



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2014-0046599

(43) 공개일자

2014년04월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/85 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2012-0111391

(22) 출원일자

2012년10월08일

심사청구일자

2013년07월17일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

박중화

서울 송파구 성내천로6길 9-12, 302호 (오금동)

정인식

서울특별시 강남구 도곡동 삼성래미안아파트 10동 1102호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

전체 청구항 수 : 총 8 항

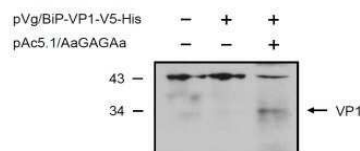
(54) 발명의 명칭 **모기 비텔로제닌 프로모터 및 전사활성 단백질을 이용한 곤충세포 외래단백질 발현 시스템**

(57) 요약

본 발명은 곤충세포에서 외래 단백질을 발현을 위한 비텔로제닌 프로모터 및 전사활성을 촉진하는 AaGATA 유전자에 관한 것이다.

본 발명의 비텔로제닌 프로모터 및 전사활성을 촉진하는 AaGATA 유전자는 여러 종류의 곤충세포에서 외래 단백질을 발현하는데 이용될 수 있으며, 특히, A형 간염바이러스 항원단백질 VP1, VP2, VP3, VP4 등의 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

장경욱

대전 유성구 배울1로 119, 1209동 601호 (용산동,
대덕테크노밸리12단지아파트)

김원용

서울 용산구 이촌로71길 10, 213동 503호 (이촌동,
한가람아파트)

손동화

경기도 용인시 기흥구 어정로 62-28, 임광크레딧스
106동 1001호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ008325

부처명 농림수산부

연구사업명 차세대바이오그린21

연구과제명 곤충세포 발현시스템을 이용한 A형 간염 백신소재 생산 플랫폼 기술 개발 및 실용화 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2011.08.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 비텔로제닌 프로모터 염기서열 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 곤충에서 외래 단백질 발현을 위한 재조합 벡터.

청구항 2

서열번호 2로 표시되는 AaGATAa 유전자 염기서열을 포함하는 곤충에서 외래 단백질 발현을 위한 재조합 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 외래 유전자는 VP1, VP2, VP3 또는 VP4로 이루어진 군에 있어서 선택된 어느 하나인 것인 재조합 벡터.

청구항 4

제1항 및 제2항의 재조합 벡터로 형질전환된 곤충 세포.

청구항 5

제4항에 있어서, 곤충세포는 초파리 세포인 형질전환된 곤충 세포.

청구항 6

제1항 및 제2항의 재조합벡터로 형질전환된 곤충.

청구항 7

하기의 단계들을 포함하는 외래 단백질을 발현하는 형질전환 곤충의 제조방법:

- (1) 서열번호 1로 표시되는 비텔로제닌 프로모터 염기서열 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 곤충에서 외래 단백질 발현을 위한 재조합 벡터를 제조하는 단계;
- (2) 서열번호 2로 표시되는 AaGATAa 유전자 염기서열을 포함하는 곤충에서 외래 단백질 발현을 위한 재조합 벡터를 제조하는 단계;
- (3) 곤충에 상기 두 재조합 벡터를 모두 도입하는 단계; 및
- (4) 상기 두 재조합 벡터가 도입되어 외래 단백질을 발현하는 곤충 형질전환체를 선별하는 단계.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 (2)의 외래 단백질은 VP1, VP2, VP3 또는 VP4로 이루어진 군에 있어서 선택된 어느 하나인 것인 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 곤충세포에서 외래 단백질 발현을 위한 전사활성을 촉진하는 AaGATA 유전자 및 비텔로제닌 프로모터를 각각 포함하는 벡터, 이를 이용한 외래 단백질 발현용 곤충 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 곤충세포를 이용한 외래 단백질 발현시스템은 발현량이 높으며, 발현된 단백질이 동물세포에서 발현된 것과 유사한 번역 후 수식 과정 (당쇄화, 인산화, 지방산의 부가)을 가지며, 복수의 단백질을 동시에 발현하거나 세포 밖으로 배출시킬 수 있기 때문에 복합 성분의 바이러스 외피단백질 및 바이러스 유사입자 등을 생산하기 용이하고 분리, 정제 및 대량 생산이 가능하여 제품화에 쉽게 응용할 수 있는 장점이 있다.

