

글리포세이트살초제견딜성유전자전이작물검출을 위한 항체제조

선우경희, 김성준, 허명식

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《과학자, 기술자들은 하면 된다는 신심과 기어이 첨단을 돌파하여 세계를 디디고 올라서겠다는 각오를 가지고 자기 부문에서 첨단수준을 돌파하기 위한 목표를 높이 세우고 힘차게 투쟁해나가야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제24권 453~454페이지)

세계적으로 살초제견딜성유전자(CP4-EPSPS)전이작물들이 광범히 재배되고 상업화되고있는 조건에서 살초제견딜성유전자전이작물검출키트의 개발[3]이 필수적인 요구로 나서고있다. 이로부터 우리는 살초제견딜성유전자(CP4-EPSPS)전이작물들을 단백질수준에서 검출할수 있는 특이항체를 개발하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

대장균발현균주 *E. coli* BL21(DE3)/pET32a(+)-CP4-EPSPS로부터 분리정제한 CP4-EPSPS 재조합단백질(순도 97%)을 항원으로 리용하였다.

선행연구[1, 2]에 기초하여 파쥐항체서고(Griffin1. Phage Antibody Library; 력가 $3.9 \cdot 10^{12}$ PFU/mL)로부터 CP4-EPSPS scFv생성균주들을 선발하였다. scFv생성균주를 암피실린이 100 μ g/mL로 들어있는 2 \times YT배지 50mL에 접종하고 37 $^{\circ}$ C에서 하루밤 진탕배양하였다. 하루밤 배양한 배양물들을 암피실린이 100 μ g/mL 들어있는 2 \times YT배지 1L에 접종하고 A_{600} 값이 1이 될 때까지 37 $^{\circ}$ C에서 진탕배양한 다음 IPTG를 최종농도가 1mmol/L 되게 첨가하고 37 $^{\circ}$ C, 250r/min에서 7h동안 진탕배양하였다. 배양물을 5 000 \times g에서 15min간 원심분리하여 상청을 제거하고 침전물들에 주변질추출완충액(50mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, 20% 사탕, pH 8.0)을 125mL 첨가하여 잘 현탁시킨 다음 얼음욕에서 1h동안 방치한 후 10 000 \times g에서 5min간 원심분리하여 상청을 수집하였다. 이렇게 얻은 주변질추출물을 류안염색(포화도 60%)한 후 50mmol/L PBS(pH 8.0)용액 5mL에 현탁시켰다. 다음 Ni-NTA아가로스겔 탭정제를 진행하여 한오리사슬단클론항체(CP4-EPSPScFv)들을 분리정제하였다. 50mmol/L PBS(pH 8.0)용액으로 평형화한 Ni-NTA아가로스겔탭(ϕ 1cm \times 2.5cm, 2mL)에 추출물을 천천히 통과시키고 탭을 PBS(pH 8.0)용액으로 충분히 세척한 다음 200mmol/L 이미다졸을 포함하는 50mmol/L PBS(pH 6.0)용액을 1mL/min의 속도로 통과시키면서 용출되는 단백질분획을 수집하였다. 수집한 scFv용액을 50배 체적의 0.01mmol/L PBS(pH 7.4)용액으로 투석한 다음 ELISA로 특이성을 결정하고 Bradford법으로 농도를 결정하였다. CP4-EPSPS재조합단백질로 토끼를 면역하여 CP4-EPSPS에 대한 항체를 제조하고 ELISA와 면역침강반응,

면역반점법으로 항체들의 특이성 및 적용효과성을 판정하였다. 살초제견딜성유전자전이콩(《GTS 40-3-2》)과 비유전자전이콩들을 분쇄한 후 증류수로 200mg/mL의 농도가 되게 현탁하고 10 000r/min에서 10min간 원심분리한 후 상청들을 시료로 리용하였다.

