



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년02월20일
(11) 등록번호 10-0804584
(24) 등록일자 2008년02월12일

(51) Int. Cl.
C12N 15/70 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2005-0022325
(22) 출원일자 2005년03월17일
심사청구일자 2005년03월17일
(65) 공개번호 10-2006-0100636
(43) 공개일자 2006년09월21일
(56) 선행기술조사문헌
US5681733 A
JP060245774 A
US5578480 A
Science Vol.299 (5615):2074-2076
(2003.03.28.)

(73) 특허권자
재단법인서울대학교산학협력재단
서울특별시 관악구 봉천7동 산4의 2번지
(72) 발명자
김영식
서울 광진구 광장동 현대아파트8차 801동 604호
김완석
서울 도봉구 도봉1동 620-8 한림맨션 404
전경진
서울 광진구 능동 258-19
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 6 항

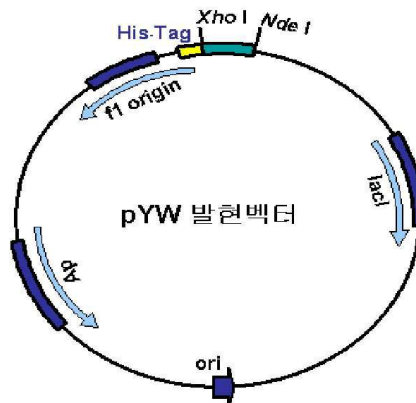
심사관 : 신원혜

(54) 글리코사미노글리칸 분해효소들의 정제방법

(57) 요약

본 발명은 글리코사미노글리칸 분해효소(glycosaminoglycan lyase)의 정제방법에 관한 것이고, 구체적으로는 글리코사미노글리칸의 일종인 헤파린을 분해하는 헤파리나제 I, 헤파란 황산을 분해하는 헤파리나제 III 및 콘드로이틴 황산을 분해하는 콘드로이티나제 ABC의 정제방법에 관한 것이다. 본 발명의 정제방법은 기존의 방법에 비하여 정제된 글리코사미노글리칸 분해효소의 수율과 활성이 높으므로 의학적 가치가 높은 글리코사미노글리칸 분해효소를 경제적으로 대량생산하는데 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

pET22b(+) 벡터에서 pelB 신호서열을 제거한 도 1의 개열지도를 갖는 벡터에 **서열번호 7**로 기재되는 헤파리나제(heparinase) I 유전자를 삽입한 발현벡터 pYWHI.

청구항 2

삭제

청구항 3

pET22b(+) 벡터에서 pelB 신호서열을 제거한 도 1의 개열지도를 갖는 벡터에 **서열번호 8**로 기재되는 헤파리나제 III 유전자를 삽입한 발현벡터 pYWHIII.

청구항 4

삭제

청구항 5

pET22b(+) 벡터에서 pelB 신호서열을 제거한 도 1의 개열지도를 갖는 벡터에 **서열번호 9**로 기재되는 콘드로이티나제(chondroitinase) ABC 유전자를 삽입한 발현벡터 pYWCSLABC.

청구항 6

삭제

청구항 7

- 1) 제 1항, 제 3항 또는 제 5항 중 어느 한 항의 발현벡터를 대장균에 도입하여 상기 유전자에 해당하는 단백질을 과발현시키는 단계;
- 2) 단계 1)에서 단백질을 과발현시킨 형질전환 세포를 과쇄하는 단계;
- 3) 단계 2)에서 수득한 과쇄된 세포의 세포 추출물 중 봉입체를 제외한 추출물에 컬럼 크로마토그래피를 실시하는 단계를 포함하는 헤파리나제 I, 헤파리나제 III 또는 콘드로이티나제 ABC 정제방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 단계 1)의 과발현시 온도 조건은 10℃ 내지 40℃임을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서, 단계 1)의 과발현시 온도 조건은 25℃임을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<34>

본 발명은 글리코사미노글리칸 분해효소(glycosaminoglycan lyase)의 정제방법에 관한 것이고, 보다 상세하게는 글리코사미노글리칸의 일종인 헤파린을 분해하는 헤파리나제 I, 헤파란황산을 분해하는 헤파리나제 III 및 콘드로이틴 황산을 분해하는 콘드로이티나제 ABC의 정제방법에 관한 것이다.

<35>

글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan, GAG)은 생합성 과정에서 변화가 일어나 구조적으로 다양하고 복잡한 형태를 지니게 된다. GAG류는 우론산과 글루코사민이 반복되고 부분적으로 황산화가 이루어져 있는 기

본 골격을 가지고 있는데, 이러한 복잡한 화학구조에 의하여 여러 종류의 생물에서 활성을 나타낼 수 있게 된다. 동물의 GAG에는 하이알루론산(hyaluronic acid), 콘드로이틴 황산(chondroitin sulfate), 케라틴 황산(keratin sulfate), 헤파란 황산(heparan sulfate), 헤파린(heparin) 등이 알려져 있는데, 이들 GAG류 중 헤파린은 간, 허파, 피부 점막내의 동맥을 따라 마스트 세포(mast cell)내에 고립되어 존재하고 그 외 나머지 GAG는 연결조직에 분포한다. 의약품으로 사용되는 콘드로이틴 황산은 상어의 척추 연골 및 소의 기관지에서 얻어지고 있다.

<36> 하등동물인 연체동물에서도 GAG가 발견되고 있는데, 그 예로서 조개류에서 3-O-황산기를 가지면서 항트롬빈(antithrombin) 결합부위가 있는 GAG(Pejler et al., *J. Biol. Chem.*, 262;11413-11421, 1986), 해삼, 성게류에서 황산기가 치환된 콘드로이틴 황산(Mourao et al., *TIGG*, 7;235-246, 1995) 등이 발견되었다. 그리고 오징어의 각막에도 콘드로이틴 황산이 존재함이 알려졌다(Karamanos et al., *Int. J. Biochem.*, 23;67-72, 1991), 아카란 황산은 아프리카산 왕달팽이에 풍부하게 존재함이 밝혀졌다(Kim et al., *J. Biol. Chem.*, 271;170-175, 1996).

<37> GAG류는 생체 내에서 프로테오글리칸(proteoglycan)의 형태로 존재하며, 이러한 프로테오글리칸은 프로테아제(protease)와 글리코시다아제(glycosidase)에 의해 분해되어 당부분이 유리된다. GAG류의 생리적 역할에 대해서 아직까지 많이 밝혀져 있지 않으나 생체 내의 단백질들과 결합하여 여러 가지 생리활성을 나타내는 것으로 보인다.

<38> 첫번째 GAG류는 프로테아제 저해제와 결합하여 생리 활성을 나타내는데, GAG류와 결합하는 대표적인 프로테아제 저해제로는 안티트롬빈 III(antithrombin III)와 헤파린 보조인자 II(heparin cofactor II)가 있다. 헤파린은 항트롬빈 III와 결합하여 혈액인자 Xa와 트롬빈의 작용을 억제하고, 헤파린 보조인자 II와 결합하여 트롬빈의 작용을 저해하여 혈액응고를 막는다.

