

살초제견딜성재조합단백질항원(CP4-EPSPS)을 얻기 위한 연구

한지현, 선우경희, 김성준

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《모든 과학자, 기술자들이 과학기술발전의 추세에 맞게 첨단과학과 기초과학발전에 힘을 넣어 나라의 과학기술을 세계적수준에 올려세우도록 하여야 합니다.》(《김정일선집》증보판 제20권 62페이지)

Agrobacterium tumefaciens CP4기원의 5-에놀피루빌시킴산-3-린산합성 효소유전자(*cp4-epsps*)가 도입된 작물들은 글리포세이트(N-포스포노메틸-글리신)살초제에 대한 견딜성을 나타낸다.[2, 5]

본문에서는 *cp4-epsps*재조합대장균의 주변질추출물로부터 살초제견딜성재조합단백질(CP4-EPSPS)항원을 얻은 연구결과에 대하여 논의하였다.

재료와 방법

재료 CP4-EPSPS항원발현재조합균주로는 *E. coli* BL21(DE3)-pET32a(+)/*cp4-epsps*를 리용하였다. 이미다졸과 이소프로필티오갈락토시드(IPTG), 단백질분자량표식자, 아크릴아미드, 니켈-니트릴로삼초산(Ni-NTA)아가로즈겔 등은 《Sigma》제품을, CP4-EPSPS검출지시퍼는 《Agdia》제품을 리용하였다.

방법 CP4-EPSPS항원발현재조합균주를 LB(Amp 100 μ g/mL 포함)배지 10mL에 접종하고 37 $^{\circ}$ C, 250r/min에서 하루밤 배양한 후 유도배양을 진행하였다. 유도배양은 IPTG농도 0.025mmol/L, 온도 25 $^{\circ}$ C 조건에서 7h동안 진행하였으며 이 배양물 1L를 원심하여 얻은 균체로부터 선행방법[4]으로 주변질추출물을 얻었다.

주변질추출물을 류안염석(포화도 50%)한 후 투석(50mmol/L 린산완충액 PBS, pH 7.8)하고 Ni-NTA아가로즈겔친화성 크로마토그래프법[1]으로 단백질분획화하였다. 50mmol/L PBS용액(pH 8.0)으로 평형화시킨 Ni-NTA아가로즈겔탑(ϕ 1.0cm \times 2.5cm, 2mL)에 추출물을 흡착시키고 50mmol/L PBS용액(pH 6.0)으로 세척한 다음 200mmol/L의 이미다졸을 포함한 50mmol/L PBS용액(pH 6.0)을 1mL/min의 속도로 통과시키면서 용출되는 단백질분획을 수집하였다.

CP4-EPSPS순도는 SDS-PAGE(12%)상에 대한 덴시토그램으로, 총단백질농도는 Bradford법으로 결정하였다.

결과 및 논의

배양액 1L에서 얻은 항원발현재조합균주의 IPTG유도배양균체 3g으로부터 주변질추출법으로 단백질을 분리한 다음 12% SDS-PAGE를 진행하고 덴시토메터로 분석하였다.(그림 1, 2)

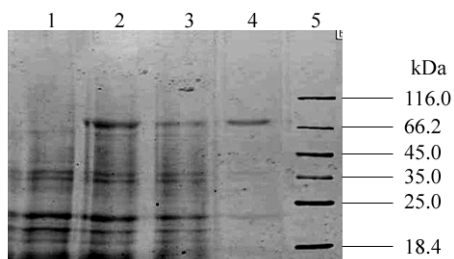


그림 1. *E. coli* BL21(DE3)/*cp4-epsps* 배양균체 추출물에 대한 12% SDS-PAGE상

- 1-비유도배양균체의 초음파추출물,
- 2, 3-유도배양균체의 초음파추출물,
- 4-유도배양균체의 주변질추출물,
- 5-단백질분자량표식자

주변질추출물에서는 유도발현산물이 비교적 단일한 띠로 관찰되었다. 이것은 재조합 유전자의 발현운반체 pET32a(+)에서의 재조합구조특성으로부터 유도발현산물이 주변질에 분비된다는것을 확증해준다.

우리는 얻어진 주변질추출물로부터 염석과 투석공정을 거쳐 3mL의 단백질용액(단백질농도 132mg/mL)을 얻고 Ni-NTA아가로즈겔탑에 통과시킨 후 6mL의 이미다졸용액으로 용출하였다.(그림 3)

