



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년10월10일
(11) 등록번호 10-0765357
(24) 등록일자 2007년10월02일

(51) Int. Cl.

C12N 15/63 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0099244

(22) 출원일자 2006년10월12일

심사청구일자 2006년10월12일

(56) 선행기술조사문헌

US5284653 A

(73) 특허권자

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

주식회사 바이넥스

부산 사하구 장림2동 480-2

(72) 발명자

김기홍

부산시 해운대구 우1동 대우마리나 아파트 201동 904호

권세련

부산시 동래구 명륜2동 100-138 5/5

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 손영희

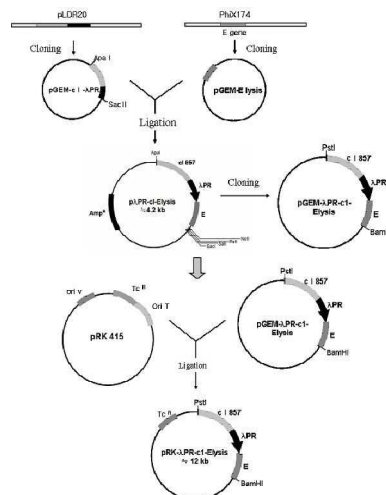
(54) 고스트 비브리오 앵귤라룸 및 이를 함유하는 비브리오증의 예방용 백신

(57) 요약

본 발명은 고스트 비브리오 앵귤라룸 및 이를 함유하는 비브리오증의 예방용백신에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 고스트(ghost) 비브리오 앵귤라룸(*Vibrio anguillarum*) 유도용 재조합백터, 상기 재조합백터로 형질전환된 재조합 비브리오 앵귤라룸, 상기 재조합 비브리오 앵귤라룸을 특정 온도 조건에서 배양하여 수득되는 것을 특징으로 하는 고스트 비브리오 앵귤라룸 및 상기 고스트 비브리오 앵귤라룸을 유효량 함유하는 비브리오증의 예방용 백신에 관한 것이다.

본 발명에 따른 백신은, 비브리오증에 대해 높은 방어 효과를 나타내어 양식 어류의 생산력 향상에 유용하다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

남윤권

부산시 남구 용호동 LG 메트로시티 5차 223동 903호

김성구

부산시 남구 용호동 LG 메트로시티 215동 1004호

정창화

부산시 부산진구 범천동 산 44-147번지 17/4

박소진

부산시 부산진구 초읍동 260-5번지 16/1

김원석

부산시 사상구 괘법동 523-14 15/5

이백천

부산시 수영구 민락동 110-8 43/5 롯데캐슬자이언츠 105-1903

특허청구의 범위

청구항 1

λ PR 프로모터(promoter)/cI 레프레서(repressor) 및 상기 λ PR 프로모터/cI 레프레서의 다운스트림에 위치한 lysis E 유전자를 포함하는 재조합백터 pRK- λ PR-cI-Elysis.

청구항 2

제1항의 재조합백터로 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 3

제1항의 재조합백터로 형질전환된 재조합 비브리오 앵귤라룸(*Vibrio anguillarum*).

청구항 4

다음 단계를 포함하는 고스트(ghost) 비브리오 앵귤라룸(*Vibrio anguillarum*)의 제조방법:

- (a) 제3항의 재조합 비브리오 앵귤라룸을 25~30℃에서 배양하는 단계;
- (b) 상기 배양액의 세포밀도(OD_{600})가 0.2~0.25에 도달하면 배양온도를 40~43℃로 가온하여 추가로 배양하는 단계; 및
- (c) 상기 배양액의 세포밀도 감소가 중지되었을 때 상기 재조합 비브리오 앵귤라룸을 수득하는 단계.

청구항 5

제4항의 방법에 의해 제조되고, lysis E 유전자를 함유하는 고스트 비브리오 앵귤라룸(*Vibrio anguillarum*) PRKG (KFCC 11377P).

청구항 6

제5항의 고스트 비브리오 앵귤라룸을 유효량 함유하는 비브리오증 예방용 백신.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <6> 발명의 분야
- <7> 본 발명은 고스트 비브리오 앵귤라룸 및 이를 함유하는 비브리오증의 예방용백신에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 고스트(ghost) 비브리오 앵귤라룸(*Vibrio anguillarum*) 유도용 재조합백터, 상기 재조합백터로 형질전환된 재조합 비브리오 앵귤라룸, 상기 재조합 비브리오 앵귤라룸을 특정 온도 조건에서 배양하여 수득되는 것을 특징으로 하는 고스트 비브리오 앵귤라룸 및 상기 고스트 비브리오 앵귤라룸을 유효량 함유하는 비브리오증의 예방용 백신에 관한 것이다.
- <8> 배경기술
- <9> 비브리오 앵귤라룸(*Vibrio anguillarum*)은 출혈성 패혈증(vibriosis)의 원인균으로 다양한 어종에 감염된다. 상기 세균은 해수 중에 상존하며 주로 선별이나 이동시 취급 부주의로 인하여 상처가 생기면 감염이 일어나거나, 다른 질병에 의한 2차 감염을 유발시키는 기회 감염적 병원세균이다.
- <10> 어패류의 패혈증을 제어하기 위한 대책으로서 지난 10년 동안 불활화 백신(inactivated vaccine)을 이용하여 주사나 침지의 방법을 주로 사용해 왔으나, 이러한 백신 사용시 혼용하는 mineral oil 등의 보조제로 인하여 성장을 저하, 만성 복막염, 부종, 육아종 등의 부작용이 초래되고 있다.

