

# 眞核細胞의 發現 및 分泌시스템 開發

Development of Expression and Secretion Vector  
in Eukaryotes

研究機關

韓國遺傳工學研究組合

科學技術處

# 제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 "진핵세포의 발현 및 분비시스템 개발" 과제의  
제3차년도 최종보고서로 제출합니다.

1992년 10월 16일

주 관 연 구 기 관 : 한국 유 전 공 학 연 구 조 합

총 팔 연 구 책 임 자 : 강 현 삼

연 구 원 : 고의찬 김승수 이정식 이영호  
박경준 김문희 구본용 장대용  
고상석 안진현 양지영 김진욱  
박용준 강충민 이미영 구영모  
이일범 박종준 이영석 이영철  
추승호 유승신 권창혁 신남규  
정지영

여 백

# 요 약 문

## I. 연구개발 목표 및 내용

이방 숙주에서의 유전자의 클로닝과 발현은 산업적으로 유용한 효소들의 생산과 특성화에 있어서 중요한 기술이다. 이방 단백질의 배양액으로의 분비는 정제에 있어 커다란 장점을 제공해 주어, 생물공학산물의 하부공정을 단순화시켜 준다. 특히 분비체계는 숙주세포가 쉽게 이용할 수 없는 고분자물질을 활용할 경우 필수적이다. 효모의 경우 유전학적 측면뿐만 아니라 공학적인 면에서도 많은 연구가 되어있어, 효모 promoter에 의한 이방단백질의 생산 및 분비에 유용한 숙주로 이용될 수 있다. 본 연구에서는 효모의 유도성 promoter인 PH05 promoter와 항상성 promoter인 *ADHI* promoter를 이용하여 killer toxin 유전자의 분비신호서열과 쥐의  $\alpha$ -amylase 유전자의 분비신호서열에 의한 분비형 벡터를 제조하였고, 이를 이용하여  $\beta$ -glucanase와 소 성장 호르몬 (bGH)의 발현과 분비에 성공하였다.

또한 본 연구에서는 포유동물 세포의 벡터개발에 필요한 test gene으로 사용하기 위하여 종양괴사인자 유전자 (TNF)를 제조하고 진핵세포에서의 이방유전자의 발현을 알아보았다. 포유동물 세포벡터에 삽입하여 발현시킨 test gene으로서 종양괴사인자 유전자는, 그 product인 종양괴사인자가 항암제로 개발될 수 있는 유용한 BRM(biological response modifier)이므로 test gene으로서의 가치가 큰 것으로 사료된다.



## 1. 효모에서의 분비형 벡터의 개발

효모 *Kluyveromyces lactis*의 killer toxin 유전자의 분비신호서열은 분비효율이 90% 이상 되는 것으로 보고된 바 있다. 이 분비신호서열을 합성하여 효모의 유도성 promoter인 *PHO5* promoter에 연결하고, 효모의 복제원점(2 $\mu$ m)과 선택표지(*LEU2*), 그리고 *CYC1* 유전자의 전사종결부위를 도입함으로써, Pi 농도에 의하여 그 발현을 조절할 수 있는 분비형 벡터(pSEC5)를 제조하였다. 이 벡터에 *Bacillus*로부터 클로닝한  $\beta$ -1,4-glucanase를 도입하여 효모에서 발현시킨 결과, 분비효율이 약 70% 정도로 나타났으며 전체분비된 양은 약 5.1 unit/ml로 아주 높게 나타났다. 또한 소성장 호르몬(bGH) 유전자를 도입하여 그 발현과 분비의 정도를 효소면역측정법으로 조사해 본 결과, 생성된 대부분의 소 성장 호르몬이 세포 배양액으로 분비됨을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서 제조된 분비형 벡터는 발현과 분비효율이 높은 벡터임을 알 수 있었다.

한편으로, mouse salivary  $\alpha$ -amylase 유전자의 분비신호서열을 효모의 항상성 promoter인 *ADHI* promoter에 연결시키고, 구리내성 유전자를 선택표지로 지니며, 또한 *CYC1* 전사종결부위를 포함하는 분비형 벡터(pAMB3)를 제조하였다. 이 벡터에 *Bacillus*로부터 클로닝한  $\beta$ -1,4-glucanase를 도입하여 효모에서 발현시킨 결과, 60% 정도의 분비효율을 나타내었다.

## 2. 포유동물세포의 벡터 개발

사람의 정상 peripheral monocyte에서 genomic DNA를 분리하여 *EcoRI* 처리에 의하여 사람 종양괴사인자 유전자를 포함하는 3kb 조각을 얻은 후 vector를 이용하여 genomic library를 제조하였다. 제조된 library는 oligonucleotide

probe를 이용하여 plaque hybridization를 통해 screening하였다. 사람종양괴사의 존재가 확인되는 phage에서 DNA를 추출하여 *EcoRI* 처리에 의해 유전자의 존재를 확인하고 3kb DNA를 수집하였다. 수집된 DNA를 pBSII 에 옮겨 TNF 유전자를 확인한 후, crude lysate를 취하여 L929 세포에 대한 cytotoxicity assay를 수행하였으며 또한 항체를 이용한 효소면역측정법으로 사람종양괴사인자의 존재를 확인하였다. AcNPV derivative vector와 pSVL plasmid에 TNF 유전자를 도입하여 진핵세포에 transfection 한 후, 배양액을 취하여 L929 세포에 대한 독성 측정과 Western blot analysis를 수행하였다. L929 암세포에 대한 종양괴사인자의 활성도는 Flick과 Gifford의 방법을 사용하여 측정하였다. Western blot은 12.5% DISC SDS-PAGE를 수행한 후 표준단백질이 있는 부분은 잘라내어 염색한 후 이동거리를 측정하여 표준직선을 얻거나, biotin으로 표지되어 있는 표준단백질과 함께 바로 blot하였다.

## II. 연구결과 및 활용에 관한 건의

결과적으로 제조된 효모의 분비형 벡터인 pSEC5는 효모내에서 multy-copy로 존재하며 LEU2 선택표지를 지니고 있어 형질전환시 형질전환체의 선별에 이용된다. 또한 *PHO5* promoter에 의해 낮은 Pi 농도에서 발현이 유도되어 *PHO5*의 전사개시점에서 mRNA를 합성하며, 만들어진 단백질은 killer toxin 유전자의 분비신호서열을 이용하여 세포밖으로 분비된다. 그리고 분비신호서열 바로 다음에 *NaeI* 제한효소자리가 single-site로 존재하기 때문에 이 제한효소를 이용하여 발현시키고자하는 구조유전자를 분비형 벡터에 도입할 수 있다.

전사의 효율을 높이기 위한 CYC1 유전자의 전사종결부위도 가지고 있다. 이 벡터에 섬유소 분해효소와 소 성장호르몬 유전자를 도입하여 효모에서 발현시킨 결과, 그 분비효율이 70%정도로 높이 나타났다. 또한 ADHI promoter를 이용한 분비형 벡터인 pAMB1과 pAMB3는 효모내에서 multi-copy로 존재하며 CUP1의 선택표지를 지닌다. 그리고 합성된 단백질은 쥐의  $\alpha$ -amylase 유전자의 분비신호서열을 이용하여 세포밖으로 분비된다.  $\beta$ -glucanase를 도입하여 조사한 결과 분비효율이 60% 정도로 나타났다. 한편 발현효율을 증대시키기 위하여 전사종결부위를 추가하였을때에는 전체 효소역가가 2배 가량 증가하였으며 분비효율에는 변화가 없었다. 본 연구에서 개발된 분비형 벡터를 보다 더 발전시키기 위해서는 서로 다른 promoter를 이용하고 또한 몇몇 효모의 유전자에서 발견되는 상위조절인자의 도입등에 의한 효과 등을 비교해 보아야 할 것이다.

3X10<sup>7</sup>개의 사람 peripheral monocyte에서 17.995 g의 DNA를 분리한 후 이것에 EcoRI를 처리하여 수집한 3kb DNA 조각을 gt11 vector에 재조합하여 사람 genomic library를 제조하였다. 이 library에서 1차와 2차의 screening을 통해 사람 종양괴사인자 유전자(TNF)를 포함하는 hybrid phage를 선별하였다. 한편 hybrid phage에서 DNA를 추출하여 EcoRI 처리에 의하여 얻은 3kb DNA는 그 양이 3X10<sup>11</sup> pfu/ml phage 당 0.1 $\mu$ g 이하로 포유동물세포 벡터 개발에 필요한 test gene으로 사용하기에 충분하지 못하여, 이 3kb DNA를 pBSII phagemid vector에 재조합해서 그 양을 늘리는 실험을 수행하였다. 선별된 hybrid phage를 *E. coli* Y1089에 감염시켜 recombinant lysogen을 제조하였으며 이 lysogen과 형질전환된 colony를 배양하여 얻은 crude lysate의 L829세포에 대한 cytotoxicity를 확인하였으며 Western blot 분석방법을 통하여 사람 종양괴사

인자(TNF)가 존재함을 확인하였다. TNE exon 3,4를 pSVE에 subcloning 한 후 COSM6에 transfection하고 배양한 후 세포추출물을 Western blot 분석방법과 L929세포에 대한 세포독성 측정 결과 transfection된 세포에서 사람종양괴사인자의 생성을 확인하였다. 한편 TNF exon 3,4를 pVL1392에 넣고 wild-type AcNPV DNA와 같이 곤충세포인 *Spodoptera frugiperda* 21에 cotransfection하여 recombinant virus를 얻었으며 현재 virus의 purification을 plaque assay방법으로 수행하고 있다.

여 백



# 목 차

제1장 효모에서의 분비형 벡터의 제조 .....	13
제1절 서론 .....	15
제2절 재료 및 방법 .....	20
1. 실험재료 .....	20
2. 실험방법 .....	26
제3절 결과 및 고찰 .....	31
1. 효모 killer toxin 유전자의 분비신호서열을 이용한 분비형 벡터의 제조 .....	31
2. 쥐 $\alpha$ -amylase 유전자의 분비신호서열을 이용한 분비형 벡터의 제조 .....	39
제4절 참고문헌 .....	43
제2장 포유동물세포의 벡터 개발 .....	49
제1절 서론 .....	51
제2절 재료 및 방법 .....	88
1. 실험 재료 .....	88
2. 실험 방법 .....	92
제3절 결과 및 고찰 .....	109
1. 사람 종양괴사 유전자의 분리 .....	109
2. pBSII plasmid vector를 이용한 사람 종양괴사인자 유전자의 subcloning .....	111
3. T7 phage promoter를 이용한 종양괴사인자의 발현 .....	113

4. pBRTNF34의 구축 .....	114
5. 포유동물세포에서의 사람종양괴사인자의 발현 .....	114
6. Baculovirus를 이용한 subcloning .....	116
7. Recombinant 사람 종양괴사인자 (hTNF)의 생성 확인 .....	117
8. 결 론 .....	119
제4절 참고문헌 .....	121

CONTENTS

CHAPTER 1. Construction of secretion vector of yeast ..... 13

Section 1. Introduction ..... 15

Section 2. Materials and Methods ..... 20

    1. Materials ..... 20

    2. Methods ..... 26

Section 3. Results and Discussion ..... 31

    1. Construction of secretion vector using the signal  
        sequence of killer toxin gene of yeast ..... 31

    2. Construction of secretion vector using the signal  
        sequence of mouse  $\alpha$ -amylase ..... 39

Section 4. References ..... 43

CHAPTER 2. The development of mammalian cell vector ..... 49

Section 1. Introduction ..... 51

Section 2. Materials and Methods ..... 88

    1. Materials ..... 88

    2. Methods ..... 92

Section 3. Results and Discussion ..... 109

    1. Isolation of TNF gene ..... 109

    2. Subcloning of TNF gene using pBSII phagemid  
        vector ..... 111

    3. Expression of TNF gene using T7 phage promoter ..... 113

    4. Construction of pBRTNF34 ..... 114



5. Expression of TNF gene in mammalian cell .....	114
6. Subcloning of TNF gene using Baculovirus .....	116
7. Identification of the production of recombinant human TNF .....	117
8. Conclusion .....	119
Section 4. References .....	121

## 제 1 장 효모에서의 분비형 벡터의 제조

여 백

## 제 1 절 서 론

이방 숙주에서의 유전자의 클로닝과 발현은 산업적으로 유용한 효소들의 생산과 특성화에 있어서 중요한 기술이다. 이방 단백질의 배양액으로의 분비는 정제에 있어 커다란 장점을 제공해 주어, 생물공학 산물의 하부공정을 단순화시켜 준다. 특히 분비체계는 숙주 세포가 쉽게 이용할 수 없는 고분자 물질을 활용할 경우 필수적이다 (1).

효모 *Saccharomyces cerevisiae*는, 효모 promoter에 외부 유전자를 결합하여 발현시키는데 있어서 매우 유용한 숙주이다. 이에 주로 이용되어온 효모의 promoter들로는 alcohol dehydrogenase I (2), alcohol dehydrogenase II, 3-phosphoglycerate kinase(3), 그리고 glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase (4-6) 등이 있다. 그러나 이상과 같은 promoter를 사용할 경우 효모에서 발현은 되지만 효모내에 존재하는 protease에 의해 생성된 단백질이 파괴되거나, 효모내에 존재하는 많은 산물이 대량생산 되어 산업적으로 유용한 산물을 분리하는데 장애가 된다. 실제로 human  $\gamma$ -interferon과 같은 것이 효모내에서 매우 불안정하고 또한 순수분리하기가 어렵다고 보고된 바 있다 (7). 따라서, 산업화를 위한 대량생산 단계에서 유용한 유전자 산물의 순수분리가 가능하며, 유전자 산물의 대량생산으로 인한 독성 효과를 제거할 수 있는 분비형 벡터의 개발이 요구되었다. 효모에서 분비되는 단백질은 여러가지 밝혀져 있으나, 세포밖으로 분비된다 하여도 대부분 cell wall에 남아 있게 된다. 그러나, 표 1에서 보는 바와 같이, 외부 단백질의 분비에 이용된 여러가지의 효모 분비신호서열이 보고되었다.

Table 1. Signal sequences used to secrete heterologous proteins from yeast.

Derivation of signal sequence	Examples of recombinant proteins secreted from yeast	Reference
$\alpha$ -Factor	Epidermal growth factor	8
	Interleukin-2, GM-CSF	9
Killer toxin	Cellulose	10
Invertase	$\alpha$ -1-Antitrypsin	11
Acid phosphatase	$\alpha$ -Interferon	12
Amyloglucosidase	Gastric lipase	unpublished

*Saccharomyces cerevisiae*에서의 단백질 분비기작은 동물세포의 단백질 수송기작을 연구하는데 있어서 중요한 모델이 되어 왔으며 유용단백질의 생산수단으로 연구되어 왔다. 효모에서 분비되는 단백질에는 고등한 진핵세포와 마찬가지로 소수성을 띠는 분비신호서열이 있는데, 이는 분비과정의 첫번째 단계인 소포체로의 전위에 중요한 역할을 한다. 효모에서 원하는 단백질을 세포밖으로 분비시키기 위해 효모자체의 분비신호 서열이나 동물세포의 분비신호 서열을 이용하려는 많은 연구들이 수행되었다. 1980년대 이후 *Saccharomyces cerevisiae*의  $\alpha$ -mating factor의 분비신호서열 (13)과 *Kluyveromyces lactis*의 killer toxin 분비신호서열 (14)이 효모에서의 이종단백질의 분비에 효과적이라는 사실이 보고되었다. 1983년 Thomsen (15)은 *Saccharomyces*

*cerevisiae*에서 mouse salivary  $\alpha$ -amylase 유전자를 발현시키고 그 유전자가 갖고 있는 분비신호서열에 의해 배양상등액으로 상당량의  $\alpha$ -amylase가 분비된다는 것을 확인하였고 1986년 Jackson등 (16)은 mouse  $\alpha$ -amylase의 분비신호서열을 이용하여 보리의 endo- $\beta$ -1,3-1,4-glucanase를 효모박으로 분비시키는데 성공하였다. Human  $\alpha$ -amylase는 그 자체의 분비신호 서열로 *Saccharomyces cerevisiae*에서 분비되었으며 (17) human serum albumin도 자체의 분비신호서열에 의해 효모박으로 분비된다고 보고되었다 (18). 효모의 분비신호서열이나 고등한 진핵세포의 분비신호서열을 이용하여 여러종류의 이종 단백질들을 효모에서 발현, 분비시키는 연구들이 수행되었는데, 단백질의 분비 여부 및 그 정도는 분비신호서열에 의해서만 결정되는 것이 아니라 어떤 단백질이 어떤 분비신호 서열과 결합되었는가에 의해서도 영향을 받는다. 즉 단백질 분비기작에 관여하는 여러가지 요인들이 복합적으로 작용하여 분비의 효율성이 결정된다는 것이다. 따라서 하나의 분비신호서열만을 이용하여 많은 수의 이종 단백질을 효과적으로 분비시킨다는 것은 거의 불가능하므로, 여러종류의 분비신호서열을 이용하는 여러종류의 분비형 벡터를 개발하는 것이 효모에서의 이종단백질의 발현 및 분비에 크게 유익하리라 여겨진다.

효모의 일종인 *Kluyveromyces lactis* killer strain에서의 분비형 toxin의 생성과 자가면역성의 발현은 두개의 linear double-stranded DNA plasmid, 즉 pGKL1 (8.9 kb)과 pGKL2 (13.4 kb)에 의해 일어난다 (19). 각각의 plasmid는 약 200 base pair 정도의 terminal inverted repeat sequence를 지니며 (20), 5' 말단에는 단백질이 부착되어 있다 (21). 이들 plasmid는 세포융합이나 형질전환 방법에 의하여 *Saccharomyces cerevisiae*를 포함한 몇몇 다른 효모에 도입될 수 있으며, 이 때 killer 표현형이 나타난다 (22-24). Killer toxin은 *K. lactis*의 non-killer strain을 포함한 다른 많은 종류의 효모에 작



용한다 (19). *S. cerevisiae*의 경우, killer toxin은 adenylate cyclase를 저해하여 성장이 G1 단계에서 멈추도록 하는것으로 밝혀졌다 (25). Curing을 이용한 실험에서 작은 plasmid인 pGKL1에서 toxin 생성과 면역작용을 나타내는 것으로 알려졌다 (26, 27). 그러나 toxin 생성에 관한 pGKL2의 연관성을 배제할 수는 없었다. 이와 같은 관찰은 pGKL1의 안전한 보존에 pGKL2가 필요함을 제시해 준다.

Plasmid pGKL1의 염기서열은 서로 다른 연구집단에 의해 밝혀 졌다 (28, 29). 그 결과 4개의 open reading frame (ORF)이 존재할 것으로 추정되었으며 실제로 각각의 ORF에 해당하는 mRNA가 확인되었다 (28). 이들 4개의 ORF중에서 ORF2와 ORF3가 signal peptide를 만드는 염기서열을 지니는 것으로 나타나 이들에 의해 합성되는 단백질은 분비되리라 예상되었다 (Figure 1). 더우기, pGKL1의 deletion mutant를 가지고 행한 실험에서 ORF2가 toxin의 구조유전자 일 것으로 예상하고 있었는데 (27), 실지로 killer toxin 을 순수 분리 하였을 때 ORF2에서는 97 kDa와 31 kDa의 subunit를, 그리고 ORF3에서는 28 kDa의 subunit를 생성하여 이들 세개의 subunit가 함께 killer toxin의 작용을 나타내는 것으로 밝혀졌다 (30). 그리고 97 kDa subunit 만이 glycosylation 됨을 알 수 있었다. Differential centrifugation을 통한 실험에서는 두 개의 killer plasmid가 세포질에 존재하는 것으로 밝혀졌다(31).

ORF2의 분비서열신호를 이용하여 human interleukin-1의 분비를 90% 이상 이루었다는 사실은 (32), 이 서열이 분비에 매우 효과적이라는 사실을말해준다. 그러나, killer toxin 유전자 자체의 promoter와 signal sequence를 이용하였을 경우에 *S. cerevisiae*에서 발현에 실패하였다는 사실과 (33), pGKL1의 자가 면역 유전자의 발현에 pGKL2가 필요하다는 연구결과 (34)로 볼 때, pGKL2에서 pGKL-specific RNA polymerase 혹은 transcription의 활성화에 필

요한 조절 인자가 생성될 가능성이 있음을 알 수 있다. 따라서 본 실험에서는 DNA 합성기를 사용하여 killer toxin의 분비 신호서열을 직접 합성하여 효모의 유도성 promoter인 acid phosphatase (PH05) promoter와 연결하여 효모에서의 분비형 벡터를 제조하였다. 완성된 분비형 벡터에 *Bacillus subtilis*의 endo  $\beta$ -1, 4-glucanase 유전자와 bovine growth hormone 유전자를 연결하여 그 발현 및 분비정도를 측정하였다.

한편으로 본 연구에서는, *Bacillus subtilis*의 endo  $\beta$ -1, 4-glucanase 유전자에 *Saccharomyces cerevisiae*의 alcohol dehydrogenase isoenzyme I 유전자 (ADHI) promoter를 연결시키고 원래의 분비신호서열 대신에 mouse salivary  $\alpha$ -amylase 유전자의 분비신호서열을 접합시켜서 산업용 알콜생산 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 54에서의 분비를 시도하였으며 발현을 증대시키기 위해 *Sacchchromyces cerevisiae*의 iso-1-cytochrome C 유전자 (CYC1)의 전사종결부위를 부가한 후 그 효과를 비교측정하였다.



## 제 2 절 재 료 및 방 법

### 1. 실험 재료

#### 가. 균 주

클로닝 벡터인 pUC18, pUC19, pBluescript(+), pGEM-5zf(+), YEp24, YEp36, pMS12, pBAG3, pBAG5, YEpGCU 그리고 pAM82는 *E. coli*의 HB101 (*supE44 hsdS20 (rB-mB-) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xy11-5 mt1-1*) 균주를 숙주로 사용하였고, pSEC1, pSEC2, pUSO, pGBS 등은  $\beta$ -galactosidase 활성도를 측정하기 위한 균주 JM109 (*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi $\Delta$ (lac-proAB) F' [traD36 proAB+ lacI<sup>q</sup> lacZ $\Delta$  M15]*) 및 XL1-blue (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac-F' [proAB+ lacI<sup>q</sup> lacZ $\Delta$  M15 Tn10(tet<sup>r</sup>)]*)를 사용하였다. 제조한 분비형 유전자운반체의 분비에 이용된 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* AH22 (*a, leu2-3, leu2-112, his4-519, can1, [ki1-0]*) 혹은 strain 54 (wild type, triploid)를 이용하였다.

#### 나. 배 지

##### 1) LB 배지

Trypton 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 1%를 멸균 후 사용하였으며 고형배지는 agar를 2%되게 첨가하여 사용하였다.

##### 2) LA, LT 배지

LB 배지를 만든 후 온도가 42-45 °C 정도 되었을 때 tetracycline, ampicillin을 최종농도가 각각 15  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml 되도록 첨가하였다.

3) LA-X-gal 배지

LB 배지를 만든 후 온도가 42-45°C 되었을 때 ampicillin을 50  $\mu$ g/ml 그리고 2% X-gal을 2  $\mu$ l/ml, 100 mM IPTG를 2  $\mu$ l/ml 되게 첨가하여 사용하였다.

4) M9-Salt Glucose 배지

0.1 M CaCl<sub>2</sub> 를 0.1 ml, 1 M MgSO<sub>4</sub> 를 0.1 ml, 10X salt 10 ml, 20% casamino acid 2 ml, 0.1% vitamin B<sub>1</sub> 16.6 ml 그리고 20% glucose 2 ml을 80 ml DW에 넣은 후 최종 100 ml이 되도록 DW를 채우고 멸균한 후 2% agar를 멸균 후 섞어 만든다.

5) YPD 배지

효모를 키우기 위한 완전배지로서 1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose를 멸균후 사용하였다.

6) SD 배지

2% glucose, 0.67% yeast nitrogen base w/o amino acids, 20 mg/l histidine의 조성이며, pAMB1 과 pAMB3 의 형질전환체 선별에는 0.4mM의 CuSO<sub>4</sub>가 첨가된 것을 사용하였다.

7) Low-Pi 배지

형질전환체에서 PH05 promoter의 발현을 유도하기 위하여 낮은 농도의 인산배지를 사용하는데 그 조성은 Table 2 와 같다. 높은 농도의 인산배지 (High-Pi 배지)의 경우에는 0.15% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 사용하였다.

고체배지에서는 CMC 최소배지 (1% Carboxymethyl Cellulose, 2% agar)를 사용하였다.

8) BSDC 배지

0.67% yeast nitrogen base w/o amino acid, 2% glucose, 1%

carboxymethyl cellulose, 50mM phosphate buffer, pH6.4

다. 용액 및 시약

1) DNA 보관용 완충용액

10mM Tris-HCl pH 7.6, 1mM EDTA, 10mM NaCl

2) TE 완충용액

10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA

3) 효모 형질전환용 완충용액

LA 용액: 0.1M lithium acetate in TE buffer

LAG 용액: 0.1M lithium acetate, 15% glycerol in TE buffer

(pH7.6)

4) 2X Cracking 완충용액

1% SDS, 0.4M sucrose, 50mM Tris-HCl, 0.01% bromophenol blue

5) 5X TBE

Tris-HCl 54g, boric acid 27.5g, 0.5M EDTA (pH8.0) 10ml in 1L DW

6) 10X Ligation 완충용액

0.66M Tris-HCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM DTT, 10mM ATP

7) PEG 용액

polyethylene glycol M.W. 4,000 in DW

8) *E. coli* 형질전환용 완충용액

50mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl pH 7.5

9) 아미노산과 Uracil의 100배 농축액

Histidine: 200 mg/ml

Leucine: 300 mg/ml

Uracil: 200 mg/ml

10) Plasmid 추출 완충용액

I : 50mM glucose, 25mM Tris-HCl(pH 8.0), 10mM EDTA, 4mg

Lysozyme/ml

II : 0.2N NaOH, 1% SDS

III : 5M potassium acetate(pH 4.8) 60ml, glycial acetic acid

11.5ml, D.W. 28.5ml

11) RNase A

10mM Tris-HCl(pH 7.5)와 15mM NaCl 용액에 RNase A를 10mg/ml 되게 녹인 다음 100℃에서 15분간 열처리 한다. 적당량으로 나누어 -20℃에 보관하여 사용한다.

12) Sequencing용 시약

12.1 Denaturation 완충용액

2N NaOH, 2mM EDTA

12.2 Stop 용액

100mM formamide, 5g mixed bead resin을 30분간 섞어 부드럽게 흔들어서 다음 여과하여 resin을 제거하고 0.3% xylene cyanol과 0.3% bromophenol blue, 0.37% EDTA 로 농도를 맞추어 사용하였다.

12.3 40% Acrylamide stock 용액

38g acrylamide, 2g bis (NN'-methylene bisacrylamide)를 100ml 되게 증류수에 녹인 다음 여과하여 4℃의 어두운 곳에 보관한다.

12.4 8% Acrylamide-7M Urea gel

Urea 42g, 40% acrylamide stock 20ml, 10X TBE 10ml을 증류수와

함께 100ml되게 녹인 다음 여과후 10% amonium persulfate 1ml,  
TEMED 200 $\mu$ l을 섞어서 gel을 만들었다.

#### 12.5 dNTP mixes (단위: $\mu$ l)

	A mix	C mix	T mix	G mix
0.5mM dCTP	20	1	20	20
0.5mM dGTP	20	20	20	1
0.5mM dTTP	20	20	1	20
1X TE buffer	20	20	20	20

#### 12.6 Dideoxy NTP stock 용액

10mM ddATP, 10mM ddCTP, 10mM ddTTP, 10mM ddGTP

#### 12.7 dNTP/ddNTP mixes

25 $\mu$ l A + 25 $\mu$ l ddATP = A/ddATP mix

25 $\mu$ l C + 25 $\mu$ l ddCTP = C/ddCTP mix

25 $\mu$ l G + 25 $\mu$ l ddGTP = G/ddGTP mix

25 $\mu$ l T + 25 $\mu$ l ddTTP = T/ddTTP mix

#### 12.8 Chase 용액

0.5mM dATP + 0.5mM dCTP + 0.5mM dGTP + 0.5mM dTTP

### 13) SDS-PAGE 용 시약

#### 13.1 Acrylamide stock 용액 (30%)

300g acrylamide, 8g bis-acrylamide를 증류수에 녹여 1L 되게 하였다.

#### 13.2 4X Lower 완충용액

187.7g Tris, 40ml 10% SDS를 증류수에 녹여 1L 되게하였다.

#### 13.3 4X Upper 완충용액



60.6g Tris, 40ml 10% SDS를 증류수에 녹여 1L되게 하였다.

13.4 2X Loading 완충용액

0.5ml  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.25ml 0.1% bromophenol blue, 4ml  
10% SDS, 5.3ml 2X Sample buffer

13.5 5X Running 완충용액

15g Tris, 72g Glycine, 50ml 10% SDS 를 증류수에 녹여 1L 되게  
하였다.

13.6 2X Sample 완충용액

12.5ml 4X Upper 완충용액 + 20.0ml Glycerol

14) Glass bead lysis 완충용액

10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA, 1mM PMSF

15) DNS 용액

0.25g 3,5-dinitrosalicylic acid, 75g sodium phosphate tartrate,  
4g NaOH in 250ml DW

16) TEAA (Triethylamine ammonium acetate) 용액

139ml Triethylamine을 증류수 800ml을 잘 섞은 다음 50ml acetic  
acid를 stirring 하면서 조금씩 적가해서 만든 다음 pH7.0으로 맞추었  
다.

17) PBS 완충용액

8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.24g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 800ml의 증류수에  
녹인 후, pH를 7.2로 맞추고 최종적으로 1L를 만들어 멸균후 사용한다

18) AP 완충용액

0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 9.5

## 2. 실험 방법

### 가. Oligomer의 합성 및 정제

Oligomer의 합성은 Beckman 회사의 System 1 Plus DNA Synthesizer를 이용하여 phosphoramidite 방법으로 합성하였다.

합성된 oligomer는 다음과 같은 단계를 거쳐 정제되었다.

#### 1) Demethylation

DNA-resin을 vacuum으로 건조한 후 thiophenol 300  $\mu$ l, triethylamine 600  $\mu$ l, dioxane 600  $\mu$ l 를 첨가하여 상온에서 매 15분 마다 섞어 주며 90분 간 반응시켰다.

#### 2) Washing 과정

Demethylation 반응이 끝난 후 상층액을 제거하고 methanol 2ml을 첨가하여 vortex를 하고 간단히 원심분리하여 상층액을 제거하는 과정을 3회 반복하였다. 다시 ether 2ml을 넣어 위의 과정을 3회 수행한 뒤 진공 상태에서 30분 동안 건조시켰다.

#### 3) Resin으로부터 oligomer의 제거

암모니아수 10ml과 2차 증류한 pyridine 1ml을 넣고 용기를 완전히 밀폐하여 50 $^{\circ}$ C에서 16 시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 용기를 얼음에서 냉각시키고 용액을 100 ml round flask에 모았다.

Evaporator 장치로 건조시킨 후 3 ml의 5% acetonitrile을 포함하는 0.1 M TEAA Buffer 에 녹였다.

#### 4) Oligomer의 정제

C18-silica gel column을 준비하여 5% acetonitrile이 들어 있는 0.1M TEAA Buffer 100 ml로 씻어내고 sample 1.5ml을 loading하였다.

Elution은 acetonitrile의 농도변화 (5%-40%)로 수행하였다. 원하는 fraction의 sample을 모아서 건조하고 ethanol로 5회 세척하였다. 80%의 acetic acid를 처리하여 oligomer의 5' 말단에 붙어 있는 DMTr group을 제거하였으며 제거된 DMTr을 TLC로 발색시험하여 확인하였다. 증류장치에서 ethanol 5 ml을 넣고 함께 건조시켜서 증류수 3ml에 녹인 다음 ethylacetate로 분순물을 제거한 다음 ethanol 침전으로 oligomer를 회수하였다.

#### 나. *E. coli*로 부터 각종 plasmid의 분리

LA 배지에서 진탕배양한 plasmid DNA는 alkaline lysis 방법으로 대량 및 소량 분리하였다 (35).

#### 다. *E. coli*의 형질전환

CaCl<sub>2</sub> 방법 (36)을 사용하였다.

#### 라. DNA 염기배열 순서의 결정

Dideoxy chain termination 방법 (37)을 약간 변형한 Willams (38)의 방법에 따라 염기 배열 순서를 결정하였다.

#### 마. 효모의 형질전환

Alkali cation 방법 (39)을 약간 변형하여 행하였다. 효모를 50ml의 YPD 배지에서 seed culture한 다음 50ml의 YPD 배지에 0.5ml (1%) 옮겨 30℃에서 5-6X10<sup>6</sup> cells/ml이 되도록 진탕배양한다. 세포를 수확하고 10ml의 증류수로 세척한 후 1.5ml의 LA 용액에 섞어서 30℃에서 1 시간 배양하였다. 그다음 세



포를 다시 수확하여 2ml의 LAG 용액에 녹여 이중 0.2ml의 competent 세포에 5-10  $\mu$ g의 plasmid DNA를 넣은 다음 1.2ml의 PEG 용액을 첨가하여 30°C에서 1시간 동안 진탕배양하였다. 42°C에서 15분간 열충격을 가한 후 수확하여 0.5ml의 TE에 녹여 선별배지에 plating하여 30°C에서 3-7 일간 배양한다.

#### 바. 형질전환체의 선별

1차 선별배지에서 자라난 colony 들을 2차 선별배지인 CMC 최소배지위에 이쭉시게로 옮겨 30°C에서 1-2 일간 배양하고, 자라난 colony들을 멸균증류수로 세척한 후 1%의 Congo Red 용액을 가하였다. 5분간 방치한 뒤 1M NaCl/1M NaOH 용액으로 5회 정도 세척하여 균체가 자랐던 부위에 clear zone 이 형성된 colony를 선별하였다 (40). 이를 SD 최소배지에서  $5 \times 10^6$  cell/ml이 되게 배양하여 전체 DNA를 회수하여 이를 다시 *E. coli*에 도입시킨 다음 plasmid를 확인하였다. 원하는 재조합 plasmid가 확인된 경우 이를 형질전환된 효모로 선별하였다.

#### 사. Polyacrylamide gel에서의 $\beta$ -1,4-glucanase 활성 확인

배양상등액을 20% PEG 20000에서 약 20배 농축시켜서 300  $\mu$ l를 acetone으로 침전시킨 다음 10% SDS polyacrylamide gel에서 분리한 다음 200ml의 10mM potassium phosphate, 25% isopropyl alcohol에서 30분간 2회 씻어 SDS를 제거하고 200ml의 10mM potassium phosphate로 30분씩 2회 씻어 isopropyl alcohol을 제거하였다. 2% agar, 0.1% CMC, 10mM potassium phosphate (pH 5.8)로 만든 substrate gel을 SDS를 제거한 polyacrylamide gel 위에 겹쳐서 물기가 들어가지 않도록 밀봉하여 55°C에서 25분간 반응시킨 후 Congo Red로 염색하였다 (41).

#### 아. $\beta$ -1,4-glucanase 역가 측정

SD 최소배지에서  $6 \times 10^7$  cell/ml 까지 배양한 다음 수확, 세척하여 Low-Pi, High-Pi 최소배지로  $4 \times 10^6$  cell/ml 되게 옮긴 후 23°C 에서 진탕 배양하여 시간 별로 효소역가를 측정하였다.

효모가 배양액으로 분비해 낸 효소역가를 측정하기 위해서 배양상등액을 효소원으로 이용하였으며, 분비되지 않은 세포내 효소의 역가를 측정하는데는 세포 추출액을 사용하였다. 세포추출액은 각 단계의 배양액 1.5ml의 균체를 수확하여 0.3ml의 glass bead lysis 완충용액으로 세척한 후 동일 부피의 완충용액에 현탁하고 glass bead를 이용하여 세포를 파괴시켰다. 현미경을 통해 세포가 충분히 파괴되었는가를 확인한 후 12000g에서 1분간 원심분리하여 상등액을 효소원으로 사용하였다. 반응혼합액 (10mM potassium phosphate, 1% CMC pH5.8) 0.5ml과 효소액 0.1ml을 잘 섞은 후 45°C 에서 20분간 반응시키고 반응액속의 환원당을 DNS법으로 측정하였다 (42). 이때 효소 1 unit는 1분당  $1 \mu\text{mole}$ 의 glucose를 생성시킬 수 있는 효소의 양으로 정하였다.

#### 자. Western Blot

Secretion vector에 의해 효모에서 생산, 분비되는 소 성장 호르몬 (bovine growth hormone: bGH)을 측정하기 위하여 항체를 이용한 효소 면역측정법인 western blot을 실시하였다. SDS-PAGE후 분리된 단백질을 NC paper로 electrotransfer 한 후 5% BSA 용액 (5% BSA in PBST buffer)에서 30분간 blocking하였다. 1:1000으로 희석된 항 bGH 항체로 상온에서 30분간 1차항체 반응을 시킨후, 1:10000으로 희석된 anti-rabbit IgG Ab-alkaline phosphatase

conjugate를 2차항체로 상온에서 30분간 반응시켰다. NC paper를 말린 후 NBT (nitroblue tetrazolium)와 BCIP(5-bromo4-chloro-3-indoyl phosphate) 포함하는 AP 완충용액에서 발색 반응을 하였다.

### 제 3 절    결 과    및    고 찰

#### 1. 효모 killer toxin 유전자의 분비신호서열을 이용한 분비형 벡터의 제조

##### 가. Acid phosphatase (*PHO5*) promoter의 분리

효모의 acid phosphatases [ APase ; orthophosphoric-monoester phosphohydrolase (acid optimum), EC 3.1.3.2] 유전자군은 적어도 세개의 구조 유전자들(*PHO3*, *PHO5*, *PHO11*)로 구성되어 있으며, 이들 효소는 모두 분비된다 (43-47). 몇몇 조절유전자들의 상호 작용은 inorganic phosphate (Pi)에 의한 이들 유전자의 발현정도를 조절한다. *PHO3* 유전자는 Pi 농도에 의한 발현정도의 차이가 없지만, *PHO5*와 *PHO11* 유전자는 낮은 농도의 Pi에서 그 발현이 induction 된다 (45). *PHO5*와 *PHO11*의 전사 활성화는 *PHO4*와 *PHO2*라는 두 개의 positive factor가 promoter에 작용함으로써 일어나는데, 그 기작은 아직 알고 있지 않다. 또한 전사 활성화에는 *PHO80*과 *PHO85*라는 두 개의 negative factor가 있어서, 이들이 uninduced state에서 *PHO4*와 complex를 형성하리라 추정하고 있다 (48).

2번 염색체에서 결손 실험을 통하여 *PHO5* 발현에 필요한 elements의 분석 (49)에서, 3개의 components를 밝혀내었다. 즉, (i) regulatory region (ii) TATA element, 그리고 (iii) specific mRNA initiation site가 그것이다. 조절 부위는 phosphate-controlled upstream activation site (UAS)로서 19-base-pair dyad sequence를 포함한다 (Figure 2). 이들 UAS들은 낮은 Pi 농도에서 *PHO5*의 전사를 활성화시킨다. 특이적 purine-pyrimidine motifs (RRYRR)는 *PHO5*의 전사 개시점으로 작용한다. pAM82 벡터는 이러한 상위조절인자, TATA 인자 그리고 전사 개시점을 포함하는 효모의 유도성 발현형 벡터이다(50).



본 실험에서는 pAM82 벡터를 이용하여 *PHO5*의 promoter를 분리하여 분비형 벡터의 개발에 이용하였다 (Figure 3). 먼저, pAM82 벡터를 *Xba*I과 *Xho*I 제한 효소로 절단하여 나온 2.4 kb의 절편을 Klenow 효소로 blunt-end로 만든 다음 pUC18의 *Sma*I 위치에 삽입하여 pSEC1 벡터를 제조하였다. 다음으로, pSEC1을 *Bam*HI과 *Hinc*II 제한효소로 반응시켜 나온 0.49 kb의 절편을 *Bam*HI과 *Sma*I으로 반응된 pUC18 벡터에 도입함으로써 *PHO5* promoter를 분리하였다. 결과적으로 만들어진 pSEC2 벡터의 효모 *PHO5* promoter는 TATA box, 전사의 상위조절 부위 (UAS), 그리고 전사 개시점을 포함하고 있으며, 낮은 Pi 농도에서 전사가 활성화 될 수 있는 promoter이다.

#### 나. Killer toxin 유전자의 분비신호서열의 합성

서론에서 언급한 바와 같이 효모 *Kluyveromyces lactis*의 killer toxin을 합성하는 유전자의 분비신호서열은 효과적인 단백질의 분비를 수행한다. 애초에는 실험적 편의에 의하여 killer toxin 유전자의 promoter와 분비신호서열을 함께 이용할 하였으나, 이 promoter의 작용에 pGKL2 plasmid에서 생성되는 어떤 인자가 작용할 것 이라는 실험적 결과(33)가 나옴에 따라 분비신호서열만을 따로 분리하여 다른 promoter와 연결하여 분비형 벡터를 만드는 방향으로 실험을 진행하였다.

Beckman사의 System 1 Plus DNA Synthesizer를 이용하여 phosphoramidite 방법으로 4개의 oligomer를 합성하였다 ( A strand, 31-mer ; B strand, 31-mer; C strand, 32-mer; D strand, 32-mer). 합성된 oligomer는 C18 silica gel을 이용한 reverse-phase chromatography 방법으로 정제하였다 (Figure 4) 그림에서 보듯이 뒤쪽의 fraction에서 나오는 peak가 완전히 합성된 oligomer이다. 순수 분리된 oligomer는 A와 B strand 그리고 C와 D strand를 annealing

하여 double-strand로 만든 다음, 양끝의 cohesive-end를 이용하여 ligation을 통해 완전한 killer toxin 유전자의 16개 아미노산의 분비신호를 만들어 낼 수 있는 염기서열을 만들었다 (Figure 5). Figure 6은 합성된 하나의 oligomer, annealing된 oligomer, 그리고 완전히 ligation을 이룬 oligomer를 agarose gel에서 관찰한 결과이다.

#### 다. *PHO5* promoter와 합성된 분비신호서열의 연결

합성된 분비신호서열은 양끝에 *Bam*HI과 *Sa*II의 cohesive-end를 가지고 있어서 pUC18 벡터의 *Bam*HI, *Sa*II 부위를 이용하여 벡터에 넣을 수 있다(pUS0). pSEC2 plasmid를 *Eco*RI과 *Bam*HI으로 절단하여 나오는 *PHO5* promoter를 pUS0 plasmid의 *Eco*RI과 *Bam*HI에 삽입함으로써 *PHO5* promoter와 합성된 분비신호서열이 연결된 pSEC3 벡터를 만들었다 (Figure 7). 그리고 여러가지 제한효소 절단에 의하여 연결을 확인하였다 (Figure 8). Figure 9은 pUS0 plasmid의 분비신호서열과 pSEC3 plasmid의 *PHO5*와 분비신호서열의 연결을 dideoxy chain-termination 방법으로 확인한 것이다.

#### 라. 1차적인 분비형 벡터의 구축

효모에 벡터를 transformation 시킬려면 복제 원점과 선택표지가 필요하다. pAM82 벡터에는 복제원점으로 효모 plasmid의 일종인  $2\mu$ m의 복제원점과 선택표지로 LEU2를 가지고 있다. pAM82를 *Hind*III로 절단하여  $2\mu$ m과 LEU2를 포함하는 3.4 kb의 절편을 취하고, 이를 *Hind*III로 반응된 pSEC3 plasmid에 도입하였다 (Figure 10). 결과적으로 생성된 pSEC4 벡터는 복제원점으로  $2\mu$ m의 복제원점을 가지고 있어 효모내에서 multi-copy로 존재할 수 있으며 LEU2 선택표지를 지니고 있어 형질전환시 형질전환체의 선별에 이용된다.

또한 *PHO5* promoter 에 의해 낮은 Pi 농도에서 발현이 유도되어 *PHO5*의 전사 개시점에서 mRNA를 합성하며, 만들어진 단백질은 killer toxin 유전자의 분비 신호서열을 이용하여 세포밖으로 분비된다. 그리고 분비신호서열 바로 다음에 *NaeI* 제한효소자리가 single site로 존재하기 때문에 이 제한효소를 이용하여 발현시키고자 하는 구조 유전자를 pSEC4에 도입할 수 있다. 결과적으로 1차적 형태의 분비형 벡터가 구축되었다. 나아가서 효과적인 전사종결에 의한 발현증대의 효과를 피하기 위하여 효모 iso-1-cytochrome C 유전자 (*CYC1*)의 전사종결부위에 해당하는 부분을 pSEC4 벡터에 도입하여 더욱 더 효과적인 분비형 벡터인 pSEC5를 제조하였다 (Figure 11, Figure 12). pSEC5의 경우 그 자체가 전사종결 부위를 포함하고 있지 않는 cDNA를 효모에서 발현시키고자 할 경우에 매우 유용하게 이용될 수 있다. 이와같이 제조된 분비형 벡터에 외부 유전자를 도입하여 그 발현정도와 분비효율을 조사하고자 *Bacillus*의  $\beta$ -1, 4-glucanase 유전자와 소 성장 호르몬 (bGH)의 cDNA를 도입하였다.

