

T-cell 하이브리도마에 의한 인체
림포카인 생산에 관한 연구

(E. coli를 이용한 HIV 표면인자의 발현 및
AIDS 환자의 진단시약 개발)

Development of AIDS diagnostic kits using E. coli
expression systems

1988. 3

한국과학기술원
부설 유전공학센터

배 포 선

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

제 출 문

한국과학기술원

부설 유전공학센터 소장 귀하

본 보고서를 " T-cell 하이브리도마에 의한 인체 림포카
인 생산에 관한 연구 " 사업의 최종연구보고서로 제출합니다.

1988 년 3 월

주관연구기관명 : 한국과학기술원 부설유전공학센터

총괄연구책임자 : 정대화 (유전공학센터 책임연구원)

연 구 원 : 이영익 (유전공학센터 선임연구원)

유향숙 (유전공학센터 선임연구원)

장원희 (유전공학센터 연구원)

김영훈 (유전공학센터 연구원)

윤미선 (유전공학센터 연구원)

요 약 문

I. 제 목

T-cell 하이브리도마에 의한 인체 림포카인 생산에 관한 연구 (E. coli 를 이용한 HIV 표면인자의 발현 및 AIDS 환자의 진단시약 개발)

II. 연구의 목적 및 중요성

본 연구에서는 최근 세계보건문제로 야기되고 있는 AIDS 의 확산을 막기 위한 조기진단 및 감염의 방지를 위하여 유전공학방법으로 진단시약을 만드는 것을 목표로 한다. 본 실험에서는 서론에서 밝힌 바와 같이 HIV (Human Immunodeficient Virus) 의 유전인자중 env 유전인자를 비롯하여 몇개의 조절유전인자를 E. coli 내에서 발현시켜서, 정제시킨 다음 정제된 단백질을 항원으로 한 진단시약 개발을 목적으로 한다.

이러한 진단시약의 개발은 전세계적으로 만연되고 있는 불치의 병이라 불리우는 AIDS 의 국내 전파를 막아, 국민보건문제로의 야기를 방지할 것이다.

III. 연구의 내용 및 범위

본 연구에서는 AIDS 를 일으키는 HIV에 대한 진단시약 개발을 목표로 한다. 표면항원 (env) 및 조절 항원에 대한 cloning 및 이의 발현을 시도하여, HIV에 대한 항원, 항체

검사를 토대로 한 진단시약개발에 역점을 두었다.

Ⅳ. 연구결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서는 E. coli에서 HIV 유전인자를 발현시킨 다음, 발현된 단백질을 이용하여, AIDS 진단시약을 만드는 것을 목표로 한다.

이렇게 만든 AIDS 진단시약은 AIDS의 확산을 막아 국민보건문제로 야기되는 AIDS를 조기에방 하여 준다.

Summary

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

AIDS, which are 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.

For these reasons, the gp160 peptide surface antigen of HIV, has been expressed in E. coli system using recombinant DNA techniques in order to use as an antigen in developing diagnostic kits.

Contents

1. Introduction	11
2. Experimental Methods	13
1) Isolation of env gene from HIV genome	13
2) KpnI digestion of pTTQ 19 vector	13
3) Cloning of gp 160 env gene into pTTQ 19 vector	14
4) Expression of env gp 160 - pTTQ 19 in <u>E.coli</u>	15
3. Results & Discussion	17
References	19

목 차

제 1 장 서 론	11
제 2 장 실험방법	13
제 1 절 HIV 유전인자로부터 표면유전인자 DNA의 분리	13
제 2 절 Tac 프로모터를 함유하고 있는 pTTQ 19 벡터의 <u>KpnI</u> 절단	13
제 3 절 표면유전인자 (gp 160) DNA의 pTTQ 19에의 cloning	14
제 4 절 표면유전자의 <u>E. coli</u> 내에서의 발현	15
제 3 장 연구결과 및 고찰	17
참 고 문 헌	19

