

Production and Storage of Virus Simulants

In-Sun Shin¹, Doyeong Kim¹, Sung-Jun Yang², Byoung-Chul Lim²,
Younggil Cha², Seongjoo Kim³ and Tae-Ju Cho^{1*}

¹School of Life Sciences, Chungbuk National University, Cheongju, Korea

²Bioneer Corp., ³The 5th Research and Development Institute, Agency for Defense Development, Daejeon, Korea

Corresponding

Tae-Ju Cho

School of Life Sciences, Chungbuk
National University, Cheongju 28644,
Korea.

Phone : +82-43-261-2309

Fax : +82-43-267-2306

E-mail : tjcho@chungbuk.ac.kr

Received : April 09, 2018

Revised : June 12, 2018

Accepted : June 14, 2018

No potential conflict of interest relevant to
this article was reported.

We have examined isolation and identification protocols for three virus simulant candidates to biological warfare agents. MS2 phage, a simulant for yellow fever virus and Hantaan virus, was propagated using as a host an *E. coli* strain with F pilus. MS2 phage genome was examined by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). Coat protein of the phage preparation was examined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and mass spectrometric analysis. *Cydia pomonella* granulosis virus (CpGV) is a virus simulant candidate to smallpox virus. CpGV was isolated from a commercialized CpGV pellet. In this study, we developed new isolation and identification protocols for CpGV. One disadvantage of using CpGV is that it is not easy to determine viability of the virus. Here, we have included T4 phage as an alternative. We established a high titer production protocol and developed an easy genome identification protocol that does not require purified phage DNA. Stability of these virus preparations was also examined under various storage conditions. When the virus preparations were not subjected to freeze drying, MS2 phage was most stable when it was stored in liquid nitrogen but unstable at 4°C. In contrast, T4 phage was most stable when it was stored at 4°C. CpGV was stable at -20°C but not at 4°C. Stability during or after freeze drying was also investigated. The result showed that 70~80% MS2 survived the freeze drying process. In contrast, only about 15% of T4 phage survived during the freeze drying. CpGV was found to be degraded during freeze drying.

Key Words: Virus simulant, MS2 phage, CpGV, T4 phage, Stability

INTRODUCTION

생물학 작용제는 생명을 위협하는 질병을 유발하기 때문에 테러나 군사작전에 사용될 수 있는 미생물 또는 독소를 의미한다. 현재, 생물학 작용제는 전쟁에서의 위험성 및 일상생활에서의 생물무기로서의 사용가능성으로 인하여 국가적으로 큰 위협이 되고 있다. 전 세계적으로 생물무기를 테러 또는 전쟁에서 사용하는 데 대비하기 위한 조기탐지체계를 구축할 필요성이 증대되고 있으며, 생물학 작용제와 유사한 모의작용제를 개발하여 환경에서의 소멸특성을 파악하고 모의훈련에 사용하는 등의 필요성도 대두되고 있다.

바이러스성 생물학 작용제 중 하나인 천연두바이러스는 크기가 300 nm이며 186 kb의 이중나선 DNA를 가진 바이러스로 치사율이 35%에 이르는 것으로 알려져 있다 (1). 황열바이러스는 크기가 11 kb인 양성가닥 RNA를 게놈으로 가지는 바이러스로 크기는 40~

Copyright © 2018 Journal of Bacteriology
and Virology

©This is an Open Access article distributed
under the terms of the Creative Commons
Attribution Non-Commercial License
(http://creativecommons.org/
license/by-nc/3.0/).

50 nm이고 구형이며 외피를 가졌다. 황열바이러스는 모기에 의해서 매개되며 평균 사망률은 3% 정도이지만 중증 환자(15~25%)의 경우 치사율이 20~50%가 되는 것으로 알려져 있다 (2). 한탄바이러스는 외피를 가진 구형의 바이러스로 3개의 단일가닥 RNA를 게놈으로 가진다. 설치류의 배설물이나 타액으로 전파되는 치명적인 바이러스로 신부전이나 출혈, 쇼크 등을 일으키는 신증후군 출혈열을 유발하는 것으로 알려져 있다 (3).

바이러스성 생물학 작용제의 모의작용제(virus simulant)는 실제 바이러스와 크기와 모양, 게놈의 특성이 유사해야 하며 사용하기 안전하여야 하고 용이하게 얻을 수 있는 특성을 가진 것이 이상적이다. 하지만, 실제로 모든 면에서 이에 부합하는 바이러스성 모의작용제는 드물다. MS2 phage는 전 세계적으로 RNA 바이러스의 모의작용제 (4), 또는 식품에 있을 수 있는 유해 바이러스의 여러 환경조건에서의 생존을 연구하는 목적으로 사용되어 왔다 (5). MS2 phage는 황열바이러스, 한탄바이러스와 모양과 크기, 그리고 게놈특성이 유사하며, F pilus를 가진 대장균만 특이적으로 감염하는 특징이 있어 인체에 무해하다. MS2 phage는 지름이 약 30 nm인 정십이면체 구조이며 3.6 kb의 양성가닥 RNA를 게놈으로 한다. DNA 바이러스성 모의작용제로는 최근 Garnier 등 (6)이 천연두바이러스와 크기와 모양이 유사하며 게놈특성도 같은 *Cydia pomonella* granulosis virus (CpGV)를 모의작용제로 사용할 것을 제시하였는데, CpGV는 코들링나방을 숙주로 하는 baculovirus이다. CpGV 사용과 관련하여 어려운 점은, CpGV의 titer를 조사하기 위해서는 코들링나방의 배아에서 추출한 primary cell을 사용하여 세포병변을 관찰하거나 코들링나방 애벌레에 바이러스를 먹여 살상효과를 분석하여야 하며, 해충인 코들링나방을 키울 적절한 시설과 인력 및 노하우가 필요하다는 점이다. 이에 따라 본 연구에서는, DNA 바이러스성 모의작용제로 T4 phage도 포함시켜 그 특성을 조사하였다. T4 phage는 천연두바이러스와 모양은 다르지만 크기와 게놈특성이 유사하며, 무엇보다 대장균이 숙주이기 때문에 환경에 유출되더라도 문제가 없고 다루기에 안전하며, 살아있는 바이러스의 수를 조사하기 쉬운 장점이 있다. T4 phage는 크기가 90 x 200 nm로 머리와 꼬리가 있는 tailed phage이며, 172 kb의 이중나선 DNA를 게놈으로 가지는 바이러스이다 (7).

본 연구에서는 바이러스성 모의작용제 후보인 CpGV, T4 phage, MS2 phage의 생산과 정제과정 및 바이러스 확인과정을 확립하고자 하였다. 그 결과, CpGV에 대해서는 상업적으로 판매되는 바이러스 함유 paste로부터 CpGV를 효율적으로 정제하는 새로운 방법을 개발하였으며, MS2 phage와 T4 phage에 대해서는 고농도 바이러스의 생산방법과 바이러스 확인과정을 확립할 수 있었다. 또한, 바이러스를 보관하는 여러 조건을 테스트해 본 결과 각 바이러스에 대한 최적 보관조건을 찾아낼 수 있었다.

