

Clontech의 Baculovirus를 이용한 단백질 발현시스템

# BacPAK™ Baculovirus Expression System & Titration Kit

- 생물학적 활성을 지닌 단백질을 높은 효율로 발현
- 특별히 제작된 BacPAK6 DNA로 100%에 가까운 재조합 효율
- 곤충세포를 이용한 간단한 실험
- 장시간 기다림이 필요한 plaque assay 대신 4 시간만에 빠르게 baculovirus titration 가능
- Polyhistidine-tagged 재조합 단백질은 TALON® resin을 이용하여 간단히 정제
- 유전자로부터 단백질 정제까지 2 주안에 해결!

Baculovirus Expression system은 곤충 숙주세포로부터 다량의 재조합 단백질을 생산하기 위해 널리 사용되고 있다. 이러한 시스템은 크기, complexity, posttranslational processing 등으로 인해 세균내에서 발현하기 어려운 단백질에 특히 적합하다. 곤충세포에서 발현된 단백질은 posttranslational processing 과정을 거치므로, 포유세포에서 일반적으로 발현되는 단백질과 거의 동등한 생물학적 활성 및 면역학적 반응성을 가진다. Baculovirus Expression system 의 또 다른 장점은 cell line 구축 없이 큰 단백질 또는 분비 단백질을 포함한 여러 단백질을 동시에 발현시킬 수 있다는 점이다. 또한, baculovirus 유전자는 포유류 세포에서 활성을 나타내지 않으므로 바이러스 증식이 불가능하고, complement system에 의해 빠르게 불활성화 되기 때문에 안전하다. 본 고에서는 Clontech의 효율적인 Baculovirus Expression system과 단백질 생산의 최대 발현을 위해 필수적인 Titration Kit를 소개하고자 한다.

## [1] Baculovirus Expression System

Clontech의 BacPAK™ Baculovirus Expression System은 1~500 mg/L 수준으로 목적 단백질을 발현시킬 수 있다. 본 시스템은 재조합 단백질을 효과적으로 발현할 수 있도록 시스템화 되어 있다. 또한, Clontech에서는 발현, 분석 및 정제 등에 기본이 되는 BacPAK™ system을 위한 다양한 기술을 제공한다. 따라서 BacPAK™ system을 이용하여 발현에서 정제까지 한 번에 실험을 진행할 수 있으며, 실험자의 요구에 따라 각각의 구성요소를 조합하여 이용할 수도 있다 (빠르고 정확한 cloning을 위한 In-Fusion™ 기술; 단백질 발현을 위한 BacPAK™ Baculovirus system; Clontech의 TALON® resin을 이용한 6xHN tag 단백질 정제). 본 고에서는 BacPAK System을 이용하여 단백질 발현 및 정제를 할 수 있는 실험방법을 간략하게 기술하였다

### ■ 단계 1: Transfer vector에 목적유전자를 클로닝 (1~3 일 소요)

재조합 baculovirus 생산을 위해 BacPAK™ Baculovirus system에서 제공되는 transfer vector의 multiple cloning site (MCS)에 목적유전자를 클로닝한다. 보다 효율적인 방법으로 Clontech의 In-Fusion™ Ready BacPAK™ Vectors를 이용할 수 있으며, 이 경우 클로닝 과정을 생략할 수 있다 (그림 1)<sup>1)</sup>. In-Fusion Ready Vectors는 선형화 되어 있는 vector로 바로 사용할 수 있으며 (제한효소 처리, phosphatase 처리

또는 gel purification 필요 없음), 같은 PCR 산물을 이용하여 두 개의 prelinearized vector의 N-말단 또는 C-말단에 6xHN tag를 포함하는 목적유전자를 클로닝 할 수 있다. Histidine-rich 6xHN tag를 가진 단백질은 immobilized metal chromatography (IMAC)를 이용하여 편리하게 정제할 수 있으며, Clontech의 TALON® resin을 사용하면 Ni resin보다 순도 높은 단백질을 정제할 수 있다.

