ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science **2018** Vol. 28. No. 12. 1416~1423 DOI : https://doi.org/10.5352/JLS.2018.28.12.1416

Functional Expression of an Anti-GFP Camel Heavy Chain Antibody Fused to Streptavidin

Seung Hee Han and Jin-Kyoo Kim*

Division of Biohealth Science, College of Natural Sciences, Changwon National University, Changwon 51140, Korea

Received September 17, 2018 / Revised October 25, 2018 / Accepted October 25, 2018

With strong biotin binding affinity (K_D = 10^{-14} M), the tetrameric feature of streptavidin could be used to increase the antigen binding activity of a camel heavy chain (VHH) antibody through their fusion, here stained with biotinylated horseradish peroxidase and subsequent immunoassays ELISA and Western blot analysis. For this application, we cloned the streptavidin gene amplified from the *Streptomyces avidinii* chromosome by PCR, and this was fused to the gene of the 8B9 VHH antibody which is specific to green fluorescent protein (GFP) antigens. To express a soluble fusion protein in *Escherichia coli*, we used the pUC119 plasmid-based expression system which uses the *lacZ* promoter for induction by IPTG, the *pelB* leader sequence at the N-terminus for secretion into the periplasmic space, and six polyhistidine tags at the C-terminus for purification of the expressed proteins using an Ni^{+}-NTA-agarose column. Although streptavidin is toxic to *E. coli* because of its strong biotin binding property, this soluble fusion protein was expressed successfully. In SDS-PAGE, the size of the purified fusion protein was 122.4 kDa in its native condition and 30.6 kDa once denatured by boiling, suggesting the tetramerization of the monomeric subunit by non-covalent association through the streptavidin moiety fusing to the 8B9 VHH antibody. In addition, this fusion protein showed biotin binding activity similar to streptavidin as well as GFP antigen binding activity through both ELISA and Western blot analysis. In conclusion, the protein resulting from the fusion of an 8B9 VHH antibody with streptavidin was successfully expressed and purified as a soluble tetramer in *E. coli*; it showed both biotin and GFP antigen binding activity suggesting the possible production of a tetrameric and bifunctional VHH antibody.

Key words : Camel heavy chain antibody (VHH), fusion protein, green fluorescent protein (GFP), streptavidin, tetramerization

서 론

VHH 항체는 낙타과 동물에서 발견되는 항체로 heavy chain variable domain 만으로만 구성된 single domain 항체이다[1, 6]. 그러므로 15 KDa의 작은 분자량을 나타냄에도 불구하고 Y-shape의 자연항체(natural antibody, 150 kDa)와 같은 높은 수용성, 안정된 구조 및 항원에 특이적으로 결합하는 특징을 나타냄으로써 단백질 정제, 탐지에 활용되고 또한 작은 분자량 때문에 침투성이 좋아 세포질 내에서 단백질의 localization을 추적하여 형상화(visualization)시키는데 활용되고 있다[17]. 그러나 VHH 항체의 single domain으로 구성된 monomer형태는 1개의 항원결합부위만을 가지므로 2개의 항원결합부위를 갖는 Y-shape의 자연항체(natural antibody)보다 antigen binding activity가 약한 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해 여러 multimeric protein을 VHH 항체에 융합시켜 multimeric VHH 융합항체를 생산하였으며 그 결과 2개 이상의 항원결합부위와 2개 이상의 기능을 동시에 갖는 multivalent and multifunctional VHH 항체를 개발할 수 있게 되었다[8].

Streptavidin (STR)은 *Streptomyces avidinii* 에서 발현되는 비당단백질(aglycosylated protein)로써 164개 아미노산으로 구성되는 16.4 kDa 크기의 subunit가 비 공유결합에 의해 tetramerization되어 65.6 kDa 크기를 나타내는 수용성 단백질이다[7, 12]. STR은 자연리간드(natural ligand)인 biotin에 대해 높은 결합력 즉 10^{-14} M의 K_D값[5]을 나타내므로 일반적인 항원-항체반응의 결합력보다 10^3-10^5배 더 강한 결합을 나타내어 다양한 생체물질의 탐지 및 특징을 알아내는데 다양하게 이용되어지고 있다[3, 15].

STR은 homotetramer를 형성하므로 구조적으로 안정하여 비활성화, 변성 및 분해에 대해 내성을 갖는 잇점이 있다. 또한 STR의 tetramer형성[5]은 원래 monomer를 형성하는 Fab, ScFv및 Fv항체들의 tetramer형성을 유도하여 항원결합부위를 4배로 증가시켜 항원결합력(avidity)을 증가시키는 데 활용되어져 왔다[2, 4, 10, 11].

***Corresponding author**
Tel : +82-55-213-3485, Fax : +82-55-213-3480
E-mail : jkkim@changwon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

본 연구에서는 tetramer를 형성하는 STR을 green fluorescent protein (GFP)항원에 특이적인 8B9 VHH 항체에 융합시켜 tetrameric 8B9 VHH-STR 융합항체제조를 시도하였다. 즉 중합효소연쇄반응(PCR)과 DNA 제한효소를 이용하여 8B9 VHH 항체유전자에 STR유전자를 융합시켜 대장균에서 발현시켰다.

발현되는 8B9 VHH-STR 융합항체는 세포내의 endogenous biotin과 결합할 수 있으므로 숙주세포의 성장을 저해할 수 있어 대장균에서의 8B9 VHH-STR 융합항체 발현은 제한적일 수 있다. 따라서 이러한 문제점을 극복하기 위해 아미노말단에 *pelB* leader [14]를 첨가시켜, 발현된 8B9 VHH-STR 융합항체를 periplasmic space로 운반하여 분비를 촉진시킴으로써 endogenous biotin에 결합가능성을 최소화하였으며 발현된 8B9 VHH-STR 융합항체는 카르복시말단에 융합되어있는 polyhexahistidine tag을 이용하여 Ni^{+}-NTA-agarose column으로 정제하였다. 정제된 8B9 VHH-STR 융합항체는 tetramer 형성유무를 분석하고 biotin에 대한 결합력 및 GFP에 대한 항원결합력 등의 기능검증을 실시하였다. 즉 8B9 VHH 항체에 융합된 STR의 tetramerization에 의해 8B9 VHH 항체도 tetramer를 형성하여 4개의 항원결합부위와 4개의 biotin결합부위를 동시에 갖는 tetravalent and bifunctional 8B9 VHH-STR 융합항체의 제조를 시도하였다.

