

피부투과펩티드와 사람상피성장인자를 융합한 재조합플라스미드 pET-TD1-hEGF의 제조

김영호, 허명식

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《당의 과학기술중시로선을 철저히 관철하여 첨단과학기술분야를 개척하며 나라의 과학기술을 높은 수준에 올려세워야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제23권 502페이지)

피부투과펩티드 TD1은 2006년 파취현시기술로 발견한 11개 아미노산(ACSSSPSKHCG)으로 이루어진 신호분자[2, 3]로서 최근 피부투과를 통한 새로운 방식의 유전자재조합약물 개발에서 세계적인 관심사로 되고있다.[4, 6, 7]

우리는 여러가지 피부외상과 수술후 상처회복, 위 및 십이지장궤양, 기능성화장품 등에 광범히 리용[1, 5]되고있는 재조합사람상피성장인자의 피부투과성을 높이기 위하여 피부투과펩티드 TD1과 사람상피성장인자를 융합하여 재조합플라스미드 pET-TD1-hEGF를 제조하고 그 염기배열을 분석하였다.

재료와 방법

재료 PCR를 위한 주형으로 재조합플라스미드 pET30c-hEGF를, 숙주균으로는 *E. coli* DH5 α 와 *E. coli* BL21(DE3)을 리용하였다.

시약으로는 Taq효소와 PCR반응키트(《Takara》), DNA회수키트(《TianGen》), T4 DNA리가제와 제한효소 *Nde* I와 *Not* I, 효소반응용액들(《BioLabs》), 핵산분자량표식자(《Fermentas》)등을 리용하였다.

방법 TD1과 hEGF를 융합하는 두 단계의 PCR반응을 위한 프라이머배열은 상류프라이머에 *Nde* I절단점을, 하류프라이머에 *Not* I절단점을 덧붙여 DNAMAN프로그램을 리용하여 설계하였다.(표 1)

표 1. TD1과 hEGF의 융합을 위한 PCR반응용프라이머배열

프라이머 종류	염기배열	산물길이/bp
5' TD1 프라이머	ACATATGGCTTGTCTCTAGTCCTTCTAAGCATTG <i>Nde</i> I	230
5' Linker 프라이머	CGGTGGGGTGGTGGTTCT GGGGGTGGTGGTTCTATGAATAGTGACTCTG	196
3' hEGF 프라이머	ACGCGGCCGCCTAGCGCAGTTCCCACCACT <i>Not</i> I	159

PCR반응[1]은 50 μ L반응계로 예비반응 95 $^{\circ}$ C 5min→변성 95 $^{\circ}$ C 30s, 아닐링 58 $^{\circ}$ C 30s, 연장 72 $^{\circ}$ C 30s, 반복 30회→72 $^{\circ}$ C 10min으로 하였다.

TD1-hEGF융합유전자와 pET-30c(+)(운반체)에 대한 제한효소(*Nde* I과 *Not* I)절단반응과 T4 DNA리가제 연결반응, 형질전환, 플라스미드분리, DNA토막의 회수는 선행방법[5, 8]으로 진행하였다. 유전자배열분석은 전문배열분석기관에 의뢰하여 진행하였다.

결과 및 논의

1) PCR에 의한 TD1과 hEGF의 융합

두 유전자 *TD1*과 *hEGF*의 융합은 펩티드 GGGGS를 사이에 두고 연결하며 운반체 pET30c(+)(+)의 삽입절단점은 *Nde* I과 *Not* I로 설계하였다.(그림 1)

먼저 재조합플라스미드 pET30c-hEGF를 주형으로 하여 5' hEGF Linker 프라이머와 3' hEGF *Not* I 프라이머로 1단계PCR를 진행하고 다음 회수한 반응산물을 주형으로 하여 5' TD1 *Nde* I 프라이머와 3' hEGF *Not* I 프라이머로 2단계PCR를 진행하였는데 그 결과는 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 1단계PCR 반응에서 크기가 196bp로 예상되는 *Linker-hEGF*의 띠가 200bp구역에서 정확히 나타났다. 그리고 2단계PCR반응에서도 크기가 300bp로 보이는 *TD1-hEGF*의 띠가 300bp구역에서 정확히 나타났다.

