



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0066169
(43) 공개일자 2012년06월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 7/01 (2006.01) *A01N 63/00* (2006.01)

C12R 1/92 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0127383

(22) 출원일자 2010년12월14일

심사청구일자 2010년12월14일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내

(72) 발명자

최태진

부산광역시 해운대구 대천로103번길 47, 대림1차
아파트 108동 501호 (좌동)

김진주

부산광역시 남구 황령대로 504, 101동 312호 (대
연동, 대연비치아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

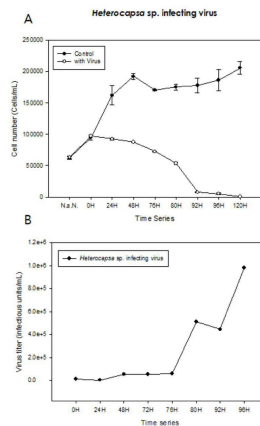
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 헤테로캡사 피그매아에 대해 특이적 용균 활성을 가지는 HpDNAV

(57) 요약

본 발명은 헤테로캡사 피그매아(*Heterocapsa pygmaea*)에 대해 특이적 용균 활성을 가지는 HpDNAV (*Heterocapsa pygmaea* infecting virus), 상기 HpDNAV를 유효성분으로 포함하는 적조 방제용 조성물 및 상기 조성물을 해수에 처리하는 단계를 포함하는 적조의 방제 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

김시욱

광주광역시 남구 봉선2동 한국아텔리움아파트 10
1동 1403호

김창훈

부산광역시 남구 분포로 113, LG메트로시티아파트
232동 1802호 (용호동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 M1071118001-08M1118-00110

부처명 교육과학기술부

연구사업명 미래유망 융합기술 파이오니어사업

연구과제명 유해조류 제어를 위한 바이옌나노 캡시드 제조 및 탑재 융합기술개발

주관기관 조선대학교

연구기간 2008.03.01 ~ 2011.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

헤테로캡사 피그매아(*Heterocapsa pygmaea*)에 대해 특이적 용균 활성을 가지는 HpDNAV (*Heterocapsa pygmaea* infecting virus).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 HpDNAV는 기탁번호가 KCTC11824BP인 것을 특징으로 하는 HpDNAV.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 HpDNAV를 유효성분으로 포함하는 적조 방제용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 적조는 헤테로캡사 피그매아(*Heterocapsa pygmaea*)에 의해 유발된 것을 특징으로 하는 적조 방제용 조성물.

청구항 5

제3항의 조성물을 해수에 처리하는 단계를 포함하는 적조의 방제 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 적조는 헤테로캡사 피그매아(*Heterocapsa pygmaea*)에 의해 유발된 것을 특징으로 하는 적조의 방제 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 헤테로캡사 피그매아(*Heterocapsa pygmaea*)에 대해 특이적 용균 활성을 가지는 HpDNAV에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 헤테로캡사 피그매아에 대해 특이적 용균 활성을 가지는 HpDNAV (*Heterocapsa pygmaea* infecting virus), 상기 HpDNAV를 유효성분으로 포함하는 적조 방제용 조성물 및 상기 조성물을 해수에 처리하는 단계를 포함하는 적조의 방제 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 바이러스는 전염성이 있는 편성(obligate) 세포내 기생체이며, 인간, 동물, 식물, 조류 및 세균에서 많은 질병을 야기한다. 바이러스의 크기는 0.02 내지 0.3 μ m 범위에 있으므로, 투과전자현미경으로 확인이 가능하다. 바이러스의 게놈은 DNA 또는 RNA를 포함하며, 상기 바이러스 게놈은 적절한 숙주세포에서 복제되어 합성이 이루어진다(Flint *et al.* 2000, Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control, Vol I. ASM Press, Washington, D.C.).

[0003] 약 20년 전, 처음으로 바이러스가 해수에 존재하는 것으로 보고되었지만(일반적인 농도 범위: 10⁵ 내지 10⁸/mL)(Fuhrman, 1999, *Nature*. 399:541-548), 상기 바이러스는 해수에서의 우세한 생물체를 감염시킨다(Suttle, 2005, *Nature*. 437:356-361). 숙주 생물체가 용균되면, 영양분이 주위 환경으로 방출되는데, 상기 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(Weinbauer and Rassoulzadegan, 2004, *Environ. Microbiol.* 6:1-11). 이것이 바이러스 및 바이러스-유사 입자가 천연 미생물 군집에서 중요한 역할을 하는 것으로 인식되는 이유이다.

[0004] 아마도 상기 대부분의 바이러스는 박테리오파지이지만, 조류를 감염시키는 바이러스는 해양 생태계에서 식물 플랑크톤 폐사의 중요한 원인체인 것으로 또한 보고되었다(Suttle, 1994, *Microb. Ecol.* 28:237-243). 바이러스는 적조 (HABs ; harmful algae blooms) 및 유독성 종을 포함하는 식물 플랑크톤의 대증식을 예방 및 소멸

시킬 수 있다(Nagasaki *et al.* 2004, *Aquat. Microb. Ecol.* 34:219-226).

