

최 종  
연구보고서

T0023833

재조합 발현 기술을 이용한 다기능 어류  
경구 백신 개발

(Development of multi-functional recombinant oral  
vaccine for fish disease)

부 경 대 학 교  
양 식 학 과

해 양 수 산 부

# 제 출 문

해양수산부장관 귀하

본 보고서를 “재조합 발현 기술을 이용한 다기능 어류 경구 백신 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 11월 7일

주관연구기관명: 부경대학교

주관연구책임자: 남 윤 권

세부연구책임자: 김 기 홍

세부연구책임자: 김 성 구

# 요 약 문

## I. 제 목

Development of multi-functional recombinant oral vaccine for fish disease

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 다기능 재조합 어류 경구 백신을 이용한 고효율 양식 어류 질병 예방 및 제어 전략 제시
- 양식 산업의 생산성 개선 방안을 도출하고 아울러 항생제 남용으로 인한 인체 및 환경 위해성 문제를 저감시킬 수 있는 기술 개발

## III. 연구개발 내용 및 범위

- 1차년도 (2004년) 병원성 세균/바이러스로부터 항원 유전자의 조작  
어류 병원성 세균의 형질전환 기술 최적화
- 2차년도 (2005년) 재조합 백신 개발 및 기능 평가  
경구투여 효과 및 현장 적용 가능성 1차 평가
- 3차년도 (2006년) 다기능/다목적 재조합 표면 발현 경구백신 개발  
최종 최적 백신 개발 및 방어 기능의 현장 적용성 평가

## IV. 연구개발 결과

- 병원성 세균 및 바이러스로부터 항원 후보 유전자 조작 및 형질전환 기술 개발
- 재조합 기술의 최적화 및 ghost 박테리아 기술 개발
- 항원의 targeting 및 표면발현 기술 개발,
- 경구 백신 기술 개발
- 다기능 재조합 백신 기술 개발
- 백신 기술 최적화 및 현장 적용성 평가

## V. 연구개발 결과의 활용 계획

- 백신 실용화 및 제품화 기술 개발
- 양식 질병 제어 중장기 계획 수립 자료로 활용
- 해양생명공학관련 재조합 단백질 조작 기술로 활용
- 학술논문, 인력 양성 및 지적재산권 확보

# SUMMARY

## I. TITLE

Development of multi-functional recombinant oral vaccine for fish disease

## II. NEEDS & OBJECTIVES

- Needs for efficient technology to control diseases of farmed fish based on vaccination through oral route
- Needs for addressing the risk or concerns associated with the antibiotics-based treatment of food fish
- Development of scientific knowledge for efficient vaccinations of fish based on recombinant expression technology

## III. RESEARCH SCOPE & CONTENTS

- Year (2004) Molecular cloning and characterization of candidate antigenic genes  
Optimization of transformation of pathogenic bacterium concerned
- Year (2005) Development and evaluation of recombinant vaccine  
Development of oral delivery method of recombinant vaccines
- Year (2006) Surface-targeted multi-functional vaccines  
Evaluation of efficacy and function of oral vaccine for fish farms

## IV. RESULTS

- Molecular characterization of target antigen genes from pathogenic bacterium and virus; optimal condition for transformation of target bacterial species
- Development and optimization of recombinant ghost bacterial technology
- Surface expression of foreign antigens and targeting
- Development of recombinant oral vaccines
- Development of multi-functional fish vaccines
- Optimization, evaluation and efficacy for fish farms

## V. DELIVERABLES

- Post R&D project for commercialization of technology developed
- Scientific background knowledge for long-term project for controlling disease for aquaculture
- Novel recombinant protein expression system
- Publication, HRD, patents

# CONTENTS

Chapter I. Introduction .....	1
Chapter II. Scientific backgrounds .....	4
Chapter III. Research contents .....	6
Section I. Research scope .....	6
1. Isolation and manipulation of pathogenic genes .....	6
2. Transformation of target <i>E. tarda</i> .....	6
3. Generation of recombinant <i>E. tarda</i> ghost .....	6
4. Development of surface expression system .....	6
5. Display of foreign antigenic protein on the surface of ghost bacterial system .....	6
6. Protective efficacy of vaccine developed .....	7
7. Optimization of recombinant expression for vaccine development .....	7
8. Functional testing of vaccines in a pilot or commercial scale .....	7
Section II. Materials and methods .....	8
1. Isolation and manipulation of pathogenic genes .....	8
2. Transformation of target <i>E. tarda</i> .....	12
3. Generation of recombinant <i>E. tarda</i> ghost .....	15
4. Development of surface expression system .....	22
5. Display of foreign antigenic protein on the surface of ghost bacterial system .....	26

6. Protective efficacy of vaccine developed .....	30
7. Optimization of recombinant expression for vaccine development ·	37
8. Functional testing of vaccines in a pilot or commercial scale .....	84
Section III. Results and Discussion .....	89
1. Isolation and manipulation of pathogenic genes .....	89
A. <i>Edwardsiella tarda</i> .....	89
B. Marine Birna Virus (MABV) .....	92
2. Transformation of target <i>E. tarda</i> .....	96
A. Treatment conditions and parameters .....	96
B. Optimization of plasmid backbones .....	98
C. Stability evaluation .....	99
3. Generation of recombinant <i>E. tarda</i> ghost .....	100
A. Expression vector .....	100
B. Ghost induction in <i>E. coli</i> .....	101
C. Ghost induction in <i>E. tarda</i> .....	102
D. Optimization and manipulation of lysis gene and regulatory sequences .....	102
E. Transcriptional characteristics of E-lysis gene in <i>E. tarda</i> bacterial ghosts .....	106
F. Efficacy test for ghost formation .....	109
4. Development of surface expression system .....	110
A. InaK surface signal .....	110
B. OMP surface loops .....	112
C. N-terminal signal of E gene .....	128
5. Display of foreign antigenic protein on the surface of ghost bacterial system .....	130
A. Surface expression in <i>E. coli</i> ghost .....	130
B. Surface expression in <i>E. tarda</i> ghost .....	133
6. Protective efficacy of vaccine developed .....	134

A. Immune response and viability .....	134
B. Oral delivery and efficacy .....	137
7. Optimization of recombinant expression .....	143
A. High constitutive expression promoters .....	143
B. Elimination of DNA by Nuclease A expression .....	153
C. Optimization of constitution of multiple expression vectors ...	156
8. Functional testing of vaccines in a pilot or commercial scale .....	172
A. Optimized operation for scale-up of vaccine production .....	172
B. Efficacy testing in a pilot or commercial scale .....	180
 Chapter IV. Achievements and contributions .....	 185
 Chapter V. Deliverables and further applications .....	 187
 Chapter VI. Literatures cited .....	 192
 Appendix-1 .....	 194
 Appendix-2 .....	 206
 Self evaluation report (separate sheet)	

# 목 차

제1장 연구개발과제의 개요 .....	1
제2장 국내외 기술개발 현황 및 과학기술정보 .....	4
제3장 연구개발 수행내용 및 결과 .....	6
제1절 연구 범위 .....	6
제1항 병원성 세균 및 바이러스 유전자의 분리 및 분석 .....	6
제2항 병원성 목적 세균 <i>E. tarda</i> 의 형질전환 조작 .....	6
제3항 재조합 <i>E. tarda ghost</i> 유도 기술 개발 .....	6
제4항 항원 탑재를 위한 표면발현 시스템 구축 .....	6
제5항 외래 항원의 <i>ghost</i> 박테리아 표면 발현 기술 개발 .....	6
제6항 개발 백신의 어체 방어 능력 평가 .....	7
제7항 재조합 다기능 백신의 유효능 및 안전성 최적화 .....	7
제8항 재조합 다기능 백신의 대량 발현, <i>pilot scale</i> 평가 및 현장 적용성 평가 .....	7
제2절 연구 내용 및 방법 .....	8
제1항 병원성 세균 및 바이러스 유전자의 분리 및 분석 .....	8
제2항 병원성 목적 세균 <i>E. tarda</i> 의 형질전환 조작 .....	12
제3항 재조합 <i>E. tarda ghost</i> 유도 기술 개발 .....	15
제4항 항원 탑재를 위한 표면발현 시스템 구축 .....	22
제5항 외래 항원의 <i>ghost</i> 박테리아 표면 발현 기술 개발 .....	26
제6항 개발 백신의 어체 방어 능력 평가 .....	30

제7항 재조합 다기능 백신의 유효능 개선 및 안전성 최적화 .....	37
제8항 재조합 다기능 백신의 대량 발현, 방어능 재평가 및 현장 적용성 평가 .....	84
제3절 연구 결과 .....	89
제1항 병원성 세균 및 바이러스 유전자의 분리 및 분석 .....	89
가. <i>Edwardsiella tarda</i> 유전자 분리 및 분석 .....	89
나. Marine Birna Virus (MABV) 유전자의 분리 및 분석 .....	92
제2항 병원성 목적 세균 <i>E. tarda</i> 의 형질전환 조작 .....	96
가. 형질전환 조건 평가 .....	96
나. 형질전환 벡터 backbone 평가 및 기타 조건의 최적화 .....	98
다. 형질전환 지속 안전성 평가 .....	99
제3항 재조합 <i>E. tarda</i> ghost 유도 기술 개발 .....	100
가. Ghost 유도용 벡터 구축 .....	100
나. 대장균에서의 ghost 발현 작동 여부 평가 .....	101
다. <i>E. tarda</i> 에서의 ghost 발현 작동 여부 평가 .....	102
라. 용해 유전자 (lysis gene) 및 발현 조절 부위의 최적화 .....	102
마. 대장균 및 <i>E. tarda</i> 에서의 lysis 재조합 유전자 발현 특징 평가 .....	106
바. Ghost 효율 및 생존력 평가 .....	109
제4항 항원 탐재를 위한 표면발현 시스템 구축 .....	110
가. InaK 단백질 표면 발현 신호를 이용한 발현 벡터 .....	110
나. OMP 단백질 구조를 이용한 표면 발현 벡터 .....	112
다. E 단백질 작동 기작을 이용한 표면 발현 벡터 .....	128
제5항 외래 항원의 ghost 박테리아 표면 발현 기술 개발 .....	130
가. 대장균 ghost 박테리아에서 외래 단백질의 표면 발현 .....	130
나. <i>E. tarda</i> ghost 박테리아에서 외래 단백질의 표면 발현 .....	133
제6항 개발 백신의 어체 방어 능력 평가 .....	134
가. 어체 면역 유도능력 및 방어능력 평가 .....	134
나. 경구 백신 처리 및 방어 기능 평가 .....	137

제7항 재조합 다기능 백신의 유효능 개선 및 안전성 최적화 .....	143
가. 항시 고발현 유용 프로모터로의 개선 및 최적화 .....	143
나. Nuclease A를 이용한 플라스미드 및 염색체 DNA 제거 기술 개발 .....	153
다. 다기능 재조합 백신 발현 벡터의 최적화 구성 .....	156
제8항 재조합 다기능 백신의 대량 발현, 방어능 재평가 및 현장 적용성 평가 .....	172
가. 재조합 백신의 대량 발현 최적화 .....	172
나. Pilot scale 및 현장에서의 경구 백신 평가 .....	180
제4장 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	185
제5장 연구개발 결과의 활용계획 .....	187
제6장 참고문헌 .....	192
부 록-1 .....	194
부 록-2 .....	206
자체평가의 견서(별지)	

## 제1장 연구개발의 개요

### 제1절 연구개발의 필요성

해양생물 산업은 현재까지 국민에게 다양한 고급 단백질을 공급하여 온 중요 산업으로써 특히 우리나라와 같이 해양 의존도가 높고 수산물을 선호하는 국가의 경우 국민의 복지가 증가할수록 육류와 곡류의 소비는 줄고 채소류와 수산물의 소비가 증가하는 경향을 보이는 특징을 갖는다. 수산물, 특히 가장 고급의 단백질원인 어류양식을 통해 원활한 수요공급의 조절은 자명한 사실이나 이를 위해서는 어류양식의 친환경적 질병제어 기술과 이를 통한 건강 증요 및 상품의 생산이 그 성패를 쥐고 있다. 우리나라는 항생제 사용은 과용 수준을 넘어서 전 세계에서 가장 많은 항생제가 이용되는 국가 중 하나이며 이러한 실정은 보건의료 분야뿐만 아니라 해산어류 생산에도 마찬가지로인 실정이다. 그러나 이러한 과도한 항생제 사용은 이미 많은 항생제 내성균을 야기시킴으로서 예전의 사용 농도로는 더 이상의 항생효과를 얻지 못하거나 또는 완전히 항생효과를 잃어버린 경우가 빈번하고 이는 항생제의 남용과 과용을 더욱 부추기는 원인이 되어 버렸다. 이미 우리나라 대다수 국민들은 「양식어류」에 의해 가장 먼저 연상되는 단어들로서 청정 이미지보다는 「항생제」와 「대량 폐사」를 지목하고 있을 정도로 수산양식에 대한 부정적 편견이 있는 수준에 도달하였고 따라서 국민 건강 및 환경 위해성 저감, 그리고 수산양식에 관한 일반 국민의 인식전환을 위해서도 항생제를 이용한 치료 중심의 질병 관리가 아닌 고효율 면역 반응을 이용한 예방 중심의 질병관리가 절실한 실정이다.

수산생물의 질병을 제어하고 건강한 상품을 생산하는 것은 수산증양식산업의 성패를 좌우하는 전제조건이나 최근 들어 날로 악화되는 환경조건 악화와 만연하는 질병으로 인해 우리나라 어류 양식업은 심각한 장애를 겪고 있음은 물론 국내 양식 산업의 최근 FTA 및 WTO 등으로 인한 수산물의 국가간 이동으로 인해 더욱 위축될 것으로 예상된다. 양식생산에 있어 질병을 제어하는 기술은 양식의 성패를 좌우할 가장 중요한 요인 중의 하나이며 양식 생산성과 직결되는 직접적인 자일 뿐만 아니라 소비자에게 건강한 우량 수산물을 제공하는 측면에서도 크게 중요시 된다.

그러나 그간 양적 양식 생산의 팽창과 함께 많은 질병원이 출현하게 되었고

매년 우리나라 양식은 양식어류의 질병 폐사로 인한 막대한 손실을 겪고 있다. 종래 현장에서 항생제 등 약물을 이용한 질병 제어가 시도되고 있으나 빈번한 항생제의 노출에 의한 심각한 내성 유발은 물론 항생제 과용으로 인한 생태계 파괴 그리고 잔류 항생제에 의한 인체 위해성 논란이 끊이지 않고 있음은 물론 최근 들어 환경 및 웰빙에 대한 사회적 관심의 증가로 인해 가까운 미래에 더 이상의 현재와 같은 항생제를 이용한 질병 치료는 불가능할 것이 자명하다. 또한 그간 무분별한 항생제 상용으로 인해 양식 어류에서도 내성 균이 출현 하는 등 항생제 치료 효과가 점차 약화되고 있는 실정이다 (Tune et al., 1993; Plumb, 1999).

따라서 질병의 출현 이후에 항생제 등 약물을 이용한 치료 전략보다는 질병을 예방할 수 있는 전략이 매우 중요시된다. 질병을 예방하는 것은 다양한 접근법이 가능하지만 단순한 양식 환경의 관리만으로는 원인균에 대한 직접적인 방어 효과를 기대하기 힘들다. 때문에 백신 전략을 이용한 생명공학적인 기술이 양식 어류의 질병 제어에 점차 중요시되고 있다 (Adams and Thompson, 2006). 이에 현재까지 일부 어류 예방용 백신을 개발하고자 하는 노력이 이루어지고 있지만 아직 대부분의 국내 양식 어류용 백신은 종래의 고전적인 화합물에 의한 불활화 사균 백신 기술에 의존하고 있다. 화합물을 기반으로한 종래의 불활화 백신들이 일부 실용화되어 양식 어류의 세균성 및 바이러스 성 질병을 예방하는데 시도되고 있지만 아직 현장에서 우수한 방어 효능의 안정적인 입증은 이루어지지 못하고 있다.

이처럼 종래 고전적 불활화 백신의 효과가 크게 우수하지 못한 주된 이유는 종래의 사균방식의 백신 (FKC 등) 제작시 필연적으로 야기되는 표면 항원성의 손실 그리고 다량의 세포질 단백질들로 인한 비특이적 immune suppression 등의 부작용 때문이다 (Szostak et al., 1996; Kwon et al., 2005). 더욱이 최근 양식어류 세균 및 바이러스류의 복합 감염에 의한 질병이 증가되므로 종래의 단일 기능 백신만으로는 효율적인 질병 예방과 제어가 불가능한 실정임. 또한 종래의 백신들은 포유류에서와 같이 주로 주사용 백신이 개발되어 어류 양식의 현장 적용력이 떨어지고 이에 경제적이고 효율적인 백신 투자를 위해서는 경구용 백신 전략이 궁극적으로 요구된다 (Hensen et al., 1996). 이에 종래의 기술적 한계를 뛰어 넘는 새로운 백신 전략이 필요하며 이는 유해한 화합물 또는 열처리를 통한 사균 생산 방식의 완전한 탈피가 요구됨, 즉 생체의 항원성을 가장 효과적으로 보존시킬 수 있음은 물론 단일 백신에 의해 병원성 세균 및 바이러스 등에 동시에 면역기능을 유발시킬 수 있는 다기능 재조합 백신 전략이 요구된다.

## 제2절 연구개발의 목표

이에 본 연구 개발과제는 상기 기술 개발의 필요성에 입각하여 다음의 연구개발 목표를 설정하였다. 본 연구과제는 (1) 유전공학 기술을 이용한 정밀 항원 유전자/단백질 소재의 발굴 및 조작을 수행함으로써 우수한 면역원성을 부여할 수 있는 항원 소재를 발굴 조작하며, (2) 연구개발의 대상 세균에 대하여 형질전환 조작, 유전자의 재설계 및 재조합 발현 기술을 구축하고, (3) 이들 기반 기술을 바탕으로 유전공학적 재조합 발현을 통한 면역원성이 극대화된 ghost 박테리아 백신을 개발하며, (4) 개발된 ghost 박테리아 백신의 기능성을 극대화할 수 있는 외래 항원 추가 발현 기술을 개발하고, (5) 따라서 동일 백신 처리를 통해 2종 이상의 질병원에 방어 기능을 부여할 수 있는 다기능 백신을 개발하며, (6) 백신 처리 기법의 간편함을 이룰 수 있는 경구형 백신을 개발하고자 하였다. 이러한 기술 목표를 달성하기 위해 본 연구개발은 목적 어종으로서 우리나라의 가장 중요 해산 양식 어종인 넙치를, 대상 병원균으로 양식 넙치에 가장 큰 피해를 주는 에드워드증 원인균 *E. tarda*를, 그리고 바이러스성 질병원이 marine birna virus를 설정하여 연구개발을 실시하였다.

## 제2장 국내외 기술 개발 현황 및 과학기술 정보

국내 양식어류 질병 제어 기술은 아직 항생제 의존도가 매우 높은 실정이다. 앞서 언급한 바와 같이 특히 양식 현장에서는 항생제의 사용이 현실적으로 빈번한 상태이며 백신을 이용한 예방 기술의 정착은 매우 미비한 실정이다. 단순 사균 방식을 이용한 불활화 백신들이 개발되기 시작하여 실용화가 추진되고 있으나 그 예방효과의 탁월성 및 방어 효능은 그다지 각광받지 못하고 있다. 따라서 현재까지 종래의 포르말린을 이용한 단순 사균 방식의 어병 백신외에 재조합 기술을 이용한 발현 백신의 경우 그 효과를 입증 받아 상용화 된 백신은 전무한 상태임. 최근 국립수산과학원 등에서 *E. tarda*에 대한 포르말린 불활화 백신을 개발하여 녹십자 수의약품 및 대성 미생물연구소에 기술 이전을 하였으나 아직 상품으로 활발히 판매되고 있지는 못함. 그 외 돌돔의 이리도바이러스 증에 대한 원인 바이러스에 대해서도 포르말린 불활화 백신이 개발되었으나 아직 실용화단계에는 접어 들지 못한 상태이다. 이에 현재 국내 개발 백신은 모두 외국에서 개발된 종래의 고전적 사균 방식을 그대로 답습하고 있는 상태이다.

전세계 적으로 수산동물의 백신은 종래의 화합물 처리를 바탕으로 한 불활화 백신, 병원체의 약독화를 통한 약독화 생백신 그리고 항원 단백질을 발현할 수 있는 DNA를 직접 주입하여 면역유도를 시도하는 DNA 백신등으로 구분할 수 있다. 이중 화합물 (포르말린 등) 또는 열처리를 통한 불활화 백신은 면역원성이 상대적으로 낮고 방어 능력이 그다지 우수하지 못하다고 알려져 있음. 이는 포르말린 등 강한 화합물을 처리할 경우 일반적으로 항원성이 집중되어 있는 병원체의 표면이 이러한 화합물에 의해 변형될 확률이 높기 때문이다. 즉 화합물 처리에 노출된 병원성 세균 또는 바이러스 등은 표면 항원성의 변화가 이루어지고 이러한 변형된 표면항원성을 백신으로 전달 하였을 때 실제 병원체의 침입을 정확히 특이적으로 인식하지 못하기 때문임 따라서 모든 불활화 백신은 이러한 세포 표면성을 최대한 생균에 가깝게 유지해야하는 것이 필수과제 임. 약독화 생균 백신의 경우 항원 또는 면역원성을 보유하는 측면에서는 매우 유리한 백신이다. 그러나 생존력을 제거하지 않고 완벽한 병원성을 제어하는 것은 매우 기술적으로 어렵고, 또한 유전공학적 knockin 또는 knockout 방법등을 통한 재조합 약독화 균을 제조할 수 있으나 유전적으로 변형된 세균체를 생태계와 매우 근접한 양식장 환경에 대량 처리하기에는 생태학적 논란의 여지가 있으며 특히 일단 약독화되었지만 어체의 통과 또는 자연적 돌연변이 유발등으로 인해 병원성의 복원 방지를 100% 장담하기 어렵다. 때문에 아직 양식어류의 경우 자연상태에서 약독화된 적절한 균주를 찾지 않는다면 재조합 기술등을 통한 유전적 변이주를 생산 이를 양어용 백신으로 사용하기는 어렵다. DNA 백신은 B-cell 및 T-cell을 모두 자극할 수 있고 면역 지

속력이 우수하며, 일양한 양질의 백신을 *in vitro* 상태에서 대량 생산 공급 가능하다는 이유로 그 효과만을 고려 시 상당한 잠재력을 보유하고 있는 백신임은 틀림없다 (Heppell and Davis, 2000). 그러나 재조합 DNA를 어체에 직접 이식하기 때문에 식용으로 하는 어류내 잔존 재조합 DNA의 인체 전달에 관한 논란이 아직 해소되지 못하고 있는 실정이다 (Robertson and Griffiths, 2006). 물론 과학적 분석 접근이 보다 많이 이루어져야 하지만 실용화를 위해서는 소비자들의 거부감 역시 백신의 충족 조건을 결정짓는 중요한 요인 중 하나이다. DNA 백신의 경우 발현 벡터들을 이용하여 항원 유전자 전체 또는 일부를 발현시키는 기술을 핵심으로 하고 있으나 아직 어류의 DNA vaccination 을 위한 어류 발현 벡터 개발은 전무한 실정임 (Gomez-Chiarri and Chiaverini, 1999). 때문에 현재까지 대부분의 DNA 백신 시도는 포유류의 cytomegalovirus (CMV) 프로모터를 이용하고 있고 이러한 점이 식용 어류의 DNA 백신에 대한 우려를 더욱 가중 시키는 요인이 되고 있다. Ghost bacteria 기술이란 세균의 벽에 nano scale의 작은 hole을 인위적으로 유도함으로써 세균의 세포질 성분을 밖으로 유실토록 하는 기술이다 (Hidinger et al., 2003; Kwon et al., 2006). 따라서 ghost화된 세균 자체는 생존능력이 없으나 세포 표면의 물리적 및 화학적 구성은 완벽히 보존시킬 수 있는 장점을 갖고 있는 신 개념의 재조합 박테리아 백신 기술이다. 따라서 ghost박테리아는 우수한 안전성을 보유함과 동시에 생균에 버금가는 항원성을 보존하고 있다. Ghost bacteria 유도를 위해서 phiX174 phage의 E-protein을 정밀 유도 발현시킬 수 있는 expression vector가 요구된다 (Witte et al., 1992). Ghost 박테리아는 기원한 세균의 표면 항원성을 그대로 보존하고 있음으로 인해 생균의 면역기능 유도 능력을 거의 보존하고 있음은 물론 여타 다른 항원 단백질들과 접목되어 사용될 경우, ghost 자체가 강력한 adjuvant로서의 기능을 갖고 있고 또한 외래 단백질의 encapsulation을 위한 「empty bag」으로서도 사용될 수 있음이 포유류 경구 백신 실험에 의해 최근 밝혀진 바 있다.

출원국	특허 주 내용 및 대상
대한민국	돌돔 이리도 바이러스 (재조합 단백질 백신)
대한민국	이리도바이러스 및 연쇄구균 (불활화)
대한민국	연어과어류 DNA 백신
미국	연쇄구균 불활화
스웨덴	비브리오 침지 백신 (약독화 백신)
일본	이리도바이러스 (세포배양 증식 포르말린 불활화)
기타 미국 특허청 기준 기술에 관한 특허 사항은 5장 활용 계획 190-191쪽 참조	

## 제3장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제1절 연구 범위

#### 제1항 병원성 세균 및 바이러스 유전자의 분리 및 분석

- 목적 세균 (*E. tarda*)로부터 항원 후보 유전자 분리
- MABV로부터 항원 후보 유전자 분리
- 항원후보 유전자 염기서열 분석
- 생물정보 분석, 말단 조작, 기타 유전학적 특징 분석

#### 제2항 병원성 목적 세균 *E. tarda*의 형질전환 조작

- 목적 세균 (*E. tarda*)의 형질전환 방법 평가
- 안정적 형질전환 조건 탐색 및 형질전환 조작
- 형질전환 최적화 및 안정성 평가
- 재조합 유전자 형질전환

#### 제3항 재조합 *E. tarda* ghost 유도 기술 개발

- Ghost 발현 벡터 구축 및 유전자 소재 조작
- Ghost 발현 벡터 작동 평가
- *E. tarda* ghost 유도 기법 확립
- *E. tarda* ghost 백신 제조 및 평가

#### 제4항 항원 탑재를 위한 표면발현 시스템 구축

- 표면발현 가능 후보 유전자 소재 발굴 및 조작
- 표면발현 벡터 구축
- 표면발현 시스템의 *E. tarda* 및 대장균내 평가

#### 제5항 외래 항원의 ghost 박테리아 표면 발현 기술 개발

- Ghost 발현 벡터 구축와 표면발현 벡터의 작동
- 외래 단백질의 bacterial ghost 표면 탑재 기술 개발

#### 제6항 개발 백신의 어체 방어 능력 평가

- 재조합 *E. tarda* ghost 백신의 실험모델 어종에서의 방어능 평가
- 재조합 *E. tarda* ghost 백신의 목적 어종에서의 방어능 평가
- 경구 가능 *E. tarda* ghost 백신 기술 개발 및 평가
- MABV-탑재 ghost 백신 평가

#### 제7항 재조합 다기능 백신의 유효능 및 안전성 최적화

- 항원 탑재 효율의 극대화를 위한 신규 고발현 프로모터 조작
- 백신 내 DNA 분자 제거를 통한 ETG 기능의 최적화
- 다기능 백신 발현 벡터의 개선, 최적화 및 평가

#### 제8항 재조합 다기능 백신의 대량 발현, pilot scale 평가 및 현장 적용성 평가

- Ghost 발현 프로그램의 최적화 및 대량 발현
- 경구 백신의 유효 방어 기능의 재확인 평가
- 현장 접목 가능성 평가

## 제2절 연구 재료 및 방법

### 제1항 병원성 세균 및 바이러스 유전자의 분리 및 분석

#### 가. *Edwardsiella tarda* 유전자 분리 및 분석

##### 1) *E. tarda* 균주 및 배양

유전자 분리를 위해 사용한 *E. tarda* 균주는 FSW910410 strain으로서 SS agar 배지 (Difco)를 이용하여 *E. tarda* 단일 클론을 분리한 후 이후 TSA 배지 (Difco)에서 28℃ 항온에서 3-4일 간격으로 계대 배양을 실시하며 균주를 유지하였다. 균주의 액체 진탕 배양은 통상의 LB 및 TSB 배지 (Difco)를 이용하여 수행하였고 28~30℃ 온도 범위에서 200-300 rpm 진탕 배양을 실시하였다. 성장 곡선을 그래프 화하고 본 배양 조건에서의 초기 증식기, 대수 증식기 및 안정기를 평가하였다.

##### 2) *E. tarda* 염색체 high molecular weight DNA 분리 및 항원 후보 유전자선발

*E. tarda*로부터 다양한 DNA 추출방법론들을 적용하여 genomic DNA의 순도와 양을 평가하였다. Early log phase, mid log phase 및 stationary phase 에 도달한 배양균을 대상으로 균체를 회수하고 wash buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA 50 mM NaCl; pH 8.0)를 이용하여 1차 세척하였다. 그리고 다시 원심분리를 통해 회수한 균체를 대상으로 genomic DNA를 추출하였다. 균체의 양 (세포 수 및 성장 단계)별로 lysozyme (50-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), proteinase K (20-200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), SDS (0.2-1.5%), Urea (6-8 M), Tris (10-200 mM), EDTA (5-50 mM), NaCl (50-150 mM),  $\text{MgCl}_2$  (5-20 mM)등의 성분을 다양하게 조합, 조절함으로써 integrity가 보장된 고효율의 DNA 분리 조건을 구축하였다. 추출된 DNA의 양과 순도는 spectrophotometer와 agarose 전기영동을 병행하여 분석하였다.

*E. tarda*로부터 항원 후보 유전자들을 설정하기 위해 선행 연구문헌과 생물정보 database의 검색 그리고 유추된 단백질 구조 및 기능을 기반으로 *Edwardsiella*속 (genus)에 속하는 종들을 대상으로 항원성을 나타낼 수 있으리라 판단되는 후보 유전자군을 선별 분석하였다. 선별된 유전자별로 multiple 또는 pairwise alignment를 수행하여 genomic ORF를 분리해낼 수 있는 primer를 design하였다. 본 선별 유전자군은 fimbrial protein군, outer membrane protein 군, periplasm protein군, hemolysin 유전자등을 포함토록 하였다.

### 3) 항원 후보 유전자의 PCR 분리, 클로닝 및 염기서열 분석

상기 순수 분리된 genomic DNA를 대상으로 합성된 primer들을 이용하여 후보 항원 유전자들을 분리하였다. 합성된 primer의 T<sub>m</sub> 값을 기준으로 gradient PCR을 통해 최적의 증폭 조건을 조사하였다. PCR은 Takara ExTaq, 250 uM dNTP mix, 3 uM forward/reverse primer를 포함하는 premix를 사용하였으며 자동온도순환 증폭기 iCycler를 이용하여 30-33 cycles 반응을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물 중 1  $\mu$ l를 agarose 전기영동을 통해 효과적인 증폭 여부를 확인한 후 Qiagen PCR purification column을 이용하여 산물을 정제하였다. 정제효율 및 산물의 농도를 측정하기 위해 spectrophotometer (GeneQuant; Pharmacia) 및 Quantity-One Image Analysis Software (BioRad)를 병행하여 평가하였다.

PCR로 증폭된 산물은 Accuprep PCR Purification kit (Bioneer)를 이용하여 정제 하였다. 제조사의 instruction manual에 의거 binding buffer와의 혼합 시료를 spin column에 넣어 13,000 rpm으로 원심분리 하여 column의 fiber filter에 DNA를 binding 시키고 500  $\mu$ l washing buffer로 2번 washing하였다. Column을 새 tube로 옮겨 maximum speed로 1분간 원심분리 하여 잔여 buffer를 제거한 후 elution buffer를 column에 통과시킴으로써 DNA를 회수하였다. 정제된 시료 2  $\mu$ l를 전기영동 하여 정제 시료의 양과 integrity를 spectrophotometry 및 gel image 분석을 통해 평가 하였다. 전기영동 분석 후 정제된 시료 3  $\mu$ l를 pGEMT-easy vector (Promega)에 16 시간 동안 12°C에서 Thermostat plus 장치를 이용하여 ligation 반응을 유도하였다. Ligation 반응물 0.5  $\mu$ l를 취하여 vectorette PCR을 통해 ligation이 이루어졌는지를 확인하고 대장균 (XL-1)에 CaCl<sub>2</sub>법으로 형질도입하였다. 형질전환 균주로부터 plasmid DNA를 분리하고 multi-cloning site의 양말단에 있는 vector primer를 이용하여 정확한 insert size를 갖는 클론들을 선별하여 염기서열 분석을 수행하였다. 염기서열 분석은 BigDye Terminator를 이용하여 자동염기서열분석기 ABI 377 또는 ABI 3700을 이용하여 염기서열 자료를 수집하였다. 수집된 염기서열 raw data는 sequence analysis software인 Sequencher (Gene Codes, USA; version 4.1)을 이용하여 editing과 trimming을 수행하고 BLAST검색 등 생물정보학 DB 분석을 통해 확보된 유전자를 동정하였다. 최종 확보된 염기서열들을 대상으로 양말단에 발현 벡터 내 클로닝, fusion protein 제작, 재조합 단백질 발현 등 요구되는 향후 각 실험 목적에 맞추어 개시 코돈을 제거하거나 또는 제한효소 위치를 추가하는 등의 조작을 수행하였다.

## 나. Marine Birna Virus (MABV) 유전자의 분리 및 분석

### 1) 세포 배양 및 MABV의 증식

MABV 바이러스로부터 핵산 소재를 확보하기 위해 세포주를 이용하여 바이러스를 증폭, 회수하였다. 바이러스 증식용 세포배양은 chinook salmon embryo (CHSE-214) epitheloid cell line을 사용하였고 20℃에서 배양하였다. 배양 배지로서는 Earle's balanced salts (MEM; HyClone)에 10 % fetal bovine serum (FBS; HyClone), 100 IU/ml penicillin (HyClone) 그리고 100 µg/ml streptomycin (HyClone)을 포함하여 사용하였다. Virus titer측정을 위해서는 96-well cell culture plates에 바이러스 stock을 10-fold serial dilution하였고, cell을 첨가해 준 후 1시간 동안 실온 shaking 배양하였다. 그 후 20℃ incubator에서 매일 cytopathic effect (CPE)를 관찰하였다. CPE가 50 % 나타났을 때를 기점으로 TCID50을 정하였다.

### 2) 항원 후보 유전자 분리, 클로닝 및 염기서열 분석

MABV RNA를 확보하기 위해 total RNA를 배양 감염 세포주로부터 확보하였다. Total RNA는 CPE가 나타난 cell debris를 모아 TRIzol Reagent (Invitrogen)로 분리하였다. 시료에 TRIzol Reagent를 넣은 후 homogenize하여 5분간 실온 배양한 후 chloroform을 첨가하였고, 강하게 shaking한 후 3분간 실온 방치 후 12,000 x g, 4℃, 15분간 원심분리하였다. 상층액에 동량의 isopropyl alcohol을 첨가, 혼합 후 10분간 실온에 방치하였다. 원심분리를 통해 RNA pellet을 회수하고 75 % 에탄올 wash 과정을 거쳐 7,500 x g, 4℃, 5분간 원심분리하여 실온에서 RNA pellet을 건조시켰다. DEPC water를 첨가하여 RNA를 resuspend시키고, 60℃에서 10분간 배양하였다. cDNA합성은 1 µg/µl로 희석한 RNA에 Random Hexapolymer (Promega) 1 µl를 첨가하고 DEPC 8.5 µl를 더해진 후 70℃에서 5분간 배양한 후 4 µl dNTP mix (TaKaRa), 4 µl RT buffer (Promega), 0.5 µl RNase inhibitor 그리고 1 µl reverse-transcriptase (Promega)를 첨가한 후 42℃ (60분) 및 95℃ (10분) 반응을 통해 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA pool을 대상으로 전체 segment A를 degeneracy primer로 PCR 클로닝하고 클로닝 된 segment A 영역으로부터 목적 항원 유전자들을 sub cloning하였으며 이때 재조합 단백질의 분리와 차후 염기서열 조작을 용이하게 하기 위해서 말단에 제한효소 위치를 첨가토록 하였다. 증폭된 산물은 TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, CA, USA)를 사용하여 cloning하였고,

Plasmid SV Kit (GENE@ALL)를 사용해서 plasmid를 분리하였다. 분리된 plasmid는 sequencing하여 insert를 확인하였고, sequencing은 BigDye Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA)를 사용하여 Automated DNA Sequencer (ABI Prism 377, Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA)로 수행하였다.

### 3) 항원 후보 유전자의 재조합 발현 및 정제

MABV로부터 후보 항원 유전자 단편을 확보하기 위해 분석된 염기서열을 바탕으로 PCR 분리를 실시하였으며 PCR 산물을 pGEM T-easy vector (Promega, USA)에 TA 클로닝을 하였다. 대상 유전자는 항원성을 갖는다고 알려져 있는 VP2 및 VP3 유전자를 이용하였다. 확보된 유전자들로부터 향후 면역학적 분석 및 재조합 발현 분석에 요구되는 단백질체 그리고 항체 제작을 위해서 재조합 발현 및 정제를 다음과 같이 실시하였다. T-vector에 cloning된 VP2, VP3 그리고 각각에 대한 발현 벡터인 pET22b, pET28a를 제한 효소인 Sal I과 Not I을 처리하였고, 확인된 product를 gel extraction kit (Nucleogen)로 gel elution하였다. Gel elution된 product들은 T4 DNA ligase (New England BioLabs, NEB)로 각각 ligation하였다. Ligation된 산물은 *E. coli* (DH5a)에 transformation하였고, 각각에 대한 insert를 확인한 plasmid를 다시 BL21 (DE3)에 transformation시켰고, colony PCR을 통해 insert 유무를 확인하였다. 실험적인 재조합 단백질 생산을 위해서 10 ml의 ALB (pET22b-pVP2, VP2) 와 KLB (pET28a-VP3)에 culture하여 37°C에서 배양하였다. O.D 600 nm 에서 1일 때 IPTG (Bioneer; 1mM)을 사용하여 37°C에 4시간 동안 배양해서 protein expression을 유도하였다. 배양 후 3,200 rpm, 4°C, 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 제거하고 pellet은 PBS 1 ml에 재 부유시켰다. Sonication (output 9: 20초 간격)을 통해 세포를 파괴하고, 14,000 rpm, 30 min, 4°C에서 원심 분리하여 상층액과 pellet을 분리하였다. 각 sample은 SDS-PAGE분석을 통해 발현 유무를 확인하였다. VP2 protein의 정제는 먼저 Ampicillin이 첨가된 LB 배지에서 VP2 (pET22b) clone을 배양 (37°C) 하고, O.D 600 nm에서 1일 때 IPTG (1 mM)를 첨가한 후 4시간 동안 induction하였다. 3,500 rpm, 4°C, 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고, pellet에 8 M Urea, 10 mM Tris-Cl, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 buffer를 pellet volume의 10배로 넣고 재 부유한 후 1시간 동안 실온에서 shaking하였다. 그리고 sonication 한 후 15,000 x g, 4°C, 10분 동안 원심 분리하여 상층액만 분리한 후 0.45 µm syringe filter (Corning)하고 투석 tube에 넣은 후 1x binding buffer를 첨가하고 4°C에서 6시간 동안 투석하여

refolding하였다. 그 후 원심분리하고, 상층액을 His-tag column으로 정제하였다. VP3 protein은 Kanamycin이 첨가된 LB 배지에서 VP3 (pET28a) clone을 배양 (37°C) 하고, O.D 600 nm에서 1일 때 IPTG (1 mM)를 첨가한 후 4시간 동안 induction한 후 3,500 rpm, 4°C, 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 상기와 같이 얻어진 sample을 대상으로 chelating Excellose Spin Kit (TaKaRa)를 이용하여 정제하였다. 정제된 단백질은 SDS-PAGE한 후 BCA method로 단백질 양을 측정하였다.

## 제2항 병원성 목적 세균 *E. tarda*의 형질전환 조작

### 가. 형질전환 조건 평가

#### 1) *E. tarda* 형질전환의 선택 배양을 위한 항생제 감수성 조사

*Edwardsiella tarda*의 선발된 strain들을 대상으로 28~37°C에서 진탕 배양으로 OD 600 nm에서 0.5까지 되도록 배양하여 10,000 cells이 한 plate (9 cm 직경)에 도말 될 수 있도록 조정 하였다. 상기 TSB 배지와 함께 10,000만큼의 배양균을 TSA 배지와 각각의 항생제 농도 구배를 갖는 선택 배지 aTSA (ampicilin conc. : 12 - 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), tTSA (tetracyclin conc. : 6 - 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), kTSA (kanamycin conc. : 12 - 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), cTSA (chloramphenicol conc. : 25 - 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 에 도말 하였다. 도말된 배지는 28°C에서 2일간 항온 배양 후 각 항생제 농도에서 colony의 형성 여부를 확인하였다. 선택배지로 활용 가능한 항생제별 농도 범위를 확인하고 조사한 최고 농도에서 항생제 내성 유전자의 작동을 통한 재조합 *E. tarda*의 생존력 확보 가능 여부를 형질전환 실험을 통해 확인하였다.

#### 2) 화학적 유도원을 이용한 *E. tarda* 형질전환 조건 평가

Chemical transformation을 위해서 calcium 및 polyethylene glycol (PEG)를 이용하여 형질전환 효율을 분석하였다. *E. tarda*의 배양은 OD 0.3-0.5 범위로 고정하였고 Ca-transformation의 경우 반응 시간, heat shock 온도 및 자극 시간, SOC recovery 시간 등을 변수로 설정하여 분석하였다. 또한 PEG를 이용한 형질전환의 경우 PEG의 농도 및 반응 온도, heat shock온도 및 자극시간 등을 변수로 설정하여 효율을 분석하였다. 그 간략한 실험 조건은 아래와 같다.

- Start OD 600 nm = 0.3 - 0.5

- Coating surface with ice-cold 0.1 - 1% PEG (Mr 400 or 8000) (10× concentration of bacterial cells)
- Incubation with DNA at 0, 4, 15, 25 or 37°C for 30 min
- Heat shock treatment (40-43°C) for 45 to 120 sec
- Recovery with SOC media at 37°C for 60 min
- Plate culture onto selective solid medium

### 3) 전기천공법 (electroporation)을 이용한 *E. tarda* 형질전환 조건 평가

Electroporation법은 균을 OD 600 nm 기준 0.5 이하 농도의 cells를 원심분리 (500g× 10분)로 회수한 후 10% glycerol (filtered) 용액에서 3번 세척하고 원래 volume (균체 배양 volume) 의 1/100이 되도록 competent cell을 만들었다. Competent cell중 40  $\mu$ l를 새로운 tube로 옮겨 plasmid 2  $\mu$ l를 넣어 혼합한 후 얼음에서 60초간 반응시켰다. 시료가 포함된 pulse cuvette을 electroporator (Bio-Rad) 에 넣고 Pulse 1.5 - 3.0 KV, 150 - 300 ohm, 2-10 ms의 조건하에 전기 충격을 가하였으며 전기 충격 후 1분 이내에 TSB 배지 1 ml를 넣어서 37°C에서 1시간 진탕 배양 시키고 선택배지에 도말하였다. 배양은 28-37°C에서 수행하면서 colony 형성 여부를 관찰하였다. 형성된 colony로부터 정확한 형질전환 플라스미드가 도입되었는지를 확인하기 위해 형성된 colony를 진탕 배양 후 miniprep을 통해 플라스미드를 동정하였다.

## 나. 형질전환 벡터 backbone 평가 및 기타 조건의 최적화

### 1) 다양한 플라스미드 backbone의 형질전환 효율 평가

*E. tarda*의 형질전환 효율이 사용한 plasmid의 구성 성분 (replication origin 등)과 농도에 따라 영향을 받는지를 조사하기 위해 low copy number origin (rop regulation 등) 또는 high copy number origin을 포함하는 다양한 플라스미드 backbone을 대상으로 electroporation 실험을 수행하였다. Electroporation 조건은 상기 선행 실험을 통해 1차 확립된 최적 조건을 이용하여 수행하였으며 plasmid construct는 pBR322를 포함, 총 6종류의 벡터들을 이용하였다. Plasmid vector별 특징은 다음과 같으며 형질전환 분석은 상기 electroporation 조건과 동일하게 수행하였다.

Plasmid construct	Size (length)	Replication origin	Antibiotics resistant marker
pBR322	4.4 kb	pMB1 ori (rop gene regulation)	Amp/Tet
pBluescript SK	3.0 kb	pUC ori f1 ori	Amp
pGEM 3Zf(+)	3.2 kb	pUC ori f1 ori	Amp
pMALp2X	6.7 kb	pMB1 ori (rop gene regulation) M13 ori	Amp
pGEX4T-1	4.9 kb	pBR322 ori (without rop gene regulation)	Amp
pKD20	6.1 kb	R101 ori	Amp

아울러 최고의 효율을 보이는 플라스미드 construct를 대상으로 DNA 양을 달리하여 electroporation을 수행한 후 형질전환 효율을 분석하였다. DNA 양은 0 - 200 ng을 대상으로 3반복 수행하였으며 앞서의 electroporation 조건을 이용하여 형질전환 효율을 분석하였다.

## 2) 최적 조건의 재확인

상기 확인된 최적 조건들을 대상으로 12회의 독립적인 배양을 통한 형질전환 조작을 실시하여 큰 변이 없이 안정적인 결과가 도출되는 지를 확인하였다.

## 다. 형질전환 지속 안전성 평가

### 1) 재조합 *E. tarda*내 형질전환 플라스미드의 copy 수 분석

재조합 *E. tarda*내 세포 당 플라스미드 copy수 및 재조합 상태의 지속 안정성 분석을 위해서 재조합 *E. tarda*내에서 세포 당 플라스미드 copy의 정도를 분석하였다. 형질전환 직후 형질전환 *E. tarda*내 replication되는 세포 당 플라스미드 copy를 대조군 *E. coli*와 비교 평가하기 위해 OD 600 nm를 기준으로 세포 수를 계산하고 아울러 일정 세포수로부터 추출된 플라스미드의 양과 플라스미드 분자량을 바탕으로 세포 당 플라스미드 copy수를 평가하였다.

## 2) 재조합 형질의 지속성 평가

*E. tarda* 내에 도입된 재조합 플라스미드가 지속적이고 안정적으로 유지되는지를 확인하기 위해서 형질전환 *E. tarda*를 이용, 형질전환 직후부터 6개월까지 3~5일 간격으로 연속적인 subculture를 수행하고 이때 1개월 단위로 플라스미드 copy수의 안정성을 분석하였다.

## 3) Marker 유전자의 발현 스크리닝 가능 여부 평가

*E. tarda* 내에 도입된 재조합 유전자의 발현이 가능한지를 확인하기 위해서 엄격한 유전자 억제 조절 기작을 갖고 있지 않는 lac 프로모터 기반 플라스미드를 상기 최적 조건을 이용하여 형질도입하고 lac 프로모터에 연결되어 있는 downstream GFP 유전자를 발현시키기 위해 배지에 1 mM의 IPTG를 첨가하였다. IPTG 유도체가 첨가된 배지에 도말한 *E. tarda* colony를 대상으로 형광 현미경 및 형광 이미지 분석기 (VersaDoc 4000; Bio-Rad, USA)를 이용하여 GFP 유전자 발현을 평가하였다.

# 제3항 재조합 *E. tarda* ghost 유도 기술 개발

## 가. Ghost 유도용 벡터 구축

### 1) Lysis 유전자 E gene의 분리

그람 음성 박테리아의 세포벽에 작은 나노크기의 구멍을 형성할 수 있는 단백질로 알려져 있는 E-protein 유전자를 확보하기 위해서 phiX174 phage DNA로부터 E gene을 PCR 분리하였다. PCR 분리는 phiX174 phage E gene frame CDS의 양 말단에 상보적인 PCR primer를 설계하여 증폭 분리하였으며 PCR 산물은 TA 클로닝을 통해 pGEM-T easy vector에 확보하였다. 염기서열 분석을 통해 정확한 클론의 삽입과 증폭 오류가 없음을 확인하였다.

### 2) Lysis 유전자 L gene의 분리

Enterobacteria phage MS2의 RNA를 추출하기 위해 host 세균의 감염을 통해 형성된 plaque로부터 phage를 회수하였다. 회수된 phage suspension을 대상으로 Qiagen RNeasy kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 수행하였고, RNA의 분리가 degradation 없이 이루어 졌는지를 확인하기 위해 1.0%

MOPS/formaldehyde gel에 전기영동을 수행 조사 하였다. MS2 phage에서 L gene을 PCR 증폭하기 위해 MS2 phage RNA 3  $\mu$ l, L-lys 1F와 L-lys 1R (5 uM) 각 2  $\mu$ l씩과, 3×DW 13  $\mu$ l을 넣고 AccuPower RT-PCR PreMix kit (Bioneer)를 이용하여 RT-PCR 반응을 수행하였다. 이 PCR 증폭 산물을 PCR purification kit를 이용하여 정제하고, pGEM-T Easy Vector System (Promega)를 이용하여 TA-cloning을 실시하였다. Plasmid miniprep과 EcoRI 절단을 통해 원하는 크기의 insert의 유무를 확인한 후 염기서열 분석을 수행하였다

### 3) Lambda PR 및 CI 857 억제 유전자의 분리

E gene 및 L gene의 전사 발현을 조절하기 위한 발현 조절 시스템으로서 배양 온도의 조작을 통해 유전자 발현을 유발시킬 수 있는 lambda PR 프로모터와 CI 857 repressor 유전자를 확보하였다. 이들 조절 부위를 확보하기 위해서 ATCC87205 번호로 기탁되어 있는 pLDR20 플라스미드를 주형으로 PCR 분리를 실시하였다. PCR 증폭 pLDR20 내 존재하는 CI repressor 유전자의 말단 영역과 PR 프로모터의 말단 영역에 상보적으로 결합되는 프라이머를 제작하여 실시하였다. 역시 TA 클로닝 및 염기서열 분석을 통해서 정확한 클론의 증폭을 확인하였다.

### 4) 1차 version의 ghost 유도용 발현 벡터 구축

각각 요구되는 유전자 소재들은 PCR과 제한효소 위치 클로닝 등을 병행하여 pGEM 벡터의 backbone에 탑재하였으며 항생제 내성 표지 유전자는 ampicillin 내성 유전자인 *bla*를 이용하였다. 그리고 최종 확보된 유전자 소재들 간의 재설계를 통해 융합 발현 벡터를 대상으로 융합 구조의 확인을 위해 염기서열을 재확인 분석하였다.

## 나. 대장균에서의 ghost 발현 작동 여부 평가

### 1) 대장균에서의 재조합 E gene의 발현 유도

구축된 벡터가 작동하는 지 여부를 확인하기 위해서 대장균의 ghost 조작 가능성을 확인하고 *E. tarda* ghost를 위한 기반 기술 조건들을 평가 분석하였다. 재조합 *E. coli*를 대상으로 최초 start 세포수 (OD = 600 nm), 온도 자극 작동 프로그램 (28 - 42°C), lysis의 확인 및 생존력 제거 효율을 분석함으로써 *E. tarda*의 ghost 유도를 위한 선행 연구를 수행하였다. 최초 ghost 유도 OD 600 nm = 0.2 내외 범위를 이용하여 28°C에서 사전 배양을 수행하고 요구되는 시

점에 42℃로 온도를 올려 CI repressor의 작동을 blocking함으로써 E-gene의 transcription을 유도하였다. Spectrophotometry를 통해 OD의 변화를 15분 간격으로 조사하였고 최초 OD 이하로 감소하는 시점을 반응의 완료 시점으로 설정하였다.

## 2) 최초 세포 수에 따른 발현 유도

재조합 ghost 박테리아의 유도에 최초 세포 수 및 성장 단계가 미치는 영향을 알아보기 위해 박테리아를 28℃에서 배양하면서 OD 600 nm 흡광도 측정을 기준으로 세포 수가 0.2, 0.4, 0.6 및 0.8에 도달하면 각 시점에서 상기와 같이 온도의 증가를 통한 E-gene 발현을 통해 ghost 유도를 실시하고 그 양상을 평가하였다.

## 3) 다양한 대장균 균주에서의 발현 작동 가능 확인

상기 실험을 통해서 얻어진 유도 조건을 바탕으로 다양한 대장균 균주들을 대상으로 ghost 유도를 실시하였다. XL-1 blue MRF' 외에 JM109, DH5-a, HB010 등을 대상으로 상기 구축된 ghost 유도 발현 벡터를 형질도입시키고 앞서와 같이 28℃의 초기 배양 및 42℃로의 temperature upshift를 수행하였다. 각 균주에서 나타나는 OD 600 nm 값의 변화를 관찰함으로써 ghost 발현 양상을 평가하였다.

## 4) 생존력 제거 능력 평가

반응이 완료되면 증류수 또는 저장액 처리를 통해 세포질을 제거하고 동결건조를 수행하였으며 동결건조물의 현탁액 및 반응 완료 직후의 배양액을 연속 희석 하여 배지에 도말, 생존력 제거 효율을 분석하였다.

## 다. *E. tarda*에서의 ghost 발현 작동 여부 평가

### 1) *E. tarda*에서의 재조합 E gene의 발현 유도

상기 결과를 바탕으로 *E. tarda* ghost 세균 유도를 수행하였다. 형질전환은 상기 최적 조건을 통해 electroporation을 실시하고 형질전환구로부터 선택배지에서 성장한 colony를 대상으로 재조합 ghost plasmid를 보유하고 있는지 miniprep을 통해 확인하였다. 확인된 클론 중 무작위로 12 클론을 선발하여 온도 자극 (42℃)을 통해 대장균에서와 같이 E-lysis gene의 발현이 유도가능한지를 확인하였다. 확인된 재조합 *E. tarda*를 대상으로 최종 3개 클론들을 재선발

하였으며 ghost 유도를 실시, ghost 박테리아를 상기와 같이 제조하였다.

## 2) 생존력 제거 능력 평가

다양한 유도 조건들을 설정하여 *E. tarda* ghost 유도를 위한 기반 조건들을 정립하였다. 최적 배지를 확인하기 위해 LB배지와 TSB배지를 평가하였고 최초 시작 세포 수, 온도자극 후 lysis 발현까지의 소요시간, 반응 종료 및 저장 액/동결건조 처리 후의 생존력 검사, 그리고 전자현미경 사진 제작을 통한 nano hole형성 유무를 확인함으로써 *E. tarda* ghost bacteria가 제조되었는지를 확인하였다.

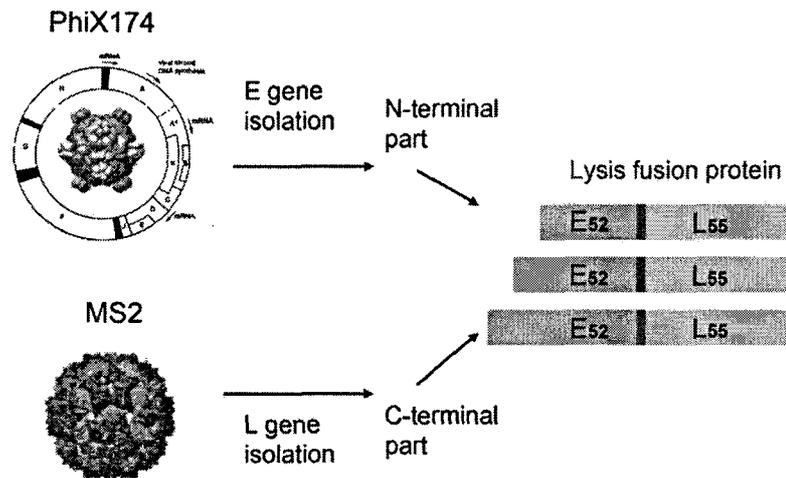
## 라. 용해 유전자 (lysis gene) 및 발현 조절 부위의 최적화

### 1) E-L fusion gene 제작 [도 M1]

상기 분리된 E-gene 과 L-gene을 대상으로 최적의 조합을 구축하기 위해 선행 연구를 통해 membrane targeting이 가능한 leader sequence 역할을 하는 것으로 알려져 있는 E gene의 N-terminal 부분을 3 종류의 길이로 세분화 하여 개시 코돈부터 각 52, 53 및 54개의 아미노산을 갖는 E-gene fragment와 L-gene의 C-terminal쪽 55개의 아미노산을 포함하는 fusion frame을 구축하였다. Fusion protein 구축을 위해 아래의 염기서열을 바탕으로 다음의 PCR primer들 말단에 제한 효소 인식 위치를 추가하여 PCR 분리를 수행하였으며 PCR 분리가 된 산물들은 gel purification, TA cloning, transformation 및 plasmid prep을 거쳐 정확한 클로닝이 되어 있는 클론들을 선발하였다. 선발된 클론들은 제한효소 위치 및 fusion frame의 정확성 확인을 위해서 염기서열을 분석하였다.

PCR 증폭 및 primer의 제한효소 말단 조작

Primer	염기서열*
<i>Bam</i> HI-Poly 1F	<u>ggatcc</u> GCTGGGCCCATTCAAACATGAGGATTA
<i>Bam</i> HI-Poly R54	<u>ggatcc</u> CCGACGCTCGACGCCATTAATA
<i>Bam</i> HI-Poly R53	<u>ggatcc</u> CCGCTCGACGCCATTAATAATG
<i>Bam</i> HI-Poly R52	<u>ggatcc</u> CCCGACGCCATTAATAATGTTT
<i>Eco</i> RI E gene 1F	<u>gaattc</u> ATGGTACGCTGGACTTTGT
<i>Nde</i> I E gene 1R	<u>catatg</u> TCACTCCTTCCGCACGTAAT
<i>Nde</i> I-L gene R	<u>catatg</u> TTAAGTAAGCAATTGCTGTA



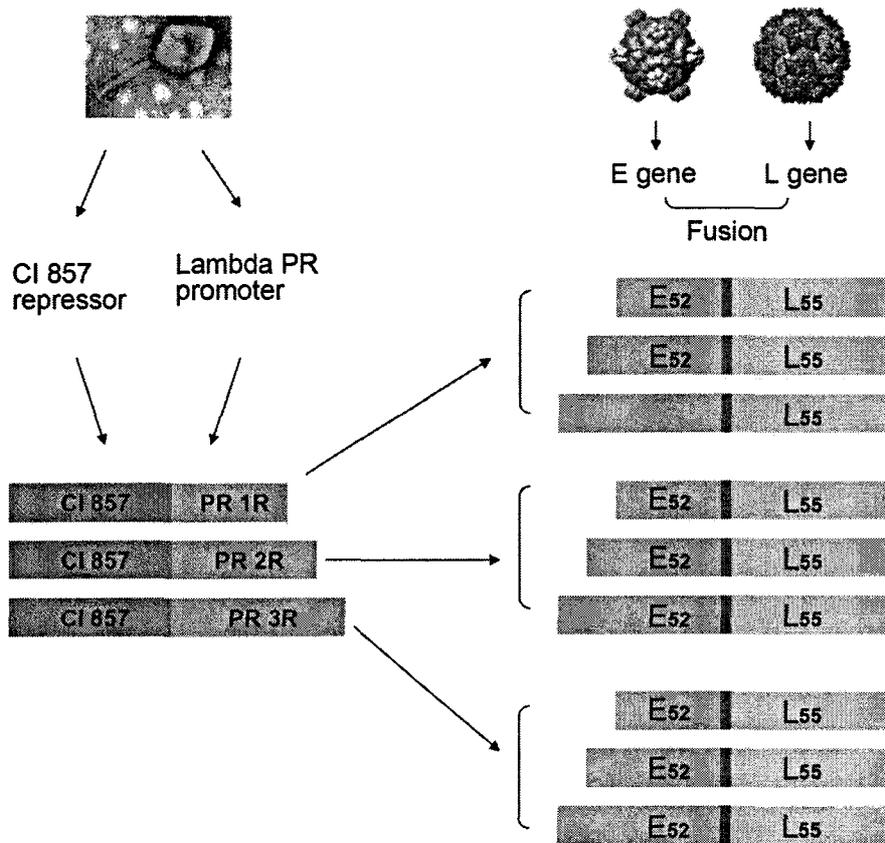
[도 M1]

Enterobacteriophage phiX174 및 MS2로부터 E-L fusion  
lysis 단백질 구축 모식도

## 2) 다양한 조절 영역 길이를 보유한 프로모터 제작

상기 제작된 1차 version의 ghost 발현 벡터를 개선시키기 위해 종래 Lambda PR에 연결된 *clo* 유전자의 일부를 포함하는 spacer sequence를 대상으로 불필요한 염기서열들을 제거하고 가장 최적의 발현 유도를 가능케 하는 조절 부위 영역 길이를 결정하고자 하였다. 종래의 조절부위를 Lambda PR 3R로 명명하고 이로부터 *clo* 유전자의 mRNA leading sequence를 포함하는 2R promoter, 그리고 *clo* leading mRNA sequence를 포함하지 않는 1R promoter를 클로닝한 후 각 1R, 2R 및 3R의 조절 영역을 대상으로 상기 E-L gene의 fusion 또는 E-gene을 연결한 후 발현 특징을 분석함으로써 최적 조합을 결정하였다 [도 M2].

Primer	염기서열* (5-3)
AatII-clRep F	<u>gacgtc</u> AGCCAAACGTCTCTTCAGGCCACT
EcoR1-PR 1R	<u>gaattc</u> GCAACCATTATCACCGCCAGAG
EcoR1-PR 2R	<u>gaattc</u> ACAACCTCCTTAGTACATGCAAC



[도 M2]

다양한 lambda PR 길이를 이용한 E-L fusion  
lysis 단백질 발현 조절 전략 모식도

### 3) 대장균 및 *E. tarda*에서의 ghost 발현 효율 평가

앞서 구축한 E-L fusion frame들을 대상으로 3종류의 조절 부위를 함께 평가하였으며 조절 부위의 PCR 분리 및 조사를 위한 primer 염기서열은 다음과 같다. 아울러 E-L fusion gene과 함께 E-gene (full length) 발현균을 대조군으로 이용하였다. PCR 분리, ligation, TA cloning, transformation 및 염기서열 분석은 앞서 언급한 바와 같이 동일하게 제조사의 manual에 기초하여 수행하였다.

### 마. 대장균 및 *E. tarda*에서의 lysis 재조합 유전자 발현 특징 평가

#### 1) 재조합 균주의 준비 및 ghost 발현 유도

구축된 벡터의 작동을 대조군인 *E. coli*와 *E. tarda*에서 평가하였다. 동일한 플라스미드 벡터로 형질전환 된 재조합 *E. coli*를 대상으로 최초 세포농도 OD<sub>600</sub> nm 0.2-0.4 범위까지 28℃에서 사전 배양을 수행하고 42℃로 온도를 올려 CI repressor의 작동을 억제하였으며 E lysis 유전자의 전사발현을 유도하였다. 분광흡광도계를 이용하여 OD의 변화를 추적하였으며 최초 OD 값 이하로 감소하는 시점을 반응의 완료 시점으로 설정하였다. 반응이 완료되면 증류수 washing을 수행하고 일부 분획은 RNA 분리를 위해 초저온 냉동고에 보관하였으며 나머지는 생균 측정을 위해 동결건조를 수행하였다. 기타 배양조건은 Kwon et al. (2005)에 의거하여 실시하였다.

## 2) E-gene mRNA 발현 분석

Ghost 발현 유도 구간에서 확보된 *E. tarda* 및 *E. coli* 시료를 대상으로 total RNA를 분리하고 semi-quantitative RT-PCR을 수행하여 E gene transcripts의 증감 양상을 추적하였다. -80℃에 보관 되어있는 균체로부터 RNeasy mini Kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 total RNA를 분리 하였고 이때 DNA의 오염을 제거하기 위해 DNase I (30 U) 처리 및 clean-up과정을 추가로 실시하였다. RNA 시료 1 µg을 MOPS-agarose gel (1 %)에 loading 하여 RNA 시료의 효과적인 추출을 확인하였고 16S rRNA band의 image densitometry와 흡광도 측정을 이용하여 RNA 시료들 간 정량 normalization을 수행하였다. 정량된 시료들로부터 500 ng의 total RNA를 취하여 RT-PCR 분석을 실시하였으며 이때 RT-PCR 분석은 42℃에서 1시간 역전사 반응 후 4분간의 RTase inactivation을 수행하고 22 cycles의 온도순환 반응 (94℃ 25 sec, 58℃ 20 sec 및 72℃ 30 sec)을 통해 E-gene transcript를 증폭하였다. PCR 반응은 iCycler (Bio-Rad, USA)를 이용하였고 증폭을 위한 oligonucleotide primer는 E-gene 단편을 특이 증폭 시킬 수 있는 primer (E-lysis FW: 5'-ATGGTACGCTGGACTTTGTG-3' 및 E-lysis RV: 5'-CTTCTGCGTCAGTAAG AACG-3')를 합성하여 사용하였다. 예상 증폭 산물의 크기는 240 bp 였다. RT-PCR용 premix (Bioneer, Korea)를 이용 3반복 분석을 수행하였으며 증폭 산물의 전기 영동상을 Quantity-one Image Analysis Software (Bio-Rad, USA)를 이용하여 각 시료의 16S rRNA band에 대하여 상대 정량 분석을 실시하였다.

## 바. Ghost 효율 및 생존력 평가

#### 1) 재조합 *E. tarda* 균주의 준비 및 ghost 발현 유도

백신 제작을 위해서 상기 최적 조건 평가를 기초로 하여 다음과 같이 백신 제작을 수행하였다. *Edwardsiella tarda* 균을 tryptic soy broth (pancreatic digest of casein, enzymatic digest of soybean meal, dextrose, sodium chloride, dipotassium phosphate) 배지 28℃에서 진탕 배양한 후 42℃ 온도 자극을 수행하고 spectrophotometer 측정에 의해 lysis가 완료됨을 확인하였다. Cell lysis가 완료되는 시점에 500g 20분 (4℃)의 원심분리를 통해 ghost를 회수하였다.

#### 2) Post-induction 처리 및 생존 균주의 평가

Ghost 발현이 유도된 대장균 및 병원성 세균 *E. tarda*를 대상으로 재조합 cell lysis 발현을 유도한 후 생존 세균 (resistant cell)의 존재 유무를 평가하고 또한 유도된 bacterial ghost들을 이용, 백신 제작을 위한 post-induction treatment 과정을 평가하였다. Ghost 유도는 상기 최적 조건을 이용하여 수행하였고, induction 수행 후 반응물의 serial dilution을 plate에 도말하여 colony forming unit를 측정하였다. 또한 반응 후 post-wash, 동결 건조, 현탁등의 처리를 통해 백신으로 처리 가능한 산물을 제조하고 다시 균체의 생존력 (cfu)를 측정하였다. Phosphate buffered saline (pH 7.2)을 이용하여 reuspsend를 수행한 후 곧 바로 lypholization을 수행하였다.

### 제4항 항원 탑재를 위한 표면발현 시스템 구축

#### 가. InaK 단백질 표면 발현 신호를 이용한 발현 벡터

##### 1) InaK 단백질 유전자의 분리

Ice nucleoprotein인 INP 극저온의 상태에서 ice crystal을 형성하는데 관여하는 membrane 단백질로서 본 단백질의 N-terminal 및 C-terminal은 독립적으로 또는 fusion 형태로 외래 단백질의 표면 발현을 유도할 수 있는 것으로 알려져 있으며 이에 본 연구에서는 *E. tarda*의 표면을 targeting 하기위해서 *P. syringae*에서 분리된 InaK 유전자의 N-terminal signal을 이용하여 targeting vector를 구축하였다.

##### 2) Inducible 및 constitutive promoter에 의한 발현 조절 벡터 구축

벡터 구축을 위해 InaN terminal을 보유하고 있는 plasmid로부터 제한효소 처리와 PCR 분리를 병행하였으며 분리된 fragment는 high constitutive expression vector인 pHCEIIB (Bioleaders, Korea)에 클로닝 시켰다. 제작된 벡터를 대상으로 InaN signal에 이어 reporter construct인 GFP 유전자를 융합시켰다. 이를 통해 high constitutive promoter에 의해 조절되는 membrane targeting signal InaN-GFP fusion frame을 구축하였다.

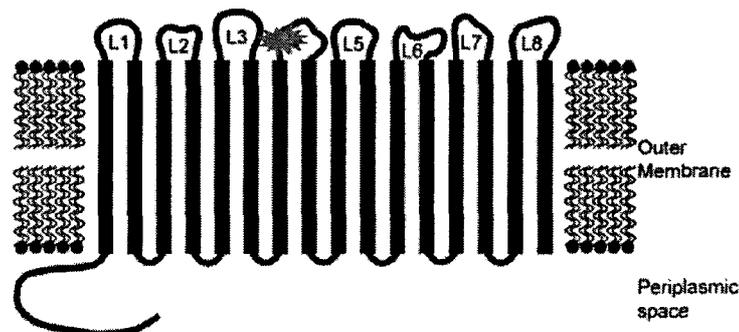
### 3) 표면 발현 평가

구축된 벡터를 이용 *E. coli*와 *E. tarda*에 형질전환 시키고 형질전환 클론을 대상으로 GFP의 발현 유무, membrane targeted expression의 유무를 조사하였다.

## 나. OMP 단백질 구조를 이용한 표면 발현 벡터

### 1) Outer membrane protein 유전자를 이용한 표면 발현 전략

본 실험은 외래 signal peptide 또는 바이러스 기원 (E-gene) signal peptide를 이용하지 않고 *E. tarda* 자체의 targeting system을 이용하고자 하였으며 그 조절 부위 대상으로 *E. tarda* outer membrane protein (OMP)을 이용하였다. 1차년도 연구를 통해 본 세균의 병원성 유전자로 알려져 있는 outer membrane protein *E. tarda* FSW910410 OmpS2를 대상으로 단백질의 2차 구조에 기초하여 세포표면에 위치하는 각 loop 영역을 파악하였고 외래 유전자를 표면 발현 시킬 수 있는 targeting system을 구축함으로써 표면발현 loop으로 이용하고자 하였다 [도 M3].



[도 M3]

다양한 OMP loop을 대상으로 한 외래 단백질 표면발현 전략

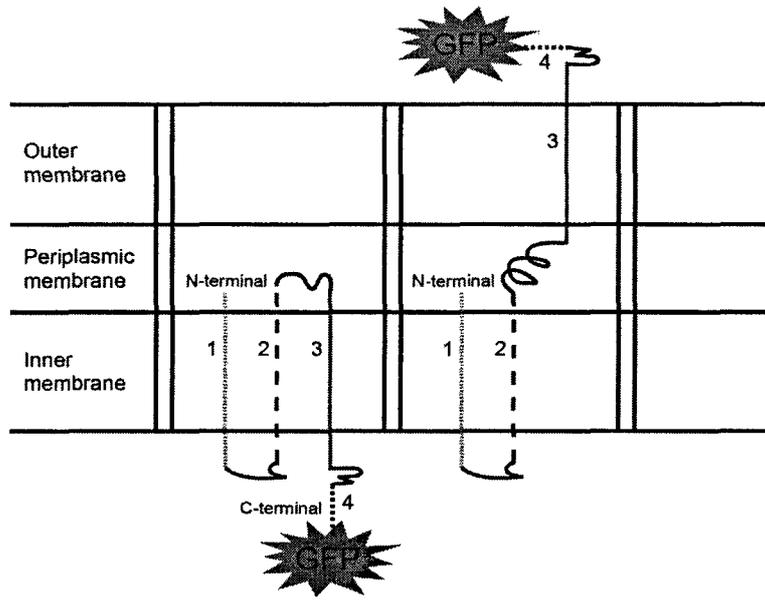
## 2) OMP 단백질의 분자 조작

이를 위해 단백질 내 비교적 변이가 많이 축적된 L4, L5, L6 또는 L7 영역에 외래 단백질 marker인 green fluorescence protein (GFP)을 tandem fusion시키거나, L4 또는 L7 영역에 sandwich fusion시켜, 외래 단백질이 정상적으로 발현되는지 파악하고자 하였다. OmpS2 전체 영역, 각 OmpS2 부분 영역 및 GFPuv의 PCR 증폭 - OmpS2의 PCR 증폭에 사용된 primer 쌍은 GenBank에 등록되어 있는 *E. tarda* PPD130/91의 OmpS2 (GenBank accession no. AY078509)를 참조하여, OmpS2와 GFPuv에 non-cut 제한효소인 *HindIII*와 *KpnI*의 염기서열이 추가된 *HindIII*-OmpS2 1F (aagcttATGTGTTTACTTCGACAGATGG)와 *KpnI*-OmpS2 R1 (ggtaccTTAGAAGTGGTAGACCAGACCC)을 설계하였다. PCR cloning된 *E. tarda* FSW910410 OmpS2 유전자의 길이를 분석하고, GenBank에 Blast search를 실시한 결과, 동일종인 *E. tarda* PPD130/91과의 유사도를 분석하였으며 기타 관련된 미생물들의 Omp 단백질들과의 구조 상동성을 평가하였다. 평가된 자료를 이용하여 2차 구조 motif에 기초한 2차 구조 영역을 표시한 후  $\beta$ -strand 영역 (membrane-spanning  $\beta$  sheets), 세포표면으로 위치하는 loop 영역(L1-L8), 및 세포 안쪽에 위치하는 turns 영역을 특징화하여 이러한 2차 구조에 기초하여 세포 표면으로 위치하면서 비교적 변이가 많이 축적된 각 L4, L5, L6, L7 영역을 외래 단백질의 tandem fusion과 sandwich fusion sites로 선택하여 단백질 분자조작을 수행하였다. 완성된 표면 발현 벡터를 이용하여 대장균 및 *E. tarda*에서 GFP의 발현에 의한 형광 검출이 이루어지는 지 여부를 확인하였다.

## 다. E 단백질 작동 기작을 이용한 표면 발현 벡터

### 1) E-protein을 이용한 표면발현 전략

E-gene은 cell lysis에 사용되는 protein임과 동시에 본 E lysis 단백질의 작용 부위가 세포막이며 따라서 E protein과의 융합에 의해 연결된 외래 단백질이 세포 surface로 display될 수 있는 특징을 갖고 있다. 이미 앞서 본 연구 결과에서도 E-L fusion gene에 의해서 E gene의 경우 외래 단백질와의 fusion 형태로서도 cell lysis가 가능성이 밝혀져 있으므로 E-gene의 lysis 특성과 surface targeting의 잠재기능을 동시에 발휘시킴으로써 두 종류의 기능을 ghost에서 동시에 부여할 수 있으리라 기대된다 [도 M4].



[도 M4]

다양한 OMP loop을 대상으로 한 외래 단백질 표면발현 전략

## 2) 클로닝 및 분자 조작

따라서 본 연구에서는 E-gene에 reporter인 GFP gene을 fusion 시킴으로써 ghost의 유도과 surface targeting을 동시에 실시하고자 하였다. E-gene construction을 위해서 상기 ghost 유도에 필요한 조절 cassette인 CI repressor - Lambda PR promoter를 그대로 이용하였다. 보유하고 있는 기존 발현 벡터에 stop codon을 제거한 E-gene과 full length GFP간의 융합을 유도하였고 이때 요구되는 DNA 조작은 제한효소 절단과 PCR을 병행하여 사용하였다. 최종 구축된 벡터는 lambda PR promoter의 조절을 받으므로 외래 단백질 발현 및 cell lysis는 온도 shift (42°C)에서 inducible 한 방식으로 이루어지도록 하였다.

## 라. 표면 발현 효율 평가

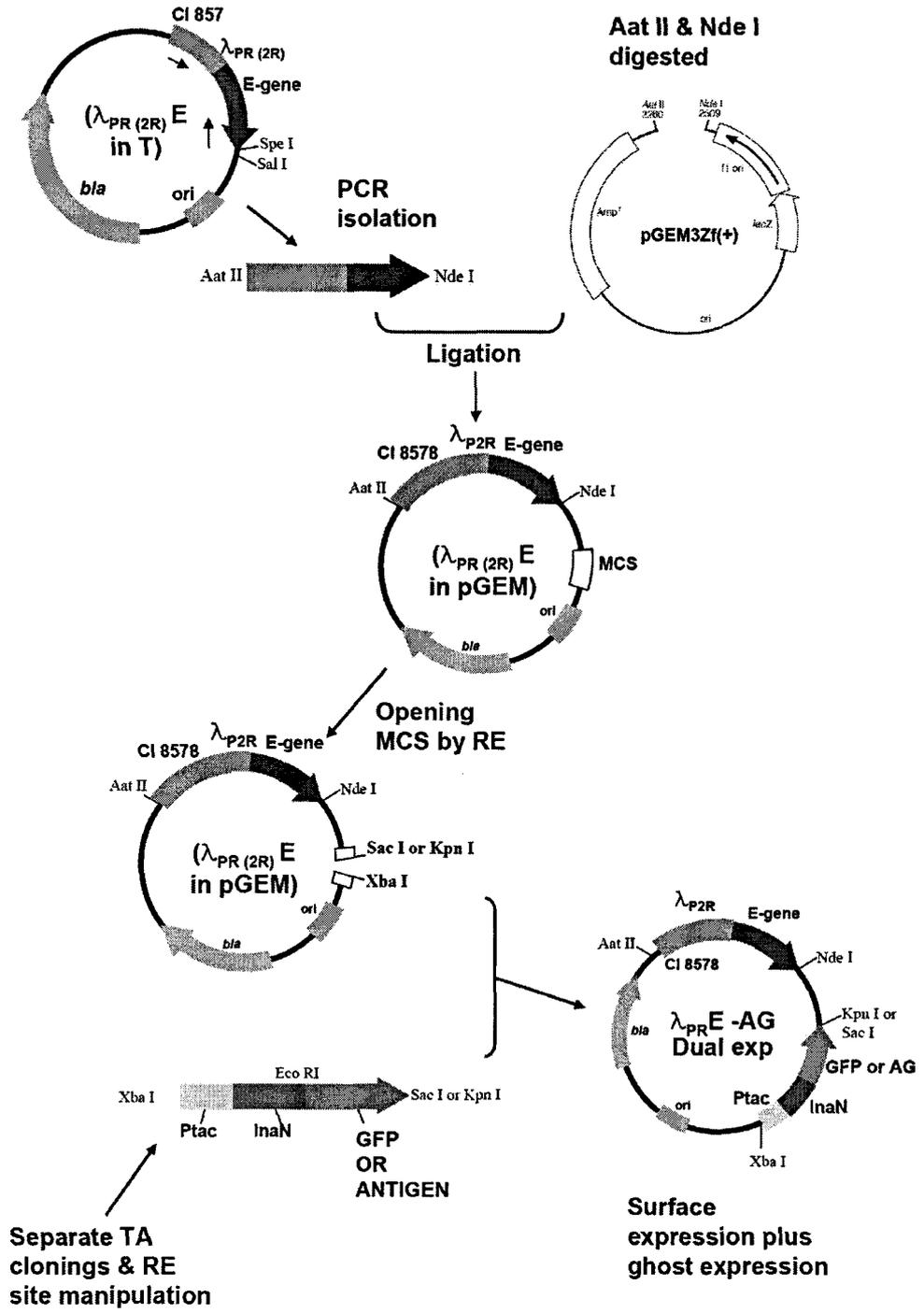
### 1) 표면발현 벡터를 포함하는 재조합 균주 제조

상기 제작된 표면 발현 시스템을 포함하는 벡터들을 이용하여 대장균 XL1 blue MRF'에 형질도입하여 GFP 형광 검출이 이루어지는지를 평가하였으며 평가는 형광현미경하에서의 검경 및 VersaDoc 4000 (Bio-Rad)에 의한 상대 정량 평가를 실시하였다. 각 표면 발현 시스템들간의 발현 효율이 높은 시스템을 선발하여 E. tarda에서 확인하였다.

## 제5항 외래 항원의 ghost 박테리아 표면 발현 기술 개발

### 가. 외래 단백질 동시 탑재 가능 dual cassette 발현 벡터 제조

상기 확보된 E-protein 발현 기반 ghost 박테리아 제조 시스템과 외래 단백질의 표면 발현 시스템 기술을 융합하여 두개의 기능을 동시에 발휘하는 dual expression vector를 구축하였다. 따라서 본 벡터의 구축을 통해 선발된 항원 유전자를 ghost 박테리아 세포 표면에 발현시킴으로써 ghost 박테리아 백신 전달 시 외래 항원이 함께 전달될 수 있도록 하기 위한 전략이다. 이를 위해서 첫째, 상기 가장 우수한 ghost 유도 효율을 보이는 lambda 조절 부위인 2R 프로모터를 포함하는 벡터로부터 PCR 분리를 통해 CI 857 억제자 유전자, PR 2R 프로모터 그리고 lysis E gene을 동시에 PCR 단편으로 확보하였다. 이때 클로닝을 용이하게 하기 위해서 PCR primer들의 5'-말단에 Aat II (GACGTC) 및 Nde I (CATATG) 제한효소의 인식 위치를 인위적으로 삽입시켰으며 분리된 산물은 PCR purification kit (Qiagen, Germany)를 이용 순수 분리하고 TA 클로닝 과정을 거쳐 다시 제한 효소 Aat II 및 Nde I 처리를 수행하였다. Gel purification 방법을 통해 단편을 회하고 dual vector의 backbone으로 이용할 pGEM 3Zf (+)로 본 ghost 발현 cassette를 이동시켰다. pGEM 3Zf(+) 역시 Aat II와 Nde I의 제한 효소 처리를 수행하여 단편을 회수하고 이들 간의 ligation 반응을 실시하였다. 박테리아 형질도입과 플라스미드 분리 확인을 통해 pGEM 3Zf(+)로 옮겨진 벡터를 확보하였다. 본 벡터로의 이동 시 multiple cloning site (MCS)를 전혀 사용하지 않았으므로 항원 표면발현 cassette를 본 MCS에 삽입토록 하였다. 먼저 MCS 내 존재하는 제한효소 위치 Sac I (GAGCTC) 또는 Kpn I (GGTACC) 와 Hind III (AAGCTT) site를 효소 반응을 통해 열고 본 제한효소 위치 내로 항원 표면 발현 cassette를 삽입하였다. 항원 표면 발현 cassette에 이용한 유전자 소재로는 tac 프로모터, 앞서 평가한 InaN 표면 발현 signal peptide, 구조 유전자 (항원 표현 가능성 사전 평가를 위한 GFP 유전자)였다. 각각의 유전자 소재들은 앞서의 연구 방법대로 PCR 분리, 제한효소 말단 조작 등을 통해서 순차적으로 tac-InaN-GFP가 부착되도록 하였으며 최종적으로 T-vector로부터 Hind III 및 Kpn I (Sac I)의 제한효소 절단을 통해 회수한 단편을 이용하였다. 준비된 벡터와 insert cassette간의 ligation (T4 DNA ligase를 이용한 16°C 12시간 반응)을 통해서 클로닝을 완료하였다. Ligation 산물을 상기와 같이 XL-1 blue MRF' 대장균에 형질도입하고 정확한 클로닝 방향 및 염기서열의 확인을 통해서 정확한 dual expression system 구축의 클로닝을 확인하였다. 그 벡터 구축 모식 개략도와 구축된 벡터의 partial restriction map은 아래 [도 M5]에 나타내었다.



[도 M5]

외래 항원의 ghost 박테리아 내 표면발현을 위한 1차 version의 dual expression vector 구축 모식도

## 나. Dual cassette 벡터를 이용한 외래 단백질 탑재 ghost 박테리아 개발

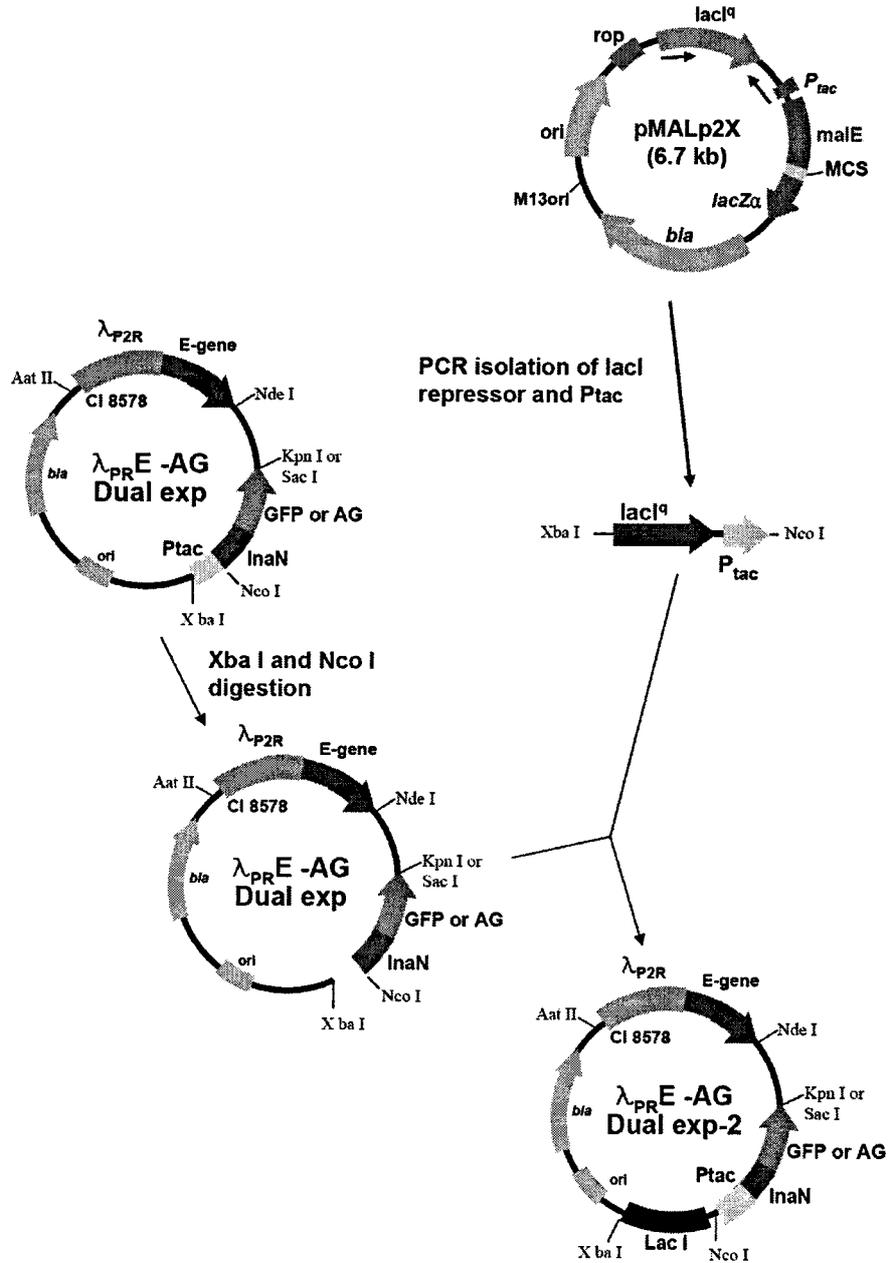
### 1) 대장균 ghost 박테리아에서의 외래 단백질 표현

상기 구축된 dual 발현 시스템의 작동 여부를 확인하기 위해서 1차로 대장균 균주 DH5-a 또는 XL1-blue MRF 균주를 대상으로 ghost 발현 및 외래 표면 단백질발현 여부를 확인하였다. 첫째, 두 발현계의 독립적 작동 여부를 먼저 평가하기 위해서 ghost 발현을 1차 확인하였다. 상기 ghost 박테리아 유도 조건을 이용하여 28°C에서 OD 600 nm = 0.4까지 배양한 후 온도 자극 (42°C)을 통해 CI 857 repressor의 프로모터 결합을 불활화 시키고 PR 2R 프로모터의 작동을 통한 E-gene 발현을 유도하였다. 둘째, 표면 발현계가 원활히 작동하는지 여부를 확인하기 위해서 37°C 및 28°C에서 선행 배양을 실시하고 (glucose 0.5% 첨가 LB 배지) OD 600 nm = 0.4~0.8 범위내에서 tac 프로모터를 활성화시켰다. tac 프로모터의 활성을 위해서 IPTG를 배양 배지 최종 농도 1 mM로 첨가하였고 첨가 후 2-3시간동안의 추가 배양을 실시하였다. IPTG 유도 후에 GFP 발현을 확인하기 위해서 형광현미경 및 형광이미지 분석기 (VersaDoc 4000, Bio-Rad, USA)를 통해 검정하였다. 또한 GFP 발현이 표면 위주로 되었는지를 재확인하기 위해서 표면 단백질 분획을 추출하여 GFP 항체 (Clontech, USA)를 이용 Western blot을 실시하여 최종 확인하였다. 셋째, 이들 두 발현계가 연속적인 프로그램을 통해서 동시에 작동할 수 있는지를 확인하였다. 이를 위해 재조합 대장균을 28°C에서 선행 배양을 실시하고 (glucose 0.5% 첨가 LB 배지) 균 배양액이 OD 600 nm = 0.2 에 도달한 시점에서 tac 프로모터를 IPTG 첨가를 통해 활성화시켰다. IPTG 첨가 후 2시간의 외래 단백질 발현 유도 구간이 완료되면 ghost 발현을 위해 42°C upshift를 실시하였다. Ghost 유도가 시작되면 지속적인 OD monitoring을 통해서 최초 OD 이하까지 계속 발현을 유도하였다. Ghost 박테리아들을 원심분리를 통해 회수하고 회수된 박테리아 펠렛을 대상으로 GFP 형광 발현 여부를 확인하였다.

