

Production of Red-spotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV) Capsid Protein Using *Saccharomyces cerevisiae* Surface Display

Mirye Park¹, Sung-Suk Suh¹, Jinik Hwang¹, Donggiun Kim², Jongbum Park², Young-Jae Chung³ and Taek-Kyun Lee^{1*}

¹South Sea Environment Research Department, Korea Institute of Ocean Science and Technology, Gaje 656-830, Korea

²Department of Biological Science, Silla University, Busan 617-736, Korea

³Department of Life Science and Biotechnology, Shin Gyeong University, Hwaseong 445-741, Korea

Received July 15, 2014 / Revised August 19, 2014 / Accepted August 22, 2014

The studies of marine viruses in terms of viral isolation and detection have been limited due to the high mutation rate and genetic diversity of marine viruses. Of the modern methods currently used to detect marine viruses, serological methods based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are the most common. They depend largely on the quality of the antibodies and on highly purified suitable antigens. Recently, a new experimental system for using viral capsid protein as an antigen has been developed using the yeast surface display (YSD) technique. In the present study, the capsid protein gene of the red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) was expressed and purified via YSD and HA-tagging systems, respectively. Two regions of the RGNNV capsid protein gene, RGNNV1 and RGNNV2, were individually synthesized and subcloned into a yeast expression vector, pCTCON. The expressions of each RGNNV capsid protein in the *Saccharomyces cerevisiae* strain EBY100 were indirectly detected by flow cytometry with fluorescently labeled antibodies, while recognizing the C-terminal c-myc tags encoded by the display vector. The expressed RGNNV capsid proteins were isolated from the yeast surface through the cleavage of the disulfide bond between the Aga1 and Aga2 proteins after β -mercaptoethanol treatment, and they were directly detected by Western blot using anti-HA antibody. These results indicated that YSD and HA-tagging systems could be applicable to the expressions and purification of recombinant RGNNV capsid proteins.

Key words : Capsid protein, flow cytometry, recombinant protein, RGNNV, yeast surface display

서 론

바이러스성 신경괴사(Viral nervous necrosis, VNN)는 노다바이러스과 내의 *Betanodavirus* 속에 속해 있는 어류 노다바이러스에 의해 유발된다[14, 27]. 이 질병은 유럽농어(*Dicentrarchus labrax*) 뿐만 아니라 줄무늬돔(*Pseudocaranx dentex*), 대서양 넙치(*Hippoglossus hippoglossus*), 가자미(*Scophthalmus maximus*) 및 그루퍼 등 경제적으로 중요한 해양어류에 영향을 미친다[11, 15, 17, 22]. VNN 질병은 주로 유생과 치어 단계의 어류에 영향을 미친다. 감염된 어류는 중추신경계 및 망막 손상으로 인하여 비정상적인 행동 및 시각기능 이상이 나타나며, 뇌와 척수에서의 액포형성과 괴사가 나타난다[2]. VNN 질병을 유발하는 신경괴사 바이러스(NNV)는 크기가

약 30 nm이며, 비외피성 정20면체 RNA 바이러스이다[9, 21]. 어류 노다바이러스는 바이러스 외피단백질 유전자 가변부(T4)의 염기서열에 따라 줄무늬돔 NNV (SJNNV), 자주복 NNV (TPNNV), 노랑가자미 NNV (BFNNV) 및 붉바리 NNV (RGNNV) 등 4종류의 유전형으로 구분된다[18].

다양한 숙주범위와 경제적인 피해로 인하여 RGNNV를 동정하고 검출하기 위한 다양한 보고가 이루어지고 있다. 특히 혈청학적 방법은 특이성, 신속함 및 단순함 때문에 자주 사용된다[7, 23]. 혈청학적 방법은 항체의 질에 크게 의존한다[24]. 고도로 정제되고 정확한 항원을 사용하는 것은 더 특이한 항체를 얻는데 있어서 가장 중요한 요소 중의 하나이다[3]. 그러나 대상 단백질의 발현이 일어나지 않거나, 정제가 거의 불가능하여 대상 항원을 얻는 것이 어렵기 때문에[26], 전통적인 혈청학적 방법은 사용할 수 없는 경우가 많다. 따라서 virus-like particles (VLPs)을 어류에 주사하는 직접 면역법을 사용하거나[14], 곤충세포 및 대장균 발현시스템을 사용하여 VLPs를 생산하는 방법이 사용되어 왔다[13, 16]. 최근에는 RGNNV 외피단백질 유전자가 형질전환된 *Saccharomyces cerevisiae* 분쇄물로부터 VLPs를 분리하고, 크로마토그래피를 이용하여 정제하는 방법이 보고되기도 하였다[6]. 특이한 바이

