

## Tyrosine Hydroxylase 재조합 단백질의 제작과 특이 항체의 생산

계명대학교 의과학연구소

이영재 · 강효경

### Preparation of Tyrosine Hydroxylase Recombinant Protein and Generation of Its Specific Antibody.

Young Jae Lee, Ph.D. and Hyo Kyung Kang, B.S.

*Institute for Medical Science, Keimyung University,  
Taegu, Korea*

#### =Abstract=

Parkinson's disease (PD) with resting tremor, rigidity, bradykinesia, leading to dementia was first documented by James Parkinson in 1817. The cause of PD is not clearly known but epidemic encephalitis, slow virus, genetic and environmental background were suggested and recently, reactive oxyradicals. Anatomically, these factors could cause progressive degeneration of dopaminergic neurons of substantia nigra pars compacta (SNc) which ultimately cause denervation and dopamine deficiency in striatal region. This deficiency can result in a relative enhancement of the action of acetylcholine, the excitatory neurotransmitter. Based on these findings, surgical and chemical treatment were tried but with side effects and reduced effectiveness on time, which invoked the development of gene therapy.

In order to facilitate the research on tyrosine hydroxylase (TH) which is the prime candidate for PD gene therapy, we have raised a polyclonal antibody against TH. A cDNA fragment corresponding to amino acid #91 to #286 of TH was PCR amplified and subcloned into bacterial expression vector, pRSETb after thorough DNA sequence analysis. The expression of recombinant protein of about 30 kD derived from the partial TH in pRSETb reached peak at approximately 1 hour post IPTG treatment. Approximately 500 µg of recombinant protein was purified from 500 ml culture using His-bind resin (Novagen). 100 µg of antigen emulsified in Freund's complete adjuvant was used to immunize rabbit (intramuscular). Four to six weeks after the primary immunization, the rabbit was boosted with 100 µg of antigen emulsified in Freund's incomplete adjuvant followed by a second boost in three to four weeks. Production and specificity of the antibody produced was confirmed by western blot analysis.

**Key Words:** Parkinson's disease, Tyrosine hydroxylase, Recombinant protein, Specific antibody

## 서 론

파킨슨씨 병 (Parkinson's disease, PD)은 50 대 이후에 발병하여 점차 진행되는 퇴행성 신경질환으로써, 진전 (resting tremor), 경직 (rigidity), 운동둔화 (bradykinesia) 등이 이 질환의 대표적인 증상이나, 이외에도 보폭이 좁고 끄는듯한 걸음걸이, 높낮이가 없는 음성, 무표정 등의 증상을 나타낸다. 또한 이런 운동성 이상 외에도 초기에는 우울증 등의 증상을 보이다가 점차 치매로 진행되기도 한다 (Yousdim & Riederer, 1997). 이 질병은 1817년 James Parkinson 이 논문으로 발표함으로써 체계화되었으며 해부학적으로 볼 때 중뇌 내의 흑질선조체 (substantia nigra pars compacta)에 위치한 도파민성 신경세포 (dopaminergic neuron)의 점진적인 퇴화로 인하여 발병한다.

도파민의 합성은 주로 뇌의 흑질선조체 혹은 수질 (medulla)에서 일어나며 L-tyrosine 이 tyrosine hydroxylase (TH, tyrosine 3-monooxygenase, EC 1.14.16.2)에 의해 L-dopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)로 전환됨으로 시작한다. L-dopa는 다시 aromatic amino acid decarboxylase에 의해 도파민으로 전환되어 norepinephrine과 epinephrine 등의 합성에 전구물질로 작용한다 (Kopin, 1993). 이 생합성에서 TH는 가장 첫번째 효소이고 tyrosine, L-dopa, catecholamine, 인산화 등에 의해 그 활성이 조절되며 반응속도 또한 늦어 rate-limiting step을 이룬다 (Kumer & Vrana, 1996). 이런 과정을 통하여 흑질선조체에서 생합성된 도파민은 도파민성 신경세포가 투사하고 있는 부위 즉 striatum에서 흥분성 신경전달물질인 acetylcholine과 서로 상반되는 역할을 하여 근육의 움직임을 정밀 조절 한다. 이런 흥분성 및 억제성 신경전달물질의 불균형으로 인하여 발병하는

파킨슨씨 병의 치료를 위해서는 도파민의 전구물질인 L-dopa, 도파민 수용체에 대한 agonist, anti-cholinergics, deprenyl 등이 쓰이지만 근본적인 대책이 되지는 못하여 유전자 치료를 시도하고 있는 분야이다. 그러나 본 질병의 유전자 치료에서 가장 효율적일 것으로 기대되는 TH에 대한 보다 많은 연구가 필요할 것이다.