MATERIALS AND METHODS

CpGV 정제

프랑스에 있는 Arysta Lifescience에서 판매하는 high-titer paste ($>10^{11}$ granule/g)을 구입하여 CpGV 정제에 사용하였다. 이 paste는 CpGV에 감염된 *Cydia pomonella* 애벌레를 간 다음 여과과정 및 2회의 원심분리과정을 통해 바이러스를 농축한 것이다. CpGV granule (occclusion body) 정제 시에는 바이러스 paste 1 그램 당 2 ml의 멸균증류수를 넣어 얻은 현탁액에 1:1의 비율로 0.1 M sodium carbonate (Na_2CO_3)를 첨가하고 1%가 되도록 Celite를 넣은 다음 믹서기에 넣고 high speed 에서 10초 동안 돌려주었다. 현탁액을 10,000 rpm, 4°C에서 5분 동안 원심분리하고, pellet을 증류수에 풀어준 다음 2배 volume의 0.1 M sodium carbonate를 첨가하여 현탁액을 얻었다. 다시 10,000 rpm, 4°C에서 5분 동안 원심분리하고 상층액을 취한 뒤 0.2 N HCl을 첨가하여 pH를 7로 맞추었다. 60% sucrose 용액과 30% sucrose 용액을 각각 5 ml씩 ultracentrifuge tube에 담고 그 위에 바이러스 샘플 20 ml을 조심스럽게 얹고 Beckman 32Ti rotor를 사용하여 72,000 g, 4°C 조건에서 1시간 30분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 30%와 60% sucrose 용액의 경계면에 위치한 band를 취하고, 85,000 g, 4°C 조건에서 2시간 원심분리하여 바이러스를 침전시켰다.

CpGV DNA 정제

CpGV DNA 정제는 Grades의 방법 (8)을 약간 수정하여 시행하였다. CpGV sample에 1:1의 비율이 되도록 0.1 M sodium carbonate를 첨가하고 37°C 수조에서 30분 동안 배양한 다음 0.2 N HCl을 첨가하여 pH 8로 맞추었다. 최종 농도가 0.1 M이 되도록 NaCl을 첨가하고 65°C에서 10분 동안 처리하고, SDS(최종 농도 1%)와 proteinase K(최종 농도 250 µg/µl)를 첨가한 후 37°C에서 1시간 배양하였다. 이후, phenol/chloroform extraction을 3회 실시하여 DNA를 추출한 다음 ethanol로 침전시켰다. 원심분리 후 얻은 DNA pellet은 적절한 volume의 TE (10 mM Tris (pH 8.0), 0.1 mM EDTA)에 녹여 보관하였다.

MS2, T4 phage 배양 및 정제

MS2 phage와 그 host 박테리아인 *E. coli* 15597은 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 구입하였으며, Dawson 등의 논문 (5)과 Kuzmanovic 등의 논문 (9)을 바탕으로 배양하고 정제하였다. 박테리아 배양에 사용한 MS2 broth의 조성은 다음과 같았다. 리터 당 10 g의 tryptone, 8 g의 NaCl, 1 g의 Bacto-yeast, 10 ml의 10% glucose, 2 ml의 1 M CaCl₂, 1 ml의 10 mg/ml 농도의 thiamine hydrochloride. Plating bacteria를 배양하여 OD₆₀₀=1.0이 되도록 맞춘 다음, MS2 phage를 감염다중도(multiplicity of infection, moi) 0.1이 되도록 첨가하고 37°C에서 20분 간 배양하였다. 0.7% w/v의 top agar와 섞은 후 agar plate에 붓고 16시간 동안 배양하였다. 150 mm plate 하나 당 15 ml의 SM buffer (100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄ 7H₂O, 50 mM Tris (pH 7.5), 0.01% gelatin)를 첨가하여 바이러스를 용출시켜 모은 뒤, polyethylene glycol (PEG)을 최종 농도가 10%가 되도록 첨가하여 바이러스를 침전하고, chloroform extraction 과정을 3번 수행하여 바이러스를 정제하였다.

T4 phage와 그 host 박테리아 *E. coli* B 균주는 CAROLINA™ (Burlington, NC, USA)로부터 구입하였으며 high titer lysate를 얻을 수 있는 protocol을 약간 수정하여 플라스크 용량의 5% 이하가 되도록 배양액을 넣고 배양하는 방법을 사용하였다. T4 broth는 리터 당 10 g tryptone, 5 g KCl, 5 g Bacto-yeast, 2 ml의 1 M CaCl₂를 첨가한 것이었다. T4 phage의 정제는 10%가 되도록 PEG를 첨가하여 침전하는 과정과 2번의 chloroform extraction 과정을 통하여 수행하였다.

Plaque assay

MS2 phage와 T4 phage는 plaque assay를 통하여 생산량을 확인하였다. 우선, phage sample을 SM buffer를 사용하여 희석하고, 희석액 0.1 ml과 0.1 ml의 host 박테리아를 넣은 다음 내용물을 잘 섞고 37°C에서 20분 동안 배양하였다. 이후, 녹은 0.7% w/v의 top agar 3.5 ml에 위 혼합액을 넣고 즉시 섞은 후 90 mm 직경의 agar plate에 부었으며 곧바로 배양접시를 좌우와 앞뒤로 가볍게 돌려 top agar가 골고루 퍼지게 하고 굳혔다. 37°C에서 16~24시간 동안 배양하고 plaque가 나타나면 그 숫자를 세어 플라크형성단위(plaque forming unit, pfu)값을 얻었다.

Phage 게놈 확인

MS2 phage의 RNA 게놈은 Ribospin™ vRD II kit (GeneAll, Seoul, Korea)를 사용하여 추출하였으며, 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 실험에 사용한 primer는 MS2 phage의 replicase 부분을 증폭하는 것으로, forward primer로 5'-CCA TTC AAA CAT GAG GAT TA-3'을 사용하였고 reverse primer로는 5'-CCT AAA TTC ATA TGA CTC GTT-3'을 사용하였다. T4 phage의 DNA를 확인하기 위한 실험에서는 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행하였다. 실험에 사용한 primer는 T4 phage의 게놈 상 특이적인 부분인 125702번째 서열부터 126062번째 서열이 증폭되도록 디자인하였으며, forward primer 서열은 5'-CCA CCT TCT TTT TGA GCC AC-3'이었으며, reverse primer 서열은 5'-CGT AAA GAC CCT ACT AAA GCG G-3'이었다.

T4 phage의 plaque PCR은 최종 정제 샘플을 희석하여 plating하여 생성된 plaque를 무작위로 고른 후 tip으로 찍고 agar plug를 50 µl의 증류수에 푼 뒤 5분 간 끓인 다음 원심분리하고 상층액 1 µl를 취하여 PCR에 사용하였다.

단백질 동정

MS2 phage 또는 CpGV 정제 sample을 18% SDS-polyacrylamide gel (8 x 10 cm)에서 125 V로 1시간 20분 동안 전기영동한 후, Coomassie blue로 염색하여 단백질 밴드를 확인하였다. Coomassie blue로 염색한 gel에서 coat protein으로 예상되는 크기의 밴드를 잘라내어 ProteomeTech Inc. (Seoul, Korea)에 분석을 의뢰하였다. 분석과정을 요약하면 다음과 같다. 잘라낸 gel 조각으로부터 단백질을 추출한 후, trypsin 처리를 통하여 단백질을 펩타이드 형태로 조각을 내었다. 펩타이드 조각은 liquid chromatography (LC)를 통하여 크기별로 분리한 후 mass spectrometry (MS)를 통해 질량을 분석하였으며, MS/MS 분석을 통하여 나타난 펩타이드 조각의 분자량과 일치하는 펩타이드 서열을 protein database에서 검색하였다.

