

<https://doi.org/10.15433/ksmb.2024.16.1.045>

ISSN 2383-5400 (Online)

## 클로렐라에서 바이너리 벡터를 이용한 hSCF와 hINF $\gamma$ 단백질의 안정적인 발현과 효율적인 분리

# Stable Expression and Efficient Secretion of hSCF and hINF $\gamma$ Protein using Binary Vectors in *Chlorella vulgaris*

정유정<sup>1</sup>, 민희경<sup>2</sup>, 이원영<sup>3</sup>, 김성천<sup>4\*</sup>Yu Jeong Jeong<sup>1</sup>, Hee Gyung Min<sup>2</sup>, Won Young Lee<sup>3</sup>, Sung Chun Kim<sup>4\*</sup><sup>1</sup>수석연구원, ㈜바이오이즈 중앙연구소 서울, 08390, 대한민국<sup>2</sup>주임연구원, ㈜바이오이즈 중앙연구소 서울, 08390, 대한민국<sup>3</sup>선임연구원, ㈜바이오이즈 중앙연구소 서울, 08390, 대한민국<sup>4</sup>대표이사, ㈜바이오이즈 중앙연구소 서울, 08390, 대한민국

Central Research Institute, Biois. Co., Ltd., Seoul, 08390, Korea

(Received 13 Mar 2024, Revised 26 Mar 2024, Accepted 4 Apr 2024)

**Abstract** Microalgae have great potential in the biomedical and pharmaceutical industries as a new type of bioreactor that can produce proteins for specific purposes, including recombinant proteins, pharmaceuticals, and industrial enzymes. Despite the production advantages and importance of microalgae-based expression systems, studies on secretion efficiency are limited. In this study, for stable expression and efficient secretion of the heterologous protein (human SCF and human INF $\gamma$ ) in *Chlorella vulgaris*, we constructed SP:hSCF:His and SP:hINF $\gamma$ :His plant binary vectors using the signal peptide (SP) of *Chlamydomonas reinhardtii*, and we obtained stable transformants through the effective agrobacterium-mediated transformation of these vectors. Transformants with accurately inserted *hSCF* and *hINF $\gamma$*  demonstrated stably increased mRNA and protein expression using RT-PCR and western blotting under the same culture conditions. Following the analysis of the proteins secreted into the culture medium using ELISA, it was confirmed that hINF $\gamma$  was effectively produced in the transformed *C. vulgaris* culture medium. The overall findings indicate that the combination of heterologous protein and SP may be crucial for ensuring the expression and secretion of recombinant proteins in *Chlorella* culture systems.

**Keywords** : *Chlorella vulgaris*, Binary vector, Signal Peptide, hSCF, hINF $\gamma$ 

## 서 론

미세조류(microalgae)는 건강상의 이점을 지닌 고부가가치의 생리활성 물질을 생산하며, 생산된 1:2

차 대사산물이 제약 산업에서 원료로 활용되고 있어 이들의 생물학적 잠재력은 크다 [1, 2]. 미세조류 기반 시스템은 짧은 성장주기, 저영양 요구량, 효율적인 대량 배양 기술, 저가의 생산 비용 등 산업적으로

\* Corresponding author Sung Chun Kim  
Phone: \*\*\*-\*\*\*\*-\*\*\*\* Fax: 02-864-9954  
E-mail: kimgp@biois.co.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

많은 이점을 활용할 수 있어 분자 농업 시스템을 개발하기 위해 이상적이며, 식물과 미생물의 유리한 특징을 선별할 수 있기 때문에 유전자 농업을 위한 효과적인 경쟁 대안이 된다 [3, 4]. 또한, 면역독소와 같은 치료용 단백질을 포함한 재조합 단백질, 화장품, 의약품, 건강보조식품, 산업용 효소와 같은 물질을 생산하기 쉬운 플랫폼으로 [5], 면역 조절제, 효소, 항체, 항암제 및 바이러스 백신 등의 특정 목적에 맞게 사용되는 단백질들을 생산할 수 있어 [6, 7, 8], 생물학 및 제약 산업에서 잠재력이 크다. 특히 클로렐라는 진핵 미세조류의 일종으로 상대적으로 작은 세포 크기, 탄력적 세포벽, 식용, 쉬운 배양, 빠른 성장 속도, 대량의 바이오매스 생산 및 물리화학적 조건에 쉽게 적응할 수 있는 산업화 물질을 생산하며, 고부가가치 화합물을 얻기 위한 경제적이고 효과적인 생물반응기 역할을 할 수 있어 식품 및 제약 산업에 적용되고 있다 [9]. 클로렐라를 이용한 단백질 의약품 개발 시 다양한 신호 펩타이드(Signal Peptide, SP) 중에서 목적 단백질 발현에 최적화된 것을 도입시 생산량을 증가시킬 수 있다 [10, 11]. 그러나, 클로렐라를 포함한 미세조류 발현시스템의 생산 장점과 중요성에도 불구하고 분비 효율성 연구가 많이 되어있지 않은 실정이다.

생명공학 기술의 발전 및 고도화로 난발현 단백질(Difficult to Express Protein, DtEP) 발현을 개선하고 재조합 단백질의 효율 증진을 위해 목적 유전자를 숙주세포의 코돈 사용법(codon usage)에 맞도록 코돈 최적화함으로써 번역 효율을 높이는 코돈 최적화(codon optimization) [12, 13, 14] 등의 발현시스템과 목적 단백질에 SP 조합으로 세포 분비 시스템을 통한 생산성 향상 사례가 보고되고 있다 [15, 16]. *C. reinhardtii* CA1 (Carbonic Anhydrase 1)의 SP로 약 84% 루시퍼라제 분비 증가 보고와 함께 실제로 이중 단백질의 효율적인 분비 전략연구는 미세조류 개발에 있어 중요하며 *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Phaeodactylum tricornutum* 등을 중심으로 집중 연구가 진행되고 있으나, *C. vulgaris*와 *P. tricornutum*에서 이중 단백질의 불안정한 발현, 낮은 형질전환 효율, 검증된 SP의 낮은 역가 등으로

개선이 필요하다 [17, 18, 19, 20].