### 2) *E. tarda* ghost 박테리아에서의 외래 단백질 표현

대장균에서 얻어진 결과를 바탕으로 실제 병원성 세균에서의 dual 발현 시스템의 작동여부를 확인하였다. 상기 최적화된 *E. tarda* 형질전환 조건을 이용하여 FSW910410 균주를 dual expression vector로 재조합시키고 앞서 대장균에서 확인하였던 방법을 통해 검정하였다. 단 이때 *E. tarda*의 경우 lac I repressor를 chromosome내 보유하고 있지 않을 가능성이 매우 높으므로 정확한 유도 발현을 위해서 상기 dual expression vector내로 Ptac 프로모터와 함께

*lacI<sup>q</sup>* repressor 유전자를 동시에 포함하는 dual expression vector를 이용하여 같이 평가하였다. 개선된 벡터의 구축 모식도와 부분 제한효소 지도는 아래의 [도 M6]에 나타내었다.



[도 M6]

1차 version의 dual expression vector로부터 *lacI* 유전자 삽입 구축 모식도

## 제6항 개발 백신의 어체 방어 능력 평가

### 가. 재조합 *E. tarda* 백신 제조

#### 1) *E. tarda* ghost 박테리아 백신 제조

*E. tarda* ghost 제작을 위해서 재조합 발현 벡터를 포함하는 균주를 대상으로 상기 최적조건을 대상으로 cell lysis를 수행하였고 PBS wash 및 동결 건조를 실시하였다. 배양은 균주 FSW910410을 대상으로 Luria Broth 또는 TSB에 50 µg/ml의 ampicillin을 포함하는 배지에서 진탕배양하였으며 E-lysis를 위해서 42°C의 온도 자극을 통해 OD 감소를 측정. ghost 유도를 실시하였다. 실시된 산물로부터 1, 1/10, 1/10<sup>3</sup> 및 1/10<sup>5</sup> dilution을 제조한 후 LB plate에 도말하고 도말된 plate를 28°C 및 37°C에서 배양하고 생존력 있는 균체가 남아있는지를 확인하였다.

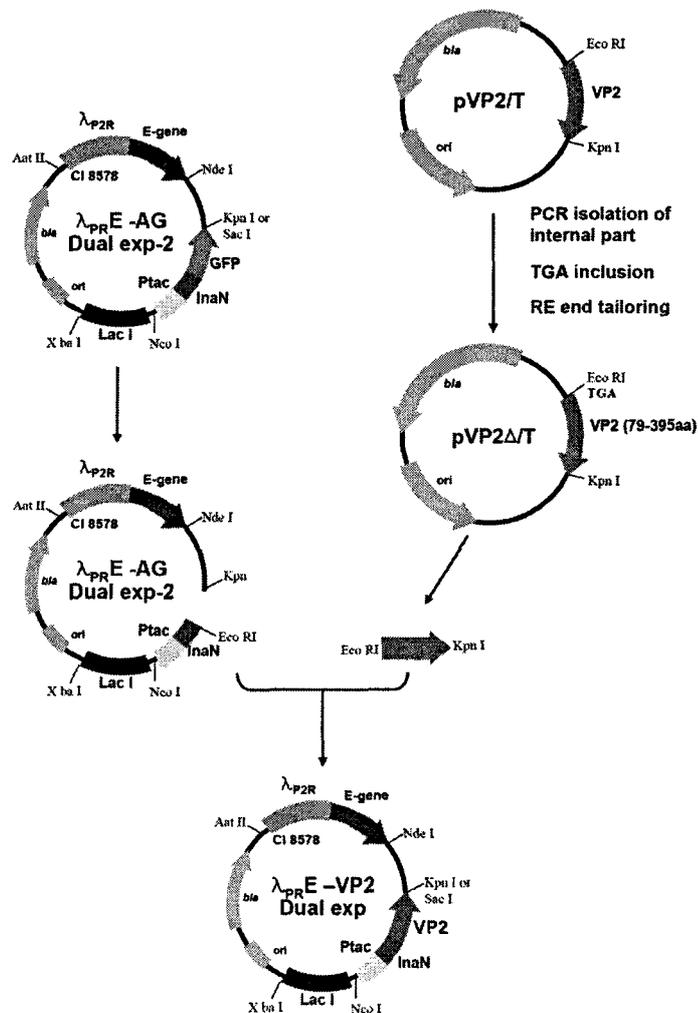
#### 2) Formalin-killed *E. tarda* 대조군 백신 제조

*E. tarda* FKC를 제작하기 위해 역시 동일 조건을 배양한 세균을 대상으로 0.5% 최종 농도가 되도록 formalin을 첨가하고 24시간의 암냉 배양을 통해 세균을 inactivation 시켰다. Formalin 처리 후 역시 1회의 DW wash와 3회의 PBS를 수행한 후 4°C에 보관하였다.

#### 3) MABV 항원 탑재 *E. tarda* ghost 박테리아 제조

*E. tarda*의 자체 표면항원과 MABV의 표면 발현 항원을 동시에 전달할 수 있는 dual 발현 벡터를 제조하고 이를 이용하여 다기능 외래 항원 탑재 bacterial ghost *E. tara*를 제조하였다. 상기 구축된 dual 발현 벡터를 이용하여 reporter construct인 GFP를 제거하고 제거된 위치에 MABV의 주요 항원 단백질인 VP2를 발현할 수 있는 유전자 소재를 삽입하였다. 이를 위해서 첫째, 벡터 backbone을 준비하기 위해 상기 dual vector를 Kpn I과 EcoRI으로 절단함으로써 GFP 유전자를 제거하였고 정확한 절단 단편만을 회수하기 위해서 gel purification을 앞서와 같이 수행하였다. MABV로부터 역전사 및 PCR 반응을 통해 기 확보하고 있던 VP2 유전자 전체에 대해서 발현 효율을 고려하여 고발현에 장애가 되리라 예상되는 양 말단의 소수성 부분을 제거한 internal part에 해당 영역만을 PCR로 분리하였다. PCR 분리 시 79-395 aa에 해당하는 유전자를 분리하였으며 이때 역방향 primer의 5'-말단에 종결 코돈인 TGA를 삽입하여

translation을 멈출 수 있도록 하였다. TA 클로닝, 제한효소 반응을 거쳐 앞서 준비된 vector backbone과의 융합을 통해 발현 벡터를 구축하였다. 본 벡터 구축에 관한 모식도와 그 restriction map은 [도 M7]에 나타내었다. 상기 벡터를 이용하여 *E. tarda*에 형질전환 시키고 재조합 *E. tarda*를 대상으로 표면 발현 및 ghost 유도를 앞서 확립된 조건을 이용하여 수행하였다. Ghost 유도 과정 중에 회수된 bacterial pellet (표면발현 유도 후)을 대상으로 VP2 발현 여부를 확인하였다. 본 제작된 박테리아 ghost는 *E. tarda*의 자체 표면 항원과 MABV의 외래 표면 발현 항원을 동시에 갖추고 있는 아래의 사균 백신으로 실험에 이용하였다.



[도 M7]

VP2 항원 탑재 ghost 박테리아 제조용 dual 발현 벡터

## 나. 어체 면역 유도능력 및 방어능력 평가

### 1) 실험모델 틸라피아를 이용한 *E. tarda* ghost 주사 백신 처리 효과 평가

#### 가) 실험어

Tilapia를 모델 어류로 설정하여 *E. tarda* ghost (ETG)의 immunization 실험을 실시하였다. 부경대학교 양어장 stock을 이용하였으며 실험 어류 (평균 체중  $35 \pm 4$  g)는 100 L 수조 3 반복구에 수용하고 2 주간의 순치 기간을 거쳐 본 실험 조건에 적응시켰다. 아올러 수조 및 수질 효과를 제거하기 위해서 500 L 수조에 compartment로 설정된 실험군 수용을 통해 역시 immunization 실험을 실시하였다.

#### 나) 호흡 폭발 (respiratory burst) 측정

Immunization 실험에 사용하지 않는 개체들을 대상으로 respiratory burst를 측정하였다. 실험어를 마취 후 (MS222) head kidney를 해부학적 기법으로 척출하였으며 척출된 조직은 minimum essential medium (MEM) 배지 (supplemented with 5% FCSI heprain 10 units/ml; penicillin 100  $\mu$ g/ml; streptomycin 100 U/ml)에 옮겼다. Phagocyte cell suspension을 얻기 위해 31/51% Percoll density gradient를 수행하고 4°C 원심분리를 통해 (30 min 400g) phagocyte enriched interphase를 회수 3회의 washing 과정을 거친 후 flat bottomed 96 well plate에 분주하였다. 20°C에서 2간의 부착 반응을 유도하였고 부착하지 않은 세포를 culture medium으로 wash 하였다. 그리고 4°C 1시간 반응의 추가 배양을 통해 plate에 부착을 추가로 유도하였으며 cell viability는 tryphan blue 평가를 통해 98% 이상임을 확인하였다. 각 well의 phagocyte number는  $1 \times 10^6$ /ml로 조정하였다. Reactive oxygen species (ROS)는 stimulated phagocyte를 통해 생성토록 하였고 automatic pholuminometer를 이용하여 정량하였다. 각 test cuvette은 0.7 ml의 luminol, 0.4 ml cell suspension, 0.3 ml ETG ( $1 \times 10^8$  cells/ml) 또는 동일 수의 *E. tarda* FKC를 혼합하였다. Zymosan-stimulation을 positive control로 이용하였다. 3 반복의 실험을 실시하였고 2시간동안 반응을 monitoring 하였다.

#### 다) 백신 처리

상기 제작된 ETG와 FKC를 PBS에 reconstitution하였다. 실험 I에서는 group 당 25미씩의 개체를 대상으로 각 3반복 수조마다 수용하였고 복강 주사

를 통해 immunization을 실시하였다. 2주간의 간격으로 2회 주사를 실시하였고 주사량은 50  $\mu$ l로 고정하였으며 ETG 및 FKC 모두  $1.4 \times 10^6$  cells을 주사하였다. Negative control로서 PBS 만을 주사한 대조군을 설정하였다. 2차 주사 2주 후 (Day 28) blood 시료를 채취하여 응집 반응 (agglutination activity) 및 살균 활성 (bactericidal activity)를 측정하였다. 실험 II에서는 수조 효과를 제거하기 위해 group 당 역시 25미씩 동일 수조에 compartment로 실험군을 분리하고 상기와 같이 immunization 실험을 실시하였다.

#### 라) 항체 응집 반응 및 박테리아 살균 활성 측정

응집반응을 확인하기 위해서 U-bottom microtiter plate를 이용하여 측정하였고 어체에서 분리된 혈청을 이용하여 FKC와 ETG 동일 양 (4 mg/ml)에 대해서 활성을 측정하였다. 실온에서 16시간동안 반응을 유도하였다. 살균 작용을 측정하기 위해서 ETG 배양액을 원심분리로 세포를 회수하고 PBS로 3회 세척하였다. 세척 후 세포 수를  $4 \times 10^9$  cells/ml로 조정한 수 25  $\mu$ l의 박테리아 suspension을 25  $\mu$ l 어체 혈청과 반응시켰다. 실온에서 1시간동안의 반응을 유도후에 CFU/ml를 측정함으로써 상대 활성을 평가하였다. 도말은 TSA (1.5% NaCl supplemented)를 이용하였다.

#### 마) 공격 실험 및 방어 능력 평가

공격 실험을 수행하기 전 보관 균주의 virulence를 증가시키기 위해 tilapia 어체를 1회 passage 시켰다. 박테리아를 복강 주사하고 3일 후 신장에서 재 분리한 균주를 이용하였고 분리된 균주는 TSA (1.5% NaCl supplemented)에서 단일 배양을 유도하고 최종  $5 \times 10^7$  cells/ml로 조정하여 공격실험에 이용하였다. 어체는 실험구당 17미씩을 이용하였고  $5 \times 10^6$  cells/fish가 되도록 복강 주사를 실시하였다. 주사후 매일 사망 개체를 recording 하면서 누적 폐사율을 25일간 관찰하였다. 폐사한 개체에서는 *E. tarda* 감염에 의한 폐사를 확인하기 위해서 신장 조직으로부터 *E. tarda*를 분리하여 (SS agar), 동정하였다. 통계적인 유의차 검정은 student t-test와 Chi-square test등을 이용하여  $P < 0.05$  수준에서 평가하였다.

#### 2) 넙치를 이용한 *E. tarda* ghost 주사 백신 처리 효과 평가

상기 틸라피아 실험을 토대로 ETG 백신의 효과를 확인하고 넙치를 대상으로 *E. tarda*에 대한 방어 능력을 주사 백신 형태로 확인하였다. 실험어는 근처 넙치 배양장에서 구입한 전장 8-10 cm 내외의 어체를 이용하였으며 실험실

로 옮겨 7일간의 순치과정을 통해 적응시킨 후 백신 처리 및 공격 실험에 이용하였다. 상기 제작 방식과 동일하게 ETG와 FKC를 제작하고 역시 완충용액 PBS에 현탁하였다. 실험구 당 25미씩의 개체를 대상으로 각 3반복 수조마다 수용하였고 복강 주사를 통해 immunization을 실시하였다. 복강 주사는 PBS에 현탁된 ETG 및 FKC 모두 앞서 실험 결과를 고려하여  $1 \times 10^6$  cells을 주사하였으며 주사 용량은 모두 50  $\mu$ l로 하였다. 백신 처리를 하지 않는 negative control로서 PBS 만을 동일 량 주사하였고 역시 3반복 구로하여 대조군을 설정하였다. 1차 immunization이 처리된 후 2주 후에 boosting을 위해서 1회 동일한 방식으로 주사 처리를 실시하였으며 다시 3주 후에 공격실험을 실시하였다. 공격 실험은 앞서 틸라피아에 사용되었던 방법과 유사하게 수행하였다. 공격 실험을 수행하기 전 보관 균주의 virulence를 증가시키기 위해 넙치 어체를 1회 passage 시킨 *E. tarda*를 이용하였다. 분리된 균주는 SS agar plate (Difco)에서 *E. tarda* colony의 형성을 확인하고 다시 TSA (1.5% NaCl supplemented)에서 단일 배양을 유도하고 최종  $5 \times 10^6$  cells을 이용하여 공격하였다. 실험구당 18 미씩을 이용하였고 복강 주사 용액은 총 50  $\mu$ l가 되도록 하였다. 공격 실험 후 주 사후 매일 사망 개체를 조사하고 폐사한 개체에서는 *E. tarda* 감염에 의한 폐사를 확인하기 위해서 신장 조직으로부터 *E. tarda*를 분리하여 (SS agar) 동정하였다. 누적 폐사율을 3주간 관찰하였고 그룹 간 폐사율에 관한 유의차 검정은 student t-test ( $P < 0.05$ )를 이용하여 평가하였다.

## 다. 경구 백신 처리 및 방어 기능 평가

### 1) 넙치 *E. tarda* ghost 경구 백신 처리 효과 평가

상기 연구 결과를 통해서 ghost 기술을 기반으로 하는 *E. tarda* 백신은 주사를 통한 delivery 시 생체 면역 유도 능력과 *in vivo* 방어 효과가 있음을 모델 어종인 틸라피아와 목적 어종인 넙치에서 확인되었다. 이에 본 실험에서는 본 연구과제의 실제 양식 현장의 넙치 생산에 적용 가능한지 여부를 확인하기 위해서 경구 경로 (oral route)를 통한 delivery 역시 방어 능력이 부여될 수 있는지를 평가하였다. 양식 현장에서는 앞서 실험에서처럼 모든 개체를 대상으로 복강 주사를 통해 immunization을 수행하는 것은 매우 번거롭고 또한 경제적/시간적 손실이 필연적으로 뒤따를 뿐만 아니라 작은 어체 크기에서는 그 백신 delivery가 용이하지 못하다는 단점이 있다. 따라서 본 실험에서는 현장 적용성 평가의 일환으로 ETG의 경구 (oral delivery) 투여를 시도함으로써 현장에 적용 가능한 백신 제작 여부를 평가하고자 하였다. 현재까지 어류의 경우 경구 백신

의 개발은 극히 미비한 실정이며 이는 대부분 경구로 투여된 FKC등 사균 백신들이 질병에 대해 방어 효과를 나타낼 만큼의 면역 유도 기능을 어체에서 유발시키지 못하기 때문이다. 그러나 본 연구개발의 ghost 기반 백신 기술은 ghost bacteria 가 갖는 특성상 생균과 거의 유사한 면역 유도기능을 갖고 있으므로 선형 포유동물의 실험적 예에서 경구 투여에서도 우수한 면역 유발의 잠재 능력이 있음이 보고되고 있다. 이에 본 연구에서는 개발된 ETG를 넙치 유영어를 대상으로 경구 투여 방식으로 immunization을 수행하고 immunized된 넙치에서의 면역 유도 능력과 실제 *E. tarda*에 대한 방어 능력을 1차 평가하고자 하였다.

#### 가) 어류 및 경구용 (oral delivery) 재조합 ghost-coated feed 제작

실험어는 10 g ( $\pm$  0.5 g)의 어체 크기를 갖는 넙치를 이용하였고 인근 양어장에서 구입한 계통을 이용하였다. 실험어를 실험실로 이송하고 200 L 수조에서 40 fish/tank의 밀도로 수용한 후 2주간의 순치를 수행하였다. 실험에 이용할 백신을 제작하기 위해서 *E. tarda* FSW910410 strain을 대상으로 상기 본 연구에서 최적화된 온도 프로그램에 의해 배양 및 E-lysis를 유도하였고 백신 제작을 위한 post-washing 및 동결 건조 과정도 상기와 같이 수행하였다. 동결 건조된 백신을 이용하여 sterility를 조사함으로써 안정적인 백신 생산이 이루어졌음을 재확인하였다. 경구 투여를 위한 백신 포함 사료를 제작하기 위해서 동결 건조된 ETG fraction을 PBS 7.2에 suspension을 만들고 일반 상품 넙치 사료(우성사료)를 이용하여 ETG suspension에 침지시켜 항원 coating을 유도하였다. Antigen attached 사료는 실온에서 1시간 동안 건조시켰으며 냉장 보관하면서 실험에 이용하였다. 대조군으로 사용할 FKC 군을 설정하기 위해서 FKC를 앞서 언급한 바와 같이 동일한 방법으로 실험 사료 제작을 실시하였고 무처리 대조군을 설정하기 위해서 antigen 없이 PBS 만을 이용하여 실험사료를 제작하였다.

#### 나) 넙치에 백신의 경구투여 및 시료 채취

앞서 2주간의 순치기간동안 어체에 공급되는 사료 량을 관찰하여 적정 사료 투여량을 실험적으로 측정하였고 이를 바탕으로 ETG 및 FKC의 경구 투여량은 1 mg antigen/fish/day로 조절하여 oral immunization을 실시하였다. 3반복 수조를 이용하여 ETG- 또는 FKC-coated 사료를 공급하였다. 경구 투여 시작부터 5일 연속으로 백신을 공급하였으며 다시 2주 후에 5일간 boosting 용 경구 투여를 실시하였다. 무처리 대조군은 상기 PBS-treated 사료를 공급하였

다. 최종 사료 투여 시점으로부터 2주 후에 각 반복구 수조로부터 10미씩을 무작위로 선별하여 분석을 위한 혈액 및 표피점액을 채취하여 면역 기능분석을 실시하였고 나머지 어류들은 공격 (challenge) 실험에 이용하였다.

#### 다) Ghost 백신의 항체가 영향 평가

경구 경로를 위해 immunized 된 실험 어류들의 항체를 평가하기 위해서 ELISA를 실시하였다. Sandwich 분석에 사용할 ELISA plate를 제작하기 위해서 50  $\mu\text{l}$  FKC (4 mg/ml in PBS)를 이용하여 plate well (flat bottom)을 60°C에서 2시간동안 coating 시켰으며 PBST (PBS supplemented with 0.1% Tween 20)를 이용하여 wash 과정을 거친 후 2% BSA를 이용한 blocking 과정을 수행하였다. Blocking 반응은 37°C에서 1시간동안 실시하였다. Blocking이 완료되면 다시 PBST를 이용하여 post-blocking washing을 실시하였고 곧 75  $\mu\text{l}$ 의 실험 어 혈청 또는 점액을 몇 개의 dilution 농도로 조절하여 설정된 well에서 배양하였다. 배양은 27°C에서 30분간 실시하였다. 반응 후 다시 PBST washing을 수행한 후 연구실에서 제작한 rabbit anti-olive flounder antiserum (1:1000) 75  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 30분간 반응시켰고 PBST로 3회 wash 후 75  $\mu\text{l}$ 의 goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase (1:1000)을 넣고 실온에서 1시간동안 반응시켰다. Post wash 후 발색 반응을 유도하기 위해서 기질인 p-nitrophenyl phosphate을 첨가하고 반응시켰으며 30분간의 발색반응 후에 ELISA reader를 이용하여 415 nm (Bio-Rad) 에서 흡광도를 측정하였다.

#### 라) *In vivo* 생체 방어 효과 평가

상기 면역 능력 평가 외에 실제 경구 투여된 ETG 백신이 넙치의 *E. tarda*에 대한 생체 방어 능력을 부여할 수 있는지를 평가하기 위해 공격 실험을 백신 최종 처리 3주 후 실시하였다. 병원성 세균의 virulence를 증대시키기 위해 상기 틸라피아 실험에서와 같이 넙치를 대상으로 *in vivo* passage를 수행하였고 역시 동일한 방법으로 균주를 분리하여 실험에 이용하였다. 공격실험은 두 종류의 route를 통해서 실시하였다. 첫 번째 challenge는 복강 주사를 통해 실시하였다. 앞서와 같이 제작된 병원성 세균을 무처리 대조군, FKC 및 ETG 군 모두  $5 \times 10^6$  cells/fish로 하여 50  $\mu\text{l}$ 의 injection volume을 이용하여 실시하였다. 두 번째 공격 실험에서는 immersion 경로를 통해 수행하였고 이때 ml 당  $1 \times 10^4$  cells의 침지 농도로 30 분간 실시하였다. 두 실험 모두 수조 효과를 제거하기 위해서 동일 수조 내 3개의 compartment를 구성하여 실험구를 수용하였고 누적 폐사율을 평가하였다. 사망 개체의 경우 *E. tarda* 감염을 확인하기

위해 신장 조직으로부터 *E. tarda*를 분리 동정하였다.

## 2) 넙치 *E. tarda*-MABV 다기능 경구 백신 처리 효과 평가

상기 구축된 dual expression vector (*E. tarda* ghost 발현 및 MABV VP internal part 발현)를 이용하여 넙치를 immunization 하고 *E. tarda*와 MABV의 challenge에 대해서 동시 방어 가능 효과가 있는지를 평가하였다. 이를 위해 앞서 언급된 dual expression vector를 포함하는 재조합 *E. tarda*를 대상으로 표면 발현 유도와 ghost 유도를 실시, 상기와 동일하게 백신을 제조하였다. 실험어는 인근 양어장에서 구입한 넙치를 이용하였고 평균 어체 중은 20 g ( $\pm$  3.9 g)였다. 실험어를 실험실로 이송하고 앞서와 유사한 방법으로 14일간 순치를 실시하고 200 ℓ 수조에서 40 fish/tank의 밀도로 수용한 후 2주간의 순치를 수행하였다. 앞서 2주간의 순치기간 동안 어체 1 개체 당 1일 및 1회 먹는 사료 양을 평가하여 백신 투여량 계산에 이용하였다. 백신의 경구 투여는 어류 1마리당 1일 1 mg antigen (동결 건조 건중량)이 되도록 투여하였고 본 투여량은 ETG  $5 \times 10^8$  cells에 해당되는 양으로 조정하였다. 3반복 수조를 이용하여 ETG- 또는 FKC 처리 백신 코팅 사료를 2주간 경구투여를 실시하였다. 무처리 대조군은 상기 PBS-treated 사료를 공급하였다. 최종 사료 투여 시점으로부터 3주 후 공격 실험을 실시하였다. 공격 실험은 앞서 수행하였던 자료를 바탕으로 (1) *E. tarda* 주사에 의한 공격, (2) MABV 주사에 의한 공격, (3) *E. tarda* 및 MABV의 동시 공격, (4) 비 공격 (대조군)으로 설정하였다. *E. tarda*의 감염 실험은 앞서와 동일한 조건으로 수행하였고 MABV의 경우 예비 실험을 통해 chinook salmon embryo cell line (CISE-214)의 cytotoxicity를 기준으로  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml의 viral stock을 50  $\mu$ l로 공격하였다. 감염 실험시 두 병원체 (*E. tarda* 및 MABV)의 병원성 활성 온도가 서로 크게 다른 점을 고려하여 *E. tarda*는 24-25 $^{\circ}$ C에서 MABV는 17-18 $^{\circ}$ C에서 실시하였고, 동시 공격은 24-25 $^{\circ}$ C와 17-18 $^{\circ}$ C를 나누어 실시하였다. 각 공격 실험별로 반복구 당 12미씩을 이용하였고 각 공격구 당 2반복 공격 실험을 실시하였다.

## 제7항 재조합 다기능 백신의 유효능 개선 및 안전성 최적화

### 가. 재조합 발현 다기능 백신 개선의 필요성

이상의 본 연구개발을 통해서 유효 방어 능력이 우수한 *E. tarda* ghost 백신과 또한 *E. tarda* ghost 내 외래 항원을 표현할 수 있는 다기능 백신 발현

시스템이 구축되었다. 그러나 본 연구개발의 효과를 극대화하고 실용화를 가속화하기 위해서는 현재까지 구축된 발현 시스템으로부터 다음의 사항에 관한 기능성 개선과 안정성 확보가 요구되었다. 따라서 본 연구개발에서는 보다 고급화된 다기능성 발현 시스템을 구축함으로써 백신의 효과를 증대시키기 위한 연구개발을 수행하였고 그 주요 연구 내용과 범위는 다음과 같다. 첫째, 상기 구축된 **dual expression** 벡터의 항원 유전자 발현은 종래의 IPTG 유도를 이용한 **tac** 프로모터 기반의 전사 발현 기작을 받는다. 그러나 본 종래의 발현 시스템은 대량 발현시 고가의 IPTG 유도체가 이용되어야 하므로 산업적 유효성이 적고 백신의 단가를 상승시키는 주요 요인으로 작용할 수 있다. 특히 포유류와는 달리 많은 개체수를 대상으로 한 양식 어류 백신의 경우 백신의 경제성 확보는 필수적이다. 따라서 본 발현 시스템 개선을 위한 본 연구개발의 제1주제는 항원 단백질을 항시 구성적 고발현 (**high constitutive expression**) 이 가능한 신규 프로모터들을 발굴하여 이들에 의한 경제적인 외래 항원의 표면 발현을 가능케 하는 것이다. 둘째, 현재까지 개발된 *E. tarda ghost* 백신은 세포의 화학적 처리 또는 생존력 제거 가능 수준까지의 고온 처리 등을 수행하지 않고 세포질을 인위적으로 제거함으로써 생산되는 사균 백신이다. 본 개발을 통해서 *E. tarda ghost*의 경우 생존력 제거 능력이 99.999% 이상이며 그 유효 방어능력도 FKC에 비해서 월등한 것으로 나타났다. 그러나 대량 생산 시 99.999% 이상의 생존력 제거라 할지라도 소수의 재조합 균주의 생태계 노출은 바람직하지 못하며 또한 식용으로 사용될 어체에 항생제 내성 유전자를 포함하는 플라스미드의 잔존 가능성은 상품의 안전성 논란을 가져올 수 있다. 따라서 최적화를 위한 제2주제는 *E. tarda ghost*의 생존력을 더욱 완벽하게 제거할 뿐만 아니라 세포질과 함께 세포내 잔여 DNA를 *ghost* 발현 유도와 함께 제거함으로써 염색체 DNA와 플라스미드 DNA를 제조 백신으로부터 제거하는 기술을 개발하는 것이다. 그 외 재조합 유전자의 발현 시 항원 단백질의 면역원성을 증대시킬 수 있는 방안으로서 enterotoxin subunit B (LTB)를 이용한 fusion protein cassette system을 추가로 개발하고 아울러 필요시 각 벡터 구성성분의 개선 조작을 실시하였다. 연구개발 내용과 방법은 다음과 같다.

#### 나. 항시 고발현 유용 프로모터로의 개선 및 최적화

유전자 발현 기술을 이용, 유용 유전자로부터 재조합 단백질을 세포 주에서 대량생산하거나 특정 세포의 단백질 발현을 조절 또는 조작하는 기술은 다양한 유전 공학 및 발효공학 분야에서 중요한 핵심 기술 중 하나이며, 본 기술은 특히 축산 및 수산 동물의 특정 질병에 대한 재조합 예방 백신의 생산을 위해서

도 매우 중요시된다 (Tijhaar *et al.*, 1994; John *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, *Aquaculture*, 2005). 현재까지 대장균, 효모 및 동식물 세포 등을 이용하여 목적 유전자 산물을 발현하기 위해서 각각의 숙주세포에 적합한 프로모터들을 이용한 발현시스템들이 개발되고 사용되고 있으며 이중 특히 미생물 발현계의 경우 대장균을 중심으로 (1) *lac* 및 *tac* 프로모터 등을 이용한 발현, (2) *lac* 조절 부위와 T7 중합효소 (polymerase)를 이용한 발현, 그리고 (3) *lambda* phage PR 프로모터/CI 억제자 및 고온 자극을 이용한 발현 시스템들이 가장 빈번히 이용되고 있다 (Sambrook and Russell, 2001; Gellissen, 2004). 그러나 이들 종래의 유도 발현 시스템들은 *lac*, *tac*, *lac*/T7 프로모터들의 경우 목적 유전자의 발현을 위해서 IPTG 등 고가의 유도체를 필연적으로 이용해야만 하기 때문에 산업적인 대량 생산 시 종종 경제적이지 못하며, 또한 *lambda* PR/CI 발현 시스템의 경우 대규모 배양기의 정밀한 온도 변화 프로그램의 번거로움 및 재조합 단백질의 고온 노출에 의한 단백질 활성 및 회수시의 악영향 등이 문제시될 수 있다 때문에 숙주세포의 성장에 큰 악 영향을 미치지 않는 재조합 단백질 등의 경우 화합물 또는 고온 유도 의한 유전자의 유도 발현 조작 없이도 미생물 세포의 성장과 함께 지속적인 항시 고효율 발현 시스템들이 종종 중요시 된다 (Dunn and Handelsman, 1999; Chen *et al.*, 2003; Carlier and von Bodman, *J. Bacteriol.*, 2006; Sun *et al.*, 2006).

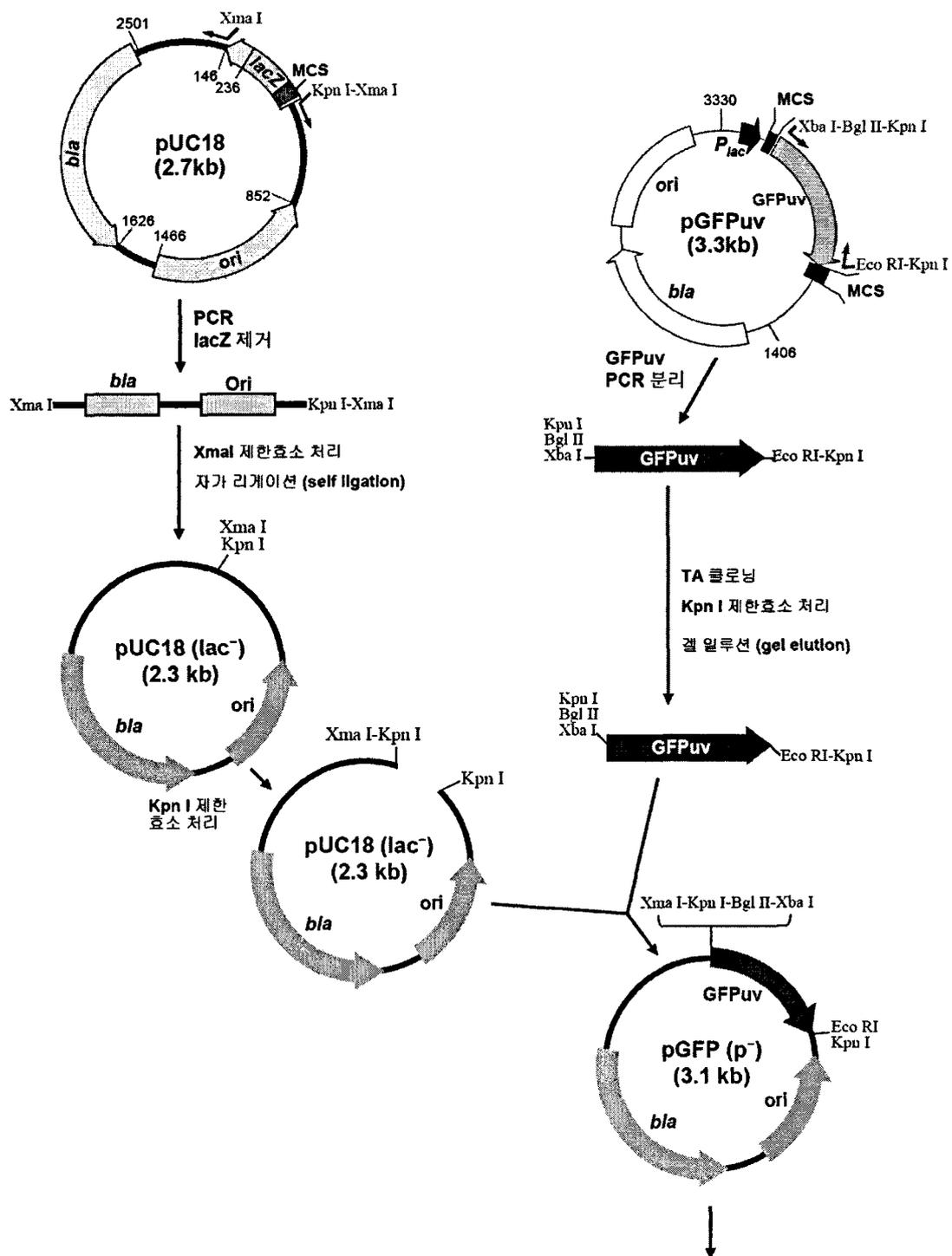
이에 본 연구개발은 어류 병원성 세균인 에드워드균으로부터 신규 프로모터를 발굴함으로써 본 에드워드균 및 대장균에서 유도 화합물 또는 온도자극 프로그램을 전혀 사용하지 않고 경제적으로 목적 유전자를 고발현 시킬 수 있는 기술을 개발하고자 하였다. 특히 질병 예방을 위한 유전공학적 백신 생산 시 가축 등의 육상동물과는 달리 양식 어류의 경우 월등히 많은 개체수를 대상으로 백신 처리를 수행해야한다는 점을 고려 할 때, 저렴하고 경제적인 재조합 발현 기술은 양식 어류 용 재조합 백신 생산의 경제성 측면에서 매우 중요시되며, 따라서 본 개발은 양식어류 재조합 백신 제조의 생산성 개선에 특히 크게 기여할 수 있다. 이에 본 연구개발에서는 백신 제조에 이용할 *E. tarda*로부터 homologous promoter를 발굴하고 이들로부터 항시 고발현 가능 프로모터를 발굴 평가하고자 하였다. 그 연구개발 방법은 다음과 같다.

#### 1) 프로모터 trap 플라스미드 벡터 제조

에드워드균 염색체 DNA 절단 산물로부터 프로모터로 작동하는 서열들을 스크리닝하기 위해서 다음의 프로모터 트랩 (promoter trap)용 플라스미드를 제조하였다. 프로모터 작동 여부의 확인을 위해서 녹색형광단백질(green

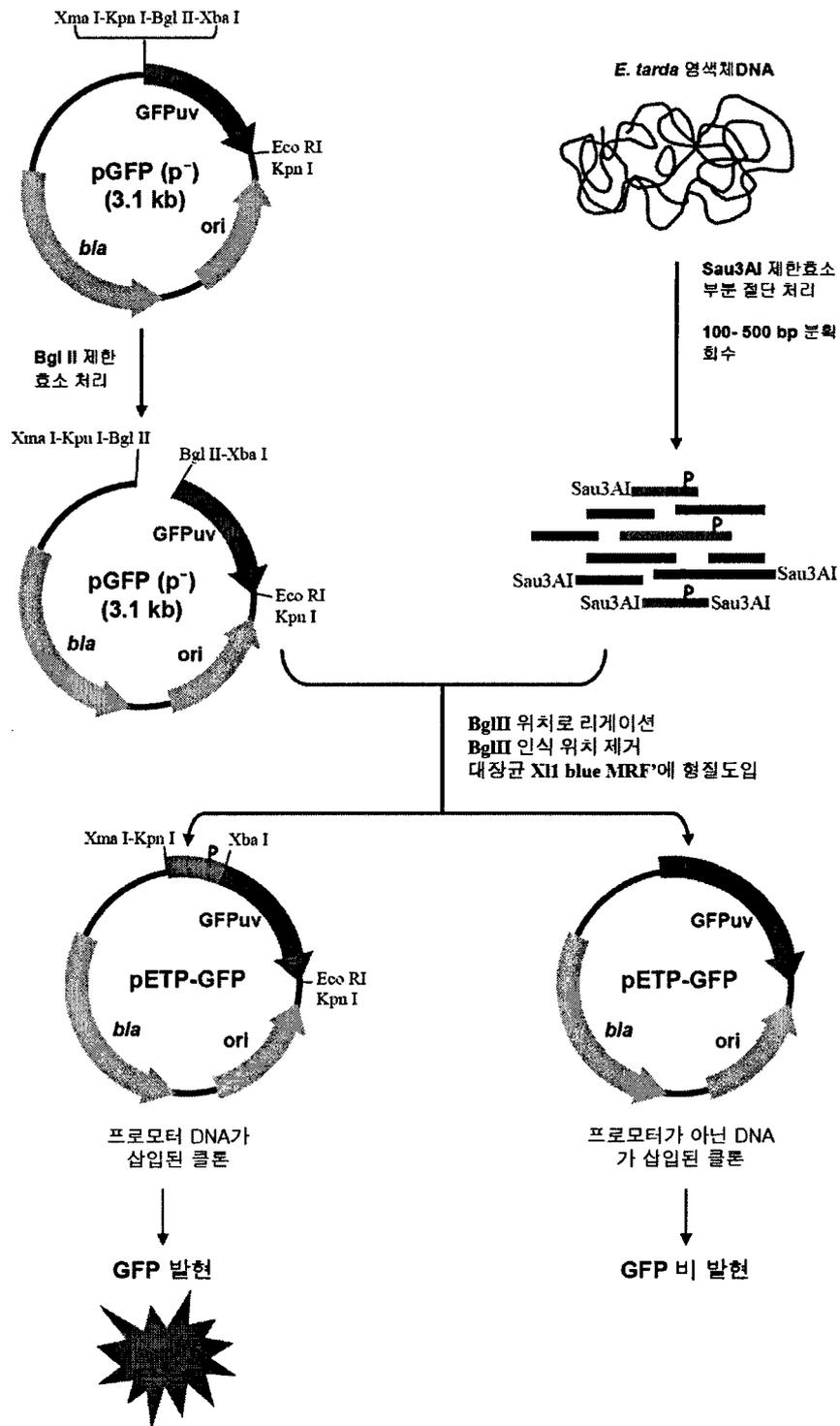
fluorescence protein) 유전자를 리포터 유전자로 이용하였고 대장균에서 스크리닝을 위해서 pUC18 플라스미드를 대상으로 lac 프로모터, 멀티클로닝 사이트, lacZ' 유전자 등을 제거하고 항생제 내성 유전자 및 증식(복제) 기점 등을 포함하는 플라스미드 백본 (backbone) 틀만을 남긴 후, 자외선에서 녹색형광을 강하게 나타내는 녹색형광단백질 유전자 (GFPuv; Clontech, USA)를 삽입시켜 프로모터 스크리닝용 벡터를 제작하였다. 그 구축 모식도는 [도 M8]에 나타내었고 그 자세한 반응은 다음과 같다. 첫째, pUC18 플라스미드로부터 lac 프로모터와 lacZ' 유전자를 제거하기 위해서 프라이머 pUC18 FW (5'-atatcccGGGAGAGGCGGTTTGC GTATT-3'; 서열번호 1) 및 탐침 프라이머 pUC18 RV (5'-attcccgggtaCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATC-3'; 서열번호 2)을 합성하였고 이때 pUC18 FW 프라이머 5'-말단에 제한효소 Xma I 절단 인식 서열 (CCCGGG)과 말단의 제한효소 위치를 보호하기 위한 임의의 4개 염기 (ATAT)가 형성되도록 말단 조작을 수행하였다. 한편 프라이머 pUC18 RV의 5-말단에는 두 개의 제한효소 (Xma I 및 Kpn I)의 인식서열 (CCCGGGTACC)이 연속적으로 포함되고 제한효소 위치 말단을 보호하기 위한 3개의 염기 (ATT)를 삽입하여 조작하였다. 따라서 상기 서열번호 1 및 2에서 소문자는 인위적으로 삽입된 서열을, 그리고 밑줄로 표시된 염기는 제한효소 인식위치를 나타낸다. PCR 증폭은 아래의 반응 조성물을 이용하여 최초 변성 (initial denaturation; 94℃에서 3분) 후, 변성 (denaturation; 94℃에서 30초), 결합 (annealing; 58℃에서 45초), 연장 (elongation; 72℃에서 1분 30초)의 총 30회의 열 순환 반응을 실시하고 최종 연장 (final elongation; 72℃에서 5분)을 수행하였다.

주형 (template) DNA 100 ng	2 $\mu$ l
Expand High Fidelity PCR mix (Roche)	1 $\mu$ l
제조사 10X 완충 용액	5 $\mu$ l
dNTP mix (2.5 mM)	5 $\mu$ l
프라이머 pUC18 FW (5 uM)	5 $\mu$ l
프라이머 pUC18 RV (5 uM)	5 $\mu$ l
멸균 3차 증류수	27 $\mu$ l
계	50 $\mu$ l



[도 M8]

신규 향시 고발현 *E. tarda* 프로모터 발굴용 벡터 구축 및 작용 원리



[도 M8 계속]

신규 항시 고발현 *E. tarda* 프로모터 발굴용 벡터 구축 및 작용 원리

PCR 반응이 완료되면 1% 한천 겔 전기영동을 통해 정확한 증폭이 이루어졌음을 확인한 후 Qiagen PCR purification kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 PCR 산물을 정제한 후 PCR 정제 산물을 *Xma* I (Promega, USA) 제한효소를 이용하여 2시간 동안 37°C에서 절단하였다. 제한효소 반응의 조성은 다음과 같다.

정제 증폭 DNA 산물	10 $\mu$ l (1 $\mu$ g)
<i>Xma</i> I	2 $\mu$ l
제조사 10X 완충 용액	3 $\mu$ l
멸균 3차 증류수	5 $\mu$ l
계	20 $\mu$ l

제한 효소 반응이 완료되면 다시 상기 PCR purification kit를 이용하여 제한효소 산물을 정제한 후 *Xma* I 절단 부위를 통한 자가 라이게이션 (self-ligation) 반응을 다음과 같이 실시하였다. 반응은 16°C에서 12시간동안 수행하였다.

정제 DNA 절단 산물	20 $\mu$ l (100 ng)
T4 DNA 리가아제 (ligase; Promega, USA)	3 $\mu$ l
제조사 10X 완충 용액	3 $\mu$ l
멸균 3차 증류수	4 $\mu$ l
계	30 $\mu$ l

라이게이션 반응이 완료되면 반응물 10  $\mu$ l를 취하여 종래 상용화된  $Ca^{2+}$  대장균 형질도입법을 통해 대장균 균주 XL-blue MRF' 에 형질도입을 실시하였다. 형질도입 반응 후 ampicillin (100  $\mu$ g/ml)이 첨가된 LB 고체 배지에 균을 도말하였고 성장한 형질도입 균주로부터 플라스미드 DNA를 추출하여 정확한 크기의 목적 플라스미드 백본이 제조되었는지를 전기영동 상으로 확인하였고 상기 플라스미드를 pUC18(lac')로 명명하였다 [도 M8]. 분리된 플라스미드 3  $\mu$ g을 이용하여 *Kpn* I 제한 효소로 절단한 후 이번엔 자가 라이게이션 (self-ligation)을 방지하기 위해 탈인산화 효소 (alkaline phosphatase; Roche, Germany)를 제조사의 권고대로 처리한 후 다시 순수 겔 용리 (gel elution) 분리 과정을 통해 *Kpn* I 절단된 플라스미드를 회수하였다. 절단된 *Bgl* II 위치로 리포터 유전자인

녹색형광단백질 유전자 단편을 삽입하기 위해서 pGFPuv (Clontech, USA) 플라스미드로부터 다음의 두 탐침 프라이머들을 이용하여 GFPuv 유전자를 분리 증폭하였다. 이때 각 탐침의 5'-말단 영역에 추후 클로닝을 용이하게 하기 위해서 제한효소 절단 인식 서열을 인위적으로 삽입하였다. 프라이머 GFPuv 1F의 5'-말단에는 *Kpn* I (GGTACC), *Bgl* II (AGATCT) 및 *Xba* I(TCTAGA)의 순차적 인식 서열 (GGTACCAGATCTAGA)이 형성되도록 말단을 조작하였고 GFPuv 1R의 5'-말단에는 *Kpn* I (GGTACC)을 인위적으로 삽입시켜 pGFPuv 플라스미드 내 GFPuv 3'-말단에 연이어 있는 *Eco*RI (GAATTC)의 절단 위치와 함께 두개의 제한효소 인식 위치가 순차적으로 형성 (GGTACCGAATTC)되도록 하였다. 두 프라이머들의 염기서열은 아래와 같으며 인위적으로 삽입시킨 서열은 소문자로 그리고 제한효소 인식서열은 밑줄로 표시하였다.

GFPuv 1F: 5'-ggtaccagatctagATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTGG-3'

GFPuv 1R: 5'-ggtaccGAATTCATTATTTGTAGAGCTCATCCATGCC-3'

상기 프라이머들을 이용하여 PCR 증폭을 아래의 반응 조성물을 이용하여 실시하였으며 열순환 반응은 최초 변성 (initial denaturation; 94°C에서 3분) 후, 변성 (denaturation; 94°C에서 30초), 결합 (annealing; 56°C에서 30초), 연장 (elongation; 72°C에서 1분)의 총 30회 실시하고 최종 연장 (final elongation)은 72°C에서 5분간 실시하였다.

주형 (template) DNA 100 ng	2 $\mu$ l
Expand High Fidelity PCR mix	1 $\mu$ l
제조사 10X 완충 용액	5 $\mu$ l
dNTP mix (2.5 mM)	5 $\mu$ l
GFPuv 1F (5 uM)	5 $\mu$ l
GFPuv 1R (5 uM)	5 $\mu$ l
멸균 3차 증류수	27 $\mu$ l
계	50 $\mu$ l

PCR 반응이 완료되면 상기와 같이 PCR 산물을 정제하였으며 정제된 산물은 pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 TA 클로닝을 제조사의 권고대로

실시하였다. 동정된 GFPuv 유전자 삽입 재조합 플라스미드를 분리하였고, 앞서 제한효소 절단 반응과 유사하게 *Kpn* I 제한효소를 이용하여 플라스미드 DNA를 소화시켰다. GFPuv 유전자 절단 산물을 겔 용출 방법으로 순수 분리하였다. 상기 확보된 *Kpn* I 절단된 플라스미드 pUC18(lac<sup>-</sup>)과 GFPuv 유전자 단편간의 라이게이션 반응 (16°C 12시간)을 다음과 같이 실시하였다.

pUC18(lac <sup>-</sup> ) (100 µg)	2 µl
GFPuv 절편 (60 ng)	2 µl
T4 DNA 리가아제	1 µl
제조사 10X 완충용액	2 µl
멸균 3차 증류수	3 µl
계	10 µl

라이게이션 반응이 완료되면 반응 물 8 µl를 이용하여 앞서 기술한 대로 대장균에 형질도입 시켰으며 형질전환 대장균으로부터 plasmid DNA를 추출 후 염기서열 분석을 통해 요구되는 방향으로의 라이게이션 반응이 이루어졌음을 확인하여 프로모터 스크리닝 용 GFP 발현 플라스미드를 구축하였고 상기 확보된 플라스미드를 pGFP(p)으로 명명하였다 [도 M8]. 구축된 pGFP(p) 플라스미드를 포함하는 재조합 대장균을 자외선 조사 시 녹색형광이 발현되지 않음을 확인함으로써 따라서 상기 완성된 프로모터 스크리닝용 플라스미드 벡터는 프로모터의 삽입 없이는 GFP 단백질을 발현하지 않지만 GFPuv 유전자의 업스트림 (upstream)쪽으로 프로모터로 작동 가능한 DNA가 삽입될 경우 GFPuv 단백질을 발현하도록 설계되었다.

완성된 pGFP(p)는 클로닝 과정을 통해 GFPuv 유전자 앞에 4개의 제한효소 종류 (*Xma* I, *Kpn* I, *Bgl* II 및 *Xba* I) 로부터 인식되는 제한효소 인식 부위를 갖고 있도록 구축되었으며 이중 *Kpn* I의 경우 GFPuv 유전자 말단을 역시 인식하므로 *Kpn* I을 제외한 *Xma* I, *Bgl* II 및 *Xba* I 인식 위치로 프로모터 DNA를 받아들일 수 있다. 이 중 일반적으로 염색체 DNA의 제한 효소 부분 소화 (partial digestion)의 경우 *Sau*3AI 제한효소가 효과적으로 이용되는 점을 고려할 때 본 개발에서는 *Sau*3AI의 절단 DNA 산물을 받아들일 수 있는 *Bgl* II를 통한 프로모터 삽입이 이루어지도록 하였다. 따라서 본 개발은 도 1에서 나

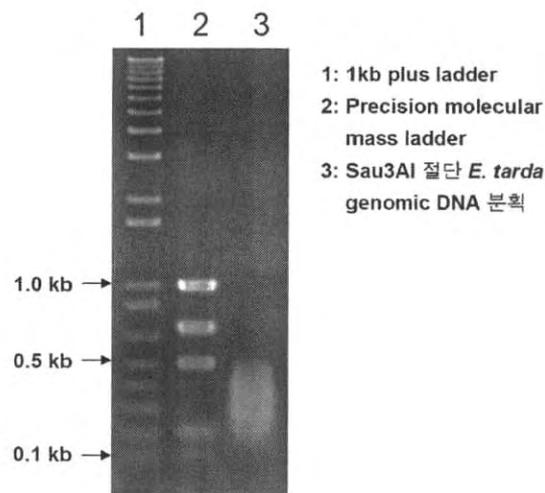
타넨 바와 같이 pGFP(p)를 *Bgl* II로 소화 시키고 *Sau*3AI으로 부분 절단된 에드워드균 염색체 DNA의 분획을 라이게이션 시켰으며 이때 라이게이션 과정 중 *Bgl* II 인식 위치는 제거된다. 라이게이션이 완성된 반응물을 제조합 대장균에 형질도입하게 되면 pGFP(p)의 GFPuv 유전자 앞으로 프로모터로 작동할 수 있는 DNA 서열이 삽입되면 GFP를 발현 형광 발색 대장균 클론을 동정할 수 있으며, 반면 프로모터가 아닌 DNA가 삽입될 때에는 GFP가 발현하지 않게 된다 [도 M8].

## 2) 프로모터 trap

본 개발을 위해 사용된 균주는 어류 병원성 세균 에드워드균 (균주 FSW910410)이다. TSA 한천 배지 (DIFCO)에서 성장한 단일 클론을 액체 배지 TSB 액체 배지에 접종하여 28°C에서 18시간 동안 진탕 배양한 후 진탕 배양된 세균으로부터 DNA를 추출하기 위해 다음의 추출 방법을 이용하였다. 진탕 배양된 세균 10 ml을 회수하여 완충 용액 (10 mM Tris-Cl, 1mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0) 3 ml를 넣고 현탁시키고 곧바로 2.5 mg/ml의 라이소자임 (Sigma, USA) 용액을 15 µl를 첨가 후 잘 섞어 준 다음 실온에서 10분간 방치하였다. 실온 반응 후 20% sodium dodecyl sulfate (SDS)를 150 µl 첨가 후 65°C에서 3분간 반응시켰다. 이후 단백질 분해효소 proteinase K (20 mg/ml Promega, USA)를 15 µl 첨가하고 50°C에서 2시간 동안 반응하였으며 세포 용해가 완료 되면 동일 양의 페놀:클로로포름 (1:1)을 이용하여 잘 섞어 준 후 원심 분리 (13000 rpm; 10분)을 통해 상등액을 회수하였고 동일한 방법으로 2회 더 수행하였다. 최종 얻은 상층액에 동일 양의 isopropanol을 첨가하여 DNA를 침전시키고 원심분리 (13000 rpm; 5분)을 통해 DNA를 회수하였다. 회수한 DNA를 70% ethanol을 이용하여 1회 세척한 후 DNA를 건조시키고 멸균수에 녹여 이용하였다. 멸균수에 녹인 DNA 5 µg을 제한효소 *Sau*3AI (Promega, USA) 3 units를 이용하여 다음의 반응 조성 조건을 이용하여 37°C에서 2시간 동안 절단하였다.

DNA (20 µg)	28 µl
<i>Sau</i> 3AI (6 units/µl)	0.5 µl
10X buffer	10 µl
Sterile water	61.5 µl
Total	100 µl

전기영동을 통해 절단이 잘 이루어 졌는지를 확인하기 위해 절단 산물 2  $\mu$ l를 1% 한천 (agarose) 겔 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 ethidium bromide 염색을 통해 절단 양상을 평가한 후 요구되는 약 100 ~ 500 bp의 절단 길이에 해당되는 DNA만을 agarose gel로부터 회수하였다. 겔 용출 회수를 위해서 Qiagen Agarose Gel Elution kit (Qiagen, Germany)를 제조사의 권고 방법대로 수행하였으며 최종 회수된 산물의 크기와 농도를 재확인하기 위해서 1% 한천 겔 전기영동 및 흡광도 측정 (OD 260 nm)을 실시하여 평가하였다. [도 M9]는 회수된 에드워드균 절단DNA의 전기영동 상을 보여주며 전기영동 상을 볼 때 원하는 대략 크기의 절단 분획이 효과적으로 회수되었음을 잘 보여주고 있다.



[도 M9]

*E. tarda* 프로모터 발굴용 염색체 부분 절단 및 회수 전기영동 상

상기 실시들에서 확보된 *Sau3AI*-절단 에드워드균 염색체 DNA들은 구축된 프로모터 스크리닝용 플라스미드 내 *Bgl* II 절단 위치와 동일한 말단 염기서열을 갖게 되므로 두 분자간의 라이게이션 반응이 가능하다. 이때 *Bgl* II 절단 pGFP(p) 벡터들의 자가 결합을 방지하기 위한 탈인산화 효소 처리를 앞서와 같이 수행하였고 *Sau3AI*과 절단 염색체 DNA들 간의 라이게이션 반응은 16°C에서 12시간동안 수행하였으며 그 반응 조성물은 다음과 같다.

Bgl II 절단 pGFP(p)	5 $\mu$ l (100 ng)
Sau3AI 절단 염색체 DNA	1 (30 ng)
T4 DNA 라이게이즈 ligase	1 $\mu$ l
제조사 10X 완충용액	1 $\mu$ l
멸균 3차 증류수	2 $\mu$ l
계	10 $\mu$ l

라이게이션 반응이 완료되면 앞서 기술한 대로 대장균에 형질 도입시켰으며 이때 박테리아 클론들 간의 단일 분리를 용이하게 하기 위해서 지름 15 cm LB 고체 한천배지 5장에 나누어 도말하였다. 한천 배지에 항생제 (ampicillin)를 100  $\mu$ g/ml 농도로 첨가하여 재조합 균주만을 선발토록 하였다. 상기 반응을 총 3회 반복하여 수행함으로써 충분한 수의 박테리아 클론이 확보되도록 하고 얻어진 15장의 배지로부터 GFP 유전자의 고발현 (녹색 형광)을 보이는 대장균 박테리아 클론들을 자외선 (UV) 하에서 다른 배지들로 옮겨 GFP 발현을 확인하였다. 이를 위해 형광이미지 분석 장비인 VersaDoc 4000 (Bio-Rad, USA)과 분석소프트웨어인 Quantity-One (Bio-Rad, USA)를 이용하여 자외선을 박테리아 클론들에 조사시키고 GFP 형광 검출 여부를 분석하였다.

### 3) 염기서열 분석, 생물정보분석, 프로모터 trimming 및 프로모터 선발

상기 GFPuv 발현 재조합 대장균 클론들을 항생제가 첨가된 액체 LB 배지에서 12시간동안 진탕 배양 후 플라스미드를 회수하였으며 플라스미드 전기영동을 통해 다양한 길이의 DNA가 삽입되어 있음을 확인하였다. 1차 선발된 총 69개의 후보 클론들로부터 플라스미드 DNA를 회수하였으며 회수된 플라스미드를 대상으로 탐침 PROSEQ FW (5'-GAGACGGTCACAGCTTGTCT-3'; 서열번호 5) 및 탐침 PROSEQ RV (5'-TTGCATCACCTTCACCCTCT-3'; 서열번호 6)를 이용하여 염기서열 분석을 실시하였다. 염기서열 분석을 통해서 GFP 유전자 앞쪽 Bgl II 위치로 삽입된 프로모터 염기서열들을 확보하였다. 확보된 각 염기서열을 대상으로 유전자 프로모터 예상 프로그램인 SOFTVERRY (<http://softberry.com/berry.phtml>)와 FRUITFLY ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html))를 이용하여 예상 프로모터 위치를 예측하였다. 분석한 클론 총 69 개중 비교적 높은 발현 강도를 나타내는 보이는 상위 클론 10개를 대상으로 예측된 프로모터 부위만을 다시 정밀 분리하기 위해서 2차 선발된 각 10개의 클론들을 이용, 프로모터 부위만을 증폭할 수 있는 PCR 탐침을 합성하였으며

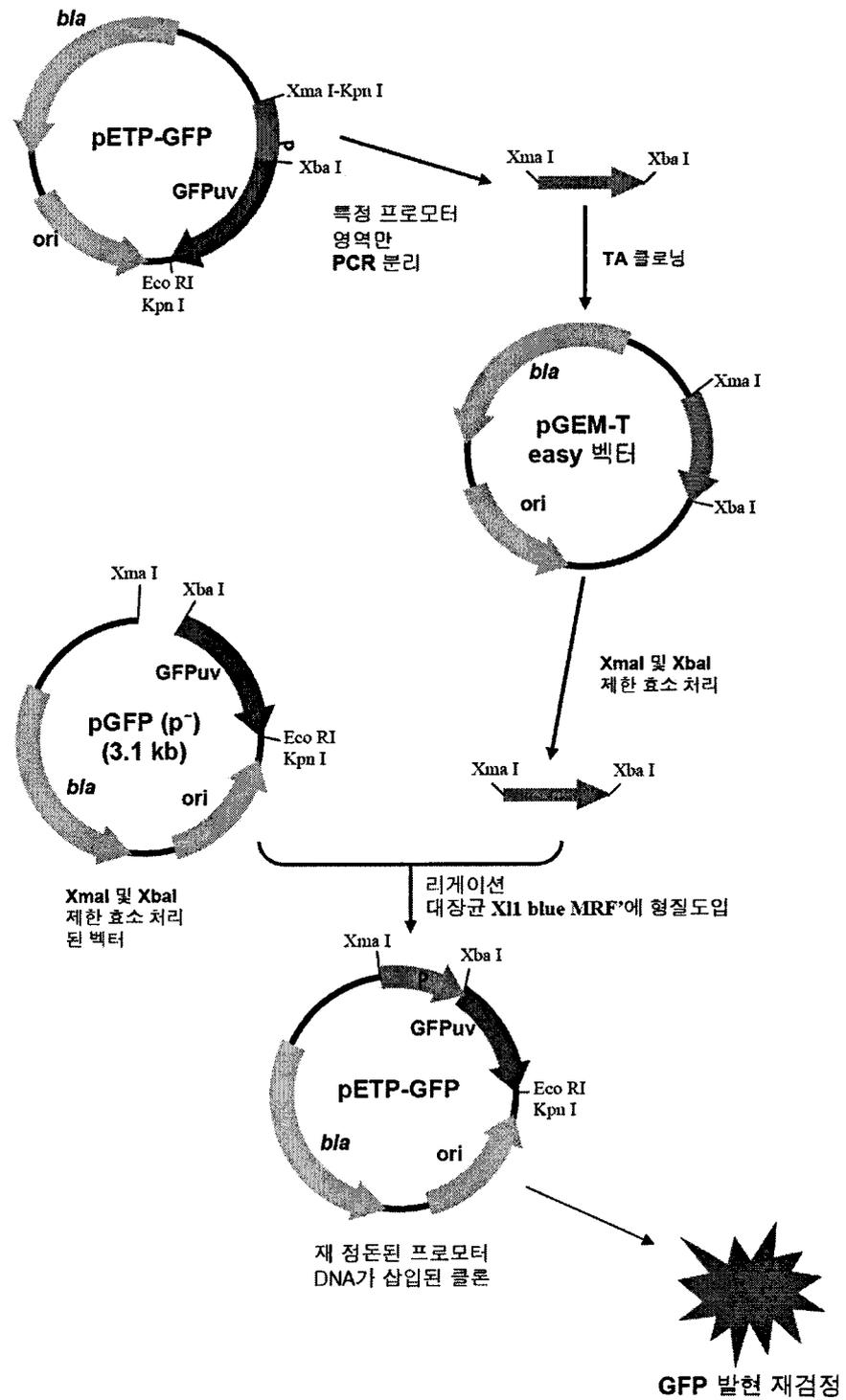
이때 클로닝을 용이하게 하기 위해서 프로모터라고 판단되는 영역의 5'-말단에는 *Xma* I 인식 위치를 그리고 3'-말단에는 *Xba* I 인식 위치를 인위적으로 첨부하였다. PCR 증폭 산물은 pGEM T-easy 벡터 (Promega, USA)에 TA 클로닝을 실시하고 다시 *Xma* I 및 *Xba* I 제한효소 소화 반응을 통해 겔 용리 (gel elution) 분리를 수행하고 *Xma* I 및 *Xba* I 제한효소로 절단된 SD sequence가 보완된 pGFP(P')와의 라이게이션 반응을 수행하였다. 라이게이션 반응이 완료되면 대장균 XL1 blue MRF' 균주에 다시 형질도입시켜 GFP 발현을 재분석하였다 [도 M10].

이때 프로모터 활성 평가를 위한 대조군 프로모터로서 현재 상용화되고 있는 항시 고발현 발현벡터 (pHCE vector; Takara) 내 GFPuv 유전자가 삽입된 플라스미드 (pHCE IIB-GFP)를 구축하여 XL1 blue MRF' 균주에 다시 형질도입시킨 후 이용하였다. pHCE IIB-GFP를 구축하기 위해서 pGFPuv (Clontech, USA) 플라스미드로부터 GFPuv 유전자를 PCR 분리하기 위해 사용한 각 탐침의 5'-말단에 제한효소 *Eco* RI과 *Hind* III 인식 위치를 삽입시켰다. [도 M11]은 pHCE IIB-GFP 대조군 플라스미드 구축에 관한 모식도를 나타낸 것이다. 클론들에 포함된 프로모터들의 발현 상대 정량을 실시하기 위해서 재조합 균주들을 흡광도 OD 600 nm의 0.8까지 ampicillin 함유 LB 배지에서 진탕 배양시킨 후 동일한 균수  $5 \times 10^8$  cells만큼씩을 100  $\mu$ l LB에 농축하여 자외선 통과 가능 96 well plate에 놓고 VersaDoc 4000 형광이미지 분석 장비 (Bio-Rad, USA)를 이용하여 GFP의 발현정도 (형광강도)를 상대 비교하였다. 독립적으로 배양된 클론별 3 반복구를 두어 발현 수준을 상대 비교하였으며 앞서 양성대조군인 pHCE IIB-GFP와 함께 음성 대조군 (negative control)으로서 프로모터를 함유하지 않는 GFP 벡터인 pGFP(P')를 함유하는 재조합 클론을 설정하여 발현 평가를 실시하였다.

#### 4) 선발 프로모터의 평가

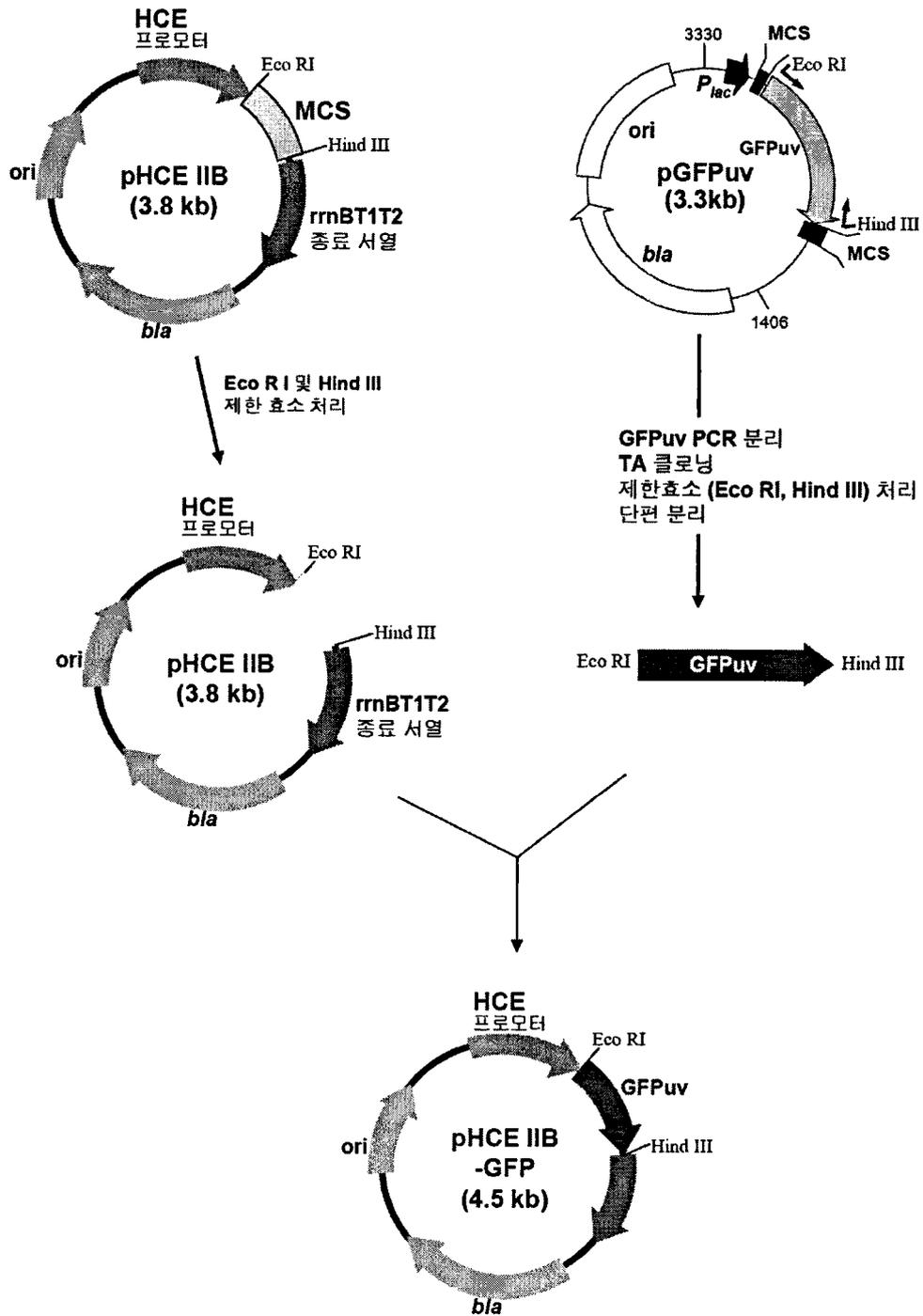
##### 가) 항시 구성적 고발현 (high constitutive expression) 가능 여부

상기 ETP-X 및 ETP-Y 및 EPT-Z 프로모터를 포함하는 GFP 발현 벡터 (pETPX-GFP, pETPY-GFP 및 pETPZ-GFP)를 이용하여 1 l 배양을 통해서 항시 고발현을 재확인하였다. 각 클론을 함유하는 재조합 균주 (XL-1 blue MRF') 단일 클론을 10 ml 항생제 (ampicillin 100  $\mu$ g/ml) 포함 LB 배지 (aLB)에 접종하여 10시간동안 진탕 배양 후 다시 1 L aLB 배지로 옮겨 16-18시간동안 37°C에서 진탕배양을 실시하면서 OD 600nm= 1.0까지 성장시켰다.



[도 M10]

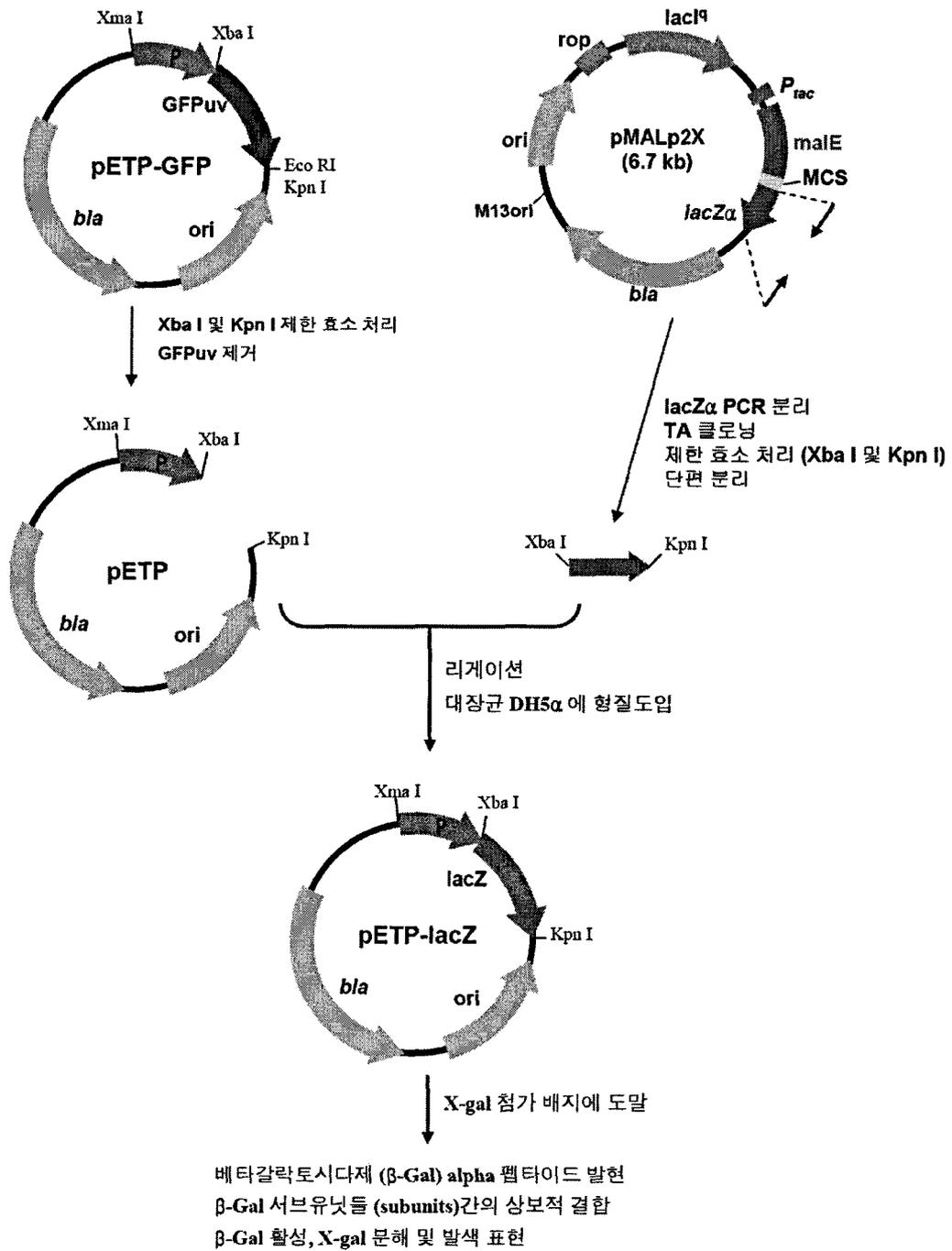
1차 발굴된 *E. tarda* 프로모터의 trimming 및 GFP 재검정



[도 M11]

*E. tarda* 고발현 프로모터 (E-HCE)의 상대활성을 평가하기 위한  
 상업용 pHCE IIB-GFP 벡터 구축

원심분리로 균을 회수한 후 10 ml의 aLB 배지에 현탁시킨 후 이중 150  $\mu$ l를 취하여 1.5 ml tube로 옮겨 GFP의 발현을 자연광 및 자외선광 하에서 육안으로 확인하였다. 이때 역시 양성 및 음성 대조군으로서 pHCE IIB-GFP와 pGFP(P)를 각 포함하는 재조합 균주를 함께 설정하여 발현 평가를 수행하였다. 상기 선발 프로모터들 (ETP-X, ETP-Y 및 ETP-Z)이 상기 GFP 리포터 유전자 외에 다른 다운스트림 유전자 역시 고효율 발현을 유발시킬 수 있음을 확인하기 위해서 상기 pETPX-GFP, pETPY-GFP 및 pETPZ-GFP 플라스미드 벡터로부터 GFPuv 유전자를 대장균 beta-galactosidase  $\alpha$  fragment (lacZ') 유전자로 교체하여 그 발현 여부를 확인하였다. 그 모식도는 [도 M12]에 나타내었고 그 자세한 반응은 다음과 같다. 상기 3종의 에드워드균 프로모터 함유 플라스미드 벡터들을 대상으로 *Xba* I 및 *Kpn* I으로 제한효소 소화 반응을 실시하고 GFPuv를 제외한 플라스미드 부분을 겔 용리 (gel elution) 반응을 통해 회수, 확보하였다. LacZ' alpha peptide 유전자 단편을 확보하기 위해서 pMALp2X 플라스미드 벡터 (New England BioLabs; NEB, USA)에 존재하는 lacZ' 유전자 단편을 아래의 탐침들을 이용하여 PCR 분리를 (최초 변성 94°C에서 3분; 변성 94°C에서 30초; 결합 55°C에서 30초; 연장 72°C에서 30초; 총 30회 열순환 반응) 수행하였다. 이때 클로닝을 용이하게 하기 위해서 각 탐침의 5'-말단에 제한효소 *Xba* I (TCTAGA) 및 *Kpn* I (GGTACC) 인식 위치를 인위적으로 삽입시켰으며 또한 pMALp2PX에 결실되어 있는 대장균 lacZ 유전자의 최초 6개 아미노산 코딩 염기서열 (밑줄 표시)도 인위적으로 LacZ A1F 탐침 서열에 첨가하여 PCR을 수행하였다. PCR 증폭된 산물들은 앞서 방법대로 pGEM T-easy vector (Promega, USA)에 TA 클로닝을 수행한 후 *Xba* I/*Kpn* I 제한효소 소화 반응과 겔 용리 반응을 통해 lacZ 유전자 단편을 순수 분리하였다. 분리된 단편을 이용 상기 GFPuv 유전자가 제거된 플라스미드벡터내로 라이게이션 반응을 앞서와 유사하게 실시하였다. 대장균 DH5a에 형질도입 후 정확한 재조합 클론들을 동정하여 확인된 클론들을 각각 pETPX-lacZ, pETPY-lacZ 및 pETPZ-lacZ로 명명하였다. 상기 3종의 lacZ' 발현 플라스미드를 각 포함하는 재조합 대장균으로부터 lacZ' 발현이 효과적으로 항시 발현되는지 확인하기 위해서 유도제 IPTG의 첨가 없이 기질인 X-gal만을 배지에 첨가하여 그 분해 여부를 확인하였다. 항생제 첨가 고체 한천 배지 aLB에 X-gal (Promega, USA)를 100  $\mu$ g/ml의 농도로 첨가하고 각 클론들을 도말하여 X-gal 분해에 의한 청색 박테리아 클론의 형성 여부를 분석하였고 이때 음성 대조군으로서 lacZ' 유전자를 포함하지 않는 pETP-GFP 포함 균주를 함께 도말하였다.



[도 M12]

*E. tarda* 고발현 프로모터 (E-HCE)의 평가를 위한 *lacZ* 발현 벡터 구축

나) 다양한 대장균 균주에서의 발현 가능 여부

상기 선발된 3종의 프로모터들이 다양한 대장균 균주에서 고발현이 가능한지를 확인하였다. 사용한 대장균 균주로는 상기 XL-blue MRF' 균주 외에 JM019 균주, HB101 균주, DH5a 균주, TOP10F 균주, BL21 균주 등에서 GFP 유전자를 발현하도록 설계된 상기 플라스미드들을 형질도입 시키고 흡광도 (OD 600 nm) 0.8~1.0까지 37°C에서 16시간 진탕 배양 후 GFP의 발현 여부를 확인하였다.

다) 다양한 배양 온도에서의 발현 가능 여부

본 개발에서 얻어진 프로모터들이 일반적으로 대장균을 숙주세포로 이용한 재조합 단백질 발현에 적용되는 배양 조건들 하에서 고발현 기능을 유지하는지를 평가하였다. 앞서 언급된 pETPX-GFP, pETPY-GFP 및 pETPZ-GFPZ 발현 벡터와 대장균 균주 XL-1 blue MRF' 균주를 이용하여 평가하였다. 배양 온도 조건은 20, 27, 32 및 37°C를 설정하여 실시하였다. 배양 배지는 모두 항생제 ampicillin 100 µg/ml을 포함도록 하였고 배양 용량은 100 µl로 하였으며 배지는 LB 배지를 이용하였다. 온도 조건 평가의 경우 각 온도에서 18 또는 24시간 성장시킨 후 동일한 세포 수 ( $8 \times 10^8$  cells)만큼씩을 취하여 형광발현 강도를 96-well plate와 VersaDoc 4000 (Bio-Rad) 분석기로 수행하였다.

라) 종래 재조합 발현 시스템과의 효능 평가

본 개발의 프로모터들의 효과를 다시 입증하기 위해서 종래 재조합 단백질 생산을 위해 사용되고 있는 tac 프로모터와 λ<sub>PR</sub> 프로모터와의 재조합 단백질 생산 능력을 평가하였다. 앞서 본 개발 프로모터들을 포함하는 pETPX-GFP, pETPY-GFP 및 pETPZ-GFP 벡터들과의 비교를 위한 tac 및 λ<sub>PR</sub> 기반 GFP 발현 벡터들을 구축하였다 [도 B13]. tac 프로모터 기반 GFP 발현 벡터의 구축을 위해서 pMALp2X 플라스미드 (NEB, USA) 내 존재하는 lacI<sup>q</sup> 억제자와 tac 프로모터 염기서열을 아래의 탐침들 (TAC-P FW 및 TAC-P RV; 서열번호 18 및 19)을 이용하여 PCR 분리하였으며, λ<sub>PR</sub> 조절 기반 GFP 발현 벡터를 구축하기 위해서는 아래의 탐침들 (LambdaP FW 및 LambdaP RV; 서열번호 20 및 21)을 이용, pLDR20 플라스미드 (ATCC 87205)로부터 CI 억제자 유전자와 λ<sub>PR</sub> 프로모터를 역시 PCR 분리를 실시하였다. 이때 클로닝을 용이하게 하기 위해서 각 탐침의 5'-말단에 Xma I (GGGCC) 또는 Xba I (TCTAGA) 인식위치를 첨가하였다. 첨가된 인식 위치는 밑줄로 표시하였다.

[프로모터 분리를 위한 프라이머 종류 및 말단 조작]

Ptac promoter & lacI<sup>q</sup> repressor

TAC-P FW: 5'-CCCGGGCCGACACCATCGAATGGTGCAA-3'

TAC-P RV: 5'-TCTAGACCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTC-3'

Lambda PR promoter & CI857 repressor

LambdaP FW: 5'-CCCGGGAACACCTTGCCGATCAGCCA-3'

LambdaP RV: 5'-TCTAGATTTAGCTGTCTTGGTTGCC-3'

Restriction site

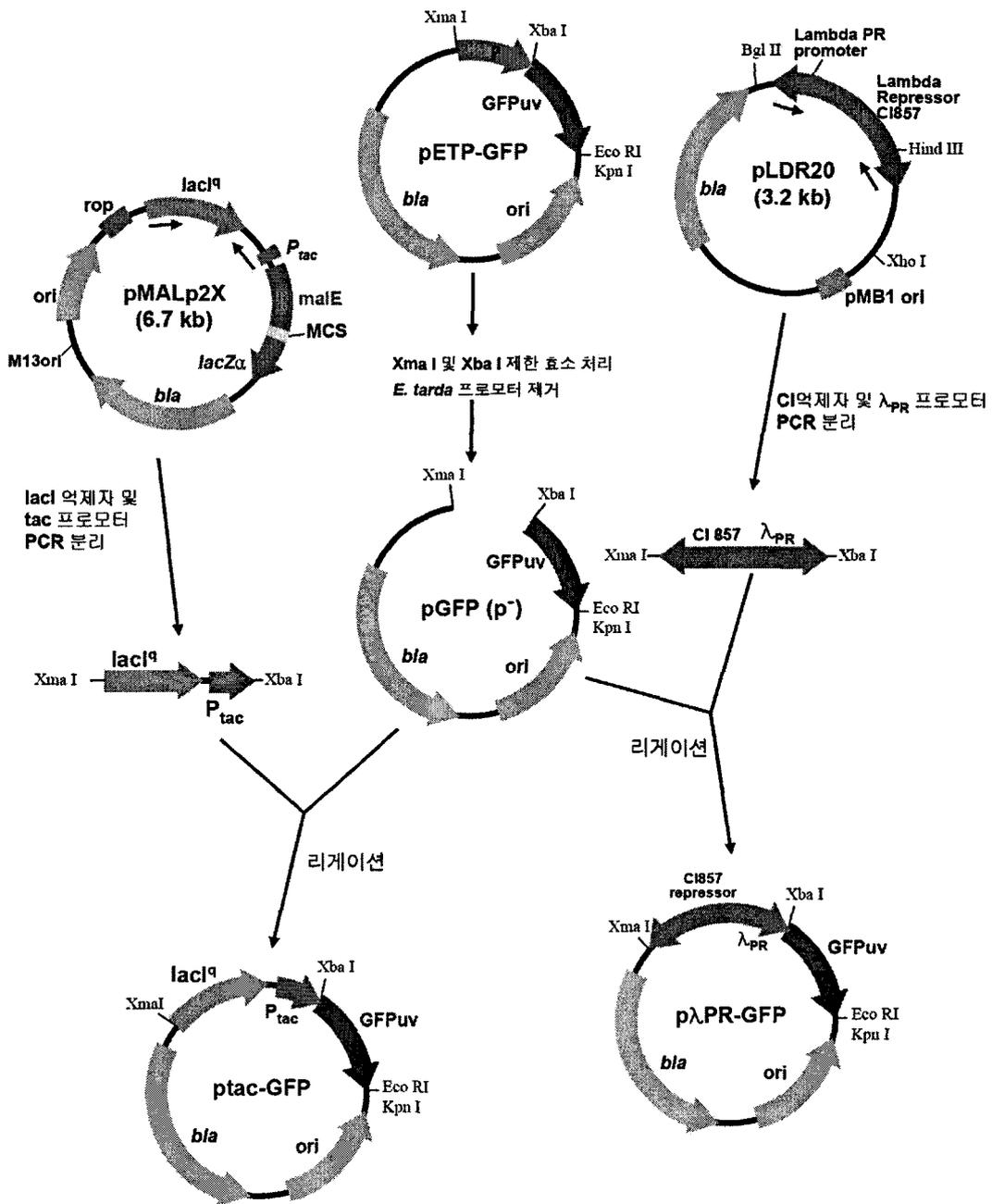
CCCGGG (Xma I)

TCTAGA (Xba I)

분리된 PCR 산물은 정제와 TA 클로닝 과정을 거쳐 준비된 Xma I 및 Xba I 절단 pGFP(P')와의 라이게이션 반응을 수행하였다 [도 B13]. 라이게이션 산물을 대장균 XL-blue MRF' 또는 DH5 $\alpha$  균주에 형질도입 시키고 정확한 클론들을 선발하여 각기 ptac-GFP (tac 프로모터 삽입) 및 p $\lambda$ PR-GFP ( $\lambda$ PR 프로모터 삽입)로 명명한 후 평가에 이용하였다 [도 M13].

프로모터들의 재조합 단백질 생산 능력을 평가하기 위해서 첫 번째 실험으로 재조합 XL-1 blue MRF'를 이용하여 음성대조군인 pGFP(P'), pHCE IIB-GFP, ptac-GFP, 그리고 본 개발 프로모터들을 포함하는 pETPX-GFP, pETPY-GFP 및 pETPZ-GFP를 대상으로 GFP 단백질 생산 능력을 평가하였다. 배양은 단일 박테리아 콜로니 (colony)를 aLB 10 ml에 접종하고 12시간의 초기 배양을 수행한 후 균 배양액을 다시 1l aLB 액체 배지를 포함하는 2l 플라스크에 접종하고 37°C에서 14시간동안 추가 진탕 배양을 실시하였다.

배양이 완료되면 ptac-GFP 포함 균주를 제외한 나머지 배양균은 원심분리를 통한 회수를 실시하였고, ptac-GFP 포함 균주는 IPTG에 의한 유도발현을 위해 IPTG 최종 농도 1 mM을 첨가하여 추가로 3시간 동안 배양을 실시하였다. 회수된 박테리아들을 10 ml의 aLB에 농축 현탁 시킨 후 VersaDoc 4000 분석기 (Bio-Rad, USA)를 이용하여 형광 발현의 상대 평가를 실시함으로써 균체 습중량 1 g 당 GFP 발현 수준을 평가하였고 이때 상대 정량 평가를 위해서 재조합 GFP 단백질 (Recombinant GFP protein; Clontech)의 연속 희석액을 이용한 표준 곡선을 VersaDoc 4000으로 작성하여 이용하였다.



[도 M13]

*E. tarda* 고발현 프로모터 (E-HCE)의 평가를 위한 *tac* 및 PR 프로모터 기반 GFP 발현 벡터 구축

마) *E. tarda*에서의 항시 고발현 가능 확인

상기 대장균에서 확인된 에드워드균 유래 선발 프로모터들이 에드워드균에서도 고활성을 나타내는지 확인하였고 이때 에드워드균주는 FSW910410 및 GY01 균주 2종을 이용하였다. 상기 최종 선발된 3종류의 프로모터 함유 각 플라스미드 벡터(pETPX-GFP, pETPY-GFP 및 pETPZ-GFPZ)와 프로모터를 갖지 않는 pGFP(P') 플라스미드를 에드워드균에 형질도입 시켰다. 형질도입을 위해서 에드워드균을 흡광도 OD 600 nm 0.4까지 액체 배양 한 후 (TSB배지 28°C 13시간) 회수하고 제조사의 권고대로 세포를 처리한 후 Gene Pulser Xcell Electroporation System (Bio-Rad, USA)를 이용하여 2.5 kV 200Ω의 조건을 이용하여 전기천공법 (electroporation)을 실시하였다. 전기천공법을 수행한 후 항생제 ampicillin이 (100 µg/ml)함유된 TSA 한천 배지에 도말한 후 형성된 에드워드균 단일 콜로니 (colony)로부터 18시간 동안의 TSA 액체 진탕배양 (28°C, 230 rpm)을 통해 배양균을 확보하고 정확한 클론의 형질도입 여부를 플라스미드 분리를 통해 확인하였다. 선발된 재조합 에드워드균 클론들을 대상으로 GFP의 항시 발현여부를 확인하기 위해 28°C에서 16시간 성장시킨 후 흡광도 (OD 600 nm) 0.6에 도달한 배양균 1 ml를 농축하여 100 µl의 TSB배지에 현탁하고 언급한 바와 같이 VersaDoc 4000을 이용하여 GFP의 발현 유무를 확인하였다

바) 항원 탑재를 위한 *E. tarda*내 대량 발현 가능 여부

상기 결과를 재확인하기 위해서 FSW910410 재조합 균주를 이용하여 대량 액체 진탕 배양을 실시한 후 발현을 확인하였으며 이때 pHCE IIB-GFP와의 발현 능력을 비교 평가하였다. 본 개발 프로모터 포함 벡터와 pHCE IIB-GFP 및 pGFP(P') 음성대조균 플라스미드로 재조합된 각 에드워드 균주를 30°C에서 12시간 동안 초기 배양 (5 ml)후에 배양균을 1 l 배지에 접종하여 추가 18시간 동안 배양하였으며 배양 후 균체를 회수한 후 GFP 발현을 평가하였다.

