



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0158417
(43) 공개일자 2024년11월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/071 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0602 (2013.01)

C12N 2710/00051 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0054757

(22) 출원일자 2023년04월26일

심사청구일자 2023년04월26일

(71) 출원인

국립부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

(72) 발명자

김광일

부산광역시 남구 용소로 45 부경대학교 수산과학대학 (C21) 9230호 (진단생화학실험실)

정예진

부산광역시 남구 용소로 45 부경대학교 수산과학대학 (C21) 9230호 (진단생화학실험실)

(74) 대리인

특허법인정진

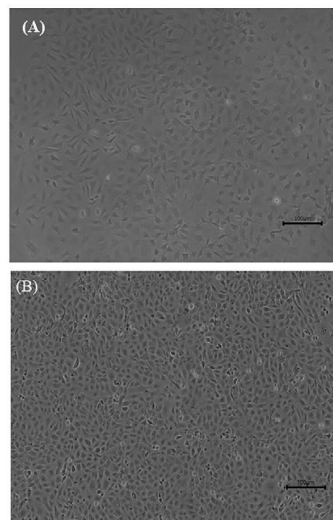
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 드워프구라미 지느러미 유래 신규 세포주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 드워프구라미 지느러미 유래 신규 세포주 및 이의 용도 등에 관한 것이다. 본 발명의 신규 드워프구라미 지느러미 세포주(Dwarf Gourami Fin, DGF)는 메갈로사이티바이러스(RSIV, ISKNV) 및 랑도바이러스(VHSV, HIRRV, SVCV)에 대해 감수성을 가지며, 특히 RSIV, ISKNV에 대한 감수성이 우수하여 대량 배양이 용이함을 확인하였다. 따라서, 어류 질병 연구 및 백신 제조에 필요한 바이러스의 대량 생산에 이용할 수 있으며, ISKNV 치료제 개발에도 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345353936
과제번호	2022R1I1A2064371
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	나노 및 마이크로 입자를 이용한 관상어류 경구형 백신 및 항바이러스제 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부경대학교 산학협력단
연구기간	2022.06.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

드워프구라미 지느러미 유래 신규 세포주(기탁번호: KCLRF-BP-00522).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 세포주는 바이러스 감수성을 가지는, 세포주.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 바이러스는 메갈로사이티바이러스 또는 랍도바이러스인, 세포주.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 메갈로사이티바이러스는 참돔이리도바이러스(Red sea bream iridovirus, RSIV), 및 전염성 비장 및 신장 괴사바이러스(Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus, ISKNV)로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 세포주.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 랍도바이러스는 바이러스성출혈성패혈증바이러스(Viral Hemorrhagic Septicemia Virus, VHSV), 잉어봄바이러스(Spring viremia of carp virus, SVCV), 및 히라메랍도바이러스(Hirame rhabdovirus, HIRRV)로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 세포주.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 세포주는 외래 유전자가 발현이 되는, 세포주

청구항 7

하기 단계를 포함하는, 드워프구라미 지느러미 유래 신규 세포주(기탁번호: KCLRF-BP-00522)의 분리 및 배양 방법:

(a) 드워프구라미로부터 적출된 지느러미에서 세포를 수득하는 단계; 및

(b) 상기 수득된 드워프구라미 지느러미 유래 세포를 배양하는 단계.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 배양은 하기 조건에서 수행되는 것인, 방법:

(a) 레이보비츠 L-15 배지; 및

(b) 18 내지 35℃.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 레이보비츠 L-15 배지는 3 내지 20%(v/v) FBS가 첨가된 것인, 세포주.

청구항 10

제1항의 드워프구라미 지느러미 유래 신규 세포주를 포함하는, 바이러스 배양용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 바이러스는 메갈로사이티바이러스 또는 랫도바이러스인, 바이러스 배양용 조성물.

청구항 12

제1항의 드워프구라미 지느러미 유래 신규 세포주에 바이러스를 감염시키는 단계; 를 포함하는, 바이러스 배양 증식 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 바이러스는 메갈로사이티바이러스 또는 랫도바이러스인, 바이러스 배양 증식 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 드워프구라미 지느러미 유래 신규 세포주 및 이의 용도 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 어류 유래 주화세포는 성장이 빠르고 바이러스 감수성이 높아 바이러스의 증식 및 특징을 연구하는데 매우 유용하다. 어류에서 질병을 유발하는 바이러스를 배양 및 연구하기 위해 지난 40년간 783여개의 어류 유래 세포가 개발되었으나, 대부분이 양식산업에 영향을 주는 바이러스성 질병에 대한 연구를 수행하기 위해 개발된 양식어류 유래 주화세포로 관상어 유래 주화세포의 개발은 드문 실정이다. 전 세계 관상어 산업이 지속적으로 성장하

고 있음에도 불구하고 관상어류에 심각한 경제적 피해를 일으키는 바이러스성 질병 제어에 관한 연구는 소외되고 있다. 따라서, 관상어 바이러스성 질병의 진단 및 치료연구를 위한 관상어 유래 주화세포의 개발이 필요하다.

[0004] 바이러스 연구를 위해서는 지속적이고 효율적인 바이러스 배양이 필수적이며, 일반적으로 바이러스 배양에 주로 사용되는 방법은 바이러스에 감수성이 있는 동물에 바이러스를 직접 접종하여 감염조직에서 바이러스를 재분리하는 방법; 닭의 유정란(embryonated eggs)을 이용하는 방법; 및 동물의 조직을 플라스크에서 배양하여 in vitro에서 바이러스를 배양하는 방법 등이 있다. 그러나, 동물을 이용한 바이러스 배양의 경우 숙주동물 면역반응에 의한 바이러스의 증식 저해, 및 바이러스의 잠복과 같은 문제가 발생할 수 있으며, 유전자 재편성 바이러스(reassortment virus) 생성의 가능성 역시 배제할 수 없다. 반면, 유정란을 이용한 바이러스 배양의 경우, 가격적인 면과 오염을 차단할 수 있다는 측면에서 매우 각광받는 방법이지만 숙주 및 온도범위의 제약이 있어, 어류와 같은 변온동물에서 발병하는 바이러스의 경우 적용이 쉽지 않다. 따라서, 어류 발병 바이러스 배양의 가장 효율적인 방법은 바이러스에 감수성이 높은 동물의 조직을 이용한 In vitro 배양이라고 할 수 있으며, 이를 위해서는 적절한 주화세포의 개발이 이루어져야 한다.

[0005] 세계동물보건기구에서는 참돔이리도바이러스병(red seabream iridoviral disease, RSIVD)의 원인체를 메갈로사이티바이러스(Megalocytivirus) 중 참돔이리도바이러스(RSIV)와 전염성 비장 및 신장 괴사 바이러스(Infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)로 규정하고 있다. RSIV와 ISKNV는 50종 이상의 해수 및 담수어에서 발생 보고되었으며, 관상어류에서도 발생 사례가 다수 보고되고 있다. 특히, RSIV는 1990년 일본의 양식산 참돔에서 최초로 발생하였으며 국내에서는 1990년 중후반부터 전염병을 일으켜 현재까지도 해결되지 않은 풍토병으로 자리잡고 있다. ISKNV로 인한 전염병은 1998년 중국에서 최초 발병하였다. 아직까지 국내에서는 ISKNV의 검출이나 감염 사례가 보고되지 않았으나, 최근 인도, 아프리카 등의 다양한 국가에서 발생하여 심각한 경제적 손실을 발생시켰다. RSIV와 ISKNV의 연구 및 백신 개발을 위해서는 in vitro 배양이 필수적이지만, 현재 세계동물보건기구에서 배양에 권장되는 BF-2와 GF 세포주에서 배양이 잘 되지 않는 등의 문제가 있다. 국내에서는 최근 참돔지느러미 세포주(PMF)를 개발하였으나(특허 10-1703783), 일반적인 배양 방법으로는 바이러스의 감염 역가가 다소 낮으며, 고역가 바이러스 배양을 위해서는 추가적인 기술이 요구되는 실정이다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 메갈로사이티바이러스 및 랏도바이러스에 대한 감수성이 높은 어류 유래 세포주를 개발하고자 노력한 결과, 드워프구라미 지느러미에서 분리된 세포주가 메갈로사이티바이러스 (RSIV-type, ISKNV-type)과 랏도바이러스 (VHSV, SVCV, HIRRV)에 대한 감수성이 높고, 타어류 세포주(GF, PMF)에 비해 고역가의 RSIV, 및 ISKNV를 배양할 수 있어 해당 바이러스의 특성 구명, 제어 연구 및 백신 생산에 유용하다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 국내 등록특허 제10-1703783호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 드워프구라미 지느러미 유래 신규 세포주(기탁번호: KCLRF-BP-00522)를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 하기 단계를 포함하는, 드워프구라미 지느러미 유래 신규 세포주(기탁번호: KCLRF-BP-00522)의 분리 및 배양 방법을 제공하는 것이다:

