



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0120413
(43) 공개일자 2010년11월16일

(51) Int. Cl.

C12N 5/02 (2006.01) *C12N 5/04* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *A01H 1/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0039207

(22) 출원일자 2009년05월06일

심사청구일자 2009년05월06일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

김동일

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남119호

전수환

인천광역시 부평구 십정2동 동암신동아아파트 10
7동 2207호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 10 항

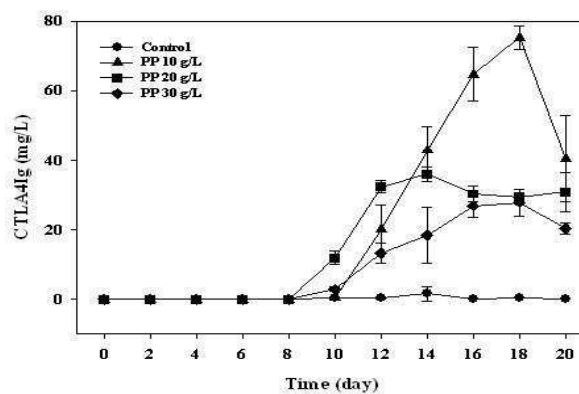
(54) 식물 유래 단백질 가수분해물을 포함하는 식물세포 배양 배지 및 재조합 단백질 대량생산 방법

(57) 요약

본 발명은 식물로부터 유래된 단백질 가수분해물을 포함하는 식물세포 배양 배지 및 이를 이용한 재조합 단백질 대량생산 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 식물 유래 단백질 가수분해물을 포함하는 초기 배양배지를 사용하여 형질전환 식물세포 배양시 재조합 단백질을 대량생산할 수 있는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 초기배양 배지에 식물유래 단백질 가수분해물을 첨가함으로써 세포의 고농도배양이 가능하고, 세포의 성장단계 및 재조합 단백질의 생산단계에서 배지교환 작업 없이 재조합 단백질의 생산이 가능하기 때문에 간편하고 신속하게 목적 단백질을 높은 수율로 회수하여 생산성을 현저히 증대시키는데 이용될 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

권준영

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남135호 세
포배양공학연구실

한지연

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남135호 세
포배양공학연구실

특허청구의 범위

청구항 1

당 고갈시 작동하는 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 식물체의 재조합 단백질 생산용 배지 조성물에 있어서, 식물로부터 유래된 단백질 가수분해물을 배양 배지 중에 0.01 내지 30 g/L의 농도로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 배양은 회분식 배양 또는 유가식 배양인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 가수분해물은 쌀, 밀, 면화, 글루텐, 완두콩 또는 콩 유래 단백질 가수분해물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 단백질 가수분해물은 콩 유래 단백질 가수분해물이며, 10g/L의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 프로모터는 RAmy3D 프로모터인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

하기의 단계를 포함하는 당 고갈시 작동하는 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 식물체로부터 목적 단백질을 생산하는 방법에 있어서, a) 단계의 배지에 식물유래 단백질 가수분해물을 첨가하는 것을 특징으로 하는 방법.

- a) 상기 형질전환된 식물세포를 당-풍부 배지에서 배양하는 식물세포의 성장 단계; 및
- b) 당-고갈 배지로의 교환 과정 없이, a)단계의 배양된 세포로부터 재조합 단백질을 생산하는 단계.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 식물유래 단백질 가수분해물은 배양 시작 시 또는 배양 중(fed-batch)에 첨가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 식물유래 단백질 가수분해물은 콩 유래 단백질 가수분해물로 배양 배지 중에 0.01 내지 30 g/L의 농도로 첨가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 단백질 가수분해물은 10g/L의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 프로모터는 RAmy3D 프로모터인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물로부터 유래된 단백질 가수분해물을 포함하는 식물세포 배양 배지 및 이를 이용한 재조합 단백질

대량생산 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 식물 유래 단백질 가수분해물을 포함하는 초기 배양배지를 사용하여 형질전환 식물세포 배양시 재조합 단백질을 대량생산할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배정기술

