

# 단백질 발현 Total Service -유전자 합성에서 항체 제작까지-

세계적인 규모로 추진된 게놈 해석 프로젝트의 결과, 많은 생물종에 대한 유전자 정보가 대규모로 축적되었다. 이에 따라 포스트 게놈 해석 시대를 맞아 단백질 기능해석 및 구조해석으로 연구의 중심이 이동하고 있다. 당사는 10여년 전부터 유전자공학, 단백질공학, 세포공학을 중심으로 종합적인 고객서비스를 전개해 왔다. 본 고에서는 유전자 염기서열 정보를 토대로 목적 유전자 전체를 합성하고, 대장균에서 재조합하여 단백질을 조제한 후, 목적 단백질에 특이적인 항체를 얻는 일련의 연구지원 서비스를 소개하고자 한다.

## 단백질 발현 total service

### (유전자 합성, 단백질 발현, 단백질 정제, 항체 제작)

유전자 재조합 기술을 이용하여 목적 단백질을 발현, 조제하기 위해서는 목적 유전자를 분리한 후, 발현 vector를 구축할 필요가 있다. 기존의 유전 공학적 방법으로는 DNA library나 게놈 library에서 유전자를 스크리닝 하였으나, 유전자에 따라서 분리가 곤란하거나 생물 종, 조직에 따라 library의 입수, 제작이 불가능한 문제가 발생한다. 또한 취득한 유전자의 서열 확인 작업과 변이가 발생한 경우는 서열 수복작업이 필요하다. 당사에서는 유전자를 얻기 위한 이런 여러 가지 문제를 해결하기 위한 방법으로 인공합성 유전자 제작 서비스를 제공하고 있다. 본 서비스를 이용하면 스크리닝 및 RT-PCR 등의 번잡한 조작을 하지 않고 게놈 데이터베이스 등의 염기서열 정보만으로도 재조합 단백질을 얻을 수 있다 (그림 1).

단백질 발현 서비스에서는 기존의 발현계 외에 당사 독자의 대장균 Coldshock 발현계를 이용할 수 있다. 이 발현계를 이용하면 인공합성 유전자로부터 재조합 단백질을 효율적으로 조제할 수 있다.

항체 관련 서비스에서는 획득한 재조합 단백질을 항원으로 하여 유전자, 단백질 기능을 해명하는데 매우 유용한 도구가 되는 항체를 제작한다.

본 고에서 소개하는 일련의 서비스를 이용하면 유전자 정보만으로 목적 단백질과 그 항체를 얻을 수 있다.

본 고에서는 전체적인 서비스의 개요와 human N-cadherin을 모델로 한 실험 방법 및 결과를 소개하고자 한다.

## 주요 항목

### ●유전자 합성

염기서열 정보로부터 유전 공학적 방법에 따라 인공적으로 DNA를 합성한다. 클로닝이나 재료 입수가 어려운 경우(예를 들면 10 kbp 이상의 긴 유전자나 반복서열 유전자)라도 염기서열 데이터가 있다면 목적 유전자의 합성이 가능하다. 또한 GeneOptimizer™(GENEART사)의 알고리즘에 따라 서열을 최적화함으로써, 발현계에 적합한 codon 변환 및 promoter 서열의 최적화, 특정 제한효소 인식부위의 도입 및 제거도 가능하다. 이 최적화에 따라 발현량이 수~수십배까지 증가될 수 있다. 대장균을 host로 유전자 최적화의 효과를 알아본 예를 그림 2에 나타내고 있다.

