

**양식 넙치 스키테리카증에 대한 고효율 백신 개발**

Development of an effective vaccine against  
scuticociliatosis in cultured olive flounder

2006. 12

부경대학교

해양수산부

## 제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “양식 넙치 스쿠티카증에 대한 고효율 백신 개발” 과제의  
최종보고서로 제출합니다.

2006 년 12 월 일

주관연구기관명 : 부경대학교

총괄연구책임자 : 김 기 홍

## 요 약 문

### I. 제 목

양식 넙치 스쿠티카증에 대한 고효율 백신 개발

### II. 연구개발의 목적 및 중요성

스쿠티카증은 양식 넙치 치어에서부터 성어에 이르기까지 광범위하게 발생하며, 일단 스쿠티카증이 발생하면 곧바로 대량폐사를 유발할 뿐만 아니라 각종 주요 세균성 질병을 간접적으로 유도함으로써 넙치의 생산성에 심각한 피해를 초래하는 섬모충성 질병이다. 현재까지 스쿠티카증에 대한 연구는 치료에 초점을 맞추어 이루어져 왔으나, 아직까지 유효한 치료제는 개발되어 있지 않은 실정이다. 따라서 본 연구의 목적은 스쿠티카증을 근원적으로 제어 할 수 있는 고효율 백신을 개발하는 것이다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

구 분	목 표	내용 및 범위
1차 년도	백신용 스쿠티카증 항원 대량 제작 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 스쿠티카증 대량배양 기술 확립</li> <li>- 총체항원 및 분비항원 제작 기술 확립</li> <li>- 백신용 항원 대량 생산 기술 확립</li> </ul>
2차 년도	스쿠티카증 고효율 백신 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 스쿠티카증에 대한 유효 방어항체 생성 유도 기술 확립</li> <li>- 효과적인 백신 투여 기술 확립</li> <li>- 스쿠티카증에 대한 효율적 예방백신 시스템 확립</li> </ul>
3차 년도 (4차 년도)	양식 현장에서의 실용성 및 효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 대규모 종묘배양장에서의 백신 효과 검증</li> <li>- 면역화된 종묘의 축양장에서의 스쿠티카증 방어능력 검증</li> <li>- 양식 현장에서 저렴하고 손쉽게 사용할 수 있는 백신 투여 시스템 개발</li> </ul>

#### IV. 연구개발결과

- 국내 스쿠티카충 원인충의 종류를 형태학적 특징 및 ribosomal RNA gene sequence 분석을 통해 3종인 것으로 확인
- multiplex PCR법을 이용한 스쿠티카충 원인충에 대한 신속감별법 개발
- 스쿠티카충 in vitro 배양 조건 확립
- whole cell 항원 및 분비항원을 이용한 백신제작
  
- 스쿠티카충 cDNA library 제작 및 EST 분석
- Suppression subtractive hybridization 및 RACE를 이용한 스쿠티카충 방어 항체 유도용 항원유전자 Screening
- Site directed mutagenesis를 이용한 스쿠티카충 항원 유전자 재조합 발현 체계 구축
- 스쿠티카충에 대한 토끼 항혈청 제작 및 분석
- 스쿠티카충 종별 공통항원 검색
- Ghost *Edwardsiella tarda* 제작
  
- 3종의 스쿠티카충에 대한 formalin-killed vaccine 및 homogenized vaccine 제작
- 스쿠티카충 항원 유전자에 대한 재조합 단백질 백신 제작
- 스쿠티카충 항원단백질을 세균에 발현시킨 백신 제작
- 스쿠티카충 항원유전자를 *E. tarda* Ghost의 표면에 발현시킬 수 있는 Dual vector 개발
- 스쿠티카충 항원유전자 표면발현 *E. tarda* Ghost를 이용한 백신 제작 및 넙치에서의 방어력 검증

## V. 연구개발결과의 활용계획

기간	연구 및 상용화 계획
2006. 11. - 2007. 03	- 스쿠티카증 재조합 백신 기능 향상을 위한 항원유전자 추가 및 항원성 강화를 위한 유전자 조작 실험
2007. 04. - 2008. 08	- 참여기업인 대성미생물 연구소에 개발백신 기술 이전 - 대성미생물연구소와 함께 제작한 백신의 현장실험을 통한 효과 검증
2008. 09. - 2009. 08	- 개발된 백신의 수산물약품으로서의 허가를 받기 위한 제반 실험
2009. 09 -	- 스쿠티카증 재조합 예방백신 상용화 및 지속적인 Version-Up 연구

## S U M M A R Y

### I. Title

Development of an effective vaccine against scuticociliatosis in cultured olive flounder

### II. Importance and Objective

Scuticociliatosis, caused by an protozoan ciliate, is a well-known culprit of massive death of cultured olive flounder and causes an outbreak of various biological diseases related to bacterial infection, also. Although several attempts have been done to treat the disease by various chemotherapeutics, there is at present no effective in vivo chemotherapeutics especially for internal infections. Therefore, the aim of the present study was to develop effective vaccines, which can offer the best way to control scuticociliatosis.

### III. Contents and Range of Research

Year	Objective	Contents and Range
1st	Mass production of scuticociliate antigens for vaccine	<ul style="list-style-type: none"> <li>- in vitro Mass culture of scuticociliates</li> <li>- Production of Crude and E/S antigens of scuticociliates</li> <li>- Mass production of scuticociliate antigens for vaccine</li> </ul>
2nd	Development of an effective vaccine against scuticociliatosis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Induction of protective antibody against scuticociliates</li> <li>- Effective vaccine delivery methods</li> <li>- Establishment of an effective vaccine system agaisnt scuticociliatosis</li> </ul>
3rd (4th)	Confirmation of the vaccine effectiveness at hatcheries and culture farms	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Confirmation of the vaccine effectiveness at hatcheries</li> <li>- Confirmation of the vaccine effectiveness at culture farms</li> <li>- Development of effective vaccine delivery system at culture farms</li> </ul>

#### IV. Results

- Identification of 3 scuticociliate species responsible for scuticociliatosis in cultured olive flounder based on the morphological characteristics and riosomal RNA gene sequences
- Development of rapid diagnosis methods for scuticociliate species identification using multiplex PCR
- Establishment of in vitro culture methods of scuticociliates
- Vaccine preparation using whole cell & E/S antigens of scuticociliates
  
- Construction of cDNA libraries of scuticociliates and EST analysis
- Screening of protective antibody-inducing antigens using suppression subtractive hybridization and RACE
- Site directed mutagenesis of scuticociliate antigen genes and Production of scuticociliates antigens as recombinant proteins
- Production of Rabbit polyclonal antibody against scuticociliates
- Screening of common antigens across scuticociliate species
- Generation of Ghost *Edwardsiella tarda*
  
- Preparation of formalin-killed and homogenized vaccines
- Preparation of recombinant protein vaccines against scuticociliatosis
- Development of dual vector, which can induce ghost bacteria and can display heterologous antigens on the bacterial ghost surface
- Production of *E. tarda* ghost expressing scuticociliate antigens on the surface and Confirmation of the vaccine effectiveness

## V. Application plan

Period	Research and Commercialization
2006. 11. - 2007. 03	- Supplementation of the research for enhancement of the vaccine effectiveness
2007. 04. - 2008. 08	- Transfer of the vaccine technologies to the participate enterprise - Confirmation of the vaccine effectiveness at culture farms
2008. 09. - 2009. 08	- Experiments needed for approval as a fisheries medicine
2009. 09 -	- Commercialization of the vaccine and consistent version-up study



CONTENTS

Chapter 1 Introduction ----- 10

Chapter 2 Research and development state ----- 14

Chapter 3 Research results ----- 16

Chapter 4 Accomplishment of the purpose and Contribution  
----- 129

Chapter 5 Application plan of the research results ----- 132

Chapter 6 References ----- 134

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	10
제 2 장 국내외 기술개발 현황	14
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	16
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	129
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	132
제 6 장 참고문헌	134

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1절 연구개발의 필요성

### 1. 연구개발의 필요성

양식 넙치에 발생하는 스쿠티카충은 어류의 대량폐사를 유발함으로써 “기르는 어업”에 심각한 타격을 입히고 있다. 넙치 양식 과정에 발생하는 주요 감염성 질병으로는 바이러스성, 세균성 및 기생충성 질병등이 있으며, 이러한 질병 중 섬모충성 기생충질병인 스쿠티카충은 특히 우리나라 양식어 중 가장 많은 생산량을 차지하는 넙치의 치어에서 부터 성어에 이르기까지 광범위하게 기생하여 대량폐사를 유발하기 때문에 스쿠티카충은 ‘기르는 어업’의 생산성 증진에 커다란 위협 요인으로 대두되어 있다.

스쿠티카충은 어류의 체표, 아가미는 물론 뇌에까지 침투하기 때문에 일단 기생당한 어류는 거의 100% 폐사에 이르게 된다. 스쿠티카충은 섬모충문 Scuticociliata 목에 속하는 원충류의 일종으로서 본래는 해수중에서 자유생활을 하는 원충류이지만 특정 상황에서는 돌연히 어류를 공격하여 조직을 파괴하는 기생충으로 전환되는 기회성 기생충 (facultative parasite)이다. 일단 어체에 기생을 하면 어류의 표피는 물론 뇌에까지 침투하기 때문에 스쿠티카충에 기생당한 어류는 거의 100% 폐사에 이르게 된다.

근래들어 스쿠티카충은 일년내내 발생하면서 그 피해량도 해마다 증가하는 추세에 있지만, 현재까지는 전혀 유효한 제어대책이 없는 실정이다. 국내의 넙치 양식장에서 스쿠티카충의 발생동향을 보면 주로 저수온기에 집중하여 발생하였지만, 근래 들어서는 여름철에도 스쿠티카충이 발생하여 많은 피해를 주고 있다. 지금까지 스쿠티카충에 대한 대처방법은 사육원수의 소독 및 감염개체의 포르말린, 과산화수소수 약욕 혹은 담수욕등이 거의 대부분이다. 포르말린은 다소의 구제효과를 기대하여 가장 많이 사용되어지는 화학물질이지만 이 물질은 유해 환경오염원으로 되어 있어 그 사용에 제한을 받을 뿐만 아니라 근래에는 매우 높은 농도의 포르말린 약욕에도 불구하고 전혀 치유가 되지 않는 실정이다. 더구나 외부기생 스쿠티카충에 대해서는 화학약제의 약욕을 통해 어느 정도의 구제효과를 기대할 수 있지만 대부분의 경우 스쿠티카충은 신속히 내부로 이행하여 뇌 및 척수를 포함한 각종 내부장기에 까지 이르기 때문에 내부 기생 스쿠티카충에 대한 구제제로서의 효과는 기대

할 수 없다.

스쿠티카충에 대한 지금까지의 연구는 주로 스쿠티카충을 죽일 수 있는 살충물질에 초점을 맞추어 왔으며, 최근 케토코나졸을 이용한 치료제가 개발단계에 있으나, 아직까지 유효한 치료제는 수산용 약제로서 판매되어지지 못하고 있다. 이러한 사실은 스쿠티카충에 감염된 후의 치료보다 백신개발을 통한 예방이 절실히 필요함을 시사한다.

#### 가. 기술적 측면

- 대부분의 경우 스쿠티카충은 신속히 어체 내부로 이행하여 뇌 및 척수를 포함한 각종 내부장기에 까지 이르기 때문에 기존의 약제로는 치료효과를 기대하기 어려움
- 종묘장에서부터 스쿠티카충에 대한 방어항체를 지닌 치어를 생산해 냄으로써 축양장에서의 불필요한 화학약제 사용을 줄이고 생산성을 높일 수 있는 고효율 백신 개발이 절실함

#### 나. 경제·산업적 측면

- 스쿠티카충은 직접적으로 대량폐사를 유발할 뿐만 아니라 각종 주요 세균성 질병을 간접적으로 유도함으로써 넙치의 생산성에 막대한 피해를 초래
- 스쿠티카충을 구제하기 위한 고가의 약제사용 및 화학약품의 오용은 양식어가의 경제성을 저해하고 동시에 환경오염을 야기

#### 다. 사회·문화적 측면

- 화학약제의 사용으로 인한 부작용 및 소비자의 선호도를 높이기 위해서는 효과적인 백신 개발이 필수적

## 2. 국내·외 관련연구의 현황과 문제점

현재까지 세계적으로 어류에 기생하여 피해를 입힌 것으로 보고된 scuticociliate 종류는 New York의 해산어 수족관에서 발생하여 피해를 입힌 *Uronema marinum*<sup>(1)</sup>, 호주의 bluefin tuna의 뇌에 침입하여 치명적인 뇌염을 일으킨 *Uronema nigricans*<sup>(2)</sup>등이 있으며, 종은 확실히 동정되지 않았지만 Scuticociliatida목에 속하는 섬모충으로서 스페인의 양식 turbot에 피해를 입힌 보고<sup>(3)</sup>가 있다. 가까운 일본에서도 scuticociliate의 기생으로 인해 양식 넙치에 심각한

피해를 입은 바 있으며 <sup>(4)</sup>, 그외 새우류에서는 치명적인 bumper car diseases를 일으키는 *Anophryoides haemophila* <sup>(5)</sup>가 있다. 이와같이 외국의 경우에도 스쿠티카증에 대한 피해사례 및 연구보고가 되어 있기는 하지만 그 피해규모가 크지 않기 때문에 비교적 많은 연구는 이루어져 있지 않은 실정이며, 스쿠티카증으로 인해 양식 넙치 생산에 큰 피해를 입은 일본에서조차도 과학적인 연구가 거의 보고되어 있지 않은 실정이다.

이와 반면에 우리나라의 양식 넙치에 기생하는 스쿠티카충은 다른 나라의 경우와는 달리 양식 넙치에 심각한 피해를 주고 있으며, 이에 대한 대책이 시급히 이루어져야만 함에도 불구하고 아직까지 스쿠티카충에 대한 심도 있는 기초연구조차 거의 이루어져 있지 않은 실정이다. 현재까지 국내에서는 양식 넙치의 스쿠티카충에 대해 약간의 연구가 진행되어진 바 있으나, 단순히 스쿠티카충의 분열 혹은 여러 물질의 *in vitro* 살충력등에만 초점을 맞추어 실험이 진행되었으며, 이러한 실험의 결과에 있어서도 효과적인 치료물질은 밝혀진 바가 없다. 이러한 결과는 앞에서도 언급한 바와 같이 치료 보다는 백신개발을 통한 예방만이 스쿠티카증을 효율적으로 제어할 수 있는 대책임을 분명히 보여 주는 것이라 할 수 있다.

### 3. 앞으로 전망

본 연구는 양식 넙치에 심각한 타격을 입히고 있는 스쿠티카충에 대해서 세계에 서 최초로 예방 백신을 개발한다는 점에서 기존의 관련 연구와는 큰 차이가 있다. 어류의 세균성 질병중 비브리오증과 같은 몇몇 질병원에 대해서는 선진 외국의 경우 이미 백신이 개발되어 시판되고 있으나, 어류 기생충의 경우에는 세균과 달리 *in vitro*에서의 대량배양이 매우 힘들기 때문에 아직까지 효과적인 백신은 전세계적으로 개발되어진 바가 없다. 따라서 본 과제의 연구결과는 어류질병에 관한 분야에서 세계적으로 매우 큰 의미를 지닌다고 할 수 있다.

## 제 2절 연구개발의 목표 및 내용

### 1. 최종 목표

- 스쿠티카증을 근원적으로 제어 할 수 있는 고효율 백신 개발
- 양식현장에서 저렴한 가격으로 신속하고, 실용적인 스쿠티카증 백신 개발
- 종묘생산부터 양성에 이르기까지 넉치의 전양식과정에 스쿠티카증을 효과적으로 제어할 수 있는 예방시스템 개발

### 2. 연차별 연구개발목표와 내용

구 분	목 표	내용 및 범위
1차 년도	백신용 스쿠티카증 항원 대량 제작 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 스쿠티카증 대량배양 기술 확립</li> <li>- 충체항원 및 분비항원 제작 기술 확립</li> <li>- 백신용 항원 대량 생산 기술 확립</li> </ul>
2차 년도	스쿠티카증 고효율 백신 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 스쿠티카증에 대한 유효 방어항체 생성 유도 기술 확립</li> <li>- 효과적인 백신 투여 기술 확립</li> <li>- 스쿠티카증에 대한 효율적 예방백신 시스템 확립</li> </ul>
3차 년도	양식 현장에서의 실용성 및 효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 대규모 종묘배양장에서의 백신 효과 검증</li> <li>- 면역화된 종묘의 축양장에서의 스쿠티카증 방어능력 검증</li> <li>- 양식 현장에서 저렴하고 손쉽게 사용할 수 있는 백신 투여 시스템 개발</li> </ul>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1절 국외 기술개발 현황

현재까지 세계적으로 어류에 기생하여 피해를 입힌 것으로 보고된 scuticociliate 종류는 New York의 해산어 수족관에서 발생하여 피해를 입힌 *Uronema marinum*<sup>(1)</sup>, 호주의 bluefin tuna의 뇌에 침입하여 치명적인 뇌염을 일으킨 *Uronema nigricans*<sup>(2)</sup> 등이 있으며, 종은 확실히 동정되지 않았지만 Scuticociliatida목에 속하는 섬모충으로서 스페인의 양식 turbot에 피해를 입힌 보고<sup>(3)</sup>가 있다. 가까운 일본에서도 scuticociliate의 기생으로 인해 양식 넙치에 심각한 피해를 입은 바 있으며<sup>(4)</sup>, 그외 새우류에서는 치명적인 bumper car diseases를 일으키는 *Anophryoides haemophila*<sup>(5)</sup>가 있다. 이와같이 외국의 경우에도 스쿠티카증에 대한 피해사례 및 연구보고가 되어 있기는 하지만 아직까지 많은 연구는 이루어져 있지 않은 실정이며, 스쿠티카증으로 인해 양식 넙치 생산에 큰 피해를 입은 일본에서조차도 과학적인 연구가 거의 보고되어 있지 않은 실정이다. 결론적으로 본 연구에서 수행하고자 하는 스쿠티카증 백신에 대해서는 현재까지 전혀 연구되어진 바가 없다.

### 제 2절 국내 기술개발 현황

우리나라의 양식 넙치에 있어서 스쿠티카증은 넙치 양식에 심각한 피해를 주고 있으며, 이에 대한 대책이 시급히 이루어져야만 함에도 불구하고 아직까지 스쿠티카증에 대한 심도 있는 연구는 거의 이루어져 있지 않은 실정이다. 현재까지 국내에서는 양식 넙치의 스쿠티카증에 대해 약간의 연구가 진행되어진 바 있으나, 단순히 스쿠티카충의 분열 혹은 여러 물질의 *in vitro* 살충력등에만 초점을 맞추어 실험이 진행되었으며, 이러한 실험의 결과에 있어서도 효과적인 치료물질은 밝혀진 바가 없다. 최근 케토코나졸을 이용한 스쿠티카증 치료제 개발이 추진되고 있으나 아직 상품화 단계에는 도달하지 못한 상태이며, 이러한 결과는 앞에서도 언급한 바와 같이 치료 보다는 백신개발을 통한 예방만이 스쿠티카증을 효율적으로 제어할 수 있는 대책임을 분명히 보여 주는 것이라 할 수 있다. 본 연구에서 수행하고자 하는 스쿠티카증 백신에 대한 연구는 아직까지 국내에서도 전혀 연구되어진 바가 없다.

### 제 3절 본 연구가 국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

본 연구는 양식 넙치에 심각한 타격을 입히고 있는 스킨카증에 대해서 세계에서 최초로 예방 백신을 개발한다는 점에서 기존의 관련 연구와는 큰 차이가 있다. 어류의 세균성 질병중 비브리오증과 같은 몇몇 질병원에 대해서는 선진 외국의 경우 이미 백신이 개발되어 시판되고 있으나, 어류 기생충의 경우에는 세균과 달리 *in vitro*에서의 대량배양이 매우 힘들기 때문에 아직까지 효과적인 백신은 전세계적으로 개발되어 진 바가 없다. 따라서 본 과제의 연구결과는 어류질병에 관한 분야에서 세계적으로 매우 큰 의미를 지닌다고 할 수 있다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1절 넙치 스쿠티카증 원인충의 종 분류 및 Multiplex PCR을 이용한 신속 종 진단

#### 1. 연구내용

국내 양식 넙치에 발생하는 스쿠티카증의 원인충은 *Uronema marinum* 인 것으로 동정되었으나, 실제 양식 현장에서의 스쿠티카증 발병양상 및 증세는 매우 다양하게 나타나고 있다. 스쿠티카증 원인충에 대한 종동정은 스쿠티카증 백신개발 전략을 수립하는데 매우 중요하기 때문에 본 연구에서는 먼저 국내에서 발생하는 스쿠티카증 원인충의 종류가 1종이 아닌 각기 생물학적 특성이 다른 여러 종에 의해서 발생할 가능성을 알아보기 위해 국내 양식장에서 발생한 스쿠티카충들을 수집하여 종동정을 수행하였다. 종동정은 형태학적 특징 및 비교적 염기서열이 conserve되어 있는 18s rRNA gene sequencing을 통해 이루어졌으며, 그 결과로 국내 양식 넙치에 발생하는 스쿠티카증의 원인충이 *Uronema marinum* 외에 *Pseudocohnilembus persalinus* 및 유럽의 양식 turbot에 큰 피해를 주고 있는 *Philasterides dicentrarchii* 등 총 3종의 스쿠티카충이 국내 양식 넙치의 스쿠티카증을 일으키는 것으로 나타났다. 또한 본 연구에서는 섬모충을 형태학적으로 동정하기 위해서는 많은 시간과 노력이 필요하기 때문에 multiplex polymerase chain reaction (PCR)법을 이용해 신속하게 스쿠티카충 종을 동정할 수 있는 특이 primer 및 조건을 개발하였다.

#### 2. 연구방법

##### 가. 스쿠티카충의 wet silver nitrate 염색을 통한 형태학적 특징 분석

(1) 고정 및 후고정: 원심분리를 이용하여 충을 모은 후 Champy's fixative에 넣고 30분동안 고정한 후 고정액을 제거하고 Da Fano's fluid에서 5 min동안 후고정하였다.

(2) 염색: 화염알콜로 처리한 슬라이드를 35°C ~ 45°C의 hot plate에 올려놓고 gelatin 조각을 1 mm의 크기로 잘라 슬라이드에서 녹였다. 충고정액을 녹은 gelatin 위에 넣고 gelatin을 잘 펴주었다. 차가운 chamber에 슬라이드를 넣고 굳힌 후 10초간 차가운 증류수에 슬라이드를 수세하였다. 차가운 silver nitrate 용액에 슬라이드를 넣고 1시간동안 염색한 후 차가운 증류수로 수세하였다. 흰색 바탕의 petridish에 3 cm 높이의 차가운 증류수를 넣고 거기에 슬라이드를 넣은 후 햇볕에 10분동안 노출시켰다. 해부현미경으로 염색강도를 확인한 후 탈수를 위해서 차가운 30%, 70%의 알코올에 10 분씩, 100% 알코올에 10분씩 2번 탈수하였다. xylene에 10 min동안 두어 투명한 후 mounting한 후 현미경으로 관찰하였다.

#### 나. 스쿠티카충 배양 및 DNA 추출

스쿠티카충을 Minimum Essential Medium (MEM)을 이용해 실온에서 3일간 배양하여 최대 증식시킨 후 원심분리 방법으로 충을 모았다. DNA 추출은 Accuprep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer)를 이용하여 추출하였으며 추출 방법은 공급자가 제공한 방법에 따라 실행하였다.

#### 다. PCR을 이용한 ribosomal RNA gene의 증폭 및 염기서열 분석

(1) primer 설계: ribosomal RNA gene에 대한 universal primer와 NCBI의 다른 섬모충의 염기서열을 참고하여 ribosomal RNA gene의 염기서열 분석이 가능하도록 primer 한쌍을 설계하였다. primer의 염기서열은 UFO : 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAG-3'(forward primer), URE2 : 5'-TGATCCATCTGCAGGTTTAC-3'(reverse primer)이었다.

(2) PCR 반응에 의한 ribosomal RNA gene의 증폭: 각 종별 스쿠티카충의 DNA 50 ng을 template로 준비하고 앞서 설계한 primer를 이용하여 PCR반응을 수행하였다.

(3) PCR products의 Cloning 및 Transformation: PCR 반응 결과 생성된 PCR products를 1% agarose gel에서 전기영동하여 band를 확인한 후 band를 잘라서 Gel Extraction Kit(Nucleogen)를 이용하여 elution하였다. PCR products의 Cloning 과정은 pGEM-T easy vector® (Promega)를 사용하여 공급자가 제공한 방법에 따라 실행하였다. white colony를 선별하여 Ampicillin이 첨가된 LB broth 배지에 접종하고 37°C에서 overnight 배양한 후 GeneAll Plasmid SV mini Kit(general biosystem)를 이용하여 plasmid DNA를 추출하였다.

(4) 염기서열분석: T7과 SP6 primer로 initial sequencing을 실시하였고 약 400-500bp 간격으로 walking primer를 설계하여 initial sequence의 연장선상에서

염기 배열을 판독하였다.

#### 라. Multiplex - PCR을 이용한 신속 종진단법

각 종별로 염기서열을 비교 분석하여 종별 특이 primer를 설계하였다. primer의 염기서열은 *Uronema marinum*의 특이 primer인 UM 1F : 5'-CTTCTGTACAGTCTCATTTC-3', UM 1R : 5'-AACGCCAATTAAGATCAAC-3', *Pseudocohnilembus persalinus*의 특이 primer인 PC 1F : 5'-TTTCTGCACGTGCCCGGTTG-3', PC 1R : 5'-AGCAAGTTGTATTGACCTGC-3', *Philasterides dicentrarchi*의 특이 primer인 PD 1F : 5'-CGGACCGGCTTATAAACTGG-3', PD 1R : 5'-GTAACGCCAATTGTGCATCGAAC-3'이었다. PCR 반응은 Perfect Premix(TAKARA)를 이용하여 수행하였고 50 ng의 template 1  $\mu$ l, 각 primer 1  $\mu$ l 씩(총 6  $\mu$ l), 멸균증류수 3  $\mu$ l를 premix에 첨가하여 총 20  $\mu$ l가 되게한 후 thermal cycler를 사용하여 PCR을 수행하였다.

### 3. 연구결과

#### 가. 스쿠티카충의 염색 결과 및 형태적 특징

##### (1) *Pseudocohnilembus persalinus* (Fig. 1-1 & 1-2)

The ciliates were elongated, spindle-shaped and measured 29 to 42  $\mu$ m in length and 15 to 19  $\mu$ m in width. A large globular macronucleus and a small micronucleus were located at the level of the buccal entrance. The posterior cytoplasm was filled with numerous food vacuoles. The somatic ciliatures were sparsely arranged, consisting of 8 to 11 bi-polar kineties made up of 15 to 18 kinetids. A non-ciliated director-meridian began just posterior to the scutica and merged with the first kinety at the posterior pole. The cytophyge, a thick argentophilic patch, was located subcaudally. A contractile vacuole pore (CVP) opened at the posterior end of the third somatic kinety. The buccal field was 15 to 18  $\mu$ m in length and occupied the anterior half of the body. The buccal apparatus consisted of 3 membranelles: M1 was a single row and located just anterior to the paroral membrane (PM); M2 was also a single row and was

parallel to M1 and PM; M3 was very small and located at the end of the PM. The paroral membrane was gently curved and positioned at the right side of the buccal cavity.

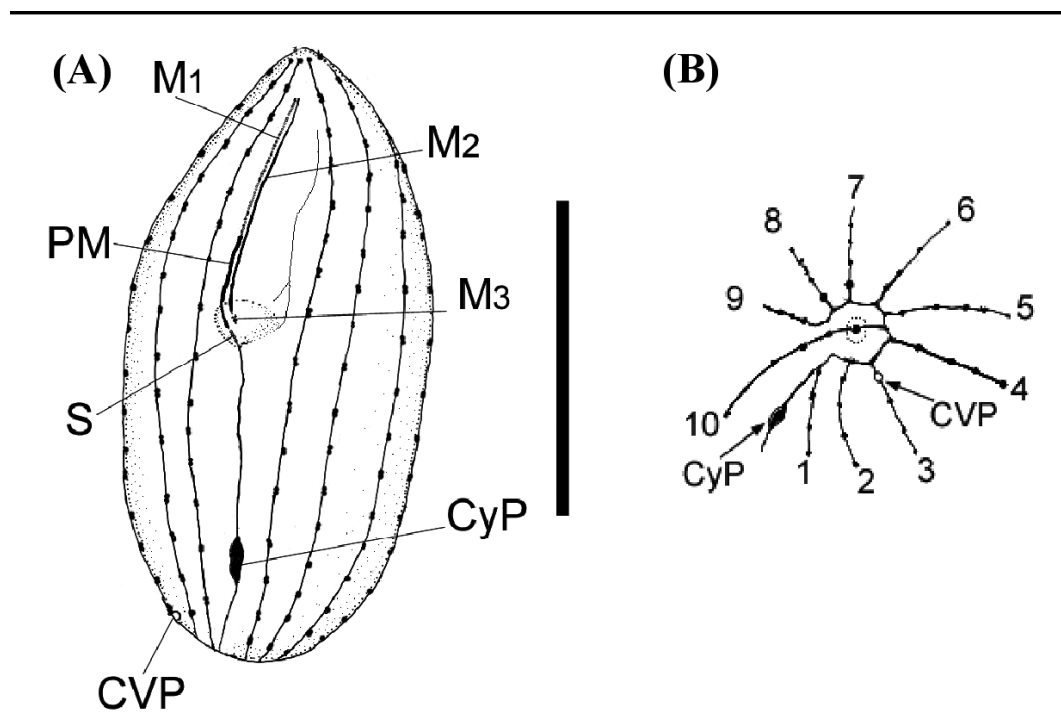


Fig. 1-1. *Pseudocohnilembus persalinus*. (A) Ventral view of silver impregnated specimen. CyP: cytopyge; CVP: pore of contractile vacuole; M1-M3: membranellae 1-3; PM: paroral membrane; S: scutico-vestige. Scale bar = 15  $\mu$ m. (B) Caudal view of silver impregnated specimen

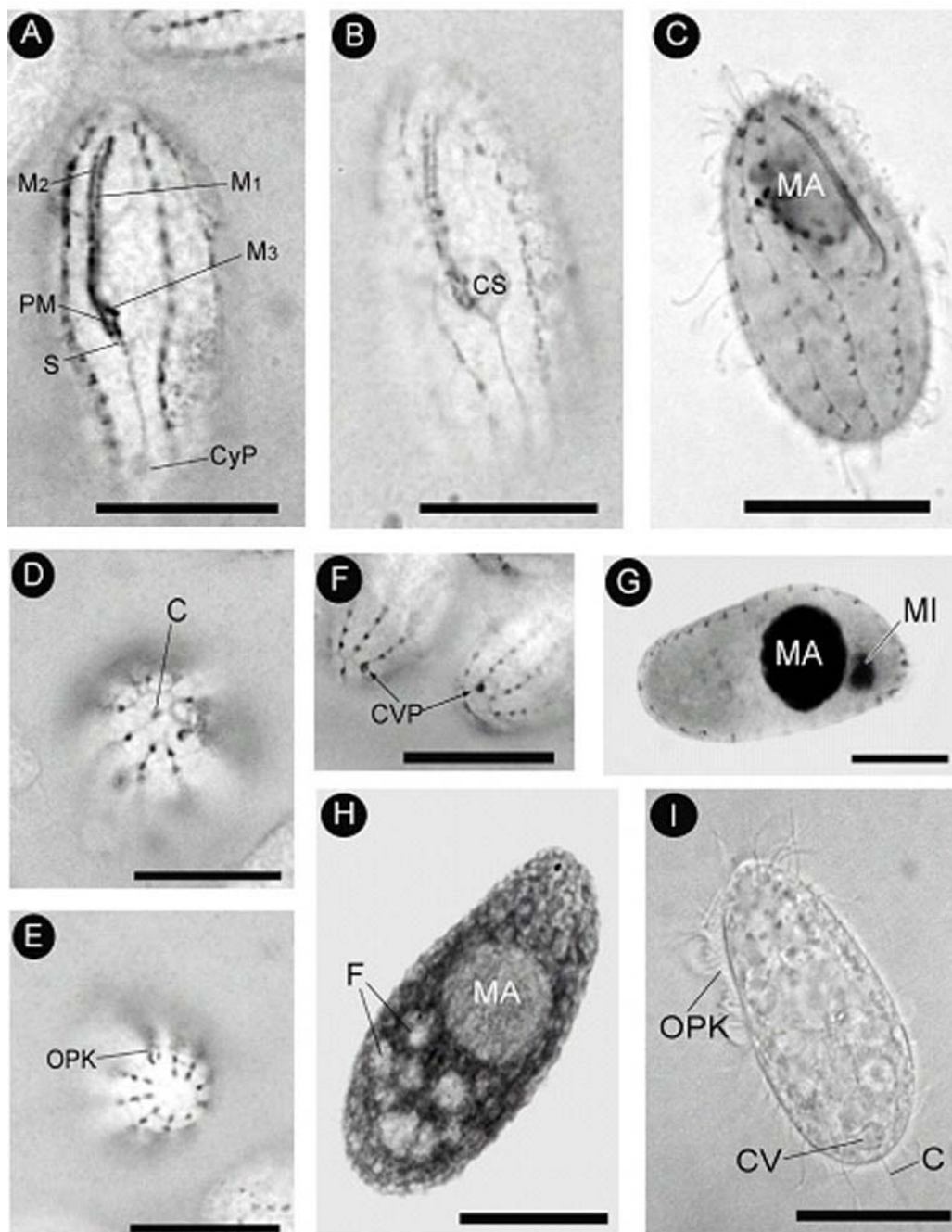


Fig. 1-2. *Pseudocohnilembus persalinus*의 형태적 특징

All bars = 10um . (A-C) A silver-impregnated ciliates showing the buccal apparatus composed of paroral membrane (PM), the 3 oral membranes (M1-3, membranelles 1-3) and the cytostome (CS), as well as the scutico-vestige(S). CyP, cytopyege; MA, macronucleus. Wet-silver impregnation in A and B and silver-carbonate impregnation in C. (D) The posterior end of a silver-impregnated

ciliate. C, caudal cilium. Wet-silver impregnation. (E) The apical pole of a silver-impregnated ciliate. OPK, oral polykinetids. Wet-silver impregnation. (F) Contractile vacuole pore (CVP) at posterior pole. Wet-silver impregnation. (G) silver-impregnated ciliate with a macronucleus (MA) and micronucleus (MI). silver-carbonate impregnation. (H) A Giemsa-stained ciliate showing a macronucleus (MA) and numerous food vacuoles. (I) Live ciliate observed under differential interference contrast microscope (DIC). CV, contractile vacuole.

**(2) *Philasterides dicentrarchii* (Fig. 1-3)**

The ciliate body was ovoid with an oval or irregular shaped macronucleus and a posteriorly situated contractile vacuole. The posterior half of the body was filled with numerous food vacuoles. The ciliate body was covered with 13 to 15 somatic kineties and a non-ciliated director meridian began just posterior to the cytostome and merged with the first kinety at the posterior end. The cytoproct was situated posteriorly on this meridian. At the posterior end, one caudal cilium present in the center and all kineties except the last one merged to an argentophilic line and formed a caudal cilium complex. The buccal apparatus consisted of 3 membranelles on the left side of the buccal cavity and a bipartite paroral membrane on the right side. Membranelle 1 (M1) was triangular or spindle-shaped, positioned near the apical pole and was clearly separated from other membranelles. M2 was trapezoidal-shaped and located close to M3. M3 was small and parallel to the base line of M2. The paroral membrane had 2 distinct parts. The first part of the paroral membrane (PM1) ran along the side of the M2 and was slightly straight. It began at the anterior part of M2 and ended at the posterior terminus of the M3. The second part of paroral membrane (PM2) was longer than the first one and slightly curved. It started from the posterior end of M3.

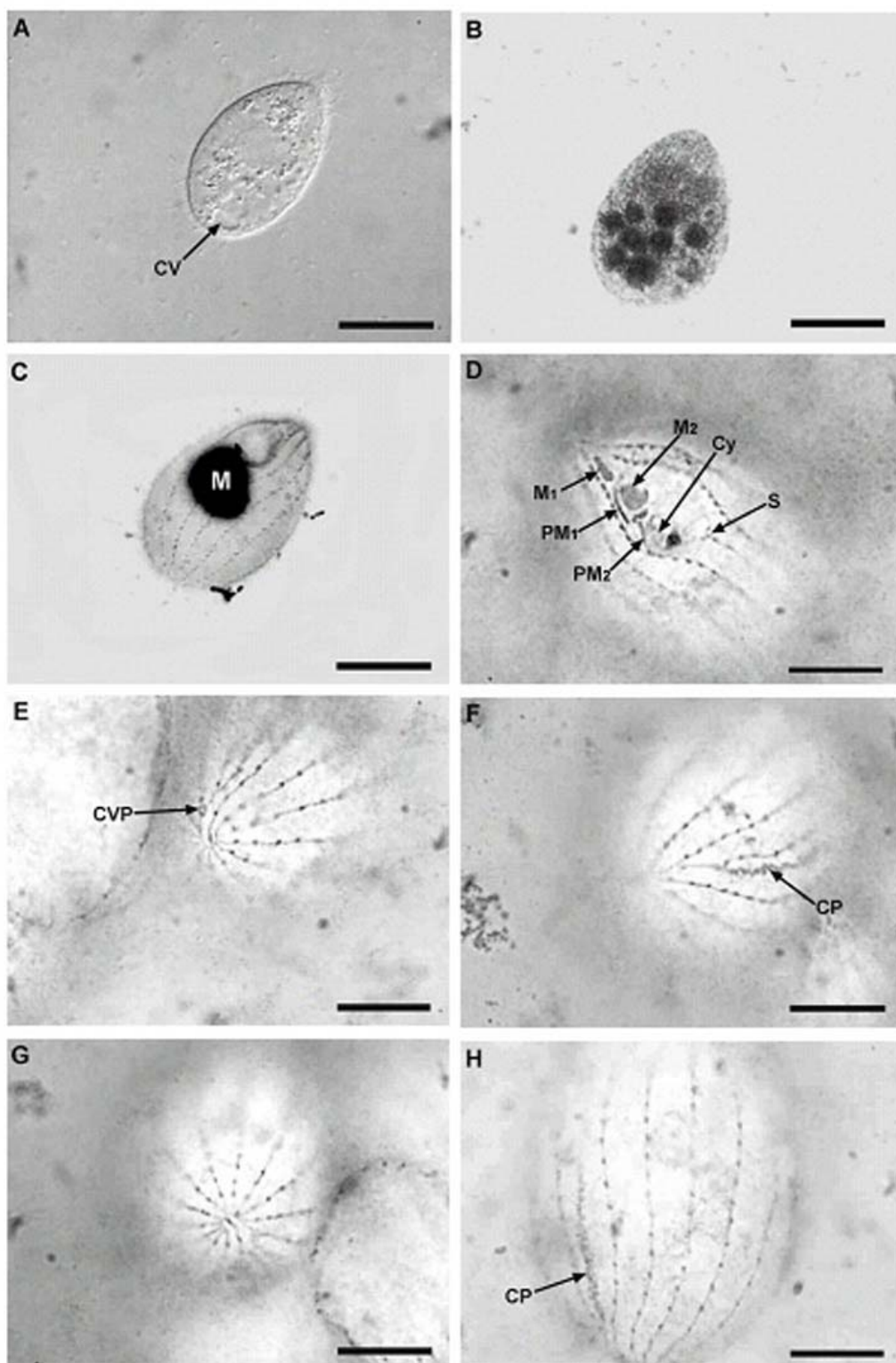


Fig. 1-3. 넙치에서 분리된 *Philasterides dicentrarchi*의 형태적 특징

(A) Live cell with contractile vacuole at the posterior end. (B) Giemsa-stained ciliate containing numerous food vacuoles. (C) The ciliate after silver carbonate impregnation. M, Macronucleus. (D) The ciliate after wet silver impregnation in ventral view. The buccal apparatus were composed of bi-partite paroral membrane (PM1, PM2), the 3 oral membranes (M1, M2 and M3) and the cytostome (Cy). S, Scutico-vestige. (E, F, G) The posterior end of a silver impregnated ciliate. The cytoproct (CP) merged with the first kinety and contractile vacuole pore (CVP) at the end of second kinety were observed. The somatic kineties except the last one connects each other by circular polar ring. Scale bars are 20um in Figs. A to C and 10um in Figs. D to H

#### 나. PCR법을 이용한 small subunit ribosomal RNA gene의 증폭 및 Sequence

*Pseudocohnilembus persalinus*, *Uronema marinum*, *Philasterides dicentrarchi*의 DNA를 추출하여 UFO와 URE2 primer를 이용하여 PCR 반응을 실시한 결과 약 1.7kb의 band가 나타났다 (Fig. 1-4).