동결건조

제조한 MS2 phage와 T4 phage 샘플에 최종 농도가 0.1 M이 되도록 trehalose를 첨가하고 10 ml 용량의 유리병에 1 ml씩 분주한 후

동결건조에 사용하였다. MS2 phage의 경우 -80°C에서 6시간 동안 동결하였으며, T4 phage 샘플의 경우 액체질소에서 급속동결하였다. 그 후 20시간 동안 상온, 진공조건 5 mTorr에서 동결건조기(모델명 FD5508, IIShinBioBase, Dongducheon, Korea)로 건조하였다.

전자현미경을 통한 바이러스 확인

정제한 바이러스 샘플을 carbon-coated copper electron microscopy grid (Structure Probe/SPI Supplies, West Chester, PA, USA)에 얹어 5분간 방치한 후, 2% phosphotungstate로 염색하였다. 그 후, Libra 120 transmission electron microscopy (Carl Zeiss, Germany)로 관찰하였다.

RESULTS

MS2 phage 생산 및 확인

MS2 phage 배양 시 최적 배양조건을 탐색하기 위하여 액체 배양과 plate 배양을 각각 수행한 결과, plate 배양이 액체 배양보다 생산성이 더 높은 것으로 나타났다. 바이러스의 plate 배양 시 최적 multiplicity of infection (moi)를 조사한 결과, moi 0.01 또는 0.1일 때 가장 높은 수율의 바이러스를 생산하였다. 15597 균주는 F pilus를 가진 대장균 균주인데, 실험실에서 보통 사용하는 대장균 균주인 XL1-Blue와 XL1-Blue MRF'도 F pilus를 가진 균주이기 때문에 이들 균주도 MS2 phage의 숙주가 될 수 있는지 테스트하였다. 하지만, XL1-Blue와 XL1-Blue MRF'의 경우 15597에 비해 생산성이 1/10 미만으로 크게 낮은 것으로 나타났다. 이에 따라 이후 MS2 phage는 15597 균주를 사용하여 moi 0.01 또는 0.1 조건에서 plate 배양을 통하여 생산하였다.

이렇게 배양한 MS2 phage lysate의 titer는 $>1.0 \times 10^{12}$ /ml이었으며, PEG 침전 후 chloroform extraction 과정을 통해 정제하였다. MS2 phage는 CsCl density gradient centrifugation을 통해 순수 정제할 수 있다. 이 방법을 시도한 결과 본 연구실에서 생산하는 조건에서는 초원심분리 후 밴드가 희미하게 관찰되는 수준이었고 밴드를 추출하는 과정과 투석과정에서 바이러스 손실이 컸다. 결과적으로 초원심분리 과정을 거치면 수율이 10% 미만으로 떨어지게 되었는데, 생산한 바이러스의 소멸특성 분석을 목적으로 할 경우에는 순수 정제까지는 필요 없는 것으로 판단되어 초원심분리 정제과정은 이후 생략하였다.

정제한 MS2 phage의 게놈 분석을 위하여 바이러스의 RNA를 추출하고 RT-PCR을 수행한 다음, 0.8% agarose gel에서 전기영동하고 EtBr로 RNA를 염색하였다. 그 결과, 예상되는 크기인 650 bp에서 밴드가 나타남을 확인하였다(Fig. 1A). 1번 lane은 바이러스 RNA가 없는 샘플을 RT-PCR 실험에 사용해 얻은 결과이고, 2번 lane은 추출한 바이러스의 RNA를 사용한 결과이다.

MS2 phage의 capsid는 180개의 coat protein(분자량 13.7 kDa)과 한 개의 A protein(분자량 44 kDa)으로 구성되는데 (9), 제조한 바이러스 샘플의 단백질을 확인하기 위하여 배양 직후의 lysate와 PEG 정제 후 샘플을 각각 18% SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동한 후 Coomassie 염색을 통하여 샘플에 존재하는 단백질을 조사하였다. 그 결과, 정제한 샘플에서는 44 kDa에 해당하는 A protein 크기의 밴드(asterisk 표시)를 관찰할 수 있었으며 13.7 kDa의 coat protein 크기의 밴드(double asterisk 표시)가 major band임을 알 수 있었다(Fig. 1B).

Major coat protein으로 예상되는 밴드를 잘라내어 trypsin으로 처리한 다음 LC-MS/MS 분석과 단백질 database 검색을 수행한 결과, trypsin으로 잘려 나온 peptide 조각의 분자량이 MS2 phage coat protein의 trypsin 펩타이드 조각의 분자량과 일치하는 것으로 나타났다(Fig. 1C). 일치하는 peptide의 서열은 밑줄을 그어 표시하였다. 전자현미경을 통하여 바이러스를 관찰한 결과, 30 nm 크기의 MS2 phage와 일치하는 구형의 입자를 관찰할 수 있었다(Fig. 1D).

CpGV 정제 및 확인

CpGV는 천연두바이러스와 크기와 모양이 비슷하고 게놈특성도 유사하며, 외부로 유출이 되더라도 숙주 외 다른 생물체, 즉 사람을 비롯한 동물이나 식물 등에 해를 끼치지 않는다는 점에서 안전하다. CpGV 바이러스는 *Baculoviridae*에 속하는 곤충바이러스로 약 123 kb 크기의 double-stranded circular DNA를 genome으로 가졌다. CpGV는 코들링나방(*Cydia pomonella*)를 특이적으로 감염하는데, 감염 후기에 'granule'이라는 타원형의 occlusion body를 형성하며 그 안에는 단일 virion이 들어있다. 이 바이러스 입자는 ODV (occlusion

