

하이드록실아민 절단을 이용한 재조합 인간 상피세포 성장인자의 제조

김선호, 이우일*
건양대학교 의료신소재학과

Preparation of Recombinant Human Epidermal Growth Factor by Hydroxylamine Cleavage

Sun-Ho Kim, Woo-Yiel Lee*
Department of Biomedical Materials, Konyang University

요약 본 연구의 목적은 재조합 인간 상피세포 성장인자(hEGF)의 발현 확인 및 정제의 용이성을 위해 단백질의 N-말단에 융합된 부분을 제거하기 위하여 기존의 고가의 효소를 사용하지 않고 간단한 화학처리로 융합 태그를 절단하면서도 여전히 친화성 크로마토그래피로 정제가 가능한 재조합 hEGF의 경제적이며 공정이 단순화된 제조법을 제공하는 것이다. 인간 상피세포 성장 인자는 인간 세포 성장 및 증식에 매우 중요한 호르몬이며 이 단백질에 대한 발현 및 정제에 관한 많은 연구가 보고 되었다. 본 연구에서는 hEGF 유전자를 대장균 코돈에 최적화 하였으며 N-말단에 Hydroxylamine에 의한 절단이 가능한 Asparagine과 Glycine이 발현되도록 포함하여 설계하였다. 제조한 DNA를 대장균 발현 벡터인 pRSET_A에 삽입하여 발현용 균주 BL21 (DE3)에 형질전환 시켰으며 재조합 융합 단백질은 대장균에서 샤페론 벡터인 pG-Tf2와 성공적으로 공발현 되었다. 발현된 융합 단백질은 Ni-NTA 컬럼 크로마토그래피로 정제 후 Hydroxylamine으로 처리해 N-말단 융합부분을 제거하였으며 SDS-PAGE를 통해 확인하였다. ELISA 분석 결과 재조합 EGF의 활성이 상업용 hEGF와 92% 이상 유사한 것으로 나타났으며 피부 섬유아세포의 세포증식을 촉진하는 것으로 확인 되었다.

Abstract The purpose of this study was to provide an economical and easy preparation method for recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) without the need for an expensive enzyme to cleave the fusion part. However, the N-terminal fusion part is still useful for affinity chromatography. The hEGF is an important hormone in cell growth and proliferation in humans, and many studies on the expression and purification of this protein have been reported. In the present study, the hEGF gene was designed to be optimized with the *E. coli* codon usage preference and to contain Asn-Gly at the N-terminus of the protein. The gene was inserted into pRSET_A, an *E. coli* expression vector, and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant fusion protein was successfully co-expressed with pG-Tf2, a chaperone vector, in *E. coli* and purified by Ni-NTA column chromatography. The rhEGF was then released by hydroxylamine treatment and confirmed by SDS-PAGE. ELISA analysis showed that the activity of the free rhEGF was more than 92% similar to that of commercial EGF. The biological activity of the rhEGF was confirmed by a cell proliferation test with human skin fibroblasts.

Keywords : Epidermal Growth Factor, Recombination, Co-Expression, Chaperone, Hydroxylamine

본 연구는 2021년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단-현장맞춤형 이공계 인재양성 지원사업(No. 2017H1D8A1029990)과 건양대학교의 지원으로 수행되었음.

*Corresponding Author : Woo-Yiel Lee(Konyang Univ.)

email: lee0519@konyang.ac.kr

Received May 3, 2021

Revised May 26, 2021

Accepted June 4, 2021

Published June 30, 2021

1. 서론

성장인자는 세포의 증식, 분화, 이동, 형태의 형성 및 세포 사멸 등 다양한 세포 기능을 조절한다. 그중 인간 상피세포 성장인자(Epidermal growth factor: EGF, 이하 EGF)는 53개의 아미노산(MW: 6,054 Da), 159개의 DNA로 이루어진 성장 인자로 [1-3] 세포 표면에 존재하는 수용체인 Epidermal growth factor receptor (EGFR)를 활성화하여 다양한 신호 경로로 세포 증식 및 분화를 초래한다[4-7]. 인간 상피세포 성장 인자(hEGF)는 주로 신장, 콩팥, 간, 유선 등에서 유래되었고 1989년 상처의 치유를 위해 사용되었으며 의약품, 기능성 화장품 등에 사용되어왔다[6, 8-10]. 그러나 EGF는 보통 동물의 소변에서 추출했으며 이를 활용하기 위해 5단계에 걸쳐 정제해야 사용이 가능하기 때문에 생산량이 매우 적어 이를 해결하기 위한 재조합 단백질 발현에 대해 많은 연구들이 보고되어 왔다[3, 11].