<39> 두번째 GAG류는 혈장의 지질단백질과 결합하는 것으로서, GAG류와 결합하는 대표적인 혈장 지질단백질에는 아포지질단백질 E와 아포지질단백질 B가 있다. 혈장 지질단백질과 결합하는 GAG류에는 헤파린과 콘드로이틴이 있으며, 이러한 헤파린과 콘드로이틴은 아포지단백질 E와 아포지단백질 B의 산성 및 염기성 아미노산이 몰려 있는 부위와 상호작용을 하여 동맥경화 발생을 조절한다.

<40> 세번째 GAG류는 성장인자와 결합하는데 GAG류와 결합하는 성장인자에는 염기성 섬유아세포 성장인자(bFGF)가 있으며, 성장인자와 결합하는 GAG류에는 헤파린과 헤파란 황산이 있다. 헤파린과 헤파란 황산은 bFGF와 결합하여 bFGF가 분해되는 것을 방지함으로써 세포성장 및 분화에 중요한 역할을 담당한다.

<41> 네번째 GAG류는 지질분해 효소와 결합하는 것으로, 헤파린과 헤파란 황산을 정맥으로 주사하면 지질분해 효소인 저밀도 지질단백질(low density lipoprotein) 분해효소와 중성지방 분해효소를 혈장세포 내로 유리시키게 되는데, 이와 같이 유리된 지질분해 효소가 혈중의 지방을 분해시키기 때문에 동맥경화 예방에 큰 역할을 한다.

<42> 다섯번째 GAG류는 외피세포 결합체와 결합하는데, GAG류와 상호작용을 하는 외피세포 결합체의 단백질로는 피브로넥틴(fibronectin), 비트로넥틴(vitronectin), 라미닌(laminin), 트롬보스폰딘(thrombospondin)이 있다. 이들 GAG류와 결합하는 단백질은 세포부착, 세포간의 정보전달, 세포분화, 세포성장 등에 주요하다.

<43> 전술한 바와 같이, GAG류는 생체내의 단백질과 결합하여 여러 가지 생리활성을 나타내므로 다양한 용도로 사용될 수 있다. GAG류가 약물로 쓰이는 예로서, 콘드로이틴 황산은 점안제, 관절염 치료제, 최근에는 강장드링크류 등에도 사용되고 있다. 임상에서 글리칸 의약품으로 널리 사용되는 것은 헤파린으로, 헤파린은 항혈액응고제로서 혈전 치료제, 수술후, 신장투석, 인공혈관, 체외순환(extracorporeal circulation) 저해, 염기성 섬유모세포(fibroblast) 성장인자의 상호작용, 항바이러스 작용 등 다양한 생물활성이 보고되고 있다. 헤파린은 GAG류의 생물학적 물질로서 동물조직으로부터 추출되며, 그들의 항응고성 및 항트롬빈성을 이용하여 상기와 같은 용도로 사용되는데, 특히 헤파린은 수술후 정맥혈전증의 치료에 유용하다. 그러나, 천연형의 헤파린은 사용조건이 매우 제한적인 결점을 보이는데, 특히 항응고 활성은 출혈을 야기할 수 있으며 PF4와 같은 혈청인자에 대한 민감성은 비교적 다량의 투여량을 사용하게 한다. 그러므로, 항트롬빈에 의한 항응고 활성이 없을 때, 항트롬빈 분해효소 활성을 높여 항트롬빈 활성을 촉진해야만 한다.

<44> GAG류가 상기와 같은 다양한 약리 작용을 나타내고 있으나, 이들의 분자량이 너무 큰 관계로 다루기가 쉽지 않고, 또한 부작용이 유발되는 문제점이 있어서 저분자량의 GAG류를 제조할 필요성이 크게 대두되었다. 상기 목적을 달성하기 위하여, 헤파린을 저평균 분자량의 분자로 단편을 내는 것이 제안되어 왔다. 헤파린이

다당류의 반복적인 구조로 이루어지므로 그의 비환원성 말단에 에틸렌형 이중결합을 가지며 중량 평균 분자량이 2,000 내지 10,000 달톤인 황산을 결합시켜 단편을 얻는 방법이 제시되고 있다. 상기와 같은 물질은 헤파린 에스테르의 중합 및 비누화에 의해 얻어지는데, 헤파린보다 더 낮은 항트롬빈 활성 및 전체 항응고 활성을 보이고 이와 같이 얻어진 헤파린이 매우 불균일한 생성물이라는 문제점이 있다.

<45> 이러한 저분자량의 GAG류를 제조하는 방법에는 화학적인 방법과 효소를 이용하는 방법이 있는데, 효소를 이용하는 방법의 경우, 라이아제(lyase), 엘리미나제(eliminase) 및 가수분해하여 단일결합물의 화합물이 생기는 수소효소(hydrolyase)가 이용되며, 라이아제에는 헤파리나제(heparinase) I, II, III 및 콘드로이틴 분해효소 ABC, AC, B등이 있다. 헤파리나제 I은 헤파린의 주요 결합구조인 $\rightarrow 4)-\alpha-D-GlcNS(6S \text{ 또는 } OH)(1\rightarrow 4)-\alpha-L-IdoA2S(1\rightarrow$ 에 특이적으로 작용하여 헤파린을 분해시킨다. 때문에 최근에는 헤파린 치료에서 과잉의 헤파린 투여시 이를 중화시킬 목적으로 헤파리나제 I을 사용하는 임상 1상이 진행되고 있으며(Zimmerman, 미국 특허출원 제 5,262,325호), 미국 FDA에서는 헤파린의 농도를 측정하는데 이를 사용하는 것을 허가하였다(Tejidor et al., *Thrombo. Haemost.*, 69:866, 1993). 헤파리나제 II는 $\rightarrow 4)-\alpha-D-GlcNS(6S \text{ 또는 } OH)(1\rightarrow 4)-\alpha-L-IdoA(2S \text{ 또는 } OH)$ 또는 $-\beta-D-GlcA(-\rightarrow 1)$ 에 작용하여 헤파린과 아카란황산을 분해시키는데 헤파란 황산의 주결합인 $\rightarrow 4)-\alpha-D-GlcNS(\text{또는 } Ac)(1\rightarrow 4)-\alpha-L-GlcA(\text{또는 } \rightarrow IdOA)(1\rightarrow$ 에 특이적으로 작용하여 분해시킨다(Steffen E., *Critic. Rev. in Biochem. and Mol. Biol.*, 30(5):387-444, 1995).

<46> 최근에 콘드로이티나제는 척수 상해에 있어서 운동신경을 회복하는데 크게 도움을 주면서 현재 치료 목적으로 전임상단계에 들어가고 있다 (Caggiano et al., *J. Neurotrauma*, 22(2), 226-239, 2005).