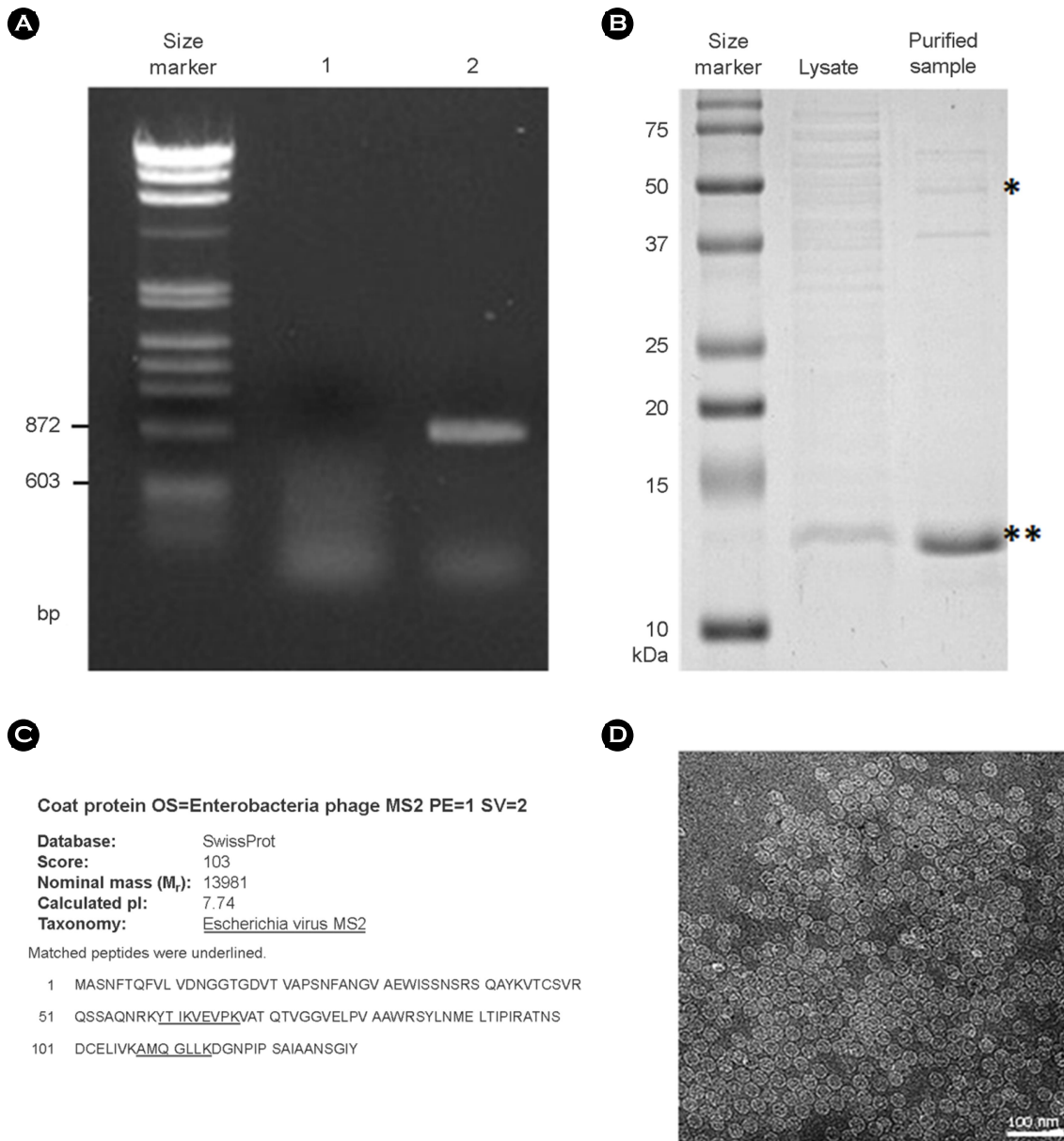


Figure 1. Verification of MS2 phage. (A) Reverse transcription (RT)-PCR analysis. RNA was isolated from the purified MS2 sample and used to amplify the phage genome by RT-PCR (lane 2). Lane 1 shows the result of RT-PCR without phage RNA. (B) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of phage proteins. 18% polyacrylamide gel was used to examine the plate lysate and purified MS2 sample. After electrophoresis, the proteins in the gel were visualized by staining with Coomassie blue. (C) Protein database search after LC-MS/MS. The band indicated by double asterisks in panel B was excised and digested with trypsin. The resulting tryptic peptides were analyzed by LC-MS/MS and protein databases were searched to identify the proteins that matched with the LC-MS/MS result. The panel shown here represents the search result, and the matched peptides are underlined. (D) Electron microscopic examination. Virus sample was mounted on a copper grid and examined under a transmission electron microscope. The virus sample was negatively stained with phosphotungstate.

body-derived virus)라 한다 (10). Occlusion body의 주 성분은 granulin이란 단백질로 ODV 바깥을 두껍게 싸고 있다. CpGV는 다른 곤충에 작용하지 않고 코들링나방 유충에 대한 살충효과가 크며 사람과 다른 동물에도 해가 없어 생물학적 살충제로 적합하다. 실제, 여러 회사에서 MADEX(회사: Andermatt Biocontrol AG), Carpovirusine(회사: NPP/Arysta LifeScience), CYD-X(회사: Certis)라는 이름의 생

물학적 살충제로 판매되고 있다.

본 연구에서는 프랑스에 있는 Arista Lifescience 회사로부터 바이러스 paste(상품명 Carpovirusine)를 구입하여 CpGV 정제에 사용하였다. 이 고농축 paste에는 바이러스가 0.6% 함유되어 있다. Garnier 등 (6)이 똑 같은 바이러스 paste로부터 CpGV를 정제하는 방법을 제시한 바 있어 그 정제방법을 시도하였다. 하지만, 문헌의 결과와는 다르게 sucrose density gradient centrifugation 후 바이러스 입자가 밴드를 형성하지 않고 대부분 침전되는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과가 바이러스 입자들이 뭉쳐있어 생기는 것으로 생각되어, 뭉친 것을 풀어주는 방법으로 초음파 처리와 Triton X-100과 같은 detergent 처리 등을 시험해 보았으나 별 효과가 없었다. 우리가 찾은 효과적인 방법은 바이러스 paste 현탁액에 연마제로 쓰이는 Carborundum 또는 Celite와 Na_2CO_3 용액을 첨가하고 mortar에서 갈아주거나 믹서기에서 돌려주는 것이었다. CpGV는 바이러스 바깥 쪽이 granulin이라는 단백질로 두껍게 싸여 있는데, Carborundum이나 Celite는 뭉쳐있는 CpGV granule들을 물리적으로 분리해주고 sodium carbonate 용액은 화학적으로 granulin을 일부 녹여내어 뭉친 바이러스들을 풀어주는 것으로 생각된다.

