

Expression and Purification of GFPuv/Cytochrome c-552 Fusion Protein in *E. coli*

홍을재¹, 이상은¹, 최정우², 홍억기¹

¹강원대학교 바이오산업공학부, ²서강대학교 화학공학과
전화 (033) 250-6275, FAX (033) 243-6350

Abstract

The genes of *GFPuv* and *Cytochrome c-552* were amplified by using PCR, and then, fused each other. 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 JM109 and BL21. This fusion protein was composed of a His-tag for the rapid one-step purification using an immobilized metal affinity chromatography.

서 론

최근에는 생체분자를 이용하고 생체의 기능을 모방하여 기존의 반도체 칩의 한계를 극복하려는 bioelectronic device의 개발에 관한 연구가 시도되고 있다. Bioelectronic device는 전자공여체, 전자 여기체, 전자 수용체로 구성된다. 본 실험에서는 생체 내 단백질인 GFPuv와 Cytochrome c-552를 bioelectronic device에 적용하였다. GFPuv는 형광단백질이며, 전자의 역 흐름을 막는 전자 여기체의 기능을 가지고 있다. 그리고 Cytochrome c-552는 고온성 균주에서 생산되는 생체내 전자전달 단백질이며, 전자 수용체로 사용될 것으로 예상하고 있다. PCR을 통해 융합한 *GFPuv*와 *Cytochrome c-552* gene을 *E.coli* 균주에 발현시키고 분리정제를 용이하게 하기 위해 *GFPuv-Cyt c*와 함께 fusion시킨 *His-tag*를 이용하여 fusion protein의 순수분리를 시도하였다.

재료 및 방법

GFPuv 와 *Cytochrome c-552* fusion protein 의 Expression

GFPuv-Cyt c/pTrcHisB를 각각 *E. coli* 균주 JM109과 BL21에 형질전환 시킨 후 이를 LB(with ampicillin)배지에 접종, 초기에 IPTG 0.5mM로 induction한 후 6시간 동안 배양하여 fusion protein을 발현시켰다. colony접종 시 배양온도는 모두 37°C, induction 후 발현온도는 각각 30°C와 37°C에서 수행하였다.

GFPuv 와 *Cytochrome c-552* fusion protein 의 purification

GFPuv-Cyt c/pTrcHisB에 의해 발현된 fusion protein은 His₆-*GFPuv-Cyt c* 로 His

tagging이 되어 있다. 이는 분리정제에 있어서 histidine의 metal affinity 특성을 이용하여 immobilized metal affinity chromatography(IMAC)를 수행하여 분리정제공정을 단순화시키기 위해 수행되었다. 위해 본 fusion protein에 함께 fusion시켜 발현되도록 하였다.

IMAC(Invitrogen社)은 제조사의 manual에 따라 수행하였다. lysate는 lysozyme(1mg/ml)으로 처리하여 native form의 fusion protein으로 IMAC을 실시하였다. Ni²⁺-IDA-agarose와 lysate는 1hr 동안 binding 시켜주었고, elution은 JM109은 0-250mM imidazole concentration, BL21은 0-150mM imidazole concentration의 linear gradient, 0.5ml/min의 flow rate으로 수행하였다.

결과 및 고찰

GFPuv 와 Cytochrome c-552 fusion protein 의 Expression

Hisx₆-GFPuv-Cyt c fusion protein의 발현은 그 온도와 균주에서 약간의 차이를 보였다. SDS-PAGE 분석 결과 Hisx₆-GFPuv-Cyt c fusion protein(약 45kDa)은 JM109, 37°C에서 가장 좋은 발현양을 보였고(Fig. 1), lysate를 uv-illuminate table에 올려 fusion protein 내의 GFPuv의 발현에 의한 형광도를 육안으로 관찰한 결과에서도 JM109, 37°C에서 발현시킨 Hisx₆-GFPuv-Cyt c fusion protein이 가장 강한 형광을 보였다(Fig. 2).

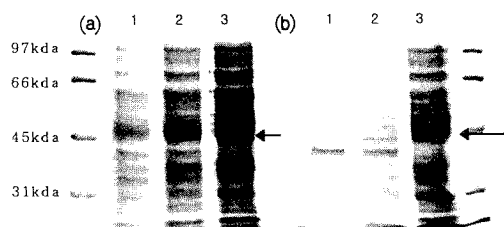


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of the bacterial lysate containing the recombinant fusion protein
 (a) Lane 1,2 ; The lysate of BL21, 37°C Lane 3 ; The lysate of JM109, 37°C
 (b) Lane 1,2 ; The lysate of BL21, 30°C Lane 3 ; The lysate of JM109, 30°C

