

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁵
C12N 15/18

(45) 공고일자 1991년01월25일
(11) 공고번호 91-000459

(21) 출원번호	특1988-0018192	(65) 공개번호	특1990-0009976
(22) 출원일자	1988년12월31일	(43) 공개일자	1990년07월06일
(71) 출원인	주식회사 럭키 최근선 서울특별시 영등포구 여의도동 20번지		
(72) 발명자	조중명 서울특별시 강동구 고덕동 185-7 이용범 대전직할시 중구 용문동 276-8 이태규 서울특별시 도봉구 수유 1동 486-573 박영우 대전직할시 중구 도룡동 386-4 이태호 대전직할시 중구 도룡동 386-4		
(74) 대리인	김윤배, 이범일		

심사관 : 김성완 (책자공보 제2168호)

(54) 인간성장호르몬 발현 벡터 pYLBC-A/G-HGH

요약

내용 없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

인간성장호르몬 발현 벡터 pYLBC-A/G-HGH

[도면의 간단한 설명]

제1도는 인간성장호르몬의 cDNA 염기서열 및 아미노산서열을 나타낸 것이다.

제2도는 본 발명에 따른 인간성장호르몬의 cDNA 라이브러리 작성과정 및 인간성장호르몬 유전자내에 제한효소 Sst I, Sal I 부위 삽입과정을 나타낸 것이다.

제3도는 본 발명에 따른 효모 발현운반체로의 크로닝 과정을 도시한 것이다.

제4도는 본 발명에 따른 인간성장호르몬 발현 벡터 pYLBC-A/G-HGH를 함유하는 효모균주의 추출물을 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동한 결과를 나타낸 것이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 인간성장호르몬 발현 벡터 pYLBC-A/G-HGH에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 유전공학적 인 방법에 따라 효모를 발현체로 하여 안전한 인간성장호르몬을 대량 생산하는데 유용하게 사용될 수 있는 인간성장호르몬 발현 벡터 pYLBC-A/G-HGH에 관한 것이다.

인간성장호르몬(Human Growth Hormone)은 191개의 아미노산기로 구성되는 분자량 약 21,500의 펩타이드 호르몬으로서, 주로 왜소증(倭小症)의 치료에 사용되어 왔다(Robin, M.S., J. Clin. Endocr., 18, 901(1985)).

종래에는 주로 교통사고나 질병으로 사망한 인간의 뇌하수체로부터 인간성장호르몬을 추출 정제하여 사용하여 왔으나, 그 양이 크게 제한되어 있어서 모든 왜소증 환자에게 공급되지 못하였으며 가격 또한 높아 사용에 많은 어려움이 있었다.

또한, 최근에 사망한 인간의 뇌하수체로부터 추출 정제한 인간성장호르몬을 투여받은 4명의 어린이

가 밝혀지지 않은 괴질의 바이러스에 감염되어 사망하고 사고가 발생하는 등 그 사용에 문제점이 있었는데, 미국식품 의약국(FDA)에서는 상기의 방법과 같이 사망한 인간의 뇌하수체로부터 추출정제 한 인간성장호르몬의 사용을 금지시켰다(Science, 234, 22(1986)).

한편, 인간성장호르몬의 다른 제조방법으로서, 화학적 합성이나 조직 배양법 또는 기타 유전자 조합에 의해 미생물 배양법 등이 공지되어 있으나, 이들 방법 역시 수율이 낮을 뿐만 아니라 제조과정의 불합리로 가격이 상승되는 등 많은 문제점을 갖고 있다.

이에 본 발명자들은 상기와 같은 문제를 해결하고자 연구 노력한 결과, 유전공학적인 방법에 따라 효모를 발현체로 하여 안전한 인간성장호르몬을 대량 생산하는데 유용하게 사용될 수 있는 인간성장호르몬 발현 벡터를 발명하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 효모에서 인간성장호르몬을 발현시키는데 유용한 인간성장호르몬 발현 벡터를 제공하는데 있다.

