KSBB Journal 2009. 24: 591~597 KSBB

B-type natriuretic peptide 분석을 위한 항 BNP scFv 항체의 대장균 세포질 내에서의 기능적 발현

맹보희 · 남동현 · 김용환*
광운대학교 공과대학 화학공학과

Functional Expression of Anti-BNP scFv in *E. coli* Cytoplasm for the Detection of B-type Natriuretic Peptide

Bo Hee Maeng, Dong Hyun Nam, and Yong Hwan Kim*
Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University, 447-1 Wolgye-dong, Nowon-gu, Seoul 139-701, Korea

Abstract B-type natriuretic peptide is a neurohormone secreted in the cardiac ventricles. BNP levels are elevated in patients with ventricular dysfunction. Therefore, the concentration of BNP is important factor to reflect diagnosis and prognosis for cardiovascular disease. In this respect, anti-BNP scFv is an urgent requirement for early diagnosis in the field of biosensor. Herein, the genetic codes of anti-BNP scFv were chemically synthesized and cloned into both pET22b (+) and pColdⅣ vector, respectively. The recombinant scFv was successfully expressed as a functional form in cytoplasm of *E. coli* and detected through Western blot and ELISA. The highest level of functional expression of anti-BNP scFv was achieved using pET22b (+) vector at 15℃ by addition of 0.1 mM IPTG. Additionally, being exposed to both BNP and ANP, anti-BNP scFv specifically captured only BNP. Therefore, anti-BNP scFv expressed in this study will be applied to measure the concentration of BNP as a diagnostic recognition molecule.

Keywords: BNP, anti-BNP, scFv

서 론

심장의 심실에서 분비되는 심장혈관 호르몬인 B-type natriuretic peptide (BNP)는 atrial natriuretic peptide (ANP), C-type natriuretic peptide (CNP)와 함께 신경호르몬의 범주에 속하며, 나트륨 조절과 수분 배출의 나트륨뇨배설항진 기능에 관여하는 중요한 호르몬이다 [1]. pro-BNP의 N-terminal pro-BNP (NT-pro-BNP)와 BNP로의 분절 과정을 거쳐 형성되는 BNP는 총 32개의 amino acids로 구성되며, cysteine residue에서 disulfide bond로 맞물린 17개의 아미노산 고리 구조에 9개의 amino-terminal tail과 6개의 carboxyl-terminal tail이 각각 연결 되어있는 형태를 띈다 [2].

혈중 BNP는 심장의 부피팽창과 압력 과부하 등의 심장 이상증상에 반응하여 분비가 촉진 되며, 그 정도가 심할수록 수치가 높게 나타나는 경향을 보인다 [3,4]. 이러한 특성을 이용한 BNP의 혈중 농도 측정은 심장질환의 진단, 예후판정, 그리고 심장병의 치료 경과를 구분 짓는 등 심장기능부전 환자의 진단에 유용하게 이용 되고 있다 [5,6].

혈청 또는 혈장에서의 BNP 농도 측정은 샌드위치 형태의 면역학적 검정법을 통해서 효과적으로 측정될 수 있다. 이러한 검정법은 첫 번째 항체를 미립자 위에 고정시켜 항원을 포획하고, 다시 두 번째 항체를 종전의 항원과 반응 하도록 하는 방법으로, 두 번째 항체에 형광물질 또는 화학발광 표지 그룹을 연결하여 이를 통하여 감지가 가능하게 된다 [5]. 따라서 BNP 농도 측정에 있어서 BNP를 탐지 할 수 있는 anti-BNP 항체의 이용은 필요 불가결한

***Corresponding author**
Tel: +82-2-940-5675, Fax: +82-2-941-1785
e-mail: metalkim@kw.ac.kr

요소로 작용한다.

오늘날 항체의 이용에 있어서 크게 각광받고 있는 것으로 대장균과 같은 원핵생물에서 적은 비용으로도 쉽게 발현 및 정제가 손쉬운 single-chain variable fragment (scFv)가 있다. 항체의 heavy chain과 light chain의 variable domain을 인위적 링커로 연결하여 만드는 scFv는 전체 면역글로불린 본래의 결합 특이성과 친화성을 유지하면서도 상대적으로 작은 크기로 인해 보다 선택적이고 강한 상호작용이 가능하며, 균주 기술을 이용한 즉각적인 isolation이 가능하다는 장점을 가지고 있다 [7]. 또한 그들이 본래 가지고 있던 친화성을 단백질 공학을 통해 한층 증가시킬 수 있는 인위적인 제조도 가능하다는 점 역시 scFv의 큰 특성 중 하나이다 [8]. 이렇게 많은 용이성을 갖춘 scFv는 항체 기술에 있어서 중요한 위치를 차지하게 되었으며 다양한 방법에 걸친 치료 및 진단에의 활용도 또한 높은 실정이다 [7]. 하지만, 대부분 scFv의 대장균에서의 발현은 불용성 형태로의 발현율이 높으며, 이러한 형태의 발현은 scFv의 다양한 이용에 방해 요인으로 작용한다. 따라서 scFv의 기능적인 가용성 형태로의 발현은 특히 중요한 과제로 남아있다 [9].

