

효모표면표출(YSD) 기법을 이용한 참돔 이리도바이러스(RSIV) 외피단백질의 발현

서승석¹, 박미례¹, 황진익¹, 이택건^{*}
¹한국해양과학기술원 남해특성연구부

Expression of the red sea bream iridovirus (RSIV) capsid protein using a yeast surface display method

Sung-Suk Suh¹, Mirye Park¹, Jinik Hwang¹, Taek-Kyun Lee^{*}

¹South Sea Environment Research Department, Korea Institute of Ocean Science & Technology

요약 참돔 이리도바이러스(RSIV)는 이리도바이러스과에 속하며, 많은 아시아 국가에서 감염성 어류 질병을 유발하여 양식산업에 커다란 경제적 손실을 입히는 바이러스이다. 우리는 최근에 효모표면발현(yeast surface display, YSD)를 사용하여 다양한 해양바이러스를 동정하고 검출할 수 있는 새로운 실험시스템을 개발하였다. 이 연구에서 우리는 참돔 이리도 바이러스(RSIV)의 외피단백질을 효모표면 발현 기법을 이용하여 발현시켰다. 바이러스 외피단백질 유전자는 염기서열 데이터베이스에 기초하여 합성되었고, 효모발현벡터인 pCTCON2으로 서브클로닝되었다. 이 벡터는 효모 strain EBY100으로 형질전환되었다. Flow cytometry와 Western blot analysis를 통해 RSIV 외피단백질의 발현을 확인하였다. β -mercaptoethanol 처리에 의해 발현된 바이러스 외피단백질을 효모 표면로부터 분리하였다. 이 연구의 결과는 YSD 시스템이 해양바이러스 외피단백질을 획득하기 위한 매우 좋은 발현시스템이라는 것을 보여준다.

Abstract The red seabream iridovirus (RSIV), which belongs to the iridoviridae, causes infectious fish diseases in many Asian countries, leading to considerable economic losses to the aquaculture industry. Using the yeast surface display (YSD) technique, a new experimental system was recently developed for the detection and identification of a variety of marine viruses. In this study, a coat protein gene of RSIV was synthesized based on the nucleotide sequence database and subcloned into the yeast expression vector, pCTCON2. The expression of viral coat proteins in the yeast strain, EBY100, was detected by flow cytometry and Western blot analysis. Finally, they were isolated from the yeast surface through a treatment with β -mercaptoethanol. The data suggests that the YSD system can be a useful method for acquiring coating proteins of marine viruses.

Key Words : Capsid protein, Flow cytometry, Recombinant protein purification, RSIV, Yeast surface display

1. 서론

이리도바이러스는 정 20면체 DNA 바이러스이며, *Chloriridovirus*, *Iridovirus*, *Lymphocystivirus*, *Megalocytivirus* 및 *Ranavirus* 등 5개의 속으로 구분된다 [1]. 이리도바이러스는 전세계 다양한 지역의 양식산업에

미치는 영향 때문에 관심을 받고 있다[2]. 이리도바이러스 병은 한국, 일본, 중국 타이완 및 태국 등의 양식어류에서 보고되었고, 심각한 어류 폐사와 많은 경제적 손실을 유발하는 것으로 알려져 있다[3-5]. 참돔이리도바이러스(red sea-bream iridovirus, RSIV)는 참돔 외에 약 30 여종의 양식어종을 감염시킨다[4,6]. RSIV에 감염된 어류는 심각

본 논문은 한국해양과학기술원 연구과제(PE99193)로 수행되었음.

*Corresponding Author : Taek-Kyun Lee(Korea Institute Ocean Science & Technology)

Tel: +82-55-639-8630 email: tklee@kiost.ac

Received June 23, 2014

Revised (1st July 28, 2014, 2nd August 6, 2014)

Accepted August 7, 2014

한 빈혈, 비장조직이나 세포의 비후화, 신장과 비장 조혈조직의 괴사 및 아가미 점상출혈 등의 증상을 보인다[4].

