

사람글루카곤양펩티드-1(GLP-1)유전자를 발현하는 대장균그루를 제작하기 위한 연구

리진철, 강영수, 장명철, 김봉혁

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《첨단과학기술분야에서 세계적경쟁력을 가진 기술들을 개발하기 위한 투쟁을 힘있게 벌려야 합니다.》

당뇨병은 암, 심장혈관질환과 함께 3대 비전염성질환으로 되고있으며 세계적으로 환자 수는 2억명이상에 달하고있다. 당뇨병은 장기적인 치료를 동반하는 난치성질환이며 그중 90% 이상은 II형당뇨병(인슐린에 의존하지 않는 당뇨병)이다. 이로부터 우리는 II형당뇨병의 치료에서 세계적으로 가장 주목되고있는 글루카곤양펩티드-1(GLP-1)[1]을 개발하는데서 첫 단계인 유전자발현균그루를 만들기 위한 연구를 하였다.

재료 및 방법

균그루 클론화균그루 *E. coli* DH5 α (supE44, Δ lacU169(Φ 80lacZ Δ M15), HsdR17, recA1, gyrA96, thi-1, relA1)와 발현균그루 *E. coli* BL21(DE3)(F⁻, ompT, hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻), dcm, gal(DE3))를 썼다.

운반체[2] 클론화운반체 pUC57(2 710bp)와 발현운반체 pET24b(+)(5 309bp)를 리용하였다.

효소 및 시약 효소로는 제한효소 *Nde* I, *Xho* I(《Promega》)을, T4DNA리가제, *Taq*DNA폴리메라제를 썼으며 PCR키트, 분자크기표식자 DL 2000(《TaKaRa》), DNA 100bp Ladder(《MBI Fermentas》), λ DNA/*Eco*14TI digest(《Sangon》), DMSO, PEG 3350(《Sangon》), 페놀, 클로로포름, NaOH, EtBr, 아가로스 등과 같은 시약들을 리용하였다.

대장균배양배지[3] LB배지(펩톤 1%, 효모엑스 0.5%, 소금 0.5%, 포도당 1%, pH 7.0), 무기염배지(R/2배지: KH₂PO₄ 6.75g, (NH₄)₂HPO₄ 2g, 레몬산 0.85g, 포도당 10g, MgSO₄·7H₂O 0.75g, 미량원소액 1mL, pH 7.0), 첨가배지(100mL당 포도당 40g, MgSO₄·7H₂O 2g, 효모엑스 2g, 카자미노산 1g, pH 7.0)를 리용하였다.

미량원소액의 조성은 다음과 같다.

1L당 FeSO₄·7H₂O 40mg, CaCl₂·2H₂O 40mg, ZnSO₄·7H₂O 2mg, Na₂MoO₄·2H₂O 2mg, MnSO₄·H₂O 10mg, AlCl₃·6H₂O 10mg, CuCl₂·2H₂O 1mg, CoCl₂·6H₂O 4mg, H₃BO₃ 0.5mg

방법 플라스미드DNA분리, 제한효소반응, 리가제반응, 감수대세포의 제조, 형질전환체의 선별, 아가로스겔전기영동, 대장균의 형질전환 등 DNA조작과 관련한 모든 실험은 선행방법[2, 3]에 준하여 진행하였다.

재조합대장균의 배양과 유전자발현검토는 선행방법[1]에 준하여 진행하였다.

결과 및 고찰

1) 주형DNA배열과 프라이머의 합성

설계한 DNA배열(357bp)은 다음과 같다.

ATACATATGCGCCACGGTGAAGGTACCTTCACCAGCGACGTTAGCAGCTACCTGGAAGAACAGGCTG
CTCAGGAATTCATCGCTTGGCTGGTTAAACATGGCGAGGGCACTTTTACTTCTGATGTATCGTCGTA
TCTTGAGGAGCAAGCAGCACAAAGAGTTTATTGCATGGCTCGTAAAGCACGGGGAAGGGACGTTACAG
AGTGACGTGAGTAGTTACTTGGGAAGAACAGGCGGCGCAGGAATTCATAGCGTGGTTGGTGAAACATG
GAGAGGGAACATTTACATCAGATGTCTCATCATATTTAGAGGAGCAAGCCGCCCAAGAGTTTATCGC
CTGGTTAGTCAAGCTCGAGCGC

밑줄친 부분과 점선친 부분은 각각 1개의 GLP-1펩티드를 암호화한다.