재료 및 방법

세균 균주 및 배지

대장균 BMH 71-18 (genotype: *thi, sup*E, Δ(*lac-pro*AB), [F′, *pro*AB, *lacI*^{q}ZΔM15])가 단백질 발현을 위해 사용되었으며 균 배양을 위한 배지는 2XTY (1% yeast extract, 1% tryptone, 0.5% NaCl, pH 7.0)를 사용하였다.

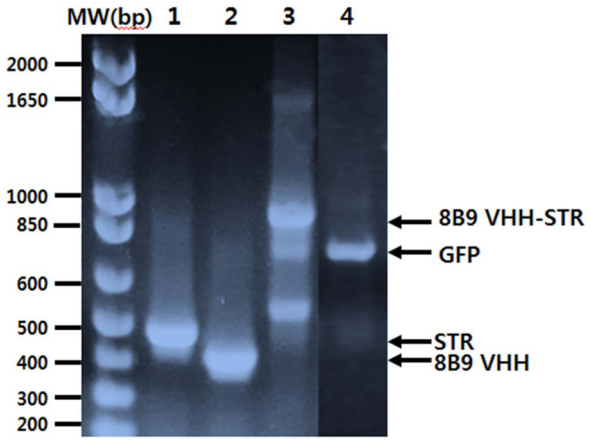

Fig. 1. DNA gel analysis of Streptavidin, GFP, 8B9 VHH and 8B9 VHH-STR genes cloned into pUC 119 expression vector. Streptavidin (STR) gene from *Streptomyces avidinii* genomic DNA amplified by PCR was cloned into pUC 119 expression vector by *Nco*I-*Bst*EII digestion (lane 1). The 8B9 VHH and GFP genes amplified by PCR were cloned into pUC 119 expression vector by *Sfi*I-*Not*I digestion (lane 2 and lane 4). The 8B9 VHH-STR gene cloned into pUC 119 expression vector by *Not*I-*Bst*EII digestion of STR was amplified by PCR (lane 3).

GFP, streptavidin, 8B9 VHH및 8B9 VHH-STR 발현 벡터 구축

Green fluorescent protein (GFP) 항원, streptavidin (STR), 8B9 VHH 항체 및 8B9 VHH-STR 융합항체는 이미 확보된 각각의 유전자를 template 로 사용하여 유전자 특이적인 프라이머(Table 1)를 사용하고 GoTaq 효소(Promega, U.S.A.)를 이용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR)을 시도하여 증폭하였다(Fig. 1). 증폭된 GFP와 8B9 VHH 항체 PCR산물은 *Sfi*I - *Not*I제한효소(New England Biolabs, U.S.A.)

Table 1. Primers used for PCR amplification of GFP, Streptavidin, 8B9 VHH and 8B9 VHH-Streptavidin genes.

	Oligonucleotides for PCR
A. GFP	
GFPSfiBack	5′-gtc ctc gca act gcg gcc cag ccg gcc atg gcc gaa agt aaa gga gaa ctt ttc act-3′
GFPNotReverse	5′-gag tca ttc tgc ggc cgc ctt gta tag ttc atc cat gcc atg tgt-3′
B. Streptavidin(STR)	
STRNcoBack	5′- atc acc atg gcc gat ccg agc aaa gat agc aaa gcg cag-3′
STRBstReverse	5′-gga tca ggt gac ctg cac cgc atc cag cgg-3′
C. 8B9 VHH	
VHHSfiBack	5′-ctc gca act gcg gcc cag ccg gcc atg gcc gag tct ggg gga ggc tcg-3′
VHHNotReverse	5′-gag tca ttc tgc ggc cgc tga gga gac ggt gac ctg ggt-3′
D. 8B9 VHH-Streptavidin (8B9 VHH-STR)	
NotSTRBack	5′-acc tga gcg gcc gca *ggt ggc gga ggc tcg gga ggc gga ggc agc gga ggc gga ggc tcg* gat ccg agc aaa gat agc aaa gcg-3′
STRBstReverse	5′-gga tca ggt gac ctg cac cgc atc cag cgg-3′

Each restriction sites are underlined. Italic represents linker sequences for construction of 8B9 VHH fused to Streptavidin.

를 이용해 발현벡터로 클로닝하였다(Fig. 2A, Fig. 2B) [13, 16]. Streptavidin (STR)의 PCR산물은 *Nco*I - *BstE*II제한효소(New England Biolabs, U.S.A.)를 이용해 발현벡터로 클로닝하였다 (Fig. 2A) [13, 16]. 한편 8B9 VHH-STR 융합항체유전자의 구축은 8B9 VHH 항체와 STR을 연결하는 linker sequences를 포함하는 NotSTRBack 프라이머와 STRBstReverse 프라이머를 이용하여 STR유전자를 증폭하여 이미 구축되어 있는 8B9 VHH 항체 발현벡터에 *Not*I-*BstE*II 제한효소(New England Biolabs, U.S.A.)를 이용해 8B9 VHH 항체유전자 의 3′-말단으로 클로닝하여 8B9 VHH-STR 형태의 발현벡터를 구축하였다(Fig. 2C). 발현벡터로 클로닝되어진 각각의 유전자들은 DNA sequencing[18]을 통해 염기배열을 최종 재확인하였다.