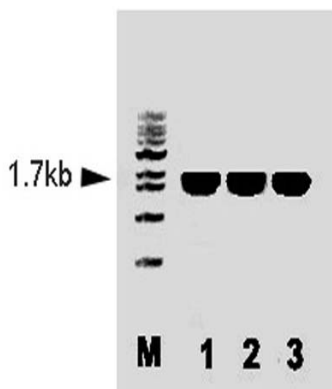


Fig 1-4. Small subunit ribosomal RNA gene의 증폭

M : 1kb marker

1: *Pseudocohnilembus persalinus*

2: *Uronema marinum*

3: *Philasterides dicentrarchi*



위 3종의 ssrRNA gene sequence는 Fig. 1-5와 같으며, sequence 비교를 통해 각종을 구분할 수 있는 특이 primer 위치를 분석하였다.

<i>P. pers</i>	597	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAMTT	<b>TCCTGACCGTG</b>	<b>CCCGGTTGTTG</b>	G-CTTCGGTC	655
<i>U. mari</i>	599	.....	.....	.....	<b>G.....T...AGT</b>	<b>T...AT...G...</b>	...A....	657
<i>P. dice</i>	600	.....	.....	.....	<b>C.....T...</b>	<b>A...C...</b>	<b>G.....</b>	659
<i>P. pers</i>	656	AGGCCGTGGC	GCGTGCAATCC	GTCTGCAAAC	CTAGACCGGC	CTTCACTGGT	CGACTAGGGG	715
<i>U. mari</i>	658	.A.AT..T.G	CT.....	.CT.....	G..G.TT...	..A.....	..G...TA.	717
<i>P. dice</i>	660	..-T...T	.TA.....	.CT.....	G.....T	.....T..A.	.....T..	718
<i>P. pers</i>	716	AGTAGACCTT	TTACCTTGAA	AAAATTAGAG	TGTTTCTAGC	AGGCAATTGC	TTGAATACAT	775
<i>U. mari</i>	718	....AG..C.	....T.....	.....	AG..	.....G..	.C.....	777
<i>P. dice</i>	719	....G.TC.	.....	.....	AG..	.....G..	.C.....	778
<i>P. pers</i>	776	TAGCATGGAA	TANTAGAATA	GGACTTCTG-	TCCATTTCTG	TGGTTATTGG	ACATTAGTAA	834
<i>U. mari</i>	778	.....	...G.....	.....T.-	.....G..	.....	..T.A....	836
<i>P. dice</i>	779	.....	...G.....	.....T.-	.....G..	.....	...A....	837
<i>P. pers</i>	835	TGATTAAAAG	GGACAGTTGG	GGGCATTAGT	ATTTAATTGT	CAGAGGTGAA	ATTCTTGGAT	894
<i>U. mari</i>	837	.....	.....	.....G..	.....CA..	.....	.....	896
<i>P. dice</i>	838	.....	.....	.....	.....	.....	.....	897
<i>P. pers</i>	895	TTATTAAAGA	CTAACTTATG	CGAAAGCATT	TGCCAAGGAT	GTTTTCATTA	ATCAAGAACG	954
<i>U. mari</i>	897	..G.....	.....	.....	.....	.....	.....	956
<i>P. dice</i>	898	.....	.....	.....	.....	.....	.....	957
<i>P. pers</i>	955	AAAGTTAGGG	GATCAAAGAC	GATTAGACAC	CGTCCTAGTC	TTRACTATAA	ACTATACCGA	1014
<i>U. mari</i>	957	.....	.....	...C...T..	.....	.....	.....	1016
<i>P. dice</i>	958	.....	.....	...C...T..	.....	.....	.....	1017
<i>P. pers</i>	1015	CTCGGAATCG	<b>GCGAGGTCTA</b>	<b>TACAGCTTTC</b>	<b>TCCGGCCCGT</b>	ATGAGAA-TC	AAAGTCTTTG	1073
<i>U. mari</i>	1017	..A.....	..ART..C.TT	.CA...ATT	C.....T..	.....A..	.....	1076
<i>P. dice</i>	1018	.....	<b>A.C..CTT</b>	<b>A...G.T</b>	.....	.....A..	.....	1077
<i>P. pers</i>	1074	GTTTCTGGGG	GGAGTATGGT	CGCAAGGCTG	AAACTTAAAG	GAATTGACGG	AAGGGCACCA	1133
<i>U. mari</i>	1077	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1136
<i>P. dice</i>	1078	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1137
<i>P. pers</i>	1134	CCAGGCCGTGG	AGCCTGCGGC	TTAATTTGAC	TCACACGGG	GAACTTACC	AGGTCCAAAC	1193
<i>U. mari</i>	1137	.....	.A.....	.....	.....	.....G	..CG.A....	1196
<i>P. dice</i>	1138	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1197
<i>P. pers</i>	1194	ATGGGTGGGA	TTGACAGATT	GAGAGCTCTT	TCTTGATTCT	ATGGGTGGTG	GTGCATGGCC	1253
<i>U. mari</i>	1197	TA....A...	.....	.....	.....	TA.....	.....	1256
<i>P. dice</i>	1198	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1257
<i>P. pers</i>	1254	GTTCTTAGTT	GGTGGAGTGA	TTTGTCTGGT	TAATTCGGTT	AACGAACGAG	ACCTTAACTT	1313
<i>U. mari</i>	1257	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1316
<i>P. dice</i>	1258	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1317
<i>P. pers</i>	1314	CGATTAAGAC	TACGCTTCTG	CGATTCGGTC	TTAATTCGGTT	GAGGCTTACC	AGGTCCAAAC	1373

Fig. 1-5. Sequence alignment of SS rRNA genes from three scuticiliate species: *Pseudocohnilembus persalinus* (*P. pers*; GenBank AY551906), *Uronema marinum* (*U. mari*; GenBank AY551905) and *Philasterides dicentrarchi* (*P. dice*; GenBank AY642280). The six oligonucleotides primers (PC 1F and PC 1R for *P. persalinus*; UM 1F and UM 1R for *U. marinum*; PD 1F and PD 1R for *P. dicentrarchi*) used for multiplex PCR were shown in black boxes.

#### 다. Multiplex-PCR을 이용한 스쿠티카충 종 진단

각 종의 PCR 증폭 크기에 차이가 나도록 특이 primer 쌍들을 제작하여 multiplex PCR 반응을 수행한 결과 Fig. 1-6에서와 같이 각각의 종 혹은 2-3종의 DNA를 함께 섞어서 template로 사용한 경우에도 각 종에 특이적인 PCR product가 생성되었다.

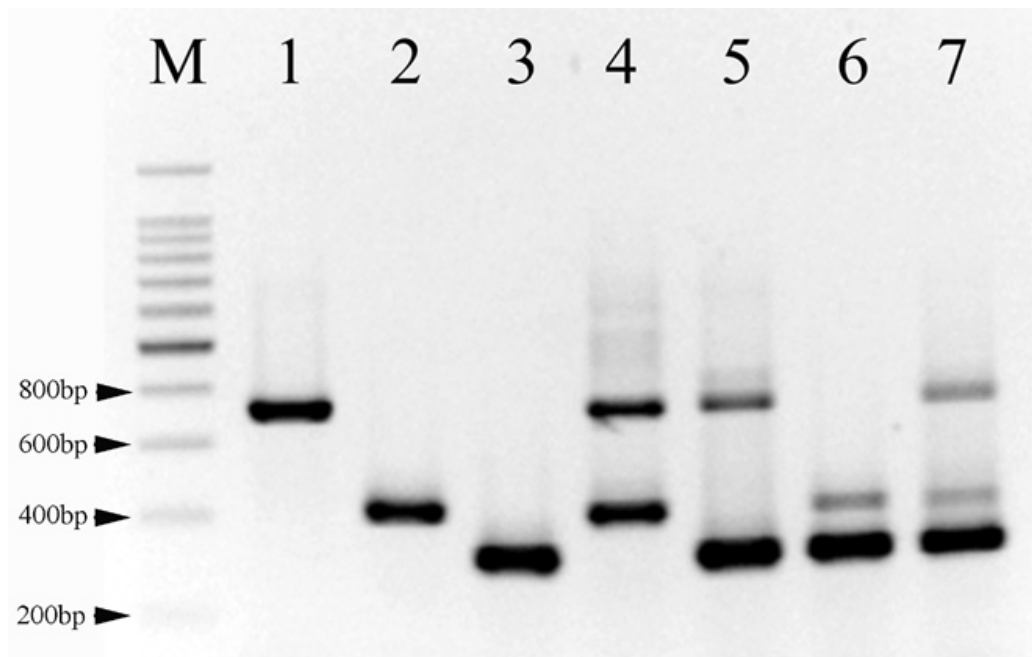


Fig 1-6. 종 특이 primer를 이용한 Multiplex-PCR의 결과

M : 200bp marker(Takara)

1 : *U. marinum* DNA template+U 1F/R, PC 1F/R, PD1F/R primer

2 : *P. persalinus* DNA template+U 1F/R, PC 1F/R, PD1F/R primer

3 : *P. dicentrarchi* DNA template+U 1F/R, PC 1F/R, PD1F/R primer

4 : *U. marinum*, *P. persalinus* DNA template+U 1F/R, PC 1F/R, PD1F/R primer

5 : *U. marinum*, *P. dicentrarchi* DNA template+U 1F/R, PC 1F/R, PD1F/R primer

6 : *P. persalinus*, *P. dicentrarchi* DNA template+U 1F/R, PC 1F/R, PD1F/R primer

7 : *U. marinum*, *P. persalinus*, *P. dicentrarchi* DNA template+U 1F/R, PC 1F/R, PD1F/R primer

## 제2절 스쿠티카충 *in vitro* 배양

### 1. 연구내용

스쿠티카충은 해수어에서의 기생생활 및 자유생활을 영위할 수 있는 facultative parasite이기 때문에 obligate parasite와 달리 *in vitro* culture가 가능한 병원체이다. 본 연구에서의 스쿠티카충 백신 개발의 전략도 초기에는 이러한 장점을 이용하여 *in vitro*에서 스쿠티카충을 대량배양한 후 이를 백신용 항원으로 사용하고자 하였다. 또한 본 연구 초기에는 국내 넙치 스쿠티카충 원인충으로서 *Uronema marinum*만이 보고되어 있었기 때문에 본 연구에서는 1차년도에 *U. marinum*을 *in vitro*에서 대량배양할 수 있는 방법에 대한 연구를 수행하였다. 그러나 연구를 수행하는 과정에서 제1절에 기술한 바와 같이 *U. marinum* 외에 *Pseudocohnilembus persalinus* 및 *Philasterides dicentrarchii* 등이 넙치 스쿠티카충을 일으키는 것으로 분석되어졌으며, 또한 역학적 조사 및 감염실험등을 통해 *P. dicentrarchii*는 *U. marinum*이나 *P. persalinus*에 비해 독성 및 생물학적 특성등이 매우 다른 것으로 나타났다. 따라서 본 연구 2차년도 부터는 *P. dicentrarchii*의 *in vitro* 배양 조건에 대한 연구도 첨가하여 실험을 수행하였다.

각 스쿠티카 종별 *in vitro* 배양 조건을 분석한 결과 *U. marinum*의 경우 무균배지에서 보다 세균이 혼합된 배지에서 성장이 잘 이루어지는 것으로 보아 주된 먹이원이 세균인 것으로 여겨졌다. 그러나 *P. dicentrarchii*의 경우에는 *U. marinum*을 키우는 배지에서는 성장이 잘 이루어지지 않은 반면 어류 배양 세포를 이용한 배양에서는 잘 증식하는 것으로 보아 histophagous 한 성격이 강한 것으로 나타났다. 이러한 충의 식습성은 넙치 스쿠티카충의 증세발현에도 영향을 미치는 것으로 여겨지며, 실제로 지금까지 넙치에서 발생하고 있는 스쿠티카충 중 폐사율이 높고 뇌를 포함한 전신적 감염이 잘 일어나는 경우는 주로 *P. dicentrarchii*에 의한 경우가 대부분이었다.

*P. dicentrarchii*의 국내 넙치 스쿠티카충에 대한 중요도를 고려할 때 본 종에 대한 *in vitro* 대량 배양이 필요하지만, 충을 cell line에 배양하거나 L-15 배지에 배양하는 경우 배지의 가격을 고려해 볼 때 소량의 strain의 유지에는 문제가 없으나, 현장 등지에 적용하기 위해 많은 양의 항원이 필요할 경우에는 전혀 경제성이 없다고 판단하여 본 연구 2차년도 중반부터는 스쿠티카충의 *in vitro* 대량배양을 통한 백신개발 전략을 수정하여 재조합 항원을 이용한 백신개발로 전략을 수정하게 되었다.

## 2. 연구방법

### 가. *Uronema marinum* in vitro 배양

#### (1) 산소의 영향

산소가 스쿠티카충의 성장과 분열에 미치는 영향을 알아보기 위하여 aeration 부여한 실험구의 스쿠티카충 성장률을 비교해 보았다. 배양용기는 바닥이 넓고 밀봉 뚜껑이 있는 플라스틱 용기를 사용하였다. Y media (0.25% yeast, 0.85% NaCl, pH 7.0)를 사용하여, 스쿠티카충을  $8 \times 10^4/\text{ml}$ 의 농도로 접종하여 24시간 마다 계수하였다. 산소의 영향과 더불어 배양 기간 중에 영양분을 보충해 주는 것에 대한 영향도 알아보았다. 실험구는 다음과 같다.

실험구 1	aeration
실험구 2	aeration + 배양 3일째 Y media 첨가
실험구 3	뚜껑 밀봉
실험구 4	뚜껑 밀봉 + 배양 3일째 Y media 첨가
실험구 5	뚜껑 개봉
실험구 6	뚜껑 개봉 + 배양 3일째 Y media 첨가

#### (2) Glucose의 영향

배양배지에 glucose 첨가가 스쿠티카충 성장률에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 glucose를 농도별로 첨가한 MEM 배지에 충을 배양하였다. glucose는 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.1 g/ml의 농도로 첨가하고 96 well plate에서  $5 \times 10^4/\text{ml}$ 의 농도로 스쿠티카충을 접종하여 시간대별로 계수하였다.

#### (3) Fermentation

세균의 대량배양에 사용되는 배양방법인 fermentation으로 스쿠티카충의 배양 효율을 비교하여 대량배양의 가능성을 확인하고자 하였다. 용량 5 l의 fermenter에 습윤 멸균된 Y media 3 l를 첨가하고 vvm은 0.5로 조정하여 스쿠티카충을  $1.7 \times 10^2/\text{ml}$ 의 농도로 접종한 후 시간대별로 계수하였다.

### 나. *Philasterides dicentrarchii* in vitro 배양

#### (1) 스쿠티카충의 분리

스쿠티카충 중에서 종을 감염된 녀치의 복수로부터 무균적으로 분리하여 HBSS()로 여러차례 washing한 후 우선적으로 confluent하게 배양된 CHSE-214 cell이 있는 culture flask에 접종하여 유지하였다.

## (2) 배지의 제조

L-glutamine이 첨가된 L-15 배지(Leibovitz)는 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 1L 분량의 L-15 powder를 900 ml의 3차 증류수에 녹인 후, 200 mg/ml의 농도로 ethanol에 녹인 L- $\alpha$ -leicithin stock solution을 1 ml 첨가하고 (최종농도는 200  $\mu$ g/ml이 된다) Tween 80 polyoxyethylenesorbitan monooleate, Sigma)를 1 ml 첨가하였다. 또한 배지 1 L 당 20 mg의 Adenosine, cytidine, uridine과 150 mg의 guanosine, 5 g의 glucose를 첨가하였다 모두 혼합한 배지는 pH를 7.2로 조정한다 다음 여과 필터(0.2  $\mu$ m)한 후 100 ml의 Fetal bovine serum(FBS, Hyclone)과 항생제 용액(10X, Hyclone)을 첨가하여 1L의 배지를 완성하였다.

## (3) *P. decentrarchi*의 배양

25 cm<sup>2</sup>과 75 cm<sup>2</sup>의 세포배양 용기에 적당량의 배지를 넣은 후 초기의 농도가 200 cells/ml의 농도로 *P. decentrarchi*를 접종하여 20°C에 배양하였다. 또한 삼각 플라스크 500 ml과 1 L 용기에 각각 200, 400 ml의 배지를 넣고 스쿠티카충을 접종하여 20°C에 배양하였다.

# 3. 연구결과

## 가. *Uronema marinum* in vitro 배양

### (1) 산소의 영향

Fig. 2-1 에서 알 수 있듯이 스쿠티카충 배양에 있어서 산소의 공급은 대량배양에 필수적인 요소인 것으로 나타났다. 그러나 배양중간에 영양분을 재차 공급하는 것은 총 성장에 큰 영향을 미치지 않았다. 배양용기 뚜껑을 개봉한 상태에서 자연적으로 공급되는 산소만으로는 스쿠티카충의 빠른 성장을 이끌어내기 어려웠으며, 따라서 스쿠티카충을 대량배양하기 위해서는 배양용기에 충분한 산소의 공급을 해주는 것이 필요하다.

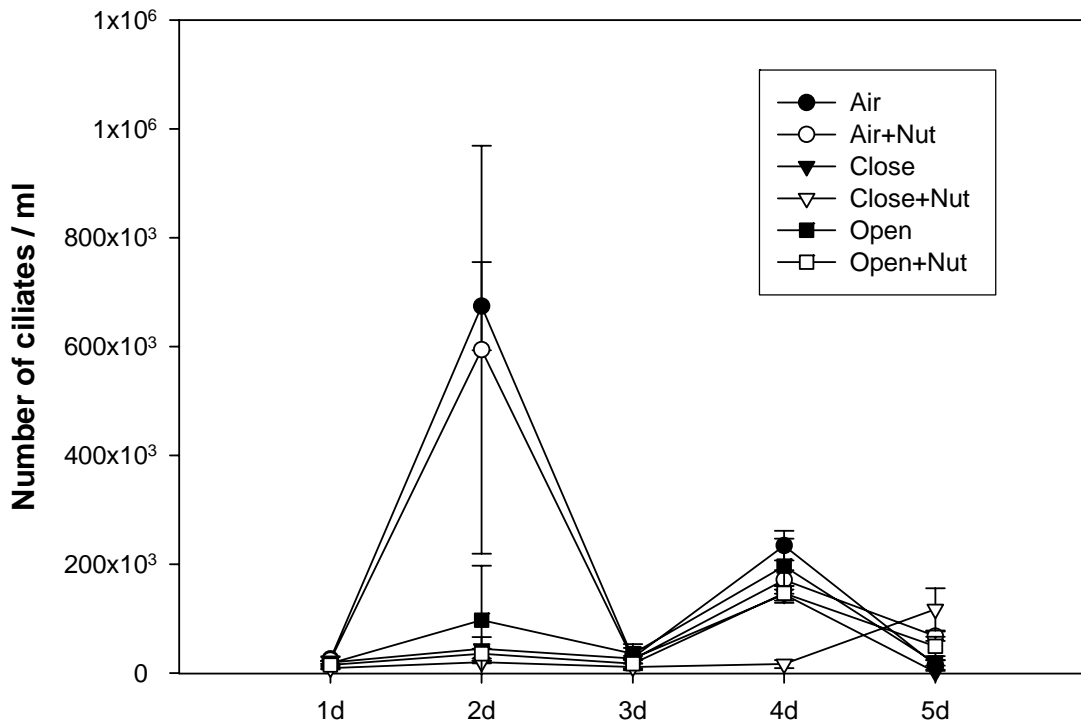


Fig. 2-1. Effects of aeration (Air) and supplemented nutrition (Nut) on the growth of scuticociliates.

## (2) Glucose의 영향

MEM 배지에 glucose를 농도별로 첨가하여 스쿠티카충 성장에 미치는 영향을 분석한 결과 glucose의 농도가 높을수록 더 높은 성장을 나타내었다 (Fig. 2-2). glucose의 농도가 5-20 g/L 사이에서는 총성장에 유의적인 차이가 없었으므로 총 배양시 5 g/L 정도의 glucose를 첨가시켜 주는 것이 좋을 것으로 여겨진다.

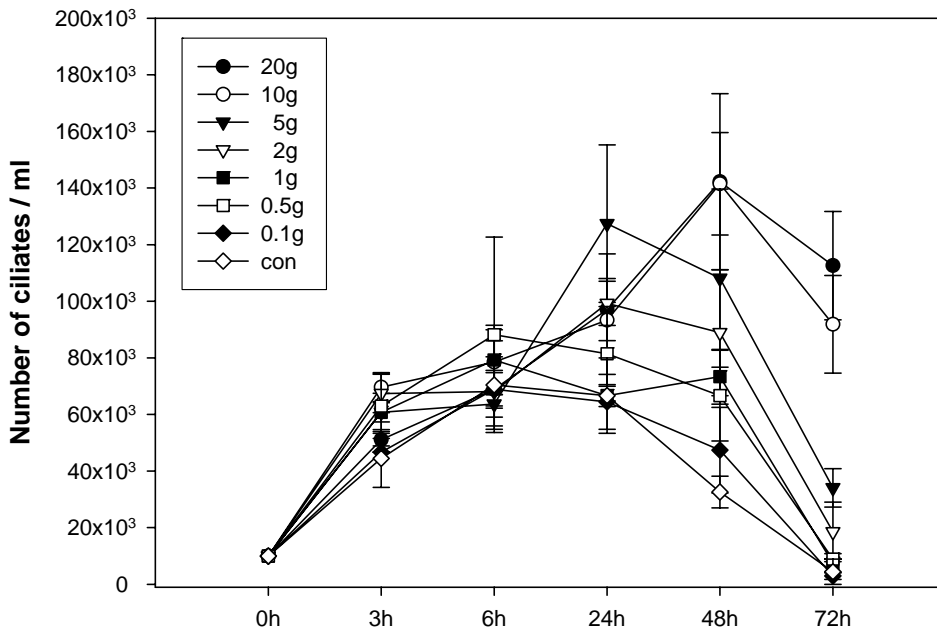


Fig. 2-2. Effect of glucose on the growth of scuticociliates.

### (3) Fermentation

fermentor를 이용한 스쿠티카충 배양은 batch culture와 달리 시간경과에 따라 꾸준한 성장을 나타냈으나 최대 총수가  $2.4 \times 10^5$  정도로서 백신생산에 필요한 단시간 대량배양에는 적절치 않은 것으로 나타났다.

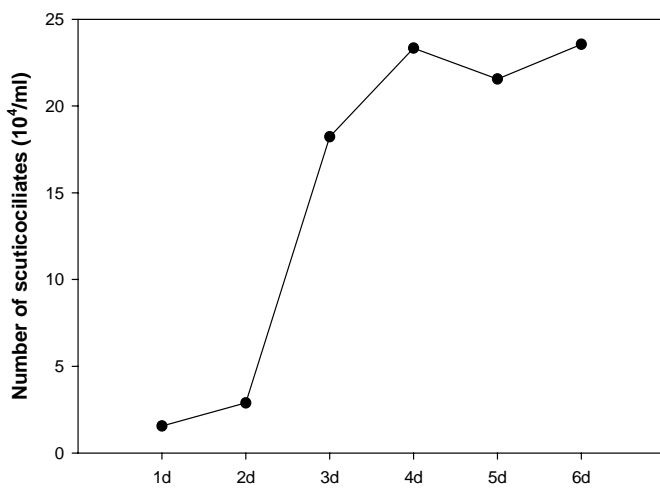


Fig. 2-3. Growth of scuticociliates by fermentation.

#### 나. *Philasterides decentrarchii* in vitro 배양

스쿠티카충에 감염된 넙치로부터 분리하여 CHSE-214 cell lines에 접종함으로써 스쿠티카충 *P. decentrarchii*가 수차례 계대 배양을 하여도 감염형과 유사한 형태와 크기를 유지하면서 성공적인 무균 배양이 이루어졌다. Iglesias et al. (2003) 논문에 의하면 *P. decentrarchii*를 배양할 때 FBS나 lipids와 같은 성분들이 모두 있는 배지에서 가장 안정적으로 배양이 되었다는 결과를 바탕으로 본 연구에서는 모든 성분을 다 포함한 배지만을 제조하여 그 효과를 보았다. 그 결과 complete L-15 배지에 배양하였을 때 역시 접종 후 일주일 뒤  $1.5 \times 10^5$  cells/ml의 cell density에 도달하며 무균적인 배양이 유지되었으며, 500 ml과 1 L 용량의 삼각플라스크에 배양하였을 경우에도  $2 \times 10^5$  cells/ml의 cell density에 도달하였다. 그러나 여러 가지 이유로 lipid 원으로 사용된 L- $\alpha$ -lecithin의 양을 조절하였더니, 처음 접종하였을 때와 수차례 계대배양을 할 경우 형태적으로 약간의 변화가 생겼다. 그러나 스쿠티카충을 cell line에 배양하거나 L-15 배지에 배양하는 경우 배지의 가격을 고려해 볼 때 소량의 strain의 유지에는 문제가 없으나, 현장 등지에 적용하기위해 많은 양의 항원이 필요할 경우에는 전혀 경제성이 없는 것으로 판단되었다.



## 제3절 스쿠티카충에 대한 항체 제작

### 1. 연구내용

현재까지의 실험결과 인위 감염이 용이하고 최근 병어에서 주로 분리되는 *Philasterides decentrarchi*에 대한 다량의 항체를 얻기 위해 토끼를 이용하여 스쿠티카충에 대한 polyclonal antibody를 생성하고자 하였다. 충 lysate를 adjuvant와 함께 토끼에 주사하여 다클론 항체를 얻었으며, ELISA를 통해 항체가를 측정하였다. 제작한 항체의 *P. dicentrarchii*에 대한 immobilization 및 killing activity를 분석하였으며, 또한 제작한 항체가 *Philasterides* 뿐만 아니라 *Uronema marinum* 및 *Pseudocohnilembus persalinus*에 대해서도 교차 반응이 나타나는가를 Western blot을 통해 확인하였다.

실험결과 *P. dicentrarchii* lysate를 이용해 제작한 항체는 *P. dicentrarchii*에 대해서는 immobilization 및 killing activity에 있어서 대조구 혈청에 비해 유의적인 차이가 나타난 반면 *U. marinum*과 *P. persalinus*에 대해서는 유의적인 반응이 나타나지 않았다. 제작 항체를 이용해 3종의 스쿠티카충에 대한 Western blot 결과에서는 *P. dicentrarchii*에 대해서는 강한 band들이 detect 되었지만 다른 2종에 대해서는 다수의 약한 band들이 detect되었다. 또한 *P. dicentrarchii*를 다른 조건으로 배양한 것을 비교한 경우에 있어서도 Western blot에 의해 다수의 서로 다른 band들이 detect되었다. 이러한 결과들은 어떤 특정 조건에서만 발현되는 항원 단백질만으로는 스쿠티카충 예방용 백신을 개발하는데 무리가 있으며, 따라서 종간에 교차반응을 나타내면서 항원성이 높은 conserved gene을 백신 target으로 잡는 것이 필요하다는 것을 알 수 있다.

### 2. 연구방법

#### 가. *Philasterides decentrarchi*의 whole cell lysate의 준비

CHSE-214 cell line에서 유지하던 *P. decentrarchi*의 cell을 원심분리하여 수집하고 수차례 HBSS로 washing한 후, 약  $3 \times 10^6$  cells을 1.5 ml의 HBSS에 재부유한 후에 sonication을 5 output에서 30초간 2회 실시한 후 protein 농도는 BCA 법을 이용하여 측정하였다.

## 나. Immunization

단백질 농도가 약 2 mg/ml 농도가 되도록 맞춘 후, 이것을 FCA와 1:1로 혼합한 다음 1 ml(antigen은 약 1 mg)을 여러 번 나누어 주사하였다. 처음 immunization 한 뒤, 2주 후에 동량의 protein을 IFA와 혼합하여 boosting하였다. 2주 후에 한번 더 boosting 한 후 2주 후에 채혈하였다. 처음 immunization하기 전에 pre-immune serum을 얻기 위해 3 ml 정도 채혈하였으며, 각 boosting하기 전, 채혈하여 serum을 분리해 두었다.

## 다. ELISA

두 번째 boosting 한 후 1주일째에 소량 채혈한 후 이제까지 보관해둔 항혈청을 이용하여 ELISA를 실시하였다. coating한 항원은 immunization할 때와 동일한 조건으로 준비하여 1.5 mg/ml과 0.3mg/ml의 농도 두 가지의 농도로 맞추었다. 각 농도별 antigen을 50  $\mu$ l씩 ELISA용 96 well plate에 넣고, 60°C에서 2시간 건조하여 coating시켰다. 이를 200  $\mu$ l의 PBST로 3회 washing한 후, 2% BSA를 200  $\mu$ l씩 각 well에 첨가하여 37°C에서 1시간 배양하여 blocking시켰다. 다시 PBST로 3회 washing하였다. Rabbit anti Ag serum을 75  $\mu$ l씩 첨가하여 37°C에서 30분 배양하였다. 이 때 antiserum은 pre-immune serum, 1st immunization 2주 후 serum, 2nd immunization 2주 후 serum, 2nd boosting 1주 후 serum의 4종류를 사용하였으며, 각각 1/50을 처음 농도로하여 1/2씩 단계희석한 것을 사용하였다. 배양후 PBST로 3회 washing한 후 goat anti rabbit Ig AP conjugate를 1:1000의 비율로 희석한 것 75  $\mu$ l을 각 well에 첨가하여 실온에서 30분 배양하고 PBST로 3회 washing하였다. 기질인 p-NPP solution을 100  $\mu$ l씩 첨가하여 실온에서 30분 반응시킨다음 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. 결과는 antibody solution이 첨가되지 않은 well의 흡광도 값을 blank로 하여 계산하였다.

## 라. Killing and immobilization/agglutination assay

각각의 실험을 *Uronema marinum*, *Pseudocohnilembus persalinus*, *Philasterides decentrarchi* 에 대해서 실시하였다. serum은 2nd boosting 2주 후 분리한 final serum과 pre-immune serum을 사용하였다.

### (1) Killing assay

control로 PBS에 충을 넣은 것을 사용하였고, serum은 control serum인 pre-immune serum과 final serum을 1/8 희석을 처음농도로 하여 이를 단계 희석 하여 사용하였다. 각각의 well에 100마리의 충을 넣고 20℃에서 배양하였다.

## (2) Immobilization/agglutination assay

killing assay에서와 같이 PBS, pre-immune serum, final serum의 세그룹으로 나누어 실시하였고, 이 경우 serum을 56℃에서 30분간 inactivation 한 후 사용하였다. serum은 1/4 희석농도를 처음농도로 하여 단계희석 하였으며, 충은 각 well 당 1000마리씩 넣어 역시 20℃에서 배양하였다.

## 마. Western blot

### (1) Western blot 시 적정항원 농도와 항혈청의 농도 결정

본실험에 사용된 토끼의 항혈청은 *P. decentrarchi*에 대해 제작한 것이므로, 우선 *P. decentrarchi*에 대한 Western blot을 실시하고, 이후의 실험을 위해 적정 농도를 결정하고자 하였다. 먼저 항원은 Immunization 때와 동일하게 준비하는데, 이 때는 L-15배지에서 배양한 *P. decentrarchi*를 사용하였다. PBS(pH 7.4)에 cells을 재부유 한 다음 5 output 으로 30초간 2회 sonication 한 후 protein 농도를 BCA법으로 측정하였다. sample의 단백질 농도는 1 mg/ml, 3 mg/ml, 5 mg/ml 세 농도로 사용하였다. 각 농도별로 20  $\mu$ l 씩 SDS-PAGE 한 다음 PVDF membrane에 90분간 Transfer하였다. Transfer된 membrane은 TTBS 로 5분간 3회 washing 후 실온에서 두시간, 4℃에서 overnight으로 Blocking하였다. (Blocking buffer : 3% BSA in TTBS) blocking 후 다시 실온으로 꺼내어 TTBS로 3회 washing 한 후 1차 항체인 anti-*Philasterdes*-rabbit serum을 1:100, 1:500, 1:1000의 비율로 희석하여 2시간 반응시켰다. 1차 항체와 반응후 다시 TTBS로 3회 washing 후 2차 항체인 goat anti-rabbit IgG AP(SantaCruz)를 1:2000의 비율로 희석하여 2시간 반응시켰다. TTBS로 3회 washing 후 PBS로 2회더 washing 한 후 기질인 BCIP/NBT solution(Sigma)을 적당량 가하여 발색반응을 확인하였다.

### (2) 3종의 스쿠티카충 항원에 대한 *Philasterides decentrarchi*에 대한 토끼 항혈청의 cross-reaction 확인

*Uronema marinum*, *Pseudocohnilembus persalinus*, *Philasterides decentrarchi* 의 항원 lysate를 이전의 방법과 동일한 방법으로 준비한 후 단백질 농도는 2 mg/ml로 맞추어 SDS-PAGE 하였다. *P. decentrarchi*의 경우에는 L-15배지에서 배양한 것과 CHSE-214 cell에서 배양한 것 두 종류에 대하여 sample을 준비하였다. 위와 동일한

방법으로 Western blot을 하되 토끼 항혈청의 경우에는 1:500 농도로 사용하여 수행하였다.

### 3. 연구결과

#### 가. ELISA

Immunization을 많이 할수록, serum의 농도가 높을수록 값이 크게 나왔다. 또한 pre-immune serum에 비해 immune serum에서 월등히 높은 항체가가 관찰되었다. ELISA 실험을 할 경우 고농도(1.5 mg/ml)의 항원을 사용하는 것 보다는 저농도 (0.3 mg/ml)의 항원을 사용하여 수행하는 것이 더 정확한 범위의 결과값을 얻을 수 있었다.

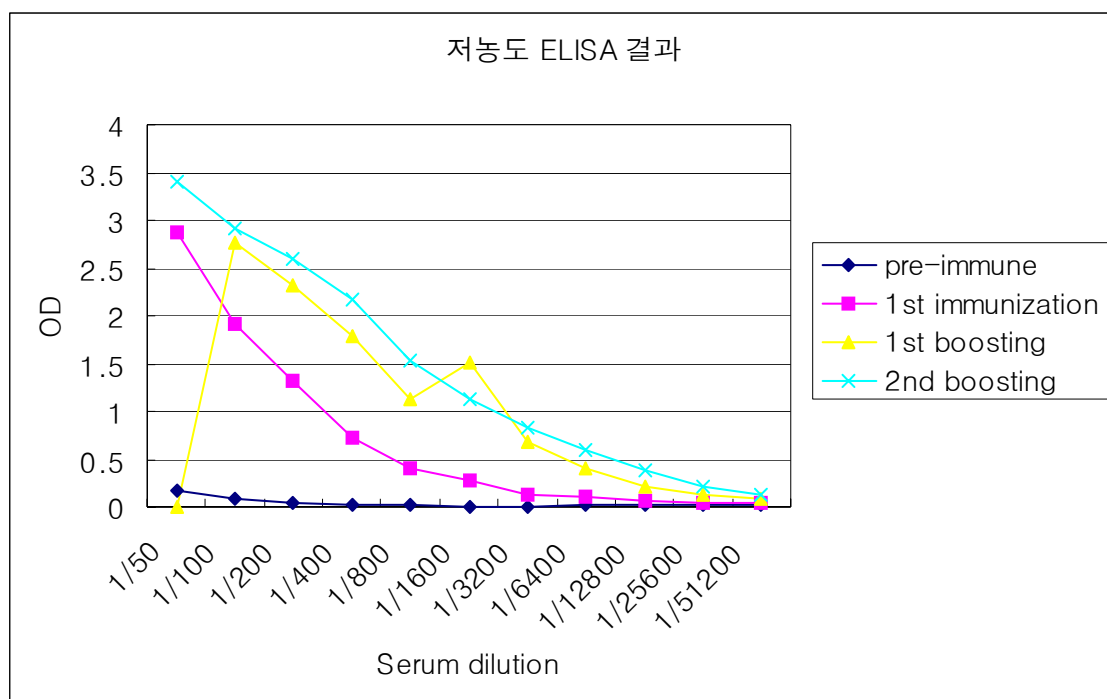


Fig. 3-1. 저농도 Ag (0.3 mg/ml) 결과

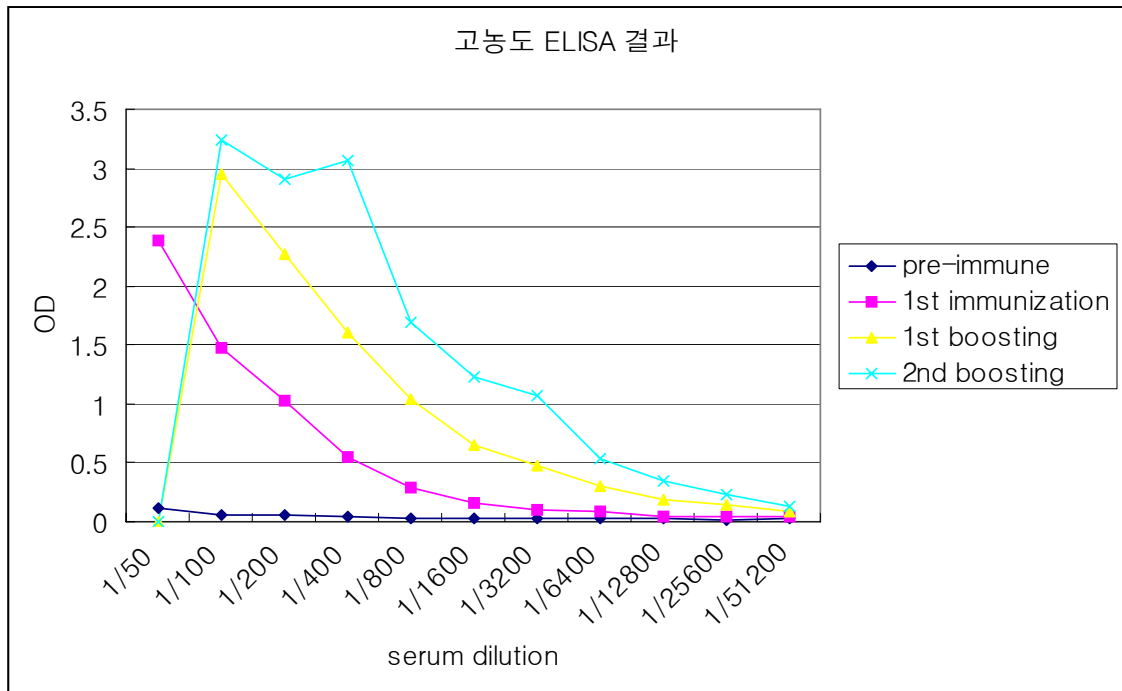


Fig. 3-2. 고농도 Ag(1.5 mg/ml) 결과

Table 3-1. ELISA 결과값

저농도 0.3mg /ml	serum dilution	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200
	pre-immune	0.162	0.092	0.05	0.025	0.017	0.008	0.01	0.011	0.022	0.015	0.012
	1st immunization	2.871	1.906	1.318	0.713	0.41	0.268	0.129	0.101	0.07	0.033	0.044
	1st boosting	***	2.759	2.32	1.792	1.12	1.521	0.683	0.406	0.207	0.133	0.084
	2nd boosting	3.404	2.923	2.595	2.167	1.532	1.118	0.836	0.601	0.386	0.216	0.122
고농도 1.5mg /ml	serum dilution	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200
	pre-immune	0.121	0.064	0.056	0.047	0.035	0.035	0.032	0.036	0.024	0.019	0.023
	1st immunization	2.39	1.48	1.028	0.544	0.29	0.162	0.104	0.083	0.047	0.043	0.042
	1st boosting	***	2.955	2.274	1.604	1.043	0.654	0.473	0.302	0.194	0.146	0.091
	2nd boosting	***	3.238	2.911	3.067	1.694	1.224	1.073	0.534	0.352	0.226	0.132

#### 나. Killing and immobilization/agglutination assay

### (1) Killing

*P. decentrarchi*의 경우, Killing assay에서 2시간에는 pre-immune serum에서 1/16까지, Immune serum에서 1/64 희석농도까지 반응이 일어났다. 그러나, *U. marinum*과 *P. persalinus*의 경우에는 1/16 희석농도까지 죽었으나, pre-immune serum과 immune serum에서 차이가 나타나지 않았다. *U. marinum*과 *P. persalinus*의 경우, 12시간 후에 1/32 희석 농도부터 cell을 counting하였다. 그 결과, 역시 큰 차이가 나타나지는 않았다.

