

메타놀동화성효모(*Pichia pastoris*)에서 HBe항원의 발현

최수성, 박숙영, 윤재성

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《보건부문에서는 위생방역기관들을 현대적으로 꾸리고 전염병을 막기 위한 사업에 힘을 집중하며 예방원식의료봉사를 잘하여 병걸린률을 극력 낮추어야 합니다.》

지금 세계적으로 4억명의 사람들이 B형간염비루스(HBV)에 감염되어있는데 그중 해마다 약 백만명의 사람들이 간세포암(HCC)과 같은 말기간장질병으로 사망하고있다.[4]

HBe항원은 중요한 생물재료로서 HBV감염자혈청검사와 관련한 진단액제조에 널리 이용된다. 지난 시기 HBe항체검사에 이용되었던 HBe항원은 주로 HBV감염자의 혈청으로부터 얻었는데 그 원천을 확보하기가 매우 어렵고 검사결과가 매번 같지 않을뿐아니라 안전하지 못하고 전염성까지 나타내었다.[3]

이로부터 우리는 재조합HBe항원효모발현운반체(pPIC9K-HBe, 9.86kb)를 만드는데 기초하여 이것을 메타놀동화성효모(*Pichia pastoris* GS115)에서 발현시키기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

균그루로는 메타놀동화성효모그루인 *Pichia pastoris* GS115(HIS4⁻)를, 운반체로는 재조합HBe항원효모발현운반체 pPIC9K-HBe(9.86kb)를 이용하였다.

배지로는 BMGY액체 및 고체배지, BMMY액체 및 고체배지, YPG액체 및 고체배지, MG액체 및 고체배지, MM액체 및 고체배지와 무기염합성배지(10×NPK+50×MCS+2% 글리세롤)를 이용하였다.

형질전환된 재조합HBe항원발현효모균을 최소배지인 MG고체배지에서 2일간 배양하여 증식유무를 확인한 후 그중 잘 자란 균무지들을 선택하여 BMGY액체배지에서 2일간 증식시킨 다음 BMMY액체배지로 교체하고 매일 메타놀을 배지에 0.5% 되게 첨가하면서 유도배양하였다.[2] 재조합HBe항원발현량측정은 샌드위치법에 기초한 효소면역검사법(ELISA)으로 진행하였는데 균체농도는 $A_{600}=100$ 을 기준으로 측정하였다.

Falcon병(배지량 10mL)배양과 플라스크(배지량 100mL)배양은 주기식으로, 30L 탱크배양은 자동배양장치(《Marushi》)에서 연속첨가방식으로 진행하였다.

메타놀농도는 선행방법[1]에 준하여 측정하였다.

HBe항원의 특이성은 현재 상품화되어있는 B형간염비루스검출 면역크로마토신속키트를 이용하여 진행하였다. 이때 HBs항원과 HBs항체, HBe항원은 두 띠로 나타날 때 양성이고 나머지 HBe항체와 HBe항체는 한띠로 나타날 때 양성이다.

결과 및 논의

1) 전기천공에 의한 재조합발현운반체의 숙주세포로의 도입

재조합발현운반체 pPIC9K-HBe를 숙주인 효모 *Pichia pastoris* GS115와 혼합하여 전기천

공한 다음 MG고체배지에 도말하였다. 배양시간에 따라 균무지의 유무를 관찰한 결과 24h 되었을 때에는 균무지가 인정되지 않았으나 48h 되었을 때에는 0.6mm, 60h 되었을 때에는 1.2mm의 크기를 가진 균무지가 나타났으며 총적으로 균무지수는 300개이상 출현하였다.

2) 재조합효모의 HBe항원단백질발현효과판정

우에서 나타난 균무지들을 80개씩 나누어 각각 4개의 BMGY고체배지에 옮기고 매 평판에서 임의로 10개를 선택하여 효소면역검사법으로 HBe항원발현량을 평가하였다.(표 1) 이때 HBe항원발현량이 양성대조보다 낮은것은 결과에 포함시키지 않았다.