GFP, Streptavidin, 8B9 VHH 및8B9 VHH-STR의 발현 및 정제

8B9 VHH-STR, GFP, STR및 8B9 VHH의 유전자가 클로닝된 각각의 발현 벡터를 대장균 BMH71-18에 형질전환 하였다 [9, 16]. 형질 전환된 대장균 BMH71-18을 2XTY (1% tryptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl) 액체배지에 100 μg/ml 의 ampicillin (Sigma-Aldrich, U.S.A.)과 1% glucose를 첨가하여 30℃에서 밤새 진탕 배양한 후, 3,000 g로 10분 동안 원심분리하여 상등액을 제거하고 2XTY 액체배지로 대장균을 재현탁한 배양액에 glucose를 제외한 2XTY 액체배지에 100 μg/ml의 ampicillin을 다시 넣어주고 0.2 mM IPTG (Sigma-Aldrich, U.S.A.)를 첨가하여 25℃, 밤새 진탕 배양하여 단백질 발현을 유도하였다. 다음날 상등액을 제거하고, 수거된 대장균에 차가운 TES 완충용액(0.5M Sucrose, 0.1mM EDTA and 200mM Tris-Cl, pH 7.5)으로 재현탁하여 4℃에서 1시간 동안 배양하였다. 다시 원심분리하여 상등액을 제거하고 수거 된 세포침전물을 초음파 파쇄를 위한 완충용액(0.1M Tris-Cl, 0.5M NaCl, pH 7.5)에 재현탁 한 후 초음파 파쇄하여 원심분리 후 상등액을 수거하였다. 수거된 상등액을 Ni^{+}-NTA-agarose column (Incospharm, Korea)에 결합시키고, 아가로스젤 부피의 20배에 해당하는 TN 완충용액(0.1M Tris-Cl, 0.5M NaCl, 20 mM imidazole, pH7.5 and pH8.0)를 이용하여 세척한 후 column에 250mM imidazole을 처리하여 발현된 단백질들을 용출해냈다. 정제 된 단백질들은 SDS-PAGE gel에 전기영동하고 Coomassie용액으로 염색하였다(Fig. 3). 정제된 각각의 단백질은 NanoDrop 분광광도계(Allsheng, China)를 이용해 단백질농도를 결정 하였다.

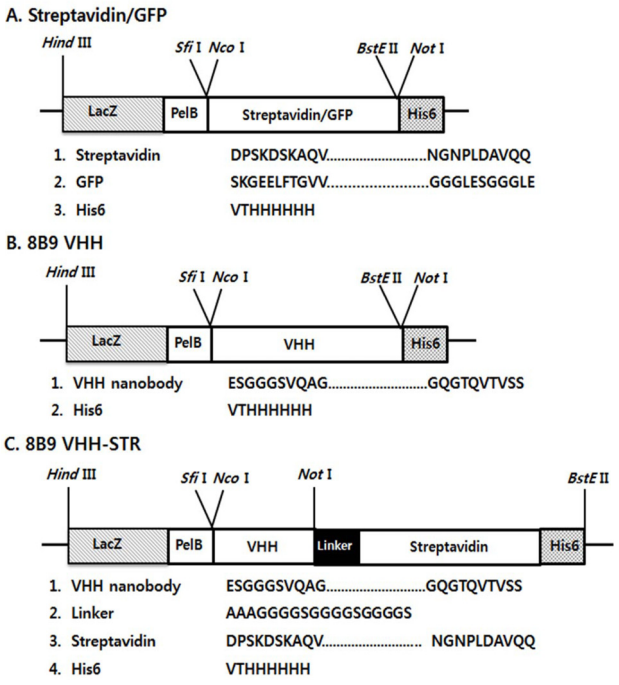

Fig. 2. Plasmid construction of streptavidin, GFP, 8B9 VHH and 8B9 VHH-STR. Streptavidin/GFP (panel A), 8B9 VHH (panel B) and 8B9 VHH-STR (panel C) were constructed in pUC 119 expression vector containing *a lac*Z promoter, 5′-*PelB* leader and 3′-hexahistidine (His6) tag by insertion of each genes using PCR and restriction enzyme digestion.

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

8B9 VHH-STR 융합항체의 biotin 결합을 측정하기 위해 4℃에서 1 μg의 8B9 VHH -STR, STR및 Bovine serum albumin (BSA) 단백질들을 PBS에 녹여 maxi-sorp 96 well plate (Nunc, Denmark)에 밤새 고정(immobilized)시켰다(Fig. 5A).

8B9 VHH - STR의 항원결합을 측정하기 위한 ELISA에서는 타깃항원인 green fluorescent protein (GFP)항원 을 같은 방법으로 96 well plate에 밤새 고정시켰다(Fig. 6). 고정시킨 각각의 96 well plate는 탈지우유를 2% 포함한 PBS-T (PBS, 0.02% Tween 20)를 blocking 완충용액으로 사용하여 1시간 동안 blocking시키고, biotin binding 측정을 위한 plates는

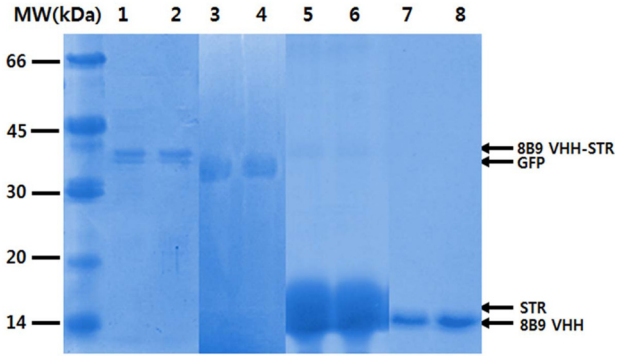

Fig. 3. SDS-PAGE analysis of soluble proteins expressed in *E. coli*. The 8B9 VHH-STR (lane 1-lane 2), GFP (lane 3-lane 4), Streptavidin (lane 5-lane 6) and 8B9 VHH (lane 7-lane 8) expressed in *E. coli* were purified and analyzed in 15% polyacrylamide gel under heated reducing condition.