[0011] (a) 드워프구라미로부터 적출된 지느러미에서 세포를 수득하는 단계; 및

[0012] (b) 상기 수득된 드워프구라미 지느러미 유래 세포를 배양하는 단계.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 드워프구라미 지느러미 유래 신규 세포주를 포함하는, 바이러스 배양용 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 드워프구라미 지느러미 유래 신규 세포주에 바이러스를 감염시키는 단계; 를 포함하는, 바이러스 배양 증식 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0018] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0020] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0021]

[0022] 본 발명은 드워프구라미 지느러미 유래 신규 세포주(기탁번호: KCLRF-BP-00522)를 제공한다.

[0023] 본 발명에서, 상기 "드워프구라미"는 버들붕어과 드워프구라미속에 속하고, 6cm 내지 8cm 정도로 성장하는 소형 어종이며, 관상어로 흔하게 유통되고 있다.

[0024] 본 발명에서, 상기 "지느러미"는 주로 어류 등의 척추 동물이 가진 물 속에서 이동할 때 물을 흘리거나 물줄기를 제어하는 운동기관이다. 몸에서 박막 형태로 돌출된다. 또한, 상기 "세포주"는 어류 조직에서 세포를 분리하여 연속적인 계대 배양을 통하여 세포 주화한 세포를 의미하며, "주화세포" 및 "세포"와 혼용하여 사용한다.

[0025] 본 발명에서, 상기 "계대(passage)"는 회식하거나 하지 않고, 또는 회식함 없이, 하나의 배양 용기로부터 다른 용기로 세포를 전달하는 것을 의미한다. 세포가 한 용기에서 다른 용기로 이송될 때마다, 세포의 특정 부분이 결손될 수 있으므로, 의도되었던 또는 의도되지 않았던 간에 세포의 회식이 일어날 수 있다. 이는 2차 배양(subculture)과 같은 의미이다. 계대 배양의 수는 세포가 배양되는 횟수로서, 새로운 용기 내로 2차 배양되거나 이송되어 현탁액 또는 부착 상태로 성장한다.

[0026] 본 발명에서, 상기 세포주는 44개의 염색체를 주로 하며, 35 내지 49개의 염색체 수를 가질 수 있는 드워프구라미 유래 세포주임을 확인하였다.

[0027] 본 발명에서, 상기 세포주는 바이러스 감수성을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명에서, 상기 바이러스는 메갈로사이티바이러스 또는 랫도바이러스일 수 있으며, 상기 메갈로사이티바이러스는 참돔이리도바이러스(Red sea bream iridovirus, RSIV), 및 전염성 비장 및 신장 괴사바이러스(Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus, ISKNV)로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있고, 상기 랫도바이러스는 바이러스성출혈성패혈증바이러스(Viral Hemorrhagic Septicemia Virus, VHSV), 잉어봄바이러스병바이러스(Spring viremia of carp virus, SVCV), 및 히라메랫도바이러스(Hirame rhabdovirus, HIRRV)로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 본 발명에서, 상기 세포주는 외래 유전자가 발현될 수 있으며, 상기 외래 유전자는 형광 단백질을 발현하는 유전자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0031] 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 드워프구라미 지느러미 유래 신규 세포주(기탁번호: KCLRF-BP-00522)의 분리 및 배양 방법을 제공한다:
- [0032] (a) 드워프구라미로부터 적출된 지느러미에서 세포를 수득하는 단계; 및
- [0033] (b) 상기 수득된 드워프구라미 지느러미 유래 세포를 배양하는 단계.
- [0034] 본 발명에서, 상기 "배양"은 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경 조건에서 생육시키기 위하여 수행하는 모든 행위를 의미한다.
- [0035] 본 발명에서, 상기 배양은 이글(Eagle) 기초 배지(BME), 이글 최소 필수 배지(EMEM), 돌베코(Dulbecco) 변형 이글배지(DMEM), DMEM-L(Dulbecco's modified eagle medium-Low glucose), DMEM-H(Dulbecco's modified eagle medium-High glucose), 글래스고우(Glasgow) 변형 이글 배지(GMEM), 조크릭(Joklik) 변형 이글 배지, 알파 변형 이글 배지, 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트(Roswell Park Memorial Institute: RPMI) 배지, 피셔(Fischer) 배지, 레이보비츠(Leibovitz) L-15 배지, 트로웰(Trowell) T-8 배지, 윌리엄스(Williams) 배지 E, 비거스(Biggers) 배지, 코노트 메디컬 리서치 라보라토리즈(Connaught Medical Research Laboratories: CMRL) 1066 배지, 햄(Ham) F10 배지, 햄 F12 배지, 이스코브(Iscove) 변형 돌베코 배지(IMDM), MCDB 104, MCDB 110, MCDB 153, 배지 199, NCTC 135 배지, 및 웨이머스(Waymouth) 배지 MB 752/1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 배지에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는 레이보비츠 L-15 배지를 사용하여 드워프구라미 지느러미 유래 세포주를 배양 및 성장시켰으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 또한, 상기 배양은 18 내지 35℃, 18 내지 33℃, 18 내지 30℃, 18 내지 29℃, 20 내지 35℃, 20 내지 33℃, 20 내지 30℃, 20 내지 29℃, 22 내지 35℃, 22 내지 33℃, 22 내지 30℃, 22 내지 29℃, 24 내지 35℃, 24 내지 33℃, 24 내지 30℃, 24 내지 29℃, 26 내지 35℃, 26 내지 33℃, 26 내지 30℃, 26 내지 29℃, 27 내지 29℃, 또는 28℃에서 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 또한, 상기 레이보비츠 L-15 배지는 3 내지 20%(v/v), 3 내지 19%(v/v), 3 내지 17%(v/v), 3 내지 16%(v/v), 5 내지 20%(v/v), 5 내지 19%(v/v), 5 내지 17%(v/v), 5 내지 16%(v/v), 7 내지 20%(v/v), 7 내지 19%(v/v), 7 내지 17%(v/v), 7 내지 16%(v/v), 9 내지 20%(v/v), 9 내지 19%(v/v), 9 내지 17%(v/v), 9 내지 16%(v/v), 11 내지 20%(v/v), 11 내지 19%(v/v), 11 내지 17%(v/v), 11 내지 16%(v/v), 13 내지 20%(v/v), 13 내지 19%(v/v), 13 내지 17%(v/v), 13 내지 16%(v/v), 또는 15%(v/v)의 FBS가 첨가될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 상기 배양조건의 온도 및 FBS를 첨가한 배지에서 배양하는 경우, 드워프구라미 지느러미 유래 세포주의 성장이 촉진될 수 있다.
- [0040] 본 발명은 본 발명의 드워프구라미 지느러미 유래 신규 세포주를 포함하는, 바이러스 배양용 조성물을 제공한다.
- [0041] 본 발명은 본 발명의 드워프구라미 지느러미 유래 신규 세포주에 바이러스를 감염시키는 단계; 를 포함하는, 바이러스 배양 증식 방법을 제공한다.
- [0042] 본 발명에서, 상기 바이러스 배양 증식 방법은 상기 바이러스에 감염된 드워프구라미 지느러미 유래 세포주를 배양하는 단계; 및 상기 배양된 세포주에서 바이러스를 수득하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 본 발명의 드워프구라미 지느러미 유래 신규 세포주를 이용하여 효과적으로 배양 및 증식되는 바이러스는 메갈로사이티바이러스 또는 람도바이러스일 수 있다.
- [0044] 본 발명에서, 상기 방법은 바이러스, 바이러스 유사 입자 또는 바이러스 벡터를 제조하는 데 사용될 수 있다. 감염된 세포를 배양한 후, 제조합 바이러스, 바이러스 벡터, 바이러스 입자 또는 그의 성분(단백질 및/또는 핵산(DNA 및/또는 RNA))일 수 있는, 바이러스를 포함하는 사용된 배양 배지는, 백신 생산, 억제성 RNA 분자(miRNA, siRNA 등)의 생산, 세포 형질감염 또는 유전자 요법에서 사용하기 위한 바이러스 벡터의 생산, 동물 또는 세포 배양물 감염, 바이러스 단백질 및/또는 핵산 연구 등을 비롯한 다양한 목적을 위해 사용될 수 있다.
- [0045] 본 발명에서, 상기 바이러스를 수득하는 단계는 당업계의 통상의 기술자에게 알려져 있는 단백질 및/또는 핵산