#### 마. $\beta$ -1,4-glucanase 유전자의 도입

pBAG5에 cloning된 *Bacillus subtilis* ATCC 6633의  $\beta$ -1, 4-endoglucanase 유전자는 크기가 2.1 kb 정도되는 DNA 절편이다 (51). 이 효소는 87개의 염기로 구성된 자체의 분비신호 서열을 갖고 있으며 분비된 단백질은 1101 bp로 암호되는 336개의 아미노산으로 구성되어 있다. 제한효소 *PstI* (염기서열+88)으로 처리하면 분비신호서열과 promoter부분이 잘려나간 1.7kb의 DNA 절편을 얻을 수 있게 된다 (Figure 13). 이 DNA조각을 *PstI*으로 절단된 pBluescript에 삽입하여 pGBS라 명명했다. 이 pGBS를 *SmaI*, *HincII*로 절단하여 얻은 1.7 kb DNA 절편을 *NaeI*으로 절단한 pSEC4, pSEC5에 도입하여 각각 pSEC4GLU와 pSEC5GLU를 만들었다 (Figure 14). 결과적으로 pSECGLU에서 만들어지는  $\beta$ -



glucanase는 *Bacillus*에서 만들어지는 것에 비해서 N-말단에 3개의 아미노산 (Gly-Arg-Ala)이 더 들어간 것이다(Figure 15). 완성된 pSECGLU는 *PHO5* promoter를 포함하기 때문에 Pi 농도에 따라 그 발현이 조절되며 *PHO5*의 전사 개시점에서 mRNA를 합성한다. 발현된 효소는 killer toxin 분비신호서열에 의해서 효모세포 밖으로 분비된다.

#### 바. 형질전환체의 선별

효모 *S. cerevisiae* AH22는 leu2, his4 auxotrophic marker를 가지고 있기 때문에 histidine이 포함된 SD배지에서 LEU2 유전자를 포함하는 pSECGLU 벡터를 이용하면 쉽게 형질전환체를 선별할 수 있게 된다. 앞서 언급한 방법으로 효모 *S. cerevisiae* AH22를 pSECGLU로 histidine이 포함된 SD배지에서 형질 전환시켜 자라나온 colony들을 CMC최소배지에 picking한 후 Congo Red test 결과 clear zone이 형성된 것을 형질전환체로 선별하였다(Figure 16). 이 colony 들이 pSECGLU를 포함하고 있는지 좀더 확인하기 위해서 histidine이 포함된 SD 배지에서 키운 형질전환체에서 mini-prep으로 얻은 plasmid를 E.coli HB101에 형질전환하여 pSECGLU를 확인하였다.

#### 사. Polyacrylamide gel에서 $\beta$ -1,4-glucanase의 활성 확인

앞서 방법에서 언급한 바와 같이 세포배양액을 농축하여 SDS-PAGE를 걸어 단백질을 분리하고 SDS를 제거한 다음 이를 0.1%의 CMC가 포함된 2% agar와 포개어 55℃에서 20분간 반응시켜 Congo Red로 염색하였다(Figure 17). 그림에서  $\beta$ -1,4-glucanase의 활성이 약 5개의 band (3 major bands and 2 minor bands)로 관찰되며 분자량은 약 36,000 Da에서 50,000Da 사이를 나타낸다. 이와같이 여러 분자량을 나타내는 것은 3개의 glycosylation 부위를 갖고



있는  $\beta$ -1,4-glucanase가 효모내의 분비과정에서 다양하게 glycosylation 되기 때문으로 보인다.

#### 아. $\beta$ -1,4-glucanase의 분비

일차적으로 CMC 최소배지에서  $\beta$ -1,4-glucanase의 분비가 확인된 colony (Figure 16)들의  $\beta$ -1, 4-glucanase의 분비 및 그 역가를 확인하기 위하여 세포배양액과 세포추출물에서 CMC 분해능력을 측정하였다. Figure 18에서 보는 바와 같이 높은 농도의 Pi 배지에서는 발현과 분비가 매우 미약한데 비해 induction 배지인 낮은 Pi 배지에서는 훨씬 많은 효소가 발현, 분비됨을 알 수 있다. 분비 비율은 약 70% 정도이나 전체 분비된 양이 5.1 unit/ml로 효모의 K1 toxin의 pre-region을 신호서열로 이용하여 *Cellulomonas*의  $\beta$ -1, 4-glucanase를 효모에서 분비시켰을 때의 1.6 unit/ml가 분비된 것 (10)과 비교해 볼때 훨씬 많은 효소가 분비되고 있음을 알 수 있다. 한편으로, pSEC4GLU와 pSEC5GLU의 발현, 분비능력을 비교해 보았을때 별 차이를 보이지 않았다. 이는 glucanase 유전자 자체내에 포함되어 있는 전사종결부위가 효모내에서 효과적으로 작동하기 때문으로 여겨진다.

#### 자. 소 성장 호르몬의 발현 및 분비

소 성장 호르몬 (bGH)는 22 kDa의 단백질로 26개의 아미노산으로 구성된 signal peptide를 가지고 있다 (Figure 19). bGH의 분비신호 서열을 포함하지 않는 구조 유전자 부위를 분비형 벡터에 도입하기 위하여, pbGH59를 *Bam*HI과 *Hind*III로 반응시킨후 Mung bean nuclease를 처리하여 0.73 kb의 bGH cDNA부위를 isolation하였다. 이를 *Nae*I으로 반응된 pSEC5에 도입하여 최종적으로 pSECbGH를 제조하였다 (Figure 20). Figure 21은 여러가지 제한효소 절단에 의

한 pSECbGH의 제조를 확인한 것이다. 결과적으로 pSECbGH에 의하여 만들어지는 bGH는 원래의 bGH N-말단에 2개의 아미노산 (Gly-Pro)을 더 포함하고 있다. pSECbGH을 포함하는 효모에서의 bGH의 발현 및 분비도를 조사하기 위하여, 앞서 방법에서 언급한 바와 같이, 시간에 따른 세포 배양액과 세포 추출액에서의 bGH의 양을 효소 면역 측정법인 Western Blot을 이용하였다(Figure 22). 그림에서 보듯이, Low-Pi 배지에서는 시간에 따라서 bGH의 양이 증가하였으며 그 대부분이 세포배양액으로 분비되는 것으로 나타났다. 따라서 *PHO5* promoter에 의해서 전사된 bGH는 killer toxin 유전자의 분비신호서열에 의해 효과적으로 세포밖으로 분비된다. 또한 효모의 *CYC1* 유전자에서 도입한 전사종결 부위가 효과적으로 작용함을 알 수 있다.

#### 차. 고 찰

본 연구에서 제조한 분비형 유전자 운반체 (pSEC5)는 전형적인 yeast-*E. coli* shuttle vector로서 효모 복제원점으로  $2\mu\text{m}$ 을 소유한 pUC18에서 유래한 유전자 운반체이며  $\beta$ -lactamase (*E. coli*), LEU2 (yeast)의 선별표지를 소유하고 있다. 또한 single cloning site로서 blunt-end를 생성하는 *NaeI*을 갖고 있기 때문에 이후의 여러 외부 유전자들을 쉽게 도입할 수 있다. 이 실험에서 사용한 *PHO5* promoter는 낮은 Pi 농도에서 induction되기 때문에 Pi 농도를 조절함으로써 삽입한 유전자의 발현을 조절할 수 있다. 그리고 killer toxin 신호서열은 발현된 단백질을 세포밖으로 높은 효율로 분비시킬 수 있다 또한 전사종결을 효과적으로 일으키기 위하여 효모의 *CYC1* 유전자에서 유래한 전사종결부위를 가지고 있다.

Figure 18에서 보는 바와 같이 분비율은 약 70% 정도로서 효모의 *MF $\alpha$ 1* 유전자의 pre-pro  $\alpha$ -factor 분비신호서열을 이용하여 human erithropoietin

(EPO)을 효모에서 분비시켰을 때 (34%-40%)(52), 효모  $\alpha$ -galactosidase의 분비신호서열을 이용하여 *Celluomonas fimi*의 exoglucanase를 효모에서 분비시켰을 때 (30%) (53), 그리고 포유동물세포의 분비신호서열을 이용하여 human- $\alpha$ -amylase 유전자를 효모에서 분비시켰을 때 (50%) (17)보다는 높았으나, mouse- $\alpha$ -amylase의 경우 (90%)와 killer toxin의 분비신호서열을 이용하여 human interleukin 1 $\beta$  (90% 이상) (32)를 효모에서 분비시켰을 때 보다는 낮은 분비율을 보여주고 있다. killer toxin의 분비신호 서열을 사용할 경우 분비효율이 비교적 높은데 비하여 본 실험에서 다소 낮은 분비율을 보이는 것은 세포의 상대적인 분비능력이 떨어지는 것이 아니라 세포내에서 효소가 과량발현되어 분비체계가 이를 수용할 수 없어 모든효소가 세포밖으로 분비되지 못한 것으로 생각된다 (52). 예를 들어  $\alpha$ -factor의 분비신호 서열에 의해 human erithropoietin을 효모에서 분비시킨 실험에서 발현수준이 높을 때에는 세포내에 효소가 축적되며 이런 축적이 세포의 성장을 감소시키거나 정지시키며 plasmid의 안정성을 떨어뜨리고 copy 수를 감소시킨다고 보고된바 있다 본 실험에서도 낮은 농도의 Pi 배지에서 세포의 성장속도가 현저히 저하되고 약  $5.5 \times 10^7$  cell/ml에서 더 이상 성장하지 않는 것으로 관찰된다. 즉 세포성장에 필수적인 세포의 효소들이 과량발현된  $\beta$ -1,4-glucanase에 의하여 분비가 방해되어 성장이 저하되는 것으로 볼 수 있다.

본 연구에서 개발된 분비형 벡터를 보다 더 발전시키기 위해서는 여러 가지의 서로 다른 promoter를 이용하고 또한 몇몇 효모의 유전자에서 발견되는 상위조절의 도입에 의한 효과 등을 비교해 보아야 할 것이다.



## 2. 쥐 $\alpha$ -amylase 유전자의 분비신호서열을 이용한 분비형 벡터의 제조

### 가. 분비신호서열과 $\beta$ -glucanase 유전자의 연결

*Bacillus subtilis*의  $\beta$ -1, 4-glucanase 유전자는 87개의 염기로 구성된 자체의 분비신호서열을 갖고 있으며 signal peptidase의 인식 가능 부위가 27번째의 아미노산 Ala에서 시작되고 작용가능 부위는 29번째의 아미노산인 Ala와 30번째의 아미노산인 Val의 결합부위라고 보고된 바 있는데 제한효소 *Pst*I (염기서열+88)으로 처리하면 분비신호 서열이 잘려 나가게 된다 (54).

한편 mouse salivary  $\beta$ -amylase 유전자는 45개의 염기로 이루어진 분비신호서열을 갖고 있으며 제한효소 *Apa*I으로 처리하면 분비신호서열 바로 다음이 잘려나가게 된다. Mouse  $\alpha$ -amylase 유전자의 분비신호서열과 자체의 분비신호서열이 제거된  $\beta$ -glucanase 유전자를 reading frame이 맞도록 접합하기 위해서 multiple cloning site를 보유하고 있는 두 종류의 플라즈미드 벡터를 이용하였다. 먼저 pUC19의 *Pst*I인식부위에 pBAG3를 *Pst*I으로 절단하여 얻은 2.4kb 크기의 DNA 단편을 도입한 후 원하는 삽입방향을 갖는 재조합 플라즈미드를 선별하여 pUC19B라고 명명하였다 (Figure 23). pGEM-5zf(+)를 제한효소 *Sa*I과 *Sph*I으로 동시에 절단한 후 pUC19B를 역시 제한효소 *Sa*I과 *Sph*I으로 동시에 절단했을때 생기는 약 2.4kb 크기의 DNA 단편과 접합시켜서  $\beta$ -glucanase 유전자의 5'쪽 말단에 *Apa*I 인식부위가 도입되도록 하였으며 이를 pGEMB라고 명명하였다 (Figure 23). 한편 *ADHI* 유전자의 promoter와 mouse salivary  $\alpha$ -amylase 구조유전자가 결합되어서 포함되어 있는 재조합 plasmid pMS12에 산업용 효모의 우성 선별표지로 이용할 수 있는 copper metallothionein 유전자 (*CUP1*)을 도입하기 위해 YEp36을 제한효소 *Ban*HI으로 절단하여 얻은 1.35kb 크기의 DNA 절편을 pMS12의 *Ban*HI 인식부위에 삽입시켰다 (Figure 23). 이렇게

얻어진 재조합 플라스미드 pAMC1을 제한효소 *ApaI*과 *HindIII*로 동시 절단하여  $\alpha$ -amylase의 coding region을 제거한 후 남아있는 분비신호서열 뒤에 역시 pGEMB에서 잘라낸 1.7kb 크기의 *ApaI-HindIII* 절편을 접합시켰다. pAMC1을 *HindIII*로 처리했을 때 효모의 2 $\mu$ m DNA가 함께 잘려나가게 되므로 1차로 완성된 pAMB $\Delta$ 2 $\mu$ 의 *HindIII* 인식부위에 pAMC1에서 회수해 두었던 2 $\mu$ m DNA 절편을 올바른 방향으로 삽입시켜서 재조합 플라스미드 pAMB1을 완성하였다 (Figure 23).

벡터를 제조하는 과정에서  $\beta$ -glucanase의 5' 쪽 말단인 *PstI* 인식부위의 앞쪽으로 제한효소 *AatII*와 *SphI* 인식부위가 추가로 만들어졌다. 비록 분비신호서열과  $\beta$ -glucanase 유전자 사이에 여분의 서열이 부가되었더라도 stop codon 등과 같이 단백질의 구조 및 유전자의 발현에 결정적인 역할을 할 수 있는 codon이 존재하지 않기 때문에 재조합 플라스미드가 제대로 작용할 수 있을 것이다. *ADHI* promoter와 분비신호서열 그리고  $\beta$ -glucanase 유전자의 연결 부분은 Figure 24에 나타나 있다.

#### 나. 전사종결 신호의 부가.

도입된  $\beta$ -glucanase 유전자의 발현을 증대시키기 위해, 효모에서 효과적인 전사종결을 할 수 있는 것으로 알려진 *CYCI* locus의 전사종결신호를 pAMB1의  $\beta$ -glucanase 유전자 3' 쪽 말단에 부가하였다. pUC19의 multiple cloning site에 있는 *SmaI* 인식 부위에 YEpGCU의 *EcoRV-ScaI* 절편 (572 bp)을 삽입시킨 후 원하는 방향으로 구성된 재조합 플라스미드를 선별하여 pUC19T라고 명명하였다 (Figure 25). 도입된 *EcoRV-ScaI* 절편 안에는 *CYCI* 유전자의 전사종결에 필요한 부위가 모두 들어 있다 (55). pAMB $\Delta$ 2 $\mu$ 를 제한 효소 *HindIII*로 절단 한 후 Klenow fragment로 처리하고 이곳에 pUC19T의 *EcoRI-SaII* 절편



(610 bp)을 역시 filling-in 시켜서 삽입시켰다. 전사종결 신호가  $\beta$ -glucanase 의 전사방향과 동일방향으로 삽입된 재조합 플라스미드를 선별하여 pAMB $\Delta$ 2 $\mu$ -T라고 명명하였다 (Figure 25). 한편 *Sa*I과 *Hind*III 인식부위가 filling-in되어서 접합된 자리에는 *Hind*III 인식부위가 그대로 남게 되므로 pAMB $\Delta$ 2 $\mu$ -T의 *Hind*III 인식부위에 pAMC1으로 부터 회수한 2 $\mu$  절편을 정상방향으로 도입하여 재조합 플라스미드 pAMB3을 완성하였다(Figure 25).

#### 다. 형질전환체의 선별

산업용 주정생산 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 54는 어떠한 auxotrophic marker도 갖고 있지 않은 다배체의 야생형 효모이지만 구리내성 유전자인 *CUP1* 유전자와 YEp 계열의 벡터를 이용하면 형질전환체를 쉽게 선별할 수 있다. CuSO<sub>4</sub> 가 포함된 최소배지에서 비교적 커다랗게 자라나오는 colony들을 BSDC배지에 toothpicking 한 후 Congo Red Test를 실시한 결과 형질전환된 효모의 colony가 있는 곳에는 clear zone이 형성된 것을 확인할 수 있었는데 이는 효모내에서 생합성된  $\beta$ -glucanase가 세포밖으로 분비되어서 배지내의 CMC를 분해한 결과를 보여주는 것이다 (Figure 26A).

$\beta$ -glucanase가 실제로 세포 밖으로 분비되었는가를 좀 더 확인하기 위하여 형질전환체를 배양한 후 배양상등액을 10배 정도 농축하여 BSDC 배지위에 점적하고 하룻밤 동안 incubation한 결과 역시 clear zone이 형성된 것을 확인할 수 있었다 (Figure 26B).

#### 라. $\beta$ -glucanase의 발현 및 분비

$\beta$ -glucanase의 역가를 확인하기 위해 CMC로 부터 환원당을 생산시키는 능력을 측정하였다. Table 3 에서 보듯이 pAMB1과 pAMB3가 도입된 형질전환체

모두에서  $\beta$ -glucanase가 배양액으로 분비되었으며 전체 효소역가중 세포밖으로 분비된 비율은 약 60% 정도였다. 효모의  $\alpha$ -pheromone 분비신호서열을 이용하여 *Bacillus subtilis*의  $\beta$ -1, 3-1, 4-glucanase를 효모에서 분비시켰을 때에는 85%의 효소가 분비된 것으로 보고된 바 있으며 (56), mouse  $\alpha$ -amylase는 *Saccharomyces cerevisiae*에서 90% 정도가 세포밖으로 분비된다고 보고된 바 있는데 이에 비하여 본 실험에서 구성된 재조합 플라스미드에 존재하는 분비체계는 다소 비효과적이라고 이야기 할 수 있다. 그러나 효모에서 이종단백질이 분비되는 기작은 분비신호서열의 구조와 단백질의 분자량 그리고 숙주의 종류등에 따라 복합적인 영향을 받는 것으로 알려져 있기 때문에 단순한 비교는 할 수 없으며 본 분비체계에  $\beta$ -glucanase 이외의 다른 단백질의 유전자를 도입하였을 때에는 다른 결과가 나올 수 있다. 한편 발현정도를 증가시키기 위하여 전사종결신호를 부가하였을 때에는 전체 효소 역가가 2배 가량 증가 하였으며 분비비율에는 변화가 없었다.

본 실험에서는 고등한 진핵세포인 포유동물의 분비신호서열을 이용하여 원핵세포의 단백질을 진핵세포인 효모에서 분비시켰는데, 산업적으로 유용한 효모의 분비백터를 구성하기 위해서는 기존의 효모 자체의 분비신호서열 이외에 이종의 분비신호서열을 이용하는 방법 등도 포괄적으로 고려해야 할 것이다.

## 제 4 절      참 고 문 헌

1. Tubb, R.S. (April, 1988) *TIBTECH.* 98-104
2. Bennetzen, J.M. and Hall, B.D. (1982) *J. Biol. Chem.* 257:3018
3. Hitzeman, R.A., Hagie, F.E., Hayflick, J.S., Chen, C.Y., Seeburg, P.H. and Derynck, R. (1982) *Nucl. Acids Res.* 10:7791
4. Bitter, G.A. and Egan, K.M. (1984) *Gene* 32:263
5. Holland, J.P. and Holland, M.M. (1979) *J. Biol. Chem.* 254:5466
6. Holland, J.P. and Holland, M.M. (1979) *J. Biol. Chem.* 254:2569
7. Derynck, R., Singh, A. and Goeddel, D.A. (1983) *Nucl. Acids Res.* 11:1819
8. Brake, A.J., Merryweather, J.P., Coit, D.G., Heberlein, V.A., Masiarz, F.R., Mullenbach, G.T., Urdea, P., Valenzuela, P. and Barr, P.J. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4642
9. Price, V., Mochizuki, D., March, C.J., Cosman, D., Deeley, M.C., Kline, R., Clevenger, W., Gills, S., Baker, D. and Urdel, D. (1987) *Gene* 55:287
10. Skipper, N., Sutherland, M., Davies, R.W., Kilburn, D., Miller, R.C., Warren, A. and Wong, R. (1985) *Science* 230:958
11. Moir, D.T. and Dumais, D.R. (1987) *Gene* 56:209
12. Hinnen, A., Meyhack, B. and Tsapis, R. (1983) *Gene Expression in Yeast*, vol.1. p157
13. Kurjan, J. and Herskowitz, I (1982) *Cell* 30:933
14. Hanes, S. D., Burn, V.E., Sturley, S.L., Tipper, D.J. and Bostian,

- K.A. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:1675
15. Thomsen, K.K. (1983) *Carlsberg Res. Commun.* 48:545
  16. Jackson, E.A., Ballance, G.M. and Thomsen, K.K. (1986) *Carlsberg Res. Commun.* 51:445
  17. Nakamura, Y., Sato, T., Emi, M., Miyanochara, A., Nishide, T. and Matsubara, K. (1986) *Gene* 50:239
  18. Sleep, D., Belfield, G.P. and Goodey, A.R. (1990) *Bio/Technology* 8::42
  19. Gunge, N., Tamura, A., Ozawa, F. and Sakaguchi, K. (1981) *J. Bacteriol.* 145:382
  20. Sor, F., Wesolowski, M. and Fukuhara, H. (1983) *Nucl. Acids Res.* 11:5037
  21. Kikuchi, Y., Hirai, K. and Hishinuma, F. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12:5685
  22. Gunge, N. and Sakaguchi, K. (1981) *J. Bacteriol.* 147:155
  23. Gunge, N., Murata, K. and Sakaguchi, K. (1982) *J. Bacteriol.* 151:462
  24. Sugisaki, Y., Gunge, N., Sakaguchi, K., Yamasaki, M. and Tamura, G. (1985) *J. Bacteriol.* 164:1373
  25. Sugisaki, Y., Gunge, N., Sakaguchi, K., Yamassaki, M. and Tamura, G. (1983) *Nature* 304:464
  26. Niwa, O., Sakaguchi, K. and Gunge, N. (1981) *J. Bacteriol.* 148:988
  27. Wesolowski, M., Algeri, A., Goffrine, P. and Fukuhara, H. (1982) *Curr. Genet.* 5:191



28. Stark, M.J.R., Mileham, A.J., Romanos, M.A. and Boyd, A. (1984)  
*Nucl. Acids Res.* 12:6011
29. Hishinuma, F., Nakamura, K., Hirai, K., Nishizawa, R., Gunge, N.  
and Maeda, T. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12:7581
30. Stark, M.J.R. and Boyd, A. (1986) *EMBO J.* 5:1995
31. Stam, J.C., Kwakman, J., Meijer, M. and Stuitje, A.R. (1986)  
*Nucl. Acids Res.* 14:6871
32. Baldari, C., Murray, J.A.H., Ghiara, P., Cesareni, G. and  
Galeatti, C.L. (1987) *EMBO J.* 6:229
33. Koh, S.S. (1988) Thesis for M.S. Degree, SNU
34. Tokunaga, N., Wada, N. and Hishinuma, F. (1987) *Nucl. Acids Res*  
15:
35. Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) *Nucl. Acids Res.* 7:1513
36. Kushner, S.R. (1978) in *Genetic Engineering* (ed. H.S. Boyer and  
S. Nicosia). Elsevier/North-Holland. Amsterdam. p17
37. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl.*  
*Acad. Sci. USA* 74:5465
38. Williams, S.A., Slakto, B.E., Moran, L.S. and DeSimone, S.M.  
(1986) *Biotechniques* 4:138
39. Ito, H., Fukuda, Y. Murata, K. and Kimura, A (1983) *J. Bacteriol*  
153:163
40. Theater, R.M. and Wood, P.J. (1982) *Appl. Environ. Microbiol.*  
43:777
41. Begun, P. (1983) *Anal. Biochem.* 131:333



42. Skipper, N., Sutherland, M., Davies, R.W., Kilburn, D., Miller, R.C., Warren, A. and Wong, R. (1985) *Science* 230:958
43. Andersen, N., Thill, G.P. and Kramer, R.A. (1983) *Mol. Cell. Biol* 3:562
44. Bostian, K.A., Lemire, J.M., Cannon, L.E. and Halvorson, H.O. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6541
45. Rogers, D.T., Lemire, J.M. and Bostian, K.A. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:2157
46. Meyhack, B., Bajwa, W., Rudolph, H., Schweingruber, A.M. and Hinnen, A. (1982) *EMBO J.* 1:675
47. Bajwa, W., Meyhack, B., Rudolph, H., Schweingruber, A.M. and Hinnen, A. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12:7721
48. Oshima, Y. (1982) *in The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces : Metabolism and Gene Expression*, eds. Strathern, J.N., Jones, E.W. and Broach, J.R. (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY), pp:159-180
49. Rudolph, H. and Hinnen, A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1340
50. Miyanochara, A., Toe-e, A., Nozaki, C., Hamada, F., Ohtomo, N. and Matsubara, K. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1
51. Seo, Y.S., Lee, Y.H. and Pek, U.H. (1985) *Korean Biochem. J.* 18:367
52. Elliott, S., Giffin, J., Suggs, S., Lau, E.P. and Banks, A.R. (1989) *Gene* 79:167

53. Curry, C., Gilkes, N., O'Neill, G., Miller, R.C.Jr. and Skipper, N.(1988) *App. and Environ. Microbiol.* p:476-484
54. Seo, Y.S., Lee, Y.H., Pek, U.H. and Kang, H.S. (1986) *Kor. Jour. Microbiol.* 24:236
55. Zaret, K.S. and Sherman, F. (1982) *Cell* 28:563
56. Zaworski, P.G., Marotti, K.R., Mackay, U., Yip, C.and Gill, G.S. (1989) *Gene* 88:545

여 백

## 제 2 장 포유동물세포의 벡터 개발

여 백



## 제 1 절 서 론

과거 십여년간 많은 cloning 벡터들이 개발되어 박테리아에서 eukaryote 단백질들이 비교적 쉽게 발현되고 대량 생산이 가능하게 되었다. 이중에서도 유전자 발현기구가 가장 잘 알려져 있는 *E. coli*가 cloning 벡터들의 숙주로 주로 사용되고 있으며 근래에는 *Bacillus sp.*도 이방 유전인자의 cloning 및 발현에 이용되고 있다. 이에 따라 수 많은 효소 단백질, 세포구조단백질들 뿐만 아니라 인슐린, 성장호르몬, 인터페론, 인터루킨, 종양괴사인자같은 호르몬류 및 생리활성물질들의 유전인자들이 clone되고 염기서열이 결정되었으며 이들의 양산방법의 개량이 생명공학 산업의 중요한 근간을 이루고 있다.

이와 같이 고등생물의 단백질을 박테리아에 의해 대량생산하기 위하여 수많은 발현 벡터들이 개발되었지만 박테리아 숙주 시스템은 native eukaryotic 단백질을 생성하는데 있어서 아직 해결해야 할 문제점들이 많다. 첫째, *E. coli*는 clone된 단백질을 분비하지 못하므로 이방단백질을 발현시켜도 회수하고 정제하는데 어려움이 있다. *Bacillus sp.*는 clone된 단백질을 분비하지만 대부분의 *Bacillus sp.*가 단백질 분해효소를 많이 가지고 있고 plasmid가 *E. coli*처럼 잘 개발되어 있지 못하고 안정하지 못한 단점을 가지고 있다. 둘째, 많은 eukaryotic 단백질들이 리보조음에서 합성된 후 post-translational modification이라는 화학적 가공을 거쳐 활성화된다. 이들 가공 중에는 glycosylation, processing 및 assembly 등이 포함되는데 *E. coli*는 이러한 일을 제대로 해내지 못하므로 eukaryotic 단백질들이 native한 상태로 활성화되지 못한다. 셋째, *E. coli*에 clone된 eukaryotic 단백질들은 *E. coli*에서

이방단백질에 속하며 *E. coli*에는 이러한 단백질을 비정상적 단백질로 간주하고 clone된 이방단백질을 제거하는 경우가 있다. 따라서 clone된 단백질의 회수율이 현저히 낮아질 가능성이 있다. 넷째, *E. coli*에서 어떤 이방단백질을 overproduction했다 해도 정확히 fold된 단백질이 생성되지 못하고 결정은 비정상 상태로 균체에 축적되는 경우가 많다. 이와 같이 clone된 단백질이 정확히 folding되지 못할 경우 단백질의 삼차구조에 의하여 생리활성 또는 antigenic determinant sites이 결정되는 vaccine의 경우 문제가 될 수 있다. 다섯째, clone된 이방유전자가 박테리아의 종결제 염기서열을 포함하고 있는 경우 전사가 도중에 종결되어 발현이 안되는 경우가 있으며, clone된 유전자의 급속한 발현이 숙주세포의 성장 및 안정성을 떨어뜨려 숙주세포가 이방유전자를 변질시켜 발현을 중지시킬수도 있다. 이상과 같은 문제점을 해결하기 위하여 단백질 분해효소 활성을 갖지 않고 있는 숙주 strain을 쓴다거나 또는 이방 유전자의 염기서열을 특별히 조작하여 이방 단백질을 균체 밖으로 분비하게 한다거나 하는 시도도 있고 성공 사례도 있지만 아직도 이방 유전자에 따라 *E. coli*에서 발현과 분비가 제대로 되지 못하는 경우가 많이 있다.

한편 포유동물이나 식물의 유전자를 박테리아에서 발현시키지 않고 포유동물의 배양세포에 주입시키는 방법은 박테리아나 효모의 세포배양에서 이방 단백질을 대량 생산하는 것처럼 경제성이 있는 것은 아니지만 고등 생물에서의 유전인자 발현연구를 비롯하여 나아가서 사람의 유전자 치료요법의 개발에 획기적인 기초작업이 될 것이다. 따라서, 고등생물 유전자를 진핵세포에서 발현, 증폭시키고 분비하게 하는 벡터개발은 박테리아에서 유전공학적으로 생산할 수 없거나 또는 native 상태로 생산이 안되는 고가의 고등동물 단백질을 생산할 수 있다는 측면에서 의미가 있다고 할 수 있다. 더우기 진핵세포에서

고등생물 유전자를 발현, 증폭시키고 분비시킬 수 있으면 이러한 벡터를 고등 생물체에 주입시켜 동물의 형질을 유전적으로 바꿀 수 있는 엄청난 일의 기초 작업이 되며 성장속도 조절, 병에 대한 저항력 증가 및 치료, 유전병 퇴치, 우량동물 개발 등 수 많은 파급효과를 가져오게 된다. 이미 선진국에서는 유전적 결함이 있는 초파리에 정상 유전인자를 도입시켜서 정상적인 형질을 되찾게 하거나 난장이 생쥐의 경우 성장 호르몬 유전자를 주입시켜 정상쥐 보다도 한배 반 정도 큰 "슈퍼 쥐"를 만드는데 성공한 바 있다. 이와 더불어 여러 종류의 사람 유전병을 치료하려는 의도에서 정상 유전인자를 포유동물세포에 발현시키고 증폭시키려는 벡터개발이 활발히 진행되고 있으며 이 분야는 앞으로 무한한 가능성을 내포하고 엄청난 파급효과를 가져오리라 사료된다. 물론 포유동물 벡터개발 및 gene delivery system은 사람 germ line therapy 및 somatic gene therapy에 사용하는 데 있어서 윤리적인 문제가 대두되지만 이 문제는 앞으로 사회 각 방면의 구체적인 숙고가 이루어질 것으로 사료된다.

대부분의 진핵세포의 발현 벡터는 바이러스 복제원점에 기초한 것으로, SV40과 Adenovirus 는 배양된 세포에서 이방 유전자의 증식과 발현에 이미 널리 사용되어왔다(1). 그러나 이런 시스템들은 몇가지 문제점을 가지고 있다 이들 바이러스들은 자신들의 productive cycle동안 자신들의 숙주 세포를 죽여 이방 유전자가 복제되고 발현되어야 할 세포주가 확립되지 못한다. 특히 nonpermissive transformed cell 들은 숙주 세포의 염색체로 안정하게 삽입된 viral DNA의 copy를 몇 개 밖에 갖고 있지 않아서 lytic cycle을 동반하는 유전자 발현의 증폭이 transformed cell에서는 발생하지 않는다. 더우기 integration이 무작위적으로 일어나기 때문에 새롭게 삽입된 염기서열의 유전적 환경을 조절할 수가 없다. 또한 진핵세포의 genome은 매우 복잡하기 때문에 이방 유전자의 발현에 대한 인접한 염기 서열의 영향 또는 chromatin



organization과 methylation같은 이차적 변형의 영향을 적절히 평가할 수 없어 integration된 유전자와 그에 의해 발현된 단백질의 기능분석을 어렵게 만든다. 따라서 이차적 변형에 무관하고 동시에 세포 lysis 가 일어나지 않으며 clone된 이방 유전자가 계속 복제되고 발현될 수 있는 벡터 개발 연구가 진행되고 있다(2).

포유동물 유전자 발현 시스템을 이용하여 다량의 생성물을 얻고자 하는 경우 세포가 증식하는 동안 벡터를 안정하게 유지시키고 벡터의 copy숫자를 증가시키기 위하여 다음의 두가지 방법을 주로 사용하고 있다. 첫째, Bovine papillomavirus (BPV) 와 같은 바이러스 복제원점을 사용하는 것이다. 이 방법은 빠른 시간내에 high copy number (대략 세포당 수백copy)를 얻을 수 있다는 장점이 있으나 그 이용범위가 viral 벡터가 복제될 수 있는 세포에만 제한되어 있으며 발현 정도와 episome 유지가 viral 벡터에 삽입된 특정 DNA 염기서열에 영향을 받을 수 있다는 단점이 있다. 둘째, 적당한 선택표지 유전자를 함께 사용하여 벡터를 숙주세포 DNA 로 integration시킨 후 선택적으로 벡터의 염기서열을 증폭시키는 것이다. 이같은 방법은 특정한 세포에 따라 제한되어 있지 않으므로 특정한 post- translational modification을 수행할 수 있거나 또는 특정한 조절 염기서열을 인식할 수 있는 세포주를 선택하여 이용할 수 있다 (3).

이상에서 언급한 사항들에 대하여 현재까지 이루어진 연구 현황을 살펴보기로 한다. 먼저 포유동물 세포발현 벡터로 가장 많이 연구된 것은 pSV2벡터인데 이것은 기본적으로 pBR322의 복제원점과 antibiotic resistance 염기서열을 가지고 있고 SV40 promoter와 polyadenylation site도 가지고 있다. pSV2.dhfr 벡터에는 앞에서 말한 기본 벡터에 transformant를 selection 하고 증폭할 수 있는 DHFR c-DNA를 삽입한 벡터의 예가 있다 (3).

그리고 DHFR 이외에도 adenosine deaminase(ADA), aspartate transcarbamylase(CAD), glutamine synthetase (GS), metallothionein-I (MT-I), thymidine kinase (TK), multi-drug resistance (mdr) 등 여러가지 유전자의 c-DNA 가 제조되어 이용되고 있다(3).

이같은 벡터들을 이용한 최근의 연구동향을 살펴보면, 먼저 H-2 class I-specific, CD-8 dependent cytotoxic T cell clone 에 의해 제공되는 T cell receptor  $\alpha$ 와  $\beta$  chain 유전자가 Lyt-2 유전자와 함께 또는 독자적으로 pSV2 벡터 유도체에 의해 class II-restricted, CD4+ cell hybridoma로 전달 되었다는 보고가 있다 (5). 또한 발현 벡터인 pSVL을 이용하여 COS 세포에서 MuIFN- $\gamma$ 가 발현되고 pKSV10 과 pSV2-DHFR+ 를 이용하여 CHO세포에서 HuIFN- $\gamma$ 가 발현 되었다는 보고도 있다(6).

한편 이방 유전자가 매우 높은 정도로 constitutive 하게 발현되는 것이 바람직하지 못한 경우 유도성 promoter를 이용하여 clone된 유전자의 발현을 조절할 수도 있다. 이때 유도성 promoter로 사용되는 것으로는 heat shock protein promoter (7), mouse mammary tumor virus (MMTV) LTR (8) 성장 호르몬 promoter (9) 등이 있다. 그리고 eucaryotic cloning 벡터로 널리 사용되는 Bovine papillomavirus type I (BPV-I)은 *in vivo*에서 epithelial tumor 와 mesenchymal tumor를 유발시키고 *in vitro*에서 bovine 세포와 rodent 세포를 형질전환 시킨다. 이 바이러스에 의해 감염되거나 형질전환된 세포에서 바이러스의 genome 은 multicopy nonintegrated circular DNA 로만 존재하기 때문에 포유동물 세포의 벡터로 이용되고 있다(10, 11). 그러나 이들 기본 BPV벡터들의 경우 transformant의 확인을 세포의 형태학적인 변화 관찰 (morphological transformation)에만 의존할 수 밖에 없기 때문에 숙주 범위가 제한된다. 따라서 BPV-1 plasmid 에 우성 선택표지를 도입하여 이들의 숙주 범



위를 확대시킨 hybrid plasmid들이 제조되어 이용되고 있다. 이 경우에 선택표지로 널리 이용되는 것으로는 herpes simplex virus type I (HSV-I)의 thymidine kinase(tk) 유전자, *E. coli* xanthine-guanine phosphoribosyl-transferase(gpt) 유전자, 그리고 transposon Tn5의 aminoglycoside-3'-phosphotransferase(aph) 유전자등이 있다. 이와같이 개발한 BPV plasmid를 이용하여 지금까지 여러 eucaryotic 유전자들이 성공적으로 cloning 되었다(12).

한편 pSV2 벡터에서 사용된 promoter는 SV40 early region promoter이나 그 대신에 Rous sarcoma virus(RSV)의 long terminal repeat(LTR)가 promoter로 또한 널리 사용되기도 한다(4). 그리고 Moloney murine sarcoma virus (MSV) LTR을 이용하거나 murine leukemia virus(MLV)에서 유도된 retroviral 벡터도 숙주 범위가 넓고 숙주 세포에 해롭지 않으며 infectivity가 높아 포유동물 발현 벡터로 연구 및 이용되고 있다(12).

앞서 살펴본 포유동물세포에서 유전자 발현에서 사용해 온 벡터의 선택표지로 주로 DHFR cDNA, HPRT 유전자, GS(glutamine synthetase) 유전자, TK 유전자, 그밖에 antibiotic resistance 유전자등이 사용되어 왔는데, 앞으로 더 좋은 선택표지들을 시험해 보는 것이 바람직 하다고 여겨진다. 이는 또한 좀 더 광범위한 숙주 세포에 선택표지로서 작용하는 c-DNA 또는 유전자 개발이라는 의미에서도 중요한 의미를 갖는다고 사료된다.

종양괴사인자(Tumor Necrosis Factor:TNF)란 활성화된 lymphocytes와 monocytes에 의해 생성되는 cytotoxic factor에 붙여진 이름으로 *in vivo* 상태에서 특정종양세포에 대해 괴사를 선택적으로 유발시킨다. 이러한 종양괴사인자의 역사는 지금으로부터 약 100년전으로 거슬러 올라가 19세기 부터 시작된다. 19세기 말엽 Coley는 *Streptococcus*와 *Serratia*를 배양한 배양액에 의해 사람 종양의 출혈성 괴사가 유도되는 사실을 관찰하였으며 또한 이와같은 배

양액을 종양부위에 주입하여 종양의 크기를 감소시킬 수 있었음을 보고하였다 (13-17). 그 후 Shear와 그의 동료들은 생쥐에 이식한 종양에 출혈성 괴사를 유발시키는 세균생성물을 분리하고 이 물질을 "세균다당류 (bacterial polysaccharide)"라고 명명하였는데 현재는 "lipopolysaccharide"라고 알려져 있다(18). 그러나 1962년 O'Malley와 Shear는 LPS로 처리한 생쥐에서 얻은 혈청에 다른 동물에서 자란 종양의 출혈성 괴사를 유발시키는 endogenous factor가 포함되어 있음을 알아냈다(19). 이로부터, 1975년 Carswell과 그의 동료들은 위와 유사한 결과를 보고하였는데(20) Bacillus Calmette-Guérin(BCG)으로 처리한 생쥐로부터 얻은 혈청이 *in vitro* 상태에서 여러가지 종양세포에 대해 세포독성(cytotoxicity)을 나타냄을 관찰하고 이와같은 활성을 "종양괴사인자"라고 명명하였다. 그 후 계속적인 연구를 통해 종양괴사인자가 탐식세포에 의해 일차적으로 생성됨을 알았고, 1984년에는 *in vitro* 상태에서 lymphocytes를 자극하면 lymphotoxin이라고하는 세포독성활성을 갖는 물질이 생성됨을 발견하였다(21, 22). 오늘날 탐식세포에서 주로 생성되는 cytotoxic factor는 TNF- $\alpha$ 라 하고 lymphocyte에서 생성되는 lymphotoxin은 TNF- $\beta$ 라 부르고 있다. TNF- $\alpha$ 와 TNF- $\beta$ 는 현재 순수하게 분리정제되어 각각의 일차구조가 밝혀지고 일련의 클로닝연구를 통해 유전자의 일차구조도 밝혀짐으로써 서로 유사한 물질임이 알려졌다.

Aggarwal과 그의 동료들은 HL-60 세포로부터 mRNA를 분리하여 얻은 cDNA를 통하여 233 개 아미노산의 open reading frame이 존재함을 보였다(23). 자연상태에서 존재하는 종양괴사인자(TNF)의 N-말단 아미노산 서열이 결정됨에 따라 처음 76 개 잔기가 pre-sequence이고, mature protein은 분자량이 1735 Da 임이 알려졌다 (24). 한편 종양괴사인자 유전자는 4개의 exon과 3 개의 intron으로 구성되며, 이것이 human chromosome 6의 MHC

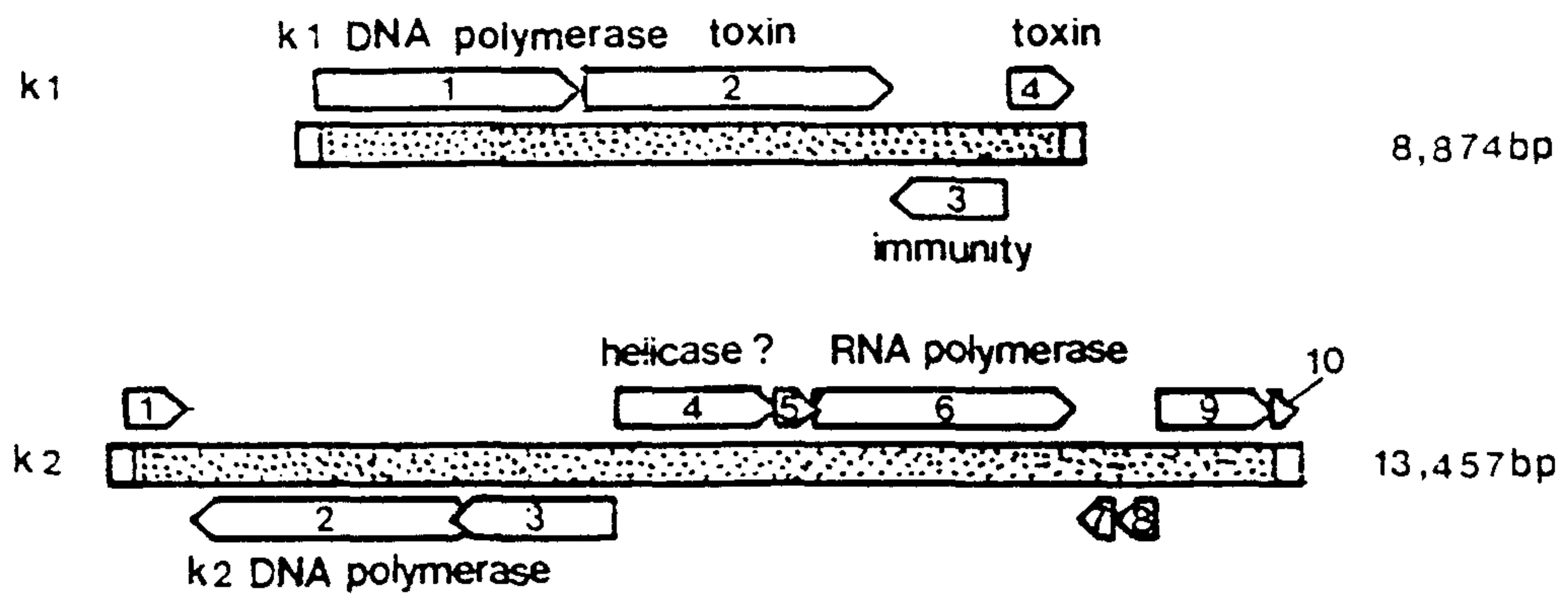
(Major Histocompatibility complex) 내부에 있음이 알려짐과 함께 (25), 포유동물 세포 벡터를 이용한 사람 종양괴사인자(hTNF)의 cloning을 통해 자연상태에서 보다 많은 양의 종양괴사인자를 얻는 한편 사람 종양괴사인자의 생합성과 종양괴사인자의 생리적인 영향을 연구하게 되었다. 종양괴사인자의 유전자를 진핵세포 시스템에서 발현시킨 예를 보면 다음과 같다.

Allen Oliff 등은 human peripheral blood leukocyte에 Sendai virus를 처리하여 사람TNF/cachectin 유전자를 얻고 이를 이용하여 재조합 TNF/cachectin-CMVIE- AKI-DHFR plasmid DNA를 구축한 후 CHO 세포에 transfection 하여 TNF/cachectin이 생성된다는 사실을 관찰하였다(26). 또한 Muller등은 TNF 유전자를 pSV2에 넣어 pSVd2-hTNF plasmid를 구축하고 이를 CHO cell line에 transfection한 결과 각각 20KD, 18.5KD, 17 KD (K Dalton)의 종양괴사인자 polypeptide를 얻었으며 특이적 면역침전법을 통해 이 종양괴사인자 polypeptide가 mature 종양괴사인자임을 입증하였다(27). Marmenout등은 TNF gene을 pSV529에 넣어 pSV529-hTNF1이라 명명하고 이를 COS cell에 DEAE-dextran 방법으로 transfection하여 transient expression을 보았는데 이때 생성되어 배지로 분비된 TNF의 양은 5000-8000 unit/ml(media)였다 (28).

