

대장균에서 환경적 요인이 한탄바이러스 뉴클레오캡시드 유전자의 발현에 미치는 영향

†노갑수·김종완·하석훈·최차용
제일제당 종합연구소, ¹서울대학교 공업화학과
(접수 : 1998. 7. 29., 게재승인 : 1998. 10. 27.)

Effects of Environmental Conditions on the Expression of Hantaan Viral Nucleocapsid Gene in *Escherichia coli*

Kap Soo Noh†, Jong Wan Kim, Suk Hoon Ha, and Cha Yong Choi¹

R & D Center of Cheiljedang, Corp., 522-1, Dokpyong-Ri, Majang-Myon, Ichon-Si, Kyonggi-Do, 467-810, Korea
¹Dept of Chemical Technology, College of Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received : 1998. 7. 29., Accepted : 1998. 10. 27.)

Viruses belonging to the *Hantavirus* genus cause two acute severe illness in humans, *i.e.* Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS) and Hantavirus Pulmonary Syndrome(HPS). Among them, Hantaan virus is one of the most important viruses causing HFRS. Recombinant expression vectors, pKK-NP and pET-NP, with Hantaan viral nucleocapsid gene were constructed, and used to transform *Escherichia coli* BL21(DE3). Stability of the vectors in the host strain, and effects of some environmental conditions on the expression of nucleocapsid gene were studied. Expression vector, pKK-NP, was very unstable, and the expression level of nucleocapsid gene was very low compared to that of pET-NP. BL21(pET-NP) produced about 100 mg of N protein per liter of culture broth. Induction time did not show any significant difference on the expression level of nucleocapsid gene and cell growth. BL21(pET-NP) culture at 35 °C showed a little higher expression level than at 30 °C during growth phase, but reached to the same level at stationary phase. Total expression level was proportional to supplemented glucose concentration of media up to 0.5% along with cell growth, but expression level per unit cell mass was inversely proportional to glucose concentration and maximal when glucose was not supplemented at all.

Key Words : Hantaan virus, Nucleocapsid protein, Expression, Environmental conditions

서 론

현재까지 적어도 약 10 여종 이상이 알려져 있는(1,2) 한타 바이러스 속 (*Hantavirus* genus)의 바이러스들은 *Bunyaviridae* 과에 속하며 지역 특유의 설치류를 매개로 하여 전세계적으로 분포하고 있으며 해를 거듭함에 따라 새로운 혈청형에 대한 보고가 이어지고 있다. 이러한 바이러스들은 인간에게 신증후출혈열 (Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome; HFRS) 과 한타바이러스폐증후군(Hantavirus Pulmonary Syndrome, HPS)이라는 2종의 심각한 질병을 유발하는데 신증후출혈열은 주로 유라시아 지역에서 발병한다. 한탄바이러스 (Hantaan virus), 서울바이러스 (Seoul virus)와 푸말라바이러스 (Puumala

virus)가 이 질병과 관련된 대표적인 혈청형들이다. 이러한 바이러스들에 의해 야기되는 신증후출혈열의 증상은 유사하지만 혈청형에 따라서 심한 정도에 차이가 있다. 한탄이 가장 심하여 높은 치사율을 보이며 다음은 서울, 그리고 푸말라는 가장 경미한 증상을 보인다. 한탄은 한국을 포함한 아시아와 동유럽 국가 일부 지역에서 주로 분포하며 푸말라는 스칸디나비아 반도를 포함한 유럽국가에 주로 분포한다. 서울은 대도시 주변의 집쥐를 매개로 전세계적으로 분포한다. 신증후출혈열은 전세계적으로 매년 약 15만명 정도의 환자가 발생하여 병원에 입원하고 있으며 치사율은 지역에 따라 다르지만 약 3~10%에 이른다.

한타바이러스폐증후군 (Hantavirus Pulmonary Syndrome)은 1993년 4월 최초 발병의 발견 이후 1996년까지 남북 아메리카 지역에서만 약 150 여명의 환자가 보고되어 이중 42%가 사망하였다. 남북 아메리카 지역에서는 신증후출혈열과는 증상에 상당한 차이가 있는 한타바이러스폐증후군 이라는 매우 심각한 질병을 유발하는 것으로 알려져 있는 신놈브리바이러스(Sm nombre)가 분포한다. 이 질병은 급격한 호흡장애를 일으킨다는 점에서 신부전증으로 대표되는 신증후출혈열과는 증상에 있어 큰 차

† Corresponding Author · R&D Center of Cheiljedang, Corp., 522-1, Dokpyong-Ri, Majang-Myon, Ichon-Si, Kyonggi-Do 467-810, Korea
Tel : 0336-639-4337, Fax : 0336-632-2784
e-mail : ksnoh@cheiljedang.com

이를 보인다.

