

(11) 공개번호 10-2021-0010097
(43) 공개일자 2021년01월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 21/00 (2006.01) *C07K 1/34* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12P 21/00 (2013.01)
C07K 1/34 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0087540

(22) 출원일자 2019년07월19일
 심사청구일자 2019년07월19일

(71) 출원인
 충남대학교산학협력단
 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자
 김동명
 대전광역시 서구 둔산로 223, 7동 303호(둔산동, 청솔아파트)

임혜진
 전라남도 여수시 무선중앙로 42-1(화장동)

(74) 대리인
 최규환

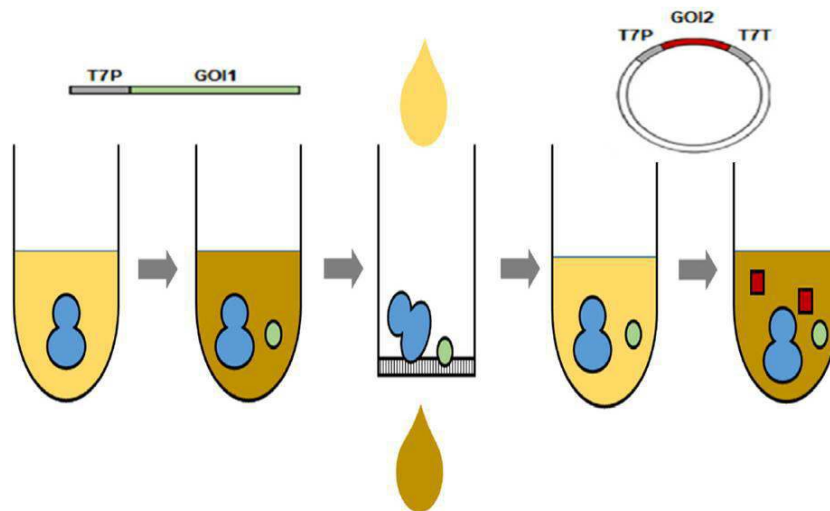
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 무세포 단백질 합성을 이용하는 단백질 발현 또는 활성 증진 보조인자의 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 무세포 단백질 합성을 이용하는 단백질 발현 또는 활성 증진 보조인자의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 상세하게는 제조합 단백질의 생산에서 단백질의 발현 및 기능적 3차원 구조의 형성은 다양한 인자에 의해 영향을 받으므로, 특정 단백질의 합성 및 기능적 구조 형성에 도움을 주는 보조인자 단백질과 목적 단백질을 순차적으로 발현함으로써 활성을 가지는 목적 단백질의 생산성을 크게 향상시키는 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C07K 14/47 (2013.01)

C12N 9/0065 (2013.01)

C12Y 111/01007 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015M3D3A1A010648
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	C1가스 리파이너리 사업
연구과제명	C1 가스화 부산물 이용 효소 및 시스템 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2018.01.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016M1A5A1027465
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	해양극지기초원천기술개발사업
연구과제명	유용물질 생합성 해양미세조류 대사경로의 고속 탐색 및 엔지니어링을 위한 무세포
합성 생물학 플랫폼 개발	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 목적 단백질의 발현 또는 활성화에 유용할 것으로 예측되는 후보 단백질을 각각 무세포 단백질 합성하는 단계;
- (2) 상기 단계 (1)에서 합성된 각각의 후보 단백질을 포함하는 반응물을, 각각 정용여과(diafiltration)하여 무세포 단백질 합성에 의해 생성된 부산물을 제거한 후, 무세포 단백질 합성에 필요한 반응물을 보충하는 단계;
- (3) 상기 단계 (2) 이후에, 목적 단백질을 코딩하는 유전자 주형을 첨가하고, 목적 단백질의 무세포 단백질 합성을 수행하는 단계; 및
- (4) 상기 단계 (3)에서 합성한 목적 단백질의 발현 또는 활성화 분석을 통해 목적 단백질의 발현 또는 활성화 증진에 적합한 단백질을 선별하는 단계;를 포함하는 단백질의 발현 또는 활성화 증진 단백질을 스크리닝하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 목적 단백질의 발현 또는 활성화에 유용할 것으로 예측되는 후보 단백질은 전사인자, 번역인자, 아실화티알라닐아미노아실화효소(aminoacyl tRNA synthetase), ATP 재생인자, mRNA안정화 인자 및 폴딩 보조인자 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 단백질의 발현 또는 활성화 증진 단백질을 스크리닝하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 폴딩 보조인자는 샤페론(chaperone) 또는 폴다아제(foldase)인 것을 특징으로 하는 단백질의 발현 또는 활성화 증진 단백질을 스크리닝하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 단계 (1)에서 후보단백질의 무세포 단백질 합성에서 사용되는 유전자 주형은 선형의 DNA 또는 mRNA인 것을 특징으로 하는 단백질의 발현 또는 활성화 증진 단백질을 스크리닝하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 단계 (1)에서 후보단백질의 무세포 단백질 합성에서 사용되는 유전자 주형은 PCR 기법으로 합성된 터미네이터를 포함하지 않는 선형의 DNA인 것을 특징으로 하는 단백질의 발현 또는 활성화 증진 단백질을 스크리닝하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 단계 (1)에서 후보단백질의 무세포 단백질 합성에서 사용되는 유전자 주형은 2단계 오버랩 연장 PCR(two-step overlap extension PCR)을 이용하여 제조되거나, 절단-라이게이션(digestion-ligation) 방법으로 제조된 것을 특징으로 하는 단백질의 발현 또는 활성화 증진 단백질을 스크리닝하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 단계 (3)의 무세포 단백질 합성에서 사용되는 유전자 주형은 플라스미드 형태인 것을 특징으로 하는 단백질의 발현 또는 활성화 증진 단백질을 스크리닝하는 방법.