우리는 DNA배열의 설계에서 저분자펩티드의 발현을 높이기 위해 4량체의 융합단백질로 설계하였으며 전사단계의 호상간섭(머리핀구조의 형성 등)을 피하기 위하여 매 반복배열에서 비반복적인 코돈들을 대응시켰다. 또한 발현된 융합단백질에서 개별적인 GLP-1펩티드를 효소분해방법으로 얻기 위하여 매 반복배열의 말단에 효소(트립신)의 절단위치에 해당하는 아미노산(Lys 또는 Arg)을 배치하고 배열내부의 효소절단점들을 다른 아미노산의 코돈들로 치환시켰다. 다음으로 이 DNA배열을 플라스미드 pET24b의 *Nde* I, *Xho* I 위치에 삽입하기 위한 제한효소인식부위들을 5', 3'말단에 각각 달아주었다.

주형DNA배열을 증폭하기 위한 프라이머는 다음과 같이 설계하였다.

상류: ATACATATGCGCCACGGTG 누클레오티드개수 19, T_m 51.7°C

하류: GCGCTCGAGCTTGACTAAC 누클레오티드개수 19, T_m 50.2°C

2) 재조합발현운반체의 제작

먼저 클론화운반체 pUC57-GLP1로부터 GLP-1유전자단편을 증폭하기 위하여 위에서 설계한 프라이머를 가지고 PCR증폭을 진행하였다.(그림 1)

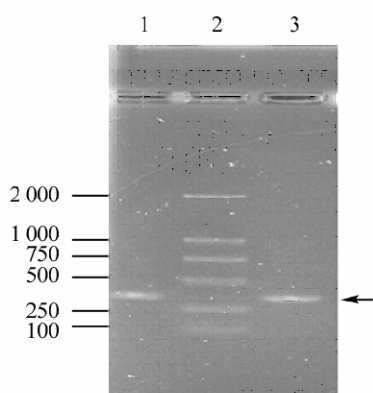


그림 1. GLP-1 4량체유전자의 PCR 증폭 산물을 확인하기 위한 1% 아가로스겔전기영동상

1, 3은 PCR산물, 2-분자크기표식자(DL2000)

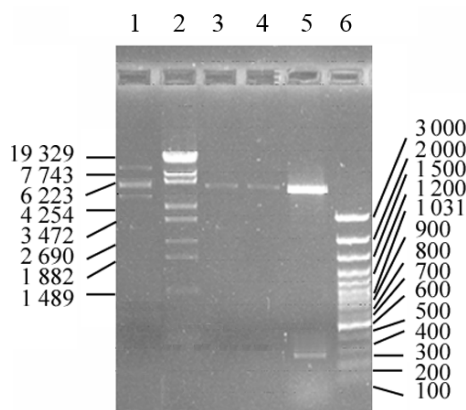


그림 2. GLP-1 4량체발현운반체에 대한 각이한 제한효소분해산물의 1% 아가로스겔전기영동상
1-pET24b-GLP1, 2-분자크기표식자(λ DNA/*Eco*14TI),
3-pET24b-GLP1/*Nde* I, 4-pET24b-GLP1/*Xho* I, 5-pET24b-GLP1/(*Nde* I + *Xho* I), 6-분자크기표식자(DNA 100bp Ladder)

그림 1에서 보는바와 같이 GLP-1 4량체의 PCR증폭산물의 분자량은 예상분자량(357bp)과 일치하였다.