*Corresponding author

Tel : +82-55-639-8530, Fax : +82-55-639-8509

E-mail : tklee@kiost.ac

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

러스 항원을 정제하거나 백신생산을 위한 가장 좋은 접근 중의 하나는 효모의 세포표면에 대상 단백질을 표출하는 것이다[20, 25, 28].

본 연구에서는 RGNNV 항체 제작에 필요한 항원을 효과적으로 개발하기 위하여 효모표면발현(yeast surface display, YSD) 시스템을 이용하였다. 이를 위하여 RGNNV 외피단백질 유전자를 합성을 통해 준비하였으며, 효모표면발현 벡터인 pCTCON 벡터에 클로닝하였다. 클로닝된 pCTCON-RGNNVcp를 효모 발현세포인 EBY100에 형질전환을 수행하였으며, hemagglutinin (HA)-tagging 시스템을 이용하여 RGNNV 외피단백질의 발현을 확인하였다.

재료 및 방법

RGNNV 외피단백질 유전자 클로닝

Saccharomyces cerevisiae 세포에서 바이러스 단백질을 발현시키기 위해 RGNNV 외피단백질 유전자(Gene Bank Number: EU391590.1)를 사용하였다. 유전자 염기서열상의 N-glycosylation 지역을 선별했고, 효모세포에서의 고도발현을 위하여 치환하였다(N-X-S/T→Q-X-S/T). 치환된 유전자 서열은 합성(Bioneer, Korea)하여 pGEMT easy vector에 클로닝하였다. YSD는 Aga2p와 GAL1-10이 포함된 pCTCON 벡터를 사용하여 수행하였다. RGNNV 외피단백질은 *Nhd*와 *Ban*II으로 절단하였고, pCTCON 벡터로 클로닝되었다. 발현벡터와 삽입유전자의 연결은 4°C, overnight 조건에서 T4 DNA ligase를 사용하여 수행하였다. Ligation 혼합물은 clone 증폭을 위해 competent *E. coli* DH5a 세포로 형질전환시키고, 50 µg/ml ampicillin이 포함된 Luria-Bertani (LB) agar 배지에서 배양하였다.

효모세포로의 형질전환

효모 형질전환은 Yeast maker™ (Clontech)의 시험방법에 따라 수행하였다[10]. YSD를 위한 *Saccharomyces cerevisiae* strain은 EBY100 (a GAL1-AGA1::URA3 ura3-52 trp1 leu2Δ 1his3Δ200 pep4::HIS2 prb1Δ1.6R can1GAL)을 사용하였다[5]. EBY100 strain은 YPD 배지(1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose)를 사용하여 배양하여 competent yeast cells을 만들었다. *E. coli* DH5a로부터 분리한 pCTCON plasmid (0.1 µg/µl) 5 µl 와 5 µl의 yeast maker carrier DNA (sheared salmon sperm DNA, 0.5 µg/µl) 및 50 µl의 competent cells를 1.5 ml E-tube에 넣고 부드럽게 섞어주었다. 500 µl의 PEG/LiAc 용액을 첨가한 후 30°C에서 30분간 배양하였으며, 매 10분마다 뒤집어 주었다. 20 ml의 DMSO를 첨가한 후 잘 섞고, 42°C에서 15분간 배양하였으며, 매 5분마다 뒤집어 주었다. 실온에서 3,800 g, 5분간 원심분리하고, pellet을 1 ml의 YPD broth에 재현탁하였다. 30°C에서 30분간 진탕

배양한 후 3,800 g, 5분간 실온에서 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 pellet을 400 µl의 0.9% NaCl 용액으로 재현탁하였다. 형질전환된 효모세포는 20 g/l의 dextrose가 포함되어 있는 최소배지(SD-CAA)에서 배양하였으며, RGNNV 외피단백질 발현을 위해서는 dextrose 대신 20 g/l의 galactose가 포함된 최소배지(SG-CAA)에서 배양하였다[8].