단리 기법에 따라 사용된 배양 배지로부터 바이러스를 단리하는 단계일 수 있다.

[0046] 본 발명에서, 상기 감염은 세포를 바이러스와 접촉시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 배양 배지 중에서 세포를 배양하기 전, 배양하는 동안, 또는 배양 후 세포를 바이러스와 접촉시킬 수 있다.

[0047] 본 발명에 의하면 메갈로사이티바이러스 또는 랍도바이러스를 효과적으로 배양 및 증식시킬 수 있으므로, 생산된 바이러스를 이용하여 바이러스 치료제 개발에 효과적으로 활용할 수 있다.

발명의 효과

[0049] 본 발명의 신규 드워프구라미 지느러미 세포주(Dwarf Gourami Fin, DGF)는 메갈로사이티바이러스(RSIV, ISKNV) 및 랍도바이러스(VHSV, HIRRV, SVCV)에 대해 감수성을 가지며, 특히 RSIV, ISKNV에 대한 감수성이 우수하여 대량 배양이 용이함을 확인하였다. 따라서, 어류 질병 연구 및 백신 제조에 필요한 바이러스의 대량 생산에 이용할 수 있으며, ISKNV 치료제 개발에도 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1에서 도 1a는 초대 배양(primary culture)된 드워프구라미 지느러미 세포를 관찰한 결과를 나타낸 것이다. 또한, 도 1b는 초대 배양한 드워프구라미 지느러미 세포를 100세대 이상 계대 배양한 후, 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 드워프구라미 지느러미 세포주(DGF cell)의 COI(mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I) 유전자 염기서열을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 DGF 세포의 염색체 수를 광학현미경으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 DGF 세포의 배지별(L-15(Leibovitz' s L-15), DMEM-L(Dulbecco' s modified eagle medium-Low glucose), DMEM-H(Dulbeccos' s modified eagle medium-High glucose)) 성장률을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5a는 DGF 세포의 온도별(20℃, 25℃, 28℃, 30℃) 성장률을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5b는 DGF 세포의 FBS 농도별(2%, 5%, 10%, 15% FBS) 성장률을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 DGF 세포에 참돔이리도바이러스(Red sea bream iridovirus, RSIV), 전염성 비장 및 신장 괴사바이러스(Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus, ISKNV), 바이러스성출혈성패혈증바이러스(Viral Hemorrhagic Septicemia Virus, VHSV), 잉어봄바이러스병바이러스(Spring viremia of carp virus, SVCV), 및 히라메랍도바이러스(Hirame rhabdovirus, HIRRV) 배양액을 접종한 후, 세포변성, 세포 축소, 및 용해를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 DGF 세포 내의 바이러스(RSIV, ISKNV, VHSV, HIRRV, SVCV) 입자를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 DGF 세포주가 감수성을 가지는 바이러스(RSIV, ISKNV, VHSV, HIRRV, SVCV)의 배양 역가를 TCID₅₀법을 이용하여 정량한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 다양한 세포주(DGF, RBF, PMF, GF)에서 RSIV와 ISKNV의 배양능을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 DGF 세포주에 GFP(green fluorescent protein) 유전자를 삽입하여 표적 단백질의 발현 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 하기 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0054] 실시예 1. 초대 세포 배양(Primary cell culture)

[0055] 관상어 수족관에서 드워프구라미를 구입하여 PCR을 통해 어류바이러스(RSIV, ISKNV)의 감염이 없음을 확인하고, 초대 세포 배양(primary cell culture)에 사용하였다. 구체적으로, 구입한 드워프구라미(체장: 2.5cm, 체중: 5.0g)는 얼음 마취 후 70% 에탄올로 체표면을 소독한 뒤, 꼬리지느러미를 적출하였다. 적출된 지느러미는 $3 \times \text{A.A.}$ (Antibiotic-Antimycotic)가 포함된 PBS(phosphate-buffered saline)를 이용하여 1회 세척하였다. 세척된 지느러미는 1mm^2 이하의 크기로 세절한 뒤, $3 \times \text{A.A.}$ 가 포함된 PBS를 이용하여 3회 세척하였다. 그 후, 세척된 지느러미를 0.25% 트립신(trypsin)-EDTA를 이용하여 세포분리 하였다. 트립신-EDTA를 처리한 지느러미 조직 및 세포는 셀 스트레이너(cell strainer, $100\mu\text{m}$)를 이용하여 1회 여과하였으며, 여과된 세포는 20% FBS와 $3 \times \text{A.A.}$ 가 포함된 Leibovitz' s L-15배지(이하, 초대 배양 세포 배양배지) 5mL을 이용하여 현탁하였다. 세포 현탁액을 4°C 에서 $500\times\text{g}$ 로 10분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 이 과정을 3회 반복하였다. 그런 다음, 세포를 초대 배양 세포 배양배지를 이용하여 재현탁한 다음, 25cm^2 조직 배양용 플라스크(tissue culture flask)에 접종하였다. 그 후, 드워프구라미 지느러미 세포는 25°C 에서 배양되었으며, 배지는 매일 한 번씩 교환하였다. 초대 배양(primary culture)된 드워프구라미 지느러미 세포에서 섬유아세포-유사 세포(fibroblast-like cell)와 상피-유사 세포(epithelial-like cell)가 함께 관찰되었다. 이는 도 1a에 나타내었다.

[0056] 초대 배양한 드워프구라미 지느러미세포가 단층(monolayer)을 형성하면, 세포는 0.25% 트립신-EDTA로 세포를 떼어낸 후, 4°C 에서 $500\times\text{g}$ 로 10분간 원심분리한 후, 1:3 비율로 새롭게 계대배양하였다. 10세대 계대 배양하였을 때 FBS의 농도를 15%로 감소시키고, A.A. 농도도 $1 \times$ 로 낮춰 배양하였으며, 이 후 40세대에서는 FBS 농도를 10%로 감소시키고 NEAA(non-essential amino acid)와 HEPES 버퍼를 배지에 첨가하여 28°C 에서 배양하였다. 결과적으로, 드워프구라미 지느러미 세포는 100세대 이상 계대배양을 실시하였으며, 상피-유사 세포(epithelial-like cell)가 우점적으로 자랐다. 이는 도 1b에 나타내었다.

