

재조합사람인슐린양성장인자-1(rhIGF-1)의 분리정제와 세포증식효과에 대한 연구

길금별, 리광옥, 현철

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《최신의학과학기술성공에 기초한 새로운 의약품과 현대적인 의료기구를 치료예방사업에 대담하게 받아들여 진단과 치료방법을 빨리 세계적수준에 올려세워야 하겠습니다.》

(《김정일선집》 증보판 제11권 77페이지)

인슐린양성장인자-1(IGF-1)은 인슐린족의 주요성분으로서 많은 종의 세포의 증식과 분화, 대사에 영향을 미치며 기초연구와 임상치료에서 넓은 응용전망을 가지고있다.[3]

우리는 유전자공학적방법으로 육종한 rhIGF-1발현효모의 배양상청액[1]으로부터 rhIGF-1을 분리정제하고 사람간엽성줄기세포에 대한 세포증식효과를 검토하여 그것의 생물학적활성을 확인하였다.

재료와 방법

재조합균주로는 *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-IGF-1)를 리용하였다.

YNB(《北京鼎国公司》), CM-섬유소(《Wathman》), DMEM배지, 소태아혈청, MTT(《Sigma》), DMSO(《Sigma》), 인슐린(《Novo Nordisk》), 단백질분자량표식자(《Fermentas》)를 리용하였으며 기타 시약들은 분석순을 구입하여 리용하였다.

재조합균주의 배양과 rhIGF-1의 세포증식능평가는 선행방법[1, 2]에 준하여 진행하였다.

단백질함량은 폴린-로우리법으로 정량하였으며 정제도평가는 트리신SDS-PAGE와 덴시토메터를 리용하여 진행하였다.

결과 및 논의

1) CM-섬유소이온교환크로마토그래프에 의한 rhIGF-1의 정제

1L의 rhIGF-1유도배양물을 원심분리(4 000r/min, 10min)하여 효모균체를 제거한 후 상청액을 20mmol/L 린산완충액(pH 7.0)으로 평형화한 CM-섬유소이온교환크로마토그래프탑에 적재하였다.

탑체적의 3배(60mL)에 해당하는 완충액으로 세척하고 0.2, 0.4, 0.6, 0.8mol/L NaCl불런속 농도구배를 조성하여 용출시켰을 때 0.4mol/L의 NaCl농도에서 해당하는 단백질이 용출되었다.(그림 1)

이 단백질분획에 대하여 트리신SDS-PAGE영동을 진행한 결과 rhIGF-1(7.6kD)에 해당하는 목적단백질이 단일띠로 나타났다.(그림 2)