사) *E. tarda ghost* 에서의 고발현 유도 가능 여부

상기 발굴된 프로모터들이 실제 *E. tarda ghost* 에서도 재조합 단백질 표현을 위한 유효한 발현 능력이 있음을 확인하기 위해서 앞서 표면 발현 InaN signal을 이용하여 프로모터와 융합시키고 이를 *E. tarda*에 다시 재조합 형질도입시켰다. 재조합 균주를 이용하여 특정 첨가물의 처리 없이 *E. tarda*에서 발현 토록 하였으며 앞서와 같이 ghost 유도를 실시하고 실시된 *E. tarda ghost*에서 강한 GFP 발현 여부를 확인하였다. 확인 방법은 상기와 동일하게 실시하였다.

## 나. Nuclease A를 이용한 플라스미드 및 염색체 DNA 제거 기술 개발

본 연구개발에서 구축된 *E. tarda* ghost 백신은 E-gene의 발현에 의해 생존력이 제거되지만 구축된 bacterial ghost내에 고분자의 genomic DNA가 잔존함은 물론 플라스미드 역시 검출되는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 잔여 DNA 분자는 ghost 발현의 유도 과정 중 불완전한 불활성화 또는 E-gene의 발현을 피해가는 소수의 박테리아로부터 유래하는 것으로 판단된다. 대다수의 박테리아가 생존력이 제거된 ghost 형태가 유도된다 할지라도 이러한 잔여 DNA는 ETG 백신의 실용적인 현장 접목성을 떨어뜨릴 뿐만 아니라 백신 처리된 개체의 식품학적 위해성 그리고 다량의 백신을 현장에서 경구 또는 침지 등으로 처리했을 때의 생태학적 문제점을 유발하게 된다. 이에 본 연구개발에서는 ETG의 bacterial ghost 형성 시 phiX174 E gene과 staphylococcal nuclease A (SNA)를 동시에 발현 시킬 수 있는 안정성 높은 ETG를 개발하고자 하였다.

### 1) Nuclease A를 이용한 핵산 제거용 발현 벡터 제작

발현 벡터를 제작하기 위한 유전자 소재 발굴을 위해서 *S. aureus* genomic DNA로부터 제한효소 말단이 조작된 PCR primer를 이용하여 SNA 유전자를 증폭하였다 (SNA *Nde*I F: CATATGATGGCAACTTCAACTAAAA ATTAC & SNA *Sac*I R: GAGCTCTTATTGACCTGAATCAGCGTTG). Lambda PR 프로모터 및 CI 억제자에 관한 유전자 소재는 앞서 발굴한 방법을 이용하여 pLDR20 플라스미드로부터 동일하게 분리하였다. 분리를 위한 PCR 프라이머와의 말단 제한효소 위치 (밑줄)은 다음과 같다.

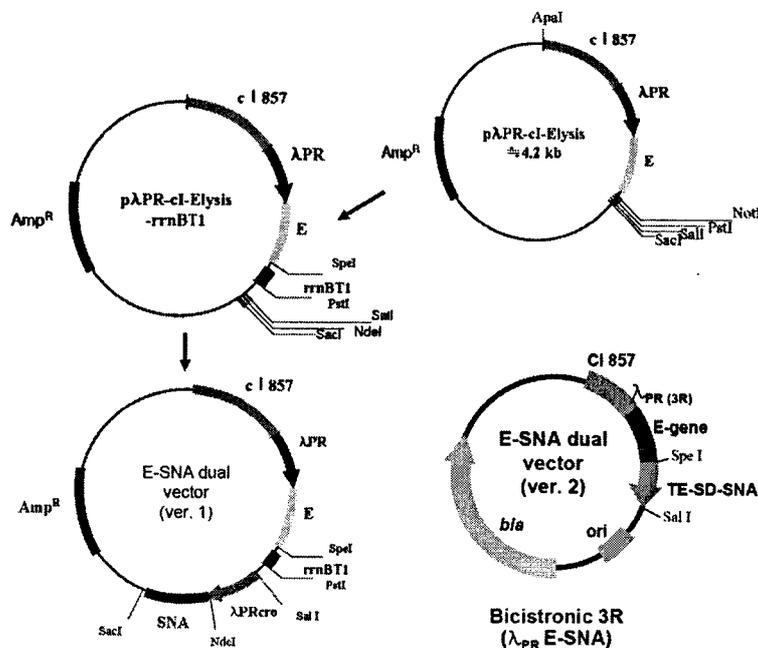
LPR-*Sac*II F 5-CCGCGGACAACCTCCTTAGTACATGCAAC-3)

Lcl-*Aat*II R 5-GACGTCAGCCAAACGTCTCTTCAGG- 3

PCR 수행 산물은 PCR purification kit로 모두 정제하였으며 pGEM-T easy vector내로 TA 클로닝을 수행하였다. 플라스미드들 간의 적절한 제한효소 처리를 통해 Lambda-CI system을 SNA 유전자를 함유하는 플라스미드내로 삽입시켜 pλ<sub>PR-cl</sub>-SNA 플라스미드를 구축하였다. 예비 실험을 통해 SNA 발현 효율이 보다 개선된 형태를 나타내는 프로모터 조절 길이를 갖도록 PR 프로모터에 downstream으로 연결되는 SNA의 앞쪽에 lambda phage cro 유전자의 26 aa를 인위적으로 in frame 삽입시켜 pλ<sub>PR-cl</sub>-Cro-SNA 발현 벡터를 구축하였다. 본 발현 벡터를 대상으로 lysis E gene을 동시 발현 시킬 수 있는 dual vector

system을 다음과 같이 구축하였다. Ribosomal RNA operon T1 terminator (*rrnBT1*) 염기서열을 p $\lambda$ PR-cl-Elysis plasmid Spe I-Pst I 제한효소 위치로 삽입시키고 다시 SNA 유전자를 NdeI 및 SacI 위치로 이동시켰다. 이후 Sal I 및 Nde I 제한효소 처리된 PR 프로모터를 Cro 유전자 N-terminal 앞으로 삽입시켜 발현 벡터를 제조하였다 [도 B14].

상기 발현 벡터 version과 함께 E-SNA를 동시에 발현시킬 수 있는 두 번째 version의 dual 발현 벡터를 구축하였다. 본 벡터의 구축은 미생물의 polycistronic mRNA 발현 특징을 이용한 것으로 발현 벡터 내 동일 프로모터 하에서 유전자 전사 발현을 조절 받지만 전사 산물이 서로 독립된 polypeptide 화 될 수 있도록 하는 방식을 적용하였다. polycistronic mRNA가 전사 발현 될 수 있도록 앞서 PR 프로모터 하에 E-gene과 SNA 유전자가 연속적으로 배열 될 수 있도록 하였으며 이때 두 유전자 사이에 translation enhance signal 및 prokaryotic ribosomal binding site (Shine Dalgarno seunce)를 인위적으로 삽입시켰다. 본 발현 벡터 ( $\lambda$ PR E-SNA-bicistronic 3R)의 부분 제한효소 map과 인위적으로 삽입시킨 signal을 포함한 cassette 염기서열은 역시 [도 M14] 및 [도 M15]에 나타내었다. 이상 구축된 2종류의 발현 벡터를 이용하여 ghost 발현의 유도과 SNA 활성에 의한 DNA의 제거효과를 대장균과 *E. tarda* 재조합 균주에서 확인하였다.



[도 M14]

E-SNA dual expression vector 구축 모식도 및 부분제한효소 지도

**Bicistronic/DH5a (ghost-TE+SD-S.nucA)**



[도 M15]

**Bicistronic E-SNA dual expression vector cassette의 염기서열 분석**

**2) 대장균 및 *E. tarda*에서의 기능 평가**

상기 SNA 단독 발현 벡터를 이용하여 대장균 DH5-a 및 *E. tarda*에 형질 도입시키고 핵산 제거 능력을 평가하였다. SNA 발현은 모두 PR promoter와 CI repressor 조절을 받으므로 앞서 28°C에서의 사전 배양을 통해 균을 성장시킨 후 42°C로의 temperature upshift를 수행하여 SNA 발현을 유도하였다. 발현 유도 시 시간대별로 균체를 회수하여 genomic DNA 및 plasmid DNA 분리를 실시하고 전기영동을 통해 DNA 제거 여부를 확인하였다. 각 배양 배지, 온도 조건 및 DNA 분리 조건은 상기 본 연구개발의 조건을 따라 실시하였다. 아울러 대장균 및 *E. tarda* ghost 박테리아에서의 기능 평가를 실시하였으며 앞서 실험 조건을 바탕으로 온도 프로그램을 조작하였고 ghost 세포를 회수하여 DNA 분해 또는 잔존 여부를 확인하였다.

## 다. 다기능 재조합 백신 발현 벡터의 최적화 구성

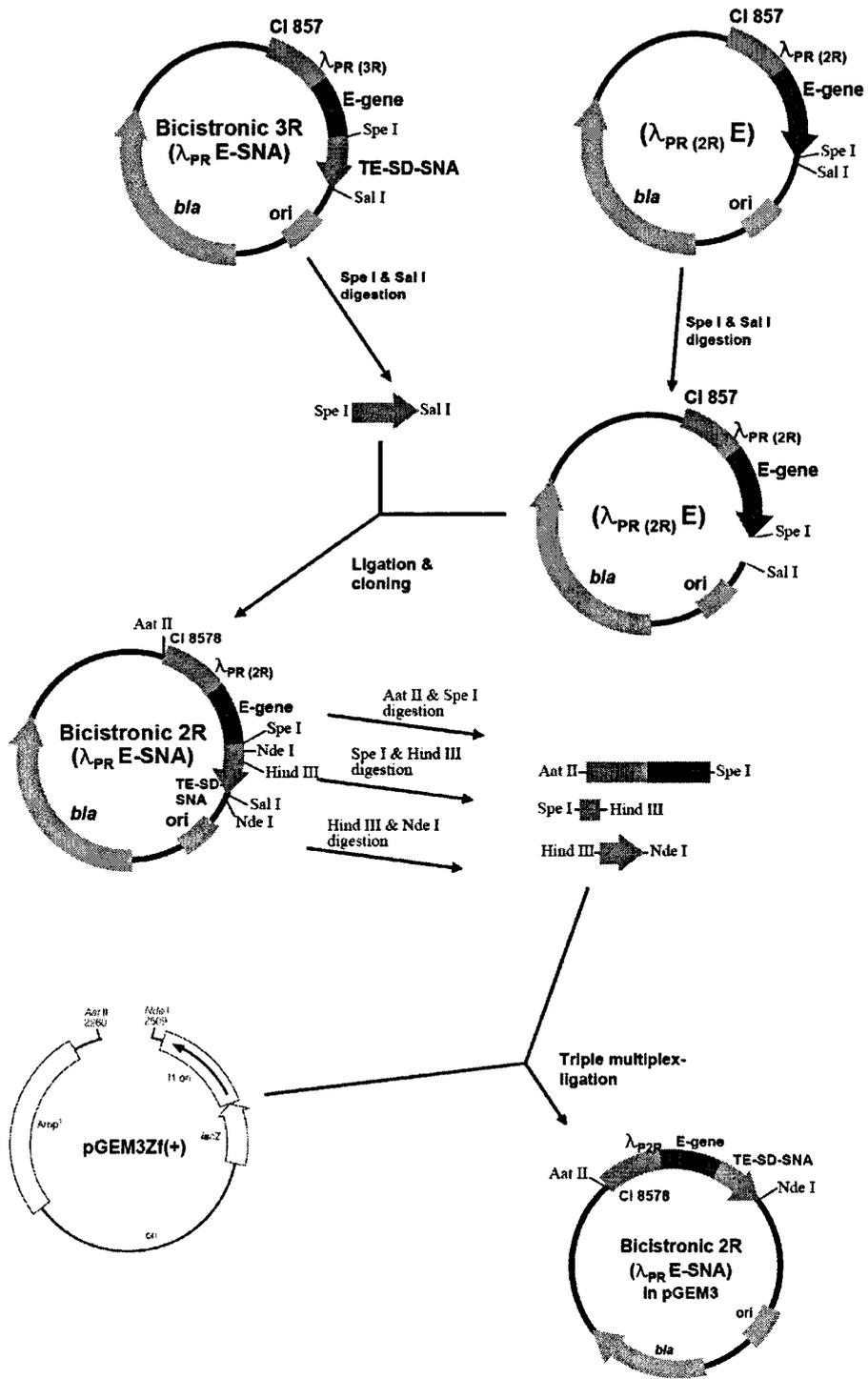
앞서의 발현 시스템 개선 실험 결과를 바탕으로 최적화된 최종 version의 다기능 백신 제조용 발현 벡터들을 구축하였다. 상기 SNA 벡터 dual system, 항원 항시 고효율 표면발현 system 및 E-lysis system을 동시에 작동시킬 수 있는 triple expression cassette를 구축, 재조합 발현 백신의 벡터를 최적화하였다. 앞서의 상대 활성 비교를 통해 ETG의 경우 bicistronic 기반 SNA 기술이 보다 유효하다고 판단되어 E-lysis와 SNA를 bicistronic 구성으로, 그리고 발굴 고발현 프로모터 시스템, InaN 표면발현 시스템 및 항원 단백질 유전자 (사전 기능평가를 위한 벡터는 GFP reporter, 그리고 외래 항원 전달을 위해서는 MABV의 VP2)를 fusion protein expression system으로 구축하였다.

### 1) Bicistronic 2R 기반 SNA-E 벡터 구축

#### 가) Bicistronic 2R 클로닝

그 첫 번째 단계로 상기 T-vector에 구축된 PR 3R 프로모터 기반 SNA-E system을 보다 효율이 우수하다고 판명된 PR 2R system으로 교체하고 triple cassette의 클로닝을 용이하게 하기 위해서 backbone을 pGEM 3Zf(+) system으로 전환하였다. 그 플라스미드 벡터 조작 전략 모식도 및 부분제한효소 지도는 [도 M16]에 나타내었고 자세한 플라스미드 및 여타 유전자 소재 조작 과정은 다음과 같다. Bicistronic 3R/T- easy vector의 lambda promoter 3R을 2R로 교체하기 위하여 기존에 확보된 CI857-Lambda pR(2R)-E gene vector에 TE-SD-S.nuc A를 삽입하였다. Bicistronic 3R/T-easy vector의 제한효소 site 가운데 SpeI을 사용하여 1st 효소 처리를 수행하였다. 제한 효소를 처리한 시료는 37°C에서 2시간 반응시켰다. 반응이 완료된 시료에 100% isopropanol, 100  $\mu$ l 과 3 M NaOAc (pH 5.2), 10  $\mu$ l, glycogen (20 mg/ml), 1  $\mu$ l을 넣고 -20°C, 1시간 반응시킨 후, 13000 rpm, 4°C, 30분 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 다음 70% ethanol, 800  $\mu$ l로 washing한 후, 1x TE' 86  $\mu$ l에 pellet을 녹였다. 그리고 두 번째 제한효소인 Sall으로 37°C에서 2시간 반응시켰다.

SpeI (Promega)	6 $\mu$ l	Sall (Promega)	6 $\mu$ l
10× SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l	10× SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l
plasmid DNA	65 $\mu$ l	Re elute	84 $\mu$ l
3×DW	19 $\mu$ l	Total	100 $\mu$ l
Total	100 $\mu$ l		



[도 M16]

Bicistronic 2R (SNA-E gene) dual expression 벡터의 구축

제한 효소 처리된 Translation enhancer-Shine Dalgarno-S.nuc A를 확보 및 정제하기 위하여 gel purification을 수행하였다. Gel purification kit는 Qiagen (Germany) 제품을 사용하였다. 1.0 % agarose gel을 사용하여 시료를 100v로 전기영동 하였다. 그리고 새로 제조한 Et-Br staining solution에 15분간 염색한 다음 DE solution에서 washing 과정을 수행하였다. Gel cutting을 위하여 illuminator를 사용하여 예상 유전자의 크기에 해당하는 DNA band를 cutter를 이용하여 절단하였다. 절단된 gel의 무게를 측정한 다음 2 ml tube에 담고 gel 무게의 3배에 해당하는 Qiagen QC buffer를 첨가하였다. 그리고 60℃에서 10분간 반응시켰다. Gel이 buffer에 모두 녹았는지 확인한 다음 100% isopropanol을 gel 무게와 동량을 첨가하여 섞어주었다. Gel purification용 column에 시료를 700  $\mu$ l 첨가 후 13000 rpm, 45초간 원심 분리하였다. Column을 통과한 시료는 모두 제거하였고 WB buffer, 500  $\mu$ l를 넣은 뒤 실온에서 2분 30초간 반응시켰다. 그리고 13000 rpm, 45초간 원심 분리하였고 column을 통과한 시료는 모두 제거하였다. 위와 같은 washing 과정을 1번 더 수행하여 DNA를 정제하였다. 마지막으로 membrane을 건조시키기 위하여 13000 rpm, 1분간 원심분리를 수행한 다음 column의 중앙으로 EL buffer를 22  $\mu$ l 넣고 실온에서 1분간 반응하였다. 그리고 13000 rpm, 1분간 원심분리를 수행하여 정제된 TE-SD-S.nuc A를 확보하였다.

CI857-Lambda pR(2R)-E gene vector의 제한효소 site 가운데 SpeI을 사용하여 1st 효소 처리를 수행하였다. 제한 효소가 처리된 시료는 37℃에서 2시간 반응시켰다. 반응이 완료된 시료는 100% isopropanol, 100  $\mu$ l과 3 M NaOAC (pH 5.2), 10  $\mu$ l, glycogen (20 mg/ml), 1  $\mu$ l을 넣고 -20℃, 1시간 반응시킨 후, 13000 rpm, 4℃, 30분 원심 분리하였다. 상층액을 제거한 다음 70% ethanol, 800  $\mu$ l로 washing한 후, 1x TE' 84  $\mu$ l에 pellet을 녹였다. 그리고 두 번째 제한효소인 Sall으로 37℃에서 2시간 반응시켰다.

SpeI (Promega)	6 $\mu$ l
10× SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l
plasmid DNA	50 $\mu$ l
3×DW	34 $\mu$ l
Total	100 $\mu$ l

Sall (Promega)	6 $\mu$ l
10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l
Re elute	84 $\mu$ l
Total	100 $\mu$ l

제한 효소 처리된 CI857-Lambda pR(2R)-E gene vector를 정제하기 위하여 gel purification을 수행하였다. 0.7% agarose gel을 사용하여 시료를 loading한 다음 Et-Br 염색을 하고, illuminator를 사용하여 gel cutting을 수행하였다. Gel purification은 kit (Qiagen, Germany)를 사용하였다.

나) CI857-Lambda pR(2R)-E gene vector와 TE-SD-S.nuc A의 ligation

위 실험을 통하여 확보된 CI857-Lambda pR(2R)-E gene vector와 TE-SD-S.nuc A를 ligation하였다. Ligation 반응은 vector농도와 크기, insert의 농도와 크기를 고려하여 vector: insert = 1:3 의 비율로 12°C에서 16 시간동안 이루어졌다. Ligation 조성은 다음과 같다.

T4 DNA Ligase (Promega)	1 $\mu$ l
10 $\times$ Ligase Buffer	1 $\mu$ l
CI857-Lambda pR(2R)-E gene vector	2 $\mu$ l
3x DW	2 $\mu$ l
Translation Enhancer-Shine Dalgarno-S.nuc A	4 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

*E. coli* XL1 blue MRF'을 tetracycline-LB 5 ml 에 접종하여 37°C에서 6~8시간 교반 배양하였다. OD 600 nm 값이 0.3~0.5일 때 원심 분리 하여 세포를 모은 뒤, 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 1 ml 처리 후, pellet을 회수한 다음 다시 200  $\mu$ l를 처리하여 competent cells을 완성하였다. 확보한 competent cell을 ligation 반응 완료 시료와 섞어준 다음 4°C (on ice), 30분 반응하였다. 42°C, 90초 동안 heat-shock 반응을 시키고, SOC 배지 800  $\mu$ l을 넣고 28°C, 90분 동안 교반 배양하였다. 배양이 끝나면 원심 분리 하여 세포를 모은 다음, 세포를 ampicillin-LB (100  $\mu$ g/ml)에 도말하여 28°C에서 배양하였다. Transformation으로 생성된 재조합 박테리아를 aLB (100  $\mu$ g/ml)에 접종하였다. 박테리아는 28°C, 220 rpm으로 24시간 교반 배양하였다. 배양이 완료된 박테리아는 plasmid extraction kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 다음과 같은 방법으로 추출하였다. 3 ml의 박테리아 용액을 회수하여 13000 rpm, 30 초간 원심 분리하여 박테리아

pellet을 확보하였다. 확보한 pellet을 풀어준 다음 250  $\mu\text{l}$  RS buffer (resuspension buffer)를 넣어준 다음 vortex 하였다. 그리고 BL buffer (lysis buffer)를 넣어준 다음 조심히 inverting 하였다. 용액이 투명해지면 350  $\mu\text{l}$  NE buffer (neutralization buffer)를 첨가하여 다시 조심히 inverting 하였다. 13000 rpm, 10분간 원심분리를 수행한 다음 상층액을 DNA binding column에 넣고 13000 rpm, 1분간 원심 분리하였다. Column을 통과한 시료는 제거하고 DE buffer (denaturation buffer) 500  $\mu\text{l}$  를 첨가 후 실온 반응 5분을 수행하였다. 13000 rpm, 1분간 원심 분리를 수행한 다음 column을 통과한 시료는 제거하고 WP buffer (washing buffer), 700  $\mu\text{l}$ 를 넣고 13000rpm, 1분간 원심분리를 수행 하였다. Column을 통과한 시료를 제거하고 13000 rpm, 1분간 원심분리를 통하여 membrane을 건조시켰다. 그리고 column을 새 1.5 ml tube로 이동시킨 다음 EL buffer 40  $\mu\text{l}$ 를 column 중앙에 넣어 주었다. 실온에서 1분간 반응시킨 다음 13000 rpm, 1분간 원심분리를 수행하여 정제된 plasmid를 확보하였다.

다) Bicistronic 2R를 T-easy vector에서 pGEM 3Zf(+) backbone으로 전환

완성된 Bicistronic 2R를 최종 구축 vector인 pGEM 3Zf(+) vector로 이동 하기 위하여 제한 효소 처리를 하였다. AatII, SpeI, Hind III, NdeI의 제한 효소를 이용하여 Bicistronic 2R을 절단하였다. 제한 효소는 37°C, 2시간의 조건으로 처리하였다. 1st 제한 효소 처리 후 100% isopropanol, 100  $\mu\text{l}$ 과 3M NaOAc (pH 5.2), 10  $\mu\text{l}$ , glycogen (20 mg/ml), 1  $\mu\text{l}$ 을 넣고 -20°C, 1시간 반응시킨 후, 13000 rpm, 4°C, 30분 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 다음 70% ethanol, 800  $\mu\text{l}$ 로 washing한 후, 1x TE' 84  $\mu\text{l}$ 에 pellet을 녹였다. 그리고 2nd 제한효소를 처음과 같은 조건으로 처리하였다. 제한 효소 조성물의 구성은 다음과 같다.

[CI857-LambdaPR 2R-Egene]

AatII (Roche)	6 $\mu\text{l}$	SpeI (Promega)	6 $\mu\text{l}$
10x SuRE/Cut Buffer	10 $\mu\text{l}$	10x SuRE/Cut Buffer	10 $\mu\text{l}$
plasmid DNA	60 $\mu\text{l}$	Re elute	84 $\mu\text{l}$
3xDW	24 $\mu\text{l}$		
Total	100 $\mu\text{l}$	Total	100 $\mu\text{l}$

[TE+SD+S.nuc A]

HindIII (Promega)	6 $\mu$ l	SpeI (Promega)	6 $\mu$ l
10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l	10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l
plasmid DNA	60 $\mu$ l	Re elute	84 $\mu$ l
3 $\times$ DW	24 $\mu$ l		
Total	100 $\mu$ l	Total	100 $\mu$ l

[S.nuc A]

HindIII (Promega)	6 $\mu$ l	NdeI (Promega)	6 $\mu$ l
10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l	10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l
plasmid DNA	60 $\mu$ l	Re elute	84 $\mu$ l
3 $\times$ DW	24 $\mu$ l		
Total	100 $\mu$ l	Total	100 $\mu$ l

제한 효소 처리가 완료된 시료는 Gel purification kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 정제하였다. Gel illuminator로 목적 유전자의 band를 관찰하여 cutter로 해당 band를 잘라내었다. 잘라낸 gel의 무게를 측정한 다음 사용한 kit의 protocol대로 실험을 진행하였다. 유전자의 크기가 2 kb 이상일 경우 GB buffer (gel binding buffer)를 gel 무게의 3배를 첨가하고, 100 bp ~ 2 kb 일 경우 GB buffer를 gel 무게의 5배를 첨가하였다. 60 $^{\circ}$ C, 10분간 반응하여 gel을 완전히 buffer에 녹인 다음 100% isopropanol을 gel 무게와 동일하게 넣고 섞어주었다. Binding column에 시료 700  $\mu$ l를 넣고 13000 rpm, 45초간 원심분리하고 column을 통과한 용액은 모두 제거하였다. 그리고 WB buffer (washing buffer) 500  $\mu$ l를 column에 넣고 실온에서 2분간 반응한 다음 13000 rpm, 45초간 원심 분리하였다. 이 과정을 1회 반복 하였다. Column을 통과한 용액은 모두 제거한 다음 membrane을 건조시키기 위하여 13000 rpm, 2분간 원심분리 하였다. Column을 새 1.5 ml tube로 옮긴 다음, EL buffer (elution buffer) 22  $\mu$ l를 column 중앙에 넣고 실온에 1분간 반응 후 13000 rpm, 1분간 원심 분리하여 정제된 product를 확보하였다.

pGEM 3Zf(+) backbone을 준비하기 위해 restriction enzyme 처리 및 gel purification을 수행하였다. 제한 효소 AatII, NdeI을 사용하여 pGEM 3Zf(+)를 절단하였다. 제한 효소를 처리한 시료는 37 $^{\circ}$ C, 2시간의 조건으로 처리하였다. 제한 효소, AatII 처리 완료 후 100% isopropanol, 100 $\mu$ l과 3 M NaOAC (pH 5.2), 10  $\mu$ l, glycogen (20 mg/ml), 1  $\mu$ l을 넣고 -20 $^{\circ}$ C, 1시간 반응시킨 후,

13000 rpm, 4°C, 30분 원심 분리하였다. 상층액을 제거한 다음 70% ethanol, 800  $\mu$ l로 washing한 후, 1x TE' 84  $\mu$ l에 pellet을 녹였다. 그리고 두 번째 제한 효소인 SpeI을 처리하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. 제한 효소 조성물의 구성은 다음과 같다.

AatII (Roche)	6 $\mu$ l
10× SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l
plasmid DNA[pGEM 3zf(+)]	60 $\mu$ l
3×DW	24 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>100 <math>\mu</math>l</b>
SpeI (Promega)	6 $\mu$ l
10× SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l
Re elute	84 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>100 <math>\mu</math>l</b>

pGEM 3Zf(+) vector와 Bicistronic 2R의 ligation을 수행하였다. 확보한 pGEM 3Zf(+) vector와 CI857-LambdaPR 2R-Egene, TE+SD+S.nuc A, S.nuc A를 ligation 하였다. Ligation 반응은 12°C에서 16시간 동안 수행하였다. Ligation 조성물 구성은 다음과 같다.

T4 DNA Ligase (Promega)	1.5 $\mu$ l
10× Ligase Buffer	1 $\mu$ l
pGEM 3zf(+) vector	0.5 $\mu$ l
CI857-lambdaPR 2R-Egene	4 $\mu$ l
TE+SD+S.nuc A	5 $\mu$ l
S.nuc A	3 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>15 <math>\mu</math>l</b>

Ligation 반응이 완료된 시료를 competent cell (*E. coli* XL1 blue MRF)에 transformation을 수행하였다. Transformation 완료 후 plate는 28°C overnight 배양하였다. Transformation 후 생성된 재조합 박테리아를 aLB에 접

중하여 28°C 배양하였다. 플라스미드 추출은 alkaline denaturation 방법으로 아래의 과정대로 수행하였다. 배양된 박테리아 용액을 수확하고 원심분리를 통하여 박테리아 pellet을 확보하여 pellet을 풀었다. Sol I 100 µl 첨가 후 vortex, Sol II 200 µl 첨가 후 조심히 inverting, Sol III 150 µl 첨가 후 조심히 inverting한 다음 얼음에서 5분 반응시켰다. 13000 rpm, 5분 원심 분리하고 상층액 450 µl을 phenol/chloroform 450 µl에 넣고 섞은 다음, 실온에서 5분간 반응하였다. 이를 13000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후, 상층액 350 µl과 동량의 100% isopropanol을 넣어 inverting하여 섞어준 뒤, 실온에 10분 반응하였다. 13000 rpm, 10분 원심 분리한 후, pellet을 제외한 상층액을 제거하였다. 70% ethanol 500 µl을 넣고 washing한 다음, dry-bath에서 30초 반응하여 ethanol을 완전히 제거하였다. 1×TE RNase 35 µl를 넣고 37°C, 30분 반응하였다.

## 2) Triple cassette vector 클로닝을 위한 유전자 소재의 확보 및 조작

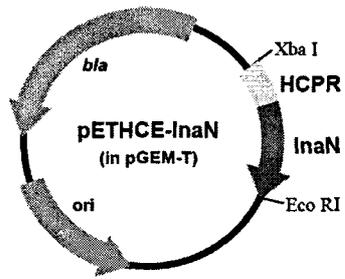
상기 SNA-E bicistronic 발현 벡터와 아울러 triple expression cassette를 구축하기 위해서 프로모터, 항원의 면역원성을 개선하기 위한 LTB fusion signal, 벡터의 기능을 사전평가하기 위해 사용한 GFP reporter 구조 유전자, MABV 항원을 표현하기 위한 VP2 유전자 등을 제한효소와 PCR 말단 조작 방법을 이용하여 아래의 [도 M17]에서와 같이 조작하였다.

### 가) 고발현 promoter 및 표면발현 InaN signal의 조작

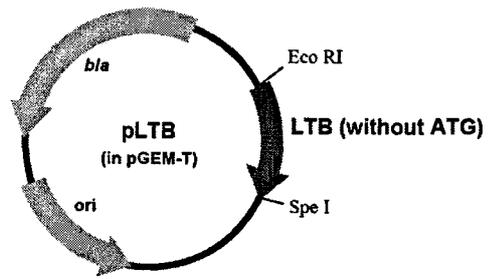
발굴된 *E. tarda* 항시 구성적 발현 프로모터 (ETHCE promoter) 및 InaN을 cloning 하기 위하여 PCR로 해당 유전자를 증폭하였다. PCR은 Expand high fidelity system (Roche, USA)을 사용하였고, PCR 조건은 Expand high fidelity system 의 protocol을 참조하여 아래와 같이 설정하였다.

Temperature	Time	Cycle
94°C	2 min	1
94°C	15 sec	10
58°C	30 sec	
72°C	1 min	
94°C	15 sec	20
58°C	30 sec	
72°C	1 min [1 cycle마다 5 초씩 증가]	
72°C	7 min	1
4°C	∞	

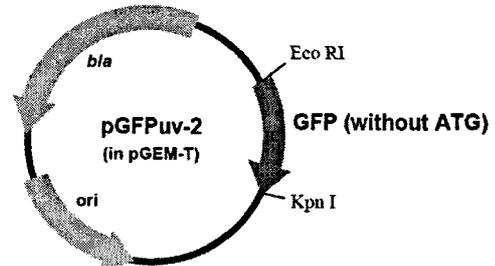
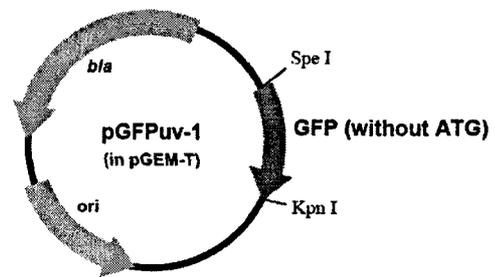
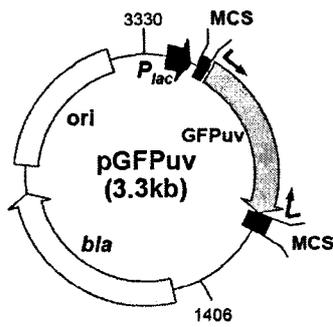
**Promoter + surface signal**



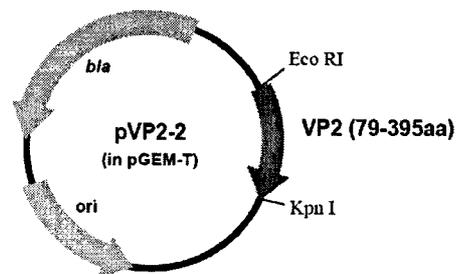
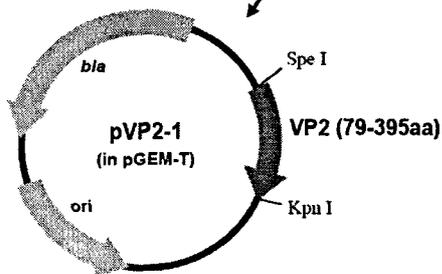
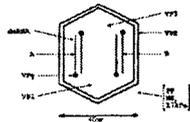
**LTB fusion signal**



**GFP reporter**



**MABV antigen**



[도 M17]

Triple expression 벡터의 구축을 위한 유전자 소재의 클로닝 및 제한효소 지도

PCR product를 정제하기 위하여 gel purification을 수행하였다. Gel purification은 kit (Bioneer, Korea)의 protocol을 참조하여 수행하였다. 정제된 product는 T-easy vector와 ligation 반응을 수행한 다음 transformation시켰다. T-easy vector는 promega (USA) 제품을 사용하였다. Ligation은 12°C에서 16시간 동안 반응시켰다. Ligation 반응물 조성표는 다음과 같다.

T4 DNA Ligase (Promega)	1 $\mu$ l
2× rapid Buffer	5 $\mu$ l
pGEM T-easy vector	1 $\mu$ l
HCE promoter-InaN	3 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

Ligation 반응이 완료된 시료를 competent cell (*E. coli* XL1 blue MRF)에 transformation을 수행하였다. 배양 온도는 37°C로 하였고, 배지는 X-gal/IPTG/aLB 를 사용하였다. Transformation 후 배양된 plate에서 white colony를 aLB에 접종하였다. 배양된 박테리아는 alkaline denaturation 방법으로 플라스미드를 추출하여 유전자 크기를 확인하였다.

#### 나) LTB 유전자의 클로닝

LTB를 cloning 하기 위하여 PCR로 해당 유전자를 증폭하였다. PCR은 Expand high fidelity system (Roche)을 사용하였고, PCR 조건은 아래의 protocol을 따라 수행하였고 PCR product의 정제와 TA 클로닝 및 재조합 박테리아의 동정은 상기와 동일하게 수행하였다

Expand High Fidelity System (Roche)	0.75 $\mu$ l
LTB/T/DH5 $\alpha$	2 $\mu$ l
10× Expand HF buffer with 15 mM MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ l
10× dNTPs (2.5 mM)	5 $\mu$ l
LTB- EcoRI 1F (5 uM)	5 $\mu$ l
LTB-SpeI 1R (5 uM)	5 $\mu$ l
3×DW	27.25 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

다) GFPuv reporter 유전자의 클로닝

GFPuv를 cloning 하기 위하여 PCR로 해당 유전자를 증폭하였다. PCR은 Expand high fidelity system (Roche)을 사용하였고, PCR 조건은 Expand high fidelity system protocol을 참조하였다. GFPuv의 경우 InaN과 ligation 할 product, LTB와 ligation 할 product 2종류가 필요하여 2번의 PCR을 수행하였다.

[PCR 조성 #1 InaN과 ligation]

Expand high Fidelity System (Roche)	0.75 $\mu$ l
pINPNC GFP	2 $\mu$ l
10 $\times$ Expand HF buffer with 15 mM MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ l
10 $\times$ dNTPs (2.5 mM)	5 $\mu$ l
EcoRI-GFPuv ORF 2F (5 uM)	5 $\mu$ l
GFPuv ORF 1R (5 uM)	5 $\mu$ l
3 $\times$ DW	27.25 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>

[PCR 조성 #2 LTB와 ligation]

Expand High Fidelity System (Roche)	0.75 $\mu$ l
pINPNC GFP	2 $\mu$ l
10 $\times$ Expand HF buffer with 15 mM MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ l
10 $\times$ dNTPs (2.5 mM)	5 $\mu$ l
GFPuv ORF 1F (5 uM)	5 $\mu$ l
GFPuv ORF 1R (5 uM)	5 $\mu$ l
3 $\times$ DW	27.25 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>

Transformation 후 배양된 plate에서 white colony를 aLB에 접종하였다. 배양된 박테리아는 alkaline denaturation 방법으로 플라스미드를 추출하여 유전자 크기를 확인하였다.

라) VP2 TA cloning

PCR은 Expand high fidelity system (Roche)을 사용하였고, VP2의 경우 역시 InaN과 ligation 할 product, LTB와 ligation 할 product 2종류가 필요하여 2번의 PCR을 서로 다른 프라이머를 이용하여 아래와 같이 수행하였다.

[PCR 조성 #1 InaN과 ligation]

Expand High Fidelity System (Roche)	0.75 $\mu$ l
VP2/T/DH5 $\alpha$	2 $\mu$ l
10 $\times$ Expand HF buffer with 15 mM MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ l
10 $\times$ dNTPs (2.5 mM)	5 $\mu$ l
EcoRI-VP2 3F (5 uM)	5 $\mu$ l
KpnI-VP2 3R (5 uM)	5 $\mu$ l
3 $\times$ DW	27.25 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>

[PCR 조성 #2 LTB와 ligation]

Expand High Fidelity System (Roche)	0.75 $\mu$ l
VP2/T/DH5 $\alpha$	2 $\mu$ l
10 $\times$ Expand HF buffer with 15 mM MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ l
10 $\times$ dNTPs (2.5 mM)	5 $\mu$ l
SpeI-VP2 2F (5 uM)	5 $\mu$ l
KpnI-VP2 3R (5 uM)	5 $\mu$ l
3 $\times$ DW	27.25 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>

[PCR 조건]

Temperature	Time	Cycle
94 $^{\circ}$ C	2 min	1
94 $^{\circ}$ C	15 sec	10
58 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	1 min	
94 $^{\circ}$ C	15 sec	20
58 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	1 min [1 cycle마다 5 초씩 증가]	
72 $^{\circ}$ C	7 min	1
4 $^{\circ}$ C	$\infty$	

앞서와 같이 PCR 산물의 정제 및 TA 클로닝을 수행하였다. Ligation 반응이 완료된 시료를 competent cell (*E. coli* XL1 blue MRF)에 transformation을 수행하였다. 배양 온도는 37 $^{\circ}$ C로 하였고, 배지는 X-gal/IPTG/aLB를 사용하여 재조합 클론을 동정하였다. 동정된 클론의 플라스미드 분리 및 염기서열 분석을 실시하여 정확한 클로닝을 확인하였다.

3) 고발현 프로모터 (ETHCE)을 포함하는 표면발현계와 LTB-GFPuv reporter 구조의 클로닝

ETHCE promoter-InaN, LTB, GFPuv의 multiplex ligation 산물로부터 direct PCR을 이용한 fusion gene construct를 분리해내고 TA cloning을 거쳐 유전자를 확보하였다. 이후 triple cassette에 포함되기 용이토록 pGEM 3Zf(+) backbone으로 이동시켰다.

가) 각 유전자의 restriction enzyme 처리 단편 확보 및 direct PCR

TA cloning으로 확보한 유전자들의 양 끝에 존재하는 제한효소 site를 이용하여 유전자를 절단하였다. HCE promoter-InaN는 XbaI과 EcoRI, LTB는 EcoRI과 SpeI, GFPuv는 SpeI과 KpnI의 제한 효소가 사용되었다. 그리고 pGEM 3Zf(+)는 XbaI과 KpnI의 제한효소가 사용되었다. 제한효소 처리는 37°C, 2시간이 소요되었다. 2nd 제한 효소 처리하기 전 100% isopropanol, 100 $\mu$ l과 3 M NaOAC (pH 5.2), 10  $\mu$ l, glycogen (20 mg/ml), 1  $\mu$ l을 넣고 -20°C, 1시간 반응시킨 후, 13000 rpm, 4°C, 30분 원심분리하였다. 상층액을 제거한 다음 70% ethanol, 800  $\mu$ l로 washing한 후, 1x TE' 41  $\mu$ l에 pellet을 녹였다. 그리고 2nd 제한 효소를 처음과 같은 조건으로 처리하였다. 제한효소 처리 조성은 다음과 같다.

[HCE promoter-InaN]

XbaI (Roche)	5 $\mu$ l
10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l
plasmid DNA [HCE promoter-InaN]	60 $\mu$ l
3 $\times$ DW	25 $\mu$ l
Total	100 $\mu$ l
EcoRI (Promega)	4 $\mu$ l
10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	5 $\mu$ l
Re elute	41 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

[LTB]

EcoRI (Promega)	5 $\mu$ l
10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l
plasmid DNA [LTB]	60 $\mu$ l
3 $\times$ DW	25 $\mu$ l
Total	100 $\mu$ l

SpeI (Promega)	4 $\mu$ l
10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	5 $\mu$ l
Re elute	41 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

[GFPuv]

SpeI (Promega)	5 $\mu$ l
10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l
plasmid DNA [LTB]	60 $\mu$ l
3 $\times$ DW	25 $\mu$ l
Total	100 $\mu$ l

KpnI (Promega)	4 $\mu$ l
10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	5 $\mu$ l
Re elute	41 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

Ligation 반응이 완료되면 본 ligation 산물로부터 유전자를 직접 분리하기 위해 ligation sample 1  $\mu$ l를 template로 하여 PCR을 수행하였다. PCR은 앞서 사용한 위해서 Expand high fidelity system (Roche)을 이용하였고 그 반응 조성물과 조건은 다음과 같다.

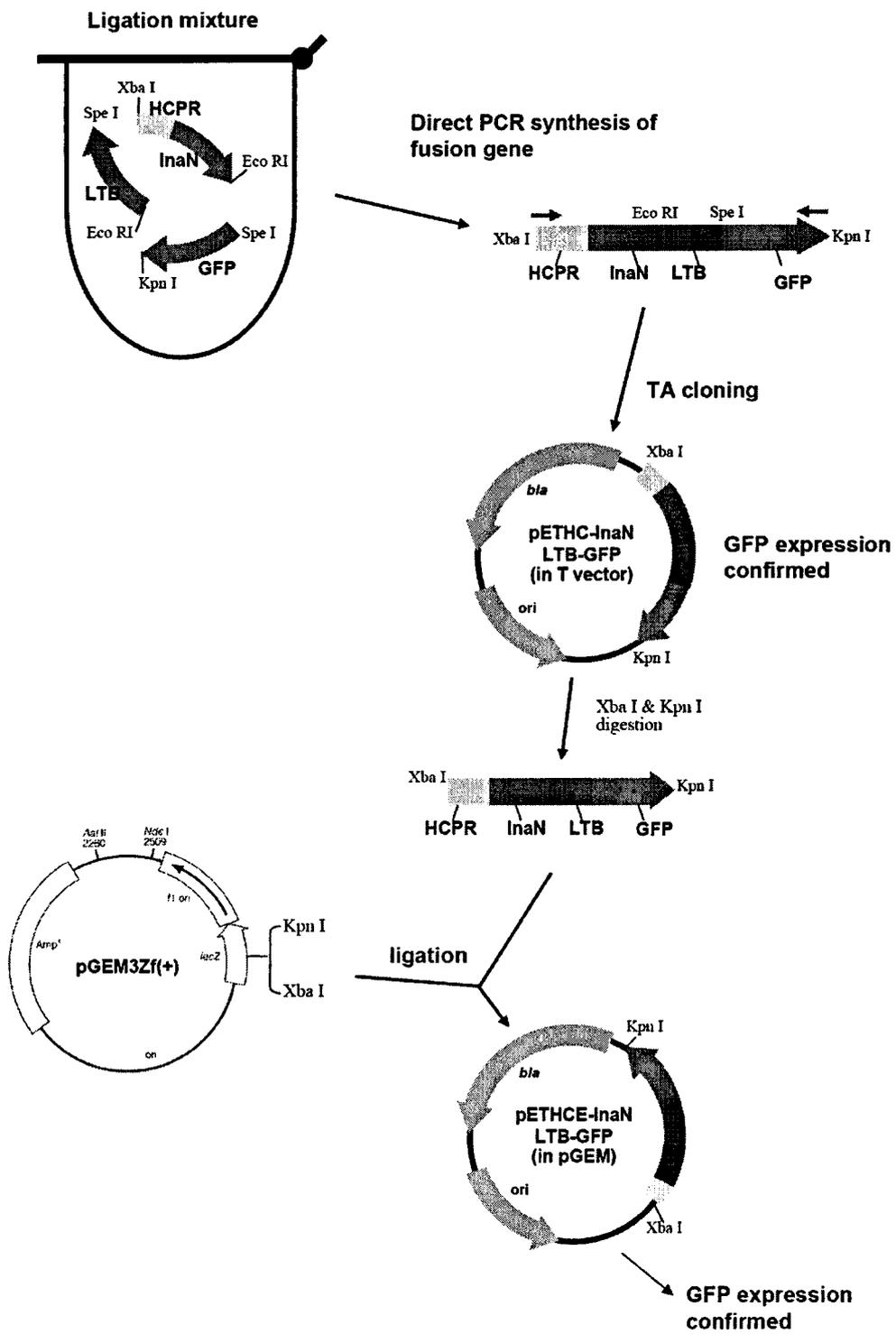
[PCR 조성]

Expand high fidelity system (Roche)	0.75 $\mu$ l
Ligation sample	1 $\mu$ l
10 $\times$ Expand HF buffer with 15 mM MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ l
10 $\times$ dNTPs (2.5 mM)	5 $\mu$ l
pHCEIIB pR-InaN-XbaI 1F (5 uM)	5 $\mu$ l
GFPuv ORF 1R (5 uM)	5 $\mu$ l
3 $\times$ DW	28.25 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

[PCR 조건]

Temperature	Time	Cycle
94 °C	2 min	1
94 °C	15 sec	10
58 °C	30 sec	
72 °C	1 min 30 sec	
94 °C	15 sec	20
58 °C	30 sec	
72 °C	1 min 30 sec [1 cycle마다 5 초씩 증가]	
72 °C	7 min	1
4 °C	$\infty$	

PCR product는 PCR purification kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 아래의 절차대로 실험을 수행하였다. PCR product volume의 5배에 해당하는 PB buffer (PCR binding buffer)를 PCR product와 섞은 뒤 DNA binding column에 시료를 첨가하였다. 13000 rpm, 45초간 원심 분리하였고 column을 통과한 시료는 제거하였다. WB buffer 500  $\mu$ l를 column에 넣고 실온에 2분간 반응 후 13000 rpm, 45초간 원심 분리한 다음 column을 통과한 시료는 제거하였다. 위 washing 과정을 한 번 더 수행 하였고 마지막으로 membrane을 건조시키기 위해서 13000 rpm, 2분간 원심 분리를 수행하였다. EL buffer 22  $\mu$ l를 column 중앙에 넣고 1분간 실온 반응 뒤 13000 rpm, 1분간 원심분리를 통하여 정제된 product를 회수하였다. 본 실험과정을 거쳐 이후 pGEM3Zf(+)-ori의 이동을 위한 최적 클론의 선발을 수행하였다. Direct PCR 유전자 분리 및 클로닝 전략은 [도 M18]에 나타내었다.



[도 M18]

Triple expression 벡터의 구축을 고발현프로모터-표면발현-LTB-GFP의 direct PCR 분리 및 플라스미드 발현 벡터 구축

나) TA 클로닝, 클론 동정 및 GFP 발현 유무 확인

상기 PCR 산물의 TA 클로닝은 앞서 사용한 T-easy vector를 이용하였고 ligation은 12°C에서 16시간 동안 반응시켰고 그 반응 조성물은 다음과 같다.

T4 DNA Ligase (Promega)	1 $\mu$ l
2× rapid Buffer	5 $\mu$ l
pGEM T-easy vector	1 $\mu$ l
PCR product	3 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

Ligation 반응이 완료된 시료를 *E. coli* XL1 blue MRF'를 competent cell로 하여 transformation을 수행하였다. 배양 온도는 37°C로 하였고, 배지는 X-gal/IPTG/aLB를 사용하였다. 배양된 plate에서 white colony를 aLB에 접종하였다. 배양된 박테리아는 alkaline denaturation 방법으로 플라스미드를 추출하여 유전자 크기를 확인하였다. 다중 ligation에서 PCR로 확보한 유전자들이 plasmid내로 정확한 방향으로의 삽입, 제한효소 위치의 보존, 돌연변이의 유발 유무 등을 확인하기 위해서 ligation cassette 전체를 염기서열 분석하여 reference sequence와 일치 여부를 확인하였다. 각 clone별로 GFP 발현율을 비교하기 위하여 아래의 20개 clone을 aLB에 배양하여 같은 OD 600 nm 값 1.0로 맞추었다. 그리고 그 배양액을 100  $\mu$ l로 농축하여 96 well에 넣어 GFP 발현을 관찰하였다. GFP 발현양상은 VersaDoc 4000 (Bio-rad. USA)을 이용하여 확인하였다.

다) 클론 선발 및 pGEM backbone으로의 이동

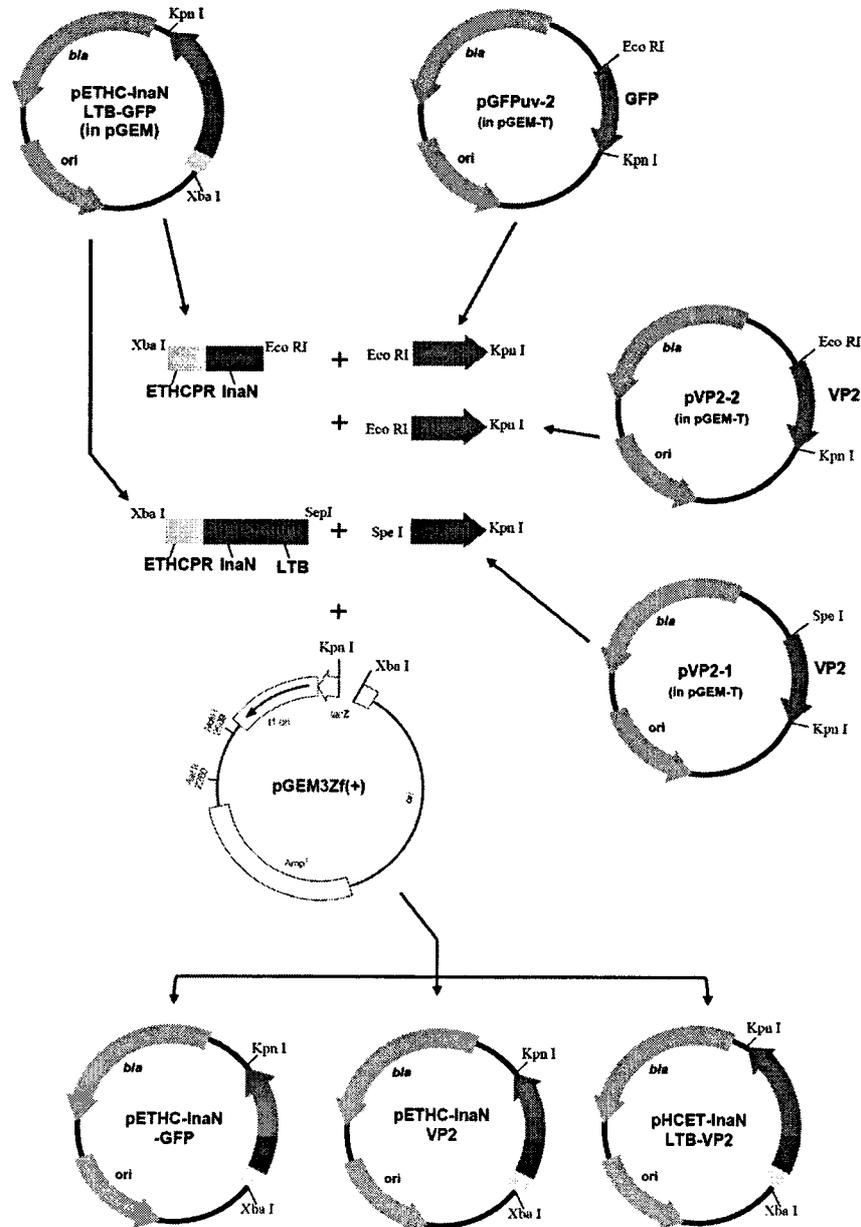
앞서 T-vector에 클로닝된 cassette를 pGEM backbone으로 이동시키기 위한 조작을 수행하였다. GFP발현이 가장 우수한 clone인 #13을 사용하여 HCE promoter-InaN-LTB-GFP을 확보하였다. HCE promoter-InaN-LTB-GFP은 XbaI, KpnI을 사용하였다. 제한 효소 반응 조건은 37°C, 2시간으로 하였다. 그리고 두 번째 제한 효소 처리 전 ethanol 침전 회수를 수행하고 다시 제한효소 반응을 실시하였다. 제한 효소 반응 조성은 다음과 같다.

XbaI (Roche)	5 $\mu$ l
10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l
plasmid DNA [HCEpR InaN LTB GFP-T #13]	50 $\mu$ l
3 $\times$ DW	35 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>100 <math>\mu</math>l</b>
KpnI (Promega)	4 $\mu$ l
10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l
Re elute	86 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>100 <math>\mu</math>l</b>

제한 효소 처리 및 정제 완료된 pGEM 3Zf(+) vector와 HCEpR-InaN-LTB-GFPuv를 ligation 하였다. Ligation은 12°C에서 16시간 동안 반응시켰다. Ligation 반응이 완료된 시료를 *E. coli* XL1 blue MRF'를 competent cell로 하여 transformation을 수행하였다. 배양 온도는 37°C로 하였고, 배지는 aLB를 사용하였다. Transformation이 완료된 plate에서 재조합 박테리아를 aLB에 접종하여 교반 배양하였다. 배양이 완료되면 alkaline denaturation 방법으로 플라스미드를 추출하여 유전자의 크기를 확인하여 clone을 선발하였다. 또한 확실한 유전자의 삽입 여부는 제한 효소의 처리 및 PCR 반응을 통하여 확인하였다. 각 clone별로 GFP 발현율을 비교하기 위하여 clone을 aLB배양하여 같은 OD 600 nm 1.0으로 맞추는 다음 100  $\mu$ l로 농축하여 96 well에 넣어 GFP 발현을 관찰하고 pGEM 3Zf(+)로의 이동 후에도 본 발현 시스템이 효과적으로 작동하는지를 확인하였다.

4) 고효율성 프로모터-표면발현 계를 이용한 항원 발현 벡터의 다양한 구성 조작  
 상기 확보된 고효율성 프로모터와 표면발현 계에 구축된 GFP reporter construct를 대상으로 이들로부터 발현 조절 부위, 표면발현 계, LTB fusion signal을 다양하게 분리하여 실제 표적 항원인 VP2와 reporter인 GFP 유전자간의 융합구조를 구축하였다. 구축을 위해서 앞서 구축된 pETHC-Ina-LTB-GFP 벡터로부터 ETHC 프로모터 (ETHCPR)-InaN 융합구조, ETHCPR-InaN-LTB 융합구조를 제한효소로 분리하고 이들과 GFP 또는 VP2 유전자간의 ligation을 실시하였다. Ligation은 다시 pGEM3Zf(+) 벡터내로 직접 수행될 수 있도록 dual ligation을 수행하였으며 결과적으로 (1) ETHC 프로모터와 InaN signal에 부착되어 있는 GFP 또는 VP2 유전자, 그리고 (2) ETHC 프로모터, InaN, LTB

fusion 구조에 부착되어 있는 GFP (기 확보하여 template로 사용한 plasmid) 또는 VP2 유전자, 총 4종을 확보하였다. 이들을 각각 pETHC-InaN-GFP, pETHC-InaN-VP2, pETHC-InaN-LTB/GFP 및 pETHC-InaN-LTB/VP2로 명명하였다. 그 클로닝 전략과 제한 효소 지도는 [도 M19]에 나타내었으며 자세한 DNA 조작은 아래와 같다.



[도 M19]

고활성 프로모터-표면발현 계를 이용한 항원 발현 벡터의 다양한 구성 조작

가) 프로모터 및 표면 발현계 분리

GFP발현이 가장 우수한 pGEM 3Zf(+) 플라스미드 기반 clone인 ETHCE promoter-InaN-LTB-GFP/pGEM 3Zf(+) #23을 사용하여 HCE promoter-InaN 및 HCE promoter-InaN-LTB을 확보하였다. HCE promoter-InaN은 XbaI, EcoRI을 사용하였고, HCE promoter-InaN-LTB은 XbaI, SpeI을 사용하였다.

[Promoter-InaN]

XbaI (Roche)	5 $\mu$ l
10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l
plasmid DNA [pR InaN LTB GFP/pGEM 3Zf(+) #23]	50 $\mu$ l
3 $\times$ DW	35 $\mu$ l
Total	100 $\mu$ l
<hr/>	
EcoRI (Promega)	4 $\mu$ l
10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l
Re elute	86 $\mu$ l
Total	100 $\mu$ l

[Promoter-InaN-LTB]

XbaI (Roche)	5 $\mu$ l
10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l
plasmid DNA [pR InaN LTB GFP/pGEM 3Zf(+) #23]	50 $\mu$ l
3 $\times$ DW	35 $\mu$ l
Total	100 $\mu$ l
<hr/>	
SpeI (Promega)	4 $\mu$ l
10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l
Re elute	86 $\mu$ l
Total	100 $\mu$ l

나) VP2 및 GFPuv의 절단면 회수

VP2의 양쪽 말단에 존재하는 제한효소는 (Spe I, Kpn I), (EcoR I, Kpn I) 이고 GFPuv의 양쪽 말단에 존재하는 제한효소는 (EcoR I, Kpn I)로서 다음의 반응을 이용하여 절단면을 회수 분리하였다.

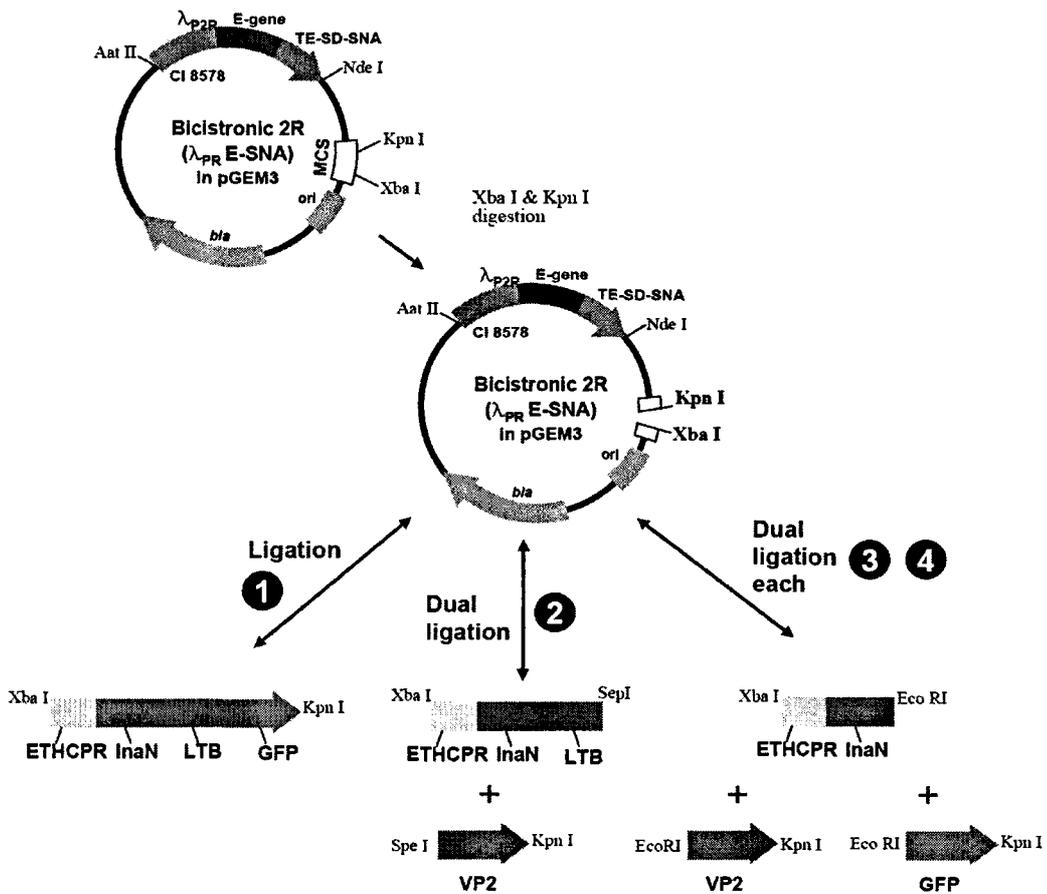
[SpeI-VP2-KpnI]			
SpeI (Promega)	5 $\mu$ l	KpnI (Promega)	5 $\mu$ l
10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l	10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l
plasmid DNA [SpeI-VP2-KpnI]	50 $\mu$ l	Re elute	85 $\mu$ l
3 $\times$ DW	35 $\mu$ l	Total	100 $\mu$ l
Total	100 $\mu$ l		
[EcoRI-VP2-KpnI]			
EcoRI (Promega)	5 $\mu$ l	KpnI (Promega)	5 $\mu$ l
10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l	10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l
plasmid DNA [EcoRI-VP2-KpnI]	50 $\mu$ l	Re elute	85 $\mu$ l
3 $\times$ DW	35 $\mu$ l	Total	100 $\mu$ l
Total	100 $\mu$ l		
[EcoRI-GFPuv-KpnI]			
EcoRI (Promega)	5 $\mu$ l	KpnI (Promega)	5 $\mu$ l
10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l	10 $\times$ SuRE/Cut Buffer	10 $\mu$ l
plasmid DNA[EcoRI-GFPuv-KpnI]	50 $\mu$ l	Re elute	85 $\mu$ l
3 $\times$ DW	35 $\mu$ l	Total	100 $\mu$ l
Total	100 $\mu$ l		

다) pGEM 3Zf (+)내로의 dual ligation 클로닝 및 클론 동정

제한 효소 처리 및 정제 완료된 pGEM 3Zf(+)와 상기 산물들을 이용하여 ligation을 수행하였고 dual ligation을 수행한 후 각 클론들이 정확한 방향성을 갖는지 여부를 염기서열 분석을 통해 확인하였다. 확인된 클론들을 대상으로 다시 GFP 또는 VP2의 유전자 발현 유무를 RT-PCR 또는 형광 분석을 통해서 수행하였고 본 실험에서 구축된 발현벡터는 ghost 유도 발현계와 triple cassette를 이루기 직전 형태의 벡터들로서 본 벡터들은 ghost 유도 없이 대장균 및 *E. tarda*에서 재조합 단백질의 고효율 표면 targeting에 이용될 수 있는 발현 시스템들이다.

5) Triple expression cassette를 포함하는 발현 벡터 시스템 구축

상기 고효율성 프로모터 표면 항원 발현 시스템 벡터들과 앞서 bicistronic 기반 ghost-SNA dual 발현 시스템 벡터들과의 융합 구조를 구축함으로써 최종 triple expression 시스템을 완성하였다. Bicistronic 2R (SNA-E) system 벡터로부터 Xba I 및 Kpn I 절단면을 회수하였고 회수된 절단 벡터와 앞서 준비된 ETHCE promoter-InaN-LTP-GFP (or VP2)의 항원 발현 표현 시스템들과의 dual 또는 single ligation을 수행하였다. Ghost 발현을 클로닝 과정 중에 억제하기 위해서 모든 클로닝은 37°C 이하에서 수행하였으며 요구되는 벡터의 구성에 따라 각각의 표면 발현 계와의 ligation 반응을 수행하였다. 제한효소 반응, ligation, transformation 및 클론 동정은 앞서의 조건과 동일하게 수행하였다 그 클로닝 전략은 아래의 [도 M20]과 같다.



[도 M20]

고효율성 표면발현 계와 SNA-E 유전자 시스템간의 triple expression 벡터 구축 전략도

상기의 각 (1), (2), (3) 및 (4) ligation 및 클로닝 과정을 통해 확보된 벡터는 각각 pGFPVac-1, pVP2Vac-1, pVP2Vac-2 및 pGFPVac-2라고 최종 명명하였다. 이들 구성된 최종 벡터들의 작동 여부를 확인하기 위해서 대장균 및 *E. tarda* 재조합 균주를 대상으로 GFP 형광 발현 (pGFPVac-1 및 pGFPVac-2 벡터) 및 Western blot 확인 (pVP2Vac-1 및 pVP2Vac-2 벡터)을 실시하였고 이때 naive 상태에서의 발현은 물론 ghost 유도시의 발현을 확인하였다. 또한 expression cassette 중 ghost 유도와 함께 작동하는 SNA 유전자 발현을 확인하기 위해서 SNA (-) 벡터와의 비교 평가를 통해 핵산제거 능력을 재확인하였다.

대장균의 경우 앞서 언급한 바와 같이 조사 평가를 실시하였으며 이때 대장균 균주는 DH5- $\alpha$  및 XL1 blue MRF' 균주를 이용하였다. 반면 *E. tarda* 균주의 경우 아래의 방법에 의거하여 평가를 수행하였다. 재조합 최종 선발된 clone을 *E. tarda*로 transformation 하여 발현 여부를 관찰하였다. *E. tarda* 균주를 제조하기 위해서 TSB배지 5ml에 *E. tarda* FSW910410을 28°C에서 220 rpm으로 교반 배양하였다. OD<sub>600</sub> 값이 0.35~0.5일 때 배양을 멈추었다. *E. tarda*를 tube에 회수하여 10분간, 속력 3.5 원심 분리하였다. Pellet만 회수한 다음 10% glycerol 1 ml을 넣고 pellet을 풀어주었다. 1.5 ml tube에 competent cell을 옮겨서 13000 rpm, 30 sec 원심 분리하였다. 상층액을 모두 제거 하였다. 10% glycerol washing 과정을 3회 반복하였다. Washing 과정이 마치면 10% glycerol을 50  $\mu$ l만 넣고 pellet을 풀어주었다. Competent cell이 완성되면 plasmid 2  $\mu$ l + competent cell 40  $\mu$ l를 넣고 섞은 다음 cuvette에 넣고 얼음에 50초간 반응시켰다. Cuvette 결면의 물기를 닦아준 다음 pulse 2.5kv, 200 $\Omega$  (GenepulserXcell, Bio-rad, USA). 1분 이내로 TSB 1 ml을 cuvette에 넣어 cell과 섞은 뒤 14 ml tube에 담아 28°C에서 1시간 30분 교반 배양하였다. 1.5 ml tube로 cell을 옮긴 다음 13000 rpm, 20초 원심 분리하여 cell을 400  $\mu$ l로 농축하였다. aTSA에 200  $\mu$ l씩 도말하여 28°C에서 배양하였다.

재조합 균주로부터 플라스미드 배양 분리를 통해 (1) 정확한 플라스미드 클론이 형질도입 되었는가 (2) 플라스미드가 재조합 형질도입 과정 중 손상을 입거나 돌연변이가 유발되지 않았는가, (3) 도입된 형질전환 플라스미드의 copy 수가 안정적으로 유지되는가, (4) *E. tarda* homologous sequence를 함유한 재조합 플라스미드들과 *E. tarda* 염색체 DNA간의 homologous recombination 등이 야기되지 않는가를 평가하여 안정적인 최적의 재조합 균주 클론을 확보하였다. 최종 확보된 클론들을 대상으로 앞서의 ghost 유도, VP2 항원의 표면발현, 그리고 핵산제거 기능을 재확인하였다.

## 제8항 재조합 다기능 백신의 대량 발현, 방어능 재평가 및 현장 적용성 평가

### 가. 배양 용량의 scale up 및 ghost 발현 재 검증

#### 1) 배양 용량의 scale up

백신의 대량 제조를 위해 개발된 백신을 이용, 배양 용량을 scale-up하고 이로부터 ghost 발현의 최적 프로그램화 및 기타 배양 조건의 확인을 실시하였다. 백신의 배양 용량은 백신 개발 시 사용된 100 - 150 ml 용량을 최소 scale로 하여, 500 ml, 1000 ml, 3000 ml 및 5000 ml로 최종 발현 용량을 선정하여 재조합 발현을 위한 백신을 실시하였다. 100 - 1000 ml까지의 배양은 항온 진탕 배양기를 이용하여 배지의 2배 용량 크기의 삼각 플라스크를 이용하여 수행하였고, 3000 ml 및 5000 ml의 배양은 자동 발효기를 이용하여 실시하였다. 각 배양 규모부터 최초 배양 (5 - 50 ml)의 접종을 이용하여 온도 자극 시점까지 배양하고 ghost 발현 유도를 실시하였다. Ghost 발현 유도는 28℃ 배양 온도를 42℃로 증가시켜 E-lysis 유전자 발현을 유도하였고 흡광도 (OD 600 nm)의 감소를 monitoring하여 ghost 유도를 확인하였다.

#### 2) 온도 shift-up lag time 효과

배양 용량의 증가로 인해 28℃에서 42℃까지의 온도 증가에 요구되는 lag time의 변화가 예상되며, 따라서 설정 온도 도달에 미치는 배양 용량의 영향을 평가하였으며 이를 통해 온도 자극 프로그램을 최적화하였다. 기준 배양 용량으로서 소규모 배양인 100 ml을 대상으로 28℃에서 42℃까지의 온도 증가에 요구되는 시점을 측정하고 측정된 기준 시간을 고려하여 배양 용량을 증가시켰을 때의 소요 시간을 평가하였다. 소요 시간 별 ghost 발현 유도와의 상관관계가 있는지 여부를 확인하였다. 이후 강제 온도 증가를 통해 1000 또는 3000 ml 배양에서 lag time을 고정시켰을 때 ghost 발현이 효과적으로 가능한지를 확인하였다.

#### 3) 항원 표면 발현의 재확인

대량 배양된 재조합 균체로부터 reporter로 이용한 GFP 항원과 실제 바이러스 항원으로 이용한 MABV VP2 항원의 표면발현이 원활히 이루어지는 지

를 확인하였다. 형광 이미지 분석을 통해 ghost 발현이 완료되고 nuclease A를 통한 최종 핵산 제거가 완료된 상태에서 GFP 단백질의 효과적인 표면 발현이 이루어졌는지를 앞서와 같이 확인하였으며 VP2의 경우 연구실에서 제작한 항체를 이용하여 Western blot을 통해 정확한 산물이 ghost 백신으로부터 표현되었는지를 확인하였다.

## 나. 기타 세부 대량 배양 조건의 최적화

### 1) 배양 배지별 효율

*E. tarda*를 항원 전달 세균으로 이용하기 위해서 표면발현 *E. tarda* 재조합 세균의 서로 다른 배지에 대한 성장 및 항원 발현 차이 여부를 평가하였다. 배지로서 Luria-Broth (LB) 배지, TSB 배지 및 BHI 배지를 이용하여 배양을 실시하였고 이때 선택 배양을 위한 항생제는 ampicillin 100 ug/ml을 첨가하여 실시하였다. 모두 50 ml의 초기 배양을 실시하고 1 L 배양액에 접종한 후 ghost 발현을 위한 최초 처리 시점 (OD600 nm = 0.2, 0.4, 0.6, 0.8)까지의 도달 시간, 그리고 ghost 발현 유도 및 항원 표현 정도를 비교함으로써 각 사용 배지에 따른 차이 유무 여부를 평가하였다.

### 2) 항생제 농도 및 처리

*E. tarda* 재조합 세균의 대량 배양 시 초기 접종부터 ghost 유도 완성까지 24시간 이상이 소요되는 점을 고려할 때, 항생제 역가의 저하 및 이로 인한 non-recombinant 박테리아의 출현을 방지할 필요가 있다. 따라서 접종 후 ghost 유도 최초 처리 시점 (온도 upshift 시점; 접종 후부터 12-15시간 소요)에 다양한 농도 (최종 농도 12.5, 25, 50, 100 ug/ml)의 항생제 (ampicillin)를 추가하고 이때의 ghost 유도 효율 및 non-recombinant 박테리아 출현 빈도에 영향을 미치는 지를 평가하였다. 온도 프로그램은 앞서의 최적 조건을 이용하였고, 배양 용량은 1000 ml를 기준으로 실시하였다.

### 3) Nuclease A 발현을 위한 Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup> 첨가 농도 및 시기

Ghost 유도 시 핵산을 제거함으로써 생존 능력의 안정적인 제거를 위해 발현시키는 nuclease A는 효소 활성을 갖기 위해서는 Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup> 이온을 필수적으로 요구한다. 그러나 Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup> 이온의 첨가는 ghost 유도 발현 시 세포질의 배출에 영향을 끼칠 수 있으며 또한 항원 발현에 역시 영향을 미칠 수 있다. 따라서 다기능 벡터의 발현에 필수적인 Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup>의 첨가 시기,

첨가 농도 등을 최적화함으로써 백신 제조의 안정성을 최적화하고자 하였다. 이를 위해  $\text{Ca}^{2+}$  및  $\text{Mg}^{2+}$ 의 농도는 stock solution을 이용하여 최종 농도 10 mM  $\text{CaCl}_2$  및 1 mM  $\text{MgCl}_2$  을 기준으로 1X, 1.5X 및 2X 농도를 처리하였으며, 처리 시점은 온도 42°C upshift 시점을 time zero (T0 hour)로 설정하여, T0, T1, T2 및 T4의 시점에 첨가하였다. 각 평가 구에서 ghost 발현, nuclease 발현 및 재조합 항원 발현을 평가하였다.

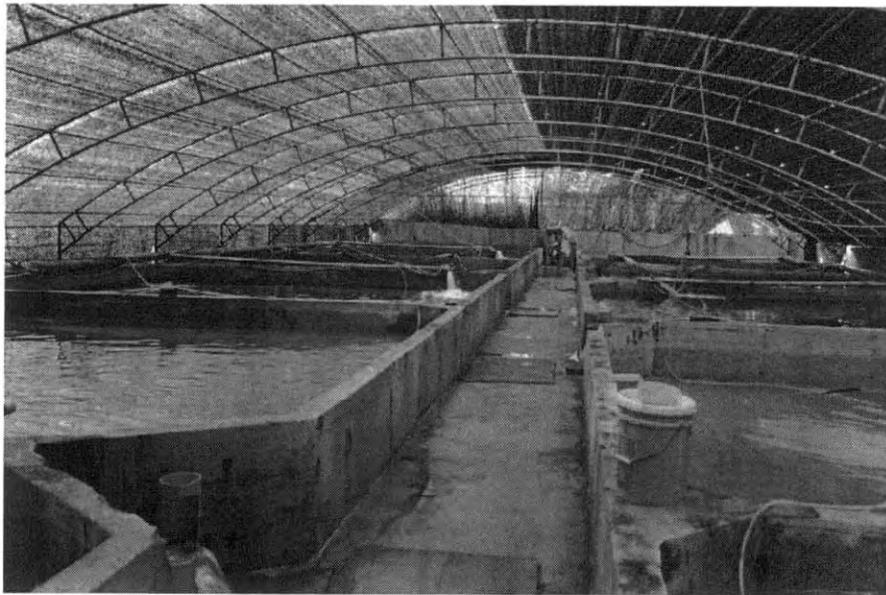
#### 다. 경구 백신의 현장 적용성 평가

##### 1) Pilot scale에서의 경구 백신 처리 효과 평가

최종 다기능 재조합 발현 백신의 경구 처리 효과를 확인하기 위해서 pilot scale의 공격 및 생존을 실험을 실시하였다. 개발된 triple cassette 기반 발현 벡터를 포함하는 MABV VP2 표면 발현 *E. tarda* 재조합 균주를 앞서 최적 대량 배양 조건들을 이용하여 배양하고 동결 건조를 거쳐 백신을 제작한 후 넙치에 대한 경구 경로 백신 처리를 하였다. 백신 처리는 앞서 평가 조건을 이용하여 10g 어체중 내외의 넙치 종묘를 이용하였으며 백신의 경구 조건은 일일 어체중 g 당 10 ug, 50 ug, 100 ug 및 200 ug 백신 (건조 균체량 기준)을 3일 씩 투여하였다. 투여는 매일 첫 먹이 공급 시 전부 섭취할 수 있도록 하였고 boosting 없이 3 주 후에 공격실험을 통해서 평가하였다. 공격 실험은 *E. tarda* ( $5 \times 10^7$  cells) 및 MABV TCID<sub>50</sub> ( $1 \times 10^5$ ) viral stock을 혼합하여 주사를 통해 동시 공격을 실시하였다. 이때 대조군 (PBS 처리된 균에의 동식 공격구)을 설정하여 백신의 기능을 평가하였다. 각 실험 구 당 2반복 구를 설정하였고 200 L 수조를 이용 50 마리씩을 수용하여 실험을 실시하였다.

##### 2) 양식 현장에서의 경구 백신 처리 효과 평가

상기 pilot 실험 결과를 바탕으로 실제 양식 육성 장 1개소를 선정하여 백신 처리를 수행하였다. 선정 양식장은 경상북도 포항시 북구 송라면 조사리 127번지의 청양수산이었으며 [도 M21], 구입된 종묘 (평균 어체중 12-15 g)를 대상으로 백신 처리를 실시하였다. 백신 처리를 위해 총 100 L의 대량 배양 (10L 씩 10회)을 통해 회수한 재조합 표면발현 ghost 백신을 이용하였다. 동결 건조된 재조합 백신을 이용하여 어체중 g 당 100 ug (개체 당 약 1.3 mg) 씩을 1일 섭취할 수 있도록 백신 사료를 제조하였으며 대조군으로 사용할 사료는 백신 첨가만을 제외하고 모두 동일하게 제조하였다.



[도 M21]

현장 실험을 수행한 양식장의 외부 및 내부 전경

실험 수조는 종묘 7 M x 7 M 팔각 콘크리트 수조 2개에 수용된 각 10,000마리씩을 (대조군 10000마리 및 처리구 10000마리) 대상으로 실험하였다. 사료 공급은 오전 6시 일일 공급량 전체를 잔여 사료가 발생하지 않도록 공급하였고, 이후 시간대에는 일반 대조군 사료를 두 실험구에 모두 동일하게 공급하였다. 이때 백신 처리를 위한 기본 사료로는 넙치용 수협 부상사료를 이용하였다. 3일간 백신 처리를 동일하게 실시한 후 매일 폐사 마리 수를 측정하였다. 그러나 실험의 조건을 최대한 현장 사육 및 양식 조건과 동일하게 하기 위해서 인위적인 균의 공격 및 감염 실험은 수행하지 않았으며 질병의 자연 발생을 기다리도록 계획하였다.

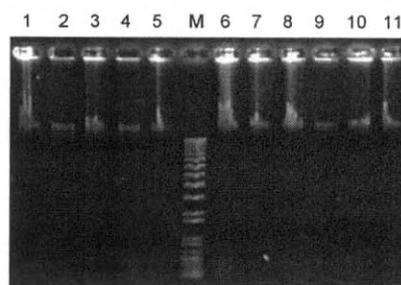
### 제3절 연구 결과

#### 제1항 병원성 세균 및 바이러스 유전자의 분리 및 분석

##### 가. *Edwardsiella tarda* 유전자 분리 및 분석

평가된 다양한 *E. tarda* 핵산 분리 조건 중 선발 최적 조건을 이용할 경우 안정적인 순도와 integrity가 확보되는 것으로 관찰되었으며 세포수의 성장 단계별 DNA 추출 효율을 분석한 결과 *E. tarda*의 실험실 배양의 late stationary phase (OD 600 nm > 1.5) 조건을 제외하고는 모두 상기 조건이 잘 작동하는 것으로 나타났다. 구간별 유의 차이는 관찰되지 않았다.

	OD 260/280 ratio	Amount DNA	High molecular integrity
Trial I	1.78	22	Yes
Trial II	1.82	21	Yes
Trial III	1.84	18	Yes
Trial IV	1.80	14	Yes
Trial V	1.71	19	Yes
Mean±SD	1.79±0.05	18.8±3.1	



0.3% agarose gel

#### [도 R1]

*E. tarda* genomic DNA 분리의 전기영동상  
(lanes 1 - 11; 서로 다른 성장단계의 배양균으로부터  
gDNA 추출 시료, M; 1 kb ladder marker)

생물정보분석을 통해 선정된 *E. tarda* 항원 후보 유전자는 크게 hemolysin (HEMO), fimbrial protein (Fim), *E. tarda* virulence protein (EVP), peripheral membrane protein (Pmp) 및 outer membrane protein (Omp)군으로 나누어 각 영역에서의 subunit들을 선발, multiple alignment 등을 통해 genomic ORF를 분리하였으며 항원 후보 유전자 분리와 말단 조작용을 위해 합성한 oligonucleotide primer들의 염기서열과 정보는 아래 표와 같다.

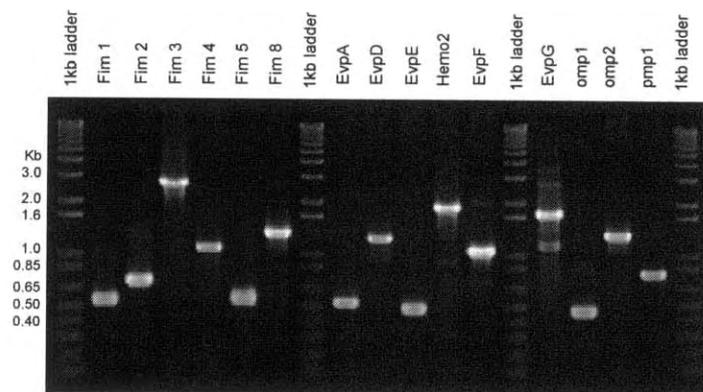
*E. tarda* 항원 후보 유전자 클로닝을 위한 primer 정보

Name	Length (bp)	G+C(%)	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
Fim1-F(speI)	32	34.37	<u>actagt</u> AAGAAAATTTACTGCCTGTTATGGC	58
Fim1-R(sacI)	31	41.93	<u>gagctc</u> TTATTTATATTCGATGGTGAACGGG	60
Fim2-F(speI)	31	35.48	<u>actagt</u> AAAAGAATCGTTGCCGATTATTAC	58
Fim2-R(sacI)	30	50.00	<u>gagctc</u> TCAGTGTACTATCGCGTCCTAAC	63
Fim3-F(speI)	28	46.42	<u>actagt</u> GCGCAACAACAACGGACAGTAT	60
Fim3-R(sacI)	27	48.14	<u>gagctc</u> TTATTGAGTCTGACAGGGTAG	60
Fim4-F(speI)	32	37.50	<u>actagt</u> AAAAGCCTAAGTATAAAACAGGCGCT	59
Fim4-R(sacI)	31	41.93	<u>gagctc</u> CTATTTAAAGGTGACGTCGATGTTG	62
Fim5-F(speI)	31	29.03	<u>actagt</u> ATAATGAAGAAAATTTACTGCCTG	55
Fim5-R(sacI)	32	43.75	<u>gagctc</u> TTATTTATATTCGATGGTGAACGGGC	62
Fim8-F(speI)	29	48.27	<u>actagt</u> AAATTCCTCCGGTCAACGCAAGTC	62
Fim8-R(sacI)	26	61.53	<u>gagctc</u> TCAGCGCTCCCAGTAGGACT	64
EvpA-1F(speI)	26	46.15	<u>actagt</u> GCAAGTGAAAGCAAGCAGCA	58
EvpA-1R(sacI)	26	61.53	<u>gagctc</u> TCATGGCTGCTTCTCCTCGC	64
EvpD-1F(speI)	26	34.61	<u>actagt</u> ATGAATATTGACGATCTCAC	53
EvpD-1R(sacI)	28	42.85	<u>gagctc</u> TCACGGGATTTTCTTTTTAGG	58
EvpE-1F(speI)	26	50.00	<u>actagt</u> ATCCTTCGCCATCTCTCCG	60

EvpE-1R(sacl)	26	50.00	<u>gagctc</u> TCACCTGTCTATTCGGTACA	60
EvpF-1F(spel)	26	46.15	actagtGTCGAGCTATTGCCCTACTA	58
EvpF-1R(sacl)	26	61.53	<u>gagctc</u> TCATGACAGCACCGCCTTGC	64
EvpG-1F(spel)	26	53.84	actagtAACGACGCCCTGAGCCCAA	61
EvpG-1R(sacl)	27	66.66	<u>gagctc</u> TTATCGCGCGGGCTTCCCGGA	67
Hemo2-1F(spe I)	26	34.61	actagtAAGCTAAAAACGCCTTTCT	53
Hemo2-1R(sac I)	27	33.33	<u>gagctc</u> TAAAAGGAATAAGAAAATCG	54
Omp1-1F	21	42.85	AAGCGTCTTATTATTGTGCC	50
Omp1-1R	20	50.00	TTACATCGGCGAGACGTTGA	52
Omp2-1F	24	45.83	TGTTACTTCGACAGATGGAACGC	56
Omp2-1R	23	47.82	TTAGAACTGGTAGACCAGACCCA	55
Pmp-1F	22	40.90	AGTAATGTAGTGACAGACMCGA	50
Pmp-1R	20	45.00	TCAGCCATARCGACCRGTAA	48

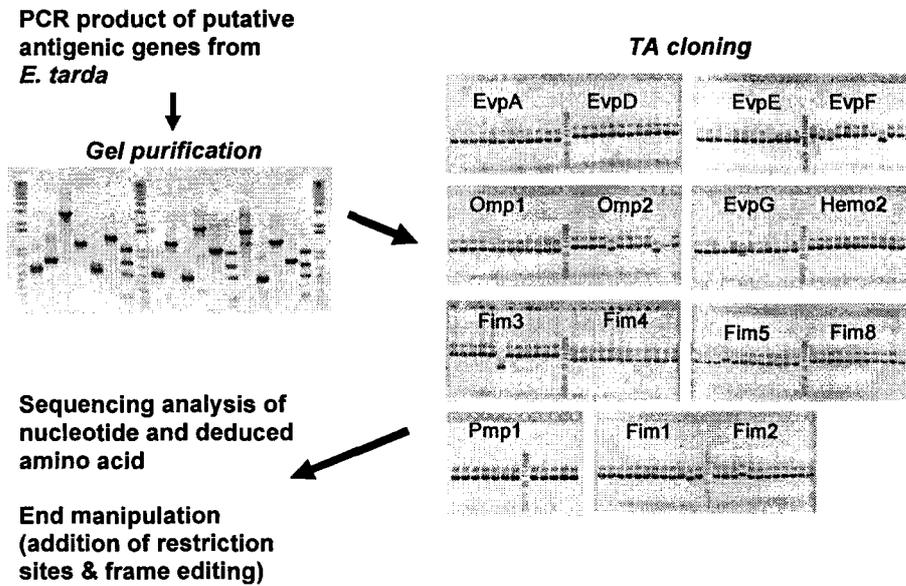
(Restriction sites added are underlined)

상기 primer들을 이용하여 분리된 *E. tarda* gDNA를 대상으로 PCR 증폭을 수행하였다. PCR 증폭을 통해 얻어진 산물의 전기영동 상은 [도 R2]에 나타내었으며 [도 R2]에서 보듯이 모두 정확한 특이 증폭이 효과적으로 이루어졌음을 알 수 있다.



[도 R2] *E. tarda*로부터 항원 후보 유전자군의 PCR 분리

증폭된 산물을 순수 정제 후 [도 R3] TA 클로닝을 통해 항원 후보 유전자들을 확보하였으며 12개의 후보 항원 유전자들에 대해서 벡터 primer 또는 walking primer를 이용하여 염기서열을 다음과 같이 결정, 분석하였다. 각 유전자의 염기서열 및 유추 아미노산 서열은 첨부 부록 I에 표기하였다.

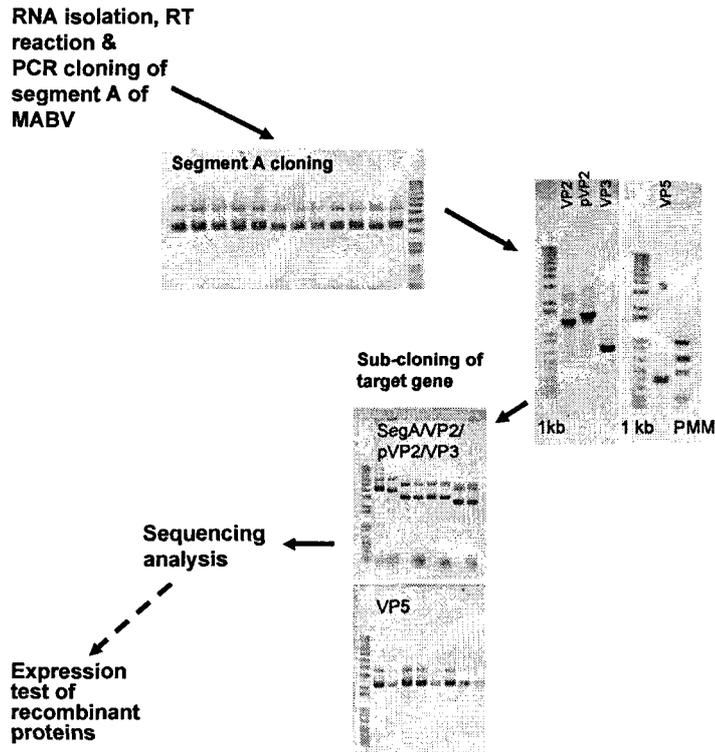


[도 R3]

*E. tarda* 항원 후보 유전자들의 클로닝 및 말단 조작

#### 나. Marine Birna Virus (MABV) 유전자의 분리 및 분석

세포배양을 통해 확보한 MABV stock을 이용하여 cDNA pool 합성, segment A 전체 영역의 클로닝, 각 후보 유전자들의 sub-cloning을 수행하였다. 염기서열 분석 결과는 모두 예상된 결과와 잘 일치하는 것으로 나타나 바이러스, segment A 전체 영역 및 각 유전자 클론의 정보를 성공적으로 수집하였고 그 클로닝 과정의 결과와 확보한 유전자 정보는 각각 [도 R4] 와 [도 R5]에 나타내었다.



