

## 피부투과도메인을 연결한 사람섬유아세포성장인자1 발현군의 제작에 대한 연구

정예진, 어동주, 허명식

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)

현시기 단백질성약물들과 약전의 사용량이 날이 감에 따라 증가하고있는 반면에 이 약물들을 피하주사로 투약하는데서 여러가지 제한성이 나타나고있는것으로 하여 그것을 해결해야 할 필요성이 절박하게 나서고있다.

2006년 파취현시기술로 11개 아미노산(ACSSSPSKHCG)으로 된 펩티드사페론모티프인 피부투과도메인1(TD1)이 발견된것으로 하여 단백질약물을 피부를 손상시키지 않고 투약할수 있는 새로운 돌파구가 열리게 되었다.[1]

피부투과도메인1을 인슐린이나 사람성장호르몬, 상피성장인자(EGF) 등 해당한 단백질의 N-말단에 연결하여 투약하였을 때 피부투과효과는 아주 높았다.[2] 이 방법은 대단히 실용가치가 있는것으로서 주사바늘을 피부에 찔려야만 하는 종전의 주사방법이나 소화효소에 의해 분해될 우려가 있는 경구투여방법을 쓰지 않고 아주 편리한 방법으로 단백질약물을 리용할수 있게 해준다.[2]

이로부터 우리는 이전 연구에서 항로화[3]와 당뇨병치료[4] 등에 널리 리용되고있는 재조합사람섬유아세포성장인자1(rhFGF1)의 유전자를 클론화한데 기초하여 rhFGF1의 피부투과성을 높이고 그 리용을 편리하게 하기 위하여 rhFGF1의 유전자에 TD1을 연결하여 대장균에서 발현시키기 위한 연구를 하였다.

### 재료 및 방법

형질전환숙주로는 *Escherichia coli* Top10을, 유전자발현숙주로는 *E. coli* BL21(DE3)을 리용하였다. 유전자발현운반체로는 pET-30 Ek/Lic를 리용하였으며 FGF1을 암호화하는 DNA는 의뢰하여 합성하고 pUC57에 재조합(pUC57-FGF1)한 후 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 클론화한것을 출발재료로 리용하였다.

유전자재조합실험에서는 플라스미드분리정제키트(《TIANGEN pure Midi》), 아가로즈겔 DNA회수키트(《YPH-Bio》), PCR산물정제키트(《SanPrep》), KOD-Plus-Neo pol키트(《TOYOBO》), LC Taq pol키트(《Thermo SCIENTIFIC》), T4 DNA리가제(《Promega》) 등을 리용하였다.

*E. coli* DH5 $\alpha$ 에 클론화된 pUC57-FGF1을 플라스미드분리정제키트를 리용하여 분리정

제하고 그것을 PCR의 주형DNA로 리용하였다. 이것을 KOD-Plus-Neo폴리메라제로 94°C 2min → 98°C 10s, 68°C 30s, 35회 순환 → 68°C 7min조건에서 PCR증폭하였다. PCR증폭단편을 PCR산물정제키트를 리용하여 정제하였다.

정제한 PCR산물을 다시 피부투과도메인을 연결한 프라이머를 리용하여 94°C 2min → 98°C 10s, 62°C 30s, 68°C 30s, 5회 순환 → 98°C 10s, 68°C 30s, 30회 순환 → 68°C 7min 조건에서 PCR증폭하였다. PCR증폭단편을 다시 PCR산물정제키트를 리용하여 정제하였다.

정제한 PCR산물과 발현운반체 pET-30 Ek/Lic를 제한효소 *NdeI*, *XhoI*로 각각 2중절단하고 1% 아가로즈겔에서 전기영동한 후 겔DNA회수키트를 리용하여 목적단편만을 분리하였다. 다음 T4 DNA리가제로 연결하여 *E. coli* Top10에 TSB-KCM법으로 형질전환하였다. 형질전환체를 50μg/mL 카나미친(Km)평판배지에서 선발하고 PCR검정과 플라스미드분리, 제한효소절단법으로 재조합플라스미드를 확인하였으며 최종적으로 전문기관에 의뢰하여 DNA배열을 결정하였다.