[0057] 분리한 드워프구라미 지느러미 세포는 DGF(Dwarf gourami fin) 세포로 명명하였다.

[0059] 실시예 2. 드워프구라미 지느러미 세포주(DGF cell)의 COI 유전자 염기서열 분석

[0060] 실시예 1에서 확립한 DGF 세포주의 유래어종을 확인하기 위하여 COI(mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I) 유전자의 염기서열을 분석하였다. 구체적으로, 드워프구라미 COI 유전자를 타겟으로 하는 DwGCOI-F 및 DwGCOI-R 프라이머 세트를 제작하고, DGF 세포에서 분리한 genomic DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. 그 후, PCR 산물을 이용하여 시퀀싱 및 계통분석 하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0061] DwGCOI-F: 5' - GTC ACA GCA CAC GCT TTT GT -3' (서열번호 1)

[0062] DwGCOI-R: 5' - TGC TGG CTA GTG GAG GGT AT -3' (서열번호 2)

[0063] 도 2에 나타난 바와 같이, DGF 세포의 COI 유전자 염기서열은 드워프구라미 COI 유전자 염기서열과 100% 일치하였으며, 계통수 분석에서도 100% 상동성을 보였다.

[0065] 실시예 3. 드워프구라미 지느러미 세포주 (DGF cell)의 염색체 수 분석

[0066] 25cm^2 조직 배양용 플라스크에서 2일 동안 배양된 DGF 세포를 PBS로 1회 세척한 후, 세포에 콜히친 용액(colchicine solution)을 $0.5\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 첨가하고 25°C 에서 5시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 세포를 스크래퍼로 떼어낸 후, 4°C 에서 $500\times\text{g}$ 로 10분간 원심분리하여 세포를 수득하였다. 상등액을 제거한 후 0.07M KCl을 첨가하여 25°C 에서 25분간 배양하였다. 세포를 Carnoy 용액(methanol: acetic acid= 3:1)으로 2분간 전고정하고, 4°C 에서 $500\times\text{g}$ 로 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 후 차가운 Carnoy 용액으로 세포를 25분 동안 재고정하였다. 이 과정을 두 번 반복한 다음, -20°C 에서 밤새 배양하였다. 세포를 재현탁한 다음, 냉각된 슬라이드 글라스에 떨어뜨린 후 건조시켰다. 그 후, 상온에서 5% 김자(Giemsa, pH 6.8)로 25분간 염색하였다. 염색 용액을 PBS를 이용하여 세척한 후, 슬라이드 글라스를 자연 건조시킨 다음, 유사분열 중기의 세포 100개의 염색체를 광학현미경($1,000\times$ 배율)으로 계수하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0067] 도 3에 나타난 바와 같이, 드워프구라미 지느러미 세포의 염색체 수는 35 내지 49개로 나타났으며, 44개의 염색체 수가 가장 높은 비율을 차지하였다.

[0069] **실시예 4. 드워프구라미 지느러미 세포주(DGF cell)의 배지별 성장률 분석**

[0070] 드워프구라미 지느러미 세포배양에 가장 적합한 배지를 확인하기 위해 15% FBS가 포함된 L-15(Leibovitz' s L-15), DMEM-L(Dulbecco' s modified eagle medium-Low glucose), 또는 DMEM-H(Dulbeccos' s modified eagle medium-High glucose) 배지에서 배양하였다. 계대 1, 3, 5, 7, 및 9일차에 세포를 수득하여 일회용 헤모사이토미터(hemocytometer, C-chip, inCYTO)를 이용하여 세포를 계수하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0071] 도 4에 나타난 바와 같이 DMEM-L 배지와, DMEM-H 배지에서는 DGF 세포가 배양되지 않으나, L-15 배지에서는 세포가 성장하는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 DGF 세포주는 L-15배지에서 배양하는 것이 적합함을 확인하였다.

[0073] **실시예 5. 드워프구라미 지느러미 세포주(DGF cell)의 온도별, FBS 농도별 성장률 분석**

[0074] 드워프구라미 지느러미 세포배양에 가장 적합한 배양온도를 확인하기 위하여, 20℃, 25℃, 28℃ 및 30℃에서 15% FBS가 첨가된 L-15배지에 세포를 2.5×10^4 cells/mL의 농도로 접종한 후, 1, 3, 5, 7, 9일차에 세포를 계수하여 성장을 비교하였다. 그 결과는 도 5a에 나타내었다.

[0075] 도 5a에 나타난 바와 같이, DGF 세포는 25 내지 30℃에서 배양이 가능하였으며, 28℃ 와 30℃에서 최적의 성장을 확인하였다.

[0076] 또한, 드워프구라미 지느러미 세포배양에 적합한 FBS 농도를 확인하기 위하여, 2%, 5%, 10%, 15% FBS를 첨가한 L-15배지에 세포를 2.5×10^4 cells/mL의 농도로 접종한 후 28℃로 배양하였으며, 1, 3, 5, 7, 9일차에 세포를 계수하여 성장을 비교하였다. 그 결과는 도 5b에 나타내었다.

[0077] 도 5b에 나타난 바와 같이, 2% FBS 배지에서는 세포가 성장하지 않았고, 5%, 10%, 15% FBS 배지에서는 세포가 각각 23.6배, 34.3배, 68.5배 성장하였으며, 15% FBS가 포함된 배지에서 세포는 통계적으로 유의미하게 높은 성장을 보여주었다.

[0078] 따라서, 이후 드워프구라미 지느러미 세포주는 15% FBS를 첨가한 L-15 배지를 이용하여, 28℃에서 유지 및 계대하였다.

[0080] **실시예 6. 드워프구라미 지느러미 세포주(DGF cell)의 바이러스 감수성 평가**

[0081] DGF 세포주의 바이러스 감수성을 평가하기 위해, 25cm² 조직 배양용 플라스크에서 단층을 형성한 DGF 세포에 $10^{5.8}$ TCID₅₀/mL 농도의 메갈로사이티바이러스(참돔이리도바이러스(Red sea bream iridovirus, RSIV), 전염성 비장 및 신장 괴사바이러스(Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus, ISKNV))와 람도바이러스(바이러스성 출혈성패혈증바이러스(Viral Hemorrhagic Septicemia Virus, VHSV), 잉어봄바이러스병바이러스(Spring viremia of carp virus, SVCV), 히라메람도바이러스(Hirame rhabdovirus, HIRRV)) 배양액을 2시간 동안 흡착하여 접종하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었다.

[0082] 도 6에 나타난 바와 같이, 감염 7-10일차 사이에 메갈로사이티바이러스(RSIV-, ISKNV-type)를 접종한 세포에서 세포가 둥글어지는 형태의 세포변성효과(CPE)가 확인되었으며, 람도바이러스(VHSV, SVCV, HIRRV)를 접종한 세포에서 세포 축소(cell shrinking) 및 용해(lysis)가 확인되었다.

[0083] 또한, DGF 세포내의 바이러스 입자를 확인하기 위하여 전자현미경 분석을 실시하였다. 각각의 바이러스를 DGF 세포에 접종한 후, CPE가 형성되었을 때(약 접종 3-4일차) 세포를 수득한 뒤, 2.5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)를 이용하여 세포를 고정하고 투과전자현미경으로 분석하였다. 그 결과는 도 7에 나타내었다.

