



# Pre-S를 이용한 간염백신 개발

Studies on the Development of Hepatitis  
Vaccine Production with Pre-S

1987. 4

한국 과학기술원  
부설 유전공학센터



## 배 포 선

사 본 번 호	부 수	배 포 처
1/15 ~ 2/15	2	유전 공학센터    기술정책실    영구보존용
3 / 15	1	유전 공학센터    기술정책실    참고용
4/15 ~ 7/15	4	유전 공학센터    기술정책실    보관용
8/15 ~ 9/15	2	유전 공학센터    분자생물학    연구실
10/15 ~ 15/15	(6)	기 타



T  
KRIB  
87-  
19

GERI

## 제 출 문

한국과학기술원

부설 유전공학센터 소장 귀하

본 보고서를 “Pre-S 를 이용한 간염백신 개발”의 사업의 최종 보고서로 제출합니다.

1987년 4월

연구책임자 : 유명희 ( 유전공학센터 분자생물학연구실 선임연구원 )

연구원 : 최영철 ( 유전공학센터 분자생물부연구실 연구원 )

이상철 ( 유전공학센터 분자생물학연구실 연구원 )



# 요 약 문

## I. 제 목

Pre-S 를 이용한 간염 백신의 개발

## II. 연구 개발의 목적 및 중요성

간염 바이러스의 표면항원중 항원성이 높은 pre-S 부분의 DNA를 플라스미드에 재조합하여 대장균에서 발현 최적화 및 안정화하는 연구를 행한다. 동시에 발현 단백질의 정제 시도 및 동물에서의 면역반응 실험을 행하여 간염 백신으로서의 개발 가능성을 연구한다.

유전공학을 통해서 생체활성물질을 생산할 때 최종 발현 단백질을 안정화하는 것은 수율을 최적화하는데 중요한 문제이다. 목적 대상의 단백질을  $\beta$ -galactosidase와 같은 안정한 숙주 단백질에 연결시키거나 또는 세포 밖으로 산출시킴으로써 발현 단백질의 안정화 및 정제용이화를 기할 수 있다. 이와같은 효율적인 발현에 관한 연구는 재조합 유전자를 이용한 생체활성물질 생산에 필수 불가결한 것으로, 본 연구에서는 간염 백신 제조에 활용되는 B형 간염 바이러스의 표면항원중 면역원성이 높은 pre-S 부위를 대상으로 최적 발현 조건에 대한 기초연구를 행하고자 한다.

## III. 연구개발의 내용과 범위

- 1) pre-S2의 유전자를  $\beta$ -galactosidase 유전자에 연결

- 2) pre-S2 유전자를 대장균의 signal sequence 에 연결
- 3) 발현 조건 연구
- 4) 발현된 fusion 단백질의 분리 및 정제
- 5) pre-S2 에 specific 한 항체를 얻어 pre-S2 를 정량하는 assay 개발

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서는 간염 바이러스의 pre-S2 유전자를 대장균의 효소인  $\beta$ -galactosidase 에 연결시켜서 pre-S2- $\beta$ -galactosidase fusion 단백질로 생산하는데 성공하였으며 그 수율이 총 세포 단백질의 15% 정도까지 되었다. 발현된 최종 단백질 산물은  $\beta$ -galactosidase 친화성 컬럼 크로마토그래피를 이용해 분리 정제되었으며 현재 토끼에서 그 면역원성에 대한 실험을 행하고 있다.

앞으로 더 해결할 문제는 생산 수율을 더 증가시키고 pre-S2 펩타이드를 분리 정제하는일, 그리고 분리된 pre-S2 펩타이드로 다른 매개체와 연결시켜서 그 면역원성을 증가시키는 일 등이 남아있다.



V. 계획과 실적의 대비표

(..... 계획, —— 진도)

구 분	연구개발기간('86.3 ~ '87.2)												진 도	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
내용연구														
클론닝														100
발현최적화														100
pre-S2 fusion 단백질 정제														100
pre-S2에 대한 항체 개발														80
pre-S2 정량 assay														50
총 진도율														



## SUMMARY

### I. Title

Studies on the Development of Hepatitis Vaccine Production with Pre-S.

### II. Aims of the Study

The goal of the present study is to clone and express in *E. coli* an immunodominant epitope of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg), pre-S2. In order to produce pre-S2 as a stable form in *E. coli*, the gene fusion strategy was adopted. Secretion of pre-S2 in *E. coli* was also attempted.

### III. Scope and Contents

- 1) Gene fusion of pre-S2 and  $\beta$ -galactosidase
- 2) Gene fusion of pre-S2 and the signal sequence of Omp F
- 3) Studies on the optimal expression
- 4) Purification of the recombinant fusion proteins
- 5) Establishment of pre-S2 assay with anti pre-S2 antibodies.

### IV. Results and Recommendations

Pre-S2 gene of hepatitis B virus was fused to 5'-end of  $\beta$ -galactosidase gene and was successfully expressed in *E. coli*. The amount of pre-S2- $\beta$ -gal fusion protein was over 15% of total cellular proteins. The fusion protein was purified by an affinity column chromatography. The immunogenicity of the purified product in rabbits are being investigated. Before the

final recombinant pre-S2 products are developed as a hepatitis vaccine, following problems have to be solved. The yield of recombinant proteins should be increased up to 50% of total proteins. From the fusion protein pre-S2 peptide has to be isolated. The immunogenicity of the purified pre-S2 has to be enhanced by conjugation to some carrier proteins or liposomes.

## CONTENTS

Chapter I.	Introduction.....	13
Chapter II.	Materials and Methods.....	20
1.	Materials.....	20
2.	Methods.....	21
Chapter III.	Results and Discussion.....	26
1.	Plasmid Construction.....	26
2.	Expression of Recombinant Proteins.....	32
3.	Characterization of Recombinant Proteins.....	36
4.	Cellular Location of Fusion Proteins.....	39
5.	Purification of Pre-S2- $\beta$ -gal Fusion Proteins.....	42
Chapter IV.	Conclusions and Recommendations.....	43
References.....		45



# 목 차

제 1 장 서 론 .....	13
제 2 장 실험재료 및 방법 .....	20
제 1 절 실험재료 .....	20
제 2 절 실험방법 .....	21
제 3 장 결과 및 고찰 .....	26
제 1 절 플라스미드 재조합 .....	26
제 2 절 재조합 단백질의 발현.....	32
제 3 절 재조합 단백질의 특성 .....	36
제 4 절 세포 내에서 fusion 단백질의 위치 .....	39
제 5 절 Pre - S2 - $\beta$ - gal fusion 단백질의 정제 .....	42
제 4 장 결론 및 건의 .....	43
참 고 문 헌 .....	45





## 제 1 장 서 론

B형 간염 바이러스 (hepatitis B virus : HBV)에 의한 감염은 심각한 국민 보건문제 중 하나로서 전 국민의 10% 이상이 만성 보균자이며 감염과 간경화증의 주된 원인이 되고 있다. 특히 HBV의 감염과 간암과의 관계가 밝혀져감에 따라 HBV의 문제는 더욱 심각해져 가고 있다.<sup>(1)</sup> 따라서 HBV의 감염을 방지하는 방법 중 하나로 효과적인 간염백신을 개발하는 것은 무엇보다도 시급한 문제이다.

현재까지의 간염백신의 원료는 주로 만성 보균자의 피에서 분리된 22 nm 입자를 사용해 오고 있는데 이는 바이러스의 외부막을 구성하고 있는 S 단백질과 지질막으로 구성되어 있다.<sup>(2)</sup> S 단백질은 HBs Ag 이라고도 불리우는데 항원결정인자로서는 그룹에 공통되는 'a' 인자와 subtype 으로 구분되는 d, y, w, r 인자들이 있다. 주된 serotype 으로는 adw, adr, ayw 등 세 종류가 있으며 그 분포가 지역에 따라 다르며 y 결정인자는 극동 아시아 지방에는 존재하지 않는다. 한국에 분포된 타입은 adr 타입이다.

Gerlich 등은<sup>(3,4,5)</sup> 전기영동 및 peptide mapping 을 이용해서 HBs Ag 의 구성 단백질들을 밝혔는데 그 크기에 따라 major protein ( 226 개 아미노산 ), middle protein ( 281 개 아미노산 ), large protein ( ay : 389 개 , ad : 400 개 아미노산 )으로 나눌 수 있다. Major protein 은 S 유전자에 의해 만들어지는데 분자량 24, 000 dalton 의 순수단백질 ( P24 ) 과 당단백질 ( GP27 ) 이 있다.

유전자 S에 의해 만들어지는 단백질 서열의 친수성도를 분석해 보면(6), 잔기번호 7-23, 80-98, 169-226은 소수성이 큰 아미노산 서열들이다. 처음 두 부위는 그림 1에서와 같이 지질막에 삽입되어 있으며 친수성이 큰 나머지 부위들은 막 외부에 존재할 것으로 간주된다. S 단백질은 두분자가 S-S 결합에 의해 연결되어 있으며  $\beta$ -mercaptoethanol 과 같은 환원제로 S-S 결합을 절단하면 항원성이 없어진다. 따라서 S 단백질의 활성이 있는 형태는 그림 1에서와 같은 dimer 상태이다.

