



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년09월30일
(11) 등록번호 10-1313906
(24) 등록일자 2013년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0062512
(22) 출원일자 2011년06월27일
심사청구일자 2011년06월27일
(65) 공개번호 10-2013-0001632
(43) 공개일자 2013년01월04일
(56) 선행기술조사문헌
손미리, 동아대학교 대학원 석사학위논문 (2010)
베칼로바이러스 감염 누에 (Bombyxmori) 유충에서
돼지 콜레라 바이러스 구조 당단백질 E2의 생산*
GenBank Accession Number AAC63683
(2009.04.10.)*
GenBank Accession Number AEA40486
(2011.04.04.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
동아대학교 산학협력단
부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, 동아대학
교 내 (하단동)
동부팜한농 주식회사
서울특별시 강남구 테헤란로 432 (대치동)
주식회사 중앙백신연구소
대전광역시 유성구 유성대로 1476-37 (화암동)
(72) 발명자
진병래
경기도 수원시 영통구 태장로35번길 64, 극동아파
트 101동 1204호 (망포동)
이광식
부산광역시 사하구 낙동대로516번길 48, 에덴맨션
2-303 (하단동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한라특허법인

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 최준호

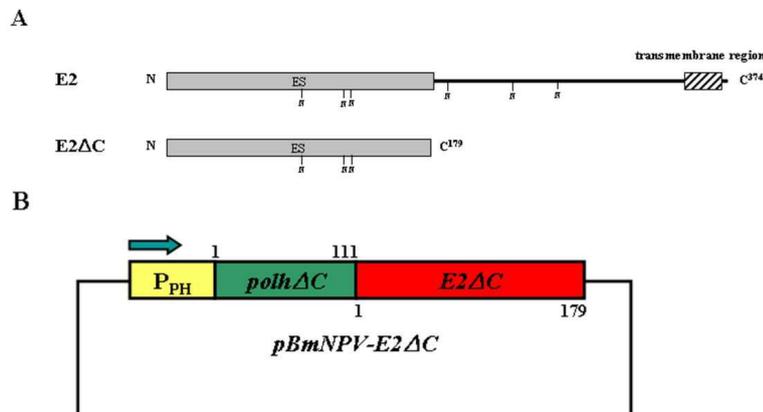
(54) 발명의 명칭 베칼로바이러스의 다각체 단백질과 돼지 콜레라 바이러스 표면 항원 E2가 융합된 융합 단백질을 발현하는 재조합 누에 핵다각체병 바이러스 및 상기 융합 단백질의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 베칼로바이러스의 다각체 단백질 N-말단 영역(polhΔC)와 돼지 콜레라 바이러스의 표면 항원 E2(E2ΔC)가 융합된 융합 단백질(polhΔC-E2ΔC)를 발현하는 재조합 누에 핵다각체병 바이러스, 상기 재조합에 사용되는 발현 벡터 pBmNPV-E2ΔC 및 상기 융합 단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 다각체 단백질과 융합된 돼지 콜레라 바이러스의 주요 표면 항원 단백질 E2를 누에 유충생체를 이용하여 대량으로 생산할 수 있으므로, 상기 바이러스 등의 예방을 위한 동물 백신 개발에 크게 기여할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

제연호

경기도 수원시 권선구 일월천로15번길 21-9, 102동
803호 (구운동, 동은아파트)

우수동

충청북도 청주시 흥덕구 청남로2005번길 70, 103동
1405호 (분평동, 보성아파트)

유성식

대전광역시 유성구 유성대로 1476-37 (화암동)

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 베쿨로바이러스의 다각체 단백질 N-말단 영역과 서열번호 2로 표시되는 돼지 콜레라 바이러스의 표면 항원 E2가 융합된 융합 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 벡터 *pBmNPV-E2ΔC*.

청구항 2

제 1 항의 발현 벡터로 형질전환된 재조합 누에 핵다각체병 바이러스 BmNPV-E2ΔC.

