(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0178296
(43) 공개일자 2024년12월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/02 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/025 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-0079818
(22) 출원일자 2023년06월21일
심사청구일자 2023년06월21일
기술이전 희망 : 기술양도

전체 청구항 수 : 총 14 항

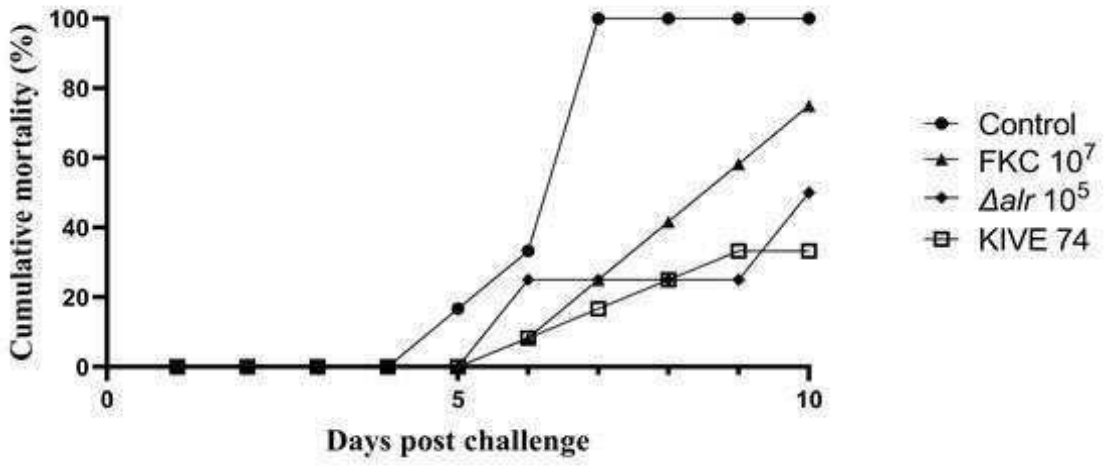
(71) 출원인
국립부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)
(72) 발명자
김기홍
부산광역시 남구 신선로 566, 308동 404호
이은경
부산광역시 부산진구 당감로 79, 20동 103호
(74) 대리인
위병갑

(54) 발명의 명칭 **불활화 및 약독화된 에드워드시엘라 피스시시다를 유효성분으로 포함하는 에드워드병 예방용 백신 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 약독화된 돌연변이 에드워드시엘라 피시시다 및 불활화 에드워드시엘라 피시시다를 혼합한 에드워드병 예방용 백신으로서, 구체적으로 포르말린으로 불활화 시킨 *E. piscicida* 및 alanine racemase (alr) 유전자를 knockout 시킨 약독화된 돌연변이 *E. piscicida*를 복합구성으로 넙치 크기에 따른 혼합 비율로 에드워드병 백신을 제작하였다. 본 발명의 백신 조성물이 에드워드병 예방에 우수한 것을 확인하였는 바, 이와 관련된 사업에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
A61K 2039/521 (2013.01)
A61K 2039/522 (2013.01)
A61K 2039/552 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711156483
과제번호 2021M3E5E6026104
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오위해평가원팀리노베이션사업
연구과제명 Edwardsiella piscicida LM 백신 상용화를 위한 LMO 위해성 평가
기 여 율 1/1
과제수행기관명 부경대학교
연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

불활화 및 약독화된 에드워드시엘라 피스시시다를 유효성분으로 포함하는 에드워드증(*Edwardsiellosis*) 예방용 백신 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 약독화된 에드워드시엘라 피스시시다는 알라닌라세마아제(alanine racemase, *alr*) 유전자의 ORF의 325bp가 결실된 것인, 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 약독화된 에드워드시엘라 피스시시다는 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 guide RNA(gRNA)에 의해 결실된 것인, 조성물.

청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 알라닌라세마아제(alanine racemase, *alr*) 유전자는 어류 병원균 유래인 것인, 조성물.

청구항 5

제 2항에 있어서,

상기 알라닌라세마아제(alanine racemase, *alr*) 유전자는 세포벽 구성 성분인 D-alanine의 단백질을 코딩하는 것인, 조성물.

청구항 6

제 2항에 있어서,

상기 어류는 넙치류, 가자미류, 농어류, 능성어, 감성돔, 참돔, 돌돔, 기타돔류, 민어, 방어, 복어류, 조피볼락, 기타볼락류, 고등어류, 노래미류, 송어류, 숭어류, 연어, 붕장어, 전갱이류, 전어, 참조기, 쥐치류, 철갑상어, 잉어류, 뱀장어류, 메기류, 쏘가리 및 열대어으로 이루어진 군에서 1이상 선택되는 것인, 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 어류은 넙치류인 것인, 조성물

청구항 8

제 4항에 있어서,

상기 병원균은 에드워드시엘라 피스시시다(*Edwardsiella piscicida*), 스트렙토코커스 이니애(*Streptococcus iniae*), 스트렙토코커스 파라우베리스(*S. parauberis*), 비브리오 할베이(*Vibrio harveyi*) 또는 비브리오 캄프벨리(*V. campbellii*)인 것인, 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 약독화된 에드워드시엘라 피스시시다 및 불활화 에드워드시엘라 피스시시다의 혼합 비율은 4 내지 6 : 6 내지 8인 것인, 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 혼합 비율은 어류의 크기에 따라 달라지는 것인, 조성물

청구항 11

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 누적 폐사률을 감소시키는 것인, 조성물.

청구항 12

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 혈청의 응집 역가를 증가시키는 것인, 조성물.

청구항 13

1) 에드워드시엘라 피스시시다를 불활화시키는 단계;

2) 에드워드시엘라 피스시시다의 알라닌라세마아제(alanine racemase, *alr*) 유전자를 결실시키는 단계;

3) 상기 1) 단계의 불활화된 에드워드시엘라 피스시시다와 2) 단계의 약독화된 에드워드시엘라 피스시시다를 혼합하는 단계;를 포함하는 에드워드병 예방용 백신 제조 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 3) 단계의 약독화된 에드워드시엘라 피스시시다 및 불활화 에드워드시엘라 피스시시다의 혼합 비율은 4 내지 6 : 6 내지 8인 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명의 목적은 불활화 및 약독화된 에드워드시엘라 피스시시다를 유효성분으로 포함하는 에드워드병 예방용 백신 조성물을 제공하는 것이다.

배 경 기 술

[0002] 에드워드시엘라 피스시시다(*Edwardsiella piscicida*) 감염에 의한 어류 에드워드시엘라병 (edwardsiellosis)은 주로 양식 넙치에 발생하여 높은 폐사를 일으키는 대표적 세균성 질병 중 하나이다.

[0003] 현재 에드워드병에 대한 상업적 백신은 포르말린을 이용해 세균을 불활화시킨 타입의 백신이 사용되고 있으나, 불활화백신의 한계인 낮은 방어효과 및 짧은 기간의 지속효과등 단점이 지적되어 왔으며, 따라서 이에 대한 개선된 백신의 필요성이 계속적으로 요구되어져 왔다.

