

Effects of pH on Purification of GFPuv/Cytochrome c-552 Fusion Protein

이상운¹, 홍을재¹, 최정우², 홍억기¹

¹강원대학교 바이오산업공학부, ²서강대학교 화학공학과

전화 (033) 250-6275, FAX (033) 243-6350

Abstract

Fusion gene of *GFPuv* and *Cytochrome c-552* was inserted into the pTrcHis B vector and transferred to *E. coli*. A fusion protein of *GFPuv* and *Cytochrome c-552* was expressed in BL21. This fusion protein was composed of a His-tag for purification using an immobilized metal affinity chromatography(IMAC). IMAC constitutes a rather facile means of unravelling the principles of recognition and, in particular, of identifying the counterligands on the protein surface, which interact with the ligated and immobilized metal ions. Histidine when present on the surface of a protein molecule under a favorable solvent condition, may serve as electron donors in coordination with the immobilized chelates of some transition metal ions(Ni^{2+}).

서 론

최근, 급속한 발전으로 전자산업의 중심에 위치하고 있는 반도체 산업은 반도체 칩에 사용되는 유기물질의 고온, 고밀도, 집적화에서 한계를 드러내고 있다. 현재 이러한 한계를 극복하기 위한 다양한 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근에는 생체분자를 이용하고 생체의 기능을 모방하여 기존의 한계를 극복하려는 bioelectronic device의 개발에 관한 연구가 수행되고 있다. 본 실험에서는 생체 내 단백질인 GFPuv와 Cytochrome c-552를 bioelectronic device에 적용하고자 융합된 두 단백질을 분리·정제하는 실험을 진행하였다.

재료 및 방법

Expression of GFPuv and Cytochrome c-552 fusion protein

GFPuv-Cyt c/pTrcHisB를 *E. coli* 균주 BL21에 형질전환 시킨 후 이를 LB(with ampicillin)배지에 colony 접종하고, 초기에 IPTG 0.5mM로 induction한 후 6시간 동안

37°C 배양하여 harvest하였다.

IMAC of GFPuv and Cytochrome c-552 fusion protein

GFPuv-Cyt c/pTrcHisB에 의해 발현된 fusion protein은 6XHis-GFPuv-Cyt c의 His tagging을 가지고 있다¹⁾. histidine은 metal affinity 특성을 가지고 있으므로²⁾ 이러한 특징을 가지고 fusion protein은 IMAC방법을 이용하여 분리·정제를 실시하였다^{3), 4)}.

IMAC(Invitrogen社)는 제조사의 manual에 따라 cell lysate preparation, column equilibration, elution, washing의 단계로 진행하였다. column equilibration을 위한 buffer는 NaPO₄ 50mM, NaCl 500mM (pH 7.8)을 사용하였고, elution buffer는 equilibration buffer에 final 농도 150mM이 되게 Imidazole을 첨가하여 pH를 4~11까지 변화를 주어 linear gradient로 실험을 수행하였다. flow rate는 0.5mL/min로 하여 fraction collector로 1mL씩 collection 하였다.

Determination of Fluorescent intensity (FI)

각 pH(4~11)별로 elution 된 fraction 마다 신뢰할 수 있는 FI값(100~1000)이 되게 5~20배정도로 희석하여 96 wall plate에 100 μ l씩 담아 Fluorescence Spectrophotometer로 형광도를 측정한다.

SDS-PAGE analysis

각 pH 별로 높은 수치로 측정된 FI값을 갖는 fraction을 4% stacking gel (80 voltage)와 12% separating gel (120 voltage)의 SDS-PAGE을 수행한 후, gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 staining하였다.

결과 및 고찰

GFPuv/Cytochrome c-552 Fusion Protein의 Expression 확인

SDS-PAGE로 cell lysate를 분석한 결과 40kda의 fusion protein이 발현되었음을 확인하였다(Fig. 1).

IMAC and SDS-PAGE result of GFPuv and Cytochrome c-552 fusion protein

Column Equilibration buffer의 조성을 동일하게 하고, elution buffer의 pH만 달리 하여 elution 한 결과 모든 pH 범위에서 Fig. 2.처럼 2band의 양상을 보였다.