[0084] 도 7에 나타난 바와 같이, RSIV와 ISKNV를 감염시킨 DGF 세포에서 메갈로사이티바이러스의 형태인 정육각형의 바이러스 입자가 확인되었으며, VHSV, SVCV, 및 HIRRV를 접종한 DGF 세포에서 람도바이러스의 형태인 총알모양의 바이러스 입자가 확인되었다. 따라서, DGF 세포는 메갈로사이티바이러스(RSIV-, ISKNV-type) 및 람도바이러스(VHSV, HIRRV, SVCV)에 대해 감수성을 가지는 것으로 확인되었다.

[0086] **실시예 7. 드워프구라미 지느러미 세포주(DGF cell)에서의 다양한 어류바이러스 생산능 평가**

[0087] 실시예 6에서 DGF 세포주가 RISV, ISKNV, VHSV, HIRRV 및 SVCV에 감수성이 있는 것이 확인되었다. 실시예 7에서는 DGF 세포주가 감수성을 가지는 바이러스의 배양 역가를 TCID₅₀법을 이용하여 정량하였다. 구체적으로, 24-웰 플레이트에서 단층을 형성한 DGF 세포주에 각각의 바이러스를 10^{5.8} TCID₅₀/mL의 농도로 희석한 뒤 접종하였다. 메갈로사이티바이러스는 28℃에서, 랍도바이러스는 20℃에서 배양하였으며, 접종 7일차에 상등액을 모두 수득하였다. 이 과정은 세 번 반복하여 수행되었다. 메갈로사이티바이러스는 DGF 세포에서, 랍도바이러스는 EPC(epithelioma papulosum cyprini) 세포를 이용하여 TCID₅₀법으로 정량하였다. 그 결과는 도 8에 나타내었다.

[0088] 도 8에 나타낸 바와 같이, RSIV(10^{9.3} TCID₅₀/mL)가 가장 높은 역가로 배양되었다. 다음으로 ISKNV(10^{8.5} TCID₅₀/mL)와 HIRRV (10^{8.4} TCID₅₀/mL)가 비슷한 수준으로 배양되었으며, VHSV와 SVCV가 가장 낮은 농도(10^{7.7} TCID₅₀/mL)로 배양되었다.

[0089] 메갈로사이티바이러스 배양을 목적으로 하여 개발된 세포주 RBF(rock bream fin) 세포와 PMF(pagrus major fin) 세포; 및 세계동물보건기구(World Organisation for Animal Health, WOAH)에서 RSIVD(Red sea bream iridoviral disease)의 원인체인 RSIV와 ISKNV를 분리하도록 권장되는 GF(grunt fin) 세포에서 메갈로사이티바이러스 배양능을 비교하였다. 구체적으로, 24-웰 플레이트에 단층을 형성한 각각의 세포주에 RSIV와 ISKNV-type 바이러스를 10^{5.8} TCID₅₀/mL의 농도로 접종한 후, 접종 7일차에 상등액을 모두 수득하여 qRT-PCR 및 TCID₅₀법을 이용하여 정량하였다. TCID₅₀법은 실시예 1에서 개발된 DGF 세포주를 이용하였다. 그 결과는 도 9 및 표 1에 나타내었다.

[0090] 도 9, 및 표 1에 나타낸 바와 같이, 타 어류 주화세포와 비교하였을 때, DGF 세포에서 ISKNV가 3.0 × 10⁸ TCID₅₀/mL (5.22 × 10⁹ genome copies/mL)의 농도로 가장 높게 배양되었다.

[0091] 따라서, 본 발명에서 개발된 DGF 세포는 RSIV 및 ISKNV 배양에 적합하고 특히, ISKNV의 고역가 배양에 최적화된 세포임을 확인한 것이다.

표 1

[0093]

Cell line	RSIV		ISKNV	
	viral genome copy	TCID ₅₀	Viral genome copy	TCID ₅₀
DGF	1.54E+10	5.44E+08 ^a	5.22E+09	3.00E+08 ^a
RBF	1.81E+09	1.00E+08 ^b	1.88E+07	3.30E+06 ^b
PMF	5.98E+10	2.77E+09 ^a	4.51E+05	2.44E+04 ^c
GF	1.20E+08	1.07E+07 ^c	3.27E+05	2.28E+04 ^c

[0095] **실시예 8. 드워프구라미 지느러미 세포주(DGF cell)의 형질감염에 의한 형광 단백질의 발현 평가**

[0096] 드워프구라미 지느러미 세포주에 외래 유전자를 삽입하여 유전자 발현에 활용할 수 있는지를 확인하기 위해, GFP(green fluorescent protein) 유전자를 삽입하여, 표적단백질의 발현여부를 확인하였다. 구체적으로, 녹색 형광 단백질 발현 벡터(pAcGFP1-C1, Takara)의 형질감염을 위해 DGF 세포를 콘포칼 디쉬(confocal dish)에 1.0 × 10⁶ cells/mL의 농도로 분주 하였다. 80% 단층을 형성한 DGF 세포에 lipofectamin 3000(invitrogen)을 이용하여 pAcGFP1-C1로 형질감염시킨 후, 28℃에서 3일간 배양하였다. 그 후, 초록 형광 단백질의 발현을 Nikon Ts2FL 형광현미경을 사용하여 관찰하였다. 그 결과는 도 10에 나타내었다.

[0097] 도 10에 나타낸 바와 같이, 초록 형광 단백질의 발현을 명확하게 관찰할 수 있었다.

[0098] 따라서, DGF 세포는 형질감염을 통해서 외부 유전자를 발현할 수 있으므로, 다양한 외부 유전자 삽입을 통한 관상어 바이러스 및 질병제어 메커니즘에 대한 연구에 활용 가능 할 것이다.

[0100] 한편, 상기 신규한 드워프구라미 지느러미 세포주는 한국세포주연구재단(Korean Cell Line Research Foundation, KCLRF)에 2023년 4월 6일에 수탁번호 KCLRF-BP-00522로 기탁하였다.

[0102] 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 신규 드워프구라미 지느러미 세포주(Dwarf Gourami Fin, DGF)는 메갈로사이트 바이러스(RSIV, ISKNV) 및 랍도바이러스(VHSV, HIRRV, SVCV)에 대해 감수성을 가지며, 특히 RSIV, ISKNV에 대한 감수성이 우수하여 바이러스의 대량 배양이 용이함을 확인하였다. 따라서, 어류 질병 연구 및 백신 제조에 필요한 바이러스의 대량 생산에 이용할 수 있으며, ISKNV 치료제 개발에도 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

[0104] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

수탁번호

[0106]

