

GOVP 12009284

615.372  
L 293 등  
v. 3

제 3 차년도  
최종보고서

# 형질전환식물을 이용한 vaccine 개발

## Development of vaccine by using transgenic plant

연 구 기 관  
한국생명공학연구조합

농 립 부



## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "형질전환 식물을 이용한 vaccine의 개발에 관한 연구" 과제의  
최종보고서로 제출합니다.

1999. 10. .

주관연구기관명 :

한국생명공학연구조합

총괄연구책임자 : 김 종 수

연구 원 : 박 송 용

연구 원 : 장 양 석

연구 원 : 황 회 구

연구 원 : 윤 순 찬

연구 원 : 이 정 식

연구 원 : 김 진 만

연구 원 : 유 태 현

연구 원 : 정 순 관

연구 원 : 이 종 민

연구 원 : 이 상 교

연구 원 : 권 기 성

협동연구기관명 : 농업과학기술원

협동연구책임자 : 김 용 환

# 요 약 문

## I. 제 목

형질전환 식물을 이용한 vaccine 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

지금 시판되고 있는 백신은 효능, 용이성, 제조 및 분배의 측면에서 많은 단점을 지니고 있다고 할 수 있다. 이것들은 일반적으로 주사에 의해 전달되며, 생산비가 비싸고 냉장을 필요로 한다.

또한 이 백신들이 전신 면역 반응은 유도하지만, 점막세포 표면에서의 면역반응은 일으키지 않는다. 그럼에도 입, 코, 내장, 눈, 폐, 요도관등의 점막표면은 대부분의 세균성, 바이러스성 병원체가 몸으로 들어오는 통로인 것이다.

본연구는 식물을 이용한 백신을 개발함으로써 현행의 백신의 문제점을 해결하는데 목적을 두고있다.

식물을 이용한 백신은 다음과 같은 장점을 갖는다.

- 1) 입이나 코를 통한 약물전달로 많은 병원체의 첫 방어막인 점막의 면역반응을 활성화시킨다.
- 2) 주사의 사용을 피하여 환자의 참여를 증대시키고, 오염된 주사기를 통한 감염의 위험을 줄일 수 있다.
- 3) 병원체 전부보다는 항원만을 사용하여 예방하고자 하는 질병의 발병위험을 줄일 수 있다.
- 4) 인간에 감염력이 있는 병원균들의 오염위험을 줄일 수 있다.
- 5) 냉장보관이 필요치 않아 보관기간이 증가되며
- 6) 비용절감 효과와 많은 양을 생산할 수 있다.

의약품 화합물을 생산하기 위해 식물체를 사용하는 것은 여러 해 전부터 인식되어 왔으며 유전공학과 단백질 공학의 발달로 식물 유래 백신의 개발이 가능하게 되었

다. 특히 식물 유래 백신은 점막 면역의 유도에 적합하다. 그 결과 식용식물의 생산물을 내장의 점막조직에 도달하게 하기 위해 구강을 통해 전달할 수 있었고, 식물체를 조작한 입자단백은 직접 코나 호흡기의 점막조직으로 전달할 수 있었다.

식물체 유래 백신은 두 가지 방법으로 개발되고 있다.

**식용 식물 백신 :** 이 기술은 감자와 같은 식용 식물체에 유전자조작으로 병원체로부터 유래된 항원을 발현시켜 vaccine을 얻는다. 식물체를 음식으로 섭취함으로써 항원이 자연적인 소화과정을 통해 내장의 점막 면역체제내에 존재하게 된다. 여행자용 설사백신에 대한 임상 1상의 결과는 내성독소를 지닌 대장균의 단백질(LT)을 포함한 감자를 익히지 않고 먹음으로 인간에게서 점막면역과 전신면역 반응을 유도하였다.

Tulane 대학 Clement 교수는 감자에서 cholera toxine B-subunit를 발현시키고 11명의 어른에게 감자를 섭취시켜 10명(91 %)에서 IgG가 형성되고 장내의 IgA 량은 6명(55%)에서 4배가 증가되었다.

**키메라 바이러스 입자(CVP) :** 식물 virus를 유전자 조작하여 surface protein에 병원성 항원 epitope를 결합시킨다. 이 기술은 다량의 peptide 복사물을 갖게 하므로 매우 면역력이 높으며, 점막을 통해 면역원성을 나타낼 수 있는 적당한 크기이다. 키메라 바이러스 입자는 식물체에서 생산되고 주사용이나 코로 전달되기 위해 정제된다.

이상의 두가지 방법으로 식물에서 항원이 발현되어 외국에서 동물 또는 사람이 형질전환 식물체를 섭취하여 항체가 형성되는 것이 증명되었다. 본 연구과제도 외국에서처럼 형질전환 식물체를 이용한 백신을 개발하기 위해 연구를 수행하였다.

본 연구 개발의 기술적 측면에서의 중요성은 두 가지로 나누어 생각할 수 있다. 첫째, 생명공학 및 의학 분야 전반에 걸쳐서 국내의 기술수준이 선진국에 비해 열세이고 자체 기술보다는 많은 부분이 외국 기술을 모방하는 단계라는 점이다. 그 실례로 식물에서 생산된 vaccine의 경우 국내에서는 아직 이러한 연구 결과를 발표한 것이 전무한 상태인 반면 미국에서는 1992년에 처음으로 Texas 대학의 Charles Antzen이 담배에서 재조합 hepatitis B surface antigen(rHBsAg)을 발현 (PNAS

1992 vol 89, 11745-11749)시킨 보고가 있고, 담배에서 발현된 vaccine이 기존의 효모에서 발현되어 시판되고 있는 재조합 vaccine처럼 항체를 형성시킴을 증명한 연구(PNAS 1995 vol 92,3358-3361)와 mucosal immunity를 유도시키는 antigen을 사용하여 사람뿐만 아니라 동물용 edible vaccine을 개발하려는 연구 등이 이루어져 왔다.

식물체에서 vaccine을 생산하려는 시도는 선진국에서도 새로운 기술로 간주되고 있으며, 연구 초기부터 그 효능성 때문에 이용 가능성이 주목되어 왔다. 최근 몇 년 동안의 연구 결과로 보아 이러한 기술이 생명과학 뿐만 아니라 농업 및 의학 분야까지도 널리 적용될 수 있는 광범위한 파급 효과가 있을 것으로 생각된다.

둘째, 연구 개발을 수행함에 따라 유전자 재조합, monoclonal antibody 생산 기술, 식물 세포 배양 기술, 식물의 형질전환 기술개발, 식물에서의 조직특이적 발현 system구축 기술, mucosal immunity를 유도시키는 방법 및 면역 측정방법 등의 기술 축적을 가져올 수 있다. 이들 기술을 통하여 식물 실험을 하는 과정에서 축적되는 생명 공학의 기반 기술을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라, 다양한 응용이 가능할 것으로 보인다. 따라서 우리나라에서도 식물에서 다양한 기능성 물질을 저렴하고 대량으로 생산할 수 있는 새로운 기술을 확보하고, 이 기술을 더욱 개선하여 국제 경쟁력을 확보해야 된다고 생각된다.

산업적 측면에서는 최근 들어 식물에서 의약품, 건강식품 등을 생산하기 위해 bioreactor를 이용하는 연구가 부각되고 있으며 생명 과학과 관련된 기업들이 증가되면서 그 규모 또한 점차 대형화되고 있는 추세이다. 특히 인간의 질병과 관련된 연구들이 실제 인류의 복지 및 의료와 연관되어 있기 때문에 식물에서 의약품 생산의 산업적 중요성은 더욱 증가될 전망이다. 현재 국내에서는 1000억원 이상의 vaccine이 혈액 유래, 또는 재조합 백신, 약독화 백신으로 생산되고 있으며, 많은 동물용 vaccine이 국내에서 생산되거나 수입되어 판매되고 있다. 지금까지의 vaccine 생산 방법은 동물 세포 배양 또는 yeast 나 bacteria 를 이용하여 재조합 vaccine을 생산하는 방법을 채택하고 있기 때문에 대형의 bioreactor를 사용하여야 하고 분리 정제에 어려움이 많으며 특히 동물세포 배양을 통해 생산된 vaccine은 항상 동물 유래 virus의 오염가능성이 문제가 되어 왔다.

반면 본 연구를 통해서 개발하고자 하는 oral vaccine(경구 백신)은 mucosal immunity를 유도하므로 항체 생성 효과가 높으며, 식물을 이용하므로 생산비용이 적게 들고 저장이 쉬우며 안전하다는 장점이 있다. 따라서 식물을 이용하여 vaccine을 대량 생산하여 상품화함으로써 커다란 효용 가치를 산출할 수 있기 때문

에 충분한 경제 효과를 가져올 수 있을 것이고 이로 인한 관련 분야의 산업도 발전시킬 수 있을 것이다.

또한 이러한 기술은 농업 및 의학 분야에 직접적으로 이용될 수 있을 뿐만 아니라 새로운 기술을 더욱 개선하고 개발한다면 충치 예방 vaccine의 개발, 식품의 질을 개선할 수 있는 건강 식품 등의 개발을 가져올 수 있고 또한 현재 주사로 투여되고 있는 많은 vaccine을 경구용으로 대체시킴으로써 투여의 간편성을 가져올 수 있기 때문에 식물을 이용한 생리 활성 물질 생산은 여러 분야로 광범위한 파급 효과를 가져올 수 있을 것으로 생각되어 진다.

따라서 이러한 기술을 국내에서도 개발함으로써 자체 기술을 축적하여 투여 시 부작용이 적은 경구용 백신을 저렴한 가격으로 생산하여 국민의 건강증진에 기여할 수 있는 방향으로 연구 개발이 추진되어야 할 것이다. 또한 이와 같은 vaccine이 국제 시장에서도 매우 경쟁력이 클 것으로 기대되며 기존에 주사용으로 개발된 vaccine을 경구 백신으로 개발 시, 적용종의 확대가 기대되며 다른 vaccine과 혼용시킨 multi vaccine 개발도 가능하리라 예측된다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 목적은 식물에서 경구용 vaccine을 생산하는데 목적이 있다. 특히 인간에게 치명적인 질병인 cholera 나 B 형 간염 vaccine을 경구용으로 투여하는 효율적인 먹는 vaccine을 개발하는 것이다. 먹는 vaccine은 장에서 흡수되는 과정에서 mucosal immunity를 일으켜서 항체 생성을 유도하는 방법으로 일반적으로 항체 생성 효율이 높은 것으로 알려져 있다.

- Cholera toxin B subunit 의 유전자와 B형 간염 표면 항원의 유전자를 *Vibrio cholerae* 및 B 형 간염 환자의 혈액에서 분리했고, cholera toxin B subunit는 미생물에서 발현시켜 분리정제 방법을 확립하였다.

- 식물체에서 발현된 antigen을 확인하기 위해 cholera toxin의 B subunit와 HBV의 표면 항원에 대한 monoclonal antibody를 생산하는 hybridoma cell-line을 각각 14개와 5개를 얻었고, 단일항체를 생산/정제하였으며, 또한 anti-CTB와 anti-HBsAg polyclonal antibody를 생산하였다.

- B 형 간염 백신을 경구 투여용으로 개발하기 위해 B 형 간염 virus의 표면 항원과 B subunit를 gene fusion 시키고 미생물에서 발현시키고, vaccine으로 mucosal immunity를 유도할 수 있는지를 동물실험을 통해 확인했다.

- 동물 실험을 통해 경구 vaccine 투여 시 항체가 생기는지를 확인할 수 있는 assay system을 구축 하였다.

형질 전환 식물을 이용해 vaccine 을 생산하기 위해 배추, 양배추, 버, 담배에서 항원을 발현시켰다.

- Vaccine을 생산하는 배추 및 양배추 품종을 개발하기 위하여, 쌍자엽에 유용한 식물발현 vector pHGCTB와 버등 단자엽 작물에서 효율적으로 형질전환되어 발현할 수 있는 pSB11의 vector를 제작하였다.

서울배추의 자엽을 성장조절제의 조성이 상이한 MS 및 B<sub>5</sub>배지에 배양한 결과, 식물체 재분화율은 동일한 성장조절제 조건에서는 MS배지가 B<sub>5</sub>배지보다 높게 나타났다으며, 그 중에서도 1 mg/L NAA와 5 mg/L kinetin 및 5 mg/L의 BA가 첨가된 MS배지에서 식물체 재분화율이 42%로 가장 높았다.

자엽조직으로 부터 재분화되는 식물체의 획득 빈도를 높이기 위하여 1 mg/L의 NAA와 여러가지 농도의 BA(2, 4, 6, 8, 10 mg/L) 및 kinetin(2, 4, 6, 8, 10 mg/L) 이 첨가된 10종류의 재분화 배지에 과종 후 5일된 배추의 자엽을 배양한 바(그림 5, 6), kinetin을 함유한 배지에서보다는 BA가 첨가된 배지에서 재분화율이 높게 나타났다으며 BA의 농도가 4mg/L일 때 63%의 가장 높은 식물체 재분화율을 나타내었다.

엽병이 부착된 배추의 자엽으로부터 식물체가 재분화되는 양상을 조직학적으로 관찰하여 본 결과, 엽병의 절단면에서 처음에는 아무런 반응도 일어나지 않았으나, 배양 3일후 부터는 잘린 조직주위에서 세포분열이 왕성하게 일어남을 관찰할 수 있었고, 배양 7일 후에는 심장형의 shoot primordia를 형성하였으며, 배양 20여일 후에는 정상적인 재분화 개체가 출현하였다.

형질전환한 배추에 원하는 유전자가 정확히 삽입되었는지를 알아보기 위해서 hgromycin 유전자를 기준으로 21mer크기의 2개의 primer를 제작하였다. primer 1은 5'-AgC CTg ACC TAT TgC ATC TCC-3'이고 primer 2는 5'-TgT CCg TCA ggA CAT TgT Tgg-3'이었다. 이를 토대로 PCR을 수행한 결과 형질전환 배추에 hgromycin 유전자와 cholera toxin B subunit 유전자가 형질전환 되었음을 확인하였다.

그리고 이들 얻어진 형질전환 배추로부터 자식종자를 얻어 이들 개체의 후대유전 양상을 조사하기 위하여 형질전환 종자와 control종자를 hygromycin이 들어간 종자

과중배지에서 발아실험을 수행한 결과, 형질전환배추의 종자들은 함생제 배지에서 대부분이 발아를 하는데 비하여 형질전환 되지 않은 종자들은 발아하지 못하는 경향을 나타내었다.

따라서 본 실험을 통하여 배추의 효율적인 조직배양 및 유전자전환 체계를 확립할 수 있었으며 vaccine유전자가 전환된 배추를 획득하였다.

- 양배추에서 vaccine을 발현하기 위해 양배추 배축조직을 *Agrobacterium*으로 접종 후 하이그로마이신이 있는 배지에 치상 후 1주일마다 배지를 교환하면서 배양하였다. 4-6주 정도 후에 배축조직으로부터 shoot와 함께 캘러스가 형성되었다. 주로 shoot보다는 캘러스 형성률이 높았다. 형성된 캘러스는 2차 재분화배지에서 shoot로 재분화 되었다. 재분화된 shoot는 성장조절제가 없는 MS배지에서 뿌리를 유기시킨 후 순화시켜 토양으로 이식하여 온실에서 재배하였다. 형질전환체 양배추 줄기의 지름이 약 1cm 정도 될 때까지 키운 후 4℃에서 약 90일정도 저온처리 한 후 온실에서 재배하였다. 약 2-3 주정도 후에 추대가 시작되어 T<sub>1</sub> 종자를 얻기위해서 내수분을 하였다. 배축조직으로부터 형질전환된 캘러스 형성률은 30-50%로 높았으나 온실에서 재배된 완전한 형질전환체가 되는 실제적인 형질전환율은 3-6% 이었다. 이렇게 해서 총 54개체의 완전한 형질전환체를 얻을 수 있었다. 형질전환체 분석은 총 54 개체에 대해서 CTB 유전자가 완전히 genome상으로 도입되었는지를 Southern 분석을 하여 확인하였다. 전달된 T-DNA 상에 제한 효소 HindIII site는 하나이므로 이 효소로 DNA를 절단하여 CTB 유전자로 hybridization하여 나온 밴드수로서 도입된 유전자의 수를 알 수 있었다. 그 결과, 형질전환시키지 않은 control 양배추에서는 밴드가 나타나지 않았고 형질전환 개체들에서는 CTB 유전자가 1-5 copy로 다양하게 genome상에 삽입되었다는 것을 확인하였다.

T<sub>1</sub> 세대종자 확보는 CTB 유전자 도입이 확인된 총54 개체 중에서 35개체에서 종자를 얻을 수 있었다. 종자 수확량은 개체에 따라 적게는 1립부터 100립이상 정도로 변이가 심하게 나타났다. 이들 개체들에 대한 하이그로마이신 저항성의 후대 분석 결과 멘델법칙에 따른 3:1의 분리비를 나타낸 개체는 10개체였고 나머지는 비정상적인 분리비를 나타내었다. T<sub>1</sub> 식물체를 CTB 유전자 primer로 PCR 분석을 하여 본 결과 백신 유전자의 0.3kb 위치에서 DNA 밴드가 형성되었다. 이것으로 양배추에는 백신 유전자가 후대로 안정적으로 유전된다는 것이 확인되었다.

- 벼에서 C6-1, C6-3는 도입되지 않았고 C1, C2-1, C2-2, C3, C5, C9, C11, C12, C14 line에서 1개, 2, C8 line에서 2개, C4, C7 line에서 3개, C13 line에서 4개의 CTB 유전자가 되었음을 확인할 수 있었다. 13개의 line에서 도입 유전자를 확인하

였고 바로 백신유전자를 도입한 결과 15개의 line중에서 2개의 line만 도입된 유전자수가 다양함을 확인할 수 있었다. 또한 2-1과 2-2, 6-1과 6-2는 각각 동일 callus에서 재분화된 식물체로서 같은 pattern을 나타내는 것으로 보아 동일 callus에서 재분화한 여러 개의 식물체는 모두 같은 형태로 형질전환 되었음을 알 수 있었다. 35 line에서 종자가 맺혔고 28%의 발임이 있었음을 확인하였다. T<sub>1</sub>종자는 20립부터 100립까지 다양하였다.

식물 발현 system 을 개발하여 항원 (cholera toxin B) 유전자가 식물체 내에서 효율적으로 발현되도록 하기 위하여 식물의 nuclear transformation, plastid transformation, chloroplast로의 단백질 targeting 및 식물 바이러스를 이용한 항원의 epitope sequence의 transient expression을 시도하였다.

- 식물의 nuclear transformation을 위하여 border sequence로 *Agrobacterium*의 left border와 right border를 사용하였으며, promoter는 CaMV35S promoter를 사용하였다. 식물 발현 벡터에 cholera toxin B (CTB) 유전자를 삽입하여 재조합 DNA를 대장균에서 구성한 후 *Agrobacterium*-mediated transformation 법에 의해 담배식물을 형질전환하였으며 형질전환 후 항생제를 포함한 선택배지에서 식물체의 재생을 유도하였다. 재생된 식물체에 대하여 유전자 분석을 실시하여 *ctb* 유전자의 도입 및 발현을 확인하였다. *ctb* 유전자의 도입 및 발현이 확인된 식물체로부터 단백질을 분리하여 immunoblotting을 실시하였으나 발현율이 낮아서 CTB의 항체와 특이적 결합을 하는 단백질 단편을 확인하기 어려웠다. 한편 유전자의 도입위치에 따른 발현정도의 차이 (position effect)를 극복하기 위하여 발현율이 높은 식물체의 genome 부위로 외부 유전자 도입을 유도하는 MAR sequence를 사용하여 보았으나 이 경우에도 *ctb* 유전자의 도입 및 발현은 확인이 되었지만 immunoblotting을 실시하였을 때 발현율이 낮아서 CTB의 항체와 특이적 결합을 하는 단백질 단편을 확인하기 어려웠다.

- Plastid transformation을 위하여 뉴저지대의 Maliger group이 발표한 pLAA24A 벡터 시스템을 사용하고자 하였으나 Maliger group이 이 벡터의 분주는 하지않는다고 하여 대안으로 동 group에서 개발한 것이지만 효율이 비교적 떨어지는 pSBL derivative를 사용하였다. pSBL 벡터 시스템은 border sequence로 *trnI*와 *trnA*를 사용하며, promoter는 Prm promoter를 사용하며, *aadA* gene에 의한

spectinomycin 내성을 부여하는데 외부 유전자는 *aadA* gene 바로 뒤에 promoter 없이 fusion 되도록하여 polycistronic 하게 발현되도록 고안된 것이다. pSBL 벡터의 *aadA* gene 뒤에 open reading frame을 맞추어 cholera toxin B(CTB) 유전자를 삽입한 재조합 DNA를 대장균에서 구성한 후 Particle bombardment 법에 의한 plastid transformation을 실시하였다. 형질전환 후 항생제를 포함한 선택배지에서 식물체의 재생을 시도하였으나 유전자 도입이 일어나지 않아 spectinomycin을 포함한 선택배지에서 살아남은 shoot를 구할 수 없었다.

Nuclear transformation시 CTB의 발현율이 낮으며, chloroplast gene targeting의 경우는 적절한 벡터의 확보가 어렵고 chloroplast의 형질전환이 기술적으로 어렵기 때문에 이에 대한 대안으로 CTB protein을 chloroplast로 이동 (targeting)시켜 식물체내에서 CTB의 발현율을 증대시키고자 하였다. 특정 단백질의 발현은 세포질 속에 존재하는 그 단백질의 양에 의해 조절될 수 있다. Chloroplast는 한 세포당 10000개 가량 존재하는데 세포질에서 생성된 단백질이 chloroplast 내로 이동하면 세포질내에 단백질의 축적을 감소시키므로 특정 단백질의 발현양 증가를 기대할 수 있다. Chloroplast로의 단백질 targeting을 위하여 *Agrobacterium*의 border sequence와 CaMV35S promoter를 사용하였으며, promoter 다음에 tobacco 및 rice의 transit peptide sequence와 각각 fusion된 *ctb* 유전자를 삽입하여 재조합 DNA를 대장균에서 구성하였다. *Agrobacterium*-mediated transformation 법에 의해 담배식물을 형질전환하였으며, 형질전환 후 항생제를 포함한 선택배지에서 식물체의 재생을 유도하였다. 그 결과 rice의 transit peptide sequence를 사용한 경우에는 1차례의 형질전환 시도에서 많은 수의 재생된 식물체를 얻었으나, tobacco의 transit peptide sequence를 사용한 경우에는 4차례의 형질전환 시도를 하였음에도 불구하고 선택배지에서 식물체의 재생이 유도되지 않았다. 이러한 결과는 담배식물에서 tobacco의 transit peptide가 매우 효율적으로 작동하여 CTB 단백질의 chloroplast membrane 이동과정 중에 소수성이 강한 CTB 단백질이 membrane에 embedding 되어 세포에 좋지 않은 영향을 주는 것으로 유추된다. 한편 담배식물에서 rice의 transit peptide는 효율적으로 작동하지 않을 가능성이 있는데 그렇다 하더라도 발현율이 높은 rice의 transit peptide의 도움을 받아 fusion된 상태로 존재하는 CTB 단백질의 발현율이 증가될 가능성이 있다. 현재 rice의 transit peptide sequence와 fusion된 *ctb* 유전자로 형질전환된 independent 담배식물 20주를 확보하고있으며, 이들에 대하여 genomic-PCR을 수행하여 rice의 transit peptide sequence와 fusion된 *ctb* 유전자의 도입을 확인하였다. 과제 종료 후에도 이에 대한 실험을 지속적으

로 진행하여 rice의 transit peptide sequence와 *ctb* 유전자가 도입된 담배식물에서 단백질을 추출하여 immunoblotting을 실시하여 CTB 단백질의 발현양을 조사하고자 한다. CTB 단백질의 발현율이 높을 경우에는 이를 상추식물에 도입하여 edible vaccine 생산 가능성을 계속 조사할 예정이다.

- 최근에 미생물과 바이러스의 epitope를 식물 바이러스의 표면에 발현시키는 방법이 소개되고 있다. 이러한 재조합 식물바이러스 역시 기존의 백신 생산의 단점을 극복할 안전성과 경제성을 지닌 경구용 백신으로서의 가능성을 지니고 있다. 식물 바이러스를 이용한 항원의 epitope sequence의 transient expression을 위하여 포유동물의 면역체계에 콜레라 epitope가 인지되어질 수 있도록 담배 모자이크 바이러스의 표피 단백질의 유전자를 재조합하였다. 담배 모자이크 바이러스 (TMV)의 외피 단백질의 surface loop에 epitope으로 작용할 수 있는 CTB sequence 부위를 4개 선정하여 epitope sequence의 transient expression을 시도하였다. TMV의 full-length cDNA의 coat protein의 surface loop region에 각각의 epitope sequence를 삽입하여 hybrid TMV cDNA를 구성한 후 run-off transcription 법으로 시험관 내에서 RNA polymerase에 의해 *in vitro* transcripts를 합성하여 이를 담배 식물에 접종하였다. 접종 7일 후 4개의 후보 epitope sequence 가운데 2개가 삽입된 변형된 hybrid TMV (pTMV6.4E와 pTMV6.4G)를 각각 접종하였을 때 식물체가 TMV 병증을 보이는 것이 확인되었다. TMV 병증을 보이는 식물체들로부터 단백질을 추출하여 immunoblotting을 실시하였으며, 그 결과 TMV 병증을 보이는 식물들의 총 단백질 중에서 CTB 항체와 특이적인 결합을 하는 단백질 단편을 확인할 수 있었다. 또한 CTB 항체와 특이적인 결합을 하는 단백질 단편은 SDS-PAGE 상에서 TMV coat protein 보다 약간 높은 위치에서 발견되는데 이러한 상대적 이동성의 차이는 재조합 표피 단백질에 삽입되어진 epitope의 길이와 정확히 맞아떨어지고 있으며, immunoblotting 분석법에서 pTMV6.4G의 재조합 표피 단백질이 pTMV6.4E와의 적은 길이 차에도 불구하고 더욱 강하게 탐지되었다.

#### IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

- 1). 본 연구에서 이루려 하는 먹는 vaccine으로 단일 vaccine으로 뿐만 아니라 multivaccine으로 사용될 수 있을 것이다.
- 2). 먹는 vaccine의 효율성이 입증되면 지금까지의 그 유용성 때문에 기존에 사용되

고 있는 불활성 및 subunit vaccine을 대치할 수 있을 것이다.

3). Chimeric antigen의 개발로 신약이 개발되면 투여량의 소량화 와 부작용을 격감시킬 수도 있다.

4). 본 연구과제 수행 중 얻어지는 기초 기술의 축적과 유전자 대량 발현 체계가 미생물과 식물에서 얻어지고 산업화가 이루어질 수 있다. 손쉬운 assay system의 확립과 기작의 연구를 통해 새로운 vaccine의 screening이 가능하며 또 다른 신약을 개발할 수 있다.

5) 식물에서 vaccine뿐만 아니라 식물을 bioreactor로 이용하여 다양한 의약품 생산도 가능하다.

## SUMMARY

The purpose of this research is to produce edible vaccine from plants. Especially this research is intended to develop a effective edible vaccine for cholera and hepatitis B. It is well known that edible vaccines are suitable for simulation of mucosal immunity and induce more antibody production.

The objects of this research are as follow.

First, we intended to clone the genes for cholera toxin B subunit and hepatitis B surface antigen from blood and express and purify cholera toxin B subunit from microorganism.

Second, we intended to develop effective vector systems and gene transfer methods for the production of edible vaccine from plants

Third, we intended to make hybridoma cell lines to produce monoclonal antibodies for cholera toxin B subunit or hepatitis B surface antigen. These antibodies were used to detect the antigens produced from plants. And we intended to produce polyclonal antibodies for cholera toxin B subunit or hepatitis B surface antigen.

Fourth, we intended to confirm the mucosal immunity of a edible vaccine using animal model. The vaccine was produced in the fusion protein form. The gene for hepatitis B surface antigen was fused gene for cholera toxin B subunit and produced from microorganism. It was demonstrated in other reports that hepatitis B surface antigen or subunit of this surface antigen in the fusion protein form could induce mucosal immunity. And another advantage of fusion antigen (or fusion protein) was to minimize the phenomenon that fusion antigen was digested in the gut by protease. To improve this effect, peptide sequence modification was done in this research.

Fifth, we intended to choose the most suitable plant and develop drug delivery systems suitable for this edible vaccine.

As a model system, transgenic plants for cholera vaccine production was generated in this study. Three strategies for production of cholera toxin in plants were devised : Genetic transformation of the nuclear genome of plants using pBDCTB ; Genetic transformation of the plastid genome of plants using pSBLCTB ; and transient expression of engineered tobacco mosaic virus (TMV) with epitope sequence of CTB.

pBDCTB is designed to produce CTB constitutively under the control of 35S CaMV dual promoter in transgenic plants. Transfer of *ctb* gene and the presence of mRNA for *ctb* gene were respectively identified by nucleic acid analysis in F1 progenies from 3 transgenic lines. However, CTB proteins were not detected by immunoblot analysis. It was likely that the expression level of *ctb* gene was very low in cytoplasm of transgenic plant cells.

Because oral immunization requires larger amount of antigens by comparison with parenteral immunization, plastid transformation using pSBLCTB was tried to improve CTB expression level. Plastid transformation event in this study based on incorporation of the *aadA* and *ctb* gene into the plastid genome by two homologous recombination via the flanking plastid genes, *Prrn*, *psbA*. Unfortunately transplastomic plants were not gained in this study.

The surface of TMV coat protein for presentation of a cholera toxin epitope to the mammalian immune system was engineered. Due to the size limitation of inserted peptides for proper assembly of TMV coat protein, 4 shortened series of a CTB epitope was selected. And synthetic oligonucleotides corresponding selected peptides were inserted into the surface loop region of the TMV coat protein gene by overlapping polymerase chain reaction, respectively. Recombinant TMVs are all transcribed *in vitro*. The infectivity of these transcripts was assayed on a TMV local legion host, *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. After 7 days, typical mosaic symptoms on the leaves of Xanthi nc inoculated with pTMV6.4E and pTMV6.4G were appeared, respectively. The recombinant coat proteins of pTMV6.4E and pTMV6.4G migrated slower than that of TMV-K in SDS-polyacrylamide electrophoresis and were specifically detected with anti cholera toxin IgG by immunoblot analysis. The differences

of apparent mobility are consistent with the presence of the inserted epitope in the recombinant coat proteins. In addition, the differences of band intensity in western blot analysis are consistent with the length of the selected epitopes. These recombinant TMVs have the possibility to meet the need for cost-effective and commercial scalable production of cholera subunit vaccines.

Tissue culture system and transformation system of cabbage were established. Using these technologies, cabbage was transformed with the gene for the vaccine. It was demonstrated that the gene was stably inserted into the chromosom of cabbage.

Total 54 transformants that had the gene were identified. It was demonstrated using southern blot that each transformants had from one to five copies of the gene in the chromosom. But It was observed using northern blot that the expression level of the gene in each transformants were different. Usually the transformants that have more gene copies in the chromosom produced more protein. However, it could be observed that the transformant that had only one copy gene produced the protein in the high level. T1 seeds for the transformants were obtained using autopolllination. T1 seeds had from one leaf to 100 leaves variouly. Until now, seeds for 35 transformants among 54 transformants could be obtained. Among transformants, Mendel's law could be applied to some ones, but not others. Using PCR analysis of T1 cabbage, it could be concluded that the gene was inserted into the chromosom and the inserted gene was stably inherited to the next generations.

When rice plant was tranformed with the gene, only 2 lines among 15 lines did not have the gene in the chromosom. It was observed that C1, C2-1, C2-2, C3, C5, C9, C11, C12 and C14 lines had one coly gene in the chromosom, C6-1, C6-2and C8 lines had two copies, C4 and C7 lines had three copies and C13 line had 4 copies.The inserted gene in the 13 lines chromosom was detected and the gene copy number was various.

Line pairs of C2-1 and C2-2, or C6-1 and C6-2 were redivided from single callus and showed the same pattern. Therefore it could be thought that many plants redivided from single callus were transformed into same pattern. Seed came into bearing in 35 lines and 28% were sterile. T1 seeds had from 20 leaves to 100 leaves variously.

## SUMMARY

### (영문요약문)

#### Contents

1. Title .....	19
2. Purpose .....	19
3. Content .....	21
3.1. Materials and methods .....	21
3.1.1. Gene cloning, development of expression vector and expression .....	21
3.1.2. Protein purification .....	26
3.1.3. Production of monoclonal antibodies and polyclonal antibodies .....	27
3.1.4. Confirmation of antibody production by oral delivery .....	30
3.2. Results .....	32
3.2.1. Cloning of gene for antigens and development of expression vector .....	32
3.2.2. Expression and purification of antigen .....	36
3.2.3. Expression of cholera toxin B subunit and cholera toxin B subunit-hepatitis B surface antigen fusion protein in <i>Pichia pastoris</i> .....	44
3.2.4. Production of monoclonal antibodies .....	47

3.2.5. Production of polyclonal antibodies .....	53
3.2.6. Oral immunization .....	53
4. Discussion .....	61
5. References .....	62
6. Contract Project I .....	64
7. Contract Project II .....	110

## 목 차

제 1장. 연구제목 .....	19
제 2장. 연구개발의 목적 과 범위 .....	19
제 3 장. 연구내용 .....	21
제 1 절    재료 및 방법 .....	21
1. 유전자 cloning, 발현 벡터 제조 및 발현 .....	21
2. 단백질의 분리 및 정제 .....	26
3. Monoclonal antibody와 polyclonal antibody 제조 .....	27
4. 경구 투여에 의한 항체형성 효과 .....	30
제 2 절    결과 .....	32
1. 항원 유전자 확보 및 발현 vector 제조 .....	32
2. 항원 발현 및 정제법 확립 .....	36
3. <i>Pichia pastoris</i> 에서의 CTB, CTB-HBsAg cloning 및 발현 .....	44
4. 단일 항체 생산 .....	47
5. Polyclonal antibody 생산 .....	53
6. 항원을 경구 투여하여 항체생성효과 .....	53
제 4 장    결    론 .....	61
제 5 장    참고문헌 .....	62
제 6 장    공동과제 .....	64
제 7 장    위탁과제 .....	110

## 제 1 장 연구제목

형질전환식물을 이용한 vaccine개발

## 제 2 장 연구개발의 목적과 범위

본 연구의 목적은 식물에서 경구용 vaccine을 개발하고 이를 이용하여 현대 사회에서 문제가 되고 있는 여러 질병들을 예방하고자 한다. 특히 인간에게 치명적인 질병인 cholera 나 B 형 간염 vaccine을 경구용으로 투여하는 효율적인 먹는 vaccine을 개발하는 것이다. 먹는 vaccine은 장에서 흡수되는 과정에서 mucosal immunity를 일으켜서 항체 생성을 유도하는 방법으로 일반적으로 항체 생성 효율이 높은 것으로 알려져 있다.

지금 시판되고 있는 백신은 효능, 용이성, 제조 및 분배의 측면에서 많은 단점을 지니고 있다고 할 수 있다. 이것들은 일반적으로 주사에 의해 전달되며, 생산비가 비싸고 냉장을 필요로 한다.

또한 이 백신들이 전신 면역 반응은 유도하지만, 점막세포 표면에서의 면역반응은 일으키지 않는다. 그럼에도 입, 코, 내장, 눈, 폐, 요도관등의 점막표면은 대부분의 세균성, 바이러스성 병원체가 몸으로 들어오는 통로인 것이다.

본연구는 식물을 이용한 백신을 개발함으로써 현행의 백신의 문제점을 해결하는데 목적을 두고있다.

Tulane 대학 Clement 교수는 감자에서 cholera toxine B-subunit를 발현시키고 11명의 어른에 감자를 섭취하여 10명(91 %)에서 IgG가 형성되고 장내의 IgA 량은 6명(55%)에서 4배가 증가되었다.

본 연구과제도 외국에서처럼 형질전환 식물체를 만들어 백신을 개발하기 위해 미생물에서 항원 유전자를 확보하고, 항원생산을 하여 미리 동물 시험을 하여 백신 효과를 미리 assay하기 위하여 항원을 미생물에서 생산하고, 정제하였으며, 발현을 확인 할 수 있는 항체 생산이나, 쥐에서 vaccine을 경구투여하여 mucosal

immunity를 유도하여 항체 형성 조건을 시험하였다.

본 연구에서 달성하는 세부 목표는 다음과 같다.

첫째, Cholera toxin B subunit 의 유전자와 B형 간염 표면 항원의 유전자를 *Vibrio cholerae* 및 B 형 간염 환자의 혈액에서 분리하고, cholera toxin B subunit 는 미생물에서 발현시켜 분리하였다.

둘째, Cholera toxin B subunit 뿐만 아니라 B 형 간염 백신을 경구 투여용으로 개발하기 위해 B 형 간염 virus의 표면 항원, 또는 HBsAg의 epitope와 B subunit 을 gene fusion 시키고 미생물에서 발현시킨 다음 단백질을 정제한다..

셋째, 식물체에서 발현된 antigen을 확인하기 위해 cholera toxin의 B subunit와 HBV 의 표면 항원에 대한 monoclonal antibody를 생산하는 hybridoma cellline를 생산하고 항체를 정제하여 하고, anti-CTB와 anti-HBsAg polyclonal antibody를 생산한다.

넷째, 미생물에서 발현된 항원을 이용하여, vaccine으로 mucosal immunity를 유도할 수 있는지를 동물실험을 통해 확인한다.

다섯째, 동물 실험을 통해 경구 vaccine 투여시 항체가 생기는지를 확인할 수 있는 assay system을 개발한다.

여섯째, 먹는 vaccine을 개발하기 위해 최적의 식물체를 선별하고, delivery system 을 개발한다.

## 제 3 장 연구내용

### 제 1절 재료 및 방법

#### 1. 유전자 cloning, 발현백터 제조 및 발현

##### 가. Polymerase Chain Reaction (PCR)과 PCR 산물의 전기영동 및 DNA 분리 정제

반응물 20 $\mu$ l에 6.7 $\mu$ l의 10 $\times$  PCR buffer(Perkin Elmer), 25 $\mu$ l씩의 sense primer와 antisense primer, 0.5 $\mu$ l의 Taq DNA polymerase(5U/ $\mu$ l), 18.8 $\mu$ l의 멸균된 증류수, 각 1 $\mu$ l씩의 10mM dNTP를 넣고 섞어 총 100 $\mu$ l의 반응부피가 되도록 하였다. PCR은 총 30 cycle을 수행하였는데, 초기 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 denaturing을 수행하고, 42 $^{\circ}$ C에서 30초간 annealing을 시킨 후, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초간 extension을 시켰다.

100 $\mu$ l의 PCR 산물에 phenol 100 $\mu$ l와 chloroform-isoamylalcohol(24:1, V/V) 100 $\mu$ l를 넣고 3분간 강하게 vortex mixer로 섞고 잠시 원침하여 층을 분리하였다. 상층액을 새 튜브로 옮기고 취한 상층액의 1/10부피의 3M sodium acetate(pH 5.2)와 2배 부피의 찬 에탄올을 가한 뒤, 4 $^{\circ}$ C에 20분 이상 방치하여 DNA를 침전시켰다. 이를 10,000 $\times$ g에서 20분간 원침한 뒤 침전된 DNA를 찬 70% 에탄올로 세척후 공기 중에서 건조시켰다. 침전을 10 $\mu$ l의 TE(10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0)에 녹인 후 1%의 agarose 겔에서 전기영동하였다. 장파장의 자외선을 비추어 DNA를 확인하고 band를 절단하고 DNA를 추출하고 이중 1 $\mu$ l를 전기영동하여 그 농도를 결정하고 나머지를 insert로 사용하였다.

##### 나. DNA의 클로닝 및 DNA염기서열 분석

증폭된 PCR 산물을 pBluescript KSII 백터에 각각 클로닝 한 후, DNA 염기서열을 분석하였다. DNA 염기서열 분석은 Sanger등이 고안한 dideoxy analogue(dNTP)방법을 이용한 USB사의 SEQ-UENASE<sup>TM</sup> VERSION 2.0 DNA sequencing kit를 사용하여 시행하였다. 1 pmol의 플라스미드 DNA에 0.2N NaOH, 0.2mM EDTA를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 방치하여 이중가닥 DNA를 단일 가닥으로

변성시킨 후, 1/10부피의 3M sodium acetate (pH 5.2)와 2배 부피의 찬 에탄올을 가하여 변성된 DNA를 4℃에서 10분간 침전시켰다. 15,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 얻은 DNA 침전을 70% 에탄올로 세척하고 건조시킨 후 TE 7 $\mu$ l에 녹인 후 2 $\mu$ l의 5x Sequenase완충액과 1 $\mu$ l의 sequencing primer(1pmol)를 가하였다. 65℃에서 2분간 방치한 후 30분에 걸쳐 서서히 상온에 이르도록 하여 anealing을 시켰다. 여기에 1 $\mu$ l의 0.1M DTT, 2 $\mu$ l의 labelling Mix(dGTP, dCTP, dTTP 각 1.5 $\mu$ M), 0.5 $\mu$ l의 <sup>35</sup>S-dATP, 2 $\mu$ l의 Sequenase(3-4unit)를 가하고 상온에서 5분간 반응시켰다. 이 중 3.5 $\mu$ l씩을 각각. 4종류의 termination mix 2.5 $\mu$ l에 가하고 37℃에서 5분간 반응시킨 후 4 $\mu$ l의 stop solution(95% formamide, 20mM EDTA, 0.05% BPB, 0.05% Xylene Cyanol FF)을 가하여 반응을 정지시켰다. 이를 95℃에서 2분이상 끓여 변성시킨 후, 8M Urea가 포함된 6% polyacrylamide sequencing gel의 각 lane에 3 $\mu$ l씩 걸고 65W로 2시간정도 전기영동하였다. gel을 3MM filter paper로 옮겨 진공 젤 건조기 (vacuume gel dryer)에 놓고 80℃에서 1시간이상 말린 후 15시간 이상 film에 노출시켰다. 현상 후 각 염기서열을 판독하였다.