[도 R4]

MABV 항원 유전자의 클로닝 및 조작

→ VP2F

```

atggtcgacctgcaggcggccggaattcactagtgattatgaacacacaaaggcaaccgcaacttacttgagatccattatgcttccc
M V D L Q A A A N S L V I M N T T K A T A T Y L R S I M L P
gagaatggtccagcaagcatccggacgacataacagagagacacatactaaacaagagacctcatcatacaacttagaggctccagac
E N G P A S I P D D I T E R H I L K Q E T S S Y N L E V P D
tccggaagtgggtctctgtctgcttcccggagctcctggatccagagtcgggtgccactacaagtggaatcagaaccagacggaactg
S G S G L L V C F P G A P G S R V G A H Y K W N Q N Q T E L
gaatcgaccagtggtggaacatcacaggacctgaagaaggcatcaactacgggaggctggctcacggaatcagacgtccagagc
E F D Q W L E T S Q D L K K A F N Y G R L V S R K Y D V Q S
tcaactctacctgctgggtctgtatgcccgaatgggacctgaacgcccgaccttcgaaggaagctgtctgaagtggagagttctccc
S T L P A G L Y A L N G T L N A A T F E G S L S E V E S F S
tacaacagctctgatgtccctcaccacgaacccccaggacaaagtgaacaaccagctagtaccaaaggagtgacagctcctaaacctacca
Y N S L M S L T T N P Q D K V N N Q L V T K G V T V L N L P
acagggttcgacaagccatacgtcccctggaggacgagacccccacaagggccccagtcattgaacggagccccggatgaggtgcacagct
T G F D K P Y V R L E D E T P Q G P Q S M N G A R M R C T A
gcaattgcaccacgaaggtatgaaatgacctccatccgacgctccccacagctaccagcgactgggacctcacaacaatctatgaa
A I A P R R Y E I D L P S A R L P T V P A T G T L T T I Y E
gggaacgccgacattgtgaactcaaccacagtgatcggcgacatcagcttcagactggaacaagaacccccgaacgacacgaagtacgac
G N A D I V N S T T V I G D I S F R L E Q E P P N D T K Y D
ttccagctcgacttctcggcttagacaacaacgtcccgttggtgcaataaccagctctacgctggccacaaccgacaactacaggggg
F Q L D F L G L D N N V P V V S I T S S T L A T T D N Y R G
gtctcagtaaatcacacagtaacccaacagagacaataacaaaacccatcaccagggtaagctgtcctacaataacaccagcag
V S V K F T Q S I P T E T I T K P I T R V K L S Y K I N Q Q
acagccatcggaatgcagcaacgcttgacccttgggccccatccgtctcattctcatcaggaacggaaacgtaacctggagtgctc
T A I G N A A T L G P L G P S S V S F S S G N G N V P G V L

```



```

VP5-3      GGTCTCACGGAAATACGACGTCCAGAGCTCAACTCTACCTGCTGGTCTGTATGCCCTGAA
VP5-4      GGTCTCACGGAAATACGACGTCCAGAGCTCAACTCTACCTGCTGGTCTGTATGCCCTGAA
VP5-1      GGTCTCACGGAAATACGACGTCCAGAGCTCAACTCTACCTGCTGGTCTGTATGCCCTGAA
            *****

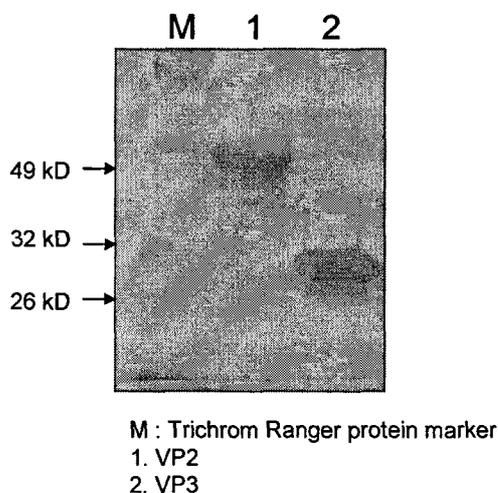
VP5-3      TGGGACCTGAACGCCGCGACCTTCGAAGGAAGTCTGTCTGAAATCACTAGT
VP5-4      TGGGACCTGAACGCCGCGACCTTCGAAGGAAGTCTGTCTGAAATCACTAGT
VP5-1      TGGGACCTGAACGCCGCGACCTTCGAAGGAAGTCTGT----AATCACTAGT
            *****

```

[도 R5]

MABV 항원 유전자의 대표 염기서열 분석

MABV 주요 후보 항원 유전자의 재조합 단백질 발현 및 정제 분리를 수행하였다. 클로닝한 MABV 주요 항원 단백질인 VP2와 VP3가 미생물 내에서 적절한 유도발현이 가능한지의 여부를 확인함으로써 차후 분석용 항체 제작과 *E. t arda*/*E. coli* 표면에 이들 단백질들의 탑재 가능성을 확인하였다. IPTG-inducible 발현 벡터에 클로닝된 두 항원 유전자들을 모두 성공적으로 재조합 단백질을 발현하는 것으로 나타났으며 아울러 His-tag등 column을 이용, 재조합 단백질만을 순수 분리 한 결과 VP2 및 VP3 모두 예상 크기의 단백질이 회수됨이 관찰되었다 [도 R6]. 따라서 차후 2차년도에 계획되어 있는 분석용 항체 및 이들 유전자 소재를 이용한 *bacteria*내 재조합 표면 발현의 가능성을 확인 하였다.



[도 R6]

MABV VP2 및 VP3 재조합 단백질의 발현/분리 정제

## 제2항 병원성 목적 세균 *E. tarda*의 형질전환 조작

### 가. 형질전환 조건 평가

형질전환 조작을 위한 선택 배지 및 내성 표지 유전자의 선발을 위해 *E. tarda* strain들을 통해 4종류의 항생제를 대상으로 다양한 농도 범위를 설정 감수성 평가를 수행하였다. 그 결과 분석한 모든 항생제에 감수성을 보였으며 ampicillin 및 tetracyclin의 경우 12  $\mu\text{g/ml}$ , kanamycin의 경우 25  $\mu\text{g/ml}$ , 그리고 chloramphenicol의 경우 50  $\mu\text{g/ml}$  이상의 항생제 조건에서 100 % 성장 억제효과가 관찰되었으며 조사한 최고 농도별로 항생제 내성 유전자를 *E. tarda*에 형질전환 시켰을 경우 모두 항생제 내성 형질의 부여가 가능한 것으로 나타났다.

선발된 *E. tarda* strain들의 항생제 선택 배지 사용 가능성 평가

항생제	농도 ( $\mu\text{g/ml}$ )				선택 배지로 사용가능 농도
	12	25	50	100 <sup>1)</sup>	
Ampicillin	12	25	50	100 <sup>1)</sup>	> 12 $\mu\text{g/ml}$
Tetracyclin	6	12	25	50 <sup>2)</sup>	> 12 $\mu\text{g/ml}$
Kanamycin	12	25	50	100 <sup>3)</sup>	> 25 $\mu\text{g/ml}$
Chloramphenicol	25	50	100	200	> 50 $\mu\text{g/ml}$

- 1) pBluescript SK phagemid transformation으로 성장 확인
- 2) pBR322 transformation으로 성장 확인
- 3) pGEM-T-Kan transformation으로 성장 확인

또한 *E. tarda*에 가장 효과적인 형질전환 방법을 구축하기 위해 화학적 방법과 전기적 방법을 비교한 결과 사용한 두 종류의 plasmid 모두에서 Ca 및 PEG 처리군 보다는 전기 충격 (electroporation) 방법이 유의적으로 우수한 형질전환 효율을 보였다. 다양한 조건들을 대상으로 수행한 화학적 형질전환 방법의 경우 최대 124 cfu/ $\mu\text{g}$  plasmid DNA의 효율을 나타낸 반면 전기충격법의 경우 그 효율이 15-50배 이상 증가함이 관찰되었다.

Chemical transformation 및 electroporation을 이용한 *E. tarda*의 형질전환 효율

Plasmid construct	Size (length)	Transformation method	Maximum cfu/ug plasmid DNA
pBR322	3.0 kb	Ca-transformation <sup>1)</sup>	25
		PEG-transformation <sup>2)</sup>	34
		Electroporation <sup>3)</sup>	1,821
pBluescript SK	3.0 kb	Ca-transformation <sup>1)</sup>	127
		PEG-transformation <sup>2)</sup>	16
		Electroporation <sup>3)</sup>	6,322

1) Ca-transformation

- 1-1) Start OD 600 nm = 0.3 - 0.5
- 1-2) Coating surface with ice-cold 0.1M CaCl<sub>2</sub> (5× concentration of bacterial cells)
- 1-3) Repeat 1-2)
- 1-4) Incubation on ice for 20-60 min
- 1-5) Heat shock treatment (40-43°C) for 45 to 120 sec
- 1-6) Recovery with SOC media at 28 to 37°C for 45 to 90 min
- 1-7) Plate culture onto selective sold medium

2) PEG-transformation

- 2-1) Start OD 600 nm = 0.3 - 0.5
- 2-2) Coating surface with ice-cold 0.1 - 1% PEG (Mr 400 or 8000) (10× concentration of bacterial cells)
- 2-3) Incubation at 0, 4, 15, 25 or 37°C for 30 min
- 2-4) Heat shock treatment (40-43°C) for 45 to 120 sec
- 2-5) Recovery with SOC media at 37°C for 60 min
- 2-6) Plate culture onto selective sold medium

3) Electroporation

- 2-1) Start OD 600 nm = 0.4 - 0.5
- 2-2) Wash the bacterial cells with ice-cold 10% glycerol (three times)
- 2-3) Concentrate the cells 100-fold from original culture volume
- 2-3) Incubate cells (40 ul) with plasmid DNA for 1 min
- 2-4) Pulse 1.5 - 3.0 KV, 150 - 300 ohm, 2-10 ms
- 2-5) Recovery with SOC media at 37°C for 40-60 min
- 2-6) Plate culture onto selective sold medium

나. 형질전환 벡터 backbone 평가 및 기타 조건의 최적화

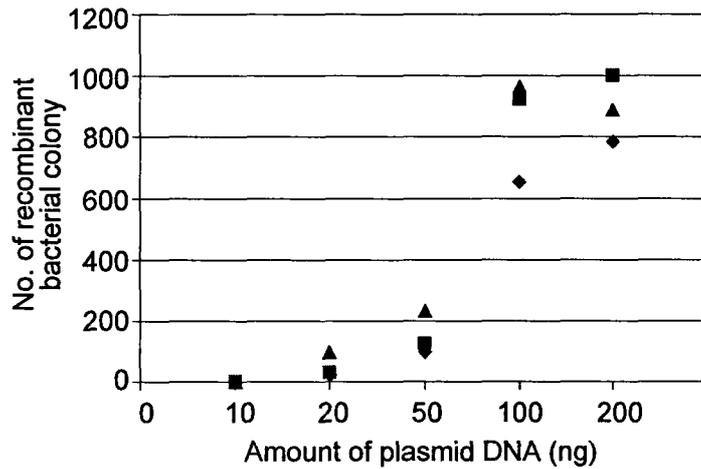
*E. tarda*의 형질전환을 위해서는 화학적 조건보다는 물리적인 전기 자극법이 훨씬 효과적인 것으로 나타났고 따라서 상기 최적의 electroporation 조건을 이용, 서로 다른 구성 요소를 갖고 있는 다양한 plasmid construct들을 대상으로 형질전환 효율을 분석하였다.

Plasmid backbone별 *E. tarda*의 electroporation 형질전환 효율 평가

Plasmid construct	Size (length)	Replication origin	Antibiotics resistant marker	Average cfu/ug plasmid DNA
pBR322	4.4 kb	pMB1 ori (rop gene regulation)	Amp/Tet	1,320
pBluescript SK	3.0 kb	pUC ori f1 ori	Amp	6,240
pGEM 3Zf(+)	3.2 kb	pUC ori f1 ori	Amp	7,809
pMALp2X	6.7 kb	pMB1 ori (rop gene regulation) M13 ori	Amp	1,511
pGEX4T-1	4.9 kb	pBR322 ori (without rop gene regulation)	Amp	923
pKD20	6.1 kb	R101 ori	Amp	347

상기 표에서 보듯이 lower copy number를 유지하는 pMB1 origin과 rop 유전자를 보유한 플라스미드 보다는 high copy number form의 pUC origin을 보유한 플라스미드가 보다 우수한 형질전환 성적을 나타내었고 특히 pGEM backbone을 갖는 플라스미드 (pGEM 3Zf)에서 가장 높은 효율이 관찰되었다. 플라스미드의 크기 (bp length)와는 큰 유의적인 상관관계가 없어 3.0 - 6.7 kb 범위는 *E. tarda* 형질전환 효율에 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 판단되었다.

상기 pGEM 3Zf(+) plasmid construct를 이용하여 electroporation시 다양한 plasmid DNA 양에 따른 형질전환 *E. tarda* 확보 효율을 분석하였다. DNA양을 0 - 200 ng까지를 6개 구간으로 나누어 형질전환 시킨 결과 50 ng이하에서는 매우 낮은 CFU가 관찰되나 100 ng 부터 유의적인 증가가 관찰되었고 200 ng과 100 ng 사이에는 통계적 차이가 관찰되지 않았다 ( $P > 0.05$ ) [도 R7].

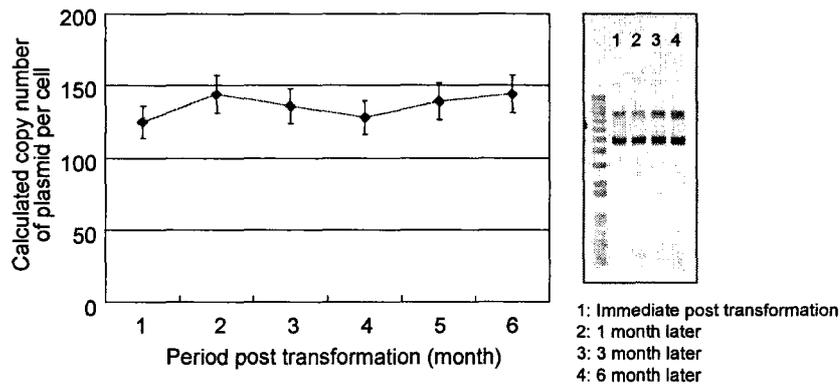


[도 R7]

Plasmid 양 (ng)에 따른 *E. tarda*의 electroporation 형질전환 효과

다. 형질전환 지속 안전성 평가

재조합 *E. tarda*내 형질전환된 plasmid (pGEM vector)의 copy 수 평가와 이의 지속 안정성을 분석한 결과를 [도 R8]에 나타내었다. [도 R8]에서 보듯이 *E. tarda*내 플라스미드의 copy수는 조사한 6개월간 50회 이상의 계대를 거치면서도 120-150 plasmid copies/cell 수준을 일양하게 유지하는 것으로 나타났으며 이에 안정적인 형질전환 *E. tarda* 균주의 확립이 가능함을 잘 보여주고 있다 [도 R8].

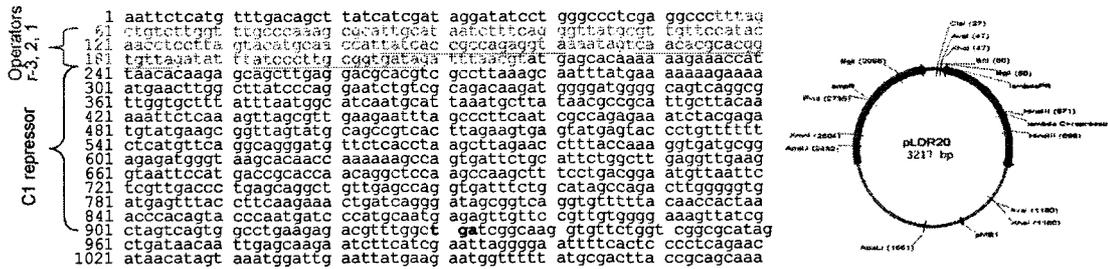


[도 R8]

*E. tarda* 형질전환 균주의 plasmid 보유 안정성 (copy number/cell) 평가

### 제3항 재조합 *E. tarda* ghost 유도 기술 개발

#### 가. Ghost 유도용 벡터 구축



Sequence of E-lysis expression cassette driven by lambda PR promoter

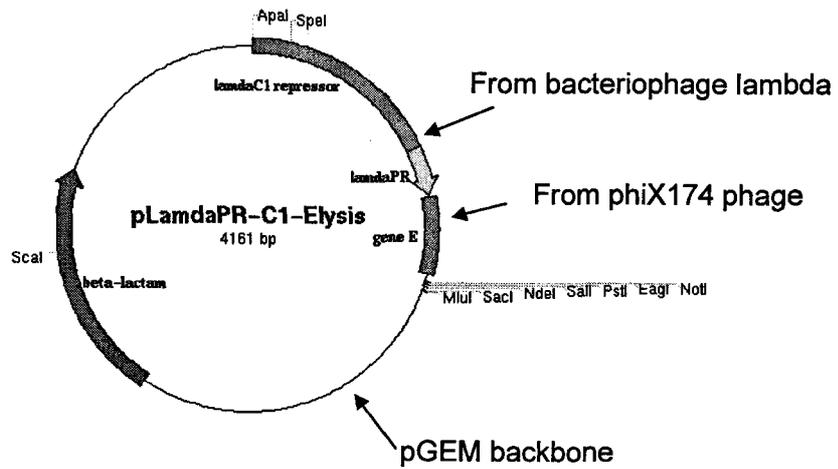
#### (ApaI) - cI rep reverse - lambda PR promoter (r3, r2, r1) - (SacII)(EcoRI) - E gene

(gggcc) **TCAGCCAAACGCTCTCTCAGGCCACTGACTAGCGATAACTTTCCCCACAACGGAACAACCTCATTCGATGGGATCATGGGTACTGTGGGTTTAGTGG**  
**TTGTA AAAACACCTGACCCGTATCCCTGATCAGTTTCTTGAAGGTA AACTCA TCACCCCAAGTCTGGCTATGCAGAAATCACCTGGCTCAACAGCCTGCTCAGGGT**  
**CAACGAGAAATTAACATTCGGTCAGGAAAGCTTGGCTTGGAGCCTGTGGTGGCGGTATGGAATTACCTTCAACCTCAAGCCAGAAATGCAGAAATCACTGGCTTTTTTG**  
**GTTGTGCTTACCCATCTCTCCGATCACCTTTGGTAAAGGTTCTAAGCTTAGGTGAGAACATCCCTGGCTGAACATGAGAAAAACAGGGTACTCATACTACTTCT**  
**AAGTGCAGCGCTGCATACTAACCCTTTCATACATCTCGTAGATTCTCTGGCGATTGAAGGGCTAAATCTTCAACGCTAACTTTGAGAATTTTGTAAAGCAATGCGG**  
**CGTTATAAGCATTTAATGCATGTATGCCATTAATAAAGCACCAACGCGCTGACTGCCCAATCCCCATCTTGTCTGGACAGATTCCTGGGATAAGCCAAGTTTCATTT**  
**TTCTTTTTTTCATAAATGCTTTAAGGCGACGTGCGTCCCAAGCTGCCTCTGTGTTAATGGTTCTTTTTTGTGCTCAT** aagtt aaatct atc aacgc aagggat a  
aatatctaaacacoutgggtgttgastatbttaactctggcggtgataatguttgcatgtactaaggagattgtatgqaacacgcataaccctaaaagatttatgca  
tggcctttgggcaaaacaaagacagctaaa (ccgagg) (gaattc) **ATGTTACGGTGGCTTTGGGATACCTGCTTTCCTGCTGCTGTTGATTTTATTTGCTGCC**  
**GTGATGCTTATTTATTTTATCCCGTCAACATTCAAACGGCTGCTGATCAATGGAAGGGCTGAAATTTACGGAAAAACATTTAATGCGCTGCGAGCTCCCGTTAA**  
**AGCCGCTGAAATTTGTTCCGCTTACCTTGGCTGTACGCGCAGGAAACACTGACGTTCTTACTGACGCGAGAAGAAAAACGGTCCGCTAAAAATACGTTCCGGAAGGAGTGA**  
tgtaatgt.

[도 R9]

#### E. tarda ghost 유도를 위한 발현벡터 구축 및 염기서열 확인

[도 R9]는 ghost 유도용 발현 벡터 제작을 위한 유전자 소재의 클로닝과 expression cassette 융합 구조의 염기서열 확인 결과를 나타내고 있다. Ghost 발현 벡터 개발을 위해 CI repressor, E-gene 및 lambda PR promoter 영역을 각기 제한효소 말단 조작을 통해 pGEM 벡터내로 클로닝 하였으며 클로닝 된 최종 벡터 [도 R10]은 4.1 kb의 발현 벡터 구조로서 재조합 박테리아를 28-30 °C 이하의 온도에서 배양 시 CI repressor의 작동으로 인해 PR promoter가 작동 하지 않으나 온도 shift를 통해 (42 °C) 고온에 노출되었을 때 repressor의 promoter binding affinity가 급격히 감소되어 transcription이 유도되는 특징을 갖고 있다.

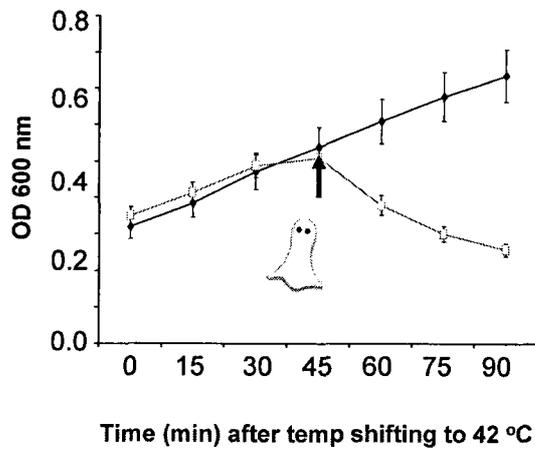


[도 R10]

1차 version의 ghost 유도 발현 벡터 partial restriction map

나. 대장균에서의 ghost 발현 작동 여부 평가

상기 벡터가 도입된 재조합 대장균 및 재조합 *E. tarda*의 ghost (E-lysis gene 발현) 유도에 따른 lysis와 이로 인한 OD value (=600 nm)의 변화를 비교하였다. 아래 그림에서 보듯이 대장균의 경우 온도 shifting 후 30-45분부터 급격한 lysis 반응이 관찰되어 최초 OD 값까지의 감소에 요구되는 반응시간은 1시간 내외로 나타났다 [도 R11].

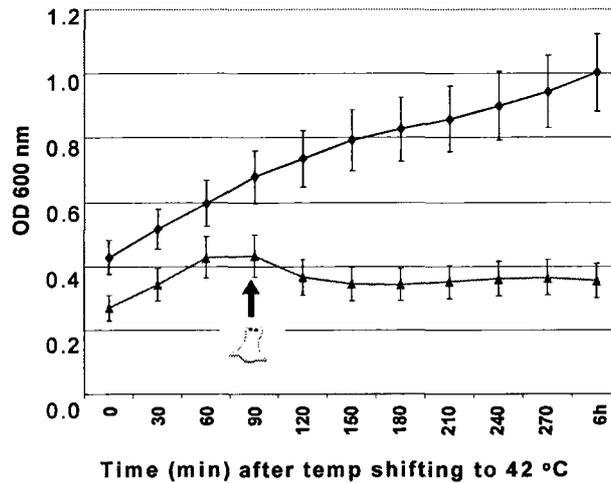


[도 R11]

*E. coli* ghost 유도에 따른 OD (600 nm) 변화 양상

다. *E. tarda*에서의 ghost 발현 작동 여부 평가

*E. tarda*의 경우 90-120분 후에 OD 값의 감소가 개시되어 *E. coli*보다는 lysis 개시점이 다소 지연되는 것으로 나타났으며 ghost 반응의 완료까지도 대장균보다 장시간 (12시간)이 필요한 것으로 나타났다 [도 R12].



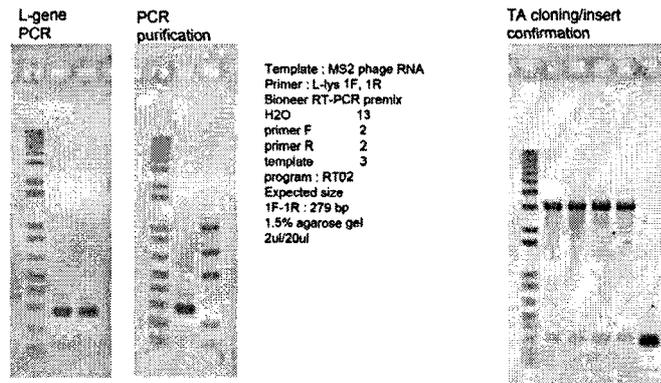
[도 R12]

*E. tarda* ghost 유도에 따른 OD (600 nm) 변화 양상

라. 용해 유전자 (lysis gene) 및 발현 조절 부위의 최적화

1) 용해 유전자의 조작

L gene을 이용한 E-L fusion protein 발현 제작을 수행하였다. AccuPower RT-PCR PreMix kit (Bioneer)를 이용하여 RT-PCR 반응을 수행한 결과 정확한 예상 크기의 PCR 산물이 확보되었으며 이에 PCR 증폭 산물의 정제와 TA 클로닝 및 plasmid 분리를 수행한 결과 모두 정확한 클로닝이 되었음을 확인할 수 있었다. 또한 TA 클로닝 된 플라스미드의 *EcoRI* 절단을 통해 원하는 크기의 insert의 유무를 확인한 한 결과 예상 크기의 산물이 클로닝 되었으며, 염기서열 분석을 통해 정확히 reference 서열과 일치함을 알 수 있었다 [도 R13]. 상기 분리된 E-gene 과 L-gene을 대상으로 최적의 조합을 구축하기 위해 연구 재료 및 방법에서 언급한 바와 같이 fusion protein coding 유전자를 구축하였고 그 염기서열 분석 결과를 [도 R14 & 15]에 나타내었다. [도 R14 & 15]에서 보듯이 정확한 클로닝을 통해 in frame fusion sequence가 구축되었음을 잘 보여 주고 있다.



[도 R13]

L-gene 클로닝 결과 전기영동 사진

EcoRI-E gene 1F  
 ATGGTACGCTGGACTTTGTCCGATACCCCTGCTTCTCCTGCTCC1GTTGAGTTTATTGCTGCCGTCATTGCTTATTATGTTTCATC  
 M V R W T L W D T L A F L L L S L L L P S L L I M F I

BamHI-Poly R52  
BamHI-Poly R53  
BamHI-Poly R54  
 CCGTCAACATTCAAACGGCCTGCTCATCATGGAAGGCGCTGAATTTACGGAAACATTATTAATGGCGTCGAGCGTCCGGTTA  
 P S T F K R P V S S W K A L N L R K T L E L M A S S V R L

AAGCCGCTGAATTTGTTGCGCTTACCTTGGCTGTACGGCAGGAAACACTGACGTTCTTACTGACCGAGAAAGAAAACGTCGCTC  
 K P L N C S R L P C V Y A Q E T L T F L L T Q K K T C V

NdeI-E gene 1R  
 AAAAAATTACCTGCGGAAGGAGTGA  
 K N Y V R K E \*

[도 R14]

E-gene으로부터 서로 다른 길이의 N-terminal 서열의 (52, 53 및 54 amino acids) 클로닝을 위한 primer 위치

BamHI-Poly 1F  
 ATGGAAACCCGATTCCCTCAGCAATCGCAGCAAACCTCCGGCATCTACTAATAGACCGCCGCAATCAACACATGAGGATTACCCA  
 M E T R F P Q Q S Q Q T P A S T N P R R P F K H E D Y P

TGTCGAAGACAACAAGAAGTTCAACTCTTTATGTATTGAECTTCTCCTCGCGATCTTTCTCTCGAAATTTACCAATCAATGCTT  
 C R R Q Q R S S T L Y V L I F L A I F L S K F T N Q L L

NdeI-Lgene R  
 CTGTGCTACTGGAAAGCGGTGATCCGCACAGTGACGACTTTACAGCAATTGCTTACTTAA  
 L S L L E A V I R T V T T L Q Q L L T \*

[도 R15]

L-gene의 C-terminal 부분 (55 amino acids) 서열의 클로닝을 위한 primer 위치

상기 **fusion gene** 클로닝을 통해 최종적으로 확보된 클론들의 염기서열은 아래와 같으며 염기서열에서 보듯이 모두 100% 정확한 염기서열이 증폭, **fusion** 및 클로닝 되었음을 잘 나타내고 있다 (서열 표시; **E gene shown in black, L gene in blue. Deduced amino acids in red**).

E<sub>52</sub>-L<sub>55</sub> 112aa (345 bp)

ATGGTACGCTGGACTTTGTGGGATACCCCTCGCTTTCCTGCTCCTGTTGAGTTTATTGCTGCCGTCATTGC  
TTATTATGTTTCATCCCGTCAACATTCAAACGGCCTGTCTCATCATGGAAGGCGCTGAATTTACGGAAAAC  
ATTATTAATGGCGTCGGGGGATCCGCTGGGCCATTCAAACATGAGGATTACCCATGTCGAAGACAACAA  
AGAAGTTCAACTCTTTATGTATTGATCTTCTCGCGATCTTCTCTCGAAATTTACCAATCAATTGCTTC  
TGTCGCTACTGGAAGCGGTGATCCGCACAGTGACGACTTTACAGCAATTGCTTACTTAAcatatg

MVRWTLWDTLAFLLLLSLLLPSLLIMFIPSTFKRPVSSWKALNLRKTLMLASGDPLGPFKHEDYPCRRQQ  
RSSTLYVLI FLAIFLSKFTNQLLLSLLEAVIRTVTTLQQLLT\*

E<sub>53</sub>-L<sub>55</sub> 113aa (348 bp)

ATGGTACGCTGGACTTTGTGGGATACCCCTCGCTTTCCTGCTCCTGTTGAGTTTATTGCTGCCGTCATTGC  
TTATTATGTTTCATCCCGTCAACATTCAAACGGCCTGTCTCATCATGGAAGGCGCTGAATTTACGGAAAAC  
ATTATTAATGGCGTCGAGCGGGGATCCGCTGGGCCATTCAAACATGAGGATTACCCATGTCGAAGACAACAA  
CAAAGAAGTTCAACTCTTTATGTATTGATCTTCTCGCGATCTTCTCTCGAAATTTACCAATCAATTGC  
TTCTGTCGCTACTGGAAGCGGTGATCCGCACAGTGACGACTTTACAGCAATTGCTTACTTAAcatatg

MVRWTLWDTLAFLLLLSLLLPSLLIMFIPSTFKRPVSSWKALNLRKTLMLASSGDPLGPFKHEDYPCRRQQ  
QRSSTLYVLI FLAIFLSKFTNQLLLSLLEAVIRTVTTLQQLLT\*

E<sub>54</sub>-L<sub>55</sub> 114aa (351 bp)

ATGGTACGCTGGACTTTGTGGGATACCCCTCGCTTTCCTGCTCCTGTTGAGTTTATTGCTGCCGTCATTGC  
TTATTATGTTTCATCCCGTCAACATTCAAACGGCCTGTCTCATCATGGAAGGCGCTGAATTTACGGAAAAC  
ATTATTAATGGCGTCGAGCGTCGGGGATCCGCTGGGCCATTCAAACATGAGGATTACCCATGTCGAAGA  
CAACAAAGAAGTTCAACTCTTTATGTATTGATCTTCTCGCGATCTTCTCTCGAAATTTACCAATCAAT  
TGCTTCTGTCGCTACTGGAAGCGGTGATCCGCACAGTGACGACTTTACAGCAATTGCTTACTTAAcatatg

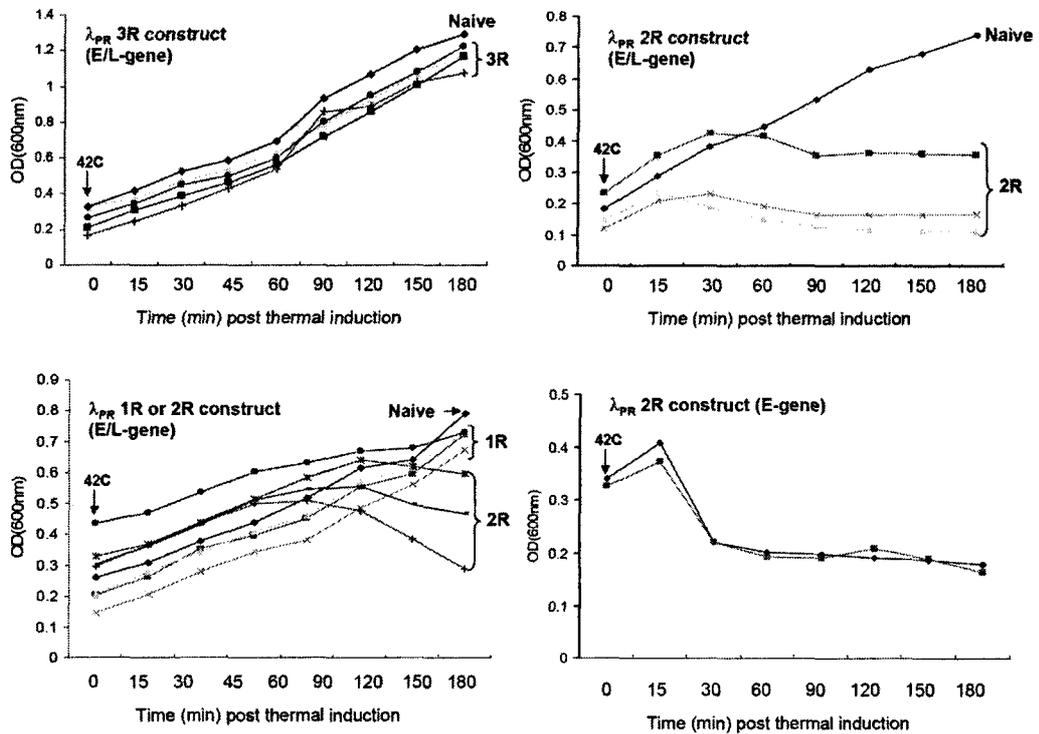
MVRWTLWDTLAFLLLLSLLLPSLLIMFIPSTFKRPVSSWKALNLRKTLMLASSVGDPLGPFKHEDYPCRR  
QQRSSTLYVLI FLAIFLSKFTNQLLLSLLEAVIRTVTTLQQLLT\*

## 2) 조절 부위 유전자의 조작

종래 **Lambda PR**에 연결된 **clo** 유전자의 일부를 포함하는 **spacer sequence**를 대상으로 불필요한 염기서열들을 제거하고 가장 최적의 발현 유도를 가능케 하는 길이의 **lambda PR promoter** 3종류를 클로닝 하였으며 클로닝 된 플라스미드 벡터들의 염기서열을 분석한 결과를 [도 R16]에 나타내었다. [도 R16]에서 보듯이 종래 **lambda PR promoter**의 영역에는 3종의 **operator region**과 **clo transcript sequence** 그리고 양 말단에 **CI 857 repressor** 및 **E-gene**과의 연결 부위가 존재하여 본 조절부위의 개선 조작에 의한 프로모터 길이 1R, 2R



서와 동일한 연구결과를 나타내어 종래의 1차 version인 lambda PR 3R에 의해 조절되는 E-gene expression은 E-gene 단독인 경우에만 cell lysis가 효율적으로 나타나는 반면 L-gene등의 추가 염기서열 또는 fusion protein의 발현은 정상적으로 이루어지지 못하였다. 또한 clo mRNA leading sequence가 없이 정확한 operator 또는 promoter sequence 만을 포함하는 경우 역시 적절한 세포 lysis 발현을 유도하지 못하였다. 따라서 두 발현 실험 모두에서 최적의 조절부위의 조합은 Lambda 2R promoter 영역을 포함하는 것으로 나타났다 [도 R17].



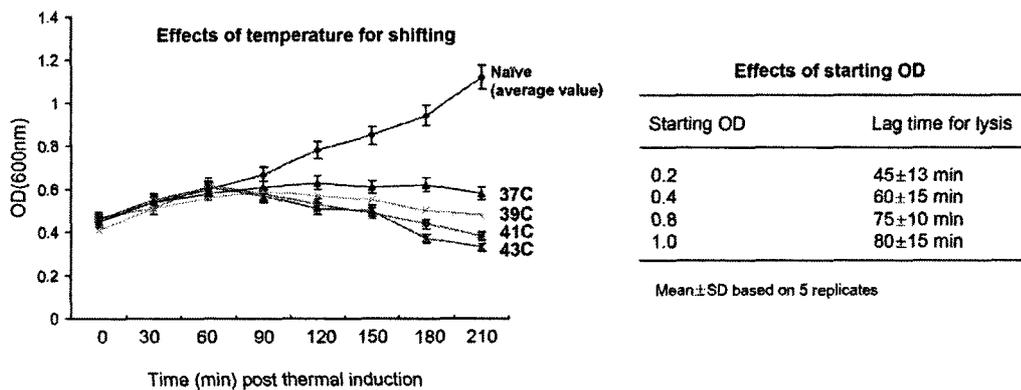
[도 R17]

다른 조절 부위에 의해 유도되는 E-또는 E/L-lysis 양상

#### 마. 대장균 및 *E. tarda*에서의 lysis 재조합 발현 특징

Lambda PR promoter/operator에 연결된 spacer sequence 영역을 대상으로 다양한 길이의 조절부위 영역을 클로닝한 후 E-gene과의 fusion cassette를 구축하고 재조합 발현을 평가하였다. 재조합 발현은 전년도 연구를 통해 1차 조사된 온도 프로그램을 이용하여 cell lysis 효율을 분석하였다. 아울러 최적 조절 부위를 보유하는 벡터를 대상으로 starting cell number (OD 600 nm = 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0)별 heat-shock temperature (37, 39, 41, 43°C)별 온도 프로그램을

설정하고 가장 우수한 재조합 발현 및 cell lysis가 유도되는 구동 프로그램을 선정하였다. 본 construct를 이용하여 다양한 온도 구동 프로그램을 수행한 결과 starting cell number (OD 600 nm = 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0)의 경우 최초 세포수가 증가할수록 ghost 유도 시작점이 지연되는 경향을 보였으나 사용한 농도 범위 모두에서 ghost 유도 자체는 완전하게 일어나는 것으로 나타나 OD 1.0 범위까지는 무난한 백신 제작이 가능한 것으로 판단되었다. 또한 heat-shock temperature (37, 39, 41, 43°C)별 온도 프로그램을 설정하고 가장 우수한 cell lysis가 유도되는 구동 프로그램을 선정한 결과 37°C에서는 유도 효율이 비교적 둔화되는 경향을 보였으나 그 이상의 온도에서는 모두 효율적인 lysis가 유도되고 특히 41°C 이상에서 가장 고효율의 유도가 관찰되었다. 따라서 본 실험 결과를 바탕으로 *E. tarda* ghost 유도는 28°C 배양 후 42°C 온도 자극이 가장 우수한 것으로 판단되었다 [도 R18].

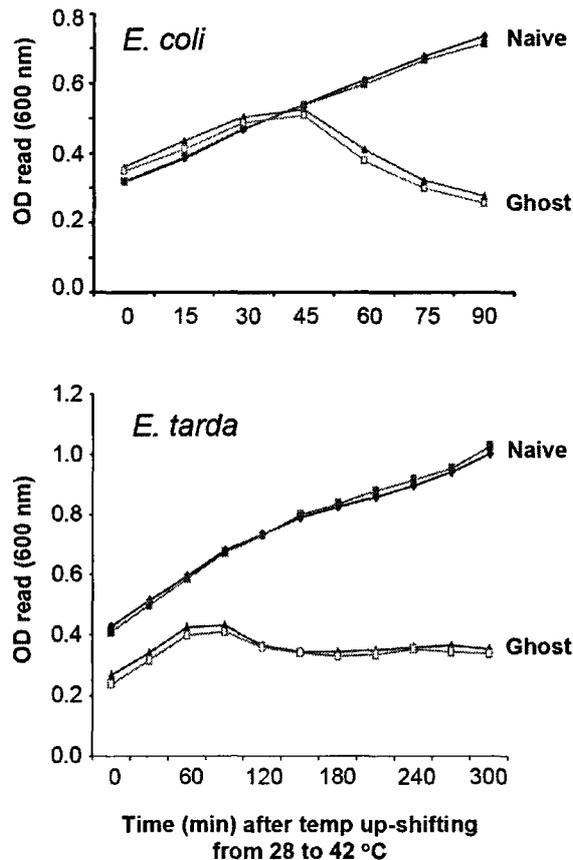


[도 R18]

초기 유도 세포 수에 따른 ghost 유도 발현 양상

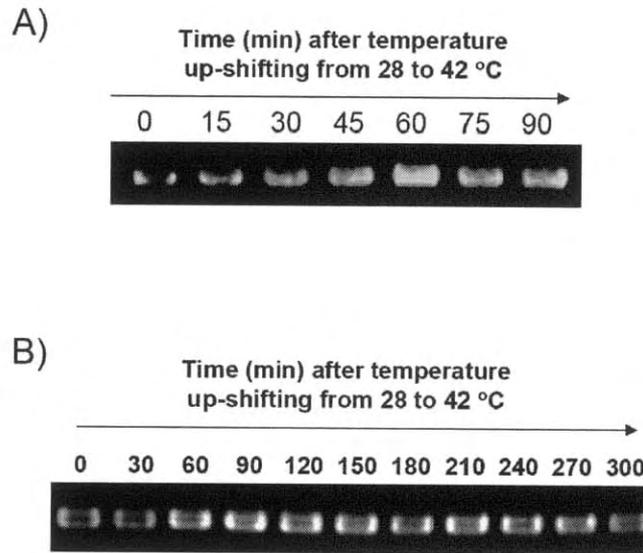
앞의 결과와 같이 *E. tarda*를 대상으로 한 ghost 유도는 대장균에 비해 상대적으로 장시간의 반응 시간이 요구되며 이는 lambda phage PR promoter의 transcription efficiency가 대장균에서보다 *E. tarda*에서 상대적으로 낮고, 또한 발현된 E protein이 *E. tarda* 세포벽에 hole을 형성하는 효율이 대장균의 경우보다 약하기 때문인 것으로 나타났다. 이는 비교적 가까운 근연 관계에 있는 두 gram (-) 세균 계통에 있어서도 종간 heterologous 유전자의 인식 차이에 기인하는 것으로 판단되며 목적 세균별로 promoter 부위 조작 및 구조 유전자의 재설계에 관한 최적화의 필요성을 잘 제시하고 있다 (Tijhaar et al., 1994; John et al., 2000). 또한 박테리아 유전자 발현의 경우 전사의 개시 (transcription initiation) 뿐

만 아니라 전사체의 신장 (elongation) 역시 유전자 발현에 많은 영향을 미칠 수 있음이 보고됨에 따라 *E. tarda*내 발현하는 E-lysis transcript들의 안전성 역시 차이가 있을 수 있음을 시사하고 있다 (Borukhov et al., 2005). E-lysis 유전자의 RT-PCR 분석 결과 *E. coli* 및 *E. tarda* 모두에서 온도 자극 초기부터 E-gene transcript가 효과적으로 검출되나 온도 자극 기간의 경과에 따라 대장균의 경우 급격한 transcript의 증가와 함께 신속한 lysis가 유도되지만, *E. tarda*의 경우 E-gene transcript 증가 폭이 상대적으로 적으며 또한 E-gene transcript가 계속 발현함에도 불구하고 lysis의 개시가 지연되는 것으로 나타났다. 이는 상기 형질전환 안정성을 고려할 때 세포 당 plasmid copy 수가 낮기 때문보다는 전사 발현 강도의 감소와 함께 발현된 E protein의 용해 능력이 *E. tarda*에서 다소 약화되었기 때문으로 판단된다 (see also Browning and Busby, 2004) [도 R19 & 20].



[도 R19]

*E. coli* 및 *E. tarda* ghost 유도 발현 양상 비교



[도 R20]

*E. coli* 및 *E. tarda* ghost 유도 시 E gene의  
전사 발현 양상 비교

#### 마. Ghost 효율 및 생존력 비교

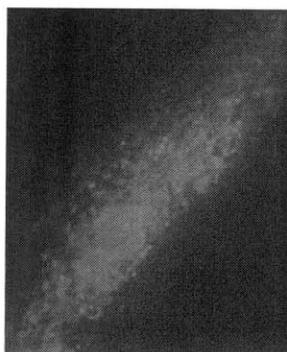
이상의 결과를 통해 lambda PR promoter를 포함하는 조절 부위는 최적의 재조합 및 fusion protein의 발현을 위해서는 promoter/operator 염기서열과 함께 clo 유전자의 5-leading mRNA 염기서열을 포함하는 것이 가장 효과적이며 또한 자극 온도는 42-43°C가 가장 적절한 것으로 나타났다. 또한 최초 처리 세포 수의 경우 최초 OD의 증가와 함께 lysis가 일어나기까지의 lagging time이 함께 증가하는 경향을 보였으나 현재 조사된 OD 600 nm = 1.0까지 구간에서는 모두 1*E. tarda* ghost가 효율적으로 유발될 수 있음을 알 수 있었다. 동결 건조 등 post-induction 처리를 통해 100% 생존력 제거가 가능한 것으로 나타나 생균의 항원성을 보유하는 사균 백신의 개발 가능성을 잘 시사하고 있다. 뿐만 아니라 E-L fusion 단백질의 경우 E-gene 단독에 의한 발현 보다 lagging time이 증가하는 것으로 나타났지만 역시 완벽한 ghost 박테리아 유도가 가능하였고 특히 lagging time의 증가에도 불구하고 MgSO<sub>4</sub> 및 DW wash를 병행할 경우 lysis hole size의 증가가 관찰되었으며 이로 인해 보다 우수한 생존력 제거 및 세포질 제거 기능이 부여 될 수 있는 system으로 판단되었다. 따라서 ghost 발현이 유

도된 대장균 및 병원성 세균 *E. tarda*를 대상으로 재조합 cell lysis 발현을 유도한 후 생존 세균 (resistant cell)의 존재 유무를 평가하고 또한 유도된 bacterial ghost들을 이용, 백신 제작을 위한 post-induction treatment 과정을 평가하였다. Ghost 유도는 상기 최적 조건을 이용하여 수행하였고, induction 수행 후 반응물의 serial dilution을 plate에 도말하여 colony forming unit를 측정하였다. 그 결과 그러나 대장균에 비해 ghost 유도 속도가 다소 낮음에도 불구하고 반응이 완성되었을 시점에서의 *E. tarda*의 ghost 효율은 대장균과 전혀 차이가 없는 것으로 나타났다. 즉 지연된 lysis 반응에도 불구하고 OD 값의 감소가 최초 수준까지 도달하였을 때는 대장균 및 *E. tarda* 모두 99.99% 이상의 생존력 제거효율을 나타내었다. 더욱이 저장액 처리 및 동결건조 과정을 통해 백신 시료를 제작하였을 경우 대장균 및 *E. tarda* 실험구 모두에서 균의 생존력이 완벽하게 100 % 제거되었음이 확인되었다 그러나 상기 조건하에서 *E. tarda*의 ghost 유도율은 유도직 후 배양액에서 99.999% 임에도 불구하고 일부 극소수이기는 하나 resistant 균들이 관찰되어 본 연구개발에서는 ghost 발현 벡터의 기능성 극대화 연구를 수행하였다 (아래 제 7항 참조).

#### 제4항 항원 탑재를 위한 표면발현 시스템 구축

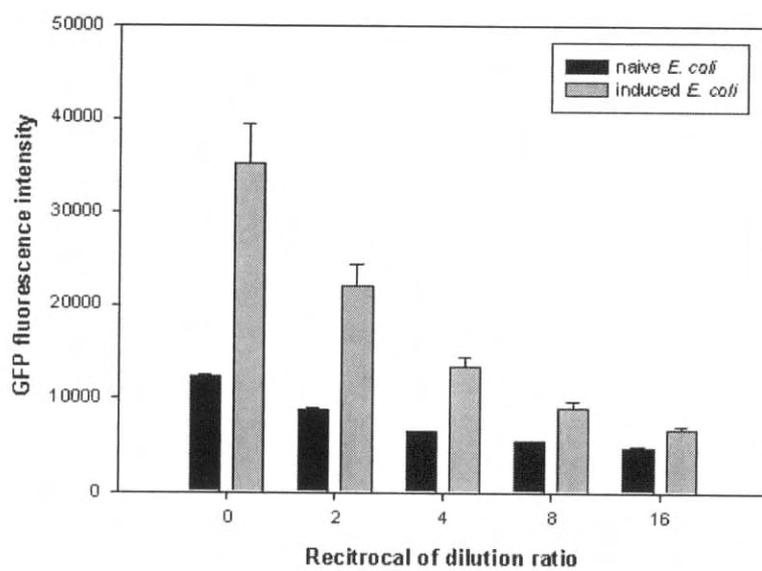
##### 가. InaK 단백질 표면 발현 신호를 이용한 발현 벡터

Ice nucleoprotein인 INP 극 저온의 상태에서 ice crystal을 형성하는데 관여하는 membrane 단백질로서 본 단백질의 N-terminal 및 C-terminal을 이용하여 표면발현 벡터를 제작하였다. *E. tarda*의 표면을 targeting 하기위해서 *P. syringae*에서 분리된 InaK 유전자의 N-terminal signal을 이용하였다. *E. coli*와 *E. tarda*에 형질전환 시키고 형질전환 클론의 ghost 유도 후 GFP의 발현 유무를 현광현미경 검경을 분석하였다. [도 R21]에서 보듯이 INP N-terminal region과 융합되어 있는 GFP 유전자의 발현은 매우 효율적으로 검출되었으며 본 현광 현미경 검경이외에 cell fraction의 total fluorescence 역시 naive 균주에 비해 유의적으로 높은 발현율을 보였다. 또한 막 단백질(membrane protein)의 선택 분리 후에도 fluorometer 분석에 의해 현광 검출이 가능한 것으로 나타나 외래 단백질의 surface display 또는 targeting에 사용될 수 있음을 시사하였다 [도 R22].



[도 R21]

재조합 ghost 박테리아에서의 InaN에 의한 GFP 표면발현 검정



[도 R22]

재조합 ghost 박테리아에서의 InaN에 의한 GFP 표면 상대 정량

나. OMP 단백질 구조를 이용한 표면 발현 벡터

*E. tarda* OMP 단백질 유전자를 이용한 표면 발현계를 구축하기 위해서 *E. tarda* FSW910401 OmpS2 유전자를 분리 특징을 분석하였다. PCR cloning된 *E. tarda* FSW910410 OmpS2 유전자의 총 길이는 1284 bp이었으며, GenBank에 Blast search를 실시한 결과, 동일종인 *E. tarda* PPD130/91과 아주 높은 99.85%의 유사도(2곳에서 염기치환이 일어남)를 보였다. 이 외에도 *Enterobacter aerogenes* Omp36 gene (AF335467), *Enterobacter cloacae* OmpC gene (AJ316539), *Escherichia coli* OmpC gene (AF057355), *Klebsiella pneumoniae* OmpK36 gene (Z33506) 등과 높은 유사도를 가졌으며, 그 alignment 데이터도 12에 표시하였다. 또한 OmpS2 단백질의 2차 구조 motif에 기초한 2차 구조 영역을 표시하였다. *E. tarda* OmpS2는 세포막을 가로지르는 16개의  $\beta$ -strand 영역 (B1-B16) (membrane-spanning  $\beta$  sheets), 8개의 세포표면으로 위치하는 loop 영역 (L1-L8), 및 8개의 세포 안쪽에 위치하는 turns (T1-T8)로 고정되었다. 이러한 2차 구조에 기초하여 세포 표면으로 위치하면서 비교적 변이가 많이 축적된 각 L4, L5, L6, L7 영역을 외래 단백질의 tandem fusion과 sandwich fusion sites로 선택하였다 [도 R23 & 24].

	10	20	30	40	50	60	70	80
PPD130/91	ATGTGTTTAC	TTCGACAGAT	GGAACGCAAT	TTAGTTCTCA	CTCGTAGCAC	GAAAAGACAA	AATAAGCAGT	GGCATCTCAT
FSW910410	ATGTGTTTAC	TTCGACAGAT	GGAACGCAAT	TTAGTTCTCA	CTCGTAGCAC	GAAAAGACAA	AATAAGCAGT	GGCATCTCAT
	<i>Hind</i> III-OmpS2 1F							
	90	100	110	120	130	140	150	160
PPD130/91	ACCTGACCGC	ACCGGTCAGC	AACTAAGAAG	GAATATTATT	GTGAAACGTA	ATCTGCTGGC	AGTCGTTATT	CCTGCTCTGT
FSW910410	ACCTGACCGC	ACCGGTCAGC	AACTAAGAAG	GAATATTATT	GTGAAACGTA	ATCTGCTGGC	AGTCGTTATT	CCTGCTCTGT
	170	180	190	200	210	220	230	240
PPD130/91	TAGTTGCAGG	CGCAGCTAAC	GCTGCGGAAA	TCTACAACAA	AGACGGCAAC	AAGCTGGATC	TGTACGGTAA	AGTAGATGGT
FSW910410	TAGTTGCAGG	CGCAGCTAAC	GCTGCGGAAA	TCTACAACAA	AGACGGCAAC	AAGCTGGATC	TGTACGGTAA	AGTAGATGGT
	250	260	270	280	290	300	310	320
PPD130/91	CTGCACTACT	TCTCTAGCGA	TAGCAGCAAG	GATGGTGACC	AGTCCTACGT	CCGTTTCGGC	TTTAAAGGCG	AAACCCAGAT
FSW910410	CTGCACTACT	TCTCTAGCGA	TAGCAGCAAG	GATGGTGACC	AGTCCTACGT	CCGTTTCGGC	TTTAAAGGCG	AAACCCAGAT
	330	340	350	360	370	380	390	400
PPD130/91	TAACGATCAG	CTGACCGGTT	ATGGCCAGTG	GGAAGCACAG	GCTAACGTTA	ACCAGCCCGA	AAGCAACTCC	TCTAACTTCT
FSW910410	TAACGATCAG	CTGACCGGTT	ATGGCCAGTG	GGAAGCACAG	GCTAACGTTA	ACCAGCCCGA	AAGCAACTCC	TCTAACTTCT
	410	420	430	440	450	460	470	480
PPD130/91	TCACCCGTCT	GGGCTTTGCC	GGCCTGAAGT	ACGGCAACTA	CGGTTCTATC	GACTIONGCCC	GTACTIONGCCC	CGTGCTGTAC
FSW910410	TCACCCGTCT	GGGCTTTGCC	GGCCTGAAGT	ACGGCAACTA	CGGTTCTATC	GACTIONGCCC	GTACTIONGCCC	CGTGCTGTAC
	490	500	510	520	530	540	550	560
PPD130/91	GACATCGAAG	GCTGGACCGA	CGTGTGCGCG	GAGTTCGGTG	GCGATACCTC	TGCCCAGACT	GACAACTACA	TGGCTCAGCG
FSW910410	GACATCGAAG	GCTGGACCGA	CGTGTGCGCG	GAGTTCGGTG	GCGATACCTC	TGCCCAGACT	GACAACTACA	TGGCTCAGCG
	570	580	590	600	610	620	630	640
PPD130/91	CGCCAACAAC	CTGGCCACCT	ACCGTAACGA	CGGCTTCTTT	GGCCTGGTTG	ATGGCCTGGA	CTTCGCCCTG	CAGTATCAGG
FSW910410	CGCCAACAAC	CTGGCCACCT	ACCGTAACGA	CGGCTTCTTT	GGCCTGGTTG	ATGGCCTGGA	CTTCGCCCTG	CAGTATCAGG
	650	660	670	680	690	700	710	720
PPD130/91	GTAAAAACGA	TGGCCACGCC	TATGGCAAAG	ATGCTGATGG	CTCCTACAGC	TGGGATGGCG	CTCCGCTGAG	CAACAATGCG
FSW910410	GTAAAAACGA	TGGCCACGCC	TATGGCAAAG	ATGCTGATGG	CTCCTACAGC	TGGGATGGCG	CTCCGCTGAG	CAACAATGCG
	<i>Xba</i> I-L4 1R		<i>Sph</i> I-L4 1F					

```

PPD130/91      730      740      750      760      770      780      790      800
FSW910410    CGTGAGATCC AAGGCCAAAA CGGCGACGGC TTCGGTATGT CCACCACCTA CGATCTGGGC TGGGGCATCA GCGCCGGTGC
CGTGAGATCC AAGGCCAAAA CGGCGACGGC TTCGGTATGT CCACCACCTA CGATCTGGGC TGGGGCATCA GCGCCGGTGC
                SphI-L4 2F

PPD130/91      810      820      830      840      850      860      870      880
FSW910410    GCGGTACACC ACCTCTAACC GTACTACCGA GCAAAAATGG AGCGGCAACC AGGCTAACTC TAACGTTGCC GCGCGTAACA
GCGGTACACC ACCTCTAACC GTACTACCGA GCAAAAATGG AGCGGCAACC AGGCTAACTC TAACGTTGCC GCGCGTAACA
                XbaI-L5 1R

PPD130/91      890      900      910      920      930      940      950      960
FSW910410    AAGCCAGTC TTGGGGCGCC GGTCTGAAGT ATGATGCTAA CAACATCTAC CTGGCCACCA TGTACTGA AAGCCAGAAC
AAGCCAGTC TTGGGGCGCC GGTCTGAAGT ATGATGCTAA CAACATCTAC CTGGCCACCA TGTACTGA AAGCCAGAAC
                XbaI-L6 1R

PPD130/91      970      980      990      1000      1010      1020      1030      1040
FSW910410    ATGACGCCGT TCGGCTCTAC CGGTATCGCT AACAAAGCGA AGAAGTTCGA AGCCGTGGCC CAGTATCAGT TCGACTTCGG
ATGACGCCGT TCGGCTCTAC CGGTATCGCT AACAAAGCGA AGAAGTTCGA AGCCGTGGCC CAGTATCAGT TCGACTTCGG
                *
                XbaI-L7 1R

PPD130/91      1050      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
FSW910410    TCTGCGTCCG TCCATCGCCT ACCTGCAGTC TAAGGCCTCT GAGCTGAACT CCTACAACGG CTTTAAACGGT GGCAAGGCTG
TCTGCGTCCG TCCATCGCCT ACCTGCAGTC TAAGGCCTCT GAGCTGAACT CCTACAACGG CTTTAAACGGT GGCAAGGCTG
                SphI-L7 1F

PPD130/91      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
FSW910410    ACCTGGTAAA ATACGTTGAC CTGGGTGCGA CCTACTACTT CAACAAGAAC ATGTCCACCT ACGTTGATTA CAAAATCAAC
ACCTGGTAAA ATACGTTGAC CTGGGTGCGA CCTACTACTT CAACAAGAAC ATGTCCACCT ACGTTGATTA CAAAATCAAC

PPD130/91      1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280
FSW910410    CTGCTGGATG AAAACGACTT CACCCGCGCG AACAGCATCA ACACCGATGA CATCGTTGCT CTGGGTCTGG TCTACCAGTT
CTGCTGGATG AAAACGACTT CACCCGCGCG AACAGCATCA ACACCGATGA CATCGTTGCT CTGGGTCTGG TCTACCAGTT
                KpnI-OmpS2 1R

PPD130/91      CTA A
FSW910410    CTA A

```

[도 R23]

*E. tarda* FSW910410과 *E. tarda* PPD130/91 OmpS2의 nucleotide 염기서열 alignment. 각 loop 영역의 PCR cloning을 위한 PCR primer의 위치를 밑줄 또는 이탤릭체 표기. \*: 염기치환이 일어난 위치.

```

Structure      10      20      30      40      50      60      70      80
FSW910410    -----MERN LVLTRSTKRQ NKQWHLIPDR TGQQLRRNII -VKRNLLAVV IPALLVAGAA NAAE IYNKD- GNKLDLYGKV
PPD130/91    MCLLRQMERN LVLTRSTKRQ NKQWHLIPDR TGQQLRRNII -VKRNLLAVV IPALLVAGAA NAAE IYNKD- GNKLDLYGKV
EaeOmp37     -----MKVKVLSLL VPALLVAGAA NAAE IYNKD- GNKLDLYGKI
EcIOmpC      -----MKVKVLSLL VPALLVAGAA NAAE IYNKD- GNKLDLYGKV
EcoOmpC      -----MKVKVLSLL VPALLVAGAA NAAE IYNKD- GNKLDLYGKV
EcoOmpN      -----MKSKVLALL IPALLAAGAA HAAE IYNKD- GNKLDLYGKV
KpnOmpK36    -----MKVKVLSLL VPALLVAGAA NAAE IYNKD- GNKLDLYGKI
KpnOmpK37    -----MKRKVLALV IPALLAAGAA HAAE IYNKD- GNKLDLYGKV
SenOmpC      -----MKVKVLSLL VPALLVAGAA NAAE IYNKD- GNKLDLYGKV
SmiOmpC      -----MKVKVLSLL VPALLVAGAA NAAE IYNKD- GNKLDLYGKV
StyOmpS2     -----MKRKVLALV IPALLAAGAA HAAE IYNKD- GNKLDLYGKV
StyOmpS1     -----MNRKVLALL VPALLVAGAA NAAE IYKNK- GNKLDLYGKV
StyOmpC      -----MKVKVLSLL VPALLVAGAA NAAE IYNKD- GNKLDLYGKV
StyOmpC-2    -----MKVKVLSLL VPALLVAGAA NAAE IYNKD- GNKLDLYGKV
SmaOmpF      -----MKRNILAVV IPALLAAGAA NAAE IYNKD- GNKLDLYGKV
SmaOmpC      -----MKLRVLSLM VPALLVAGTA GAAE IYNKD- GNKLDLYGKV
CbiPceC      -----MNRKVLALV IPALLAAGAA HAAE IYNKD- GNKLDLYGKV

```

	90	100	110	120	130	140	150	160
Structure	-----]L1--	-----[B2--	-----]T	2[B3-----	--]L2-----	-----[	B4-----]T3	[B5---]L3-
FSW910410	DGLHYFSSDS	SKDGDQSYVR	FGFKGETQIN	DQLTGYGQWE	AQANVNPQES	NSSN--FFTRL	GFAGLKYGNY	GSIDYGRNNG
PPD130/91	DGLHYFSSDS	SKDGDQSYVR	FGFKGETQIN	DQLTGYGQWE	AQANVNPQES	NSSN--FFTRL	GFAGLKYGNY	GSIDYGRNNG
EaeOmp37	DGLHYFSSDD	SVDGDQTYMR	IGVKGETQIN	DQLTGYGQWE	YNVQANNTE	SSDQ--AWTRL	AFAGLKFQDA	GSFDYGRNNG
EcoOmpC	DGLHYFSDD	SVDGDQTYMR	LGFKGETQVN	DQLTGYGQWE	YQIQGNNGEN	ENN--SWTRV	AFAGLKFQDA	GSFDYGRNNG
EcoOmpC	DGLHYFSDDK	SVDGDQTYMR	LGFKGETQVT	DQLTGYGQWE	YQIQGNNSAEN	ENN--SWTRV	AFAGLKFQDV	GSFDYGRNNG
EcoOmpN	DGLHYFSDNS	AKDGDQSYAR	LGFKGETQIN	DQLTGYGQWE	YNIQANNTE	SKNQ--SWTRL	AFAGLKFADY	GSFDYGRNNG
KpnOmpK36	DGLHYFSDDK	DVDGDQTYMR	LGVKGETQIN	DQLTGYGQWE	YNVQANNTE	SSDQ--AWTRL	AFAGLKFQDA	GSFDYGRNNG
KpnOmpK37	DGLHYFSSDS	KKDGDQTYLR	FGFKGETQIN	DQLTGYGQWE	YNVQANNTE	SSDQ--AWTRL	AFAGLKFQDA	GSFDYGRNNG
SenOmpC	DGLHYFSDDK	GSDGDQTYMR	IGFKGETQVN	DQLTGYGQWE	YQIQGNQTEG	SND--SWTRV	AFAGLKFADA	GSFDYGRNNG
SmiOmpC	DGLHYFSDDK	GSDGDQTYMR	IGFKGETQVN	DQLTGYGQWE	YQIQGNQTEG	SND--SWTRV	AFAGLKFADA	GSFDYGRNNG
StyOmpS2	DGLHYFSDD	SKDGDQTYMR	VGFKGETQIN	DQLTGYGQWE	YNVQANNTE	EGAN--SWTRL	AFAGLKFQDY	GSFDYGRNNG
StyOmpS1	DGLRYFSDNA	GDDGDQSYAR	IGFKGETQIN	DMLTGYGQWE	YNIKVNTEG	EGAN--SWTRL	GFAGLKFGEY	GSFDYGRNNG
StyOmpC	DGLHYFSDDK	GSDGDQTYMR	IGFKGETQVN	DQLTGYGQWE	YQIQGNQTEG	SND--SWTRV	AFAGLKFADA	GSFDYGRNNG
StyOmpC-2	DGLHYFSDDK	GSDGDQTYMR	IGFKGETQVN	DQLTGYGQWE	YQIQGNQTEG	SND--SWTRV	AFAGLKFADA	GSFDYGRNNG
SmaOmpF	DGLHYFSKDK	GNDGDQTYVR	FGFKGETQIT	DQLTGYGQWE	YNVQSNHAES	QGTGKTRTL	GFAGLKFADY	GSFDYGRNNG
SmaOmpC	DGLHYFSNN	GVDGDQSYMR	FGLRGETQIS	DQLTGYGQWE	YQANLNHAEN	QDNK--NFTRY	GFAGLKFQDY	GSFDYGRNTG
CbiPceC	DGLHYFSDDA	NSDGDQTYMR	MGFKGETQVN	DMITGYGQWE	YQVQANGTEG	DKGD--SWTRL	AFAGLKFQDY	GSFDYGRNNG

	170	180	190	200	210	220	230	240
Structure	-----	-----	-----	--[B6---]T	4-----	[B7-----]	L	4-----
FSW910410	VLYDIEGWD	VLPEFGGDS	AQTDNYMAQR	ANNLATYRNN	GFFGLVDGLD	FALQYQGKND	GHAQKADAD	SYSWDGAPLS
PPD130/91	VLYDIEGWD	VLPEFGGDS	AQTDNYMAQR	ANNLATYRND	GFFGLVDGLD	FALQYQGKND	GHAQKADAD	SYSWDGAPLS
EaeOmp37	VYVDVTSWD	VLPEFGGDTY	G--SDNFLQSR	ANGVATYRNS	DFGLVDGLN	FALQYQGKNG	SVSG-----	ED QTNG----
EcoOmpC	VYVDVTSWD	VLPEFGGDTY	G--SDNFMQQR	GNGFATYRNS	DFGLVDGLN	FAVQYQGKNG	SASG-----	ED QTNG----
EcoOmpC	VYVDVTSWD	VLPEFGGDTY	G--SDNFMQQR	GNGFATYRNT	DFGLVDGLN	FAVQYQGKNG	SVS-----	EG MTNG----
EcoOmpN	VYVDVTSWD	VLPEFGGDSY	TNADNFMTR	ANGVATYRNT	DFGLVNGLN	FAVQYQGKNG	GAS--NGOE	GTNG----
KpnOmpK36	VYVDVTSWD	VLPEFGGDTY	G--SDNFLQSR	ANGVATYRNS	DFGLVDGLN	FALQYQGKNG	SVSG-----	EG TNG----
KpnOmpK37	VLYDVEGWD	ILPEFGGDSY	TYADNFMAGR	ANGVATYRNS	DFGLVEGLN	FALQYQGKNE	GONAQDINV	TNNS----
SenOmpC	VTYDVTSWD	VLPEFGGDTY	G--ADNFMQQR	GNGVATYRNT	DFGLVDGLD	FALQYQGKNG	SVS-----	G ENTNG----
SmiOmpC	VTYDVTSWD	VLPEFGGDTY	G--ADNFMQQR	GNGVATYRNT	DFGLVDGLD	FALQYQGKNG	SVS-----	G ENDGG----
StyOmpS2	VLYDVEGWD	MLPEFGGDSY	TYADNFMTR	ANGVATYRNT	DFGLVDGLN	FALQYQGKNE	SQSADDVNI	G TNNR----
StyOmpS1	VLYDIEAWTD	ALPEFGGDTY	TQTDVYMLGR	TNGVATYRNT	DFGLVEGLN	FALQYQGKNG	NGG--AGAGE	GTNG----
StyOmpC	VTYDVTSWD	VLPEFGGDTY	G--ADNFMQQR	GNGVATYRNT	DFGLVDGLD	FALQYQGKNG	SVS-----	G ENTNG----
StyOmpC-2	VTYDVTSWD	VLPEFGGDTY	G--ADNFMQQR	GNGVATYRNT	DFGLVDGLD	FALQYQGKNG	SVS-----	G ENTNG----
SmaOmpF	VLYDVEGWD	MLPEFGGDTY	TYADNFMTR	TNGVATYRNT	DFGLVDGLN	FALQYQGKNG	NDG-----	-----
SmaOmpC	VLYDVAAYTD	LQPEFDGMTY	G--ADQFMQQR	SSGLATYRNT	DFGLVDGLN	FALQYQGKNG	NGE-----	E TNG----
CbiPceC	VYDVEGWD	MLPEFGGDSY	TKADNFMTR	ANGVATYRNT	DFGLVDGLN	VALQYQGAN	NQS--PEQEG	TNGG----

	250	260	270	280	290	300	310	320
Structure	-----[	B8-----	--]T5[B9--	-----]L5-	-----	-----	-----[B10--	-----]T6[B
FSW910410	NNAREIQGN	GDGFGMSTTY	DLGW-GISAG	AAYTTSNRRT	EQKWSGN---	---QANSNVA	GGNKAQSWG	GLKYDAN-NI
PPD130/91	NNAREIQGN	GDGFGMSTTY	DLGW-GISAG	AAYTTSNRRT	EQKWSGN---	---QANSNVA	GGNKAQSWG	GLKYDAN-NI
EaeOmp37	---RDFQKQ	GEGFGTSVY	DIWD-GISAG	FAYSSSKRTD	EQNNSTFVSK	TDGGRYVGLG	EGDHAETYT	GLKYDAN-NI
EcoOmpC	---RTELQ	GDGVGGSITY	MLGE-GFGIG	TAVSSSKRTS	SQN-----	---D-LTYG	NGDRAETYT	GLKYDAN-NI
EcoOmpC	---REALQ	GDGVGGSITY	DY-E-GFGIG	AAVSSSKRTD	DQN-----	---SPLYIG	NGDRAETYT	GLKYDAN-NI
EcoOmpN	---RDVRHEN	GDGWLSTTY	DLGM-GFSAG	AAYTSSDRTN	DQVNH-----	---TAA	GGDKADAWT	GLKYDAN-NI
KpnOmpK36	---RGALKQ	GDGFGTSVY	DIFD-GISAG	FAYANSKRTD	DQNK-----	---LLL	EGDHAETYT	GLKYDAN-NI
KpnOmpK37	---SDSVRFDN	GDGGLSTSY	DFGM-GISAA	AAYTSSDRTN	DQMTQ-----	---TNA	RGDKAEAWT	GLKYDAN-DI
SenOmpC	---RSLLNQ	GDGYGGSITY	AIGE-GFSVG	GAITTSKRTA	DQNNTA----	---DEHLYG	NGDRATVYT	GLKYDAN-NI
SmiOmpC	---RSLLNQ	GDGYGGSITY	AIGE-GFSVG	GAITTSKRTA	DQNNTA----	---DARLYG	NGDRATVYT	GLKYDAN-NI
StyOmpS2	---NGDDIRYDN	GDGFGISTTY	DIGM-GFSAG	AAYTSSDRTN	EQVNAGG----	---TIA	GGDKADAWT	GLKYDAN-NI
StyOmpS1	---N-RKLAREN	GDGFGMSTSY	DFDF-GLSLG	AAVSSSDRS	NQVARGYGDG	M--NERNNYA	GGETAEAWT	GAKYDAY-NV
StyOmpC	---RSLLNQ	GDGYGGSITY	AIGE-GFSVG	GAITTSKRTA	DQNNTA----	---NARLYG	NGDRATVYT	GLKYDAN-NI
StyOmpC-2	---RSLLNQ	GDGYGGSITY	AIGE-GFSVG	GAITTSKRTA	DQNNTA----	---NARLYG	NGDRATVYT	GLKYDAN-NI
SmaOmpF	---RDVKQ	GDGWISSY	DIGE-GVSFG	AAYASSNRRT	DQKLR-----	---SNE	RGDKADAWT	GAKYDAY-NV
SmaOmpC	---RDVLQ	GEGYGMSTY	DMGY-GISAA	GAFFNSRRTS	EQNGANG----	---HQNIMG	RGDKAEGYS	GLKYDAN-DV
CbiPceC	---DDRMKNSN	GDGFGISSTY	DLGM-GVSFG	AAYTSSDRTN	EQVND-----	---STA	GGDKADAWT	GLKYDAN-NI

	330	340	350	360	370	380	390	400
Structure	11-----] L6-----	-----	-----	-----[B12-	-----]T7	[B13-----	---]L7----	-----
FSW910410	YLATMYTETQ	NMTPFGS---	-----	TGIANKAKNF	EVAQYQDF	GLRPSIAYLQ	SKASELNSYN	GFN---GGK
PPD130/91	YLATMYTETQ	NMTPFGS---	-----	TGIANKAKNF	EVAQYQDF	GLRPSIAYLQ	SKASELNSYN	GFN---GGK
EaeOmp37	YLATQYTQTY	NATRTGN---	-----	IGFANKAQNF	EVVAQYQDF	GLRPSVAYLQ	SKGKD---M-	-GR---YGD
EciOmpC	YLAQYQTY	NATRVGN---	-----	LGWANKAQNF	EVVAQYQDF	GLRPSVAYLQ	SKGKD--LEN	G-----YGD
EcoOmpC	YLAQYQTY	NATRVGS---	-----	LGWANKAQNF	EVAQYQDF	GLRPSLAYLQ	SKGKNLGVIN	GRN----YDD
EcoOmpN	YLATMYSETR	NMTPFGDS--	-----D	YAVANKQNF	EVTAYQDF	GLRPAVSFLM	SKGRDLHAAG	GADNPAGVDD
KpnOmpK36	YLATQYTQTY	NATRAGS---	-----	LGFANKAQNF	EVAQYQDF	GLRPSVAYLQ	SKGKD---L-	-NG---YGD
KpnOmpK37	YLATMYSETR	NMTPYGN---	-----	DGVANKQNF	EVTAYQDF	GLRPAISYLQ	SKGKDL-YNN	GRY----AD
SenOmpC	YLAQYQTY	NATRFGTSG	N---NKSTS	YGFANKAQNF	EVVAQYQDF	GLRPSVAYLQ	SKGKDI STGY	GAS---YGD
SmiOmpC	YLAQYQTY	NATRFGTSG	N---NKSDS	YGFANKAQNF	EVVAQYQDF	GLRPSVAYLQ	SKGKDI SNGY	GAS---YGD
StyOmpS2	YLATMYSETR	NMTPYGKT--	-----DKGYD	GGVANKQNF	EVTAYQDF	GLRPAVSFLM	SKGKDLTYNN	VNG-----DD
StyOmpS1	YLAAMYAETR	NMTYGGG---	-----NGEGN	GSIANKTQNF	EVVAQYQDF	GLRPSIAYLQ	SKGKDLGGQE	VHRGNWRYTD
StyOmpC	YVAQYQTY	NATRFGTSG	S---NPSTS	YGFANKAQNF	EVVAQYQDF	GLRPSVAYLQ	SKGKDI SNGY	GAS---YGD
StyOmpC-2	YLAQYQTY	NATRFGTSG	S---NPSTS	YGFANKAQNF	EVVAQYQDF	GLRPSVAYLQ	SKGKDI SNGY	GAS---YGD
SmaOmpF	YLAAMYAETR	NMTPFGGNF	TNTCAATENC	GGFASKQNF	EVTAYQDF	GLRPEVSYLQ	SKGKLNLPV	VGS-----D
SmaOmpC	YLAVMTQSY	NAARFGSS--	-----DSSV	YGANKAQSF	EVAHYQDF	GLRPFVGYNQ	TKGKDLGRAG	NGKD---YGD
CbiPceC	YLATMYSETR	NMTPYGG--	-----N-GSD	NTIANKTQNF	EVTAYQDF	GLRPEVSFLM	SKGKDLGVNG	SD-----GD

	410	420	430	440	450	
Structure	-----[B14-	-----]T8[B1	5-----]L8-	-----	-----[B16	-----]
FSW910410	ADLVKYVDLG	ATYYFNKNMS	TYVDYKINLL	D-ENDFTRAN	SINTDDIVAL	GLVYQF
PPD130/91	ADLVKYVDLG	ATYYFNKNMS	TYVDYKINLL	D-ENDFTRAN	SINTDDIVAL	GLVYQF
EaeOmp37	QDILKYVDLG	ATYYFNKNMS	TYVDYKINLL	D-DNKFTKDA	SISTDNVVAL	GLVYQF
EciOmpC	QDLLKYVDVG	ATYYFNKNMS	TYVDYKINLL	D-DKEFTRNA	GISTDDIVAL	GLVYQF
EcoOmpC	EDILKYVDVG	ATYYFNKNMS	TYVDYKINLL	D-DNQFTRDA	GINTDNIVAL	GLFYQF
EcoOmpN	KDLVKYADV	ATYYFNKNMS	TYVDYKINLL	DEDDSFYTAN	GISTDDIVAL	GLVYQF
KpnOmpK36	QDILKYVDVG	ATYYFNKNMS	TYVDYKINLL	D-DNSFTRSA	GISTDDIVAL	GLVYQF
KpnOmpK37	KDLVKYMDVG	ATYYFNKNMS	TYVDYKINLL	DGNDKFYEDN	GISTDNIVAL	GLVYQF
SenOmpC	QDIVKYVDVG	ATYYFNKNMS	TYVDYKINLL	D-KNDFTRDG	-INTDDIVAL	GLVYQF
SmiOmpC	QDIVKYVDVG	ATYYFNKNMS	TYVDYKINLL	D-KNDFTRDA	GINTDDIVAL	GLVYQF
StyOmpS2	KDLVKYADV	ATYYFNKNFS	TYVDYKINLL	DDDDPFYKDA	GISTDDIVAL	GMVYQF
StyOmpS1	KDLVKYVDVG	MTYYFNKNMS	TYVDYKINLL	DEDDDFYANN	GIATDDIVGV	GLVYQF
StyOmpC	QDIVKYVDVG	ATYYFNTNMS	TYVDYKINLL	D-KYEFTRDA	GINTDDIVAL	GLVYQF
StyOmpC-2	QDIVKYVDVG	ATYYFNKNMS	TYVDYKINLL	D-KNDFTRDA	GINTDDIVAL	GLVYQF
SmaOmpF	QDLVKYVSVG	TTYFFNKNMS	TYVDYKINLL	D-DNDFTKAT	GIATDDIVGV	GLVYQF
SmaOmpC	QDLVKFVDLG	ATYYFNKNMS	TYVDYKINLV	D-DNDFTDA	GINTDNVAV	GLVYQF
CbiPceC	QDLVKYASVG	ATYYFNKNFS	TYVDYKINLL	DEDKNFYSSK	-----	RHLRY-

[도 R24]

*E. tarda* OmpS2와 다른 세균에서 유래한 유사 표면발현 유전자의 아미노산 염기서열 alignment. Polypeptide의 2차 구조 motif에 기초한 2차 구조 영역을 Alerti et al. (1995)에 따라 표시. T1-T8: turns, B1-B16: β-strand 영역, L1-L8: loop 영역

상기 생물정보를 바탕으로 *E. tarda* OmpS2의 각 loop 영역을 특이적으로 PCR cloning할 수 있는 primer를 설계하였다. 아울러 GFPuv와 각 OmpS2 부분영역과의 fusion construct를 만들기 위해 개시 코돈(ATG)이 삭제된 *Xba*I-GFPuv 1F(2)와 *Kpn*I-GFPuv 1R 또는 *Sph*I-GFPuv 2R을 설계하였으며 [도 R25], pINPNC-GFP 20 ng을 주형으로 사용하였다.

Primer	염기서열*	사용 영역	증폭 영역
<i>Hind</i> III-OmpS2 1F	aagcttATGTGTTTACTTCGACAGATGG	시스템 I & II	모든 OmpS2
<i>Kpn</i> I-OmpS2 1R	ggtaccTTAGAACTGGTAGACCAGACCC	시스템 II	모든 OmpS2
<i>Xba</i> I-L4 1R	tctagaGCCATCGTTTTTACCCTG	시스템 I	OmpL4
<i>Xba</i> I-L5 1R	tctagaAGTACGGTTAGAGGTGGT	"	OmpL5
<i>Xba</i> I-L6 1R	tctagaCATGTTCTGGGTTTCAGT	"	OmpL6
<i>Xba</i> I-L7 1R	tctagaCAGCTCAGAGGCCTTAGA	"	OmpL7
<i>Sph</i> I-L4 1F	gcatgcCACGCCTATGGCAAAGATGC	시스템 II	L4Omp
<i>Sph</i> I-L4 2F	gcatgcGGCCAAAACGGCGACGGCTTC	"	L4dOmp
<i>Sph</i> I-L7 1F	gcatgcAACTCCTACAACGGCTTTAAC	"	L7Omp
<i>Xba</i> I-GFPuv 1F(2)	tctagaAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCAC	시스템 I & II	모든 GFPuv
<i>Kpn</i> I-GFPuv 1R	ggtaccTTATTTGTAGAGCTCATC	시스템 I	GFPuv
<i>Sph</i> I-GFPuv 2R	gcatgcTTTGTAGAGCTCATCCATGC	시스템 II	sGFPuv

\*첨가된 제한효소 서열은 소문자로 표시

tct

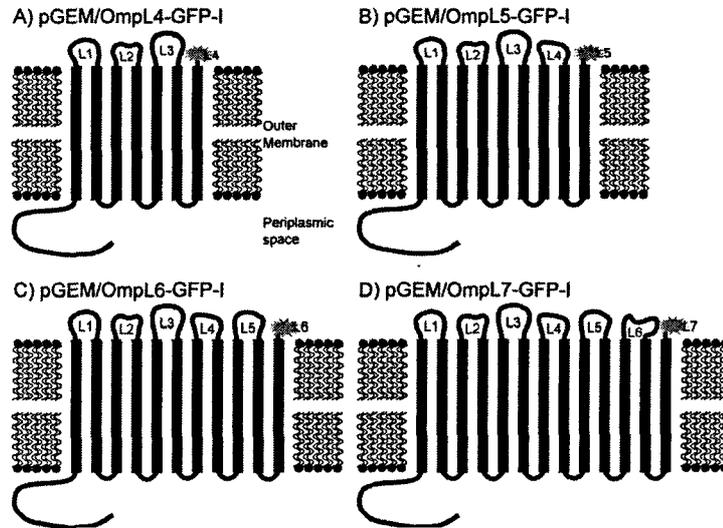
agaAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATG  
*Xba*I-GFPuv 1F(2)  
GGCACAAATTTTCTGTCAAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTAT  
TTGCACTACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAAACACTTGTCACTACTTTCTTTATGGTGTTCATGTC  
TTTTCCCGTTATCCGGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTAC  
AGGAACGCACTATATCTTTCAAGATGACGGAACTACAAGACGCGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGA  
TACCCTTGTTAATCGTATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGAAAACATTCTCGGACACAAA  
CTCGAGTACAACATAAATCACACAATGTATACATCACGGCAGACAAAACAAAAGAATGGAATCAAAGCTA  
ACTTCAAATTCGCCACAACATTGAAGATGGATCCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCC  
AATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCACTTGTGACACAATCTGCCCTTTCGAAAGAT  
CCCAACGAAAAGCGTGACCACATGGTCTTCTTGAGTTTGTAACTGCTGCTGGGATTACACATGGCATGG  
ATGAGCTCTACAAATAAagggtacc  
*Kpn*I-GFPuv 1R, *Sph*I-GFPuv 2R(gcatgcTTTGTAGAGCTCATCCATGC; excluding  
stop codon)

### [도 R25]

GFPuv의 염기서열 정보와 PCR cloning을 위한 PCR primer 위치 (밑줄). 시스템 I에는 GFPuv의 stop codon을 포함시킨 *Kpn*I-GFPuv 1R을 사용, 시스템 II에는 GFPuv의 stop codon을 포함시킨 않은 *Sph*I-GFPuv 2R 사용.

*E. tarda* OmpS2에 의해 유전자를 탑재하기 위해, OmpS2 단백질의 2차 구조 motif에 기초하여 유전적 변이가 많이 축적된 L4, L5, L6, L7 영역의 C-terminal에 의

래 유전자인 green fluorescent protein (GFP; 238 aa)을 tandem fusion하는 전략으로써 다음의 4가지 fusion construct들을 만들었고 이를 [도 R26]에 도식화하였다 (표면발현 시스템 I). 이 fusion construct를 pGEM-3Zf(+)의 multi-cloning site에 삽입시켜 다음과 같이 명명하였다.

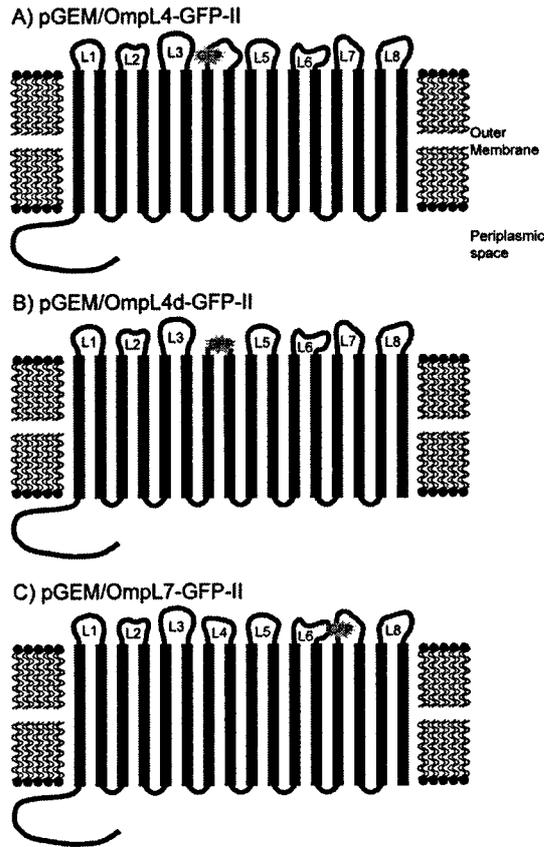


[도 R26]

*E. tarda* OmpS2의 loop 영역에 외래 단백질인 GFP의 tandem fusion 모식도(시스템 I)

한편, OmpS2 L4와 L7 영역에 GFP를 sandwich fusion하는 전략으로써 다음의 3가지 fusion construct들을 만들었고 이를 [도 R27]에 도식화하였다 (표면발현 시스템 II). pGEM/OmpL4-GFP II와 pGEM/OmpL7-GFP II는 *E. tarda*의 OmpS2 유전자 중 L4와 L7 영역을 끊고 그 사이에 외래 유전자인 GFP를 삽입시켰다. 반면, pGEM/OmpL4d-GFP II은 OmpS2 L4 영역 중에서 일부 서열만 남기고 나머지 서열을 제거하고 GFP를 삽입시켰다.

- I) (*Hind*III)-OmpS2 L4-(*Xba*I)-GFP-(*Sph*I)-L4 OmpS2-(*Kpn*I); pGEM/OmpL4-GFP II
- II) (*Hind*III)-OmpS2 L4-(*Xba*I)-GFP-(*Sph*I)-L4d OmpS2-(*Kpn*I); pGEM/OmpL4d-GFP II
- III) (*Hind*III)-OmpS2 L4-(*Xba*I)-GFP-(*Sph*I)-L7 OmpS2-(*Kpn*I); pGEM/OmpL7-GFP II



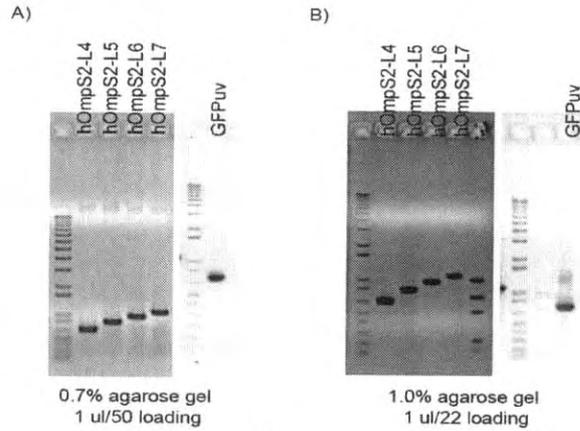
[도 R27]

*E. tarda* OmpS2의 loop 영역에 외래 단백질인 GFP의 sandwich fusion 모식도 (시스템 II).

