

활성 최적화를 위한 백금을 이용한 Epidermal Growth Factor(EGF) 무기물 하이브리드의 제조

김선호*, 오재영*, 최소현*, 최낙식**, 이우일*

*건양대학교 의료신소재학과

** (주)케이프로텍

rktndnjs5@naver.com

Preparation of Epidermal Growth Factor(EGF) Inorganic Hybrid for Activity Optimization by Platinum

Sun-Ho Kim*, Jae-Young Oh*, So-Hyeon Choi*, Nak-Sik Choi**, Woo-Yiel Lee*

*Dept. of Biomedical Materials, Konyang University

**Kprotec Inc.

요약

본 논문에서는 기능성 소재인 Epidermal Growth Factor(EGF)의 다량 생산 및 세포 내부화 방지에 초점을 두어 연구를 진행하였다. 단백질 의약품, 항체 등은 신체에 적용시 세포 내부화 및 반감기로 인하여 제 기능을 내지 못하는 실상이다. 이를 방지하기 위하여 생체 적합성이 우수한 백금과 고정화를 통하여 이를 방지하는 연구를 진행하였다. 다량 생산을 위하여 대장균을 통한 다량 발현 시스템을 선택하였으며 이에 맞게 코돈 최적화를 통해 다량 발현이 가능하도록 진행하였다. 또한 생체적합성을 지닌 백금 기관을 고정화함으로써 EGF의 입체적 크기를 증가시켜 세포 내부화를 방지할 수 있도록 하였다.

1. 서론

Epidermal Growth Factor(EGF)는 각 종류에 따라 약 6.5 kDa의 크기를 가지는 기능성 폴리펩타이드이며 배아의 발생, 성장, 조직 복구 및 재생 등에 생리적으로 관여한다. [1]. EGF는 의약품, 기능성 화장품 등 다양한 분야에서 사용되고 있는 추세이나 식품의약품안전처의 화장품 원료 지정에 관한 규정 전문 개정에 따르면 EGF는 기능성 화장품의 소재로 사용할시 총 함량이 10ppm 미만으로 하도록 규제되어있으나 EGF는 작은 크기로 인한 세포 내부화와 짧은 생물학적 반감기를 가지고 있으며 화장품에 사용시 변성이 일어나기도 하여 제 기능성을 내기가 어렵다. 이를 해결하기 위해 인체에 해가 되지 않은 특정 물질을 부착하여 안정성과 반감기를 높이는 연구가 진행되고 있다.[2] 그 예시로 PEGylation은 Polyethylene glycol(PEG)이 단백질이나 항체, 작은 약물, 올리고 뉴클레오타이드 및 다른 생체분자의 표면에 부착되어 크기를 증가시키고 효소 분해로부터 체내 분해를 보호하는 반응이다.[3,4] 이러한 반응은 단백질 내부의 시스테인에 thiol그룹과 반응하여 결합하는 메커니즘을 보인다.[5] 이러한 특성을 이용하여 본 연구에서는 다 기능 소재로 사용되는 EGF의 다량 생산과 무기물인 백금을 결합시켜 EGF의 안정성 및 내부화를 방지시키는 것이 궁극적인 목표이다.

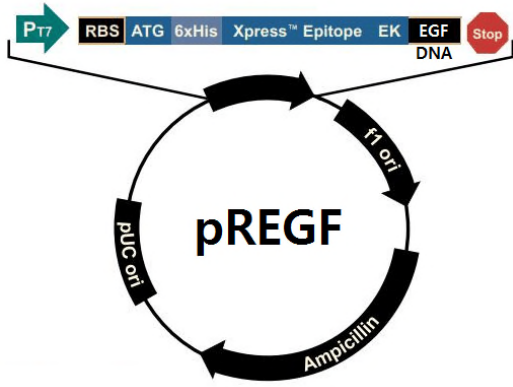
2. 실험 방법

2.1 재료

유전자 증폭을 위한 PCR 시약은 주형 DNA와 primer를 제외하고 TAKARA사에서 구입하였으며 단백질 발현 vector는 ThermoFisher사의 pRSET_A를 사용하였으며 단백질 발현 균주는 enzymonics사 제품의 BL21(DE3)를 사용하였다. 단백질 정제용 column은 Ni-NTA agarose를 이용했으며 각 분석용 시약은 각 실험방법에 기입하였으며 이외의 시약은 모두 일급을 사용하였다.

2.2 재조합 EGF의 발현 벡터 구축

재조합 EGF의 발현 벡터 구축을 위해 사용한 인간 유래의 EGF DNA는 대장균에서 발현하기에 적절하지 않은 코돈을 가지고 있어 기존 아미노산 서열을 바탕으로 코돈 최적화를 진행하여 바이오니아사에 합성을 의뢰하여 확보하였다. 이를 다량 확보하기 위해 PCR을 이용하여 증폭하였고 제한효소 Nde I과 BamH I을 이용하여 pRSET-A vector와 함께 절단 후 T4 DNA ligase를 이용해 재조합 벡터인 pREGF를 구축하였다. 재조합 벡터의 구축 여부는 colony PCR 증폭 후 agarose gel 전기영동을 통해 확인하였다.