재조합플라스미드를 분리정제하고 다시 발현숙주 *E. coli* BL21(DE3)에 우와 같은 방법으로 형질전환하여 선발한 다음 재조합산물의 발현상을 18% SDS-폴아겔전기영동으로 확인하였다.

모든 유전자조작은 선행방법[5]에 준하여 진행하였다.

## 결과 및 논의

### 1) 피부투과도메인을 연결한 사람섬유아세포성장인자1(TD1-TD1-hFGF1)의 CDS와 증폭용프라이머의 설계

피부투과도메인1(TD1)을 연결할 hFGF1유전자는 이미 클론화하여 *E. coli* DH5α에 보관한 pUC57-hFGF1로부터 PCR증폭하여 리용하기로 하였다.

pUC57-hFGF1에서 hFGF1유전자를 PCR증폭하기 위한 프라이머배열은 다음과 같다.

상류프라이머 1: 5'-ATGGCTGAAGGTGAAATCACCA-3'(22nt,  $T_m=61.8^\circ\text{C}$ )

하류프라이머 1: 5'-CCGGTTCTCGAGTTAATCGGAAG-3'(23nt,  $T_m=64.3^\circ\text{C}$ )

#### *XhoI*

피부투과도메인1(TD1)은 2단계PCR의 상류프라이머의 5'-말단에 연결시키고 PCR증폭으로 hFGF1유전자에 연결하기로 하였다.

TD1과 연결한 증폭용프라이머를 설계하는데서 2013년에 발표된 피부투과도메인1을 유전자재조합약물에 2중으로 연결시키는 경우 약물의 작용효과는 연결시키기 전과 같으며 피부투과효과는 연결시키기 전의 5배, 1중으로 연결시킨것의 3배라는 연구자료[6]에 기초하여 TD1를 2중으로 연결하기로 하였다.

2중피부투과도메인 TD1-TD1과 *rhFGF1*의 연결은 펩티드 GGGGS를 사이에 두고 PCR로 연결하며 삽입절단은 *NdeI*와 *XhoI*로 하도록 설계하였다.(그림 1)

*hFGF1*와 TD1-TD1을 연결시키기 위한 프라이머배열은 다음과 같다.

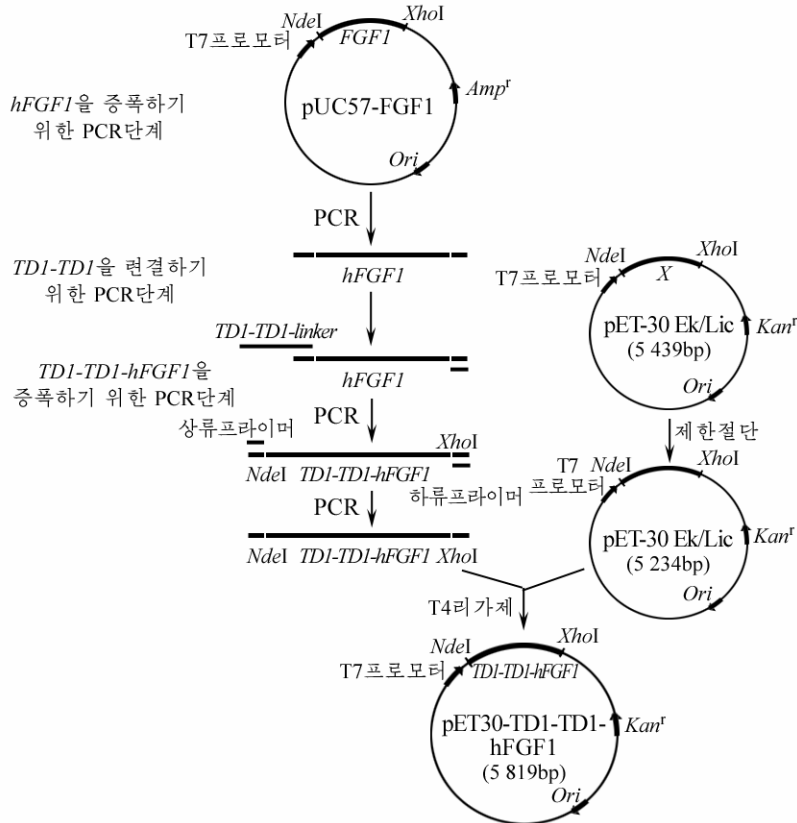


그림 1. TD1과 hFGF1의 연결과 재조합플라스미드 pET30-TD1-TD1-hFGF1의 제작설계공정

TD1-TD1-linker 프라이머: 5'-ACTcatatg**g**cgT**g**TagcagcAGTccaagcAAGCATTGCGGT  
NdeI TD1

