



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0169517
(43) 공개일자 2022년12월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23K 10/16 (2017.01) A23K 20/142 (2016.01)
A23K 20/174 (2016.01) A23K 20/189 (2016.01)
A23K 20/20 (2016.01) A23K 40/10 (2016.01)
A61K 36/05 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23K 10/16 (2016.05)
A23K 20/142 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2021-0079507

(22) 출원일자 2021년06월18일

심사청구일자 2021년06월18일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

(72) 발명자

최태진

부산광역시 남구 분포로 111, 139동 601호(용호동, 엘지메트로시티)

김민정

부산광역시 남구 수영로334번길 56-10, 302호(대연동, 남광원룸)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

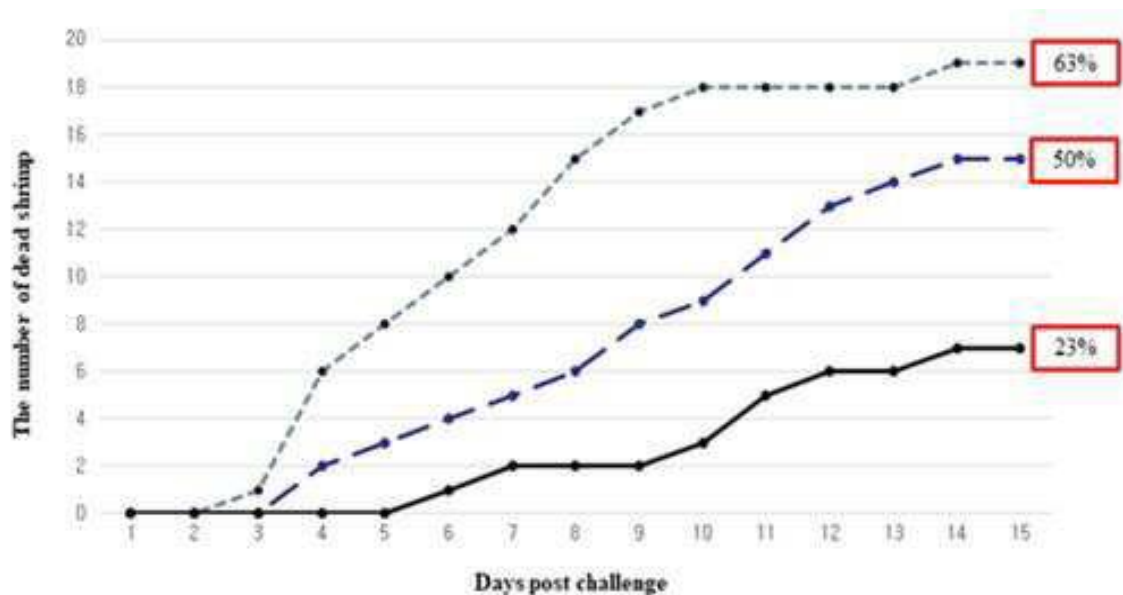
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 흰 반점 증후군 바이러스 외피 단백질을 발현하는 형질전환 미세조류를 유효성분으로 포함하는 흰 반점 증후군의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

흰 반점 증후군 바이러스 외피 단백질을 발현하는 형질전환 미세조류를 유효성분으로 포함하는 흰 반점 증후군의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로서, 본 발명의 흰 반점 증후군 바이러스(WSSV)의 VP28을 발현하는 형질전환된 클로렐라가, 효과적으로 VP28을 발현하는 것을 확인하였으며, 형질전환 클로렐라를 사료에 혼합하여, 징거미새우(*Macrobrachium nipponense*) 및 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)에 경구투여하였을 때, 효과적으로 WSSV의 감염을 억제하는 것을 확인하였다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A23K 20/174 (2016.05)
A23K 20/30 (2016.05)
A61K 36/05 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)
A61P 31/20 (2018.01)
C07K 14/005 (2013.01)
C12N 15/79 (2013.01)
A61K 2039/517 (2013.01)
C12N 2710/18022 (2013.01)

(72) 발명자

김소연

부산광역시 수영구 호암로29번길 50, 103동 3002호(광안동, 광안자이)

김수현

서울특별시 성북구 보문로32길 92-2, 204호(동선동2가)

김지석

경상남도 김해시 함박로101번길 19, 305동 1505호(외동, 대동한마음타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345292785
과제번호	2018R1D1A3B07043672
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	지역대학우수과학자지원사업(1년-5년)
연구과제명	형질전환 클로렐라를 이용한 새우 흰반점 바이러스 경구 백신 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부경대학교
연구기간	2018.06.01 ~ 2021.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

흰 반점 증후군 바이러스(white spot syndrome virus, WSSV)의 외피 단백질을 발현하는 미세조류를 유효성분으로 포함하는 흰 반점 증후군(white spot syndrome)의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 WSSV의 외피단백질은, 바이러스 단백질(VP) 15, 19, 24, 26 및 28로 이루어진 군에서 선택된 단백질인 것을 특징으로 하는 흰 반점 증후군의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 바이러스 단백질(VP)은 VP28인 것을 특징으로 하는 흰 반점 증후군의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 VP28은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 유전자로 코딩되는 것을 특징으로 하는 흰 반점 증후군의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물.

청구항 5

제 3항에 있어서,

상기 VP28은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 흰 반점 증후군의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 미세조류는 클로렐라(*Chlorella*), 세네데스무스(*Scenedesmus*), 두날리엘라(*Dunaliella*), 스피룰리나(*Spirulina*), 난노클로롭시스(*Nannochloropsis*), 테트라셀미스(*Tetraselmis*), 케토세로스(*Chaetoceros*), 안키스트로데스무스(*Ankistrodesmus*) 및 헤마토코커스 플루비아리스(*Haematococcus pluvialis*)로 이루어진 군에서 선택된 미세조류인 것을 특징으로 하는 흰 반점 증후군의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 흰 반점 증후군은 갑각류에 유발되는 것을 특징으로 하는 흰 반점 증후군의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 갑각류는, 참새우(*Penaeus chinensis*), 줄새우(*Palaemon paucidens*), 징거미새우(*Macrobrachium nipponense*), 보리새우(*Penaeus indicus*) 및 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)로 이루어진 군에서 선택된 갑각류인 것을 특징으로 하는 흰 반점 증후군의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 갑각류는, 해수, 담수 또는 민물 갑각류인 것을 특징으로 하는 흰 반점 증후군의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물.

청구항 10

제 1항에 있어서,

상기 사료첨가제 조성물은, 사료 중량에 1 내지 10% 중량으로 혼합되는 것을 특징으로 하는 흰 반점 증후군의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 사료는 개체의 체중에 1 내지 5% 중량으로 급여되는 것을 특징으로 하는 흰 반점 증후군의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물.