이에 우리는 심장병 진단용 센서의 펩타머로써의 이용을 위한 항 BNP scFv 항체의 대장균 균주 세포질 내에서의 발현을 시도하고자 하였다. 세포질 내의 발현은 periplasmic 발현에서 발생되는 배양액으로의 단백질 손실을 방지하여 높은 농도의 단백질을 회수할 수 있다는 장점이 있다. 본 실험에서는 대장균에서 재조합 단백질 발현에 가장 널리 쓰이고 있는 T7 프로모터로 발현시스템을 구축하고 있는 pET 벡터와, 저온 유도성 프로모터인 *cspA* 프로모터를 발현시스템으로 구축하고 있는 pCold 벡터를 이용하여 scFv 항체의 세포질 내로의 발현을 시도하였다. 특히 *cspA* 프로모터는 낮은 온도에서 전사의 시작과 아미노산 번역이 이루어 지며, 이러한 저온 발현의 특성상 올바른 단백질 접힘이 가능하기 때문에 최근 대장균에서 불용성 단백질의 가용성 단백질로의 발현에 많이 이용되고 있는 벡터 시스템이다.

본 연구에서는 항 BNP scFv 항체 유전자로 최적 발현 벡터를 탐색하고 단백질 발현에 있어서 온도의 영향, IPTG 투여 농도에 따라 달라지는 발현 양상을 비교하여 최적 발현 조건을 탐색하였으며, 발현된 scFv 항체와 BNP 항원의 친화도를 ANP 항원과의 친화도와 비교하여 항 BNP scFv 항체의 BNP에 대한 특이적 기능성을 확인하였다. 항 BNP scFv 항체의 대장균 균주에서의 세포질 내 발현에 관하여 발표 되어진 연구사례가 아직 없으므로, 이번 연구는 최초의 항 BNP scFv 항체 발현 연구가 될 것이라 기대한다. 또한 심장질환의 계속적인 증가 추세로 인하여 최근, BNP와 같은 심장혈관호르몬 수치를 이용하는 방법에 큰 관심이 집중되고 있는 점을 고려해 볼 때, 항 BNP scFv 항체의 발현은 그 활용에 있어서도 큰 의미가 있다고 하겠다.

재료 및 방법

박테리아 균주와 플라스미드

이 실험에서 재조합 항 BNP scFv 항체 발현을 위해 사용된, pColdⅣ 벡터는 TaKaRa Inc. (Japan)에서 pET22b (+) 벡터는 Novagen (WI, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 그리고 형질전환을 위해 사용된 BL21 (DE3) 발현 균주는 RBC Bioscience (Taiwan)에서 구매를 하였다. Western blot과 ELISA실험을 위한 primary antibody인 anti-His mouse monoclonal antibody와 Alkaline phosphatase (AP)가 융합된 secondary antibody인 rabbit anti-mouse IgG polyclonal antibody는 Abcam (UK)에서 각각 구매하였다. 그 외에 필요한 시약들은 Sigma-aldrich에서 구매하여 사용하였다.

유전자 클로닝 및 형질전환

항 BNP scFv 항체 유전자는 Robert Deberardine Abbott Laboratories에서 발표된 서열에 근거하여 디자인 하였으며 [3], COSMO co. (Korea)에서 합성하여 사용하였다. 이 유전자는 351 bp의 heavy chain과 344 bp light chain을 45 bp의 링커로 연결하여, 총 768개의 핵산으로 구성 되었으며 C-terminal에 hexa-histidine을 암호화하고 있는 유전자를 융합하여 (Fig. 1(a)) 단백질 정제 및 Western blot과 ELISA 수행을 위한 항체 표식자로 사용하였다.

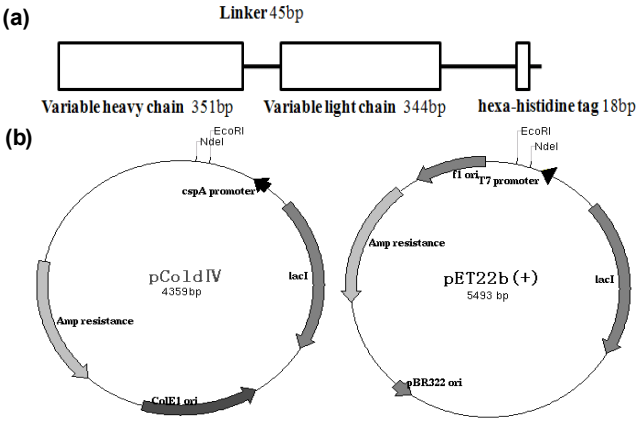

Fig. 1. (a) Scheme of anti-BNP scFv gene. (b) Map of the expression vector pColdⅣ and pET22b (+).