본 연구에서는 포유동물 세포 벡터의 개발에 필요한 test gene으로 사용하기 위하여 genomic cloning을 통해 TNF gene을 분리하고, 이 TNF gene을 amplification하는 한편, 강력한 promoter인 T7  $\phi$  10을 이용하여 prokaryote에서 TNF의 양산을 모색하는 동시에 포유동물 시스템에서 생산되는 TNF와 어떤 활성의 차이를 보이는지를 알기위한 지표로 삼았다. 포유동물에서의 발현실험에는 현재 많이 연구가 되어있고 이용되고 있는 SV40의 late promoter를 갖는 pSVL plasmid를 이용하여 진핵세포 내에서 TNF의 발현을 알아보는 실험을 수행



하였다. 한편 포유동물에서 종양괴사인자와 같은 독성물질을 발현시킬 때 숙주가 어떤 영향을 받을 가능성이 있고 또한 발현양도 많지 않아 Baculovirus (AcNPV)를 이용한 사람종양괴사인자의 발현도 시도하였다.



**Figure 1.** Genetic organization of the linear plasmids, pGKL1 and pGKL2.



**Table 2. Composition of yeast low Pi synthetic minimal medium.**

---

---

<b>Nitrogen source</b>	
Asparagine	2 g
<b>Carbon source</b>	
Glucose	20 g
<b>Vitamines</b>	
Biotin	2 $\mu$ g
Calcium pantothenate	400 $\mu$ g
Folic acid	2 $\mu$ g
Inositol	2 mg
Niacin	400 $\mu$ g
p-Aminobenzoic acid	200 $\mu$ g
Pyridoxin	400 $\mu$ g
Riboflavin	200 $\mu$ g
Thiamine	400 $\mu$ g
<b>Trace elements</b>	
Boric acid	500 $\mu$ g
Copper sulfate	40 $\mu$ g
Potassium iodide	100 $\mu$ g
Ferric chloride	200 $\mu$ g
Manganese sulfate	400 $\mu$ g
Sodium molibdate	200 $\mu$ g
Zinc sulfate	400 $\mu$ g
<b>Salts</b>	
Potassium phosphate monobasic	1.5 g
Magnesium sulfate	0.5 g
Sodium chloride	0.1 g
Calcium chloride	0.1 g
Potassium chloride	1.5 g
Potassium phosphate dibasic	30 mg
<b>Necessary amino acids</b>	40 mg
<i>Adjust the volume to 1 liter with DW</i>	

---

---

PHO5 PROMOTER DELETIONS

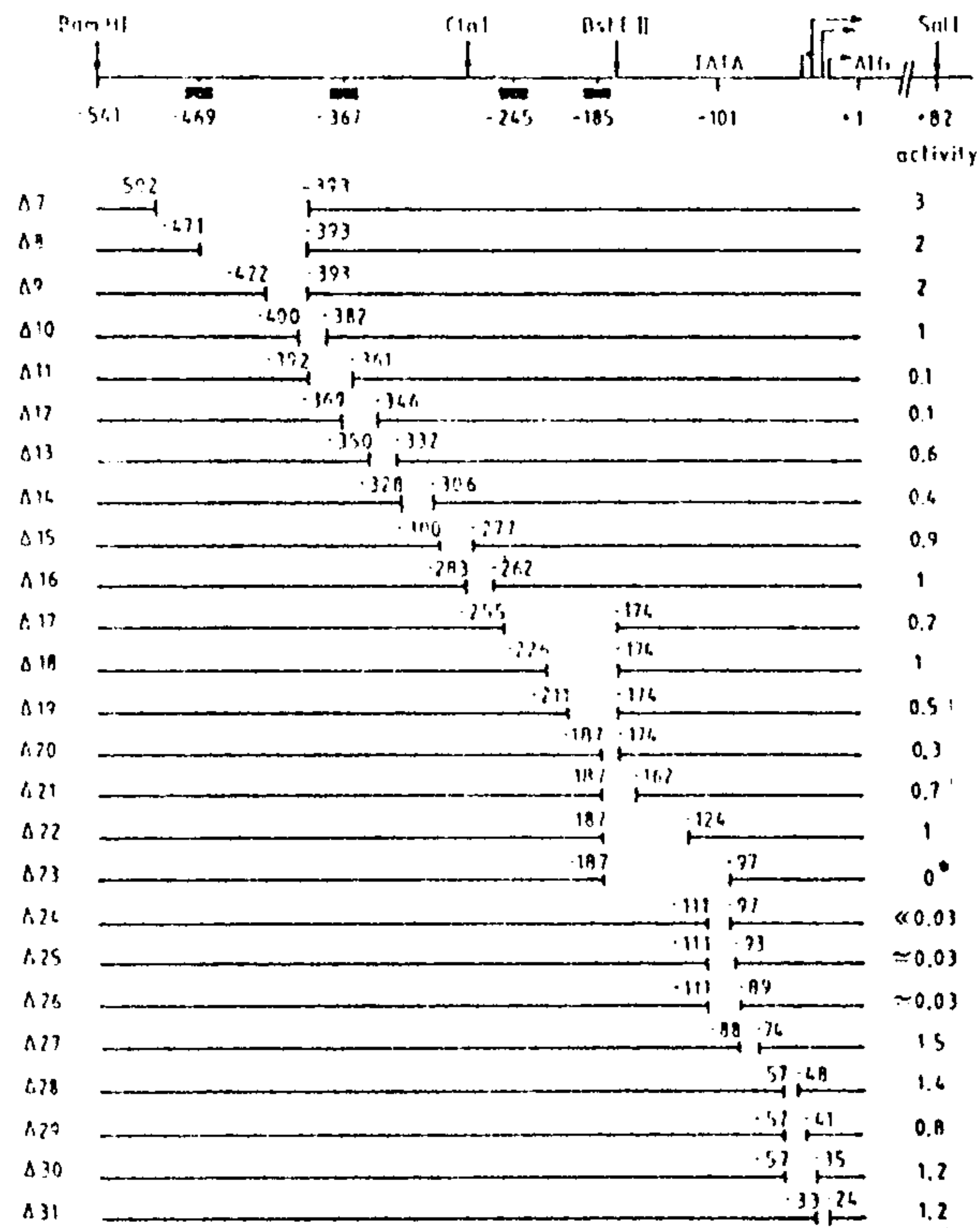
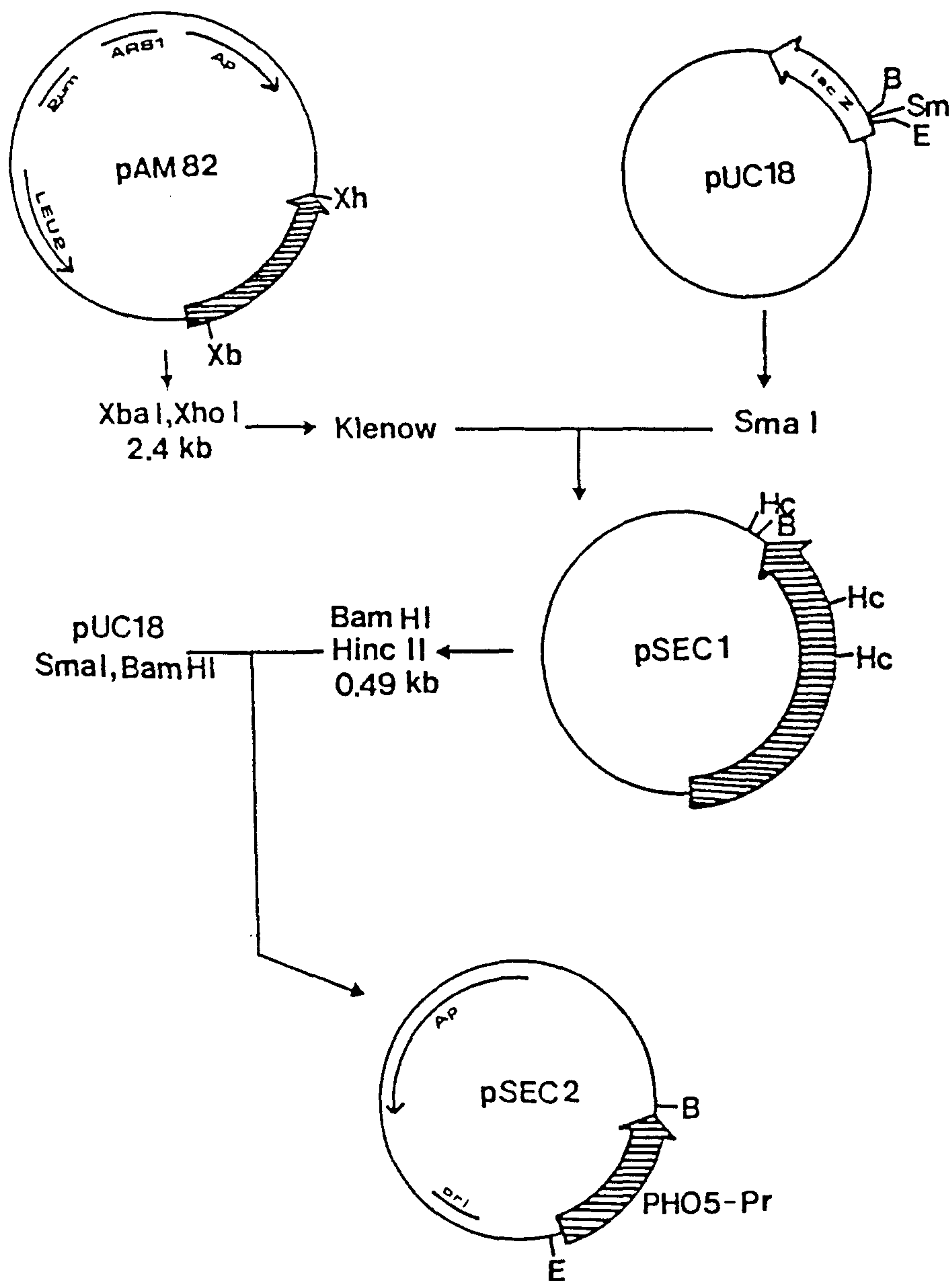
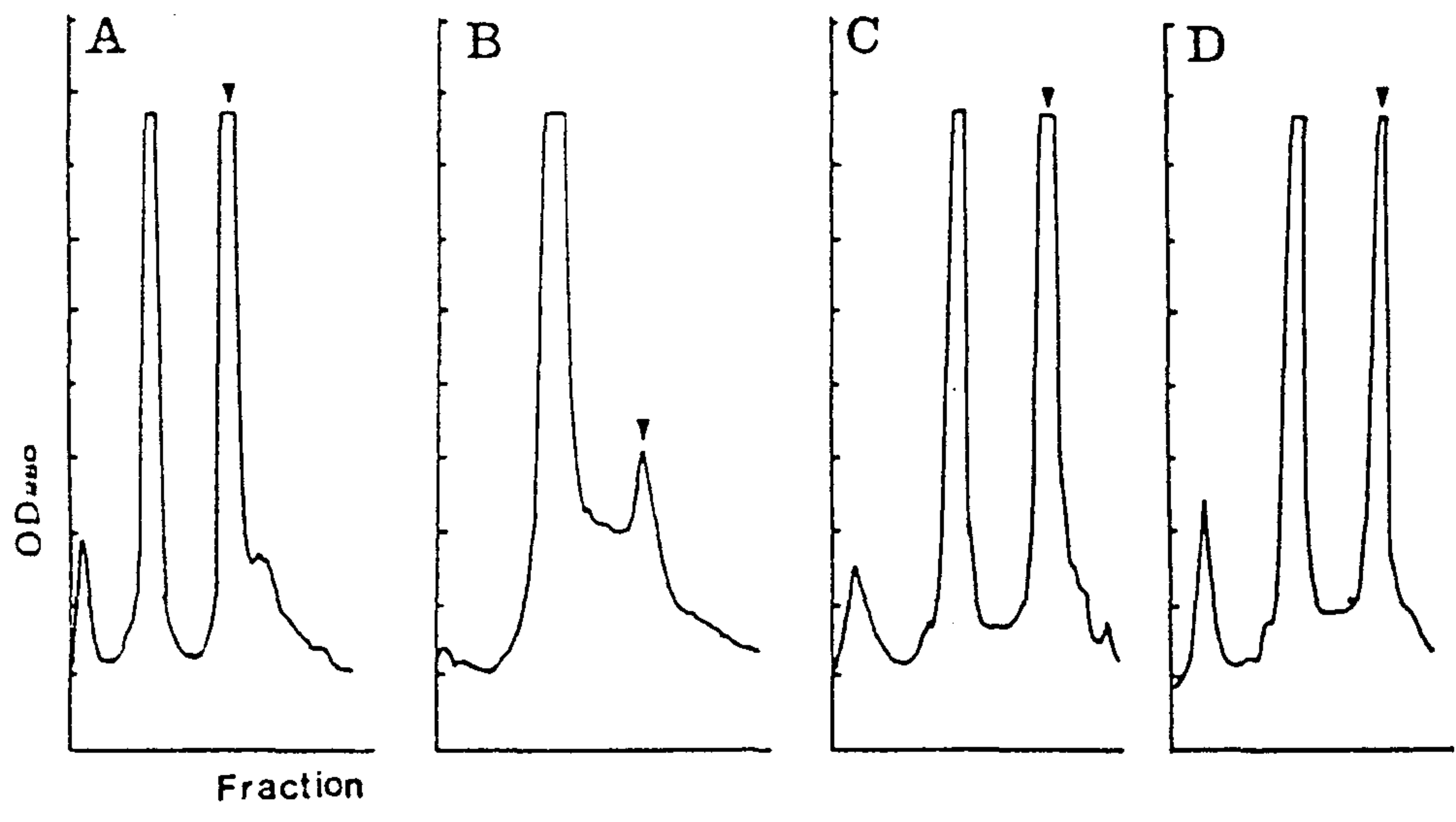


Figure 2. The PHO5 promoter and deletion derivatives.

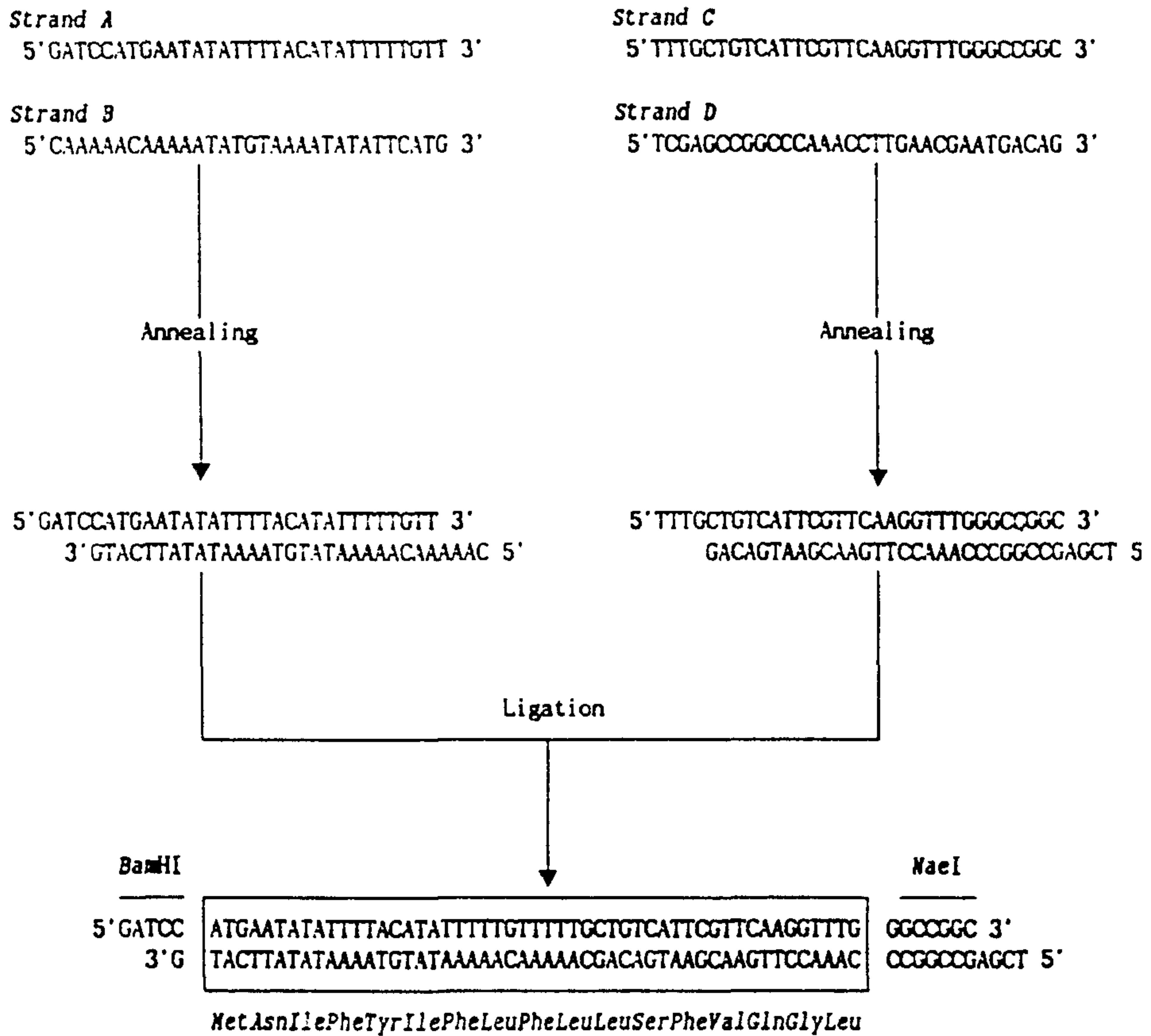
The restriction map shows 623 bp of the wild-type promoter. mRNA starts are indicated by arrows; TATA box and ATG are marked. Boxes represent the dyads of UAS. The deletion made in a particular mutant and the relative amounts of total PHO5 mRNA (wild type = 1, the asterisk marks a PHO5 mRNA level below detection limit) are indicated.



**Figure 3** Isolation of yeast *PHO5* promoter.  
 Hatched region represents *PHO5* promoter.  
 Abbreviations are Xb;*Xba*I, Xh;*Xho*I, B;*Bam*HI, Sm;*Sma*I,  
 E;*Eco*RI, Hc;*Hinc*II.

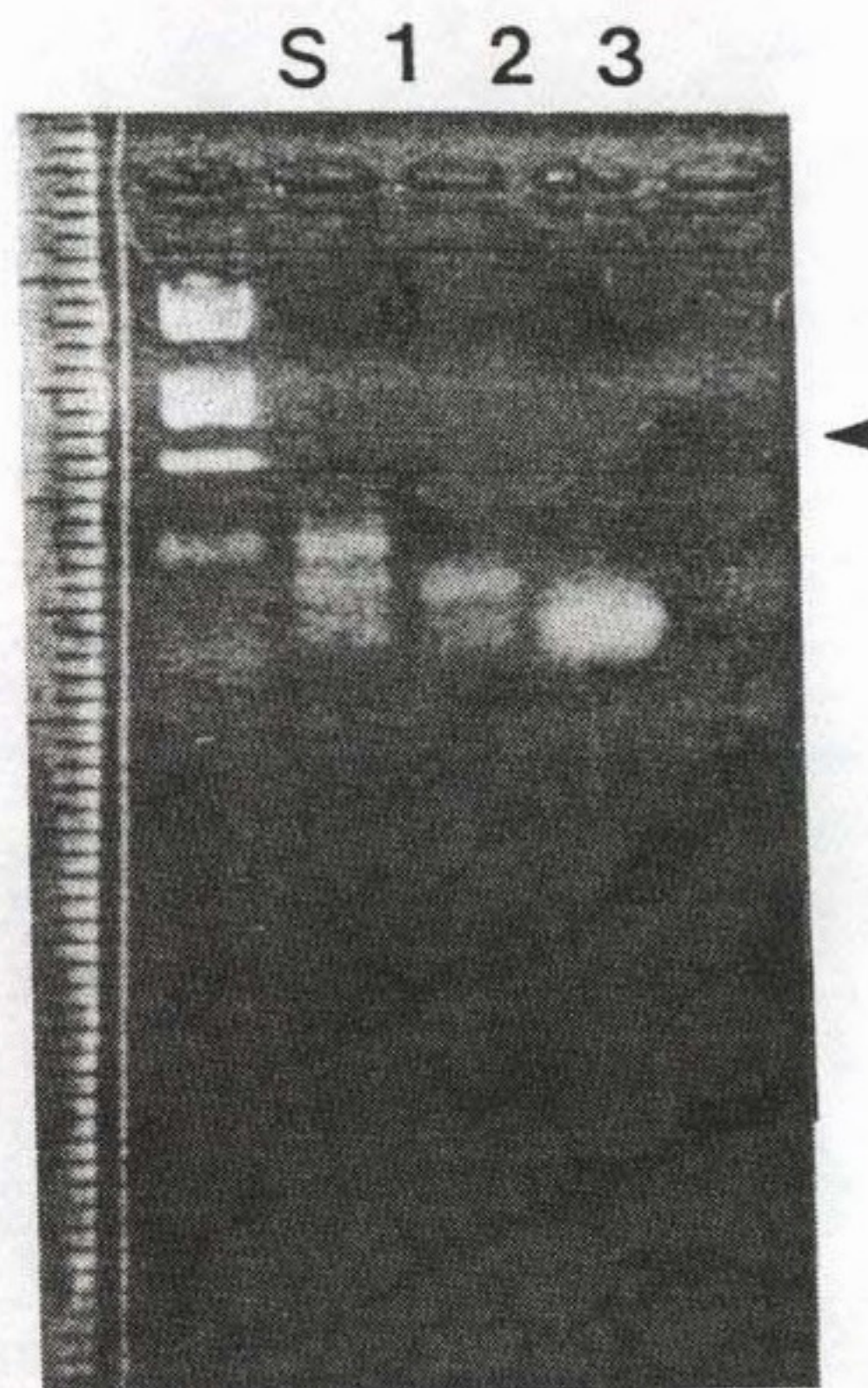


**Figure 4** Isolation of oligonucleotides by reverse-phase chromatography on a silica gel. Arrowheads indicate the fractions of full-length oligomers.

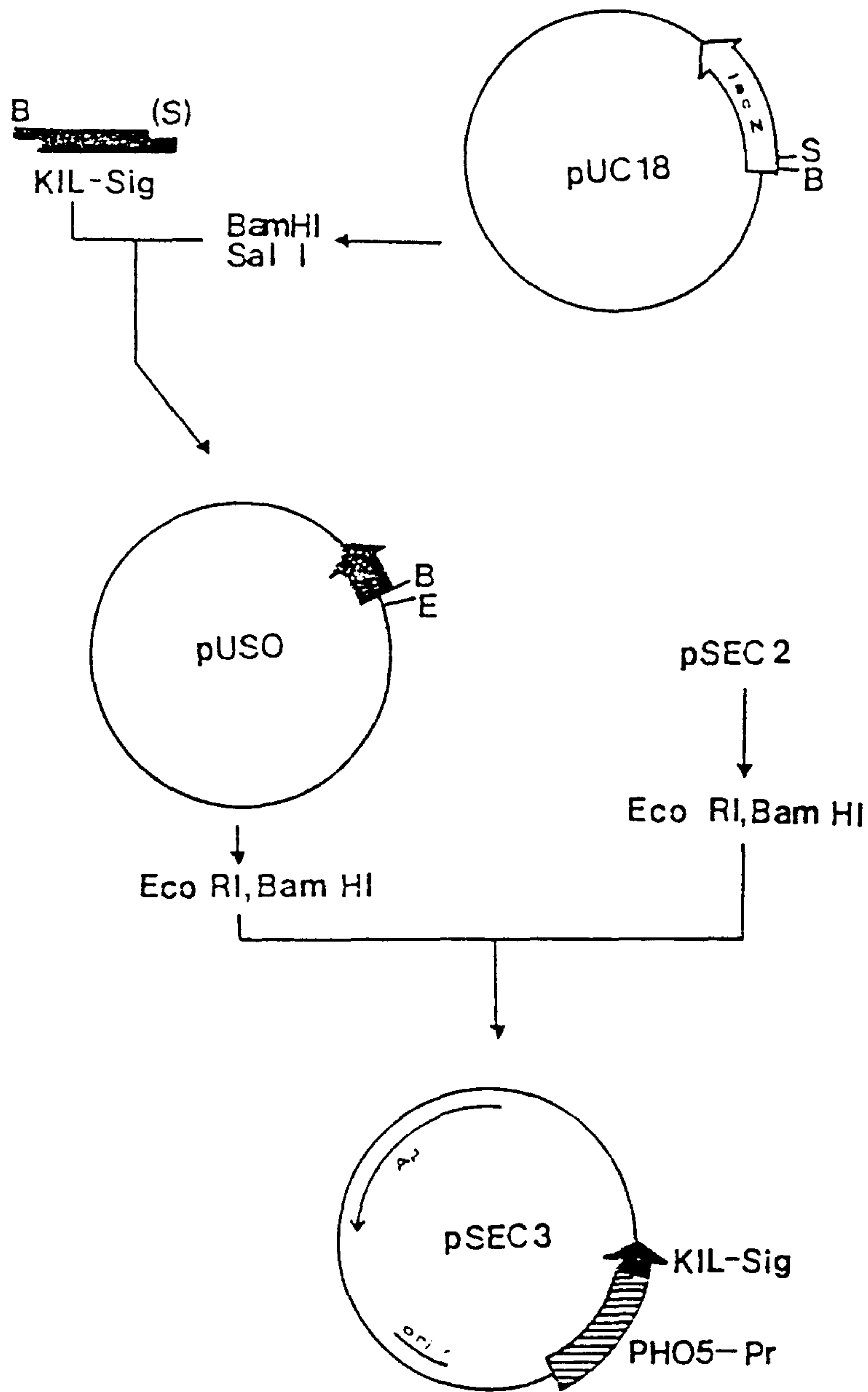


**Figure 5** Strategy for the production of synthetic signal sequence of killer toxin gene. Boxed region represents the signal sequence encoding 16 amino acids.





**Figure 6** Agarose gel electrophoresis of ligated oligomer (1), annealed oligomer (2) and synthetic oligomer (3). pUC18 digested with *Hinf*1 was represented (s). Arrowhead indicates the complete, synthetic signal sequence.



**Figure 7** Fusion of synthetic signal sequence with *PHO5* promoter  
Abbreviations are B;BamHI, S;SalI, E;EcoRI.





**Figure 8** Agarose gel electrophoresis of pSEC2, pSEC3 and pUSO.

lane 1 ; pSEC3

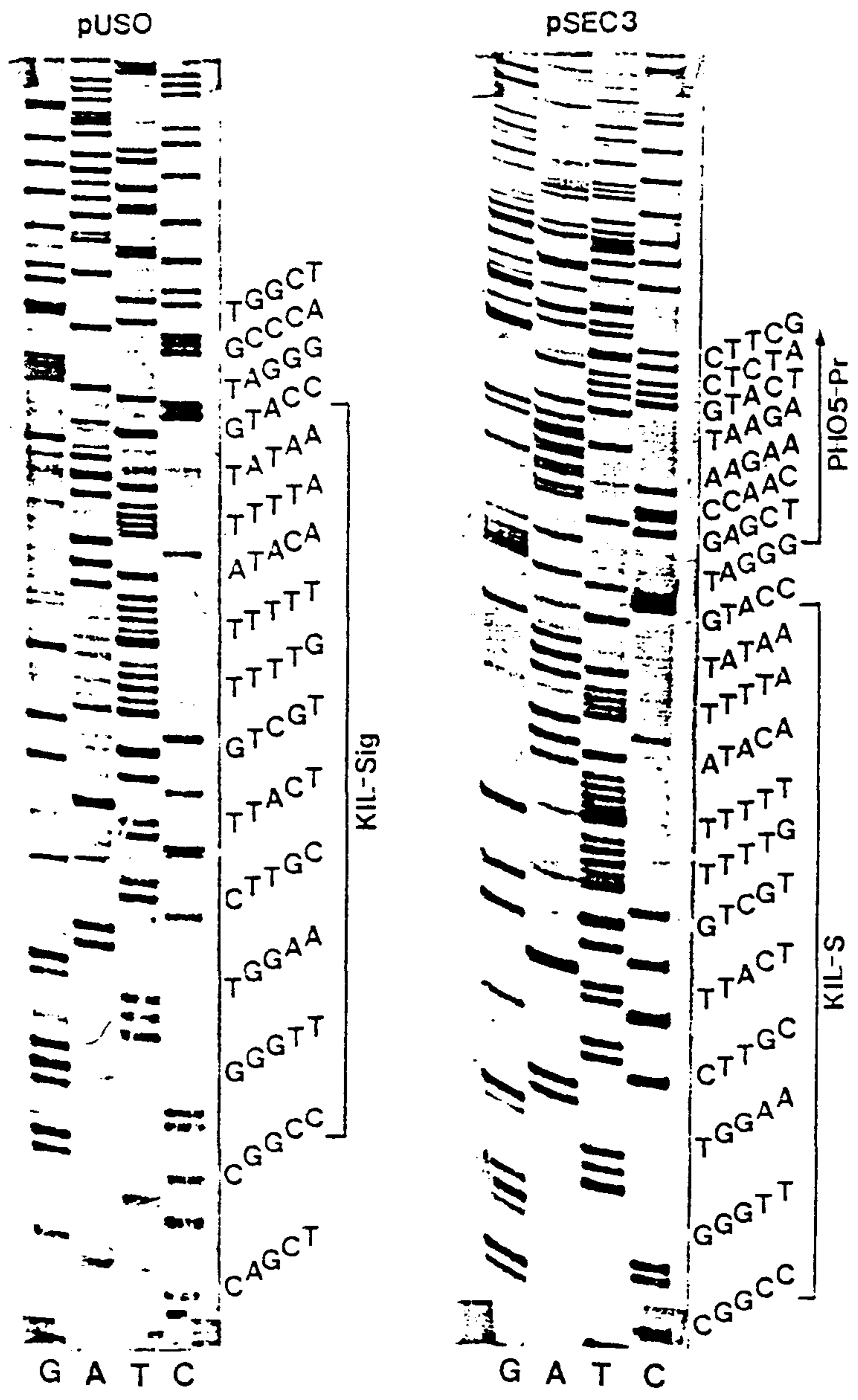
lane 2 ; pSEC3-*Pst*I

lane 3 ; pSEC3-*Eco*RI, *Hind*III

lane 4 ; pSEC2-*Eco*RI, *Hind*III

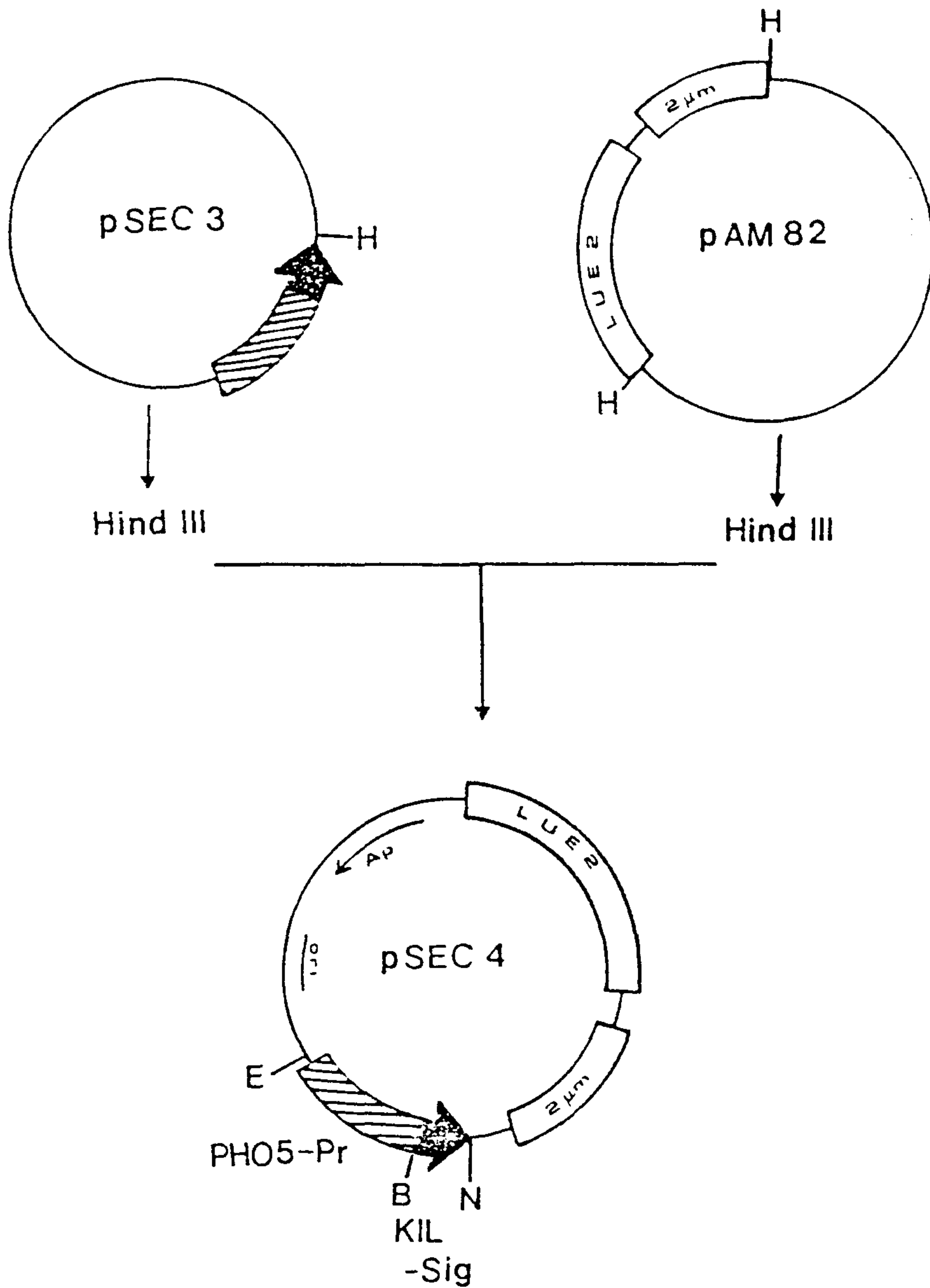
lane 5 ; pSEC3-*Bam*HI, *Hind*III

lane 6 ; pUSO -*Eco*RI, *Hind*III



**Figure 9** Sequence analysis of pUSO and pSEC3. Synthetic signal sequence and *PHO5* regions were bracketed





**Figure 10** Construction of primary secretion vector of yeast.  
 Abbreviations are Ss;Sspl, H ;HindIII, E;EcoRI, Sm;SmaI,  
 B;BamHI, N;NaeI.

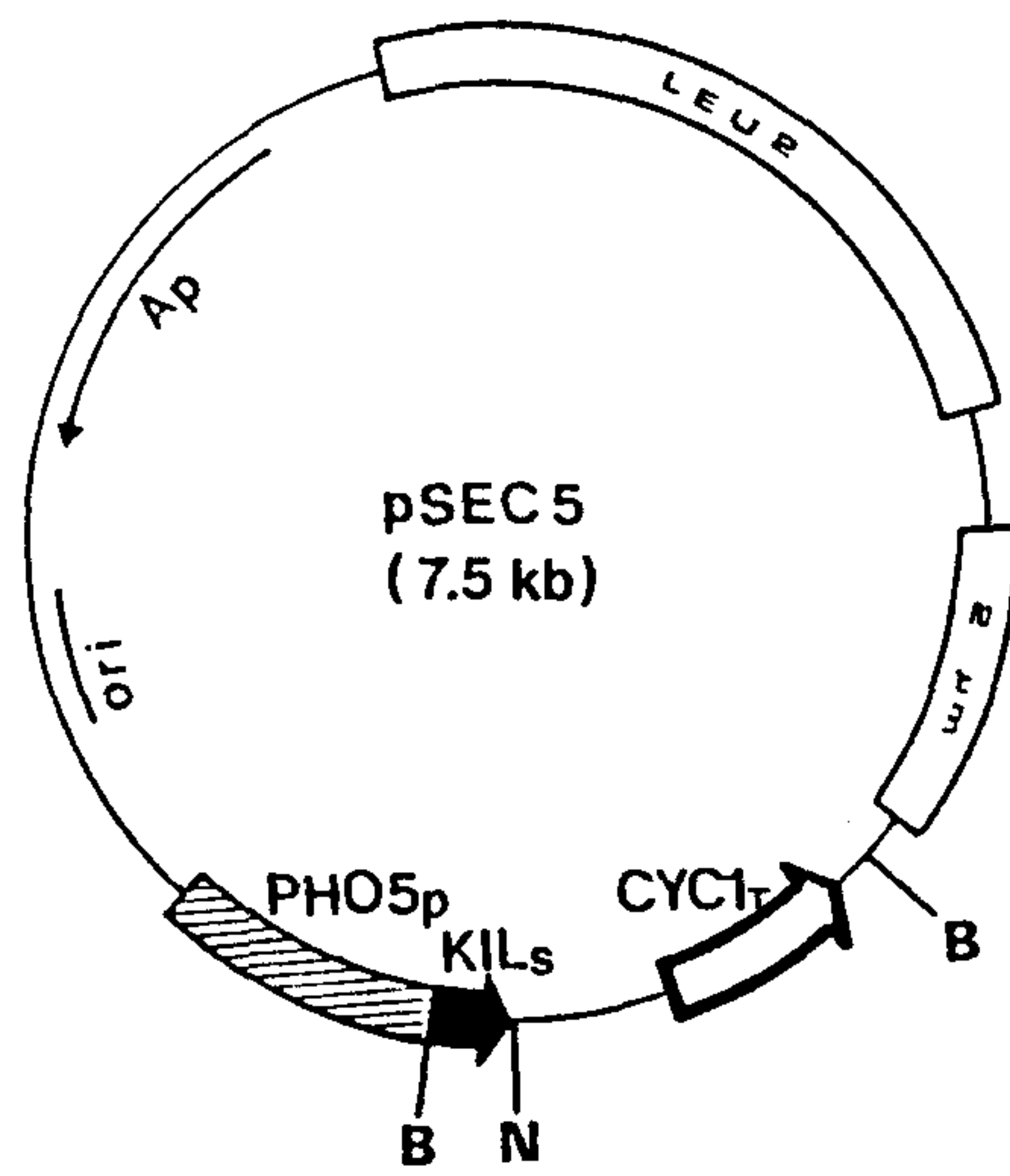
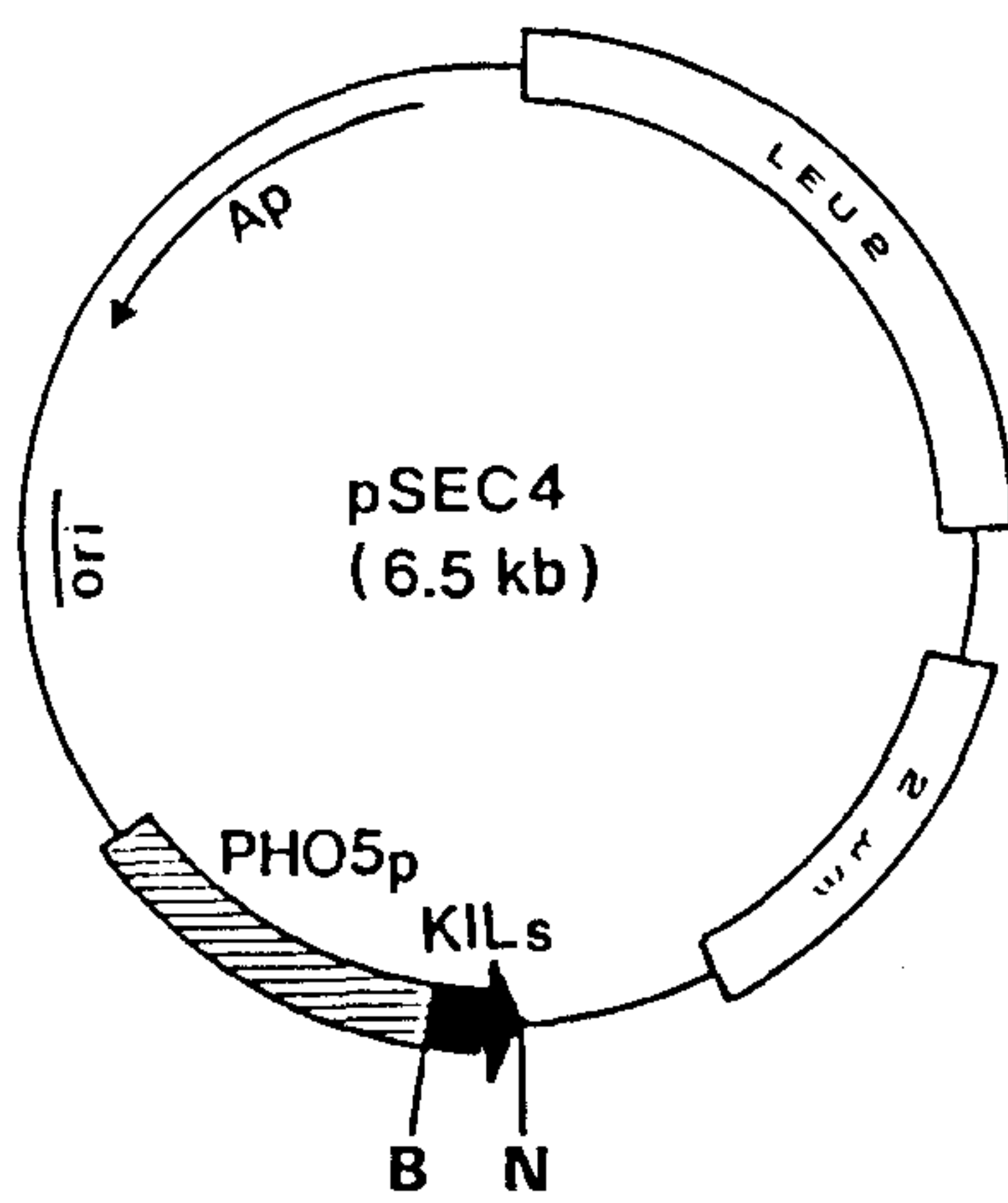


Figure 11. The secretion vector pSEC4 and pSEC5.  
 B: BamHI, N: NaeI

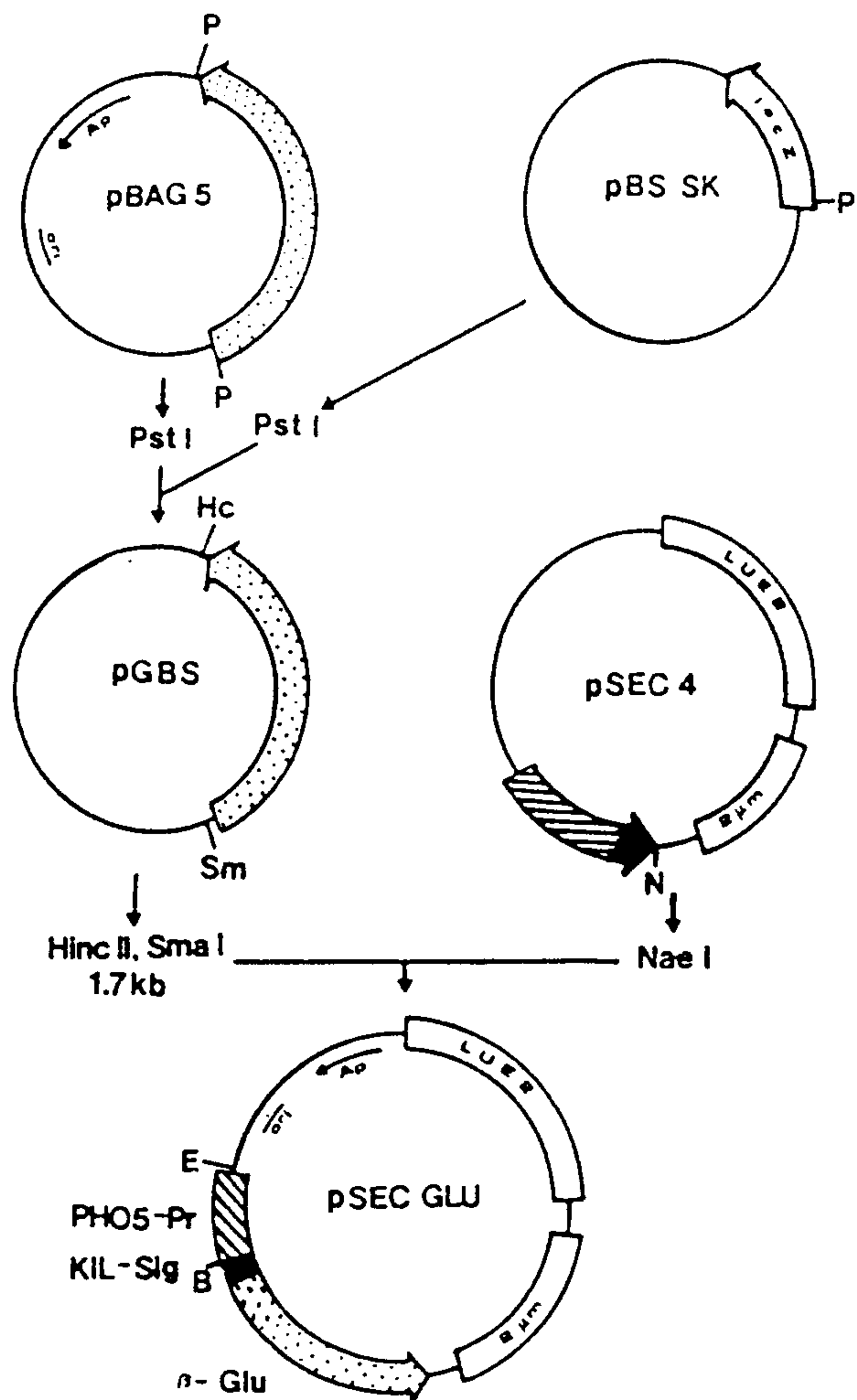


**Figure 12.** Restriction enzyme (BamHI) digestion of pSEC5.  
Lanes 1, 6, and 7 represent correct orientation and  
lanes 2, 4, and 5 represent reverse orientation.  
Lane 9 is size marker (pUC18-HinI)

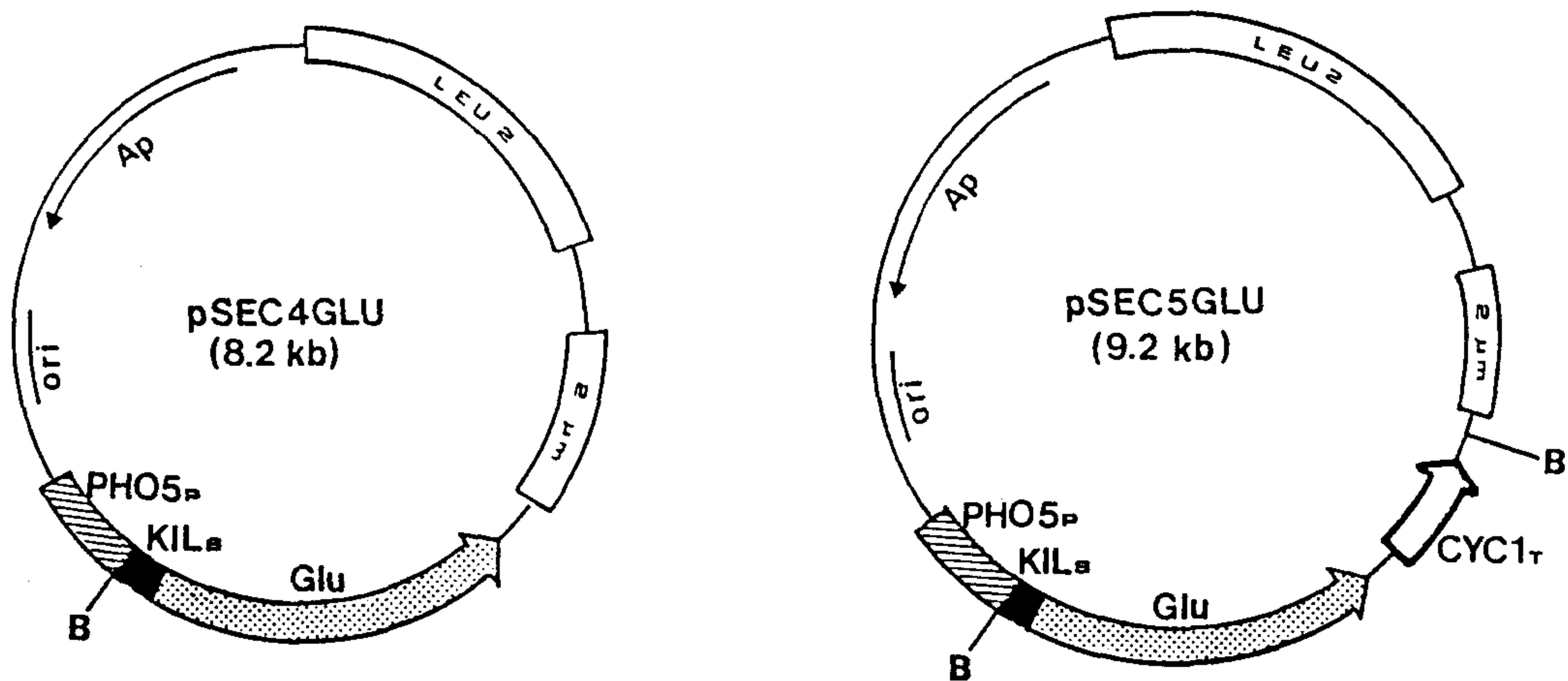








**Figure 14** Introduction of  $\beta$ -1,4-Glucanase gene into pSEC4. Abbreviations are P;PstI, Hc;HincII, Sm;SmaI, N;NaeI, E;EcoRI, B;BamHI.