면역체계에 중요한 조절자인 사이토카인은 면역세포의 항상성을 조절하는 세포 신호 전달자로 세포의 증식분화, 활동 및 면역반응 및 조직 손상과 회복을 조절하며 그 종류가 많고 면역반응에 다양한 역할을 담당하기에 [21, 22], 치료 목적의 재조합 사이토카인에 대한 효과적인 생산량 증가 및 생산 비용을 목적으로 다양한 발현시스템이 적용되고 있다.

줄기세포인자(Stem Cell Factor, SCF)는 *c-Kit* 수용체에 결합하는 사이토카인으로 조혈, 줄기세포 유지, 비만 세포 발달, 멜라닌 세포의 분화 및 생성 자극에 중요한 역할을 하는 면역조절물질이다 [23]. 또한, *c-KIT*의 리간드 결합 도메인에 결합하여 여러 생화학적 신호 경로를 통해 세포 성장, 분화 및 증식 등 다양한 생물학적 기능을 조절하며 거의 모든 조직에 존재하는 줄기세포를 활성화하는 필수 요소로서 피부노화 방지 및 새로운 모낭 형성을 촉진하기도 한다 [24]. 박테리아로부터 주원료가 생산되는 hSCF는 당화 부족에 따른 낮은 활성도로 인해 많은 양의 원료 사용으로 고가의 생산 비용이 발생하여 효율적인 생산이 필요하다 [25].

인터페론 감마(Interferon gamma, INF $\gamma$ )는 항바이러스, 항종양, 면역조절 기능을 지닌 다발성 사이토카인으로 세포증식억제 및 세포 사멸 촉진 기능을 기반으로 다양한 유형의 암에 대한 보조 면역치료에 잠재적으로 사용되고 있다 [26, 27]. INF $\gamma$ 는 고가의 생물약제로, 주로 *E. coli*에서 발현되어 Actimmune® (Vidara Therapeutics, Dublin, Ireland)명으로 판매되고 있으나 혈류에서 짧은 반감기와 발현시스템에 고비용이 소요된다 [28].

본 연구에서는 *C. vulgaris* 발현시스템에서 산업적으로 중요 역할을 하는 이중 단백질 hSCF와 hINF $\gamma$ 의 안정적인 발현과 효율적인 단백질 분비를 위해 코돈 최적화된 hSCF와 hINF $\gamma$  단백질 서열 앞에 기 보고된 CA1 단백질의 SP를 재조합하여, 방법이 쉽고 길이가 긴 DNA를 핵내로 전달할 수 있는 형질전환 효율이 높은 아그로박테리움 매개 형질전환 방법으로 [29], host인 *C. vulgaris*에 도입하여 안정적인 발현과 세포외 분비 효율을 향상시키고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 미세조류 및 배지 배양 조건

본 연구에 사용한 *Chlorella vulgaris* AG10032의 배양 배지는 유기탄소원 0.5% glucose를 첨가한 BG (Blue-Green) 11 [30] 배지를 사용하였다. BG11 액체 배지(pH 7.0)는 NaNO<sub>3</sub> 1500 mg/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 40 mg/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 75 mg/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 36 mg/L, C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>8</sub> 6 mg/L, FeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·NH<sub>4</sub>OH 6 mg/L, Trace metal solution 1 ml/L (Na<sub>2</sub>-EDTA 1 mg/L, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1.81 g/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.22 g/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.39 g/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.08 g/L, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.05 g/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.86 g/L)의 기본 조성으로, 유기탄소원 0.5% glucose를 첨가하여 제조하였다. 제조된 배지는 121°C에서 15분간 멸균, 냉각하여 250 ml 세포배양 플라스크에 접종액 1x10<sup>5</sup> cells/ml를 넣고, 광주기 14 h:10 h (Light:Dark), 배양온도 25°C, 광도 3200 lux, 150 rpm이 공급되는 진탕 배양기(VS-8480SR-L, Vision Scientific, Korea)에서 배양하였다. UV/Vis 분광광도계(Optizen pop, Mecacy, Korea)를 이용하여 흡광도 O.D<sub>680</sub> (Optical Density, 680 nm)에서 생장률 측정 후 본 실험에 사용하였다.

### 2. 코돈 최적화된 hSCF/hINF $\gamma$ 와 신호 펩타이드를 조합한 바이너리 벡터 클로닝

*C. reinhardtii*의 CA1 (GenBank: D90206.1, 377 A.A) [31]의 SP(MARTGALLLVALALAGCAQA, 20 A.A)에 코돈 최적화 알고리즘 툴 (<https://zendto.bioneer.co.kr/codon/index.py/>)을 적용한 human SCF (26-190 A.A, 165 A.A, GenBank: AAA85450.1)와 human INF $\gamma$  (144 A.A, GenBank: AAP20100.1) 서열을 각각 연결하고 이들의 5' 말단에 6xHistidine Tag으로 구성된 서열을 (주)바이오닉스에 의뢰하여 합성하였다. 합성된 서열을 *SpeI*-*BstE* II 제한효소로 절단하여 바이너리 벡터인 pCAMBIA1302 (GenBank: AF234298.1)에 삽입하고, 50  $\mu$ g/ $\mu$ l Kanamycin이 첨가된 배지에서 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니에서 colony PCR로 삽입된 hSCF와 hINF $\gamma$ 를 각각 확인하고 서열 분석 (sequencing)을 통하여 SP:hSCF:His와 SP:hINF $\gamma$ :His

로 각각 표기하였다(Figure 1A, 1B).