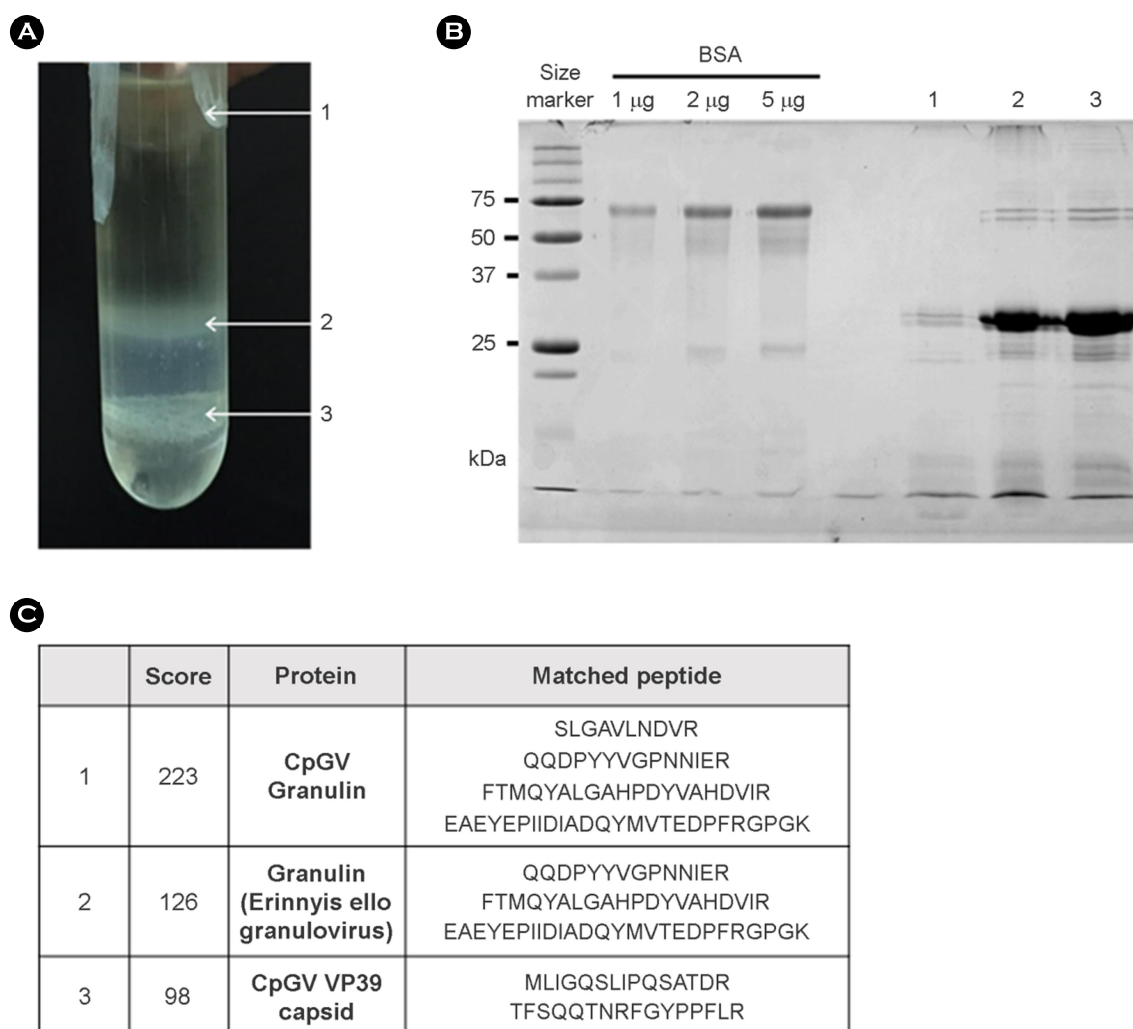


Figure 2. Purification and identification of CpGV. (A) Purification of CpGV occlusion body by ultracentrifugation. CpGV sample was layered onto discontinuous layers of 60% and 30% sucrose solutions prepared in a swing-out tube and centrifuged at 72,000 g at 4°C for 1 hr 30 min. Three bands formed after centrifugation were labeled #1, #2, and #3. (B) SDS-PAGE analysis. 12.5% SDS-polyacrylamide gel was used to examine the protein in the band shown in panel A. (C) Protein database search after LC-MS/MS. The major band after Coomassie staining was excised and analyzed as described in Fig. 1C. The result of the protein database search was summarized.

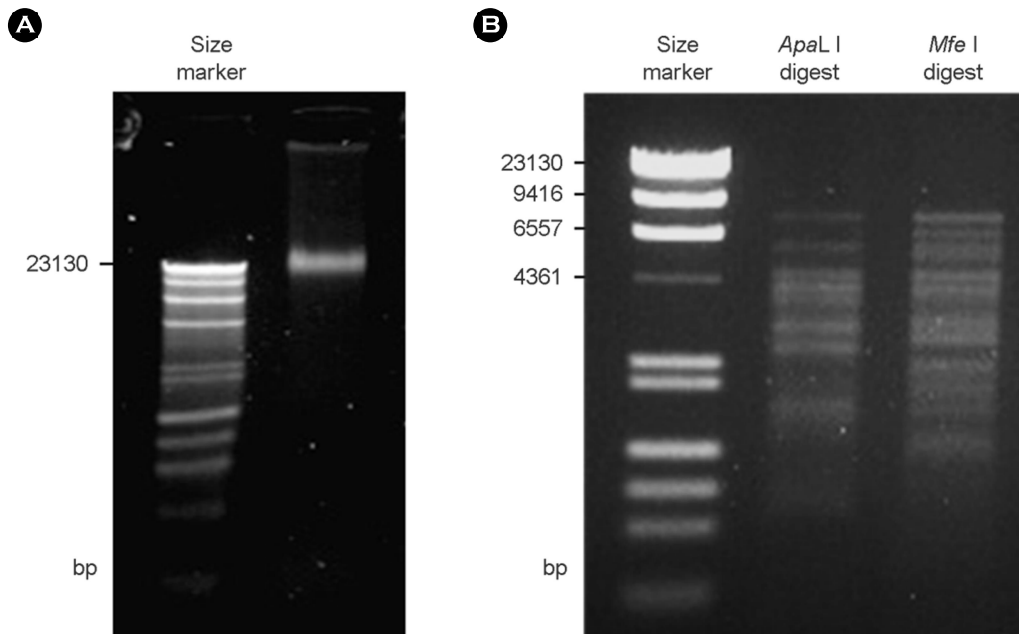


Figure 3. Analysis of CpGV DNA. (A) Agarose gel electrophoresis of purified CpGV DNA. CpGV DNA was electrophoresed in a 0.8% agarose gel and stained with EtBr. (B) Restriction enzyme digestion pattern of CpGV DNA. Virus genomic DNA was digested with either *Apa*I or *Mfe*I and the restriction fragments were separated by agarose gel electrophoresis.

바이러스 현탁액에 Na_2CO_3 을 넣어 1차 처리한 후 원심분리하여 상층액과 pellet을 조사한 결과, granulin 단백질과 바이러스 DNA는 거의 pellet에 존재하는 것으로 나타났다. 다시 pellet을 풀어 Na_2CO_3 로 2차 처리한 후에는 CpGV 바이러스가 상층액으로 녹아나오는 것을 확인하였다. 이후 30%/60% sucrose step gradient ultracentrifugation을 통하여 바이러스를 정제하였다(Fig. 2A). 초원심분리를 통하여 얻은 밴드(Fig. 3A의 #1, #2, #3 밴드)를 취하여 SDS-PAGE를 통하여 확인한 결과, 2번 밴드와 3번 밴드에서 CpGV의 granulin으로 추정되는 28 kDa의 단백질 밴드를 관찰할 수 있었다(Fig. 2B). 전체적인 양으로 판단하면 3번 밴드에 80% 이상의 CpGV가 존재했다. 3번 밴드는 60% sucrose 용액과 30% sucrose 용액의 경계면에 위치해 있다. CpGV가 속한 nucleopolyhedrovirus ODV의 buoyant density는 sucrose 용액에서 1.18~1.25인 것으로 알려져 있는데, 35% sucrose 용액의 밀도가 1.151이고 45% sucrose 용액의 밀도가 1.203이므로 30%/60% sucrose step gradient의 경우에는 두 sucrose 용액 사이에 존재한다고 판단하는 것이 타당하다.

Granulin 단백질로 추정되는 28 kDa의 밴드가 실제 granulin이 맞는지 확인하기 위하여 SDS-PAGE 후 Coomassie staining으로 나온 밴드를 잘라내 LC-MS/MS 분석을 의뢰하였다. 그 결과와 부합되는 단백질을 protein database에서 검색한 결과, 분석결과와 가장 부합되는 단백질은 CpGV granulin으로 나타났으며 VP39 단백질(CpGV의 major coat protein)도 약간 섞여 있는 것으로 나타났다(Fig. 2C).

초원심분리를 통하여 얻은 CpGV 샘플로부터 DNA를 추출하여 실제 CpGV DNA가 맞는지 확인하였다. CpGV occlusion body로부터 DNA를 추출하는 과정은 다소 까다로운 편인데, 일반적인 phenol/chloroform 추출 전에 0.1 M Na_2CO_3 처리, 65°C에서의 열 처리, 그리고 SDS/proteinase K 처리가 필요했다. 이러한 과정은 ODV 바깥의 granulin 층을 제거하기 위해 필요한 것으로 생각된다. DNA 정제 후 agarose gel에 전기영동하여 DNA를 확인한 결과, 23 kb DNA 보다 느리게 움직이는 것으로 나타났다(Fig. 3A). CpGV의 genomic DNA는 123 kb 크기의 circular DNA인데, 추출한 DNA가 실제 CpGV DNA가 맞는지 확인하기 위하여 CpGV 샘플에서 추출한 DNA를 제한효소 *Apa*I 과 *Mfe*I 으로 처리하고 전기영동하여 관찰하였다. 그 결과, CpGV genome의 염기서열(GenBank accession number U53466)에서 예상되는 패턴으로 DNA가 절단되는 것으로 나타났다(Fig. 3B). 보다 확실하게 확인하는 방법으로, *Mfe*I 으로 처리한 DNA를 T-vector에 클로닝하고 무작위로 10개 clone을 택해 염기서열을 분석한 결과 10개 재조합 DNA 모두 그 염기서열이 CpGV 염기서열과 일치하는 것으로 나타났다.

