

재조합사람상피성장인자의 발현에 미치는 IPTG와 배양온도의 영향

김영호, 어동주, 김순의

사람상피성장인자(human Epidermal Growth Factor: hEGF)는 피부와 폐 등의 상피조직을 이루는 세포의 성장과 분화를 촉진하며 위산분비를 억제하는것으로 하여 화상과 창상, 욕창, 위 및 십이지장궤양, 피저, 방사선피부염의 치료뿐만아니라 화장품제조, 정형수술 등에 광범히 응용되고있다.[1, 2, 4]

우리는 상피성장인자를 발현하는 재조합대장균에서 hEGF발현에 미치는 IPTG농도와 배양온도의 영향을 보았다.

재료와 방법

균주로는 hEGF유전자를 삽입한 재조합플라즈미드(pET30c-hEGF)를 형질전환시킨 대장균(*E. coli* BL21(DE3)/pET30c-hEGF)을 리용하였다.

시약으로는 트립톤(《OXOID》), 효모추출물(《OXOID》), 이소프로필-D-티오갈락토시드(IPTG), 카나미친, 트리스(《Amresco》), 쿠마시청(Coomassie Blue R250), 단백질분자량표식자(《Thermo Scientific》) 등을 리용하였다.

종균배지로는 카나미친을 100 μ g/mL로 넣은 LB배지(트립톤 10g/L, NaCl 10g/L, 효모추출물 5g/L)를, 유도배지로는 카나미친을 25 μ g/mL로, IPTG를 0.05~2.0mmol/L로 넣은 LB배지를 리용하였다.[3] 종균배양은 37 $^{\circ}$ C에서 12~14h동안 진탕배양(220r/min)하였고 유도배양은 유도배지에서 OD₆₀₀값이 0.5~0.7로 될 때까지 2~3h동안 예비배양한 다음 IPTG를 더 첨가하고 각이한 온도에서 진탕배양(220r/min)하였다.

유도배양한 균배양액을 2min동안 원심분리(5 000r/min)하여 균집하고 초음파처리(20W로 10s 처리, 10s 중지, 2min 처리)한 다음 균체총단백질과 원심분리(8 000r/min에서 5min)상청액, 침전물의 hEGF에 대한 영동분석시료를 만들었다.[6] 15% SDS-폴아겔전기영동을 진행하고 0.1% 쿠마시청으로 염색하여 hEGF발현정도를 평가하였다.[4, 5]

영동결과를 Gel-PRO Analyzer프로그램으로 분석하여 hEGF의 상대함량(총단백질량에 대한 목적단백질량의 백분율)을 결정하였다.

결과 및 논의

1) hEGF발현에 미치는 IPTG농도의 영향

pET계열은반체에서 재조합단백질의 발현은 IPTG의 농도에 의하여 조절된다.[3, 4] 따라서 IPTG농도를 0.05~2.0mmol/L로 변화시키면서 hEGF의 발현정도를 평가하였다. IPTG

농도에 따르는 hEGF발현에 대한 SDS-폴아겔전기영동상은 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 IPTG농도에 따라 hEGF의 발현량은 크게 차이났다. 0.2mmol/L이하에서 hEGF는 거의나 발현되지 않았지만 0.4mmol/L이상에서부터는 hEGF의 발현이 명백히 관찰되었다. 0.5~2.0mmol/L의 농도에서 hEGF가 비교적 많은 량 발현되었다.

0.5~2.0mmol/L의 농도에서 발현된 hEGF의 가용성정도를 확인하기 위하여 균체총단백질과 원심분리상청액, 침전물의 단백질에 대한 15% SDS-폴아겔전기영동을 진행하고 hEGF의 존재를 확인하였다.(그림 2)

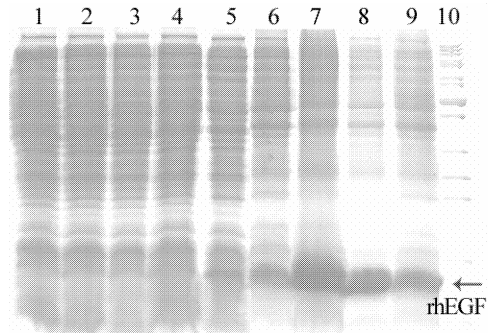


그림 1. IPTG농도에 따르는 hEGF발현의 SDS-폴아겔전기영동상

1-대조, 2-9는 IPTG농도가 각각 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0mmol/L일 때, 10-분자량표식자; 배양온도 37℃, 배양시간 6h