다음으로 증폭된 PCR단편과 발현운반체 pET24b(+)를 각각 제한효소 *Nde* I과 *Xho* I로 동시절단하고 리가제반응으로 연결시켜 재조합운반체를 얻은 다음 그 정확성을 확인하였다.(그림 2)

그림 2에서 보는바와 같이 GLP-1 4량체 발현운반체 pET24b-GLP1을 제한효소 *Nde* I과 *Xho* I로 각각 분해시켰을 때 예상크기(5 666bp)와 일치한 1개의 단편으로, *Nde* I, *Xho* I로 동시절단하였을 때 pET24b운반체(5 309bp)와 목적하는 GLP-1 4량체유전자단편(357bp)이 얻어졌다. 이것은 재조합발현운반체가 정확히 조립되었다는것을 보여준다.

3) GLP-1 4량체의 발현검토

재조합발현운반체 pET24b-GLP1을 *E.coli* BL21(DE)에 형질전환시키고 카나미친저항성(Km^r)을 표식자로 하여 형질전환체를 선발한 다음 GLP-1 4량체유전자의 발현을 검토하였다.(그림 3)

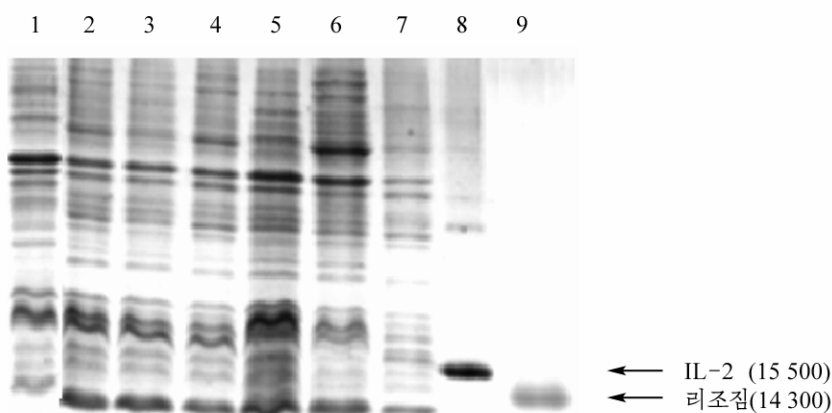


그림 3. GLP-1 4량체의 발현유무를 검토하기 위한 18% SDS-PAGE상

1-비유도, 2-5는 IPTG유도균체(15~27%), 6-초음파상청액,

7-초음파침전, 8-대조(IL-2), 9-대조(리조짐)

그림 3에서 보는바와 같이 IPTG로 유도할 때 비유도에는 없는 GLP-1 4량체단백질이 얻어졌으며 분자량은 예상분자량(13 800)과 일치하였다. 그리고 GLP-1 4량체단백질은 대장균 세포질속에서 가용성과 봉입체의 형태로 다 발현되었다. 또한 균그루별로 GLP-1 4량체의 발현수준은 각이하며 최고발현수준은 27%였다.

맺 는 말

1) GLP-1 4량체유전자의 크기는 357bp이며 pET24b(+)의 *Nde* I, *Xho* I위치에 정확히 재조합되었다.

2) 재조합대장균그루 *E. coli* BL21(DE3)(pET24b-GLP1)에서 GLP-1 4량체단백질은 봉입체와 가용성으로 다같이 발현되며 최고발현수준은 27%였다.

참 고 문 헌

- [1] L. Patricia; Endocrinology, 151, 1984, 2010.
- [2] Liz Chandler et al.; Journal of Diabetes, 19, 1, 32, 2015.
- [3] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning 1: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 13~108, 1989.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Construction of Recombinant *E. coli* Strain Expressing Human Glucagon Like Peptide-1(GLP-1) Gene

Ri Jin Chol, Kang Yong Su, Jang Myong Chol and Kim Pong Hyok

We designed and synthesized human glucagon likepeptide-1(GLP-1) gene and constructed recombinant *E. coli* BL21(DE3)(pET24b-GLP1).

GLP-1gene was expressed simultaneously in forms of inclusion body and soluble fraction in *E. coli* and the expression level was about 27%.

Key words: human glucagon like peptide-1, diabetes, gene expression, soluble fraction, inclusion body