- [0005] 해양 진핵성 조류를 감염시키는 대략 50 종의 다른 바이러스에서 관찰된 바이러스 및 바이러스-유사 입자는 최근 20년간 분리 및 규명되었다.(Nagasaki, 2008, *J. Microbiol.* 46:235-243).
- [0006] 상기 많은 바이러스는 담수 및 해수 유래의 진핵성 조류 숙주를 감염시키는 바이러스 그룹 중, 유전학적 다양성을 가지지만 형태학적으로는 유사한 피코드나비리데 과(family *Phycodnaviridae*)의 멤버 및 유망한 멤버이다. 상기 과(family) 명은 2가지 구별되는 특성에서 유래한다: (i) 조류 숙주 유래의 "피코(phyco)", 및 (ii) 상기 모든 바이러스가 이중 가닥 DNA 게놈을 가지는 특성에서 유래한 "dna" (Wilson *et al.* 2005b, Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 163-175). 보통 바이러스 크기의 범위가 100 nm 이상인 바이러스는 "자이언트 바이러스"로 불리는데(Van Etten and Meints, 1999, *Annu. Rev. Microbiol.* 53:447-494), 본 발명자들은 숙주의 이름에 의거하여 바이러스를 명명하였다. 예를 들면, 클로로바이러스(Chlorovirus), 프라시노바이러스(Prasinovirus), 프림네시오바이러스(Prymnesiovirus), 페오바이러스(Phaeovirus), 코콜리토바이러스(Coccolithovirus) 및 라피도바이러스(Rapidovirus)가 있다.
- [0007] 피코드나비리데를 포함하는 수생 바이러스의 발견 국면은 더 많은 환경 샘플에서 조사된 바와 같이 지속적으로 발견되고 있는 새로운 바이러스와 함께 이제 시작일 뿐이다. 비록 단지 몇몇의 서열만이 완성되었다 할지라도, 피코드나비리데에 존재하는 유전적 다양성은 다양성의 한계가 없다는 것을 나타낸다. 왜냐하면 피코드나비리데는 약 40,000 여종의 알려진 진핵성 조류 중에서 단지 약 0.1%에서 동정되었기 때문이다(Guiry and Rindi, 2005, World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway).
- [0008] 피코드나비리데는 아마도 아주 오래된 종일 것이다. 축적된 유전적 증거는 폭스바이러스(poxvirus), 이리도바이러스(iridovirus), ASFV (African swine fever virus), 및 최근에 발견된 미미바이러스(mimivirus)와 함께 피코드나비리데가 유카리오제네시스(eukaryogenesis)의 순간에 아마도 발생하였고(Raoult *et al.* 2004, *Science.* 306:1344-1350), 대략 20 내지 27 억년 전에 존재한 것으로 보고된(Glansdorff, 2000, *Mol. Microbial.* 38:177-185), 공통된 진화적 조상을 가진다는 것을 나타낸다. 상기 모든 바이러스는 9개의 유전자 산물을 공유하며, 33개 이상의 유전자 산물은 상기 5개의 바이러스 과 중 적어도 2개에서 존재한다(Raoult *et al.* 2004, *Science.* 306:1344-1350). 종합해보면, 상기 바이러스는 NCLDV (nucleocytoplasmic large DNA virus)로 언급할 수 있다(Iyer *et al.* 2001, *J. Virol.* 75:11720-11734).
- [0009] 본 발명자들은 한국 연안 해수로부터 헤테로캡사 피그매아(*Heterocapsa pygmaea*)를 감염시키는 살조성(algicidal) 바이러스를 분리하였다. 그 후, 상기 바이러스의 형태학적 특성과 생장 시험, 바이러스 역가 및 게놈 형태와 같은 기본 특성이 관찰되었다.
- [0010] 한국등록특허 제10-0758997호에는 슈도모나스 속 미생물을 이용한 편모 조류의 억제 방법이 개시되어 있으며, 한국공개특허 제2010-0014998호에는 코클로디니움 속 조류에 대해 살조 활성을 가지는 해양 박테리아가 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 해수로부터 분리한 바이러스가 적조의 원인체 중 하나인 헤테로캡사 피그매아(*Heterocapsa pygmaea*)에 대해 특이적 용균 활성을 갖는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 헤테로캡사 피그매아(*Heterocapsa pygmaea*)에 대해 특이적 용균 활성을 가지는 HpDNAV (*Heterocapsa pygmaea* infecting virus)를 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 HpDNAV를 유효성분으로 포함하는 적조 방제용 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 해수에 처리하는 단계를 포함하는 적조의 방제 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명의 HpDNAV (*Heterocapsa pygmaea* infecting virus)는 헤테로캡사 피그매아(*Heterocapsa pygmaea*)에 대

해 특이적 용균 활성을 가지므로, 적조의 방제에 유용할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 현장 해수 샘플로부터 바이러스 분리 절차를 나타낸다.

도 2는 헤테로캡사 피그매아(*Heterocapsa pygmaea*) NF-F-GYM-SP-1을 나타낸다. (A) 정상 배양물(좌측) 및 HpDNAV 접종 배양물(우측)의 사진, (B) 손상되지 않은 세포의 광학현미경 관찰, (C) 96 hpi에서 HpDNAV-감염 세포의 광학현미경 관찰.

도 3은 헤테로캡사 피그매아(*Heterocapsa pygmaea*) NF-F-GYM-SP-1을 나타낸다. (A) 손상되지 않은 세포의 투과 전자현미경 관찰, (B) 96 hpi에서 HpDNAV-감염 세포의 투과 전자현미경 관찰, (C) (B)의 정사각형 부위의 더 높은 배율. (D) 양성 염색된 HpDNAV.

도 4는 투과 전자현미경에 의해 관찰된 헤테로캡사 피그매아(*Heterocapsa pygmaea*) NF-F-GYM-SP-1의 외부 껍질을 나타낸다.

도 5는 생장 실험의 결과를 나타낸다. (A) 바이러스 접종(○) 또는 무접종(●)을 한 헤테로캡사 피그매아 NF-F-GYM-SP-1 세포의 증식 변화. HpDNAV는 기하급수적으로 성장한 숙주 배양물에 접종되었다. 조류 세포의 수는 직접적인 계수에 의해 측정되었다. 상기 분석은 적어도 3번 수행되었다. (B) 바이러스의 수는 접종 후 76시간 후에 증가하기 시작하였다. 바이러스 역가는 MPN 방법으로 측정되었다.

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

도 7은 효소 무처리(레인 2), DNase I 처리(레인 3), 및 RNase A 처리(레인 4)를 한 HpDNAV의 핵산을 나타낸다. 샘플은 1Kb DNA 마커(레인 1)와 함께 1% 아가로스 겔에서 전기영동 되었다.