표 1. 효소면역검사법을 리용한 균무지번호에 따르는 재조합효모의 HBe항원발현량

균무지번호	HBe항원발현량(A_{450})	균무지번호	HBe항원발현량(A_{450})
1-3	1.33	3-6	1.12
1-8	2.22	3-8	2.17
2-2	1.15	4-2	1.54
2-6	1.67	4-5	2.20
3-4	1.55	4-8	1.93

키트의 음성대조 0.01, 양성대조 0.78

표 1에서 보는바와 같이 HBe항원발현량이 2이상인 균무지들은 1-8, 3-8, 4-5였으며 여러차례의 배양을 통하여 최종적으로 1-8균그룹을 선택하였다.

3) 배양규모에 따르는 재조합효모의 발현특성

소규모배양에서의 발현특성 재조합효모를 Falcon배양병(배양액 10mL)과 플라스크(배양액 100mL)에서 2일간 증식시킨 다음 매일 배지에 메타놀을 0.5% 되게 첨가하여 유도배양을 진행하면서 유도배양기일에 따르는 HBe항원발현량을 평가하였다.(표 2)

표 2. 배양규모에 따르는 재조합효모의 발현특성

배양 규모	지표	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
10mL	A_{600}	2.0	17.2±0.9*	33.6±0.9*	43.8±0.8*	50.0±0.8	52.2±0.7	53.2±0.7
	HBe항원 발현량	—	—	—	—	—	2.2±0.06	2.2±0.06
100mL	A_{600}	2.0	17.8±0.8*	34.4±0.5*	44.1±0.7*	52.5±0.4	52.4±0.3	52.7±0.3
	HBe항원 발현량	—	—	—	—	—	2.3±0.03	2.3±0.03

n=3, * $p<0.05$ (96h과 비교)

표 2에서 보는바와 같이 배양규모에 관계없이 96h 즉 유도배양 2일까지 증식성이 점차 높아졌으나 그 이후로는 완만하였다. 배양 96h 즉 유도배양 2일까지는 HBe항원이 발현되지 않았고 유도배양 3일째부터 발현되었다.

30L 배양장치에서의 발현특성 소규모배양에서와 같이 주기식배양이 아니라 30L배양장치에서 무기염과 글리세롤 및 메타놀을 첨가하면서 HBe항원발현량을 평가하였다. 이때 산소분배(주입압력 202.6kPa(2기압), 탱크내압 101.3kPa(1기압))를 리용하여 산소를 주입하고 압

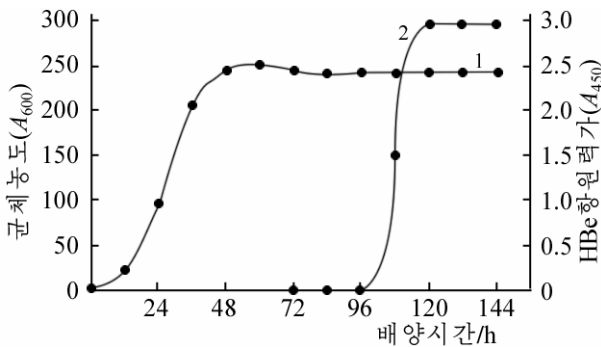


그림 1. 30L 배양장치에서 유도배양
기일에 따르는 증식곡선
1-균체농도, 2-HBe항원력가

모니아수로 낮아진 pH를 5~6으로 보정하였으며 증식배양 2일 후에 메타놀유도배양을 진행하였다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 증식배양 2일까지 균체농도는 지수함수적으로 증가하였으며 유도배양기간에는 완만하게 증식하여 유도배양 3일(배양 5일, 120h)에는 균체농도가 240(A_{600})으로서 플라스크배양의 4배이상이었다.