Glycosidic Residue

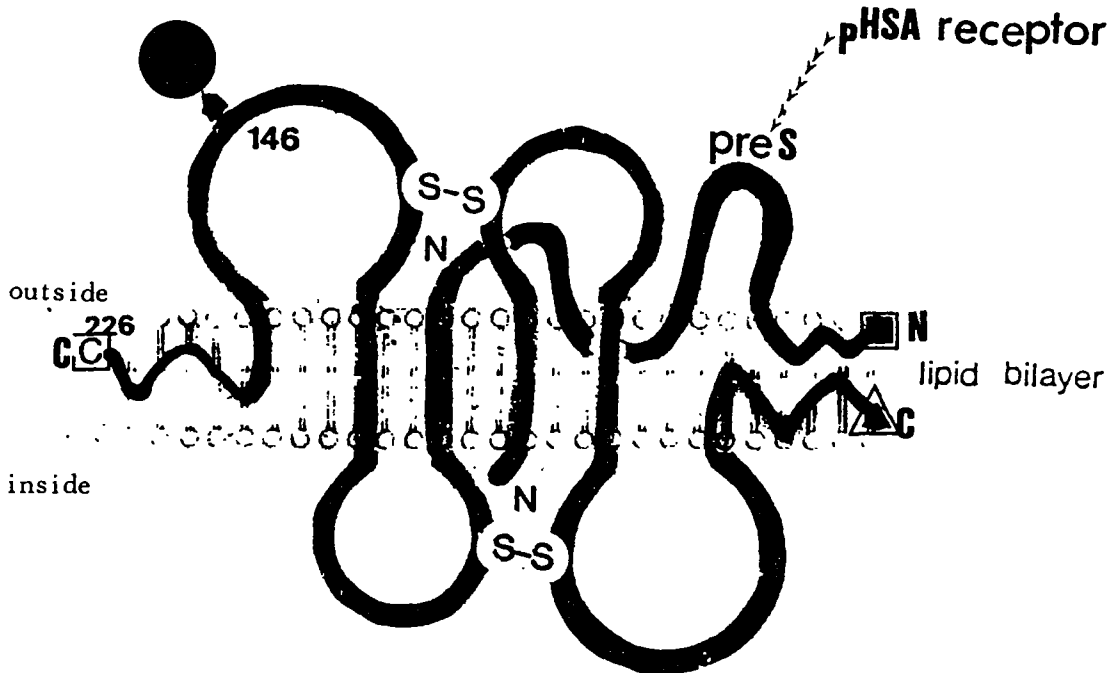


그림 1. HBs Ag 단백질구조의 모형

Middle protein은 pre-S2와 S 유전자에 의해 만들어지는 데 당의 결합 정도에 따라 GP33과 GP36으로 나뉜다. Pre-S2

유전자에 의해 코드된 55개 아미노산의 펩타이드는 주로 친수성이 큰 잔기로 구성되어 있으며 그림 1에서와 같이 바이러스 막 표면에 위치할 것으로 간주된다. Pre-S2 부위는 S-S 결합의 존재 여부에 상관없이 우세한 항원결정인자(dominant epitope)를 가지고 있다. 또한 Pre-S2 펩타이드는 중합된 사람 혈청 알부민(pHSA)과 결합하는 능력이 있는데, 사람 간세포 역시 pHSA 결합 수용체를 지니고 있다.<sup>(7,8)</sup> 이는 B형 간염바이러스가 Pre-S2 부위를 통해 pHSA를 매개체로 하여 간세포에 감염될 가능성을 보여주고 있다.

Large protein은 Pre-S1, Pre-S2와 S 유전자에 의해 만들어지며 순수단백질(P39)와 당단백질(GP42)이 존재한다. 크기는 약 400개 아미노산으로 구성되어 있으며 적어도 N-말단 부위는 바이러스 막 표면에 위치할 것으로 간주된다. Pre-S1 부위 역시 B형 간염바이러스가 간세포에 결합하는데 관여할 것으로 보인다

상기의 개개 표면항원들이 바이러스 입자에 존재하는 양을 살펴보면 Dane 입자의 경우는 envelope에 300~400개 major protein 분자가 존재하며 middle과 large protein의 경우는 40~80개 정도 존재한다. 22 nm 입자의 경우는 100개 정도의 major protein과 10개 정도의 middle protein이 존재하며 large protein은 한 두 분자만 존재한다. 바이러스 복제가 안 일어날 경우 22 nm 입자는 거의 major protein으로 구성되며 middle protein은 1% 이하로 존재하며 large protein은 전혀 존재하지 않는다.

Pre-S2 부위의 역할은 상기한 바와 같이 바이러스에 의한

간세포의 감염에 중요한 역할을 하는것 외에 바이러스의 assembly에도 중요한 역할을 할 것으로 간주되고 있다. 최근 Persing 등은<sup>(9)</sup> S (226 a.a.)와 pre-S + S (389 a.a.) 유전자를 동물세포에서 발현시켰는데 S 단백질은 배지로 잘 분비되는 반면에 pre-S를 가진 S 단백질은 분비가 저해되어 단백질이 세포질 내에 축적됨을 알 수 있었다. 뿐만 아니라 S와 pre-S + S를 동시에 한 세포내에서 발현시키면 S 단백질의 분비도 저해되었다. 이러한 결과는 S와 pre-S+S 단백질이 특이적으로 상호작용을 하며 pre-S 부위가 바이러스 assembly에 중요한 역할을 할것을 암시하고 있다.

간염 바이러스의 표면항원 (HBsAg)은 상기의 S 단백질들로 구성되어 있는데 현재의 예방백신의 주요 성분이다. 현재까지는 만성보균자의 피에 존재하는 22 nm 입자를 분리 정제하여 포르말린 처리로 오염된 바이러스 입자들을 불활성화 시킨후 사용하고 있다. 하지만 그 원료인 보균자 피의 제한된 양, 그로 인한 높은 단가 그리고 피에 존재하는 다른 바이러스 인자의 오염 등의 문제점이 있기 때문에 새로운 방법에 의한 백신제조가 요구되고 있다. 따라서 유전자 재조합에 의해 HBsAg을 미생물이나 동물세포에서 생산하는 방법, 또는 항원성이 높은 epitope 부위를 펩타이드 합성에 의한 생산법 등이 활발히 연구되고 있다.

HBsAg은 소수성이 큰 부위가 존재하고 대장균으로 부터 외부 단백질로 인식되기 때문에 클론된 유전자를 대장균에서 성공적으로 발현시키기는 어렵다. 따라서 소수성이 큰 N-말단 부분을 제거하거나 대장균내에서 안정한  $\beta$ -galactosidase나  $\beta$ -lactamase에 연결시켜서 발현을 시도하였다.<sup>(10,11,12,13)</sup> 최근 pre-S2 부위의 중

요성이 부각되면서 pre-S2 유전자에 대한 클로닝이 시도되었다. Fujisawa 등은<sup>(14)</sup> S 유전자 앞에 pre-S2 유전자가 붙은 것을 클로닝하여 대장균에서 발현 시켰는데 그 수율이 250  $\mu\text{g}/\ell$  정도로 S 유전자만 클로닝된 것에 비해 수율이 10배 이상 증가되었으며 성장 저해 현상도 안 나타났다. 이때 발현된 단백질은 HBs Ag의 항원성은 물론 pHSA에 결합하는 능력도 가지고 있었다. 최근 Offen-sperger 등은<sup>(15)</sup> pre-S2 부위만을  $\beta$ -galactosidase 앞에 연결시켜 대장균에서 발현시켰는데 fusion 단백질의 양은 200  $\text{mg}/\ell$ 로 전체 세포 단백질의 3%를 차지 했다. 이들 Pre-S2- $\beta$ -gal 단백질은 Pre-S2에 특이한 항원성을 나타내고 있다.

HBs Ag은 소수성이 큰 부분때문에 대장균에서 발현시키는데는 여러가지 문제점이 많았으나 효모에서는 비교적 쉽게 발현되었다. 대표적인 예로 Valenzuela 등은 S 유전자를 ADHI, GAPDH, PK promoter 등에 연결시켜서 효모에서 성공적으로 S 단백질은 생산해 냈다.<sup>(16,17)</sup> 이들은 또한 pre-S2 유전자를 삽입시켜서 발현시켰는데 S 유전자만 클로닝했을 경우에는 그 수율이 40  $\text{mg}/\ell$ 인 반면에 Pre-S2를 포함한 S의 경우는 105  $\text{mg}/\ell$ 로 그 수율이 크게 증가 되었다.<sup>(18)</sup> 효모에서 제조된 HBs Ag은 당이 결합되어 있지 않지만 세포내에서 입자를 형성하며 그 크기와 비중이 간염 환자 피에서 분리된 22 nm 입자와 비슷하였다. 입자를 형성하고 있는 HBs Ag은 단합체의 HBs Ag보다 면역원성이 1,000배 정도 더 높다고 알려졌다.<sup>(19)</sup> 이와 같이 효모에서 생산된 HBs Ag 입자들은 1986년 7월 미국 F.D.A.에서 간염 예방 백신으로 사용할 수 있도록 허가하였다.

