



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년07월28일
(11) 등록번호 10-0848600
(24) 등록일자 2008년07월21일

(51) Int. Cl.

C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0020587

(22) 출원일자 2007년02월28일

심사청구일자 2007년02월28일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020040057555 A

KR1020050054209 A

(73) 특허권자

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

김동일

인천 남구 용현3동 인하대학교

전수환

인천 부평구 십정2동 신동아아파트 107동 2207호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 14 항

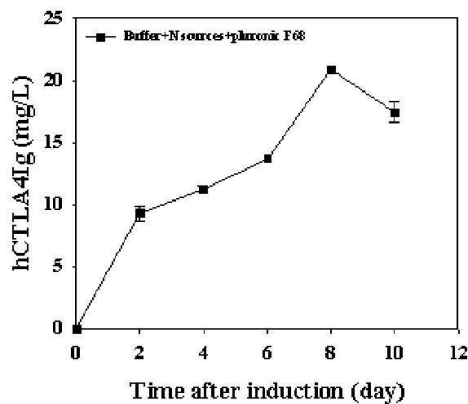
심사관 : 김지윤

(54) 완충용액을 이용한 재조합 단백질 대량생산 방법

(57) 요약

본 발명은 완충용액을 이용한 재조합 단백질 대량생산 방법에 관한 것으로, 구체적으로 완충용액을 생산 배지 대체용으로 이용하여 형질전환 식물세포배양시 재조합 단백질을 대량생산할 수 있는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 의해 인산 나트륨 완충용액 등을 재조합 단백질의 생산배지로 대체 사용할 수 있고 생산 동시 분리를 위한 단백질 A 컬럼의 정제용매로도 사용가능하여 간편하고 신속하게 목적 단백질을 높은 수율로 회수하여 생산성을 증대시키는데 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

이경훈

경기 시흥시 대야동 서해아파트 101동 1003호

권준영

인천 부평구 청천2동 200 금호어울림 107동 1702호

류현남

경기 부천시 오정구 여월동 8-7호 복지빌라 나동
303호

특허청구의 범위

청구항 1

완충용액을 재조합 단백질 생산 및 정제용 배지로 이용하여 형질전환 식물체로부터 재조합 단백질을 생산하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 완충용액의 주성분은 소듐 포스페이트, 포스페이트 살린 또는 트리스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 완충용액은 인산 나트륨을 1 ~100 mM의 농도로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 형질전환 식물체는 RAmv3D 프로모터를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 완충용액은 목적 단백질 생산 및 정제시에 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

완충용액 조성물질과 복합질소원을 유효성분으로 함유하는 식물세포의 재조합 단백질 생산용 배지 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 복합질소원은 효모 니트로겐 베이스(Yeast nitrogen base), 효모 추출물, 펩톤, 트립톤 또는 이 중 둘 이상의 혼합물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서, 복합질소원은 0.01 ~ 50 g/L의 농도, 완충용액 조성물질은 0.1 ~ 1M의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 6항에 있어서, 완충용액 조성물질은 소듐 포스페이트, 포스페이트 살린 또는 트리스인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제 6항의 조성물을 이용하여 형질전환 식물체로부터 재조합 단백질을 생산하는 방법.

청구항 11

완충용액 조성물질, 복합질소원 및 비이온성 계면활성제를 유효성분으로 함유하는 식물세포의 재조합 단백질 생산용 배지 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서, 비이온성 계면활성제는 0.01 ~ 20g/L, 완충용액 조성물질은 0.1 ~ 1M, 복합질소원은 0.01 ~ 50 g/L의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제 11항에 있어서, 완충용액 조성물질은 소듐 포스페이트, 포스페이트 살린 또는 트리스인 것을 특징으로 하는 방법.

로 하는 조성물.

청구항 14

제 11항의 조성물을 배지로 이용하여 형질전환 식물체로부터 재조합 단백질을 생산하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<7> 본 발명은 완충용액을 이용한 재조합 단백질 대량생산 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 완충용액을 생산배지 대체용으로 이용하여 형질전환 식물세포배양시 재조합 단백질을 대량생산할 수 있는 방법에 관한 것이다.