청구항 12

흰 반점 증후군 바이러스(white spot syndrome virus, WSSV)의 외피 단백질을 발현하는 형질전환 미세조류를 유효성분으로 포함하는 흰 반점 증후군(white spot syndrome)의 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 흰 반점 증후군은 갑각류에 유발되는 것을 특징으로 하는 흰 반점 증후군의 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 갑각류는, 참새우(*Penaeus chinensis*), 줄새우(*Palaemon paucidens*), 징거미새우(*Macrobrachium nipponense*), 보리새우(*Penaeus indicus*) 및 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)로 이루어진 군에서 선택된 갑각류인 것을 특징으로 하는 흰 반점 증후군의 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 15

제 12항에 있어서,

상기 백신 조성물은, 사료 중량에 1 내지 10% 중량으로 혼합되어 투여되는 것을 특징으로 하는 흰 반점 증후군의 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 16

제 12항에 있어서,

상기 사료는 개체의 체중에 1 내지 5% 중량으로 급여되는 것을 특징으로 하는 흰 반점 증후군의 예방 또는 치료용 백신 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은, 흰 반점 증후군 바이러스(white spot syndrome virus, WSSV) 외피 단백질을 발현하는 형질전환 미세조류를 유효성분으로 포함하는 흰 반점 증후군(white spot syndrome, WSS)의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 새우는 미국과 아시아를 포함한 전 세계의 중소 규모에서 양식되며, 많은 새우 종 중에서 페나에이드 종(*penaeid species*), 흰다리 새우(*Litopenaeus vannamei*) 및 징거미 새우(*Macrobrachium nipponense*)가 세계 새우 생산의 큰 부분을 차지하고 있다. 페나에이드 종을 포함한 새우 양식 산업에서, 새우 질병에 대한 인식이 증가하고 있으며(Lightner, D. V., 1993), 박테리아, 균류, 병원성 원생 동물 및 바이러스는 새우 양식 산업에서 새우에 질병을 유발하고, 새우의 집단 폐사로 인한 막대한 경제적 손실의 원인이 되고 있다. 특히 새우는 바이러스 성 질병에 의한 감염 위험이 크다. 새우 양식에서 새우의 집단 폐사의 원인이 되는 주요 바이러스는 WSSV (white-spot syndrome virus), YHV (yellow-head virus), HPV (hepatopancreatic parvovirus) 및 MBV (monodon baculovirus)가 보고되었다(Flegel, T., 2006).
- [0003] 한편, 해양 바이러스 인 WSSV는 많은 새우 종에서 이 질병을 유발하는 것으로 보고되었으며 갑각류에 유도되는 치명적인 질병이다(Corbel, Zuprizal, Shi, Arcier, & Bonami, 2001). 이 바이러스는 꼬리가 있는 난형 형태를 가지고 있으며, 원형 dsDNA 게놈을 가지고 있고 크기는 약 300kb인 바이러스 이다. 'WSSV' 감염이 발생하면 새우는 2 ~ 7 일 이내에 죽고, 100 %의 사망률을 나타내는 치명적인 바이러스이다(Xu, Han, & Zhang, 2007). 또한, WSSV는 세계적으로 새우 양식에 막대한 경제적 손실을 초래하는 바이러스 이다(Rout, Kumar, Jaganmohan, & Murugan, 2007). WSSV에는 감염에 중요한 역할을 하는 5 가지 주요 단백질인 바이러스 단백질 (VP) 15, 19, 24, 26 및 28이 있으며, 특히 VP19 및 VP28 단백질은 외피 단백질로 알려져 있고 초기 감염에 핵심적인 역할을 하고, VP28은 VP19보다 초기 감염에서의 역할이 중요한 것으로 보고되었다(Kwang, 2011) (Wu, Wang, & Zhang, 2005) (Ning, Zhu, Xu, Zheng, & Meng, 2009) (Kulkarni et al., 2013). 그러나, WSSV의 단백질을 사용하여, 많은 재조합 백신이 만들어 지고 있고, 백신을 투여하기 위한 다양한 방법이 연구되고 있으나, WSSV를 제어하기 위한 포괄적인 방법이 부족한 실정이다.
- [0004] 한편, 재조합 단백질 시장은 2001년 이후 매년 35%의 성장을 이루었으며, 2013년에서 2018년까지는 매년 8.83%의 성장을 이루어 2017년에는 1,410억 달러에 달할 것으로 예측되었다. 현재 재조합 단백질은 39%가 대장균(*Escherichia coli*), 35%가 CHO (Chinese hamster ovary) 세포, 15%가 효모, 10% 정도가 기타 포유류 시스템을 이용하고 있으나, 최근 미국과 중국을 중심으로 형질전환 미세조류를 이용 하여 다양한 치료용 단백질 및 백신 등의 생산에 관한 연구가 이루어지고 있으며, 미세조류의 여러 장점 때문에 앞으로 미세조류를 이용한 재조합 단백질의 생산이 늘어날 것으로 예상된다.
- [0005] 미세조류의 형질전환 기술은 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)를 대표 모델로 하여 개발되고 있으나, 최근 클로렐라(*Chlorella*) 등 다양한 미세조류를 대상으로 한 형질전환 기술들이 보고되고 있다.
- [0006] 이에, 본 발명자들은 WSSV의 외피 단백질인 VP28을 발현하는 형질전환 클로렐라를 제조하여, 이를 통상의 사료에 첨가하여 새우의 면역 증진용 조성물이 효과적으로 WSSV를 예방하는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 흰 반점 증후군 바이러스(white spot syndrome virus, WSSV)의 외피 단백질을 발현하는 미세조류를 유효성분으로 포함하는 흰 반점 증후군(white spot syndrome)의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물을 제공하는 것이다. 본 발명자들은 염유도성 프로모터를 이용하여 WSSV의 VP28 단백질을 발현하는 클로렐라를 형질전환하여 제작하였다. 형질전환된 클로렐라는 배양 시 250mM의 염을 추가하여 배양하여 WSSV의 VP28단백질의 발현량을 증폭시킨 후 형질전환된 클로렐라는 원심분리를 통해 펠렛부분만 취하고 펠렛무게의 동량의 PBS를 첨가하여 초음파 분쇄 후 동결건조하여 유효성분을 제작하였다. 제작된 유효성분을 사료에 혼합하여 새우의 먹이로 일주일간 급여 후 WSSV접종 실험한 결과 유효성을 검증함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 흰 반점 증후군 바이러스(white spot syndrome virus, WSSV)의 외피 단백질을 발현하는 미세조류를 유효성분으로 포함하는 흰 반점 증후군(white spot syndrome)의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 흰 반점 증후군 바이러스(white spot syndrome virus, WSSV)의 외피 단백질을 발현하는 미세조류를 유효성분으로 포함하는 흰 반점 증후군(white spot syndrome)의 예방 또는 치료용 백신 조성물을

제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 흰 반점 증후군 바이러스(WSSV)의 VP28을 발현하는 형질전환된 클로렐라가, 효과적으로 VP28을 발현하는 것을 확인하였으며, 형질전환 클로렐라를 사료에 혼합하여, 징거미새우(*Macrobrachium nipponense*) 및 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)에 경구투여하였을 때, 효과적으로 WSSV의 감염을 억제하는 것을 확인하여, 관련 산업에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명의 미세조류 형질전환 벡터인 CVnr(1kb)-SIP-VP28 벡터의 벡터맵을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 CVnr(1kb)-SIP-VP28 벡터로 형질전환된 미세조류의 선별을 위한 집락 형성을 확인한 도이다 (A: 야생형 미세조류 광배양, B: 야생형 미세조류 암배양, C: 형질전환 미세조류 광배양).

도 3은 본 발명의 형질전환된 미세조류에서, SIP 프로모터 및 VP28 유전자의 삽입을 PCR로 확인한 도이다.

도 4는 본 발명의 형질전환된 미세조류에서 VP28의 발현을 웨스턴 블랏으로 분석한 도이다.

도 5는 NaCl이 포함된 배지에서, 본 발명의 형질전환된 미세조류의 생장을 확인한 도이다.