- <11> 또한, 종래의 불활화 백신의 효과가 아직 뚜렷한 결과를 보이지 못하고 있는데, 이는 종래의 기술에 의한 대부분의 어류 세균성 질병 예방용 백신들이 강한 반응성을 갖는 화합물(포르말린 등) 또는 높은 고온의 열(heat) 처리 과정을 필연적으로 거치기 때문이다. 기존의 불활화 백신은 제작 과정 중 항원성 표면 단백질의 변성이 빈번히 야기된다는 문제점을 안고 있으며, 열이나 포르말린 처리를 통한 불활성화시 표면 항원 단백질의 구조 변성은 백신 효율의 감소뿐 아니라 부정확한 면역 반응을 야기시킬 수 있다. 따라서, 안정적이고 새로운 백신 방법이 절실히 요구되고 있다.
- <12> 한편, 고스트 박테리아 기술은 재설계된 유전자 재조합백터를 이용하여, 대상 세균을 형질전환시키고, 특정 세포 용해 유전자(lysis gene, PhiX174 lysis gene E 등)의 발현을 프로그램화함으로써 세균벽에 미세한 터널구조를 유도하고, 세포질을 외부로 방출시키는 세부 기술로 구성되어 있다. 이렇게 제작된 고스트 박테리아는 생존 및 분열 능력은 완전히 제거되었지만 세포벽 구조는 거의 완벽하게 보존됨으로써 생균과 동일한 표면 항원성을 제공할 수 있고, 특히 종래의 백신 제작기술과는 달리 표면 단백질의 변성을 유발할 수 있는 화합물 또는 고온 처리를 전혀 수행하지 않기 때문에 처리의 간편함 및 안전성에서 월등한 효과를 얻을 수 있다 (Witte, *et. al.*, 1992). 따라서, 고스트 박테리아 백신은 이미 포유류를 대상으로 활발한 연구가 시작되어 기존의 불활화 백신이나 약독화 백신에 비해 월등히 우수한 성능이 보고되고 있다 (Eko, *et. al.*, 1994; Szostak, *et. al.*, 1996; Katinger, *et. al.*, 1999; Panthel, *et. al.*, 2002; Marchart, *et. al.*, 2003).
- <13> 그러나, 백신 기술과 관련하여 포유류에 비해 어류 및 수산용 백신은 아직 고전적인 FKC(Formalin killed cell)-불활화 백신 기술에 머물고 있는 실정으로, 특히 어류 병원성 세균을 대상으로 한 고스트 박테리아(ghost bacteria) 기술의 개발은 전혀 시도되지 못하고 있다.
- <14> 이에, 본 발명자들은 포르말린 등의 유독성 화학물질을 처리하지 않고 생균에 버금가는 표면 항원성을 보유하는 새로운 비브리오증 예방 백신을 개발하고자 예의 노력한 결과, 고스트 비브리오 앵귤라룸 유도용 재조합백터로 형질전환된 재조합 비브리오 앵귤라룸을 특정 배양 온도로 가온하여 고스트 비브리오 앵귤라룸을 제작하고, 이를 어류에 처리한 경우 어류 비브리오증의 예방에 효과적임을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <15> 본 발명의 주된 목적은 조절부위 및 세포 용해 유전자를 함유하는 고스트(ghost) 비브리오 앵귤라룸(*Vibrio anguillarum*) 유도용 재조합백터 및 상기 재조합백터로 형질전환된 재조합 고스트 비브리오 앵귤라룸을 제공하는데 있다.
- <16> 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 고스트 비브리오 앵귤라룸을 특정 온도 조건에서 배양하여 수득하는 것을 특징으로 하는 고스트 비브리오 앵귤라룸 및 그 제조방법을 제공하는데 있다.
- <17> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 고스트 비브리오 앵귤라룸을 유효량 함유하는 비브리오증 예방용 백신을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

- <18> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 λ PR 프로모터(promoter)/cI 레프레서(repressor) 및 상기 λ PR 프로모터/cI 레프레서의 다운스트림에 위치한 lysis E 유전자를 포함하는 재조합백터 pRK- λ PR-cI-Elysis을 제공한다.
- <19> 본 발명은 또한, 상기 재조합백터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다.
- <20> 본 발명은 또한, 상기 재조합백터로 형질전환된 재조합 비브리오 앵귤라룸(*ibrio anguillarum*)을 제공한다.
- <21> 본 발명에 있어서, 상기 미생물은 박테리아, 효모 및 곰팡이로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있고, 바람직하게는 병원성 박테리아, 더욱 바람직하게는 비브리오 앵귤라룸인 것을 특징으로 할 수 있다.
- <22> 본 발명은 또한, (a) 상기 재조합 비브리오 앵귤라룸을 25~30℃에서 배양하는 단계; (b) 상기 배양액의 세포밀도(OD₆₀₀)가 0.2~0.25에 도달하면 배양온도를 40~43℃로 가온하여 추가로 배양하는 단계; 및 (c) 상기 배양액의 세포밀도 감소가 중지되었을 때 상기 재조합 비브리오 앵귤라룸을 수득하는 단계를 포함하는 고스트(ghost) 비브리오 앵귤라룸(*Vibrio anguillarum*)의 제조방법을 제공한다.
- <23> 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조되고, lysis E 유전자를 함유하는 고스트 비브리오 앵귤라룸(*Vibrio*

anguillarum) PRKG(KFCC 11377P)를 제공한다.

