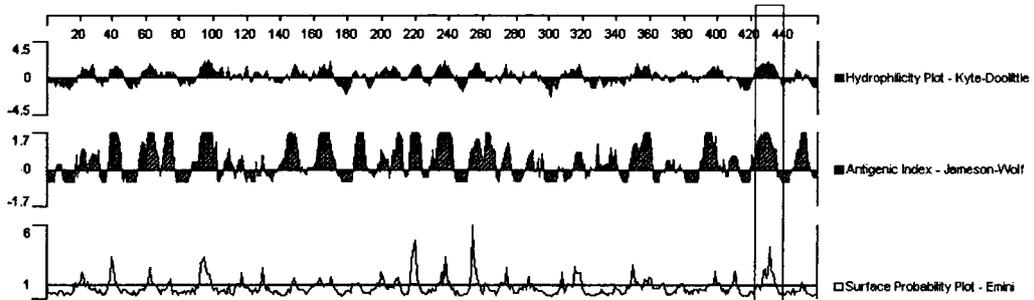
- 표 3에서와 같이, 기존에 넙치에 감염하는 것으로 보고된 바이러스들을 대상으로 scFv 항체 제조를 위한 항원을 준비하였다.

표 3. 본 연구에 사용한 바이러스의 항원 준비

바이러스	대상단백질	항원제조 방식
Lymphocystis virus	MCP	peptide 합성
Marine birnavirus	VP2	제조합단백질 제조
Nodavirus	coat protein	제조합단백질 제조
Hirame rhabdovirus	G	peptide 합성
VHSV	G	peptide 합성
Iridovirus	MCP	제조합단백질 제조

- Lymphocystis virus의 경우 바이러스 입자 표면에 있는 것으로 알려진 MCP를 대상으로 항원을 준비하였다. MCP의 아미노산 서열을 분석하여 3차구조상 표면에 있으면서 항원성이 높은 것으로 확인되는 부분인 aa 421-440 의 peptide를 합성하여 항원으로 사용하였다 (그림 18).

MTSVAGSSVTSAFIDLATYDTIEKHLYGGDSAVAYFVRETKKCTWFSKLPVLLTRCSGTPNF
 DQEFVNVSRGGDYVLNAWMTVRIPAVKLKTNNRMNANGTIRWCKNLFHNLVKQTSV
 QFNDLVAQKFESYFLDFWSSFGMCGSKRIGYDNMIGNTIDMTQPVDSNGQLPEKVLLPLP
 YFFSRDSGMALPSAALPYNEIRSTFHRLRDWTELLIFQNKNDSTIMPLTAGDLLDWGKPDLDK
 VQVWITNVVVTNEERRLMGTVPRDILVEQVQTAPKHVFQPLTIPSPNFDIRFASHAIKILFFG
 VRNVTYQAIQSNTSSSPVIFDGGIASDLPGIAADPISNVTLVYENSARLNEMGSEYYSLVQP
 YYFGGSIPVDTGYHMYCYSLNMMDVDPMGSTNYGRLSNVSIKLTSPIAVITAGGNGGNT
SGYKDAQKFEFLTMAVNHNVIRIKNGSMGFPVL



Lympho-MCP-421 : N-GNGGNTSGYKDAQKFEFLTM-C

그림 18. Lymphocystis virus MCP의 아미노산 서열 분석 및 이를 바탕으로 한 peptide의 선별

○ Marine birnavirus의 경우 바이러스 입자 표면에 있는 것으로 알려진 VP2의 cDNA를 prokaryotic expression vector인 pET28a에 cloning한 다음 이를 E.coli BL21에 transformation 시킨 후 발현시켰다. 이때 VP2의 full-length cDNA를 cloning하지 않고 본 연구진에 의하여 immunogenicity를 지니고 있다고 확인된 aa 79-359 부분 (Moon et al., 2004) 만을 대상으로 발현시켰다. 이와 같이 발현된 재조합단백질을 nickel column으로 분리한 다음 항원으로 사용하였다 (그림 19).

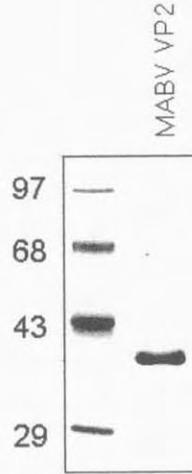


그림 19. Marine birnavirus의 partial VP2에 대한 재조합단백질 제조

- Fish nodavirus 역시 바이러스 입자 표면에 있는 것으로 알려진 coat protein을 대상으로 항원을 준비하였다. Coat protein의 full-length cDNA를 prokaryotic expression vector인 pET28a에 cloning한 다음 이를 E.coli BL21에 transformation 시킨 후 발현시켰다. 발현된 재조합단백질을 nickel column으로 분리한 다음 항원으로 사용하였다 (그림 20).

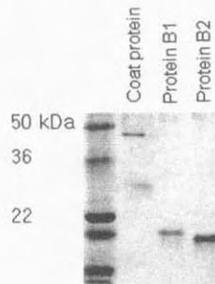
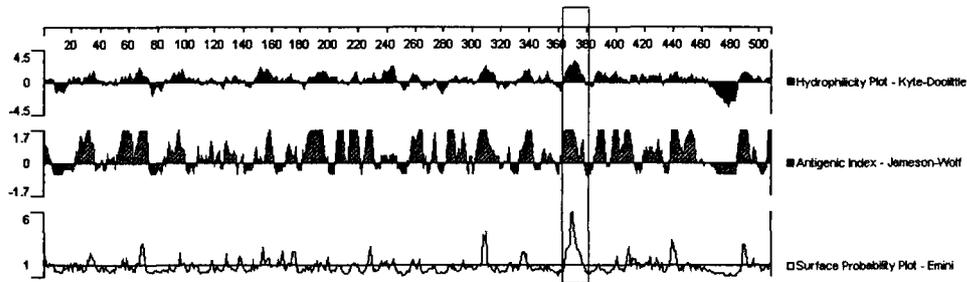


그림 20. Fish nodavirus의 coat protein 재조합 단백질 제조

- Hirame rhabdovirus의 경우 바이러스 입자 표면에 있는 것으로 알려진 glycoprotein (G)을 대상으로 항원을 준비하였다. G의 아미노산 서열을 분석하여 3차구조상 표면에 있으면서 항원성이 높은 것으로 확인되는 부분인 aa 361-380의 peptide를 합성하여 항원으로 사용하였다 (그림 21).

MDPRIMYYTVLLTTAARVYGQTIKPGVDSVSDQPTWANPLFTYPVDCPAAKLSKVSPSQL
 RCPRIFDDENQGLVAYPAVIRLSVGNLGDIIHTQGEYVHKVLYR TTCSTGFFGGQTIEKA
 LVEMKLAPREVGVDTTTTASALYFPAPRCQWYTDNVHNDLTFYTTAKSVLRDPYTLGFL
 DSDFIEGKCSKSPCQTHWSNVVWKGDSGVAACDTGPEIKGHIFVDKTSHHVVKATS YGH
 HPWGWPHRACMITFCGKPWIRTDLDGLIAIEYNGGATLLA FPA CKD TTVGMRGSLDDFAYL
 DDLVKSSEREECLEAHAEIIATNSVTPYLLSKFRSPHPGINDVYAMHDGSIYHGKCMTVAI
DEVSKDRRTYRAHQTSAFVAWGHPFGDEWGGFHGLHGNDTPVIPDLEKYVAQYKVSM
 MDKMDIRPVPHPVSVQILYNDTDTADITIRKIDSFDLQSLNWSFWP SLSALGGVPILLALVFF
 LYCCMNRRRPSMPAAPQEIPMYHLASRG

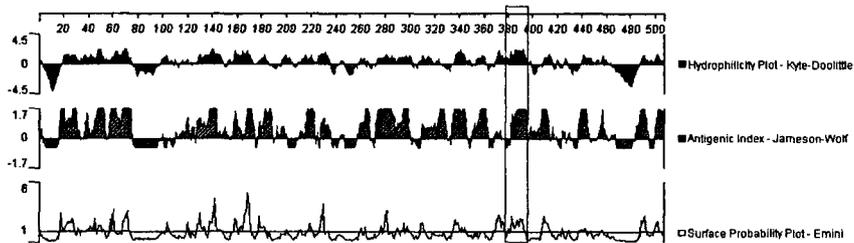


HRV-G-361 : N-AIDVSKDRRTYRAHQTSAF-C

그림 21. Hirame rhabdovirus G의 아미노산 서열 분석 및 이를 바탕으로 한 peptide의 선별

- VHSV 역시 hirage rhabdovirus와 마찬가지로 바이러스 입자 표면에 있는 것으로 알려진 glycoprotein (G)을 대상으로 항원을 준비하였다. G의 아미노산 서열을 분석하여 3차 구조상 표면에 있으면서 항원성이 높은 것으로 확인되는 부분인 aa 379-398의 peptide를 합성하여 항원으로 사용하였다 (그림 22).

