

Cell growth and GFP expression in *E. coli* BL21 and W3110 under coexpression of *Vitreoscilla* hemoglobin

김동균, 김연규, 차형준

포항공과대학교 화학공학과 및 분자생명과학부, 분자생물공학연구소

전화 (054) 279-5951, FAX (054) 279-2280

abstract

Expression of the *vhb* gene encoding bacterial hemoglobin (VHb) from *Vitreoscilla* has been used to improve recombinant cell growth and enhance product formation under microaerobic conditions because of its ability to enhance oxygen use. We coexpressed GFP and VHb in *Escherichia coli* BL21 and W3110, and compared with GFP control which was not expressed VHb. We used *nar* oxygen-dependent inducible promoter for VHb expression. The GFP amounts in *E. coli* expressed VHb was about five fold higher than in the control. Fluorescence intensity was increased about two fold.

서론

지금까지 외래 단백질의 생산량증가를 위한 목적으로 많은 연구가 이루어져 왔는데 그중 *Vitreoscilla* sp. 유래의 hemoglobin의 호기성 미생물에의 발현은 가장 잘 알려진 예 중의 하나이다(1,2,3,4). VHb는 저산소농도 하에서 산소전달을 도와 세포의 성장과 단백질생산을 증가시키는 것으로 알려져 있는데 최근의 연구결과에 따르면 VHb가 발현된 대장균에서의 생화학 및 생리학적 조사에서 ATP 생산 및 turnover rate가 증가되고 cytochrome *o* 의 발현 및 활성이 증가된다고 보고되었다(5,6,7).

본 연구에서는 대장균 BL21과 W3110에서 green fluorescent protein(GFP)발현에 VHb를 함께 발현시켜 VHb가 GFP 발현 및 활성에 어떻게 영향을 미치는지 조사하였다. VHb의 발현은 산소농도에 의존하여 작용하는 *nar* promoter를 이용하였는데 *nar* promoter는 외래단백질의 발현용 프로모터로서 이용된(8) 바 있으므로 세포 성장에 따른 용존산소의 저하에 따라 VHb가 발현되도록 하였다.

GFP는 형광강도를 나타내기 위하여 chromophore를 형성하는데 이때 oxygen molecule을 필요로 한다(9). 따라서 VHb가 GFP의 활성을 띄게 하는데 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. 또, BL21과 W3110 두 균주의 VHb에 의한 GFP 발현차이와 세포성장의 차이도 조사하였다.

재료 및 방법

gfpuv gene을 pGFPuv(clontech)로부터 polymerase chain reaction(PCR)을 이용해 NheI-HindIII 사이트로 하여 pTrc-His C(invitrogen)에 클로닝 하였다. control 플라스미드 pTG를 위와같이 만든 뒤 pTG로부터 NcoI 사이트로 *gfpuv* gene과 termination sequence를 PCR하여 다시 pTrc-His C 벡터에 클로닝 하였다. 이 벡터에 Bgl II-Acc651 사이트로 *E. coli* K12 genomic DNA로부터 *nar* promoter를 PCR하여 클로닝 하였고, *vhb* gene은 Acc651-EcoRI 사이트로 *Vitreoscilla filiformis* sp. genomic DNA로부터 PCR하여 클로닝 하였다.(그림1)

이렇게 만들어진 플라스미드 pTG와 pTGNV를 *E. coli* BL21과 W3110에 형질전환한 뒤 만들어진 재조합 균주를 LB(Luria Broth)에서 12시간동안 배양한 후 -70℃에 보관하였다.

냉동보관된 재조합 균주를 5mL tube에서 2mL LB에 12시간동안 배양한 뒤 500mL flask에서 100mL M9(0.5% glucose)배지에 옮긴 후 배양 실험하였다.

1시간단위로 샘플링하여 세포농도를 UV spectrophotometer UV-1605PC(shimadzu) 600nm를 이용해 측정하였다. GFP의 발현은 mid-growth phase에서 IPTG 1mM로 하여 induction 하였고 induction 후부터 1시간 단위로 fluorescence spectrophotometer RF-5301PC(shimadzu)를 이용해 fluorescence intensity를 측정하였다. 그리고 배양중의 배양액으로부터 1mL씩 1.5mL tube에 보관한 뒤 GFP 양을 측정하였다. GFP의 양은 세포를 원심분리기를 이용해 회수한 뒤 105℃에서 5분간 끓인 뒤 3uL를 nitrocellulose membrane(pharmacia)에 옮긴 후 AP conjugated polyclonal anti-GFP antibody(clontech)로 처리한 뒤 fast red TR/NAPHTHOL AS-MX(sigma)로 color development하여 확인하였다. membrane을 스캔한 뒤 image-analyze software를 이용해 분석하였다.(그림2)

결과 및 고찰

Cell density를 보게 되면(그림3) BL21의 경우가 W3110보다 더 성장이 잘됨을 볼 수 있었다. 그리고 Vhb가 발현되는 경우에서 세포성장이 조금 더 낮아지는 결과를 보였다. 형광강도에서는(그림4) 두 균주에서 모두 Vhb가 발현되는 경우가 두배정도 높게 나왔는데 균주에 따라서는 BL21의 경우가 값이 더 높게 나왔다. GFP 발현양을(그림5) 보았을 때 Vhb가 발현된 경우가 발현되지 않은 경우보다 5배 정도 높은 값을 나타내는데 Vhb가 발현되는 세포에서 GFP의 양적 증가에 비해 형광강도의 증가율이 낮았으므로, 이 결과로부터 GFP의 양과 형광강도의 관계를 그래프로 그려보았다(그림6). 균주에 따라서는 그래프에 차이가 없었고 Vhb가 발현되는 경우가 발현이 되지 않는 경우에 비해 GFP 양당 형광강도가 더 낮게 나옴을 볼 수 있었