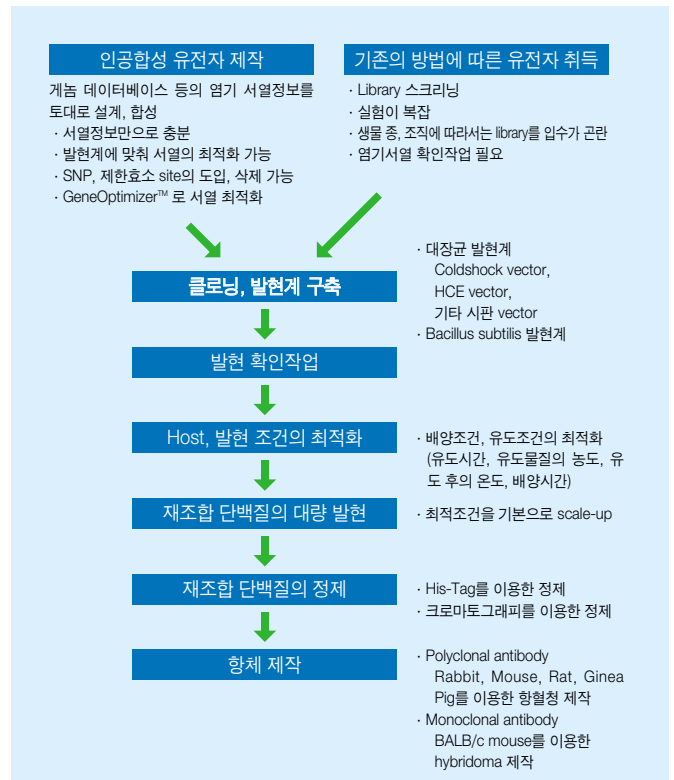


그림 1 유전자의 인공합성에서 항체 제작까지의 Flowchart

### ●단백질 발현

당사에서는 주로 대장균을 host로 하는 재조합 단백질 발현 서비스를 하고 있다. 대장균을 host로 하는 발현계는 비용이 저렴하며, 범용성으로 scale-up도 비교적 용이하다는 특징이 있다. 발현 vector로는 예전부터 널리 이용되어온 T7 발현계 등 시판되는 vector 외에 당사가 독자 개발한 Coldshock 발현계(pCold vector 시리즈)도 이용할 수 있다.

pCold vector 시리즈는 대장균의 배양 온도를 저온으로 전환 할 때 특이적으로 발현하는 Coldshock 단백질 중의 하나인 cspA 유전자의 promoter 서열과 5' untranslated region(UTR)을 이용한 새로운 단백질

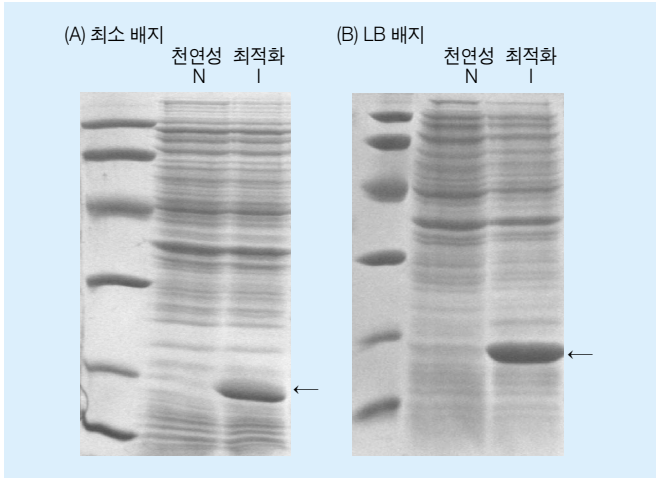


그림 2 유전자 최적화의 효과

N: 천연형 유전자, I: 최적화 서열 유전자. 초호열균 유전자의 서열을 최적화한 후, 유전자를 합성하여 T7 발현계 vector에 삽입하였다. 이 재조합 vector로 대장균에 형질 전환한 후, 최소배지 및 LB 배지에서 배양하여 재조합 단백질의 발현을 조사하였다. 두 배지에서 서열을 최적화한 유전자(I)가 천연형 유전자(N)보다 발현량이 훨씬 많음을 알 수 있다.

발현계로, 저온에서 발현을 유도함으로써 host 대장균에서 유래하는 단백질 합성은 억제되며 목적 단백질만 고효율로 얻을 수 있는 장점이 있다. 또한 T7 발현계에서 발현되지 않는 단백질의 발현을 기대할 수 있을 뿐 아니라, T7 발현계에서 불용성으로 발현되었던 여러 단백질이 가용성으로 발현된다.

이 밖에 포유동물세포(Life science & Biotechnology 33호 41~42 페이지 참조), 곤충세포 및 *Bacillus subtilis* (본지 48~49 페이지 참조)에서의 단백질 발현서비스도 실시하고 있다.

