

대장균에서 인간면역결핍 바이러스 1형의 gag p24 및 env gp41 단백질의 과발현 및 정제

동아제약 (주) 연구소

김채영 · 신순천 · 이성희 · 김원배 · 김병문

=Abstract=

Overexpression and Purification of p24 and gp41 Proteins of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in *E. coli*

Chae-Young Kim, Soon-Cheon Shin, Sung-Hee Lee,
Won-Bae Kim and Byong-Moon Kim

Research Laboratories, Dong-A Pharmaceutical Co., Ltd., Kyunggi-Do 449-900, Korea

Synthetic genes encoding the gag p24 and the part of the envelope protein gp41 of the human immunodeficiency virus (HIV-1) were cloned and overexpressed as fusion proteins in *Escherichia coli*, using an expression vector carrying T7 promoter and the poly-histidine leader sequence. The overexpressed p24 fusion protein was purified by centrifugation, Ni-affinity chromatography and CM-sepharose chromatography. The overexpressed gp41 fusion protein was purified by centrifugation, C₄ chromatography and DEAE-sepharose chromatography. The purified fusion proteins showed a high level of purity and immunoreactivity in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and western blot analysis. These results suggest that this prokaryotic expression - purification method is suitable for obtaining a large amount of the viral antigen which may be useful for screening of antibodies to HIV-1 in human blood samples.

Key Words: HIV-1, p24, gp41, Expression, Purification

서 론

인 면역결핍 바이러스 1형 (human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)은 인간에게 후천성 면역결핍증 (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS)을 유발하는 인간 리트로바이러스 (retro virus)로서 1983년에 프랑스 Pasteur연구소에서 최초로 분리되었으며 [1], 1986년에는 아프리카 및 유럽의 일부지역에서만 발견되고 있는 인 면역결핍 바이러스 2형 (human immunodeficiency virus type 2, HIV-2)도 존재함이 확인되었다 [2].

HIV-1 바이러스는 약 10Kb의 RNA 게놈을 포함하고 있으며, 이 RNA게놈은 5', 3' 말단 양쪽에 긴 반복적인 염기서열 (long terminal repeat) 그리고 gag, pol, env 유전자 및 기타 조절유전자들로 구성되어 있다 [3]. gag 유전자는 비리온 (virion)의 코어 (core) 핵단백질, pol 유전자는 핵산합성과 재조합에 관련된 작용을 하는 단백질, 그리고 env 유전자는 바이러스의 외피 (envelope)를 구성하는 단백질을 생성한다 [4]. 또한, 조절유전자들은 tat, rev 그리고 nef 등이 있으며, 이 유전자들은 바이러스 증식에 필수적인 단백질들을 생성하여 바이러스 증식률을 조절하는데 중요한 역할을 한다 [5]. 이들 이외에 기타 다른 종류의

Corresponding author: Chae-Young Kim, Research Laboratories, Dong-A Pharmaceutical Co., Ltd., Kyunggi-Do 449-900, Korea

부수적인 유전자 (accessory gene products)들도 존재하는 것으로 알려져 있다 [4].

유병학적인 분석에 의하면 HIV-1 바이러스는 감염자의 혈액, 정자 그리고 경부 및 질 분비물을 통해 다른 정상인에게 전파되는 전염성 바이러스로서, 감염자와의 성접촉, 감염혈액 및 혈액 제제의 수혈, 마약 복용자들과의 주사기 혼용 등이 주요 감염 경로가 되고 있다. 세계 보건기구 (WHO)의 자료에 의하면 1997년말 현재 HIV 감염자수가 전 세계적으로 3천60만명에 이르고 있으며, 2000년에는 4천만명에 육박할 것으로 예측되고 있을 정도로 HIV 감염자가 계속 늘어나고 있는 실정이다 [6].

AIDS는 그 동안 효과적인 치료방법이 없는 불치의 병으로 알려져 왔으나, 최근에 HIV의 복제 및 증식을 저해하는 약물들을 사용한 병용치료법이 어느 정도 효과를 나타내면서 AIDS의 치료 가능성이 점차 높아져 가고 있다 [7]. 그러나 현재까지는 AIDS를 완전하게 치료하는 방법이나 HIV예방 백신이 개발되어 있지 않은 상황으로 HIV 감염 여부를 조기에 검사하여 미연에 방지하는 것이 최선의 길이다.

HIV 검사에는 HIV가 인체에 감염된 후 감염자의 혈액속에 나타나는 다양한 혈청학적 마커들을 측정하는 방법들이 주로 사용되고 있다. 인체에 HIV-1이 감염되면, 감염초기에는 HIV-1 p24항원이 생성되어 혈액내에 고농도로 존재하다가, HIV-1 감염 2주~3개월 내에 혈청학적 전환이 일어나면서 HIV-1에 대한 항체가 생성되고 HIV-1 p24항원의 농도는 감소하여 측정치 이하로 줄어든다. HIV-1에 대한 항체로는 일반적으로 gag (p24) 및 envelope (gp120 및 gp160)에 대한 항체가 먼저 생성되며 gp41 및 pol에 대한 항체 형성이 뒤따른다 [8]. 또한, HIV-1 항체는 IgM 항체가 먼저 생성되고 시간이 지남에 따라 IgG 항체로 전환되는 것으로 보고되고 있다 [9].

현재, HIV-1 검사법으로는 HIV-1 감염자의 혈액속에 존재하는 마커들중 HIV-1 특이 항체들을 측정하는 항체 검사법이 가장 널리 사용되고 있으며, 특히 효소면역 측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 원리를 이용하여 HIV-1 gag 및 envelope에 대한 특이 항체들을 측정하는 시약들이 정확·신속·간편·경제성면에서나 대량 검사시 많은 장점을 갖고 있어 가장 많이 사용되고 있다 [10].