### 3. 아그로박테리움 형질전환체 제작 및 선별

제작된 SP:hSCF:His와 SP:hINF $\gamma$ :His 벡터는 *Agrobacterium*의 freeze-thaw 방법 [32]을 이용하여 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (O.D<sub>600</sub>=0.8)에 도입 후, 10  $\mu$ g/ $\mu$ l Gentamycin (Gen<sup>10</sup>), 50  $\mu$ g/ $\mu$ l Rifampicin (Rif<sup>60</sup>)과 50  $\mu$ g/ml Kanamycin (Kan<sup>50</sup>)이 첨가된 Luria-Bertani (LB) (Difco, Laboratories, USA) 선별 배지에서 배양하였다. 항생제(Gen<sup>10</sup>, Rif<sup>60</sup>, Kan<sup>50</sup>) 저항성 배지에 자란 콜로니는 hSCF/hptII와 hINF $\gamma$ /hptII 특이적 프라미어로 colony PCR 하여 유전자 도입을 확인하였다.

### 4. Colony PCR 및 제한효소 처리

SP:hSCF:His와 SP:hINF $\gamma$ :His 벡터가 도입된 *E. coli*와 *A. tumefaciens* 콜로니는 증류수에 희석하여 현탁액을 주형으로 유전자 특이적 프라이머(Table 1, hSCF\_F/hSCF\_R primer sets, hINF $\gamma$ \_F/hINF $\gamma$ \_R primer sets, hptII\_F/hptII\_R primer sets)를 사용하여 2xGS-Taq PCR Master Mix (#3308, BEAMSBIO, Korea)로 colony PCR (Polymerase Chain Reaction)을 하고 1% 아가로즈 젤에서 패턴을 확인하였다. 반응 조건은 I 단계 94°C-1분, II 단계 30 cycles; 98°C-10초 /62°C-30초/ 72°C-30~60초로 증폭하였다. 제한효소 *SpeI*, *BstEII*와 *ScaI* (Enzymomics, Korea)의 1 unit을 제조사에서 제시한 프로토콜에 따라 1시간 처리 후, 0.8% 아가로즈 젤에서 패턴을 확인하였다.

### 5. 아그로박테리움 매개 *C. vulgaris* 공동배양을 통한 형질전환

SP:hSCF:His와 SP:hINF $\gamma$ :His 벡터가 각각 도입된 아그로박테리움 균주는 LB 배지(Gen<sup>10</sup>, Rif<sup>60</sup>, Kan<sup>50</sup>)에 접종하고 28°C에서 암배양(O.D<sub>600</sub>=0.7~0.8) 하고, 형질전환을 위한 접종액으로 사용하였다.

*C. vulgaris*는 0.5% glucose가 첨가된 BG11 액체 배지에서 25°C, 5일 동안 암배양 후, 형질전환을 위한 전배양(O.D<sub>680</sub>=1)으로 사용하였다. Cha 등 방법 (2012)을 변형하여 아그로박테리움 접종액과 *C.*

*vulgaris* 전배양액은 120 rpm/200 rpm에서 각각 원심 분리하여 상등액을 제거하고, 유도 배지(100 μM acetosyringon이 첨가된 BG11 배지)로 세척 후 재현탁 하였다 [33]. 유도 배지로 재현탁 된 아그로박테리움을 *C. vulgaris*에 이식하고, 25°C 암조건에서 5일간 공동배양 후, 20 μg/ml Hygromycin (Hyg<sup>20</sup>)과 150 μg/ml Cefotaxime (Cef<sup>50</sup>)이 포함된 BG11 (0.5% glucose 첨가) 고체배지에서 2일 동안 암배양 하였다. 양광저온배양기(DS-53FPL, DASOL Science, Korea)로 옮겨 증식시킨 후, 항생제에 저항성을 보이는 콜로니들을 2주 간격으로 연속 계대 배양하여 안정적인 개체들을 선별하였다.

**6. 도입 유전자 및 mRNA 발현 확인**

Genomic DNA (gDNA) PCR과 RT-PCR을 통해 형질전환된 클로넬라에서 *hSCF*와 *hINFγ* 유전자 도입 유무 및 발현을 확인하기 위하여 항생제 저항성 배지에서 안정화된 콜로니를 대상으로 SDS 추출 버퍼를 사용하여 gDNA를 분리하였다. 추출된 gDNA를 주형으로 유전자 특이적 프라이머(Table 1, Table 1, *hSCF\_F/hSCF\_R* primer sets, *hINFγ\_F/hINFγ\_R* primer sets, *hptII\_F/hptII\_R* primer sets)를 사용하여 EmeraldAmp<sup>®</sup> GT PCR Master Mix (RR300A, Takara Bio, Korea)로 PCR 하였다. 반응 조건은 I 단계 98°C-1분, II 단계 30 cycles; 98°C-10초/62°C-30초/ 72°C-30~60초이다.

유전자 도입이 확인된 *C. vulgaris* 형질전환체에서 *hSCF*와 *hINFγ* 유전자 발현 여부를 각각 확인하기 위해 0.5% glucose가 첨가된 BG11 액체배지 (Hyg<sup>20</sup>, Cef<sup>50</sup>)에 접종하고 5일 동안 150 rpm에서 배양 후, 음성대조군으로 형질되지 않은 *C. vulgaris*와 함께 TRIzol Plus RNA Purification Kit (#12183555, Invitrogen, USA)로 총 RNA를 추출하고, M-MLV RT-Kit (BR122-10k, BioFACT, Korea)로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 Table 1 프라이머 세트(*hSCF\_F/hSCF\_R* primer sets, *hINFγ\_F/hINFγ\_R* primer sets)와 EmeraldAmp<sup>®</sup> GT PCR Master Mix를 사용하여 SimpliAmp Thermal Cycler (A24811, Applied Biosystems, USA)로 증폭 후, 발현을 분석하

였다.