본 연구에서는 이러한 연구의 활성화를 꾀하기 위하여 PCR을 이용하여 TH 유전자의 일부를 증폭하였다. 증폭된 DNA는 bacterial expression vector에 subclone하고 이를 이용하여 재조합 단백질을 만들었다. 본 재조합 단백질은 순수분리 후 토끼에 주사하여 본 단백질에 대한 항체를 생산하고 western blot analysis를 이용하여 생산된 항체의 특이성을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### DNA 조작

사람의 type 2 TH를 가진 hTH63의 일부 (TH의 아미노산 #91~#286에 해당)는 두 개의 oligo (ThAb5D와 ThAb5U)를 이용하여 PCR 증폭하고 염기서열을 확인한 후 bacterial expression vector인 pRSETb (Invitrogen)에 subclone하여 pTH/pRb라 명명하였다. 이 과정에서 흔히 쓰이는 일반적인 DNA의 조작 즉 제한효소에 의한 절단, subcloning, polymerase chain reaction (PCR), plasmid DNA의 분리, 전기영동 등을 Sambrook *et al.* (1989)의 방법에 준하여 행하였다.

### 재조합 단백질의 발현유도 및 순수분리

pTH/pRb로 transformation된 BL21(DE3) colony는 2 ml의 LB에서 밤새 배양하였다. 다음날 배양액은 20 ml의 LB에 옮겨넣고 다시 두 시간 동안 배양한 후 1 ml을 취하여 원심하고 이

를 To의 시료로 하였다. IPTG는 농도가 0.4 mM 이 되게 첨가하여 재조합 단백질의 발현을 유도하고 4시간 동안 매 시간마다 1 ml의 시료를 취하였다. 각 시간에 취한 시료는 원심 분리하고 pellet에는 20  $\mu\text{l}$ 의 SDS sample buffer (62.5 mM Tris, pH 6.8, 10% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 2.3% SDS)를 첨가하여 용해하고 5분간 끓인후 10% acrylamide gel에서 분리하였다. 분리가 끝난 gel은 coomasie (0.25% coomasie blue R-250, 50% methanol, 10% acetic acid)로 염색하고 발현되는 단백질의 양을 비교하였다.

가장 많은 양의 재조합 단백질을 발현하는 clone 은 500 ml의 LB에 배양하고 위에서 정한 가장 이상적인 조건 하에서 재조합 단백질의 발현을 유도하였다. 배양액은 3,000/g에서 원심분리하고 pellet은 1/10 용량의 세척액 (0.5 M NaCl, 20 mM Tris pH 7.9, 5 mM imidazole)으로 씻고 다시 원심한 후 1/20 용량의 binding buffer (0.5 M NaCl, 20 mM Tris pH 7.9, 5 mM imidazole, 750 mM urea)에 부유하였다. 부유 액은 얼음에서 1시간 동안 보관한 후 5-10회 sonicate하고 12,000/g에서 20분간 원심분리 후 상층액은 수거하여 여과하였다. Bacterial lysate을 준비하는 동안 column을 준비하였다. 내경 1 cm의 column에 2 ml의 His-bind resin (Novagen)을 넣고 서서히 packing 하였다. Column은 bed volume의 3배 ( $3 \times V_0$ )의 중류수로 씻어내고  $5 \times V_0$ 의 charge solution (50 mM NiSO<sub>4</sub>)을 통과하여 Ni<sup>2+</sup>가 resin에 charge 되도록 하였다. Charge 된 column은  $3 \times V_0$ 의 binding buffer로 씻고 위에서 준비한 bacterial lysate을 load 하였다. Column은 다시 15 ml의 binding buffer로 씻고 결합된 단백질중 비특이성 단백질을 제거하기 위해 imidazole 농도를 20 mM로 올린 binding buffer 15 ml로 다시 씻었다. 재조합 단백질은 15 ml의 elution buffer(imidazole의 농도를 1 M로 증가시킨 binding buffer)로 elution 하고 각 1 ml씩 15 개의 fraction을 모았다. OD<sub>280</sub>을 기

준으로 전체의 80% 정도에 해당하는 단백질을 가진 fraction을 모아서 6 M, 4 M, 2 M의 urea에서 차례로 투석하고 마지막으로 PBS에 투석하였다. 투석이 끝난 시료는 aquacide로 농축하여 용량이 1 ml 정도가 되게 하였다. 순수분리된 단백질의 농도는 회색한 BSA와 함께 전기영동하고 coomassie로 염색하여 그 밝기 정도를 비교하여 정하였다.

### Immunization

순수분리된 재조합 단백질 100  $\mu\text{g}$ 은 500  $\mu\text{l}$ 의 PBS에 회색하고 1.5 ml의 Freund's complete adjuvant를 첨가한 후 two-hub syringe에 넣고 500번 이상 왕복하였다. 재조합 단백질과 adjuvant의 섞임 정도는 혼탁액을 물위에 한방울 떨어뜨려서 퍼지지 않을 때 까지 계속하였다. 완전히 섞인 재조합 단백질과 adjuvant는 토끼의 각 다리에 0.5 ml씩 주사하였다. 4-6주 후 boost 시에는 재조합 단백질과 adjuvant의 양을 반으로 줄이고 또한 incomplete adjuvant를 사용하여 위와 같은 방법으로 섞은 후 뒷다리에 0.5 ml씩 주사하였다. Boost는 4주에 한번씩 두 번 실시하고 boost 1주 후 채혈하여 항체의 생성을 확인하였다 (Hurn & Chantler, 1980; Siegel et al, 1983).

