

## HBe항원발현효모운반체 pPIC9K-HBe의 제조

리성현, 리신혁, 윤재성

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《정보기술, 나노기술, 생물공학을 비롯한 핵심기초기술과 새 재료기술, 새 에너지기기술, 우주기술, 핵기술과 같은 중심적이고 견인력이 강한 과학기술분야를 주라격방향으로 정하고 힘을 집중하여야 합니다.》

B형간염바이러스(HBV)는 헤파드나바이러스과에 속하며 비루스성간염을 일으키는 기본비루스의 하나이다. HBV가 일으키는 B형간염은 위험성이 높은 전염성질환이다. 세계보건기구자료[1, 3, 5]에 의하면 세계적으로 약 20억명의 인구가 HBV에 감염되어있으며 그중 만성감염자가 4억명, 매해 약 100만명이 HBV가 일으키는 간부전, 간경변 및 간암으로 하여 사망하고있다. 현재 만성간염으로 앓는 환자들중 약 80%이상이 만성B형간염환자이며 HBV만성감염을 앓은 사람들은 원발성간세포암의 상대적위험성이 정상사람에 비하여 적어도 300배 높다.[2-4]

B형간염e항원(HBeAg)은 피속에 존재하는 가용성항원으로서 HBV-DNA와 함께 HBV 복제의 정성 및 정량지표로서 만성HBV감염의 진단에서 중요한 자리를 차지하며 더우기는 B형간염바이러스의 모아수직감염을 예방하는데서 관건적의의를 가진다.[1, 6, 7]

그러나 지난 시기 HBV감염자혈청으로부터 분리한 HBeAg는 원천이 제한되어있고 재현성과 안정성이 낮은 결함을 가지고있으며 대장균에서 발현시킨 재조합HBe항원은 B형간염숙질항원과의 교차반응성이 있는것으로 하여 B형간염진단에서 심각한 문제를 안고있다.[6, 7]

이로부터 우리는 *Pichia*효모계통을 리용하여 특이성 및 면역반응성이 높고 B형간염숙질항원과의 교차반응성이 없는 재조합B형간염e항원을 발현시키기 위한 연구를 하였다.

### 재료와 방법

제한효소로는 *EcoR* I, *Xba* I, *Sal* I, *pfu* DNA폴리메라제, T4 DNA리가제, dNTP를 리용하였다.

프라이머로는 정방향프라이머 5'-AGAGAATTCATGCAACTGTTCCAC-3', 역방향프라이머 5'-CGGGAATTCTCTAGACTAAACAACAGTAGT-3'를 리용하였다.

운반체로는 효모통합형운반체 pPIC9K(9.3kb)를 리용하였다.

형질전환수용균으로 *E. coli* TOP 10F', 메타놀동화성효모그루 *Pichia pastoris* GS115(HIS4<sup>-</sup>)를 리용하였다.

핵산분리정제는 알카리법[1]으로, 대장균형질전환은 염화칼시움법[1]으로, 유전자단편분획채취는 저융점아가로즈겔법[1]으로, 핵산단편크기확인용 아가로즈겔전기영동법[1]으로, 유전자단편과 운반체와의 재조합은 T4 DNA리가제를 리용하여 진행하였다.

메타놀동화성효모그루 *Pichia pastoris* GS115(HIS4<sup>-</sup>)의 최적코돈에 맞게 HBeAg의 배열염기들을 치환하여 유전자를 설계합성하였다.

전기천공법에 의한 효모형질전환은 메타놀동화성효모감수성세포 80μL와 *Sal* I 로 절단한 선상플라스미드 10μL(5~10μg)를 혼합하여 미리 랭각한 전용큐베트에 넣고 얼음욕에서

