

재조합사람프로인슐린의 재구조화에 미치는 인자들의 영향

정성일, 고송미, 강귀남, 림고근

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《현시기 질병과의 투쟁에서 중요한것은 심장혈관계통질병, 암성질병, 물질대사질병을 비롯하여 병걸린률과 노동능력상실률이 높은 질병을 미리막기 위한 대책을 바로세우는것입니다.》(《김정일선집》 증보판 제11권 72페이지)

인슐린은 췌장의 랑게르한스섬의 β -세포에 의하여 생성되는 폴리펩티드성 호르몬으로서 피속의 혈당을 낮추는 당뇨병치료약으로 광범히 리용[1-3]되고있다.

우리는 림상실천에서 광범히 요구되는 사람인슐린의 생물공학적생산에서 중요한 공정인 프로인슐린의 재구조화조건을 밝히기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

재조합사람프로인슐린생성균 *E. coli* BL21(DE3)(pET-hIN)의 배양균체에서 분리한 붕입체단백질을 출발재료로 리용하였다.

붕입체를 7~8mol/L 뇨소와 1mmol/L EDTA가 포함되어있는 20mmol/L 트리스-염산완충액(pH 8.0)으로 가용화한 다음 50mmol/L 글리신완충액(pH 10.5)에 희석하여 4℃에서 일정한 시간동안 교반하는 방법으로 프로인슐린의 재구조화를 진행하였다. 재구조화에 미치는 반응시간의 영향, 단백질농도, 환원제인 β -메르캅토에타놀의 농도, 뇨소농도의 영향을 재구조화산물에 대한 RP-HPLC분석으로 평가하였다.

결과 및 고찰

붕입체가용화용액을 50mmol/L 글리신완충액(pH 10.5)에 단백질농도가 0.05~1.00 mg/mL 되게 희석한 다음 메르캅토에타놀과 뇨소를 적당량 첨가하고 4℃에서 24h 교반하면서 4h마다 반응액을 취하여 선행방법[2]으로 RP-HPLC 분석을 진행하였으며 용출봉우리의 변화상태를 관찰하는 방법으로 재구조화상태를 평가하였다.(그림 1, 표 1)

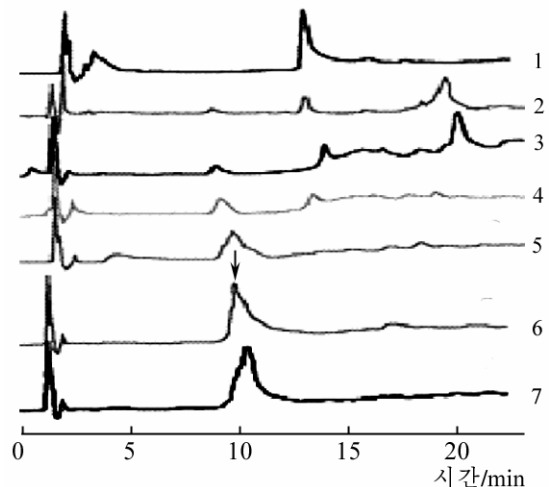


그림 1. 재구조화반응시간에 따르는
반응산물의 RP-HPLC분석상

1-7은 각각 재구조화반응시간 0, 4, 8, 12,
16, 20, 24h에 해당하는 분석상

표 1. 재구조화률에 미치는 재구조화 반응시간의 영향

반응시간/h	용출시간/min	붕우리면적/%
0	—	—
4	10.3	1.121 1
8	10.3	15.309 9
12	10.3	38.353 9
16	10.3	55.547 8
20	10.3	74.994 7
24	10.3	74.335 4

그림 1과 표 1을 통하여 알수 있는바와 같이 시료1(반응전시료)에서는 용출시간 약 10.3min에 용출붕우리가 없지만 시료2(반응 4h시료)부터 약간한 붕우리가 출현하고 반응 시간이 길어짐에 따라 붕우리면적이 증가하였다. 반응 20h이상에서는 약 74%수준에서 큰 변화가 없다는것을 알수 있다. 총시료용출붕우리면적에 대한 목적붕우리면적이 차지하는 비율을 상대적인 재구조화률로 보고 우와 같은 방법으로 재구조화률에 미치는 단백질농도와 뇨소농도, 메르캅토에타놀농도의 영향을 평가하였다.(표 2—4)

표 2. 재구조화률에 미치는 단백질농도의 영향

단백질농도 (mg·mL ⁻¹)	재구조화률 /%
0.05	82.21
0.10	73.53
0.50	61.39
1.00	32.92

표 3. 재구조화률에 미치는 뇨소농도의 영향

뇨소농도 (mol·L ⁻¹)	재구조화률 /%
0.5	68.36
1.0	74.25
1.5	56.32
2.0	37.68

표 4. 재구조화률에 미치는 β-메르캅토에타놀농도의 영향

β-메르캅토에타놀의 농도/(mmol·L ⁻¹)	재구조화률 /%
0.1	45.16
0.5	54.30
1.0	71.43
1.5	62.52

표 2—4에서 보는바와 같이 재구조화률은 단백질농도 0.1mg/mL, 뇨소농도 1mol/L, 메르캅토에타놀농도 1mmol/L일 때 70%이상으로서 높았다.

선행방법 [3]에 준하여 재구조화반응과정에 형성된 잘못 재구조화된 프로인슐린이성체를 제거하기 위하여 재구조화반응액의 pH를 프로인슐린의 등전점보다 약간 낮은 6.5로 조절하고 이때 생긴 침전물을 원심분리방법으로 제거하였다. 다음 재구조화용액의 pH를 2~3으로 조절하고 20% NaCl을 첨가하여 염석시키는 방법으로 단백질을 회수하고 12% Native-PAGE 분석하였다.(그림 2)

그림 2에서 보는바와 같이 붕입체가용화시료로부터 재구조화반응을 거쳐 순도가 높은 프로인슐린이 얻어졌다.

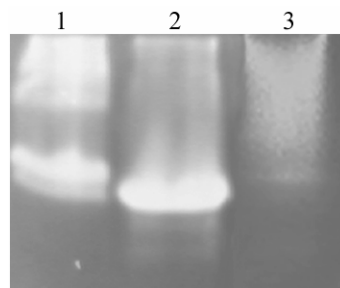


그림 2. 재구조화반응산물의 Native-PAGE상

1—붕입체가용화시료, 2—재구조화된 프로인슐린, 3—잘못 재구조화된 프로인슐린

맺 는 말

제조합사람프로인슐린붕입체단백질의 재구조화는 반응시간 20h, 단백질농도 0.1mg/mL, 뇨소농도 1mol/L, β-메르캅토에타놀농도 1mmol/L일 때 효과적으로 진행되었으며 이때 재구조화률은 70%이상이었다.

참 고 문 헌

- [1] R. Tantipolphan et al.; Pharm. Biomed. Anal., 52, 2, 195, 2010.
- [2] Jeannette Winter et al.; Analytical Biochemistry, 148, 310, 2002.
- [3] Jie Yuan et al.; Biomed. Chromatogr, 29, 5, 777, 2015.

주제 107(2018)년 10월 5일 원고접수

Effect of Factors on the Refolding of Recombinant Human Proinsulin

Jong Song Il, Ko Song Mi, Kang Kwi Nam and Rim Ko Gun

We researched the effect of the factors on the refolding of recombinant human proinsulin by RT-HPLC, and concluded the refolding time, concentrations of protein, urea and β -mercaptoethanol for the highest refolding yield.

Key words: proinsulin, refolding, RT-HPLC