따라서 이러한 질병의 조속한 진단이나 백신 개발과 관련하여 많은 연구가 있었지만 대부분 쥐의 뇌에 접종하거나 세포 배양을 통해 증식된 바이러스를 이용하였다. 그러나 이러한 방법들은 바이러스 증식 수율이 매우 저조하고 작업자들의 바이러스 감염에 대한 노출 위험성과 대량의 항원 확보를 위해서는 설비 문제가 제기된다. 따라서 본 연구자들은 한타바이러스 속의 바이러스들의 주요 항원으로 알려진 3개 항원(외피 당단백질인 G1, G2와 RNA genome을 싸고 있는 뉴클레오캡시드 단백질)(3) 중에서, 특히 진단용 항원으로서의 유용성이 알려진 바 있는 한타바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질 (nucleocapsid protein; N protein)을 대장균에서 생산코자하여 뉴클레오캡시드 유전자를 클로닝하여 발현을 확인하였으며 또한 이 단백질을 90% 이상의 순도로 정제한 바 있다(한국생물공학회지 13권 6호). 여기서는 뉴클레오캡시드 유전자의 발현 효율과 관련하여 발현량의 용이한 분석방법과 이를 이용한 제반 배양조건이 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

균주, 시약 및 재료

한타바이러스의 뉴클레오캡시드 유전자의 발현을 위한 재조합 플라스미드는 Figure 1에서 보는 바와 같이 플라스미드 pET-3a(4)의 *EcoR* I과 *Bam*H I 부위에 유전자가 클로닝된 재조합 플라스미드 pET-NP와 플라스미드 pKK223-3(5)의 *EcoR* I과 *Sma* I 부위에 유전자를 클로닝한 재조합 플라스미드 pKK-NP를 사용하였다. 발현을 위한 숙주 세포는 대장균 BL21(DE3)(4)을 사용하였다. 뉴클레오캡시드 단백질의 EIA를 위한 1차 항체로는 자체에서 제작한 hybridoma로부터 생산된 한타바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질에 대한 단일군 항체 ht90-40을 사용하였으며 2차 항체로는 horse radish peroxidase가 conjugation된 anti-mouse IgG를 Accurate Chemicals and Scientific시(Westbury, New York, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

균체의 배양 및 파쇄

재조합 대장균의 배양을 위한 배지는 LG-ampicillin broth (NaCl 10 g, tryptone 10 g, yeast extract 5 g, glucose 2 g, ampicillin 50 mg/L, pH 7.0)와 LG-ampicillin agar(2%)를 사용

하였으며 발현을 위한 배양은 35°C와 200 rpm으로 세팅된 rotary shaker에서 baffle이 달린 삼각 플라스크에 접종하여 배양하였다. 배양액의 흡광도(A_{600})가 0.5~0.8에 도달했을 때 IPTG를 0.5 mM의 농도로 첨가하여 4~8시간 더 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 균체를 회수하고 0.8% NaCl 용액으로 1회 세척하였다.

회수된 균체는 배양액의 1/20 부피의 Tris 버퍼(50 mM, pH 8.0)에 현탁하여 초음파기(Fisher Dismembrator Model 300)를 사용하여 균체를 파쇄하였고 필요한 경우 파쇄의 정도를 Bradford assay(6) 방법을 써서 파쇄액의 단백질 농도가 더 이상 증가하지 않을 때까지 수행하였다.

EIA에 의한 뉴클레오캡시드 단백질의 정량

재조합 대장균의 뉴클레오캡시드 단백질의 발현량을 측정하기 위해서는 Andrew 등(7)의 ELISA 방법을 기본으로 하여 다음과 같이 측정하였다. 균체 파쇄 후 원심분리를 통해 얻은 상등액을 sodium bicarbonate 버퍼(50 mM, pH 9.6)에 적정농도로 희석하여, 96 well의 ELISA용 plate(Costar, Massachusetts, USA, cat. no. 3590)의 각 well에 100 μ l씩 넣고 4°C에서 16시간 동안 코팅하였다. 이때 콘트롤로 이미 농도를 알고 있는 정제된 뉴클레오캡시드 단백질도 같이 코팅하였다. 이후 100 μ l의 3% BSA로 37°C에서 2시간 blocking하였다. 0.05% Tween-20이 포함된 PBS 버퍼(8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na_2HPO_4 , 0.24 g KH_2PO_4 /L, pH 7.4)로 3회 세척한 후 한타바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질에 대한 단일군 항체 ht90-40을 100 μ l씩 첨가하고 37°C에서 2시간 반응시켰다. 3회 세척 후 2차 항체로 horse radish peroxidase(HRP)가 conjugation된 mouse IgG를 $10^3 \sim 10^4$ 회 희석하여 100 μ l씩 첨가하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. 3회 세척 후 1 mg/mL OPD (*o*-phenylenediamine dihydrochloride) 및 0.03% H_2O_2 가 함유된 0.1 M citrate phosphate 버퍼(pH 4.9) 100 μ l을 넣어 차광하여 실온에서 20~30분 후 1 M 황산을 50 μ l을 넣어 반응을 정지시키고 MICRO ELISA READER (Dynatech Product MR580)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 콘트롤의 흡광도에 따른 뉴클레오캡시드 단백질의 calibration curve를 작성하고 샘플의 흡광도에 따른 뉴클레오캡시드 단백질의 농도를 계산하였다.