한편 고등동물 세포에서도 재조합 DNA를 이용하여 HBs Ag을 생산해 내는데 성공하였는데, 이들은 효모에서 생성된 것과는 달리 당분자들이 결합되어 있으며 또 세포 밖 배양액으로 분비되었다.(20,21) Laub 등은 HBs Ag 유전자가 클론된 SV 40 벡터를 원숭이 신장세포(COS) 안에서 발현시키는데 성공하였는데, 이때 pre-S 유전자 전체가 더 삽입된 클론은 S 유전자만 가진 것보다 HBs Ag 생산 수율이 40 ~ 50 배 정도 떨어진 것을 알 수 있었다.(22) 비슷한 결과가 Persing 등에(9) 의해 보고되었는데, 이들은 Pre-S 부위가 S 단백질이 배지로 분비되는 것을 저해한다고 하였다. 최근 Michel 등은(23,24) pre-S 부위를 pre-S2 만이 더 S 유전자에 결합된 상태로 SV-40-pBR 322 하이브리드 벡터에 삽입하여 클론하였는데, 형질전환된 CHO(Chinese Hamster Ovary) 세포에서 생산된 HBs Ag은 22 nm 입자들을 만들었으며 그 subunit 구성, 항원결정인자 등이 실제의 입자와 비슷하였다. 또한 pre-S2가 가지고 있는 중합된 사람 혈청 알부민과 결합하는 능력도 나타냈다. 이와같이 생성된 입자들을 가지고 쥐에서의 면역 반응을 조사하여 보았는데 pre-S2를 포함하고 있는 HBs Ag들이 S만을 가진 것들 보다 훨씬 더 강한 면역 반응을 일으켰다.(25)

상기에서는 재조합 DNA를 이용하여 HBS Ag을 생산하는 방법을 서술하였는데 이외에도 원하는 epitope의 아미노산 서열을 직접 합성하는 방법도 있다. HBS Ag 아미노산 서열중 친수성이 큰 부분의 몇개 아미노산을 화학적 합성을 하여 그 면역 반응을 조사하였는데(26,27,28,29) 이런 방법에서의 문제점은 합성된 펩타이드의 면역원성이 비교적 약하다는 것이다. 하지만 최근 Neurath 등은(30)

pre-S2 부위 26 개 아미노산을 합성하여 liposome 에 붙여서 그 면역원성을 높이는데 성공하였다. 뿐만 아니라 이와 같은 합성 펩타이드에 의해 생성된 항체들은 HBV 입자들이 사람 간세포에 부착하는 것을 방지해 주었다.<sup>(31)</sup> 또 항체들과 HBV 입자들을 섞어서 원숭이 (chimpanzee) 에 주사하였을 때 그 원숭이는 다른 원숭이들이 HBV 에 의해 감염이 될때 전혀 감염이 되지 않음을 알 수 있었다.<sup>(32)</sup>

국내에서도 pre-S2 를 포함하는 간염 백신 제조에 관심이 높아지고 있다. 제일제당 연구소에서는 pre-S 와 S 를 코드하는 유전자를 동물세포에서 발현시키는데 성공하였으며, 럭키와 녹십자 연구소에서는 효모를 이용한 HBsAg 생산을 시도하고 있다. 본 연구소에서는 대장균에서 pre-S2 펩타이드를 생산하는 방법을 시도하고 있다. 일단 pre-S2 펩타이드 자체만을 클론하면 대장균이 외부 단백질로 인식하여 분해하기 때문에 안정한 대장균의 단백질에 fusion하여 생산하는 방법을 택했다.

## 제 2 장 실험재료 및 방법

### 제 1 절 실험재료

사용한 대장균 균주들은 다음과 같다. E. coli HB101 : F<sup>-</sup>, hsd S20 (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), recA13, ara-14, pro A2, lacY1, galK2, rpsL20(Sm<sup>r</sup>), xyl-5, mtl-1, supE44 (Su2<sup>+</sup>)λ<sup>-</sup>; MH3000 : araD139, Δ(ara, leu)7697, Δ(lac)×74, galU, galK, rpsL20(Sm<sup>r</sup>), ompR101; TK1046 : araD139, Δ(arg F-lac)U169, rpsL150 (Str<sup>r</sup>), relA1, f16B5301 deoC1, ptsF25, malPQ::Tn5, ompBcs1; JM109 : recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, λ<sup>-</sup>, Δ(lac pro AB), F' (traD36, pro AB, lac I<sup>q</sup>, lac Z ΔM15).

플라스미드 pUC4K, pUC7, pUC12는 PL Biochemicals로 부터 구매하였고, pORF1은 Silhavy 박사로부터 (33), ptacl2는 Ptashne 박사로부터 (34), 그리고 pINIIIAl은 강현삼박사로부터 얻었다. 플라스미드 pHBV (adw2 type)는 채치범박사로부터 얻었는데 그 구조는 EcoRI으로 절단된 HBV 유전자가 pBR322의 EcoRI자리에 나란히 두개가 삽입된 상태이다.

제한효소들, E. coli DNA polymerase I (Klenow), T4 DNA ligase, bacterial alkaline phosphatase (BAP), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactoside (X-gal)은 Bethesda Research Laboratories로 부터, bovine serum albumin, ampicillin, isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG), 6-aminohexanoic acid-Sepharose



4B(CH-Sepharose), 0-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside (ONPG), p-aminophenyl- $\beta$ -D-thio-galactoside (TPEG) 등은 Sigma Chemical Company로부터 구입하였다. ATP와 다른 nucleotide 들은 PL Biochemicals로부터, AUSRIA II-125 R.I.A. kit은 Abbott laboratories로부터 구매하였다.

## 제 2 절 실험 방법

### 1. 클로닝 방법

유전자 클로닝에 필요한 모든 효소 반응은 Maniatis 등의<sup>(35)</sup> 방법에 의해 행하여졌다. 재조합 DNA에 의한 대장균의 형질전환은  $\text{CaCl}_2$  방법<sup>(36)</sup>으로 행하였다.

### 2. 재조합 유전자 산물의 검증

형질전환된 대장균의 colony들은 첫 단계로 ampicillin 배지 ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ )에서 선별하였다.  $\beta$ -galactosidase의 활성을 지닌 colony들은 X-Gal 배지 (2% X-Gal을 배지당  $50 \mu\ell$  첨가했음)에서 선별하였다. Pre-S2- $\beta$ -gal fusion 단백질을 검증하기 위해서는 첫째로 각각 재조합 균주의 세포 추출액에서  $\beta$ -galactosidase 효소 활성을 잰으며, 다음 단계에서는 전기영동 방법으로 세포 단백질을 분리하여 원하는 위치에 단백질밴드가 존재하는가를 확인하였으며 마지막으로 pre-S2 특성을 검증하기 위해 Western blot (면역학적 방법)을 행하였다. 각각의 방법들을 자세히 서술하면 다음과 같다

$\beta$ -galactosidase의 활성은 Miller의 방법으로<sup>(37)</sup> 하였다.

세포추출액 (50-200  $\mu\ell$ )을 완충용액 (100mM sodium phosphate, pH 7.0, 10mM KCl, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol)에 섞어 1 ml로 만들었다. 여기에 0.1% (W/V) SDS 용액 50  $\mu\ell$ 와 CHCl<sub>3</sub> 두 방울을 넣어서 5초동안 완전히 섞은 다음 28°C에서 5분간 방치시켰다. 여기에 ONPG 용액 (4mg/ml)을 200  $\mu\ell$  넣고 노란색이 나타나면 그때까지의 반응시간을 기록하고 500  $\mu\ell$ 의 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1M)을 넣어 반응을 중지시켰다. 최종 반응물에서 빛을 산란 (Scatter) 시키는 세포찌기를 원심분리 (12,000  $\times g$ , 5분)로 제거한 후 420nm에서 흡광도 (absorbance)를 잰다.  $\beta$ -galactosidase의 활성은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Units} = 1,000 \times \frac{\text{OD}_{420}}{t \times v \times \text{OD}_{600}}$$

여기서 t = 반응 시간

v = culture volume (in ml)

OD<sub>600</sub> = 정량전 Sample culture의 흡광도

세포 단백질의 전기영동은 Laemmli의 discontinuous SDS polyacrylamide gel을 사용하였다.

Fusion 단백질에 존재하는 pre-S2 특이의 항원성을 조사하기 위해서는 Towbin 등의 (38) 면역학적 방법을 적용하였다. 단백질들을 8% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동으로 분리시킨 후, nitrocellulose sheet에 전기영동법으로 옮겨 부착시켰다. (6V/cm for one hour). Nitrocellulose에 단백질이 부착된 나머지 부분들은 bovine serum albumin (3% in 0.9% NaCl, 10mM Tris-

Cl, pH 7.4) 용액에서 두 시간 동안 반응시켜 (37 °C) 포화시켰다. 이렇게 처리된 'nitrocellulose sheet' 는 <sup>125</sup>I-labeled human anti-HBs Ag antibody 용액에 넣고 상온에서 6 시간 반응시킨 후 완전히 세척하고 공기중에서 말린 후 X-ray 필름에 autoradiography 시켰다.