- [0003] 기존의 형질전환 곤충세포와 외래 단백질을 생산하기 위한 발현시스템으로는 actin, metallothionein (MT) 또는 copia 전사조절 부위, 배큐로바이러스 전사조절 부위, SV40 polyadenylation signal (SV40pA), 초파리 IgG heavy chain 결합 단백질의 secretion signal sequence (BiP) 또는 선별유전자 (hygromycin, puromycin) 등을 지니는 벡터들이 주로 이용되어왔다.
- [0004] 일례로 곤충의 배큐로바이러스 세포 발현 시스템은 일반적으로 임의의 크기의 재조합 단백질 제조에 있어서 가장 강력하고 다용도로 사용될 수 있는 툴 중 하나로 인식된다. 상기 시스템은 높은 수준의 단백질 발현 달성 및 포유류 세포의 주요 번역 후 변형이 일어나는 동안 상기 단백질이 생물체에 작용하게 되는 올바른 접합의 두 가지 주요 특성에 기반을 둔다. 게다가 상기 시스템의 발생 시간은 짧고 재조합 유전자의 안정성은 매우 높다. 상기 배큐로바이러스 게놈은 상위 유기체에서 가장 강력한 프로모터로 알려진 폴리헤드린(polyhedrin) 프로모터 (pL) 및 p10 프로모터(p10 단백질)를 포함하고 있다. 상기 pL 프로모터는 사실상 임의의 유전자의 발현을 조절하는데 사용된다. 단백질 제조를 위한 배큐로바이러스는 변형된 동물 세포 또는 유전자 이식 동물에 기반을 둔 어느 다른 발달된 제조 시스템보다 더욱 빠르고 경제적이다. 그럼에도 불구하고 종래의 상업적으로 이용 가능한 프로모터는 유전자 발현을 촉진시키는 단계가 매우 느리다는 단점을 가지고 있다. 그와 동시에 세포조직이 크게 영향을 받고, 곤충 세포에서 발현된 이중기원 단백질 분야에서는 불완전한 과정과 응집 때문에 제 기능을 하지 못한다.
- [0005] 현재까지, 곤충세포에서 외래 단백질의 생산을 증가시키기 위한 배지 첨가물의 개발 연구 및 세포배양 조건의 최적화 연구 등이 중점적으로 수행되었지만, 외래 단백질 유전자의 발현을 증가시키기 위한 새로운 전사조절 부위의 이용 및 전사활성 단백질을 이용한 발현시스템 개발에 대한 연구는 미진한 실정이다.
- [0006] 비텔로제닌 (vitellogenin, Vg) 단백질 유전자의 전사조절 부위와 전사활성 단백질 AaGATAa은 모기의 흡혈 후에 크게 증가하여 모기 알의 발달 과정에 관여하는 것으로 알려져 있지만, 이를 이용한 곤충세포 발현시스템 개발 및 외래 단백질 생산에 대한 연구는 아직 진행된 바가 없다.
- [0007] A형 간염(hepatitis A)바이러스는 Picornaviridae과에 속하는 27nm 크기의 RNA 바이러스로서, 평균 28일의 잠복기 후에 고열, 권태감, 식욕부진, 오심, 복통, 암노, 황달등의 임상증상 특징으로 하는 급성 간질환을 일으키는 질환이다. A형 간염바이러스는 로타바이러스와 마찬가지로 피막이 없으며 직경 27 nm의 정20면체 형태로 7.5 kb의 단일가닥 RNA 게놈을 가지고 있으며 한 개의 긴 ORF(P1~3)를 가지고 있는 것이 특징이다. A형 간염의 주된 전파경로는 로타바이러스와 같이 분변-경구 통로이며, 오염된 음식물이나 식수에 의하여 전염되고 있는 실정이다.
- [0008] 최근에 A형 간염의 발생이 세계적으로 증가하고 있는 추세이므로 ACIP는 A형 간염 풍토성이 있는 지역에 여행하는 사람, 혈액 응고 질환이 있는 사람, 동성연애자, 만성 간 질환을 갖고 있는 사람, A형 간염의 빈도가 높은 지역에 거주하는 소아 군에서 예방 접종을 권고하고 있고, 특히 인구 10만 명당 10명 이상 발생 시, 광범위 백신 접종이 필요하며 특히 만성 B형 간염 보균자, 노인, 만성신부전으로 혈액투석을 받는 환자 등과 집단 생활을 하는 청소년에서는 A형 간염 백신 접종이 필수적으로 요구되고 있다.
- [0009] 기존의 A형 간염 바이러스 항원의 제조는 대장균이나 배큐로바이러스를 통한 발현시스템을 이용하여 시도된 바 있으나 그 발현량이 미미하여 현재까지 그러한 발현시스템에서 항원 발현량이 정확히 보고된 바 없으며 특허로의 출원도 되지 못하고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) KR 10-2011-7007066
(특허문헌 0002) KR 10-2011-0023380