청구항 3

제 2 항의 재조합 누에 핵다각체병 바이러스에 의하여 발현되어 서열번호 4로 표시되는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 4

제 2 항의 재조합 누에 핵다각체병 바이러스를 누에 유충 생체에 주입하는 단계; 및

상기 누에 유충의 체액로부터 융합 단백질을 분리하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는, 서열번호 1로 표시되는 베쿨로바이러스의 다각체 단백질 N-말단 영역과 서열번호 2로 표시되는 돼지 콜레라 바이러스의 표면 항원 E2가 융합된 융합 단백질의 제조방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, pH 6.5 ~ 7.5 조건에서 원심분리를 통하여 체액으로부터 융합 단백질을 분리 및 정제하는 것을 특징으로 하는 융합 단백질의 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 베쿨로바이러스의 다각체 단백질 N-말단 영역(*polhΔC*)와 돼지 콜레라 바이러스의 표면 항원 E2(*E2ΔC*)가 융합된 융합 단백질(*polhΔC-E2ΔC*)을 발현하는 재조합 누에 핵다각체병 바이러스, 상기 재조합에 사용되는 발현 벡터 *pBmNPV-E2ΔC* 및 상기 융합 단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 돼지 콜레라 바이러스(Classical swine fever virus, CSFV)는 프라비비리데 (Flaviviridae)과에 속하는 페스티 바이러스(Pestivirus)의 일종으로 열, 출혈, 운동실소 및 면역억제를 야기하는 병으로, 돼지에 있어서 전염성이 높고 치명적인 질병이다(Lindenbach, B. D. & Rice, C. N. Fields Virology, 4th ed p991-1041, 2001). CSFV 게놈 크기는 3,898 아미노산 전구체를 코딩하는 약 12.3 kb의 한 가닥으로 이루어진 RNA를 가진다 (Rumenapf et al., J. Virol. 67, p3288-3294, 1993). 구조단백질은 뉴클레오캡시드 C 단백질(nucleocapsid C protein)과 세 가지 당단백질(E0, E1 및 E2)을 포함하는데, 그 중, E2 당단백질은 높은 면역성을 나타내는 것으로 알려져 있어, CSFV 감염에 대한 가장 중요한 중화 항체를 형성하는 목적 단백질이며(Van Zijl et al., J. Virol. 65, p2761-2765, 1991; Hulst et al., J. Virol. 67, p5435-5442, 1993; Konig et al., J. Virol. 69, p6479-6486, 1995; Van Rijn et al., J. Gen. Virol. 77, p2737-2745, 1996) CSFV 백신으

로 사용되고 있다(Rumenapf et al., J. Virol. 67, p3288-3294. 1993; Van Rijn et al., J. Gen. Virol. 77, p2737-2745. 1996). 상기 E2 당단백질은 N-말단 영역에 포함된 4개의 항원 영역으로 이루어져 있으며 이들 항원 영역에 대한 특성이 알려져 있다(Wensvoort J. Gen. Virol. 70, p2865-2876. 1989; Van Rijn et al. Vet. Microbiol. 33, p221-230. 1992a, Vet. Microbiol. 33, p221-230. 1992b, J. Virol. 68, p3934-3942. 1994; Lin et al., J. Virol. 74, p11619-11625. 2000).

[0003] 현재, CSFV의 치료와 관련하여 CSFV에 대한 새로운 재조합 백신의 개발에 대한 연구가 진행되고 있다. 돼지 콜레라 바이러스의 당단백질 E2 백신 후보는 염소의 젖샘(Toleda et al., J. Biotechnol. 133, p370-376. 2008)과 우유 (Barrera et al., Vet. Immunol. Immunopathol. 133, p25-32. 2009)에서 발현시켰으며, 식물 (Shao et al., C. R. Biologies 331, p179-184. 2008)과 이스트 (yeast) 발현시스템(Lin et al., Vet. Microbiol. 139, p369-374. 2009)에서도 시도되었다. 또한 E2 항원을 발현하는 바이러스 벡터를 이용한 백신 응용도 시도되고 있다 (Rumenapf et al., J. Virol. 65, p589-597. 1991; Van Zijl et al., J. Virol. 65, p2761-2765. 1991; Konig et al., J. Virol. 69, p6479-6486. 1995; Hammond et al., Vaccine 18, p1040-1050. 2000; Sun et al., Res. Vet. Sci. 88, p77-82. 2010).

[0004] 베클로바이러스의 곤충세포 감염에 의해 발현된 돼지 콜레라 바이러스의 당단백질 E2 서브유닛 백신이 개발되어 동물백신 시장에서 이용되고 있다 (Hulst et al., J. Virol. 67, p5435-5442. 1993). 이러한 백신은 효능성과 안정성면에서의 이점으로 인해 돼지 콜레라의 임상에서 효율적인 면역 반응을 나타낸다 (Bouma et al., Vet. Microbiol. 66, p101-114. 1999).