### 3. Fusion 단백질 산물의 세포 내에서 위치 조사

형질전환된 세포들은 28 °C에서 하루밤 배양시킨 후 Schuman 등(39)의 방법으로 세포 물질을 분획시켰다. 20 ml의 배양액을 원심 분리하여 세포들을 수거한 후 2 ml의 lysis 용액 (50 mM Tris-Cl, pH 7.0, 2 mM EDTA, 200 µg/ml lysozyme)에 녹인 후 0 °C에서 30 분간 방치시켰다. 생성된 spheroplast 들은 얼렸다 녹였다를 세 번 반복하여 분쇄하고 DNase I (1 µg/ml)과 Mg SO<sub>4</sub> (10 mM)을 넣어 점성을 줄인 후 원심분리 (3,000 × g, 10 분)에 의해 찌꺼기를 가라 앉혔다. 상등액을 다시 4 °C에서 원심분리 (250,000 × g, 한 시간)시키면 membrane 분획은 가라앉고 수용성 단백질들은 상등액에 남게 된다. 침전물에서 cytoplasmic membrane 과 outer membrane 을 분리시키기 위해 10 mM Tris - Cl, pH 7.5 로 침전물을 세척한 후 2 ml의 10 mM Tris - Cl, pH 7.5, 2 % (V/V) Triton - X100 용액에 녹여 상온에서 30 분간 방치시켰다. 반응물을 다시 4 °C에서 원심분리 (100,000 × g, 한 시간)시키면 cytoplasmic membrane 단백질들은 상등액에 남고 나머지는 가라앉게 된다. 침전물을 다시 2 ml의 10 mM Tris - Cl, pH 7.5 2 % (V/V) Triton - X100, 10 mM EDTA에서 녹여 상온에서 30 분간 반응시키고 다시 4 °C에서 원심분리

( 100,000×g , 한시간 ) 시키면 outer membrane 단백질들이 상등액에 존재하게 된다.

#### 4. Pre-S2-β-galactosidase fusion 단백질의 정제

플라스미드 pTBG (H-) 를 포함하고 있는 대장균 JM109 세포 1 ℓ 를 28 °C에서 배양하였다. 이른 log phase에서 IPTG (2mM) 을 넣어 재조합 유전자의 발현을 유도시킨 후 stationary phase 까지 계속 배양시켰다. 세포들을 원심분리로 수거하여 20 ml의 20 mM Tris - Cl, pH 7.4, 10mM MgCl<sub>2</sub> 용액에 녹인 후 sonication ( 30 sec × 20 ) 방법으로 세포를 분쇄하였다. Membrane 입자들을 원심분리 ( 12,000 × g , 20 분 ) 로 제거시키고 상등액으로 부터 pre-S2 -β-gal fusion 단백질을 친화성 컬럼 크로마토그래피로 분리시켰다 TPEG-Sepharose 친화성 컬럼은 Ullmann 의 방법<sup>(40)</sup> 에 의해 제조 했는데 자세한 과정은 다음 부분에 서술되어 있다. 수거한 상등액에 5 M의 NaCl 용액을 섞어서 NaCl 농도가 1.6 M로 되게 한 후 β-mercaptoethanol (10 mM) 을 첨가하였다. 이 용액을 10 ml의 TPEG-Sepharose 컬럼에 걸었다. 이 때 컬럼 완충 용액은 20mM Tris-Cl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.6M NaCl, 10mM β-mercaptoethanol, pH 7.4 이었다. 상등액을 컬럼에 걸은 후 같은 완충 용액으로 컬럼을 완전히 씻어내 주고 fusion 단백질들은 50 ml의 100mM sodium borate, 10 mM β-mercaptoethanol, pH 10 을 넣어서 받아내었다.

#### 5. TPEG-Sepharose 친화성 컬럼의 제조

CH-Sepharose 4 B ( pharmacia Fine Chemical ) 를 여러번 증

류수에 씻은 후 10 ml의 CH-Sepharose 4B당 1 ml의 TPEG (Sigma, 농도 1 mM) 용액을 넣었다. 잘 섞은 후 pH를 4.7로 유지시키기 위해 1N HCl을 적당량 넣어주고 0.8 ml의 N-acetyl-N'-(3-dimethyl aminopropyl)-carbodiimide (Sigma, 농도 7.5 mM) 용액을 천천히 넣어 주었다. 용액 pH를 4.7에서 한 시간 더 유지시켜준 후 상온에서 24 시간 동안 계속 저어주면서 반응을 시켰다. 완성된 TPEG-Sepharose는 증류수로 철저히 세척한 후 4 °C에서 보관하였다.

## 제 3 장 결과 및 고찰

### 제 1 절 플라스미드 재조합

#### 1. 플라스미드 pHBSC20

Pre-S2와  $\beta$ -galactosidase 유전자의 fusion을 하기 위해서, 그 첫 단계로 pORFI 백터를 이용하여 pre-S2 유전자를 OmpF의 signal 서열과  $\beta$ -galactosidase 유전자(lac Z)사이에 삽입시켰다. 이렇게 재조합된 pre-S2 유전자는 ompF promoter의 조절을 받으며 단백질 산물은 OmpF-pre-S2- $\beta$ -gal이 fusion된 tribrid 단백질로 된다. 그 재조합 방법은 그림 2에서 보여지고 있다. 플라스미드 pHBV를 EcoRI 과 Hinc II로 절단하여 pre-S2를 가지는 216 b.p.의 DNA 절편을 gel에서 elution하여 얻었다. 이 절편을 pUC12의 EcoRI 과 Hinc II 자리 사이에 삽입시켜 pHBSC12를 만들었다. 이 때 pre-S2 유전자는 pUC12의 lac Z' ( $\alpha$ -peptide encoding sequence) 서열과 reading frame이 맞게 된다. 플라스미드 pHBSC12로부터 EcoRI 과 Hind III로 절단하여 얻은 233 b.p. DNA 절편을 pINIIIAI 플라스미드의 EcoRI 과 Hind III 자리 사이에 삽입시켰다. 그 결과 얻은 플라스미드를 pHBSC13 이라 명명하였다. 다음 단계로는 pHBSC13에서 pre-S2 유전자를 pORFI으로 옮겼는데 이 때 pORFI의 lac Z와 frame을 맞추기 위해 pUC4K로부터 EcoRI mobilizing fragment를 얻어 pHBSC13

