

후천성 면역 결핍증 (AIDS) 환자의 진단시약
개발 연구

Development of AIDS Diagnostic Kits using
E. coli Expression Systems

연구기관
한국과학기술연구원
부설 유전공학센터

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 "후천성 면역 결핍증(AIDS) 환자의 진단시약 개발 연구" 사업의 최종보고서로 제출합니다.

1989년 5월

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원 부설 유전공학센터

총괄연구책임자 : 이영익 (유전공학센터 책임연구원)

연 구 원 : 유향숙 (유전공학센터 선임연구원)

임선영 (" ")

박희동 (" ")

장원희 (" 연구원)

현상원 (" ")

요 약 문

I. 제 목

후천성 면역 결핍증(AIDS) 환자의 진단시약 개발 연구

II. 연구의 목적 및 중요성

본 연구에서는 최근 세계적으로 보건문제화 되고 있는 AIDS의 확산을 막기 위한 조기진단 및 감염의 방지를 위하여 유전공학적 방법으로 진단시약을 만드는 것을 목표로 한다. 본 실험에서는 서론에서 밝힌 바와 같이 HIV(Human Immunodeficiency Virus)의 유전인자중 env 유전인자를 비롯하여 몇 개의 구조 유전인자를 *E. coli*내에서 발현시켜서, 정제시킨 다음 정제된 단백질을 항원으로 한 진단시약의 개발을 목적으로 한다.

이러한 진단시약의 개발은 전세계적으로 만연되고 있는 AIDS의 국내전파를 막아, 국민보건향상에 기여할 것이다.

III. 연구의 내용 및 범위

본 연구에서는 AIDS를 일으키는 HIV에 대한 진단시약을 개발하기 위하여 표면항원(env), core protein(gag) 및 protease의 발현을 시도하여, HIV에 대한 항원, 항체 검사를 토대로한 진단시약 개발에 역점을 두었다.

IV. 연구결과 및 활용에 관한 건의

본 연구에서는 *E. coli*에서 HIV 표면항원 (env) 유전인자와 core protein을 발현시켰고, 현재 발현된 단백질을 정제하는 실험을 현재 진행중에 있다.

이렇게 만든 진단시약은 AIDS의 확산을 막아 국민보건문제로 대두되고 있는 AIDS를 조기에방하는데 기여하게 될 것이다.

SUMMARY

Development of AIDS diagnostic kits using *E. coli* expression systems.

AIDS, which is caused by HIV, become big social problems in all over the world. Ever since the cause of the AIDS has been identified by Robert C. Gallo and Luc Montagnier, lots of efforts were put onto the development of vaccines and therapeutic agents, though there were not much progress in these fields.

So, it is our urgent problem to develop the diagnostic kits in order to prevent the diffusion of AIDS in this society which has become one of the big social health problems in these days. Immunodominant regions of HIV genes, including part of env gp120, p41 and gag p17 regions were expressed using *E. coli* expression systems.

After purification, these proteins will be used as antigen in order to make diagnostic kits for HIV infections.

CONTENTS

I.	Introduction	11
II.	Materials & Method	15
1.	<i>E. coli</i> strains and media	15
2.	Expression plasmids	16
3.	Enzymes	16
4.	Transformation	17
5.	Isolation of plasmid DNA	17
6.	Bacterial growth and induction of gene expression	17
7.	Polyacrylamide Gel electrophoresis	18
III.	Results and Discussion	19
1.	Expression of env gpl60	19
1.1	Direct expression of env gpl60	19
1.2	Expression of env- β -gal fusion proteins	20
1.3	Expression of TrpE-env fusion proteins	20
2.	Expression of env gpl20	21
3.	Expression of transmembrane protein p41	22
4.	Expression of core protein	23
4.1	Construction and expression of pYJM-gagl	

expression vector	23
4.2 Construction and expression of pYYM-gag1	
expression vector	23
4.3 Construction and expression of pYYM-gag2	
expression vector	24
5. Expression of TrpE-Gag-Env fusion proteins	24
5.1 Construction of pYYJM-Gag/env1	
expression vector	24
5.2 Construction of pYYPM-Gag/env1	
expression vector	25
5.3 Expression of pYYJM-Gag/env1 and pYYPM-	
Gag/env1 expression vectors	25
6. Expression of protease protein	26
6.1 Direct expression of protease	26
6.2 Expression of TrpE-protease fusion proteins ...	26
IV. Conclusion and Recommendations	27
References	31
Figure and Table	33

목 차

제 1 장 서 론	11
제 2 장 실험재료 및 방법	15
1. <i>E. coli</i> 균주 및 배지	15
2. 발현 플라스미드	16
3. 효 소	16
4. <i>E. coli</i> 의 형질전환	17
5. 플라스미드 DNA의 분리	17
6. 클로닝된 유전자의 발현	17
7. 폴리아크릴아마이드 전기영동	18
제 3 장 결과 및 고찰	19
1. env gp160 단백질의 발현	19
1.1 env gp160 직접 발현백터의 제조 및 발현	19
1.2 env- β -gal 융합 발현백터의 제조 및 발현	20
1.3 TrpE-env 융합 발현백터의 제조 및 발현	20
2. env gp120 단백질의 발현	21
3. transmembrane protein p41의 발현	22
4. core protein gag의 발현	23
4.1 pYJM-Gag1 발현백터의 제조 및 발현	23

4.2	pYYM-Gag1	발현벡터의 제조 및 발현	23
4.3	pYYM-Gag2	발현벡터의 제조 및 발현	24
5.	TrpE-Gag-env	융합단백질의 발현	24
5.1	pYYJM-Gag/env1	발현벡터의 제조	24
5.2	pYYPM-Gag/env1	발현벡터의 제조	25
5.3	gag-env	융합발현벡터의 발현	25
6.	protease p11	발현벡터의 제조 및 발현	26
6.1	protease	직접발현벡터의 제조 및 발현	26
6.2	TrpE-protease	융합발현벡터의 제조 및 발현	26
제 4 장 결론 및 건의사항			27
참 고 문 헌			31
그림 및 표			33

제 1 장 서 론

1981년에 처음으로 알려진 이후 후천성 면역결핍증(AIDS)와 AIDS에 관계된 증후군(ARC)는 전세계를 통하여 매우 중요한 보건문제가 되어 왔다. 그로부터 3년후 AIDS의 대체적인 전역경로의 윤곽이 알려지고, 새로운 바이러스 - Human Immunodeficiency virus (HIV) - 가 분리되었으며, 이 바이러스가 AIDS를 일으킨다는 것이 밝혀졌다.

HIV의 염기서열이 최근에 발표되었고⁽¹⁾ 이 provirus 유전인자는 9749bp로 구성되어 있다. HIV는 다른 retrovirus에 공통된 여러가지 구조적인 특징을 가지고 있다. 두개의 long terminal repeat sequence (LTRs), core protein 유전자(gag), RNA-dependent DNA polymerase를 coding하는 유전자(pol), envelope glycoprotein (env)을 coding하는 유전자, transcription을 활성화시키는 Trans-acting factor를 coding하는 유전자(tat)가 있으며, 이외에 HIV에만 특이하게 존재하는 nef(negative effectorgene), rev 등의 조절유전인자가 존재한다.

HIV에 대한 감염여부를 진단하는 것은 virus의 확산을 막는데 매우 중요하다. 지금까지 가장 신빙성있는 방법으로는 사람의 혈액중의 HIV에 대한 antibody가 있는지를 검사하는 것이다. 대부분의 AIDS환자나 AIDS에 관계된 증후를 보이는 사람은

혈액중에 바이러스의 structural protein 에 대한 항체를 보유하고 있다. 이 HIV 에 대한 seropositivity 를 진단할때 enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) 를 하는데 지금까지는 항원으로서 조직배양한 바이러스를 많이 사용해 왔다. 이것은 혈액중의 바이러스에 대한 항체를 검사하는데는 정확한 방법이나, 각 환자가 면역반응을 보인 특정 viral antibody 에 대해서는 알 수가 없다는 단점이 있다. 또 각각의 바이러스 항원에 대한 환자의 항체반응의 양상이 병의 단계를 반영하기 때문에, 병의 정도를 알 수가 없다는 또 하나의 단점이 있다. 그러나 최근 유전자 재조합 기술의 발전으로 전체 바이러스를 쓰지 않고도 이러한 연구에 필요한 각각의 viral protein 을 충분히 공급할 수 있게 되었다.

우리가 이 연구에 이용한 각각의 viral protein 과 유전자에 관해서 알아보면 다음과 같다.

; *env* gene : HIV 의 여러 isolate 들의 염기서열을 비교해 보면 genome 상의 변이도가 많은데, 그중 가장 변화가 심한 곳이 이 envelope gene이다. 이 env protein 이 HIV 의 pathogenicity 에 큰 영향을 미칠것으로 생각이 되고 있으며, 따라서 효과적인 진단, 치료, 예방을 위한 시약을 개발하는데 꼭 필요한 중요한 부분이다. env 유전자는 하나의 큰 polyprotein precursor (gp 160) 로 만들어진 후, 이것이 processing 되어 external envelope glycoprotein (gp 120) 과 작은 trans-membrane protein (p41) 로 된다. 이 연구에서는 env. 유전

자중 protein 의 hydrophilicity 와 이차구조로 예상해 보았을때, 강한 항원성을 나타내며 또 여러 다른 분리된 HIV 에서 아미노산서열이 보존된 env 부분을 선택하여 진단시약 개발에 이용하기로 하였다.

gag gene : HIV 의 gag gene 도 512 a.a 의 polyprotein precursor 로 만들어진 후 proteolytically processing 되어 각각의 p17 . p24 . p15 protein 으로 된다. 이 protein 은 바이러스의 중요한 항원성을 나타내는 구성성분이며, 또한 gag protein 에 대한 항체의 profile 은 AIDS 의 병의 단계에 따라 다른 양상을 보이므로 효과적인 진단 및 치료에 있어 중요한 부분이다. 이 연구에서는 p24 와 p17 을 발현하여 연구에 사용하기로 하였다.

pol gene ; pol gene 은 gag gene 의 3' end 와 80 a.a 정도가 overlap 되어 있고, pol region 은 처음에는 gag-pol fusion protein 으로 만들어진 후 processing 되어 protease (PR), reverse transcriptase (RT), endonuclease / Integrase 각각으로 만들어 진다. 각각의 위에 언급한 효소들은 아미노산이 잘 보존되어 있어서, 공통된 항원성을 나타내므로, 본 실험에서는 protease (p11) 를 coding 하는 HIV 의 유전인자를 발현시켜서 진단시약 개발에 이용하였다.

본 과제에서는 효과적인 진단 시약개발을 위해서 HIV 의

extracellular glycoprotein (gp120), transmembrane protein (p⁴¹), protease, core protein (p²⁴, p¹⁷) 유전자를 택하여 subcloning 하였으며, 이것을 여러가지의 다양한 발현 플라스미드를 사용하여 대량 생산하는 실험이 현재 진행중에 있다.

제 2 장 실험재료 및 방법

1. *E. coli* 균주 및 배지

① 사용된 *E. coli* 균주는 아래와 같다.

E. coli HB101 : F^- , hsd S20 (r_B^- , m_B^-), recA13,
ara-14, proA2, lacY1, galK2,
rpsL20 (S_m^+), Xyl-5, mtl-1,
SupE44, λ^-

E. coli RR1 : F^- ; the same as HB101 except
recA⁺

E. coli JM109 : Δ (lac pro), thi, strA, supE,
endA sbcB, hsdR⁻, F' traD36,
proAB, lacI^q, Z Δ M15

② 배지

E. coli RR1, *E. coli* HB101 을 위한 LB 배지는 1 ℓ 당
10 g 의 bactotryptone, 5 g 의 yeast extract와 10 g
의 NaCl 을 포함하며 plate 를 만들때는 1.5 % (w/v) 의
bactoagar 를 넣었고, ampicillin 배지는 ampicillin을
50 ug/ml 농도로 넣어주었다.

E. coli JM109 를 위한 M9 배지는 1 ℓ 당 6 g의 Na₂-HPO₄, 3 g의 KH₂PO₄, 0.5 g의 NaCl, 2 g의 casamino acid, 1 g의 NH₄Cl을 넣어 멸균한 후 1 M MgSO₄ 2 ml 와 20 % glucose 10 ml, 1 M CaCl₂ 0.1 ml 와 0.2 % thiamine 1 ml 를 첨가하였다.

2. 발현 플라스미드

발현 플라스미드 pATH1, pATH2, pATH3 는 Dr. Tomas Cunningham (university of Tennessee)로 부터 얻었으며, pTTQ19 vactor 는 Amersham 에서 구입하였고, pCT10 vector 는 Dr. 유명희 (유전공학센터)로 부터 제공받았다. plasmid DND 의 분리와 여러 조작은 Maniatis et. al⁽²⁾에 따라 행하였다.

3. 효소

제한효소 EcoRI, BamHI, Bgl II, Hind III, Pst I 은 KOSKO 로 부터 구입하였고, Hae III, Sma I, Rsa I 은 New England Biolabs 에서 구하였다. T4 DNA Kinase, *E. coli* DNA polymerase large fragment 는 Bedesda Reserch laboratory 로 부터 구입하였고, T4 DNA ligase 는 KOSCO 로 부터 구입하였다.

4. *E. coli* 의 형질전환

E. coli 의 형질전환에는 Hanahan 방법 (3) 과 CaCl_2 방법 (4,5) 을 사용하였다.

5. 플라스미드 DNA 의 분리 (6)

16~20 시간 키운 *E. coli* 배양액 1.5 ml 를 1 분동안 원심 분리하여 침전된 세포들을 lysozyme 처리 (100 ul), 알칼리 용출 (200 ul) 그리고 potassium acetate 에 의한 침전 후 phenol / chloroform 으로 추출하였다. 수용액층을 에탄올로 침전시킨 후 70 % 에탄올로 한번 씻어주며 이 DNA 를 말린 후 0.5 ug/ml RNase 를 함유한 TE (~ 50 ul) 에 녹였다.

6. 클로닝된 유전자의 발현

pATHn 과 env 발현 플라스미드를 포함한 *E. coli* RR1 배양액을 0.2 % glucose, 0.2 % casamino acid, 2 g/l thiamine, 50 $\mu\text{g/ml}$ Tryptophan 이 들어있는 M9 배지에서 밤새 키운 후, 아침에 Tryptophan 이 들어있지 않은 신선한 배지에 1:10 의 비율로 접종하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간 배양한 후, 50ug /ml 의 3 β - indoleacrylic acid 를 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2 시간 더 키운 후 cell 을 침전시켜 모았다.

pCT10 과 pTTQ19 vector 를 이용한 env expression plasmid와 gag expression plasmid 를 포함한 *E. coli* JM109 배양액은 50 ug/ml ampicillin 을 넣은 LB 배지에서

midlog phase 까지 키운 뒤 IPTG 를 1 mM 되게 첨가한 후 37 °C에서 4 시간 더 배양한 다음 균체를 침전시켜 모았다.

7. 폴리아크릴아마이드 전기영동 (7)

Cell 침전물을 1 × Sample buffer (100 ul)에 녹인 뒤 95 °C에서 5 분간 끓인 후 SDS - PAGE 를 행하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

1. env gp160 발현 벡터의 제조 및 발현

env gp160의 발현을 위해서 direct expression, β -갈락토시다제와 융합된 상태로 발현, trpE 단백질과 융합된 상태로 발현시키는 여러가지 발현벡터를 제조하여 발현시켜 보았다.

1.1 gp160 direct expression 벡터의 제조 및 발현

그림 1에서 나타낸 바와같이 gp160을 coding 하는 유전자의 각각 다른 네개의 fragment를 pTTQ19 direct expression vector에 연결하여 네개의 발현벡터를 제조하였고 pYYM-env1, pYYM-env2, pYYM-env3, pYPM-env4이라고 명명하였다(Fig 2, 3, 4, 6). 이들 네가지 발현벡터는 tac promotor의 조절을 받아, pYYM-env1은 5' signal peptide를 전체 gp160이 90 kd을 발현시키고, pYYM-env2와 pYYM-env3는 gp160의 5'-signal peptide와 3'-coding region이 약간씩 deletion된 78 kd, 66 kd의 gp160을 생성하고, pYPM-env4는 gp160의 47.6 kd subregion을 생성하게 된다. 이를 네 발현벡터를 발현유도한 결과는 그림 23에 나타낸 바와같이 pYPM-env4의 경우 발현이 되지않았으며, pYYM-env1, pYYM-env2, pYYM-env3의 경우 기대되는 크기의 gp160 단백질이 생성되었으나, 발현양이 적었다.