다양한 숙주범위와 경제적인 피해로 인하여 RSIV를 검출하기 위한 다양한 기법이 보고되고 있다. Giemsa staining[4], 단클론 항체를 이용한 immunofluorescence [7,8], 전통적인 PCR[9,10] 및 quantitative real-time PCR[11] 등의 방법이 개발되었으며, 최근에는 loop-mediated isothermal amplification method도 적용되고 있다[2].

Yeast surface display (YSD)는 단백질공학에 있어서 강력한 도구로 사용된다. 이 방법은 Wittrup에 의해 1997년에 새롭게 고안된 방법으로써 목적으로 하는 유전자의 단백질과 효모 mating 단백질인 Aga2p를 *Saccharomyces cerevisiae* 세포의 표면에 융합하게 한다 [12-14]. 융합된 단백질의 Aga2p 지역은 효모세포 표면의 Aga1과 이항화결합을 통해 연결됨으로써 효모의 표면에 목적으로 하는 단백질을 발현시키는 시스템이다 [12,15,16]. 지금까지의 연구를 통해 YSD를 이용한 세포 인식 인자, 기능성 단백질, 효소 수용기, 항원, 항체 등 다양한 단백질 공학기술에 사용되어지고 있다[16]. YSD는 진핵생물 발현시스템으로, 전사후 변이 및 chaperone을 통한 기능적 3차구조를 지닌 단백질을 효과적으로 발현시키는 quality control 시스템이다. 더불어 고속 선별 기술(HTS)인 FACS (fluorescence activated cell sorting)을 통해 정량화가 쉬운 특징을 가지고 있다[17,18]. 따라서 일반적인 단백질의 정제 방법에 비해 수용성 단백질 획득 및 안정적인 단백질의 획득이라는 측면에서 매우 좋은 장점을 가지고 있다.

본 연구에서는 RSIV에 대한 항체 생산을 위한 전단계로 YSD 시스템을 이용한 RSIV 항원화 기술을 개발하였다. 대상 유전자로 RSIV 외피단백질 유전자를 선정하였으며, N-glycosylation을 방지하도록 일부 염기서열을 수정한 후 합성하였다. 합성된 RSIV 유전자는 YSD 벡터인 pCTCON2 벡터를 통해 효모 발현세포인 EBY100에 형질 전환을 수행하였다. RSIV 외피단백질의 발현은 hemagglutinin (HA)-tagging 시스템을 이용하여 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 RSIV 외피단백질 유전자 합성 및 클로닝

YSD에서 바이러스 외피단백질 발현을 위해 RSIV 외피단백질 유전자(Gene Bank Number: AB666336.1)를 사용하였다. 유전자 염기서열상의 글리코실화 지역을 선별하여 치환하였다(N-X-S/T→Q-X-S/T). 준비된 유전자 서열은 바이오니아(Korea)에서 합성하였다.

YSD는 Aga2p와 GAL1-10이 포함된 pCTCON2 벡터 (Addgene, USA)를 사용하여 수행하였다. RSIV 외피단백질은 *NheI* (Takara, Japan)와 *BamHI* (Takara, Japan)으로 절단하였고, pCTCON2 벡터로 클로닝되었다. 벡터와 삽입유전자의 연결은 4°C, O/N 조건에서 T4 DNA ligase (Promaga, USA)를 사용하여 수행하였다. Ligation 혼합물은 competent *E. coli* DH5a 세포로 형질 전환시키고, 50 µg/mL ampicillin이 포함된 Luria-Bertani (LB) agar 배지에서 배양하였다.

2.2 효모세포로의 형질전환

효모 형질전환은 Yeast maker™(Clontech)의 시험방법에 따라 heat-shock 방법으로 수행하였다[19]. YSD를 위한 *Saccharomyces cerevisiae* strain은 EBY100(a GAL1-AGA1::URA3 ura3-52 trp1 leu2Δhis3Δ200 pep4::HIS2 prb1Δ1.6R can1GAL)을 사용하였다[29]. EBY100 strain은 YPD 배지(1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose)를 사용하여 배양하였다. SD-base-Trp plate에서 형질전환된 효모세포만 선택하였으며, dextrose가 포함된 최소배지(SD-CAA)에서 배양하였다. 갈락토오스가 포함된 최소배지(SG-CAA)에서 배양하면서 RSIV 외피단백질이 표면발현을 유도하였다[12].