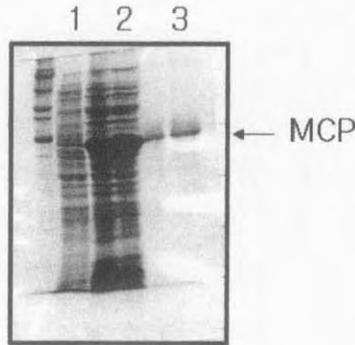
MECNTFFLVILIIIIKSTTSQITQRPPVENISTYHVDWDTPLYTHPSNCRKNSFVPIRPDQLRC
 PHEFEDTNKGLVSVPAQIIHLPLSVTGVSAVANGHYLHRVTVYRVTCTNFFGGQTIEKTILE
 AKLSRQEAIN EAGKDHEYPPFFPEPSCIWMKDNVHKDITHYYKTPKTVSIDLYSRKFLNPDFI
 EGVCTTSPCPTHWQGVYWGATPQAHCPTSETLKGHLFTRTHDHRVVKAIVAGHHPWG
 LTMACTVTFCGTEWIKTDLGDLIQVTGQGGAKKLSPKKCVNTDVQMRGATDDFSYLNHL
 ITNMAQRTECLDAHSDITASGKISPFLLSKFRPSHPGPGKAHYLLDGQIMRGECDYEAVVSI
 NYNSAQYKTVNNIWKPWDRIDNNTDGYDGMIFGDKLIIPDIEKYQSIYDSGMLVQRNLVE
 IPHPSIVFVSNSTDLSTNHIHTNLIPSDWSFKWSLWPSLSGMGVVGGAFLLLVLCCCCRASP
 PPSYGIPMQQFSRSQMV



VHSV-G-379 : N-NIWKPWDRIDNNTDGYDGMIFGDKLIIPDIEKYQSIYDSGMLVQRNLVE-C

그림 22. VHSV G의 아미노산 서열 분석 및 이를 바탕으로 한 peptide의 선별

○ Iridovirus가 넓치에 감염함은 본 연구진에 의하여 밝혀졌다 (Do et al., 2005). 또한 양식 어류에 감염하는 iridovirus의 전체 genomic sequence 역시 본 연구진이 밝혀내어 보고한 바 있다 (Do et al., 2004). 본 연구진의 연구 결과를 바탕으로 iridovirus 입자의 표면에 존재하는 것으로 알려진 MCP의 full-length cDNA를 prokaryotic expression vector인 pET28a에 cloning한 다음 이를 E.coli BL21에 transformation 시킨 후 발현시켰다. 이와 같이 발현된 재조합단백질을 nickel column으로 분리한 다음 항원으로 사용하였다 (그림 23).



1: E. coli transformed with pET vector
 2: E.coli transformed with pET-MCP
 3: Purified MCP

그림 23. Iridovirus의 MCP 제조함 단백질 제조

나. 바이러스들에 대한 scFv 단클론항체 제조

- 앞에서와 같이 준비한 바이러스 항원들을 PBS에 20 ug/ml 농도로 맞춘 후 배양 용기에 coating 하였다. 바이러스 항원이 coating된 배양 용기에 본 연구의 1년차에서와 같이 제조한 phage display library를 넣어 반응 시킨 후 20회 이상을 washing하여 항원과 결합하지 않은 phage들을 제거하였다. 항원에 붙은 phage에 E. coli TG1 strain을 첨가하여 infection 시킨 다음 ampicillin이 첨가된 배지에 E. coli를 배양하며 colony를 형성 시켰다.
- 이후 세균 항원을 대상으로 한 scFv 선별과정과 동일하게 진행하였는데, 형성된 각 colony 들을 96 multiwell plate의 각 well에 배양하였다. 여기에 M13 KO7 helper phage를 첨가하여 phage를 rescue 시킨 다음 항원이 coating된 ELISA plate에 phage를 옮겨 넣고 M13 phage에 대한 항체를 사용하여 항원과 결합하는 scFv를 발현하는 phage를 선별하였다.
- 선별한 phage들 중 각 바이러스에 대하여 ELISA 값이 높은 clone들을 각각 3개씩을 선별하여 soluble form의 scFv를 제조하였다. M13 phage에 display된 scFv 항체의 soluble form 제조는 M13 phage를 E. coli HB2151 strain에 감염시켜서 제조하였다.
- 이와 같이 E. coli에서 만든 scFv form의 항체를 affinity column을 사용하여 순수분리 하였다. 이와 같은 방법으로 순수분리한 scFv들 중 각 바이러스 항원에 대한 것 하나씩을 선정하여 SDS-PAGE를 통하여 확인한 결과 그림 와 같았다 (그림 24).

1 2 3 4 5 6

← scFv

1: Lymphocystis virus MCP
2: Marine birnavirus VP2
3: Nodavirus capsid protein
4: Hiramé rhabdovirus G
5: VHSV G
6: Iridovirus MCP

그림 24. 순수분리된, 각 바이러스 항원들에 대한 scFv 항체들의 SDS-PAGE.

다. ELISA, western blotting, immunohistochemistry에 적합한 항체 선별

- 이와 같이 제조한 scFv 항체들을 대상으로 세균의 경우와 같이 ELISA, ELISPOT, western blotting에 적합함을 확인 하였다.

5. 국내외에서 새로 발견되는 병원체들에 대하여 scFv 단클론항체 제조

가. 국내외에서 새로 발견되는 병원체들의 정보 수집 및 scFv screening을 위한 항원 준비

- 앞에서 언급한 병원체들 외에 새로이 넙치에 감염하는, 혹은 감염 가능성이 있는 병원체들이 보고되었다. 먼저 일본의 양식 넙치에 herpesvirus가 감염한다는 보고가 있었고 (Iida & Nagai, 2004), IPNV가 넙치에 감염한다는 보고가 있었다 (McAllister et al., 1984; Crane et al., 2000). 그리고 우리나라에서 양식 중인 넙치와는 다른 종이지만 넙치에 SFRV라는 전혀 새로운 바이러스가 검출되었다는 보고가 있었다 (Mork et al., 2004). 따라서 본 연구에서는 이들을 대상으로 scFv 항체를 제작하여 이후 진단키트 개발에 활용하고자 하였다.
- 먼저 herpesvirus의 경우 아직 외국에서도 바이러스를 증식시키지 못하였으며 단지 PCR을 통하여 바이러스 유전자 일부분만을 분석한 상태이다 (Iida & Nagai, 2004). 보고된 herpesvirus의 서열을 바탕으로 peptide를 합성하고자 하였는데, 보고된 염기서열이 매우 짧고 이로부터 아미노산 서열을 정확하게 유추할 수 없어서 현재로서는 peptide를 합성할 수 없었다. 따라서 herpesvirus의 경우 바이러스 배양 혹은 염기서열의 정보가 더 많

이 확보될 때까지 scFv 제작을 미루기로 하였다.

- IPNV의 경우 본 연구진에 의하여 VP2 및 VP3가 항원성 있음이 보고된 바 있다 (Park & Jeong, 1996; Moon et al., 2004). 따라서 본 연구에서는 IPNV의 VP2 및 VP3를 항원으로 하여 scFv를 제조하기로 하였다. 항원으로는 VP2 및 VP3의 재조합 단백질을 제조하였는데, VP3는 full-length cDNA를 대상으로하였고 VP2는 marine birnavirus와 같이 aa 79-359에 해당하는 partial cDNA를 대상으로 재조합 단백질을 제조하였다. VP2 및 VP3의 cDNA를 prokaryotic expression vector인 pET28a에 cloning한 다음 이를 E. coli BL21에 transformation 시킨 후 발현시켰다. 이와 같이 발현된 재조합단백질을 nickel column으로 분리한 다음 항원으로 사용하였다 (그림 25).