이렇게 두 단계의 PCR에 의하여 *TD1*과 *hEGF*가 정확히 융합되었다.

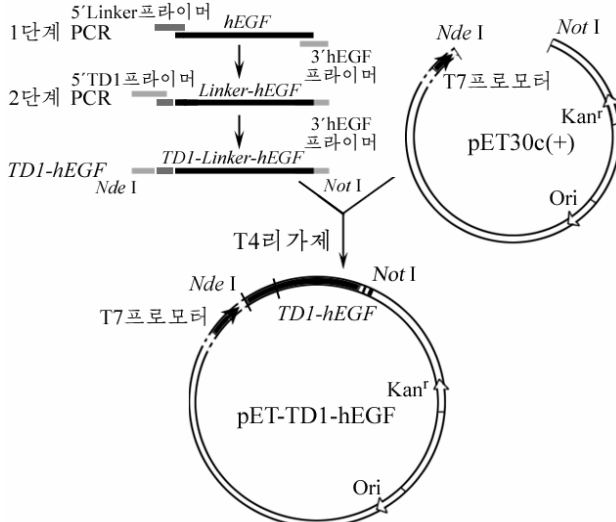


그림 1. *TD1*과 *hEGF*의 융합과 재조합플라스미드 pET-TD1-hEGF의 제작설계

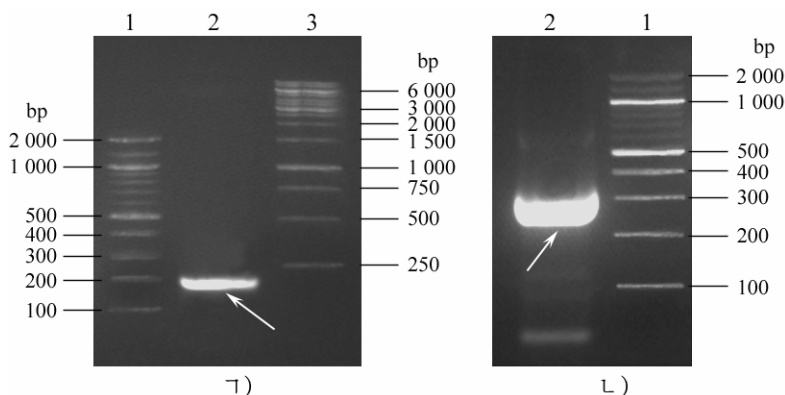


그림 2. *TD1*과 *hEGF*융합을 위한 두 단계 PCR반응결과

㉠) 1단계, ㉡) 2단계; 1-100bp 분자량표식자, 2-융합된 유전자, 3-1kb 분자량표식자

2) TD1-hEGF발현운반체의 제조

PCR로 융합한 *TD1-hEGF*유전자와 대장균운반체pET-30c(+)(+)를 두 제한효소(*Nde* I과 *Not* I)로 절단하고 T4 DNA리가제로 연결시켰다. 연결된 재조합플라스미드를 대장균(*E. coli* DH5 α)

에 형질전환시키고 선발배지(100 μ g/mL의 카나미신을 첨가한 LB배지)에서 선발배양하였다.

선발배지에서 자란 균주들 중에서 6개의 클론을 취하여 플라스미드를 분리하고 제한효소(*Nde* I와 *Not* I)로 절단하여 검정하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 검정한 모든 클론에서 크기가 230bp정도로 예상되는 *TD1-hEGF* 절단띠가 정확히 나타났다.

1개의 클론을 취하여 앞에서 이미 리용하였던 세종의 프라이머들을 쌍으로 *TD1-hEGF*의 삽입에 대한 PCR검정을 진행하였다.(그림 4)