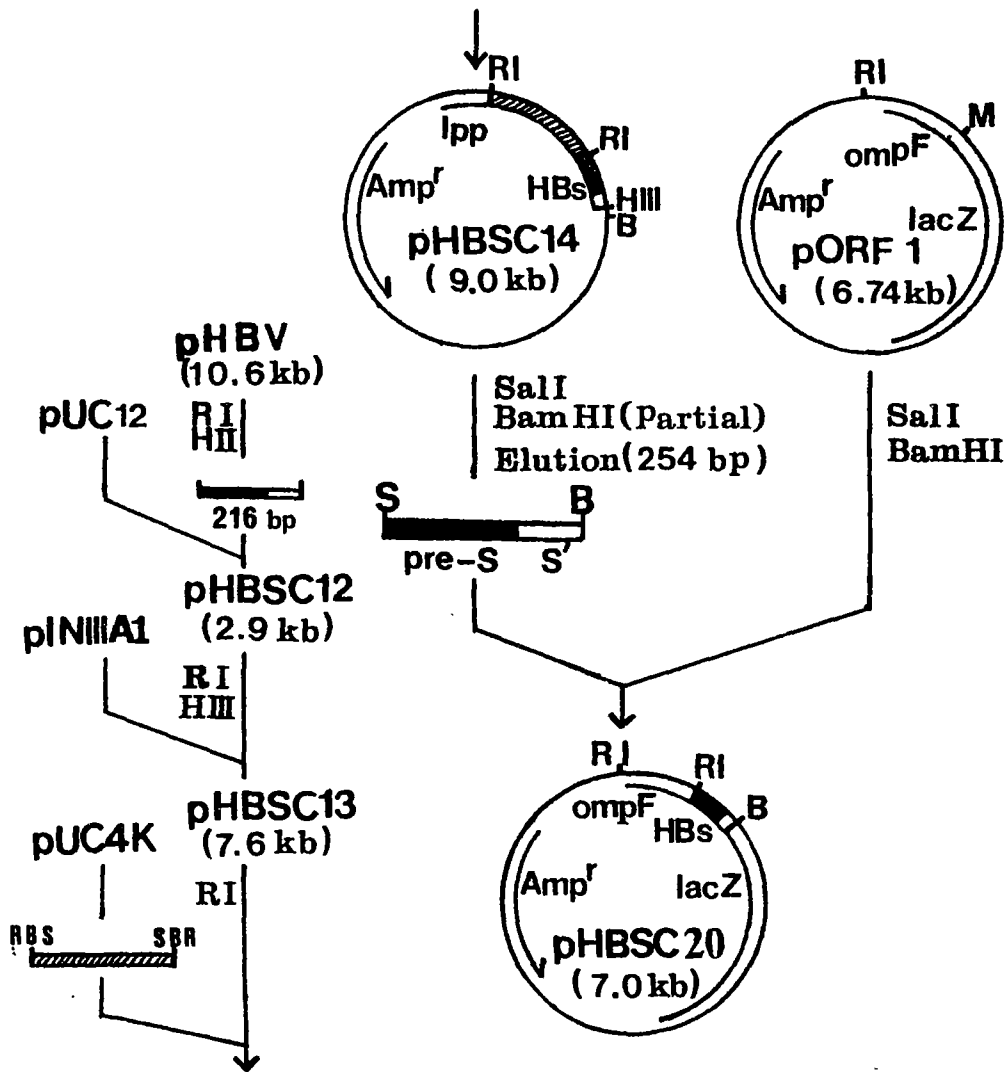


그림 2. 플라스미드 pHBSC20 제조 과정. B, BamHI ; H II, Hinc II ; H III, Hind III ; RI, EcoRI ; S, SalI ; M, multiple cloning sites (PstI, SalI, BamHI, SmaI, and BamHI)

의 EcoRI 자리에 삽입시켰다. 이렇게 하여 얻어진 pHBSC14로부터, Sal I으로 절단하고 BamHI 과 부분적 반응을 시킨 후 얻은 254b.p. 절편을 gel-elution 방법으로 분리하여 얻었다. 이 절편은 pre-S2 유전자를 포함하고 있는데 이것을 pORFI 벡터의 SalI 과 BamHI 자리 사이에 삽입시켜서 pHBSC20을 얻었다. 플라스미드 pHBSC20을 대장균 균주 MH3000에 transformation 시키고 ampicillin 과 X - Gal 을 포함하는 배지에서 파란색 colony 를 선정하였다. 2번 그림의 각각 단계에서 재조합된 플라스미드들은 제한효소들과 반응하여 그 구조가 확인되었다.

## 2. 플라스미드 pTBG

플라스미드 pHBSC20에 의해 생산되는 단백질 산물은 pre-S2 유전자 앞에 OmpF의 signal sequence와 N-말단 서열은 포함하게 되므로 이를 제거하여 pre-S2- $\beta$ -gal 만이 fusion된 상태로 만들기 위해 그림 3과 같이 재조합하였다. 이 때 fusion 단백질의 발현이 tac promoter의 조절을 받게 하였다. 우선 lacZ가 tac promoter 조절하에 발현되고 lacZ의 앞부분에 다른 유전자들이 fusion될 수 있도록 하기위해 pTBG 벡터를 건설하였다. 플라스미드 ptacl2를 사용했는데 이것은 클로닝할 수 있는 자리가 하나(PvuII site)이기 때문에 multiple cloning site vector를 만들기 위해 pUC7(PL-Biochemicals)의 polylinker 서열을 이용하였다. 플라스미드 pUC7을 PvuII로 절단하여 polylinker 서열을 가지는 310b.p. 절편을 분리하고 다시 AluI으로 절단하여 150 b.p. 절편을 얻었다. 이 AluI 절편을 PvuII로 짜른 ptacl2



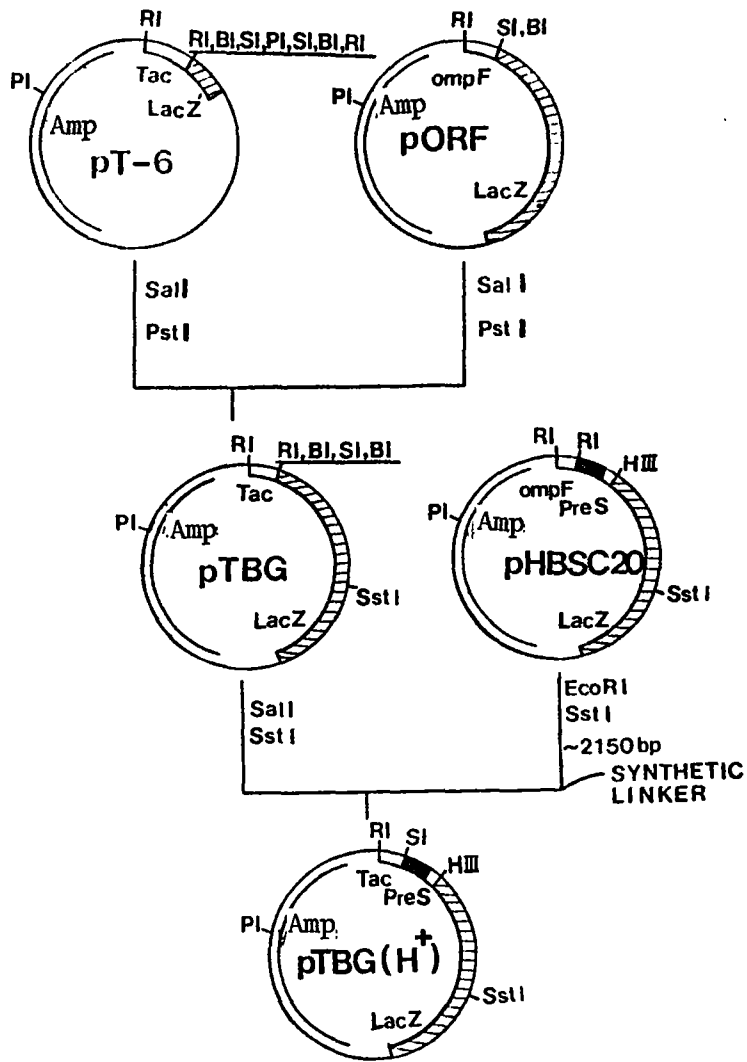


그림 3. 플라스미드 pTBG(H<sup>+</sup>) 제조 과정.

에 삽입시켜서 연결시킨 후 대장균 JM109 균주에 transformation 시켰다. Ampicillin 배지에서 선정된 colony 은 중 원하는 배열의 재조합 플라스미드를 가지고 있는 것 하나를 취해서 pT-6 라 명명하였다. pT-6 는 tac promoter 와 lac Z' 서열을 가지며 그 중간에 polylinker site 을 포함하고 있다. 전체의 lac Z 유전자는 pORFI 에서 얻었다. 플라스미드 pORFI 을 BamHI 으로 절단시키고 다시 연결하면 lac Z 유전자가 in frame 으로 맞게된다.( pORF ). 이로부터 Sal I (lac Z 포함) 절편을 얻고 위의 pT-6 로 부터 Sal I-Pst I (tac promoter 포함) 절편을 얻어 연결시킨 후 JM109 균주에 transformation 시켰다. Ampicillin, X-Gal 배지에서 파란색 colony 를 형성하는 균주를 선정하여 플라스미드를 분리시켜 pTBG 라 명명했다. 따라서 플라스미드 pTBG 는 ampicillin-resistancy marker 를 가지며, tac promoter 조절하에 lac Z 유전자가 발현될 수 있고, promoter 와 lac Z 사이에 다른 외부 유전자들을 연결시킬 수 있도록 EcoRI, BamHI, SalI 등의 클로닝 자리들이 존재한다.

### 3. 플라스미드 pTBG(H+)

플라스미드 pTBG 에 pre-S2 유전자를 연결시키기 위해 그림 2 의 pHBSC20 으로부터 pre-S2 유전자를 얻었다. pHBSC20 을 EcoRI, SstI 으로 절단시켜서 pre-S2 를 포함하는 2150 b.p. 절편을 분리하였다. 그런데 이 절편은 pre-S2 의 N - 말단에 존재하는 세개의 아미노산 (Met-Gln-Trp) 을 코드할 수 없기 때문에 합성 oligonucleotide, 5'TCGACAGAATCGATGCAGTGG  
GTCTTAGCTACGTCACCTTAA5' 를 만들어

연결시켰다. 상기 합성 oligonucleotide 는 5' 부분에 Sal I adapter 를, 3' 부분에는 EcoRI adapter 를 각각 포함하고 있다. 이 oligonucleotide 와 상기 EcoRI - Sst I 절편을 연결시키면 EcoRI 에서 연결된 oligo-pre-S2 절편은 양쪽에 SalI 과 Sst I 과 연결할 수 있게 되는데 이를 pTBG 벡터의 SstI-SalI 절편과 연결시켜 pTBG(H+) 를 만들었다. 결과적으로 pTBG(H+) 는 pre-S2 유전자가 lac Z 의 N - 말단에 연결되었으며 그 발현이 tac promoter 의 조절을 받게 되었다 (그림 3).