pUC57 복제벡터에 재조합 되어온 scFv 유전자는 제한효소 *Nde I*, *EcoR I*으로 처리하였고, 동일한 제한효소로 절단된 pColdⅣ와 pET22b (+)에 T4 DNA 리가아제 (Fermentas)를 이용하여 각각 접합시켰다 (Fig. 1(b)). 이렇게 재조합된 플라스미드 pCold-anti-BNP scFv, pET-anti-BNP scFv는 BL21에 각각 형질전환 하였으며, 유전자 조작과 박테리아로의 형질전환은 Sambrook et al. [10]에 의해 기술 되어진

방법을 토대로 행하였다.

균주의 배양 및 anti-BNP scFv 발현의 유도

pCold-anti-BNP scFv, pET-anti-BNP scFv 플라스미드로 형질 전환된 균주의 콜로니를 암피실린이 첨가된 3 mL Luria-Bertani (LB) 액체배지에 접종하여 37℃, 200 rpm의 조건에서 하루 동안 배양하였으며, 이 배양액을 새로운 50 mL LB배지에 접종 후 37℃, 200 rpm에서 OD_{600} 0.6~0.8이 될 때까지 배양하였다. 배양이 끝난 균주는 각각 발현벡터의 발현 시스템에 따라 25℃와 15℃의 서로 다른 온도 조건에서 발현을 유도하였다.

pColdⅣ 벡터는 낮은 온도에서 발현을 유도하는 *cspA* (Cold Shock Protein A) 프로모터를 지니고 있으므로 이 프로모터를 작동시키기 위하여 200 rpm에서 OD_{600} 0.6~0.8까지의 배양이 끝난 배양액을 30분 동안 얼음에 방치한 뒤 (cold-shock) 1 mM의 IPTG를 투여하여 15℃, 200 rpm의 조건에서 24시간동안 항 BNP scFv 항체의 발현을 유도하였다.

pET22b (+) 벡터의 경우 박테리오파지로부터 유래된 강력한 T7 프로모터로 구축된 벡터시스템 이므로 암피실린 첨가 LB배지 50 mL에서 $O.D_{600}$ 0.6~0.8까지 배양이 끝난 배양액을 cold-shock 없이 바로 1 mM의 IPTG를 투여하고 25℃, 200 rpm에서 4시간동안 발현을 유도하였다.

또한 발현 온도에 변화를 주어 각 벡터에 따른 최적의 발현 온도 조건을 탐색하기 위하여 pColdⅣ 벡터를 포함한 균주 배양액을 cold shock 없이 1 mM의 IPTG를 투여 하여 25℃, 200 rpm에서 4시간 동안 발현 하였으며, pET22b (+) 벡터를 포함한 균주 배양액은 얼음에서 30분 동안 방치하여 1 mM의 IPTG를 투여 한 뒤 15℃, 200 rpm에서 24시간 발현을 유도하였다.

위의 비교실험을 통하여 각각의 벡터 시스템에서의 항 BNP scFv 항체의 발현율을 비교하고 최적의 벡터 시스템과 온도 조건을 선별한 뒤, 이 조건 하에서 최적 IPTG 투여 농도 결정을 위한 실험을 수행하였다. 이때는 IPTG 농도를 0 mM, 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM로 다양하게 접종 하여 발현을 유도하고 발현율을 비교하였다.

균주의 회수 및 단백질 정제

배양 및 유도가 끝난 균주는 4500 rpm 에서 20분간 원심분리 하여 상층액과 분리시켜 회수하였다. 회수된 세포 덩어리를 Ni-NTA Spin Kit (QIagen)을 이용하여 세포 덩어리 내의 재조합 항 BNP scFv 항체를 정제하였다. 회수된 세포 덩어리는 Lysozyme과 Benzonase가 첨가된 Native Lysis Buffer (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0) 1.5 mL로 현탁 시켜 10분마다 흔들어 섞어주며 30분간 얼음에서 방치한 뒤, 4℃, 14000 × g로 30분간 원심분리 하였다. 원심분리 하여 분리된 상층액의 20 μL를 SDS-PAGE 분석을 위하여 보관하였다 (soluble fraction). 원심분리 하여 남은 insoblue 부분은 Denaturation buffer (7 M Urea, 100 mM NaH_2PO_4, 100 mM Tris · Cl, pH 8.0)로 녹여서 SDS-PAGE 분석을 위하여 보관하였다 (insoluble fraction). 원심분리 하여 분리된 상층액을 Ni-NTA spin column에 로딩하여 2000 rpm (700 × g)에서 2분간 원심분리하고, Wash Buffer (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) 600 ul로 2000 rpm (700 × g)에서 2분간 원심분리 하여 오염물을 제거하였다. 세척과정을 끝낸 후 Elution Buffer (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 8.0) 200 μL를 column에 로딩하여 2000 rpm (700 × g)으로 2분간 원심분리 하여 anti-BNP scFv를 정제하였다 (elution fraction).