청구항 8

- (1) 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 단백질의 발현 또는 활성화 증진 단백질을 스크리닝하는 방법을 통해 채택된 단백질을 무세포 단백질 합성하는 단계;
- (2) 상기 단계 (1)에서 합성된 단백질을 포함하는 반응물을 정용여과(diafiltration)하여 무세포 단백질 합성에 의해 생성된 부산물을 제거한 후, 무세포 단백질 합성에 필요한 반응물을 보충하는 단계; 및

(3) 상기 단계 (2) 이후에, 목적 단백질을 코딩하는 유전자 주형을 첨가하고, 목적 단백질의 무세포 단백질 합성을 수행하는 단계;를 포함하는 무세포 단백질의 합성 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 무세포 단백질 합성을 이용하는 단백질 발현 또는 활성 증진 보조인자의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단백질은 생물 약학적 또는 정제 화학제품 등의 산업적 적용을 위하여 식물 또는 동물의 조직이나 미생물 등의 천연 원료로부터 추출 및 정제하여 획득하거나 재조합 기술을 이용하여 획득할 수 있다. 재조합 단백질 생산에서 기본적인 문제는 생산된 재조합 단백질의 폴딩(folding) 구조에 대한 것이다. 재조합에 의해 생산되는 신생 폴리펩티드의 최종 구조는 주로 아미노산 서열에 의해 결정되지만, 많은 경우 최종 3차 구조의 형성은 분자 샤페론(chaperone) 및 폴다아제(foldase)를 포함하는 다양한 보조인자에 영향을 받는다. 즉, 샤페론 및 폴다아제를 이용하여 재조합 단백질 발현 시 용해되지 않은 봉입체(inclusion body) 형태의 단백질이 아닌 가용성의 활성형 단백질을 효과적으로 생산하는 것이 매우 중요한 문제이다.

[0003] 재조합 단백질의 생산은 주로 대장균 시스템을 이용하여 발현시키는데, 무작위적인 이황화 결합 또는 폴딩 중간체의 형성 등으로 불용성 또는 불활성의 봉입체 상태로 축적되는 경우가 많아, 다량의 재조합 단백질이 생산되더라도, 실질적으로 가용성의 활성형 단백질은 낮은 수준으로 생산할 수밖에 없는 실정이다.

[0004] 이에 재조합 단백질 생산에서 리폴딩(refolding)에 관한 기술이 개발돼 왔다. 일례로, 한국등록특허 제0494644호에 단백질의 산업적인 리폴딩 방법이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1520105호에 재조합 단백질의 리폴딩이 개시되어 있으나 아직까지도 재조합 단백질의 발현 단계에서 불용성 단백질을 줄이고, 가용성의 활성형 단백질의 생산량을 극대화시키지는 못하고 있는 실정이다.

[0005] 한편, 무세포 단백질 합성(cell-free protein synthesis)은 세포에서 단백질 생산에 관련되는 세포 내 기구와 이의 인자들만을 추출하여 세포 외부에서 세포의 생리적 조절 기작이 배제된 상태로 단백질의 합성 과정만을 인위적으로 반복시켜 단기간에 목적 단백질을 대량 생산함으로써, 세포 배양공정을 거치지 않고 고속으로 단백질을 합성할 수 있을 뿐만 아니라 세포막과 세포벽 등으로 구획되는 세포 내 공간 안에서 단백질 발현이 진행되는 세포 배양공정에 비해 물리적인 장벽이 존재하지 않는 완전히 열린 시스템으로 단백질 생산에서 매우 유용한 기술로 알려져 있다.

[0006] 무세포 단백질 합성 기술은 다양하게 조건을 변형시켜가면서 목적 단백질의 발현량, 가용성 및 활성을 유연하게 증가시킬 수 있다는 장점이 있는 것으로, 단백질 합성과정에서 필요한 아미노산류나 대사요소들을 보충하거나, 변형함으로써 무세포 단백질 합성 시스템의 생산성을 증가시키기 위한 방법으로 연속적 2단계 무세포 단백질 합성법이 보고된 바 있다. 하지만, 이 방법은 동일한 무세포 단백질 합성 시스템 내에서 두 종류의 유전자를 단순히 순차적으로 발현시키는 방법으로서, 첫 번째 단백질 합성 반응에서의 단백질 합성 기질 등의 소모로 인해 두 번째 반응에서 생산되는 단백질의 생산성이 저해를 받을 수 있어, 첫 번째 반응에서 생성된 단백질이 두 번째 단백질의 생산에 미치는 영향을 조사하는데 있어 오류적 결과를 야기할 수 있다. 상기한 바와 같이, 무세포 단백질 합성을 통한 단백질의 발현량 또는 가용성 등의 증진을 위한 다양한 기술이 개발되고 있지만, 본 발명의 무세포 단백질 합성을 이용하는 단백질 발현 또는 활성 증진 보조인자의 스크리닝 방법에 대해 개시된 바는 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 무세포 단백질 합성을 이용하는 단백질 발현 또는 활성 증진 보조인자의 스크리닝 방법을 제공하고, 본 발명의 스크리닝 방법에서 1차 무세포 단백질 합성 후, 정용여과를 통해 1차 무세포 단백질 합성에 의해 생성된 부산물을 제거하고, 무세포 단백질 합성에 필요한 반응물을 보충한 후, 목적 단백질의 합성을 위한 유전자 주형을 첨가하고 2차 무세포 단백질 합성을 수행함으로써, 생산된 단백질의 발현량 및 활성이 증진된다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (1) 목적 단백질의 발현 또는 활성화에 유용할 것으로 예측되는 후보 단백질을 각각 무세포 단백질 합성하는 단계;
- [0009] (2) 상기 단계 (1)에서 합성된 각각의 후보 단백질을 포함하는 반응물을, 각각 정용여과(diafiltration)하여 무세포 단백질 합성에 의해 생성된 부산물을 제거한 후, 무세포 단백질 합성에 필요한 반응물을 보충하는 단계;
- [0010] (3) 상기 단계 (2) 이후에, 목적 단백질을 코딩하는 유전자 주형을 첨가하고, 목적 단백질의 무세포 단백질 합성을 수행하는 단계; 및
- [0011] (4) 상기 단계 (3)에서 합성한 목적 단백질의 발현 또는 활성 분석을 통해 목적 단백질의 발현 또는 활성 증진에 적합한 단백질을 선별하는 단계;를 포함하는 단백질의 발현 또는 활성 증진 단백질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 (1) 상기 단백질의 발현 또는 활성 증진 단백질을 스크리닝하는 방법을 통해 채택된 단백질을 무세포 단백질 합성하는 단계;
- [0013] (2) 상기 단계 (1)에서 합성된 단백질을 포함하는 반응물을 정용여과(diafiltration)하여 무세포 단백질 합성에 의해 생성된 부산물을 제거한 후, 무세포 단백질 합성에 필요한 반응물을 보충하는 단계; 및
- [0014] (3) 상기 단계 (2) 이후에, 목적 단백질을 코딩하는 유전자 주형을 첨가하고, 목적 단백질의 무세포 단백질 합성을 수행하는 단계;를 포함하는 무세포 단백질의 합성 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명은 무세포 단백질 합성을 이용하는 단백질 발현 또는 활성 증진 보조인자의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 본 발명의 스크리닝 방법에서 1차 무세포 단백질 합성 후, 정용여과를 통해 1차 무세포 단백질 합성에 의해 생성된 부산물을 제거하고, 무세포 단백질 합성에 필요한 반응물을 보충한 후, 목적 단백질의 합성을 위한 유전자 주형을 첨가하고 2차 무세포 단백질 합성을 수행함으로써, 생산된 단백질의 발현량 및 활성을 증진시킬 수 있는 단백질 발현 또는 활성 증진 보조인자의 스크리닝에 매우 유용한 방법이다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 정용여과(diafiltration)에 의한 무세포 단백질 합성의 재활성화를 확인한 결과이다. A는 플라스미드 pK7sfGFP를 주형으로, 2시간 동안 무세포 단백질 합성하고, 정용여과하여 무세포 단백질 합성에 필요한 반응물을 보충하여 무세포 단백질 합성을 수행한 경우(-●-)와 정용여과 없이 무세포 단백질 합성한 경우(-○-)에 대한 sfGFP 단백질의 형광 값을 확인한 것이고, B는 PCR 산물인 선형의 sfGFP 유전자를 주형으로 무세포 단백질 합성을 수행한 것으로 -●-는 정용여과한 결과이고, -○-는 정용여과하지 않은 결과이다. 화살표(→)는 정용여과 시점을 의미하며, 실험값은 3번 반복 측정된 것이고, 오차 막대는 95% 신뢰구간을 나타낸다.
- 도 2는 본 발명에 따른 순차적 무세포 단백질 합성과정을 나타내는 개략도로서, 1차 단백질 합성 후, 반응물을 정용여과하여 무세포 단백질 합성 용액을 초기 상태 환경으로 되돌린 후, 2차 무세포 단백질 합성하는 과정을 나타낸 것이다. G011은 단백질 폴딩 보조인자 단백질을 코딩하는 유전자 주형이고, G012는 목적 단백질을 코딩하는 유전자 주형이며, T7P는 T7 프로모터이고, T7T는 T7 터미네이터이다.
- 도 3은 1차 무세포 단백질 합성에서 사용된 유전자 주형이 T7 터미네이터의 존재 여부에 따라 1차 무세포 단백질 합성에서 획득한 단백질(sfGFP)의 발현량(흰색 막대)과 2차 무세포 단백질 합성에서 획득한 단백질(DsRed)의 발현량(회색 막대)을 확인한 것이다. w/o T7T는 1차 단백질 합성에서 T7 터미네이터가 존재하지 않는 선형 sfGFP 유전자 주형을 이용한 것이고, w/ T7T는 1차 단백질 합성에서 T7 터미네이터가 존재하는 선형 sfGFP 유전자 주형을 이용한 것이다.
- 도 4는 fklB, fkpA, fkpB, ibpA, surA 및 yegD의 샤페론 유전자를 단백질 폴딩 보조인자의 주형으로 채택하여 1차 무세포 단백질 합성 및 정용여과한 후 2차 무세포 단백질 합성하여 획득된 CalB 단백질의 활성을 나타낸 것이다. 실험값은 3번 반복 측정된 것이고, 오차 막대는 95% 신뢰구간을 나타낸다.
- 도 5는 FkpB가 과발현된 세포 과쇄액(FkpB-enriched S12)을 이용하여 제조된 반응물에서 CalB의 무세포 단백질 합성한 결과로, A는 총 발현량(흰색 막대)과 가용성 단백질의 발현량(회색 막대)을 나타낸 것이고, B는 가용성