이하 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

본 발명은, cDNA 라이브러리(Library)에서 인간성장호르몬의 염기서열을 확인하여 제한효소 Sst I 및 Sal I 부위를 갖는 인간성장호르몬 유전자를 제조한 다음, 이 유전자를 아미노말단 합성유전자와 접합시키고 프로모우터와 터미네이터를 갖는 대장균 운반체에 클로닝시켜서 효모 프로모우터-인간성장호르몬 유전자-종료코돈으로 이루어진 카세트를 제조한 후, 이를 효모 발현운반체에 재클로닝시켜서 된 것임을 특징으로 하는 인간성장호르몬 발현 벡터 pYLBC-A/G-HGH를 제공하는 것이다.

이와 같은 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.

인간성장호르몬 cDNA 라이브러리를 작성하기 위해, 우선 인간성장호르몬을 분비하는 조직세포인 뇌하수체로부터 Chirgwin et al. (Biochemistry, 18, 5294(1979))의 방법으로 poly(A)⁺ RNA를 분리한 후, Okayama, H. & Berg, P. (Mol. Cell Biol. 2 : 161(1982))의 방법으로 이중나선의 cDNA(complementary DNA)를 만든다. 그 다음, 제한효소 EcoR I 부위를 메틸화시키고 EcoR I 링커를 접합시킨 후, 제한효소 EcoR I으로 절단시킨다. 이를 λgt 11에 삽입시켜서, 시험관내에서 패키징(packaging)시킨 다음, 대장균 Y1088(ATCC 37195)에 형질감염(transfection)시키고 증폭시킨다.

이와 같이 하여 작성된 DNA 라이브러리에서 인간성장호르몬 cDNA 클론을 검색하기 위해, 공지되어 있는 인간성장호르몬 아미노말단의 8개 아미노산(Liu W.K. et al., Biochem. Biophys. Acta, 93, 428(1964), Li C.H. et al., J. Amer. Chem. Soc. 88, 2050(1966))을 이용하여 Suggs et al. (PNAS 78 : 6613(1981))의 방법으로 혼합된 합성탐침을 제조한 후 Benton, W. D. & Davis, R. W. (Science 196, 180(1977))의 플러그 혼성화(Plaque hybridization) 방법으로 인간성장호르몬 cDNA 클론을 선별(screening)한다. 선별된 cDNA 클론을 서던블로팅(Southern Blotting : Southern E. M., J. Mol. Biol., 98, 503(1975))으로 확인하며, 생거의 디데옥시방법(Sanger Dideoxy Method : PNAS 74, 5463(1977))으로 염기서열을 확인한다. 확인된 염기서열을 제1도에 나타내었다.

얻어진 인간성장호르몬 cDNA의 앞부분에는 시그널 펩타이드가 포함되어 있으므로 발현을 위해서는 이를 제거시켜야 한다. 따라서, 본 발명자들은 극부돌연변이(Site-directed mutagenesis) 방법을 이용하여 인간성장호르몬의 16,17,18번째 아미노산인 -Arg-Ala-His- 위치에 제한효소 Sst I 인지서열인 5' -GAGTC-3' 를, 또한 종료코돈 뒷부분에는 제한효소 Sal I 인지서열인 5' -GTCGAC-3' 을 삽입시켰다. 즉 상기의 인간성장호르몬 cDNA를 함유하는 람다파아지로부터 EcoR I-Sma I 절편(710bp)을 분리하여 이를 제한효소 EcoR I/Xba I으로 절단시킨 M13mp18(BioRad's MutaGene in vitro

Mutagenesis Kit) (Xba I 부위는 클레노우 절편(Klenow fragment)를 이용하여 블런트엔드(blunt end)로 만들었음)에 삽입시켜서 배양한 후, 얻어진 단일가닥 DNA를 주형(template)으로 하고 상기 제한효소 Sst I 인지서열을 포함하는 프라이머(primer)와 Sal I 인지서열을 포함하는 프라이머를 이용하여 DNA를 합성하여서 인간성장호르몬 유전자내에 제한효소 Sst I 및 Sal I 부위를 삽입한다.

이상과 같은 cDNA 라이브러리 작성 및 인간성장호르몬 유전자내에 제한효소 Sst I, Sal I 부위 삽입 과정을 요약하여 제2도에 도시하였다.

