(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0015601
(43) 공개일자 2013년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) *C02F 3/34* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0077675
(22) 출원일자 2011년08월04일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
김창훈
경상남도 창원시 용호동 176-8 LG메트로시티 232동 1802호
김진주
부산광역시 남구 황령대로 504, 101동 312호 (대연동, 대연비치아파트)
(74) 대리인
위병갑

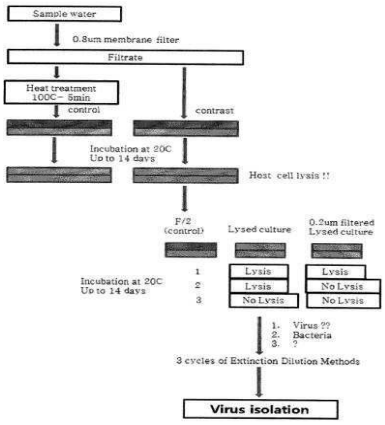
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **적조유발 조류에 대해 특이적 용균 활성을 갖는 프로로센트럼 미니멈 감염 바이러스 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 적조유발 조류에 대해 특이적 용균 활성을 갖는 신규한 바이러스 균주인 PminDNAV(Prorocentrum minimum infecting virus), 상기 PminDNAV를 유효성분으로 포함하는 적조 방제용 조성물 및 상기 조성물을 해수에 처리하는 단계를 포함하는 적조의 방제 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 PminDNAV 바이러스는 적조를 유발하는 유해성 조류인 프로로센트럼 미니멈(*Prorocentrum minimum*)에 대해 특이적 용균 활성을 나타내므로 조류에 의한 적조 현상을 제어하는데 유용하게 사용될 수 있으며, 환경오염의 유발 없이 적조를 효과적으로 방제할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	108212-03-3-CG000
부처명	농림수산식품부
연구사업명	수산특정연구개발사업
연구과제명	생활사 해명을 통한 코클로디니움 유해 적조의 제어기술개발
주관기관	부경대학교
연구기간	2008.12.01 ~ 2011.11.30

특허청구의 범위

청구항 1

적조유발 조류에 대해 특이적 용균 활성을 가지는 프로로센트럼 미니멈 감염 바이러스인 PminDNAV(*Prorocentrum minimum* infecing virus, 기탁번호 KCTC 11981BP).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 적조유발 조류는 프로로센트럼 미니멈(*Prorocentrum minimum*)인 것을 특징으로 하는 PminDNAV.

청구항 3

PminDNAV(*Prorocentrum minimum* infecing virus, 기탁번호 KCTC 11981BP)을 유효성분으로 포함하는 적조 방제용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 PminDNAV(*Prorocentrum minimum* infecing virus)은 적조유발 조류에 대해 특이적 용균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 적조 방제용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 적조유발 조류는 프로로센트럼 미니멈(Prorocentrum minimun)인 것을 특징으로 하는 적조 방제용 조성물.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 해수에 처리하는 단계를 포함하는 적조의 방제 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 적조유발 조류에 대해 특이적 용균 활성을 갖는 신규한 바이러스인 PminDNAV(*Prorocentrum minimum* infecting virus), 상기 PminDNAV를 유효성분으로 포함하는 적조 방제용 조성물 및 상기 조성물을 해수에 처리하는 단계를 포함하는 적조의 방제 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 적조현상이란 일반적으로 해양에 서식하는 동식물성 플랑크톤, 원생동물 및 박테리아와 같은 미생물이 일시에 다량으로 증식되거나 또는 생물, 물리적으로 집적되어 바닷물의 색깔을 변색시키고 해양생물에 나쁜 영향을 미치는 현상을 뜻한다. 적조현상은 어패류를 폐사시키거나 독화시켜 수산업에 막대한 피해를 주고, 심지어 인간에까지 그 영향을 미쳐 직간접적으로 우리에게 심각한 문제를 야기시키고 있다.

[0003] 상기 적조현상은 세계의 모든 연안 수역에서 널리 발생하며, 특히 일본의 세토 내해, 미국의 캘리포니아 연안, 동남 아시아 연안과 북해 연안에서 자주 발생하고 있다. 최근 우리 나라 남해 연안과 서해 및 동해남부 연안 수역에서 자주 발생하는 적조현상은 계절에 관계없이 상습적으로 발생하고 있으며, 특히 적조생물은 규조류에서 편모조류로 바뀌어 가고 고밀도화되어 가는 경향을 보이고 있다.

[0004] 적조를 일으키는 생물은 식물성 플랑크톤으로 규조류(diatom), 편모조류(dinoflagellate), 남조류(blue-green algae), 미세조류(microalgae), 원생동물 등을 들 수 있는데, 우리나라에서 발견된 것만도 50여 종이나 된다. 플랑크톤의 종류에 따라 바닷물의 색깔은 적색으로 국한되지 않고 다갈색, 청색, 백색 등으로 나타나기도 한다. 우리 나라에서 발생하는 대표적인 적조원인생물은 코클리디움 폴리크리코이더스(Cochlodinium polykrikoides),

짐노디니움 임푸디쿰(Gymnodinium impudicum), 아카시오 상기니아(Akashiwo sanguinea), 린굴로디니늄 폴리에드룸(Lingulodinium polyedrum), 프로로센트럼 미칸스(Prorocentrum micans), 짐노디움 카테나튬(Gymnodinium catenatum) 등 6종이 주종을 이루고 있다.

[0005] 한편, 지금까지 알려진 적조 원인 생물의 제거 방법은 화학약품 살포법, 초음파 및 오존처리법, 해면회수 및 침강법, 황토살포법 등이 있다.

[0006] 이러한 방법 중 가장 많이 사용되고 있는 화학약품 살포법은 황산구리($CuSO_4$), 이산화염소(ClO_2), 시마진(Simazine) 등을 살포하는 방법으로서 과거부터 이용되어 왔는데, 그 중 비용이 가장 저렴하여 널리 이용되는 황산구리는 유해성 편모조류에만 특이적(specific)이지 않아 적조원인 생물 외에 다른 해양생물에까지 영향을 끼쳐, 수중의 다른 생물에 대한 독성 및 부식의 측면에서 문제를 일으킬 수 있으며, 또한 상기 황산구리는 일시적 효과만 나타내기 때문에 반복 사용해야 하며, 조류의 적조 발생시 수반되는 높은 알칼리성 환경 조건하에서는 황산구리가 불안정해지기 때문에 많은 양을 처리하여야 하므로 비경제적이라는 단점이 있다.

[0007] 대한민국등록특허 제0407829호에는 초음파 처리법을 통한 적조제거 방법이 개시되어 있는데, 이러한 기술은 초음파로 적조원인생물의 세포를 파괴하는 방법이고, 오존처리법은 적조 발생 수역에 고압의 오존을 투입하여 적조로 인한 독성을 중화시키는 방법으로, 두 방법 모두 실용화단계에는 이르지 못하고 있다.

[0008] 해면회수 및 침강법은 원심분리기, 응집본조, 혼합조 및 가압부상조로 구성된 가압부상분리장치를 이용하여 기포를 발생시켜 적조 생물을 흡착, 부상시키고 해표면에서 회수하는 방법으로 우리나라에서 널리 사용하고 있다.

[0009] 또한 대한민국등록특허 제0325396호에는 황토살포법에 의한 적조 제거 방법이 개시되어 있는데, 즉, 황토(계면활성점토(Montmorillonite))를 해수 중에 살포하여 적조생물을 흡착 침강시키고, 황토속의 알루미늄 이온이 적조원인 생물의 세포를 파괴시키는 성질을 이용한 방법으로 우리나라에서 널리 사용하고 있다. 그러나, 해수 중에 황토를 살포하면 부유물질이 증가되어 어류 양식장과 저층에 정착생물이 살고 있는 어장에서는 어류 아가미 폐쇄로 호흡 장애 등 생물에 영향을 미칠 수 있으므로 주의를 요한다. 더불어, 황토는 적조생물을 바다 밑으로 가라앉혀 죽이므로 바다 속에 2차 오염을 유발할 것으로 여겨진다. 또한, 현재까지 우리나라 연안에 출현한 코클로디니움과 같은 적조생물은 몸에 껍질이 없고 끈적끈적한 점액질 성분이 있어 황토가 흡착효과를 발휘하지만 헤테로시그마(Heterosigma) 속 등 다른 종류에는 껍질이 있어 황토 살포가 소용이 없다.