2.3 효모세포의 발현유도 및 flow cytometry 분석

SD-CAA 배지는 탄소원으로 20 g/L의 dextrose가 포함되어 있으며, SG-CAA 배지는 동량의 galactose가 포함된 배지이다. 형질전환된 콜로니를 5 mL의 SD-CAA 배지에 접종하고, 30°C, 200 rpm의 조건으로 OD600 값이 4-6이 되도록 배양하였다. pCTCON2 벡터의 발현을 위해 배양된 세포를 OD600 값이 1이 되도록 SG-CAA 배지에 재현탁하였다. 30°C, 200 rpm의 조건으로 OD600 값이 4-6이 되도록 배양하였다. 0.1% bovine serum albumin이 포함된 PBS 배지에 OD600 값이 0.4가 되도록 재현탁하였다. 형질전환된 효모 세포는 최후부피가 50 µL가 되도록 mouse 9E10에서 생산된 monoclonal

anti-c-myc 항체(1:4000, Sigma- Aldrich)와 함께 배양 하였다. 1 h 실온에서 배양 후 세포를 모으고 ice-cold PBS/BSA에서 세척하였다. 세포는 goat anti-mouse fluorescein isothiocyanate conjugate (1:4000, Abcam)와 함께 배양하였다. 500 µL의 ice-cold PBS/BSA에 재현탁 한 후 flow cytometry (Merck Millipore)로 옮겨 효모에 서의 각 바이러스 단백질의 발현정도를 분석하였다.

2.4 Western blots 분석

효모세포 표면에 발현된 단백질의 이황화결합을 분리 하였다. 2 mL의 효모세포를 원심분리하여 200 µL로 농 축하였고, 50 µL의 β-mercaptoethanol을 첨가한 후 10분 간 가열하였다. 10분간 100,000 g, 실온에서 원심 분리하 여 상등액을 모았다. 상등액에 non-reducing 15% SDS-PAGE loading buffer를 섞은 후 10% polyacrylamide gel에 loading하였다. 전기영동은 100 v 로 1 h 실시했다. Blotting buffer (192 mM glycine, 25 mM Tris-base, 0.1% SDS, 20% methanol, pH 8.3)내에 서 2 h 실온에서 polyvinylidene fluoride membranes (GE Healthcare)으로 이동되었다. 멤브레인은 0.1% Tween가 들어 있는 1X Tris buffered saline 용액에서 5% nonfat milk powder로 blocking 하였다. 멤브레인은 1:4000으로 희석된 anti-c-myc 항체(Sigma-Aldrich)와 반응시켰고 3번 세척 후 horse radish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Cell Signaling Technology) 이차항체(1:5,000)로 2 h 동안 반응시켰다.

3. 결과 및 고찰

3.1 N-glycosylation 치환

참돔 이리도 바이러스(RSIV)의 외피단백질 유전자의 기본 염기서열은 NCBI의 Genebank (No. AB666336.1)에 서 확인하였다. 효모에서 YSD 시스템에 의한 정제를 수 행할 경우 발생하게 될 세포벽 단백질의 hyperglycosylation을 억제하기 위해 N-glycosylation site를 치환하였다. N-linked glycosylation은 진핵세포 단백질의 folding과 세포-세포 및 세포-세포외 기질 결 합에 매우 중요한 역할을 한다[20]. 효모 당단백질은 탄 수화물 사슬이 단백질의 특이 아미노산 잔기와 결합되어 있는 구조를 갖는다. 예를 들면 N-linked 올리고당의 경

우 asparagine이며, O-linked 올리고당의 경우 serine과 threonin이 결합되어 있다[21]. 총 4개의 N-glycosylation (Asparagine-X-Serine/Threonine, N-X-S/T) 지역을 찾았으며, 염기서열 중 AAC 또는 AAT 부분을 CAG로 치환하였다[Table 1].