- [0002] 일상생활에서 필요로 하는 단백질을 대량으로 수득하기 위하여 목적세포를 발현백터로 형질전환하여 원하는 재조합 단백질을 대량생산하는 시스템이 존재한다. 일반적으로 동물세포와 미생물에의 형질전환을 통한 재조합 단백질 수득 시스템이 구축되어 왔으나, 최근 대량생산에서의 비용 문제 및 FDA 허가 시 동물유래 바이러스나 독소(toxin) 등의 감염 문제가 발생할 수 있다. 식물세포에서 재조합 단백질을 생산하는 것은 식물세포에서 발현할 수 있는 프로모터 및 목적유전자를 포함하는 발현백터로 식물세포를 형질전환 하는 것으로서, 식물세포배양에 사용할 수 있는 기본배지로는 AA, MS, N6, WHITE 및 SH 배지 등이 있으며, (Ge, X. *et al.*, *Plant cell Rep.*, 25: 392-402, 2006; Terashime *et al.*, *Biochem. Eng. J.*, 4: 31-36, 1999). 식물세포배양은 동물세포배양에 비해 동물유래의 바이러스와 독소 등을 포함하지 않는다는 점, 동물세포배양에 비해 그 정제과정이 간단하고 경제적이란 점(Doran, P. M., *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 199-204, 2000)에서 많은 연구가 이루어지고 있다.
- [0003] 한편 벼세포의 경우 현탁배양에서 배지내로 분비되는 총 단백질의 20~40%는 알파 아밀라아제 유전자 집단(α -amylase gene family)인 RAm3D와 RAm3E이고, 이 두 가지 유전자는 배지내 당 농도에 따라 발현양의 현저한 차이를 나타낸다. 특히 RAm3D는 배지내 당이 고갈되었을 때 발현양이 165배 증가되며, 이와 반대로 배지내 수크로즈, 글루코즈, 프락토즈, 갈락토즈 같은 당이 존재할 시 RAm3D 유전자의 발현이 억제된다고 알려져 있다. (Hellwig, S. *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 22: 1415-1422, 2004). 이러한 유도 프로모터(inducible promoter)를 배양에 이용하면 세포생장 시 당을 첨가하여 세포의 농도를 증진시키고, 당 고갈에 의해 생산성을 향상시킬 수 있는 2단계 배양이 가능하기 때문에, (James, E. A. and J. M. Lee, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 72: 127-156, 2001). 최근, 형질전환된 식물세포의 대표적인 예로서, 벼세포에서 RAm3D 프로모터를 이용해 재조합 단백질인 G-CSF, GM-CSF, SA, AAT, INF- γ , hCTLA4Ig 등을 생산하고 있다.
- [0004] 종래에는 형질전환된 벼 현탁세포를 이용한 재조합 CTLA4Ig 단백질 생산 시, 배지에서 당이 고갈되는 시점에서 작동되는 α -아밀라아제 프로모터 시스템(α -amylase promotor system)을 사용함에 따라(Terashima M. *et al.*, *Biochem Eng J* 4:31-36, 1999; Trexler MM. *et al.*, *Biotechnol Prog* 21:321-328, 2005). 세포의 생장단계와 단백질 생산단계가 분리되는 2단계 배양을 수행하여 당이 존재하는 세포의 생장단계 이후 당이 제거된 배지로 교환해주어 재조합 단백질을 생산하였다. 그러나, 종래의 2단계 배양 방법에 따르면 생장단계에서는 부피당 생산성(volumetric productivity)을 증가시키기 위한 고농도배양이 이루어져야 하고, 이후 생산배지로의 교환이 이루어지며 생산단계에 접어들어 재조합 단백질의 생산이 이루어지게 되기 때문에, 만약 배지교환이 없는 회분식 배양으로 재조합 단백질을 생산할 경우 추가적인 영양분의 공급이 없기 때문에 후반부에 사멸기로 들어가게 되고 자연적으로 당이 고갈이 되어 목적단백질의 생산이 유도되지만 실제 재조합 CTLA4Ig 단백질을 거의 수득할 수 없게 된다. 