●항체 제작

Rabbit, mouse, rat, ginea pig를 이용한 Polyclonal antibody의 제작 및 BALB/c mouse를 이용한 hybridoma제작 및 Monoclonal antibody도 제작한다(본지 43~45 페이지 참조). 일반적으로 항체 제작 서비스에서는 항원 준비만으로 가능하며, 염기서열 정보를 토대로 항원의 epitope 검색도 가능하다. 유전자의 목적 영역만 합성하고 그것을 발현시켜 항원으로 이

용함으로써, 그 영역에 반응하는 특이항체를 효율적으로 얻을 수 있다. (보다 자세한 항체 제작 서비스에 관해서는 당사 홈페이지를 참조하시기 바랍니다.)

모델 사례: Human N-cadherin 특정 영역을 코드하는 유전자의 합성, 발현 및 그 발현 단백질에 대한 항체 제작

단백질 발현 수탁 total service의 모델 사례로 human N-cadherin의 특정 영역을 타겟으로 유전자를 인공합성하고, 그 유전자를 T7 발현계 vector(이하, T7 vector) 및 pCold vector에 삽입하여 재조합 단백질 발현 vector를 제작하고, 대장균에 도입해 단백질 발현을 실시하였다. 이 단백질을 이용하여 Monoclonal antibody 및 Polyclonal antibody를 제작하였다.

1. 유전자 합성과 발현 vector의 구축

① Human N-cadherin 유전자 단편의 합성과 T7 vector로의 삽입

Human N-cadherin 737-876 부위의 아미노산 서열(140개 아미노산)을 타겟으로, 이를 코드하는 유전자(420 bp)를 인공합성하였다. 5' 말단에는 *Nco* I site를, 3' 말단에는 *Sal* I site, protease 인식 site 및 *Xho* I site를 첨가하였다. 이 합성유전자를 pUC vector에 삽입한 후, host 대장균을 형질 전환하여 얻어진 클론의 염기서열을 확인한 후 목적 합성유전자를 포함한 plasmid를 얻었다.

Plasmid를 제한효소로 절단하고 human N-cadherin 유전자 단편(약 470 bp)을 분리정제한 후, T7 vector에 재조합하였다. 합성유전자의 번역 개시 codon은 *Nco* I site 중의 ATG, 종결 codon은 발현 vector에 존재하는 것을 이용하도록 설계하였다.

② Human N-cadherin 유전자 단편(2종류)의 PCR 클로닝과 pCold I vector로의 삽입

T7 vector의 발현과 비교하기 위해 ①에서 기술한 합성유전자를 pCold I vector에 삽입하였다. T7 vector와 pCold I vector는 클로닝 site가 동일하지 않기 때문에 아래와 같은 순서로 제작하였다.

①에서 언급한 합성유전자를 포함한 pUC plasmid를 주형으로 적절한 클로닝 site를 부가하기 위하여 primer와 high fidelity PCR 효소(*Pyrobest*<sup>®</sup> DNA Polymerase)를 이용하여 human N-cadherin 유전자를 PCR로 증폭하였다(PCR 클로닝). 얻어진 PCR 산물을 제한효소로 절단하고, pCold I vector의 multi-cloning site에 삽입하여 재조합 단백질 발현 vector를 구축하였다.