유전자 합성의 효율을 높이기 위해 open reading frame을 고려하여 372 bp, 378 bp 그리고 348 bp로 나누 어 합성을 수행하였다. 각각의 절편은 RSIV1, RSIV2, RSIV3라 명명하였으며 효모 발현 벡터에 클로닝하기 위 해 유전자의 5' 말단에는 *NheI* 서열과 3' 말단에는 *BamHI* restriction enzyme site를 첨가하여 최종적으로 pGEMT-easy vector에 클로닝하였다.

[Table 1] Substitution of N-glycosylation site on RGNNV CP gene. The amino acid of N (asparagine) on 'N-X-S/T' was changed to Q (glutamine) on 'Q-X-S/T'.

CP gene	Substituted Nucleotide sequences
RSIV1	GCTAGC ATGTCCTGCAA TCTCAGGTGC GCAG (AAC) GTAACC AGTGGGTTC TCGACATCTC CGCGTTTGTAT GCGATGGAGA CCCACTTTGTA TGGCGGCGAC AATGCCGTGA CCTACTTTGC C CGTGAGACC GTGCGTAGTT CCTGGTACAG CA AGCTGCCC GTCACCCTAT CAAAACAGAC TGG CCATGCT AATTTTCGGCC AGGAGTTTGT TGT GACTGTG GCAAGGGGTG GCGACTACCT CAT TAATGTG TGGCTGGGTG TTAAGATCCC CTC CATCAG TCCAGCAAGG AGAACAGCTA CAT TCGCTGG TGTGATAATT TGATGCACAA TCT AGTTGAG GAGGTGTCGG TGTCATTTAA CGA CCTGGTG GGATCC
	GCTAGC GCACAGACCC TGACCAGCGA GTTCC TTGAC TTTTGGAACG CCTGCATGAT GCCTG GCAGC AAACAATCTG GCTACAACAA GATGA TTGGC ATGCGCAGCG ACCTGGTGGG CGGTAT CACC AACGTCAGA CTATGCCCCG CGCCTAC CTT AATTTGCCA TTCCCCTGTT CTTTACCC
RSIV2	GT GACACAGGCC TTGCATTTGCC TACTGTGTC T CTGCCGTACA ATGAGGTGCG CATCCACTTC AAGCTGCGGC GCTGGGAGGA CCTGCTCATC A GCCAGAGCA CCAGGCCGA CATGGCCATA TC GACTGTCA CCCTGGCTAA CATTGGCAAT GT AGCACCCG CACTGACC CAG(AAC) GTGTCCGT G ATGGGC GGATCC
	GCTAGC ACCT ACGCTGTA CT GACAAGTGAG GAGCGTGAGG TTGTGGCCCA GTCTAGCCGT A GCATGCTCA TTGAGCAGTG TCAGGTGGCG CC TCGTGTGC CTGTCACACC CGTAGACAAT TCC TTGGTGC ATCTCGACCT GAGGTTTCAGT CACC CTGTGA AGGCCTTGTT CTTTGCAGT AAG CAG(AAT) GTCA CTCACCGCAA CGTGCAAAGC CAG(AAT) TACACCG CGGCCAGTCC CGTGTAT GTC AACACAACAGG TGAATCTGCC TTTTGTG GCC ACCAATCCCC TGTCCGAGGT GTCGCTCA TT TACGAGAACA CCCTCGGCT CCACCAGAT G GGAGTAGACT AC GGATCC
RSIV3	