[0004] 백신은 인공적으로 병원체의 항원성을 떨어뜨려 만든 것으로 숙주의 면역세포에서 병원체에 대한 항체를 생산하여 면역력을 높이고, 재감염에 대해 예방할 수 있다.

[0005] 불활화 백신의 단점을 극복하기 위한 방법의 하나로 에드워드시엘라 피스시시다의 병원성 유전자를 knockout 시켜 약독화된 세균을 만들고 이를 이용해 약독화 백신의 효과를 보고한 논문은 다수 있으나, 약독화 세균은 여전히 분열능을 유지하고 있기 때문에 약독화 세균을 충분한 방어효과를 얻을 수 있는 농도로 어류에 투여하였을 때 면역력이 약화된 개체들에서 병을 유발할 수 있다는 안전성 문제들이 계속적으로 단점으로 지적되어 왔다. 또한, 병원성 유전자의 제거로 인한 항원성 및 면역원성의 변화가 초래될 수 있고, 이로 인한 백신 효력의 저하도 문제점 중의 하나로 지적되어 왔다.

[0006] 병원성 유전자외에 약독화된 유전자를 knockout 시키는 방법은 배양배지에 knockout 대상 유전자의 산물을 첨가하여 약독화된 유전자 knockout 세균을 키울 수 있으며, 병원성 관련 유전자가 그대로 유지되어 있기 때문에 높은 면역원성을 지니고 있으며, 또한 숙주 생물에서 해당 약독화된 유전자 산물을 공급받지 못하기 때문에 적은 수의 분열 후에 사멸하는 장점이 있다. 그러나, 약독화된 물질을 배양배지에 첨가시켜야 하기 때문에 백신 생산 단가를 상승시킨다는 단점이 있다.

[0007] 에드워드시엘라 피스시시다의 유전자를 knockout 시키는 방법은 주로 상동 재조합(homologous recombination)을 기반으로 하는 대립유전자교환(allelic exchange)법이 사용 되어져 왔지만, 최근 CRISPR/Cas9을 이용한 유전자 knockout 기법이 개발되면서 좀 더 안전하고 제작에 소요되는 시간 및 노동력등을 절감할 수 있는 방법의 적용이 어병 세균에서도 필요한 시점에 와있다.

[0008] 따라서, 에드워드시엘라 피스시시다에 대한 효과적이고 경제적인 백신개발을 위해서는 각각의 백신 타입의 단점을 보완하면서 동시에 효과를 높일 수 있는 방법의 개발이 요구되며, 본 발명은 이러한 요구를 충족시킬 수 있는 새로운 백신법에 관한 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 불활화 및 약독화된 에드워드시엘라 피스시시다를 유효성분으로 포함하는 에드워드증(*Edwardsiellosis*)예방용 백신 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 아울러, 본 발명의 목적은 1) 에드워드시엘라 피스시시다를 불활화시키는 단계;

[0011] 2) 에드워드시엘라 피스시시다의 알라닌라세마아제(alanine racemase, *alr*) 유전자를 결실시키는 단계;

[0012] 3) 상기 1) 단계의 불활화된 에드워드시엘라 피스시시다와 2) 단계의 약독화된 에드워드시엘라 피스시시다를 혼합하는 단계;를 포함하는 에드워드병 예방용 백신 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 불활화 및 약독화된 에드워드시엘라 피스시시다를 유효성분으로 포함하는 에드워드증(*Edwardsiellosis*)예방용 백신 조성물을 제공한다.

[0014] 아울러, 본 발명은 1) 에드워드시엘라 피스시시다를 불활화시키는 단계;

[0015] 2) 에드워드시엘라 피스시시다의 알라닌라세마아제(alanine racemase, *alr*) 유전자를 결실시키는 단계;

[0016] 3) 상기 1) 단계의 불활화된 에드워드시엘라 피스시시다와 2) 단계의 약독화된 에드워드시엘라 피스시시다를 혼합하는 단계;를 포함하는 에드워드병 예방용 백신 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 약독화된 돌연변이 에드워드시엘라 피시시다 및 불활화 에드워드시엘라 피시시다를 혼합한 에드워드병 예방용 백신으로서, 구체적으로 포르말린으로 불활화 시킨 *E. piscicida* 및 alanine racemase (alr) 유전자를 knockout 시킨 약독화된 돌연변이 *E. piscicida*를 복합구성으로 넙치 크기에 따른 혼합 비율로 에드워드병 백신을 제작하였다. 본 발명의 백신 조성물이 에드워드병 예방에 우수한 것을 확인하였는 바, 이와 관련된 사업에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 1st vector인 “pCas9-lambda"의 설계도를 나타낸 도이다.

도 2는 2nd vector인 "psgRNA-alr325"의 설계도를 나타낸 도이다.

도 3은 평균 체장 14.3 cm, 평균 체중 17.6 g의 넙치에 각 실험 그룹을 접종한 후, 야생형 에드워드균(wild type *Edwardsiella piscicida*) 투여 결과, 각 실험 그룹의 예방 효과를 누적 폐사 그래프로 나타낸 도이다.

(KIVE74: 불활화 *E. piscicida* 1 × 10^7 cfu, 약독화된 돌연변이 *E. piscicida* 1 × 10^4 cfu을 혼합하여 백신한

그룹, FKC 10^7:단독 불활화 *E. piscicida* 1 × 10^7 cfu로 백신한 그룹, *Δalr* 10^5: 단독 약독화된 돌연변이 *E. piscicida* 1 × 10^5 cfu로 백신한 그룹)

도 4는 평균 체장 14.3 cm, 평균 체중 17.6 g의 넙치에 각 실험 그룹을 접종한 후, 야생형 에드워드균(wild type *Edwardsiella piscicida*) 투여 결과, 각 실험 그룹의 혈청 응집 역가를 나타낸 도이다.

도 5는 평균 체장 7.6 cm, 평균 체중 3.4 g의 넙치에 각 실험 그룹을 접종한 후, 야생형 에드워드균(wild type *Edwardsiella piscicida*) 투여 결과, 각 실험 그룹의 예방 효과를 누적 폐사 그래프로 나타낸 도이다.

(KIVE65: 불활화 *E. piscicida* 1 × 10^6 cfu, 약독화된 돌연변이 E. piscicida를 1 × 10^5 cfu을 혼합하여 백신한 그룹, FKC 10^6:단독 불활화 *E. piscicida* 1 × 10^6 cfu로 백신한 그룹)

도 6은 평균 체장 16.3 cm, 평균 체중 42 g의 넙치에 각 실험 그룹을 접종한 후, 야생형 에드워드균(wild type *Edwardsiella piscicida*) 투여 결과, 각 실험 그룹의 예방 효과를 누적 폐사 그래프로 나타낸 도이다.