#### 다. 벡터와의 ligation

앞서 기술한 바와 같이 준비한 insert와 vector의 몰비(molar ratio)가 약 3:1이 되도록 혼합하고, 1 $\mu$ l의 5x ligase buffer와 1 $\mu$ l의 T4 DNA ligase를 가하여 총 5 $\mu$ l가 되도록 한 후, 14℃ 수조에 12시간 이상 방치하였다

#### 라. 제한 효소의 처리

실험에 사용한 모든 제한 효소와 완충액은 New England Biolab.사의 것을 사용하였다. 추출된 플라스미드 DNA 1~2 $\mu$ g를 각 제한 효소에 적합한 완충액과 제한 효소와 섞어 37℃에서 12시간 이상 절단하였다. 효소 반응이 끝나면 0.8% agarose 겔에 전기영동하여 절단 양상을 확인하고 원하는 크기의 밴드를 추출하여 사용하였다.

#### 마. Competent cell의 준비

Competent cell는 Inoue등(1990)의 방법으로 준비하였다. -70℃에 보관해 두었던

*E. coli* DH5 $\alpha$ 의 glycerol stock을 루프(loop)로 따내어 LB(1% bacto-trypton, 0.5% bacto-yeast extract, 10mM NaCl)-agar 평판에 streak하고 37°C 배양기에서 12시간 이상 배양하였다. 10-12개의 큰 집락(2-3mm)을 취하여 250ml의 SOB배지 (2% bacto-trypton, 0.5% bacto-yeast extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>)에 옮기고 600nm에서의 흡광도가 0.6이 될 때까지 18°C에서 진탕 배양하였다. 얼음 속에서 미리 식혀둔 50ml 원심분리관 5개로 옮겨 얼음 속에서 10분간 방치하였다. 2500rpm에서 15분간 원심 분리한 후, 침전을 20ml의 TB용액(transformation buffer, 10mM PIPES,pH6.7, 55mM MnCl<sub>2</sub>, 15mM CaCl<sub>2</sub>, 250mM KCl)에 조심스럽게 부유시켰다. 10분간 얼음에 방치하고, 2000rpm에서 10분간 원심 분리한 후, 침전을 다시 4ml의 TB용액에 조심스럽게 부유하였다. 여기에 280 $\mu$ l의 DMSO를 가한 후, 얼음속에 10분간 방치하였다. 이를 200 $\mu$ l씩 미리 차게 해두었던 튜브에 분주하고 액체질소속에서 급속냉각시킨 후, -70°C에 보관하였다.

#### 바. *E. coli*의 형질전환

열전도가 잘되는 14ml polypropylene 튜브를 미리 차게 준비해 두고, 앞서 기술한 대로 준비한 적격세포 200 $\mu$ l를 상온에서 녹인 후 준비해 둔 튜브로 옮겼다. Competent세포에 ligation산물 2 $\mu$ l를 혼합하여 30분간 얼음 속에 방치한 후, 42°C에서 30초간 열 충격을 가해주었다. 즉시 얼음으로 옮겨 3분간 식힌 후, 800 $\mu$ l의 SOC배지 (SOB with 20mM glucose)를 가하고 37°C에서 1시간동안 진탕 배양하였다. 이를 5000rpm에서 5분간 원침시킨 후 100-200 $\mu$ l의 SOC에 재 부유하여 40 $\mu$ g/ml의 X-gal, 0.2mM의 IPTG, 그리고 100 $\mu$ g/ml의 ampicillin이 포함된 LB agar 평판에 균일하게 발랐다. 이후 37°C에서 밤새 배양하였다.

#### 사. 양성 집락의 검색

하얀 집락을 취하여 100 $\mu$ g/ml의 ampicillin이 함유된 LB배지 20 $\mu$ l에 접종하고 37°C 배양기에서 1시간동안 배양한 후 1 $\mu$ l씩 취하여 PCR로 검색하였다. 이때 사용한 primer는 CTB 또는 HBsAg 내부 서열에 존재하는 primer를 사용하였다.

#### 아. 플라스미드 DNA의 추출

플라스미드의 추출은 알칼리 용해법에 따라 수행하였다. 클로닝이 확인된 박테리아를 100 $\mu$ g/ml의 ampicillin이 함유된 LB배지 50ml에 접종하고 37 $^{\circ}$ C에서 14시간 진탕 배양하였다. 6000rpm에서 10분간 원심 분리하여 얻은 침전을 10ml의 STE용액(0.1M NaCl, 10mM Tris · Cl, 1mM EDTA, pH8.0)에 재 부유하여 세척한 후 다시 6,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 침전을 얻었다. 이를 5ml의 solution I(50mM glucose, 25mM Tris · Cl, 10mM EDTA, pH8.0)에 재 부유한 후 10ml의 solution II(0.2N NaOH, 1% SDS)를 가하여 실온에서 5분간 용해시켰다. 여기에 7.5ml의 solution III(3M potassium acetate, pH 4.8)를 가한 후 얼음에 10분간 방치하고, 6000rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 얻은 상층액에 15ml의 isopropanol을 가하여 DNA를 침전시켰다. 상온에서 10분간 방치한 후 6,000rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 DNA 침전을 찬 70% 에탄올로 세척하고 공기 중에서 건조시켰다. 침전을 500 $\mu$ l의 TE에 녹인 후 microtube로 옮겼다. 여기에 동일한 부피의 5M LiCl<sub>2</sub>를 가한 후 15,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 얻은 다음 동일한 부피의 isopropanol로 DNA를 침전시켰다. 침전을 70% 에탄올로 세척하고 건조시켜 20 $\mu$ g/ml의 RNase A가 함유된 TE 100 $\mu$ l에 녹인 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 여기에 동일한 부피의 13% PEG, 1.6M NaCl을 가하고 얼음 속에서 1시간 이상 방치한 후 15,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 침전을 400 $\mu$ l의 TE에 녹인 후 phenol로 한번, phenol:chloroform으로 한번, chloroform으로 한번씩 추출한 후 1/10 부피의 3M sodium acetate (pH 5.2)와 2배 부피의 찬 에탄올을 가하여 실온에 10분간 방치하였다. 15,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 얻은 DNA 침전을 찬 70% 에탄올로 세척하고 건조시켜 TE 100 $\mu$ l에 녹인 후 260nm에서의 흡광도를 측정하여 DNA 농도를 정량하였다.

#### 자. 클론의 검색을 위한 소량 플라스미드 DNA의 추출

각 클론을 2ml의 LB-ampicillin 배지에 접종하고 37 $^{\circ}$ C에서 14시간 가량 진탕 배양하였다. 이로부터 plasmid DNA를 추출하였다(Modification of Molecular Cloning 2nd Ed., 1989). 먼저 1.5ml의 bacteria부유액을 microtube로 옮기고 12,000g에서 30초간 원심 분리하였다. 상층액을 버리고 남은 침전을 resuspension solution(50mM Tris · Cl, pH7.5, 10mM EDTA, 100 $\mu$ g/ml RNase A) 200 $\mu$ l에 재부유하고 200 $\mu$ l의 lysis solution(0.2N NaOH, 1% SDS)을 가하여 5분간 bacteria를 용해시켰다. 여기

에 200 $\mu$ l의 neutralization solution(3M potassium acetate, pH 4.8)을 가하고 얼음 속에서 5분간 방치한 후 12,000g에서 5분간 원심 분리하였다. 상층액을 새 tube로 옮겨 동일 부피의 phenol:chloroform(1:1, v/v)을 가해 잘 섞은 뒤 12,000g에서 2분간 원심 분리하였다. 수용액 층을 새 tube로 옮겨 2배 부피의 에탄올을 가한 후 실온에서 2분간 방치하였다. 12,000g에서 10분간 원심 분리한 후 상층액을 버리고 침전을 70% 에탄올로 세척하였다. 공기 중에서 10분간 말린 후 침전을 20 $\mu$ g/ml의 RNase A가 함유된 TE에 녹였다. 이 중에서 1 $\mu$ l를 취하여 제한 효소와 37 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 반응시킨 후, 6x 젤 부하 완충액(0.25% BPB, 15% Ficoll)을 가해 2 $\mu$ g/ml의 ethidium bromide가 함유된 1% agarose gel에서 전기영동하였다. 자외선을 비취보아 DNA band의 양상을 관찰하였다.

차. 효모(*Pichia pastoris*)에서의 발현

1) CTB, CTB-HBsAg, HBsAg-CTB의 효모 단백질 발현 벡터에의 클로닝

준비한 세 종류의 pBluescript KSII 벡터에 각각 클로닝된 CTB, CTB-HBsAg, HBsAg-CTB 유전자를 효모 단백질 발현벡터인 pPIC3 플라스미드에 클로닝 하였다. 클로닝을 마친 후, 각 제한 효소로 절단한 부위의 DNA 염기서열을 분석하여 reading frame을 확인하였다. 이렇게 해서 서로 다른 세 종류의 항원을 발현할 수 있는 발현벡터(expression vector)를 준비하였다.

2) 효모의 형질전환 및 발현

효모의 형질전환은 lithium acetate를 사용하는 방법을 변형하여 사용하였다. -70 $^{\circ}$ C에 보관해 두었던 *Pichia pastoris* Mut<sup>+</sup> strain에의 glycerol stock을 루프로 따내어 YPD(1% bacto-yeast extract, 2% bacto-peptone, 2% glucose)-agar 평판에 streak하고 30 $^{\circ}$ C 배양기에서 2일간 배양하였다. 직경이 2-3mm되는 큰 집락 1개를 루프로 취하여 30ml의 YPD배지에 접종하고 14~18시간동안 30 $^{\circ}$ C에서 진탕배양하였다. 이 중 일부를 취하여 300ml의 YPD배지에 넣어 600nm에서의 흡광도가 0.2가 되게 한 뒤 30 $^{\circ}$ C에서 2시간 가량 진탕배양하여 600nm에서의 흡광도가 0.5가 되게 하였다. 이를 실온에서 1,000 $\times$ g로 5분간 원심 분리한 뒤, 침전을 10ml의 멸균된 물에 재 부유하여 씻은 후 다시 1,000 $\times$ g로 5분간 원심 분리하여 세포를 침전시켰다. 침전된 효모를 1.5ml의 멸균된 TE/LiAc용액 (TE, pH7.5, 0.1M lithium acetate, pH7.5)에 재부유 시켰다. 이렇게 준비한 *Pichia pastoris* Mut<sup>+</sup> strain competent세

포 200 $\mu$ l에 2~5 $\mu$ g의 이입하고자 하는 DNA와 직전에 끊여 변성시킨 100 $\mu$ g의 carrier DNA(단일가닥 연어 DNA)를 잘 혼합시키고, 이에 1.2ml의 즉시 준비한 PEG/LiAc용액(40% PEG, TE/LiAc)을 넣고 잘 섞은 뒤 30 $^{\circ}$ C에서 30분간 진탕 배양하였다. 그 후 42 $^{\circ}$ C 수조에 15분간 방치하여 열 충격을 준 다음, 바로 얼음에 넣어 식혔다. 이를 약 5초간 원심 분리하여 상층액을 따라 버린 다음, 침전된 *Pichia pastoris* Mut<sup>+</sup> strain를 150 $\mu$ l의 TE에 재 부유시켰다. 이를 CM(complete minimal) drop out(6.7g yeast nitrogen base without amino acids, 20g glucose, 0.77g CSM-his per liter)-agar 평판에 끌고루 퍼 바른 뒤 30 $^{\circ}$ C에서 집락이 생길 때까지 3일 가량 배양하였다. 이 배지에서 집락을 형성하는 효모는 pPIC3이 이입된 효모이므로 그 집락을 취하여 단백질의 발현을 유도하였다. 단백질의 발현 여부를 확인하기 위하여 효모를 균질화하여 단백질을 추출하고, 이를 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide 겔에 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 겔에 Coomassie 염색과 면역블롯팅을 수행하여 단백질의 발현 여부를 확인하였다.

### 3) 효모의 균질화

효모는 세포벽이 매우 단단하므로 glass bead을 사용하여 균질화시켰다. 배양된 효모를 2,000 $\times$ g에서 5분간 원심 분리하여 침전시킨 뒤 물로 재 부유하여 세척하고 다시 침전시켰다. 효모 침전의 무게를 측정하여 부피로 환산한 뒤 이 packed cell volume을 기준으로 3배 부피의 균질화 완충액(50mM Tris·Cl, pH 7.5, 250mM sucrose, 0.2mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM EDTA, 10mM DTT, 1mM PMSF, 5mM benzamidine-HCl, 25 $\mu$ g/ml leupeptin, 25 $\mu$ g/ml aprotinin)을 가하여 재 부유 시켰다. 이에 4배 부피의 찬 glass bead를 가한 뒤, vortex mixer로 20초간 vortexing하고 얼음에 1분간 두어 식혔다가 다시 vortexing하였다. 이 과정을 15회 반복한 뒤 튜브의 하단에 24 게이지 주사기 바늘로 구멍을 뚫고 새 튜브에 연결하여 원심 분리함으로써 bead로부터 균질액을 분리해 내었다. 분리한 균질액을 20,000 $\times$ g로 10분간 원심 분리한 뒤 상층액을 새 튜브로 옮겨 이후의 실험에 사용하였다. 위의 전 과정동안 4 $^{\circ}$ C이하로 온도를 유지하여 수행하였다.

## 2. 단백질 분리 및 정제

### 가. 단백질 전기영동 및 면역 블롯팅

Sodium dodecyl sulfate(SDS) polyacrylamide 젤 전기영동은 5% stacking gel, 8% separating gel을 사용하여 수행하였다. Sample은 2% SDS를 함유한 5배 시료 완충용액과 4:1로 섞어 3분간 끓인 뒤 각 well에 20ul씩 걸고 100V로 전기영동을 행하였다. 전기영동을 하고 난 뒤 Towbin등의 방법에 따라 Biorad사의 TransBlot<sup>®</sup> Cell에 전이 완충액(39mM glycine, 4mM Tris base, 0.037% SDS, 20% methanol)을 넣고 1A로 2시간동안 단백질을 nitrocellulose(NC)막으로 이동시켜 부착시켰다. 단백질이 부착된 NC막에 5% 탈지분유가 포함된 TTBS(25mM Tris · Cl, pH 7.4, 137mM NaCl, 3mM KCl, 0.05% Tween20)를 가하고 1시간동안 실온에 방치하여 blocking을 하고난 후 TTBS로 1차례 세척하였다. 항 HA mouse monoclonal antibody를 5% 탈지분유가 들어있는 TTBS로 1:1000 희석하여 blocking된 NC막에 가하고 2시간동안 실온에서 반응시킨 후 TTBS로 5분씩 5차례 세척하였다. 이에 horseradish peroxidase가 결합된 goat anti-mouse IgG를 TTBS로 1:2000 희석하여 가하고 1시간동안 실온에서 반응시킨 후 다시 TTBS로 5분씩 5차례 세척하였다. 세척이 끝난 뒤 enhanced chemiluminiscence (ECL, Amersham)방법에 의해 각 단백질 밴드의 양상을 확인하였다.

### 3. Monoclonal antibody와 polyclonal antibody 제조

#### 가. Hybridoma 세포의 제조

##### 1) Myeloma 세포주

Hybridoma에 이용되는 동물은 BALB/c 마우스이고, 이에서 유래된 myeloma cell line은 P3-X63-Ag8, P3-NS1/1-Ag4-1(NS1), P3-X63-Ag8,653 (V.653), Sp2/0-Ag14(SP2) 및 FO 등으로 이들이 hybridoma에 널리 이용되어 왔다. 현재 사용한 myeloma cell line은 SP2로 ATCC에서 구매해 사용한다.

##### 2) 면역에 사용된 Mouse

설치류 BALB/c mouse를 사용하며 Charles River Japan, Inc.에서 구매한다. 보통 5-6주령의 건강한 female mouse만을 구매하여 2-3주간 순화시킨 후 상태가 양호한 mouse만을 면역에 사용한다. Fusion에 사용된 mouse 생체 조직 기관은 spleen을 사용한다.

### 3) 세포융합

2마리의 mouse에서 먼저 spleen을 적출하여 wash medium 10 ml가 담긴 cell culture dish에 넣고 잘 흔들어 계속하여 2개의 새로운 dish로 옮겨가며 잘 세척한다. 60mm cell culture dish 위에 60 mesh 철망을 올려놓고 이에 세척된 spleen을 올려놓는다. 한 손으로는 spleen을 집게로 눌러 터뜨리며 한 손으로는 wash medium 10ml를 방울방울 떨어뜨리어 철망 위에는 하얗게 퇴색된 connective tissue만 남도록 한다. Dish에 모아진 spleen 파편을 pippet으로 잘 부유시켜 bovine serum 2.5 ml이 들어 있는 15ml 원추형 원심 분리관에 서서히 중첩시키고 20분간 방치하여 둔다. Tissue debris들이 원심 분리관 바닥에 완전히 침전되면 pippet으로 윗 부분만 서서히 뽑아 또다른 원심분리관으로 옮겨 실온에서  $300 \times g$ 로 10분간 원심 분리한다. 상층액을 흡인하여 제거하고 이에 0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  용액 10 ml을 가하여 침전된 세포를 3분간 부유하면서 적혈구가 용혈 되도록 한다. 이를 15 ml 원심 분리관의 fetal bovine serum 2.5 ml 위에 중첩시킨 후에 원심 분리한다. 상층액을 흡인 제거 후에 wash medium 10ml을 가하고 세포를 잘 부유하여 원심 분리한다. 위와 같은 방법을 두 번 더 반복한다. 위 부유물을 50배로 희석하여 hemocytometer로 세포수를 센다. 다음으로 myeloma cell의 준비를 위해서 8-Azaguanine medium에서 mid-log phase로 ( $1-4 \times 10^5$  cells/ml) 분열하는 myeloma cell을 원심 분리하여 수확한다. 이를 wash medium 10 ml로 부유하여 10 배로 희석한 후 hemocytometer로 세포수를 센다. Splenocytes 와 myeloma cells의 혼합 비율은 5:1로 한다.

세포를 융합하기 위해  $1 \times 10^8$  splenocyte와  $2 \times 10^7$  myeloma cell을 50ml 원심 분리관에 옮기고 이를 원심 분리한다. Wash medium으로 침전된 cell을 부유한 후 원심 분리한다. 위와 같은 방법을 한번 더 반복한다. 상층액을 제거하고 원심 분리관 바닥을 바닥에 푹푹 쳐서 두 종류의 세포가 잘 섞이도록 한다. 이어서 원심 분리관을 비스듬히 누어서 한 손으로 돌려주면서 PEG(50%) 1 ml를 1분간에 걸쳐 아주 서서히 가한다. 1분간 원심 분리관을 비스듬히 누어 계속해서 돌려준다. 이어서 wash medium 1 ml를 1분간에 걸쳐 가한다. 계속하여 wash medium 10 ml를 가하는데 이 때 처음 2 ml는 2분간에 걸쳐 넣고 나머지 8 ml는 방울방울 가한다. 위 세포부유물을  $200 \times g$ 로 10분간 실온에서 원심 분리한다. 상층액을 버리고 침전된 cell을 2×HAT medium : conditioned medium(1:1)의 비율로 섞은 배지로 부유하여 96-well plate에 multi-channel pipette으로 분배한다. 대략적으로 splenocyte수를 기준으로  $0.3-0.5 \times 10^8$  cells/ml이 하나의 96-well plate에 들어가게 하며 매

well당 0.2 ml씩 들어가게 한다. 96-well plate를 습기가 포화된 37°C의 5 % CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한다. 다음날에 1× HAT medium을 가하여 매 well이 가득 차도록 한다. 12시간 또는 24시간 후에 상층액의 반을 흡인하여 제거하고 1× HAT medium을 가득 채운다. 이후로는 매 2-3일 후에 이와 같이 1× HAT medium으로 medium을 바꾸어 준다. 10일 후에는 1× HT medium으로 바꾼다. 대략 세포 융합후 2주일이면 ELISA로 antibody를 검색할 수 있다.

#### 4) 면역원

CTB에 대한 hybridoma를 얻기 위해서 면역원으로 sigma에서 구입한 CTB를 사용하고, HBsAg에 대한 hybridoma를 얻기 위해서 면역원으로 녹십자에서 생산되는 HBsAg 사용한다.

#### 5) 면역

항원으로 사용되는 CTB와 HBsAg의 단백질 용액과 같은 부피의 Complete Freund's adjuvant를 가하여 이를 용접된 주사 바늘을 이용하여 emulsion으로 만든다. 이 때 단백질의 농도가 낮아서 emulsion이 잘 안 되는 경우에는 Complete Freund's adjuvant를 더 가하여 Freund's adjuvant mixture를 준비한다.

단백질의 농도, 총량에 따라 마우스 당 20-200 µg의 단백질이 주입되도록 Freund's adjuvant mixture의 양(0.1 ml-1 ml)을 결정하여 이를 생후 6-8주의 BALB/c 마우스 복강에 주사하여 면역을 시작한다. Complete Freund's adjuvant mixture를 복강에 주사하는 경우에는 주사 간격을 대략 3-4주로 하고 단백질 용액을 직접 주사하는 경우에는 대략 2주 간격으로 한다. 면적이 잘되고 있는가를 확인하기 위하여 항원을 주입한지 3-4일 후에 눈에서 채혈하여 항체역가를 측정한다. 이 결과를 토대로 하여 면역 기간을 결정한다. Booster 주사는 세포 융합을 하기 3-4일전에 시행된다. 이 때 항원은 생리식염수나 phosphate-buffered saline (PBS)에 녹여 0.45 ml filter로 여과된 것을 사용한다. 항원은 가능하면 마우스 꼬리 정맥으로 주입하는 것이 좋으며 여의치 않으면 복강에 주입한다. 정맥으로 항원을 주입하는 경우에는 과민반응이 일어날 때도 있으며 이러한 때는 즉시 epinephrine을 주사한다.

#### 6) Screening

Indirect ELISA로 screening한다. Immunoassay plate well을 항원으로 coating 하기 위하여 항원인 CTB, HBsAG 용액(1 µg/ml) 100 µl를 가하고 wrap으로 둘러

싸서 용액의 증발을 막고 4 ℃의 냉장고에서 overnight으로 정치 반응시킨다. 다음 날 용액을 제거하고 well 표면을 1 % BSA/PBS 용액 300ul로 1시간동안 37℃ incubator에서 blocking시킨다. Blocking 용액을 완전히 제거해내고 나서 hybridoma 배양 상층액 100ul를 well에 가하고 37℃ incubator에서 1시간 동안 반응시킨다. PBS-Tween 20 (0.05%) 용액으로 3회씩 세척하고 2' antibody을 적정농도(1000 배)로 5 % BSA/PBS 용액에 희석하여 well당 100 ul씩을 넣어 37℃ incubator에서 1시간 동안 반응시킨다. PBS-T로 well을 3회 세척하고 ABTS 기질 용액을 100 ul씩 넣어 발색시킨다. 발색된 푸른색의 흡광도를 405 nm에서 ELISA Reader로 측정한다. 설명한 ELISA 방법에 의해서 양성으로 확인된 well의 세포만을 배양한다. 최종 hybridoma 세포주 선별은 western blot으로 확인한 후 결정한다.

#### 나. 토끼에서 polyclonal antibody 생산

Monoclonal antibody가 일정 epitope만 인식하기 때문에 식물 virus에서 발견되는 CTB peptide epitope을 인식하기 위해 Anti-CTB polyclonal antibody를 토끼에서 생산하였다.

항원으로 사용되는 CTB 단백질 용액과 같은 부피의 Complete Freund's adjuvant를 가하여 이를 용접된 주사 바늘을 이용하여 emulsion으로 만든다. 이 때 단백질의 농도가 낮아서 emulsion이 잘 안 되는 경우에는 Complete Freund's adjuvant를 더 가하여 Freund's adjuvant mixture를 준비한다.

단백질의 농도, 총량에 따라 토끼 당 200 ug의 단백질이 주입되도록 Freund's adjuvant mixture의 양 1 ml을 토끼 등에 주사하여 면역 시작한다. 주사 간격을 대략 3주로 하고 면역이 잘되고 있는가를 확인하기 위하여 항원을 주입한지 3번 면역후에 귀에서 채혈하여 항체역가를 측정한다. 이 결과를 토대로 하여 채혈을 결정하고, 심장 채혈하여 항체를 Elisa 방법으로 확인하였다.

#### 4. 경구투여에 의한 항체형성 효과

##### 가. 마우스 준비 항원 경구 투여

Anti-CTB IgG를 사용한 특이적 ELISA로 seronegative 확인된 Charles River로부터 구입한 ICR 어미 마우스로부터 태어난 6주령의 마우스를 본 실험에 사용하였다. 위내 산성 조건을 중화하기 위해 4% sodium bicarbonate 용액을 100  $\mu$ l씩 먼저 주사기로 투여한 후 앞서 준비한 CTB, CTP-HBsAg 15mer epitope, CTB-HBsAg을 농도별로 경구 투여하였다. 음성대조군으로는 saline를 먹인 마우스를 사용하였다. 경구 투여 간격을 대략 2주로 하고 면역이 잘되고 있는가를 확인하기 위하여 항원을 주입한지 3번 면역후에 눈에서 채혈하여 항체역가를 측정한다. 이 결과를 토대로 하여 채혈을 결정하고, 심장 채혈하여 항체가를 Elisa 방법으로 확인하였다.

#### 나. Elisa 방법

- 1) CTB 또는 HBsAg를 1  $\mu$ /ml의 농도로 0.05M carbonate buffer, 0.05M sodium bicarbonate buffer(pH9.6)에 녹여 ELISA plate에 100  $\mu$ L/well씩 넣어준 후 4°C에서 overnight로 보관한다.
- 2) washing buffer로 5번 씻어낸다.
- 3) blocking buffer(PBS에 1% BSA(Bovine Serum Albumin))를 300  $\mu$ l/well씩 넣어준 후 37°C에서 1시간 동안 incubation시킨다.
- 4) washing buffer: PBS용액에 0.05%Tween 20을 넣어준다.  
: PBS에 1% BSA(Bovine Serum Albumin)을 넣어준다.
- 5) Anti-CTB IgG 또는 Anti-HBsAg IgG를 희석하여 100  $\mu$ l/well넣어준후 37°C에서 1시간동안 incubation시킨다.
- 6) washing buffer로 4번 씻어낸다.
- 7) Anti-mouse IgG(Fc specific)를 100  $\mu$ l/well넣어준후 37°C에서 1시간동안 incubation시킨다.
- 8) washing buffer로 4번 씻어낸다.
- 9) 발색제(ABTS: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=1:1)를 100  $\mu$ l/well넣어준 후 30분간 발색시킨다.
- 10) ELISA reader에서 405nm의 파장으로 찍어서 정량한다.

## 제 2절 결과

### 1. 항원 유전자 확보 및 발현 vector 제조

가. Cholera toxin B subunit(CTB), CTB-HBsAg, HBsAg-CTB 클로닝 및 *E. coli* 발현 vector 제조

*E. coli* 발현 체계를 이용하여 항원을 생산하기 위해 *Vibrio cholera* inaba strain 을 LB 배지에서 37도에서 24시간 배양하여 phenol 추출하여 total DNA를 추출하였다. pfu PCR을 수행하고, 제한효소 EcoRI 처리를 실시하여, agarose 겔 상에서 분리하고, pBluescript KSII 벡터 상의 MCS의 EcoRV-EcoRI 부위를 제한효소 처리 후, 역시 같은 방법으로 분리하였다. ligation은 T4 DNA ligase로 접합하였고, *E. coli* strain DH5- $\alpha$ 에 형질전환하여, 제한효소 처리 후, agarose 겔상에서 클로닝을 확인하였다. CTB를 cloning한 pBluescript KSII plasmid와 pET11a(+)벡터를 제한효소 NdeI과 BamHI로 처리하여, 다시 agarose 겔상에서 분리하여 ligation하여, *E. coli* strain DH5- $\alpha$ 에 형질전환하여, 제한효소 처리 후, agarose 겔상에서 클로닝을 확인하고 염기서열을 하였다.

CTB-HBsAg(CTB-HBV)유전자를 cloning 하기 위하여 우선 HBV virus에 오염된 혈장에서 HBsAg 유전자를 PCR를 이용하여 확보하고 염기서열을 분석하여 유전자를 확인하였다. CTB, HBsAg 유전자를 fusion 시키기 위해 PCR primer를 이용하여 CTB 유전자와 HBsAg 유전자를 연결하여 CTB-HBsAg(CTB-HBV) 확보할 수 있었다. pfu PCR을 수행하고, 제한효소 EcoRI처리를 실시하여, agarose 겔상에서 분리하여, pBluescript KSII 벡터 상의 MCS의 EcoRV-EcoRI 부위를 제한효소 처리 후, 역시 같은 방법으로 분리하였다. ligation은 T4 DNA ligase로 접합하였고, *E. coli* strain DH5- $\alpha$ 에 형질전환하여, 제한효소 처리 후, Agarose 겔상에서 클로닝을 확인하였다. CTB-HBV를 cloning한 pBluescript KSII plasmid와 pET11a(+)벡터를 제한효소 NdeI과 BamHI로 처리하여, 다시 agarose 겔상에서 분리하여 ligation하여, *E. coli* strain DH5- $\alpha$ 에 형질전환하여, 제한효소 처리 후, agarose 겔상에서 클로닝을 확인하였다.(Fig1)

나. CTB-HBsAg epitope 13mer 클로닝

CTB-HBsAg epitope 13mer 유전자를 cloning 하기 위하여 이미 알려진 HBsAg epitope 유전자 연결은 primer을 합성하고 CTB 유전자 C-terminal에 PCR를 이용하여 gene fusion 시켜 CTB-HBsAg epitope 13mer peptide을 확보하고 염기서열하여 유전자를 확인하였다. 사용된 primer는 다음과 같다.

- 1) AGTATGGCAACTACCAGCACGGGACCATGCAAGACCTGCACGATTCCT  
GCTTAAGCGGATCCGG
- 2) AAATTTTAATTTGATCATATGT

다. pET32a(+)발현 vector를 이용한 CTB, CTB-HBsAg 13mer epitope, CTB-HBsAg의 발현.

CTB, CTB-HBsAg 13mer epitope, CTB-HBV, HBV-CTB를 pET 11a vector에 cloning 하여 *E. coli* strain BL21에서 발현하였으나 inclusion body로 발현되어 active한 protein으로 만들기 위해 다시 refolding 하여야했다. *E. coli* 발현 system에서 발현되어 활성이 있는 CTB, CTB-HBsAg, HBsAg-CTB를 생산하기 위해 soluble protein 생산 vector인 pET32a(+)에 그림 2와 같이 BamHI과 EcoRI site에 cloning하고, *E. coli* strain AD494(DE3)에 transformation하여 발현을 확인하였다.(Fig2)

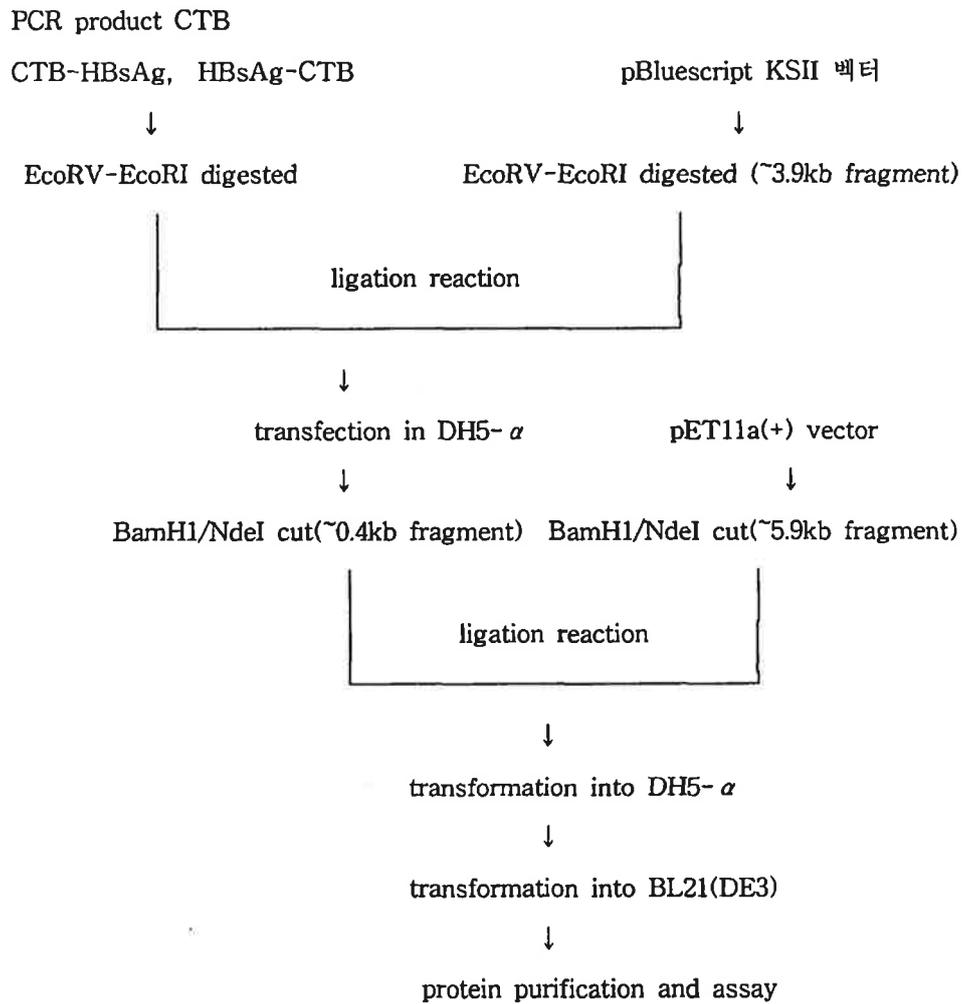


Fig. 1. CTB, CTB-HBsAg, HBsAg-CTB 의 full gene cloning과 발현 scheme

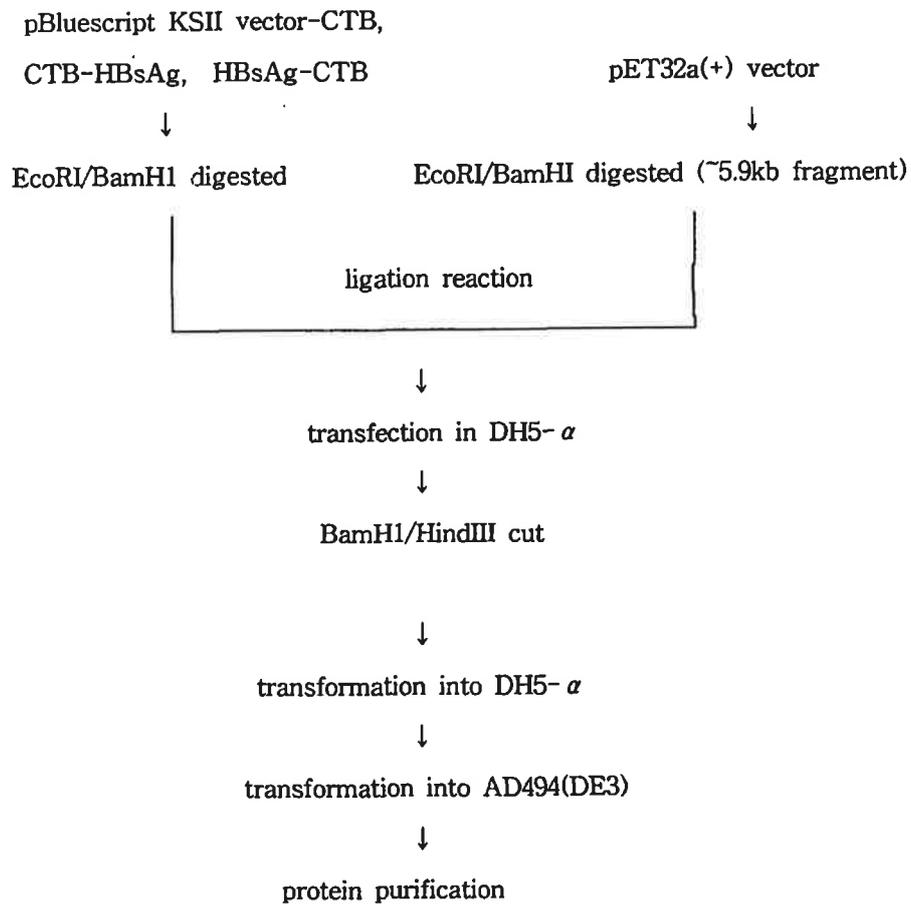


Fig. 2. pET32a(+) vector에서 항원 발현

## 2. 항원의 발현 및 정제법 확립

가. *E. coli*에서 항원 생산

pET11a vector에 CTB 유전자를 도입하여 IPTG로 발현한 결과 발현량은 총 단백질의 40%였으며 inclusion body와 soluble 형태는 80% : 20%로 발현 되어 만족할만한 결과를 얻었다. pET11a vector에 CTB-HBsAg-13mer epitope 유전자를 도입하여 발현한 결과는 총 단백질의 40% 였으나 inclusion body로 발현되었다. 그러나 pET11a vector에 CTB-HBsAg, HBsAg-CTB 유전자를 도입하여 발현한 항원을 SDS-PAGE 와 anti-CTB, anti-HBsAg monoclonal antibody을 이용하여 western blotting을 비교한 결과, 항원이 inclusion body로 발현되고 발현양도 미흡하여(전체 단백질의 5%정도) 만족할만한 결과를 얻지 못하였다.(Fig.3)

pET 벡터를 사용하여 발현한 CTB를 soluble protein으로 얻기위하여 *E. coli* 배양시 배양조건을 변화시켜 30°C에서 배양하여 soluble 형태의 단백질 함량을 40%까지 증가시킬 수 있었으나 배양시간이 길어지고 총 발현 항원의 생산은 줄어들었다.

그림 3에서 처럼 pET11a vector을 이용하여 발현된 CTB를 anti-CTB monoclonal antibody를 생산하는 CTB14번 hybridoma clone을 fetal calf serum이 포함된 배지에서 배양하고 배양상층액을 직접 western blotting 하였기 때문에 CTB외에도 비특이적인 반응으로 잡다한 band가 관찰 되었다.

pET11a vector에 CTB-HBsAg, HBsAg-CTB 유전자를 도입하여 발현한 항원은 생산양이 적어서 뚜렷한 band가 확인되지 않았다. *E. coli*에서 발현된 CTB-HBsAg, HBsAg-CTB 확인하기 위하여 anti-HBsAg monoclonal antibody를 생산하는 HBsAg 4번 hybridoma clone을 fetal calf serum이 포함된 배지에서 배양하고 배양상층액을 4배 희석하여 western blotting 하였으나, HBsAg외에도 약간의 비특이적인 band가 관찰 되었다. (Fig4)

Monoclonal antibody를 사용하여 western blotting을 했을 때 비특이적인 band가 나타난 원인은 fetal calf serum이 포함된 배지에서 항체생산용 hybridoma 세포를 배양하였고, 배양액을 Protein A-sepharose affinity column을 이용하여 정제를 하지 않았기 때문으로 사료되어, 이러한 문제점을 개선하기 위해 무혈청 배지에서 hybridoma 세포를 배양하였고, 항체생산 방법의 개선과 affinity chromatography를 이용하여 anti-CTB, anti-HBsAg 항체를 정제하였다.