효모세포의 발현유도 및 flow cytometry 분석

형질전환된 콜로니를 5 ml의 SD-CAA 배지에 접종하고, 30°C, 170 g의 조건으로 OD600 값이 4-6이 되도록 배양하였다. 세포를 원심분리하고, OD600 값이 1이 되도록 SG-CAA 배지에 재현탁하였다. 30°C, 170 g의 조건으로 OD600 값이 4-6이 되도록 배양하였다. 세포를 원심분리하여 모으고, 0.1% bovine serum albumin (BSA)이 포함된 PBS 배지에 OD600 값이 0.4가 되도록 재현탁하였다. 형질전환된 효모 세포는 최종부피가 50 µl가 되도록 mouse 9E10에서 생산된 monoclonal anti-c-myc 항체(1:4,000, Sigma-Aldrich)와 함께 배양하였다. 1시간 실온에서 배양 후 세포를 모으고 ice-cold PBS/BSA에서 2회 세척하였다. 세포는 goat anti-mouse fluorescein isothiocyanate conjugate (1:4,000, Abcam)와 함께 4°C 암처에서 1시간 배양하였다. 500 µl의 ice-cold PBS/BSA에 재현탁한 후 flow cytometry (Merck Millipore)로 옮겨 효모에서의 각 바이러스 단백질의 발현정도를 분석하였다.

효모세포 표면으로부터 RGNNV 외피단백질 정제

효모세포표면에 발현된 단백질의 disulfide 결합을 분리하였다. 200 µl의 효모세포를 원심분리하여 100 µl로 농축하였고, 50 µl의 β-mercaptoethanol을 혼합한 후 10 분간 가열하였다. 1 분간 100,000 g, 4°C에서 원심분리하여 상층액을 모았다. 상층액은 Pierce HA Tag IP/Co-IP kit (Thermo)를 사용하여 정제하였다. 단백질은 non-reducing 15% SDS-PAGE loading buffer로 분리하였으며, 분리된 단백질은 blotting buffer (192 mM glycine, 25 mM Tris-base, 0.1% SDS, 20% methanol, pH 8.3)내에서 2시간 동안 실온에서 polyvinylidene fluoride membranes (GE Healthcare)으로 이동되었다. 멤브레인은 0.1% Tween가 들어 있는 1X Tris buffered saline (TBS) 용액에서 5% nonfat milk powder로 blocking 하였다. 멤브레인은 1:1,000으로 희석된 anti-c-myc antibody (Sigma-Aldrich)와 반응시켰고 3번 세척 후 goat pAb to mouse IgG (Cell Signaling Technology) secondary antibody (1:1,000)로 실온에서 2시간 동안 반응시켰다.

결과 및 고찰

N-glycosylation 치환

RGNNV 외피단백질을 발현시키기 위해서 효모시스템을

사용하였다. 효모시스템을 사용하기 위해서는 진핵세포의 특징인 glycosylation을 고려해야만 한다. 세포표면 단백질의 N-glycosylation은 정제를 위한 가수분해를 저해하기 때문에 [19], 성공적인 발현단백질 정제를 위해서는 다른 아미노산으로 치환되어야 한다. 효모 당단백질은 탄수화물 사슬이 단백질의 특이 아미노산 잔기와 결합되어 있는 구조를 갖는다. N-linked 올리고당의 경우 asparagine이며, O-linked 올리고당의 경우 serine과 threonine이 결합되어 있다[12]. RGNNV 외피단백질 유전자를 분석하였을 때, 총 6개의 N-glycosylation (Asparagine-X-Serine/ Threonine, N-X-S/T) 지역이 존재하였으며, asparagine (AAC 또는 AAT) 부분을 glutamine (CAG)으로 치환하였다(Table 1). 유전자 합성의 효율을 높이기 위해 open reading frame을 고려하여 339 bp 및 525 bp로 나누어 합성을 수행하였으며, 각각의 절편은 RGNNV1 및 RGNNV2로 명명하였다(Table 1). 이 두 절편을 각각 효모 발현 벡터에 클로닝하기 위해 유전자의 5' 말단에는 *NheI* 서열과 3' 말단에는 *BamHI* 제한효소 서열을 첨가하였으며, 최종적으로 pGEMT-easy vector에 클로닝하였다.