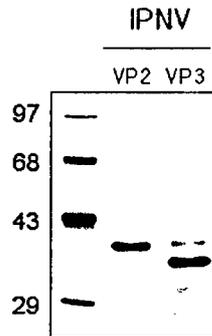
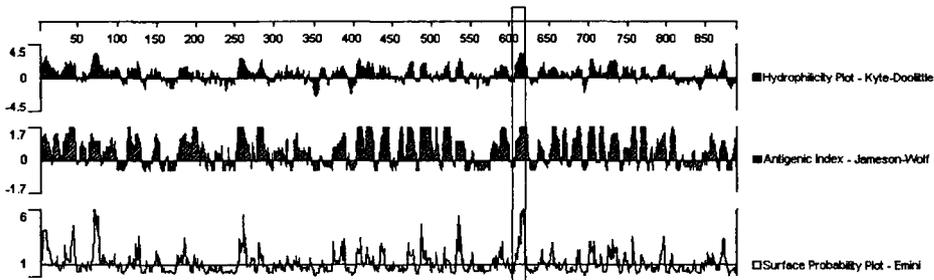


그림 25. IPNV의 VP2 및 VP3 재조합 단백질 제조

- SFRV의 경우 아직 전체 유전자 정보가 분석되지 못한 상태이고 단지 이 바이러스의 polymerase인 L의 염기서열이 보고되어 있을 뿐이다. 일반적으로 polymerase는 바이러스 입자의 안쪽에 존재하기 때문에 항체 제작용 항원으로 적합하지 않다. 그러나 현재로서는 SFRV의 유일한 정보가 L gene이기 때문에 우선 이를 대상으로 scFv 항체를 제작하고, 이후 표면에 나와있는 단백질 관련 정보가 나오면 그 때 다시 scFv 항체를 제작하기로 하였다. SFRV L에 대한 scFv를 신속하게 만들기 위하여 L gene의 아미노산 서열을 분석하여 3차구조상 L 단백질의 표면에 있으면서 항원성이 높은 것으로 확인되는 부분인 aa 601-620의 peptide를 합성하여 항원으로 사용하였다 (그림 26).

MDENYDTEENFEYNSAFDSDDIELPSWLEDDIKQGNPLNPKDYSLNSPLIGDKLEALTRFL
 RTGHLERRHKRERA EYTAWKDYLPKSHSVSRQLSDLHQWGMKILLSNIPPGRFQEFKDI
 NREADEMIPILEAYLKHWGIPNMDTLEKTSVPYQILGQGSLWLTLHQIILYMNSQTSIEKTN
 LKRSIRGKVVKVG DREL FELDTAELGKVVISDNYIWIKDADLILDRITILMIKDM LIGRVQT
 CISMVDRSDGRYSEKDVEKLMKLYEYGD MIIERSGDEGYEAIKMLEPICNLR LSDL AHEFRP
 LIPDFPHFRNHVMTATDDLSELHPELDIRRLVMTETEYVYVVLVFFSSFRHWGHPFDYFAG
 LTKLNKQVTLKKTIDKDYANALASDLALILKKHFDSNKKWAVDTEKLDGDHPLYDHVM
 NATWPTPKQIEDFGDLWHQLPLTKIYDIPDLIDPSIYSDKSHSMNRTEVLM AVQDDPDNP
 IPTRKVLKTLLETPATNWPVFLKEIDENGLDPEDLVIGLKGKERELKKAGRFFSLMSWKLRE
 YFVITEYLIKHHFVPLFKGLTMADDMTEVMKKMLERSQGQGSIDYENICIANHIDYEKWN
 NHQRKESNGPVFRVMGQFLGYPSLLERTHQFFEQSLMYNNGRPDLMEVQNGTLVNNSD
 HLVCWNGQAGGLEGLRQKGWSILNLLVIRRESKVRNTRVQTLAQGDNQVICTQYKQLPH
 HNESELKEMLTNVVNNNQVMDAIERGTNKLGLIINNDETIQSADFMTYGVPIFRGNIR
 GLETKRWSRVTCVTNDQLPSLANVMSSVTTNALT VSHFDISMIEPMRHFIFFATFARKLIEY
 HNPALRETMSYLADLTHDERLKYNAAVFLFLDPSLGGV



SFRV-L-601 : N-CIANHIDYEKWN NHQRKESN-C

그림 26. SFRV L의 아미노산 서열 분석 및 이를 바탕으로 한 peptide의 선별

나. 국내외에서 새로 발견되는 병원체들에 대한 scFv 단클론항체 제조

- 바이러스 항원들을 PBS에 20 ug/ml 농도로 맞춘 후 배양 용기에 coating 하였다. 이후 앞의 바이러스 항원을 사용한 scFv 선별과정과 동일한 방법을 사용하여 각 바이러스 항원에 대하여 3개의 scFv를 제조하였다. M13 phage에 display된 scFv 항체의 soluble form 제조는 M13 phage를 E. coli HB2151 strain에 감염시켜서 제조하였다.
- 이와 같이 E. coli에서 만든 scFv form의 항체를 affinity column을 사용하여 순수분리 하였다. 이와 같은 방법으로 순수분리한 scFv들 중 각 바이러스 항원에 대한 것 하나씩을 선정하여 SDS-PAGE를 통하여 확인한 결과 그림 27 같았다.

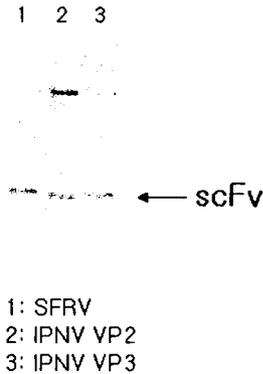


그림 27. 순수분리된, 각 바이러스 항원들에 대한 scFv 항체들의 SDS-PAGE.

다. ELISA, western blotting, immunohistochemistry에 적합한 항체 선별

- 제조한 scFv 항체들을 3차년도 연구 내용인 신속진단키트 개발 및 항원성 확인에 사용하기 위하여 ELISA, ELISPOT, western blotting에 적합함을 확인하였다.

6. 제조한 scFv 단클론 항체를 사용하여 기존에 보고된 세균 및 바이러스들을 동시에 신속 진단하는 기술 개발

가. 지금까지 보고 된 녀치의 병원성 세균 및 바이러스들을 동시에 screening할 수 있는 ELISA system 개발

- 앞에서와 같이 제조한 scFv 항체들을 사용하여 녀치의 병원성 세균 및 바이러스들을 동시에 screening 할 수 있는 ELISA키트를 개발하고자 하였다. 이를 위하여 먼저 제조한 scFv 항체들의 specificity를 분석하였다. 즉 제조한 scFv 항체들이 자신에 대한 항원 이외에 다른 항원 (병원체)들과 cross reactivity가 있는지를 확인 하였다. 이를 위하여 녀치의 병원성 세균 및 바이러스들 각각에 대하여 panning 및 colony screening 과정 중 높은 ELISA 값을 보였던 3 종류의 scFv clone들을 사용하였다. 먼저 96-well ELISA plate에 각 병원체의 항원을 그림 28과 같이 coating 하였다. 재조합 단백질 및 peptide 항원은 2ug/ml 농도의 항원을 사용하였으며 세균의 경우 formalin killed bacteria를 OD₆₀₀ 1.0의 농도로 맞춘 후 사용하였다. 이후 각 scFv 들을 첨가한 다음 ELISA를 수행하였다.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

그림 28. scFv 단클론항체들의 cross reactivity 분석을 위하여 96 well ELISA plate에 다양한 항원을 coating 한 pattern

○ 이 결과들로부터 각 병원체마다 비교적 높은 specificity를 보이는 2개의 scFv clone들을 선별하여 각각을 "-1" 및 "-2"로 명명을 한 다음 (표 4) 이후의 ELISA screening에 사용하였다.

