

## 사람글루카곤양펩티드-1(GLP-1) 4량체단백질의 분리정제

조원철, 강영수, 김춘혁, 라승룡

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《첨단과학기술분야에서 세계적경쟁력을 가진 기술들을 개발하기 위한 투쟁을 힘있게 벌려야 합니다.》

발병률이 높은 난치성질병인 당뇨병을 치료하는것은 인민들의 건강증진과 관련된 중요한 문제의 하나이다.

이로부터 우리는 II형 당뇨병의 치료에서 세계적인 주목을 끌고있는 사람글루카곤양펩티드-1(GLP-1)[3, 4, 6]을 4량체형식으로 발현시키고 분리정제하기 위한 연구를 하였다.

### 재료 및 방법

#### 1) 재료

GLP-1발현균그루로는 *E.coli* BL21(DE3)(pET24b-GLP1)를 리용하였다.

크로마토그래프용담체로는 DEAE-섬유소, 세파덱스 G-100, Ni-IDA(혹은 NTA)를 리용하였다.

시약으로는  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{HCl}$ , 이미다졸 등을 리용하였다.

GLP-1 4량체단백질의 아미노산배열은 다음과 같다.

MRHGGEGTFTSDVSSYLEEQAAQEFIAWLVKHGGEGTFTSDVSSYLEEQAAQEFIAWLVKHG  
EGTFTSDVSSYLEEQAAQEFIAWLVKHGGEGTFTSDVSSYLEEQAAQEFIAWLVKLEHHHHHHH

밑줄을 한번 친것(굵은 선과 점선)은 GLP-1펩티드의 반복배열을 보여주며 밑줄을 두 번 친것은 C말단의 His Tag를 나타낸다.

#### 2) 방법[1, 2, 5]

초음파처리 GLP-1 4량체단백질을 분리하기 위하여 젖은 균체 20g을 완충액 80mL에 현탁하고 초음파처리하였다. 초음파처리는 4°C에서 출력 300W, 3s 처리, 3s 휴식하면서 40min 씩 2회 진행하였다.

DEAE-섬유소크로마토그래프에 의한 정제 초음파처리상등액을 20mmol/L 린산나트륨 완충액(pH 8.0)으로 미리 평형화시킨 DEAE-섬유소탐에 흡착시키고 같은 완충액으로 세척한 후 0~1mol/L NaCl농도구배로 용출시켰다.

세파덱스 G-100크로마토그래프에 의한 정제 DEAE-섬유소용출분획을 20mmol/L 린산나트륨완충액(pH 7.0, 0.1mol/L NaCl 포함)으로 평형화한 세파덱스 G-100에서 분획화하였다.

Ni-IDA(혹은 NTA) 친화성크로마토그래프에 의한 정제 세파덱스 G-100분획을 우와 같은 완충액으로 미리 평형화한 Ni-IDA담체에 흡착시키고 10mmol/L 이미다졸용액으로 세척한 후 250mmol/L 이미다졸용액으로 용출시켰다.

매 정제단계에서 4량체GLP-1단백질의 상대함량은 SDS-PAAG의 덴시토그램[1]으로 평가하였다.

## 결과 및 고찰

### 1) DEAE-섬유소크로마토그래프에 의한 정제

DEAE-섬유소크로마토그래프를 리용하여 GLP-1 4량체단백질을 분획화한 결과(그림 1) GLP-1 4량체의 초음파상등액시료를 리용한 DEAE-섬유소크로마토그래프정제단계에서는 잡단백질이 많이 제거되었으며 목적단백질의 상대함량이 14%로부터 35%로 높아졌다.

### 2) 세파덱스 G-100크로마토그래프에 의한 정제

DEAE-섬유소용출분획을 세파덱스 G-100크로마토그래프로 분획화하였다.(그림 2)

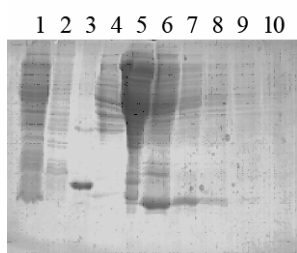


그림 1. DEAE-섬유소크로마토그래프 분획의 SDS-PAGE상

1-초음파상등액, 2-세척분획, 3-리조짐(14 300Da), 4-10은 용출분획

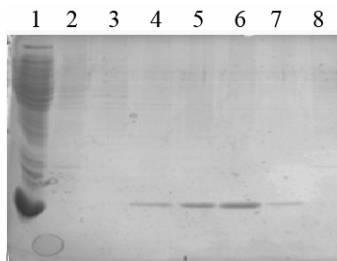


그림 2. 세파덱스 G-100크로마토그래프분획의 SDS-PAGE상

1은 DEAE-섬유소용출분획, 2는 1-5번 분획, 3은 6-9번 분획, 4는 10-12번 분획, 5는 13-18번 분획, 6은 19-21번 분획, 7은 22, 23번 분획, 8은 24-26번 분획