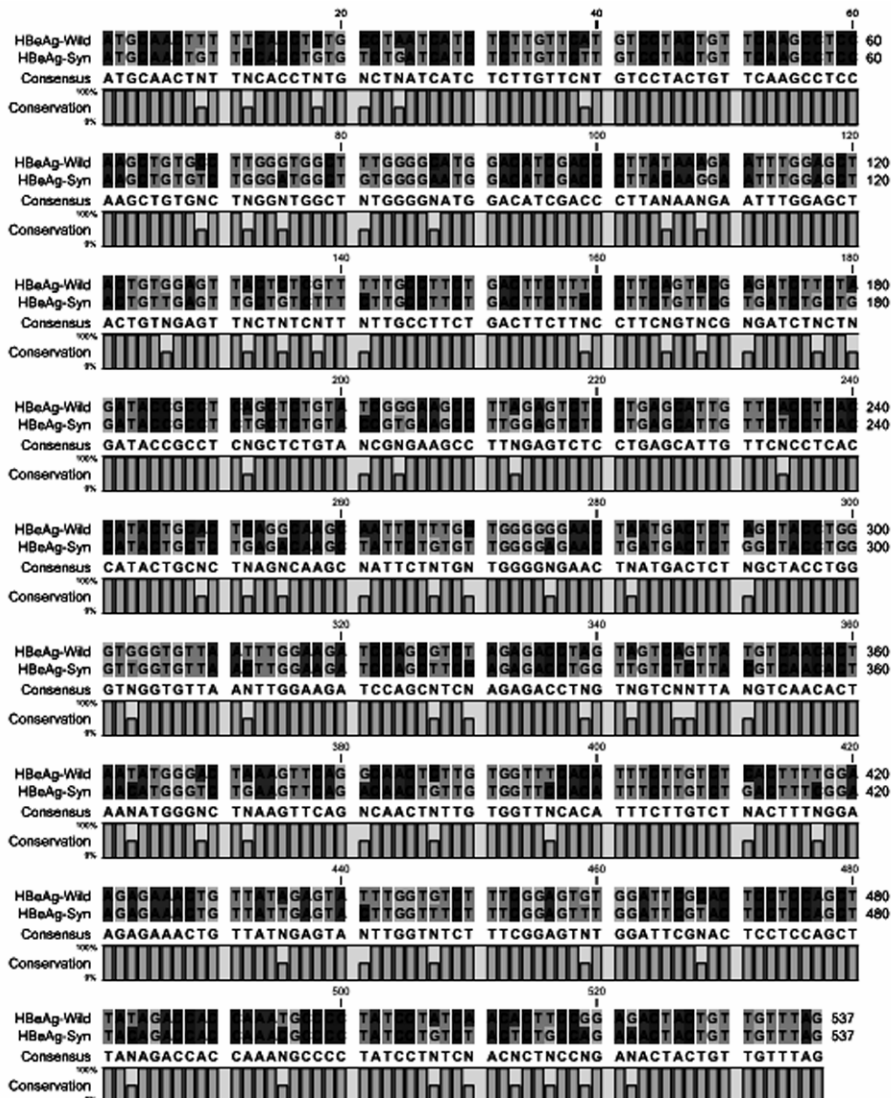
5min동안 방치한 다음 1 500V, 25 $\mu$ F, 200 $\Omega$ 의 조건에서 10ms동안 전기천공하는 방법으로 진행하였다. 다음 미리 랭각시킨 1mol/L 소르비톨 1mL를 넣고 혼합한 다음 1.5mL 원심관에 옮겨 30 $^{\circ}$ C에서 2h동안 배양하였다. 100~200 $\mu$ L를 MG평판에 도말하고 30 $^{\circ}$ C에서 2~4일동안 배양하였다.

형질전환된 재조합HBe항원발현효모균들을 최소메타놀배지인 MM배지에서 3일간 배양하여 Mut<sup>+</sup>형질전환체를 선별하였다. 그중 잘 자란 균무지들을 선택하여 BMGY배지에서 증식시킨 후 BMMY배지로 교체하고 매일 메타놀을 0.5% 첨가하면서 유도배양하였다.

## 결과 및 논의

### 1) HBe항원유전자의 설계 및 합성

야생형HBV의 e항원유전자배열가운데서 효모에서 빈도가 낮은 암호들을 빈도가 높은 암호들로 치환하여 전문기관에 주문하여 합성한 배열은 다음과 같다.