[0005] 상용되는 CSFV E2 서브유닛 백신은 베클로바이러스 발현 시스템을 이용하여 개발되었으나(Hulst et al., J. Virol. 67, p5435-5442. 1993; Dewulf et al., Vaccine 19, p475-482. 2001; Uttenthal et al., Vet. Microbiol. 83, p85-106. 2001), 기존 백신보다 더 안전하고 효과적이며 경제적인 장점 가진 새로운 백신의 개발이 요구되고 있다.

[0006] 베클로바이러스를 감염시킨 곤충 세포주에서 다각체 단백질의 발현량은 전체 단백질의 약 50%까지 발현됨에도 불구하고(O'Reilly et al., W.H. Freeman & Co. 1992), 다각체 단백질 프로모터 조절 하에 발현된 바이러스 항원단백질과 CSFV E2 서브유닛 백신은 상대적으로 매우 낮은 수준으로 발현된다.

[0007] 이러한 문제점을 개선하기 위해 다각체 단백질과 CSFV E2 항원 단백질의 융합에 의해 재조합 항원의 발현량을 높이고, 이를 용이하게 정제할 수 있는 방법의 개발이 요구되는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 상기 재조합 항원의 발현량을 높일 수 있는 방법을 연구, 노력한 결과, 베클로바이러스의 다각체 단백질 N-말단 영역과 돼지 콜레라 바이러스의 표면 항원 E2가 융합된 융합 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제조하고, 상기 재조합 누에 핵다각체병 바이러스가 감염된 누에 유충으로부터 융합 단백질을 분리 및 정제할 수 있음을 발견함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 따라서 본 발명은 베클로바이러스의 다각체 단백질 N-말단 영역과 돼지 콜레라 바이러스의 표면 항원 E2가 융합된 융합 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 벡터 *pBmNPV-E2ΔC* 및 이를 이용하여 재조합된 누에 핵다각체병 바이러스 BmNPV-E2ΔC를 제공하는데 그 목적이 있다.

[0010] 또한 본 발명은 상기 재조합 누에 핵다각체병 바이러스 BmNPV-E2ΔC를 이용하여 누에 생체 내에서 융합 단백질을 제조하는 방법을 제공하는 데 또 다른 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 베클로바이러스의 다각체 단백질 N-말단 영역과 서열번호 2로 표시되는 돼지 콜레라 바이러스의 표면 항원 E2가 융합된 융합 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 벡터 *pBmNPV-E2ΔC* 및 이를 이용하여 재조합된 재조합 누에 핵다각체병 바이러스 BmNPV-E2ΔC를 그 특징으로 한다.

- [0012] 또한 본 발명은,
- [0013] 상기 재조합 누에 핵다각체병 바이러스를 누에 유충 생체에 주입하는 단계; 및
- [0014] 상기 누에 유충의 체액으로부터 융합 단백질을 분리하는 단계
- [0015] 를 포함하는 융합 단백질의 제조방법 및 제조된 단백질의 분리 정제 방법을 또 다른 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명은 다각체 단백질과 융합된 돼지 콜레라 바이러스의 주요 표면 항원 단백질 E2를 누에 유충생체를 이용하여 대량으로 생산할 수 있으므로, 상기 바이러스 등의 예방을 위한 동물 백신 개발에 크게 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1A는 돼지 콜레라 바이러스의 주요 표면 항원 단백질인 E2와 E2의 C-말단을 제거한 E2 Δ C의 구조를 나타낸 모식도이다. 상기 모식도에서 ES는 E2의 주요 항원 결정 부위(epitope site), N은 당쇄부가 부위(N-glycosylation site)를 의미한다.

도 1B는 본 발명의 발현 벡터 *pBmNPV-E2 Δ C*의 모식도이다. 상기 모식도에서 P_{PH}는 다각체 단백질 프로모터, polh Δ C 다각체 단백질 N-말단 영역을 코딩하는 유전자 및 E2 Δ C는 돼지 콜레라 바이러스 주요 표면 항원 단백질 E2의 N-말단 영역을 코딩하는 유전자를 나타내며, 화살표는 전사 방향을 나타낸다.

도 2는 재조합 누에 핵다각체병 바이러스 BmNPV-E2 Δ C를 감염시킨 누에 유충 혈림프의 단백질 전기영동사진과 다각체 단백질 항체, 돼지 콜레라 바이러스 E2 항체를 이용하여 웨스턴 블랏 분석한 결과는 나타낸 것이다.

