

## 재조합사람상피성장인자봉입체의 가용화에 미치는 몇가지 요인의 영향

김계룡, 김영호

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.[1-3]

우리는 대장균에서 봉입체형태로 발현되는 재조합사람상피성장인자를 효소가용화법으로 분리하기 위한 연구를 하였다.

### 재료와 방법

균주로는 hEGF유전자를 삽입한 재조합플라스미드(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》), 효소(《Amresco》), 쿠마시청(Coomassie Blue R250), 단백질분자량표식자(《Thermo Scientific》) 등을 리용하였다.

종균배양배지(LB배지에 카나미친을 100 $\mu$ g/mL 되게 첨가)에서 12~14h 진탕배양(37 $^{\circ}$ C, 220r/min)하고 유도배양배지(LB배지에 카나미친을 25 $\mu$ g/mL 되게, IPTG를 1.0mmol/L 되게 첨가)에서 6~8h동안 유도배양하였다.

균체를 모으고 얼음욕에서 초음파처리(20kHz, 300W의 초음파로 2min 처리, 5min 정지, 10회 반복)한 후 세척하여 잡단백질을 제거하고 봉입체를 얻은 다음 효소용액에서 가용화하였다.

균체시료에 대하여 15% 겔에서 SDS-PAGE를 진행하고 0.1% 쿠마시청으로 염색한 다음 rhEGF의 존재유무를 관찰하였다.[3, 5]

가용화용액을 생물소형광도계(《Eppendorf Biophotometer Plus》)로 파장 260, 280, 340nm에서 흡광도를 측정하고 다음의 공식에 따라 단백질농도(mg/mL)를 계산하였다.

$$C = 1.5 \times (A_{280} - A_{340}) - 0.75 \times (A_{260} - A_{340})$$

### 결과 및 논의

#### 1) 가용화용액의 효소농도와 pH의 영향

효소에 의한 봉입체의 가용화는 가역적인 변성과정으로서 효소의 농도에 따라 그 가용화정도가 차이난다.[4] 우리는 1~8mol/L의 효소용액으로 재조합사람상피성장인자

봉입체를 가용화하고 원심분리상청액과 침전물들에 대하여 15% 겔에서 SDS-PAGE를 진행하였다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 재조합사람상피성장인자봉입체는 1mol/L의 노소용액에서부터 약간씩 가용화되다가 4mol/L에서부터는 급격히 많은 량 가용화되었다. 보통 봉입체의 가용화에는 8mol/L 노소를 리용[4]하지만 실험으로부터 재조합사람상피성장인자봉입체의 가용화를 위한 최소노소농도는 4mol/L라는것을 알수 있다.

다음 재조합사람상피성장인자봉입체의 가용화에 미치는 pH의 영향을 보았다.(그림 2)

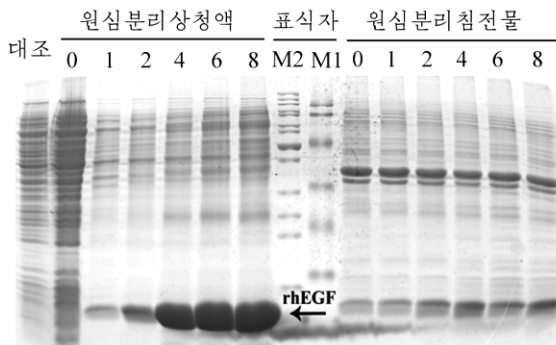


그림 1. 노소농도에 따르는 재조합사람상피성장인자봉입체의 가용성정도  
0-8은 노소의 농도가 각각 0, 1, 2, 4, 6, 8mol/L인 경우, 가용화시간은 30min

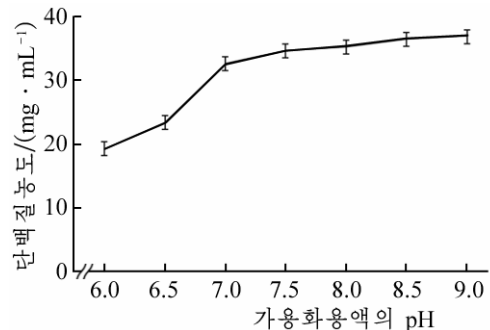


그림 2. 가용화용액의 pH에 따르는 단백질농도변화

가용화용액으로는 4mol/L의 노소용액을 씀, 얼음욕에서 30min 방치

그림 2에서 보는바와 같이 가용화용액의 pH가 증가함에 따라 원심분리상청액속의 단백질함량은 증가하였다. 특히 재조합사람상피성장인자봉입체는 pH 7.0이상에서 가용화가 잘되었는데 8.5이상에서는 rhEGF의 활성이 떨어지므로[6] 가용화에 합리적인 pH구간을 7.0~8.0으로 보았다.