CalB 단백질의 활성을 확인한 것이다. Standard S12는 FkpB가 과발현되지 않은 표준 세포 파쇄액을 의미한다. 실험값은 3번 반복 측정된 것이고, 오차 막대는 95% 신뢰구간을 나타낸다.

도 6은 본 발명의 1차 무세포 단백질 합성을 위한 선형의 주형 DNA 제작방법을 나타낸 것으로, (A)는 2단계 오버랩 연장 PCR 방법을 도식화한 것이고, (B)는 절단-라이게이션 방법(digestion-ligation method)을 도식화한 것이다.

도 7은 무세포 단백질 합성에서, 활성형 HRP(horseradish peroxidase) 단백질을 증진시킬 수 있는 샤페론을 스크리닝한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명은 (1) 목적 단백질의 발현 또는 활성에 유용할 것으로 예측되는 후보 단백질을 각각 무세포 단백질 합성하는 단계;
- [0018] (2) 상기 단계 (1)에서 합성된 각각의 후보 단백질을 포함하는 반응물을, 각각 정용여과(diafiltration)하여 무세포 단백질 합성에 의해 생성된 부산물을 제거한 후, 무세포 단백질 합성에 필요한 반응물을 보충하는 단계;
- [0019] (3) 상기 단계 (2) 이후에, 목적 단백질을 코딩하는 유전자 주형을 첨가하고, 목적 단백질의 무세포 단백질 합성을 수행하는 단계; 및
- [0020] (4) 상기 단계 (3)에서 합성한 목적 단백질의 발현 또는 활성 분석을 통해 목적 단백질의 발현 또는 활성 증진에 적합한 단백질을 선별하는 단계;를 포함하는 단백질의 발현 또는 활성 증진 단백질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.
- [0021] 상기 목적 단백질의 발현 또는 활성에 유용할 것으로 예측되는 후보 단백질은 전사인자, 번역인자, 아실화티알엔에이합성효소(aminoacyl tRNA synthetase), ATP 재생인자, mRNA안정화 인자 또는 폴딩 보조인자인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않으며, 상기 전사인자는 TFIIA, TFIIIB, TFIIID, TFIIIE, TFIIIF 또는 TFIIH인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않으며, 상기 폴딩 보조인자는 샤페론(chaperone) 또는 폴다아제(foldase)인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.
- [0022] 상기 단계 (1)에서 후보단백질의 무세포 단백질 합성에서 사용되는 유전자 주형은 선형의 DNA 또는 mRNA인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 PCR 기법으로 합성된 터미네이터를 포함하지 않는 선형의 DNA이며, 더욱더 바람직하게는 PCR 기법으로 합성된 T7 터미네이터를 포함하지 않는 선형의 DNA인 것이지만 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0023] T7 터미네이터를 포함하지 않는 것은 전사되는 mRNA의 안정성을 감소시켜 분해를 촉진시킴으로써 잔여의 mRNA가 단계 (3)에서의 단백질 발현에 영향을 미치지 않도록 하려는 것으로, 이외에도 단계 (1)에서 가해지거나 생성된 mRNA의 분해를 촉진하기 위한 여타의 방법이 사용될 수 있다.
- [0024] 상기 단계 (1)에서 후보단백질의 무세포 단백질 합성에서 사용되는 유전자 주형은 2단계 오버랩 연장 PCR(two-step overlap extension PCR)을 이용하여 제조되거나, 절단-라이게이션(digestion-ligation) 방법으로 제조된 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.
- [0025] 상기 단계 (3)의 무세포 단백질 합성에서 사용되는 유전자 주형은 플라스미드 형태인 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 스크리닝 방법에서, 무세포 단백질 합성은 종래의 방법을 따르되, 목적 단백질에 따라 반응물의 조성이나 함량을 얼마든지 조절할 수 있으며, 무세포 단백질 합성 시간은 0.5~4시간 동안 합성하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 0.5~2.5시간 동안 합성하는 것이고, 더욱더 바람직하게는 2시간 동안 합성하는 것이다.
- [0027] 또한, 본 발명은 (1) 상기 단백질의 발현 또는 활성 증진 단백질을 스크리닝하는 방법을 통해 채택된 단백질을 무세포 단백질 합성하는 단계;
- [0028] (2) 상기 단계 (1)에서 합성된 단백질을 포함하는 반응물을 정용여과(diafiltration)하여 무세포 단백질 합성에 의해 생성된 부산물을 제거한 후, 무세포 단백질 합성에 필요한 반응물을 보충하는 단계; 및
- [0029] (3) 상기 단계 (2) 이후에, 목적 단백질을 코딩하는 유전자 주형을 첨가하고, 목적 단백질의 무세포 단백질 합