서 론

현대 사회문제로 야기되고 있는 AIDS의 원인이 되는 HIV의 발견은 극히 최근의 일이며, 1983년 볼란서의 Luc Montagnier에 의해 최초로 전자현미경 촬영이 시도되었으며, 1984년 미국의 Robert C. Gallo에 의해서 AIDS를 일으키는 원 인체임이 밝혀졌다.¹

현재까지 이러한 AIDS를 일으키는 균은 두종류라고 알려져 있으며 (HIV-1, HIV-2), 본연구에서는 HIV-1에 대한 진단시약을 개발하게 된다.²

이러한 HIV-1의 유전인자는 도표 1에서도 나타난 바와같이 5개의 구조인자와 3개의 조절인자로 이루어졌다.³ 이중에 표면유전인자인 env의 변이는 상당히 높으며, 이러한 다양성때문에 정확한 백신 및 진단시약의 개발은 어려움을 겪게 된다.

이러한 이유로 본연구에서는 표면항원 및 조절항원에 대한 발현 및 정제를 하여 보다 정확한 진단시약 개발을 하게 된다.

본 보고서에서는 우선 표면유전인자 gp 160에 대한 발현에 대한 실험을 기술하고자 한다.⁴ 표면유전자(env)는 160 kd의 glycoprotein을 code하게 되는데 이러한 gp160은 protein processing에 의해서 외부의 glycoprotein인 gp 120과 막내에 존재하여 있는, transmembrane protein인 gp41로 되어 있다.⁵

이중에 gp120 은 virus 감염의 시초인 CD 4 에 결합됨이 밝혀졌으며, 이러한 gp120 - CD 4 의 결합이 원인이 되어 병원성을 나타내게 된다. HIV 에 감염된 환자에서 gp 41, gp120, p24 에 대한 면역학적 작용이 중요시되고 있는데, 도표 2 에서 보는 바와 같이 HIV 에 감염된 환자는 감염후 6 주후부터 항체를 지니게 된다.⁶

그림에서 보는 바와같이 gp 41 에 대한 항체는 항상 지니게 된다. p 24 (gag)에 대한 serology도 다양한 변이를 나타내게 되는데, 처음 AIDS 에 감염된 환자는 6 주후부터 p24 에 대한 항체를 나타내다가 발병기에 이르러서는 항체의 양이 감소되며, 항원이 증가하게 되며 이때부터 AIDS 로의 발병상태가 나타나게 된다.

이러한 여러점으로 볼때 여러 유전인자에 대한 발현정제 및 이 단백질들을 복합적으로 사용하여 항원으로 이용하여, 진단시약을 개발하는 것은 중요한 의미를 지니게 된다.

실 험 방 법

1. HIV 유전자로부터 표면유전자 (Env, gp160) DNA 의 분리

psP64 플라스미드의 SstI 위치에 HIV 유전자가 들어있는 플라스미드 BH10 (그림 3)을 KpnI 효소로 37 °C에서 2 시간 작용시켜 절단한 후 1% agarose gel에서 전기영동하여 표면 유전자 DNA를 포함하고 있는 2.65 kilobase pair(Kb)의 KpnI 절편을 분리하였다. 분리된 이 2.65 Kb 절편을 agarose gel로부터 elution하여 phenol 추출 및 에타놀 침전방법을 거쳐 순수하게 분리하였다. 이 fragment는 표면유전자(gp160)의 49 번째 아미노산을 coding하는 DNA 서열로부터 마지막 아미노산인 863 번째 아미노산을 coding하는 DNA sequence를 포함하고 있다.

2. Tac 프로모터를 함유하고 있는 pTTQ19 벡터의 KpnI 절단

플라스미드 pTTQ19 벡터 (그림 3)는 합성된 tac 프로모터를 가지고 있고 E. coli β -galactosidase gene (LacZ) 중 α -fragment protein을 coding하는 DNA sequence를 함유하며 tac 프로모터와 LacZ의 α -fragment gene 사이에 polylinker site들의 DNA sequence들이 LacZ gene sequence와 frame이 맞게 연결되어 있어 이 부위에 제한효소를 이용하여 reading frame이 맞게 DNA를 삽입하면 tac 프로모터로부터 N-terminal의 몇개의 아미노산이 혼성된 단백

질을 만들 수 있다. 이러한 pTTQ19 플라스미드 DNA를 poly-linker에 있는 KpnI site를 KpnI 제한효소로 절단한 후(37 °C에서 2시간) linear form의 plasmid를 agarose gel에 전기영동하여 분리하고 agarose gel로부터 elution하여 phenol 추출, 에타놀 침전을 거쳐 분리 정제하였다.