<47> 전술한 헤파리나제들은 대부분 플라보박테리움 헤파리눔(*Flavobacterium heparinum*)으로부터 분리되었으며, 플라보박테리움 속 이외에 내열성 균주인 바실러스 속(*Bacillus sp.*)(Bellamy et al., 미국 특허출원 제 5,145,778호)과 혐기성 균주인 박테로이드 속(*Bacteroides sp.*)에서도 헤파린 분해효소가 발견된 바 있다. 혐기성 균주인 박테로이드 속에 대하여서는 Gesner 등이 처음으로 보고하였으며(Gesner et al., *J. Bacteriol.*, 81:595-604, 1961), 구강에서 발견된 박테로이드 헤파리놀리티쿠스(*Bacteroides heparinolyticus*, Nakamura et al., *J. Clin. Microbiol.*, 26:1070-1071, 1988), 장내에 존재하고 있는 박테로이드 오바타(*Bacteroides ovata*)와 박테로이드 세타이오타오마이크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*) 등도 보고된 바 있다(Riley, T. V. et al., *Microbios Lett.*, 25:141-148, 1984; Riley, *J. Clin. Pathol.*, 40:384-386, 1987). 이와 같이 사람의 장내에 서식하는 박테로이드 오바타, 박테로이드 세타이오타오마이크론 및 박테로이드 유니포미스(*B. uniformis*)와 같은 균주들에서 헤파리나제가 존재한다고 보고되었으나(Riley, T.V., *Microb. Lett.*, 25:141-149, 1984; Riley, *J.Clin. Path.*, 40:384-386, 1987) 아직까지 박테로이드 헤파리나제를 정제한 보고는 없었다.

<48> 글리코사미노글리칸 분해효소(glycosaminoglycan lyase)를 클로닝하여 발현시킨 사례가 있기는 하나 모두 플라보박테리움 헤파리눔(*Flavobacterium heparinum*) 유래의 라이아제(lyase)를 *E.coli*에서 발현시킨 것인데(Ernst, S. et al., *Biochem. J.* 315, 589-597, 1996; Su, H. et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2723-2734, 1996; Tkalec A. L. et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 29-35, 2000) 이 방법은 이미 캐나다의 아이벡스사(Ivex)에 의하여 특허출원된 기술이므로 상기 방법으로 라이아제를 생산하기 위해서는 엄청난 로열티(royalty)를 지불해야만 하는 문제점이 있다.

<49> 본 발명자들은 다량의 글리코사미노글리칸 분해효소들을 확보하기 위하여 본 발명자들이 이전에 분리, 동정한 박테로이드 스테르코리스(Kim et al., *Can. J. Microbiol.* 1998; 대한민국 특허출원 제 10-0257168호)에서 클로닝을 시도하였지만 문제점이 발견되어 최근에 게놈 서열이 밝혀진 박테로이드 세타이오타오마이크론의 DNA 서열(Xu J. et al., *Science* 28:299(5615):2074-6, 2003)을 바탕으로 클로닝을 하여 발현 및 정제를 시도하였다. 상기 세타이오타오마이크론의 DNA 서열을 바탕으로 글리코사미노글리칸 분해효소를 발현, 정제하기 위한 시도가 이미 있었으나 기술상의 어려움으로 제대로 정제된 사례가 없었다. 글리코사미노글리칸 관련 분야의 권위자인 캐나다 McGill University의 Macro Molecular Structure Group의 Myrek Cygler 교수의 경우에도 글리코사미노글리칸 분해효소를 발현, 정제하려 하였으나 대부분 불용성 형태(insoluble form)이고 활성도 낮은 상태로 수득하였다.

<50> 이에, 본 발명자들은 박테로이드 세타이오타오마이크론으로부터 글리코사미칸 분해효소인 헤파린, 콘드로이틴을 분해하는 헤파리나제 I, 헤파리나제 III, 콘드로이티나제 ABC를 ORF(open reading frame) 이외의 서열도 함께 첨가 삽입하여 이전의 클로닝 방법과 다르게 클로닝하고 발현 및 정제방법을 변화시켜 수율과 활성이 높은 상태로 정제하여 상기 분해효소들을 경제적으로 대량생산할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<51> 본 발명의 목적은 의학적으로 다양하게 사용될 수 있는 글리코사미노글리칸 분해효소(glycosaminoglycan lyase)를 활성 및 수율이 높은 상태로 발현 및 정제하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<52> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 7로 기재되는 헤파리나제(heparinase) I 유전자를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

<53> 또한, 본 발명은 서열번호 8로 기재되는 헤파리나제 III 유전자를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

<54> 또한, 본 발명은 서열번호 9로 기재되는 콘드로이티나제(condroitinase) ABC 유전자를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

<55> 또한, 본 발명은

<56> 1) 서열번호 7 내지 9로 기재되는 유전자 중 어느 하나의 유전자를 포함하는 발현벡터를 대장균에 도입하여 상기 유전자에 해당하는 단백질을 과발현시키는 단계;

<57> 2) 단계 1)에서 단백질을 과발현시킨 형질전환 세포를 파쇄하는 단계;

<58> 3) 단계 2)에서 수득한 파쇄된 세포의 세포 추출물 중 봉입체를 제외한 추출물에 컬럼 크로마토그래피를 실시하는 단계를 포함하는 헤파리나제 I, 헤파리나제 III 및 콘드로이티나제 ABC 정제방법을 제공한다.

<59> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<60> 본 발명은 서열번호 7로 기재되는 헤파리나제(heparinase) I 유전자, 서열번호 8으로 기재되는 헤파리나제 III 유전자, 서열번호 9로 기재되는 콘드로이티나제(condroitinase) ABC 유전자를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

<61> 본 발명자들은 박테로이데스 세타이오타오미크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*)으로부터 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan, GAG) 분해효소에 해당하는 유전자를 분리하여 염기서열 분석을 위해서 pGEM-T 벡터에 클로닝(cloning)하고 상기 유전자들의 이중발현과 His-표지 및 정제를 위해서 pET22b(+) 벡터의 pelB 신호서열을 제거한 pYW 벡터에 클로닝하였다.

<62> 구체적으로, 2003년 Science(Xu J. et al., *Science* 299(5615): 2074-2076)에 발표된 박테로이데스 세타이오타오미크론 타입 종(strain)인, VPI-5482(ATCC 29148)의 게놈 DNA 서열을 기초로 GAG 분해효소를 생성하는 유전자 부위에 해당하는 프라이머를 제작하였다. 상기 프라이머로 PCR을 수행하여 수득한 GAG 분해효소들의 유전자(도 2 참조)를 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 pGEMHI, pGEMHIII, pGRMCSLABC의 벡터를 제작하고 pET22b(+) 벡터를 변형시킨 pYW 벡터에 2차 클로닝시켜 pYWHI, pYWHIII, pYWCSLABC의 발현벡터를 제작하였다(도 1 참조). 그런데 본 발명은 다른 연구팀들이 GAG 분해효소의 ORF(open reading frame)만을 클로닝했던 것과는 달리 신호 펩타이드(signal peptide)를 코딩하는 선도 서열(leader sequence)까지 포함하여 클로닝하였고(서열번호 7 내지 9 참조) pET22b(+) 벡터에서 발현된 단백질을 주변 세포질(periplasm)로 위치하게 하는 pelB 신호서열을 절단하여 제작한 pYW를 발현벡터로 이용함으로써(발현된 단백질이 세포질내에 위치하게 함), 이전의 연구팀들이 분리 정제한 단백질에 비해 수득율과 활성이 월등히 높은 GAG 분해효소를 획득하였다.