- <24> 본 발명은 또한, 상기 고스트 비브리오 앵귤라룸을 유효량 함유하는 비브리오증 예방용 백신을 제공한다.
- <25> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <26> 본 발명의 일 양태는 종래의 포르말린 처리에 의한 불활화 비브리오증 백신에 비해 비브리오 앵귤라룸(*Vibrio anguillarum*) 감염증(비브리오증)에 대하여 우수한 방어 효과를 나타내는 고스트 비브리오 앵귤라룸을 유도하기 위해서, 특정 온도 조건에서만 세포 용해(lysis) 유전자가 선택적으로 발현되는 재조합백터에 관한 것이다.
- <27> 상기 재조합백터 제작시, 조절 부위는 특정 온도 조건에서만 유전자의 유도발현이 가능한 박테리오파지 λ PR프로모터(promoter)/cI 레프레서(repressor)를 이용하였고, 세균벽에 미세 구멍을 유도하기 위하여 phiX174 파지의 lysis E 유전자를 이용하였다. lysis E 유전자 및 λ PR promoter/cI repressor를 각각 백터에 클로닝한 후, 융합백터를 제작함으로써 특정 온도 조건에서만 lysis E 유전자의 선택적인 발현을 유도할 수 있도록 하였다. 상기 방법에 의해 제작된 재조합백터를 pRK- λ PR-cI-Elysis로 명명하였다.
- <28> 상기 재조합백터 pRK- λ PR-cI-Elysis를 비브리오 앵귤라룸에 접합(conjugation) 방법에 의해 도입하였다. 상기 재조합 비브리오 앵귤라룸을 25~30℃, 180~220rpm으로 배양하여 lysis E 유전자의 발현을 억제하면서 특정 세포 농도에 도달한 후, lysis E 유전자의 발현을 위해 40~43℃, 280~320rpm으로 배양하였다. 이때, 초기 배양 온도 조건이 상기 범위를 벗어나면 미세 터널구조 형성의 효율성이 저하되는 문제가 있고, 가온 온도가 상기 범위를 벗어나면 세균 생장 온도 범위를 초과하여 자연사하는 문제가 있다. 상기 40~43℃로의 온도 자극을 통해 lysis E 유전자의 발현을 유도하여 세포벽의 미세한 터널구조를 유도하고, 이를 통하여 세포질을 유출시켜 고스트화하였다. 상기 온도 자극 후, 세포밀도를 측정하여 세포밀도의 감소가 더 이상 일어나지 않을 때 집균한 다음, 동결 건조하여 냉장 보관하였다. 상기의 방법으로 제조된 고스트(ghost) 비브리오 앵귤라룸(*Vibrio anguillarum*) PRKG를 2006년 9월 26일자로 한국미생물 보존센터에 기탁하였다 (KFCC 11377P).
- <29> 본 발명에서, "백터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 백터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 백터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 백터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "백터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 백터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 백터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 백터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 백터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 백터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.
- <30> 라이게이션 후에, 백터는 적절한 숙주세포로 형질전환되어야 한다. 형질전환은 Sambrook, *et. al.*, *supra*의 1.82 섹션에 기술된 칼슘 클로라이드 방법을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 선택적으로, 전기천공법(electroporation)(Neumann, *et. al.*, *EMBO J.*, 1:841, 1982) 또한 이러한 세포들의 형질전환에 사용될 수 있다.
- <31> 본 발명에 따른 유전자의 과발현을 위하여 사용되는 백터는 당업계에서 공지된 발현 백터가 사용될 수 있다.
- <32> 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결(operably linked)"된다. 이것은 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)가 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