1.2 env - β -gal 융합발현백터의 제조 및 발현

env. gp160 direct expression 의 결과 발현양이 적었으므로, gp160 을 β - 갈락토시다제의 아미노말단에 융합시켜 발현시키는 융합발현백터를 제조하였다.

그림 1 에서 보는것 처럼 gp160 을 coding 하는 유전자의 각각 다른 두개의 fragment 를 pTTQ19 vector 에 연결하여 pYPM-env1, pYJM-env4 발현백터를 제조하였다(Fig.5,7). 이들 두 발현백터는 tac promotor 의 조절을 받아 gp160 단백질의 각각의 부분을 pTTQ19 vector 에 있는 베타갈락토시다제의 50 a.a. 와 융합된 상태로 발현시키게 된다. 이 두 발현백터를 발현유도한 결과 모두 gp160 단백질이 발현되지 않았다(그림 23).

다음 시도로 그림 6 에서 보는 것처럼 gp160 을 coding 하는 유전자 뒤에 β - 갈락토시다제의 350 a.a 를 coding 하는 gene 을 붙여서 pYPM-env2 발현백터를 제조하였다. 이 발현백터를 발현유도한 결과 gp160-lacz' 융합단백질이 발현되지 않았다(그림 23).

1.3 Trp E-env 융합발현백터의 제조 및 발현

env gp160 을 coding 하는 유전자를 E. coli β - 갈락토시다제의 유전자와 융합시켜 발현시켜 본 결과 발현이 되지 않았으므로, gp160 을 trpE 와 융합시켜 발현시키는 시도를 하였다.

그림 1 에서 보는 것처럼 gp160 을 coding 하는 두 frag-

ment 를 trpE 유전자의 3' end 에 연결하여 pYYM-env 7, pYYM-env 6 발현벡터를 제조하였다.(그림 8, 그림 9). 이 두 발현 벡터는 trp promotor 의 조절을 받아 gp160 단백질의 600 aa subregion, 352 a.a subregion 을 trpE 단백질의 카르복실 말단에 융합된 상태로 발현시키게 된다.

pYYM-env 7 발현벡터를 발현유도한 결과 SDS-acrylamide gel 상에서 coomassie blue staining 에 의해 나타날 정도의 재조합 융합단백질은 합성되지 않았고(그림 22 lane D), pYYM-env 6 을 발현유도한 결과 trpE-gp160 융합단백질이 소량 합성되었다(그림 22 lane C)

2. env gp120 단백질의 발현

위에서 기술한 대로 env gp160 을 여러가지 발현벡터를 써서 발현시킨 결과, 재조합 단백질이 발현이 되지 않거나, 발현된다 해도 생성양이 많지 않았으므로, env gp160 을 gp120 과 p41 의 부분으로 나누어 발현시키기로 하였다.

그림 1 에서 보는 것처럼 gp120 의 두 subregion 을 trpE 유전자에 연결하여 pYYM-env 4 와 pYYM-env 5 발현벡터를 제조하였다(그림 10, 그림 11). 이 두 클론은 trp promotor 의 조절을 받아 pYYM-env 4 는 gp120 의 231 a.a subregion 을, pYYM-env 5 는 gp120 의 194 a.a subregion 을 각각 trpE 단백질의 카르복실말단에 융합된 상태로 생성하게 된다. SDS-polyacrylamide gel 에서 coomassie blue staining 에 의해

발현유도된 단백질의 양을 검사한 결과 다른 band 와 구별되게 분명한 band 로 보일만큼 충분한 양의 융합단백질이 생성되었다 (그림 22. lane A, B).

3. transmembrane protein p⁴¹ 의 발현

transmembrane protein p⁴¹ 에 관하여는 초기에 immunodominant epitope 을 규명하는 연구가 활발하여서 이 immunodominant epitope 이 p⁴¹ 의 N-term 에 있음이 밝혀졌다. (8,9) 따라서 본 연구에서는 이 epitope 을 포함한 subregion 을 클로닝하여 발현시키는 시도를 하였다.

그림 1 에서 보는 것처럼 p⁴¹ 을 coding 하는 유전자의 두 subregion 을 trpE 유전자의 3' 에 연결하여 pYJM-env 2 과 pYJM-env 3 발현벡터를 제조하였다.(그림 12. 그림 13). 위의 두 클론은 trp promoter 의 조절을 받아 pYJM-env 2 는 p⁴¹ 의 아미노말단의 99 a.a subregion 을, pYJM-env 3 는 p⁴¹ 아미노말단의 55 a.a subregion 을 trpE 단백질의 카르복실 말단의 융합된 상태로 생성시키게 된다. 이 발현벡터를 발현유도한 결과, trpE-p⁴¹ 융합단백질이 coomasie-blue 염색한 SDS-polyacrylamide 젤에서 E. coli 전체 단백질의 20~30 % 정도로 생산되었다 (그림 22. laneE, laneF).

4. core protein gag 의 발현

4.1 pYYJM-Gag 1 발현벡터의 제조 및 발현

그림 14 에서 보는 것처럼 Gag 의 p²⁴ 와 p¹⁵ 를 coding 하는 Pvu II fragment 를 pTTQ 19 vector 의 Sma I site 에 삽입시켜 pYJM-Gag 1 발현벡터를 제조하였다. 이 플라스미드는 tac promotor 의 조절을 받아서 p¹⁷ 의 카르복실말단의 13 a.a 와 p²⁴ 와 p¹⁵ 가 합쳐진 40 KD 의 Gag protein 을 생성하게 된다.

이 발현벡터를 발현유도시킨 결과 재조합 Gag 단백질이 SDS-gel 상에서 보일 정도로 합성되지는 않았다(자료 미제시).

4.2 pYYM-Gag 1 발현벡터의 제조 및 발현

다음 시도로 p¹⁷ 유전자 자체만을 trpE 유전자의 3' 뒤에 넣어서 trpE-p¹⁷ 융합단백질을 만들기로 하고 그림 15 와 같은 방법으로 pYYM-Gag 1 발현벡터를 제조하였다. 이때 trpE 에 융합되는 p¹⁷ 유전자의 5' 과 3' 말단에 hydroxylamine culting site 가 있는 oligonucleotide 를 넣어주었다. 이렇게 함으로 해서 trpE-p¹⁷ 융합단백질이 생성된 후 hydroxylamine 으로 절단하면 우리가 원하는 Gag p¹⁷ 단백질만을 얻을 수 있게 된다.

이 발현벡터의 발현유도 결과 trpE-p¹⁷ 융합단백질이 coomasie-blue 염색한 gel 에서 분명한 band 로 보일만큼 다량 합성되었다(그림 22. lane G).

4.3 pYYM-Gag 2 발현벡터의 제조 및 발현

Gag protein 중 p¹⁷ 과 p²⁴ 모두 항원성이 높으므로 본 연구에서는 또한 p¹⁷ 과 p²⁴ 를 같이 생성시키는 발현벡터를 제조하기로 하였다.

그림 16 에 보는 것처럼 pYYM-Gag 1 발현벡터에 p²⁴ 유전자 부분을 연결시켜 pYYM-Gag 2 발현벡터를 제조하였다. 이 플라스미드는 trpE 프로모터의 조절을 받아 p¹⁷ 과 p²⁴ 단백질이 trpE 의 카르복실말단에 융합된 상태로 발현되게 된다. 또한 생성된 trpE-p¹⁷-p²⁴ 융합단백질을 hydroxylamine 으로 절단하면, 원하는 p¹⁷-p²⁴ 단백질을 얻을 수 있게 된다.

이 발현벡터를 발현유도한 결과 재조합 융합단백질이 SDS-polyacrylamide 겔에서 다른 단백질과 비교하였을 때 구별될 만큼 분명한 band 로 발현이 되었다(그림 22. lane H).

5. TrpE-Gag-Env 융합단백질 발현벡터의 제조 및 발현

앞부분에서 기술한 바와 같이 Gag p¹⁷ 유전자와 env p⁴¹ 유전자가 각각 trpE 유전자에 융합된 상태로 발현이 잘 되었으므로, 이번에는 gag p¹⁷ 유전자와 env p⁴¹ 유전자를 붙여서 trpE 유전자에 융합시켜 발현시키는 시도를 하였다.

5.1 pYYJM-gag / env 1 발현벡터의 제조

그림 17 에서 보는 것처럼 pYYM-gag 1 플라스미드에서 p¹⁷ 유전자의 Pvu II site 뒤에 env p⁴¹ 의 Hae III - Hind III 300 bp

절편을 frame 을 맞추어 삽입시켜 pYYJM - gag / env 1 발현벡터를 제조하였다.

이 플라스미드는 trp 프로모터의 조절을 받아 gag p¹⁷ 단백질과 env p⁴¹의 강한 면역성을 나타내는 epitope 부분을 trpE 단백질의 카르복실말단에 융합된 상태로 발현시키게 된다. 이 재조합 융합단백질을 hydroxylamine 으로 절단하면 원하는 Gag p¹⁷-env p⁴¹ 융합단백질이 얻어지게 된다.

5.2 pYYPM - gag / env 1 발현벡터의 제조

그림 18 에서 보는 것처럼 pYYM-gag 1 발현벡터의 Pvu II site 다음에 env gp 160 의 Bgl II - Hind III 520 bp 절편을 삽입시켜 pYYPM - gag / env 1 발현벡터를 제조하였다. 이 플라스미드는 trp 프로모터의 조절을 받아 gag p¹⁷ 단백질과, env gp 120 과 env p⁴¹의 강한 항원성을 나타내는 부분이 trpE 단백질의 카르복실말단에 융합된 상태로 발현되게 된다. 이 재조합융합단백질을 hydroxylamine 으로 절단하면 우리가 원하는 p¹⁷-gp 120 - p⁴¹ 융합단백질이 얻어지게 된다.

5.3 gag - env 융합발현벡터의 발현

위에서 제조한 TrpE - Gag - Env 융합단백질 발현벡터를 E. coli RR1 에서 발현시킨 결과를 그림 19 에 나타내었다. pYYPM gag/env 1 발현벡터의 발현유도결과 재조합 단백질이 SDS - polyacrylamide 겔에서 coomassie blue 염색에 의해서는 구별될

정도로 생성되지 않았다. 그러나 pYYJM gag/env1 발현벡터의 발현유도결과 61 KD 의 TrpE-p17-p41 융합단백질의 SDS-polyacrylamide 젤에서 분명한 band로 보일만큼 생성이 되었다.

6. protease 발현벡터의 제조 및 발현

6.1 protease 직접발현벡터의 제조 및 발현

그림 20 에서 보는 것처럼 protease 전체유전자를 pTTQ 19 vector 에 연결하여 pYHM-pro1 발현벡터를 제조하였다. 이 플라스미드는 tac promotor의 조절을 받아 protease 단백질을 생성하게 된다.

이 발현벡터의 발현유도결과 protease 단백질이 발현되지 않았다 (그림 24)

6.2 TrpE-protease 융합발현벡터의 제조 및 발현

다음 시도로 protease 유전자를 trpE 유전자의 3' end 다음에 연결하여 trpE-protease 융합발현을 시키기로 하고, 그림 21 에서 나타낸대로 pYHM-pro 2 발현벡터를 제조하였다. 이 플라스미드는 trp 프로모터의 조절을 받아 trpE-protease 융합단백질을 생성하게 된다.

이 발현벡터의 발현유도 결과 재조합융합단백질이 SDS-acrylamide 상에서 coomassie blue staining 에 의한 단백질 조사방법에는 나타나지 않았다.

제 4 장 결론 및 전의사항

HIV 의 각 유전인자의 발현 생성물의 항원성에 대한 실험은 gp 120 , gp 41 등의 envelope 구성물에 대하여 많은 실험이 이루어졌다. 이중 특히 gp 120 및 gp 41 의 각 부위에 대한 immunodominant epitope 에 관한 고찰이 많이 이루어졌으며, 이중 C-terminus 의 gp 120 과 N-terminus 의 gp 41 부위가 강한 항원성을 나타낸다는 사실이 알려졌다. 이러한 고찰은 각 epitope 부위를 β - gal 이나 tryp LE 에 융합단백질과 발현시킨 후 immunogenicity에 관한 실험 후 알려지기 시작하였다.^(10,11)

gp 41 의 연구에서 Hind III 위치의 3' 쪽에 대한 항원성의 실험에서 이 부분이 transmembrane 위치를 나타내며, 강한 항원성을 나타내나, 발현에는 성공치 못하였다는 보고가 있다. 이러한 사실로 발현에 대한 실험외에도, 많은 다른 방법을 이용하여 항원성의 유무에 관한 실험이 이루어졌다.

이러한 방법중, envelope 의 어떤 일정한 부위를 합성하여 이 합성된 peptide 를 이용하여 항원성 유무를 결정짓기도 하였다.⁽¹²⁾ 최근에 Charles Woad 등의 보고에 의하면⁽¹⁰⁾ gp 41 의 N-terminus 쪽의 51 아미노산이 강한 항원성을 나타낸다는 보고가 있으며, 또한 gp 120 의 C-terminus 쪽이 강한 항원성을 나타내는 보고가 있다.

이러한 일련의 보고를 토대로 하여 본 실험에서는 envelope (gp 120, gp 41) 및 gag (p¹⁷, p²⁴)의 각 restriction fragment 에 대한 항원성의 결정을 위하여, 여러 expression vector 를 이용하여 β -gal 및 trp E의 융합 단백질로서 *E. coli* 에서 발현시켰다.

그림 1 에서 보는바와 같이 HIV 의 envelope 에서 gp 120, gp 41 의 각 부위를 직접 발현시키거나, β -galactosidase 나, trypE 의 융합 단백질로서 발현시키는 실험을 하였다. 이곳에 사용된 발현벡터는 pTTQ 19, pCT 10 또는 pATH 1, 2, 3 를 이용하였다. envelope 의 직접 발현 실험에서, Env 1 - Env 4 까지를 발현시켰으며 이들의 cloning 방법은 그림 2, 3, 4, 5 에 나타나 있다. 이들은 전부 tac promoter 를 이용하여 발현을 시도하였으며, Inducer 로서 IPTG 를 이용하였다.

그림 6 에서는 pCT 10 벡터를 이용하여 350 아미노산, 50 아미노산을 coding 하는 env 부위를 β -galactosidase 와 결합시켜서 Tac promoter 를 이용하여 발현시켰다.

그림 7 에서는 gp 120 과 gp 41 의 부분을 pTac 에서 발현시키는 cloning 의 모식도이며, gp 120 의 3' 쪽의 Bgl II 에서 부터 gp 41 의 5' 쪽 Bam H I 쪽의 단편을 pTTQ 발현벡터의 Pst I, EcoR I 위치에 넣은 것이다. 이 부위는 현재 까지 나타난 바에 의하면 gp 120 과 gp 41 의 강한 항원성을 나타낸다는 사실이 알려졌다. AIDS 환자의 혈청과도 강한 결합을 한다는 사실도 알려졌다.

이외에도 envelope 의 각 부위를 발현시키기 위하여 trp E 와의 융합단백질로서의 발현도 시도하였다. 그림 1 의 Env- Trp E fusion 에서 보는바와 같이 gp120 및 gp41 의 각 부위를 TrpE vector 인 pATH 발현 vector 에 cloning시켰다. 그림 9, 10, 11, 12, 13 은 이들 단편의 PATH 에의 cloning 을 나타낸 것으로 hydroxylamine site 를 넣어서 발현후에도 envelope 단백질을 용이하게 분리시키게끔 cloning 하였다.