<63> 또한, 본 발명은

<64> 1) 서열번호 7 내지 9로 기재되는 유전자 중 어느 하나의 유전자를 포함하는 발현벡터를 대장균에 도입하여 상기 유전자에 해당하는 단백질을 과발현시키는 단계;

<65> 2) 단계 1)에서 단백질을 과발현시킨 형질전환 세포를 파쇄하는 단계;

<66> 3) 단계 2)에서 수득한 파쇄된 세포의 세포 추출물 중 봉입체를 제외한 추출물에 컬럼 크로마토그래피를 실시하는 단계를 포함하는 헤파리나제 I, 헤파리나제 III 및 콘드로이티나제 ABC 정제방법을 제공한다.

<67> 본 발명자들은 GAG 분해효소 유전자를 포함하는 발현벡터인 pYWHI, pYWHIII, pYWCSLABC를 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환시킨 후 IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 처리하고 10℃ 내지 40℃, 바람직하게는 25℃에서 배양하여 과발현을 유도하였다. 이를 His-결합 수지(his-bind resin, Ni-NTA matrices)를

사용하여 친화도 크로마토그래피(affinity chromatography)를 실시하여 정제하였다(도 4 내지 6). 정제한 단백질을 브래드포드 분석(bradford assay)으로 정량한 결과, 기존의 발현, 정제 방법에 비하여 단백질 농도가 매우 높음을 확인하였다.

<68> 정제한 효소들의 활성은 헤파린(heparin), 헤파란 황산(heparan sulfate) 및 콘드로이틴 황산(condroitine sulfate)을 기질로 반응시켜 확인하였다. 그 결과, 기존의 발현, 정제방법으로 수득한 GAG 분해 효소에 비해 활성이 매우 높음을 확인하였다.

<69> 정제한 효소들의 특성을 알아보기 위하여 활성이 가장 높은 최적의 조건을 관찰하였다. 최적 pH 조건은 pH가 서로 다른 완충용액, 최적의 온도 조건은 25℃에서 50℃사이의 다른 온도 조건, 반응 최적의 염 농도는 0 M에서 1.0 M 까지의 NaCl로 조정하고 효소에 기질을 첨가한 후 반응시켰다. 그 결과, 헤파리나제 I 은 pH 7.0, 37℃, 250mM NaCl에서, 헤파리나제 III는 pH 7.0, 35℃, 150mM NaCl에서, 콘드로이티나제 ABC는 pH 7.0, 35℃, 0mM NaCl에서 최대의 활성을 나타내었다.

<70> 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

<71> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<72> <실시예 1> 균주, 플라스미드 및 시약 준비

<73> <1-1> 균주 및 플라스미드

<74> GAG(glycosaminoglycan) 분해효소에 해당하는 유전자를 분리하기 위하여 한국 미생물 보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)로부터 박테로이데스 세타이오타오미크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*)을 분양받았다. GAG 분해효소 생성에 관여하는 유전자를 도입시키기 위한 균주로는 *E.coli* JM109(Promega)와 *E. coli* BL21(DE3) 균주(Novagen)를 사용하였다. GAG 분해효소 생성 유전자의 다량 확보 및 염기서열 분석을 위해서 pGEM-T 벡터(Promega)를 사용하였으며 GAG 분해효소 생성 유전자들의 이중발현과 his-표지 정제를 위해서 pET22b(+) 벡터(Novagen)를 사용하였다(표 1).

<75> <1-2> 시약

<76> 본 실험을 위해 사용한 시약은 주로 Sigma(USA)사의 제품을 이용하였으며, 배지의 조제에 필요한 시약은 Difco(USA)사에서 구입하였다. DNA의 조작을 위한 제한효소, T4 DNA 접합효소(ligase), Taq 중합효소(polymerase), calf intestinal alkaline phosphatase(CIAP), 아가로즈(agarose)는 Takara(Japan)사의 제품을 사용하였다. 1kb DNA 래더 마커(ladder marker)는 New England Biolabs 사의 제품을 사용하였다. 발현된 단백질의 정제는 Ni-NTA 아가로즈(QIAGEN, USA)를 사용하였다. SDS-PAGE를 위한 고분자량 마커(high molecular weight marker)와 전기영동 키트는 Bio-Rad 사의 제품을 사용하였으며 저분자량 마커(low molecular weight marker)는 Sigma 사(USA)의 제품을 사용하였다.

<77> [표 1] 실험에 사용된 종(strains)과 플라스미드

종과 플라스미드	유전형(Genotype)	참고
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3)	Novagen co.
<i>E. coli</i> JM 109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>), [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^q</i> ΔM15]	Promega co.
pGEM-T	<i>lac</i> , <i>lacZ</i> , Amp ^r	Promega co.
pET22b(+)	<i>lacI</i> , <i>bla</i> , <i>pefB</i> , His ₆ , Amp ^r	Novagen co.
pETHI	헤파리나제 I 유전자군(gene cluster)	본 발명
pETHIII	헤파리나제 III 유전자군	본 발명
pETCSLABC	콘드로이티나제 ABC 유전자군	본 발명

<79> <실시예 2> 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan, GAG) 분해효소 생성 관련 유전자군의 분리

<80> <2-1> 글리코사미노글리칸 분해효소 생산균주의 배양

<81> 글리코사미노글리칸 생산 균주인 박테로이데스 세타이오타오미크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*)은 영양 배지(Nutrition media)에서 1일 동안 37℃에서 정치 배양을 하였다.

<82> <2-2> 게놈 DNA의 분리

<83> 게놈 DNA의 분리를 위해 박테로이데스 세타이오타오미크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*, ATCC 29148)을 배양하여서 G-spin™ Genomic DNA Extraction kit(iNtRON biotechnology)를 사용하여 게놈 DNA를 분리하였다. 배양액을 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하여 침전된 세포를 모은 다음 ddH₂O 200 μl에 재현탁시킨 뒤 300 μl의 G-완충용액을 가한 후 잘 섞어준 다음 65℃에서 15분 동안 방치하여 세포막을 제거하였다. 여기에 250 μl의 결합용액(binding solution)을 첨가해주고 이것을 G-spin 컬럼에 옮긴 다음 13,000 rpm에서 원심분리하였다. 컬럼을 세척 완충용액 A(washing buffer A)로 씻어준 다음 세척 완충용액 B(washing buffer B)로 씻어 주었다. 컬럼을 새 튜브에 옮긴 후 200 μl의 용리 완충용액(elution buffer)을 가해서 게놈 DNA를 분리하였다.

<84> <2-3> 프라이머 제작

<85> 박테로이데스 세타이오타오미크론 타입 종(strain)인, VPI-5482(ATCC 29148)의 6.26-Mb 게놈 DNA 서열은 2003년 Science에(Xu J. et al., *Science* 299(5615): 2074-2076)를 통해서 발표되었다. 이 발표된 논문의 박테로이데스 세타이오타오미크론 VPI-5482의 게놈 서열 정보를 기초로 하여서 각각의 GAG 분해효소를 생성하는 것으로 여겨지는 유전자 부위의 서열을 기초로 하여서 프라이머를 제작하였다.

