

Antibody 유전자 해석을 위한 tool

SMART 기술을 이용한 antibody 가변영역 (Variable region)의 신속한 cloning

Monoclonal antibody는 antigen과의 특이성 높은 반응을 이용할 수 있어 다양한 연구 분야 및 진단 분야에 활용되어 왔다. 최근에는 chimera antibody, humanized antibody의 개발, 또는 이러한 제조 기술의 개량과 같은 항체공학 (antibody engineering)의 기술이 진보함에 따라 의약품으로서의 이용도 진행되고 있다. Antibody와 antigen의 특이성은 가변영역 (variable region)의 구조에 의해 결정되기 때문에 이 영역의 서열 해석은 antibody의 비동물적 제조, 의약품의 개발 및 수식 antibody 분자 제작 등에 응용하기 위한 첫 걸음이며, 특히 전략에 있어서도 중요시 되고 있다.

■ Antibody 가변영역의 염기서열 해석 개요

생체에는 외계에서 침입하는 물질에 대한 방어 기작으로 10⁶종의 다양성을 갖는 antibody 분자들이 있다. Antibody분자는 genome 상에 다양하게 encoding 되는 VDJ 영역의 재편성에 의해 다양화하는데 기본적으로는 1개 세포의 림프구가 1 종류의 antibody를 생산한다. Antibody의 antigen과의 결합성은 H chain (Heavy chain)과 L chain (Light chain)의 N-말단의 배열로 구성되는 가변 영역의 구조에 의해 결정된다 (그림 1).

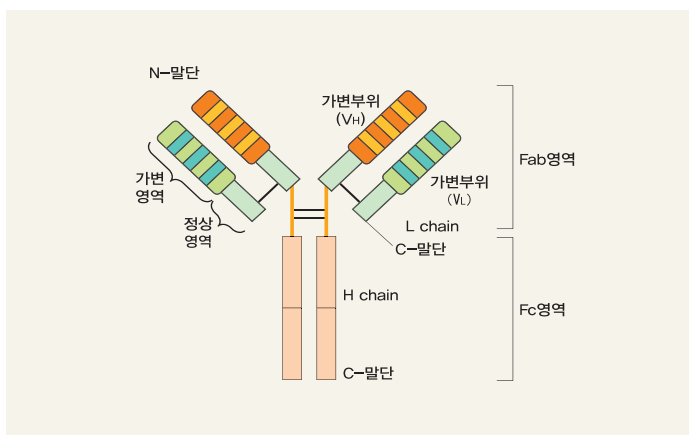


그림 1. Antibody의 기본 구조

Antibody 유전자의 cloning에 있어서, H chain과 L chain의 유전자는 가변부위 (Variable segments)의 상류 5'-말단이 서열 상동성 (sequence homology)이 낮기 때문에 전체에 대응하는 universal primer를 설정하는 것이 어렵다. 이 때문에 가변부위의 염기서열 해석을 수행하기 위해서는 가변부위 하류의 비교적 서열이 잘 보존된 정상영역에 degenerate primer를 설계하고, 5'-RACE법으로 목적 영역을 cloning하여 염기서열을 해석하는 방법이 유효하다.

최근 새롭게 디자인된 SMARTer™ Oligo와 신규 역전사효소 SMARTScribe™ RTase를 이용하여 고성능으로 업그레이드된 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (TaKaRa Code 634923, 634924)가 발매되어 monoclonal antibody의 가변영역 염기서열을 보다 신속하고 간편하게 해석할 수 있게 되었다. 역전사용 primer (RT primer)와 RACE PCR용 reverse primer (5'-RACE primer)는 NCBI의 nt database에 등록된 모든 종류의

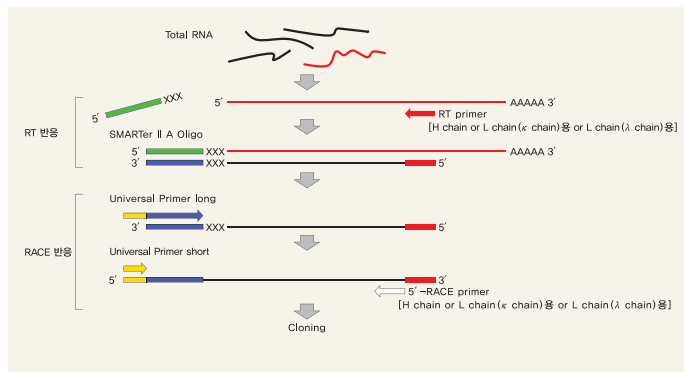


그림 2. SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit를 이용한 antibody 가변 부위의 cloning 개요

mouse IgG의 서열을 기본으로, H chain, L chain (κ chain), L chain (λ chain)에 대하여 설계하였다. 이들 primer와 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit를 이용하여 monoclonal antibody를 생산하는 hybridoma 유래의 total RNA로부터 1st strand cDNA 합성을 한 후, 5'-RACE PCR을 하여 5'-말단의 서열에 관계없이 가변영역 전체길이를 포함하는 cDNA 단편을 얻을 수 있다 (그림 2).

SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit는 역전사효소가 갖는 terminal transferase 활성과 제 2의 주형으로 switching하는 능력을 이용한 Clontech사의 매우 독창적인 SMART 기술에 의해 역전사 반응 시 특이적인 SMARTer™ Oligo의 서열이 cDNA의 말단에 부가되어, 간단한 실험으로 목적 유전자의 5'-말단 쪽의 서열을 cloning할 수 있다. 구성품과 protocol의 최적화에 의한 업그레이드로 비특이적 background가 대폭 저하되었고 증폭 효율도 향상되었다. 또한, genomic DNA의 혼입 가능성이 있는 시료를 포함한 폭넓은 분야에 적용 가능하다.

이 kit와 High Fidelity PCR 효소인 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (TaKaRa Code R010A)나 Advantage HD Polymerase Mix (TaKaRa Code 639241)를 조합시켜서 5'-RACE PCR을 수행하면 PCR에 의한 error가 매우 적은 cDNA 단편을 얻을 수 있어, 정확한 염기서열 결정이 필요할 경우에는 효과적이다.

■ 실험예: Mouse hybridoma 유래 antibody 유전자의 cloning

【방법】

1) Total RNA의 조제

Subcloning 실험에 의해 H chain은 γ2a chain, L chain은 κ chain의 monoclonal antibody를 생산하는 것으로 확인된 hybridoma (본사 보존 세포주)를 배양하여 10⁶ 개의 세포 (φ9 cm plate (laboratory dish) 1장)로부터 FastPure® RNA Kit (TaKaRa Code 9190)를 사용해 total RNA를 조제하였다 (수량 약 70 μg).

Antibody 유전자 해석을 위한 tool

SMART 기술을 이용한 antibody 가변영역 (Variable region)의 신속한 cloning

Continued...

2) 1st strand cDNA의 합성

SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit의 protocol에 따라, total RNA 500 ng을 template로 1st strand cDNA를 합성하였다. 역전사 반응은 H chain과 L chain (κ)용, 각각의 RT primer를 이용해서 2 개의 반응을 병행하였다.

Total RNA (500 ng/μl)	1 μl
RT primer (12 pmol/μl)	1 μl
Deionized H ₂ O*	1.75 μl
Total	3.75 μl
혼합 후	
72℃, 3 분	
42℃, 2 분	

SMARTer II A Oligonucleotide (12 μm)*¹ 1 μl 첨가

이하의 반응액을 첨가 혼합하고, 42℃, 90 분 반응시키고, 70℃, 10분의 역전사 반응을 수행하였다. 반응 종료 후, Tricine-EDTA Buffer*¹를 50 μl 첨가하여 RACE 반응 수행 전까지 -20℃에 보존하였다.

5× First-Strand Buffer ¹	2 μl
DTT (20 μm) ¹	1 μl
dNTP Mix (10 μm) ¹	1 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl) ¹	0.25 μl
SMARTScribe Reverse Transcriptase (100 U/μl) ¹	1 μl
Total	5.25 μl

*¹: SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit에 포함된 구성품

3) 5' -RACE PCR

1st strand cDNA를 template로 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase를 이용하여 5' -RACE PCR을 수행하였다.

5 x PrimeSTAR Buffer (Mg ²⁺ plus)	10 μl
dNTP Mixture (각 2.5 mM)	4 μl
1st strand cDNA	2.5 μl
10 x UPM (Universal Primer A Mix) ¹	5 μl
5' -RACE primer (10 pmol/μl)	1 μl
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (2.5 U/μl)	0.5 μl
H ₂ O	27 μl
Total	50 μl

*¹: SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit에 포함된 구성품

[반응조건]

94℃, 10초	) 30 cycles
↓	
98℃, 10초	
60℃, 5초	
72℃, 1분	)
↓	
72℃, 3분	

【결과】

반응 종료 후 반응액의 일부를 agarose gel에 전기영동(2% NuSieve® 3:1 Agarose 사용)하여 증폭 산물의 유무를 확인하였다 (그림 3). 이 증폭 산물을 Mighty Cloning Kit (Blunt End) (TaKaRa Code 6026;종매)을 이용해 pUC118에 cloning하고 염기서열을 확인한 결과, monoclonal antibody의 N-말단 아미노산서열 분석으로 얻었던 H chain, L chain의 아미노산서열과 일치하는 ORF를 포함하는 서열이 확인되었다.