3.2 RSIV 외피단백질 발현 분석

합성된 RSIV 외피단백질 유전자는 pGEMT-easy 벡터에 클로닝되었고, *NheI* 과 *BamHI* restriction enzyme에 의해 절단 후 yeast 발현 벡터인 pCTCON vector에 클로닝하였다[Fig. 1]. pCTCON 벡터는 목적유전자의 N-말단 부위에 Aga2p 단백질을 발현하게 되고, C-말단 부위에는 융합펩티드인 HA epitope tag과 c-myc epitope tag 부위를 가지는 벡터이다. Aga2p 단백질은 Aga1p 단백질과 α -agglutinin receptor를 구성하게 되는데, Aga1p 단백질의 경우 형질전환 세포인 *S. cerevisiae* strain EBY100에 chromosomal integration 되어 있는 단백질이다. Aga1p 단백질의 경우 세포 밖으로 분비되고, 효모 세포벽의 β -glucan과 공유결합을 형성한다. 또한 aga1p는 Aga2p 단백질과 이황화결합을 형성함으로써 세포벽에 목적으로 하는 유전자를 발현할 수 있게 해준다[13,14]. 본 연구에서 pCTCON-RSIVcp 벡터 클론을 Aga1p 단백질을 발현하는 세포인 EBY100 세포에 형질전환을 수행하였다. N-말단 부위에 Aga2p 단백질을 융합한 RSIV 외피단백질은 세포벽에 발현되어 공유결합되어 있는 Aga1p와 이황화결합을 형성함으로써 RSIV 외피단백질을 발현시켰다.

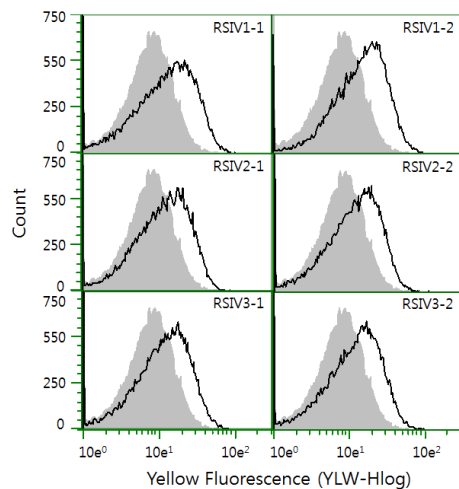
3.3 FACS에 의한 발현단백질 정량적 분석

고발현 RSIV 외피단백질 유전자가 형질전환된 세포 주 및 단백질의 발현정도를 확인하기 위해 FACS 분석을 수행하였다. 세포벽에 발현되어 있는 RSIV 외피단백질의 경우 C-말단 부위에 c-myc tag을 발현하고 있기 때문에 anti-c-myc 항체를 이용하여 형광염색을 수행하였다. FACS를 이용하여 형광량을 측정함으로써 각각의 형질전환 세포주에서 RSIV 외피단백질 발현양 차이를 측정하였다. 고발현 세포주를 측정하기에 위해 탄소원인 galactose가 포함된 SG-CAA 배지를 이용하여 pCTCON 벡터의 발현을 유도하였으며, 형질전환하지 않은 EBY100 세포를 대조군으로 하여 각 RSIV 외피단백질 절편 3개마다 2개씩 총 6개의 형질전환 라인의 발현양을 측정하였다(Fig 1). 대조군의 FACS 평균값은 9.18이었으며 RSIV1 형질전환 라인은 평균 17.37 및 19.08의 값이 측정되었으며, RSIV2는 14.74 및 14.86, RSIV3은 14.66 및 15.08 값이 측정되었다. 측정된 6개의 형질전환 라인 중 RSIV1의 2라인에서 가장 높은 발현량(평균: 19.08)이 검출되었다[Table 2].

FACS 분석결과 3종류의 RSIV 외피단백질 조각 중 RSIV1의 발현이 RSIV2 및 RSIV3 보다 높게 나타났다. 이러한 결과는 각 RSIV 조각들의 염기서열 차이로 인한 결과로 추측된다. 즉, 단백질은 특이적 구조를 형성하여 그 기능이 나타나도록 하게 되는데, 각 외피단백질 조각을 암호화하는 염기서열의 차이가 다른 기능적 구조를 형성하게 하여, 효모 세포막으로의 이동에 영향을 미쳐, 결과적으로 세포표면에서의 발현정도에 영향을 미치게 되는 것으로 추측된다.