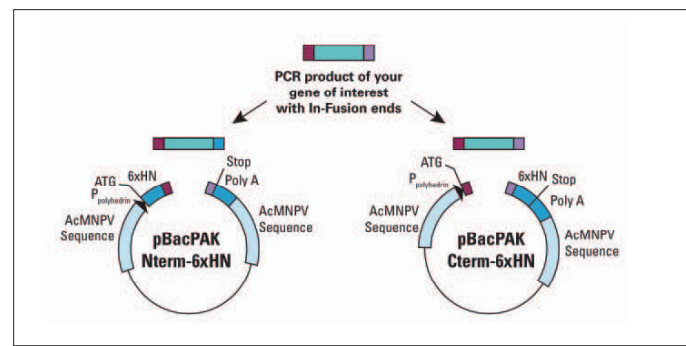


그림 1. Simplify recombinant baculovirus production with the In-Fusion™ Ready BacPAK Vector Set. Insert your gene of interest into the transfer vector, then transform into *E. coli*.

### ■ 단계 2: 목적유전자를 발현하는 재조합 baculovirus 제작 (3~4 일 소요)

Transfer vector와 linearized BacPAK6 baculoviral DNA를 Sf21 insect cells에 cotransfection 하여 목적유전자를 발현하는 baculovirus를 제작한다. 세포는 CO<sub>2</sub>를 필요로 하지 않으며 trypsin 처리 없이 monolayer에서 부유 배양으로 쉽게 전환되므로 다루기 편리하다. 적정 생장은 도인 27 °C에서 세포는 20~24 시간 만에 doubling 된다. 일단 곤충 세포가 준비되고 목적유전자가 BacPAK transfer vector에 클로닝되면 (단계 1), plasmid와 선형의 BacPAK6 Viral DNA를 곤충세포에 cotransfection하여 재조합 baculovirus를 만든다 (그림 2).

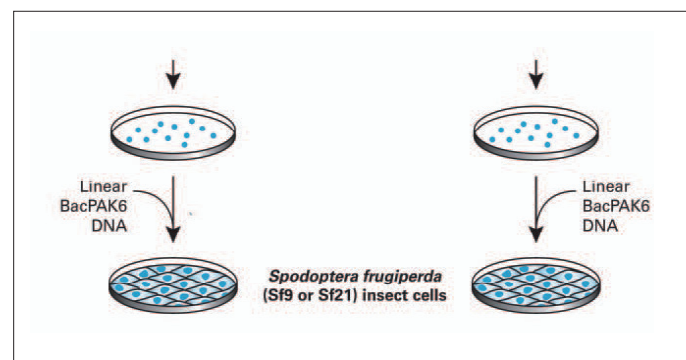


그림 2. Cotransfect pBacPAK plasmid (from Step 1) and BacPAK6 linear DNA into Sf21 Insect Cells.

■ 단계 3: 바이러스 회수 및 증폭 (3~4 일 소요)

일반적으로 [단계 2]에서의 재조합 효율은 96 ~ 99%이므로, plaque 정제를 하지 않고도 바로 대량 단백질 생산에 필요한 높은 역가의 바이러스 stock를 만드는데 사용할 수 있다.

하지만, 형질전환 직후 생성된 바이러스는 그 역가가 낮아 바로 대량 단백질 생산에 이용할 수는 없다. 따라서 형질전환한 세포 배양액을 회수하여 일부를 다시 새로운 세포에 첨가한 후 3 ~ 4 일간 배양하여 바이러스를 증폭하고 회수하여, 높은 역가의 바이러스 stock을 준비하는 과정이 필요하다.

이렇게 준비된 고역가의 바이러스 stock은 단백질 발현 분석 (단계 5) 또는 재조합 단백질 생산 (단계 6)을 목적으로 바로 곤충세포에 감염시킬 수 있다.

■ 단계 4: 바이러스 titer 측정 (1~2 일 소요)

바이러스 stock의 titer를 확인함으로써 재조합 단백질 생산을 극대화시킬 수 있다. Clontech에서는 기존의 titering 방법에 소요되었던 시간을 획기적으로 줄일 수 있는 새로운 titering 방법을 개발하였다. Clontech의 BacPAK™ qPCR Titration Kit (TaKaRa Code 631414)과 BacPAK™ Baculovirus Rapid Titer Kits (TaKaRa Code 631406)를 이용하여 각각 4 시간과 48 시간 만에 감염을 위한 바이러스 활성과 바이러스 유래 단백질 발현을 측정할 수 있다.

■ 단계 5: 유전자 발현 확인 (2~3 일 소요)

목적단백질을 대량으로 발현하기 전에 재조합 바이러스로부터 유전자 발현을 분석하고, 단백질 발현 과정의 시간경과 추이를 결정하기 위해 소규모 실험을 권장한다. 대부분의 단백질이 2~3 일 안에 최대 발현량을 나타낸다. 단백질 발현은 Western blotting이나 polyhistidine-tag antibody를 이용하여 확인할 수 있다. Clontech의 Universal His Western Blot Kit 2.0(TaKaRa Code 635642) (그림 3)은 다양한 polyhistidine tag과 결합하는 TALON에 기초한 검출시약으로 0.5 ng의 정제된 단백질도 검출할 수 있다 (단계 7).