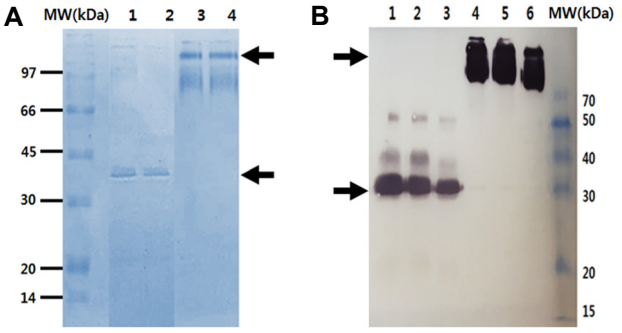

Fig. 4. SDS-PAGE analysis and Westernblot analysis of 8B9 VHH-STR expressed in *E. coli*. Expressed 8B9 VHH-STR protein was denatured with boiling and without boiling. Each sample was loaded onto 15% SDS-PAGE gels. Monomeric 8B9 VHH-STR with boiling was migrated as 30.6 kDa (lane 1-lane 2 in panel A). 8B9 VHH-STR without boiling was migrated as 122.4 kDa suggesting tetramerization of monomeric 8B9 VHH-STR by non-covalent association (lane 3-lane 4 in panel A). In Westernblot analysis, as shown in panel B, The 8B9 VHH-STR protein with boiling and without boiling were transferred onto nitrocellulose membrane. Color development with DAB substrate was carried out by using anti-polyhistidine antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRPO).

blocking 완충용액에 1:2,000으로 희석된 biotinylated horseradish peroxidase (HRPO)를 첨가하여 1시간 동안 상온에서 반응시켰다(Fig. 5A).

8B9 VHH－STR융합항체의 GFP 항원결합측정을 위한

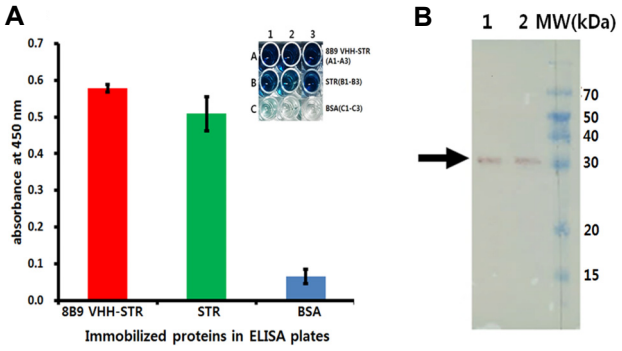

Fig. 5. ELISA analysis and Westernblot analysis to determine biotin binding activity of 8B9 VHH-STR. As shown in panel A, The 8B9 VHH-STR, Streptavidin and BSA were coated onto 96－well plate. Color development with ABTS substrate using biotinylated horseradish peroxidase (HRPO) confirmed biotin binding activity of 8B9 VHH-STR and streptavidin. Each streptavidin and BSA was used as a positive control and a negative control. For Westernblot analysis in panel B, The 8B9 VHH-STR was coated onto nitrocellulose membrane. Color development with DAB substrate was carried out using biotinylated horseradish peroxidase (HRPO).

plates에서는 1차 항체로 1 μg의 8B9 VHH-STR, STR및 PBS를 1차 항체로 첨가하여 1 시간 동안 상온에서 반응시킨 후 PBS-T로 2회 세척하고 연속해서 2차 항체로 biotinylated horseradish peroxidase (HRPO) 를 첨가하여 1 시간 동안 상온에서 반응시켰다(Fig. 6A). 각각 반응시킨 두 종류의 plates는 최종적으로 PBS-T 로 3회 세척을 재시도한 다음 ABTS (2,2′-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (Sigma-Aldrich, U.S.A.)의 발색기질을 첨가하여 96-well Microplate reader (biochrome, U.K.)로 파장 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Westernblot analysis

8B9 VHH－STR 융합항체의 tetramer형성을 확인하기 위해 8B9 VHH－STR 단백질을 SDS gel-loading buffer에 1:1로 섞은 후 100℃에서 5분간 가열하거나 또는 100℃에서 5분간 가열하지 않은 2종류의 8B9 VHH－STR 융합항체 단백질을 준비하였다. 준비된 2종류의 단백질을 각각 SDS-PAGE 젤에 전기영동하고 nitrocellulose membrane (Millipore, U.S.A.)으로 transfer하였고 transfer된 membrane을 2%(w/v) 탈지우유를 포함한 PBS-T 완충용액을 이용하여 실온에서 1시간 동안 blocking한 다음 PBS-T로 3회 세척하였다. 최종적으로 발색을 위해 anti-polyhistidine antibody conjugated horseradish per-

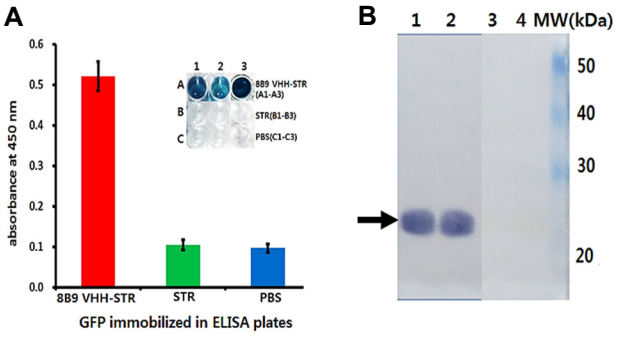

Fig. 6. ELISA analysis and Westernblot analysis to determine GFP antigen binding activity of 8B9 VHH-STR. The GFP antigen expressed in *E. coli* was coated onto either 96-well plate for ELISA or transferred onto nitrocellulose membrane for Westernblot analysis. In ELISA, 8B9 VHH-STR, STR and PBS were added as a primary antibody. Color development with ABTS substrate was carried out using biotinylated horseradish peroxidase (HRPO) as a secondary antibody (panel A). Both streptavidin (STR) and PBS were used as a negative control. In Westernblot analysis shown in panel B, 8B9 VHH-STR (lane 1-lane 2) and STR (lane 3-lane 4) were added as a primary antibody into nitrocellulose membrane immobilized with GFP antigen. Color development with DAB substrate was carried out using biotinylated horseradish peroxidase (HRPO) as a secondary antibody. Streptavidin (STR) was used as a negative control.

oxidase (HRPO)를 사용하여 1시간 동안 반응시켰다(Fig. 4B).

Biotin결합력을 측정하기 위해 발현된 8B9 VHH-STR 융합항체단백질을 SDS-PAGE 젤에 전기영동하고 nitrocellulose membrane (Millipore, U.S.A.)으로 transfer하였다. Transfer된 membrane을 2%(w/v) 탈지우유를 포함한 PBS-T 완충용액을 이용하여 실온에서 1시간 동안 blocking한 다음 PBS-T로 3회 세척하였다. 최종적으로 biotin과 결합을 확인하기 위해 biotinylated horseradish peroxidase (HRPO)를 사용하여 1시간 동안 반응시켰다(Fig. 5B).