### (2) Immobilization/agglutination

*P. decentrarchi*의 경우, agglutination 반응이 1/32 희석농도까지 수분~1시간 내에 나타났다. 그러나, *U. marinum*과 *P. persalinus*에 대해서는 아무런 반응이 나타나지 않았다.

## 다. Western blot 결과

### (1) 토끼 항혈청을 사용하여 Western blot시 적정항원 및 항혈청의 농도 결정

본 실험에서는 항원의 농도를 1 mg/ml, 3 mg/ml, 5 mg/ml의 3가지 농도로, 항혈청의 농도는 1:100, 1:500, 1:1000의 3가지 농도로 사용하여 Western blot 과정을 수행하였다. 실험결과, 항원의 농도는 1~3 mg/ml의 농도를, 항혈청의 농도는 1:500의 농도를 사용하였을 경우 깨끗한 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 이후의 실험을 할 때 스쿠티카충의 lysate를 준비할 경우와 Western blot시 토끼의 항혈청을 사용할 경우 이 농도로 사용하기로 결정하였다.

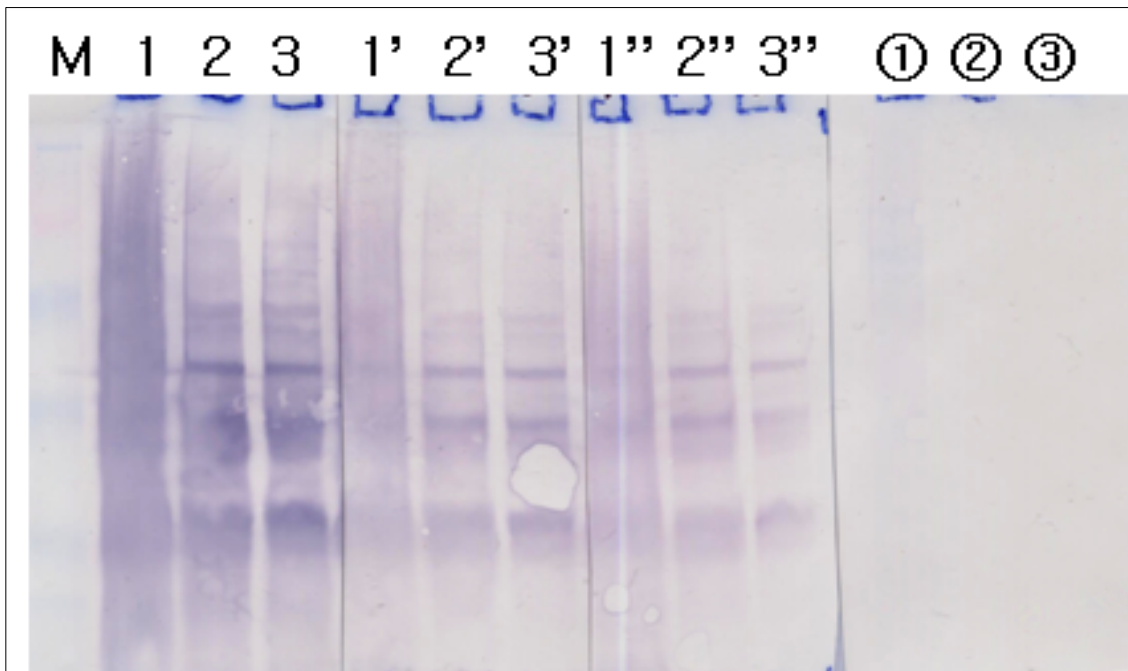


Fig. 3-3. Western blot analysis

M : PIERCE protein size marker

1 : 5mg/ml Philasterides whole cell lysate (1:100 rabbit antiserum)

2 : 3mg/ml Philasterides whole cell lysate (1:100 rabbit antiserum)

3 : 1mg/ml Philasterides whole cell lysate (1:100 rabbit antiserum)

1' : 5mg/ml Philasterides whole cell lysate (1:500 rabbit antiserum)

2' : 3mg/ml Philasterides whole cell lysate (1:500 rabbit antiserum)

3' : 1mg/ml Philasterides whole cell lysate (1:500 rabbit antiserum)

1'' : 5mg/ml Philasterides whole cell lysate (1:1000 rabbit antiserum)

2'' : 3mg/ml Philasterides whole cell lysate (1:1000 rabbit antiserum)

3'' : 1mg/ml Philasterides whole cell lysate (1:1000 rabbit antiserum)

① : 5mg/ml Philasterides whole cell lysate (1:500 rabbit pre-immune serum)

② : 3mg/ml Philasterides whole cell lysate (1:500 rabbit pre-immune serum)

③ : 1mg/ml Philasterides whole cell lysate (1:500 rabbit pre-immune serum)

**(2) 3종의 스쿠티카충 항원에 대한 *Philasterides decentrarchi*에 대한 토끼 항혈청의 cross-reaction 확인**

*P. decentrarchi*의 경우 L-15 배지에 배양한 것과 cell line에서 배양한 것의 밴드의 차이가 보였다. 또한 앞의 실험의 결과에서와도 밴드의 pattern의 차이가 나타났다. 이것은 스쿠티카충이 배양조건등에 대해 그 항원성이 변할 가능성이 있다는 것을 나타내준다. 또한 *U. marinum*에서도 연하지만 여러 band가 나타났고, *P. persalinus*에서도 약한 band가 몇가지 나타났다. 이는 공통적인 항원이 세 종 사이에 존재할 것이라는 것을 나타내주고 있다.

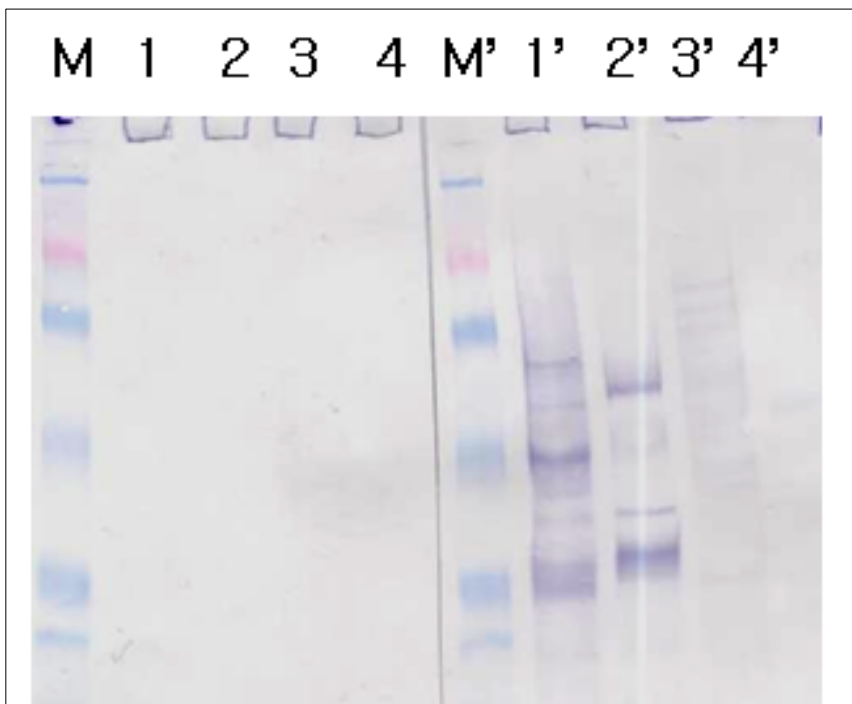


Fig. Western blot analysis of whole cell lysate

M, M' : PIERCE protein size marker

- 1 : *P. decentrarchi* cell lysate cultured in L-15 medium (Pre-immune serum 1:500)
- 2 : *P. decentrarchi* cell lysate cultured in CHSE-214 cell line (Pre-immune serum 1:500)
- 3 : *U. marinum* cell lysate (Pre-immune serum 1:500)
- 4 : *P. persalinus* cell lysate (Pre-immune serum 1:500)
- 1' : *P. decentrarchi* cell lysate cultured in L-15 medium (Immune serum 1:500)
- 2' : *P. decentrarchi* cell lysate cultured in CHSE-214 cell line (Immune serum 1:500)
- 3' : *U. marinum* cell lysate (Immune serum 1:500)
- 4' : *P. persalinus* cell lysate (Immune serum 1:500)



## 제4절 스키테카충 cDNA library 제작 및 EST 분석

### 1. 연구내용

앞의 연구결과에서 나타난 바와 같이 스키테카충에 대한 백신개발은 현재 국내 스키테카충에 가장 핵심적인 종인 *Philasterides dicentrarchii* 를 위주로 진행되어야 하지만, 이 종의 in vitro 대량배양에 있어서 고가의 배지가 필요하기 때문에 충체를 이용한 백신개발은 실용성이 결여된 것으로 판단하였으며, 또한 스키테카충 항체에 의한 분석실험에 있어서도 스키테카충 종간의 교차반응을 유도하기 위해서는 방어항체를 유도할 수 있는 스키테카충 항원에 대한 선별 연구가 필요하게 되었다. 그러나 스키테카충에 대한 항원 유전자에 대한 정보는 거의 없는 실정이기 때문에 본 연구에서는 국내 양식 넙치의 스키테카충 원인충인 *Pseudocohnilembus persalinus*, *Uronama marinum* 및 *Philasterides dicentrarchii* 3종에 대해서 cDNA library를 제작하고 Expressed sequence tags (EST) 분석을 통해 스키테카충 항원 유전자를 선별하는 작업을 수행하였다. 특히 스키테카충이 자유생활에서 기생생활로 전환될때 충의 세포내 signal에 많은 변화가 있을 것으로 예상하여 이러한 세포 signal에 중추적인 역할을 하는 protein kinase C (PKC)를 자극하는 phorbol myristate acetate (PMA)를 충에 처리하여 특이적으로 발현되는 유전자들을 Suppression subtractive hybridization (SSH) 법을 이용하여 분석하였다.

EST 분석을 통해 중간 교차반응을 일으킬 것으로 예상되는 항원유전자 및 주요 표면 항원유전자들을 선별하였으며, 이렇게 선별된 유전자들에 대한 재조합 발현 및 면역원성에 대한 실험을 다음 절에서 기술하였다.

### 2. 연구방법

#### 가. 스키테카충 cDNA library 제작 및 EST 분석

##### (1) total RNA 분리

log phase로 자란 스키테카충을 원심분리를 이용하여 모은 후, total RNA를 분리하였다. total RNA는 Ambion 사의 RNeasy<sup>TM</sup>-4PCR kit를 사용하여 분리하였다. 자세한 과정은 다음과 같다. 스키테카 충 약  $1 \times 10^6$  cells을 원심분리하여 pellet

만 남긴 후, 500  $\mu\text{l}$ 의 Lysis/Binding solution을 첨가하여 vortexing으로 lysis시켰다. 동량의 64% Ethanol을 첨가한 후, Filter cartridge에 옮겨담고 14,000 rpm으로 1분간 원심분리 하였다. Filter cartridge를 통과한 액은 버리고, 700  $\mu\text{l}$ 의 Wash solution #1을 다시 첨가하여 1분간 원심분리 하였다. 같은 방법으로 500  $\mu\text{l}$ 의 Wash solution #2/3으로 두 번 washing하였다. 마지막 washing 후에는 30초 정도 한번 더 원심분리하여 남아있는 wash solution을 제거하였다. 마지막으로 새 1.5 ml tube에 70°C에 미리 heating해 놓은 50  $\mu\text{l}$ 의 Elution solution을 넣고, 실온에서 15,000  $\times$  g로 30초정도 원심분리 하여 RNA를 elution하였다.

## (2) cDNA library 제작

앞에서 분리한 스크티카 총의 total RNA를 이용하여 cDNA library를 제작하였다. cDNA library 의 제작에는 Clontech의 SMART™ cDNA library construction kit를 사용하였고, 제작사의 User manual의 과정에 따라 수행하였다. Clontech의 SMART™ cDNA library construction kit는 PCR을 기초로 cDNA을 증폭하는 방법으로 적은 양의 total RNA나 mRNA만으로도 library 제작이 가능한 이점이 있다.

### ① First-strand cDNA 합성

1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 total RNA 2  $\mu\text{l}$ , SMART IV Oligonucleotide 1  $\mu\text{l}$ , CDS III/3' PCR primer 1  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 72°C에서 2분간 배양하고 얼음에 2분간 cooling한 다음, 5 $\times$  First-strand buffer 2  $\mu\text{l}$ , DTT (20 mM) 1  $\mu\text{l}$ , dNTP Mix (10 mM) 1  $\mu\text{l}$ , PowerScript Reverse Transcriptase 1  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 42°C에서 1시간 동안 배양 후 바로 얼음으로 옮겼다.

### ② LD PCR에 의한 cDNA의 증폭

앞의 First-strand cDNA 합성 반응액의 2  $\mu\text{l}$ 를 새로운 0.2 ml PCR tube에 옮기고, 10 $\times$  Advantage 2 PCR Buffer, 50 $\times$  dNTP Mix, 5' PCR primer, CDS III/3' PCR primer, 50 $\times$  Advantage 2 Polymerase Mix, dH<sub>2</sub>O를 혼합한 후 95°C 20초, 20 cycles( 95°C 5초, 68°C 6분)의 조건으로 LD PCR을 실시하였다. PCR 반응 후 5  $\mu\text{l}$ 의 sample을 1.1% agarose gel에 전기영동하여 0.1-4 kb 범위의 double stranded cDNA smear가 나타났는지 확인하였다.

### ③ Proteinase K, Sfi I digestion 및 cDNA size fractionation

증폭된 double stranded cDNA 50  $\mu\text{l}$ (2-3  $\mu\text{g}$ )에 2  $\mu\text{l}$ 의 Proteinase K를 첨가하여 45°C에서 20분간 배양한 후 Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol(25:24:1) 처리하고, 3 M sodium acetate와 Glycogen, 95% ethanol을 첨가하여 침전시켰다. pellet을 80% ethanol로 washing한 후 10분정도 air-dry하고 79  $\mu\text{l}$ 의 dH<sub>2</sub>O에 재부유하였다.

library 제작시 사용되는  $\lambda$  phage vector에 Sfi I digestion site가 있으므로 insert가 되는 cDNA에도 Sfi I site를 만들어 주어야 한다. 이를 위해 cDNA 79  $\mu$ l와 10 $\times$  Sfi I Buffer, Sfi I Enzyme, 100 $\times$  BSA를 혼합하여 50 $^{\circ}$ C에 2시간 배양한다. 이 sample에 2  $\mu$ l의 1% Xylene cyanol dye를 첨가하여, CHROMA SPIN-400 Column에 통과시켜 16개의 tube에 각각 35-40  $\mu$ l 정도의 fraction을 모았다. 각 tube에서 3  $\mu$ l씩 1.1% agarose gel에 전기영동하여 peak fraction을 결정하고, size가 500 bp 이상인 4번째 fraction까지의 cDNA를 합하여 다시 3 M sodium acetate와 Glycogen, 95% ethanol을 첨가하여 침전시켰다. 그 후 pellet을 7  $\mu$ l의 dH<sub>2</sub>O에 재부유 시켰다.

#### ④ $\lambda$ TriplEx2 vector로의 cDNA 삽입 및 Packaging

cDNA와 vector (500 ng/ $\mu$ l), 10 $\times$  ligation buffer, ATP (10 mM), T4 DNA ligase, Deionized H<sub>2</sub>O를 total volume이 5  $\mu$ l가 되게 혼합하여 16 $^{\circ}$ C에 overnight 배양하고, 다음날  $\lambda$ -phage packaging reaction을 수행하였다. packaging 반응은 Promega Packagene<sup>®</sup> Extract 으로 수행하였다. 약 0.5  $\mu$ g의 ligated cDNA를 50  $\mu$ l의 Packagene<sup>®</sup> Extract와 혼합하여 22 $^{\circ}$ C(실온)에서 3시간 배양한 후 445  $\mu$ l의 phage buffer와 25  $\mu$ l의 chloroform을 첨가한 후에 chloroform이 가라앉을 때까지 두었다가 상층액을 사용하였다.

#### ⑤ cDNA library의 Titration 및 증폭

*E. coli* XL1-blue strain의 single colony를 15 ml의 LB/MgSO<sub>4</sub>/maltose broth에 overnight 배양한 다음 5,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 pellet을 10 mM MgSO<sub>4</sub> 용액에 재부유하였다. 200  $\mu$ l의 위의 배양액과 packaging reaction 1  $\mu$ l를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 phage가 *E. coli*에 흡수되게 둔다음, 45 $^{\circ}$ C에 pre-heating 해 놓은 Top agar 3 ml과 혼합하여 LB/MgSO<sub>4</sub> agar plate 위에 top agar가 골고루 퍼지도록 재빨리 붓고, 다음날 plaque의 수를 세어 library의 titer를 결정하였다. 이 library를 오래 보관하기 위해서는 증폭을 해야하며 증폭한 후에도 다시 이와 같은 titration 과정을 수행해야한다. 이 과정에서 바르게 vector에 cDNA fragment가 삽입이 되었는지 확인하기 위해서 Top agar와 *E. coli*/phage 혼합액을 섞을 때 IPTG와 X-Gal을 함께 넣어 LB/MgSO<sub>4</sub> agar plate에 붓고, overnight 배양 후에는 푸른 색(nonrecombinant) 혹은 무색(recombinant)의 plaque가 나타나는지 확인하였다..

### 나. PMA를 처리한 스쿠티카충의 subtracted cDNA library 구축 및 EST 분석

스쿠티카충에 PKC의 direct activator인 PMA를 처리하여 이로 인해 발현되는 일련의 유전자들을 조사하기 위해 SSH(Suppression subtractive hybridization)법을

이용하였다. SSH는 Clontech 사의 PCR-select cDNA Subtraction kit를 사용하여 수행하였다.

### (1) PMA 처리한 스쿠티카충 *Uronema marinum*으로부터 total RNA 추출

① log phase로 자란 스쿠티카충을 원심분리를 이용하여 모은 후, cell 수를  $5 \times 10^6$ /ml로 맞추고, PMA를 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 1시간 처리한 후 3,000 x rpm으로 5분간 원심분리하여 pellet을 만든 후 RNA 분리 전까지 RNA later에 보관하였다. PMA를 처리하지 않고 같은 시간 반응시킨 스쿠티카충을 control로 함께 수집하였다.

### ② Total RNA의 추출

Total RNA는 Sigma사의 Tri Reagent를 사용하여 추출하였다. 즉,  $1 \times 10^7$  cells 당 1 ml의 Trizol reagent(Invitrogen)를 첨가한 후 pipetting하여 스쿠티카충을 lysis 한 다음 실온에 5분정도 두었다. Chloroform을 Trizol 1 ml당 0.2 ml 첨가하여 잘 혼합한 다음 실온에 3분정도 두었다가 12,000 x g로 15분간 원심분리하였다. 상층액을 조심스럽게 새 튜브에 덜어낸 다음 동량의 Isopropanol을 첨가하여 실온에 10분동안 두고, 다시 12,000 x g로 10분간 원심분리하여. RNA pellet이 생기면 상층액을 버리고, 75% Ethanol을 첨가하여 7,500 x g로 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고, 10분간 자연 건조시킨 후 적당량의 DEPC 처리한 3차 증류수에 녹여 60°C heating block에서 RNA를 완전히 녹인 후 50배 희석하여 농도를 측정하였다.

### (2) 스쿠티카충 total RNA로부터 poly A<sup>+</sup> RNA 추출

poly A<sup>+</sup> RNA는 앞에서 분리한 control 및 PMA 처리한 스쿠티카충의 Total RNA 500  $\mu\text{g}$ 로부터 Promega사의 PolyAtract mRNA Isolation systems을 사용하여 분리하였다. RNase-free 1.5 ml 튜브에 Total RNA 500  $\mu\text{g}$ 을 volume이 500  $\mu\text{l}$ 되게 RNase-free water에 녹인 후, 65°C heating block에 10분동안 넣어두었다. 3  $\mu\text{l}$  (150pmol)의 Biotinylated-Oligo(dT) probe와 13  $\mu\text{l}$ 의 20X SSC를 RNA에 첨가하여 조심스럽게 혼합하고, 실온에서 완전히 식혔다. 식히는 동안 Streptavidin-Paramagnetic Particles(SA-PMPs)를 준비하는데, sample당 한 개의 튜브를 꺼내 particles을 재부유하여, magnetic stand에 놓아 튜브 한쪽으로 particles이 모이도록 한 다음, 상층액을 조심스럽게 제거하고, 0.5X SSC 300  $\mu\text{l}$ 로 세 번 washing한 후, 100  $\mu\text{l}$ 의 0.5X SSC에 재부유하였다. 앞의 RNA와 Biotinylated-Oligo(dT) probe 반응액 전부를 washing 해둔 SA-PMPs가 들어있는 튜브에 첨가하여 실온에서 10분간 배양하였는데, 이 때, 매 2분마다 inverting하여 혼

합하였다. 이것을 magnetic stand를 사용하여 capture하고, pellet은 흐트러지지 않게 상층액을 조심스럽게 제거한 후에, 0.1X SSC로 4번 washing 하는데, 마지막 washing 후에는 상층액을 가능한한 많이 제거하였다. 마지막으로 SA-PMPs pellet을 100  $\mu$ l의 RNase-free water로 재부유하고, 잘 혼합한다음 magnetic stand로 분리하여 Elution된 RNA를 멸균된 RNase-free tube에 옮겼다. 150  $\mu$ l의 RNase-free water로 한번더 Elution한 후, Spectrophotometer로 RNA 농도를 측정하고, 0.1 volume의 5 M Ammonium acetate와 0.02 volume의 Linear acrylamide, 2.5 volume의 100% ethanol을 첨가한 후 -20°C에서 overnight하여 RNA를 침전시킨 후에 원심분리 하여 RNA pellet을 만든다음 20  $\mu$ l 정도의 RNase-free water에 녹였다. 이후의 SSH 과정을 수행하기 위해 농도를 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l로 맞추어 두었다.

### (3) First-strand cDNA 합성

앞으로는 PMA를 처리한 스쿠티카충으로부터 분리한 sample을 Tester, PMA를 처리하지 않은 스쿠티카충으로부터 분리한 sample을 Driver라고 표기한다. 각각의 poly A+ RNA에 대해, Poly A+ RNA 4  $\mu$ l(2  $\mu$ g)와 cDNA synthesis primer 1  $\mu$ l를 혼합하여 70°C에 2분간 배양하고, 즉시 얼음에 넣어 식힌 후, 5X First-strand buffer 2  $\mu$ l, dNTP mix 1  $\mu$ l, Sterile H<sub>2</sub>O 1  $\mu$ l, AMV Reverse Transcriptase 1  $\mu$ l를 첨가하여 가볍게 spin한 다음 42°C에서 1.5시간동안 배양하고, tube를 얼음에 넣어 반응을 종료시켰다.

### (4) Second-strand cDNA 합성

Sterile H<sub>2</sub>O 48.4  $\mu$ l, 5X Second-strand buffer 16  $\mu$ l, dNTP mix 1.6  $\mu$ l, 20X Second-strand Enzyme cocktail 4  $\mu$ l를 앞의 First-strand cDNA를 합성한 튜브에 첨가하여 final volume이 80  $\mu$ l가 되게 한 다음, 16°C에서 2시간 배양한 후, 2  $\mu$ l의 T4 DNA polymerase를 첨가하여 16°C에서 30분간 배양한다. 4  $\mu$ l의 20X EGTA/Glycogen mix를 첨가하여 반응을 종료시키고, phenol 추출과 ethanol 침전을 한 후에 pellet을 50  $\mu$ l의 H<sub>2</sub>O에 녹였다.

### (5) Rsa I 처리

앞에서 만들어진 double stranded cDNA에 Rsa I 제한 효소를 처리하면 Blunt-ended cDNA 단편이 만들어지게 된다. 앞 과정에서 만든 ds cDNA 43.5  $\mu$ l와 10X Rsa I restriction buffer 5  $\mu$ l, Rsa I enzyme 1.5  $\mu$ l를 혼합하여 37°C에서 1.5시간 배양한 후, 2.5  $\mu$ l의 20X EGTA/Glycogen mix를 첨가하여 반응을 종료시

키고, phenol 추출과 ethanol 침전을 한 후에 pellet을 5.5  $\mu$ l의 H<sub>2</sub>O에 녹였다.

#### **(6) Adaptor ligation**

PMA를 처리한 스쿠티카 층의 cDNA 즉, tester cDNA에만 adaptor를 붙이고, 처리하지 않은 control cDNA 즉, driver cDNA에는 adaptor를 붙이지 않았다. PMA를 처리한 스쿠티카 층의 cDNA는 두가지 다른 adaptor(Adaptor 1, 2R)와 Ligation하기 위해 두 개의 튜브로 분리하였다. 1  $\mu$ l의 Rsa I을 처리한 스쿠티카층 cDNA를 5  $\mu$ l의 H<sub>2</sub>O에 희석하여 2  $\mu$ l씩을 각각 adaptor 1과 adaptor 2R 2  $\mu$ l과 ligation 하였는데, 400 units의 T4 DNA ligase를 사용하여 16°C에 overnight으로 수행하였다. ligation 후에는 20X EGTA/Glycogen mix를 첨가하여 반응을 종료시키고, 72°C에서 5분간 처리하여 ligase를 불활화시킨후 다음과정까지 -20°C에 보관하였다.

#### **(7) Subtractive Hybridization - First and Second Hybridization**

2  $\mu$ l의 PMA를 처리하지 않은 스쿠티카 층의 cDNA와 1  $\mu$ l의 4X Hybridization buffer를 각각 다른 adaptor 1 과 adaptor 2R에 ligation한 PMA 처리한 스쿠티카층의 cDNA 2  $\mu$ l가 포함된 튜브에 첨가하여, mineral oil을 한방울 떨어뜨린 후 98°C에서 1.5분간 denaturation시킨다음 68°C에서 8시간 동안 hybridization 시켰다. 이 first hybridization 후에, PMA 처리하지 않은 스쿠티카 층의 cDNA 1  $\mu$ l를 98°C에서 1.5분간 denaturation한 후, 이것과 1차로 hybridization 한 두 sample을 혼합한 후에 68°C에서 overnight으로 hybridization시켰다. 반응이 끝난 후에 200  $\mu$ l의 dilution buffer로 희석한 후 68°C에서 7분간 heating하여 -20°C에 보관하였다. 이렇게 하면 두가지 adaptors를 모두 가지는 PMA 처리한 스쿠티카 층에 특이적인 cDNA가 만들어지게 되었다.

#### **(8) PCR Amplification and Purification**

PCR은 두 번에 걸쳐 수행하였고, total 25  $\mu$ l volume으로 반응하였다. PCR은 Advantage cDNA PCR kit(Clontech)으로 수행하였다. 사용되는 Primer는 PCR primer 1로 이것은 adaptor 1과 2R에 특이적인 염기서열이며, 따라서 adaptor가 붙어있는 PMA 처리된 스쿠티카층의 cDNA를 특이적으로 증폭시키게 된다. hybridization후 희석한 cDNA 1  $\mu$ l를 template로 하고, 나머지 10X buffer와 dNTP 및 Polymerase mix가 첨가된 24  $\mu$ l의 Master mix를 첨가하여 PCR을 수행하였다. 75°C에서 5분간 반응하여 adaptor 부분의 나머지 부분을 채워주는 단계를 통해

Primer가 binding할 수 있는 sequence를 만들어 준 다음, 94°C에서 30초간 predenaturation 후, 94°C 30초, 66°C 30sec, 72°C 1.5분으로 27 cycles 반응하였다. 이 1차 PCR 산물을 10배 희석하여 1  $\mu$ l를 template로 2차 nested PCR을 수행하였다. primer는 nested PCR primer 1과 nested PCR primer 2R를 사용하고, 94°C 30초, 68°C 30초, 72°C 1.5분으로 12cycles 반응하고, 마지막에는 72°C에서 7분간 final extension을 수행한후 1차 PCR과 2차 nested PCR 산물의 8 $\mu$ l씩 전기영동하여 확인하였다.

### (9) Cloning and Sequencing

2차 PCR 산물을 PCR purification한 후에, 바로 pGEM-T easy vector(promega)에 cloning하여, *E. coli* strain DH5a에 형질전환시킨 다음 생긴 흰색 colony로부터 GeneALL Plasmid miniprep kit를 사용하여 Plasmid를 분리하여 염기서열을 분석하였다. homology는 NCBI의 BLAST X program을 사용하여 분석하였다.

## 3. 연구결과

### 가. 스쿠티카충 *Pseudocohmilembus persalinus* 의 cDNA library 제작 및 ESTs(Expressed sequence tags)의 분석 결과

실험실내에서 계속적으로 MEM에 배양해 오던 스쿠티카 충을  $1 \times 10^6$  cells을 harvest하여 Ambion사의 RNAqueous<sup>TM</sup>-4PCR kit를 사용하여 user manual에 따라 total RNA를 분리하였고, 정량 후에 1 $\mu$ g/ $\mu$ l의 농도로 맞춘 후 2 $\mu$ l를 cDNA 합성에 사용하였다. 이 total RNA로부터 구축된 cDNA library의 titer는 증폭전에는  $2.7 \times 10^6$  pfu/ml, 증폭 후에는  $1.5 \times 10^{10}$  pfu/ml 이었다. 이 값은 일반적으로 제안되는 titer에 해당하는 결과이다.

Table ESTs 분석 결과



No.	results	E value	Identities
152	Transcript Antisense to Ribosomal RNA; Tar1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	6.00E-06	31/73 (42%)
1	similar to RIKEN cDNA 1810007P19 [ <i>Rattus norvegicus</i> ]	7.00E-37	77/115 (66%)
153	SEQ B folder(fail)		
2	SEQ B folder(fail)		
154	beta-galactosidase alpha polypeptide(insert X)		
3	inositol 1-phosphate synthase [ <i>Pichia pastoris</i> ]	4.00E-33	63/156 (40%)
155	SEQ B folder(fail)		
4	adenylosuccinate synthetase, possibly N-myristoylated (50.2 kD) (5F298) [ <i>Caenorhabditis elegans</i> ]	2.00E-12	34/108 (31%)
156	beta-galactosidase alpha polypeptide(insert X)		
157	hypothetical protein [ <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7]	0.002	38/157 (24%)
5	hypothetical protein MG08163.4 [ <i>Magnaporthe grisea</i> 70-15]	8.00E-13	32/53 (60%),
158	Hypothetical protein CBG24837 [ <i>Caenorhabditis briggsae</i> ]	0.001	40/158 (25%)
6	60S ribosomal protein L13a	2.00E-56	109/200 (54%)
159	SEQ B folder(fail)		
7	SEQ B folder(fail)		
160	sensory transduction histidine kinase [ <i>Methanosarcina acetivorans</i> str. C2A]	0.043	18/62 (29%)
8	arginine n-methyltransferase, putative [ <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7]	0.34	20/85 (23%)
161	SEQ B folder(fail)		
9	NADPH-dependent mannose 6-phosphate reductase [ <i>Apium graveolens</i> ]	2.00E-35	84/239 (35%)
162	hypothetical protein [ <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7]	0.005	24/84 (28%)
10	hypothetical protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	4.4	22/89 (24%)
163	SEQ B folder(fail)		
11	hypothetical protein [ <i>Plasmodium yoelii yoelii</i> ]	4.00E-20	60/121 (49%)
164	hemolysin [ <i>Acanthamoeba polyphaga</i> ]	1.00E-14	49/89 (55%)
12	hypothetical protein [ <i>Plasmodium yoelii yoelii</i> ]	4.00E-20	60/121 (49%)
165	SEQ B folder(fail)		
13	glutathione S-transferase [ <i>Euphorbia esula</i> ]	2.00E-20	68/205 (33%)
166	beta-galactosidase alpha polypeptide(insert X)		
14	SEQ B folder(fail)		
167	SEQ B folder(fail)		
15	hypothetical protein phiCTXp12 [Bacteriophage phi CTX]	2.00E-09	55/181 (30%)
168	CCAAT-box DNA binding protein subunit B [ <i>Plasmodium yoelii yoelii</i> ]	0.005	42/135 (31%)
16	hypothetical protein [ <i>Plasmodium yoelii yoelii</i> ]	5.00E-05	39/131 (29%)
169	SEQ B folder(fail)		
17	protein C50H11.9 [imported] - <i>Caenorhabditis elegans</i>	0.055	31/124 (25%)
170	GLP_291_11778_8566 [ <i>Giardia lamblia</i> ATCC 50803]	1.00E-06	39/129 (30%)
18	hypothetical protein [ <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7]	0.029	28/138 (20%)
171	SEQ B folder(fail)		
19	Transcript Antisense to Ribosomal RNA; Tar1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	6.00E-06	31/73 (42%)
172	40S RIBOSOMAL PROTEIN <sub>48</sub> 12	2.00E-62	113/140 (80%)
20	potassium channel PAK11 protein [ <i>Paramecium tetraurelia</i> ]	5.00E-09	35/114 (30%)
173	SEQ B folder(fail)		
21	variant-specific surface protein M165 [ <i>Giardia intestinalis</i> ]	0.005	27/75 (36%)

## 나. PMA를 처리한 스쿠티카충 *Uronema marinum*의 subtracted cDNA library의 구축 및 ESTs의 분석

PMA를 처리한 *U. marinum*를 사용하여 SSH법을 이용하여 subtracted cDNA library를 제작하였으며, 총 243개의 클론의 염기서열을 분석하였고, 결과 나온 염기서열은 NCBI의 BLAST X 프로그램을 사용하여 기존의 protein database에서 유사한 유전자들을 검색하였다. 그 결과 여러 가지 세포신호전달에 관여하는 유전자들과, 스쿠티카충의 침입에 관여할 것으로 여겨지는 여러 가지 유전자들이 검색이 되었다. 이렇게 얻어진 유전자의 database는백신의 후보유전자들을 선별하는 등의 이후의 연구에 대한 기본적인 자료가 될 것이다.

3.2.1. E-value <  $10^{-5}$  인 클론

① Ribosomal Protein ; 39 clones( 종류 : 20 )

No	BLAST X 결과	E-value	insert (bp)
PMA-252	turgor-like protein [Sterkiella histriomuscorum	2.00E-26	271
PMA-181	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase (Polynucleotide phosphorylase) (PNPase)	0.006	263
	rhoptry protein [Plasmodium yoelii yoelii]	0.85	
PMA-109	putative serine/threonine protein kinase; HcSTK [Haemonchus contortus]	1.00E-15	429
PMA-7	phosphorylase phosphatase [Xenopus laevis]	5.00E-28	540
	aldehyde dehydrogenase, putative / antiquitin, putative	2.00E-25	
	putative protein phosphatase regulatory subunit 등	7.2	
PMA-22	phosphorylase phosphatase [Xenopus laevis]	3.00E-26	534
PMA-1	cytoplasmic ribosomal protein L18	4.00E-14	276
	serine/threonine-rich protein - fluke (Schistosoma mansoni	2.8	
	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3 [Danio rerio]	9.00E-15	
	piperidine-6-carboxylic acid dehydrogenase [Streptomyces	5.00E-20	
PMA-116	64번과 같음		
	Protein phosphatase 2A at 29B CG13383-PA [Drosophila melanogaster]	9.00E-25	
PMA-103	cytoplasmic ribosomal protein L18	1.00E-12	277
	NPK1-related protein kinase 1S [Arabidopsis thaliana]	1.00E-14	
	chloroquine resistance marker protein, putative [Plasmodium yoelii	4.8	
PMA-201	64번과 같음		355
PMA-21	ribosomal protein L3 [Tetrahymena thermophila]	2.00E-48	732
PMA-226	Unknown (protein for MGC:65385) [Mus musculus	7.00E-15	728
	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit [Ustilago maydis]	5.00E-14	
	Serine/threonine protein phosphatase 2A,	2.00E-23	
PMA-184	similar to internalin proteins (LPXTG motif) [Listeria innocua	0.066	456
PMA-73	acid phosphatase [Giardia intestinalis]	1.1	357
	ATPase involved in DNA repair [Nostoc punctiforme	0.27	
PMA-24	ribosomal protein L3 [Tetrahymena thermophila]	1.00E-61	427
PMA-125	앞의 7번과 같음		540
PMA-127	preprocathepsin C [Schistosoma japonicum], (Cathepsin C)	9.00E-19	604
	Serine protease [Streptococcus pneumoniae R6]	8.1	
	Peroxiredoxin	1.1	
	RGC2 resistance protein L [Lactuca serriola]	1.3	
PMA-53	ribosomal protein L3	2.00E-81	598
PMA-8	protein tyrosine kinase 1 [Tetrahymena thermophila] 등	2.00E-11	718
PMA-137	calcium-dept. protein kinase [Plasmodium yoelii yoelii]	5.00E-57	699
	putative AT-hook protein 1 [Oryza sativa	2.8	
	DEAD box RNA helicase	9.3	
	huntingtin interacting protein [Homo sapiens	5	
PMA-108	ribosomal protein L3 [Tetrahymena thermophila]	3.00E-70	594
	NRK-related kinase [Tetrahymena pyriformis]	1.00E-11	
	calmodulin-domain protein kinase 1 [Toxoplasma gondii]	6.00E-56	
PMA-186	cytochrome oxidase subunit II [Chaitophorus populeti]	0.23	356
PMA-77	73번과 같음		

PMA-160	ribosomal protein L3 [Tetrahymena	2.00E-62	429
	probable MAP kinase kinase [Leishmania major]	9.00E-09	
PMA-147	probable acyl-CoA dehydrogenase	2.00E-42	386
	Peroxiredoxin [Ferronlasma	0.3	

## 제5절 스키테카충 백신 후보 유전자 분석 및 재조합 발현을 위한 Site-directed mutagenesis

### 1. 연구내용

앞에서 제작한 스키테카충 종별 cDNA library 및 SSH library의 EST 분석 결과를 바탕으로 여러 종류의 스키테카충 백신 후보 항원 유전자들을 선별하였다. 그 종류로는 *Uronema marinum*의 Protein phosphatase 2C (PP2C)와 surface antigen, *Pseudocohnilembus persalinus*의  $\beta$ -tubulin, *Philasterides decentrarchi*의 plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase 및 GAPDH등이었다. 선별된 유전자들에 대해서는 full open reading frame (ORF)을 알기 위해 RACE법을 이용한 full sequencing을 수행하였다.

섬모충의 재조합 발현에 있어서 가장 큰 문제점은 섬모충이 일반적으로 진핵생물이 종료코돈으로 사용하는 TAA와 TAG를 종료코돈이 아닌 glutamine을 coding 하는데 사용한다는 점이며, 또한 이러한 codon이 하나의 유전자내에서도 많은 수가 존재하기 때문에 이러한 코돈 하나하나를 모두 CAA나 CAG로 mutation 시켜야만 원하는 단백질을 생산해낼 수 있다. 이러한 작업은 시간과 경비를 많이 요구하는 작업이기 때문에 스키테카충의 항원 유전자의 선별 및 분석에 있어서 많은 제약이 따를 수 밖에 없었다. 본 연구에서는 선별한 항원유전자들을 재조합 발현시키기 위해 Stratagene의 QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis kit를 사용하여 mutation 작업을 수행하였다.

### 2. 연구방법

#### 가. cDNA library screening을 통한 $\beta$ -tubulin gene의 full-length sequence 분석

##### (1) 스키테카충으로부터 $\beta$ -tubulin gene의 cloning 및 염기서열 분석

GenBank에 나타나 있는 스키테카충과 유사한 몇몇 진핵생물의  $\beta$ -tubulin gene sequence로부터 PCR primer를 제작하여 스키테카충 total RNA에서 Reverse-transcriptase PCR을 실시하였다. 먼저 Ambion 사의 RNAqueous<sup>™</sup>-4PCR kit를 이용하여 스키테카충으로부터 total RNA를 분리한 후에, Ambion 사의

RETROscript First Strand Synthesis kit로 cDNA를 합성하였다. 이 반응액 1 $\mu$ l를 template로 PCR 반응을 수행하였다. PCR primer는 Forward primer : 5'-TTCTGGGAAGTCATTTCCGA-3', Reverse primer : 5'-AGGGAGTGGGTGATTTGGAA-3'이며, 증폭결과 1% agarose gel 전기영동으로 359bp의 PCR product를 확인하였다. 이 fragment를 Bioneer Gel purification kit를 사용하여 정제한 후에 Topo Cloning kit(Invitrogen)를 사용하여 pCR 2.1 T-vector에 삽입하였다. 이 vector를 TOP 10 competent cell(Invitrogen)에 형질전환하여 생긴 백색 colony 중 하나를 Ampicillin이 첨가된 LB broth에 배양한 다음 Bioneer plasmid extraction kit를 이용하여 plasmid를 분리하여 sequencing하였다. sequencing 결과는 BLAST 검색하여 기존의  $\beta$ -tubulin gene들과의 상동성을 비교하였다.