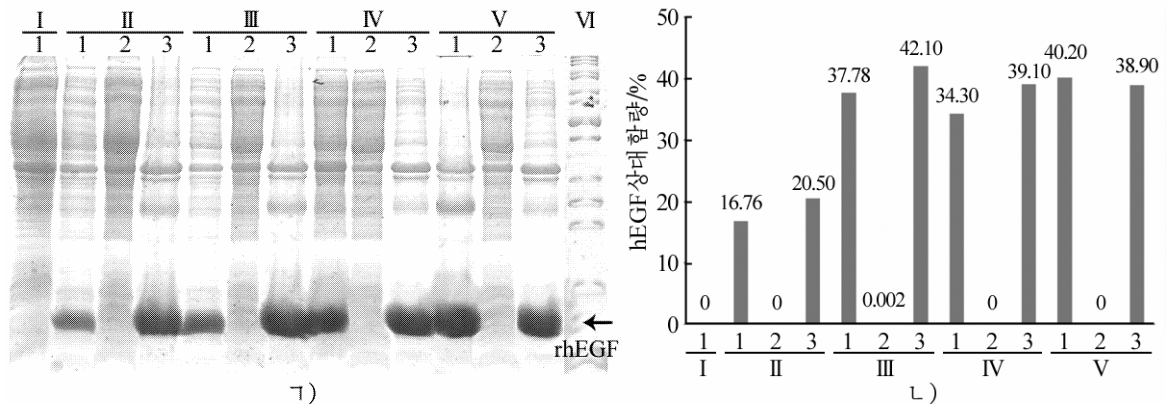


그림 2. 각이한 IPTG농도에서 발현된 hEGF의 가용성정도 확인

ㄱ) 15% SDS-폴아겔전기영동상, ㄴ) Gel-PRO Analyzer로 분석한 hEGF상대함량; I-대조, II-V는 IPTG의 농도가 각각 0.5, 1.0, 1.5, 2.0mmol/L일 때, VI-분자량표식자, 1-균체총단백질, 2-원심분리상청액, 3-원심분리침전물

그림 2에서 보는바와 같이 원심분리상청액속에는 가용성hEGF가 거의 없고 침전물에서만 hEGF를 확인할수 있었다. 또한 1.0~2.0mmol/L의 농도에서 발현된 hEGF량은 균체총단백질의 40%정도로 매우 높았다. 이로부터 hEGF발현에 적합한 IPTG의 농도를 1.0mmol/L로 정하였다.

2) hEGF발현에 미치는 배양온도의 영향

LB배지에 IPTG를 1.0mmol/L의 농도로 넣고 각이한 온도(37, 25, 16℃)에서 hEGF발현량을 시간별로 관찰하였다.

먼저 37℃에서 배양하면서 hEGF발현량을 시간별로 관찰하였다. hEGF발현에 대한 SDS-폴아겔전기영동상은 그림 3과 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 37℃에서는 배양 1h만에 hEGF가 발현되기 시작하는데 5~6h이면 충분히 발현되었다. 원심분리상청액에서 가용성hEGF는 관찰되지 않았으므로 37℃에서 배양할 때 발현되는 hEGF는 거의나 다 불용성의 봉입체라는것을 알수 있다.

다음 25°C에서 배양하면서 hEGF발현량을 시간별로 관찰하였다. hEGF발현에 대한 SDS-폴아겔전기영동상은 그림 4와 같다.

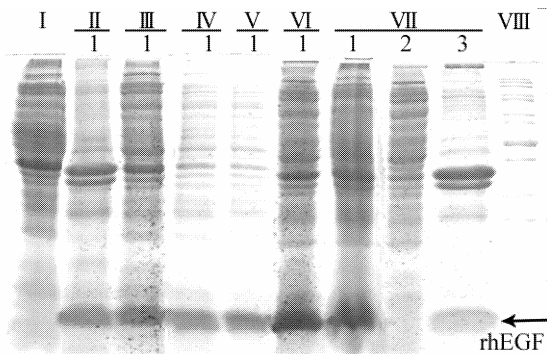


그림 3. hEGF발현에 대한 SDS-폴아겔 전기영동상(37°C)

I-대조, II-VII은 배양시간이 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6h일 때, VIII-분자량표식자, 1-균체총단백질, 2-원심분리상청액, 3-원심분리침전물; 배양온도 37°C