본 발명의 인간성장호르몬 발현 벡터는 발현체로서 효모를 이용하는 바, 상기 제한효소 Sst I 및 Sal I을 갖는 인간성장호르몬 유전자의 제한효소 Sst I 부위 앞부분을 효모에서 통상적으로 이용되는 코돈 위주로 설계하여야 한다. 따라서 본 발명에서는, 시작 코돈인 ATG 부위와 제한효소 Nco I 부위와 상보적이고 그 반대쪽은 제한효소 Sst I 부위와 상보적이 되도록 고안한 Sco I-Sst I 링커(아미노말단 합성유전자)로서 뒷가닥 55mer(5' -C ATG TTC CCA ACT ATT CCA CTC TCG AGA TTG TTC GAC AAC GCT ATG TTG AGA GCT-3' 와 아래가닥 47mer(3' -AAG GGT TGA TAA GGT GAG AGC TCT AAC AAG CTG TTG CGA TAC AAC TC-5')로 구성된 것을 사용한다. 즉, 상기 제한효소 Sst I, Sal I 부위를 갖는 인간성장호르몬 유전자를 함유하고 있는 M13mp18로부터 Sst I-Sal I 절편(530bp)을 분리하여, 이를 상기 Nco I-Sst I 링커와 함께 A/G 프로모우터를 함유하는 대장균 운반체 pBS100(Yeast 2, 72, 1986 또는 Chiron Corp Emeryville, CA 94608 USA, ATCC37179 또는 33875, 미국 Amersham사 벡터 pJDB207 : Catalogue No N338)의 Nco I-Sst I 절단부위에 삽입시킴으로써 효모 프로모우터-인간성장호르몬 유전자-종료코돈 카세트를 함유하는 벡터를 얻을 수 있다.

그 다음 효모 발현 운반체인 pYLBC를 BamH I로 전달시켜 여기에 상기 벡터 인간성장호르몬 유전자를 함유하는 벡터를 삽입시켜서 본 발명이 목적하는 인간성장호르몬 유전자 발현 벡터 pYLBC-A/G-HGH를 제조한다.

이상과 같은 인간성장호르몬 유전자를 함유하는 벡터를 효모 발현 운반체로 크로닝시키는 과정을 요약하여 제3도에 도시하였다.

본 출원인은 본 발명의 인간성장호르몬 발현 벡터 pYLBC-A/G-HGH를 함유하는 미생물 Sacchar-omyces cerevisiae[pYLBC-A/G-HGH]를 한국종균협회에 1988년 12월 27일자 기탁번호 KFCC-10669로 기탁하였

다.

이하 본 발명을 실시예에 의거하여 상세히 설명하면 다음과 같다.

[실시예 1]

[cDNA 라이브러리 작성 및 인간성장호르몬 유전자의 검색]

인간 뇌하수체 2g을 20ml의 조직 구아니딘 용액(4M 구아니딘 이소시아네이트, 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM EDTA, 5% 2-메르캅토에탄올)에 혼합시켜 조직균등기로 균등화(homogenize)시켰다. 이 용액을 12°C에서 10,000rpm으로 10분간 원심분리시켜(Beckman JA-13 rotor 이용), 상층액을 모은 후, 1/10배 부피의 20% 사코실을 첨가하고 65°C에서 2분간 가열하였다. 여기에 CsCl을 0.1g/ml의 농도로 첨가시킨 후, 이를 9ml CsCl 쿠션(5.7M CsCl, 0.1mM EDTA) 위에 놓고 25,000rpm으로 16시간 원심분리시켰다(Beckman SW-28 rotor 이용), 침전된 RNA를 4°C에서 5mM EDTA, 0.5% 사코실, 5% 2-메르캅토에탄올 용액 3ml에 용해시킨 후 페놀/클로로포름/이소아밀알코올(25 : 24 : 1, V/V/V)로 추출하고 클로로포름/이소아밀알코올(24 : 1, V/V)로 재추출한 다음, 3M 소듐아세테이트를 1/10배 부피로 첨가하고 2.5배 부피의 에탄올을 첨가하여 원심분리한 뒤, 침전된 RNA를 증류수에 녹였다. 이와 같이 하여 얻어진 전체 RNA를 70°C에서 10분간 가열하고, LiCl의 최종농도가 0.5M이 되도록 한 후, 올리고-di-셀룰로오스 크로마토그래피(Type 3, Collaborative Research, USA)로 폴리(A)⁺ RNA를 분리하였다(Aviv, H & Leder P., J. Mol. Biol. 134: 743(1972)).