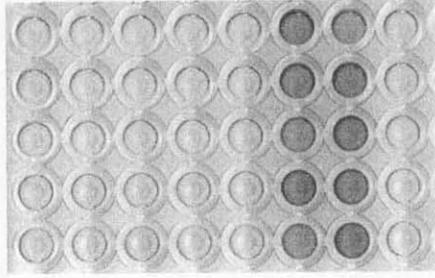
표 4. cross reactivity 분석을 통하여 최종적으로 선별한 scFv clones

병원체 및 항원	scFv clone	
Lymphocystis MCP	LMCP-1	LMCP-2
Marine birnavirus VP2	MBVP2-1	MBVP2-2
Nodavirus coat protein	NCP-1	NCP-2
Hirame rhabdovirus glycoprotein	HRVG-1	HRVG-2
VHSV glycoprotein	VHSVG-1	VHSVG-2
Iridovirus MCP	IMCP-1	IMCP-2
IPNV VP2	IPNVVP2-1	IPNVVP2-2
SFRV L	SFRVL-1	SFRVL-2
<i>Streptococcus iniae</i> FP2031	SI2031-1	SI2031-2
<i>Streptococcus iniae</i> FP4150	SI4150-1	SI4150-2
<i>Edwardsiella tarda</i> FP4102	ET4102-1	ET4102-2
<i>Photobacterium damsela</i>	PD-1	PD-2
<i>Vibrio vulnificus</i> biotype 1	VV1-1	VV1-2
<i>Vibrio vulnificus</i> biotype 2	VV2-1	VV2-2
<i>Vibrio vulnificus</i> ATCC 27562	VV27562-1	VV27562-2

나. 넙치 양식장에서 사육 중 질병에 걸린 넙치들을 대상으로 ELISA 키트 현장 적용 실험

- 제조한 ELISA kit가 실제 양식 넙치의 병원체를 신속하게 진단할 수 있는지를 확인하기 위하여 양식장에서 질병에 걸린 넙치를 대상으로 ELISA를 수행하였다. 질병이 발생한, 서로 다른 2개의 양식장에서 넙치를 sampling한 다음 넙치의 kidney 및 간 조직을 대상으로 ELISA를 수행하였다. 이 결과의 신빙성을 확인하기 위하여 PCR을 사용 하여 넙치의 병원체를 분리 확인하였다. 두 개의 시료 모두 본 연구에서 제조한 ELISA kit를 사용하여 screening한 결과 전반적으로 ELISA 값이 높지 않았는데, 한 시료에서는 VHSV에 대한 scFv 항체들에서 ELISA 값이 약간 증가하였으며, 다른 한 시료에서는 marine birnavirus에 대한 scFv 항체에서 비교적 높은 ELISA 값이 나타났다. 이와 같은 결과는 PCR 및 nucleotide sequencing 을 통한 분석 결과인 VHSV 및 marine birnavirus와 일치함을 확인할 수 있었다 (그림 29).

A



B

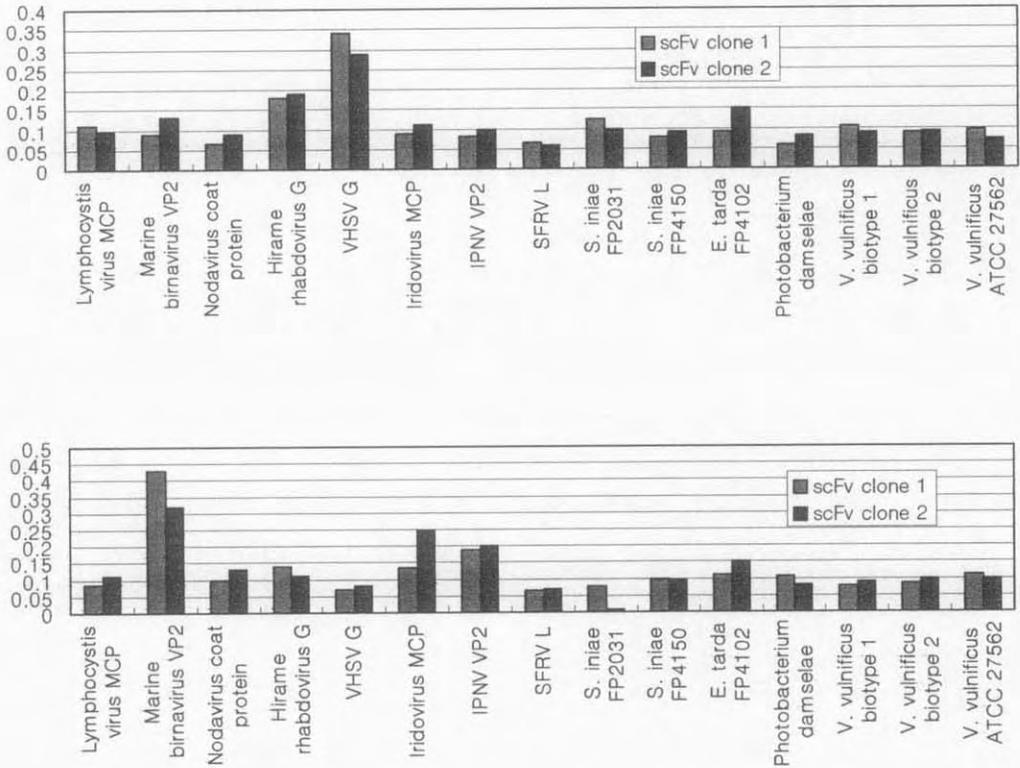


그림 29. ELISA를 사용한 넙치 시료의 rapid screening 결과. A, ELISA plate의 사진 일부. B, 2nwhdfb의 시료를 대상으로 얻은 ELISA 값을 바탕으로 그린 graph.

다. 지금까지 보고 된 넙치의 병원성 세균 및 바이러스들을 동시에 screening할 수 있는 ELISPOT 진단키트 개발 및 넙치 양식장에서 사육 중 질병에 걸린 넙치들을 대상으로 ELISPOT 키트 현장 적용실험

- 애초의 계획은 membrane에 넙치 병원성 세균 및 바이러스들에 대한 scFv들은 dotting 한 다음 여기에 질병 걸린 넙치의 조직 혹은 혈청을 반응시켜 보다 용이하게 넙치 질병을 screening하는 sandwich 방식의 kit를 개발하고자 하였다. 즉 1차로 각 병원체들에 대한 scFv 항체 clone 1을 membrane에 dotting 한 다음 여기에 넙치 조직 lysate를 넣고 이어서 scFv 항체 clone 2를 반응시키고자 하였다. 이후 항원에 결합한 scFv clone 2를 alkaline phosphatase가 conjugation 된 anti-E tag 항체와 BCIP/NBT로 detection 하고자 하였다. 이것이 가능한 경우 미리 scFv clone 1 항체들이 dotting 되어 있는 membrane을 만들어 놓고 여기에 시료를 바로 처리함으로써 시료 이후의 단계부터 비교적 빨리 결과를 얻을 수 있을 것이라고 예상을 하여 본 계획을 수립하였다.
- 그런데, 실제 membrane dotting에 사용한 scFv clone 1과, 항원 결합 이후에 첨가한 scFv clone 2가 서로 동일한 tag (E-tag)을 지니고 있기 때문에 anti-E tag 항체를 처리하면 항원에 결합한 항원 specific scFv clone 2 뿐만 아니라 membrane에 dotting한 모든 scFv clone 1들과도 반응을 하여 모든 dot에서 color response 가 나타났다. 따라서 sandwich 방식을 사용한 ELISPOT 방법은 더 이상 진행하지 않았다.
- 앞서와 같은 문제점 때문에 sandwich 방식의 ELISPOT 대신 membrane에 항원을 직접 dotting 한 다음 여기에 scFv 항체들을 반응시키는 direct 방식의 ELISPOT를 수행하였다. 이때 사용한 scFv 항체들은 ELISA를 통하여 각 넙치 병원체에 specificity를 보였던 scFv 항체들을 사용하였다. 이 scFv 항체들을 질병에 걸린 넙치의 조직을 대상으로 ELISPOT을 수행하였다. 즉, membrane에 하나의 넙치시료 조직 lysate를 scFv 항체 수만큼 dotting을 하였다. Membrane중 항원이 dotting 되지 않은 부분은 BSA로 blocking 한 다음 각 dot 들에 넙치 병원체들에 대한 scFv 항체들을 처리하였다. 항원에 결합하지 않은 scFv 항체들을 washing out한 다음 scFv에 존재하는 E-tag에 대한 항체 (HRP conjugated Ab)를 사용하여 결합을 확인 하였다. 그 결과 marine birnavirus 에 대한 scFv 항체를 처리한 dot에서 비교적 진한 발색 반응을 나타내었다 (그림 30).