Western Blot

전기영동을 위한 시료는 분리된 전체 단백질과 Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad)를 1 : 1로 혼합한 후 5분간 90℃로 열처리 하여 변성시켜 사용하였다. 전기영동은 10% SDS, 30% acrylamide mix (Bio-Rad), 10% ammonium persulfate (Sigma-aldrich), 1.5 M Tris, TEMED 를 혼합하여 제작한 SDS gel과 Tris glycine buffer를 이용하여 20 mA에서 90분간 행하였다. 전기영동이 끝난 gel은 Western blot을 위하여 100 V에서 100분간 Nitrocellulose transfer membrane에 transfer 시켰다. Transfer된 membrane은 5% skim milk로 60분간 blocking 하고, 0.1% Tween-20을 포함하는 PBS buffer로 15분과 5분에 걸쳐 4회의 세척과정을 거쳤다. 세척된 membrane은 1차 anti-His mouse monoclonal antibody를 5% skim milk로 1/1000로 희석하여 60분간 반응 시키고 0.1% Tween-20을 포함하는 PBS buffer로 4회의 세척과정을 거쳤다. 세척 후 5% skim milk에 Alkaline Phosphatase가 융합된 2차 rabbit anti-Mouse IgG polyclonal antibody를 5% skim milk로 1/2000 희석하여 다시 60분간 반응 시키고 동일한 세척과정을 거친 후 membrane을 1-Step™ NBT/BCIP (Bio-Rad) 용액과 반응시켜 반응을 보인 밴드를 관찰하였다. Western blot의 결과는 Java 이미지 처리 프로그램인 Image J를 이용하여 밴드의 세기정도를 분석하여 이를 수치화 하였으며, 그 측정값으로 발현율을 비교하였다.

ELISA

항 BNP scFv 항체의 기능적인 활성 측정을 위하여 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 행하였다. ELISA는 ELISA plate의 well을 1 μg/mL, 10 μg/mL, 25 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL 농도로 희석한 BNP 항원 50 μL로 채우고 상온에서 1시간 coating 후, 0.1% Tween-20이 함유된 PBS buffer로 2회의 세척과정을 거쳤다. 세척된 plate는 5% skim milk로 1시간 blocking 하고, 다시 0.1% Tween-20을 포함하는 PBS buffer로 세척하였다.

발현한 항 BNP scFv 항체를 5% skim milk에 1 : 1 비율

로 혼합 후 각각의 well에 100 μL씩 주입하여 항원과 상온에서 1시간 동안 반응 시켰으며, 반응 후 4회 세척과정을 거친 후 1차 anti-His mouse monoclonal antibody를 5% skim milk에 1/200 희석하여 60분간 반응 시킨 후 4회 세척하였다. 2차 항원항체반응은 Alkaline phosphatase로 표지된 rabbit anti-mouse IgG secondary antibody를 5% skim milk에 1/500 희석하여 다시 1시간 반응 시켜 발색반응을 관찰하였다. 발색반응은 bicarbonate buffer와 TMB Substrate Solution 혼합액을 기질로 첨가하여 상온에서 반응시킨 후 OD_{405}에서의 흡광도를 측정하였다. 대조군 실험 (control)은 항 BNP scFv 항체를 첨가하지 않고 위와 동일한 실험 방법을 거쳐 측정 하였다.

발현한 항 BNP scFv 항체가 BNP 항원과의 특이적인 친화력을 가지는지 알아보기 위하여 구조적으로 비슷한 ANP 항원과의 활성을 ELISA 방법을 사용하여 측정하였으며, ELISA plate의 well을 1 μg/mL, 10 μg/mL, 25 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL 농도의 ANP 항원 50 μL로 채우는 것을 제외하고 그 외의 방법은 BNP 항원을 이용 할 때와 동일한 방법으로 ELISA를 수행하여 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

심장혈관호르몬 BNP의 탐지 인자인 항 BNP scFv 항체 유전자를 pColdⅣ와 pET22b (+) 벡터에 삽입하여 pCold-anti-BNP scFv, pET-anti-BNP scFv 플라스미드를 각각 구축하였으며, 이를 대장균 BL21에서 발현시켰다. scFv 발현의 최적 벡터 및 온도를 결정하기 위하여 벡터와 온도를 다르게 하여 발현 하였던 모든 scFv의 Western blot 발색 반응 결과, 항 BNP scFv 항체의 분자량과 동일한 28 kDa의 위치에서 뚜렷한 밴드가 나타났으며 (Fig. 2(b)) 이를 통하여 항 BNP scFv의 발현이 성공적이었음을 확인하였다.