플라스미드의 안정성 연구

재조합 대장균이 함유하고 있는 발현 플라스미드의 균체 내에

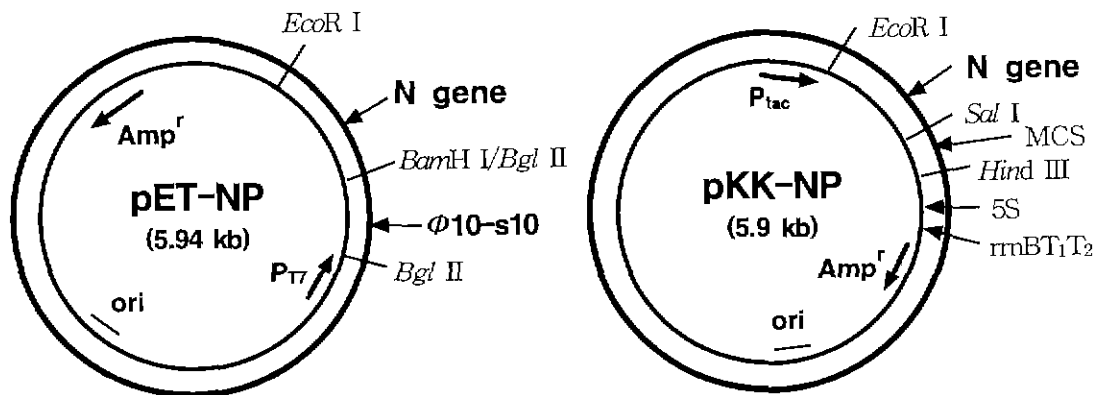


Figure 1. Structures of recombinant expression plasmids pET-NP and pKK-NP.

서의 segregational instability의 조사를 위해서는 액체 배지에서 계대 배양하면서 배 계대배양 시 접종할 때의 희석배수와 흡광도에 따라 액체 배지에서 generation 수를 계산하고 계대배양 시 취한 배양액을 희석하여 LG agar 배지에 도말하여 여기서 자란 단일콜로니들을 다시 LG-ampicillin agar에 옮겨 자란 단일콜로니들의 수를 세어 백분율로 계산하였다.

결과 및 고찰

발현된 뉴클레오텍시드 단백질의 정량

대장균에서 발현되는 뉴클레오텍시드 단백질의 정량은 당초 western blot을 통한 발색 정도로만 확인할 수 있었다. 따라서 유전자 재조합 대장균의 균체 파쇄액 중에 포함되어 있는 뉴클레오텍시드 단백질의 양을 측정하기란 매우 힘들었다. 뉴클레오텍시드 단백질 발현의 최적 조건에 대한 연구를 수행하기 위해서는 뉴클레오텍시드 단백질의 발현량을 쉽게 측정할 수 있는 방법이 필요했다. 따라서 이미 정제하여 농도를 알고 있는 뉴클레오텍시드 단백질을 이용하여 ELISA법으로 정량이 가능한지를 시험해 보았다. 이미 알고 있는 농도의 뉴클레오텍시드 단백질을 적정 농도로 제한 희석하여 96 well EIA plate에 코팅하고 재조합 균주를 초음파기로 파쇄한 후 원심분리하여 상등액을 회수하여 역시 적정 배수 제한 희석하여 동일한 방법으로 96 well plate에 코팅하였다. 여기에 뉴클레오텍시드 단백질에 대한 마우스의 단일군 항체와 반응시킨 후 HRP로 커플링된 2차 항체를 붙여 OPD와 H₂O₂를 사용하여 발색 반응을 시키고 발색 정도는 ELISA reader로 490 nm에서 흡광도로 측정하였다. 물론 이 실험에는 대장균 유래의 단백질에 대한 background 값을 알아보기 위해 뉴클레오텍시드 단백질을 발현하지 않는 대장균의 균체 파쇄액을 negative control로 사용하였으나 negative control에서는 발색 반응을 나타내지 않았다. 시험 결과 ELISA 방법으로 균체 파쇄액 중의 뉴클레오텍시드 단백질의 양을 측정할 수 있음을 알았다. 이미 알고 있는 뉴클레오텍시드 단백질의 농도와 ELISA를 통해 측정된 흡광도(A₄₉₀)와의 calibration

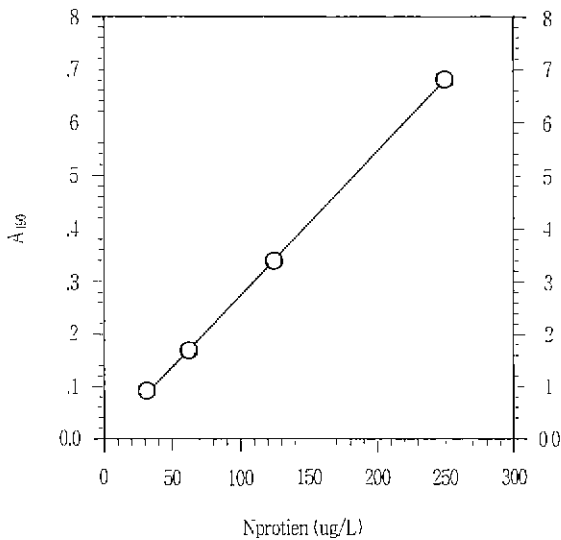


Figure 2. Calibration curve of N protein concentration according to absorbance(A₄₉₀) on ELISA.

curve를 Figure 2에 나타내었다. 흡광도 0.1에서 0.7까지 뉴클레오텍시드 단백질 농도와의 비례 관계가 매우 잘 유지됨을 관찰할 수 있다. 따라서 이 방법을 사용하여 세포 배양액 중에 측정된 뉴클레오텍시드 단백질 양의 측정을 통해 뉴클레오텍시드 단백질 생산 최적 조건 실험이 가능할 것으로 판단되었다. 이 방법을 통해 균체 파쇄액의 상등액 중의 뉴클레오텍시드 단백질 양을 측정해 본 결과 LG-ampicillin 배지에서 배양액 기준으로 100 mg/L의 뉴클레오텍시드 단백질이 생산됨을 알 수 있었다.