이렇게 하여 얻어진 폴리(A)⁺ RNA 10 μ g을 65°C에서 5분간 처리시켜 준 다음, 즉시 얼음조에 놓고 20 μ l의 5mM dNTPs와 40 μ l의 5 \times PT 완충용액(5 \times 역전사효소 완충용액 : 0.25M Tris-HCl, pH 8.3, 0.5M KCl, 50mM MgCl₂), 10 μ l의 200mM DTT, 20 μ l의 0.5mg/ml 올리고(dT₁₂₋₁₈) (Pharmacia Inc., USA), 80 μ l의 H₂O, 10 μ l(10units)의 RNasin(Promega Biotech, USA)와 20 μ l(20units)의 AMV 역전사효소(Life Science Inc. USA)를 첨가한 후 잘 교반시켜 주어, 42°C에서 90분간 반응시켰다. 여기에 5 μ l의 0.5M EDTA(pH 8.0)와 200 μ l의 완충페놀을 첨가하여 잘 교반시켜 준 후, 상온에서 10분동안 미량 원심분리하여 상층액을 얻고, 반응생성물은 1ml의 디에틸에테르로 2회 추출한 다음, 20 μ l의 3M 소듐아세테이트와 1ml의 95% 에탄올용액에 첨가하여 cDNA를 침전시켰다.

그 다음, 얻어진 단선의 cDNA를 이중나선의 cDNA로 합성하기 위해, 상기 단선의 cDNA 침전물에 284 μ l의 증류수를 넣어 녹인 후, 40 μ l의 5mM dNTPs와 80 μ l의 5 \times SS 완충용액, 12 μ l의 5mM β -NAD⁺, 2 μ l의 3000Ci-mmol [α -³²P]dCTP, 4 μ l(4units)의 RNase H, 4 μ l(20units)의 E. coli DNA 리가아제 및 10 μ l(100units)의 E. coli DNA 폴리머라제 I를 넣고 14°C에서 16시간 반응시켰다. 결과된 반응생성물을 상기와 같은 방법으로 페놀 추출 및 에탄올로 침전시켰다. 얻어진 이중나선 cDNA를 블런트 엔드로 만들기 위해, 상기 이중나선의 cDNA 침전물에 42 μ l의 증류수를 첨가하고, 5 μ l의 5mM dNTPs와 16 μ l의 5 \times TA 완충용액, 1 μ l의 5mM β -NAD⁺, 4 μ l의 RNase A(2 μ g/ml, boiled), 4 μ l(4units)의 RNase H, 4 μ l(20units)의 E. coli DNA 리가아제 및 4 μ l(8units)의 T4 DNA 폴리머라제를 첨가하고 37°C에서 45분간 반응시켰다. 결과된 반응생성물을 상기와 같은 방법으로 페놀 추출 및 에탄올로 침전시켰다.

얻어진 cDNA의 EcoR I 부위를 메틸화시키기 위해, 상기 블런트 엔드를 갖는 이중나선의 cDNA 침전물 25 μ l의 증류수에 녹이고 27 μ l의 2 \times 메틸라제 완충용액(100mM NaCl, 100mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA)과 1 μ l 50 \times SAM(1mg S-아데노실메치오닌을 50 \times SAM 희석 완충용액(0.14mM 소듐아세테이트, pH 5.2)에 녹인 용액) 및 10 μ l(10units)의 EcoR I 메틸라제(Biolabs, USA)를 첨가하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. 결과된 반응생성물을 상기와 같은 방법으로 페놀 추출 및 에탄올로 침전시켰다.

그런 다음, 얻어진 메틸화된 cDNA를 2 μ l의 1 μ g/ml EcoR I 링커(Biolabs, USA)와 800units의 T4 DNA 리가아제(Biolabs, USA)로 4°C에서 하룻동안 반응시켜 cDNA에 링커를 접합시켰다.

EcoR I 링커가 접합된 cDNA를 60units의 EcoR I으로 절단시키고 Sepharose CL-4B 컬럼을 이용하여 잔여 링커를 제거한 다음, EcoR I 링커가 붙은 cDNA의 EcoR I 절편을 λ gt 11의 EcoR I 부위에 클로닝하였다. 이를 시험관내에서 패키징하여 (λ in vitro packaging Kit, Amersham Corp., USA), 대장균 Y1088(ATCC37195)에 형질감염 및 증폭시켰다.