단백질 발현 및 다량 생산은 동물 세포, 곤충 세포 및 효모 등 여러 숙주가 이용될 수 있는데 그중 대장균은 간단한 조건, 빠른 시간 등 용이성이 뛰어나다는 장점이 있다[12-14].

*E. coli*에서 일부 단백질은 다량 발현 시 높은 전사율로 인하여 봉입체 형태로 발현되기도 한다. 이를 해결하기 위해 다양한 연구가 진행되고 있으며 대표적인 한 방법으로는 샤페론 공발현을 통한 가용성 단백질 발현이 있다[13]. 샤페론은 대장균에서 발현되는 단백질의 응집을 감소시키며 가용성 발현을 증가시키는 트리거 인자(trigger factor)로 GroES, GroEL, DnaK, DnaJ, GrpE 5개의 분자가 존재한다. 트리거 인자는 새로 합성되는 폴리펩타이드를 결합하고 목적 단백질 접힘을 돕는다[15,16]. DnaK 인자는 폴리펩타이드의 접힘을 도울 뿐 아닌 잘못 접힌 단백질을 복구하기위해 작용한다. 이와 달리 GroEL은 번역된 펩타이드에만 작용한다. 이들은 *E. coli*에서 가용성 단백질의 발현에 크게 영향을 미친다[17-19].

E. coli 발현 시스템을 사용하는 경우 재조합 단백질의 N-말단 부위에 발현 확인용의 epitope와 정제의 용이성을 위한 6개의 His tag 부분이 첨가되는 발현 벡터를 주로 사용하게 된다. 이 경우 재조합 단백질의 발현 후 affinity chromatography를 통한 정제를 성공적으로 진행할 수 있지만 N-말단의 융합 태그의 절단에 의한 제거가 반드시 필요하다. 융합 단백질의 절단은 FXa, TEV protease, Entrokinase 등 효소를 사용하여 절단

하는 경우가 많은데 이 효소 반응은 추가적인 chromatography와 같은 정제 과정을 요구하게 되며 경제적 측면에서도 단점으로 지적되어왔다. 이와 같은 단점을 보완하는 효소를 사용하지 않는 방법 중 대표적인 화학처리 방법으로 Hydroxylamine을 이용하여 단백질을 절단하는 방법이 보고되어왔다[20, 21].

우리는 최근에 재조합 hEGF를 활성형태로 발현하기 위한 목적으로 샤페론과의 성공적인 공발현 시스템을 보고 하였다[22]. 그러나 이 공정은 N-말단의 융합태그가 사전에 제거된 형태로 affinity chromatography의 사용이 불가하여 정제과정에서의 번거로움이 존재한다.

본 연구에서는 최근의 재조합 hEGF의 샤페론 공발현 시스템에 N-말단의 6x His tag를 활용하여 정제의 용이성을 추가하면서도 이에 동반되는 부가적인 정제공정을 요구하는 Enterokinase 효소반응을 Hydroxylamine 화학 처리로 대체할 수 있도록 하는 재조합 hEGF 제조 과정이 조사되었다.

2. 본론

2.1 재료

E. coli BL21 (DE3) (iNtRON, Republic of Korea) 와 DH5 α (iNtRON, Republic of Korea)가 단백질 발현 및 재조합 플라스미드의 다량 확보를 위한 숙주로 사용되었으며 단백질 발현을 위한 벡터로는 pRSET_A (Thermo Fisher, USA)가 사용되었다. 샤페론 공발현을 위한 단백질 발현 벡터는 pG-TF2 (TaKaRa, Japan)를 사용하였다. 균주는 SOB broth (Biosesang, Republic of Korea)을 통해 배양하였다. His-tag 단백질을 정제하기위해 Ni-NTA Agarose (QIAGEN, Germany)을 사용하였다. ELISA 분석은 Human EGF ELISA kit (Aviva Systems Biology, USA)를 사용하였고 세포증식 시험에서는 CCD-986sk cell (human fibroblast cell line), IMDM/High Glucose (LM004-01, Welgene), Penicillin/Streptomycin (SV30010, Thermo), Fetal bovine serum (16000-044, Gibco), TrypLE (12604-013, Gibco), 96 well cell culture plate (3595, Corning), EZ-CYTOX (EZ-1000, Daeillab)들이 사용되었다. 그밖에 사용된 시약들은 모두 일급내지 이에 준하는 등급들로 구매하여 사용하였다.