[0010] 적조현상을 제어하기 위한 또 다른 방법으로 많은 생물학적인 방법들이 시도되고 있으며, 따라서 편모조류에 의한 적조 현상에 박테리아의 역할이 중요하게 부각되고 있다. 특히, 천적인 동물성 플랑크톤과 해양 세균을 이용하거나 유해 내지 유독성 적조생물과 영양 경쟁 관계에 있으면서 비교적 해가 덜한 적조의 종을 인위적으로 유발시켜 영양염류의 소비를 촉진시키는 방법 등 적조 발생과 번식을 억제하는 생물학적 방법 연구에 관심을 기울이고 있다.

[0011] 또 다른 분야에서는 해양 박테리아가 분비하는 물질에 의한 적조생물을 죽이는 방법도 활발히 연구되고 있다. 최근에는 단백질 합성저해제, 세포벽 저해제 및 세포막에 작용을 하는 항생제들을 사용하여 적조생물을 방제하는 시도를 하고 있다. 또한 이러한 물질들을 모델로 하여 인위적으로 저분자 물질들을 유기합성을 하여 생산하기도 하는데 이는 바다에서 분해가 되지 않고 축적되어 결국 농업부분에서 사용되는 농약에 의해 야기되는 문제점들처럼 해양생태계나 바다에서 생산되는 먹거리를 통해 인체에까지 축적되는 문제가 발생하게 된다.

[0012] 따라서 이러한 문제점을 해소할 수 있으면서 동시에 적조를 효과적으로 제거할 수 있는 새로운 기술의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 이에 본 발명자들은 한국 연안 해수로부터 프로로센트럼 미니멈(*Prorocentrum minimum*)을 감염시키는 신규한 살조성(algaecide) 바이러스를 분리하였으며, 해수로부터 분리한 바이러스가 프로로센트럼 미니멈에 대해 특이적 용균 활성을 갖는다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0014] 따라서 본 발명의 목적은 프로로센트럼 미니멈(*Prorocentrum minimum*)에 대해 특이적 용균 활성을 갖는 신규한 바이러스인 PminDNAV(*Prorocentrum minimum* infecting virus)(기탁번호 KCTC 11981BP)를 제공하고자 하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 상술한 PminDNAV을 유효성분으로 포함하는 적조 방제용 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

[0016] 나아가 본 발명의 또 다른 목적은 상술한 적조 방제용 조성물을 해수에 처리하는 단계를 포함하는 적조의 방제 방법을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 적조유발 조류에 대해 특이적 용균 활성을 가지는 PminDNAV(*Prorocentrum minimum* infecing virus)(기탁번호 KCTC 11981BP)를 제공한다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 적조유발 조류는 프로로센트럼 미니멈(*Prorocentrum minimum*)일 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 PminDNAV(*Prorocentrum minimum* infecing virus)(기탁번호 KCTC 11981BP)을 유효성분으로 포함하는 적조 방제용 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 PminDNAV(*Prorocentrum minimum* infecing virus)은 적조유발 조류에 대해 특이적 용균 활성을 갖는 것일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 적조유발 조류는 프로로센트럼 미니멈(*Prorocentrum minimun*)일 수 있다.

[0022] 나아가 본 발명은 상술한 적조 방제용 조성물을 해수에 처리하는 단계를 포함하는 적조의 방제 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따른 PminDNAV 바이러스는 적조를 유발하는 유해성 조류인 프로로센트럼 미니멈(*Prorocentrum minimum*)에 대해 특이적 용균 활성을 나타내므로 조류에 의한 적조 현상을 제어하는데 유용하게 사용될 수 있으며, 환경오염의 유발 없이 적조를 효과적으로 방제할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 현장 해수 샘플로부터 바이러스를 분리하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 프로로센트럼 미니멈(*Prorocentrum minimum*)의 (A) 정상 배양물(좌측) 및 PminDNAV 접종 배양물(우측)의 광학현미경 사진, (B) 손상되지 않은 세포의 광학현미경 사진, (C) 120 hpi에서 PminDNAV-감염 세포의 광학현미경 사진을 나타낸다.

도 3은 프로로센트럼 미니멈(*Prorocentrum minimum*)의 (A) 양성 염색된 PminDNAV의 투과 전자현미경(TEM) 사진, (B) 음성 염색된 PminDNAV의 투과 전자현미경(TEM) 사진을 나타낸다.

도 4는 프로로센트럼 미니멈(*Prorocentrum minimum*)의 (A) 손상되지 않은 세포의 투과 전자현미경(TEM) 사진, (B) 120 hpi에서 PminDNAV-감염 세포의 투과 전자현미경(TEM) 사진, (C) (B)의 정사각형 부위에 대해 더 높은 배율에서의 투과 전자현미경(TEM) 사진을 나타낸다.

도 5는 생장 실험 결과를 나타낸다. (A) 바이러스 접종(○) 또는 무접종(●)을 한 프로로센트럼 미니멈(*Prorocentrum minimum*) NF-F-PMI-1d 세포의 증식 변화를 나타낸다; PminDNAV는 기하급수적으로 생장한 숙주 배양물에 접종하였으며, 조류 세포의 수는 직접적인 계수에 의해 측정하였고, 이러한 분석은 적어도 3회 수행하였다. (B) 바이러스의 수는 접종 후 80시간째에 증가하기 시작하였으며, 바이러스 역가는 MPN 방법으로 측정하였다.

도 6은 MPN 방법에 의해 측정된 각 온도 조건에서 PminDNAV의 바이러스 안정성 실험 결과를 나타낸다. (A) 광조건, (B) 암 조건(1W: 1주일, 2Ws: 2주일, 1M: 1개월).

도 7은 MPN 방법에 의해 측정된 각 -80℃와 -196℃(액체 질소)의 온도 조건에서 동해방지제의 유무에 따른 PminDNAV의 바이러스 안정성 결과를 나타낸다(1W: 1주일, 2Ws: 2주일, 1M: 1개월).

도 8은 1% 아가로스 겔 전기영동에 의한 PminDNAV 바이러스의 핵산 분석 결과를 나타낸다. 레인 1: 효소 무처리, 레인 2: DNase I 처리, 레인 3: RNAse A 처리, 레인 4: S1 nuclease I 처리, 레인 5: Exonuclease I 처리, 레인 6: Endonuclease V처리, 레인 M: 100bp DNA 마커(왼쪽)/ 1kb DNA 마커(오른쪽).

도 9는 1% 아가로스 겔 전기영동에 의한 PCR 산물의 분석 결과를 나타낸다. 레인 M: 분자량 마커(1kb DNA Ladder; Bioneer), 레인 1: 프라이머 세트 AVS1-AVS2에 의해 증폭된 PminDNAV 분리 균주 유래 절편, 레인 2: 프라이머 세트 AVS1-AVS3에 의해 증폭된 PminDNAV 분리 균주 유래 절편.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은 적조유발 조류에 대해 특이적 용균 활성을 갖는 신규한 바이러스인 PminDNAV(*Prorocentrum minimum* infecting virus)에 관한 것으로, 상기 PminDNAV는 적조유발 조류 중에서도 특히 프로로센트럼 미니멈(*Prorocentrum minimum*)에 대해 용균 활성을 나타낸다는 점에 그 특징이 있다.

[0026] 약 20년 전 처음으로 바이러스가 해수에 존재하는 것으로 보고되었으며, 이러한 바이러스는 해수에서의 우세한 생물체를 감염시킨다. 숙주 생물체가 용균되면 영양분이 주위 환경으로 방출되는데, 이러한 방식의 바이러스는 해양 환경에서 탄소 및 영양분의 순환에 있어서 중요하다. 게다가 바이러스는 숙주세포 군집의 증식 및 다양성에 직접적으로 영향을 주며, 숙주 및 바이러스 군집의 전반적인 진화에 기여한다.

[0027] 대부분의 바이러스는 박테리오파지이지만 조류를 감염시키는 바이러스는 해양 생태계에서 식물 플랑크톤 폐사의 중요한 원인체인 것으로 보고된 바 있다. 이러한 바이러스는 적조 및 유독성 종을 포함하는 식물 플랑크톤의 대증식을 예방 및 소멸시킬 수 있다. 해양 진핵성 조류를 감염시키는 대략 50여 종의 다른 바이러스에서 관찰된 바이러스 및 바이러스-유사 입자는 최근 20년간 분리 및 규명되었다.