### 채혈 및 혈청의 분리

Boost 1주 후 채혈시에는 토끼의 귀를 알콜로 소독하고 xylene을 묻힌 솜으로 살짝 문질러 혈관이 팽창되게 하였다. 21G 주사바늘을 혈관에 삽입한후 주사바늘을 통하여 자연적으로 흘러나오는 혈액을 채취하였다. 혈액은 37°C에서 한시간 이상 방치하여 혈전이 생기게 하고 다시 3,500 g로 원심하여 혈전과 혈청을 분리하였다. 혈청에는 1/100 volume의 2 M Tris (pH 8.2)를 섞어 pH를 조절하고 sodium azide를 넣어 세균이 자라는 것을 방지한다. 항체의 생성이 확인된 혈청은 분주하여 -80°C에 보관하였다.

### Western blot analysis

Plate의 세포는 trypsin으로 lift하여 hemacytometer로 세포의 수를 세고  $1 \times 10^6$  세포당 100  $\mu\text{l}$ 의 SDS lysis buffer (62.5 mM Tris pH 6.8, 10% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 2.3% SDS)로 lyse하고 10초간 sonication하였다. SDS-PAGE는 10%, stacking gel은 pH 6.8, running gel은 pH 8.8로 하였다. Polymerize된 gel에 5분간 끓인 시료 20  $\mu\text{l}$  (2x105 cell에 해당)를 load한 후 glycine running buffer (200 mM glycine, 30 mM Tris-B pH 8.3, 1% SDS)에서 constant 60V로 2-3시간 영동하였다. 영동이 끝난 gel은 Towbin's buffer (192 mM glycine, 25 mM Tris pH 8.3, 0.1% SDS, 10% methanol)에서 150 mA로 1시간 동안 nitrocellulose membrane으로 옮겼다. 단백질이 옮겨진 membrane은 5% skim milk/TBST (10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Triton)에서 한시간 이상 비특이성 단백질에 대한 결합을 차단하고 1:1000으로 희석시킨 1차 항체로 다시 한 시간 동안 처리하였다. Membrane은 TBST에서 4번 (5분, 5분, 15분, 15분) 이상 씻은 후 HRP가 conjugate된 2차 항체 (1:2000, Amersham)로 다시 한시간 처리하고 위와 같은 방법으로 4번 이상 씻었다. Washing이 끝난 membrane은 Enhanced Chemiluminescence (Amersham, RPN 2106) kit로 발색하였다.

### 결과 및 고찰

#### TH 유전자의 증폭과 단백질의 발현을 위한 유전자 조작

재조합 단백질을 만들기 위한 cDNA는 본 단백질의 조절부위와 효소부위를 포함하는 196개의 아미노산에 해당하는 부분을 PCR을 이용하여 증폭하였다. 본 증폭을 위한 두 개의 primer의 염기서열은 5' CCGCTGCAGTCCCCTCGGA-G3' (ThAb5D)와 5' AGCTTCGGCCTCC-

AGGTGCTCCCCG3' (ThAb5U)이다. ThAb5U에는 이후의 subcloning을 용이하게 하기 위하여 Hind III 제한효소 자리를 넣었으므로 PCR 증폭시 첫 5 cycle은 55°C에서 annealing하고 다른 25 cycle은 63°C로 올려 증폭하였다. 증폭산물은 agarose gel에서 전기영동하여 성공적인 증폭을 확인하였다 (Figure 1A). 그러나 두 가지의 annealing 온도를 이용하는 방법은 complementary sequence가 짧은 primer를 사용하여도 증폭을 할 수 있다는 장점은 있으나 비특이적 증폭산물의 비율이 비교적 높다는 결점을 갖고 있다. 본 증폭에서도 비특이적 산물의 증폭이 상당히 많았으므로 증폭산물은 다시 agarose gel에 전기영동하여 약 600 bp에 해당하는 DNA 절편을 잘라내고 이를 pCR2.1 (Invitrogen)에 subclone하였다. Alkaline lysis 방법으로 분리한 plasmid DNA는 Eco RI 제한효소를 이용하여 성공적인 subcloning을 확인하고 (Figure 1B) 자동 염기서열 분석기 (기초과학지원 분소, 부산)를 이용하여 염기서열을 확인하였다 (Figure 2). 염기서열 분석의 정확도를 높이기 위해 T7 primer (Figure 2A)와 M13 Rev primer (Figure 2B)를 사용하여 양방향으로 염기서열을 분석하였으며 이들을 종합한 염기서열은 Figure 2C에 나타나 있다. 본 Figure에서 밑줄친 염기 62번에서 염기 82번 까지는 ThAb5D primer의 염기서열이고 염기 636번에서 염기 662번까지는 ThAb5U primer의 염기서열이다. PCR에 의하여 증폭된 부분의 염기서열은 wild type TH와 비교하였을 때 3개의 점 돌연변이를 보이고 있는데 첫 번째는 염기 262번에서 "T"가 deletion되었고, 두 번째는 염기 267번에 "A"가 insertion되었다. 이들 두 개의 돌연변이로 인하여 260번에서 268번 까지의 염기는 "GCT GGG GGC"에서 "GCG GGG AGC"로 바뀌었으며 이로 인한 peptide의 서열은 "ala gly gly"에서 "ala gly ser"으로 바뀌었다. 이는 두 개의 돌연변이 (deletion과 insertion)가 모두 reading frame에 변화를 줄 수 있으나 두 개의 돌연변이가 가까이 있어서 서로의 효과를 상쇄하였고