흡광도에 따른 제조할 균주의 단위 배양액 부피당 dry cell weight (DCW)와 wet cell weight (WCW)의 변화를 측정하여 보았다. Wet cell weight는 마이크로 원심분리기를 사용하여 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 pellet의 중량을 측정하였고 dry cell weight는 80℃에서 48시간 동안 건조하여 중량을 측정하였다. 이 때 균체의 pellet은 배지중의 salt 등을 제거하기 위해 증류수로 2회 세척하였다. 그 결과물 Figure 3에 나타내었다. 배양액을 10배 희석하여 600 nm의 파장에서 측정하였을 때 A₆₀₀가 0.1일 때 wet cell weight는 2 g/L 정도 되었으며 dry cell weight는 이 값의 약 25%인 0.5 g/L 정도 되었다. DCW와 WCW 중에 뉴클레오텍시드 단백질이 차지하는 비율을 계산해 본 결과, DCW의 12%와 WCW의 3%에 이르는 것으로 계산되었다.

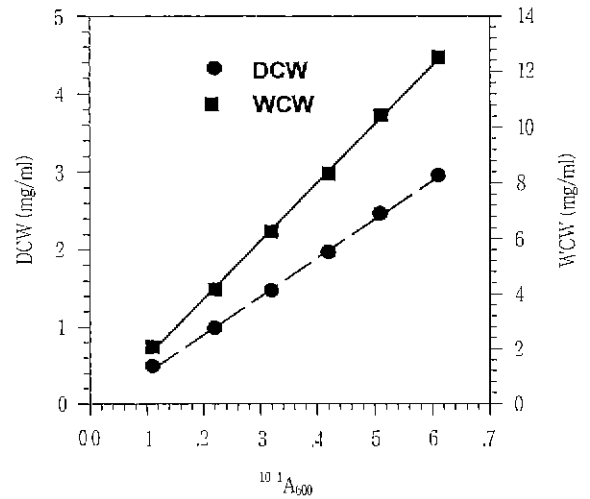


Figure 3. Calibration curve of BL21(pET-NP) dry cell weight and wet cell weight according to absorbance(A₆₀₀).

플라스미드의 안정성 연구

숙주 세포 내에서의 플라스미드의 안정성은 유전자 재조합 균주를 통한 단백질의 생산에 있어 매우 중요한 요인의 하나로 생각할 수 있다. 따라서 숙주 세포 BL21에서 플라스미드 pET-NP와 pKK-NP에 대한 안정성 연구를 수행하였다. 플라스미드의 instability는 크게 segregational instability와 structural instability로 분류할 수 있는데 여기서는 structural instability는 무시하고 segregational instability만을 조사하였다. 인두서(inducer)인 IPTG와 ampicillin을 배지 중에 첨가 여부에 따른 안정성 연구를 수행하였는데 pET-NP에 대한 결과를 Figure 4에 나타내었다. IPTG를 첨가하지 않은 경우는 ampicillin의 첨