**Table 1. List of primers for this study**

Gene Name	Primer	
	Name	Sequence (5' → 3')
<i>hSCF</i>	<i>hSCF_F</i>	ATGGAGGGGATCTGCCGGAAC
	<i>hSCF_R</i>	AGCGACCGGGGAGCATG
<i>hINFγ</i>	<i>hINFγ_F</i>	ATGCAGGACCCCTACGTGAAGG
	<i>hINFγ_R</i>	GGCCCTGAAACAGCATCTGGGA
<i>18S rRNA</i>	<i>18S rRNA_F</i>	TTCTATGGGTGGTGGTGCATG
	<i>18S rRNA_R</i>	GCGAACCAACCGTGACTATT
<i>hptII</i>	<i>hyg_F</i>	TTCTTTGCCCTCGGACGAGTG
	<i>hyg_R</i>	ACAGCGTCTCCGACCTGATG

**7. 단백질 추출 및 발현, 분비 함량 확인**

유전자 도입과 mRNA 발현이 확인된 *C. vulgaris* 형질전환체를 대상으로 mRNA 발현 배양조건과 동일 조건으로 배양 후, 배양액 내로 분비된 각각의 *hSCF*와 *hINFγ* 단백질 함량을 측정하기 위해 배양 배지에서 His-tag ELISA detection kit (L00436, Genscript, USA)의 제조사 매뉴얼에 따라 측정하였다 [34, 35]. His Tag Standard와 배양액을 His Tag Plate의 각 well에 분주하고, Anti-His Monoclonal Antibody 첨가 후 상온에서 30분 배양, 4번 세척 하였다. Antibody Tracer를 넣고 상온에서 추가로 4번 세척하고 TMB substrate 첨가하여 10분간 반응시킨 뒤 Stop 버퍼를 넣고 450 nm에서 측정하였다. 표준곡선과 함께 실험 결과는 평균값과 표준편차를 오차범위로 표기하였다.

동일 배양조건에서 형질전환된 *C. vulgaris* 세포 내에 있는 단백질 발현을 확인하기 위해 원심분리 후 상등액을 제거하고, 액체질소로 동결 건조하여 소형 전동 막자(Micro-Electric Pestle)로 곱게 분쇄하였다. 단백질 추출 버퍼(50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.1% Nonidet-P40, Protease inhibitor cocktail (GenDEPOT)를 넣고 얼음에서 10분간 반응시킨 후 원심 분리하고 상등액만을 회수하여 Pierce<sup>™</sup> BCA Protein Assay Kit (#23227, Thermo Scientific, USA)로 단백질을 정량하였다. 정량된 단백질은 15% Polyacrylamide gel에 30 μl씩 로딩하고 전기영동(Bio-rad, USA)을 진행하였다. 전기영동이 끝난 Polyacrylamide gel을

Trans-Blot® Turbo™ Transfer Starter System, Midi PVDF (#17001919, Bio-rad, USA)의 방법대로 transfer 하였다. 5% Skim Milk (#44230, Difco, USA)로 blocking하고, 1차 항체인 Anti-6xHis tag antibody (#137839, abcam, USA)로 1시간 반응시킨 후, PBST (1% PBS, 0.05% Tween 20)로 3번 세척 하였다. 2차 항체인 Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab205718, abcam, USA)로 1시간 반응시키고, 3번 세척 후 Optiblot ECL Detect kit (ab133406, abcam, USA) 시약으로 반응시킨 뒤 Odyssey Fc Imager (Li-Cor, USA) 매뉴얼에 따라 결과를 확인하였다.

8. 통계 분석

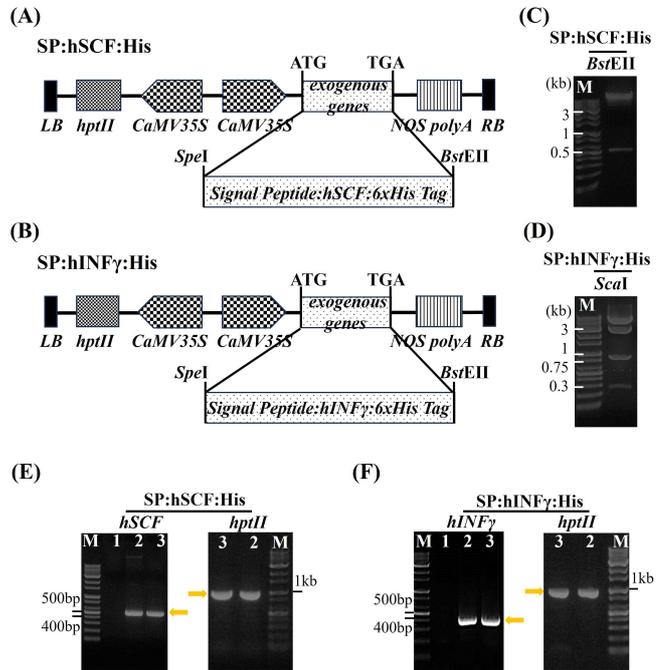
데이터 유의성 분석을 위해 SAS 소프트웨어(버전 9.1)를 사용하였으며, Tukey 테스트( $p < 0.05$ )로 검증하였다.

결 과 및 고 찰

본 연구에서는 *C. vulgaris* 발현시스템에서 hSCF와 hINF $\gamma$  발현 증가 및 효율적인 단백질 분비 유도를 위해 기보고된 *C. reinhardtii* CA1의 SP와 hSCF:6xHis Tag와 hINF $\gamma$ :6xHis Tag 서열을 합성하여, pCAMBIA1302 벡터에 도입하고, colony PCR과 제한효소 확인(Figure 1C-1F)을 통해 SP:hSCF:His와 SP:hINF $\gamma$ :His 벡터를 제작하였다(Figure 1A, 1B). 이들 벡터는 모든 조직에서 유전자 발현을 유도하는 Cauliflower mosaic virus (CaMV 35S) 프로모터 [36]와 항생제인 카나마이신 내성 유전자, T-DNA에는 항생제인 하이그로마이신 내성 유전자(hygromycin phosphotransferase II, *hptII*)가 있는 식물 바이너리 벡터이다.