3. 표면유전자 (gp160) DNA의 pTTQ19에의 cloning

앞에서 분리한 표면유전자 DNA를 KpnI 효소로 자른 linear form의 플라스미드 pTTQ19와 ligation buffer(66 mM Tris-HCl pH 7.6, 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 10 mM ATP 1 μg/μl BSA)내에서 혼합한 후 T₄ DNA ligase를 이용하여 12 °C에서 16시간동안 반응시켰다. 이렇게 하여 ligation이 된 DNA를 CaCl₂(6) 방법으로 competent하게 한 E. coli HB 101 cell내에 형질전환시켰다. 형질전환된 E. coli cell중에서 플라스미드를 포함하는 colony cell들을 Ampicillin이 포함된 (200 mg/l) Luria-Broth(LB) plate상에서 선택하여 이로부터 플라스미드를 다음 방법에 의해 분리하여 분석하였다. 각 colony들을 5 ml Ampicillin-LB배지에 접종하여 37 °C에서 16시간동안 배양한 후 이로부터 1.5 ml를 취하여 alkaline 방법(2)에 의하여 플라스미드를 분리하였다. 분리한 플라스미드를 KpnI, BamHI, HindIII, SalI 제한효소를 이용하여 절단한 후 agarose gel에 전기영동하여 tac 프로모터 다음에 표면유전자가 제위치에 들어간 clone을 확인하였다 (그림 3의

pYYM-Env-1). 이 플라스미드를 포함하고 있는 E. coli HB 101 cell 을 다음 방법을 통해 표면유전자 발현여부를 조사하였다.

4. 표면유전자 (Env, GP160) 의 E. coli 내에서의 발현

a) 세포배양 및 발현유도

표면유전자 DNA 를 포함하고 있는 플라스미드 (PYYM-Env-1) 를 함유하는 E. coli cell 을 5 ml 의 Ampicillin-LB 배지에서 접종하여 37 °C에서 16 시간 배양한 후 이중 0.1 ml 를 취하여 10 ml 의 Ampicillin-M9 minimal 배지에 접종한 후 37 °C에서 배양하였다. Cell 농도가 $A_{600} = 0.2$ 될 때 100 mM IPTG (Isopropylthiogalactoside) 용액 200 μ l 를 넣어 최종농도가 2 mM 되도록 한 후 계속하여 37 °C에서 진탕배양하였다. 그후 2 시간, 4 시간, 8 시간, 16 시간마다 1.5 ml 씩 취하여 12,000 g 에서 3 분간 원심분리하여 E. coli cell pellet 을 모았다.

b) SDS-acrylamide gel 전기영동 및 단백질 분리

IPTG 로 발현유도시킨 E. coli cell 들에 100 μ l sample buffer (100 mM Tris pH 6.8, 5% glycerol, 1% β -mercapto ethanol 2% SDS 0.1% bromophenol blue) 를 넣어 진탕한 후 95 °C에서 5 분간 끓이고 이어서 12000 \times G에서 5 분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액 20 μ l 를 아래와 같이

제조한 10% polyacrylamide-SDS gel 에 넣어 전기영동하였다.