[0028] 이에 본 발명자들은 해양에서 분리한 바이러스 중 프로로센트럼 미니멈에 대해 용균 활성이 있는 바이러스로 신규한 PminDNAV를 선발하였으며, PminDNAV 바이러스의 형태학적 특성과 생장 시험, 바이러스 역가 및 게놈 형태와 같은 기본 특성을 관찰함으로써 PminDNAV 바이러스가 프로로센트럼 미니멈(P. *minimum*)에 대해 살조성(algaecide)을 있음을 확인하였고, 새롭게 동정된 본 발명의 신규한 바이러스 균주인 PminDNAV를 한국생명공학연구원에 기탁하여 2011.07.12일자로 기탁번호 KCTC 11981BP를 부여받았다.

[0029] 이에 본 발명자들은 본 발명에서 동정한 신규한 바이러스 균주인 PminDNAV가 실제 적조를 제거할 수 있는지를 확인하는 실험을 수행하였는데, 본 발명의 일실시예에 따르면, 적조유발 조류에 대해 억제능을 갖는 PminDNAV 바이러스를 스크리닝하기 위하여 세균 세포 및 원생생물을 제거하기 위해 해수를 여과하고, 숙주인 프로로센트럼 미니멈(P. *minimum*) NF-F-PMI-1d의 배양물과 여과액을 혼합하여 분석하였다. 그 결과 프로로센트럼 미니멈(P. *minimum*)의 용균을 야기하는 클로닝된 병원체를 성공적으로 분리하였으며, 병원체에 의해 용균된 프로로센트럼 미니멈(P. *minimum*)의 배양물 및 세포는 색이 투명하게 변하는 것을 확인하였다(도 2 참조). 그리고 PminDNAV 바이러스 입자는 숙주 세포의 세포질에 존재하는 것으로 나타났다(도 4 참조).

[0030] 또한, 생장 실험을 통해 PminDNAV 바이러스가 접종된 배양물에서 숙주의 증식 감소가 현저하게 나타났으며(도 5 참조), 암 조건에서 바이러스의 역가가 광 조건보다 더 높은 안정성을 나타내었다(도 6 참조).

[0031] 본 발명에 따르면 PminDNAV 바이러스는 오직 하나의 숙주 균주인 프로로센트럼 미니멈(P. *minimum*)에서만 용균을 야기하였는데, 이를 통해 높은 감염 특이성을 갖는다는 것을 확인하였다.

[0032] 따라서 본 발명은 적조유발 조류에 대해 특이적 용균 활성을 가지는 PminDNAV(*Prorocentrum minimum* infecing virus)(기탁번호 KCTC 11981BP)을 제공한다. 상기 적조유발 조류는 편모조류이며, 바람직하게는 프로로센트럼 미니멈(P. *minimum*)이다.

[0033] 또한, 본 발명은 PminDNAV(*Prorocentrum minimum* infecing virus)(기탁번호 KCTC 11981BP)을 유효성분으로 포함하는 적조 방제용 조성물을 제공한다. 상기 적조는 프로로센트럼 미니멈(P. *minimum*)에 의해 유발될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0034] 본 발명의 적조 방제용 조성물에 사용된 PminDNAV는 편모조류에 대한 억제능력을 갖고 있으므로, 상기 균주를 이용하는 적조 방제용 조성물은 편모조류 대발생에 의한 적조현상을 방제하는데 유용하게 사용될 수 있다. 본 발명의 적조 방제용 조성물은 편모조류에 대한 방제 효과를 나타내며, 구체적으로 프로로센트럼 속에 대해 방제 효과를 나타낸다. 보다 바람직하게 프로로센트럼 속은 프로로센트럼 미니멈이다.

[0035] 본 발명의 적조 방제용 조성물을 살조제로서 첨가할 경우 PminDNAV 또는 PminDNAV 배양물이 포함된 채로 제조될 수 있고, 장기간 보존을 위해 별도로 보관하였다가 사용직전에 혼합하여 사용할 수도 있다. 상기 PminDNAV을 장기간 보존하기 위해 별도로 공급되는 경우에는 예를 들어, 10% 글리세롤 저장 용액에 -70℃ 이하로 얼려 보존하거나 동결 건조한 후 4℃에서 보존하여 사용할 수 있다.

[0036] 본 발명의 적조 방제용 조성물은 PminDNAV 또는 이의 배양물에 증량제, 영양제, 천연다당류, 광물질, 계면 활성제 등을 첨가, 혼합하여 여러 가지 형태로 제조될 수 있다. 구체적으로 수화제, 액제 또는 유제의 형태로 제조될 수 있으며, 예를 들어 직접 분사가능한 용액, 분말 및 현탁액의 형태, 고농축 수성 및 유성 또는 다른 현탁액, 분산액, 에멀젼, 유성 분산액, 페이스트, 분진, 흩뿌림 물질 또는 과립제로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0037] 미생물제제의 제조 과정은 미생물 종류에 따라 상이하지만 일반적으로 미생물제제 생산에 이용되는 균은 24 ~ 48시간 정도 순수하게 액체 배양하여 활성이 가장 높을 때 균체를 회수한다. 배양액 자체를 이용하여 이들의 활력이 떨어지지 않도록 불활성화 보호제나 미량요소를 첨가하면 액상의 제품이 되고 광물질 자재나 토탄, 쌀겨와 같은 유기물에 흡착시키면 분말 또는 과립상의 제품을 생산할 수 있다. 고체 배지에 배양한 후 이를 건조하고 분쇄하여 일정한 수분이 유지되도록 조절하는 경우도 있으며 생산된 모든 제품에 대해서는 균의 밀도, 순수성, 병원균의 혼입여부를 정밀하게 검사한 후 포장하게 된다.

[0038] 또한, 본 발명에 따른 적조 방제용 조성물은 다양한 형태로 제제화할 수 있다. 상기 제제는 용매 및/또는 담체를 첨가함으로써 제조될 수 있다. 필요에 따라 비활성 첨가제, 표면-활성 물질, 예를 들어 유화제 또는 분산제를 제제에 혼합할 수 있다. 시용할 수 있는 표면-활성 물질으로는 방향족 술폰산(예를 들어, 리그노슬폰산, 페놀-술폰산, 나프탈렌-술폰산, 디부팅나프탈렌-술폰산), 지방산, 알킬- 및 알킬아릴술포네이트, 알킬 라우릴 에테르, 지방 알코올 설페이트의 알칼리 금속, 알카라인 토금속, 암모늄염, 설페이트화 헥사-, 헵타- 및 옥타데칸올, 지방 알코올 글리콜 에테르의 염, 술포네이트 나프탈렌 및 이의 유도체, 포름알데리드의 축합물, 나프탈렌 또는 나프탈렌술폰산, 페놀 및 포름알데히드의 축합물, 폴리옥시에틸렌옥틸 페놀 에테르, 에톡실화 이소옥틸-, 옥틸- 또는 노닐-페놀, 알킬페닐 또는 트리부틸페닐 폴리글리콜 에테르, 알킬아릴폴리에테르 알코올, 이소트리데실 알코올, 지방 알코올/에틸렌 옥사이드 축합물, 에톡실화 피마자유, 폴리옥시에틸렌 알킬에테르 또는 폴리옥시프로필렌, 라우릴 알코올 폴리글리콜 에테르 아세테이트, 소르비톨 에스테르, 리그닌-설파이트 폐액 또는 메틸셀룰로오스일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0039] 또한, 상기 제제는 계면활성제, 비활성 담체, 보존제, 습윤제, 완충제, 부형제, 공급촉진제, 유인제, 결합제, 캡슐화제, 유화제, 완충제, 부형제(excipient), 희석제(diluent) 등과 같은 각종 첨가제를 하나 또는 둘 이상을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0040] 나아가 본 발명은 PminDNAV(*Prorocentrum minimum* infecing virus)(기탁번호 KCTC 11981BP)을 유효성분으로 포함하는 적조 방제용 조성물을 해수에 처리하는 단계를 포함하는 적조의 방제 방법을 제공한다. 상기 적조는 프로로센트럼 미니멈(P. *minimum*)에 의해 유발될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0041] 본 발명에 따른 적조의 방제 방법은 보다 구체적으로, 프로로센트럼 미니멈(P. *minimum*)에 대한 억제능을 갖는 PminDNAV(*Prorocentrum minimum* infecing virus)을 선별하는 단계; PminDNAV을 배양하여 배양물을 획득하는 단계; 및 상기 배양물을 적조 발생 해역에 살포하는 단계를 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명에 따른 적조 방제용 조성물은 분사, 분무, 살포, 흩뿌림 또는 붓기의 방법으로 사용될 수 있으며, 사용형태는 의도한 목적에 의존하는데, 모든 경우에 본 발명에 따른 조성물의 분포가 가능한 한 미세하고 균일하도록 하는 것이 좋다.