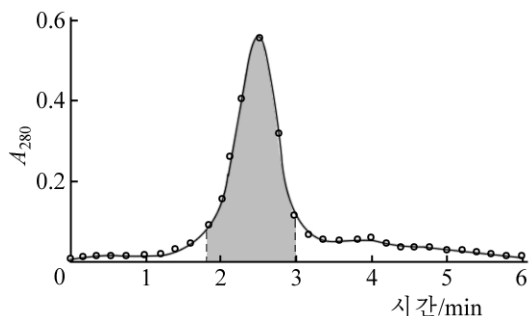


그림 3. Ni-NTA아가로즈겔크로마토그램
분획체적 0.2mL, 용출속도 1mL/min

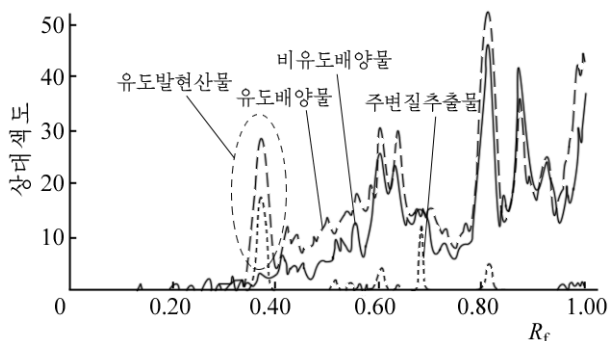


그림 2. PAGE의 덴시토그램

그림 1, 2에서 보는바와 같이 재조합균주의 유도배양물에서 유도발현산물인 목적하는 크기의 재조합 단백질띠(70kDa근방)가 관찰되었다.

그림 3에서 보는바와 같이 분획들에 대한 CP4-EPSPS검출지시띠검사결과 표식된 부분의 분획들에 재조합단백질이 들어있었다.

Ni-NTA아가로즈겔탑에서 분획화한 항원 단백질의 순도를 12% SDS-PAGE상으로 평가한 결과는 그림 4와 같다.

그림 4에서 보는바와 같이 Ni-NTA아가로즈겔탑으로 재조합단백질을 명백한 단일띠로 분획화할수 있었다. 분획 6개를 합하여 얻은 1.2mL 재조합단백질용액의 단백질농도는 17mg/mL였으며 순도는 97.3%였다.

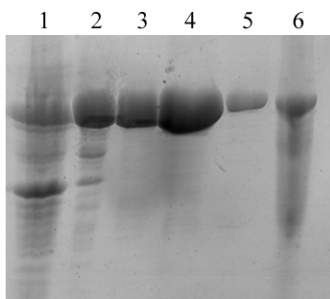


그림 4. Ni-NTA아가로즈겔탑분획들의 12% SDS-PAGE상(Γ)과 분획시료영동상에 대한 덴시토그램(L))

- 1-균체마쇄물, 2-주변질추출물(염석, 투석한것), 3-5는 Ni-NTA아가로즈겔탑분획들, 6-BSA

다음 얻어진 재조합단백질의 항원성[3]을 CP4-EPSPS항원검출지시띠로 판정한 결과는 그림 5와 같다.

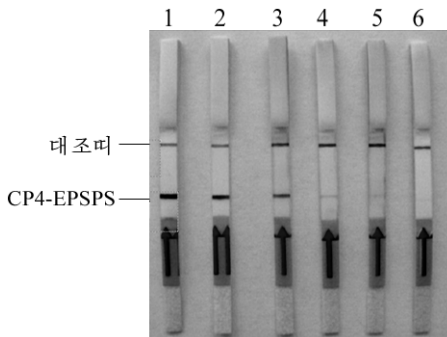


그림 5. CP4-EPSPS검출지시띠에 의한 재조합단백질의 항원성판정

1-CP4-EPSPS용액(100 μ g/mL), 2-CP4-EPSPS용액(10 μ g/mL), 3-CP4-EPSPS용액(1 μ g/mL), 4-CP4-EPSPS용액(100ng/mL), 5-CP4-EPSPS용액(10ng/mL), 6-음성대조(H₂O)

그림 5에서 보는바와 같이 CP4-EPSPS검출지시띠의 면역학적검사결과 발현된 재조합단백질 CP4-EPSPS는 지시띠의 검출한계(100ng/mL)에서도 양성을 나타냄으로써 항원성을 충분히 가진다는것을 보여주었다.

맺 는 말

재조합CP4-EPSPS항원발현균주유도배양액 1L에서 얻은 균체의 주변질추출물로부터 순도가 97.3%인 항원단백질용액 1.2mL(단백질농도 17mg/mL)를 얻었다.

분리한 항원단백질은 분자량이 70kDa정도이며 충분한 항원성을 가진다.

참 고 문 헌

- [1] J. A. Bornhorst et al.; Methods Enzymol., 326, 245, 2000.
- [2] R. W. David; Crop Sci., 46, 30, 2006.
- [3] Arne Holst Jensen; Biotechnology Advances, 27, 1071, 2009.
- [4] Shinzaburo Takamiya; Archives of Biochemistry and Biophysics, 413, 253, 2003.
- [5] Xu Jun-Wang et al.; 植物学报, 44, 2, 188, 2002.

주체104(2015)년 5월 5일 원고접수

Isolation of Herbicide Tolerance Recombinant Protein Antigen CP4-EPSPS

Han Ji Hyon, Sonu Kyong Hui and Kim Song Jun

We isolated antigen needed for producing anti-CP4-EPSPS antibody from *E. coli* strain expressing CP4-EPSPS by using Ni-NTA agarose gel.

We confirmed that the MW of recombinant protein was about 70kDa on 12% SDS-PAGE. It has enough antigenicity and the purity of CP4-EPSPS is 97.3%.

Key words: CP4-EPSPS, Ni-NTA, isolation