도 3은 재조합 누에 핵다각체병 바이러스 BmNPV-E2 Δ C를 감염시킨 누에 유충 혈림프에서 분리한 융합 단백질 (polh Δ C-E2 Δ C)의 단백질 전기영동사진과 다각체 단백질 항체, 돼지 콜레라 바이러스 E2 항체를 이용하여 웨스턴 블랏 분석한 결과는 나타낸 것이다.

도 4는 재조합 누에 핵다각체병 바이러스 BmNPV-E2 Δ C를 감염시킨 누에 유충으로부터 제조된 융합 단백질(polh Δ C-E2 Δ C) 및 융합 단백질로부터 분리된 표면항원 E2 Δ C 단백질(E2 Δ C)의 유충 한 마리당 생산량을 나타낸 그래프이다.

도 5는 실시예 3에서 마우스를 대상으로 융합 단백질(polh Δ C-E2 Δ C) 및 융합 단백질로부터 분리된 표면항원 E2 Δ C 단백질(E2 Δ C)의 항체 생성 능력을 분석한 그래프이다.

도 6은 재조합 누에 핵다각체병 바이러스 BmNPV-E2 Δ C 누에 유충으로부터 제조된 융합 단백질(polh Δ C-E2 Δ C)을 분리하여 용해형 단백질로 전환하는 방법의 개략도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이와 같은 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.
- [0019] 본 발명은 재조합 표면 항원 단백질을 제조하기 위하여, 베콜로바이러스의 다각체 단백질 N-말단 영역(polh Δ C)와 돼지 콜레라 바이러스의 표면 항원 E2(E2 Δ C)가 융합된 융합 단백질(polh Δ C-E2 Δ C)를 발현하는 재조합 누에 핵다각체병 바이러스 및 상기 재조합에 사용되는 발현 벡터 *pBmNPV-E2 Δ C*에 관한 것이다.
- [0020] 상기 베콜로바이러스의 다각체 단백질 N-말단 영역은 서열번호 1로 표시되는 111개의 아미노산으로 이루어진다. 또한 돼지 콜레라 바이러스의 표면 항원 E2으로 N-말단 영역의 서열번호 2로 표시되는 179개의 아미노산을 사용한다.
- [0021] 돼지 콜레라 바이러스 표면 항원 E2의 N-말단 영역은 바이러스의 막과 결합하는 C-말단과 함께 가장 중요 항원 인지 영역으로 알려져 있다(Lin et al., J. Virol. 74, p11619-11625. 2000). 돼지의 IgG 항체와 결합하는 서열은 123개 아미노산의 N-말단(아미노산 서열 690부터 812까지)에 존재한다(Lin et al., J. Virol. 74, p11619-11625. 2000). 그리고 최근에는 돼지 콜레라 바이러스 표면 항원 E2의 N-말단 영역인 692부터 711까지 아미노산 서열이 중화항체 반응에 있어 중요 역할을 하며 (Dong et al., 2006), 아미노산 서열 693부터

699까지의 CKEDYRY 서열이 N-말단의 항원결정부분으로 보고되었다(Dong과 Chen, Vaccine 24, p4029-4034, 2006).