[0043] 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.

[0044] **<실시예 1>**

[0045] **재료 및 방법**

[0046] **<1-1> 샘플링 장소**

[0047] 현장 샘플링은 자란만(JR) 1 ~ 11 정점 및 사량도(SR) 주변 1 ~ 3 정점에서 2009년 2월 ~ 12월까지 매월 수행하였다. 그리고 자란만(JR) 4, 7, 8 및 10 정점에서 2010년 2월 ~ 9월까지 매월 수행하였다. 해수 샘플은 표면층(0m) 및 바닥층(B-1m)으로부터 수집하였다.

[0048] **<1-2> 조류의 배양 및 생장 조건**

[0049] 프로로센트럼 미니멈(*Prorocentrum minimum*) NF-F-PMI-1d의 균주는 국립수산과학원(NFRDI)으로부터 얻었다. 백색 형광 조명을 이용하는 80 ~ 90 μmol 광자/㎡/s의 12시간 광:12시간 암 주기하에, 20℃의 온도조건으로 변형된 f/2 배지에서 배양하였다.

[0050] **<실시예 2>**

[0051] **바이러스 분리 및 형태학적 분석**

[0052] 바이러스 스크리닝은 세균 세포 및 원생생물을 제거하기 위해 해수를 여과하고, 숙주인 프로로센트럼 미니멈(P. *minimum*) NF-F-PMI-1d의 배양물과 상기 해수 여과액을 혼합하여 분석하였다. 분리된 병원체의 형태는 광학현미경 및 투과 전자현미경(TEM)을 이용하여 관찰하였다.

[0053] **<2-1> PminDNAV(*Prorocentrum minimum* infecting virus)의 분리 및 유지**

[0054] 먼저, 프로로센트럼 미니멈(P. *minimum*)을 감염시켜 용균시킬 수 있는 신규한 바이러스를 동정하기 위해, 수집한 해수 샘플에서 진핵성 미생물 및 대부분의 세균 제거를 위해 0.8㎛ 구멍 크기의 폴리카보네이트 막 필터(Niclepore)를 이용하여 샘플링 즉시 여과하였다. 획득한 상기 여과액 0.5㎖을 프로로센트럼 미니멈(*P. minimum*) 배양액 1㎖에 접종하였고, 백색 형광 조명을 이용하는 80 ~ 90 μmol 광자/㎡/s의 12시간 광:12시간 암 주기하에, 20℃에서 배양하였다. f/2 배지로 접종된 조류 배양액은 대조군으로 사용하였다. 그 후 조류의 용균 발생은 광학현미경을 이용하여 14일 동안 2일 주기로 관찰하였다.

[0055] 용균이 발생한 후, 세균을 제거하기 위해 상기 용균액의 분취액(0.5㎖)을 0.2㎛ Dismic-25cs filter(Advantec)로 여과하였다. 그 후 조건을 달리하여 3가지의 다른 샘플을 제조하였는데, 첫 번째는 대조군으로 이용하기 위해 f/2 배지를 첨가하였고, 두 번째는 아무런 처리없이 용균액을 첨가하였다. 세 번째는 프로로센트럼 미니멈(*P. minimum*)을 감염시키는 바이러스를 확인하기 위하여 여과액을 첨가하였다. 이후 세포 배양 플레이트는 백색 형광 조명을 이용하는 80 ~ 90 μmol 광자/㎡/s의 12시간 광:12시간 암 주기하에, 20℃에서 배양하였다. 그 후 조류의 용균 발생을 확인하기 위해 광학현미경을 이용하여 14일 동안 2일마다 모니터링하였다(도 1 참조).

[0056] 바이러스 적정 시험 전에, 클로닝된 바이러스 샘플에서 프로로센트럼 미니멈(P. *minimum*)을 감염시키는 바이러스의 증식은 소멸 희석법을 이용하여 측정하였다. 여과액은 변형된 f/2 배지를 이용하여 일련의 10배 희석단계로 희석하였고, 각 희석 단계의 분취액(100㎕)은 숙주 배양액 150㎕를 분주한 96 웰 세포 배양 플레이트에 첨가하였다. 상기 세포 배양 플레이트는 백색 형광 조명을 이용하는 80 ~ 90 μmol 광자/㎡/s의 12시간 광:12시간 암 주기하에, 20℃에서 배양하였다. 그 후 조류의 용균 발생을 확인하기 위해 광학현미경을 이용하여 14일 동안 2일마다 모니터링하였고, 가장 개연성이 있는 용균 바이러스의 수는 Nishihara 등(1986, *Eisei Kagaku* 32:226-228)에 의해 고안된 컴퓨터 프로그램을 이용하여 측정하였다.

[0057] 이후 프로로센트럼 미니멈(P. *minimumm*)의 용균을 야기하는 바이러스를 분리하였으며, 분리된 바이러스의 형태는 광학현미경 및 TEM을 이용하여 관찰하였다. 상기 바이러스 병원체는 0.2㎛ 구멍 크기의 필터로 여과한 후에도 살조 활성(algicidal activity)을 나타내기 때문에, 쉽게 세균 오염이 없는 상태로 만들 수 있었다. 상기 살조 활성은 일관되게 용균이 야기된 새로운 프로로센트럼 미니멈(P. *minimum*) NF-F-PMI-1d 배양물에 연쇄적으로 전이가 가능하다. 상기 병원체에 의해 용균된 프로로센트럼 미니멈(P. *minimum*)의 배양물 및 세포는 색이 투명하게 되는데, 이는 광합성 색소의 손실 또는 분해 때문인 것으로 생각할 수 있다(도 2 참조). 상기 병원체가 1주일 이내에 상기 숙주 배양물의 완전한 용균을 야기하는 것은 특징적이다. 이렇게 앞서 기술된 방법으로 분리된 본 발명의 신규한 바이러스 병원체는 0.2㎛ 구멍 크기의 필터로 여과한 후에도 살조 활성(algicidal activity)을 갖는 것으로 나타났으며, 이후 실험을 위해 50% cryoprotectant(Cellcanker™2, Nippon Zenyaku Kogyo, co. LTD)를 첨가하여 -80℃및 -196℃에서 보관하였다. 또한, 본 발명의 방법으로 분리 및 동정한 프로로센트럼 미니멈(P. *minimum*)균주를 감염시키는 바이러스는 한국생명공학연구원에 기탁하여 2011.07.12일자로 기탁번호 KCTC 11981BP를 부여받았다.

[0058] **<2-2> 투과 전자현미경(TEM)**

[0059] 양성 염색 샘플을 제조하기 위해, 프로로센트럼 미니멈(P. *minimum*) 배양물에 병원체를 접종하였고, 접종 후 92시간째에 샘플(10ml)을 수집하였다. 그 후, 150 메쉬 그리드로 세포 잔해물을 제거하고 건조시켰다. 상기 그리드는 4% 아세트산 우라닐로 염색하였고, 60kV에서 작동하는 JEOL JEM-2010 TEM을 이용하여 관찰하였다.

[0060] 음성 염색 샘플을 제조하기 위해, 프로로센트럼 미니멈(P. *minimum*) 배양물에 본 발명에서 동정한 바이러스 병원체를 접종하였고, 접종 후 92시간째에 샘플(10ml)을 수집하였다. 그 후, 150 메쉬 그리드로 세포 잔해물을 제거하고 건조시켰다. 상기 그리드는 4% 아세트산 우라닐 및 3% 구연산 납으로 염색하였고, 60kV에서 작동하는 JEOL JEM-2010 TEM을 이용하여 관찰하였다.

[0061] 양성 및 음성 염색 관찰 결과, 본 발명에서 규명한 신규한 바이러스인 PminDNAV는 정이십면체이고, 지름이 175 ± 10nm(평균± 표준편차; n=30)이며, 외막이 없고 꼬리-유사 구조가 없다는 것을 확인하였다(도 3A 및 3B 참조).