- <33> 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 재조합벡터 내에 포함되게 된다. 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 재조합벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.
- <34> 상술한 재조합 벡터에 의해 형질전환된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다.
- <35> 물론 모든 벡터가 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다.
- <36> 본 발명의 다른 양태는 상기 고스트 비브리오 앵굴라룸을 유효량 함유하는 비브리오증 예방용 백신에 관한 것이다.
- <37> 상기 고스트 비브리오 앵굴라룸을 백신으로 사용할 때에는 동결건조한 상기 고스트 비브리오 앵굴라룸을 완충 용액에 현탁하여 사용하였다. 상기 백신 제제는 비브리오증에 감수성이 있는 양식 어류의 치어기 예방 백신으로서 사용할 수 있다. 사용법으로는 복강 내 주사법이 가능하며 용량은 어체당 50~100 μ g의 용량으로 사용하는 것이 바람직하다. 상기 백신의 효과를 측정하기 위하여, 2종의 실험어(틸라피아(*Oreochromis niloticus*) 및 넙치(*Paralichthys olivaceus*))에 투여한 결과, 비브리오증에 대해 우수한 방어 능력을 가진다는 것을 확인할 수 있었다.
- <38> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- <39> **실시예 1. pRK- λ PR-c I-Elysis 재조합벡터의 제작**
- <40> 세균벽에 미세 구멍을 유도하기 위한 lysis E 유전자를 클로닝하기 위하여, 박테리오파지 PhiX174(New England BioLabs Inc)의 염색체 DNA를 주형으로 하고, lysis E 유전자에 특이적인 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행함으로써 증폭하였다.
- <41> 서열번호 1: 5'-ATGGTACGCTGGACTTTGTG
- <42> 서열번호 2: 5'-ACATTACATCACTCCTCCG
- <43> PCR 반응 조건은 초기변성을 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 수행한 후, 변성(denaturation, 95 $^{\circ}$ C에서 30초), 결합(annealing, 55 $^{\circ}$ C에서 30초), 연장(elongation, 72 $^{\circ}$ C에서 1분) 단계를 총 30회 반복한 다음, 최종 연장(final elongation, 72 $^{\circ}$ C에서 7분)을 수행하였다. 상기 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T easy 벡터(Promega)에 클로닝하여 pGEM-E lysis 벡터를 수득하였다.
- <44> 특정 온도 조건에 따라 lysis E 유전자의 발현을 조절하는 λ PR-c I 조절 시스템을 구축하기 위하여 λ PR-c I 유전자를 클로닝하였다. 박테리오파지 pLDR20(American Type Culture Cell, USA)의 염색체 DNA를 주형으로 하고, 말단에 각각 SacII 및 Apa I 제한효소 부위가 첨가된 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머를 사용하여 상기의 조건으로 PCR을 수행함으로써 λ PR-c I 유전자를 증폭하였다. 서열번호 3의 밀줄친 부분은 SacII 제한효소 부위이고, 서열번호 4의 밀줄친 부분은 Apa I 제한효소 부위를 나타낸 것이다.
- <45> 서열번호 3: 5'-CCGCGGCCCTTTAGCTGTCTTGGTTTGC
- <46> 서열번호 4: 5'-GGGCCCCGACCAGAACACCTTGCCG
- <47> 상기 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T easy 벡터(Promega)에 클로닝하여 pGEM-c I- λ PR 벡터를 수득하였다.
- <48> 상기 클로닝된 조절부위(λ PR 프로모터(promoter)/cI 레프레서(repressor)) 및 lysis E 유전자의 융합벡터를 제

작하기 위하여, 상기 pGEM-cI-λPR 벡터를 제한효소 *ApaI* 및 *SacII*로 절단하여 λPR/cI 절편을 회수하고, 상기 pGEM-E lysis 벡터를 상기와 동일한 제한효소 *ApaI* 및 *SacII*로 절단한 후, 상기 *ApaI*/*SacII*-조절부위(λPR promoter/cI repressor)와 lysis E 유전자를 연결(ligation)하였다. 상기 연결(Ligation)은 T4 DNA 연결효소(ligase, New England BioLabs)를 이용하여 12℃에서 16시간 동안 수행하였다. 상기 λPR-cI 조절 시스템 및 lysis E 유전자가 연결된 재조합벡터를 pλPR-cI-Elysis라고 명명하였다.

<49> 상기 pλPR-cI-Elysis 재조합벡터에서 λPR-cI 및 lysis E 유전자 부분을 말단에 각각 *PstI* 및 *BamHI* 제한효소 부위가 첨가된 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머를 사용하여 상기의 조건으로 PCR을 수행함으로써 증폭하였다. 서열번호 5의 밑줄 친 부분은 *PstI* 제한효소 부위이고, 서열번호 6의 밑줄 친 부분은 *BamHI* 제한효소 부위를 나타낸 것이다.

<50> 서열번호 5: 5'-CTGCAGGACCAGAACACCTTGCCGAT

<51> 서열번호 6: 5'-GGATCCACATTACATCACTCCTTCG

<52> 상기 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T easy 벡터(Promega)에 클로닝하여 pGEM-λPR-cI-Elysis 벡터를 수득하였다.

<53> 상기 클로닝된 조절부위(λPR promoter/cI repressor) 및 lysis E 유전자를 *PstI* 및 *BamHI* 제한효소로 절단하여 절편을 회수하고, pRK415(NCCB) 벡터를 상기와 동일한 제한효소 *PstI* 및 *BamHI*으로 절단한 후, 상기 조절부위(λPR promoter/cI repressor) 및 lysis E 유전자와 연결(ligation)하였다. 상기 연결(ligation)은 T4 DNA 연결효소(ligase, New England BioLabs)를 이용하여 12℃에서 16시간 동안 수행하였다. 상기 pRK415 벡터에 λPR promoter/cI repressor 및 lysis E 유전자가 연결된 재조합벡터를 pRK-λPR-cI-Elysis라고 명명하였다(도 1).

<54> 상기 재조합벡터를 대장균 DH-5α에 도입한 후, 테트라사이클린이 포함된 LB-아가 배지에서 28℃, 20시간 동안 배양하였다. 상기 형질전환체가 재조합벡터를 포함하고 있는지 확인하기 위하여, 상기 형질전환체로부터 재조합벡터를 순수 분리하고 제한효소 인식 부위의 위치 등을 재확인하였다.