(KIVE86:불활화 *E. piscicida* 1 ×10^8 cfu, 약독화된 돌연변이 *E. piscicida*를 1 ×10^6 cfu을 혼합하여 백신한 그룹, FKC 10^8: 불활화 *E. piscicida* 1 × 10^8 cfu로 백신한 그룹)

도 7은 평균 체장 16.3 cm, 평균 체중 42 g의 넙치에 각 실험 그룹을 접종한 후, 야생형 에드워드균(wild type *Edwardsiella piscicida*) 투여 결과, 각 실험 그룹의 혈청 응집 역가를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 상세히 설명한다. 이하의 설명에 있어, 당업자에게 주지 저명한 기술에 대해서는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다.

[0020] 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0021] 본 발명은 불활화 및 약독화된 에드워드시엘라 피스시시다를 유효성분으로 포함하는 에드워드증(*Edwardsiellosis*) 예방용 백신 조성물을 제공한다.

[0022] 일 실시예에 있어서, 상기 약독화된 에드워드시엘라 피스시시다는 알라닌라세마아제(alanine racemase, *alr*) 유전자가 결실된 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 일 실시예에 있어서, 상기 약독화된 에드워드시엘라 피스시시다는 ORF의 325bp가 결실된 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 일 실시예에 있어서, 상기 알라닌라세마아제(alanine racemase, *alr*) 유전자는 어류 병원균 유래인 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 일 실시예에 있어서, 상기 알라닌라세마아제(alanine racemase, *alr*) 유전자는 세포벽 구성 성분인 D-alanine의 단백질을 코딩하는 것일 수 있다.

[0026] 일 실시예에 있어서, 상기 어류는 넙치류, 가자미류, 농어류, 능성어, 감성돔, 참돔, 돌돔, 기타돔류, 민어, 방어, 복어류, 조피볼락, 기타볼락류, 고등어류, 노래미류, 송어류, 숭어류, 연어, 붕장어, 전갱이류, 전어, 참조기, 쥐치류, 철갑상어, 잉어류, 뱀장어류, 메기류, 쏘가리 및 열대어으로 이루어진 군에서 1이상 선택되는 것으나, 바람직하게는 넙치류일 수도 있다.

[0027] 일 실시예에 있어서, 상기 병원균은 에드워드시엘라 피스시시다(*Edwardsiella piscicida*), 스트렙토코커스 이니애(*Streptococcus iniae*), 스트렙토코커스 파라우베리스(*S. parauberis*), 비브리오 할베이(*Vibrio harveyi*) 또는 비브리오 캄프벨리(*V. campbellii*)인 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 일 실시예에 있어서, 상기 약독화된 에드워드시엘라 피스시시다 및 불활화 에드워드시엘라 피스시시다의 혼합 비율은 4 내지 6 : 6 내지 8인 것이나, 바람직하게는 4:7, 5:6, 6:8일 수도 있다.

[0029] 일 실시예에 있어서, 상기 혼합 비율은 어류의 크기에 따라 달라지는 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 누적 폐사률을 감소시키는 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 혈청의 응집 역가를 증가시키는 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 일 구현예에 있어서, 본 발명은 1) 에드워드시엘라 피스시시다를 불활화시키는 단계;

[0033] 2) 에드워드시엘라 피스시시다의 알라닌라세마아제(alanine racemase, *alr*) 유전자를 결실시키는 단계;

[0034] 3) 상기 1) 단계의 불활화된 에드워드시엘라 피스시시다와 2) 단계의 약독화된 에드워드시엘라 피스시시다를 혼합하는 단계;를 포함하는 에드워드병 예방용 백신 제조 방법을 제공한다.

[0035] 일 실시예에 있어서, 상기 3) 단계의 약독화된 에드워드시엘라 피스시시다 및 불활화 에드워드시엘라 피스시시다의 혼합 비율은 4 내지 6 : 6 내지 8인 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[0036] 이하 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0037] **제조예 1. 에드워드시엘라 피스시시다(*Edwardsiella piscicida*)의 알라닌라세마아제(alanine racemase, *alr*) 유전자 클로닝 및 벡터 제작**

[0038] 에드워드시엘라 피스시시다의 alanine racemase(*alr*) 유전자 클로닝 및 벡터 제작하기 위해, 에드워드시엘라 피스시시다의 약독화된 돌연변이를 제작하였다.

[0039] 우선, 대표적인 약독화된 유전자인 alanine racemase (*alr*)를 목적 유전자로 선정하였으며, 약독화된 유전자인 alanine racemase (*alr*) 유전자는 세포벽의 필수 구성 성분인 D-alanine을 합성하는데에 필요한 단백질을 코딩하고 있으며, *alr* 유전자가 에드워드균(*E. pisicicida*)에서 결실된다면 결실된 세균은 D-alanine을 합성하지 못하므로 결과적으로 *alr* 유전자가 결실된 세균은 세포벽을 합성하지 못하고 결국 사멸하게 된다.

[0040] 본 발명의 에드워드시엘라 피스시시다는 우리나라 남해의 죽은 넙치에서 발견된 야생형 에드워드균(wild type *Edwardsiella piscicida*) NH 균주를 이용하였으며 *alr* 유전자 클로닝을 위해서 National Center for Biotechnology Inferomation (NCBI)에 등록된 *E. pisicicida*의 전체 게놈 서열(whole genome sequence)를 참고하였다. 이를 바탕으로 에드워드시엘라 피스시시다 NH 균주의 *alr* 유전자의 전체 시퀀스(full sequence)를 확인하기 위해 해당 유전자의 앞과 뒤쪽에 각각 binding 하는 “alr-up-F”, “alr-down-R” 프라이머(primer)를 하기 표 1과 같이 설계하였다.

표 1

[0041]

Primer name	Sequence (5’-3’)
alr-up-F	GCACGCTCGGCCCGTGGGAC
alr-down-R	AGATCTATCACGCGGCCCGCT

[0042] Alanine racemase(*alr*)의 염기서열을 확인하기 위해, 야생형 에드워드균(wild type *Edwardsiella piscicida*) NH 균주의 유전체 DNA(genomic DNA)를 분리하였다.

[0043] 야생형 에드워드균(wild type *Edwardsiella piscicida*) NH 균주를 1.5% NaCl이 포함된 Tryptic soy (TS, Difco) broth에서 배양 온도 27℃로 하여 24시간 동안 배양하였고 해당 균액을 3000rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 세균 펠렛을 수거하였다. 유전체 DNA(genomic DNA) 분리를 위해 GeneAll 사의 Exgene Clinic SV mini kit를 이용하였고 제조사의 메뉴얼(manual)을 따랐다.