[0062] 한편, 얇게 섹션(section)된 TEM 샘플을 제조하기 위해, 프로로센트럼 미니멈(P.minimum) 배양물에 PminDNAV 병원체를 접종하였고, 접종 후 0, 24, 48, 72, 80 및 92시간째에 샘플(10ml)을 수집하였다. 각 세포 현탁액은 상기 동일한 배지에서 1% 글루타르알데리드(glutaraldehyde) 및 2% 사산화 오스미움(Osmium tetroxide) 용액으로 4℃에서 1시간 동안 고정하였다. 세포는 3,000rpm에서 20분 동안 원심분리하여 수집하였고, 그 후 2% 사산화 오스미움 용액을 이용하여 추가로 1시간 동안 4℃에서 후 고정하였다. 상기 펠렛은 일련의 등급별 에탄올(20, 30, 50, 70, 80, 90, 95 및 100%)에서 각각 15분 동안 탈수시켰다. 그 후 100% 프로필렌 옥사이드 용액에서 침윤시켰다. 상기 펠렛은 Poly/Bed 812 resin(Polyscience, Inc.)과 프로필렌 옥사이드 용액의 1:2 혼합물, 2:1 혼합물, 1:1 혼합물, 그리고 포매 전 100% Poly/Bed 812 resin(Polyscience, Inc.) 용액으로 침윤시켰다.

[0063] 상기 샘플은 적절하게 라벨링된 포매 틀로 옮긴 후, 60℃ 오븐에서 48시간 동안 중합시켰다. 상기 블록을 다듬기 위해 150nm로 절단한 후, 다이아몬드 칼로 70nm 두께로 섹션되었다. 상기 섹션은 4% 아세트산 우라닐 및 3% 구연산 납으로 염색하였고, 60kV에서 작동하는 JEOL JEM-2010 TEM을 이용하여 관찰하였다.

[0064] TEM 관찰 결과, 바이러스 입자가 숙주 세포의 세포질에서만 존재하는 것으로 나타났다(도 4B 참조).

[0065] **<실시예 3>**

[0066] **생리학적 분석**

[0067] **<3-1> 생장 실험**

[0068] 생장 실험을 위해, 대수증식기의 프로로센트럼 미니멈(P. *minimum*) NF-F-PMI-1d 배양물 500ml에 병원체인 PminDNAV 현탁액 20mL을 접종하였다. f/2 배지 20mL이 첨가된 대조군 배양물은 비교를 위해 사용하였다. 상기 세포 현탁액의 분취액 20mL은 접종 후 0, 24, 48, 72, 80 및 96시간째에 샘플링하였다. 그 후, 세포 밀도는 광학현미경을 이용하여 측정하였으며, 병원체 밀도는 소멸 희석법(Extinction dilution method)를 이용하여 측정하였다. 그 후, 상기 몇몇 분취액은 TEM 관찰을 위해 사용하였다. 각 실험은 3회 반복하였다.

[0069] 그 결과, 생장 실험에서 바이러스 접종이 숙주 배양물의 정지기(stationary phase)에서 수행되었을 때, 바이러스의 증식 증가는 접종 후 80 ~ 96시간째에 현저하게 나타났다. 따라서, PminDNAV의 잠복기는 80시간으로, 총 용균 주기는 96시간까지로 추정하였다. 숙주의 증식 감소는 바이러스가 접종된 배양물에서 더 현저하게 나타났다. 접종 후 4일째에 숙주 및 바이러스의 증식은 버스트(burst) 크기를 계산하기 위해 사용하였다. 가장 높은 산출값은 9.8×10^{5} 감염 유닛/mL(96 hpi)으로 나타났다. 또한 상기 시점에서 모든 숙주 세포는 완전히 사멸된 것으로 나타났다(도 5 참조).

[0070] **<3-2> 안정성 실험**

[0071] PminDNAV에 대한 온도의 영향은 Tomaru 등(2005, *Plankton. Biol. Ecol.* 52:1-6)의 방법에 따라 조사하였다.

[0072] 먼저, 상기 생장 실험 후의 용균액은 세포 잔해물을 제거하기 위해 0.8㎛ 및 0.2㎛ 폴라카보네이트 막 필터(Nuclepore)를 이용하여 순차적으로 처리하였다. 상기 새로운 용균액의 역가는 소멸 희석법을 이용하여 측정하였다. 그 후, 상기 용균액의 분취액은 동결보존제의 첨가없이 광 및 암 조건에서 20, 15, 4, -20, -80 및 -196

℃(액체 질소)에 저장하였다. 저장 1주일, 2주일 및 1개월째에 상기 샘플에 대해 각 저장 온도에서 바이러스 병원체의 안정성을 추산하기 위해 소멸 희석법을 이용하여 바이러스 현탁액의 감염 역가를 측정하였다.

[0073] 그 결과, 4℃에서 광 및 암 조건의 역가는 1주일째에는 안정적이었지만, 그 후 감소하기 시작하였다. 암 조건에서 상기 바이러스의 역가는 광 조건보다 더 높은 안정성을 나타내었다. 15℃ 및 20℃에서 광 및 암 조건의 역가는 감소하였으며, -20℃ 및 -80℃와 같은 더 낮은 온도에서 광 및 암 조건의 역가는 상기 숙주에 대한 무반응을 나타내었다(도 6 참조).

[0074] 또한, PminDNAV에 대한 저장 실험에서 -80℃와 -196℃(액체 질소)의 온도 조건에서 동해방지제의 유무에 따른 바이러스 병원체의 안정성을 추산하기 위해 동해방지제의 종류 및 농도 조건하(10% DMSO, 20% DMSO, 30% DMSO)에서 저장 후 1주일, 2주일 및 1개월째에 바이러스 현탁액의 감염 역가를 측정하였다.

[0075] 그 결과, 10% DMSO에서 상기 바이러스의 역가는 한달까지 유지되는 것으로 나타났으며, 20%와 30% DMSO에서는 보존 2주일까지는 유지되었지만 이후에는 급격히 감소하는 것을 확인하였다(도 7 참조).

[0076] **<3-3> 숙주 범위**

[0077] 본 발명에서 분리 및 동정한 바이러스인 PminDNAV에 대한 종간 숙주 특이성을 확인하기 위하여, 바실라리오파이트(bacillariophyte), 클로로파이트(chlorophyte), 디노파이트(dinophyte), 라피도파이트(raphidophyte) 속에 속하는 숙주를 포함하여 28가지 식물 플랑크톤 균주를 이용하여 조사하였다.

[0078] 이를 위해, Dismic-25cs filter(Advantec)를 통해 여과된 새 용균액의 5%(v/v) 분취액을 28가지 조류 균주의 배양물에 각각 첨가하여 조사하였다. 그 후, 20℃에서 전술한 조건 하에 배양하였다. 각 조류 배양물에서 생장 및 용균의 증거는 광학현미경으로 모니터링하였고, f/2 배지로 접종된 대조군 배양물과 비교하였다. 접종 후 14일째에 용균되지 않은 배양물은 상기 바이러스 병원체에 대해 적절하지 않은 숙주로 판단하였다.

[0079] 그 결과, 하기 표 1에 나타낸 바와 같이, PminDNAV는 오직 하나의 숙주 균주에서만 용균을 야기하였고, 조사된 다른 임의의 미세조류 종에서는 용균을 야기하지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해 상기 바이러스가 높은 감염 특이성을 갖는다는 것을 확인할 수 있었다.