도 8은 1% 아가로스 겔 전기영동에 의한 PCR 산물의 분석 결과를 나타낸다. 레인 M: 분자량 마커(1Kb DNA Ladder; Bioneer), 레인 1: 프라이머 세트 DNA pol-1 및 DNA pol-2에 의해 증폭된 HpDNAV 분리 균주 유래 절편, 레인 2: 프라이머 세트 DNA pol-1 및 DNA pol-3에 의해 증폭된 HpDNAV 분리 균주 유래 절편. 적색 화살표는 시퀀싱을 위해 정제된 증폭 DNA를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 헤테로캡사 피그매아(*Heterocapsa pygmaea*)에 대해 특이적 용균 활성을 가지는 HpDNAV (*Heterocapsa pygmaea* infecting virus)를 제공한다.

상기 HpDNAV (*Heterocapsa pygmaea* infecting virus)는 해양에서 분리한 바이러스 중 헤테로캡사 피그매아(*Heterocapsa pygmaea*)에 대해 용균 활성이 있는 바이러스를 선별한 것이다. 상기 HpDNAV를 한국생명공학연구원에 2010년 12월 9일자로 기탁하였다(기탁번호: KCTC11824BP).

또한, 본 발명은 상기 HpDNAV를 유효성분으로 포함하는 적조 방제용 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 상기 적조는 헤테로캡사 피그매아(*Heterocapsa pygmaea*)에 의해 유발될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

본 발명에 따른 헤테로캡사 피그매아 유발성 적조의 방제용 조성물은 예를 들어 직접 분사가 가능한 용액, 분말 및 현탁액의 형태, 고농축 수성 및 유성 또는 다른 현탁액, 분산액, 에멀전, 유성 분산액, 페이스트, 분진, 흩뿌림 물질 또는 과립제로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

본 발명의 헤테로캡사 피그매아 유발성 적조의 방제용 조성물은 다양한 형태로 제제화할 수 있다. 상기 제제는 예를 들어 용매 및/또는 담체를 첨가함으로써 제조될 수 있다. 종종, 비활성 첨가제 및 표면-활성 물질, 예를 들어 유화제 또는 분산제를 제제에 혼합한다. 적합한 표면-활성 물질은 방향족 술폰산(예를 들어 리그노술폰산, 페놀-술폰산, 나프탈렌- 및 디부틸나프탈렌술폰산), 지방산, 알킬- 및 알킬아릴술폰레이트, 알킬 라우릴 에테르, 지방 알코올 술폰레이트의 알칼리 금속, 알카라인 토금속, 암모늄염, 술폰이트화 핵사-, 헵타- 및 옥타데칸올, 지방 알코올 글리콜 에테르의 염, 술폰이트 나프탈렌 및 이의 유도체, 포름알데히드의 축합물, 나프탈렌 또는 나프탈렌술폰산, 페놀 및 포름알데히드의 축합물, 폴리옥시에틸렌옥틸 페놀 에테르, 에톡실화 이소옥틸-, 옥틸- 또는 노닐-페놀, 알킬페닐 또는 트리부틸페닐 폴리글리콜 에테르, 알킬아릴폴리에테르 알코올, 이소트리테실 알코올, 지방 알코올/에틸렌 옥사이드 축합물, 에톡실화 피마자유, 폴리옥시에틸렌 알킬에테르 또는 폴리옥시프로필렌, 라우릴 알코올 폴리글리콜 에테르 아세테이트, 소르비톨 에스테르, 리그닌-술폰

이트 폐액 또는 메틸셀룰로오스일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0022] 상기 제제는 또한, 보존제, 습윤제, 완충제, 부형제, 공급촉진제, 유인제, 결합제 또는 희석제와 같은 각종 첨가제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0023] 또한, 본 발명은 본 발명의 조성물을 해수에 처리하는 단계를 포함하는 적조의 방제 방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 적조는 헤테로캡사 피그매아(*Heterocapsa pygmaea*)에 의해 유발될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0024] 상기 헤테로캡사 피그매아 유발성 적조의 방제용 조성물은 분사, 분무, 살포, 흠뿌림 또는 붓기에 의해 사용될 수 있다. 사용 형태는 의도한 목적에 의존하는데, 모든 경우에 본 발명에 따른 조성물의 분포가 가능한 한 미세하고 균일하도록 해야 한다.

[0025] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 재료 및 방법

[0027] 샘플링 장소

[0028] 현장 샘플링은 고성외 자란만(JR) 1 내지 11번가 및 사량도(SR) 주변 정점 1번 내지 정점 3번에서 2009년 2월 ~ 12월까지 매월 수행되었다. 그리고 자란만(JR) 정점 4, 7, 8 및 10번에서 2010년 2월 ~ 9월까지 매월 수행되었다. 해수 샘플은 표면층(0 m) 및 바닥층(B-1 m)으로부터 수집되었다.

[0029] 조류의 배양 및 성장 조건

[0030] 김노디니움(*Gymnodinium*) (*Heterocapsa pygmaea*) NF-F-GYM-SP-1의 숙주 균주는 국립수산물과학원(NFRDI)으로부터 제공되었고, 백색 형광 조명을 이용하는 80 내지 90 μmol 광자/ m^2/s 의 12시간 광:12시간 암 주기하에, 변형된 F/2 배지에서 20℃의 조건으로 배양되었다(Guillard 1973, Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp.29-60).