이와 같은 제조된 cDNA 라이브러리에서 인간성장호르몬 유전자를 지닌 람다파아지를 선별하기 위해 프라크 혼성화(plaque hybridization, Benton, W.D. & Davis, W., Science 196, 180(1977)) 방법을 이용하여 실시하였다. 이때 탐침으로는 유전자 합성기(Applied Biosystems Model 380B, USA)로 인간성장호르몬 아미노말단의 8개 펩타이드(N-Phe-Pro-Thr-Ile-Pro-Leu-Ser-Arg)를 기초로 하여 혼합된-시퀀스 올리고뉴클레오티드 탐침 24mer를 합성하였다. 1차로 선별하여 나온 파아지 플라그를 다시 2차, 3차로 선별하여 인간성장호르몬 유전자를 지닌 파아지를 순수하게 선별하였다. 이와 같이 얻어진 파아지를 배양하여 DNA를 추출한 후, EcoR I으로 절단시켜서, 1% 아가로스 겔 전기영동하고, 서던 블로팅(Southern, E., J. Mol. Biol. 98, 503(1975))으로 확인하였으며, 또한 EcoR I 절편을 M13mp18에 클로닝시켜 생거의 디데옥시 방법(PNAS 74, 5463(1977))으로 인간성장호르몬 전체 유전자의 DNA 염기서열을 확인하였다.

[실시예 2]

[인간성장호르몬 유전자내에 Sst I와 Sal I 인지부위 삽입]

상기 실시예 1에서 얻어진 인간성장호르몬 cDNA를 함유하는 람다파아지로부터 EcoR I-Sma I 절편(710bp)을 분리하여, 이를 EcoR I/Xba I으로 절단시킨 M13mp18 대장균 CJ 236(Bio-Rad's Muta-Gene in vitro Mutagenesis Kit)에 삽입시킨 후, 이를 배양하였다. 한편 Sst I 인지서열을 포함하는 프라이머 3' -CGA TCA GAG GCT CGA GTA GCA GAC-5' 및 Sal I 인지서열을 포함하는 프라이머 3' -GAC GGG CCC AGC TGA GGG ACA CTG G-5' 를 DNA 합성기(Applied Biosystems Inc. Model 380B, USA)를 이

용하여 합성한 후 0.1 A260을 취하여 건조시키고, 카이네이즈 반응조건(50mM Tris, pH 8.0, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM ATP, 폴리뉴클레오타이드 카이네이즈 9units) 하에 37°C에서 40분간 반응시켜서 인산화시켰다. 상기 배양하여 얻어진 단일가닥 DNA를 주형으로 하여 어닐링조건(20mM Tris, pH 7.5m, 2mM MgCl₂, 50mM NaCl) 하에서 인산시퀀 프라이머를 총 반응액에 10 μ l가 되게 혼합시킨 후 70°C의 수조에 넣고 1시간 가량 서서히 식혔다. 여기에 T4 폴리머라제 1unit를 첨가하여 반응조건(500 μ M 각각 dNTPs, 1mM ATP, 8mM MgCl₂, 30mM Tris-HCl(pH 7.4), 2mM DTT, 50mM NaCl) 하에 37°C에서 90분간 반응시켰다. 이를 JM101(ATCC33876)에 형질전환시킨 후 생거의 디데옥시방법으로 염기서열을 확인하였다.

[실시예 3]

[효모 발현 운반체로의 클로닝]

인간성장호르몬 유전자의 Sst I의 앞부분을 효모에서 통상적으로 사용되는 코돈으로 설계한 후, 시작코돈은 ATG 부위가 Nco I 부위와 상보적으로 반대쪽은 Sst I 부위와 상보적이 되도록 고안된 윗가닥 55mer(5' -CATG TTC CCA ACT ATT CCA CTC TCG AGA TTG TTC GAC AAC GCT ATG TTG AGA GCT-3' 와 아래가닥 47mer(3' -AAG GGT TGA TAA GGT GAG AGC TCT AAC AAG CTG TTG CGA TAC AAC TC-5')의 Nco I-Sst I 링커를 합성하였다.