성을 수행하는 단계;를 포함하는 무세포 단백질의 합성 방법에 관한 것이다.

이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[재료 및 방법]

1. 재료

ATP, GTP, UTP, CTP, 크레아틴 인산염, 크레아틴 키나아제 및 대장균 총 tRNA 혼합물은 로슈 어플라이드 사이언스(Indianapolis, IN, USA)에서 구입하였다. PCR용 올리고뉴클레오티드는 마크로젠(서울, 한국)에서 합성하였다. S12 추출물은 BL21(DE3)과 BL21Star(DE3)를 이용하여 제조하였다. 이외의 다른 시약들은 시그마(St Louis, USA)에서 구입하였다.

2. 발현 주형의 구성

표적 유전자의 단백질 코딩 서열을 NdeI/SalI 부위 사이의 pK7 플라스미드에 클로닝하였다. 순차적인 무세포 단백질 합성에서, 1차 무세포 단백질 합성에서의 유전자 주형은 T7 프로모터를 표적으로 하는 프라이머를 이용하여 합성한 PCR 산물을 이용하였고, 2차 무세포 단백질 합성에서의 유전자 주형은 플라스미드-클로닝된 유전자를 사용하였다. 한편, 본 발명에서 사용한 플라스미드 및 프라이머는 하기 표 1에 개시하였다.

표 1

Name	Description	
플라스미드		
pK7-sfGFP	Km ^R , T7 promoter, 3.6-kb	
pK7-DsRed	Km ^R , T7 promoter, 3.6-kb	
pK7-CalB	Km ^R , T7 promoter, 4.3-kb	
pET21a-fkpB	Am ^R , T7 promoter, 6.0-kb	
Primers (5' →3')		
T7200up	TGGCACGACAGGTTTCCCG	서열번호 1
T715up	TCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGG	서열번호 2
pK7-start-R	CATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGAAACC	서열번호 3
Fk1B-F	GGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACC ACCCCAACTTTTGACACCA	서열번호 4
Fk1B-R	TTTGTTAGCAGCCGGTCGACTTAGAGGATTTCCAGCAGTTCGACTTCAAAC	서열번호 5
FkpA-F	GGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAA TCACTGTTTAAAGTAACGCTGCTGGC	서열번호 6
FkpA-R	TTTGTTAGCAGCCGGTCGACTTATTTTTCAGCAGATCTGCGGCTTTCGC	서열번호 7
FkpB-F	GGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTCT GAATCTGTACAGACCAATAGCGC	서열번호 8
FkpB-R	TTTGTTAGCAGCCGGTCGACTTACGCCTCCAGTGCCGG	서열번호 9
IbpA-F	GGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGT AACTTTGATTTATCCCGCTTACC	서열번호 10
IbpA-R	TTTGTTAGCAGCCGGTCGACTTAGTTGATTCGATACGGCGCGGT	서열번호 11
Skp-F	GGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAA AAGTGTTATTAGCTGCAGGTCTCG	서열번호 12
Skp-R	TTTGTTAGCAGCCGGTCGACTTATTTAACTGTTTCAGTACGTGCGCAGTG	서열번호 13
SurA-F	GGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAG AACTGGAAAACGCTGCTCTCG	서열번호 14
SurA-R	TTTGTTAGCAGCCGGTCGACTTAGTTGCTCAGGATTTTAACTAGGCGC	서열번호 15
YegD-F	GGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTTT ATTGGTTTGATTACGGTACAGCAAACTGT	서열번호 16
YegD-R	TTTGTTAGCAGCCGGTCGACTTAACGAAACACCACTCCGCC	서열번호 17
pK7-No-T7T-R	TTTGTTAGCAGCCGGTCGACTTA	서열번호 18
GTB	CAA AAA ACC CCT CAA GAC CCG TTT A	서열번호 19

[0037] **3. 무세포 단백질 합성**

[0038] 무세포 단백질 합성을 위한 표준 반응 혼합물은 150 μ l의 최종 용량에서 하기의 성분들로 구성되었다; 57mM의 완충용액(HEPES-KOH, pH 8.2); 1.2mM의 ATP; 0.85 mM의 CTP, GTP 및 UTP; 2mM의 DTT; 대장균 MRE600으로부터 획득한 0.17mg/ml의 대장균 tRNA 혼합물; 0.64mM의 cAMP; 90mM의 포타슘 글루타메이트(potassium glutamate); 80mM의 아세트산 암모늄; 12mM의 마그네슘 아세테이트(magnesium acetate); 34 μ g/ml의 L-5-포르밀-5,6,7,8-테트라히드로폴릭산(L-5-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid; folinic acid); 1.5mM의 20종의 아미노산 혼합물; 2%(w/v)의 PEG(8000); 67mM 크레아틴 포스페이트; 3.2 μ g/ml의 크레아틴 키나아제; 및 40 μ l의 S12 추출물;을 포함한다.