<55>

<56> 실시예 2: 고스트 비브리오 앵귤라룸의 제조

<57> 상기 재조합벡터 pRK-λPR-cI-Elysis를 접합(conjugation) 방법으로 비브리오 앵귤라룸(*Vibrio anguillarum*, 국립수산물학원 병리과)에 도입하여 수여균(recipient cell)으로 사용하였다. 또한, 상기 재조합벡터 pRK-λPR-cI-Elysis를 SM10λpir(The Donnenberg Laboratory, University of Maryland School of Medicine, Division of Infectious Diseases)에 화학 변환(chemical transformation) 방법으로 도입하여 접합 실험시 증여균(donor cell)으로 사용하였다. 상기 증여균 및 수여균을 LB 배지 1ml에 각각 접종하여 27℃에서 하룻밤 동안 진탕 배양하였다. 상기 배양액을 LB 배지로 3회 세척한 후, 재부유하여 박테리아 현탁액(bacterial suspension)을 만들었다. 상기 현탁액을 각각 1×10^7 cells 및 1×10^8 cells이 되도록 회수하여, 서로 섞어준 후, 27℃에서 16시간 동안 배양한 다음, 상기 세균 배양액을 테트라사이클린 15μg/ml가 첨가된 TCBS(Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose, DIFCO) 아가 배지에 접종하였다.

<58> 상기 재조합 비브리오 앵귤라룸을 알칼라인 용해(alkaline lysis) 방법으로 균체 내에 있는 재조합벡터를 분리하여 확인한 후, LB 배지에 27℃에서 배양하여 세포 밀도(OD₆₀₀)가 0.25 정도가 될 때, 온도를 42℃로 올리고 300rpm에서 진탕 배양하여 시간대 별로 흡광도를 측정함으로써 고스트 박테리아가 되는지 확인하였다. 고스트 박테리아가 완성되는 시점은 흡광도의 감소가 더 이상 나타나지 않을 때로 결정하였으며, 그 시점의 균 배양액을 LB 아가 플레이트에 접종하여 균의 생존을 관찰함으로써 고스트 박테리아 제작의 효율을 확인하였다.

<59> 그 결과, 일반 비브리오 앵귤라룸 대조군(naive *Vibrio anguillarum*)의 경우, 42℃로 온도가 상승한 이후에도 지속적인 흡광도 증가, 즉 분열에 의한 균체량의 증가가 계속 유지되는 반면, 고스트 유도용 재조합벡터 pRK-λPR-cI-Elysis가 도입된 재조합 비브리오 앵귤라룸은 42℃로 온도가 상승한 후 1시간 30분부터 흡광도의 감소가 시작되어 지속적으로 감소되었다. 이는 특정 온도 조건에서만 lysis E 유전자가 선택적으로 발현되어 세포 용해(lysis)가 유도되었다는 것을 나타낸다(도 2).

<60> 또한, 상기 고스트 비브리오 앵귤라룸 유도가 완료된 배양액을 다양한 농도로 LB-아가 플레이트에 도말하여 생존하는 균의 존재 유무를 조사한 결과, 대조군은 다수의 콜로니가 형성되는 반면, 고스트 비브리오 앵귤라룸 유도군에서는 콜로니가 형성되지 않았다. 이는 상기 고스트 비브리오 앵귤라룸 유도에 의해 비브리오 앵귤라룸의

분열·생존력이 효과적으로 제거되었다는 것을 나타낸다.

<61> 상기 고스트 비브리오 앵귤라룸 유도에 의한 세포벽 미세 구멍의 형성 여부를 전계방출주사전자현미경(field emission scanning electron microscope)으로 관찰하였다. 그 결과, 상기 고스트 비브리오 앵귤라룸 유도에 의해 비브리오 앵귤라룸의 세포벽에 미세구멍이 형성되었다는 것을 확인하고 (도 3), 상기 고스트 비브리오 앵귤라룸을 PRKG로 명명하고, 2006년 9월 26일자로 한국미생물 보존센터에 기탁하였다 (KFCC 11377P).

<62> 상기 고스트 비브리오 앵귤라룸의 유도가 확인된 배양액을 4 ℃에서 5000rpm으로 10분간 원심분리하여 집균한 후, PBS로 3회 세척한 다음, 원심분리하여 PBS에 현탁, 동결건조하여 냉장보관하였다. 상기 고스트 비브리오 앵귤라룸을 백신으로 사용하고자 할 때에는 PBS에 현탁하여 사용하였다.

<63> 실시예 3: 틸라피아(*Oreochromis mosambicus*) 주사 백신 효과 측정

<64> 부경대학교 양어장으로부터 분양받은 체중 100 ± 20 g, 체장 12 ± 2 cm의 틸라피아를 3개의 50ℓ 수조에 각 20마리씩 넣고 수온 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지하여, 2주일 동안 순치하였으며 먹이는 상업용 사료를 공급하였다.

<65> FKC(formalin killed cell)를 제조하기 위하여, 비브리오 앵귤라룸(*Vibrio anguillarum*) 균주를 1.5% NaCl이 첨가된 TSA(tryptic soy agar, DIFCO) 배지에서 27℃, 24시간 동안 배양한 후, 0.5% 농도가 되도록 포르말린을 첨가하고 27℃에서 24시간 동안 배양하여 불활화하였다. 상기 불활화된 균액을 4℃에서 5000rpm으로 10분간 원심분리하여 집균한 후, PBS(pH 7.2)로 3회 세척하여 포르말린 성분을 제거한 다음, 원심분리하여 균체의 습중량을 측정하고 PBS에 현탁하여 냉장 보관하였다.