2.2 코돈 최적화 및 Hydroxylamine 인식 서열이 포함된 hEGF 유전자의 확보

최근 연구발표에서 hEGF의 53개 아미노산들이 대장균에서 발현이 용이하도록 대장균 선호 코돈으로 최적화되어 구축된 pEGF[22] template로 사용하였다. Forward primer (pF)에 Hydroxylamine인식 아미노산 서열인 Asparagine-Glycine (Asn-Gly)의 DNA서열 AAC GGC와 BamHI 인식 서열 GGA TCC를 삽입하였으며 reverse primer (pR)는 EcoRI 인식 서열 GAA TTC를 추가하여 아래 Table 1과 같이 설계하였다. hEGF N-말단에 Asn-Gly 서열을 추가하였기 때문에 발현 및 정제 후 Hydroxylamine 처리로 N-말단 융합 태그 부분이 제거되면 본래의 hEGF보다 N-말단에 하나의 아미노산인 Gly이 더 추가되어 54개의 아미노산으로 이루어진 재조합 hEGF가 된다. PCR 반응은 i-StarMAXII™ DNA polymerase (iNtRON, Republic of Korea)를 사용하였으며 30 cycles (94 °C for 30 sec, 52 °C for 30 sec, 72 °C for 30 sec)로 수행하였고 증폭 후 1.5% Agarose gel에서 전기영동으로 분석하였다.

Table 1. Primer design for amplification of hEGF. The restriction enzyme recognition site is underlined. The hydroxylamine recognition sequence is shown in bold.

Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')
Forward primer (pF)	CGC <u>GGA TCC</u> AAC GGC AAC AGC GAT AGC GAA TG
Reverse primer (pR)	GGC CCG <u>AAT TCT</u> TAG CGC AGT TCC CAC

2.3 재조합 hEGF 발현 벡터 구축

PCR로 증폭된 hEGF 유전자를 BamHI, EcoRI 제한효소로 처리하여 동일한 제한효소로 절단한 pRSET_A 벡터에 삽입하여 발현 벡터 pHAEGF를 구축하였다(Fig. 1). BL21 (DE3)을 pHAEGF로 형질전환하여 Ampicillin (Amp)이 포함된 SOB 배지에서 배양하였다. 형질전환된 pHAEGF/BL21 (DE3)는 발현 유무를 확인하기 위해 소량으로 발현 테스트를 진행하였다. OD₆₀₀에서 0.6이 되도록 pHAEGF/BL21 (DE3)를 배양 후 1.0 mM Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 첨가하였다. 발현 확인은 15% SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동으로 발현 유무를 확인하였다.

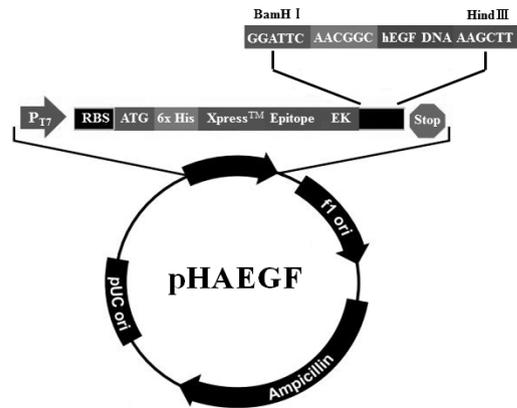


Fig. 1. Schematic representation of the expression vector pHAEGF

2.4 pG-Tf2와 pHAEGF의 공발현

최근 hEGF를 활성형태로의 발현을 목적으로한 사페론과의 공발현에 관한 연구에서 사페론 벡터 중 pG-Tf2와의 공발현이 성공적으로 보고 되었다[22]. 본 연구에서도 활성 형태의 재조합 단백질을 얻기 위하여 pG-Tf2와의 공발현을 시도하였다. *E. coli* BL21 (DE3)를 pG-Tf2로 형질전환 시킨 후 Chloramphenicol (Cm)을 함유한 배지에서 배양하여 형질전환 유무를 1차적으로 확인하고 pG-Tf2/BL21 (DE3)는 다시 pHAEGF로 형질전환 시켰다. Amp와 Cm이 함유된 SOB 배지에서 pG-Tf2, pHAEGF/BL21 (DE3)를 선별하여 배양액에 10 ng/μl Tetracyclin을 첨가하여 OD₆₀₀에서 0.6이 될 때까지 배양 후 1.0 mM IPTG를 첨가하여 6시간동안 추가적으로 배양하였다.