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 곤충에서 외래 단백질 유전자의 발현을 증가시키기 위한 새로운 전사조절 부위 및 전사활성 단백질을

이용한 발현시스템 개발을 위하여 곤충세포에서 외래 단백질 발현을 위한 비텔로제닌 프로모터 및 전사활성을 촉진하는 AaGATA 유전자를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 곤충에서 외래 단백질 발현을 증가시키기 위한 시스템을 확립하고자 하였다. 이 과정에서 비텔로제닌 프로모터 및 외래 유전자를 포함하는 벡터와 전사활성을 촉진하는 AaGATA 유전자를 포함하는 벡터를 곤충세포에 함께 처리하는 경우, 외래 단백질의 발현을 유도함을 luciferase 활성을 통해 확인하였다. 이에 따라 상기 비텔로제닌 프로모터와 AaGATA 유전자를 확보하여 이를 각각 포함하는 발현벡터를 제조한 후, VP1을 초파리 세포에 도입하여 형질전환시킨 형질전환체에서 VP1이 발현됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0013] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 비텔로제닌 프로모터 염기서열 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 곤충에서 외래 단백질 발현을 위한 재조합 벡터를 제공한다.
- [0014] 프로모터는 유전자의 환경적, 시기적 및 조직적 발현을 조절하는 필수적인 요소로서, 본 발명에 따른 비텔로제닌의 프로모터를 사용하여 곤충에서 외래 단백질 발현을 유도할 수 있다.
- [0015] 비텔로제닌은 곤충의 체액 단백질 중 난황단백질로 직접 난내로 들어가는 단백질에 해당한다. 유충의 지방조직에서 합성되는 인지질 단백질로 곤충의 종류에 따라서는 그 합성에 유약호르몬이 관계된다는 것이 알려져 있으며, 알속에 존재하는 비텔린(vitelin)의 전구물질에 해당한다. 즉, 비텔로제닌과 관련하여 곤충의 알의 발달 과정에 관여되는 것만이 알려져 있을 뿐 이를 통한 외래 단백질의 발현 등에 대해서는 알려진 바가 없다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 비텔로제닌의 프로모터는 비텔로제닌 단백질 코딩 유전자의 Downstream 약 0.7kb에 해당하며, 본 발명 서열번호 1의 염기서열을 말한다.
- [0017] 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 AaGATA 유전자 염기서열을 포함하는 곤충에서 외래 단백질 발현을 위한 재조합 벡터를 제공한다.
- [0018] AaGATA 유전자는 전사활성을 나타내는 유전자에 해당한다.
- [0019] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 의미하며, DNA를 복제하고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유래하거나, 둘 다의 요소를 포함할 수 있다. 따라서, 발현 벡터는 재조합 DNA 또는 RNA 구축물, 예컨대, 플라스미드, 파지, 재조합 바이러스 또는 적절한 숙주 세포 내 도입시, 클로닝된 DNA의 발현을 초래하는 다른 벡터를 의미한다. 적절한 발현 벡터는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 진핵세포 및/또는 원핵세포 내에서 복제가능한 것들 및 에피솜으로 남는 것들 또는 숙주 세포 계통 내에 통합되는 것들을 포함한다.
- [0020] 상기 통상의 벡터는 본 발명의 비텔로제닌 프로모터와 AaGATA 유전자를 도입할 수 있는 것이면 어떠한 것이든 무방하나, 바람직하게는 곤충 세포 발현용 벡터 및 이에 파생된 벡터로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0021] "본 발명 비텔로제닌의 프로모터" 또는 "AaGATA 유전자"와 "기능적으로 동등한 절편"은 본 발명 비텔로제닌의 프로모터 또는 AaGATA 유전자와 실질적으로 동등한 효과를 나타내는, 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 조각 또는 일부분을 의미한다. 이러한 핵산 절편은 서열번호 1에 기재된 염기서열과 비교하여 80% 이상의 서열 상동성을 가지며, 이러한 핵산 절편은 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다.
- [0022] 바람직하게는 상기 발현벡터는 곤충에서 발현시키고자 하는 유용한 외래 유전자를 포함할 수 있다.
- [0023] 상기 외래 유전자는 곤충에서 발현 가능한 유전자이면 당업계에서 일반적으로 이용되는 공지의 유전자 또는 서열 무엇이든 무방하며, 바람직하게는 A형 간염과 관련된 유전자로서 예컨대, VP1, VP2, VP3 또는 VP4 등으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 이용할 수 있다.
- [0024] 이때, 상기 VP1 유전자는 1480-2298 bp 또는 1480-2379 bp의 총 길이 각각 819bp, 900bp에 해당하는 유전자이다.