[0031] HpDNAV(*Heterocapsa pygmaea* infecting virus)의 분리 및 유지

[0032] 상기 해수 샘플은 진핵성 미생물 및 대부분의 세균을 제거하기 위해 0.8 μm 구멍 크기의 폴리카보네이트 막 필터 (Nuclepore)를 이용하여 즉시 예비 여과되었다. 획득된 상기 여과액 0.5 ml은 김노디니움 속(*H. pygmaea*) 배양액 1 ml에 접종되었고, 백색 형광 조명을 이용하는 80 내지 90 μmol 광자/ m^2/s 의 12시간 광:12시간 암 주기하에 20℃의 조건으로 배양하였다. F/2 배지로 접종된 조류 배양액은 대조군으로서 이용되었다. 그 후 조류의 용균 발생은 광학현미경을 이용하여 14일 동안 2일마다 모니터링되었다. 용균이 발생한 후, 세균을 제거하기 위해 상기 용균액의 분취액(0.5 ml)을 0.2 μm Dismic-25cs filter (Advantec)로 여과하였다. 그 후 3가지 다른 조건으로 제조하였는데, 첫 번째는 대조군으로 이용하기 위해 F/2 배지를 첨가하고, 두 번째는 상기 용균액을 첨가한다. 세 번째는 김노디니움 속(*H. pygmaea*)을 감염시키는 바이러스를 확인하기 위한 상기 여과액을 첨가한다. 상기 세포 배양 플레이트는 전술한 광 조건을 이용하여 20℃에서 배양되었다. 그 후 조류의 용균 발생은 광학현미경을 이용하여 14일 동안 2일마다 모니터링되었다 (도 1).

[0033] 바이러스 적정 시험 전에, 클로닝된 바이러스 샘플에서 김노디니움 속(*H. pygmaea*)을 감염시키는 바이러스의 증식은 소멸 희석법(extinction dilution method)에 의해 측정되었다(Nagasaki and Yamaguchi 1997, *Aquat. Microb. Ecol.*, 13:135-140). 요약하면, 여과액은 변형된 F/2 배지를 이용하여 일련의 10배 희석 단계로 희석되었고, 각 희석 단계의 분취액(100 μl)은 숙주 배양액 150 μl 를 포함하는 96 웰 세포 배양 플레이트의 8 웰에 첨가되었다. 숙주인, 김노디니움 속(*Heterocapsa pygmaea*) NF-F-GYM-SP-1은 해수 샘플에서 바이러스 수를 측정하기 위해 사용되었다. 상기 세포 배양 플레이트는 전술한 광 조건을 이용하여 20℃에서 배양되었다. 그 후 조류의 용균 발생은 광학현미경을 이용하여 14일 동안 2일마다 모니터링되었고, 가장 개연성이 있는 용균 바이러스의 수는 Nishihara 등(1986, *Eisei Kagaku* 32:226-228)에 의해 고안된 컴퓨터 프로그램을 이용하여

측정되었다.

[0034] **숙주의 동정**

[0035] 숙주의 동정을 위해, 음성 염색 샘플이 사용되었다. 김노디니움 속(*Heterocapsa pygmaea*) NF-F-GYM-SP-1은 병원체로 접종되었고, 접종 후 92시간째에 샘플(10 ml)을 수집하였다. 그 후, 150-메쉬 그리드(grid)로 세포 잔해물을 제거하고 건조시켰다. 상기 그리드는 4% 아세트산 우라닐(uranyl acetate) 및 3% 구연산 납(lead citrate)으로 염색되었고 60kV에서 작동하는 JEOL JEM-2010 TEM 하에 관찰되었다. 김노디니움 속(*H. pygmaea*)은 광학 현미경으로 상세히 조사되었다.

[0036] **형태학적 및 생리학적 분석**

[0037] **투과 전자현미경(TEM)**

[0038] 음성 염색 샘플을 위해, 김노디니움 속(*H. pygmaea*) 배양물에 병원체를 접종되었고, 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 염색되었고 60kV에서 작동하는 JEOL JEM-2010 TEM 하에 관찰되었다.

[0039] 얇게 섹션(section)된 TEM 샘플을 위해, 헤테로캡사 피그마아(*H. pygmaea*) 배양물에 병원체를 접종하였고, 접종 후 0, 24, 48, 72, 80 및 92시간째에 샘플(10ml)을 수집하였다. 각 세포 현탁액은 상기 동일한 배지에서 1% 글루타르알데히드(glutaraldehyde) 및 2% 사산화 오스미움(Osmium tetroxide) 용액으로 4℃에서 1시간 동안 고정되었다. 세포는 3,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 수집되었고, 그 후 2% 사산화 오스미움 용액을 이용하여 추가로 1시간 동안 4℃에서 후고정되었다. PBS 완충액을 이용한 두 범위에 따라, 상기 펠렛은 일련의 등급별 에탄올(20, 30, 50, 70, 80, 90, 95 및 100%)에서 각각 15분 동안 탈수되었다. 그 후 상기 펠렛은 3:1 탈수제에서 포매 용액에 의해 침윤되었다. 저장 용액은 2:1 혼합물, 1:1 혼합물, 그리고 포매 전 마지막 단계를 위한 Poly/Bed 812 resin(Polyscience, Inc.)의 저장 용액의 최종 두 변경물이 사용되었다.

[0040] 상기 샘플은 적절하게 라벨링된 포매 틀로 옮겨졌다. 그 후, 60℃ 오븐에서 48시간 동안 중합시켰다. 상기 블록은 다듬기 위해 150 nm로 처음에 절단되었고 그 후, 다이아몬드 칼로 70 nm 두께로 섹션되었다. 상기 섹션은 4% 아세트산 우라닐 및 3% 구연산 납으로 염색되었고, 60kV에서 작동하는 JEOL JEM-1010 TEM 하에 관찰되었다.

[0041] **생장 실험 및 안정성**

[0042] 생장 실험에서, 김노디니움 속(*H. pygmaea*) NF-F-GYM-SP-1 균주의 기하급수적 생장 배양물 500 ml은 병원체인 HpDNAV 현탁액 20 mL로 접종되었다. F/2 배지 20 mL이 첨가된 대조군 배양물은 비교를 위해 제공되었다. 상기 세포 현탁액의 분취액 20 mL은 접종 후 0, 24, 48, 72, 80 및 96시간째에 샘플링되었다. 그 후, 세포 밀도는 광학현미경에 의해 측정되었고, 병원체 밀도는 소멸 회석법에 의해 측정되었다. 그 후, 상기 몇몇 분취액은 TEM 관찰을 위해 사용되었다. 각 실험은 3회 반복되었다.