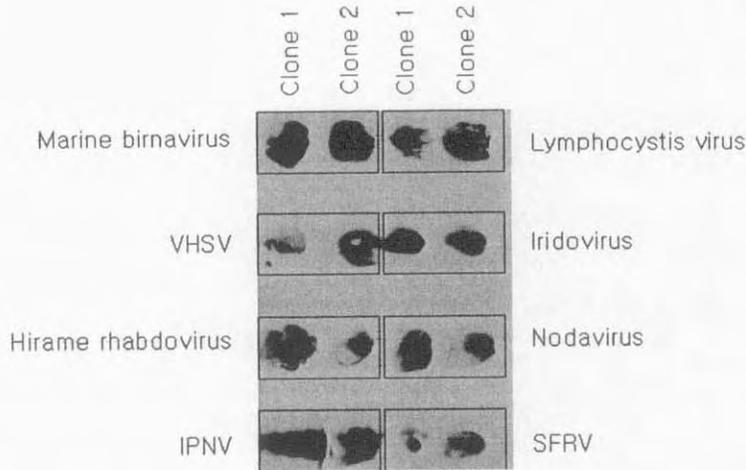


그림 30. ELISPOT을 사용한 넙치 시료의 rapid screening 결과.

- 이와 같은 결과는 ELISA로 확인 한 결과 및 classic methods 를 사용한 진단 결과와 일치하는 것이었다. Direct ELISPOT를 사용한 넙치 병원체 screening 방법은 ELISA와 거의 비슷한 시간 및 노력이 필요하고 결과도 비슷하게 나오는 반면, ELISA에 비하여 data를 정확하게 분석하기 어려운 면이 있었다. 즉 ELISA의 경우 항원-항체 반응의 차이를 OD 값이라는 수치를 통하여 분석할 수 있었지만 ELISPOT은 항원-항체 반응의 차이를 육안으로 판단하여야 하기 때문에 결과 해석에 오류를 범할 가능성이 있었다. 따라서 비슷한 의미를 제공하고 비슷한 노력을 들여야 하는 ELISA와 ELISPOT 중 ELISA가 향후에 더 필요할 것으로 판단된다.

7. 제조한 scFv 단클론 항체를 사용하여 기존에 보고된 넙치 바이러스의 면역유도단백질 및 중화 epitope를 지니는 단백질 확인

가. 지금까지 보고 된 넙치의 바이러스들에 대하여 면역유도단백질과 중화 epitope의 분석 및 확인

- 본 연구 결과 제조된 scFv 항체를 이용할 수 있는 분야로서 앞에서 언급한, “ELISA를 사용한 신속 진단”, 이외에도 “바이러스의 면역유도 단백질 및 중화 epitope를 지니는 단백질 신속확인” 이 있다. 본 연구에서도 제조한 scFv 항체를 사용하여 넙치 병원체, 특히 넙치에 감염하는 바이러스의 면역유도 단백질을 확인하고 이를 바탕으로 중화 epitope를 분석할 수 있는지를 확인 하였다.
- 일반적으로 B cell의 표면에 존재하는 항체와 결합하여 항체 반응을 유도하는 단백질을

면역유도 단백질이라 부른다. 만약 바이러스의 어떤 단백질이 scFv 항체와 결합할 수 있다면 실제 동물에서 이 항체를 발현하는 B cell을 활성화 시켜 항체반응을 유도할 가능성이 매우 높게 된다. 이와 같은 면역유도 단백질은 향후 그 바이러스의 recombinant vaccine 개발의 target 단백질로 사용될 수 있다. 따라서 본 연구에서 scFv를 사용하여 넓치 바이러스 단백질 들 중 scFv 항체와 결합하는 것을 찾고자 하였다. 그런데, 앞에서 계속 언급한 바와 같이 본 연구에 사용한 모든 바이러스 항원들에 대하여 scFv 항체를 찾을 수가 있었다. 비록 scFv 항체와 항원간에 affinity는 측정하지 못하였지만 선별한 scFv 들이 넓치 바이러스에 어느정도 specificity를 지니는 것으로 판단된다. 이로부터 본 연구에서 사용한 넓치 바이러스의 단백질들은 모두 면역유도 특성을 지님을 확인 할 수 있었다.

- 그러나 본 연구에서 제조한 scFv 항체 library는 mouse의 항체 library 이다. 따라서 위의 결과를 다시 해석하면 본 연구에 사용한 넓치 바이러스 단백질들이 mouse에 들어갔을 때 항체 반응을 유발 할 수 있음을 나타낸다. 그런데, 양식 넓치에 적용을 위해서는 mouse의 면역 반응을 유도하는 것은 의미가 없고 넓치의 면역 반응을 유도하는 단백질을 확인하는 것이 필요하다. 따라서 넓치 바이러스들의 단백질들 중 면역유도 단백질 선별은 본 연구에서 제작한 mouse scFv 항체 library를 사용하는 것 보다 이 단백질들을 실제 넓치에 주사하였을 때 면역반응 (항체 반응)이 보이는 지를 확인 하는 것이 바람직하다고 판단된다.
- 넓치바이러스의 제조항 단백질 백신 제조에 있어서 면역유도 단백질 확인보다 더 중요한 것이 중화 epitope를 지니는 단백질의 확인이다.
- 본 연구에서 개발한 scFv phage displayed library를 사용하여 중화 epitope를 확인할 수 있다. 간단히 설명하면 다음과 같다. 먼저, 바이러스의 구조중 바깥쪽에 위치하는 것으로 확인 된 구조단백질의 아미노산 서열을 분석하여 hydrophilicity와 antigenicity가 있는 부분을 선별한다. 이 부분이 여러 개 있는 경우 각각에 대한 peptide를 합성한다. 합성한 peptide를 항원으로 하여 scFv phage-displayed library의 screening을 수행하여 각 peptide들에 대한 scFv 단클론 항체를 선별한다. 이와 같이 선별한 단클론항체를 사용하여 바이러스의 중화 실험을 수행한다. 만약 특정 peptide에 대한 scFv 단클론 항체가 바이러스의 감염성을 중화시킨다면 그 peptide에 중화 epitope가 있음을 말하여 준다.
- 본 연구에서 사용한 넓치 바이러스들의 단백질들에 중화 epitope가 있는지를 확인하기 위하여 중화 실험을 수행하였다. 먼저 본 실험에 사용한 넓치 바이러스들 중 nodavirus,

marine birnavirus, IPNV, iridovirus 등을 대상으로 scFv 항체에 의한 중화 실험을 수행하였다. 각 바이러스의 단백질마다 2종류의 scFv clone들을 사용하여 중화 실험을 수행하였다. 그리고 nodavirus coat protein, marine birnavirus VP2, IPNV VP2 등의 경우 이들의 재조합 단백질을 토끼에 주사하여 얻은 항혈청을 대조구로 사용하였다. 그 결과 표와 같았다. 즉 토끼의 항혈청을 사용한 anti-nodavirus coat protein, anti-marine birnavirus VP2, anti-IPNV VP2 등의 경우 모두 10,000 이상의 비교적 높은 중화 titer를 보였다. 이에 비하여 이들 바이러스 단백질들에 대한 scFv 항체의 경우 marine nodavirus와 IPNV에 대한 scFv에서 각각 1개의 clone들만 중화 값을 보였으며, 이들 scFv 항체의 중화 값이 50이하로서 토끼의 항혈청에 비하여 매우 낮은 값을 보였다. 이상의 결과부터 다음과 같은 사실을 확인할 수 있었다. 즉 토끼 혈청을 사용한 실험으로부터 nodavirus의 coat protein, marine birnavirus의 VP2, 그리고 IPNV의 VP2에 중화 epitope가 존재하며, 단클론항체인 scFv를 사용한 실험 결과로부터 scFv MBVP2-1 및 IPNVVP2-2가 결합하는 epitope가 중화 epitope임을 확인할 수 있었다.