- [0022] 따라서 본 발명에서는 돼지 콜레라 바이러스 표면 항원(아미노산 서열 690부터 868까지)의 179개 아미노산 서열의 N-말단 영역(E2ΔC)을 클로닝하여 사용한다(도 1A).
- [0023] 본 발명의 형질 전환용 발현 벡터 *pBmNPV-E2ΔC*는 서열번호 1로 표시되는 베쿨로바이러스의 다각체 단백질 N-말단 영역과 서열번호 2로 표시되는 돼지 콜레라 바이러스의 표면 항원 E2가 융합된 융합 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하며, 상기 유전자는 서열번호 3의 DNA 서열로 나타난다.
- [0024] 상기 발현 벡터로 형질 전환된 재조합 누에 핵다각체병 바이러스는 BmNPV-E2ΔC로 명명하였으며, 상기 바이러스는 서열번호 4의 융합 단백질(polhΔC-E2ΔC)을 발현할 수 있다.
- [0025] 또한 본 발명은 재조합 누에 핵다각체병 바이러스를 누에 유충 생체에 주입하고, 상기 누에 유충의 체액을 채취하여 이로부터 융합 단백질을 분리함으로써 융합 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0026] 상기 융합 단백질을 분리함에 있어서는 단백질의 분리에 일반적으로 사용되는 원심분리, 여과, 염석 또는 크로마토그래피법 등이 사용될 수 있으나, 본 발명의 융합 단백질은 세포 내 응집체 형태로 발현되므로 원심분리를 이용하여 분리하는 것이 바람직하다.
- [0027] 더욱 바람직하게는 pH 6.5 ~ 7.5의 PBS 용액을 사용하여 원심분리를 진행하는 것이 좋으며, 이 때, PBS 용액으로 원심분리 한 후, 소듐 도데실 설페이트(Sodium dodecyl sulfate, SDS)가 포함된 PBS 용액으로 다시 원심분리한 후, 다시 PBS로 원심분리하면 정제 효율을 보다 높일 수 있다. 상기 과정을 통하여 얻은 융합 단백질은 pH 11 ~ 13의 PBS 용액에서 완전히 용해되어 균질화될 수 있다.
- [0028] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 하기 실시예들은 여러가지 다른 형태로 변형될 수 있으므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0029] **실시예 1 : 누에 핵다각체병 바이러스의 제조**

- [0030] 먼저 돼지 콜레라 바이러스의 LOM strain E2(GenBank accession no. EU789580)의 N-말단 179개 아미노산 영역의 cDNA 단편을 제조하였다. 상기 cDNA 단편은 *pBlueScript-CSFV-E2*를 주형으로 하고, 전방 프라이머(CSFV E2ΔC-F primer, 5'-AGATCTATGCGGCTAGCCTGCAAG-3', 서열번호 5)와 후방 프라이머(CSFV E2ΔC-R primer, 5'-GAATTCGAATAAATCTTCATTTCCAC-3', 서열번호 6)를 사용하여 증폭시켰다.
- [0031] 또한 베쿨로바이러스의 다각체 단백질 N-말단 111개 아미노산 영역의 DNA 단편은 BmNPV DNA를 주형으로 하고, 전방 프라이머(polhΔC-F primer, 5'-AGATCTATGCCGAATTATTCATAC-3', 서열번호 7) 및 후방 프라이머(polhΔC-R primer); 5'-CTCGAGGTTTACAATGGGAAGCTG-3', 서열번호 8)을 사용하여 클로닝하였다.
- [0032] 상기 PCR 산물을 전이 벡터 *pBacPAK8*(Clonetech사, 미국)의 *Bam*HI과 *Xho*I 절단 부위에 상기 베쿨로바이러스의 다각체 단백질 N-말단 111개 아미노산 영역의 DNA 단편을 삽입하고, *Bg*III와 *Eco*RI 절단 부위에 상기 E2의 N-말단 179개 아미노산 영역의 cDNA 단편을 삽입하여 다각체 단백질 프로모터(P_{PH})의 조절 하에 융합 단백질의 발현이 이루어지도록 한 발현 벡터 *pBmNPV-E2ΔC*를 제조하였다(도 1B).
- [0033] 상기 발현 벡터 *pBmNPV-E2ΔC* 500 ng과 비비엠고자(bBmGOZA) 바이러스 DNA(Je et al., Biotechnol. Lett.,23:1809-1817, 2001)(서울대학교, 한국) 100 ng을 혼합하고, 용액량을 멸균수를 첨가하여 50μl로 조정하였다.
- [0034] 한편, 멸균수 ml 당 100ng의 lipofectin(Clonetech사, 미국)을 준비하여, 상기 발현 벡터와 비비엠고자 바이러스 DNA 혼합액과 동일양인 50μl를 혼합하여 30분간 실온에 둔 다음, lipofectin과 DNA 혼합액을 BmN 누에 세포주에 트랜스펙션(transfection)을 진행하여 재조합 누에 핵다각체병 바이러스 BmNPV-E2ΔC를 제조하였다.