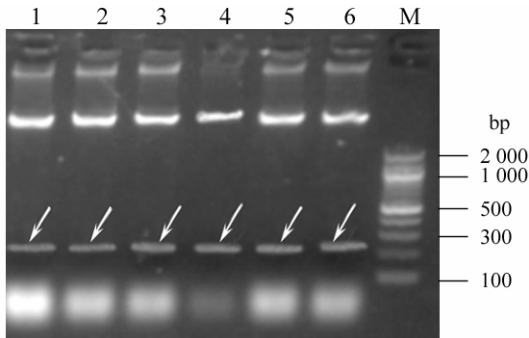


그림 3. 재조합플라스미드 pET-TD1-hEGF에 대한 제한효소검정 결과

M은 분자량표식자, 1-6은 선발된 클론들

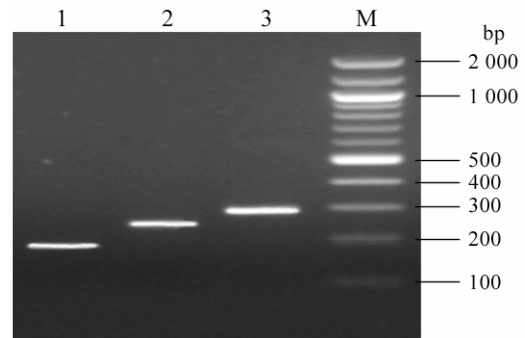


그림 4. 재조합플라스미드 pET-TD1-hEGF에 대한 PCR검정 결과

M은 분자량표식자, 1-5' hEGF Sal I 프라이머와 3' hEGF *Not* I 프라이머(187bp), 2-5' hEGF Linker 프라이머와 3' hEGF *Not* I 프라이머(196bp), 3-TD1 *Nde* I 프라이머와 3' hEGF *Not* I 프라이머(230bp)

그림 4에서 보는것처럼 세가지 PCR검정에서 *hEGF*와 *Linker-hEGF*, *TD1-hEGF*의 띠들이 예측한 180bp와 200, 230bp구역들에서 모두 정확히 나타났다.

다음 새로 제조한 재조합플라스미드 pET-TD1-hEGF에서 *TD1-hEGF*의 삽입정확성을 확인하기 위한 염기배열분석결과는 그림 5와 같다.

ACATATGGCTTGTTCTTCTAGTCCTTCTAAGCATTGCGGTGGGGGTGGTGGTT
CTATGAATAGTGACTCTGAATGTCCCTGTCCACGATGGGTACTGCCTCCAT
GATGGTGTGTGCATGTATATTGAAGCATTGGACAAGTATGCATGCAACTGTG
TTGTTGGCTACATCGGGGAGCGATGTCAGTACCGAGACCTGAAGTGGTGGGA
ACTGCGCTAG

그림 5. *TD1-hEGF*가 삽입된 pET-TD1-hEGF에 대한 배열분석결과
회색으로 표시한 부분은 *Linker*, 한 밑줄로 표시한 부분은 *TD1*, 두 밑줄로 표시한 부분은 *hEGF*

그림 5에서 보는것처럼 염기배열분석결과 *TD1-hEGF*가 대장균운반체 pET30c(+)*의 Nde* I과 *Not* I절단점사이에 정확히 삽입되었다.

맺 는 말

두 단계의 PCR반응으로 유전자 *TD1*과 *hEGF*들을 연결하고 대장균운반체 pET30c(+)*에* 삽입하여 재조합플라스미드 pET-TD1-hEGF를 제조하였다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 61, 8, 104, 주체104(2015).
- [2] R. P. Mark; Nature Biotechnology, 24, 4, 416, 2006.
- [3] Yongping Chen et al.; Nature Biotechnology, 24, 4, 455, 2006.
- [4] J. Mohammadian et al.; Advanced Pharmaceutical Bulletin, 3, 2, 473, 2013.
- [5] Ren-quan Ruan et al.; European Journal of Medicinal Chemistry, 62, 405, 2013.
- [6] S. Zheng et al.; Journal of University of Science and Technology of China, 39, 4, 344, 2009.
- [7] H. Kalluri et al.; AAPS Pharm. Sci. Tech., 12, 1, 433, 2011.
- [8] Cao Qi Lei et al.; Journal of Innate Immunity, 7, 2, 153, 2015.

주체105(2016)년 6월 5일 원고접수

Construction of Recombinant Plasmid pET-TD1-hEGF Included with Fusion Gene of Transdermal Peptid TD1 and Human Epidermal Growth Factor

Kim Yong Ho, Ho Myong Sik

Transdermal peptid TD1 and human epidermal growth factor (hEGF) genes were fused by two steps of PCR and recombinant plasmid pET-TD1-hEGF was constructed by inserting into *E. coli* expression vector pET-30c(+).

Key words: hEGF, transdermal peptid, TD1, recombinant plasmid