

RGD모티브와 사람I형콜라겐유전자를 융합시킨 재조합플라스미드의 제조

박정성, 김영호

경애하는 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《보건실천에서 절박하게 요구되는 새로운 의학과과학기술분야를 개척하고 고려의학을 과학화하며 최신의학과과학기술을 적극 받아들여야 합니다.》

사람I형콜라겐은 피부, 뼈, 연골, 힘줄을 비롯한 결합조직의 세포외기질(ECM: extracellular matrix)의 기본성분으로서 재생의학분야에서 여러가지 인공장기제조와 조직재생을 위한 천연재료로 널리 이용되고있다.[1, 2, 9]

또한 세가지 아미노산(R: 아르기닌, G: 글리신, D: 아스파라긴산)으로 이루어진 RGD 모티브는 수많은 ECM단백질들이 세포표면의 인테그린을 인식하게 하는 기본세포접착 기능단[7]으로 알려져있다. 때문에 이 RGD모티브는 여러가지 생체재료들의 세포접착성을 높이기 위한 표면수식에 많이 이용되고있다.[3-6, 8]

논문에서는 생물공학적인방법으로 세포접착성이 보다 높은 재조합사람I형콜라겐을 제조하기 위하여 대장균에서 RGD모티브와 사람I형콜라겐의 융합유전자를 발현시키는 재조합 플라스미드(pET30c-RGD-hCOL)를 만든 결과에 대하여 논의하였다.

재료와 방법

재료 PCR주형으로는 사람I형콜라겐 $\alpha 1$ 유전자단편(크기 1 233bp)을 클론화한 재조합 플라스미드 pET30c-hCOL1A1을, 운반체로는 원핵생물발현운반체인 pET30c(+), 숙주균으로는 *E. coli* Top10과 *E. coli* BL21(DE3)을 이용하였다.

시약 PCR반응키트(《TaKaRa》), DNA회수키트(《TianGen》), DNA표식자(《Fermentas》), T4 DNA리가제와 제한효소 *Sal* I과 *Not* I(《BioLabs》), 호모엑스(《OXOID》), 펩톤(《OXOID》), NaCl, IPTG(이소프로필- β -D-티오갈락토시드) 등을 이용하였다.

프라이머는 GenBank자료기지에서 탐색한 hCOL1A1유전자(GeneID: 1277, 등록번호: JQ236861.1)배열에 준하여 프라이머설계전용프로그램 DNAMAN을 이용하여 설계하였다.(표) hCOL1A1유전자중복배열과 함께 5'프라이머에는 제한효소 *Sal* I의 인식배열과 RGD를 포함한 TGRGDSPA펩티드의 암호배열을 덧붙였고 3'프라이머에는 종결코돈과 제한효소 *Not* I의 인식배열을 더 포함시켰다.

표. RGD모티브와 사람I형콜라겐유전자융합을 위한 프라이머배열

프라이머 종류	염기배열	길이 /bp
5'프라이머	<u>GGTTCGACA</u> ACTGGCCGTGGAGACAGCCCCGAGGTTTCAGTGGTTTGGATGG <i>Sal</i> I	52
3'프라이머	AGCGGCCGCCTATCTCTCGCCTCTTGCTCCA <i>Not</i> I	31

방법 PCR는 50 μ L반응계로 예비변성 94 $^{\circ}$ C에서 5min→변성 94 $^{\circ}$ C에서 30s, 아닐링 58 $^{\circ}$ C에서 45s, 연장 72 $^{\circ}$ C에서 2min, 순환 30회→최종연장 72 $^{\circ}$ C에서 10min으로 진행하였다. PCR 산물을 1.2% 아가로스겔로 전기영동하여 DNA분리키트로 회수하였다.

제한효소(*Sal* I과 *Not* I)절단반응과 T4 DNA리가제반응, 형질전환, 플라스미드분리, DNA 단편회수 및 IPTG에 의한 재조합단백질의 유도발현과 SDS-폴아겔전기영동은 선행방법[9]대로 진행하였다. 염기배열분석은 전문유전자배열분석기관에 의뢰하여 진행하였으며 분석 결과는 NCBI자료기지에서 상동성검색프로그램인 BLAST를 리용하여 비교해석하였다.

결과 및 논의

1) 재조합플라스미드(pET30c-RGD-hCOL)의 제조

재조합플라스미드 pET30c-hCOL1A1을 주형으로 PCR를 진행하고 증폭산물을 1.2% 아가로스겔에서 전기영동하였다.(그림 1)

PCR증폭결과 사람I형콜라겐 α 1유전자단편(크기 1 233bp)의 5'말단에 제한효소 *Sal* I 인식배열과 RGD모티브암호배열(ACTGGC CGTGGAGACAGCCCCGCA)이, 3'말단에 종결코돈과 제한효소 *Not* I 인식배열이 덧붙게 되므로 그 크기는 1 260bp여야 한다.