[0043] 상기 생장 실험 후의 용균액은 세포 잔해물을 제거하기 위해 0.8 μ m 및 0.2 μ m 폴리카보네이트 막 필터(Nuclepore)를 이용하여 순차적으로 처리되었다. 상기 새 용균액의 역가는 소멸 회석법으로 측정되었다. 그 후, 상기 용균액의 분취액은 동결보존제의 첨가 없이 광 및 암 조건에서 20, 15, 4, -20, -80 및 -196℃(액체 질소)에 저장되었다. 저장 1주일, 15일 및 1개월 후, 상기 샘플은 각 저장 온도에서 바이러스 병원체의 안정성을 추산하기 위해 소멸 회석법을 이용하여 다시 역가가 측정되었다.

[0044] **숙주 범위**

[0045] 상기 바이러스 HpDNAV에 대한 중간 숙주 특이성은 Dismic-25cs filter (Advantec)를 통해 여과된 새 용균액의 5%(v/v) 분취액을 28가지 조류 균주의 배양물에 각각 첨가하여 조사되었다. 그 후, 20℃에서 전술한 조건 하에 배양되었다. 각 조류 배양물에서 생장 및 용균의 증거는 광학현미경으로 모니터링되었고, F/2 배지로 접종된 대조군 배양물과 비교되었다. 접종 후 14일째에 용균되지 않은 배양물은 상기 바이러스 병원체에 대해 적

절하지 않은 숙주로 판단되었다.

[0046] 유전학적 분석

[0047] 게놈 추출

[0048] 대수증식기까지 성장한 헤테로캡사 피그매아(*H. pygmaea*) 배양물 2 L에 바이러스 HpDNAV 현탁액 30 mL를 접종하여 용균되었다. 상기 용균액은 세포 잔해물을 제거하기 위해 0.8 μm 및 0.2 μm 폴리카보네이트 막 필터(Nuclepore)를 이용하여 순차적으로 처리되었다. 폴리에틸렌 글리콜 6000 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)은 최종 농도 10% (wt/vol) 수준으로 상기 여과물에 첨가되었고, 상기 현탁액은 암 조건하에 4℃에서 밤새 저장되었다. 22,000 rpm, 4℃에서 1.5시간 동안 원심분리 후, 상기 펠렛은 10 mM 인산염 완충액(pH 7.2)으로 세척되었고, 바이러스 입자를 수집하기 위해 35,000 rpm, 4℃에서 4시간 동안 다시 원심분리되었다. 상기 펠렛은 DEPC-처리된 증류수 500 μl 에 재현탁되었다.

[0049] HpDNAV의 핵산은 표준 페놀-클로로포름 방법으로 추출되었고, 에탄올 침전 처리되었으며, 상기 펠렛은 DEPC-증류수 100 μl 에 용해되었다. 총 DNA 함량은 아가로스 겔(1%; SeaKem LE agarose; BMA, Inc.)에서 50V에서 1시간 동안 전기영동시켜 확인되었다. 핵산은 에티디움 브로마이드(ethidium bromide) 염색을 이용하여 시각화되었다.

[0050] 효소 처리

[0051] 상기 핵산 용액 5 μl 는 DNase I (Takara Bio. Inc.) 5 U를 포함하는 10× DNase I 완충액, RNase A (Takara Bio. Inc.) 60 U, Exonuclease I (Takara Bio, Inc)을 이용하여 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션 시키거나, S1 Nuclease (Takara Bio. Inc.) 170 U를 포함하는 10× S1 Nuclease 완충액을 이용하여 23℃에서 15분 동안 인큐베이션 시켰다. 효소 처리 없이 1시간 동안 얼음에 저장된 핵산 샘플은 대조군으로 제공되었다. 그 후, 상기 샘플은 아가로스 겔(1%; SeaKem LE agarose; BMA, Inc.)에서 50V에서 1시간 동안 전기영동 되었다. 핵산은 에티디움 브로마이드 염색을 이용하여 시각화되었다.

[0052] PCR에 의한 DNA 중합효소 유전자 증폭

[0053] 상기 분리된 핵산의 농도는 나노드롭(Nanodrop)을 이용하여 260 nm에서 측정되었다. 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 프라이머(AVS3 5'-SWRTCIGTRTCICCRTA-3'; 서열번호 2), 그리고 정방향(AVS1 5'-GARGGIGCIACIGTIYTIGAYGC-3'; 서열번호 1) 및 역방향 프라이머(AVS2 5'-GCIGCRTAICKYTTYTTISWRTA-3'; 서열번호 3)를 사용하였다.

[0054] PCR 반응은 10× Ex Taq 완충액, 각 프라이머 50 pmol, 2.5mM dNTP, Ex Taq DNA polymerase(Takara, Japan) 2.5 U 및 게놈 DNA 50 ng를 포함하는 최종 부피 50 μl 에서 수행되었다. 상기 PCR 반응은 95℃에서 15분간의 예비-변성 과정을 포함하고, 95℃에서 30초, 50℃에서 45초, 및 72℃에서 1분간의 과정으로 구성되는 30주기로 My CyclerTM thermal cycler(BIO-RAD, USA)를 사용하여 수행되었다.

[0055] 상기 증폭된 산물은 1% 아가로스 겔에서 전기영동하여 분석되었다. 상기 증폭된 DNA는 AccuPrep Gel purification kit (Bioneer)을 이용하여 정제되었고, 라이게이션(ligation)되었으며, TOPO TA Cloning kit (Invitrogen)를 이용하여 대장균 균주 TOP10내로 형질전환되었고, 그 후 37℃에서 밤새 인큐베이션되었다. 상기 삽입된 절편인 AVS1-AVS2 및 AVS1-AVS3 PCR 산물 750 bp는 제조사의 지시에 따라 증폭되었다. 상기 증폭된 PCR 산물은 AccuPrep PCR purification kit (Bioneer)를 이용하여 정제되었고, 그 후 시퀀싱되었다.

