

## 재조합사람프로인슐린류사체(글라르긴)생성균 *E. coli* BL21(DE3)/pET32a-hIN(L)의 제작

고송미, 정성일, 차영철, 리남선

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《우리는 과학기술분야에서 이룩한 성과에 만족하지 말고 나라의 과학기술을 새로운 높은 단계으로 발전시키기 위하여 적극 투쟁하여야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제11권 133페이지)

우리는 생물공학적인 방법으로 재조합사람인슐린을 생산하기 위하여 사람프로인슐린류사체(글라르긴)[1]를 생성하는 대장균주를 만들기 위한 연구를 하였다.

### 재료와 방법

사람프로인슐린류사체(글라르긴)유전자는 전문회사에 의뢰하여 합성하였다.

출발플라즈미드로는 사람프로인슐린류사체(글라르긴)유전자보유균 *E. coli* DH5 $\alpha$ (pMD-hIN)의 플라즈미드를 리용하였다. 클론화숙주로 *E. coli* DH5 $\alpha$ 를, 발현숙주로 *E. coli* BL21(DE3)을, 대장균발현운반체로는 pET32a(+)를 리용하였다. 재조합플라즈미드의 제작 및 확인을 위하여 T4 DNA리가제와 제한효소 *Nde*I과 *Hind*III을, DNA크기표식자로 DL2000과  $\lambda$ /EcoT14를 리용하였다. 대장균형질전환은 염화칼시움법으로 진행하였다.

대장균형질전환체에서 목적유전자의 발현성검토는 균배양지수증식기 중기에 유도제 IPTG를 최종농도가 0.5mmol/L 되게 첨가하고 4h 유도배양한 다음 균체총단백질을 추출하여 15% SDS-PAGE분석을 진행하고 영동상에서 발현산물의 존재를 확인하는 방법[2]으로 진행하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1) 사람프로인슐린류사체(글라르긴)유전자발현운반체제작

NCBI자료기지에 기초하여 사람프로인슐린유전자배열을 탐색하고 유전자배열의 5'말단에 제한효소 *Nde*I의 인식부위와 6 $\times$ His Tag배열, Arg를 암호하는 CGT염기를 부가하고 <sup>32</sup>P-Asp를 암호화하는 GAC염기를 Gly를 암호하는 GGC로 치환하였으며 유전자배열의 3'말단에는 종결코돈 TAA와 제한효소 *Hind*III의 인식부위를 부가하였다. 한편 배열내의 코돈을 대장균 발현에 유리한 코돈으로 치환하여 설계하였다.

사람프로인슐린류사체유전자를 발현운반체 pET32a(+)에 재조합하기 위하여 먼저 사람프로인슐린류사체유전자가 재조합된 플라즈미드 pMT-hIN과 발현운반체 pET32a(+)를 분리 정제하고 각각 제한효소 *Nde*I과 *Hind*III으로 동시반응을 진행한 다음 얻어진 목적DNA단편

들을 겔정제하여 전기영동으로 확인하였다.(그림 1)

전기영동결과 그림 1에서 보는바와 같이 pET32a/(*Nde*I+*Hind*III)에서는 분자크기가 약 6 000bp인 운반체단편이 검출되었으며 pMD18-hIN/(*Nde*I+*Hind*III)에서는 분자크기가 약 300bp인 유전자단편이 검출되었다.

DNA단편들을 리가제반응시키고 반응산물로 *E. coli* DH5 $\alpha$ 를 형질전환한 후 예상되는 크기의 플라스미드를 보유하고있는 재조합균무지를 선발하였다. 재조합균주로부터 플라스미드DNA를 분리하여 제한효소 *Nde*I+*Hind*III, *Pst*I, *Pvu* II로 반응시켜 재조합체의 정확성을 확인하였다.(그림 2)

그림 2에서 보는바와 같이 재조합플라스미드에 대한 제한효소 *Nde*I+*Hind*III의 동시반응(1주로)에서는 운반

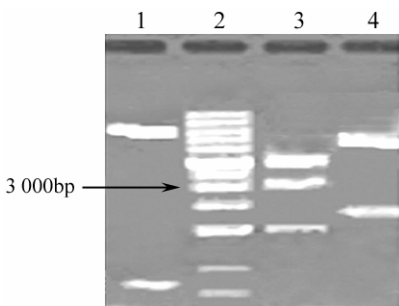


그림 2. 재조합플라스미드에 대한 효소반응산물의 전기영동상

1-*Nde* I +*Hind*III, 2- $\lambda$ /*Eco*T14, 3-*Pvu* II, 4-*Pst*I

다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 발현산물은 분자량이 리조짐(14 000Da)보다 작은 위치(약 11 000Da)에서 정확히 검출되었으며 대부분 용입체로 발현된다는것을 알수 있다.