RGNNV 외피단백질 발현

확보한 RGNNV 외피단백질 유전자를 효모 표면에 발현시키기 위해 pGEMT-easy vector에 클로닝되어 있는 RGNNV1과 RGNNV2를 각각 효모 표면 발현 vector인 pCTCON으로 옮겼다. 효모세포벽의 N말단이 공유결합된 형태로 존재하는 α-agglutinin의 특성을 응용한 방법이며, Aga1과 Aga2의 소단위체(subunit)로 구성되어 있다. Aga1 단백질이 β-glucan 결합으로 세포벽에 고정되고, Aga2 (69개 amino acids)가 이 황화결합을 하고 있다. Aga2 단백질로부터 HA tagging 단백질, 항원, c-myc 순으로 효모 표면에 발현한다[1, 4]. 본 연구에서 pCTCON-RGNNVcp 벡터 클론을 Aga1p 단백질을 발현하는 세포인 EBY100 세포에 형질전환을 수행하였다.

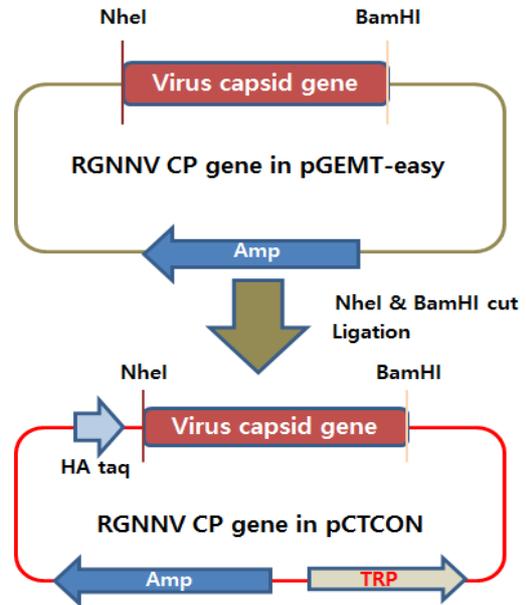


Fig. 1. Diagram of RGNNV CP gene cloning to pCTCON vector.

pCTCON 발현벡터는 TRP (Tryptophan) nutritional marker를 지니고 있어 형질전환 후 세포들을 선택배지인 SC-TRP plates에서 형질전환 세포를 선별하였으며, 형질전환 효율은 각 플라스미드에서 10⁴ 형질전환체를 얻는 것으로 나타났다. 이러한 과정을 통해 선발된 형질전환체는 N-말단 부위에 Aga2p 단백질을 융합한 RGNNV 외피단백질은 세포벽에 발현되어 공유결합되어 있는 Aga1p와 이황화결합을 형성함으로써 RGNNV 외피단백질을 발현시킨다.

FACS에 의한 발현단백질 분석

RGNNV 외피단백질 유전자가 고발현되는 형질전환 세포주를 확인하기 위해 FACS 분석을 수행하였다(Fig. 2). 세포벽

Table 1. Substitution of N-glycosylation site on RGNNV CP gene

CP gene	Substituted Nucleotide sequences
RGNNV1	GCTAGC ATGGTACGCA AAGGTGAGAA GAAATTGGCA AAACCCGCGA CCACCAAGGCCGCGAATCCGCAACCCCGCCGACGTGCTAACAATCGTCCG CGTAGT CAG(AAT) CGCACTGACGCACCTGTGTCTAAAGCCTCGA CTGTAACCTGG GTTTGGACGT GGGACCAATG ACGTCCATCT CTAGGTATG TCGAGAATCT CCCAGGCCGT CCTCCCAGCC GGGACAGGAA CAGACGGATA CGTTGTTGTT GACGCAACCA TCGTCCCCGA CCTCCTGCCA CGACTGGGAC ACGCTGCTAG AATCTCCAG CGATACGCTG TTGAAACACT GGAGTTTGAA ATTACGCCA GGATCC
RGNNV2	GCTAGC A TGTGCCCCGC AAACACGGGC GGTGGTTACG CTGCTGGCTT CTGCCTGAT CCAACTGACA ACGATCACAC CTTGACGCG CTTCAAGCAA CTCGTGGTGC AGTCGTTGCC AAATGGTGGG AAAGCAGAAC AGTCCGACCT CAGTACACCC GTACGCTCCT CTGGACCTCG TCGGGAAAGG AGCAGCGTCT CACGTCACCT GGTCGGCTGA TACTCCTGTG TGTCCGG CAG(AAC) AACACTGATG TGGT CAG(AAC) GT GTCAGTGTCT GTTCGCTGGA GTGTTGACT GAGCGTTCCA TCTCTTGAGA CACCTGAAGA GACCACCGCT CCCATCATGA CACAAGGTTT CCTGT ACCAG(AAC) GATTCCCTTT CCACAAATGA CTTCAAGTCC ATCCTCCTAG GATCCATACC ACTGGACATT GCCCCTGATG GATCAGTCTT CCAGCTGGAC CGCCCGCTGT CCATTGACTA CAGCCTTGGA ACTGGAGATG TTGACCGTGC TGTTTACTGG CACCTCAAGA AGTTTGCTGG ACAG(AAT) GGATCC