게다가, 본사 보존 중인 6종의 hybridoma에 대해서도 같은 antibody 가변영역의 유전자 서열 분석을 하여, 모든 종류의 subclass antibody에 대해서도 PCR 증폭 산물을 얻을 수 있었다 (그림 4). 서열 분석 결과, H chain에서는 90% 이상, L chain에서는 50% 이상의 비율로 원하는 antibody 단백질의 N-말단 아미노산 서열을 coding하고 있는 clone을 얻을 수 있었다.

그러나 취득한 clone 안에는 antibody 유전자와 상동성을 갖지만 서열 내에 stop codon이 있어 기능적인 ORF를 갖지 않는다고 생각되는 clone이나 복수의 hybridoma 사이에 공통에 얻어지고 세포 융합에 이용된 myeloma 유래의 전사 산물이라고 추측되는 서열 등도 포함되어 있었다. Hybridoma에 따라서는 목적 monoclonal antibody를 coding하는 clone보다 이것들의 유사 서열 clone의 비율이 높은 경우도 있었다. 따라서 목적 antibody 단백질의 N-말단 아미노산 서열을 병행 분석하여 확인하는 것이 중요하다.

Antibody 유전자 해석을 위한 tool

SMART 기술을 이용한 antibody 가변영역 (Variable region)의 신속한 cloning

Continued...

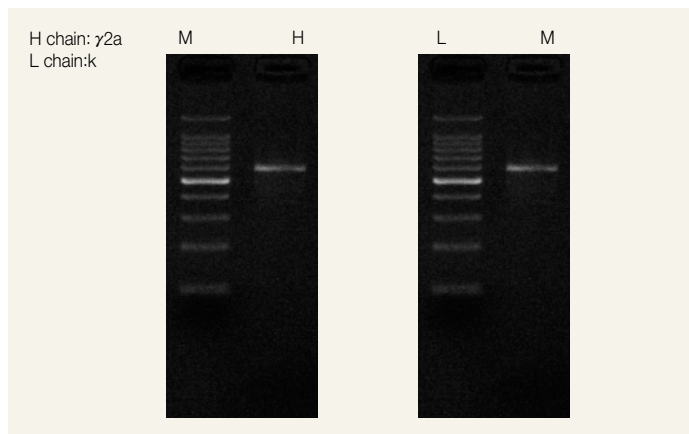


그림 3. Antibody 유전자 증폭 예
M : 100 bp DNA Ladder

■ 맺음말

5' -RACE 등으로 cloning한 clone 안에는 목적 산물 이외의 유사한 서열의 산물도 포함되어 있다. Antibody 유전자의 경우 유전자 구조가 유사한 서열이 많이 존재하기 때문에 antibody 단백질의 N-말단 아미노산 서열 해석까지 병행 실시하는 등의 별도의 방법을 병행하여 확인하는 것이 중요하다. 또한, 이번에는 PCR 반응에 정확성이 높은 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase를 사용하였지만, 취득한 PCR 산물의 clone 간에 염기 서열의 차이가 나타날 수 있다. 그러므로 역전사 반응에서 PCR를 실시하는 RACE 반응의 경우, 최종적인 염기 서열 결정을 위해 적어도 3 개 이상의 clone 서열을 비교하는 것을 권장한다.

현재는 antibody engineering 기술에 의해 antigen 특이성을 유지한 고기능 antibody 분자 제작이 가능해졌다. 예를 들면, 추가변 부위의 서열에 변이를 넣은 결합력이 강한 antibody 분자나, 수식한 Fc 영역과 결합시킨 생체 내에서의 안정성이 향상된 antibody, 또는 2 종류 이상의 특이성을 가진 멀티 antibody 등의 제작도 가능하다. 유용한 antibody를 얻었을 경우, 우선 그 가변 부위의 서열을 결정해 특허를 취득하는 것이 향후 더욱 중요하게 될 것으로 생각된다.

■ 관련제품

제 품 명	용 량	TaKaRa Code
SMARTer [™] RACE cDNA Amplification Kit	10 회	634923
	20 회	634924
PrimeSTAR [®] HS DNA Polymerase	250 U	R010A
	1,000 U	R010B
Advantage HD Polymerase Mix	200 회	639241

* License Notice : [3, 16]