## 2) HBe항원유전자발현운반체 pPIC9K-HBe제조

pPIC9K를 제한효소 *EcoR* I 로 반응시킨 다음 T4 DNA리가제를 리용하여 HBe항원유전자단편과 연결시켰다.(그림 1)

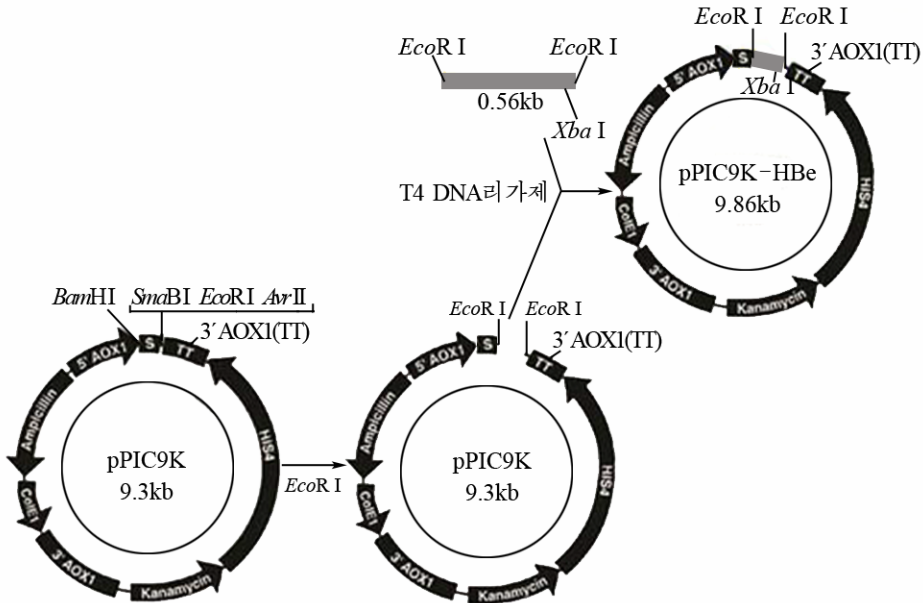


그림 1. HBe항원유전자발현운반체 pPIC9K-HBe제조도식

리가제반응산물을 염화칼시움법을 리용하여 TOP 10F'에 형질전환시켰다.

형질전환된 후보재조합체균그룹들에 대한 플라스미드신속분리결과는 그림 2, 3과 같다.

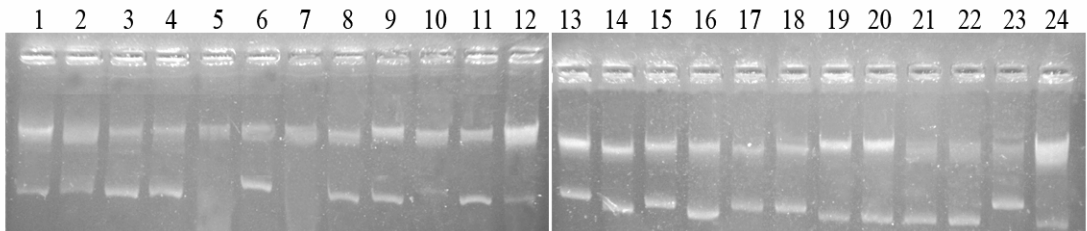


그림 2. 형질전환체들의 속성분리상

1-24는 후보재조합체균그룹

플라스미드속성분리결과로부터 재조합체로 보아지는 7개의 형질전환체에 대하여 PCR를 진행하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 5개의 후보재조합체(1, 3, 4, 5, 6번 주로)에서 HBe항원유전자단편의 증폭이 확인되었다.

선발한 5개의 후보재조합체에서 유전자단편의 방향성을 확인하기 위하여 제한효소 *Xba* I 를 반응시켰다.(그림 4)

아가로즈겔전기영동에서 정방향인 경우에는 9.05kb와 0.81kb 크기의 단편이, 역방향인 경우에는 8.49kb와 1.37kb 크기의 단편이 얻어지게 되어있다. 그림 4에서 보는바와 같이 1, 3번의 후보재조합체가 정방향재조합체로 확인되었다.(9.05, 0.81kb)

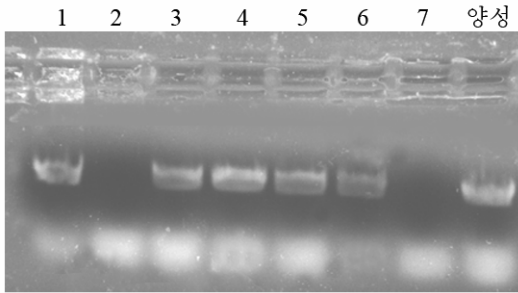


그림 3. 후보재조합체들에 대한 1% 아가로즈겔 전기영동상

1-1번 재조합체균그루, 2-3번 재조합체균그루,  
3-5번 재조합체균그루, 4-6번 재조합체균그루,  
5-11번 재조합체균그루, 6-18번 재조합체균그루,  
7-22번 재조합체균그루