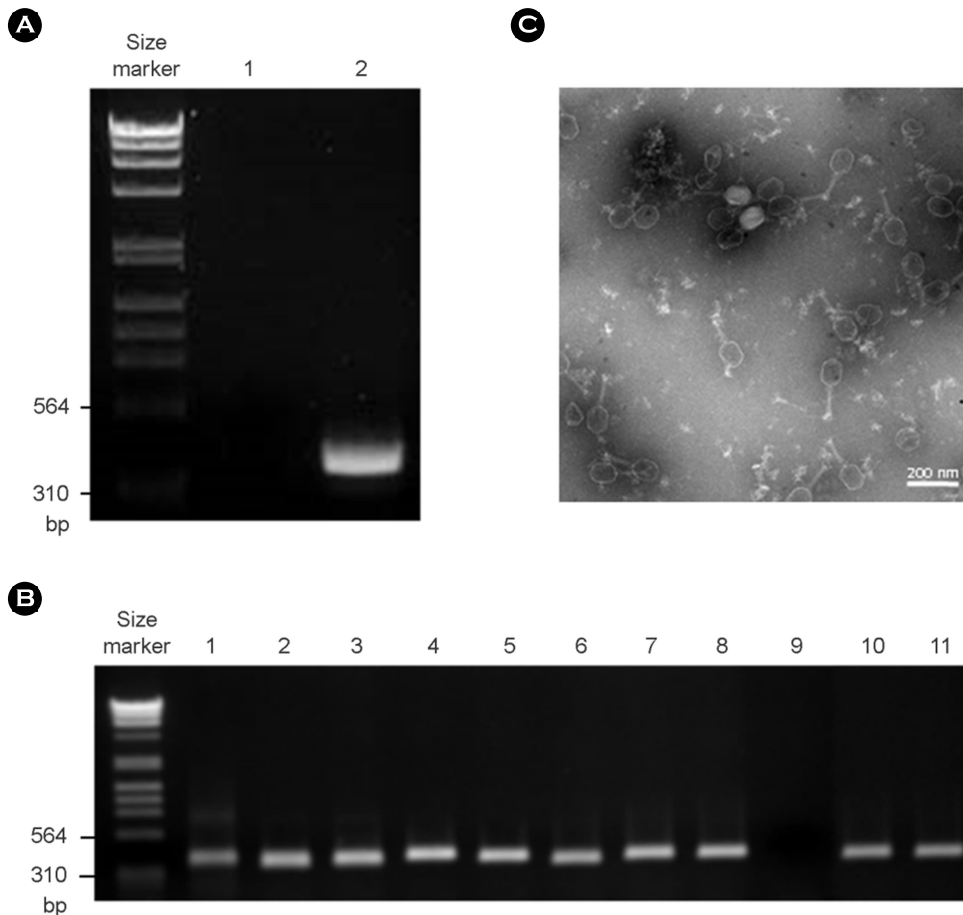


Figure 4. Verification of T4 phage. (A) PCR analysis. DNA was isolated from purified T4 phage sample and used to amplify the phage genome by PCR. (B) Plaque PCR. Purified T4 phage sample was plated with host bacteria and the resulting plaques were randomly taken by poking each plaque with a micropipette tip. The agar plug in the tip was resuspended in distilled water and boiled for 5 min. After centrifugation, 1 μ l of the supernatant was directly used in PCR. (C) Electron microscopic examination. Virus sample was examined as described in Fig. 1D.

T4 phage 정제 및 확인

T4 phage는 대장균이 숙주이기 때문에 환경에 유출되더라도 문제가 없고 다루기에 안전하며, plaque assay를 통해 살아있는 바이러스 수를 쉽게 조사할 수 있다. 이러한 이유로 T4 bacteriophage를 모의작용제 후보로 추가 선정하여 그 특성을 분석하였다.

T4 phage를 high titer로 얻는 방법은 1리터 플라스크에 비교적 소량인 50 ml 이하의 배지를 넣고 배양하는 방법이었는데, 배양 결과 1.0×10^{11} /ml 이상의 titer를 얻을 수 있었다. 배양한 T4 phage는 PEG 침전 후 chloroform extraction을 통하여 정제하였다. 정제한 T4 phage의 게놈 분석을 위하여 바이러스 DNA를 추출한 후 PCR을 수행한 결과 예상되는 크기인 350 bp의 PCR 산물이 생성되는 것을 확인하였다(Fig. 4A). 1번 lane은 DNA 대신 증류수를 PCR에 사용해 얻은 결과이고, 2번 lane은 바이러스 DNA를 PCR에 사용한 결과이다.

T4 phage의 캡시드는 40 종류 이상의 단백질로 이루어져 있어 (7), major coat protein이 한 종류뿐인 MS2 phage와는 달리 SDS-PAGE를 통해 분석하더라도 정제 정도나 오염 여부를 확인하기 어렵다. 이와 같은 점을 보완하기 위해, 최종 정제 샘플을 사용해 얻은 plaque를 무작위적으로 10개 정도 택해 T4 phage인지 확인하되 DNA 정제과정 없이 간편하게 확인할 수 있는 방법을 고안하여 테스트하였다. 이 방법은 plaque에 있는 phage DNA를 정제과정 없이 PCR로 증폭하는 방법으로, 테스트 결과 phage DNA 증폭이 잘 일어나는 것으

Table 1. Stability of purified MS2 and T4 phages at various storage conditions

Virus	Stability	Viability at different temperatures ^a			Stability under optimum storage conditions ^b
		4°C	-80°C	liquid N ₂	
MS2 phage		(1.3±0.1)% n=3	(80.3±4.1)% n=3	(100.0±2.7)% n=3	96.0% (8 mo) 77.6% (19 mo) 73.2% (2 yr)
T4 phage		(100.0±5.4)% n=3	(24.0±1.4)% n=3	(87.6±7.9)% n=3	(92.3±2.1)% (8 mo, n=4) (90.6±7.0)% (10 mo, n=4)

^a Viability was determined after 5 months. The titer before storage was taken as 100%.

^b MS2 phage was stored in liquid nitrogen, and the titer was determined after a given period of months (mo) or years (yr) shown in parenthesis. T4 phage was stored at 4°C and the titer determination was carried out four times after a given period of time. The titer before storage was taken as 100%.

로 나타났다(Fig. 4B). 1~8 lane과 10, 11번 lane은 plaque를 PCR한 결과이고 9번은 plate 상에서 plaque가 생성되지 않은 부위를 취하여 PCR에 사용한 결과이다. Plaque PCR를 통하여 얻은 DNA의 이동 속도는 샘플에 따라 약간의 차이를 보였는데, 이것이 실제 PCR 산물의 크기가 다르기 때문에 그런 건지 확인하기 위하여 증폭된 DNA를 TA vector에 cloning한 후 DNA 염기서열을 분석한 결과, 10개의 증폭된 DNA 모두 같은 T4 phage의 염기서열을 가진 것으로 나타났다. 한편, 정제한 샘플을 전자현미경을 통하여 관찰한 결과 T4 phage의 머리와 꼬리 구조를 확실하게 볼 수 있었으며, 다른 바이러스는 관찰할 수 없었다(Fig. 4C).