3.4 Western blot에 의한 RSIV 외피단백질 발현 분석

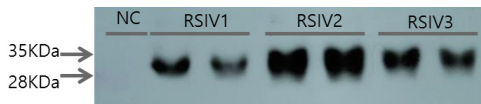
β -mercaptoethanol을 처리함으로써, Aga2와 결합된 발현된 RSIV 외피단백질을 효모표면 상의 Aga1 단백질로부터 분리하였다[Fig. 2]. Anti-c-myc 항체를 사용하여 western blots을 수행하였을 때 RSIV 외피단백질의 발현이 대상 크기(28-35 kDa)에서 확인되었다. 이 분석은 단지 RSIV 외피단백질의 효모세포 표면에서 발현여부를 확인하기 위해 실행된 것이지만 얼마나 많이 발현되는지에 대한 정량적 분석이 아니다. 이러한 결과는 YSD 시스템이 재조합 단백질의 발현에 적용가능하다는 것을 의미한다. 따라서 YSD를 통한 외부단백질의 발현시스템 구축은 향후 항체개발을 위한 항원 생산 및 단백질 분비 메커니즘 규명 등에 활용 가능할 수 있을 것으로 판단된다.



[Fig. 1] Flow cytometric analysis of RGNNV CP expression on yeast. The gray background indicates non-induced cells. The black histogram represents the RSIV CP expressing yeast cells.

[Table 2] FACS mean values from flow cytometry analysis.

Sample	Mean values
Control	9.18
RSIV1-1	17.37
RSIV1-2	19.08
RSIV2-1	14.86
RSIV2-2	14.74
RSIV3-1	14.66
RSIV3-2	15.08



[Fig. 2] Identification of RSIV CP fragments by western blot using anti-HA antibody.

본 과제에서는 진핵생물 시스템인 효모 표면 발현 시스템기술을 이용하여 참돔 이리도바이러스(RSIV)의 외피단백질을 대량 발현시켰다. 일반적으로 단백질의 번역(translation) 이후 다양한 변형을 통한 기능적 3차 구조를 갖게 된다. 이 과정에서 chaperone은 단백질의 불필요한 분자간 또는 분자내 상호작용을 방지하여 원하는 3차 구조를 가질 수 있도록 도와주는 역할을 하는 보조단백질이다[22]. Foldase는 단백질의 접힘단계에서 율속단계로 알려져 있는 이황화 결합 또는 이성화 단계를 보다 용이하게 하는 접힘촉진 효소이다[23]. 제조업 대장균에서 chaperone 또는 foldase 등의 단백질 접힘 보조단백질을 외래 단백질과 동시에 발현시킴으로써 외래단백질을 생산할 수 있으나, 이러한 chaperone이나 foldase의 동시발현은 제품 단백질을 생산한 세포에 큰 대사적 부담(metabolic burden)으로 작용할 수 있다. 효모 표면 발현 시스템은 기존의 원핵생물시스템인 *E. coli* 표면발현과 달리, 진핵생물 발현시스템이기 때문에 보다 효율적으로 표적 단백질의 기능적 변형을 이끌어 낼 수 있다. 이러한 시스템은 앞으로 표적 단백질의 발현, 분비 경로의 제어 메커니즘 규명 및 항체 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

4. 결론

효모 표면 발현 시스템은 기존의 원핵생물시스템인 bacteria 또는 phage 표면발현과 달리, 진핵생물 발현시

스템으로 보다 효율적으로 표적 단백질의 기능적 변형을 이끌어 낸다. 또한 효모 표면에서의 표적 단백질의 분리는 단백질 분해효소로부터의 표적 단백질을 보호할 수 있으며 무엇보다 간단한 처리방법으로 효모 표면으로부터 얻을 수 있다. 본 연구에서는 효모 발현 시스템을 이용하여 기존에 연구가 되지 않았던 RSIV 항원연구의 첫 단계인 RSIV 항원의 대량생산 가능성을 증명하였다. 이러한 방법은 의약 및 식품생명 산업에서 필요로 하는 표적단백질의 효과적 생산에 좋은 대안이 될 수 있다.