Fig. 2(a)는 image J 프로그램으로 수치화 한 Western blot 밴드세기 측정값을 pColdⅣ 벡터 15℃ 발현 조건에서의 가용성 발현 측정값을 기준으로 상대적 세기로 표현한 후, 그 값을 그래프로 나타낸 것이다. 동일한 벡터와 온도조건에서 발현된 scFv 항체의 가용성과 불용성 형태 밴드세기 상대값을 합하여 총 발현율을 비교하였을 때, 15℃ 발현에서는 pET22b (+) 벡터의 사용이 pColdⅣ 벡터를 사용하였을 때 보다 2.3배 높은 발현율로 나타났으며, 25℃ 온도의 발현에서도 pET22b (+) 벡터가 pColdⅣ 벡터를 사용 하였을 때 보다 2.5배 높은 발현율로 나타났다. 이는 pET 벡터에 구축된 박테리오 파지에서 유래한 T7 프로모터가 pCold 벡터에 구축된 *cspA* 프로모터에 비하여 강력한 발현율을 보여 준다는 것으로 해석 가능하다. *cspA* 프로모터는 낮은 온도에서 발현이 유도되기 때문에 상대적으로 느린 전사, 번역을 일으켜 최종적으로 발현되는 단백질의 양도 작아진다. 흥미로운 것은 pET22b (+) 벡터를 이용하여 cold shock을 준 뒤, 15℃의 저온으로 장시간 발현하였던 경우 가용성 형태로의 scFv 발현율은 25℃의 발현율에 비해 1.2배 정도 높고, 불용성 단백질의 발현율은 1.5배 이상 낮다는 실험 결과가 나온 것이다 (Fig. 2(a)). 저온에서의 가용성 단백질 발현이 증가된 이유는 높은 온도에서는 단백질들이 제대로 된 접힘을 일으키기도 전에 빠른 속도로 펩타이드 사슬들이 번역되어 나와 이들이 뭉쳐져 불용성 단백질의 형태가 될 가능성이 상당히 높은데 비하여, 낮은 온도에서는 전사, 번역 속도가 감소되어 최종적으로 효과적인 단백질의 접힘이 가능하게 되기 때문이다. 이는 이전에 보고된 결과와도 일치함이 확인되었다 [9,11].

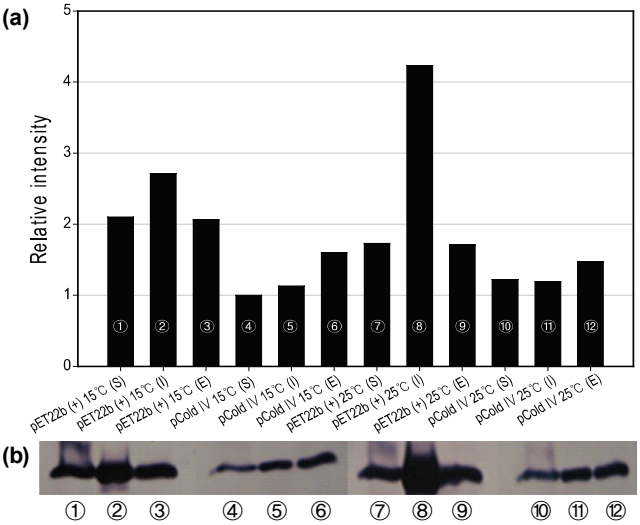

Fig. 2. Effects of expression vectors and temperature on funtional expression of anti-BNP scFv. (a) Western blot analysis relative intensity of expressed anti-BNP scFv. Separation of soluble (S), insoluble (I), elution (E) fractions obtained from expression in pColdⅣ and pET22b (+) vector. The intensity was determined by 'Image J' program, which is one of the image processing programs. The relative intensities of scFv were determined on the basis of the intensity of pColdⅣ vector expressed at 15℃ soluble fraction. (b) Western blotting of soluble, insoluble, elution fractions of anti-BNP scFv. Lane ①, pET22b (+) 15℃ soluble; Lane ②, pET22b (+) 15℃ insoluble; Lane ③, pET22b (+) 15℃ elution; Lane ④, pColdⅣ 15℃ soluble; Lane ⑤, pColdⅣ 15℃ insoluble; Lane ⑥, pColdⅣ 15℃ elution; Lane ⑦, pET22b (+) 25℃ soluble; Lane ⑧, pET22b (+) 25℃ insoluble; Lane ⑨, pET22b (+) 25℃ elution; Lane ⑩, pColdⅣ 25℃ soluble; Lane ⑪, pColdⅣ 25℃ insoluble; Lane ⑫, pColdⅣ 25℃ elution.