보관안정성 조사

정제한 바이러스의 최적 보관조건을 알아보기 위하여 MS2 phage와 T4 phage를 4°C, -80°C 그리고 액체질소에서 5개월간 보관한 후의 titer 변화를 조사하였다(Table 1). 표시된 수치는 온도 별로 3개씩 보관한 바이러스 샘플의 생존율에 대한 평균 값과 표준편차이며, 보관 직전의 titer를 100%으로 한 것이다. 보관 온도에 따른 바이러스의 생존율을 조사한 결과, MS2의 경우 액체질소에서 가장 안정한 것으로 나타났으며 4°C에 보관한 MS2 phage의 생존율은 매우 낮은 것으로 나타났다. 이 결과는 MS2 phage의 안정성이 4°C에서보다는 -80°C에서 더 좋다는 이전의 보고 (11)와 일치하는 것인데, 본 연구 결과 액체질소에서 보관하는 것이 약간 더 좋은 것으로 나타났다. 정제한 MS2 phage의 최적 보관조건인 액체질소에서 시간에 따른 생존율 변화를 조사한 결과, 24개월 후에도 생존율이 70% 이상으로 유지되는 것으로 나타났다.

T4 phage의 경우, 4°C에 바이러스를 보관한 경우에는 titer가 처음 그대로 거의 유지되었으며, 액체질소에서는 그 보다 약간 낮은 80% 대의 생존율을 보였다. 이와 같은 결과는 앞서 기술한 MS2 phage의 결과, 즉 MS2 phage는 4°C에서는 생존율이 크게 감소하는 것과는 대조되는 결과이다. -80°C에서는 가장 낮은 생존율을 보였다. 이는 머리와 꼬리, 그리고 tail fiber가 있는 상당히 정교한 구조의 T4 phage의 경우, 동결이 서서히 일어날 때 구조가 상당히 파괴되기 때문이라고 추측된다. 액체질소에서 급속동결하였을 경우가 -80°C에서 동결하였을 때보다 영향을 덜 받는 것도 급속동결로 구조 손상이 덜 일어나기 때문이라고 생각된다. 가장 높은 생존율을 보이는 4°C에서의 T4 phage 보관 안정성을 조사한 결과, 보관 후 10개월이 지나도 90% 정도의 생존율을 보이는 것으로 나타났다.

CpGV의 경우 살아있는 바이러스 수 대신 DNA를 추출하여 조사하였는데, 그 결과 4°C에 보관할 경우에는 DNA 분해가 나타났다. 이는 바이러스가 분해된 것을 의미하는데, -20°C에 보관한 경우에는 뚜렷한 DNA 분해는 관찰할 수 없었다. 참고로, Arysta Lifescience 회사에서도 CpGV pellet을 얻은 후 -20°C에 보관하고 있다.

바이러스를 보관하는 다른 방법은 동결건조 후에 보관하는 것인데, 제조한 바이러스의 최적 동결건조 조건을 탐색하기 위하여 보존제로 가장 많이 사용되는 trehalose, sucrose, methyl- α -D-glucopyranoside를 선정하여 0.1 M 농도가 되도록 섞고 갈색유리 vial에 1 ml씩 담아 동결건조하였다. 그 결과, 0.1 M의 trehalose를 사용하였을 때 가장 좋은 생존율을 나타내어(data not shown), 이후 바이러스의 동결건조에는 trehalose를 사용하였다. 분주한 MS2 phage는 -80°C에서 6시간 동안 동결한 후 20시간 동안 건조시켰다. 동결건조 전과 후의 titer를 비교한 결과, 동결건조 과정에서 titer가 20~30% 감소하는 것으로 나타났다(Table 2). 동결건조한 MS2 phage를 상온과

Table 2. Stability of freeze-dried virus samples

	Survival rate after freeze drying	Stability at -20°C ^a
MS2 phage	77.6±10.6% (n=11)	87.6%, 85% (13 mo) 83.4%, 81.4% (14 mo)
T4 phage	14.5±7.6% (n=13)	62.1%, 80.7% (10 mo) 58.5%, 76.3%, 61.9% (12 mo)

^a Viability values of two or three virus samples in lyophilization vials were determined after a given period of months (mo) shown in parenthesis. The titer right after freeze drying was taken as 100%.

-20°C에서 약 3개월 보관한 후 생존율을 조사한 결과, 상온에서는 73%로 나타났고 -20°C에서는 거의 그대로 유지되는 것으로 나타났다. MS2 phage를 -20°C에서 장기 보관할 경우 14개월이 경과하더라도 80% 대의 생존율(동결건조 직후 titer 기준)을 유지하는 것으로 나타났다(Table 2). 4°C에서 보관한 경우에는 -20°C에서 보관했을 경우에 비해 약간 낮은 생존율을 보였다(data not shown). 대부분 phage의 경우 동결건조 후 1개월이 지나면 titer가 1/10로 감소한다는 보고 (12)를 감안하면 본 연구의 결과는 고무적인 것이라 할 수 있다.

T4 phage의 최적 동결건조 조건을 조사하기 위하여 -80°C에서 6시간 동결 후 20시간 건조, 또는 액체질소에서 동결 후 20시간 건조하는 방식을 테스트한 결과, 액체질소에서 동결하는 방식이 더 높은 생존율을 보였다. 따라서 이후 T4 phage는 액체질소에서 동결 후 20시간 동안 건조하였다. T4 phage의 동결건조 직후의 생존율은 동결건조 전과 비교하였을 때 약 15%인 것으로 나타났다(Table 2). 동결건조 후 상온과 -20°C에서 보관하였을 때의 생존율을 조사한 결과, 상온에서는 3개월 후 약 절반으로 감소한 반면 -20°C에서는 5개월 후에도 80% 정도를 유지하여, 이후 동결건조 샘플을 -20°C에서 보관하고 시간에 따른 생존율 변화를 조사하였다. 그 결과는 Table 2에 보인 바와 같다. 10개월 보관 후의 생존율 값은 두 개 vial 샘플을 조사한 값이고, 12개월 후의 생존율 값은 3개 vial 샘플을 조사한 값이다. 동결건조 직후의 titer를 기준으로 -20°C에서 보관하였을 경우 12개월 후 생존율이 약 65%인 것으로 나타났다. 한편, 동결건조한 T4 phage의 vial 간 편차는 MS2 phage에 비해 2~3배 정도 더 큰 것으로 나타났다.

DISCUSSION

CpGV 바이러스의 경우 살아있는 CpGV의 titer 조사가 까다로워 소멸특성 분석이 어려운 문제점이 있다. CpGV는 코들링나방(*Cydia pomonella*)만 선택적으로 감염하는데, 그러한 숙주특이성을 이용해 CpGV를 생물학적 살충제로 사용할 수 있다. 한편으로, 바로 그러한 숙주특이성으로 인해 baculovirus 연구에 보편적으로 사용하는 곤충세포(예: sf9 cell)를 사용할 수 없다. CpGV의 경우에도 그 바이러스를 키울 수 있는 세포가 개발되었으며 (10), CpGV 복제나 저장성을 연구하는 데 사용되고 있다 (13, 14). CpGV titer를 조사할 때는 이 Cp14R 세포를 희석한 바이러스 샘플로 감염시키고 10~11일 후 occlusion body가 형성되었는지 관찰하여 TCID₅₀ 값을 구하는 방법을 사용한다 (10). 하지만 이 Cp14R 세포는 코들링나방의 배아에서 추출한 primary cell로서 얻기가 쉽지 않고 유지하는 데에도 시간과 인력이 많이 소요된다는 점이 까다로운 점이며, 동물세포를 배양해야 하기 때문에 비용도 많이 들어간다.