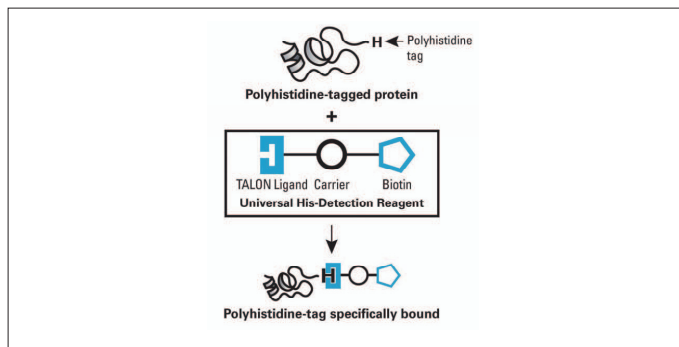


그림 3. Analyze expression of your protein of interest with the Universal His Western Blot Kit 2.0.

■ 단계 6: 목적 단백질의 대량 발현

단계 5에서 결정된 최적 조건을 이용하여 단백질 발현량을 증가시킨 단계 4에서 결정된 최적화 감염 multiplicity를 사용하면 다량의 바이러스로 인한 반복 감염 없이 모든 세포에서 동시에 감염이 일어날 것이다. 적절한 시간에 세포를 회수하여 원심분리하고 pellet을 냉동보관한다. 단백질 정제를 위해 다음단계로 넘어 간다.

■ 단계 7: 목적 단백질의 정제 (1 시간 소요)

TALON® Single Step Columns으로 polyhistidine-tagged 단백질을 간단하게 정제한다 (그림4). 본 column은 초기 정제 단계 (세포 용해, 원심분리, resin 결합)를 간단히 하기 위해 기존의 TALON resin에 TALON×Tractor Buffer가 포함되어 있다. 따라서 전체 단백질 정제 과정을 1 시간 안에 완료할 수 있다.

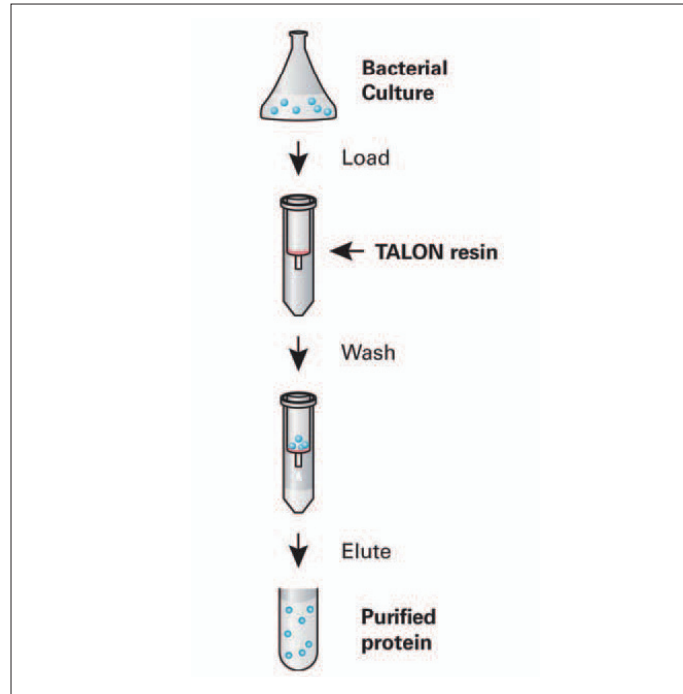


그림 4. Extract and purify your target proteins in one step with TALON Single-Step Columns.

[2] 목적 단백질의 최대 발현에 필수적인 BacPAK™ Titration Kit

Baculovirus system은 곤충 세포에서 고품질의 재조합 단백질을 대량으로 생산하기 위한 가장 효율적인 방법이지만, 단백질의 생산량을 극대화하기 위해서는 정확한 바이러스 titer와 최적의 MOI (multiplicity of infection)에 대한 정보를 파악하여야 한다. 본 실험에서는 형광 단백질 (AcGFP1)을 발현하는 바이러스를 이용하여 단백질 발현 시점과 발현 정점이 바이러스 양에 따라 다르다는 것을 확인하고자 하였다. 그 결과 MOI 10을 사용하였을 때 최상의 결과를 얻을 수 있었으며, 바이러스를 과도하게 사용하면 단백질 발현 정점이 현저하게 낮아지는 것도 확인하였다.