The amino acid of N (asparagine) on 'N-X-S/T' was changed to Q (glutamine) on 'Q-X-S/T'.

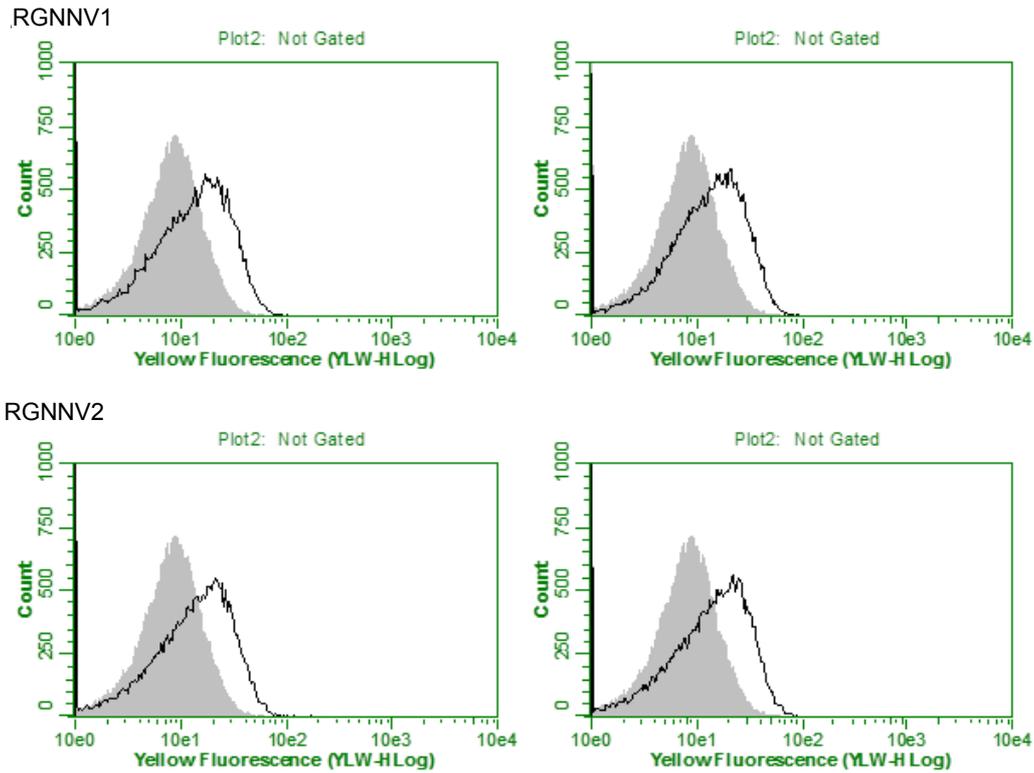


Fig. 2. Flow cytometric analysis of RGNNV CP expression on yeast. The yeast cells were cultured on galactose containing medium, and then cells were labeled with anti c-myc antibody for fluorescence-activated cell sorting analysis. The gray background indicates non-induced cells. The black histogram represents the RGNNV CP expressing yeast cells.