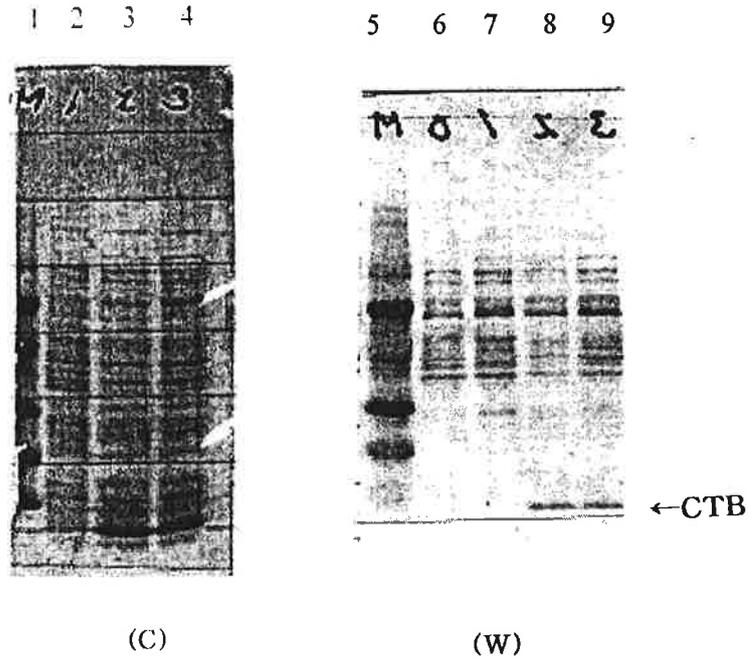


Fig 3 *E. coli*-pET 11a vector system에서 항원 발현 및 western blotting을 이용한 확인

C : Coomassie blue 염색, W : Western Blotting

Coomassie blue 염색

- 1 : Standard marker : 200k, 97.4k, 68k, 43k, 29k, 18.4k, 14.3k
- 2 : HBsA-CTB IPTG induction
- 3 : CTB(10μl culture broth) IPTG induction
- 4 : CTB(20μl culture broth) IPTG induction

Western Blotting 염색

- 5 : Standard marker
- 6 : HBsA-CTB IPTG non-induction
- 7 : HBsA-CTB IPTG -induction
- 8 : CTB(10μl culture broth) IPTG induction
- 9 : CTB(20μl culture broth) IPTG induction

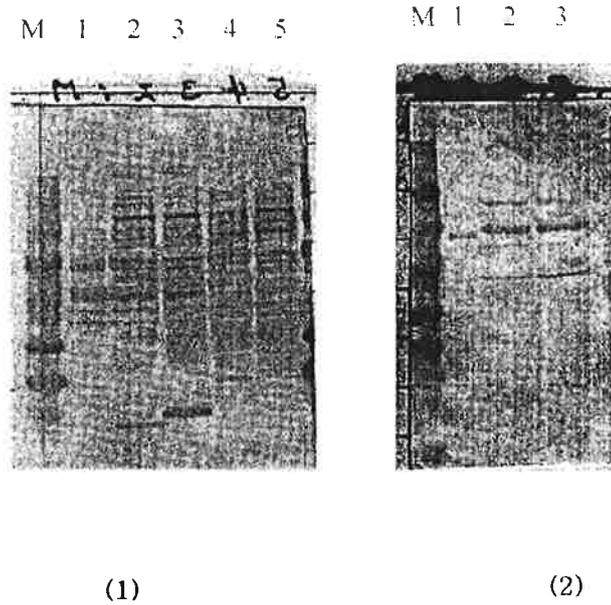


Fig 4 *E. coli*-pET 11a vector system에서 항원 발현 및 western blotting을 이용한 확인

(1) Anti-CTB 항체를 이용한 western blotting

M : Standard marker 200k, 97.4k, 68k, 43k, 29k, 18.4k, 14.3k

1 : CTB IPTG non-induction

2 : CTB(20 $\mu$ l culture broth), IPTG induction

3 : CTB-HBsAg13mer epitope(10 $\mu$ l culture broth) IPTG -induction

4 : HBsA-CTB (10 $\mu$ l culture broth), IPTG induction

5 : CTB-HBsAg (10 $\mu$ l culture broth), IPTG -induction

(2) Anti-HBsAg 항체를 이용한 western blotting

1 : HBsA-CTB IPTG non-induction

2 : HBsA-CTB (10 $\mu$ l culture broth), IPTG -induction

3 : CTB-HBsAg (10 $\mu$ l culture broth), IPTG -induction

그러나 pET 11a vector system에서 항원이 inactive 형태로 얻어지기 때문에, 활성이 있는 soluble 형태의 항원을 생산하기 위하여 *E. coli*-pET32a(+) system을 사용하였다. pET32a 발현 system에서 CTB는 pET11 vector에서 보다 약간 발현량이 떨어지고, pET11 vector system에서 처럼 CTB-HBsAg, HBsAg-CTB의 경우는 발현량이 5% 이하로 발현량이 낮았다. 또한 CTB, CTB-HBsAg, HBsAg-CTB 항원 모두가 inclusion body로 발현되어 *E. coli*-pET32a(+) system을 사용할 수 없었다. (Fig 5)

발현 단백 함량은 bovine serum albumin(BSA)를 표준물질로 사용하여 Bradford의 방법에 의해 정량 하였다.

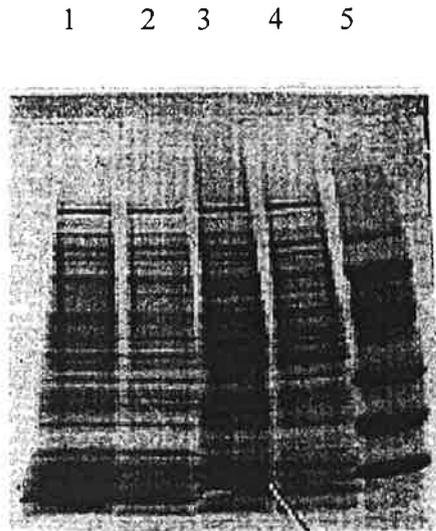


Fig 5 *E. coli*-pET 32a vector system에서 항원 발현

- 1 : CTB (20 $\mu$ l culture broth), IPTG induction
- 2 : CTB (10 $\mu$ l culture broth), IPTG induction
- 3 : HBsA-CTB (20 $\mu$ l culture broth), IPTG induction
- 4 : CTB-HBsAg (10 $\mu$ l culture broth), IPTG induction
- 5 : Standard marker 200k, 97.4k, 68k, 43k, 29k, 18.4k, 14.3k

*E. coli*에서 항원을 발현시키기 위해서는 pET11a vector를 이용하여 CTB와 CTB-HBsAg 13mer epitope을 발현 시키는 방법이 발현량이 높아 적당하다고 판단하고 균주를 LB배지 37°C에서 키워 OD<sub>600</sub> = 0.5상태에서 1mM IPTG로 발현을 유도 한 후 OD<sub>600</sub> = 3 상태에서 배양액을 harvest하여 세포를 파쇄하고, 원심분리하여 pellet를 10% Tris-Glycine gel에 전기영동을 실시한 결과 예상 밴드가 12kDa에서 각각 확인 되었다.

*E. coli*에서 항원을 발현시키고 CTB 분리를 쉽게 하기 위해 inclusion body(40% 정도)로 유도하고, 세포를 파쇄하여 inclusion body 정제를 위해, 여러번 detergent로 세척하고 정제된 inclusion body를 8M Urea/Tris buffer에 용해시킨 후 투석을 단계별로 행하여 active 항원으로 refolding 시키고 분리 및 정제조건을 찾았다. 이미 CTB 정제는 ganglioside affinity column을 이용하면 분리/정제할 수 있지만 다량의 CTB를 분리하기 위하여 정제 방법을 개선하였다.

Inclusion body로 얻어진 CTB를 3회 세척하여 60% 이상 순도를 얻을 수 있고 refolding한 후 gel chromatography와 ion exchange chromatography를 하여 CTB를 정제 하였다.

정제 방법은 Inclusion body에서 refolding된 CTB를 12,000g로 30분간 원심분리 후 순도를 높이기 위하여 분자크기에 의해 단백질을 분리하는 Sephadex G-75 column을 이용하여 gel filtration(50mM Tris-HCl pH7.5) 하였다. Main peak부분을 모아 centricon으로 농축하여 10% SDS-PAGE를 실시하여 densitometer로 각 단백질 band의 상대적인 농도를 측정하였을 때 정제도는 70%이상률 나타내었으며, 단백 회수율은 30 % 수준이었다.

Ion exchange chromatography를 이용하여 정제하기위해 Sephadex G-75 column을 이용하여 정제된 peak를 회수하여 중성 pH에서 소수성 칼럼인 octyl-과 mono Q- 칼럼을 사용하여 정제도를 비교하여 하였으며, mono Q-칼럼을 이용하여 50mM PB(pH7.2)/1M Urea/ 100mM-950mM NaCl gradient 조건으로 분리하였을 때 90% 정제효과를 보았고, 회수율은 25%의 CTB를 얻을 수 있었다.

면역용으로 사용할 항원은 *E. coli*에서 inclusion body로 얻어진 CTB를 3회 세척하여 refolding한 후 refolding된 active CTB를 12,000g로 30분간 원심분리 후 mono Q-칼럼을 이용하여 50mM PB(pH7.2)/1M Urea 조건으로 분리하였을 때 80% 정제효과를 보았고, 회수율은 30%의 CTB를 얻을 수 있었다. (Fig6).

*E. coli*에서 발현되어 세포를 파쇄하고 inclusion body로 얻어지고 gel chromatography와 ion exchange chromatography 단계마다의 정제효과를 확인하기

위하여 SDS-PAGE를 실시하여 그림 7 에서 확인하였다.

본 연구를 진행하는데 사용된 물질 및 방법과 각 단계별 정제도는 아래의 table 1에 요약되어 있다

Table 1. CTB full gene 발현 산물 정제과정 진행표

단계	조 작	방 법	volume	prot. amount
Culture	fermentation	LB broth batch	8L	
	cell harvest	centrifuge 5,000rpm, 15'		10g cells
	microfluidize	cell suspension (100mM Tris pH7.5, 20mMEDTA, 0.2M NaCl, 1mM PMSF, 100ug/ml Lysozyme) ->stir 30', RT ->add 200ul(5mg DNase/ml), stir 5' ->add DNase treat (50mM Tris, 7.5, 10mM MgCl <sub>2</sub> 20ug/ml DNase), 300ml	300ml (+300ml)	
	inclusion body purify	Triton X-100 treatment 2-3times (100mM Tris, 7.5, 10mM EDTA, 2.5% Triton X-100) ->homogenize and stir 30', RT ->centrifuge 12,000. 14°C. 30' final washing (100mM Tris, 7.5, 10mM EDTA) ->homogenize and stir 30', RT ->centrifuge 12,000. 14°C. 30'		2.4g
정제	용해	8M Urea(100mM Tris pH7.5) and 25mM DTT ->homogenize (30"+60")x 5times ->stir for 30', RT ->centrifuge 12,000xg, 15'	15 ml	0.5g
	refolding	by dilution (50xd) dialysis in refolding buff. (2M urea (100mM Tris pH7.5), 0.25mM EDTA, 0.3M Lysine, 0.2mM Cystine, 2mM Cysteine). for o/n	90 ml	120mg
	투석	in running buff. (50mM Tris pH7.5) 1. 1/2 change for 1hr 2. 4/3 change for 2hr 3. 9/10 change for 3hr 4. 100% change for 5hr ->centrifuge 12,000. 14°C. 30'	90 ml	100mg
	gel filtration (G-75)	in running buff. (50mM Tris pH7.5)	200 ml	30mg
	FPLC	mono-Q sepharose (20mM Tris(pH7.2)	22 ml	17mg

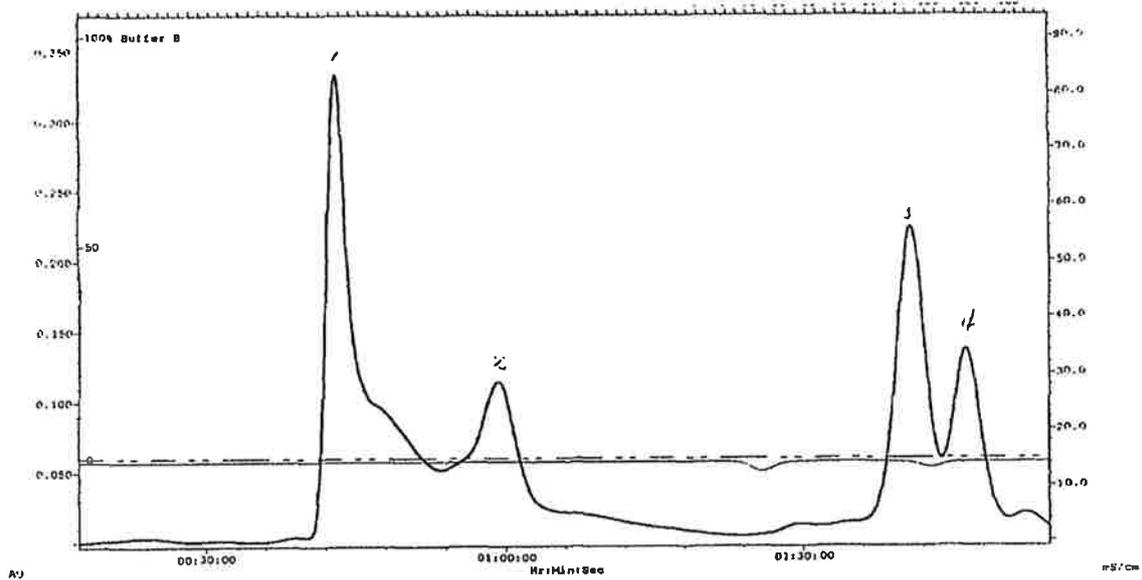


Fig. 6 Ion exchange chromatography (Q-Sepharose)을 이용한 정제 profile



Fig. 7. SDS-PAGE에 의한 CTB 정제도 확인

Lane 1-5 :

M : Standard marker : 200k, 97.4k, 68k, 43k, 29k, 18.4k, 14.3k

1 : CTB non induction

2 : CTB pellet

3 : CTB supernatant

4 : CTB washing pellet

5 : Q-Sepharose 정제 CTB

### 3. *Pichia pastoris*에서 CTB, CTB-HBsAg pPIC3 벡터에의 클로닝 및 발현

메탄올 자화 효모인 *Pichia pastoris*는 유전자 재조합 단백질을 생산하는데 있어서 많은 장점을 지니고 있는 유용 가능성이 매우 큰 숙주세포로 알려져 있는데 그 장점으로 첫째로 *P. pastoris*의 알콜 산화효소 1 프로모터 (AOX 1 promotor)는 매우 강력하고 (발현량이 전체 단백질의 30% 이상) 잘 제어 조절된다는 것이고 둘째로는 이 *P. pastoris*에서 외래 유전자를 발현시키기 위해 외래 DNA (foreign DNA)를 *P. pastoris*의 크로모솜 DNA (chromosomal DNA)에 삽입하게 되므로 이 삽입된 외래 DNA는 고농도 발효 및 발현 기간 동안 매우 안정하다는 것이며 셋째로 *P. pastoris*는 shaking flask로부터 발효기에서의 고농도 발효로의 scale up이 쉽다는 것과 넷째로 당화 (glycosylation) 형태가 *S. cerevisiae*에서 발현할 경우와 다르게 terminal  $\alpha$  1,3-linkage mannose를 가지고 있지 않으므로 후에 의약품 용으로 사용할 때 antigenicity 문제를 일으키지 않는다는 것이다.

이러한 메탄올 자화 효모인 *P. pastoris*를 이용하여 CTB, CTB-HBsAg 유전자를 pPIC3 vector에 삽입하여 발현용 vector를 제조하였다.

*Pichia pastoris* intracellular expression vector pPIC3의 MCS BamHI과 EcoRI 부위에 pBluescript KSII 벡터 상의 MCS의 BamHI-EcoRI 부위를 제한효소 처리 후, 역시 같은 방법으로 분리하였다. ligation은 T4 DNA ligase로 접합하였고, *E. coli* strain DH5- $\alpha$ 에 형질전환하여, 제한효소 처리 후, agarose 겔상에서 클로닝을 확인하였다. (Fig 8)

pPIC3 벡터에는 AOX promotor가 있어 methanol존재 하에 단백질의 발현이 유도된다. YNB 평판에서 자란 집락을 취하여 배지에 접종하고 30°C에서 이틀간 진탕 배양해서 다량의 효모를 확보한 뒤 단백질 발현 유도실험에 사용하였다.

배양한 효모를 YNB(yeast nitrogen base) without amino acids, inorganic salt, trace salt, biotin, 1% glycerol을 넣은 배지 50ml에 5% 접종하여 넣고 30°C에서 18시간동안 진탕 배양한 뒤 최종 농도가 0.5%가 되도록 methanol을 되게 가한 다음 48시간 진탕 배양하여 단백질의 발현을 유도하였다. 이때 600nm에서의 흡광도는 1.0정도로 조정하였다. 배양한 효모를 원심 분리하여 침전시킨 뒤 멸균된 물로 재부유 시켜 세척하고 pellet을 취하여 단백질을 추출하였다.

단백질의 발현 여부를 확인하기 위하여 효모를 균질화하여 단백질을 추출하고, 이를 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide 겔에 전기영동하였다. 전기영동이 끝

난 겔에 Coomassie blue 염색과 면역블롯팅을 수행하여 단백질의 발현 여부를 확인하였다.(Fig 9)

CTB와 CTB-HBsAg가 soluble 형태로 얻어지나 발현량이 적어 항원을 얻는 목적으로 분리/정제를 수행하지 않았다.

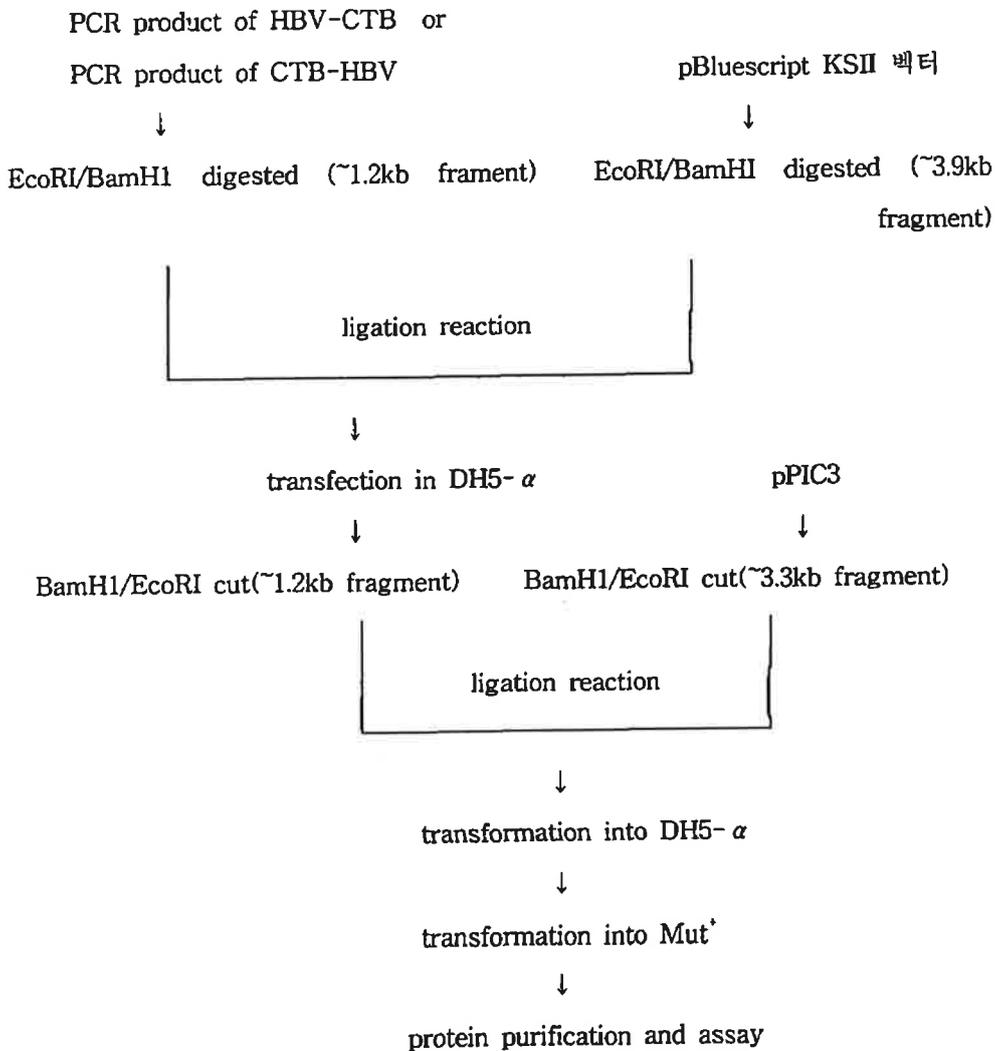


Fig. 8. CTB-HBsAg 의 full gene cloning과 pPIC3 발현 scheme

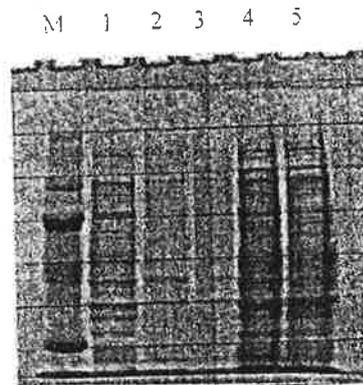


Fig. 9 SDS-PAGE에 의한 CTB-HBsAg, HBsAg-CTB 발현 확인

M : 200k, 97.4k, 68k, 43k, 29k, 18.4k, 14.3k

Lane 1 : cell lysate of *P.pastoris* host cell (non-induction)

lane 2-3 : cell lysate CTB-HBsAg, induced with methanol induction  
(30 °C, for 30hrs)

lane 4-5 : cell lysate HBsAg-CTB, induced with methanol induction  
(30 °C, for 30hrs)

#### 4. 단일 항체 생산

CTB 와 HBsAg의 monoclonal antibody를 생산하기 위하여 CTB와 HBsAg를 쥐에 주사하여 3번 면역시킨 후 spleen cell을 획득하고 myeloma cell인 SP2/0 cell 과 융합시킨 후 anti-CTB hybridoma cell 과 anti-HBsAg hybridoma cell을 선별하였다.

##### 가. 하이브리도마의 선별

##### 1) Anti-CTB mouse monoclonal hybridoma 선별

선발과정을 거쳐 24개의 세포주를 1차 선발하고 선발된 세포주의 항체 생산정도를 판단하기 위하여 12개의 clone을 T-flask에서 배양하고 배양 상청을 정제하여 각 fraction을 280nm에서 흡광도를 측정하였고 이를 항체농도로 환산한 결과는 Table 2과 같다.

CTB14 번 hybridoma clone에서 anti-CTB Ab 생산량이 가장 높았으며, 항체 생산을 목적으로 serum free medium에서 적응시켜 항체 생산 clone으로 사용하였다

Table 2. 마우스 하이브리도마 세포주의 MAb 생산량

세포주 종류	A280	Ab conc.(ug/ml)
CTB2	0.079	55
CTB5	0.028	19.5
CTB6	0.090	62.8
CTB9	0.031	22
CTB10	0.050	34.9
CTB13	0.026	18.4
CTB14	0.19	136
CTB15	0.020	14
CTB17	0.029	20.4
CTB19	0.050	34.8
CTB20	0.082	57.3
CTB24	0.020	14

## 2) Anti-HBsAg monoclonal hybridoma 선별

선발과정을 거쳐 21개의 세포주를 1차 선별하고 ELISA시험을 통하여 가장 항체생산량이 높은 5개의 세포주 HBV4, HBV8, HBV15, HBV 17를 선별하였다. 세포주 HBV4, HBV8, HBV15, HBV 17를 세포주의 항체 생산정도를 판단하기 위하여 4개의 clone을 T-flask에서 배양하고 배양 상청을 정제하여 각 fraction을 280nm에서 흡광도를 측정하였고 이를 Ab농도로 환산한 결과를 Table 3과 같다.

Table 3 각 세포주의 anti-HBsAg 항체 생산량

세포주	정제후 항체량(ug/mL)
HBV4	65
HBV8	78
HBV15	131
HBV 17	83
HBV 20	45

위의 네가지 세포주의 HBsAg에 대한 항체의 affinity를 비교하기 위하여 각각의 세포주를 무혈청배지에서 5일간 배양한 후 Protein A Sepharose 4B gel chromatography로 항체를 분리 정제하였고, 정제된 항체를 동일한 양(10 ug/mL)이 되도록 희석한후 5-fold serial dilution하여 ELISA를 실시하였다. 그 결과 affinity는 HBV4 > HBV15 > HBV8 > HBV 17 > HBV20의 순으로 나타났다.(Fig10) 결국 항 HBsAg 항체 생산용으로 필요한 항체는 binding affinity가 강한 clone이어야 하므로 본 실험에서는 HBV4을 선별하여 이용하였다.

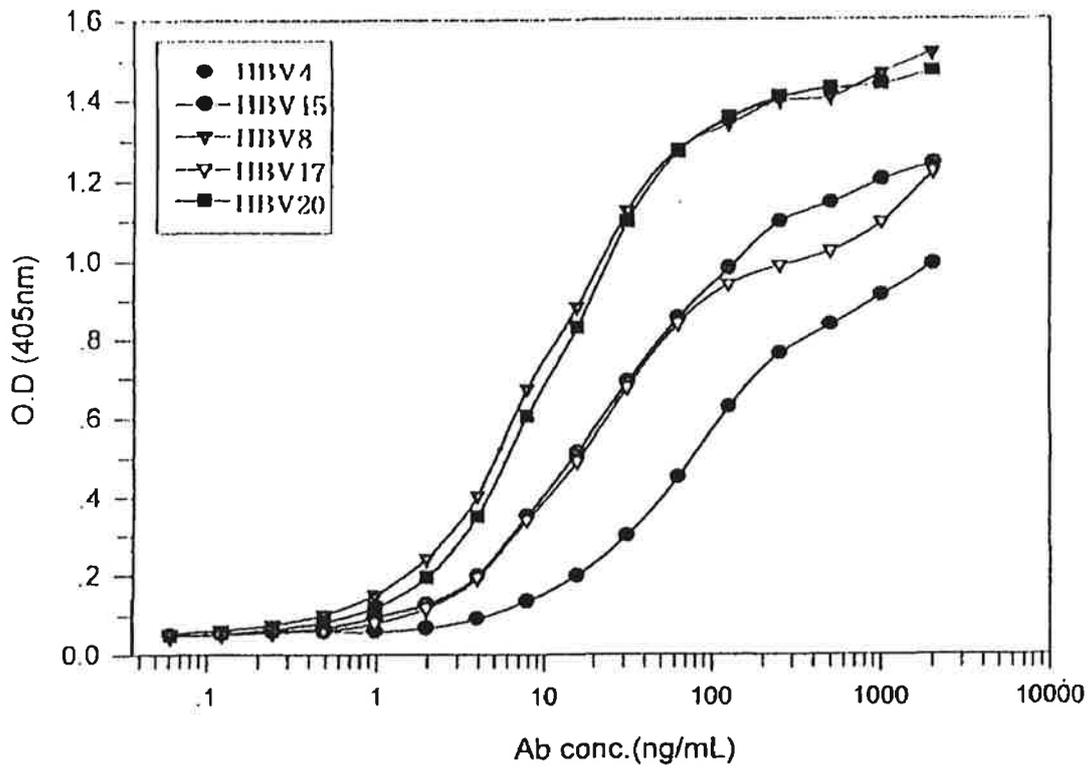


Fig. 10 Affinity ranking of anti-HBsAg monoclonal antibody

Hybridoma cell-line에서 생산된 anti-CTB, anti-HBsAg monoclonal antibody를 혈청을 함유한 배지에서 항체를 생산 하여 western blotting을 하였을 때 *E. coli*에서 발현된 단백질과 세포 배양 상청액 내의 항체와 비특이적인 결합 때문에 다양한 잡 band가 나타났다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 anti-CTB, anti-HBsAg monoclonal antibody 생산 hybridoma cell 을 무혈청 배지에서 적응 시켜 배양하였다.

우선 배양주를 serum dilution 방법으로 무혈청 배지에 적응된 현탁 세포주를 얻기 위해서는 목적 세포주의 특성과파악이 필요하고, T-flask상에서 자랄 때의 성장 특성을 이용하여 최적농도의 세포를 접종하고 또한 세포성장이 가능한 농도의 혈청을 첨가하여 현탁 배양을 실시하고 혈청농도를 줄여가면서 최종적으로 완전한 무혈청 배지에 적응된 현탁 세포주를 찾는 방법을 이용하였다. 접종농도 효과를 파악하기 위해서 T-flask에  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>에서부터 2, 3, 5,  $6 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>까지 세포를 접종하여 5일간 배양하며 매일 세포수를 측정하였다. 혈청농도 효과 파악을 위해서는  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>의 세포를 접종하고 배양배지의 혈청 농도를 0.5, 1, 2, 3, 4, 5%로 각각 순차적으로 높인 배지로 배양하여 매일 세포수를 측정하였다. 위의 두 실험에서 얻은 결과를 볼 때 CTB 14 세포의 경우, 접종 농도는  $2-3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>, 혈청농도는 2%부터 무혈청 첨가물의 필요성을 확인하였다.

Anti-HBsAg 항체를 생산하는 HBV4 세포주는 5%의 dialyzed FBS가 들어있는  $\alpha$ -MEM 배지에서 배양하고 80-90% confluency에서 세포를 떼어내서 250mL spinner flask로 옮겨 배양하였다. 초기에는 T-flask에서와 동일한 배지로 배양하고 세포가 자라면 혈청농도를 5%에서 3%, 2%까지 줄여 나갔다. 초기의 접종 세포농도는  $3-5 \times 10^5$  cells/mL로 하였다. GC-CHO-P1 배지에 혈청농도를 2%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.1%, 0.05%, 0.01%로 점진적으로 낮추어 주면서 각 농도 단계에서 적어도 2세대 이상을 배양한 후 세포성장이 정상적으로 일어났을 때 다음 단계로 진행하였다. 완전한 무혈청 상태에서는 배지를 GC-CHO-P1/EX-Cell 301(1:1)로 교환하고 초기 접종농도를  $2 \times 10^5$  cells/mL로 낮추고 세포농도  $8-10 \times 10^5$  cells/ml에서 계대를 실시하였다. 무혈청 배지 적응기간 중의 세포 활성도는 평균 90%를 유지할 수 있었다.

### 3). Monoclonal antibody 정제

Anti-CTB Ab를 생산한 CTB14 cell-line을 무혈청 배지에서 배양하고 한외 여과막을 사용하여 약 40 배 농축하였다. A-Sepharose column에 PBS buffer로 평형

시키고 hybridoma 배양 농축액을 affinity-chromatography 실시하고 0.5M NaCl PBS로 washing 한 후, 0.1M glycine buffer(pH3.0) 으로 elution하였다. (그림 11)

용출된 항체는 PBS buffer로 투석하고 protein A-Sepharose column을 이용하여 분리/정제한 항체의 정제도를 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다(그림 12). 1차 affinity column을 이용한 정제도는 70% 정도고 정제 회수율은 45%이었다.

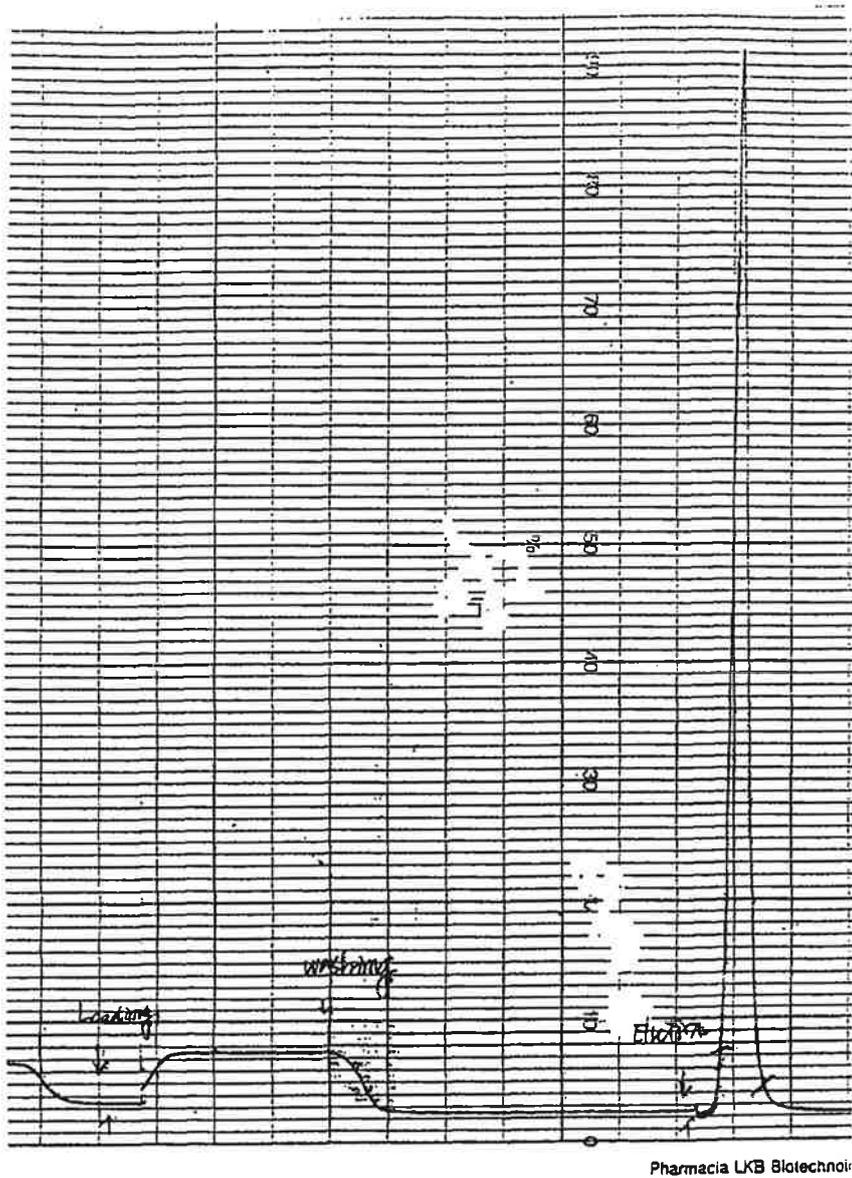


Fig 11 Protein A column chromatography profile

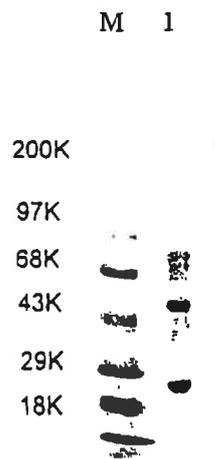


Fig. 12 Anti-CTB antibody의 SDS-PAGE를 이용한 정제도

M : MW maker 1. Standard marker : 200k, 97.4k, 68k, 43k, 29k, 18.4k, 14.3k

1: Anti-CTB

## 5. 토끼에서 Anti-HBsAg와 Anti-CTB polyclonal antibody 생산

현재의 monoclonal antibody가 일정 epitope만 인식하기 때문에 모든 HBsAg와 CTB peptide epitope을 인식하기 위해 Anti-HBsAg polyclonal antibody를 토끼에서 생산했다. 200  $\mu$ g/ml HBsAg와 CTB각각을 500  $\mu$ l PBS에 희석하고 500  $\mu$ l Freund adjuvant와 함께 완벽하게 혼합시킨다음 토끼의 등에 피하주사 하였다. 면역기간은 3주 간격으로 3회 면역하였다. 3회 면역후 심장채혈한다. 50 ml Falcone tube에서 16시간 냉장고에서 방치하고 3000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다.

Elisa method로 혈청 내의 anti-HBsAg polyclonal 항체의 titer를 계산하였다. CTB, HBsAg 각각을 96 well plate에 10ng/100 $\mu$ l coating하고 혈청을 희석하여 anti-HBsAg, anti-CTB polyclonal 항체를 계산하였다. Anti-CTB 항혈청의 적정 희석 농도는 6000배 anti-HBsAg 항혈청의 희석 농도는 10000배 희석하였을 때 가장 좋은 ELISA 결과를 얻을 수 있었다.

## 6. 항원을 경구투여 하여 항체생성 효과

식물 백신은 항원을 생산하는 형질전환 식물을 동물이나 사람이 섭취하여 장내에서 항원이 흡수되어 IgA와 IgG가 형성되고 질병을 예방 할 수 있는 방법이다. 본 세부 과제에서는 미생물에서 생산된 항원을 경구투여하여 IgA또는 IgG 항체가 생성되는 조건을 연구함으로써 형질전환 식물을 섭취하였을 때 항체형성 조건을 미리 예측하기 위해 미생물에서 발현된 항원을 경구 주사 또는 사료로 투여후 항체형성을 유도하고 심장 채혈하여 항체를 측정 하였으며 시험내용으로는 CTB 투여량 CTB의 active, inactive상태, HBsAg와 fusion 단백질, 사료와 혼합, CTB-HBsAg epitope을 연결하여 anti-CTP와 anti-HBsAg 항체를 생산할 수 있는지를 시험 하였다.

### 가. CTB 양에 따른 항체생성 효과

Soluble CTB와 inclusion body CTB를 20  $\mu$ g/dose, 50  $\mu$ g/dose, 200  $\mu$ g/dose, 500  $\mu$ g/dose, 농도로 mouse에서 각각 쥐 3마리씩 3회 경구투여시 200  $\mu$ g/dose 이상에서만 항체가 형성되었다.

9-10일 간격으로 전(前)채혈, 1차 접종, 채혈, 2차 접종, 채혈, 3차 접종, 채혈을 실시하였다. 실험 결과 20  $\mu\text{g}/\text{dose}$ 에서는 투여양이 적어 뚜렷한 면역효과를 확인 할 수 없었으나, 상대적으로 순도가 높은 Sigma 제품에서 면역징후가 보였으며, 200  $\mu\text{g}/\text{dose}$ 에서는 sigma 제품과 inclusion body를 사용한 쥐에서 면역 징후가 나타났다.

이들 결과로 미루어 볼 때, 단언할 수는 없으나, 200  $\mu\text{g}/\text{dose}$ 이상을 주입할 경우 보다 확실한 면역 징후를 볼 수 있을 것이며, 다른 항원과 융합할 경우 보다 확실한 면역효과를 확인 할 수 있을 것으로 생각된다.(Table4)

Table 4. CTB 양에 따른 항체생성 효과

	20 $\mu\text{g}/\text{dose}$		50 $\mu\text{g}/\text{dose}$		200 $\mu\text{g}/\text{dose}$		500 $\mu\text{g}/\text{dose}$	
	접종전	접종후	접종전	접종후	접종전	접종후	접종전	접종후
CTB-sigma	0	0	0	0	0	5	0	8
CTB-inclusion body	0	0	0	0	0	1.5	0	7
정제 CTB	0	0	0	0	0	2	0	8

문헌에 의하면 Cholera toxin B subunit(CTB)를 감자에 발현시켜 1 g(30  $\mu\text{g}$ 의 CTB에 해당)의 transgenic 감자의 잎과 microtuber를 쥐에 먹었을 때 모두 항-CTB 항체가 형성되었으며 콜레라 독소를 중화시킬 수 있었다. 그러나 정제된 CTB를 경구 투여시는 많은 양의 항원이 필요한 이유는 음식물로 투여시보다 장내의 protease에 의하여 분해되어 효능이 감소되지 않나 사료된다.

#### 나. Inactivation cells를 이용한 항체형성효과

경구투여시 정제된 CTB를 투여해도 anti-CTB IgG가 형성되기 때문에 형질 전환 식물에서처럼 CTB가 쥐의 소화장에서 쉽게 분해되지 않게 하기 위해, 대장균에서(PET11a vector)에서 항원을 발현시키고 배양 후 formalin으로 불활화시켜 원심 분리 후 PBS buffer로 세척하였다. 불활화된 대장균을 세포 파쇄 후 발현된 CTB 농도를 SDS-PAGE로 확인하고, 정제된 CTB와 경구투여하여 비교하였으나 예상과는 다르게 표5 에서처럼 정제된 CTB를 경구투여 했을 때 항체형성 효과가 우수 하였으나, CTB를 생산한 대장균을 직접 투여했을 때에는 500  $\mu\text{gCTB}/\text{dose}$ 를 투여

하여도 항체 형성 효과가 미미하였다.

Table 5. Inactivation cells 을 이용한 항체형성효과

	200 $\mu$ gCTB/dose		500 $\mu$ gCTB/dose	
	접종전	접종후	접종전	접종후
CTB	0	3	0	7
CTB-inclusion body	0	2	0	6
CTB-inactivation cells	0	0	0	1

다. CTB-HBsAg를 이용한 항체형성효과

정제된 CTB와 *E. coli*-inclusion body로 얻어지는 CTB, CTB-HBsAg를 이용하여 각각의 경우에 있어 200  $\mu$ g/dose, 500  $\mu$ g/dose씩 두 가지 농도로 각각 10 수씩을 실험하였다. CTB 200  $\mu$ g/dose에서는 투여량이 적어 뚜렷한 면역효과를 확인 할 수 없었으나, 500  $\mu$ g/dose에서는 inclusion body를 사용한 쥐에서 면역 징후가 나타났다. 또한 CTB와 HBsAg로 융합시킨 CTB-HBsAg에서는 anti-CTB 항체를 생성하는 효과가 CTB 보다도 떨어지는 결과로 미루어 볼 때, 단언할 수는 없으나, HBsAg융합 단백질이 보다 안정하나 장내 세포내로 inclusion body가 흡수가 되지 않아 확실한 면역 징후를 볼 수 없었던 것 같다.

*E.coli*에서는 CTB, CTB-HBsAg inclusion body로 얻어나 효모 발현 system을 이용하면 active한 항원을 얻을 수 있어, 비록 대장균 발현 체계에 비교하여 발현양은 낮으나 *P. pastoris*에서 active CTB-HBsAg fusion 단백질을 발현하여, CTB-HBsAg 정제하지 않고 *P. pastoris* 세포 파쇄후 발현된 항원량을 SDS-PAGE상에서 계산하여 *P. pastoris* 세포 파쇄액을 직접 경구 투여하여도 항체 생성 효과를 관찰 할 수 없었다. 이는 HBsAg융합 단백질이 보다 안정하나 장내 세포내로 CTB-HBsAg fusion 단백질이 흡수가 되지 않아 확실한 면역 징후를 볼 수 없었던 것으로 사료된다.(Table 6)

Table 6. CTB-HBsAg 융합단백질을 이용한 항체형성효과

	200 $\mu$ g CTB/dose		500 $\mu$ g CTB/dose	
	접종전	접종후	접종전	접종후
정제 CTB	0	1	0	7
CTB-inclusion body	0	1	0	6
CTB-HBsAg inclusion body	0	0	0	7
CTB-HBsAg	0	1	-	-

라. mucosal immunity를 나타내는 조건검사 및 adjuvant를 이용하여 면역효과 개선.