항 BNP scFv 항체의 활성은 ELISA를 통하여 확인하였다. ELISA를 통한 분석 결과 pET22b (+) 벡터로 15℃에서 발현하였을 때의 활성도가 25℃에 비하여 월등히 높음을 확인 할 수 있으며 (약 4배), 이 결과 또한 Western blot 결론을 뒷받침해 주고 있다 (Fig. 3).

pColdIV 벡터를 이용하여 발현하였을 시, pET22b (+) 벡터를 사용 할 때 보다 발현율은 상당히 낮았다. 이때의 가용성 형태로의 발현율은 25℃의 발현조건일 때가 15℃ 조건

일 때 보다 약간 높았으나 (Fig. 2), 활성측면에서는 15℃ 발현조건에서의 활성이 약간 높았다 (Fig. 3). 온도 상승에 의해 전사와 번역의 속도가 다소 빨라져서 발현율은 높아졌을 가능성이 있으나, 저온에서 발현 하였을 때에 적절한 단백질 접힘 현상이 일어나서 활성이 더 높게 나타난 것으로 보인다.

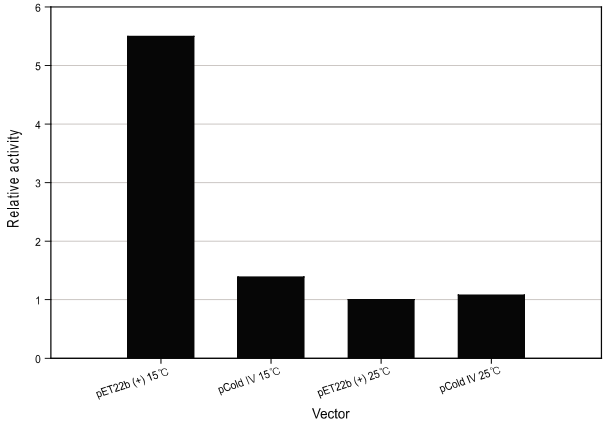

Fig. 3. Effects of vectors and temperature on the activity of anti-BNP scFv. ELISA results for expressed anti-BNP scFv with pColdⅣ and pET22b (+) vector. The relative activities of scFv were determined on the basis of the activity of pET22b (+) vector expressed at 25℃.

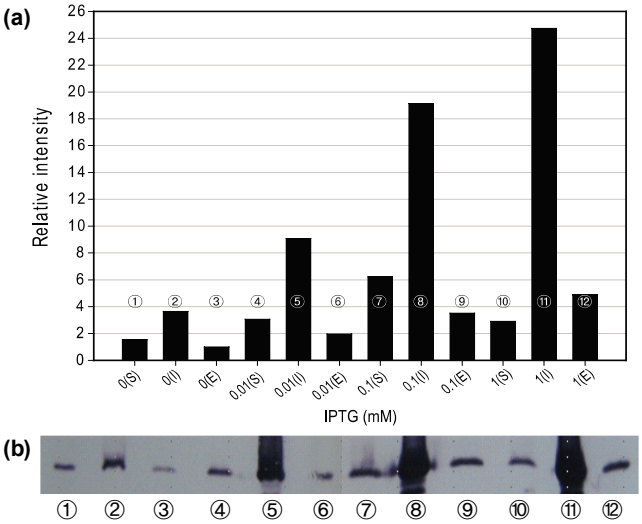

Fig. 4. Effects of IPTG concentration on functional expression of anti-BNP scFv. (a) Western blotting analysis relative intensity of expressed anti-BNP scFv. Separation of soluble (S), insoluble (I), elution (E) fractions obtained from expression in pET22b (+) vector. The intensity was determined by 'Image J' program, which is one of the image processing programs. The relative intensities of scFv were determined on the basis of the intensity of scFv induced by elution fraction of 0 mM IPTG. (b) Western blotting of soluble (lanes ①, ④, ⑦, ⑩), insoluble (lanes ②, ⑤, ⑧, ⑪), elution (lanes ③, ⑥, ⑨, ⑫) fractions of anti-BNP scFv with various IPTG concentration. Lanes ①, ②, and ③, 0 mM; lanes④, ⑤ and ⑥, 0.01 mM; lanes⑦, ⑧ and ⑨, 0.1 mM; lanes⑩, ⑪ and ⑫, 1 mM.