상기 전략을 실현시키기 위한 실험 수행 결과는 다음과 같다.

1) 시스템 I의 fusion construct 제작

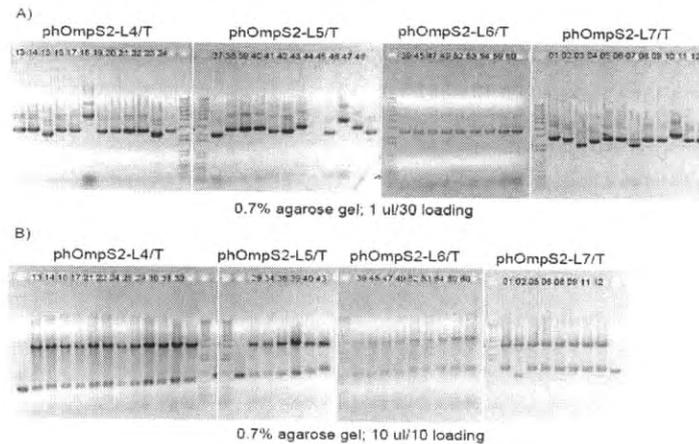
OmpS2의 각 부분 영역의 PCR 증폭 산물과 전기영동 사진을 도 16-A에 나타내었다. hOmpS2-L4, hOmpS2-L5, hOmpS2-L6, hOmpS2-L7은 모두 예상된 크기의 PCR 산물이 증폭되었다(각각 666, 837, 975, 1098 bp). 한편, GFPuv도 예상 증폭 크기인 723 bp를 보였다. 이들을 ligation 반응을 위해 정제한 후, 전기영동 한 사진을 [도 R28]에 나타내었다.



[도 R28]

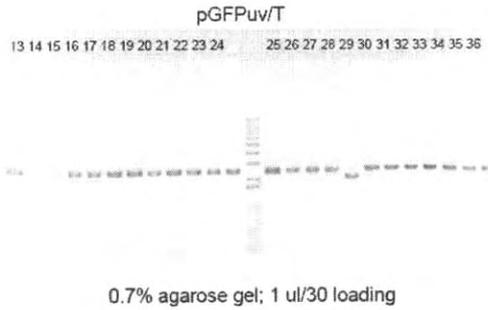
표면발현 시스템 I를 위한 OmpS2의 전체 또는 각 부분 영역과 GFPuv의 PCR 증폭(A)과 PCR 산물의 정제 결과(B).

정제된 PCR 산물을 TA-cloning 한 후, *E. coli*에 transformation하고, plasmid miniprep을 실시하였으며(phOmpS2-L4/T, phOmpS2-L5/T, phOmpS2-L6/T, phOmpS2-L7/T, pGFPuv/T), insert size를 *Eco*RI로 절단하여 확인하였다 [도 R29 및 도 R30]. 이 중에서 PCR 산물과 동일한 insert size를 가지면서 *E. tarda* OmpS2와 100% 일치하는 각각의 PCR clone을 염기서열 분석을 통해 선택하였다(phOmpS2-L4/T #24, phOmpS2-L5/T #40, #43, phOmpS2-L6/T #45, #54, phOmpS2-L7/T #8, pGFPuv/T #13, #33).



[도 R29]

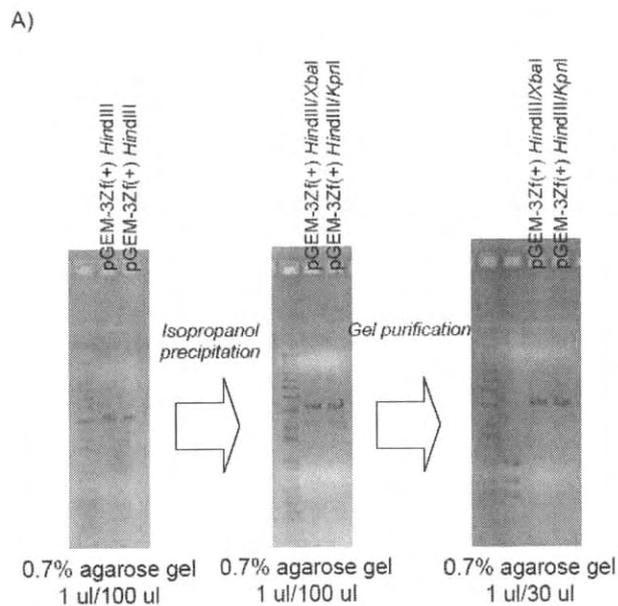
*E. tarda* OmpS2 각 영역을 TA-cloning 한 후의 plasmid miniprep (A)과 insert size를 확인하기 위한 *Eco*RI 절단(B).



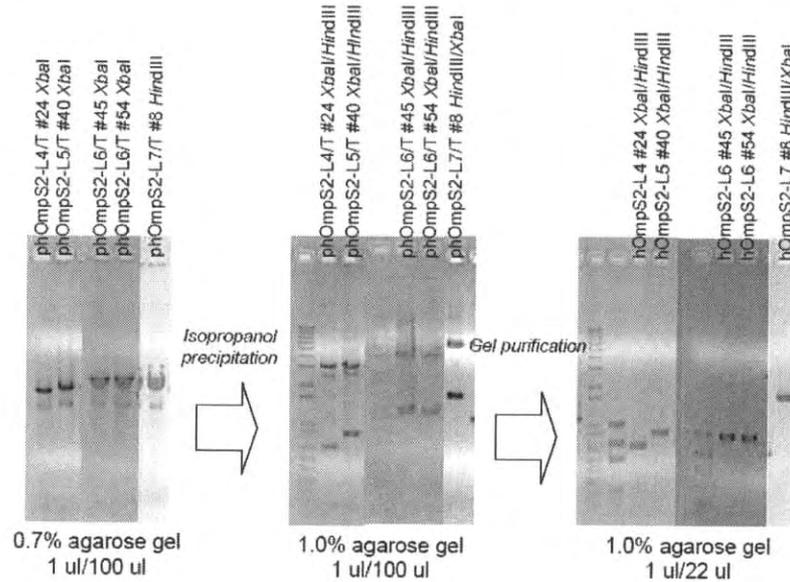
[도 R30]

GFPuv을 cloning한 후의 plasmid miniprep.

이들 각각의 OmpS2 PCR clone들을 plasmid midiprep을 실시하여 대량 확보한 후, 아래와 같이 PCR primer 합성 시에 첨가된 non-cut 제한효소인 *Hind*III와 *Xba*I (Promega, USA)으로 절단하였고(hOmpS2-L4 *Hind*III/*Xba*I, hOmpS2-L5 *Hind*III/*Xba*I, hOmpS2-L6 *Hind*III/*Xba*I, hOmpS2-L7 *Hind*III/*Xba*I) [도 R31], 이와 동시에 vector인 pGEM-3Zf(+)*Hind*III와 *Xba*I으로 절단하였다 (pGEM-3Zf(+)*Hind*III/*Xba*I). 이러한 각 과정과 최종적으로 gel purification 하였다.



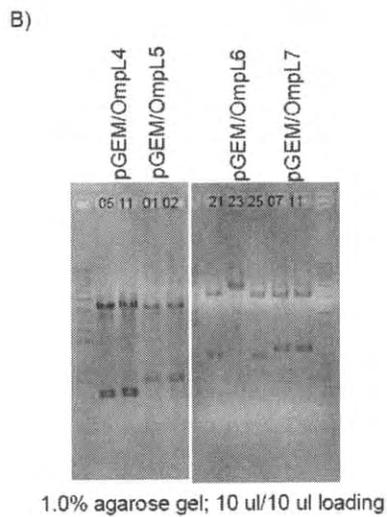
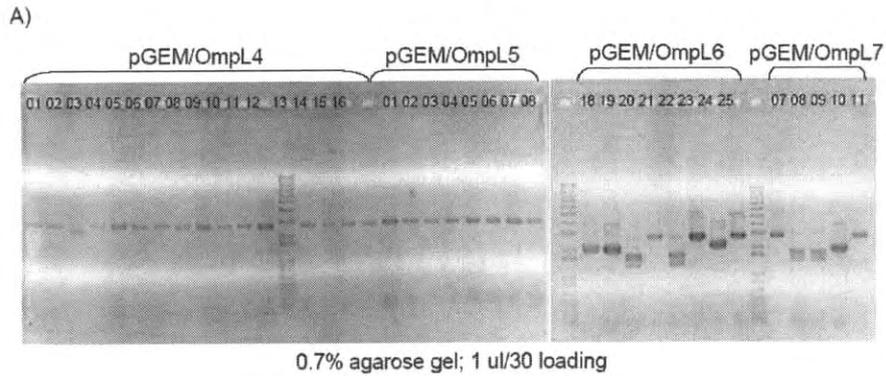
B)



[도 R31]

pGEM-3Zf(+)<sup>1</sup>의 multi-cloning site에(A) pGEM-T Easy Vector (Promega)에 cloning된 *E. tarda* OmpS2 각 영역들을(B) ligation시키기 위한 제한효소 절단.

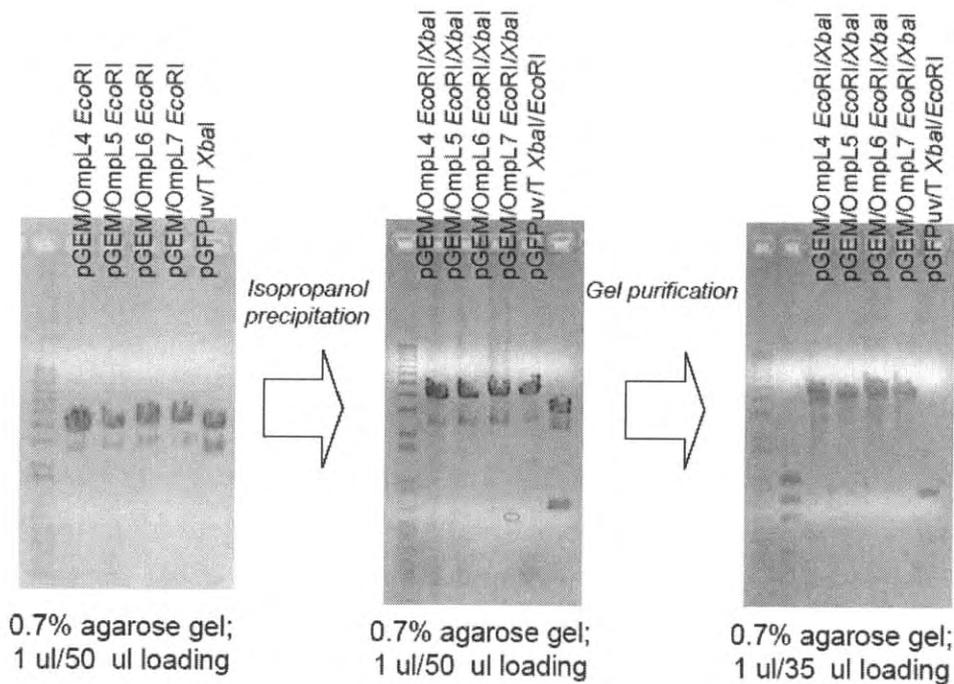
이후 pGEM-3Zf(+)<sup>1</sup> HindIII/XbaI과 hOmpS2-L4 HindIII/XbaI, hOmpS2-L5 HindIII/XbaI, hOmpS2-L6 HindIII/XbaI 및 hOmpS2-L7 HindIII/XbaI를 vector와 insert의 비율이 1:3이 되도록 아래와 같은 조성으로 ligation 반응을 실시하였다 (pGEM/OmpL4, pGEM/OmpL5, pGEM/OmpL6, pGEM/OmpL7). 이들 ligation 반응액을 *E. coli*에 transformation한 후, plasmid miniprep을 실시하였으며 원하는 크기의 insert를 가졌는지를 제한효소 절단을 통해 확인하였다 [도 R32]. Plasmid의 염기분석을 통해 *E. tarda* OmpS2와 100% 일치하거나 아미노산의 염기치환이 일어나지 않은 bacterial clones를 선택하였다(pGEM/OmpL4 #05, #11, pGEM/OmpL5 #01, #02, #05, #06, pGEM/OmpL6 #21, #25, pGEM/OmpL7 #07, #11) [도 R32]. 이들 중 OmpS2 각 부분 영역에서 각각 1개의 bacterial clone을 선택하여 plasmid midiprep을 수행하였다(pGEM/OmpL4 #05, pGEM/OmpL5 #02, pGEM/OmpL6 #25, pGEM/OmpL7 #11).



[도 R32]

*E. tarda* OmpS2 각 부분 영역을 pGEM-3Zf(+)에 ligation시킨 후의 plasmid miniprep (A)과 insert size를 확인하기 위한 *Hind*III와 *Bam*HI 절단(B).

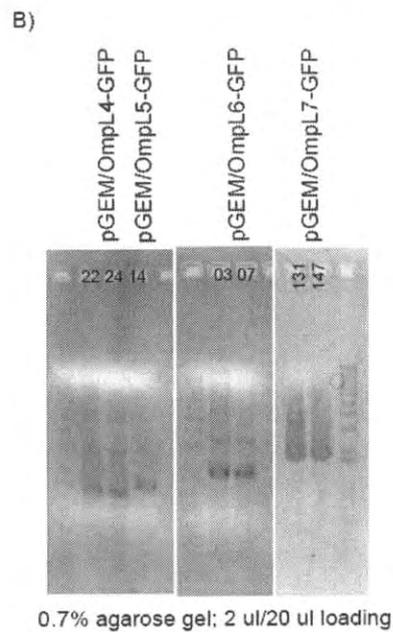
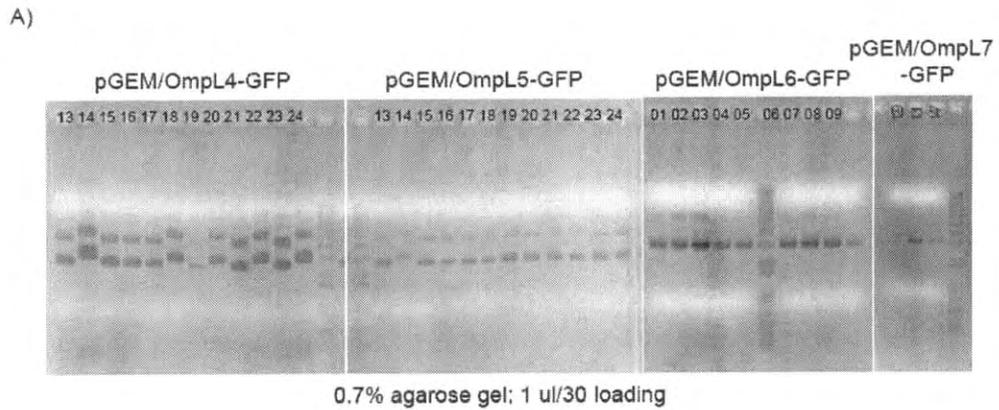
pGEM/OmpL4 등에 GFPuv를 tandem fusion시키기 위해, 이들 각 각각의 plasmid들을 PCR primer의 합성 시에 첨가된 non-cut 제한효소인 *Hind*III와 vector의 non-cut 제한효소인 *Eco*RI으로 아래와 같이 절단하였고(pGEM/OmpL4 *Hind*III/*Eco*RI, pGEM/OmpL5 *Hind*III/*Eco*RI, pGEM/OmpL6 *Hind*III/*Eco*RI, pGEM/OmpL7 *Hind*III/*Eco*RI), 이와 동시에 pGFPuv/T를 *Xba*I과 *Eco*RI으로 절단 하였다(GFPuv *Xba*I/*Eco*RI) [도 R33].



[도 R33]

pGEM/OmpL4 등에 GFPuv를 tandem fusion하기 위한 *EcoRI*와 *XbaI* 절단

이를 각각의 제한효소 절단 산물의 농도를 precision mass (Bio-Rad, USA)를 이용하여 파악하였으며, vector와 insert의 비율이 1:3이 되도록 다음과 같이 ligation 반응을 실시하였다(pGEM/OmpL4-GFP, pGEM/OmpL5-GFP, pGEM/OmpL6-GFP, pGEM/OmpL7-GFP). 각 ligation 반응액 1  $\mu$ l을 PCR 주형, *HindIII*-OmpS2 1F/T7과 SP6/*KpnI*-GFPuv 1R을 primer로 사용하여, 정확하게 ligation 반응이 일어났는지를 확인하였다. 이후, *E. coli*에 transformation하고, plasmid miniprep을 실시하였다. 이들을 위와 동일한 PCR 반응을 통해 정확한 insert size를 가지는 bacterial clones를 선택하였다(pGEM/OmpL4-GFP I #22, #24, pGEM/OmpL5-GFP I #14, pGEM/OmpL6-GFP I #03, #07, pGEM/OmpL7-GFP I #131, #147) [도 R34].

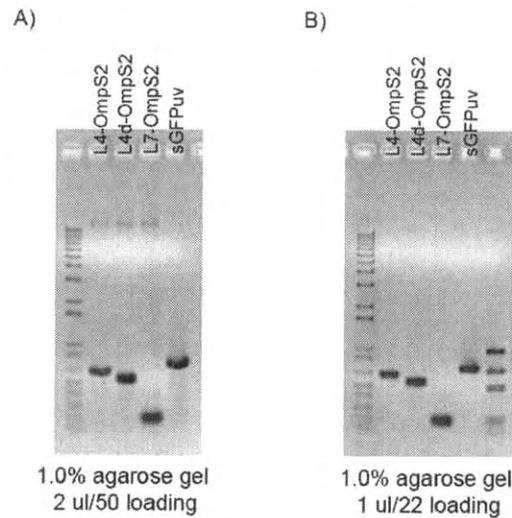


[도 R34]

pGEM/OmpL4 등에 GFPuv를 tandem fusion시킨 후의 plasmid miniprep (A)과 insert size를 확인하기 위한 PCR 반응(B).

## 2) 시스템 II의 fusion construct 제작

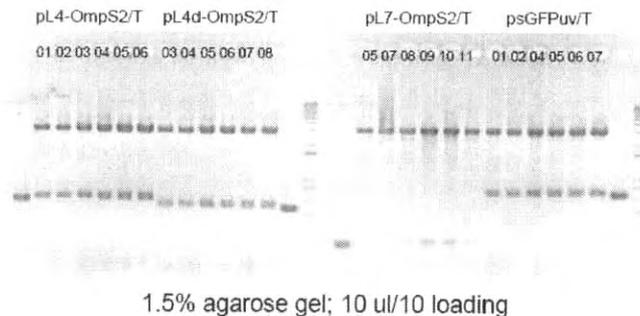
OmpS2의 각 부분 영역의 PCR 증폭 산물과 전기영동 사진을 도-23A에 나타내었다. L4-OmpS2, L4d-OmpS2, L7-OmpS2은 모두 예상된 크기의 PCR 산물이 증폭되었다(각각 642, 564, 975, 210 bp) [도 R35]. 한편, sGFPuv도 예상 증폭 크기인 723 bp를 보였다. 이들을 ligation 반응을 위해 정제한 후, 전기영동 한 사진을 [도 R35]에 나타내었다.



[도 R35]

표면발현 시스템 II를 위한 OmpS2의 각 부분 영역과 sGFPuv의 PCR 증폭(A)과 PCR 산물의 정제 결과(B).

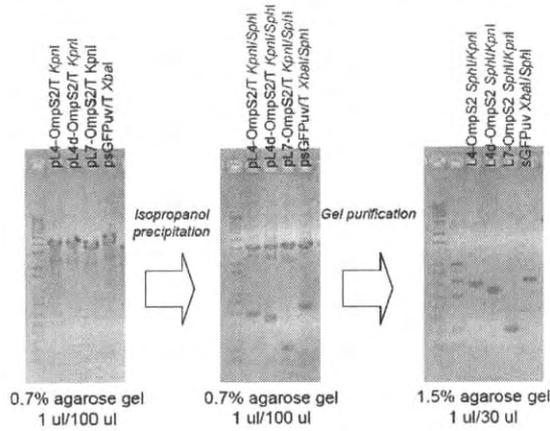
정제된 PCR 산물을 TA-cloning 한 후, *E. coli*에 transformation하고, plasmid miniprep을 실시하였으며(pL4-OmpS2/T, pL4d-OmpS2/T, pL7-OmpS2/T, psGFPuv/T), 이들의 insert size를 *EcoRI*로 절단하여 확인하였다 [도 R36]. 이 중에서 PCR 산물과 동일한 insert size를 가지면서 *E. tarda* OmpS2와 100% 일치하는 각각의 PCR clone을 염기서열 분석을 통해 선택하였다(pL4-OmpS2/T #01, #02, pL4d-OmpS2/T #04, #05, pL7-OmpS2/T #08, #11, psGFPuv/T #01, #04)).



[도 R 36]

*E. tarda* OmpS2 각 영역을 TA-cloning 한 후 insert size를 확인하기 위한 *EcoRI* 절단(B).

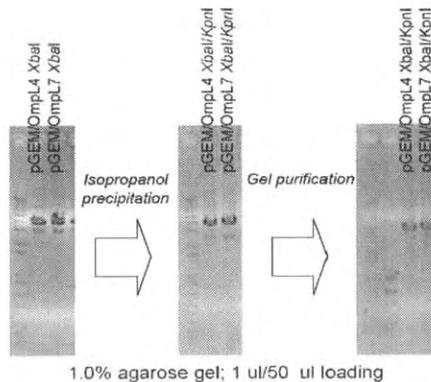
이들 각각의 OmpS2 PCR clone과 sGFPuv를 plasmid midiprep을 실시하여 대량 확보한 후, 아래와 같이 PCR primer 합성 시에 첨가된 non-cut 제한효소인 *SphI/KpnI* 또는 *XbaI/SphI* (Promega, USA)으로 절단하였다(L4-OmpS2 *SphI/KpnI*, L4d-OmpS2 *SphI/KpnI*, L7-OmpS2 *SphI/KpnI*, sGFPuv *XbaI/SphI*). 이러한 각 과정과 최종적으로 gel purification한 사진을 [도 R37]에 나타내었다.



[도 R37]

pGEM-T Easy Vector (Promega)에 PCR cloning된 *E. tarda* OmpS2 각 영역들과 GFPuv을 pGEM/OmpL4 *XbaI/KpnI* 또는 pGEM/OmpL7 *XbaI/KpnI*에 ligation시키기 위한 제한효소 절단.

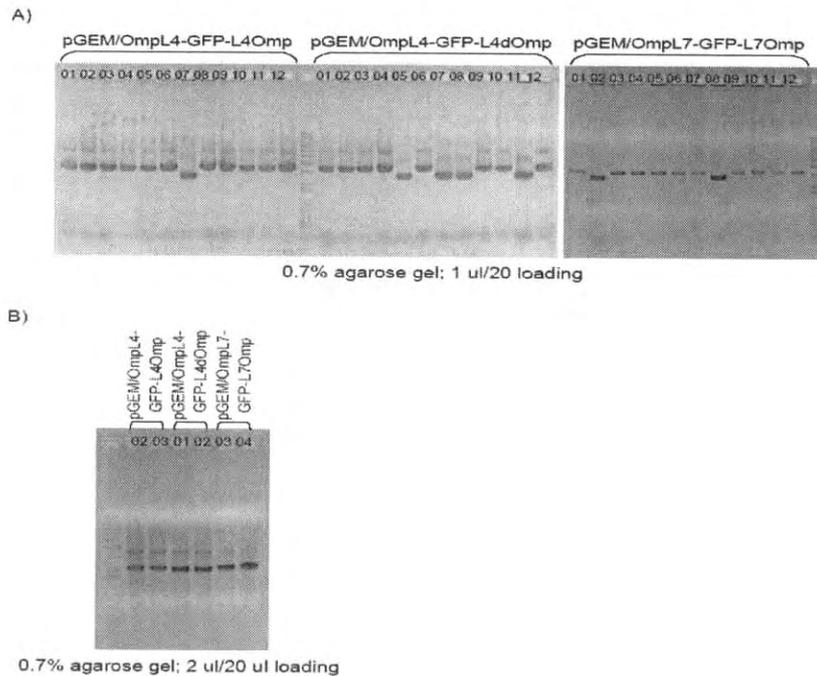
이와 동시에 pGEM/OmpL4와 pGEM/OmpL7을 아래와 같이 *XbaI*와 *KpnI*으로 절단하였다. 이러한 각 과정과 최종적으로 gel purification한 사진을 [도 R38]에 나타내었다.



[도 R38]

pGEM/OmpL4와 pGEM/OmpL7의 클로닝

이후 pGEM/OmpL4 *Xba*I/*Kpn*I 또는 pGEM/OmpL7 *Xba*I/*Kpn*I과 L4-OmpS2 *Sph*I/*Kpn*I, L4d-OmpS2 *Sph*I/*Kpn*I, L7-OmpS2 *Sph*I/*Kpn*I, sGFPuv *Xba*I/*Sph*I를 vector와 insert의 비율이 1:3이 되도록 아래와 같은 조성으로 ligation 반응을 실시하였다(pGEM/OmpL4 II, pGEM/OmpL4d II, pGEM/OmpL7 II). 각 ligation 반응액 1  $\mu$ l을 PCR 주형, *Hind*III-OmpS2 1F/T7과 SP6/*Kpn*I-OmpS2 1R을 primer로 사용하여, 정확하게 ligation 반응이 일어났는지를 확인하였다. 이후, *E. coli*에 transformation하고, plasmid miniprep을 실시하였다. 이들을 위와 동일한 PCR 반응을 통해 정확한 insert size를 가지는 bacterial clones를 선택하였다 (pGEM/OmpL4-GFP II #02, #03, pGEM/OmpL4d-GFP II #01, #02, pGEM/OmpL4-GFP II #03, #04) [도 R39].



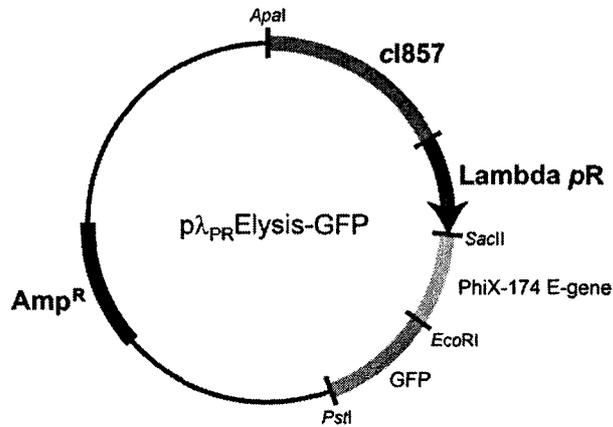
[도 R39]

*E. tarda* OmpS2 각 영역과 sGFPuv를 pGEM/OmpL4 *Xba*I/*Kpn*I 또는 pGEM/OmpL7 *Xba*I/*Kpn*I에 ligation시킨 후의 plasmid miniprep (A)과 insert size를 확인하기 위한 PCR 증폭 반응 (B).

상기 일련의 클로닝 및 DNA 조작 과정을 통해서 현재 두개의 targeting system내 총 7개의 subsystem들이 아래와 같이 구축되어 있다. 즉 system I은 OMP C-terminal의 조작을 기반으로 4개의 서로 다른 loop 영역에 단백질 발현을 위한 시스템이며 반면 system II의 경우 insertional 또는 deletional mutation을 통해서 외래 단백질을 두개의 loop 영역에 각각 표현코자 함이다.

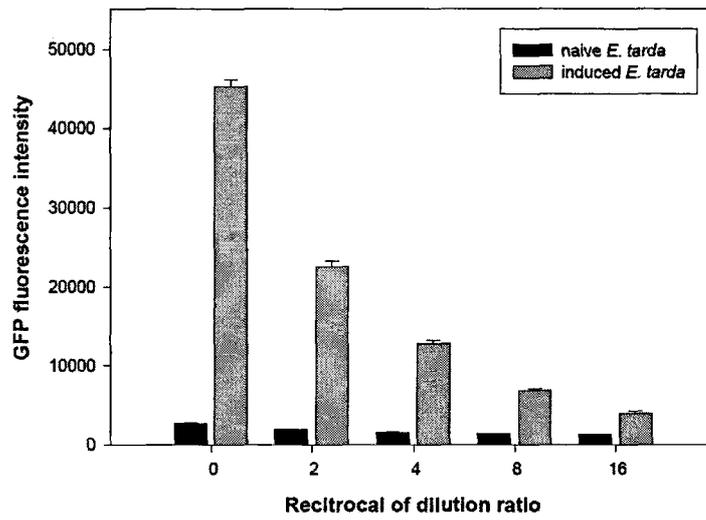
다. E 단백질 작동 기작을 이용한 표면 발현 벡터

E-gene based surface construct의 partial map은 아래 [도 R40]과 같다. 상기 벡터는 *E. coli*는 물론 *E. tarda*에서도 매우 tight한 조절 방식을 보이며 고효율로 외래 단백질을 표현할 수 있는 것으로 나타났다 [도 R41]. 뿐만 아니라 본 조절 방식에 의해서 유도되는 외래 단백질 발현은 outer membrane fraction의 단백질만을 추출한 산물에서 anti-GFP를 이용한 western blot 분석에 의해 정확한 signal이 검출됨에 따라 E-gene을 leading sequence로 이용한 membrane targeting이 가능한 것으로 나타났다 [도 R42]. 특히 본 전략은 ghost 유도와 동시에 이루어 질수 있으므로 세포질 내 혹은 잔존하는 외래 단백질은 모두 제거시킬 수 있다는 장점 역시 보유하고 있다.



[도 R40]

E-gene 기반 표면 발현 벡터의 partial map



[도 R41]

E-gene based 외래 단백질 (GFP)의 재조합 *E. tarda* 내 유도 발현



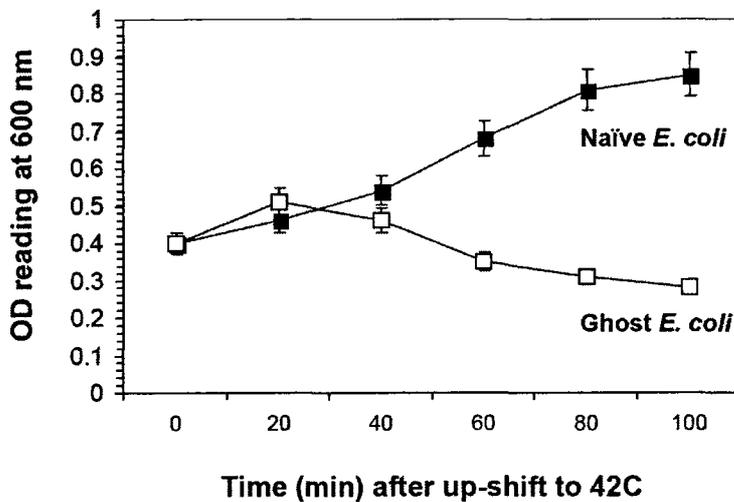
[도 R42]

Outer membrane (*E. tarda*) fraction 내 E-gene 기반 외래 단백질 (GFP)의 western blot 검색 (M, size marker; 1, naive *E. tarda*, 2, recombinant *E. tarda*)

## 제5항 외래 단백질의 ghost 박테리아 표면 발현 기술

가. 대장균 ghost 박테리아에서의 외래 단백질의 표면 발현

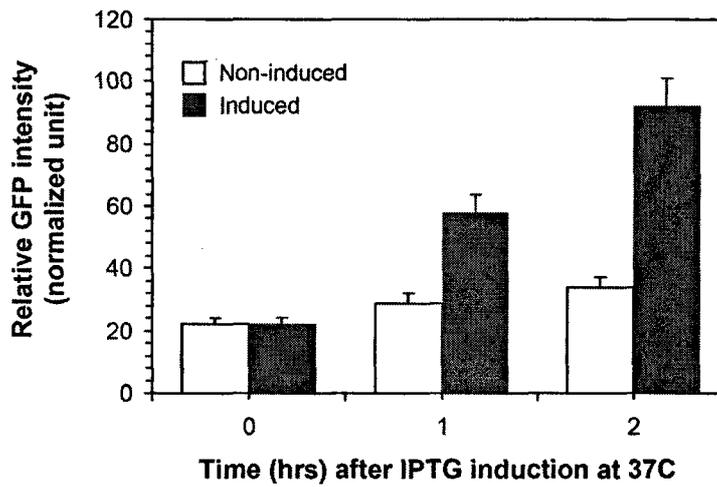
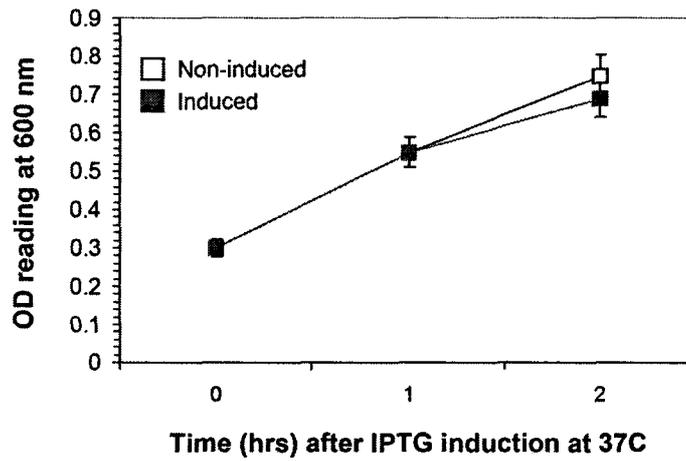
Ghost 발현 cassette와 IPTG 유도 기반 항원 발현 시스템 (tac 프로모터)을 동시에 보유하는 1차 발현 벡터를 이용하여 두 종류의 발현 시스템이 대장균에서 효과적으로 모두 작동하는지를 확인하였다. 제작된 발현 벡터를 이용하여 형질도입된 대장균으로부터 ghost 발현계의 작동이 원활히 유도되는지를 확인하기 위해서 42°C 온도 자극을 통해 naive 대장균 대조구와 확연히 구분되는 E-lysis 발현이 유도됨을 알 수 있었다 [도 R43].



[도 R43]

Dual 발현 벡터 (version 1.0)를 포함하는 재조합 대장균에서의 ghost 발현계의 유도

또한 GFP 발현 reporter를 이용한 항원 표면 발현계를 작동시키기 위해서 IPTG 유도를 실시하였다. 그 결과 IPTG 처리군에서 약간의 성장 저해가 관찰되었으나 통계적인 유의차는 없었고, IPTG 유도가 완성되는 시점까지 (2시간), 유도군과 비유도군간의 GFP의 발현을 형광으로 상대 정량한 결과, 비대조군에서도 낮은 수준에서의 GFP가 관찰되었으나 유도군에서는 월등히 높은 수준의 GFP 외래 단백질의 표면 발현이 가능한 것으로 나타났다. 비유도군의 경우 시간 경과에 따라 큰 발현율의 차이는 관찰되지 않았지만 유도군의 경우 2시간째 보다 증가된 GFP 발현을 나타내었다 [도 R44].

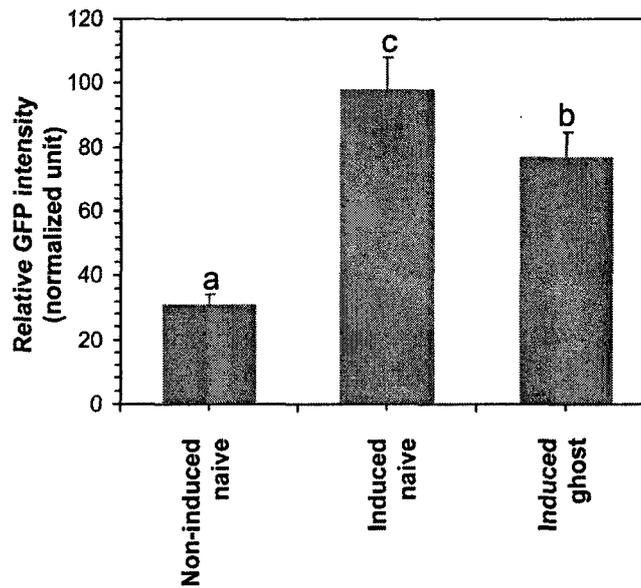
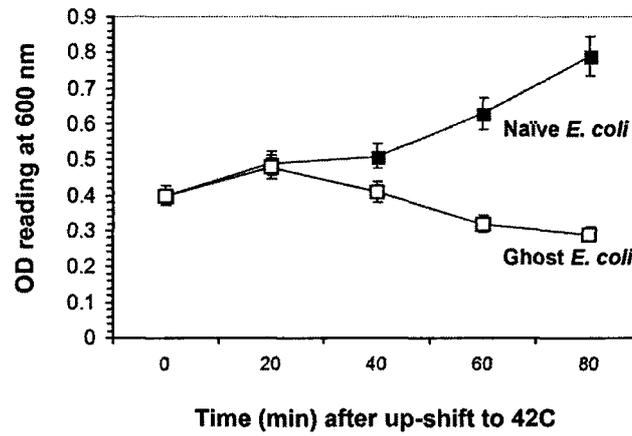


[도 R44]

Dual 발현 벡터 (version 1.0)를 포함하는 재조합 대장균에서의  
GFP 항원 발현계의 유도

상기 독립된 두 실험 결과를 바탕으로 GFP 항원 발현계와 ghost 발현계를 순차적으로 작동시켰다. GFP 발현을 위해서 OD 0.2까지 도달한 사전 배양균 (28°C)에서 2시간의 IPTG 유도를 실시하였고, 이후 OD 0.4로 조정된 실험구들을 이어 ghost 발현을 유도하였다. 두 발현계가 모두 효과적으로 작동하는 것으로 나타났으며 ghost 균에서 세포질의 소실과 함께 GFP 발현이 상대적으로 감소하는 경향을 나타냄으로써 표면 발현계가 모두 세포 표면에 집중되는 것은 아님을

시사하였다. 그러나 ghost 유도 후에도 유의적인 외래 항원이 ghost 표면에 보존됨이 관찰되었고 따라서 dual 백신을 위한 1차 벡터로서 ghost 표면에 항원 단백질의 표현이 가능한 것으로 나타났다 [도 R45].

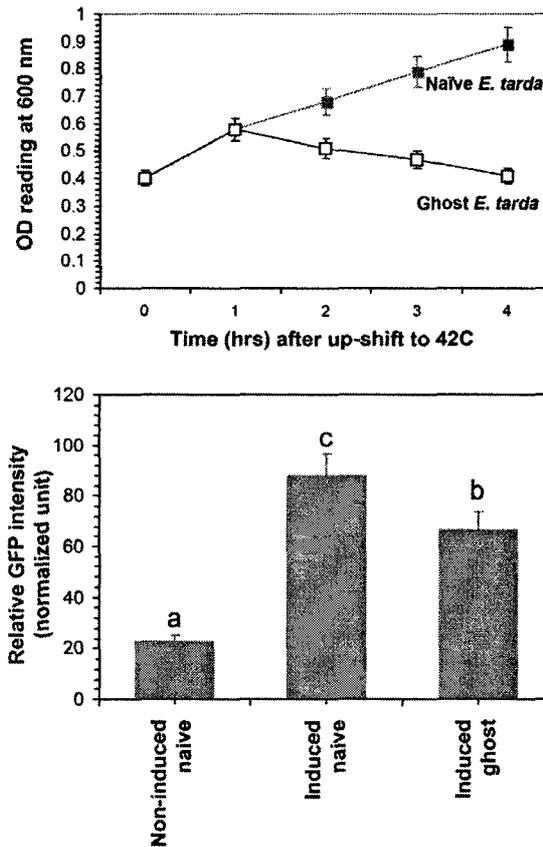


[도 R45]

Dual 발현 벡터 (version 1.0)를 포함하는 재조합 대장균에서의 GFP 항원 발현 및 ghost 발현계의 순차적 작동

나. *E. tarda* ghost 박테리아에서의 외래 단백질의 표면 발현

상기 대장균 ghost 발현 cassette와 IPTG 유도 기반 항원 발현 시스템 (tac 프로모터)의 평가를 통해서 얻어진 결과를 바탕으로 본 1차 version의 dual vector를 *E. tarda* 내로 형질도입시키고 형질전환 균주를 확보하였다. 앞서의 대장균에서와 같이 IPTG를 이용한 외래 단백질의 표면 발현과 ghost 유도를 순차적으로 작동시켰다. 도 R46에서 보듯이 대장균에 비해 다소 지연된 ghost 유도가 관찰되었으나 단일 E-lysis vector를 이용한 결과와 큰 차이를 나타내지 않아 전형적인 *E. tarda* ghost 유도 양상을 보였다. 최종 회수된 *E. tarda* ghost를 이용하여 외래 단백질 표면 탑재 여부를 평가한 결과 induced naive 실험구에서 가장 높은 형광이 발현되었고 이어 세포질을 소실한 ghost 균에서도 유의적인 GFP 발현이 동정되었다. 그러나 IPTG 유도를 하지 않는 대조구에서도 낮은 수준의 GFP가 관찰되어 완벽한 tight regulation은 가능하지 않았다 [도 R46].



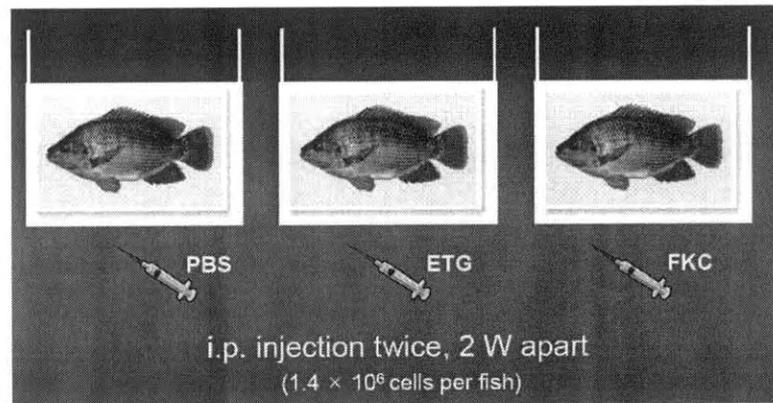
[도 R46]

Dual 발현 벡터 (version 1.0)를 포함하는 재조합 *E. tarda*에서의 GFP 항원 발현 및 ghost 발현계의 순차적 작동

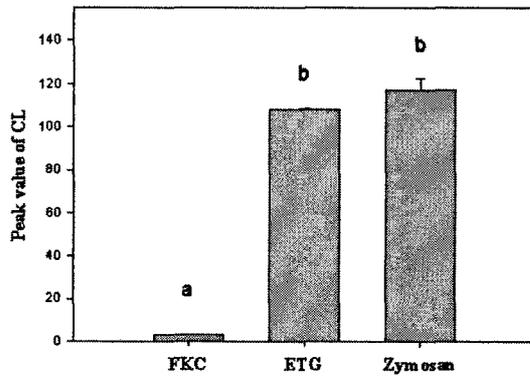
## 제6항 개발 백신의 어체 방어 능력 평가

### 가. 어체 면역 유도능력 및 방어능력 평가

#### 1) 실험모델 틸라피아를 이용한 주사 백신 처리 효과 평가

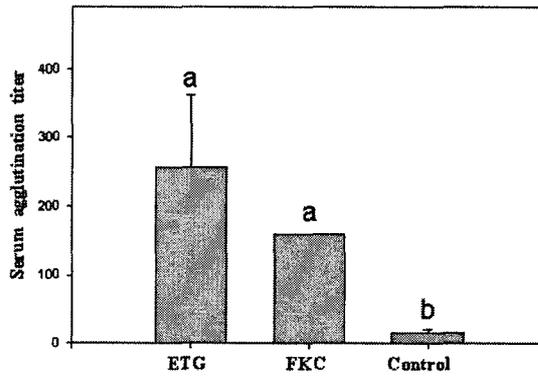


Phagocyte의 호흡 폭발을 측정 한 결과 ETG에 의해 자극되는 phagocyte는 종래 화학적 처리에 의해 제작된 FKC 보다 유의적으로 높은 활성을 나타내었고 [도 R47], chemiluminescence 측정을 바탕으로 평가 시 ETG-stimulated 군의 경우 대조군으로 사용된 zymosan에 필적할 만큼의 자극 능력을 잘 나타냄으로써 생균에 버금가는 면역 유도 능력 보유의 가능성을 시사하고 있다. Agglutination and bactericidal activity를 분석한 결과 ETG와 FKC로 immunization 된 틸라피아 어체의 경우 대조군 보다 유의적으로 높은 응집가(titer)를 나타내었으며 ETG가 FKC에 비해 약간 높은 응집가를 보였으나 통계적인 유의차는 관찰되지 않았다. Bactericidal activity의 경우 ETG가 FKC보다 훨씬 높은 활성을 나타냄으로써 가장 우수한 성적을 보였고 두 immunized 군 모두 대조군보다는 유의적으로 높은 활성을 나타내었다 [도 R48 & R49].



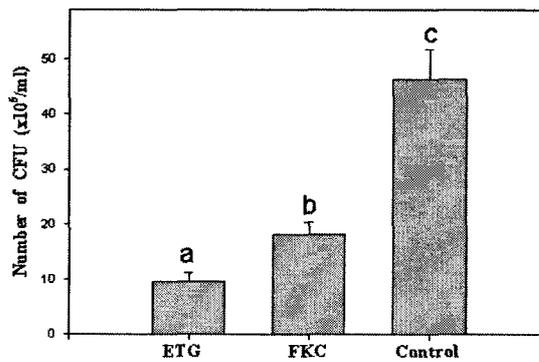
[도 R47]

*E. tarda* ghost 및 FKC의 phagocyte respiratory burst 유도 능력 평가



[도 R48]

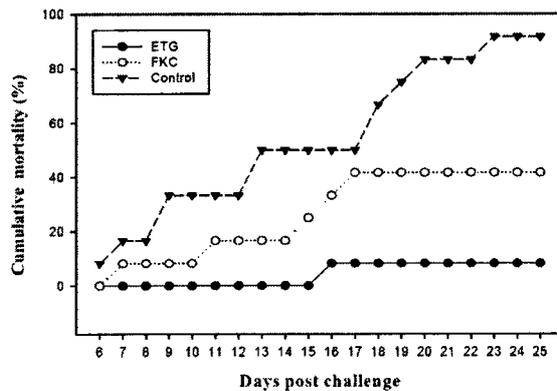
ETG 및 FKC로 immunized 된 틸라피아 혈청의 응집 반응 활성



[도 R49]

ETG 및 FKC로 immunized 된 틸라피아 혈청의 살균 반응 활성

*In vivo* 생체 반응 효과를 분석한 결과 첫 번째 백신 실험에서 (3반복 수조 이용) ETG와 FKC 모두 대조군에 비해서 낮은 누적 폐사율을 보였으며 이에 *E. tarda*에 대한 방어 능력이 부여되었음을 알 수 있었다. 특히 ETG로 immunization 된 틸라피아군의 경우 종래의 FKC-immunized 군에 비해 유의적으로 높은 생존율을 나타냄으로써 ETG의 우수한 생체 방어 능력이 관찰되었다. 총 25일간의 관찰을 통해 대조군의 경우 90%에 이르는 폐사가 관찰된 반면 FKC에서는 40%, 그러나 ETG의 경우 10% 미만의 총 누적 폐사율이 관찰되었다 [도 R50]. 특히 두 번째 백신 실험에서 (단일 수조 이용) 수조 효과를 제거한 상태에서는 그 효과가 훨씬 더 뚜렷하게 나타나 단기실험에서 대조군이 20%의 폐사가 관찰되는 시점에서 FKC는 8%, 그러나 ETG의 경우 단 한 마리의 폐사 개체도 관찰되지 않았다. 이상에서와 같이 본 연구개발에 의해 제작된 백신 ETG는 생체 면역 자극능력은 물론 실제 immunization에 의해 *E. tarda* 감염증에 대한 *in vivo* 방어 기능을 어체에 부여할 수 있는 것으로 나타났고, 그 성능 역시 종래의 화학처리를 기반으로 한 formalin-killed cell vaccine 보다 월등히 우수한 성적을 나타내었다. 이는 ETG의 경우 세포 표면에 있는 항원 작용 가능 단백질들의 구조적 손상 없이 생존력만을 제거할 수 있는 특징을 갖고 있기 때문으로 판단되며 또한 불필요한 세포질 등 immune suppressor로 작용할 수 있는 세포질 내 단백질들이 다량을 제거되었기 때문으로 여겨진다. 따라서 본 ETG 백신의 효과를 극대화할 수 있는 최종 version을 후속 연구로 제시함으로써 종래의 백신 효율을 개선시킬 수 있는 우수한 대체 백신으로서 또 ETG 표면을 유전공학적으로 조작이 이루어질 것이다.

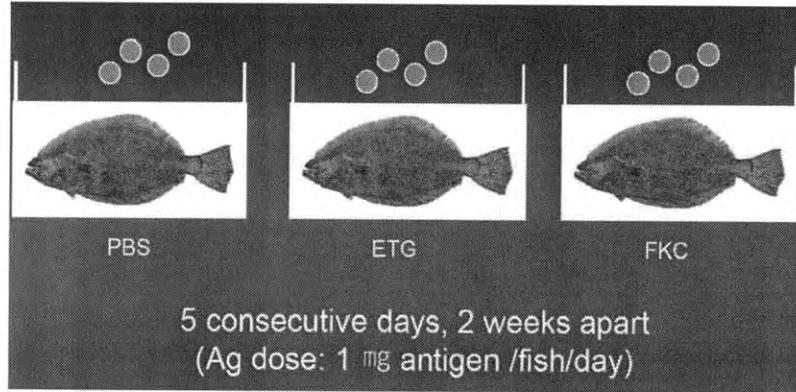


[도 R50]

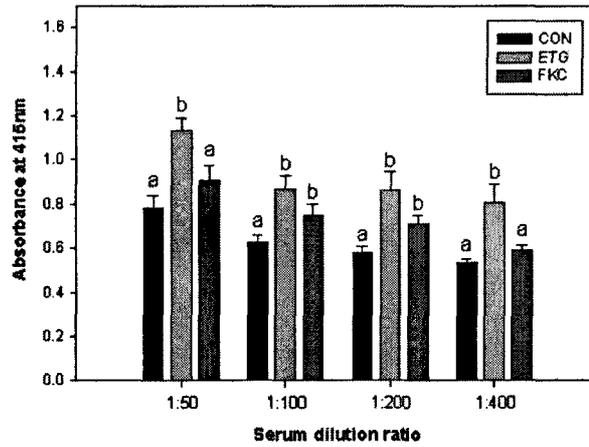
공격실험시 ETG 및 FKC로 immunized 된 틸라피아의 누적 폐사율

## 나. 경구 백신 처리 및 방어 기능 평가

### 1) 넙치 *E. tarda* ghost 경구 백신 처리 효과 평가

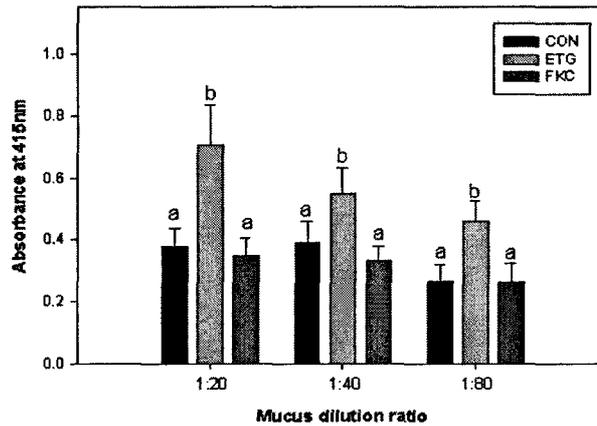


경구 ETG 투여시 면역 유도 기능을 분석하였다. ETG 및 FKC의 경구 투여를 통해 immunized 넙치의 경우 무처리 대조군에 비해 serum 및 mucus antibody titer가 모두 높게 나타나는 경향을 보였으며, 특히 ETG 군은 FKC군에 비해 통계적인 유의차를 보이며 월등히 높은 항체가를 나타내었다. Serum antibody titer의 경우 1:50에서 1:400까지의 dilution 모두에서 dilution effect가 강하게 나타나지는 않았으나 모두 일양하게 ETG 군이 가장 높은 antibody titer를 보였다. 특히 FKC군의 경우 일부 구간에서 PBS 처리군과 차이를 보이지 않는 결과를 나타낸 반면 ETG군은 전 구간에서 대조군 및 FKC군과 통계적인 유의차를 보였다 [도 R51]. Mucus antibody titer에서도 유사한 경향을 나타내었으며 그 차이는 더욱 선명하게 관찰되었다. 특히 FKC-immunized 군의 경우 mucus에서는 전 dilution 구간에서 대조군과 유의적인 항체가 차이를 나타내지 않는 반면 ETG의 경우 대조군 및 FKC 군에 비해 150-200% 이상의 항체가를 전 구간에서 나타냄으로써 FKC에 비해 월등히 우수한 항체 유도 능력이 있음을 시사하였다 [도 R52]. 뿐만 아니라 본 immunization이 경구 경로로 수행된 점을 고려할 경우 FKC가 경구 경로에서 큰 효과가 없음에도 불구하고 ETG는 경구에 의한 백신 효과가 가능함을 보여주고 있다.



[도 R51]

경구 투여된 ETG 및 FKC의 혈청 항체에 미치는 영향

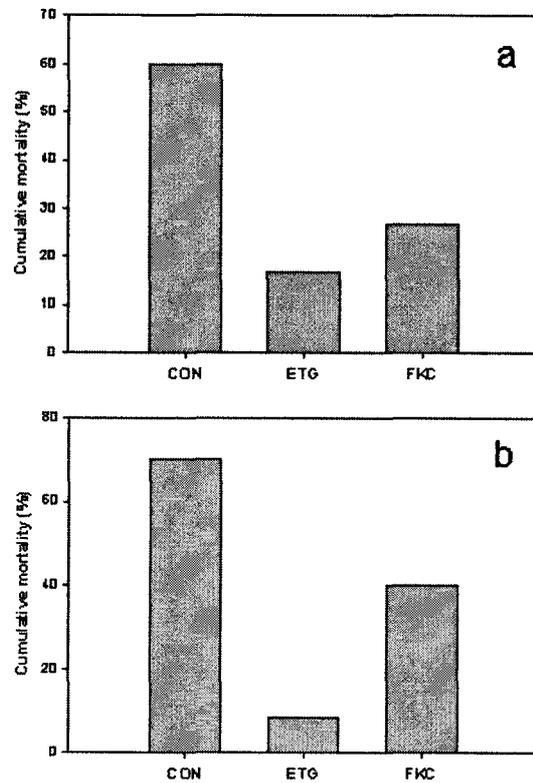


[도 R52]

경구 투여된 ETG 및 FKC의 혈청 항체에 미치는 영향

ETG 및 FKC의 경구 투여를 통해 immunized 녀치 모두 무처리 대조군에 비해 낮은 누적 폐사율을 나타냄으로써 PBS가 처리된 대조군 보다는 높은 방어 능력을 나타내었고 그 경향은 injection에 의한 공격실험과 immersion에 의한 공격 실험 모두에서 유사하게 관찰되었다. ETG와 FKC를 비교시 ETG가 두 공격 실험에서 모두 유의적으로 높은 생체 방어 능력을 표현하였으며 상기 면역 유도 실험 및 앞서의 킬라피아 실험에서의 결과와 일치하였다. Immersion을 이용한 실험시 대조군의 폐사율은 60%에 처리 10일째 60%에 육박하였으나

FKC 처리군의 경우 25% 그리고 ETG의 경우 16%를 나타내었다 [도 R53]. 또한 Injection을 수행한 실험에서는 그 차이가 보다 뚜렷하게 나타나 대조군은 70%의 폐사율을, FKC의 경우 40%의 폐사율을 보인 반면 ETG의 경우 10% 미만의 폐사율을 나타냄으로써 FKC에 의 4배에 가까운 *in vivo* 생체 방어 효과가 관찰되었다 [도 R53].



[도 R53]

ETG 및 FKC의 oral administration에 의한 *in vivo* 생체 방어 효과

이에 ghost 유도 및 백신 제작을 위한 최적화가 성공적으로 이루어 졌고 INP를 이용한 membrane targeting 뿐만 아니라 E-gene-based targeting 그리고 나아가 *E. tarda* 자체 OMP를 이용한 display기술이 추가로 정립되는 등 계획 이상의 성과를 확보할 수 있었다. 본 연구개발에서 제작된 *E. tarda* ghost는 모델 어종 (틸라피아) 및 목적 어종 (넙치) 모두에서 종래의 FKC에 비해 월등한 면역 유도 능

력과 생체 방어 기능을 부여할 수 있는 것으로 관찰되었다. 특히 목적 어종을 대상으로 경구 투여 기반의 immunization을 통해서도 월등한 방어 기능이 관찰됨에 따라 본 개발 백신의 현장 적용 가능성이 확인되었다.

## 2) Dual 발현 백신의 경구 처리 효과

앞서 ghost 내 표면 발현 시스템을 이용하여 MABV의 VP 항원 단백질을 표면발현하는 *E. tarda* ghost 백신을 상기와 같이 제조하였고 본 dual 기능 백신을 넙치에 면역화하고 *E. tarda* 및 MABV 단독 및 동시 공격을 실시하였다. 그러나 두 병원체는 감염 및 질환 유발 온도 범위가 서로 다르다고 알려져 있어 *E. tarda*의 공격은 25℃에서 그리고 MABV 공격은 18℃에서 실시하였다. 그 결과를 아래의 도에 나타내었다. 첫째, *E. tarda* 단독 공격 시 무공격 대조군(무처리 및 무공격)은 10 - 15%의 누적 폐사율을 나타내어 비교적 안정적인 사육 조건 및 공격 실험 상태를 나타내었다. 백신 처리 없이 (PBS coating 사료) *E. tarda*에 공격된 대조군은 처리 5일째부터 사망개체가 관찰되기 시작하여 10일째부터 급격한 폐사가 관찰되었으며 이후 지속적인 폐사의 증가가 누적되어 17일째 50%이상의 개체가 폐사하였다. 반면 백신 처리구에서는 7일째부터 폐사가 10% 관찰되기 시작하여 최종 20% 내외의 폐사가 관찰되어 약 2배의 생존력 개선 효과가 관찰되었다. 둘째, MABV 단독 공격 실험에서는 무공격구, PBS 처리구 및 백신 처리구 모두에서 MABV 단독 공격을 통해 유의적인 폐사 개체가 유발되지 않는 것으로 나타났다. 3실험구 모두에서 10-15%의 누적 폐사율이 관찰되었다. 셋째, 25℃에서 *E. tarda* 및 MABV 동시 공격에서는 무공격 실험구에서 앞서와 같이 10% 이하의 낮은 폐사율이 관찰되었고, PBS 처리 후 동시 공격구에서는 17일째 60%에 달하는 누적 폐사율이 측정되었다. 그러나 백신 처리구에서는 비록 7일째부터 폐사 개체가 출현하였으나 큰 증가 없이 14일째까지 유지되었고 최종 17일째에는 약 15%의 누적 폐사가 관찰되었다. 넷째, 18℃에서 *E. tarda* 및 MABV 동시 공격 실험에서는 백신처리구가 비록 낮은 누적 폐사율을 나타내었으나 25℃ 실험에서와 같이 뚜렷한 차이를 나타내지는 못하였다 [도 R54]. 이상의 결과에서 dual 백신의 기능 중 *E. tarda*에 대한 ghost 백신은 *E. tarda*의 공격에 매우 우수한 방어 효과가 경구투여에 의해서 확보될 수 있었으나 MABV의 경우 백신 처리구와 무처리구 모두에서 뚜렷한 질병에 의한 폐사를 유도할 수 없었다. 개체들의 MABV 감염은 RT-PCR에 의해 조직별로 다양하게 확인되었지만 감염에 의해 폐사까지는 관찰되지 못하였고 추가 실험을 통해 MABV 농도를 2-3배까지 증가시켰음에도 불구하고 LD50 등을 구할 수 있는 폐사 유도는 불가능하였다. 따라서 비록 dual vaccine 처리와 두 병원체의 동시 공격에서 PBS 처리군에 비해 월등

히 높은 방어 능이 관찰되었지만 이는 MABV의 감염과 폐사 유발에 대한 방어 효과라기보다는 *E. tarda*의 질병 유발에 대한 방어 효과에 기인한 것으로 판단된다. 내재성 MABV에 의한 폐사가 유도되지 않는 점에 대한 정확한 분자 기작은 아직 불투명한 상태이며 단지 본 연구진의 추가 실험을 통해 내재성 MABV가 특정 *stimulant*에 의해 활성화 될 수는 있으나 넘치의 대량 폐사까지는 유도할 수 없음을 관찰하였고 그 결과를 한국어류학회지에 보고하였다.

Korean J. Ichthyol. 19(2), 88-92, 2007

### Effects of Dexamethasone on the Burden of Marine Birnavirus (MABV) in Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Se Ryun Kwon and Yoon Kwon Nam<sup>1\*</sup>

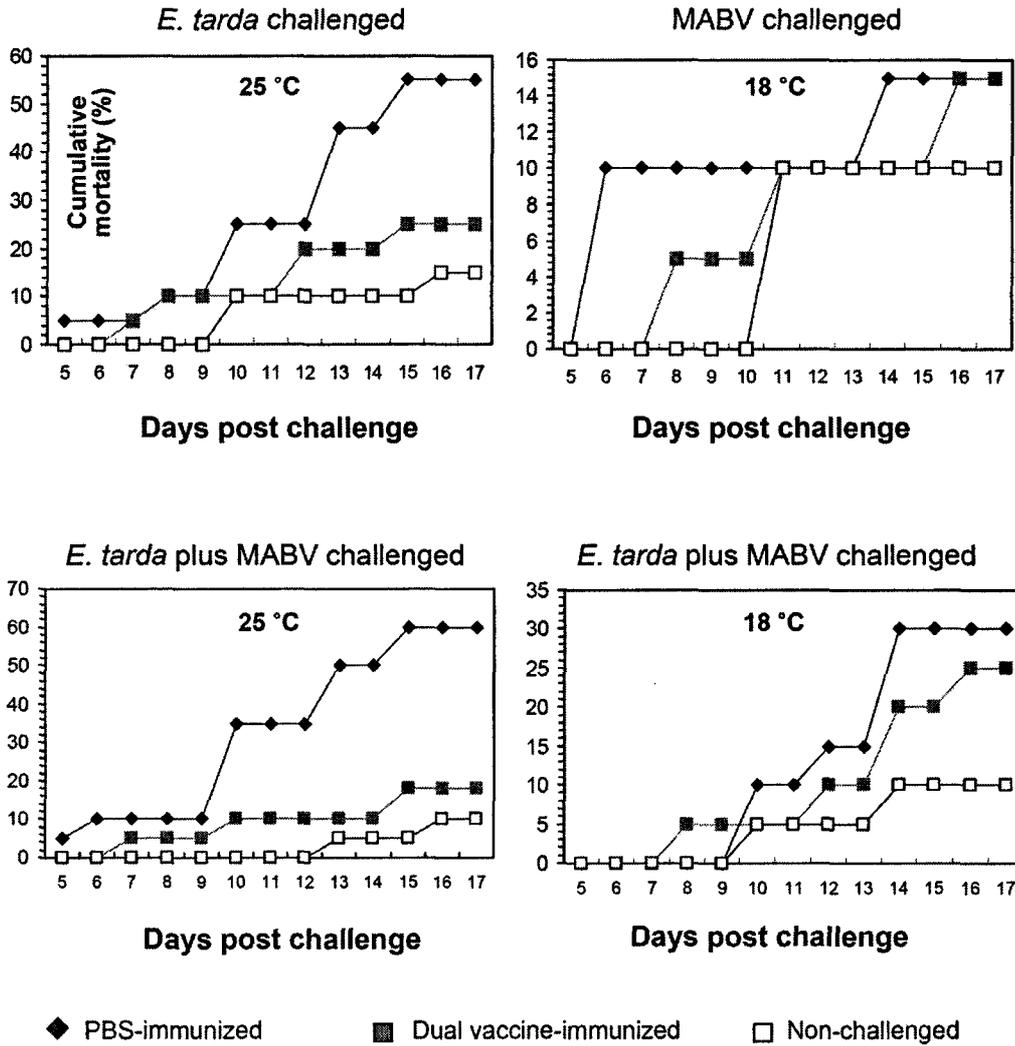
Department of Aquatic Life Medicine,

<sup>1</sup>Department of Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

The effect of dexamethasone injection on the burden of marine birnavirus (MABV) in asymptotically infected olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fingerlings was investigated. In real time PCR analysis, the threshold cycle (Ct) value of the fish injected with dexamethasone was significantly lower than that of the fish in the PBS-injected and no-handling groups. The higher amplification of the MABV gene in the dexamethasone-injected group than the 2 control groups was confirmed also by semi-quantitative RT-PCR. The results indicate an increase of MABV burden in olive flounder fingerlings after a single injection with dexamethasone.

**Key words :** marine birnavirus, dexamethasone, viral titer, olive flounder

따라서 MABV 단독 공격으로는 넘치의 대량 폐사를 유발하지 못한다는 점, *E. tarda*와 같이 고수온기 발생 세균성 질병과 함께 창궐하여 MABV에 의한 폐사가 유발되지 않는다는 점 등을 고려 시 현장 실험 실시가 동계 및 하계에 구분되어야 할 필요성이 있다고 판단된다. 그러나 본 연구개발의 다기능 백신이 ghost 기반 표면 항원성과 외래 항원의 표면 발현이 동시에 이루어짐이 확인되었으므로 본 발현 시스템을 최적화함으로써 본 연구개발 범위로 국한된 MABV 항원이 아닌 여타 외래 항원 표면 발현 시스템으로의 활용이 필요하다고 판단된다. 특히 백신의 산업적 이용성을 극대화하기 위해서는 외래 표면 항원 전달 시스템으로서의 병원성 세균과 재조합에 의해 표면에 표현될 외래 항원의 조합을 보다 개선해야 할 것으로 판단된다. 즉 고수온기 및 저수온기에 동시 출현이 예상되는 항원들간의 조합이 필요할 것이며 본 연구개발에서 최적화된 cassette 시스템을 활용하여 다양한 항원들간의 효과적인 조합이 가능할 것으로 판단된다.



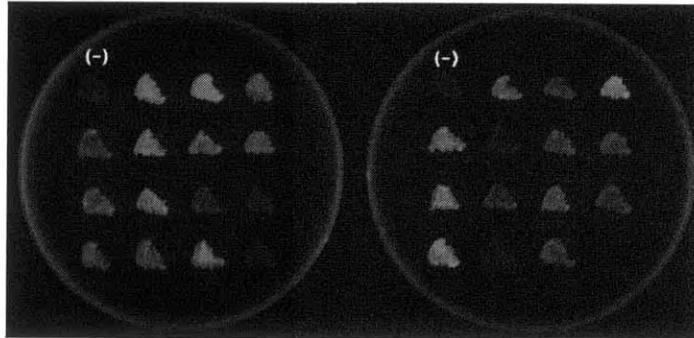
[도 R54]

Dual 기능 백신의 경구 투여 및 방어 효과 평가

## 제7항 재조합 다기능 백신의 유효능 개선 및 안전성 최적화

### 가. 항시 고발현 유용 프로모터로의 개선 및 최적화

1) 프로모터 trap 플라스미드 벡터 제조 및 항시 발현 프로모터 포함 균주 동정  
앞서 연구 방법에서 언급된 전략을 이용하여 재조합 균주를 제작하고 이들의 GFP 형광 발현을 검출한 결과 4반복 실험에 의해 총 120여개의 GFP 발현 균주를 확보할 수 있었으며 단일 클론들로의 분리 후 비교적 우수한 발현을 보이는 클론들을 선발하였다. [도 R55]은 실시 예에서 얻어진 GFPuv 발현 재조합 대장균 클론을 동정한 예를 보여주고 있다. [도 R55]에서 보듯이 분리된 클론들은 프로모터 없이 GFPuv 유전자만을 갖고 있는 재조합 클론 (음성 대조군)과 비교 시 뚜렷한 형광 발현을 보여 주고 있으며 클론들 별로 다양한 강도의 형광발현을 보임으로써 다양한 항시 고발현 프로모터들이 발굴되었음을 잘 보여 주고 있다.



(-): 음성대조군 [프로모터 삽입 없이 pGFP (p<sup>-</sup>)만으로 형질 도입한 대장균]

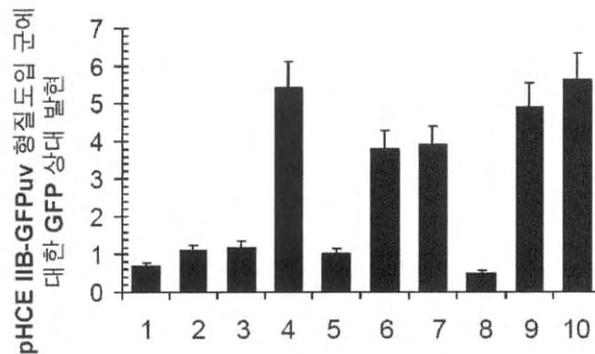
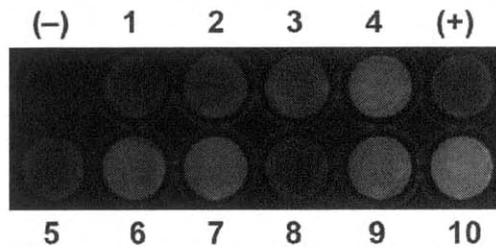
[도 R55]

항시고발현 프로모터의 단일 클론 분리 사진

### 2) 프로모터 선발

아래 [도 R56]은 이들 클론들의 형광 이미지 발현 분석의 결과 예시와 형광 발현을 기준으로 한 프로모터들의 상대 활성을 나타낸다. 상기 도표들에서 보듯이 분리된 후보 프로모터들은 각기 서로 다른 수준의 활성을 나타냄을 보여 주고 있으며 일부 클론들은 pHCE IIB-GFP를 포함하는 재조합 균주들과 유사한 발현 양상을 보이지만 다른 일부 클론들은 양성 대조군으로 상용한 pHCE IIB-GFP 균 보다 유의적으로 높은 발현 활성을 나타내어 최대 5배 이상의 발현 활성을 나타냄을 잘 보여주고 있다 [도 R56]. 따라서 3차 선발을 통해 3개의 프

로모터를 본 발명에서 최종 선발하였으며 이들 프로모터 클론들을 각각 ETP-X ([도 R56]의 4번 클론), EPP-Y 및 ETP-Z ([도 R56]의 10번 클론)라고 명명하였다. ETP-X, -Y 및 -Z의 염기서열은 아래의 서열번호 #7, #8, #9에 나타내었다. 이들 프로모터 염기서열 중 밑줄로 표시된 서열은 앞서 원핵생물 프로모터 영역 예상 프로그램을 통해 가장 높은 확률로 예측된 핵심 프로모터 기능 영역을 나타내며 소문자 진한 글씨체로 표시된 부분은 본 프로모터를 PCR 분리하기 위해 사용된 탐침들의 부착 위치를 나타낸다. 탐침의 밑줄 친 부분은 클로닝을 용이하게 하기 위해 5'-말단에 인위적으로 삽입시킨 제한효소 인식 서열을 나타낸다.



(-): pGFP(p<sup>-</sup>) 형질도입 대장균

(+): pHCE IIB-GFPuv 형질도입 대장균

1-10: *E. tarda* 프로모터를 포함하는 GFP 발현벡터로 형질도입된 대장균

[도 R56]

항시고발현 프로모터의 상대 활성 평가

ETP-X의 염기서열

**5'-aacggctcgggtggccgagtgctgaaaa**CTTGTCAACGTCAAGCGGGCTTATTCCC  
ATCGCTGGTATTGTATTGCCCCACACTCGGCCATATCCAAAAAATGACCACAAAA  
AAACCGCAAGTCTATCGGGTGCGGAGGCCGCGTTGAGGTGTTTTCAGCACCTG  
AGCGGACTATACCCCGACATCGCGGGTAAACTAATTCCGATTTATGATACTTT  
ACTTACAAATCATAGGAATGCAATAACCATCCCCTTGGAACAGTGTGTGGCATAT  
ATTCCTAATGCTCTTAAAAACCGCCATTCCAGGACGCCAATCCCAGCAACAGA  
TGTTGCCGCTGCCACTACGCTCTAGCGCTCACAATTCCGATGGGCAAAGAACTTG  
CGAAAACATAACAATATTGTTATGTTTCACTCCATGAACTACACTATTGAGTACTa  
cagcgaagagggttcggcttgaggtc-3'

ETP-Y의 염기서열

**5'-agotgtcgcagcagggccgatat**GTTTGGCTTTACCGACTGTCAGCCGTTTATGCCG  
ACCCGCTGGCTGCAGCAGGGCGACACCCTGGCGGTGGGCGAGGAGCAGCTGA  
CGGTGCTGCACTGTCCGGGTCATACGCCGGGCCACGTCGTTTACTTCTGCGAGA  
AGGCGCGTCTGGCGCAGGTGGGCGATGTGCTGTTTCGCGGCAGCATCGGGCGC  
AGCGATTTGCCGGCGGCAACCACCGCATCAAAGCCGAAGCTCATCCTATTAC  
ACTTTGCAGTCTTGGTGAAGATATCACTTGGCAAGTAGTTTTTTTTGCAATACCA  
TTTTAACAAACGCATCTTGgcaataccaccgcagtaa-3'

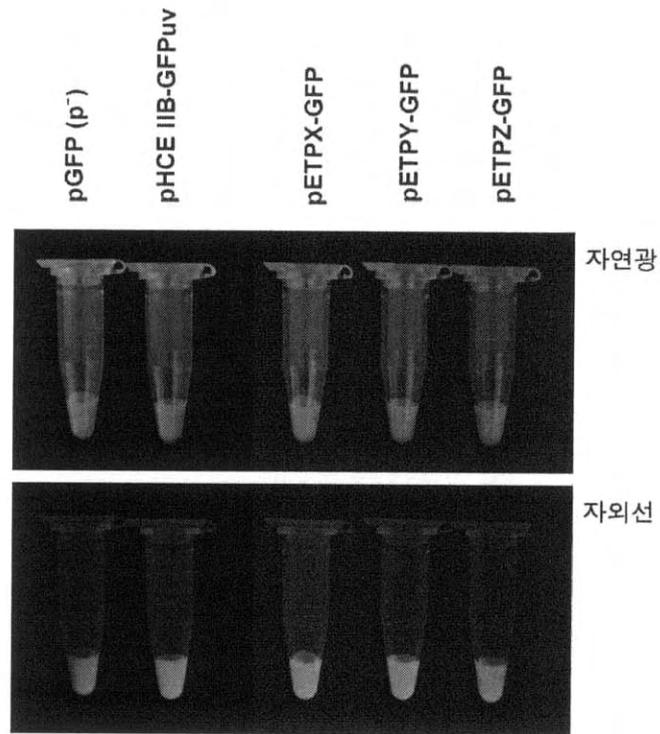
ETP-Z의 염기서열

**5'-acgagatggcaagaggcta**TGGGGCTGAGCTATCTATTTGGCACTTTTTTTGAAA  
AGTGCTAAAAAACAATTTGTAGTATGAATAATATGGCGTAGTCGGCCTAAAGTG  
AGGATGGAATCGGCTCAAAATGTATAATACATCGCATTTTAAACTTATTATTTAC  
TTTTTTCGCGGATAAGAGGATGACGAATGCGTCAGAATAGCGTAAAAAGGAGGA

CATGAGAGTCAAGGAAAACCAAAGGGTGAGTGCTGGAAAAATGAACGTCGCTG  
 TGGCAGCAGAAAACGCTACGCATGGCAACTTATTTTCAGCATAAACATGACCAGT  
 TTTCCGCCGACCGTTTTATTTCTGTGCGACATGTTCGTTCACTGAATAAAAATGGC  
 TTGCCATTGAATTGAGAGTATGTGATAACGCATTGGAGTAAAGCGAGGTACAGTT  
 CTGTCTATGTGTGGCATTTCAGTAAAGAAGTTCCGAGTAAAAACGTTTTCGTTG  
 CTTACTACTTCTCTGCCGAACCTTATCTTAGTGCCTCAAGCAGTAACGACTCTAG  
TTTGTCTGTGTAACGCCCTCGGGCGGTTTAATCAATAGTAAGGAAATACGTAAGA  
TGGCTAAGATCGCGCATCAGCGATAGAGCCGTACGTCGCCGTCGACGATGGCGA  
 ACTGGCGCTGCCACGCCTGCAGCGTCAACGCCGCCAGCGACGCC**agtcacctgat**  
**aaaacgggt-3'**

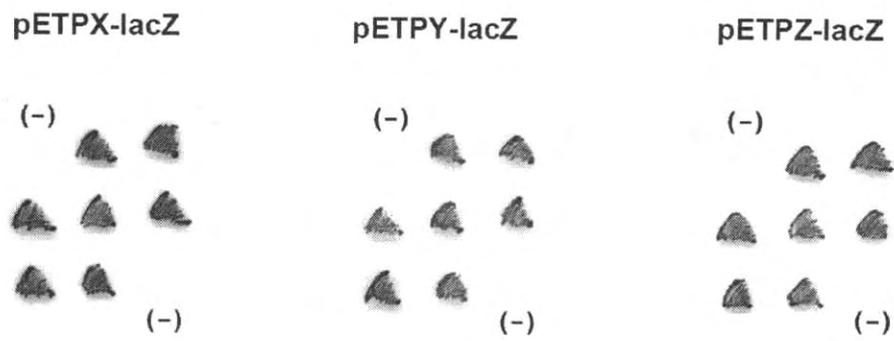
상기 선발 3종 서열 외에 발굴된 *E. tarda* 항시 발현 가능 프로모터 후보  
 군은 본 최종보고서 부록 II에 나타내었다.

상기 ETP-X 및 ETP-Y 및 EPT-Z 프로모터를 포함하는 GFP 발현 벡터  
 (pETPX-GFP, pETPY-GFP 및 pETPZ-GFP)를 이용하여 1 L 배양을 통해서 항  
 시 고발현을 재확인한 결과를 [도 R57]에 나타내었다. [도 R57]에서 보듯이 상  
 기 선발된 에드워드균 유래 고발현 프로모터 함유 재조합 클론들은 음성 대조  
 군과 확연히 차이나는 GFP의 고발현 양상을 나타내었음은 물론 양성 대조군으  
 로 사용된 pHCE IIB-GFP 포함 재조합 클론에 비해서도 월등히 높은 발현을 나  
 타내고 있다. 아울러 상기 선발 프로모터들 (ETP-X, ETP-Y 및 ETP-Z)이 상기  
 GFP 리포터 유전자외에 다른 다운스트림 유전자 역시 고효율 발현을 유발시킬  
 수 있음을 확인하기 위해서 상기 pETPX-GFP, pETPY-GFP 및 pETPZ-GFP 플  
 라스미드 벡터로부터 GFPuv 유전자를 대장균 beta-galactosidase α fragment  
 (lacZ') 유전자로 교체하여 그 발현 여부를 확인하였다. 그 결과 상기 선발된 프  
 로모터 3종류 프로모터 포함 재조합 균주에서 IPTG 유도체의 첨가 없이 강력  
 한 X-gal 분해반응이 검출됨에 따라 LacZ'의 고발현, 즉 높은 프로모터의 활성,  
 이 가능한 것으로 나타내었으며 이에 본 발명의 프로모터들은 자신들의 다운스  
 트림쪽에 연결된 다양한 여타 유전자들을 항시 고발현 할 수 있는 잠재 능력을  
 보유하고 있음을 잘 알 수 있다 [도 R58].



[도 R57]

선발된 *E. tarda* 항시고발현 프로모터에 의한 GFP 발현 평가



(-): pETPX-GFP

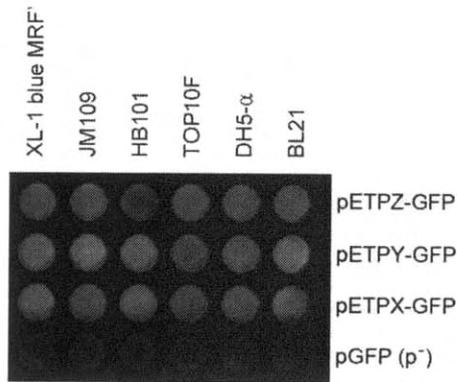
[도 R58]

선발된 *E. tarda* 항시고발현 프로모터에 의한 lacZ 발현

## 6) 선발 프로모터의 평가

[도 R59]은 진탕 배양한 각 속주 배양균 100 ul 씩을 96-well plate에 넣고 VersaDoc 4000 분석기로 분석한 그림을 나타낸 것이며 [도 R59]에서 보듯이 선발된 3개 클론 모두 다양한 대장균에서 항시 고발현을 보이며 플라스미드를 포함하지 않는 일반 균주와 뚜렷한 차이를 나타내고 있다. 이에 본 프로모터들은 상용한 모든 대장균 균주에서 고효율의 유전자 발현을 나타낼 수 있음을 잘 증명하고 있으며 따라서 본 실시 예에서 확인된 대장균 균주들 외에도 여러 다양한 다른 대장균 균주들에서도 본 발현 시스템을 이용할 수 있음을 시사한다. 본 연구의 3종 프로모터들은 모두 대장균의 성장 단계와 밀접한 연관을 보임으로써 3종 모두에서 32 및 37°C 배양균이 저온 배양균 (20 및 27°C)보다 높은 발현을 나타내었으며, 이 중 32 및 37°C 온도 구간 간에는 통계적인 유의 차이가 관찰되지 않았다. 27°C 배양균의 경우 역시 유의적인 발현을 나타내었으나 32 및 37°C 배양균보다는 낮은 발현율을 나타내었고, 특히 20°C의 경우는 극히 낮은 발현 활성이 관찰되었다. 이는 각 배양 온도군에서 관찰되는 대장균의 성장곡선과 밀접한 관계를 갖는 것으로 판단되는데 즉, 본 연구의 프로모터는 대장균이 대수 증식기를 넘어선 일정 성장 단계 이상 시점에서 높은 활성을 보이는 것으로 나타났으며 이는 대장균 성장 곡선이 아직 대수 증식기로 접어들지 않는 20°C 배양균에서 GFP의 낮은 발현이 관찰되는 현상과도 잘 일치한다. 따라서 본 발명의 프로모터들을 이용, 재조합 단백질을 효과적으로 발현 확보하기 위해서는 32°C 이상의 배양과 최소한 대수 증식기 이후의 단백질 회수가 중요함을 시사하고 있다 [도 R60].

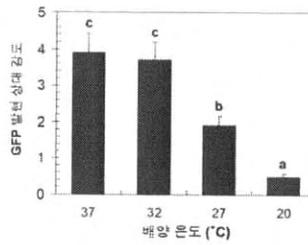
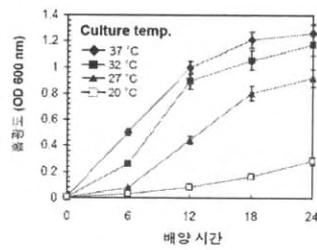
본 개발의 프로모터들은 재조합 XL-blue MRF' 균주에서 IPTG 유도에 의한 tac 프로모터보다 10배에 가까운 재조합 발현 능력을 보이며 pHCE IIB-GFP에 의한 발현과 비교시에도 월등히 높은 재조합 단백질 발현 능력을 갖추고 있어 본 발명의 효과를 잘 입증하고 있다. 두 번째 평가는 동일한 벡터들을 이용하여 대장균 균주 DH5a에서 재확인을 동일하게 실시하였다. 이때 온도 조절에 의해 작동하는 p $\lambda$ PR-GFP와의 평가를 위해서, 초기 배양 및 후기 배양은 37°C 대신 28°C에서 수행하였으며 후기 배양이 종료되는 시점에서  $\lambda$ PR 프로모터를 활성화시켜 GFP 발현을 유도하기 위해 배양온도를 42°C로 증가시켰으며 증가 후 4시간 동안 추가 배양을 실시하였다. DH5a에서의 평가 결과 역시 XL-1 blue MRF' 결과와 유사한 양상을 나타내었으며 본 개발의 프로모터를 이용한 재조합 단백질의 발현 수율은 tac 프로모터,  $\lambda$ PR 프로모터 및 HCE IIB 프로모터에 비해서 월등히 높게 나타났고 tac 및  $\lambda$ PR 프로모터에 의한 수율에 비해 최대 8배까지 높은 효율을 보였다 [도 R61 & R62].



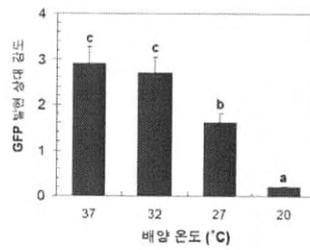
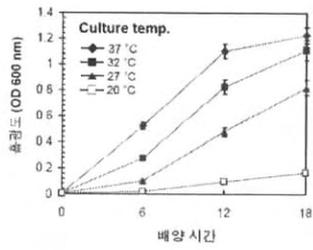
[도 R59]

다양한 숙주 대장균에서의 항시고발현 능력 평가

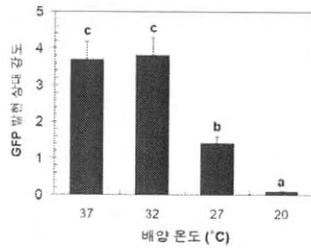
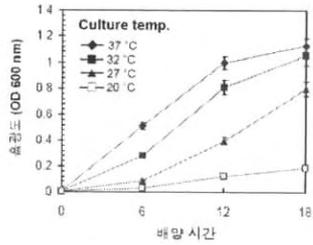
pETPX-GFP



pETPY-GFP

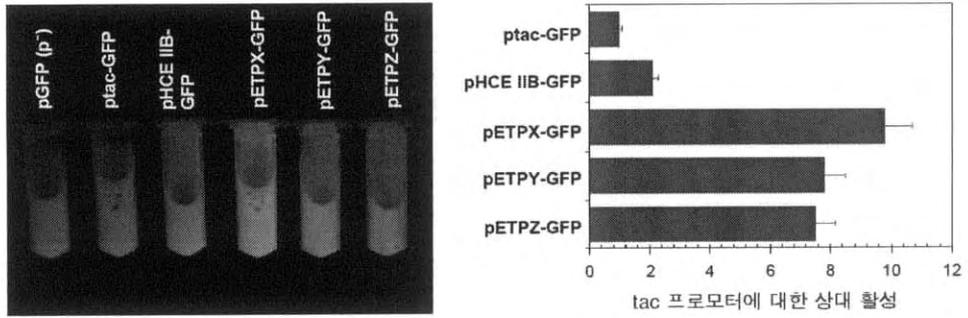


pETPZ-GFP



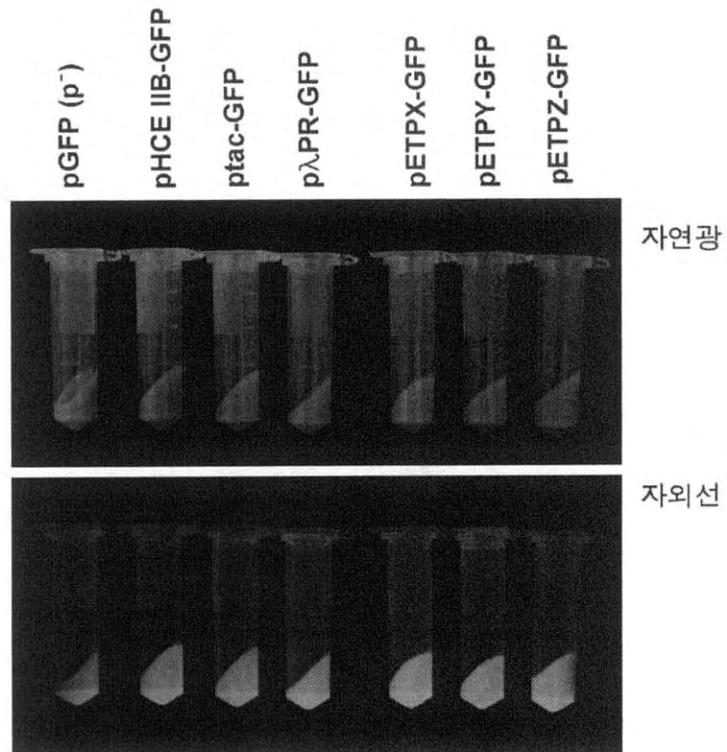
[도 R60]

다양한 배양 온도에서의 항시 고발현 능력 평가



[도 R61]

개발된 항시 고발현 프로모터의 tac 프로모터에 대한 상대 활성 평가

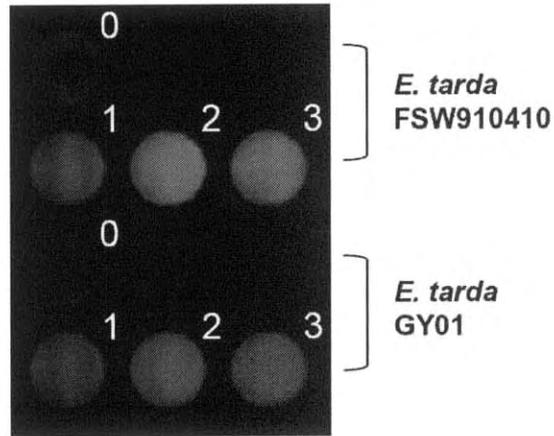


[도 R62]

항시 고발현 능력의 tac 및 lambda PR 프로모터와의 상대 평가

상기 대장균에서 확인된 에드워드균 유래 선발 프로모터들이 에드워드균에서도 고효성을 나타내는지 확인하였다. [도 R63]에서 보듯이 사용한 에드워드균주 2종 모두에서 음성대조군 pGFP(P) 포함 에드워드균과 확연히 구분되는 강한 GFP 발현이 확인되어 본 발명의 프로모터들은 대장균뿐만 아니라 원 출처인 에드워드균에서도 항시 고효발현 능력이 있음을 보여주고 있다. 상기 결과를 재확인하기 위해서 FSW910410 재조합 균주를 이용하여 대량 액체 진탕 배양을 실시한 후 발현을 확인하였으며 이때 pHCE IIB-GFP와의 발현 능력을 비교 평가하였다. 그 실시 예의 결과를 나타낸다. [도 R64]에서 보듯이 배양액 100 ml에 해당하는 균 회수 펠릿을 관찰한 결과 음성 대조군 외에 본 발명의 프로모터 함유 재조합 균주들 및 pHCE IIB-GFP에 의한 재조합 균주들은 모두 높은 GFP 발현을 나타내어 자외선 광조사 없이 자연광에서도 GFP의 발현을 확연히 관찰할 수 있었고 특히 본 발명의 프로모터를 포함하는 재조합 균주들에서 더욱 뚜렷한 차이가 관찰되었다. 자외선 조사 시 GFP의 발현은 더욱 선명하였으며 pHCE IIB-GFP 재조합균에 비해 높은 발현 강도를 나타내었다 [도 R64]. 따라서 본 실시 예를 통해 본 발명의 프로모터들은 대장균 및 에드워드균에서의 항시 고효율의 재조합 유전자 발현 능력을 잘 보여주고 있으며 이에 대장균에서의 재조합 단백질 분리뿐만 아니라 병원성 세균인 에드워드 균을 대상으로 한 백신 목적의 재조합 발현 조작 등이 효과적으로 이루어질 수 있음을 시사하고 있다.