[0056] 실시예 1: 바이러스 분리 및 형태학적 분석

[0057] 바이러스 스크리닝은 세균 세포 및 원생생물을 제거하기 위해 해수를 여과하고, 숙주인 김노디니움 속(*Heterocapsa pygmaea*) NF-F-GYM-SP-1의 배양물과 상기 여과액을 혼합하여 분석되었다.

[0058] 김노디니움 속(*H. pygmaea*) NF-F-GYM-SP-1의 용균을 야기하는 클로닝된 병원체는 성공적으로 분리되었다. 분

리된 병원체의 형태는 광학현미경 및 TEM 하에 관찰되었다. 상기 바이러스 병원체는 0.2 μ m 구멍 크기의 필터로 여과한 후에도 살조 활성(algicidal activity)을 가졌기 때문에, 쉽게 세균 오염이 없는 상태로 만들어졌다. 상기 살조 활성은 일관되게 용균이 야기된 새 헤테로캡사 피그매아(*H. pygmaea*) NF-F-GYM-SP-1 배양물에 연속적으로 전이가 가능하였다. 상기 병원체에 의해 용균된 김노디니움 속(*H. pygmaea*)의 배양물 및 세포는 색이 투명하게 되었는데, 이는 아마도 광합성 색소의 손실 또는 분해 때문인 것으로 생각된다(도 2). 상기 병원체가 1주일 이내에 상기 숙주 배양물의 완전한 용균을 야기하는 것은 특징적이다.

[0059] 2009년 7월 28일에, 자란만 정점 5, 7 및 10번에서 많은 클론이 분리되었다(표 1). 본 발명자들은 2010년에 바이러스 스크리닝을 실시하였다. 본 발명자들은 그 후 HpDNAV 클론을 분리할 수 없었다. 상기 모든 바이러스 병원체는 0.2 μ m 구멍 크기의 필터로 여과한 후 살조 활성을 가졌다. 상기 모든 클론은 50% cryoprotectant (CellbankerTM 2, Nippon Zenyaku Kogyo, co. LTD.)를 첨가하여 -80℃ 및 -196℃에서 유지되었다.

[0060] TEM 관찰은 바이러스 입자가 숙주 세포의 세포질에서만 존재한다는 것을 나타내었다(도 3B 및 3C). 음성 염색 관찰은 HpDNAV가 정이십면체이고, 지름이 160 $\pm$ 10 nm (평균 $\pm$ 표준편차; n=30)이며, 외막이 없고 꼬리-유사 구조가 없다는 것을 나타내었다(도 3D). 그리고 상기 숙주는 그 스케일로 판단했을 때 헤테로캡사 피그매아라는 것을 나타낸다(도 4).

표 1

[0061] 헤테로캡사 피그매아(*Heterocapsa pygmaea*) 균주를 감염시키는 스크리닝 지역에서 분리된 DNA 바이러스(HpDNAV)

균주 명	분리 날짜	샘플링 지역	샘플링 깊이
HpV10-05	2010. 7. 28	자란만 5번가	0m
HpV10-07	2010. 7. 28	자란만 7번가	0m
HpV10-10	2010. 7. 28	자란만 10번가	0m

[0062] 실시예 2: 생리학적 분석

[0063] 상기 생장 실험에서, 바이러스 접종이 숙주 배양물의 정지기(stationary phase)에서 수행되었을 때, 바이러스의 증식 증가는 접종 후 76 내지 80시간째에 현저하였다. 따라서, HpDNAV의 잠복기는 76시간으로, 총 용균 주기는 96시간까지로 추정되었다. 숙주의 증식 감소는 바이러스가 접종된 배양물에서 더 현저하였다. 접종 후 4 일째에 숙주 및 바이러스의 증식은 버스트(burst) 크기를 계산하기 위해 사용되었다. 가장 높은 산출값은 9.8 $\times 10^5$ 감염 유닛/mL(96 hpi에서)였다. 또한 상기 시점에서, 모든 숙주 세포는 완전히 사멸되었다(도 5).

[0064] HpDNAV에 대한 온도의 영향은 Tomaru 등(2005, *Plankton. Biol. Ecol.* 52:1-6)의 방법에 따라 조사되었다. 저장 실험에서, 바이러스 현탁액의 감염 역가는 광 및 암 조건하에서 저장 후 1주일, 2주일 및 1개월째에 측정되었다(도 6). 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 감소하였다. 그리고, -20 및 -80℃와 같은 더 낮은 온도에서, 상기 두 조건의 역가는 상기 숙주에 대한 무반응을 나타내었다.

[0065] HpDNAV의 숙주 범위는 바실라리오파이트(bacillariophyte), 클로로파이트(chlorophyte), 디노파이트(dinophyte) 및 라피도파이트(raphidophyte) 속에 속하는 숙주를 포함하여 28가지 식물 플랑크톤 균주를 이용하여 조사되었다. HpDNAV는 오직 하나의 숙주 균주에서만 용균을 야기하였고, 조사된 다른 임의의 미세조류 종에서는 용균을 야기하지 않았다. 상기 결과는 상기 바이러스가 높은 감염 특이성을 가진다는 것을 나타낸다(표 2).