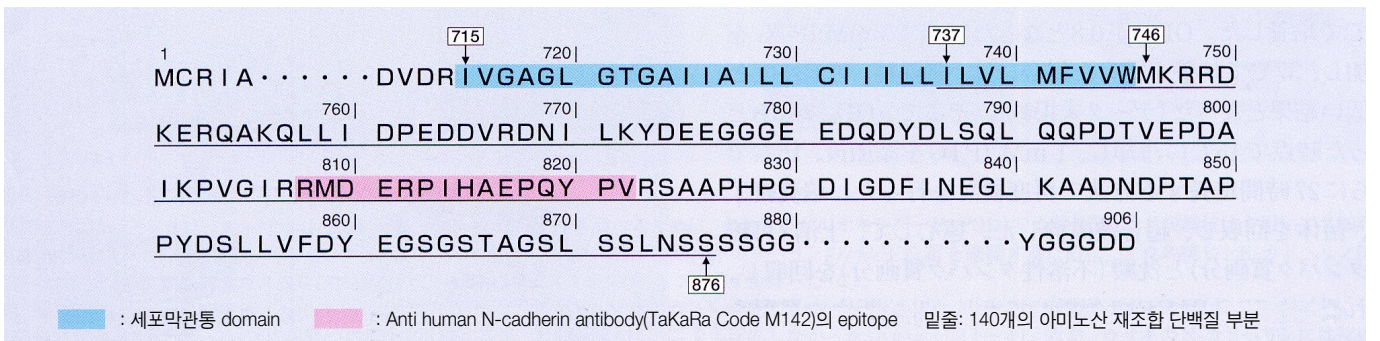


그림 3 Human N-cadherin의 아미노산 서열(일부)

유전자를 합성한 서열은 737-876 부위의 아미노산 서열(140개 아미노산)을 코드하는 부분이다. T7 vector에는 이 영역의 합성유전자를 삽입하고, pCold vector에는 이 영역, 또는 이 영역에서 세포막관통 domain(소수성 영역)을 제외한 영역(746-876 부위의 아미노산 서열, 131개 아미노산)을 코드하는 유전자를 삽입하였다(이 유전자는 PCR 클로닝에 따라 제작하였다. 본문 참조)

## 특집 1 단백질 발현 Total Service -유전자 합성에서 항체 제작까지-

이와는 별도로 가용성 발현에서 human N-cadherin의 세포막관통 domain의 소수성 영역의 영향을 피하기 위하여, 소수성 영역을 제외한 746-876 부위의 아미노산(131개 아미노산)을 코드하는 유전자(393 bp)를 같은 방법(PCR 클로닝)으로 제작하고, pCold I vector에 삽입하여 재조합 단백질 발현 vector를 구축하였다.

### 2. 대장균에서의 발현

Human N-cadherin 유전자 단편을 삽입한 T7 vector 및 pCold I vector로 대장균을 형질전환하고 cadherin 단백질의 발현을 시도하였다. pCold I vector의 host로 *E.coli* BL21, T7 vector의 host로 *E.coli* Rosetta™(DE3)을 이용하였다.

#### ① T7 vector로 cadherin 단편의 발현

Human N-cadherin의 140개 아미노산(소수성 영역 포함)을 발현하는 재조합 T7 vector로 형질전환한 *E.coli*를 ampicillin, chloramphenicol을 포함한 5 ml LB 배지에 접종하고, 37°C에서 배양하였다. OD<sub>600</sub>이 0.8이 될때 1 mM IPTG를 첨가하고 37°C에서 계속 배양한 결과, 발현량과 가용성 모두 낮은 결과를 나타내어(데이터 미공개), OD<sub>600</sub>이 0.8이 된 시점에서 15°C로 냉각시키고 1 mM IPTG를 첨가한 후 15°C에서 27시간 배양하고 균체를 회수하고 초음파로 파쇄하였다. 원심분리하여 상층액(가용성 단백질 분획)과 침전(불용성 단백질 분획)을 회수하고, 각각을 SDS-PAGE로 분석하여 cadherin 단편의 발현을 조사하였다.

그림 4와 같이 가용성 단백질 분획(S)과 불용성 단백질 분획(P) 양쪽에 cadherin 단편이 존재하는 것이 확인되었다.