- [0025] 상기 발현백터는 통상의 백터에 본 발명의 프로모터를 도입한 것일 수 있으며, 이처럼 본 발명의 프로모터를 도입하여 발현백터를 제조하는 것은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 공지의 방법에 따라 용이하게 실시 가능하다.
- [0026] 본 발명은 상기 두 재조합 백터에 의해 형질전환된 곤충 세포를 제공한다.
- [0027] 상기한 재조합 백터는 감염, 형질도입, 트랜스펙션, 전기천공 및 형질전환과 같은 주지된 기술을 이용하여 배양된 숙주 세포 내로 도입될 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 외래 유전자를 발현시키기 위해 사용되는 숙주세포는 임의의 곤충 세포가 이용가능하다. 예를 들어, 초파리속 곤충세포 이외에도 스포도프테라속(Spodoptera), 트리코플루시아속(Trichoplusia) 세포, 누에세포 및 기타 곤충세포 등 다양한 숙주 세포가 사용될 수 있으며, 바람직하게는 초파리 세포가 사용될 수 있으며 이는 유전공학 분야에서 광범하게 이용되고 있는 세포주의 하나로서 공지되어 있는 세포주이다.
- [0029] 상기 곤충세포는 이러한 형질전환 및 배양에는 목적하는 외래 유전자를 효과적으로 발현시킬 수 있지만 하면, 유전공학 분야에서 통상적인 어떠한 방법이라도 사용될 수 있다. 특히 바람직하게 형질전환된 곤충세포는 넌크(Nunc) T-플라스크를 이용하여 배양한다.
- [0030] 또한 본 발명은 상기 백터 또는 상기 형질전환 세포로 형질 전환된 형질전환 곤충을 제공한다.
- [0031] 이러한 형질 전환 곤충은 도입된 외래 유전자를 발현할 수 있어 외래 단백질 생산에 폭 넓게 이용될 수 있다.
- [0032] "본 발명의 형질전환 곤충"과 "기능적으로 동등한 형질전환 곤충"은 비텔로제닌의 프로모터 또는 AaGATA 유전자와 실질적으로 동등한 효과를 나타내는, 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 조각 또는 일부분과 비교하여 80% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 이용하여 제조된 형질 전환 곤충으로써, 외래 단백질 발현 효과가 실질적으로 동등한 특징을 가지는 형질전환 곤충이다.
- [0033] 본 발명의 곤충의 형질전환은 DNA를 곤충에 전이시키기 위한 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0034] 이러한 변이체는 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다.
- [0035] 본 발명은 외래 단백질을 발현하는 형질전환 곤충의 제조방법을 제공한다.
- [0036] 바람직하게, (1) 서열번호 1로 표시되는 비텔로제닌 프로모터 염기서열 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 곤충에서 외래 단백질 발현을 위한 재조합 백터를 제조하는 단계;
- [0037] (2) 서열번호 2로 표시되는 AaGATA 유전자 염기서열을 포함하는 곤충에서 외래 단백질 발현을 위한 재조합 백터;
- [0038] (3) 곤충에 상기 두 재조합 백터를 모두 도입하는 단계; 및
- [0039] (4) 상기 두 재조합 백터가 도입되어 외래 단백질을 발현하는 곤충 형질전환체를 선별하는 단계를 포함하는 제조방법이며, 보다 바람직하게 상기 (2)의 외래 단백질은 VP1, VP2, VP3 또는 VP4에서 선택된 어느 하나이다.