항원 결합력을 측정하기 위한 경우에는 정제된 GFP 1 μg 항원을 역시 같은 방법으로 nitrocellulose membrane (Millipore, U.S.A.)으로 transfer하고 blocking및 세척을 실시하였다. 세척된 membrane은 1차 항체로 PBS-T blocking 완충용액에 1:2,000으로 희석된 8B9 VHH-STR, STR및 PBS를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBS-T로 2회 세척하고 다시 2차 항체로 biotinylated horseradish peroxidase (HRPO)을 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체의 비특이적 결합을 배제하기 위해 PBS-T로 5 회 재세척하였다(Fig. 6B). 각각 반응시킨 3 종류의 membrane은 공통적으로 발색기질로 DAB (3,3′-Diaminobenzidine) (Sigma-Aldrich, U.S.A.)을 처리하여 8B9 VHH-STR 융합항체의 tetramer형성과 biotin 및 항원에 대한 결합력 등을 결정하였다.

8B9 VHH-STR 융합항체의 3차 구조 모델링

항체 3차 구조 모델링을 위한 프로그램 Discovery Studio 2.5 (Accelrys, U.S.A.)를 이용하여 8B9 VHH-STR 융합항체의 3차 구조 모델링을 시도하였다. 즉 protein data bank (PDB: http://www.rcsb.org/pdb/home)에 8B9 VHH 항체의 아미노산 배열을 입력하여 아미노산배열의 유사성(sequence homology)이 가장 높은 항체(PDB ID: 1XFP)를 찾아내고 이를 주형(template)으로 하여 8B9 VHH 항체의 항원결합부위인 complementarity determining region (CDR)의 loop와 항체의 안정화 역할을 담당하는 framework (FR)의 3차 구조를 예측하였다. Streptavidin의 3차 구조 역시 PDB에서 주형(PDB ID: 1STP)을 찾아내고 두 단백질을 AAAGGGGSGGGGSGG GGS로 연결시켜 융합된 8B9 VHH-STR 융합항체 3차 구조를 예측하였으며 Discovery Studio 4.0 visualizer (Accelrys, U.S.A.) 프로그램을 이용하여 형상화하였다.

결 과

GFP, streptavidin, 8B9 VHH및 8B9 VHH-STR 발현벡터 구축

Green fluorescent protein (GFP)항원, 8B9 VHH 유전자는 각각의 특이적인 프라이머(Table 1A and Table 1C)를 이용하여 PCR산물(Fig. 1)을 증폭한 다음 *Sfi*I-*Not*I 제한효소를 이용하여 발현벡터를 구축하였고(Fig. 2A and Fig. 2B) streptavidin (STR)은 STR특이적 프라이머(Table 1B)를 사용하여 증폭된 PCR 산물(Fig. 1)을 *Nco*I-*BstE*II 제한효소를 이용하여 발현벡터를 구축하였다(Fig. 2A). 8B9 VHH-STR 융합항체 발현 벡터는 STR 유전자를 8B9 VHH에 융합시키기 위한 프라이머(Table 1D)를 사용하여 PCR산물(Fig. 1)을 증폭한 다음 제한효소 *Not*I-*BstE*II에 의해 *Sfi*I-*Not*I 제한효소를 이용하여 이미 클로닝된 8B9 VHH의 3′-말단에 삽입하여 STR에 융합된 8B9 VHH를 최종적으로 구축하였다(Fig. 2C). 즉, STR 유전자의 upstream에 다양한 VHH 항체 유전자를 *Sfi*I과 *Not*I의 제한효소를 이용하여 클로닝되면 자동적으로 STR과 융합된 VHH 항체발현벡터가 구축되도록 고안되었다(Fig. 2C) 구축된 STR과 8B9 VHH 발현벡터는 8B9 VHH가 융합되지 않은 STR과 STR이 융합되지 않은 8B9 VHH 단백질을 발현하기 위해 구축되었으며 GFP 발현벡터는 8B9 VHH-STR 융합항체의 항원결합력을 측정하기 위해 사용될 항원단백질을 발현하기 위해 구축되었다[9, 16].

GFP, streptavidin, 8B9 VHH 및8B9 VHH-STR의 발현및 정제

구축된 모든 발현벡터는 *lac*Z promoter를 사용하여 IPTG에 의한 단백질발현을 유도하였고 아미노말단에 *pelB* leader[14]를 삽입하여 발현된 단백질을 대장균의 periplasmic space로 이동시켜 수용성단백질로 분비되도록 하였다(Fig. 2). 카르복시말단에는 6개의 histidine으로 이루어진 polyhexahistidine tag을 삽입하여 Ni^{+}-NTA-agarose affinity column을 이용하여 4 종류의 발현벡터로부터 발현된 모든 단백질을 정제하였다(Fig. 3). 정제된 단백질들을 100℃에서 가열하여 비공유결합을 제거한 후 SDS-PAGE를 하여 분자량을 분석해 본 결과 8B9 VHH-STR, GFP, STR및 8B9 VHH는 각각 30.6 kDa, 28.5 kDa, 16.4 kDa 및 13 kDa으로 확인되었다(Table 2 and Fig. 3). 그러

Table 2. Biochemical analysis of GFP, Streptavidin, 8B9 VHH and 8B9 VHH-STR

	GFP	Stretpavidin	8B9 VHH	8B9 VHH-STR
Gene size (bp)	711	477	363	894
Amino acid Number	255	159	121	298
Molecular weight (kDa)	28.5	16.4	13	30.6
Isoelectric point (pI)	5.95	6.53	6.62	6.53
Charge at pH 7.4	-7.83	-0.6	-0.2	-1.3
Multimer	monomer	Tetramer	Monomer	Tetramer

나 실제SDS-PAGE에서는 카르복시말단에 6개의 histidine이 첨가되어 계산되어진 분자량보다 약간 크게 관찰되었다.