1985년에 처음으로 개발된 HIV-1 항체 진단시약은 세포 배양법으로 생산된 HIV-1 바이러스 분해물을 항원으로 사용하여 제조된 1세대 ELISA 진단시약들로 많은 문제점이 있었다. 이들 1세대 시약들은 바이러스 분해물 전체를 항원으로 사용함으로써 항체 측정에 중요한 특이항원의 농도가 낮아 민감도가 저하되었으며 바이러스 분해물에는 인간 혈액내 물질과 비 특이 반응을 보이는 성분이 있어 위양성 반응이 일어나는 경우도 발생하였으며, 또한 바이러스 분해물 취급시 감염의 위험성을 배제할 수 없었다 [11]. 1세대 진단시약들의 단점들은 유전자 재조합기술을 이용하여 제조된 재조합 HIV 항원들이나 합성 펩티드 항원들을 사용한 2세대 ELISA 시약들이 개발됨에 따라 어느 정도 해결이 되고 있다. 이들 2세대 시약들은 항원성이 높으며 진단에 중요한 항원들만 사용함으로써 1세대 진단시약들의 문제점을 해결하였고, 최근에는 double-antigen sandwich ELISA 원리를 이용한 3세대 시약들이 개발되어 IgM 항체도 측정이 가능해짐에 따라 초기 감염자에 대한 민감도가 향상되었고, 특이도도 더욱 개선되었다 [12].

본 연구에서는 HIV-1항체 검출에 유용하게 사용될 수 있는 고순도의 고 반응성 HIV-1 p24 및 gp41항원들의 대량생산 공정을 확립하고, 생산된 항원들의 반응성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 발현 벡터

HIV-1의 core 및 env지역의 유전자 서열을 참조하여 p24 및 gp41항원 유전자를 설계하고 합성하였다. 유전자 합성은 DNA 합성기 (Applied Biosystem 381A)를 이용하여 몇 개의 단편으로 합성한 후 결합하여 각각의 항원 유전자를 만들었다. p24항원 유전자는 대장균 발현벡터인 pRSETA 플라스미드 (Invitrogen사)의 BamH I과 EcoR I 제한효소 자리에 T₄리가제 (ligase)를 이용하여 결합시켜, 재조합 플라스미드 pRSETA-p24를 만들었다. 또한 gp41항원 유전자는 pRSETA 플라스미드의 BamH I과 Pst I 제한효소 자리에 결합시켜, 재조합 플라스미드 pRSETA-gp41을 만들었다. 숙주세포로는 대장균 BL₂₁DE₃를 이용하였다. pRSETA 벡터에 결합된 항원은 T₇ promoter 조절 하에 있으며, 숙주 세포 내에서 발현

되는 T₇ polymerase에 의해 전사되는 발현체계를 가지고 있다. 발현 시 각각의 항원은 N발단부위에 6개의 히스티딘 아미노산이 포함하는 약 30개의 아미노산으로 구성된 펩티드 융합단백질 형태로 발현시켰다.

2. 배양 및 발현 유도

p24항원 발현 균주 (BL₂₁DE₃/pRSETA-p24)와 gp41항원 발현 균주 (BL₂₁DE₃/pRSETA-gp41)을 각각 50 µg/ml 암피실린을 함유한 20 ml LB배양액 (Luria-Bertani Medium)에 접종한 후 37°C에서 14시간 배양하였다. 이렇게 배양시킨 종균 5 ml을 50 µg/ml 암피실린을 함유한 LB배양액 2 L에 접종 후 37°C에서 14시간 배양하였다. 균체 배양액으로부터 원심분리기를 이용 소량의 균체를 각각 회수하여 SDS-PAGE와 western blot방법으로 발현을 및 항원성을 확인하였다.

3. p24항원 정제

p24항원이 발현된 균주 배양액 2 L를 12,000×g에서 30분간 원심 분리하여 균체를 분리하였다. 분리된 균체를 PBS (phosphate buffered saline)완충액으로 2회 세척 후, 세척된 균체 10 g당 TE-I (Tris 6 g, EDTA 0.372 g, NaCl 5.8 g/L, pH 8.0)완충액 30 ml를 넣어 잘 현탁하여 초음파 분쇄기로 균체를 파쇄하였다. 파쇄된 균체를 12,000×g로 30분간 원심 분리하여 상등액을 제거 후 봉입체 (inclusion body)을 분리하였다. 분리한 봉입체에 TE-I 완충액 30 ml를 첨가하고 잘 현탁시킨 후 라이소자임 (Sigma)을 0.2 mg/ml, DNase I (B.M)을 10 µg/ml되게 첨가하여 37°C에서 60분간 혼합하였다. 이렇게 반응시킨 반응액을 12,000×g에서 30분간 원심 분리시켜 봉입체를 다시 회수하였다. 회수된 봉입체에 TE-II (Tris 6 g, EDTA 0.372 g/L, pH 8.0) 완충액 30 ml를 넣어 잘 현탁 후 Triton x-100을 0.5%되게 첨가하여 37°C에서 30분간 혼합하였다. 위 반응액을 다시 12,000×g에서 30분간 원심 분리하여 봉입체를 회수하였다.

이것을 TE-III (Tris 6 g, EDTA 0.372 g/L, pH 8.0)에서 세척 후 8 M urea, 20 mM sodiumphosphate, 0.5 M NaCl 완충액 (pH 8.0) 30 ml로 녹인 후 증류수로 희석하여 단백질 농도가 1~2 mg/ml정도로 되게 하였다. 이 용액에 1 M NaOH를 가하여 pH 12로 조정 후 NaOH로 pH 11로 맞춘 증류수로 5배 희석하였으며, 희석된 항원액에 1 M H₃PO₄를

가하여 pH 10.5로 조정하였다. 상온에서 14시간 경과 후, p24항원액에 1 M H₃PO₄용액을 점차적으로 가하여 pH 5.7로 조정하여 대장균 단백질을 산 침전시켰다. 산 침전시킨 용액을 12,000×g에서 30분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다.