<66> 상기 FKC 및 고스트 비브리오 앵귤라룸(*Vibrio anguillarum* ghost, VAG)의 항원을 어체당 100μg씩 복강 주사하고, 대조군은 PBS를 주사하였다. 2주 후 동일한 양과 방법으로 부스팅하였다.

<67> 주사한 지 2주 후, 상기 각 실험군으로부터 10마리씩 무작위로 골라내어 공격 실험을 하였다. 공격 실험에 사용된 비브리오 앵귤라룸은 어체를 1회 통과시켜 독력을 회복시킨 균을 1.5% NaCl이 첨가된 TSB(tryptic soy broth, DIFCO) 배지에서 성장기(log phase)가 될 때까지 배양시킨 후, PBS로 세척하여 상기 각 실험군의 복강에 9.8×10^7 cells의 균체로 복강 주사하였다. 상기 공격 실험 후, 깨끗한 수조로 옮겨 각 실험군의 폐사율을 관찰하였고, 폐사된 개체의 장기는 TCBS 아가 배지에 접종하여 비브리오 앵귤라룸 유무를 확인하였다.

<68> 그 결과, 고스트 비브리오 앵귤라룸 주사군(VAG)은 FKC 주사군 및 대조군에 비해 유의적으로 높은 생존율을 나타내었고, 특히 고스트 비브리오 앵귤라룸 주사군에서는 폐사된 개체가 한 마리도 관찰되지 않았다 (도 4). 이는 상기 백신이 종래의 FKC 백신에 비해 월등히 우수한 방어 효과를 가진다는 것을 나타낸다.

<69> 실시예 4: 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서의 주사 백신의 효과 측정

<70> 넙치 치어는 통영 소재지의 양어장에서 채집하여 500ℓ 수조에서 상업용 사료를 공급하여 사육하였고, 체중 6.8 ± 1.5 g, 체장 7 ± 0.5 cm의 넙치를 3개의 50ℓ 수조에 각 20마리씩 넣어 수온 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지하면서 순치시켰다.

<71> 상기 넙치 치어에 상기 FKC 및 고스트 비브리오 앵귤라룸(*Vibrio anguillarum* ghost, VAG) 백신을 어체당 50μg씩 복강 주사하고, 대조군은 PBS를 주사하였다. 2주 후 동일한 양과 방법으로 부스팅하였다.

<72> 상기 항원을 복강 주사한 지 1주 후, 전 실험군에서 자연적으로 비브리오 속 (*Vibrio* sp.) 균주에 의한 감염이 일어났으며, 이로 인한 폐사를 분석하였다. 그 결과, 고스트 비브리오 앵귤라룸 백신 주사군이 FKC 주사군이나 대조군에 비해 높은 생존율을 나타내었다 (도 5). 이는 상기 백신이 종래의 FKC 백신에 비해 월등히 우수한 방어 효과를 가진다는 것을 나타낸다.

<73> 실시예 5: 고스트 비브리오 앵귤라룸 백신의 안정성 및 독성 측정

<74> 실시예 5-1. 고스트 비브리오 앵귤라룸 백신의 안정성 측정

<75> 상기 고스트 비브리오 앵귤라룸 백신이 안정성을 유지하는지 확인하기 위하여, 백신 제작시, 제작 후 6개월 및 1년 후 동결건조된 백신을 다양한 농도로 LB-아가 플레이트에 도말하여, 생존 균의 존재 유무를 조사하였다.

<76> 그 결과, 대조군은 다수의 콜로니가 형성되는 반면, 고스트 비브리오 앵귤라룸 백신균은 콜로니가 형성되지 않았다. 이는 상기 백신이 비브리오 앵귤라룸의 분열·생존력을 효과적으로 제거하였다는 것을 나타내며, 안정성이 장기간 유지된다는 것을 알 수 있다.

<77> 실시예 5-2. 고스트 비브리오 앵귤라룸 백신의 독성 측정

- <78> 상기 고스트 비브리오 앵귤라룸 백신의 독성을 측정하기 위하여, 최대 권장 투여량의 2배, 5배 및 10배를 틸라피아(*Oreochromis mosambicus*)에 복강 주사한 후, 행동 및 체중 변화, 폐사율 등을 2달간 측정하였다.
- <79> 그 결과, 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았으므로, 상기 고스트 비브리오 앵귤라룸 백신이 어류에 안전하다는 것을 알 수 있다.