도 6은 NaCl이 포함된 배지에서, 본 발명의 형질전환된 미세조류의 VP28 단백질 발현을 SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏으로 확인한 도이다(A: SDS-PAGE분석, B: 웨스턴 블랏 분석).

도 7은 본 발명의 CVnr(1kb)-SIP-VP28로 형질전환된 미세조류를 징거미 새우에 접종하여, WSSV 감염 억제효과를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 흰 반점 증후군 바이러스(white spot syndrome virus, WSSV)의 외피 단백질을 발현하는 미세조류를 유효성분으로 포함하는 흰 반점 증후군(white spot syndrome)의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명에서 사용되는 용어 “예방”은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0014] 본 발명에서 사용되는 용어 “개선”은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0015] 본 발명에서 사용되는 용어 “벡터”는 DNA 재조합 실험에 있어서, 목적하는 DNA 단편을 숙주군 등에 도입시켜 증폭할 수 있는 원형의 DNA로서, 클로닝 운반체를 의미한다.

[0016] 본 발명에서 사용되는 용어, “형질전환”이란 외래핵산 단편이 유기체의 내부로 이동하여 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로 외래 핵산을 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 말한다. 상기의 형질전환에 의해 목적 단백질을 코딩하는 외래 핵산 또는 이를 포함하는 재조합 벡터를 숙주로 도입함으로써 유용한 성분을 만들어 내는 형질전환체(transformant)를 획득할 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 실시 예에서, 상기 사료첨가제는 WSSV에 대한 갑각류의 면역활성을 증가시키는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명에 따른 VP28 단백질의 범위는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. “기능적 동등물”이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. 본 발명의 VP28 단백질은 이의 천연형 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 이의 아미노산 서열 변이체가 또한 본 발명의 범위에 포함된다. VP28 단백질의 변이체란 VP28 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다 (H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic

Press, New York, 1979). 상기 VP28 단백질 또는 이의 변이체는 천연에서 추출하거나 합성 (Merrifield, J. Amer. chem. Soc. 85:2149-2156, 1963) 또는 DNA 서열을 기본으로 하는 유전자 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다 (Sambrook et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 2판, 1989).

[0019] 또한, 서열번호 1의 염기 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본 발명의 VP28 단백질을 코딩하는 유전자로서 사용될 수 있는 VP28 핵산분자는 이를 구성하는 핵산 분자의 작용성 등가물, 예를 들어, VP28 핵산 분자의 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, VP28 핵산 분자와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants)를 포함하는 개념이다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 구현 예에서, 상기 사료첨가제 조성물은 WSSV 외피 단백질을 발현하는 형질전환 미세조류 외에, 추가적으로 갑각류에 허용되는 담체를 함유할 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 사료첨가제 조성물을 그대로 또는 공지의 담체, 안정제, 보조제(adjuvant) 등을 가할 수 있으며, 필요에 따라 비타민, 아미노산류, 미네랄 등의 각종 양분, 항산화제, 항생물질, 항균제 및 기타의 첨가제 등을 가할 수도 있으며, 그 형상으로는 분체, 과립, 펠릿, 현탁액 등의 적당한 상태일 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명의 사료첨가제 조성물은 하나 이상의 효소 제제를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어 리파제와 같은 지방 분해효소, 피틴산(phytic acid)을 분해하여 인산염과 이노시톨인산염을 만드는 파이타제(phytase), 녹말과 글리코겐 등에 포함되어 있는 알파-1,4-글리코시드 결합(α -1,4-glycoside bond)을 가수분해하는 효소인 아밀라제, 유기인산에스테르를 가수분해하는 효소인 포스파타제(phosphatase), 말토오스를 두 분자의 글루코스로 가수분해하는 말타제 및 사카로스를 가수분해하여 글루코스-프룩토스 혼합물을 만드는 전환효소 등을 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명의 사료첨가제 조성물은 갑각류에게 단독으로 투여되거나 식용 담체 중에서 다른 사료첨가제와 조합되어 투여될 수 있다. 통상적으로, 당업계에 잘 알려진 바와 같이 단독 일일 섭취량 또는 분할 일일 섭취량을 사용할 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 WSSV의 외피단백질은, 바이러스 단백질(VP) 15, 19, 24, 26 및 28로 이루어진 군에서 선택된 단백질인 것일 수 있으며, 바람직하게는 VP28이나 이에 제한되지는 않는다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 VP28은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 유전자로 코딩되는 것일 수 있고, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 형질전환 미세조류는 클로렐라(*Chlorella*), 세네데스무스(*Scenedesmus*), 두날리엘라(*Dunaliella*), 스피룰리나(*Spirulina*), 난노클로롭시스(*Nannochloropsis*), 테트라셀미스(*Tetraselmis*), 케토세로스(*Chaetoceros*), 안키스트로데스무스(*Ankistrodesmus*) 및 헤마토코커스 플루비아리스(*Heamatococcus pluvialis*)로 이루어진 군에서 선택된 미세조류인 것일 수 있으며, 바람직하게는 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*)이나 이에 제한되지는 않는다.

[0026] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 흰 반점 증후군은 갑각류에 유발되는 것일 수 있으며, 상기 갑각류는 참새우(*Penaeus chinensis*), 줄새우(*Palaemon paucidens*), 징거미새우(*Macrobrachium nipponense*), 보리새우(*Penaeus indicus*) 및 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)로 이루어지는 군에서 선택된 갑각류 일 수 있으며, 바람직하게는 징거미새우(*Macrobrachium nipponense*) 및 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)이나 이에 제한되지는 않는다.

[0027] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 갑각류는, 해수, 담수 또는 민물 갑각류인 것일 수 있으며, 바람직하게는 해수 또는 민물 갑각류이나 이에 제한되지는 않는다.

[0028] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 사료첨가제 조성물은, 사료 중량에 1 내지 10% 중량으로 혼합될 수 있으며, 바람직하게는 3 내지 7% 중량으로 혼합될 수 있고, 더욱 바람직하게는 4 내지 5% 중량으로 혼합될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0029] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 사료첨가제 조성물은, 갑각류의 사료에 혼입될 수 있으며, 상기 사료는, 갑각류 개체의 체중대비 1 내지 5% 중량으로 급여될 수 있고, 바람직하게는 2 내지 3% 중량으로 급여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0031] 또한, 본 발명은 흰 반점 증후군 바이러스(white spot syndrome virus, WSSV)의 외피 단백질을 발현하는 형질전환 미세조류를 유효성분으로 포함하는 흰 반점 증후군(white spot syndrome)의 예방 또는 치료용 백신 조성물을 제공한다.
- [0032] 본 발명에서 사용되는 용어 “치료”는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0033] 본 발명에서 사용되는 용어 “백신”은 생체에 면역을 주는 항원을 함유한 생물학적인 제제로서, 감염증의 예방을 위하여 사람이나 동물에 주사하거나 경구 투여함으로써 생체에 면역이 생기게 하는 면역원 또는 항원성 물질을 말한다.
- [0034] 본 발명에 따른 백신 조성물은 유효성분을 수의학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 수의학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명에서 용어 “수의학적으로 허용 가능한 담체”란 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항원 보강제, 안정제, 희석제, 보존제, 항균제 및 항진균제, 등장성 작용제, 흡착 지연제 등을 포함한다. 본 발명의 백신 조성물에 이용할 수 있는 수의학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0035] 본 발명의 백신 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0036] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0037] 또한, 상기 부형제는 애드juvant(adjuvant)라고도 불리며, 면역세포의 초기 활성화 과정에서 비특이적으로 항원에 대한 면역 반응을 촉진하는 물질로, 숙주에게 면역원은 아니지만 면역계의 세포의 활성을 증대시킴으로써 면역을 강화하는 제제, 분자 등을 의미한다. 불활화 백신의 제작시 부형제의 선택은 백신 효능의 중요한 원인이 된다.
- [0038] 일 구현예에서, 상기 백신 조성물은 당분야에 공지된 부형제를 제한없이 포함할 수 있고, 바람직하게는 오일 및 겔을 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 오일 및 수산화 알루미늄 겔을 포함할 수 있다. 상기 오일과 겔의 혼합 비율은 겔의 함유량이 많을 수록 부형제의 성상이 안정되고, 백신 부작용이 적어지며, 세포 응집도 약하게 나타나는 것을 특징으로 한다. 상기 오일과 수산화 알루미늄 겔은 바람직하게는 오일 및 수산화 알루미늄 겔을 1 : 3 내지 5의 부피비로 하여 추가적으로 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 오일 및 수산화 알루미늄 겔을 1 : 4의 부피비로 하여 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 백신 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 백신 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택된다. 상기 백신 조성물 중 포함되는 유효성분의 농도는 대상에 따라 다양하게 선택할 수 있음은 자명하며, 바람직하게는 약