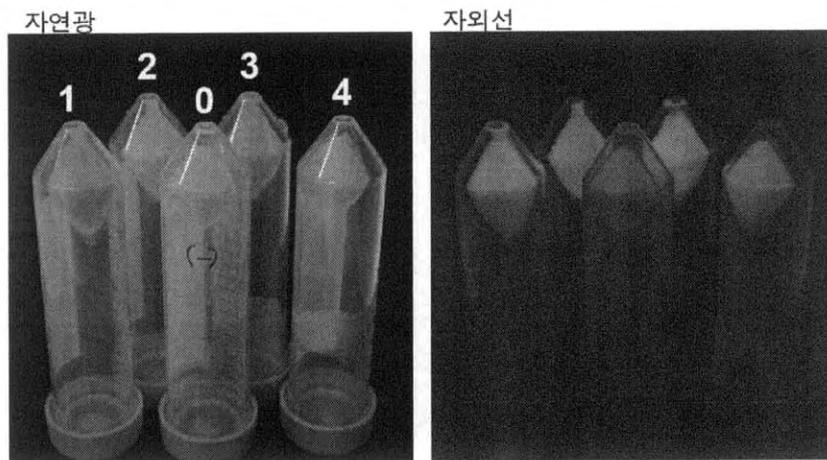
이상의 실시 예에서 보듯이 본 발명을 통해 개발된 신규 프로모터 DNA 서열들은 발현벡터 내에서 다운스트림의 재조합 유전자 등을 항시 고효발현 시킬 수 있는 능력 있으며 그 능력은 다양한 대장균 균주 및 에드워드균 균주에서 발휘될 수 있다. 특히 이들 재조합 균주들에서 외래 단백질을 발현시킴에 있어 종래의 유도체 화합물 또는 특정 온도 조작을 전혀 사용하지 않으며 숙주 세포의 단순 배양만으로 세포내 항시 고효율 유전자 발현을 얻을 수 있다. 따라서 본 발명을 이용할 경우 대장균 및 에드워드균에서 저렴하고 손쉽게 재조합 단백질을 대량 발현 시킬 수 있으며, 이를 통해 유용 재조합 단백질의 고효율 생산은 물론 다양한 양식 어류에 질병을 유발하는 병원성 세균인 에드워드균을 대상으로 한 백신 목적의 재조합 발현 조작 (즉, 또 다른 외래 항원의 재조합 에드워드균 내 추가 발현 등)에 매우 유용하다.



- 0: pGFP (p<sup>-</sup>)
- 1: pETPX-GFP
- 2: pETPY-GFP
- 3: pETPZ-GFP

[도 R63]

항시 고발현 프로모터의 *E. tarda*내 활성 평가



- 0: pGFP (p<sup>-</sup>)
- 1: pETPX-GFP
- 2: pETPY-GFP
- 3: pETPZ-GFP
- 4: pHCE IIB-GFP

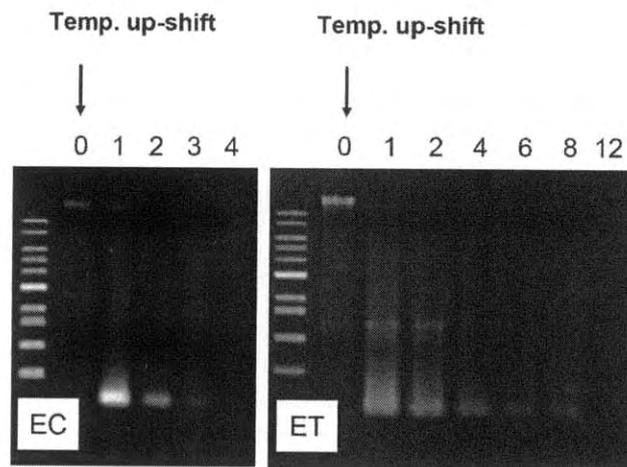
[도 R64]

*E. tarda*내 항시 고발현 프로모터의 대량 발현

## 나. Nuclease A를 이용한 플라스미드 및 염색체 DNA 제거 기술 개발

### 1) Nuclease A (SNA) 단독 발현을 통한 대장균 및 *E. tarda*의 불활성화

SNA 유전자의 발현에 의한 DNA의 제거와 숙주 균주에 미치는 영향을 조사하기 위해 먼저 상기 연구 방법에서 언급한 SNA 단독 발현 벡터를 대장균에 형질도입하였다. 형질도입후 lambda PR promoter의 온도 민감 조절 방식을 통해 SNA 유전자를 발현시켰다. 본 SNA 단독벡터는 SNA 유전자의 secretion을 방지 효과를 위해서 cro 유전자의 26개 aa를 추가로 N-terminal에 삽입된 형태이다. SNA의 활성화에 필수적인 MgCl<sub>2</sub> 및 CaCl<sub>2</sub>의 첨가와 고온 자극 (42°C)을 통해서 SNA 발현을 유도하였다. SNA 발현을 통해서 재조합 *E. tarda* 및 대장균 모두 불활화 되었고, 재조합 균주들이 갖고 있는 염색체 DNA는 물론 SNA를 발현하는 자체 plasmid DNA 역시 분해되는 것으로 나타났다 [도 R65].



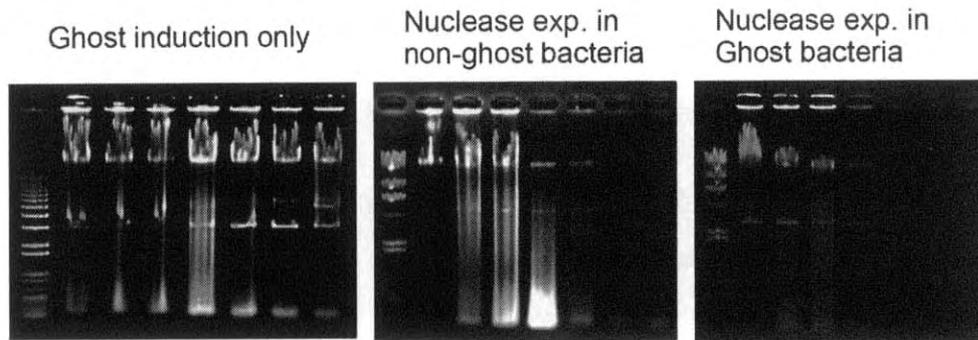
[도 R65]

대장균 (EC) 및 *E. tarda* (ET)에서의 SNA 유전자 발현 효과

### 2) Ghost 발현 및 SNA 발현의 동시 유도

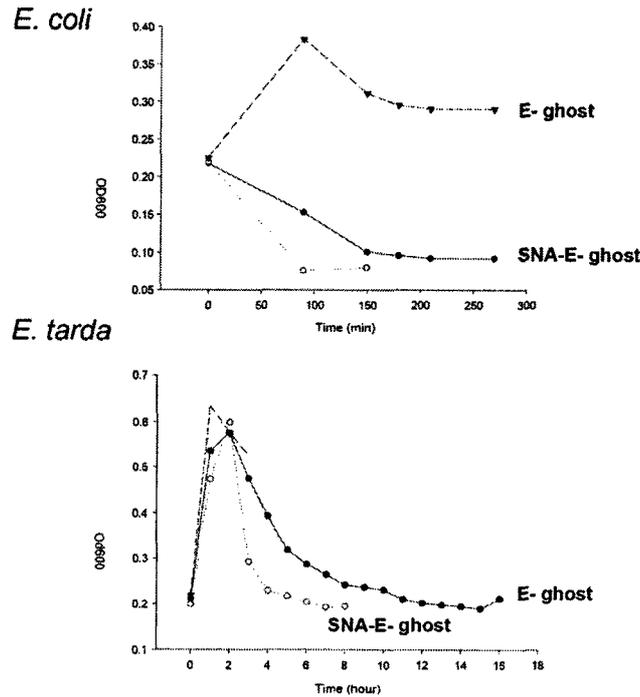
상기 결과를 바탕으로 제작한 SNA-E dual 벡터를 이용 (두 유전자 모두 lambda PR 조절)하여 대장균 및 *E. tarda*에 형질도입 시키고 배양 온도 프로그램에 의해서 (28°C > 42°C) E gene 및 SNA gene을 함께 발현 시켰다. MgCl<sub>2</sub> 및 CaCl<sub>2</sub>의 첨가 시간이 ghost bacterial의 생산 효율에 영향을 미치는 것으로 나타났으며 특히 ghost 유도 이전에 MgCl<sub>2</sub> 및 CaCl<sub>2</sub>의 첨가는 ghost 형성 효율

을 저하시키지만 온도 유도 후 첨가는 ghost 형성 효율에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 핵산의 전기영동 분석 결과, ghost 단독 유도군에서는 분해되지 않는 high molecular weight genomic DNA가 bacterial ghost 내에서 관찰되었다. 그러나 본 dual vector를 포함하는 균의 경우 intact genomic DNA 및 plasmid DNA 모두 서서히 분해 제거되는 것으로 나타났고, 대장균의 경우 3시간 이후에는 DNA 분자가 전기영동 상에서 관찰할 수 없었다. 상기  $Mg^{2+}$  또는  $Ca^{2+}$  이온을 E-SNA 유도 이전에 첨가하는 경우 약간의 간섭효과가 관찰되었다. 반면 *E. tarda*의 경우 DNA 제거의 분해 속도가 대장균에 비해서는 다소 늦은 편이었고 2-3시간 이후부터 high molecular weight gDNA는 관찰되지 않아 분해된 DNA가 관찰되었으며 이 역시 8시간 이후에는 거의 검출되지 않았다 [도 R66]. 두 박테리아 균 (대장균 및 *E. tarda*) 모두에서 ghost의 유도 효율은 99.99% 이상이었다 [도 R67]. 상기 dual promoter를 이용한 SNA-E gene의 동시 발현외에 bicistronic을 이용한 SNA-E gene 벡터 역시 대장균 및 *E. tarda*에서 매우 효과적으로 작동하는 것으로 나타났으며 그 양상은 dual promoter를 이용한 시스템과 크게 다르지 않았다.



[도 R66]

*E. tarda* (ET)에서의 SNA 및 E gene의 단독 및 동시 발현 효과 평가



[도 R67]

대장균 (EC) 및 *E. tarda* (ET) E-ghost 및 SNA-E ghost의 흡광도 측정

본 연구 결과 staphylococcal nuclease A (SNA)와 lysis E gene과의 동시 발현을 유발할 경우 *E. tarda* ghost (ETG) 제작에 매우 중요한 것으로 나타났으며 종래 ETG 제조시 필연적으로 야기되는 non-lysed bacteria의 출현 또는 잔존 DNA 분자의 위해성 문제를 매우 효과적으로 처리할 수 있는 잠재 능력을 보여주었다. ETG 뿐만 아니라 최근의 국외 연구개발에 의해 대장균 병원체 O157 균주의 백신 제조를 위한 목적으로 SNA와 E-gene의 동시 발현이 시도된 바있다 (Haidinger et al., 2003; Mayr et al., 2005). 그러나 이들 선행 연구에서는 서로 독립적인 두 종류의 플라스미드를 동시에 한 균체에 도입하여 두 종류의 플라스미드가 각기 작동하도록 하였으나 본 연구에서는 이들 두 유전자를 하나의 플라스미드 시스템에 삽입, dual expression system을 구축함으로써 보다 간편하고 손쉬운 E-SNA 동시 발현을 가능케 하였다. Staphylococcal nuclease 계열들은 주로 세포 밖으로 분비되는 효소들로 알려져 있으며 이중 SNA는 외부로 분비된 SNB의 mature 형태로 알려져 있다. 따라서 SNA를 세포질 내에서 발현토록 하기 위해서는 SNB의 secretion signal을 제거해야만 하고 본 연구 개발에서는 특히 secretion signal 제거 후에도 잠재

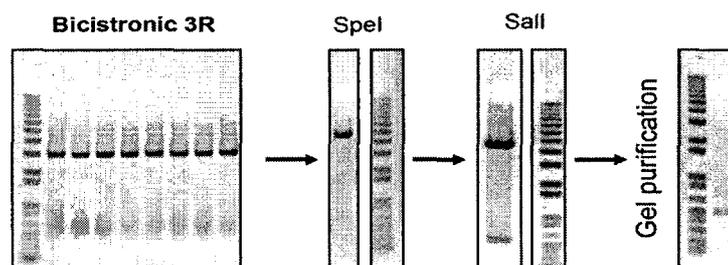
secretion 가능성을 보다 완벽히 배제하기 위해서 cro AA과의 fusion protein을 발현토록 벡터를 구축하였다. 따라서 본 연구개발에서 구축된 SNA-E dual system은 고가의 유도체를 따로 사용하지 않고도 ghost 유발과 함께 핵산의 제거를 가능케 하는 발현 시스템이며 *E. tarda* ghost의 기능성과 실용성을 훨씬 증대시킬 수 있으리라 기대된다.

#### 다. 다기능 재조합 백신 발현 벡터의 최적화 구성

재조합 발현벡터의 기능성을 개선하고 안정성을 확보하기 위한 최적 구성 조작을 수행한 결과는 다음과 같다. 본 최적화 구성은 고효율 항시발현 프로모터, 표면발현, ghost 발현과 SNA의 동시 발현을 통한 ghost 효율 증대 및 ghost 백신 내 DNA 제거를 목표로 하였으며 최종, triple expression을 동시에 발휘할 수 있는 벡터를 구축하고자 하였다. 분자 조작에 관한 결과는 다음과 같다.

##### 1) Bicistronic 2R 기반 SNA-E 벡터 구축

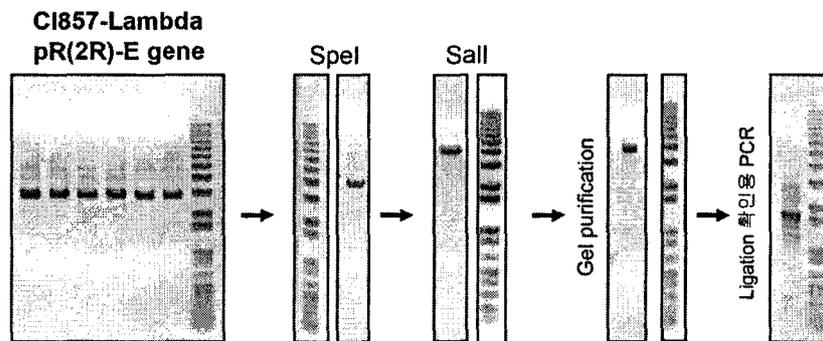
Bicistronic 2R 기반 SNA-E dual 벡터 구축을 위해 선행 실험을 통해 구축한 bicistronic 3R/T-easy vector의 restriction enzyme 처리를 통해 translation enhancer-Shine Dalgarno-S.nuc A를 분리하였다. Bicistronic 3R에서 translation enhancer (TE)-Shine Dalgarno-S.nuc A 만을 떼어내기 위하여 두 가지 제한 효소를 사용하였다. 첫 번째 제한 효소로 SpeI을 사용한 결과 약 4.7 kb에서 단일 band가 나타남으로써 linear plasmid를 제조하였고 두 번째 제한 효소, SalI을 처리하여 목적으로 하는 약 520 bp에서 DNA 단편을 확보하였다. 절단 단편은 또 하나의 band가 나타남을 전기영동을 통하여 확인할 수 있었다. 아래 [도 R68]는 목적으로 하는 절단 DNA 단편의 회수가 정확히 이루어졌음을 보여주는 전기영동 상이다.



[도 R68]

Bicistronic (3R) vector에서 Translation Enhancer (TE)  
-Shine Dalgarno-SNA 단편의 분리 및 정제

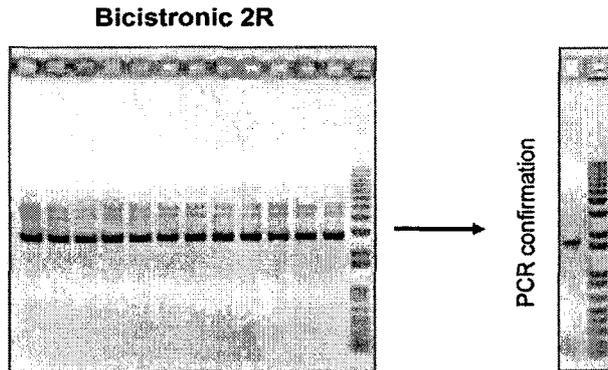
Bicistronic 2R 기반의 SNA-E 벡터의 backbone을 제작하기 위해서 CI857-Lambda pR(2R)-E gene vector로부터 제한 효소, Spe I과 Sall을 처리하여 목적 유전자의 band를 전기영동을 통하여 확인하였고 예상 크기인 약 4.1 kb의 크기와 정확히 일치하는 절단 단편을 확보하였음을 [도 R69]에서 잘 보여주고 있으며 아울러 이를 이용한 ligation 산물을 direct PCR 증폭한 결과 예상 band가 정확히 증폭되었다.



[도 R69]

CI857-Lambda pR(2R)-E plasmid backbone의 SpeI/Sall 절단 및 정제

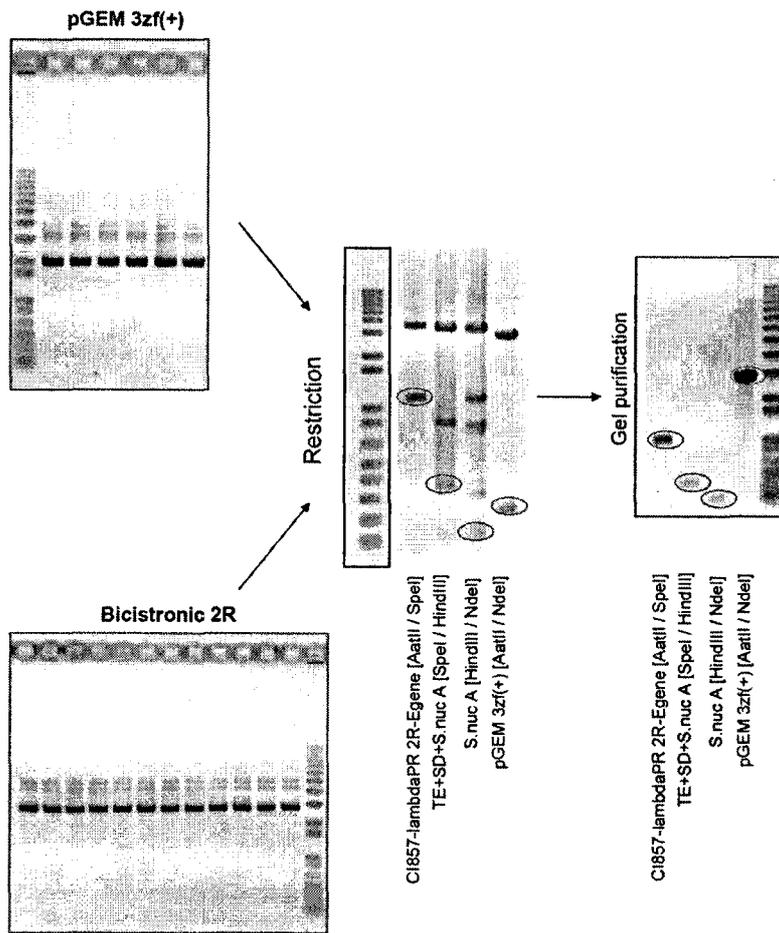
정제과정이 완료된 TE-SD-SNA 단편과 CI857-Lambda pR(2R)-E plasmid backbone과의 ligation을 통해서 Bicistronic 2R vector를 구축하였으며 이때 ligation이 제대로 이루어졌음을 PCR로 증폭하여 확인하였다. 대장균에 형질전환 도입 후 얻은 재조합 클론들로부터 플라스미드를 추출한 결과 모두 같은 예상 크기의 플라스미드가 검출되었으며 또한 클로닝 위치로의 삽입유전자 크기 확인 작업을 위해 PCR을 수행한 결과 역시 1.6 kb의 정확한 Bicistronic 2R이 클로닝 되었음을 보여주었다 [도 R70].



[도 R70]

Bicistronic 2R miniprep 전기영동 사진 및 insert DNA 확인용 PCR 분석 결과

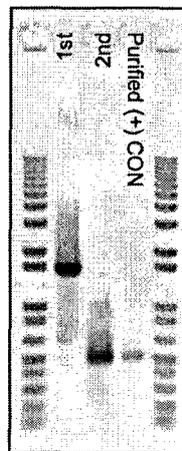
T 벡터내로 확보한 bicistronic 2R cassette를 차후 클로닝을 용이하게 하기 위해서 T-easy vector에서 pGEM 3Zf(+)로 이동시켰다. T-easy vector에서 pGEM 3Zf(+)로 Bicistronic 2R을 옮기기 위하여 제한 효소 처리를 수행하였으며 제한 효소 처리 결과 총 3개의 유전자 단편들이 생성되었다. 각 단편들은 CI857-lambdaPR2R-Egene (1.16 kb), TE+SD+S.nuc A (362 bp), SNA (155 bp)와 정확히 일치하였고 이들 단편들은 gel purification과정을 통하여 정제하였다. pGEM 3Zf(+) 역시 동일 제한 효소들을 이용하여 2949 bp의 product를 확보한 다음 gel purification으로 정제하였다. 사용한 제한효소의 종류와 예상 크기의 전기영동 상 그리고 gel purification 분리 결과는 [도 R71]에 나타내었다.



[도 R71]

Bicstronic 2R, pGEM 3Zf(+)<sup>+</sup>의 제한효소 단편의 확보 및 클로닝 결과

pGEM 3Zf(+) vector내로 multiplex ligation을 통해서 삽입된 bicistronic cassette들의 정확한 클론을 확보하기 위해 형질도입된 재조합 박테리아 총 72종의 클론을 대상으로 플라스미드를 분리하였고 정확한 방향으로의 삽입이 이루어 졌으리라 판단되는 클론들을 PCR 분석을 통해 평가한 결과 #69 clone이 정확한 ligation 반응에 의한 clone임을 확인 할 수 있었다. PCR 전기영동 결과 1st lane은 Bicistronic 2R을 모두 포함하는 크기인 1.6 kb임을 확인할 수 있었고 2nd lane은 (+) con 과 같은 크기인 TE+SD+SNA의 크기인 520 bp임을 확인 할 수 있었다 [도 R72].



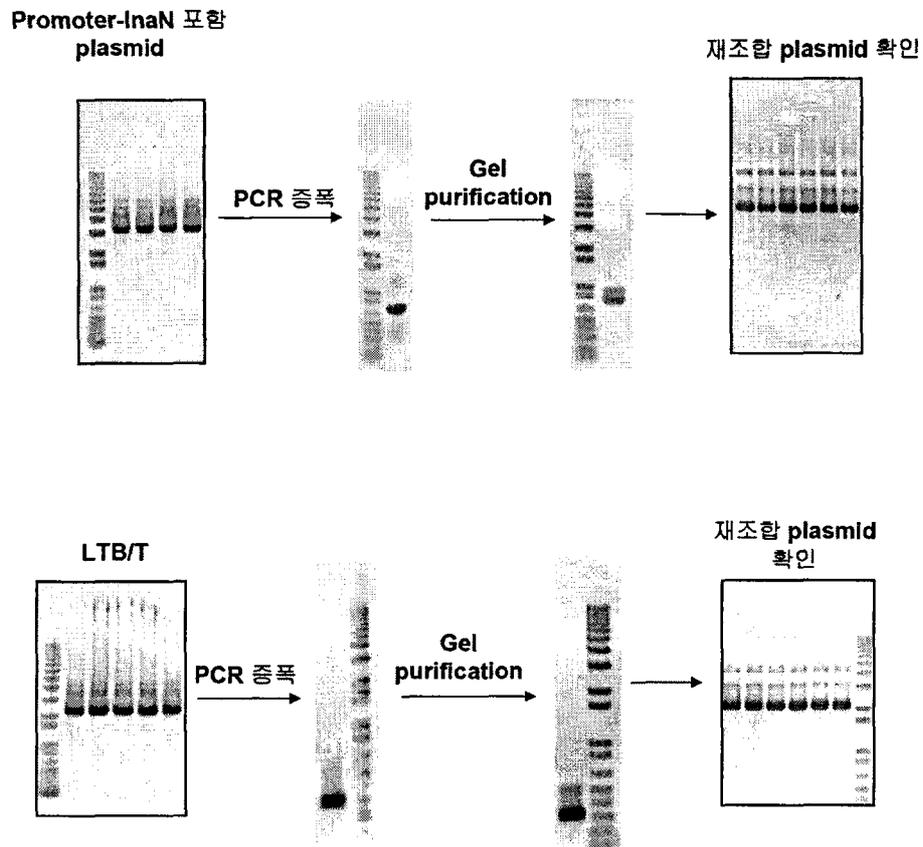
[도 R72]

Bicistronic 2R/pGEM 3Zf(+) #69 clone의 ligation 확인용 PCR 분석 결과

## 2) 최적 발현 벡터 제조를 위한 유전자 소재의 클로닝 및 조작

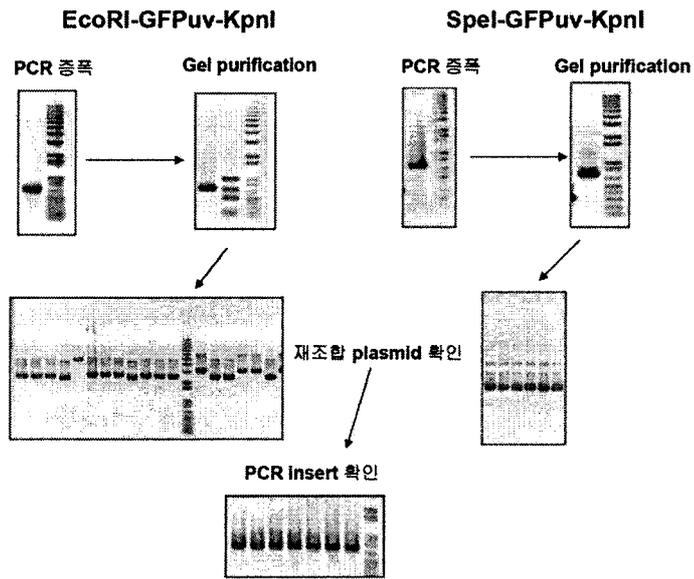
Triple expression vector를 최종 구축하기 위해 항시 고효율 표면발현, LTB fusion signal, VP2 antigen 유전자 및 reporter GFP 유전자들을 PCR 또는 제한효소 처리를 통한 말단 조작을 실시하고 각 종류에 대한 유전자 소재를 확보하였다. 첫째, 항시고발현 프로모터-표면발현계가 앞서 클로닝되어 있는 T-vector로부터 PCR 분리를 실시하였다. PCR 분리를 통해 예상 크기의 0.8 kb 증폭 band가 정확히 전기 영동상 관찰되었고, 둘째, 역시 말단이 조작된 프라이머들을 이용하여 PCR 분리를 통해 예상 크기의 LTB (320 bp) 및 GFPuv (729 bp) 단편들을 회수하였다. 셋째, 아울러 최종 외래 항원으로서 ghost 표면에 탑

재시퀀싱 VP2 역시 동일한 방법으로 분리하여 예상 크기인 858 bp를 확보하였고  
 상기 모든 PCR 산물들은 gel purification 방법을 통해 정제하였다. [도 R73]에서  
 [도 R75]까지는 이들의 PCR 분리, 정제 및 플라스미드 확인 과정이 모두 정확  
 하게 이루어졌음을 보여주는 전기영동상이다.



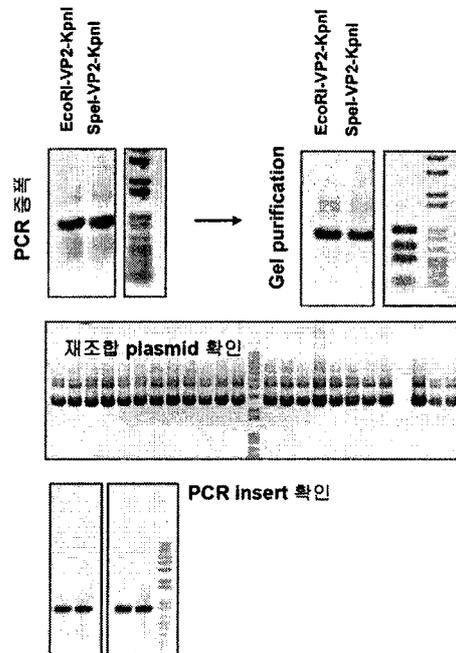
[도 R73]

벡터 최적화를 위한 프로모터, 표면발현 signal 및  
 LTB 유전자의 말단 조작 및 클로닝



[도 R74]

벡터 최적화를 위한 GFP reporter 유전자의 말단 조작 및 클로닝

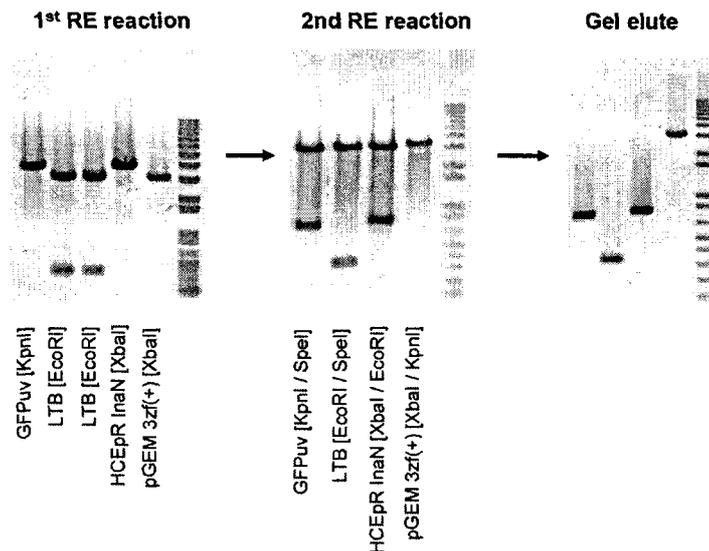


[도 R75]

벡터 최적화를 위한 VP2 항원 유전자의 말단 조작 및 클로닝

3) 고발현 프로모터, 표면발현 signal (InaN), LTB signal, GFPuv를 이용한 ligation 및 TA cloning

상기 확보한 말단 조작 유전자 소재들을 이용하여 고효율 표면발현 계 및 LTB signal을 이용한 벡터 최적화를 수행하였으며 1차로 조작된 벡터의 기능을 확인하기 위해서 GFP reporter를 이용하여 실시하였다. 각 유전자의 제한효소 처리 결과 GFPuv는 약 720 bp의 band를 관찰할 수 있었고, LTB는 약 320 bp, HCE promoter-InaN은 약 770 bp, 그리고 pGEM 3zf(+)는 약 3 kb 정도에서 band를 확인할 수 있었으며 모두 예상 크기와 일치하였다. 크기를 확인한 sample은 gel purification을 수행한 후 융합반응에 이용하였다 [도 R76].

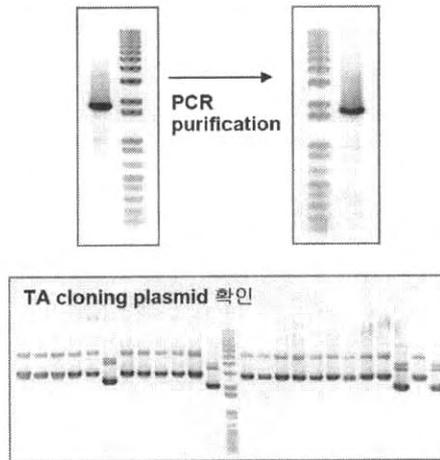


[도 R76]

항시 고효율 항원 표면발현을 위한 벡터 구축 용 제한효소 처리 결과

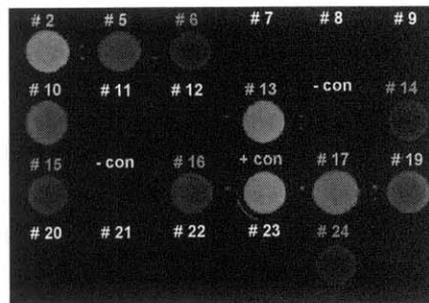
이들 간의 dual ligation등을 수행한 후 ligation sample을 사용하여 PCR 증폭을 실시하였다. PCR product 크기는 marker의 1.6 및 2.0 kb band 사이로 관찰됨으로써 적절한 ligation 반응이 이루어졌음을 확인할 수 있었으며 본 PCR 산물은 정제과정을 통해 TA 클로닝에 이용하였다. 따라서 이들 ligation 반응을 통해 고발현 프로모터 - 표면발현 - LTB fusion signal 및 GFP reporter가 앞서 처리한 말단 조작에 의해 순차적으로 클로닝 되었음을 시사한다. TA 클로닝된 플라스미드들을 분리하여 정확한 크기의 insert DNA가 포함되어 있음을 확인하

였고 [도 R77] 선발된 플라스미드 클론들을 이용하여 GFP 발현 여부를 함께 평가하였다. 클로닝 과정 중 돌연변이 또는 증폭 error에 의한 발현 능력을 소실한 클론들을 제외하고 GFP의 항시 고발현 양상을 보이는 클론들을 선발하여 최종 양방향 염기서열 분석을 실시함으로써 발현 cassette의 정확한 제조를 확인하였다 [도 R78].



[도 R77]

고발현 프로모터 - 표면발현 - LTB fusion signal 및 GFP reporter의 순차적 multiplex ligation 반응물로부터 fusion gene의 PCR 분리

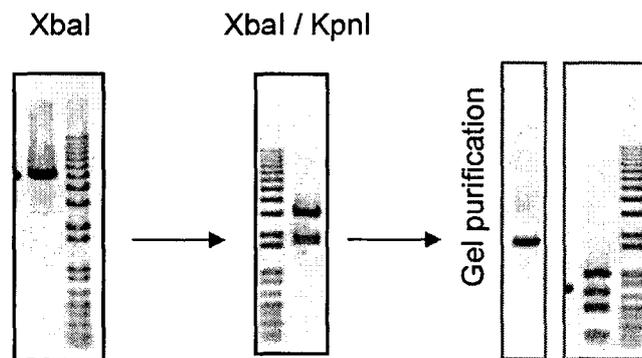


Rank #1: # 2, 13, 17, +CON  
 Rank #2: # 5, 10, 19  
 Rank #3: # 6, 14, 15, 16, 24  
 Rank #4: # -CON, 7, 8, 9, 11, 12, 20, 21, 22, 23

[도 R78]

Multiplex ligation에 의해 클로닝된 HCPR-InaN-LTB-GFPuv cassette의 GFP 발현 유무 분석

상기 확보된 선발에서의 HCE promoter-InaN-LTB-GFP 확보하기 위해서 cassette를 분리해낼 수 있는 XbaI 및 KpnI을 처리하여 단편을 회수하였다. 제한효소 처리 시 예상 크기인 1.6 kb에 band가 관찰 되었으며 해당 단편을 gel purification하여 확보하였다 [도 R79]. 회수된 단편을 이용하여 pGEM 3Zf(+)와의 ligation을 통해서 차후 triple expression vector 제작에 이용하도록 하였다. pGEM backbone으로 옮겨진 cassette의 GFP 발현 작동 여부를 재확인하여 가장 우수한 제조합 클론을 선발하였다.



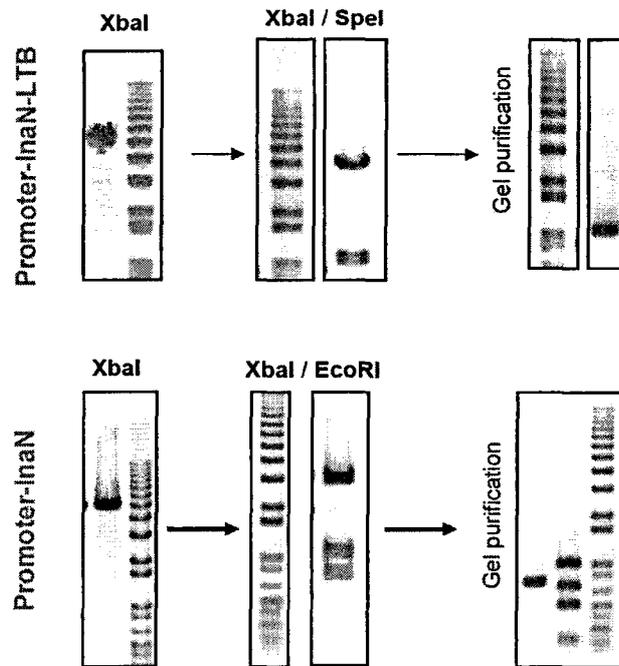
[도 R79]

HCE promoter-InaN-LTB-GFP/T #13의 제한효소 처리 및 gel purification

#### 4) Triple expression 벡터 구축을 위한 항원 발현 계의 최적화

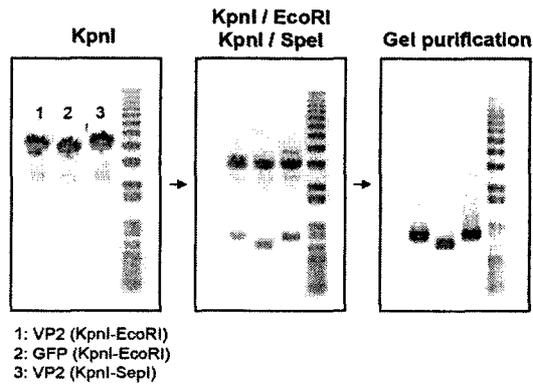
Triple expression 벡터를 제조하기 위한 전단계로서 다양한 fusion signal을 갖을 수 있는 cassette들을 구축하였다. 상기 선발 클론으로부터 promoter-InaN-LTB 및 promoter-InaN signal을 회수하고 아울러 triple expression vector의 항원 또는 reporter로 이용할 VP2 및 GFP 유전자 단편들을 회수하였다. 프로모터 영역 및 fusion signal 분리의 경우 제한 효소 처리를 통해 예상 크기인 1092 bp (promoter-InaN-LTB)와 777 bp (promoter-InaN)의 정확한 분리를 확인하였고 확인 시료를 이용하여 gel purification을 통해 클로닝에 이용하였다 [도 R80]. 한편 항원 (VP2) 및 왜래 단백질 reporter (GFP) 단편

의 분리는 [도 R81]에 나타내었다. 역시 EcoRI-VP2-KpnI (858 bp), EcoRI-GFP-KpnI (728 bp), SpeI-VP2-KpnI (858 bp)의 예상 크기와 제한 효소 처리 후 전기영동에서 확인된 band의 크기가 서로 일치함을 확인하여 gel purification을 수행하였다. 상기 확보된 클론들 간의 ligation 조합을 통해서 pGEM 3Zf(+) backbone에 삽입시키고 형질도입 후 재조합 균주들을 대상으로 플라스미드 분리를 실시하였다 [도 R82]. 플라스미드 전기영동 상을 토대로 정확한 재조합이 이루어졌음을 알 수 있었으며 선발된 클론들을 대상으로 제한 효소 처리를 통해 유전자 재조합의 정확도 및 클로닝 site들의 보존 여부를 확인하였다 [도 R83]. 최종 선발된 클론들을 대상으로 염기서열 분석을 통해서 reference sequence와의 일치 여부를 확인하였다.



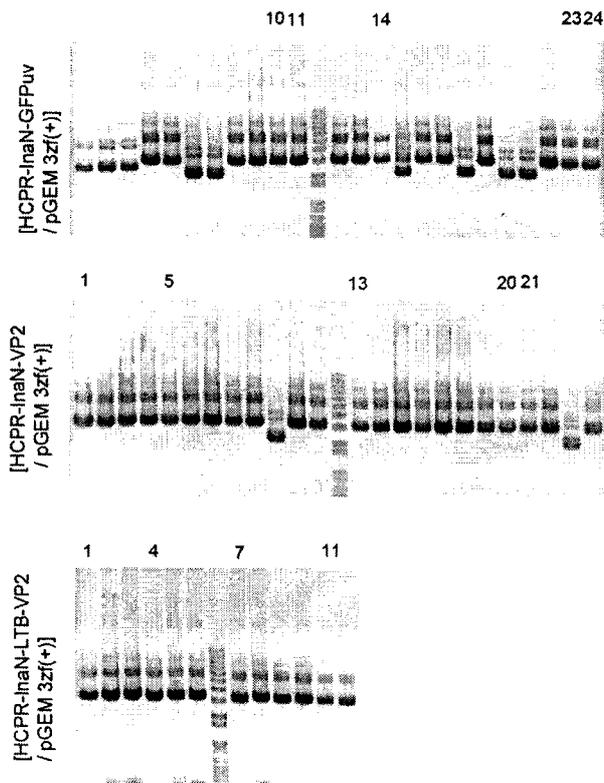
[도 R80]

벡터 구성 최적화를 위한 프로모터 및 fusion signal의 제한효소 분리 및 단편 회수



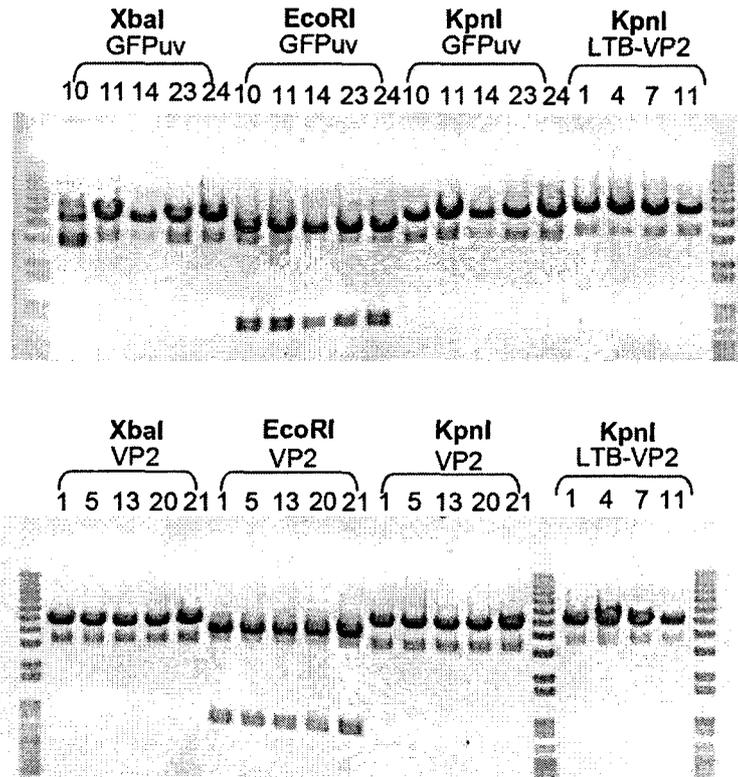
[도 R81]

벡터 구성 최적화를 위한 VP2 및 GFP 유전자의 제한효소 분리 및 단편 회수



[도 R82]

재조합된 항시고발현 항원 표면발현 cassette를  
함유하는 플라스미드 벡터의 전기영동 상



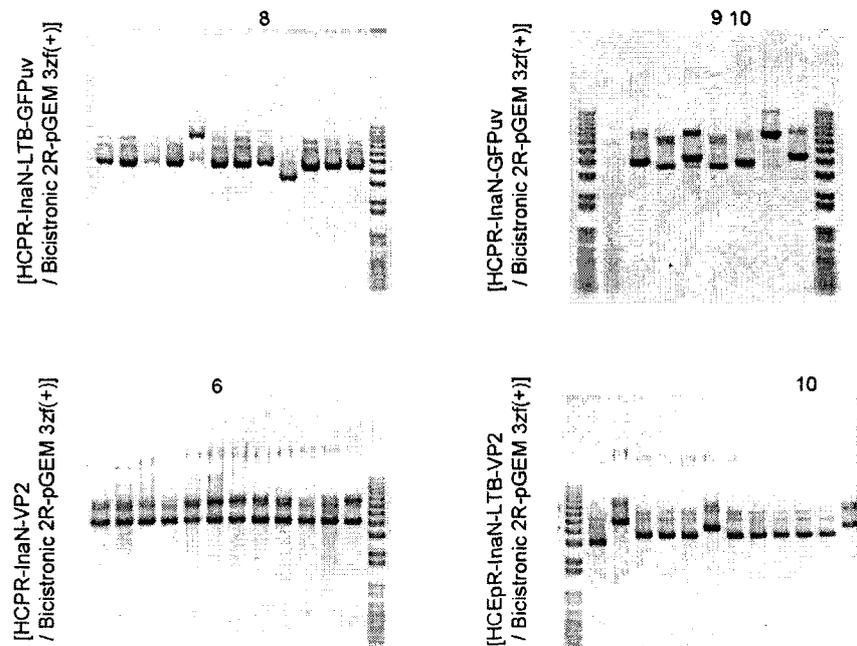
[도 R83]

선발된 클론들의 제한효소 처리를 통한 재조합 검정

### 5) Triple expression 벡터의 구축

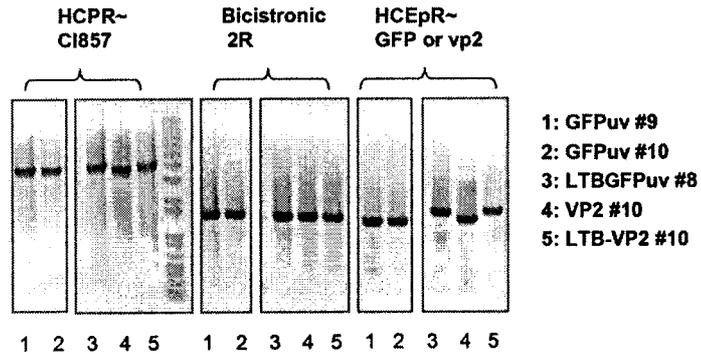
앞서 완성된 다양한 항원 표면 발현계를 이용하여 상기 SNA-E bicistronic dual 벡터에 항원 표면 발현 시스템을 추가함으로써 triple expression 벡터를 구축하였다. 각 항원 발현 소재 (GFP 또는 VP2를 포함하는 fusion signal)를 항시 고발현 표면 발현계와 함께 제한효소로 분리하고 SNA-E dual vector와의 single 또는 dual ligation을 수행하였다. [도 R84]는 ligation에 의한 유전자 재설계 후 형질도입된 재조합 균주로부터 완성된 벡터의 플라스미드 분리 전기영동상을 보여준다. [도 R84]에서 표시된 예상 클론들을 대상으로 구축된 triple expression system의 정확한 재조합여부를 PCR로 분석하였다. PCR 분석 결과는 [도 R85]에 나타내었다. PCR 수행 결과 모두 정확한 예상 크기 생성물이 증폭되었음을 확인하였다. HCEpR~CI857영역의 PCR 증폭 크기는

약 4 kb에 해당되며, LTB signal을 보유하는 항원 발현계는 이보다 300 bp정도 큰 산물인 4.3 kb로 정확히 증폭되었다. 그리고 Bicistronic 2R 영역의 PCR 증폭 크기는 모두 예상 크기인 1.6 kb로 증폭 되었고 마지막으로 HCEpR~GFPuv 또는 VP까지 PCR 증폭 길이는 LTB가 없는 경우 1.5 kb, LTB 를 보유할 경우 1.8 kb로 정확하게 나타났다. 따라서 4종의 발현벡터는 각각 pGEFvac-1, pVP2Vac-1, pGFPvac-2 및 pVP2Vac-2로 명명하였고 이들의 partial 제한 효소 지도는 [도 R86]에 나타내었다. [도 R86]에서 보듯이 본 4종의 벡터들은 항시고 발현 프로모터 계를 포함한 항원 표면 발현계, ghost 유도를 위한 E-lysis 발현계 그리고 ghost 백신 내 DNA를 제거하기 위한 SNA 발현계를 보유한 다기능 발현 벡터로서 이중 ghost 유도 및 핵산 제거를 위한 발현계는 bicistronic 구조로 구성되어 있음을 특징으로 한다. 아울러 본 발현 벡터 시스템은 본 연구개발에서 사용한 reporter construct 또는 MABV 항원 뿐만 아니라 항원 발현계에 다양한 외래 단백질을 탑재시킬 수 있는 cassette 시스템으로서 대장균 및 E. tarda를 위시한 그람 음성균의 다기능 ghost 백신 제조에 활용될 수 있다. 최종 구축된 본 triple 발현 벡터 시스템의 각 영역별 기능과 구성 요소를 [도 R87]에 나타내었다.



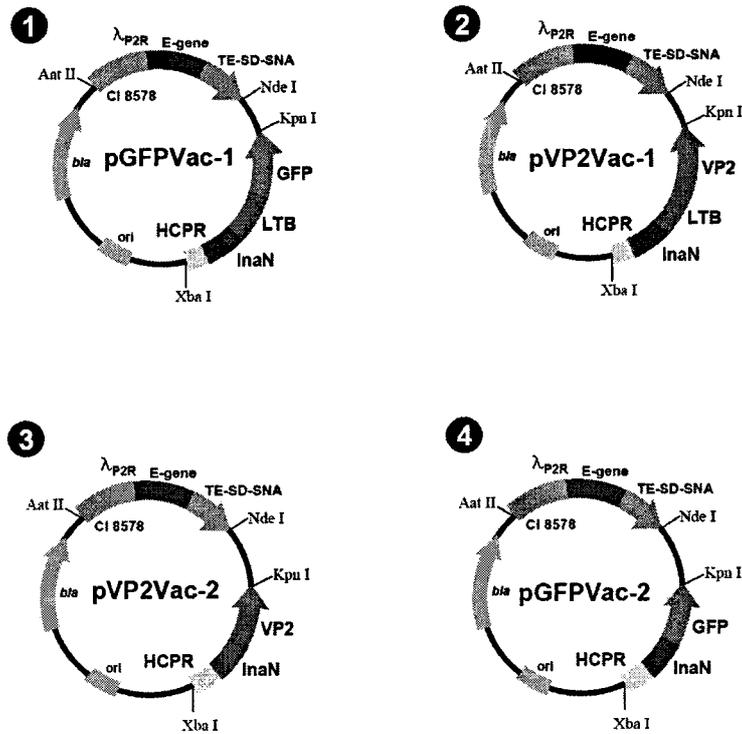
[도 R84]

Triple expression 벡터 재조합 후 형질전환 균주에서  
분리한 플라스미드 전기영동 상



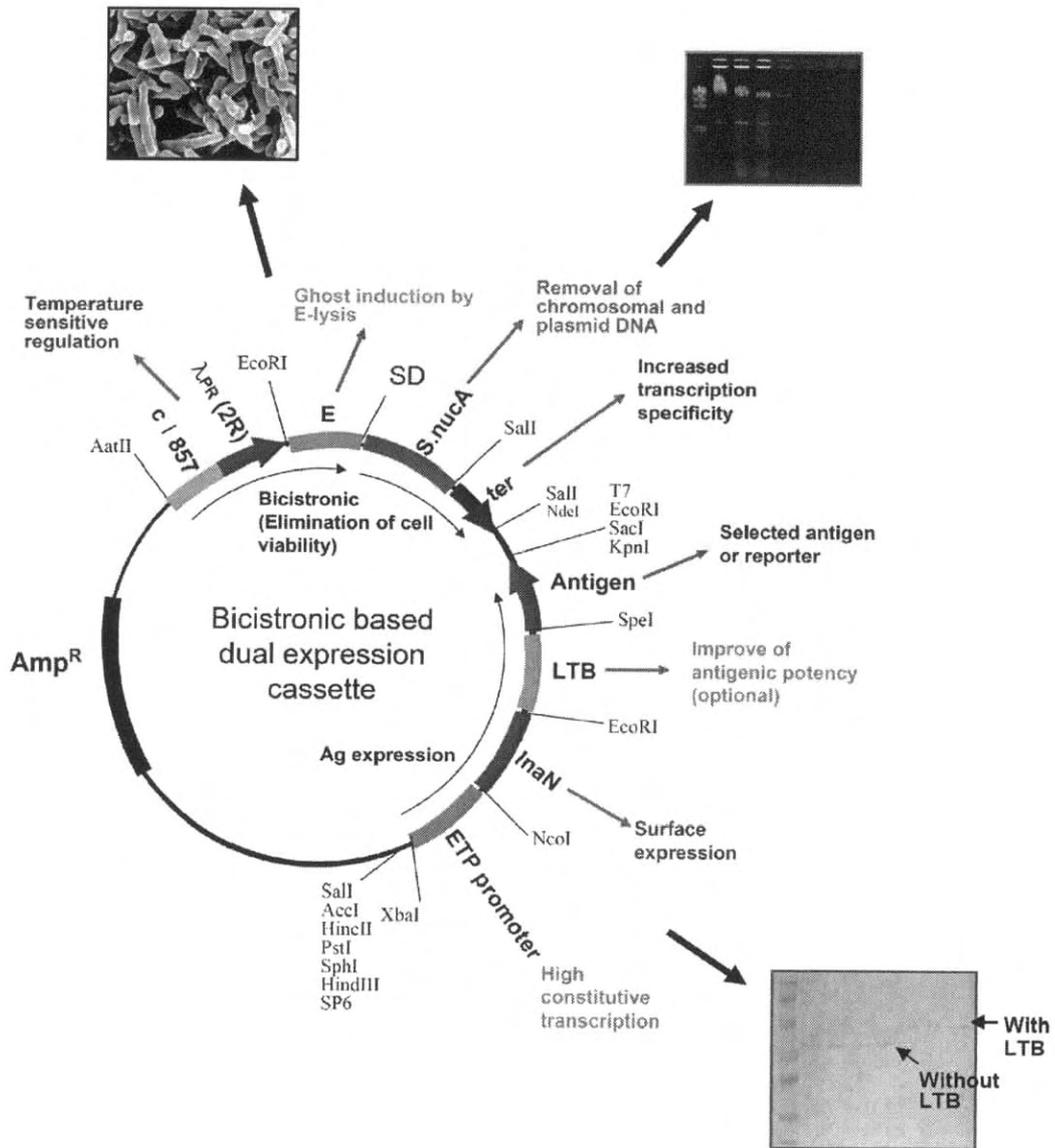
[도 R85]

Triple expression 벡터의 구성 및 재조합 정확도를 확인하기 위한 PCR 검정



[도 R86]

구축된 VP2 또는 GFP 표면발현 triple expression 발현 벡터의 부분 제한효소 지도



[도 R87]

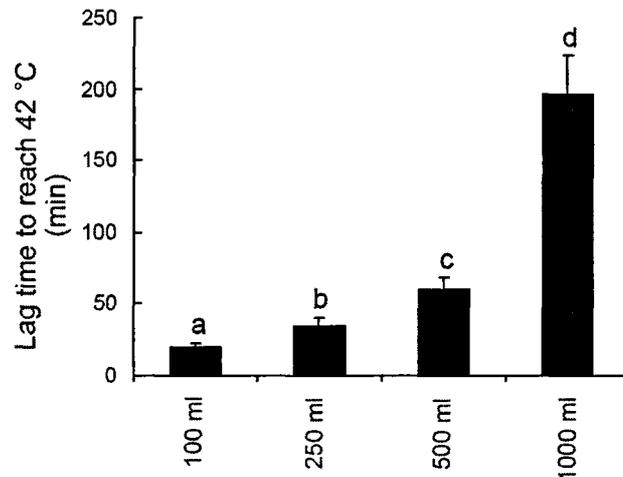
본 연구개발 최적 재조합 백신 발현 벡터의 구성 요소 및 작동 영역

## 제8항 재조합 백신의 대량 발현, 방어 능 및 현장 적용성 평가

### 가. 재조합 백신의 대량 발현 최적화

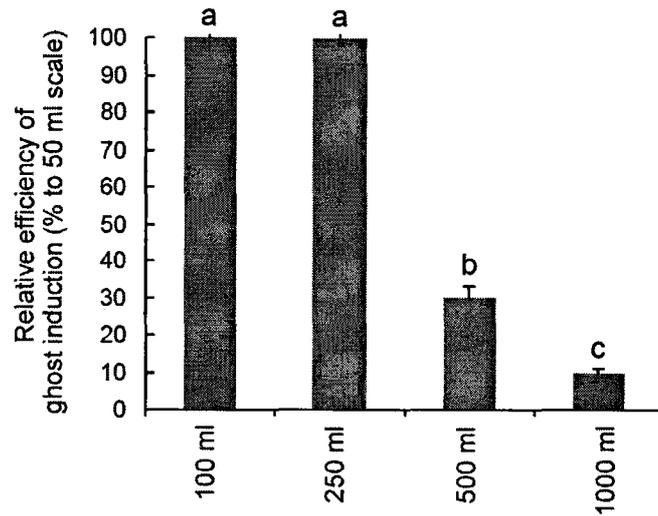
#### 1) 배양의 scale up 및 최적 온도 조작 프로그램

백신의 대량 제조를 위한 scale up 실험에서 ghost 유도 조작을 위한 온도 프로그램을 최적화 하였다. 28℃로 사전 배양을 100 ml, 250 ml, 500 ml 및 1000 ml로 실시한 후 OD 600 nm = 0.4에서 42℃로의 온도 자극을 실시하였으며 이때 E-lysis 발현을 위한 lambda PR 프로모터의 작동이 개시되는 시점을 조사하였다. [도 R88]에서 보듯이 배양 용량이 증가될 경우 100 ml에서는 20분 만에 목적 온도인 42℃에 도달하였으나 용량이 증가되어 250 ml의 경우 평균 35분째, 그리고 500 ml에서는 60분이 소요되었다. 특히 1 L로 배양 용량을 증가시켰을 때는 3시간 이상의 lag time이 관찰되었다. 때문에 단순 42℃ 온도 설정만으로는 신속한 배양 온도의 전환이 불가능하였으며 따라서 lambda PR 프로모터의 작동이 불완전하고 목적 온도에 도달하여서도 ghost 유도가 원활히 수행되지 않는 것으로 나타났다. 즉 250 ml 용량까지는 소규모 10-50 ml에서의 실험적 유도와 동일한 ghost 유도가 가능하였으나 증가된 용량에서는 그렇지 못하였고, 특히 1 L의 용량에서는 ghost 유도가 거의 이루어지지 않아 생존력 제거 효율 (상대 CFU 비교)을 비교 시 10% 정도만이 lambda PR 프로모터 작동에 의한 ghost 유도가 가능한 것으로 나타났다 [도 R89].



[도 R88]

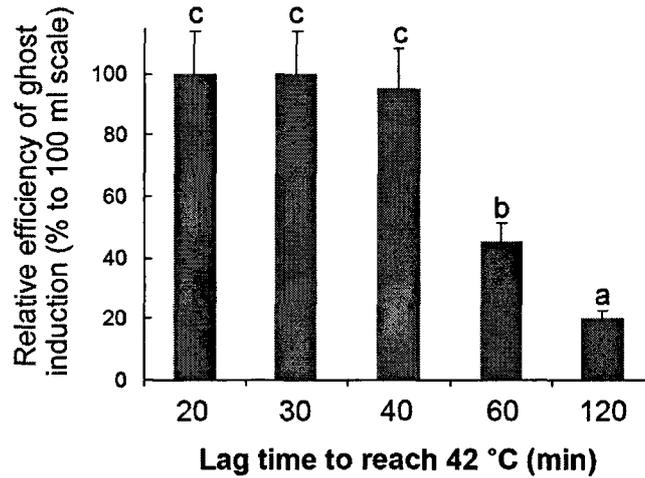
재조합 발현 백신의 균체 배양 용량에 따른 목적온도 (42℃)까지 도달 시간



[도 R89]

제조합 발현 백신의 균체 배양 용량에 ghost 유도 효율

이에 고용량 발현 시 단순 42℃ 온도 조작보다는 강제 열 순환 방식 등을 이용한 온도 전환이 효과적인 ghost 유도에 필수적인 것으로 나타났고, 따라서 1 L 배양 용량을 기준으로 목적온도인 42℃까지의 도달 시간을 강제적 heating 을 통해서 20분부터 120분까지로 조절하였으며 이때의 ghost 유도 효율을 평가하였다. 그 결과 1 L 기준 시 lag time이 40분 이내에서만 ghost 유도가 효과적으로 이루어짐을 알 수 있었으며 통계적으로 20분에서 40분까지는 유의적인 차이가 없었고 ( $P > 0.05$ ), 60분에서는 50% 미만의 효율이, 그리고 120분에서는 20% 이하의 효율이 관찰되어 lag time 단축의 중요성을 잘 나타내었다 [도 R90]. 이를 바탕으로 온도 자동 조절 발효조를 이용한 3 L 및 5 L 대량 배양에서는 lag time 30분을 설정하여 실시하였다. 강제 열 순환 방식을 통해 30분 이내에 목적 온도에 도달 시킬 경우 3반복구 모두에서 소규모의 실험 유도에서와 동일한 ghost 유도 효율을 얻을 수 있었다.



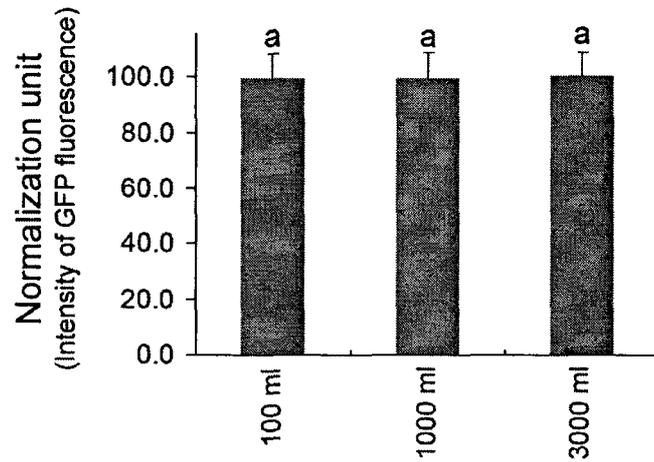
[도 R90]

재조합 발현 백신 1 L 배양 용량에서 lag time의 ghost 유도 효율에 미치는 영향

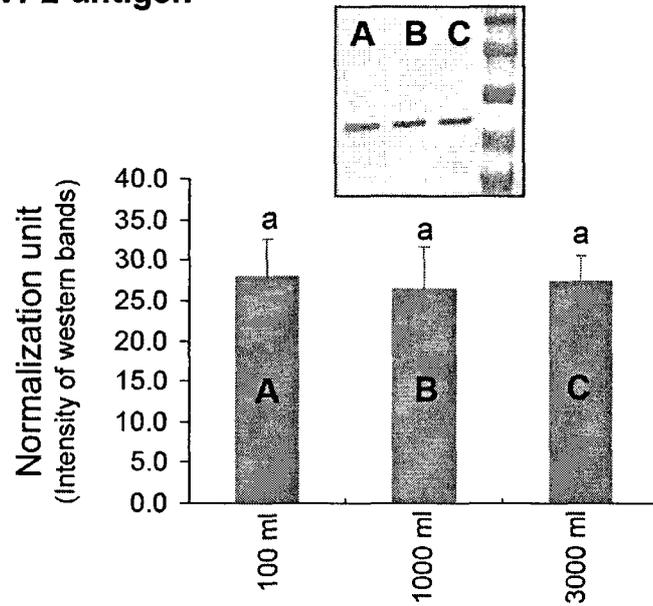
## 2) 대량 배양에서의 항원 발현 재평가

상기 최적화된 온도 조작 프로그램을 바탕으로 1~3 L의 대량 배양에서 재조합 E. tarda 표면에 항원 단백질의 발현이 소규모 실험 배양에서와 마찬가지로 이루어지는지를 확인하였다. 배양 용량을 100 ml, 1 L 및 3 L로 설정하여 ghost 발현 및 백신 제조과정 (post wash 등)을 수행하고 동일 수의 ghost 박테리아를 포함하는 50 ml 단위 배양액을 취하여 원심분리를 실시하였다. 원심분리 후 reporter 항원으로 이용한 GFP 항원의 경우 VersaDoc 4000 image 분석기를 이용하여 상대 형광 강도를 측정함으로써 대량 배양 시 항원의 표면 발현이 원활히 이루어지는지를 확인하였다. 또한 실제 바이러스 항원인 MABV의 VP2 항원의 경우 토끼에서 제작한 VP2 항체를 이용하여 western blot 분석을 실시하였다. Western blot에서 band를 scan한 후 역시 Quantity-one (Bio-Rad) 프로그램으로 상대 정량을 실시하였다. [도 R91]에서 나타나듯이 본 최적화된 프로그램을 이용할 경우 대량 발현 시에도 항원의 효과적인 표현이 가능한 것으로 나타났다.

### GFP-reporter



### VP2-antigen

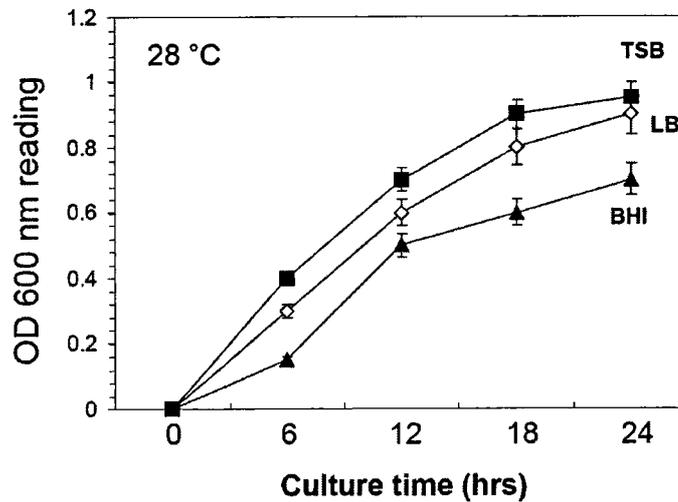


[도 R91]

대량 발현된 재조합 발현 백신에서의 항원 단백질 표면 발현 확인  
(GFP reporter 및 VP2-antigen)

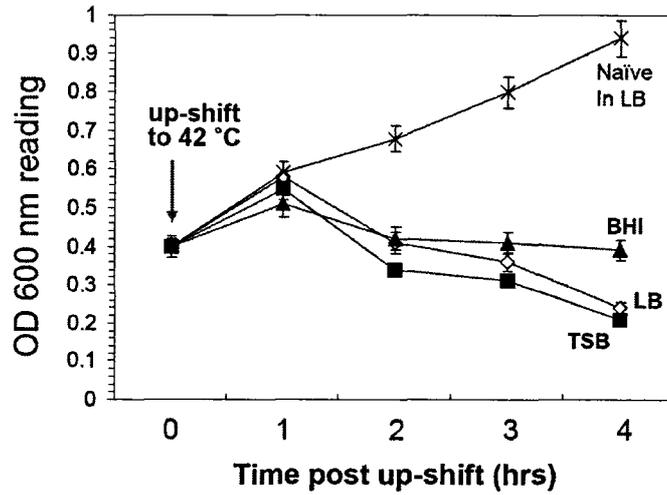
## 2) 기타 세부 발현 조건의 최적화

*E. tarda* 재조합 백신의 대량 생산 시 배지의 경제성을 개선하기 위해서 종래 흔히 사용되는 TSB 배지를 보다 값싼 LB 배지로 대체 가능한지를 배양 1 L 용량을 이용하여 확인하였다. TSB, LB 및 BHI 배지를 대상으로 단일 항생제 농도 (100 ug/ml)를 첨가하여 재조합 백신의 ghost 유도 가능 시점인 0.8 (OD 600 nm)까지의 성장 실험을 실시하였다. 그 결과 BHI 배지에서는 약간의 지연 성장이 관찰되었으나 TSB 및 LB 배지에서는 차이가 없는 것으로 나타났고 [도 R92], 또한 ghost 유도 실험에서 navie 균주의 경우 지속적인 OD 증가가 관찰되는 반면, 재조합 균주의 경우 3종류 배지 모두에서 ghost 발현과 SNA 발현이 가능한 것으로 나타나 산업적 규모의 대량 배양 시 배지의 가격 절감을 위한 평가의 필요성을 잘 보여주었다 [도 R93].



[도 R92]

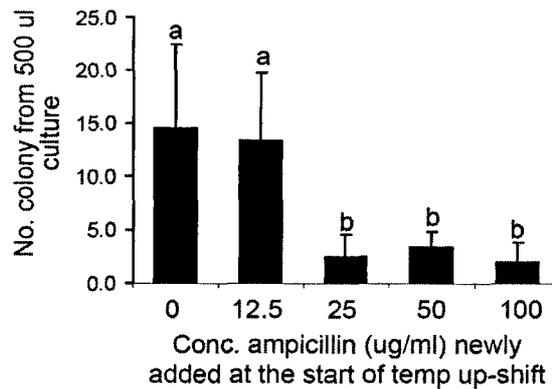
서로 다른 배지 조성의 재조합 *E. tarda* 성장에 미치는 영향



[도 R93]

서로 다른 배지 조성에서의 재조합 *E. tarda* ghost 유도

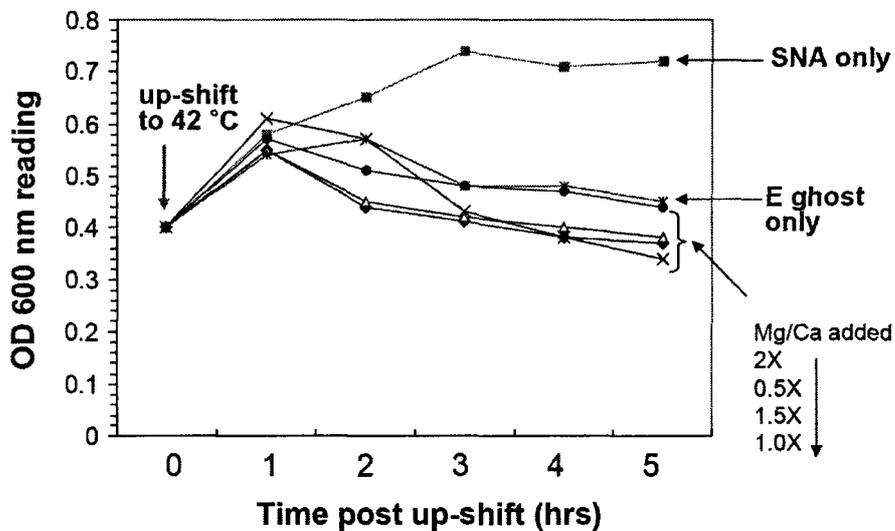
아울러 ghost의 장기간 유도 시 항생제 역가 감소로 인한 비재조합 균체의 생성 방지를 위해 ghost 유도 시점에서 다양한 농도의 항생제 (ampicillin)을 첨가하고 이때 생성되는 생균 수를 측정하였다. Ghost 발현과 SNA 발현을 모두 수행할 경우 분석한 모든 실험구에서 99.99999% 이상의 제거효율이 나타났으며 특히 post washing 및 동결건조 후에는 생존 개체가 거의 관찰되지 않았다. 하지만 동결 건조 직전 시점에서는 비록 그 수가 0.00001% 미만의 생균이라 할지라도 실험구간에 차이를 나타내어 25 ug/ml 이상의 추가 항생제를 처리할 때 보다 유효하게 생존을 제거가 가능할 것으로 나타났다 [도 R94].



[도 R94]

재조합 *E. tarda* ghost 유도 시 추가 항생제 첨가 효과

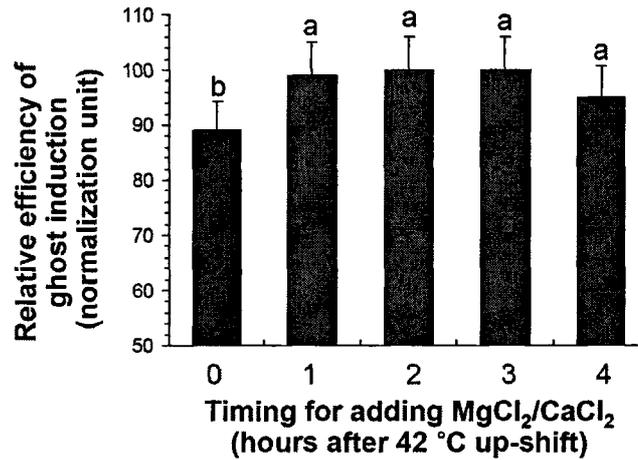
대량 배양 시 SNA 작동을 위한 MgCl<sub>2</sub> 및 CaCl<sub>2</sub>의 첨가 농도와 그 시점을 최적화하였다. 첫째, 1 mM MgCl<sub>2</sub> 및 10 mM CaCl<sub>2</sub>를 1X 농도로 설정한 후 1 또는 3 L의 대량 배양에서 ghost 유도 처리 (온도 자극 최초 시점) 시점에서 0.5X, 1.0X, 1.5X 및 2.0X의 농도로 MgCl<sub>2</sub> 와 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하여 SNA를 활성화시켰고 이때 대조구로서 ghost 유도 없이 SNA 단독 발현, 그리고 SNA 발현 없이 ghost 단독 발현구를 설정하여 비교하였다. 그 결과 SNA 단독 발현 대조구 (ghost expression cassette를 포함하지 않는 재조합 균)에서는 42°C로의 온도 증가 시 3시간까지는 증가 경향을 나타내었고 그 이후에는 OD의 추가 증가 없이 일정한 수준이 관찰되었다. Ghost 단독 발현 (MgCl<sub>2</sub> 와 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하지 않는 실험구)에서는 1시간까지 OD의 증가가 이루어지고 측정 2시간째부터 OD 감소가 관찰되기 시작하였고 조금씩 OD의 감소가 관찰되었다. 다양한 농도의 MgCl<sub>2</sub> 와 CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 실험구들 간에는 유사한 경향이 일반적으로 관찰되었으나 대부분 ghost 단독 발현보다는 OD 감소가 보다 뚜렷하였다. 그러나 최고 농도인 2X 처리군에서는 다른 처리군과 비교 시 ghost 유도가 효율적이지 못한 것으로 나타나 배지 내 고농도의 이온이 세포질의 세포 밖으로의 유출에 저해 인자로 작용하는 것으로 판단되었다 [도 R95].



[도 R95]

Ghost 내 SNA 작동을 위한 MgCl<sub>2</sub> 및 CaCl<sub>2</sub>의 첨가 농도 효과

또한 대량 배양 시 SNA 작동에서  $MgCl_2$  및  $CaCl_2$ 의 첨가 시점에 따른 핵산 제거 효율을 비교하였다. 앞서 실험 결과를 바탕으로 SNA와 ghost의 동시 활성화, 또는 ghost 유도 후의 SNA 활성화 조건을 평가하기 위해  $MgCl_2$  및  $CaCl_2$ 의 첨가를 온도 자극 개시 직후부터 4시간 후까지를 설정하여 이온의 첨가 (1X 농도)를 수행하였다. Ghost 유도가 완성된 후 10 ml의 배양액을 1 L 배양액으로부터 무작위로 3반복 취한 후 DNA 분리를 실시하였다. 전기영동 분석을 통해서 완전히 DNA가 절단된 양성 대조군 시료 (50 ml 소규모 실험 배양)와 비교하여 그 효율을 분석하였다. 아래에서 보듯이 최초 처리시점에서 SNA의 동시 활성화 보다는 ghost 유도 발현 조작 후 1-3시간 후에  $MgCl_2$  및  $CaCl_2$ 를 첨가하는 것이 보다 유효한 것으로 나타났다 [도 R96].



[도 R96]

Ghost 내 SNA 작동을 위한  $MgCl_2$  및  $CaCl_2$ 의 첨가 시점에 따른 DNA 제거 효과

## 나. Pilot scale 및 현장에서의 경구 백신 평가

### 1) Pilot scale에서의 경구 백신 기능 평가

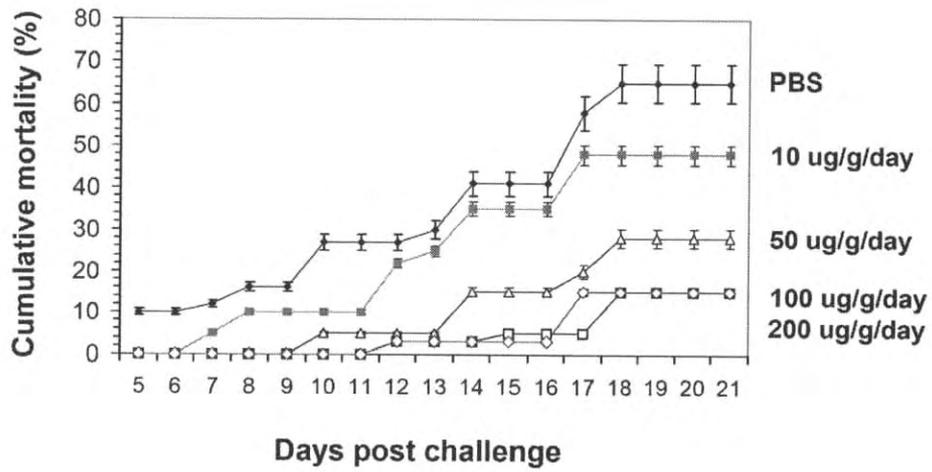
최적화된 백신 제조 프로그램에 의해 백신을 대량 발현 시킨 후 pilot scale에서의 경구 백신 가능 조건을 평가하였다. 현장 적용을 위한 사전 조사를 위해서 백신의 투여 량을 최적화하였다.

경구 투여를 위해서 10-12 g의 어체중 넙치 종묘를 대상으로 1주간의 순치 사육을 실시하여 1회 섭취하는 사료 양을 평균치로 측정하고 1회 섭취 사료 양의 70%에 해당하는 양의 사료와 재조합 백신을 coating 하였다. Coating은 예비 실험을 토대로 멸균 증류수를 이용하여 흡착 후 저온 건조시켰으며 암냉소에 보관하면서 경구투여를 실시하였다. 경구 투여는 매일 첫 먹이 공급 시 (오전 9:00-9:30) 1일 분량을 모두 공급하였고 5일간 공급하였다. 연구 방법에 기술된 조건으로 백신 처리 3 주 후 *E. tarda*와 MABV를 동시 공격하였고 (23°C) 최초 폐사가 일어나는 시점부터 3주간 누적 폐사율을 측정하였다.

그 결과를 [도 R97]에 나타내었으며 [도 R97]에서 보듯이 투여된 백신의 양에 따라 뚜렷한 방어 능력을 나타내었다. 백신 처리 없이 PBS 주사 후 공격 실험에 노출된 대조군은 공격 5일째부터 사망 개체가 관찰되기 시작하여 (10%) 시간이 지날수록 폐사율이 급격히 증가하는 경향을 보였고 3주째에는 60% 이상의 개체들이 누적 폐사하였다. 백신 경구 투여 10 ug/g BW로 처리된 실험구에서는 최종 3주째 대조군과의 통계적 유의차는 관찰되었으나 ( $P < 0.05$ ) 그다지 확연한 차이는 나타내지 않아 전체 마리 수 중 약 48%의 폐사율이 관찰되었다.

그러나 50 ug/g BW 처리된 실험구에서는 보다 뚜렷한 방어 능 효과가 관찰되었으며 최초 사망 개체의 출현 시점도 대조군에 비해 지연되었고 3주째 약 28%의 평균 누적 사망률을 나타내어 대조군 대비 2배 이상의 생존 능력을 나타내었다 ( $P < 0.05$ ). 나아가 100 ug/g BW 처리군에서는 매우 유효한 방어 능이 관찰되었으며 3주째 15% 개체만이 폐사하는 것으로 나타났다. 한편 최고 농도인 200 ug/g BW 처리군에서도 역시 유사한 방어 능력이 관찰되었으며 100 ug/g BW와 통계적 유의차는 관찰되지 않았다 ( $P > 0.05$ ).

따라서 현장 적용 평가를 위해서는 100 ug/g BW의 백신 경구 투여가 유효할 것으로 판단되었고 선정된 양식 현장에서의 백신 처리는 상기 최적화된 농도를 이용하여 실시하였다. 본 결과를 바탕으로 넙치 종묘를 대상으로 ETG dual 백신의 경구 처리 시 50-100 ug/g BW를 일일 1회 공급하여 3-5일간 처리 함으로써 넙치에 유효 방어능이 부여됨을 알 수 있었다.

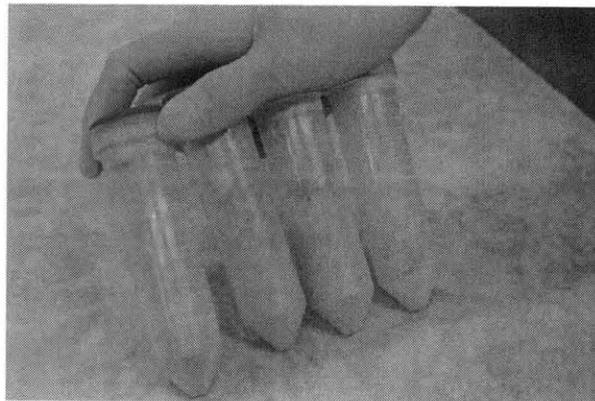


[도 R97]

Pilot scale에서의 백신 경구 투여량에 대한 넘치 방어능 효과

2) 양식 현장에서의 경구 백신 평가

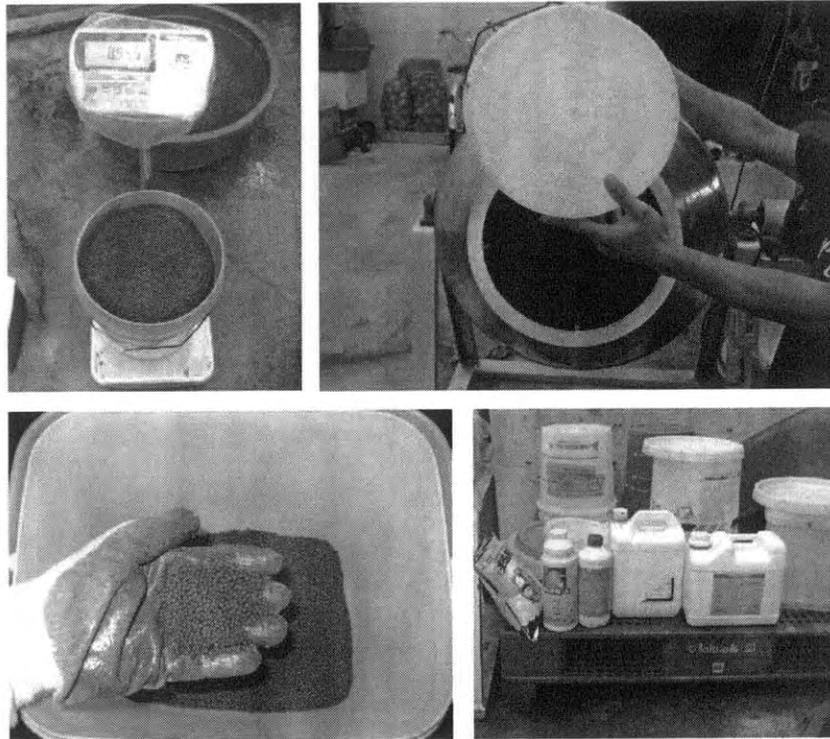
상기 pilot scale의 실험을 바탕으로 선정된 1개소의 양식 현장에서 대량 발현 제조된 경구 백신을 이용하여 경구 투여 처리를 실시하였다. 100 L의 발현 ghost 균체를 최종 동결 건조 백신을 제작하였고 [도 R98], 건조량을 측정하고 다시 백신의 사균 형태를 도말하여 확인하였다.



[도 R98]

현장 실험을 위해 제작된 동결 건조 백신

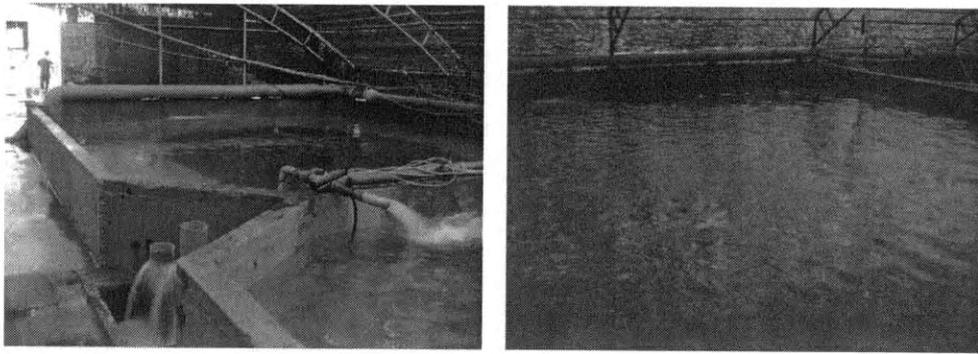
백신의 경구 처리를 위해 선정된 양식장은 매년 고 수온기 *E. tarda* 질병 출현이 예상되는 동해안 소재 양식장으로서 고 수온 기 에드워드증 출현이 예상되는 지역이다. 백신 처리를 위한 실험어는 본 양어장에서 종묘를 구입하여 1개월 이상 양식장 환경에 적응, 순치된 stock이었으며 평균 어체중은 10 g 내외였으며 실험 수조 7 x 7 M 팔각 수조에 10,000여마리씩 수용되어 있는 개체들이었다. 따라서 본 현장실험에서는 2007년 7월 9일 본 양식장을 방문하여 백신 사료 제작을 실시하였으며 이때 3일 연속 경구 투여에 필요한 전 사료량을 제조하였다. 실험 사료 제조는 해당 양식장의 사료 제조 매뉴얼을 그대로 따라 수협 넙치 치어 부상사료를 이용하였으며, 미네랄 및 비타민류 역시 백신과 함께 혼합하여 제조하였다 [도 R99].



[도 R99]

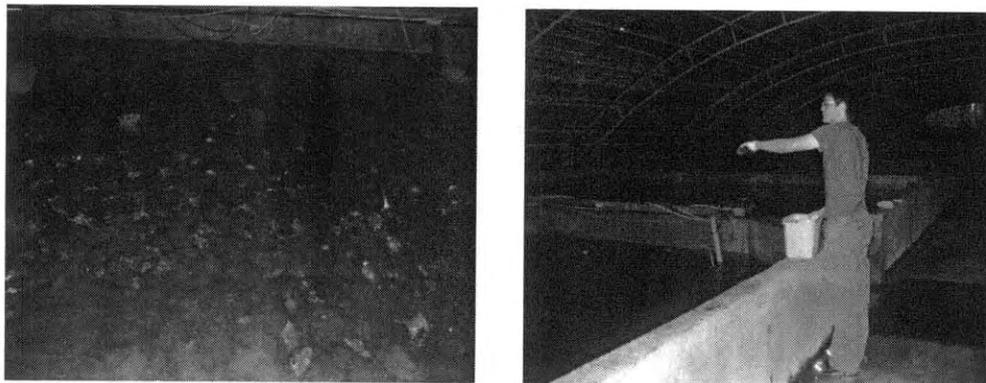
현장 실험 용 백신 coating 사료의 제작

백신의 경구처리는 앞서 pilot scale 실험에서 얻어진 결과를 바탕으로 100 ug/g BW의 조건으로 백신 처리구 및 대조군 10000마리를 대상으로 실시하였고 2007년 7월 10일부터 2007년 7월 12일까지 3일간 연속 백신 경구 투여를 실시하였다. 1일 투여량은 오전 6:00시 잔여 사료 량 없이 모두 투여하였으며 3일간 동일하게 실시하였다 [도 R100 & R101]. 이때 일일 평균 수온은 21.8℃였다.