그림 14, 15, 16 은 gag 부위의 발현을 위한 cloning 을 나타낸 것이다. 이들은 gag 부위의 p¹⁷, p²⁴, p¹⁵ 의 Pvu II 절편, Cla I - Rsa I, 절편, 또한 Cla I - Rsa I 절편에 p²⁴ 의 Hind III 절편을 연결시킨 pYYM-gag 2 를 cloning 하였다.

이렇게하여 발현을 시도한 결과는 그림 22 에 나타나 있으며, p¹⁷ 의 Cla I - Rsa I 과 p¹⁷ 과 p²⁴ 의 융합단백질인 Cla I - Hind III 부위가 발현이 됨을 알 수 있다. 이러한 사실을 이용하여 p¹⁷ 과 gp41 및 gp120 의 단편을 gag 에 연결시키는 cloning 을 시도하였다. 그림 17 과 18 에서 보는 바와 같이 gp41 의 Hind III - Hae III 절편과 gp120 - gp41 을 포함하는 Pst I - Hind III fragment 를 p¹⁷ 과 연결시켜 cloning 하였다. 이외에도 pTTQ 19 과 pATH 2 를 이용하여 protease 와 reverse transcriptase 를 발현시키기 위한 cloning 을 시도하였다 (그림 20, 21 참조).

위의 모든 제조된 발현벡터에의 envelope gp120 과 cloning gp41 및 gag 유전인자 및 protease, RTase 에 대한

직접 또는 융합단백질로의 발현결과는 그림 22 와 23 에 종합적으로 나타나있고 Table 에 종합적으로 결과가 나타나 있다.

그림 22 에서 trpE 에 융합시킨 envelope 유전인자 절편의 발현 및 gag 유전인자의 발현 결과를 나타내었으며, SDS - PAGE 상에 발현된 융합단백질을 발견할 수 있다.

그림 23 의 HIV - env 의 pTTQ19 벡터를 이용한 직접 발현에서도 env gp120 의 N - terminus 쪽의 발현은 가능한 것으로 나타나 있다.

이상의 모든 결과는 AIDS 진단시약 개발의 1 차년도 연구 결과이며, 발현된 HIV I 의 env 및 gag 또한 env - gag 단백질의 정제를 가능케 함으로서 항원으로의 이용을 도모하여 항원 - 항체 반응을 이용한 진단시약 개발에 박차를 가할 수 있다.

참 고 문 헌

- (1) Lee, Ratner, et al.(1985) Nature 313, 277
- (2) Mamatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.(1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY
- (3) Hanahan, D.(1983) J. Mol. Biol. 166, 557
- (4) Cohen, S.N., Chang, A.C. and Hsu, L.(1972) Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 2110
- (5) Dagert, M. and Ehrlich, S.D.(1976) Gene 6, 23
- (6) Birnboim, H.C., and Doly, J.(1979) Nucl. Acids. Res. 7, 153
- (7) Laemmli, U.K.(1970) Nature 227, 680
- (8) Cabradilla, C.D., Groopman, J.E., Lanigan, J., Renz, M. Lasky, L.A. and Capon, D.J.(1986) Bio/Technology 4, 128
- (9) Certa, U., Bannwarth, W., Stuber, D., Gentz, R., Lanzer, M., LeGrice, S., Guillot, F., Wendler, I., Hunsman, G., Bujard, H. and Mous, J.(1986) EMBO J. 5, 3051
- (10) Michael G. Windheuser and Charles Wood(1988) Gene 64, 107.

- (11) Cabradilla, C.D., Groopman, J.E., Lanigen, J., Renz, M., Lasky L.A. and Capon, D.J.(1986). *Biotechnology* 4, 128.
- (12) Certa, U. Bannwarth, W. Stuber, D. Gentz, R., Lanzer, M. LeGrice, S., Guillot, F., Wendler and Mous, J.(1986) *EMBO J.* 5, 3051.

그림 및 표

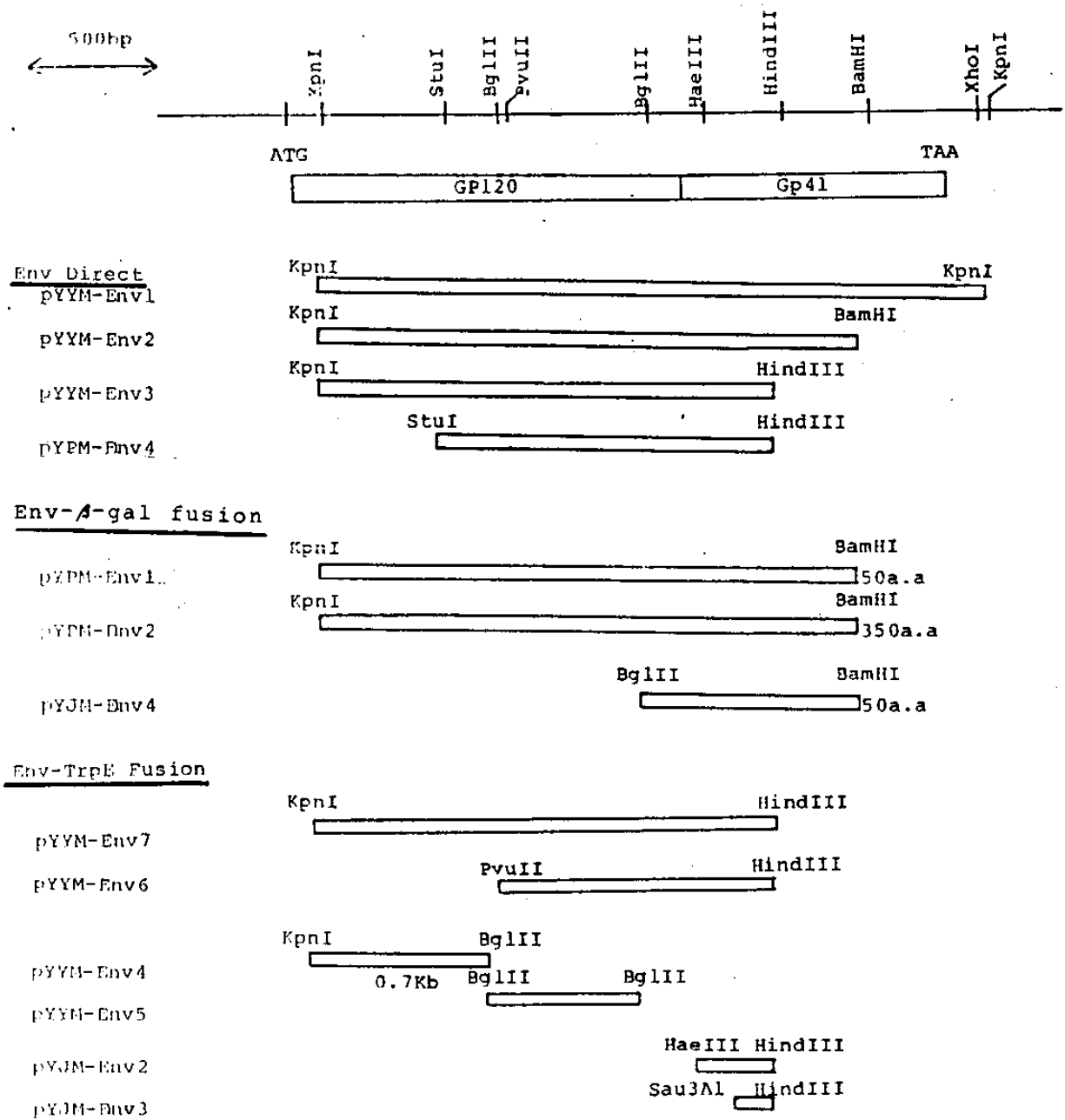


그림 1. env gp160 유전자의 제한효소지도 및 cloning 한 단편들.