[0039] 또한, 플라스미드-클로닝된 유전자 2 μ g 또는 PCR 증폭된 유전자 10 μ g를 주형으로 사용하였다. 무세포 단백질 합성 반응은 30 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 수행되었다.

[0040] 순차적인 무세포 단백질 합성 반응에서, 1차 무세포 단백질 합성 반응 후, 원심 분리 장치(Ultra-0.5 centrifugal filter, Merck Millipore, Billerica, MA, USA)를 이용하여 S12 완충용액(10mM Tris-acetate, pH8.2, 14mM magnesium acetate 및 60mM potassium acetate)으로 희석하여 정용여과 하여 희석된 반응 혼합물을 40 μ l(S12 추출물의 원래 부피 반응 혼합물)되도록 하였으며, 이 과정을 3번 반복하였다. 이후, 상등액을 취해 2차 무세포 단백질 합성 반응을 위한 주형과 무세포 단백질 합성용 반응물을 첨가하여 최종 부피가 150 μ l가 되도록 하였다.

[0041] 상기 2차 무세포 단백질 합성에서, CalB의 합성(발현)을 위해, 4mM의 산화된(GSSG) 및 1mM의 환원된(GSH) 글루타티온 혼합물을 반응 혼합물에 첨가하여 디설파이드 결합의 형성을 위한 산화적 산화-환원 환경을 제공하였다.

[0042] **4. 단백질의 활성 분석**

[0043] 무세포 합성 단백질을 정량하기 위해 0.01mM의 L-[U- ^{14} C]루신(11.1 GBq/mmol)을 반응 혼합물에 포함시키고, 트리클로로 아세트산(trichloroacetic acid, TCA)-침전된 방사능을 액체섬광계수기(Wallac 1410; PerkinElmer, Waltham, MA, USA)에서 측정하였다.

[0044] 녹색 형광 단백질(sfGFP) 또는 Discosoma sp.의 적색 형광 단백질(DsRed)은 형광 마이크로 플레이트 리더(Victor X2, PerkinElmer)를 사용하여 측정하였다.

[0045] CalB 단백질의 효소 활성은 p-니트로 페닐 팔미테이트 (pNPP)를 사용하는 종래에 알려진 방법으로 측정하였다.

[0046] **5. 무세포 단백질 합성에 사용될 주형 DNA의 제작**

[0047] (1) 2단계 오버랩 연장 PCR

[0048] 분자 샤페론의 단백질 코딩 서열(HtpG, Flk, SurA, Skp, Tig, IbpA, Hs10, YegD, SecB, GroL 및 FkpB)은 대장균 BL21(DE3)의 게놈 DNA로부터, PCR 증폭하였다. 도 6A에 개시한 바와 같이, 2단계 오버랩 연장 PCR에 의해 주형 DNA를 제조하기 위해 제1단계 PCR용 순방향 프라이머는 제2단계 PCR에서 T7 프로모터 및 리보솜-결합 부위(RBS) 서열이 포함된 긴 정방향 프라이머로 어닐링할 수 있게, 5'오버행(5'-TGTTTAAGTTTAAGAAGGAGATATACAT-3': 서열번호 20)을 포함하여 설계되었다.

[0049] (2) 절단-라이게이션 방법(digestion-ligation method)

[0050] 분자 샤페론의 서열은 NdeI 제한효소자리(5'-CATATG-3')를 포함하는 14개의 뉴클레오타이드의 짧은 오버행을 갖는 정방향 프라이머를 사용하여 증폭시켰다. T7 프로모터 및 RBS를 함유하는 5'-UTR 서열은 NdeI 제한 효소 부위가 옆에 있는 역방향 프라이머를 사용하여 pK7 플라스미드로부터 별도로 증폭시켰다.

[0051] 이후, 분자 샤페론 및 5'-UTR의 증폭된 단편은 NdeI로 절단하고, T4 DNA 리가아제(ligase)로 결합시킴으로써 조립하였다. 절단-라이게이션 방법(digestion-ligation method)의 조건은 sfGFP 모델 단백질을 사용하여 구조물의 발현에 최적화되었다(도 6B).

[0052] 유비퀴틴 융합된 HRP 단백질을 발현하기 위한 주형 DNA를 준비하기 위해, pET21a 플라스미드(pET21a-HRP)에 클로닝된 HRP 유전자는 유비퀴틴 서열이 인접한 T7프로모터에 대한 정방향 프라이머 및 T7 터미네이터에 대한 역방향 프라이머를 이용하여 PCR 증폭되었다. 이후, 상기 PCR 산물을 pET21a 플라스미드로 재클로닝하여 pET21a-ubi-HRP 플라스미드를 제조하였다.

[0053] 실시예 1. 정용여과(diafiltration)에 의한 무세포 단백질 합성의 재활성화

[0054] 일반적으로 무세포 단백질 합성 반응은 일정 시간 동안만 이루어진다. 무세포 단백질 합성 시스템으로 플라스미드-클로닝된 유전자로부터 sfGFP를 합성할 경우, 단백질 합성 속도는 10분 후부터 감소하기 시작하고, 2시간 이내에 정체된다. 그 이유로는 무세포 단백질 합성 시, 기질의 고갈, 무세포 단백질 합성의 저해 부산물의 축적 및/또는 세포 추출물 내의 번역 시스템의 불활성화 등이 있다.

[0055] 하지만, 2시간 동안 지속된 sfGFP 단백질의 무세포 단백질 합성 후에 sfGFP 합성 반응 혼합물에 함유된 작은 분자를 정용여과하여 무세포 단백질 합성 반응 초기상태로 재현될 경우, 무세포 단백질 합성은 재개되며, 정용여과 후에 재개된 제2의 무세포 단백질 합성에서도 1차적으로 무세포 단백질 합성한 것과 동등한 수준의 sfGFP 단백질이 합성되는 것을 확인하였다(도 1A).

[0056] 이러한 결과로부터, 무세포 단백질 합성에서 단백질 합성의 종결은 주로 번역 시스템의 비가역적 비활성화보다는 기질의 침전 및 억제 부산물의 축적을 포함하는 생화학적 조건의 변화에 기인할 것으로 판단하였다.

[0057] 한편, 초기 무세포 단백질 합성에서의 반응 혼합물이 플라스미드로 암호화 된 유전자 대신에 PCR 증폭된 DNA로 프라이머를 사용하는 경우, 반응 혼합물을 정용여과 하여도, sfGFP 형광은 유의미하게 증가하지 않았다(도 1B). 이는 세포 추출물에 풍부한 엑소뉴클레아제(exonuclease)가 PCR 산물인 선형 DNA를 분해하여 플라스미드를 사용하는 것에 비해 무세포 단백질 합성량을 낮추는 것으로 예측할 수 있다. 선형 DNA는 다 수 분자의 mRNA로 전사되므로, 선형 DNA가 분해되더라도 기 전사된 mRNA가 단백질 합성의 주형으로 사용될 수 있으나, mRNA 역시 세포 과채액에 존재하는 뉴클레아제에 의해 분해되게 된다.