2.5 재조합 hEGF 단백질 정제 공정

배양액을 6,000 rpm에서 30분 원심분리하여 *E. coli*를 회수하고 pellet 1 g당 Buffer 1 (10% Sucrose, 0.1 M Tris-HCl, 0.05 M EDTA, 0.2 M NaCl, pH 7.9) 5 ml로 현탁하고 초음파 처리하였다. 셀 파쇄 용액으로부터 16,000 rpm에서, 30분간 원심 분리하여 수용성 단백질을 획득하였다. 단백질 정제는 BioLogic LP System (BIO-RAD, USA)으로 수행하였다. Column에 Ni-NTA agarose를 충전 후 Buffer 2 (50 mM Sodium phosphate, 500 mM Sodium chloride, 10 mM Imidazole, pH 8.0)을 1 ml/min으로 column을 평형화하고 획득한 수용성 단백질을 0.5 ml/min으로

loading 하였다. 용출 peak가 나타나지 않을 때까지 Buffer 3 (50 mM Sodium phosphate, 500 mM Sodium chloride, 20 mM Imidazole, pH 8.0)로 세척하여 주고 Imidazole 농도가 250 mM이 되는 Buffer 4 (50 mM Sodium phosphate, 500 mM Sodium chloride, 250 mM Imidazole)용액으로 용출하였다.

2.6 재조합 hEGF의 용합 단백질 절단

정제된 재조합 hEGF 수용액(약 13 mg/l) 1 ml를 Buffer 5 (0.2 M Tris-HCl, 2 M Hydroxylamine, pH 9.0) 2 ml에 첨가하여 45 °C에서 2 hr 동안 반응시켰다. 이후 HCl을 이용하여 pH 6.0으로 낮추며 반응을 종결시켰다. 절단된 단백질은 LabScale TFF system (Micropore, USA)을 이용하여 5 kDa membrane으로 목적 단백질 재조합 hEGF를 분리하였다. 이후 15% SDS-PAGE gel을 통해 전기영동으로 분석을 하였다.

2.7 재조합 hEGF의 활성도 분석

활성도 분석은 Human EGF ELISA kit 프로토콜의 설명에 따라 진행하였다. 96 well plate에 standard human EGF와 실험군을 추가한 뒤 37 °C에서 90분 동안 배양하였다. Plate well 바닥이 마르지 않을 정도로 액체를 제거 후 anti-human EGF antibody를 첨가하고 37 °C에서 60분 동안 배양하였다. Washing buffer로 3회 세척 후 1x Avidin-biotin-peroxidase complex를 첨가하고 37 °C에서 30분 배양하고 5회 세척하였다. TMB 발색제를 첨가하여 암실에서 37 °C에서 25분 배양하고 정지용액을 넣어 반응을 종결시켰다. Microplate reader로 OD₄₅₀에서 실험군 및 대조군을 각 2 well씩 3회 반복 측정하였다.

2.8 세포 증식 시험

CCD-986sk cell을 96 well plate에 2 x 10³ cells/well으로 초기 농도를 설정 후 10% Fetal bovine serum과 1% Penicillin/Streptomycin이 첨가된 IMDM/High glucose 용액에서 기존에 기술된 방법에 따라 배양하였다[23]. 실험군 및 대조군을 각 농도별로 1% Penicillin/Streptomycin IMDM 배지에 희석하여 96 well plate에 배지를 교체 후 48시간 배양하였다. 이후 EZ-CYTOX 을 이용하여 반응을 종결시킨 뒤 microplate reader로 OD₄₅₀에서 측정하였다. 각 시료들은 각 2개의 well에서 3회씩 실험하였으며 평균값으로 데이터를 분석하였다.

3. 실험 결과

3.1 pHAEFG 발현벡터 구축

코돈 최적화된 hEGF DNA는 PCR을 통해 성공적으로 Hydroxylamine cleavage site인 Asn-Gly 서열이 삽입된 hEGF DNA를 획득하였으며 pRSET_A 벡터에 삽입하여 발현 벡터 pHAEFG를 구축하였다(Fig. 1). pHAEFG 발현벡터가 목적 단백질 발현이 가능한지 확인하기 위해 소량으로 IPTG 유도 발현 후 SDS-PAGE를 수행하여 분석 확인하였다.