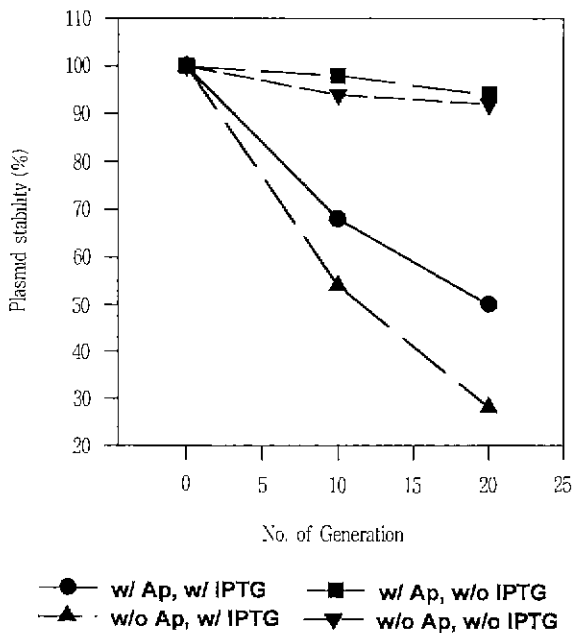


Figure 4 Stability of plasmid pET-NP in BL21

가 유무에 관계없이 20세대 까지 90% 이상의 세포에서 플라스미드가 유지된 반면, IPTG를 0.5 mM되게 첨가해 준 경우는 다소 불안정하여 ampicillin을 첨가해 주었을 때는 20세대 동안 50%까지 떨어졌고 ampicillin을 첨가하지 않은 경우는 28% 까지 떨어졌다. 이 사실은 뉴클레오펙시드 단백질의 발현이 유도되지 않은 상태에서는 플라스미드가 매우 안정적으로 유지된다고 할 수 있으며, 일단 발현이 유도되는 환경에서는 설령 배지 중에 ampicillin을 첨가하더라도 플라스미드의 안정성 유지를 위한 확실한 방법은 될 수 없음을 의미한다. 이것은 뉴클레오펙시드 단백질의 발현이 유도되지 않은 상태에서 플라스미드 함유 자체만으로는 세포에 큰 부담으로 작용하지 않으며 따라서 플라스미드를 포함하고 있는 세포와 포함하고 있지 않은 세포간의 성장 속도 상의 큰 차이가 없음을 의미하며, 또한 배양액 중의 세포 농도가 어느 정도 이상 도달하면 플라스미드에 코딩되어 있는 ampicillin 분해효소(β -lactamase)가 발현 분비되어 배양액 중의 ampicillin을 분해해버리기 때문에 배지중에 ampicillin의 첨가가 플라스미드 안정성 유지에 다소의 도움은 되지만 확실한 보장책은 될 수 없음을 의미한다. 그러나 ampicillin이 첨가된 상태에서 20세대 동안 50% 정도의 플라스미드 안정성이라면 뉴클레오펙시드 단백질의 생산에는 큰 문제가 없다고 할 수 있다. LG-ampicillin 배지를 사용하여 batch 방식으로 배양한다고 가정할 때 인두서 첨가후 배양액이 stationary phase에 도달할 때까지의 소요되는 세대수는 5 내외가 될 것이기 때문이다.

BL21에서 플라스미드 pKK-NP에 대해 동일한 실험을 수행하였는데 인두서 첨가시 pET-NP와는 달리 매우 불안정하였다. 결과는 Figure 5에 나타내었다. 인두서를 첨가하지 않은 경우는 ampicillin의 첨가 유무에 관계없이 매우 안정하여 20세대 동안 100% 유지되었으나 인두서인 IPTG를 0.5 mM되게 첨가해 준 경우는 역시 ampicillin 첨가 유무에 관계없이 모두 10세대 지난 후에는 플라스미드를 포함한 세포가 거의 없었다. 따라서 pKK-NP는 인두서에 매우 민감한 반응을 보임을 알 수 있었

다. 이 플라스미드의 경우는 생산용 벡터로 사용하기에는 부적합하다고 할 수 있겠다. 앞의 연구에서 pKK-NP를 사용한 뉴클레오펙시드 단백질의 발현 확인에 있어서도 pET-NP에 비해 발현량이 매우 적었던 이유로 플라스미드의 불안정성이 가장 큰 원인이었을 것으로 생각된다. pKK-NP의 경우 ampicillin을 배지 중에 첨가해 주었음에도 플라스미드의 안정성 유지에 큰 도움이 안되는 이유로는 배지 중에 첨가된 ampicillin이 균체 농도가 낮은 배양 초기에는 어느 정도 플라스미드 안정성 유지에 도움이 되나, 균체 농도가 증가함에 따라 균체로부터 생산 분비되는 ampicillin의 분해 효소인 β -lactamase에 의해 배지 중의 ampicillin이 분해되기 때문에 플라스미드 안정성 유지에 큰 도움이 될 수 없기 때문인 것으로 판단된다. 다음은 배지 중에 첨가된 인두서의 농도별로 10세대 동안 플라스미드의 안정성에 미치는 영향을 조사해 보았다. 그 결과를 Figure 6에 나타내었다. pET-NP의 경우는 IPTG의 농도의 증가에 따른 안정성의 감소가 상당히 완만한 경향을 보여 0.1 mM에서 80% 1.0 mM에서는 58% 가 유지된 반면 pKK-NP의 경우는 0.1 mM에서 이미 4% 까지 떨어지고

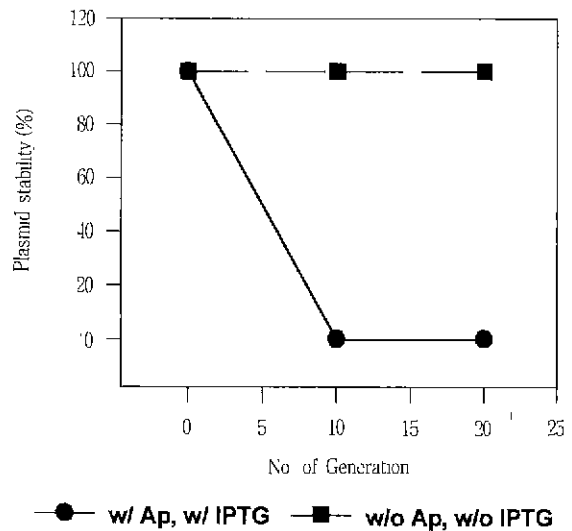


Figure 5. Stability of plasmid pKK-NP in BL21.