아직 형질전환 식물에서 CTB 발현량이 낮아 동물시험에서 항체형성을 유발하기 위해서는 다량의 식물체를 섭취하여야 항체 생산이 가능하다. 형질전환 식물체를 쥐가 섭취해서 항체가 형성되는 조건을 인위적으로 확인하기 위해, *E. coli*에서 발현된 inclusion body CTB를 정제하지 않고 inclusion body CTB를 5번 washing buffer로 세척하고 SDS PAGE로 정제도를 확인한 결과 70% 이상을 나타냈다. 70% 이상 정제된 CTB를 쥐 먹이에 섞어 pellet를 만들고, 먹이로 섭취 시켜 형질전환 식물체를 섭취한 조건으로 예비실험을 수행 하였다. 삼육사료 pellet에 inclusion body CTB를 1M Urea에 녹여 20  $\mu$ g/pellet, 50  $\mu$ g/pellet, 200  $\mu$ g/pellet, 500  $\mu$ g/pellet, 1m g/pellet 농도로 각 군 당 30마리 씩 mouse에서 3주 간격으로 3회 먹여 쥐에서 심장 채혈 후 항체 형성을 확인하였다(Table 7). 또한 control 군으로 똑 같은 농도의 CTB를 2M Urea에 녹여 20  $\mu$ g, 50  $\mu$ g, 200  $\mu$ g, 500  $\mu$ g, 1mg를 500 $\mu$ l를 주사기를 이용하여 경구로 투여하였다. 각 군당 30마리 씩 mouse에서 2주 간격으로 3회 경구 투여 후 쥐에서 심장 채혈하여 항체 형성을 확인하였다.(Table 8)

Table 7 CTB 섭취 후 Anti-CTB 항체 형성

항원 농도	20 $\mu$ g/pellet	50 $\mu$ g/pellet	200 $\mu$ g/pellet	500 $\mu$ g/pellet	1mg/pellet
항체생성 마리수	-	-	2	15	25

Table 8 CTB 경구 투여 후 Anti-CTB 항체 형성

항원투여량	20 $\mu$ g	50 $\mu$ g	200 $\mu$ g	500 $\mu$ g	1mg
항체생성 마리수	-	-	3	18	27

CTB를 경구 투여했을 때가, 먹이로 섭취했을 때 보다 약간 높게 항체 생성 효과가 나타났다. 먹이로 CTB를 섭취하였을 때의 문제점은 쥐 개체당 일정량의 CTB를 섭취시키기가 어려운 문제점이 있으나, 형질전환 식물체를 먹이로 공급하면 오차가 줄고 더 높은 항체 생성 효과가 나타나리라 예측된다. Soluble CTB를 쥐에 경구 투여했을 때와 동일하게, inclusion body CTB도 200 $\mu$ g이상 투여했을 때만 anti-CTB항체를 형성하였다.

아직 형질전환 식물에서 CTB 발현량이 낮아 동물시험에서 항체형성을 유발하기 위해서는 다량의 식물체를 섭취하여야 항체 생산이 가능하다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 미생물에서 발현된 CTB를 쥐먹이에 섞어 cake를 만들어 섭취 시켰다.

Soluble CTB와 inclusion body CTB를 20  $\mu$ g/dose, 50  $\mu$ g/dose, 200  $\mu$ g/dose, 500  $\mu$ g/dose, 1mg/dose 농도로 mouse에서 3회 경구투여시 200  $\mu$ g/dose 이상에서만 항체가 형성되었다.

마. Cholera toxin B subunit-HBsAg 13 mer epitope생산 및 항체 형성 효과

Oral cholera vaccine과 B형 간염 백신을 개발하기 위하여 CTB를 *E. coli*에서 발현시켜 쥐에 경구투여하여 anti-CTB antiserum을 얻었으나, HBsAg나 CTB-HBsAg를 경구 투여 하였을 때는 anti-HBsAg나 anti-CTB antiserum이 형성되지 않았다. HBsAg나 CTB-HBsAg 항원자체가 거대 분자이기 때문에 장내

세포를 통과 못하거나 또는 CTB-HBsAg항원은 CTB에 HBsAg를 결합하여 구조 변화에 의하여 fusion된 항원이 CTB와 같지 않게 구조가 변화되어 장내 세포에 결합이 안되고 흡수가 되지 않아 항체가 형성되지 않는다고 사료된다.

Fusion된 CTB-HBsAg항원은 anti-HBsAg나 anti-CTB 항체가 형성되지 않기 때문에 CTB의 C-terminal에 이미 알려진 B형 간염 virus epitope를 연결하고 쥐에 경구 투여하여 B형 간염 항체와 cholera 항체가 동시에 형성되는지를 확인하였다.

CTB-HBsAg 13mer epitope peptide 항원을 pET11a vector에서 발현시켜 inclusion body로 회수하고 inclusion body CTB-HBsAg 13mer epitope 최대한 washing 하여 70% 이상의 정제도를 얻을 수 있었으며, CTB를 refolding하는 방법으로 active 항원으로 변환 시켰을 때 20%의 회수율로 soluble 단백질로 회수되었다. Soluble CTB-HBsAg 13mer epitope 항원을 쥐에 피하주사와 경구투여하여 anti-CTB 및 anti-HBsAg Ab 형성을 확인하였다.

#### 1). Anti-CTB-13mer 면역

항원을 PBS, 1M Urea에 녹여 500 µg/ml 농도로 제조하고 30마리 mouse에서 2주 간격으로 3회 쥐에 경구투여 후 심장 채혈하여 항체 형성을 확인하였고, 피하주사용으로는 항원을 PBS, 1M Urea에 녹여 0.5ml 200 µg CTB/ml과 0.5ml Freund adjuvant를 잘 섞어서 5마리 mouse에서 2주 간격으로 3회 피하투여 후 심장 채혈하여 항체 형성을 확인하였다. 또한 control 군으로 10 마리에 saline을 주사기를 이용하여 경구로 투여하였다. 3회 투여 하고 1주일 후 심장 채혈하였다.

#### 2). Anti-CTB, Anti-HBsAg 면역반응 확인

CTB-HBsAg 13mer epitope를 경구투여와 피하주사로 면역하여 anti-CTB, anti-HBsAg 항체 형성을 확인한 이유는 이미 HBsAg의 epitope로 알려진 peptide(TSTGPCKTCTPPA)를 CTB와 gene fusion하여 생성된 fusion 단백질에 epitope가 masking되어 anti-epitope 항체가 형성되지 않을 수 있기 때문에 동시에 피하와 경구투여 하여 anti-CTB, anti-HBsAg 항체 형성을 확인함으로써 CTB에 연결된 epitope가 CTB구조를 최대한 변화 시키지 않고 경구 투여시 anti-CTB 항체와 anti-HBsAg 항체가 형성 되게 함이다. anti-CTB, anti-HBsAg 항체 형성을 immunodiffusion, ELISA, Western blotting 방법으로 확인하였다.

#### 가) Immunodiffusion

경구투여와 피하주사로 형성된 항체를 확인하기 위하여 anti-CTB-13mer

antiserum를 CTB 과 HBsAg를 반응시켰으나 피하주사로 면역시킨 쥐에서 심장체 혈한 혈청에서는 immunoprecipitation를 확인할수 있었으나, 경구투여로 형성된 항체를 확인하기 위하여 anti-CTB-13mer antiserum를 CTB 과 HBsAg를 반응시켰으나 immunoprecipitation를 확인할수 없었다.

ELISA의 결과로 볼때 경구투여로 면역한 쥐에서 anti-CTB-13mer 항체가 낮아 CTB와 HBsAg의 항원 항체반응 효과가 나타나지 않았다고 사료된다.

#### 나) ELISA 방법으로 항체 형성 효과 확인

Coating antigen으로 100ng/ml 1  $\mu$ g/ml농도로 CTB(Sigma)와 HBsAg(녹십자 제조)를 96 well plate에 coating하고, 피하주사와 경구투여로 생산된 anti-CTB-HBsAg 13mer epitope antiserum을 100배에서부터 12,800 배까지 희석하여 well당 100  $\mu$ l 씩 가하여 항체 항원 반응을 검사하였다.

ELISA결과에 의하면 피하주사로 면역한 쥐에서 생산한 anti-CTB-HBsAg 13mer epitope antiserum 과 CTB, HBsAg를 반응시켰을 때 CTB와는 10000배 HBsAg와는 6000배 희석하여도 Elisa상에서 결과가 우수하였으나, 경구투여로 형성된 항체를 확인하기 위하여 anti-CTB-13mer antiserum을 CTB 과 HBsAg를 반응시킨 ELISA 결과는 HBsAg와 반응은 300배, CTB와는 400배 희석하여도 항원-항체 반응을 확인 할 수 있었다. 경구 투여시 항체 형성 효과가 떨어지고 적정 희석 배수는 400배 희석까지 항체 항원 반응을 관찰 할 수 있었다.

#### 다) Western blotting

Anti-CTB-HBsAg 13mer epitope antibody 가 CTB와 HBsAg 항원과 면역 반응을 확인하기 위하여 이를 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide 겔에 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 겔에 Coomassie 염색과 면역블롯팅을 수행하여 단백질의 발현 여부를 확인하였다.

HBsAg 는 녹십자에서 생산되고 있는 제품과 CTB는 *E. coli*에서 정제하였다. 피하주사로 면역하여 생산된 CTB-HBsAg 13mer epitope antiserum을 3000배 희석하여 western blotting 하였다. Western blotting의 결과로 anti-CTB-HBsAg 13mer peptide antibody가 HBsAg와 CTB에 모두 면역 반응을 나타냄을 확인하였다. (Fig 13)

이상의 결과에 의하면 CTB-HBsAg 13mer peptide를 식물 백신으로 개발하면 경구 투여로 cholera와 B형 간염을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

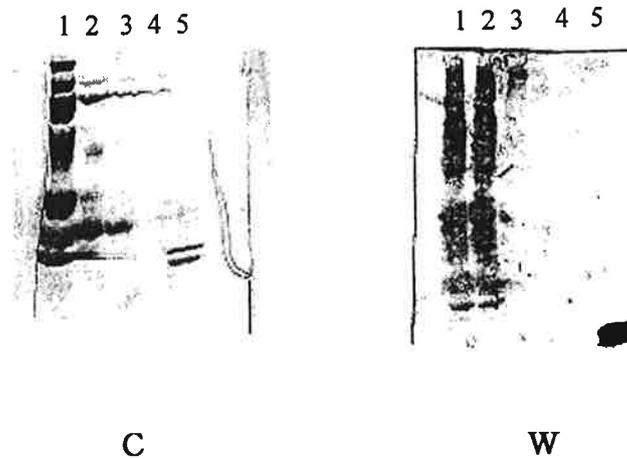


Fig 13 Anti-CTB-HBsAg-13mer epitope Ab 의 western Blotting 분석  
4-20% Gradient Gel

**C : Coomassie blue 염색**

1. Standard marker : 200k, 97.4k, 68k, 43k, 29k, 18.4k, 14.3k
2. HBsAg 5  $\mu$ g, 3. HBsAg 3  $\mu$ g, 4. HBsAg 1  $\mu$ g, 5. CTB 1  $\mu$ g,

**W : Western blotting**

1. HBsAg 5  $\mu$ g, 2. HBsAg 3  $\mu$ g 3. HBsAg 1  $\mu$ g
4. CTB 1  $\mu$ g 5. CTB 3  $\mu$ g

## 제 4 장 결 론

연구 개발 결과를 요약하면 다음과 같다.

- Cholera toxin B subunit 의 유전자와 B형 간염 표면 항원의 유전자를 *Vibrio cholerae* 및 B 형 간염 환자의 혈액에서 분리했고, cholera toxin B subunit는 미생물에서 발현시켜 정제 방법을 확립하였다.

- 미생물과 식물체에서 발현된 antigen을 확인하기 위해 anti-cholera toxin B subunit 와 HBV의 표면 항원에 대한 항체를 생산하는 hybridoma cell-line을 각각 14개와 5개를 얻어 항체를 생산하고 정제하였으며 또한 anti-CTB와 anti-HBsAg polyclonal antibody 를 생산하였다.

- B 형 간염 백신을 경구 투여용으로 개발하기 위해 B 형 간염 virus의 표면 항원의 epitope와 B subunit을 gene fusion 시키고 미생물에서 발현시키고, vaccine으로 mucosal immunity를 유도할 수 있는지를 동물실험을 통해 확인했다.

HBsAg 의 일부분의 peptide만 사용하여도 mucosal immunity가 있음이 증명되었다.

- 동물 실험을 통해 경구 vaccine 투여 시 항체가 생기는지를 확인할 수 있는 assay system을 개발하였다.

식물백신을 개발하기 위해 형질전환 식물체를 만들고 이를 섭취하여 mucosal immunity를 유도할 수 있는지를 동물실험을 통해 확인해야 한다. 그러나 형질전환 식물체에서 충분한 양의 항원이 발현되고 후대검정을 통하여 안정된 형질전환 식물체를 얻는데 장기간의 시험기간이 필요하므로, 미생물 발현 체계를 이용하여 백신을 생산하고, 항체를 이용하여 확인하고, 동물시험을 함으로써 mucosal 면역을 유도하는 조건을 개발하였다.

외국에서 CTB 형질전환 감자를 소량 섭취하여(30 $\mu$ g CTB에 해당) 항체가 형성되었으나 정제된 CTB를 경구 투여 시 많은 양의 CTB를 투여해야 anti-CTB가 형성되었다. 정제된 CTB를 경구투여 했을 때와 비교해서, 형질전환 감자를 소량 섭취해도 항체가 형성될 수 있는 원인은 미생물에서 분리된 정제 CTB가 식물체 조직 내에 있는 CTB와 비교해서 proteinase에 의해 쉽게 장에서 분해되고, 또한 식물체는 adjuvant로 알려진 saponine을 함유하고 있어 형질전환 식물체에서 발현된 백신은 소량으로도 백신 효과가 우수하다고 사료된다.

## 제 5 장 참고문헌

1. Tariq A. Haq, Hugh S. Mason, John D. Clements, Charles J. Arntzen, 1995. Oral Immunization with a Recombinant Bacterial Antigen Produced in Transgenic Plants, *Science* vol. 268: 714-716.
2. Gregory D. May, Rownak Afza, Hugh S. Mason, Alicja Wiecko, Frantisek J. Novak, and Charles J. Arntzen, 1995. Generation of transgenic Banana(*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-Mediated transformation, *Biotechnology* vol. 13:486-492.
3. Claude P. Muller, Philippe Beauverger, Francois Schneider, Gunther Jung and Nicolaas H. C. Brons, 1995. Cholera toxin B stimulates systemic neutralizing antibodies after intranasal co-immunization with measles virus, *J. of General Virology*. vol. 76:1371-1380.
4. Jan Holmgren, Nils Lycke and Cecil Czerkinsky, 1993. Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine*, Vol. 11:1179-1184.
5. Mark T. Dertzbaugh, Darrell L Peterson and Francis L. Macrina. 1990. Cholera toxin B-subunit gene fusion: Structural and Functional analysis of the Chimeric protein. *Infection and Immunology*, vol. 58:70-79.
6. Toufic O. Nashar, Tehmina Amin, Alessandro Marcello and Timothy R. Hirst. 1993. Current progress in the development of the B subunits of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as carriers for the oral delivery of heterologous antigens and epitopes. *Vaccine*, Vol. 11:235-240.
7. Patrick Laloi, Cindy L. Munro, Kevin R. Jones, and Francis L. Macrina. 1996. Immunologic characteristics of a *Streptococcus mutans* Glucosyltransferase B sucrose-binding site peptide-Cholera toxin B-subunit chimeric protein. *Infection*

and Immunity, vol. 64:28-36.

8. Charlotta Bergquist, Teresa Lagergard, Marianne Lindblad, and Jan Holmgren. 1995. Local and systemic antibody responses to dextran-Cholera toxin B subunit conjugates. Infection and Immunity, vol. 63:2021-2025.

9. Takeshi Arakawa, Daniel K.X. Chong and William H.R. Langridge 1998, Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine, Nature Biotechnology, vol. 16, 292-297

10. Anna Modelska, Bernard Dietzschold, N. Sleysh and Vidadi Yusibov 1998, Immunization against rabies with plant-derived antigen, Proc. Natl. Acad. Sci. U SA Vol. 95, 2481-2485

## 제 출 문

본 보고서를 “외래유전자 도입에 의한 vaccine 생산용 배추 개발에 관한 연구”(“형질전환 식물을 이용한 vaccine의 개발에 관한 연구“과제의 공동연구과제) 최종보고서로 제출합니다.

1999. 10. .

공동연구기관명 : 농업과학기술원

공동연구책임자 : 김 용 환

연 구 원 : 이 연 회

연 구 원 : 이 명 철

연 구 원 : 차 영 순

연 구 원 : 김 정 선

연 구 원 : 윤 도 원

연 구 원 : 이 강 섭

연 구 원 : 이 동 원

연 구 원 : 김 동 준

연 구 원 : 백 진 훈

## 요 약 문

### I. 제 목

외래유전자 도입에 의한 vaccine 생산용 배추 개발에 관한 연구

### II. 연구개발의 목적 및 중요성

유전공학기법을 이용한 유용유전자의 효율적인 식물체내 형질전환과 이들 유전자가 안정적으로 발현하는 식물종자의 획득은 식물생물공학을 연구하는 많은 연구자들의 목표이다.

현재 우리나라에서도 많은 연구소와 대학에서 이에 대한 연구를 수행 중에 있으며 이와 관련된 논문도 해마다 증가추세에 있다. 하지만 아직 우리나라의 유용유전자 탐색 및 유전자의 식물체내 형질전환 기술은 선진국에 비하여 낮은 수준이며, 특히 외래유전자가 안정적으로 발현하는 종자의 확보와 이를 이용한 품종의 개발은 시급한 과제이다.

따라서 본 연구는 우리나라 주요 채소작물인 배추를 기본식물로 이용하여 효율적인 유전자 전환 체계 확립과 vaccine유전자가 안정적으로 발현하는 종자를 확보하기 위해 수행되었다.

궁극적으로 배추에서 인간에게 치명적인 질병인 cholera나 B형 간염 vaccine을 경구용으로 투여하는 효율적인 먹는 vaccine의 개발은 본 실험의 가장 중요한 목적이다.

그리고 이러한 유전공학 기술의 실용화를 통한 vaccine생산용 배추의 개발은 기존의 주사용vaccine보다 훨씬 거부감이 줄어들 뿐 아니라 vaccine생산에 드는 노력과 비용도 혁신적으로 줄일 수 있게 되는 것이다. UR 협상타결이후 높아져 가는 농산물의 개방압력과 선진각국의 유전공학 관련 신작물의 특허확보 움직임 속에서 우리가 능동적으로 대처해 나가기 위해서는 최소한 우리나라 중요작물들에 대한 유전공학적 품종개발 기법을 확립시킬 필요가 있다.

지금 세계각국은 농업유전공학 산업 및 이를 이용한 중요산업의 특허획득에 의한 부가적인 이익증대를 추구하고 있으므로 우리도 이에 대한 대응책으로 농업유전공학의 중요한 기술인 식물형질전환기술의 체계화 및 실용화에 많은 노력을 기울여야

할 것이다.

### III 연구 개발 내용과 범위

- Vaccine을 생산하는 배추 및 양배추 품종을 개발하기 위하여, 쌍자엽에 유용한 식물발현vector pHGCTB 와 벼 등 단자엽작물에서 효율적으로 형질전환되어 발현할 수 있는 pSB11의 vector를 제작하였다.

서울배추의 자엽을 성장조절제의 조성이 상이한 MS 및 B<sub>5</sub>배지에 배양한 결과, 식물체 재분화율은 동일한 성장조절제 조건에서는 MS배지가 B<sub>5</sub>배지보다 높게 나타났다으며, 그중에서도 1 mg/L NAA와 5 mg/L kinetin 및 5 mg/L의 BA가 첨가된 MS배지에서 식물체 재분화율이 42%로 가장 높았다.

자엽조직으로 부터 재분화되는 식물체의 획득 빈도를 높이기 위하여 1 mg/L의 NAA와 여러가지 농도의 BA(2, 4, 6, 8, 10 mg/L) 및 kinetin(2, 4, 6, 8, 10 mg/L) 이 첨가된 10종류의 재분화 배지에 파종후 5일된 배추의 자엽을 배양한 바(그림 5, 6), kinetin을 함유한 배지에서 보다는 BA가 첨가된 배지에서 재분화율이 높게 나타났다으며 BA의 농도가 4mg/L일 때 63%의 가장 높은 식물체 재분화율을 나타내었다.

엽병이 부착된 배추의 자엽으로부터 식물체가 재분화되는 양상을 조직학적으로 관찰하여 본 결과, 엽병의 절단면에서 처음에는 아무런 반응도 일어나지 않았으나, 배양 3일 후 부터는 잘린 조직주위에서 세포분열이 왕성하게 일어남을 관찰할 수 있었고, 배양 7일 후에는 심장형의 shoot primordia를 형성하였으며, 배양 20여일 후에는 정상적인 재분화개체가 출현하였다.

형질전환된 배추에 원하는 유전자가 정확히 삽입되었는지를 알아보기 위해서 Hgromycin 유전자를 기준으로 21mer크기의 2개의 primer를 제작하였다. primer 1 은 5'-AgC CTg ACC TAT TgC ATC TCC-3'이고 primer 2는 5'-TgT CCG TCA ggA CAT TgT Tgg-3'이었다. 이를 토대로 PCR을 수행한 결과 형질전환 배추에 hgromycin 유전자와 cholera toxin B subunit유전자가 형질전환 되었음을 확인하였다.

그리고 이들 얻어진 형질전환 배추로부터 자식종자를 얻어 이들 개체의 후대유전 양상을 조사하기 위하여 형질전환 종자와 control종자를 hygromycin이 들어간 종자 파종배지에서 발아실험을 수행한 결과, 형질전환배추의 종자들은 항생제 배지에서 대부분이 발아를 하는데 비하여 형질전환 되지 않은 종자들은 발아하지 못하는 경향을 나타내었다.

따라서 본 실험을 통하여 배추의 효율적인 조직배양 및 유전자전환 체계를 확립할 수 있었으며 vaccine유전자가 전환된 배추를 획득하였다.

양배추에서는 배축조직을 *Agrobacterium*으로 접종 후 하이그로마이신이 있는 배지에 치상 후 1주일 마다 배지를 교환하면서 배양하였다. 4-6주 정도 후에 배축조직으로부터 shoot와 함께 캘러스가 형성되었다. 주로 shoot보다는 캘러스 형성이 높았다. 형성된 캘러스는 2차 재분화배지에서 shoot로 재분화되었다. 재분화된 shoot는 성장조절제가 없는 MS배지에서 뿌리를 유기시킨후 순화시켜 토양으로 이식하여 온실에서 재배하였다. 형질전환체 양배추 줄기의 지름이 약 1cm 정도 될 때까지 키운후 4℃에서 약 90일정도 저온처리한 후 온실에서 재배하였다. 약 2-3주 정도 후에 추대가 시작되어 T<sub>1</sub> 종자를 얻기위해서 내수분을 하였다. 배축조직으로부터 형질전환된 캘러스 형성률은 30-50%로 높았으나 온실에서 재배된 완전한 형질전환체가 되는 실제적인 형질전환율은 3-6% 이었다. 이렇게 해서 총 54개체의 완전한 형질전환체를 얻을 수 있었다. 형질전환체 분석은 총 54 개체에 대해서 CTB 유전자가 완전히 genome상으로 도입되었는지를 Southern 분석을 하여 확인하였다. 전달된 T-DNA 상에 제한 효소 HindIII site는 하나이므로 이 효소로 DNA를 절단하여 CTB 유전자로 hybridization하여 나온 밴드수로서 도입된 유전자의 수를 알 수 있었다. 그 결과 형질전환시키지 않은 control 양배추에서는 밴드가 나타나지 않았고 형질전환 개체들에서는 CTB 유전자가 1-5 copy로 다양하게 genome상에 삽입되었다는 것을 확인하였다.

T<sub>1</sub> 세대종자 확보는 CTB 유전자 도입이 확인된 총54 개체 중에서 35개체에서 종자를 얻을 수 있었다. 종자 수확량은 개체에 따라 적게는 1립부터 100립이상 정도로 변이가 심하게 나타났다. 이들 개체들에 대한 하이그로마이신 저항성의 후대 분석 결과 멘델법칙에 따른 3:1의 분리비를 나타낸 개체는 10개체였고 나머지는 비정상적인 분리비를 나타내었다. T<sub>1</sub> 식물체를 CTB 유전자 primer로 PCR 분석을 하여 본 결과 백신 유전자의 0.3kb 위치에서 DNA 밴드가 형성되었다. 이것으로 양배추에는 백신 유전자가 후대로 안정적으로 유전된다는 것이 확인되었다.

- 벼의 경우 C6-1, C6-도입되지 않았고 C1, C2-1, C2-2, C3, C5, C9, C11, C12, C14 line에서 1개, 2, C8 line에서 2개, C4, C7 line에서 3개, C13 line에서 4개의 CTB 유전자가 되었음을 확인할 수 있었다. 13개의 line에서 도입 유전자를 확인하였고 벼로 백신유전자를 도입한 결과 15개의 line중에서 2개의 line만 유전자가 도

입된 유전자수는 다양함을 확인할 수 있었다. 또한 2-1과 2-2, 6-1과 6-2는 각각 동일 callus에서 재분화된 식물체로서 같은 pattern을 나타내는 것으로 보아 동일 callus에서 재분화한 여러 개의 식물체는 모두 같은 형태로 형질전환 되었음을 알 수 있었다. 35 line에서 종자가 맺혔고 28%의 불임이 있었음을 확인하였다. T<sub>1</sub>종자는 20립부터 100립까지 다양하였다.

## SUMMARY

Tissue culture system and transformation system of cabbage were established. Using these technologies, cabbage was transformed with the gene for the vaccine. It was demonstrated that the gene was stably inserted into the chromosom of cabbage.

Total 54 transformants that had the gene were identified. It was demonstrated using southern blot that each transformants had from one to five copies of the gene in the chromosom. But It was observed using northern blot that the expression level of the gene in each transformants were different. Usually the transformants that have more gene copies in the chromosom produced more protein. However, it could be observed that the transformant that had only one copy gene produced the protein in the high level. T1 seeds for the transformants were obtained using autopollination. T1 seeds had from one leaf to 100 leaves variouly. Until now, seeds for 35 transformants among 54 transformants could be obtained. Among transformants, Mendel's law could be applied to some ones, but not others. Using PCR analysis of T1 cabbage, it could be concluded that the gene was inserted into the chromosom and the inserted gene was stably inherited to the next generations.

When rice plant was tranformed with the gene, only 2 lines among 15 lines did not have the gene in the chromosom. It was observed that C1, C2-1, C2-2, C3, C5, C9, C11, C12 and C14 lines had one coly gene in the chromosom, C6-1, C6-2and C8 lines had two copies, C4 and C7 lines had three copies and C13 line had 4 copies. The inserted gene in the 13 lines chromosom was detected and the gene copy number was various. Line pairs of C2-1 and C2-2, or C6-1 and C6-2 were redivided from single callus and showed the same pattern. Therefore it could be thought that many plants redivided from single callus were transformed into same pattern. Seed came into bearing in 35 lines and 28

## CONTENTS

1. Title .....	72
2. Introduction .....	72
3. Material and Method .....	77
4. Results .....	89
5. Discussion .....	107
6. References .....	108

# 목 차

제 1 장 연구제목 .....	72
제 2 장 서 론 .....	72
제 1절 연구개발의 목적 및 중요성 .....	73
제 2절 연구개발의 내용과 범위 .....	74
제 3 장 재료 및 방법 .....	77
제 1절 Vaccine 유전자 : Cholera Toxin B - subunit (CTB) .....	77
제 2절 식물재료 .....	80
제 3절 식물의 조직배양 및 형질전환 .....	81
제 4 장 결과 및 고찰 .....	89
제 1절 배추에 있어서 AgNO <sub>3</sub> 의 효과 및 품종간 재분화능력 .....	89
제 2절 CTB유전자 전환작물 개발 .....	93
제 5 장 결론 .....	107
제 6 장 참고문헌 .....	108

# 제 1 장 연구제목: 외래유전자 도입에 의한 vaccine 생산용 배추 개발

## 제 2 장 서론

지금까지의 vaccine생산 방법은 동물세포배양 또는 yeast나 bacteria를 이용하여 재조합 vaccine을 생산하는 방법을 사용하였다. 이러한 방법으로 vaccine을 생산할 경우 vaccine 생산에 많은 장비와 노력이 들것이다. 본 연구는 보다 간편하고 안정적인 방법으로 vaccine을 생산하고 이를 쉽게 인체에서 발현시킬 수 있는 방법을 개발하기 위하여 수행되었다.

먼저 배추에 대한 유전자 전환 시스템을 확립하고 이를 바탕으로 vaccine유전자를 식물체에 유전자 전환하여 vaccine 유전자를 생산하는 새로운 식물체를 개발하고자 이와 관련된 여러가지 실험을 수행하였다.

배추는 동북아시아에서 중요한 채소작물로 널리 재배되고 있을뿐만 아니라, 특히 우리나라에서는 김치의 주원료로 널리 사용되고 있다. 지금까지 배추의 조직배양은 다른 Brassica속 식물에 비해 배양효율이 매우 낮은 것으로 알려져 왔으며 이에대한 연구성과도 매우 저조하였다. 1990년이후 약, 자엽, 배축, 엽절편 등 여러조직으로부터 재분화 식물체를 얻었으나 그 效率은 그다지 높지 못하였다. 하지만 최근에 배지조성, 성장조절제의 조성, 에틸렌억제제의 첨가 등과 같은 연구결과가 보고되면서 과거보다는 배양효율이 개선되고 있으나 아직 배추의 조직배양 효율은 매우 낮은 실정이다. 따라서 본 실험에서는 먼저 배추의 자엽과 배축조직을 이용하여 보다 높은 재분화식물체를 획득할 수 있는 조건을 구명하고자 배추 조직배양 시 배지 및 성장조절제의 영향, 에틸렌억제제(AgNO<sub>3</sub>)의 효과, 적정품종 및 explant의 선발 등과 같은 일련의 연구를 수행하였다. 그리고 이를 바탕으로 vaccine유전자를 배추에 형질전환 하고자 vaccine유전자를 지닌 식물발현용 벡터 제작, 배추의 형질전환 체계 확립, 그리고 이들 형질전환 배추에 대한 분자생물학적 검정 등과같은 일련의 연구를 수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

한편 양배추(*Brassica oleracea* ssp. *capitata*)의 경우에도 배추에서 얻어지는 기초자료를 배경으로 CTB유전자를 전환하였으며, 벼의 경우 잘 정립된 형질전환 체계를 이용함으로써 식물로부터 CTB단백질을 대량생산할 수 있는 모델 시스템으로

활용할 수 있는 가능성을 제시하고자 본 실험을 수행하였다.

## 제 1절. 연구개발의 목적 및 중요성

유전공학기법을 이용한 유용유전자의 효율적인 식물체내 형질전환과 이들 유전자가 안정적으로 발현하는 식물종자의 획득은 식물생물공학을 연구하는 많은 연구자들의 목표이다.

현재 우리나라에서도 많은 연구소와 대학에서 이에 대한 연구를 수행중에 있으며 이와 관련된 논문도 해마다 증가추세에 있다. 하지만 아직 우리나라의 유용유전자 탐색 및 유전자의 식물체내 형질전환 기술은 선진국에 비하여 낮은 수준이며, 특히 외래유전자가 안정적으로 발현하는 종자의 확보와 이를 이용한 품종의 개발은 시급한 과제이다.

따라서 본 연구는 우리나라 주요 채소작물인 배추를 기본식물로 이용하여 효율적인 유전자 전환 체계 확립과 vaccine유전자가 안정적으로 발현하는 종자를 확보하기 위해 수행되었다.

궁극적으로 배추에서 인간에게 치명적인 질병인 cholera나 B형 간염 vaccine을 경구용으로 투여하는 효율적인 먹는 vaccine의 개발은 본 실험의 가장 중요한 목적이다.

그리고 이러한 유전공학 기술의 실용화를 통한 vaccine생산용 배추의 개발은 기존의 주사용vaccine보다 훨씬 거부감이 줄어들 뿐 아니라 vaccine생산에 드는 노력과 비용도 혁신적으로 줄일수 있게 되는 것이다. UR협상타결이후 높아져가는 농산물의 개방압력과 선진각국의 유전공학 관련 신작물의 특허확보 움직임 속에서 우리가 능동적으로 대처해 나가기 위해서는 최소한 우리나라 중요작물들에 대한 유전공학작 품종개발 기법을 확립시킬 필요가 있다.

지금 세계각국은 농업유전공학 산업 및 이를 이용한 종묘산업의 특허획득에 의한 부가적인 이익증대를 추구하고 있으므로 우리도 이에 대한 대응책으로 농업유전공학의 중요한 기술인 식물형질전환기술의 체계화 및 실용화에 많은 노력을 기울여야 할 것이다.

## 제 2절. 연구개발의 내용과 범위

### 1. 배추

vaccine을 생산하는 배추 및 양배추 품종을 개발하기 위하여, 쌍자엽에 유용한 식물발현vector pHGCTB와 벼 등 단자엽작물에서 효율적으로 형질전환되어 발현할 수 있는 pSB11의 vector를 제작하였다.

서울배추의 자엽을 성장조절제의 조성이 상이한 MS 및 B<sub>5</sub>배지에 배양한 결과, 식물체 재분화율은 동일한 성장조절제 조건에서는 MS배지가 B<sub>5</sub>배지보다 높게 나타났으며, 그중에서도 1 mg/L NAA와 5 mg/L kinetin 및 5 mg/L의 BA가 첨가된 MS배지에서 식물체 재분화율이 42%로 가장 높았다.

자엽조직으로 부터 재분화되는 식물체의 획득 빈도를 높이기 위하여 1 mg/L의 NAA와 여러가지 농도의 BA(2, 4, 6, 8, 10 mg/L) 및 kinetin(2, 4, 6, 8, 10 mg/L)이 첨가된 10종류의 재분화 배지에 파종후 5일된 배추의 자엽을 배양한 바(그림 5, 6), kinetin을 함유한 배지에서 보다는 BA가 첨가된 배지에서 재분화율이 높게 나타났으며 BA의 농도가 4mg/L일 때 63%의 가장 높은 식물체 재분화율을 나타내었다.

엽병이 부착된 배추의 자엽으로부터 식물체가 재분화되는 양상을 조직학적으로 관찰하여 본 결과, 엽병의 절단면에서 처음에는 아무런 반응도 일어나지 않았으나, 배양 3일후 부터는 잘린 조직주위에서 세포분열이 왕성하게 일어남을 관찰할 수 있었고, 배양 7일 후에는 심장형의 shoot primordia를 형성하였으며, 배양 20여일 후에는 정상적인 재분화개체가 출현하였다.

형질전환된 배추에 원하는 유전자가 정확히 삽입되었는지를 알아보기 위해서 Hgromycin 유전자를 기준으로 21mer크기의 2개의 primer를 제작하였다. primer 1은 5'-AgC CTg ACC TAT TgC ATC TCC-3'이고 primer 2는 5'-TgT CCg TCA ggA CAT TgT Tgg-3'이었다. 이를 토대로 PCR을 수행한 결과 형질전환 배추에 hgromycin 유전자와 cholera toxin B subunit유전자가 형질전환 되었음을 확인하였다.

그리고 이들 얻어진 형질전환 배추로부터 자식종자를 얻어 이들 개체의 후대유전 양상을 조사하기 위하여 형질전환 종자와 control종자를 hygromycin이 들어간 종자 파종배지에서 발아실험을 수행한 결과, 형질전환배추의 종자들은 항생제 배지에서 대부분이 발아를 하는데 비하여 형질전환 되지 않은 종자들은 발아하지 못하는 경향을 나타내었다.

따라서 본 실험을 통하여 배추의 효율적인 조직배양 및 유전자전환 체계를 확립할 수 있었으며 vaccine유전자가 전환된 배추를 획득하였다.

## 2. 양배추

양배추 배축조직을 *Agrobacterium*으로 접종 후 하이그로마이신이 있는 배지에 치상 후 1주일 마다 배지를 교환하면서 배양하였다. 4-6주 정도 후에 배축조직으로부터 shoot와 함께 캘러스가 형성되었다. 주로 shoot보다는 캘러스 형성률이 높았다. 형성된 캘러스는 2차 재분화배지에서 shoot로 재분화 되었다. 재분화된 shoot는 성장조절제가 없는 MS배지에서 뿌리를 유기시킨후 순화시켜 토양으로 이식하여 온실에서 재배하였다. 형질전환체 양배추 줄기의 지름이 약 1cm 정도 될 때까지 키운후 4℃에서 약 90일정도 저온처리한 후 온실에서 재배하였다. 약 2-3주 정도 후에 추대가 시작되어 T<sub>1</sub> 종자를 얻기위해서 내수분을 하였다. 배축조직으로부터 형질전환된 캘러스 형성률은 30-50%로 높았으나 온실에서 재배된 완전한 형질전환체가 되는 실제적인 형질전환율은 3-6% 이었다. 이렇게 해서 총 54개체의 완전한 형질전환체를 얻을 수 있었다. 형질전환체 분석은 총 54 개체에 대해서 CTB 유전자가 완전히 genome상으로 도입되었는지를 Southern 분석을 하여 확인하였다. 전달된 T-DNA 상에 제한 효소 HindIII site는 하나이므로 이 효소로 DNA를 절단하여 CTB 유전자로 hybridization하여 나온 밴드수로서 도입된 유전자의 수를 알 수 있었다. 그 결과 형질전환시키지 않은 control 양배추에서는 밴드가 나타나지 않았고 형질전환 개체들에서는 CTB 유전자가 1-5 copy로 다양하게 genome상에 삽입되었다는 것을 확인하였다.

T<sub>1</sub> 세대종자 확보는 CTB 유전자 도입이 확인된 총54 개체 중에서 35개체에서 종자를 얻을 수 있었다. 종자 수확량은 개체에 따라 적게는 1립부터 100립이상 정도로 변이가 심하게 나타났다. 이들 개체들에 대한 하이그로마이신 저항성의 후대 분석 결과 멘델법칙에 따른 3:1의 분리비를 나타낸 개체는 10개체였고 나머지는 비정상적인 분리비를 나타내었다. T<sub>1</sub> 식물체를 CTB 유전자 primer로 PCR 분석을 하여 본 결과 백신 유전자의 0.3kb 위치에서 DNA 밴드가 형성되었다. 이것으로 양배추에는 백신 유전자가 후대로 안정적으로 유전된다는 것이 확인되었다.

## 3. 벼

C6-1, C6-도입되지 않았고 C1, C2-1, C2-2, C3, C5, C9, C11, C12, C14 line에서 1개, 2, C8 line에서 2개, C4, C7 line에서 3개, C13 line에서 4개의 CTB 유전자가

되었음을 확인할 수 있었다. 13개의 line에서 도입 유전자를 확인하였고 비로 백신 유전자를 도입한 결과 15개의 line중에서 2개의 line만 유전자가 도입된 유전자수는 다양함을 확인할 수 있었다. 또한 2-1과 2-2, 6-1과 6-2는 각각 동일 callus에서 재분화된 식물체로서 같은 pattern을 나타내는 것으로 보아 동일 callus에서 재분화한 여러 개의 식물체는 모두 같은 형태로 형질전환 되었음을 알 수 있었다. 35 line에서 종자가 맺혔고 28%의 불임이 있었음을 확인하였다. T<sub>1</sub>종자는 20립부터 100립까지 다양하였다.

### 제 3 장 재료 및 방법

#### 제 1절. Vaccine 유전자 ; Cholera Toxin B-subunit (CTB)

분양받은 cholera toxin B subunit를 염기서열 분석하여 NCBI에 등록된 VCTOX(sequence ID = K01170)과 비교한 결과 동일한 것으로 판명되었다. 따라서 염기서열 분석결과를 토대로 하여 2개의 primer (Pf/Pr)를 제작하였으며, PCR을 실시하여 CTB를 증폭시켰다.

Pf ; 5' aa ccatgg cc acacct caaaata ttactga 3' (30mer) ( $T_m = 69.4 \text{ }^\circ\text{C}$ )

NcoI

Pr ; 5' ga gcggccgc cagtgtga 3' (18mer) ( $T_m = 69.6 \text{ }^\circ\text{C}$ )

NotI

##### 1. 배추, 양배추용 운반체 제작

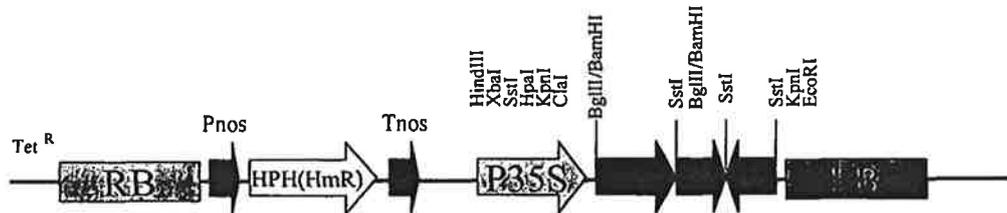


Fig. 1. Restriction map of vector(pHBCTB) for CTB gene transformation in cabbage.

##### 2. 벼 형질전환용 운반체 제작 및 도입

###### 가. 형질전환용 운반체 제작

CTB gene 이 들어있지 않은 pSK-RTG를 이용하여 pSK-RTC를 제작하였다. 또한 pSK-RTC를 이용하여 Intermediate vector인 pSBRTC-MAR(pSB11)를 제작하였다 (그림2).

사용된 기본적인 운반체는 pSB11 및 *Agrobacterium* LBA4404(pSB1)인데, 이 운반체의 특징은 acceptor vector인 pSB1은 *Agrobacterium*뿐만 아니라 *E. coli*에서도 복제할 수 있는 복제 origin을 가지고 있으며 tetracycline 저항성 유전자를 포함하고 Vir B, C, G를 과량 발현하도록 고안된 운반체이며 intermediate vector pSB11은 *E.coli*에서만 복제할 수 있는 복제 origin을 가지고 있고 spectinomycin 저항성 유전자를 포함하며 유용 유전자를 도입시킬 수 있는 left border 및 right border를 가지고 있고 super binary 운반체 시스템으로써 CTB 유전자는 pSB11의 left border와 right border내에 제작되었으며, 제초제 저항성 유전자인 bar 유전자가 이 운반체내에 35S promoter에 연결되어 있다.