표 5. 바이러스에 대한 scFv 단클론항체들의 바이러스 중화 값

Virus	Neutralizing titer		
	scFv clone		Rabbit antisera
	Clone #1	Clone #2	
Marine birnavirus	640	-	102,400
IPNV	-	320	102,400
Nodavirus	-	-	51,200
Iridovirus	-	-	ND

*-, neutralizing activity was not detected

**ND, not determined

○ 본 연구 결과 토끼의 항혈청을 사용한 결과와 본 연구에서 제작한 scFv library를 사용한 결과에 차이가 있었다. 이와 같은 차이는 첫째, 토끼의 항혈청은 polyclonal antibody로서 다양한 epitope와 결합할 수 있는 항체들이 섞여 존재하는 반면 각 scFv는 하나의 epitope만 인지할 수 있는 monoclonal antibody이기 때문이며, 둘째, 기본적으로 토끼의 항혈청은 bivalent 이상인 반면 scFv 항체는 monovalent 라서 항원에 대한 affinity가 낮으며, 셋째, 전체 항체의 repertoire에 있어서 본 연구에서 제작한 scFv 항체 repertoire가 토끼의 항체 repertoire에 비하여 작기 때문이라고 판단된다.

나. 선별된 바이러스들의 단백질들을 대장균에서 발현시킨 후 넵치에 주사하여 실제 면역반응을 유발 하는 지, 그리고 중화 항체를 유도하는 지 확인

○ 앞에서 확인한 바와 같이 중화 epitope를 지니는 것으로 확인된 nodavirus coat protein, marine birnavirus VP2, IPNV VP2 등이 실제 넵치에서 중화항체를 유도하는 지를 확인 하였다. 그림 5와 같이 E. coli에서 발현한 recombinant protein들을 넵치 복강에 2회 주사한 다음 혈청을 채취하였다. 이들 넵치 혈청들을 대상으로 ELISA 및 중화 실험을 수행하여 바이러스 단백질들에 대한 항체 생성 여부 (면역유도 특성 확인) 및 바이러스에 대한 중화 항체 생성 여부를 측정하였다. 그 결과 표 5와 같았다. 즉, nodavirus coat protein, marine birnavirus VP2, IPNV VP2 를 주사하여 얻은 넵치 혈청에 각각의 바이러스를 중화시키는 항체가 존재함을 확인 할 수 있었다.

○ 이상으로 본 연구의 결과를 종합하면 다음과 같다

- 1) mouse의 항체 유전자 heavy chain gene들과 light chain gene들을 PCR cloning 하여 pCANTAB vector에 subcloning 하였다.
- 2) 이를 M13 phage에 packaging 한 다음 repertoire를 분석 한 결과 적어도 10^7 이상임을 확인하였다.
- 3) M13 phage의 P3 tail에 display된 scFv 항체 library를 사용하여 특정 항원에 대한 monoclonal scFv 항체를 20 정도 안에 제조할 수 있음을 확인 하였다.
- 4) 제조한 scFv library를 사용하여 넵치 병원체 15종류 (8 viruses, 7 bacteria)에 대한 scFv 항체들을 선별하였다.
- 5) 선별한 scFv 항체를 사용하여 넵치의 병원성 세균 및 바이러스를 신속 screening할 수 있는 ELISA kit 및 ELISPOT kit를 개발하였다. 이중 ELISA kit가 실용화에 더 적합한 것으로 확인되었다.
- 6) 제조한 scFv 항체 library를 사용하여 바이러스 단백질 중 면역유도 단백질 및 중화 epitope를 지니는 단백질을 확인 할 수 있었다. 그러나 실제 사용에 있어서 중화 epitope 확인에 있어서 본 scFv 항체 library 활용은 의미가 있으나, 면역유도 단백질 확인에의 활용은 큰 의미를 갖지 못하는 것으로 판단된다.

제 4 장 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발목표 및 평가의 착안점

1. 연구개발 목표

- Phage display법을 사용하여 양식 어류의 다양한 병원체에 대한 단클론항체를 신속하게 제조하는 기술 개발
- 양식 어류의 다양한 병원체에 대한 단클론항체를 사용하여 다양한 병원체를 동시에 진단하는 고효율 진단 기술 개발
- 다양한 바이러스의 면역유도단백질 및 중화 epitope를 지니는 단백질들을 신속하고 고효율로 분석하는 기술 개발

2. 연차별 연구개발목표와 내용

구 분	목 표	내용 및 범위
1차 년도 (2004년)	Mouse 항체 유전자를 대상으로 phage display library 제조	- mouse에서 림프구 분리 및 cDNA 합성 - RT-PCR을 사용하여 항체 H chain 및 L chain 각각의 V region gene의 유전자들을 증폭 - Linker를 사용하여 V _H 및 V _L 유전자를 fusion gene으로 제조후 pCANTAB 5E phagemid vector에 cloning - E. coli TG1 strain과 M13 KO7 helper phage를 사용하여 phage rescue를 통하여 phage display library 제조
	제조한 phage display library의 size 및 유의성 검증	- E. coli TG1 strain을 사용한 plaque assay를 통하여 library size 분석: 10 ¹² PFU/ml 이상으로 제조 - E. tarda 및 Iridovirus (RBIV)를 항원으로하여 20일 안에 단클론 항체가 제조 되는 지를 확인 - E. coli HB2151 strain을 사용하여 제조한 항체를 분리한 후 ELISA, Western blotting, 중화실험, immunohistochemistry 등에 사용하여 적용범위 분석
2차 년도 (2005년)	Phage display library를 사용하여 기존에 보고된 넙치의 세균성 병원체에 대한 scFv 단클론항체 제조	- <i>E. tarda</i> , <i>Flexibacter maritimus</i> , <i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Vibrio ichthyenteri</i> , <i>Streptococcus iniae</i> , <i>Streptococcus parauberis</i> , <i>Lactococcus garvieae</i> 등의 지금까지 보고된 넙치 세균성 병원체에 대한 여러 종류의 단클론 항체 제조 - 각각의 세균들에 대하여 ELISA, Western blotting, immunohistochemistry에 적합한 단클론항체 선별
	Phage display library를 사용하여 기존에 보고된 넙치의 바이러스성 병원체들에 대한 scFv 단클론항체 제조	- Herpesvirus, marine birnavirus, lymphocystis virus, HRV, nodavirus, VHSV, iridovirus 등과 같이 지금까지 보고된 넙치에 감염하는 바이러스들에 대한 단클론항체 제조 - 각각의 바이러스들에 대하여 ELISA, Western blotting, immunohistochemistry, neutralization에 적합한 단클론항체 선별
	국내외에서 새로 발견되는 병원체들에 대하여 scFv 단클론항체 제조	- 국내외에서 새로 발견되는 병원체를 확보하여 이에 대한 단클론 항체 제조 - 이 병원체들에 대하여 ELISA, Western blotting, immunohistochemistry, neutralization에 적합한 단클론항체 선별
3차 년도 (2006년)	제조한 scFv 단클론 항체를 사용하여 기존에 보고된 세균 및 바이러스 모두를 동시에 신속 진단하는 기술 개발	- 지금까지 보고된 넙치의 병원성 세균 및 바이러스 모두가 포함된 ELISA 진단키트 개발 및 현장 적용 실험 - 지금까지 보고된 넙치의 병원성 세균 및 바이러스 모두가 포함된 ELISPOT 진단키트 개발 및 현장 적용 실험
	제조한 scFv 단클론 항체를 사용하여 기존에 보고된 넙치 바이러스의 면역유도단백질 및 중화 epitope를 지니는 단백질 확인	- 지금까지 보고된 넙치의 바이러스 모두에 대하여 면역유도단백질 분석 - 모든 넙치 바이러스를 대상으로 중화 epitope를 지니는 단백질 분석 - 선별된 바이러스들의 단백질들을 대장균에서 발현시킨 후 넙치에 주사하여 실제 면역반응을 유발 하는 지, 그리고 중화 항체를 유도하는 지 확인

3. 평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)*
1차년도(2004년)	○ 넵치 항체 유전자의 phage display library 제조 여부	50
	○ Phage display library의 size 확인 및 유의성 검증 여부	50
2차년도(2005년)	○ 기존에 국내에 보고된 넵치의 모든 병원성 세균들에 대한 단클론항체 제조 여부	35
	○ 기존에 국내에 보고된 넵치의 모든 바이러스에 대한 단클론항체 제조 여부	35
	○ 국내외에서 새로 발견된 병원체들에 대한 단클론항체 제조 여부	30
3차년도(2006년)	○ 기존에 보고된 넵치의 병원성 세균 및 바이러스 모두를 포함하는 신속 진단키트 개발 여부	60
	○ 국내에 보고된 넵치의 바이러스에 대한 중화 epitope 분석 여부	40
최종평가	○ 넵치 항체 유전자의 phage display library 제조 여부	20
	○ 넵치 병원성 세균 및 바이러스에 대한 단클론항체 제조 여부	20
	○ 기존에 보고된 넵치의 병원성 세균 및 바이러스 모두를 포함하는 신속 진단키트 개발 여부	30
	○ 국내에 보고된 넵치의 바이러스에 대한 중화 epitope 분석 여부	30

* 주 : 척도(점수)의 합계는 각년도 100으로 함.