표 1

[0080] PminDNAV의 28가지 해양 식물 플랑크톤 균주에 대한 감염 특이성(+ : 용균됨, - : 용균되지 않음)

분류(Class)	종(Species)	Strains	PminDNAV01의 감염특이성
Bacillariophyceae	Asterionella glacialis	NF-F-Asa-1	-
	Chaetoceros curvisetus	ME-CCS-1	-
	Chaetoceros curvisetus	NF-F-CCS-1	-
	Skeletonema palmeriana	NF-D-SPA-1	-
	Skeletonema costatum	ME-SCM-1	-
Chlorophyceae	Dunaliella sp.	PK-F-DUN-SP-1	-
Cryptomonadaceae	Rhodomonas sp.	PK-F-RHO-SP-1	-
	Rhodomonas sp.	PK-F-RHO-SP-2	-
	Rhodomonas sp.	PK-F-RHO-SP-3	-

Dinophyceae	Akashiwo sanguinea	NF-F-AKA-1	-
	Alexandrium sp.	NF-F-ALE-SP-1	-
	Alexandrium sp.	NF-F-ALE-SP-2	-
	Alexandrium catenella	NF-F-ACA-1	-
	Alexandrium catenella	NF-F-ACA-3	-
	Alexandrium carterae	PK-F-ACA-1	-
	Cochlodinium polykrikoides	NF-F-CPO-3(old)	-
	Gymnodinium impudicum	NF-F-GIM-1	-
	Gymnodinium sp. (Heterocapsa pygmaea)	NF-F-GYM-SP-1	-
	Prorocentrum minimum	NF-F-PMI-1d	+
	Prorocentrum minimum	NF-F-PMI-2	-
	Prorocentrum micans	NF-F-PMC-1	-
	Prorocentrum micans	NF-F-PMC-2	-
Euglenophyceae	Eutreptia sp.	NF-F-EUT-SP-1	-
Prymnesiophyceae	Prymnessium parvum	NF-F-Pry-SP-1	-
Raphidophyceae	Heterosigma akashiwo	NF-F-HAK-1	-
	Heterosigma akashiwo	PK-F-HAK-1	-
	Heterosigma akashiwo	PK-F-HAK-2	-
	Chattonella antiqua	NF-F-CAN-1	-

[0081] **<실시예 4>**

[0082] **유전학적 분석**

[0083] 본 발명에서 동정한 바이러스 균주인 PminDNAV의 게놈 유형(type)을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0084] **<4-1> 게놈 추출**

[0085] 대수증식기의 프로로센트럼 미니멈(P. *minimum*) 배양물 2L에 바이러스 PminDNAV 현탁액 30mL를 접종하여 용균시켰다. 상기 용균액은 세포 잔해물을 제거하기 위해 0.8㎛ 및 0.2㎛ 폴라카보네이트 막 필터(Nuclepore)를 이용하여 순차적으로 처리하였다. 폴리에틸렌 글리콜 6000(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)은 최종 농도 10%(wt/vol) 수준으로 상기 여과물에 첨가하였고, 상기 현탁액은 암 조건하에 4℃에서 밤새 저장하였다. 22,000 rpm, 4℃에서 1.5시간 동안 원심분리 후, 상기 펠렛은 10mM 인산염 완충액(pH 7.2)으로 세척하였고, 바이러스 입자를 수집하기 위해 35,000 rpm, 4℃에서 4시간 동안 다시 원심분리하였다. 상기 펠렛은 DEPC 처리된 증류수 500㎕에 재현탁시켰다.

[0086] PminDNAV의 핵산은 표준 페놀-클로로포름 방법으로 추출하였고, 에탄올 침전 처리하였으며, 상기 펠렛은 DEPC 처리된 증류수 100㎕에 용해하였다. 총 DNA 함량은 1% 아가로스 겔(SeaKem LE agarose, BMA. Inc.)에서 50V에서 1시간 동안 전기영동하여 확인하였다. 핵산은 에티디움 브로마이드(ethidium bromide) 염색을 이용하여 시각화시켰다.

[0087] **<4-2> 효소 처리**

[0088] 상기 핵산 용액 5㎕는 DNase I(Takara Bio, Inc.) 5U을 포함하는 10×DNase I 완충액, RNase A(Takara Bio, Inc.) 60U, Exonuclease I(Takara Bio, Inc.), Endonuclease V(Takara Bio, Inc.)을 이용하여 37℃에서 1시간 동안 배양하거나, S1 Nuclease(Takara Bio, Inc.) 170U을 포함하는 10×S1 Nuclease 완충액을 이용하여 23℃에서 15분 동안 배양하였다. 효소처리 없이 1시간 동안 37℃에서 배양한 핵산 샘플은 대조군으로 사용하였다. 그 후, 상기 샘플은 1% 아가로스 겔(SeaKem LE agarose, BMA. Inc.)에서 50V에서 1시간 동안 전기영동하여 확인하였다. 핵산은 에티디움 브로마이드(ethidium bromide) 염색을 이용하여 시각화시켰다.

[0089] 그 결과, 아가로스 겔 전기영동 결과를 통해, PminDNAV로부터 추출된 핵산의 게놈이DNA라는 것을 확인하였다(도 8 참조). 상기 밴드는 RNAse A에 대해 감수성이 없었지만, DNAse I는 상기 추출된 핵산을 완전히 분해하였다.

또한 상기 밴드는 Exonuclease, Endonuclease 및 S1 뉴클리아제(S1 nuclease)에 대해 감수성이 있었으며, 이러한 결과는 상기 게놈이 선형-dsDNA라는 것을 나타낸다.

[0090] **<4-3> PCR에 의한 DNA 중합효소 유전자 증폭**

[0091] 상기 분리된 핵산의 농도는 나노드롭(Nanodrop)을 이용하여 260nm에서 측정하였다. 상기 바이러스 DNA 중합효소 유전자를 증폭하기 위해, 본 발명자들은 Chen 등(1995, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:1274-1278)에 의해 고안된 2개의 프라이머 세트, 정방향(AVS1 5'-GARGGIGCIACIGTIYTIGAYGC-3'; 서열번호 1) 및 역방향(AVS3 5'-SWRTCISTRTCICCRTA-3'; 서열번호 2) 프라이머, 정방향(AVS1 5'-GARGGIGCIACIGTIYTIGAYGC-3'; 서열번호 1) 및 역방향(AVS2 5'-GCIGCRTAICKYTTYTTISWRTA-3'; 서열번호 3) 프라이머를 사용하였다.

[0092] PCR 반응은 10×Ex Taq 완충액, 각 프라이머 50pmol, 2.5mM dNTP, Ex Taq DNA polymerase(Takara, Japan) 2.5U 및 게놈 DNA 50ng을 포함하는 최종 부피 50㎕에서 수행하였다. 상기 PCR 반응은 95℃에서 15분간 예비-변성시키고, 95℃에서 30초, 50℃에서 45초 및 72℃에서 1분간의 과정으로 구성되는 30주기로 My Cyclear™ thermal cyclear(BIO-RAD, USA)를 사용하여 수행하였다.

[0093] 상기 증폭된 산물은 1% 아가로스 겔에서 전기영동하여 분석하였다. 상기 증폭된 DNA는 AccuPrep Gel purification kit(Bioneer)을 이용하여 정제하였고, 라이게이션(ligation)시켰으며, TOPO TA Cloning kit(Invitrogen)를 이용하여 대장균 균주 TOP10내로 형질전환시켰고, 그 후 37℃에서 밤새 배양하였다. 상기 삽입된 절편인 AVS1-AVS2 및 AVS1-AVS3 PCR 산물 750bp는 제조사의 지시에 따라 증폭시켰다. 상기 증폭된 PCR 산물은 AccuPrep Gel purification kit(Bioneer)을 이용하여 정제하였으며, 그 후 시퀀싱하였다.

[0094] 그 결과, AVS1-AVS2의 프라이머 세트를 이용한 PCR 증폭은 다수의 밴드를 나타내었는데, 그 중 약 750bp 밴드는 AVS1-AVS2에서 다른 임의의 밴드보다 강도가 더 강하게 나타났다. 또한, AVS1-AVS3의 프라이머 세트를 이용한 PCR 증폭도 다수의 밴드를 나타내었다(도 9 참조). 상기 AVS1-AVS2 증폭 산물은 AVS1-AVS3 프라이머 세트에 의해 재증폭되었고, 증폭 산물은 관찰되지 않았다(데이터 미도시). AVS1-AVS2 및 AVS1-AVS3 증폭 산물의 서열은 BLAST 검색에서 등록된 데이터와 일치하지 않는 것으로 나타났다.