ATGAATATATTTTACATATTTTGTGCTGTCATTCGTTCAAGGTTTGGGCCGGGCTGCAGTAGGGGAA-->  
 MetAsnIlePheTyrIlePheLeuPheLeuLeuSerPheValGlnGlyLeu GlyArgAla AlaValGlyGlu-->



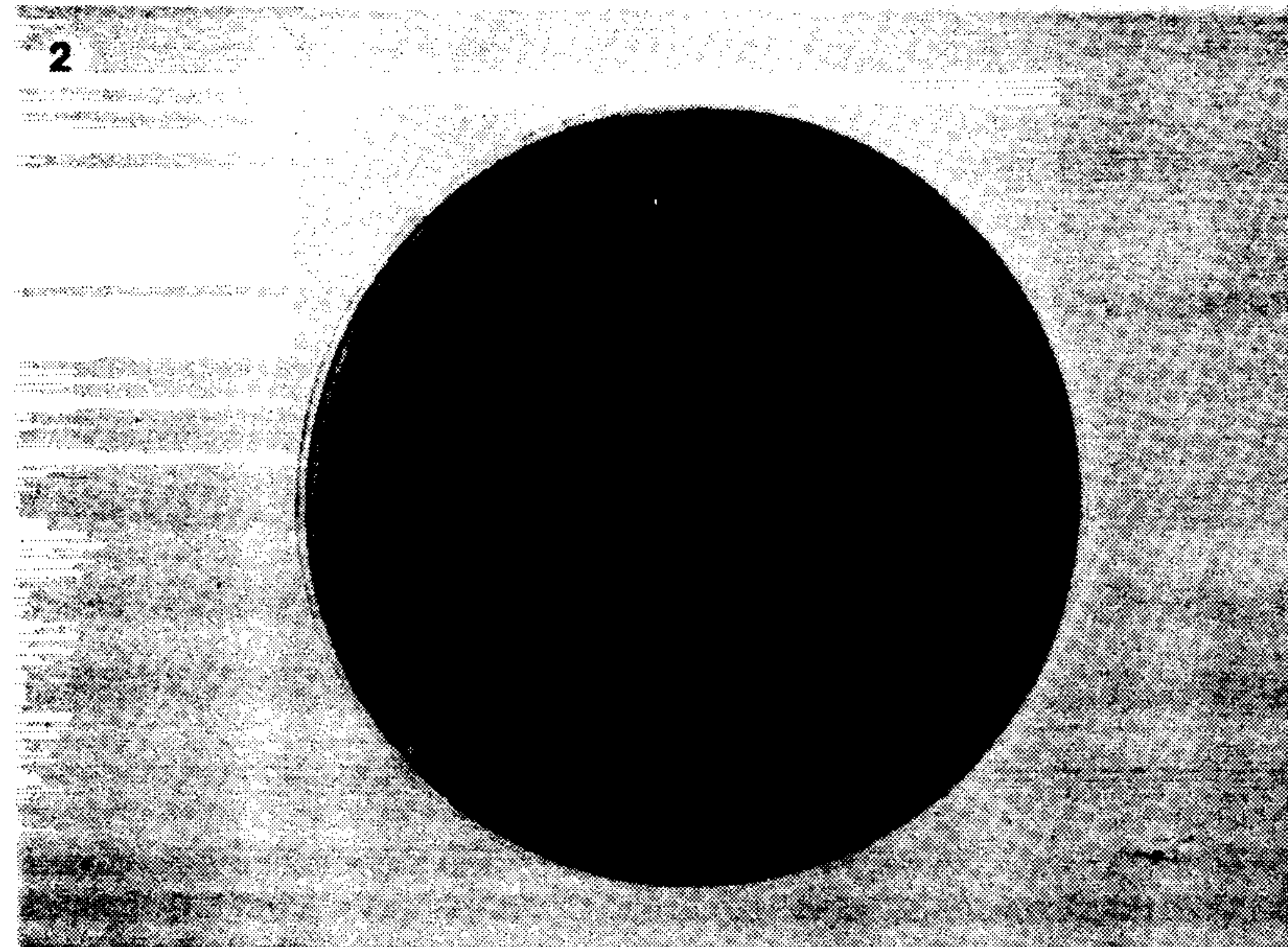
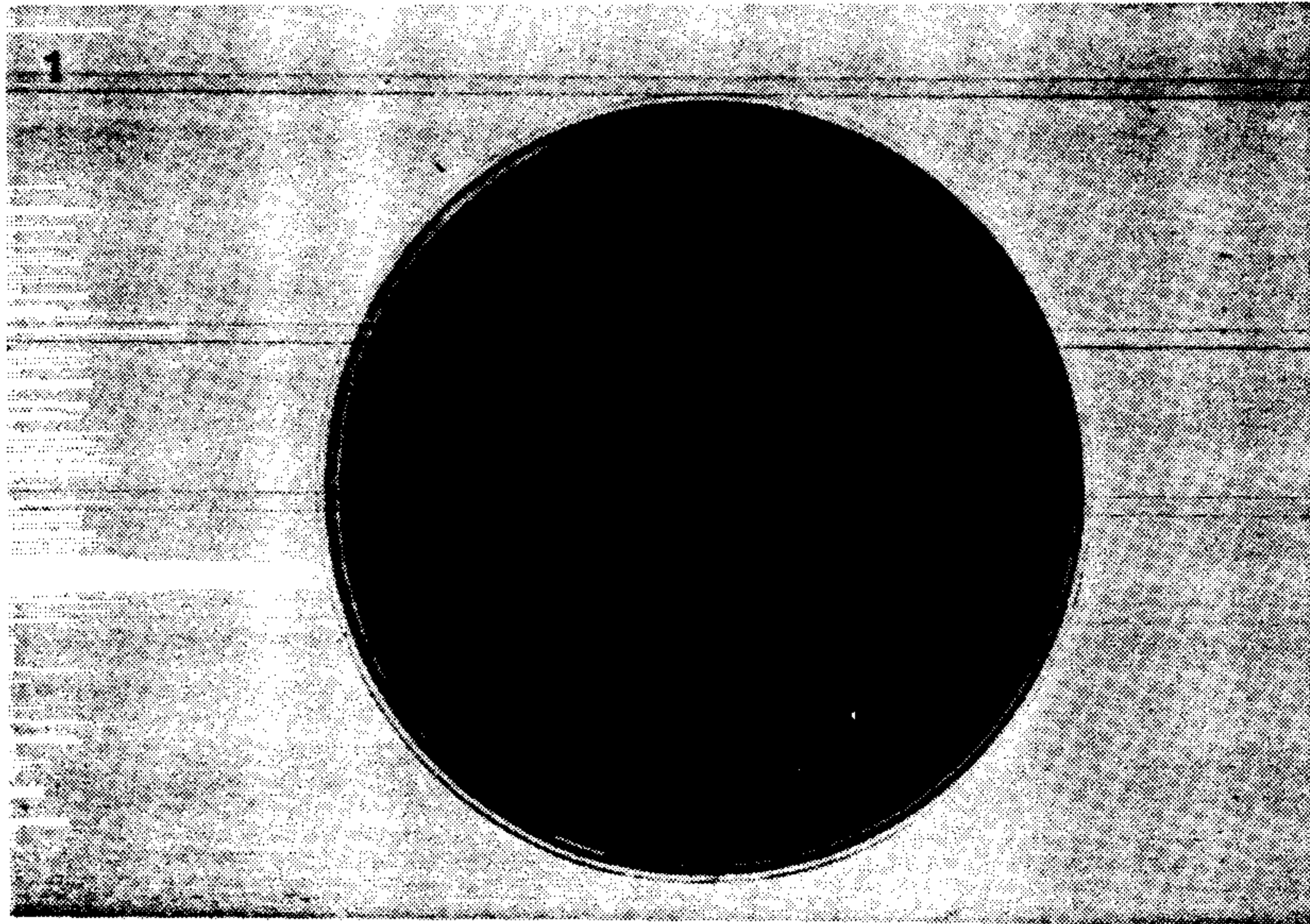
Signal Sequence of Killer Toxin

B-gluconase

Figure 15. The map of pSEC4GLU and pSEC5GLU.

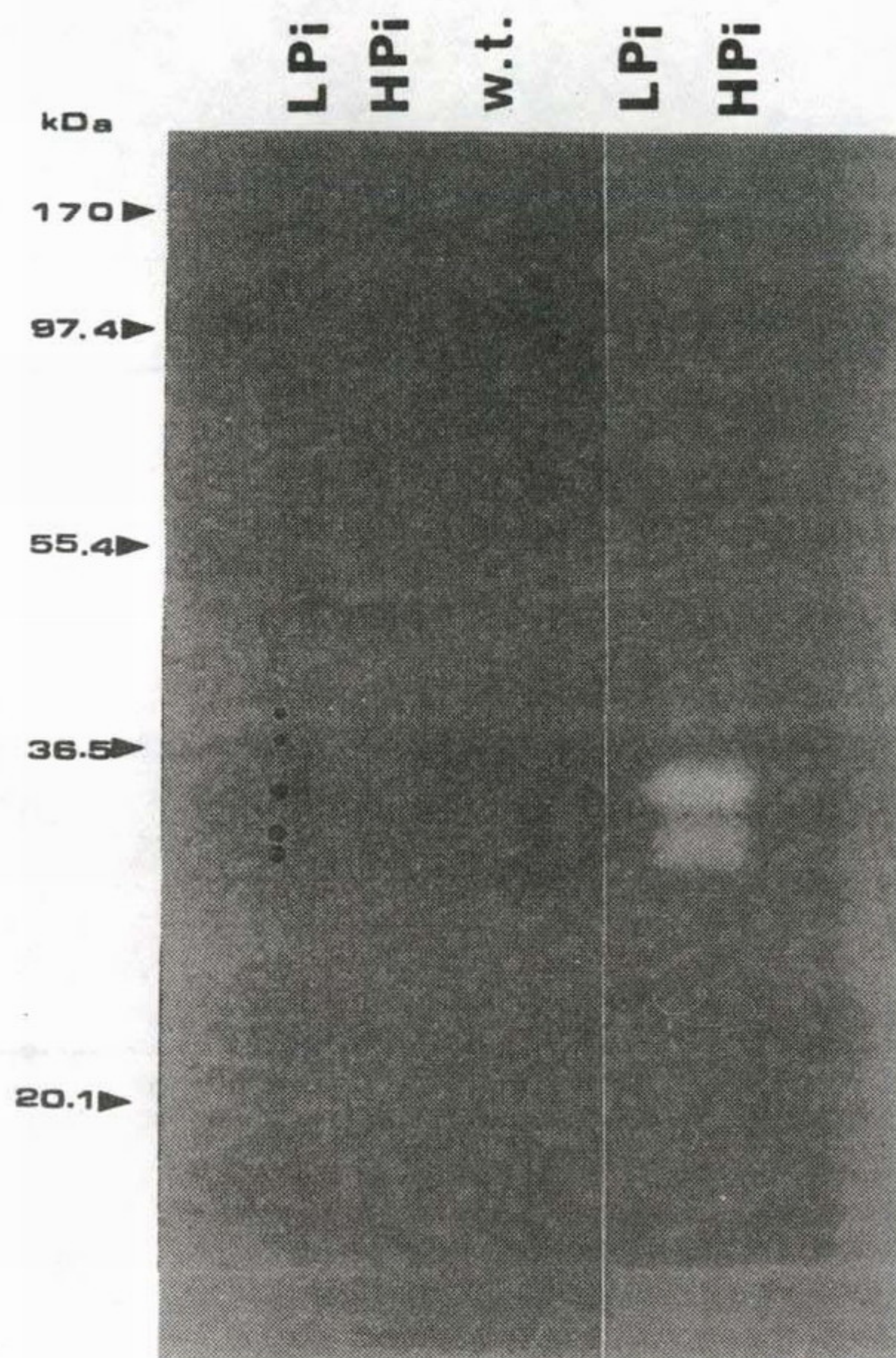
The nucleotide sequence and its amino acid sequence of the junction region between signal sequence of killer toxin and B-gluconase were represented.





**Figure 16** Degradation of CMC by  $\beta$ -1,4-Glucanase secreted by transformant containing the pSECGLU.  
a) High Pi medium  
b) Low Pi medium

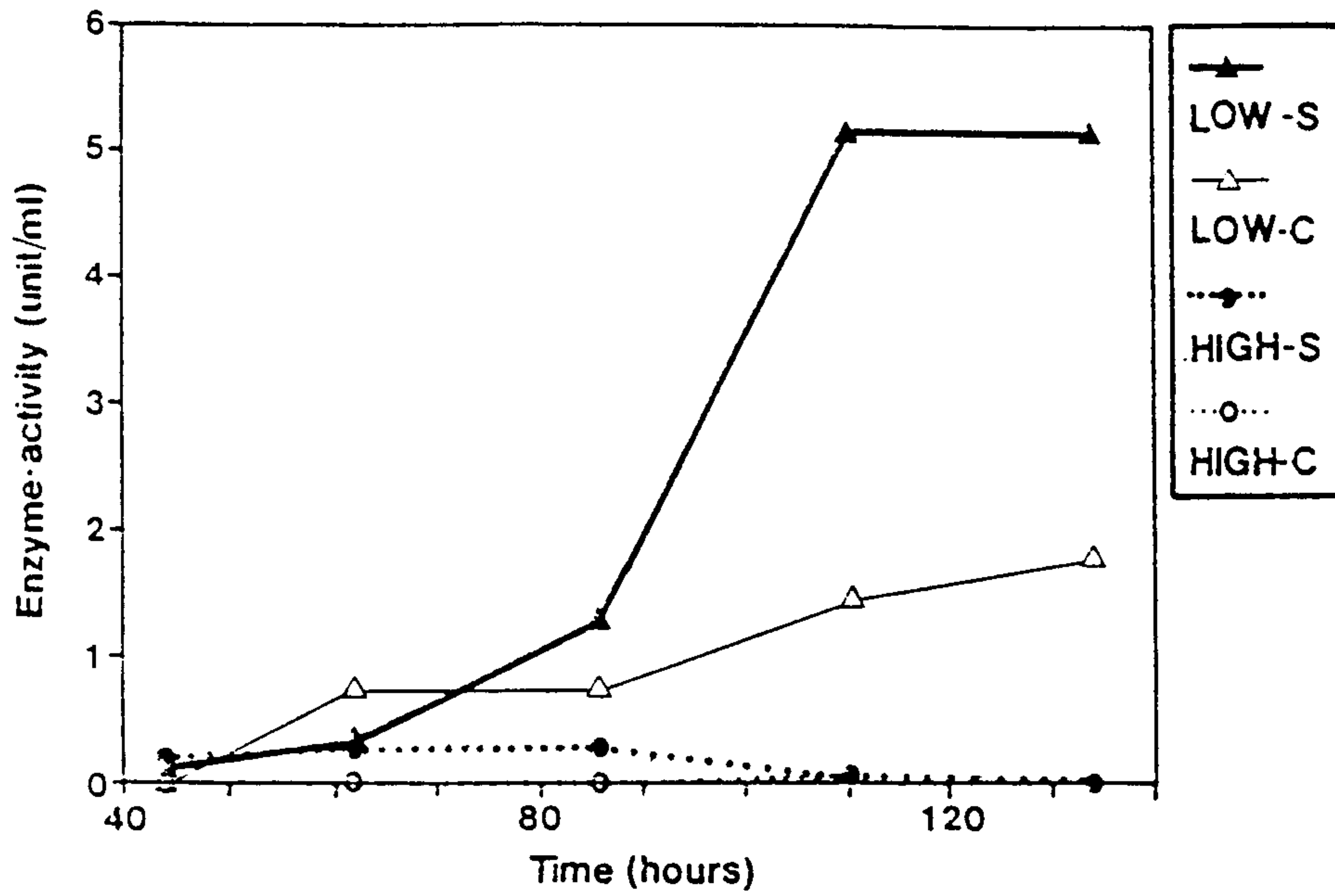




**Figure 17** Detection of  $\beta$ -D-glucanase activity in polyacrylamide gels using Congo Red-stained agar replicas.

- a) Size marker
- b) Supernatant of low Pi medium
- c) Supernatant of high Pi medium
- d) Supernatant of Wild type





**Figure 18**  $\beta$ -1,4-Glucanase activity of the yeast transformed with pSECGLU.  
 LOW -S ; Supernatant of low Pi medium  
 LOW -C ; Cell extract in low Pi medium  
 HIGH-S ; Supernatant of high Pi medium  
 HIGH-C ; Cell extract of high Pi medium

```

                                     -26          -20
                                     Met Met Ala Ala Gly Pro Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe
ACGGCUCAGGGUCCGUGACAGCUCACCAGCT AUG AUG GCU GCA GGC CCC CGG ACC UCC CUG CUC CUG GCU UUC

                                     -10          1          10
Ala Leu Leu Cys Leu Pro Trp Thr Sin Val Val Gly Ala Phe Pro Ala Met Ser Leu Ser Gly Leu
GCC CUG CUC UGC CUG CCC UGG ACU CAG AUG GUG GGC GCC UUC CCA GCC AUG UCC UUG UCC GGC CUG

                                     20          30
Phe Ala Asn Ala Val Leu Arg Ala Sin His Leu His Sin Leu Ala Ala Asp Thr Phe Lys Glu Phe
UUU GCC AAC GCU GUG CUC CGG GCU CAG CAC CUG CAC CAG CUG GCU GCU GAC ACC UUC AAA GAG UUU

                                     40          50
Glu Arg Thr Tyr Ile Pro Glu Gly Sin Arg Tyr Ser Ile Sin Asn Thr Sin Val Ala Phe Cys Phe
GAG CGU ACC UAC AUC CCS GAG GGA CAG AGA UAC UCC AUC CAG AAC ACC CAG GUU GCC UUC UGC UUC

                                     60          70
Ser Glu Thr Ile Pro Ala Pro Thr Gly Lys Asn Glu Ala Sin Sin Lys Ser Asp Leu Glu Leu Leu
UCC GAA ACC AUC CCS GCC CCC ACS GGC AAG AAU GAG GCC CAG CAG AAA UCA GAC UUG GAG CUG CUU

                                     80          90
Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Sin Ser Trp Leu Gly Pro Leu Sin Phe Leu Ser Arg Val Phe Thr
CGC AUC UCA CUG CUC CUC AUC CAG UCS UGG CUU GGG CCC CUG CAG UUU CUC AGC AGA GUC UUC ACC

                                     100          110          120
Asn Ser Leu Val Phe Gly Thr Ser Asp Arg Val Tyr Glu Lys Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile
AAC AGC UUG GUG UUU GGC ACC UCS GAC CGU GUC UAU GAG AAG CUG AAG GAC CUG GAG GAA GGC AUC

                                     130          140
Leu Ala Leu Met Arg Glu Leu Glu Asp Gly Thr Pro Arg Ala Gly Sin Ile Leu Lys Sin Thr Tyr
UUG GCC CUG AUG CGG GAG CUG GAA GAU GGC ACC CCC CGG GCU GGG CAG AUC CUC AAG CAG ACC UAU

                                     150          160
Asp Lys Phe Asp Thr Asn Met Arg Ser Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Ser Cys
GAC AAA UUU GAC ACA AAC AUG CSC AGU GAC GAC GCS CUG CUC AAG AAC UAC GGU CUG CUC UCC UGC

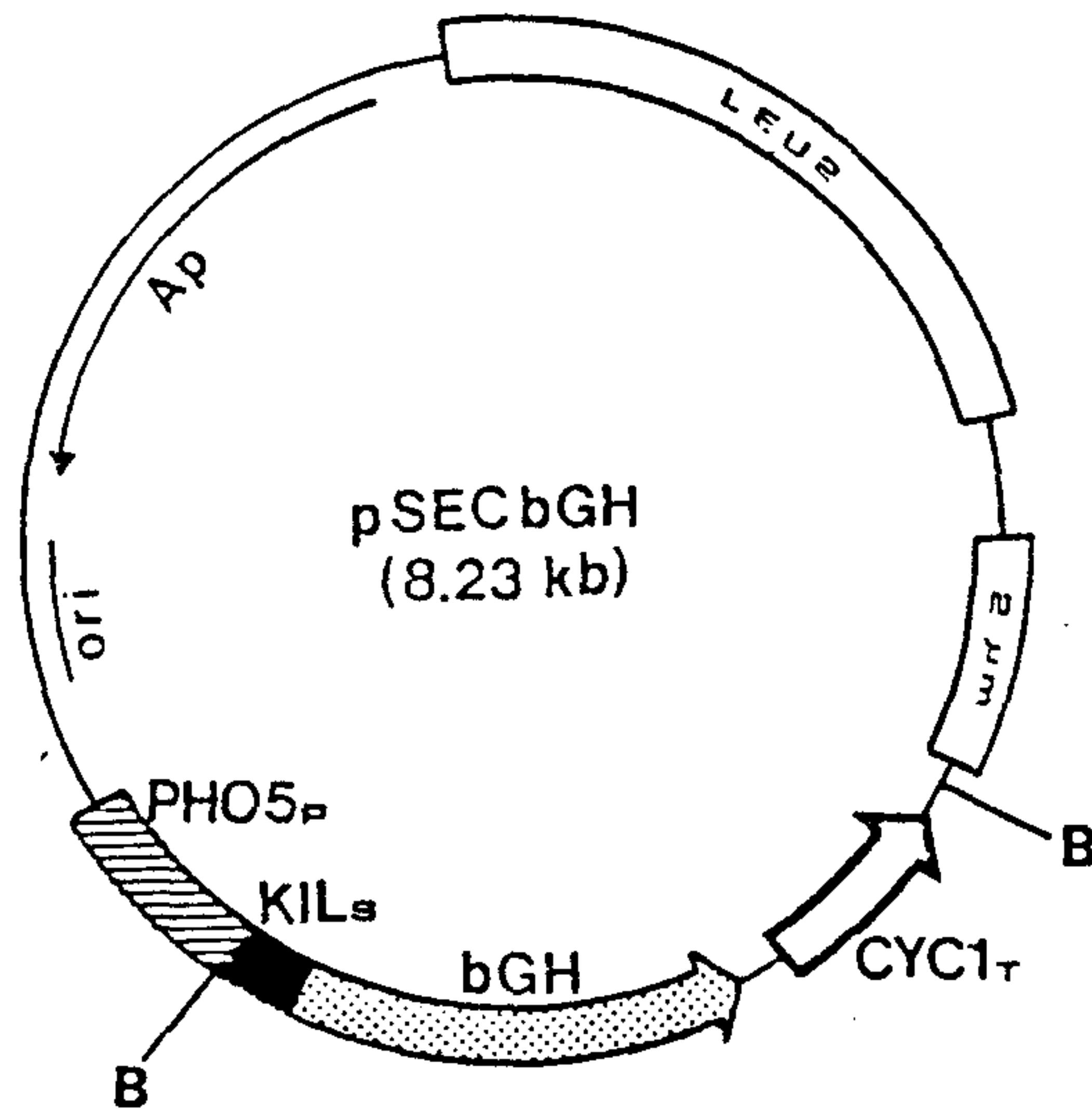
                                     170          180
Phe Arg Lys Asp Leu His Lys Thr Glu Thr Tyr Leu Arg Val Met Lys Cys Arg Arg Phe Gly Glu
UUC CGG AAG GAC CUG CAU AAG ACS GAG ACS UAC CUG AGG GUC AUG AAG UGC CGC CGC UUC GGG GAG

                                     190 191
Ala Ser Cys Ala Phe AM
GCC AGC UGU GCC UUC UAG UUGCCAGCCAUUCUGUGUUGGCCCCUCCCCCSUGCCUCCUUGACCCUGGAAGGUGCCA

CUGCCACUGUCCUUCUAAUAAAAUGAGGAAAUUGCAUCGC(polyA)

```

Figure 19. Nucleotide sequence of bovine growth hormone mRNA and its derived amino acid sequence as determined by the nucleotide sequence of the cDNA.

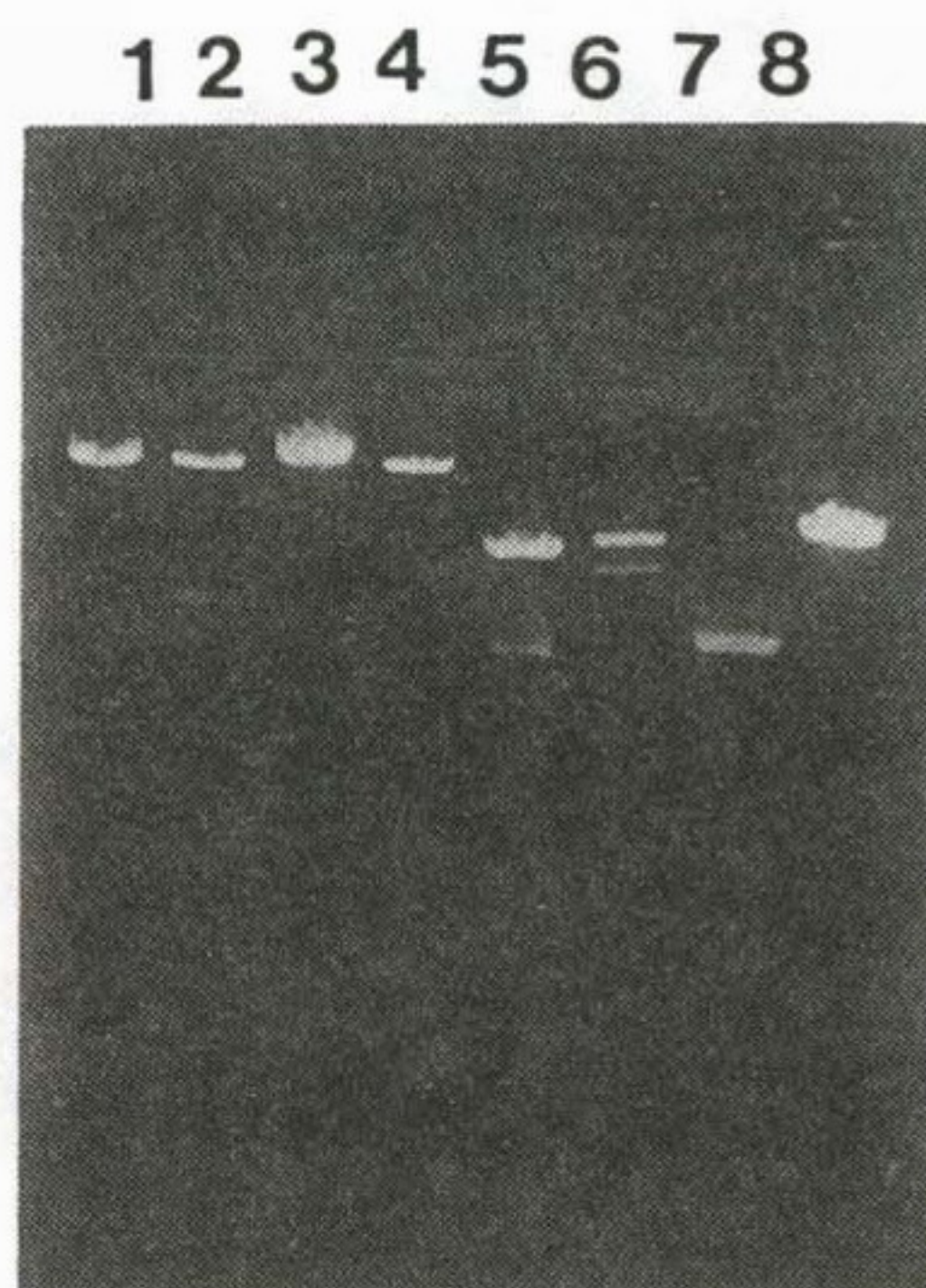


ATGAATATATTTTACATATTTTGTGCTGTCATTCGTTCAAGGTTG GGCCA TTTCCAGCCATG----->  
 MetAsnIlePheTyrIlePheLeuPheLeuLeuSerPheValGlnGlyLeu GlyPro PheProAlaMet----->  
 [Solid black bar] [Dotted bar] ----->  
 Signal Sequence of Killer Toxin bGH

Figure 20. The map of pSECbGH.

The nucleotide sequence and its amino acid sequence of the junction region between signal sequence of killer toxin and bGH were represented.





**Figure 21.** Restriction enzyme digestion of pSECbGH.

- Lane 1: pSEC5-BamHI
- Lane 2: pSECbGH-BamHI
- Lane 3: pSEC5-SmaI
- Lane 4: pSECbGH-SmaI
- Lane 5: pSEC5-EcoRI
- Lane 6: pSECbGH-EcoRI
- Lane 7: pUC18-Hinfl
- Lane 8: YEp24-HindIII, EcoRI



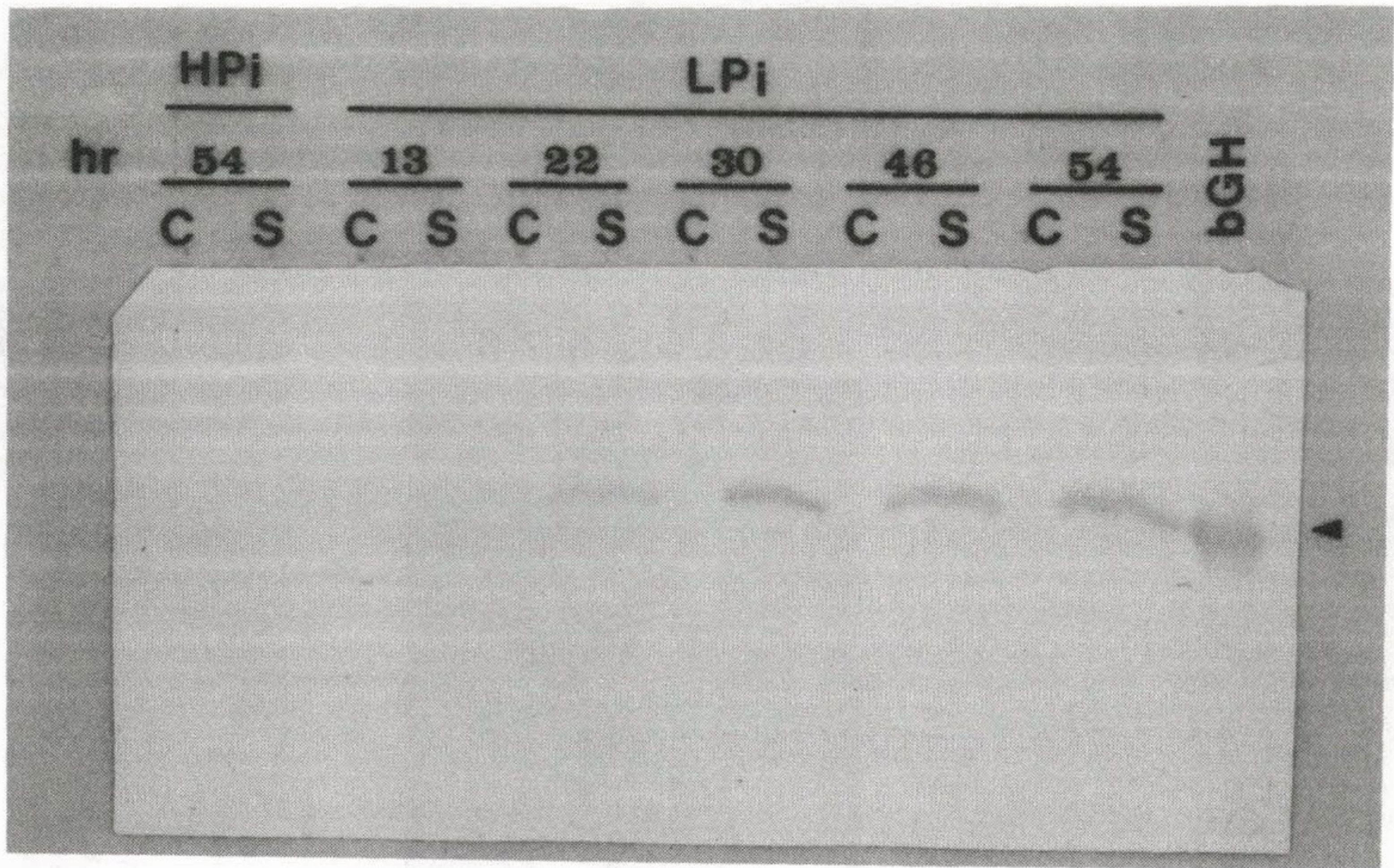


Figure 22. Production of bovine growth hormone in yeast using the recombinant vector pSECbGH. Yeast cells containing pSECbGH were grown in High-Pi medium and transferred into Low-Pi medium for induction. Culture medium was aliquoted with time course, and cell extracts (C) and supernatants (S) were prepared as described in Materials and Methods. The production of bGH was detected by western blot. Arrowhead represents authentic bGH.



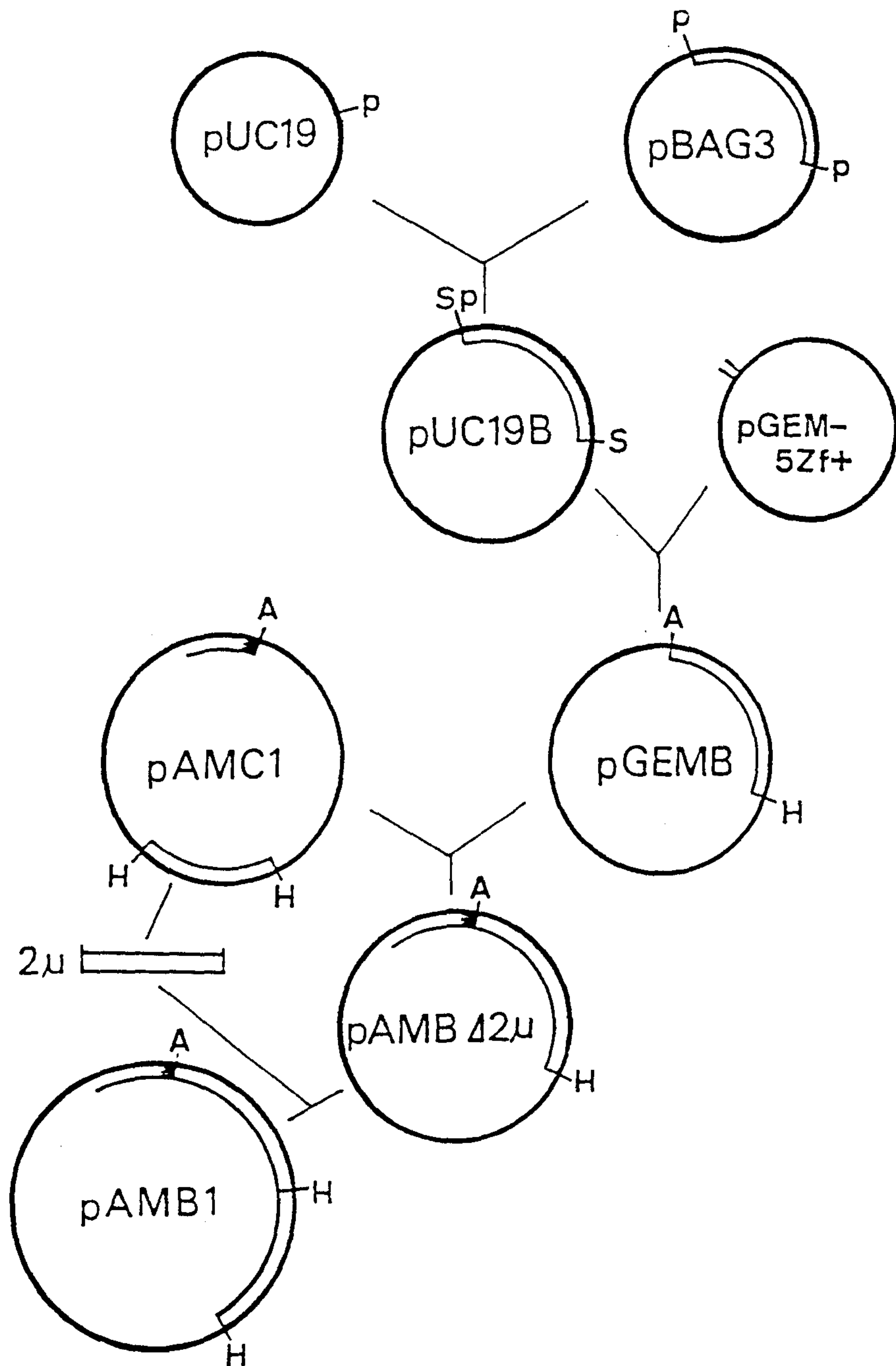


Figure 23 Construction of the recombinant plasmid pAMB1.



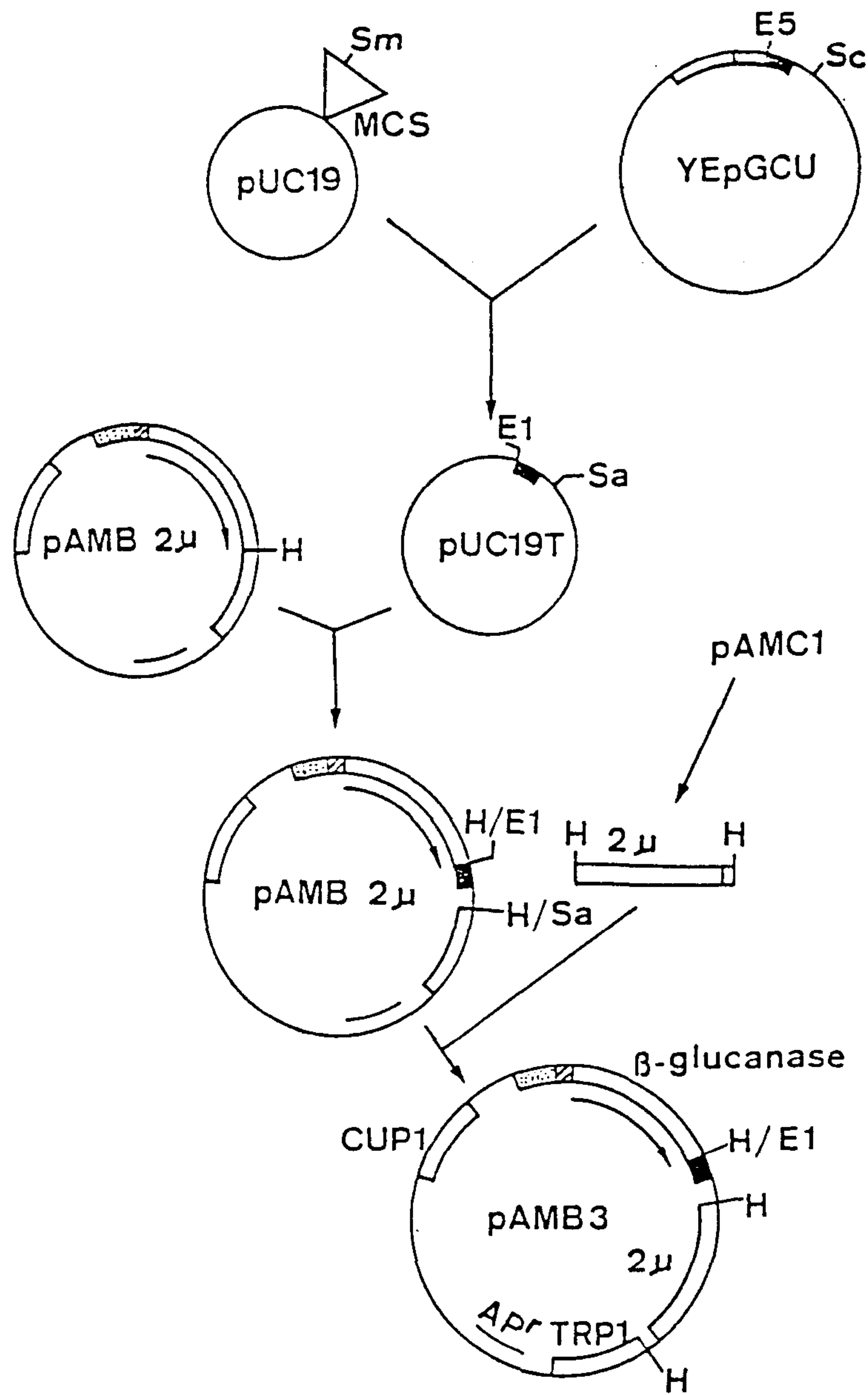


Figure 25 Construction of the recombinant plasmid pAMB3



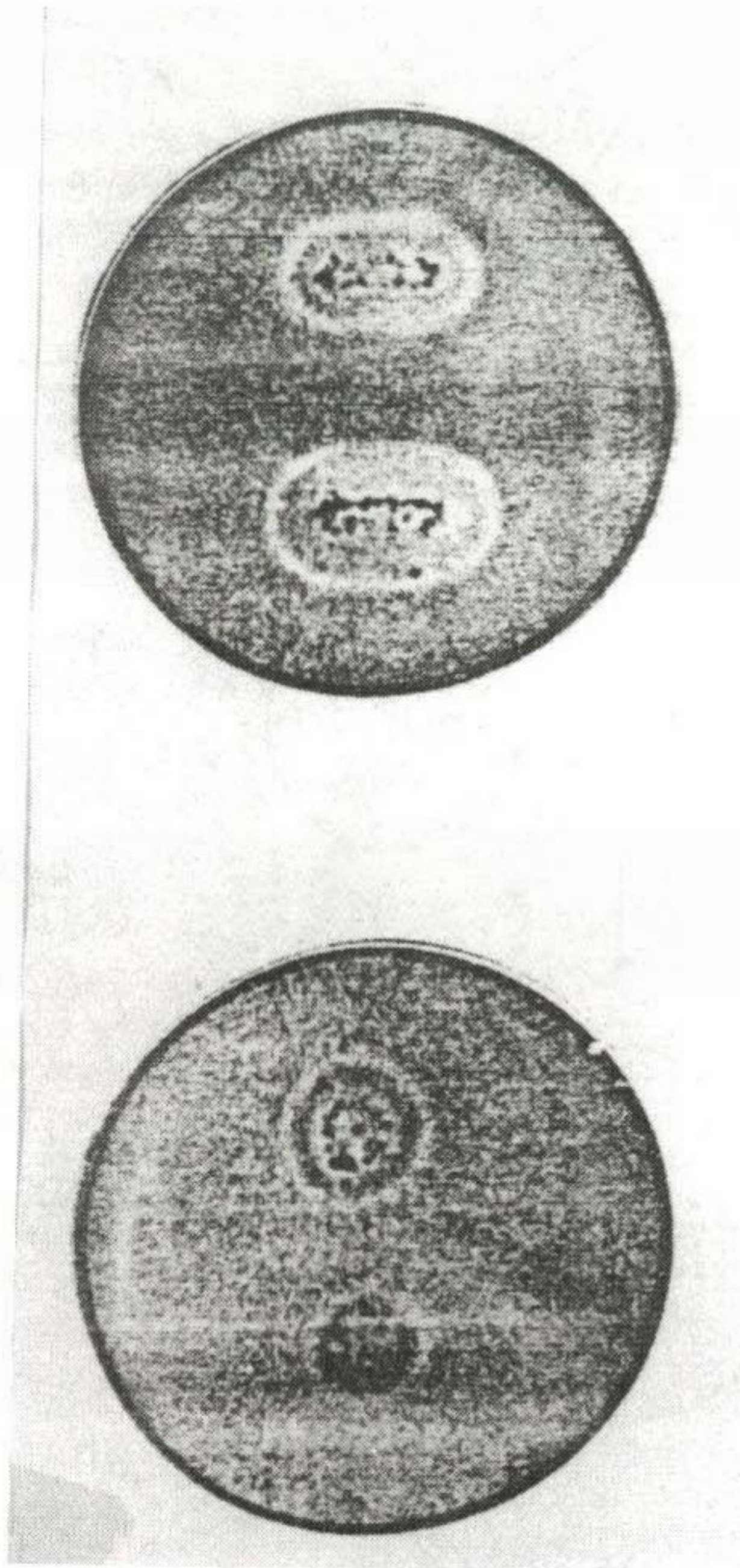


Figure 26 Secretion of  $\beta$ -glucanase by transformants containing the plasmids.