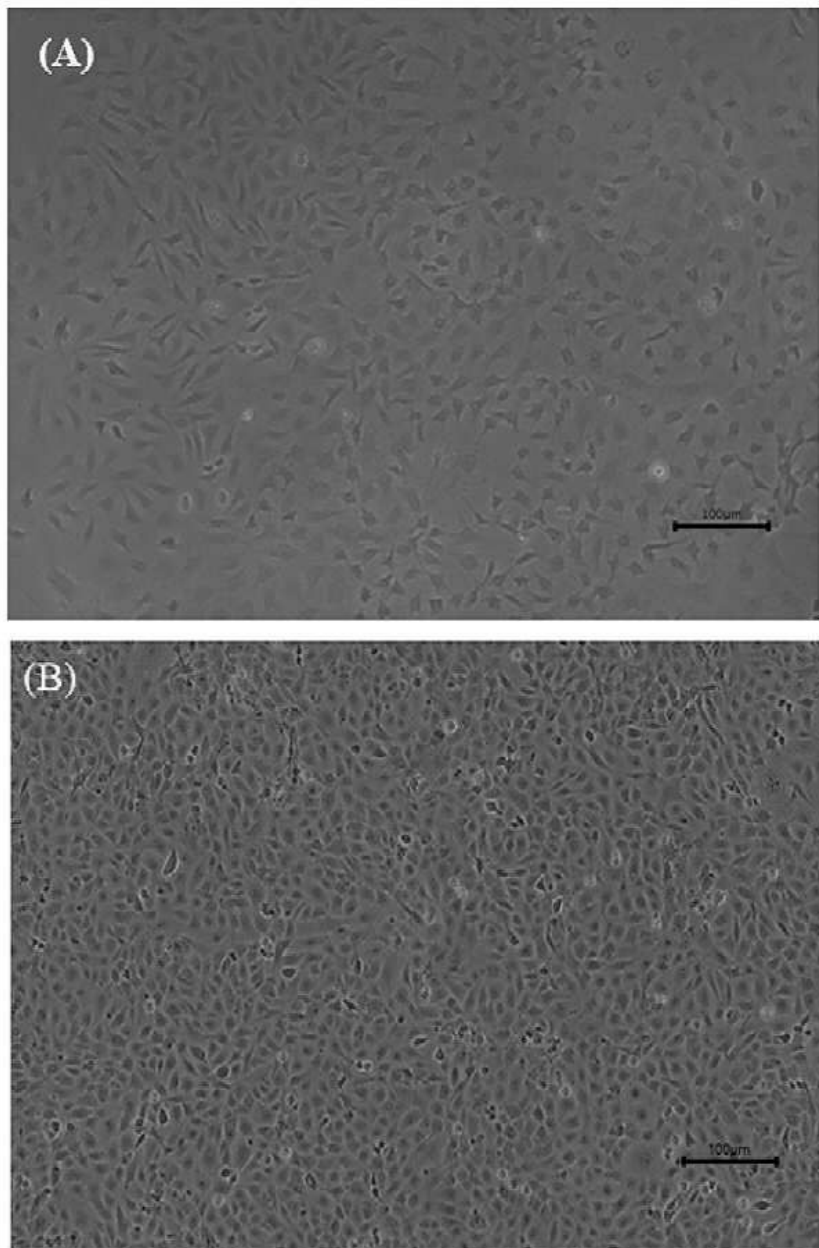
기탁기관명 : 한국세포주연구재단

수탁번호 : KCLRF-BP-00522

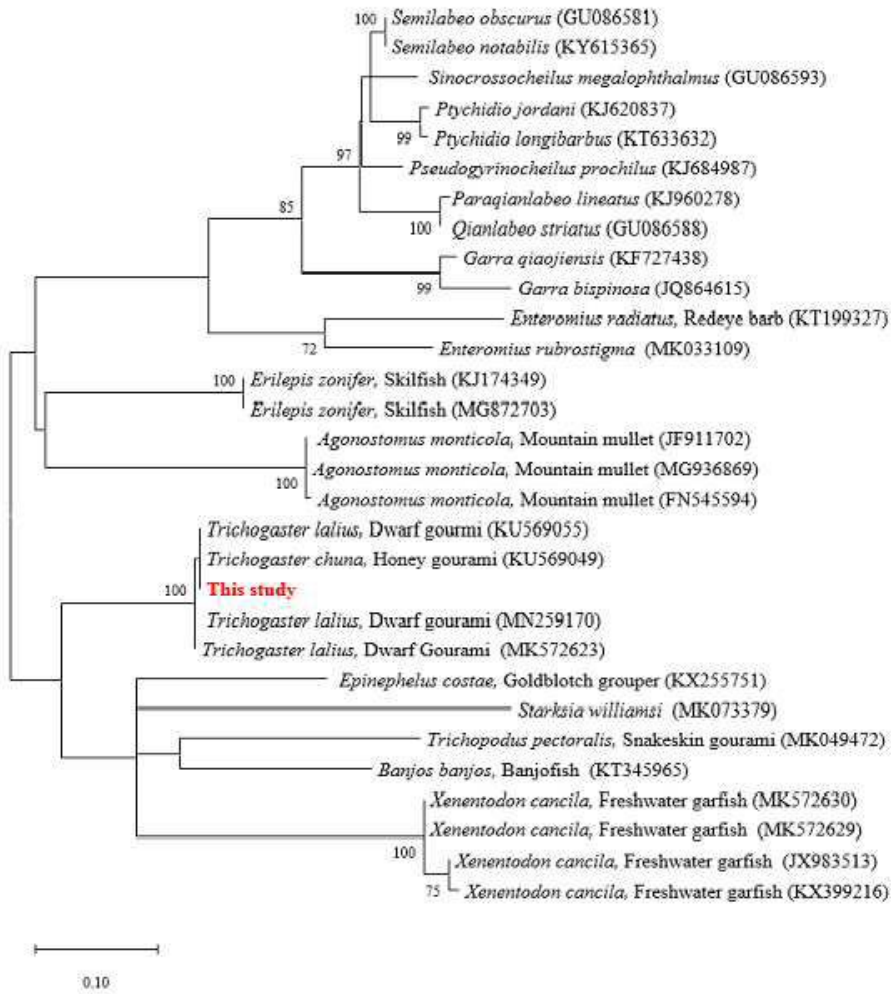
수탁일자 : 20230406

도면

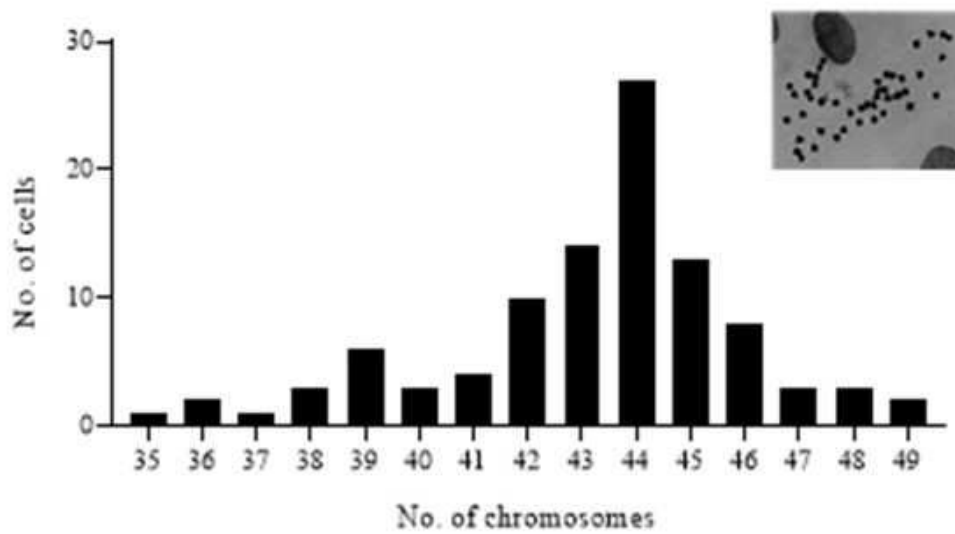