Result of Fluorescent intensity (FI)

각기 다른 elution buffer의 pH(4~11)에 따른 F.I 값은 pH4, 5, 6의 산성과 pH 9, 10, 11의 염기성에서 maximum F.I값이 2500, 3000정도의 낮은 결과 값을 보인 반면, 중성인 pH 7, 8에서 다소 높은 F.I값인 4000, 5500을 나타냈다(Fig. 3 & Fig. 4).

요 약

SDS-PAGE 결과 elution pH에 따라 분리되는 band pattern은 비슷하게 2band의 양상을 보이지만, FI값을 비교하여 보았을 때 다른 pH보다 8.0에서 가장 높은 수준을 보였으므로 GFPuv/Cytochrome c-552 Fusion Protein의 분리·정제에 가장 적합한 pH를 8.0으로 정하였다.

참고문헌

1. R. Janknechi, G. De Martynoff, J. Lou, R. A. Hipskind, A. Nordhem, and H. G. Stunnenberg, "Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus"(1991), *Biochemistry*, 88, 8972-8976.
2. Y. J. Zhao, E. Sulkowski, and J. Porath, "Surface topography of histidine residues in lysozymes"(1991), *Eur. J. Biochem.*, 202, 1115-1119.
3. D. M. Mitchell and R. B. Gennis, "Rapid purification of wildtype and mutant cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* by Ni^{2+} -NTA affinity chromatography"(1995), *FEBS Letters*, 368, 148-150.
4. Y. Li, A. Agrawal, J. Sakon, R. R. Beitle, "Characterization of metal affinity of green fluorescent protein and its purification through salt promoted, immobilized metal affinity chromatography"(2001), *J. Chromatogr.*, 909, 183-190.

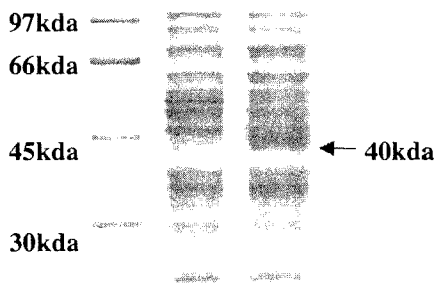


Fig. 1. SDS-PAGE Analysis of Fusion Protein
lane 1 : Marker
lane 2 : Cell lysate of BL21



Fig 2. SDS-PAGE analysis of elution pH 8.0
lane 1 : Marker
lane 2 ~ 10 : fraction #23 ~ 31

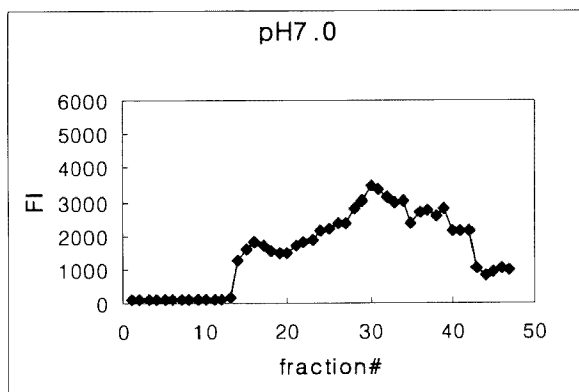


Fig 3. FI value at elution pH 7.0

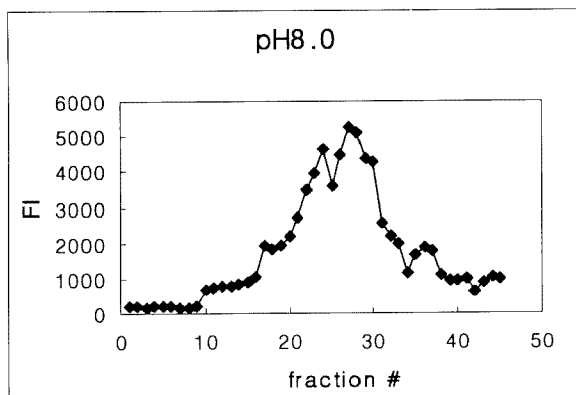


Fig 4. FI value at elution pH 8.0