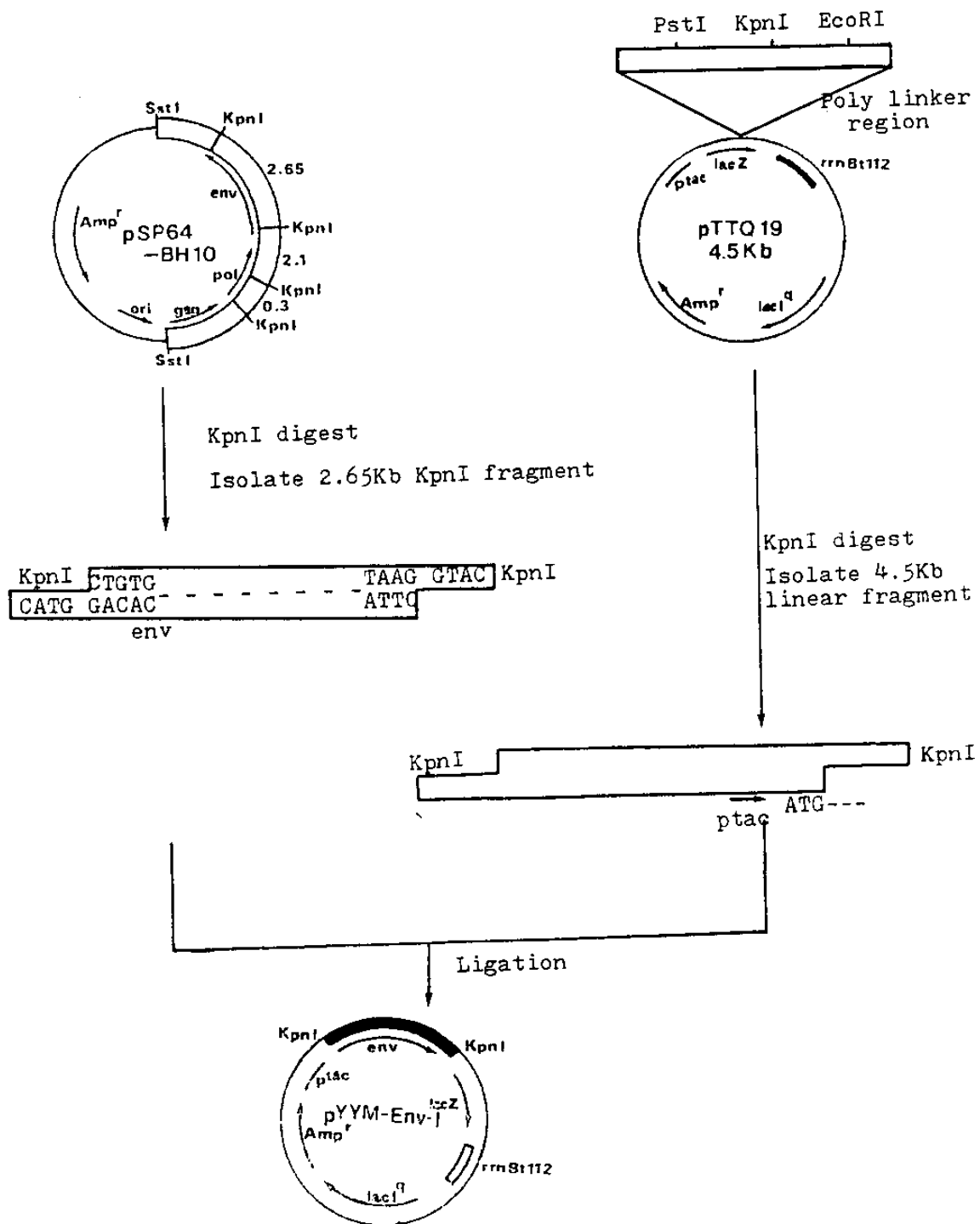


그림 2 . pYYM-env1 발현벡터의 제조

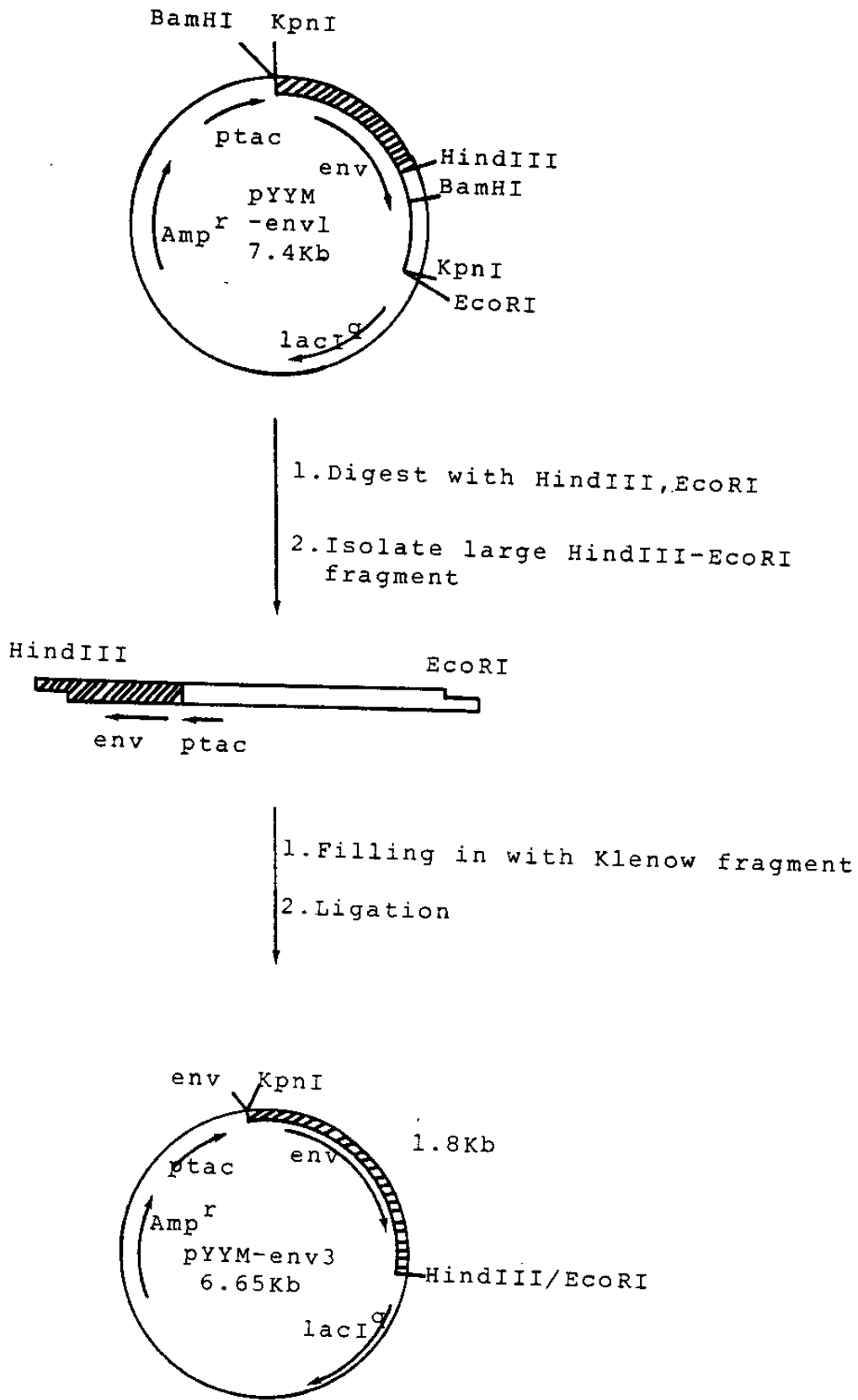


그림 3. pYYM-env3 발현벡터의 제조

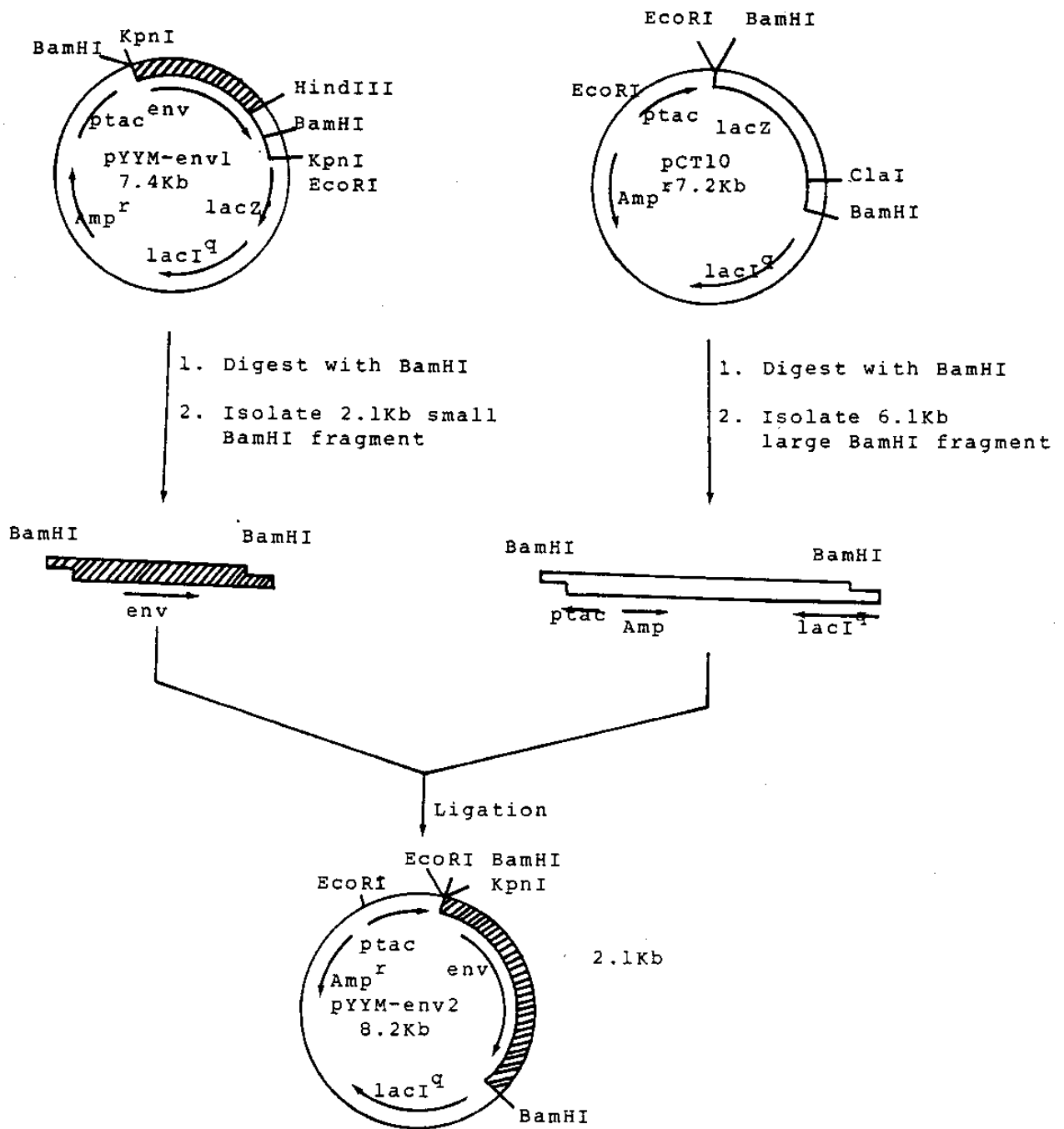


그림 4. pYYM-env 2 발현벡터의 제조

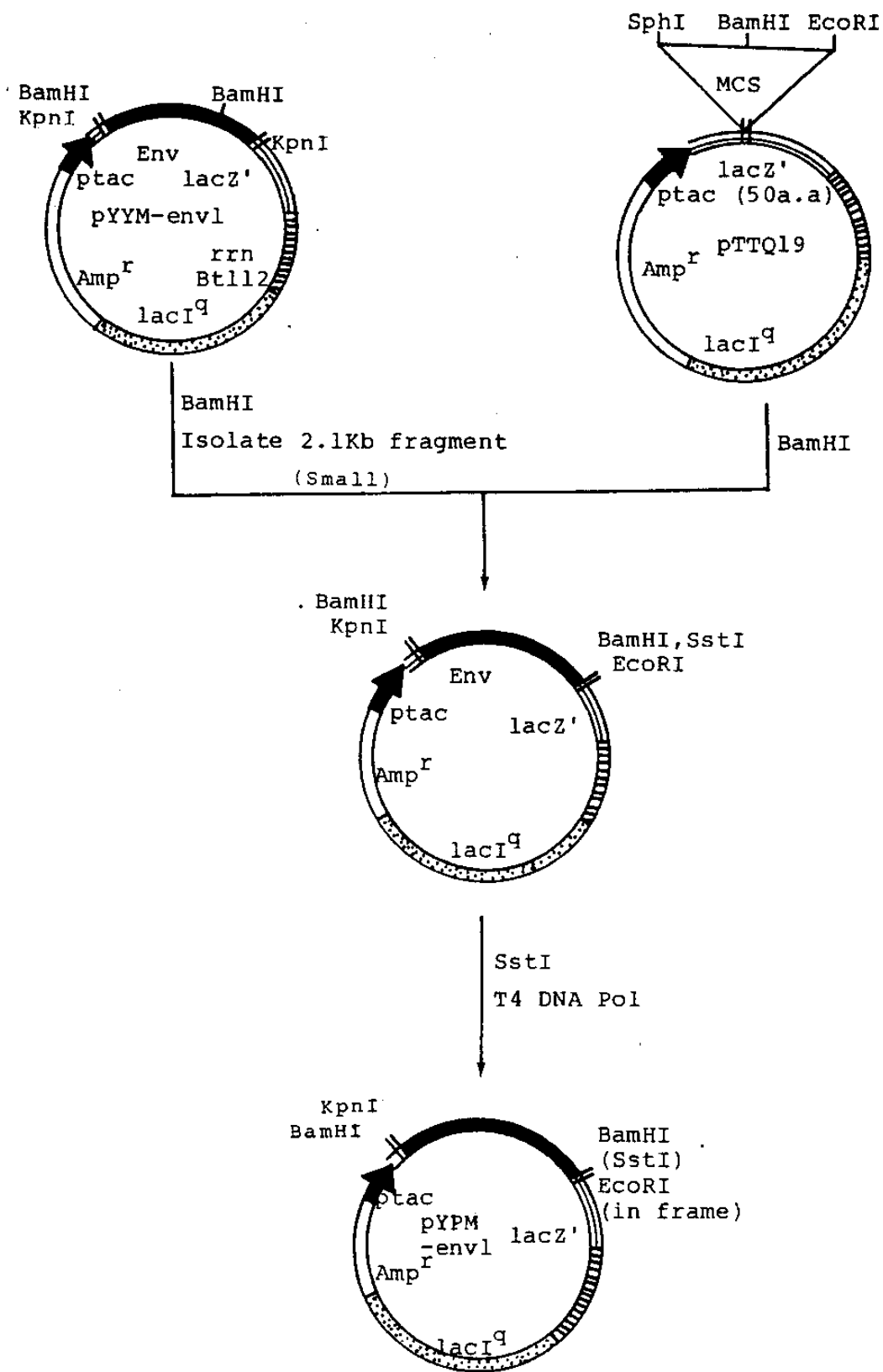


그림 5. pYPM-env1 발현벡터의 제조

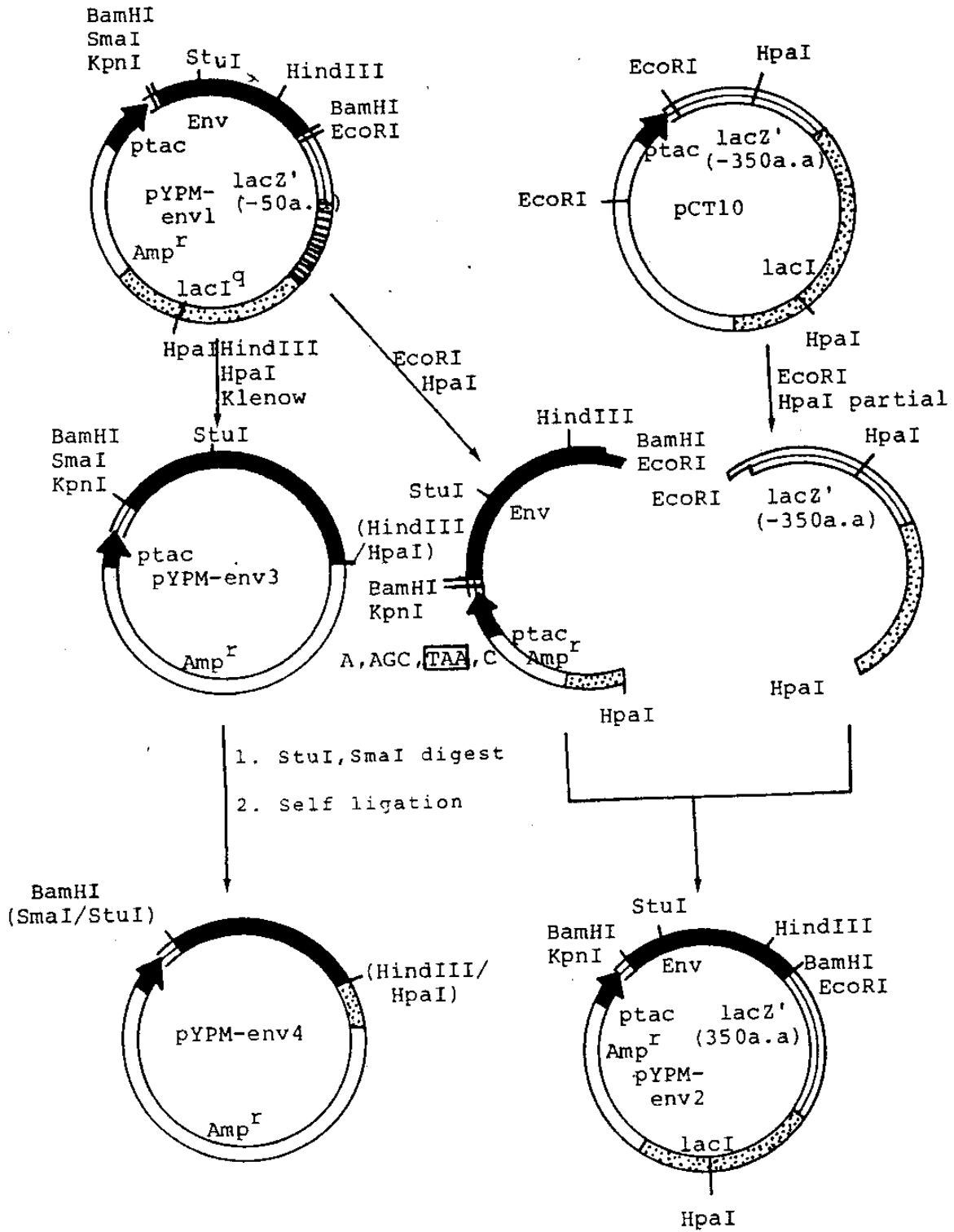


그림 6. pYPM-env 2, pYPM-env 4 발현벡터의 제조

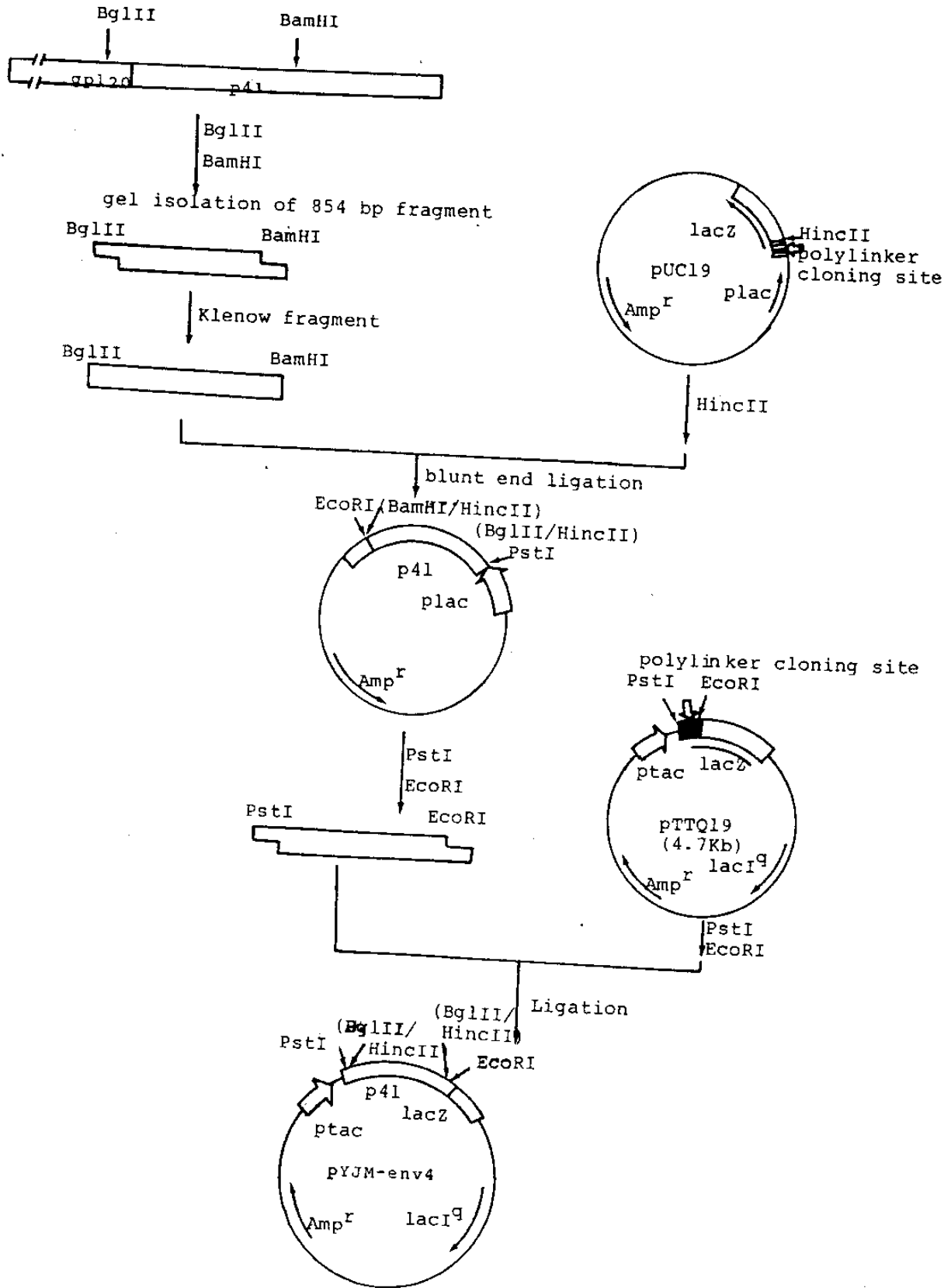


그림 7. pYJM-env 4 발현벡터의 제조

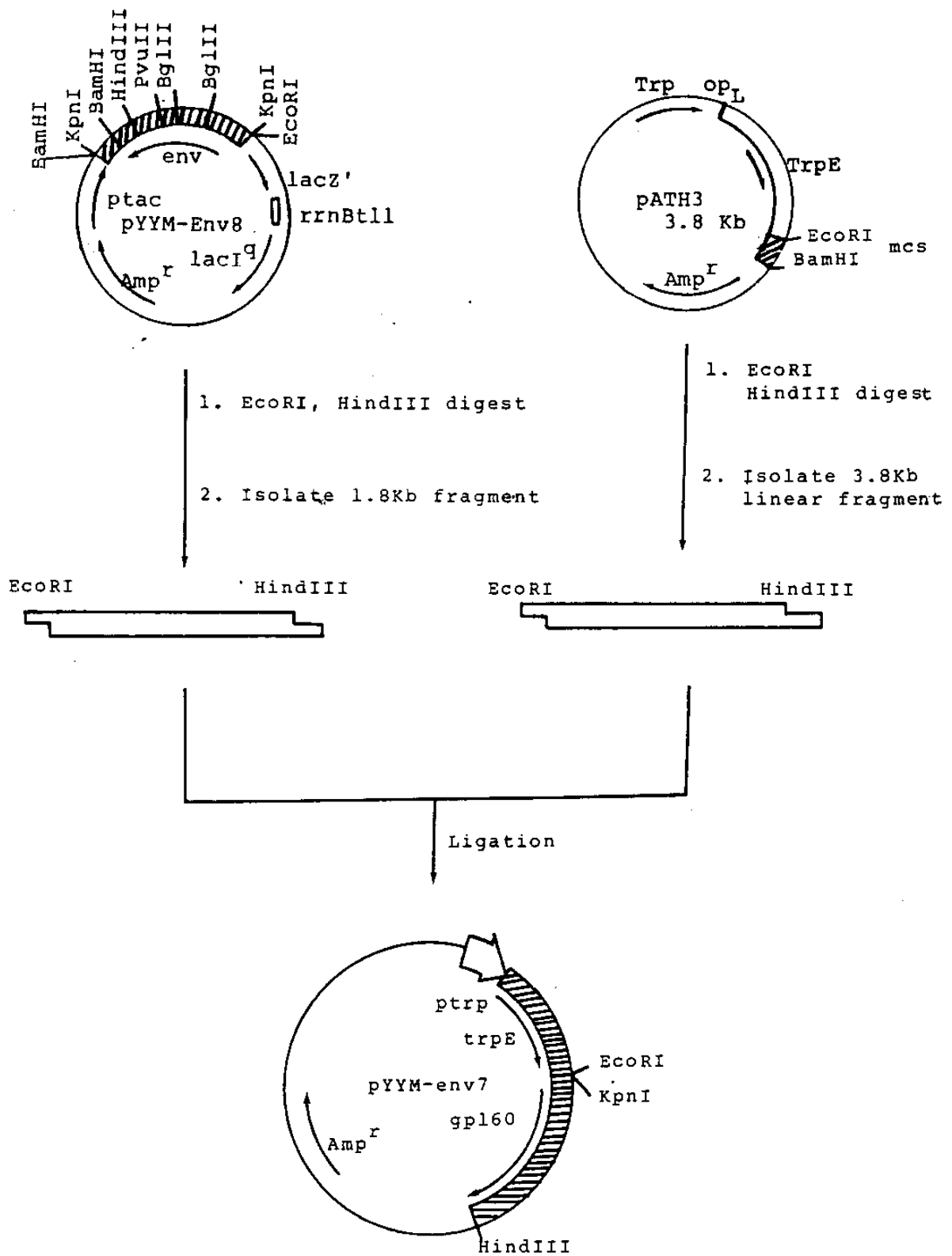


그림 8. pYYM-env7 발현벡터의 제조

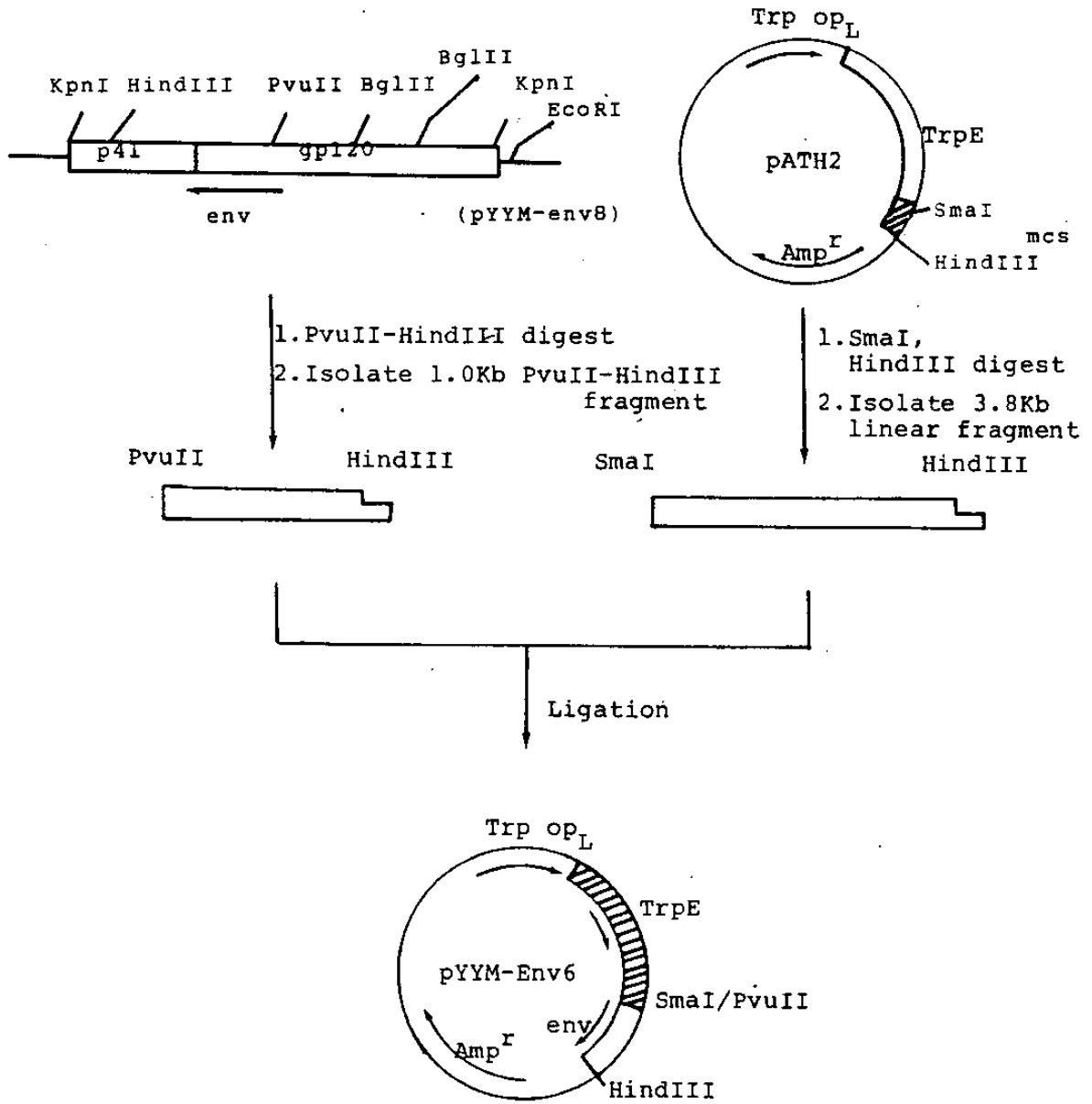


그림 9. pYYM-env 6 발현벡터의 제조

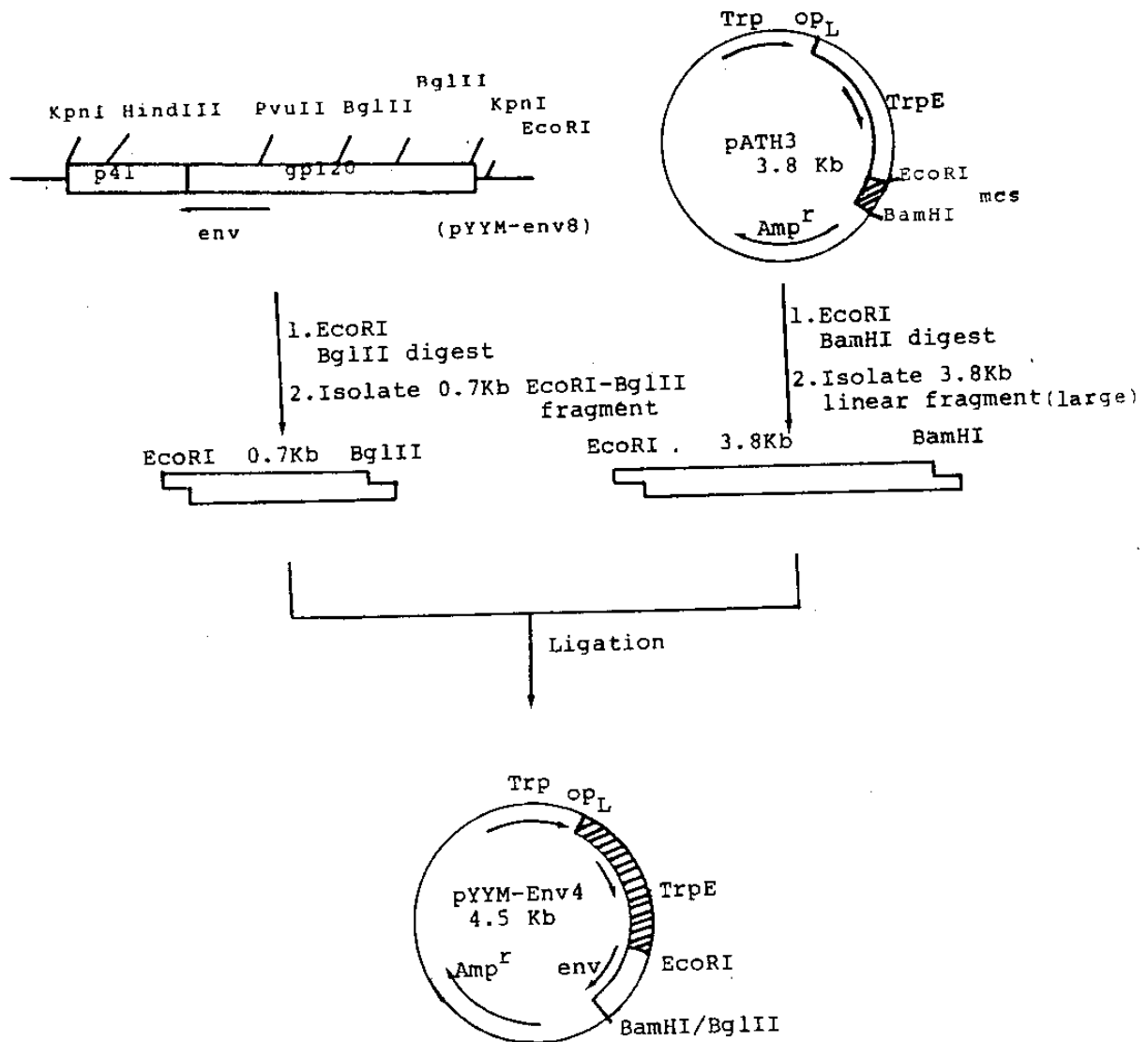


그림 10. pYYM-env 4 발현 벡터의 제조

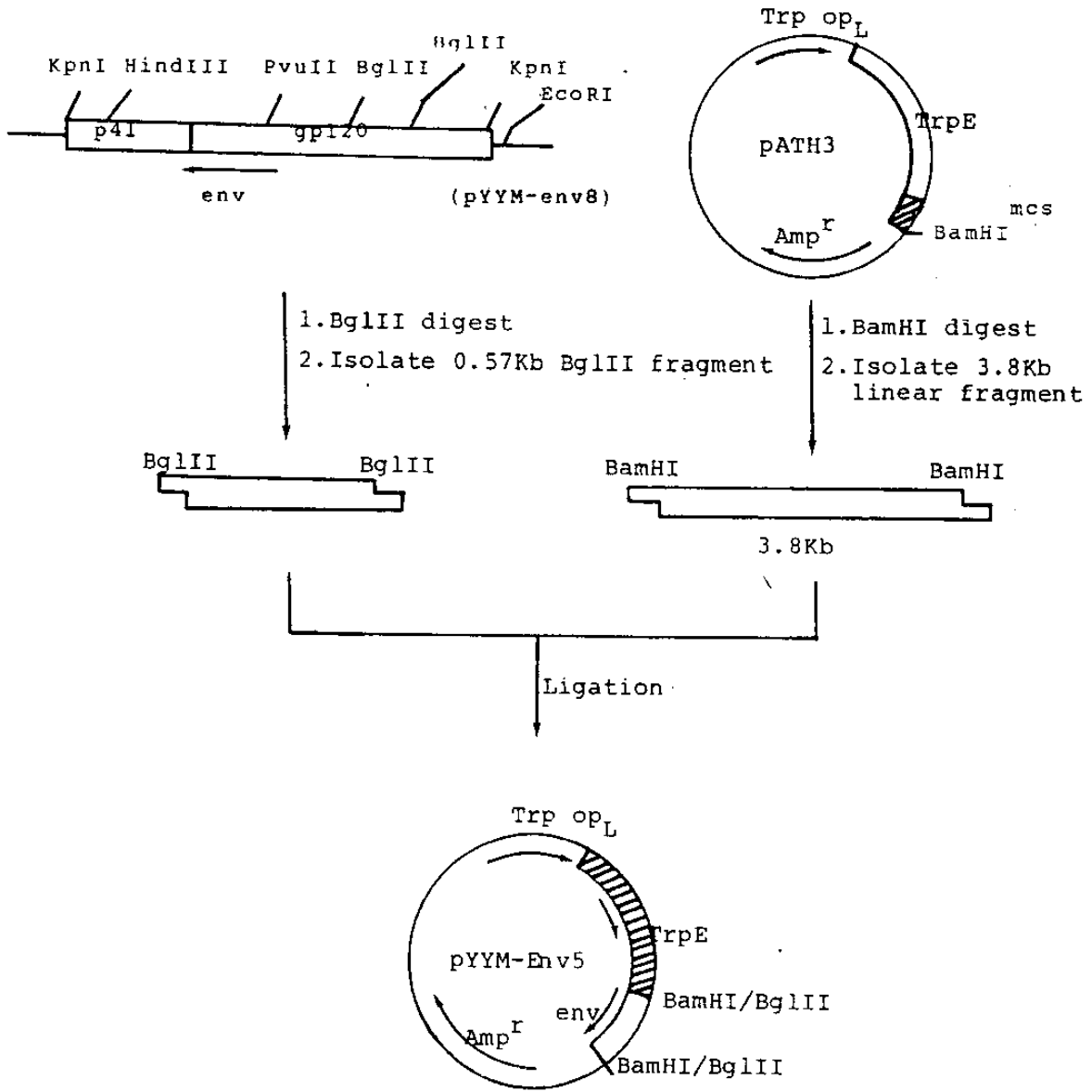