발명의 효과

- [0040] 본 발명은 곤충세포에서 외래 단백질을 발현을 위한 비텔로제닌 프로모터 및 전사활성을 촉진하는 AaGATA 유전자에 관한 것으로서, 이는 여러 종류의 곤충세포에서 외래 단백질을 발현하는데 이용될 수 있으며, 특히, A형 간염바이러스 항원단백질 VP1, VP2, VP3, VP4 등의 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0041] 도 1은 모기 비텔로제닌 유전자 전사 조절 부위 및 모기 전사 조절 단백질을 이용한 신규 곤충세포 발현시스템의 백터 및 유전자 발현을 나타내는 도이다.

도 2는 모기 비텔로제닌 유전자 전사조절 부위를 지니는 luciferase 유전자 발현 백터 (pVg/Luciferase)와 모기 AaGATA 전사활성 단백질 발현백터 (pAc5.1/AaGATAa)를 초파리 곤충세포에 발현 시킨 결과를 나타내는 도이다.

도 3은 모기 AaGATAa 전사활성 단백질 발현백터 (pAc5.1/AaGATAa)와 비텔로제닌 유전자 전사조절 부위에 연결한

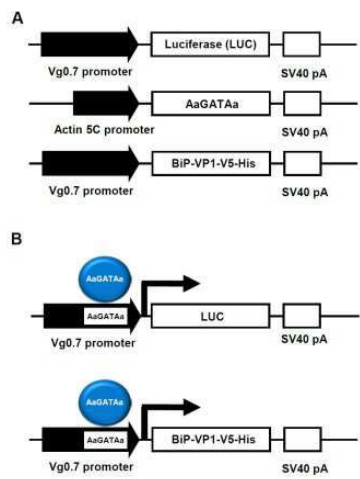
pVg/BiP-VP1-V5-His 벡터를 곤충세포에 동시에 형질전환 시키고 VP1 단백질 발현을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