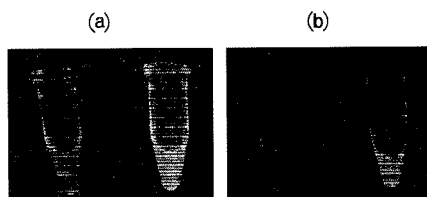


Fig. 2. The photograph of cell lysate during irradiation with UV illuminator
 (a) left ; BL 21. 37°C expression, right ; JM109. 37°C expression
 (b) left ; BL 21. 30°C expression, right ; JM109. 30°C expression

Western blotting analysis

발현된 His₆-GFPuv-Cyt c fusion protein을 확인하기 위해 soluble cell lysate로 western blotting을 시행한 결과 예상되어졌던 45kDa 부근의 band와 약 37kDa 부근에 degraded fusion protein band의 two blots로 나타났다(Fig. 3).

GFPuv 와 Cytochrome c-552 fusion protein의 purification

발현된 His₆-GFPuv-Cyt c fusion protein(약 45kDa)은 JM109과 BL21모두 약 100-150mM imidazole 농도에서 가장 많이 elution되는 양상을 보였다. 그러나 JM109에서는 약 35kDa 부근에, BL21에서는 약 37kDa 부근에 각각 impurity가 함께 elution 되었다(Fig. 4).

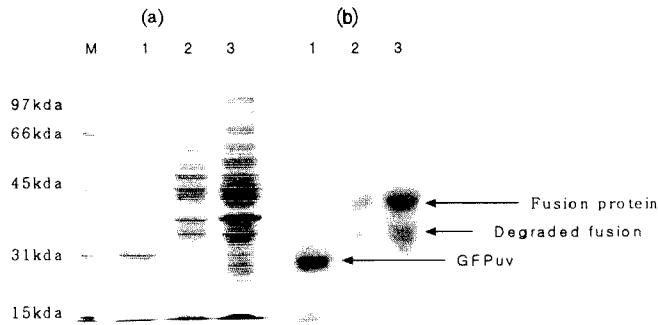


Fig. 3 (a) SDS-PAGE and (b) western blot analysis of cell lysate(12hr culture).

Lane 1, 2 and 3 is cell lysate of GFPuv/JM109, His6-GFPuv-Cyt c552 protein/JM109 and His6-GFPuv-Cyt c552 protein /BL21, respectively.



Fig. 4. Chromatography of the fusion His₆-GFPuv-Cyt c552 protein on Ni²⁺-IDA-agarose.

- (a) JM109 , 30°C expression
- (b) JM109 , 37°C expression
- (c) BL 21 , 37°C expression

요 약

Hisx₆-GFPuv-Cyt c fusion protein을 *E.coli* 균주 JM109과 BL21 각각에서 발현시킨 결과 발현온도는 30°C보다 37°C에서, BL21보다 JM109에서의 발현량이 더 많았다. 그러나 JM109, 37°C에서 발현시킨 fusion protein의 Ni²⁺-IDA-agarose purification결과 약 45kDa 부근의 fusion protein의 density가 감소되었음을 SDS-PAGE analysis을 통해 알 수 있었다. 또한 western blotting analysis를 통해 이 impurity가 degraded fusion임을 확인 할 수 있었다. degraded fusion은 BL21 균주에서 발현시킨 fusion protein에서도 생성됨을 확인하였다.

모든 결과를 종합해 볼때 Hisx₆-GFPuv-Cyt c fusion protein의 발현은 JM109, 37°C에서 더 많았지만, BL21, 37°C에서 expression시킨 fusion protein이 보다 안정하다고 판단 되어진다. 향후 fusion protein이 bioelectronic device에 적용되려면 degraded fusion protein의 생성을 줄여 activity를 유지하도록 안정한 형태로 발현되어 순수하게 분리정제 되어야 하겠다.

참고문헌

1. Y. Li, A. Agrawal, J. Sakon, and R. R. Beitle, "Characterization of metal affinity of green fluorescent protein and its purification through salt promoted, immobilized metal affinity chromatography" (2001) *Journal of chromatography A*, 909 183-190
2. L. Brigitte, K. Birgit, F. Karsten, and F. Ulf-Ingo, "Expression of the functional mature chloroplast triose phosphate translocator in yeast internal membranes and purification of the histidine-tagged protein by a single metal-affinity chromatography step"(1993), *Proc Natl. Acad. Sci. USA* Vol.90, 2155-2159
3. H. J. Cha, N. G. Dalal, V. N. Vakharia, and W. E. Bentley, "Expression and purification of human interleukin-2 simplified as a fusion with green fluorescent protein in suspended Sf-9 insect cells"(1999), *J. Biotechnol.* 69, 9-17
4. W. Jiang and M. T. W. Hearn, "Protein interaction with immobilized metal ion affinity ligands under high ionic strength conditions"(1996), *Analytical Biochemistry* 242, 45-54