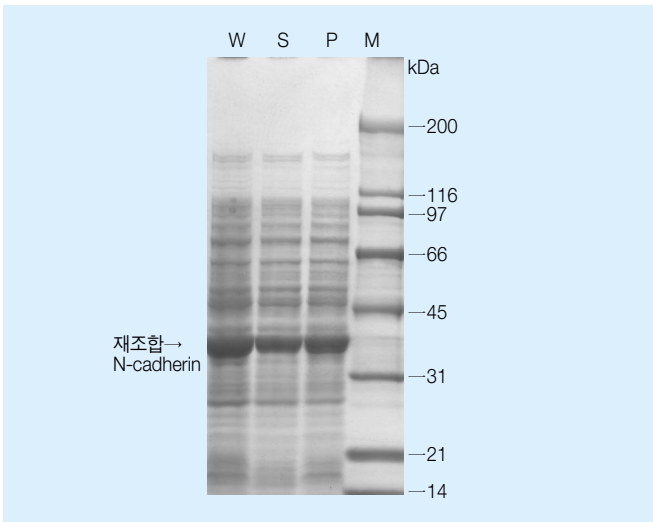


그림 4 T7 vector에 의한 human N-cadherin 단편(140개 아미노산)의 발현(CBB 염색)  
W: 전체 단백질 분획(파쇄액); S: 가용성 단백질 분획(상층액);  
P: 불용성 단백질 분획(침전); M: 단백질 분자량 marker

#### ② pCold I vector로 cadherin 단편의 발현

Human N-cadherin의 140개 아미노산 또는 131개 아미노산(내부 서열)을 발현하는 재조합 pCold I vector로 형질전환한 *E.coli*를 ampicillin을 포함한 5 ml LB 배지에 접종하고, 37°C에서 배양하였다. OD<sub>600</sub>이 0.7이 될때 15°C로 냉각하고 1 mM IPTG를 첨가한 후 15°C에서 27시간 배양하였다.

배양 종료 후, 위와 같은 방법으로 cadherin 단편의 발현량을 조사한 결과를 그림 5에 나타내고 있다.

pCold I vector에 의해 발현한 cadherin 단편은 소수성 영역 유무와 관계 없이 대부분이 가용성 단백질로 회수되고, pCold I vector에 의한 발현에서는 T7 vector에 의한 발현에 비해 가용성이 높으며, 총단백질 당 발현량이 높은 결과를 얻었다.

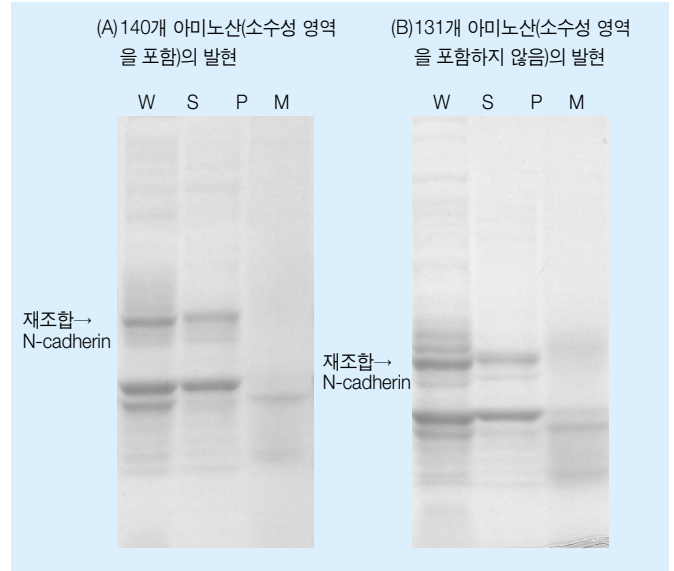


그림 5 pCold I vector에 의한 human N-cadherin 단편의 발현(CBB 염색)  
W: 전체 단백질 분획; S: 가용성 단백질 분획; P: 불용성 단백질 분획

### 3. pCold I vector로 재조합 human N-cadherin 세포내 영역 단백질의 대량 발현과 정제

pCold I vector에서 발현된 단백질은 가용성이 높으며 순도가 높아, 이를 항원 단백질로 이용하기로 하였다.

Human N-cadherin의 131개 아미노산을 발현하는 재조합 pCold I vector에서 형질전환한 *E.coli*를 ampicillin을 포함한 3 L의 LB 배지에 접종하고, 위와 동일한 조건으로 배양시켜 발현을 유도하였다. 균체를 회수하여 초음파 파쇄한 후, 원심분리하여 상층액을 회수하였다.

원심분리한 상층액 중 가용성 단백질을 1.5 ml의 Ni-affinity 담체에 흡착시키고, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol을 포함한 50 mM 인산완충액(pH 8.0)으로 세정한 후, 20~250 mM imidazol의 농도에 따라 재조합 human N-cadherin 세포내 단백질을 용출하였다. 3 L 배양으로 약 12 mg의 정제 단백질을 얻었다.