분리한 상등액을 0.4 M urea, 0.5 M NaCl, 50 mM sodiumphosphate 완충액 (pH 8.0)에서 2회 투석 후 Ni-affinity 크로마토그래피를 실시하였다. 이 완충액 상에서 Ni-affinity 수지에 항원을 결합시키고, p24항원과 대장균 유래 단백질을 분리하기 위해 먼저 0.4 M urea, 0.5 M NaCl, 20 mM sodium phosphate (pH 6.0)완충액으로 대장균의 단백질을 용출시킨 후, 동일 완충액으로 pH 6에서 pH 4로 직선적 (gradient)로 pH를 낮추어 흡착된 p24항원을 용출시켰다.

Ni-affinity 크로마토그래피로 정제한 p24항원액을 50 mM sodium acetate완충액 (pH 5.4)에서 2회 투석하였으며, 투석 후 양이온 수지인 CM-Sephrose 크로마토그래피를 이용하여 50 mM sodium acetate 완충액 (pH 5.4)에서 2차 정제를 실시하였다. 이때 p24항원을 0-1 M NaCl 밀도 구배로 용출시켰으며, 분획을 SDS-PAGE로 정제도를 조사하였다.

4. gp41항원 정제

gp41항원이 발현된 균주 배양액 2 L를 12,000×g에서 30분간 원심 분리하여 균체를 분리하였다. 분리된 균체를 PBS 완충액으로 2회 세척 후, 세척된 균체 10 g당 TE-I 완충액 30 ml를 넣어 잘 현탁한 다음 초음파 분쇄기로 파쇄하였다. 파쇄한 균체를 12,000×g로 30분간 원심 분리하여 상등액을 제거 후 봉입체를 분리하였다. 분리한 봉입체에 TE-I 완충액 30 ml를 첨가하고 잘 현탁시킨 후 라이소자임을 0.2 mg/ml, DNase를 10 µg/ml되게 첨가하여 37°C에서 60분간 반응시켰다. 이렇게 반응시킨 용액을 12,000×g에서 30분간 원심 분리시켜 봉입체를 회수하였다. 회수된 봉입체에 TE-II 완충액 30 ml를 가하고, Triton x-100을 0.5%되게 첨가하여 37°C에서 30분간 혼합하였다. 이 반응 액을 다시 12,000×g에서 30분간 원심 분리하여 봉입체를 회수하였다. 이것을 TE-III용액으로 세척 후 8 M urea, 50 mM Tris, 10 mM DTT 완충액 (pH 9.6) 30 ml로 용해시켰다.