[그림 1] pREGF vector의 모식도

3. 실험 결과

3.1 pREGF/BL21(DE3) 형질전환 유무 분석

Ampicillin을 첨가한 SOB agar 배지에 키움으로서 균주에 vector가 삽입됨을 1차적으로 확인하였으며 colony PCR을 통해 2차 확인하였다. Agarose gel 전기영동 분석 결과 100~200bp에서 나타남으로 pREGF가 제대로 구축되었음을 확인하였다.

3.2 pREGF 발현 및 정제 확인

SDS-PAGE를 통하여 단백질 발현을 확인하였다.

2.3 pREGF 발현 및 정제

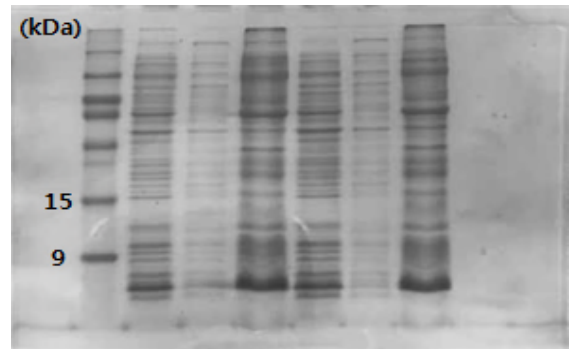
BL21(DE3)균주를 competent cell로 변환 후 형질전환을 진행하였다. ampicillin을 첨가한 SOB agar 배지에 균주를 선별하여 colony PCR로 1차 형질전환을 확인한다. 확인된 균주는 IPTG가 최종농도의 0.1mM이 되도록 첨가 후 37°C, 3hr 발현한다. 발현 후 SDS-PAGE로 결과를 확인하였다. 발현 확인 후 정제는 Ni-NTA chromatography를 사용하였다.

2.4 pREGF 단백질의 refolding

정제가 완료된 pREGF는 Dilution 방법을 통하여 진행하였다. 단백질 refolding에 사용한 buffer는 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT를 첨가하여 제조하였으며 정제된 단백질에 Refolding buffer를 천천히 첨가하여 Urea의 농도를 낮추었다. buffer는 제조한 단백질의 20배를 첨가하였으며, 4°C에서 48시간동안 교반하였다. Refolding 후 수득률을 구하기 위해 BCA protein 분석을 실행하였으며 refolding 과정을 거치기 전 EGF의 활성도를 비교하기 위해 AVIVA systems biology사의 EGF ELISA Kit(Human)을 이용하여 비교 분석하였다. 실험방법은 kit에 나온 protocol을 따랐으며 refolding 전 pREGF와 농도를 같게 한 후 2회씩 3번 반복실험 하였다.

2.5 pREGF-Pt의 Immobilization

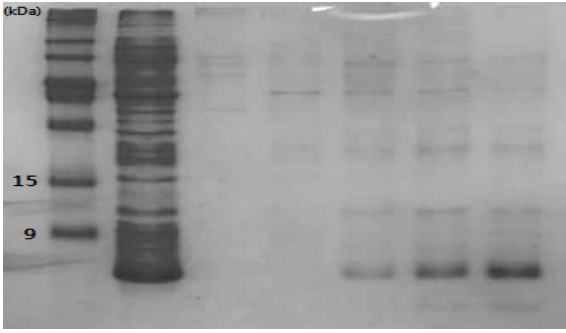
Platinum을 고정 기관으로 사용하기 위해 piranha solution (H₂SO₄ 3 : 1 H₂O₂ v/v%) 으로 30초 세척 후 N₂가스로 건조시켰다. 에탄올을 용매로 10mM cysteine buffer 2를 제조 후 기관을 담그고 16시간 흡착시킨다. 40ug/ml EGF와 10mM phosphate buffer을 혼합 후 75mM EDC와 15mM NHS을 동시에 첨가 후 15분간 교반시킨다. 만들어진 용액에 백금 기관을 넣은 후 1시간 반응 후 0.1M NaOH으로 1시간 세척한다. 결합 유무는 FT-IR로 확인하였다.



[그림 2] SDS-PAGE 분석을 통한 pREGF 발현 확인
(lane 1 : Smart color protein Marker,
lane 2 : non-expression pREGF/BL21(DE3)_1,
lane 3 : soluble protein by pREGF/BL21(DE3)_1,
lane 4 : Inclusion body by pREGF/BL21(DE3)_1,
lane 5 : non-expression pREGF/BL21(DE3)_2,
lane 6 : soluble protein by pREGF/BL21(DE3)_2,
lane 7 : Inclusion body by pREGF/BL21(DE3)_2)

pREGF는 6.5kDa의 EGF 부분 이외에도 6x his tag, epitope 인식 부위, EK 절단부위 등이 융합되어 발현되기 때문에 기존 EGF단백질보다 큰 크기를 가진다. 약 7.5kDa에서 확인되는 것으로 보아 pREGF가 올바르게 발현되었음을 확인하였다. 발현 전 분석 데이터를 보아 pREGF는 봉입체 형태로 발현되는 것을 보아 정제 후 refolding을 통해 구조를 복원해야 함을 알 수 있다.