이와 같은 종래 기술은 실질적으로 고농도배양을 하고자 할 때 FDA 허가 시 문제가 되는 첨가물의 제약과 세포배양기 운전을 통한 월등한 고농도 배양 달성에 어려움이 있으며, 세포배양기에서 배지 교환 시 오염 발생의 위험성과 식물세포 특성상 배지로부터의 세포 분리 장치 사용의 어려움이 있어 현재 2단계 배양을 통한 고농도배양과 재조합 단백질의 대량 생산은 그 공정을 대량화(scale-up) 하는 데에 한계가 존재하였다. 또한, 식물세포배양의 현탁배양 시 생산시기에 배지내로 단백질 분해제(protease)의 분비로 인해 재조합 단백질의 분해가 이루어짐에 따라 목적 단백질의 안정성이나 생산성에 문제가 발생하므로, 이는 재조합 단백질 생산의 산업화를 고려할 때 제품의 품질에도 영향을 미치게 된다.
- [0005] 따라서, 배지의 환경 조건을 조절하거나 안정제 역할을 하는 물질을 첨가함으로써 목적 단백질 생산을 높이는 기술의 개발의 필요성이 증대하고 이에 대한 연구가 진행되고 있으나, 목적단백질의 분해를 극복하거나 생산량을 크게 증가시킬 수 있는 방법의 개발은 현재까지 이루어지고 있지 않은 실정이다.
- [0006] 이에 본 발명자들은 배지교환 없이 세포 생장단계에 고농도로 배양된 후 재조합 단백질 생산단계로 바로 이어질 수 있는 식물세포에서의 재조합 단백질의 대량생산 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 세포 배양 시 식물유래 단백질 가수분해물을 배양 시작 또는 배양 중(fed-batch)에 첨가할 경우, 배양 배지 교환 없이도 높은 수율의 재조합 단백질을 수득할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0007] 따라서 본 발명의 목적은 식물로부터 유래된 단백질 가수분해물을 포함하는 식물세포 배양 배지를 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 식물로부터 유래된 단백질 가수분해물을 포함하는 배양 배지를 사용하여 배지교환 없이 식물세포에서 재조합 단백질의 대량생산 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 식물로부터 유래된 단백질 가수분해물을 포함하는 식물세포 배양 배지를 제공한다.
- [0010] 본 발명에 따른, 식물 유래 단백질 가수분해물은 바람직하게는 콩 유래 단백질 가수분해물이며, 이들은 배양 배지 중에 0.01 내지 30 g/L, 바람직하게는 10g/L의 농도로 첨가될 수 있다. 상기 식물 유래 단백질 가수분해물의 세포 배양 시 첨가함으로써 당 고갈시 작동하는 프로모터를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 식물체로부터 재조합 단백질을 배양배지의 교환이 없는 회분식(batch) 배양 또는 유가식 배양을 통하여 생산할 수 있게 된다.
- [0011] 본 발명의 일 실시예에서, 도 6에 나타나는 바와 같이 CTLA4Ig 를 발현할 수 있는 RAm3D 프로모터를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 벼세포를 사용하여, 식물유래 단백질 가수분해물을 배양 시작에 첨가함으로써 성장부터 생산단계까지 배지교환 및 추가의 배지 첨가물 없는 간소화된 공정으로 세포의 고농도배양과 재조합 단백질 생산이 가능함을 확인하였다.