Baculovirus system은 재조합 단백질을 매우 높은 수준으로 생산할 수 있을 뿐만 아니라<sup>3,4)</sup>, Bacterial system과는 다르게 곤충 세포에서 발현되기 때문에 생산된 목적 단백질의 품질, 활성, 구조, 전사 후 특성이 본연의 포유동물 단백질과 매우 유사하다. 일반적인 시스템에서 바이러스 복제 시 목적 단백질은 바이러스의 polyhedrin promoter로부터 발현이 되는데, 이 promoter는 강력하지만 매우 느리게 작동하며, 감염 주기 후반부로 갈수록 점점 활성화되는 특징을 가지고 있다. 따라서, polyhedrin promoter가 최대 활성을 가질 때, 재조합 목적 단백질을 효율적으로 발현시킬 수 있는 감염 조건 설정은 단백질을 최대 발현시키기 위하여 필수적이다.

■ MOI 검토

가장 효율적인 감염을 위해 세포 당 바이러스 입자의 비율 (MOI 사용)을 최적화 해야 하며, 이러한 최적의 조건은 특정범위로 정리할 수 있다 (표 1).

만약 MOI가 너무 낮으면 replication이 동시에 일어나지 않으며, premature cell lysis도 줄어들어 단백질 생산이 지연된다. 만약 MOI가 너무 높으면, 단백질의 발현이 정점에 도달하기 전에 빠르게 바이러스가 증식하여 세포 내 대사 물질이 급격하게 감소한다. 따라서, 바이러스의 역가를 측정하여 바이러스 증식과 효과적인 단백질 생산 사이에 균형을 이룰 수 있는 적절한 양의 바이러스를 사용하는 것은 매우 중요하다.

표 1. Baculovirus System에서 목적 단백질의 발현에 미치는 MOI의 영향

MOI	Effects
1 이하	바이러스가 숙주세포의 일부에만 감염되어 모든 세포가 즉시 목적 단백질을 발현하지는 않는다. 따라서, 최대 발현에는 며칠이 소요되고, 동시에 발현되지 않을 수 있다.
1-20	일반적으로 이 영역에서 단백질 생산량이 극대화되며, 최적화된 MOI에서 바이러스가 동시에 감염되어 동시다발적으로 목적 단백질의 발현이 일어난다.
20 이상	세포에 과다한 바이러스 입자가 감염하여 느리게 작동하는 polyhedrin promoter가 활성화되기 이전에 세포 내 대사원이 고갈되어 강한 단백질 발현을 유도할 수 없게 된다.

■ 재조합 단백질 발현 시점의 모니터링

MOI가 단백질 발현 시점과 발현 수준에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 바이러스의 양 (세포 당 0.1-100 감염 입자; MOI<sub>0.1-100</sub>)을 달리하여 곤충세포 SF21에 감염시키고 배양하며 6 일 이상 세포의 형광을 측정하였다 (그림 5).

바이러스 구축을 위해 BacPAK™ Baculovirus Expression System (TaKaRa Code 631402)을 이용하여 AcGFP1 Living Colors® fluorescent protein을 발현하는 바이러스를 제작하였다. 바이러스는 plaque 정제 및 증폭 후 BacPAK™ BaculovirusRapid Titer Kit (TaKaRa Code 631406)를 이용하여 역가를 측정하였다.

감염된 세포는 6 일 동안 12 시간마다 회수하여 원심분리하고, 배양액을 제거하기 위해 PBS로 한번 세척한 후 -80 °C에 냉동시켰다. 정해진 시간별로 세포를 수집하였고, 수집된 세포는 해동하여 Clontech의 TALON® xTractor Buffer (TaKaRa Code 635625)로 용해시켰다. 세포 용해물은 96-well plate에 분주하여 AcGFP1 발현에 따른 형광 강도를 fluorescence plate reader로 측정하였다.