그림 1에서 보는바와 같이 RGD모티브와 사람I형콜라겐 유전자가 융합된 DNA띠가 1 200bp정도 되는 위치에 나타났다.

PCR증폭한 RGD-hCOL유전자와 원핵발현운반체인 pET30c(+)를 *Sal* I과 *Not* I로 절단한 다음 T4 DNA리가제로 반응시키고 클론화용숙주균(*E. coli* Top10)에 형질전환시켜 카나미친 (50 μ g/mL)을 첨가한 LB배지에서 배양하여 4개의 단독균무지들을 선발하였다.

선발한 균무지들에서 플라스미드를 분리한 다음 두종의 제한효소 *Sal* I과 *Not* I에 의한 제한분해검정과 PCR검정을

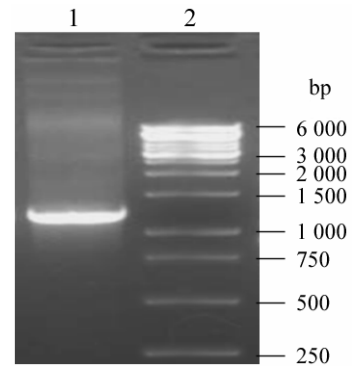


그림 1. PCR증폭산물에 대한 1.2% 아가로스겔전기영동상
1-PCR증폭산물, 2-1kb DNA 분자크기표식자

진행하였다.(그림 2)

그림 2에서 보는바와 같이 1, 3번 균무지들에서 크기가 1 260bp로 보이는 제한분해 단편이 정확히 나타났다. 2개의 균무지들에 대한 PCR검정에서도 융합유전자의 증폭 산물이 예상된 위치에 명백하게 나타났다.

T7프로모터 프라이머를 리용하여 이 재조합플라스미드에 대한 염기배열분석을 진행한 결과 RGD모티브와 사람I형콜라겐 유전자가 결합된 RGD-hCOL유전자가 pET30c(+)의 두 제한효소 *Sal* I과 *Not* I절단점사이에 정확히 삽입되었다는것을 확인하였다. 또한 BLAST검색결과 사람I형콜라겐유전자도 NCBI자료기지의 GenBank에 등록되어있는 hCOL1A1유전자(등록번호 NM 000088.3)배열과 일치하였다.

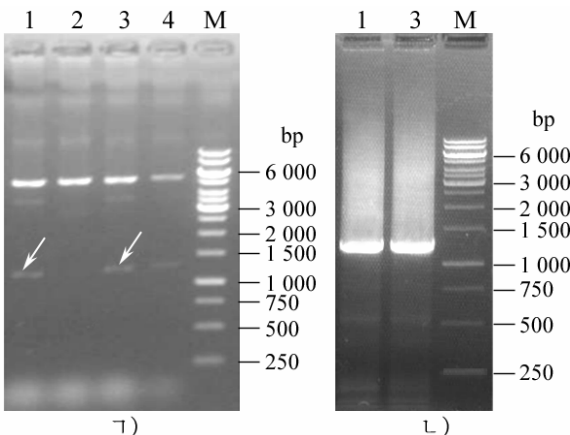


그림 2. 선발된 균무지들에 대한 제한분해(㉠) 및 PCR검정(㉡)결과
1-4는 선발된 양성균무지들, M은 1kb DNA분자크기표식자

2) 재조합플라스미드 pET30c-RGD-hCOL에서 단백질의 유도발현

새로 만든 재조합플라스미드 pET30c-RGD-hCOL의 유전자지도는 그림 3과 같다.