- [0012] 본 발명자들은 기존 AA 배지에 식물유래 단백질 가수분해물이 첨가된 배지를 사용하여 성장 및 생산단계의 배지로 사용하였으며, 이는 성장단계 시 세포의 고농도배양을 이루고 배지교환이 없이 재조합 단백질을 생산하게 한다. 또한, 사용된 식물유래 단백질 가수분해물은 재조합 단백질 생산 공정 허가 시 문제가 되지 않아 실제 산업화로의 적용이 가능하다.
- [0013] 본 발명자들은 기존 배지(도 1)와 식물유래 단백질 가수분해물이 첨가된 배지(도 3)에서의 배양 시 건조된 세포 중량을 비교한 결과, 기존 AA배지에 비해 식물유래 단백질 가수분해물이 첨가된 배지에서의 세포 생장이 우수한 결과를 확인하였다. 이는 본 발명에 따른 식물유래 단백질 가수분해물이 첨가된 배지가 재조합 단백질 생산 시 부피당 생산성(volumetric productivity)을 증진시킬 수 있는 고농도배양을 가능케 한다는 것을 나타낸다.
- [0014] 또한, 본 발명자들은 상기 실험과 같은 조건에서, 식물유래 단백질 가수분해물이 첨가된 배지에서의 재조합 CTLA4Ig 단백질이 생산량(도 4)을 기존 AA배지에서의 생산량(도 2)과 비교한 결과, 기존 AA배지에서 당 고갈 배지로의 교체 없는 배양을 통해 재조합 CTLA4Ig 단백질 생산을 확인하였고, 월등히 높은 재조합 CTLA4Ig 생산 결과를 확인할 수 있었다. 바람직하게는 본 발명의 일 실시예에서 콩 유래 단백질 가수분해물을 10g/L처리한 결과, 상기 단백질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 3배 이상의 재조합 CTLA4Ig를 생산할 수 있음을 확인하였다. 즉, 본 발명에 따른 식물로부터 유래된 단백질 가수분해물을 포함하는 식물세포 배양 배지를 이용할 경우 재조합 단백질의 생산에 있어서 실제 대량화(scale-up) 공정으로의 적용이 가능함을 알 수 있다.
- [0015] 본 발명은 또한 식물로부터 유래된 단백질 가수분해물을 포함하는 배양 배지를 사용하여 당 고갈시 작동하는 프로모터를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 식물세포에서 배지교환 없이 재조합 단백질을 대량생산할 수 있는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른, 식물 유래 단백질 가수분해물은 쌀, 밀, 면화, 글루텐, 완두콩 또는 콩등이며, 바람직하게는 콩 유래 단백질 가수분해물이며, 이들은 배양 배지 중에 0.01 내지 30 g/L의 농도로 첨가될 수 있으며, 이들은 세포 배양 시작 시기 또는 배양 중(fed-batch)에 첨가된다. 상기 재조합 단백질의 대량생산 방법은 배양배지의 교환이 없는 회분식(batch) 배양 또는 유가식 배양을 통하여 이루어지므로, 본 발명은 벼 현탁세포 배양 시 접종 시점에 식물유래 단백질 가수분해물을 첨가하여 이후에 당 고갈 배지로의 교환이 없이 생산하는 방법을 제공할 수 있다.
- [0016] 또한, 본 발명에 따른 식물유래 단백질 가수분해물은 현탁세포 배양 시 분비되는 단백질 분해제(protease)로부터의 대체 기질로 이용됨으로 목적 단백질을 보호하여 목적 단백질의 안정성 및 생산성을 확보할 수 있기 때문에 식물세포에서 목적하는 재조합 단백질의 고농도배양을 통한 대량 생산이 가능하게 된다.
- [0017] 본 발명의 식물유래 단백질 가수분해물 성분 외에도 형질전환 식물세포의 성장에 직·간접적으로 영향을 주는 물질들을 포함할 수 있음은 당업자에게 자명한 사실이며, 일례로 고농도 세포 배양 및 재조합 단백질의 고효율 수득이 가능하도록, 배지 내 완충용액, 복합질소원, 계면활성제등을 첨가할 수 있고, 본 발명의 기술분야에 종