본 출원인의 동일자 특허출원 "인간성장호르몬 발현 벡터 pYLBC-GAP-HGH" 명세서의 실시예3에서 얻어진 pGAP-HGH로부터 BamH I을 처리하여 글리세르 알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제의 프로모우터와 인간성장 유도(INDUCIBLE) 프로모우터인 ADH/GAP(A/G) 혼성 프로모우터를 사용하기 위해 pBS100를 Nco I으로 처리한 뒤, 상기 실시예 2에서 얻어진 인간성장호르몬 유전자를 함유하는 M13mp로부터 Sst I-Sal I 절편(530bp)을 분리하여 이를 합성 링커 55mer/47mer와 함께 상기 Nco I/Sal I 절단시킨 pBS100에 접합반응시킨 다음, 대장균 HB101(ATCC33698)에 형질전환시키고, pBS100-HGH를 선별하였다(상기 접합반응참조).

이렇게 하여 얻어진 pA/G-HGH 벡터로부터 효모 프로모우터-인간성장호르몬 유전자-터미네이터 카세트를 함유하는 267bp 절편을 분리하여 이를 BamH I으로 절단시킨 효모 운반체 pYLCB(ATCC27115, 미국 Amersham사, Catalogue No. N338 또는 Yeast Genetic Stock Center, University California, Berkeley, CA, USA)에 삽입시켜서 인간성장호르몬 발현 벡터 pYLCB-A/G-HGH를 제조하였다.

[실시예 4]

[효모에서 인간성장호르몬의 대량 발현 및 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동에 의한 확인]

실시예 3에서 얻어진 인간성장호르몬 발현 벡터 pYLCB-A/G-HGH로 형질전환된 효모 균주를 3ml의 루이신 결핍 배양액(배양액 1 liter당 아미노산을 함유하지 않는 효모 질소영양기 6.7g과 루이신 결핍 영양공급제 0.25g 및 6% 글루코오스를 함유)에서 24시간동안 30°C에서 배양시킨 후, 이를 100ml의 YEPD 배양액(2% 펩톤, 1% 효모 추출물, 2% 글루코오스)에 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였다.

이때 최종 흡광도는 650nm에서 OD 값이 2.5 정도였다. 이 중에서 흡광도가 650nm에서 10에 해당하는 양을 원심분리로 침전시켜, 400 μ l 완충용액(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA, 2mM PMSF, 8M Urea)에 용존시키고 직경 0.4mm의 유리구슬을 같은 부피로 첨가하고 강하게 진탕시켜 세포벽을 파괴하여서 효모추출물을 얻었다. 4 μ l의 효모추출물을 12.5% SDS 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동시키고, 그 결과를 제4도에 나타내었다.

제4도에서, 1레인 및 6레인은 단백질 표준분자량(BioRad사)으로서 위로부터 43000, 29000, 18400, 14300, 6200 및 2300 dalton이며, 2레인은 인간성장호르몬 유전자를 함유하지 않는 효모의 추출물이고, 4레인은 본 실시예에서 얻어진 인간성장호르몬 발현 벡터 pYLCB-A/G-HGH를 함유하는 효모의 추출물이며, 제5레인은 인간성장호르몬의 표준시료이다.

제4도에 나타난 바와 같이, 3레인의 인간성장호르몬 발현 벡터 pYLCB-A/G-HGH를 함유하는 효모의 추출물을 전기영동한 결과, 2레인의 인간성장호르몬 유전자를 함유하지 않는 통상의 효모의 경우와는 달리 인간성장호르몬 표준시료의 위치, 즉 분자량 22,000 dalton에 상응하는 위치에서 진한 밴드를 보이고 있는바, 인간성장호르몬이 발현되었다는 것을 확인할 수 있었다.