#### 4. 플라스미드 pTBG(H-)

상기 플라스미드 pTBG(H+) 에서는 pre-S2 유전자와 lac Z 사이에 S 유전자의 소수성이 강한 N - 발단서열을 약간 포함하게 된다. 따라서 이를 제거하기 위해 pTBG(H+) 를 SalI 과 Ava II 로 절단하여 165 b.p. 절편을 얻었다 (그림 4) 이 절편은 C - 말단의 네개의 아미노산을 제외한 모든 pre-S2 서열을 코드할 수 있다. 분리된 pre-S2 절편은 SalI 부위는 Klenow 효소로 cohesive-end 를 메꾸어서 blunt-end 로 한 후 T4 DNA ligase 로 연결시켰다. 이렇게 하여 얻은 플라스미드는 pTBG(H-) 라 하였으며 pre-S2 부위의 51개 아미노산이  $\beta$ -galactosidase 의 9 번째 아미노산에 연결된 상태의 fusion 단백질을 코드할 수 있다. 플라스미드 pTBG(H+) 와 pTBG(H-) 가 코드하는 pre-S2 부위의 아미노산 서열의 차이점은 pre-S2 와 lac Z 사이의 30개의 소수성 아미노산들의 존재 여부이다.

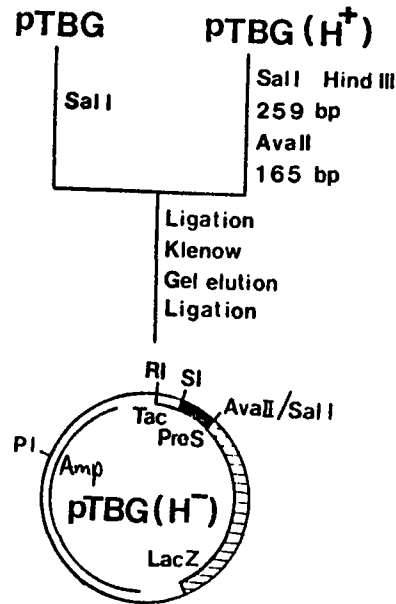


그림 4. 플라스미드 pTBG(H-) 제조과정.

## 제 2 절 재조합 단백질의 발현

### 1. 대장균 TK1046/pHBSC20 에 의한 OmpF-pre-S2-β-gal 단백질의 발현

대장균 TK1046 균주를 플라스미드 pHBSC20 으로 형질전환시킨 후 fusion 단백질의 생성을 β-galactosidase 활성 측정으로 알아 보았다. TK1046 균주는 ompB 유전자에 cs 1 변이를 가지고 있어서 이 균주 안에서는 30 °C 근처에서는 ompF의 발현이 낮아지며 37 °C 이상에서는 ompF의 발현이 증가되게 된다.(33) 그림 5에서 보는 바와 같이 세포배양 시간이 지남에 따라 β-gal-

actosidase의 활성이 증가됨을 알 수 있었다. 하지만 37℃에서 배양한 세포들이 28℃에서 배양한 것들 보다 더 낮은  $\beta$ -galactosidase 활성을 보였다. 28℃에서도 TK1046/pHBSC20 세포들은 그 배양조건에 따라 8,000 ~ 40,000 Miller unit<sup>(37)</sup>의 다양한  $\beta$ -galactosidase 활성을 보였는데 이러한 현상은 주로 재조합 플라스미드의 불안전성에서 기인하였다.

## 2. 대장균 JM109/pTBG(H+)와 JM109/pTBG(H-)에 의한 pre-S2- $\beta$ -gal 단백질의 발현

플라스미드 pTBG(H+) 또는 pTBG(H-)에 의해 형질전환된 JM109 세포는 28℃에서 배양하여 이른 log phase에서 IPTG(2mM)을 첨가하여 발현을 유도시켰다. 그후 한 시간마다  $\beta$ -galactosidase 활성을 측정하여 fusion 단백질의 생산을 알아 보았다. 그림 6(a)에서 보듯이 시간이 지남에 따라 효소 활성이 증가함을 알 수 있는데 pTBG(H-)경우가 pTBG(H+)의 경우보다 두 배 정도 더 많은양의 효소를 생산함을 보여주고 있다. 또한 IPTG에 의해 발현을 유도할 때 배양온도를 37℃ 또는 42℃로 올려주었을 때 그림 6의 (b)(c)에서와 같이 pTBG(H-)의 경우는 28℃ 배양의 경우와 거의 비슷한 양의  $\beta$ -galactosidase가 생성된 것에 반해 pTBG(H+)의 경우는 온도가 높아짐에 따라  $\beta$ -galactosidase 생성이 현저하게 줄어드는 것을 알 수 있었다. 이러한 현상은 pTBG(H+)에 존재하는 소수성 아미노산 서열에서 기인한 것 같다.

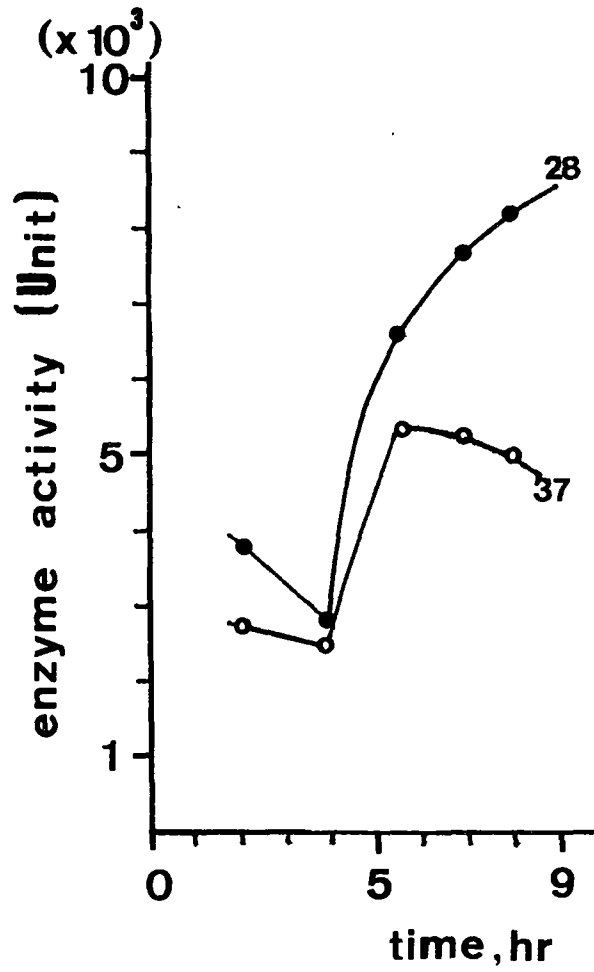


그림 5 . 대장균 TK1046/pHBSC20 의  $\beta$ -galactosidase 활성

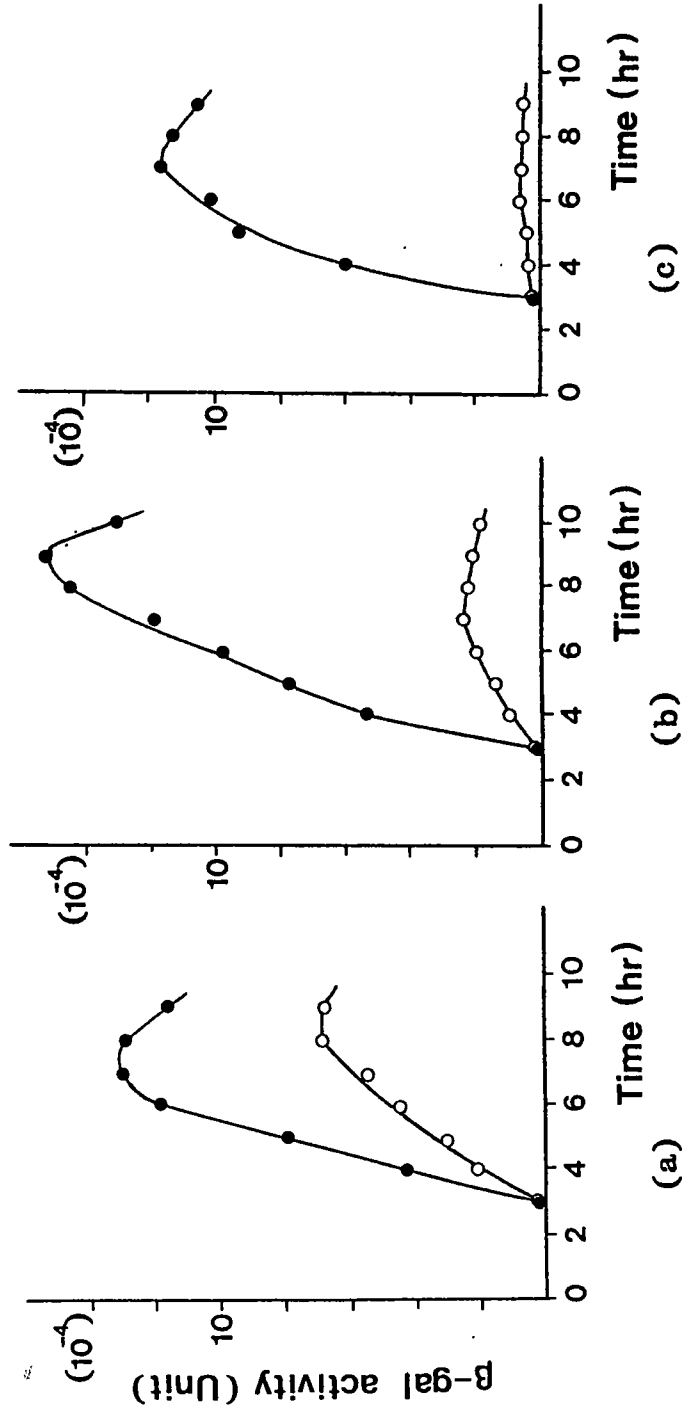


그림 6 . 대장균 JM109/pTBG(H+)(O-O)와 JM109/pTBG(H-)(●-●)