[0058] 실시예 2. 순차적 무세포 단백질 합성 반응

[0059] 상기 실시예 1에서 개시한 바와 같이, 무세포 단백질 합성에서 반응 혼합물 내에 단백질 번역을 위한 새로운 기질을 보충해 줌으로써, 무세포 단백질 합성이 재활성화될 수 있다는 것에 기초하여, 세포로부터 추출된 번역 시스템을 이용하는 무세포 단백질 합성에서, 1차 무세포 단백질 합성 후에, 정용여과 하고, 2차 무세포 단백질 합성을 위해 주형 DNA를 첨가하여 상이한 단백질을 순차적으로 합성하는 것을 디자인 하였다(도 2).

[0060] 상이한 단백질을 순차적으로 합성하는 본 발명의 방법에 있어서, 첫 번째 주형(DNA 또는 mRNA)은 2차 무세포 단백질의 합성을 방해하지 않도록 2차 무세포 단백질 합성 전에 제거해야 한다.

[0061] 상기 실시예 1에서, PCR 증폭 DNA를 주형으로 하는 경우, 엑소뉴클레아제(exonuclease)가 선형 DNA를 분해하므로, 두 번째 반응 전에 제거될 수 있다.

[0062] 또한, T7 터미네이터의 헤어핀 구조가 엑소뉴클레아제에 대한 상류 mRNA의 구조적 안정성을 실질적으로 향상시키므로, 본 발명에서는 T7 터미네이터 서열을 포함하지 않음으로써, 1차 단백질 합성에서 사용된 주형 DNA를 제거할 수 있다.

[0063] 도 1B에 개시한 결과는 DNA의 PCR 증폭에 사용된 역방향 프라이머는 T7 터미네이터 서열을 포함하지 않은 것이다.

[0064] 본 실시예 2에서는 1차 무세포 단백질 합성에서 sfGFP 단백질을 합성하고, 정용여과한 후, 순차적으로 2차 무세포 단백질 합성으로, DsRed 단백질을 합성하였다. 이때, 1차 무세포 단백질 합성에서, T7 터미네이터의 존재 여부에 따라, 2차 무세포 단백질 합성량이 달라진다는 것을 확인하였고, T7 터미네이터가 존재하지 않는 경우, 2차 무세포 단백질 합성된 DsRed의 합성량이 현저하게 증가하였다(도 3)

[0065] 실시예 3. CalB 단백질의 합성 및 활성을 증진시키는 단백질 폴딩 보조인자 샤페론 단백질의 스크리닝

[0066] 본 실시예 3에서는 순차적 무세포 단백질 합성 방법을 통해 CalB 단백질의 합성에서 가용성 발현을 증진시킬 수 있는 효과적인 샤페론을 스크리닝하고자 하였다.

[0067] 상기 실시예 1 및 2를 바탕으로, T7 터미네이터가 없는 다양한 샤페론의 선형 유전자(fk1B, fkpA, fkpB, ibpA, surA 및 yegD)를 주형으로 하는 1차 무세포 단백질 합성을 2시간 동안 수행하였고, 이후 정용여과하여 무세포 단백질 합성 반응물을 초기 수준으로 신선하게 교체한 후, 2차 무세포 단백질 합성을 위하여 CalB 단백질이 클로닝된 pK 플라스미드(pK7-CalB)를 유전자 주형으로 첨가하였다. 이후 2시간 동안 무세포 단백질 합성을 하였다.

[0068] 그 결과, 1차 무세포 단백질 합성에서 합성된 여섯 개의 분자 샤페론(fk1B, fkpA, fkpB, ibpA, surA 및 yegD)

중에서, Fk1B, FkpA 및 FkpB 샤페론이 1차 합성된 경우, 2차 무세포 단백질 합성된 CalB 단백질의 효소 활성이 증가된 것을 확인하였다(도 4).

[0069] **실시예 4. FkpB가 과발현된 세포 파쇄액(FkpB-enriched S12)에서 CalB의 무세포 단백질 합성**

[0070] 상기 실시예 3의 결과를 바탕으로, fkpB 유전자를 대장균 BL21 균주의 염색체 DNA로부터 PCR 증폭하고 플라스미드 pET21a (pET21a-FkpB)에 클로닝하여, FkpB를 포함하는 플라스미드가 있는 대장균을 이용하여 FkpB가 과발현된 S12 반응물을 준비하였다. 이를 이용하여 CalB 단백질을 합성한 결과, CalB 단백질의 발현량은 표준 S12 반응물을 이용하여 무세포 단백질 합성한 것에 비해 약간 낮은 수준이었으나, 가용성 CalB 단백질의 발현량은 표준 S12 반응물에 비해 FkpB가 과발현된 경우가 약 3배 정도 증가한 것으로 나타났고(도 5A), CalB 단백질의 활성은 약 6배 이상 증가한 것을 확인하였다(도 5B).

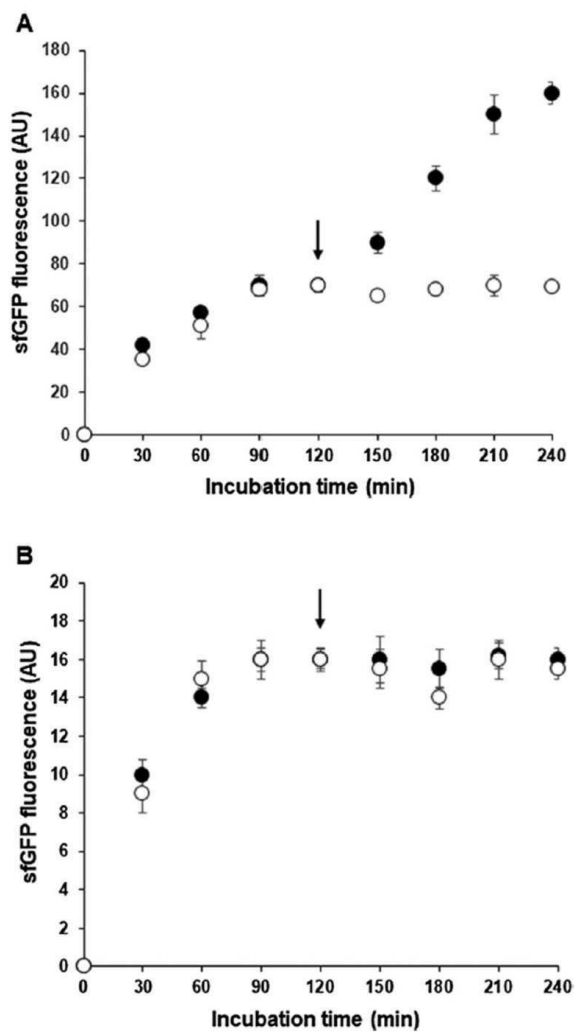
[0071] **실시예 5. HRP 단백질의 활성 증진에 효과적인 분자 샤페론의 스크리닝**