CpGV titer를 구하는 다른 방법으로는, 코들링나방 애벌레에 적절히 희석한 occlusion body를 먹여 치사 dose(LD₅₀) 값을 구하는 방법도 사용할 수 있는데, 이 경우에도 코들링나방 애벌레를 항상 사용할 수 있도록 키워야 하고, 또 titer를 조사할 때 적당한 성장단계의 애벌레를 사용하고 occlusion body가 들어있는 먹이를 먹지 않은 애벌레는 세심하게 골라내야 하는 등 적절한 시설과 인력 및 노하우가 많이 필요하다. 이러한 시설과 인력이 확보만 된다면 CpGV는 천연두바이러스의 좋은 모의작용제가 될 것이다. 천연두바이러스 이외의 다른 DNA 바이러스에 대한 모의작용제로, 또는 전반적인 DNA 바이러스의 소멸특성을 조사하는 연구목적에는 T4 phage가 적합할 수 있는데, 그 이유는 살아있는 바이러스의 갯수를 쉽게 조사할 수 있고 또 실험실에서 비교적 쉽게 키울 수 있으며 안전하기 때문이다. 또한 T4 phage의 장점은 바이러스 확인과정에서 DNA 추출 또는 정제과정 없이 plaque PCR로 바이러스의 계통을 쉽게 확인할 수 있다는 점이다.

MS2 phage와 T4 phage의 보관안정성을 조사한 결과, 각 바이러스에 대해 최적의 보관조건을 찾아낼 수 있었다. 대부분 바이러스의 경우, 어떤 보관조건에서든 1년 후에는 titer가 1/10로 정도로 감소하는 것으로 알려져 있는데 (12), MS2 phage는 액체질소에서 보관할

경우 2년 후에도 titer가 70% 이상 유지되며, 동결건조 후 -20℃에서 보관할 경우에도 안정적으로(1년 후에도 동결건조 직후 titer의 80% 이상으로) 유지할 수 있는 것으로 나타났다.

T4 phage의 동결건조 직후 생존율은 4~25%이었다. 이 결과는 tailed phage인 *Staphylococcus aureus* phage ISP의 동결건조 직후 생존율이 약 10%라는 보고(15)와 *E. coli* phage인 λ phage의 동결건조 직후 생존율이 5~20%이라는 보고 (16)와 대체적으로 일치하는 결과이다. 동결건조 시 T4 phage 생존율이 많이 감소하는 것은 Fig. 4C에 보인 바와 같이 head, tail, tail fiber로 구성된 경교한 T4 phage의 구조와 관련이 있는 것으로 보이며, 동결건조 과정 중에 구조적 손상이 일어나 바이러스의 생존에 영향을 미친 것으로 생각된다.

T4 phage와 같은 tailed phage의 경우 동결건조 시의 생존율이 여러 요인에 의해 좌우되는 것으로 보고되었다. Puapermpoonsiri 등 (17)은 *Staphylococcus aureus* 또는 *Pseudomonas aeruginosa*를 숙주로 하는 tailed phage의 동결건조 시 안정성에 대해 조사하였는데, PEG6000이나 sucrose 같은 보존제가 오히려 생존율을 감소시키는 요인이 될 수도 있다고 보고하였다. 또한, 동결건조 시 두 번째 건조 cycle이 상당히 중요하다는 것과 동결건조한 샘플의 수분함량이 너무 낮으면(2~3%) 생존율이 크게 낮아질 수 있다고 보고하였다. 본 연구에서, T4 phage의 동결건조 후 생존율이 동결건조를 시행할 때마다 큰 폭의 차이를 보였으며, vial 간 편차도 MS2 phage에 비해 큰 것으로 나타났는데, 이와 같은 결과는 사용한 동결건조기의 기계적 특성상 동결건조 조건, 특히 건조 시 온도를 임의로 조정하는 기능이 없어 주위온도에 따라 온도가 달라진 것이 한 요인이라고 생각된다.

한편 T4 phage를 동결건조하지 않고 액상 상태로 4℃에서 보관하였을 경우 10개월이 경과하더라도 90% 정도의 titer를 유지하는 것으로 나타났다. 따라서 T4 phage의 경우 까다로운 동결건조 조건을 감안하면, 동결건조를 하지 않고 액상으로 4℃에서 보관하는 것이 가장 적절한 보관방법이 될 것으로 생각한다.

ACKNOWLEDGMENTS

본 연구는 국방과학연구소 산학연주관 선도형 핵심기술사업인 '맞춤형 유사생물학작용제 제조기술 개발' 과제의 연구비로 수행되었음.

REFERENCES

- 1) Gubser C, Hué S, Kellam P, Smith GL. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. J Gen Virol 2004;85:105-17.
- 2) Wasserman S, Tambyah PA, Lim PL. Yellow fever cases in Asia: primed for an epidemic. Int J Infect Dis 2016;48:98-103.
- 3) Kim HY. Hemorrhagic fever with renal syndrome. Infect Chemother 2009;41:323-32.
- 4) Bentahir M, Laduron F, Irengé L, Ambroise J, Gala JL. Rapid and efficient filtration-based procedure for separation and safe analysis of CBRN mixed samples. PLoS One 2014;9:e88055.
- 5) Dawson DJ, Paish A, Staffell LM, Seymour IJ, Appleton H. Survival of viruses on fresh produce, using MS2 as a surrogate for norovirus. J Appl Microbiol 2005;98:203-9.
- 6) Garnier L, Gaudin JC, Bensadoun P, Rebillat I, Morel Y. Real-time PCR assay for detection of a new simulant for poxvirus biothreat agents. Appl Environ Microbiol 2009;75:1614-20.
- 7) Leiman PG, Kanamaru S, Mesyanzhinov VV, Arisaka F, Rossmann MG. Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. Cell Mol Life Sci 2003;60:2356-70.
- 8) Grades ZE. Novel isolates of *Cydia pomonella* granule virus (CpGV): deciphering the molecular mechanism for overcoming CpGV resistance in codling moth (*Cydia pomonella*). Ph.D. thesis 2010; Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.

- 9) Kuzmanovic DA, Elashvili I, Wick C, O'Connell C, Krueger S. Bacteriophage MS2: Molecular weight and spatial distribution of the protein and RNA components by small-angle neutron scattering and virus counting. *Structure* 2003;11:1339-48.
- 10) Winstanley D, Crook NE. Replication of *Cydia pomonella* granulosis virus in cell cultures. *J Gen Virol* 1993;74:1599-609.
- 11) Jończyk E, Klak M, Międzybrodzki R, Górski A. The influence of external factors on bacteriophages-review. *Folia Microbiol* 2011;56:191-200.
- 12) Ackermann HW, Tremblay D, Moineau S. Long-term bacteriophage preservation. *WFCC Newslett* 2004;38:35-40.
- 13) Hilton S, Winstanley D. Identification and functional analysis of the origins of DNA replication in the *Cydia pomonella* granulo virus genome. *J Gen Virol* 2007;88:1496-504.
- 14) Gebhardt MM, Eberle KE, Radtke P, Jehle JA. Baculovirus resistance in codling moth is virus isolate-dependent and the consequence of a mutation in viral gene pe38. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:15711-6.
- 15) Merabishvili M, Vervaeke C, Pirnay JP, Vos DD, Verbeken G, Mast J, *et al.* Stability of *Staphylococcus aureus* phage ISP after freezing-drying (lyophilization). *PLoS One* 2013;8:e68797.
- 16) Jepson CD, March JB. Bacteriophage lambda is a highly stable DNA vaccine delivery vehicle. *Vaccine* 2004;22:2413-9.
- 17) Puapermponisiri U, Ford SJ, van der Walle CF. Stabilization of bacteriophage during freeze drying. *Int J Pharm* 2010;389:168-75.