학 조성물에 0.01 ~ 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함되는 것이다. 그 농도가 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만일 경우에는 약학 활성이 나타나지 않을 수 있고, 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 초과할 경우에는 개체에 독성을 나타낼 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명은, 상기의 사료첨가제 조성물을 배합한 갑각류용 사료조성물을 제공한다.

[0043] 본 발명의 사료 조성물은 종래 사료에 첨가되는 성분을 더 포함할 수 있다. 이러한 사료에 첨가되는 성분의 일 예로서 곡류분말, 고기분말, 및 두류 등을 포함할 수 있다. 상기에서 곡류분말은 쌀가루, 밀가루, 보리가루, 및 옥수수가루 중에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다. 상기에서 고기분말은 닭고기, 소고기, 돼지고기, 및 타조고기 중에서 선택된 어느 하나 이상을 분말화한 고기분말을 사용할 수 있다. 상기에서 두류는 대두, 강낭콩, 완두콩, 및 검정콩 중에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다.

[0044] 본 발명의 사료 조성물은 상기에서 언급한 종래 사료에 첨가되는 성분인 곡류분말, 고기분말, 및 두류 이외에도 사료의 영양성을 증대시키기 위해 영양제, 및 무기물 중에서 선택된 어느 하나 이상을 첨가할 수 있으며, 사료 품질의 저하를 막기 위해 항곰팡이제, 항산화제, 항응고제, 유화제, 및 결합제 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0045] 본 발명의 실시예에 따르면, 상기 갑각류는 페나에이드 종(*penaeid species*), 흰다리 새우(*Litopenaeus vannamei*) 및 징거미 새우(*Macrobrachium nipponense*)로 이루어진 군에서 선택된 갑각류인 것일 수 있고, 바람직하게는 흰다리 새우(*Litopenaeus vannamei*) 및 징거미 새우(*Macrobrachium nipponense*)일 수 있다.

[0047] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0050] <실시예 1> WSSV의 VP28의 코돈 최적화 및 벡터 제작

[0051] <1-1> WSSV VP28의 미세조류 코돈 최적화 서열 합성

[0052] 본 발명의 흰 반점 증후군 바이러스(white spot syndrome virus, WSSV)의 외피 단백질인 VP28을 미세조류인 클로렐라에서 효과적으로 발현하도록, 코돈 최적화를 시행하였다. 구체적으로, WSSV VP28에 포함되어있는 restriction enzyme site인 EcoRV, Nco I, Apa I, EcoRI, BamHI, Xho I, Not I, Nde I 을 제거하고 효과적인 클로닝을 위하여 5' 말단에 BamHI (GGATCC), Kozak sequence를 포함시키며 3' 말단에 Xho I (CTCGAG)을 포함시켜 (주)바이오니아에서 DNA를 합성하였다. 합성된 DNA를 VP28이라 명명하였다(서열번호 1). 이후 VP28을 종래의 미세조류 형질전환용 벡터인 CVnr-35S vector에 삽입하여, CVnr-35S-VP28 벡터를 준비하였다.

[0054] <1-2> CVnr(1kb)-SIP2-VP28 벡터를 이용한 형질전환용 DNA fragment primers 제작 및 형질전환

[0055] 상기 실시예 1-1의 CVnr-35S-VP28 벡터에서, 미세조류에서의 형질 전환 및 VP28의 효과적인 발현을 위하여 Nitrate reductase (NR) gene 부분을 1kb로 변경하고, 미세조류 유래의 내인성 염유도성 프로모터가 포함된 CVnr(1kb)-SIP-VP28 벡터를 제작하였다(도 1). 그 후 형질전환 미세조류를 feed vaccine으로 사용하기 위해 필요한 서열을 제거하기 위하여, CVnr(1kb)-SIP-VP28 벡터의 5' fragment와 3' fragment의 양 말단 sequence에 맞추어 형질전환 증폭용 primers를 제작하였다(표 1).

표 1

Target	Primer name	Sequences(5' - 3')	PCR product
CVnr (1kb)	1Kb UF_28	AACAAGATGTCGTAGGTTCAAATCCTAT	4076p
	1Kb DR_28	TTTACAGGTTGCAGTACCAGGAGAATAC	

[0057] 이후, 제작된 CVnr(1kb)-SIP-VP28 형질전환 증폭용 primers를 Elpis Bio사의 Hipi Plus 5x PCR Master Mix,

CVnr(1kb) primers를 사용하여 PCR 하였고, vector에 존재하는 Ampicillin resistance gene 및 vector의 서열이 포함되지 않는 Insert gene만을 가진 DNA product를 제작하였다. 본 발명에서 미세조류를 형질전환하기 위하여, 미세조류인 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) PKVL7422를 $1.0-2.0 \times 10^6$ cells/ml의 세포농도 까지 배양하고, 배양액 10 ml을 Hanil사의 combi-514R로 3,500 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 버리고 pellets을 1 ml의 Osmosis buffer (0.2 M mannitol, 0.2 M sorbitol)에 resuspension하여 테스트 튜브로 옮겨 상온에서 1시간동안 안정화 시켰다. 다시 원심분리한 후 상등액을 버리고 pellets을 400 μ l의 electroporation buffer (500 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 20 mM Hepes, 200 mM mannitol, and 200 mM sorbitol; pH 7.2)에 resuspension 하였다. 테스트 튜브에 PCR로 증폭시킨 VP28_DNA를 5 μ g 넣고 10분간 ice에 보관하였다. DNA와 cell의 혼합액 400 μ l을 0.2 cm electroporation cuvette에 옮기고 1000 V, 25 μ F, 400 Ω 의 조건으로 bio-rad사의 Gene Pulser XcellTM Electroporation System으로 5초간 electroporation을 하였다. 형질전환이 끝난 *C. vulgaris* PKVL7422를 6-well plate에 fresh한 BGNK(표 2) broth 5 ml을 넣고 20 $^{\circ}$ C 암 조건에서 16시간 recovery 하였다.