[0072] 무세포 단백질 합성에서 활성형 HRP(horseradish peroxidase) 단백질의 증진을 위한 분자 샤페론을 스크리닝하고자 하였다. 다양한 분자 샤페론 후보(htpG, flk, surA, skp, tig, ibpA, hsl0, yegD, secB, fkpB 및 groL) 단백질을 무세포 단백질 합성하기 위하여, 상기한 절단-라이게이션 방법(digestion-ligation method)으로 선형의 DNA를 준비하였다. 이후, 상기 준비된 선형의 DNA를 주형으로 하는 1차 무세포 단백질 합성을 최적의 조건인 21℃에서 2시간 동안 수행하였고, 이후 정용여과하여 무세포 단백질 합성 반응물을 초기 수준으로 신선하게 교체한 후, 주형DNA로 pET21a-Ubi-HRP 플라스미드를 첨가하여 목적 단백질 HRP의 무세포 단백질을 합성하였다. 합성된 HRP 단백질의 활성은 TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 어세이를 통해 분석하였다.

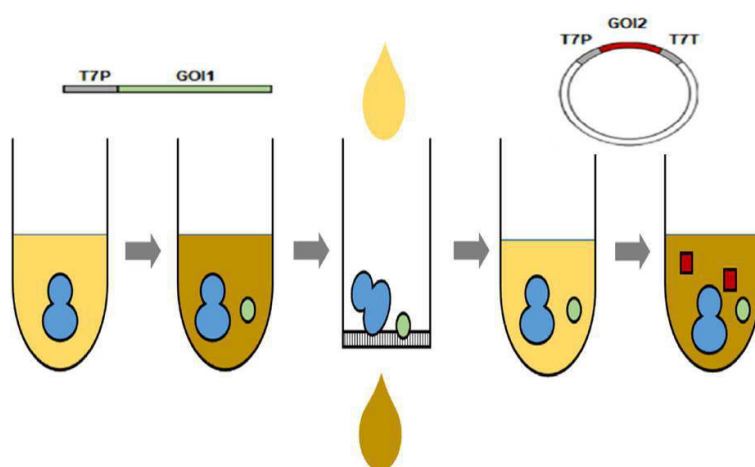
[0073] 그 결과 도 7에 개시한 바와 같이, HRP의 활성은 FkpB, Hsl0 및 IbpA 샤페론이 우수한 것으로 나타났고, FkpB 샤페론이 가장 우수하였다.