용해된 gp41항원액을 20% acetonitrile, 50 mM Na₂CO₃ 완충액 (pH 10.8)로 2회 투석시킨 후, C₄

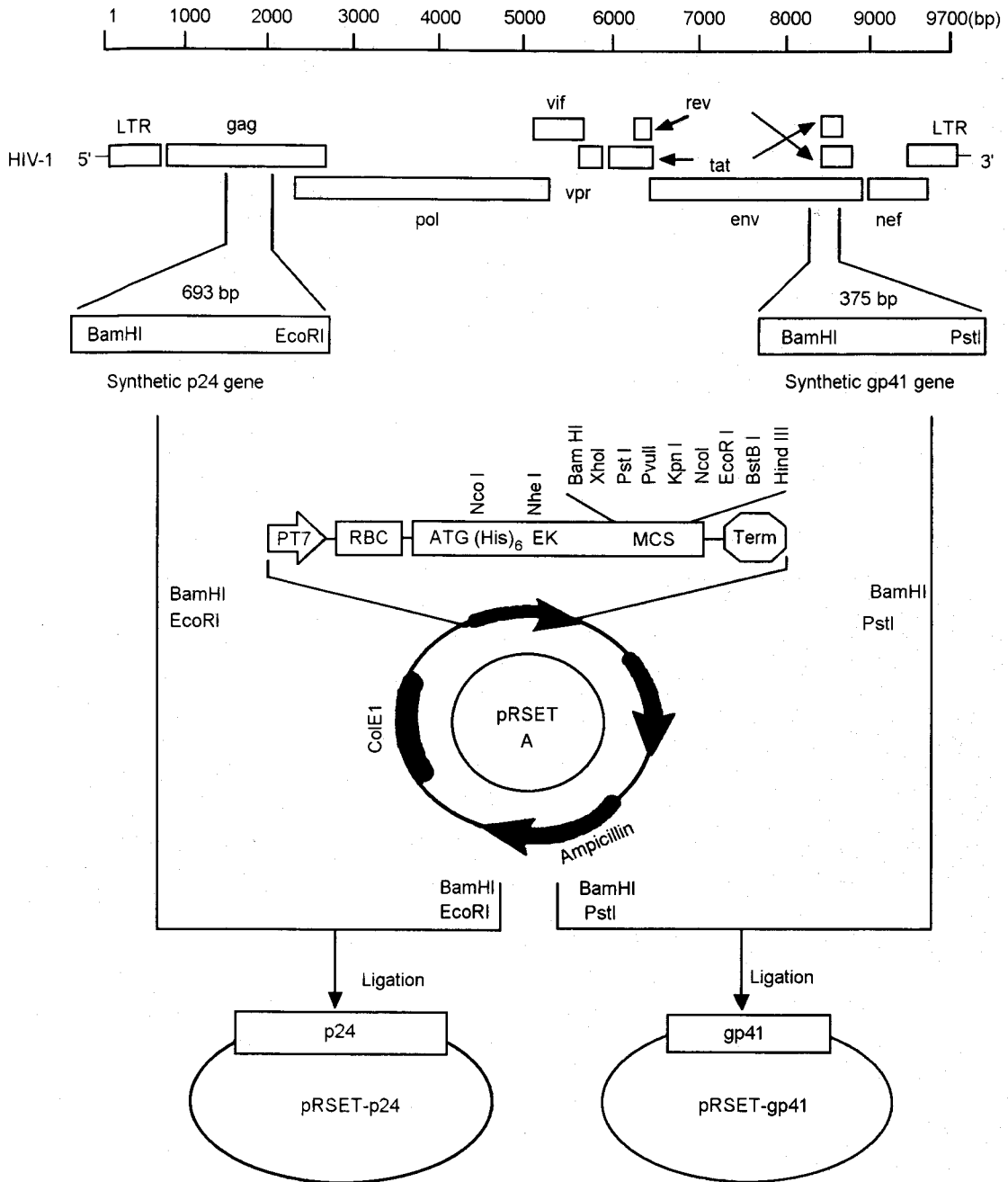


Fig. 1. Construction of p24 and gp41 expression vector. The pRSETA vector of p24 and gp41 antigen expression contain polyhistidine gene under the control of T7 promoter.

크로마토그래피를 실시하였다. 이 반응에서 20% acetonitrile, 50 mM Na₂CO₃ 완충액 (pH 10.8) 상에서 항원을 수지에 결합 후 동일 완충액 조건에서 acetonitrile 농도를 20%에서 60%로 직선적으로 증가시켜 gp41항원을 분리하였다.

분리된 gp41항원을 8 M urea, 50 mM Tris, 10 mM DTT 완충액 (pH 9.6)에서 2회 투석 후 DEAE-Sephacrose 크로마토그래피를 실시하였다. DEAE-Sephacrose 크로마토그래피에서는 8 M urea, 50 mM Tris, 10 mM DTT 완충액 (pH 9.6)에서 수지

에 항원을 결합시킨 후, NaCl 농도를 0-1 M로 직선적으로 밀도구배하여 gp41항원을 용출시켜 분리하였다.

5. 전기영동 및 western blot 분석

전기영동과 western blot에 사용하는 gel, 용액 그리고 Nitrocellulose membrane들은 Novex사 (San Diego, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 각 항원별로 항원의 발현율, 정제도, 그리고 항원성을 확인하기 위하여 전기영동과 western blot 방법을 이용하였다. 먼저 분석 항원시료를 SDS와 DTT가 함유된 Sample Buffer와 섞은 후 100℃에서 5분간 끓인 다음 Novex 4-20%-Tris-glycine gel에서 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 Commassie Brilliant Blue용액에서 염색하고 30% MeOH, 10% acetic acid용액에서 탈색 후 Gel Drying system을 이용하여 건조시켰다. western blot 분석은 전기영동으로 분리시킨 gel상의 단백질을 전기영동 법으로 Nitrocellulose membrane에 전이시키고, 5% skim milk가 포함된 PBS 완충액으로 membrane을 blocking하였다. HIV-1 항체 양성자 혈청을 PBS 완충액으로 1000배 희석시킨 1차 항체액에 이 membrane을 1시간 상온에서 반응시킨 후 PBS 완충액으로 3회 세척하였다. 2차 반응

으로 PBS 완충액에 Goat anti-human IgG-alkaline phosphatase conjugate (Sigma사)를 1000배 희석시킨 액을 1시간 상온에서 반응시킨 후 PBS 완충액으로 3회 세척 후 NBT-BCIP기질용액 (Pierce사)으로 발색시켰다.

결 과

1. 균주 및 발현 벡터

p24, gp41 항원 유전자들을 DNA 합성기를 이용하여 각각 몇 개의 단편들로 합성 후 결합하여, T₇ 프로모터 (promoter)에 의한 발현 벡터인 pRSETA 프라스미드에 cloning하였다. Cloning된 p24항원 유전자는 HIV-1 p24항원 유전자의 전체 유전자로 693bp이며, gp41항원 유전자는 항원성이 높은 것으로 알려진 부위를 cloning하였으며, 375bp로 이루어져 있다 (Fig. 1). 이렇게 만들어진 각각의 항원 발현 벡터를 발현 균주인 대장균 BL₂₁DE₃에 CaCl₂방법으로 형질 전환시킨 후, 형질 전환된 균주를 분리하였다. 분리된 형질 전환 균주를 배양 후 발현 플라스미드를 분리하여 정확하게 유전자가 cloning된 것을 제한효소와 agarose 전기영동 법을 이용하여 확인하였다. 또한 각각의 발현 균주들을 배양하여 배양액의 발