8B9 VHH-STR 융합항체의 tetramer형성 유무를 분석하기 위해 8B9 VHH-STR 융합항체 단백질을 100℃에서 가열처리를 한 것과 가열처리를 하지 않은 것을 SDS-PAGE를 수행 하였을 경우(Fig. 4A) 분자량이 각각 monomer 크기인30.6 kDa과 tetramer크기인 124.4 kDa으로 확인되어 8B9 VHH-STR 융합항체 단백질은 가열시키지 않은 경우 STR이8B9 VHH항체에 융합되더라도 융합되지 않은 원래의STR [7]과 같이 비공유결합에 의한 homotetramer를 형성함을 확인할 수 있었다.

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 결과

8B9 VHH-STR 융합항체와 융합되지 않은 원래의 STR의 biotin binding activity를 측정하기 위해 ELISA를 수행하였다. Fig. 5A는 8B9 VHH-STR 융합항체 및 STR의 biotin binding activity를 측정하기 위해 수행한 ELISA결과이다. 즉 8B9 VHH-STR 융합항체, STR및 BSA를 96-well plates에 고정시킨 경우 발색을 위해 사용된 biotinylated horseradish peroxidase (HRPO)는 8B9 VHH-STR 융합항체와 STR은 biotin에 결합하여 발색되었으나 대조군으로 사용된 BSA에서는 발색이 되지 않아 HRPO에 의한 발색은 STR과 biotin간의 특이적 결합에 의해 일어남을 확인할 수 있었다(Fig. 5A).

한편 항원결합력을 분석하기 위해 GFP 항원을 96-well에 고정시키고 1차 항체로 8B9 VHH-STR, STR및 PBS를 각각 사용하고 2차 항체로 biotinylated HRPO를 사용하여 ELISA를 수행한 결과 1차 항체로 STR및 PBS를 사용한 대조군에서는 발색이 탐지되지 않아 GFP에 대한 항원결합력을 나타내지 않았으나 8B9 VHH-STR 를 1차 항체로 사용한 경우에는 발색됨으로써 GFP항원에 특이적 결합력을 나타내었다(Fig. 6A). 위의 결과를 종합하면 8B9 VHH-STR 융합항체는 아미노말단의 VHH 항체가 GFP항원에 대한 결합력을 갖고 동시에 카르복시말단의 STR은 biotin에 대한 결합력을 갖는 bifunctionality의 특징을 나타내었다.

Westernblot analysis 결과

8B9 VHH-STR 융합항체의 tetramer형성 유무를 확인하기 위해 Westernblot analysis를 analysis를 수행 하였을 경우 SDS-PAGE와 같은 결과를 나타내어 8B9 VHH-STR 융합항체는 비공유결합에 의한 tetramer를 형성함을 재확인할 수 있었다(Fig. 4B).

8B9 VHH-STR 융합항체의 biotin결합을 측정하기 위해 8B9 VHH-STR 단백질을 고정시킨 Westernblot analysis를 수행하였는데 ELISA결과와 같이 8B9 VHH-STR은 biotin에 대한 결합력을 나타내었다(Fig. 5B).

8B9 VHH-STR 융합항체의 항원결합력을 측정하기 위한 Westernblot analysis에서 1차 항체로 사용된 8B9 VHH-STR 융합항체는 nitrocellulose membrane에 transfer된 28.5 kDa의 GFP항원에 대한 항원결합력을 나타내었으나 대조군인 STR 및 PBS를 1차 항체로 사용한 경우 2차 항체인 biotinylated HRPO가 발색을 나타내지 않아 8B9 VHH-STR 융합항체의 GFP 항원결합력은 ELISA결과와 같이 2차 항체인 biotinylated HRPO의 biotin이 8B9 VHH항체에 융합된 STR에 특이적으로 결합한 결과 HRPO 효소가 발색시켰음을 확인해주었다(Fig. 6B).

8B9 VHH-STR 융합항체의 3차 구조 모델링 결과

컴퓨터를 이용한 *in silico* modeling에 의해 8B9 VHH-STR 융합항체 3차 구조를 추정한 결과 4개의 STR subunit가 비공유결합을 이루어 homotetramer를 형성하면 원래 monomer인 8B9 VHH 또한 tetramer를 형성하게 되어 Fig. 7과 같이 4개의 항원결합부위와 4개의 biotin결합부위를 갖는 tetrameric and tetravalent structure가 예측되었다.

고 찰

Streptavidin (STR)은 구조적으로 16.8 KDa의 subunit 4개가 비공유결합에 의해 homotetramer를 형성하며 특히 알려진 생체분자들 중에서 ligand에 대해 가장 강한 결합력을 나타내는 단백질로 알려져 있다. 즉 STR은 Natural ligand인 biotin에

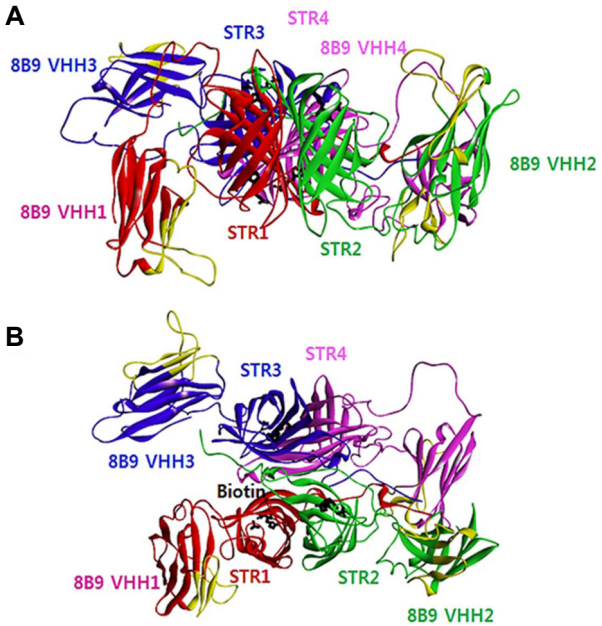

Fig. 7. 3D modeling of 8B9 VHH-STR tetramer. Tetrameric 8B9 VHH-STR was designed and visualized as a 3D structure by Discovery Studio 4.0 visualizer (Accelrys, U.S.A.) program. Tetrameric structure of 8B9 VHH-STR was shown as top view (panel A) and side view (panel B). Each antigen binding sites and biotin binding sites in 8B9 VHH-STR tetramer were colored in yellow and black.