에 발현되어 있는 RGNNV 외피단백질의 경우 C-말단 부위에 c-myc tag를 발현하고 있기 때문에 anti-c-Myc 항체를 이용하여 형광염색을 수행하였다. FACS를 이용하여 형광량을 측정함으로써 각각의 형질전환 세포주에서 RGNNV 외피단백질 발현량 차이를 측정하였다. 고발현 세포주를 측정하기 위하여 탄소원인 galactose가 포함된 SG-CAA 배지를 이용하여 발현을 유도하였으며, 벡터를 형질전환하지 않은 EBY100 세포를 대조군으로 하여 각 RGNNV 외피단백질마다 2개씩 총 4개의 형질전환 라인의 발현량 정도를 FACS 분석을 통한 상대적인 형광의 강도를 수치화하여 알아보았다(Fig. 2). 대조군의 FACS 평균값은 9.73이었으며, RGNNV1 형질전환 라인은 평균 16.70-16.75의 값이 측정되었으며, RGNNV2는 16.96-17.17 값이 측정되었다. 여기에서 RGNNV2의 평균 발현 정도가 RGNNV1보다 높게 나타났는데 이는 둘 사이의 뉴클레오타이드 서열차이에서 발생한 현상으로 추측된다. 즉 RGNNV2와 RGNNV1의 서열이 각각 다르며, 이러한 차이는 두 단백질의 효모 표면에서의 발현에 영향을 줄 수 있다. 또한 일반적으로 FACS 분석과정 중 세포자체에서 발생하는 auto fluorescence가 측정되는데 이는 yeast display system의 전형적인 현상이다. 여기에서 대조군이 가지는 FACS 평균값이 세포자체에서 발생한 형광의 강도를 나타낸다. 결과적으로 측정된 4개의 형질전환 라인 중 RGNNV2의 2라인에서 가장 높은

발현량(평균: 17.17)이 검출되었다(Table 2).

RGNNV 외피단백질 정제

β -mercaptoethanol을 처리함으로써, Aga2와 결합된 발현된 RGNNV 외피단백질을 효모표면 상의 Aga1 단백질로부터 분리하였다. RGNNV 외피단백질은 상층액으로부터 anti-HA agarose로 정제하였다. 생산된 RGNNV 외피단백질 조각의 발현을 확인하기 위하여 anti-HA 항체로 Western blots을 수행하였으며, 대조군으로는 RGNNV 외피단백질이 발현되지 않는 SD-CAA 배지 배양 세포 유래 단백질을 대조군으로 사용하였다. Western blot 결과 전체 RGNNV의 절편인 RGNNV1과 RGNNV2 외피단백질이 대상 크기(22-36 kDa)에서 각각 검출되었다(Fig. 3). 여기서 RGNNV1와 RGNNV2 사이의 뉴클레오타이드 서열길이의 상대적인 차이로 인한 이들의 발현단백

Table 2. FACS mean values from flow cytometry analysis

Sample	Mean값
Control	9.73
RGNNV1-1	16.70
RGNNV1-2	16.75
RGNNV2-1	16.96
RGNNV2-2	17.17

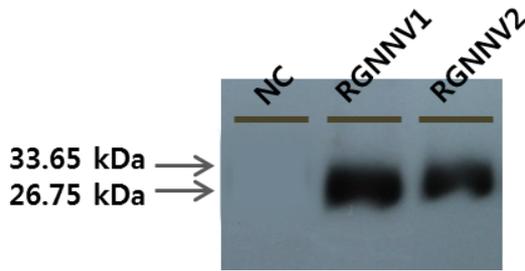


Fig. 3. Purification of RGNNV CP by western blot using anti-HA antibody.

질의 크기 또한 차이를 보였다. 즉, 상대적인 긴 서열을 지닌 RGNNV2 외피단백질의 크기(33.65 kDa)가 작은 서열을 지닌 RGNNV1 (26.75 kDa)보다 크기가 컸다.