제작된 SP:hSCF:His와 SP:hINF $\gamma$ :His의 DNA는 *Agrobacterium*에 도입하고, LB 고체배지(Gen<sup>10</sup>, Rif<sup>50</sup>, Kan<sup>50</sup>)에서 자란 콜로니는 각 벡터의 *hptII/hSCF*와 *hptII/hINF $\gamma$*  특이적 프라이머(Table 1)를 각각 사용하여 colony PCR 확인 결과, *hptII/hSCF*와 *hptII/hINF $\gamma$* 에 대해 각각 495 bp/964 bp와 429 bp/964 bp 산물을 확인하였다(Figure 1E, 1F).

*C. vulgaris* 형질전환을 위해 *C. reinhardtii*, *Chlorella* sp., *Symbiodinium* sp., *Nannochloropsis* sp. 등의 미세조류 종의 형질전환에 사용되고 있는 [37],



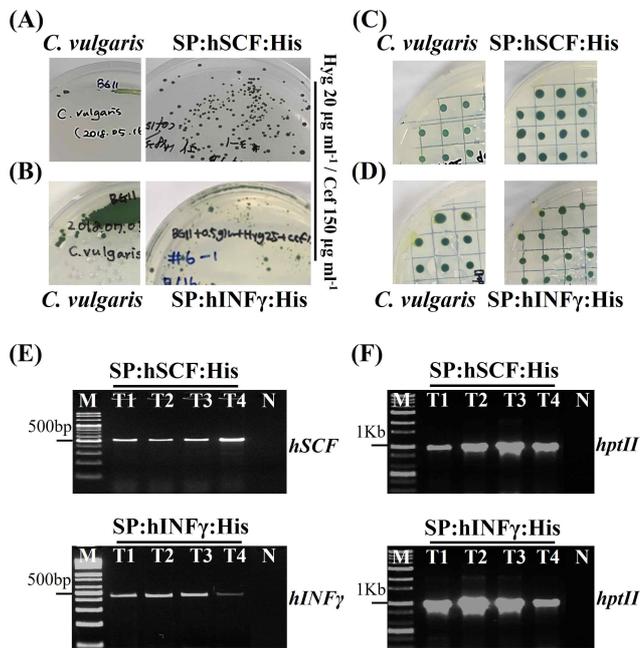
**Figure 1.** Cloning of the binary vector used for *C. vulgaris* transformation in this study. (A-B) Schematic representations of the binary vector constructs, SP:hSCF:His (A) and SP:hINF $\gamma$ :His (B). LB, T-DNA left border; RB: T-DNA right border; *hptII*, hygromycin resistant gene; CaMV 35S, Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter; His tag, 6xHistidine epitope tags; NOS polyA, NOS nopaline synthase terminator. (C) The *BstEII* digestion product of the SP:hSCF:His plasmid. From top to bottom, the positions of the 9892 bp, and 495 bp fragments are shown in that order. (D) The *ScaI* digestion product of the SP:hINF $\gamma$ :His plasmid. From top to bottom, the positions of the 6255 bp, 2966 bp, 849 bp, and 495 bp fragments are shown in that order. (E-F) Colony PCR of the SP:hSCF:His (E) and SP:hINF $\gamma$ :His (F). The orange arrow indicates the 495 bp, 429 bp, and 964 bp fragments of *hSCF*, *hINF $\gamma$* , and *hptII*, respectively. Lanes M, the 1 kb Plus DNA Ladder; Lane 1, the negative control based on H<sub>2</sub>O; Lanes 2, the *E. coli* liquid PCR products; Lanes 3, the *A. tumefaciens* liquid PCR products.

아그로박테리움 매개 형질전환 방법을 적용하였다. 0.5% glucose를 첨가한 BG11 고체배지(Hyg<sup>R</sup>, Cef<sup>R</sup>)에서 항생제에 저항성을 보이는 *C. vulgaris*를 스크리닝하고(Figure 2A, 2B), 이들을 2주 간격으로 3회에 걸쳐 연속 계대 배양하여 안정적인 *C. vulgaris*를 대상으로(Figure 2C, 2D) gDNA를 추출하였다. 형질전환 시킨 *C. vulgaris*의 염색체 내에 *hSCF*와 *hINF $\gamma$*  유전자 삽입을 확인하기 위해 각각의 유전자 특이적 프라이머를 사용하여 PCR한 결과, SP:hSCF:His와 SP:hINF $\gamma$ :His로 형질전환 시킨 *C. vulgaris*에서는 *hSCF/hptII*의 495 bp/964 bp 산물과 *hINF $\gamma$ /hptII*의

429 bp/964 bp 산물이 각각 확인되었다. 그러나 음성대조군인 형질전환 되지 않은 *C. vulgaris*에서는 어떠한 밴드도 검출되지 않았다. 따라서, SP:hSCF:His와 SP:hINF $\gamma$ :His 형질전환된 *C. vulgaris* 염색체 내에 *hSCF*와 *hINF $\gamma$*  유전자 도입 결과를 확인하였다(Figure 2E).

*C. vulgaris* 염색체내에 *hSCF*와 *hINF $\gamma$* 의 도입이 확인된 형질전환체들 중에서 대표적으로 두 개 라인(T1~T2)을 선발하여 해당 유전자의 mRNA 발현을 분석한 결과, *hSCF*가 도입한 형질전환체(T1~T2)와 *hINF $\gamma$* 가 도입된 형질전환체(T1~T2)에서 *hSCF*와 *hINF $\gamma$* 의 mRNA 발현이 각각 증가되었다(Figure 3A, 3B). 이를 통해 *C. vulgaris* 형질전환체 내에 *hSCF*와 *hINF $\gamma$*  유전자가 *C. vulgaris* 염색체 내에 삽입되어 있고 삽입된 유전자의 전사가 정상적으로 일어나고 있음을 확인하였다. 본 결과처럼 최근까지 재조합 단백질 생산을 위한 미세조류 플랫폼에서 여러 종류의 목적 단백질이 형질전환 되었으며 기술 개선을 통해 형질전환 클로넬라에서 외래 유전자의 안정적인 발현 연구가 진행되고 있다 [38, 39].