표 2

0.002 mM Na ₃ MGEDTA		
0.02 mM Ferric ammonium citrate		
0.03 mM Citric acid • 1H ₂ O		
0.03 mM MgSO ₄ • 7H ₂ O		
0.22 mM K ₂ HPO ₄		
0.2 mM CaCl ₂ • 2H ₂ O		
0.18 mM Na ₂ CO ₃		
Microelements (1 ml/L)	H ₃ BO ₃	2.86 g/L
	MnCl ₂ • 4H ₂ O	1.81 g/L
	ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0.222 g/L
	CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.079 g/L
	COCl ₂ • 6H ₂ O	0.050 g/L
	NaMoO ₄ • 2H ₂ O	0.391 g/L
Nitrogen sources	17 mM NH ₄ Cl	
Carbone sources	0.5% (w/v) Glucose	
Chlorate sources	200 mM KClO ₃	

상기 *C. vulgaris* PKVL7422를 형질전환 시켰으며, BGNK 배지에 접종한 후에, 20 $^{\circ}$ C 암 조건에서 2주간 배양한 후 집락을 확인하였다(도 2).

<실시예 2> 1kb-SIP-VP28_PCR 형질전환체 선별 및 단백질 발현 확인

<2-1> 형질전환체 선별

상기 실시예 1-2에서 확인된 집락을 BGPK broth 10ml이 들어있는 culture flask로 옮겨 1주간 배양하였다. 배양된 미세조류내에 도입 유전자를 확인하기 위하여 PCR을 실시하였다. 미세조류의 DNA는 Biofactories 사의 5min Plant DNA Extraction Kit를 사용하여 추출하였고, VP28 specific primer D_VP28 Salt2555_F (5' - ACAGCTTTTGCTCAGGCA-3')와 D_VP28 R_483 (5' -TTGCCACCG GCTGTTG-3')를 사용하여 PCR을 실시하여 형질전환체 내 target DNA의 삽입을 확인하였다.

그 결과, 형질전환체 내에 SIP 프로모터 및 VP28 유전자가 삽입된 것을 확인하였다(도 3).

<2-2> 단백질 추출 및 발현 확인

단백질 추출법은 형질전환 클로렐라를 1×10^8 cells/ml의 세포농도까지 배양하고, 배양된 배양액 3 ml을 Hanil사의 combi514R을 이용하여 3,500 rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 원심분리하고 상등액을 완전히 제거한 후 단백질 추출 완충액(2X RIPA) buffer (Biobasic), protease inhibitor cocktail, Roche)을 400 μ l을 넣고 섞어준 뒤 얼음에서 1시간 유지한 다음 초음파 분쇄 (2s/2s)를 10분간 실행하였다. 이 후 5X SDS sample loading buffer를 100 μ l을 넣고 90 $^{\circ}$ C에서 10분간 끓인 후 얼음 위에서 5분간 유지하였다. 15% SDS PAGE gel에서 전기영동 후 PVDF membrane으로 옮긴 후 VP28 polyclonal antibody를 이용하여 western blot을 실시하였다.

[0068] 그 결과, 야생형 클로렐라에서 검출되지 않는 28 kDa의 단백질이 형질전환 클로렐라에서 발현되는 것을 확인하여, 형질전환된 미세조류가 효과적으로 VP28을 발현하는 것을 확인하였다(도 4).

[0070] <실시예 3> 형질전환 미세조류의 최적 배양 조건 확인

[0071] <3-1> NaCl 농도에 따른 배양 확인

[0072] 상기 실시예 2-2에서 선별된 형질전환 미세조류의 배양 최적화 조건을 확인하기 위하여, 형질전환체를 BGPK 배지에서 3일동안 OD 0.2로 배양하고 여기에 NaCl를 최종 농도가 0, 200, 250, 300, 350 mM가 되도록 첨가한 후 20℃에서 1주일간 배양하면서 성장을 관찰하였다.

[0073] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 형질전환된 *C. vulgaris* PKVL7422는 염분이 포함되지 않은 배지에서, 초기 생장이 우수하였으나, 1주일 후에는 NaCl이 250 mM의 농도로 포함된 배지에서도 성장하는 것을 확인하였다.

[0075] <3-2> NaCl 농도에 따른 VP28 발현 확인

[0076] 상기 실시예 2-2에서 선별된 형질전환 미세조류의 NaCl의 농도에 따른 VP28의 발현량을 확인하기 위하여, 상기 실시예 3-1과 동일한 조건에서, 10^8 cell/ml의 세포수가 되도록 5일간 배양하였다. 배양된 세포는 3,500rpm에서 30 min 원심분리하여 회수하고 침전된 세포는 RIPA buffer로 재현탁한 후 2초의 On/Off 프로그램을 이용하여 5분간 sonication을 이용하여 파쇄하였다. 파쇄된 세포액을 정량하여 동일한 양의 단백질을 15% SDS-PAGE gel에서 전기영동한 후 VP28 단백질 특이 항체 및 Horse-radish Peroxidase(HRP)가 결합된 2차 항체를 이용하여 Western blot을 실시하였다.

[0077] 그 결과, 250mM의 NaCl을 처리하여 5일간 배양한 경우 VP28의 발현율이 가장 높음을 확인하였다(도 6).

[0079] <실시예 4>

[0080] <4-1>징거미 새우를 이용한 백신효과의 검증

[0081] WSSV VP28 단백질을 발현하는 클로렐라의 경구 투여에 의한 WSSV 감염억제를 알아보기 위하여 징거미 새우 (*Macrobrachium nipponense*)를 경남 하동의 채집업자를 통하여 구입하였다. VP28 발현 형질전환 클로렐라는 1×10^6 cells/ml의 농도로 BGPK 배지에 접종하여 20℃에서 3일간 배양하고 NaCl을 250mM이 되게 첨가한 후 5일간 추가 배양한 후 원심분리하여 수확한 후, sonication과 동결건조를 통하여 불활성화 시켰다. 불활성화된 VP28 발현 클로렐라 또는 야생형 클로렐라를 상용의 새우사료와 장어사료를 1:1 희석한 혼합액에 dry weight 기준으로 5%가 되도록 첨가하여 경구백신용 사료를 제작하였다. 이후, 30리터 사각 수조에 30마리의 큰징거미 새우를 입식하여 1주일간 상용의 새우먹이를 공급한 후 1주일간 VP28 발현 클로렐라 또는 야생형 클로렐라를 혼합한 사료를 하루 1회 새우 체중의 3%를 공급한 후, 공격접종을 위하여, 새우먹이 : 장어먹이 : WSSV 감염새우를 1 : 1 : 1로 혼합한 먹이를 5일간 급여한 후 폐사율을 비교하였으며, 폐사 개체를 회수하여, WSSV 특이 primer를 이용한 PCR을 수행하여, 바이러스 감염에 의한 폐사를 확인하였다.

[0082] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 2주일 후 일반사료 급여군, wild type 클로렐라 급여군, VP28 발현 클로렐라 급여군에서의 폐사율이 각각 63%, 50%, 23%로 나타나 VP28 발현 클로렐라 급여에 의한 징거미 새우에서의 WSSV 감염 억제 효과를 확인하였다.