[0035] **실시예 2 : 누에 유충생체로부터 융합 단백질의 생산 및 특성 분석**

- [0036] 상기 재조합 누에 핵다각체병 바이러스 BmNPV-E2ΔC를 누에유충 5령 1일째 1×10^5 pfu의 농도로 접종하고, 혈

림프를 접종 후 1일 간격으로 수거하였다. 상기 혈림프는 누에 유충의 다리끝 부분을 잘라 얼음에 냉각된 튜브에 수거하였다. 혈림프 1 μ l를 단백질 전기영동(SDS-PAGE) 후, 단백질은 니트로셀룰로오스 막(Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)에 전이시키고 1% BSA(bovine serum albumin) 용액에서 막을 블로킹시켰다. 그리고 베클로바이러스의 다각체 단백질 또는 돼지 콜레라 바이러스 E2 항체(1:1,000 v/v)와 상온에서 1시간 반응시킨 후, TBST(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.05% (w/v) Tween 20)로 막을 세척한 뒤, horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG에 상온에서 1시간 반응시켰다. 다시 세척 후, ECL 검출 시약(Amesham Bioscience)에 반응시키고 필름에 노출시켰다. 재조합 누에 핵다각체병 바이러스 BmNPV-E2 Δ C 감염된 누에 유충 혈림프의 단백질 전기영동 및 웨스턴 블랏 분석 결과, 약 44 kDa 용합 단백질(polh Δ C-E2 Δ C)은 접종 후 5일과 6일째에 확인되었다(도 2).

[0037] 혈림프 10 μ l로부터 분리된 용합 단백질을 시료 완충액과 혼합하여 5분간 100 $^{\circ}$ C 처리 후, 12% SDS-PAGE 및 베클로바이러스의 다각체 단백질 또는 돼지 콜레라 바이러스 E2 항체를 이용한 웨스턴 블랏 분석을 수행한 결과, 용합 단백질의 발현량은 접종 후 6일째 가장 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다(도 3).

[0038] 혈림프로부터 분리된 용합 단백질은 Bio-Rad Protein Assay Kit(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 그 농도를 측정하였다. 용합 단백질로부터 표면 항원 E2 Δ C 단백질을 분리하기 위하여 용합 단백질 10 μ g당 factor Xa(Novagen, USA)를 0.05 U/ μ l의 농도로 처리하여, 용합 단백질로부터 E2 Δ C 단백질을 분리하여 단백질의 농도를 측정하였다. 재조합 누에 핵다각체병 바이러스 BmNPV-E2 Δ C의 접종 후, 6일째 누에 유충 1마리당 용합 단백질(polh Δ C-E2 Δ C)은 2.75 mg을 생산하였으며, 표면 항원 E2 Δ C 단백질은 0.61 mg을 생산한 것을 확인할 수 있었다(도 4).

[0039] 이러한 결과는 누에 유충으로부터 본 발명의 재조합 누에 핵다각체병 바이러스 BmNPV-E2 Δ C를 이용하여 표면 항원 E2 Δ C를 포함하고 있는 용합 단백질을 대량으로 생산할 수 있음을 확인하였다.

[0040] **실시예 3 : 누에 유충생체에서 생산된 용합단백질의 면역원성**

[0041] 실험동물로 BALB/c종 6주령 암컷 마우스를 사용하여 용합단백질 및 상기 실시예 2에서 용합 단백질로부터 분리된 표면 항원 E2 Δ C 단백질을 각각 10 μ g 주사하였다. 또한 대조구로서 마우스에 PBS를 주사하였다. 첫 번째 주사는 항원 단백질과 Freund's complete adjuvant(Sigma)를 혼합하여 접종하고 2주 뒤, 같은 양의 항원 단백질과 Freund's incomplete adjuvant(Sigma)를 혼합하여 접종하였다. 1차 접종 후, 1주일 간격으로 마우스 꼬리로부터 ELISA 분석을 위해 소량의 혈액을 수거하였으며 2차 주사 2주 후에 마리당 약 1 ml 정도의 혈청을 수거하여 CSFV Antibody Detection Kit(IDEXX, Me, USA)을 사용하여 돼지 콜레라 바이러스 E2에 대한 항체 형성 정도를 ELISA microplate reader를 사용하여 450 nm에서 측정하였다.

[0042] 상기 측정 결과 용합 단백질을 주사한 마우스 혈청으로부터 돼지 콜레라 바이러스 E2에 대한 항체가 생성되었으며, 분리된 표면 항원 E2 Δ C 단백질을 주사한 경우 용합 단백질을 주사하였을 때보다 항체 형성 정도가 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다(도 5). 이를 통하여 본 발명의 용합 단백질 및 이로부터 분리된 표면 항원 E2 Δ C 단백질이 면역원성을 나타냄을 확인하였다.