GGGGGTGGTGGTTCT**GCTTGTTCCTCTAGTCCTTCTAAGCATTGCGGT**GGGGGTGG  
linker TD1 linker

TGGTTCATAGGCTGAAGGTGAAATCACCA-3'(124nt,  $T_m = 61.8^\circ\text{C}$ )  
linker

상류프라이머 2 5'-ACTCATATGGCGTGTAGCAGCAGTC-3'(25nt,  $T_m = 64.8^\circ\text{C}$ )  
NdeI

하류프라이머 2 5'-CCGGTTC**CT**CGAGTTAATCGGAAG-3'(23nt,  $T_m = 64.3^\circ\text{C}$ )  
XhoI

소문자로 쓴것은 TD1을 2중으로 연결하므로 TD1펩티드들의 상보적결합을 막기 위하여 코돈치환을 진행한 누클레오티드들이다.

재조합플라스미드 pUC57-FGF1을 주형으로 하여 PCR증폭한 다음 회수한 hFGF1유전자를 주형으로 하고 TD1-TD1-linker프라이머와 상류프라이머 2, 하류프라이머 2를 프라이머로 하여 2단계PCR를 진행하기로 하였다.

제한효소인식배열을 추가한 TD1-TD1-hFGF1의 CDS는 다음과 같다.(사체로 준 부분은 보호누클레오티드, 일반정체로 준 부분은 CDS를, 배경색을 준 부분은 시작코돈을, 소문자로 준 부분은 코돈치환한 염기들을 의미한다.)

5'-ACTcatatggcgtGTagcagcAGTccaagcAAGCATTGCGGTGGGGGTGGTGGTTCTG  
*NdeI* linker  
 CTTGTTCTTCTAGTCCTTCTAAGCATTGCGGTGGGGGTGGTGGTTCTATGGCTGAAGGTG  
 linker  
 AAATCACCCACGTTCACTGCCCTGACCGAGAAGTTTAACCTGCCTCCAGGTAATTACAAGA  
 AACCGAAACTGTTGTACTGTAGCAACGGTGGCCACTTCCTGCGTATCCTGCCGGATGGCA  
 CCGTGGATGGTACTCGTGACCGCAGCGACCAGCACATTCAACTGCAGCTTTCTGCGGAAA  
 GCGTGGGTGAGGTGTATATCAAGTCCACCGAGACTGGCCAGTACCTGGCGATGGACACCG  
 ACGGTCTGTTATACGGCTCTCAGACTCCAAACGAGGAATGTCTGTTCTTCTGGAACGTCTGG  
 AAGAGAACCATTACAACACCTATATCTCCAAGAAACATGCAGAGAAGAACTGGTTTGTGTG  
 GCCTGAAGAAAAATGGTAGCTGCAAACGCGGTCTCTGCACTCACTATGGCCAGAAAGCAA  
 TCCTGTTTCTCCCGCTGCCAGTCTCTTCCGATTAACCTCGAGAACCCTG-3'(585bp)  
*XhoI*

## 2) 사람섬유아세포성장인자1(hFGF1)유전자의 클론화

합성한 hFGF1 유전자가 삽입된 재조합플라스미드 pUC57-FGF1로부터 우의 상류 및 하류프라이머1을 리용하여 목적유전자만을 증폭한 PCR결과는 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 예상했던 491bp 크기의 DNA단편이 정확히 단일하게 증폭되었다.

우의 PCR산물과 TD1-TD1 유전자를 연결시키기 위하여 진행한 2단계PCR결과는 그림 3과 같다.