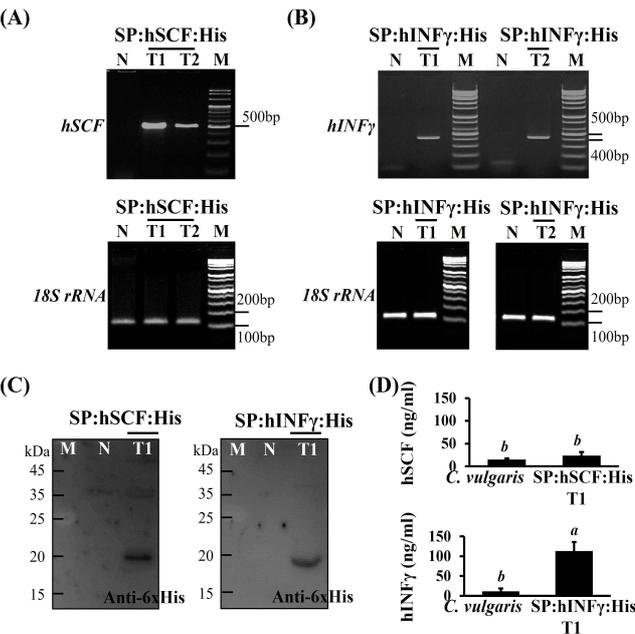
mRNA 발현이 확인된 각각의 형질전환 *C. vulgaris* (SP:hSCF:His와 SP:hINF $\gamma$ :His)에서 세포내 단백질 발현 여부 및 배양액 내로의 분비를 확인하기 위하여 mRNA 발현 확인 실험과 동일 조건으로 배양 후, 먼저 cell lysate에서 estern blot을 실시하였다. 음성대조군으로 사용된 *C. vulgaris*에서는 *hSCF*와 *hINF $\gamma$* 에 대응하는 밴드과 나타나지 않았으며, mRNA 발현이 확인된 SP:hSCF:His와 SP:hINF $\gamma$ :His의 형질전환체에서는 *hSCF*와 *hINF $\gamma$* 의 분자량에 해당되는 단백질이 각각 탐지되었다(Figure 3C). 또한, 정량한 총단백질의 SDS-PAGE 상에서 Coomassie blue 염색 시 단백질의 패턴에는 변화가 없었다(결과 미제시). 배양액 내로 분비된 *hSCF*와 *hINF $\gamma$*  단백질 함량을 ELISA assay 한 결과, SP:hSCF:His 형질전환체의 배양액 내의 분비와 달리 SP:hINF $\gamma$ :His 형질전환체의 배양액 내에서는 *hINF $\gamma$*  분비된 양이 크게 증가되었다(Figure 3D). 이는 CA1의 SP가 *hSCF* 보다는 *hINF $\gamma$* 의 분비된 발현 증가에 더 도움이 되었음을 나타낸다. 단백질을 배양액으로 분비하는 시스템은



**Figure 2.** Screening of *C. vulgaris* transformants, SP:hSCF:His and SP:hINF $\gamma$ :His. (A-B) Colony formation of Agrobacterium-mediated *C. vulgaris* transformation on the selection plates including 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Hygromycin and 150  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Cefotaxime. (C-D) Stable transformants obtained through serial subcultures at 2-week intervals on the selective medium containing Hyg<sup>20</sup> and Cef<sup>50</sup>. (E-F) PCR analysis confirmation from gDNA of the SP:hSCF:His and SP:hINF $\gamma$ :His transformants using the *hSCF/hptII* (E) and *hINF $\gamma$ /hptII* (F) specific primers, respectively. Lanes M, the 1 kb Plus DNA Ladder; T1~T4, four independent transformants; N, the negative control based on non-transformed *C. vulgaris*.

세포내 단백질 정제 시스템보다 상대적으로 단계가 덜 복잡하므로 약학적으로 중요한 단백질을 생산하기 위한 비용 효율적인 플랫폼이다. 또한, 숙주와 함께 목적 단백질과 최적합한 SP는 발현시스템에서 분비된 단백질의 전체 수율에 영향을 미치며 재조합 단백질의 발현에 따라 분비 효율이 달라질 수 있음

을 뒷받침해 준다. 우리의 결과는 미세조류를 이용한 단백질 생산 시스템의 범용성과 효율성을 더욱 개선할 수 있을 것으로 *C. vulgaris* 플랫폼에서 높은 hINF $\gamma$ 의 분비 생산을 위한 전략 제공과 다운스트림 처리 비용을 최소화하기 위한 저비용의 산업적 관련 단백질 분비에 활용할 수 있을 것이다.



**Figure 3.** Analysis of mRNA and protein expression for the hSCF and hINF $\gamma$  in selected transgenic *C. vulgaris*, SP:hSCF:His and SP:hINF $\gamma$ :His. (A-B) RT-PCR analysis of mRNA expression levels for *hSCF* (A) and *hINF $\gamma$*  (B) gene in *C. vulgaris* transformants. The *18S rRNA* gene was used as an internal control. Lanes M, the 1 kb Plus DNA Ladder; T1~T2, two independent transformants; N, the negative control based on non-transformed *C. vulgaris*. (C) Western blot analysis of total proteins extracted from cell lysates in the *C. vulgaris* transformants SP:hSCF:His (left) and SP:hINF $\gamma$ :His (right). Lanes M, Protein Marker (3.5-245 kDa); N, the negative control based on non-transformed *C. vulgaris*. (D) ELISA quantification of hSCF (upper) and hINF $\gamma$  (down) concentration in the media. The data are averages of three independent experiments, and error bars indicate standard errors (S.E.). Different letters over columns indicate significant differences between groups ( $p < 0.05$  when compared to *C. vulgaris*).