## (2) 스쿠티카충 $\beta$ -tubulin gene probe 제작

염기서열 분석을 통해  $\beta$ -tubulin gene이라는 것을 확인한 후에, Full sequence를 알기 위하여 cDNA library screening을 수행하기 위해 앞의 PCR product로 probe를 제작하였다. probe는 Roche Applied Science사의 DIG DNA Labeling and Detection kit를 사용하여 방사선 동위원소를 이용하지 않는 방법으로 제작하였다. 그 방법은 다음과 같다. 10 ng-3  $\mu$ g의 정제된 PCR product DNA를 멸균된 2차 증류수와 총량이 15  $\mu$ l가 되게 혼합하여, 끓는 물에 10분간 denature시키고 곧바로 얼음에 식혔다. 이 denature된 DNA에 10 $\times$  Hexanucleotide Mix와, dNTP Labeling Mix, Klenow enzyme labeling grade를 혼합한 후 37 $^{\circ}$ C에서 overnight 배양하고 0.2 M EDTA(pH 8.0)을 첨가하여 반응을 종료시켰다. label된 probe는 DIG-labeled control DNA를 참고하여 label된 DNA의 효율과 양을 결정하였다.

## (3) Plaque Hybridization을 통한 $\beta$ -tubulin gene을 포함하는 clone의 선별

positively-charged nylon membrane(Roche Applied Science)을 적당한 크기로 잘라, phage plaque이 있는 LB agar plate에 기포가 생기지 않게 3분간 올려놓고, 이때 주사기를 이용하여 비대칭적으로 위치를 표시해 두었다. 10 $\times$  SSC로 적신 Whatman paper 위에 membrane을 올려 UV-crosslinker를 이용하여 DNA를 fixation한 후에 2차 증류수로 rinsing하였다. 이어서 prehybridization 및 hybridization을 실시하는데, Tm은 사용하는 probe에 맞게 결정하였다 [Tm = 49.82 + 0.41% (G+C)-(600/length of hybrid in base pairs)]. 적절한 양의 DIG Easy Hyb를 hybridization 온도로 pre-heating하였다. Hybridization bottle에 membrane과

pre-heated DIG Easy Hyb를 넣고 약하게 흔들어주면서 30분동안 prehybridization 하고, 그사이에 DIG-labeled DNA probe를 5분간 boiling하여 denature한 후 얼음에 식혔다. probe의 농도는 약 25 ng/ml로 하고, denatured DIG-labeled DNA probe를 적당량의 pre-heated DIG Easy Hyb에 첨가하여 기포가 생기지 않게 잘 섞어 두었다. prehybridization solution을 버리고, probe/hybridization buffer의 혼합액을 membrane에 첨가하여 적당한 온도에서 회전시키면서 6시간이상 overnight 배양하였다. Hybridization이 끝나고 0.5× SSC로 두 번, 0.1%의 SDS가 포함된 pre-heated 2× SSC로 5분간 두 번 stringency washing하였다. washing이 끝난 후 다음과 같이 Immunological detection을 수행하였다. membrane을 washing buffer로 5분 동안 rinsing한다. washing buffer를 버리고 50 ml의 Blocking solution을 첨가하여 30분 동안 배양 후, 20 ml의 Antibody solution으로 다시 30분 배양하였다. washing buffer로 15분간 2번 washing 한 후 20 ml의 Detection buffer로 3분 동안 equilibration한 다음 새 용기에 옮겨 10 ml의 Color substrate solution을 넣고 membrane을 어두운 곳에서 shaking 없이 배양하였다. 원하는 정도의 spot이나 band의 intensity가 나타났을 때는 반응을 종료시키기 위해 50 ml의 멸균 2차 증류수 또는 TE buffer로 membrane을 5분간 washing한 후 TE buffer에 보관하였다.

#### (4) Positive clone의 phage로부터 plasmid로의 excision 및 plasmid 분리, 염기서열 분석

위의 hybridization에서 선별한 positive plaque를 350  $\mu$ l의 1× lambda dilution buffer에 희석한 후에 37°C에서 3-4시간 배양하여 phage를 elution시켰다. BM25.8 *E. coli* strain의 overnight culture 200  $\mu$ l와 150  $\mu$ l의 eluted positive plaque을 혼합하여 31°C에서 30분간 배양한 다음 400  $\mu$ l의 LB broth를 첨가하여 31°C에서 225 rpm으로 shaking하면서 1시간 더 배양한 후 1-10  $\mu$ l를 LB/ampicillin agar plate에 멸균 glass spreader로 spread하여 31°C에 overnight 배양하였다. single colony가 분리되면 몇 개의 colony에서 각각 alkaline lysis 법으로 plasmid DNA를 분리하여, 분리된 plasmid는 염기서열을 분석하고, 그 결과는 Blast 검색하여 다른 종의 gene과의 상동성을 비교하였다.

#### 나. RACE법을 이용한 Full-sequencing

SSH를 통해서 얻어진 염기서열은 어떤 유전자의 일부 서열이므로, Full sequencing하기 위해서 RACE 법을 이용하였다. RACE법을 이용하여 full-length cDNA의 염기서열을 분석한 유전자는 Protein phosphatase 2C (PP2C)와 Surface

antigen(Gal), GAPDH였다. RACE PCR은 Clontech SMART™ RACE cDNA Amplification Kit를 사용하였다. 5' RACE와 3' RACE PCR은 분리해서 수행하였다.

### (1) *P. decentrarchi*로부터의 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene cloning

NCBI에 등록되어 있는 여러 진핵생물의 GAPDH의 시퀀스를 바탕으로 Degenerated primer를 제작하여 *P. decentrarchi*로부터 GAPDH gene을 cloning하였다. Primer의 sequence는 For:5'-GAAAABTTYGGAATTGYTGAAGG-3', Re:5'-ATGGTDGGRACCTCTGAARGMCATACC-3' 이다. 이 primer를 사용하여 RT-PCR을 하여 224bp의 product를 얻어서, T-vector에 cloning한 후 염기서열을 확인하였다. 이 fragment의 sequence에서 RACE에 필요한 primer들을 디자인하였다.

### (2) 5' RACE를 위한 cDNA의 합성

PP2C와 Surface antigen의 RACE를 위해서는 PMA를 처리한 스퀴티카충으로부터 total RNA를 분리하여 농도를 1 µg/3 µl로 맞추어 이 total RNA 3 µl와 5'-CDS primer 1 µl, SMART II A oligo를 혼합하여 5 µl로 만든 다음 70°C에 2분간 배양한 후 곧바로 얼음에 2분간 두었다. 튜브를 살짝 원심분리한 다음 2 µl의 5X First-strand buffer, 1 µl의 DTT, 1 µl의 dNTP mix, PowerScript Reverse Transcriptase를 첨가한 다음 42°C에서 1.5시간 동안 배양하고 배양이 끝난 후에는 Tricine-EDTA buffer를 100 µl 첨가하여 희석해서 72°C에 7분간 heating 후 10 µl 정도씩 분주하여 -20°C에 보관하였다. GAPDH의 RACE를 위해서는 CHSE-214 cell line에서 배양한 *P. decentrarchi*로부터 total RNA를 분리한 후 이후의 과정은 위와 동일한 과정으로 수행하였다.

### (3) 3' RACE를 위한 cDNA의 합성

PP2C와 Surface antigen의 RACE를 위해서는 PMA를 처리한 스퀴티카충으로부터 total RNA를 분리하여 분리한 total RNA 1 µl와 1 µl의 3'-CDS primer A를 혼합하고 dH<sub>2</sub>O를 8.5 µl 첨가한 후 70°C에서 5분간 배양 후 얼음에 넣고, 여기에 5X MMLV buffer 4 µl, dNTP 4 µl, 0.5 µl의 RNase inhibitor, MMLV RT(promega)를 첨가한 후 42°C에서 1.5시간 동안 배양하고 94°C에서 5분간 heating한 후 80 µl Tricine-EDTA buffer로 희석하고 역시 10 µl씩 분주하여 -20°C에 보관하였다. GAPDH의 RACE를 위해서는 CHSE-214 cell line에서 배양한 *P. decentrarchi*로부터 total RNA를 분리한 후 이후의 과정은 위와 동일한 과정으로 수행하였다.



#### (4) PCR 증폭

##### ① RACE PCR에 사용된 Primer의 염기서열

Primer	Sequence
Universal primer A mix	Long:5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTA TCAACGCAGAGT-3'
	Short : 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
Nested universal Primer A	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
PP2C For-1	5'-GCTGGTGATAGTAGATCTGTTTTATGC-3'
PP2C For-2	5'-CAGTGATGCTGGGGGATTCGTAAG-3'
PP2C Re	5'-TCCAACACCATTTGAAGTATCTGAGGC-3'
PP2C Re-1	5'-GTCCCGGTATCAGTAGGATCACTTG-3'
ScuGAL For-1	5'-GCTATGATGGATGGTATTATAAAGAAGATG-3'
ScuGAL For-2	5'-TGCTAGATGCAAAAGTGAACAAGTAGG-3'
ScuGAL Re-1	5'-ACCTACAGCTTCATTTTCACATTTAG-3'
ScuGAL Re-2	5'-TCCTTCACTGTCGACCAAATAATAACC-3'
GAPDH For-1	5'-CTTCGGAATTGCTGAAGGATTAATG-3'
GAPDH For-2	5'-GGAGAGCTGGAAGAGCTGCTTCTACC-3'
GAPDH Re-1	5'-GGTTGGGACTCTGAAAGACATAACCGG-3'
GAPDH Re-2	5'-CCTTTCAATTCGGGTAAGACTAATCCG-3'

##### ② 5' RACE PCR

합성된 5' RACE 용 cDNA 1.5  $\mu$ l를 template로 하고, kit 내에 포함된 Universal Primer A Mix 2.5  $\mu$ l, 증폭하고자 하는 cDNA에 특이적인 Primer(Reverse primer) 0.5  $\mu$ l와 PCR buffer 및 dNTP, Polymerase mix가 포함된 Master mix를 20.5  $\mu$ l를 혼합한 후 predenaturation으로 95°C 3분 반응한 다음, 95°C 30초, 60°C 1분, 72°C 3분으로 30 cycles PCR반응을 수행하였다. PCR 반응 후 3  $\mu$ l를 1% Agarose gel에 전기영동하여 확인한 후 뚜렷한 산물이 나타나지 않았을 경우, Nested PCR을 실시하였다. 첫 번째 PCR의 산물을 10배 희석하여 이것의 1  $\mu$ l를 template로 하고, kit에 포함된 Nested universal primer와 알고자 하는 gene의 nested primer를 0.5  $\mu$ l씩 첨가한 다음 Master mix 22.5  $\mu$ l 와 혼합하여 PCR반응을 진행하였다.

##### ③ 3' RACE PCR

합성된 3' RACE 용 cDNA 1.5  $\mu$ l를 template로 하고, kit 내에 포함된 Universal Primer A Mix 2.5  $\mu$ l, 증폭하고자 하는 cDNA에 특이적인

Primer(Forward primer) 0.5  $\mu$ l와 PCR buffer 및 dNTP, Polymerase mix가 포함된 Master mix를 20.5  $\mu$ l를 혼합한 후 predenaturation으로 95°C 3분 반응한 다음, 95°C 30초, 60°C 1분, 72°C 3분으로 30 cycles PCR반응을 수행하였다. band가 나오지 않았을 경우, 역시 Nested PCR 반응을 수행하였다.

#### (5) PCR 산물의 정제 및 Cloning, 염기서열 분석

PCR 반응 후 나타난 band를 Gel purification하여, T-vector에 cloning 한 후 염기서열을 분석하였다.

#### 다. 재조합 발현을 위한 Site-directed mutagenesis

스쿠티카충과 같은 섬모충들은 사용하는 코돈이 TAA나 TAG가 일반적으로는 종료코돈인데 반해, Glutamine을 coding 한다. 따라서 E. coli에서 재조합 단백질을 발현시키거나, DNA vaccine을 하기 위하여 각각에 적절한 vector에 Ligation을 하려고 할때, TAA나 TAG를 CAA나 CAG로 바꾸어 주어야한다. 이렇게 염기서열을 바꾸기 위해 Site-directed mutagenesis를 수행하였는데, 이것은 Stratagene의 QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis kit(Stratagene)를 사용하였다.

#### (1) 후보 유전자 클로닝 및 Mutagenic primer의 설계

원하는 mutation부분을 정가운데 오게 하고 양쪽으로 10~15 mer정도로 하여 mutagenic primer 한 쌍을 설계하였다. primer의 길이는 25~45 mer 길이로 하고 Tm은 78°C 이상이 되어야 하며 primer의 GC content는 최소 40% 이상이 되어야 한다. primer는 fast polynucleotide liquid chromatography(FPLC) 또는 polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 정제하였다.

##### ① $\beta$ -tubulin (BTU)

Full ORF를 이후의 재조합 벡터의 제작등에 이용하려고 하였다. ORF를 증폭하기 위해 Primer를 제작하였는데 이 때 다른 vector들에 Ligation하기 위해 제한효소 site를 넣었다. 스쿠티카충으로부터 total RNA를 분리한 후 RT-PCR을 하여 ORF부분을 증폭하였고, pGEM-T easy vector에 cloning하여 다시 한 번 염기서열을 확인하였다. 모두 15부분을 mutation 하기 위해 12쌍의 primer를 제작하였고, primer의 염기서열은 table 5-1에 나타내었다.

##### ② Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

역시 Full ORF를 모두 이용하였으며, ORF를 다시 cloning할 때, primer에 제한 효소 site를 첨가하였으며, 모두 4부분을 mutation하기 위해 4쌍의 primer를 제작하였다 (Table 5-2).

③ Plasma membranr Ca<sup>2+</sup> ATPase (PMCA)

*P. decentrarchi*의 subtracted library의 ESTs 결과에서 얻은 일부분 sequence를 재조합 vector에 ligation하기로 하고 이 sequence에 또한 제한효소 site를 첨가하여 다시 cloning 한 후 염기서열을 확인하였다. sequence내에 있는 모두 7부분을 mutation 하기 위해 5쌍의 primer를 제작하였다 (Table 5-3).

④ Protein phosphatase 2C

PP2C의 경우 Full ORF를 이후의 재조합 벡터의 제작등에 이용하려고 하였다. ORF cloning하기 위해 PCR할 때 다른 발현 vector로의 ligation을 위해 제한 효소 site를 추가하여 primer를 제작하였다. PMA를 처리한 스쿠티카충으로부터 total RNA를 분리한 후 RT-PCR을 하여 ORF부분을 증폭하였고, pGEM-T easy vector에 cloning하여 다시한번 염기서열을 확인하였다. 총 14부분의 TAA를 CAA로 바꾸기 위한 Site-directed mutagenesis를 하기 위해 모두 8쌍의 Primer를 제작하였다 (table 5-4). PP2C ORF를 삽입한 T-vector를 mutagenesis PCR의 template로 사용하였다.

⑤ Surface antigen

full sequencing 결과 전체 gene의 크기가 3 kb를 넘어 재조합 단백질 등을 제작하기에는 이를 다 사용하기 어렵기 때문에, 일부 염기서열만을 증폭하여 cloning 한 후 염기서열을 분석한 다음 Site-directed mutagenesis를 수행하였다. 모두 6쌍의 primer를 제작하였다 (Table 5-5).

Table 5-1. BTU 유전자의 site-directed mutagenesis에 사용된 primer sequence

primer	primer sequence
SDM-BTU 1	F: 5'-CGGAGATTCCGATTTACAATTGGAAAGAATCAATG-3'
	R: 5'-CATTGATTCTTTCCAATTGTAATCGGAATCTCCG-3'
SDM-BTU 2	F: 5'-CTTCGTCTTCCGACAAACCGGAGCCGG-3'
	R: 5'-CCGGCTCCGGTTTGTCCGAAGACGAAG-3'
SDM-BTU 3	F: 5'-GGATGTGATTGTTTACAAGGATTCTAAATTACC-3'
	R: 5'-GGTAATTTAGAATCCTTGTAACAATCACATCC-3'
SDM-BTU 4	F: 5'-GATTGTTTACAAGGATTCCAAATTACCCACTCTTTAGG-3'
	R: 5'-CCTAAAGAGTGGGTAATTTGGAATCCTTGTAACAATC-3'
SDM-BTU 5	F: 5'-CTTCCAGAGGATCTCAACAATACAGAGCCTTAAC-3'
	R: 5'-GTTAAGGCTCTGTATTGTTGAGATCCTCTGGAAG-3'
SDM-BTU 6	F: 5'-CCCGAATTAACTCAACAAATGTTTCGATGC-3'
	R: 5'-GCATCGAACATTTGTTGAGTTAATTCGGG-3'
SDM-BTU 7	F: 5'-CTAAAGAAGTTGACGAACAAATGTTAAACGTTCAAAAC-3'
	R: 5'-GTTTTGAACGTTTAACATTTGTTTCGTCAACTTCTTTAG-3'
SDM-BTU 8	F: 5'-GACGAATAAATGTTAAACGTTCAAAACAAAGATTCTTCTTATTTTC-3'
	R: 5'-GAAATAAGAAGAATCTTTGTTTTGAACGTTTAACATTTATTCGTC-3'
SDM-BTU 9	F: 5'-GAAATTCTACCGCTATCCAAGAAATGTTCAAAAGAG-3'
	R: 5'-CTCTTTTGAACATTTCTTGGATAGCGGTAGAATTTTC-3'
SDM-BTU 10	F: 5'-CAAAAGAGTTGGAGAACAATTCACCGCTATGTTC-3'
	R: 5'-GAACATAGCGGTGAATTGTTCTCCAACCTTTTTG-3'
SDM-BTU 11	F: 5'-GATTTAGTTTCCGAATATCAACAATATCAAGACGCTACTGCC-3'
	R: 5'-GGCAGTAGCGTCTTGATATTGTTGATATTCGGAACTAAATC-3'
SDM-BTU 12	F: 5'-GAATATTAATAATATCAAGACGCTACTGCCGAAG-3'
	R: 5'-CTTCGGCAGTAGCGTCTTGATATTATTAATATTC-3'

Table 5-2. GAPDH 유전자의 site-directed mutagenesis에 사용된 primer sequence

primer	primer sequence
SDM-GAPDH 1	F: 5'-AAATATACCGCTGACCAACATATCATTTCCAAC-3'
	R: 5'-GTTGAAATGATATGTTGGTCAGCGGTATATTT-3'
SDM-GAPDH 2	F: 5'-CTATCTCTAAAGTCTTACAAGACAACCTTCGGAATTGC-3'
	R: 5'-GCAATTCCGAAGTTGTCTTGTAAGACTTTAGAGATAG-3'
SDM-GAPDH 3	F: 5'-CTTCTGAAACTAGTTTACAAGGAATCTTAGGATACAC-3'
	R: 5'-GTGTATCCTAAGATTCCCTTGTAACACTAGTTTCAGAAG-3'
SDM-GAPDH 4	F: 5'-GACCCGTTGTTTCTTAAGACTTCTTACGCGAT-3'
	R: 5'-ATCGCGTAAGAAGTCTTGAGAAACAACGGCGTC-3'

Table 5-3. PMCA(Plasma membrane  $Ca^{2+}$  ATPase) 유전자의 site-directed mutagenesis에 사용된 primer sequence

primer	primer sequence
SDM-PMCA 1	F: 5'-TTAGAAAATTCCTT <b>CAGTTTCAACT</b> CACAGTCAATG-3'
	R: 5'-CATTGACTGTGAG <b>TTGAAACTG</b> AAGGAATTTTCTAA-3'
SDM-PMCA 2	F: 5'-CACCCCACAACAGAAAC <b>CAAT</b> TATATTATTTCAAAAAAG-3'
	R: 5'-CTTTTTTGAATAATATA <b>TTGGTTTCTGTTGTGGGGTG</b> -3'
SDM-PMCA 3	F: 5'-CATATCTTTGGG <b>CAGGC</b> CTTATTAC <b>CAG</b> ATTTTTG-3'
	R: 5'-CAAAAAT <b>CTGTAATAAGGCCTG</b> CCCAAAGATATG-3'
SDM-PMCA 4	F: 5'-CTGAGTGGGAAAGCAAAC <b>CAAT</b> TCAAAGATAAAATCC-3'
	R: 5'-GGATTTTATCTTTGAAT <b>TTGTTGCTTCCCACTCAG</b> -3'
SDM-PMCA 5	F: 5'-GAATTAATTTCCGATTAT <b>CAAG</b> GATACCTTAAGTG-3'
	R: 5'-CACTTAAGGTATC <b>TTG</b> GATAATCCGAAATTAATTC-3'

Table 5-4. Protein phosphatase 2C(PP2C) 유전자의 site-directed mutagenesis에 사용된 primer sequence

primer	primer sequence
SDM-PP2C 1	F: 5'-CTTATTTACAAGCTTGTGCTAGTCAAATGCAAGGATGG-3'
	R: 5'-CCATCCTTGCATTTCACTAGCACAAAGCTTGTAATAAG-3'
SDM-PP2C 2	F: 5'-GGATGCGCATATTTTACAAATGAATATTAATGGAG-3'
	R: 5'-CTCCATTAATATTCATTTGTAATAATATGCGCATCC-3'
SDM-PP2C 3	F: 5'-GAGGTAAAGAAGTTGCCCAATTTGTAGAAAAACAT-3'
	R: 5'-ATGTTTTTCTACAAATTGGGCAACTTCTTTACCTC-3'
SDM-PP2C 4	F: 5'-CTGAAAGTGGTCAACAAGAATTGAACCAAATTAGAGCAG-3'
	R: 5'-CTGCTCTAATTTGGTTCAATTCTTGTTGACCACTTTCAG-3'
SDM-PP2C 5	F: 5'-CCTAATGAAGAACAATCAGGAGGACAATCTTATGCTGG-3'
	R: 5'-GGAGCATAAGATTGTCCTCCTGATTGTTCTTCATTAGG-3'
SDM-PP2C 6	F: 5'-AGATAGACCTAGAGACCAACAATTAATTATATCCAAC-3'
	R: 5'-GTTTGGATATAATTAATTGTTGGTCTCTAGGTCTATCT-3'
SDM-PP2C 7	F: 5'-ACTAATGAAGAACTTATCCAATATTGTAAAGAAAG-3'
	R: 5'-CTTCTTTTACAATATTGGATAAGTTCTTCATTAGT-3'
SDM-PP2C 8	F: 5'-AAGAAAGAATTGAAAAACAACAAGACTTAAATCAAATA-3'
	R: 5'-TATTGATTTTAAGTCTTGTGTTTTTCAATTCTTCTT-3'

Table 5-5. Surface antigen(Gal) 유전자의 site-directed mutagenesis에 사용된 primer sequence

primer	primer sequence
SDM-Gal 1	F: 5'-GATAAGGTTAATGCTCAATGTCAGCAATGTTTAAATG-3'
	R: 5'-CATTTAAACATTGCTGACATTGAGCATTAACTTATC-3'
SDM-Gal 2	F: 5'-GTAGGTATAACATGCCAAGGACAAAATAGATCTAATG-3'
	R: 5'-CATTAGATCTATTTTGTCCCTGGCATGTTATACCTAC-3'
SDM-Gal 3	F: 5'-GGATATTATGATGATCAACAAAACAATGCTGATTGTC-3'
	R: 5'-GACAATCAGCATTGTTTTGTTGATCATCATAATATCC-3'
SDM-Gal 4	F: 5'-CTGTGCTCAGTGCACAAATAATTCAGATTGCCAAGTTTG-3'
	R: 5'-CAAACCTGGCAATCTGAATTATTTGTGCACTGAGCACAG-3'
SDM-Gal 5	F: 5'-CAGTGAAGGAATTCAAACTGTCAAAAATGTCCATTG-3'
	R: 5'-CAATGGACATTTTTGACAAGTTTGAATTCCTTCACTG-3'
SDM-Gal 6	F: 5'-GAATGTCAAGGCCAAGGAAGAACTGTAACCTCAATG-3'
	R: 5'-CATTGAGGAGTTACAGTTCTTAATTGGCCTTGACATTC-3'

## (2) Mutant strand의 합성 반응

mutant strand의 합성을 위해서 Table 5-6과 같은 반응액을 제조하고 Table 5-7과 같은 조건으로 PCR반응을 수행하였다.

Table 5-6. Reagents for mutagenesis PCR

Reagent	Working concentration
Template plasmid DNA	1 $\mu$ l (50ng/ $\mu$ l)
Primer(forward, reverse)	각 1 $\mu$ l씩(125ng/ $\mu$ l)
10X reaction buffer	5 $\mu$ l
dNTP mix	1 $\mu$ l
<i>pfuTurbo</i> DNA polymerase	1 $\mu$ l (2.5U/ $\mu$ l)
Sterilized distilled water	up to 50 $\mu$ l

Table 5-7. Condition of reaction steps and PCR cycles

Step	Temperature	Reaction Time	Cycle
Pre-denaturation	95 $^{\circ}$ C	3min	1
Denaturation	95 $^{\circ}$ C	30sec	12
Annealing	55 $^{\circ}$ C	1min	
Extension	68 $^{\circ}$ C	5min	

## (3) 증폭된 PCR 산물의 *Dpn* I digestion

PCR 산물 중 10 $\mu$ l를 새 tube에 넣어놓은 후 *Dpn* I 1  $\mu$ l(10U/ $\mu$ l)를 증폭된 PCR 산물 40  $\mu$ l에 첨가하여 조심스럽게 혼합하고 반응액을 spin down하고 37 $^{\circ}$ C에서 1 hr동안 반응하여 mutation이 되지 않은 parental supercoiled dsDNA plasmid를 digestion하였다. 미리 넣어놓은 *Dpn* I을 처리하지 않은 10  $\mu$ l의 PCR 산물과 *Dpn*

I을 처리한 PCR 산물 10  $\mu$ l를 1% agarose gel에 loading하여 parental supercoiled dsDNA plasmid가 digestion되었는지 하였다.

#### (4) Transformation과 Plasmid 분리

50  $\mu$ l씩 분주해둔 XL1-Blue supercompetent cell을 ice에 넣어 두고, *Dpn* I을 처리한 plasmid DNA를 supercompetent cell에 1  $\mu$ l를 첨가하고 42°C에서 45초동안 heat shock한 후 ice에 2분 동안 두었다. SOC 500  $\mu$ l를 첨가하고 37°C에서 1시간동안 225-250 rpm으로 교반하며 배양한 후 LB(80  $\mu$ g/ml의 X-gal과 20 mM의 IPTG가 첨가된 ampicillin LB agar plates) plate에 250  $\mu$ l의 배양액을 도말한 후 37°C에서 16시간동안 배양하여 colony color screening하였다. white colony를 선별하여 ampicillin이 포함된 LB broth에서 16시간동안 교반하면서 배양하고 GeneAll Plasmid SV mini Kit(general biosystem)를 이용하여 plasmid를 분리하였다. 이렇게 분리한 plasmid를 template로 하여 mutation할 부분의 primer를 차례로 이용하여 PCR 하였다.

#### (5) 염기서열분석

mutation한 후 T7과 SP6 primer를 이용하여 염기서열을 분석하고 sequence 중의 TAA 또는TAG가 모두 CAA 또는 CAG로 mutation되었는지 확인하였다.

### 3. 연구결과

#### 가. cDNA library screening을 통한 $\beta$ -tubulin gene의 full-length sequence 분석

##### (1) 스쿠티카충으로부터 $\beta$ -tubulin gene의 cloning 및 염기서열 분석

GenBank에 등록되어 있는 data를 바탕으로 연구실에서 제작한 primer로 스쿠티카충의 cDNA의 PCR을 실시한 결과 359 bp의 PCR product를 얻을 수 있었다. 이를 Gel purification 한 후 pCR 2.1 T-vector(Invitrogen)에 바로 cloning하여 plasmid를 분리하여 염기서열을 분석한 결과, 기존의 알려진  $\beta$ -tubulin gene들과 매우 상동성이 높은 것으로 나타나 스쿠티카충의  $\beta$ -tubulin gene의 일부가 증폭된 것임을 확인하였다. 따라서 이 PCR product를 labeling 하여 probe로 사용하였다. 이 probe로 사용한 염기서열의 BLASTN 검색결과 *Tetrahymena thermophila* beta-tubulin (BTU2) gene(GenBank ACCESSION No. L01416)의 일부와 86%의 상

동성을 나타내었다. E-value는 e-113으로 나타났다.

## (2) Plaque Hybridization을 통한 $\beta$ -tubulin gene을 포함하는 clone의 선별

Prehybridization 및 Hybridization은 45°C에서 수행하였으며, Stringency washing은 0.1%의 SDS가 포함된 2× SSC로 실온에서 15분간 2회, 0.1% SDS가 포함된 0.5× SSC로 68°C에서 15분간 2회 실시하였다. immunological detection 후에는 3개의 positive plaque을 선별할 수 있었다.

## (3) Positive clone의 phage로부터 plasmid로의 excision 및 plasmid 분리, 염기서열 분석

앞에서 선별된 positive plaque을 각각 single excision하여 plasmid를 분리하였다. 분리한 plasmid를 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 sequencing 가능 유무를 확인하였는데, band가 3개 이상 나와서 이것을 TOP 10 competent cell에 다시 transformation하였다. 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 확인 후에 Kit에 제공된 5' sequencing primer로 염기서열 분석을 실시하였으며, 그 결과는 Fig. 5-1과 같다. 또한 sequencing 된 Full ORF를 바탕으로 primer를 설계하여 다른 2종의 스쿠티카충에 대한  $\beta$ -tubulin 유전자의 cDNA를 cloning/sequencing하고 그 염기서열 및 amino acid 서열을 비교하면 Fig. 5-2 및 Fig. 5-3과 같이 매우 높은 homology를 나타내었다.



```

1 GATAATAAAAATAAAAATTATTTCTAAAAAATAAAAATTTTTAAATAAATAATATAGTTAAC
ATGAGAGAGATCGTTTATTTCAAGGAGGACAATGTGGTAATCAAATCGGAGCCAAATTTCTGGGAA
M R E I V H I Q G G Q C G N Q I G A K F W E
GTCATTTCTGACGAACCGAATTGACCCACCGGAACCTACCACGGAGATTCCGATTTATAATTG
V I S D E H G I D P T G T Y H G D S D L Q L
GAAAGAATCAATGTTTATATAACGAAGCCACTGGAGGAAGATACGTCCCCAGAGCCATCTTAATG
E R I N V Y Y N E A T G G R Y V P R A I L M
GATTTAGAACCCGGAACCATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCCGACAATTATTAGACCTGAC
D L E P G T M D S V R A G P F G Q L F R P D
AACTTCGTCTTCGGATAAACCGGAGCCGGAACAATTGGGCTAAAGGACATTATACTGAAGGACT
N F V F G Q T G A G N N W A K G H Y T E G A
GAATTAATTGACTCCGTTTATAGATGTTGTTGGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTGTTTATAAGGA
E L I D S V L D V V G K E A E G C D C L Q G
TTCTAAATTACCCACTCTTAGGAGGAGGAACCGGATCCGGTATGGGAACCTTTATTGATCTCTAAA
F Q I T H S L G G G T G S G M G T L L I S K
GTCAGAGAAGAATATCCCGATAGAATTATGGAACTTTCTCCGTTGTTCCCTCTCCCAAAGTCTCC
V R E E Y P D R I M E T F S V V P S P K V S
GACACCGTTGTGAAACCTATAACGCCACCTTATCCGTCATCAATTAGTTGAAAACGCTGATGAA
D T V V E P Y N A T L S V H Q L V E N A D E
TGTATGATCATTGATAACGAAGCCTTATACGATATCTGTTTCAGAACCTTAAAATTAACCACCCCC
C M I I D N E A L Y D I C F R T L K L T T P
ACTTACGGAGATTTGAATCACCTCGTTTCTGCCTCTATGTCTGGAGTTACTTGTGTTTAAGATTC
T Y G D L N H L V S A S M S G V T C C L R F
CCCGGACAATTGAACTCTGATTTAAGAAAGTTAGCCGTCATCTCGTTCCCTTTCCCCAGATTACAT
P G Q L N S D L R K L A V N L V P F P R L H
TTCTTCATGATCGGATTCGCCCCCTTGACTTCCAGAGGATCTTAATAATACAGAGCCTTAACTGTC
F F M I G F A P L T S R G S Q Q Y R A L T V
CCCGAATTAACTTAAATAAATGTTTCGATGCTAAAAACATGATGTGTGCCGCTGACCCAGACACGGA
P E L T Q Q M F D A K N M M C A A D P R H G
AGATATTTAACCGCTTCTGCCTTATTAGAGGAAGAATGTCCACTAAAGAAGTTGACGAATAAATG
R Y L T A S A L F R G R M S T K E V D E Q M
TTAAACGTTTAAACAAAGATTCTTCTTATTTGTTGAATGGATCCCCAATAACATTAATCTTCC
L N V Q N K D S S Y F V E W I P N N I K S S
ATTTGTGATATTTCCCCCTAAAGGACTTAAATGGCCGTTACTTTGTTGAAATTCTACCGCTATC
I C D I P P K G L K M A V T F V G N S T A I
TAAAGAAATGTTCAAAAGAGTTGGAGAAATAATTCACCGCTATGTTTCAAAGAAAAGCCTTTTTACAT
Q E M F K R V G E Q F T A M F R R K A F L H
TGGTATACTGGAGAAGGTATGGACGAAATGGAATTCACTGAAGCCGAATCCAACATGAACGATTTA
W Y T G E G M D E M E F T E A E S N M N D L
GTTTCCGAATATTAATAATATTAAAGACGCTACTGCCGAAGAAGAAGGAGAATTTGATGAAGAAGAA
V S E Y Q Q Y Q D A T A E E E G E F D E E E
GGAGAAATGTGA
G E M *
TTTTGACTTTTTTTAAGAAATAATTTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1453

```

Fig. 5-1. Full Sequence of  $\beta$ -tubulin.