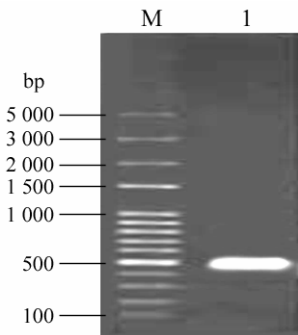


그림 2. hFGF1의 PCR증폭산물  
 M은 DNA분자량표식자, 1-hFGF1

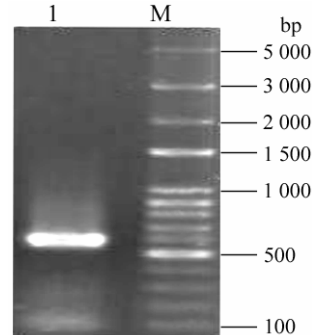


그림 3. TD1-TD1-hFGF1의 PCR증폭산물  
 M은 DNA분자량표식자, 1-TD1-TD1-hFGF1

이때 TD1-TD1-linker 프라이머와 상류프라이머를 1 : 100의 비율로 넣어주었다.(표)

표. 2단계PCR반응액조성

구성 물질	체적/μL	최종농도
ddH <sub>2</sub> O	32	
KOD-Plus-Neo 폴리메라제 10× 완충액	5	1×
2mmol/L dNTP	5	0.2mmol/L
25mmol/L MgSO <sub>4</sub>	3	1.5mmol/L
0.1μmol/L TD1-TD1-linker 프라이머	1	0.002μmol/L
프라이머 10μmol/L 상류 프라이머 2	1	0.2μmol/L
10μmol/L 하류 프라이머 2	1	0.2μmol/L
주형(5ng/μL hFGF1)	1	0.1ng/μL
KOD-Plus-Neo 폴리메라제(1U/μL)	1	1U
총체적	50	

그림 3에서 보는바와 같이 585bp정도로 예상되는 DNA단편이 정확히 600bp 구역에서 나타났다.

우의 PCR산물과 유도발현운반체 pET-30 Ek/Lic를 제한효소 *NdeI*, *XhoI*로 각각 2중절단하고 T4 DNA리가제로 연결하여 *E. coli* Top10에 형질전환하였다.

50 $\mu$ g/mL Km을 첨가한 LB배지에서 선발된 균무지들중에서 3개를 선택하여 유전자증폭에 리용하였던 프라이머로 PCR검정을 진행한 결과는 그림 4와 같다.

그림 4에서 보는바와 같이 3개의 선발된 균무지들이 모두 목적하는 유전자가 들어있는 양성균무지들이었다.

이 균무지들에서 플라스미드를 분리하고 전기영동하여 확인하였는데 재조합플라스미드들이 자기 위치에서 정확히 나타났다.(그림 5)

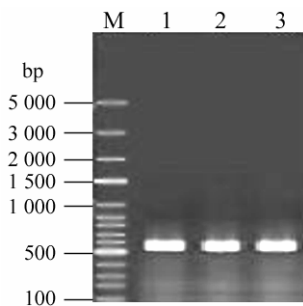


그림 4. 형질전환체들에 대한 PCR검정결과  
M은 DNA분자량표식자,  
1-3은 형질전환균무지

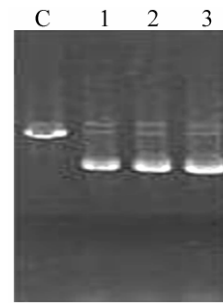


그림 5. *E. coli* Top10형질전환균무지들의 플라스미드분리정제상  
C는 pET-30 Ek/Lic(선형), 1-3은 선발된 형질전환체들의 플라스미드

분리한 재조합플라스미드를 제한효소로 절단하고 분석한 전기영동상은 그림 6과 같다.

그림 6에서 보는바와 같이 제한효소로 절단한 구에서 플라스미드가 5.3kb근방의 선형 플라스미드와 600bp정도의 삽입단편으로 정확히 분리되었다. 이로부터 재조합플라스미드에는 제한효소인식배열이 그대로 존재하며 목적유전자가 정확한 방향으로 삽입되었다는것을 알수 있다.