## 결론

미세조류는 새로운 유형의 생물반응기로서 재조합 의약품 단백질을 생산을 위한 중요한 잠재적 자원이다. 본 연구는 *C. vulgaris* 발현시스템에서 산업적으로 중요한 hSCF와 hINF $\gamma$ 의 안정적인 발현 증가와 효율적인 단백질 분비 유도를 위해 hSCF/hINF $\gamma$ 와 *C. reinhardtii* CA1의 SP를 CaMV 35 프로모터를 가진 식물 바이너리 벡터에 클로닝하고 빠르고 쉬운 아그로박테리움 매개 *C. vulgaris* 공동배양을 통해 형질전환 하였다. 안정적으로 계대배양 되는 *C. vulgaris* 형질전환체(SP:hSCF:His와 SP:hINF $\gamma$ :His)를 대상으로 염색체 내에 *hSCF*와 *hINF $\gamma$*  유전자 삽입을 확인하였다. 확인된 *C. vulgaris* 형질전환체에서 동일 조건으로 배양 후, RT-PCR을 통한 *hSCF*와 *hINF $\gamma$* 의 증가된 전사 수준 및 western blot을 통한 *C. vulgaris* 세포내의 안정적인 단백질 발현을 확인하였다. RT-PCR과 western blot으로 동시에 발현이 확인된 SP:hSCF:His와 SP:hINF $\gamma$ :His 형질전환체에서 동일 배양조건의 배양액으로부터 ELISA로 hSCF와 hINF $\gamma$  함량을 측정된 결과, *C. reinhardtii* CA1의 SP1에 의해 hSCF와 달리 배양액 내로 분비 촉진된 hINF $\gamma$ 의 증가를 확인하였다. 이러한 결과는 *C. vulgaris* 발현시스템에서 CA1의 SP가 발현되는 목적 단백질에 따라 분비 효율이 달라질 수 있으며 전체 수율 증가에 영향을 주어 형질 전환된 *C. vulgaris*에서 hSCF와 hINF $\gamma$ 의 발현 확인으로 미세조류를 이용한 재조합 단백질의 생산 가능성을 보여주었다.

## References

- Cuellar-Bermudez, S. P., Aguilar-Hernandez, I., Cardenas-Chavez, D. L., Ornelas-Soto, N., Romero-Ogawa, M. A. and Parra-Saldivar, R. 2015.

- Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microb. Biotechnol.* 8(2), 190-209.
2. Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A. and Abd Allah, E. F. 2019. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi. J. Biol. Sci.* 26(4), 709-722.
  3. Gong, Y., Hu, H., Gao, Y., Xu, X. and Gao, H. 2011. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38(12), 1879-1890.
  4. El-Ayouty, Y., El-Manawy, I., Nasih, S., Hamdy, E. and Kebeish, R. 2019. Engineering *Chlamydomonas reinhardtii* for Expression of Functionally Active Human Interferon- $\alpha$ . *Mol. Biotechnol.* 61(2), 134-144.
  5. Rasala, B. A. and Mayfield, S. P. 2015. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. *Photosynth. Res.* 123(3), 227-239.
  6. Khavari, F., Saidijam, M., Taheri, M. and Nouri, F. 2021. Microalgae: therapeutic potentials and applications. *Mol. Biol. Rep.* 48(5), 4757-4765.
  7. Fu, W., Nelson, D. R., Mystikou, A., Daakour, S. and Salehi-Ashtiani, K. 2019. Advances in microalgal research and engineering development. *Curr. Opin. Biotechnol.* 59, 157-164.
  8. Hempel, F. and Maier, U. G. 2012. An engineered diatom acting like a plasma cell secreting human IgG antibodies with high efficiency. *Microb. Cell Fact.* 11, 126.
  9. Yan, N., Fan, C., Chen, Y. and Hu, Z. 2016. The Potential for Microalgae as Bioreactors to Produce Pharmaceuticals. *Int. J. Mol. Sci.* 17(6), 962.
  10. Wen, B., Deng, Y., Guan, J., Yan, W., Wang, Y., Tan, W. and Gao, J. 2011. Signal peptide replacements enhance expression and secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Acta. Biochim. Biophys. Sin (Shanghai).* 43(2), 96-102.
  11. Futatsumori-Sugai, M. and Tsumoto, K. 2010. Signal peptide design for improving recombinant protein secretion in the baculovirus expression vector system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391(1), 931-935.
  12. Heitzer, M., Eckert, A., Fuhrmann, M. and Griesbeck, C. 2007. Influence of codon bias on the expression of foreign genes in microalgae. *Adv. Exp. Med. Biol.* 616, 46-53.
  13. Malla, A., Rosales-Mendoza, S., Phoolcharoen, W. and Vimolmangkang, S. 2021. Efficient Transient Expression of Recombinant Proteins Using DNA Viral Vectors in Freshwater Microalgal Species. *Front. Plant Sci.* 12, 650820.
  14. Nakamura, Y., Gojobori, T. and Ikemura, T. 2000. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res.* 28(1), 292.
  15. Weber, E., Birkenfeld, J., Franz, J., Gritzan, U. Linden L. and Trautwein M. 2017. Modular Protein Expression Toolbox (MoPET), a standardized assembly system for defined expression constructs and expression optimization libraries. *PLoS One.* 12(5), e0176314.
  16. Freudl, R. 2018. Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems. *Microb. Cell Fact.* 29, 17(1):52.
  17. Lauersen, K. J., Berger, H., Mussnug, J. H. and Kruse, O. 2013. Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biotechnol.* 167(2), 101-110.
  18. Shin, J. H., Choi, J., Jeon, J., Kumar, M., Lee, J., Jeong, W. J. and Kim, S. R. 2020. The establishment of new protein expression system using N starvation inducible promoters in *Chlorella*. *Sci. Rep.* 10(1), 12713.
  19. Zhuang, H., Ou, Y., Chen, R., Huang, D. and Wang, C. 2023. Comparing the Ability of Secretory Signal Peptides for Heterologous Expression of Anti-Lipopolysaccharide Factor 3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mar. Drugs.* 21(6), 346.
  20. Molino, J. V. D., de Carvalho, J. C. M. and Mayfield, S. P. 2018. Comparison of secretory signal peptides for heterologous protein expression in microalgae: Expanding the secretion portfolio for *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One.* 13(2), e0192433.