사하는 자들에게 널리 공지된 세포 배양 성분들이 적절하게 사용될 수 있으며, 공지성분의 첨가는 본 발명의 기술적 사상의 범주에 포함된다.

효 과

[0018] 본 발명에 따르면, 초기배양 배지에 식물유래 단백질 가수분해물을 첨가함으로써 세포의 성장단계 및 재조합 단백질의 생산단계에서 배지교환 작업이 없는 간소화된 재조합 단백질 생산 공정을 제공할 수 있으며, 이는 기존 재조합 단백질 생산에 비해 저렴한 생산 비용, 간소화된 대량생산공정 개발, 단백질 분해제로부터의 보호를 통하여 형질전환 식물세포배양에서 재조합 단백질의 대량생산 시, 저비용, 고효율로 생산성을 증대시키는데 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 식물로부터 유래된 단백질 가수분해물을 포함하는 식물세포 배양 배지 및 이를 이용한 재조합 단백질 대량생산 방법을 제공한다.

[0020] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0021] <실시예 1> 형질전환 식물체 제작 및 배양

[0022] 1-1. 형질전환된 벼 제작

[0023] 세포주는 재조합 CTLA4Ig 단백질을 생산하도록 형질전환된 발현벡터(도 6 참조, 전북대학교, 보령제약, 대한민국)를 *Oryza sativa* L. cv. Dongjin의 현탁세포(전북대학교, 보령제약 대한민국)에 사용하였다. 여기에는 벼의 아밀라제 유전자군인 RAm3D 유도 프로모터를 particle-bombardment 방법(Lee, S. J. *et al.*, *Protein Express. Purif.* 51: 293-302, 2007)을 이용하여 벡터에 삽입시켜 형질전환하였고, 상기 프로모터는 수크로스가 고갈된 상태에서 작동된다.

[0024] 1-2. 형질전환 세포 배양

[0025] 상기 실시예 1-1에서 제작한 형질전환 세포주 3g/L를 30g/L 수크로스를 첨가한 AA 배지에서 배양하였다. 배지의 pH는 5.8로 맞춘 뒤 500 mL 엘렌마이어 플라스크(Erlenmeyer flask)에 분주하여 가압증기 멸균하였다. 현탁 배양은 120 rpm, 암 조건으로 유지하였으며 9일 간격으로 계대 배양을 수행하였다.

[0026] <실시예 2> 식물유래 단백질 가수분해물 첨가 배양시, 건조된 세포중량

[0027] 상기 실시예 1-2의 성장배지에서 9일 동안 배양한 형질전환 세포를 여과한 후, 식물유래 단백질 가수분해물이 첨가된 AA배지에 재조합단백질 생산을 유도하였다. 식물유래 단백질 가수분해물의 첨가는 기존 AA배지에 콩유래 단백질 가수분해물(BBL™, Difco™)을 10~30 g/L 첨가하여 0.22 μ m membrane filter로 여과 멸균하였다. 이후, 식물유래 단백질 가수분해물 첨가 배양시의 건조된 세포중량을 기존의 AA 기본배지와 비교하였다.

[0028] 건조된 세포중량은 Buhner funnel (OMG사, 대한민국)과 Advantec No. 1여과지(Advantec 사, 프랑스)를 이용하여 세포와 배지를 분리하고 weighing dish(OMG사, 대한민국)에 옮겨 담아서 세포 생체량을 측정 후 60℃의 건조 오븐에서 48시간동안 항량될 때까지 건조시킨 후 측정하였다.

[0029] 세포건조중량 측정결과 콩유래 단백질 가수분해물 30 g/L를 첨가한 경우, 초기 접종농도가 2 g/L이지만, 8일째에는 15.8 g/L까지 급격히 세포가 증대하는 경향을 보였다. 콩유래 단백질 가수분해물 20 g/L를 첨가한 경우, 같은 초기 접종농도에서 10일째에 13.8 g/L까지, 10 g/L를 첨가한 경우, 같은 초기 접종농도에서, 8일째에 13.5 g/L까지 세포 성장 결과를 보였다(도 3). 이는 기존 AA배지의 경우, 초기 접종농도가 2 g/L일때, 10일째에 8.9 g/L까지 성장하기 때문에(도 1), 식물유래 단백질 가수분해물의 사용 시 최대 세포성장 시간을 앞당기고 기존의 AA배지 보다 최대세포량을 1.8 배 향상시킨 우수한 결과를 보임을 확인할 수 있다.

표 1

[0030] 식물유래 단백질 가수분해물 첨가 배양시의 건조된 세포중량

구분	세포생장(g/L)
Control	8.9
PP10	13.5
PP20	13.8
PP30	15.8

[0031] <실시예 3> 식물유래 단백질 가수분해물 첨가 배양시, 재조합 단백질 생산량

[0032] 종래 AA 배지의 사용으로 재조합 단백질을 생산할 경우에는 RAmv3D 프로모터의 발현이 당 고갈에 의해 작동되기 때문에, AA기본배지에서 당을 제거하여 이를 유도배지, 즉 생산배지로 이용하였다.

[0033] 하지만 본 발명자들은 상기 실험과 같은 조건에서, 즉 기존 AA배지에 식물유래 단백질 가수분해물을 첨가한 후 당이 제거된 생산배지로의 교환 없이 목적단백질의 생산을 확인할 수 있었다. 또한, 기존 AA배지의 생산량과 비교하였다. 배지로 분비된 재조합 CTLA4Ig 단백질은 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 분석법을 이용하여 정량하였다.