3.2 pG-Tf2, pHAEFG/BL21 (DE3) 공발현

본 연구에서의 재조합 hEGF는 Hydroxylamine 인식 서열인 Asn-Gly이 추가되었기 때문에 절단 후에는 본래의 EGF보다 1개의 아미노산 즉 Gly이 EGF의 N-말단에 추가된 54개의 아미노산으로 이루어져있으며 크기는 약 6.5 kDa이다. pRSET_A의 발현 벡터로 인한 융합 태그의 크기는 약 3 kDa이므로 cloning 후 발현된 단백질은 약 9.5 kDa의 크기로 나타난다. 봉입체로 발현되는 목적 단백질의 folding을 돕는 groES-groEL-tig 단백질을 발현하는 pG-Tf2 vector와의 공발현을 진행하였으며 SDS-PAGE로 결과를 분석하였다(Fig. 2). Fig. 2의 lane 2는 수용성 단백질을 보여주고 있는데 약 9 kDa 크기에서 재조합 hEGF의 발현이 western blot 분석에 의해 확인 되었다(Fig. 3, lane 2). 최근의 N-말단 태그가 없는 재조합 hEGF와 pG-Tf2의 공발현 보고[22]와

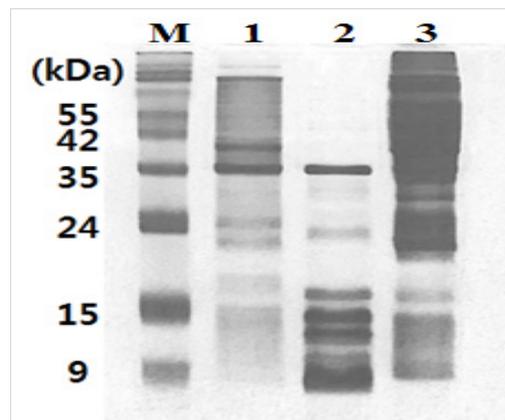


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of expression by pHAEFG in *E. coli* BL21 (DE3) (lane M: Smart Color Protein Marker, lane 1: BL21 (DE3), lane 2: rhEGF soluble protein, lane 3: rhEGF inclusion body)

상응하는 결과로 pRSET vector에서 발현 단백질의 N-말단에 융합되는 6개의 His과 epitope 부분이 사페론과 공발현에서의 단백질 접합에 영향을 없는 것으로 유추된다.

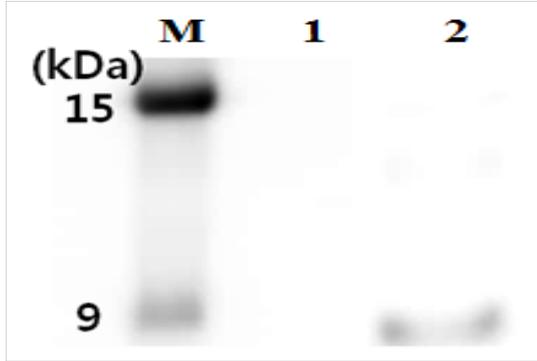


Fig. 3. Western blot analysis of expression by pHAEGF in *E. coli* BL21 (DE3) (lane M: Smart Color Protein Marker, lane 1: BL21 (DE3), lane 2: rhEGF soluble protein)

3.3 재조합 hEGF의 정제

발현된 hEGF는 N-말단에 6개의 His 잔기의 Imidazole 그룹과 특이적인 배위결합을 할 수 있는 Ni-NTA column chromatography를 수행하여 정제 되었다(Fig. 4). *E. coli* 유래 수용성 단백질 용액을 loading 한 다음 세척용 완충용액(Buffer 3)으로 충분히 세척하고 Ni-NTA column에 결합된 재조합 hEGF는 250 mM Imidazole을 경쟁 물질로 사용하여 용출시켰다(Fig. 4).

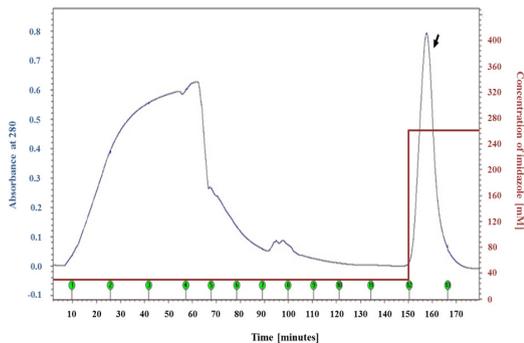


Fig. 4. Ni-NTA agarose column - immobilized metal affinity chromatography of rhEGF conditions: in 250 mM imidazole buffer (Buffer 4) elution with flow rate 1.0 ml/min; chromatogram representing protein concentration at 280 nm.

용출된 단백질들은 15% SDS-PAGE gel을 통해 분석 되었다. Fig. 5의 lane 3는 250 mM Imidazole로 용출된 시료로서 9 kDa 근처에서 단일 band를 나타내며 성공적인 재조합 hEGF의 정제를 보여주고 있다.