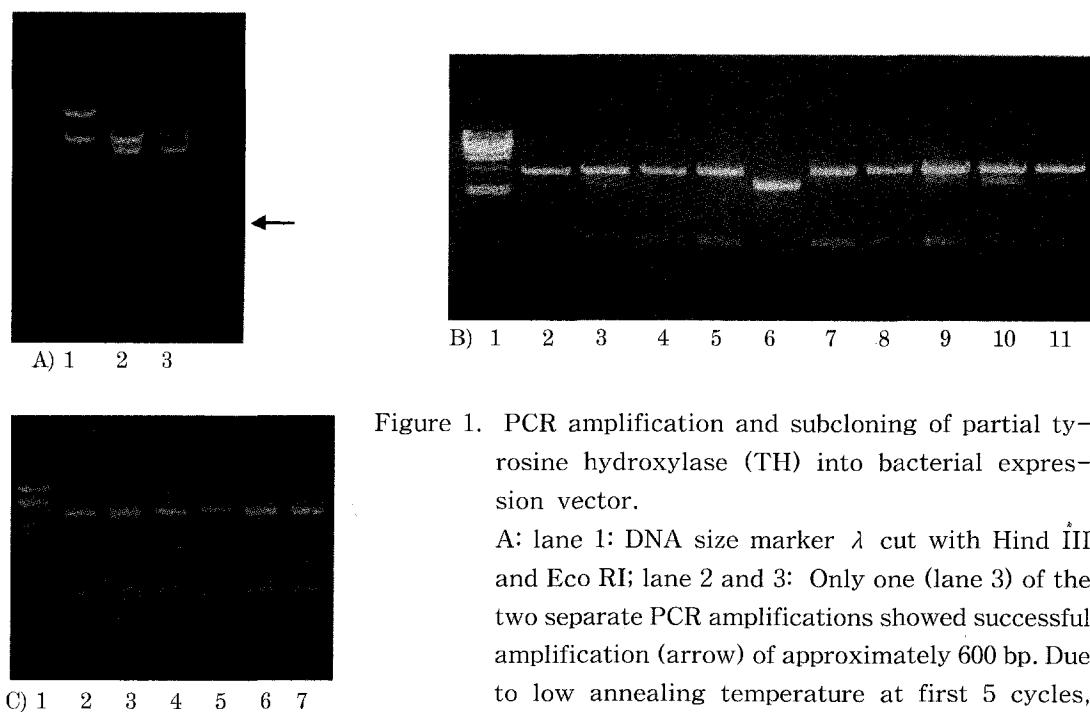


Figure 1. PCR amplification and subcloning of partial tyrosine hydroxylase (TH) into bacterial expression vector.

A: lane 1: DNA size marker  $\lambda$  cut with Hind III and Eco RI; lane 2 and 3: Only one (lane 3) of the two separate PCR amplifications showed successful amplification (arrow) of approximately 600 bp. Due to low annealing temperature at first 5 cycles, some non-specific bands are also visible.

B: Subcloning of PCR amplified TH into pCR2.1 showing successful subcloning in lanes 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, and 11. Alkaline lysis miniprep DNA was digested with Eco RI.