<8> 식물세포배양에 사용할 수 있는 기본배지로는 AA, MS, N6, WHITE 및 SH 배지 등이 있다(Ge, X. et al., *Plant cell Rep.*, **25**: 392-402, 2006, Terashime et al., *Biochem. Eng. J.*, **4**: 31-36, 1999). 일반적으로 식물세포배양용 배지의 단가가 동물세포배양용 배지의 단가 보다 1/1,000~1/10,000 정도로 저렴하다고 하지만, 식물세포 성장 및 생산을 위해 첨가 되는 기본적인 거대분자와 미세분자가 포함된다. 예를 든다면, AA 배지에 탄소원, 질소원 및 무기염, 생장조절제, 아미노산 혼합물, 비타민 혼합물 등이 포함되며, 이들의 단가를 표 1에 나타내었다. 인산 나트륨 완충용액의 단가비용은 AA 기본배지의 단가비용에 약 1/4배~1/10배 이하로 매우 저렴하다.

<9> 표 1: 기존 생산배지(AA) 배지와 완충용액 구입 단가 비교

표 1

<10>

구성	단가	비고(구입처)
AA basal salt mixture	378.51 원/L	Sigma-Aldrich Inc.
2,4-D	0.64 원/L	Sigma-Aldrich Inc.
Kinetin	13.12 원/L	Sigma-Aldrich Inc.
GA3	6.00 원/L	Sigma-Aldrich Inc.
MS vitamin mixture	59.94 원/L	Sigma-Aldrich Inc.
Amino mixture	1426.71 원/L	Sigma-Aldrich Inc.
단가총액(원/L)	1884.92 원/L	

<11>

구성	단가	비고(구입처)
sodium phosphate	491.77 원/L	Sigma-Aldrich Inc.

<12>

식물세포배양은 동물세포배양에 비해 동물유래의 바이러스와 독소 등을 포함하지 않는 장점이 있다(Doran, P. M., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**: 199-204, 2000). 그러나, AA 기본배지는 식물생장호르몬인 2,4-D 2.0 mg/L, 항생제인 하이그로마이신을 포함하고 있다. 이들은 생물유래 의약품 등의 인·허가시 문제가 되며, 배양배지를 그대로 유출시킬 시, 환경 오염 등의 치명적인 결과를 초래한다. 2,4-D는 제초제 농약으로 쓰이며, 모노클로로아세트산과 2,4-디클로로페놀과의 반응으로 합성되는 화합물로, 주성분은 2,4-디클로로페녹시아세트산이다. 무색·분상(粉狀)물질로 페놀 냄새를 띠며 녹는점은 140.5℃, 증기압은 0.4mmHg(160℃)이다. 물(25℃)에는 620mg/L 정도 녹으며 알칼리용액이나 알코올·디에틸에테르에는 녹으나 석유에는 녹지 않은 성질을 지닌다.

<13>

또한, 식물세포배양은 동물세포배양에 비해 그 정제과정이 간단하다. 일반적으로, 식물세포배양용 배지는 제한배지(defined medium)로 그 구성성분이 잘 알려져 있으며, 다른 단백질성분 등을 포함하고 있지 않기 때문에, 동물세포배양용 배지보다 저렴하고 간단하게 목적단백질을 분리·정제할 수 있다(Doran, P. M., *Curr.*

Opin. Biotechnol. **11**: 199-204, 2000). 그러나 배양 중, 배지내 축적되는 단백질분해제 등은 불가피하며, 이들은 목적단백질 생산에 부정적인 역할을 한다. 또한 배양 중, 배지내 pH 변화 등은 목적단백질의 변성 등을 초래할 수 있다. 따라서, 이들로부터 목적단백질을 보호하기 위해 생산 동시 분리 공정이 필요하다(James, E. et al., *Biochem. Eng. J.* **12**: 205-213, 2002). 최근 발표된 연구에서도 목적단백질을 이러한 유해인자로부터 보호하기 위해, *in situ recovery* 공정이 개발되고 있지만, 이것 또한 이후 여러 정제단계를 통하기 때문에, 비효율, 비효율적인 생산성을 나타내었다.