<86> <2-4> PCR(Polymerase Chain Reaction)

<87> GAG 분해효소 생성에 관련된 각각의 유전자를 얻기 위하여 PCR을 수행하였다. PCR을 위한 주형으로는 *B. thetaiotaomicron*으로부터 얻은 게놈 DNA를 사용하였다. 프라이머들은 서브클로닝을 유용하게 하기 위하여 개시 코돈 앞부분에 *Nde* I 제한효소부위를 삽입하였으며, 발현된 유전자 산물의 His-표지 정제를 위하여 종결 코돈을 제거하고 *Xho* I 제한효소 부위를 삽입하여 제작하였다(표 2). 이 프라이머는 바이오닉스에 합성을 의뢰하여 사용하였다. PCR을 위한 반응혼합물의 조성은 각 프라이머 100 pmol, 주형 DNA 100 ng, 10X PCR 완충용액, dNTP 0.2 mmol과 5 unit의 Taq 중합효소(Takara, Japan)로 전체부피를 50 μl로 하였다. PCR 반응의 조건은 전변성(predenaturation)을 95℃에서 5분 동안 실시하였으며 증폭을 위해서 98℃에서 30초 동안 변성(denaturation), 57℃에서 1분 동안 어닐링(annealing), 72℃에서 1분동안 연장(extension) 반응을 45 주기 실시하였고 마지막으로 72℃에서 10 분 동안 마지막으로 연장(extension) 하였다. 상기 PCR 결과 GAG 분해효소 유전자를 확보하였다(도 2).

<88> <실시예 3> GAG 분해효소 생성 유전자군의 1차 서브클로닝

<89> <3-1> 접합(Ligation)

<90> PCR을 통해서 얻어진 GAG 분해효소들의 유전자들을 pGEM-T easy vector와 3:1의 비율로 혼합하고 여기에 2X 속성 접합 완충용액(rapid ligation buffer)과 T4 DNA 리가아제(Promega, USA)를 넣어 최종 부피가 10 μl가 되게 한 다음 상온에서 1시간 동안 방치하여 pGEMHI(Heparinase I), pGEMHIII(Heparinase III), pGEMCSLABC(Condroitinase ABC)의 재조합체를 만들었다.

<91> <3-2> 형질전환

<92> -70℃에 보관된 *E.coli* JM 109 형질전환 가능세포(competent cell)을 얼음에서 녹인 뒤 여기에 접합(ligation) 반응 혼합물을 가하여 20분간 얼음에서 방치하고 다시 42℃에서 50초, 얼음에서 2분간 방치 후 NZP 브로스(broth)를 500 μl 가하여 37℃에서 1시간 배양시킨 다음 항생제 앰피실린(ampicillin)을 함유하는 LB 아가(agar) 배지에 도말하여 37℃에서 하룻밤 배양하였다. 얻어진 콜로니(colony)를 LB broth 10 ml에 배양한 뒤 바이오니아사에서 구입한 플라스미드 DNA 프렙 키트(prepare kit)를 사용하여 각 GAG 분해효소의 유전자를 가지는 플라스미드 DNA를 분리하였다. 분리된 플라스미드 DNA를 제한효소 처리와 염기서열 분석을 통하여 형질 전환체를 확인하였다.

[표 2] GAG 라이아제 유전자 PCR에 사용된 올리고뉴클레오타이드(Oligonucleotides)

유전자		올리고프라이머
Heparinase I	정방향	5'-CAT ATG CTG ACT GCT CAG ACT AAA AAT ACG C-3' (서열번호 1)
	역방향	5'-CTC GAG TCT TTC CGA ATA TCC TGC G-3' (서열번호 2)
Heparinase III	정방향	5'-CAT ATG AAT AAA ACC CTG AAA TAT ATC GTC CTG C-3' (서열번호 3)
	역방향	5'-CTC GAG TAA TTT ATA TTT TAA TGA CTG TTT CTT GCC-3' (서열번호 4)
Chondroitinase ABC	정방향	5'-CAT ATG CTG ATA TTG TCT TTT CTC TGT CCG-3' (서열번호 5)
	역방향	5'-CTC GAG TTT CTC CAG TTC TAC CTC ATA GCT G-3' (서열번호 6)

* 밑줄 친 DNA 서열은 서브클로닝을 용이하게 하기 위해 올리고프라이머(oligoprimer)에 도입된 제한효소부위를 나타낸다.

<실시예 4> GAG 분해효소 생성 유전자군의 2차 서브클로닝(subcloning)

<4-1> 제한효소 처리

위의 실험을 통해서 얻어진 플라스미드 DNA 재조합체(pGEMHI, pGEMHIII, pGEMCSLABC)들에 제한효소 *Nde* I(10 U)과 *Xho* I(10 U)을 넣은 다음 10X 완충용액을 넣어 최종 부피가 20 μ l가 되게 한 다음 37°C에서 1시간 30분 동안 반응시켰다.

<4-2> 젤 용리(elution)

제한효소 처리를 통해서 얻어진 유전자 산물들을 1% 아가로스 젤에 전기영동하여 나온 절편의 DNA 밴드를 젤에서 잘라낸 다음 QIAquick Gel Extraction 키트(QIAGEN, USA)를 사용하여 제공된 방법에 따라 유전자 산물들을 용리(elution)하였다.

<4-3> 접합(ligation)

시판되는 pET-22b(+) 벡터(Novagen)는 *pelB* 신호서열(signal sequence)을 포함하는데 이는 상기 벡터를 통해 발현된 단백질을 주변세포질(periplasm)에 위치하도록 하는 서열이다. 본 발명자들은 pET-22b(+) 벡터 중 *pelB* 신호서열을 제거하여 발현된 단백질이 주변세포질이 아닌 세포질에 위치하도록 pYW 벡터를 제작하였다(도 1). 동일한 제한효소(*Nde* I/*Xho* I)로 처리한 pYW 벡터와 젤 용리를 통해서 얻어진 헤파리나제 I, 헤파리나제 III, 콘드로이티나제 ABC 유전자의 DNA 비율을 1:3으로 혼합하고 여기에 10X 접합 완충용액과 T4 DNA 접합효소(Takara, Japan)를 넣어 최종 부피가 20 μ l가 되게 한 다음 16°C에서 하룻밤동안 방치하여 서열번호 7로 기재되는 헤파리나제 I 유전자가 삽입된 pYWHI, 서열번호 8으로 기재되는 헤파리나제 III가 삽입된 pYWHIII, 서열번호 9로 기재되는 콘드로이티나제 ABC가 삽입된 pYWCSLABC의 재조합 발현벡터를 만들었다.

<4-4> 형질전환(transformation)

-70°C에 보관된 *E. coli* BL21(DE3) 형질전환 가능세포(competent cell)를 얼음에서 녹인 뒤 여기에 접합 반응 혼합물을 가하여 30분간 얼음에서 방치하고 다시 42°C에서 1분 30초, 얼음에서 2분간 방치 후 LB 브로스(broth)를 500 μ l 가하여 37°C에서 1시간 배양시킨 다음 항생제 앰피실린(ampicillin)을 함유하는 LB 아가 배지에 도말하여 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 얻어진 콜로니를 LB 브로스(broth) 10 ml에 배양한 뒤 바이오니아사에서 구입한 플라스미드 DNA 프랩 키트를 사용하여서 각 GAG 분해효소의 유전자를 가지는 플라스미드 DNA를 분리하였다. 분리된 플라스미드 DNA를 제한효소 처리를 통하여 형질 전환체를 확인하였다.