■ 최적 MOI 분석

MOI<sub>0.1</sub>과 MOI<sub>1</sub>에서는 바이러스를 숙주세포에 감염시킨 후 2.5 ~ 3 일 까지 단백질 생산이 지연되었다. 또한, 단백질 발현은 5 일 까지도 정점에 이르지 못하였으며, 세포가 죽기 시작하면서 빠르게 감소되었다. MOI<sub>10</sub> (i.e., 1 ~ 20의 추천 범위 내)에서는 36 시간 후부터 단백질 측정

이 시작되었고, 84 시간에서 정점을 나타내었는데 이는 더 낮은 MOI에 서보다 1.5 일 정도 빠른 것이다. 그리고 AcGFP1 발현 또한 MOI<sub>10</sub>에서 최고의 발현수준을 보였다. MOI<sub>100</sub>의 경우 초기에는 MOI<sub>10</sub>보다 조금 높은 수준으로 발현되었고, 더 빠르게 정점에 이르렀지만, MOI<sub>100</sub>에서의 최대 발현은 현저하게 낮았다.

MOI<sub>10</sub>에서는 84 시간에서 단백질 발현 정점을 보이는데, 이는 MOI<sub>100</sub>에서 발현 정점인 74 시간에 비하여 24% 더 높은 수준이며, 동일 시간인 84 시간 보다 31% 높은 발현 수준을 보였다. 이러한 결과를 통해 정확한 양 (예를 들면 MOI<sub>10</sub>)의 baculovirus를 사용하면 효과적으로 세포를 배양할 수 있으며, 정제 및 회수 가능한 단백질의 양을 최대화 할 수 있다.

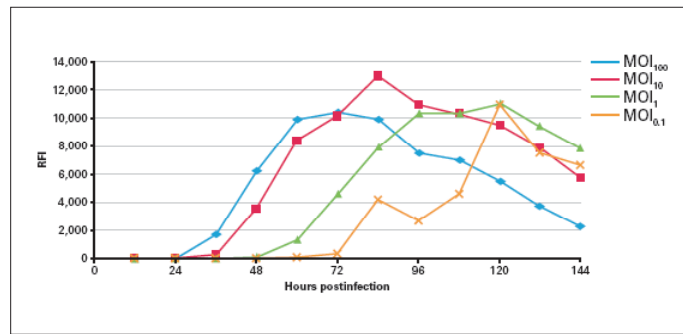


그림 5. Using the correct MOI enables high levels of recombinant protein production. Insect cells were infected at different MOIs and fluorescent protein expression was measured every 12 hr. The highest levels of AcGFP1 expression in cells were observed at an MOI of 10 (MOI<sub>10</sub>), whereas infection with MOIs of 0.1, 1, or 100 produced lower maximum levels of recombinant protein. RFI = relative fluorescence intensity.

■ 신속한 Virus Titration : 더 많은 생산을 위한 첫 번째 단계

원하는 재조합 단백질을 발현시키는 것은 장기간 진행되는 연구의 시작이므로, 이 단계를 신속히 완료하는 것은 최종 연구 목적을 달성하는데 중요한 역할을 한다.

위에서 확인한 바와 같이 바이러스의 사용량이 단백질 발현 속도 및 발현량에 큰 영향을 준다는 것이 증명되었다. 최적의 생산량을 확보하기 위해서는 정확한 농도의 바이러스를 이용하는 것이 필수적이다.

Clontech에서는 쉽고, 빠르게 바이러스를 정량할 수 있는 두 종류의 titration kit를 제공하고 있다. 이를 이용하여 역가 (titration)를 정확히 측정함으로써 실험의 재현성을 높이고, 감염조건이 최적인지를 확인하여 확실하게 세포를 감염시킬 수 있다. 바이러스의 역가를 측정하는 것은 활발한 세포 증식과 재조합 단백질 생산 사이에서 가장 적합한 조건을 쉽게 유지하도록 도와줄 것이다.

BacPAK™ Baculovirus Rapid Titer Kit는 바이러스에 감염된 곤충세포를 구분하기 위해 항체를 이용하며, BacPAK™ qPCR Titration Kit는 qPCR과 SYBR® Green 검출 기술을 이용하여 약 4 시간 안에 바이러스 genome의 함유량을 확인 할 수 있다. 전통적인 titration 방법인 plaque assay, end-point dilution assay의 경우 매우 숙련된 기술을 필요로 하며, 1~2 주 정도의 시간이 소요되는데 비해, 이들 제품은 보다 간편하며 짧은 시간 안에 결과를 도출할 수 있다.