또한 HBe항원은 소규모배양에서와 같이 유도배양 3일만에 발현되었으며 그림 2에서 보는것처럼 발현량은 3.0으로서 양성대조의 4배정도였다. 이것은 HBe항원이 높

은 수준에서 발현된다는것을 의미한다.

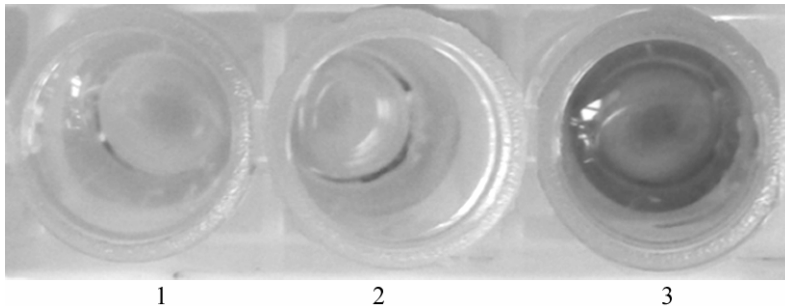


그림 2. 30L 배양상청액의 HBe항원에 대한 효소면역검사결과
1-음성대조, 2-양성대조 ($A_{450}=0.78$), 3-HBe항원
발현효모배양상청액 ($A_{450}=3.0$)

4) HBe항원의 특이성검토

B형간염신속키트를 리용하여 배양상청액의 항원성을 확인하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 배양상청액은 HBe항원검출키트에서만 양성을 나타내고 HBs항원, HBs항체, HBe항체 및 HBc항체검사에서는 모두 음성이었다.

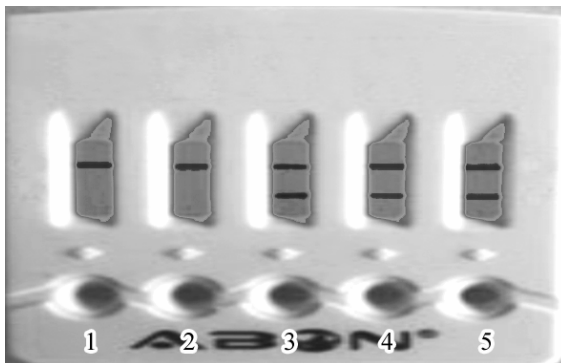


그림 3. 배양상청액의 항원성
1-HBs항원, 2-HBs항체, 3-HBe항원,
4-HBe항체, 5-HBc항체,

맺는 말

1) 전기천공법으로 재조합발현운반체 pPIC9K-HBe(9.86kb)를 *Pichia pastoris* GS115에 형질전환시키고 HBeAg유전자가 발현된다는것을 확인하였다.

2) HBeAg항원단백질은 배양규모에 관계없이 유도배양 3일부터 발현되었으며 무기염첨가배양으로 균증식성이나 HBe항원발현력가를 유의하게 높일수 있다.

참 고 문 헌

- [1] 고봉국 등; 조선민주주의인민공화국약전, 의학과학출판사, 66~163, 주체92(2003).
- [2] R. David et al.; *Pichia* Protocols, Humana Press, 1~278, 2005.
- [3] D. Rolland et al.; *Journal of Virological Methods*, 103, 67, 2002.
- [4] Songsong Lan et al.; *International Journal of Infectious Diseases*, 46, 42, 2016.

주체109(2020)년 4월 5일 원고접수

Expression of Hepatitis B Virus e Antigen(HBeAg) in *Pichia pastoris* GS115

Choe Su Song, Pak Suk Yong and Yun Jae Song

Pichia pastoris GS115 is transformed with pPIC9K-HBe by electroporation and HBeAg is identified with expression product.

The titre of HBeAg is significantly high at 3rd day of induction culture and isn't higher after 3 days. The growth of *Pichia pastoris* and the titre of HBeAg expressed are significantly higher in the non-organic compound adding incubation.

Keywords: HBeAg, expression, *Pichia pastoris*