분리한 재조합플라스미드를 전문기관에 의뢰하여 *TD1-TD1-hFGF1*의 CDS영역과 전사조절 및 종결영역을 포함하여 배열분석한 결과 *TD1-TD1-hFGF1*의 배열은 설계된 배열과 완전히 일치하고 정확한 읽기틀을 가지고 재조합되었으며 pET-30 Ek/Lic발현플라스미드의 프로모터영역과 전사종결부위, 리보솜결합부위 등 기타 구조영역들이 그대로 보존되었다는것을 확인하였다. 이렇게 얻은 피부투과도메인을 2중으로 연결한 사람섬유아세포성장인자1(TD1-TD1-hFGF1)이 삽입된 발현운반체를 pET30-TD1-TD1-hFGF1로 부르기로 하였다.

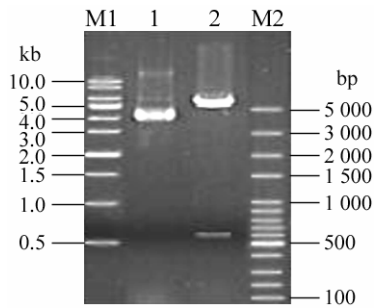


그림 6. 재조합플라스미드에 대한 제한효소분석상  
M1, M2는 DNA분자량표식자,  
1-pET30-TD1-TD1-hFGF1,  
2-pET30-TD1-TD1-hFGF1의 제한효소분해산물

### 3) 피부투과도메인1을 연결한 사람섬유아세포성장인자1(TD1-TD1-hFGF1)발현균의 제작

우의 형질전환체들중에서 1번 균주를 배양하여 플라스미드를 분리하고 발현숙주인 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환하였다. 얻어진 형질전환체들중에서 4개의 균무지를 취하여 플

라즈미드신속검정을 한 결과는 그림 7과 같다.

그림 7에서 보는바와 같이 선발된 4개의 형질전환체들이 모두 목적하는 플라스미드를 보유하고있었다.

pET30-TD1-TD1-hFGF1이 도입된 *E. coli* BL21(DE3) 하루밤배양액을 50 $\mu$ g/mL Km을 첨가한 LB배지에 1%로 접종하고 OD<sub>600</sub>값이 1.0정도 될 때까지 배양한 후 IPTG를 1mmol/L 농도로 첨가하여 유도배양을 진행하였다.

37 $^{\circ}$ C에서 0, 1, 3, 6h동안 유도배양한 후 배양액을 1mL씩 취하여 균체를 수집하고 총 단백질을 18% SDS-폴리아크릴아미드겔전기영동하였는데 그 결과는 그림 8과 같다.

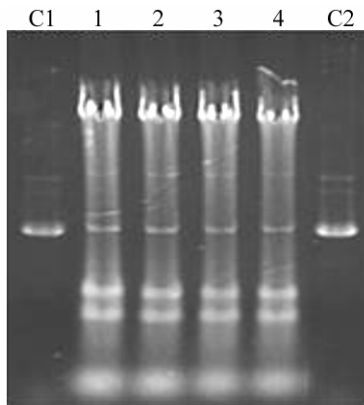


그림 7. *E. coli* BL21(DE3) 형질전환  
균무지들의 플라스미드확인상  
C1, C2는 대조플라스미드(pET30-TD1-TD1-  
hFGF1), 1-4는 선발된 형질전환체

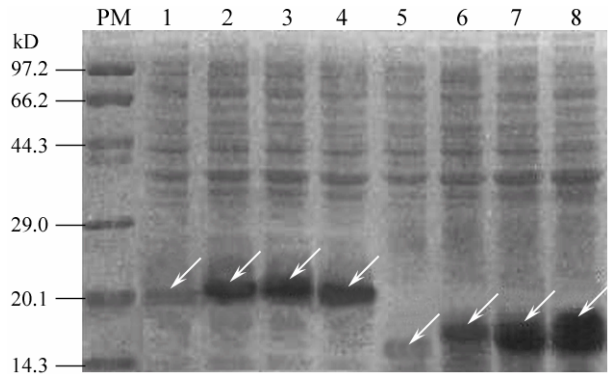


그림 8. 유도배양한 *E. coli* BL21(DE3)  
pET30-TD1-TD1-hFGF1의 18% SDS-  
폴리아크릴아미드겔전기영동상  
PM은 단백질분자량표식자, 1-4는  
TD1-TD1-hFGF1, 5-8은 hFGF1

18% SDS-폴리아크릴아미드겔전기영동상에서 목적단백질이라고 보아지는 띠들의 분자량을 추정해본 결과는 그림 9와 같다.