이상에서 설명한 바와 같은 본 발명의 인간성장호르몬 발현 벡터 pYLCB-A/G-HGH는 유전공학적인 방법에 따라 인간성장호르몬을 대량 생산하는데 유용하게 사용할 수 있음은 물론, 이렇게 하여 제조된 인간성장호르몬은 바이러스에 감염되는 등의 문제점이 없고, 인간에게 사용하기에 안전한 상태를 얻을 수 있다. 특히, 본 발명의 인간성장호르몬 발현 벡터 pYLCB-A/G-HGH를 이용함으로써 인간성장호르몬을 대량으로 생산할 수 있게 되어짐에 따라 모든 왜소증 환자뿐 아니라 앞으로는 비만증치료, 노화방지, 근육발달, 화상 및 상처의 치료에서 임상실험할 수 있을 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

cDNA 라이브러리에서 인간성장호르몬의 염기서열을 확인하여 제한효소 Sst I 및 Sal I 부위를 갖는 인간성장호르몬 유전자를 제조한 다음, 이 유전자를 아미노말단 합성유전자와 접합시키고 프로모우터와 터미네이터를 갖는 대장균 운반체에 클로닝시켜서 효모 프로모우터-인간성장호르몬 유전자-종료코돈으로 되어진 카세트를 제조한 후, 이를 효모 발현 운반체에 재클로닝시켜서 된 것임을 특징으로 하는 인간성장호르몬 발현 벡터 pYLCB-A/G-HGH.

청구항 2

제1항에 있어서, 인간성장호르몬 유전자는 인간성장호르몬의 16, 17, 18번째인 아미노산 위치에 제한

효소 Sst I 부위를 갖도록 하고 카르복시말단 위치에 제한효소 Sal I 부위를 갖도록 제조된 것임을 특징으로 하는 인간성장호르몬 발현 벡터 pYLBC-A/G-HGH.

청구항 3

제1항에 있어서, 아미노말단 합성유전자는 시작코돈인 ATG 부위가 제한효소 Nco I 부위와 상보적이고 반대쪽이 제한효소 Sst I 부위와 상보적인 것임을 특징으로 하는 인간성장호르몬 발현 벡터 pYLBC-A/G-HGH.

청구항 4

제1항 또는 제3항에 있어서, 아미노말단 합성유전자는 55mer(5' -CATG TTC CCA ACT ATT CCA CTC TCG AGA TTG TTC GAC AAC GCT ATG TTG AGA GCT-3' 와 아래가닥 47mer(3' -AAG GGT TGA TAA GGT GAG AGC TCT AAC AAG CTG TTG CGA TAC AAC TC-5')로 구성된 것임을 특징으로 하는 인간성장호르몬 발현 벡터 pYLBC-A/G-HGH.