[0084] <4-2> 흰다리 새우를 이용한 백신효과의 검증

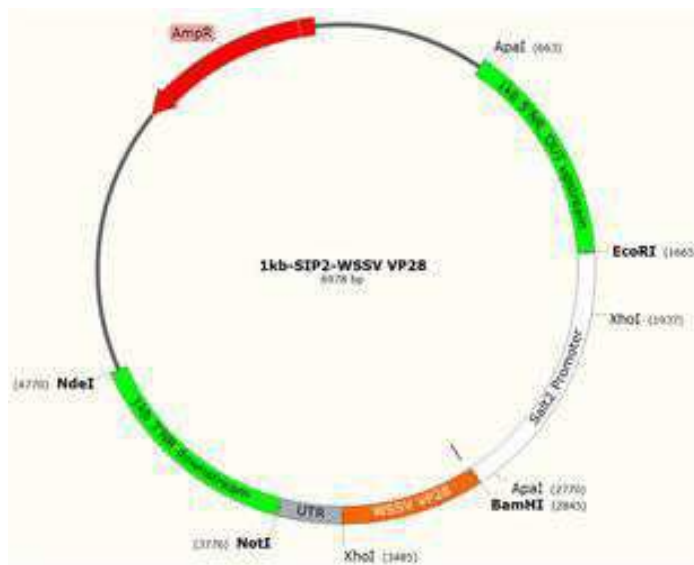
[0085] WSSV VP28 단백질을 발현하는 클로렐라의 경구 투여에 의한 WSSV 감염억제를 알아보기 위하여, 흰다리 새우 (*Litopenaeus vannamei*)를 충남 서천의 양식업자로부터 공급받아 PCR을 통하여 WSSV 감염여부를 확인한 후 실험에 사용하였다. 감염되지 않은 새우를 이용하여, 상기 실시예 4-1과 동일한 방법으로 수행하였으며, 사료내의 클로렐라의 함량을 1% 및 5%로 처리하였고, 공격접종은 새우 체중의 3%에 해당하는 감염새우를 12시간 간격으로 3회 나누어 급여하여 실시하였다.

[0086] 그 결과, 초기 2일간 VP28을 발현하는 클로렐라를 급여하는 군에서, WSSV의 감염을 급여 7일차 까지 유의미하게 억제하는 것을 확인하였다.

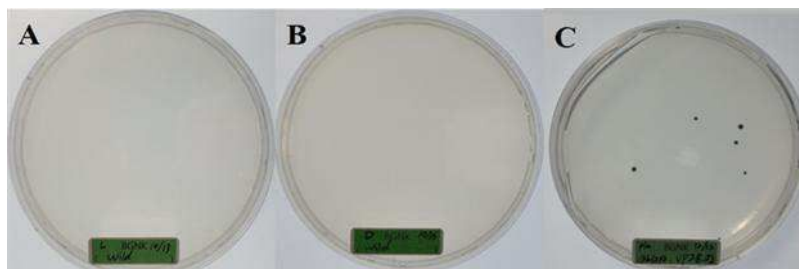
[0088] 따라서, 본 발명의 흰 반점 증후군 바이러스(WSSV)의 VP28을 발현하는 형질전환된 클로렐라가, 효과적으로 VP28을 발현하는 것을 확인하였으며, 형질전환 클로렐라를 사료에 혼합하여, 징거미 새우(*Macrobrachium nipponense*) 및 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)에 경구투여하였을 때, 효과적으로 WSSV의 감염을 억제하는 것을 확인하였다.

도면

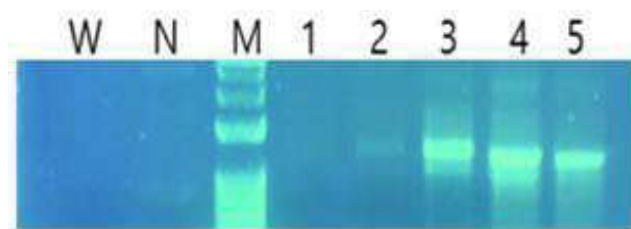
도면1



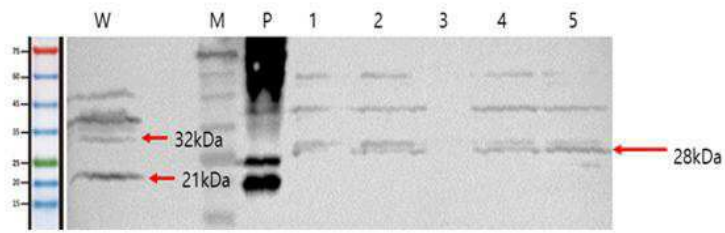
도면2



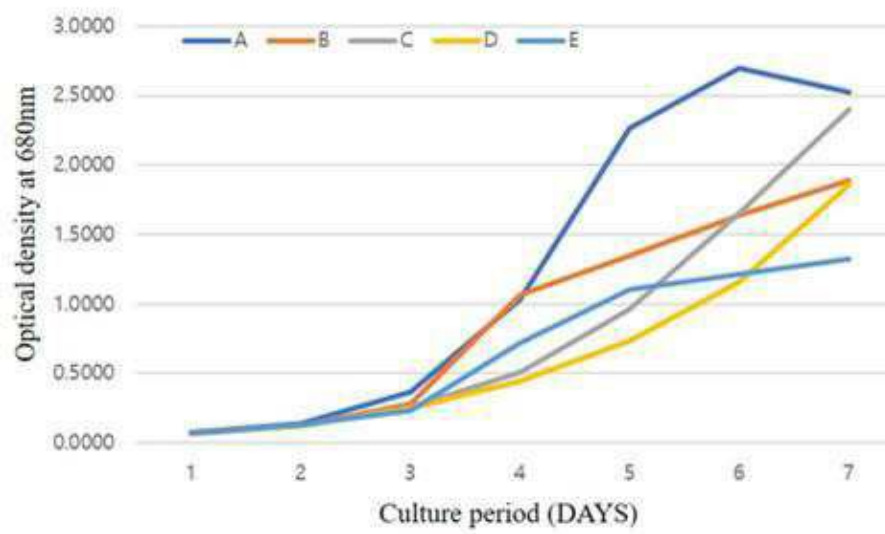
도면3



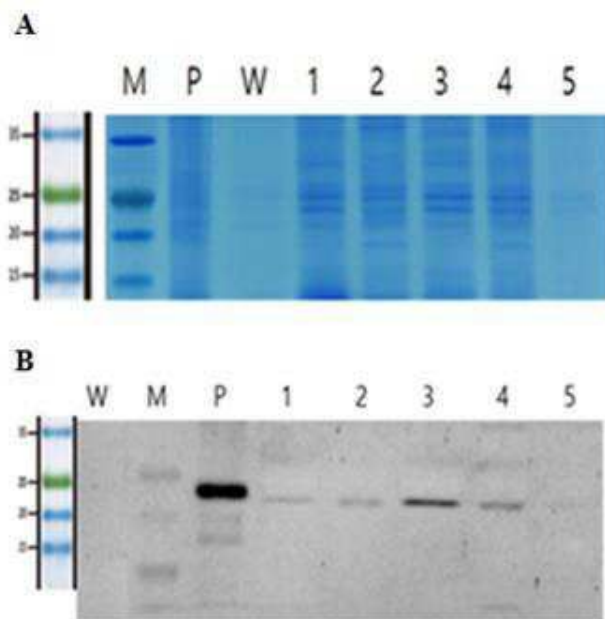
도면4



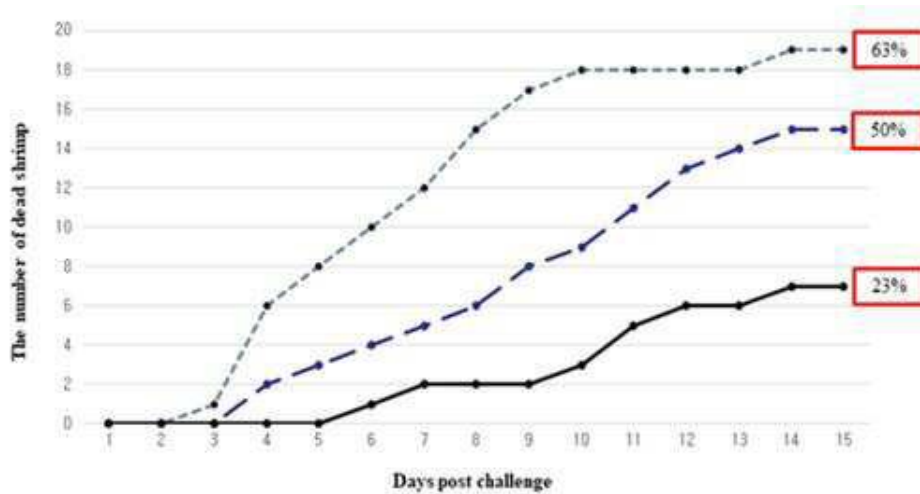
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> Feed additive composition for preventing or improving WSS
comprising transgenic microalgae expressing WSSV envelope protein
as an active ingredient, and use thereof