대해 해리평형상수(K_D)값이 10^{-14} M를 나타내어 비공유결합임에도 거의 해리가 되지 않는 공유결합적인 강한 결합을 띄게 된다. 그러므로 biotinylation된 단백질 정제를 위한 affinity chromatography에 활용되거나 항원-항체반응을 탐지하는 ELISA, Westernblot analysis 및 immunocytochemistry등에도 활용될 수 있다. 즉 STR이 융합된 항체를 1차 항체로 항원에 결합시키고 2차 항체로 일반적으로 사용하는 효소가 결합된 항체 보다 biotin이 결합된 효소를 사용하면 항체의 일반적인 K_D (10^{-7}- 10^{-9} M)보다 biotin의 STR에 대한 K_D (10^{-14} M)가 훨씬 낮으므로 10^5배 이상의 더 높은 결합력을 갖게 되어 훨씬 강한 기질발색을 나타내어 1차 항체의 항원결합력을 더 정확하게 측정할 수 있게 되는 것이다.

STR은 homotetramer를 형성하므로 STR에 monomer 항체(예, Fab, ScFv, VHH)을 융합시키면 항체의 tetramer형성을 유도하여 항원결합부위를 4개까지 증가시킬 수 있으므로 항원결합력(avidity) 또한 증가시킬 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 이러한 STR과 biotin 사이의 강한 결합력을 응용한 streptavidin이 융합된 VHH 항체개발을 시도하였다. 즉 *Streptomyces avidinii*에서 추출된 genomic DNA로 부터 streptavidin (STR) 유전자를 발현 vector에 클로닝하고 GFP항원에 특이적으로 결합하는8B9 VHH항체유전자도 같은 vector에 클로닝하여 구축된 8B9 VHH-STR형태의 융합단백질을 대장균에서 발현 정제하였다.

8B9 VHH항체와 STR를 융합시키기 위한 linker로 AAAGG GGSGGGGSGGGGS를 사용하여 두 단백질의 접힘(folding)이 독립적으로 일어나 각각의 고유한 기능을 유지할 수 있도록 하였다. 아미노말단의 3개의 alanine은 클로닝에 *Not*I 제한효소를 사용한 결과 부수적으로 첨가된 아미노산들이며 따라서 실제 linker의 기본단위는 GGGGS이다. Glycine은 R-group이 수소 이므로 charge에 영향을 미치지 않고 아미노산들 중에서 가장 작은 분자량을 나타내어 3차 구조형성에 중요한 인자인 아미노산의 크기와 전하 때문에 발생될 수 있는 steric hindrance를 배제 하였으며 극성을 띠는 serine은 친수성을 나타내어 glycine의 소수성을 상쇄시켜 발현하고자 하는 단백질의 수용화를 촉진 시켜 발현된 단백질이 카르복시말단에 존재하는 polyhexahistidine tag이 Ni^+-NTA-agarose column에 결합하여 수용성 단백질형태로 정제 가능 하게 하였다.

정제된 8B9 VHH-STR 융합항체단백질을 가열하여 SDS-PAGE를 시도한 결과 30.6 kDa의 monomer를 나타내었으나 가열하지 않은 경우에는 122.4 kDa을 나타내어 8B9 VHH-STR 융합항체가 비공유결합에 의한 tetramerization됨을 확인하였으며 8B9 VHH-STR과 STR의 두 단백질을 고정시켜(immobilized) 수행한 ELISA와 8B9 VHH-STR를 고정시켜 수행한 Westernblot analysis에서 공통적으로 STR의 biotin binding activity를 관찰할 수 있었다. ELISA의 경우 비특이적 결합가능성을 배제하기 위하여 BSA를 대조군으로 96-well에 고정시켰다. 한편 8B9 VHH-STR 융합항체의 GFP 항원에 대한 항원특이적 결합을 측정하기 위해 GFP항원을 고정시킨(immobilized) ELISA와 Westernblot analysis를 수행한 결과 공통적으로 GFP 항원 특이적 결합을 나타내었으며 GFP항원에 대한 비특이적 결합가능성을 배제하기 위해 ELISA에서는 대조군으로 STR및 PBS를 1차 항체로 이용하여 수행하였으며 Westernblot analysis에서는 대조군으로 STR을 1차 항체로 사용하였다.

본 연구를 통해8B9 VHH-STR 융합항체의 biotin및 GFP에 대한 결합력은 확인할 수 있었으나 8B9 VHH-STR 융합항체의 tetramer구조로 인한 항원결합력이 8B9 VHH monomer 와 비교하여 정량적으로 얼마나 더 증가되었는지를 확인하기 위해서는 결합속도상수(k_{on})와 해리속도상수(k_{off})를 측정하고 이 두 결합지표의 상관관계를 나타내는 해리평형상수($K_D = k_{on}/k_{off}$)를 측정하는 연구가 추가적으로 요구된다.

결론적으로 8B9 VHH-STR 융합항체는 대장균에서 수용성 단백질 형태로 성공적으로 발현되었으며 정제된 8B9 VHH-STR 융합항체 는 비공유결합에 의한 tetramer를 형성하였고 biotin 결합력과 GFP항원에 대한 결합력을 동시에 나타내었다. 특히 8B9 VHH-STR 융합항체 의 tetramer형성은 4개의 항원분자와 동시에 결합 가능하게 되어 항원결합력(avidity)을 증가시킬 수 있다. 즉 본 연구를 통해 streptavidin을 VHH 항체에 융합시켜 tetravalent and tetrameric VHH 항체개발이 가능함을 제시하였다. 또한 streptavidin과 biotin의 강한 결합력을 응용하여 VHH 1-STR 항체에 biotinylated VHH 2항체를 결합시킨다면 VHH 1에 융합된 STR tetramer의 4개의 biotin 결합부위에 최대 4개의 biotinylated VHH 2가 결합할 수 있으므로 그 결과 VHH 2항체가 최대4개까지 결합 가능하므로 $(VHH\ 1\text{-}STR\text{- biotinylated VHH 2})_4$ 형태의 octameric, octavalent and bispecific VHH항체 제조 또한 가능할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2017~2018년도 창원대학교 자율연구과제 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Arbabi-Ghahroudi, M., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R., and Muyldermans, S. 1997. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett.* **414**, 521-526.
2. Cao, Y., Christian, S. and Suresh, M. R. 1998. Development of a bispecific monoclonal antibody as a universal immunoprobe for detecting biotinylated macromolecules. *J. Immunol. Methods* **220**, 85-91.
3. Diamandis, E. P. and Christopoulos, T. K. 1991. The biotin-(strept) avidin system: principles and applications in bio-