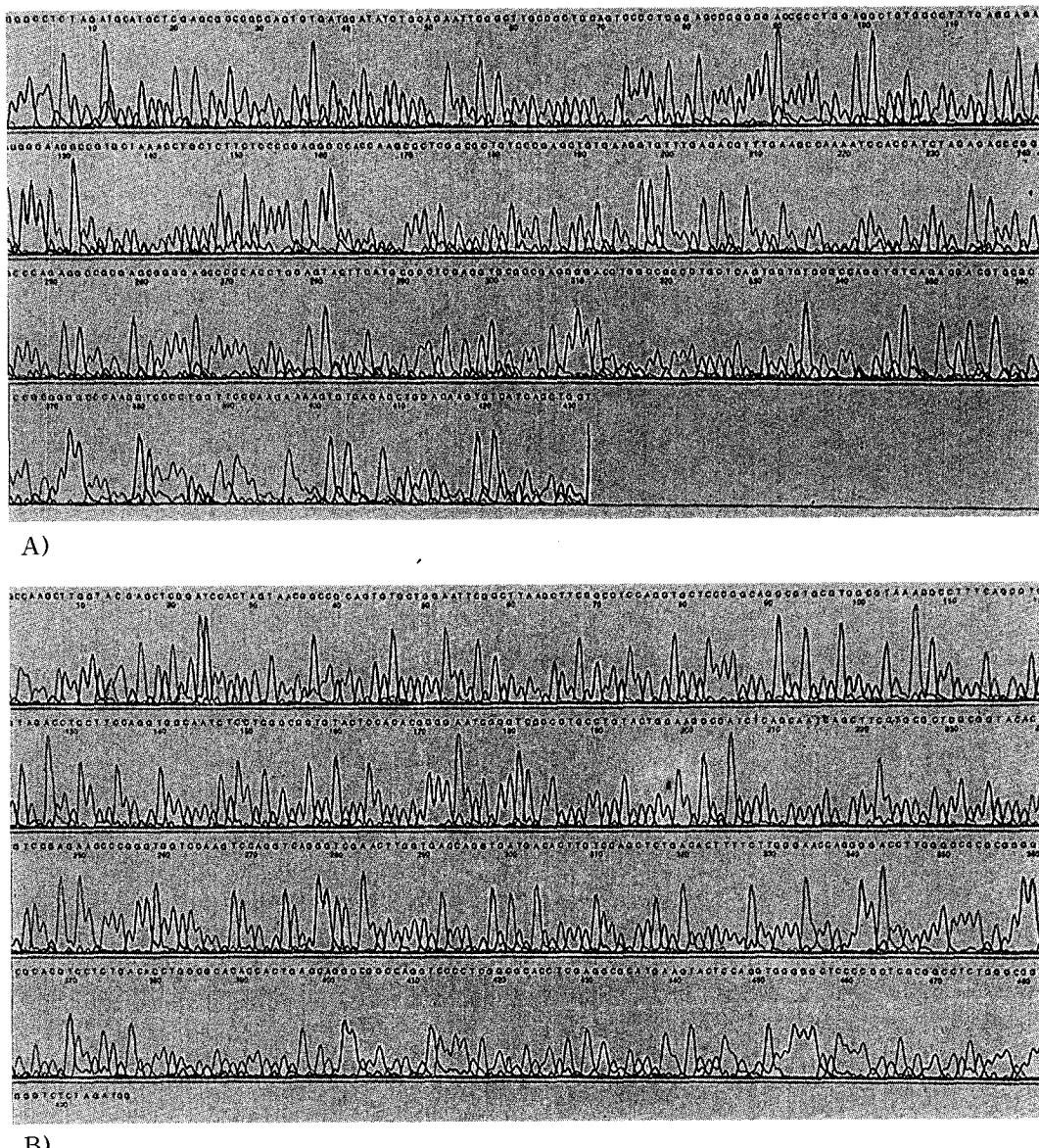
C: Subcloning of PCR amplified TH into pRSETb, showing all colonies tested are positive.

또 이들 두 개의 돌연변이 사이에는 다섯 개의 “G”가 위치하고 있어서 결과적으로 한 개의 아미노산만이 변화되었다. 세 번째 돌연변이는 염기 287 번이 “G”에서 “A”로 전환됨으로 인하여 valine 이 methionine 으로 변화되었다. 이런 세 개의 돌연변이는 PCR 증폭에 의한 돌연변이로는 상당히 높은 빈도를 보이고 있으나 PCR 증폭시 첫 5 cycle의 annealing 온도가 낮음으로 인하여 생긴 것으로 사료된다. 염기서열이 확인된후 pCR2.1 에 lone 된 증폭산물은 Pst I 과 Hin dIII 로 잘라내고 이는 같은 제한효소를 처리한 bacterial expression vector pRSETb (Invitrogen)에 subclone 하고 pTH/pRb 라 하였다 (Figure 1C). 이로 인하여 code 되는 재조

합 단백질의 서열은 Figure 3에 표시하였다. 본 Figure에서 윗줄은 재조합 단백질에 의해 code되는 아미노산의 서열이며 아래줄의 wild type TH 와 비교하였다. 이탈릭체로 표시된 serine 과 methionine 은 위에서 언급한 세 개의 돌연변이에 의해 변화된 아미노산을 표시한 것이며, 밑줄친 38 개의 아미노산은 pRSETb에 의해 발현된 부분이다.

#### 재조합 TH 단백질의 발현 및 순수분리

Bacterial expression vector pRSETb는 T7 RNA polymerase에 의해 transcribe 될 수 있는 promoter를 갖고 있다. 본 plasmid에



subclone 된 TH 유전자는 DE3 lysogen 을 갖고 있는 bacteria BL21(DE3)에 transform 하였는데 DE3 lysogen 은 lac operator 와 T7 RNA polymerase 유전자가 연결된 형태를 하고 있어서 IPTG 에 의해 RNA polymerase 를 발현할 수 있다. 이렇게 생성된 RNA polymerase 는 다시 pRSETb 에서 재조합 단백질의 발현을 유도하므로 본 system 에서는 pRSETb 에서 기인하는 38 개의 아미노산과 TH 유전자에서 발현

되는 196 개의 아미노산을 가진 약 30 kD 의 재조합 단백질이 만들어질 것이다. 본 재조합 단백질의 발현을 확인하기 위하여 pTH/pRb 를 가진 BL21(DE3)는 0.4 mM IPTG 로 induce 한 후 매 시간별로 시료를 채취하여 30 kD 의 재조합 단백질의 발현을 확인하였다 (Figure 4A). 그러나 본 재조합 단백질의 경우 IPTG 를 첨가하지 않은 상태에서도 약간의 단백질이 발현하고 있었으며 (Figure 4A, lane 2) IPTG 첨가 1 시간후에 가