Table 3  $\beta$ -glucanase activities of yeast transformants.

Transformant	$\beta$ -glucanase activity(units/ml)	
	Extracellular	Intracellular.
<i>S.cerevisiae</i> 54/pAMB1	0.30	0.20
<i>S.cerevisiae</i> 54/pAMB3	0.58	0.39

## 제 2 절 재 료 및 방 법

### 1. 실험 재료

#### 가. 동물세포

종양괴사인자의 cytotoxicity assay를 위한 동물세포인 L929 (mouse fibroblast cell line)는 ATCC(American Type Culture Collection)사와 한국과학기술원 효소공학실의 정태화 박사로부터 각각 구입 및 분양받아 사용하였다. 사람 종양괴사인자 cloning 연구의 genomic library 제조에 이용된 사람의 peripheral monocyte 는 중앙적십자 혈액원에서 구입한 사람의 백혈구 농축액으로부터 분리하여 사용하였다.

AcNPV virus DNA를 사용하기 위한 숙주세포로는 *Spodoptera frugiperda* (IPLB-SF21)를 이용하였으며 virus는 *Baculovirus*의 일종인 *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (AcNPV)를 이용하였다. 포유동물 세포 벡터로 사용한 pSVL의 숙주세포로는 ATCC에서 구입한 CHO cell과 서울대 노현모 교수로부터 분양받은 COSM6 cell line을 사용하였다.

#### 나. 사용 vector

본 실험에서 사용한 vector 중  $\lambda$ gt11 [*lac5* (*shind* III  $\lambda$  2-3) *srI* $\lambda$  3'*cI* 857 *srI* $\lambda$  4'*nin* 5 *srI* $\lambda$  5'*Sam* 100] phage와 pBR322은 Promega사에서 구입하여 사용하였다. Plasmid vector로는 pBSIIKS 및 pBSIISK는 Stratagene에서 구입하여 사용하였고, expression을 위하여 사용한 pT7-7은 포항공대의 성영철 교수로부터 분양받아 사용하였다. Mammalian expression vector인 pSVL은 Pharmacia사로 부터 구입 사용하였다. 한편 포유동물 세



포에 cotransfection한 vector는 Stratagene사로 부터 구입한 pWLneo이었다.

#### 다. 사용균주

$\lambda$ gt11 phage 의 lysogenic 균주로는 *E. coli* Y1089[ $\Delta$ lac U 169 *proA*<sup>+</sup>  $\Delta$ lon *ara* D 139 *str A hf1A* 150[chr::Tn 10](pMC9)] 를 사용하였다.  $\lambda$ gt11 phage 용 균주로는 *E. coli* Y1090[ $\Delta$ lac U169 *proA*<sup>+</sup>  $\Delta$ lon *ara* D 139 *str A sup F* [ *trp C* 22::Tn 10 ](pMC9) ]을 사용하였다. 위의 *E. coli* Y1089 와 Y1090 은 Promega 사에서 구입하였다. *E. coli* XL1Blue (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46thi relA1 lac-*)은 pBSII, pT7-7, pBR322, pSVL, pVLTNF34에 대한 competent cell로 사용하였다. *E. coli* BL21(F- *hsdS gal*)로 부터 유도된 Lysogen BL21 (DE3)과 *E. coli* K38/pGP1-2는 T7 promoter를 사용하는 pT7-TNF34의 발현 숙주세포로 이용하였다.

#### 라. 배지

##### 1) 동물세포의 성장배지

동물세포인 L929 세포는 각각 HEPES (Boehringer Mannheim), gentamycin sulfate (Boehringer Mannheim) sodium bicarbonate (Sigma)와 fetal calf serum (Hyclone, Gibco, Flow, Sigma)등이 들어있는 MEM배지에서 배양하였다. 한편 사람의 peripheral monocyte를 배양할 때에는 FBS보다는 autologous serum을 20% 첨가하여 배양하였다. 동물세포인 CHO cell line과 COSM6 cell line의 배지는 각각 HEPES (Boehringer Mannheim), gentamycin sulfate (Boehringer Mannheim) sodium bicarbonate (Sigma)와 fetal calf serum (Hyclone, Gibco, Flow, Sigma)이 들어 있는 MEM과 DMEM 배지를 사용하였다.



## 2) 동물세포의 보존배지

실험에 사용한 각종동물세포는 각 성장배지에 10 % DMSO와 10 % FCS를 첨가한 배지를 가해 액체질소통에서 보관하였다. COS와 CHO세포는 10 % Glycerol을 더하여 사용하기도 하였다.

## 3) 동물세포의 선택배지

Geneticin에 저항성을 보이는 cotransfection vector인 pWLneo가 들어 있는 COS cell을 선별하기 위하여 5% FCS가 포함된 DMEM에 Gibco사로부터 구입한 Geneticin (G418)을 최종농도가  $400\mu\text{g}/\text{l}$ 가 되게하여 사용하였다.

## 4) 곤충세포의 성장배지

곤충세포인 IPLB-SF21은 Sigma사로부터 구입한 Grace media에 lactalbumin hydrolysate (Sigma)와 Yeast extract (Gibco), sodium bicarbonate(Sigma)을 첨가한 후 10 % Fetal bovine serum (Hyclone, Gibco, Flow, Sigma)섞어 만든 TNM-FH배지에서 배양하였다.

## 5) 곤충세포의 보존배지

곤충세포인 IPLB-SF21의 보존배지로는 TNM-FH배지에 10% glycerol과 10% FBS를 첨가한 배지를 사용하였다.

## 6) LB 배지

Bacto-tryptone, yeast extract, Bacto-agar 는 Difco 제품을 사용하였으며, Bacto-tryptone 10g, yeast extract 5g, NaCl 10g 을 1 L의 증류수에 녹여 pH7.0 으로 맞추고 멸균시켜 사용하였다. Ampicillin에 저항성을 보이는 *E.coli* 의 성장 배지로는 LB 배지에 ampicillin을  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  되게 첨가한 것을 사용하였다.

#### 7) $\lambda$ gt11 을 위한 LB soft(top) agarose

LB 배지에  $50\mu\text{g/ml}$ 의 ampicillin과  $3\mu\text{l/ml}$ 의 X-gal(10%),  $3\mu\text{l/ml}$ 의 IPTG (100mM), 10mM  $\text{MgSO}_4$ , 그리고 LB배지 1L당 agarose 6.0g을 넣어 사용하였다.

#### 마. 염색용액

L929 세포에 대한 종양괴사인자의 cytotoxicity를 결정하기 위해 0.05% crystal violet 용액으로 염색한다. Sigma사에서 구입한 crystal violet으로 제조한 염색용액에서 고정화용액으로는 calcium carbonate saturated formalin을 사용하였다. 한편 recombinant virus(AcNPV)를 골라내기 위해 수행한 plaque assay시에는 Sigma에서 구입한 neutral red 와 trypan blue를 증류수에 녹여 사용하였다.

#### 바. 그밖의 재료 및 시약

T4 DNA ligase, polynucleotide kinase, Mungbean nuclease, proteinase K, *Bam*HI, *Sma*I, *Sca*I은 Promega제품을 사용하였고, pronase, RNaseA(DNase-free)는 Sigma 제품을 사용하였다. *Eco*RI, *Hind*III, *Bgl*II 과 *Eco*RI linker는 NEB제품을 사용하였다. Western blot 분석에 사용한 mouse anti-human TNF monoclonal antibody는 Boehringer Mannheim 제품을 사용하였고, anti-mouse Ig G alkaline phosphatase conjugate과 anti-mouse Ig G peroxidase conjugate는 Sigma 제품을 사용하였다. Plaque hybridization과 PCR(polymerase chain reaction) 및 Southern hybridization에 필요한 oligonucleotide probe는 한국과학기술원 유전공학센터 이대실 박사로부터 선사받아 사용하였다. 동물세포 배양에 필요한 조직배양 플라스크(65ml, 650ml),

96-well plate, centrifuge tube, petri-dish, cryotube 등 plastic ware는 Costar, Corning, Falcon, Nunc 및 녹십자 등에서 구입하여 사용하였다. 이 밖에 inverted microscopy (Nikon), deionizer (Barnstead), hemocytometer, microplate reader (CLS) 등을 사용하였다. 한편, recombinant 사람 종양 괴사인자의 확인 및 분자량 측정을 위해 Hoefer Transphor kit (LKB) 와 Sephadex G-150 (Sigma) resin을 사용하였다. Mammalian cell인 CHO와 COSM6 cell로의 transfection에 사용한 N, N-bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid와 DEAE-Dextran, Plasmid Quick™ Purification kit 은 Stratagene사로 부터 구입 사용하였다. 또한 selection을 위한 G418 (Geneticin)은 Gibco사로 부터 구입 사용하였다.

그 밖에 사용한 시약으로 LPS, PMA, actinomycin D, acrylamide, N-N'-methylene-bis-acrylamide, sodium lauryl sulfate, TEMED, agarose, low melting agarose, Trizma base, Trizma-HCl, X-Gal, IPTG, calf thymus DNA, bromophenolblue, ethidium bromide, EDTA, NBT, BCIP, BSA(Pentax Fraction V), nitrocellulose membrane, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3000 Ci/mole) 등은 Sigma, Merck, Gelman, Amersham, Boehringer Mannheim 등에서 구입하여 사용하였다.

## 2. 실험 방법

### 가. $\lambda$ gt11 vector를 이용한 사람 종양괴사인자 유전자의 cloning

#### 1) 사람의 peripheral monocyte로부터 DNA의 분리

사람 백혈구 농축액으로부터 사람의 peripheral monocytes를 분리하여 10배 부피의 pronase 용액(1 mg/ml)을 처리하였다. 이 용액을 같은 부피의 1:1 SS-phenol:chloroform로 유기추출과정을 반복하였다. 분리된 상층의 수용액상



에 1/10 부피의 3 M sodium acetate와 2.5부피의 ethanol을 첨가하여 섞고 원심분리하여 침전된 DNA를 수집하고 침전을 80% ethanol로 씻은 후 질소가스로 말리고 나서 TE buffer에 녹였다.

이 용액에 RNase A (DNase free)를 처리하여 RNA를 제거하고 SS-phenol:chloroform extraction후 수용액상에 2.5배 부피의 ethanol을 첨가하여 DNA를 침전시켰다. Ethanol을 완전히 제거하고 침전을 TE buffer에 녹여 제한효소에 의한 digestion에 이용하기 위해 이 genomic DNA용액을 4°C에서 보관하였다.

## 2) $\lambda$ gt 11 vector를 이용한 사람의 peripheral monocyte genomic library 제조

순수하게 분리된 사람의 peripheral monocyte의 genomic DNA를 *EcoRI*으로 절단하였다. 이렇게 반응시킨 DNA를 전기영동과 electroelution을 수행하여 3kb DNA 조각들을 모아 genomic library 제조에 사용하였다. 이러한 3 kb DNA 조각과 dephosphorylation된  $\lambda$ gt11을 16°C에서 T4 ligase 100 U와 반응시켜 유전자를 재조합하였다. 재조합한 DNA를 packagene extract과 섞고 22°C에서 2시간동안 방치하여 packaging반응을 수행하였다. packaging 반응용액에 0.1 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl(pH 7.9), 0.01 M MgSO<sub>4</sub>가 포함된 phage의 회석용액과 chloroform을 첨가하여 4°C에서 보관하였다.

Plaque를 만들 때에는 *in vitro* packaging시킨 phage용액 (P.F.U.  $2 \times 10^9$ )을 TMG 완충용액 [10 mM Tris (pH 7.4), 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.01% gelatin]에 회석한 후 이같은 phage 회석용액과 0.2 % maltose가 포함된 LB배지에서 stationary phase까지 배양한 *E. coli* Y1090를 섞어 세균에 phage를 흡착시킨 후, ampicillin, X-Gal (10 %), IPTG (100 mM), MgSO<sub>4</sub>가 포함된 0.7 % soft agar와 섞어 LB plate위에 고르게 뿌려준 후 42°C에서 8~16시간 배양하였다



### 3) 제조한 genomic library로부터 hybrid phage의 screening

세균에 감염된 phage중에서 3 kb DNA 조각이  $\lambda$ gt 11 vector에 들어가 재조합된 phage는 X-Gal과 IPTG가 포함된 배지에서 X-Gal을 분해하지 못하여 clear plaque를 형성하고 재조합 되지않은 phage는 X-Gal을 분해하므로 청색 plaque를 형성한다. 따라서 앞에 서술한 방법에 의해 plaque를 생성시켜 외부 DNA가 들어간 phage를 1차 선별하였다. 3 kb 사람 종양괴사인자의 유전자가 cloning된 phage를 보다 용이하게 찾아내기 위하여 사람 종양괴사인자 유전자의 5' 말단과 상보적인 염기서열을 갖고 있는 30 개 염기의 DNA (TCGAAGTGGTGGTCTTGTTGCTTAAAGTTC)를 oligonucleotide probe로 이용하여 다음과 같이 plaque hybridization시켰다.

Nitrocellulose filter를 plaque와 접촉시켜 plaque를 filter로 옮겨 붙인 후 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH 용액에서 1 분간 변성 시켰다. 이와같이 처리한 filter paper를 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0)용액으로 8분간 중화시키고 3 × SSC [0.45 M NaCl, 0.045 M sodium citrate (pH 7.0)]로 씻어 주었다. 이 filter paper를 말리고 oven에서 80°C로 3시간 구운다음 6 × SSC로 5분간 씻어주고 prewashing용액[50mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS]으로 42°C에서 90분간 더 씻어주었다. 이와같이 처리한 filter paper를 prehybridization용액 [50 % formamide, 5×Denhardt's 용액(1g Ficoll, 1g polyvinylpyrrolidone, 1g BSA (fraction V)/L), 5×SSPE (0.75 M NaCl, 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, 0.005 M EDTA-Na<sub>2</sub> (pH7.4), 100 μg/ml denatured calf thymus DNA]에 넣고 42°C로 5시간 prehybridization 시킨 다음 32P로 표지된 DNA probe (10<sup>8</sup> cpm/μg)를 25 μg넣고 24시간 더 hybridization 시켰다. Hybridization이 끝난 다음 0.1 % SDS가 포함된 1 × SSC로 68°C에서 2회 더 씻어주었다. 이와같은 hybridization과정을 거쳐

### 3) 제조한 genomic library로부터 hybrid phage의 screening

세균에 감염된 phage중에서 3 kb DNA 조각이  $\lambda$ gt 11 vector에 들어가 재조합된 phage는 X-Gal과 IPTG가 포함된 배지에서 X-Gal을 분해하지 못하여 clear plaque를 형성하고 재조합 되지않은 phage는 X-Gal을 분해하므로 청색 plaque를 형성한다. 따라서 앞에 서술한 방법에 의해 plaque를 생성시켜 외부 DNA가 들어간 phage를 1차 선별하였다. 3 kb 사람 종양괴사인자의 유전자가 cloning된 phage를 보다 용이하게 찾아내기 위하여 사람 종양괴사인자 유전자의 5' 말단과 상보적인 염기서열을 갖고 있는 30 개 염기의 DNA (TCGAAGTGGTGGTCTTGTTGCTTAAAGTTC)를 oligonucleotide probe로 이용하여 다음과 같이 plaque hybridization시켰다.

Nitrocellulose filter를 plaque와 접촉시켜 plaque를 filter로 옮겨 붙인 후 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH 용액에서 1 분간 변성 시켰다. 이와같이 처리한 filter paper를 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0)용액으로 8분간 중화시키고 3 × SSC [0.45 M NaCl, 0.045 M sodium citrate (pH 7.0)]로 씻어 주었다. 이 filter paper를 말리고 oven에서 80°C로 3시간 구운다음 6 × SSC로 5분간 씻어주고 prewashing용액[50mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS]으로 42°C에서 90분간 더 씻어주었다. 이와같이 처리한 filter paper를 prehybridization용액 [50 % formamide, 5×Denhardt's 용액(1g Ficoll, 1g polyvinylpyrrolidone, 1g BSA (fraction V)/L), 5×SSPE (0.75 M NaCl, 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 0.005 M EDTA-Na<sub>2</sub> (pH7.4), 100 μg/ml denatured calf thymus DNA]에 넣고 42°C로 5시간 prehybridization 시킨 다음 <sup>32</sup>P로 표지된 DNA probe (10<sup>8</sup> cpm/μg)를 25 μg넣고 24시간 더 hybridization 시켰다. Hybridization이 끝난 다음 0.1 % SDS가 포함된 1 × SSC로 68°C에서 2회 더 씻어주었다. 이와같은 hybridization과정을 거쳐

hybridization시킨 filter paper를 건조시킨 후 KODAK X-ray 필름과 함께 autoradiography cassette에 넣어 -70°C에서 14일동안 방치한 다음 필름을 현상하였다.

#### 4) $\lambda$ gt 11 hybrid phage의 lysogenization

10mM MgCl<sub>2</sub>를 포함하는 LB배지 선별된 hybrid phage(P.F.U.5×10<sup>8</sup>)로 0.2% maltose를 포함하는 LB배지에서 배양된 *E. coli* Y1089 세포를 32°C에서 20분동안 감염시켜  $\lambda$ gt 11 recombinant lysogen을 제조한 후 32°C에서는 자랄 수 있지만 42°C에서는 자랄 수 없는 콜로니를 선별하였다.

### 나. pBSII plasmid vector를 이용한 사람 종양괴사인자 유전자의 subcloning

#### 1) 사람 종양괴사인자 유전자의 pBSII로의 subcloning

앞에서 얻은 3 kb DNA를 pBSII plasmid vector(Figure 1)에 T4 DNA ligase를 이용하여 재조합 시킨 후 *E. coli* XL1Blue에 transformation하였다.

Transformation을 위한 competent cell은 LB배지에서 *E. coli* XL1Blue를 배양하여 OD<sub>600</sub>=0.5 일 때 원심분리(3000 rpm, 10분)하여 harvest한 후, 20 mM CaCl<sub>2</sub> 용액에 suspension시켜 사용하였다. 재조합된 plasmid(1  $\mu$ l, 0.01  $\mu$ g/ $\mu$ l)와 competent cell (200  $\mu$ l)을 섞어 transformation시킨 후, X-Gal과 IPTG를 포함하는 배지에 뿌려준 후 clear colony를 선별하였다.

선별된 colony는 LB배지 (50  $\mu$ g/ml ampicillin포함)에서 배양하여 OD<sub>600</sub> = 1 일때 원심분리하여 (3000 rpm, 10분) harvest 하였다. 수집된 pellet으로 Holmes and Quigley의 방법(29)을 사용하여 plasmid DNA solution을 얻었다.

여기서 얻은 recombinant plasmid solution 10  $\mu$ l에 제한효소 *EcoRI* 10



unit을 처리한후 0.8 % agarose gel에서 전기영동을 수행하고 3Kb DNA band는 잘라내어 elution을 하였다. Agarose gel상에서 분리가 확인된 3Kb DNA는 Southern blotting를 수행한 후, oligonucleotide probe (30mer) 를 이용하여 hybridization을 수행하였다.

Hybridization은 가.3)에서 기술한 방법을 사용하였으며, Southern blotting은 25 mM sodium phosphate buffer에서, LKB electroblotting kit을 사용하여 수행하였다.

### 2) 사람종양괴사인자 유전자의 exon 4 의 PCR(polymerase chain reaction)

PCR(polymerase chain reaction)을 수행하기 위해, genomic DNA( $0.5\mu\text{g}/0.5\mu\text{l}$ ) 와 3Kb TNF gene ( $50\text{ ng}/\mu\text{l}$ )에 0.1 nmole의 primer를 가한후  $95^{\circ}\text{C}$  에서 5분간 방치하였다. 이 반응액에 10unit의 Taq DNA polymerase와 dNTP(각각 1.25 mM)를 가한 후,  $94^{\circ}\text{C}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$ ,  $73^{\circ}\text{C}$ 에서 각각 1분, 1분, 1분30초씩 35 cycle을 반응시키고, phenol/chloroform extraction과 ethanol침전을 순차적으로 수행하였다. 얻어진 산물을 agarose gel상에서 전기이동하여 생성물의 크기를 확인하였다.

### 3) 사람 종양괴사인자 유전자의 exon 4의 subcloning

PCR을 통하여 얻은 사람종양괴사인자의 네번째 exon에 제한효소 *Hind* III를 처리하고 pBS II SK에는 *Sma* I 과 *Hind* III를 각각 처리한 후 low melting agarose gel (1 %) 상에서 전기이동하여 elution을 수행하였다. 여기서 얻은 네번째 exon과 pBS/*Sma* I, *Hind* III을 T4 DNA ligase를 이용하여 재조합시킨 후, *E. coli* XL1Blue에 transformation하여 ampicillin에 저항성이 있는 colony를 선별하였다.

선별된 colony들에서 나.에 언급한 방법을 사용하여 plasmid를 분리하고,

plasmid solution에 제한효소 *Bam*HI, *Hind*III를 처리하여 1% agarose gel상에서 전기이동을 수행하였다. 또한, 삽입된 insert는 분리해 내어 restriction mapping을 수행하였다.

#### 4) 사람 종양괴사인자 유전자의 exon 3 - exon 4 의 subcloning

3)에서 cloning하여 얻은 recombinant plasmid 2 $\mu$ g에 5 unit의 *Dra*III와 *Hind*III를 1시간동안 처리하여 1% low melting agrose gel 상에서 전기이동을 수행한 후 네번째 exon에 해당하는 0.56 Kb의 band를 잘라 내어 elution하였다. Elution된 *Dra*III-*Hind*III end의 네번째 exon은 세번째 exon과의 ligation을 위하여 CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) 1 U를 30분간 처리하여 dephosphorylation시켰다. 한편, 세번째 exon에 해당하는 부분의 double strand DNA는 각각 46mer (GAGATCTTATAGAACCCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCACGTT) 와 43mer 합성을 하고 annealing을 통해 합성된 두 strand를 붙여 double strand 가 되게 하였다. 그런데 합성된 DNA의 5' end가 -OH이므로 nucleotide kinase 로 kination 해주었다. 그리고 spun column chromatography를 통하여 desalting된 세번째 exon을 준비하였다. 이것을 dephosphorylation된 *Dra*III-*Hind*III end의 네번째 exon과 10 unit의 T4 DNA ligase 처리에 의해 ligation 시킨 후, 1.2 % agarose gel상에서 전기이동을 수행하였다. Agarose gel상에서의 전기이동을 통해 ligation이 확인된 반응액 10 $\mu$ l (0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l)에 *Eco*RV-*Hind*III end의 pBSII SK와 pBSII KS를 1 $\mu$ l (0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l)씩 각각 가하고 T4 DNA ligase 100 unit을 처리하여 23 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 방치한 후, 반응액 중 1 $\mu$ l를 사용하여 *E. coli* XL1Blue에 transformation시키고 ampicillin에 저항성이 있는 colony를 선별하였다. 선별된 colony에서 plasmid를 분리하여 *Bam*HI, *Hind*III 처리를 하고 1 % agarose gel상에서 전기이동을 수행하였다.

다. pT7-7을 이용한 subcloning과 발현

1) pT7-TNF34의 구축

앞서 pBSII에 subcloning된 pTNF34에서 발현된 단백질은  $\beta$ -galactodidase의 일부와 fusion이 되어있고 또한 expression level이 낮아서 large expression을 위해 strong promoter ( $\phi 10$ )를 갖는 pT7-7(Figure 2)에 subcloning을 수행하였다. pTNF34SK를 *Bgl*II 과, *Hind*III를 처리하고 pT7-7을 *Bam*HI 과 *Hind*III로 처리한것을 low melting agarose gel electrophoresis를 통하여 각각 TNF exon 3,4부분 (0.6 kb)과 vector부분(2.46 kb)을 오려내고 70°C에서 5분간 방치하여 DNA가 포함된 gel slice를 녹이고 phenol extraction과 ethanol 침전을 통해 gel로 부터 DNA조각을 뽑아내었다. 이 두 DNA조각에 T4 DNA ligase 1 unit을 처리하여 16°C에서 12시간동안 반응시켜 ligation시켰다. 반응액 중 5 $\mu$ l를 사용하여 *E. coli* XL1Blue에 Hanahan의 방법으로 transformation시키고 (30) ampicillin에 저항성이 있는 colony를 선별하였다. 선별된 colony를 2 ml의 LB배지에서 키워 alkali lysis (31, 32)로 plasmid를 뽑아 *Eco*R I 과 *Hind*III로 digest하고 agarose gel electrophoresis하여 약 0.6 kb의 insert band가 나타남을 확인하였다.

Transform된 *E. coli* XLIB에서 pT7-TNF34를 뽑아 Expression균주인 K38/pGp1-2와 BL21(DE3)에 각각 calcium phosphate방법으로 transformation시켰다. pGp1-2에는 kanamycin에 저항성을 보이게 해주는 단백질을 code하는 유전자가 들어있으므로 kanamycin과 ampicillin에 저항성이 있는 colony를 선별하였다.

2) K38/pGp1-2, pT7-TNF34균주와 BL21(DE3)/pT7-TNF34에서의 TNF발현유도 및 cell crude extract의 준비

위에서 선별한 K38/pGp1-2, pT7-TNF34 colony를 LB배지에 접종하고 30°C에



서  $A_{590} = 1.5$ 이 될 때까지 세포를 배양하고  $42^{\circ}\text{C}$ 로 온도를 높여 20분간 heat shock을 준 후 rifampicin을 최종농도  $200\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 더 배양하였다. 이렇게 준비된 세포배양액을  $5,000\times g$ 로 10분간 원심분리하여 세포를 수집하였으며, 모아진 세포는 최소 부피의(세포부피의 1.5배) PBS에 녹였다. 이를 sonication으로 세포를 터뜨려 세포내 물질을 얻었으며 cell debris는  $13,500\times g$ 에서 10분간 원심분리를 하여 제거하였다.

K38/pGp1-2, pT7-TNF34의 경우 온도변화에 민감하고 또한 두 종류의 plasmid를 갖으므로 해서 세포배양으로 얻어지는 recombinant TNF의 양이 키울 때 마다 변화가 생겨 T7 RNA polymerase gene이 lysogen 형태로 bacterial chromosome에 들어있는 BL21(DE3)에 pT7-TNF34를 넣었다. 이 경우  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 세포를 배양하다가  $A_{600} = 0.5$ 일 때 IPTG( $\beta$ -D-thiogalactopyranoside)를 최종농도가  $1\text{ mM}$ 되도록 넣고 4시간정도 세포배양을 하여 사람종양괴사인자의 발현을 유도하였다. 이후의 세포의 수집과정과 세포액의 준비방법은 K38/pGp1-2, pT7-TNF34의 경우와 같다.

#### 라. pBR322을 이용한 subcloning

앞으로 사용할 mammalian expression vector인 pSVL과 Baculovirus를 이용하는 expression system에서의 recombination vector, pVL1392로의 subcloning을 용이하게 하기위해 TNF exon 3,4 뒷부분에 제한효소 *Bam*HI 로 끊을 수 있는 자리가 필요하였다. pBR322을 *Eco*R I 과 *Hind*III로 처리하고 pTNF34SK를 또한 *Eco*R I 과 *Hind*III로 처리한 후 각각을 1.2 % agarose gel 상에서 전기영동을 수행한 이후 원하는 DNA band를 오리고 DNA를 elution시켰다. 두 DNA의 분자 비율이 1:1이되도록 섞은 후, T4 ligase 1 unit을 처리하여  $16^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 방치하였다. 반응액 중  $5\mu\text{l}$ 를 사용하여 *E. coli* XL1Blue에

transformation시키고 ampicillin에 저항성이 있는 colony를 선별하였다.

마. Mammalian expression vector pSVL을 이용한 subcloning

#### 1) pSVE Vector의 구축

Mammalian expression vector pSVL(Figure 3)의 multiple cloning site에는 *EcoRI* site가 없고 *ori site*의 5'쪽으로 *EcoRI* site가 있어서 기존에 있는 *EcoRI* site는 없애고 multiple cloning site에 *EcoRI* site를 넣어주기 위하여 아래와 같은 실험이 필요하였다.

먼저 기존에 있던 *EcoRI* site를 없애주기 위하여, pSVL을 *EcoRI* 으로 처리하고 mung bean nuclease로 *EcoRI* 에 의해 생긴 cohesive termini를 제거하였다. T4 ligase로 ligation하여 *E. coli* XL1B에 transformation하고, ampicillin에 저항성을 보이는 colony를 선별하고 선별된 cell을 키워 각각의 plasmid를 분리한 후 *EcoRI* 을 처리하여 *EcoRI* 으로 잘리지 않는 plasmid를 갖는 colony를 선택했다 (pSVNE). pSVNE를 multiple cloning site에 restriction site가 있는 *SmaI* 을 처리하고 1.5 % agarose gel상에서 전기영동을 수행한 후, relaxed form DNA위치의 band를 올려내어 elution 하였다. 용출된 DNA용액에 alkaline calf intestine phosphatase (CIP)를 2 unit을 첨가하고 37°C 에서 30분간 반응시켰다. 이후 65°C 에서 30분간 열처리하여 CIP의 활성을 없애주고, T4 polynucleotide kinase로 kination시킨 *EcoRI* linker (d CGAATTCC )를 더하여 섞어준 후 T4 ligase 2 unit을 처리하고 16°C 에서 12시간 방치하였다. 반응액 중 5 $\mu$ l를 사용하여 *E. coli* XL1Blue에 transformation시키고 small scale plasmid preparation하여 얻어진 plasmid에 *EcoRI* 을 처리했고 이때 *EcoRI* 에 의하여 끊어지는 colony를 선별하였다 (pSVE).

## 2) pSVTNF34의 구축

라.에서 구축한 pBRTNF와 마.1)에서 구축한 pSVE를 *EcoRI* 과 *BamHI* 처리하고 1.2% agarose gel electrophoresis를 수행하였다. pBRTNF/*EcoRI*, *BamHI* 을 내린 lane에서는 0.9 kb정도의 길이의 TNF exon3, 4를 포함하는 fragment를, pSVE/*EcoRI*, *BamHI* 를 내린 lane에서는 4.8kb정도의 길이를 갖는 vector부분을 오려 DNA를 elution하였다. elution된 두 DNA에 T4 ligase 1 unit을 처리하고 16°C에서 12시간 방치하였다. 전체 20 $\mu$ l의 반응액 중 5 $\mu$ l를 사용하여 *E. coli* XL1Blue에 transformation시키고 ampicillin에 저항성이 있는 colony를 선별하였다.

## 3) COS 및 CHO cell line 으로의 Transfection

마. 2)에서 구축한 pSVTNF34를 대량으로 준비하였다. 이때 깨끗이 정제된 DNA가 필요하여 준비된 DNA를 acidified phenol[pH4.0]으로 유기추출을 하여 FormI DNA (covalently closed circular supercoiled DNA)만을 얻고 이를 다시 Stratagene의 Plasmid Quick™ Purification kit을 이용하여 plasmid DNA를 정제하였다. DNA의 순수도와 양은 Kontron사의 UVIKON 930으로 260nm 과 280nm의 흡광을 측정하여 결정하였다.

Mammalian cell로의 transfection은 stable transformant를 얻기 위한 calcium-phosphate 방법과 (33), transient expression을 보기위한 DEAE-dextran방법을 사용하였는데 calcium-phosphate방법 사용시 앞서 구축한 pSVTNF34에 selection marker가 없기 때문에, neomycin analog인 G418에 resistant를 나타내는 pWLneo와 같이 co-transfection을 수행하였다.

( 34, 35 ) pSVTNF34 20 $\mu$ g과 pWLneo 2 $\mu$ g을 450 $\mu$ l의 증류수에 녹이고 2.5 M CaCl<sub>2</sub> 50 $\mu$ l을 더하고 여기에 다시 500 $\mu$ l의 2 × BBS : 280



mM NaCl, 50 mM BES, N,N-bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid (pH 6.95), 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 가한 후, tube를 아래 위로 뒤집으면서 서서히 섞고 상온에서 10~20분간 방치하여 침전이 생기게 하였다. 이 침전을 다시 pipetting으로 서서히 풀어준 후 5 × 10<sup>5</sup> cell/dish로 12시간 전 seeding한 COSM6 배양액위에 골고루 섞어주었다. 이를 CO<sub>2</sub>가 3 %로 유지되는 humidified incubator에서 24시간 방치하여 DNA와 calcium이 뭉쳐있는 침전이 서서히 세포로 들어가게 하였다. 이후 오래된 배지를 제거하고 serum이 없는 DMEM-HEPES용액으로 3회 닦아주고 10 % serum이 포함된 DMEM을 가하여 또 다시 24시간 배양하였다. 이 이후의 CO<sub>2</sub> 농도는 7 %로 하였다. 이렇게 하여 세포가 자라고 있는 flask에 1 × Trypsin-EDTA 용액 0.5 ml을 넣어, 세포를 배양 플라스크 바닥에서 떼어내고 이를 1:10의 비율로 희석하여 10개의 세포 배양 플라스크에 접종하고 G418의 최종농도가 400 μg/ml이 되게 하여 2일간 세포를 배양하여 pWLneo가 들어 있는 세포만이 살아남아 colony를 형성하게 하였다. 지름이 0.5mm되는 colony를 따서 12 well plate에 옮기고 7일간 배양하였다.

#### 4) Transfection된 세포의 분리와 세포 추출물의 준비

생겨난 colony들 중에는 pWLneo만이 들어있는 것과, pWLneo와 함께 pSVTNF34가 같이 co-transfection되어 있는 것이 있게 된다. 실험상에서 요구되는 세포는 pWLneo와 pSVTNF34가 모두 들어 있는 것이어야 하므로 12 well plate에서의 subculture하여 일부세포는 떼어내어 L929 세포에 처리하여 cytotoxicity 활성을 측정하는데 사용하고 여기서 cytotoxic activity가 있는 부분을 쫓아서 계속된 subculture를 수행하였고 지금도 수행 중이다.

세포액을 분리하기위해 12-well plate에 단층으로 꼭 찬 세포에 trypsin을 처리하여 세포를 바닥에서 떼어내고 PBS에 suspension시킨후 1000 × g에

서 3분간 원심분리하여 세포를 수집하고 PBS로 세포를 3회정도 씻어주어 trypsin등을 제거한다. 수집된 세포를 최소부피의 PBS에 suspension시킨후 28 kHz의 초음파에 30초씩 10회 노출시켜 세포를 깨뜨리고 12,000 ×g에서 10분간 원심분리를 하여 cell debris를 제거한 세포추출물을 얻는다.

#### 바. AcNPV를 이용한 subcloning

##### 1) pVLTNF34 (AcNPV transfer vector)의 구축

Baculovirus를 이용한 유전자 발현에는 AcNPV (*Autographa Californica* nuclear polyhedrosis virus)가 이용되는데 AcNPV의 유전자내에 직접 발현을 원하는 외부유전자를 삽입하는데는 여러가지 기술적인 난점이 있어 general recombination이 가능한 plasmid(pVL1392)를 사용했다.(Figure 4) pVL1392의 multiple cloning site의 앞뒤로 viral genome내의 polyhedrin gene sequence와 같은 sequence가 존재하여 viral DNA와 plasmid를 cotransfection시켜주면 그중 일부에서는 general recombination이 일어나게되고 그 결과로 viral genome에 사람 종양괴사인자 유전자가 들어가게 된다.(Figure 5)

pVL1392와 앞서 구축한 pBRTNF34를 제한효소 *Bam*HI 과 *Eco*RI 으로 처리한 후, 1% low melting agarose gel에서 전기영동을 수행하고 원하는 DNA band를 오려 DNA를 elution하였다. elution된 pVL1392 / *Eco*RI, *Bam*HI에 1 unit의 CIP를 더하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 65°C에서 30분간 열처리하여 CIP를 불활성화 하였다. dephosphorylation된 pVL1392/*Eco*RI, *Bam*HI DNA와 앞서 gel에서 용출시킨 사람종양괴사인자유전자를 포함하는 1 kb정도의 DNA와 분자비가 1:1이 되게 섞고 T4 DNA ligase 1 unit을 가하여 16°C에서 12시간 방치하여 ligation 하였다. 전체 20μl 반응액 중 5μl를 취하여 *E. coli* XL1B에 transform하였고 ampicillin이 든 LB배지에서 clone을 선별하였다.

## 2) Wild-type AcNPV로 부터 DNA의 분리

5개 75cm<sup>2</sup> flask에  $6 \times 10^6$  cell/flask의 농도로 세포를 접종하고 12시간동안 27℃에서 배양한 후 flask당 10 P.F.U.의 wild-type AcNPV를 넣어 AcNPV에 곤충세포가 감염되게 하였다. 27℃에서 3~4일 정도 배양을 하면 약 80% 정도의 세포내에 aggregate된 polyhedrin을 볼 수 있는데 이때 플라스크 바닥에 붙어 있는 세포를 rubber policeman으로 긁어서 떼어냈다. cell suspension을 1000 × g에서 10분간 원심분리하여 세포를 포함한 침전물을 봉입형 바이러스 (occluded virus ; OV)의 분리를 위해 모은다. 상층액은 미봉입 바이러스(extracellular virus; EV)의 분리를 위해 10,000 × g에서 원심분리하여 cell debris를 제거한 후 100,000 × g 로 30분간 ultracentrifuge 하여 침전물을 얻었다. virus이외의 배지 잔여물을 없애주기 위해 0.1 × TE 완충용액 10 ml로 현탁시킨 후 다시 100,000 × g에서 30분간 초원심 분리를 하여 virus를 harvest하였다. 얻어진 침전물에 4.5 ml의 1 × TE 완충용액에 (0.2 M NaCl과 200 μg proteinase K이 포함된) 녹인후 50℃에서 2시간동안 방치하였다. 여기에 10 % sarkosyl 0.5ml을 가하여 50℃에서 2시간 방치후 27℃로 온도를 낮추어 overnight incubation을 수행하였다. phenol: Chloroform 천천히 5분간 섞어주고 100 rpm에서 5분간 원심분리를 하여 유기용매와 층을 가르고 상층액을 끝이 넓은 pipet을 사용하여 새튜브에 옮기고 동일한 방법으로 유기추출 과정을 2회 반복하였다. chloroform만으로 1회 유기추출을 수행하고, 상층액을 새 튜브에 옮긴 후 10 ml의 cold ethanol을 가하여 천천히 섞어 주었다. 이를 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 DNA 침전을 얻었으며 80 % ethanol로 washing을 하여 salt등을 제거하였다. 이를 clean bench에서 밤새 말리고 증류수에 녹였다. 이를 회석하여 Kontron사의 UVIKON 930을 사용하여 260nm와 280nm의 흡광을 측정하여 정량 하였다.



### 3) 곤충세포에의 cotransfection

1  $\mu$ g의 AcNPV DNA와 2 g의 plasmid DNA를 섞고 0.75 ml의 배지를 더하였다. 여기에 0.75 ml의 transfection buffer (25 mM HEPES [pH7.1], 140 mM NaCl, 125 mM CaCl<sub>2</sub>)를 더해 섞어주고, 1시간전에 미리 25cm<sup>2</sup> flask에 2.0  $\times$  10<sup>6</sup> cell을 접종하여 바닥에 붙도록 한 세포에 더해 주었다. 27°C에서 4시간정도 incubation시킨 후 배지를 걷어내고 serum free media로 3회 세척하였다. 완전한 배지 5 ml을 더하여 4-5일 더 키웠다.

### 4) Plaque assay

위에서 키운 세포배양액을 걷어 serum이 없는 배지에서 serial dilution을 하고 10<sup>-5</sup> 10<sup>-7</sup> 사이로 희석된 바이러스액을 곤충세포로 한 면이 확장 지름이 30 mm인 dish에 넣어주고 1시간 방치하여 바이러스가 세포에 붙게하였다. 바이러스액을 완전히 씻어 주고 멸균된 3% low melting agarose용액 (0.1% trypan blue가 섞인)과 배지를 1:1의 비율로 섞어 세포면 위에 조심스럽게 부었다. 30분정도 지나 agarose가 굳으면 배지를 1 ml 가하여 27°C에서 5-6일 키운 뒤 plaque의 생성을 확인하였다. plaque중 occlusion body (polyhedrin)이 없는 plaque를 골라 Pasteur pipette으로 떼내고 이것을 70% 정도 세포가 깔린 플라스크에 접종하여 얻은 바이러스를 증식시켰다.

### 사. 사람 종양괴사인자의 생성확인

앞선 여러 실험에서 준비한 세포 추출물 혹은 배지에서의 사람종양괴사인자를 확인하기위하여 L929 세포에 대한 독성측정과 Western blot analysis를 수행하였다. 각각의 실험 방법은 다음과 같다.

#### 1) L929 암세포에 대한 세포독성활성

종양괴사인자의 활성도는 Flick과 Gifford (36)의 방법을 사용하여 측정하

였다. 목적세포인 L929 세포를 96-well plate에 seeding하여 24시간 배양하고, 96-well plate의 상층 배지를 버린 후 멸균처리한 test sample을 배지로 적당히 희석하여 처리한 후 CO<sub>2</sub> 배양기(37 , 5% CO<sub>2</sub>)에서 actinomycin D를 5μg/ml로 첨가하여 18시간 배양하였다. 배양 후 plate의 배지를 털어 버리고 7% 포르말린 용액이 들어있는 0.05% crystal violet 염색용액에 20분간 담궈 세포를 고정시키며, 염색 시켰다. 이같이 염색시킨 plate를 잘 세척한 후 털어서 말리고 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 test sample의 cytotoxicity (%)는 다음과 같이 결정하였다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \frac{A_{540}(\text{control}) - A_{540}(\text{sample})}{A_{540}(\text{control})} \times 100$$

한편 종양괴사인자 1 unit은 위의 종양괴사인자 assay에서 50% cytotoxicity 를 나타내는 test sample의 희석배수의 역수로 하였다(37). Test sample의 단백질 양은 Lowry의 방법을 이용하였다 (38) .

## 2) Western blot 분석방법

위에서 언급한 방법대로 준비된 각각의 sample로 Western blot을 수행하였다. 이때 사용된 DISC SDS-PAGE gel system은 3% stacking gel과 12.5% running gel이었다 (39). 전기영동을 수행한 후 표준단백질이 있는 부분은 잘라내어 염색한 후 이동거리를 측정하여 표준직선을 얻거나, biotin으로 표시되어있는 표준단백질과 함께 바로 blot하였다.

먼저 gel을 transfer완충용액으로 평형을 이루게 했다. 그리고 Hoefer Transfer kit에 transfer 완충용액을 채우고 cassette, 스폰지, Whatman 3MM filter paper, nitrocellulose filter, gel, Whatman paper, 스폰지, cassette 순으로 조립한 후 nitrocellulose filter는 양극을, gel은 음극을

향하도록 kit에 넣었다. 조립한 cassette를 kit에 넣고 1.2 A로 1시간동안 electroblot하였다. Nitrocellulose filter를 cassette에서 떼어낸 후 0.5% Triton이 든 PBS로(PBST) 간단히 씻어주고 1% BSA를 포함하는 PBST용액에서 30분동안 흔들어주며 background를 blocking하였다. nitrocellulose filter를 PBST로 1/300 희석된 mouse anti-human TNF monoclonal 항체용액에 옮겨 30분 동안 방치했다. 불지않은 항체는 PBST로 간단히 씻어주어 제거한 후 PBST로 1/200 희석된 anti-mouse Ig G alkaline phosphatase conjugate 혹은 anti-mouse IgG peroxidase conjugate와 avidin-alkaline phosphatase를 포함하는 용액에 nitrocellulose filter를 넣어 방치했다. 젖은 nitrocellulose filter를 filter paper에 놓아 마르게 한 후 NBT/BCIP가 포함된 발색용액에 넣어 발색반응을 진행시켰고, peroxidase를 사용한 경우 AEC발색 반응을 시켰다. 발색반응이 원하는 정도로 진행되었을 때 증류수로 씻어주어 발색반응을 정지시켰다.