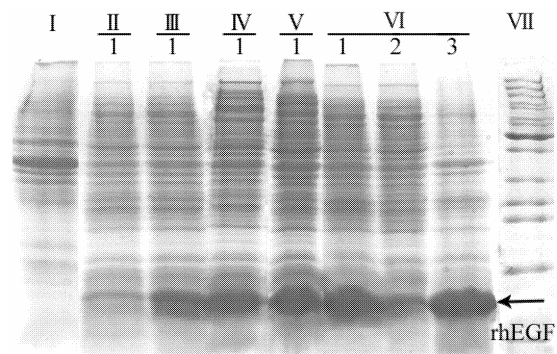


그림 4. hEGF발현에 대한 SDS-폴아겔 전기영동상(25°C)

I-대조, II-VI은 배양시간이 각각 2, 6, 12, 18, 24h일 때, VII-분자량표식자, 1-균체총단백질, 2-원심분리상청액, 3-원심분리침전물; 배양온도 25°C

그림 4에서 보는바와 같이 배양 2h때에는 hEGF가 거의나 관찰되지 않았으며 6h만에야 명백히 관찰되었다. 25°C에서 18~24h정도 배양할 때 hEGF가 충분히 발현되었다. 24h 동안 배양하였을 때 원심분리상청액에는 약간의 가용성hEGF가 들어있었지만 여전히 침전물에 불용성상태의 hEGF봉입체가 많이 들어있었다.

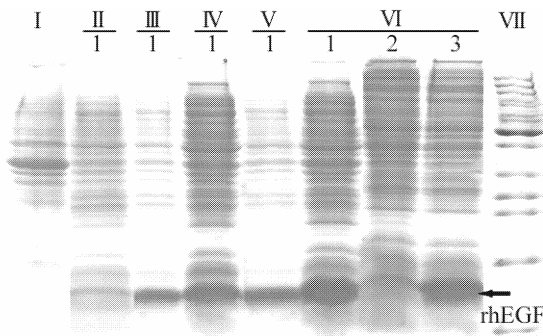


그림 5. hEGF발현에 대한 SDS-폴아겔 전기영동상(16°C)

I-대조, II-VI은 배양시간이 각각 2, 6, 12, 24, 36h일 때, VII-분자량표식자; 1-균체총단백질, 2-원심분리상청액, 3-원심분리침전물; 배양온도 16°C

다음 16°C에서 배양하면서 hEGF발현량을 시간별로 관찰하였다. hEGF발현에 대한 SDS-폴아겔전기영동상은 그림 5와 같다.

그림 5에서 보는바와 같이 16°C에서 hEGF의 발현은 배양 6h부터 시작되어 배양 36h만에야 충분히 발현되었다. 가용성hEGF는 원심분리상청액에서 약간 관찰되었고 기본적으로는 침전물에서 불용성상태의 hEGF봉입체로 관찰되었다.

이로부터 37°C에서 6h정도 배양하면 주로 불용성의 hEGF봉입체가 발현되지만 25, 16°C에서 24, 36h정도 배양하면 적은량의 가용성hEGF와 많은량의 불용성hEGF봉입체가 발현된다는것을 알수 있다.

맺 는 말

재조합대장균(*E. coli* BL21(DE3)/pET30c-hEGF)배양에서 hEGF발현에 적합한 IPTG농도는 1.0mmol/L이며 이때 균체단백질의 40%정도가 hEGF이다.

hEGF는 37°C에서 배양하면 봉입체로만, 25°C나 16°C에서 배양하면 가용성과 봉입체상태로 다같이 발현된다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 61, 8, 104, 주체104(2015).
- [2] S. Cohen et al.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 4, 1317, 1975.
- [3] Wenjiao Xue et al.; Journal of Bioscience and Bioengineering, 109, 3, 257, 2010.
- [4] Han Yun et al.; Chin. J. Chem. Eng., 15, 5, 760, 2007.
- [5] Cao Qi Lei et al.; Journal of Innate Immunity, 7, 2, 153, 2015.
- [6] 章静泼 等; 细胞生物学实验指南, 科学出版社, 750, 2008.

주체106(2017)년 2월 5일 원고접수

Effect of IPTG Concentration and Culture Temperature on Expression of Recombinant Human Epidermal Growth Factor

Kim Yong Ho, O Tong Ju and Kim Sun Ui

The suitable concentration of IPTG for hEGF expression in *E. coli* BL21(DE3)/pET30c-hEGF culture is 1.0~2.0mmol/L, in this condition 40 percentage of whole bacteria protein is hEGF.

When we cultured bacteria in 37°C, productions almost are inclusion bodies, in 25°C or 16°C productions are both soluble protein and insoluble inclusion bodies.

Key words: recombinant hEGF, protein expression, cellular proliferation