발명의 효과

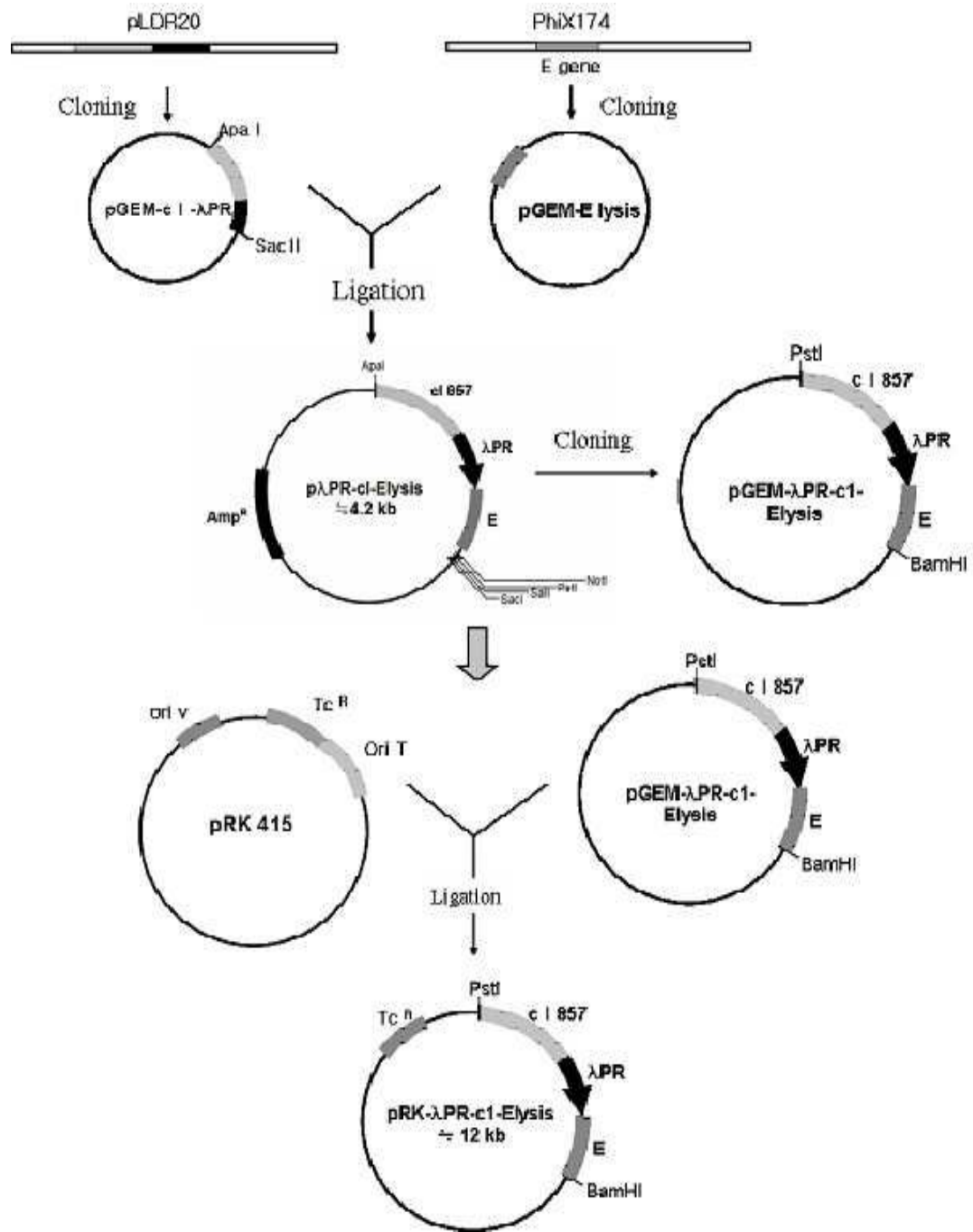
- <80> 이상 상세히 기술한 바와 같이, 본 발명은 고스트(ghost) 비브리오 앵귤라룸(*Vibrio anguillarum*) 유도용 재조합백터로 형질전환된 재조합 비브리오 앵귤라룸을 특정 온도 조건에서 배양하는 것을 특징으로 하는 고스트 비브리오 앵귤라룸 및 상기 고스트 비브리오 앵귤라룸을 유효량 함유하는 비브리오증 예방 또는 치료용 백신을 제공하는 효과가 있다. 본 발명에 따르면 양식어류에 치명적 피해를 입히고 있는 비브리오 앵귤라룸(*Vibrio anguillarum*) 감염증(비브리오증)에 대하여 재조합 고스트 비브리오 앵귤라룸을 이용함으로써 종래의 포르말린 처리에 의한 불활화 백신에 비해 월등하게 높은 방어 효과를 나타내므로 양식 어류의 생산력 향상에 유용하다.
- <81> 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