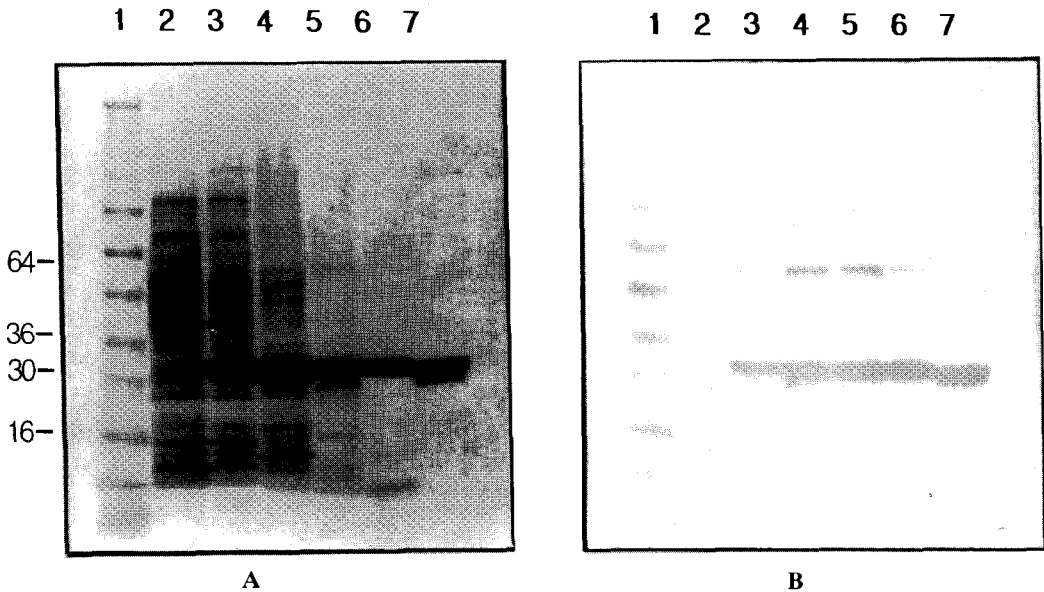


Fig. 2. SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of p24 antigen purification steps. Lane 1, Size marker (SeeBlue small capital); lane 2, Host cell (BL₂₁DE₃); lane 3, p24 antigen-expressed cell; lane 4, Inclusion body; lane 5, Acid precipitated fraction; lane 6, p24 purified by Ni²⁺-affinity chromatography; lane 7, p24 purified by CM-sepharose chromatography.

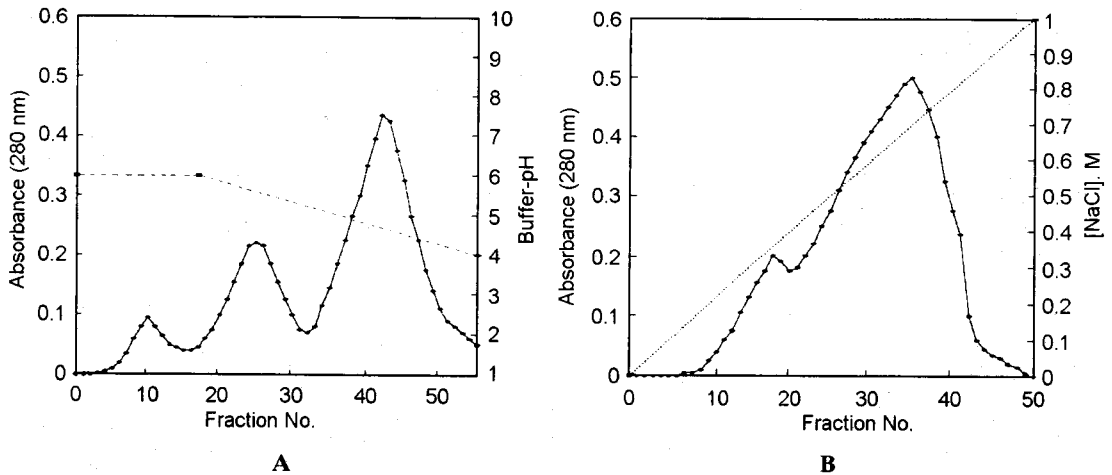


Fig. 3. Purification of recombinant p24 antigen. Elution profiles of Ni²⁺-Affinity Chromatography (panel A), and CM-Sepharose Chromatography (panel B) are shown. The dotted lines are pH gradient (panel A) and salt gradient (panel B).

현 균주를 분리한 후 SDS-PAGE와 western blot 방법으로 숙주세포에서 발현되어 항원성을 나타내는 것을 확인하였다 (Fig. 2, 4).

2. p24 및 gp41항원 발현

p24 및 gp41항원 생산 균주들을 각각 50 µg/ml 암피실린에 들어있는 2 L LB배양액에서 14시간 37°C에서 flask 배양하여 발현을 유도하였다. 위 배양조건에서 배양액 1 L당 균체의 습윤중량은 약 6 g이었으며, 두 항원 발현 균주의 회수율은 비슷하였다. 발현 유도제인 IPTG를 사용한 경우와 사용하지 않은 경우를 비교해 본 결과, IPTG를 사용하지 않았을 때 발현 균주의 성장률과 발현율이 더 높았으므로 유도제를 사용하지 않은 조건에서 배양하였다. 발현 균주를 소량을 취하여 SDS-PAGE와 western blot으로 각각의 항원의 발현율과 항원성을 고찰하였다. p24항원은 30Kda의 poly-histidine 융합단백질 형태로 대장균 전체 단백질의 약 25%정도로 고발현되었으며, western blot 시험에서 높은 항원성을 나타내었다 (Fig. 2). 또한 gp41항원은 18Kda의 polyhistidine 융합단백질 형태로 대장균 전체 단백질의 약 20%정도로 고발현되었으며, 높은 항원성을 나타내었다 (Fig. 4).