[0043] **실시예 4 : 누에 유충 생체에서 용합 단백질의 분리 및 정제**

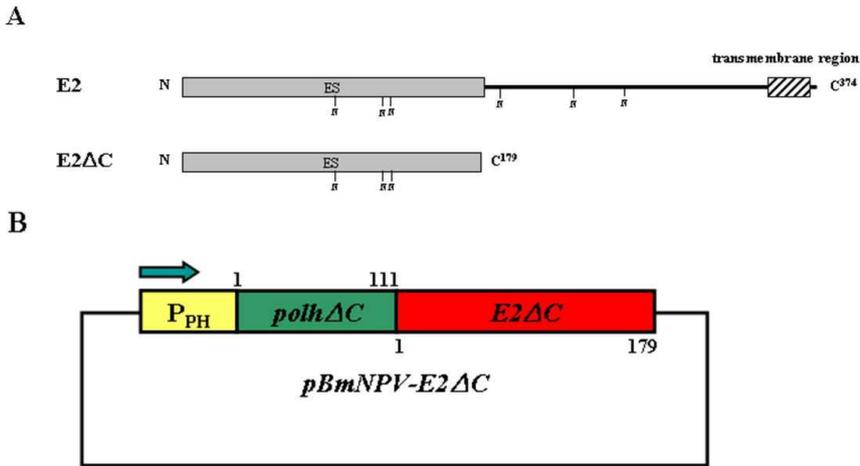
[0044] 상기 재조합 누에 핵다각체병 바이러스 BmNPV-E2 Δ C를 5령 누에유충 1일째 1×10^5 pfu의 농도로 접종하고 6일째 혈림프를 수거하였다. 상기 누에 혈림프를 500 \times g 에서 5분 저속원심분리를 실시하여 세포 파편(cell debris) 및 혈구(hemocytes)를 제거하고, 상등액을 12,000 \times g에서 5분 원심분리하면 다각체 단백질 N-말단 영역의 특성에 의하여 용합 단백질은 침전됨을 확인할 수 있었다.

[0045] 이후 0.1% 소듐염 도데실 설페이트(Sodium dodecyl sulfate, SDS)가 포함된 PBS(pH 7.0)에서 다시 12,000 \times g에서 원심분리로 세척하고, 최종적으로 SDS가 포함되지 않은 PBS(pH 7.0)로 12,000 \times g 원심분리하면 용합 단백질은 침전되어 쉽게 분리 정제할 수 있음을 확인하였다.

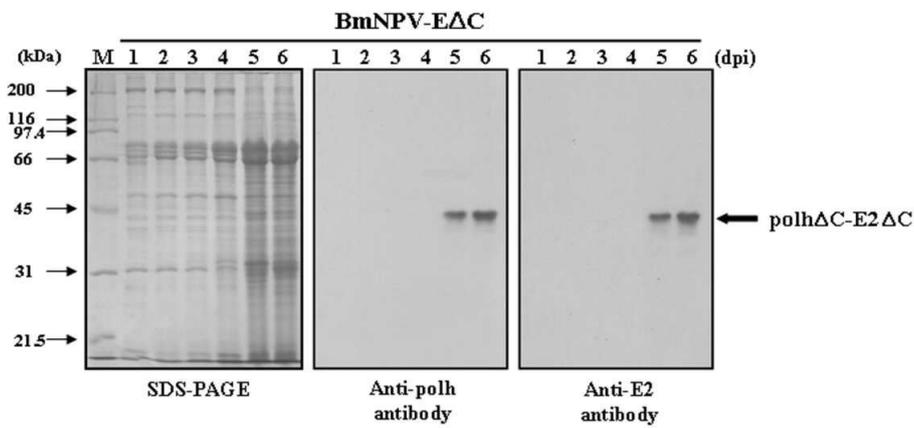
[0046] 상기 정제된 용합 단백질은 pH 12의 PBS에서 완전히 용해 형태(soluble form)로 균질화될 수 있음을 확인하였다(도 6).