<실시예 5> GAG 분해효소 생성 유전자들의 과발현(overexpression)

<5-1> 세포 추출물(Cell extract) 조제

1000 ml의 LB 브로스(broth)가 담긴 2000 ml의 삼각플라스크에 접종한 재조합체(pYWHI, pYWHIII,

pYWCSLABC) 10 ml을 가하여 37℃, 200 rpm에서 배양한 뒤, 600 nm에서 세포 성장을 측정하여 O.D가 0.8-1.0가 될 때까지 키운 다음 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) 1 mM을 가한 후 25℃, 200 rpm에서 하룻밤을 더 배양하여 과대발현을 유도하였다. 위의 배지로부터 균체를 원심분리(5,000 rpm, 20 min, 4℃)하여 모은 뒤 1X 결합 완충용액(binding buffer, 10 mM imidazole, 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0) 20 ml에 재현탁 시키고 10 mg/ml 라이소자임 200 μl를 가하여 얼음에 30분간 방치하여 세포를 용해(lysis)시켰다. 이를 초음파파쇄기(sonicator, Cole-Parmer Instruments, USA)를 사용하여 20분간 세포를 파쇄(sonication)한 후, 세포를 완전히 갠 다음 원심분리(15,000 rpm, 45 min, 4℃)하여 상등액을 모아 세포 추출물(cell-free extract)을 조제하였다

<108>

<5-2> 발현 단백질의 정제

<109>

발현된 단백질을 정제하기 위해 His-결합 수지(his-bind resin, Ni-NTA matrices)을 사용하여 친화도 크로마토그래피(affinity chromatography)를 실시하였다. 먼저 오픈 컬럼에 수지를 2 ml 충전한 후 5배의 1X 결합 완충용액으로 컬럼을 평형화(equilibration)시킨 다음 세포 추출물(cell extract)을 로딩(loading)하였다. 여기에 10배의 1X 결합 완충용액을 사용하여 효소용액을 수지에 결합시키고 10배의 세척 완충용액(wash buffer; 20 mM imidazole, 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ pH8.0)로 수지에 결합하지 않은 단백질들을 씻어낸 다음 각각 이미다졸(imidazole)의 농도가 40 mM, 50 mM, 80 mM, 100 mM, 250 mM 순서로 5배에서 10배의 용리 완충용액(elution buffer; 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0 함유)를 사용하여 단계적인 구배(step gradient)로 용출하였다. 용출된 단백질의 정량은 BSA를 표준 단백질로 하여 Bradford 방법(Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* 72, 248-254, 1976)을 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 그 결과, 기존의 방법으로 발현, 정제했던 GAG 분해효소에 비해 헤파리나제 I, 헤파리나제 III, 콘드로이티나제 ABC는 모두 6 mg/liter 이상으로 정제된 단백질의 농도가 매우 높음을 확인하였다.

<110>

정제된 발현 단백질은 변형된 램리(Laemmli)의 방법(Laemmli, U. K. *Nature* 227; 680-685, 1970)을 사용하여 SDS-PAGE(8%, 10% gel)를 통하여 발현정도를 확인하였다. 젤은 쿠마시 용액(Coomassie brilliant blue R-250 solution)으로 염색을 하였다. 전기영동시 마커로는 고분자량 마커(high molecular weight marker)와 저분자량 마커(low molecular weight marker)를 사용하였다. 고분자량 마커는 미오신(myosin, 200,000), β-갈락토시다제(β-galactosidase, 116,250), 포스포릴라제(phosphorylase, 97,400), BSA(bovine serum albumin, 66,400), 오발부민(ovalbumin, 45,000)으로 이루어져 있으며 저분자량 마커는 BSA(bovine serum albumin, 66,000), 오발부민(ovalbumin, 45,000), 글리세르알데하이드-3-포스페이트(glyceraldehydes-3-phosphate, 36,000), 탈탄산효소(carbonic anhydrase, 29,000), 트립시노젠(trypsinogen, 24,000), 대두 트립신 억제제(soybean trypsin inhibitor, 20,100), α-락트알부민(lactalbumin, 14,200)으로 구성되어있다. 도 4 내지 6에 나타난 바와 같이, 본 발명의 정제방법에 의하여 GAG 분해효소가 단일 밴드(band)로 뚜렷하게 분리됨을 확인하였다.

<111>

<실시예 6> GAG 분해효소들의 활성

<112>

제조합 헤파리나제 I, 헤파리나제 III, 콘드로이티나제 ABC의 GAG 분해효소들의 활성은 로스와 린하트(Lohse and Linhardt) 방법(Lohse, D. L. et al., *J. Biol. Chem.* 267, 24347-24355)을 이용하여서 측정하였다. 제조합 GAG 분해효소들의 활성은 232 nm에서의 흡광도의 변화를 기초로 하여서 측정하였다. 반응은 기질로서 헤파린, 헤파란 황산 그리고 콘드로이틴 황산을 사용하여 35℃에서 수행하였다. 분광기(spectrophotometer V-550, Jasco 사)의 내부 온도를 35℃로 유지를 시켜주고 1 ml의 큐벳(cuvette, path length 1 cm)에 기질로써 헤파린(헤파리나제 I), N-아세틸하파로산(acetylhaparosan, 헤파리나제 III), 콘드로이틴 황산(콘드로이티나제 ABC)를 1mg 첨가하고 각 제조합 GAG 분해효소들을 50 μl 넣어준 후 최종 부피가 1 ml이 되도록 완충용액(50 mM phosphate pH 7.0)를 넣어준 다음 232 nm에서 흡광도의 변화를 5분간 1초 단위로 측정하였다. 각 GAG 분해효소들의 활성은 GAG 분해효소들에 의해서 생성되는 불포화 올리고사카라이드(unsaturated oligosaccharide)에 대한 3,800M⁻¹cm⁻¹의 계수(coefficient)를 가지고 다음의 식으로 계산하였다.

<113>

$$\text{효소 활성 (enzyme activity)} = (\Delta A_{232}/\text{min}) (1000 \mu\text{l})/3800 \text{ M}^{-1}$$

<114>

그 결과, 위의 방법으로 발현, 정제한 GAG 분해효소들의 특이적 활성(specific activity) 값이 헤파리나제 I은 93.0 IU/mg 이상, 헤파리나제 III는 9.0 IU/mg 이상, 콘드로이티나제 ABC는 24.9 IU/mg 이상으로 활

성이 매우 높게 나타났음을 확인하였다.

<실시예 7> GAG 분해효소들 생화학적 특성 분석

<7-1> 반응 최적 pH 분석

정제된 재조합 GAG 분해효소들의 최적 pH 조건을 알아보기 위해서 50 mM 아세트산 나트륨 완충용액(sodium acetate buffer, pH 5.0~6.0), 50 mM 인산 나트륨 완충용액(sodium phosphate buffer, pH 6.0~7.0), 50 mM Tris · Cl 완충용액(Tris · Cl buffer, pH 7.0~9.0)을 사용하여 pH 5.0에서 pH 9.0 사이의 다른 pH 조건하에서 각 GAG 분해효소들의 효소 활성을 측정하였다. 각 GAG 분해효소들을 pH가 서로 다른 완충용액에 기질을 첨가해 주고 5분간 232 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 그 결과, 헤파리나제 I, III, 콘드로이티나제 ABC는 pH 7.0 에서 모두 최대의 활성을 나타내었다.