<14> 한편, 벼세포의 현탁배양에서 배지내로 분비되는 총 단백질의 20~40%는 알파 아밀라아제 유전자 집단(α -amylase gene family)인 RAm3D와 RAm3E이며, 이 두 가지 유전자는 배지내 당 농도에 따라 발현량의 현저한 차이를 나타낸다. 특히 RAm3D는 배지내 당이 고갈되었을 때 발현량이 165배 증가되며, 이와 반대로 배지내 수크로즈, 글루코즈, 프락토스, 갈락토스 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 가능하다(James, E. A. and J. M. Lee, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **72**: 127-156, 2001). 최근, RAm3D 프로모터를 이용해 재조합 단백질인 G-CSF, GM-CSF, SA, AAT, INF- γ , hCTLA4Ig 등을 생산하고 있다. 재조합 단백질의 생산을 증진시키기 위해 생산 공정에 적합한 고효율 발현 벡터 이용, 대체 탄소원 사용, 삼투압조절제 첨가, 단백질 안정제 사용, 고농도 배양, 배지 교환식 배양 등 다양한 방법 등이 적용되고 있다. 그러나, 현재까지, 벼 세포 배양시, 완충용액을 생산을 위한 대체배지와 정제용매로 동시에 사용하는 연구와 특허는 전무한 실정이다.

<15> 이에, 본 발명자들은 저렴하고 제조가 쉬운 완충용액을 이용해 재조합 단백질의 생산성을 증대시켰고, 2,4-D 성분 등 배지 내 유해성분을 완전히 제거하여 친환경적 식물세포배양을 가능하게 하였고, 또한 간편하고, 빠르며, 높은 수율로 생산 동시 정제할 수 있는 대량생산 방법을 확립함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<16> 본 발명의 목적은 형질전환 식물세포배양에서 완충용액을 생산배지와 정제용매로 동시에 사용할 수 있는 완충용액을 이용한 재조합 단백질 대량생산 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<17> 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 완충용액을 배지로 이용하여 형질전환 식물체로부터 재조합 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

<18> 또한, 본 발명은 완충용액과 복합질소원으로 구성된 식물세포 생산용 배지 조성물 및 이를 이용하여 형질전환 식물체로부터 재조합 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

<19> 아울러, 본 발명은 완충용액, 복합질소원 및 비이온성 계면활성제로 구성된 식물세포 생산용 배지 조성물 및 이를 이용하여 형질전환 식물체로부터 재조합 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

<20> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<21> 본 발명은 완충용액을 배지로 이용하여 형질전환 식물체로부터 재조합 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

<22> 본 발명자들은 완충용액을 생산배지로 대체사용하여, 저렴하고도 효과적으로 목적단백질을 생산하고자 하였고, 2,4-D와 항생제 등의 성분을 배지 내에서 완전히 제거하여 무해한 배양생산공정을 확립하고자 하였다. 또한 본 실험에 사용된 완충용액은 컬럼 친화도를 통한 재조합 단백질 정제시 사용되는 결합 완충용액으로서, 생산 동시 회수(*in situ recovery*)가 가능토록 하여, 대량화 생산 공정에도 이용할 수 있는 방법을 확립하고자 하였다. 이를 통해 배양 시 증가하는 단백질 분해제의 활성을 감소시키고, 배양 중 pH 변화를 감소시켜 생성물의 안정성을 증진시킬 수 있는 조건을 제공하였고, 재조합 단백질의 생산성을 극대화 할 수 있는 방법을 제공하고자 하였다.

<23> 본 발명자들은 완충용액에서 배양시의 건조된 세포중량과 상대 세포생존도를 기존의 AA기본배지와 비교한 결과, 당을 제거한 AA기본배지에서의 건조된 세포중량은 당 고갈에 의한 세포사멸 때문에 급격히 감소하는 경향을 보였다. 상대세포생존도도 당 고갈에 의해 계속 감소되었다. 완충용액을 이용한 배양에서의 건조된 세포중량은 상기 AA기본배지와 유사한 감소경향을 보였다. 그러나 완충용액에서의 상대 세포생존도는 AA기본배지

보다 높았다. 따라서 세포 생존도에 있어서 완충용액 사용시 기존의 AA기본배지 보다 우수한 결과를 확인할 수 있었다(도 1 참조).