그림 11. pYYM-env 5 발현 벡터의 제조

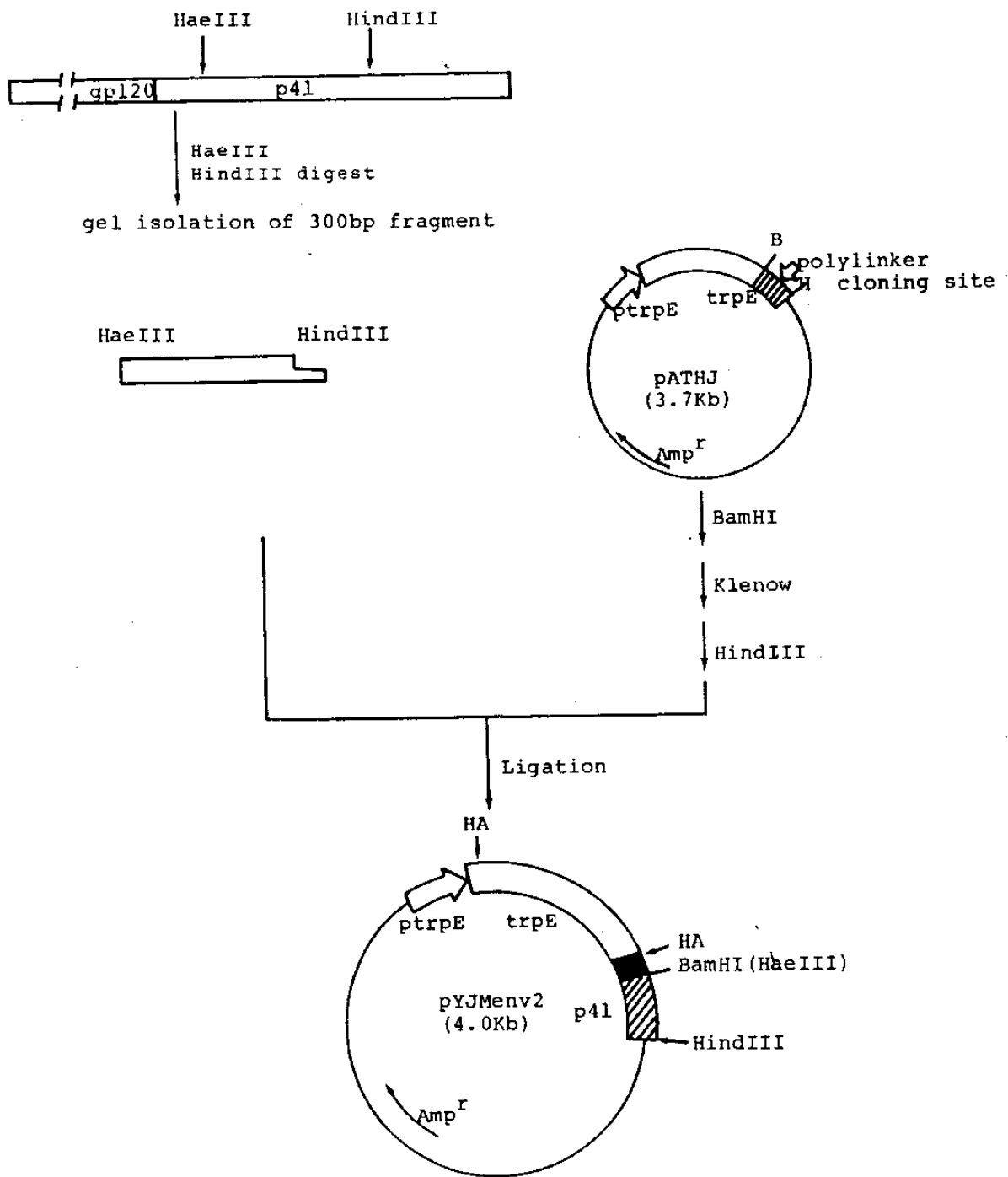


그림 12. pYJM-env 2 발현벡터의 제조

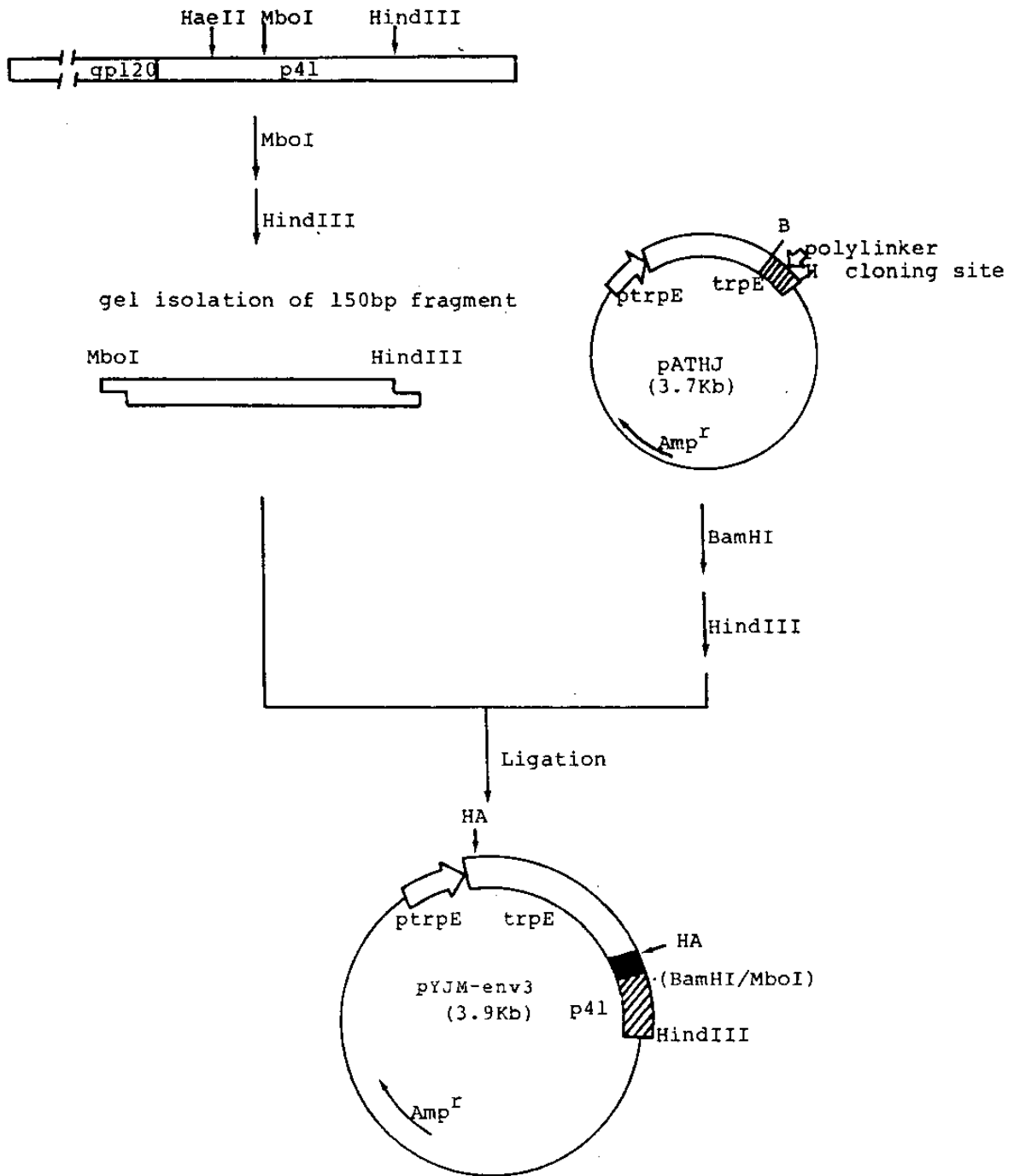


그림 13. pYJM-env 2 발현벡터의 제조

Construction of pYJMgag1 expression plasmid

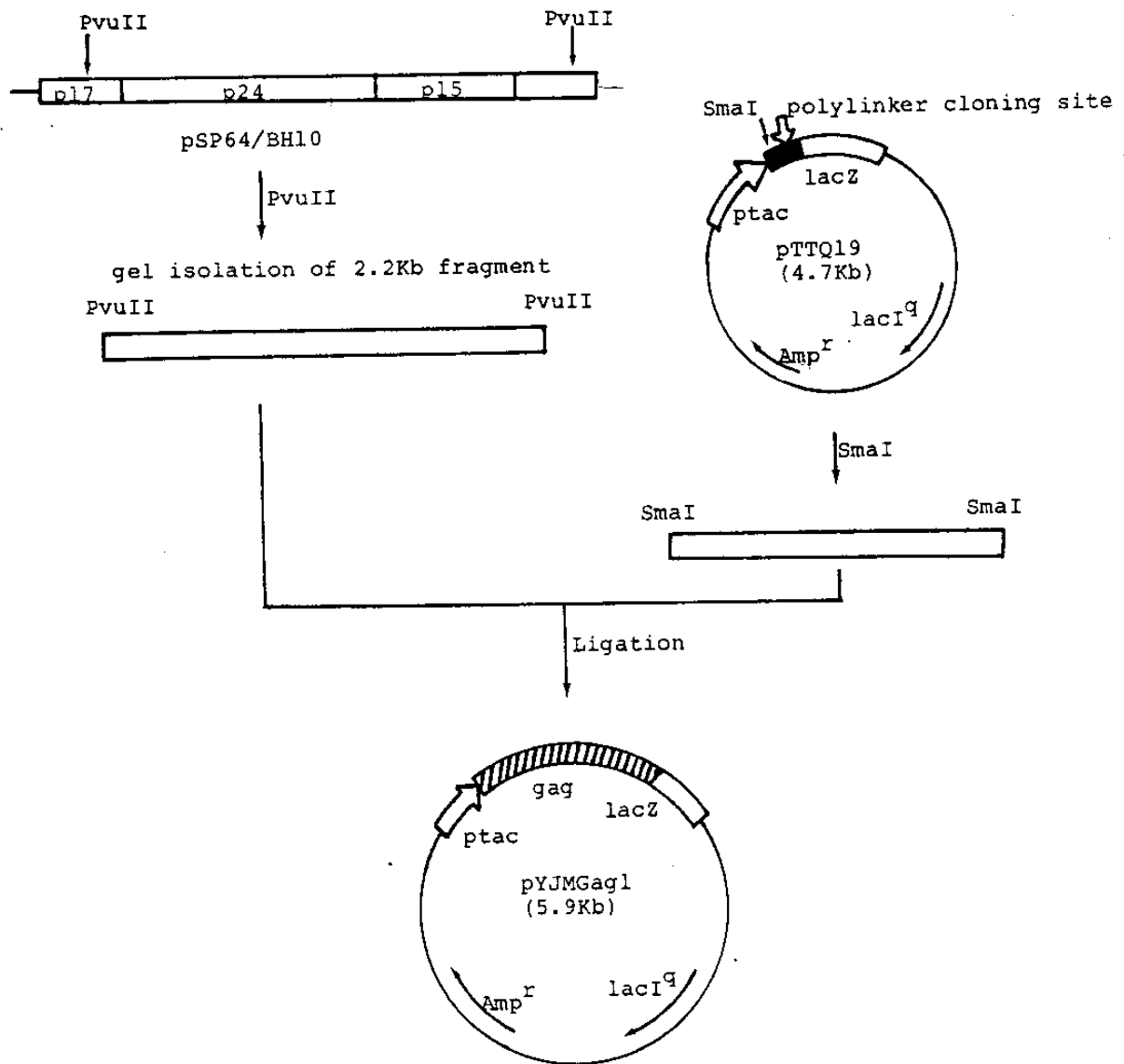


그림 14. pYJM-Gag 1 발현벡터의 제조

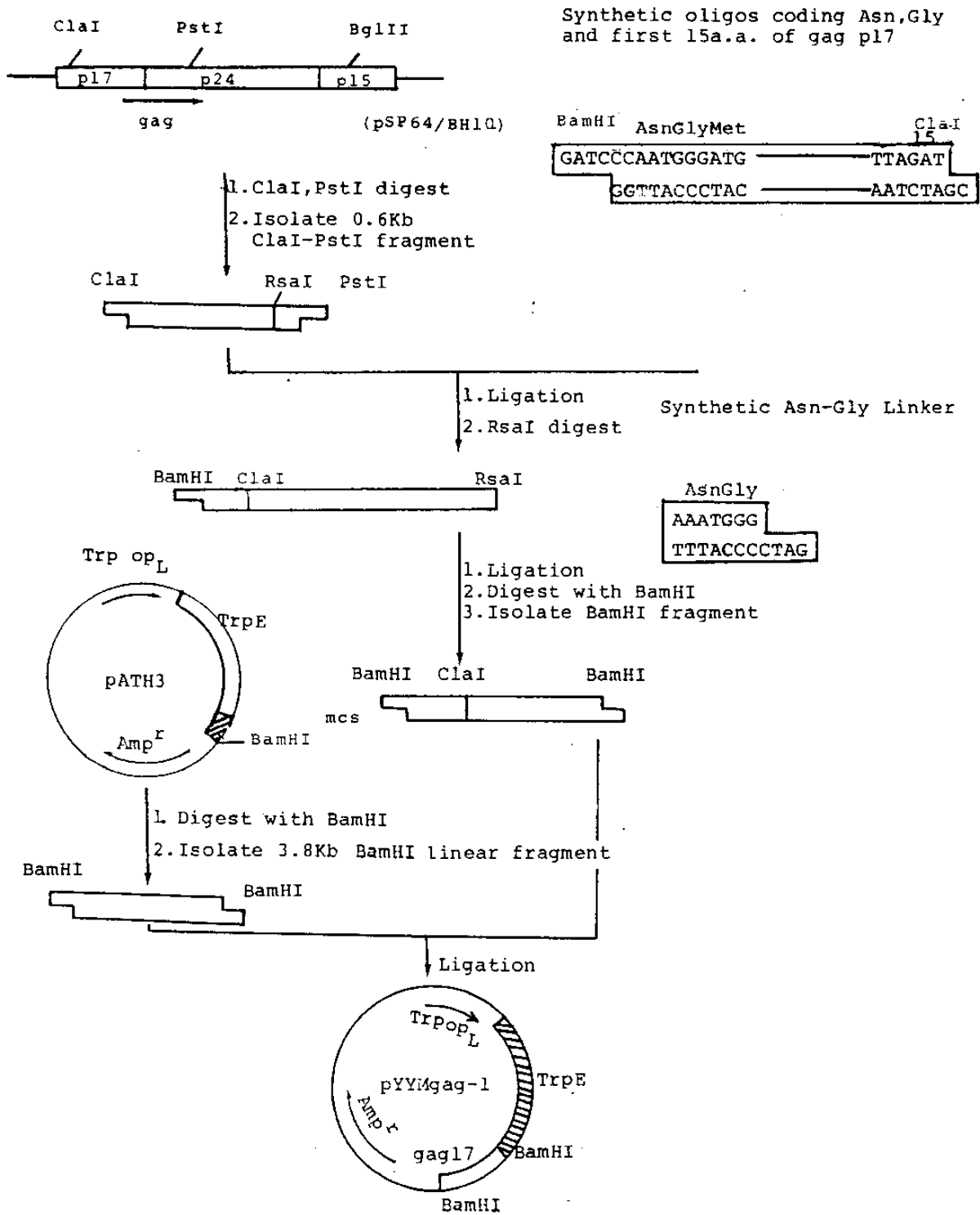


그림 15. pYYM-Gag 1 발현 벡터의 제조

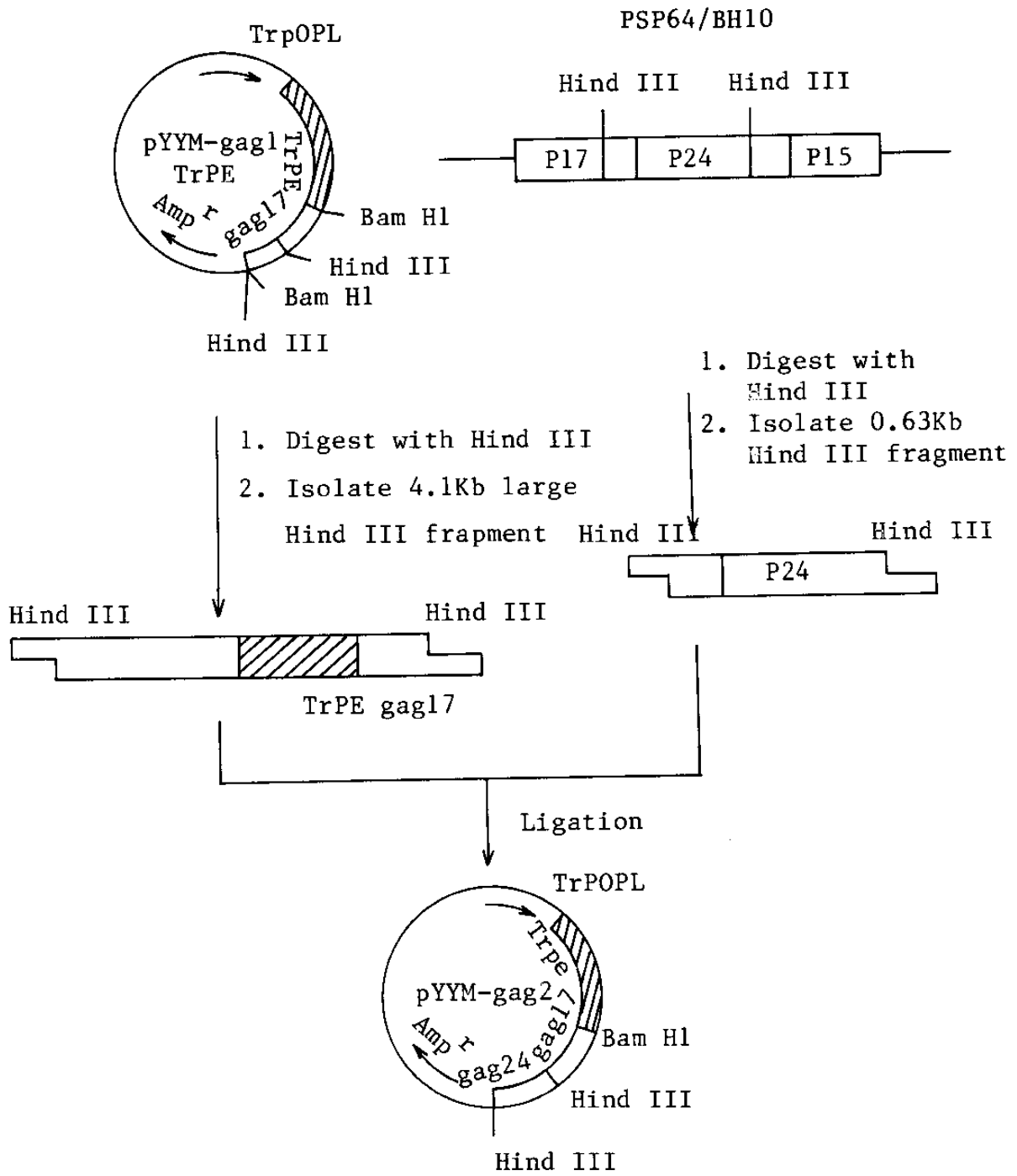


그림 16. pYYM-Gag 2 발현벡터의 제조방법

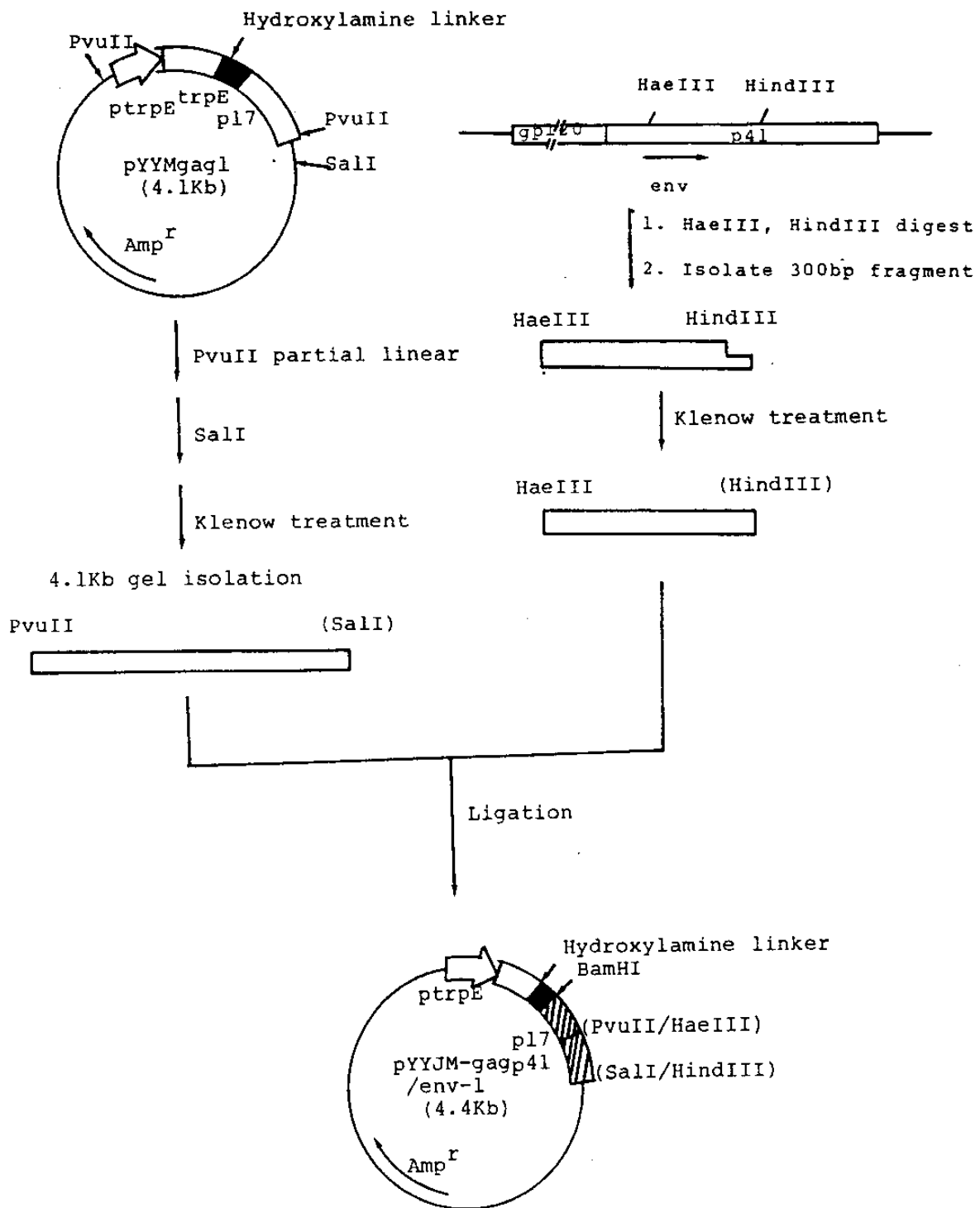


그림 17. pYYJM-Gag / env 1 발현백터의 제조

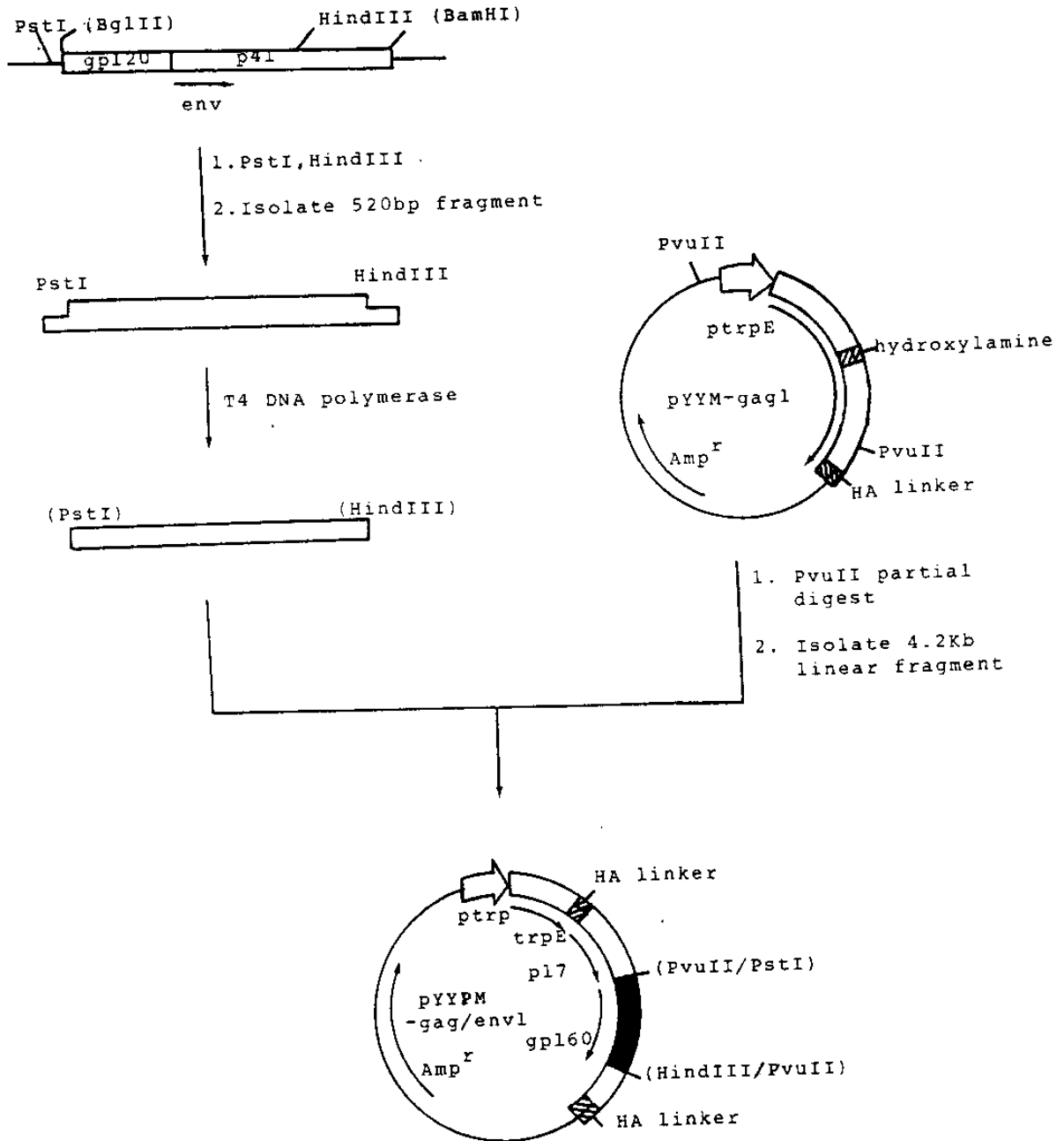


그림 18. pYYPM-Gag / env 1 발현벡터의 제조

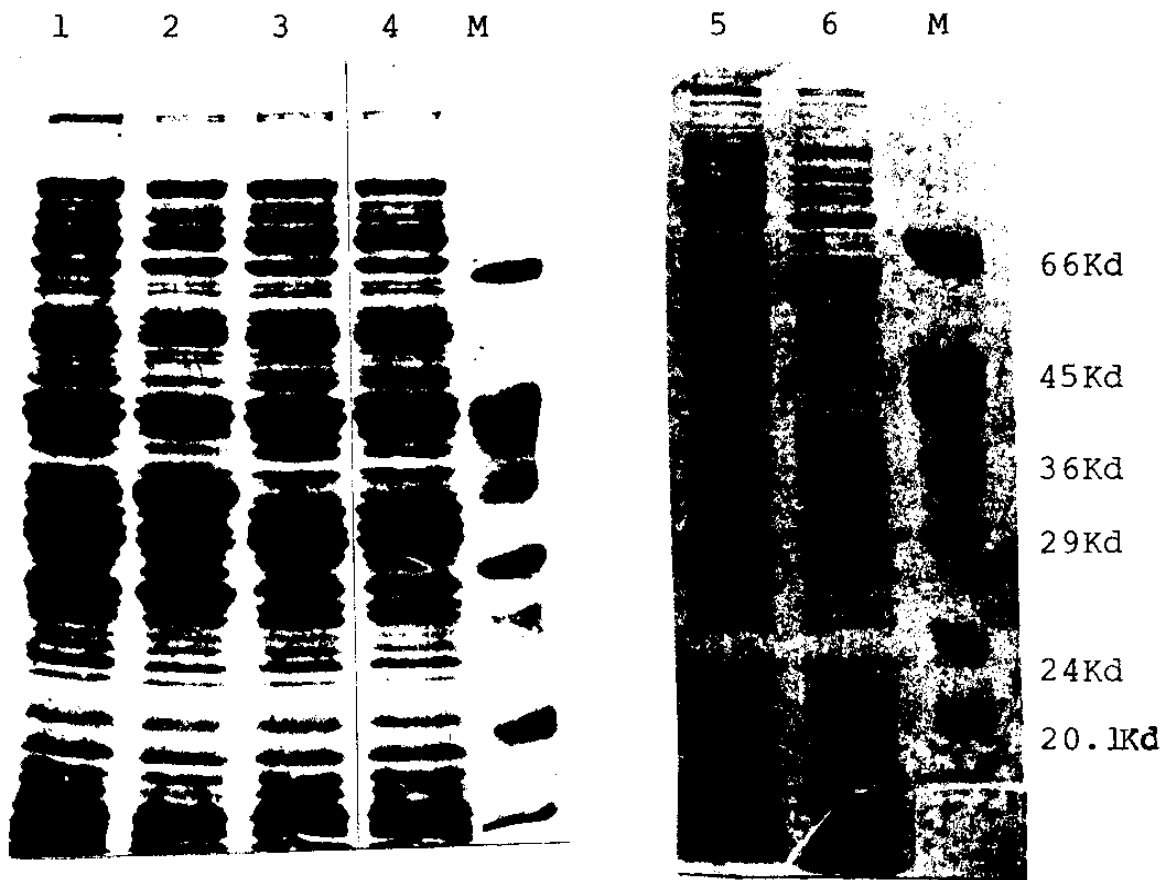


그림 19. pYYPM Gag/env1 발현백터와 pYYJM gag/env1 발현백터의 *E. coli* RR1에서의 발현