Pse	1	ATGAGAGAGATCGTTTCATATTCAAGGAGGACAATGTGGTAAATCAAATCGGAGCCAAATTCGGGAAGTCATTTCTGACGA	80
Uro	1	ATGAGAGAGATCGTTTCATATTCAAGGAGGATAATGTGGTAAATCAAATCGGAGCCAAATTCGGGAAGTCATTTCTGACGA	80
Phi	1	ATGAGAGAGATCGTTTCATATTCAAGGAGGACAATGTGGTAAATCAAATCGGAGCCAAATTCGGGAAGTCATTTCTGATGA	80
Pse	81	ACACGGAAATTGACCCACCCGGAACCTACCACGGAGATTCGGATTATAAATCGAAAAGAATCAATGTTTATTATAACGAAG	160
Uro	81	ACACGGTATTGACCCACCCGGAACCTATCACGGAGATTCTGATTTATAAATAGAAAAGAATCAACGTTTACTATAACGAAG	160
Phi	81	ACACGGAAATTGACCCACCCGGAACCTACCACGGAGATTCTGATTTATAAATAGAAAAGAATCAACGTTTACTATAATGAAG	160
Pse	161	CCACTGGAGGAAGATACGTCCTCCACGAGCCATCTTAATGGATTTAGAACCCGGAACCATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCT	240
Uro	161	CTACTGGAGGAAGATATCTACCACAGGATCTCTTAATGGATTTAGAACCCGGAACCATGGACTCCGTAAGAGCTGGACCT	240
Phi	161	CCACTGGAGGAAGATACGTTACCCAGAGCCATCTCATGGATTTGGAACCCGGTACCATGGACTCCGTCAGAGCCGGACCT	240
Pse	241	TTCCGGACAATTATTACAGACTGACAACTTCGTTCTCCGATAAACCCGAGCCGGAAAACAATTGGGCTAAAAGCATTATAC	320
Uro	241	TTCCGGTTAATTATTACAGACCCGATAACTTCGTAATTTGGATAAACCCGAGCTGGTAAACAATTGGGCTAAAAGCTACTACAC	320
Phi	241	TTCCGGACAACCTTTACAGACCCGACAACCTTCGTTCTCCGATAAACCCGAGCCGGAAAACAATTGGGCTAAAAGCATTATAC	320
Pse	321	TGAAGGAGCTGAATTAATGACTCCGTTTTAGATGTTGTTGCAAAAAGAGCTGAAGGATGTGATTGTTTATAAGGATTCT	400
Uro	321	CGAAGGTGCTGAATTAATCGACTCTGTATTAGATGTTGTAAGAAAAGAGCCGAAGGATGTGATTGTTTATAAGGTTTCT	400
Phi	321	CGAAGGAGCTGAATTAATCGACTCCGTTTTGGACGTTGTCAGAAAAGAGCTGAAGGATGTGACTGTTTCTAAGGATTCT	400
Pse	401	AAATTAACCCACTCTTTAGGAGGAGGAACCCGGATCCGGTATGGGAACTTTTATTGATCTCTAAAAGTCAGAGAAGATATCCC	480
Uro	401	AAATCACTCACTCTTTAGCAGCAGGAACCCGGATCTGGTATGGGTACCTTATTAATCTCCAAAAGTAAGAGAAGATATCCC	480
Phi	401	AAATCAACCCACTCTTAGGAGGAGGAACCCGGATCCGGAACTGGGAACTTATTGATCTCCAAAAGTCAGAGAAGATATCCC	480
Pse	481	GATAGAATTATGGAAGAACTTTCTCCGTTGTTCCCTCTCCCAAAGCTCTCCGACACCGTTGTCGAACCCCTATAACGCCACCTT	560
Uro	481	GATAGAATCATGGAAGAACTTTCTCCGTTGTAACCTTCCCCCAAAGTATCTGATACCGTTGTAGAACCCTATAACGCCACCTT	560
Phi	481	GACAGAATTATGGAAGAACTTTCTCCGTTGTTCCCTCTCCCAAAGTTCCTAAAAGTTCCTGACACCGCTGTTGAACCCCTATAACGCCACCTT	560
Pse	561	ATCCCTCCATCAATTAAGTTGAAAACCGCTGATGAATCTATGATCATTGATAACGGAAGCCTTATACGATATCTGTTTCAGAA	640
Uro	561	ATCTGTACATTAATTAAGTAGAAAACCGCTGATGAATCTATGATCATTGATAACGGAAGCCTTATATGATATCTGTTTCAGAA	640
Phi	561	ATCCCTCCACCAATTGGTCGAAAACCGCCGATGAATGTATGATCATTGATAACGGAAGCCTTACGATATTTGCTTCAGAA	640
Pse	641	CCTTAAAATTAACCAACCCCACTTACGGAGATTTGAATCACTTCGTTTTCTGCCTCTATGTCGGAGTTACTTGTGTTTA	720
Uro	641	CCTTAAAATTAACCAACCCCACTTATGGTGACTTAAATCACTTACTATCTGCCTCTATGTCGGGTGTAACCTTGTGTTTA	720
Phi	641	CCCTTAAAATTAACCAACCCCACTACGGAGATTTGAACCACTTAGTTTCTGCCTCCATCTCCGGAGTTACCACTGTGTTG	720
Pse	721	AGATTCCCCGGACAATTGAACCTCTGATTTAAGAAAAGTTAGCCGTCAAATCTCGTTCCCTTCCCCAGATTACATTTCTTCAT	800
Uro	721	AGATTCCCTGGTTAATTAACCTCTGATTTAAGAAAATTAGCTGTGCAACTTAAATTCCTTCCCCAGACTTCACTTCTTCAT	800
Phi	721	AGATTCCCCGGTCAATTGAACCTCTGATTTGAGAAAATTAGCCGTCAACTTCATCCCTTCCCCAGACTTCACTTCTTCAT	800
Pse	801	GATCGGATTCGCCCCCTTTCACCTCCAGAGGATCTTAATAATACAGAGCCTTAACTGTCCCGGAATTAACCTTAATAAATGT	880
Uro	801	GATCGGTTTCGCCCCCTTAACTCCAGAGGATCTTAATAATACAGAGCCTTAACTGTCCCTGAAATTAACCTTAATAAATGT	880
Phi	801	GATCGGATTCGCCCCCTTAACTCCAGAGGATCTCAATAATACAGAGCCTTAACTGTCCCGAATTAACCCAAATAAATGT	880
Pse	881	TCGATGCTAAAAACATGATGTGTGCCGCTGACCCACAGACCGGAAGATATTTAACCCGCTTCTGCCTTATTACAGAGGAAG	960
Uro	881	TTGATGCCAAAAACATGATGTGTGCTGCTGATCCACAGACCGGAAGATATTTAACCCGCTTCCGCTTATTACAGAGGTAGA	960
Phi	881	TCGATGCCAAAAACATGATGTGCCGCGCGATCCACAGACCGGAAGATATTTAACCCGCTTCTGCCTTATTACAGAGGAAG	960
Pse	961	ATGTCACCTAAAGCAACTTCACGAATAAATCTTAAACGTTTAAAACAAAGATTTCTTTATTTCGTTGAATGGATCCCCAA	1040
Uro	961	ATGTCACCCAAAAGCAACTTCATGAATAAATGTTAAACGTTAATAAACAAATAACTTCTTACTTCGTTGAATGGATCCCCAA	1040
Phi	961	ATGTCACCCAAAAGCAACTTCATGAATAAATGTTAAACGTTAATAAACAAACAACCTTCTTACTTCTGTTGAATGGATCCCCAA	1040
Pse	1041	TAACATTAATCTTCCATTTCTGATATCCCCCTAAAAGGACTTAAAATGGCCGTTACTTTTCGTTGAAAATTTCTACCCGCTA	1120
Uro	1041	TAACATAAAATCCTCCATTTCTGATATCCCCCTAAAAGGATTAATAATGGCCGTAACCTTCCGTAGGTAACCTCCACCCGCTC	1120
Phi	1041	CAACATCAAAATCCTCCATCTGTGATATCCCCCTAAAAGGATTAATAATGGCCGTCACCTTTCGTTGAAAATTTCTACCCGCTA	1120
Pse	1121	TCTAAGAAATGTTCAAAAAGACTTGAGAAATAATTCACCCGCTATGTTTCAAGAAAAGCCTTTTACATTGCTATACTGGA	1200
Uro	1121	TATAAGAAATGTTCAAAAAGACTAGCTGAATAATTCACCCGCTATGTTTCAAGAAAAGCCTTTTACATTGCTTACACCCGGA	1200
Phi	1121	TCTAAGAAATGTTCAAAAAGACTGCTGAACAATTCACCCGCTATGTTTCAAGAAAAGCCTTTTACATTGCTTACACCCGGA	1200
Pse	1201	GAAGCTATGGACGAAATGCAATTCACCTGAAGCCGAATCAACATGAACGATTTAGTTTCCGAATATTAATAATATTAAGA	1280
Uro	1201	GAAGCTATGGACGAAATGCAATTCACCTGAAGCCGAATCAACATGAACGATTTAGTATCCGAATATTAATAATATTAAGA	1280
Phi	1201	GAAGGAATGGACGAAATGCAATTCACCTGAAGCTGAATCAACATGAACGATCTCGTTTCCGAATATCAATAATATTAAGA	1280
Pse	1281	CGCTACTGCCGAAGAAAGGAGAAATTTGATGAAGAAGGAGAAATGTGA	1332
Uro	1281	TGCCACCCGCTGAAGAAAGGAGAAATTCGATGAAGAAGGAGAAATGTGA	1332
Phi	1281	TGCTACCCTGAAGAAAGGAGAAATTTGATGAAGAAGGAGAAATGTGA	1332

Fig. 5-2. *P. persalinus*, *U. marinum*, *P. dicentrarchi*의  $\beta$ -tubulin gene의 염기서열 분석 및 상동성의 비교

```

Pse 1  MREIVHIQGGCCGQIGAKFWEVISDEHGIDPTCTYHGDSDLQLERINVYYNEATCGRYVPPRAILMDLEPCTHDSVRACP 80
Uro 1  MREIVHIQGGCCGQIGAKFWEVISDEHGIDPTCTYHGDSDLQLERINVYYNEATCGRYVPPRAILMDLEPCTHDSVRACP 80
Phi 1  MREIVHIQGGCCGQIGAKFWEVISDEHGIDPTCTYHGDSDLQLERINVYYNEATCGRYVPPRAILMDLEPCTHDSVRACP 80

Pse 81  FGQLFRPDNFVFGQTGACNNWARGHYTEGAE LIDS VLDVVRKEAEGCCDCLQGFQITHSLGGCTGSCMCTLLISKVREYYP 160
Uro 81  FGQLFRPDNFVFGQTGACNNWARGHYTEGAE LIDS VLDVVRKEAEGCCDCLQGFQITHSLGGCTGSCMCTLLISKVREYYP 160
Phi 81  FGQLFRPDNFVFGQTGACNNWARGHYTEGAE LIDS VLDVVRKEAEGCCDCLQGFQITHSLGGCTGSCMCTLLISKVREYYP 160

Pse 161 DRIMETFSVVPSPKVSDTVVEPYNATLSVHQLVENADECHIIDNEALYD ICFRTLKLTTPTYGDLNHLVSASMSGVTCCCL 240
Uro 161 DRIMETFSVVPSPKVSDTVVEPYNATLSVHQLVENADECHIIDNEALYD ICFRTLKLTTPTYGDLNHLVSASMSGVTCCCL 240
Phi 161 DRIMETFSVVPSPKVSDTVVEPYNATLSVHQLVENADECHIIDNEALYD ICFRTLKLTTPTYGDLNHLVSASMSGVTCCCL 240

Pse 241 RFPGQLNSDLRKLAVNLVPPRLHFFMIGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQMFDAKNMMCAADPRHGRYLTA SALFRGR 320
Uro 241 RFPGQLNSDLRKLAVNLVPPRLHFFMIGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQMFDAKNMMCAADPRHGRYLTA SALFRGR 320
Phi 241 RFPGQLNSDLRKLAVNLVPPRLHFFMIGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQMFDAKNMMCAADPRHGRYLTA SALFRGR 320

Pse 321 MSTKEVDEQMLNVQNKDSSYFVEWIPNNIKSSICDIPPKLKMVA TVFCGNSTAIQEMFKRVGEQFTAMFRKAF LHWYTG 400
Uro 321 MSTKEVDEQMLNVQNKDSSYFVEWIPNNIKSSICDIPPKLKMVA TVFCGNSTAVQEMFKRVGEQFTAMFRKAF LHWYTG 400
Phi 321 MSTKEVDEQMLNVQNKDSSYFVEWIPNNIKSSICDIPPKLKMVA TVFCGNSTAIQEMFKRVGEQFTAMFRKAF LHWYTG 400

Pse 401 EGMDEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATAEEEGE FDEEEGEM* 444
Uro 401 EGMDEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATAEEEGE FDEEEGEM* 444
Phi 401 EGMDEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATAEEEGE IDEEEGEM* 444

```

Fig. 5-3. *P. persalinus*, *U. marinum*, *P. dicentrarchi*의  $\beta$ -tubulin 아미노산 서열 분석 및 상동성의 비교

#### 나. RACE법을 이용한 Full-sequencing 결과

##### (1) Protein phosphatase 2C (PP2C)의 Full-length cDNA 분석 결과

PP2C의 full length cDNA를 cloning 하기 위한 RACE 전략은 Fig. 5-4와 같았다. RACE를 통해 분석한 Protein phosphatase 2C의 full-length cDNA는 그 길이가 총 1137 bp였으며, 그 중 310개의 아미노산을 코딩하는 933 bp의 ORF (Open reading frame) 와 4 bp의 5'-UTR (Untranslated region), 200 bp의 poly A+ tail을 포함한 3'-UTR로 구성되어 있었다 (Fig. 5-5).

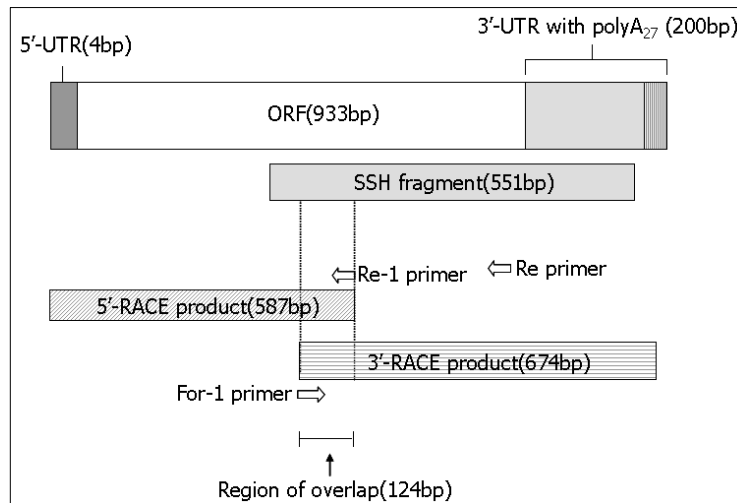


Fig. 5-4. The RACE PCR strategy for isolation of full-length cDNA of UmPP2C. Primers used in RACE PCR were designed from the sequences obtained SSH procedure. The full-length cDNA of UmPP2C was 1137 bp, containing a 933 bp of open reading frame encoding 310 amino acids, a 4 bp of 5'-UTR, a 200 bp of 3'-UTR including a poly(A)<sup>+</sup> tail.

```

1 AGAAATGGGACCATATTAATCTGTACCTACTAAAACATAACATCATTCTCCTAAAGAAGAAAACCCGTTGCTTAT
  M G P Y Q S V P T K T K H H S P K E E N S V A Y
TCTTTATTAAGCTTGTGCTAGTGAARTGTAAAGGATGGAGAARATGGAAATGGAGGATGCCCATATTTTAAATG
  S Y L Q A C A S E M Q G W R N G M E D A H I L Q M
AATATTAATGGAGAAGGAATTAGTATTTTGGTGTTTTGGATGGACATGGAGGTAAGAAGTTCCTAAATTTGTA
  N I N G E G I S I F G V F D G H G G K E V A Q F V
GAAAAACATTATATGAAGAARTCACTCGTTTGAATCTTATAAAAATAGAGATTTTGA AAAAGCATTAGTTGAA
  E K H Y I E E I T R L E S Y K N R D F E K A L V E
TCATTTTACAAAACGGATGAATTAAATGAATCTGAAAGTGGTAAATAAGAARTGAARTAAATAGAGCAGGACCT
  S F Y K T D E L M E S E S G Q Q E L N Q I R A G P
AATGAAGAARTAAATCAGGAGGATAAATCTTATGCTGGTGTACTGCTAATGTAGCTTTATTTTAAAGACAACTT
  N E E Q S G G Q S Y A G C T A N V A L F Y K D N L
TATGTATCTAATGCTGGTGTAGTATCTGTTTTATGCAGAARTGAAAAACCTTACCTTATGTCAGAAGATCAT
  Y V S N A G D S R S V L C R N E K P Y P M S E D H
AAACCTGATAACACTGATGAAAAAAAAGAATCAGTGATGCTGGGGATTTCGTAAATGAAGTAAAGTAAATGGA
  K P D N T D E K K R I S D A G G F V S K G R V N G
AATTTGAACCTAAGTAGCTATGGAGATTTAGAATATAAAAATAAATAAAGATAGACCTAGAGACTAATAATTA
  N L N L S R A M G D L E Y K N N K D R P R D Q Q L
ATATATATCCAAACCTGATGTAAAACACACTAAATTAACAARAAGATGATAAATCTTGTAAATGGGATGTGATGGT
  I I S K P D V K H T K L T K D D K F L L M G C D G
ATTTGGGAARTGAAAACCTAATGAAGAARTTATCTAATATTGTAAAGAAGARTTGAAAAATAATAAGACTTAAAA
  I W E C K T N E E L I Q Y C K E R I E K Q Q D L K
TCAATAAACACTGAATTATTAGATGAAATTTAGCCCTCAGATACTTCAAATGGTGTGGATGTGATAAATAGT
  S I N T E L L D E I L A S D T S N G V G C D N M S
TTAATATTAAATAAACTTCACTGACATTCCTTAAATGA
  L I L I N F T D I P Q *
AGTGTAAATTTGAAGATATTTATGATTTGTACTAATAAGATATTTCTTTTTTGTTTACTTAATTTATAAATTA
  AATGAAAAATATATATAAAAATAAAGTATAATATATTTATATATATCTTAATATTATATAGTATATTCATTATT
  AAATATATAGTAAATATTTATGTAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1137

```

Fig. 5-5. The full-length cDNA sequence and deduced amino acid sequence of UmPP2C. The full-length cDNA of UmPP2C has a 933 bp ORF which has both the start codon (ATG) and the stop codon (TGA). The ATG and TGA codons are underlined. The TAA codons coding for Q were marked by the squares.

(2) Surface antigen의 Full-length cDNA 염기서열 분석 결과

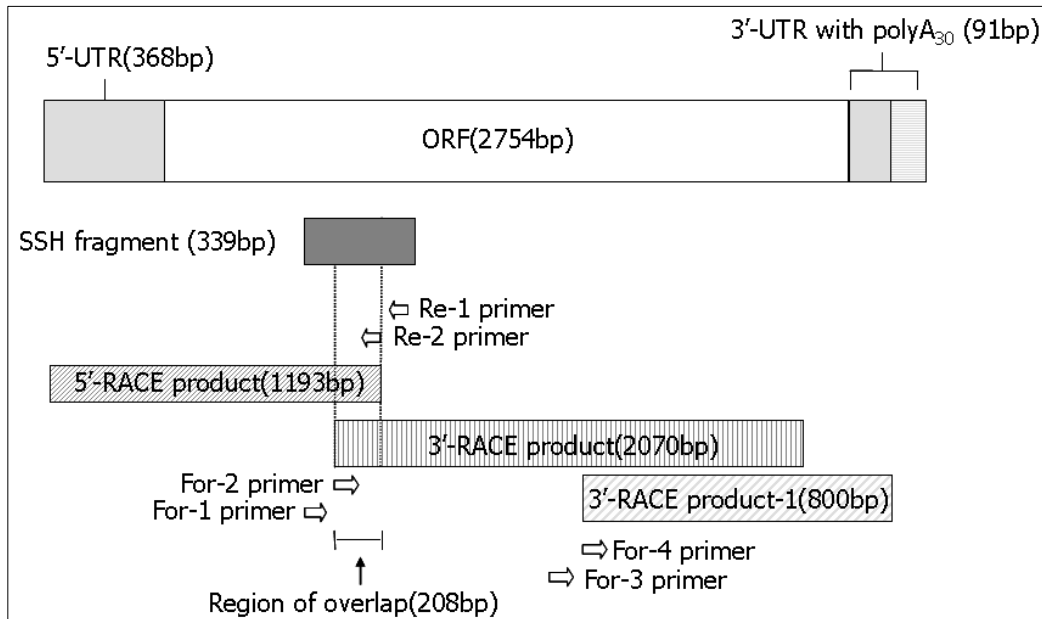


Fig. 5-6. The RACE PCR strategy for isolation of full-length cDNA of surface antigen. Primers used in RACE PCR were designed from the sequence obtained SSH procedure. Primers used to obtain the 3'-RACE product-1 fragment were designed from the sequence of the 3'-RACE product (2070bp). For-3 and For-4 primer indicate Gal-RACE-For-1 and Gal-RACE-For-2 primer in Table 2. The full-length cDNA of surface antigen was 3213 bp, containing a 2754 bp of open reading frame encoding 917 amino acids, a 368 bp of 5'-UTR, a 91 bp of 3'-UTR including a poly(A)<sup>+</sup> tail.

1 ACCTAATTACACCTACTTTTCCAAAATTTTATTTATATATGGGGTAATAATTTTATATA  
ATACAAGATTAATAAATAAAAATAAAAATATAATGTATAAATAATAATAATACATAGGTATA  
ACGATATTACAGATGCAACTGGTTTATGCTAAGCCTTATAGAATTATTAACCTAATTATA  
TAAATATAAGACTATACTATAACAAATTAATTCACCTGAAACATTATATACACTTTTAA  
AAGGATAAAAAGAACTTTAGAAACTTTATACCTTATATATTCAAGGTAATTCCTAGTGATT  
AAACATAACAAAATGAAATTTTATTACCTATAACTTATTATTAGAAAATCTTAAATAAAGT  
ATATTAGTATGAGCTATACTGAGTAAAAAATATTATTTTATATAAATTTTAAATATTTTT  
TTTACTTCTTTATATTAATAAAAAAGTCTGTATATAGTACATATATATCTTAAAGTAATT  
TATAAGTTGATGGGTAATATCCAGCTATATCTTAAAATGGAGTTTGTGGTCTGATTACA  
TGTAAGCTAAATATTACCACCTTAGTAAATGGTAGTAAAACCTGTAGTAATTGTTTACGG  
ATAAATGCCATAGTTGTTTATGAAGGTTAGTAATAATGTGCTAAATGCAGGTATTCTATTC  
CAGCTAGAGTTATAGAAAAGGATTGTAAATGTCCAGATGGGTATATGAAGGTGAATAAA  
ATTACGAATGTTTGAATGTAGTGATTCTTGTATTACTTGTAAATCAGAACTATAATGTG  
ATAGTTGTATTAGTTCTGAAAGATTAAGAATAAATCTTGTACTTGTCTGATGGTTATT  
ATGATGATAAGGTTAATGCTTAATGTTAGCAATGTTTAAATGATTGTAAAGCTTGCCCAA  
GTAAAGTTGAGTGTACAACCTTGCTATGATGGATGGTATTATAAAGAAAGATGATAACTA  
TATGTTTAAATGTTTAGAAAAATTTGCTACATGCAAAAGTGAACAAGTAGGTATAACAT  
GCTAAGGATAAAAATAGATCTAATGAATTGCCATGTAATTGTTTATTAGGATATTATGATG  
ATTAATAAAAACAAATGCTGATTGCTTGAATGTAAGATAAAGTGTGCTTAGTGCACAATA  
ATTCAGATTGCTAAGTTTGTAAAGATGGTTATTATTTGGTGCACAGTGAAGGAATTTAAA  
CTTGTAAAAATGTCCATTGATTTTTCTTAAATGTGAAAATGAAGCTGTAGGTACAGAAT  
GTTAAGGCTAAGGAAGAAGTGAACCTCCTAATGTTTATGTGATAATACATTTTATAATA  
TTTAGGATTAATCAGATTGTTGGTGTAGTGTAAATAGCCTAGTATAAATGTTTCATCAATAG  
ATAAATGTAATCTTGTATATCTGGATATATTTAAATAAATTAATAATGTTAATTAATGTC  
CCTTAAAGTTTGTACATGCTCTAATGAACTGAAGGAGAATAATGTTAAGGAAGTAATA  
GAACATAATAAATCCTGATTGTGAATGTGAAAAGGTTATTATAATGATGATTCTTAGT  
AAGATTGTTTATAATGTATTTCTCCTGTGAATGAATGTATAAATAAATTAGTGCTTAA  
CATGTATTTAAGGTTATTATATTTAAGAAAAAATTTGATTTAATGCCCTGAGAAATTCG  
AACTTGTCTGATGAAAATAAATGGAATAAATGTAAAGGATAAATAAGAACCTAATAAAA  
TACCAGATTGTGAATGTGAAAAGGTTATATAATGTAGAATCTTAGTAAGATTGTATAA  
AATGTATAGAAACATGTTTGAATGTAAATAGTGAACAGAATGTACTAAATGTATTGATG  
GATATTTCTTGTGTCAGGAAGTATTGTTATATAATGTGAAAGTAAATTTGAAACATGTGAAA  
ATGAAACTACTGGAATTAATGTAAAGGATAAAAACAGATCAACCCACCTGATTGCTAAT  
GTTTAGATACTTTTCATGAATAAGAAAATGAATAAGATTGTATATCTTGCCCAAATAAAT  
GTGCAAAATGTAGCTCTGTTGATGTTGTACTAGTTGTGAAATTTGGTAAATATTTGTAAG  
ATGGTTTGTGTATAAATGTCCTGAAAAGTTTAAATGATTGTATCAATACTGAAATAGGAT  
CTTCTTGCAATGGAATAAATAGAAAACCTAACCTGATTGTATTACAAATTTATATG  
AAAAAGAAGGAGAAATAGACTGTTAAATATGTGTAGGTAATTGTTTCATATGTGCTGATA  
ATACCCTTGTATAGATTGTGAAATAGGTTATTATTTAGAAAATAAATGAATGCAAAAAGT  
GTTCTAAGTAATTTTCTTAATGTATTAATGCTGAAGTAGGATTATAATGTGCTGGAAATA  
ATAGATAATAAATAGTTCCAGAATGCCCTGTGAAGAAGGGTTTATGATAATGGAATTG  
ATGAAGATTGCTTTGAATGTTAACTCCCATGTTTATCATGCTAATACTCTAGAATTTCTT  
GTTTATCATGTCAAGAAGGATATTTATTTAGACTATAATTTATGTATATTATGTAATGAAG  
AAAATTTATGGAGGGATGAATGTTCTAATTAATAATCTGGTGTATATAAGGAAGTGATA  
AAAGTTAATAATCTTAATAAATAATCTCTAATGATAAAGATTCTGAAAATCTAACTAAT  
TAACATTGATAATAACTAGGTACTAGTATTTCTTTTTATGGTGGATTTTGCTTTTGA  
TTATATACTATGTATATAGGAAGTATGTAAAAAACCTAAAGAAAACCAAATAGAAGATA  
ACGATTAAACTGGGAATACAGTAATAGATTAACTAAAACCTAATATTAACTACTTAATA  
CCATTAATACAGAAAATAATTTGGATAAATCTGATAATAAAAAGTGTCTATATCTGCAT  
CACCAGAAAATTAACCTAAATATAAAAAATAATAGTATTTAAAAATAAGAATCTAAAAAAA  
TACTTAGTTTAAATGAAATGTTTCTACACCAGAGGAATAACCAAAAAATTTAAATAAAAA  
CTAAAAAAGAAAATCTGTTATGAAAAAATAGTAACAAAAAAGCTTTTATAATTAAAGAT  
GA]TTTAAACATTTTATAATTATAGAATTTATTAATAAATTTCTAATATAAATTTAGTCCA  
TAGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3213

Fig. 5-7. Surface antigen full-length cDNA sequence.

```

1  TGTACTTGTCTGATGGTTATTATGATGATAAGGTTAATGCTTAATGTTAGCAATGTTTA
   C T C P D G Y Y D D K V N A Q C Q Q C L
   AATGATTGTAAAGCTTGCCCAAGTAAAGTTGAGTGTACAACCTTGCTATGATGGATGGTAT
   N D C K A C P S K V E C T T C Y D G W Y
   TATAAAGAAGATGATAAATACTATATGTTTAAAATGTTTAGAAAAATTTGCTACATGCAAA
   Y K E D D N T I C L K C L E K F A T C K
   AGTGACAAGTAGGTATAACATGCTAAGGATAAAATAGATCTAATGAATTGCCATGTAAT
   S E Q V G I T C Q G Q N R S N E L P C N
   TGTTTATTAGGATATTATGATGATTAATAAACAATGCTGATTGTCTTGAATGTAAAGAT
   C L L G Y Y D D Q Q N N A D C L E C K D
   AACTGTGCTTAGTGCACAAATAATTCAGATTGCTAAGTTTGTAAGATGGTTATTATTG
   N C A Q C T N N S D C Q V C K D G Y Y L
   GTCGACAGTGAAGGAATTTAAACTTGTAAAATGTCCATTGATTTTTTCTAAATGTGAA
   V D S E G I Q T C Q K C P L I F S K C E
   AATGAAGCTGTAGGTACAGAATGTTAAGGCTAAGGAAGAACTGTAACCTCTAATGTTTA
   N E A V G T E C Q G Q G R T V T P Q C L
   TGTGATAATACATTTATAATATTTAGGATTAATCAGAT 519
   C D N T F Y N I Q D Q S D

```

Fig. 5-8. Surface antigen partial sequence for site-directed mutagenesis.

(3) GAPDH의 Full-length ORF의 분석 결과

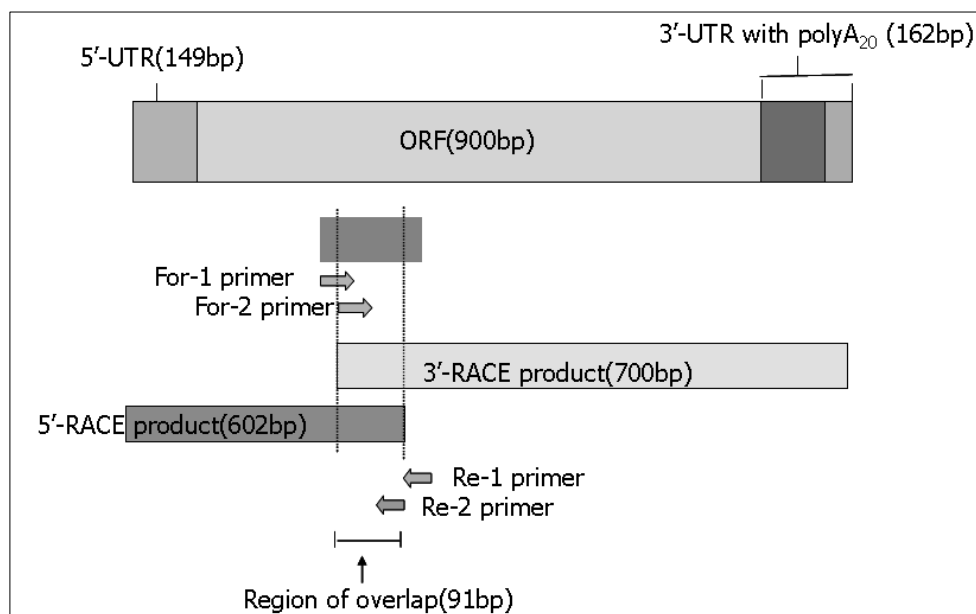


Fig. 5-9. The RACE PCR strategy for isolation of full-length cDNA of GAPDH.

```

1 ATGATCTACCAACTTAGATACGACTCTGCCACCTTAAATTCAATGTTCCCATGAAAAA
  M I Y Q L R Y D S A H L K F N V P I E K
  ATTAACGAAAACACCATCAGTATCAACGGAAAACACATCAGAGTCTTCAATGAAAAGAAC
  I N E N T I S I N G K H I R V F N E K N
  CCTGCTGACATTAATGGGGTGATGTTGGAGCTACTTTTCGTTTGTGAATCTACCGGAGCT
  P A D I K W G D V G A T F V C E S T G A
  TTCTTATCCCAAGAAAAGCTCAAGCTCACCTTAAAGGAGGAGCCAAAAAAGTTATCTTA
  F L S Q E K A Q A H L K G G A K K V I L
  TCTGCTCCTGCTAAAGATAACACTCCCACTTACGTTTACGGAGTCAACCACGAAAAATAT
  S A P A K D N T P T Y V Y G V N H E K Y
  ACCGCTGACTAACATATCATTTCACCGCTTCTTGTACCACCAACTGTTTGGCCCTATC
  T A D Q H I I S N A S C T T N C L A P I
  TCTAAAGTCTTATAAGACAACCTTCGGAATTGCTGAAGGATTAATGACCACCGTTCACGCT
  S K V L Q D N F G I A E G L M T T V H A
  TCCACCGCCGCCAATTAGTTTGTGATGGACCCGCCAAAGGAGGAAAGGACTGGAGAGCT
  S T A A Q L V V D G P A K G G K D W R A
  GGAAGAGCTGCTTCTACCAACATCATTCCTTCCACCACCGGAGCTGCCAAAGCCGTCGGA
  G R A A S T N I I P S T T G A A K A V G
  TTAGTCTTACCCGAATTGAAAGGAAAATTAACCGGAATGGCCTTACAGAGTCCCCACCATC
  L V L P E L K G K L T G M A F R V P T I
  AACGTTTCCGTTGTTGACTTGACCGTCAAATTAGGAAAGGGAGCTTCTTACGCCAATGTT
  N V S V V D L T V K L G K G A S Y A N V
  TGTGAAGCTATGAAACATGCTTCTGAACTAGTTTATAAGGAATCTTAGGATACACCGAA
  C E A M K H A S E T S L Q G I L G Y T E
  GACGCCGTTGTTTCTTAAGACTTCTTACACGATGCCAGATCTTCCATCTTCGACTCTAAA
  D A V V S Q D F L H D A R S S I F D S K
  GCCGGAATTGGACTAAATGACAACCTCCACAAAATTATCTCTTGGTACGACAACGAATGG
  A G I G L N D N F H K I I S W Y D N E W
  GGATACTCCAACAGAATTTTGGACTTAGCTGAACACGTTAACAAAGTTTCTGGATTATGA 900
  G Y S N R I L D L A E H V N K V S G L *

```

Fig. 5-10. Full-length ORF sequence of GAPDH

#### (4) Plasma membrane $\text{Ca}^{2+}$ ATPase (PMCA)

EST 분석 결과 나타난 클론들 중에서 PMCA와 상동성이 있는 염기서열을 가진 클론의 염기서열 중에서 일부분을 선택하여 이를 재조합 발현에 이용하고자 하였다. sequence는 Fig. 5-11과 같으며, mutation할 부분을 사각형으로 표시하였다.



```

1 ACTTCAGTAGCTAGAGATGCTTCTGATATCATATTGCTGGATGATAACTTTAACTCAATT
  T S V A R D A S D I I L L D D N F N S I
  GTCAAAGCTGTTATGTGGGGAAGAAACATCTATGATTCAATTAGAAAATTCCTTTAGTTT
  V K A V M W G R N I Y D S I R K F L Q F
  TAACTCACAGTCAATGTCGTCGCAGTAACTATTACTTTGGTTAGTGCAGCCATCACTAAA
  Q L T V N V V A V T I T L V S A A I T K
  CAAGAAGTTTTGACTCCTATTCAAATGCTATGGGTCAATCTTATTATGGATACCTTCGCT
  Q E V L T P I Q M L W V N L I M D T F A
  TCATTGGCTCTAGCCACTGAACCTCCTACTGAAGAATTACTGAAAAGAGCACCCCACAAC
  S L A L A T E P P T E E L L K R A P H N
  AGAAACTAATATATTATTTCAAAAAGATGACCAAACATATCTTTGGGTAGGCCTTATTA
  R N Q Y I I S K K M T K H I F G Q A L L
  TAGATTTTTGTTTTATTGTTACTAACTTTCGGTGGAGAAAATTCCTACCTGAGTGGGAA
  Q I F V L L L L T F G G E K F L P E W E
  AGCAAATAATTCAAAGATAAAATCCCTGAATTAATTTCGGATTATTAAAGATACCTTAAGT
  S K Q F K D K I P E L I S D Y Q D T L S
  GAAAATCGAGAGCCACTAATGAATCACTTAGATACATAGTTAGAAACCCTTATGCTTAT
  E K S R A T N E S L R Y I V R N P Y A Y
  CAATTTCCGATTCTAGTAAGGATTACGTTGTTTCTGGAAGATTAAGATCATATTCTGGA
  Q F S D S S K D Y V V S G R L R S Y S G
  TTTGATAAAGAATATTACCACATAATGAAAGTATTCTAA 639
  F D K E Y Y H I M K V F *

```

Fig. 5-11. Partial sequence of PMCA.

#### 다. Site-directed mutagenesis

각각의 백신 후보 유전자들의 Full-length cDNA 또는 full ORF sequence와 Site-directed mutagenesis 법으로 TAA나 TAG를 CAA나 CAG로 mutation 해야 할 부분들을 앞의 그림에 모두 표시하였다. 각 유전자들의 염기서열에 따라 제작한 primer들로 mutation한 결과 모두 성공적으로 mutation되었다. 각 유전자별 Site-directed mutagenesis의 반응예를 Fig. 5-12에 나타내었다. BTU는 15곳, GAPDH는 4곳, PMCA는 7곳, PP2C는 16곳, Surface antigen은 15곳의 TAA나 TAG를 CAA나 CAG로 mutation하였다.

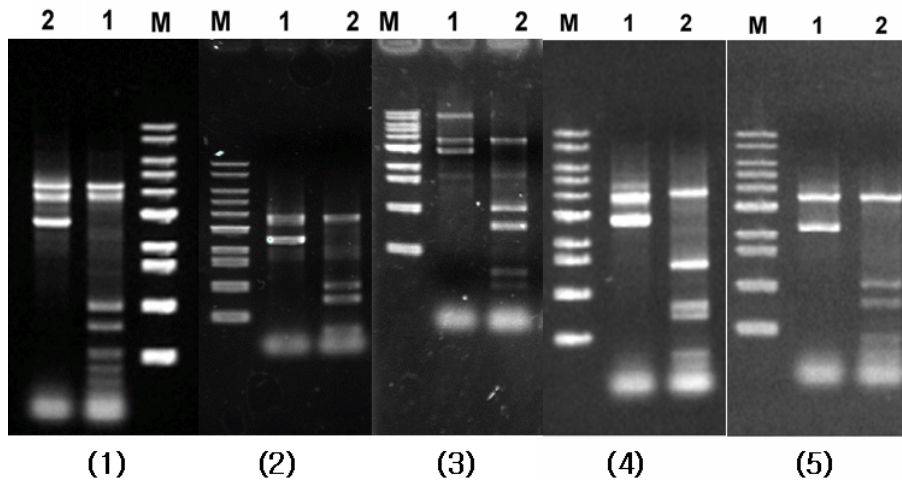


Fig. 5-12. Site-directed mutagenesis 반응예

M : Bioneer 1kb DNA ladder

1. SDM 전

2. SDM 후

(1) BTU

(2) GAPDH

(3) PMCA

(4) PP2C

(5) Surface antigen

## 제6절 스쿠티카충 재조합 항원 발현 및 항체 생산

### 1. 연구내용

앞절에서 기술한 바와 같이 선별된 스쿠티카충 백신 후보 항원 유전자들에 대해 site-directed mutagenesis를 통해 일반 진핵세포가 사용하는 유전자 codon으로 전환시킨 후 대장균에서 재조합 단백질을 생산하는 실험을 수행하였다. 재조합 단백질 생산은 항원 유전자의 성격에 따라 full-ORF 혹은 partial-ORF를 선택하여 발현시켰으며, His-tag 혹은 GST를 fusion protein으로 사용하였다. 또한 생산된 각각의 재조합 단백질에 대해 분석용 항체를 생산하기 위해 각각의 항원 단백질을 Rat 혹은 Rabbit에 immunization 하여 항체를 제작하였다. 이러한 스쿠티카충 항원 재조합 발현은 스쿠티카충을 고가의 배지에서 배양하지 않고 *E. coli* 혹은 넓치 병원성 세균에서 항원 유전자를 발현시켜 백신으로 사용할 수 있게 하기 위한 방법으로서 본 연구에서 최종적으로 제작한 스쿠티카충 항원 유전자들이 세균 시스템에서 작동하는가를 분석함으로써 추후 스쿠티카충 재조합 백신의 적용 여부를 판단할 수 있는 중요한 단계이다.

### 2. 연구방법

#### 가. 백신 후보 유전자들의 재조합 발현 vector의 제작 및 재조합 단백질 발현

##### (1) $\beta$ -tubulin의 재조합 발현 vector 제작 및 재조합 단백질 발현

###### (가) Ligation

pGEX/4T-1 vector (Amersham)와 mutation한 BTU sequence의 단백질 합성 frame을 맞추어 제한효소 site (BTU-Sal I: 5'-GGTCGACTCATGAGAGAGATCGTTCATATTCAA-3', BTU-Not I : 5'-GAGCGGCCGCATTCACATTTCTCCTTCTTTCATCA-3')를 첨가한 primer를 설계하였다. 이 primer를 이용하여 mutation이 완료된  $\beta$ -tubulin gene이 삽입되어 있는 plasmid를 template로 PCR하여 증폭하였다. T easy vector (Promega)에 cloning하고 *E. coli*(DH5a)에 transformation하여 plasmid를 분리하고 pGEX/4T-1 vector도 plasmid 분리한 후 다음과 같은 조성으로 1hr동안 37°C에서 배양하여 제한효소를 처리하였다.

BTU-plasmid	50 $\mu$ l	pGEX/4T-1 vector	50 $\mu$ l
$\times 10$ H buffer	10 $\mu$ l	$\times 10$ H buffer	10 $\mu$ l
Sal I	5 $\mu$ l	Sal I	5 $\mu$ l
Not I	5 $\mu$ l	Not I	5 $\mu$ l
DW	30 $\mu$ l	DW	30 $\mu$ l
total	100 $\mu$ l	total	100 $\mu$ l

1% agarose에 loading하여 원하는 크기의 vector와 BTU band를 잘라내어 Gel Extraction Kit (Nucleogen)를 이용하여 gel elution하였다. 1% agarose gel에 loading하여 농도를 확인하고 다음과 같은 조성으로 혼합하여 12°C에서 16시간동안 배양하여 ligation 반응을 수행하였다.

pGEX/4T-1 vector	4 $\mu$ l
BTU insert	4 $\mu$ l
$\times 10$ ligation buffer	1 $\mu$ l
T4 ligase	1 $\mu$ l
total	10 $\mu$ l

cloning reaction을 competent *E. coli*(BL21) 50  $\mu$ l에 transformation한 다음 plasmid DNA를 추출하여 insert를 확인하였다.

#### (나) 발현 확인 및 정제

ligation이 잘 된 clone을 10 ml의 ALB broth에 접종하여 37°C에서 overnight으로 전배양하여 이것을 1 L의 ALB에 subculture 하였다. OD600 값이 1정도 되었을 때 IPTG를 1 mM이 되게 첨가하여 37°C에서 4시간 더 배양하였다. 원심분리하여 pellet을 모은후 100ml의 1X Binding buffer(PBS pH7.4)에 재우분하여 7 output으로 20분간 30초 간격으로 sonication하고 남은 pellet을 8M Urea에 1시간 처리하고, 1X binding buffer로 투석하여 Urea를 제거한 후 Amersham의 GSTrap<sup>TM</sup>FF affinity column을 사용하여 정제하였다. 정제후 SDS-PAGE하여 확인하였다.

## (2) GAPDH의 재조합 발현 vector 제작 및 재조합 단백질 발현

### (가) Ligation

pHCEIIB vector (Takara)와 mutation한 GAPDH sequence의 단백질 합성 frame을 고려하여 제한효소 site가 첨가된 primer 를 설계하였다. 이 primer를 이용하여 mutation이 완료된 GAPDH 유전자가 삽입되어 있는 plasmid를 template로 PCR을

하였다. pGEM-T easy vector (Promega)에 cloning하고 *E. coli*(DH5a)에 transformation하여 plasmid를 분리하였다. pGEX/4T-1 vector도 plasmid를 분리하여 다음과 같은 조성으로 1hr동안 37°C에서 배양하여 제한효소를 처리하였다.

GAPDH plasmid	50 $\mu$ l	pHCEIIB vector	50 $\mu$ l
$\times 10$ B buffer	10 $\mu$ l	$\times 10$ B buffer	10 $\mu$ l
BamHI	5 $\mu$ l	BamHI	5 $\mu$ l
HindIII	5 $\mu$ l	HindIII	5 $\mu$ l
DW	30 $\mu$ l	DW	30 $\mu$ l
total	100 $\mu$ l	total	100 $\mu$ l

1% agarose에 loading하여 원하는 크기의 vector와 GAPDH band를 잘라내어 Gel Extraction Kit (Nucleogen)를 이용하여 gel elution하였다. 1% agarose gel에 loading하여 농도를 확인하고 다음과 같은 조성으로 혼합하여 12°C에서 16시간동안 배양하여 ligation 반응을 수행하였다.

pHCE vector	4 $\mu$ l
GAPDH insert	4 $\mu$ l
$\times 10$ ligation buffer	1 $\mu$ l
T4 ligase	1 $\mu$ l
total	10 $\mu$ l

cloning reaction을 competent *E. coli*(DH5a) 50  $\mu$ l에 transformation하고, plasmid DNA를 추출하여 insert를 확인한다.