<130> PN2105-230

<160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 615

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VP28 basic sequence

<400> 1

atggatctgt cgttcaactct gtcggtgggc agcgcgatcc tggccatcac tgccgtcatt 60

gccgtcttca tcgtgatatt tcgtaccac aatacgggtga ccaagaccat cgaaacacac 120

accgacaaca tcgagaccaa tatggatgag aacctccgca ttctgtgtac cgccgaggtg 180

ggaagcggct acttcaagat gaccgacgtc tccttcgaca gcgacaccct cggcaagatc 240

aagatccgca acggcaagtc agacgtcag atgaaggagg aggacgcgga cctggtcatc 300

acaccgtgg agggccgggc acttgaggtg acggtggggc agaacctgac gttcgaggga 360

acattcaagg tgtggaacaa caccagccgc aagatcaaca ttacgggcat gcagatggtg 420

ccgaagatca acccaagcaa ggcctttgtg ggtagctcca acacgtcttc cttcaccccc 480

gttttcatcg acgaggacga ggtcggcacc tttgtctgcg gcaccacctt tggggcaccg 540

atcgcggaac cagccggtgg caacctgttc gacatgtacg tccacgtcac ctactccggc 600

accgagaccg agtga 615

<210> 2

<211> 204

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VP28 amino acid sequence

<400> 2

Met Asp Leu Ser Phe Thr Leu Ser Val Val Ser Ala Ile Leu Ala Ile

1 5 10 15

Thr Ala Val Ile Ala Val Phe Ile Val Ile Phe Arg Tyr His Asn Thr

20 25 30

Val Thr Lys Thr Ile Glu Thr His Thr Asp Asn Ile Glu Thr Asn Met

35 40 45

Asp Glu Asn Leu Arg Ile Pro Val Thr Ala Glu Val Gly Ser Gly Tyr

50 55 60

Phe Lys Met Thr Asp Val Ser Phe Asp Ser Asp Thr Leu Gly Lys Ile

65 70 75 80

Lys Ile Arg Asn Gly Lys Ser Asp Ala Gln Met Lys Glu Glu Asp Ala

85 90 95

Asp Leu Val Ile Thr Pro Val Glu Gly Arg Ala Leu Glu Val Thr Val

100 105 110

Gly Gln Asn Leu Thr Phe Glu Gly Thr Phe Lys Val Trp Asn Asn Thr

115 120 125

Ser Arg Lys Ile Asn Ile Thr Gly Met Gln Met Val Pro Lys Ile Asn

130 135 140

Pro Ser Lys Ala Phe Val Gly Ser Ser Asn Thr Ser Ser Phe Thr Pro

145 150 155 160

Val Phe Ile Asp Glu Asp Glu Val Gly Thr Phe Val Cys Gly Thr Thr

165	170	175
Phe Gly Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ala Gly Gly Asn Leu Phe Asp Met		
180	185	190
Tyr Val His Val Thr Tyr Ser Gly Thr Glu Thr Glu		
195	200	
<210>	3	
<211>	6978	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CVnr(1kb)-SIP-VP28	
<400>	3	
cacctaaatt gtaagcgtaa atattttgtt aaaattcgcg ttaaattttt gttaaatcag		60
ctcatttttt aaccaatagg ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa aagaatagac		120
cgagataggg ttgagtgttg ttccagtttg gaacaagagt ccactattaa agaacgtgga		180
ctccaacgtc aaagggcgaa aaaccgtcta tcagggcgat ggcccactac gtgaaccatc		240
accctaataca agtttttttg ggtcaggttg ccgtaaagca ctaaatcgga accctaaagg		300
gagccccga tttagagctt gacggggaaa gccggcgaaac gtggcgagaa aggaaggga		360
gaaagcgaaa ggagcgggct ctagggcgct ggcaagtgtg gcggtcacgc tgcgcgtaac		420
caccacacc gccgcgtta atgcgccgt acagggcgcg tccattcgc cattcaggct		480
gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa		540
agggggatgt gctgcaaggc gattaagttg ggtaaccca gggttttccc agtcacgacg		600
ttgtaaaacg acggccagtg aattgtaata cgactacta tagggcgaat tgggtaccgg		660
gcccggcgac gcttgttttg ggaacaagat gtcgtaggtt caaatcctat ggacaagaca		720
gggttcggtg caggcatgca ggcgtgagc aagtgagcga agcatgagc agcccacaag		780
gctgcttgca cggcacacaa gtagctgtct gtagcaagga gcgtcacca tggcacagcg		840
ggcgggtgtc cagcagctca tgtggatcaa tgccagcaat gggcgagccc gtgatgttgc		900
gaacgttgtc catgccgtc tgcacagcac agaagaacag gacagacgc atgagcgatg		960
ggccggggcg agatatggag gctagtgtac cgcagatgaa tgcagcaggt cacctcctgg		1020
tgccagtgat gcattacatg acaaagtagc taaacctgcc tcattctgtg cagcccttgc		1080
cagtgcattc agaaagggtg ttccggcacc gcatagcatg gcacagcaca gtgtcatgca		1140
cagcagcagc tagagcagtg tacagcagca cagcgagcg cagcaggctc accatgaagg		1200
aagtgaggcc gcgtcctgc agcccagcga taatgcggtc ggcatcctcc agctgcacac		1260