References

- [1] T. Williams, V. Barbosa-Solomieu, V. G. Chinchar. "A Decade of Advances in Iridovirus Research". *Adv Virus Res* 65, 173-248, 2005.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3527\(05\)65006-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3527(05)65006-3)
- [2] C. M. A. Caipang, I. Haraguchi, T. Ohira, I. Hirono, T. Aoki. "Rapid Detection of a Fish Iridovirus Using Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)". *J Virol Methods* 121, 155-161, 2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.06.011>
- [3] S. Jung, M. Oh. "Iridovirus Like Infection Associated with High Mortalities of Striped Beakperch, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel), in Southern Coastal Areas of the Korean Peninsula". *J Fish Diseases* 23, 223-226, 2000.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00212.x>
- [4] K. Inoue, K. Yamano, Y. Maeno, K. Nakajima, M. Matsuoka, Y. Wada, M. Sorimachi. "Iridovirus Infection of Cultured Red Sea Bream, *Pagrus major*". *Fish Pathol* 27, 19-27, 1992.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3147/jsfp.27.19>
- [5] M. Miyata, K. Matsuno, S. Jung, Y. Danayadol, T. Miyazaki. "Genetic Similarity of Iridoviruses from Japan and Thailand". *J Fish Diseases* 20, 127-134, 1997.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.d01-115.x>
- [6] H. Kawakami, K. Nakajima. "Cultured Fish Species Affected by Red Sea Bream Iridoviral Disease from 1996 to 2000". *Fish Pathol* 37, 45-48, 2002.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3147/jsfp.37.45>
- [7] K. Nakajima, Y. Maeno, M. Fukudome, Y. Fukuda, S. Tanaka, S. Sorimachi. "Immunofluorescence Test for the Rapid Diagnosis of Red Sea Bream Iridovirus Infection Using Monoclonal Antibody". *Fish Pathol* 30, 115-119, 1995.