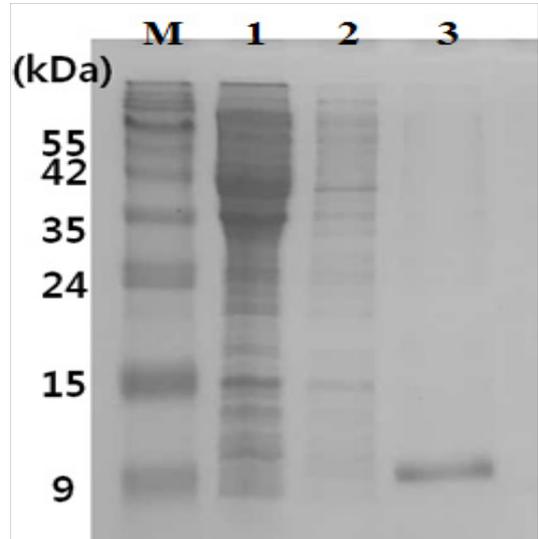


Fig. 5. Analysis of rhEGF purified by Ni-NTA column chromatography (lane M: Smart Color Protein Marker, lane 1: sample loading step, lane 2: rhEGF column wash step, lane 3: rhEGF elution step)

3.4 재조합 hEGF의 융합 태그 절단

Hydroxylamine은 유·무기 반응의 환원제로 주로 쓰이나 특이적으로 아미노산 서열의 Asn-Gly 결합을 절단하는 용도로 사용되어 왔다[24]. 순수한 재조합 hEGF를 얻기 위해 45 °C에서 2 hr 동안 Hydroxylamine으로 처리하여 융합 태그 부분의 절단이 수행되었다. SDS-PAGE 분석(Fig. 6)에서 융합태그가 붙어있는 재조합 hEGF (약 9.0 kDa, lane 1)가 lane 2에서 (Hydroxylamine 처리 시료) 약 3 kDa 정도가 작아진 단백질 밴드로 나타나 재조합 hEGF의 N-말단 융합부분이 성공적으로 제거되었음이 확인 되었다. Hydroxylamine으로 처리된 시료는 5 kDa membrane cut off를 통해서 재조합 hEGF를 회수하였다(lane 3). BCA protein assay를 통해 수득량을 측정 한 결과 리터당 약 12.5 mg으로 본 실험실에서 발표한 최근의 N-말단 융합부분이 없이 발현된 재조합 hEGF의 양과 유사한 것으로 나타났다[22].

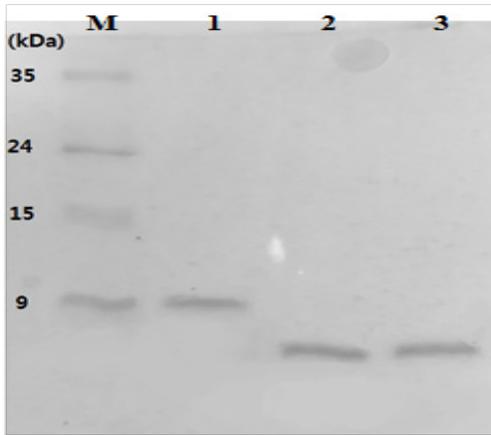


Fig. 6. Cleavage of rhEGF fusion peptide by Hydroxylamine (lane M.: Smart Color Protein Marker, lane 1: rhEGF, lane 2: cleavage rhEGF, lane 3: cut-off rhEGF)

3.5 재조합 hEGF 활성도 분석

N-말단 융합 태그 부분이 제거된 재조합 hEGF의 활성도는 ELISA assay로 분석 되었다. Control은 봉입체 형태의 재조합 hEGF를 사용하였으며, standard EGF로 상업용 EGF가 사용되었다. 동일한 조건에서 봉입체 형태의 재조합 hEGF는 기능이 거의 없는 것으로 나타나 control로서 적당한 것으로 판단되었다. 본 연구과정에서 얻은 즉 사페론과의 공발현 및 Hydroxylamine 처리를 통한 재조합 hEGF가 재접힘을 통한 재조합 hEGF보다 약 8% 더 높은 활성을 보이며 상업용 standard EGF와 92% 정도의 유사한 활성도를 나타내었다.