3. p24항원의 정제

p24항원 발현 균주 BL₂₁DE₃/pRSETA-p24의 배양액으로부터 균체를 회수하여, 초음파 분쇄기로 세포를 파쇄한 후 봉입체를 분리하였다. 발현

균체 10 g당 (습윤중량) 약 3 g의 봉입체를 회수하였다. 분리한 봉입체를 TE 완충액, lysozyme, DNase I, TritonX-100 등을 이용하여 대장균 유래 단백질, 지질, 세포벽, DNA 등 각종 불순물을 세척하였다. 이렇게 세척한 봉입체를 urea 완충액으로 용해한 후 용액의 pH를 12로 올려 단백질을 펼쳐진 상태로 만든 후 증류수로 희석하여 urea 농도가 약 0.4 M, pH 10.5 되게 조정하여 상온에서 14시간 방치하여 refolding시켰다. Refolding 후 1 M H3PO₄를 이용하여 pH 5.7로 낮추어 대장균 유래 단백질을 산 침전시켰다. 이 과정에서 refolding된 p24항원 단백질의 95% 이상이 가용성 (soluble form)으로 존재하였으며, 대장균 유래 단백질의 대부분은 침전물 (pellet) 형태로 분리되었다. 봉입체 분리, 세척, refolding 그리고 산 침전 과정에서 p24항원 단백질 손실은 전체 p24발현 단백질 중 약 10% 이하임을 SDS-PAGE 및 단백질 농도 측정시험으로 확인하였다. 또한 봉입체내의 P24항원 단백질은 약 60% 정도였으며 refolding과 산 침전과정을 거치면서 p24항원은 전체 단백질의 약 92%정도를 정제되었다 (Fig. 2).

대장균 단백질을 산 침전시킨 다음 투석방법으로 완충액을 변경하여 Ni-affinity 크로마토그래피를 이용하여 p24항원을 분리하였다. p24항원은 연속적으로 6개의 히스티딘 아미노산을 가진 poly histidine 융합단백질 형태로 발현되는 것을 이용하여 대장균 단백질을 분리할 수 있었다.

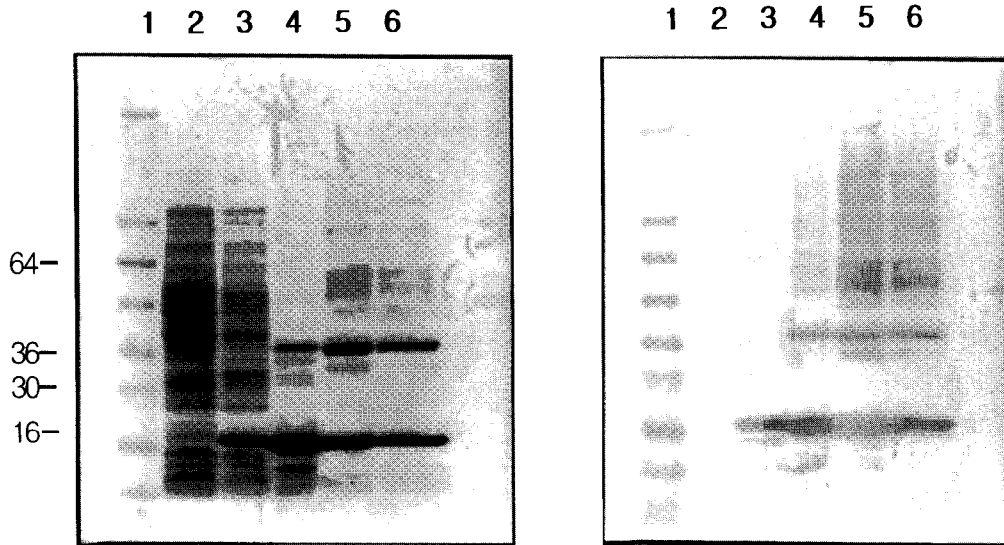


Fig. 4. SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of gp41 antigen purification steps. Lane 1, Size marker (SeeBlue small capital); lane 2, Host cell (BL₂₁DE₃); lane 3, gp41 antigen-expressed cell; lane 4, Inclusion body; lane 5, gp41 antigen purified by C₄ chromatography; lane 6, gp41 antigen purified by DEAE-sepharose chromatography.

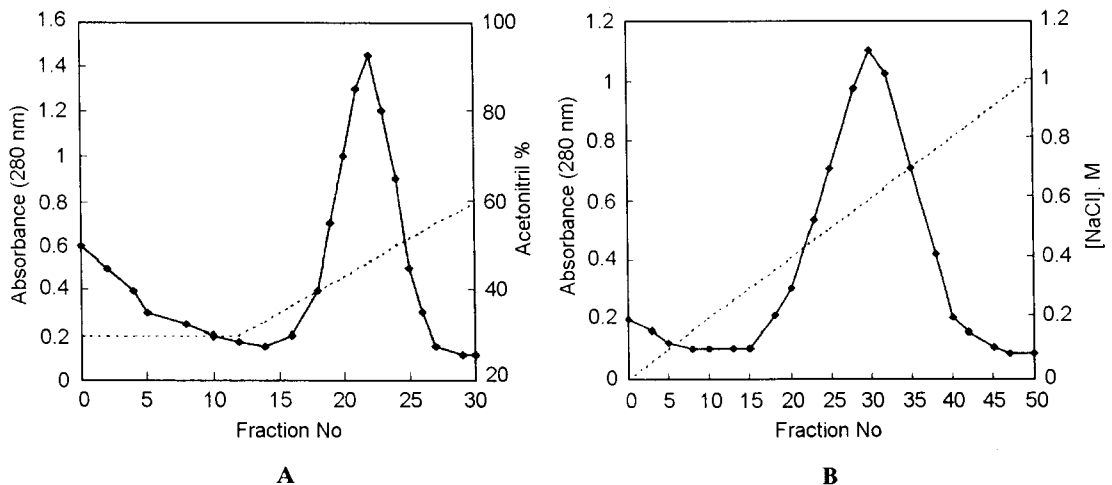


Fig. 5. Purification of recombinant gp41 antigen. Elution profiles of C₄-Sepharose Chromatography (panel A), and DEAE-Sepharose Chromatography (panel B) are shown. The dotted lines are acetonitrile concentration (panel A) and salt concentration (panel B).

pH 8 조건에서 단백질을 수지에 결합 후 pH를 점차 낮추어 먼저 대장균 유래 단백질을 용출시킨 후 p24 항원을 분리하였다. p24항원은 pH 5-4부위에서 용출되어 고순도로 정제할 수 있었다 (Fig. 3). 용출 분액을 SDS-PAGE를 실시해본 결과 약 97% 이상의 순도를 가진 단일 밴드로 정제되었음을 확인하였다 (Fig. 2).