<24> 본 발명자들은 기존 배지와 완충용액에서 배양시, 생산된 재조합 단백질의 안정성을 알아보기 위하여, 상기 실험과 같은 조건으로, 완충용액에서의 단백질분해제 활성을 기존 AA기본배지와 비교하였다. 그 결과, 기존 AA기본배지에서의 단백질분해제 활성은 급격히 증가하였으나 완충용액에서의 단백질분해제 활성은 완만한 증가를 보였으며, 기존의 AA기본배지에 비해 30% 낮았다. 따라서, 완충용액에서의 단백질분해제 활성은 기존 AA기본배지의 단백질분해제 활성보다 낮게 유지되어 목적단백질 안정성에 유리함을 확인하였다(도 2 참조).

<25> 본 발명자들은 상기 실험과 같은 조건에서, 완충용액에서의 목적단백질의 생산량을 기존 AA 기본 배지의 생산량과 비교하였다. 그 결과, 완충용액의 경우 최대생산량에 있어서 기존 AA 기본배지와 유사한 결과를 보였으나 최대생산량 도달시점은 단축되는 결과를 확인할 수 있었다. 그러므로, 완충용액이 기본AA배지의 대체 생산배지로의 사용 가능함을 확인하였다(도 3 참조).

<26> 본 발명에서는 식물세포에 독성이 적고 당이 포함되지 않는 모든 종류의 완충용액을 사용할 수 있다. 완충용액의 주성분은 소듐 포스페이트, 포스페이트 살린 또는 트리스가 가능하고 바람직하게는 10 ~ 100 mM의 인산 나트륨 완충용액, 인산 완충용액 등을 사용 할 수 있다.

<27> 또한, 본 발명은 완충용액과 복합질소원으로 구성된 식물세포 생산용 배지 조성물 및 이를 이용하여 형질전환 식물체로부터 재조합 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

<28> 완충용액에서의 생산량을 높이거나 복합질소원을 첨가하였다. 펩톤 등의 복합질소원을 배양 초기 첨가하였다. 생산량을 비교하면, 복합질소원을 첨가한 완충용액에 경우 최대생산량에 있어서 대조군보다 32% 향상된 결과를 얻을 수 있었다(도 4).

<29> 상기 완충용액에 복합질소원은 효모 니트로젠 베이스(Yeast nitrogen base), 효모 추출물, 펩톤, 트립톤 또는 이 중 둘 이상의 혼합물을 사용가능하고 바람직하게는 효모 니트로젠 베이스(yeast nitrogen base), 펩톤 등을 2~40 g/L의 농도로 첨가할 수 있다.

<30> 복합질소원은 0.01 ~ 50 g/L의 농도, 완충용액 조성물질은 0.1 ~ 1M의 농도로 포함가능하다.

<31>

<32> 아울러, 본 발명은 완충용액, 복합질소원 및 비이온성 계면활성제로 구성된 식물세포 생산용 배지 조성물 및 이를 이용하여 형질전환 식물체로부터 재조합 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

<33> 본 발명자들은 완충용액을 이용한 생산배지의 생산성을 증진시키고자, 도 4의 복합질소원과 함께 비이온성 계면활성제인 Pluronic F-68를 첨가하였다. 그 결과, 비이온성 계면활성제를 복합질소원과 함께 첨가한 경우, 복합질소원만 첨가한 최대생산량에 비해 44% 향상된 결과를 얻을 수 있었다. 그리고 완충용액만 사용했을 때의 최대생산량에 비해서는 82% 증진된 결과로, 복합질소원의 첨가는 완충용액을 생산대체배지로 이용시 목적단백질의 생산성을 효과적으로 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다(도 5 참조).

<34> 복합질소원이 포함된 완충용액에 비이온성 계면활성제인 Pluronic F-68 등을 0.1 ~ 10 g/L의 농도로 첨가할 수 있다.