도면

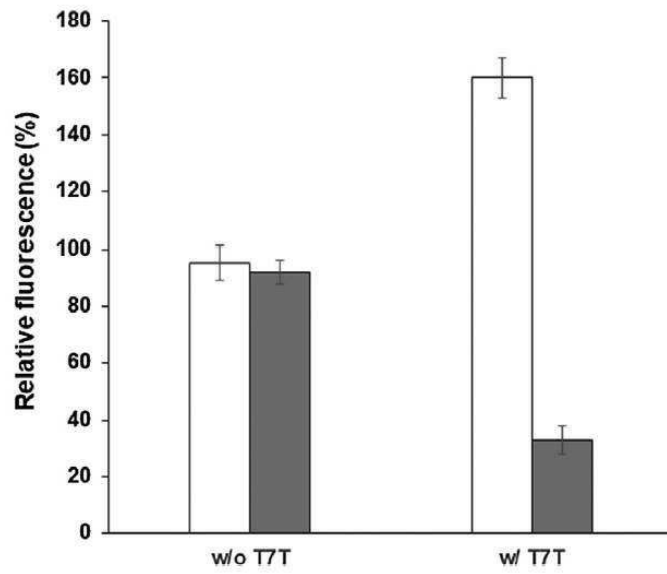
도면1



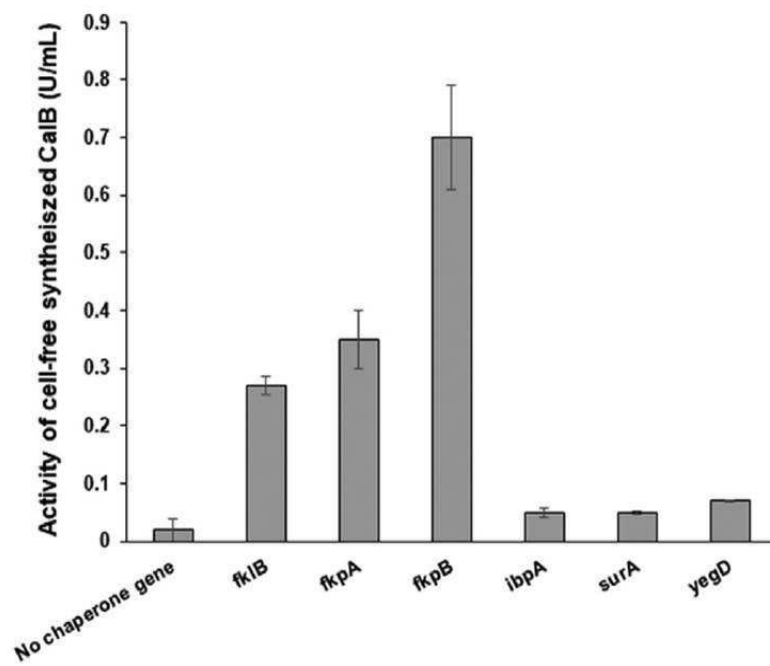
도면2



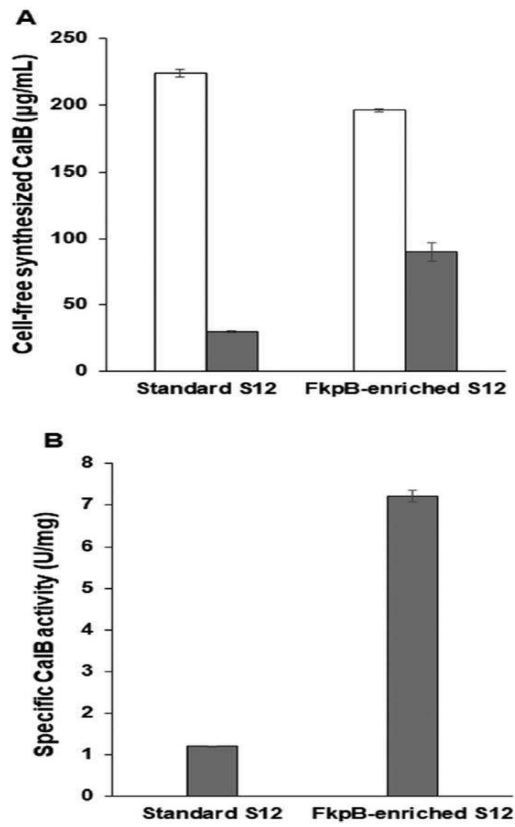
도면3



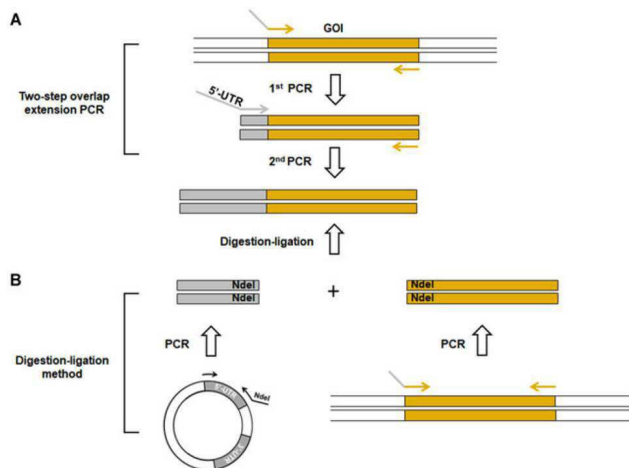
도면4



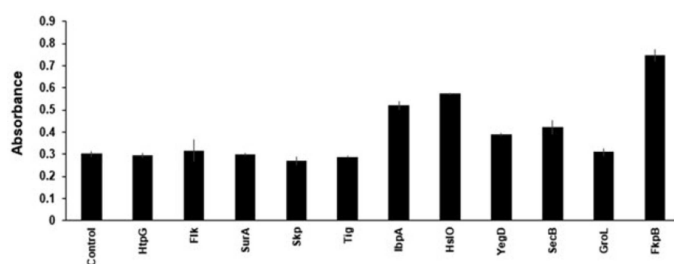
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110>	The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)	
<120>	Screening method based on cell-free protein synthesis to determine the factors affecting the expression efficiency or activity of recombinant proteins	
<130>	PN19055	
<160>	20	
<170>	KopatentIn 2.0	
<210>	1	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	T7200up	
<400>	1	
	tggcagcaca ggtttcccg	19
<210>	2	
<211>	34	
<212>		
	DNA	
<213>	T715up	
<400>	2	
	tcgatccgc gaaattaata cgactcacta tagg	34
<210>	3	
<211>	53	
<212>	DNA	
<213>	pK7-start-R	
<400>	3	
	catatgtata tctccttctt aaagttaaac aaaattatit ctagaggga acc	53
<210>	4	
<211>	75	
<212>	DNA	
<213>	FklB-F	
<400>	4	
	ggtttccctc tagaaataat tttgtttaac ttaagaagg agatatacat atgaccaccc	60
	caacttttga cacca	75
<210>		

5		
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	FklB-R	
<400>	5	
	tttgtagca gccggtcgac ttagaggatt tccagcagtt cgacttcaaa c	51
<210>	6	
<211>	82	
<212>	DNA	
<213>	FkpA-F	
<400>	6	
	ggtttccctc tagaaataat ttgttttaac tttagaagg agatatacat atgaaatcac	60
	tgtttaaagt aacgctgctg gc	82
<210>	7	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	FkpA-R	
<400>	7	
	tttgtagca gccggtcgac ttatitttta gcagaatctg cggctttcgc	50
<210>	8	
<211>	79	
<212>	DNA	
<213>	FkpB-F	
<400>	8	
	ggtttccctc tagaaataat ttgttttaac tttagaagg agatatacat atgtctgaat	60
	ctgtacagag caatagcgc	79
<210>	9	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	FkpB-R	
<400>	9	
	tttgtagca gccggtcgac ttacgcctcc agtgccgg	38
<210>	10	
<211>	81	

<212> DNA
 <213> IbpA-F
 <400> 10
 ggtttccctc tagaaataat ttgtttaac ttaagaagg agatatacat atgcgtaact 60

 ttgatttata cccgctttac c 81
 <210> 11
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> IbpA-R
 <400> 11
 ttgttagca gccggtcgac ttagttgatt tcgatacggc gcggt 45
 <210> 12
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Skp-F
 <400> 12
 ggtttccctc tagaaataat ttgtttaac ttaagaagg agatatacat atgaaaaagt 60
 ggttattagc tgcaggcttc g 81
 <210> 13
 <211> 51
 <212> DNA
 <213>
 Skp-R
 <400> 13
 ttgttagca gccggtcgac ttatttaacc tgtttcagta cgtcggcagt g 51
 <210> 14
 <211> 78
 <212> DNA
 <213> SurA-F
 <400> 14
 ggtttccctc tagaaataat ttgtttaac ttaagaagg agatatacat atgaagaact 60
 ggaaaacgct gcttctcg 78
 <210> 15
 <211> 49

<212>	DNA	
<213>	SurA-R	
<400>	15	
	tttgtagca gccggtcgac ttagttgctc aggattttaa cgtaggcgc	49
<210>	16	
<211>	86	
<212>	DNA	
<213>	YegD-F	
<400>	16	
	ggtttccctc tagaaataat ttgttttaac tttagaagg agatatacat atgtttattg	60
	gttttgatta cgttacagca aactgt	86
<210>	17	
<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	YegD-R	
<400>	17	
	tttgtagca gccggtcgac ttaacgaaac accatttcg ccc	43
<210>	18	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	pK7-No-T7T-R	
<400>	18	
	tttgtagca gccggtcgac tta	23
<210>	19	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	GTB	
<400>	19	
	caaaaaaccc ctcaagaccc gtta	25
<210>	20	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	5'overhang	

<400> 20

tgtttaactt taagaaggag atatacat

28