이로부터 재조합사람상피성장인자봉입체에 대한 가용화용액의 노소농도를 4mol/L이상으로, pH는 7.0~8.0으로 정하였다.

## 2) 봉입체와 가용화용액의 비와 가용화시간의 영향

봉입체와 가용화용액의 비가 재조합사람상피성장인자봉입체의 가용화에 미치는 영향을 보았다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 봉입체와 가용화용액의 비가 작아짐에 따라 용액속에 가용화되는 단백질의 농도는 점차 줄어들지만 추출되는 총단백질의 량은 많아졌다. 봉입체 : 가용화용액비가 1 : 10일 때 가용화되는 총단백질의 량은 400mg정도로 가장 많았다. 이로부터 재조합사람상피성장인자봉입체의 가용화에서 봉입체 : 가용화용액비를 1 : 10으로 정하였다.

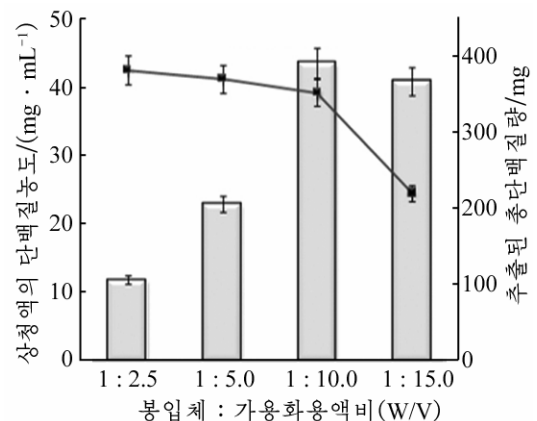


그림 3. 봉입체:가용화용액비에 따르는 가용화용액속의 단백질농도와 총단백질량  
선그래프: 상청액의 단백질농도, 기둥그래프: 추출된 총단백질량; 가용화시간: 얼음욕에서 30min 방치

가용화시간에 따르는 재조합사람상피성장인자봉입체의 가용화정도를 보았다.(그림 4)

그림 4에서 보는바와 같이 가용화시간이 길어짐에 따라 가용화되는 단백질의 함량도 증가하였다. 60min이상에서는 단백질함량이 더이상 증가하지 않았으므로 합리적인 가용화시간을 60min으로 정하였다.

### 맺는 말

재조합사람상피성장인자봉입체의 가용화를 위한 합리적인 조건은 다음과 같다. 효소용액의 농도는 4mol/L이상이고 pH는 pH 7.0~8.0이며 봉입체 : 가용화용액의 비는 1 : 10, 가용화시간은 60min이다.

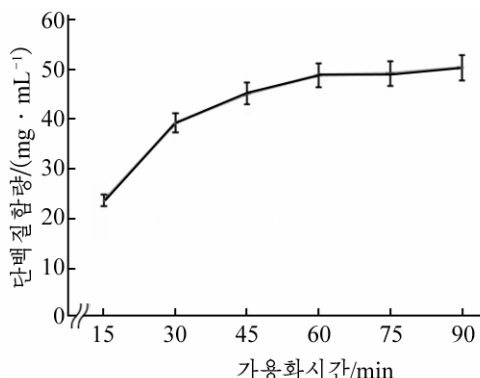


그림 4. 가용화시간에 따르는 가용화용액의 단백질함량변화  
가용화용액의 pH 7.2~7.4

### 참고 문헌

- [1] 김일성 종합대학학보(자연과학), 61, 8, 104, 주체104(2015).
- [2] S. Cohen et al.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 4, 1317, 1975.
- [3] P. U. Le et al.; Protein Expression and Purification, 64, 108, 2009.
- [4] K. Sharma et al.; Protein Expression and Purification, 60, 7, 2008.
- [5] Cao Qi Lei et al.; Journal of Innate Immunity, 7, 2, 153, 2015.
- [6] 陆兵 等; 生物技术通讯, 12, 3, 2001.

주체106(2017)년 1월 5일 원고접수

## The Effect of Some Factors on Solubilization of Recombinant Human Epidermal Growth Factor Inclusion Body

Kim Kye Ryong, Kim Yong Ho

The suitable conditions for solubilization of recombinant human epidermal growth factor(rhEGF) inclusion body are as follows: concentration of urea solution is higher than 4.0mol/L, pH is 7.0~8.0, rate of inclusion body and lysis buffer is 1 : 10 and solubilization time is 60 min.

Key words: recombinant hEGF, inclusion body, solubilization