<7-2> 반응 최적 온도 분석

각 GAG 분해효소들의 온도에 대한 의존도 및 반응 최적의 온도 조건을 알아보기 위해서 25℃에서 50℃ 사이의 다른 온도 조건하에서 각 GAG 분해효소들의 효소 활성을 측정하였다. 각 GAG 분해효소들을 완충용액과 함께 2분간 정온배치(pre-incubation)한 후 기질을 첨가해 주고 5분간 232 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 그 결과, 헤파리나제 I은 37℃, 헤파리나제 III, 콘드로이티나제 ABC는 35℃에서 최대의 활성을 나타내었다.

<7-3> 반응 최적 염 농도 분석

각 GAG 분해효소들의 염 농도에 대한 반응 최적의 온도 조건을 알아보기 위해서 NaCl을 사용하여 0 M에서 1 M 사이의 다른 염 농도 조건하에서 각 GAG 분해효소들의 효소 활성을 측정하였다. 각 GAG 분해효소들을 buffer와 함께 0 M에서 1.0 M 까지의 NaCl을 첨가한 후 기질을 첨가해 주고 5분간 232 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 그 결과, 헤파리나제 I은 250 mM, 헤파리나제 III는 150 mM, 콘드로이티나제 ABC는 0 mM에서 최대의 활성을 나타내었다.

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 글리코사미칸 분해효소의 발현 및 정제방법은 기존의 방법에 비하여 효소의 수득율이 높고 정제된 단백질의 활성이 높으므로 상기 효소를 경제적으로 대량생산하는데 이용될 수 있다. 따라서 본 발명의 방법에 의해 생산된 글리코사미노글리칸 분해효소들은 글리코사미노글리칸을 저분자로 만들어 다루기 용이하게 하고 특히, 헤파리나제 I, III는 항응고제로 사용되는 헤파린을 분해하므로 헤파린과다 사용시 부작용인 출혈을 막는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 글리코사미노글리칸 분해효소 발현 벡터의 모식도이고,

도 2는 박테로이데스 세타이오타오마이크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*)으로부터 분리한 계놈 DNA를 주형으로 각각의 글리코사미노글리칸 분해효소에 해당하는 유전자의 PCR 반응을 수행한 결과를 나타내는 젤 전기영동 사진이고,

M: 1 kb 래더 마커(ladder marker)

레인 1: 헤파리나제(heparinase) I 유전자

레인 2: 헤파리나제 III 유전자

레인 3: 콘드로이티나제(chondroitinase) ABC 유전자

도 3은 글리코사미노글리칸 분해효소에 해당하는 유전자를 pGEM-T 벡터에 1차, pYW 벡터에 2차 서브클로닝을 실시하여 재조합 발현벡터 pYWH I, pYWHIII, pYWCSLABC를 제작하고 대장균에 형질전환시켜, 형질전환체 내에 발현벡터가 삽입되었는지 확인한 결과를 나타내는 젤 전기영동 사진이고,

M: 1 kb 래더 마커(ladder marker)

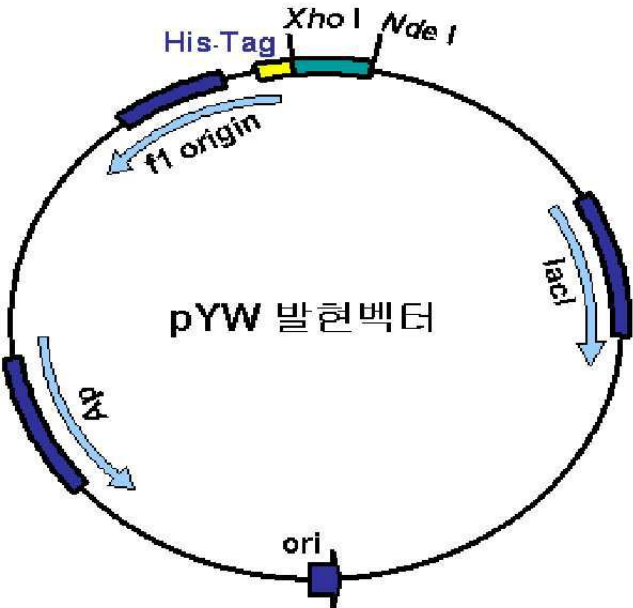
레인 1: 헤파리나제 I 유전자

레인 2: 헤파리나제 III 유전자

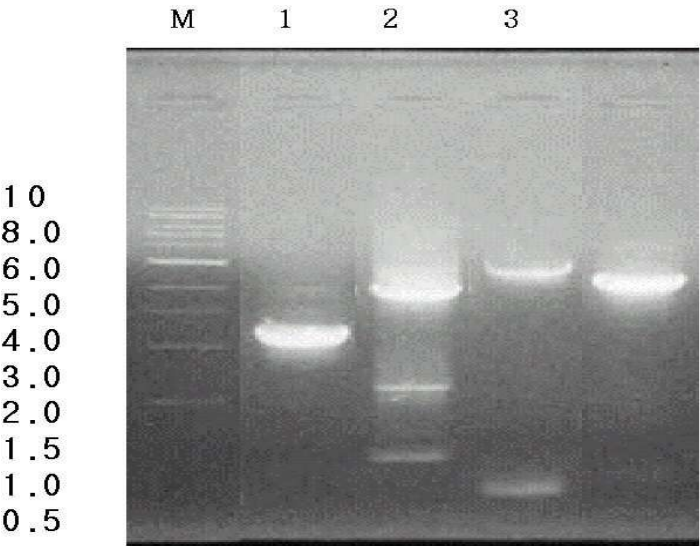
- <11> 레인 3: 콘드로이티나제 ABC 유전자
- <12> **도 4**는 *E. coli*.에서 헤파리나제 I을 정제하였을 때, 세척 횟수, 용리 횟수가 늘어남에 따라 순수하게 정제되어가는 과정을 나타내는 사진이고,
- <13> 레인 1: 저분자량 마커(low molecular weight marker)
- <14> 레인 2: 플로우-스루(flow-through)
- <15> 레인 3: 10 mM 이미다졸(imidazole) 완충액
- <16> 레인 4: 15 mM 이미다졸 완충액 레인 5, 6: 20 mM 이미다졸 완충액
- <17> 레인 7, 8: 30 mM 완충액 레인 9: 100 mM 완충액
- <18> 레인 10: 250 mM 완충액
- <19> **도 5**는 *E. coli*.에서 헤파리나제 III를 정제하였을 때, 세척 횟수, 용리 횟수가 늘어남에 따라 순수하게 정제되어가는 과정을 나타내는 사진이고,
- <20> 레인 1: 고분자량 마커(high molecular weight marker)
- <21> 레인 2: 플로우-스루(flow-through) 레인 3: 10 mM 이미다졸 완충액
- <22> 레인 4: 15 mM 이미다졸 완충액 레인 5, 6: 20 mM 이미다졸 완충액
- <23> 레인 7: 30 mM 이미다졸 완충액 레인 8: 40 mM 이미다졸 완충액
- <24> 레인 9: 50 mM 이미다졸 완충액 레인 10: 60 mM 이미다졸 완충액
- <25> 레인 11: 80 mM 이미다졸 완충액 레인 12: 100 mM 이미다졸 완충액
- <26> 레인 13: 250 mM 용리(elution)
- <27> **도 6**는 *E. coli*에서 발현된 콘드로이티나제 ABC를 정제하였을 때, 세척 횟수, 용리 횟수가 늘어남에 따라 순수하게 정제되어가는 과정을 나타내는 사진이다.
- <28> 레인 1: 고분자량 마커(high molecular weight marker)
- <29> 레인 2: 플로우-스루(flow-through) 레인 3: 10 mM 이미다졸 완충액
- <30> 레인 4: 15 mM 이미다졸 완충액 레인 5, 6: 20 mM 이미다졸 완충액
- <31> 레인 7, 8: 40 mM 이미다졸 완충액 레인 9, 10: 50 mM 이미다졸 완충액
- <32> 레인 11: 60 mM 이미다졸 완충액 레인 12: 80 mM 이미다졸 완충액
- <33> 레인 13: 100 mM 이미다졸 완충액 레인 14: 250 mM 이미다졸 완충액