결론

바이러스 외피단백질을 항원으로 사용하기 위해서는 해당 바이러스를 농축하고, 이들을 항원으로 사용하여 항체를 개발하는 방법이 일반적으로 사용된다. 본 연구에서는 알려진 바이러스 유전자를 YSD 시스템에 적용하여 발현시키고, 정제하여 항원으로 사용할 수 있는 기법을 개발하였다. Gene Bank에서 확인된 RGNNV 외피단백질 유전자를 합성하고, pCTCON 벡터를 이용하여 효모세포로 형질전환한 후, 형질전환 여부를 FACs를 이용하여 확인하고, 발현된 RGNNV 외피단백질을 β -mercaptoethanol을 처리함으로써 확보하였다. 이러한 결과는 YSD와 HA-tagging 시스템이 RGNNV 외피단백질의 발현 및 정제에 적용 가능하다는 것을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 한국해양과학기술원(과제번호: PE99193)의 연구사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Boder, E. T. and Wittrup, K. D. 1997. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol* **15**, 553-557.
- Bovo, G., Nishizawa, T., Maltese, C., Borghesan, F., Mutinelli, F., Montesi, F. and De Mas, S. 1999. Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy. *Virus Res* **63**, 143-146.
- Brown, M. C., Joaquim, T. R., Chambers, R., Onisk, D. V., Yin, F., Moriango, J. M., Xu, Y., Fancy, D. A., Crowgey, E. L. and He, Y. 2011. Impact of immunization technology and assay application on antibody performance-A systematic comparative evaluation. *PLoS One* **6**, e28718.
- Chao, G., Lau, W. L., Hackel, B. J., Sazinsky, S. L., Lippow, S. M. and Wittrup, K. D. 2006. Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. *Nat Protoc* **1**, 755-768.
- Cho, E. S., Kim, H. J., Jung, S., Kim, J. H., Kim, Y. H. and Nam, S. W. 2009. Cell Surface Display of Arylsulfatase Gene from *Pseudalteromonas carageenovora* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Korean J Microbiol Biotechnol* **37**, 355-360.
- Choi, Y. R., Kim, H. J., Lee, J. Y., Kang, H. A., Kim, H. and Kim, J. 2013. Chromatographically-purified capsid proteins of red-spotted grouper nervous necrosis virus expressed in *Saccharomyces cerevisiae* form virus-like particles. *Protein Expr Purif* **89**, 162-168.
- Clark, M. F. and Adams, A. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* **34**, 475-483.
- Colby, D. W., Kellogg, B. A., Graff, C. P., Yeung, Y. A., Swers, J. S. and Wittrup, K. D. 2004. Engineering antibody affinity by yeast surface display. *Methods Enzymol* **388**, 348-358.
- Fukuda, Y., Nguyen, H. D., Furuhashi, M. and Nakai, T. 1996. Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. *Fish Pathol* **31**, 165-170.
- Gietz, R. D. and Woods, R. A. 2001. Genetic transformation of yeast. *Biotechniques* **30**, 816-831.
- Johansen, R., Grove, S., Svendsen, A. K., Modahl, I. and Dannevig, B. 2004. A sequential study of pathological findings in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L), throughout one year after an acute outbreak of viral encephalopathy and retinopathy. *J Fish Dis* **27**, 327-341.
- Kukuruzinska, M., Bergh, M. and Jackson, B. 1987. Protein glycosylation in yeast. *Ann Rev Biochem* **56**, 915-944.
- Lin, C. S., Lu, M. W., Tang, L., Liu, W. T., Chao, C. B., Lin, C. J., Krishna, N. K., Johnson, J. E. and Schneemann, A. 2001. Characterization of virus-like particles assembled in a recombinant baculovirus system expressing the capsid protein of a fish nodavirus. *Virology* **290**, 50-58.
- Liu, W., Hsu, C. H., Chang, C. Y., Chen, H. H. and Lin, C. S. 2006. Immune response against grouper nervous necrosis virus by vaccination of virus-like particles. *Vaccine* **24**, 6282-6287.
- Lopez-Jimena, B., Garcia-Rosado, E., Thompson, K. D., Adams, A., Infante, C., Borrego, J. J. and Alonso, M. C., 2012. Distribution of red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) antigens in nervous and non-nervous organs of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) during the course of an experimental challenge. *J Vet Sci* **13**, 355-362.
- Lu, M. W., Liu, W. T. and Lin, C. S. 2003. Infection competition against grouper nervous necrosis virus by virus-like particles produced in *Escherichia coli*. *J Gen Virol* **84**, 1577-1582.
- Munday, B. L., Kwang, J. and Moody, N. 2002. Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J Fish Dis* **25**, 127-142.
- Nishizawa, T., Furuhashi, M., Nagai, T., Nakai, T. and Muroga, K. 1997. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Appl Environ Microbiol* **63**, 1633-1636.