도면1



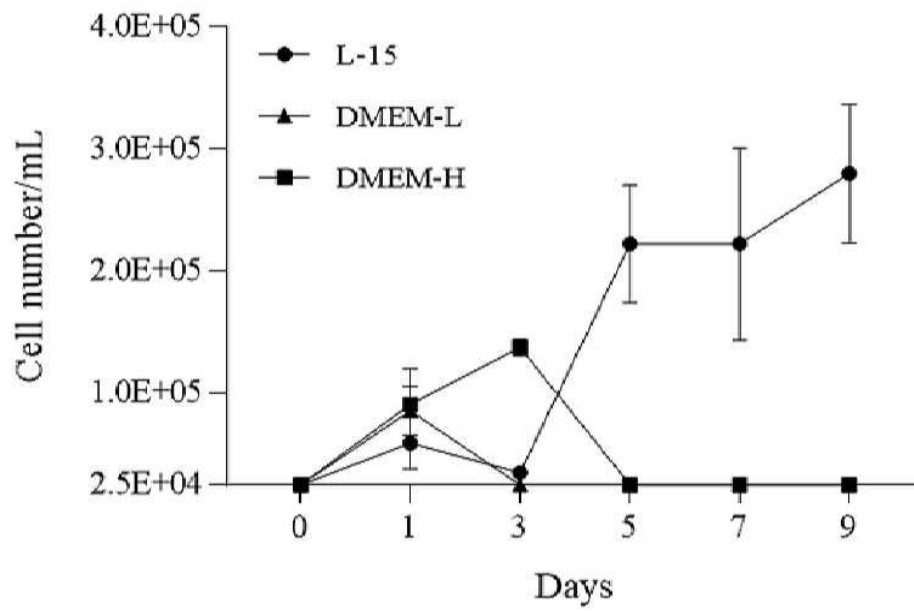
도면2



도면3

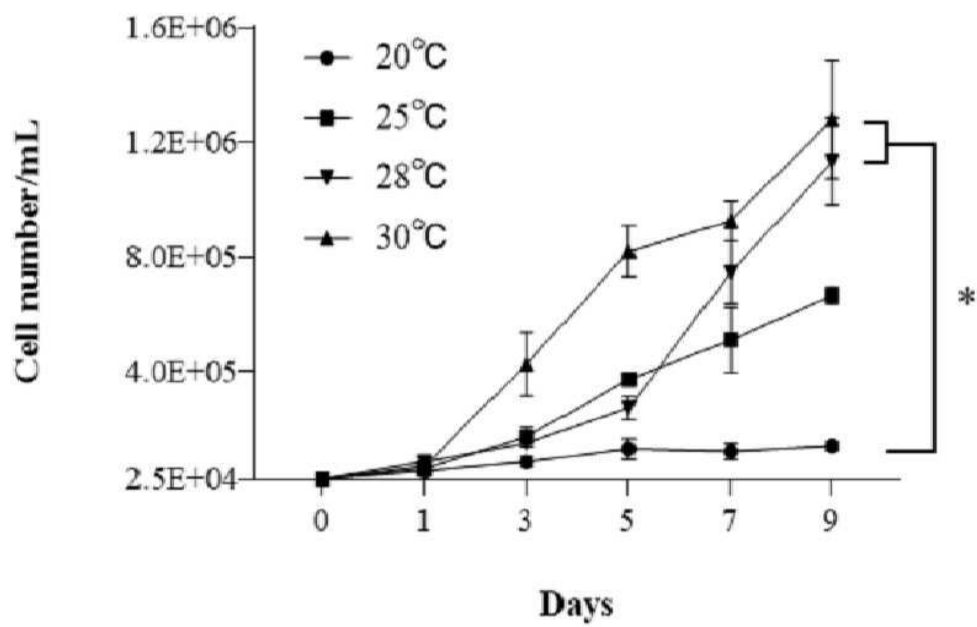


도면4



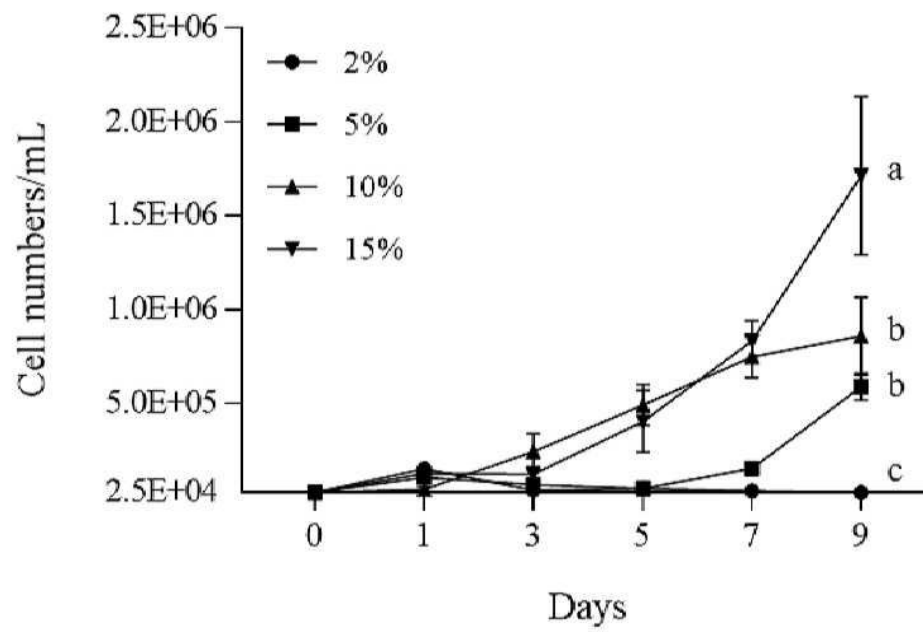
도면5a

(A)