<35> 비이온성 계면활성제는 0.01 ~ 20g/L, 완충용액 조성물질은 0.1 ~ 1M, 복합질소원은 0.01 ~ 50 g/L의 농도로 포함될 수 있다.

<36> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용을 제한하지는 않는다.

<37> <실시예 1> 형질전환 식물체 제작 및 배양

<38> <1-1> 형질전환된 벼 제작

<39> 세포주는 hCTLA4Ig를 생산하도록 형질전환된 발현벡터(도 6 참조, 전북대학교, 보령제약, 대한민국) *Oryza sativa* L. cv. Dongjin의 현탁세포(전북대학교, 보령제약 대한민국) 사용하였다. 여기에는 벼의 아밀라제 유전자군인 RAmy3D 유도 프로모터를 particle-bombardment 방법(Lee, S. J. et al., *Protein Expres. Purif.* 51: 293-302, 2007)을 이용하여 벡터에 삽입시켜 형질전환하였고, 상기 프로모터는 수크로스가 고갈된 상태에서 작동된다.

<40> <1-2> 형질전환 세포 배양

<41> 상기에서 제작한 형질전환 세포주 3g/L를 30g/L 수크로스를 첨가한 AA 배지에서 배양하였다. 배지의 pH는 5.8로 맞춘 뒤 500 mL 얼렌마이어 플라스크(Erlenmeyer flask)에 분주하여 가압증기 멸균하였다. 현탁 배양은 120 rpm, 압 조건으로 유지하였으며 7일 간격으로 계대 배양을 수행하였다.

<42>

<43> <실시예 2> 완충용액 배양시, 건조된 세포중량 및 상대 세포생존도 그래프

<44> 상기와 같이 생장배지에서 7일 동안 배양한 세포를 여과한 후, 생산배지로 접종하여 재조합단백질 생산을 유도하였다. 이후, 완충용액에서 배양시의 건조된 세포중량과 상대 세포생존도를 기존의 AA 기본배지(Sigma aldrich)와 비교하였다. RAm3D 프로모터의 발현은 당 고갈에 의해 작동되기 때문에, AA기본배지에서 당을 제거하여 이를 유도배지, 즉 생산배지로 이용하였다.

<45> 당을 제거한 AA 기본배지에서의 건조된 세포중량은 Buhner funner(OMG사, 대한민국)과 Advantec No. 1 여과지(Advantec 사, 프랑스)를 이용하여 세포와 배지를 분리하고 weighing dish(OMG사, 대한민국) 옮겨 담아서 세포 생체량을 측정 한 후 60℃의 건조 오븐에서 48시간동안 항량될 때까지 건조시킨 후 측정하였다. 세포건조중량 측정결과 초기 접종농도가 6 g/L이지만, 10일째에는 당 고갈에 의한 세포사멸 때문에 2.4 g/L까지 급격히 감소하는 경향을 보였다. 상대세포생존도 세포 생체량 0.1g에 1.5% TTC(triphenyl tetrazolium chloride, pH9)도 당 고갈에 의해 계속 감소되어 6일째에는 생존도가 2% 이하로 떨어졌다.

<46> 완충용액(20mM sodium phosphate buffer: sodium phosphate dibasic(Na_2HPO_4)1.6387g/L + sodium phosphate monobasic(NaH_2PO_4)1.0152g/L)을 이용한 배양에서의 건조된 세포중량은 상기 AA기본배지와 유사한 감소경향을 보였다. 그러나 완충용액에서의 상대 세포생존도는 AA기본배지보다 높았으며, 6일째까지 10%이상 생존도를 유지하였다. 따라서 세포생존도에 있어서 완충용액 사용시 기존의 AA기본배지 보다 우수한 결과를 확인할 수 있었다(도 1).

<47> <실시예 3> 완충용액 배양시, 단백질 분해제 활성 그래프

<48> 본 발명자들은 기존 배지와 완충용액에서 배양시, 생산된 재조합 단백질의 안정성을 알아보기 위하여, 도 1의 실험과 같은 조건으로, 완충용액에서의 단백질분해제 활성을 기존 AA 기본배지와 비교하였다.