#### 나. 제작 운반체의 *Agrobacterium*내로의 도입

벼 핵형질전환용 운반체의 *Agrobacterium*내로의 도입은 intermediate vector (pSBRTC-MAR)를 가지고 있는 *E.coli* DH5 $\alpha$ 와 acceptor vector(pSB1)를 가지고 있는 *Agrobacterium* LBA4404사이에 pRK2013을 가지고 있는 conjugal strain인 *E.coli* HB101을 통해 운반체를 전달하는 triparental mating 방법으로 수행하였다. 먼저 3일간 키운 pSB1(LBA4404)과, 1일 키운 pRK2013(HB101), pSBRTC-MAR(DH5 $\alpha$ )를 Nutrient-agar 배지의 중앙에 negative control로 pSB1과 pSBRTC-MAR를, 주위로 등글게 pSB1, pRK2013, pSBRTC-MAR의 순서로 5~7개의 spot을 만들어 spreading 하였다. 28 $^{\circ}$ C에서 1일 키운 후, ABST 액체배지 1ml에 녹였다. 이를 각각 ABST 고체배지에 도말하여 28 $^{\circ}$ C에서 3일동안 키운 후 2번의 계대배양을 통하여 purify하여 single colony를 확보하고, *Agrobacterium*내로 도입시킨 후 co-integration을 확인하는 실험을 실시하였다.

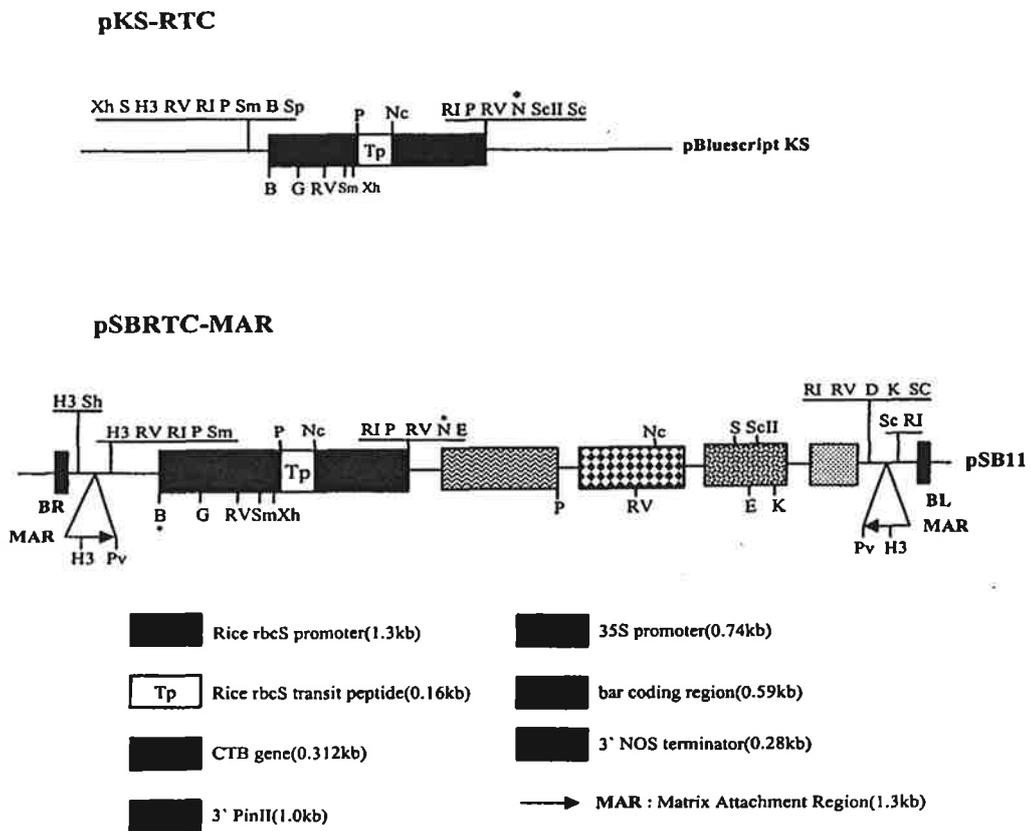


Fig. 2. Restriction map of vector for CTB gene transformaton in rice

## 제 2절. 식물재료

### 1. 배추

본 실험에 사용된 배지는 주로 MS 및 B<sub>5</sub>배지를 이용하였고 식물생장조절제는 BA, NAA, 2,4-D, kinetin, IBA, zeatin, GA<sub>3</sub> 등을 이용하였다.

공시품종은 “서울배추”의 14품종으로 이들 배추의 종자를 70 % ethanol에서 30 초, 50 % Rox 용액에서 20분간 침지 살균한 후 멸균수로 3-4회 세척하여 3 % sucrose와 0.8 % agar를 함유한 MS배지에 파종하여 25℃, 1일 16시간 명상태로 배양하였다. 무균배양 5일후 자엽을 엽병이 2 mm정도 부착된 상태로 절단하거나 하배축을 1 cm크기로 잘라 조직배양 시료로 사용하였다.

배추의 조직배양 조건을 확립하기 위하여 먼저 기본배지로 MS배지와 B<sub>5</sub>배지를 사용하고 BA, NAA, 2,4-D, kinetin, IBA, zeatin, GA<sub>3</sub>등이 여러가지 농도로 혼용된 14종류의 재분화 배지에 자엽을 50~100개씩 치상하여 25℃, 명상태로 배양하였다. 재분화배지의 성장조절제 조성이 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 NAA 1 mg/L과 BA 2, 4, 6, 8, 10 mg/L 또는 kinetin 2, 4, 6, 8, 10 mg/L이 첨가된 10종류의 MS재분화 배지에 자엽을 배양하였고 성장조절제 조성별 재분화율을 조사하였다.

에틸렌 생합성 억제제인 AgNO<sub>3</sub>가 배추 하배축으로부터 식물체 분화에 미치는 영향을 조사하고자 파종후 5일동안 무균배양된 하배축을 NAA(1 mg/L)와 BA(4 mg/L)가 첨가되고 0~5 mg/L의 AgNO<sub>3</sub>를 함유한 MS배지에 배양하여 각 처리별 식물체 재분화율을 조사하였다.

배추의 품종별 재분화률을 알아보기 위하여 “서울배추”의 14품종의 자엽을 NAA(1 mg/L)와 BA(4 mg/L)가 첨가된 MS배지에 배양하여 품종간 식물체 재분화율을 조사하였다.

재분화된 식물체는 성장조절제가 첨가되지 않은 MS배지로 이식하여 뿌리를 유기하였으며 약 3주후 뿌리가 유기된 식물체를 peat moss, vermiculite, ferrite가 1:1:1로 혼합한 상토로 옮겨 순화시킨 후 포장으로 이식하였다.

### 2. 양배추

본 실험에 사용된 양배추는 F1 hybrid 종자를 사용하였다. 종자를 70% 에탄올에서

1분 처리한 후 50% 락스(유한락스)에서 15-20분 동안 흔들어 주면서 표면살균하였다. 락스 처리 후 멸균수로 5 번 정도 세척한 후 생장조절제가 첨가되지 않은 MSO (MS 기본배지 + 3% sucrose + 0.8% T.C.agar)배지에 치상하였다. 치상된 종자를 광상태의 배양실에서 6-7일 정도 발아시킨 후 자엽과 생장점을 제거하고 배측조직을 0.5cm 크기로 잘라서 형질전환 재료로 사용하였다. 배측조직을 균에 감염시키기 전에 shoot 재분화배지에서 1일동안 전배양하였다

### 3. 벼

*Agrobacterium*을 매개체로한 벼 핵형질전환에 필요한 재료로서는 scutellum으로부터 유기된 캘러스가 가장 효율적인것으로 알려져 있다. 따라서 scutellum으로부터 캘러스를 유기하기 위하여 벼 품종으로는 낙동벼(*Oryza sativa*, cv Nakdongbyo)를 사용하였다.

## 제 3절. 식물의 조직배양 및 형질전환

### 1. 배추

서울배추의 파종후 5일된 자엽을 엽병이 약 2 mm 정도 부착된 상태로 절단하여 생장조절제의 조성이 상이한 MS 및 B<sub>5</sub>배지에 배양한 결과(그림 3,4), 식물체 재분화율은 동일한 생장조절제 조건에서는 MS배지가 B<sub>5</sub>배지보다 높게 나타났으며, 그 중에서도 1 mg/L NAA와 5 mg/L kinetin 및 5 mg/L의 BA가 첨가된 MS배지에서 식물체 재분화율이 42%로 가장 높았다. Narashimhulu와 Chopra도 배추 자엽의 재분화시 MS배지가 B<sub>5</sub>배지보다 효과적이었다고 하여 기본배지면에서 본 실험의 결과와 일치되었다.

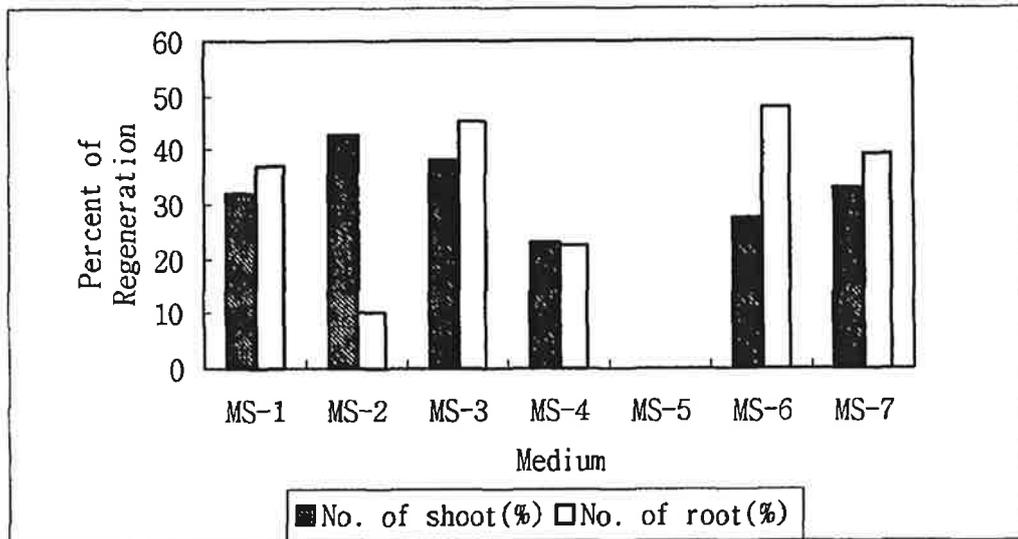


Fig. 3. Shoot and root regeneration from cotyledon tissues of *B. campestris* ssp. *pekinensis* on MS media with different hormone combination.

MS medium: MS basal medium + 30 g/L sucrose + 8 g/L agar.

MS - 1: MS + 3 mg/L IBA + 10 mg/L BA.

MS - 2: MS + 1 mg/L NAA + 5 mg/L kinetin + 5 mg/L BA.

MS - 3: MS + 3 mg/L IBA + 5 mg/L kinetin.

MS - 4: MS + 3 mg/L IBA + 10 mg/L BA + 0.5 mg/L GA<sub>3</sub>.

MS - 5: MS + 3 mg/L IBA + 10 mg/L BA + 0.5 mg/L 2,4-D.

MS - 6: MS + 1 mg/L NAA + 4 mg/L zeatin.

MS - 7: MS + 1 mg/L NAA + 6 mg/L zeatin.

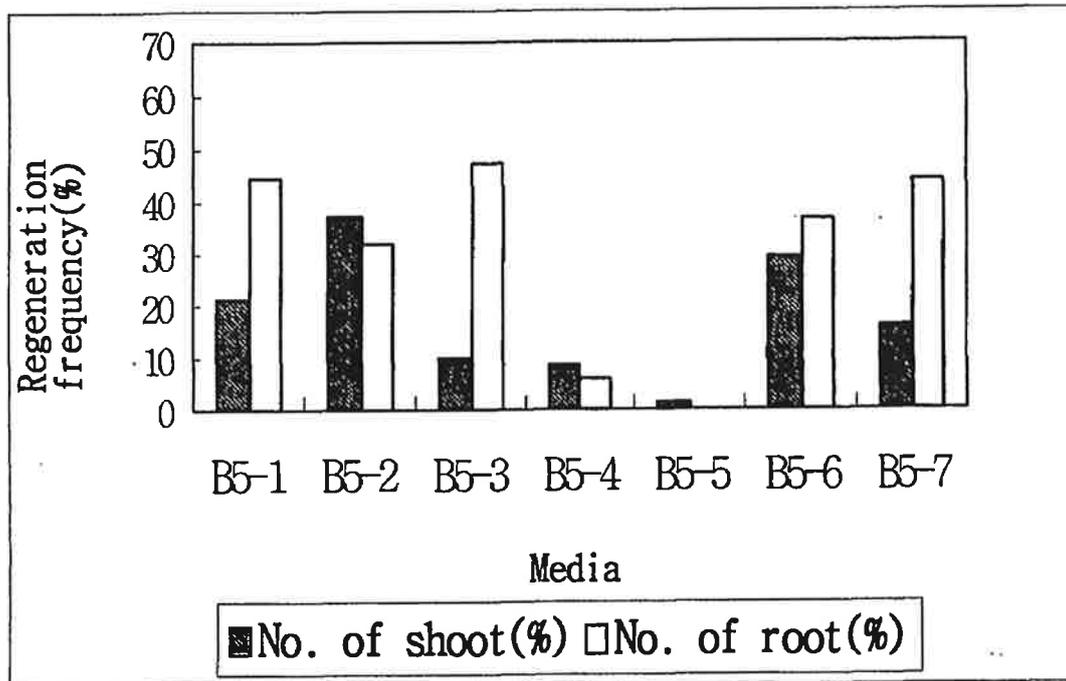


Fig. 4. Shoot and root regeneration from cotyledon tissue of *B. campestris* ssp.

*pekinensis* on B<sub>5</sub> media with different hormone combination..

B<sub>5</sub> medium: B<sub>5</sub> basal medium + 30 g/L sucrose + 8 g/L agar.

B<sub>5</sub> - 1: B<sub>5</sub> + 3 mg/L IBA + 10 mg/L BA.

B<sub>5</sub> - 2: B<sub>5</sub> + 1 mg/L NAA + 5 mg/L kinetin + 5 mg/L BA.

B<sub>5</sub> - 3: B<sub>5</sub> + 3 mg/L IBA + 5 mg/L kinetin.

B<sub>5</sub> - 4: B<sub>5</sub> + 3 mg/L IBA + 10 mg/L BA + 0.5 mg/L GA<sub>3</sub>.

B<sub>5</sub> - 5: B<sub>5</sub> + 3 mg/L IBA + 10 mg/L BA + 0.5 mg/L 2,4-D.

B<sub>5</sub> - 6: B<sub>5</sub> + 1 mg/L NAA + 4 mg/L zeatin.

B<sub>5</sub> - 7: B<sub>5</sub> + 1 mg/L NAA + 6 mg/L zeatin.

자엽조직으로 부터 재분화되는 식물체의 획득 빈도를 높이기 위하여 1 mg/L의 NAA와 여러가지 농도의 BA(2, 4, 6, 8, 10 mg/L) 및 kinetin(2, 4, 6, 8, 10 mg/L) 이 첨가된 10종류의 재분화 배지에 파종후 5일된 배추의 자엽을 배양한 바(그림 5, 6), kinetin을 함유한 배지에서 보다는 BA가 첨가된 배지에서 재분화율이 높게 나타났으며 BA의 농도가 4mg/L일 때 63%의 가장 높은 식물체 재분화율을 나타내었다. 이는 *B. juncea*의 조직배양에서 BA가 Zeatin, 2-ip 및 kinetin보다 효과적이었다고 한 Sharma등과 Chi등의 연구결과 및 유채의 자엽배양에서 BA가 효과적이었

다고 한 Ono등의 연구결과와 BA효과면에서 비슷한 경향이었고, 본 연구에서 1 mg/L의 NAA와 4 mg/L의 BA가 혼용되었을 때 가장 높은 식물체 재분화율을 나타내었는데, 이 결과는 배추조직배양에서 NAA와 BA를 혼용하는 것이 효과적이었다고 한 Hachey등과 Yoon등의 연구결과와 유사하였지만 이들이 밝힌 NAA와 BA의 적정농도는 본 연구의 결과와 다르게 나타났는데 이는 재료식물의 genotype과 조직부위가 서로 다른데서 비롯된 결과라고 생각된다.

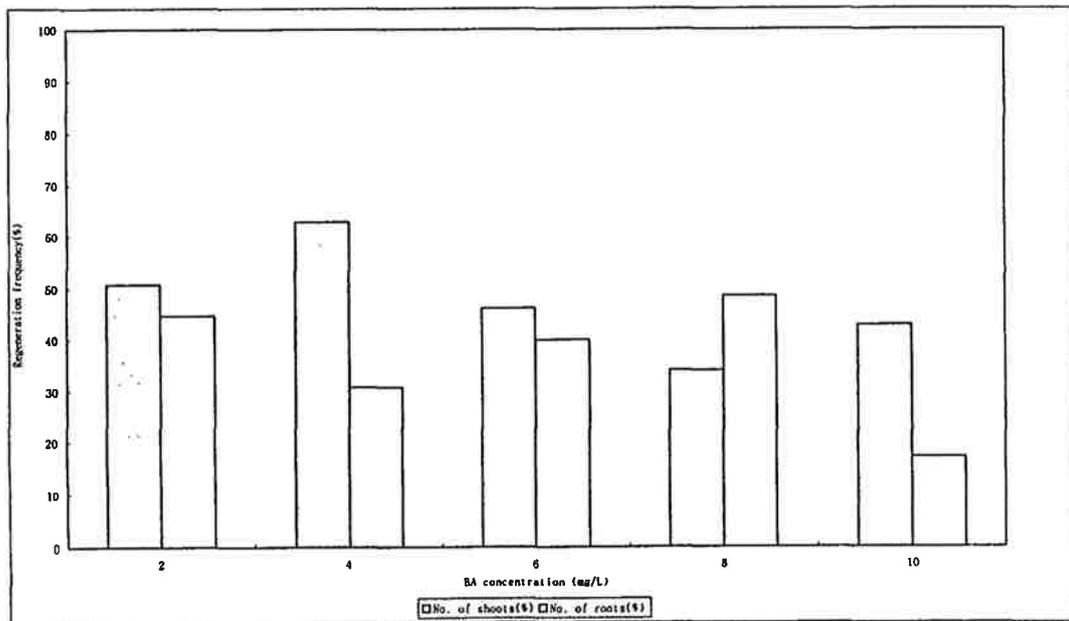


Fig. 5. Effect of BA concentration on shoot formation from cotyledons of *B. campestris* ssp. *pekinensis*.

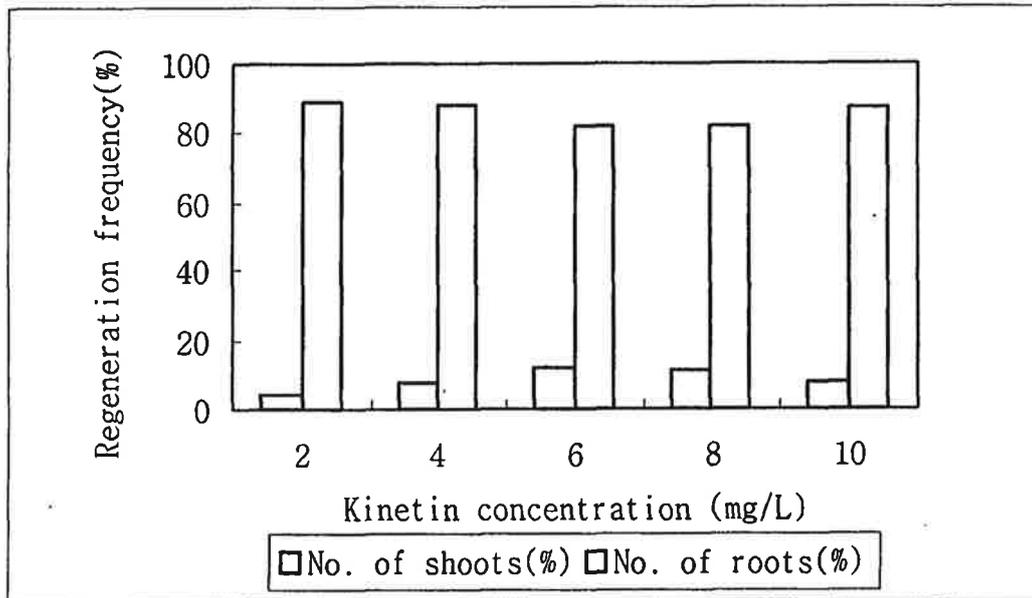


Fig. 6. Effect of kinetin concentration on shoot formation from cotyledons of *B. campestris* ssp. *pekinensis*.

## 2. 양배추

양배추 배축조직의 형질전환은 식물체 선발 marker로서 hpt(하이그로마이신 저항성 유전자) 유전자가 있고 백신 유전자로 CTB(콜레라 독신 B) 유전자를 포함하고 있는 pHGCTB가 있는 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하였다. *Agrobacterium*은 카나마이신과 하이그로마이신이 포함되어 있는 YEP 배지에서 48시간 배양한 후 농도를  $5-8 \times 10^8/ml$  으로 조정하여 형질전환에 사용하였다. 농도가 조정된 균 현탁액에 1일 전배양한 양배추 배축조직을 넣고 15분 정도 부드럽게 흔들어주면서 처리하였다. 균이 감염된 양배추 조직을 재분화 배지위에 놓여 있는 filter paper위에 치상한 후 25℃에서 2일간 공동배양하였다. T-DNA transfer를 용이하게 하기 위하여 담배 현탁배양 세포나 Acetosyringone( $100 \mu M$ )을 재분화배지에 첨가하여 사용하였다. 공동배양 후 액체 재분화배지로 *Agrobacterium*을 세척해낸 후 carbenicillin (100 mg/l)과 cefotaxime(250 mg/l)이 첨가되고 선발 항생제로 15 mg/l의 하이그로마이신이 첨가된 재분화배지 (MS기본배지 + 3% sucrose +1 mg/l NAA + 2 mg/l BA + 2 mg/l  $AgNO_3$  + 0.8% T.C. agar)에 치상하였다. 배지를 7-10일 간격으로 교환하면서 광 상태에서 3-6주 정도 배양하였다. 배양 4-6주 후에 배

측의 끝부위에서 캘러스와 동시에 재분화된 shoot를 분리하여 뿌리 유기를 위해서 carbenicillin과 cefotaxime이 첨가된 MSO배지로 옮겼다. Shoot가 제거된 하이그로 마이신 저항성 캘러스로부터 shoot를 더 재분화시키기 위해서 캘러스를 2차 선발 재분화배지 (MS기본배지 + 3% sucrose + 0.2 mg/l NAA + 2 mg/l BA + 2 mg/l AgNO<sub>3</sub> + 0.8% T.C. agar)로 계대배양하였다.

형질전환체 순화 및 종자수확은 선발 항생제가 포함되어 있는 재분화배지에서 형성된 shoot로부터 뿌리를 유기시킨 후 기내에서 자라고 있는 양배추를 멸균된 토양에 옮겨서 서서히 순화시켜 온실에서 재배하였다. 양배추의 줄기가 0.5-1cm 되도록 키운 후 4℃로 옮겨 저온처리를 하여 추대를 촉진시켰다. 저온에서 60-90일 정도 처리된 양배추를 다시 온실로 옮겨 추대를 시킨후 꽃이 완전히 개화되기전에 내수분을 시켜 selfing된 종자를 얻었다.

형질전환체 분석은 선발되어 나온 양배추 형질전환체의 잎을 채취하여 DNA와 RNA를 분리하여 Southern 과 Northern 분석을 하였다. Southern 분석은 다음과 같이 하였다. 잎으로부터 분리한 Total DNA(10 μg)를 HindIII로 자른 후 0.8% agarose gel에 전기영동하여 nylon membrane에 옮겼다. <sup>32</sup>P-dCTP 방사성 동위원소로 표지한 CTB 유전자를 probe로 하여 hybridization을 하였다. Hybridization을 68℃에서 18시간 정도 한 후 상온에서 2xSSC, 0.1%SDS로 15분, 68℃에서 1XSSC, 0.1%SDS로 20분, 0.1XSSC, 0.1XSDS로 30분동안 membrane을 세척한 후 X-ray film에 노출시켰다. Northern 분석은 total RNA(30 μg)를 분리후 formamide gel에서 전기영동한 후 Southern 분석과 같은 방법으로 hybridization을 하였다.

### 3. 벼

#### 가. 캘러스 준비

형질전환에 앞서 우선 벼 종자로부터 형질전환의 재료인 캘러스를 얻어내기 위해 실험당 약 200개의 종자의 껍질을 벗겨내고 멸균된 삼각플라스크에 담아 70% 에탄올 100ml을 부어 1분간 세계 흔들어 씻어준후 20% 락스 100ml을 넣고 120rpm의 진탕기 위에서 1시간 소독한 다음 멸균수로 5-6회 씻어내고, 멸균된 종자를 2N6 캘러스 유기 배지에 치상하고 25℃ 배양기에서 4주간 암배양한다. 4주후 scutella로부터 유기된 캘러스를 새로운 2N6고체배지로 계대배양하고 옮긴지 4일된 캘러스를 형질전환에 사용하였다.

나. 균주준비

Co-cultivation시 *Agrobacterium*의 농도는  $3-5 \times 10^9$  cell/ml일때 형질전환이 가장 효율적인 것으로 알려져 있어 *Agrobacterium*의 농도가  $10^9$  cells/ml이 되도록 하기 위해 LBA4404(pSBG700)를 2개의 ABST고체배지에 도말한 다음 28℃ 배양기에서 3일 동안 배양한 후 약 스폰으로 잘 끊어모아 모두 취하여 AAM 액체배지 30ml에 녹인 다음 사용한다.

다. Co-cultivation

4일 계대 후 왕성하게 분열한 켈러스를 직경 1-2mm정도의 크기로 자른 뒤 *A.tumefaciens* LBA4404(pSBRTC-MAR)가 녹아있는 있는 AAM 액체배지에 5분 동안 담근 후 2N6-AS고체배지 한 plate당 50개씩 co-cultivation하여 25℃ 배양기에서 3일 동안 암배양한다.

라. 1차 선발

3일 동안 co-cultivation한후 켈러스로부터 *Agrobacterium*을 분리해 내기위해 *Agrobacterium* 치사항생제인 cefotaxime(250mg/l)이 들어 있는 멸균수에 담구어 씻어내고 형질전환된 켈러스를 선발하기위해 2N6-CP 1차선발 고체배지에 옮겨 25℃ 배양기에서 3주 동안 암배양한다.

마. 2차 선발

1차 선발된 켈러스를 N6-7-CP 2차 선발 고체배지로 옮겨 25℃ 배양기에서 10일 동안 암배양하고, 10일후 1차선발된 켈러스중 하얗고 왕성하게 분열한 켈러스를 선발한다.

바. 재분화

2차 선발 배지에서 하얗고 왕성하게 자란 켈러스 만을 선발하여 재분화 배지인 MS-CP로 옮겨 28℃ 배양실에서 명배양으로 재분화를 유도시킨다. 1,2차 선발 모두

마친 켈러스는 MS-CP 재분화 배지로 옮기고, 제초제 성분인 phosphinotricin이 들어있는 배지에서 실시합니다. 배양실에서 재분화된 벼 형질전환체는 MS0배지에 옮겨 10일간 배양한 뒤 토양이 있는 용기로 옮겨주고 2주뒤 온실로 옮겼다.

## 제 4 장 결과 및 고찰

### 제 1절. 배추에 있어서 $\text{AgNO}_3$ 의 효과 및 품종간 재분화 능력

$\text{AgNO}_3$ 가 배추의 배측조직으로 부터 식물체 분화에 미치는 영향을 조사하고자 NAA (1 mg/L), BA (4 mg/L) 및 1~5 g/L의  $\text{AgNO}_3$ 가 첨가된 MS배지에 파종 5 일된 배추의 배측조직 (1 cm크기)을 배양한 바(그림 5),  $\text{AgNO}_3$ 가 첨가되지 않은 배지에서는 6.3%의 저조한 식물체 분화율을 보인 반면, 1 mg/L의  $\text{AgNO}_3$ 를 함유한 배지에서는 81.3%의 높은 식물체 분화율을 나타내었고  $\text{AgNO}_3$ 의 농도간에는 큰 차이가 없었으나  $\text{AgNO}_3$ 의 농도가 3 mg/L 이상일 때는 재분화된 식물체의 유리질화가 심한 경향이였다. 그리고 뿌리의 분화는  $\text{AgNO}_3$ 에 의해 크게 억제되는 것으로 나타났다. 이러한  $\text{AgNO}_3$ 의 첨가효과는 배추의 자엽, 하배측, 잎 및 엽병의 조직배양에서도 비교적 높게 나타났다. 이는 *B. juncea*<sup>2</sup> 및 배추의 하배측 조직배양에서  $\text{AgNO}_3$ 가 효과적이었다고 한 연구결과와  $\text{AgNO}_3$ 의 효과면에서 같은 양상을 나타내었다. 다만 본 연구에서  $\text{AgNO}_3$ 가 첨가된 배지에 배양된 하배측조직의 경우 shoot의 분화는 크게 향상되었지만 뿌리의 분화는 크게 억제되었는데 이는 감자의 엽육 조직배양에서  $\text{AgNO}_3$ 는 캘러스 형성이나 shoot분화에는 효과적이었지만 뿌리형성이 잘되지 않는다고 한 De Block<sup>6)</sup>의 연구결과와 비슷한 경향이였다.

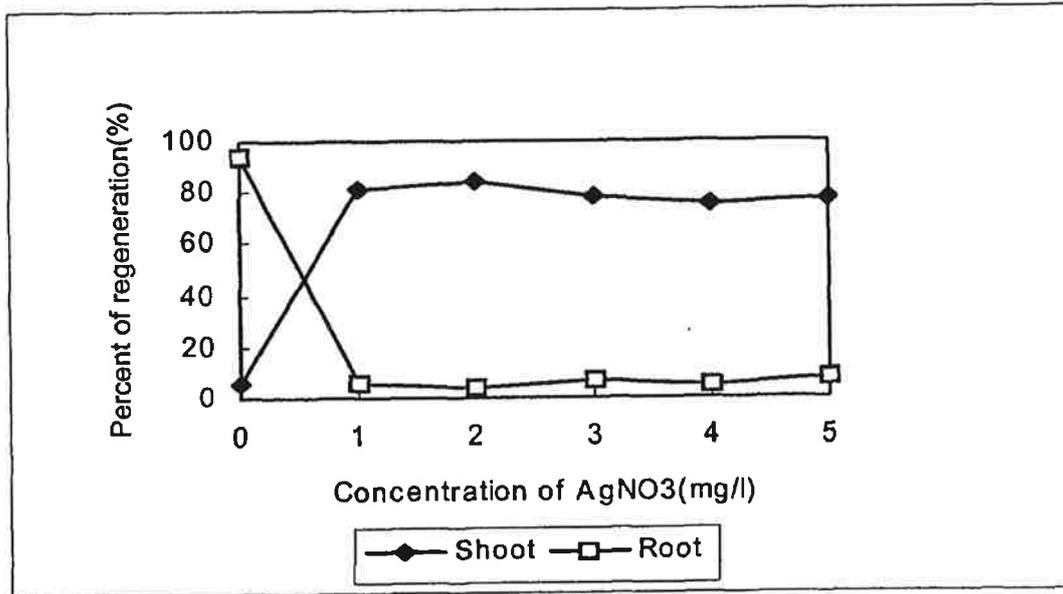


Fig. 7. Effect of AgNO<sub>3</sub> concentration on shoot and root regeneration from hypocotyl tissue of *B. campestris* ssp. *pekinensis*.

자엽의 성장일수에 따른 식물체 분화율을 조사하기 위하여 파종 후 4일, 5일, 6일된 자엽을 NAA (1 mg/L)와 BA (4 mg/L)가 첨가된 배지에 배양한 바(표 1), 파종 4일된 자엽에서 27.5%의 가장 높은 식물체 재분화율을 보였다. 이러한 결과는 Sharma등이 *B.juncea*의 자엽 배양에서 파종 5일된 자엽이 가장 재분화가 잘되었다고 한 연구결과와는 상이하였지만 Knittel등은 해바라기의 자엽배양에서, Ono등은 유채의 자엽배양에서 각각 4일된 자엽에서 재분화율이 높았다고 한 연구결과와는 일치되는 경향이였다.

Table 1. Effect of seedling ages on shoot regeneration of *B. campestris* ssp. *pekinensis*

Response	4 days	5 days	6 days
No. of shoots(%)	22(27.5)	13(14.4)	13(13.0)
No. of roots(%)	53(66.3)	72(80.0)	72(72.0)
Total no. of cotyledons plated	80	90	100

Regeneration medium: MS medium + 1 mg/L NAA + 4 mg/L BA.

배추의 품종별 식물체 재분화율을 알아보기 위해 “서울배추”의 14품종의 자엽을 NAA (1 mg/L)와 BA (4 mg/L)가 첨가된 MS배지에 배양했을때(표 2), “서울배추”만이 57.8%의 높은 재분화율을 보였고 나머지 품종에서는 1% 내외의 매우 낮은 재분화율을 보이거나 전혀 재분화가 일어나지 않았으므로 형질전환 실험에는 “서울배추”를 공시품종으로 이용하였다. 이러한 genotype간 재분화능력의 차이는 조직배양 초기부터 여러작물에서 알려져 왔고, *Brassica*속 식물에서도 *B. campestris*, 유채, *B. juncea*등에서 품종간 재분화 능력의 차이가 보고된 바 있다.

Table 2. Varietal difference in efficiency of shoot and root regeneration  
from cotyledon of *B. campestris* ssp. *pekinensis*

Varieties	No. of cotyledons cultured	No. of cotyledons forming	
		shoots(%)	roots(%)
Seoul	180	104(57.8)	70(38.8)
Samjin	160	0	62(38.7)
Jangwon	180	3(1.6)	30(16.6)
Manna	200	1(0.5)	83(41.5)
60 days	200	1(0.5)	39(19.5)
Pungsan	150	2(1.3)	35(23.3)
Naeshu samgae	110	0	85(77.2)
Olympic	80	0	28(35.0)
Wonwoo	50	0	0
Tambok	200	0	1(0.5)
Hanyerum	190	0	85(44.4)
Gowon	160	0	43(26.8)
Hanmukum	200	1(0.5)	120(60.0)
Gangsae	100	0	67(67.0)
Manjum	200	2(1.0)	135(67.5)

Medium:MS medium + 1mg/L NAA + 4mg/L BA + 30g/L sucrose + 8g/L agar.

엽병이 부착된 배추의 자엽으로부터 식물체가 재분화되는 양상을 조직학적으로 관찰하여 본 결과, 엽병의 절단면에서 처음에는 아무런 반응도 일어나지 않았으나, 배양 3일후 부터는 잘린 조직주위에서 세포분열이 왕성하게 일어남을 관찰할 수 있었고, 배양 7일 후에는 심장형의 shoot primordia를 형성하였으며, 배양 20여일후에는 정상적인 재분화개체가 출현하였다.

## 제 2절. CTB유전자 전환작물 개발

### 1. 배추

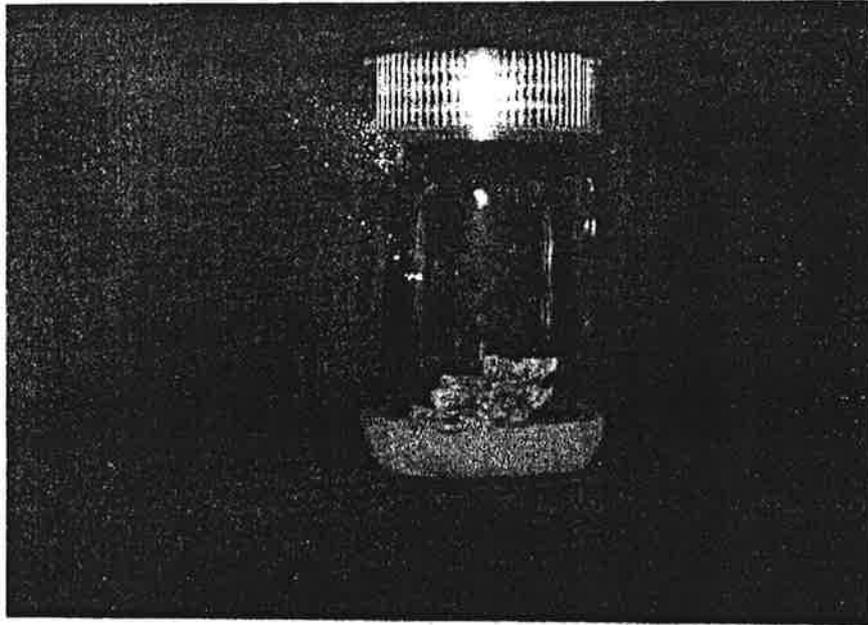


Fig. 8. Transgenic chinese cabbage containing colera B Subunit(CTB) gene transformed with *Agrobacterium* vector.

형질전환된 배추에 원하는 유전자가 정확히 삽입되었는지를 알아보기 위해서 Hgromycin 유전자를 기준으로 21mer크기의 2개의 primer를 제작하였다. primer 1은 5'-AgC CTg ACC TAT TgC ATC TCC-3'이고 primer 2는 5'-TgT CCg TCA ggA CAT TgT Tgg-3'이었다. 이를 토대로 PCR을 수행한 결과 형질전환 배추에 hgromycin 유전자와 CTB유전자가 형질전환 되었음을 확인하였다(그림9).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

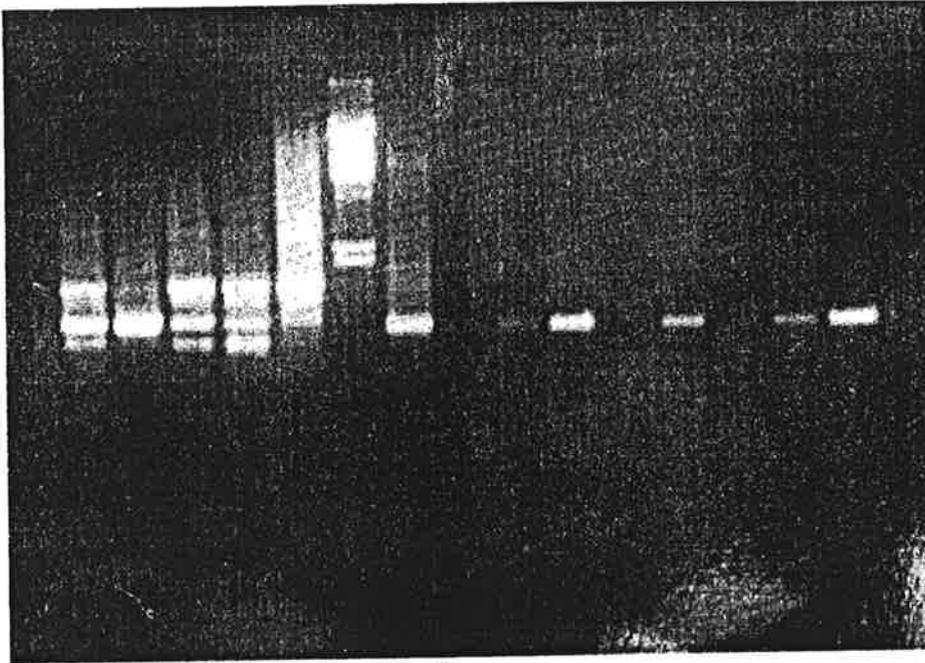


Fig. 9. PCR amplification of the hygromycin gene in transformed and nontransformed Chinese cabbage.

Lane 1 - 5: Transgenic plants, Lane 6:  $\lambda$ /Hind III marker, Lane 8 : control plants

Lane 9, 10, 12, 14, 15: transgenic plants Lane 11, 13: non transgenic plants

그리고 이들 얻어진 형질전환 배추로 부터 자식종자를 얻어 이들 개체의 후대유전양상을 조사하기 위하여 형질전환 종자와 control종자를 hygromycin이 들어간 종자과종배지에서 발아 실험을 수행한 결과(그림10), 형질전환배추의 종자들은 항생제 배지에서 대부분이 발아를 하는데 비하여 형질전환 되지 않은 종자들은 발아하지 못하는 경향을 나타내었다. 이들 얻어진 형질전환 배추들은 앞으로 vaccine유전자 발현정도와 안정적인 후대유전에 관한 연구를 더욱 심도있게 계속 연구하여야 할 것으로 사료된다.