### 제 3 절 결 과 및 고 찰

#### 1. 사람 종양괴사인자 유전자(TNF gene)의 분리

##### 가. 사람의 peripheral monocyte로 부터 DNA의 분리

분리한 DNA의 양은  $A_{260}$ 이 1인 경우  $20\mu\text{g/ml}$ 로 정하였으며 순수도는  $A_{260}/A_{280}$ 이 1.8-2.0이면 거의 순수한 DNA로 간주하였다.

사람 백혈구 농축액으로부터  $3 \times 10^7$ 개의 사람의 정상 peripheral monocytes세포를 분리하여 이것으로부터 pronase-phenol:chloroform 추출 방법에 의해 DNA를 추출한 결과  $17.995\mu\text{g}$ 의 DNA를 얻었다. 이같이 추출한 DNA의 순수도는  $A_{260}/A_{280}$ 값이 1.84였으므로 비교적 순수도가 높은 상태라고 볼 수 있어 사람의 peripheral monocytes genomic library제조를 위한 제한효소에 의한 digestion에 계속하여 이용하였다.

##### 나. $\lambda$ gt11 vector를 이용한 leukocyte genomic library의 제조

추출한 사람의 leukocyte genomic DNA를 제한효소 *EcoRI*으로 절단한 후 전기영동하여 3 Kb 부분의 band를 elution하였다.

이미 알려져 있는 사람종양괴사인자의 염기서열과 flanking sequence상의 restriction site를 조사해보면 *EcoRI*으로 절단할 경우 약 3 Kb의 DNA조각이 생기고 이 단편의 내부에 사람종양괴사인자 유전자가 위치하게됨을 알 수 있다 따라서 *EcoRI*으로 절단된 3Kb DNA조각을 사용하면 사람종양괴사인자 유전자를 cloning할 수 있을 것으로 생각되었다. 따라서 이 3 Kb DNA 조각들을 이용하여  $\lambda$ gt11 vector에 재조합한 후, *in vitro* packaging과 *E. coli* Y1090에의 감염을 통해 90 mm plate에서 확인한 titer는  $10^4$  pfu (plaque forming unit) 이

상이었다.

다.  $\lambda$  gt 11 vector를 이용한 사람의 peripheral monocytes genomic library제조 및 screening

$\lambda$  gt 11은 크기가 작은 *EcoRI*조각(6Kb 이하), 특히 *EcoRI* linker를 갖는 cDNA조각의 cloning연구에 적당한 43.7Kb의 linear double  $\lambda$  stranded bacteriophage이다. 외부 DNA를 집어넣는데 이용되는 *EcoRI* 부위는 lac Z gene의 3'부근에 위치하고 있어서 외부 DNA가 이곳에 삽입되면 활성이 없는  $\beta$ -galactosidase가 만들어져 X-gal과 IPTG가 포함된 LB배지에서 무색의 clear plaque를 형성하게 된다.  $\lambda$  gt 11 phage와 *E. coli* Y1090을 함께 조합하여 screening에 많이 사용하므로 우리도 이 system을 사람종양괴사인자 유전자의 cloning연구에 이용하였다. 사람종양괴사인자유전자를 포함하는 3Kb DNA 조각과 dephosphorylation된  $\lambda$  gt 11 arm을 ligase로 연결한 후 *in vitro* packaging시켜 hybrid phage를 제조하였다. 이같이 제조한 hybrid phage를 *E. coli* Y1090에 감염시킨 후 X-gal과 IPTG가 포함된 배지에서 배양하여 clear plaque를 생성하는 hybrid phage를 1차 선별하고, 선별된 phage를 가지고 다시 plaque hybridization 방법에 의해 cloned phage를 2차 선별하였다. 이때 사용한 probe는 사람종양괴사인자 유전자의 5' 말단과 상보적인 염기서열을 갖는 30개의 염기로 된 oligonucleotide probe였다.

라. *E. coli* Y1089를 이용한  $\lambda$  gt11 recombinant lysogen의 제조 및 screening

*E. coli* Y1089 세포를 1, 2 차에 걸쳐 선별된 hybrid phage로 감염시켜  $\lambda$  gt 11 recombinant lysogen을 제조했다. *E. coli* Y1089가 갖고 있는

hf1A150에 의해  $\lambda$  gt11 phage와 숙주세포 염색체간의 recombination이 잘 발생한다. 제조된 lysogen은  $\lambda$  gt 11 phage가 갖고있는 cI857에 의해 32°C에서는 자랄 수 있으나 42°C에서는 자랄 수 없어 이같은 콜로니를 선별했다.

30mer의 종양괴사인자 유전자에 대한 oligonucleotide probe로 *in situ* hybridization을 통해 얻은 positive plaque는  $2 \times 10^5$  pfu의 phage들 중 26개 였으며 이 positive plaque를 선별하여 다시 screening을 수행한 후, dot blot hybridization를 통해 positive clone을 확인 하였다(Figure 6). 이 hybrid phage DNA는 제한효소 *EcoRI* 처리 후 전기이동을 통해  $\lambda$  gt11 vector내에 3 Kb의 insert가 삽입된 것을 확인하고 Southern hybridization에 의해 삽입된 3kb DNA가 종양괴사 유전자임을 입증하여 이 recombinant  $\lambda$  DNA를  $\lambda$  gt11-TNF라 명명하였다(Figure 7).

## 2. pBSII plasmid vector를 이용한 사람 종양괴사인자 유전자의 subcloning

### 가. 3 Kb 사람종양괴사인자 유전자의 pBSII로의 subcloning

$\lambda$  gt11-TNF를 *EcoRI*으로 처리하여 얻은 3 Kb 종양괴사인자 유전자를 pBSII의 *EcoRI* site에 삽입하여 선별한 colony에서 plasmid를 분리하고 *EcoRI* 처리와 전기이동을 통해 3 Kb DNA가 삽입된 colony를 2차 선별하였다. 삽입된 3kb DNA는 Southern hybridization을 통해 종양괴사인자 유전자임을 확인되었다(Figure 8).

### 나. 사람종양괴사인자 유전자의 네번째 exon PCR

(Polymerase Chain Reaction)

3 Kb 종양괴사인자 유전자 50 ng을 template로 해서 35 cycle의 PCR을 수



행해서 얻은 네번째 exon에 해당하는 PCR product의 양은  $20\mu\text{g}$  이상이었다. 또한 사람의 leukocyte genomic DNA  $0.5\mu\text{g}$ 을 template로 사용한 PCR product의 양 역시  $20\mu\text{g}$  이상이었다(Figure 9).

한편 세번째 exon-intron-네번째 exon을 PCR을 수행하여 얻은 결과  $0.5\mu\text{g}$ 의 leukocyte genomic DNA를 template로 하여  $10\mu\text{g}$  이상의 PCR product를 얻었다(Figure 10). 이 세번째 exon-intron-네번째 exon의 PCR product는 세번째 exon의 sense strand와 4번째 exon의 primer를 사용하였으므로 네번째 exon의 PCR product와 동일한 template에서 생성되었음을 알 수 있었다.

#### 다. 사람종양괴사인자 유전자의 네번째 exon의 subcloning

pBS II SK의 *Sma*I-*Hind*III site에 삽입된 네번째 exon은 그 5' 말단으로부터 *Sma*I site의 8 bp upstream에 존재하는 *Bam*HI과 3' 말단의 *Hind*III site를 이용하여 제한효소 *Bam*HI, *Hind*III를 처리하여 전기이동을 수행한 후 0.56Kb의 insert가 삽입되었음을 확인하였으며 이 recombinant plasmid를 pTNF4SK라 명명하였다(Figure 11). 삽입된 insert의 restriction map은 이미 보고된 사람종양괴사인자의 염기서열의 분석을 통한 map과 일치하였다.

#### 라. 사람종양괴사인자 유전자의 exon 3 - exon 4의 subcloning

pTNF4SK에 삽입된 네번째 exon은 PCR primer를 구상할 때 5' 말단 쪽 codon의 third base point change를 통해 *Dra*III site를 구축하였고, 세번째 exon은 3' 말단의 4번째 exon과 reading frame을 맞추어 같은 방법으로 *Dra*III site를 구축한 후, 두 fragment를 cassette ligation을 하였다.(Figure 12, 13).

Ligation된 세번째와 네번째 exon은 바로 pBS II SK와 pBS II KS의 *Eco*RV와 *Hind*III site에 삽입하여 *Eco*RV site의 20 bp 5' upstream에 존재하는

*Bam*HI과 3' 말단의 *Hind*III site를 이용하여 절단해서 약 0.6 Kb의 insert가 삽입된 것을 확인하였다 (Figure14). pBSII SK와 pBSII KS의 *Eco*RV와 *Hind*III site에 종양괴사인자 유전자의 세번째 exon과 네번째 exon을 삽입한 recombinant plasmid를 각각 pTNF34SK와 pTNF34KS로 명명하였다. pBSII 34SK는 *Jac* promoter를 통해 종양괴사인자의 N말단에  $\beta$ -galactosidase의 일부인 약 3 KD의 polypeptide가 fusion되어 발현되도록 구축되었으며 pTNF34KS는 T7 promoter를 통해 157개 아미노산의 mature 종양괴사인자가 발현되도록 구축하였다.

### 3. T7 phage promoter를 이용한 종양괴사인자의 발현

#### 가. pT7-TNF34의 구축

T7 phage promoter,  $\phi$ 10을 포함한 plasmid인 pT7-7의 multiple cloning site에 restriction site가 있는 *Bam*HI와 *Hind*III로 자르고 거기에 frame을 맞추어 pTNF34를 *Bgl*II와 *Hind*III로 잘리워 생긴 TNF gene을 끼워 넣고 이를 pT7-TNF34라고 명명하였다. *Bam*HI이나 *Bgl*II로는 pT7-TNF34를 끊을 수가 없어 insert의 확인을 위해 pT7-7의 *Bam*HI site의 5'쪽에 위치한 *Eco*RI site를 이용하였다. 곧 pT7-TNF34를 *Eco*RI과 *Hind*III처리하고 1% agarose gel상에서 전기영동을 수행하여 0.61kb정도의 insert가 존재함을 확인 하였다 (Figure15, Figure16).

#### 나. K38/pGp1-2, pT7-TNF34에서의 TNF 발현 유도

pGp1-2는 T7 RNA polymerase gene을 포함하는 7.2kb정도의 plasmid이다. pGp1-2가 code하는 T7 RNA polymerase는 열에 의해 (42°C) 유도되기 때문에

K38/pGp1-2 균주에 pT7-TNF34 plasmid를 넣어주면 TNF의 생성도 열에 의해 유도될 수 있다. pT7-TNF34를 넣어 주지 않은 대조군의 세포와 넣어준 세포를 같은 조건에서 키우다가, 42°C로 배양온도를 올려 주면 T7 RNA polymerase의 생성이 유도된다. 실험방법에서 설명한대로 세포를 배양하고 원심분리하여 세포를 수집한 후 수집된 세포를 초음파로 파쇄하여 세포추출액을 준비하였다. 이렇게 준비된 sample을 모아 다음의 실험에 쓸 수 있도록 준비하였다.

#### 4. pBRTNF34의 구축

앞으로 사용할 vector로 subcloning 수행에 용이하도록 TNF exon3-4 gene의 3'쪽의 flanking sequence에 *Bam*HI restriction site를 만들어 주기 위해 pBR322 vector로 subcloning을 수행하였다 (Figure 17). 만들어진 pBRTNF34를 *Eco*RI과 *Hind*III 제한효소로 끊어주고 이것을 1.2 % agarose gel에서 전기영동을 수행하여 0.61 kb의 insert를 확인하였다(Figure 18).

#### 5. 포유동물세포에서의 사람종양괴사인자의 발현

##### 가. 사용 vector의 구축

포유동물에서 사람종양괴사인자 발현 vector의 구축을 용이하게 하고 발현에도 문제가 크게 발생하지 않게 하기 위해, mammalian expression vector인 pSVL의 multiple cloning site에 *Eco*RI에 의해 잘리우는 sequence를 넣기로 했다. 그러나 pSVL의 SV40 late promoter의 5'쪽에 *Eco*RI site가 존재하기 때문에 multiple cloning site에 *Eco*RI site를 넣어 주기에 앞서 기존에 존재하는 *Eco*RI site를 없애 주어야 하였다. pSVL을 *Eco*RI 으로 끊고 결과로 생긴



sticky end를 mung bean nuclease로 blunt end가 되도록 하여 T4 ligase로 ligation을 해주면 *EcoRI* site가 없어지게 되는데 이를 pSVNE라 명명하였다. 한편 *E. coli*에서 plasmid를 alkaline lysis로 뽑으면 일반적으로 supercoiled, relaxed, catenated form의 3가지를 얻을 수 있는데 여기에 어떠한 제한효소를 처리해 주면 relaxed form의 위치로 수렴하는 현상을 볼 수 있다. 이러한 현상을 이용하여 위에서 준비된 pSVNE에 *EcoRI*처리를 하면 원래의 의도대로 *EcoRI* site가 없어진 경우에는 band의 수렴을 볼 수 없는 반면 *EcoRI* site가 남아 있는 경우는 3가지형태의 DNA를 모두 보이게 된다(Figure 19).

pSVNE를 *SmaI*으로 잘라주고 합성한 *EcoRI* linker(d GAATTC)의 5'OH를 kination한 product와 같이 ligation하였다. 이를 pSVE라 명명하였으며 (Figure 20) 이의 확인은 앞서 pSVNE의 생성을 확인한 방법과 같이하여 vector의 구축을 확인하였다 (Figure 19).

#### 나. 사람종양괴사인자 발현 vector, pSVTNF34의 구축

pSVE와 pBRTNF34를 *EcoRI*과 *BamHI*으로 처리하여 pSVE의 vector부분과 pBRTNF34의 TNF exon3-4를 포함하는 부분을 얻어 ligation하여 pSVTNF34라고 명명하였다(Figure 21). 이 pSVTNF34를 다시 *EcoRI*과 *BamHI*으로 끊고 1% agarose gel상에서 전기영동을 하여 사람종양괴사인자 유전자를 포함하는 1kb 정도의 insert를 확인할 수 있었다(Figure 22).

#### 다. COSM6 cell line으로의 transfection

Plasmid를 포유동물세포에 transfection할 때 일반적으로 매우 깨끗한 DNA가 필요하다. 본 실험에서는 pSVTNF34가 들어있는 *E. coli* XL1B를 20 ml의 LB 배지에서 키워 Stratagene사의 Plasmid Quick™ Purification Kit을 사용

하여 transfection에 요구되는 정도의 깨끗한 plasmid를 얻고 이것을 serial dilution한것을 240nm에서 300nm 사이에서 wavelength scan을 하여 얻은 plasmid의 순도를 결정하였다 (Figure 23).  $A_{260nm}/A_{280nm}$ 의 값은 평균 1.8이상이었고,  $A_{260nm}$ 값으로 DNA의 양을 결정하였다.

pSVTNF34 27  $\mu$ g과 Geneticin(G418)에 저항성을 보이는 유전자를 포함하는 pWLneo 2.7  $\mu$ g을 섞어 transfection에 사용하였다.

#### 라. Transfection된 세포의 분리와 세포추출물의 제조

Transient expression을 보기위해 수행한 DEAE - dextran mediated transfection에서 얻어진 세포와 stable transformant를 보기위해 calcium-phosphate mediatedtransfection을 수행한 경우 모두 세포에 trypsin-EDTA를 가해 세포를 플라스크 바닥에서 떼고 PBS로 2번 씻어준 후 세포 부피와 1:1이 되도록 PBS를 가해 sonication하였다. 단백질농도를 6mg/ml 이 되도록 희석하여 다음실험에 대비 하였다.

### 6. Baculovirus를 이용한 subcloning

#### 가. pVLTNF34 (AcNPV transfer vector)의 구축

AcNPV virus의 genome에 의해 만들어지는 단백질은 75종에 달하고 이단백질들은 일시적인 조절과정(temporally regulated process)에 의해 발현된다. AcNPV의 polyhedrin promoter를 이용하면 전체 단백질중 50% 정도에 해당될 정도로 매우 많은 산물을 얻을 수 있으며, 다른 시스템에 비해 transformant의 선별이 쉽다.

pVL1392의 multiple cloning site에 pBRTNF34로 부터 얻어진 사람종양피

사인자 exon 3-4부분을 넣고 이를 pVLTNF34라고 명명하였다(Figure 24). 이를 확인하기 위하여 pVLTNF34를 EcoRI과 BamHI으로 끊고 1 % agarose gel에서 전기영동을 수행하여 1 kb의 insert를 확인 하였다 (Figure 25).

#### 나. Wild-type AcNPV로 부터 DNA의 분리

Intact한 바이러스로 부터 genome DNA를 추출해 내어 증류수에 적정농도로 희석을 하여 Kontron사의 UVIKON 930을 사용하여 260nm와 280nm의 흡광을 측정하여 정량 하였다. 1/100으로 희석한 경우 260 nm에서의 흡광도는 0.163이었고 280 nm의 흡광도는 0.087이었다 (Figure 26). 따라서 상당히 순수한 viral DNA를 얻은것으로 간주하여 곤충세포에의 cotransfection을 수행하였다.

#### 다. Plaque assay

27℃에서 5-6일을 키워야 occlusion body가 보이고 2-3일 사이에 plaque가 미리 생겨 plaque purification을 완전히 마치지 못하였다. 이후 사람종양괴사인자의 발현여부를 확인하기 위해 70% 정도 세포가 깔린 플라스크에 바이러스를 접종하여 얻은 세포액과 배지를 건어 각각 다음실험을 위하여 모아두었다.

### 7. Recombinant 사람 종양괴사인자(hTNF)의 생성확인

#### 가. 원핵세포에서 발현된 사람종양괴사인자

recombinant lysogen과 transformant의 콜로니로부터 제조한 crude lysate로 cytotoxicity assay를 수행하였을 때 60% 이상의 cytotoxicity를 갖는 것을 확인했다. 이와 같이 확인된 crude lysate를 가지고 mouse anti-



human TNF monoclonal 항체를 이용하여 Western blot에 의해 분석하였을 때 *E. coli*에서 사람 종양괴사인자가 발현되었음을 확인하였다.

세번째와 네번째 exon을 subcloning한 pTNF34SK와 pT7-TNF34에서 발현된 사람종양괴사인자는 각각  $1.01 \times 10^2$ 과  $4.7 \times 10^6$  units/mg로 나타났다. PAGE와 Western blot분석을 통해 나타난 분자량은 21KDa이었으며 이를 densitometer로 보면 pT7-TNF34에서 생성된 사람종양괴사인자는 전체 crude 단백질의 25% 정도에 해당하는 것으로 나타났다 (Figure 24).

#### 나. 진핵세포에서 발현된 사람종양괴사인자

DEAE-dextran mediated transfection으로 얻은 세포추출물의 경우 L929에 대한 세포독성은 약 20 unit/total protein (mg)정도이었으며 곤충세포에서 plaque purification과정을 거치지 않은 세포추출물과 세포배양배지에서는 세포독성활성을 볼 수 없었다.

#### 다. Western blot 분석방법에 의한 재조합 종양괴사인자의 분자량결정

XL1Blue/pTNF34SK에서 발현된 재조합 종양괴사인자는 그 분자량이 약 22 KDa으로 나타났다 (Figure 25). 또한 recombinant lysogen에서 발현된 재조합 종양괴사인자는 분자량이 약 17KDa로 나타났다 (Figure 26). 한편 K38/pGp1-2, pT7-TNF34에서 발현된 종양괴사인자의 분자량은 20 kD로 나타났다 (Figure 27)

또한 DEAE-dextran mediated transfection으로 얻은 세포추출물의 경우와 곤충세포에서 plaque purification과정을 거치지 않은 세포추출물과 세포배양 배지에서를 12.5 % Disc PAGE를 수행하고 western blot분석방법으로 사람종양 괴사인자의 생성을 확인 할 수 없었으나 곤충세포를 초음파로 파쇄하고 원심 분리하여 얻은 침전물에 동일 부피의  $4 \times$  SDS sample buffer를 가하여 수행한

실험에서는 약 18 kD 크기를 갖는 사람 종양괴사인자의 발현을 확인 할 수 있었다 (Figure 28).

## 8. 결 론

사람의 peripheral leukocyte genomic DNA에 *EcoRI*을 처리하여 3Kb 종양괴사인자 유전자를 분리한 후  $\lambda$ gt11 vector를 사용하여 genomic library를 제조하였다. 제조한 genomic library로부터 3Kb 종양괴사인자 유전자가 삽입된 hybrid phage는 종양괴사인자 유전자에 대한 oligonucleotide probe를 사용하여 선별하였다. Hybrid phage에 삽입된 3Kb 종양괴사인자 유전자는 *EcoRI*을 처리하여 분리한 후 pBSII vector의 *EcoRI* site에 재조합시켜 subcloning을 하였다.

한편 *E. coli* 내에서 사람 종양괴사인자의 발현을 위하여서는 먼저 PCR을 이용하여 종양괴사인자 유전자의 네번째 exon 과, exon 3-exon 4를 얻은 후 이들을 pBSII에 subcloning하여 recombinant plasmid인 pTNF4SK, pTNF34SK, 를 얻었으며 대량생산을 목적으로 pT7-7에 subcloning하여 pT7-TNF34도 구축하였다. 이들 recombinant  $\lambda$  DNA와 recombinant plasmid들을 각각 *E. coli* Y1089, XL1Blue 그리고 K38/pGp1-2에 transfection 및 transformation 과정을 통해 얻은 crude extract는 L929 암세포에 대한 세포독성활성을 보였으며, Western blot 분석방법에 의해  $\lambda$  lysogen, pTNF34SK, 그리고 pT7-TNF34를 통해 발현된 종양괴사인자의 분자량이 각각 17KD, 22KD, 20KD로 pTNF34SK와 pT7-TNF34에 삽입된 종양괴사인자 유전자의 염기서열로부터 예상한 값과 일치하였다.

포유동물 시스템에서 사람 종양괴사인자의 발현을 위하여, pBRTNF34에서

exon 3-exon 4를 분리하여 SV40 late promoter를 갖는 벡터인 pSVL에 subcloning하여 recombinant plasmid인 pSVTNF34를 얻었다. 이를 DEAE-dextran방법으로 COSM6세포에 transfection시켜 얻은 crude extract는 L929 암세포에 대한 세포독성활성을 보였으나 발현양이 적어서 Western blot분석방법으로는 사람종양괴사인자의 생성을 확인할 수 없었다. calcium-phosphate방법으로 COSM6 세포에 transfection한 것은 stable transformant를 얻기 위해 계속된 screening작업을 수행중이다.

한편 eucaryotic system에서 대량으로 사람종양괴사인자를 발현시키기 위하여 Baculovirus를 사용하였다. pBRTNF34에서 exon 3-exon 4를 분리하여 pVL1392에 subcloning하여 transfer 벡터인 pVLTNF34를 구축하였다.

pVLTNF34와 wild-type viral DNA를 *Spodoptera frugiperda* 21(SF21) 곤충세포에 cotransfection하여 recombinant virus를 얻었고 이 recombinant virus를 SF21에 감염시켜 얻은 crude extract를 Western blotting하여 여기서 발현된 사람종양괴사인자의 분자량은 18 KD으로 나타났다.



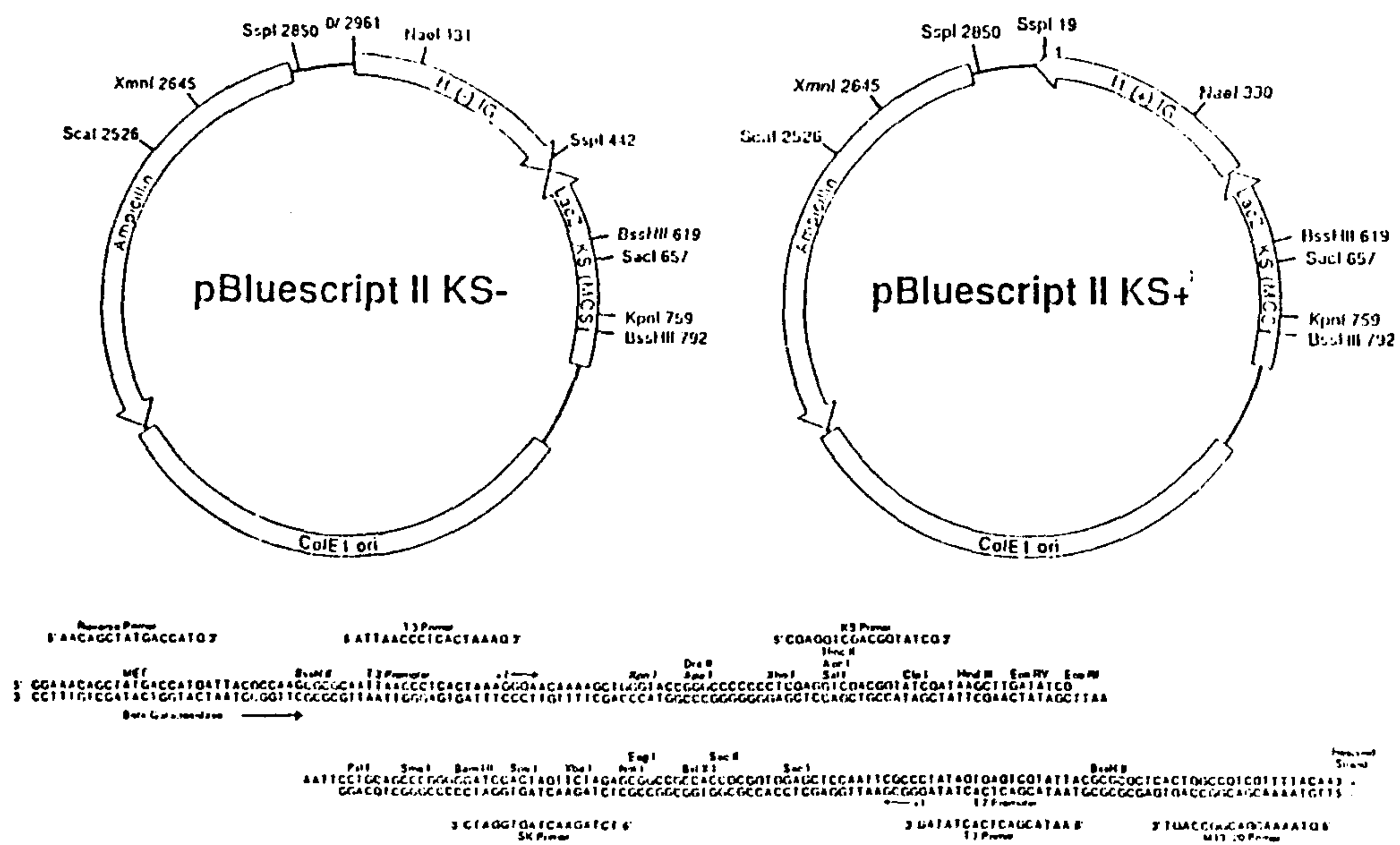
## 제 4 절 참 고 문 헌

1. Rigby, P. W. J. (1982) in *Genetic Engineering*, vol. 3, Williamson, R.(ed), Academic press, pp.83
2. Glover, D.M (1985) in *DNA cloning*, IRL press, Washington D. C., vol. 2, pp.213
3. Glover, D.M (1987) in *DNA cloning*, IRL press, Washington D. C., vol. 3, pp.163
4. Glover, D.M (1985) in *DNA cloning*, IRL Press, Washington D. C., vol. 2, pp.143
5. Jean, G., Claire, L., Rose, Z., Jane, R.P., Anne-Marie Schmitt Verhulst, and Bernard, M. (1987) *Cell*, 50, 545.
6. Clemens, M.J., Morris, A.G., and Gearing, A.J.H. (1987) in *Lymphokines and Interferons*, IRL Press, Washington D.C., pp.61
7. Pelham, H. and Bienz, M. (1982) *EMBO J.*, 1, 1473.
8. Lee, F. et al. (1981) *Nature*, 294, 228.
9. Robins, D. et al. (1982) *Cell*, 29, 623.
10. Lancaster, W. D. and Olson, C. (1982) *Microbiological Reviews*, 46, 191.
11. Pfister, H. (1984) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 99, 112.
12. Glover, D. M. (1987) in *DNA cloning*, IRL Press, Washington D.C., vol. 3, pp.189.
13. Coley, W.B. (1893) *Am. J. Med. Sci.*, 105, 487.
14. Coley, W.B. (1894) *Trans. Am. Surg. Assoc.*, 12, 183.

15. Coley, W.B. (1896) *Am. J. Med. Sci.*, 112, 251.
16. Coley, W.B. (1896) *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 65, 157.
17. Coley, W.B. (1906) *Am. J. Med. Sci.*, 131, 375.
18. Shear, M.J. and Andervont, H.B. (1936) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 34, 323.
19. O'Malley, W.E. et al. (1962) *J. Natl. Cancer Inst.*, 29, 1169.
20. Carswell, E.A. et al. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80, 1194.
21. Aggarwal, B.B. et al. (1984) *J. Exp. Med.*, 159, 828.
22. Aggarwal, B.B. et al. (1984) *J. Biol. Chem.*, 12, 891.
23. Aggarwal, B.B. et al. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 2345.
24. Pennica, D. et al. (1984) *Nature*, 312, 724.
25. Spies, T. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 8699.
26. Allen, O., Deborah Defeo-Jones, Mark, B., Doudlas, M., David, K., Gerald, V., Abigail, W., and Susan, H.S (1987) *Cell*, 50, 555.
27. Rita, M. et al. (1986) *FEBS*, 197, 99.
28. Marmenout, A. et al. (1985) *Eur. J. Biochem.* 152, 515.
29. Holmes, D.S. and M. Quigley. (1981) *Anal. Biochem.* 114, 193.
30. Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 3, 208-218.
31. Birnboim, H.C. and J. Doly. (1979) *Nucleic Acids Res.* 7, 1513.
32. Ish-Horowicz, D. and J.F. Burke. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9, 2989.
33. Chen, C. and Okayama, H. (1987) *Mol. Cell. Biol.*, 7, 2745-2752.
34. Southern, P.J. and Berg, P. J. (1982) *Mol. App. Gen.*
35. Mantei, N., Boll, W. and Weissman, C. (1979) *Nature* 281, 40-46.
36. Flick, D. A. and Gifford, G. E. (1984) *J. Immunol. Methods*, 68, 167

37. Kull, F. C. *et al.* (1981) *Cancer Res.*, 41, 4885.
38. Lowry, O. H. *et al.* (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
39. Laemmli, U. K. (1970) *Nature*, 227, 680.





**Figure 1. pBluescript II KS (+/-) phagemid.**  
 The pBluescript II KS (+/-) phagemid is a 2961 basepair phagemid derived from pUC19. The KS designation indicates the polylinker is oriented such that lacZ transcription proceeds from KpnI to SacI.

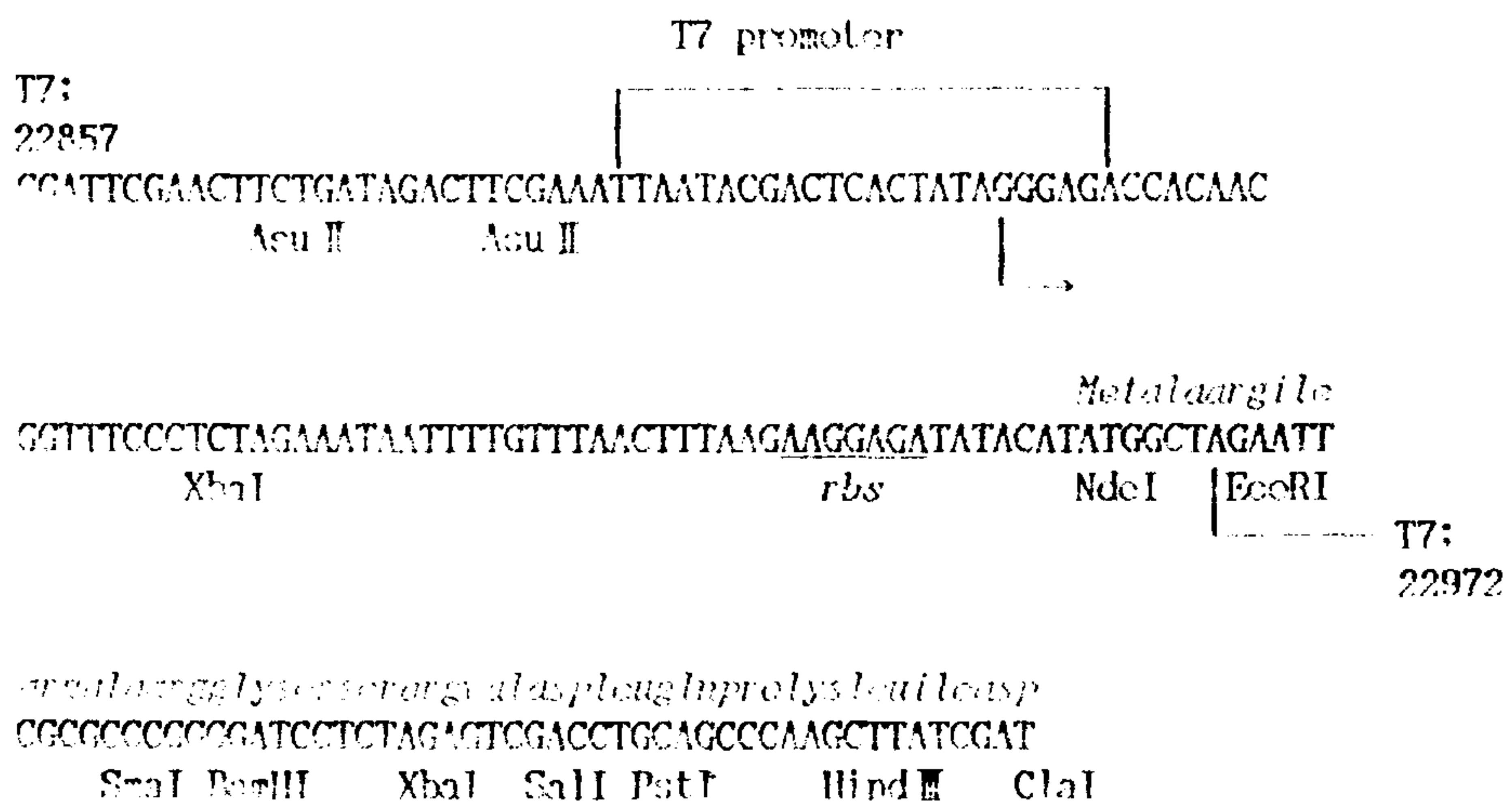
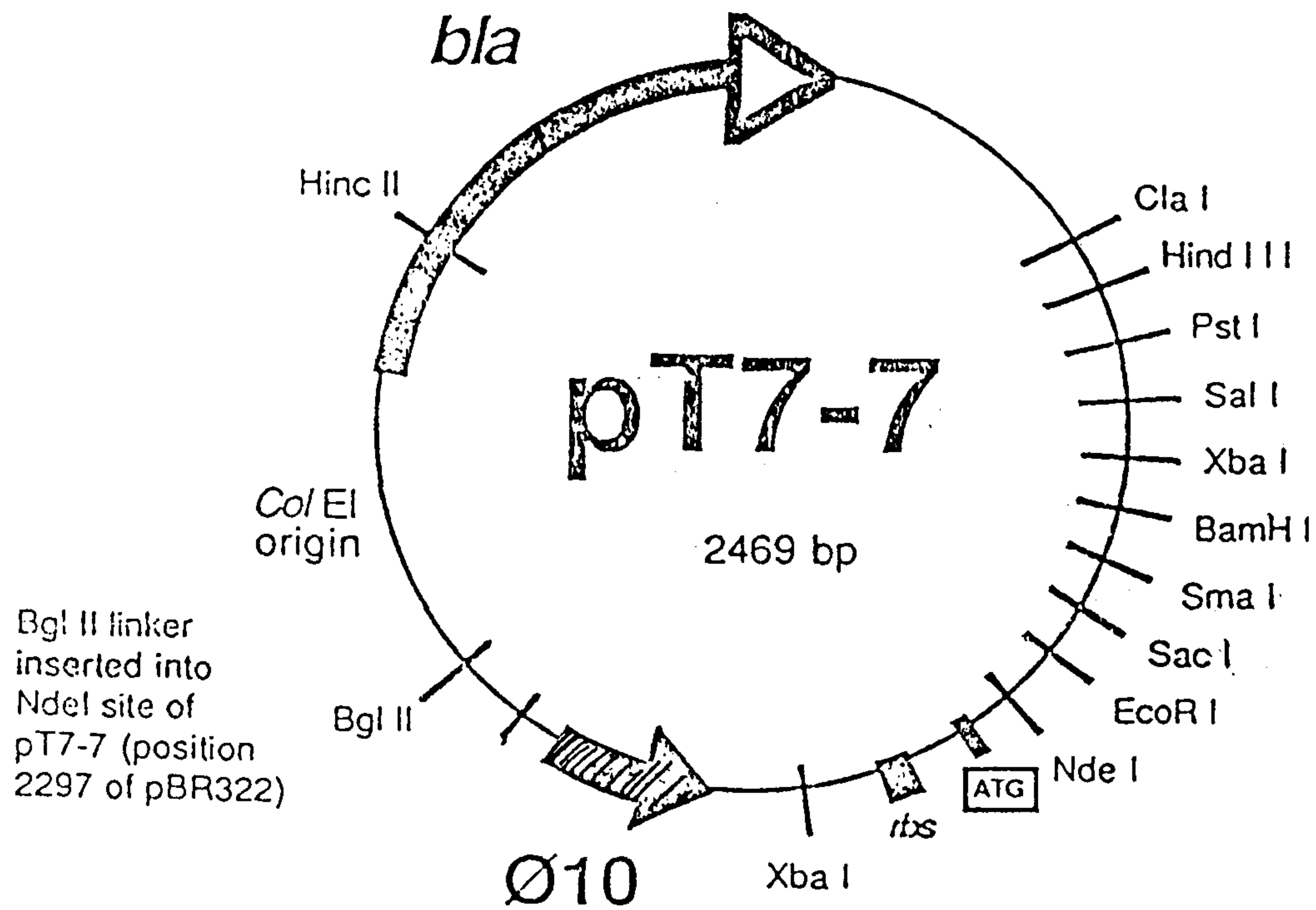


Figure 2. The plasmid pT7-7.

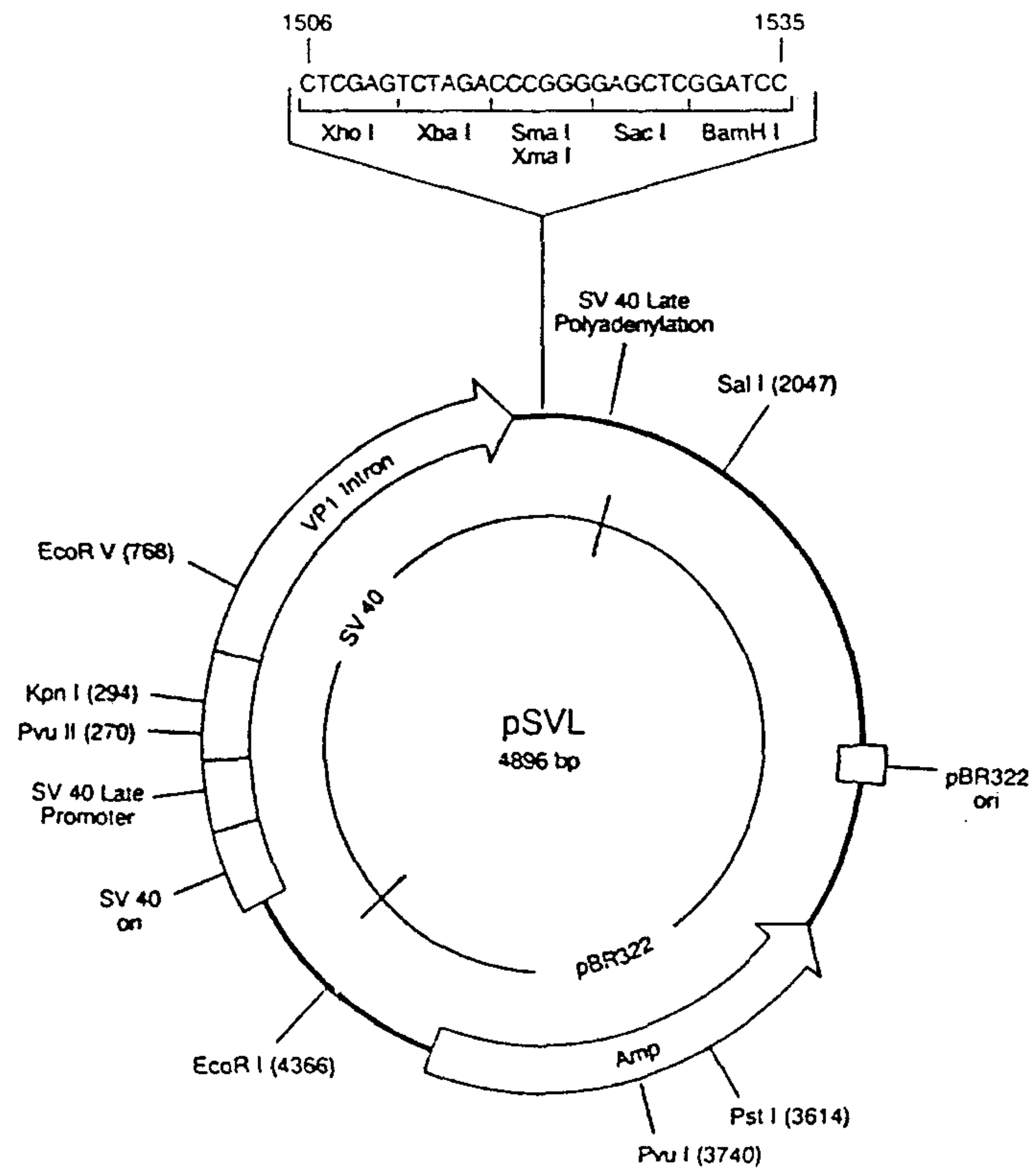


Figure 3. The plasmid pSVL.