[도 R100]

현장 실험을 위해 사용한 실험 수조



[도 R101]

제조합 백신 사료의 공급

현장에서의 효과를 최대한 반영하기 위해서 인위적인 감염 또는 공격 실험은 수행하지 않았다. 백신 처리가 완료되는 7월 12일부터는 일반 사료를 공급하면서 자연 감염이 일어나는지를 기다리며 백신처리구 및 대조군간의 사망 개체를 매일 측정하고 있다. 개체의 성장에 따른 공간 저해 저감과 개체간 성장 편차에 따른 생존율 간섭효과를 최소화하기 위해서 2007년 7월 17일 1차 선별을 통해 20% 하위 그룹을 선별해 제거하였고 대조군 및 처리군 각 8000마리를 새로운 수조에 독립적으로 수용하였다. 2007년 7월 24일 백신 처리가 수행된지 2주째 그간 백신 처리에 대한 부가 영향이 있는지를 확인하기 위해서 그간의 생존율을 측정하였으나 대조군 및 처리군 모두에서 8000미 중 일일 폐사 개체는 2-5마리 수준으로 자연 폐사 수준을 넘지 않는 상태이다. 7월 24일 각 수조에서 채수한 사육수를 대상으로 *E. tarda* 출현 검사를 실시하였으나 에드워드 증 유발 가능 균수로의 증가는 없었고 소수의 폐사 개체 역시 에드워드 증 감염에 대한 뚜렷한 증거는 관찰되지 않았다. 현재부터 2-3회의 추가 선별을 예상하고 있어 최종 2000 - 3000미씩의 개체를 확보할 것으로 예상되며 고수온기 자연 상태에서 에드워드 증의 발병 시점을 기다리고 있다. 에드워드 증 발병에 의해 대조군과 백신 처리군간의 생존율 차이가 발생할 경우 각 수조에서 대조군 및 처리군 시료를 확보하여 면역력 등을 평가하고 최종 누적 폐사율을 상대 비교할 예정이다.

## 제4장 연구개발 목표 달성도 및 관련분야 기여도

### 제1절 연구개발 목표 달성도

구분	평가의 착안점 및 척도			
	목 표 및 주 내용	척도	달성 내용 및 달성도	(%)
1차 년도	○ 병원성 유전자/단백질 소재 발굴여부	40	○ 목적세균 바이러스 유전자 조작 완료	100
	○ 형질전환 병원성 세균 확보여부	40	○ 안정적 형질전환 기술 확립	100
	○ 1차 ghost 용 발현 기반 확보 여부	20	○ Ghost 발현 백신 기술 확립	100
2차 년도	○ 재조합 백신 개발 여부	30	○ 재조합 백신 최적화 달성	100
	○ 재조합 백신의 기능 평가 여부	30	○ 유효 면역 기능 개선 평가	100
	○ 재조합 백신의 <i>in vivo</i> 기능성 평가	40	○ 백신의 어체 유효 방어능력 확보	100
3차 년도	○ 복합 기능의 재조합 백신 확보 여부	50	○ 복합 다중 발현 백신 제조	100
	○ 경구 가능 백신 개발 여부	30	○ 경구 백신에 의한 방어능 확인	100
	○ 현장적용력 평가 여부	20	○ 양식 현장 실험 평가 수행	95*
최종 평가	○ 다기능 백신 기술 확보	50	○ 다기능 백신 기술 확보	100
	○ 경구 투여 기술 확보	50	○ 경구 투여 기술 확보	100

\*현재 양식장에서 백신 처리 완료 후 백신 처리된 넙치를 양식생산 중

## 제2절 관련 분야 기여도

### 1. 어류 재조합 발현 백신의 신규 기술 정립

: 신규 유전자 소재를 이용한 재조합 발현 (항시 고발현 및 온도 조작 유도 발현) 시스템을 정착함으로써 새로운 핵심기술들을 확립하였음

### 2. 경구 가능 어병 백신 기술 개척

: 종래의 주사 및 침지 기술에서 나아가 소형 어체에도 백신 처리가 가능한 경구 가능 백신 기술을 개척하였고 그 효과를 평가하였음

### 3. 재조합 단백질 생산 분야 항시 고발현 신규 발현계 발굴 및 제공

: 항원 및 기타 재조합 단백질의 항시 고효율의 구성적 발현을 가능케하는 신규 프로모터들을 대량 발굴함으로써 어류 백신 제조 및 기타 유전 공학적 재조합 단백질 발현 분야에 새로운 유용 소재를 제공하였음

### 4. 다중 재조합 발현 기술의 어병 백신 개발 분야에 접목 방법 제시

: 서로 다른 발현 시스템을 하나의 단일 벡터에 집적할 수 있는 방법을 제공함으로써 triple 다중 발현 시스템을 어류 백신 분야에 최초로 제시하였음

### 5. 어류 분자면역학분야의 새로운 연구 방법 제시

: 종래 소형 크기의 백신 처리에 관한 기술적 난제를 경구백신으로 극복함으로써 소형 실험어 및 초기 양식 종묘를 대상으로 한 어류 분자면역 연구에 새로운 방향을 제시하였음

### 6. 학술 논문 발표 및 인력 양성

: 본 연구개발을 통해 연구 기간 중 국제 전문학술지 (SCI) 게재 2편, 게재 예정 1편, 국내 전문학술지 게재 2편, 특허 출원 1건의 실적과 다수의 학술대회 발표를 수행하였음. 본 연구개발 프로젝트를 통해서 박사 1인, 석사 1인이 기 배출되었고 추후 석사 2명이 추가로 배출될 예정이다.

## 제5장 연구개발결과의 활용 계획

### 1. 개발된 기술을 이용, 시제품 제작을 위한 제품화 연구 추진

: 본 연구개발을 통해 확보된 원천 및 핵심 기술들은 이미 현장 적용 가능성이 타진되었고 이에 연구진 및 업체와의 협의를 통해 제품화 연구를 추진할 수 있고 아울러 후속 과제 개발이 이루어 질 것임

### 2. 희망 양식장들을 대상으로 한 백신 효과 확대 검증 연구 추진

: 연구 개발 기간 중 선정된 양식장으로부터 현장의 평가가 완성되면 추후 추가 양식장들을 대상으로 현장 실험을 협의를 거쳐 확대할 예정임

### 3. 보다 유효할 것으로 판단되는 연관 질병원들에 대한 다기능 백신 확대 개발 연구 추진

: 현재 제안서에 의해 명시된 두 종류의 항원 외에 본 다중 발현 시스템은 다양한 항원 조합을 가능케 할 수 있으며, 따라서 동시 출현 질병원들을 중심으로 보다 유효한 재조합 발현 조합을 확대 개발할 수 있음

### 4. 참여 기업 등 희망 기업과의 실용화 추진

: 상기 확대 개발등이 완료되면 참여 기업 또는 희망 기업들과의 실용화 추진 연구와 시제품 개발 연구를 수행할 수 있음

### 5. 신규 발굴된 고효성 발현 계의 기타 재조합 단백질 발현 계로의 추가 확대 개발

: 본 연구개발 과정에서 기대 이상의 성과를 거둔 신규 발현계는 항원 표현을 위한 백신 개발외에 다양한 외래 단백질의 대량 발현에 이용될 수 있음. 따라서 본 프로모터들을 이용하여 기타 유전공학 분야에서 구성적 항시 발현 시스템으로 발전시킬 수 있음

### 6. 학술 논문, 지적재산권 및 참여 기업 기술 지도/이전 추진

: 연구 종료 후에도 공개 가능 정보에 대해서는 학술논문 및 발표, 또는 추가 특허 확보, 그리고 희망 시 참여기업으로의 기술 이전 등이 실시될 예정임

### [상용화 추진 계획]

본 연구개발 백신은 학술적으로 또는 기술적으로 그 효과가 충분히 입증되었으나 본 개발 백신의 상용화를 위해서는 현장 실험의 보강이 추가로 보완되어야 할 것으로 판단됨 따라서 다음의 추진 계획을 통해 본 연구결과물의 현장 실험 보강 및 실용화를 추진할 계획임

일 정	항목
2008년 5월 - 2008년 10월	(현장 적용 실험 보강) <sup>1)</sup> - 넙치 종묘 생산 현장 조건에서 개발 백신 처리 - 개발 백신 처리된 현장 어체 시료의 분석 - 현장에서의 생존률 개선 및 방어 능력 평가
2008년 9월 - 2008년 12월	(참여기업과의 사업화 계획에 대한 역할 논의) <sup>2)</sup> - 기술 이전 추진 계획 - 실용화를 위한 추가 현장 실험 계획 - 참여 기업 요구 추가 분석 실험 계획 - 특허 추가 개발 및 업체와의 권리 분할 계획
2009년 5월 - 2010년 5월	(참여 기업과 현장 실험의 공동 추진) <sup>2)</sup> - 현장 시료 및 안정성 평가 공동 추진 - 제품화 과제 개발 - 특허 추가 확보 <sup>3)</sup>
2010년 9월 -	(실용화 및 시장 공략) <sup>4)</sup> - 제품 개발 - 백신의 지속적인 version upgrade - 수출 전략 수립

1) 양식 현장 실험의 특성상 실험실 또는 연구소 규모에서 인위적 감염을 통한 효과 검증은 큰 의미가 없으며 따라서 양식 생산 조건에서 자연적 수평 감염

을 통해 이루어진 경우에 개발 백신의 실질적 효과를 검증할 수 있음. 때문에 이미 이루어진 현장 처리 시료에 인위적 감염을 실험실로 이송하여 실시하는 것은 유효하지 못하다고 판단되며 그 보다는 향후 추진 계획을 통해 보다 실질적 효과 검증이 필요함. 따라서 에드워드 질병이 가장 만연하리라 예상되는 시점에 대비하여 내년 5월 - 10월 동안 선정된 업체의 종묘를 대상으로 백신 효과를 검증할 계획임. 업체 선정은 연구진 및 참여기업과의 논의를 통해서 수행하며 실용화를 위한 실질적 자료를 확보할 수 있도록 할 것임

2) 향후 사업화 계획에 대한 연구자와 참여기업의 역할에 대한 기술의 필요성에 대하여 이미 본 연구팀과 참여기업은 회의를 가진바 있으며 그 회의 결과를 바탕으로 다음의 역할 담당을 수행하기로 하였음

2-1) 에드워드 백신 + MABV 백신은 기술적으로 높은 완성도에 달하였으나 산업적 측면에서는 감염 시기, 감염 피해 정도에 비추어 큰 효과를 기대하기 어려움. 즉 동일시기에 복합 감염이 이루어지는 에드워드 ghost 백신으로의 version-up이 이루어져야 참여 기업에서는 보다 높은 효과를 기대할 수 있음.

2-2) 따라서 이미 연구진에 다기능 백신 기술이 개발되어 있으므로 에드워드 ghost 백신 표면에 보다 유효한 항원을 탑재한 다기능 백신 개발이 필요하다고 판단됨. 이에 연구진은 MABV외에 또 다른 항원을 탑재할 수 있는 에드워드 백신 system을 준비하고 업체에서는 병원균의 선정을 실시할 것임. 이미 백신 cassette가 완비되어 있으므로 항원의 교체는 장기간의 노력이 필요 없는 상태임.

2-3) 실용화에 대한 구체적인 추진전략을 수립하기 위해서 1차 연구진이 수행하는 현장 실험의 보완이 완료되면 2008년 9월부터 차년도 후속 현장 실험, 참여기업의 추가 부담 및 요구 사항, 제품화 개발을 위한 특허 사전 확보, 특허권의 분할 등에 대한 구체적인 논의가 이루어질 것임

2-4) 논의에 의거하여 다시 실용화 이전에 개발된 백신의 수산물 의약품 허가를 취득하기 위해서 현장실험 및 안전성 확보에 대한 실시를 참여기업과 공동 추진할 것이다. 아울러 실제 제품을 출시하기 위해 부가적으로 필요한 사항을 충족시키기 위해서 해수부 또는 산자부의 제품화 과제 연구개발을

추진할 계획에 있다. 본 제품화과제는 참여기업이 주관연구기관이 되어야 하고 개발 후 중소기업의 이윤 창출 및 경쟁력 확보를 위한 주력 상품개발이 이루어지도록 할 것이며, 이때 본 연구진 전체 또는 그 일부 연구팀은 제품화를 위해 추가적으로 필요한 pilot 실험, 백신의 version up, 특허 확보 등을 담당할 것이고 기업은 현장 실험, 안전성 평가, 대량 공정 개발 등을 담당케 될 것임.

3) 특허 및 실용 신안 실적의 추가 확보를 위해서 연구개발이 종료된 이후에도 참여기업과의 기술에 대한 추가 특허, 제품에 대한 실용신안 등이 추가적으로 확보될 것이며 그 확보 기한은 본격 제품화가 가능하다고 판단되는 2010년을 기준으로 설정하고 있다. 특허의 분야는 현재 연구개발을 통해 고효율 발현 프로모터에 관한 내용이 출원되었으므로 추가적으로 다기능 백신 기술 자체에 대한 특허를 추가 확보할 계획이며 또한 제품화가 이루어진다면 해당 제품을 중심으로한 실용신안이 확보될 것이다. 특허의 재원은 주관연구기관 및 참여기업의 부담 내역을 협의하여 결정할 것이다.

4) 현재 수산동물을 대상으로한 비슷한 백신 사례, 즉 ghost 기반 백신은 본 연구진이 현재 최초 개발한 상태이며, 아직 수산용 백신을 목적으로 ghost를 기반으로 한 다기능 백신은 개발 사례를 찾아보기 힘들. 포유류에서도 최근 성공한 기술로서 현재 미국 특허청 검색 tool에서 포유류를 대상으로한 ghost 박테리아 기술 등이 US Patent Full-Text Database Manual Search (<http://www.uspto.gov/patft/>)에서 아래와 같이 특허 신청이 이루어져 있으나 아래의 각 특허 청구항을 검토 시 향후 본 연구진/참여기업이 실시하고자 하는 특정 제품에 대한 특허권 분쟁 요인은 없다고 판단됨

[주요 관련 특허]

7,067,639	Method to provide bacterial ghosts provided with antigens
6,896,887	Bacterial ghosts provided with antigens
6,964,845	Thermostable phage lambda operator mutants for regulating gene expression
6,951,756	Closure of bacterial ghost

[간접적으로 ghost 기술이 포함된 특허]

- 7,166,575 Compositions and methods for enhanced mucosal delivery of peptide YY and methods for treating and preventing obesity
- 6,833,130 Recombinant microorganisms expressing an oligosaccharide receptor mimic
- 6,596,510 Secretion of carrier-bound proteins into the periplasma and the extracellular space
- 6,177,083 Process for the production of vaccines and their use
- 5,470,573 Immunogens comprising the non-lytic membrane spanning domain of bacteriophages MS2 or PhiX174

## 제6장 참고 문헌

- Adams, A. and K.D. Thompson. 2006. Biotechnology offers revolution to fish health management. *Trends Biotech.*, 24 : 201~205.
- Borukhov, S., J. Lee and O. Laptenko. 2005. Bacterial transcription elongation factors: new insights into molecular mechanism of action. *Mol. Microbiol.*, 55 : 1315~1324.
- Browning, D.F. and S.J. Busby. 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2 : 57~65.
- Gómez-Chiarri, M. and L.A. Chiaverini. 1999. Evaluation of eukaryotic promoters for the construction of DNA vaccines for aquaculture. *Genet. Anal. Biomol. Eng.*, 15 : 121~124.
- Haidinger, W., U.B. Mayr, M.P. Szostak, S. Resch and W. Lubitz. 2003. *Escherichia coli* ghost production by expression of lysis gene *E* and staphylococcal nuclease. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 : 6106~6113.
- Hensel, A., L.A.G. van Leengoed, M.P. Szostak, H. Windt, H. Weissenböck, N. Stockhofe-Zurwieden, A. Katinger, M. Stadler, M. Ganter, S. Bunka, R. Papst and W. Lubitz. 1996. Induction of protective immunity by aerosol or oral application of candidate vaccines in a dose-controlled pig aerosol infection model. *J. Biotechnol.*, 44 : 171~181.
- Heppell, J. and H.L. Davis. 2000. Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Adv. Drug Del. Rev.*, 43 : 29~43.
- John, M., T.I. Crean, S.B. Calderwood and E.T. Ryan. 2000. In vitro and in vivo analyses of constitutive and in vivo-induced promoters in attenuated vaccine and vector strains of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.*, 68 : 1171~1175.
- Kwon, S.R., Y.K. Nam, S.K. Kim and K.H. Kim. 2006. Protection of tilapia

- (*Oreochromis mosambicus*) from edwardsiellosis by vaccination with *Edwardsiella tarda* ghosts. *Fish Shellfish Immunol.*, 20 : 621~626.
- Kwon, S.R., Y.K. Nam, S.K. Kim, D.S. Kim and K.H. Kim. 2005. Generation of *Edwardsiella tarda* ghosts by bacteriophage PhiX174 lysis gene E. *Aquaculture*, 250 : 16~21.
- Plumb, J.A. 1999. *Edwardsiella* septicaemias. In: Woo, P.T.K., Bruno, D.W. (Eds.), *Fish Diseases and Disorders Vol. 3. Viral, Bacterial and Fungal Infections*. CAB International, pp. 479~521.
- Robertson J.S. and E. Griffiths. 2006. Assuring the quality, safety, and efficacy of DNA vaccines. *Methods Mol. Med.*, 127 : 363~374.
- Szostak, M.P., A. Hensel, F.O. Eko, R. Klein, T. Auer, H. Mader, A. Haslberger, S. Bunka, G. Wanner and W. Lubitz. 1996. Bacterial ghosts: non living candidate vaccines. *J. Biotechnol.*, 44 : 161~170.
- Thune, R.L., L.A. Stanley and R.K. Cooper. 1993. Pathogenesis of gram negative bacterial infections in warm water fish. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 3 : 37~68.
- Tijhaar, E.J., Y. Zheng-Xin, J.A. Karlas, T.F. Meyer, M.J. Stukart, A.D. Osterhau and F.R. Mooi. 1994. Construction and evaluation of an expression vector allowing the stable expression of foreign antigens in a *Salmonella typhimurium* vaccine strain. *Vaccine*, 12 : 1004~1011.
- Witte, A., G. Wanner and W. Lubitz. 1992. Dynamics of PhiX174 protein E-mediated lysis of *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.*, 157 : 381~388.

## 부 록 (Appendix)

- *E. tarda* 항원 후보 유전자들의 염기서열 -

### Fimbrial protein I (177 aa)

```
1 atgaagaaaattttactgcctgttatggctctggccgccgcccgt
  M K K I L L P V M A L A A A A
46 gtgagtggtcaggcaagcgcagctaacggtaaagttgagtttacg
  V S G Q A S A A N G K V E F T
91 ggtgaaatcgttaactccacctgccaggaagcagcgactctcaa
  G E I V N S T C Q V S S D S Q
136 aatatcaacgtgtatgtgggtaaatatccgacctctgcatttaa
  N I N V Y L G K Y P T S A F K
181 gcggttgccgataagtcgcatccaaggctttccagatcaacctg
  A V G D K S A S K A F Q I N L
226 gagcagtgtgagccggggagctacaccgtacgtttcgatggcaat
  E Q C E P G S Y T V R F D G N
271 accgttgccggcatcctgacctgctggccgtctccagcagcgg
  T V A G H P D L L A V S S S G
316 gccaccgcccggcgaaggcgtgggtatcgaattacggacggt
  A T A A A K G V G I E I T D V
361 aacggcaagccgttcccgatcgccgatcagagccagggcgatgtg
  N G K P F P I A D Q S Q G D V
406 cccacggtgacggttgtagcgataagaaggcgatatttacctg
  P T V T V V S D K K A I F N L
451 caggcgcgctatcgctcttacgccaacacggttacagccggtctg
  Q A R Y R S Y A N T V T A G L
496 gccaacgcgaccagcccgttcaccatcgaatataaataa 534
  A N A T S P F T I E Y K *
```

Fimbrial protein II (228 aa)

1 atgaaagaatcgttgccgattattactggtgagcgcatttgct  
M K R I V A A L L L V S A F A  
46 gccacgcaggaattcaggttgatgctacgcgcttayttataac  
A H A G I Q V D A T R V X Y N  
91 ggcgatgaaaagtcagcgtcactgcctatccacaatgacagcgcg  
G D E K S A S L P I H N D S A  
136 gatgcctatatggtgcagacctggctggataaaggggatagcacc  
D A Y M V Q T W L D K G D S T  
181 aaggtagagaataagttaccgatggttggtgcccgcgattggt  
K V E N K L P M V V V P P I V  
226 aagctggatgcgcaaaaatcggcaatttacgcttcatctattct  
K L D A Q K S A I L R F I Y S  
271 gggcagggttttcygcaggatcaggaaacgctgctgtgggtcaac  
G Q G F X Q D Q E T L L W V N  
316 gtgcaggaaatccgccgacgccaagcaagaaaacgtattacag  
V Q E I P P T P K Q E N V L Q  
361 gytgccgtgcgcacgcggaatagctgttttatcgcccagttcg  
X A V R T R I K L F Y R P S S  
406 ctgcataaccacctggatgagcaggtgcataagctgcgctggcag  
L H T T L D E Q V H K L R W Q  
451 aaagcgggtaatcaattgctggccatcaacgacgggcccgtacac  
K A G N Q L L A I N D G P L H  
496 atcacctttggctctgtacagatgcagggcagcaacggcaaacc  
I T F G S V Q M Q G S N G K P  
541 atcgcggtcgatgccaaatggttgacccccacagccgctggcg  
I A V D A N M V D P H S R L A  
586 atgccattccggcggggctcgcgctcggaatacagtctccttc  
I A I P A G A R V G N T V S F  
631 agctacatcaatgactttggaggtcggactgaggttaaggacgcg  
S Y I N D F G G R T E V K D A  
676 atagtactga 687  
I V H \*

Fimbrial protein IV (356 aa)

1 atgaaaagcctaagtataaaacaggcgctggcattcacgctgcta  
 M K S L S I K Q A L A F T L L  
 46 ctgctgctgggcctttgcgtcagccgccaggcgctccgcgctctcc  
 L L L G L C V S R Q A S A L S  
 91 tgccgagagggcagtaatgcagggagctggctgcccacgaggat  
 C R E G S N A G S W S P I G S  
 136 atttatcagcgcacgatatcggcgccgattatcctgtccgcc  
 I Y Q R I D I G R P I I L S A  
 181 gccgactttaccgccggtaacctgatttggcggttcgcagaacttt  
 A D F T A G N L I W R S Q N F  
 226 accaccctttacctgttgggataactggaatactggaagggga  
 T T T F T C W D N W N T G R G  
 271 gagcacgcctacatttactggaacccgaaggatgcgttcgggagc  
 E H A Y I Y W N P K D A F G S  
 316 ctgaccggttcgctgtcggttggggtttcgatcaacgggatcgac  
 L H R S L S V G V S I N G I D  
 361 tatgatgcgattaacctcagacagagcggcagccggcccagtggc  
 Y D A I N L R Q S G S R P S G  
 406 cccgatctgggtgaggggacctcaaacagcggcggcggtcgcc  
 P D L G E G T S N S G G G V A  
 451 agaccggtacggtcaccgtcagctattcgggtgacatcaaggcc  
 R P R T V T V S Y S V Y I K A  
 496 accggcatcacgccggcggggtaacttcccggcgctggggctg  
 T G I T P P A G N F P A L G L  
 541 ccgtcgctgtttcaaattgacggcggtggcggttggacgcgcgc  
 P S L F Q I D G V G G L D A R  
 586 cccaacggcaactttaacgcctatactccgggctggataagatc  
 P N G N F N A Y I S G L D K I  
 631 caggtgatccactgcaaccgcagatcagcgtgctggcgaataac  
 Q V I H C N P Q I S V L A N N  
 676 ggcaacagatcgactttggtacgctgagcggcggcgcgcgct  
 G N S I D F G T L S A A G A R  
 721 ccgggggttatcgctcgccagataccgttcagcatcaaggcgagc  
 P G V I A R Q I P F S I K A T  
 766 ctgcggcgggcgagtgcgggggcagcagctacaggccagcttc  
 L R G G E C G G Q Q L Q A S F  
 811 agcacctgaggccggacgtcagcgatcgatcgctgatcctgccg  
 S T L R P D V S D R S L I L P  
 856 gataccaacccggcggtggggattttcctgacgaaggcggcgat  
 D T N P G V G I F L T K A G D  
 901 accagcgtacggcatcccgtgcagaccaatgtcgacttcggc  
 T S A T P I P L Q T N V D F G  
 946 ggtcggctgcaggataagcagaatgaggtgagcgagaactttacc  
 G R L Q D K Q N E V S E N F T  
 991 gccaatctgaaatggctgactaatcggccgacggcggggcgcttc  
 A N L K W L T N R P T A G R F  
 1036 catgacggccaacatcgacgtcacctttaaatag 1071  
 H A T A N I D V T F K \*

Fimbrial protein V (179 aa)

```
1 atgataatgaagaaaatcttactgcctggttatggctctggccgcc
  M I M K K I L L P V M A L A A
46 gccgctgtgagtggtcaggcaagcgagcctaacggtaaagttgag
  A A V S G Q A S A A N G K V E
91 ttacgggtgaaatcgttaactccacctgccaggaagcagcgac
  F T G E I V N S T C Q V S S D
136 tctcaaaatatcaacgtgtatttgggtaaataatccgacctctgca
  S Q N I N V Y L G K Y P T S A
181 tttaaagcggttggcgataagtccgcatccaaggctttccagatc
  F K A V G D K S A S K A F Q I
226 aacctggagcagtgtagccggggagctacacctacgtttcgat
  N L E Q C E P G S Y T V R F D
271 ggcaataaccgttgccggtcatcctgacctgctggccgtctccagc
  G N T V A G H P D L L A V S S
316 agcggtgccaccgcgggcgaaaggcgtgggtatcgaaattacg
  S G A T A A A K G V G I E I T
361 gacgttaacggcaagccgttcccgatcgccgatcagagccagggc
  D V N G K P F P I A D Q S Q G
406 gatgtgccacggtgacggttgtagcgataagaaggcgatattt
  D V P T V T V V S D K K A I F
451 aacctgcaggcgcgctatcgctcttacccaacacggttacagcc
  N L Q A R Y R S Y A N T V T A
496 ggtctggccaacgcgaccagcccgttcaccatcgaatataaataa 540
  G L A N A T S P F T I E Y K *
```

Fimbrial protein VIII (433 aa)

1 atgaattccccggtcaacgcaagtccaacactatttccccggt  
 M K F P G Q R K S K H Y F P V  
 46 aatgcccgcatccgctgctgcaaaagacgcagcataatgaaatt  
 N A R D P L L Q K T Q H N E I  
 91 gataaagcctacgtcgtgggtatcgatcagacgctggatatt  
 D K A Y V V G I D Q T L V D I  
 136 gaggccaaggtggatgaggcgtttatcgccccgtacggcctgagc  
 E A K V D E A F I A R Y G L S  
 181 caagggcactcgtggatcgaggatgatgctgccgaagcgtg  
 Q G H S L V I E D D V A E A L  
 226 taccaggagctgtgtgacagtaagctgattacccatgagttgcc  
 Y Q E L C D S K L I T H E F A  
 271 gggggcacgatcggcaataccctgcacaactactccgtgctggcc  
 G G T I G N T L H N Y S V L A  
 316 gacgatcgtcgggtctgctgggggtgatgtgcgaaaacgtcaaa  
 D D R S V L L G V M C E N V K  
 361 atcggcagctatgcctaccgctatctgtgtaaacacctcaagccg  
 I G S Y A Y R Y L C N T S S R  
 406 accgatctggaccatttgcagggcgtcgtggccctatcgggctg  
 T D L D H L Q G V D G P I G R  
 451 tgtttaccctgatcaccgataacggcgaacgcacctttgccatt  
 C F T L I T D N G E R T F A I  
 496 agccccggcatgatgaaccagctgccccgaaagcattccccgag  
 S P G M M N Q L R P E S I P E  
 541 gcggtgatcggcgtgctcggcgtgggtgctgacggcctatctg  
 A V I A G A S A L V L T A Y L  
 586 gtgcgctgtaagccgggagccgatgcgcatgcgaccatgcag  
 V R C K P G E P M R D A T M Q  
 631 gcgatgcctatgcaaaaagcaccacgttccggtggtgctgacc  
 A I A Y A K K H H V P V V L T  
 676 ctgggcaccaagtatgtgatcggcagcatccgcagttctggcgc  
 L G T K Y V I A D D P Q F W R  
 721 gatttccctgcgcatcacgtcaccattgtggcgtgaacgaagaa  
 D F L R D H V T I V A M N E E  
 766 gaggctcaggagctgaccgggctgtccgatccgctggcggcctcg  
 E A Q E L T G L S D P L A A S  
 811 gacagggcgtggagtggtggatctggtgctgtgcaccgccccg  
 D R A L E W V D L V L C T A G  
 856 ccggtcggcctgtatatggcggcctataccgaagatgacggcaag  
 P V G L Y M A G Y T E D D G K  
 901 cgcaaaaccagcatccgctgctgccccgggtgatccctgagttc  
 R K T Q H P L L P G V I P E F  
 946 aacctgtacgagtttagccgggcatgctgcgccaatgtgcgac  
 N L Y E F S R A M R R A M C D  
 991 gcgcccgtccggatctactcgcatattgcgccctatatggggggc  
 A P C R I Y S H I A P Y M G G  
 1036 ccgagaagatcatgaaccaacggcggcggagatggcgcgctc  
 P E K I M N T N G A G D G A L  
 1081 tctgcgctgctgcatgatatcgcgccaatgagtttaccgtacc  
 S A L L H D I A A N E F H R T  
 1126 aatgtgcctaactccagtaagcatcagcgtagctatctgacttac  
 N V P N S S K H Q R S Y L T Y  
 1171 tcccccctggcgcaggtgtgcaaatatgctaccgcgctcagctat  
 S S L A Q V C K Y A N R V S Y  
 1216 caggtgctcaaccagcactcggcggctgaccccgggtctgcc  
 Q V L N Q H S P R L T R G L P  
 1261 gagcgggaagacagcctggaagagtcctactgggagcgtga 1302  
 E R E D S L E E S Y W E R \*

Outer membrane protein 1 (154 aa)

```
1 atgaagcgtcttattattgtcgccattgccacggcaaccctggcg
  M K R L I I V A I A T A T L A
46 ggctgtgccaataccagcaccctgtccggcgacgtgtacagcgcc
  G C A N T S T L S G D V Y S A
91 aatcaggccaagcaggtacagcaggtgacatatggcaccatcgtc
  N Q A K Q V Q Q V T Y G T I V
136 tccatggagccggtacagattcaagccggtagcaggcgaacatg
  S M E P V Q I Q A G S E A N M
181 atcggcaccatcggcggcgcggtcatcggggggctgctgggtaac
  I G T I G G A V I G G L L G N
226 accatcggcggcggcaccgggacgcagcctggcgaccgccgcaggc
  T I G G G T G R S L A T A A G
271 gccgtcgcgggcggcgtggccggcaacagcattgagggcgcggtc
  A V A G G V A G N S I E G A V
316 aaccgtaccaacggcgtccagctggtgatccgctcgcacagcgg
  N R T N G V Q L V I R L D S G
361 aagaccatcgccgtggtacagaaaaacgacaagcaggctttccgg
  K T I A V V Q K N D K Q A F R
406 gttaatcagcgcgtaatgctgctgagcaacggcagcaccgtcaac
  V N Q R V M L L S N G S T V N
451 gtctcgccgatgtaa 465
  V S P M *
```

Outer membrane protein 1 (427 aa)

1 atgtgttacttcgacagatggaacgcaatttagttctcactcgt  
 M C L L R Q M E R N L V L T R  
 46 agcacgaaaagacaaaataagcagtgccatctcatactgaccgc  
 S T K R Q N K Q W H L I P D R  
 91 accggtcagcaactaagaaggaatattattgtgaaacgtaactcg  
 T G Q Q L R R N I I V K R N L  
 136 ctggcagtcggtattcctgctctgtagttgcagggcagcctaac  
 L A V V I P A L L V A G A A N  
 181 gctgcggaactacaacaagacggcaacaagctggatctgtac  
 A A E I Y N K D G N K L D L Y  
 226 ggtaaagtagatggctgcactacttcttagcgatagcagcaag  
 G K V D G L H Y F S S D S S K  
 271 gatggtgaccagtcctacgtccggttccggcttaaggcgaacc  
 D G D Q S Y V R F G F K G E T  
 316 cagattaacgatcagctgaccggttatggccagtggaagcag  
 Q I N D Q L T G Y G Q W E A Q  
 361 gctaacgtaaccagcccgaagcaactcctctaacttcttcacc  
 A N V N Q P E S N S S N F F T  
 406 cgtctgggcttccggcctgaagtacggcaactacggttctatc  
 R L G F A G L K Y G N Y G S I  
 451 gactacggccgtaactacggcgtgctgtacgacatcgaaggctgg  
 D Y G R N Y G V L Y D I E G W  
 496 accgacgtgctgccggagtccggtggcgatacctcggccagact  
 T D V L P E F G G D T S A Q T  
 541 gacaactacatggctcagcgcgcaacaacctggccacctaccgt  
 D N Y M A Q R A N N L A T Y R  
 586 aacaacggcttcttggcctgggtgatggcctggacttcgccctg  
 N N G F F G L V D G L D F A L  
 631 cagtatcagggtaaaaacgatggccacgctatggcaaagatgct  
 Q Y Q G K N D G H A Y G K D A  
 676 gatggctcctacagctgggatggcgc tccgctgagcaacaatgcg  
 D G S Y S W D G A P L S N N A  
 721 cgtgagatccaaggccaaaacggcgacggcttcggtatgtccacc  
 R E I Q G Q N G D G F G M S T  
 766 acctacgatctgggctggggcatcagcgggtgctggcgtaacc  
 T Y D L G W G I S A G A A Y T  
 811 accttaaccgtactaccgagcaaaaatggagcggcaaccaggct  
 T S N R T T E Q K W S G N Q A  
 856 aacttaacgctgccggcgttaaaaagcccagcttggggcgc  
 N S N V A G G N K A Q S W G A  
 901 ggtctgaagtatgatgctaacaactctacctggccaccatgtac  
 G L K Y D A N N I Y L A T M Y  
 946 actgaaaccagaacatgacgccgttcggctctaccggtatcgct  
 T E T Q N M T P F G S T G I A  
 991 aacaaagcgaagaacttcgaagcgtggcccagtatcagttcgac  
 N K A K N F E A V A Q Y Q F D  
 1036 ttcggtctgctccgtccatcgctacctgcagctaaaggcctct  
 F G L R P S I A Y L Q S K A S  
 1081 gagctgaactcctacaacggctttaaagggtggcaaggctgacctg  
 E L N S Y N G F N G G K A D L  
 1126 gtaaaatagcttgacctgggtgcgacctactactcaacaagaac  
 V K Y V D L G A T Y Y F N K N  
 1171 atgccacctacgttgattacaaaatcaacctgctggatgaaaac  
 M S T Y V D Y K I N L L D E N  
 1216 gacttcacccgcggaacagcatcaacaccgatgacatcgcttgct  
 D F T R A N S I N T D D I V A  
 1261 ctgggtctggtctaccagttctaa 1284  
 L G L V Y Q F \*

Periplasm membrane protein 1 (259 aa)

1 atgagtaatgtagtgacagacacgaccaacagtaaaattcaggtg  
M S N V V T D T T N S K I Q V  
46 cgcgatctgaacttctattacggaaaattccacgcgctgaagaat  
R D L N F Y Y G K F H A L K N  
91 atctcgctggatattgagaaaaacaaagtacggccttcatcgg  
I S L D I E K N K V T A F I G  
136 ccctccggctcggtaagtcgacgctgctgctgctacctttaacaag  
P S G C G K S T L L R T F N K  
181 atgttcagctttaccggagcagcgcgagaggggatatttta  
M F Q L Y P E Q R A E G D I L  
226 ctggatggtcagaatatcctgaccgacagccaggatgtcgcgctg  
L D G Q N I L T D S Q D V A L  
271 ctgcgcgccaagtggggatgggtgttcagaagccgacgccgttt  
L R A K V G M V F Q K P T P F  
316 cccatgtccatctacgacaatatcgccctcggcgtacgcctgttt  
P M S I Y D N I A F G V R L F  
361 gaaaagctgtcgcgggcccgatatggatgagcgggtgcagtgggcg  
E K L S R A D M D E R V Q W A  
406 ctgaccaaggcggcgcgtgtggagtgagacgaaagataagctgcac  
L T K A A L W S E T K D K L H  
451 caaagcggctatagcctgtctggcggccagcagcagcgtctgtgt  
Q S G Y S L S G G Q Q Q R L C  
496 atgcccgcggcattgctatccgtccggaggtcttactgctggat  
I A R G I A I R P E V L L L D  
541 gagccctgctctgcgctggaccctatttcgaccagccgtatcgag  
E P C S A L D P I S T S R I E  
586 gagctgatcaccgagctgaagcaggactacaccgtggatcgctg  
E L I T E L K Q D Y T V V I V  
631 acccacaacatgcagcagggcggcgcgtgttctgattacactgca  
T H N M Q Q A A R C S D Y T A  
676 tttatgtatcttggatgaactaattgaatttagtgatacagataag  
F M Y L G E L I E F S D T D K  
721 ctgtttaccgcccctgcacagcggcagacggaagactatattacy  
L F T A P A Q R Q T E D Y I T  
766 ggtcgctatggctga 780  
G R Y G \*

E tarda virulence protein-A (172 aa)

```
1 atggcaagtgaaagcaagcagcatatcggtggatcgagtcgctcg
  M A S E S K Q H T L D R V R S
46 ccaagagtgcagattacctatgatgtgaaattggcgatgcgcag
  P R V Q I T Y D V E I G D A Q
91 gaaatgaaggagctgccattgttatgggagtgctcggtgactat
  E M K E L P F V M G V L G D Y
136 tcagggcagccggcgactccgcttccaagctgaaagagcgcaaa
  S G Q P A T P L P K L K E R K
181 ttcgtttcgattgatcgcgacaacttcaacgatgtatcaaaggg
  F V S I D R D N F N D V I K G
226 gtgcatccccatctgtcattccgcaccgagaataccctgagcgga
  V H P H L S F R T E N T L S G
271 gatgacagccaactgtcggtaggatctgcattttcagagcatggcg
  D D S Q L S V D L H F Q S M A
316 gatttcaccccagagcgggtcgcggcaggttgagccgctgcgc
  D F T P E R V A A Q V E P L R
361 aagctgatggatatccgcagccgcctctctgacctgaaaaacaag
  K L M D I R S R L S D L K N K
406 atgtacagcaatgaacgcctgggtgaggtattgcagggcatcatt
  M Y S N E R L G E V L Q G I I
451 gaggataccgaaaagctgcagagctcgggtaaagagaccggcttt
  E D T E K L Q S L G K E T G F
496 ggcgaggagaagcagccatga 516
  G E E K Q P *
```

E tarda virulence protein-D (407 aa)

1 atgatgaatattgacgatctcactgatgaagagctgtgggaacag  
 M M N I D D L T D E E L W E Q  
 46 ctgggtccaaagccaaagcggcaggccggattttacagcgcgccc  
 L G P K P K R Q A G F Y S A P  
 91 gtgctaccaccgacatactccgcattggcggatgtgtcatcagc  
 V L P T D I L R M A D V V I S  
 136 catacgctgaagttcgacgcagaatccittgacgcgctgctgaag  
 H T L K F D A E S F D A L L K  
 181 aagctaaaggcgtgccaggatgatgcgatgaatcaaaaagccacc  
 K L K A C Q D D A M N Q K A T  
 226 tcaactgctgcgcccgcgagtgccctatcgacagccatccgtat  
 S L L R P P Q W P I D S H P D  
 271 gatcggggggacatggcatcagcgtcccgcaggatcatcgccac  
 D A G G H G I S V P Q V I G H  
 316 atcggaaacctgacctccagcgcgaatcagacggccgctgtac  
 I G T L T S S A N Q T A A L Y  
 361 ggctatatccagagggcatcggggcccgttaccgacggatgcgacg  
 G Y I Q R A S G P L P T D A Q  
 406 ggcatcgctaccttttcaacctcgacggcgtccaatgtgctgggt  
 G I A T F S T S T A S N V L G  
 451 gccgcaaacctgatcaataaccgctgacaatatcttaggaaacccg  
 A A N L I N T A D N I L G N P  
 496 ttaccaagccggctaaaacggcgtgacggcaatcaacaagatg  
 L P K P A K T A L T A I N K M  
 541 gcggagggggctcgccttatatcgcgctgaccaatcagatcatc  
 A E G V S P Y I A L T N Q I I  
 586 gcggccacgcaggaagtgtctccgtcggcggcaacgcgttactg  
 A A T Q G S V S V G G N A L L  
 631 agcaccgtcggccatgccgtggcggcggcgtcgggtccgcgctg  
 S T V G H A V G G G V G A A L  
 676 tcggtggccgcccaccggctcggggttatcctgggctggccgtg  
 S V A A T P V G V I L G L A V  
 721 accaccgcccagcgtggcgtcgaccatggatgtgatggcacgctg  
 T T A S V A S T M D V Y G T L  
 766 tgggatctgcgccagcgtttgtatccctgcacctgcccagctgc  
 W D L R Q R L Y P C T C G Q C  
 811 gatgagcggctcaagttcattatcgaacgctatgatcagagcaat  
 D E R L K F I I E R Y D Q S N  
 856 acggccaaagcggctcggctttgccgctggctttatcatcgtggg  
 T A K A V G F A A G F I I V G  
 901 ctgatcccggcgtggccatcggcatgcaagctgaccaccgc  
 L I P A M A I G M R K L H H R  
 946 ctacagggcagcgcctctacaacaccaaagtgtctacagatg  
 L Q G S A S Y K H Q M C L Q M  
 991 attcaggccgcagaagccggggcaccagatgaaggaaccccc  
 I Q A A R S R G T Q M K G T P  
 1036 ggcccggcggcgtgaacggaaaacctgtatgcccggctttcag  
 G P A P L N G K P C M P G F Q  
 1081 gtcaccacgcccggctgcccgaccgctatcgcccattgctgctg  
 V T T P G C P T A I A A I A L  
 1126 ctgatgggagatcacggaacaaaaacgggtatctgaaaacgctg  
 L M G D H G T K N G Y L K T L  
 1171 gcggtcatgctgctgaccgacggcgtcgacaacctaaaaaagaaa  
 A V M L S T D G V D N L K K K  
 1216 atcccgtga 1224  
 I P \*

E tarda virulence protein-E (158 aa)

```
1 atgatccttcgcatctcttccgcccctccgtgctggatcgtctg
  M I L R H L F R P S V L D R L
46 ttcgatgatttcccacaggagcgaaccgaacggacatcagaccgt
  F D D F P Q E R T E R T S D R
91 cggatgacctggcccacttctcgtgggccgtccgacgggatgtg
  R Y D L A H F R W A V R R D V
136 gaggatgtcctgaatacgcgatccgcgctgtcgtggatatcgat
  E D V L N T R S A L S L D I D
181 cagtggcctgagctggaaaagtccccctgaattacggcctgccg
  Q W P E L E K S P L N Y G L P
226 gactgctccaacctgagcgcgccaacgccgaggatcgggagtgg
  D C S N L S A A N A E D R E W
271 atccgccagcatatcgagcgggccatcgatctgtttgaacccgg
  I R Q H I E R A I D L F E P R
316 ctgagccaggtccgggtgcacatccatctggatgagaaaaccggc
  L S Q V R V H I H L D E K T G
361 atcagccagctgatcttcaggatcgaggcattactggacgtcgat
  I S Q L I F R I E A L L D V D
406 ccctcgcggagccggtgatgttcgatgccgtgctggatgtttca
  P S P E P V M F D A V L D V S
451 acacagctgtaccgaatagacaggtga 477
  T Q L Y R I D R *
```

E tarda virulence protein-G (341 aa)

1 atgaacgacgccctgagcccaagtccatgctggagcagctgtat  
 M N D A L S P K S M L E Q L Y  
 46 gcgcgccctatgagttcgattttttcaggccgtcaggatactg  
 A R P Y E F D F F Q A V R I L  
 91 gagctgcagcagctacgggtggctgccaggagcttccgctgcgc  
 E L Q Q L R C G C Q E L P L R  
 136 ttccggacgcatcttccctggccaccccgccagcagtgctat  
 F R T H L S L A T P A S S V Y  
 181 gcgctgcagccgcccgcggcagaccagccgaggtcatgaccatc  
 A L Q P P A A D Q P Q V M T I  
 226 aacttcatggggctgaccggccctctggggcgctgccgacgcgg  
 N F M G L T G P S G A L P T R  
 271 tataccgagatgctgctggcgcgctgcctgcagcatcgggatcag  
 Y T E M L L A R R L Q H R D Q  
 316 accgccaccactttttgatctgctcaatcaccgtctgatcacc  
 T A H H F F D L L N H R L I T  
 361 ctgtttaccagcatggcgcaagcatcaggcgacggccgatctg  
 L F Y Q A W R K H Q A T A D L  
 406 gagtgcggcctgcaggccgactggcgccagatgctgcttccctg  
 E C G L Q A D W R Q M L L S L  
 451 gccggtctgggcacgctgggctgcagaaccggctgaaaaaagac  
 A G L G T L G L Q N R L K K D  
 496 ggcgtcaatgacgatgtctttgcctattacgccggacgggtccggc  
 G V N D D V F A Y Y A G R F G  
 541 acccgctcgctcagcagaggaggggctgcgcacgctgctgacagac  
 T R S L S E E G L R T L L T D  
 586 tatttttccgtgccggtcgagatcctgccctttcagggccgctgg  
 Y F S V P V E I L P F Q G R W  
 631 ctgaagctggatgaggcggacctcctcactctggggcgccaaaac  
 L K L D E A D L L T L G R Q N  
 676 tgcactctgggagagtgccgggtgctggggcgacaggtatgggat  
 C T L G E W P V L G R Q V W D  
 721 gcccaaagccagtttaggatccgcctcggcccatgagctatcag  
 A Q S Q F R I R L G P M S Y Q  
 766 cagtttcagccatttttgccgggggcaaggactttcgggcgctg  
 Q F Q P F L P G G K D F R A L  
 811 accaagctggtccgttttgccatcgagatcgccgtcacattcgat  
 T K L V R F A I E I A V T F D  
 856 attcagctggtgctggccgcccagcaggtccccctgcacgctg  
 I Q L V L A A S E V P P C T L  
 901 ggcgatagtcaggccggggcgcccgctcccggatggattggctgg  
 G D S Q A G A A R P G W I G W  
 946 ctgggaggccgtcccgccaggctgggggatgccgacgaagtggta  
 L G G R P A R L G D A D E V V  
 991 ttgcaggcgtcagagtccgggaagcccgcgcgataa 1026  
 L Q A S E S G K P A R \*

## 부 록 (Appedix)

- *E. tarda*로부터 분리된 프로모터 활성 DNA 염기서열 목록 -

**Shaded by yellow: possible -35 sequence predicted by software A**

**Shaded by cyan: possible -10 sequence predicted by software A**

**Underlined: possilbe prokaryotic promoter sequence predicted by software B**

### >I-A1

GATACCAATCAAGGTTGCTGCTTACACATGGAGGTTTCTCCTTTGATTATGGTGACGACGAACTAT  
CACATATCGTTATACGCCTGAATGCAGGAGGAAGGCGACGTCCATTCCATTGACCGTCTGTGGAAAA  
AATAATGCCGCTGCTAGATACCCTCTGCGGTAGTCATGGGGTCGGACCGGTATGTCATGAGCTGAAT  
ATCGCCCCATCGACGTACTIONACCGGCACCAAAATTACCGTCAGCACCCCTGAAGCTCGTAGCGATATTT  
TTGATTACATCGAAATGTTTTATAACAGTAGGCGTCGGCATGGTTCGAGTGTTTCAGATGTCACCGAC  
AGAATATGAAAACCAATATTTATCAACGGCTCAGAAGTGCTAGATTATCCGTGGCGATTTCAGTTCGA  
TTTATTCAGCAAAGCCTCTATCATCAGATAAAATTGAGTGCTTATCTCGGGCATAAGTGATTTTCG  
TCTTCCGGTGTTAAATATTCTGAAATTTAAATTATCGAACTTATTGCTGGATAACGACATTATATTC  
TATGCTGGTTGATGTGCATAGATTAACAGGGATTCAATCGCGTTTAGTTCGGTATTATCCTTACTGA  
TAG

### >I-A2

AGTAATTATTTAAAGTTTAGGTAGAAATCGCTATGAAACGCACCTTCCAACCGTCCGTATTGAAACG  
CAACCGTACCCACGGTTTCCGTGCTCGTATGGCAAACAAAAATGGCCGTGAGGTTCTTGCCCGTCGC  
CGCGCTAAAGGCCGCGCTCGTCTGACCGTAGCCGGTTAATTTAGCTGACCAGATTAGTGGTTAAGCT  
AAGTTTCCCTAGGGAGTTACGTTTGTTAACTCCCAATCACTTCAATTTTCGTCTCCAGCAACCGCAA  
CGAGCCGGTACGCCCCAACTTACCATTCTCGGCCGTATGAACTCGCTGGGGTATCCCCGCATCGGTC  
TTACAGTCGCCAAAAAGCATGTCAAACGCGCTCACGAGCGTAATCGTATCAAGCGTCTGACACGCGA  
AAGTTTCCGTCTGCGTCAGCATTCGCTGCCAGCCATGGACTTTGTGGTAATCGTCAAAAAGGGTGTT  
CAGGAACTCGATAATCGGGCGCTGACAGAGATGTTGGAAAAATTATGGCGTCGCCATTGTCGCCAGG  
CTCGCGTCTCCTGATTGCGCTGATACGTTGGTTATCAGTCGCTTTATCAGTCCGCTGCTTGGGCCGCAC

TGTCGCTTCCATCCTACCTGCTCACAGTACGGAATTGAGGCCTTGCGCAGGTTTGGAGTGGTAAAAG  
GCAGTTGGTTGACACTGAAACGCGTATTAAAATGCCACCCTTTGAACCCGGGTGGCGATgatcCGCA  
TGCTGCAGCAGACGATAGAGCAGGCGTTGCTGGAGCAAGGACGCATTACCGAGCGTCCCAGAACCTC  
TTTTGAGTAAAAATTAACCTACTGATTATACAACAATATTTACAAAGAAAGCCGTCCATAAAGCGA  
AAGTTGTTAGTAAACAGTAACAAAGCAGCAAGATTTCAAATTTCTCTGAGGTGTTTCGTGCGCG  
GGCCAGTCCCCTGAGCCGATATTTCAAACCTTAAGAATGTGGCGCTCCACAACCCGGTGAGCAGGCTC  
GGTCTCCGAGAAGCCTTAAAGTTGTGACGTTATGTTACCTTGAACCCGGGTTCAAGGGTTACAGC  
CTGCTACGGCACCTCGGAGATCCCTAAAACGCCAGTCTGCCGCGGAGTCAGTCCATGTTCCAGG  
AATCTGCGCTCTCTCCCGTCATCAGTTTCGCCATCGTCTGCGCAGCTGCGCCGTTTCGCTTTCCCA  
C

**>I-A3**

GATACCAATCAAGGTGCTGCTTTACACATGGAGGTTTCTCCTTTGATTATGGTGACGACGAACTAT  
CACATATCGTTATACGCCTGAATGCAGGAGGAAGGCGACGTCCATTCCATTGACCGTCTGTGGAAAA  
AATAATGCCGCTGCTAGATACCCTCTGCGGTAGTCATGGGGTCGGACCGGTATGTCATGAGCTGAAT  
ATCGCCCCATCGACGTACTACGGCACCAAAATTACCGTCAGCACCTGAAGCTCGTAGCGATATTT  
TTGATTACATCGAAATGTTTTATAACAGTAGGCGTCGGCATGGTTTCGAGTGTTCAGATGTCACCGAC  
AGAATATGAAAACCAATATATCAACGGCTCAGAAGTGTCTAGATTATCCGTGGCGATTTCAGTTCGA  
TTTATTCAGCAAAGCCTC  
TATCATCACGATAAAAATGAGTGCCTATCTCGGGCATAAGTGATTTTCGTCTTCCGGTGTTAAATAT  
TCTGAAATTTAAATATCGAACTTATTGCTGGATAACGACATTATACTATGCTGGTTGATGTGCA  
TAGATTAACAGGGATTCAATCGCGTTTAGTTTCGGTATTATCCTTACTGATAG

**>I-A4**

ACCCTCTGTATAACGATTCTACCGATGCTAAAAATCATTGATTTCAGGTCAATAAAAATTTACTTTATC  
AAATCGCCATCCCATATATAGTGTCTCTGACGTAAACGAACACCTATATATAGTAGTTATCCACAA  
AGCATCCACACAACGCGCTAAAGCCTGATTTACGCGGCTTTGTGCTGTGGATAACCGGTAGATGG  
ATGCACACCACAATCACAGGAGCGAGAAAACGGTGAAACCTATAGTGATTAAACGGGACGGTTGTCA  
GGTACCCTTCAACGAACAGCGTATCAAGGAAGCGGTGCTGCGTGCAGCGCTGGCCGCTGACGTGGAT  
GATGCCGATTACTGCGCAACCGTTGCCCGGTAGTCGCTATGCAGATGGCC

**>I-A5**

GATTCTGTGGATACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGA  
GCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAAACCGCTCTCCCCGCGCGT  
TGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGAAAGCGGGCAGTGAAgatcCTG  
GACGAAATCGCAGCCGAGTATGCAGGGAAGCTGACCATTGCTAAGCTGAATATCGACGAAAACCCGG

CCACTGCGCCGAAGTACGGTATTCGTGGTATTCGGACGCTGCTGCTGTTCAAGAACGGCGCGGTTGC  
GGCCACCAAAGTGGGCGCGCTGTCCAAGACTCAGTTGAAAGAGTTCTTGGATGCCAACCTGTAAGGT  
TGCCCGCCATTTGTGACGGCGTCCGGCGGTTAACGGATTCCTGCTGTTGACCCTAGACGTCCGCTC  
ATAAGCGTGTAAAGTTAACCACGCTGCCTAGTCAGTGCTTACCTGTAGTTTGAATCATCTGGTTTG  
AACCAAAGTTAGAACTAAGTTTACTCTGTTTGAAACCTCTGTATCGCCAGCGTTCTTCTGTTG  
TATATGGCCGTGTCGCCGGGATGAAGCATG

**>I-A6**

TGCATACCGAATCGCTGCGCGCCGAGCAGCTGTGTATCAACGTGGACCGCACCCCTGACCACGCTGTG  
GCGTCTGCGGCGTACCCTGTGCTGGCCGCTGGCCTGGCCCGGTTTACGCCCGCCGTATCCCTCC  
CGTCTGCTAAGCGGTATAAAACGGGCCGTAGGCCCTGTGGAGCACCCCTGCGTTTGGCACGCCGCACCT  
TCTACCCATgatcGCCGCCGGCATCTTCGCTACGGACCCGCTGCGCGTCTGATGCCCCCTTACC  
CACCACGCGTCCCGCGCTGATGCGGGGTACATACGCGCCATAGCCTACCCACGTGACCATTAG  
CGCATTTTTATACAAAAATCATTAATACATTATTAATAAAACGGTGCTgatcACCCTCTGTATAAC  
GATTCTACCGATGCTAAAAATCATTGATTCAGGTCAATAAAATTTACTTTATCAAATCGCCATTCCC  
ATATATAGTGTCTCTGACGTAAACGAACACCTATATATAGTAGTTATCCACAAAGCATCCACACAAC  
GCGCGTAAAGCCTGATTTACGCGGCTTTGTGCTGTGGATAACCGGTAGATGGATGCACACCACAAT  
CACAGGAGCGAGAAAACGGTGAACCTATAGTGATTAACGGGACGGTTGTCAGGTACCCCTTCAACG  
AACAGCGTATCAAGGAAGCGGTGCTGCGTGCAGCGCTGGCCGCTGACGTGGATGATGCCGATTACTG  
CGCAACCGTTGCCCGCTAGTCGCTATGCAGATGGCCgatcGCATACCGACATGGCGCCAAAGGTGT  
CGCCGTGGTAGCCCTGACGCAGGGTGAGAAAAGCGCTGGCGCGGTTCCGCCGCGCCTGCCAGTACTG  
CAGCGCCATCTTCAGCGCCACCTCGACGGCAACGGAGCCGAGTCCGCCAGAAACACGCACTCCAGC  
GCCTGGGGGGTCACTCTGACCAGCTTTCCGCACAGGGCGACCGCCGTGGGATGGGTGACGCCGCCGA  
ACATGACGTGGGCCATCTGCCCATCTGACGCGCGATGGCCTGATTGAGATGGGGGTGATTATAGCC  
GTGAATGGCGGCCACCAGGAGGACATGCCGTCCACCAGACGTCGGCCATCCGCCAGCTGCAGCTCG  
CAGCCGGACGCCCGGTGACCGGGTACACCGGCAGAGGTTGGCTCATCGAAGTATAGGGATGCCAGA  
TATGGCGCGGTTCAAAGTCGAGGTCGCTGGCGTTCATGGCGCTCGTTAGGTAAACCCTGTTGTGTTT  
TTTGAGTTTACAGTTTAGCGGTTAACGCCGCTGCGTCATGCTCCATGCCGATATGTGGAGATTTGT  
TGGTTTCAATCTGTAAACCATTACACATATAAGTTGGTTGACATGGTATTTCTCCGTTCTACACTGA  
GCCCACTTTTACC

**>I-A7**

GATACCAATCAAGGTTGCTGCTTACACATGGAGGTTTCTCCTTTGATTATGGTGACGACGAACAT  
CACATATCGTTATACGCCCTGAATGCAGGAGGAAGCGACGTCATTCCATTGACCGTCTGTGGAAAA  
AATAATGCCGCTGCTAGATACCCTCTGCGGTAGTCATGGGGTCCGACCGGTATGTCATGAGCTGAAT  
ATCGCCCCATCGACGTACTACCGGCACCAAAATACCGTCAGCACCCCTGAAGCTCGTAGCGATATTT

TTGATTACATCGAAATGTTTTATAACAGTAGGCGTCGGCATGGTTCGAGTGTTCAGATGTCACCGAC  
AGAATATGAAAACCAATATTATCAACGGCTCAGAAGTGCTAGATTATCCGTGGCGATTAGTTCTGA  
TTTATTTCAGCAAAGCCTCTATCATCACGATAAAAATTGAGTGCTTATCTCGGGCATAAGTGATTTTCG  
TCTTCCGGTGTAAATATTCTGAAATTTAAATTATCGAACTTATTGCTGGATAACGACATTATAATG  
TATGCTGGTTGATGTGCATAGATTAACAGGGATTCAATCGCGTTTAGTTTCGGTATTATCCTTACTGA  
TAG

**>I-A8**

CCCAGTCCCAGTGAGCAGAGAAAGTAGTTCATTCACACAGAAAGCCGTCGTgatcCAGCATTTCCT  
GCCCGTTAAGGCCGCTGTCCAGCGCCAGCGCTTTTCGCTGTGGCTGAGGTCGATAAGATAACACAG  
CGCGCCGACGGCCAGTATTAGGGAGAGGATTTGCAGCAGGGTCAGGCAGCGGAGTGCGTGGTCGTC  
AATGACATCGTCGCCCTCCAGGCCGCTGAAAGCGTGGCATGATACAGAAAAATCACCGAGGGTAAAC  
GTAAAACAGGTCAgatcTGTGCGTTAATCGTACGTTTTTGCCCGGCCAAAAGTGGTTTTATGCGCTT  
ATGTTGCTTTTTTGTAACCGTTAACACGGTGGCTAAATGCTGATATGCTGAAAAGGCTATCCGGG  
TATCCGACAGGCGGTGAGCGATGGGTAGGGCACGGCACGCTACCGGCATCCCGGTATCTACAATG  
ACAATGAGAGCGAGGAGTCGAGTCGTGCTAAAAGAATACCGTGAGCACGTCGCCGAGCGGGCGGCC  
TGGGTGTGGTTCCTAAGCCGCTGGACCGGCGCAGATGGCAGCGCTGGTTGAGCTGCTTAAGTCACC  
GCCGGCGGGCAGGAGGCCCTGCTGCTG

**>I-A9**

GGCATCgatcAGCTGGCGAACCAGCGTCATGTCCTGCGGATACGTCAGACACAGCAGCCATACCGGC  
ATGCCTTGCCACTCACCGATGCGATACGCCGCTCTCGCCGACCAAATGCCACTGAGCGGGCGCTACCGT  
AGGGCAGCTCGCCCTCCGGCAGCCAGATACGTCCCCgatcGCTGACCACCCACCAGCCGCTATCGCT  
GTCACTCAATTGCTGTGCCACTGTACCGTATAAACCCCTTACGCTCGATGGACGCGCCCGGCTTCC  
CCCGCGCAGGCAGCGCGCATCAAGTCTACGTCATTAATAACATATTATTAACAATGCTTGCAGTTT  
CGCAGGCCGCTCCTTACACTGGCTCCCGCATCGTAGGGCAGCCTGCGCTGCGCGCTATCTTGTGCG  
AGTGCCTAGCTGATACGCCGTATCACAGGCTGAGACCGTTGATTCCGGgatcCCAGCTTTCCTTCGG  
GCTGCCCTGGCCGAGTGGGCCCCCTCTTGGTTTAAGCCGACCGGCGACTGCGGCTACGATGCGCCG  
ATGGTGCCACAGGGCGTGGCGCTGGACAGCGTACAGCAGTGGTTTATCGACATGTACGTGCAGGCTG  
AGGGCTGGTATCTgatcCCCTCCATGCAGTTTATGAATATGGCGCAGGCCTGTTTCCTGGCCTTTGC  
GCTGTGCTTTGCGatcCTGGTgatcATGAGCGTAGCCTGGGCTATCCACCTGCTGCGCCGCCGCGCG  
ATGCCCCGAGACCCTACCGCCTTACCCCCGCTAAACCACTGGCGGAGTTTAACTCCGCCACCGCC  
CTCCCTCGTCACACGCTCACGGACGATAGTTTGACCCTACTCACGCTTTGCTGCATTTTACCTTGAT  
GGAGTATGCTCCATAATAAATTCATATGGAGTTCAATTCTAAAGCGTAATCAAGGTGAGGTGCC  
ATGTCTGTATTCACCACTCTACAACAGCATATTCAACGCAACGGTGCCCTgatcTA

**>I-B1**

GCGCTGGCGCGTAAAATCGGCTTTCAGGTGAAAATTCTGCTGGAGGACGGGATAGTCAATCTTTCAC  
TATCGCTGTCGGACAGCACGCTGCCAGACAGCGAAAAATGCTGAGACAATTCGACAAATCGTGCCA  
AAACATACGCAACGGGATAAAACTAGCGTTAATACGTCCGATTCCGTTGGTTAAACTGAGCGTGTG  
CAACCGCCCGCGCTGCCTACGACAAGAGAAGAAGCGCACTGTGATGTTGTCCAAATTTAAGCGAGC  
CAAACATCAACAACACCTTGTCAACTGCCAAACTCCCGCAACAGGTCGGTGAGGTAGAGACGCTG  
TTTTCGCCGGCGGCATTCCGTCAGGCGCTGCTGGAGGCCATCGGCCAGGCAACACAGCG

**>II-A1**

ACTGACCGCTTACCGGTAGCACAGCTTGCCGCCGATgatcAGCGCAGCGACGCGCTTTGAGCGCCGG  
CGGATTAATTTTCGCAGCAAAATGATAGCGCTATCACGAAATCACCTCCTCGAACTAGATAGCGCTAC  
CATTGCTCTCTACTATGCCTTTCAACAAGAGAATCATTTAAAAAAACAGCCGACATGACCAGGAGCC  
GATTGAATGTTGACGAACTGCTTACCCCAACGTCATTCAGGTTATCGAGCAGGTAACGGACTGGC  
GTGAGGCGATTCAAACCGCCTGTGCCCACTGATAGAAAATAATGCGATTACCCCTGGCTATGTGCA  
TGCCATTATTCAGTCGCATAACAAAATCGGCCCTATTATGTGCTGGGCCAGGCATGGCAATGCCG  
CATGCACGCCCGGAAGATGGCGTTAATCAATTGGCATTAGGCCTGACCGTCAITAAACACGGCGTCG  
AATTCGGCTCCGCCGTAACgatcCGGCGGCGGCCAGCGGCTGTTCCAGCAGGCAGAGGCGCTGCT  
GGCCGAGGATGTGCCGACCATTCGCTATACCACTACGTCAGCGTGCGGCTGGTGAAGCCCTATGTC  
GGCGGGTACCAGCCCGCAACATGGACTACCTCTATAGCAAGGACATGTATATCCGCGCTCACTGAC  
GCGCTCAGGCGCGGCCgatcGCGGGGGCCGCGGGCGGACGCTCTACAGAAACAGCTCCAGCAGGG  
AGTTGAGGAACAGCTTGCCGTGGGGGGTGACCTGCCAGTGGCTGGGGGTCTCGCTGATGTAGCCCTG  
CGCCAGCGCCGCTCCAGCTGCGGGCGAATCGTGGCTTCGTCCACGCCGTATAGGCGCTGAAGTCG  
GCGCGGCGCCGTTCCAGCAGACGGAAGCGGTTATAAAGAACTCAAACGGCCTCTCCGCCATGG  
CCACCTGCTGCCGTT

**>II-A10**

GCCACGATGGCGCAGCTGCCTGATGGTTTATTGCGCCGCTACGGCGGAGGTCTAGTGGTTGCAGGGC  
TGTTTATCTACTACATGTTGCGTAGTCGCCTCGGCGGCTGATATGTCAGACAAAATTTGCGCAATCG  
TGTGCGAAAAATGCTGAAAGCTGAAAAATGAGGGGTAGAATCCATTTTTAACAACGTGGTGAATAG  
CTAAAATGGGCAAGAACGTCGTCGTA CTGGGCACCCAATGGGGTGACGAAGGTAAAGGTAAGGTCGT  
AGACCTCTTAACTGAACGGGCCAAGTATGTTGTACGCTATCAGGGCGGGCACAACGCGGGCCATACG  
CTAGTCATTAAACGGTGAAAAAACCGTTCTGCATCTGATTCCCTCAGGTATTCTGCGGAAAATGTGC  
TCAGTATTATTGCCAACGGCGTTGTTCTGGCGCCGGATGCGCTGCTGCGCGAAAATGACCGAGCTGGA  
AGCGCGCGGTGTACCGGTGCGCGAGCGCCTGCTGCTCTCTGAAGCCTGTCCGCTgatcCTGCCGAT  
CACGTTGCGCTGGACAATGCGCGAGAGAAAAGCGCGCGGTGCCAAGGCTATCGGCACCACCGGTGCGG  
GCATCGGCCCGGCTATGAAGACAAAAGTCGCTCGCCGCGCCCTGCGCGTGGCGACCTGTTTGATAA

AGAAAGCTTCGCCGTTAAGCTGAAAGAGATTATGGAAATACCATAACTTCCAGCTGGTGAACACTACTAC  
CACGTCGATGCCGTTGATTACCAGCGCGTGGACGAAAGTGATGGCGGTTGCCGACCTGCTGACCA  
GCATGGTGGTTGACGTTGCCgatcACGGAGCAGGGTTATCGTGGTGGCATGACCATCCTGAGAGAGT  
TCATACGTTCACTTGCCATTCCTCAGGAACAGGAGCCTGTCGTGCGCTTCGAAACAGAGCCAGGACG  
ACAGATGCAGGTTGACTGGGGACCATGCGTAATGGCAAATCACCACCTCATGTGTTTCGTTGCCGTT  
CTGGGGTTCAGCAGAATGCTGTATATCGAGTTCAGTGACAAATATGCGCTACGACACCCTGGAAAGAAAT  
GCCACCGTAATGCGTTCAGCTTCTTCGGTGGCGTACCGCGTGAAGTGCTCTACGACAACATGAAAAC  
GGTAGTGCTACAGCGGATGCTTATCGGGCCGGGCAACACCGGTTCAACCCTTCACTGTGGCAGTTC  
GGCAAAGAGATGGGCTTCTCTCCACGGCTGTGCCGCCCTTCAGAGCACAGACTAAAGGCAAGGTGG  
AGCGGATGGTGCAGTACACCCGCAACAGCTTCTACATCCCGCTAATGACTCGCCTGCGTCCGTTGGG

**>II-A11**

CGCATGCTGCAGCAGACGATAGAGCAGGCGTTGCTGGAGCAAGGACGCATTACCGAGCGTCCCGGAA  
CCTCTTTTGAGTAAAAATTAACTACTGATTATACAACAATATTTACAAAGAAAGCCGTTCCATAAA  
GCGAAAGTTGGTTAGTAAAACAGTAACAAGCAGCAAGATTTCAAATTTCTCTGAGGTGTTTCGTG  
CGCGGGCCAGTCCCCTGAGCCGATATTTCAAACCTTAAGAATGTGGCGCTCCACAACCGGTGAGCAG  
GCTCGGTCTCCGAGAAGCCTTAAAGTTGTGACGTTATGTTACACCTGAACCCCGGGTTCAAGGGTTA  
CAGCCTGCTACGGCACCTCGGAGATTCCTAAAACGCCAGTCTGCCGCGGAGTCAGCTCCATGTTTC  
CAGGAATCTGCGCTCTCTCCCGTCATCAGTTTCGCCATCGTCTGCGCACGCTGCGCCGTTTCGTTTT  
CCCAC

**>II-A12**

CTCAGCTATGAAATCCGCGTCGCGCATCTGgatcGCCAGGCGGCCAAGGCGCCGGCGGTAGAGGAGG  
CAGCCTATCCGTTGGCGGACgatcTGGAGCGCTTTTATGCCCATCTGGAGCAGACGCTGCACCACAC  
CGGCTTTATCCGCGAGAAGAATCCGGGCCAGGTCATGAACCGCCTGCGCCGCCTGTTACCCGCGCT  
CGTCCGGAGGCACAGGAGCTGAATATCCTGCGCGGGATACTGGCCTCAATTGATAAGTGCGACGCAG  
AACGGCACGAAAGTTAACTGCGACAGCGCTATATCATAGTAGAATGCACGGGTATTTTTGCGCGGA  
CGCTGGCCGAGATTGTCGCGCTTCTCGCGGATGGGCGGCGTCGACAACGGGATAATACCTGACTA  
AAATAGTAGGATAAAATAGTTGACTGAAATAGTCAGGAATGAGAGGATGAAACCGTTGAGCAACACCG  
CGTGTTCCTCTTTTTCCCAAAGGGACTATTAGCCATGAGACTGACATCCAAAGGGCGCTATGCCG  
TAACAGCCATGCTCGATGTGGCGCTTCACTCCAGGAAGGGCCGGTACCGCTGGCGGATATTTCTGA  
ACGCCAGGG

**>II-A13**

GATACCAATCAAGGTTGCTGCTTTACACATGGAGGTTTCTCCTTTGATTATGGTGACGACGAACTAT  
CACATATCGTTATACGCCTGAATGCAGGAGGAAGGCGACGTCCATTCCATTGACCGTCTGTGGAAAA

AATAATGCCGCTGCTAGATACCCTCTGCGGTAGTCATGGGGTCGGACCGGTATGTCATGAGCTGAAT  
ATCGCCCCATCGACGTACTACCGGCACCAAAATTACCGTCAGCACCCCTGAAGCTCGTAGCGATATTT  
TTGATTACATCGAAATGTTTTATAACAGTAGGCGTCGGCATGGTTCGAGTGTTCAGATGTCACCGAC  
AGAATATGAAAACCAATATTATCAACGGCTCAGAAGTGTCTAGATTATCCGTGGCGATTGAGTTCGA  
TTTATTCAGCAAAGCCTC  
TATCATCAGGATAAAATTGAGTGCCTTATCTCGGGCATAAAGTGATTTTCGTCTTCCGGTGTAAATAT  
TCTGAAATTTAAATTATCGAACTTATTGCTGGATAACGACATTATATCTATGCTGGTTGATGTGCA  
TAGATTAACAGGGATTCAATCGCGTTTAGTTCGGTATTATCCTTACTGATAG

**>II-A14-T7**

CGCGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGAAGCTAACGCGTTA  
AATCGACCGACCTGGGGAGTACGGCCGAAGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGACAA  
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGCGAA  
TCCTGTAGAGATACGGGAGTGCCTTCGGGAACGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCG  
TGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGG  
CCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG  
GCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGAACTCGCGAGAGC  
AAGCGGACCTCATAAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAA  
TCGCTAGTAATCGTG

**>II-A14-pBlueII 2R**

GCTAGCGGCAGGGAAGACGGAGAGCGGCAGGGGAGCCTGCCGCCAGGCGGTGTCCGGTTTATTTGTC  
TTGCTGCTGTGCCTTAAGTAAGTCGCGGATTTCCGTTAGCAGTACCTCTTCTGCGCTGGGCGCCGGC  
GGCGTTGCTTCTGCCTTTTGGCGGGCAGCTTGTTCATCAGCTTgatcTGAAGAATACC

**>II-A15**

CGATGCCGACGATGCTCCTTTATGTGTAATGAATAATTACATATAATGTAACGTCAGTTGACGAA  
GGTGATTTTTTCCGTACGCTGCCATTAAATAACTCCCTGGAGCAGTAAAGCAGAGGAAAGCGTGAG  
AAATCGTACAATTGGCAGTATTTTATCGTGGCAGGAACCACCATTGGCGCAGGGATGCTGGCGATG  
CCGCTGGCCGCCCGCGGCGTCCGGCTTTAGCACACGCTGGTGATGCTgatcGCGCTGTGGGCGCTGA  
TGTGCTATACGGCCCTGCTGATGGTCGAGGTCTATCAGCATGCCCCGGCCGATGAGGGGCTGGGCAC  
CTTGGCCCCCGCTATCTGGGGCGTCCCGCCAATGGTTGGCCGGTATCAGCATGCTGTTCTCATG  
TACGCGCTCACCGCGCCTATATCAGCGGCGCCGGTGAGCTGCTGGCTGCCAGCCTGGGGCAGTGGC  
TGTGCTGTCGGTCTCGCCACCCTGGGCGTACTGCTGTTACGCTGGTGGCGGCACGATTGTCAG  
CGTCGGTACCCATTCGGTC

**>II-A16-T7**

TTAAGCTGAAAGAGATTATGGAATACCATAACTTTCCAGCTGGTGAACACTACCACGTCGATGCCG  
TTGATTACCAGCGCGTGTGGACGAAGTATGGCGGTTGCCGACCTGCTGACCAGCATGGTGGTTGA  
CGTTGCCgatcACGGAGCAGGGTTATCGGGTGGCATGACCATCCTGAGAGAGTTCATACGTTCACT  
TGCCATTCCTCAGGAACAGGAGCCTGTCGTGCGCTTCGAAACAGAGCCAGGACGACAGATGCAGGTT  
GACTGGGGCACCATGCGTAATGGCAAATCACCACTTCATGTGTTTCGTTGCCGTTCTGGGGTTCAGCA  
GAATGCTGTATATCGAGTTCCTGACAATATGCGCTACGACACCCTGGAAGAATGCCACCGTAATGC  
GTTGAGCTTCTTCGGTGGCGTACCGCGTGAAGTGTCTACGACAACATGAAAACGGTAGTGCTACAG  
CGCGATGCTTATCGGGCCGGGCAACACCGGTTCAACCCCTCACTGTGGCAGTTCGGCAAAGAGATGG  
GCTTCTCTCCACGGCTGTGCCGCCCTTCAGAGCACAGACTAAAGGCAAGGTGGAGCGGATGGTGCA  
GTACACCCGCAACAGCTTCTACATCCCGCTAATGACTCGCCTGCGTCCGTTGGG

**>II-A16 pBlueII 2R**

CTGGTTAGATTTCATCGTGCCTCTCTCAATAGGCTAGTTCAATTTTTCTGAGGCGGTCAAAAAGCGC  
CGCCGGTATTTGTTGCCACGACGCTTGGTTTCTGTTTACACACCACCTGGTGATGGCTGACGTATCG  
TCAACACTGACTCATATTGCATAACATTTGCCGTGAGCGTGAACCGGGGAGATGCCAGGCGGGGCGC  
GGTCTGGCGAGGCGTTTGGCTCAAAAATATTTGAATGATTAAAAAAAAGTTGGATTGCGTGTGA  
TTAATGCCGGGAATGGCGTAAATATCTCTCTCGAAATAGAGATATAGCTCACACTTTTAAGGAGTTTA  
AGATGAAACAAGTTAAATCCTTTATGCAC

**>II-A17**

TCCGCCAGCGCTCGCTCCCAGGTTCCGCCAGCAGCGGATAGCCACCCTGCAGGGCGCTGCGAA  
CCAGCGGACCATACTGCGCCACGGCCAGCCCGACGACCACTGCAGCCGGGCCACCACCTGCGCATC  
CGACAGCGATGGCTGGCGCGCCGCCACGCGGCTGCTgatcCGGGCTTAGCATCTCCAACAGC  
ACGCTGCCCTGCGGCCGAGGGCCGACATCTGCAGCAGTAGCCAGTGGGCgatcTGCTGATGACGCG  
GGTTATCGTGCCGTTCCGCCGACGATGACCCGCGGCGATGCCGCCAAACGCTGGGCCAGCTGCGTCGG  
CGTCAGCGTCTGGCCATCCACCAGTGACACAATCCGCTCTGCCACCGGCGCCGGCGTTTGGCATCCG  
CTCAGCGCCAGCAGCGCCAGGGTCAACAGCATCGTTTCGCATCgatcCTCCCTCGCCACCGCGTCACC  
CGGTACGGGGGCGCAGAGCATAACATCGCCCCGGCAGCGCCAGGGGTTCAATAGAGACAAAAATGC  
CGCCCGCAGGCGGCATTATCACAGCGCTACAGCGCCCTGCTCTGGGCCTCCACCACCGACAGCGCCA  
CCATATTGACGATGCGGCGCACGGAGGCgatcGGCGTCAGGATATGCACCGGCTTACTgatcATGGC  
GTTTACGATGCTGTTTCGCTGGTATTTTGGTCCACGTTGGCGATACTTTCAGCCTGACGAAGAGCGG  
CGCATCGGCGATTGAGAGCCTGCTCTATTACGGCGTGGGTGGCTGGCGTGGCCTGCCTGGGGACG  
GGAACTATTCCATATTGAAGACGGCGCGCTGGCGTTAGCGCCGCTAGGGCCGCCCGGGGCGCG  
CCGCGGGTGGGGGATAGGGCGCGCCCCGGCGTGGGTTTTTAGCGCCGCGGCGTGATTAGCGCATGC  
CTGTGCGCATTTCTGTGTTAAACTGAAAGCGTTTTTTTGCAAGTTCATGTCTGAGGTGAATCTGAACA

CGCCCACCCAGCTTTCATTGCCGCTCTATCTGCCCGACGATGAAACCTTTGCCAGTTTCTACGCGGG  
GGAGAATGCCGCGCTGCTCGCTGCGCTGCAGAATGCATTACGTCAAGAGCACG

**>II-A18-T7**

CAAGATTGCTCATCATACCAGATGGCAACCCCGCTGATATAGCGCCGATAGCGCTTAAACATACAAA  
CTGTGCCACGGCGGCAAAAGCCACGTGCGAATGCGAAATGCGAATAAAAATTCATTTTCTATTGAGC  
CTGCGGCAGCAGTAGATATATAAA AAGACTCATTATCAATAATGCGGAGAGAgatcTCCCTGTTGT  
GCCGCGGTTGTTGCGCCTGATGTAAGCGGAGTCACCCCCAAAAAGGCAGAGTTTATCTCTGCCTTT  
TTGCGTTCGTGTCACCCGCCGTGCGATAGAAACATCCCGCGCTCACGGAACAACGTGGGATAACGG  
TCTGAGCGCCGACGCCACGCACGGTTACGGAGCACGCCCTCGTACCCTATAACGCTGGTATGTCAGC  
GAAATGACACGGCAGCGCGGTGCGGGGGCGAGGGGGGAAACGGACATGGTGATAGCCGGTTGGCGCG  
ACCTGACGGGATGTTTCAGAAAAACCAACGGGGGCTTCGTTATCACCGAATTATCTGGTCTAGCAG  
CTCACAAAAAGTAGATTTAGCGACGCGGAGAATTGCGCCGTGCGCTGCCTGTGAGATAATGAGCCGG  
TTGCGGGGATTCGCGTAAAAATCCGCTGAACGACTCCCGATTCTGACA

**>II-A18 pBlueII 2R**

CGTGAAGAACGTCTGCTGAAAGTACTGCGCGCGCCGACGTTTCTGAAAAAGCGTCTATGGCGATGG  
AAAAGAACAACACCATCGTTCTCAAAGTTGCTACAGATGCAACCAAAGCAGAAATCAAAGCCGCAGT  
TAAGAAACTGTTCGAAGTTGAAGTTGACACTGTTGCGACCCTGGTTGTTAAAGGGAAAGTGAAGCGT  
CACGGTCAGCGTATCGGTCGTCGTAGCGACTGGAAAAAAGCTTACGTCACCCTGAAAGAAGGCCAGA  
ATCTGGACTTCATCGGCGGCGCAGAGTAAGTCGGAGGAGTAGCGAACAATGGCAATTGTTAAATGTA  
AACCAGACTCTCCGGGTCGTCGCCACGTGTTAAAGTGGTTAACCTGAGCTGCACAAGGGCAAACC  
GTTGCCCCGCTGCTGGAGAAAAACAGCAAGACCGGTGGTTCGTAACAACAACGGCCGCATCACCACT  
CGTCACATCGGTGGTGGTCACAAACAGCAGTATCGTCTGATTGACTTCAAACGCAATAAAGACGGTA  
TCCCGGCTGTTGTTGAGCGTCTGGAGTACgatcTAAACGCGCCAGCGTCTCCAGAATATTCAGCCG  
GAGGTTTCCCAAAAAGTTGTTACCTGCGTCGGCTTACCATGCCGgatcGTCAGCCATCCATCGCGCG  
CTAAACGCTGCAGTACCTCACGCAGGGTAGTACGGGTAACGCCAATCAGCTCAGACAACCTCTCGCTC  
TGCGGGCAGGATAGAACCGGGTGGGAAACGGTTATTCAAATACTTTCAATTAATACTCTTCCGCA  
AAACCAGCTGGACTCTGCGCCTTA

**>II-A19**

TGGGCTGCGGCAACGGCGTCTGGGACTGGCGGCGCTGAGCAGCAGCCCGCAGGCTCGGGTGTCTGTT  
TGCCGATGAGTCTATATGGCGGTGGCCTCGGCGCGCCTGAACCTGCAGCATTAACCGTCCGCAGGAT  
TTGGCGCGCTGCGAGTTCTGGGTCGGTAACGGGCTGGCGGGGCGGAAGGCGGCACGCTGGACGCGG  
TGCTGTGTAACCCGCCGTTTCATCAGCAGCATTTCGATTACCgatcAGGTGGCGTGGGACATGTTCTG  
CGCCGCGCGGCTGTTTGAAGCGCAACGGGGCGCTGTATATCGTCGGCAACCGTCACCTGGACTAT

TATCCGAAGCTGCGTCGTCTGTTTGGCAACTGCGCTACCCTGGGAATGAACCGCAAATTTGTGGTGC  
TCAAGGCGGTGAAAACGG  
CCTGAACGCCGCGCTATATTGAAATAAATACGCATGGAAAAGTGAATAAATATTGGTCATGSCATGAT  
TTTTGGTTATGCTGAACGCGGTTATCCTCGCTCAACCGTTATCCAATATTGTCTTCCGACGCCGAC  
CGAACCGGGGCTCCCCCGCTCGGTGAGCCGAAAAAGAAAAGGACTTTGCCATGgatcACGGAGC  
AGGTTATCGTGGTGGCATGACCATCCTGAGAGAGTTCATACGTTCACTTGCCATTCTCAGGAACA  
GGAGCCTGTCGTGCGTTTCGAAACAGAGCCAGGACGACAGATGCAGGTTGACTGGGGCACCATGCGT  
AATGGCAAATCACCACTTCATGTGTTGCTTCCGTTCTGGGGTTCAGCAGAATGCTGTATATCGAGT  
TCACTGACAATATGCGCTACGACACCCGGAAGAATGCCACCGTAATGCGTTCAGCTTCTTCGGTGG  
CGTACCGCGTGAAGTGCTCTACGACAACATGAAAACGGTAGTGCTACAGCGCGATGCTTATCGGGCC  
GGGCAACACCGGTTCAACCCCTCACTGTGGCAGTTCCGGCAAAGAGATGGGCTTCTCTCCACGGCTGT  
GCCGCCCTTCAGAGCACAGACTAAAGGCAAGGTGGAGCGGATGGTGCAGTACACCCGCAACAGCTT  
CTACATCCCGCTAATGACTCGCTGCGTCCGTTGGG

**>II-A20-T7**

CTTCACACTTTTTATTAAGCCGGTTGAAGTTATTATAGGTGCAATTACAATACTAAAACACTGGAT  
TGTTACTGCACCTGCAGGCAAACCTgatcAGGCTCTTGGCAATGCCCGGCGGCCGAGCAGGAAGA  
CGCTTCGCCGCACAGCGCAGCCAGCAGACACAGGCGTACCGCCTGCTGCCGCTCATAACAGTCCAGA  
CTCCAGCGCCTGGCTCAGTCGTGAAATACGTTCCGGCCAATTGGCGAGGTTGCGTCATAATATTCTCT  
ATTCAATGACATGGATGATTTTGTGTATCCATTTATAACCTGTATGACCAGCTTTTTATTTTCATTCA  
CGGCCATCGGGGAGATATTCACCGGCAACCGCGCGGCGTCACATGCTGTTTGTACATAATCAA  
TATTCTTTCGGGTTTACAGTGGGAATACATGGGTATTTATGCATACTGTGCAACCTTTATCTGCGC  
TCGGGATGTTGGCGCATTGATGGCTGACGGAATTTCAAACGAAAAATGATATGAGTACAGAACAGA  
AACGTTCACTGACTACGTTGACGCTGGCCGCTATCGGCGCTGCTGATGGCGATATCGGCACCACTCC  
GCTGTATACCCTGCGCGAGTGTTCGCGGCACTATGGATTTGAGGTGAAGCCTGA

**>II-A20-pBlueII 2R**

CGTCAGGTCGGCGGTTGGCCGCTGGCGGTTTTCCACGGGAGGGTTTCAGCAGACTTTCGCGCAGG  
GGAGTCAGGTTGAACGCCCTTATATCCCTGATACATGTCATACTCCATCAGCTGTTTCACGCCGGAA  
CGCTGGCGTAAAACGGCAAATTAGCCGATGGTGTATGGCAGTAGTCACAGCCTTTTTCGCTCAGTAT  
CCCCAATACCTGCGCATTAAGCGGTGAACTTGCCGGTTCACCTCGGTACGGTATTACGCTGTTTGTCA  
TGATTATAGACATAGCCGACCAACCTAAGTAGCAGGCGAGACCGGCAATGACGATGCCCTCCGCCC  
ATTTGCTTATTTTTTTCATTGTTACAAAACCTTTTTGAGAGTGTCAATACGGCTGCGGAGGCAGCC  
GACAAATGTCGGCGAACCGACGCGCCCATAGTGCAGGGTGGTCTCGCGTCGATATTTGATAAGTGTC  
AACGATAGATGCAGGGATAACCTATCATTAAAGATAGGAATCGACAATTAAGCGCGTTTTGTTAGATG  
TATATACTGTCTTTAGGCCGGATTTGGCGATTAATTTATAATTTACAGGGTAATACTATCTGTTTTC

TGACAGATgatcTGACTCGCCGTACCAACGCCATCGGCTGGACGACCGTGTGGCGAGAGGCACCGG  
CGCTGACGCCGCGGcGatcGCATCGTCAGTGAACGCCGGCTTATTATGCGTTGGTTGGATAGAGAGA  
TTACGCCGATAATGAATTCCCTTTCACCATACTTAATTGCATTATGATTATCTCTGTTGATATAGGT  
CGGCGCGGTgatcGCCAACCATA