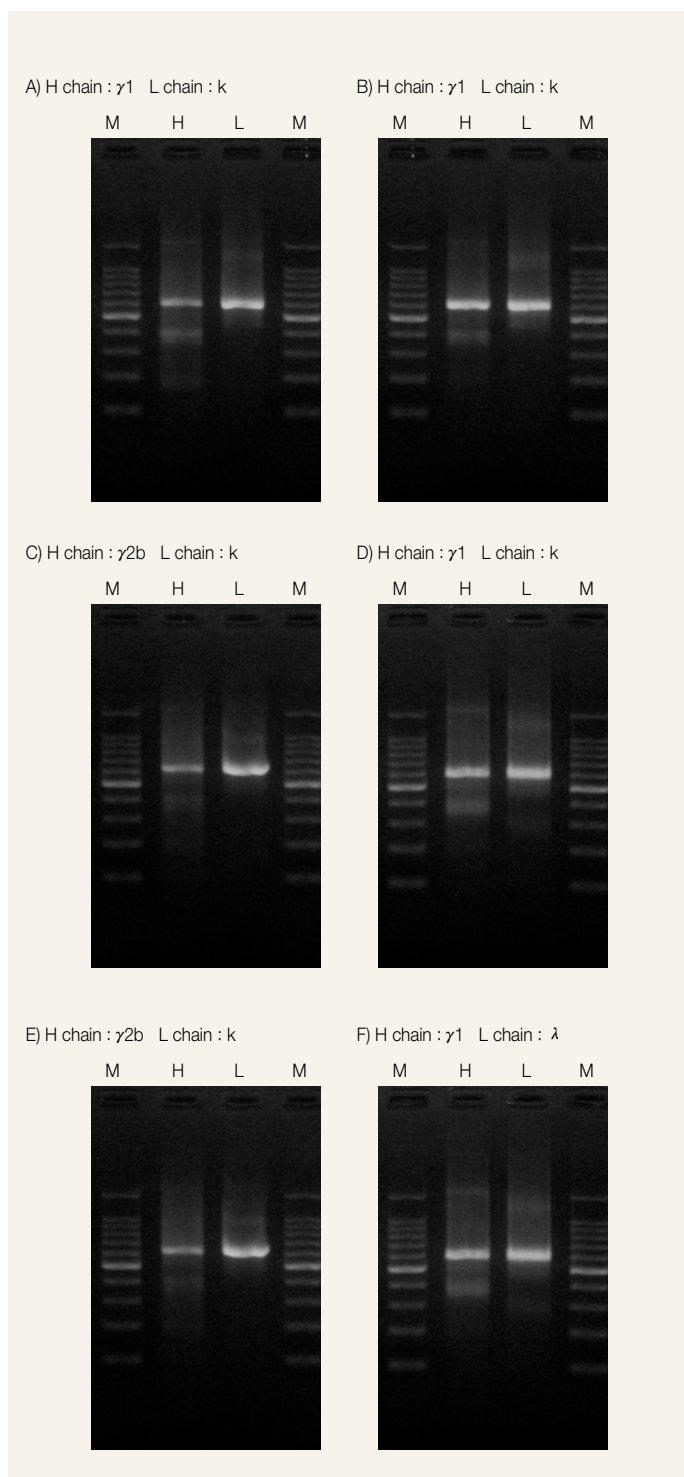


그림 4. 각종 subclass의 antibody 유전자 (mouse)의 증폭 M : 100 bp DNA Ladder

Clontech PCR Polymerase 선택 가이드

실험 목적에 따라 적절한 PCR Polymerase 선택으로 조건 설정 시간을 줄이고 실험 효율을 높일 수 있다.

		Titanium Taq	Advantage 2	Advantage-GC 2	Advantage-HF 2	Advantage HD	Advantage Genomic LA	Advantage GC Genomic LA	Advantage cDNA polymerase	Advantage GC cDNA Polymerase
Application	Routine PCR	●	●							
	Screening/Genotyping	●	●							
	SNP Genotyping	●								
	Cloning/Library Construction	●	●	●	●	●	●	●		
	cDNA Amplification	●	●	●	●	●			●	●
Template/ Amplicon Size Recommended	Human Genomic DNA (Kb)	0,1-2,0	<6,0	<6,0	<3,5	<8,5	8,0-30,0	8,0-30,0	<5,0	<6,0
	Plasmid or λ lysate (Kb)	0,1-2,0	<18,5	<6,0	<2,0	<28,0	<35,0	<20,0	<18,5	<6,0
	cDNA (Kb)	<4,0	0,4-8,5	<0,5	<1,3	<4,0	<10,0	<10,0	<3,0	<0,5
Performance	Short Amplicon/General Purpose	①								
	Highest Yields	①	①			①			②	
	Highly Complex (GC rich)			①				①		②
	Long and Accurate		②					①		
	High Fidelity		②		①	①	②	②		
	Lower Cost Option					①				
Features	Hot Start	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	T/A Cloning Compatible	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y
	Sprint Option (Dry-down)	Y	Y							

● 해당 application에 추천

① 제시된 application에 최적의 조건

② 제시된 application에 2번째 최적의 조건