M: Size marker

1: pATH2: uninduced

2: pATH2: induced

3: pYYPM gag/env1: uninduced

4: pYYPM gag/env1: induced

5: pYYJM gag/env1: uninduced

6: pYYJM gag/env1: induced

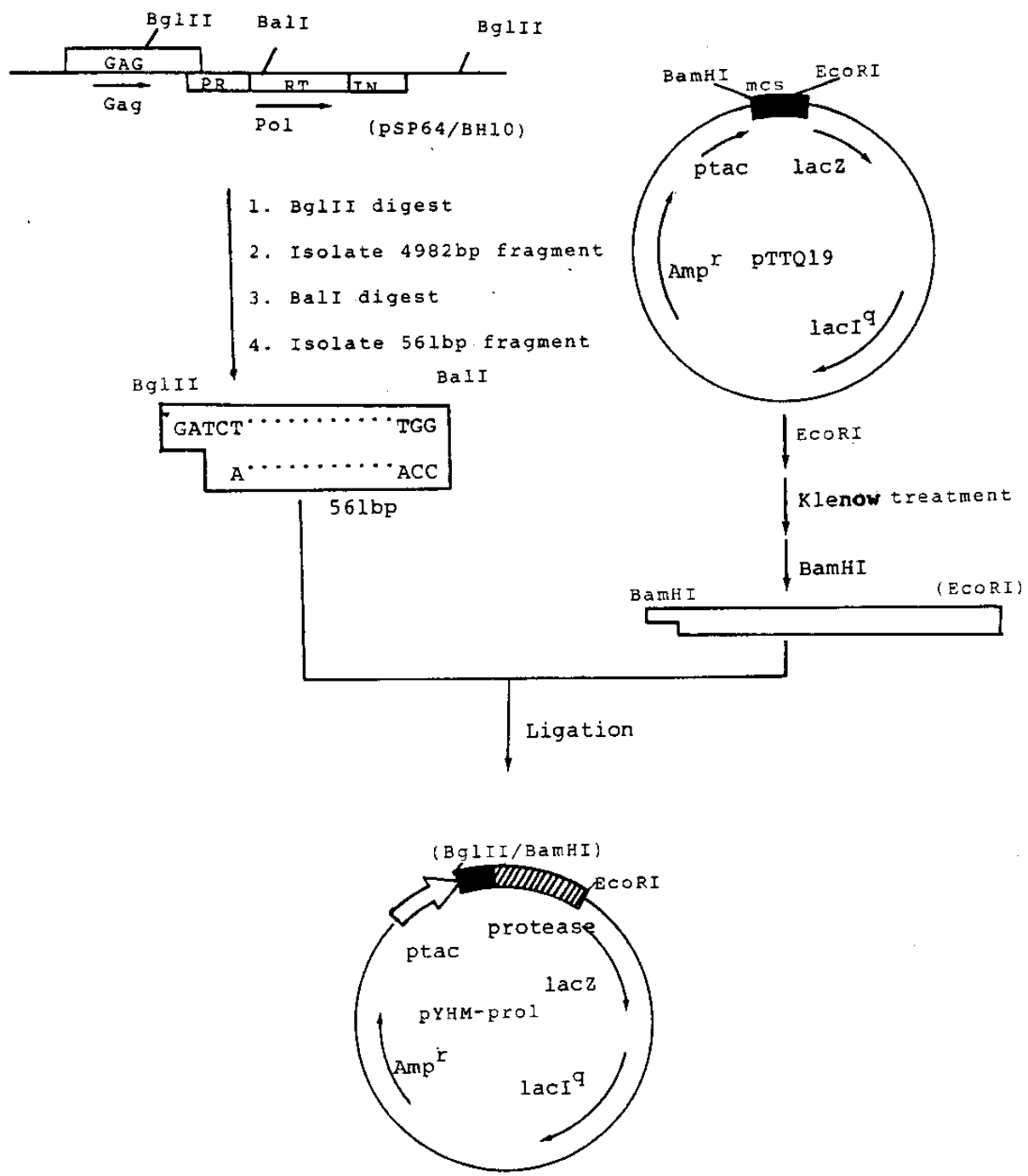


그림 20. pYHM-Pro 1 발현벡터의 제조

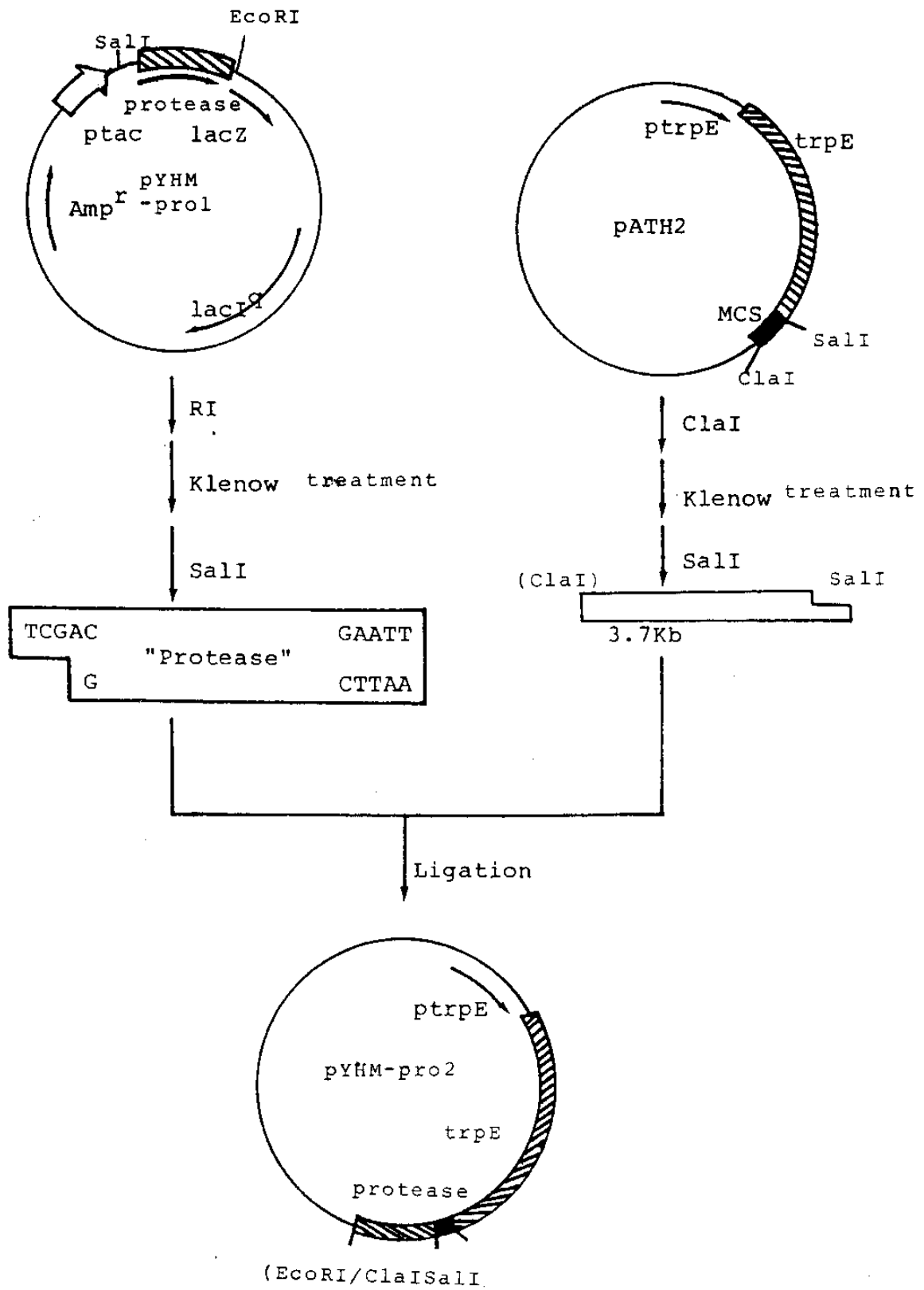
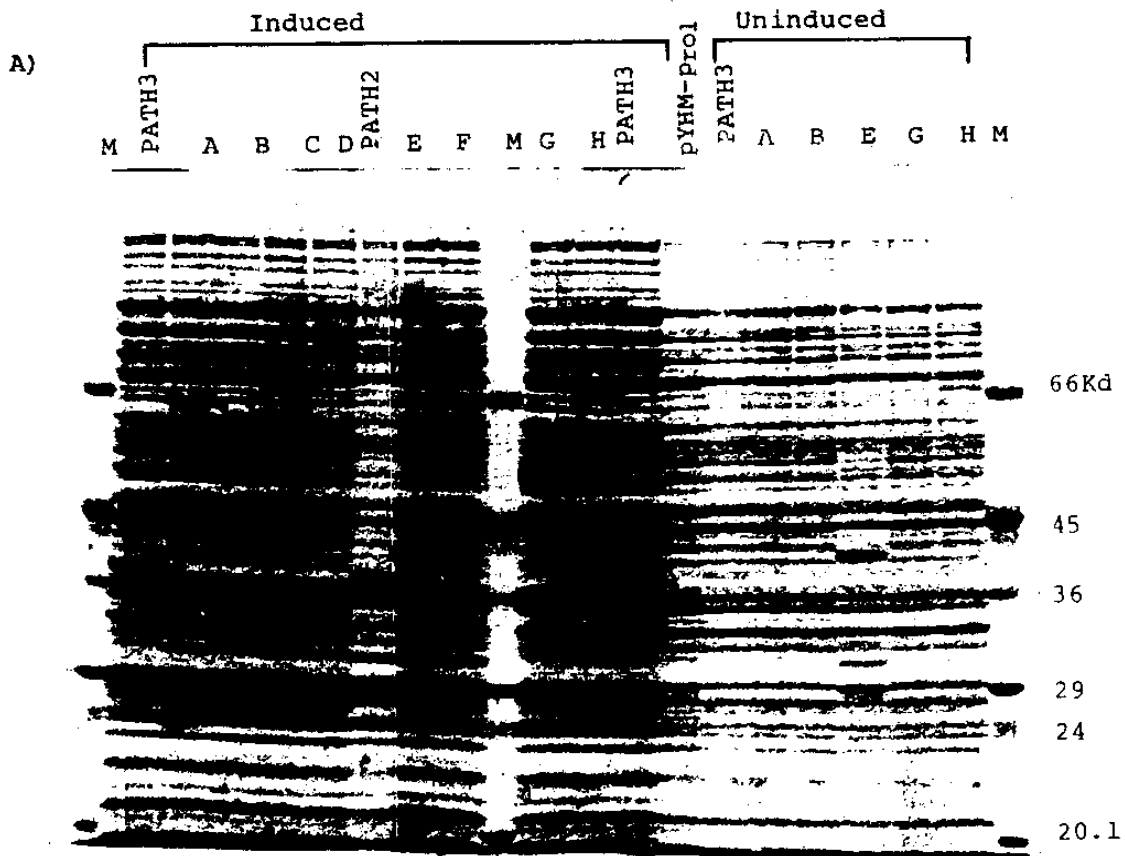


그림 21. pYHM-Pro 2 발현벡터의 제조



B)

Subcloning of HIV-Env Gag gene fragments into TrpE fusion vector

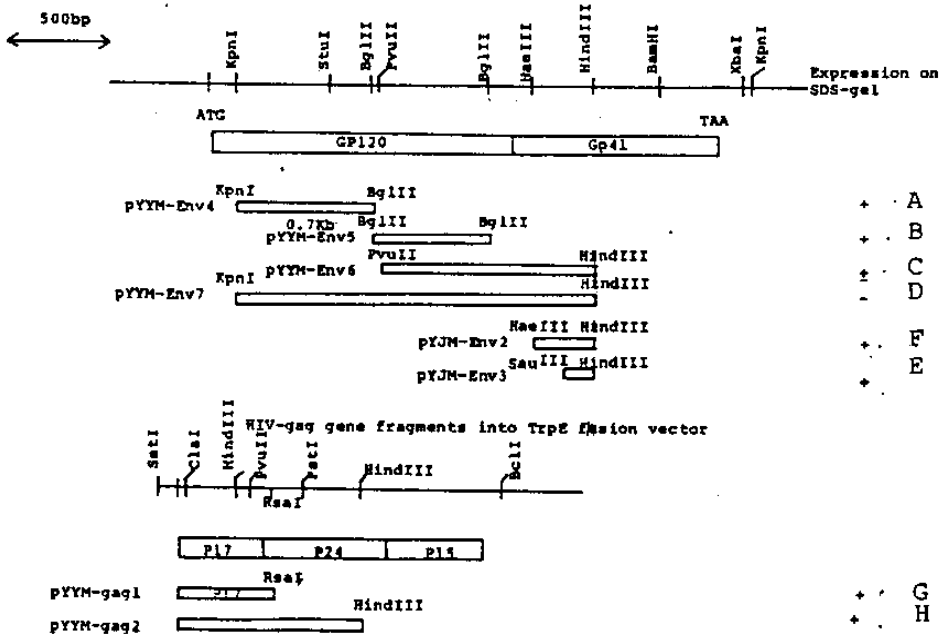
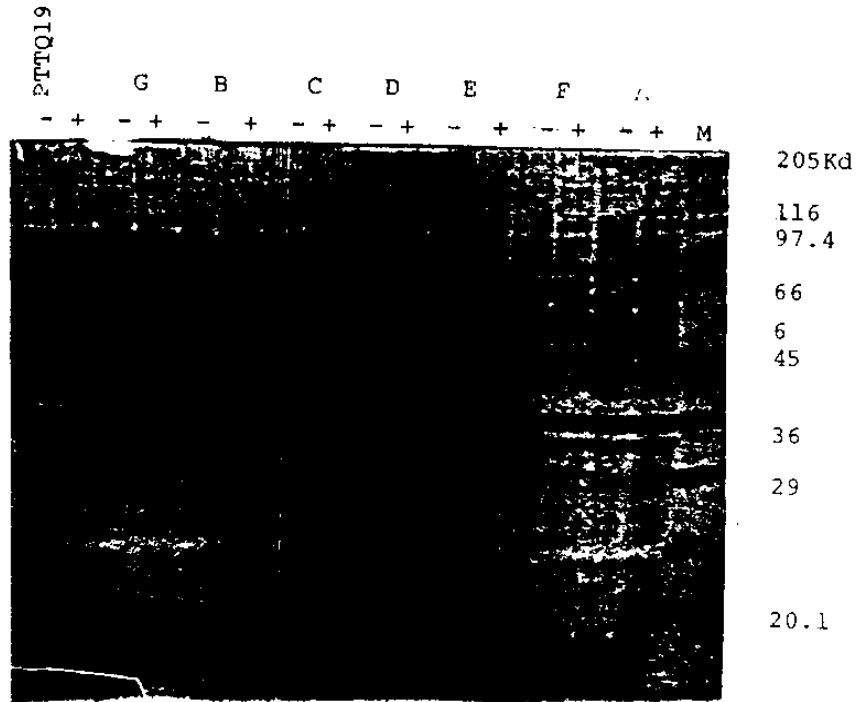


그림 22. A) 클로닝된 HIV 유전인자의 발현 (lane 설명은 B에 있음)

B) Trp E 융합벡터에 subcloning 된 HIV-env, gag, pro 유전인자의 단편들.

A)



-: Uninduced, +: Induced

B)

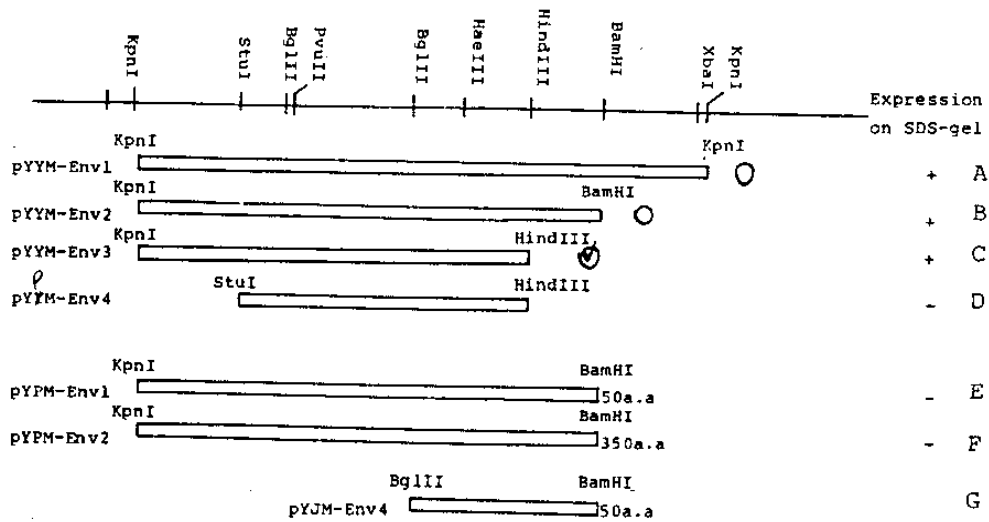