[0044] 제조사 메뉴얼에 따르면, 세균 pellet을 CL buffer로 현탁 하였고 단백질분해효소 K(proteinase K)를 첨가한 후 56 ℃에서 15 분간 반응시켰다. 그 후에 RNase 용액(RNase Asolution)을 처리하였고 BL buffer를 CL buffer와 동량으로 넣어준 후 70 ℃에서 10 분간 반응하였다. 반응 후 고순도 알코올(absolute ethanol)을 첨가하여 볼텍

싱(vortexing) 후 DNA 바인딩 컬럼(DNA binding column)에 내리고 washing 및 용출(elution) 하였다. 분리한 유전체 DNA(genomic DNA)를 template로 표 1에서 설계한 primer를 이용하여 PCR 하였다. PCR 반응 조건은 95℃ 3분 반응 후 95℃ 30초, 58℃ 30초, 72℃ 30초 조건에서 30 cycle 실시 후 72℃에서 2분을 마지막으로 반응하였다. 해당 PCR 산물은 0.7% agarose gel에 전기영동하여 밴드를 확인하였고, gel에서 PCR product를 회수하여 시퀀싱하였다. 시퀀싱 결과 야생형 에드워드균(wild type *Edwardsiella piscicida*) NH 균주의 *alr* 염기서열(서열번호 1)을 파악하였으며, 이를 토대로 *alr* 유전자의 ORF를 cloning 하였다.

[0045] 또한, 알라닌라세마아제(alanine racemase) 유전자 ORF cloning을 위해서 시퀀싱한 결과를 토대로 primer를 하기 표 2와 같이 설계하였다(“alr-F”, “alr-R”).

표 2

[0046]

Primer name	Sequence (5’-3’)
alr-F	ATGAAAGCGGCAACCGCCAT
alr-R	CTACGCCTCTTCGCCGATATAT

[0047] 위에서 분리한 유전체 DNA(genomic DNA)를 template으로 제작한 primer를 이용하여 PCR 하였으며 PCR 반응 조건은 95℃ 3분 반응 후 95℃ 30초, 58℃ 30초, 72℃ 30초 조건에서 30 cycle 실시 후 72℃에서 2분을 마지막으로 반응을 마무리 하였다. 해당 PCR 산물은 0.7% agarose gel에 전기영동하여 밴드를 확인하였고, gel에서 PCR product를 회수한 후 Promega사의 pGEM T-easy vector에 삽입하여, *E. piscicida*의 *alr* 유전자를 cloning한 벡터를 제작하였다.

[0048] **제조예 2. 에드워드시엘라 피스시시다(*Edwardsiella piscicida*)의 알라닌라세마아제(alanine racemase, *alr*) 유전자 타겟팅 CRISPR/Cas9 시스템 제작**

[0049] 본 발명은 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 에드워드시엘라 피스시시다의 alanine racemase(*alr*) 유전자를 knock out 하였다.

[0050] CRISPR/Cas9 시스템을 에드워드시엘라 피스시시다(Edwardsiella piscicida)에 도입하기 위해 two vector system을 이용하였으며 각 vector를 1st vector, 2nd vector라 하였다.

[0051] 1st vector에는 엔도뉴클레아제(endonuclease)인 Cas9과 CRISPR/Cas9에 의한 유전자 편집 효율을 증가시키기 위한 λ-red system을 포함하였다. 먼저 “pCas9-J23109”를 template로 하여 promoter J23109에 의해 발현되는 Cas9 유전자를 PCR로 증폭하였다. λ-red system을 증폭하기 위해서는 “pKDsgRNA-p15”를 template로 하여 증폭하였다. 또한 1st vector의 selection marker로 kanamycin을 사용하였고, 이를 위해 “pET-28 a (+)”에서 kanamycin 유전자를 해당 promoter sequence와 같이 증폭하였다. 이때 세 fragment를 각각 15 bp가 상동하게 PCR 하였고, 이를 Elpisbio사의 Overlap Cloner DNA Cloning Kit를 이용하여 상동하는 부분을 이어지게 만들어 vector를 제작하였다. 해당 1st vector는 “pCas9-lambda”라고 명명하였다(도 1).

[0052] pCas9-lambda 제작을 위한 프라이머는 하기 표 3에 나열하여 나타내었으며, 표 3에 Primer name의 spCas9-F의 "CGTCTTGAGTCCAACC", spCas9-R의 "CGAGTGAGCTAG", KanR/Cas9-OC-F의 "ATCTTGTTCAATCA", KanR/Cas9-OC-R의 "GACGAGTTCTTCTG"은 오버랩핑 시퀀스(overlapping sequence)을 나타낸 것이다.

표 3

[0053]

Primer name	Sequence (5’-3’)
spCas9-F	CGTCTTGAGTCCAACCCCTGAAGTCAGCCCCATACG
spCas9-R	CGAGTGAGCTAGCTAGGTATAAACGCAGAAAGGCCC
lambda-F	TAGCTAGCTCACTCGGTCGC
lambda-R	GGTTGGACTCAAGACGATAGG
NeoR/kanR-F	ATGATTGAACAAGATGGATTGCACG
NeoR/kanR-R	TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAG
KanR/Cas9-OC-F	ATCTTGTTCAATCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATG
KanR/Cas9-OC-R	GACGAGTTCTTCTGATAATTTGATATCGAGCTCGCTTGG

[0054] 2nd vector는 알라인 라세마제(alanine racemase) 유전자를 타겟할 수 있는 20 bp의 guide RNA(gRNA)를 포함하는 single guide RNA(sgRNA)와, *alr* 유전자 ORF를 325 bp 제거시킬 수 있도록 상동성 암(homologous arm)을 포함하였다. 20 bp의 gRNA를 설계하기 위해 CRISPR RGEN tools의 Cas-Designer에서 PAM 시퀀스를 분석하였고, “5‘-GGGGTGGTGGCGATAGGCTA-3’”를 gRNA(서열번호 3)로 선정하였다. 해당 gRNA 시퀀스를 포함할 수 있도록 sgRNA를 “pKDsgRNA-p15”를 template으로 증폭하였고 이를 Promega사의 pGEM T-easy vector에 cloning 하였다. 위에서 설계한 sgRNA를 발현하기 위해서 promoter J23119를 이용하였다. Promoter J23119 sequence는 primer를 이용하여 합성하였고, 합성된 product 또한 Promega사의 pGEM T-easy vector에 cloning 하였다.

[0055] 한편, 상동성 암(Homologous arm) 제작을 위해서는 제조예 1에서 분리한 야생형 에드워드균(wild type *Edwardsiella piscicida*) NH 균주의 genomic DNA에서 alanine racemase ORF에서 제거할 부분 325 bp를 기준으로 업스트림(upstream), 다운스트림(downstream) 각각 500 bp를 증폭하였다. 이때 업스트림(upstream) 500bp를 left arm, 다운스트림(downstream) 500 bp를 right arm으로 칭하였으며, overlapping PCR로 두 fragment를 이어붙였고 이를 Promega사의 pGEM T-easy vector에 cloning 하였다. 그리고 promoter J23119와 sgRNA, homologous arm을 cloning한 각 벡터를 Elpisbio사의 Overlap Cloner DNA Cloning Kit를 이용하여 이어붙여 2nd vector를 제작하였다. 해당 2nd vector는 psgRNA-alr325라고 명명하였다(도 2).