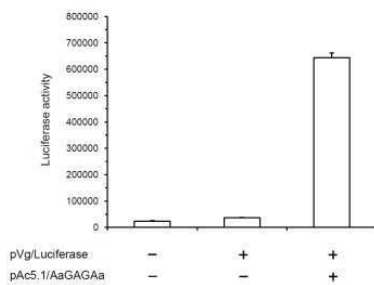
- [0042] 이하에서는, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 아래의 실시예는 발명의 이해를 돕기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0043] <실시예 1> 비텔로제닌의 프로모터를 포함하는 발현 벡터의 제작
- [0044] 모기 비텔로제닌 유전자 전사조절 부위 (Vg 단백질 코딩 유전자의 0.7 kb downstream 부위)를 모기세포 (CCL-125: *Aedes aegypti* cell line established from a pool of freshly hatched larvae, ATCC)에서 추출한 genomic DNA에 PCR 반응을 통해 확보하여 luciferase 유전자를 지니는 pGL3/Basic 벡터에 클로닝하였다. 벡터에 대한 대략적인 정보는 도 1에 나타내었다.
- [0045] 보다 상세하게, 비텔로제닌 유전자 전사조절 부위를 포함하는 벡터는 하기 방법에 의해 제조되었다.
- [0046] <실시예 2> 전사활성을 촉진하는 AaGATA 유전자를 포함하는 발현 벡터의 제작
- [0047] 모기 GATA 전사활성인자 AaGATAa 유전자를 CCL-125 모기세포에서 추출한 total RNA에서 RT-PCR 반응을 통해 확보하고 곤충세포 발현벡터인 pAc5.1 벡터에 클로닝하여 AaGATAa 유전자가 클로닝된 pAc5.1/AaGATAa 벡터를 제조하였다. 벡터에 대한 대략적인 정보는 도 1에 나타내었다.
- [0048] 보다 상세하게, AaGATAa 유전자를 포함하는 발현 벡터는 하기의 방법에 의해 제조되었다.
- [0049] <실시예 3> 재조합 벡터에 의한 luciferase 단백질 발현 확인
- [0050] 재조합 벡터들에 의한 외래 단백질 발현을 확인하기 위하여, 상기 실시예 1 및 실시예 2에서 제조된 모기 비텔로제닌 유전자 전사조절 부위를 지니는 luciferase 유전자 발현 벡터 (pVg/Luciferase)와 모기 AaGATA 전사활성 단백질 발현벡터 (pAc5.1/AaGATAa)를 초파리 곤충세포에 동시 발현시켜 luminometer로 luciferase 단백질을 발현을 확인하였다.
- [0051] 상기 실험 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0052] 도 2에 나타난 바와 같이, luciferase 유전자 발현 벡터 (pVg/Luciferase)와 모기 AaGATA 전사활성 단백질 발현벡터 (pAc5.1/AaGATAa)를 초파리 곤충세포에 동시 발현시킨 실험군에서만 luciferase 단백질 발현이 나타나는 것을 확인 할 수 있었다.
- [0053] 즉, 상기 결과를 통해서 luciferase 유전자 발현 벡터 (pVg/Luciferase)와 모기 AaGATA 전사활성 단백질 발현 벡터 (pAc5.1/AaGATAa)가 함께 곤충 세포에서 발현될 때 외래 단백질 발현 효과를 나타내는 것을 알 수 있다.
- [0054] <실시예 4> 곤충에서 VP1 단백질의 발현 확인
- [0055] 상기와 같은 외래 단백질 발현 효과를 외래 유전자로 VP1을 포함하는 발현 벡터를 제조하여, 이를 확인하였다.
- [0056] BiP, V5-His epitope이 fusion된 VP1 유전자를 모기 비텔로제닌 유전자 전사조절 부위에 연결한 pVg/BiP-VP1-V5-His 벡터를 제조하였으며, 이의 제조 방법은 하기와 같다.
- [0057] 모기 AaGATAa 전사활성 단백질 발현벡터는 상기 실시예 2에서 제조된 pAc5.1/AaGATAa 벡터를 사용하였다.
- [0058] 제조된 상기 두 벡터를 초파리 곤충 세포에 형질 전환 시켰다.
- [0059] 형질전환된 세포로부터 단백질을 추출하여 VP1 단백질 발현 여부를 웨스턴 블랏으로 확인하였다.
- [0060] 상기 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0061] 도 3에 나타난 바와 같이, pVg/BiP-VP1-V5-His 벡터와 pAc5.1/AaGATAa 벡터를 동시에 형질전환 시킨 실험군에서만 외래단백질인 VP1 단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0062] 상기 결과를 통해서, 비텔로제닌 유전자 전사조절 부위를 지니는 발현벡터와 AaGATAa 유전자 및 외래 유전자를 지니는 발현벡터를 이용해서 외래단백질을 곤충세포에서 발현시킬 수 있음을 알 수 있다.

도면

도면1



도면2



도면3