21. Saxton, R. A., Glassman, C. R. and Garcia, K. C. 2023. Emerging principles of cytokine pharmacology and therapeutics. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 22, 21-37.
22. Deckers, J., Anbergen, T., Hokke, A. M., de Dreu, A., Schrijver, D. P., de Bruin, K., Toner, Y. C., Beldman, T. J., Spangler, J. B., de Greef, T. F. A., Grisoni, F., van der Meel, R., Joosten, L. A. B., Merckx, M., Netea, M. G. and Mulder, W. J. M. 2023. Engineering cytokine therapeutics. *Nat. Rev. Bioeng.* 1(4), 286-303.
23. Lennartsson, J. and Ronnstrand, L. 2012. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiol. Rev.* 92(4), 1619-1649.
24. Cardoso, H. J., Figueira, M. I. and Socorro, S. 2017. The stem cell factor (SCF)/c-KIT signalling in testis and prostate cancer. *J. Cell Commun. Signal.* 11(4), 297-307.
25. Lee, E., de Paula, M. N., Baek, S., Ta, H. K. K., Nguyen, M. T., Jeong, T. H., Kim, C. J., Jang, Y. J. and Choe, H. 2021. Novel Bacterial Production of Two Different Bioactive Forms of Human Stem-Cell Factor. *Int. J. Mol. Sci.* 22(12), 6361.
26. Wu, L., Estrada, O., Zaborina, O., Bains, M., Shen, L., Kohler, J. E., Patel, N., Musch, M. W., Chang, E. B., Fu, Y. X., Jacobs, M. A., Nishimura M. I., Hancock, R. E., Turner, J. R. and Alverdy, J. C. 2005. Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science.* 309(5735), 774-777.
27. Mendoza, J. L., Escalante, N. K., Jude, K. M., Sotolongo Bellon, J., Su, L., Horton, T. M., Tsutsumi, N., Berardinelli, S. J., Haltiwanger, R. S., Piehler, J., Engleman, E. G. and Garcia K. C. 2019. Structure of the IFN $\gamma$  receptor complex guides design of biased agonists. *Nature.* 567(7746), 56-60.
28. Castro, L. S., Lobo, G. S., Pereira, P., Freire, M. G., Neves, M. C. and Pedro, A. Q. 2021. Interferon-Based Biopharmaceuticals: Overview on the Production, Purification, and Formulation. *Vaccines (Basel).* 9(4), 328.
29. Ortiz-Matamoros, M. F., Villanueva M, A. and Islas-Flores, T. 2018. Genetic transformation of cell-walled plant and algae cells: delivering DNA through the cell wall. *Brief. Funct. Genomics.* 17(1), 26-33.
30. Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. and Cohen-Bazire, G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bac. Rev.* 35, 171-205.
31. Fujiwara, S., Fukuzawa, H., Tachiki, A. and Miyachi, S. 1990. Structure and differential expression of two genes encoding carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87(24), 9779-9783.
32. Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A. and Messens, E., van Montagu, M., and Schell, J. 1978. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 163, 181-187.
33. Cha, T. S., Yee, W. and Aziz, A. 2012. Assessment of factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28(4), 1771-1779.
34. Koyama, T., Nakamoto, M., Morishima, K., Yamashita, R., Yamashita, T., Sasaki, K., Kuruma, Y., Mizuno, N., Suzuki, M., Okada, Y., Ieda, R., Uchino, T., Tasumi, S., Hosoya, S., Uno, S., Koyama, J., Toyoda, A., Kikuchi, K. and Sakamoto, T. 2019. A SNP in a Steroidogenic Enzyme Is Associated with Phenotypic Sex in *Seriola* Fishes. *Curr. Biol.* 29(11), 1901-1909.
35. Ye, L., Zhao, F., Yang, Q., Zhang, J., Li, Q., Wang, C., Guo, Z., Yang, Y. and Zhu, Z. 2018. OK/basigin expression on red blood cells varies between blood donors and correlates with binding of recombinant *Plasmodium falciparum* reticulocyte-binding protein homolog 5. *Transfusion.* 58(8), 2046-2053.
36. Amack, S. C. and Antunes, M. S. 2020. CaMV35S promoter-a plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology. *Curr. Opin. Plant Biol.* 24, 100179.
37. Ruiz-Ruiz, F., Torres-Acosta, M. A., Garcia-Echauri, S. A., Aguilar-Yanez, J. M., Rito-Palomares, M., and Ruiz-Ruiz, F. 2018. Genetic Manipulation of Microalgae for the Production of Bioproducts. *Front. Biosci.* 10, 254-275.

38. Montero-Lobato, Z., Vazquez, M., Navarro, F., Fuentes, J.L., Bermejo, E., Garbayo, I., and Vilchez, C. and Cuaresma, M. 2018. Chemically-Induced Production of Anti-Inflammatory Molecules in Microalgae. *Mar. Drugs*. 16(12), 478.
39. Bai, L. L., Yin, W. B., Chen, Y. H., Niu, L. L., Sun, Y. R., Zhao, S. M., Yang, F. Q., Wang, R. R., Wu, Q., Zhang, X. Q. and Hu, Z. M. 2013. A new strategy to produce a defensin: stable production of mutated NP-1 in nitrate reductase-deficient *Chlorella ellipsoidea*. *PLoS One*. 8(1), e54966.