이상의 실험결과로부터 재조합균주에서 사람프로인솔린류사체(글라르긴)유전자가 정확히 발현되었다는것을 알수 있으며 덴시터메터측정결과 목적유전자의 발현수준은 균체총단백질의 약 30%정도였다.

사람프로인솔린류사체(글라르긴)를 생성하는 균주를 *E. coli* BL21(DE3)/pET32-hIN(L)라고 명명하였다.

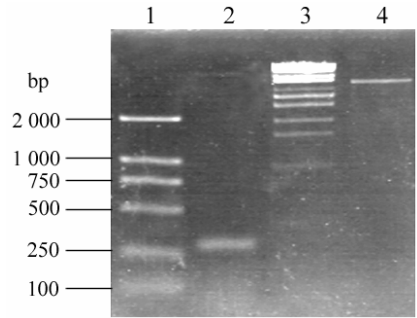


그림 1. 재조합체제작에 리용한 DNA단편들의 전기영동상

1-DL2000, 2-pMD18-hIN/(*Nde* I + *Hind* III), 3-*Eco*43T Ladder, 4-pET32a/(*Nde* I +*Hind* III)

체단편(분자크기가 약 5 700bp)과 목적유전자단편(분자크기가 약 300bp)이 정확히 검출되었다. 또한 재조합플라스미드에 대한 *Pvu* II 반응(3주로)에서는 약 2 600, 2 200, 1 000bp정도의 DNA단편이, *Pst*I반응(4주로)에서는 약 4 400, 1 300bp정도의 DNA단편이 예상대로 얻어졌다.

이러한 결과로부터 사람프로인솔린류사체유전자가 발현운반체 pET32a에 정확히 삽입되었다는것을 알수 있으며 이 재조합플라스미드를 pET32a-hIN(L)로 명명하였다.

## 2) 재조합사람프로인솔린류사체생성균주의 제작

재조합플라스미드 pET32a-hIN(L)로 *E. coli* BL21(DE3)을 형질전환한 후 암피실린이 들어있는 LB고체평판에서 자라는 균주를 선발하여 목적유전자의 발현성을 검토하였

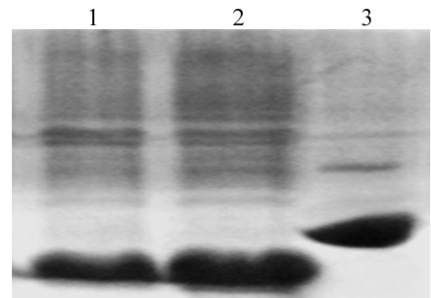


그림 3. 균체총단백질의 SDS-PAGE분석상

1-균체총단백질, 2-균체초음파침전, 3-리조짐(14 000Da)

## 맺 는 말

- 1) 사람프로인슐린류사체(글라르긴)유전자발현운반체 pET32a-hIN을 제작하였다.
- 2) 재조합사람프로인슐린류사체(글라르긴)생성균주 *E. coli* BL21(DE3)/pET32a-hIN(L)을 만들고 목적유전자의 발현수준이 균체총단백질의 약 30%정도라는것을 확증하였다.

## 참 고 문 헌

- [1] T. G. A. Cartledge; EP 1042479 A1, WO 99/33988.  
[2] Jie Yuan et al.; Biomed. Chromatogr., 29, 5, 777, 2015.

주체107(2018)년 10월 5일 원고접수

### **Manufacturing Recombinant *E. coli* BL21(DE3)/pET32a-hIN(L) Producing Human Proinsulin Analog(Glargine)**

*Ko Song Mi, Jong Song Il, Cha Yong Chol and Ri Nam Son*

We constructed the expression vector pET32a-hIN carrying human proinsulin analog(glargine) gene, being transformed into *E. coli*, resulting in *E. coli* strain producing human proinsulin analog(glargine).

Key words: expression vector, recombinant human proinsulin analog, glargine, inclusion body