제2절 연구개발 목표의 달성도

1. Mouse 항체 유전자를 대상으로 phage display library 제조

- 20 마리의 Balb/c mouse로 부터 spleen cell을 분리하여 이로부터 cDNA를 합성 완료
- PCR을 사용하여 mouse heavy chain의 V region을 증폭 완료
- PCR을 사용하여 mouse light (kappa) chain의 V region을 증폭 완료
- 증폭된 VH와 VK gene fragment를 linker [(Gly₄-ser)₃]를 사용하여 VH-linker-VK 형태인

single chain Fv (scFv) gene으로 연결하였으며 이를 pCANTAB 5E phagemid vector의 *SfiI/NotI* site에 cloning 완료

- scFv/pCANTAB 5E phagemid vector를 E. coli TG1 strain과 M13 KO7 helper phage를 사용하여 phage displayed scFv library 제조 완료

2. 제조한 phage display library의 size 및 유의성 검증

- E. coli TG1 strain을 사용한 library size를 분석한 결과 10^{10} /ml 이상임을 확인 완료
- 양식 넙치에서 분리된 E. tarda와 iridovirus의 MCP를 항원으로 하여 scFv phage display library로부터 scFv 단클론항체를 제조 완료하였으며, 이때 약 13일 만에 scFv 단클론항체가 제조됨을 확인
- scFv 항체를 display하고 있는 M13 phage를 E. coli HB2151 strain에 infection 시켜 soluble form의 scFv를 분리 완료하였으며 이 항체를 사용하여 ELISA, Western blotting, 중화실험, immunohistochemistry 등에 적용 가능한지 확인

3. 기존에 보고된 넙치의 세균성 병원체들에 대한 scFv 단클론항체 제조

- 기존에 보고된 세균 수집: *Vibrio vulnificus*, *Streptococcus iniae*, *Edwardsiella tarda*, *Photobacterium damsela*
- 세균들의 배양 및 scFv screening을 위한 항원 준비 완료
- 세균들에 대한 scFv 단클론항체 제조 완료
- ELISA, western blotting, immunohistochemistry에 적합한 항체 선별 확인

4. 기존에 보고된 넙치의 바이러스성 병원체들에 대한 scFv 단클론항체 제조

- 기존에 보고된 바이러스 및 정보 수집: Lymphocystis virus, marine birnavirus, Hiram rhabdovirus, nodavirus, VHSV, iridovirus
- scFv screening을 위한 바이러스들의 항원 준비 완료
제조합단백질: marine birnavirus, nodavirus, iridovirus
peptide 합성: lymphocystis virus, hiram rhabdovirus, VHSV
- 바이러스들에 대한 scFv 단클론항체 제조 완료
- ELISA, western blotting, immunohistochemistry, 중화실험에 적합한 항체 선별 확인

5. 국내외에서 새로 발견되는 병원체들에 대하여 scFv 단클론항체 제조

- 다음과 같은 병원체에 대한 항원 준비 완료
외국에서 넙치에 감염하는 것으로 밝혀진 IPNV (McAllister et al., 1984; Crane et al., 2000): VP2 및 VP3 제조합단백질 준비 완료
우리나라에서 양식되는 넙치와 유사한 flounder에 감염하는 것으로 밝혀진 SFRV (Mork

et al., 2004): peptide 합성 완료

- scFv 항체 제조 완료
- ELISA, western blotting, immunohistochemistry에 적합한 항체 선별

6. 제조한 scFv 단클론 항체를 사용하여 기존에 보고된 세균 및 바이러스 모두를 동시에 신속 진단하는 기술 개발

- 지금까지 보고 된 녀치의 병원성 세균 및 바이러스 모두가 포함된 ELISA 진단키트 개발 및 현장 적용 실험
- 지금까지 보고 된 녀치의 병원성 세균 및 바이러스 모두가 포함된 ELISPOT 진단키트 개발 및 현장 적용 실험

7. 제조한 scFv 단클론 항체를 사용하여 기존에 보고된 녀치 바이러스의 면역유도단백질 및 중화 epitope를 지니는 단백질 확인

- 지금까지 보고 된 녀치의 바이러스에 대하여 면역유도단백질 분석
- 모든 녀치 바이러스를 대상으로 중화 epitope를 지니는 단백질 분석
- 선별된 바이러스들의 단백질을 대장균에서 발현시킨 후 녀치에 주사하여 실제 면역반응을 유발 하는 지, 그리고 중화 항체를 유도하는 지 확인

제3절 상기 평가의 착안점에 따른 달성도에 대한 자체평가

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항	척 도 (점수)*	달성도 (%)
1차년도(2004년)	○ 넵치 항체 유전자의 phage display library 제조 여부	50	100
	○ Phage display library의 size 확인 및 유의성 검증 여부	50	100
2차년도(2005년)	○ 기존에 국내에 보고된 넵치의 모든 병원성 세균들에 대한 단클론항체 제조 여부	35	100
	○ 기존에 국내에 보고된 넵치의 모든 바이러스에 대한 단클론항체 제조 여부	35	100
	○ 국내외에서 새로 발견된 병원체들에 대한 단클론항체 제조 여부	30	100
3차년도(2006년)	○ 기존에 보고된 넵치의 병원성 세균 및 바이러스 모두를 포함하는 신속 진단키트 개발 여부	60	100
	○ 국내에 보고된 넵치의 바이러스에 대한 중화 epitope 분석 여부	40	90
최종평가	○ 넵치 항체 유전자의 phage display library 제조 여부	20	100
	○ 넵치 병원성 세균 및 바이러스에 대한 단클론항체 제조 여부	20	100
	○ 기존에 보고된 넵치의 병원성 세균 및 바이러스 모두를 포함하는 신속 진단키트 개발 여부	30	100
	○ 국내에 보고된 넵치의 바이러스에 대한 중화 epitope 분석 여부	30	90

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제1절 현장보급방안

- 사용하기에 간편하고 저렴한 가격의 ELISPOT 법의 신속진단 키트를 개발하여 양식어민들이 사용하기에 편리하고 무리가 없게 함
- 연구소나 학교 등과 같이 비교적 전문 인력이 있고 기기가 갖추어진 연구소나 학교 등을 대상으로 정확도와 정량이 가능하면서 간편하게 사용할 수 있는 ELISA 법의 신속진단 키트를 개발하여 보급
- 위와 같은 진단 키트의 사용법을 책자로 만들어 양식어민들에게 배포하고 또한 적절한 기회에 직접 설명함으로써 사용법을 익히도록 함

제2절 산업화계획방안

- 신속진단 키트: 제약회사와 제휴하여 보다 간편하고 싼 키트 개발하여 국내외에 판매
- 바이러스 재조합 단백질 백신: 본 연구 결과 얻어지는 중화 epitope 결과를 바탕으로 국립수산물학원 및 제약회사와 공동으로 바이러스 재조합 단백질 백신 개발에 활용

제3절 추가기술개발방안

- 본 연구가 성공적으로 마무리되어 scFv 단클론항체가 실용화 된 이후에도 넙치의 새로운 병원체가 발생하면 이들에 대하여도 단클론항체를 제조하여 진단키트에 추가
- 또한 새로운 바이러스가 발견되면 단클론항체를 제조후 신속하게 중화 epitope를 지니는 단백질을 확인하여 재조합단백질 백신이 개발될 수 있도록 유도함
- 본 연구 결과 얻어진 특정 scFv 항체가 affinity가 낮은 경우 이 항체 유전자를 분석한 다음 CDR3 부위의 modification을 통하여 affinity를 높임
- 특정 scFv 항체의 stability가 낮아서 문제가 발생하는 경우 그 항체의 Fv 유전자를 constant region에 연결하여 intact한 bivalent form으로 제조하여 안정성을 높임
- 본 연구 결과 개발되는 기술을 넙치 이외의 다른 어종에도 적용