### 4. 재조합 human N-cadherin 세포내영역 단백질에 대한 항체 제작

가용성 단백질로 얻어진 재조합 human N-cadherin 세포내영역 단백질(131개 아미노산)을 항원으로 하여 Monoclonal antibody와 Polyclonal antibody를 제작하였다.

#### ① Monoclonal antibody 제작

항원(0.2 mg/ml) 0.5 ml + PBS 0.5 ml + FCA(Freunds complete adjuvant) 1 ml의 혼합액을 4마리, 6주령 BALB/c mouse 복강에 투여하여 최초 면역을 실시하였다. 2차, 3차 면역으로 항원(0.2 mg/ml) 0.9 ml + RIBI adjuvant



0.1 ml 혼합액을 이미 면역된 mouse에 2주 간격으로 복강 내에 투여하였다. 3회 면역 1주 후, mouse 눈 아랫부분에서 부분 채혈하고 이 혈청을 이용하여 항원을 고정화한 EIA plate에서 항체 역가를 측정하였다. 10<sup>4</sup>배 희석한 항혈청에서 충분한 양성 반응을 확인할 수 있었고, 4회 면역 3일 후 2마리의 mouse에서 비장을 적출해 mouse myeloma cell과 세포융합을 실시하였다.

HAT 선택배지에서 융합세포만 선택한 후, 항원을 고정화한 EIA plate에서 스크리닝을 실시하고 양성반응을 보인 2개(No.1, No.4b)를 선발하였다. 양성 클론을 배양한 후, 한계희석법에 따라 완전한 클론 세포(클론 Ncad1-1, Ncad4b-1)를 얻었다. 각 클론을 mouse 복강 내에 투여하고 복수에서 대량 배양한 후, 각각의 정제항체를 조제하였다. 얻어진 2개의 정제 Monoclonal antibody의 특이성을 조사한 결과를 그림 6에 나타내고 있다.

② Polyclonal antibody 제작

항원(재조합 human N-cadherin 세포내영역 단백질)을 rabbit에 면역하여 Polyclonal antibody를 제작하였다.

1회 면역당 항원(0.2 mg/ml) 1 ml +FCA(Freunds complete adjuvant) 1 ml의 혼합액을 이용하여 rabbit에게 총 4회 면역을 2주 간격으로 실시하였다. 3회째 면역을 시킨 후, 1주 후 부분 혈청을 이용한 역가측정에서 10<sup>4</sup>배 희석액에서 양성반응을 확인할 수 있었으며, 4회째 면역 10일 후에 전체 채혈을 실시하였다.

1마리의 전체 채혈혈청 59 ml를 protein A column에 걸쳐 affinity 정제하고, 약 610 mg의 정제된 IgG를 얻었다.

맺음말

단백질 발현 total service의 일례로 human N-cadherin의 특정 영역 유전자의 합성, 발현 vector의 구축, 발현 단백질의 생산·정제 및 정제 발현 단백질을 항원으로 한 항체 제작에 대하여 소개하였다.

모델로 선택한 human N-cadherin의 특정 영역은 이미 항원성이 존재한다(anti-human N-cadherin peptide 항체(TaKaRa Code M142)와 반응한다)고 확인된 것이지만, 항원성에 관한 정보를 얻을 수 없는 신규 유전자인 경우, 그 아미노산 서열정보로 epitope이 될 수 있는 영역을 추측할 수 있다. 그 아미노산 서열로부터 host에 맞는 최적의 염기서열을 설계, 합성하여 발현 vector를 구축함으로써 항원성이 강한 목적 단백질을 얻을 수 있으며, 그것을 항원으로 특이항체를 얻을 수 있게 된다. 얻어진 항체는 ELISA 검출 구축 및 항체 컬럼의 조제, 이를 이용한 천연항원의 취득 등 다양한 용도에 이용이 가능하다.