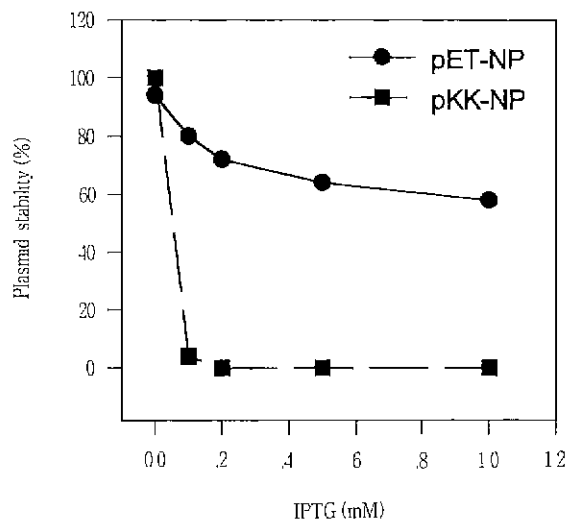


Figure 6. Effect of inducer concentration on plasmid stability.

0.2 mM 이상에서는 0% 였다. 여기서 pET-NP는 인두서 농도에 다소 둔감한 반응을 보인 반면 pKK-NP는 매우 민감한 반응을 보임을 알 수 있다.

유전자 재조합 균주의 성장 특성

앞의 연구 결과들로 pKK-NP는 뉴클레오펙시드 단백질의 생산 용으로는 부적합 판단을 내리고 pET-NP를 포함한 BL21에 대해서만 이 후의 연구를 수행하였다 먼저 인두서의 첨가 유무와 첨가 시기에 따른 성장 pattern을 살펴보았다. Figure 7에서 보는 바와 같이 인두서를 첨가하지 않은 경우가 첨가한 경우보다 최종 세포 농도가 10% 정도 높았으며 성장 속도도 약간 빨랐다. 인두서를 접종과 동시에 첨가한 경우와 접종 2시간 후 첨가한 경우를 비교해 보면 stationary phase에 도달하는 시간에만 약간 차이가 있었고 최종 세포 농도는 동일하였다 따라서 pET-NP를 포함한 BL21의 경우는 인두서의 첨가 시기는 세포 성장에 거의 영향을 미치지 않고 첨가 유무에 따른 영향도 무시할 만한 정도로 판단된다.

온도에 따른 영향

배양 온도가 세포 성장과 뉴클레오펙시드 단백질의 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 30°C와 35°C에서 배양 시간에 따른 세포의 성장과 뉴클레오펙시드 단백질의 생산 profiles를 조사해 보았다. 배지는 LB배지에 glucose를 2 g/L 되게 첨가하여 사용하였다. 인두서는 온도차에 따른 성장 차이를 고려하여 35°C의 경우는 접종 2시간 후 IPTG를 0.5 mM되게 첨가하였고 30°C의 경우는 접종 3시간 후에 첨가하였다. 결과를 Figure 8에 나타내었는데 성장 속도는 35°C가 약간 빠르긴 하지만 최종 세포 농도는 30°C에서 오히려 약간 높았다. 뉴클레오펙시드 단백질의 생산에 있어서는 35°C에서는 stationary phase 도달 후 뉴클레오펙시드 단백질이 다소 분해되는 양상을 보이고 있으나 30°C에서는 그러한 양상을 보이지 않았다. 그러나 뉴클레오펙시드 단백질 생산 profiles에서의 최고치는 35°C에서 다소 높게 나타났다.

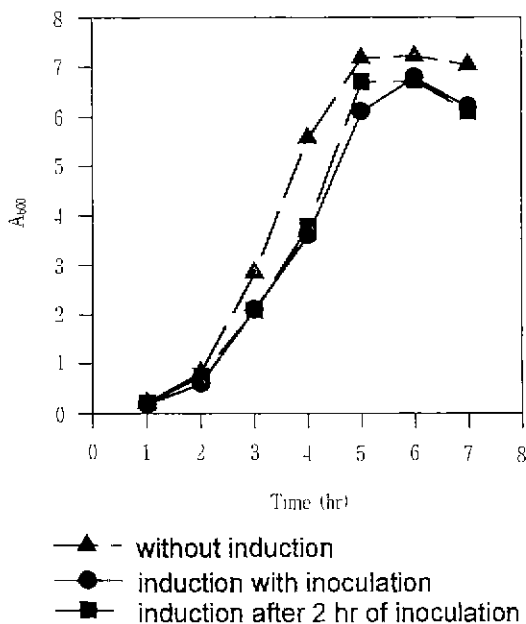


Figure 7. Growth patterns of BL21 with pET-NP.

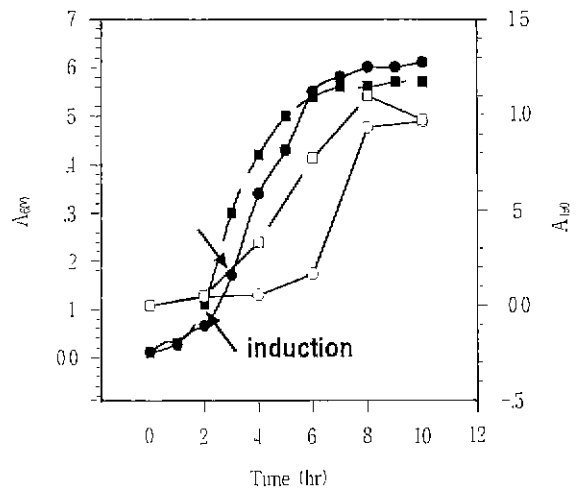


Figure 8. Effect of temperature on cell growth and N protein production.