위의 결과를 종합하여 강력한 T7 프로모터에 의한 높은 발현율과 이 때 저온으로의 온도변화를 이용하여 불용성 단백질을 가용성 단백질로 전환 시키는 방법이 항 BNP scFv 항체의 세포내 가용성 단백질 발현 극대화를 위한 좋은 전략임을 밝혔다. pET22b (+) 벡터를 이용한 15℃에서의 저온발현을 항 BNP scFv 항체의 생산을 위한 최적조건으로 결정하였지만 이때의 발현조건 에서도 여전히 불용성 단백질 형태로의 발현율이 높은 상태이므로 불용성 단백질을 가용성 형태의 발현으로 유도 할 수 있는 다른 조건들을 변화시킬 필요가 있다. 따라서 IPTG 투여 농도에 변화를 주어 가용성 단백질의 생산을 극대화할 수 있도록 하였다. 최적벡터 및 온도조건으로 결정한 pET22b (+) 벡터를 이용, 15℃ 발현의 실험과정을 유지하면서 IPTG 투여 농도만을 0 mM, 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM으로 다르게 하여 발현을 유도하였으며, Western blot으로 결과를 확인하여 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4(a) 역시 Fig. 3(a)에서와 마찬가지로 image J 프로그램으로 Western blot 밴드의 세기를 측정하여 수치화하였으며, 0 mM IPTG 투여 조건에서의 측정값을 기준으로 하여 상대적인 세기로 다시 표현하여 그래프로 나타내었다.

항 BNP scFv 항체의 총 발현율 (가용성 단백질 + 불용성 단백질)은 IPTG 투여 농도가 높을수록 증가하였고, 가용성 단백질로의 발현은 IPTG 투여 농도가 0 mM, 0.01 mM, 0.1 mM로 높아질수록 점차적으로 증가하여 0.1 mM에서 최대 발현율을 보여주었으며, 1 mM 에서는 다시 발현율이 감소하였다 (Fig. 4(a)).

Fig. 5는 IPTG 농도에 따른 항 BNP scFv 항체의 활성을 보여준다. ELISA를 통한 활성측정 결과 IPTG 투여 농도가 0 mM, 0.01 mM, 0.1 mM로 높아질수록 활성이 증가하는 양상을 보이다가 1 mM의 농도에서는 활성이 떨어짐을 확인 할 수 있었으며, 이는 Western blot 결과에서의 가용성 단백질 증가 양상과 일치한 형태를 보여준다.

이는 IPTG 농도의 증가는 negative control을 통한 재조합 단백질의 유전자 전사를 빠르게 하여 단백질 생산량을 늘려주기는 하나, 최적 농도 이상의 IPTG 투여는 세포내의 독성을 일으켜 단백질의 생산을 저해하는 것으로 판단된다 [10-12].

Table 1. ELISA activity of anti-BNP scFv compare to BNP with ANP. The activity of scFv was determined by electrophotometery

Conc. (μg/mL)	antigen		
	No antibody (control)	BNP	ANP
1	0	0.293	0
10	0	0.825	0
25	0	0.957	0
50	0	0.991	0
100	0	0.888	0

마지막으로 대장균에서 발현된 항 BNP scFv 항체를 ELISA 방법을 이용하여 항원 BNP와 ANP와의 활성을 비교하였고, BNP 항원에서만 특이적으로 활성을 나타냄을 확인하였다

(Table 1). ANP는 BNP와 같이 심장에서 분비되는 심장혈관호르몬으로 17개의 아미노산으로 형성된 고리구조에 6개의 amino-terminal tail과 5개의 carboxyl-terminal tail이 각각 연결되어있는 BNP와 매우 유사한 형태의 신경호르몬이다[1,3,4]. 따라서 항 BNP scFv 항체와 반응 할 수 있는 위험소지가 크다고 판단하였으나 ELISA 활성반응 결과 ANP와는 아무런 활성도 감지되지 않았으므로 발현 되어진 항 BNP scFv 항체는 오직 BNP와 특이적인 친화성을 가진다는 사실을 확인 하였다.

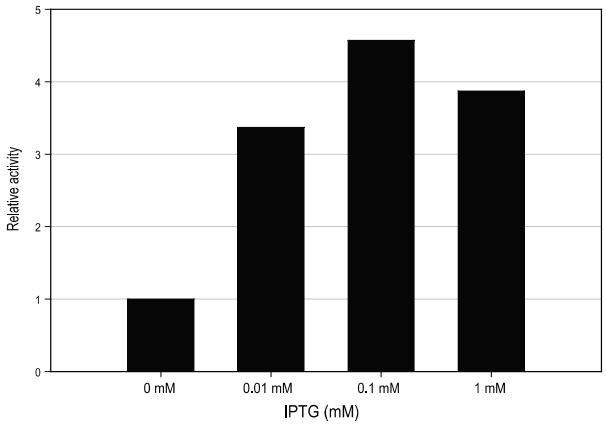

Fig. 5. Effect of IPTG concentration on the activity of anti-BNP scFv. ELISA results for expressed anti-BNP scFv with pET22b(+) vector at 15℃. The relative activities of scFv were determined on the basis of the activity without IPTG addition.