표 2

헤테로카프사 피그매아(*Heterocapsa pygmaea*)를 감염시키는 DNA 바이러스 (HpDNAV)의 28가지 해양 식물 플랑크톤 균주에 대한 감염 특이성

Class	Genus and Species	Strains	Sensitivity to HpDNAV
Bacillariophyceae	<i>Asterionella glacialis</i>	NF-F-Asa-1	-
	<i>Chaetoceros curvisetus</i>	ME-CCS-1	-
	<i>Chaetoceros curvisetus</i>	NF-F-CCS-2	-
	<i>Skeletonema palmeriana</i>	NF-D-SPA-1	-
	<i>Skeletonema costatum</i>	ME-SCM-1	-
Chlorophyceae	<i>Dunaliella</i> sp.	PK-F-DUN-SP-1	-
Cryptomonadaceae	<i>Rhodomonas</i> sp.	PK-F-RHO-SP-1	-
	<i>Rhodomonas</i> sp.	PK-F-RHO-SP-2	-
	<i>Rhodomonas</i> sp.	PK-F-RHO-SP-3	-
Dinophyceae	<i>Akashiwo sanguinea</i>	NF-F-AKA-1	-
	<i>Alexandrium</i> sp.	NF-F-ALE-SP-1	-
	<i>Alexandrium</i> sp.	NF-F-ALE-SP-2	-
	<i>Alexandrium catenella</i>	NF-F-ACA-1	-
	<i>Alexandrium catenella</i>	NF-F-ACA-3	-
	<i>Amphidinium carterae</i>	PK-F-ACA-1	-
	<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	NF-F-CPO-3(old)	-
	<i>Gymnodinium impudicum</i>	NF-F-GIM-1	-
	<i>Gymnodinium</i> sp.	NF-F-GYM-SP-1	+
	<i>Prorocentrum minimum</i>	NF-F-PMI-1d	-
	<i>Prorocentrum minimum</i>	NF-F-PMI-2	-
	<i>Prorocentrum micans</i>	NF-F-PMC-1	-
	<i>Prorocentrum micans</i>	NF-F-PMC-2	-
Euglenophyceae	<i>Eutreptia</i> sp.	NF-F-EUT-SP-1	-
Prymnesiophyceae	<i>Prymnessium parvum</i>	PK-F-Pry-SP-1	-
Raphidophyceae	<i>Heterosigma akashiwo</i>	NF-F-HAK-1	-
	<i>Heterosigma akashiwo</i>	PK-F-HAK-1	-
	<i>Heterosigma akashiwo</i>	PK-F-HAK-2	-
	<i>Chattonella antiqua</i>	NF-F-CAN-1	-

+: 용균됨, -: 용균되지 않음.

실시예 3: 유전학적 분석

상기 실험은 게놈의 유형(type)을 확인하기 위해 고안되었다. 아가로스 겔 전기영동의 결과는 HpDNAV로부터 추출된 핵산의 게놈 크기가 10kb 이상이라는 것을 나타낸다(도 7). 상기 밴드는 RNase A에 대해 감수성이 없었지만, DNase I는 상기 추출된 핵산을 완전히 분해하였다. 그리고 또한 상기 밴드는 S1 뉴클리아제(S1 nuclease)에 대해 감수성이 있었다(데이터 미제시). 상기 결과는 상기 게놈이 선형-dsDNA라는 것을 나타낸다.

AVS1-AVS2의 프라이머 세트를 이용한 PCR 증폭은 다수의 밴드를 나타내었다. 그 중, 약 750bp 밴드는 AVS1-AVS2에서 다른 임의의 밴드보다 강도가 더 강했다. 또한, AVS1-AVS3의 프라이머 세트를 이용한 PCR 증폭도 다수의 밴드를 나타내었다(도 8). 상기 AVS1-AVS2 증폭 산물은 AVS1-AVS3 프라이머 세트에 의해 재증폭되었고, 증폭 산물은 관찰되지 않았다(데이터 미제시). AVS1-AVS2 및 AVS1-AVS3 증폭 산물의 서열은 BLAST 검색에서 등록된 데이터와 일치하지 않았다.

수탁번호

[0071]

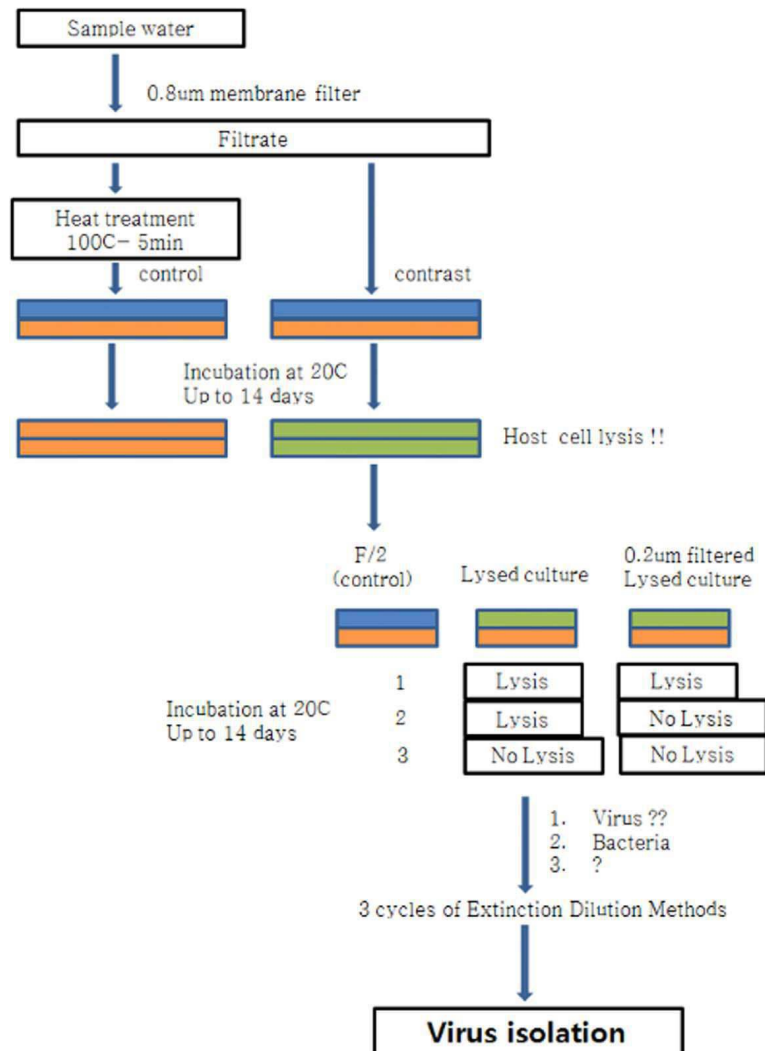
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11824