[0034] Capture 항체로 Goat anti-human IgG (KPL, USA)를 사용하였으며, capture 항체와 coating 버퍼(15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6)를 1 : 1000으로 희석하여 well당 100 mL씩 분주하여 4℃ overnight한 후, blocking 버퍼 (8 g/L NaCl, 0.2 g/L KH₂PO₄, 1.15 g/L Na₂HPO₄, 0.2 g/L KCl, 2% FBS, pH 7.4)를 well당 200 mL씩 분주하여 1~2시간 상온에서 incubation 시켰다. Standard는 human IgG (Pierce, USA)를 사용하여 assay diluent를 well당 100 mL씩 분주하고 시료 및 standard 200 mL씩 넣고 1/2씩 희석하여 상온에서 2시간 incubation 시켰다. Detection 항체인 peroxidase labeled goat anti-human IgG (KPL, USA)와 assay diluent를 1 : 5000으로 혼합하여 well당 100 mL씩 분주하고 상온에서 1시간 incubation한 후, ABTS peroxidase substrate (KPL, USA)를 well당 100 mL씩 분주하여 상온에서 20분 동안 incubation 시켰다. 그 후, stop 버퍼를 well당 100 mL씩 분주하여 microplate reader (Bio-Rad, USA)를 이용하여 405 nm에서 측정하였다.

[0035] 그 결과, 기존 AA 배지에서의 생산은 배양 20일째 까지 이루어지지 않은 반면(도 2), 식물유래 단백질 가수분해물이 첨가된 배지에서는 10일째부터 생산이 이루어졌다(도4).

[0036] 또한, 콩 유래 단백질 가수분해물 10 g/L를 첨가한 경우, 최대 생산량은 18일째에는 75.3 mg/L까지 월등한 생산성을 확인할 수 있었다. 콩유래 단백질 가수분해물 20 g/L를 첨가한 경우, 14일째에 36.1 mg/L까지, 30 g/L를 첨가한 경우, 18일째에는 27.8 mg/L까지 생산함을 확인하였다. 이는 기존 AA배지를 사용하여 당이 제거된 유도배지 즉, 생산배지를 사용했을 시 생산량인 25 mg/L의 수준보다도 월등히 높은 생산량임을 확인할 수 있었다.

표 2

[0037] 식물유래 단백질 가수분해물 첨가 배양시의 재조합 단백질 생산량

구분	생산량(mg/L)
Control	25
PP10	75.3
PP20	36.1
PP30	27.8

[0038] <실시예 4> 식물유래 단백질 가수분해물 첨가 배양시, 재조합 단백질 생산 형태

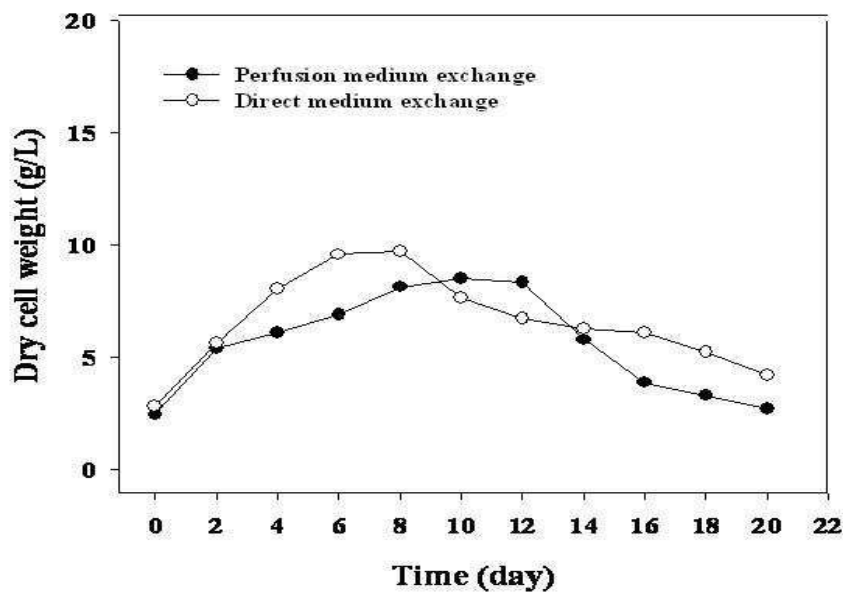
[0039] 본 발명에 사용한 식물(콩) 유래 단백질 가수분해물을 첨가한 배양 공정을 통한 재조합 CTLA4Ig 단백질 발현 양상을 웨스턴 블롯(Western blot)으로 확인하였다. 12% 트리스-글라이신 겔(invitrogen)을 사용하여 SDS-PAGE를 수행하고, 웨스턴 블롯(Western blot)을 통한 단백질 분자량을 확인하기 위해 electroblotting module(Mini-Blot cell, Invitrogen)을 사용하여 PVDF membrane에 블러팅 하였다. 1차 항체로 모노클로날 항-인간CTLA4 항체(from mouse, KPL)와 반응시켰으며, 퍼옥시다제(peroxidase)가 라벨된 항-마우스 IgG(from goat, KPL)를 2차 항체로 사용하였다. 기질반응을 한 후 증류수로 세척하여 반응을 중지시켰다. 특히 항체와의 반응 결과 분자량 약 50kDa의 재조합 CTLA4Ig 단백질을 확인하였다(도 5).