도면

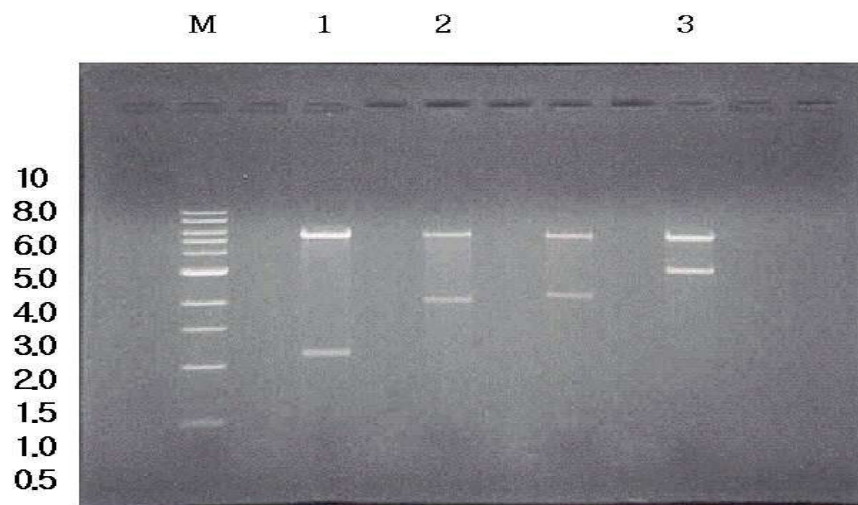
도면1



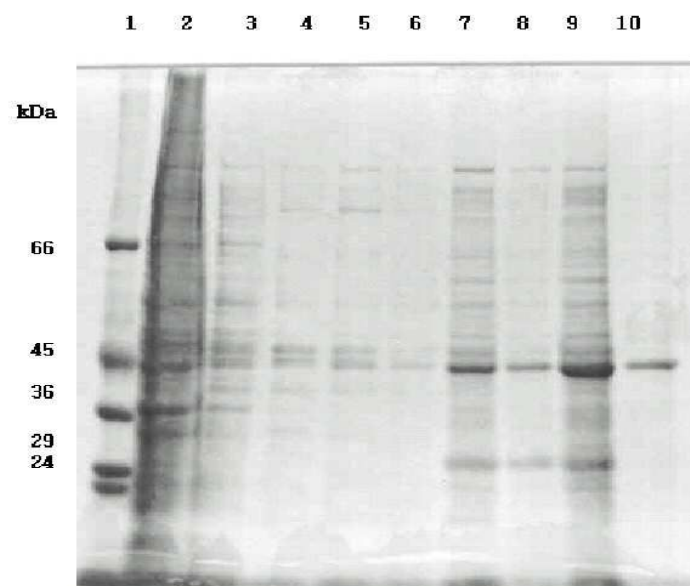
도면2



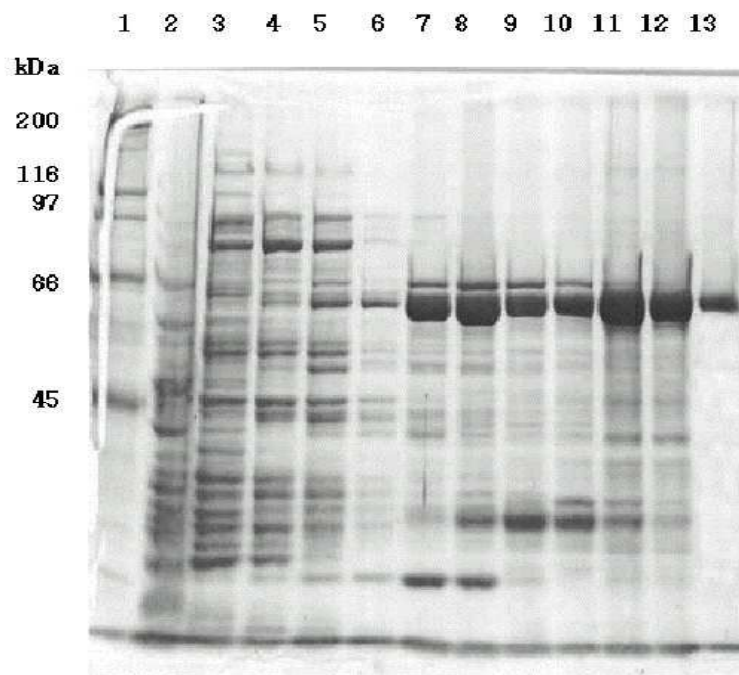
도면3



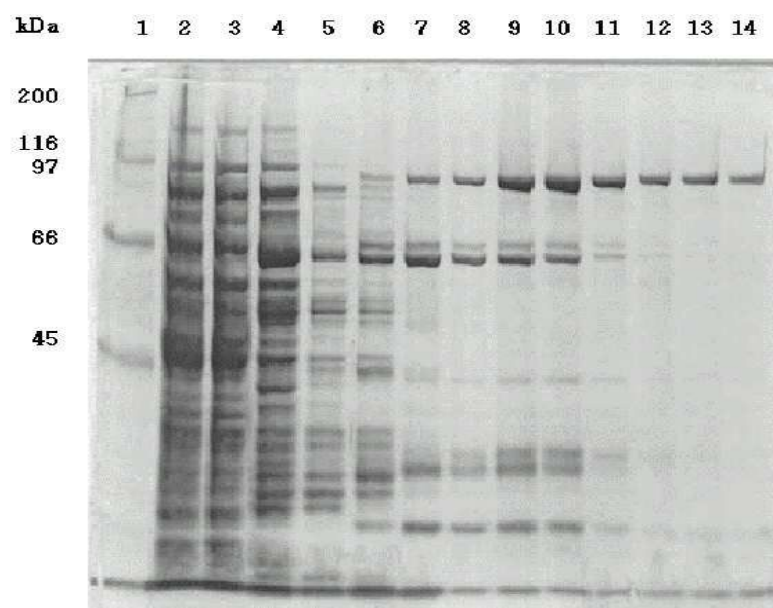
도면4



도면5



도면6



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)