- DOI: <http://dx.doi.org/10.3147/jsfp.30.115>
- [8] K. Nakajima, M. Sorimachi. "Production of Monoclonal Antibodies against Red Sea Bream Iridovirus". *Fish Pathol* 30, 47-52, 1995.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3147/jsfp.30.47>
- [9] S. Oshima, J. Hata, N. Hirasawa, T. Ohtaka, I. Hirono, T. Aoki, S. Yamashita. "Rapid Diagnosis of Red Sea Bream Iridovirus Infection Using the Polymerase Chain Reaction". *Dis Aquat Organ* 32, 87-90, 1998.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3354/dao032087>
- [10] J. Kurita, K. Nakajima, I. Hirono, T. Aoki. "Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification of DNA of Red Sea Bream Iridovirus (RSIV)". *Fish Pathol* 33, 17-23, 1998.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3147/jsfp.33.17>
- [11] C. M. Caipang, I. Hirono, T. Aoki. "Development of a Real-time PCR Assay for the Detection and Quantification of Red Sea Bream Iridovirus (RSIV)". *Fish Pathol* 38, 1-7, 2003.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3147/jsfp.38.1>
- [12] D. W. Colby, B. A. Kellogg, C. P. Graff, Y. A. Yeung, J. S. Swers, K. D. Wittrup. "Engineering Antibody Affinity by Yeast Surface Display". *Methods Enzymol* 388, 348-358, 2004.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)88027-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(04)88027-3)
- [13] G. Chao, W. L. Lau, B. J. Hackel, S. L. Sazinsky, S. M. Lippow, K. D. Wittrup. "Isolating and Engineering Human Antibodies Using Yeast Surface Display". *Nature protocols* 1, 755-768, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.94>
- [14] E. T. Boder, K. D. Wittrup. "Yeast Surface Display for Screening Combinatorial Polypeptide Libraries". *Nature Biotech* 15, 553-557, 1997.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0697-553>
- [15] M. Watzel, F. Klis, W. Tanner. "Purification and Characterization of the Inducible Agglutinin of *Saccharomyces cerevisiae*". *EMBO J* 7, 1483-1488, 1988.
- [16] A. Kondo, M. Ueda. "Yeast Cell-surface Display-Applications of Molecular Display". *Applied Microbiol Biotech* 64, 28-40, 2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-003-1492-3>
- [17] L. R. Pepper, Y. K. Cho, E. T. Boder, E. V. Shusta. "A Decade of Yeast Surface Display Technology: Where Are We Now?" *Comb Chem High Throughput Screen* 11, 127-134, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/138620708783744516>
- [18] S. A. Gai, K. D. Wittrup. "Yeast Surface Display for Protein Engineering and Characterization". *Cur Opin Structural Biol* 17, 467-473, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2007.08.012>
- [19] E-S. Cho, H-J. Kim, S. Jung, J-H. Kim, Y-H. Kim, S-W. Nam. "Cell Surface Display of Arylsulfatase Gene from *Pseudoalteromonas carageenovora* in *Saccharomyces cerevisiae*". *Kor J Microbiol Biotechnol* 37, 355-360, 2009.
- [20] P. M. Rudd, M. R. Wormald, R. L. Stanfield, M. Huang, N. Mattsson, J. A. Speir, J. A. Digennaro, J. S. Fetrow, R. A. Dwek, I. A. Wilson. "Roles for Glycosylation of Cell Surface Receptors Involved in Cellular Immune Recognition". *J Mol Biol* 293, 351-366, 1999.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1999.3104>
- [21] M. Kukuruzinska, M. Bergh, B. Jackson. "Protein Glycosylation in Yeast". *Ann Rev Biochem* 56, 915-944, 1987.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.004411>
- [22] T. Y. Hsieh, N. B. Nillegoda, J. Tyedmers, B. Bukau, A. Mogk, G. Kramer. "Monitoring protein misfolding by site-specific labelling of proteins in vivo" *PLoS One*, 10, e99395. 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0099395>
- [23] E. Ciplys, K. Sasnauskas, R. Slibinskas. "Overexpression of human calnexin in yeast improves meales surface glycoprotein solubility" *FEMS Yeast Res.* 11, 514-523, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00742>

서 승 석(Sung-Suk Suh)

[정회원]



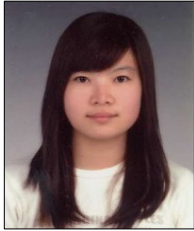
- 2002년 9월 : 서울대학교 생물학과 (이학석사)
- 2012년 3월 : 오하이오 주립대 생화학 (이학박사)
- 2012년 3월 ~ 2013년 8월 : 오하이오 주립대 의과대 (포닥)
- 2013년 8월 ~ 현재 : 한국해양과학기술원 연수연구원

<관심분야>

해양환경독성학, 해양분자생물학

박 미 레(Mirye Park)

[정회원]



- 2010년 2월 : 동아대학교 생명과학전공 (이학학사)
- 2011년 10월 ~ 2012년 8월 : 한국해양연구원 남해특성연구부 인턴연구원
- 2012년 9월 ~ 현재 : 한국과학기술연합대학원 대학교 석·박사통합과정 재학

<관심분야>

해양환경독성학, 해양분자생물학

황 진 익(Jinik Hwang)

[정회원]



- 2008년 2월 : 신라대학교 생물학과 (이학학사)
- 2007년 9월 ~ 2011년 2월 : 한국해양연구원 인턴연구원
- 2011년 3월 ~ 현재 : 한국과학기술연합대학원 대학교 석·박사통합과정 재학

<관심분야>

해양환경독성학, 해양분자생물학

이 택 건(Tack-Kyun Lee)

[정회원]



- 1991년 2월 : 성균관대학교 생물학 (이학석사)
- 1998년 2월 : 성균관대학교 식물분자생리학 (이학박사)
- 1998년 9월 ~ 2000년 8월 : 한국해양연구원 연수연구원
- 2000년 9월 ~ 현재 : 한국해양과학기술원 책임연구원

<관심분야>

환경분자생리학, 해양환경독성학