SDS-polyacrylamide gel : 30 % stock acrylamide 용액 (acrylamide : bisacrylamide = 29.2 : 0.8) 10 ml , lower gel buffer (1.5 M Tris pH 8.8 , 0.4 % SDS) 7.5 ml 10 % ammonium persulfate 0.1 ml , TEMED 15 μ l 그리고 H₂O 12.5 ml 을 섞어 10 % acrylamide 용액이 되도록 하여 17.5 × 0.15 15 cm 의 유리 plate 사이에 부어 main gel 을 만들고, 그 위에 stacking gel 로서 30 % stock acrylamid 용액 1.8 ml , upper gel buffer (0.5 M Tris pH 6.8 , 0.4 % SDS) 3.0 ml , 10 % ammonium persulfate 40 μ l , TEMED 12 μ l , 그리고 H₂O , 7.2 ml 을 섞어 4.5 % acrylamide 용액이 되도록 하여 main gel 위에 부어 만들었다. 여기에 위에서 처리한 cell sample 들을 각각 20 μ l 씩 gel 에 넣은 후 Tris-glycine buffer (25 mM Tris , glycine 0.1 % SDS pH 8.3) 를 이용하여 150 V 에서 Bromophenol blue 가 gel 의 밑에 올때 까지 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후 gel 을 유리판에서부터 분리하여 Coomassie blue staining solution 에 1 ~ 2 시간 동안 염색한 후 다시 탈색하여 gel 상에 나타난 단백질의 band 들을 조사하였다.

연구결과 및 고찰

1. 표면유전자 DNA (gp160)를 포함하는 plasmid 제조

그림 3에서 보는 바와 같이 HIV 유전자 DNA를 KpnI 제한효소로 자르면 2.65 Kb의 KpnI fragment가 나오는데 이 DNA는 표면유전자 DNA 중 49 번째 아미노산을 coding 하는 DNA로부터 gp160 단백질의 마지막 아미노산을 coding 하는 DNA를 포함하게 되며, 이 DNA가 플라스미드 pTTQ19의 tac promoter 뒤에 있는 polylinker 부위의 KpnI 제한효소 자리에 삽입이 되면 polylinker 부위의 14개 아미노산을 coding 하는 DNA 다음에 이어서 표면유전자 DNA의 49 번째 아미노산을 coding 하는 DNA가 연결된다. 결국 플라스미드 pTTQ19의 KpnI 자리에 표면유전자 DNA가 삽입되어 이로부터 단백질이 생기게 되면 표면유전자 단백질 gp160의 N-terminal 쪽 48개의 아미노산이 빠지고 그대신 14개의 다른 아미노산이 들어가므로 gp160의 48 아미노산이 14개의 다른 아미노산으로 치환된 단백질이 만들어지게 된다. 그러므로 이 플라스미드 (pYYM-Env-1)로부터 단백질이 제조되면 gp160의 총 아미노산 863개 대신 826개의 아미노산을 가진 단백질이 생성된다.

2. Clone된 표면유전자의 발현

앞에서 제조한 플라스미드 (pYYM-Env-1)를 함유하는

E. coli HB101 을 배양하여 IPTG 로 표현유도한 후 E. coli 전체 단백질을 10% polyacrylamide-SDS gel 상에서 분석하여 보면 그림 4 에서 보는 바와 같이 IPTG 로 처리하여 발현 유도시킨 cell 에서는 IPTG 로 발현유도 시키지 않은 세포보다 분자량 100,000 정도인 단백질이 나오는 것을 볼 수 있다. 또한 2.65 kb KpnI fragment (표면유전자 DNA) 를 가지고 있지 않는 플라스미드 pTTQ19 을 함유하는 E. coli cell IPTG 로 발현을 유도하더라도, 분자가 100,000 인 단백질 band 가 나오지 않는 것으로 보아 100,000 분자량을 가진 이 단백질은 표면유전자 DNA 를 포함하는 2.65 kb DNA fragment 로부터 생성되는 것임을 알 수 있다. IPTG 로 발현유도된 cell 에서 나오는 이 단백질 band 가 과연 표면유전자로부터 나오는 단백질인지 아닌지를 더욱 검토하기 위하여 이 단백질을 분리하여 AIDS 환자로부터 얻은 혈청과 반응시켜보아 이 혈청속에 있는 표면유전자 단백질에 대한 항체와 반응하는가를 조사하여야 한다. 현재 IPTG 로 유도된 E. coli 전체 단백질을 다시 전기영동하여 Western blot 방법에 의해 nitrocellulose paper 에 이전시켜 단백질들을 고정시킨 후 이 단백질들이 부착되어 있는 nitrocellulose paper 와 AIDS 환자의 혈청을 반응시켜 표면단백질 항원-항체 반응이 일어나는지 여부를 조사하고 있는 중이다.