도면의 간단한 설명

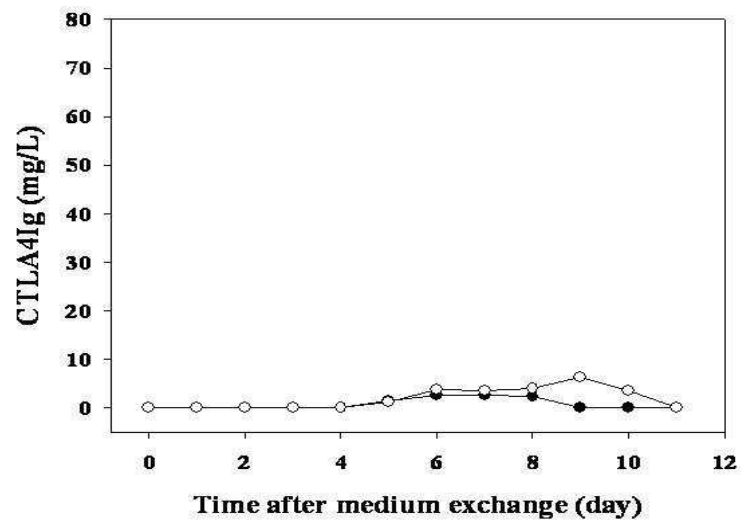
- [0040] 도 1은 당 고갈시 작동하는 프로모터를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 식물체의 재조합 단백질 생산을 위한 종래 2단계 배양에서의 배양시간에 따른 세포건조중량 그래프이고,
- [0041] 도 2는 종래 2단계 배양에서의 배양시간에 따른 재조합 CTLA4Ig 단백질 생산량 그래프이며,
- [0042] 도 3은 본 발명인 식물유래 단백질 가수분해물을 배양 시작에 첨가 후 배양 시간에 따른 세포건조중량 그래프이고,
- [0043] 도 4는 본 발명인 식물유래 단백질 가수분해물을 배양 시작에 첨가 후 배양 시간에 따른 재조합 CTLA4Ig 단백질 생산량 그래프이며,
- [0044] 도 5는 본 발명인 식물유래 단백질 가수분해물을 배양 시작에 첨가 후 배양 시간에 따른 재조합 CTLA4Ig 단백질의 웨스턴 블롯(Western blot) 결과를 나타내며,
- [0045] 도 6은 본 발명에 사용된 재조합 CTLA4Ig 단백질을 생산하도록 벼세포에 형질전환된 발현벡터를 도시한다.