[0056] psgRNA-alr325 제작을 위한 프라이머는 하기 표 4에 나타내었으며, 표 4에 Primer name의 Pj23119-F의 "TTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGC", Pj23119-R의 "GCTAGCATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAA", pKD-R의 "TAGCTGTCAAGTCGACAAAC", pJ23119-OC-F의 "GTTTGTCGAC", pJ23119-OC-R의 "TATCGCCACCACCCC", sgRNA-OC-F의 "GGGGTGGTGGCGATAGGCTA", psgRNA-OC-F의 "ACGAAAGGGCCTCGTG", 325-Larm-F의 "CTTACTCGAGTCTAGAC", 325-Rarm-F의 "CACCGAGCAGCAGCTGGCCT", 325-Rarm-R의 "ACGAGGCCCTTTCGT" 부분은 오버랩핑 시퀀스(overlapping sequence)을 나타낸 것이다.

표 4

[0057]

Primer name	Sequence (5’-3’)
Pj23119-F	TTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGC
Pj23119-R	GCTAGCATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAA
pKD-F	GCTCACTGACTCGCTGTGATAGAGATACTGAGCACC
pKD-R	TAGCTGTCAAGTCGACAAACAACGGTTGGACTCAAGACG
pJ23119-OC-F	GTTTGTCGACTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAAT
pJ23119-OC-R	TATCGCCACCACCCCGCTAGCATTATACCTAGGACTGAG
sgRNA-OC-F	GGGGTGGTGGCGATAGGCTAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
sgRNA-OC-R	GTCTAGACTCGAGTAAGGATCCAG
psgRNA-OC-F	ACGAAAGGGCCTCGTGAATCACTAGTGAATTCGCGGC
sgRNA-OC-R	GTCTAGACTCGAGTAAGGATCCAG
325-Larm-F	CTTACTCGAGTCTAGACCCGCGCTCTGCGACATAAC
325-Larm-R	AGGCCAGCTGCTGCTCGGT
325-Rarm-F	CACCGAGCAGCAGCTGGCCTGGGCACGCCGGTGCTGATC
325-Rarm-R	ACGAGGCCCTTTCGTCCGCCATCGACGCGACGC

[0058] **제조예 3. 제작한 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 에드워드시엘라 피스시시다(*Edwardsiella piscicida*)의 알라닌 라세마아제(alanine racemase) 유전자 knockout**

[0059] 제조예 2에서 제작한 1st, 2nd vector를 에드워드시엘라 피스시시다 내에 삽입하여 CRISPR/Cas9 시스템을 유도하기 위해 에드워드시엘라 피스시시다를 electro-competent cell을 제작하였다. 야생형 에드워드균(wild type *E. piscicida*) NH 균주를 제조예 1과 같이 배양한 후 1/100의 부피로 계대 배양하였다. 600nm에서 Optical density가 0.5-0.6이 되었을 때 3000rpm에서 10분간 원심분리하였고 얻어진 세균 펠렛을 10% glycerol로 3번 워싱, 최종적으로 10% glycerol에 현탁한 후 100㎕씩 분주하여 -80℃에서 보관하였다.

[0060] 에드워드시엘라 피스시시다에서 CRISPR/Cas9 시스템을 발현하기 위해 먼저 1st vector 100ng과 electro-competent cell을 섞은 후 0.2cm cuvette에 넣고 Bio-rad사의 전기청공기(electroporator)에서 2.5 kV, 200 Ω, 5 ms의 조건으로 전기청공기(electroporator) 하였다. 형질 전환된 균주는 카나마이신(kanamycin) 내성과

colony PCR을 통해 확인하였으며 확인된 균주는 다시 electro-competent cell로 제작하였다. 카나마이신(Kanamycin)이 포함된 1.5% NaCl TS broth에서 overnight 동안 배양한 후 1/100 부피로 계대 배양하였고, 600nm에서 Optical density가 0.1이 되었을 때 최종 농도가 0.1%가 되게 L-arabinose를 첨가하고 추가 배양하였으며 광학밀도(Optical density)가 0.5-0.6이 되었을 때 이를 원심분리하고 electro-competent cell을 제작하였다. 이렇게 제작된 1st vector가 삽입된 electro-competent cell에 2nd vector를 위와 같은 조건으로 전기천공법(electroporation) 하였다. 이때 D-alanine을 넣어주어 알라닌라세마아제(alanine racemase) 유전자가 knock out 된 clone이 사멸하지 않고 도말한 배지에 나타나게 하였다.

[0061] **제조예 4. 알라닌라세마아제(alanine racemase, *alr*) 유전자 knockout 에드워드시엘라 피스시시다(*Edwardsiella piscicida*) 확인 및 성장특성**

[0062] CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 에드워드시엘라 피스시시다(*Edwardsiella piscicida*)의 아알라닌라세마아제(alanine racemase) 유전자 ORF 중 325 bp를 knock out 하였고 이를 *E. piscicida* delta *alr*325라 하였다(서열번호 2). *alr* 유전자가 제거되면 세균 내에 D-alanine이 합성되지 못하고 이는 곧 세포벽 합성 저해로 이어져 세균이 복제되지 못한다. 이에 *E. piscicida* delta *alr*325를 배양하기 위해서는 배양 배지에 D-alanine을 필수적으로 첨가해주어야 한다. 이러한 원리를 이용한 negative selection으로 *E. piscicida*에서 *alr* 유전자가 kncok out 되었는지, *alr* 유전자가 발현되지 못해 세균이 성장하지 못하는 약독화된 돌연변이가 되었는지 확인하였다.

[0063] 1.5% NaCl이 첨가된 TS에 최종 농도 100㎍/ml이 되게끔 D-alanine을 첨가한 agar와 첨가하지 않은 agar를 준비하였고, *alr* 유전자가 부분 결손된 에드워드시엘라 피스시시다를 각 배지에 도말한 후 27℃에서 24시간 배양하였다.

[0064] 배양 결과, D-alanine을 첨가한 배양 배지에서만 *E. piscicida* delta *alr*325가 배양 되었다. 해당 균주를 액체배지에서도 위와 같은 조건에서 실험한 결과에서도 D-alanine을 첨가한 배양 배지에서만 *E. piscicida* delta *alr*325가 배양 되었다.

[0065] 또한, *Edwardsiella piscicida* delta *alr*325의 *alr* 유전자가 설계대로 knock out 되었는지 sequencing을 통해 확인하였다. *E. piscicida* delta *alr*325를 1.5% NaCl와 최종 농도 50㎛M이 첨가된 TS broth에서 27℃, 24시간 동안 배양하였다. 배양한 균액에서 유전체 DNA(genomic DNA)를 제조예 1과 같은 방법으로 분리하였고, 이를 template으로 *alr* 유전자를 PCR 하였다. PCR에 사용된 primer는 제조예 1에서 제작한 *alr*의 5'과 3' 바깥쪽에 binding 할 수 있는 “alr-up-F”, “alr-down-R”을 사용하였으며 반응 조건은 95℃ 3분 후 95℃ 30초, 58℃ 30초, 72℃ 30초 조건에서 30 cycle 실시 후 72℃에서 2분을 마지막으로 반응하였다.