#### (나) 발현 확인

ligation이 잘 되었는지 확인한 클론을 10 ml의 ALB broth에 20시간정도 배양하였다. 원심분리하여 배지를 제거한 다음 2 ml 정도의 PBS에 재부유한 다음 sonication 하고, 12,000 x rpm 으로 20분간 원심분리하여 상층액을 분리하고, pellet은 0.5 ml의 PBS에 재부유하여 각각을 SDS-PAGE하였다.

### (3) Surface antigen(Gal)의 재조합 발현 vector 제작 및 재조합 단백질 발현

#### (가) Ligation into expression vectors

##### ① Vector preparation

pGEX4T-1 GST-fusion expression vector에 Enzyme site를 첨가하고, mutagenesis를 마친 Gal partial sequences를 ligation 하였다.

##### ② Plasmid preparation

*E. coli* pGEX 4T-1/XL-1 Blue 균주와 Gal-1-1/Tvector/DH5 $\alpha$ 에서 plasmid를 GeneALL 사 kit로 분리하였다.

### ③ Enzyme digestion

#### ③-1. BamHI digestion

	pGEX 4T-1	Gal-1-1(TGA)
plasmid	70	70
x10 buffer	10	10
Enzyme	2	2
DW	18	18
total	100	100

위의 조성대로 혼합하여 37°C에서 배양, 2 시간 후 1  $\mu$ l씩 loading하여 확인한 후에 PCR purification kit를 사용하여 purification한 후 25  $\mu$ l volume으로 elution 하였다. 다음 곧 바로 second enzyme digestion을 하였다.

#### ③-2. XhoI digestion

	pGEX 4T-1	Gal-1-1(TGA)
plasmid	25	25
x10 buffer	3	3
Enzyme	2	2
DW	0	0
total	30	30

위와 같이 혼합한 후 다시 37°C에 배양하고 두 시간 후 1  $\mu$ l씩 loading 하여 확인한 후 Gel extraction kit를 사용하여 band를 elution 한 후에 다시 1  $\mu$ l씩 loading 하여 확인하였다.

### ④ Ligation and Transformation into *E. coli*

vector와 insert를 적정 비율로 혼합하고, NEB사의 T4 DNA ligase를 이용하여 ligation하였다. 즉, vector와 insert를 1:1의 비율로 4  $\mu$ l씩 혼합한 후에 x10 reaction buffer를 1  $\mu$ l, T4 DNA ligase를 1  $\mu$ l씩 첨가하여 total volume 10 $\mu$ l가 되게 한 후 12°C에서 overnight으로 ligation 반응을 수행하였다. 24시간 ligation 한 후에 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 transformation하였다. 3개의 clone을 각각 선택하여 plasmid를 분리하여 ligation이 잘 되었는지 확인하였고, 이 plasmid를 다시 protein expression을 하기 위하여 *E. coli* BL21(DE3)와 Codonplus RIPL *E. coli* BL21(DE3)에 transformation하였다.

#### (나) Expression and purification of GST-Gal protein

##### ① Protein sample preparation

pGEX-Gal/codonplus BL21 clone을 2 ml 의 ALB/Chl broth에 overnight culture한 후에 50  $\mu$ l의 배양액을 10 ml의 새 배지에 subculture하여 OD 600값이 0.6정도 될 때까지 30°C에서 배양한 후에 IPTG를 1 mM 농도로 첨가하여 20°C에서 overnight culture하여 단백질 발현을 유도하였다. 다음날 4,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후에 pellet을 2 ml의 PBS에 재부유하고, lysozyme을 1 mg/ml의 농도로 첨가한 후 얼음에 30분 정도 두어 lysis 시킨후 5 output으로 30초씩 두 번 sonication하여 완전히 lysis 한 후에 14,000 g로 20분간 원심분리하여 상층액을 sample로 사용하였다.

##### ② GST-Gal protein purification

- 단백질 정제는 Takara의 Glutathione Excellose<sup>®</sup> Spin kit를 사용하여 수행하였다. Collection tube에 spin column을 끼운 후에 마이크로 튜브 렉에 놓은 다음 Glutathione Excellose<sup>®</sup>를 잘 흔들어 섞은 후 0.5 ml씩 컬럼에 분주하고, 700 g에서 2분간 원심분리하였다. collection tube에 흘러나온 elute를 버리고, Washing buffer(PBS pH 7.4)를 0.5 ml 가한 후 원심분리하고 흘러나온 액을 버린 후, 위에서 준비한 단백질 sample을 0.6 ml 가하여 원심분리하였다. 컬럼을 통과한 flow-through fraction을 다른 튜브에 옮겨둔 다음 Washing buffer를 0.5 ml 가하고 다시 원심분리하는 Washing 과정을 2회 실시하였다. 마지막으로 Elution buffer를 0.2 ml 가하고 원심분리하여 새로운 튜브에 단백질을 elution 하였다. 컬럼을 통과 하기 전의 sample과 마지막 Elution한 정제된 sample을 SDS-PAGE 하였다.

##### ③ Western blot

SDS-PAGE 결과 GST-Gal protein의 예상 크기와 유사한 크기에 band가 나타났으므로 이것을 확인하기 위해 Western blot으로 확인하였다. SDS-PAGE에 사용한 sample을 그대로 다시 한 번 SDS-PAGE하여, membrane에 transfer한 후 membrane을 Blocking solution에 넣어 실온에서 2시간 4°C에서 overnight 처리하여 blocking 하였다. 다음날 TTBS로 10분씩 3회 washing한 후 1차 항체(rabbit anti-GST antibody)를 1:2000으로 희석하여 이 antibody solution에 두 시간 반응 후 15분 씩 3회 TTBS로 washing하고, 1:2000 희석 2차 항체(mouse anti-rabbit IgG) solution에 2시간 반응 후 다시 TTBS로 3회 washing, PBS로 2회 washing 한 후 BCIP/NBT solution 1ml로 1분간 반응시켜 color development를 확인하였다.

#### (4) PMCA 클로닝 및 재조합 단백질의 발현

기존에 알고 있던 약 600bp의 PMCA sequence를 이용하여 재조합단백질을 만들기 위하여 여러종류의 발현 벡터에 ligation하여 단백질의 발현을 조사하였으나, 단백질의 발현이 이루어지지 않았다. 때문에 아미노산 시퀀스를 transmembrane domain을 찾아주는 프로그램을 이용하여 조사한 결과 이 염기서열 내에는 두 부분의 transmembrane domain이 포함되어 있었다 (Fig. 6-1). 이러한 hydrophobic한 transmembrane domain이 포함되어 있을 경우 *E. coli* system에서 단백질 발현을 유도하기는 쉽지 않기 때문에, 아래 그림에서 나타난 outside 부분 약 160 bp 정도만을 다시 클로닝하였다.

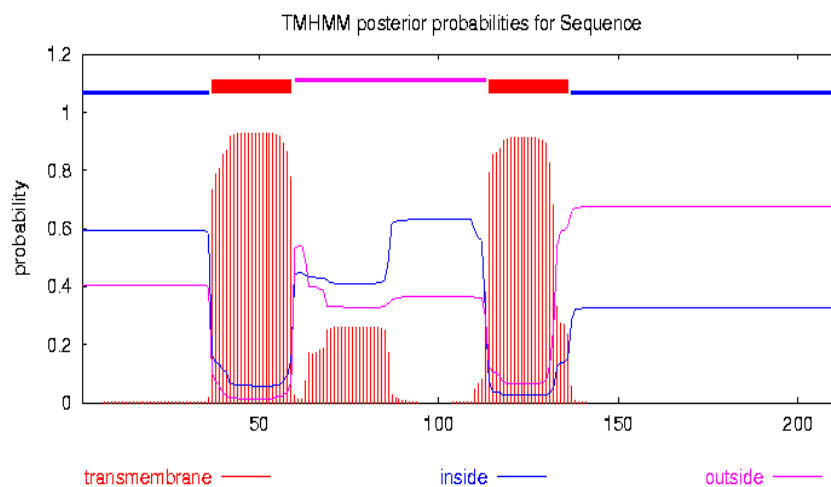


Fig. 6-1. Analysis of transmembrane domain of PMCA.

다시 클로닝한 160bp의 염기서열은 다음과 같았다.

```

AAACAAGAAGTTTTGACTCCTATTCAAATGCTATG
GGTCAATCTTATTATGGATACCTTCGCTTCATTGG
CTCTAGCCACTGAACCTCCTACTGAAGAATTACTG
AAAAGAGCACCCACAACAGAAACCAATATATTAT
TTCAAAAAAGATGACCAAACAT

```

#### (가) Cloning

GST fusion vector인 pGEX-4T-1 vector 및 ghost vector로의 ligation을 위하여 primer의 양쪽에 적절한 enzyme site를 첨가하여 primer를 제작하여, 이 primer들을 사용하여 PCR한 후, pGEM-T easy vector(promega)에 클로닝한 후 마크로젠에 분석을 의뢰하여 염기서열을 확인하였다.



## PMCA partial sequence의 클로닝을 위한 primers

Primer	Sequence
SpeI-PMCA-For	5'-ACTAGT AAACAAGAAGTTTTGACTCCTATTC-3'
SacI-PMCA-Re	5'-GAGCTC TCAATGTTTGGTCATCTTTTTTG-3'
EcoRI-PMCA-For	5'-GAATTC AAACAAGAAGTTTTGACTCCTATTC-3'
Sall-PMCA-Re	5'-GTCGAC TCAATGTTTGGTCATCTTTTTTG-3'

### (나) 단백질 발현을 위한 vector로의 ligation

단백질 발현을 위해 pGEX4T-1, pHCE-InaN vector에 ligation하였다. pGEX 4T-1 vector와의 ligation에는 EcoRI, Sall enzyme을 사용하여 digestion 하였고, pHCE-InaN vector와의 ligation에는 SpeI, SacI enzyme을 사용하였다. 각각의 enzyme으로 digestion한 후, ligation을 수행하였다. Ligation에는 NEB사의 T4 DNA ligase를 사용하였으며 12°C에서 overnight으로 ligation 반응을 수행한 후, 반응액 전부를 *E. coli* DH5a에 transformation하였다. positive 클론은 ALB plate에 plating하여 screening하였다. ALB에서 자란 클론의 colony PCR을 통해 ligation과 transformation이 잘 된 클론을 선별하여 단백질 발현의 확인 및 정제를 위해 사용하였다.

### (다) 단백질 발현의 확인 및 재조합 단백질의 정제

위에서 선별된 클론의 플라스미드를 분리하여 단백질 발현을 위하여 *E. coli* colonplus BL21(DE3) strain에 다시 transformation 하였다. 일단 발현이 잘 유도되는지를 확인하기 위하여 10ml 정도만을 배양하여 확인하였다. overnight으로 전배양한 다음 10 ml의 새로운 배지에 subculture한 후 충분히 배양하여 OD 600 값이 1.5정도가 되게끔 배양하고, IPTG를 1 mM의 농도로 첨가하여 20°C에서 overnight 배양하여 단백질 발현을 유도하였다. IPTG를 첨가하지 않은 control을 함께 두어 비교하였다. 이렇게 발현시킨 균 배양액을 다음날 원심분리를 통해 집균한 다음, PBS에 재현탁하였다. 7output에서 30초간 2회정도 sonication한 후 14,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액과 펠렛으로 구분하였다. 이렇게 만들어진 sample을 SDS-PAGE하고, Western blotting하여 단백질이 잘 발현되는지 확인하였다. Western blot 시에는 anti-GST antibody를 사용하였다.

## 나. 백신후보 유전자 재조합 단백질에 대한 항체 생산

각각의 정제한 재조합 단백질을 FCA와 1:1의 비율로 혼합하여 Rat 혹은 Rabbit

에 복강 혹은 근육 주사하였다. 2주 간격으로 재조합 단백질을 IFA와 1:1의 비율로 혼합하여 boosting 주사하였다. 최종 boosting 2주 후, 심장에서 전혈을 채취하여 혈청을 분리하였다.

분리된 혈청을 이용하여 종별 스쿠티카 총과 반응하여 immobilizing/killing test를 실시하였다. immobilizing test에 사용한 혈청은 56℃에서 30min동안 반응하여 보체를 불활성화 시킨 후 실험하였다. 96 well에 혈청을 PBS에 1/2희석한 것을 초기농도로 1/2048의 농도까지 단계희석하고  $1 \times 10^3$ 의 총을 첨가하여 2시간동안 초반 20분동안은 5분 간격으로 그 이 후는 20분 간격으로 현미경을 통하여 총의 활성을 관찰하였다.

각가의 혈청은 Western blotting을 이용하여 항체생성 여부를 확인하였다. 정제한 재조합 항원 단백질을 SDS-PAGE 하고 nitrocellulose paper에 blotting하였다. 1차 항체로서 vaccination한 rat 혹은 rabbit의 혈청을 희석하여 사용하였고, 2차 항체로서 rabbit IgG anti-rat IgG-AP conjugates 혹은 Goat IgG anti-rabbit IgG-AP conjugates를 1:2000의 비율로 희석하여 사용하였다. BCIP/NBT를 기질로 사용하여 발색반응을 관찰하였다.

### 3. 연구결과

#### 가. 스쿠티카총 $\beta$ -tubulin 재조합 단백질 발현, 정제 및 분석

스쿠티카총  $\beta$ -tubulin에 대한 GST fusion 재조합 단백질의 발현 및 정제는 Fig. 6-2와 같다. 약 77.5 kDa의 재조합 단백질이 단일 band로 정제되었다. 정제한 단백질을 rat에 주사하여 항체를 얻은 후 이를 이용해 Western blotting을 한 결과는 Fig. 6-3과 같으며, 재조합 단백질에 의한 항체가 형성되었음을 확인할 수 있었다.

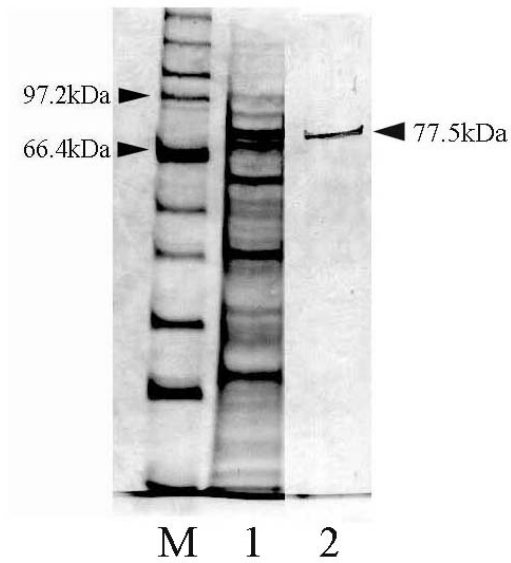


Fig. 6-2. Coomassie blue stained SDS-PAGE gel of GST-fused  $\beta$ -tubulin (BTU) of *Pseudocohnilembus persalinus*. M: : proteinmolecular mass marker (kDa). Lane 1: total lysate of bacteria expressing GST-BTU by addition of IPTG. Lane 2: a fraction of purified GST-BTU.

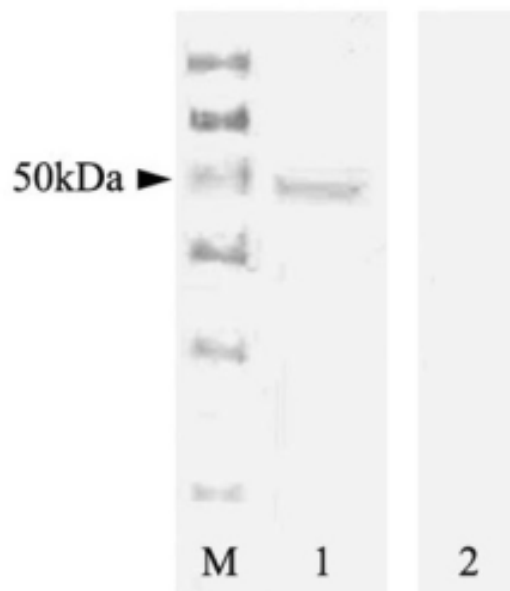


Fig 6-3. Western blot analysis of GST-BTU immunized rat serum against *Pseudocohnilembus persalinus* lysate. M1: prestained protein marker. Lane1: rat immune serum. Lane 2: rat control serum.

재조합  $\beta$ -tubulin에 대한 antiserum의 스키테카충에 대한 killing activity 및 증식 억제 능력을 분석한 결과  $\beta$ -tubulin에 대한 antisera가 control sera에 비해 유의적으로 높은 killing activity를 나타내었으며, 또한 충의 증식도 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 6-4).

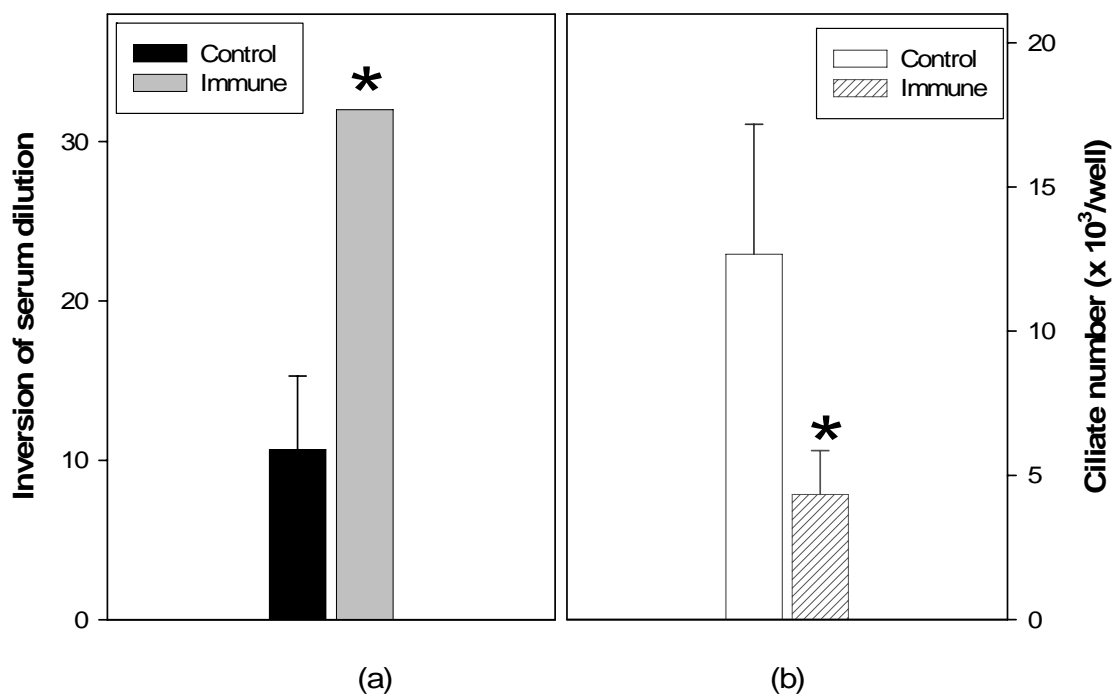


Fig. 6-4. Parasiticidal (a) and proliferation inhibitory (b) activities of sera of GST-BTU immunized rats and non-immunized control rats. Values are mean±standard deviation. Asterisks on the bar indicate statistically significant differences at  $P<0.05$ .

#### 나. GAPDH 재조합 단백질 발현

스쿠테카충 GAPDH cDNA를 constitutive promoter를 지닌 pHCE vector에 삽입 후 *E. coli*에 transformation 하여 overnight 배양한 것을 sonication 하여 상층액과 pellet으로 fraction을 나누어 SDS-PAGE하였을 때 control *E. coli* DH5a에서는 나타나지 않는 protein band가 pellet fraction에서 나타났으며 (Fig. 6-5), 그 분자량은 GAPDH와 일치하였다.

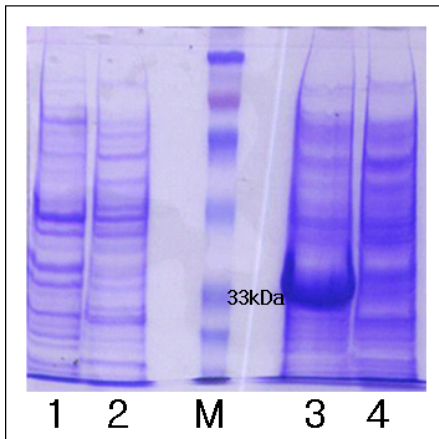


Fig. 6-5. GAPDH 의 발현

M PIERCE protein marker

1. DH5α lysate pellet
2. DH5α lysate supernatant
3. pHCE-GAPDH/DH5α lysate pellet
4. pHEC-GAPDH/DH5α lysate supernatant

#### 다. Surface antigen(Gal)의 재조합 단백질 발현

스쿠티카충 surface antigen (Gal)의 partial gene을 GST에 fusion 시킨 후 *E. coli* 에서 발현시킨 결과 tarfet gene이 발현되었으므로 fghkr인할 수 있었으며, 이를 GST-column을 이용해 fraction을 분석한 결과 Fig. 6-6에서와 같이 약 50 kDA 크기의 fusion protein이 과발현되어 정제되었음을 알 수 있었다.

발현된 재조합 surface antigen에 대한 Western blot 결과는 Fi. 6-7에서와 같이 정제전 및 column 통과한 정제 산물에 대해서도 잘 반응함을 알 수 있었다.

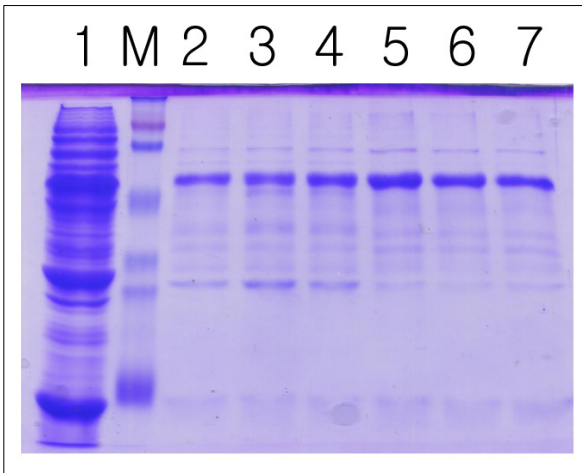


Fig. 6-6. Expression and purification of GST-Gal protein

1. 컬럼 통과 전 상층액

M.. PIERCE protein marker

Lane 2-7. sample # 1 - # 6

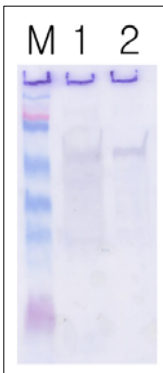


Fig. 6-7. Western blot analysis M. PIERCE marker

1. 컬럼 통과 전 cell lysate

2. 컬럼 통과 후 sample

#### 라. PMCA 재조합 단백질 발현 및 분석

스쿠티카충 PMCA의 hydrophilic 한 부분만을 재클로닝하여 GST-fusion vector에 삽입 후 (Fig. 6-8 & 6-9) 발현 및 분석실험을 수행하였다.

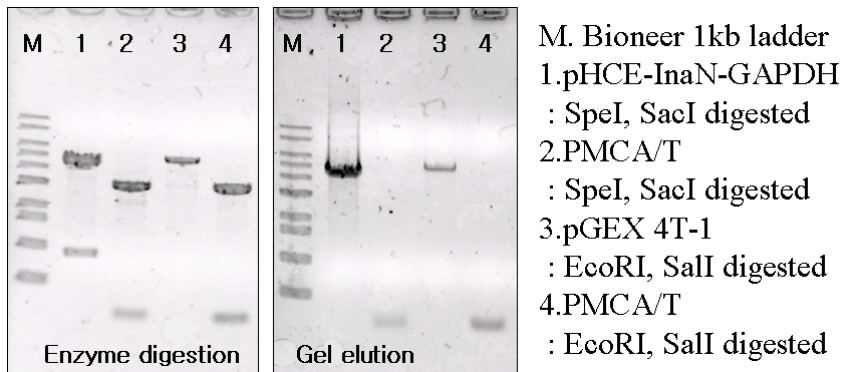


Fig. 6-8. Restriction enzyme digestion 및 Gel Elution

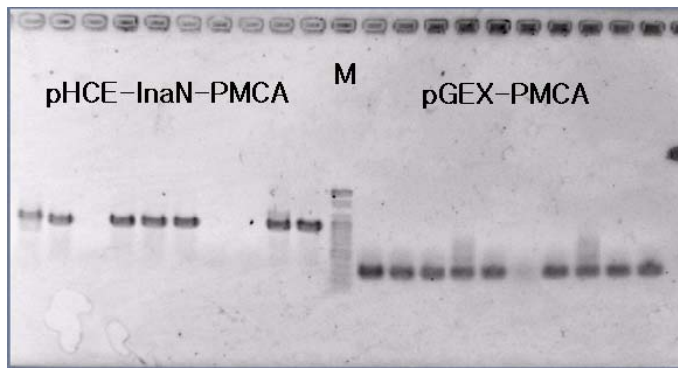


Fig. 6-9. transformation 후 클론들의 Insert colony PCR결과

먼저 적은 volume으로 단백질 발현을 유도시켜 SDS-PAGE 한 결과는 Fig. 6-10과 같다.

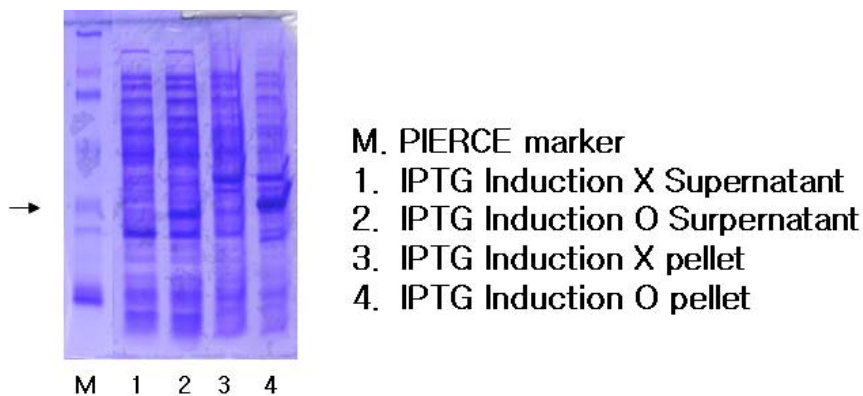


Fig. 6-10. pGEX-PMCA/codonplus BL21 단백질 sample의 SDS-PAGE

약 30kDa 부분에 Induction 하지 않은 것과 비교하여 다른 진한 band가 나타났다. 이를 정확히 확인하기 위해 GST antibody로 Western blotting한 결과는 Fig. 6-11과

같다.

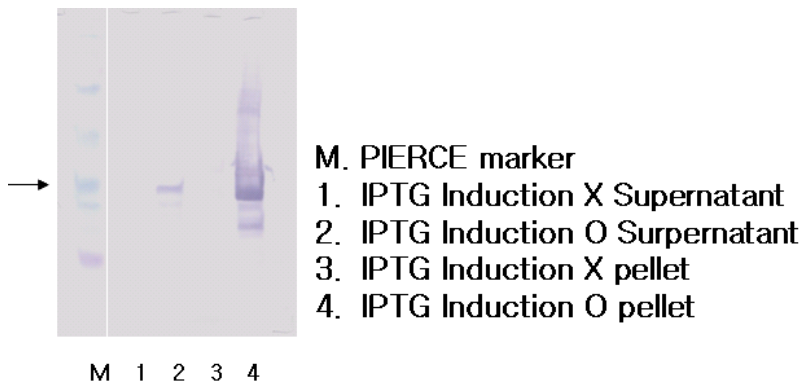


Fig. 6-11. Western blotting 결과

Western blot의 결과 IPTG로 유도한 sample에서 상층액과 펠렛 모두에 band가 관찰되었음을 알 수 있다. 상층액 즉 soluble fraction에의 발현을 이와 같이 확인한 후 대량으로 sample을 만들어 정제를 시도하였으며 그 결과는 Fig. 6-12와 같다.

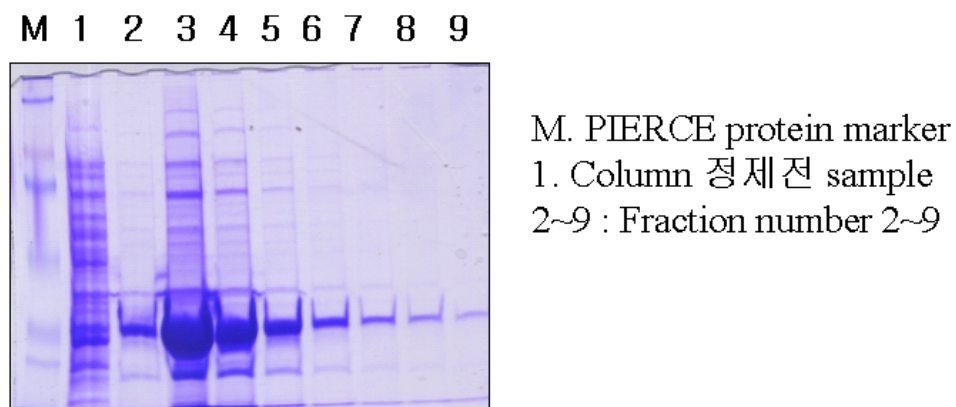


Fig. 6-12. GST Affinity column을 사용한 GST-PMCA 단백질의 정제



## 제7절 스쿠티카충 항원 발현 *Edwardsiella tarda* ghost bacteria를 이용한 백신

### 1. 연구내용

스쿠티카충에 대한 백신 개발을 위해 앞에서 선정된 항원 후보유전자들을 대상으로 백신 실험을 수행하였다. 넓치에 immunization 하는 방법으로서 스쿠티카충 항원 재조합 단백질을 adjuvant와 혼합하여 투여하는 방법은 재조합단백질의 정제 과정을 거쳐야 하므로 어류 백신으로서의 경제성이 떨어지며, 또한 단백질항원 백신시 주로 사용하는 adjuvant로서 mineral oil은 어류에 부작용이 생겨날 가능성이 높다. 다른 한편으로 재조합 항원을 발현시킨 대장균등의 세균을 lysate로 만들어 immunization 하는 경우 경제성 문제는 해결할 수 있으나 재조합 단백질 발현을 위해 사용한 expression vector 내에 antibiotic resistant gene의 잔류 문제를 야기시킨다. 따라서 본 연구에서는 이러한 재조합 단백질을 이용한 어류 백신 delivery의 문제점을 해결하기 위해 새로운 vaccine delivery 방법을 개발하여 이를 스쿠티카충 백신에 적용하였다.

본 연구에서 개발한 백신 delivery 방법은 Ghost bacteria의 표면에 스쿠티카충의 항원을 발현시킨 형태이다. Ghost bacteria 기술이란 세균의 벽에 nano scale의 작은 hole을 인위적으로 유도함으로써 세균의 세포질 성분을 밖으로 유실토록 하는 기술이다. 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. 본 연구에서는 Ghost bacteria 유도를 위해서 phiX174 phage의 E-protein을 정밀 유도 발현시킬 수 있는 expression vector를 제작하였다. 유도발현은 백신 제작시 경제성을 극대화하기 위해서 lambda phage의  $\lambda_{PR}$  및 CI repressor 조절부위들을 바탕으로한 temperature-sensitive activation 벡터를 구축하였다. Ghost 박테리아는 기원한 세균의 표면 항원성을 그대로 보존하고 있음으로 인해 생균의 면역기능 유도 능력을 거의 보존하고 있음은 물론 여타 다른 항원 단백질들과 접촉되어 사용될 경우, ghost 자체가 강력한 adjuvant로서의 기능을 갖고 있음이 포유류 경구 백신 실험에 의해 최근 밝혀진 바 있다. 본 연구진은 양식넙치에 감염되어 심각한 폐사를 일으키는 대표적 세균인 *Edwardsiella tarda* 를 ghost bacteria 대상 세균으로 정하여 이미 *E. tarda* ghost (ETG) 생성을 확인한 바 있으며, 본 연구에서는 개발된 *E. tarda* ghost의 표면에 스

쿠티카층 항원 단백질을 발현시킴으로써 에드워드증과 스쿠티카층에 대한 복합백신으로서의 기능을 하도록 연구를 수행하였다. 스쿠티카층 항원의 ghost bacteria 표면 발현은 ice nucleation protein (INP)의 N-terminal oligonucleotides를 표면발현 signal로 사용하였으며, 이 INP와 fusion된 스쿠티카층 항원 유전자의 고발현을 위해 constitutive promoter를 사용하였다.

*E. tarda* Ghost의 표면에 발현된 스쿠티카층 항원은 Western blot을 통해 확인하였으며, 이러한 스쿠티카층 항원 표면발현 *E. tarda* ghost 백신을 넙치에 면역화시켜 스쿠티카층에 대한 방어효율을 검증하였다.

## 2. 연구방법

### 가. Vector construction

#### (1) plasmid vector에 삽입할 각각의 구성요소들의 확보

표면 발현의 signal sequence로서 사용할 sequence는 *Pseudomonas syringae*의 Ice Nucleation Protein 유전자인 *inaK*의 N-terminal sequence(InaN)로서, 이것은 pINPNCGFP plasmid로부터 PCR을 이용하여 증폭하여 클로닝한 것을 사용하였다. 스쿠티카층 항원을 사용하여 실험을 수행하는 것과 동시에, construction된 vector로 인한 항원단백질의 발현 및 표면 발현의 유무를 확인하기 위해 reporter gene으로서 GFP (Green Fluorescence Protein gene)를 사용하였다.

스쿠티카층의 항원으로는 앞서 클로닝한 Surface antigen(Gal)의 partial sequence,  $\beta$ -tubulin, Plasma membrane  $Ca^{2+}$  ATPase의 partial sequence, GAPDH를 사용하였고, ligation을 위해 PCR primer에 Forward primer에는 SpeI, Reverse primer에는 SacI site를 첨가하여 PCR하여 클로닝하였다.

Ghost cassette는 기존의 ghost plasmid에서의 ghost cassette를 pBluescript KS plasmid에 옮겨 37°C에서 안정하도록 promoter 부분을 mutation 해놓은 pBS-ghost 37SDM 내에 있는 mutation된 sequence를 이용하였다.

#### (가) GFP의 cloning

##### ① PCR primer 의 제작

Primer	Sequence
GFP-SpeI-For	5'- <b>ACTAGT</b> AGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTG-3'
GFP-KpnI-Re	5'- <b>CGGGGTACCT</b> TATTTGTAGAGCTCATCCATGCC -3'

```

ACTAGTAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTC
GFP-SpeI-For
TTGTTGAATTAGATGGTGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTGAG
TGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTACCCTTAAA
TTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTG
TCACTACTTTCTCTTATGGTGTTCATGCTTTTCCCGTTATCCGGA
TCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGT
TATGTACAGGAACGCCTATATCTTTCAAAGATGACGGGAACTACA
AGACGCGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATCG
TATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTC
GGACACAAACTCGAGTACAACATAACTCACACAATGTATACATCA
CGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGCTAACTTCAAATTCG
CCACAACATTGAAGATGGATCCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAA
CAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACC
ATTACCTGTGACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAA
GCGTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAAGTGTGCTGGGATT
ACACATGGCATGGATGAGCTCTACAAATAAGGTACCCCG
GFP-KpnI-Re

```

## ② PCR 및 Gel extraction, Cloning

PCR은 pINPNCGFP plasmid를 DW로 50배 희석한 후 1  $\mu$ l를 template로 하여 위의 GFP-SpeI-For primer와 GFP-KpnI-Re primer를 각각 10 pmol 씩 사용하여 Takara 사의 premix를 사용하여 수행하였다. PCR 산물은 Gel extraction 한 다음 pGEM-T easy vector(Promega)에 cloning하였다.

GFP의 PCR 반응후 gel extraction 산물, 1  $\mu$ l loading



M : Bioneer 1kb ladder,  
1. GFP elute (약 700bp)

## ③ 염기서열 분석

클로닝 하여 *E. coli* DH5a에 transformation 한 다음, General biosystem 의

Plasmid miniprep kit를 사용하여 plasmid를 분리한 후, (주) 마크로젠에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 기존의 염기서열과 비교하여 첨가한 enzyme site를 확인하였다.

(나) 스쿠티카충 항원의 SpeI, SacI cloning

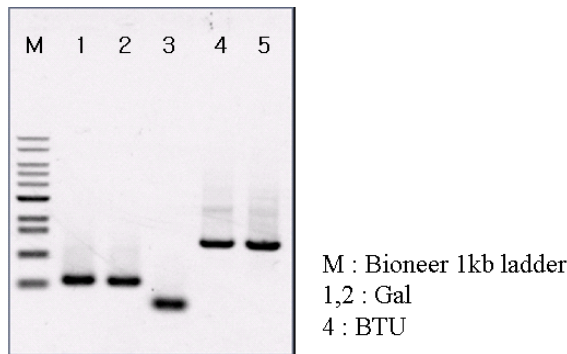
① PCR primer 의 제작

Primer	Sequence
Gal-SpeI-For	5'-ACTAGTTGTA CTTGTCCTGATGG-3'
Gal-SacI-Re	5'-GAGCTCTCAATCTGATTGATCCTG-3'
BTU-SpeI-For	5'-ACTAGTATGAGAGAGATCGTTCATATTC-3'
BTU-SacI-Re	5'-GAGCTCTCACATTTCTCCTTCTTCTTC-3'
PMCA-SpeI-For	5'-ACTAGTAAACAAGAAGTTTTGACTCCTATTC-3'
PMCA-SacI-Re	5'-GAGCTCTCAATGTTTGGTCATCTTTTTTG-3'
GAPDH-SpeI-For	5'-ACTAGTATGATCTACCAACTTAGATACGAC-3'
GSPDH-SacI-Re	5'-GAGCTCTCATAATCCAGAACTTTGTTAACG-3'

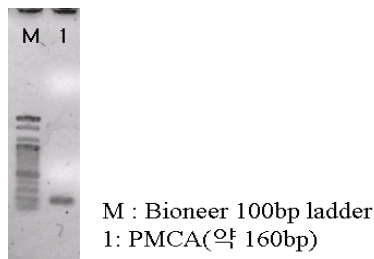
② PCR 및 Gel extraction, Cloning

스쿠티카충의 항원단백질 역시 위의 primer를 사용하여 각각 PCR하고 클로닝하였다.

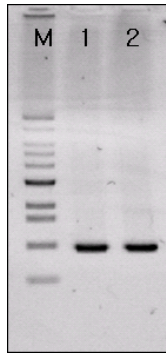
Gal(약530bp), BTU(약1.3kb) PCR product의 loading



PMCA의 PCR product loading



## GAPDH의 PCR product loading



M : Bioneer 1kb ladder  
1,2: GAPDH(약 950bp)

### ③ 염기서열 분석

클로닝 하여 *E. coli* DH5a에 transformation 한 다음, General biosystem 의 Plasmid miniprep kit를 사용하여 plasmid를 분리한 후, (주) 마크로젠에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 기존의 염기서열과 비교하여 첨가한 enzyme site를 확인하였다.

### (2) Ligation

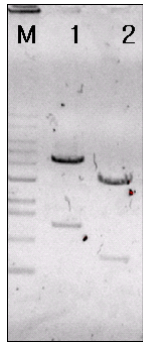
IPTG를 첨가하지 않아도 단백질의 발현의 유도가 되는 항시적 고발현 vector인 pHCEIIB plasmid vector를 Bioleaders에서 구입하여, 이것을 NcoI, SacI digestion 하여 pInaN-UreA-Ghost로부터 같은 restriction enzyme을 처리하여 나온 insert인 InaN+Ag sequence를 ligation하였다. 이렇게 하여 만들어진 pHCE-InaN-Ag에 각각의 스쿠티카 항원을 SpeI, SacI digestion하여 Ag 자리에 ligation하였다. 각각의 plasmid에 최종적으로 ghost cassette를 KpnI, Sall digestion하여 ligation하였다. 이렇게 하여 최종적으로 완성된 plasmid는 pHCE-InaN-ScuAg-ghost 37이다.