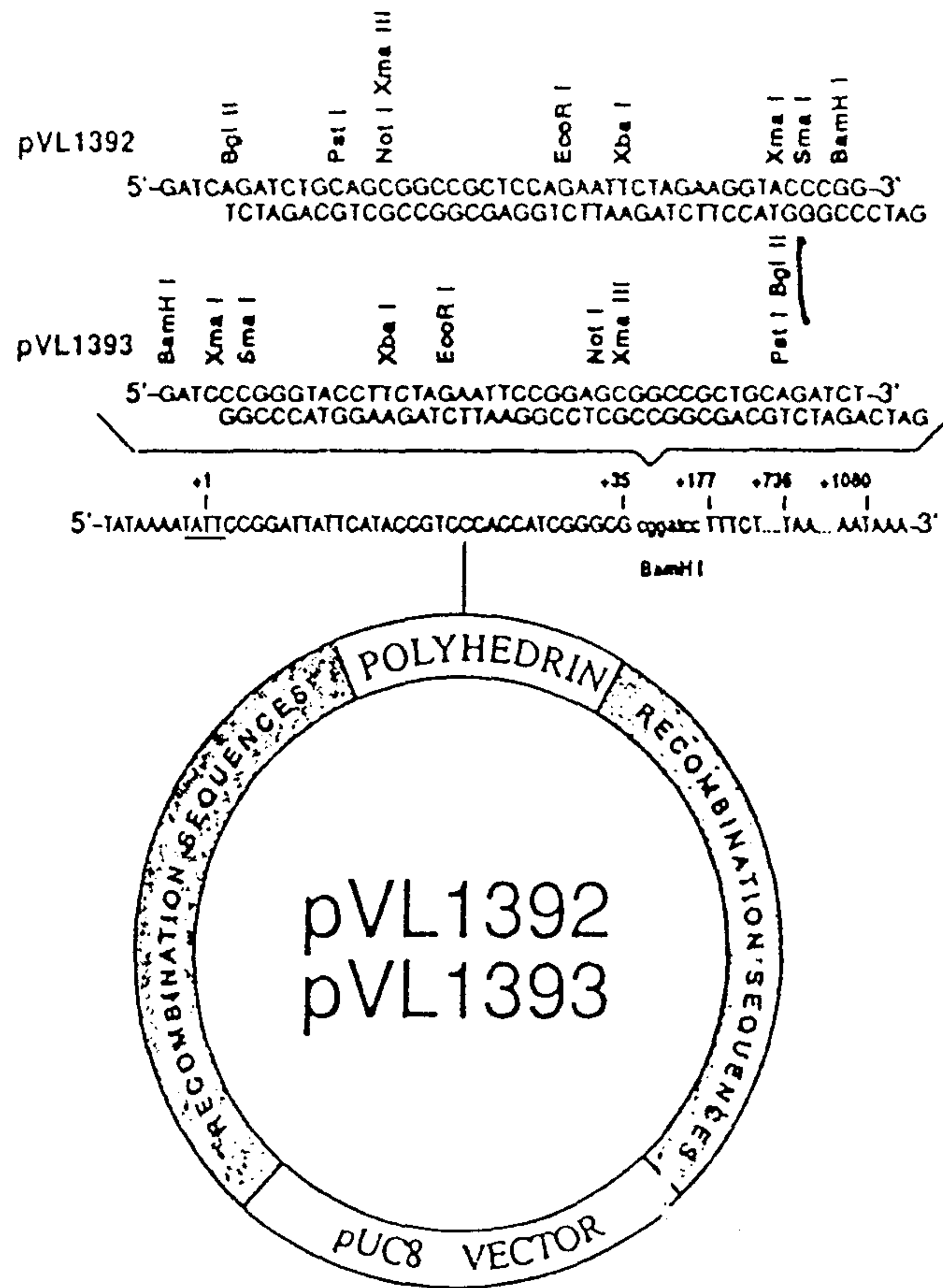
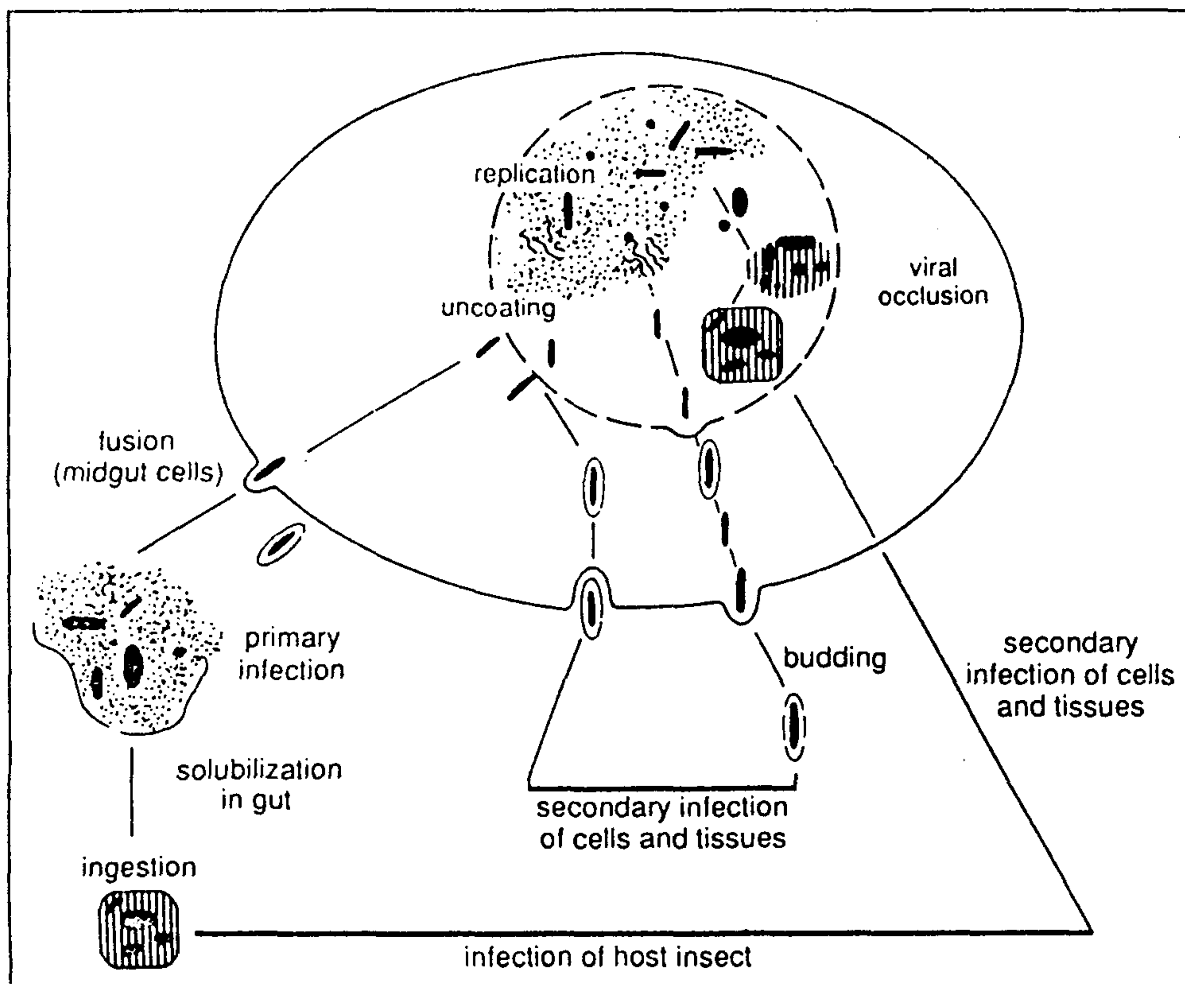
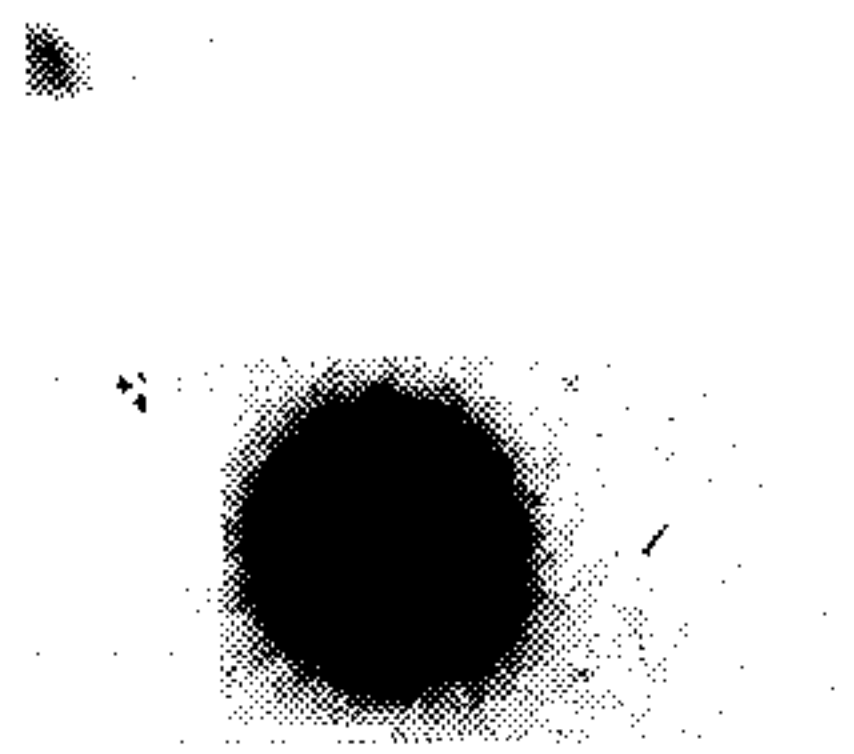


Figure 4. pVL1392 and pVL1393.



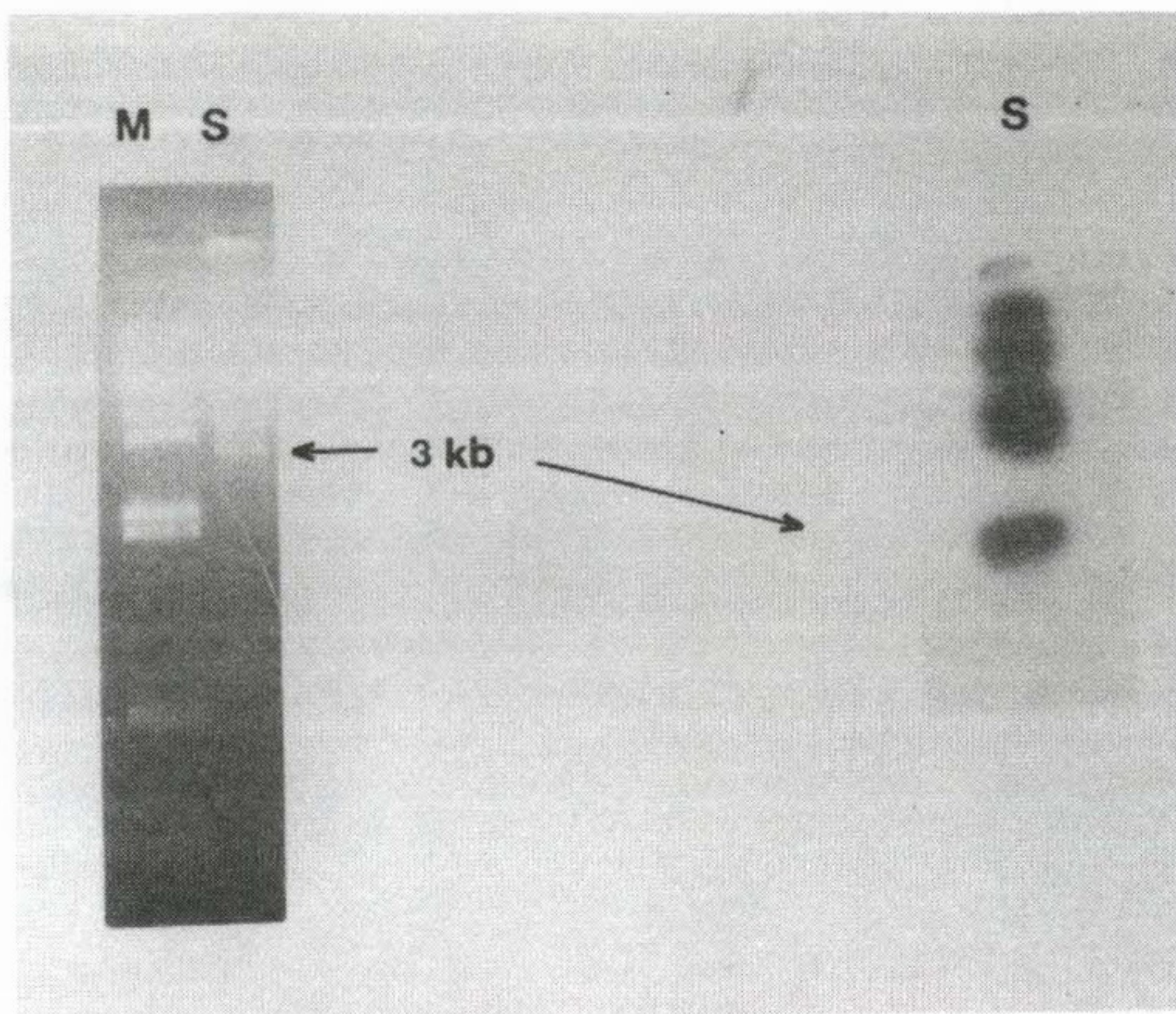
**Figure 5.** Baculovirus life cycle. Reproduced from Summers and Smith (1987) with permission from the Texas Agricultural Experiment Station. Viruses enter cells by adsorptive endocytosis and move to the nucleus where their DNA is released. Both DNA replication and viral assembly take place in the nuclei of infected cells to generate two types of viral progeny. These include extracellular (nonoccluded) virus particles and polyhedra-derived (occluded) virus particles. Extracellular virus is released from the cell by budding, starting at ~12 hr postinfection and ending ~36 hr postinfection. Polyhedra-derived virus, on the other hand, appears later (~18 hr postinfection) and accumulates in the nuclei of infected cells  $\leq 72$  hr postinfection or until cellular lysis. Polyhedra-derived virus is embedded in proteinaceous viral occlusions, the major protein component of which is the viral polyhedrin protein. Secondary infection of cells and tissues occurs by two pathways. In the first, the extracellular virus, once budded from the site of primary infection, is free to infect neighboring cells by the pathway just described. Alternatively, polyhedra-derived virus is released from occlusion bodies after an infected food source is ingested by a new host.



**Figure 6.** Dot blot hybridization of screened hybrid phage

The DNA from hybrid phage, screened through *in situ* hybridization, was blotted on nylon membrane, and the blotted membrane was used for hybridization with oligonucleotide probe





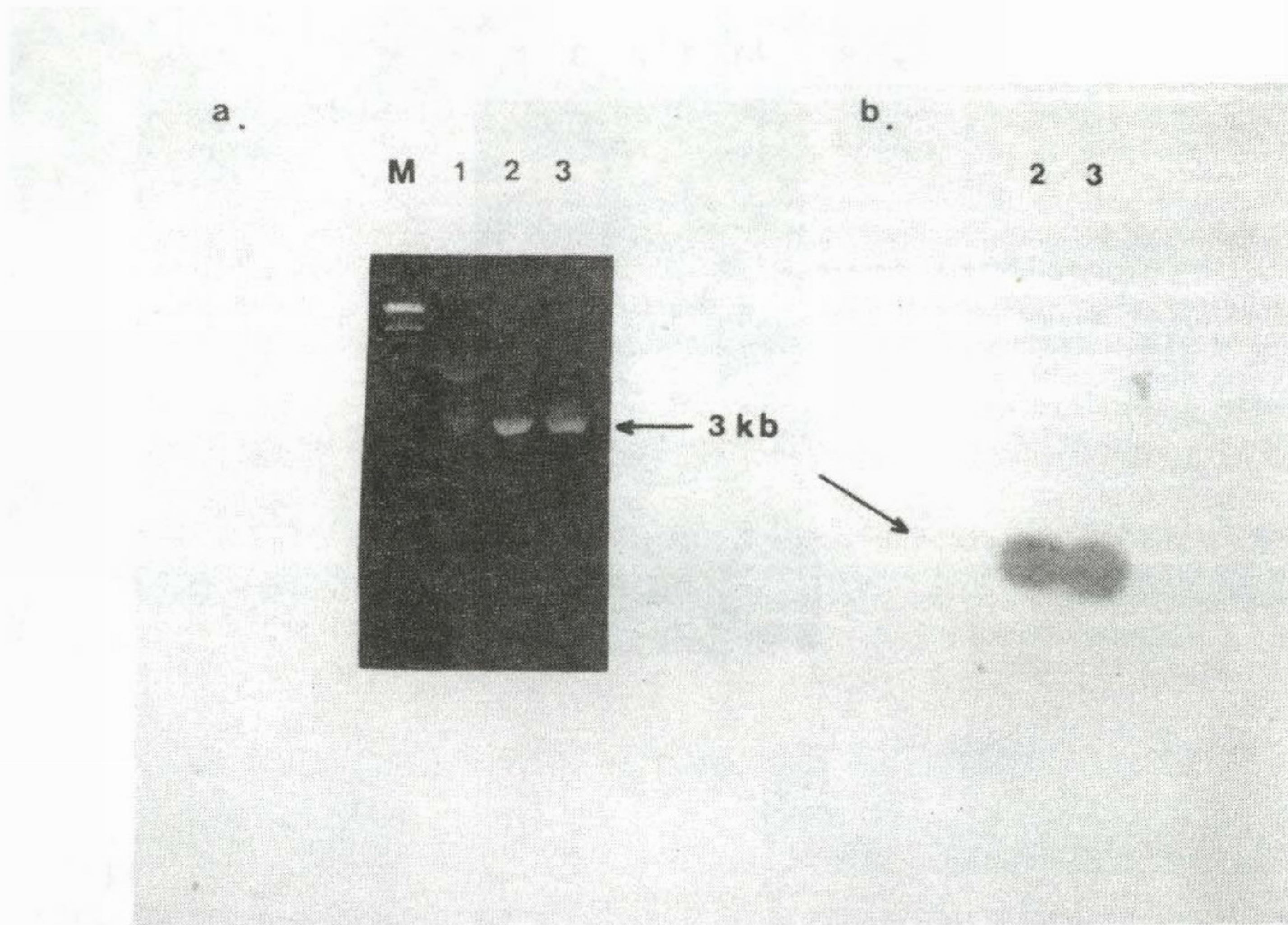
**Figure 7.** Identification of 3Kb insert from  $\lambda$ gt11-TNF

3  $\mu$ g of  $\lambda$ gt11-TNF, treated with 10 unit of EcoRI for 1 hour, was electrophoresed on 1% agarose gel (a), followed by Southern hybridization (b).

Lane M:  $\lambda$ /HindIII size marker

S:  $\lambda$ gt11-TNF/EcoRI





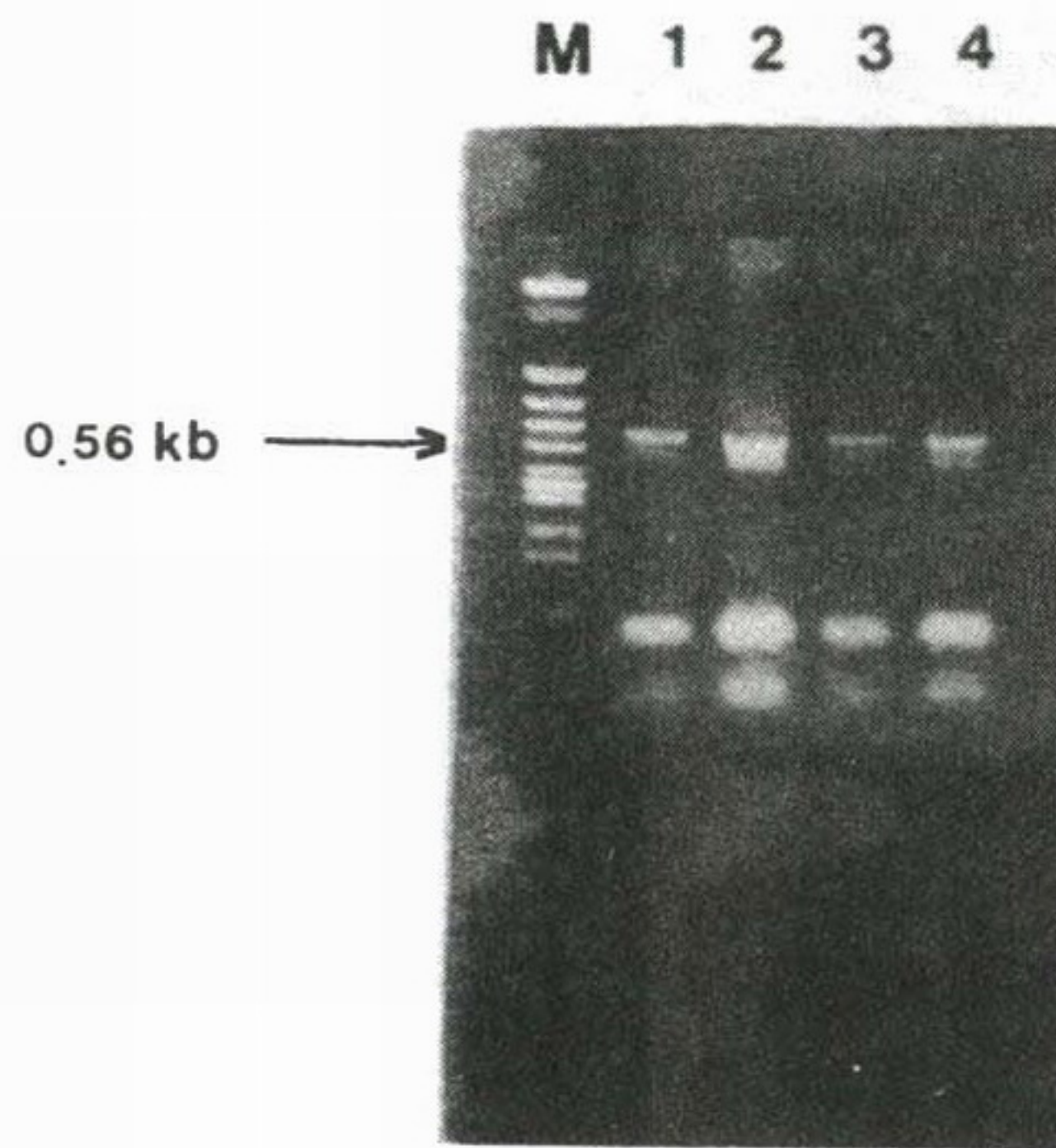
**Figure 8.** Identification of 3Kb insert from pBS II-TNF

1  $\mu$ g of pBSII-TNF, digested with 5 unit of EcoRI for 2 hours, was electrophoresed on 0.8% agarose gel (a), followed by Southern hybridization (b).

Lane M:  $\lambda$ /HindIII size marker

1: pBSII, 2: 3kb TNF gene, 3: pBSII-TNF/EcoRI

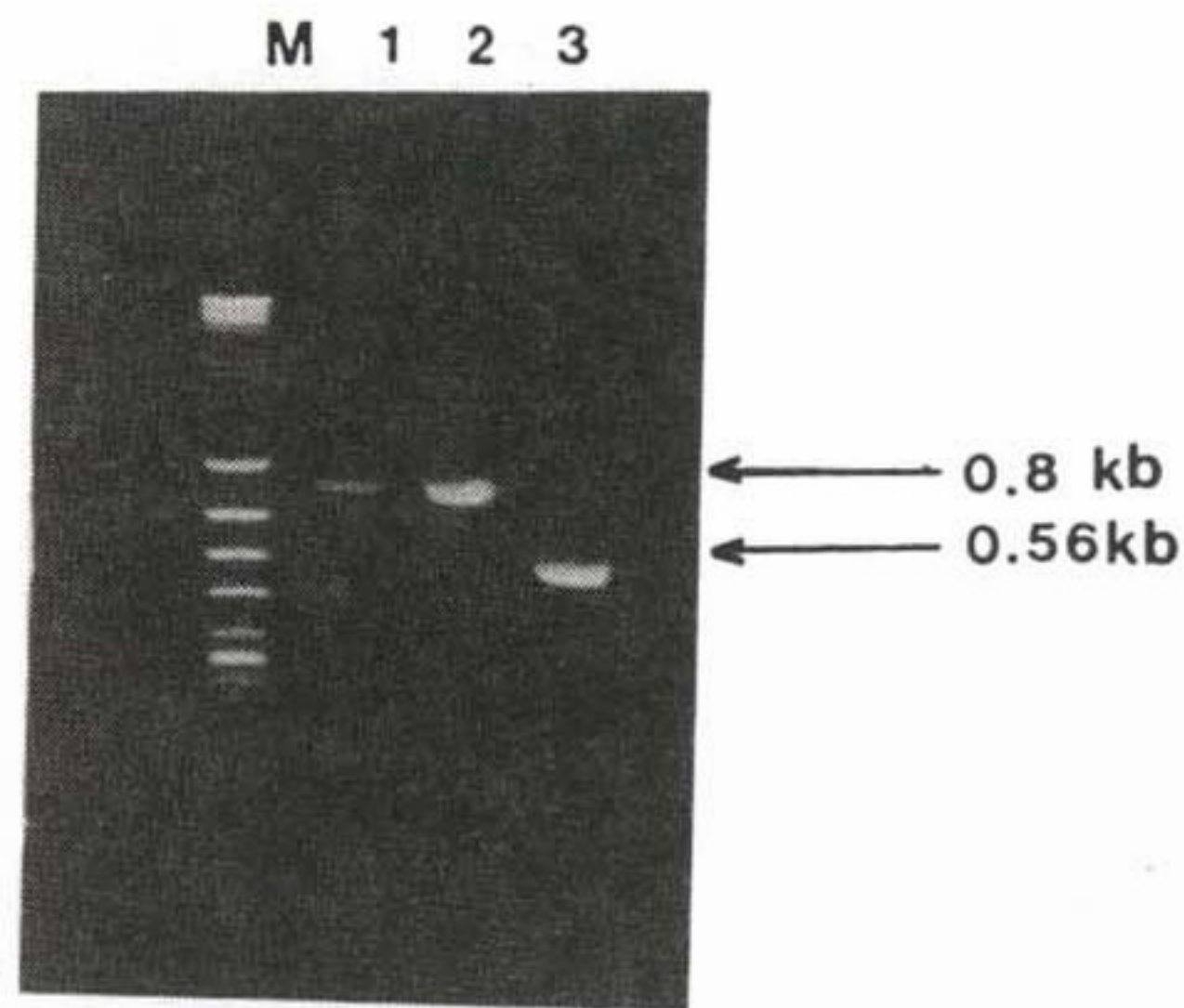




**Figure 9.** PCR (Polymerase Chain Reaction) of TNF fourth exon

PCR product, polymerized by Taq DNA polymerase treatment, was identified through 1% agarose gel electrophoresis.

Lane M:  $\lambda$ /HindIII- $\phi$ X174/HincII size marker, 1 and 3: PCR product from 3 kb TNF gene, 2 and 4: PCR product from leukocyte genomic DNA

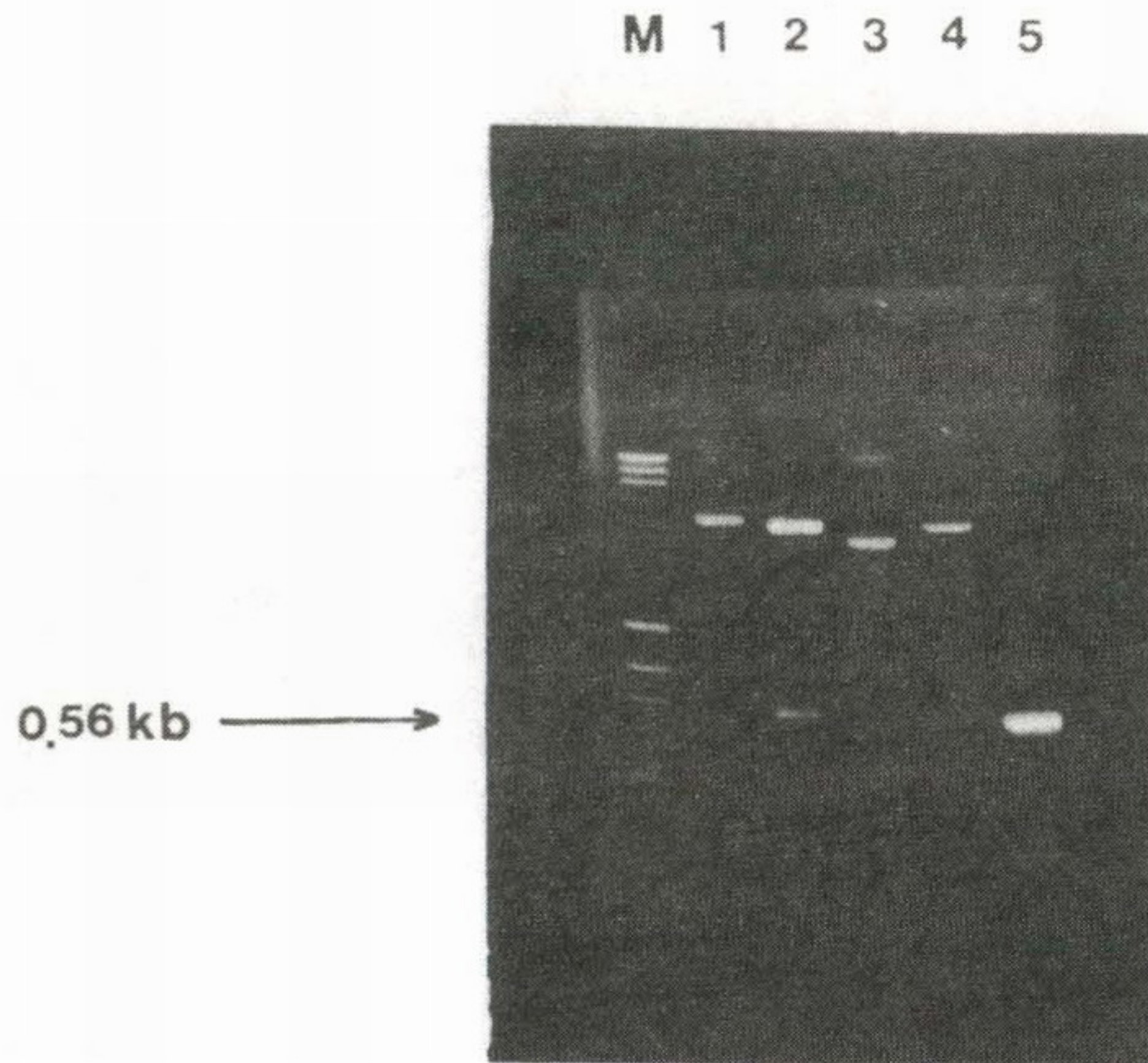


**Figure 10.** PCR (Polymerase Chain Reaction) of TNF third exon-intron-fourth exon

The PCR product, corresponding the third and fourth exon of TNF, was identified by 1% agarose gel electrophoresis.

Lane M:  $\lambda$ /HindIII- $\phi$ X174/HincII size marker, 1 and 2: PCR product of third exon-intron-fourth exon, 3: PCR product of fourth exon





**Figure 11.** Identification of 0.56 Kb insert from pTNF4SK

1  $\mu$ g of pTNF4, digested by 5 unit of BamHI and HindIII, was electrophoresed on 1% agarose gel.

Lane M:  $\lambda$ /HindIII- $\phi$ x174/HincII size marker, 1: pTNF4SK, 2: pTNF4SK/BamHI & HindIII, 3: pBSIISK, 4: pBSIISK/SmaI & HindIII  
5: PCR product of TNF fourth exon



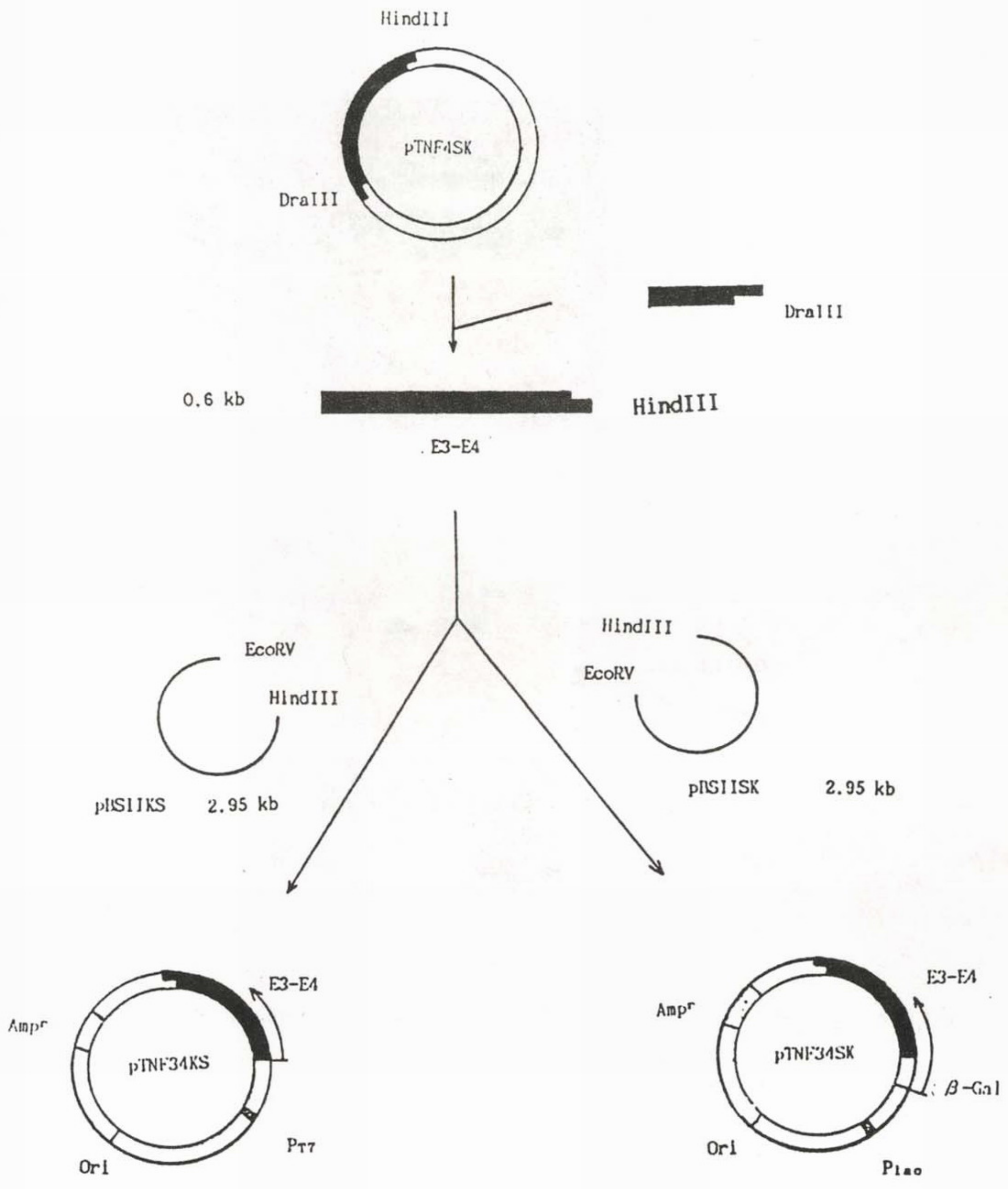
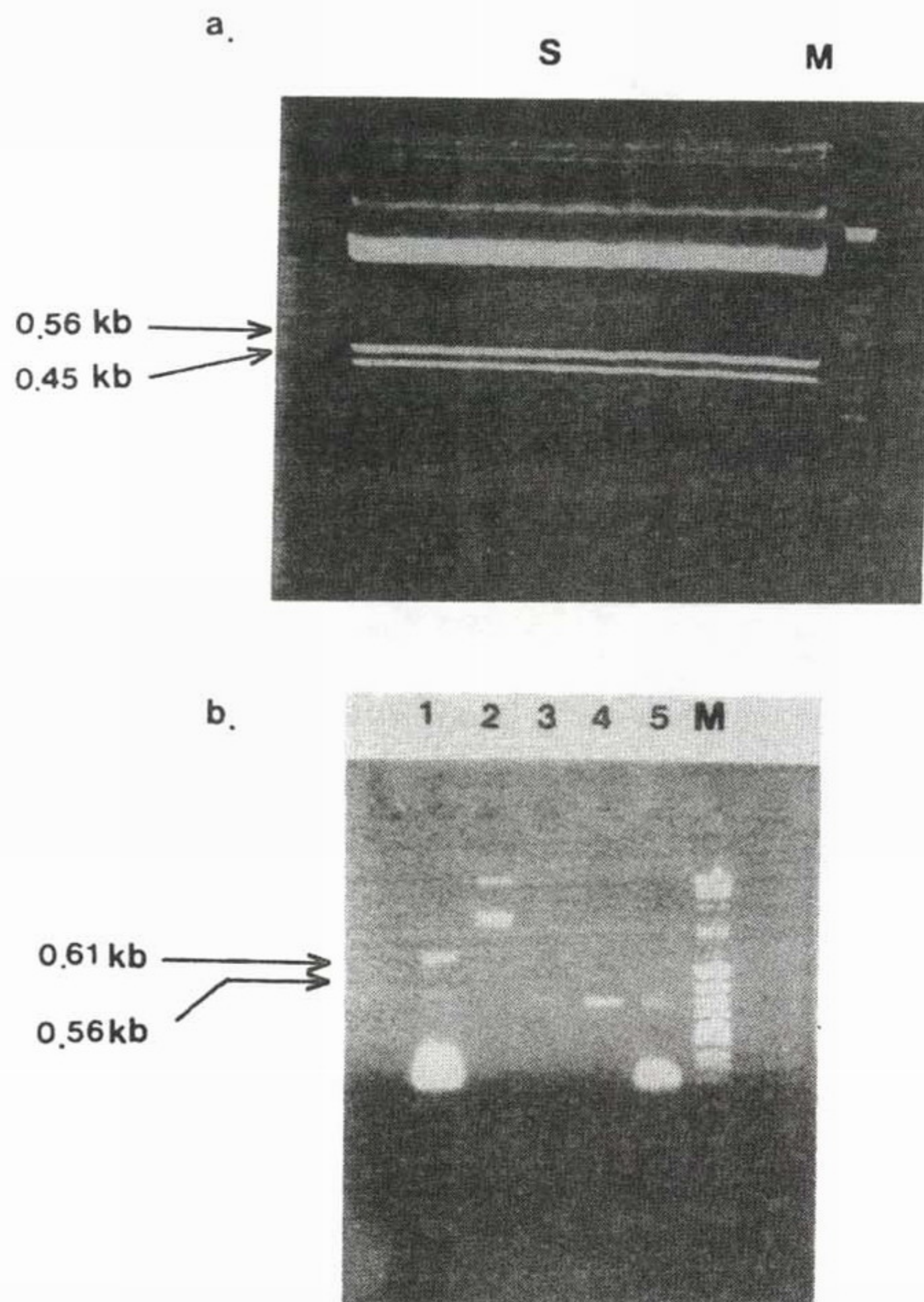


Figure 12. The cloning scheme of TNF third & fourth exon

E3: third exon of TNF gene, E4: fourth exon of TNF gene





**Figure 13.** DraIII-HindIII digestion of pTNF4SK and ligation of TNF third exon with fourth exon

DraIII-HindIII insert of pTNF4SK was isolated(a) and ligated to the third exon of TNF gene(b)

Lane M:  $\lambda$ /HindIII- $\phi$ x174/HincII size marker, 1:ligation of pBSIISK with third exon-fourth exon, 2:pTNF4SK, 3:ligation of pBSIISK with fourth exon, 4: fourth exon of TNF gene, 5: ligation of third exon with fourth exon, S: DraIII-HindIII digestion of pTNF4SK



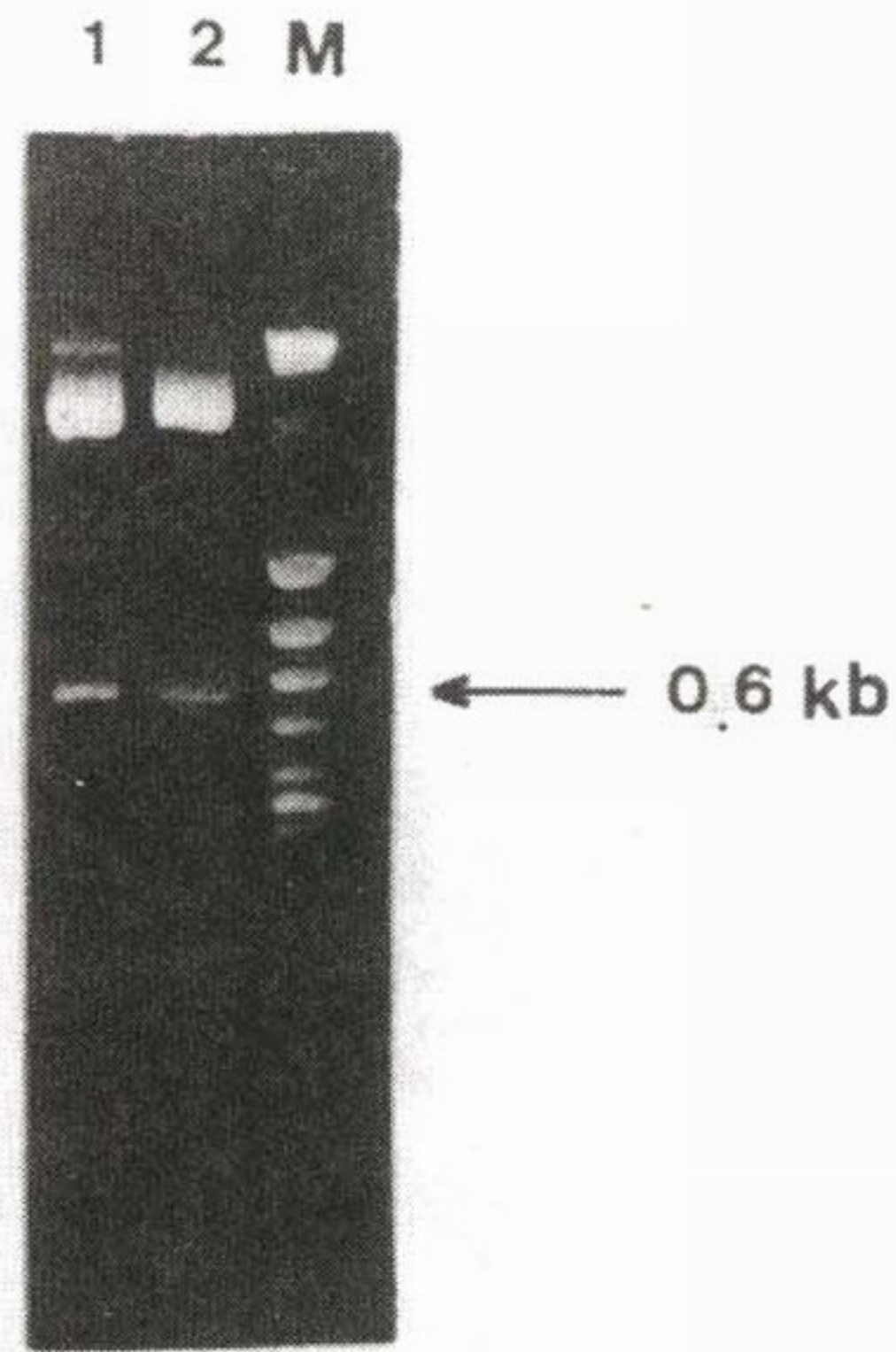


Figure 14. Identification of 0.6 Kb insert from pTNF34SK

2  $\mu$ g of pTNF34, treated with 5 unit of BamHI and HindIII respectively, were electrophoresed on 1% agarose gel.

Lane M:  $\lambda$ /HindIII- $\phi$ X174/HincII size marker, 1: pTNF34SK/BamHI & HindIII, 2: pTNF34KS/BamHI & HindIII

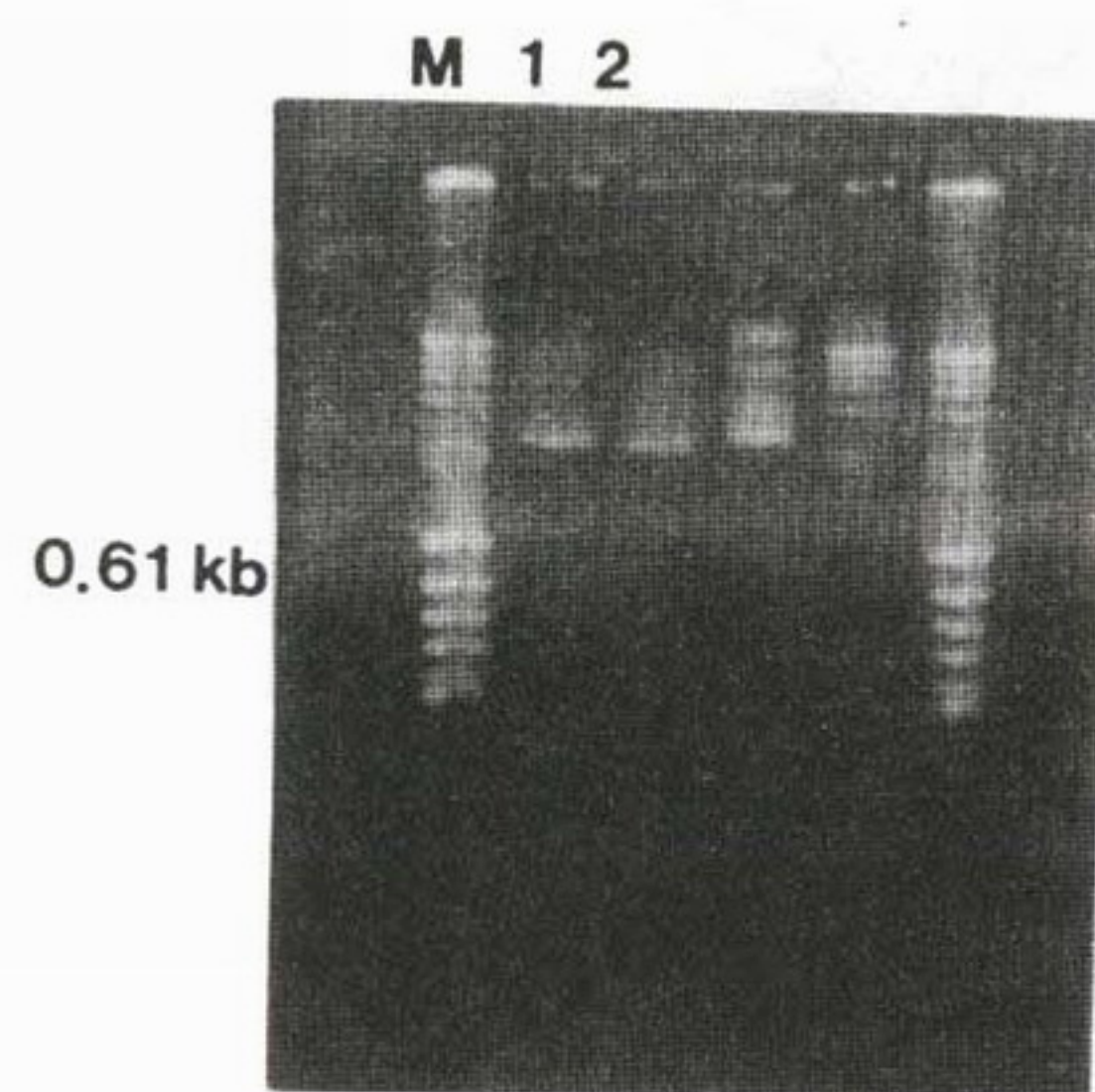


Figure 15. Restriction enzyme (EcoRI/HindIII) digestion of pT7-TNF34.