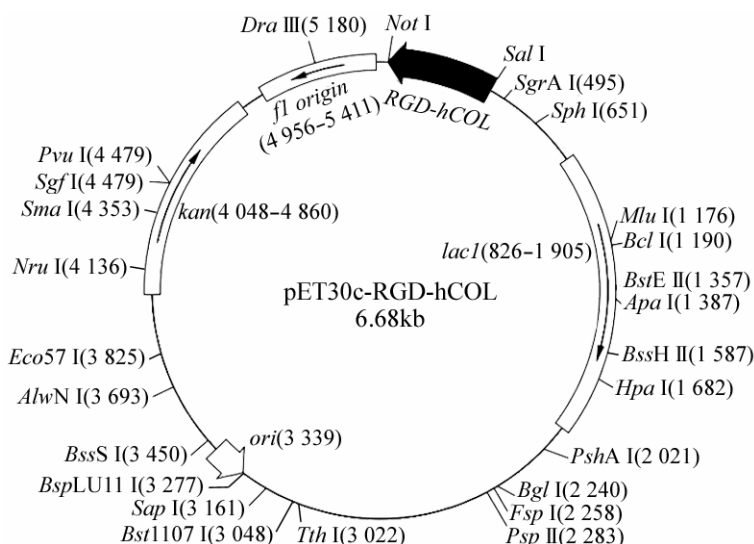


그림 3. 재조합플라스미드 pET30c-RGD-hCOL의 유전자지도

재조합플라스미드 pET30c-RGD-hCOL에서 T7 RNA폴리메라제에 의하여 전사되는 유전자 배열의 크기는 운반체 pET30c(+)안의 고유배열(171bp)과 RGD-hCOL배열(1260bp)이 합하여 도합 1431bp이다. 이 번역 단백질은 총 476개의 아미노산으로 이루어졌으며 크기는 43.3KD(6×His로 시작하는 운반체의 고유번역배열 6.30KD과 RGD-hCOL 37KD)로 예견된다.

재조합플라스미드 pET30c-RGD-hCOL를 대장균 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환하여 재조합대장균그루 *E. coli* BL21(DE3)/pET30c-RGD-hCOL를 만들었다. 다음 재조합균 그루를 1.0mmol/L의 IPTG를 첨가한 LB배지에서 37°C, 220r/min을 보장하면서 4h동안 유도배양하고 8% SDS-폴아겔 전기영동으로 확인하였다.(그림 4)

그림 4에서 보는것처럼 분자량이 43KD로 예견되는 목적 단백질띠가 40~50KD사이에서 IPTG로 유도한 시험구에서 정확히 나타났다. 이것은 새로 만든 재조합플라스미드 pET30c-RGD-hCOL에서 RGD모티브와 사람I형콜라겐유전자가 융합된 RGD-hCOL유전자가 정확히 발현된다는것을 보여준다.

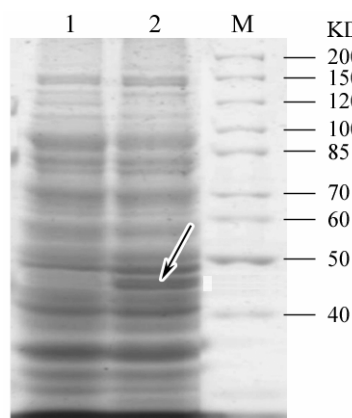


그림 4. 재조합대장균발현산물에 대한 8% SDS-PAGE상
1-대조, 2-IPTG 1.0mmol/L,
M은 단백질분자량표식자

맺 는 말

1) PCR증폭으로 얻어낸 RGD-hCOL융합유전자를 원핵발현운반체 pET30c(+)에 삽입하여 재조합플라스미드 pET30c-RGD-hCOL을 만들었다.

2) 재조합대장균 *E. coli* BL21(DE3)/pET30c-RGD-hCOL에서 크기가 약 43KD인 재조합 단백질이 1.0mmol/L의 IPTG에 의하여 정확히 발현된다.

참 고 문 헌

- [1] Florence Ruggiero et al.; Science Direct Methods, 45, 75, 2008.
- [2] Yoshihiro Ishikawa et al.; Biochemica et Biophysica Acta, 1833, 2479, 2013.
- [3] Imen Elloumi et al.; Biomaterials, 27, 3451, 2006.
- [4] Jing Qin et al.; Chem. Pharm. Bull., 55, 8, 1192, 2007.
- [5] Poornima Kolhar et al.; Journal of Biotechnology, 146, 143, 2010.
- [6] Chao Deng et al.; Elsevier Polymer, 48, 139, 2007.
- [7] Markus Nieberler et al.; Cancers, 9, 116, 2017.
- [8] Nick Huettner et al.; Trends in Biotechnology, 1605, 1–12, 2018.
- [9] 胡堃 等; 中国生物工程杂志, 27, 8, 1, 2007.

주제 110(2021)년 4월 5일 원고접수

Construction of the Recombinant Plasmid Blended RGD Motif and Human Collagen Type I Gene

Pak Jong Song, Kim Yong Ho

In the present study, the recombinant plasmid(pET30c-RGD-hCOL) encoded RGD-hCOL fusion gene was constructed and transformed into host strain, *E. coli* BL21(DE3). The recombinant fusion protein(RGD-hCOL, molecular weight 43KD) production was induced by the addition of 1.0mmol/L IPTG and verified by the 8% SDS-PAGE.

Keywords: RGD, cell adhesive, recombinant human-derived collagen