[0095] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

[0096]

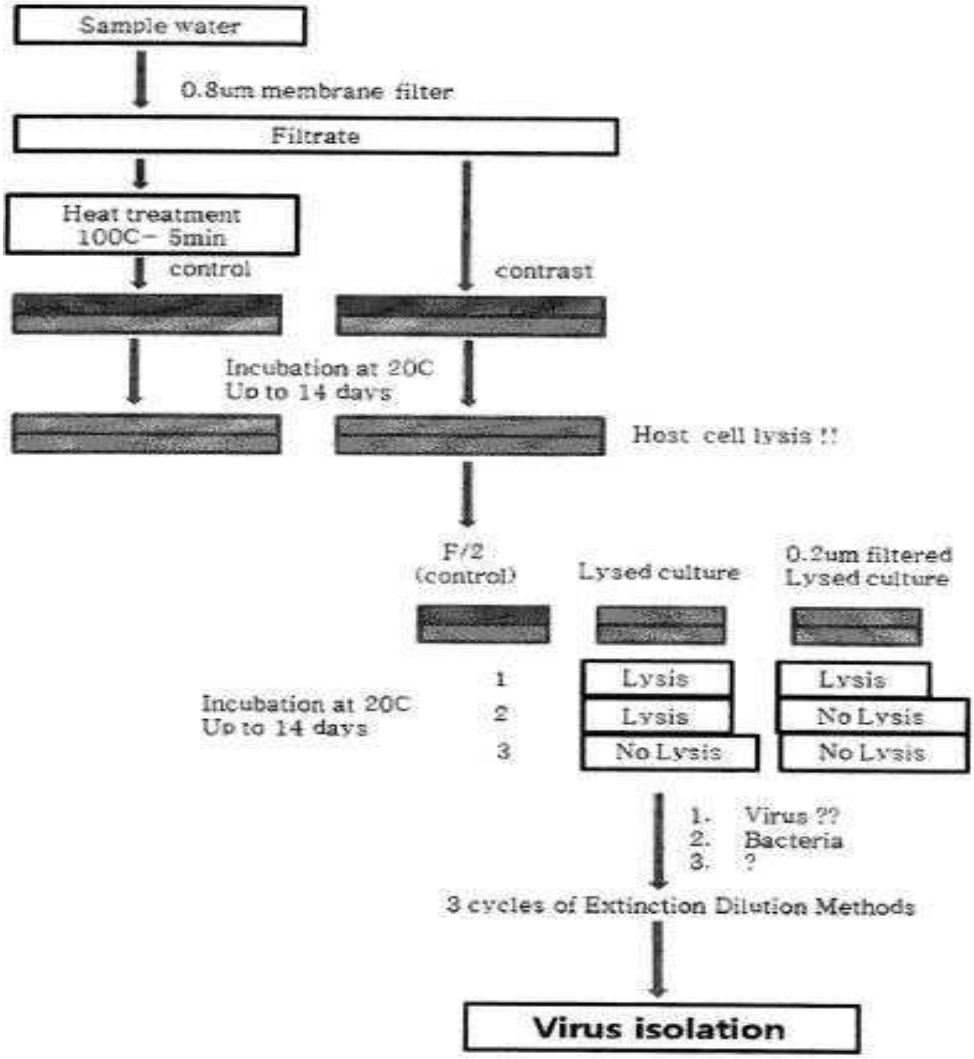
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11981BP

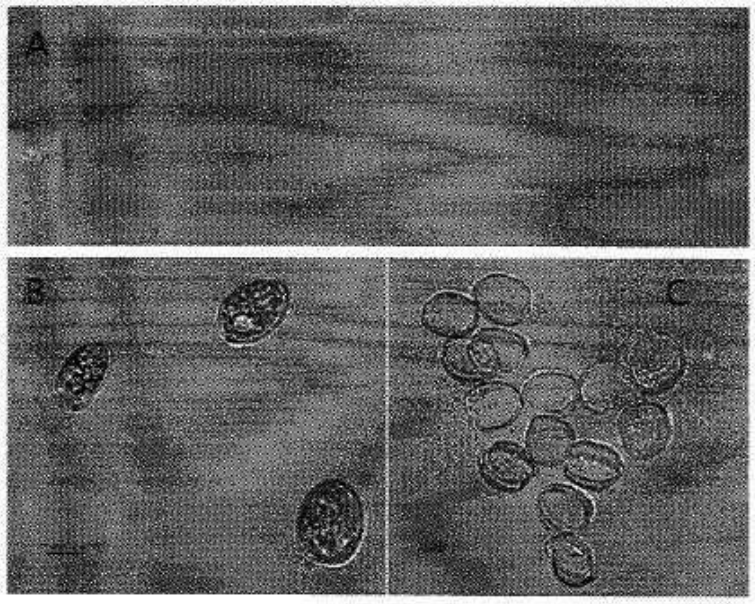
수탁일자 : 20110712

도면

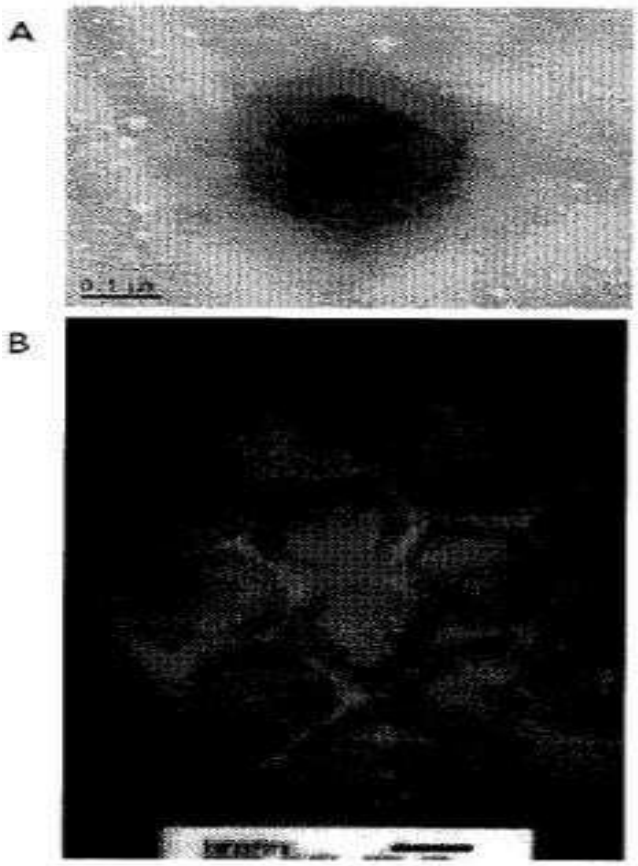
도면1


Sample water
0.8um membrane filter
Filtrate
Heat treatment
100C- 5min
control
contrast
Incubation at 20C
Up to 14 days
Host cell lysis !!
F/2
(control)
Lysed culture
0.2um filtered
Lysed culture
Incubation at 20C
Up to 14 days
1
2
3
Lysis
Lysis
No Lysis
Lysis
No Lysis
No Lysis
1. Virus ??
2. Bacteria
3. ?
3 cycles of Extinction Dilution Methods
Virus isolation