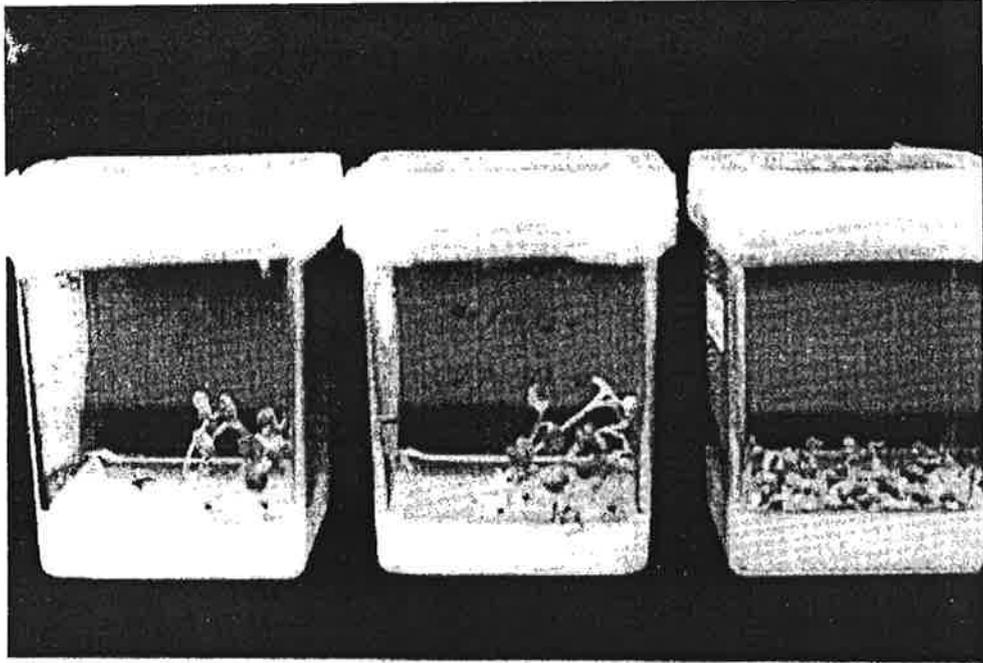


Fig 10. Progeny test of transgenic chinese cabbages containing Hg and CTB genes

## 2. 양배추

양배추 배축조직을 *Agrobacterium*으로 접종 후 하이그로마이신이 있는 배지 (MS 배지 + NAA 1mg/l + BA 2mg/l + AgNO<sub>3</sub> 2mg/l)에 치상 후 1주일 마다 배지를 교환하면서 배양하였다. 4-6주 정도 후에 배축조직으로부터 shoot와 함께 캘러스가 형성되었다. 주로 shoot보다는 캘러스 형성률이 높았다. 형성된 캘러스는 2차 재분화배지(MS + NAA 0.1mg/l + BA 2mg/l + AgNO<sub>3</sub> 2 mg/l)에서 shoot로 재분화되었다(Fig. 11). 재분화된 shoot는 성장조절제가 없는 MS배지에서 뿌리류 유기시킨후 순화시켜 토양으로 이식하여 온실에서 재배하였다(Fig. 12). 형질전환체 양배추 줄기의 지름이 약 1cm 정도 될 때까지 키운후 4℃에서 약 90일정도 저온처리한 후 온실에서 재배하였다. 약 2-3주 정도 후에 추대가 시작되어 T<sub>1</sub> 증자할 얻기 위해서 내수분을 하였다(Fig. 13). 배축조직으로부터 형질전환된 캘러스 형성률은 30-50%로 높았으나 온실에서 재배된 완전한 형질전환체가 되는 실제적인 형질전환율은 3-6% 이었다. 이렇게 해서 총 54개체의 완전한 형질전환체를 얻을 수 있었다. 형질전환체 분석은 총 54 개체에 대해서 CTB 유전자가 완전히 genome상으로 도입되었는지를 Southern 분석을 하여 확인하였다. 전달된 T-DNA 상에 제한 효소 HindIII site는 하나이므로 이 효소로 DNA를 절단하여 CTB 유전자로 hybridization하여 나온 밴드수로서 도입된 유전자의 수를 알 수 있었다. 그 결과 형질전환시키지 않은 control 양배추에서는 밴드가 나타나지 않았고 형질전환 개체들에서는 CTB 유전자가 1-5 copy로 다양하게 genome상에 삽입되었다는 것을 확인하였다(Fig. 14, 15, 16, Table ).



Fig. 11. Shoot regeneration from hygromycin resistant callus derived from hypocotyls infected with *Agrobacterium*.

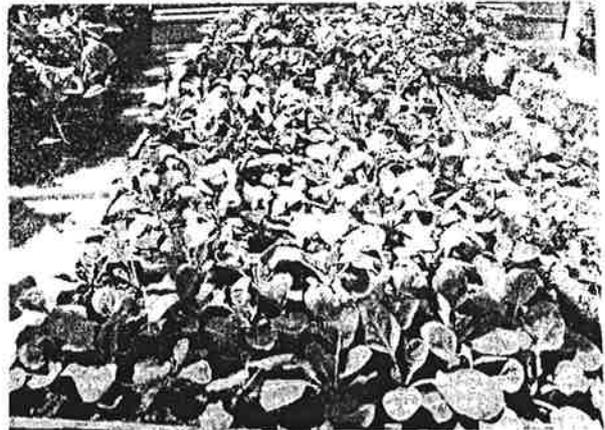


Fig. 12. Transgenic cabbage plants habituated in greenhouse.



Fig. 13. Transgenic cabbage plants selfed by bud-pollination and seed setting in greenhouse.

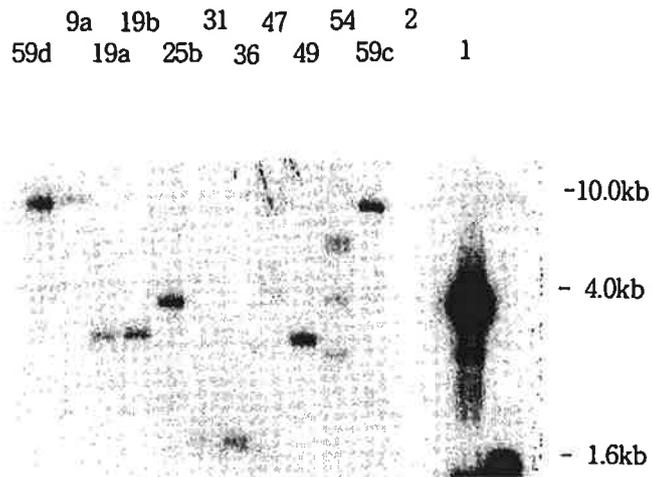


Fig.14. Southern blot analysis of transgenic cabbage transformed with *Agrobacterium tumefaciens* (pHGCTB). Lane 1: plasmid DNA(4.0kb), lane 2: untransformant, lane3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, and 13: No. of transgenic plants.

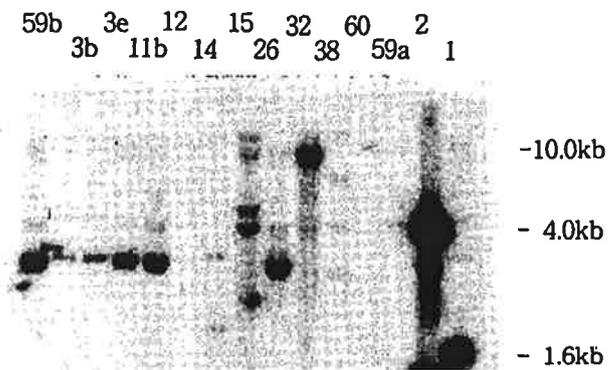


Fig .15. Southern blot analysis of transgenic cabbage transformed with *Agrobacterium tumefaciens* (pHGCTB). Lane 1: plasmid DNA(4.0kb), lane 2: untransformant, lane3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 and 14: No. of transgenic plants.

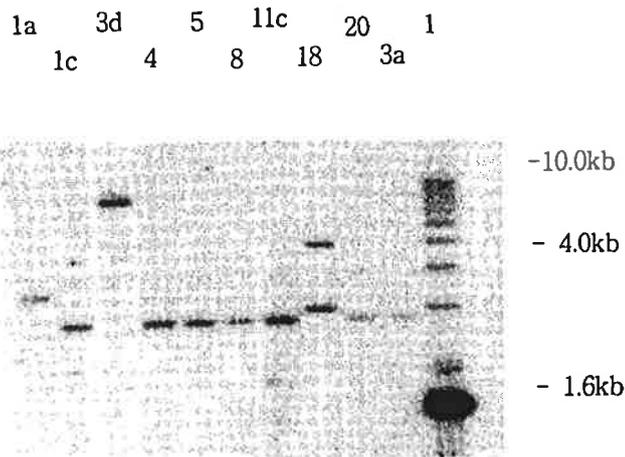


Fig .16. Southern blot analysis of transgenic cabbage transformed with *Agrobacterium tumefaciens* (pHGCTB). Lane 1: 1kb DNA marker, lane 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 11: No. of transgenic plants.

도입된 CTB 유전자의 발현을 Northern 분석을 통하여 조사하여 본 결과 유전자가 도입되지 않은 control 양배추에서는 밴드가 나타나지 않았다. CTB 유전자가 도입된 54개체중에서 2 개체에서만 CTB 발현이 되지 않고 나머지 개체에서 원하는 0.3kb 위치에서 밴드가 형성되었다. 이것으로 CTB 유전자가 양배추에 도입되어 RNA로 전사된다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 RNA 발현량은 일반적으로 알려진 것과 같이 대체로 copy수가 많을수록 발현량이 높게 나타났다 (Fig. 17, 18. Table3)

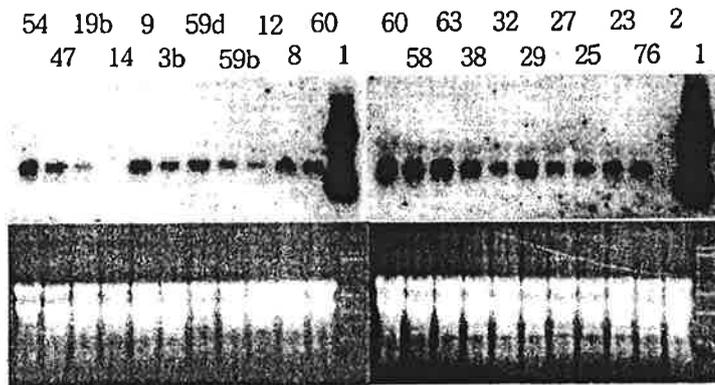


Fig 17. Expression of CTB in transgenic cabbage analyzed by Northern blot hybridization. Lane 1: RNA ladder, lane 2: untransformant, the remainder of lanes: No. of transformants.

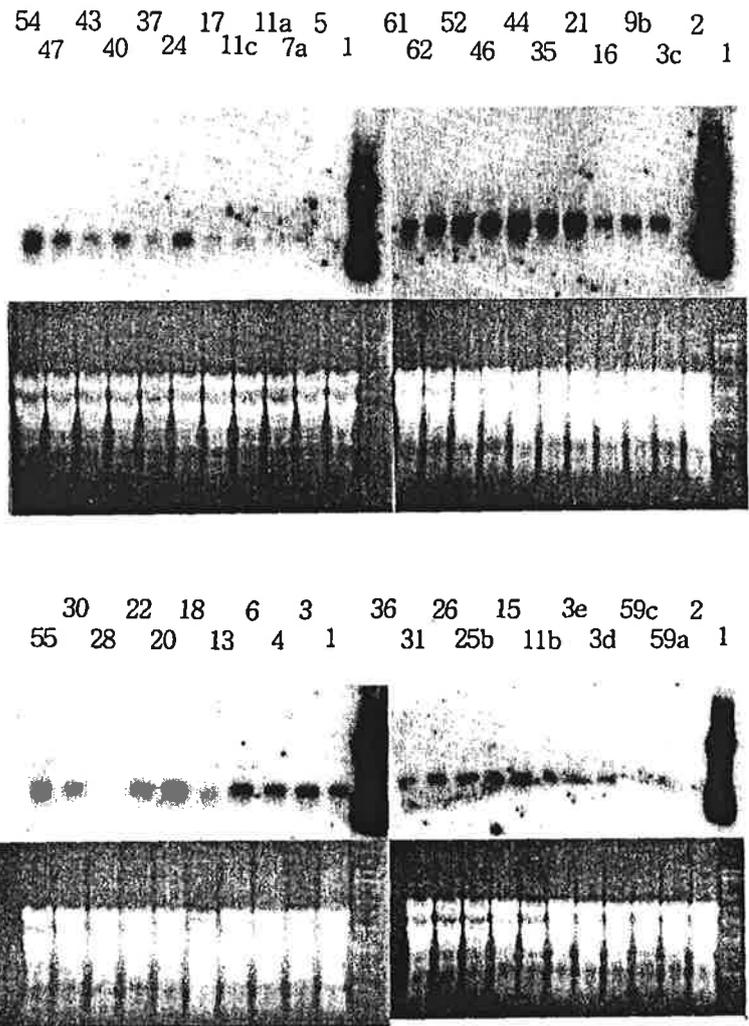


Fig. 18. Expression of CTB in transgenic cabbage analyzed by Northern blot hybridization. Lane 1: RNA ladder, lane 2: untransformant, the remainder of lanes: No. of transformants.

T<sub>1</sub> 세대종자 확보는 CTB 유전자 도입이 확인된 총 54 개체 중에서 35개체에서 종자를 얻을 수 있었다. 종자 수확량은 개체에 따라 적게는 1립부터 100립이상 정도로 변이가 심하게 나타났다(Table 3). 이들 개체들에 대한 하이그로마이신

저항성의 후대 분석 결과 멘델법칙에 따른 3:1의 분리비를 나타낸 개체는 10개체였고 나머지는 비정상적인 분리비를 나타내었다(Table 4). T<sub>1</sub> 식물체를 CTB 유전자 primer로 PCR 분석을 하여 본 결과 백신 유전자의 0.3kb 위치에서 DNA 밴드가 형성되었다(Fig. 19). 이것으로 백신 유전자가 후대로 안정적으로 유전된다는 것이 확인되었다.

Table 3. Copy numbers and expression of CTB gene and seed setting in the T<sub>0</sub> cabbage transformants.

Transgenic plants	Copy number	RNA expression level	Seed setting	Transgenic plants	Copy number	RNA expression level	Seed setting
1a	1	+	>100	22	4	+	
b	1	+	>100	23	NT	++	70
c	1	+	>100	25a	1	+++	50
3a	1	++	100	b	1	+++	64
b	1	++	33	27	1	NT	45
c	1	++	52	28	NT	-	48
d	1	++	100	29	1	++	>100
e	1	++	>100	30	NT	+	95
4	1	+	>100	31	1	+++	
5	1	+		32	1	NT	48
7a	1	++	3	35	1	+++	20
b	1	++	>100	36	1	+	
8	1	++		37	1	+	
9a	1	+++	>100	38	1	++	>100
b	1	++	30	39	1	NT	>100
10	1	+	40	40	3	+++	
11a	1	+	66	44	1	+++	
b	1	+	30	46	1	+++	
c	1	+	100	47	2	+++	
12	1	+	74	52	2	+++	
16	NT	NT		54	5	+++	
17	1	+	47	55	2	++	
18	2	+	>100	58	4	+++	
19a	1	+	○	59a	1	++	>100
b	1	+	86	b	1	++	
20	1	++	1	c	1	++	
21	3	+++		60	5	+++	

Table 4. Segregation of resistance to hygromycin in T<sub>1</sub> progeny of selfed transformants of cabbage.

Transgenic plant No.	Number of seeds	No germination	Hygromycin resistance	
			Resistant	Susceptible
1a	74		62	12
1b	74		57	17
1c	83		65	18
3a	74		59	15
3b	20		15	5
3c	18	9	3	6
3d	54		43	11
3e	65	5	48	12
4	74	2	33	39
7b	34	2	22	10
9a	72		37	35
9b	13	7	3	3
10	24		13	11
11a	42	3	30	9
11b	29	10	9	10
11c	63	3	44	16
12	39		24	15
17	28		24	4
18	39	11	13	15
19b	63		40	23
23	35		27	8
25a	37		31	6
25b	35		24	11
27	23		18	5
28	28	2	16	10
29	81	1	49	31
30	54		32	22
32	30	3	19	8
35	22	5	15	2
38	70	4	36	30
59a	68	1	32	35

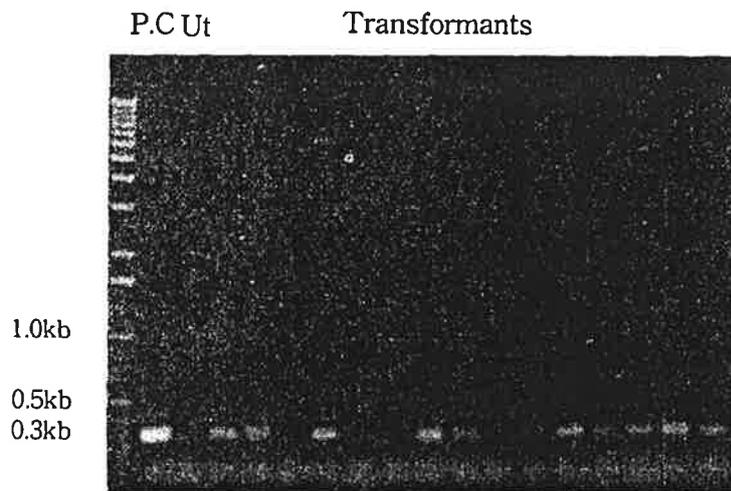


Fig. 19. PCR analysis of T<sub>1</sub> transgenic cabbage plants. Ut: untransformant, P.C positive control, CTB plasmid DNA.

3. 벼

Table 4 . *Agrobacterium*-mediated transformation of rice

Plasmid	Experiment	Co-cultivation	After 3 weeks on selective medium	After 10days on selective medium	Regeneration on regeneration medium	Herbicide resistant plants
pSBRTC-MAR	1	370	330(89.1%)	215(58.1%)	70(18.9%)	4
	2	460	430(93.4%)	131(28.4%)	42(9.1%)	5
	3	470	435(92.5%)	220(46.8%)	85(18.1%)	12
	4	400	355(88.7%)	171(42.8%)	97(24.3%)	21

가. 형질전환된 벼 식물체의 제초제 저항성 검정

선발 마커로서 제초제 저항성 유전자를 사용하기 때문에 일반적인 항생제 저항성 유전자와는 달리 조직배양시 캘러스 수준에서의 선발뿐만 아니라 형질 전환된 식물체 수준에서도 선발할 수 있는 장점을 가지고 있어 실험실에서 선발되어 재분화된 벼 식물체를 온실에서 약 한 달간 키운 후 제초제 저항성 검정을 실시한다. 형질전환된 벼의 제초제 저항성 검정을 하기 위하여 시중에 유통되고 있는 Basta 용액을 최종농도 0.5%가 되게 희석하여 검정하고자 하는 잎과 대조구로는 형질전환되지 않은 낙동벼 잎의 전면과 후면에 골고루 발라주고 다음 1주일 지난 다음 결과를 관찰한다. 관찰한 결과 대조구는 잎이 시들고 갈색으로 변한 반면 형질전환체는 본래의 초록색을 유지, 아무런 변화를 관찰할 수 없었다.

나. 형질전환된 벼 식물체의 도입 유전자 확인 및 분석

형질전환된 벼의 개체는 30여개의 Line에 개체수는 100여개체에 이르고 있으며, CTB 유전자의 도입 및 유전자수(copy number)를 알아보기 위하여 genomic Southern blot을 수행하였다. 형질전환된 벼와 형질전환되지 않은 벼식물체로부터 채취한 0.5g의 어린 잎으로부터 genomic DNA를 분리하였다. 도입 유전자의 확인은 도입 유전자만을 선택적으로 절단할 수 있는 제한효소를 이용하였고 도입된 유전자수의 확인은 운반체내에 도입 유전자를 포함하고 있는 단일 절단 부위만을 가지고 있는 제한효소를 이용하였다. 이에 따라 pSBRTC-MAR의 형질전환 식물체로부터 도입 유전자 확인을 위하여 EcoRV으로 절단하였고, 도입된 유전자수를 확

인하기 위하여 NotI으로 절단하였다. 도입된 CTB 유전자에 대한 probe로는 CTB 함유 운반체인 pSBRTC-MAR을 PstI으로 절단하여 0.5kb의 CTB 유전자 단편을 이용하였다.

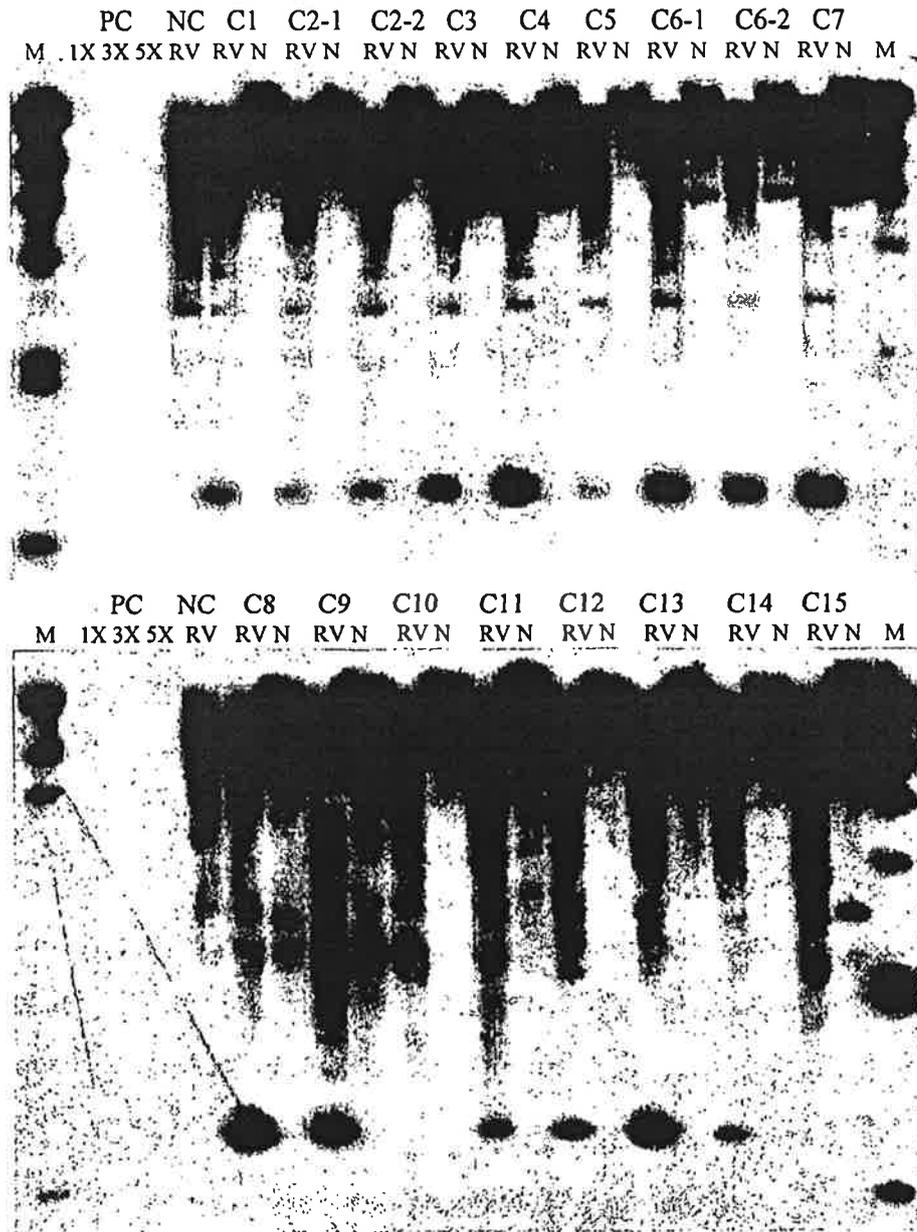


Fig.20. Southern blot analysis of pSBRTC-MAR transformed transgenic rice plants and estimation of the transgene copy number.

1X, 3X and 5X in PC represent 1, 3 and 5 genome equivalents of pSBRTC-MAR relative 5 $\mu$ g of rice genomic DNA, respectively. The size markers(M) are indicated on the left-handed and right-handed side. Genomic DNAs isolated from the leaf tissue of pSBRTC-MAR transgenic rice plants (C1-C15) and from an untransformed control plant(NC) were digested EcoRV (RV), NotI(N) and hybridized with a <sup>32</sup>P-labeled 0.5kb DNA fragment containing the CTB coding region. PC contains EcoRV digested pSBRTC-MAR

## 제 5 장 결 론

vaccine유전자의 배추내 형질전환은 먼저 배추의 조직배양 및 형질전환 체계를 확립하였고 이를 토대로 vaccine유전자를 효과적으로 배추에 형질전환 하였으며 이들 계체에 대해 유전자의 삽입여부를 확인한 결과 유전자가 안정적으로 도입되었음을 확인하였다.

양배추로 백신유전자를 도입한 결과 완전히 형질전환되어 유전자가 확인된 개체는 총 54개체로 각각의 계통으로 볼 수 있다. 이들 각개체들에 대한 Southern 분석 결과 유전자가 하나에서 다섯 copy 까지 도입되었다. 그리고 도입된 유전자의 발현을 확인하기 위하여 Northern 분석을 하여 본 결과 발현량이 다양하게 나타났다. 대부분 copy수가 많을수록 발현량이 높게 나타났으며 한 copy가 도입된 양배추에서도 발현량이 높게 나타난 것이 있었다. 이들 양배추를 자가수분하여 T<sub>1</sub> 종자를 확보하였다. 수확된 종자수는 1립부터 100립까지 다양하였다. 54개체들 중에서 현재까지 35개체에서 종자를 확보하였다. 이들 개체들에 대한 후대 검정 결과 분리비가 멘델유전법칙에 따른 3:1의 비율을 나타낸것과 비정상적인 비율로 분리하는 것이 있었다. 백신 유전자가 도입된 T<sub>1</sub> 양배추 식물의 PCR 분석 결과 유전자가 도입된 것이 확인되었고 이로서 유전자가 안정적으로 후대로 유전된다는 것을 확인할 수 있었다.

벼로 백신유전자를 도입한 결과를 분석해 보면 15개의 line중에서 2개의 line만 유전자가 도입되지 않았고 C1, C2-1, C2-2, C3, C5, C9, C11, C12, C14 line에서 1개, C6-1, C6-2, C8 line에서 2개, C4, C7 line에서 3개, C13 line에서 4개의 CTB 유전자가 되었음을 확인할 수 있었다. 13개의 line에서 도입 유전자를 확인하였고 도입된 유전자수는 다양함을 확인할 수 있었다. 또한 2-1과 2-2, 6-1과 6-2는 각각 동일 callus에서 재분화된 식물체로서 같은 pattern을 나타내는 것으로 보아 동일 callus에서 재분화한 여러 개의 식물체는 모두 같은 형태로 형질전환 되었음을 알 수 있었다. 35 line에서 종자가 맺혔고 28%의 불임이 있었음을 확인하였다. T<sub>1</sub>종자는 20립부터 100립까지 다양하였다.

## 제 6 장 참고문헌

1. Aronson AI, Beckman W and Dunn P 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol. Rev. 50 : 1-24.
2. Barfield DG and Pua EC 1991. Gene transfer in plants of *Brassica Juncea* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Plant Cell Reports. 10 : 308-314.
3. Choi IH, Yoo JK and Na SY 1992. Studies on the ecological characteristics and effect of chemical control to diamondback moth, *Plutella xylostella* L.. RDA. J. Agri. Sci. 34 : 40-47.
4. De Block M, Brouwer DD, Tennig P. 1989. Transformaton of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and nptII genes in the transgenic plants. Plant Physiol. 91: 694-701
5. Délannay X, LaValle BJ, Proksch RK, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT, Marrone PG, Dodson RB, Augustine JJ, Layton JG and Fischhoff D A 1989. Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insect control protein. Bio/Technology. 7 : 1265-1269.
6. Feitelson, JS, Payne J and Kim L 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. Bio/Technology. 10 : 271-275.
7. Gupta, V, Sita RL, Shaila MS and jagannathan V 1993. Genetic transformation of *Brassica nigra* by *Agrobacterium* based vector and direct plasmid uptake. Plant Cell Reports. 12 : 418-421.
8. Hofte H and Whiteley HR 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus*

*thuringiensis*. Microbiological Reviews. 53 : 242-255.

9. Jefferson RA 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5 : 387-405.

10. Jenes B, Moore H, Cao J, Zhang W and Wu R 1993. Techniques for gene transfer, In: S. Kung and R. Wu (eds), Transgenic plants, Vol. 1. Academic Press, Sandiego, California, pp. 125-146.

11. Jun SI, Kwon SY, Paek KY and Paek KH 1995, *Agrobacterium* - mediated transformation and regeneration of fertile transgenic plants of chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. 'springflavor'). Plant Cell Reports. 14 ; 620-625.

12. Moloney MM, Walker JM and Sharma KK 1989. High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. Plant Cell Reports. 8 : 23

## 제 출 문

본 보고서를 “담배에서 vaccine 유전자를 포함한 재조합 식물 발현 벡터의 구축에 관한 연구”(“형질전환 식물을 이용한 vaccine의 개발에 관한 연구“과제의 위탁과제) 최종보고서로 제출합니다.

1999. 10. .

위탁연구기관명 : 고려대학교

위탁연구책임자 : 박 영 인

연 구 원 : 송 은 경

연 구 원 : 홍 진 한

연 구 원 : 방 은 영

연 구 원 : 조 효 진

연 구 원 : 김 연 회

## 요 약 문

### I. 제 목

담배에서 vaccine 유전자를 포함한 재조합 식물 발현 벡터의 구축

### II. 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구의 목적은 식물을 생산 시스템으로 이용하여 백신을 생산하는데 있다. 백신 생산의 원가를 낮추기 위해 새로운 신기술에 대한 탐색이 활발히 이루어지고 있는 가운데 식물에서의 백신 생산 시스템이 큰 관심을 모으고 있다. 식물에서의 백신 생산은 기존의 백신 생산 방법에 비하여 매우 큰 장점을 갖는다. 식물 백신 생산 시스템은 공장 시설비, 공장 가동비 및 배지 값이 필요하지 않으며, 식물의 생육 조건이 animal cell이나 Yeast cell과 달리 까다롭지 않으므로 현 백신 보다 매우 저렴한 비용으로 생산이 가능하여 경제적으로 유리하다. 무엇보다 식물 백신은 cultured animal cell을 이용한 백신 생산에서 항상 위험 요인으로 대두되는 animal virus의 감염에 대한 두려움이 없어 안정성이 뛰어나므로 식물에서의 백신 생산은 산업적으로 매우 중요하다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 항원 (cholera toxin B) 유전자가 식물체 내에서 효율적으로 발현되도록 하기 위하여 식물의 nuclear transformation, plasmid transformation, chloroplast로의 단백질 targeting 및 식물 바이러스를 이용한 항원의 epitope sequence의 transient expression을 시도하였다.

식물의 nuclear transformation을 위하여 border sequence로 *Agrobacterium*의 left border와 right border를 사용하였으며, promoter는 CaMV35S promoter를 사용하였다. 식물 발현 벡터에 cholera toxin B (CTB) 유전자를 삽입하여 재조합 DNA를 대장균에서 구성한 후 *Agrobacterium*-mediated transformation 법에 의해 담배식물을 형질전환하였으며 형질전환 후 항생제를 포함한 선택배지에서 식물체의 재생을 유도하였다. 재생된 식물체에 대하여 유전자 분석을 실시하여 *ctb* 유전자의

도입 및 발현을 확인하였다. *ctb* 유전자의 도입 및 발현이 확인된 식물체로부터 단백질을 분리하여 immunoblotting을 실시하였으나 발현율이 낮아서 CTB의 항체와 특이적 결합을 하는 단백질 단편을 확인하기 어려웠다. 한편 유전자의 도입위치에 따른 발현정도의 차이 (position effect)를 극복하기 위하여 발현율이 높은 식물체의 genome 부위로 외부 유전자 도입을 유도하는 MAR sequence를 사용하여 보았으나 이 경우에도 *ctb* 유전자의 도입 및 발현은 확인이 되었지만 immunoblotting을 실시하였을 때 발현율이 낮아서 CTB의 항체와 특이적 결합을 하는 단백질 단편을 확인하기 어려웠다

Plastid transformation을 위하여 뉴저지대의 Maliger group이 발표한 pLAA24A 벡터 시스템을 사용하고자 하였으나 Maliger group이 이 벡터의 분주는 하지않는다고 하여 대안으로 동 group에서 개발한 것이지만 효율이 비교적 떨어지는 pSBL derivative를 사용하였다. pSBL 벡터 시스템은 border sequence로 *trnI*와 *trnA*를 사용하며, promoter는 Prm promoter를 사용하며, *aadA* gene에 의한 spectinomycin 내성을 부여하는데 외부 유전자는 *aadA* gene 바로 뒤에 promoter 없이 fusion 되도록하여 polycistronic 하게 발현되도록 고안된 것이다. pSBL 벡터의 *aadA* gene 뒤에 open reading frame을 맞추어 cholera toxin B(CTB) 유전자를 삽입한 재조합 DNA를 대장균에서 구성한 후 Particle bombardment 법에 의한 plastid transformation을 실시하였다. 형질전환 후 항생제를 포함한 선택배지에서 식물체의 재생을 시도하였으나 유전자 도입이 일어나지 않아 spectinomycin을 포함한 선택배지에서 살아남은 shoot를 구할 수 없었다.

Nuclear transformation시 CTB의 발현율이 낮으며, chloroplast gene targeting의 경우는 적절한 벡터의 확보가 어렵고 chloroplast의 형질전환이 기술적으로 어렵기 때문에 이에 대한 대안으로 CTB protein을 chloroplast로 이동 (targeting)시켜 식물체내에서 CTB의 발현율을 증대시키고자 하였다. 특정 단백질의 발현은 세포질속에 존재하는 그 단백질의 양에 의해 조절될 수 있다. Chloroplast는 한 세포당 10000개 가량 존재하는데 세포질에서 생성된 단백질이 chloroplast 내로 이동하면 세포질내에 단백질의 축적을 감소시키므로 특정 단백질의 발현양 증가를 기대할 수 있다. Chloroplast로의 단백질 targeting을 위하여 *Agrobacterium*의 border sequence와 CaMV35S promoter를 사용하였으며, promoter 다음에 tobacco 및 rice의 transit peptide sequence와 각각 fusion된 *ctb* 유전자를 삽입하여 재조합 DNA를 대장균에서 구성하였다. *Agrobacterium*-mediated transformation 법에 의해 담배식물을 형질전환하였으며, 형질전환 후 항생제를 포함한 선택배지에서 식물체의

재생을 유도하였다. 그 결과 rice의 transit peptide sequence를 사용한 경우에는 1차례의 형질전환 시도에서 많은 수의 재생된 식물체를 얻었으나, tobacco의 transit peptide sequence를 사용한 경우에는 4차례의 형질전환 시도를 하였음에도 불구하고 선택배지에서 식물체의 재생이 유도되지 않았다. 이러한 결과는 담배식물에서 tobacco의 transit peptide가 매우 효율적으로 작동하여 CTB 단백질의 chloroplast membrane 이동과정 중에 소수성이 강한 CTB 단백질이 membrane에 embedding 되어 세포에 좋지 않은 영향을 주는 것으로 유추된다. 한편 담배식물에서 rice의 transit peptide는 효율적으로 작동하지 않을 가능성이 있는데 그렇다 하더라도 발현율이 높은 rice의 transit peptide의 도움을 받아 fusion된 상태로 존재하는 CTB 단백질의 발현율이 증가될 가능성이 있다. 현재 rice의 transit peptide sequence와 fusion된 *ctb* 유전자로 형질전환된 independent 담배식물 20주를 확보하고 있으며, 이들에 대하여 genomic-PCR을 수행하여 rice의 transit peptide sequence와 fusion된 *ctb* 유전자의 도입을 확인하였다. 과제 종료 후에도 이에 대한 실험을 지속적으로 진행하여 rice의 transit peptide sequence와 *ctb* 유전자가 도입된 담배식물에서 단백질을 추출하여 immunoblotting을 실시하여 CTB 단백질의 발현양을 조사하고자 한다. CTB 단백질의 발현율이 높을 경우에는 이를 상추식물에 도입하여 edible vaccine 생산 가능성을 계속 조사할 예정이다.

최근에 미생물과 바이러스의 epitope를 식물 바이러스의 표면에 발현시키는 방법이 소개되고 있다. 이러한 재조합 식물바이러스 역시 기존의 백신 생산의 단점을 극복할 안전성과 경제성을 지닌 경구용 백신으로서의 가능성을 지니고 있다. 식물 바이러스를 이용한 항원의 epitope sequence의 transient expression을 위하여 포유동물의 면역체계에 콜레라 epitope가 인지되어질 수 있도록 담배 모자이크 바이러스의 표피 단백질의 유전자를 재조합하였다. 담배 모자이크 바이러스 (TMV)의 외피 단백질의 surface loop에 epitope으로 작용할 수 있는 CTB sequence 부위를 4개 선정하여 epitope sequence의 transient expression을 시도하였다. TMV의 full-length cDNA의 coat protein의 surface loop region에 각각의 epitope sequence를 삽입하여 hybrid TMV cDNA를 구성한 후 run-off transcription 법으로 시험관 내에서 RNA polymerase에 의해 *in vitro* transcripts를 합성하여 이를 담배 식물에 접종하였다. 접종 7일 후 4개의 후보 epitope sequence 가운데 2개가 삽입된 변형된 hybrid TMV (pTMV6.4E와 pTMV6.4G)를 각각 접종하였을 때 식물체가 TMV 병증을 보이는 것이 확인되었다. TMV 병증을 보이는 식물체들로부터 단백질을 추출하여 immunoblotting을 실시하였으며, 그 결과 TMV 병증을 보이는 식물들의 총

단백질 중에서 CTB 항체와 특이적인 결합을 하는 단백질 단편을 확인할 수 있었다. 또한 CTB 항체와 특이적인 결합을 하는 단백질 단편은 SDS-PAGE 상에서 TMV coat protein 보다 약간 높은 위치에서 발견되는데 이러한 상대적 이동성의 차이는 재조합 표피 단백질에 삽입되어진 epitope의 길이와 정확히 맞아떨어지고 있으며, immunoblotting 분석법에서 pTMV6.4G의 재조합 표피 단백질이 pTMV6.4E와의 적은 길이 차에도 불구하고 더욱 강하게 탐지되었다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

일반적으로 경구면역은 parenteral 면역에 비해 더 많은 양의 항원이 필요하므로 CTB의 발현 양을 높일 수 있는 여러 가지 전략을 사용하여 보았다. 본 연구에서 nuclear transformation을 이용한 CTB 발현시 position effect 보다는 식물과 CTB 항원 유전자의 codon usage가 다른 것이 *ctb* 유전자의 발현에 영향을 주는 것으로 판단되므로 합성 oligomer를 이용한 항원 유전자의 염기서열 변형이 필요한 것으로 사려된다. Chloroplast gene targeting의 경우 chloroplast의 유전자 내에 외부유전자가 삽입 되기위하여는 homologous recombination을 유발하는 border sequence가 매우 중요하므로 Maliger 그룹의 chloroplast gene targeting 벡터와 유사한 기능을 갖는 벡터시스템의 확보가 먼저 선행되어야 할 것으로 사려된다. 식물 바이러스를 이용한 항원의 epitope sequence의 transient expression을 시도한 경우 immunoblotting 분석법에서 pTMV6.4G의 재조합 표피 단백질이 pTMV6.4E와의 적은 길이 차에도 불구하고 더욱 강하게 탐지되는 것은 선택된 epitope sequence가 매우 antigenic하다는 것을 의미하며 이와 같은 결과로 볼 때, 재조합 TMV가 경제성과 생산성을 수반한 새로운 콜레라 subunit 백신으로서의 이용 가능성을 가진 것으로 사려된다.

## SUMMARY

As a model system, transgenic plants for cholera vaccine production was generated in this study. Three strategies for production of cholera toxin in plants were devised : Genetic transformation of the nuclear genome of plants using pBDCTB ; Genetic transformation of the plastid genome of plants using pSBLCTB ; and transient expression of engineered tobacco mosaic virus (TMV) with epitope sequence of CTB.

pBDCTB is designed to produce CTB constitutively under the control of 35S CaMV dual promoter in transgenic plants. Transfer of *ctb* gene and the presence of mRNA for *ctb* gene were respectively identified by nucleic acid analysis in F1 progenies from 3 transgenic lines. However, CTB proteins were not detected by immunoblot analysis. It was likely that the expression level of *ctb* gene was very low in cytoplasm of transgenic plant cells.

Because oral immunization requires larger amount of antigens by comparison with parenteral immunization, plastid transformation using pSBLCTB was tried to improve CTB expression level. Plastid transformation event in this study based on incorporation of the *aadA* and *ctb* gene into the plastid genome by two homologous recombination via the flanking plastid genes, *Prrn*, *psbA*. Unfortunately transplastomic plants were not gained in this study.

The surface of TMV coat protein for presentation of a cholera toxin epitope to the mammalian immune system was engineered. Due to the size limitation of inserted peptides for proper assembly of TMV coat protein, 4 shortened series of a CTB epitope was selected. And synthetic oligonucleotides corresponding selected peptides were inserted into the surface loop region of the TMV coat protein gene by overlapping polymerase chain reaction, respectively. Recombinant TMVs are all transcribed *in vitro*. The infectivity of these transcripts was assayed on a TMV local legion host, *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. After 7 days, typical mosaic symptoms on the leaves of Xanthi nc inoculated with pTMV6.4E and pTMV6.4G were appeared, respectively. The

recombinant coat proteins of pTMV6.4E and pTMV6.4G migrated slower than that of TMV-K in SDS-polyacrylamide electrophoresis and were specifically detected with anti cholera toxin IgG by immunoblot analysis. The differences of apparent mobility are consistent with the presence of the inserted epitope in the recombinant coat proteins. In addition, the differences of band intensity in western blot analysis are consistent with the length of the selected epitopes. These recombinant TMVs have the possibility to meet the need for cost-effective and commercial scalable production of cholera subunit vaccines.