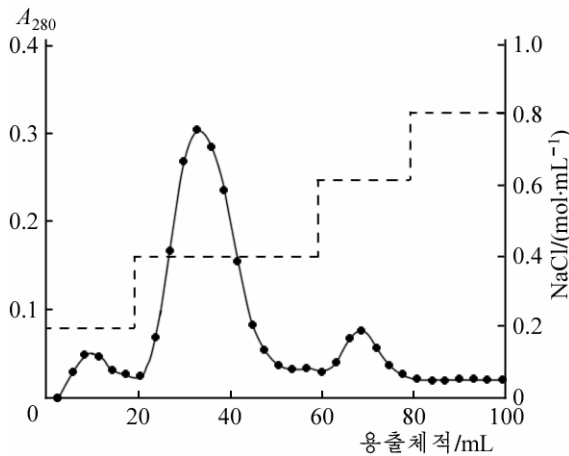


그림 1. rhIGF-1의 CM-섬유소이온교환 크로마토그래프
타크기 2.2cm×5.1cm, 류속 30mL/h

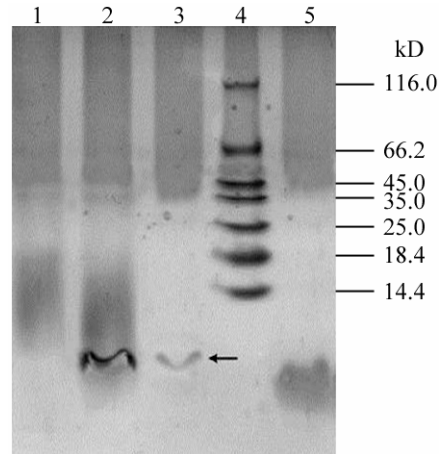


그림 2. 정제한 rhIGF-1의 트리신SDS-PAGE상
1-음성대조, 2-유도배양상청액, 3-정제산물,
4-단백질분자량표지자(5.8kD), 5-인슐린(3.5mg/mL)

그림 2에서 보는바와 같이 *Pichia parstoris* 숙주자체가 분비하는 단백질들이 상대적으로 많으므로 한차례의 양이온교환크로마토그래프를 통하여 rhIGF-1을 비교적 순수하게 분리정제할수 있었다. 분리정제결과는 표와 같다.

표. rhIGF-1의 정제단계별정제도와 거둬들

| 정제단계 | 시료 체적 /mL | 단백질 농도 /(mg·mL ⁻¹) | rhIGF-1 농도 /(mg·mL ⁻¹) | 총단백질 량/mg | rhIGF-1량 /mg | 상대함량 /% | 정제도 | 거둬들 /% |
|-----------------|-----------------|--------------------------------------|--|--------------|-----------------|------------|------|-----------|
| 배양상청액 | 1 000 | 0.038 | 0.015 3 | 38.0 | 15.3 | 40.3 | 1.00 | 100 |
| 이온교환크로 마토그래프 | 60 | 0.180 | 0.148 0 | 10.8 | 8.88 | 82.2 | 2.04 | 58.8 |

표에서 보는바와 같이 덴시토메터분석법으로 측정한 결과 재조합균주의 배양상청액에 분비된 목적단백질의 상대함량은 약 40% 정도였으며 분리정제과정에 58.8%의 거둬들로 2.04배 정제되었다.

2) 사람간엽성줄기세포증식에 미치는 rhIGF-1의 영향

IGF-1는 엽기성섬유아세포성장인자(bFGF)[2]와 마찬가지로 세포의 증식을 촉진하며 이러한 세포증식촉진작용은 IGF-1의 생물학적활성의 중요한 지표로 된다.[4]

분리정제한 rhIGF-1을 각이한 농도로 첨가하여 사람간엽성줄기세포에 대한 증식촉진작용을 검토하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 사람간엽성줄기세

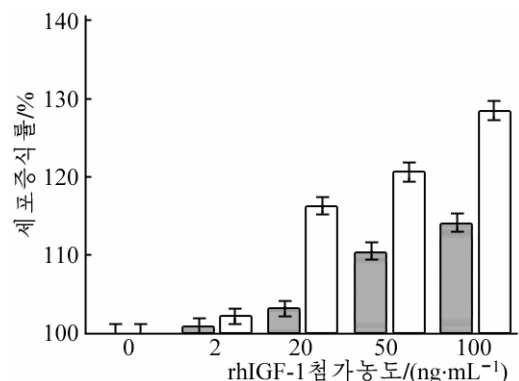


그림 3. rhIGF-1의 첨가농도에 따른 사람간엽성줄기세포의 증식률변화

■ 48h, □ 72h, 점종세포수 5×10^4 개/cm², n=5

포에 대하여 2ng/mL의 rhIGF-1농도에서는 대조에 비하여 현저한 차이가 나타나지 않았으나 20ng/mL의 농도에서부터는 72h 배양후 세포증식률이 116.3%이상으로서 뚜렷한 세포증식촉진활성이 나타났다. 줄기세포배양물의 광학현미경상에서도 증식촉진활성에 의한 세포밀도차이가 현저하게 나타났다.(그림 4)