**>II-A21**

AGCTGCGCCTTGAATACCGCATAGTTCCGGTTTTGCAGGGCATCGTAGAATACCCGGTCCACTCGT  
TAAACAGGACATTGAGGTACACCGCGCCAGGGTCAGGACGACGATGGCGAGCAGACGGTCCAGGC  
GCTGACTTTTTCTTCTGAAACCCAGTAGGGCCTgatcAGCTGCCACACTTCCCGCCAGTGGGTGGCT  
TTTTGGGTGAAATGCATGCGATGACTTTCCTACAGCATGAAAATAATAAAAAGGGGTGTCCGTTTAG  
GCCACGGGACATGACAAACGTTCTGTGGCCAAATGTAAGTAATTTAATGATATGCCGAACGTTTAG  
GATACCCCGTTCGTAATGGCGGGCGATTATCGGGACGGTTCGCGCCGCTGTGCGGCGGCGGGGg  
atcAGCGGGAGGCGACCTGACGGGCGAACAGCTCCCGAAAGACCGGGTAGATGTCTGCGGCTCCCG  
GATATGCTGCATGGCAAAGTTGTCGCAGCGCTGGCTCAGCCCCTCATACTCTCGCCATAGGGTCTGG  
TGGGCGGGCGGGTgATTTTCGATATAGCAATAGTAGCGTACCAGCGGCAGCAGCCGGGTGGTgAGCA  
GCTGCTGGCACAGGGGGGAGTCATCGGCCAGTTGTGCGCGTCCGAGGCCTGGGCGGCATAGATGTT  
CCACTGAGCGGgatcCGCATGCTGCAGCAGACGATAGAGCAGGCGTTGCTGGAGCAAGGACGCATTA  
CCGAGCGTCCCGAACCTCTTTGAGTAAAAATTAACCTACTGATTATAACAATATTTACAAAGA  
AAGCCGTTCCATAAAGCGAAAGTTGCTGTAATAAAGCAGTAACAAAGCAGCAAGATTTCAAATTT  
TCTGAGGTGTTCTGTCGCGGGCCAGTCCCTGAGCCGATATTTCAAACCTTAAGAATGTGGCGCTCC  
ACAACCGGTGAGCAGGCTCGGTCTCCGAGAAGCCTTAAAGTTGTGACGTTATGTTACCTTGAACCC  
CGGTTCAAGGGTTACAGCTGCTACGGCACCTCGGAGATTCCCTAAAACGCCAGTCTGCGCGGA  
GTCAGCTCCATGTTCCAGGAATCTGCGCTCTTCCCGTCATCAGTTTCGCCATCGTCTGCGCACGC  
TGCGCCGTTGCTTTCCACgatcAGCAGAATCAGGCCGCCCTTGCCTCAAAGatcGCCTGCTAAT  
GCTGCGCGACTGAGCCAGCCGCGACACATCGCGCTCTATTTACCCTTTGACGGCGAGCCGGATACC  
CAGCCGCTgatcTA

**>II-A23**

CAGTACTCATCACCTCAACCTCGACGCTGGGCTTCTTCGTCGACTTTATCAACATTGGTTATGATA  
TGGAGATAAAGGCGCACTCGATAGGCACTATCCTGATGTGGAACAATCTGGAAAAGCGACCGAGAA  
AGCCATGCCCTCGCGCTCCCGCTGCATTTCTCTTCGGCTTTATGTCAGGAAAATACAAGCAGCGG  
TGGTCAATCCGGTTCGGCTCGGCAGAACCCTGATATAGCCGCCGACGGCGCTAGCGCCATTTTCG  
CCCCACGCCGGGCGCGCCGCTAAGCCCACTGTGCCAGAGTGCAGTGGGCATATCGCCCCCTTAC  
CAACGCTCGCAGAGGGCGCCATCGGCAGCTGAAAATAATCTCAACTTACCTTACCAGATAACTA  
TGATAGTATTTGTAATACCATTAAGTATTACCTAACGAGATAATACCGTGAATAACAACATT  
TATTTTCTCTGTATCTATCTACCGCCCCCTACTGCTCTCCGCCTGCGCCCAACCTGAAAGCAG

CGCCGCGCGCCACGCTAAACACCTCACCTACGCCTCCGATGATAATTTGACCCCTAACTACCGCACT  
AAACTCTATGACTCATAACCAATCCTCCATCCCCTTTTTGCAGCAGTTCTGGGAACTAGGGAAAAA

**>II-A24**

TGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCTCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGG  
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGATTTGGAGGTTGTGCCCT  
TGAGGCGTGGCTTCCGAAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAA  
CTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAG  
AACCTTACCTACTCTTGACATCCAGCGAATCCTGTAGAGATACGGGAGTGCCCTTCGGGAACGCTGAG  
ACAGGTGCTGCATGGCTGCTGACGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA  
ACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTTCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAG  
GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTTGCTACAATGGCG  
TATACAAAGAGAAGCAAACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGA  
GTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGgatcCGGCGGCGATGCTGAATAC  
CTTTCGCAGCGGCGACAGCAATAATACCCCGCAGTACAGCAACCCCGCTTCGACGCCGTGCTGGCG  
CAGGCGTCGCGCAGTCAGgatcCGGCGGCGCGCCAGCGGCTGTTCCAGCAGGCAGAGGCGCTGCTGG  
CCGAGGATGTGCCGACCATTCCGCTATACCACTACGTGACGCTGCGGCTGGTGAAGCCCTATGTCGG  
CGGGTACCAGCCGGCAACATCGACTACCTCTATAGCAAGGACATGTATATCCGCGCTCACTGACGC  
GCTCAGGCGCGGCCgatcGCGGGGGCCGCGCGGCGGACGTCTACAGAAACAGCTCCAGCAGGGAG  
TTGAGGAACAGCTTGCCGTGGGGGTGACCTGCCAGTGGCTGGGGGTCTCGCTGATGTAGCCCTGCG  
CCAGCGCCGCTCCAGCTGCGGGCGAATCGTGGCTTCGTCCACGCCGATATAGGCGCTGAAGTCGGC  
GCGCGGCGCCGTTCCAGCAGACGGAAGCGGTTTATAAAGAACTCAAACGGCCTCTCCGCCATGGCC  
ACCTGCTGCCGTTgatcCAGGTAGTTGCCCTGCATATAGCCGCGCGGGTGGCGGGTTTTGGCGGCTC  
GCTCAATGCGTCCGTCGCGAAGGTGAGCTTGCCATGCGCGCTGCAGCCgatcCCAGATAGTCGCC  
GAAGCGCCAGTAGTTGAGGTTGTGCTGGCACTGACGTCCCGGCAGGGCATAGGCGGAGGTTTCATAC  
TGCTGGTAGCCCGACGCGCGCAGCAGACgatcGCCCTGCTCAAA

**>II-A26**

ACGGTCAATATAATATGCATATTTGGCTCTCTCCGGCGATAGCGAAACAGGTGGCGATTGCGATTCA  
TGACCGATTAGTGCAACGAAGCCACAAAATAAAGACAACTGGATGTCAACCTACGTAAATTCGAG  
CAACAACCTTGAGCAGACAGAAAAGAAAGTTGGTATCATGCTGCGGCCTGTGCAGGATAAAGGGTATT  
TTGTCTTTCACGATGCCTATGGTTACTTCGAGAAAACCTTTGGCCTGACTCCGTTGGGGCATTTCAC  
GGTCAATCCCGAGATACAGCCTGGCGCACGGCGCTTACACCAAATTCGAACACAGCTGGTTGAGCAA  
AAAGCGTTTTGCGTTTTTGTGAGCCACAGTTCAGGCCAGCCGTTATCTCGGCGATTGCGCAGGGGA  
CCCCTGTTCCGGCAGGGTACGCTA

**>II-A27**

AGGCCGAGTGCCTGGTTACCCTGTGGAACGGCCAGCCTATCGCGGTTACCCCGCCGAACCTTCGTTGA  
GCTGAAATCGTTGAGACCgatcCGGGCCTGAAAGGGGATACCGCCGGTACCGGCGGCAAGCCGGCA  
ACCCTGACCACCGGCGCCGTGGTTAAGGTTCCGCTGTTTCGTTCAgatcGGCGAAGTCATCAAGGTGG  
ATACCCGCTCTGGCGAATATGTCTCCCGCGTGAAGTAATCCCTCTCGCTGAAGAAAACCGCGCCTGG  
CGCGGTTTTTTTTTGTCTATCGCGGCGCATGGCGTTCCCATCATCGGCCGGGAAGCGSTATGSTATAGAG  
AAACACCTGGGGATGCCGCTACGGCTCCTCCTGTGCGGGACGACCCGCACATGCCGCTTTTTTCAG  
GGACGCCCTGCCCGTCGTTGGACACCATCATGTCTTGATTGTATTGCTGATAGCCGGCTGCTCG  
AAGTGGTCTGGGCCATCAGTTTAAAGTATTCCCATGGATTTACCCGCTCTGTGGCCAGCGTGGTTAC  
GCTGCTGGCGATGGCCGCTAGCGTGCTGCTGCTGGCCCATGCGATGAAAACCCTGCCAGCCGGTACC  
GCCTATGCGGTCTGGACCGGCATTGGCGCGTTCGGCGCCG

**>II-A28**

CTCAGCTATGAAATCCGCGTCGCGCATCTGgatcGCCAGGCGGCCAAGGCGCCGGCGGTAGAGGAGG  
CAGCCTATCCGCTGGCGGACgatcTGGAGCGCTTTTATGCCCATCTGGAGCAGACGCTGCACCACAC  
CGGCTTTATCCGCGAGAAGAATCCGGGCCAGGTCATGAACCGCTGCGCCGCTGTTACCCGCGCT  
CGTCCGAGGCACAGGAGCTGAATATCCTGCGCGGGATACTGGCCTCAATTGATAAGTGCACGCAG  
AACGGCACGAAAGTTAACTGCGACAGCGGCTATATCAACTAGAAATGCACGGGTATTTTTGCGCGGA  
CGCTGGCCGAGATTGTCGCGCGTTTCTCGCGGATGGGCGGCGTCGACAACGGGATAATACCTGACTA  
AAATAGTAGGATAAATAGTTGACTGAAATAGTCAGGAATGAGAGGATGAAACCGTTGAGCAACACCG  
CGTGTTCCTACTCTTTTTCCCAAAGGGACTATTAGCCATGAGACTGACATCCAAAGGGCGCTATGCCG  
TAACAGCCATGCTCGATGTGGCGCTTCACTCCAGGAAGGGCCGGTACCGCTGGCGGATATTTCTGA  
ACGCCAGG

**>II-A29**

TCACGCTAAAGGTAGCCCTCCGCCCCTGAATATGCAAACCGCGGCGCACCGGGAGTGCAGGCGGAAA  
AAGGGACGCGGACGCCCTGCGCGGACATCAATATCTTTTTGTTAACAACATAGAGTTAACAAATTT  
ATTAATAAGCGTTAATAAAAAGTGTGACGCCGCTTTGGCGACGGAATTACCATTAATTAACgatc  
GTTAAAATAATAGATAAACGACCCGTATACCATAGCGTCACTGC

**>II-A3**

GCTGCCTGGCTGGCGACTGTTTACGATTTACGCCGTTTTACGCCGAGTAACACGACGTCATATCGC  
CTTATGCTATACTCTCTCCCGTTGAGTCCGAGACGGGGGAGAGCCAGCGGCCTGACCCAACTTG  
GTTTCCCGCTGATATGGTTTTATTCTCCTCGGTGCGCCGAAGCGGCGTATGCTTCTGTGAAGTC  
ACTGTTGCAGATTTGTGCAATAATATCCGCTATAATAGTGAACCTGTGGGATGACTCACGGTCAAT

TATGCAGAATCGTGCTAACTTTCGTTGTTGGCCCTTTTGCCCGGCCGGAAGCTGTAGTGCACGGAC  
TGTTATCGTATTGAGAGGGTTTGATGACCAAAGAAATGCAAACCTTTAACCTTGGTTCCCCAGGGCAG  
TCTGGAGGCCTACGTGCGGGCTGCCAACGCCTATCCGATGCTGACGGCAGAGGAAGAGCGGGCGCTG  
GGGAACGGCTGCATTACAAGGGAGACCTGGATGCCGCCAAACAGCT

**>II-A4**

GCCCCAGGCATGCCGCCTTCGGCGCGCCGGATGCGCCCGGTTGAGCCCGCTTATCGGTCGTCGTC  
ACGATGCCGGTCAGCCGCGGGCCAAGGGGGCAGAGTGCCGACATGACGCGGCCAGTCCATGGCCGC  
CGCCGAGGGCGACCACACAGTCCAATCAGCCAGGGTGCGGTTTCGCATAGGGTTCCTTTTCGGGCG  
CAGTGGGGGCGCTACGATAGCGgatcGGCGGAAAAAGCGAAGCCGCGCGCGGTTGCGTGACAT  
GTATCAATTGCAACCGGCGTGATTTTGGTACTATGAAGACTAAGCTACTGAGATATAAGCGTTATA  
TTTTTGATTATATAACGCTTGGCCGCTGCAGAAGGTGCGGCTGAGCGCCTGCGCTGCACCGGTCCGT  
TGACCGTCGCGTCTTTTTTGCCCGGAGTGCCTGCGCCGTCAGAGCAAAGAAGATGTTTCAGCA  
ACAGCCGCTATGGCCTGCGGCAGCACGCCCGCGCGGGTATTTTTGAACTCCGAGCCCTGATGC  
CTAAGTGTGCGCTCCTGCGCAGATAAGGTCTCTTGCCGCTGGCTTCGCGCCACCAGGGTGTGAGGTA  
GAAATGCCGGCGCTCCCGACTTGAAAAGGTGTTTATCGTGTCCAGTTAACCGACGCATTTGCGCG  
CACATCTATTATCTGCGCCTGTCAGTCACCGATGTGTGCAACTTTGTTGCACCTACTGCCTGCCG  
GACGGCTATCGTCCAGATAGCCACGCTGCCAAGCGCTTCTTATCGCGCGATGA

**>II-A5**

GCAGTATCCAGCGGATTCTGCAGGAGGTGAGAAAACGAGTCGCTGCTgatcGCCCTGAAGGACGCGG  
ACGAAGCGCTGACGCGAGAAGTTCATGCGCAATATGTCCAGCGTGCGCCGATATCCTGCGCGACG  
ACCTGGCGACCCGCGTCCGATACGTCTGTGCTGGTCGAGGCGGAGCAGAAGTCTATCCTGCTCAT  
CGTCCGCCGCTTGCGGAGACCGGCGAgatcGTGATTGGCGGCGGAGGATACCTATGTCTAACTC  
TCCGTTCCGTAAACAGGTGCTGCCAAGGGCAGCCCCGAAGCCAGCgatcCGCGCTGGAAGCGCTGG  
GAAATGCATGACTTTGCCGCGCCGCGCCGACCGCTGCGTCCGCGCATTGAGGCGGACGAGCAGAGCG  
ACGGCGCCGCGCAGTGCAGCCAGCCAGGCTGCCGCCAGGCCGAAGCGGAGCGTCTGCGTCACGA  
CGCACAGCAGCAGGGGCTGC

**>II-A5-pBlueII 2R**

TGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCTCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGG  
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGATTTGGAGGTTGTGCCCT  
TGAGGCGTGGCTTCCGAAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAA  
CTCAAATGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAG  
AACCTTACCTACTCTTGACATCCAGCGAATCCTGTAGAGATACGGGAGTGCCTTCGGGAACGCTGAG  
ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA

ACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAG  
GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGCTGCTACAATGGCG  
TATACAAAGAGAAGCGAACTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGA  
GTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG

**>II-A6-pBlueII 2R**

TGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCTCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGG  
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCT  
TGAGGCGTGGCTTCGGAAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAA  
CTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAG  
AACCTTACCTACTCTTGACATCCAGCGAATCCTGTAGAGATACGGGAGTGCCTTCGGGAACGCTGAG  
ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTACGTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA  
ACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAG  
GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGCTGCTACAATGGCG  
TATACAAAGAGAAGCGAACTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGA  
GTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTG

**>II-A7**

CCGCGCCTGCGCGACGATGCGCGGGCTACGGGCCGCGGGGCGGATTTTATCGCCACGTCGCCA  
TTCCCGACCGGTGGAGGCGGCCTTTACACGGGTGGCGGCTCGCTGGGTGAGCGCTATGGCTTTCG  
TCCGGCCTAAGTGCGCCGCCGGGCGAGGGATATCTCTGCCTCGCCGGGCGCCTAAATGCTAACGGC  
GTCATATTTAGCGCTTTTTCAGTGTCTTGCTGCGCTTACGCCATATAATCGATTATACAACGAT  
ATAACCGAATGAGCGGGGAGATGTGATGAAAGCGTGGAATAGATTACTGGCGGGGGCCGTACTGGCC  
GTCGGCGTCTGCCAGGGCGCCAGGCCGAAGACAAGGTGACAGTCTTTGCCGCCGCTCCCTGACCA  
ACGCGCTGCAGGAGATTGCGGGCAGTATCAGCAGGGCAAGCAGGTGAGCATCGTCACCTCGTTCGC  
CTCTTCTCGACGCTGGCGCGTCA

**>II-A8**

ACCCTCTGTATAACGATTCTACCGATGCTAAAAATCATTGATTTCAGGTCAATAAAATTTACTTTATC  
AAATCGCCATTCCCATATATAGTGTCTCTGACGTAAACGAACACCTATATATAGTAGTTATCCACAA  
AGCATCCACACAACGCGCGTAAAGCCTGATTTACGCGGCTTTGTGCTGTGGATAACCGGTAGATGG  
ATGCACACCACAATCACAGGAGCGAGAAAACGGTGAAACCTATAGTGATTAACGGGACGGTTGTCA  
GGTACCCTTCAACGAACAGCGTATCAAGGAAGCGGTGCTGCGTGCAGCGCTGGCCGCTGACGTGGAT  
GATGCCGATTACTGCGCAACCGTTGCCCGCTAGTCGTATGCAGATGGCCgatcGCGAGCGTGTGG  
ATATCAACGACATCCAGCACGCCGTAGAAAAACCAACTGATGGCGGGCAACTATAAGCAGCTTGC  
CGCCTATATCGAGTACCGTCAC

**>II-B1**

CGCCAGGGCGATAATACCTGCTACGCGTCACCACCCGCGCCGCGCAGCCGCTGGTGTCTACGCTCA  
ACCGCGGCTAACGTCCGCGCCGTCGGTAAGCGAGGGGCGACGCCGCCCTCGCCATCCCGGATACGC  
TTAACCTGAGGCCCACTCGGTAAATATATTATATATCACTGCCGCAACAATATTTATCAGACTA  
ATCCTCTACGTCCAGCGGTTATCCTGACAAAATAGAACTTGCTAAAACCCCCCGTGCGTGAGTTAA  
TGCGATGCTGGTTTGCATCCATTGGGCAAAATTTGCGATTTATTGACCTACGCTCCCGGgatcAC  
CGCCTTGGAGTTAAAGCCGATGCGGGTGAAGAACATCTTCATCTGCTCGATGGTGGTGTCTGGCTC  
TCATCCAGAAATGATAAAGGCATCGTTCAGGGTTCGCGCATATAGGCCAGCGGCGCCACTTCGA  
TGACGTTGCGCTCCATCAGCTTCTCGACCCGTTGGAAGCCGAGCATTTCAAACAGCGCATCGTACAG  
CGGACGCAGGTACGGGTGACCTTTTGGCTGA

**>II-B10**

AGCGAGGCGCCGCGCCGCTGAGAGATGCCCGCAGGTGAGCGAAGAGCTAGATAAGCTGCAGTAAG  
ATAATGGGCGGCGTCTGCTTCGGGAGACGTCGCCTAAAATGCGGTAACGCCTCTACGCTCGCAGAT  
TAAAATAGCCGACATGAACGCCATCGGGTATTTATTCAACAGCCTGCGGTTTTATTTAAGTAATGAA  
ACTAAAATCGCTGTACATATTCCTTTCTCTCGCTGCCCGGTGAAAGTTCTGTATTCTCCATTTTTT  
ATAGATTAGCTATCGTCA TAGTAATAAATTAGATATAAATCCAGCCCTGTAATGTCTTCAGCGCGG  
TGTCAGAAGAATCACTCCAAAACCGTCT

**>II-B11**

TGCGCCGCTCTCAGACAGCCTCCTGGCCCTGACCGCGCGGAGGCGCCACCGGCAACCCCGCCGACAA  
TTACGATTTTCATCTGCTCACCTCATCGAATCCGATTATCAGACCGGCAGCGACCCGGCTCGGCGTT  
GCCAGCTTCCCTCAACATATATAAATAATATAATAATAAAAATAAGAAAGCGTTAGTGAGGAGGCG  
CACGATGACGACATCTCAAATACACCGGCAGATGCAGCGGGCGGCGGCGGACACATCGCG

**>II-B12**

ACCAGATTGGCGACGTTGCGGTGTACAAATAGCTCCCCCGGCTGTAGACCGGTCAACTGCTCCGCCG  
GCACCCGGCTATCGAACAGCCAATCCACAGAAAGCGCGGACGCTGGGACTCTGCCAGCTTGCGGAA  
GAAGGTCGGATTATCCTCCTTTACCTGCTGTGACCATGCCTGGTTGTTGGCgatcGTCACCGGCCTA  
TGTTTCATGTTTATTGAGGCGATGGCCGATGCGGCGGTTTCGTGCCGGGATGCCGCGGGCACAGGCC  
TATCAGTTTTCGGCCCAGGCGGTGATGGGCGCGGCAAAAATGGTGTGGAAACCGGTACGCATCCGG  
CGGAGCTGAAGGATATGGTGTGTTGCGCCGGGCGGCACGACCATTGAGGCGGTGGCCGCGCTGGAGGA  
GAACGGCATGCGTTCGTCGGTgatcGCCGCAAAAATCATCGATACCCTGGGGCTCAATCGCCGCATG  
TATTGAGATGGCGCCTGCCCTGTGCGCCGATCCCTGCGCCGCGGGGCGGGCAAAAAGGCGCTTAT  
TGTGCGACATGACGCATGTAAGAAAGTACATCAACTGCTCACAAAAGCAGCGACGCTCTAT

GATTTGTCGGTAATTGCTTTATCGTgatcGCCCTGATATACCGTCATTATCGCCGCCCCCGCATC  
GCGCGCCAGCTGACAAATCTGCTCTAACATACGCTCTCCTCCCCCTGGTTCGGATACGGATACACCT  
GCGTCATTGCACCATGCGACGCTCGCAGAAATGCGTAGGCGTACCCCACTGTGCTCATCATGGGTTTT  
GCCACCGATAAACGCCAGCGCAAGCGATAATTTTCCCCGGGAAATACGGCAATTCGGCTGCACGCCA  
CAAAGGGATGGCGCACAAATATAAATTCATTTAAAAAACACCTTATAGAGCACACGTTAAGGAGCA  
CATCATGACATACCGC

*Reverse Complement 5'*

GCGGTATGTCATGATGTGCTCCTTAACGTGTGCTCTATAAGGTGTATTTTAAATGCAATTTATATTG  
TGCGCCATCCCTTTTGTGGCGTGCAGCGGAATTGCCGTATTTCCCGGGGAAAATTATCGCTTGCGCT  
GGCGTTTATCGGTGGCAAACCCATGATGAGCACAGTGGGGTACGCCTACGCATTCTGCGAGCGTCG  
CATGGTGCAATGACGCAGGTGTATCCGTATCCGAACCAGGGGGAGGAGAGCGTATG

**>II-B13**

CTCAAGCGCAGCGTACACCAACAGGCGCTACGCAAGGCGGCCACCAGCGGAAAACCTGCTTCTTCC  
TCGGCACCAGCTCCGCGCCGCACCTGCGCGGGCGCAAAGAGTCGGCCTGCGGCTGCGCCGGGGTCTT  
CAACGCGCCGACGGCGCTACAGGCTACGCAACGGTCTTTGACGAGGAGCAGGCGCTGCAGCACCTG  
GAGGCCTTCTGTTCGGAACGACCGGCTTTTATGGACTCCCGCCAATGAGCGTATATTGAGCT  
GGTACAAGAGCCTGCGTCTGTCTGACAGTATCGCCAGCGGTGATGAAACCTgatcTTTACCCTGA  
CTTCAGCTCGACCTTGGCCATCTCAACGGCGCCGATATGGTGCAGCAGCATCCCGCGCGCAAGGCC  
ACATCGGgatcGTTGCTCATCATGCCCTTCATCATATCCTCATGCATGGTGCCATGGCACCGTGCA  
GCTCATGGTGCATCGCCGCCCTGCTCTGCGGGCgatcGGCCGACGCGGGCGCCGCGGCAGC  
GGCCAGTAATAACGCGCTCGCTAACGCTATCGTTTTATACAACGCTCCTGTTCGGTGGGATACTGC  
AGATAATCCTAATCCCTCCCTAAGGGGAAGGTCAAGGGGGCTTTTCGCCGACGCCCCGGCGCCGAG  
TCATATTCAATTCGGTTCTAACTGTTAATTTATATTCTTTAGCGAGCTAACCGCGCCACGCTATAG  
TCCGGACTACCGCTCACTCACCCGGGCCCTTAT

**>II-B14**

CGCCGCCAACGCCGACCCCTGCGCACCGGCTGGAAAATCACCTCGACGGTGAGGTGGCCAA  
ACCGATGACCCTGGATATGGACGATATCCTGCGCCGCTTCCGCTGGAGGAGCGCATCTACCGCATG  
CGCTGCGTAGAGGCTGGTCCATGGTgatcCGCCACCGAATTTTAGGCGCTGTCCGCCCGCCAACGC  
CGCCCGGGCGCCAGAATCGCGGGGTGCGGCTAGCGACCGGCGCAATCGGGTAACATCAGAGG  
TTACCTTCCATTGTTAACCAGAGATACAAAATCCACTATGGCTTCAGTCACTGATACAACAG

**>II-B15**

AGCACCACCACGTCGCCCTCATTGGAGTTCATGCAGCTCATGCGCTGCATGACGATGTCGTCAAAGT  
AGACCACCGAATGTTGAAACGGAAAAATTTGTTTCATGGCGTCATGAGCCACGGCGGGAGGGCC  
CAGGCCGAAGAAAGAAATTTTCTTCGCCTGGGTGAGCagatcGACC GCGGGTTGATGGTGGCCATG  
TCCAGATGGTTTTTGGCCATCTCCAGACCCGCCATCGCCGATTCGAAgatcCACACGCTGGTAGACC  
GCCATCTGACGCCGCCGAGCGCCCCGTGCGCTAAAACTGCTTGCCGTCGCCGGCGTCTTATACGA  
TAATGATTATCATTAAGATGAAGAGCAGAAATTATCCCTACGTACTCACTATGGAAAAAGCGACCCC  
CGATTCACCACGTACCAGACTGACGCAAGAGCGTACTGCGCCGCCGGGAGTACCATCGCCAGTCAC  
ACCCTGCTCGGTGAGGAAGGCCGGGTGACAATTACCCACCAGGGAGAGCACTACCAGCTACGCCAGA  
CCC

**>II-B16**

ATATAATCAAAAGTCATATATTGCAGCGGTGTTGATAGGCGTTTTTACGGAGCTGCGCGGTAGCG  
GGGGCTGTTCAATCAGTCGACAGACGGCGTCCGCCAACGCCTTTGCATCATGGGGAGGGCAGAGCAG  
ACCGTTTTGCTCGTGGGC

**>II-B17**

TCAGCGTCAGCGTGCCTACGCCGTGCGGGTCGACGAGGTAAACGGCCTGCTGCAAAAGGCAGCATC  
GACGGCATTTCATGCTATAGTTGATTACACAGAATTACCGCTGGTCTCGACCGACTTTAATCACGAC  
CCGCACAGCGCCATCGTGGACGGCACCCAGACGCGGGTCAGTGGTCGGCATTGATTAAAACGTTGG  
TCTGGTGTGACAACGAATGGGGCTTCGCCAACCGGATGCTGGATACTACGCTGGCGATGACCCGGGC  
AGTTTCTAATGCGTCGTAGCCGCGTGCGGCGACACAGCTTAAAGCAACTTTTAGAGAATCAATGAGA  
GGATTCACCATGCTGTAAATTAAGATGACCGATTTG

**>II-B18**

TTTAAAAGCACGTCGCTGGCCTACACCATCACCCCTGATGGAGGTGATGGGCTATGCCAGCAGCTGT  
ATGGACGCACCTACGACGTGATGGTCTTCGGCGCCGCCGGCCTGGTCTATCTGTGCGTCAACGGTCT  
ATTGACGCTGATGATGCGCATGATTGAGCGCAGAGCGCTGGCGTTTGGAGCAGCGCAGCTAAACTGTT  
CAACACATTGAAAGGTCGGTTATTACCGACCTTTTTTTACATCCAACAAAAACACAGAAAATATA  
TTTATACATATCTATTGCATAACAATCACTCAATGGCACATTCAACTCCAGCCCCTCGCCTACGCC  
GTCGCGCC

**>II-B19**

CCGCCACCGTTCACGCTGCGCGGAGCCGTCATCAGGCGGCGCCGGCGACGCACGGTCAGCGCGGCG  
GGCGTCGACCCCGCGTGACGCGTACACTTGCAGAACACAGCCTCATGACTCAGACCTCACAGCGCAT  
TTATCTTCTTTGCGGCAGCCTGCTATTGCTGCTGATGGCCGGCTGCTCCAGCCGTCACCACCGCCG  
CGCGCCAGCTATAATCCCCAGGCCACGACGGCATCATCCAGACGGCGGGCCAGTACAATCTGg

atcCGCCACCGAATTTTAGGCGCTGTCCGCCCGCCAACGCCGCCCGGGCGCCAGAATCGCGGGGTG  
CGGCCTAGCGACCGACGGCGCAATCGGGTAACATCAGAGGTTACCTTCCATTGTTTAAACCGAGAGAT  
ACAAAATCCACTATGGCTTCAGTCACTGATACAACAG

**>II-B2**

AATCATGGAGCGTTCCTTGGGCTTCAGAGCAGTTATGCGGTAGCCGATACGTTACCGTAGTGTTCATG  
GCGGATGCCAGAGCGGGTCGTAATTATCCCCCAGGCCGCGGCATAAGGATAAAAAATGCGCGATAA  
CGAGCCTGTATTACGCTGTTTGTGAGCGAACCCAATAATCGGCAATGGTGATTGCGCGCTACTGGC  
TTTGGCGCTATAGTCGGTTTGCCTTATTCTCAGGGCGGGGTGAAAGTCCCTACCGCGGTAATTGGT  
ACGCTTCGGCGTCACTGAAAGCCCGGAGCGCTCGCACGACCATGCGGGGTGAGCA

**>II-B4**

AACTTCAGATTGACCTGATTGGCGCTGGAGACAATACGGCTCTGATAGCGATGCTGGTTACCCCTGC  
ATGTTGCTGGTCTGTACCTTGGCGCCGACGTTCCCTGACGCAGGGCCGCCACATTGTGCGTCTGCA  
CCTTGGCCGTGCTACGCTCGGCAATCTGCACGTCGGTGACCATGGTATAAATGACATCCTCGACCAT  
CGCATCCGCCGCCAGCCC

**>II-B5**

CGTTCGTCGAATTATCGGGGCAACGCTGCATTTTGGACTGGATTAATTAATCCCTTTCGTAHTTAA  
TTCTATTACTCCGCGTGGCGTGGTTATTTTATTTATGGCGCGCCCGGATTCCCGCCGGCGTCTGTC  
TAGCCACGCGGATACCTCAGCAGCGCTGAAAAACGGCGGGCGCGCACGGCGGCAGGGG

**>II-B6**

CGAGCGGGCTGAACTATAAGGCCGGCGACGCTTTCGCGCCGCCGCGCGGGCAAGAGCAACCAGCC  
GGTGGTCTTTATCGACTCCAGCGGACGCAGCTATGCCCTCgatacCGCTGACGCTGCCGTGCGCGCGC  
GGGCAGGGTGAGCCGTGACCGGTAAGCTGACGCCGCCCGGGGGCAACCATCGAACACGTAAGTGA  
TGGCTGCGGACAATCAGAAGCTGCTGATGGCTCCGACGCCGGCTATGGCTTTGTCTGCACCTTTAG  
CgatacCATTGCCAACGGTGAGCAGCGCAGGGCTAAATTACCCGCTCCGTACGTACGCTGCGGTC  
GATATGTATTTAGATGATAAAATAACAAGGTTTAAACAACGGACCGACGCCGAAGCGGCCGCGAGG  
CGCTTCGGGGCATCGCGCTAACTGTGGTAAATGGCGTCAACTATTGGCAGGGAACCGCGACCATG  
ACCACCCCACTTTGCAGCGACTGCTGGCCAGGCAGAACAA

**>II-B7**

TGTGCGTTAATCGTACGTTTTTGGCCGCCAAAAGTGGTTTTATGCGCTTATGTTGCTTTTTTTGTAA  
ACCGTTTAAACCGGTGGCTAAATGCTGATATGCTGAAAAGGCTATCCGGGTATCCGACAGGCGGTCA  
GGCGATGGGTTAGGGCACGGCACGCTACCGGCATCCCGGTATCTACAATGACAATGAGAGCGAGGAG

TCGAGTCGTGCTAAAAGAATACCGTGAGCACGTCGCCGAGCGGGCGGCCCTGGGTGTGGTTCCTAAG  
CCGCTGGACGCGGCGCAGATGGCAGCGCTGGTTGAGCTGCTTAAGTACCGCCGGCGGGCGAGGAGG  
CCCTGCTGCTG

**>II-B8**

AGGGCACCGTTGCGTTGAATATGCTGTTGTAGAGTGGTGAATACAGACATGGCACCTCACCTTGATT  
ACGCTTTAGAAATTGAACTCCATATGAATTTATAATATGGAGCAATACTCCATCAAGGTAAAATGCAG  
CAAAGCGTGAGTAGGGTCAAACATATCGTCCGTGAGCGTGTGACGAGGGAGGGCGGTGGCGGAGTTAA  
ACTCCGCCAGTGGTTTAGCGGGGGTAGAGGCGGTAGGGTCTGCGGGCATCGCGCGGCGGCGCAGCA  
GGTGGATAGCCCAGGCTACGCTCAT

**>II-B9**

GTCGGGCTAGCGCGTTAATTATCGCCCCATTTTGCCTAGATTATCGCCGTAAAATACGCCGCCGA  
GCACCCGCTGATAAGGGGCCCGCGCCGCTGATAGCGCGGGTTGTTTCGCCCATCATTTCTGTAAAA  
TAGCTGTATTCATTGAAATCAACCATATTTTTCCTTAT

**>I-C1**

ATTTACGCCTCCATTTTGGTAGGCGTTCAGGCCAAACTGCGCGAGTTTACGGGTATCGGCCCCGGCC  
ATCAGCCATTCGGTCACCGCTCAAATACCGACGTGACGGCCATAACAACGACGGCGAGGCCTGAC  
GGATAGCGTCCACTGCTCCACGAAGTCTTTGCCGTTAACCGGCTTCCCCTTGGCATTTCGGATGGTTA  
ACCAGCGCCAACGGCTGGTTCAGGGTGCCATCTTTATACTGCTGACCGCGATCATGAGCGTAGCCTG  
GGCTATCCACCTGCTGCGCCCGCGCGATGCCCGCAGACCCTACCGCCTCTACCCCCGCTAAACC  
ACTGGCGGAGTTAACTCCGCCACCGCCCTCCCTCGTCACACGCTCACGGACGATAGTTTGACCCTA  
CTCACGCTTTGCTGCATTTTACCTTGATGAGTATTGCTCCATAATATAAATTCATATGGAGTTCAA  
TTCTAAAGCGTAATCAAGGTGAGGTGCCATGTCTGTATTCACCACTCTACAACAGCATATTCAACGC  
AACGGTGCCCTGATCGGCTCACCATCAGCTCCGATGGCAACGGCAGCGTGCCGCGCTTTGACGCGCA  
GGCAGCATATCGGACTGGACGCGGCGCCGCTGGACGGCAACCTGCAGCTGCTGCCGAGCTGATT  
GACCAGCGTATTTCCCTGCCGAGGCGCTGGCGATGGTACCGCCAACGTGGCCGACGCGCTGGGG

**>I-C2**

CTTTTATCATTTCCGCTGCTGCACCTGATCTGCCCATTCAGGCCGCTCAGACTGTTTTCAGCTCCGGCAG  
CGCCGACTGCAGCTTGGCGCGCAGCCTCTGGGCCACGAACAGCCGGTTGATCTGGCGCCCTACC  
GCATCGAAATCGTCTTCGTCAACGACGGCAGCAGCGACCGGACGGAAGAGGTATCTCCGGAATAAT  
CGATGACGATACCAATACCAACTCAGGCCGCAAGCGCGGATGATCGAACACATCATGCTGGCGAT  
GCAGTTCCCCGTGGAGCTGATCATGAGCGTAGCCTGGGCTATCCACCTGCTGCGCCCGCGCGATG  
CCCCGAGACCCTACCGCCTCTACCCCCCGCTAAACCACTGGCGGAGTTAACTCCGCCACCGCCCTC

CCTCGTCACACGCTCACGGACGATAGTTTGACCCTACTCACGCTTTGCTGCATTTTACCTTGATGGA  
GTATTGCTCCATAATAATAAATTCATATGGAGTTCAATTCTAAAGCGTAATCAAGGTGAGGTGCCATG  
TCTGTATTCACTACTTACAACAGCATATTC AACGCAACGGTGCCCT

**>I-C3**

ACTGGCAGCGCCGGGGGCTGACGATACCGCTGTCGCTGAATGTTTCGGCGCTGCAGCTGGTCGACGC  
CCGCTTTGGCCAACGCCTAGAGACCCTGCTGCAGCAGCACGCGATCCTGCATATGCGCCTGGAAGAA  
GGTATCACTCATCCAGGCGACGCCAAAGACGGAAAAGATAGCGACCATAACCGGCTTTAAAGACGGCG  
CCGCTGGAGATTTGCGCCGGCTTGACCTTACAGGACATCAGGATGATGGCGCCGGCGATCTTCCCGG  
TACCCGAACGGCTCGGGTGGCCGAGTGTGAAAACCTTGTC AACGTC AAGCGGGCTTATTTCCCATCGC  
TGGTATTGATTGCCCCACTCGGCCATATCCAAAAAATGACCACAAAAAACCGCAAGTCTATCG  
GGTGCGGAGGCCGCTTGGAGGTGTTTTCAGCACCTGAGCGGACTATACCCCGACATCGCGGGTAA  
ACTAATTCGATTTATGATACTTTACTTACAAATCATAGGAATGCAATAACCATCCCCTTGAACAG  
TGTGTGGCATATATTTCCCTAATGCTCTTAAAAACCGCCATTCCAGGACGCCAATCCCAGCAACAGA  
TGTTGCCGCTGCCACTACGCTCTAGCGCTCACAATTCGGATGGGCAAGAACTTGGGAAAACATAACA  
ATATTGTTAAGTTTCACTCCATGAACTACACTATTGAGTACTACAGCGAAGAGGTTGCGCTTGGAGT  
C

**>I-C4**

GTGGGTGACGAAGATAAAGGTGATGCCAGCTTGCGCTGCAGCGCCTTCAGCTCGTTCTGCATCTGC  
TTGCGCAGCTTGTAGTCCAGCGCCGACAGCGACTCGTCCAGCAGCAGTACCCGCGGCTTATTGACCA  
CCGCGCGGGCGATGGCCACCCGCTGCTGCTGGCCCGGAGAGCTGATGCGGGCGGGCGCTGGGCCAG  
CTCGTCCAGCTGTACCATGCGCAGGGCATCCATGACCGCGGGCGCGATGTCATGGTGGGGGTTTTTC  
TGCATGCGCAGGCCAAAGGCCACGTTTTTCAAAGACGCTCATGTGCGGAAACAGGGCGTAGCTCTGGA  
AGACGGTGTGACGTGGCGCTGTTGCGCGGGCTGGTGGGTTATCTCCTCTCCGTCCAGCGCGACCTG  
GCCGCTGTCGACCTTCCAGCCCGCGATCTGCTGGTGTGCTGGGTAACGCCCTGCTGCCGACCG  
CCTGGCGCAGCTTTGACGCCGTACGCGCCGGCGTGGCGCCGGCTGCTGATCCGGCACCGGCACCG  
CCGACATCAGCGCCTTGGTGTAGGGGTGCTGTGGGTTGTGATACACCTCATCATAGGTACCCAGCTC  
CACCGCATGTCCAAAATACATCACCAGCACGGGTGCGAGATATGCTTACCACCGCCAGATCGAGG  
AGTGTGCTCATAGTGAAATTCCTGGGTATGGCAGAAAGGGCTCAGGGACTGTCCAACGGGAGC

**>I-C4 (2)**

GCGCATCGTTTTGAAAGTCTTTGGTTGTTATTTCGAAAGTTTGTGAAAGCAATCATATTTTCGGTT  
GTTTATGTTGAAAGCAATCGTAATGTATTAATCTTAGGTCGAGGCCTGTTGAAGTTTCGCTTTAACC  
GGTTTCGTAAGGGACAAAAGTAAAAGCGGCAGCAATCGAAAGGCGCATGAAATCTTCAACGTAGT  
GACCGCCAAAGGAAGGCACGCGTTGAGGAGTTGGCCGACGGTTTAAACGTCTCAAGCGTCACCATC

CGCAGTGACCTGACTTTTCTGGAAGAGAACGGCTACATCGTGCGTTTCGCACGGCGGGCAATCCCCA  
ATACCGGGGTGATCTCGTCGCGGTTTTACATAGGTGGGTATGCAGATAGGTGTCGGGGTACTCTTC  
GCGCAGGCGCTGGGCCATCGCCAGCTGCTCCGGGCTGGAGGTCGGCGCAAAGCGCGGCGTCACCGCG  
TACAGCAGGCGCCATTCTTGTGCCAGCGTCGATCAGGGTATTGATGTTGTCGGCCATGCGGTTAA  
ACCGACCCCTAAGCGATGCAGGCTGGAGGTGCTGTGCGAAGTGCCTGCGCTCCTGCAGGTGCCCTTC  
GCCAGGCGCTGGGCGGCGTTCTCCAGCCTGAGCAGATCTGCTCTCCTACCTGCGGGTGTGACCAA  
CCCGGATGATGACAGTGCCTTTTTGCGTATCGTCAATACGCCGGCGGAGA

**>I-C5**

GCTTGGCGTTATTTGCTGAGTAGTCTTCATTTTCGCGCTGCGATAAAAAGAACCATCGGTTCGTGGCCTG  
ATTGCCACCAGTATCGTCGTGCAGGCCATGGCCTGACCGACGCACAGCGTAGCGATCCGTTTGCCG  
CCGCCGTGATGATGTAGTAGCCAAGCTGGTTGATAAGCGCGACGTCTGAATTTAACTGGTGAAGAA  
TTCGCGTTACATCCGCCATATCCTGCGCGGTTAACTCAGTAATTTGTTCTAAATTCATTGTTTT  
ATTTCAACTGTGTATGGATGTCCCGCCAGGCGGAGCCCTTGCCAGGCTGCCATGGGCAGCCAATA  
TAGTATGATTGTACTTGAAAAATGATTTAGATAAACGGCGGGGAGAAAACGTGCTTTTTTTCTTCT  
TTTCTCCTGATTCTACCCCTTGCTCTCTGAATGATTTTTGCGTACAATTCGCGCCCTATTGTGAATAT  
TTATAGCGCGTATCGGACTATGAGCCATGCGTGCGGAAATGCGGAGTTTTATATGTACGCGGTTTTC  
CAAAGTGGTGGTAAACAACACCGAGTAAGCGAAGGCCAGACCGTTTCGCTTGAAAAGCTGGACATCG  
CAACTGGTAAAACGTGAGTTGACCAGATTCTGATGGTCGCTAACGGCGAAGACATCAAGATTGG  
CGTTCCTTTTGTAGCTGGCGGTAAGTTAAGGCTGAAGTTGTTGCTCACGGTCGTGGCGAGAAAGTG  
AA

**>I-C6**

CACGGCATGTCATGGTATCAGCACACGCCGACGCTACCGCAGCGTTTCTTTGCCAGGTGACGCATT  
GCCTGGCCGTATCTCACGCCTGCAACCGTATGCTGGAGCTTAAACACCATATCACGCAGCCGATCCG  
TTTGGCCGCCCGCTGATGATGTAGTAGCCAAGCTGGTTGATAAGCGCGACGTCTGAATTTAACTGG  
TGAAGAATTCGCGTTCACATCCGCCATATCCTGCGCGGTTAACTCAGTAATTTGTTCTAAATTC  
TTGTTTTATTTCAACTGTGTATGGATGTCCCGCCAGGCGGAGCCCTTGCCAGGCTGCCATGGGCAG  
CCAATATAGTATGATTGTAAGTAAATGATTTAGATAAACGGCGGGGAGAAAACGTGCTTTTT  
TTCTTCTTTTCTCCTGATTCTACCCCTTGCTCTCTGAATGATTTTTGCGTACAATTCGCGCCCTATTG  
TGAATATTTATAGCGCGTATCGGACTATGAGCCATGCGTGCGGAAATGCGGAGTTTTATATGTACGC  
GGTTTTCCAAAGTGGTGGTAAACAACACCGAGTAAGCGAAGGCCAGACCGTTTCGCTTGAAAAGCTG  
GACATCGCAACTGGTAAAACGTGAGTTTACCAGATTCTGATGGTCGCTAACGGCGAAGACATCA  
AGATTGGCGTTCCTTTTGTAGCTGGCGGTAAGTTAAGGCTGAAGTTGTTGCTCACGGTCGTGGCGA  
GAAAGTGAA

>I-C7

AGCGCCGAGCCACCGTAGCTGACCAGAGGCAAAGGTACGCCAACCACGGTAAAAGCCACTAACCA  
TGCCGATATTAACGAAAACATAAACGAATAGAATCAACATTAACCGCCGACCATCACCCGGCCAAA  
GGTGGTCTGGGCGCGGGCGGCATATACAGTCCGCGCATGATGATCTCACGCCACGCGCTGCCATCC  
TGCCTTTCCAGCATCACCGCCACCCCGGGGCGGTTTCCCGTCTGCTGATTGAGGATATGCACGC  
TCAGCGTGCCACCGGCGGGCTGCGCCGCGCGCGGATTACAGATAACATCGCGGTAAGTAAAAG  
CATTTTTTTCATCACTGGGCTCCCATGTTATGTCATCCCTTCGGCAGCCTAGCAAAATGCGTCCCC  
GCTTATTAACTTTCGTTATCTTTTCAGCGCAATCACCCATACCCTGCGCGCTACAGCGGCAGC  
AGGGTAAAGGTGAGCAGCAGATTTCATCAGCGCCGCGACCGCCATCGGAATCGCGGTACGCTTAATCA  
CCAGGAAAGGCGATACGCCGGCGATGCCGGCAATCGCCACGATCAGCAGCACCAGCGCCATCGCGCG  
AATAAATGTGACACTGTAACATCGCGACGCCGCGAGCCAGCCACAGCAACAGCGCCGCGCCATAG  
GCAC TGCCGATATAAAAAAAGTACTGCACCGCCACGGCAGCCAGGCAACCGGTGCGGGCTACCA  
GGATCAGCCGTCGCGGTGCCACCCCGCGTACCATCAGCCGCGGAGCGGGCCGCTCGCCGCCG  
CAGCTGTAGCCCTCCGCGGAGAGCGGCAGGGGACGGGGCGCGGAGCGCCTGCGGCATGTCGCGG  
CGCGGCGCGGATGCTCTGCCCTTCCGGGGCGTCGCATCGTCGGCGGCGCAATCGGGGAGGGGT  
GGGGCGTTGGCTGCGCCAGCAGCTGACGGAAACGCTCGGCGTCACGATCAGGCTCGCCGACGCATCG  
CCCTGACCATGCGTCTGGATGAGCAGCCCGCGAAGGCGGAGGCCGACGCTCGTCCGCC

>I-C9

TATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAA  
GAAACATTTATTCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAG  
AATTCGAGCTCGGTACCCGGGATCCAGTTGAGTGAGCGGCTCGGCGCTCGCCTGCCTGTCCGGCAT  
CGCCAGGGCAAAGTTCCCCCAGGCAGATAAGCGCCGCGGCTGCCGTGCGAGATAGCCTGCATA  
CTGGCCACCGCCGATGGCCGGGGCCGCCGGGGTAAAGCCAAAGTAGGCACCCAGTCGCGCCA  
GAACTCGGCCGACGGTTTTTTCAGTGATGCCGACGGTGCGATCAGCTGTGCGAGCAGGCCGATATGT  
TTGGCTTTACCGACTGTCAGCCGTTTATGCCGACCCGCTGGCTGCAGCAGGGCGACACCCTGGCGGT  
GGGCGAGGAGCAGCTGACGGTGCTGCACTGTCCGGTCATACGCCGGGCCACGTCGTTTACTTCTGC  
GAGAAGGCGGCTCTGGCGCAGGTGGGCGATGTGCTGTTTCGCGGCAGCATCGGGCGCAGCATTG  
CCGCGGCAACCACCGCATCAAAGCCGAAGCTCATCCTATTACACTTTGCAGTCTTGGTGAAGATA  
TCACTTGGCAAGTAGTTTTTTTGCAATACCATTTTAAACAACGCATCTTGGCAATACCACCCGAGT  
TAA

>I-C10

GTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTC  
AACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAACCGTTCTTCG  
GGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCA

ACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGC  
CGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTAT  
TGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAAC  
AAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGGCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCAT  
GACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCGAGCTCGGTACC  
CGGGGATCCTGTGCGGGCCCTGTTAACC CGGACAGCGCTATTTTTGCCACCAGCGATGGCGTCAG  
CGAGCTGGACAACCTGTGTCCAACGCTGGCCTTTATCTCTGCGGCTGGCATCTCCGTACAGCAGGGG  
GCCACCTGTTACAACCTGGACGAAATCGCGATGAAGCGCAAAGCGATGATGCGGGCAAACCGCACGC  
TGCT

**>I-c10**

AGCAGCGTGC GGTTTGCCCGCATCATCGCTTTGCGCTTCATCGCGATTTTCGTCCAGGTTGTAACAGG  
TGGCCCCCTGCTGTACGGAGATGCCAGCCGAGAGATAAAGGCCAGCGTTGGACACAGGTTGTCCAG  
CTCGCTGACGCCATCGCTGGTGGCAAAAATAGCGCTGTCCGGGTTAAACAGGCCGCCGACAGGATC  
CCCGGGTACCGAGCTCGAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAA  
TCCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCT  
ATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGC  
TTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTT  
TGCGGCATTTTGCCCTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGAT  
CAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTC  
GCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCG  
TGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTAC  
TCAC

**>I-c12**

GCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCAACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTT  
ACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACAC  
GGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCT  
CATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCC  
CGAAAAGTGGCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTA  
TCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCATTTGCGCCCTGCATGACG  
TCCGCCAGACCGTGAACGCGGATAATCCCGTGCCTCACGGAGACGATTGTACCTTCGTTGTGAGCTT  
CGCTCACACGTCGAACTGAGCAATGCGCTGCTTGATCACAACGGCATCATGTATTATCGTGTCACT  
ATTGACTATACACATTTACCAATATATATTCCATTGCCTAATGTAACATTGGGATCGAAGCCGATA  
AGTCCGGCGTCGTTAAGGCGATCCTGGTAGAAAACGGTCAACCGGTTGAGTTTGACGAGCCGTTGGT  
GGTCATCGAATAACGGGGCGAACATGCTAGATAAAAATTGTTATCGCTAACCGTGGTGAATCGCCCT

GCG

**>I-C12 Reverse complement**

CGCAGGGCGATTCACCACGGTTAGCGATAACAATTTATCTAGCATGTTCGCCCCTTATTCGATG  
ACCACCAACGGCTCGTCAAACCTCAACCGGTTGACCGTTTTCTACCAGGATCGCCTTAACGACGCCGG  
ACTTATCGGCTTCGATCCCAATGTTACATTAGGCAATGGAATATATATTGGTAAAATGTGTATAGTC  
AATAGTGACACGATAATACATGATGCCGTTGTGATCAAGCAGCGCATTGCTCAGTTCGACGTGGTGA  
GCGAAGCTCACAACGAAGGTACAATCGTCTCCGTGAGCGACGGGATTATCCGCGTTCACGGTCTGGC  
GGACGTCATGCAGGGCGAAATGATCCCCGGTACCGAGCTCGAATTCCTGAAGACGAAAGGGCCTCG  
TGATACGCCCTATTTTTATAAGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTT  
TCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTC  
ATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATT  
TCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTGCCTTCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCT  
GGTAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAAC  
AGC

**>I-C14**

CAGGCGGTAGCAATGCCAGCGGCAGACTGAAGATCTCCACCAATCCATAATCCTGCGGCGCCGCCG  
CAGGCGGAACAATCCAGCCATCGCCGTCGGCCTTGAGCTTTTTGTACAGCTGCGGATTGACCCGCGT  
CTGTAGATGGCGTGACTGGTAGCGCCACTTACCGTCTGAGATATAAAGCGCAGCGCTACGGCGCGA  
TCCGCGCTGGAAGCGCTGGGAAATGCATGACTTTGCCGCGCCGCGCCGACCGCTGCGTCCGCGCATT  
GAGGCGGACGAGCAGAGCGACGGCGCCGCCAGCAGTGCCGCGAGCCAGGCTGCCGCCAGGCCGAAG  
CGGAGCGTCTGCGTCACGACGCACAGCAGCAGGGGCTGCAGATCGACCTGGCCACCATAGTGTTCGA  
CGATAGCCCTGGTGTCCAGACAGATGCCGATGATGGGCAGGCGTCCGCACAGCGTTTCAGCAGCGC  
GGGCATGCAGCCTGCGTCAGTCGGCGCGCCGGGGCCGGGGAAAGCATCAGCAGCGGCTGGTGCAGC  
CTATCCAGATGCCGCGCAGCGTATCCGGCGCGACGCTGTTACGGTAGATAACCACCCGATGACCGC  
CGCTGCGTAGCTGATCATTTTGTCTGCCGCGGGGCGACTGGCATAGGGCCGAGCAGGACGCGGTGC  
CAGCTGCCTCCGCTGGTATGCGGCTTCTATTCCGCCAAAGGCCAGCTGGGCCCCTACCGATTCCG  
CCT

**>I-C15**

TACGCCTCCTCGGCGCGCAGATCGCCCGCCCGCCCGGCGTGGTGTCTGCACCTTTGGTGACGCCAT  
GCGCGTGCCGGGTCGACGCGGCTCCCTGCTCGACGCCAAGCGTCAGGGGGCGGACGTACGCATCGTT  
TACTCTCCCTCGATGCGCTGAACCTGGCGCAGCAGATGCCGGATCCCCTGACGGCGGTAGGCTTCA  
TCCACCGCCAGCGGCGCCAGGCCAACCCTGGCACTCCTCACCGTCGACCGTCACCGGGCTGAAGG  
CGGCATAGCCGACCACGCCCCCTCATCATCCGTGGCAACGATCAGCATGATGTTGACCTGATATCA

CTAATGGTATTAAATGTACTTAACATAGCCAAAGCCATACATAGTTTTCAGTTGCAGCGTCGCTGTA  
ACTTTGCGCAGCAATACAGAGGGTATCATCATGAGTCACGCATTGAAAAAGGCCGCTCGCTTGAGCA  
TTCAGCCTCGTGACAAGTCTCAGCTGGCTCATCCACGTGCGGC

**>I-C16**

TATATGTAATTATTCATTTACACATAAAGGAGCATCGTCGGCATCGGATCATGAGCGTAGCCTGGGC  
TATCCACCTGCTGCGCCGCCGCGGATGCCCGCAGACCCTACCGCCTCTACCCCCGCTAAACCACT  
GGCGGAGTTAACTCCGCCACCGCCCTCCCTCGTCACACGCTCACGGACGATAGTTTGACCCTACTC  
ACGCTTTGCTGCATTTTACCTTGATGGAGTATTGCTCCATAAATAAATCATATGGAGTTCAATTC  
TAAAGCGTAATCAAGGTGAGGTGCCATGTCTGTATTCACTCTACAACAGCATATTCAACGCAAC  
GGTGCCCTGATCCCGTGGTGATGGACGGCGCCGGTCGGCAACGTAAGTACTGAGCGTGACCGAGGCGG  
AGCAGAGCTTCGCCTTCGACAACGTGCCGACGGCGCCGACCGCTCGCTGCTGCGGGAGTTTTCCGC  
GCCGGTGCTCTGGAGTACCCCTACAGCGATCGTAGTTATACATGGAGACGGTGGCGTTAGCCGCT  
GCACCGCCGGCAGCGCACGGATCGTGGTCTGAGTCTGCTGGCCGACTTTAGCAACCCGCTGGTCT  
CGGCGGCAACTTCGATGCTGGCGACGCAATCTACTTTATATCACCGGGTCACAGCTCGACTAC  
CAGGCCGCCAGCACCCCTCGGCGTATTTCTGCTGCTGTTCTCGCTGCTGGTGTGTTTTCGCTACAGTATC  
TGTG

**>I-C17**

TTTGCCGTCAAAGGATTTGCGGATGTGGGTCAGGCATACGACCGCAGCGCCTGGGCGTCTACAGAG  
GAAGTCTCAGTCATTTAGTGGTACTCTATCCCGAGAGATGTTGCAGATAGAACCGCCGCTGAAAAA  
GACTGCGTGAGCACACCGGGATTTCCGGCGCTCGAAACCAGCGACGTCGATCGTCTACAGCGGCGCC  
TGCGCCGGGGCTTCAACCCCTTTACCCTGGGGGACGGTGGTCAACGGGATGCTGGAAAACCTGA  
ACATTTCCCGCCCGCTGGCGCTGCACTATACCTACACCTACGCCATCGGGCTAAGCATGTTTTTGGC  
CCACACGGCGATCTGGTCAGCGAAGATAACGGTCGGCTTCAGACCCAGCGCACGGTAGCAGGCGTTT  
AGCATCTTGGAGATGGCTTTCTTGCCAGCGGCTGGTTAACGATAGTGTACGGCAGACCTTTTCGGTA  
CGATCTTTCGAAATGAGGTGAAACTGCTAAATTAGCGGTTGACACTCACCGAGGAAAGCGTAATATA  
CGCCACCTCGACTTGGGTAAGGAAAACTTGCTAAGTCACTGCTCTTTAACAAATTATCAGACAATCTG  
TGTGGCACTCGCAAGATTCGTATTACGCATTCCTCGGAATGCGAAAATATTTAAAGTCTTGAAGAG  
TGACAGCAGTTAATTCATTACGAATAACACTTTAATTTCTTTGAGCATCAAGCTTTTAATTGAAGA  
GTTT

**>I-C18**

AAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCACCGC  
GCCATCCTGGGGTCCATGGAGCGCTTTATCGGTATTCTGACCGAAGAGTTTGCCGGCTTTTTCCAA  
CGTGGCTGGCGCCGGTACAGGCCGTAGTGATGAATATCACCGATTCTCAGGCTGAATATGTCAAGA

ATTGAGCAAAAACTGCAGGCCGCCGGTATTCGCGCAAAATCAGACTTGAGAAACGAGAAGATTGGC  
TTTAAAAATTCGCGAACATACTTTACGTCGCGTCCCTTACATGTTGGTTTGCAGGACAAAGAAGTCG  
AAGCCGGCAAAGTGGCAGTGGTACACGCCGTGGTAAAGACCTGGGCGTAATTAGCATTGACGACGT  
AATCGAGAAGCTGCAGCAAGAGATTCGAGCCGTAGTCTTCATCAGTTGGAGGAATAAGGTATTAAA  
GGCGGAAAACGAGTTCAAACGGCGCGTCTAATCGTATTAAACGGGGAAATTCGCGCCCAAGAGGTTT  
GCTTGACAGGTGTGGATGGCGAGCAGATTGGTATTGTCAGTCTGAGAGAAGCTCTTGAGAAGGCCGA  
GGAAGCTGGCGTCGACCTGGTCGAAATCAGCCCCAACGCTGAACCGCCGGTTTGTGCTATCATGGAT  
TADGGCAAAATTCCTCTATGAGAAGAGTAAGGCTAGCAAAGAGCAGAAGAAAAACAGAAAGTTGTCC  
A

>I-C19

CCTCAAGCAGTAACGACTCTAGTTTGTCTGTGTAACGCCCTCGGGCGGTTAATCAATAGTAAGGAA  
ATACGTAAGATCGCTAAGATCGGACGCTTACCGCCGCGCAGCATGGCCTGCAGCGTCATGGCCAGGG  
TGCCGGTTTTTCGGCTCCAGCAGGCGGCCGTACGTGAGCGCCACCCTCCATAAAGTATTCGACGGA  
GTAGCCGCGGCTGAACAGCTCGCCGAGGTATTCGCGGAACACCGTGGAGTAGAGCTTATTGCCCTTA  
AAGGTCCGGCGGATGAAGAAGGCGCCAGCCGACGGAAGATCCAGACGACGCAGAGCAGCGCCGGGT  
AGAACAGGAATTCAGCTCCTTGCTGAGGACAAAGGTGAGCAGCTTTTTTCAGCATCAACCAGTCCTG  
GGTCAGCCAGAACAGCGCTCCTGGGCGCCGATCGAGGACTGCGCTCAGCGTGCGGGCCGCGATGGC  
ACGCAGTTATAGGGAGTATTTTCATTGACACAAGGGACCGTTCGCTGCGAGTAAATCAGATATTGT  
TCGAAGTTATCACGGTTTGCAGGGGAAATACCCACCGGCGCTGACGTCAGGGGACAGGTGAATAG  
ACGATCCTTGACCCAGAAAGCTGGCCTCAGCAATGCGCAGCCGATTATGCATCCAACCGCAGCGGTTT  
AGCTGGCGCATGGCGGCATCCACCAGCGAAAGCCGGTCATCCCCTGCTGCCAACGCTGCAGTCCCG  
CCG

>I-C20

GCGCCACGCGATAGCCCTTATCCCCCTATCTCCCGATGACNTACGCCGCGGCACCCCCCAGTCTC  
CGCAGACGCTCTCCACTACGCTCACCAGCCACGCCCCGGCATTGCACCCACATTGGTTAACCA  
AATACCCTAAAAACAATTAATTTGGCATACCAATATTACATTCATGATTAATACACACATTAATGT  
TTATTTTTTATGTAATATCGCCTCATCGTTTTTCACGCTGTGGAGACCCGCTGTTTTACGCATTGGCA  
AGGCTGTGGCACTACCCCAAACATAACAAAACCAACAACCGAATAACCAAGAGATTACTATGAAAA  
GATCAGCAGCCAGGCGGTTCGGCAGCAGGGCGACCCAGGCGTAGGCCTGGCGCTTCATGCGGAACAGC  
ACCACGGCACACAGCATCAGTGCCATGCCCAGCATCTGATTGGCAATGCCGAACAGCGGCCACA  
GGGTATTGATCCCAGCGAGACGCGGTTCGGGCCAGCAGGCGGAGAGGATGTCACGCCCCAGGTGG  
TCGGTACCAGCCAGTGTGGCCATCCGGCGCACGCAGGCGCGGGGAGATCGATGCGCCCCAGGC  
GTGGTGGGACGCCATGCAGGCCGCCGAGCTGATATGCAAGCCGCTGCTCGATGCCGTTCCGCT  
GACATCGCTCTCCGGCGTTCGGCGCCAGCCAGGCGGGCAAGCTGGCCAAGCTCGGACTGGTTACCATA

CAG

>I-C21

AAAATAAACAAATAGGGGTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCAT  
TATTAATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTCTTCAAGAATTCGAG  
CTCGGTACCCGGGGATCGGGATGGCCGCCCTCGCGAATACCGTCGATGTCGGTCAAGCGCCGCTC  
TATCTCGCTCAGCGAAATGCGTTTTTCTTCAATTTTACCACGCGCCACGGCGTCCGGCAAGGCAG  
AAGCGTCCGTCGTCGCAAAGCGCAGCACATCGTCAAGCAGCAGGCCGTGAGGATCGCCGCCGACGG  
TGGCTACGCTTCAAGTATGCCAACGGCCGCTACGAGACCAATAACGTGCGCGTCGACAACGCCGGA  
TCGTTTTGAAAGTCTTTGGTGTATTTCGAAAGTTTGTGAAAGCAATCATATTTTTTCGGTTGTTTAT  
GTTGAAAGCAATCGTAATGTATTAATCTTAGGTCGAGGCCCTGTTGAAGTTCGCTTTAACCGGTTTC  
GTAAGGGGACAAAAGTAAAAGCGGCAGCAATCGAAAGGCGCATGAAATCTTCAACGTAGTGACCGC  
CCAAGGGAAGGCACGCGTTGAGGAGTTGGCCGACGGTTTAAAGTCTCAAGCGTCACCATCCGCAGT  
GACCTGACTTTTCTGGAAGAGAACGGCTACATCGTTCGCTTCGCACGGCGCGGCAATCCCCAATACCG  
GGGT

>I-C22

CGGGTGACCGCCACGTAGGTCGGGGCGGCGACGCTGTGCGGGAAATAGTGGAACGTCAGATGGGGGT  
CGGTGCTGAGCATCTGGGCATAGTTGTGATGACCGGGCCGAGGGTGCCGAGACCGGTCTGGATCAC  
GAGATGGCAAGAGGCTATGGGGCTGAGCTATCTATTTGGCACTTTTTTTGAAAAGTGTAAAAAAAC  
AATTTGTAGTATGAATAATATGGCGTAGTCGGCCTAAAAGTGAAGGATGGAATCGGCTCAAAATGTATA  
ATACATCGCATTTTAAACTTATTATTTCACTTTTTTCGCGGATAAGAGGATGACGAATGCGTCAGAA  
TAGCGTAAAAAGGAGGACATGAGAGTCAAGGAAAACCAAAGGGTGAGTGTGGAAAAATGAACGTG  
CTGTGGCAGCAGAAAACGCTACGCATGGCAACTTATTTTACGATAAACATGACCAGTTTTTCCGCCGA  
CCGTTTTATTTCTGTGCGACATGTCGTTCACTGAATAAAAATGGCTTGGCATTGAATTGAGAGTATC  
TGATAACGCATTGGAGTAAAGCGAGGTACAGTTCTGTCTATGTGTGGCATTTCAGTAAAGAAGTTC  
CGAGTAAAAACGTTTGCCTTGCTTACTACTTCTCTGCCAACCTTATCTTAGTGCCTCAAGCAGTAA  
CGACTCTAGTTTGTCTGTGTAACGCCCTCGGGCGGTTTAAATCAATAGTAAGGAAATACGTAAGATGG  
CTAA

>I-C23

TCTTATCCTAGGATACTGGTGCCAAACCTCGTTCAGGCCCATTTCCCAGCCTAGGCTAAAAATAGCGCA  
CGAGATACATCCCGGCAGCAGCCCATTCATCCATATCATATATTCGCATCAATGCCATTCCCAGCGC  
CATCCACGCGCTATCCCTTACCCGCTTCAGCTGGGGCGCCGAACCGCTCCCCGCCCGACGATTCT  
ACTCTCCTCTCGCCAATAATTTATATAGATCATGAGCGTAGCCTGGGCTATCCACCTGCTGCGCCGC  
CGCGCGATGCCCGCAGACCCTACCGCCTTACCCCCGCTAAACCACTGGCGGAGTTTAACTCCGCC

ACCGCCCTCCCTCGTCACACGCTCACGGACGATAGTTTGACCCTACTCACGCTTTGCTGCATTTTAC  
CTTGATGGAGTATTGCTCCATAAATAAAATTCATATGGAGTTCAATTCTAAAGCGTAATCAAGGTGA  
GGTGCCATGTCTGTATTCACCACTCTACAACAGCATATTCAACGCAACGGTGCCCTGATCGGGACAA  
CTTCTCGCAGTCGCGAGCGCTGAGCTATCAGCAGGAGCAGCTGGCCGATGGCTGGCAGACGCTGGTG  
ATGACGCGAGTGACCATTAACCGGGTCGCGATCGTCGGCGGGGAGCGGGATGATGGCCAGCCGGGCA  
TAGCCGGGGGCGACCCGGTTGAGCTGGTTGCAGGCGTGGATACACTCATTGCAGCCGACGCACTTTG  
ACT

**>I-C26**

GTCA TGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGT GAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGT  
GTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAACA CCGGATAAATACCGGCCACATAGCAGAAC  
TTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCCTGTTG  
AGATCCAGTTCGATGTAACCACTCGTGCACCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCG  
TTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGAATAAGGGCGACACGGAAATG  
TTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGC  
GGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCGAAAAG  
TGCCACCTGACGCTAAGAAACCAATTATTCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAG  
GCCTTTTCGCTTCAAGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTATGTTACATTCTGATTTTCATCT  
AATGTGACAGTGAACACAAATATGACGGAGTTTTGCTTCAAAATAATCACACCAGAAGGGCTGTGT  
GCGGTGAGATGGATCAGGGTGCGGGTTATCTGGAAGAGGCCGAGCATAAACGGGCACTCAAACATCT  
CTTC

**>I-C26 Reverse complement**

GAAGAGATGTTTGAGTGCCCGTTTATGCTCGGCCCTTCCAGATAACCCGCACCCTGATCCATCTCA  
CCGCACACAGCCCTTCTGGTGTGATTATTTGAACACAAAACCTCCGTCAATTTGTGTTCACTGTCA  
CATTAGATGAAAATCAGAAATGTAACATAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCTTGAAGACGAAA  
GGCCCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGT  
GGCACTTTTCGGGAAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGT  
ATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTGATAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTAT  
TCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCAACCA  
GAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGG  
ATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTT  
TAAAGTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCCGTGTGACCGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCG  
ATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCA  
TGAC

>I-C27

CGGACAAAGCGATAGCCGATCACGAGATGGCAAGAGGCTATGGGGCTGAGCTATCTATTTGGCACTT  
TTTTTGAAGGTGCTAAAAAACAATTTGTAGTATGAATAATATGGCGTAGTCGGCCTAAAGTGAGG  
ATGGAATCGGCTCAAAATGTATAATACATCGCATTTTAACTTATTATTTCACTTTTTTCGCGGATA  
AGAGGATGACGAATGCGTCAGAATAGCGTAAAAAGGAGGACATGAGAGTCAAGGAAAACCAAAGGGT  
GAGTGTGGAAAAATGAACGTGCTGTGGCAGCAGAAAAACGCTACGCATGGCAACTTATTTTCAGCAT  
AAACATGACCAGTTTTCCGCCGACCCTTTTATTTCTGTGCGACATGTCGTTCACTGAATAAAAATGG  
CTTGCCATTGAATTGAGAGTATGATGAACGCATTGGAGTAAAGCGAGGTACAGTTCTGTCTATGTG  
TGCCATTTTCAGTAAAGAAGTCCGAGTAAAAACGTTTGCCTTGCTTACTACTTCTCTGCCGAACCT  
TATCTTAGTGCCTCAAGCAGTAACGACTCTAGTTTGTCTGTGTAACGCCCTCGGGCGGTTTAATCAA  
TAGTAAGGAAATACGTAAGATGGCTAAGATCGCGCATCAGCGATAGAGCCGTACGTCGCCGTCGACG  
ATGGCGAACTGGCGCTGCCACGCCCTGCAGCGTCAACGCCGCCAGCGACGCCAGTCCCTGATAAAACG  
GGT

>I-C28

TGGCGGCCCCCTGCGAGGGGGAGACGCTGGTGGTGACCGAAGGGGTCTTCAGTATGGACGGCGACAG  
CGCGCCGCTGAGCGCTCTGCGGGCGCAGTGCATCTGGGGCAGCACATCGCCGAGTATGCCGATCT  
GCGTATCAAGATGTTCCCGCCAAAGGGGCGCTGCTGATCACCACGGTCCCAGCGCCGCCAGCATG  
ATGGCGATGGGGTAAATGCGCTGCGGGTGTCCACATCCTTCACGTGAATGGCGTTCATCTCCATCC  
CGGCGTAAAACAGGAAGATACTGGCCGCCAGCACCAGTTGTCAAAGTTGGTGAAGTCGGGTACCAC  
CTGATCGCCAACCATAGCCGCATCGCTTTTACAATACAGAGATTTATTTAATTTATGAGTTATTGGG  
GAAGTGTAAAGGTGACGCTAATATAGCGATAAAATTACCCATCGGCTTCACACTTTTTTTATTAAGCCG  
GTTGAAGTTATTATAGGTGCAATACAACTAAAACACTGGATTGTTACTGCACCTGCAGGCAAAA  
CCTGATCTCGGTCAGCTGCGGCCCTTGGCGAGGTCATAGCCAGCCTGCGCCACGTGCCAGGCCAGG  
TGCTCGGCGACCTGCTCCGGCGGCAGATGGTTAATATAGTGGTGGTTCAGCCACTGCAGCTTTTCGG  
TATTAAGGCGCTGGCTGACTTGCTGATGGCGTCCAGGGTAAAGAACTCCGTCATCTCCGCCACGCT  
GAA

>I-C29

TGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTA  
CTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGGCACCAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGG  
GATAATACCGCGCCACATAGCAGAAGTTAAAAGTGTCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAA  
AACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATC  
TTCAGCATCTTTACTTTTACCAGCGTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAA  
AAGGGAATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCA  
TTTATCAGGGTTATTTGCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGG

GGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTAATTATCATGACATTA  
ACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGAT  
CTTCTCGCCGTACCACAGCACCCGAGCTGCTCCAGCATCTCAATCTGCTCAAGCTGACTGGGCGCC  
CACGTACATAGCGGCGAATAAAACCGGCGCATAGGCATAAATGCCGATGTGGCGCAGAAACGTCT  
GCCC

**>I-C29 Reverse complement**

GGGCAGACGTTTCTGCGCCACATCGGCATTTATGCCTATCGCGCCGGTTTTATTTCGCCGCTATGTGA  
CGTGGGCGCCAGTCAGCTTGAGCAGATTGAGATGCTGGAGCAGCTGCGGGTCTGTGGTACGGCGA  
GAAGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATCTTGAAGACGAAAAGGGCCTCGTGATACGCCCTATTTTTAT  
AAGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGG  
AACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGA  
TAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCACATTTCCGTGTCGCCCTTATTC  
CCTTTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTTTCCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGC  
TGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAG  
AGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTAT  
TATCCCGTGTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACTATTCTCAGAATGACTTGGT  
TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCT  
GCCA

**>I-C30**

TCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAATCTCT  
TACTGTCATGCCATCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAA  
TAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCTCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCA  
GAACTTTAAAAGTGCTCATCATTTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCT  
GTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACC  
AGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGA  
AATGTTGAATACTCATACTCTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCAT  
GAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGA  
AAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTAATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCA  
CGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCTGGCCGGCTGCTGTGCGGGG  
CGGGGCACAGGGGATAACCTCCAGCGTGATGCCGCTGACGGCGCGCACCTGCACGCACTGTCCGGCG  
GGCA

**>I-C30 Reverse complement**

TGCCCCGCGGACAGTGCCTGCAGGTGCGCGCCGTGAGCGGCATCACGCTGGAGGTTATCCCCTGTGC

CCC GCCCGCGACAGCAGCCGGCCAGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCTTGAAGACGAAAGGGC  
CTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCA  
CTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCC  
GCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAA  
CATTTCCGTGTGCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAA  
CGCTGGTAAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCT  
CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAA  
GTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATAC  
ACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGAC  
AGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACA  
ACGA

**>I-C31**

CTTTAAAAGTGCTCATCATTTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTT  
GAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGC  
GTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAAT  
GTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG  
CGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAA  
GTGCCACCTGACGCTAAGAACCATTTATATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGA  
GGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCGCAGTTACACCTTATTTTTCCAAC  
AGATAGCGACAGAAATACTTTCGGTTAATTGCCAACCGAAAGCCTTGGCCGATGGCCGCGCCGCGG  
GTTGAGCGGTGAGTTATCCCGCATGACGCCTTTGTAAAGCGAACGATTGCGCAGAAACCGAAAGGAA  
AGCGGGGAGAAATGAGGGAATGAAAGTTGTGTTGTTGACCGATCGTGGTAAGATGACCACCGCCGT  
GGGCTGGTGTGGGCGCTCGGTTGATGACCACCAAGCGTGGTAACCGCATCGGAATGTGCACTCTG  
GAC

**>I-C31 Reverse complement**

GTCCAGAGTGCACATTCGGATGCGGTTACCACGCTTGGTGGTCATCACCCGAGCGCCAGCACCAGC  
CCCACGGCGGTGGTCATCTTACCACGATCGGTCAAACAACACAACCTTTCATTCCCTCATTTCTCCCC  
GCTTTCCTTTCGGTTTCTGCGCAATCGTTTCGCTTAACAAAGGCGTCATGCGGGATAACTCACCGCTC  
AACGCCGCGGCGGCCATCGGCCAAGGCTTTCGGTTGGCAATTAACCGAAAGTATTTCTGTGCTA  
TCTGTTGGAAAAATAAGGTGTAAGTGCATCCCCGGTACCGAGCTCGAATTCTTGAAGACGAAAGG  
GCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGG  
CACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTAT  
CCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTC  
AACATTTCCGTGTGCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGA

AACGCTGGTCAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGAT  
CTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTA  
AAG

**>I-C32**

GGAATATATTATTTGTATGTGAAAAATACTAAATCAATATAACCGCGCCAACGGCCAATTTAACG  
TCCAACTAAAAACAAAATCCGCTACCGCATCGGGTTTTTCGCCCTCTTCGCTGACCGTAACACCTA  
AAAAATCCACGCATTGGCGTGGATTTTTTTAATATCGCGATCCACCGCTGAATACGCACGTCGAT  
GCCGGGATAGGCGCTATTGAAGCCGGAGAGCCGCGGCACCAGCCACTGAATAGCGAAGCTCGGCGGC  
AGGCTAACGGTCAGCGCCCCCTTGGCGCTCCGCGCCTGCAGCTTGCAGCTCGCTCGTTCAGCGCAG  
AAAAGATCATATTAATGGTGAGAAAGTAAATAACTTGGGTATTGCTGGAATTAATACTCGGAGTAT  
ATTGATCCGTGACGAAAACGGCCTGGCTATCGACTTTGACATCGAAGGCGAATACCCGAGTTCCGT  
AACAACGATCAGTCCGCGGGCGCCCGGCGCATACCCAGCCAGACCACGCCGGGGCGGGCCACTGA  
CCGGCGTCATCCAGCGTCAGGCTAAAGGGCGCCTGACGGATACGCCCGCCAGCGTCTGCAGACGCT  
GCTGCTGTGCGCTGCCGACGTCCGCAAGAAAAGCCAGCGTCAGATGCAGGTTGGCGGGCGGATCAC  
ACCGCTGATGAAGGGTTCTTCAACAGGGCGCTCTTAACCAAACAGTCGGTTTTCCGGCATCACGGAG  
GC

**>I-C33**

ATGGTGTGGTATCCGGAGATTAGGGACAATATTTACCGTGAGCTACCGCAGATTATCCAGCGGCGTC  
CTCATAAGATTAAGGCCGCTGGGGATTGAAGCATCAAGGGCTTACTATCCTGGAGTATAAGGTGGC  
GCTGAAACCGCAGAGTTTTTCGCGGGCGTACGTTACGCGGGGAGAGGAGTCCGAGTGATCTTTACT  
TTTAGTTTTCGCCGGTCAATGTCACACTTTTATTGCTTTTGAATGTTTTCTTTATTTTGGTTAATG  
ATTAATGAAAGCAGATGAAGATCGGAGGTGTGACGATGTTTTTGGTTTTCTTCCCGGGATATGCTG  
CTGCAGGCGCAGGCCAAGGGGTACGCGGTACCGGCGTTTTAACATTCACAACCTGGAGACCATTACAG  
TCATTGCCAAGACGGCGGCCAGATGGGGTCTCCGGTGATCAGGGCAAGCGTCAGCGTCGTACGCGA  
TGGCGCCTTACCGCGCAGCAACGGACACAGCCAGCAGCCAGTCCAGCGCCAGCAGCAGCTGCGC  
AGGCCAGCAGACCGGCAAAATCCGGAACCAGGGCATAGGCCTGCTGCACCGCGCTGTGGATGGTGG  
CCAGGCCACTCCCCTGCATGCCAGCGGCCACCACGCCGACCAACCGGGCAAGCAGCTCAGCAGCGG  
CAGCAGGCGCAGCGAGGGCGAGTCCATCTCCACCGACCGCAGCAGCAGATAGCCAGCAGCGGCCCG  
CC

**>I-C34**

CCTCAATAAGCAAAATCGCAAGATGACATGATTGTTTCACACTCGCACCAAGCGGTAAACCATTGGC  
TCAACGCCGAGATTTCCCGCGCGTGCGCCGCATAATTTCCGGATAACTCACAGATAAATGCAAAGTT  
ATAAACACACACGCGATAGCGAGGGCGGCTTTTATTCACTTTTTCTGTGGATATATTTGTGTAGAAGT

GTCTGGAAAGAGGGGTAAAACCTTATCGCCACCGCCATAGCCACTCAACGCCACCACAAAATATTTCA  
ATATCTTTCAATTAATTAATCAACAATCTCACCTGTATACA CGATAAAA ATGTGATCACGGTGCCG  
GCCTACTTCGATGATGCGCAGCGCCAGGGGACGAAGGACGCCGCGCTCTGGCCGGTCTGCACGTGC  
TGCGCCTGCTCAATGAGCCGACCGCAGCGCCATCGCCTATGGGCTGGACTCCGGTCAGGAGGGGGT  
GATCTTTCGAAATGAGGTGAAACTGCTAAATTAGCGGTTGACACTCACCGAGGAAAGCGTAATATAC  
GCCACCTCGACTTGGTAAGGAAAACCTTGCTAAGTCACTGCTCTTTAACAAATTATCAGACAATCTGT  
GTGGGCACCTCGCAAGATTGCTATTACGCATTCCTCGGAATGCGAAAATATTTAAAGTCTTGAAGAGT  
GACAGCAGTTAATTCATTACGAATAAACA CTTTAATT CTTTGAGCATCAAGCTTTTAATTGAAGAG  
TTT

**>I-C35**

TGTATAATACATCGCATTTTAAACTTATTATTTCACTTTTTTCGCGGATAAGAGGATGACGAATGCG  
TCAGAATAGCGTAAAAAGGAGGACATGAGAGTCAAGGAAAACCAAAGGGTGAGTGTGGAAAAATGA  
ACGTGCGTGTGGCAGCAGAAAACGCTACGCATGGCAACTTATTTGAGCATAAACATGACCAGTTTTTC  
CGCCGACCGTTTTATTCTGTGCGACATGTCGTTCACTGAATAAAAATGGCTTGCCATTGAATTGAG  
AGTATG GCATAAC GCATTGGAGTAAAGCGAGGTACAGTTCTGTCTATGTGTGGCATTTCAGTAAAG  
AAGTCCGAGTAAAAACGTTTGCCTGCTTACTACTTCTCTGCCAACCTTATCTTAGTGCCTCAAG  
CAGTAACGACTCTAGTTTTGTCTGTGTAACGCCCTCGGGCGGTTTAAATCAATAGTAAGGAAATACGTA  
AGATGGCTAAGATCCGCGCATTGCCATCATGAGGGGGCGCACGCATGAATTTTTACCGCTCCGCCC  
GCGGGTTCGGTACGTCTGGCCCTGCTGCTCATTATCCTGTTGACGCTGATCGCCCAGGAGGCAATCGA  
AAAGCATATCAATACCAGCATG GATAAGCT TTACCAGCAGGCTTGCTTTTCAGGAATAAATCCAGAATG  
TTCATGTCAGTCACTGCTTAAACTCCGCGACAATAGACTTTGGAAGCGCAATTGGCTTCATTAGATT  
TT

**>I-C36**

TCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTT  
CCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAAC CATTATTAT CATGACATTAACCT  
ATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCTGG  
CGAACGTCATTGCCGATGCGGTGAAGGCGGCCAGCTAAGGGCGAGTCGACCGGCGAAAGCTCGCTTT  
TGCCGGTTTTTTCTCCAATCACGTCGGCGTGAAAAATTTACCCTTGCGCCCTATGACGGCATTGGGT  
AGTATTCACACCCGCTTCAGTGGATGTTTTATCCATGGGTTTCGATAGAAGCTTTTACTGCGGATGG  
GCCGCAAGGAATCAGGTACGACTATGTATGAAGCTCTTTTGGTAATTTTCTGCTGGTGTCTGTGGC  
GCTGATCGCTGTGCTGCGTGAGCAGGCTGTACTTGGCCTCAATGTAATCCGCCAGCTCCAGGTACAG  
CTGGTTCAGGGTTTCGCGGATCGCCGCGCATCACGGCGTTATCCAGCGCCTGCTGGGCACTCTGCTT  
GCCGGTCCAGACCCCTCTAGCTCCTCGTCTACCACGGTGC GGATCTGCGGCATGTTGCCAGACGT  
ACGCCTT TAGTAAACG GTAGCGGCGCTTTATTTCAGCATCTGGCGCGTGCCTGATCGGGCGCCGGAT

TGC

>I-C37

GCCCGACTGGCGCCAGCGTCGATCTGCGTCTGGGATTCGTCGACTTCGCCCCGATCCACTTCATCTC  
CGCCCTGCACGGCAGCGGCGTGGGCAACCTGTTCGAATCGATTCAGGAAGCCTACGAAAGTGCCACC  
CGCCGCGTCAGCACCGCGATGCTGACCCGCATTATGACCATGGCGCAGGATGACCACCAGCCGCCGA  
TGGTTCGCGGGCGCCGAGTGAAGCTGAAGTATGCGCACGCCGGGGCTATAACCCGCCGATCGTCAT  
CAACCAGTAATATCTTATTCATTGGGTGTTACCTCCTGACGAAAATACGATATCAAATGCCGCTAA  
TCCATGACTTTACTTAGTTTTACATCCCTGACGCATGTTTTAGCTGTATGAGTAGACTGCACTCA  
TCGATTCAATGAGCGGGCCGGTACCTAGGAGTGAGAGATGCATAAAACTGCAACCCCTGACCATGGCC  
GCTTTCCGATGATGACCTCCGTCGCCGTATACGCCGATGAAGGGGAGCCAGTATGTGCTGGCATC  
AGGGCAACGACATGATGCAACAGAGTATGGATCAGCCGACGGAGGATGGCTTTGTCTATCGGGTCGA  
CATGCGTCTGCGCCCTTCGGCGACAGCGGTCTCTGGTGCTGAGTTTCTCCGCGCTGGAAGACTAT  
TACCAAGAGCAGGGGCGCGACTGGGAGCGTTACGCCATGGTGAAGGCGCGTCTGCTGGGCGAAGGAC  
AG

>I-C38

CTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTG  
AATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGT  
CTAAGAAACAAATATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTCTT  
CAAGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCCATCGACCAGATGGCCGCGGGAACGTGCAGGTACAT  
AATGCGGTAGCTGTTACCCTGCTGATAGTCCGCTGGTGCAAAGCCGAATCCCCAGATCCCGCCATC  
ACGATGAACACCAGCAGCAGGCTGGGCCAGGCATCCCACAGGGCTTTACCCGCTGACGCAGGGTCG  
GACGCGCGCTGACCGGTAATTACGCGCCTTGCGGATAAAGGCGCACACAGCATGATCAGTGAGGC  
GATGCGCCCTTACCGATTGCGGCGAAATGGTCAGTGAATCGTTTTCAGTGTGATTCCGCACTACGC  
GGTGGGGTGTGCGGACCATCGAGGAAAGCGTGCAGATAGATGGCCTCTGCGCCGCGCTGGGCTGCCA  
GATCGCTTTCGCTTTGATGACAAGGAGGGGCGAGGCACCTGGCTCTGTAACCAGTGCGGTGCCGGGG  
ATGGGTTGACGCTGGTCGAAAAGGTATTGGGTGTTACGGCATCAGTCGCGGCCGATAAGGTGAACGC  
GGT

>I-C39

GGCCGCGCCTCCGTATCGCTGGGCTATATCGGGATCGTGGTGGACGCCGATTCAGCGGCAGCGAAC  
CCGGCAGCGTCATCACGCTGCGCGACGACGAAGTCCCGGCGATGTTTAGCCGTAAGATTTGCCCGCA  
TCAGCTGGGGCTGGCCGACGTGCTGTGCGGCGTGCCTGACGGACGAGTTCCCGAAGAAGCTGACG  
CTGGTTCGGTATTGAGCCGAGTCGCTGGAGCCGAACATCGGTTTGACGCCGGCGATCTTATGCTGTA  
AAATAAAGAAACCCGCATAGGCAGGAGAAGCATTGCTGGAATATCTAACTTTGCCACATTCAACGC

ATAAATGGTAATTTGGTAGTTATGGGGCTTTGCTCCAGCCGGAGGGCAAGCGCCGCCAAAGCCATCA  
TAGCCGAAATCATTACGTAGCTGAATGGCGCCCTTCGGTAAAGTCTGGCTATTTTTTACCCCGGTAT  
TTTCAGATAGATGGTGTACATTAGCGGGTATATTGATCCGCGTGTTTAACATGAACAAGCCGGGTGC  
GCTGCGTCGCGTAGTGATGGGCGAACAAGAAGGTACGCTGATCGGGACGGCGGGCGCCGCTGCTGT  
CGGTCTTCGGCGGCAAGCTGACCACCTACCGTAAGCTGGCGGAGCACGCACTGGAAAAGCTGCGCCC  
CTACTATCCGCACTGCGGCGATGCCTGGACCAAGGGCGCGGTGCTGCCGGCGGGGAGATGGGCTGC