도면

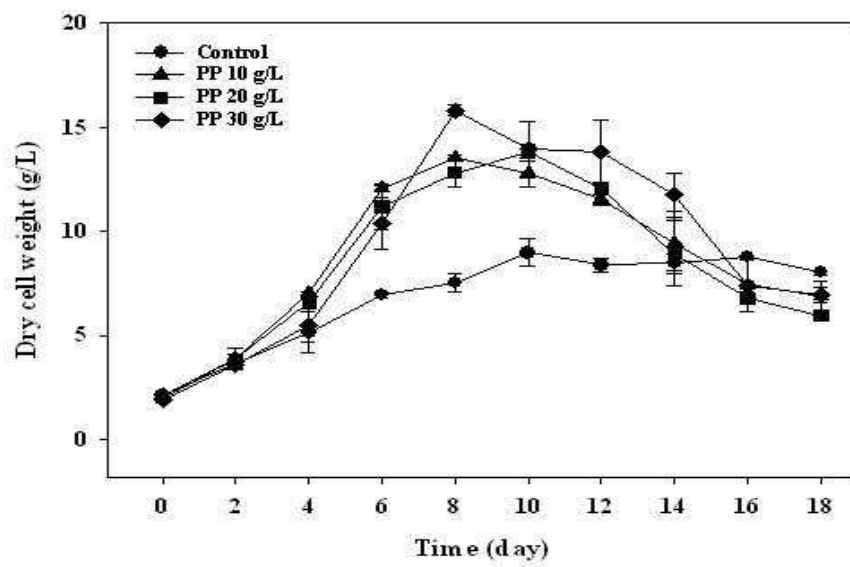
도면1



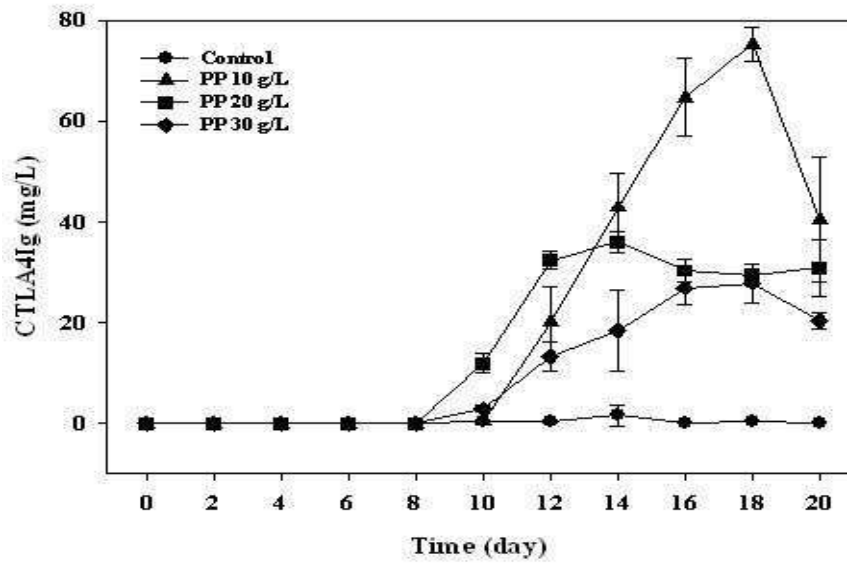
도면2



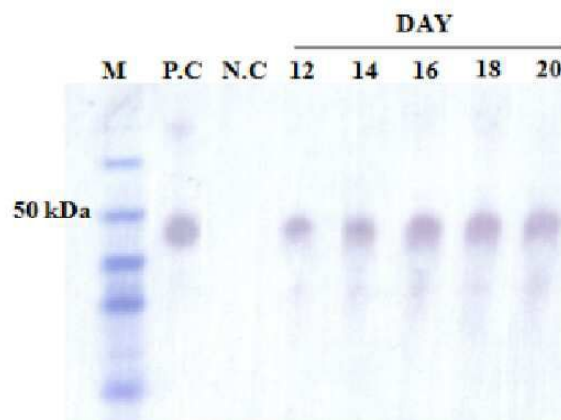
도면3



도면4



도면5



Lane1. SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Marker (Invitrogen)
 Lane2. Insect CTLA4Ig standard 0.6ug/ml
 Lane3. Control day 0
 Lane4. PP 10 g/L day 12
 Lane5. PP 10 g/L day 14
 Lane6. PP 10 g/L day 16
 Lane7. PP 10 g/L day 18
 Lane8. PP 10 g/L day 20

도면6