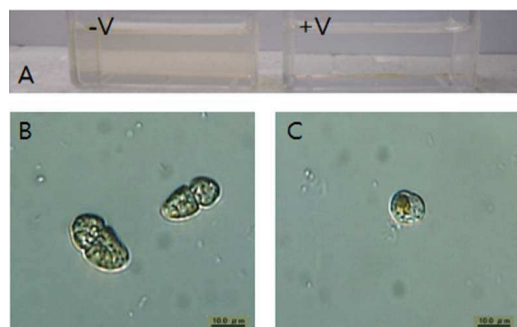
수탁일자 : 20101209

도면

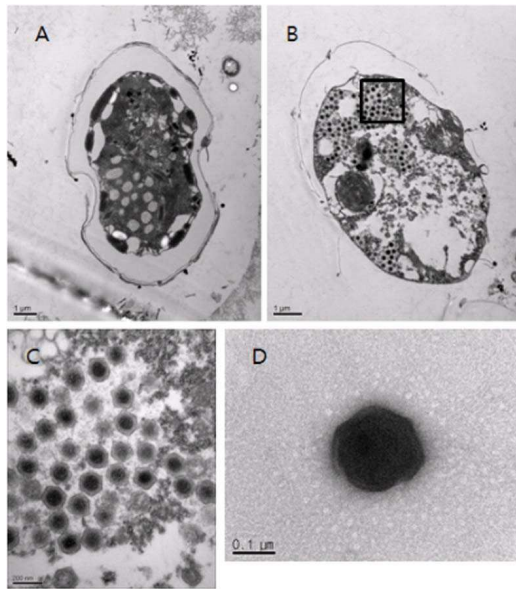
도면1



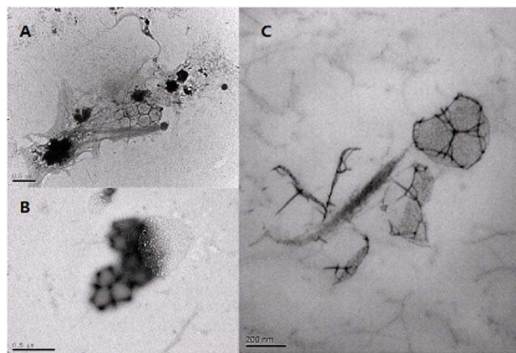
도면2



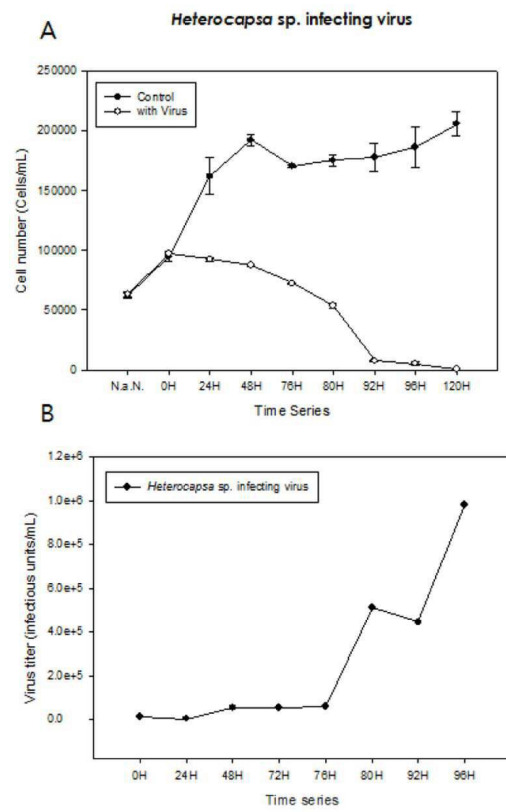
도면3



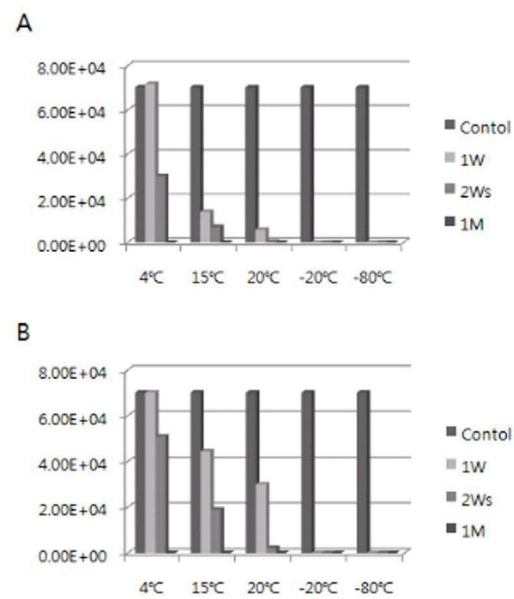
도면4



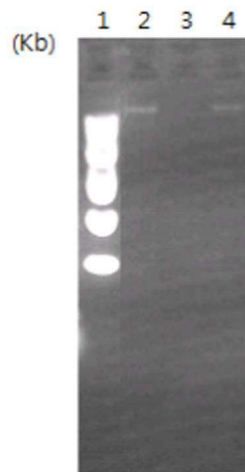
도면5



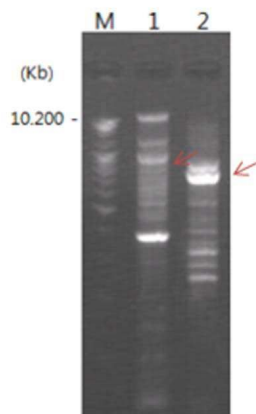
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University
- <120> HpDNAV having specific lysis activity against Heterocapsa pygmaea
- <130> PN10292
- <160> 3
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> AVS1 forward primer
- <400> 1
- garggngcna cngtnytnga ygc
- <210> 2
- <211> 17

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AVS3 reverse primer

<400> 2
 swrtcngtrt cncrta 17

<210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AVS2 reverse primer
 <400> 3
 gngcrtanc kyttttnsw rta 23