## CONTENTS

1. Title .....	121
2. Purpose of this study .....	121
3. Results .....	124
3.1 <i>ctb</i> gene .....	124
3.2 Nuclear transformation by <i>ctb</i> gene .....	128
3.2.1 Construction of pBDCTB .....	128
3.2.2 Nuclear transformation via cocultivation with <i>Agrobacterium</i> containing <i>ctb</i> gene .....	131
3.2.3 PCR analysis for genomic DNA of transgenic plants transformed with pBDCTB .....	133
3.2.4 RT-PCR analysis for total RNA of transgenic plants transformed with pBDCTB .....	133
3.2.5 Immunoblot analysis of transgenic plants transformed with pBDCTB ..	135
3.3 Chloroplast transformation by <i>ctb</i> gene .....	136
3.3.1 Construction of pSBLCTB .....	136
3.3.2 Chloroplast transformation via the particle bombardment with pSBLCTB .....	138
3.4 Chloroplast targeting of CTB protein .....	138
3.4.1 Construction of pBDToTPCTB and pBDRiTPCTB .....	138
3.4.2 Nuclear transformation via cocultivation with <i>Agrobacterium</i> containing <i>ctb</i> gene fused with tobacco transit peptide .....	145

3.4.3 Nuclear transformation via cocultivation with <i>Agrobacterium</i> containing <i>ctb</i> gene fused with rice transit peptide .....	145
3.4.4 PCR analysis for genomic DNA of transgenic plants transformed with pBDRiTPCTB .....	146
3.5 Transient expression of CTB epitopes .....	148
3.5.1 Construction of pTMV6.4D, pTMV6.4E, pTMV6.4F, pTMV6.4G .....	148
3.5.2 Synthesis of <i>in vitro</i> transcripts from the cDNA of pTMV6.4D, pTMV6.4E, pTMV6.4F, pTMV6.4G .....	155
3.5.3 SDS-PAGE analysis of recombinant TMV coat protein .....	155
3.5.4 Immunoblot analysis of tobacco plants infected with <i>in vitro</i> transcripts of pTMV6.4E, or pTMV6.4G .....	156
4. References .....	160

## 목 차

제 1장. 연구제목 .....	121
제 2장. 연구목적 .....	121
제 3 장. 연구내용 .....	124
제 1절. <i>ctb</i> 유전자 .....	124
제 2절. <i>ctb</i> 유전자에 의한 nuclear transformation .....	128
제 1항. pBDCTB의 구성 .....	128
제 2항. <i>ctb</i> 유전자를 갖고 있는 <i>Agrobacterium</i> 과의 동시 배양에 의한 담배식 물의 형질전환 .....	131
제 3항. 형질전환 후 재생된 식물체에서 genomic PCR 분석에 의한 <i>ctb</i> 유전자 의 도입 확인 .....	131
제 4항. <i>ctb</i> 유전자의 도입이 확인된 형질전환 식물체에서 RT-PCR 분석에 의 한 <i>ctb</i> 유전자의 발현 확인 .....	133
제 5항. <i>ctb</i> 유전자의 발현이 확인된 형질전환 식물체의 총 단백질에 대한 immunoblotting .....	135
제 3절. <i>ctb</i> 유전자에 의한 chloroplast transformation .....	136
제 1항. pSBLCTB의 구성 .....	136
제 2항. Particle bombardment 법에 의한 chloroplast의 형질전환 시도 .....	138
제 4절. CTB 단백질의 chloroplast targeting .....	138
제 1항. pBDToTPCTB 및 pBDRiTPCTB의 구성 .....	138
제 2항. Tobacco의 transit peptide sequence (ToTP)와 fusion된 <i>ctb</i> 유전자를 갖고 있는 <i>Agrobacterium</i> 과의 동시 배양에 의한 담배식물의 형질전환 .....	145
제 3항. Rice의 transit peptide sequence (RiTP)와 fusion된 <i>ctb</i> 유전자를 갖고 있는 <i>Agrobacterium</i> 과의 동시 배양에 의한 담배식물의 형질전환 .....	145

제 4항. 형질전환 후 재생된 식물체에서 genomic PCR 분석에 의한 Ri- <i>ctb</i> 유전자의 도입 확인 .....	146
제 5절. CTB epitope의 잠정 발현 .....	148
제 1항. pTMV6.4D, pTMV6.4E, pTMV6.4F 및 pTMV6.4G의 구성 .....	148
제 2항. 각각의 CTB epitope sequence를 포함하는 recombinant full-length cDNA를 주형으로 하는 <i>in vitro</i> 전사체의 합성 .....	155
제 3항. SDS-PAGE 분석법에 의한 recombinant TMV coat protein의 확인 .....	155
제 4항. Immunoblotting에 의한 CTB epitope의 발현확인 .....	156
제 4장. 참고문헌 .....	160

## 제 1장 연구제목

담배에서 vaccine 유전자를 포함한 재조합 식물 발현 벡터의 구축

## 제 2장 연구목적

본 연구의 목적은 식물을 생산 시스템으로 이용하여 백신을 생산하는데 있다. 식물 생명공학의 신기술의 발달은 외부 유전자의 식물내 발현을 용이하게 하여 농산물의 생산성 증대를 위해 필요한 여러 가지 특성 (제초제, 해충, 바이러스 저항성)을 가진 transgenic plant 의 육종을 가능하게 하였다. 최근 외국의 학계와 산업체의 연구실에서는 한 걸음 더 나아가 공장과 같은 역할을 할 수 있는 transgenic plant 에 대한 연구를 실시하고 있으며, 산업적 또는 의약적 가치를 갖는 생물학적 제품들이 식물에서 생산될 날이 멀지 않은 것으로 전망되고 있다.

식물을 생산 시스템으로 이용하고자 할 때 생물학적 제품 가운데 백신이 가장 실용성이 있으며, 연구가 앞서 있다. 식물에서의 백신 생산은 cultured animal cell 또는 Yeast cell을 이용하는 기존의 생산 방법에 비하여 매우 큰 장점을 갖는다. 식물 백신 생산 시스템은 공장 시설비, 공장 가동비 및 배지 값이 필요하지 않으며, 식물의 생육 조건이 animal cell이나 Yeast cell과 달리 까다롭지 않으므로 현 백신보다 매우 저렴한 비용으로 생산이 가능하여 경제적으로 유리하다. 무엇보다 식물 백신은 cultured animal cell을 이용한 백신 생산에서 항상 위험 요인으로 대두되는 animal virus의 감염에 대한 두려움을 제거할 수 있다.

식물에서 백신 생산을 위하여 2가지 전략이 사용될 수 있다. 하나는 *Agrobacterium* T DNA vector 또는 particle gun 등의 직접적인 방법에 의해 항원 단백질을 암호화하는 유전자를 식물의 염색체 내에 안정하게 삽입시키는 것 (stable gene expression) 인데 아직 이 방법에 의해 백신을 생산 한 보고는 없다. 다른 하나는 viral vector에 항원 단백질에 epitope 염기서열을 삽입하는 방법을 이용한 잠정적 발현 (transient expression) 이다. Stable gene expression은 많은 후대 transgenic plant를 얻을 수 있다는 장점이 있으며, 더 큰 장점은 multiple component 백신 생산을 위하여 한 개 이상의 유전자를 도입할 수 있다는 것이다. 또한 유전자 발현을 위한 적절한 promoter의 선택은 항원 유전자의 기관과 조직

특이적 발현을 가능하도록 한다. 식물에는 toxic alkaloids가 많이 존재하여 식물에서 생산된 백신을 주사용으로 사용할 경우에는 고 난이도의 정제 과정이 필요하다. 그러나 백신을 섭취 가능한 식물조직에 발현시켜 식물 조직과 함께 섭취한 경우에도 immune response가 유도된다면 정제 비용이 절감되므로 생산 원가를 낮출 수 있다. Transient expression은 viral vector를 각각의 식물에 접종해야 하는 번거로움이 있으나 매우 높은 yield의 항원을 간단한 정제 과정에 의해 회수할 수 있는 장점이 있다.

외국의 연구진들에 의해 외부 유전자의 안정적인 또는 잠정적 발현에 의해 식물에서 백신들이 만들어졌다. Texas A&M 대학의 Arntzen 팀은 Hepatitis B virus의 표면 단백질을 암호화하는 유전자를 식물에 도입하여 식물에서 virus protein이 합성되는 것을 확인하였고 쥐에 soluble extract를 먹인 결과 쥐에서 HVB의 표면 단백질을 인지할 수 있는 항체가 생성됨을 보여주었다. 다음 단계에서 Arntzen 팀은 enterotoxin의 subunit protein을 암호화하는 유전자를 감자에 도입한 뒤 enterotoxin의 subunit protein을 합성하여 갖고 있는 감자괴경을 조리하지 않고 쥐에게 먹인 결과 쥐에서 enterotoxin에 대한 antibody가 합성되었으며, serum antibody 뿐만 아니라 장내 소화기계를 포함한 점막 조직에 분비되는 mucosal antibody도 함께 합성됨을 보여주었는데, 이러한 결과는 식물에서 생산된 백신이 경구용 백신으로 사용될 수 있음을 의미한다. 식물 바이러스는 animal에서 질병을 유발할 수 없으므로 많은 연구팀에서 식물 바이러스의 외피 단백질 내에 immune response능이 있는 항원 단백질의 일부 (epitope)를 발현할 수 있도록 식물 바이러스의 유전자를 조작하였다. John 등은 TMV의 외피 단백질 내에 mouse zona pellucida에 발견되는 단백질의 13개 아미노산을 삽입시켜 변형시킨 다음 epitope 서열을 포함하는 변형된 TMV의 외피 단백질을 쥐에 주사한 결과 쥐에서 zona pellucida protein fragment를 인지할 수 있는 antibody가 만들어짐을 확인하였다. 퍼듀대의 Johnson 등은 HIV 바이러스의 gp41 surface protein을 cowpea mosaic virus에 삽입시켰으며 그 결과 변형된 recombinant plant 바이러스는 mouse antibody 생산을 유발하였으며 시험관 내에서 antibody는 HIV virus를 무독화할 수 있었다. 이러한 결과는 식물 바이러스의 외피 단백질에 특이적인 epitope을 삽입함에 의해 animal virus의 백신 생산이 가능함을 보여준다.

식물에서 생산된 백신을 식물조직과 함께 복용하고자 할 때 조직 내에 항원 단백질이 많은 양으로 존재해야 작은 양의 조직 섭취에 의해서도 면역 반응이 유발되므로 발현율이 높은 시스템의 확립이 식물 백신 생산에서 필수적이다. 본 연구에

서는 항원 (cholera toxin B) 유전자가 식물체 내에서 효율적으로 발현되도록 하기 위하여 식물의 nuclear transformation, plastid transformation, chloroplast로의 단백질 targeting 및 식물 바이러스를 이용한 항원의 epitope sequence의 transient expression을 시도하였다.

## 제 3장. 연구내용

### 제 1절. *ctb* 유전자

녹십자 연구소에서 어린이 설사병 원인균인 *Vibrio cholerae* inaba type의 cholera-toxin B subunit 유전자를 PCR 클로닝한 것을 제공받았다. 제공받은 *ctb* 유전자는 박테리아에서 signal sequence로 작용하는 첫 번째 아미노산부터 스물한 번째 아미노산이 제거된 상태이며, 첫 번째 아미노산이 Thr로 시작되는 특징을 갖는다. 제공받은 *ctb* 유전자에는 그 자체로 식물 발현 벡터에 클로닝하기 위한 적절한 제한 효소 부위가 없고 첫 번째 아미노산이 Thr으로 시작되므로 initiation에 적절하지 않다. 식물 발현 벡터 클로닝에 적합한 제한 효소 부위를 삽입하고, 첫 번째 아미노산인 Thr의 codon (ACA) 앞에 ATG를 삽입하여 효율적인 initiation codon으로 작용하도록 하기 위하여 본 연구실에서 primer를 고안하여 proof-reading 기능이 있어 에러율이 낮다고 알려진 pFU DNA polymerase (NEB)를 사용하여 PCR 클로닝을 실시하고 염기서열을 분석하였다. 그 결과 *ctb* 유전자는 PCR 반응중에 우려되는 base deletion 및 단백질의 구조 형성에 영향을 미칠만한 심각한 base change 등의 변화가 일어나지 않았으며, primer 고안시 삽입한 initiation codon과 제한 효소 부위들이 존재하여 식물벡터에 클로닝하기에 적절한 상태임을 확인할 수 있었다. 그림 1은 본 연구실에서 *ctb* 유전자를 염기분석 한 후 발표된 다른 strain의 *ctb* 유전자와 염기서열을 비교한 것으로서 식물 발현 벡터에 클로닝하기 위하여 확보된 *ctb* 유전자는 569B-classical type과 sequence가 정확히 일치됨이 확인되었다.

39  
 atg atc aaa tta aaa ttt ggt gtt ttt ttt aca gtt tta Classical biotype 569B  
 atg atc aaa tta aaa ttt ggt gtt ttt ttt aca gtt tta 1854/0139-Benga  
 atg atc aaa tta aaa ttt ggt gtt ttt ttt aca gtt tta S7/037  
 atg atc aaa tta aaa ttt ggt gtt ttt ttt aca gtt tta 4260B/0139  
 atg atc aaa tta aaa ttt ggt gtt ttt ttt aca gtt tta eltor2125

78  
cggatcc atg gcc aca cct caa aat att This study  
cta tat tca gca tat gca cat gga aca cct caa aat att Classical biotype 569B  
 cta tat tca gca tat gca cat gga aca cct caa aat att 1854/0139-Benga  
 cta tat tca gca tat gca cat gga aca cct caa aat att S7/037  
 cta tat tca gca tat gca cat gga aca cct caa aat att 4260B/0139  
 cta tat tca gca tat gca cat gga aca cct caa aat att eltor2125

117  
 act gat ttg tgt gca gaa tac cac aac aca caa ata tat This study  
 act gat ttg tgt gca gaa tac cac aac aca caa ata tat Classical biotype 569B  
 act gat ttg tgt gca gaa tac cac aac aca caa ata tat 1854/0139-Benga  
 act gat ttg tgt gca gaa tac cac aac aca caa ata tat S7/037  
 act gat ttg tgt gca gaa tac cac aac aca caa ata tat 4260B/0139  
 act gat ttg tgt gca gaa tac cac aac aca caa ata tat eltor2125

156  
 acg cta aat gat aag ata ttt tcg tat aca gaa tct cta This study  
 acg cta aat gat aag ata ttt tcg tat aca gaa tct cta Classical biotype 569B  
 acg cta aat gat aag ata ttt tcg tat aca gaa tct cta 1854/0139-Benga  
 acg cta aat gat aag ata ttG tcg tat aca gaa tct cta S7/037  
 acg cta aat gat aag ata ttt tcg tat aca gaa tct cta 4260B/0139  
 acg cta aat gat aag ata ttt tcg tat aca gaa tct cta eltor2125

195

gat gga aaa aga gag atg gct atc att act ttt aag aat	This study
gat gga aaa aga gag atg gct atc att act ttt aag aat	Classical biotype 569B
gat gga aaa aga gag atg gct atc att act ttt aag aat	1854/0139-Benga
gat gga aaa aga gag atg gct atc att act ttt aag aat	S7/037
gat gga aaa aga gag atg gct atc att act ttt aag aat	4260B/0139
gat gga aaa aga gag atg gct atc att act ttt aag aat	eltor2125

234

ggt gca act ttt caa gta gaa gta cca ggt agt caa cat	This study
ggt gca act ttt caa gta gaa gta cca ggt agt caa cat	Classical biotype 569B
ggt gca aTt ttt caa gta gaa gta cca ggt agt caa cat	1854/0139-Benga
ggt gca act ttt caa gta gaa gta cca ggt agt caa cat	S7/037
ggt gca aTt ttt caa gta gaa gta cca ggt agt caa cat	4260B/0139
ggt gca aTt ttt caa gta gaa gta cca ggt agt caa cat	eltor2125

273

ata gat tca caa aaa aaa gag att gaa agg atg aag gat	This study
ata gat tca caa aaa aaa gag att gaa agg atg aag gat	Classical biotype 569B
ata gat tca caa aaa aaa gag att gaa agg atg aag gat	1854/0139-Benga
ata gat tca caa aaa aaa gag att gaa agg atg aag gat	S7/037
ata gat tca caa aaa aaa gag att gaa agg atg aag gat	4260B/0139
ata gat tca caa aaa aaa gag att gaa agg atg aag gat	eltor2125

312

acc ctg agg att gca tat ctt act gaa gct aaa gtc gaa	This study
acc ctg agg att gca tat ctt act gaa gct aaa gtc gaa	Classical biotype 569B
acc ctg agg att gca tat ctt act gaa gct aaa gtc gaa	1854/0139-Benga
acc ctg agg att gca tat ctt act gaa gct aaa gtc gaa	S7/037
acc ctg agg att gca tat ctt act gaa gct aaa gtc gaa	4260B/0139
acc ctg agg att gca tat ctt act gaa gct aaa gtc gaa	eltor2125

351

aag tta tgt gta tgg aat aat aaa acg cct cat gcg att	This study
aag tta tgt gta tgg aat aat aaa acg cct cat gcg att	Classical biotype 569B
aag tta tgt gta tgg aat aat aaa acg cct cat gcg att	1854/0139-Benga
aag tta tgt gta tgg aat aat aaa acg cct cat gcg att	S7/037
aag tta tgt gta tgg aat aat aaa acg cct cat gcg att	4260B/0139
aag tta tgt gta tgg aat aat aaa acg cct cat gcg att	eltor2125

375

<u>gcc gca att agt atg gca act taa gagctcg</u>	This study
gcc gca att agt atg gca act taa	Classical biotype 569B
gcc gca att agt atg gca act taa	1854/0139-Benga
gcc gca att agt atg gca act taa	S7/037
gcc gca att agt atg gca act taa	4260B/0139
gcc gca att agt atg gca act taa	eltor2125

그림1. 본 연구에서 사용된 *ctb* 유전자의 염기서열을 기존에 보고된 5개 strain의 *ctb* 유전자의 염기서열과 비교한 것임. Strain 간에 염기가 다른 부분은 대문자로 표시하였으며, 밑줄친 부분은 primer 합성에 사용된 부위를 나타낸다.

## 제 2절. *ctb* 유전자에 의한 nuclear transformation

### 1. pBDCTB의 구성

식물에서 cholera-toxin B 유전자의 발현을 위하여 녹십자에서 제공한 *ctb* 유전자를 주형으로 하고 클로닝에 적합한 제한 효소 부위와 initiation codon이 삽입된 primers와 pFU DNA polymerase (NEB)를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다. 이때 사용된 up stream primer인 CTXUP의 sequence는 5'-cggatccatggccacacctcaaat attac-3' 이며 down stream primer인 CTXDN의 sequence는 5'-cgagctcttaattgccat actaattgctgg-3' 이다. 증폭된 DNA 단편을 pUC19 벡터에 클로닝하여 pUC19CTB라 명명하고 염기서열을 분석하였다. 염기분석 결과 그림 1에서 보는 바와 같이 PCR 반응중에 우려되는 base deletion 및 base change 등의 변화가 일어나지 않았으며, primer 고안시 삽입한 initiation codon과 제한 효소 부위들이 존재하여 증폭된 DNA는 식물벡터에 클로닝하기에 적절한 상태임을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 식물 발현 벡터로 pBD121을 사용하였는데 pBD121 벡터는 외부 단백질의 발현시 일반적으로 이용되는 CaMV35S promoter를 가지며 *npt* 유전자 발현에 필요한 cassette를 갖고 있어 kanamycin selection이 가능하고 *Agrobacterium*의 border sequence를 가지고 있어 homologous recombination에 의한 nuclear transformation을 가능케 한다. pUC19CTB로부터 *ctb* 유전자를 *Bam*HI 과 *Sac*I site를 이용하여 잘라낸 다음 이를 똑같은 제한 효소로 자른 pBD121에 구성하여 pBDCTB로 명명하였으며 pBDCTB를 제한 효소로 절단하여 *ctb* gene이 sense orientation으로 벡터내에 올바르게 삽입되어 있음을 확인하였다. 그림 2와 3은 pBDCTB의 construction scheme과 제한효소 분석 결과를 각각 보여준다. 대장균에서 구성된 pBDCTB는 이를 식물에 도입하기 전에 *Agrobacterium*에 먼저 도입되어야 한다. *Agrobacterium*에는 Ti plasmid가 존재하여 유전자를 식물에 도입할 때 필요한 성분들을 합성하여 외부 유전자에 의한 식물의 형질전환을 가능케 한다. pBDCTB로 형질전환된 *Agrobacterium*으로부터 DNA를 추출하여 *ctb* 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 PCR 반응을 수행한 결과 *ctb* 유전자 크기에 해당하는 약 312bp의 DNA 단편이 증폭되는 것이 확인되었다.

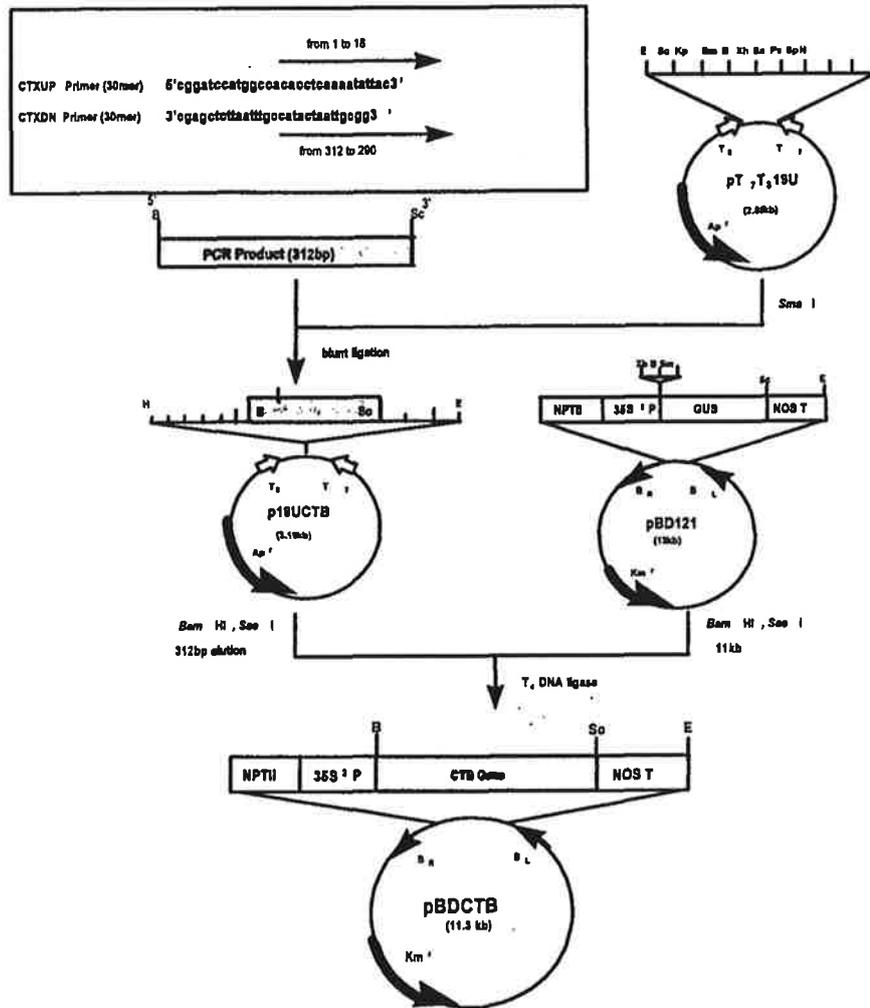


Figure 2. Construction scheme of pBDCTB, plant binary vector containing *ctb* gene. NPTII, neomycine phosphotransferase gene; 35S<sup>2</sup> P, cauliflower mosaic virus dual 35S promoter; GUS, glucuronidase; NOS T, nopaline synthetase gene terminator; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; Kp, *Kpn*I; Sc, *Sac*I; Sp, *Sph*I; Xb, *Xba*I

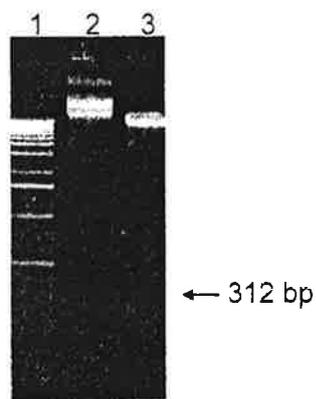


Figure 3. Restriction analysis of plasmid pBDCTB. Plasmids were digested with restriction enzymes (*Bam*HI and *Sac*I) and DNA fragment generated by the cleavage of restriction enzymes were separated on 1.5% agarose gel. Lane 1: 1 kb ladder, Lane 2: pBDCTB, Lane 3: pBDCTB /*Bam*HI and *Sac*I

## 2. *ctb* 유전자를 갖고 있는 *Agrobacterium*과의 동시 배양에 의한 담배식물의 형질전환

pBDCTB로 형질전환된 *Agrobacterium*을 kanamycin (20 $\mu$ g/ml)과 acetosyringone (50 $\mu$ M/EtOH) 존재 하에서 O.D 값이 0.3이 되도록 배양한 다음 *Nicotiana tabacum* cv. NC82의 leaf disk와 2일간 동시 배양하여 *ctb* 유전자가 식물 세포의 genome에 도입되도록 유도하였다. *Agrobacterium*과 동시배양이 끝난 담배식물의 leaf disk 조직을 항생제 (kanamycin, 200 $\mu$ g/ml)가 첨가된 배지로 옮겨 shoot 형성을 유도하여 형질전환체를 일차적으로 선별하였다. 식물 배지로서는 MS medium을 사용하였으며, shoot 형성 유도 배지로서는 MS medium에 1ppm의 BAP와 0.1ppm의 NAA가 첨가된 것을 사용하였다. *Agrobacterium*과 동시배양이 끝난 담배식물의 leaf disk 조직을 항생제가 첨가된 배지로 옮긴 다음 3주가 지나면 항생제 저항성 shoot가 나오기 시작하며, 4-6 주정도 지나면 stem이 확실하게 형성된다. 이때 항생제가 첨가된 배지는 3 주마다 새로운 배지로 바꾸어 주는 것이 escape를 줄이는 데 효과적이다. Shoot가 자라서 leaf와 stem이 확실히 구분되면 이를 잘라서 식물 hormone이 첨가되지 않은 MS medium에 옮겨 root 형성을 유도하였다. 각각의 leaf disk로부터 하나의 shoot만을 취하여 independent cell line을 15주 정도 확보하였다. *Agrobacterium*과 동시배양부터 기내에서 root를 형성까지는 2개월 정도의 시간이 걸린다.

## 3. 형질전환 후 재생된 식물체에서 genomic PCR 분석에 의한 *ctb* 유전자의 도입 확인

pBDCTB로 형질전환 후 확보된 재분화 kanamycin 저항성 식물체들이 기내에서 10cm 크기로 자랐을 때 이들로부터 leaf 조각을 떼어내어 Gawel과 Jarret의 방법에 의해 genomic DNA를 분리하였다. Leaf 조각 150mg을 취하여 막자 사발 안에서 액체질소로 곱게 간 다음 여기에 DNA extraction buffer [1% (w/v) CTAB, 100mM Tris·Cl pH8.0, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 1% (v/v) mercaptoethanol] 1.5ml을 첨가한 다음 잘 섞어준 다음 extraction buffer의 3/4 부피에 해당하는 chloroform을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 30분 이상 방치하면서 잘 섞어주었다. 시료를 4 $^{\circ}$ C, 14000rpm에서 30분간 원심분리한 다음 상등액을 취하여 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) extraction을 실시하여 상등액을 취한

다음 상등액과 등 부피의 isopropyl alcohol을 가한 후 4℃에서 30분간 방치하였다. 시료를 4℃, 14000rpm에서 30분간 원심분리하여 genomic DNA pellet을 회수하였다. DNA pellet을 70% EtOH로 세척하여 여분의 salt를 제거한 후 400 $\mu$ l의 TE에 현탁한 다음 5 $\mu$ g의 RNase를 첨가하여 시료내의 RNA를 제거하였다. RNase 처리 후 phenol extraction/EtOH precipitation 과정을 거쳐 pellet을 50 $\mu$ l의 TE에 현탁시켜 DNA 시료를 준비하였다. 이와 같은 방법으로 genomic DNA를 추출할 경우 150mg의 leaf 시료당 약 50 $\mu$ g 정도의 genomic DNA를 얻을 수 있다. Genomic DNA 시료(1 $\mu$ g)를 주형으로 하고 *ctb* gene에 특이적인 양 말단의 primer (각 50 pmole)와 taq DNA polymerase(1U)를 사용하여 PCR (95℃, 1분 → 94℃, 1분; 57℃, 1분; 72℃, 1분 30초 → 72℃, 5분) 반응을 30회 수행함으로써 *ctb* gene을 갖고 있는 형질전환 식물을 확인하였다. 확보된 재분화 kanamycin 저항성 식물체들의 대부분에서 *ctb* gene의 도입을 확인할 수 있었는데 *ctb* 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 PCR 반응을 수행한 것을 agarose gel을 사용하여 전기 영동 분석한 결과 *ctb* 유전자 크기에 해당하는 약 320bp의 DNA 단편이 증폭되는 것이 확인되었다 (그림 4).

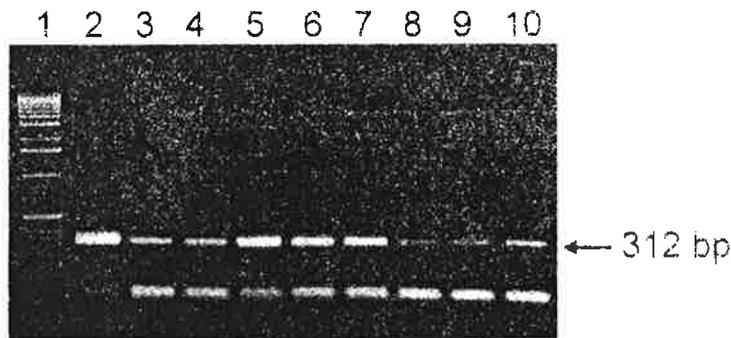


Figure 4. PCR-amplified *ctb* gene from genomic DNA of transgenic F1 plants. Amplified DNA fragments were separated on 1.8% agarose gel. Lane 1: 1kb ladder, Lane 2: pBDCTB as positive control, Lane 3: No. 4-1, Lane 4: No. 22-1, Lane 5: No. 22-2, Lane 6: No. 22-3, Lane 7: No. 22-4, Lane 8: No. 34-1, Lane 9: No. 34-2, Lane 10: No. 34-3

#### 4. *ctb* 유전자의 도입이 확인된 형질전환 식물체에서 RT-PCR 분석에 의한 *ctb* 유전자의 발현 확인

3항에서 *ctb* 유전자 도입이 확인된 재분화 형질전환 식물체에서 leaf 조각을 떼어 내어 이로부터 Chomzynski의 방법에 의해 total RNA를 분리하였다. Leaf 조각 150mg을 취하여 막자 사발 안에서 액체질소로 곱게 간 다음 여기에 RNA extraction buffer인 solution D (4M guanidium isothyanate, 25mM sodium citrate, 0.5% sarcosyl, 1% (v/v) mercaptoethanol) 1.5ml을 첨가한 다음 잘 섞어주고나서 extraction buffer의 0.1 부피의 2M sodium citrate (pH4.0), 1 부피의 acidic phenol, 0.2 부피의 chloroform/isopropanol alcohol (49:1)을 순차적으로 첨가하여 잘 섞어주고 4℃에서 30분 이상 방치하였다. 시료를 4℃, 14000rpm에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 취한 다음 상등액과 동 부피의 isopropyl alcohol을 가한 후 4℃에서 30분간 방치하였다. 시료를 4℃, 14000rpm에서 30분간 원심분리하여 total RNA를 회수한 다음 RNA pellet을 80% EtOH로 세척하여 여분의 salt를 제거한 후 400 $\mu$ l의 solution D에 현탁하였다. RNA 시료에 동 부피의 isopropyl alcohol을 가하여 alcohol precipitation을 실시한 후 얻은 RNA pellet을 200 $\mu$ l의 DEPC-treated D.W에 현탁한 다음 phenol extraction/alcohol precipitation 과정을 거쳐 최종적으로 50 $\mu$ l의 DEPC-treated D.W에 현탁시켜 RNA 시료를 준비하였다. RNA 시료(2-5 $\mu$ g)를 주형으로 하고 *ctb* gene의 3'-말단에 특이적인 primer (50 pmole)와 Superscript reverse transcriptase II (2U, GibcoBRL)를 사용하여 37℃에서 1시간 반응시켜 1st-stranded cDNA를 합성하였다. 1st-stranded cDNA 합성 반응액을 주형으로 하고 *ctb* gene에 특이적인 양 말단의 primer (각 50 pmole)와 taq DNA polymerase(1U)를 사용하여 PCR(95℃, 1분 → 94℃, 1분; 57℃, 1분; 72℃, 1분 30초 → 72℃, 5분) 반응을 30회 수행함으로써 *ctb* gene을 발현하는 형질전환 식물을 확인하였다. *ctb* 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 RT-PCR 반응을 수행한 후 시료를 agarose gel을 사용하여 전기 영동 분석한 결과 *ctb* 유전자 크기에 해당하는 약 320bp의 DNA 단편이 증폭되는 것이 확인되었다 (그림 5).



Figure 5. RT- PCR-amplified *ctb* gene from total RNA of transgenic F1 plants. Amplified DNA fragments were separated on 1.8% agarose gel. Lane 1: 1kb ladder, Lane 2: positive control, Lane 3: No. 4-1, Lane 4: No. 4-2, Lane 5: No. 4-3, Lane 6: No. 22-1, Lane 7: No. 22-2, Lane 8: No. 22-3, Lane 9: No. 34-1, Lane 10: No. 34-3

5. *ctb* 유전자의 발현이 확인된 형질전환 식물체의 총 단백질에 대한 immunoblotting

Genomic-PCR과 RT-PCR법에 의해 *ctb* 유전자의 도입 및 발현이 확인된 형질전환 식물체에서 CTB 단백질의 축적을 조사하기 위해 immunoblotting을 실시하였다. 형질전환 식물체에서 leaf 조각을 막자 사발 안에서 액체질소로 곱게 간 후 여기에 4℃로 차게한 protein extraction buffer [25mM sodium phosphate pH6.6, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 50mM sodium ascorbate, 0.5% (v/v) PMSF, 1% triton X-100]를 leaf 1g당 4ml을 가하여 잘 섞어준 다음 단백질 추출물을 4℃, 14000rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 취한후 Lowry법에 의해 총 단백질 농도를 측정하였다. 대조구 담배와 형질전환 식물체들에서 추출한 단백질들(30μg)을 SDS를 포함하는 12% polyacrylamide gel에서 전기영동하여 분리한 후 gel 상의 단백질들을 PVDF membrane에 이동시켰다. 단백질이 blotting된 PVDF membrane을 Tris-buffered saline (25mM Tris-Cl pH 7.5, 500mM NaCl)에 녹여있는 3% bovine serum albumin (BSA) 용액으로 3시간 동안 blocking을 시킨 뒤 CTB 단백질의 항체와 3시간 반응시켰다. CTB 단백질의 항체와 반응 후 3회에 걸쳐 Tris-buffered saline으로 세척하여 여분의 1차 항체를 제거한 다음 alkaline phosphatase와 conjugation된 2차 항체 (anti-rabbit IgG)와 1시간 반응시켰다. 2차 항체와 반응이 끝난 membrane을 3회에 걸쳐 Tris-buffered saline으로 세척하여 여분의 2차 항체를 제거한 다음 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate와 p-nitro-blue-tetrazolium chloride의 alkaline phosphatase 기질이 들어 있는 용액에 침지하여 발색을 시켜 형질전환 식물체에서 CTB 단백질이 축적되는지를 조사하였다. 그결과 positive control로 사용한 CTB 단백질의 lane에서는 발색반응이 나타났으나 형질전환 식물체의 단백질이 loading된 lane에서는 특이적 발색반응을 확인할 수 없었는데 이는 형질전환 식물체에서 CTB 단백질이 immunoblotting으로 검출될 수 있는 양보다 적은 양으로 축적되기 때문인 것으로 추측된다.

### 제 3절 *ctb* 유전자에 의한 chloroplast transformation

#### 제 1항. pSBLCTB의 구성

Chloroplast에 *ctb* 유전자를 도입하기 위한 vector를 구성하는 전략을 그림 6에 나타내었다.

*ctb* 유전자를 포함하는 pUC19CTB 플라스미드에서 *Bam*HI과 *Sac*I 제한효소로 삽입된 *ctb* 유전자부분을 절단하여 T4 DNA polymerase I를 처리한 후, *Sma*I 제한효소로 절단한 pSBL-*ctb*2 플라스미드에 연결시켰다. 삽입된 *ctb* 유전자의 방향은 제한효소를 이용하여 제대로 삽입되었는지 확인하였다. PSBLCTB의 제한효소 지도는 그림 7에 나타내었다. 이 결과로 담배의 색소체에 도입되어 외부유전자를 발현시키는 벡터로서의 pSBLCTB가 구성되었다. 이 벡터는 대장균에서 증폭되는 플라스미드인 pUC19에 기반을 두고 있고 spectinomycin 에 저항성을 부여하는 *aadA* 유전자와 *ctb* 유전자가 1.24kb와 0.86kb의 크기를 갖는 색소체 유래의 DNA에 인접하도록 구성되었다. *aadA* 유전자와 *ctb* 유전자는 homologous recombination 방식에 의해 식물 색소체에 도입되도록 구성하였다.

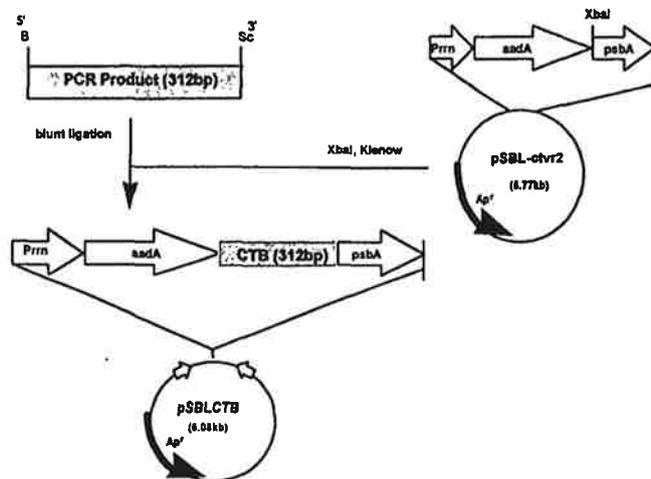


Figure 6. Construction scheme of pSBLCTB. Prm, the 3' region of the plastid *psbA* gene; *aadA*, adenylyltransferase as selective marker



Figure 7. Restriction analysis of plasmid pSBLCTB. Plasmids were digested with restriction enzymes (*Bam*HI and *Xba*I) and generated DNA fragments were separated on a 1.5% agarose gel. Lan 1, pSBL-ctv2: Lane 2, *Bam*HI digested pSBL-ctv2: Lane 3, *Bam*HI and *Xba*I digested pSBL-ctv2: Lane 4, 1kb ladder: Lan 5, pSBLCTB: Lane 6, *Bam*HI digested pSBLCTB: Lane 7, *Bam*HI and *Xba*I digested pSBLCTB

## 2. Particle bombardment 법에 의한 chloroplast의 형질전환 시도

Browers등은 단세포 식물인 *Chlamydomonas reinhardtii*에 외부유전자를 색소체에 도입하여 안정적으로 발현시킬 수 있음을 보고하였다. 또한 1990년 Svab등은 고등식물인 담배의 색소체에 안정적인 유전자 도입을 행하였다. 그러나 육상식물의 색소체로의 외부유전자 도입은 현재까지 효율이 낮은 것으로 알려져 있다. 이 기법에 착안하여 CTB항원을 색소체에 도입하는 연구에 착수하였다.

· 색소체 형질전환은 다음과 같이 진행하였다. 텅스텐 또는 금 입자를 pSBLCTB 플라스미드로 도포하여 담배 엽편에 bombardment법에 의해 형질전환을 시도하였다. pSBLCTB 플라스미드는 리보솜 RNA 오페론의 promoter인 Prm을 포함하고 있고, 색소체 유전자인 *psbA* 유전자의 3'-말단 부위를 포함하고 있으며 aminoglycoside 3-adenyl transferase 유전자인 *aadA*를 포함하고 있다. *aadA*는 spectinomycin에 저항성을 부여하는 인자이다. pSBLCTB를 이용한 형질전환은 색소체 유전자인 Prm과 *aadA*사이의 *ctb* 유전자 부분이 유사서열 재조합에 의해 삽입되는 원리이다. 본 연구에서 배지의 종류, 미소전달체의 크기, 선택시간등을 달리 하는 등 다양한 조건하에서 약 800회의 bombardment를 수행하였으나 형질전환체를 얻을 수 없었다.

Plastid transformation을 위하여 뉴저지대의 Maliger group이 발표한 pLAA24A 벡터 시스템을 사용하고자 하였으나 Maliger group이 어떠한 경우에도 이 벡터는 분주를 하지 않는다고 하여 대안으로 동 group에서 개발한 것이지만 효율이 비교적 떨어지는 pSBL derivative를 사용하였다. Chloroplast gene targeting의 경우 chloroplast의 유전자 내에 외부유전자가 삽입 되기위하여는 homologous recombination을 유발하는 border sequence가 매우 중요하므로 Maliger 그룹과 유사한 기능을 갖는 벡터시스템의 확보가 먼저 선행되어야 할 것으로 사려된다.

## 제 4절 *ctb* 단백질의 chloroplast targeting

### 1. pBDToTPCTB 및 pBDRiTPCTB의 구성

Chloroplast로의 단백질 targeting을 위하여 *Agrobacterium*의 border sequence와 CaMV35S promoter를 사용하였으며, promoter 다음에 tobacco 및 rice의 transit peptide sequence와 각각 fusion된 *ctb* 유전자를 삽입하여 재조합 DNA를 대장균에

서 구성하였다. Tobacco의 transit peptide sequence 는 본 연구실에서 담배식물의 RNA를 주형으로 한 RT-PCR 법에 의해 확보하였으며 rice의transit peptide sequence 는 명지대의 김주곤 교수로부터 분주 받은 rice의 chloroplast protein targeting 벡터에서 subcloning하여 사용하였다.