[0066] 해당 PCR 산물은 0.7% agarose gel에 전기영동하여 밴드를 확인하였고, gel에서 PCR product를 회수하여 시퀀싱하였다. 시퀀싱 결과 *alr* 유전자 ORF 중 325 bp가 설계대로 제거된 것을 확인하였다.

[0067] **제조예 5. 에드워드시엘라 피스시시다(*Edwardsiella piscicida*) 불활화 세균 제작**

[0068] 야생형 에드워드균(wild type *Edwardsiella piscicida*) NH 균주를 1.5% NaC이 포함된 Tryptic soy (TS) broth에서 배양 온도 27℃로 하여 24시간 동안 배양하였다. 해당 균액에 최종 농도가 0.1%가 되게끔 formalin을 첨가하였고 27℃에서 24시간 동안 추가 배양하였다. 후에 3000 rpm에서 10 분동안 원심 분리하여 세균 펠렛을 모아주었고 이를 PBS 워싱하였다. 본 과정을 총 3번 반복하여 충분히 포르말린(formalin) 성분을 없애주었고, PBS로 최종 현탁한 후에 1.5% NaCl이 포함된 TS agar 에 도말하여 불활화되었는지 확인하였다. 불활화 확인이 끝난 *E. piscicida* 불활화세균은 사용까지 4 ℃ sample freezer에서 보관하였다.

[0069] **실시예 1. 에드워드시엘라 피스시시다(*Edwardsiella piscicida*) 불활화세균과 약독화된 *E. piscicida* delta *alr*325를 혼합한 백신의 효과 검증**

[0070] 본 발명의 에드워드시엘라 피스시시다 불활화세균과 약독화된 돌연변이를 혼합한 백신의 효과 검증을 확인하기 위해, 약독화된 돌연변이 및 에드워드시엘라 피스시시다 불활화세균를 혼합한 에드워드병 예방용 백신의 효과를 확인하고, 단독 약독화된 돌연변이 백신 또는 단독 불활화세균 백신으로 백신하였을 누적 폐사 감소를 통하여 방어 효과를 비교하였으며, 또한, 혈청 응집가 역가 측정을 통하여 숙주 내 면역 반응 유도 수준을 확인하였다.

[0071] 평균 체장 14.3 cm, 평균 체중 17.6 g의 양식된 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)를 실험 수조에 15 마리씩 분주하고, PBS를 주사한 대조구 (Control), 불활화 *E. piscicida* 1×10^7 cfu로 백신한 그룹 (FKC 10^7), 약독화된

돌연변이 E. piscicida 1 × 10^5 cfu로 백신한 그룹 (*Δalr* 10^5), 불활화 *E. piscicida* 1 × 10^7 cfu, 약독화된 돌연변이 *E. piscicida* 1 × 10^4 cfu을 혼합하여 백신한 그룹 (KIVE 74)으로 나누어 복강 주사를 통해 백신을 접종하였다. 백신 4주 기간 동안에는 수온을 20 ℃로 설정하였다.

[0072] 백신 접종 4주 후, 각 그룹에서 5 마리를 무작위적으로 골라 혈액을 채취하였고 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 혈청 응집가 시험을 수행하여 혈청 응집 역가를 측정하였다. 그리고 남은 넙치에 wild type *E. piscicida* 2 × 10^5 cfu을 복강 주사를 통해 공격 접종 하였고 11 일 동안 폐사를 확인하였다. 공격 접종 시기에는 22 ℃로 온도를 상승시켜 유지하였다.

[0073] 1-1. 에드워드시엘라 피스시시다(*Edwardsiella piscicida*) 불활화세균과 *E. piscicida* delta *alr*325를 혼합한 백신 방어의 효과

[0074] 11 일 동안의 폐사 확인 결과, 대조구에서 100 % 폐사가 일어났으며, 약독화된 돌연변이 Edwardsiella piscicida 및 불활화 E. piscicida를 혼합하여 백신했던 KIVE 74 그룹에서 누적 폐사율 33 %, 대조구와의 상대생존율 67 %로 가장 높은 백신 효과를 확인하였다.

[0075] 또한, 단독 약독화된 돌연변이 *E. piscicida*를 1 × 10^5 cfu로 백신했던 그룹에서 50 %의 누적 폐사, 불활화 E. piscicia를 1 × 10^7 cfu로 백신 했던 그룹에서 75 %의 누적폐사를 보였으며, 100배 낮은 농도의 약독화된 돌연변이 *E. piscicida*를 백신하였던 그룹에서 더 높은 방어효과를 확인하였다.

[0076] 따라서, 약독화된 돌연변이 *E. piscicida* 및 불활화 *E. piscicida*를 혼합하여 백신하였을 때 가장 우수한 백신 효과를 확인하였다(도 3).

[0077] 1-2. 에드워드시엘라 피스시시다(*Edwardsiella piscicida*) 불활화세균과 *E. piscicida* delta *alr*325를 혼합한 백신의 혈청 응집 역가

[0078] 백신 접종 4주 후, 각 그룹에서 5 마리를 무작위적으로 골라 혈액을 채취하였고 혈청을 분리하였던 혈청 응집에 대한 시험 결과는 상기 1-1의 누적 폐사 결과와 상응하게 KIVE 74에서 가장 높은 혈청 응집 역가를 확인하였다 (도 4).

[0079] **실시예 2. 에드워드시엘라 피스시시다(*Edwardsiella piscicida*) 불활화 세균 및 약독화된 *E. piscicida* delta *alr*325 혼합백신의 에드워드병 방어에 대한 시너지 효과 확인**

[0080] 본 발명의 에드워드시엘라 피스시시다(*Edwardsiella piscicida*) 불활화세균과 *E. piscicida* delta *alr*325를 혼합한 백신의 방어 효과를 누적 폐사 감소 효과로 알아 보았다.

[0081] 실시예 1과 다른 크기인 평균 체장 7.6 cm, 평균 체중 3.4 g의 양식된 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 실험 수조에 15 마리씩 분주하고 PBS를 주사한 대조구 (Control), 불활화 E. piscicida 1 × 10^6 cfu로 백신한 그룹 (FKC 10^6), 불활화 E. piscicida 1 × 10^6 cfu, 약독화된 돌연변이 *E. piscicida*를 1 × 10^5 cfu을 혼합하여 백신한 그룹 (KIVE 65)으로 나누어 복강 주사를 통해 백신을 접종하였다. 백신 기간 동안에는 수온을 20 ℃로 설정하였다.