C)	10	20	30	40	50	60
	GGGCCGCTAG	ATGCATGCTC	GAGCGGCCGC	CAGTGTGATG	GATATCTGCA	GAATTGGCT
	70	80	90	100	110	120
	<u>TGCCCCTGCA</u>	<u>GTCCCCCTCGG</u>	<u>AGCCCCGGGA</u>	<u>CCCCCTGGAG</u>	<u>GCTGTGGCCT</u>	<u>TTGAGGGAGAA</u>
	130	140	150	160	170	180
	GGAGGGGAAG	GCGGTGCTAA	ACCTGCTCTT	CTCCCCGAGG	GCCACCAAGC	CCTCGGCGCT
	190	200	210	220	230	240
	GTCCCGAGCT	GTGAAGGTGT	TTGAGACGTT	TGAAGCCAAA	ATCCACCATC <i>CCATC</i>	TAGAGACCCG <i>TAGAGACCCG</i>
	250	260	270	280	290	300
	<i>GCCCCGCCAG</i>	AGGCCGCGAG	CGGGGAGGCC	CCACCTGGAG	TACTTCATGC	GCCTCGAGGT
	<i>GCCCCGCCAG</i>	<i>AGGCCGCGAG</i>	<i>CGGGGAGGCC</i>	<i>CCACCTGGAG</i>	<i>TACTTCATGC</i>	<i>GCCTCGAGGT</i>
	310	320	330	340	350	360
	<i>GCGCCGAGGG</i>	GACCTGGCCG	CCCTGCTCAG	TGGTGTGCGC	CAGGTGTCAG	AGGACGTGCG
	<i>GCGCCGAGGG</i>	<i>GACCTGGCCG</i>	<i>CCCTGCTCAG</i>	<i>TGGTGTGCGC</i>	<i>CAGGTGTCAG</i>	<i>AGGACGTGCG</i>
	370	380	390	400	410	420
	<i>CAGCCCCGCG</i>	GGGCCCAAGG	TCCCTGGTT	CCCAAGAAAA	GTGTCAGAGC	TGGACAAGTG
	<i>CAGCCCCGCG</i>	<i>GGGCCCAAGG</i>	<i>TCCCTGGTT</i>	<i>CCCAAGAAAA</i>	<i>GTGTCAGAGC</i>	<i>TGGACAAGTG</i>
	430	440	450	460	470	480
	<i>TCATCACCTG</i>	GT				
	<i>TCATCACCTG</i>	<i>GTCACCAAGT</i>	<i>TCGACCCCTGA</i>	<i>CCTGGACTTG</i>	<i>GACCACCCGG</i>	<i>GCTTCTCGGA</i>
	490	500	510	520	530	540
	<i>CCAGGTGTAC</i>	<i>CGCCAGCGCA</i>	<i>GGAAGCTGAT</i>	<i>TGCTGAGATC</i>	<i>GCCTTCCAGT</i>	<i>ACAGGCACGG</i>
	550	560	570	580	590	600
	<i>CGACCCGATT</i>	<i>CCCCGTGTGG</i>	<i>AGTACACCGC</i>	<i>CGAGGGAGATT</i>	<i>GCCACCTGGA</i>	<i>AGGAGGTCTA</i>
	610	620	630	640	650	660
	<i>CACCAACGCTG</i>	<i>AAAGGCCTTT</i>	<i>ACGCCACGCA</i>	<i>CGCCTGCGGG</i>	<i>GAGCACCTGG</i>	<i>AGGCCGAAGC</i>
	670	680	690	700	710	720
	<i>TTAACCGAA</i>	<i>TTCCAGCACCA</i>	<i>CTGCGGCCGT</i>	<i>TACTAGTGGA</i>	<i>TCCGAGCTCG</i>	<i>TACCAAGCTT</i>
	<i>GGC</i>					

Figure 2. Automated DNA sequence analysis of PCR amplified TH in pCR2.1.

A: DNA sequence read from forward primer;

B: DNA sequence read from reverse primer;

C: Composite of DNA sequences read from figure 2A and 2B. Sequences on the top lines are from reaction with forward primer and bottom lines (italicized) are from reaction with reverse primer. Underlined sequences from nucleotide #62 to #82 and from #636 to #662 are the sequences of primers used for PCR amplification.

met arg gly ser his his his his his gly met ala ser met thr gly gly gln gln  
met gly arg asp leu tyr asp asp asp lys asp pro ser ser arg ser ala ala val  
pro ser glu pro gly asp pro leu glu ala val ala phe glu glu lys glu gly lys ala  
val leu asn leu leu phe ser pro gly asp pro pro arg ala thr lys pro ser ala leu  
ser arg ala val lys val phe glu thr phe glu ala lys ile his his leu glu thr arg pro  
ala gln arg pro arg ala gly ser pro his leu glu tyr phe met arg leu glu val arg  
arg gly asp leu ala ala leu leu ser gly val arg gln val ser glu asp val arg ser  
pro ala gly pro lys val pro trp phe pro arg lys val ser glu leu asp lys cys his  
his leu val thr lys phe asp pro asp leu asp his pro gly phe ser asp gln  
val tyr arg gln arg arg lys leu ile ala glu ile ala phe gln tyr arg his gly asp pro  
ile pro arg val glu tyr thr ala glu glu ile ala thr trp lys glu val tyr thr thr leu  
lys gly leu tyr ala thr his ala cys gly glu his leu glu ala

Figure 3. Deduced amino acid sequence from PCR amplified TH. Due to three PCR errors, two amino acids were mutated to serine and methionine (italicized).