도면

도면1

```

10      20      30      40      50      60
GGATCCCAAGGCCCACTCCCGAACCCTCAGGGTCCCTGTGGACGCTCACCTAGCTGCA

70      80      90      100     110     120
ATGGCTACAGGCTCCCGACGTCCTCTCCTGGCTTTTGGCCCTCTGCTGCTGCCCTCG
MetAlaThrGlySerArgThrSerLeuLeuLeuAlaPheGlyLeuLeuCysLeuProTrp

130     140     150     160     170     180
CTTCAAGAGGGCCAGTCCCTTCCCAACCATTCCTTATCCAGGCTTTTGGACACGCTATG
LeuGlnGluGlySerAlaPheProThrIleProLeuSerArgLeuPheAspAlaMet

190     200     210     220     230     240
CTCCCGCCCATCGCTGCAACCACCTCCCTTTCACACTACCCAGGATTTGAAGAAGCC
LeuArgAlaHisArgLeuHisGlnLeuAlaPheAspThrTyrGlnGluPheGluGluAla

250     260     270     280     290     300
TATATCCAAAGCAACAGAGTATTCACTCCTGCAGAACCCCAACCTCCCTCTCTTTC
TyrIleProLysGluGlnLysTyrSerPheLeuGlnAsnProGlnThrSerLeuCysPhe

310     320     330     340     350     360
TCAGAGTCTATTCCGACACCCCTCCAAACGGGAGGAAACACACAGAAATCCAACTAGAG
SerGluSerIleProThrProSerLeuArgGluGluThrGlnGlnLysSerAsnLeuGlu

370     380     390     400     410     420
CTGCTCCGCATCTCCCTGCTCTCATCCACTCCTGCTGGAGCCCGTGCAGTTCTCTCAGG
LeuLeuArgIleSerLeuLeuLeuIleGlnSerTrpLeuGluProValGlnPheLeuArg

430     440     450     460     470     480
AGTGTCTTCGCCAACAGCCCTGCTACGGGGCCCTCTGACAGCAACGTCTATGACCTCCTA
SerValPheAlaAsnSerLeuValTyrGlyAlaSerAspSerAsnValTyrAspLeuLeu

490     500     510     520     530     540
AAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGATGGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCCGG
LysAspLeuGluGluGlyIleGlnThrLeuMetGlyArgLeuGluAspGlySerProArg

550     560     570     580     590     600
ACTGGGCATCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACAACTCACAAACGATGAC
ThrGlyGlnIlePheLysGlnThrTyrSerLysPheAspThrAsnSerHisAsnAspAsp

610     620     630     640     650     660
GCCTACTCAAGAACTACGGCTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGSAACAAGTTCGAG
AlaLeuLeuLysAsnTyrGlyLeuLeuTyrCysPheArgLysAspMetAspLysValGlu

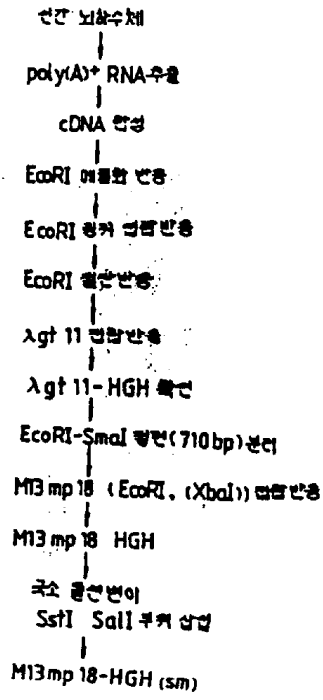
670     680     690     700     710     720
ACATTCCTGGGCATCGTGCAGTGGCTCTCTGTGGAGGGCAGCTGCTGCTTCTAGCTGCC
ThrPheLeuArgIleValGlnCysArgSerValGluGlySerTyrGlyPheEnd

730     740     750     760     770     780
GGCTGGCATCCCTGTCAACCCCTCCCAAGTCCCTCTCTCTGGCCTTGGAGTTCACCTCCA

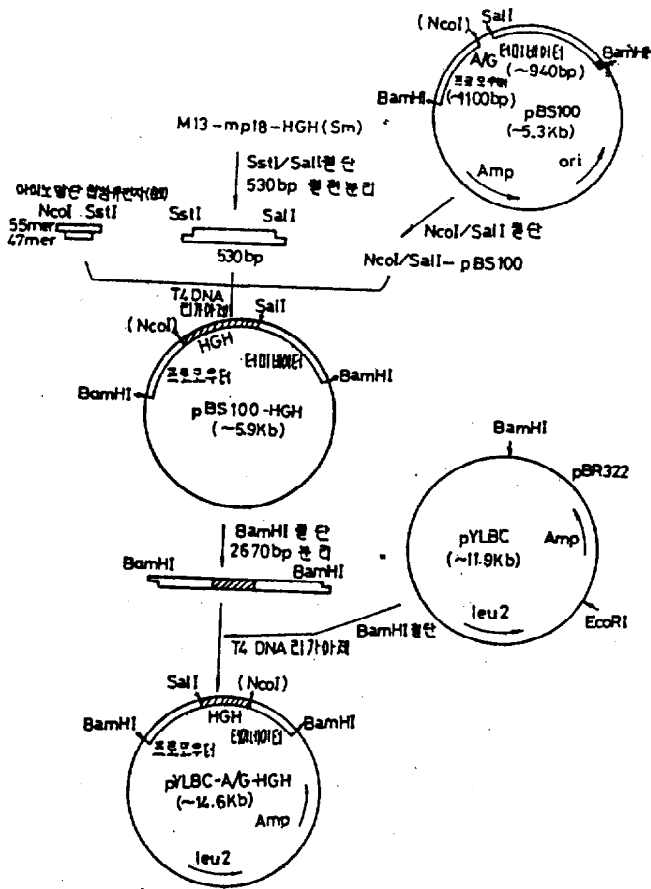
790     800     810     820
GTGCCCAACAGCCCTGTCTTAATAAAATTAAGTTGCATCA

```

도면2



도면3



도면4