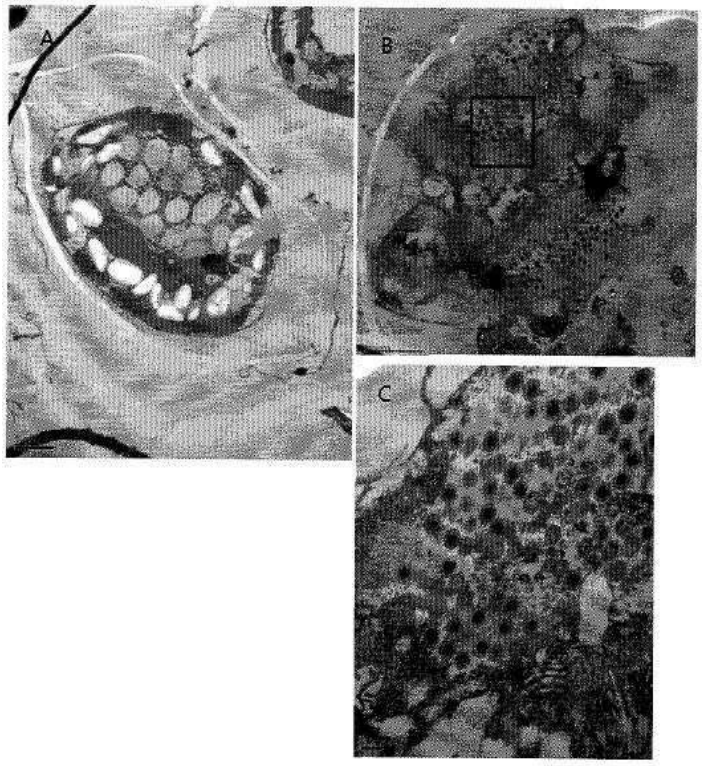
도면2



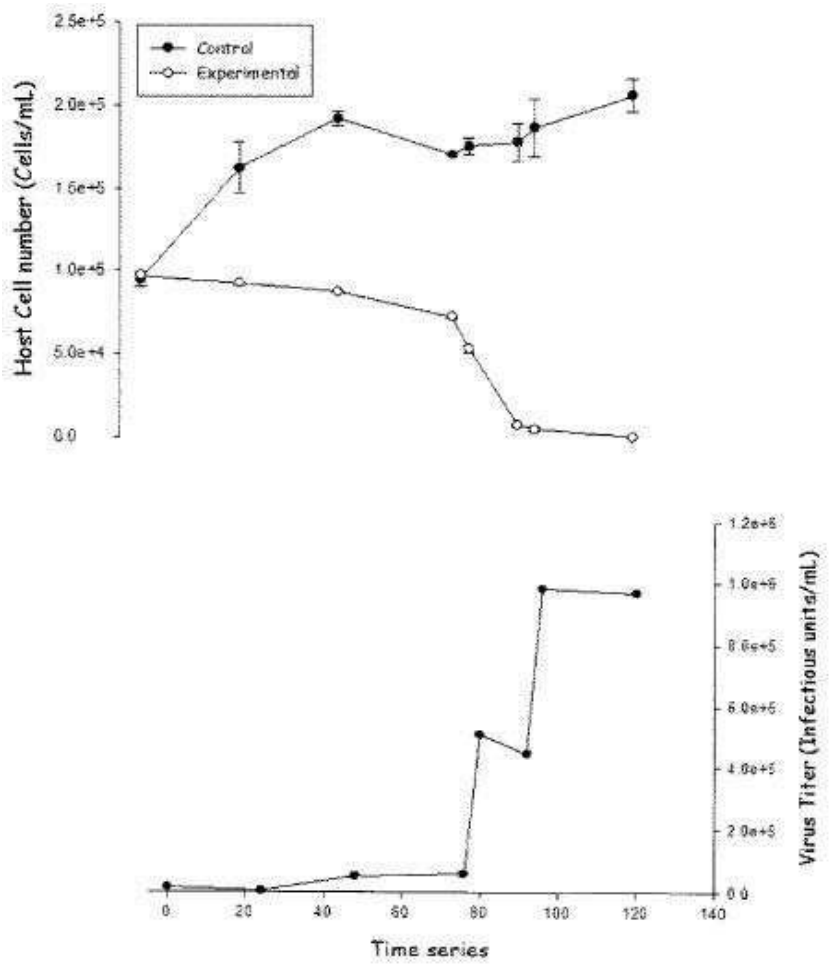
도면3



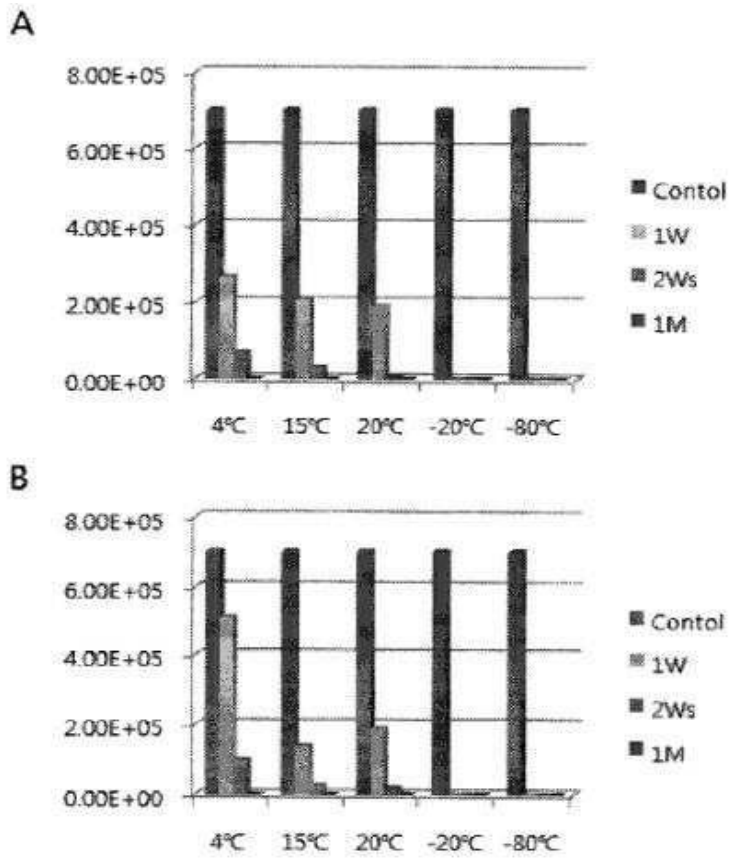
도면4



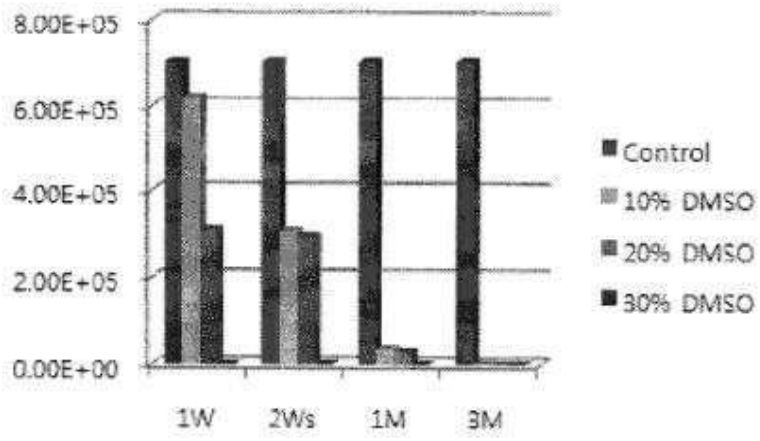
도면5


Control
Experimental
Host Cell number (Cells/mL)
2.5e+5
2.0e+5
1.5e+5
1.0e+5
5.0e+4
0.0
Virus Titer (Infectious units/mL)
1.2e+6
1.0e+6
8.0e+5
6.0e+5
4.0e+5
2.0e+5
0.0
0
20
40
60
80
100
120
140
Time series

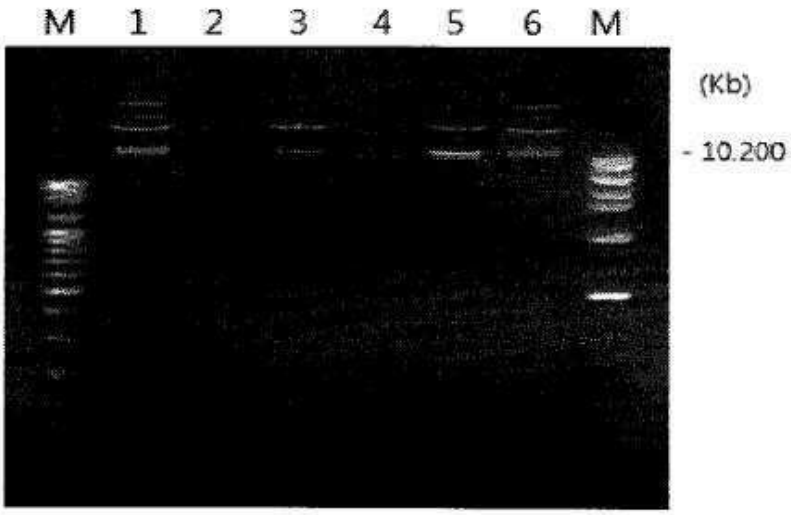
도면6


A
8.00E+05
6.00E+05
4.00E+05
2.00E+05
0.00E+00
4℃
15℃
20℃
-20℃
-80℃
Contol
1W
2Ws
1M
B
8.00E+05
6.00E+05
4.00E+05
2.00E+05
0.00E+00
4℃
15℃
20℃
-20℃
-80℃
Contol
1W
2Ws
1M

도면7


8.00E+05
6.00E+05
4.00E+05
2.00E+05
0.00E+00
1W
2Ws
1M
3M
Control
10% DMSO
20% DMSO
30% DMSO

도면8



도면9