19. Rudd, P. M., Wormald, M. R., Stanfield, R. L., Huang, M., Mattsson, N., Speir, J. A., Digennaro, J. A., Fetrow, J. S., Dwek, R. A. and Wilson, I. A. 1999. Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. *J Mol Biol* **293**, 351-366.
20. Schreuder, M. P., Deen, C., Boersma, W. J. A., Pouwels, P. H. and Klis, E. M. 1996. Yeast expressing hepatitis B virus surface antigen determinants on its surface: implications for a possible oral vaccine. *Vaccine* **14**, 383-388.
21. Sohn, S. G., Park, M. A., Oh, M. J. and Chun, S. K. 1998. A fish nodavirus isolated from cultured sevenband group-er, *Epinephelus septemfasciatus*. *J Fish Pathol* **11**, 97-104.
22. Starkey, W. G., Ireland, J. H., Muir, K. F., Jenkins, M. E., Roy, W. J., Richards, R. H. and Ferguson, H. W. 2001. Nodavirus infection in Atlantic cod and Dover sole in the UK. *Vet Rec* **149**, 179-181.
23. Torrance, L. 1992. Developments in methodology of plant virus detection. *Neth J Pl Path* **98**, 21-28.
24. Torrance, L. 1998. Developments in serological methods to detect and identify plant viruses. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **52**, 27-32.
25. Ueda, M. and Tanaka, A. 2000. Genetic immobilization of proteins on the yeast cell surface. *Biotechnol Adv* **18**, 121-140.
26. Voller, A., Bartlett, A., Bidwell, D., Clark, M. and Adams, A. 1976. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Gen Virol* **33**, 165-167.
27. Watanabe, K., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M. 2000. Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis Aquat Organ* **41**, 219-223.
28. Zhu, K., Chi, Z., Li, J., Zhang, F., Li, M., Yasoda, H. N. and Wu, L. 2006. The surface display of haemolysin from *Vibrio harveyi* on yeast cells and their potential applications as live vaccine in marine fish. *Vaccine* **24**, 6046-6052.

초록 : *Saccharomyces cerevisiae* 표면 발현을 이용한 붉바리 신경괴사 바이러스 외피단백질의 생산

박미례¹ · 서승석¹ · 황진익¹ · 김동균² · 박종범² · 정영재³ · 이택건^{1*}

(¹한국해양과학기술원 남해특성연구부, ²신라대학교 생명과학과, ³신경대학교 생명공학과)

바이러스 분리 및 검출 측면에서의 해양바이러스 연구는 높은 빈도의 돌연변이와 유전적 다양성 때문에 한계가 있어 왔다. 현재 해양바이러스를 검출하기 위해 사용되고 있는 방법 중 ELISA를 기반으로 하는 혈청학적 방법이 가장 보편적이다. 혈청학적 방법은 항체의 질과 고도로 정제된 정확한 항원을 요구한다. 최근에 바이러스 외피단백질을 항원으로 이용하고자 하는 새로운 실험시스템이 yeast surface display (YSD)를 사용하여 개발되었다. 이 연구에서는 붉바리 신경괴사 바이러스(RGNNV)의 외피단백질 유전자를 YSD와 HA-tagging 시스템을 이용하여 발현시키고 정제하였다. 2개의 RGNNV 외피단백질 유전자 조각(RGNNV1 및 RGNNV2)을 염기서열 데이터베이스에 기초하여 합성하였고, 효모 발현 벡터인 pCTCON로 클로닝하였다. 효모 strain EBY100에서의 RGNNV 외피단백질의 발현은 발현벡터에 의해 코딩되는 C-말단의 c-myc tags를 인지하는 형광표지된 항체를 이용하여 flow cytometry로 검출되었다. 발현된 RGNNV 외피단백질은 β-mercaptoethanol 처리 후 Aga1과 Aga2 사이의 이황화결합 절단에 의해 효모표면으로부터 분리되었다. Anti-HA 항체를 사용한 Western blots을 수행하였을 때 각 RGNNV 외피단백질이 정해진 크기에서 검출되는 것이 확인되었다. 이러한 결과는 YSD와 HA-tagging 시스템이 재조합 RGNNV 외피단백질의 발현과 정제에 적용가능함을 나타낸다.