References

1. M. Popovic and Robert C. Gallo *Science* 224: 497 (1984)
2. Phyllis J. Kanki et al. *Science* 236: 827 (1987)
3. "The control of human retrovirus gene expression" edited by B. Robert Franza Jr. Cold Spring Harbor, in press
4. The AIDS Virus Robert C. Gallo in *Scientific American* vol 256 No. 1, pages 38-48, Jan, 1988.
5. Willian A. Haseltine and Joseph G. Sodroski "in *Retrovirus Biology*" edited by Robert C. Gallo Marcel Dekker, Inc., 1988
6. *Molecular Cloning* (1982)
T. Maniatis, T. Fritsh. E. F. and Sambrook J.

HTLV-III

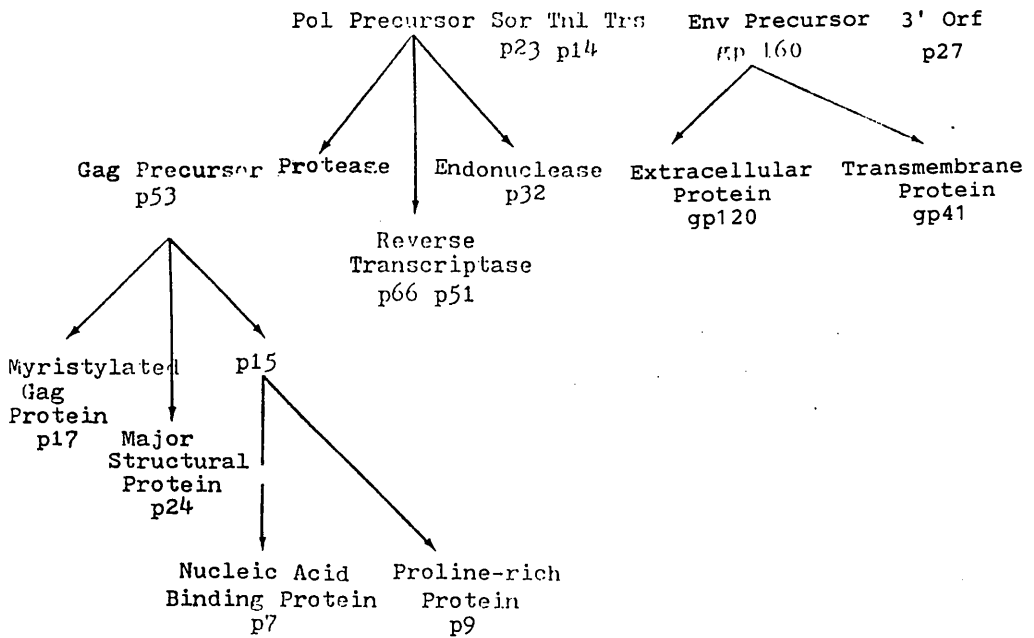
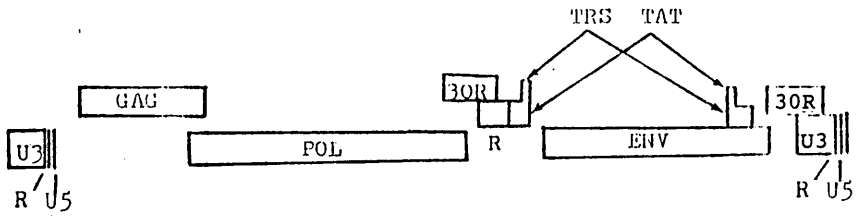
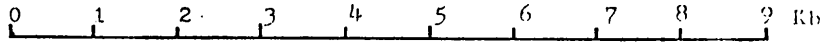


그림 1.