- ; Cell growth at 35°C (A_{600})
- ; Cell growth at 30°C (A_{600})
- ; N protein production at 35°C (A_{490})
- ; N protein production at 30°C (A_{490})

Induction time의 영향

유전자 재조합 대장균에서 외래 유전자에 의한 단백질을 과량 발현할 경우 균체 성장에 큰 부담으로 작용할 수 있고 플라스미드를 segregation시키는 중요 요인으로 작용할 수 있으므로 외래 유전자의 발현을 임의로 조정할 수 있는 발현 벡터 시스템이 많이 이용되고 있다. 대표적인 예로서 lac 프로모터의 경우는 IPTG의 첨가에 의해 발현이 유도되고, λP_L , P_R 프로모터와 cI_{857} temperature sensitive mutant 시스템을 이용한 경우는 낮은 온도에서는 정상적인 리프레서의 생산에 의해 프로모터가 작동할 수 없으나 온도를 높여주는 경우 리프레서의 불활성화에 의해 프로모터가 정상적으로 작동되어 프로모터 아래쪽에 클로닝된 유전자의 발현이 유도된다. 본 연구에서 사용된 pET-3a와 숙주 균주 BL21(DE3)의 경우도 IPTG의 첨가에 의해 염색체 DNA 중에 integration된 DE3 중의 T7 RNA polymerase의 생산을 유도하고 이것이 다시 pET-3a의 $\phi-10$ 프로모터를 작동시킴으로써 $\phi-10$ 프로모터 하에 클로닝된 유전자의 발현을 유도하게 된다. 이러한 시스템들은 통상 배양 초기에 외래 유전자의 발현에 의해 균체 성장이 저해되는 것을 막기 위해 균체 농도가 어느 정도 이상 되었을 때 또는 log phase에 도달했을 때 발현을 유도하게 된다. 따라서 BL21(pET-NP)도 induction point를 달리했을 때 뉴클레오펙시드 단백질의 생산에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험을 수행하였다.

35°C에서 접종 초기와 접종 2시간 후 IPTG를 0.5 mM되게 첨가해 준 후 성장 뉴클레오펙시드 단백질 생산 profiles를 관찰하였다. 결과는 Figure 9에 나타내었는데 성장에 있어서는 거의 차이를 관찰할 수 없고 뉴클레오펙시드 단백질 생산의 경우 접종 초기에 인두서를 첨가한 경우 배양 초기 6시간까지는 뉴클레오펙시드 단백질의 축적량이 많았으나 그 이후는 동일한 pattern의 뉴클레오펙시드 단백질 축적량을 보였다. 따라서 인두서의 첨가 시기는 뉴클레오펙시드 단백질의 성장과 뉴클레오펙시드 단백질의 생산에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 결론지었다.

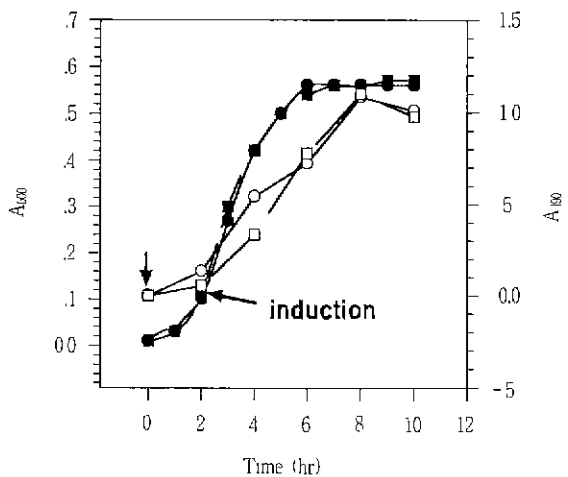


Figure 9. Effect of induction time on cell growth and N protein production.

- , Cell growth induced at 2 hr (A₆₀₀)
- , Cell growth induced at 0 hr (A₆₀₀)
- ; N protein production induced at 2 hr (A₄₉₀)
- ; N protein production induced at 0 hr (A₄₉₀)

Glucose 농도에 따른 영향

LG-ampicillin 배지 중에 첨가된 glucose의 농도를 0, 1, 3, 5, 7 g/L되게 조정하여 첨가된 glucose의 농도가 뉴클레오캡시드 단백질의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 이때 인두서는 접종 2시간 후 0.5 mM되게 첨가해 주었다. 접종 8시간 후 배양을 중단하고 최종 세포 농도와 뉴클레오캡시드 단백질의 축적량을 조사하였다. 그 결과를 Figure 10에 나타내었다. 세포의 성장과 뉴클레오캡시드 단백질의 축적은 glucose 농도가 0에서 5 g/L까지는 비례하여 증가하고 7 g/L에서는 세포 농도와 뉴클레오캡시드 단백질의 축적이 5 g/L의 glucose 농도에 비해 다소 감소하였다. 5 g/L 이상의 glucose 농도에서는 세포 생장이 다