요 약

심장이상증상의 상태에서 분비되는 심장혈관호르몬인 BNP의 혈중 농도측정은 심장기능부전환자의 진단에 유용하게 이용 되고 있다. 혈청 또는 혈장에서의 BNP 농도측정은 샌드위치형태의 면역학적 검정법을 이용할 수 있으며, 이때에 항 BNP 항체를 BNP 탐지 인자로 사용할 수 있다. 특히, 탐지 인자로의 사용을 위해서는 항원항체 반응부분을 링커로 연결하여 전체 항체에 비해서 경제적이며 효율 면에서도 뛰어난 scFv의 사용이 용이하다고 판단하였고, 이에 scFv의 취약점인 대장균에서의 불용성 형태의 발현을 최소화 시키고 기능적 발현을 극대화하여 심장질환 진단용 센서의 센서 칩 항체로 사용할 수 있도록 항 BNP scFv 항체의 발현을 대장균 세포질 내에서 유도 하였다. 대장균 세포질 내에서의 scFv 제작을 위하여 항 BNP scFv 항체 유전자를 pColdⅣ 벡터와 pET22b (+)벡터에 각각 클로닝한 후 발현 하였으며, 그 결과 대량 생산의 장점이 있는 강력한 T7 promoter를 지닌 pET22b (+) 벡터를 이용하여 낮은 온도에서 단백질의 발현을 느리게 유도할 때 적절한 단백질 접힘 현상이 일어나 기능적인 scFv의 발현이 극대화됨을 확인 하였다. 또한 IPTG의 투여에 있어서 그 농도가 높아지면 빠른 단백질 유전자의 전사를 도와 발현율이 증가하지만 과도한 농도의 IPTG 투여는 세포내의 독성을 일으켜 단백질의 생산을 저해할 수 있다는 결론에 도달하였으며, 연구를 통하여 개발한 항 BNP scFv 항체가 오직 BNP 항원과의 결합특이성을 가진다는 사실도 확인 가능 하였다.

감 사

본 연구는 지식경제부 지역연계기술개발사업과 (주)아이센스의 지원에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

접수 : 2009년 9월 24일, 게재승인 : 2009년 12월 23일

REFERENCES

1. Tetin, S. Y., Q. Ruan, S. C. Saldana, M. R. Pope, Y. Chen, H. Wu, M. S. Pinkus, J. Jiang, and P. L. Richardson (2006) Interactions of two monoclonal antibodies with BNP: high resolution epitope mapping using fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry* 45: 14155-14165.
2. Deborah, A. (2004) B-type natriuretic peptide; congestive heart failure. *Clin Lab Sci.* 17: 53.
3. Brophy, S. E. et al. (2007) United States patent Application Publication. 60: 734, 964.
4. Morrison, L. K., A. Harrison, P. Krishnaswamy, R. Kazanegra, P. Clopton, and A. Maisel (2002) Utility of a rapid B-Natriuretic peptide assay in differentiating congestive heart failure from lung disease in patients presenting with dyspnea. *J. Am Coll Cardio.* 39: 202-209.
5. Longenecker, K. L., Q. Ruan, E. H. Fry, S. C. Saldana, S. E. Brophy, P. L. Richardson, and S. Y. Tetin (2009) Crystal structure and thermodynamic analysis of diagnostic mAb 106.3 complexed with BNP 5-13 (C10A). *Proteins*. 76: 536-547.
6. Cardarelli, R. (2003) B-type natriuretic peptide: A review of its diagnostic, prognostic, and therapeutic monitoring value in heart failure for primary care physicians. 16: 327-333.
7. Choi, G. H., D. H. Lee, W. K. Min, Y. J. Cho, D. H. Kweon, D. H. Son, K. M. Park, and J. H. Seo (2004) Cloning, expression, and characterization of against mycotoxin deoxynivalenol in recombinant *Escherichiacoli,* Protein Expression and Purification. 35: 84-92.
8. Whittington, H. A., L. J. Ashworth, and R. E. Hawkins (1998), Recombinant adenoviral delivery for *in vivo* expression of scFv antibody fusion proteins. *Gene therapy* 5: 770-777.
9. Heo, M. A., S. H. Kim, S. Y. Kim, Y. J. Kim, J. H. Chung, M. K. Oh, S. G. Lee (2006) Functional

expression of single-chain variable fragment antibody against c-Met in the cytoplasm of *Escherichiacoli. Protein Expression and Purification.* 47: 203-209.
10. Sambrook, J., D. W. Russell (2001) *Molecular Cloning*. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
11. Yang, Q. H., C. L. Wu, K. Lin, and L. Li (1997) Low concentration of inducer favors production of active from of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in *Escherichia coli.* Protein expression and purification. 10: 320-324.
12. Chen, S. J., M. C. Chang, and C. Y. Cheng (1997) Effect of induction conditions on production and excretion of *Aeromonas hydrophilia* Chitinase by Recombinant *Escherichia coli, Journal of Fermentation and Bioengineering.* 84: 610-613.