에서  $\beta$ -galactosidase 활성

배양온도 : (a), 28 °C ; (b), 37 °C ; (c), 42 °C

### 제 3 절 재조합 단백질의 특성

#### 1. OmpF-pre-S2- $\beta$ -gal fusion 단백질

재조합 단백질의 생산은 SDS-polyacrylamide gel에서 총 세포 단백질을 분리하는 방법에 의해서도 확인되었다. TK1046/pH-BC20 세포들을 28℃에서 하룻 밤 배양하고 세포를 수거하였다. 세포들을 SDS sample 용액에 녹여서 100℃에서 3분 동안 가열시킨 후 전기영동시켰다. 그림 7은 Coomassie blue로 염색한 gel인데 7(a)에서 보듯이 OmpF-pre-S2- $\beta$ -gal fusion 단백질 (lane 3)은 OmpF- $\beta$ -gal 단백질 (lane 2)보다 더 천천히 이동한 것을 알 수 있다. 이것은 OmpF-pre-S2- $\beta$ -gal이 pre-S2 만큼 분자량이 더 크기 때문이다. 그 양을 densitometer로 측정한 결과, OmpF-pre-S2- $\beta$ -gal이 배양조건에 따라 세포 총 단백질의 1~5%정도가 됨을 알 수 있었다.

재조합 단백질이 pre-S2 특이의 항원성을 지니고 있는가를 조사하기 위해 SDS-gel에서 분리된 단백질들을 nitrocellulose sheet에 옮긴 후 <sup>125</sup>I-labeled 항체 (AUSRIAII-125)와 반응시켰다. 항체와 반응을 한 단백질은 autoradiography에 의해 밝혀졌다. 그림 8의 (b)에서 보는 바와 같이 오직 OmpF-pre-S2- $\beta$ -gal의 위치에 존재하는 밴드 하나만이 HBs Ag 항체와 결합하는 것을 알 수 있었다 (lane 1,2).

#### 2. Pre-S2- $\beta$ -gal fusion 단백질

재조합 플라스미드를 포함하는 JM109 세포들을 28℃에서 배



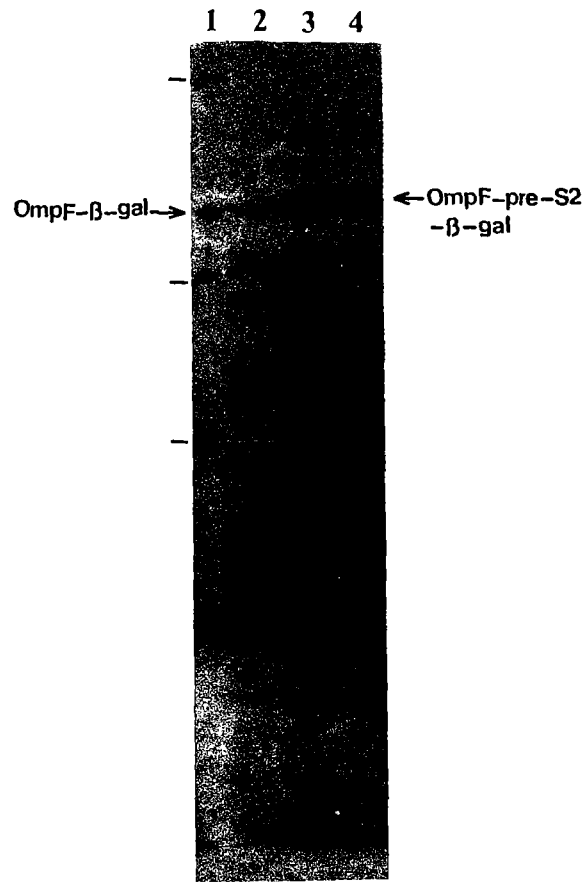


그림 7. 총 세포단백질의 전기영동. 1, M. W. Standards;  
 2, E. coli TK1046/pORF(blue); 3&4, E. coli TK1046/  
 pHBSC20.

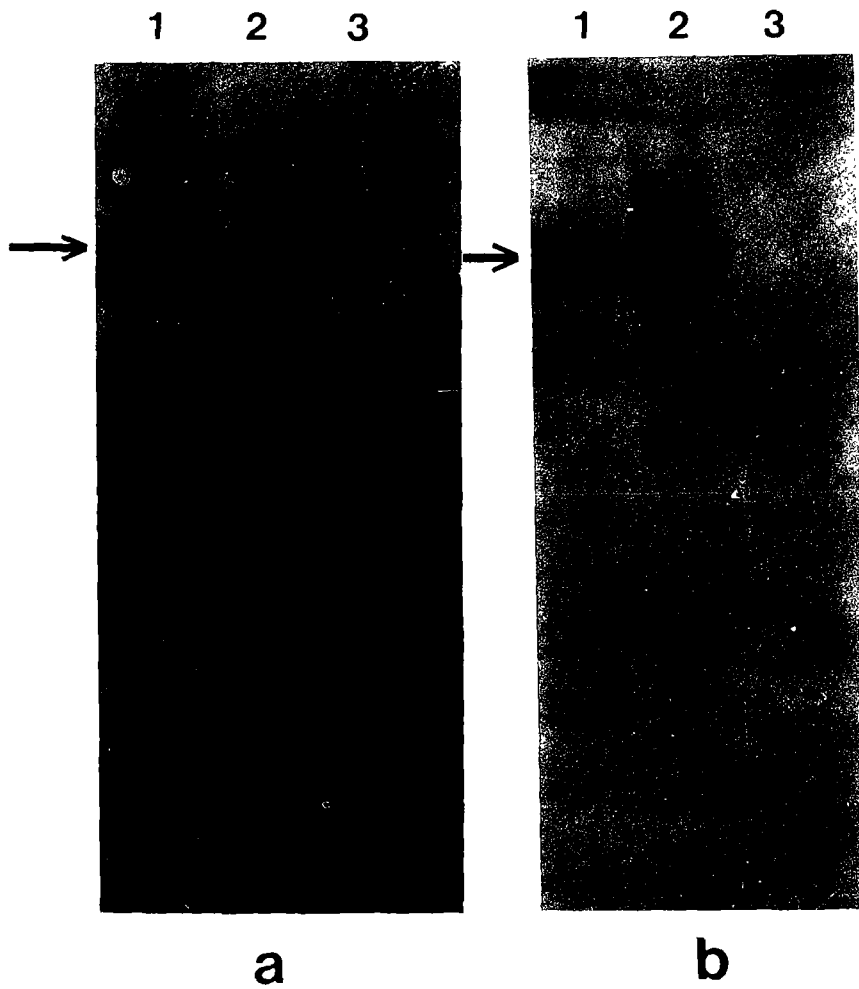


그림 8. a, Coomassie blue 로 염색한 단백질 gel.  
 b, 항-HBsAg 항체와 immunoblot 한 결과.  
 1. 37 ℃에서 배양한 E.coli TK1046/pHBSC20 ;  
 2. 28 ℃에서 배양한 E.coli TK1046/pHBSC20 ;  
 3. 37 ℃에서 배양한 E.coli TK 1046.

양하고 IPTG로 발현을 유도시켰다. 총 세포 단백질을 SDS gel에서 분리시키고 Coomassie blue로 염색하였다. 그림 9에서 보는 바와 같이 JM109/pTBG, JM109/pTBG(H+), JM109/pTBG(H-) 모두 기대한 위치에서  $\beta$ -galactosidase나 또는 fusion 단백질의 밴드가 나타났다. 각각의 양을 densitometer로 분석한 결과 pre-S2-gal fusion 단백질의 양이 JM109/pTBG(H+)의 경우는 총 세포 단백질의 8% 정도이며 JM109/pTBG(H-)의 경우는 15% 정도였다.