이와 같이 분리한 p24항원액을 투석방법으로 50 mM sodium acetate 완충액 (pH 5.4)로 변경하여 CM-Sepharose 크로마토그래피 방법으로 p24항원을 정제하였다. p24항원액을 수지에 결합시킨 후 0-1 M NaCl 밀도 구배로 용출시켰다. 대장균 유래 단백질은 NaCl 농도가 약 0-0.4 M에서 용출되었으며, p24항원은 약 0.3 M 이상에서 용출되

기 시작하였으므로 p24 항원을 분리할 수 있었다 (Fig. 3). SDS-PAGE 분석결과 약 99% 정도의 순도를 나타내었다 (Fig. 2). 균주 배양액 2 L로부터 최종 p24항원 약 100 mg을 정제할 수 있었다.

4. gp41항원의 정제

gp41항원 발현 균주인 BL₂₁DE₃/pRSETA-gp41의 배양액으로부터 균체를 분리하여 초음파로 균체를 파쇄한 후 봉입체를 분리하였다. 분리한 봉입체를 p24항원의 정제방법과 동일하게 TE 완충액, lysozyme, DNase I, TritonX-100 등으로 불순물을 세척하였다. 분리된 봉입체의 수율은 균체 10 g당 약 2.5 g (습윤중량)을 분리할 수 있었다. 봉입체를 urea 완충액으로 용해시킨 후 SDS-PAGE방법을 이용하여 용액 내 gp41항원의 정제율을 확인한 결과, 전체 단백질 중 약 75%가 gp41항원이었다. 이 항원 액을 투석 후 C₄ 크로마토그래피를 실시하였다. gp41 항원액을 20% acetonitrile, 50 mM Na₂CO₃ 완충액에서 수지에 결합시킨 후 동일 완충액 조건하에서 acetonitrile 농도를 증가시켜 gp41항원을 분리 용출시켰다. 이 분리과정에서 대부분의 대장균 유래 단백질은 수지에 흡착과정에서 결합하지 않은 형태로 용출되었으며, gp41항원은 acetonitrile농도가 40% 정도에서 용출되기 시작하였으므로 gp41항원을 고순도로 분리할 수 있었다 (Fig. 5). 분리된 gp41항원을 SDS-PAGE 방법으로 분석해본 결과 전체 단백질의 약 95% 이상으로 gp41항원이 정제되었음을 알 수 있었다 (Fig. 4). 1차 정제된 gp41항원액을 투석방법으로 완충액을 8 M urea, 50 mM Tris, 10 mM DTT 완충액 (pH 9.6)으로 변화시켜 DEAE-Sepharse 크로마토그래피 방법으로 gp41항원을 정제하였다. 위 완충액 상태에서 단백질을 수지에 결합시킨 후 동일 조건하에서 NaCl 농도를 증가시켜 단백질을 용출시켰다 (Fig. 5). 용출된 gp41 항원 액을 SDS-PAGE 분석결과 약 99% 정도의 정제도를 나타냈으며, 단체와 다양한 복합체로 존재하고 있음을 볼 수 있었다 (Fig. 4).

위의 공정에서 균주 약 2 L배양액으로부터 약 60 mg의 정제된 gp41 항원을 얻을 수 있었다.

고 찰

HIV-1바이러스는 인간 후천성 면역결핍증의 원인바이러스로 널리 알려져 있으며, 인간 리트

로바이러스의 한 종이다. 또한 이 바이러스는 수혈, 혈액제제, 성 접촉 등으로 전파되는 전염성 바이러스이므로 한 감염자로부터 다른 사람에게 전파된다. 그러므로 공혈자의 혈액 또는 혈액 제제등을 사용할 때 HIV-1바이러스 감염여부를 판단하는 것이 매우 중요하다. 대부분의 혈액의 HIV 감염 검사시 항체진단법인 ELISA법을 사용하므로 ELISA kit의 민감도 및 특이도가 매우 중요하다. 최근 생물공학기술의 발달로 ELISA kit에 사용되는 p24, gp41항원을 각각 유전자 재조합 방법으로 발현 정제하여, 항원을 생산하므로 감도 및 특이도를 보다 향상시킬 수 있었다. 따라서, 본 연구에서는 HIV-1 항체진단시약의 중요항원으로 사용되는 p24, gp41항원들에 대한 유전자는 이미 밝혀진 HIV-1 게놈의 염기서열을 이용하여 발현시킬 항원 유전자들의 부위를 선정하였다 [13].

p24유전자는 전체 유전자 부위를 선정하였고, gp41유전자는 Immunodominant 부분이 존재한다고 밝혀진 부위를 선정하였다. DNA 합성기로 이용하여 각 유전자를 여러조각으로 합성 후 결합시켜 pRSETA 플라스미드에 각각 cloning하였다. p24항원 유전자를 693bp이며 BamH I과 EcoR I 사이에 결합시켰으며, 또한 gp41항원 유전자를 375bp이며 BamH I과 Pst I 사이에 결합시켰다. 발현 벡터인 pRSETA는 T₇프로모트에 의한 발현체계를 가지고 있으며, 숙주체로 사용되는 대장균 BL₂₁DE₃균의 염색체내 존재하는 T₇폴리머아제 유전자가 발현되면, cloning된 유전자가 전사 (transcription)된다. p24, gp41항원 유전자가 cloning된 플라스미드를 각각 대장균 BL₂₁DE₃에 CaCl₂방법으로 형질 전환시켰다. 형질 전환된 균주를 분리하여 배양 후 발현연구를 실시하였다. 위 두 항원을 발현 시 배양액 내에 유도제로 사용되는 IPTG를 첨가하지 않아도 항원이 과량으로 발현되는 것을 SDS-PAGE 및 western blot으로 확인하였다. 이러한 원인으로서는 숙주세포 내 T₇폴리머아제 유전자가 lacUV₅ 프로모터 하에 있으나, 유도제인 IPTG를 첨가하지 않아도 소량으로 발현되기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 고가인 유도제를 사용하지 않아도 발현되므로 이들의 발현체계는 매우 경제적이다. 이 방법으로 발현결과 p24항원은 전체 대장균 단백질의 약 25%, gp41항원은 약 20% 정도로 고발현된 것을 확인하였다.