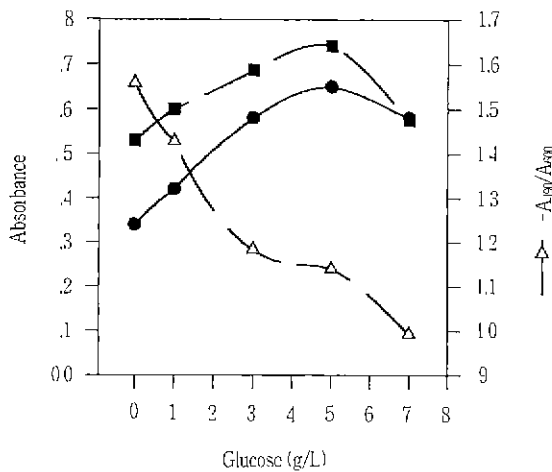


Figure 10. Effect of glucose concentration on cell growth and N protein production.

- : Cell growth (A₆₀₀)
- ; N protein production (A₄₉₀)
- △- , ratio of N protein production to cell growth (A₄₉₀/A₆₀₀)

소 저해를 받기 시작하는 것으로 판단된다. 세포 성장이나 뉴클레오캡시드 단백질의 생산적인 측면만을 본다면 5 g/L의 glucose 농도가 최적 조건이라고 볼 수 있으나 단위 세포량 당 뉴클레오캡시드 단백질의 생산량 (A₄₉₀/A₆₀₀)을 조사해 볼 필요가 있다. 단위 세포량 당 뉴클레오캡시드 단백질의 함유량이 크면 클수록 균체 과쇄액 중의 뉴클레오캡시드 단백질의 상대적인 농도가 높기 때문에 뉴클레오캡시드 단백질의 정제에 있어 그만큼 유리할 수 있기 때문이다. Figure 10에서 보는 바와 같이 단위 세포량 당 뉴클레오캡시드 단백질의 생산량은 glucose의 농도에 반비례함을 알 수 있다. 따라서 재조합 균주의 배양에 있어 glucose가 다소 제한된 상태에서 낮은 농도로 유지해 줄 수 있는 배양 조건이 뉴클레오캡시드 단백질의 정제에 있어 바람직할 것으로 판단된다.

요 약

신증후출혈열과 한타바이러스페증후군이라는 2종의 급속한 질병을 유발하는 원인균으로 알려진 한타바이러스 속에 속하는 바이러스들 중의 주요 바이러스로 알려진 한타바이러스의 뉴클레오캡시드 유전자가 클로닝된 2종의 플라스미드 pET-NP와 pKK-NP를 함유하는 대장균 BL21(DE3)의 뉴클레오캡시드 단백질의 발현과 관련하여 플라스미드 안정성과 제반 배양 환경이 미치는 영향을 조사하였다.

EIA 방법으로 손쉽게 균체 내에 축적된 뉴클레오캡시드 단백질 양을 측정할 수 있는 방법을 확립하여 발현량을 조사한 결과, 플라스미드 pKK-NP는 숙주 대장균 내에서 매우 불안정하여 발현이 매우 미미하였고 pET-NP는 약 100 mg/L 발현량을 보였다. 플라스미드 pET-NP를 함유한 BL21은 성장과 뉴클레오캡시드 단백질의 생산에 있어서 inducer인 IPTG의 첨가시기에 별 영향을 받지 않았다. 뉴클레오캡시드 단백질의 생산 최고치는 30°C 보다는 35°C에서 더 높았으나 35°C에서는 stationary phase 이후 축적된 뉴클레오캡시드 단백질이 다소 감소하는 경향을 보였다. 배양액 중의 glucose 농도는 세포 성장과 total 뉴클레오캡시드 단백질 생산량에서는 0.5%가 최적이었으나 단위 균체량에 대한 뉴클레오캡시드 단백질의 생산량은 glucose의 첨가량이 반비례하여 첨가하지 않았을 때 가장 높게 나타났다.

참 고 문 헌

1. Hjelle, B., S. A. Jenison, D. E. Goade, W. B. Green, R. M. Feddersen, and A. A. Scott (1995). Hantaviruses: Chemical, Microbiologic, and Epidemiologic Aspects, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*, 32, 469-508.
2. 노갑수 (1997), 유행성출혈열과 한타바이러스 (Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome and Hantaviruses), 미생물과 산업, 23, 10-17.
3. Elliott, L. H., M. P. Kiley, and J. B. McCormick (1984), Hantaan virus: Identification of Virion proteins, *J. Gen. Virol.*, 65, 1285-1293.
4. Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, and J. W. Dubendorff (1990), Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Meth. Enzymol.*, 185, 60-89.

5. Brosius, J. and A. Holy (1984), Regulation of ribosomal RNA promoters with a synthetic *lac* operator, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6929-6933.
6. Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
7. Andrew, S. M. and J. A. Titus (1991), Antibody detection and preparation, *Current protocols in immunology* (Coligan, J. E. eds), pp. 2.13-2.19, Wiley Interscience, New York.