GLP-1 4량체의 DEAE-섬유소분획을 리용한 세파덱스 G-100크로마토그래프정제단계에서도 잡단백질이 많이 제거(그림 2)되었으며 결과 목적단백질의 상대함량이 35%로부터 76%로 높아졌다. 목적단백질의 용출구간은 10-26번 분획이 포함된 구간이었다.

### 3) Ni-IDA크로마토그래프에 의한 정제

세파덱스 G-100려과분획을 Ni-IDA크로마토그래프로 분획화하였다.

GLP-1 4량체의 세파덱스 G-100분획을 리용한 Ni-IDA크로마토그래프정제단계에서는 잡단백질이 거의 제거(그림 3)되었으며 목적단백질의 상대함량이 76%로부터 95%로 높아졌다.

### 4) 분리정제공정별분석

GLP-1 4량체단백질의 정제결과와 분리정제공정별 분리특성은 표, 그림 4와 같다.

표. GLP-1 4량체단백질의 분리정제결과

정제단계	총단백질량 /mg	목적단백질 상대함량/%	목적단백질량 /mg	거둠률 /%	정제도 /배
초음파처리	2 060	14	288.4	100	1
DEAE-섬유소분획화	360	35	126	43.7	2.5
세파덱스 G-100려과	130	76	98.8	34.3	5.4
Ni-IDA분획화	84	95	74.8	27.7	6.8

초기균체량 20g

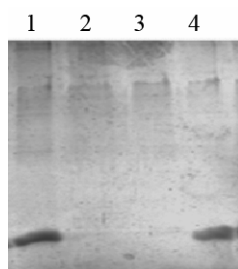


그림 3. Ni-IDA크로마토그래프분획의 SDS-PAGE상

1-G-100려과분획, 2-세척분획, 3-10mmol/L 용출분획, 4-초음파상등액(14%), 2-DEAE-섬유소분획(35%), 3-G-100려과(76%), 4-Ni-IDA분획화(95%)

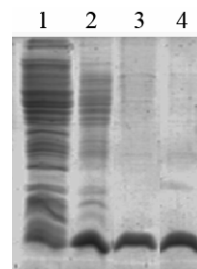


그림 4. GLP-1 4량체단백질의 분리정제과정별 분리특성을 보여주는 SDS-PAGE상

표, 그림 4에서 보는바와 같이 GLP-1 4량체단백질(14%)은 3단계의 크로마토그래프정제공정을 거치면서 순도가 매우 높아졌으며(95%이상) 목적단백질의 최종거둠률은 27%, 정제도는 6.8이었다.

## 맺는 말

GLP-1 4량체단백질은 초음파처리, DEAE-섬유소크로마토그래프, 세파덱스 G-100크로마토그래프, Ni-IDA크로마토그래프정제공정을 거쳐 전기영동적으로 순수한 단백질로 분리정제할수 있다. 분리정제공정의 거둠률은 27%, 정제도는 6.8, 순도는 95%이상이다.

## 참고 문헌

- [1] J. Sambrook; Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 205~208, 2002.
- [2] Z. Gu et al.; Protein Expr. Purif., 25, 1, 174, 2002.
- [3] S. K. Garg et al.; Diabetes Technology & Therapeutics, 17, 1, 119, 2015.
- [4] L. Chandler et al.; Journal of Diabetes Nursing, 19, 1, 32, 2015.
- [5] Meenakshi Amar Kumar; International Journal of Applied Research, 1, 5, 41, 2015.
- [6] 李校芳; 药物蛋白质分离纯化技术, 化学工业出版社, 9~11, 133~138, 2005.

주제108(2019)년 10월 5일 원고접수

## Isolation and Purification of Human Glucagon Like Peptide-1(GLP-1) Protein of Tetramer

Jo Won Chol, Kang Yong Su, Kim Chun Hyok and Ra Sung Ryong

Human glucagon like peptide-1(GLP-1) protein of tetramer was electrophoretically purified protein by sonication, DEAE-cellulose, Sephadex G-100 and Ni-IDA sepharose chromatographic processes, and the yield was 27%, the purification was 6.8 and the purity was above 95%.

Keywords: human glucagon like peptide-1(GLP-1) protein, isolation, purification, chromatography