ctcggatctg tggcaggcag gaagaaagga acgggcagggt tgaaaggggg tgaggcaggc	1320
aggggcaggc aggcgtgctc tgggcaagct gccgcattgt caactgccag acgcttgcca	1380
tgctttgtgc cttcgtcaag gtgtgcagggt tgcctgctca cgctccctc tctcgcgcc	1440
cgtgagcggc gtttgcggca acccgaccca accgaaccaa caaacctgca tgttggcgcg	1500
ggtggtgatg tccgcacagc cgtcggcgcc atagggggca atacagtctc ccaggtaccg	1560
cagctgtgcc gccgtcagct cgccgttggg caccttgagc cgcatcatga agcgcccggg	1620
ggtgcgcttg cggcgggtga acaggccaga ccacttcagg cgcagaattc cggctgacaa	1680
agatgagcga gaagccgatg tcaggttgggt tgcgtgctctc agcctctggg caggctgggc	1740
tatgcagtgt gtggtcgtgt gcgctgctgg ggcggtccag cccacttagc ttgctttagc	1800
ttgtaccag gtggcctagg cactccacaa tgcgtcgtt cacttgtctc atcccccttct	1860
gtgctctgcc cgcccgcgcc ttgcagctgc caagctggac gaggtgagcc gcaagatcag	1920
cgtgctttct tcttcctcg agaccctga ggaggctgcg gcgctggcag aggctgagga	1980
tgccgagccc attgctgctg aggtggcggg gggcgacaac gaggaggagg gtgaggacgt	2040
gtacgtgat gggtttgatg ataatgaggg ggcaggtggg tggttcggcg catccgctgc	2100
agcgtgtctg ctgctgcggc ggtgtattga ccaactgcac tacagttggc cagcctgagc	2160
tggggattgg gccgctgcgc tgtgctgggc ctgctggcag caggtggtgg tgggcagcaa	2220
gtgtgtcagc gtgaggctgc ggtgtgttc caactgacag ctttttgctt caggcactgt	2280
cgtcaagctg acgccctcca cggctcacgt gctgcagagc tggagggtga ggataggag	2340
gcgggaggcg agggaggaga gtttggagag gaggaggagg atgtggaggt gcaggcagct	2400
gatgatgatg atgaccgta tgaggacgaa tcagagctct gatacgctc tcagcagaaa	2460
ttatcacttg ggtgctgcac cgcttgttct gtttcgtttg tctgttgac tgagtccgc	2520
cgctctcatg ccgtgacgtc ccaacgggtgt gtatgctgct gctactgccg tcgcttgtaa	2580
ggctgtcgtt tgtcgcagtg ccgctgtagt ttgatggcaa gtgcaggtag gaaagctgtg	2640
gggtgtgtgt cagagcgtag ttgtgccgtg gagagccccg gttacgtcat gcggtatgcc	2700
cttttgccag cggtcacaca acgcatgcgg cggcggcggt catcaaaacc atagcgtga	2760
catgcgggcc ctataaattg tggattgtgt gattcttaa gccgtattga gtattatatt	2820
gtgtgggctg tggtcgcagt cgccggatcc ccgggtggtc agtgccacca tggatctgtc	2880
gttactctg tcggtggta cgcgcatcct ggccatcact gccgtcattg ccgtcttcat	2940
cgtgatattt cgctaccaca atacggtgac caagaccatc gaaacacaca ccgacaacat	3000

cgagaccaat atggatgaga acctccgcat tcctgtgacc gccgaggtgg gaagcggcta	3060
cttcaagatg accgacgtct ccttcgacag cgacaccctc ggcaagatca agatccgcaa	3120
cggaagtca gacgctcaga tgaaggagga ggacgcggac ctggtcatca caccctgga	3180
gggccgggca cttaggtga cggtggggca gaacctgacg ttcgaggaa cattcaaggt	3240
gtggaacaac accagccga agatcaacat tacgggcatg cagatggtgc cgaagatcaa	3300
ccaagcaag gcctttgtgg gtagctcaa cagctctcc ttcaccccg ttttcacga	3360
cgaggacgag gtcggcacct ttgtctgcgg caccacctt ggggcaccga tcgcggcaac	3420
agccggtggc aacctgttcg acatgtacgt ccacgtcacc tactccgga ccgagaccga	3480
gtgactcgag ccgacgtcga gccactctag aagatccccg ctccgtgtaa atggaggcgc	3540
tcgttgatct gagccttgcc cctgacgaa cggcgggtga tggagagtac tgctctcaag	3600
tgctgaagcg gtagcttagc tccccgttc gtgctgatca gtcttttca acacgtaaaa	3660
agcggaggag ttttgcaatt ttgttggttg taacgatcct ccgttgattt tggcctcttt	3720
ctccatgggc gggctgggcg tatttgaagc gggtaccgac ctggaattgt cgaggcgcc	3780
gcgtgcgtgc agggttgcta gatgggaggg aggggggctc gggatgctgg gacttgcatg	3840
ggactgctgg ggagaattgc tgcccgttgc cgctgtccgt tgcccctgca caaacgcaag	3900
gttgcatgtg gcaccgttc tctctgctct tctcccttc tcaccatgct cccacactct	3960
cgcccttggtt tgggtgcag ttgacaaggc ggatgagggg tggccgttca gcactgggtt	4020
catcaatgag gagatgtga aggagcgtt gtccccgggt gagtgcattg ttggttgca	4080
gcaaggcacc accctgtgcg gcagcagtgg cgtgtgcagc ggcggcctgg atgtctgtgt	4140
ctgcgttgtg aaagaaaaa actgatttgg gggacggttg aatgcagaca tgaggtattg	4200
gaggagagg agggctgcta gcctggctgc tcaacgtca agcttgctgc tctcttgtt	4260
cgcttcttga cactcaactt tctctgccc tgcgtgccc tgcctctct tgctgcagcc	4320
ggtgacgaca ccatctgctg cctgtgcggc cctccccca tgatcaagtt tgcctgcctg	4380
ccaaccgcg agaagctggg ctacaagca gagcagtga ttcagtttg agcagcagca	4440
gtgcttagt atcgacacac tctggacaga ccacgttgc tgccttgacc tgtggatttc	4500
tgcctgccgc tttcatcgaa cagcctcagt gtgttttatt ttgtgtgtac gcgcctttgc	4560
gagttgctag ctgcttgctc tacttgcgag taccgcccc agcatccct ttcctcgttt	4620
catatcgctt gcatccaaa cgcaacttat ctatgctctc ctgctatccc tcagcgctgc	4680
tcctgtcct gctcactgcc ctagcaccg cctcggttg ggctccgct gtattctct	4740

ggtactgcaa cctgtaaacc agcactgcca tatggagctc cagcttttgt tccctttagt	4800
gagggttaat ttcgagcttg gcgtaatcat ggctcatagct gtttcctgtg tgaaattgtt	4860
atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg	4920
cctaattgagt gagctaactc acattaatig cgttgcgctc actgcccgtt tccagtcgg	4980
gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc	5040
gtattgggcg ctcttccgtt tcttcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggtgc	5100
ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata	5160
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg	5220
cgttgcctggc gtttttccat aggcctccgc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgt	5280
caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa	5340
gtccctcgt gcgctctctt gttccgacct tgcgcttac cggatactg tccgcctttc	5400
tcccttcggg aagcgtggcg cttttcata gtcacgctg taggtatctc agttcggtgt	5460
aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaacccc cgttcagccc gaccgtgcg	5520
ccttatccgg taactatcgt cttgagtcga acccgtaag acacgactta tcgccactgg	5580
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatgt aggcggtgct acagattct	5640
tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc	5700
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtatgtcttg atccggcaaa caaaccaccg	5760
ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaagatctc	5820
aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgtca gtggaacgaa aactcacgtt	5880
aagggatctt ggcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa	5940
aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat	6000
gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct	6060
gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggtt accatctggc cccagtgtg	6120
caatgatacc gcgagaccga cgtcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag	6180
ccggaagggc cgagcgaga agtggctctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta	6240
attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcgc aacgttgttg	6300
ccattgtac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg	6360
gttccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct	6420
ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtggtatca ctcatggtta	6480
tggcagcact gcataattct ctactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg	6540
gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc	6600

cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcattcattg	6660
gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga	6720
tgtaaccac tcgtgcacc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg	6780
ggtgagcaaa aacaggaagg caaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat	6840
gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc	6900
tcatgagcgg atacatatit gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca	6960
catttccccg aaaagtgc	6978