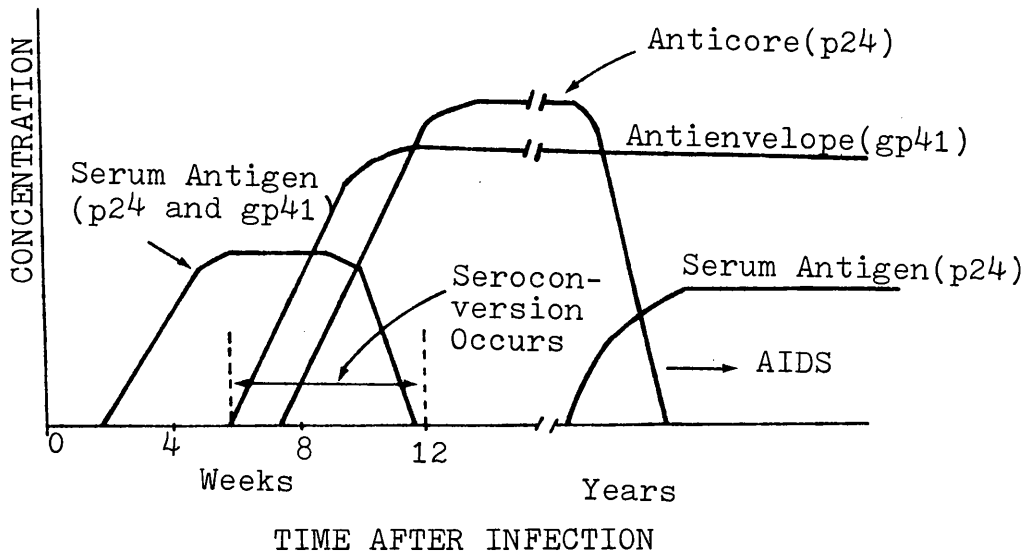


그림 2.

The dynamics of the antibody response to HIV-1 infection as detected by EIA methods.