#### 제 4 절 세포 내에서 fusion 단백질의 위치

OmpF-pre-S2- $\beta$ -gal fusion 단백질이 세포 내에서 존재하는 위치를 알아 보기 위해 TK1046/pHBSC20 세포로부터 수용성 분획과 membrane 분획을 준비하였다. 각 분획에 대해  $\beta$ -galactosidase 효소 활성 측정 결과 총 활성의 8% 이상이 cytoplasmic membrane 분획에서 발견되었다. 또한 각 분획의 단백질을 SDS-gel에서 전기영동 하였을 때 fusion 단백질 밴드가 cytoplasmic membrane 분획에서 발견되었다(그림 10 lane 5). 이와같은 결과는 OmpF-pre-S2- $\beta$ -gal 단백질이 membrane과 결합된 상태로 있음을 말해 주는데 아마도 OmpF의 signal sequence에 의해 단백질이 membrane과 binding했지만  $\beta$ -gal 같은 크기가 큰 단백질은 membrane을 통과할 수 없기 때문에 binding 상태로 남아있는 것 같다.

마찬가지로 JM109/pTBG(H+) 또는 JM109/pTBG(H-)에 의

1 2 3 4 5



그림 9 . 총세포 단백질의 전기영동 1 , M.W. standard;  
2 , E. coli JM109/pTBG; 3 , E. coli JM109/pTBG(H+);  
4 , E. coli JM109/pTBG(H- ) ; 5 , 정제된 pre-S2- $\beta$ -gal  
fusion 단백질 .



그림 10. *E. coli* TK1046/pHBSC20 세포의 분획.  
1, cytoplasm ; 2, Total ; 3, M.W. standard  
4. outer membrane ; 5, inner membrane.

해 생성된 fusion 단백질에 대해서도 수용성 분획과 membrane 분획을 분리하여 구성 단백질을 SDS-gel에서 전기영동하였다. JM109/pTBG(H+)에 의해 생성된 소수성 서열을 가진 pre-S2-β-gal은 수용성 분획에서 발견되었다. 따라서 소수성이 큰 30개의 S 단백질의 N-말단 서열은 pre-S2-β-gal fusion 단백질을 membrane으로 유도하는 역할을 하거나 혹은 적어도 membrane과 결합 능력을 제공하고 있다.

#### 제 5 절 Pre-S2-β-gal fusion 단백질의 정제

재조합 단백질의 정제 과정에서 pTBG(H+)에 의해 생산된 pre-S2-β-gal은 소수성 잔기가 존재하여 membrane 분획에서 수거되기 때문에 그 정제가 불가능하였다. 하지만 pTBG(H-)에 의해 만들어진 pre-S2-β-gal은 수용성 분획에 존재하기 때문에 그 정제를 시도할 수 있었다. JM109/pTBG(H-) 세포 추출액을 실험방법에서 기술한 바와 같이 membrane 입자들을 제거하고 TPEG-Sepharose 친화성 컬럼 크로마토그래피에 통과시켰다. 컬럼에 결합되지 않은 단백질들은 완충용액으로 말끔히 제거하고 결합된 pre-S2-β-gal 단백질은 이온농도를 높여서 컬럼으로부터 분리시켰다. 분리된 단백질의 순수도를 알아보기 위해서 SDS-gel에서 전기영동한 결과 그림 9의 lane 5에서와 같이 기대했던 위치에서 한 개의 밴드로 나타났다. 뿐만아니라 HBsAg 항체와 결합하는 능력도 있었다.

## 제 4 장 결론 및 건의

본 연구에서는 hepatitis B virus의 표면항원중 항원성이 높은 것으로 알려진 pre-S2 부위를 코딩하는 유전자를 대장균에 클론하여 발현하는 것을 연구하였다. pre-S2와 같이 길이가 짧은 외부 단백질은 대장균에서 안정한 형태의 발현이 잘 안된다. 따라서 pre-S2를  $\beta$ -galactosidase와 같은 안정한 숙주 단백질에 연결시키는 방법을 채택하였다. 또한 pre-S2를 대장균의 outer membrane에 존재하는 Omp F 단백질의 신호서열 뒤에 연결시켜서 세포질 밖으로 산출하는 방법도 시도하였다. Omp F의 신호 서열을 연결시켰을 때는 Omp F-pre-S2- $\beta$ -gal 상태의 tribrid 단백질을 생산하게 되었는데 이는 membrane에 삽입은 되어도 통과하지는 못하게 되었다. 그리고 재조합 단백질의 수율도 세포 단백질 전체의 1~3% 밖에 되지 않았다. 비교적 수율이 높은 재조합 단백질은 플라스미드 pTBG(H<sup>-</sup>)에 의해 생산된, pre-S2와  $\beta$ -galactosidase만이 fusion된 단백질이다. 이것은 총 세포 단백질의 15%나 되며 수용성 분획에서 수거되었다. 이 pre-S2- $\beta$ -gal 단백질은  $\beta$ -galactosidase 친수성 컬럼 크로마토그래피를 통해서 정제되었다. 정제된 fusion 단백질은 항-HBs Ag 항체와 반응시킨 결과 pre-S2 특이의 항원을 지닌 것이 확인되었다. 현재 정제된 fusion 단백질을 토끼에 주사하여 pre-S2의 면역원성을 조사하고 있다.

Pre-S2를 이용한 간염 백신 개발을 위해서는 다음과 같은 몇가지 연구가 더 진행되어야 한다. 첫째, 재조합 단백질의 수율을

더 높여서 총 세포 단백질의 50%정도가 되도록해야 한다. 들쭉재조합 단백질로 부터 pre-S2를 분리 정제해야 한다. 이것은 전체  $\beta$ -galactosidase와 같이 길이가 긴 단백질에 fusion 시키면은 CNBr로 자른 후에도 그 펩타이드 산물들이 너무 많기때문에 pre-S2만을 분리해 내기는 어렵다. 따라서 길이를 줄인 (truncated)  $\beta$ -galactosidase와 연결시키는 방법을 연구하고 있다. 세제 분리된 pre-S2 펩타이드는 그 자체로서 pre-S2 면역원성이 높은가를 확인해야 한다. 만일 면역원성이 낮을 경우에는 분리된 pre-S2 펩타이드를 다른 carrier 단백질이나 liposome에 연결시켜서 면역원성을 높이는 방법을 연구하여야 한다.



## 참 고 문 헌

- (1) Dejean, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5350 (1984)
- (2) Tiollais, P. et al., Nature, 317, 489 (1985)
- (3) Stibbe, W. and Gerlich, W.H., Virology, 123, 436 (1982)
- (4) Stibbe, W. and Gerlich, W.H., J. Virol., 46, 626 (1983)
- (5) Heermann, K.H. et al., J. Virol., 52, 396 (1984)
- (6) Hopp, T.P. and Woods, K.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3824 (1981)
- (7) Machida, A. et al., Gastroenterology, 85, 268 (1983)
- (8) Machida, A. et al., Gastroenterology, 86, 910 (1984)
- (9) Persing, D.H. et al., Science, 234, 1388 (1986)
- (10) Charnay, P. et al., Nature, 286, 893 (1980)
- (11) Edman, J.C. et al., Nature, 291, 503 (1981)
- (12) MacKay, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4510 (1981)
- (13) Fujisawa, Y. et al., Nucleic Acids Res., 11, 3581 (1983)
- (14) Fujisawa, Y. et al., Gene, 40, 23 (1985)
- (15) Offensperger, W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 7540 (1985)
- (16) Valenzuela, P. et al., Nature, 298, 347 (1982)
- (17) Valenzuela, P. et al., in "Modern Approaches to Vaccines" (Chanock, R.M. and Lerner, R.A. eds.), Cold Spring Harbor Laboratories, New York, pp. 209-213 (1984)
- (18) Valenzuela, P. et al., Biotechnology, 3, 317 (1985)
- (19) Gabral, G.A. et al., J. Gen. Virol., 38, 339 (1978)
- (20) Christman, J.K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1815 (1982)
- (21) Moriarity, A.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2606 (1981)

- (22) Laub, O. et al., *J. Virol.*, 48, 271 (1983)
- (23) Michel, M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 7708 (1984)
- (24) Michel, M. et al., *Biotechnology*, 3, 561 (1985)
- (25) Milich, D.R. et al., *Science*, 228, 1195 (1985)
- (26) Lerner, R.A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3403 (1981)
- (27) Dressman, G.R. et al., *Nature*, 295d 158 (1982)
- (28) Bhatnagar, P.K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4400 (1982)
- (29) Nenrath, A.R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7871 (1982)
- (30) Neurath, A.R. et al., *Science*, 224, 392 (1984)
- (31) Neurath, A.R. et al., *Nature*, 315, 154 (1985)
- (32) *Chemical and Engineering News*, March 1986, 5 (1986)
- (33) Weinstock, G.M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 4432 (1983)
- (34) Amann, E. et al., *Gene*, 25f 167 (1983)
- (35) Maniatis, T. et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratories, New-York (1982)
- (36) Mandel, M. and Higa, A., *J. Mol. Biol.* 53, 154 (1970)
- (37) Miller, J.H., in "Experiments in Molecular Genetics" Cold Spring Harbor Laboratories, New-York, pp. 352-356 (1972)
- (38) Towbin, H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350 (1979)
- (39) Schumann, H.A. and Silhavy, T.J., *J. Biol. Chem.*, 256, 560 (1981)
- (40) Ullmann, A., *Gene*, 29, 27 (1984)