technology. *Clin. Chem.* **37**, 625-636.
4. Dübel, S., Breitling, F., Kontermann, R., Schmidt, T., Skerra, A. and Little, M. 1995. Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibodies (scFv). *J. Immunol. Methods* **178**, 201-209.
5. Green, N. M. 1990. Avidin and streptavidin. *Meth. Enzymol.* **184**, 51-67.
6. Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., Bendahman, N. and Hamers, R. 1993. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**, 446-448.
7. Han, S. H., Kim, H. M., Lim, M. W. and Kim, J. K. 2015. Functional Expression of Soluble Streptavidin in *Escherichia coli*. *J. Life Sci.* **25**, 631-637.
8. Huet, H. A., Growney, J. D., Johnson, J. A., Li, J., Bilic, S., Ostrom, L., Zafari, M., Kowal, C., Yang, G. and Royo, A. 2014. Multivalent nanobodies targeting death receptor 5 elicit superior tumor cell killing through efficient caspase induction. *MAbs* **6**, 1560-1570.
9. Kim, J. K., Tsen, M. F., Ghetie, V. and Ward, E. S. 1994. Identifying amino acid residues that influence plasma clearance of murine IgG1 fragments by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Immunol.* **24**, 542-548.
10. Kipriyanov, S. M., Breitling, F., Little, M. and Dübel, S. 1995. Single-chain antibody streptavidin fusions: tetrameric bifunctional scFv-complexes with biotin binding activity and enhanced affinity to antigen. *Hum. Antibodies Hybridomas* **6**, 93-101.
11. Koo, K., Foegeding, P. M. and Swaisgood, H. E. 1998. Development of a streptavidin-conjugated single-chain antibody that binds Bacillus cereus spores. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2497-2502.
12. Laitinen, O., Hytönen, V., Nordlund, H. and Kulomaa, M. 2006. Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2992-3017.
13. Lee, S. H., Park, D. W., Sung, E. S., Park, H. R., Kim, J. K. and Kim, Y. S. 2010. Humanization of an agonistic anti-death receptor 4 single chain variable fragment antibody and avidity-mediated enhancement of its cell death-inducing activity. *Mol. Immunol.* **47**, 816-824.
14. Lei, S. P., Lin, H., Wang, S. S., Callaway, J. and Wilcox, G. 1987. Characterization of the *Erwinia carotovora pelB* gene and its product pectate lyase. *J. Bacteriol.* **169**, 4379-4383.
15. Lindqvist, Y., and Schneider, G. 1996. Protein-biotin interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 798-803.
16. Park, K. J., Park, D. W., Kim, C. H., Han, B. K., Park, T. S., Han, J. Y., Lillehoj, H. S. and Kim, J. K. 2005. Development and characterization of a recombinant chicken single-chain Fv antibody detecting Eimeria acervulina sporozoite antigen. *Biotechnol. Lett.* **27**, 289-295.
17. Ries, J., Kaplan, C., Platonova, E., Eghlidi, H. and Ewers, H. 2012. A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nat. Methods* **9**, 582-.
18. Zimmermann, J., Voss, H., Schwager, C., Stegemann, J. and Ansorge, W. 1988. Automated Sanger dideoxy sequencing reaction protocol. *FEBS Lett.* **233**, 432-436.

초록 : Streptavidin이 융합된 GFP항원 특이적인 VHH 항체의 기능적 발현

한승희 · 김진규*
(창원대학교 자연과학대학 생명보건학부)

Biotin에 강한 결합 친화력(K_D = 10^{-14} M)과 함께 streptavidin의 tetramer 특징은 VHH 항체를 streptavidin에 융합시키게 하여 biotinylated horseradish peroxidase를 사용하는ELISA 와Western blot analysis 등의 면역분석법에서 VHH 항체의 항원결합력을 증가시키는데 응용 가능하다. 이를 응용하기 위해 우리는 *Streptomyces avidinii* 염색체 DNA로부터 PCR을 통해 streptavidin유전자를 증폭하고 이를 green fluorescent protein항원에 특이적으로 결합하는 8B9 VHH 항체유전자에 융합시켰다. 대장균에서 수용성 융합단백질로 발현시키기 위해 pUC119 플라스미드에 기초한 발현시스템을 사용하였다. 즉 *lacZ* promoter를 사용하여 IPTG에 의해 단백질발현을 유도하게 하였으며, 아미노말단에 *pelB* leader를 두어 발현된 단백질의 periplasmic space로 이동하게 하여 수용성 단백질형태의 분비를 촉진하였으며 카르복시말단에 6개의 polyhistidine tags를 두어 Ni^{+}-NTA-agarose column을 사용하여 발현된 단백질을 정제하였다. Streptavidin이 biotin에 강하게 결합함으로 대장균에 독성을 나타냄에도 불구하고 본 수용성 융합단백질은 성공적으로 발현되었다. SDS-PAGE에서 가열하는 경우 변성되어 30.6 kDa를, 가열하지 않는 경우에는 자연 상태의 122.4 kDa을 나타내었다. 이는 8B9 VHH항체에 융합된 streptavidin moiety에 의해 monomer subunit가 비공유결합으로 tetramerization됨을 제시해준다. 또한 본 융합단백질은 ELISA와 Westernblot analysis에서 보여진 것처럼 parental streptavidin과 유사한 biotin결합력과 green fluorescent protein항원 결합력을 모두 나타내었다. 결론적으로 streptavidin에 융합된 8B9 VHH 항체형태의 융합단백질은 대장균에서 수용성 tetramer로 성공적으로 발현 및 정제되었으며 biotin과 green fluorescent protein 항원에 동시에 결합함으로써 tetrameric and bifunctional VHH 항체제조의 가능성을 제시해주었다.