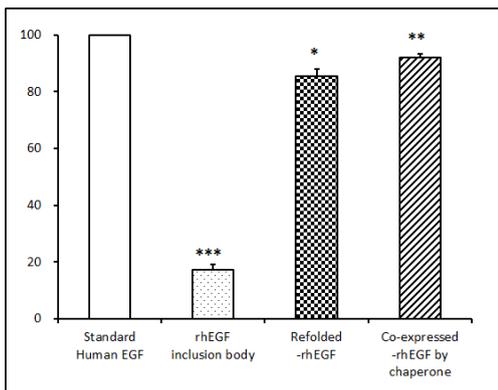


Fig. 7. ELISA analysis with anti-human EGF antibody ($p < 0.05 = *$, $p < 0.01 = **$, $p < 0.001 = ***$)

3.6 재조합 hEGF의 세포 증식 시험 분석

Hydroxylamine 처리 후 정제된 재조합 hEGF의 세포증식에 대해 미치는 영향은 인간 유래 섬유아세포 CCD-986sk의 세포증식 시험으로 평가 되었다. 본 연구를 통해 제조된 재조합 hEGF는 0.1 내지 10 ppm 처리 농도 범위에서 농도 의존적이며 통계적으로 유의한 ($p < 0.05$) 수준으로 섬유아세포의 세포증식을 촉진하는 것으로 나타났다(Fig. 8).

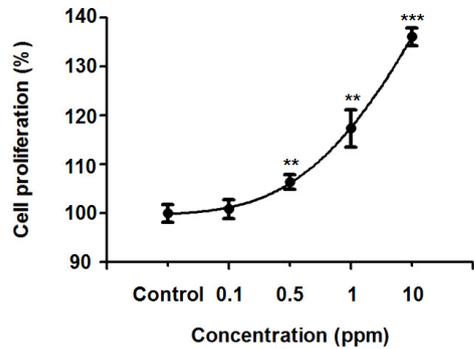


Fig. 8. Cell proliferation test of rhEGF ($p < 0.05 = *$, $p < 0.01 = **$, $p < 0.001 = ***$)

4. 결론 및 고찰

본 연구는 기능성 단백질인 hEGF의 제조에 있어서 사페론 공발현을 통한 활성 형태의 발현과 ion exchange chromatography 작업으로 이루어지는 최근 발표된 제조 과정에서 야기되는 번거로운 2번의 연속적인 chromatography 수행을 효율적으로 개선하기 위해 진행 되었다. hEGF의 코돈을 대장균에 최적화하고 재조합 단백질의 정제 후 Enterokinase를 사용하지 않고 융합 태그를 절단하기 위해 AAC GGC를 추가하여 Hydroxylamine으로 절단이 가능하도록 설계하였다. 이를 발현 벡터 pRSET_A에 삽입하여 발현을 진행하였으며 활성 형태의 발현을 위하여 사페론 벡터 pG-Tf2와의 공발현을 최근의 보고와 같은 방법으로 수행 하였다[22]. 사페론과의 성공적인 공발현이 관측 되었으며 재조합 hEGF의 N-말단 His tag를 활용한 affinity chromatography로 용이하게 재조합 단백질이 정제 되었고 정제 후 Hydroxylamine 처리로 순수한 재조합 hEGF를 제조 하였다. N-말단 융합 부분을 활용한 정제와 Hydroxylamine 처리로 제조한 재조합 hEGF는 ELISA assay에서 시판 중인 hEGF와 유사한 활성

도를 보이고 세포증식시험에서 CCD-986sk에 존재하는 EGFR과 결합하며 유의미하게 농도 의존적으로 세포증식을 촉진하는 것으로 나타났다. 본 연구의 Hydroxylamine 절단을 가능하게 하는 발현벡터를 통한 재조합 hEGF의 제조 방법은 affinity chromatography를 이용한 용이한 정제 방법과 효소를 사용하지 않고 N-말단 용해를 절단하는 경제적 이점을 제공하고 있다.