그림 23. A) 클로닝된 HIV 유전인자의 발현 (lane 설명은 B에 있음)
 B) pTTQ19 벡터에 직접 발현시킨, 또는 β -갈락토시다제에 융합발현시킨 HIV-env 유전인자의 단편들.

표 1. 제조한 발원벡터와 발현에 사용한 host와 발현결과 요약

Recombinant Plasmid	Host	Vector	Insert size / Restriction Enzyme	Protein Direct Fusion	Gene	Expression
pYYM-env1	HB101	pTTQ19	2.65Kb/KpnI-KpnI	○	env	+
pYYM-env2	HB101	pTTQ19	2.1Kb/KpnI-BamHI	○	env	+
pYYM-env3	HB101	pTTQ19	1.8Kb/KpnI-HindIII	○	env	+
pYYM-env4	HB101	pATH3	0.7Kb/KpnI-BglII		env	+
pYYM-env5	HB101	pATH3	0.57Kb/BglII-BglII		env	+
pYYM-env6	HB101	pATH2	1.0Kb/PvuII-HindIII		env	-
pYYM-env7	HB101	pATH3	1.8Kb/KpnI-HindIII		env	-
pYJM-env2	RRI	pATH2	0.3Kb/HaeIII-HindIII		env	-
pYJM-env3	RRI	pATH2	0.15Kb/Sau3AI-HindIII		env	+