관련제품 및 서비스

· pCold I ~ IV DNA	3361 ~ 3364	각 390,000원
· pCold Vector Set	3360	1,170,000원
· Pyrobest <sup>®</sup> DNA polymerase	R005A/B	148,000원/499,000원
· 인공합성 유전자 제작 서비스		
· 단백질 발현 서비스		
· 항체 제작 서비스		

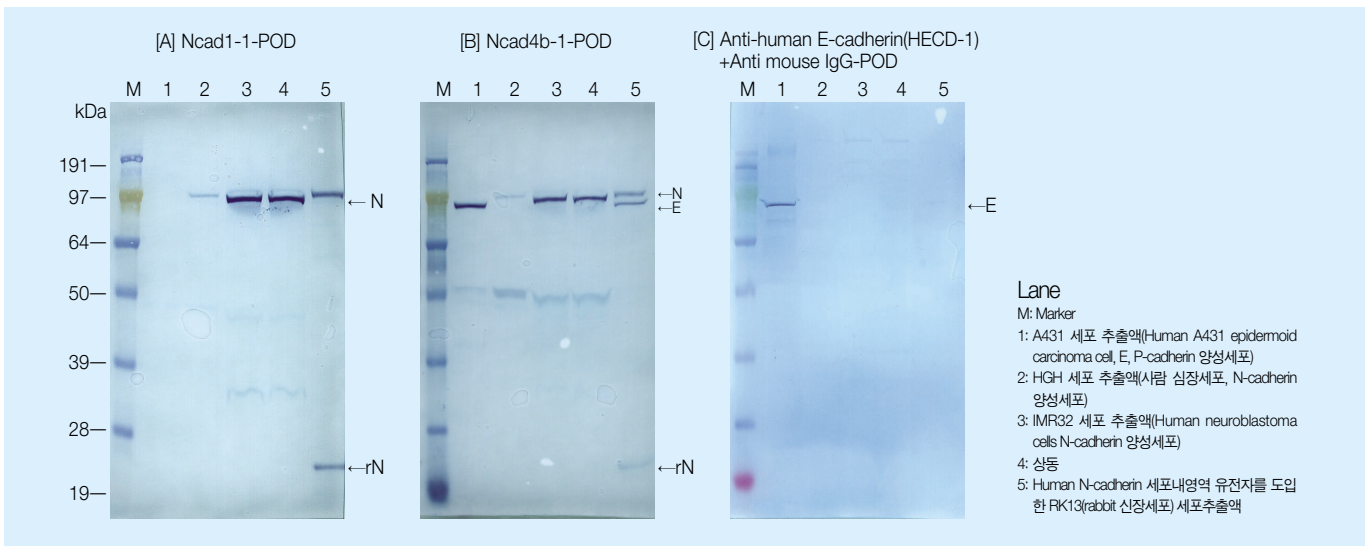


그림 6 2개의 Monoclonal antibody 특이성

얻어진 2개의 Monoclonal antibody(Ncad1-1, Ncad4b-1)의 특이성을 조사하기 위하여 peroxidase(POD)로 표식하고, 각 표식항체를 이용하여 각 세포추출액(lane 1-5)의 western blot을 하였다(A, B). 또한 E-cadherin의 밴드 위치를 확인하기 위해 mouse anti-human E-cadherin 항체(HECD-1)와 POD 표식 anti-mouse IgG 항체를 이용하여 western blot을 실시하였다(C).

rN, N, E의 ←는 재조합 human N-cadherin(세포내영역), 천연형 human N-cadherin, 천연형 human E-cadherin의 밴드 위치를 나타낸다.

Ncad1-1 항체는 N-cadherin에 특이적으로 반응하며, 다른 유형의 cadherin에는 교차반응하지 않고(A lane 1~4), rabbit의 N-cadherin에는 반응하였다(A lane 5).

Ncad4b-1 항체는 N-cadherin 이외에 E(또는 P)-cadherin에도 반응하며, 그 공통서열을 인식하고 있을 가능성이 있다. 또한 rabbit의 cadherin(N, E로 추정된다)에도 교차반응했다(B lane 5).

모든 항체는 rabbit의 신장 세포내에서 발현시킨 재조합 human N-cadherin 단편(세포내영역, 131 아미노산)에 반응했다(A, B lane 5). 또한 HECD-1의 rabbit E-cadherin에 대한 교차반응은 보이지 않았다(C lane 5).