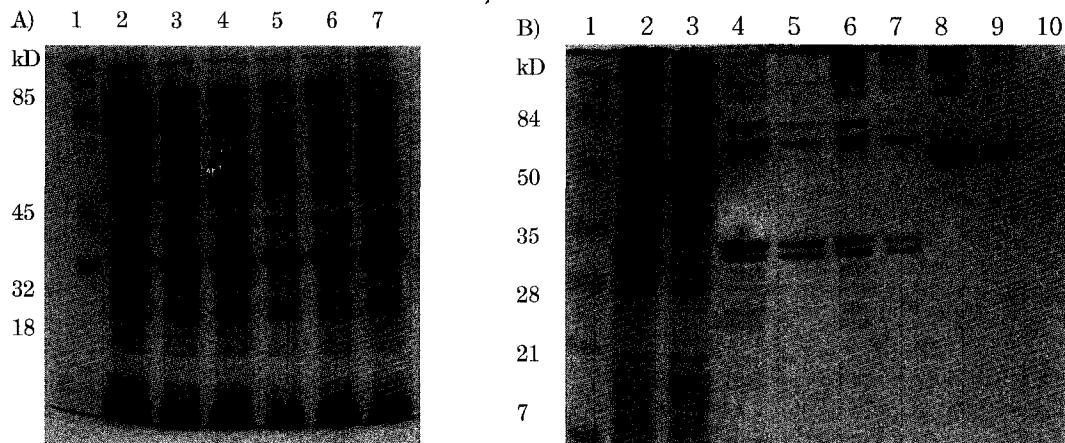


Figure 4. Induction and purification of the recombinant protein.

A: Induction of TH recombinant protein in different time point.

- Lane 1: size marker;
- Lane 2: bacterial lysate before induction;
- Lane 3: bacterial lysate after 30 min of induction with 0.4 mM IPTG;
- Lane 4: bacterial lysate after 1 hr of induction with 0.4 mM IPTG;
- Lane 5: bacterial lysate after 2 hr of induction with 0.4 mM IPTG;
- Lane 6: bacterial lysate after 3 hr of induction with 0.4 mM IPTG;
- Lane 7: bacterial lysate after 4 hr of induction with 0.4 mM IPTG.

B: Purification and concentration of recombinant protein

- Lane 1: size marker;
- Lane 2: total bacterial lysate before loading to column;
- Lane 3: total bacterial lysate after passing through the column;
- Lane 4: first eluent;
- Lane 5: second eluent;
- Lane 6: dialysed first eluent;
- Lane 7: dialysed second eluent;
- Lane 8: 20  $\mu$ g of BSA;
- Lane 9: 4  $\mu$ g of BSA;
- Lane 10: 800 ng of BSA.

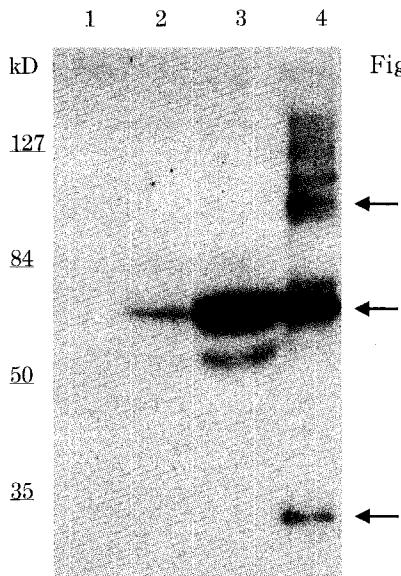


Figure 5. Specificity of antibody was confirmed by western blot analysis.

Lane 1: NIH-3T3 showing no immunoreactivity to the antiserum  
 Lane 2: sample from  $4 \times 10^5$  KNTH2 cells;  
 Lane 3: sample from  $4 \times 10^5$  KNTH2GC6 cells;  
 Lane 4: 4 ng of purified recombinant protein.  
 Proteins of approximately 30 kD (monomer), 60 kD (dimer) and 120 kD (tetramer) are indicated by arrows.

장 많은 양의 재조합 단백질을 발현함을 알수가 있었다 (Figure 4A, lane 4). 이렇게 발현된 재조합 단백질은 His-bind kit (Novagen)을 이용하여 순수분리 하였다. His-bind resin은 sepharose bead로써  $\text{Ni}^{2+}$ 과 쉽게 conjugate 하며  $\text{Ni}^{2+}$  charged resin은 pRSETb에서 기인하는 38 개의 아미노산중에 포함된 6 개의 histidine과 결합함으로 bacterial lysate 중에서 재조합 단백질만 특이적으로 분리해 낼 수 있다. 본 TH 단백질의 경우 IPTG 처리후 1시간 만에 peak를 보인 30 kD 단백질 (Figure 4B, lane 2)은 His-bind column을 지난 후 pass through에서는 보이지 않게 되었다 (Figure 4B, lane 3). 재조합 단백질은 elution 시 첫 2 ml (Vo, bed volume)에서는 거의 보이지 않았으나 (data not shown) 두 번째 ( $V_1$ , Figure 4B, lane 4)와 세 번째 2 ml ( $V_2$ , Figure 4B, lane 5)에서 거의 대부분이 elution 되었다. Elution 된 재조합 단백질은 60 kD, 120 kD 등에서도 나타나고 있는데 이는 dimer 혹은 tetramer를 형성하였기 때문인 것으로 사료된다 (Figure 5). Elution 된 재조합 단백질은 4 M 과 2 M 의 urea에서 차례로 투석하고 마지막으로 PBS에서 투석하였다 (Figure 4B, lane 6, 7). 투석된 단백질은 BSA