도면

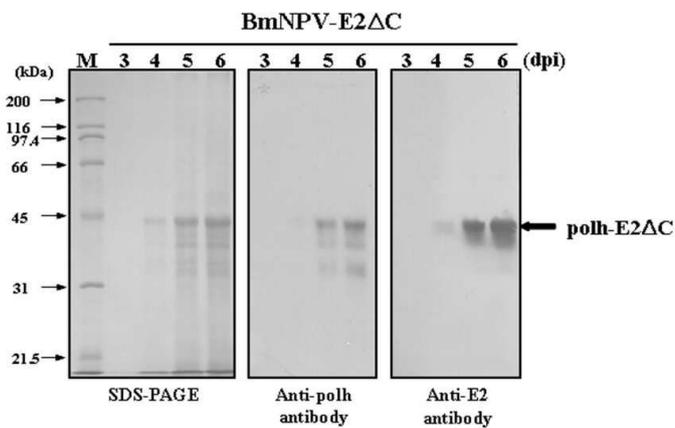
도면1



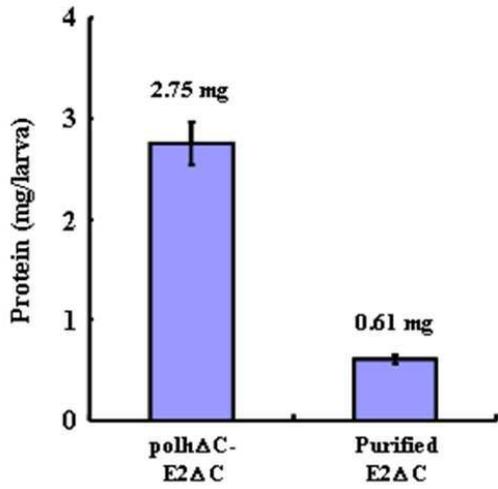
도면2



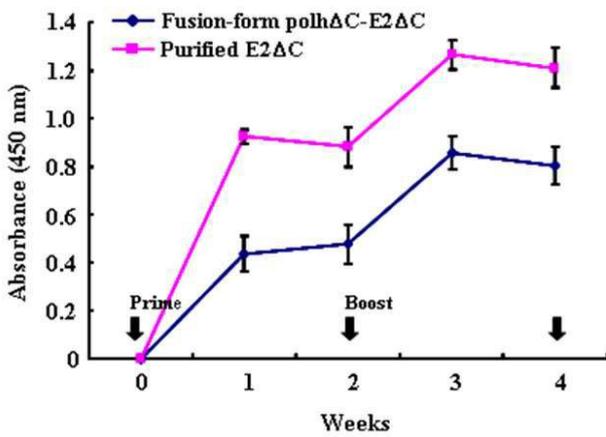
도면3



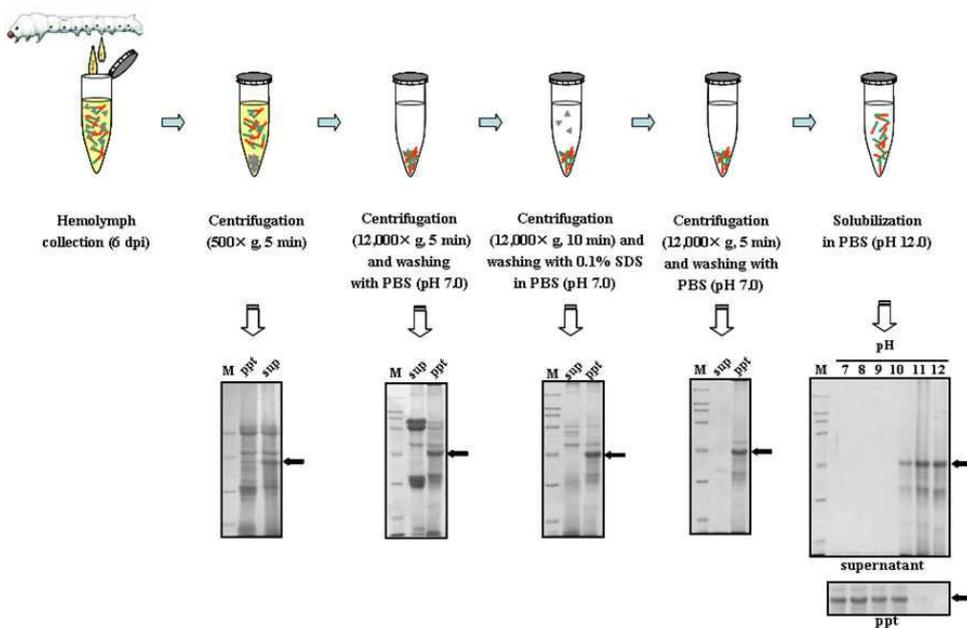
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부