[0082] 백신 접종 3주 후 wild type *E. piscicida* 5 × 10^2 cfu을 복강 주사를 통해 공격 접종하였고 6 일 동안 폐사를 확인하였으며 수온을 22 ℃로 상승시켜 유지하였다.

[0083] 2-1. *Edwardsiella piscicida* 불활화세균과 약독화된 *E. piscicida* delta *alr*325를 혼합하여 백신하였을 시, 폐사 감소 효과 확인

[0084] 누적 폐사 확인 결과, 대조구에서 90 %의 폐사가 일어났으며, 약독화된 돌연변이 *Edwardsiella piscicida*(*E. piscicida* delta *alr*325)와 불활화 *E. piscicida* 균주를 혼합하여 백신했던 KIVE 65 그룹에서 누적 폐사율 30 %, 대조구와의 상대생존율 67 %로 가장 우수한 방어 효과를 확인하였다(도 5).

[0085] 한편, 불활화 *E. piscicida*를 10^6 cfu로 백신 했던 그룹에서는 대조구와 같은 90 %의 높은 누적 폐사를 확인하였다. 이는 같은 농도의 불활화 *E. piscicida*를 사용하였지만 약독화된 돌연변이 E. pisicicida를 혼합한 백신을 접종하였을 때 백신 효과가 증가됨을 시사한다(도 5).

[0086] **실시예 3. 에드워드시엘라 피스시시다(*Edwardsiella piscicida*) 불활화세균과 약독화된 *E. piscicida* delta *alr*325를 혼합한 백신의 효과 검증 2**

[0087] 본 발명의 에드워드시엘라 피스시시다 불활화세균과 약독화된 돌연변이(*E. piscicida* delta *alr*325)를 혼합한 백신의 효과 검증을 확인하기 위해, 약독화된 돌연변이(*E. piscicida* delta *alr*325) 및 에드워드시엘라 피스시시다(*Edwardsiella piscicida*) 불활화세균를 혼합한 에드워드병 예방용 백신의 효과를 확인하고, 단독 불활화 *E. piscicida* 1 × 10^8 cfu로 백신한 그룹 (FKC 10^8)의 실시예 1 또는 2와 다른 크기에 넙치에 누적 폐사 및 혈청 응집 역가를 비교하여 확인 하였다.

[0088] 평균 체장 16.3 cm, 평균 체중 42 g의 양식된 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 실험 수조에 분주하고 PBS를 주사한 대조구 (Control), 불활화 E. piscicida 1 × 10^8 cfu로 백신한 그룹 (FKC 10^8). 불활화 *E. piscicida* 1 ×10^8 cfu, 약독화된 돌연변이 *E. piscicida*를 1 ×10^6 cfu을 혼합하여 백신한 그룹 (KIV 86)으로 나누어 복강 주사를 통해 백신을 접종하였다. 백신 기간 동안에는 수온을 20 ℃로 설정하였다.

[0089] 백신 접종 4주 후, 각 그룹에서 5마리를 무작위적으로 골라 혈액을 채취하였고 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 혈청 응집 시험을 수행하여 혈청 응집 역가를 측정하였다.

[0090] 그 후, 남은 넙치에 wild type *E. piscicida* 1 × 10^4 cfu을 복강 주사를 통해 공격 접종 하였고 18 일 동안 폐사를 확인하였다. 공격 접종 시기에는 22 ℃로 온도를 상승시켜 유지하였다.

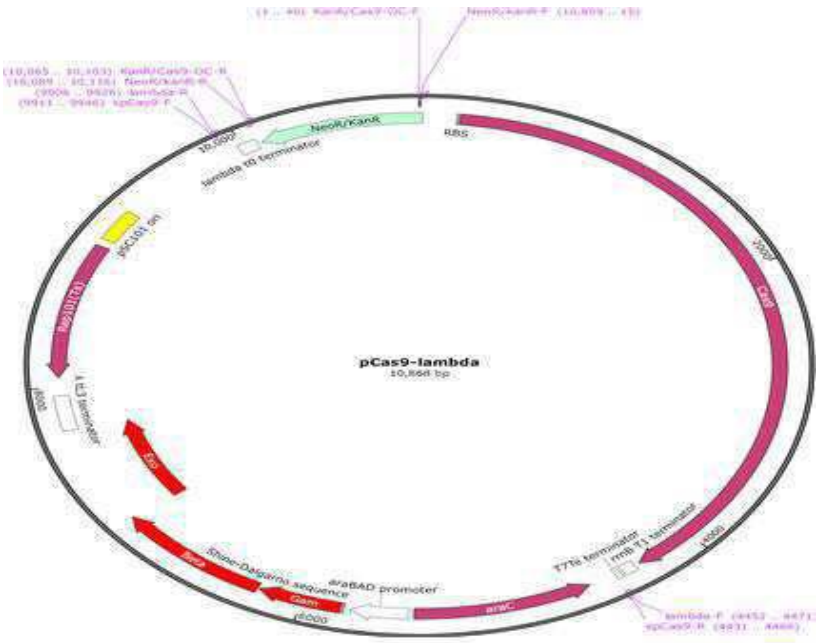
[0091] 누적 폐사 관찰 결과, 대조구에서 100 %의 폐사가 일어났으며, 약독화된 돌연변이와 불활화 균주를 혼합 백신 KIVE 86 그룹에서는 단 한 마리의 폐사도 나타나지 않았다. 한편 불활화 *E. piscicida*를 10^8 cfu로 백신 했던 그룹에서는 30 %의 폐사를 확인하였다(도 6).

[0092] 혈청 응집 시험 결과, 대조구의 혈청에서는 응집 반응이 일어나지 않았으며, FKC 10^8 그룹의 혈청 응집 역가는 개체 평균 54, KIVE 86 그룹은 개체 평균 320의 역가를 나타내었다. 불활화 *E. piscicida* 만을 고농도로 백신하였을 때 보다 약독화된 돌연변이 *E. piscicida*를 혼합하여 백신하였을 때 숙주의 면역 반응을 상당한 수준으로 유도하였고 이는 누적 폐사 결과로 이어짐을 확인하였다(도 7).