### (가) pHCE-InaN-GFP-ghost 37 vector의 construction

#### ① pHCE-InaN-GFP의 construction

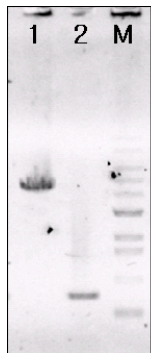
GFP sequence에 SpeI, KpnI을 첨가하여 T vector에 클로닝 되어 있는 plasmid와 pHCE-InaN vector를 SpeI과 KpnI을 각각 처리하여, gel elution한 후 1:1의 비율로 ligation하였다.

pHCE-InaN vector, GFP/T vector의 SpeI, KpnI enzyme digestion 후



M : Bioneer 1kb ladder  
1. Vector  
2. GFP/T

Gel extraction 후 loading

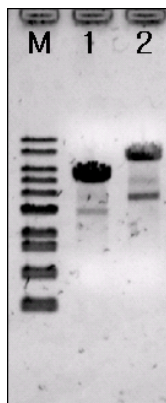


M : Bioneer 1kb ladder  
1. pHCE-InaN(vector)  
2. GFP

② pHCE-InaN-GFP-ghost 37의 construction

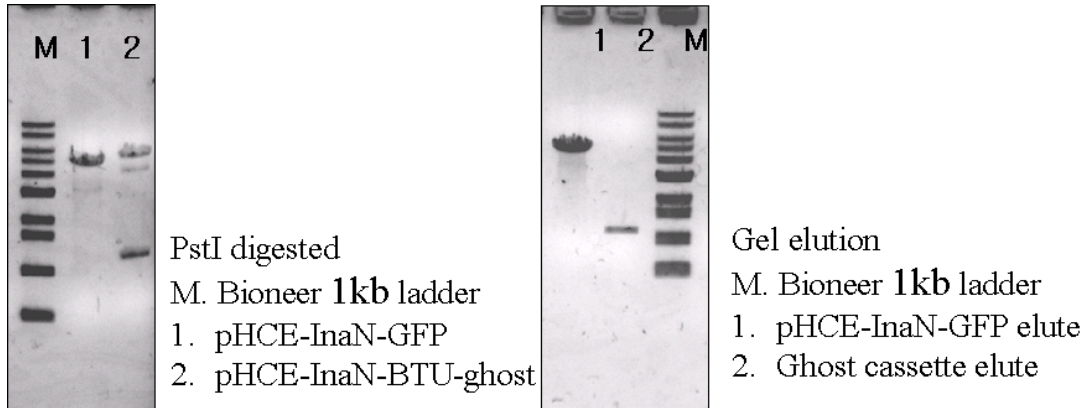
pHCE-InaN-GFP plasmid와 ghost 37 cassette를 KpnI과 PstI으로 digestion 한 후 ligation하였다.

KpnI digestion 후 loading



M. Bioneer 1kb ladder  
1. pHCE-InaN-GFP  
2. pHCE-InaN-BTU-ghost

PstI digestion 후, Gel elution

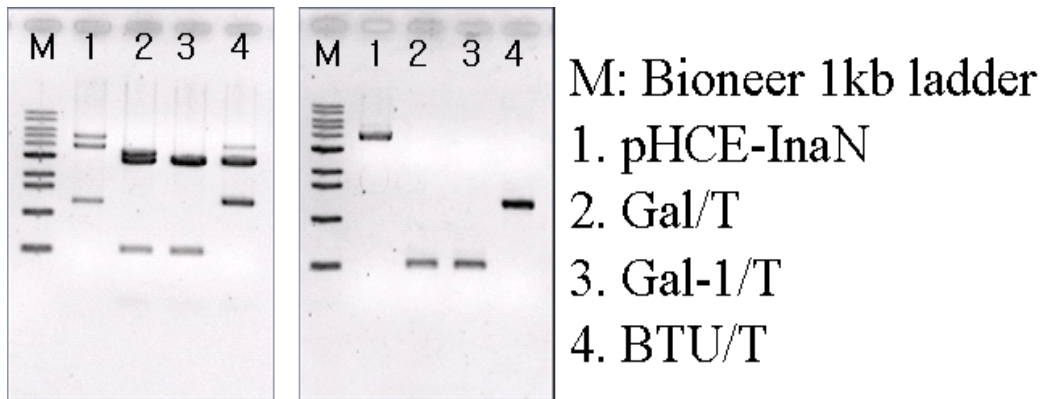


(나) pHCE-InaN-ScuAG-ghost 37 vector의 construction

① pHCE-InaN-ScuAG plasmid construction

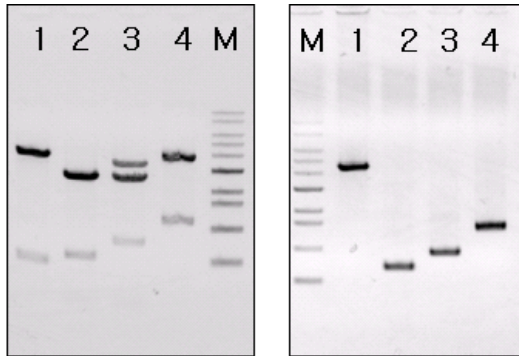
4가지 스쿠티카 항원 단백질 중에서 Gal과 BTU는 SpeI, SacI을 첨가하여 T vector에 클로닝한 것을 사용하여, 각각 SpeI과 SacI enzyme을 처리한 후 같은 enzyme을 처리한 pHCE-InaN vector에 ligation하였다.

SpeI, SacI digestion 후 gel elution



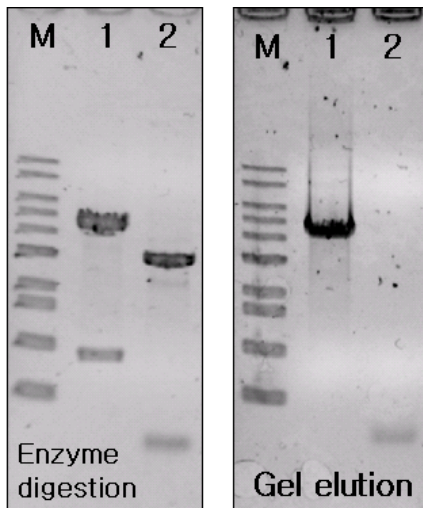
나머지 스쿠티카 항원 단백질에 대해서도, SpeI과 SacI을 첨가하여 클로닝 한 후 동일한 방법으로 pHCE-InaN vector에 ligation하였다.

SpeI, SacI digestion 후 Gel elution



M: Bioneer 1kb ladder  
 1. pHCE-InaN-Gal  
 2. PMCA(Old)/T  
 3. GAPDH/T  
 4. BTU/T

pHCE-InaN, PMCA(new, 160bp)/T SpeI, SacI digestion



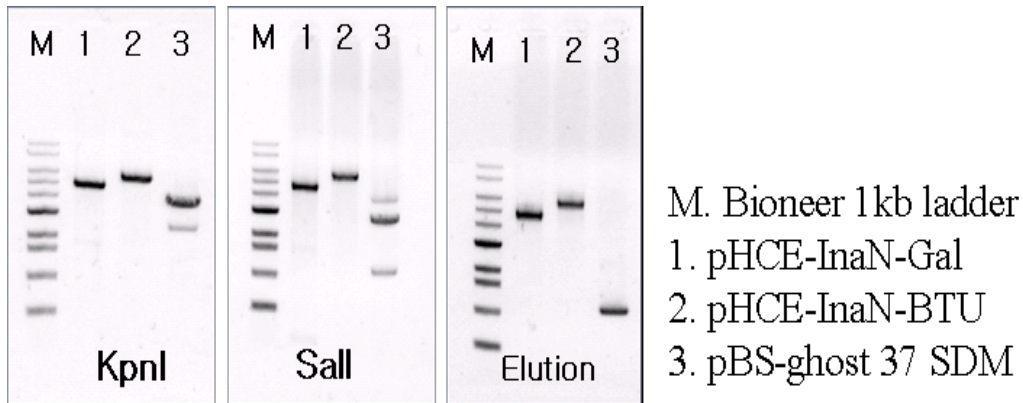
M. Bioneer 1kb ladder  
 1. pHCE-InaN  
 2. PMCA/T

## ② pHCE-InaN-ScuAg-ghost 37 vector construction

pHCE-InaN-ScuAg 와 ghost cassette의 ligation을 위해서, 먼저 pHCE-InaN-Gal, pHCE-InaN-BTU와 pBS-ghost37 SDM을 KpnI, Sall digestion 하여 pBS-ghost 37 SDM plasmid에 있는 ghost 37 cassette를 pHCE-InaN-BTU에 ligation 하였다. Enzyme을 처리하고 gel elution한 것을 다음 그림에 나타내었다.

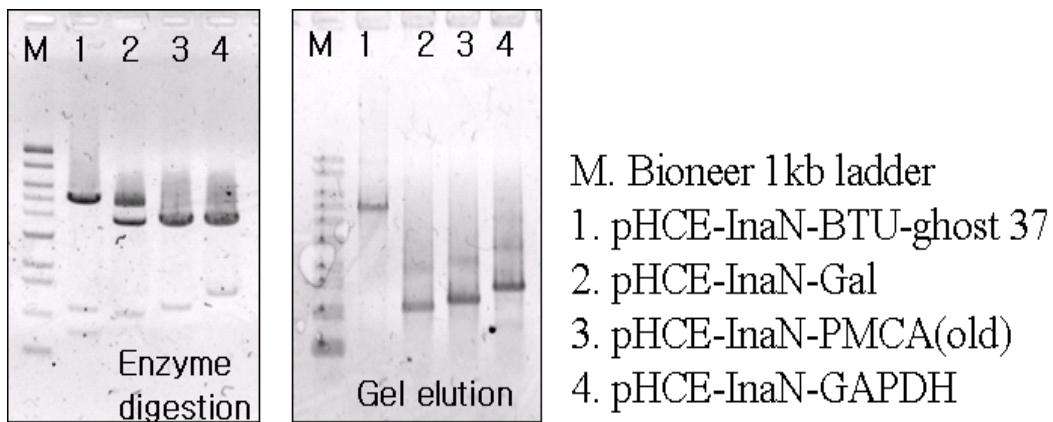


pHCE-InaN-Gal, pHCE-InaN-BTU, pBS-ghost37 SDM의 KpnI, Sall digestion



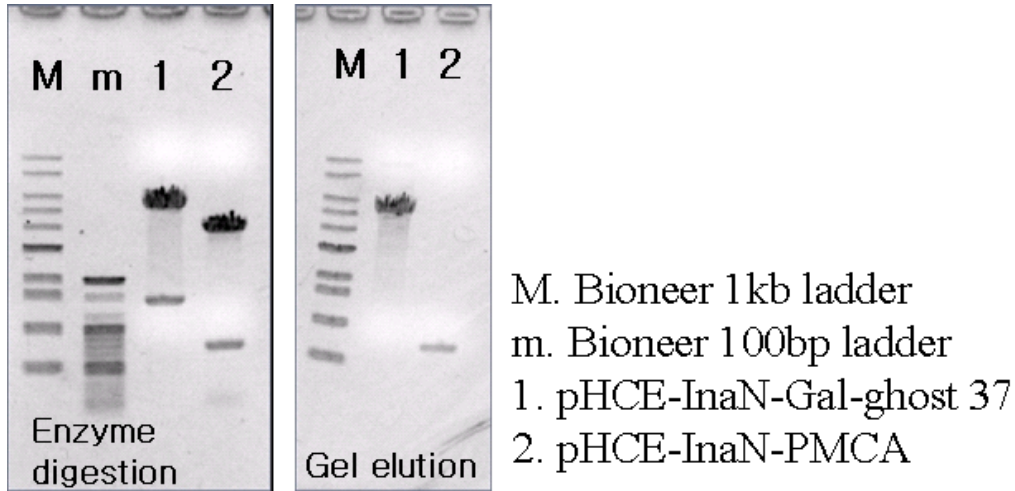
이렇게 ligation한 결과, BTU만 ligation이 되어 나머지 항원 단백질에 대해 다시 ligation을 수행하였다. 이때는 pHCE-InaN-BTU-ghost 37에 NcoI, SacI 처리하여 pHCE-InaN-Gal, pHCE-InaN-PMCA(old), pHCE-InaN-GAPDH 로부터 InaN-Gal, InaN-PMCA(old) 또는 InaN-GAPDH를 ligation하였다.

NcoI, SacI 처리후 gel elution



또한 다시 클로닝한 PMCA(new, 160bp)는 pHCE-InaN-Gal-ghost 37 plasmid를 NcoI, SacI enzyme으로 digestion한 후, 같은 enzyme을 처리하여 gel elution한 InaN-PMCA를 ligation하였다.

NcoI, SacI digestion, gel elution



#### 나. Transformation 및 positive clone의 선별

##### (1) *E. coli*에 transformation 및 positive clone의 선별

Ligation한 반응액을 먼저 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 transformation하였고, transformation이 잘 되어 plasmid를 보유한 *E. coli*를 대상으로 ghost 형성을 확인하였다. ghost의 형성은 37°C에서 overnight culture한 세균을 20 ml의 새 배지에 subculture하여 계속 37°C에서 배양하여 OD600 값이 0.2가 되었을 때 42°C로 온도를 올려 OD가 증가하다가 감소하는 것을 monitoring하여 확인하였다.

##### (2) *E. tarda*에 transformation 및 *E. tarda* ghost의 제조

###### (가) pHCE-InaN-ScuAg-ghost37 plasmid의 *E. tarda*로의 transformation

*E. coli*에서 ghost 형성까지 확인된 클론으로부터 plasmid를 분리하여 이 plasmid를 *E. tarda*에 transformation하였다. *E. tarda*에의 transformation은 기존의 *E. coli*에서처럼 Chemical method를 사용하지 않고, Electroporation법을 사용하였다. 간단히 *E. tarda*의 콜로니를 2 ml의 STB 배지에 overnight으로 전배양한 후, 소량을 다시 20 ml의 STB에 subculture하여 OD600의 값이 0.3에서 0.4정도가 될 때까지 배양하였다. 이 균배양액을 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 배지를 제거

한 후, ice-cold 10% glycerol 용액으로 3회정도 washing하여 최종적으로 200  $\mu$ l 정도의 10% glycerol에 재부유하였다. 한번에 40  $\mu$ l정도 사용하였으며, 사용전에 이렇게 만들어진 electro-competent cell을 plasmid를 넣지 않은 상태에서 pulse를 주어 cell에 제대로 만들어졌는지 확인하여 이상이 없는 cell을 사용하였다. transformation은 electrocompetent cell 40  $\mu$ l에 pHCE-InaN-ScuAg-ghost37 plasmid 2  $\mu$ l를 혼합하여 얼음에서 1분간 배양한 후 2 mm electroporation cuvette에 넣고, electroporator(전기천공기)에 넣어 2.5 kV의 pulse를 준 다음 1 ml의 SOC 배지에 현탁하여 90분간 배양하여 ALB agar plate에 spread하였다. 이틀정도 배양후 colony가 생기면 이 colony로부터 plasmid 분리와 ghost 확인 OD monitoring을 수행하였다.

#### (나) 스쿠티카 항원 발현 *E. tarda* ghost 제조

OD monitoring 결과 선별된 클론으로 vaccination의 항원으로 쓸수 있도록 대량으로 항원을 제작하였다. 약 10 ml의 ALB broth에 colony를 접종하여 overnight으로 전배양한것을 다음날 500 ml의 ALB broth에 subculture한 후 OD600 값이 0.2가 될 때까지 배양하였다. OD 600값이 0.2가 되면 42 $^{\circ}$ C로 배양온도를 올려 ghost 생성을 유도하였다. 약 20~24시간 배양한 후 OD값이 감소하다가 유지되는 시점에서 균을 집균하고, 균 pellet은 차가운 3차 증류수에 3-4회 washing한 후 소량의 3차 증류수에 재부유하여 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

#### 다. *E. coli* 및 *E. tarda*에서의 단백질 발현 확인

각각의 스쿠티카 항원에 대하여 *E. tarda*에 성공적으로 transformation되어 ghost 생성이 이루어진 클론을 이용하여 실제로 세균의 표면에서 항원이 발현되는지의 여부를 SDS-PAGE와 Western blot 등을 수행하여 조사하였다.

##### (1) GFP의 발현 확인

먼저 ghost cassette를 ligation 하지 않은 클론으로 일단 construction한 vector의 효과를 알아보려고 하였다. GFP에 대해서는 monoclonal antibody도 보유하고 있으며, fluorescence를 측정할 수도 있으므로 이를 reporter protein으로 사용하였다. GFP에 대해서는 우선적으로 *E. coli*에서 실험을 수행하였다. GFP가 세균의 표면에

어느정도 발현이 되는지를 확인하기 위해 비교할 다른 vector들도 construction 하였다. construction 한 plasmid vector는 pHCE IIB vector에 표면 발현 signal을 넣지 않은 pHCE-GFP, 기존의 pINPNCGFP에서 InaK의 N, C terminal을 모두 포함하는 sequence를 pHCE vector에 ligation한 pHCE-InaKNCGFP를 비교하고, 아무런 plasmid를 transformation 하지 않은 *E. coli* DH5a도 비교하였다.

각 클론 하나씩을 37°C에 overnight으로 배양한 후 5,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층의 배지를 제거하고, PBS로 3회 washing하였다. 이를 OD 600 값이 2가 되도록 균수를 맞추었다. GFP의 fluorescence의 측정은 본연구실의 Polarion으로 측정하였다. 96-Blackwell plate에 위에서 희석한 균액을 가장 높은 농도로 하여 2배씩 단계희석하여 total volume은 200  $\mu$ l가 되게 넣고, Fluorescence 값을 측정하였다.

## (2) 스쿠티카충 항원 단백질의 발현 확인

스쿠티카충 항원 단백질의 발현도 ghost cassette를 ligation하지 않은 것과 ghost cassette를 ligation한 후 ghost bacteria를 유도한 것에 대해 모두 확인하였다.

## (3) 동결건조 ghost bacteria 제작 후 스쿠티카충 항원 단백질의 발현 확인

vaccination을 하기 위해 ghost bacteria를 제조한 후 동결건조한 것을 다시 PBS에 재현탁한 후 2회정도 sonication하였다. sonication한 sample을 SDS-PAGE하고 Western blotting하였다.

## 라. Vaccination

### (1) *E. tarda* ghost 항원의 제작

*E. tarda*의 경우 37°C에서 안정하게 자라지 못하기 때문에, 일단 27°C에서 소량 overnight으로 전배양한 후 다시 새로운 배지에 subculture하여 OD600 값이 0.2정도 되었을 때 42°C로 온도를 올려 ghost를 제작하였다. OD600 값이 일정하게 유지되는 시점에서 1  $\mu$ l를 효율을 조사하기위하여 plating하고 나머지는 집균하였다. 원심분리를 이용하여 집균한 다음 배지를 제거하고, 차가운 3차 증류수를 사용하여 3회 washing 한다음 소량의 3차 증류수에 재부유하여 -80°C에 보관하였다가, 동결건조하였다.

## (2) 백신의 투여

앞에서 제조된 ghost bacteria는 동결건조 후 다시 3차 증류수에 소량을 재현탁하여 1  $\mu$ l를 ALB plate에 plating하여 효율을 확인한 후 사용하였다. 각각의 스쿠티카 항원 단백질에 대한 ghost bacteria를 PBS에 현탁하여 농도를 맞춘 후 실험을 실시하였다. 실험구는 ① PBS control, ② *E. tarda* ghost control, ③ Gal, ④ BTU, ⑤ GAPDH, ⑥ Mix(Gal+BTU+GAPDH) 의 여섯 개의 그룹으로 나누고, 각 그룹당 약 10g 넙치 20마리씩을 250 l 수조에 넣어, 100 ug/fish의 농도로 복강주사하였다. 2주 후에 동량을 boosting하였다.

## (3) Challenge test

Challenge test를 실시하기 약 2주전에 실험에 사용한 넙치를 이용하여 예비 공격실험을 수행하였다. CHSE-214 cell line에 배양하던 *Philasterides* strain을 마리당  $1 \times 10^4$  cells 과  $1 \times 10^5$  cells의 농도로 복강 주사하여 폐사를 관찰하였다.  $1 \times 10^5$  cells을 주사하였을 때 2주 이내에 거의 100% 폐사하는 것을 확인하고 농도를 정하였다. Boosting 한 후 2주째되는 날 채혈과 공격실험을 실시하였다.

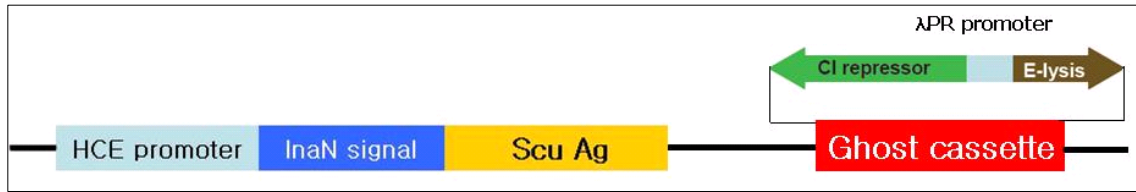
## 3. 연구결과

### 가. Vector construction

표면 발현을 위한 signal sequeunce로 사용한 InaN sequence는 다음 그림과 같다.

```
InaK N terminal sequeunce (InaN)
CCATGGCTCTCGACAAGGCGTTGGTGCTGCGTACCTGTGCAAATAA
NcoI
CATGGCCGATCACTGCGGCCTTATATGGCCC GCGTCCGGCACGGTG
GAATCCAGATACTGGCAGTCAACCAGGCGGCATGAGATGGTCTGGT
CGGTTTACTGTGGGGCGCTGGAACCAGCGCTTTTCTAAGCGTGCA
GCCGATGCTCGATGGATTGTCTGTGAAGTTGCCGTTGCAGACATCA
TCAGTCTGGAAGAGCCGGGAATGGTCAGTTTCCGCGGGCCGAGGTG
GTTTCATGTCGGCGACAGGATCAGCGCGTCACACTTCATTTTCGGCAC
GTCAGGCCGACCCCTGCGTCAACGTCAACGTCAACGTCAACGTCAAC
GTTAACGCCAATGCCACGGCCATACCCACGCCCATGCCTGCGGTAG
CAAGTGTACGTTACCGGTGGCCGAACAGGCCCGTCATGAAGTGTT
CGATGTCGCGTCCGTCAGCGCGCTGCCGCCCCAGTAAACACCCTG
CCGGGACGACGCCGAGAATTTGCAGACC ACTAGT
SpeI
```

본연구에서는 아래 그림과 같은 표면 발현 cassette와 ghost cassette가 동시에 하나의 plasmid vector에 포함되도록하는 vector를 구축하였다.

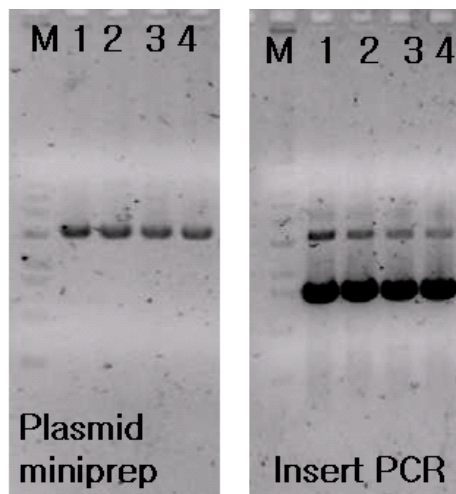


(1) pHCE-InaN-GFP-ghost 37 vector의 construction

(가) pHCE-InaN-GFP의 construction

먼저 pHCE-InaN vector로의 GFP ligation은 transformation한 후 생성된 colony를 배양하여 plasmid miniprep하고, insert에 대해 PCR한 결과 ligation이 잘 이루어졌음을 알 수 있었다.

transformation 후 ligation 된 클론의 miniprep 및 Insert 확인 PCR 결과

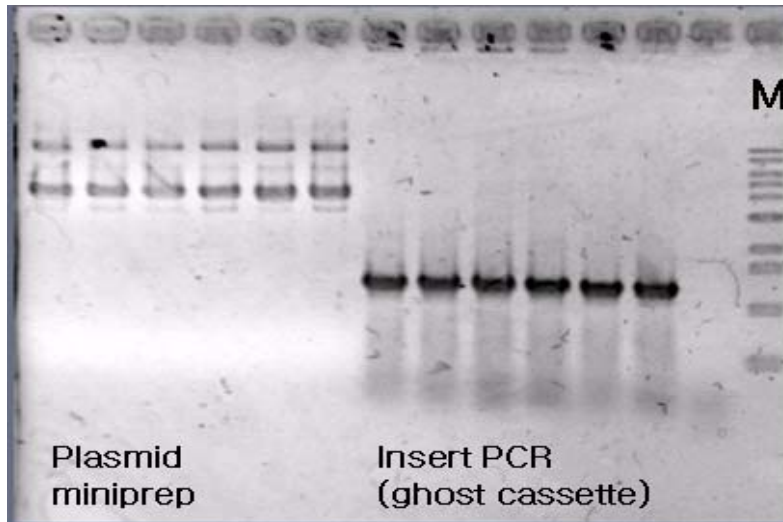


M : Bioneer 1kb ladder  
1~4. pHCE-InaN-GFP clone

(나) pHCE-InaN-GFP-ghost 37의 construction

pHCE-InaN-GFP plasmid와 ghost 37 cassette는 KpnI과 PstI으로 digestion한 후 ligation하였다.

ligation된 plasmid가 transformation 된 클론의 miniprep 및 ghost cassette에 대한 insert PCR 결과

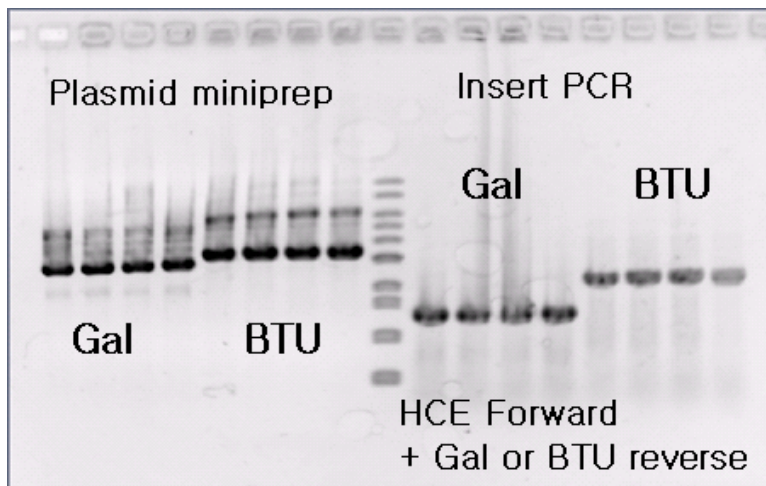


(2) pHCE-InaN-ScuAg-ghost 37 vector의 construction

(가) pHCE-InaN-ScuAg plasmid construction

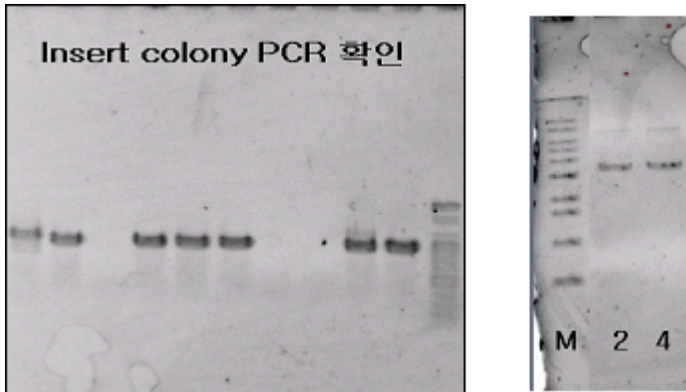
4가지 스쿠티카 항원 단백질 Surface antigen(Gal)의 partial sequence,  $\beta$ -tubulin, Plasma membrane  $Ca^{2+}$  ATPase의 partial sequence, GAPDH 모두 ligation이 잘 이루어졌다.

[Gal,BTU] Figure ligation 후 plasmid miniprep 및 Insert 확인 PCR

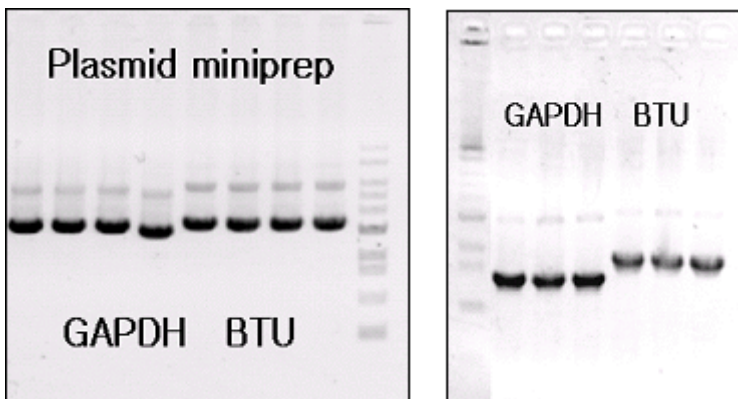




[PMCA] colony PCR 확인, 2,4 clone plasmid miniprep



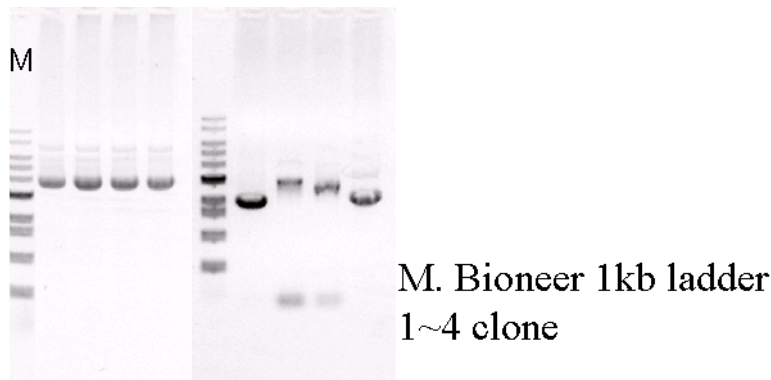
[GAPDH] plasmid prep 및 Insert 확인 PCR



(나) pHCE-InaN-ScuAG-ghost 37 vector construction

먼저 pHCE-InaN-Gal, pHCE-InaN-BTU와 pBS-ghost37 SDM을 KpnI, SalI digestion 하여 pBS-ghost 37 SDM plasmid에 있는 ghost 37 cassette를 pHCE-InaN-BTU에 ligation 하였으나, BTU만 ligation이 잘 되었다.

[BTU] pHCE-InaN-BTU-ghost 37 plasmid miniprep 및 Insert PCR

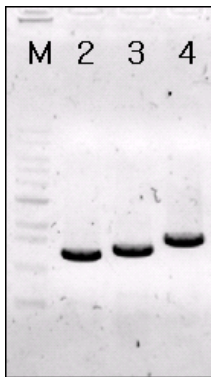




Gal, PMCA(old), GAPDH는 pHCE-InaN-BTU-ghost 37에 NcoI, SacI 처리하여 pHCE-InaN-Gal, pHCE-InaN-PMCA(old), pHCE-InaN-GAPDH 로부터 InaN-Gal, InaN-PMCA(old) 또는 InaN-GAPDH를 ligation하였다.

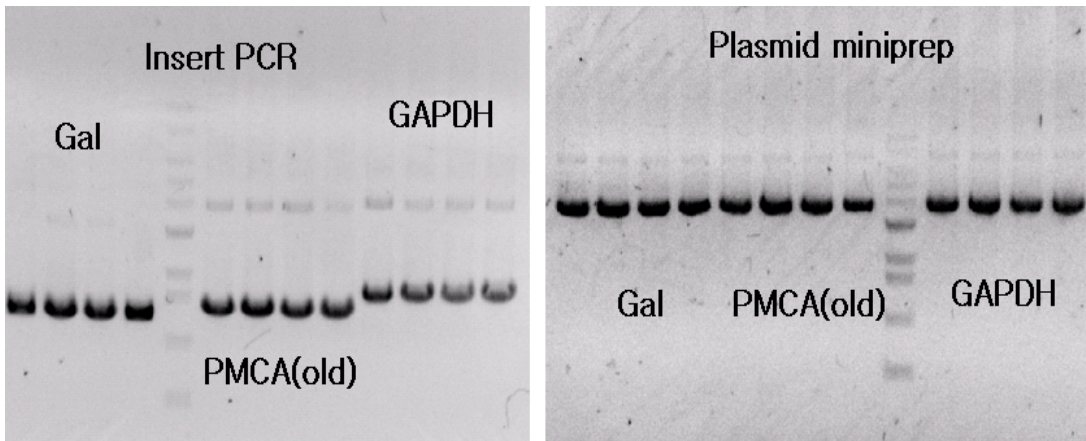
Ligation 반응을 overnight 10  $\mu$ l reaction volume으로 수행하였으며, 이 reaction 중 0.1  $\mu$ l를 template로 하여 PCR 하여 ligation이 잘 되었는지 확인하고, transformation 한후 plasmid를 분리하고, insert를 PCR하여 확인하였다.

[Gal, PMCA(old), GAPDH] Ligation 확인 PCR



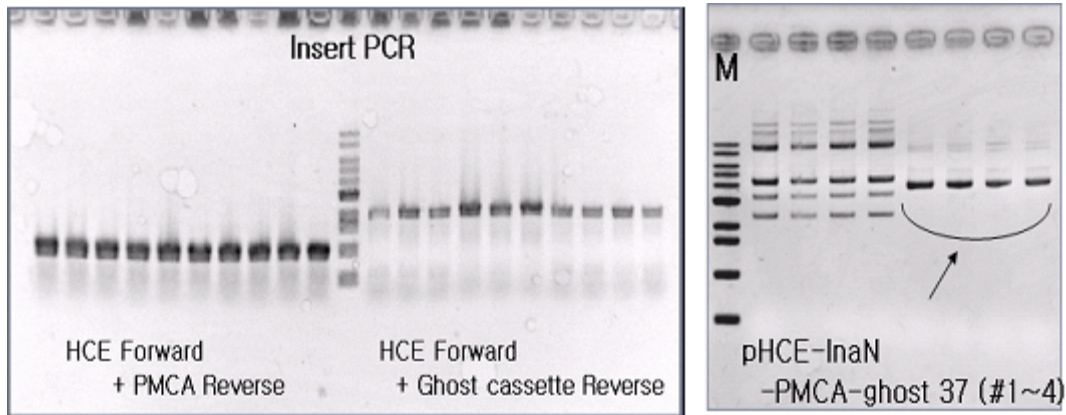
M. Bioneer 1kb ladder  
 2.pHCE-InaN-Gal  
 3.pHCE-InaN-PMCA(old)  
 4.pHCE-InaN-GAPDH

[Gal, PMCA(old), GAPDH] Plasmid miniprep 및 Insert PCR



클로닝한 PMCA(new, 160bp) 또한 pHCE-InaN-Gal-ghost 37 plasmid를 NcoI, SacI enzyme으로 digestion한 후, 같은 enzyme을 처리하여 gel elution한 InaN-PMCA를 ligation하였다.

[PMCA(new, 160bp)] pHCE-InaN-PMCA(new, 160bp)-ghost37의 insert colony PCR 및 plasmid miniprep

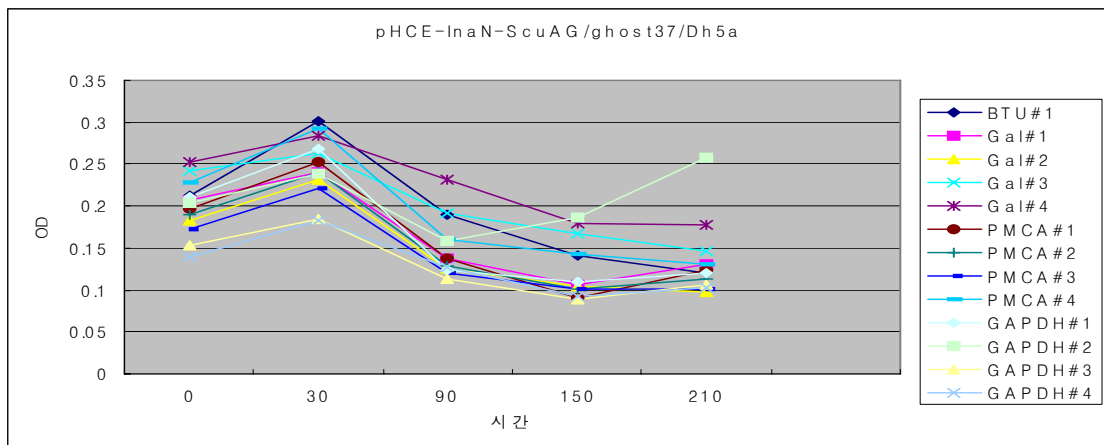


#### 나. Transformation 및 positive clone의 선별

##### (1) *E. coli*에 transformation 및 positive clone의 선별

Ligation한 반응액을 먼저 *E. coli* DH5a에 transformation하였고, transformation이 잘 되어 plasmid를 보유한 *E. coli*를 대상으로 ghost 형성을 확인하였다. ghost의 형성은 37°C에서 overnight culture한 세균을 20 ml의 새 배지에 subculture하여 계속 37°C에서 배양하여 OD600 값이 0.2가 되었을 때 42°C로 온도를 올려 OD가 증가하다가 감소하는 것을 monitoring하여 확인하였다.

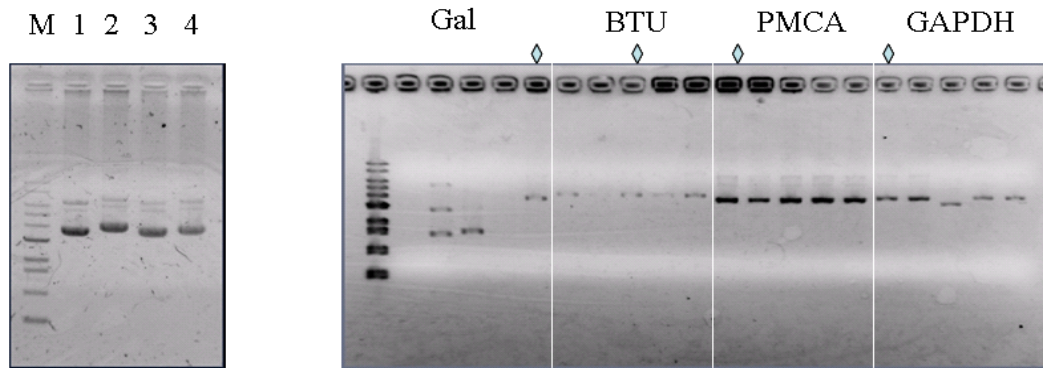
##### pHCE-InaN-ScuAg-ghost37/DH5a 클론들의 OD monitoring



(2) *E. tarda*에 transformation 및 *E. tarda* ghost의 제조

(가) pHCE-InaN-ScuAg-ghost37 plasmid의 *E. tarda*로의 transformation

Plasmid construction 결과 - Gal, BTU, PMCA(old), GAPDH

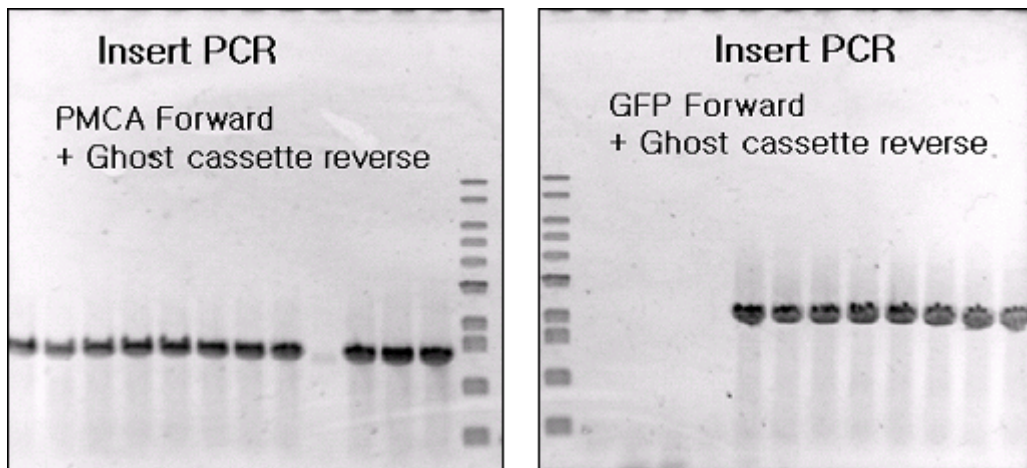


1. Gal, 2. BTU,  
3. PMCA, 4. GAPDH  
*E. coli* DH5a

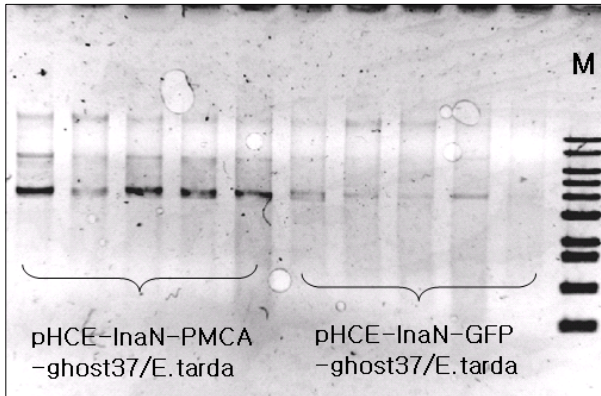
*E. tarda*

-- 표시한 클론을 사용하여 다음의 OD monitoring을 수행하였다.