References

- [1] G. Carpenter, S. Cohen, "Epidermal Growth Factor.", *Annual Review of Biochemistry*, 48(1): 193-216, 1979. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.48.070179.001205>
- [2] R. C. Harris, E. Chung, R. J. Coffey, "EGF receptor ligands.", *The EGF Receptor Family, Experimental Cell Research*, 284(1): 2-13, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(02\)00105-2](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(02)00105-2)
- [3] S. Cohen, G. Carpenter, "Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(4), 1317-1321, 1975. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.72.4.1317>
- [4] R. S. Herbst, "Review of epidermal growth factor receptor biology.", *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 59(2), S21-S26, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2003.11.041>. PMID: 15142631.
- [5] P. Martin, "Wound healing--aiming for perfect skin regeneration." *Science*, 276(5309), 75-81, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.75>
- [6] S. Pastore, F. Mascia, V. Mariani, G. Girolomoni, "The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation.", *Journal of Investigative Dermatology*, 128(6), 1365-1374, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701184>
- [7] H. C. Chang, D. Y. Huang, N. L. Wu, R. Kannagi, "BLIMP1 transcriptionally induced by EGFR activation and post-translationally regulated by proteasome and lysosome is involved in keratinocyte differentiation, migration and inflammation.", *Journal of dermatological science*, 92(2), 151-161, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idermsci.2018.08.011>
- [8] M. J. Berridge, P. Lipp, M. D. Bootman "The versatility and universality of calcium signalling.", *Nature reviews Molecular cell biology*, 1(1), 11-21, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1038/35036035>
- [9] J. S. Kang, H. N. La, S. U. Bak, H. J. Eom, "Development of Dermal Transduction Epidermal Growth Factor (EGF) Using A Skin Penetrating Functional Peptide." *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, 45(2), 175-184, 2019. DOI: <https://doi.org/10.15230/SCSK.2019.45.2.175>
- [10] S. Yoshida, S. Kasuga, Y. Hirao, T. Fuwa, S. Nakagawa "Effect of biosynthetic human epidermal growth factor on the synthesis and secretion of mucin glycoprotein from primary culture of rabbit fundal mucosa cells." *In vitro cellular & developmental biology*, 23(7), 460-464, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02628415>
- [11] R. H. Starkey, S. Cohen, D. N. Orth, "Epidermal growth factor: identification of a new hormone in human urine." *Science*, 189(4205), 800-802, 1975. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1172293>
- [12] G. L. Rosano, A. C. Eduardo, "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges.", *Frontiers in microbiology*, 5, 172, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- [13] T. K. Singha, P. Gulati, A. Mohanty, Y. P. Khasa "Efficient genetic approaches for improvement of plasmid based expression of recombinant protein in *Escherichia coli*: a review.", *Process Biochemistry*, 55, 17-31, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.01.026>
- [14] S. J. Rao, S. Chatterjee, J. K. Pal. "Untranslated regions of mRNA and their role in regulation of gene expression in protozoan parasites.", *Journal of biosciences*, 42(1), 189-207, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12038-016-9660-7>
- [15] H. F. Ulrich, H. H. Manajit, "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein.", *Science*, 295(5561), 1852-1858, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1068408>
- [16] S. Robin, D. M. Togashi, A. G. Ryder, J. G. Wall "Trigger factor from the psychrophilic bacterium *Psychrobacter frigidicola* is a monomeric chaperone.", *Journal of bacteriology*, 191(4), 1162-1168, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.01137-08>
- [17] A. D. Marco, E. Deuerling, A. Mogk, T. Tomoyasu, B. Bukau "Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*." *BMC biotechnology*, 7(1), 1-9, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-32>
- [18] B. Bukau, E. Deuerling, C. Pfund, E. A. Craig, "Getting newly synthesized proteins into shape.", *Cell*, 101(2), 119-122, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80806-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80806-5)
- [19] P. Mahamad, C. Boonchird, W. Panbangred "High level accumulation of soluble diphtheria toxin mutant (CRM197) with co-expression of chaperones in recombinant *Escherichia coli*." *Applied microbiology and biotechnology*, 100(14), 6319-6330, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7453-4>
- [20] J. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular Cloning: a laboratory manual third edition*, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, 2001, pp 15.6-15.8
- [21] S. Orrapin, S. Intorasoot, "Recombinant expression of

novel protegrin-1 dimer and LL-37-linker-histatin-5 hybrid peptide mediated biotin carboxyl carrier protein fusion partner." Protein expression and purification, 93, 46-53, 2014.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.10.010>

- [22] E. B. Jang, J. S. Kim, W. Y. Lee, "Expression of Recombinant Human Epidermal Growth Factor as a Active Form through Codon Optimization with *E. coli* and Co-expression of Chaperone", Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society, 21(9), 559-568, 2020,
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2020.21.9.559>
- [23] H. G. Seo, D. G. Kim, C. K. Lee, Culture cell Experiment Handbook, WORLDSCIENCE, 2007, pp 82-85
- [24] F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, Short protocols in molecular biology fifth edition volumn 3, WILEY, 2002, pp 16.9-16.18

김 선 호(Sun-Ho Kim)

[준회원]



- 2019년 8월 : 건양대학교 제약생 명공학과 (공학학사)
- 2021년 8월 : 건양대학교 일반대 학원 의료신소재학과 (공학석사)

<관심분야>

의료공학, 분자생물학

이 우 일(Woo-Yiel Lee)

[정회원]



- 1988년 8월 : 경희대학교 문리과 대학 화학과 (이학석사)
- 1996년 8월 : (미국)애리조나주립 대학교 생화학과 (이학박사)
- 1997년 1월 ~ 1998년 8월 : 한국 생명공학연구원 postdoctorate
- 2006년 3월 ~ 2019년 2월 : 건양 대학교 제약생명공학과 교수
- 2019년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 의료신소재학과 교수

<관심분야>

생명과학, 단백질화학