결과 및 논의

1) 단클론항체토막(CP4-EPSPS scFv)의 제조

분리정제한 재조합단백질 CP4-EPSPS에 대한 현시파취선발을 3회전 진행하고 용출과 취들을 *E. coli* TG1에 감염시켜 scFv생성클론 60개를 선발하였다. 개별적인 클론들로 파취증폭액을 준비하고 CP4-EPSPS에 대한 파취ELISA를 진행하여 $A_{시험}/A_{음성대조}$ 가 2.0이상인 5개의 균주들을 선발하였다. 5개의 개별적인 균주들을 IPTG농도 1mmol/L, 37°C, 250r/min 조건에서 7h동안 유도배양한 후 주변질로부터 scFv들을 분리하였다. 분리한 scFv들을 리용하여 CP4-EPSPS항원과 살초제견딜성유전자전이콩(《GTS 40-3-2》), 비유전자전이콩들의 추출물들에 대한 ELISA를 진행하였다.(표)

표. 분리한 scFv들의 특이성검정을 위한 ELISA

클론번호	CP4-EPSPS항원 ($A_{시험}/A_{음성대조}$)	유전자전이콩(《GTS 40-3-2》) ($A_{시험}/A_{음성대조}$)	비유전자전이콩 ($A_{시험}/A_{음성대조}$)
1	3.241 ± 0.014	3.032 ± 0.011	1.435 ± 0.021
2	2.302 ± 0.031	2.144 ± 0.023	2.016 ± 0.013
26	5.124 ± 0.025	3.421 ± 0.012	1.127 ± 0.032
37	2.743 ± 0.081	2.545 ± 0.028	1.918 ± 0.014
50	2.563 ± 0.017	2.264 ± 0.012	1.769 ± 0.021

$n=3$

표 1에서 보는바와 같이 CP4-EPSPS항원과 유전자전이콩 《GTS 40-3-2》에 대하여 가장 높은 특이성을 나타내는 26번 균주를 scFv생산균주로 선발하였다. 26번 균주를 1L 규모에서 배양하고 주변질을 추출한 다음 Ni-NTA아가로즈겔정제를 진행하였다. 주변질추출물을 류안염석하여 5mL의 50mmol/L PBS(pH 8.0)용액에 풀고 Ni-NTA아가로즈겔탑에 천천히 통과시켜 흡착시켰다. 탑을 PBS로 충분히 세척하고 200mmol/L 이미다졸용액을 6mL 통과시켜 탑에 흡착된 scFv들을 용리시킨 다음 흡광도(OD_{280})의 변화를 본 결과는 그림 1과 같다.

이때 시료의 흐름속도는 1mL/min, 0.5mL/분획으로 설정하였다.

그림 1에서 보는바와 같이 용리시작 5min부터 8min사이에 봉우리가 나타났다. 분획들에 대한 12% SDS-폴리아크릴아미드겔전기영동을 진행하고 전기영동상을 덴시터메터(《GS-800 Calibrated Densitometer》)로 분석한

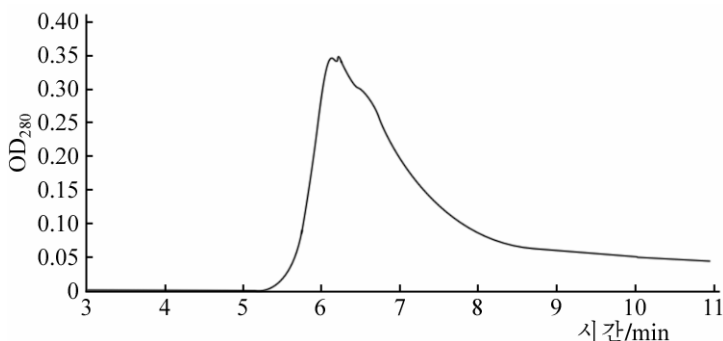


그림 1. Ni-NTA아가로즈겔크로마토그램

용출속도 1mL/min, 분획체적 0.5mL

결과 그림 2에서 보는바와 같이 Ni-NTA아가로즈겔 정제를 진행하였을 때 70 000Da근방에서 단일한 띠가 관찰되었으며 얻어진 scFv의 순도는 95%정도로 평가되었다. 3mL의 scFv용출분획의 농도를 단백 질정량방법(Bradford법)으로 측정한 결과 0.3mg/mL 였다.