gp41항원 발현은 p24항원 발현과 동일한 방법

으로 실시하여 2 L배양액 중 균체 약 12 g (습윤중량)을 얻을 수 있었다. 균체를 초음파 분쇄기로 파쇄 후 봉입체를 분리하여 세척하였다. 세척된 봉입체를 용해시킨 후 SDS-PAGE와 western blot 방법으로 gp41항원이 전체 단백질 중 약 70% 정도임을 알 수 있었다. 이 항원액으로 refolding, 산 침전, 그리고 Ni-Affinity 크로마토그래피 등의 정제연구를 여러 조건에서 실험하였으나 대장균 유래 단백질과 gp41항원을 분리할 수가 없었다. 원인으로서는 gp41항원이 막투과 단백질로 높은 hydrophobicity를 가지고 있으며, solubility가 매우 낮고, 높은 pH 조건에서만 용해되므로 위의 방법으로 분리정제가 어려웠다. 따라서 gp41항원이 높은 hydrophobic 성질을 나타내고 있는 점을 이용하여 C4-Sepharose 크로마토그래피를 실시하였다. 결과 gp41단백질을 약 95% 이상의 순도로 정제할 수 있었다. 분리한 gp41항원을 다시 완충액을 교체 후 DEAE-Sepharose 크로마토그래피를 실시하였으며 SDS-PAGE를 확인결과 약 99%의 정제도를 나타내었다. gp41항원은 위 정제 과정에서 시간이 지남에 따라, 높은 hydrophobic한 성질에 의하여 여러 종류의 다가체가 형성되는 것을 볼 수 있었다. 이러한 원인 또한 gp41항원의 정제를 매우 어렵게 하는 부분이었다. 위 공정으로 gp41항원발현 균체 12 g (습윤중량)으로 정제된 항원 약 60 mg을 얻을 수 있으므로, 이 방법이 gp41항원을 고순도, 고효율로 정제할 수 있는 방법임을 알 수 있었다. 정제된 p24, gp41항원은 SDS-PAGE 및 western blot 실시 결과 고순도로 정제되었으며, HIV-1 항체에 대하여 높은 항원성을 나타내므로 HIV 항체 진단시약의 항원으로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

결 론

p24, gp41항원 유전자를 합성하여 발현벡터를 제작한 후 대장균을 이용하여 항원을 발현시키고 정제하는 실험을 수행하여 다음의 결과를 얻었다.

1. p24항원 발현 균주 BL₂₁DE₃/pRSETA-p24와 gp41항원 발현 균주 BL₂₁DE₃/pRSETA-gp41를 제작하였으며, 이들 두 항원들이 각각 고발현되는 것을 확인하였다.

2. p24항원은 발현 균체로부터 봉입체를 분리하여 refolding, 산 침전, Ni-affinity 크로마토그래피

및 CM-Sepharose 크로마토그래피 방법으로 99%의 고순도 항원을 정제하였다.

3. gp41항원은 발현 균체로부터 봉입체를 분리하여 C4-Sepharose 크로마토그래피, DEAE-Sepharose 크로마토그래피 방법으로 99% 고순도로 정제하였다.

4. 분리된 p24, gp41항원을 western blot 방법으로 시험한 결과 인간 HIV-1항체에 대하여 고 항원성을 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al: Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868, 1983.
2. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, et al: Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233: 343, 1986.
3. Morrow CD Park J, Wakefield JK: Viral gene products and replication of the human immunodeficiency type 1 virus. *Am J physiol* 266 C1135, 1994.
4. Vaishnav YN, Wong-Staal F: The Biochemistry of AIDS. *Ann Rev Biochem* 60: 577, 1991.
5. Steffy K, Wong-Staal F: Genetic regulation of human immunodeficiency virus. *Microbiol Rev* 55: 193, 1991
6. Merson MH: Slowing the spread of HIV: agenda for the 1990s. *Science* 260: 1266, 1993.
7. Perelson AS, Essunger P, Cao Y, et al: Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* 387: 188, 1997.
8. Lange JM, Coutinho RA, Korone WJ, et al: Distinct IgG recognition patterns during progression of subclinical and clinical infection with lymphadenopathy associated virus/human T-lymphotropic virus. *Br Med J (Clin Res)* 292: 228, 1986.
9. Bedarida G, Cambie G, et al: Anti-IgM screening for HIV. *Lancet* 2: 1456, 1986.
10. Schwantz JS, Dans PE, Kinoshian BP: Human immunodeficiency virus test evaluation, perfor-

- mance, and use. JAMA 259: 2574, 1988.
11. Kuhl P, Seiol S, Holzberger G: HLA DR4 antibodies cause positive HTLV-III antibody ELISA results. Lancet 1: 1222, 1985.
 12. Zaaijer HL, Exel-Oehlers PV, et al: Early detection of antibodies to HIV-1 by third-generation assays. Lancet 340: 770, 1992.
 13. Lee Ratner, William Haseltine, et al: Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. Nature 313: 277, 1985.
-