<49> modified Anson's method를 사용하였고(Bettaglino, R. A. ET AL., Appl. Microbiol. Biotechnol., 35: 292-238, 2006). 구체적으로 1% casein(67mM phosphate buffer, pH7.0) 용액 0.5 mL에 배지 0.2 mL을 첨가한 후, 50℃에서 20분간 반응시켰다. 30% TCA(trichloroacetic acid) 용액 0.3 mL을 첨가하여 30분간 50℃에서 정치시킨 후, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 0.8mL을 취하였다. 상등액은 spectrophotometer(Agilent 8453)를 이용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선은 티로신(tyrosine) 용액 농도를 기준으로 얻었으며, 블랭크(blank)는 3차 증류수로 하였다. 기존 AA기본배지에서의 단백질분해제 활성은 6일째까지 63 U/mL로 급격히 증가하였다. 그러나 완충용액에서의 단백질분해제 활성은 2일째 이후 완만한 증가를 보였으며, 6일째에 44 U/mL로 기존의 AA기본배지에 비해 30% 낮았다. 따라서, 완충용액에서의 단백질분해제활성은 기존 AA기본배지의 단백질분해제 활성보다 낮게 유지되어 목적단백질 안정성에 유리함을 확인하였다(도 2).

<50> <실시예 4> 완충용액 배양시, 재조합 단백질 생산량 그래프

<51> 본 발명자들은 도 1의 실험과 같은 조건에서, 완충용액에서의 목적단백질의 생산량을 기존 AA 기본 배지의 생산량과 비교하였다. 배지로 분비된 hCTLA4Ig는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 분석법을 이용하여 정량하였다.

<52> 그 결과, 기존 AA 배지에서의 생산량은 4일째 급격히 증가하여 10.4 mg/L에 도달하였으며 8일째 최대생산량 11 mg/L을 나타내었다. 완충용액에서의 생산량은 4일째 최대생산량 11.5 mg/L로 관찰되었다. 완충용액의 경우 최대생산량에 있어서 기존 AA 기본배지와 유사한 결과를 보였다. 또한 기존의 AA기본배지에 비해 최대생산량 도달시점이 단축되는 결과를 확인할 수 있었다. 그러므로, 완충용액이 기본AA배지의 대체생산배지로의 사용 가능성을 확인하였다(도 3).

<53> 표 2: ELISA 분석법

표 2

<54>

Step	Reagent & Condition
1. Capture Ab coating	Capture Ab: Goat anti-human IgG (Fc) (KPL, USA) Capture Ab와 coating buffer를 1:1000으로 희석 Well 당 100 mL 씩 loading 4℃ overnight
2. Blocking	Blocking buffer를 well당 200 mL씩 분주 2시간 상온에서 incubation Washing 3회
3. Standard & sample loading	Standard: Human IgG (Pierce, USA) Sample & standard를 200 mL씩 loading, 1/2로 3회 희석 1시간 37℃에서 incubation (or 4℃ overnight) Washing 4회
4. Detection (2nd) Ab	Detection Ab: Peroxidase labeled goat anti-human IgG(g) (KPL, USA) Detection Ab와 assay buffer를 1:5000으로 희석 Well 당 100 mL씩 분주 1시간 37℃에서 incubation Washing 5회
6. Substrate	Substrate: ABTS peroxidase substrate (KPL, USA) Well 당 100 mL씩 분주 15분 동안 상온에서 incubation
7. Stop buffer	Stop buffer를 well 당 100 mL씩 분주
8. Microplate reading	O.D. 405 nm에서 측정

<55>

<56> <실시예 5> 완충용액 + 복합질소원 첨가시 재조합단백질 생산량 그래프

<57>

완충용액에서의 생산량을 높이하고자 복합질소원을 첨가하였다. 펩톤 등의 복합질소원(YNB w/o Ammonium sulfate, Q-Biogene)을 2 g/L로 하여 배양 초기 첨가하였다. 생산량을 비교하면, 대조군으로 기본 AA 배지의 경우 8일째 최대 11 mg/L의 생산성을 보인 반면에, 복합질소원을 첨가한 경우는 6일째 12.5 mg/L에 도달하였으며, 10일째 최대생산량 14.5 mg/L을 보였다. 복합질소원을 첨가한 완충용액에 경우 최대생산량에 있어서 대조군보다 32% 향상된 결과를 얻을 수 있었다(도 4).