pYJM-env4	JM109	pTTQ19	0.85Kb/BglII-BamHI	○	env	-
pYPM-env1	JM109	pTTQ19	2.1Kb/KpnI-BamHI		env	-
pYPM-env2	JM109	pTTQ19	2.1Kb/KpnI-BamHI		env	-
pYPM-env3	JM109	pTTQ19	1.8Kb/KpnI-HindIII	○	env	-
pYPM-env4	JM109	pTTQ19	1.3Kb/StuI-HindIII	○	env	-
<hr/>						
pYYM-gag1	HB101	pATH3	0.45Kb/RsaI		gag	+
pYYM-gag2	HB101	pATH3	0.92Kb/HindIII		gag	+
pYJM-gag1	JM109	pTTQ19	2.2Kb/PvuII-PvuII	○	gag	-
<hr/>						
pYHM-pro1	JM109	pTTQ19	0.56Kb/BamHI-EcoRI		pro	-
pYHM-pro2	JM109	pATH2	0.56Kb/SalI-ClaI		pro	-
<hr/>						
pYYJM-gag/env1	HB101	pYYM-gag1	0.3Kb/HaeIII-HmdIII		gag·env	+
pYYPM-gag/env1	HB101	pYYM-gag1	0.85Kb/BglII-HindIII		gag·env	-

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 한다.