를 기준으로 농도를 확인하여 (Figure 4B, lane 8, 9, 10) 500 ml의 배양액에서 총 500  $\mu\text{g}$ 의 재조합 단백질을 분리하였음을 확인하였다. 분리된 재조합 단백질은 Freund's complete adjuvant와 섞어서 1차 immunization 하고 4-6주 후 boost 시에는 incomplete adjuvant와 섞어서 주사하였다.

#### 생성된 항체의 특이성 확인

Boost 후 항체의 생성여부를 확인하기 위하여 토끼의 귀에서 1 ml의 혈액을 채취하였다. 이는 37°C에서 한시간 이상 방치한 후 원심하여 혈전과 혈장을 분리하고 혈장에는 2 M Tris (pH 8.2)를 첨가하여 pH를 조절하였다. 항체생성의 확인은 western blot 법을 이용하였으며 (Figure 5) TH를 발현하는 세포주 KNTH2, KNTH2GC6 (이영재 외, 1999)와 순수분리한 재조합 단백질을 epitope로 이용하였다. 10  $\mu\text{l}$ 의 SDS sample buffer에서 lyse 한  $4 \times 10^5$ 의 NIH-3T3 (Figure 5, lane 1), KNTH2 (Figure 5, lane 2), KNTH2GC6 (Figure 5, lane 3)와 순수분리된 재조합 단백질 4 ng은 10% SDS-PAGE에서 분리하고 nitrocellulose 막에 옮긴 후 1:1000으로 희석한 TH antiserum으로 blot 하였다.

KNTH2 와 KNTH2GC6 에서는 약 60 kD 의 TH 단백질이 검출되었으며 이영재 외 (1999)에서 발표한 바와 같이 KNTH2 와 KNTH2GC6 에서의 TH 단백질의 발현은 10 배 이상의 차이를 보이고 있으며 이들의 parental cell line 인 NIH-3T3 에서는 전혀 검색되지 않았다. 또한 본 항체를 생산하기 위해 쓴 재조합 단백질도 본 항체에 잘 반응하여서 (Figure 5, lane 4) monomer 인 30 kD, dimer 인 60 kD, tetramer 로 여겨지는 120 kD 에서 단백질이 검출되었다. 이런 결과로 볼 때 본 항체의 특이성은 TH 혹은 도파민성 신경세포를 인지하는 지표로 사용함에 있어서 전혀 손색이 없는 것으로 사료된다.

## 요 약

파킨슨씨 병은 퇴행성 신경질환으로서 특효약이 없어서 유전자 치료의 시도가 요망되는 분야이다. 본 질환에 대한 유전자 치료에는 여러 가지 유전자가 시도되었으나 tyrosine hydroxylase (TH) 가 가장 효율적일것으로 기대된다. 본 유전자를 이용한 유전자 치료는 일부 시도되었으나 대단히 성공적이지는 못하였다. 이는 본 유전자에 대한 기초적인 연구가 유전자 치료를 시도하기에는 다소 부족한 것이 한 이유가 될 수 있겠다. 본 연구에서는 이러한 TH 에 대한 연구의 활성화를 꾀하기 위하여 TH 의 일부를 PCR 증폭하여 이로써 재조합 단백질을 만들었다. 본 재조합 단백질은 재조합 단백질으로 토끼에 주사하여 이에 대한 항체가 형성되도록 하였다. Antiserum 은

western blot analysis 를 이용하여 항체의 특이성을 확인하였다.

## 참 고 문 헌

- 이영재, 한인숙, 이상도: GTP cyclohydrolase I 이 tyrosine hydroxylase 의 활성, 발현 및 세포의 성장에 미치는 영향. 대한신경학회지 1999; 17:122-130.
- Hurn BA, Chantler SM: Production of reagent antinodies. *Methods Enzymol* 1980;70: 104-142.
- Kopin IJ: The pharmacology of Parkinson's disease therapy: an update. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993;32:467-495.
- Kumer SC, Vrana KE: Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 1996;67:443-462.
- Sambrook J, Fritsch EF Maniatis T: Molecular cloning: a laboratory manual., 2ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Cold Spring Harbor*, 1989, NY.
- Siegel MB, Sinha Y, VanderLaan WP: Production of antibodies by inoculation into lymph nodes. *Methods Enzymology* 1983;93: 3-13.
- Youdim MBH Riederer P: Understanding Parkinson's disease. *Scientific American* 1997; January: 52-59.