<58>

<실시예 6> 완충용액 + 복합질소원 + 비이온성 계면활성제 첨가시 재조합단백질 생산량 그래프

<59>

완충용액을 이용한 생산배지의 생산성을 증진시키고자, 도 4의 복합질소원과 함께 비이온성 계면활성제인 Pluronic F-68(Sigma-Aldrich, USA)을 2 g/L로 하여 배양 초기에 첨가하였다. 비이온성 계면 활성제는 생산된 재조합 단백질이 배지로 분비되는 것을 촉진한다고 알려져 있다.

<60>

그 결과, 비이온성 계면활성제를 복합질소원과 함께 첨가한 경우, 8일째 최대생산량은 21 mg/L로 관찰되었다. 복합질소원만 첨가한 14.5 mg/L의 최대생산량에 비해 44% 향상된 결과를 얻을 수 있었다. 그리고 완충용액만 사용했을 때의 11.5 mg/L의 최대생산량에 비해서는 82% 증진된 결과로, 복합질소원의 첨가는 완충용액을 생산대체배지로 이용시 목적단백질의 생산성을 효과적으로 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다(도 5).

발명의 효과

<61>

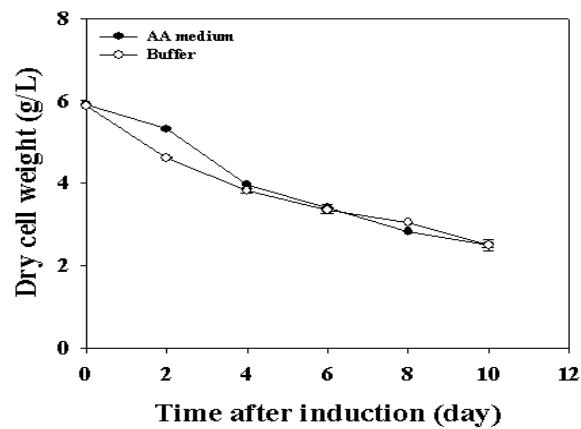
상기에 언급한 바와 같이, 본 발명에서는 완충용액을 생산배지와 정제용매로 동시에 이용하여 재조합 단백질을 대량생산하였다. 구체적인 효과로는 완충용액을 이용하여 기존배지에 비해 저렴한 생산 비용, 유해한 2,4-D 성분 등 완전제거, 간단한 생산 동시 정제공정 개발, pH 변화 감소에 의한 생성물 안정, 단백질분해제 활성 억제, 생산 동시 분리를 통해 단백질분해제에 의한 분해 최소화, 생산 억제 감소로 인해 재조합 단백질의 생산성을 현저히 향상시켰다. 따라서 본 발명을 통해 형질전환 식물세포배양에서 재조합 단백질의 대량생산시, 저비용, 고효율로 바이오리액터 생산이 가능하여 산업화가 가능하다.

도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 완충용액 배양시, 건조된 세포중량 및 상대 세포생존도 그래프이고,
- <2> 도 2는 완충용액 배양시, 단백질분해제 활성 그래프이고,
- <3> 도 3은 완충용액 배양시, 재조합단백질 생산량 그래프이고,
- <4> 도 4는 완충용액 + 복합질소원 첨가시 재조합단백질 생산량 그래프이고,
- <5> 도 5는 완충용액 + 복합질소원 + 비이온성 계면활성제 첨가시 재조합 단백질 생산량 그래프이고,
- <6> 도 6은 hCTLA4Ig 발현 벡터의 개열지도이다.