봉입체에서 Ni-NTA를 이용한 정제는 buffer마다 pH를 다르게 하여 정제를 했으며 용출 결과 pREGF가 제대로 용출되었지만 미량의 단백질이 같이 정제되어 10kDa MWCO amicon membrane을 사용하여 2차 정제를 하였다.



[그림 3] pREGF의 Ni-NTA 정제 유무 확인을 위한 SDS-PAGE 분석

(lane 1 : Smart color protein Marker,
lane 2 : non-purification pREGF,
lane 3 : loading step sample loading solution,
lane 4 : washing step collection solution,
lane 5 : elution step collection solution_9,
lane 6 : elution step collection solution_10,
lane 7 : elution step collection solution_11)

3.3 pREGF의 활성화 분석

활성도는 측정 시료와 농도를 같게 제조한 standard EGF의 활성도를 100%으로 설정한 후 측정값의 평균값으로 계산하여 비교하였다.

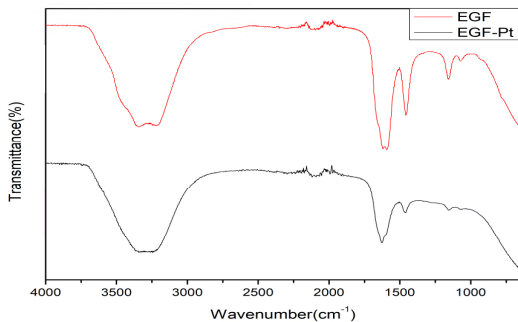
[표 1] pREGF의 단백질 정량 분석 및 활성화 분석

	Inclusion body pREGF	refolding pREGF
BCA protein assay	370ug/ml	361ug/ml
activity	23%	92%

분석 결과 refolding 과정에서 약 2.4%의 손실이 일어났지만 활성화도 비교 결과 약간의 손실이 발생하여도 refolding 상태의 단백질 활성화도가 매우 뛰어나기 때문에 refolding 과정은 필수적인 것을 알 수 있다.

3.4 pREGF-Pt 고정화 검증

정제된 EGF와 함께 고정화한 EGF-Pt 기판은 FT-IR로 분석을 실행하였다.



[그림 4] pREGF와 pREGF-Pt 하이브리드의 결합 유무 확인을 위한 FT-IR 분석

깨끗이 세척된 백금 기판은 FT-IR 분석시 피크가 나타나지 않는 특성을 이용하였으며 [그림 4]와 같이 두 개의 peak가 유사한 것을 보아 성공적으로 하이브리드가 만들어진 것을 확인하였다.

4. 결론

본 연구는 기능성 소재인 Epidermal Growth Factor의 다량 생산 및 세포 내부화의 방식에 대해 연구하였다. 대장균 using에 맞춰 코돈 최적화 결과 대장균에서 다량 생산이 가능해졌으나 inclusion body 형태로 발현되는 것을 확인하였다. 봉입체 형태로는 단백질이 제 기능을 못내기 때문에 refolding을 통하여 구조를 복원시킴으로써 활성도를 비약적으로 증가시켰다. 또한 무기물에 고정화 시킴으로서 기능성 소재로서의 하이브리드 가능성을 확인하였으며 본 연구에서는 백금 기판을 이용하여 실험을 진행하였지만 향후 생체 적합한 금속 입자 또는 유기물을 부착하여 더욱 뛰어난 소재를 제조할 수 있을 것으로 기대된다.

5. 감사의 글

This research was supported by x-mind Corps program of National Research Foundation of Korea(NRF) funded by the Ministry of Science and ICT (2019030267)

참고문헌

[1] Marti, U., Burwen, S.J. and Jones, A.L. (1989), Biological effects of epidermal growth factor, with emphasis on the gastrointestinal tract and liver: An update. *Hepatology*, 9: 126-138. doi:10.1002/hep.1840090122.

[2]The Korean Society for biomaterials, *BIOMATERIALS2nd*,Paju:FreeacademyINC.,2016,p324-325

[3] Balazs, Daniel A, and Wt Godbey. "Liposomes for use in gene delivery." *Journal of drug delivery* vol. 2011 (2011): 326497. doi:10.1155/2011/326497

[4] Paola Milla, Franco Dosio and Luigi Cattel, " PEGylation of Proteins and Liposomes: a Powerful and Flexible Strategy to Improve the Drug Delivery", *Current Drug Metabolism* (2012) 13: 105. <https://doi.org/10.2174/138920012798356934>

[5] Jae-Hyun Lee, *Effect of Pegylation on pharmaceuticals*, 2004 , CN : KAR2003003323