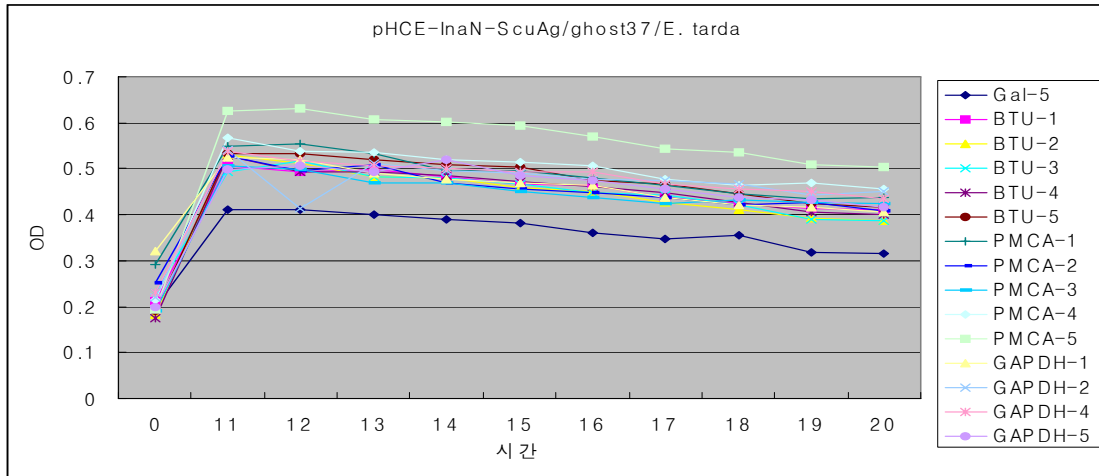
PMCA(new, 160bp), GFP/ghost 37 *E. tarda* transformation 한 것 colony PCR



*E. tarda* miniprep PMCA(new,160), GFP



*E. tarda*에 transformation 한 클론들의 ghost 형성확인 OD monitoring



#### 다. *E. coli* 및 *E. tarda*에서의 단백질 발현 확인

##### (1) SDS-PAGE 및 Western blot

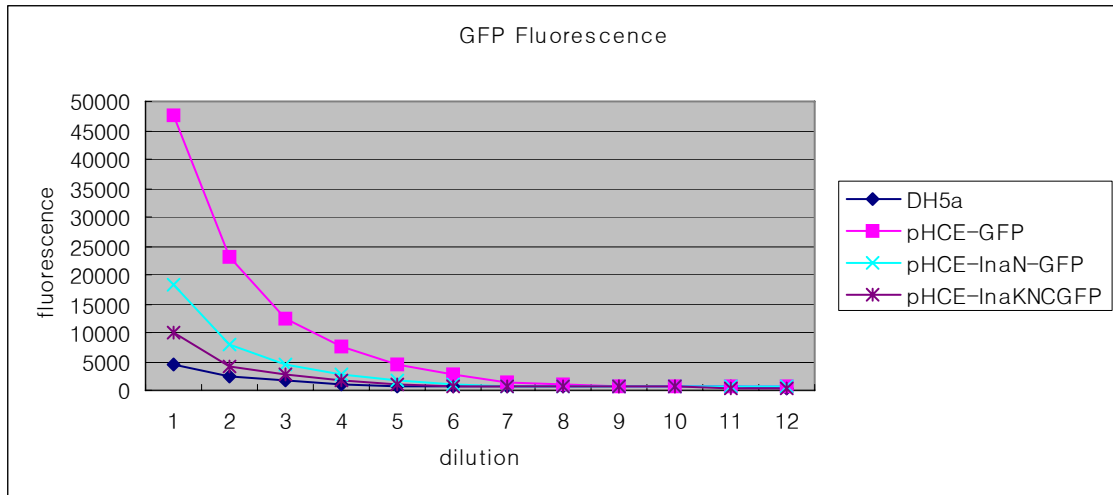
각각의 스쿠티카 항원에 대하여 *E. tarda*에 성공적으로 transformation되어 ghost 생성이 이루어진 클론을 이용하여 실제로 세균의 표면에서 항원이 발현되는지의 여부를 SDS-PAGE와 Western blot 등을 수행하여 조사하였다.

##### (가) GFP의 발현 확인

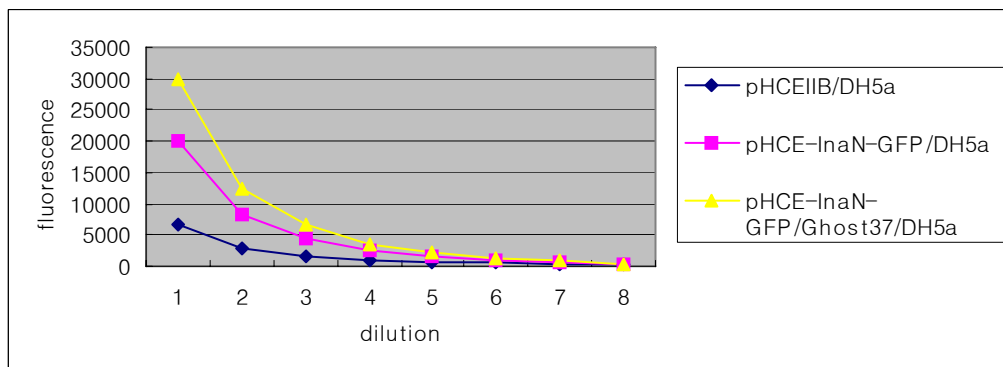
GFP에 대해서는 우선적으로 *E. coli*에서 실험을 수행하였다. pHCE IIB vector에 표면 발현 signal을 넣지 않은 pHCE-GFP, 기존의 pINPNCGFP에서 InaK의 N, C terminal을 모두 포함하는 sequence를 pHCE vector에 ligation한

pHCE-InaKNCGFP를 비교하고, 아무런 plasmid를 transformation 하지 않은 *E. coli* DH5a도 비교하였다.

Figure : polarion으로 GFP fluorescence 측정

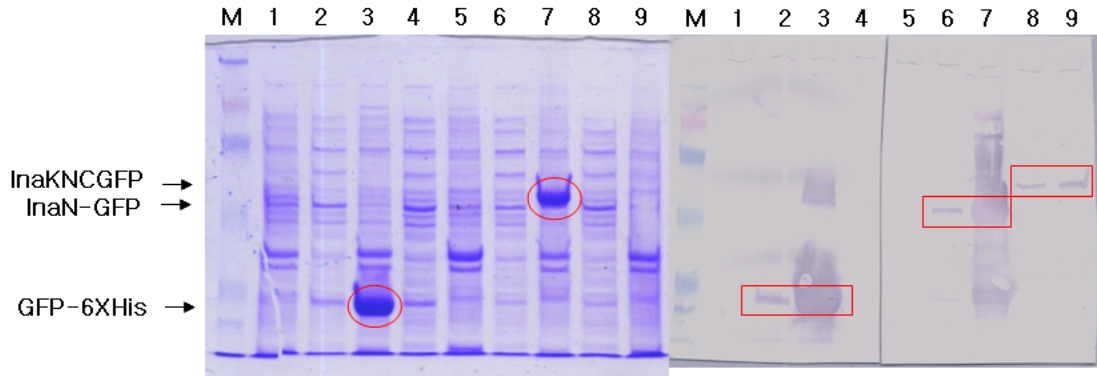


Fluorescence를 측정한 결과로는 pHCE-GFP가 가장 높았다. 그러나 GFP가 표면에 발현되었는지 확인하기는 어렵다. 따라서, 실험실에 있는 GFP monoclonal antibody를 이용하여 bacteria의 GFP antibody에 대한 agglutination titer를 측정한 결과 흥미롭게도, fluorescence 측정시 가장 높았던 pHCE-GFP는 전혀 agglutination이 일어나지 않았고, pHCE-InaN-GFP와 pHCE-InaKNCGFP에서만 나타났다. agglutination을 두 그룹이 비슷하였으나, fluorescence는 pHCE-InaN-GFP가 약간 더 높았다. 또한 ghost cassette를 ligation한 클론도 비교하였는데, 즉, pHCEIIB/DH5a, pHCE-InaN-GFP/DH5a, pHCE-InaN-GFP-ghost37/DH5a를 비교하였다. 그 결과 control에 비해 GFP의 발현이 차이가 남을 확인하였다.





fluorescence 측정과 동시에 western blotting도 실시하였다. 그 결과 pHCE-InaN-GFP 클론에서 GFP의 발현이 pellet에 잘 이루어짐을 확인하였다.



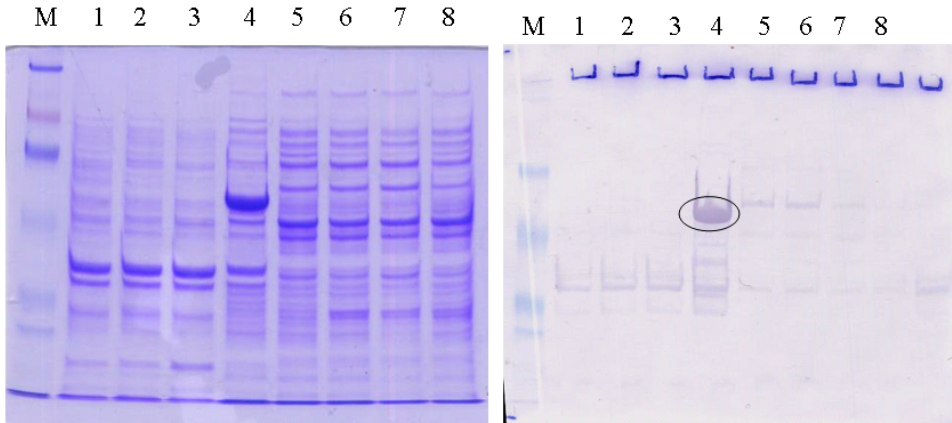
M. Marker

1. DH5a lysate
2. pHCE-GFP-C-His Supernatant
3. pHCE-GFP-C-His Pellet
6. pHCE-InaN-GFP Supernatant
7. pHCE-InaN-GFP pellet
8. pHCE-InaKNCGFP Supernatant
9. pHCE-InaKNCGFP Pellet

(나) 스쿠티카충 항원 단백질의 발현 확인

스쿠티카충 항원 단백질의 발현도 ghost cassette를 ligation하지 않은 것과 ghost cassette를 ligation한 후 ghost bacteria를 유도한 것에 대해 모두 확인하였다. pHCE-InaN-ScuAg plasmid를 *E. coli* 및 *E. tarda*에 transformation한 후 단백질의 발현을 확인하였다. 이 때에는 ghost cassette가 없는 것이므로, 37°C에서 소량 overnight culture한 것을 sample로 사용하였다. Western blotting시 항체로는 Rabbit anti-Philasterides serum을 사용하였다.

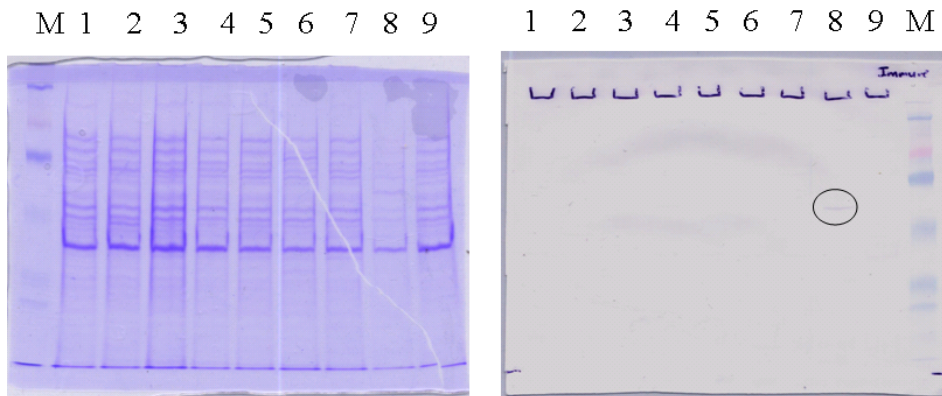
*E. coli*에서의 발현확인



1~4 : pellet, 5~8 : supernatant  
 1. Gal, 2. BTU, 3. PMCA, 4. GAPDH  
 M. PIERCE protein marker

위의 그림에서처럼, *E. coli*에서 확인한 결과, GAPDH는 SDS-PAGE에서도 과발현이 확인되었지만, 나머지 항원단백질에 대해서는 뚜렷한 band는 확인되지 않았다.

*E. tarda*에서의 발현 확인

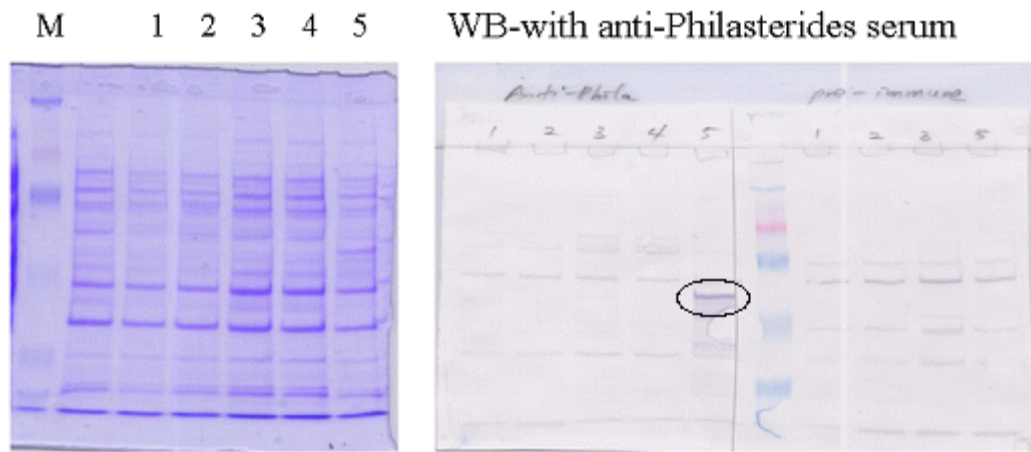


1. Gal -27, 2. BTU-27, 3. PMCA-27, 4.GAPDH-27  
 5. Gal -37, 6. BTU-37, 7. PMCA-37, 8.GAPDH-37, 9. *E. tarda*

*E. tarda*에서는 위의 그림에서 보듯이 GAPDH에서만 연하게 band가 확인되었다. 또한 본연구에서 사용한 pHCE vector의 HCE promoter는 37°C에서 유도가 잘 이루어지는데, *E. tarda*는 37°C에서는 성장이 불안정하므로 발현 확인시에 27°C와

37°C에서 비교하였지만 37°C에서만 발현이 잘 이루어졌다. 각 단백질에 대해 특이 항체를 보유하고 있는 것도 있지만 모두 보유하고 있지는 않기 때문에, anti-Philasterides 항체를 사용한 결과 GAPDH만 확인이 가능하였고, *E. coli*에서뿐 아니라 *E. tarda*에서 sonication하여 원심분리한 pellet에서 발현이 확인되었다. pellet에서 발현이 확인이 되었다고 해서 outer membrane에 발현되는 것은 아니지만, 가능성은 확인하였다. 또한 ghost cassette를 ligation하여 *E. tarda*에 transformation한 다음, ghost production 후 washing한 다음 sonication한 다음에도 단백질의 발현을 확인하였다.

pHCE-InaN-ScuAg/ghost37/*E. tarda*

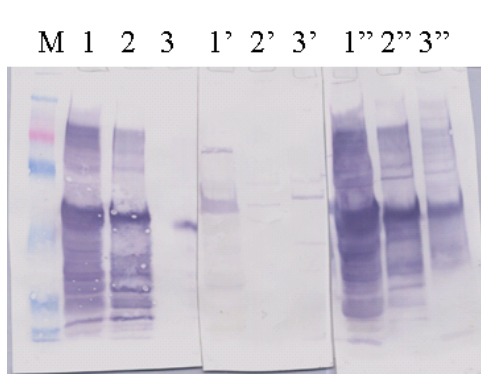


1. Gal, 2.. BTU, 3. PMCA, 4. PMCA-2, 5. GAPDH

Rabbit anti-Philasterides serum으로 확인하였을 때는 pre-immune serum의 결과와 비교하였을 때 GAPDH만 band가 검출되었다. Gal과 BTU는 rabbit의 GST fusion protein에 대한 antiserum이 있으므로, 따로 이 항체를 이용하여 Western blot을 실시하였다.



pHCE-InaN-Gal/ghost37/*E. tarda* ghost의 단백질 발현 확인

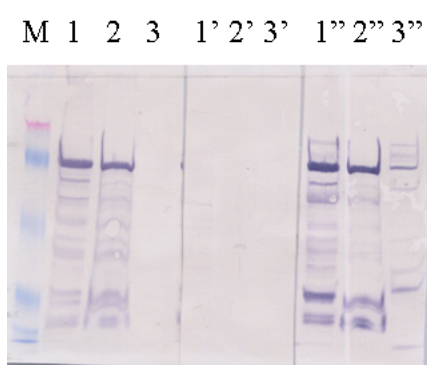


GST-Gal protein sample  
 1,1',1'' : Before purification  
 2,2',2'' : After purification  
 3,3',3'' : Sonicated ghost bacteria  
 M : PIERCE protein marker

Western blot Antiserum  
 1~3 : Anti-GST Ab  
 1'~3' : Pre-immune serum  
 1''~3'' : Rabbit Anti-GST-Gal serum

위 그림에 나타났듯이 Gal의 경우, pre-immune serum에서는 band가 거의 없는 점, GST가 fusion되어 있지 않은 ghost sample이 GST antibody로 band가 나타나지 않았지만, GST-Gal antiserum에 대해서는 band가 나타난 점으로 보아 *E. tarda* ghost에 Gal protein이 발현되고 있음을 알 수 있었다. GST-Gal과 InaN-Gal은 size가 유사하게 나타났다.

pHCE-InaN-BTU/ghost37/*E. tarda* ghost의 단백질 발현 확인



GST-BTU protein sample  
 1,1',1'' : Anti-GST Ab  
 2,2',2'' : Pre-immune serum  
 3,3',3'' : Rabbit Anti-GST-BTU serum  
 M : PIERCE protein marker

Western blot antiserum  
 1~3 : Anti-GST Ab  
 1'~3' : Pre-immune serum  
 1''~3'' : Rabbit Anti-GST-BTU serum

BTU의 경우에도, Gal의 결과와 마찬가지로 *E. tarda* ghost에서 BTU가 발현됨을 알 수 있었다.

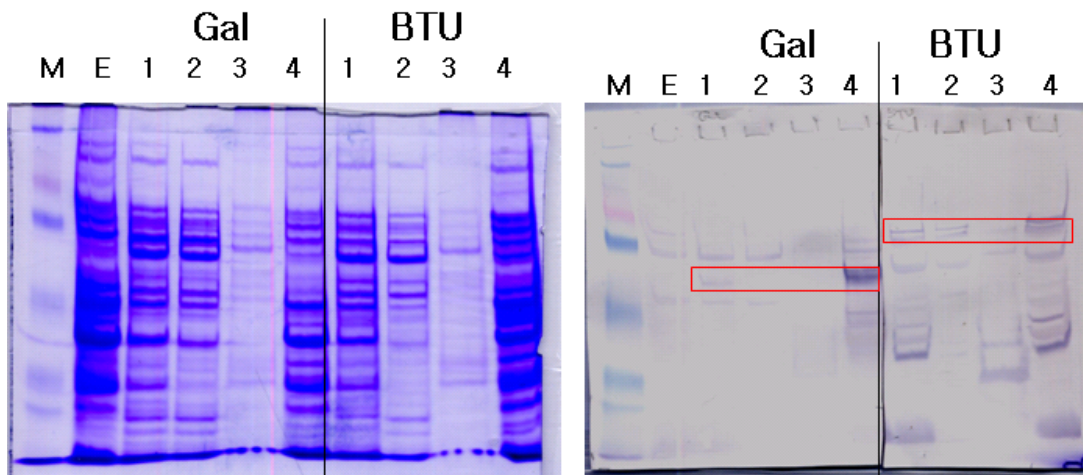
(다) 동결건조 ghost bacteria 제작 후 스쿠티카충 항원 단백질의 발현 확인

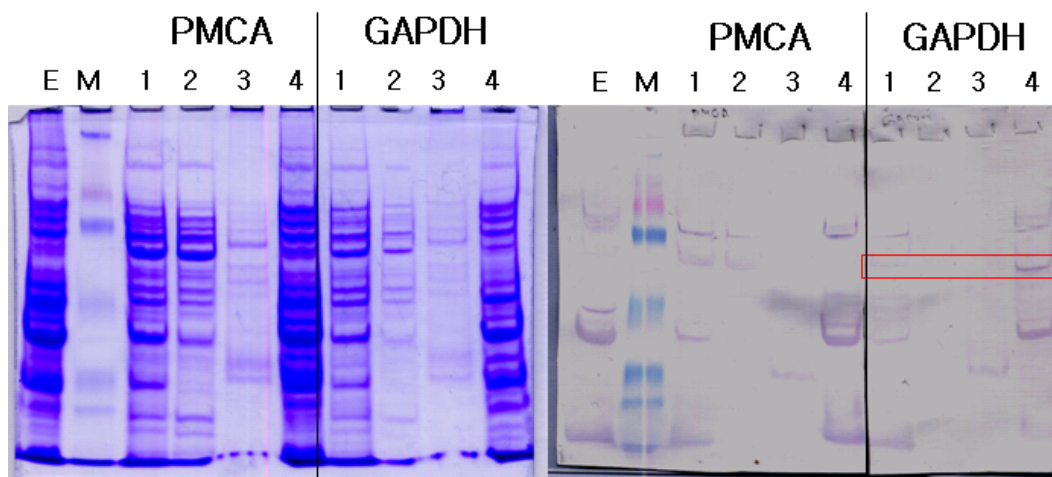
vaccination을 하기 위해 ghost bacteria를 제조한 후 동결건조한 것을 다시 PBS에 재현탁한 후 2회정도 sonication하였다. sonication한 sample을 SDS-PAGE하고 Western blotting하였다. 또한 ScuAg이 발현된 *E. tarda* ghost bacteria에서 과연 이 antigen protein들이 InaN signal과 함께 세포표면으로 발현되는지의 여부를 확인하기 위하여 outermembrane protein을 분리하여 다시 Western blotting으로 확인하였다. outermembrane protein의 분리는 journal [ Functional Display of Foreign Protein on Surface of Escherichia coli Using N-Terminal Domain of Ice Nucleation Protein ]을 참조하여 수행하였다.

그 결과는 다음 그림에 나타내었다.

E. *E. tarda* ghost (without protein expression)

1. total lysate
2. 1st centrifuge 후 상층액
3. 2nd centrifuge 후 상층액
4. final pellet (maybe outer membrane protein fraction)



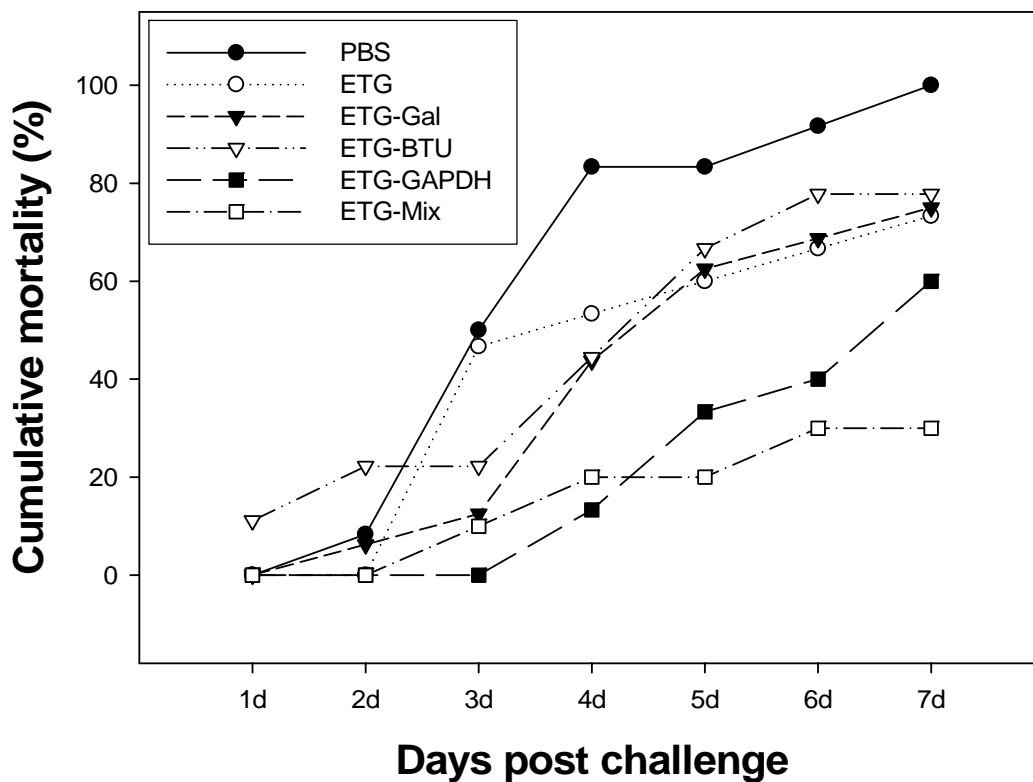


그림에서 각 4번 lane이 outermembrane fraction으로 생각되며, 그림에서 보듯이 예상되는 size에 약하게 band가 나타나 outermembrane에도 단백질의 발현이 이루어진 것을 알 수 있었다. PMCA는 이전의 transmembrane 부분 같이 있는 것이므로, 발현이 되지 않았을 가능성이 크므로 특이적인 band 나타나지 않았으나, 나머지는 control Eghost sample에는 없는 band들이 total lysate와 final pellet에 detection이 되었다.

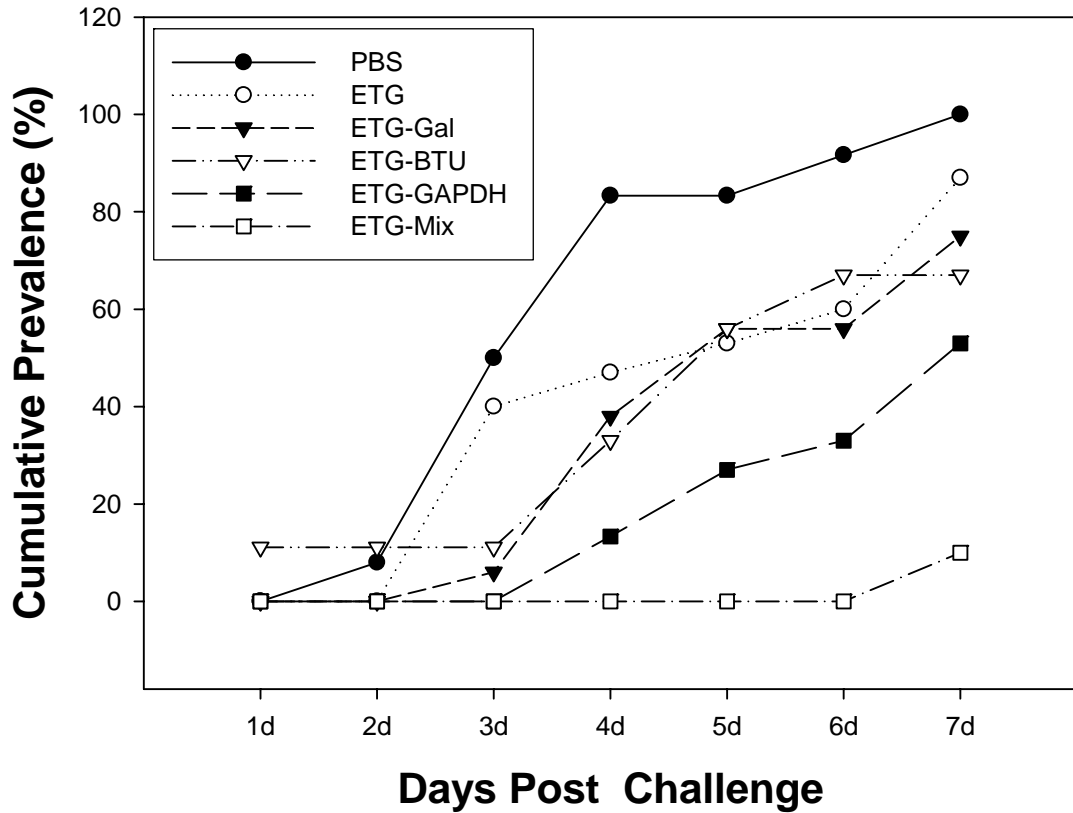
## 라. Vaccination

CHSE-214 cell line에 배양하던 *Philasterides* strain을 마리당  $1 \times 10^5$  cells의 농도로 복강 주사하여 폐사를 관찰하였다. 결과는 누적폐사율로 나타내었고 스쿠티카충의 감염여부도 나타내었다. 스쿠티카충의 감염여부는 체표, 아가미, 복수, 뇌에서의 스쿠티카충 감염을 조사하여 체표이외의 부위에서 감염이 확인될 경우를 positive로 정하였다.

백신실험 결과 폐사율은 ① PBS control group이 100%, ② *E. tarda* ghost control group은 73%, ③ Gal group은 75%, ④ BTU group은 78%, ⑤ GAPDH group은 60%, ⑥ Mix(Gal+BTU+GAPDH) group은 30%로 나타났다.



실험어의 체표, 아가미, 복수, 뇌의 총 감염율 조사 결과 ① PBS control group 이 100%, ② *E. tarda* ghost control group은 87%, ③ Gal group은 75%, ④ BTU group은 67%, ⑤ GAPDH group은 53%, ⑥ Mix(Gal+BTU+GAPDH) group은 10%로 나타났다.



이상의 결과로부터 *E. tarda* ghost에 스쿠티카충 항원을 표면발현 시킨 백신은 스쿠티카충의 감염에 대해 좋은 방어 효과를 나타냄을 알 수 있다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1절 목표달성도

#### 1. 연차별 연구개발 목표 및 연차별 실적

연구수행 년차	연구목표	연구 실적
1년차	백신용 스쿠티카충 항원 대량 제작 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 스쿠티카충 원인충의 종류를 형태학적 특징 및 ribosomal RNA gene sequence 분석을 통해 3종인 것으로 확인</li> <li>- multiplex PCR법을 이용한 스쿠티카충 원인충에 대한 신속감별법 개발</li> <li>- 스쿠티카충 in vitro 배양 조건 확립</li> <li>- whole cell 항원 및 분비항원을 이용한 백신제작</li> </ul>
2년차	스쿠티카충 고효율 백신 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 스쿠티카충 cDNA library 제작 및 EST 분석</li> <li>- Suppression subtractive hybridization 및 RACE를 이용한 스쿠티카충 방어항체 유도용 항원유전자 Screening</li> <li>- Site directed mutagenesis를 이용한 스쿠티카충 항원 유전자 재조합 발현 체계 구축</li> <li>- 스쿠티카충에 대한 토끼 항혈청 제작 및 분석</li> <li>- 스쿠티카충 종별 공통항원 검색</li> <li>- Ghost <i>Edwardsiella tarda</i> 제작</li> </ul>
3년차 (4년차)	양식 현장에서의 실용성 및 효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 3종의 스쿠티카충에 대한 formalin-killed vaccine 및 homogenized vaccine 제작</li> <li>- 스쿠티카충 항원 유전자에 대한 재조합 단백질 백신 제작</li> <li>- 스쿠티카충 항원단백질을 세균에 발현시킨 백신 제작</li> <li>- 스쿠티카충 항원유전자를 <i>E. tarda</i> Ghost의 표면에 발현시킬 수 있는 Dual vector 개발</li> <li>- 스쿠티카충 항원유전자 표면발현 <i>E. tarda</i> Ghost를 이용한 백신 제작 및 넙치에서의 방어력 검증</li> </ul>

## 2. 평가의 착안점 및 달성도

### 가. 평가의 착안점

구분	평가의 착안점 및 척도	
	착안사항	척도
1차년도 (2002-3년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 스쿠티카충 대량배양 기술 개발</li> <li>○ 충체항원 및 분비항원 제작 기술 개발</li> <li>○ 백신용 항원 대량 생산 기술 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>대량배양 여부</li> <li>기술 개발의 정도</li> <li>대량생산의 정도</li> </ul>
2차년도 (2003-4년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 스쿠티카충에 대한 유효 방어항체 생성 유도 기술 개발</li> <li>○ 효과적인 백신 투여 기술 개발</li> <li>○ 스쿠티카충에 대한 효율적 예방백신 시스템 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>방어력 생성 여부</li> <li>방어력의 정도</li> <li>백신의 효율성</li> </ul>
3차년도 (2004-5년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 대규모 종묘배양장에서의 백신 효과 검증</li> <li>○ 면역화된 종묘의 축양장에서의 스쿠티카충 방어능력 검증</li> <li>○ 양식 현장에서 저렴하고 손쉽게 사용할 수 있는 백신 투여 시스템 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>방어력의 정도</li> <li>방어력의 정도</li> <li>경제성 및 실용성</li> </ul>

### 나. 상기 평가의 착안점에 따른 달성도에 대한 자체평가

구분	평가의 착안점 및 달성도		
	착안사항	척도 (점수)	달성도 (%)
1차년도 (2002년)	○ 스쿠티카충 대량배양 기술 개발	30/100	100
	○ 충체항원 및 분비항원 제작 기술 개발	30/100	100
	○ 백신용 항원 대량 생산 기술 개발	40/100	100
2차년도 (2003년)	○ 스쿠티카충에 대한 유효 방어항체 생성 유도 기술 개발	30/100	90
	○ 효과적인 백신 투여 기술 개발	30/100	90
	○ 스쿠티카충에 대한 효율적 예방백신 시스템 확립	40/100	90
3차년도 (2004년)	○ 대규모 종묘배양장에서의 백신 효과 검증	35/100	90
	○ 면역화된 종묘의 축양장에서의 스쿠티카충 방어능력 검증	35/100	80
	○ 현장에서 손쉽게 사용할 수 있는 백신 투여 시스템 개발	30/100	90

## 제 2절 관련분야에의 기여도

### 1. 기술적 측면

- ▶ 넙치 양식에 있어서 난치병으로 알려진 스쿠티카증을 효과적으로 제어할 수 있는 예방시스템 확립
- ▶ 현재 스쿠티카증 치료용으로 사용되는 포르말린을 비롯한 기타 환경 위해성 화학물질에 대한 대체 효과
- ▶ 어류 양식에 있어서 화학약제의 사용을 줄이면서 생산성을 높이고자 하는 세계적 추세에 부응
- ▶ 스쿠티카증 백신에 대한 특허는 국내는 물론 외국에 걸쳐 장기간에 걸친 기술의 독점이 가능하며, 어류질병 제어에 대한 기술적 우위를 점할 수 있음
- ▶ 어류 질병에 대한 백신 개발 연구에 새로운 전기를 마련함으로써 관련 분야 기술 발전에 박차를 가할 수 있음

### 2. 경제 · 산업적 측면

- ▶ 스쿠티카증으로 인한 양식 어류의 폐사를 방지함으로써 매년 수십억원 이상의 경제적 손실을 방지할 수 있으며 이에 따른 '기르는 어업'의 생산성 향상
- ▶ 스쿠티카증 백신에 대한 특허 및 산업화를 통해 어류 백신 산업의 활성화
- ▶ 현재 일본 및 중국등지의 넙치 양식과 유럽등지의 turbot 양식에 있어서 스쿠티카증이 생산성을 저하시키는 주된 요인으로 부각되어 있으므로 스쿠티카증 백신 기술에 대한 시장성은 매우 큼.
- ▶ 화학약제의 사용을 줄임으로써 소비자의 선호도를 증진시킴
- ▶ 스쿠티카증에 대한 백신의 산업화 추진을 통한 수산관련 1차 (양식업), 2차 (제약업) 산업의 활성화



## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1절 연구 성과

본 연구를 통해 현재까지 다음과 같은 학술 논문을 게재, 발표하였다.

#### 국외 Journal

1. Kim, S. M., J. B. Cho, S. K. Kim, Y. K. Nam and **K. H. Kim**, 2004. Occurrence of scuticociliatosis in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida). *Dis. Aquat. Org.* 62:233-238.
2. Kim, S. M., J. B. Cho, E. H. Lee, S. R. Kwon, S. K. Kim, Y. K. Nam and **K. H. Kim**, 2004. *Pseudocohnilembus persalinus* (Ciliophora: Scuticociliatida) is an additional species causing scuticociliatosis in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Dis. Aquat. Org.* 62: 239-244.
3. Kim, H. J., S. K. Choi, S. H. Choi, M. S. Kim, S. K. Kim, **K. H. Kim**, 2004. Effects of bile acids on proliferation and production of proteinase activity of *Uronema marinum* (Ciliophora: Scuticociliatida). *Dis. Aquat. Org.* 62: 245-248.
4. Kim, S. M., E. H. Lee, S. R. Kwon, S. J. Lee, S. K. Kim, Y. K. Nam, **K. H. Kim**, 2006. Preliminary analysis of recombinant  $\beta$ -tubulin of *Pseudocohnilembus persalinus* (Ciliophora: Scuticociliatida) as a vaccine antigen candidate against scuticociliatosis. *Aquaculture* 260: 21-26.

#### 국내 Journal

1. Kim, S. M., E. H. Lee and **K. H. Kim**, 2004. Differentiation of three scuticociliatosis causing species in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by multiplex PCR. *J. Fish Pathol.* 17:145-149.
2. Lee, E. H., S. R. Kwon, S. H. Choi, **K. H. Kim**, 2006. Effect of iron on the proteolytic activity of live *Uronema marinum* (Ciliata: Scuticociliatida) measured by fluorescence polarization. *J. Fish Pathol.* 19: 83-86.

## 제 2절 활용 계획

본 연구개발을 통해 학술적으로는 충분히 개발된 백신의 효능이 입증되었으나, 이 개발된 백신의 상용화를 위해서는 현장실험을 통한 산업화 연구가 좀 더 필요하며, 따라서 다음과 같은 추진 계획을 통해 본연구의 결과물을 상용화할 계획임.

### 스쿠티카증 재조합 예방 백신 상용화를 위한 추후 연구 계획

기간	연구 및 상용화 계획
2006. 11. - 2007. 03	- 스쿠티카증 재조합 백신 기능 향상을 위한 항원유전자 추가 및 항원성 강화를 위한 유전자 조작 실험
2007. 04. - 2008. 08	- 참여기업인 대성미생물 연구소에 개발백신 기술 이전 - 대성미생물연구소와 함께 제작한 백신의 현장실험을 통한 효과 검증
2008. 09. - 2009. 08	- 개발된 백신의 수산물약품으로서의 허가를 받기 위한 제반 실험
2009. 09 -	- 스쿠티카증 재조합 예방백신 상용화 및 지속적인 Version-Up 연구

## 제 6 장 참고문헌

- (1) Cheung, P. J., Nigrelli, R. F. & Ruggieri, G. D. (1980) Studies on the morphology of *Uronema marinum* Dujardin (Ciliata: Uronematidae) with a description of the histopathology of the infection in marine fishes. *Journal of Fish Diseases*, 3: 295-303.
- (2) Munday, B.L., O'Donoghue, P. J., Watts, M., Rough, K. & Hawkesford, T. (1997) Fatal encephalitis due to the scuticociliate *Uronema nigricans* in sea-caged, southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 30: 17-25.
- (3) Dykova, I. & Figueras, A. (1994) Histopathological changes in turbot *Scophthalmus maximus* due to a histophagous ciliate. *Diseases of Aquatic Organisms*, 18: 5-9.
- (4) Yoshinaga, T. & Nakazoe, J. (1993) Isolation and in vitro cultivation of an unidentified ciliate causing scuticociliatosis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Gyobyō Kenkyū*, 28: 131-134.
- (5) Cawthorn, R. J., Lynn, D. H., Despres, B. et al. (1996) Description of *Anophryoides haemophila* n. sp. (Scuticociliatida: Orchitophryidae), a pathogen of American lobster *Homarus americanus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 24: 143-148.