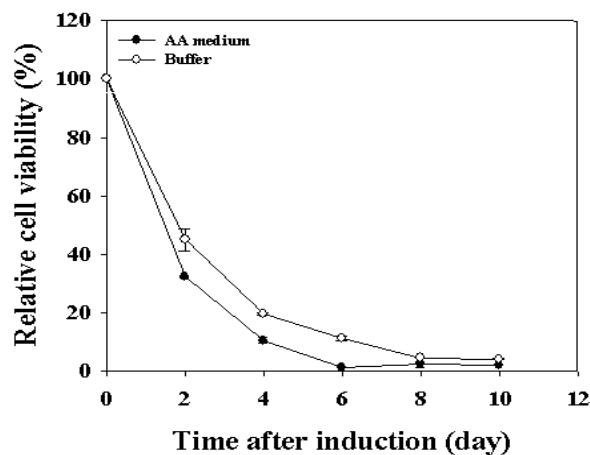
도면

도면1a



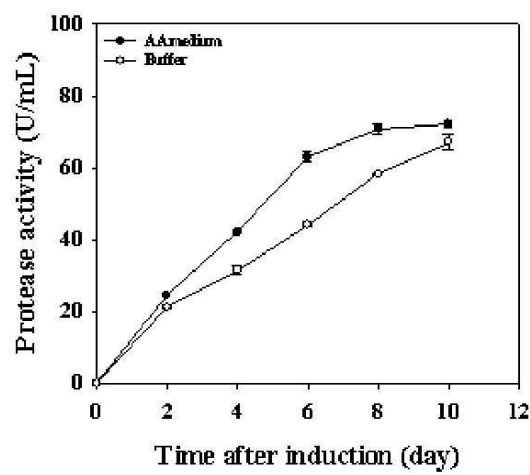
(A) 건조된 세포중량

도면1b

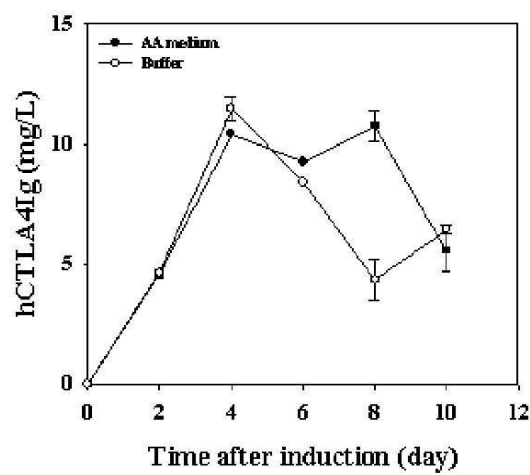


(B) 상대 세포생존도

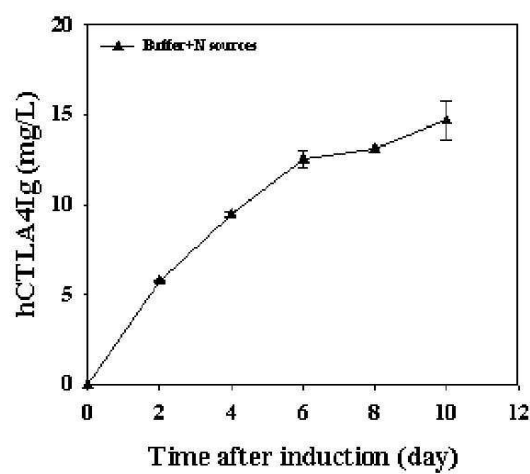
도면2



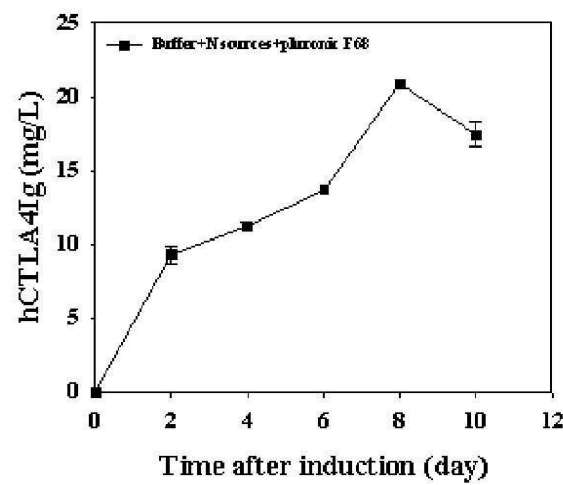
도면3



도면4



도면5



도면6