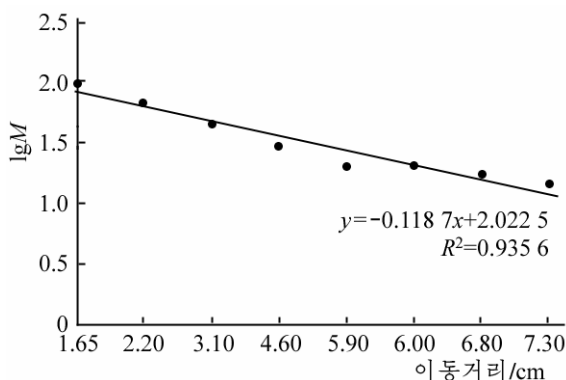


그림 9. 18% SDS-폴리아크릴아미드겔  
전기영동상에서 이동거리에 따르는  
분자량로그값

그림 9로부터 TD1-TD1-hFGF1의 분자량이 (20.0 $\pm$ 0.4)kD, hFGF1의 분자량이 (17.0 $\pm$ 0.4)kD정도라고 추정하였다. 실제로 발현된 단백질크기가 예측하였던 단백질의 크기 (TD1-TD1-hFGF1 19.8kD, hFGF1 16.8kD)와 허용오차범위에서 같으므로 발현된 단백질이 실지 목적단백질이라고 간접적으로 확인하였다.

그림 8에서 보는바와 같이 TD1과 연결하지 않은 hFGF1에 비해볼 때 TD1-TD1-hFGF1의 발현량이 적었다. 그것은 TD1유전자설계를 진행할 때 TD1펩티드와 연결펩티드의 유

전자배열에서 린접한 같은 아미노산에 대하여 같은 코돈을 썼기때문이라고 보아진다. 그러나 유도배양시간에 따라 목적하는 단백질(약 20kD)의 발현량이 증대되었으며 유도배양하기 전에도 기저수준에서의 발현이 어느 정도 진행된다는것을 알수 있다.

## 맺 는 말

사람섬유아세포성장인자1(hFGF1)과 피부투과도메인1(TD1)을 2중으로 연결하기 위한 유전자증폭용프라이머를 설계합성하였다.

TD1-TD1-hFGF1유전자를 대장균발현운반체인 pET-30 Ek/Lic에 재조합하여 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환하였다.

재조합hFGF1(rhFGF1)이 도입된 *E. coli* BL21(DE3)균주를 37°C에서 6h동안 IPTG유도배양하여 SDS-폴아겔전기영동상에서 재조합단백질이 정확히 발현된다는것을 확인하였다.

## 참 고 문 헌

- [1] Yongping Chen et al.; Nature Biotechnology, 24, 4, 405, 2006.
- [2] M. R. Prausnits; Nature Biotechnology, 24, 4, 416, 2006.
- [3] Justyna Zeranska et al.; Adv Dermatol Allergol, 33, 1, 28, 2016.
- [4] J. M. Suh et al.; Nature, 513, 436, 2014.
- [5] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 18~2222, 2001.
- [6] P. P. Jin et al.; Protein Pept. Lett, 21, 6, 550, 2014.

주체106(2017)년 7월 5일 원고접수

## Research on Making the Bacteria to Express the Human Fibroblast Growth Factor 1 connected with the Transdermal Domain

Jong Ye Jin, O Tong Ju and Ho Myong Sik

We combined TD1 and rhEGF, which has been using in protecting aging and the therapy of the diabetes, and studied to express them in *E. coli*.

We designed and synthesized primers for gene amplification to connect the genes of double TD1 and the human fibroblast growth factor 1.

We inserted TD1-TD1-hFGF1 into pET-30 Ek/Lic vector and transformed *E. coli* BL21(DE3) with the recombinant plasmid.

After *E. coli* BL21(DE3) with the recombinant plasmid had been cultured by IPTG induction for 6 hours at 37°C, we confirmed the correct expression of the recombinant protein by means of SDS-PAGE.

Key words: human fibroblast growth factor 1, transdermal domain, diabetes