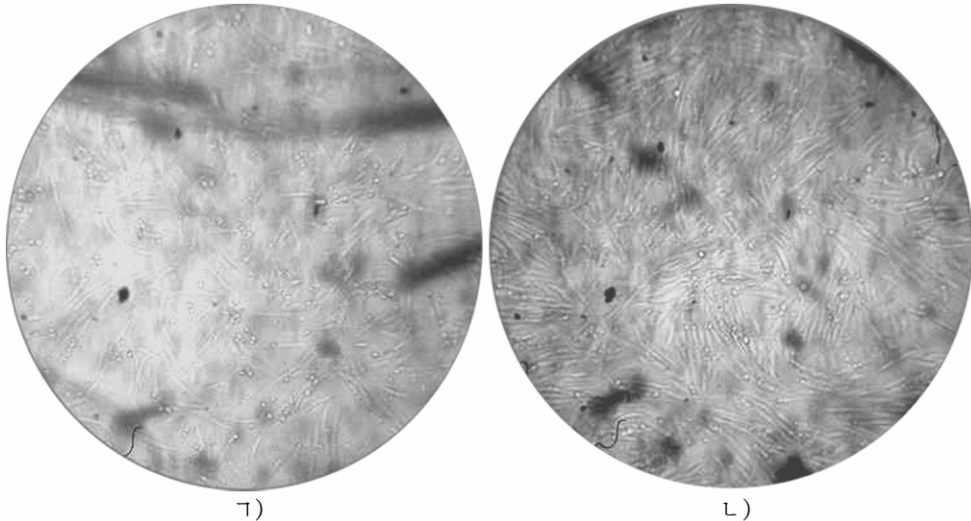


그림 4. 72h 배양후 사람간엽성줄기세포의 광학현미경상(×250)

ㄱ) 대조구, ㄴ) 20ng/mL rhIGF-1첨가구

또한 50ng/mL의 rhIGF-1첨가농도에서 세포증식촉진률은 120.6%로서 표품으로 리용한 양성대조(50ng/mL bFGF: 123.2%)[2]에 비해볼 때 큰 차이가 없었다. 이상의 결과로부터 분리정제한 rhIGF-1이 세포증식촉진작용을 나타내며 생물학적활성을 가진다는것을 알수 있다.

맺 는 말

1) 재조합균주 *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-IGF-1)의 유도발현산물로부터 한단계의 CM-섬유소양이온교환크로마토그래프분리를 통하여 rhIGF-1을 58.8%의 거둬들로 2.04배 분리정제하였다. 정제산물은 트리신SDS-폴아겔전기영동적으로 순수하다.

2) 분리정제한 rhIGF-1은 사람간엽성줄기세포에 대한 뚜렷한 증식촉진효과를 가지며 50ng/mL에서 같은 농도의 bFGF표품과 유사한 활성을 나타낸다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보 생명과학, 64, 1, 64, 주체107(2018).
- [2] 강용일; 조선민주주의인민공화국 과학원통보, 5, 56, 주체103(2014).
- [3] J. Ren; Biochemical Pharmacology, 93, 409, 2015.
- [4] J. Menetrey; The Journal of Bone and Joint Surgery, 82-B, 1, 131, 2000.

주체107(2018)년 10월 5일 원고접수

Study on Purification of Recombinant Human Insulin-Like Growth Factor-1(rhIGF-1) and Cell Growth Effect

Kil Kum Byol, Ri Kwang Ok and Hyon Chol

We have purified rhIGF-1 from supernatant of the induced culture of recombinant *Pichia pastoris* GS115 by CM cellulose cation exchange chromatography. The purified rhIGF-1 is pure in tricine SDS-PAGE and it is purified 2.04 times with 58.8% of rate of actual yield. The purified rhIGF-1 promotes the proliferation of stem cells, and the activity is similar to that of bFGF at same concentration of 50ng/mL.

Key words: recombinant human insulin-like growth factor-1, proliferation, *Pichia pastoris*, CM cellulose cation exchange chromatography