제4절 기술이전방안

- 본 연구 결과 얻어진 scFv library 및 이로부터 선별한 scFv 단클론항체를 사용한 넓치 병원체 신속 진단 ELISA 키트에 대한 특허를 출원하여 취득 한 후 국내외 제약회사 들에게 기술을 이전할 계획임

제 6 장 참고문헌

- Anderson, E. D., D. V. Mourich, S. C. Fahrenkrug, S. Lapatra, J. Shepherd, J. A. Leong. 1996. Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 5: 114-122.
- Bang JD, Kim JW, Lee SD, Park SI, Chun SG, Jeong CS, Park JW. 1996. Humoral immune response of flounder to *Edwardsiella tarda*: The presence of various sizes of immunoglobulins in flounder. *Diseases of Aquatic Organisms* 26(3): 197-203
- Boudinot, P., M. Blanco, P. de Kinkelin, A. Benmansour. 1998. Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout. *Virology* 249: 297-306
- Cho WJ, Cha SJ, Do JW, Choi JY, Lee JY, Jeong CS, Cho KJ, Choi WS, Kang HS, Kim HD, Park JW. 1997. A novel 90 kDa stress protein induced in fish cells by fish rhabdovirus infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 233(2): 316-319
- Cho WJ, Yoon WJ, Moon CH, Cha SJ, Song H, Cho HR, Jang SJ, Chung DK, Jeong CS, Park JW. 2002. Molecular cloning of a novel chaperone-like protein induced by rhabdovirus infection with sequence similarity to the bacterial extracellular solute-binding protein, family 5. *Journal of Biological Chemistry* 277(44):41489-41496
- Christie, K. E. 1997. Immunization with viral antigens: infectious pancreatic necrosis. *Dev. Biol. Stand.* 90: 1-9
- Corbeil, S., S. E. Lapatra, E. D. Anderson, G. Kurath. 2000. Nanogram quantities of a DNA vaccine protect rainbow trout fry against heterologous strains of infectious hematopoietic necrosis virus. *Vaccine.* 18: 2817-2824.
- Engelking, H., and J. C. Leong. 1989. The glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus elicits neutralizing antibody and protective responses. *Virus Research.* 13: 213-230.
- Food and agricultural Organization Aquaculture Production Statistics 1988-1997 (Food and Agricultural Organization, Rome, 1999)

- Frost, P., A. Ness, N. P. Maaseide, D. H. Knappskog, and O. M. Rodseth. 1995. Efficacy of recombinant vaccine against infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon post-smolt. *Intervet Norvio*. pp784.
- Gilmore, R. D., H. M. Engelking, D. S. Manning, and J. C. Leong. 1988. Expression in *E. coli* of an epitope of the glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus protect against viral challenge. *Bio/Technology*. 6(3): 85–90.
- Hah, Y. C., S. W. Hong, M. H. Kim, J. L. Fryer, and J. R. Winton. 1984. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from gold fish (*Carassius auratus*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in Korea. *KOR. J. Microbiol.* 22(2):85–90.
- Hedrick, R. P, W. D. Eaton, J. L. Fryer, Y. C. Hah, J. W. Park, and S. W. Hong. 1985. Biochemical and serological properties of birnaviruses isolated from fish in Korea. *Fish Pathol.* 20(4):463–468.
- James H et al. 2001. Fish as food: aquaculture's contribution. *EMBO Reports* 2: 958–963
- Lawrence, W. R., E. Nagy, R. Duncan, P. Krell, and P. Dobos. 1989. Expression in *E. coli* of the major outer capsid protein of infectious pancreatic necrosis virus. *Gene*. 79: 369–374.
- Lee, J. Y., W. J. Cho, J. W. Do, H. J. Kim, J. W. Park, M. A. Park, S. G. Sohn, G. Jeong, and Y. C. Hah. 1996. Monoclonal antibodies raised against infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) G protein and a cellular 90 kDa protein neutralize IHNV infection in vitro. *J. Gen. Virol.* 77: 1731–1737.
- Lee UH, Pack HJ, Do JW, Bang JD, Cho HR, Ko BK, Nam CW, Choi DH, Yu HK, Jeong CS, Han IS, Park JW. 2001. Flounder (*Paralichthys olivaceus*) cDNA encoding a secreted immunoglobulin M heavy chain. *Fish & Shellfish Immunology* 11(6): 537–540
- Lee UH, Son SJ, Son, Lee JJ, Kwon B, Park JW, Kwon BS. 2004. Humanization of antagonistic anti-human 4-1BB monoclonal antibody using a phage-displayed combinatorial library. *Journal of Immunotherapy*. 27: 201–210
- Moon, C. H., 1998. Gene cloning of nucleocapsid protein of a Korean isolate of infectious hematopoietic necrosis virus. *Korean Journal of Microbiology* 34: 69–73.
- Moon, C. H., 2000. Cloning of the non-virion (NV) of a Korean Isolate of Infectious Hematopoietic Necrosis and identification of the role of the NV in

- IHN replication. *Korean Journal of Microbiology* 36(2): 103–108
- Moon CH et al., 2004. Comparison of the immunogenicity of recombinant VP2 and VP3 of infectious pancreatic necrosis virus and marine birnavirus. *Arch Virol.* 149:2059–68.
- Nagy, E., and P. Dobos. 1987. Epitope mapping of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) polypeptides using monoclonal antibodies. VII. International Congress of Virology, Edmonton, Canada. Abstracts. OP 25.2, p. 311.
- Naylor, R. L. et al., Effect of aquaculture on world fish supplies. (2000) *Nature* 405: 1017–1024
- Okamoto, N. et al., 1983. Antigenic relationship of selected strains of IPNV and eel virus european (EVE). *J. Fish Dis.* 6: 19–25
- Oshima, S., J. Hata, C. Segawa, S. Yamashita. 1996. Mother to fry, successful transfer of immunity against infectious hematopoietic necrosis virus infection in rainbow trout. *J. Gen. Virol.* 77: 2441–2445
- Park, J. M., et al., 1998. Gene cloning of matrix proteins of a Korean isolate of infectious hematopoietic necrosis virus. *Korean Journal of Microbiology* 34: 64–68.
- Park, J. W., and G. Jeong. 1996. Identification of VP3 as an important neutralising epitope from DRT strain, a Korean isolate of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish & Shellfish Immunol.* 6: 207–219.
- Park, J. W., J. J. Lee, G. Jeong, and Y. C. Hah. 1989. Characterization of the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolated from pen-cultured rainbow trout in Korea. *KOR. J. Microbiol.* 27(3):225–230.
- Park, M. A., S. G. Sohn, S. D. Lee, S. K. Chun, J. W. Park, J. L. Fryer and Y. C. Hah. 1993. Infectious Hematopoietic Necrosis Virus from salmonids cultured in Korea. *J. Fish Dis.* 16:471–478
- Pilcher, K. S., and J. L. Fryer. 1980. The viral diseases of fish: a review through 1978. *Crit. Rev. Microbiol.* 7: 287–364.
- Ristow, S. S. E. LaPatra, R. Dixon, C. R. Pedrow, J. W. Park, and G. H. Thorgaard. 2000. Responses of cloned rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) to an attenuated strain of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus. *Dis. Aquat. Org.* 42(3):163–72.
- Sohn, S. G., M. A. Park, J. W. Do, J. Y. Choi, and J. W. Park. 1995. Birnavirus isolated from cultured flounder in Korea. *Fish Pathol.* 30(4): 279–280.
- Son JH, Lee UH, Lee JJ, Kwon B, Kwon BS, Park JW. 2004. Humanization of

agonistic anti-human 4-1BB monoclonal antibody using a phage-displayed combinatorial library. *Journal of Immunological Methods* 286, 187-201

Xu, L., D. V. Mourich., H. M. Engelking, S. Ristow, J. Arnzen, and J. C. Leong. 1991. Epitope mapping and characterization of infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein, using fusion proteins synthesized in *E. coli*. *J. Virol.* 65(3): 1611-1615.