HIV Envelope gene (env) cloning in *E. coli*

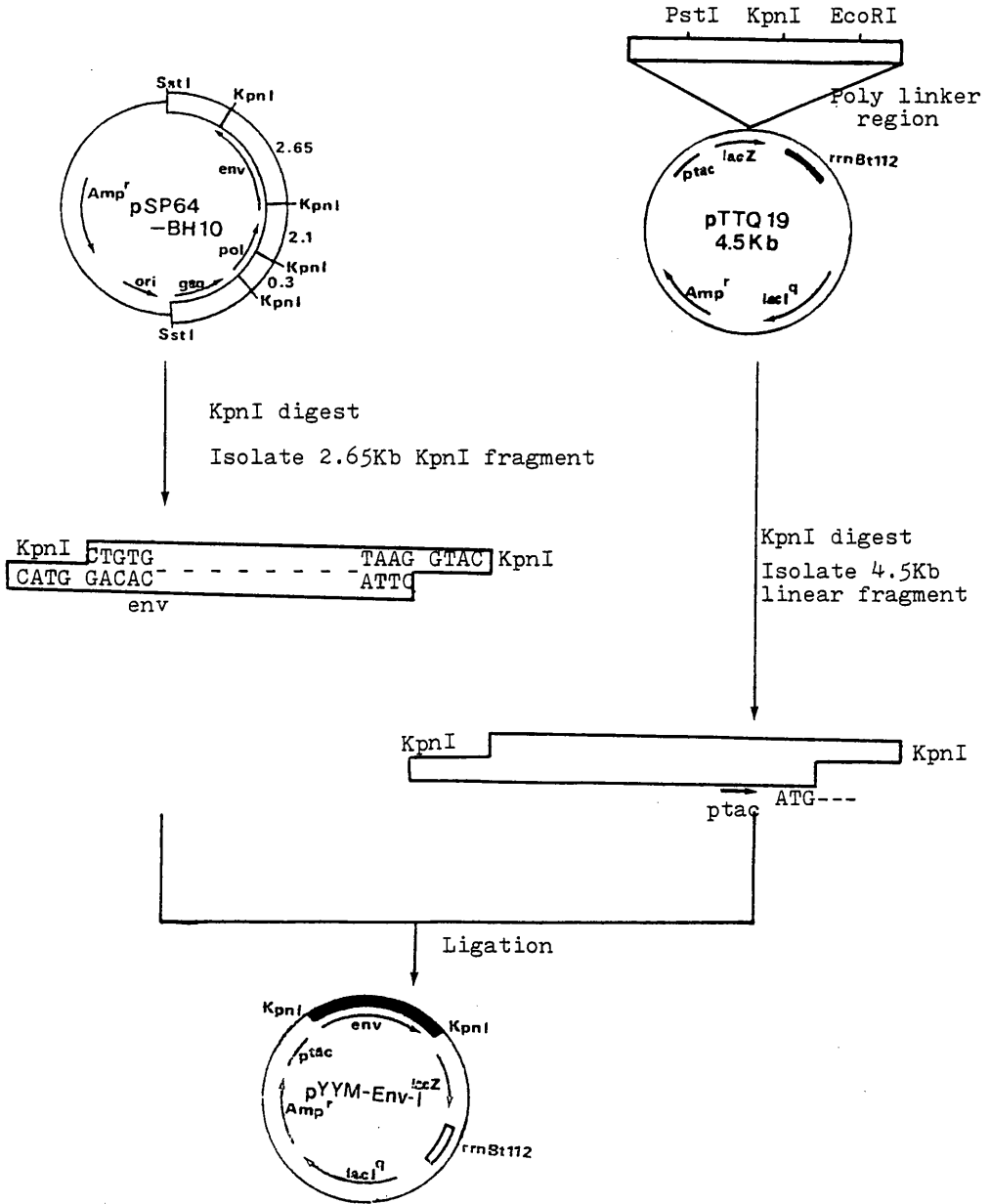


그림 3.

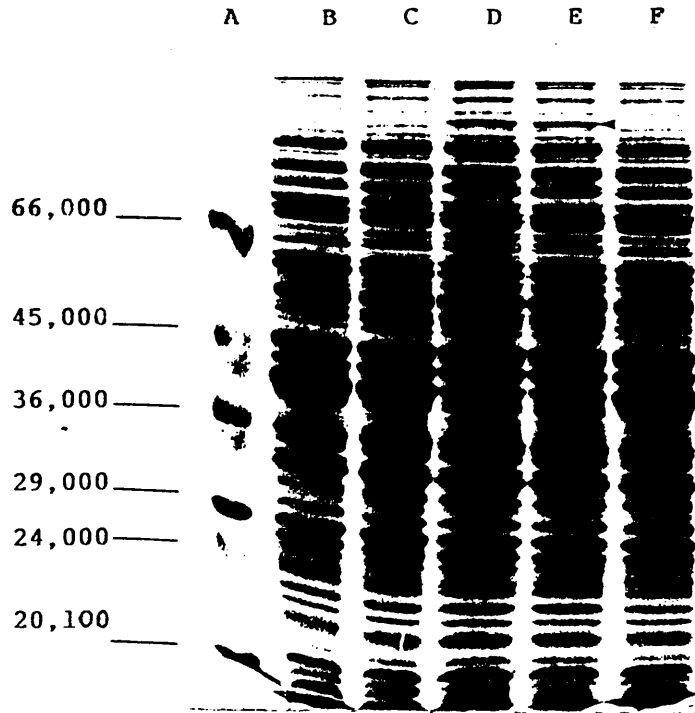


그림 4.

- A : Size marker :
- B : HBIOI containing plasmid PTTQI9 Vector : Induced for 16hrs
- C : HBIOI containing plasmid PTTQI9 Vector : Uninduced
- D : HBIOI Containing plasmid PYYM-Env-1 : Induced for 16hrs
- E : Same as D
- F : HBIOI containing plasmid PYYM-Env-1 : Uninduced

Figure 4 : 10% acrylamide-SDS gel of cell extracts containing each plasmid. Arrow indicates the protein band produced from inserted env DNA.