다. 이것은 VHb를 과발현시켜 외래단백질을 생산할 경우에 외래단백질이 inclusion body로 나온다는 보고(10)가 있는데 solubility 측정실험으로 VHb가 발현되는 경우에서 GFP의 solubility가 떨어짐을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Bailey, J. E., A. Sburlati, V. Hatzimanikatis, K. Lee, W. A. Renner, and P.S Tsai. "Inverse metabolic engineering: a strategy for directed genetic engineering of useful phenotypes." (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 52, 109-121
2. Bülow, L., N. Holmberg, G. Lilius, and J. E. Bailey. "The metabolic effects of native and transgenic hemoglobins on plants."(1999), *Trends Biotechnol.*, 17, 21-24
3. Holmberg, N., G. Lilius, J. E. Bailey, and L. Bülow. "Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production."(1997), *Nat. Biotechnol.*, 15, 244-247
4. Minas, W., P. Brünker, P. T. Kallio, and J. E. Bailey. "Improved erythromycin production in a genetically engineered industrial strain of *Saccharopolyspora erythraea*."(1998), *Biotechnol. Prog.*, 14, 561-566
5. Chen, R., and J. E. Bailey. "Energetic effect of *Vitreoscilla* hemoglobin expression in *Escherichia coli*: an on-line ^{31}P NMR and saturation transfer study."(1994), *Biotechnol. Prog.*, 10, 360-364
6. Nilsson, M., P. T. Kallio, J. E. Bailey, L. Bülow, and E.-G. Wahlund. "Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Escherichia coli* enhances ribosome and tRNA levels: a flow field-flow fractionation study."(1999), *Biotechnol. Prog.*, 15, 158-163
7. Tsai, P. S., M. Nägeli, and J. E. Bailey. "Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin modifies microaerobic *Escherichia coli* metabolism through elevated concentration and specific activity of cytochrome *o*."(1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 151-160
8. Han S. J., H. N. Chang, J. Lee. "Fed-batch cultivation of an oxygen-dependent inducible promoter system, the *nar* promoter in *Escherichia coli* with an inactivated *nar* operon"(1998), *Biotechnol. Bioeng.*, 59(4), 400-406
9. Heim, R., D. C. Prasher, and R. W. Tsien. "Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein."(1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(26), 12501-12504
10. Rinas, U., J. E. Bailey. "Overexpression of bacterial hemoglobin causes incorporation of pre-beta-lactamase into cytoplasmic inclusion bodies."(1993) *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(2), 561-566

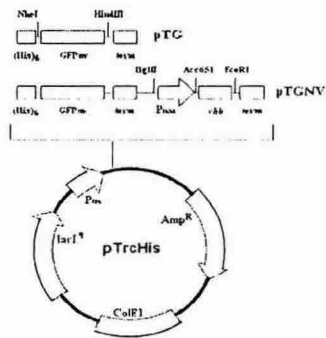


그림1

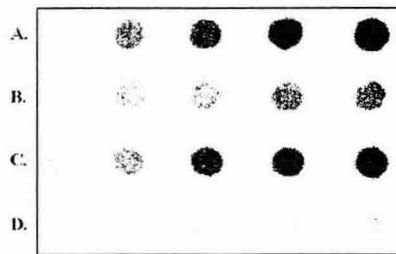


그림2. A:BL21(pTGNV), B:BL21(pTG), C:W3110(pTGNV), and D:W3110(pTG)

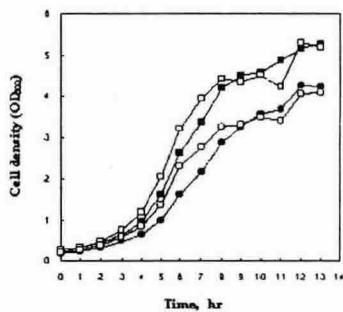


그림3. Induction time was after 4hr in BL21 and 6hr in W3110

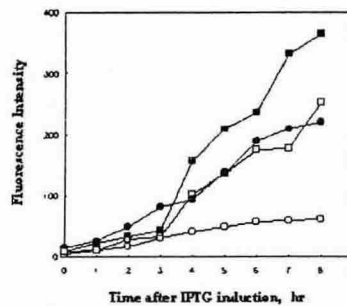


그림4.

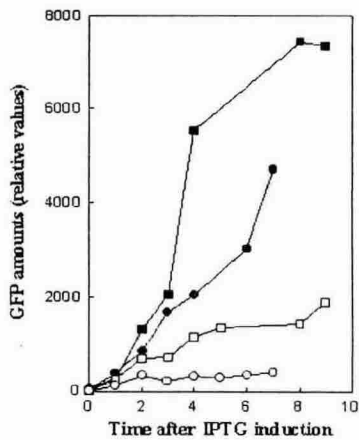


그림5.

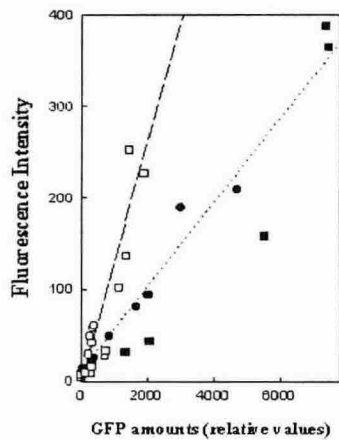


그림6.

※square: BL21, circle: W3110, closed: with VHLb, and open: w/o VHLb