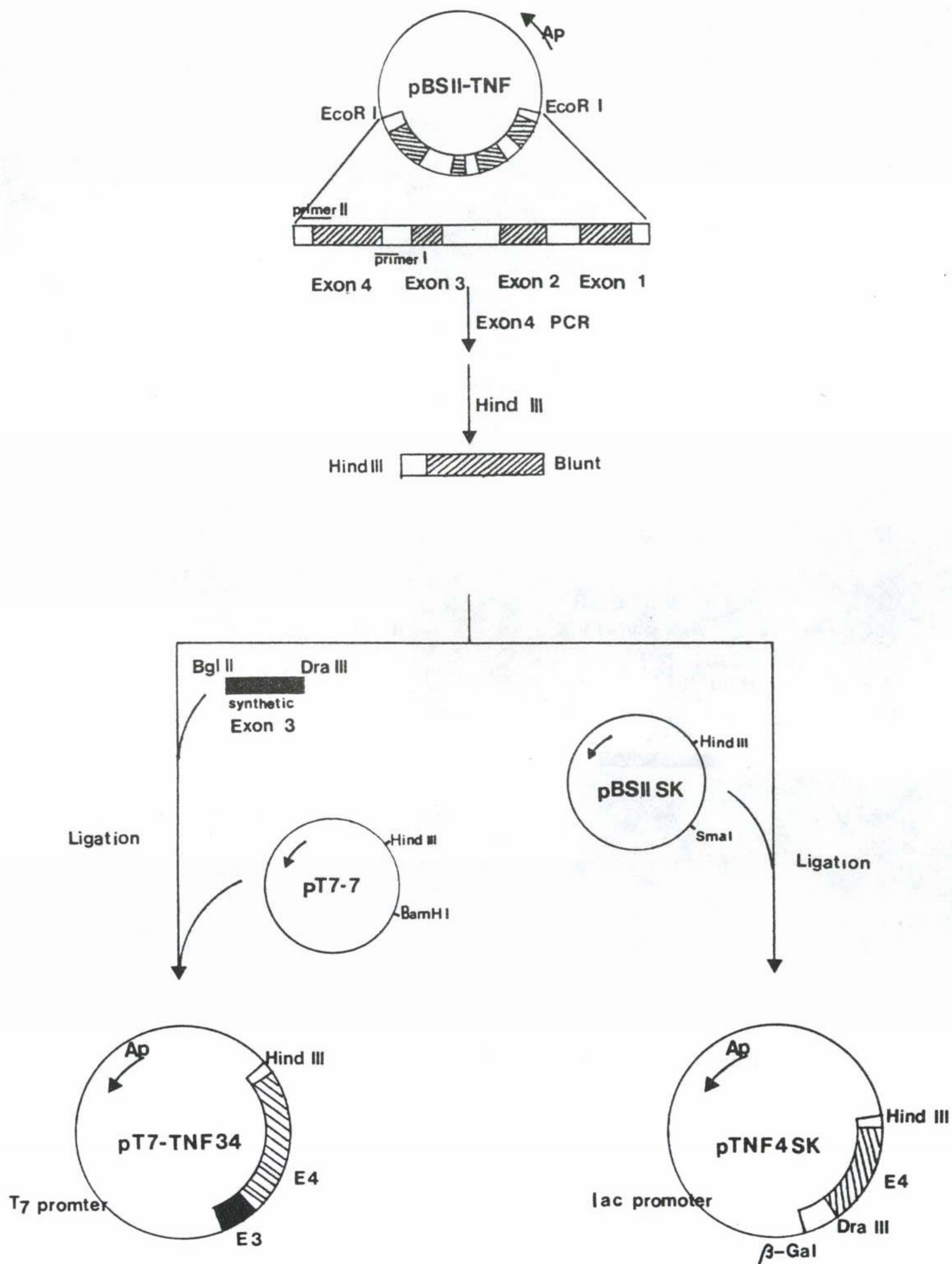


Figure 16. Scheme for the construction of expression plasmids, pTNF4SK and pT7-TNF34



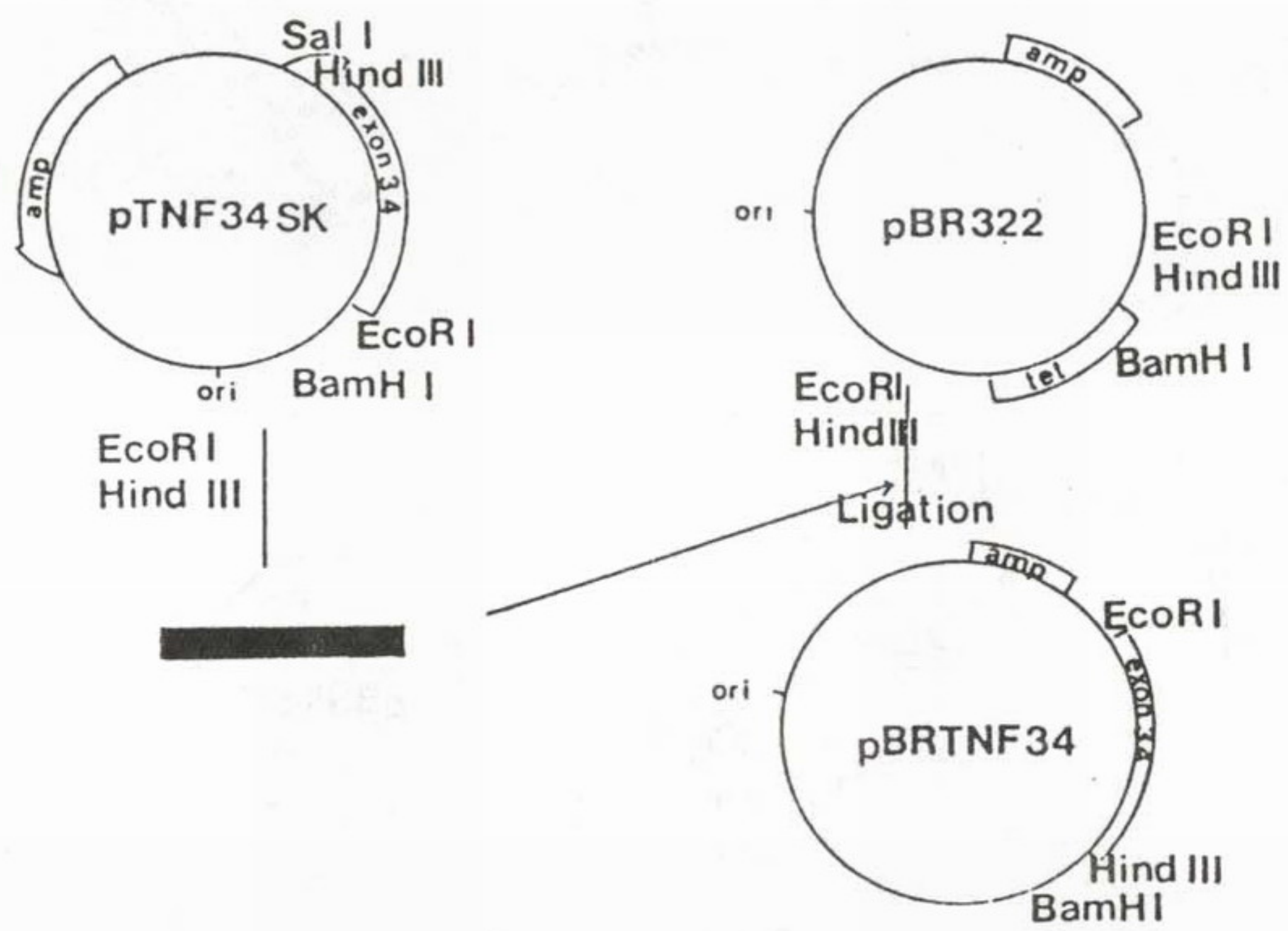
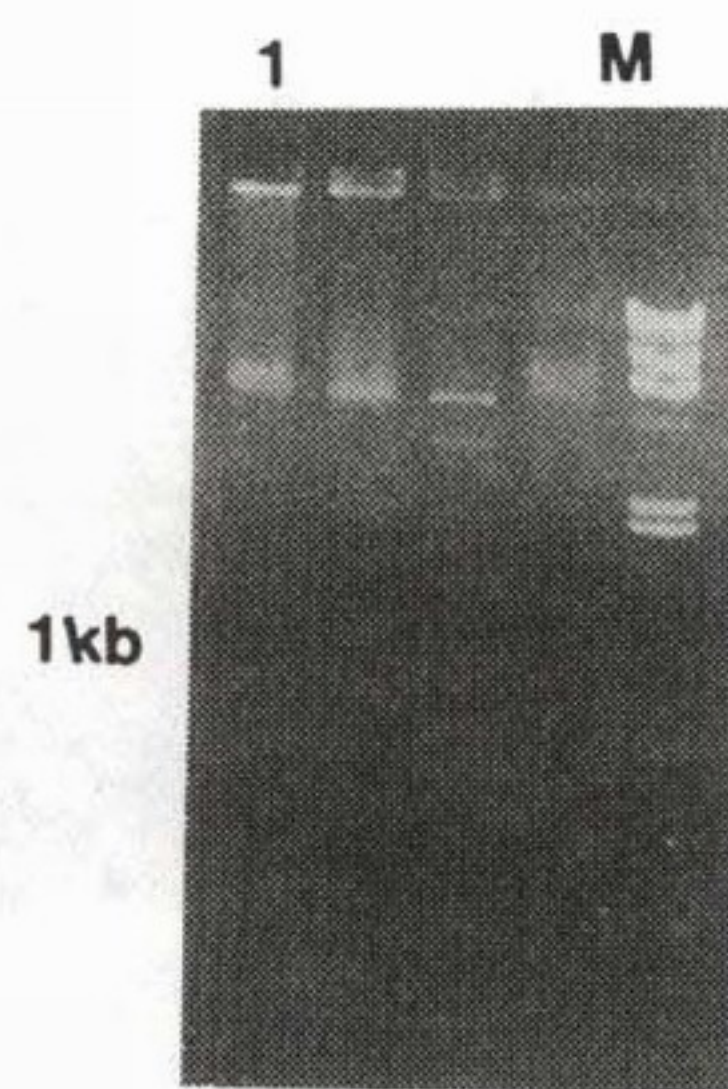


Figure 17. Construction of pBRTNF34



**Figure 18.** Restriction enzyme (EcoRI/hindIII) digestion of pBRTNF34.

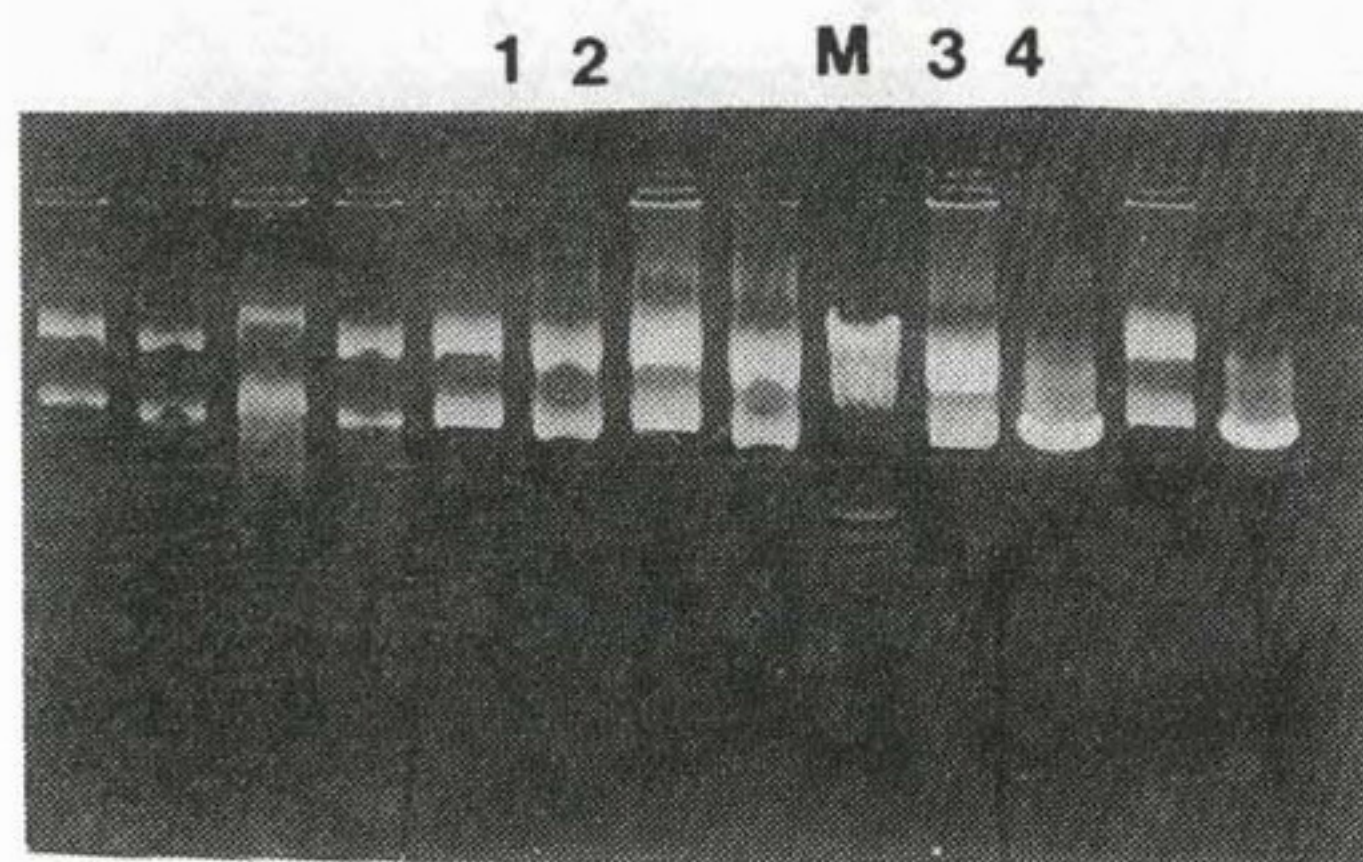


Figure 19.



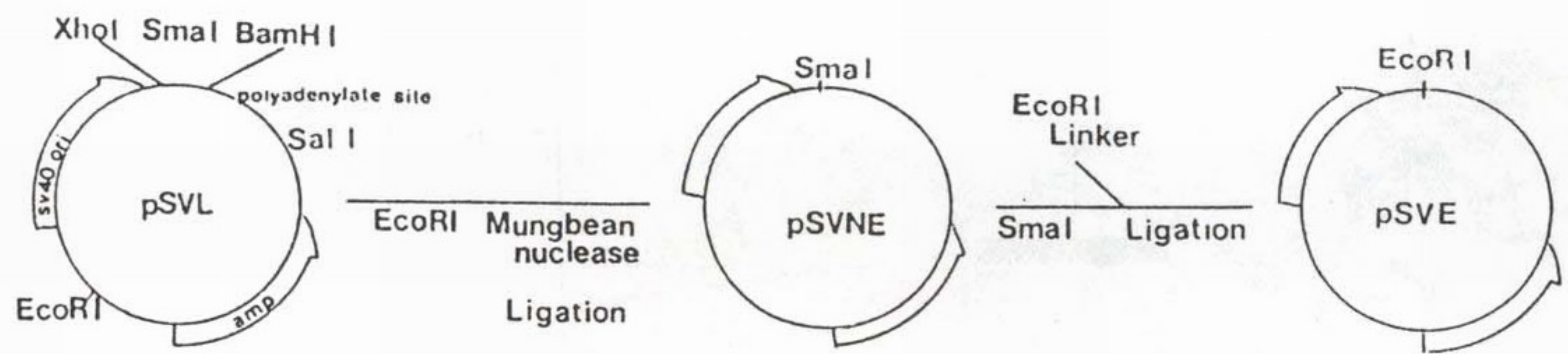


Figure 20. Construction of pSVE.

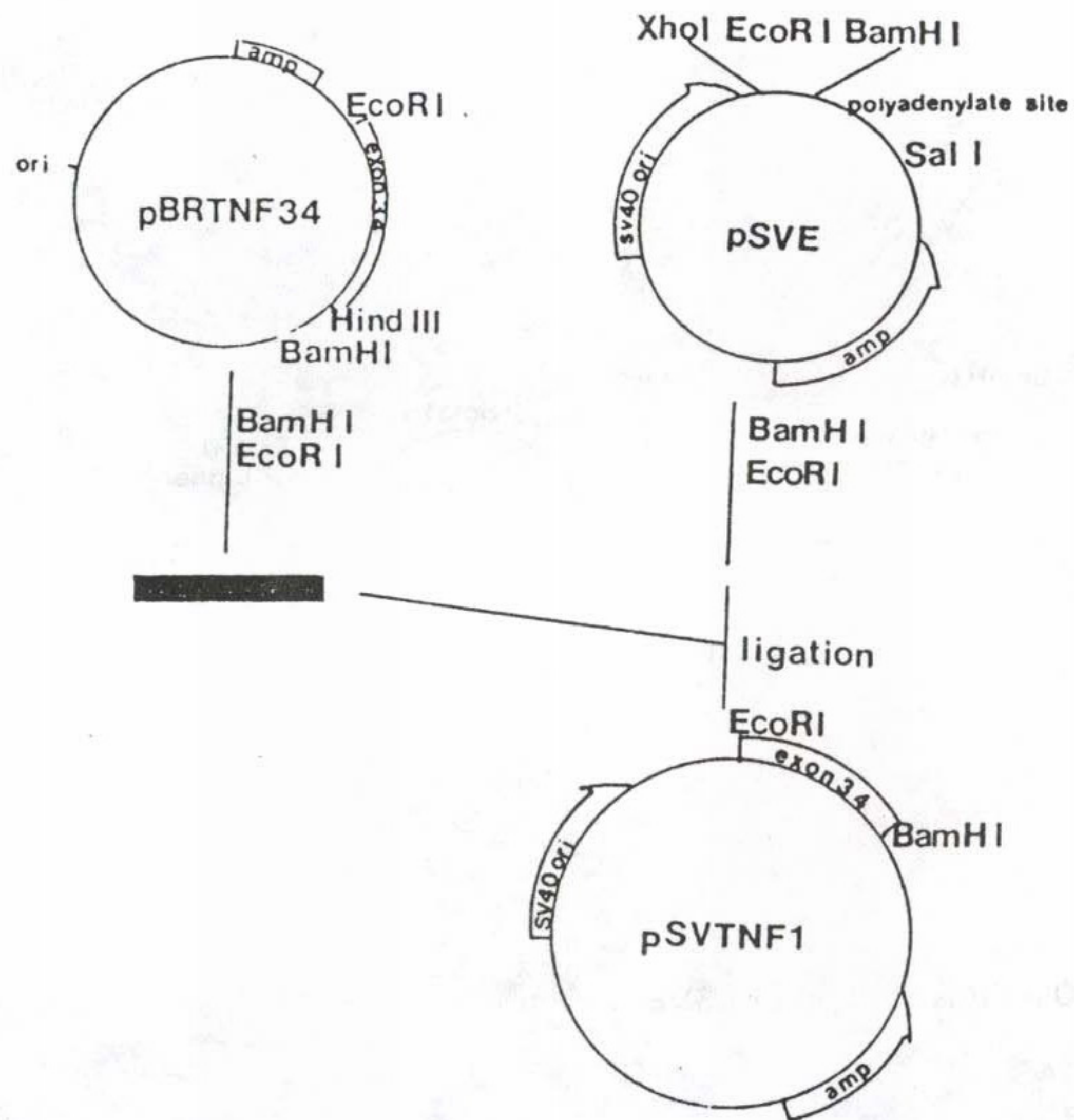


Figure 21. Construction of pSVTNF34

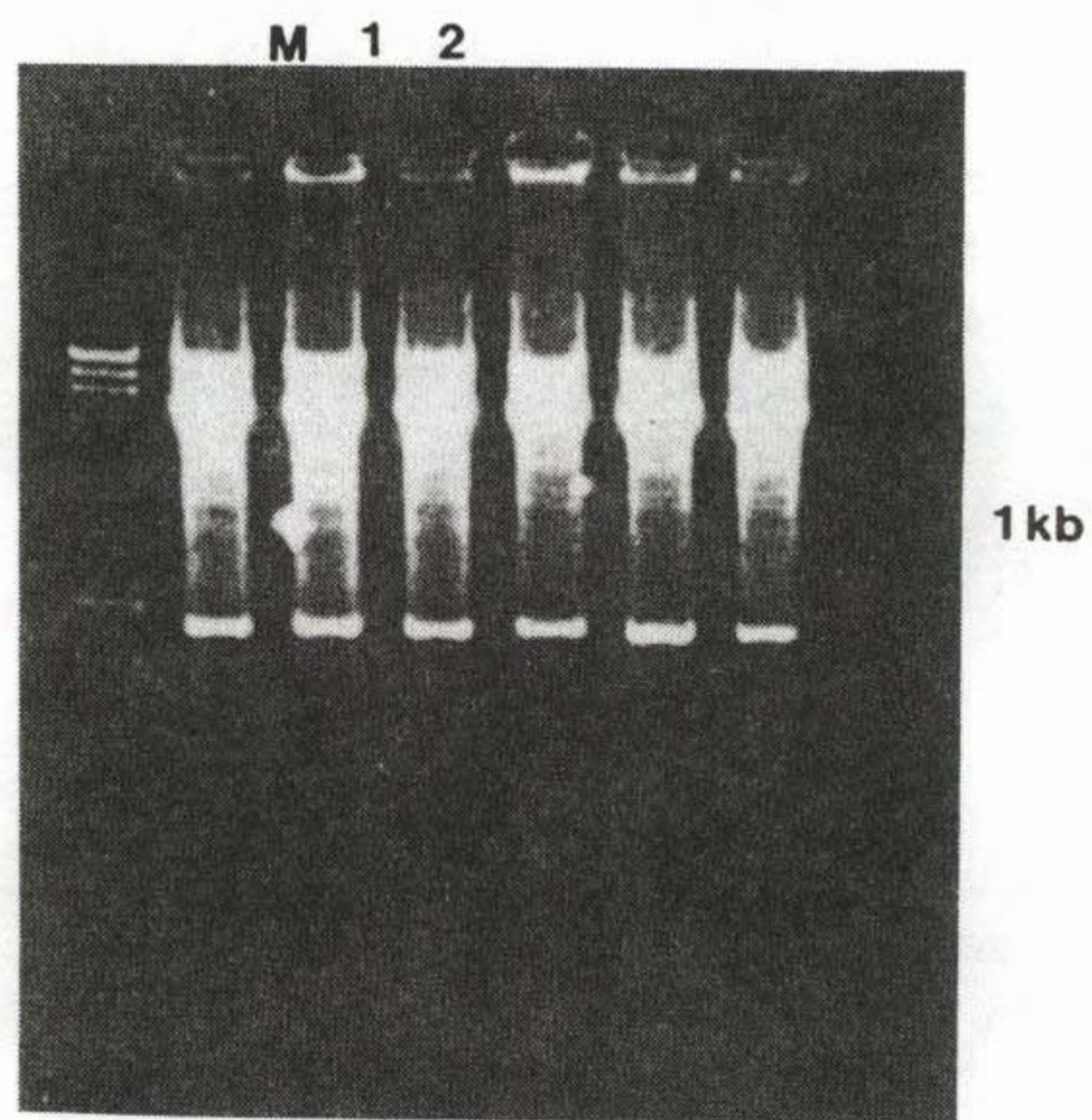


Figure 22. Restriction enzyme (EcoRI/BamHI) digestion of pSVTNF34



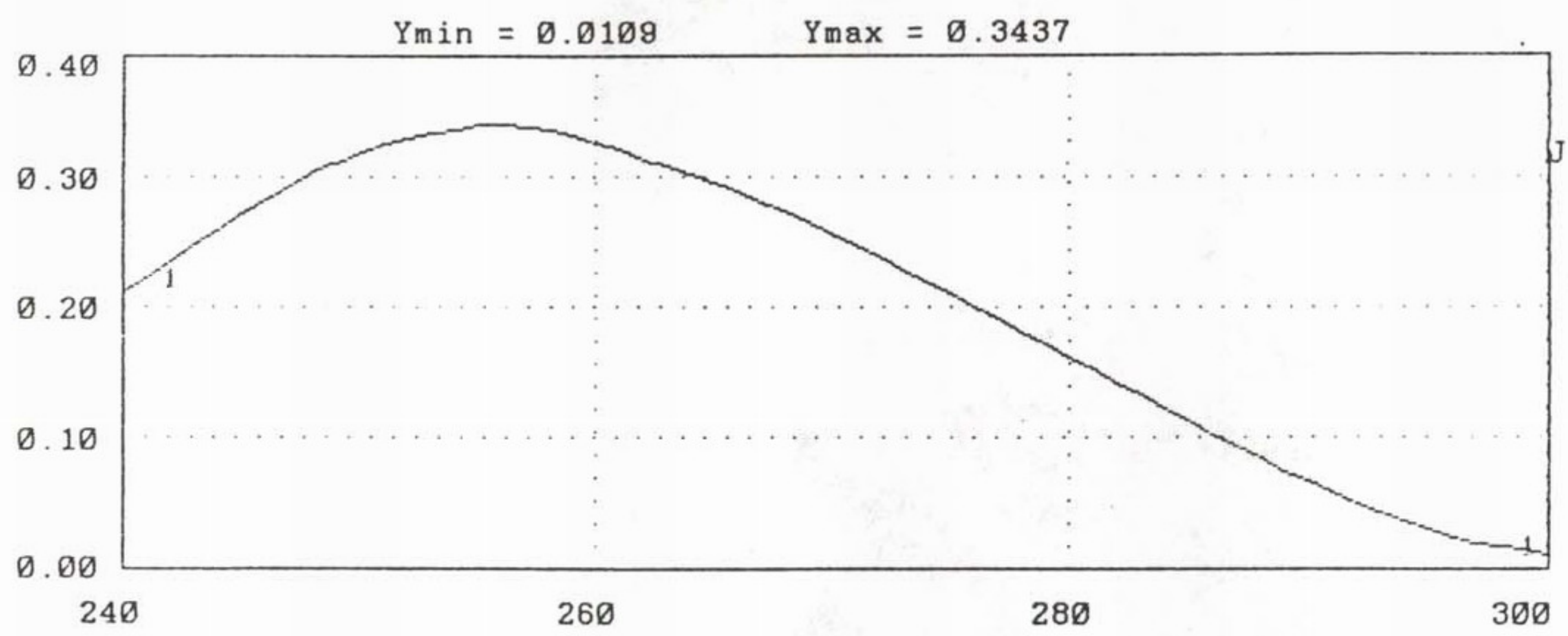


Figure 23. Determination of plasmid purity.

Track = 2 of 19/19  
 X-pos = 87.00 X-width = 1 (= 800 microns)  
 Type of beam = line Smoothing: 1  
 Peak-width.-#.Z = 2. 100. 0.0  
 Base line at 0.093 AU is average of the 16 lowest data points (Type = 1)

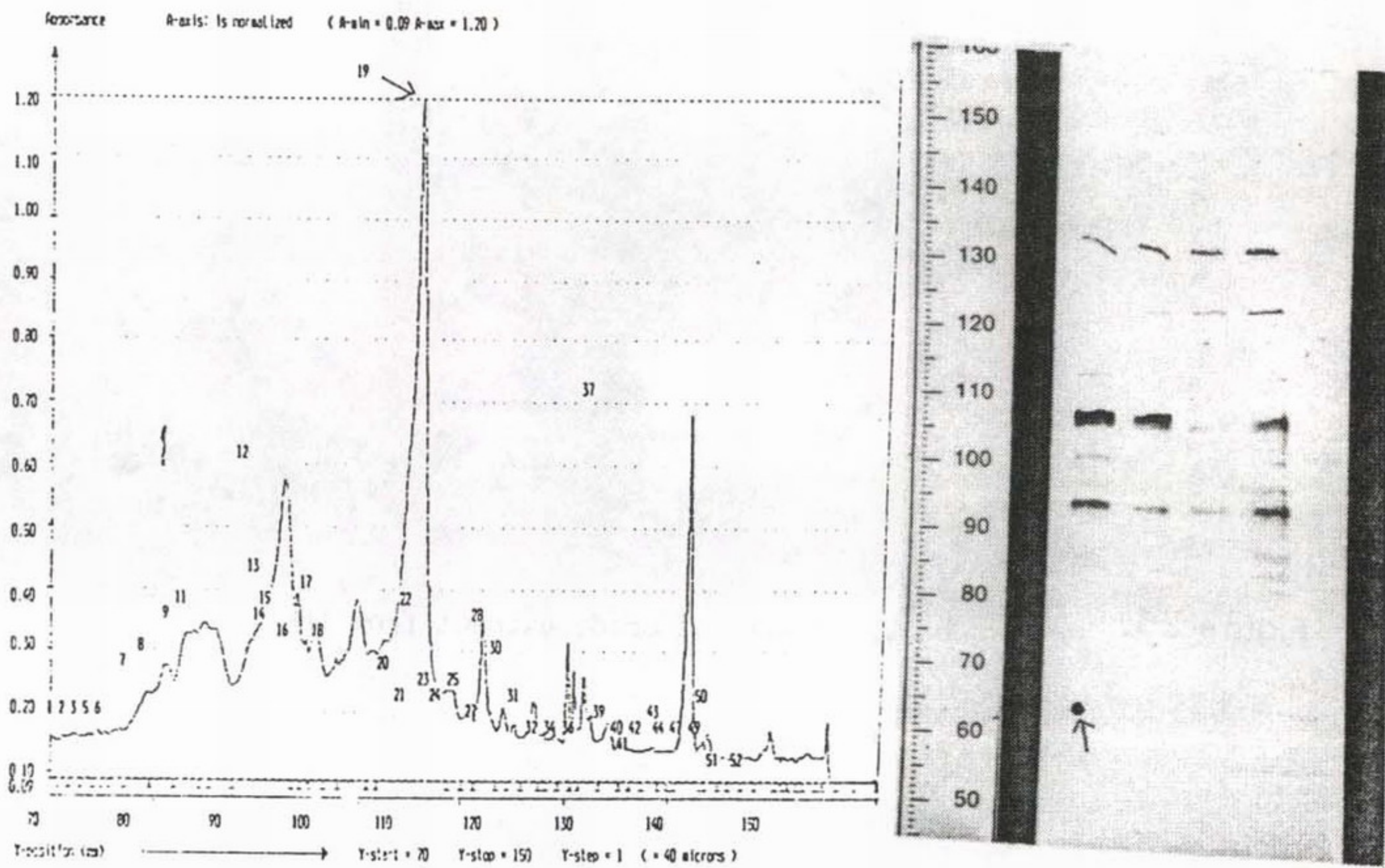
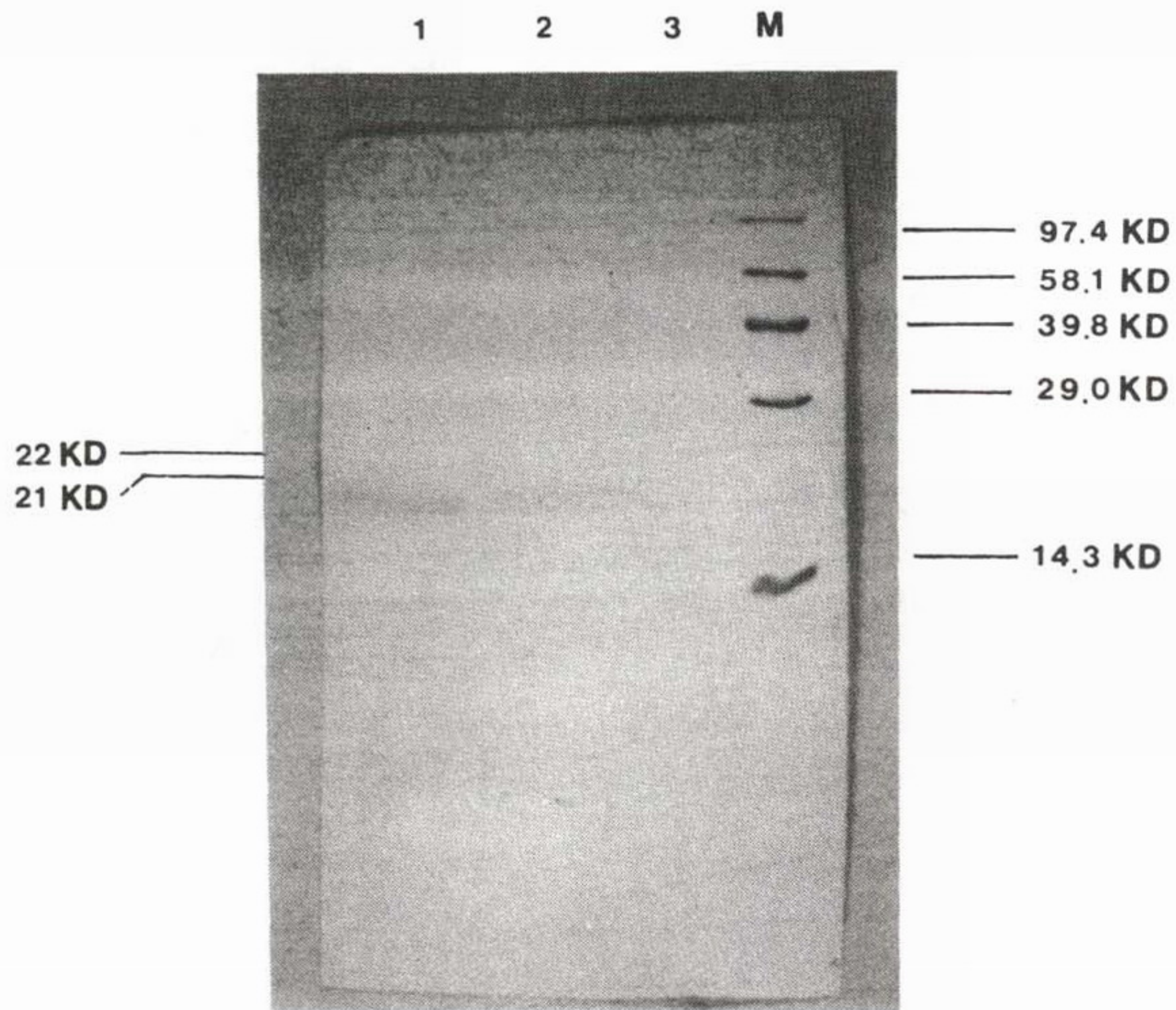


Figure 24.



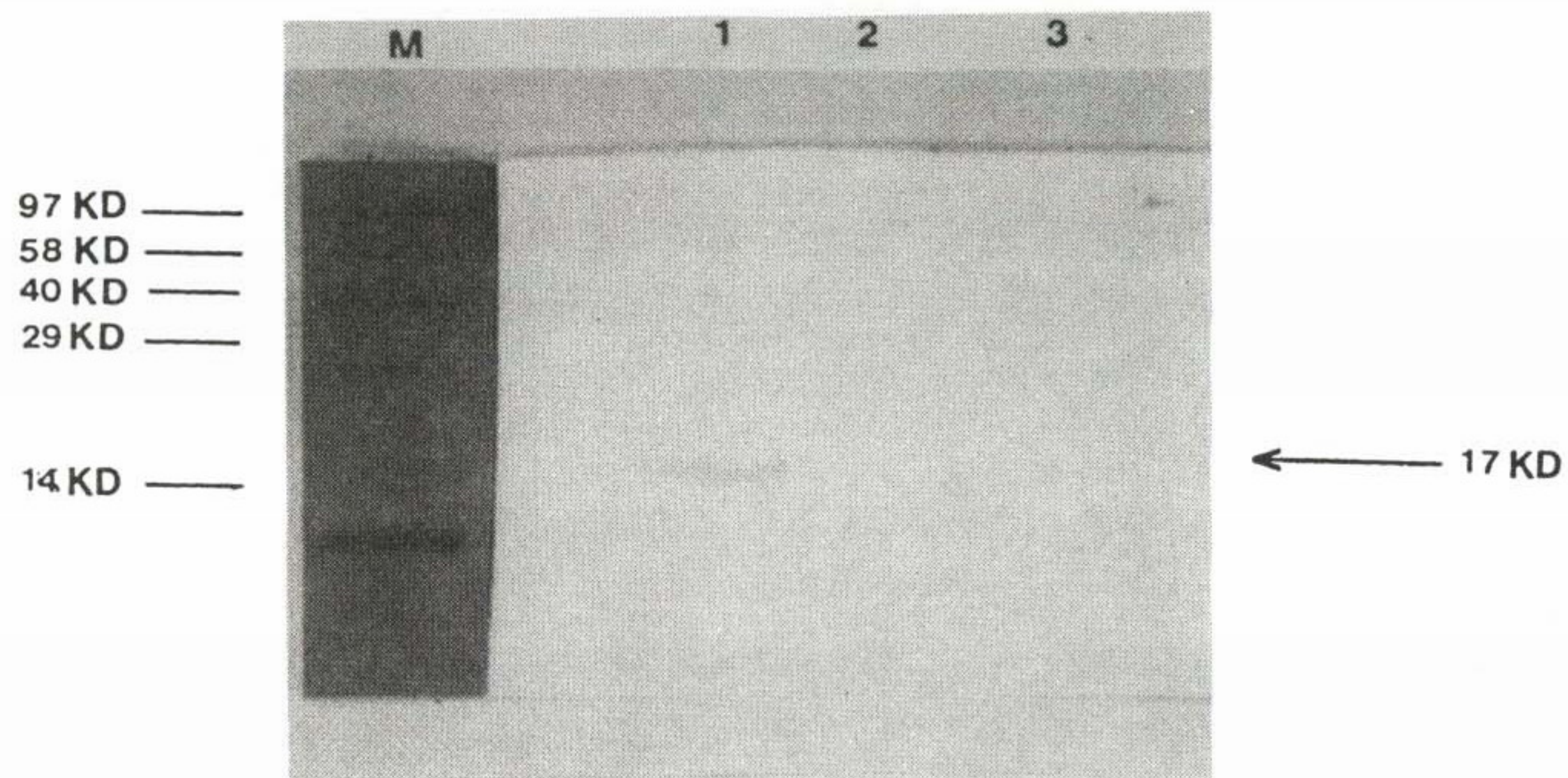


**Figure 25.** Western blot analysis of crude extract from the transformed *E. coli*

Crude extracts from the transformed *E. coli* XL1Blue/pTNF4SK and XL1Blue/pTNF34SK were electrophoresed on 12.5% SDS polyacrylamide gel and blotted on nitrocellulose membrane for immunodetection with anti-human TNF monoclonal antibody.

Lane M: Molecular weight size marker, 1: Crude extract from XL1Blue/pTNF4SK, 2: Crude extract from XL1Blue/pTNF34SK 3: Crude extract from XL1Blue/pKS11SK



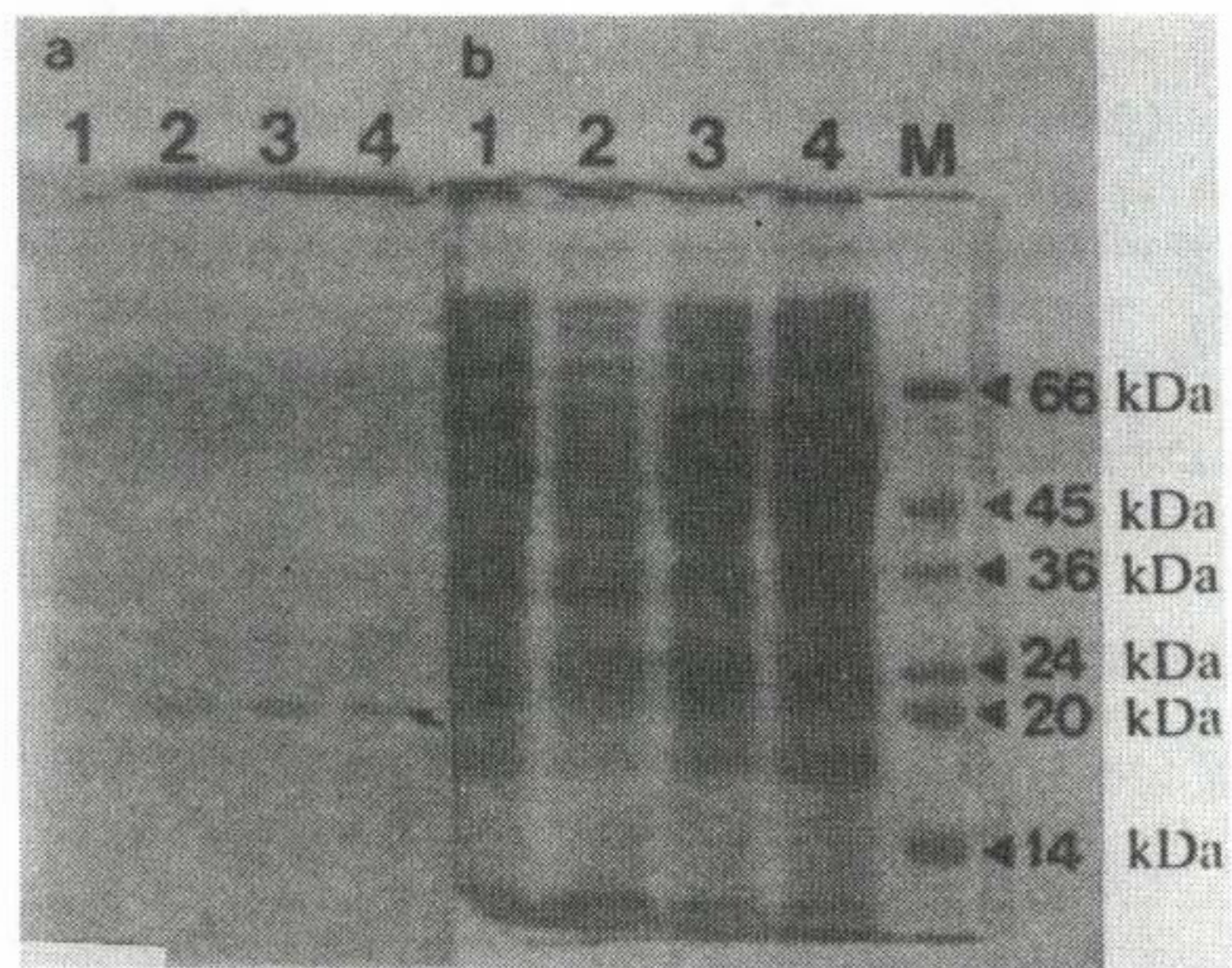


**Figure 26.** Western blot analysis of crude extract from recombinant lysogen

Crude extract from recombinant lysogen was electrophoresed on 12.5% SDS polyacrylamide gel and blotted on nitrocellulose membrane to be immunodetected using anti-human TNF monoclonal antibody.

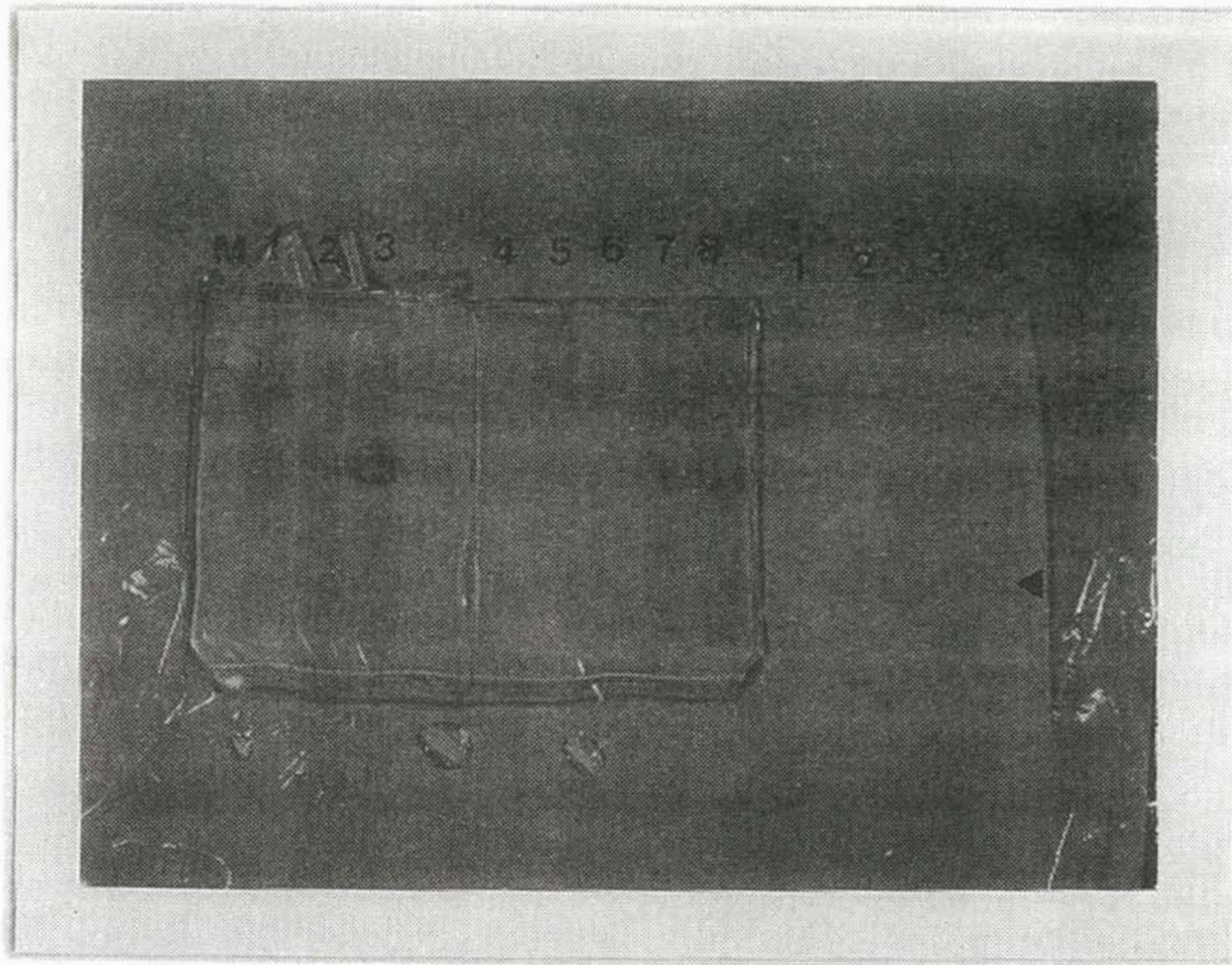
Lane M: Molecular weight size marker, 1 and 3: Crude extract from the recombinant lysogen, 2: Crude extract from the nonrecombinant lysogen





**Figure 27.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (b) and Western blotting (a) of the sonication-soluble proteins of the transformant K38(pGp1-2) carrying pT7-TNF34. Lane M, molecular weight size marker; lane 1, K38(pGp1-2) lysate; lane 2, uninduced cell lysate; Lane 3, 42 °C heat shocked cell lysate; lane 4, 42 °C heat shocked and rifampicin treated cell lysate.





**Figure 28.**

Panel A: 12.5% SDS-PAGE (Coomassie brilliant blue stained)

m; molecular weight marker

1,4; Crude extracts of SF cell infected by wild-type AcNPV

2,5; Crude extracts of SF cell infected by recombinant AcNPV

3,7,8; Inclusion body of SF cell infected by recombinant AcNPV

Panel B: Western blot analysis

1; Crude extracts of SF cell infected by wild-type AcNPV

2; Crude extracts of SF cell infected by recombinant AcNPV

3,4; Inclusion body of SF cell infected by recombinant AcNPV