■ 최적화된 감염조건 검토

Baculovirus system은 많은 양의 재조합 단백질을 생산할 수 있다. 하지만, 너무 적은 양의 바이러스를 사용하면 단백질이 최대로 발현되는 시점이 지연되거나 발현량이 감소하고, 반대로 너무 많은 양의 바이러스를 사용하면 최대 발현량이 줄어들고, 불필요하게 바이러스를 소모하게 된다.

위에서 하나의 재조합 baculovirus를 다양한 농도로 감염시켜 시간에 따른 감염효율을 테스트한 결과, 최적의 MOI 값이 10임을 제시하였다. 실험결과로 보아, 어떠한 특정 바이러스의 최적의 MOI 값과 감염 특성은 바이러스 준비 및 제조과정에 따라 달라지는 것으로 생각된다. 따라서, 세포에 감염시키기 전에 증폭한 바이러스의 감염능력 (titer)을 측정하고, 감염 후 단백질 생산을 모니터링 하는 것은 세포를 회수할 최적의 시간을 결정할 수 있도록 한다. 따라서 바이러스의 역가를 측정하여 최적의 MOI로 감염시키고, 단백질의 최대 발현 시점에서 세포를 회수하는 것은 다량의 단백질을 생산할 수 있는 척도일 것이다.

■ Clontech의 Baculovirus titration kit

Clontech에서는 24~48 시간 만에 baculovirus의 역가를 측정할 수 있는 두 가지 타입의 baculovirus titration kit를 판매하고 있다. 두 제품 모두 다양한 baculovirus 시스템과 함께 사용할 수 있으며 정확하고, 재현성 있게 바이러스의 역가를 측정할 수 있다. 각 제품에 대한 특성은 아래와 같다.

■ 관련제품

제품명	용량	TaKaRa Code
BacPAK Baculovirus Expression System	each	631402
In-Fusion Ready BacPAK Vector Set	3 vectors	631410
In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit with Cloning Enhancer	8 회	639609
BacPAK6 DNA (Bsu36 I digest)	5 회 분	631401
IPLB-Sf21 Insect Cells	1 vial	631411
BacPAK Complete Medium	1 L	631403
BacPAK Grace 's Basic Medium	500 ml	631404
BacPAK Baculovirus Rapid Titer Kit	Each	631406
BacPAK qPCR Titration Kit	200 회	631414
Universal His Western Blot Kit 2,0	each	635642
TALON Single Step Columns (5 ml)	25 columns	635628
TALON Single Step Columns (20 ml)	10 columns	635632
TALON <sup>®</sup> xTractor Buffer	500 ml	635625
TALON <sup>®</sup> xTractor Kit	Each	635623

제품명	BacPAK <sup>™</sup> Baculovirus Rapid Titer Kit (TaKaRa Code 631406)	BacPAK <sup>™</sup> qPCR Titration Kit (TaKaRa Code 631414)
적용범위	AcMNPV 타입의 baculovirus	
방법	Virus에 감염되어 외피 당단백질인 GP64를 발현하는 세포를 면역염색	SYBR <sup>®</sup> Green I을 이용한 Real Time PCR
타겟	GP64-AcMNPV baculovirus의 외피 당단백질	GP64 Viral DNA
장비	광학현미경 Multichannel pipette (옵션)	Real Time PCR 기기
제품구성	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mouse gp64 Antibody</li> <li>• Goat Anti-Mouse Antibody/HRP Conjugate</li> <li>• Blue Peroxidase Substrate</li> <li>• Normal Goat Serum</li> <li>• Methyl Cellulose Overlay</li> <li>• Resealable Plastic Bags</li> <li>• Control Baculovirus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BacPAK DNA Control Template</li> <li>• BacPAK Forward Titer Primer</li> <li>• BacPAK Reverse Titer Primer</li> <li>• Easy Dilution Buffer</li> <li>• SYBR<sup>®</sup> Advantage<sup>®</sup> qPCR Premix</li> <li>• NucleoSpin<sup>®</sup> Virus Kit</li> </ul>

■ 참고문헌

1. In-Fusion<sup>™</sup> Ready BacPAK Vector Set (July 2006) *Clontechiques* **XXI**(2):18 - 19.
2. Rapid & Accurate Baculoviral Titration (July 2009) *Clontechiques* **XXIV**(1):10 - 11
3. Kitts, P. A., & Possee, R. D. (1993) *BioTechniques* **14**(5):810 - 817.
4. Kitts, P.A. et al. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**(19):5667 - 5672.

\*License Notice :[1], [2]