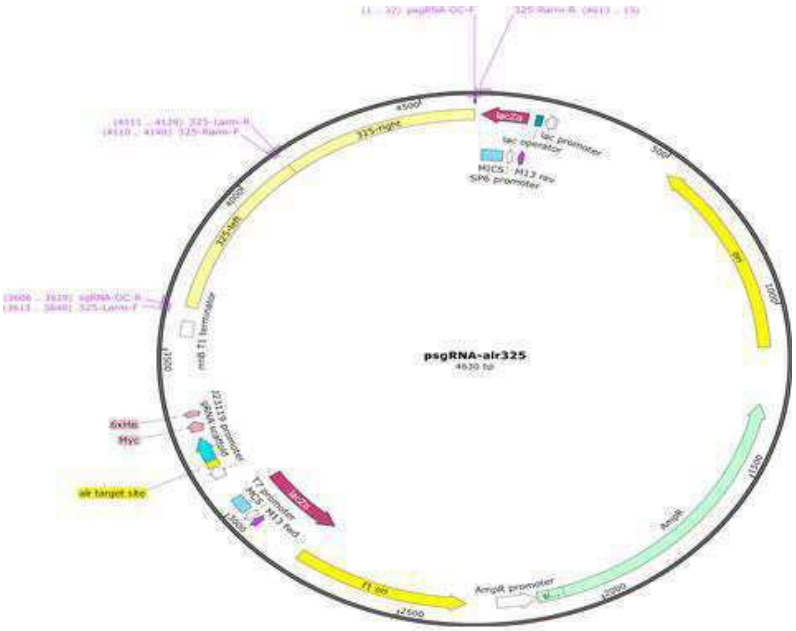
[0093] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다

도면

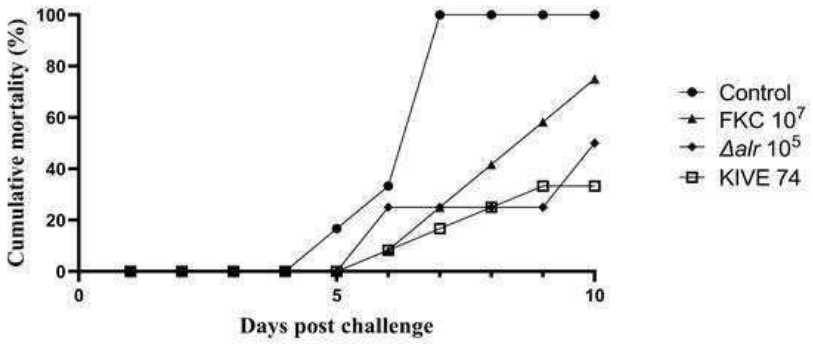
도면1


pCas9-lambda
10,868 bp
NeoR/KanR
RBS
Cas9
rrnB T1 terminator
T7Te terminator
araBAD promoter
araC
Beta
Gam
Shine-Dalgarno sequence
Exo
lambda T0 terminator
pSC101 ori
repA(Ts)

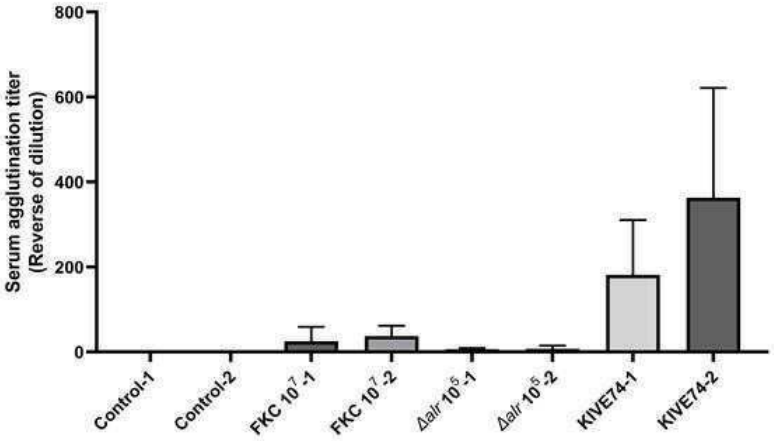
도면2


psgRNA-alr325
4630 bp
lacZa
lac promoter
lac operator
M1C5 : M13 rev
SP6 promoter
325-right
325-left
rrnB T1 terminator
pJ23119 promoter
sgRNA scaffold
6xHis
Myc
alr target site
T7 promoter
M1C5 : M13 fwd
ori
AmpR
AmpR promoter

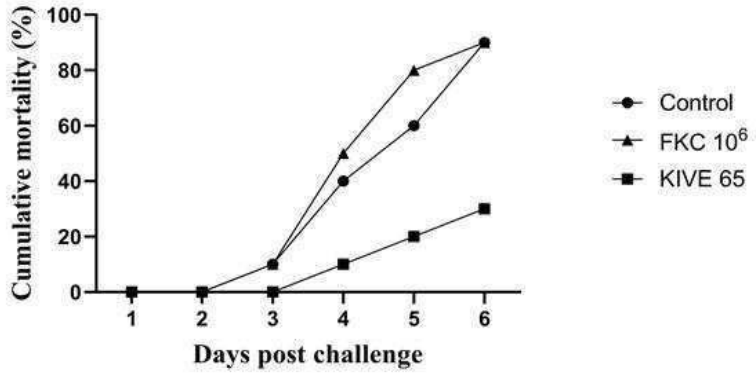
도면3


Cumulative mortality (%)
100
80
60
40
20
0
0
5
10
Days post challenge
Control
FKC 10^7
Δalr 10^5
KIVE 74

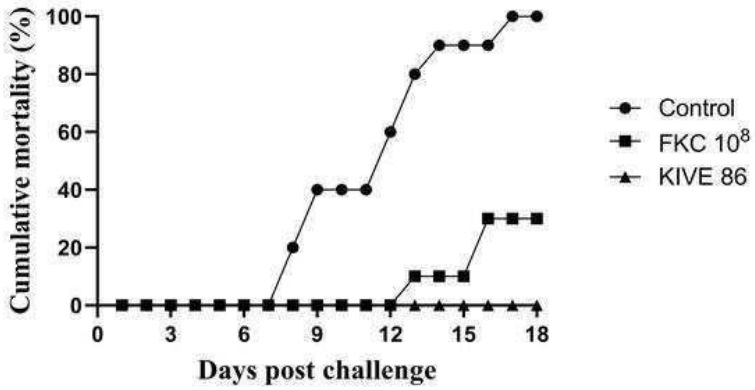
도면4


Serum agglutination titer
(Reverse of dilution)
800
600
400
200
0
Control-1
Control-2
FKC 10^7 -1
FKC 10^7 -2
Δalr 10^5 -1
Δalr 10^5 -2
KIVE74-1
KIVE74-2

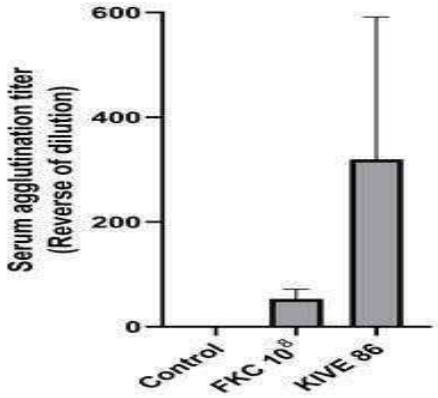
도면5


Cumulative mortality (%)
100
80
60
40
20
0
1
2
3
4
5
6
Days post challenge
Control
FKC 10^6
KIVE 65

도면6


Cumulative mortality (%)
100
80
60
40
20
0
0
3
6
9
12
15
18
Days post challenge
Control
FKC 10^8
KIVE 86

도면7


Serum agglutination titer
(Reverse of dilution)
600
400
200
0
Control
FKC 10^8
KIVE 86

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.