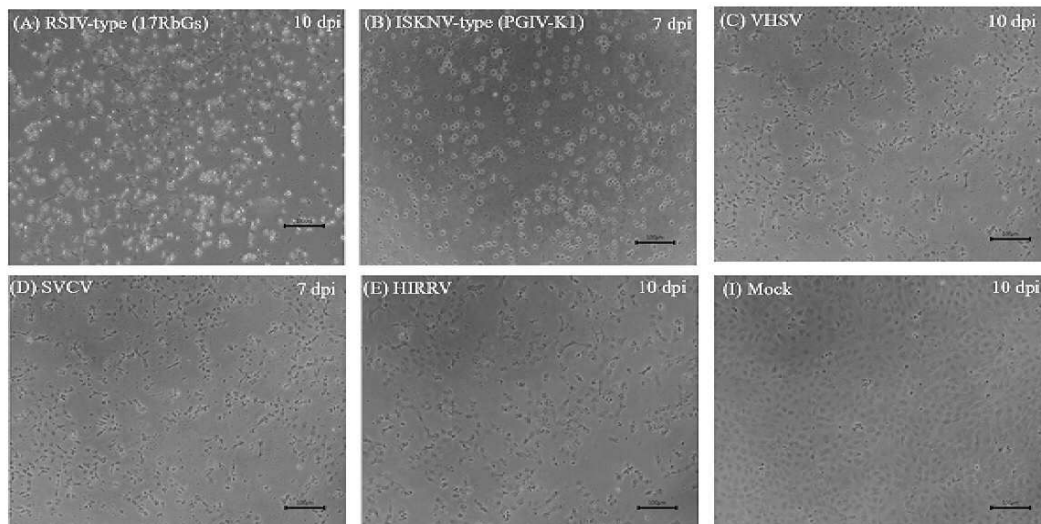


도면5b

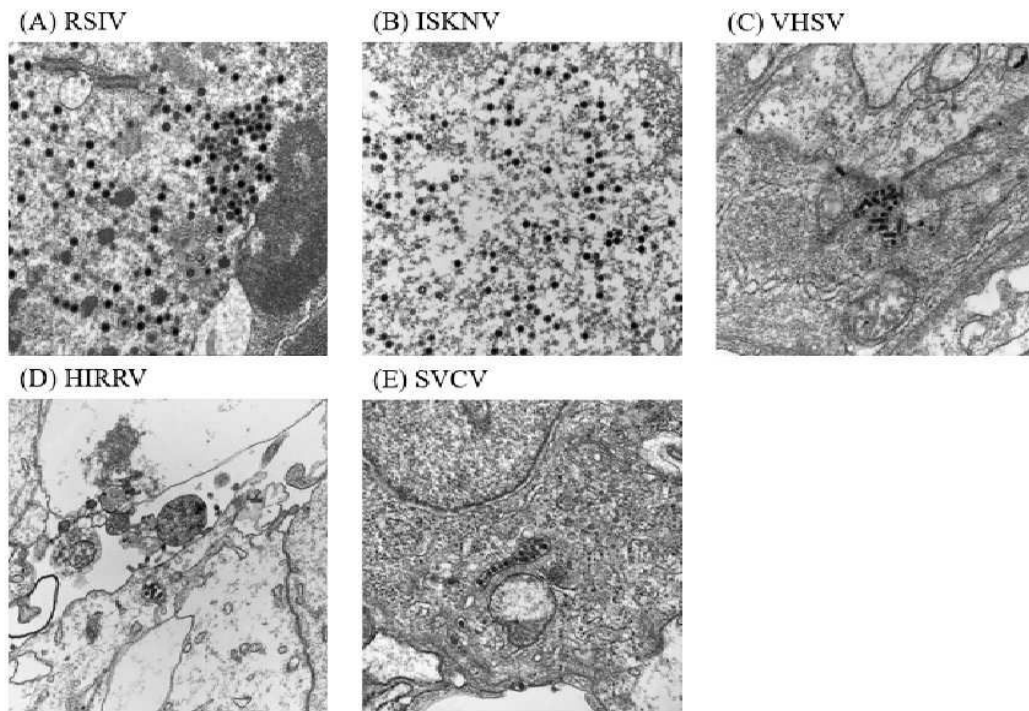
(B)



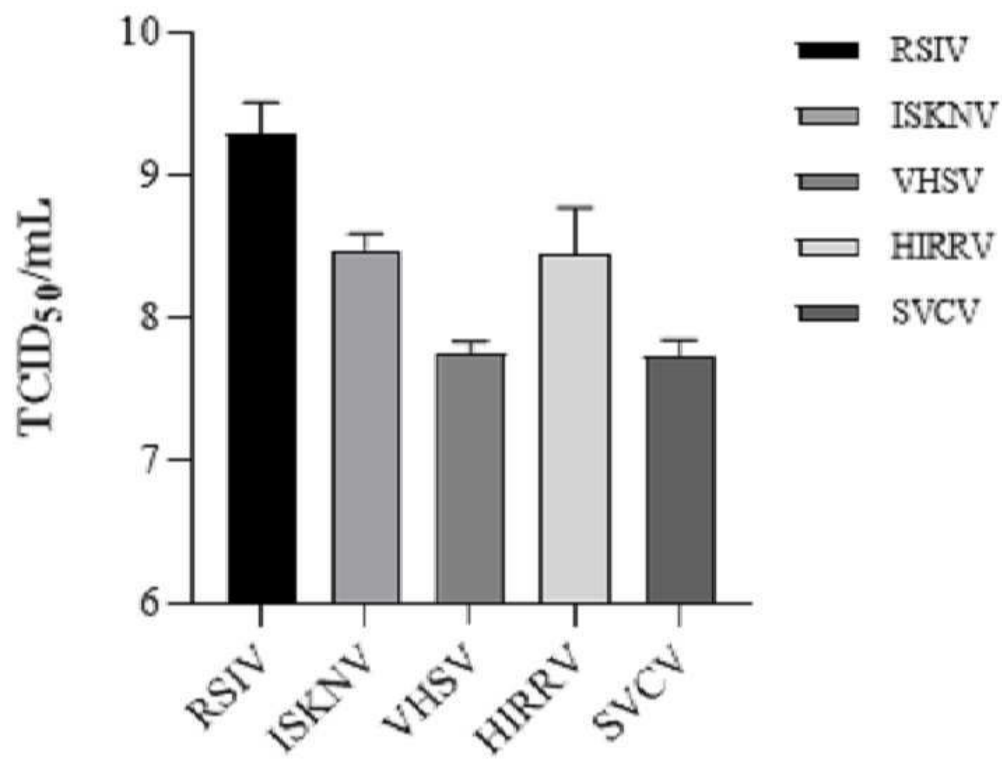
도면6



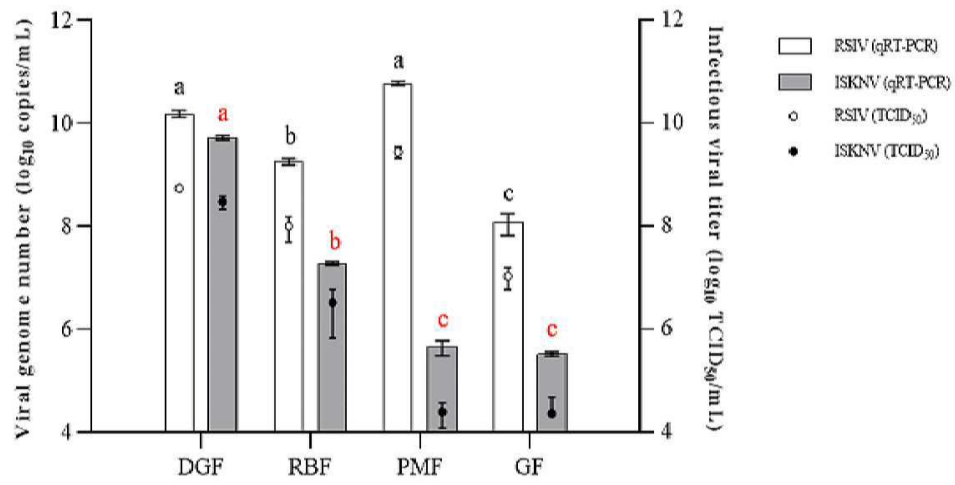
도면7



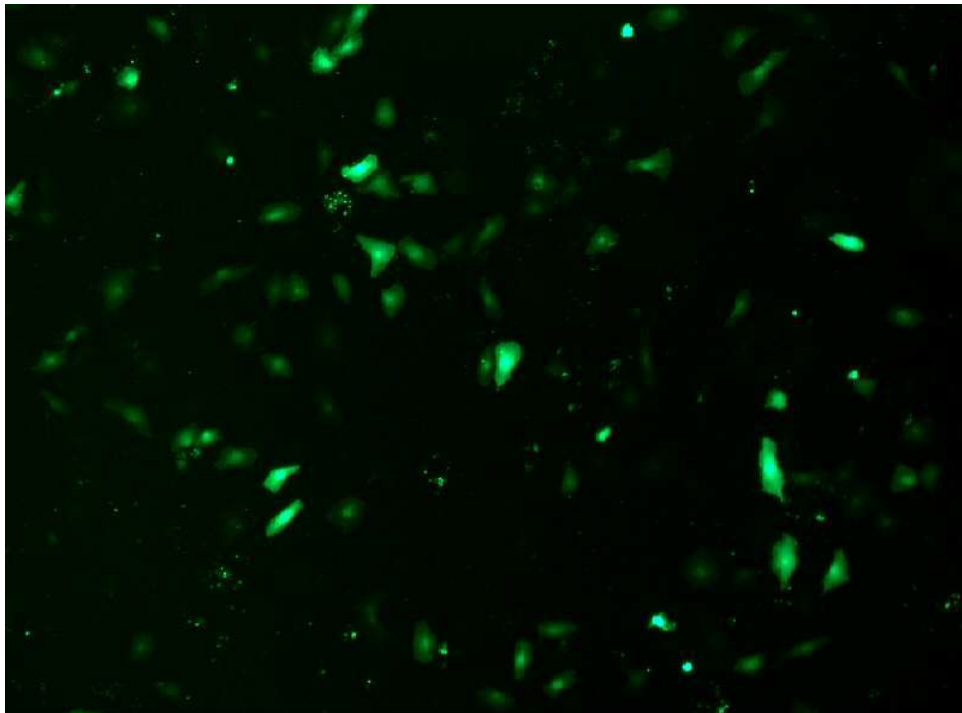
도면8



도면9



도면10



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.