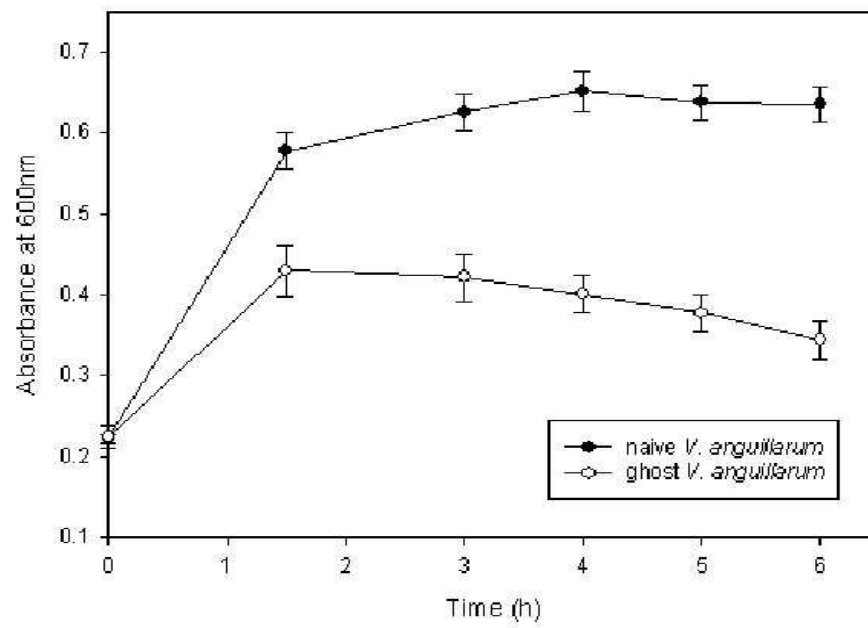
- <1> 도 1은 고스트(ghost) 비브리오 앵귤라룸(*Vibrio anguillarum*) 유도용 재조합백터 pRK-λPR-c I -Elysis의 제작 과정을 나타낸 것이다.
- <2> 도 2는 온도 상승에 의한 고스트 비브리오 앵귤라룸의 흡광도 변화를 나타낸 것이다.
- <3> 도 3은 고스트 비브리오 앵귤라룸의 전자현미경 사진이다.
- <4> 도 4는 고스트 비브리오 앵귤라룸 백신을 틸라피아에 복강 주사한 경우 어체의 방어 효과를 나타낸 것이다.
- <5> 도 5는 고스트 비브리오 앵귤라룸 백신을 넙치에 복강 주사한 경우 어체의 방어 효과를 나타낸 것이다.

도면

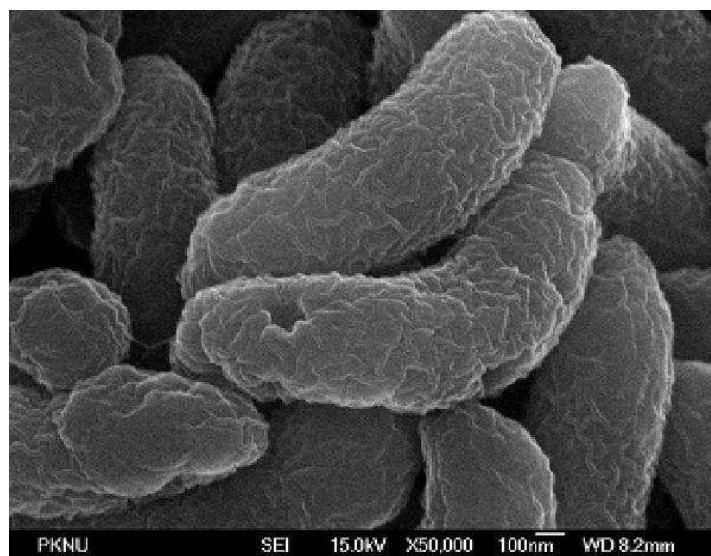
도면1



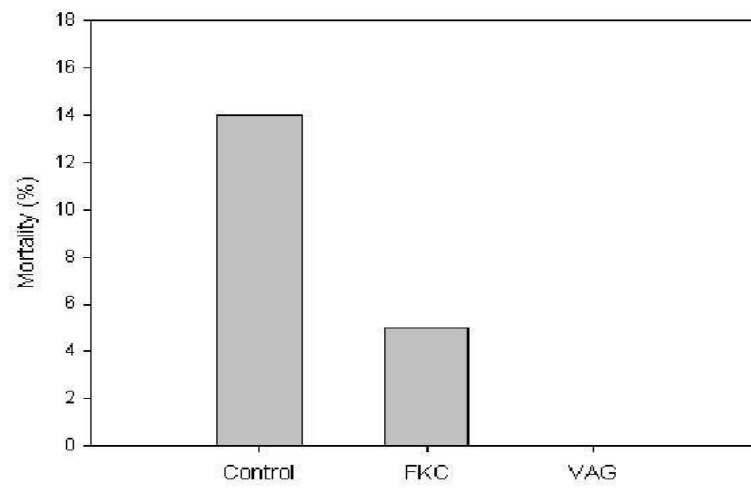
도면2



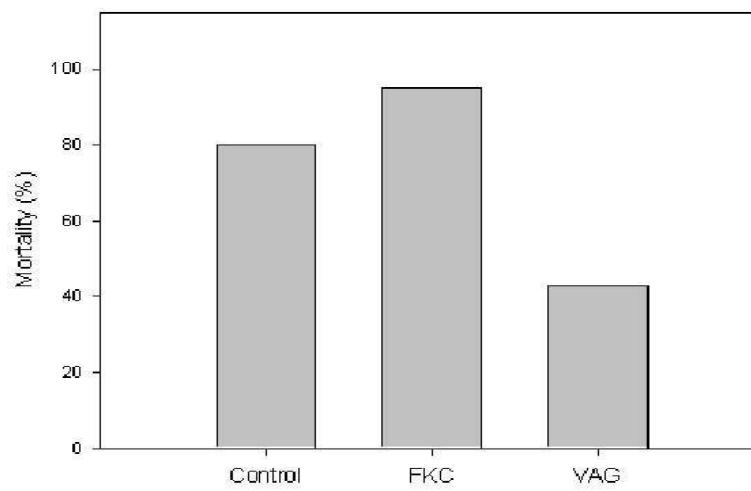
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록

[서열목록 전자파일 첨부](#)

-