Tobacco의 transit peptide sequence와 fusion된 *ctb* 유전자로 구성된 pBDToTPCTB를 얻기 위하여 우선 담배식물의 RNA를 주형으로 한 RT-PCR 법에 의해 증폭된 tobacco의 transit peptide sequence를 확보하고 이를 pT7T319U 벡터에 클로닝하여 p19UToTP로 명명하였다. 이때 사용된 up stream primer인 ToTPUP 의 sequence는 5'gaggatcgcgccaccatggcttctc3' 이며 down stream primer 인 ToTPDN의 sequence는 5'gccatggcctgcatgcattgcactc3' 이다. p19UToTP를 *Bam*H1과 *Nco*I으로 절단하여 얻은 200bp의 transit peptide sequence를 똑같은 제한효소로 자른 pUC19CTB (제 2절 제 1항)과 ligation 하여 pToTPCTP를 구하였다. pToTPCTP를 *Bam*H1과 *Sac*I으로 절단하여 얻은 510bp의 tobacco transit peptide sequence와 fusion된 *ctb* 유전자를 똑같은 제한효소로 자른 pBD121과 ligation 하여 최종적으로 pBDToTPCTB를 얻었다. 그림 8과 9는 pBDToTPCTB의 construction scheme과 제한효소 분석 결과를 각각 보여준다. 대장균에서 구성된 pBDToTPCTB는 *Agrobacterium*에 도입되었으며 형질전환된 *Agrobacterium*으로부터 DNA를 추출하여 *ctb* 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 PCR 반응을 수행한 결과 *ctb* 유전자 크기에 해당하는 약 320bp의 DNA 단편이 증폭되는 것이 확인되었다 (그림 10).

Rice의 transit peptide sequence와 fusion된 *ctb* 유전자로 구성된 pBDRiTPCTB를 얻기위하여 우선 명지대에서 분주받은 pSK-RTG를 *Pst*I과 *Nco*I으로 절단하여 얻은 160bp의 rice의 transit peptide sequence를 똑같은 제한효소로 자른 pDK101 벡터와 ligation 하여 pDKTP를 구하였는데 이과정은 pDK101 벡터의 *Pst*I과 *Nco*I를 이용하기 위하여 수행한 것이다. pDKTP를 *Pst*I과 *Nco*I으로 절단하여 얻은 160bp의 rice의 transit peptide sequence를 똑같은 제한효소로 자른 pUC19CTB와 ligation 하여 pRiTPCTP를 구하였다. pRiTPCTP를 *Pst*I/T4DNA polymerase/*Sac*I으로 처리하여 얻은 470bp의 rice transit peptide sequence와 fusion된 *ctb* 유전자를 *Sma*I과 *Sac*I으로 절단한 pBD121과 ligation 하여 최종적으로 pBDRiTPCTB를 얻었다. 그림 11은 pBDRiTPCTB의 construction scheme을 보여주며, 그림 12는 대장균에서 최종적으로 구성된 재조합 DNA에 대하여 PCR 반응을 수행하여 insert로서 *ctb* 유전자가 존재함을 확인한 것이다. 대장균에서 구

성된 pBDRiTPCTB는 *Agrobacterium*에 도입되었으며 형질전환된 *Agrobacterium* 으로부터 DNA를 추출하여 *ctb* 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 PCR 반응을 수행한 결과 *ctb* 유전자 크기에 해당하는 약 320bp의 DNA 단편이 증폭되는 것이 확인되었다.

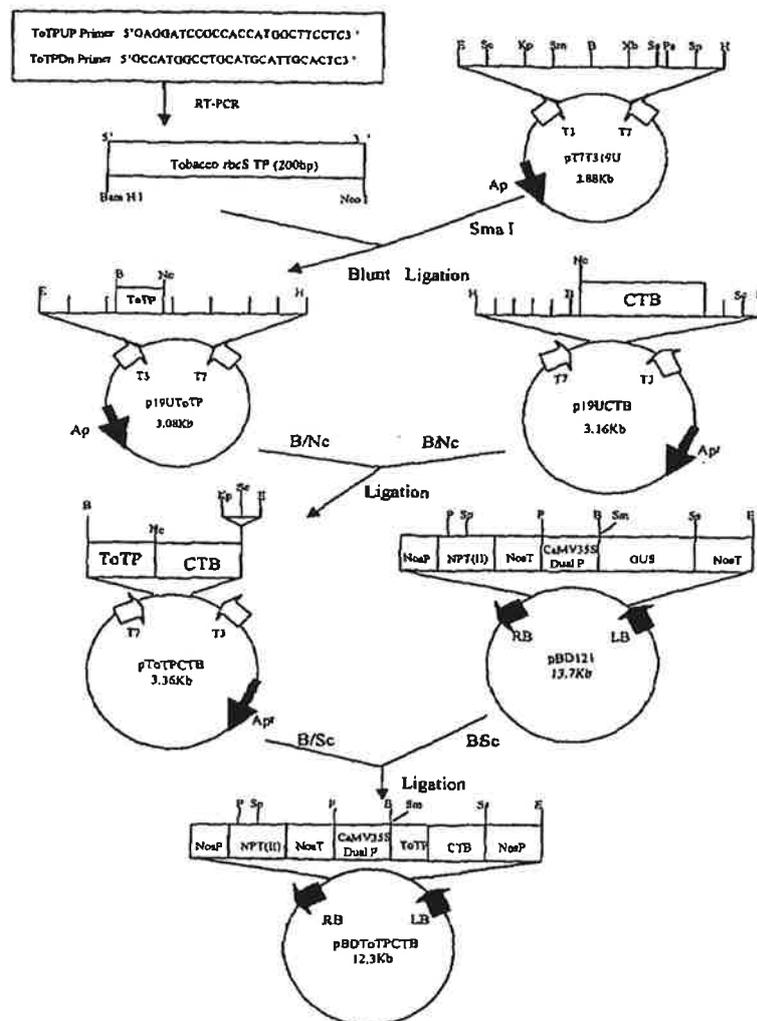


Figure 8. Construction scheme of pBDToTPCTB

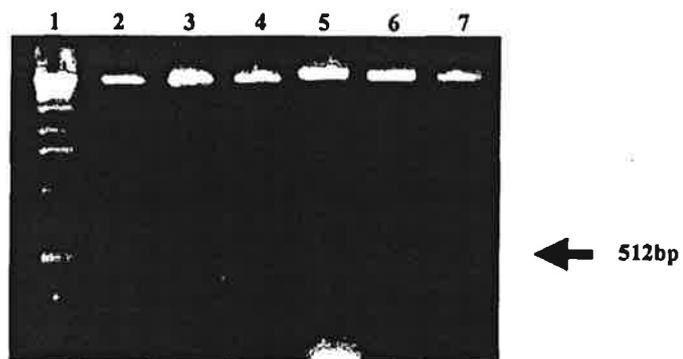


Figure 9. Restriction analysis of pBDToTPCTB. Plasmids were digested with restriction enzymes(*Bam*HI and *Sac*I) and DNA fragment generated by the cleavage of restriction enzymes were separated on a 1% agarose gel. Lane 1:1Kb ladder, Lane 2-7: pBDToTPCTB/*Bam*HI and *Sac*I

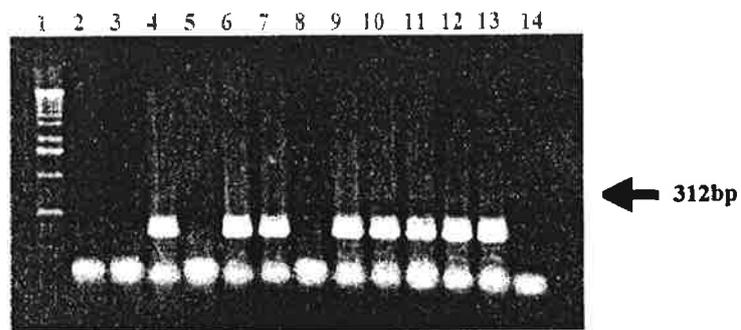


Figure 10. PCR analysis for plasmid DNA purified from *Agrobacterium* transformed with pBDToTPCTB. Amplified DNA fragments were separated on a 1.5% agarose gel. Lane 1, 1Kb ladder; Lane 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12 and 13, transformed *Agrobacterium*; Lane 14, pBD121 as a negative control

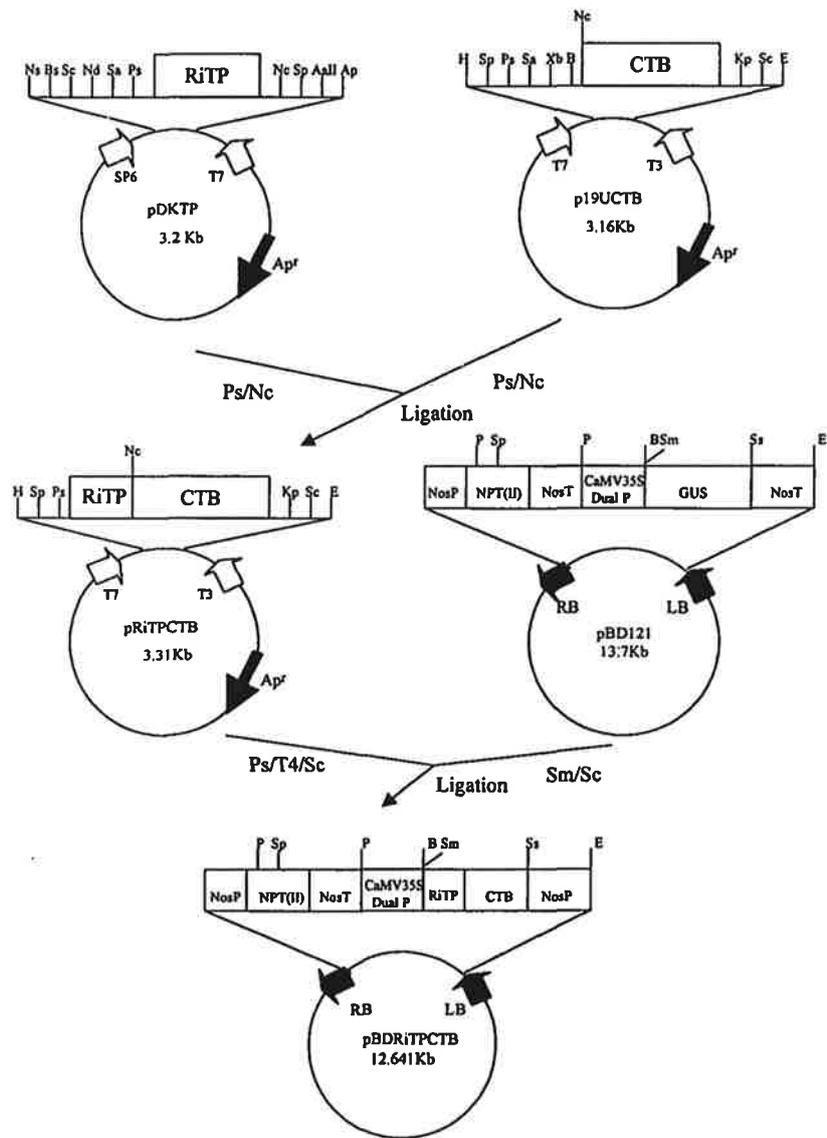


Figure 11. Construction scheme of pBDRiTPCTB

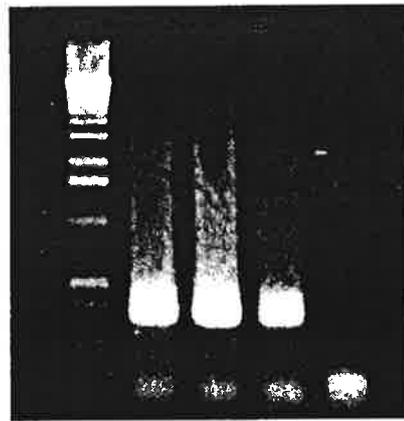


Figure 12. PCR analysis for plasmid DNA from *E. coli* HB101 transformed with pBDRiTPCTB. Amplified DNA fragments were separated on a 1.5% agarose gel. Lane 1:1Kb ladder, Lane 2,3,4:PCR product, Lane 5: negative control

## 2. Tobacco의 transit peptide sequence (ToTP)와 fusion된 *ctb* 유전자를 갖고 있는 *Agrobacterium*과의 동시 배양에 의한 담배식물의 형질전환

pBDToTPCTB로 형질전환된 *Agrobacterium*을 kanamycin (20 $\mu$ g/ml)과 acetosyringone (50  $\mu$ M/EtOH) 존재하에서 O.D 값이 0.3이 되도록 배양한 다음 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nn의 leaf disk와 2일간 동시 배양하여 tobacco transit peptide sequence와 fusion된 *ctb* 유전자가 식물 세포의 genome에 도입되도록 유도하였다. *Agrobacterium*과 동시배양이 끝난 담배식물의 leaf disk 조직을 항생제(kanamycin, 200 $\mu$ g/ml) 및 1ppm의 BAP와 0.1ppm의 NAA의 식물 호르몬이 첨가된 배지로 옮겨 shoot 형성을 유도하였으나 1차 배에 300개의 leaf disk를 준비하여 4차례의 형질전환 시도를 하였음에도 불구하고 선택배지에서 식물체의 재생이 유도되지 않았다. 이러한 결과는 담배식물에서 tobacco의 transit peptide가 매우 효율적으로 작동하여 CTB 단백질의 chloroplast membrane으로 이동하는 과정 중에 소수성이 강한 CTB 단백질이 membrane에 embedding 되어 세포에 좋지 않은 영향을 주는 것으로 유추된다.

## 3. Rice의 transit peptide sequence (RiTP)와 fusion된 *ctb* 유전자를 갖고 있는 *Agrobacterium*과의 동시 배양에 의한 담배식물의 형질전환

pBDTRiPCTB로 형질전환된 *Agrobacterium*을 kanamycin (20 $\mu$ g/ml)과 acetosyringone (50  $\mu$ M/EtOH) 존재하에서 O.D 값이 0.3이 되도록 배양한 다음 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nn의 leaf disk와 2일간 동시 배양하여 rice transit peptide sequence와 fusion된 *ctb* 유전자가 식물 세포의 genome에 도입되도록 유도하였다. *Agrobacterium*과 동시배양이 끝난 담배식물의 leaf disk 조직을 항생제(kanamycin, 200 $\mu$ g/ml)가 첨가된 배지로 옮겨 shoot 형성을 유도하였다. 그 결과 rice의 transit peptide sequence를 사용한 경우에는 1차례의 형질전환 시도에서 많은 수의 재생된 식물체를 얻었다. 담배식물에서 rice의 transit peptide는 효율적으로 작동하지 않을 가능성이 있는데 그렇다 하더라도 발현율이 높은 rice의 transit peptide의 도움을 받아 fusion된 상태로 존재하는 CTB 단백질의 발현율이 증가될 가능성이 있다.

#### 4. 형질전환 후 재생된 식물체에서 genomic PCR 분석에 의한 Ri-*ctb* 유전자의 도입 확인

pBDTRiPCTB로 형질전환 후 확보된 재분화 kanamycin 저항성 식물체들이 기 내에서 10cm 크기로 자랐을 때 이들로부터 leaf 조각을 떼어내어 제 2절의 3항에서와 같은 방법으로 genomic DNA를 분리하였다. 현재 rice의 transit peptide sequence와 fusion된 *ctb* 유전자로 형질전환된 independent 담배식물 20주를 확보하고있으며, 이에 대한 genomic-PCR을 수행하여 rice의 transit peptide sequence와 *ctb* 유전자의 도입을 확인하였다. Genomic DNA 시료(1 $\mu$ g)를 주형으로 하고 *ctb* gene에 특이적인 양 말단의 primer (각 50 pmole)와 taq DNA polymerase(1U)를 사용하여 PCR(95 $^{\circ}$ C, 1분 → 94 $^{\circ}$ C, 1분; 57 $^{\circ}$ C, 1분; 72 $^{\circ}$ C, 1분 30초 → 72 $^{\circ}$ C, 5분) 반응을 30회 수행함으로써 *ctb* gene을 갖고 있는 형질전환 식물을 확인하였다. 그림 13은 kanamycin 저항성 식물체들에서 추출된 genomic DNA에 대하여 *ctb* 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 PCR 반응을 수행한 것을 agarose gel을 사용하여 전기 영동 분석한 결과로서 *ctb* 유전자 크기에 해당하는 약 320bp의 증폭된 DNA 단편을 보여준다. 본 연구실에서는 이에 대한 실험을 과제 종료 후에도 지속적으로 진행하여 rice의 transit peptide sequence와 *ctb* 유전자가 도입된 담배식물에서 단백질을 추출하여 immunoblotting을 실시하여 CTB 단백질의 발현양을 조사하고자 한다. CTB 단백질의 발현율이 높을 경우에는 이를 상추식물에 도입하여 edible vaccine 생산 가능성을 계속 조사할 예정이다.

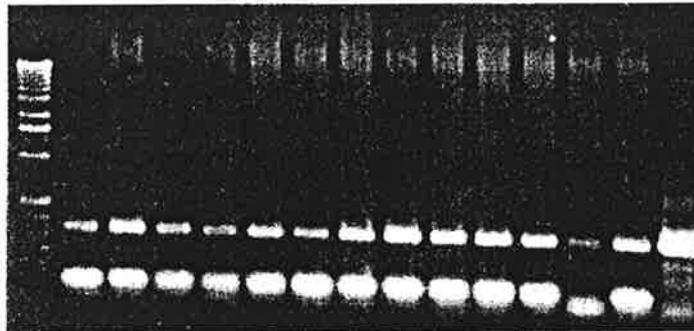


Figure 13. PCR analysis for genomic DNA of transgenic plants transformed with pBDRiTPCTB. Amplified DNA fragments were separated on a 1.5% agarose gel. Lane 1, 1Kb ladder; Lane 2-14, transgenic lines; Lane 15, positive control

## 제 5절 CTB epitope의 잠정 발현

### 1. pTMV6.4D, pTMV6.4E, pTMV6.4F 및 pTMV6.4G의 구성

1995년 Turpen 등이 TMV의 coat protein의 surface loop region에 malaria epitope을 transient expression시킨 것을 보고한 바 있다. 이 시스템의 장점은 매우 높은 yield의 항원을 간단한 정제 과정에 의해 회수할 수 있다는 것이다.

식물 바이러스를 이용한 항원의 생산을 위하여 담배 모자이크 바이러스 (TMV)의 외피 단백질의 surface loop에 epitope으로 작용할 수 있는 CTB sequence의 4개 부위를 선정하여 epitope sequence의 transient expression을 시도하였다. 본 연구실에서는 선행 연구에서 한국형 TMV (TMV-K)의 전체 genome을 포함하는 cDNA를 합성하여 그 염기서열을 분석하였으며 TMV-K의 full-length cDNA가 구성된 재조합 플라스미드를 pTMV6.4C로 명명하고 TMV-K의 full-length cDNA를 주형으로 하여 합성된 *in vitro* 전사체를 식물에 감염시켰을 때 progeny virus가 생산됨을 확인한 바 있다. 1986년 Guyon-gruaz 등은 synthetic peptide를 이용하여 CTB의 30-50 번째 아미노산과 50-75 번째 아미노산을 경구적으로 투입하였을 때 항체를 유도하여 epitope sequence로서 기능을 가지며 이 중 30-50의 아미노산이 보다 효과적임을 보고하였기 때문에 본 연구에서는 CTB의 30-50 번째 아미노산을 대상으로 epitope의 길이 및 위치 등을 고려하여 4개 부위를 선정하였다. 선정된 각각의 epitope sequence에 대한 oligomer를 합성하였으며, overlapping-PCR법을 이용하여 TMV-K의 full-length cDNA의 coat protein gene의 surface loop region (coat protein의 63-66 번째 아미노산 잔기에 해당)에 각각 삽입하였다.

그림 14와 15는 CTB의 epitope sequence를 포함하는 recombinant TMV를 구성하는 전략을 보여준다. 표1은 실험에 사용된 합성 oligomer의 sequence를 정리한 것이며, 표2는 TMV coat protein의 surface loop region에 삽입된 epitope의 아미노산 서열을 보여준다. Epitope sequence 클로닝의 편의성과 클로닝 후 염기서열 분석의 최소화를 위해 TMV genome의 5785-6395에 해당하는 부위만 증폭되도록 primer (TMVpaCIUP과 TMVsaIIDN)를 design 하였다. EPITOPEUP primer는 TMV coat protein의 56-63번째 아미노산에 해당하는 sequence와 epitope sequence의 5'-region을 포함하며, EPITOPEDN primer는 epitope sequence의 3'-region과 TMV coat protein의 63-70번째 아미노산에 해당하는 sequence를 포함하는데 EPITOPE의 UP과 DN primer에는 서로 15 base 정도의 중첩된 sequence가 있어

overlapping-PCR이 가능하다.

1EPITOPE sequence가 삽입된 recombinant TMV인 pTMV6.4D를 구성하기 위하여 우선 TMVPacIUP과 1EPITOPEDN primer 및 1EPITOPEUP와 TMVSalIDN primer를 각각 사용하여 TMV-K의 full-length cDNA를 포함하는 플라스미드인 pTMV6.4C를 주형으로하여 PCR 반응을 수행하였다. 각각의 tube에서 예상된 크기의 증폭된 DNA를 확인하고 이를 gel에서 elution한 다음 각각의 elution된 DNA를 같은 분자비로 섞어서 이를 주형으로 하고 TMVPacIUP과 TMVSalIDN primer를 PCR 반응을 수행하여 coat protein gene의 surface loop region에 epitope sequence가 삽입된 증폭된 DNA 단편을 얻었으며, 이를 pT7T319U 벡터에 클로닝하여 p19U1EPITOP을 얻었다. p19U1EPITOP의 insert를 sequencing한 결과 의도한 위치에 epitope sequence가 정확히 삽입되어있음을 확인하였다. p19U1EPITOPE을 *PacI*과 *SalI*으로 절단하여 얻은 670bp의 DNA 단편을 똑같은 제한효소로 자른 pTMV6.4C과 ligation 하여 최종적으로 1EPITOPE sequence가 삽입된 pTMV6.4D를 구성하였다.

1EPITOPE sequence를 삽입한 방법과 마찬가지로 2EPITOPE sequence, 3EPITOPE sequence 및 4EPITOPE sequence를 pTMV6.4C에 각각 삽입하여 pTMV6.4E, pTMV6.4F 및 pTMV6.4G를 대장균에서 구성하였다. 그림 16은 pTMV6.4C, pTMV6.4D, pTMV6.4E, pTMV6.4F, 및 pTMV6.4G에 대한 제한 효소 분석 결과를 보여준다.

Table 1. Primers used in insertion of epitope sequence into coat protein gene

Primers	Sequences
TMVPacIUP (TMV:5785-5809)	5'-ttaattaattatgtactaatgcc-3'
TMVSalIDN (TMV:6384-6395)	5'-gtcgactgggccctac-3'
1EPITOPEUP	5'-atggctattattactttaagaatggtgctactttgaaagtagtgactttaag-3'
1EPITOPEDN	5'-ctaaaagtaataatagccatttcacgcttaccagcaagagagaacctaacagt-3'
2EPITOPEUP	5'-ggtgctactttgaaagtgactttaag-3'
2EPITOPEDN	5'-aaaagtagcaccattcttgaacctaacagt-3'
3EPITOPEUP	5'-gctattattactttaagaatggtgctactttgaaagtgactttaag-3'
3EPITOPEDN	5'-ctaaaagtaataatagccatttcacgcttaccgaacctaacagt-3'
4EPITOPEUP	5'-ggtaagcgtgaaatgctattattagtgactttaag-3'
4EPITOPEDN	5'-catttcacgcttaccagcaagagagaacctaacagt-3'

Table 2. Epitope sequences inserted into the surface loop region of coat protein gene in each recombinant TMV

Recombinant plasmids	Epitope sequence
pTMV6.4C (TMV vector)	none
pTMV6.4D	SLAGKREMAITFKNGATFEV
pTMV6.4E	FKNGATFEV
pTMV6.4F	GKREMAITFKNGATFE
pTMV6.4G	SLAGKREMAII

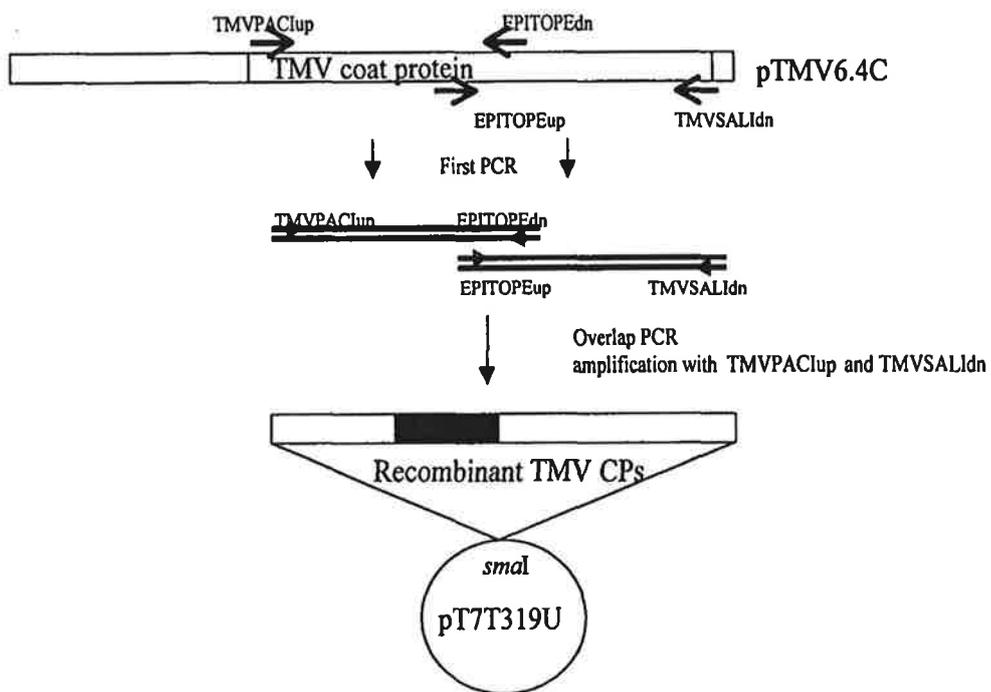
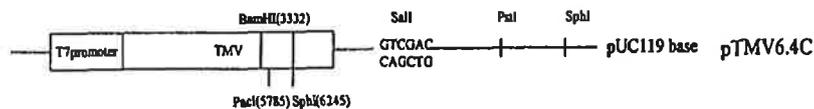


Figure 14. Construction scheme of p19UEPITOPEs (p19U1EPITOPE, 19U2EPITOPE, p19U3EPITOPE, p19U4EPITOPE).

pTMV6.4C (pTMV449/SphI (trimmed between T7promoter and TMV coding region) is ligated with pTMV6.4B/SphI)



pTMV6.4D,E,F,G (pTMV6.4C/ PacI SalI is ligated with selected 4 epitopes of p19UEPITOPES, respectively)

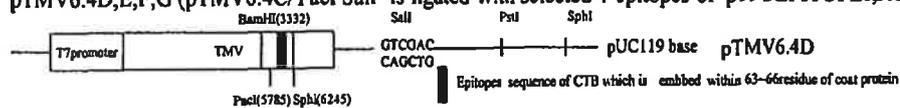


Figure 15. Construction scheme of recombinant TMVs(pTMV6.4C, pTMV6.4D, pTMV6.4E, pTMV6.4F, pTMV6.4G).

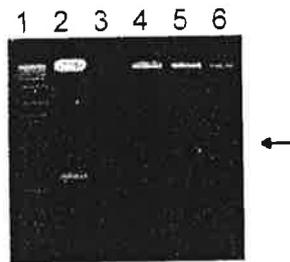


Figure 16. Restriction analysis of plasmid pTMV6.4C, pTMV6.4D, pTMV6.4E, pTMV6.4F, and pTMV6.4G. Plasmids were digested with restriction enzymes (*PacI* and *PstI*) and DNA fragment generated by the cleavage of restriction enzymes were separated on 1.8% agarose gel. The arrow indicates TMV coat protein gene and recombinant coat protein genes.

Lane 1: 1kb ladder, Lane 2: *PacI* and *PstI* digested pTMV6.4C, Lane 3: *PacI* and *PstI* digested pTMV6.4D, Lane 4: *PacI* and *PstI* digested pTMV6.4E, Lane 5: *PacI* and *PstI* digested pTMV6.4F, Lane 6: *PacI* and *PstI* digested pTMV6.4G

## 2. 각각의 CTB epitope sequence를 포함하는 recombinant full-length cDNA 를 주형으로 하는 *in vitro* 전사체의 합성

TMV의 full-length cDNA의 coat protein의 surface loop region에 각각의 epitope sequence가 삽입된 hybrid TMV cDNA (pTMV6.4D, pTMV6.4E, pTMV6.4F 및 pTMV6.4G)를 각각 *Sa*II로 절단한 다음 linearized DNA를 template로 하여 cap analogue ( $m^7GpppG$ ) 존재하에 T7 RNA polymerase를 사용하여 각각의 *in vitro* transcripts를 합성하였다 (그림 17). *In vitro* transcripts가 들어있는 각각의 tube에 동 부피의 50mM TE (pH8.0)와 Celite를 최종 농도가 5mg/ml 되도록 첨가한 다음 4종류의 *in vitro* transcripts를 면봉을 이용하여 각각의 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc에 접종한 후 병증이 나타나는 것을 매일 관찰하였다. 그 결과 접종 7일 후 4개의 후보 epitope sequence 가운데 2EPITOPE sequence와 4EPITOPE sequence가 삽입된 변형된 TMV (pTMV6.4E와 pTMV6.4G)를 접종하였을 때 식물체에서 TMV 병증이 나타나는 것이 확인되었다.

## 3. SDS-PAGE 분석법에 의한 recombinant TMV coat protein의 확인

pTMV6.4E와 pTMV6.4G를 접종하였을 때 식물체에서 TMV 병증이 나타나는 것이 확인되었으므로 이들로부터 단백질을 추출하여 단백질을 분석해 보았다. TMV 병증을 보이는 식물체의 leaf 조각을 막자 사발 안에서 액체질소로 곱게 갈았다. 곱게 갈린 잎조직에 4℃로 차게한 disruption buffer [10% (v/v) glycerol, 2.3% (w/v) SDS, 60mM Tris·Cl pH8.0, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol]를 leaf 1g 당 1ml을 가하여 잘 섞어준 다음 단백질 추출물을 100℃에서 5분간 끓인 후 4℃, 14000rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 취한후 Lowry법에 의해 총 단백질 농도를 측정하였다. Mock를 접종한 대조구 담배와 병증을 나타내는 식물체에서 추출한 단백질들(30 $\mu$ g)을 SDS를 포함하는 12% polyacrylamide gel에서 전기영동하여 분리하여 본 결과 병증을 나타내는 식물체에서 추출한 단백질들이 loading된 lane에서 TMV의 coat protein 보다 약간 큰 예상크기의 단백질이 확인되었다 (그림 18). 반면에 mock를 접종한 대조구 식물의 단백질들에서는 이 크기의 단백질이 발견되지 않았다.

#### 4. Immunoblotting에 의한 CTB epitope의 발현확인

SDS-PAGE에서 전기영동한 결과 병증을 나타내는 식물체에서 추출한 단백질들이 loading된 lane에서 TMV의 coat protein 보다 약간 큰 크기의 단백질이 확인되었으므로 immunoblotting을 실시하여 이 단백질이 CTB의 항체와 특이적인 반응을 일으키는지를 확인하였다. 12% polyacrylamide gel에서 전기영동하여 분리된 gel 상의 단백질들을 PVDF membrane에 이동시킨 후 단백질이 blotting된 PVDF membrane을 Tris-buffered saline (25mM Tris-Cl pH7.5, 500mM NaCl)에 녹여있는 3% bovine serum albumin (BSA) 용액으로 3시간 동안 blocking을 시켰다. Blocking 후 CTB 단백질의 항체와 3시간 반응시킨 다음 3회에 걸쳐 Tris-buffered saline으로 세척하여 여분의 1차 항체를 제거한 후 alkaline phosphatase와 conjugation된 2차 항체 (anti-rabbit IgG)와 1시간 반응시켰다. 2차 항체와 반응이 끝난 membrane을 3회에 걸쳐 Tris-buffered saline으로 세척하여 여분의 2차 항체를 제거한 다음 alkaline phosphatase 기질인 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate와 p-nitro-blue-tetrazolium chloride이 들어 있는 용액에 침지하여 발색시킨 결과 positive control로 사용한 CTB 단백질과 TMV의 coat protein 보다 약간 큰 크기의 단백질이 특이적 발색반응을 보이는 것이 확인되었다 (그림 19). 또한 상대적 이동성의 차이는 재조합 표피 단백질에 삽입되어진 epitope의 길이와 정확히 맞아떨어지고 있으며, immunoblotting 분석법에서 pTMV6.4G의 재조합 표피 단백질이 pTMV6.4E와의 적은 길이 차에도 불구하고 더욱 강하게 탐지되었다. 식물 바이러스를 이용한 항원의 epitope sequence의 transient expression을 시도한 경우 immunoblotting 분석법에서 pTMV6.4G의 재조합 표피 단백질이 pTMV6.4E와의 적은 길이 차에도 불구하고 더욱 강하게 탐지되었다.

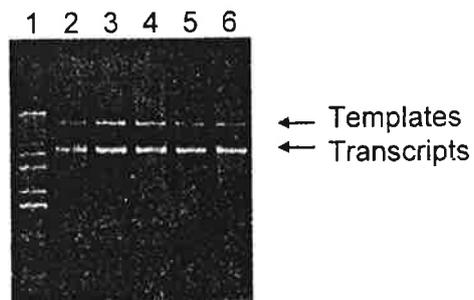


Figure 17. Synthesis of recombinant TMV RNA by in vitro transcription. Lane 1 1kb ladder, Lane 2: transcript of pTMV6.4C, Lane 3: transcript of pTMV6.4D Lane 4: transcript of pTMV6.4E, Lane 5: transcript of pTMV6.4F, Lane 6 transcript of pTMV6.4G

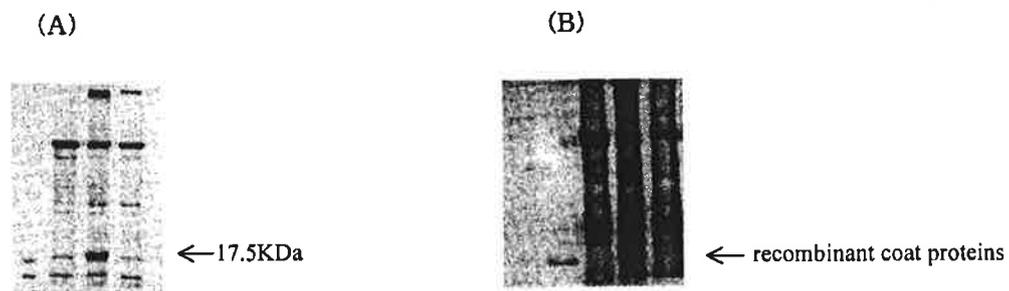


Figure 18. SDS-PAGE analysis of tobacco plant leaves infected with in vitro transcripts of pTMV6.4C, pTMV6.4D, pTMV6.4E, and pTMV6.4G, respectively. Total proteins extracted from non-infected and infected leaves were separated on a 12% SDS-polyacrylamide gel.

Panel A. Lane 1: marker, Lane 2: mock as negative control, Lane 3: pTMV6.4C, Lane 4: pTMV6.4D

Panel B. Lane 1: marker, Lane 2: TMV-K as positive marker, Lane 3: mock as negative control, Lane 4: pTMV6.4E, Lane 5: pTMV6.4G

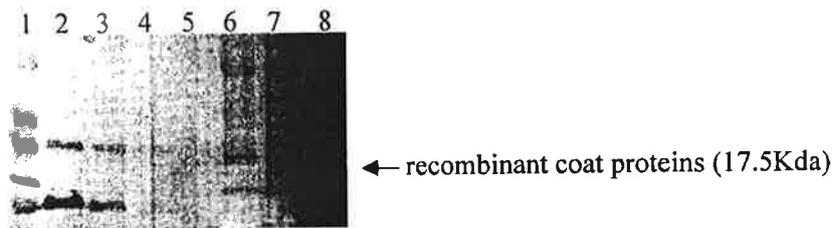


Figure 19. Western blot analysis of plants infected with *in vitro* transcripts of pTMV6.4E and pTMV6.4G, respectively. Total proteins were separated on 12% SDS-PAGE and carried out western blotting. The arrow indicates recombinant coat proteins Lane 1: prestained marker, Lane 2: CTB (100ng), Lane 3: CTB (50ng), Lane 4: CTB (10ng), Lane 5: TMV-K, Lane 6: mock as negative control, Lane 7: pTMV6.4E, Lane 8: pTMV6.4G

## 제 4장 참고문헌

- An, G. P., Ebert, R., Mitra, A., and Ha, S. B. (1988) Binary vectors in plant molecular biology A 3, 1 - 19, Kluwer Academic Publishers, New York
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513 - 1522
- Blondel, A., and Thillet, J. (1990) A fast and convenient way to produce single stranded DNA from a phagemid. *Nucleic Acids Res.* 19, 181
- Blowers, A. D., Bogorad, L., Shark, K. B., and Sanford, J. C. (1989) Studies on *Chlamydomonas* chloroplast transformation: foreign DNA can be stably maintained in the chromosome. *Plant cell* 1, 123 - 132
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single step method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156 - 159
- Dalsgaard, K., Uttenthal, A., Jones, T. D., Xu, F., Merryweather, A., Hamilton, W. D. O., Langeveld, J. P. M., Boshuizen, R. S., Kamstrup, S., Lomonossoff, G. P., Poerta, C., Vela, C., Casal, J. I., Meloen, R. H., and Rodgers, P. B. (1997) Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nature Biotechnology* 15, 248 - 252
- Gawel, N. J., and Jarret, R. L. (1991) A modified CTAB DNA extraction procedure for the *Musa* and *Ipomea*. *Plant Molecular Biology Reporter* 9, 262 - 266
- Glenn, G., Rao, M., Matyas G. R., and Alving C. R. (1998) Skin immunization made possible by cholera toxin. *Nature* 26, 851
- Haq, T. A., Mason, H. S., Clements, J. D., Arntzen, C. J. (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268, 714 - 716
- Hoekema, A., van Haaren, M., Fellingner, A. J., Hooykaas, P. J. J., and Schitperoot, R. A. (1985) Non oncogenic plant vectors for use in the *Agrobacterium* binary system. *Plant Mol. Biol.* 5, 85-89
- Horsch, R. B., Fry, J., Hoffmann, N., Neidermeyer, J., Rogers, S. G., and Fraley, R. T. (1988) Leaf disc transformation. *Plant Molecular Biology Manual* A5, 1 - 9, Kluwer

Academic Publishers, New York

- Holsters, M., de Wale, D., Depicker, A., Messeno, E., van Montagu, M., and Schella, J. (1978) Transfection and transformation of *A. tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 163, 181-187
- Guyon-Gruaz, A., Delmas, A., Pedoussaut, S., Halimi, H., Milhaud, G., Raulais, D., and Rivaille, P. (1986) Oral immunization with a synthetic peptide of cholera toxin B subunit. *Eur. J. Biochem.* 159, 525 - 528
- Johnson, J., Lin, T., Lomonossoff, G. (1997) Presentation of heterologous peptides on plant viruses *Annu. Rev. Phytopathol.* 35, 67 - 86
- Klein, T.M., Arentzen, R., Lewis, P. A. (1992) Transformation of microbes, plants, and animals by particle bombardment. *Bio/technology* 10, 286 - 291
- Koh, H. K., Song, E. K., Lee, S. Y., Park, Y. I., and Park, W. M. (1992) Nucleotide sequence of cDNA of the tobacco mosaic virus RNA isolated in Korea. *Nucleic Acids Res.* 20, 5474.
- Lamm, M. E. (1997) Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 311 - 340
- Lederberg, E. M., and Cohen, S. N. (1974) Transformation *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 119, 1072 - 1074
- Mason, H. S., Lam, D. M., and Arntzen, C. J. (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11745 - 11749
- Mason, H.S. and Arntzen, C. J. (1995) Transgenic plants as vaccine production systems. *TIBTECH* 13, 167 - 171
- Mason, H. S., Ball, J. M., Shi, J. J., Jiang, X., Estes, M. K., and Arntzen, C. J. (1996) Expression of norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its immunogenicity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5335 - 5340
- Modelska, A., Dietzschold, B., Sleysh, N., Fu, Z. F., Steplewski, K., Hooper, D. C., Koprowski, H., and Yusibov, V. (1998) Immunization against rabies with plant-derived antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2481 - 2485
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning A Laboratory manual* 2nd edition Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor

- Sanchez, J., and Holmren, J. (1989) Recombinant system for overexpression of cholera toxin B subunit in *Vibrio cholerae* as a basis for vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 481 - 485
- Sanger, F., Nicklen S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463 - 5467
- Sixma, T. K., Pronk, S. E., and Kalk, K. H. (1991) Crystal structure of cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature* 351, 371 - 377
- Svab, Z., Hajdukiewicz, P., and Maliga, P. (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8526 - 8530
- Svab, Z., and Maliga, P. (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 913 - 917
- Thanavala, Y., Yang, Y. F., Lyons, P., Mason, H. S., and Arntzen, C. (1995) Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3358 - 3361
- Turpen, T. H., Reinl, S. J., Charoenvit, R. Y., Hoffman, S. L., Fallarme, V., and Grill, L. K. (1995) Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus. *Bio/technology* 13, 53 - 57