2) 항CP4-EPSPS토끼항체의 면역학적특성

CP4-EPSPS재조합단백질로 토끼를 면역시키고 혈청을 분리하는 방법으로 CP4-EPSPS토끼 항체를 얻었다. 혈청(1mg/mL)을 중심홀에 놓고 항원들을 주변에 배열하는 방법으로 면역확산침강반응을 진행한 결과 토끼 항체는 재조합단백질과 뚜렷한 침강선을 형성하였으며 유전자전이콩의 추출물과도 명백한 침강선을 형성하였다. 그러나 비유전자전이콩의 추출물과는 침강선을 형성하지 않았다.

이 결과는 분리한 토끼항체가 면역침강반응상에서 CP4-EPSPS재조합단백질뿐 아니라 살초제건딜성유전자(CP4-EPSPS)전이콩의 단백질과도 특이적으로 반응하지만 비유전자전 이콩의 단백질과는 반응하지 않는다는것을 보여준다.

3) 면역반점법에 의한 검사

니트로섬유소막에 분리한 토끼 항체를 부착시키고 나노금표식한 CP4-EPSPS scFv를 리 용하여 면역반점법으로 유전자전이콩과 비유전자전이콩에 대한 검사를 진행하였다.(그림 3)

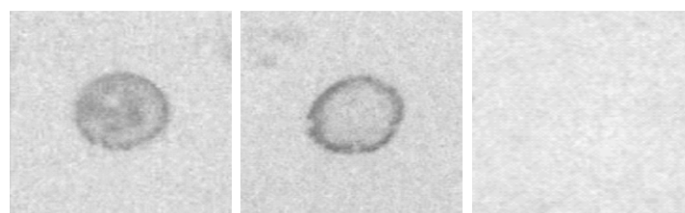


그림 3. 나노금표식 CP4-EPSPS scFv를 리용한 면역반점법에 의한 검사

1) 재조합CP4-EPSPS항원, 2) 유전자전이콩(《GTS 40-3-2》), 3) 비유전자전이콩

그림 3에서 보는바와 같이 재조합CP4-EPSPS단백질과 유전자전이콩 《GTS 40-3-2》에 서 뚜렷한 면역반점이 나타났으나 비유전자전이콩에서는 발색이 전혀 나타나지 않았다. 결과는 얻어진 항체들을 글리포세이트살초제건딜성유전자전이작물검사에 충분히 리용할 수 있다는것을 보여준다.

맺 는 말

파취항체서고로부터 분리한 단클론항체(항CP4-EPSPS scFv)와 항CP4-EPSPS토끼 항체 를 리용하여 살초제건딜성유전자전이콩(《GTS 40-3-2》)을 효과적으로 검출하였다.

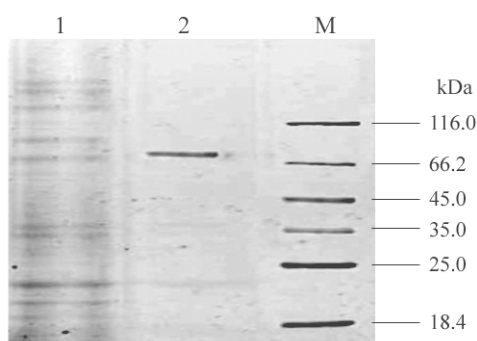


그림 2. 항CP4-EPSPS scFv의 12% SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동상
1-주변질추출물, 2-Ni-NTA아가로즈겔 정제산물, M은 단백질분자량표식자

참 고 문 헌

- [1] M. Philippa et al.; Antibody Phage Display: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 178, Humana Press, 133~342, 2002.
- [2] Robert Burns; Immunochemical Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 295, Humana Press Inc, 1~280, 2005.
- [3] M. M. Marani et al.; Peptide Science, 104, 2, 91, 2015.

주체105(2016)년 9월 5일 원고접수

Preparation of Antibody for the Detection of the Glyphosate Herbicide Tolerant Transgenic Crops

Sonu Kyong Hui, Kim Song Jun and Ho Myong Sik

We developed antibodies for the detection of the glyphosate herbicide tolerant transgenic crops.

We detected the glyphosate herbicide tolerant soybean(“GTS 40-3-2”) effectively with monoclonal antibody(anti-CP4-EPSPS scFv) and anti rabbit antibody CP4-EPSPS.

Key word: *CP4-EPSPS*, antibody, scFv