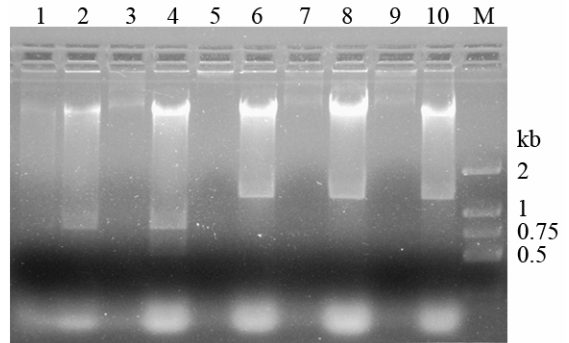


그림 4. 후보재조합체의 제한효소반응상

1-1번 재조합체DNA, 2-*Xba* I로 처리한 1번 재조합체DNA, 3-3번 재조합체DNA, 4-*Xba* I로 처리한 3번 재조합체DNA, 5-4번 재조합체DNA, 6-*Xba* I로 처리한 4번 재조합체DNA, 7-5번 재조합체DNA, 8-*Xba* I로 처리한 5번 재조합체DNA, 9-6번 재조합체DNA, 10-*Xba* I로 처리한 6번 재조합체DNA, M은 분자크기표식자

### 3) 전기천공에 의한 재조합발현운반체의 숙주내 도입

배양시간에 따라 균무지의 유무를 관찰한 결과 24h 되었을 때에는 균무지가 나타나지 않았고 48h 되었을 때에는 0.6mm, 60h 되었을 때에는 1.2mm의 크기를 가진 균무지가 나타났으며 총적으로 300개이상의 균무지가 출현하였다. 재조합발현운반체를 넣지 않은 대조배지에서는 균무지가 나타나지 않았다.

형질전환된 재조합HBe항원발현효모균들을 최소메타놀배지인 MM배지에서 3일간 배양하여  $Mut^+$ 형질전환체를 선발하였다.

### 4) 재조합HBe항원단백의 발현

선별한 재조합HBe항원발현효모운반체를 BMGY증식배지와 BMMY유도배지에서 배양한 다음 배양상청액에서의 재조합HBe항원에 대한 효소면역검사를 진행한 결과 재조합HBe항원이 정확히 발현된다는것을 확인하였다.

## 맺 는 말

HBe항원발현효모운반체 pPIC9K-HBe(9.86kb, GS115/ $Mut^+$ )를 제조한 후 그것을 효모숙주 *Pichia pastoris* GS115에 형질전환시킨 결과 HBeAg유전자가 정확히 발현되었다.

## 참 고 문 헌

- [1] G. Bang et al.; Virology, 332, 216, 2005.
- [2] J. M. Murray et al.; Journal of Theoretical Biology, 391, 74, 2016.
- [3] K. K. Ljunggren et al.; Journal of Hospital Infection, 64, 352, 2006.
- [4] M. L. Michel et al.; Journal of Hepatology, 54, 1286, 2011.
- [5] Y. Lobaina et al.; Vaccine, 2452, 58, 2006.

[6] 李计来 等; 中国生物制品学杂志, 26, 6, 745, 2013.

[7] 李朝霞 等; 中华检验医学杂志, 29, 9, 807, 2006.

주체109(2020)년 4월 5일 원고접수

## **The Manufacturing of pPIC9K-HBe, the Yeast Vector for Expressing HBeAg**

*Ri Song Hyon, Ri Sin Hyok and Yun Jae Song*

We manufactured pPIC9K-HBe(9.86kb, GS115/Mut<sup>+</sup>), the yeast vector for expressing HBeAg. We transformed the recombinant expressing vector, pPIC9K-HBe into *Pichia pastoris* GS115 and validated the expression of HBeAg.

Keywords: HBeAg, pPIC9K, *Pichia pastoris*