

Expression of various fluorescent protein and their production in shake flasks

So-Jung Park^{2,3}, Kyung-Ah Han^{1,3} and Jong Il Rhee^{2,3}

Department of Material and Biochemical Engineering¹, Faculty of Applied Chemical Engineering²,
Bioprocess Technology lab.³, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Republic of Korea

Tel : +82-062-530-0847, Fax : +82-062-530-0846

Abstract

The green fluorescent protein (GFP) from the jellyfish *aequorea victoria* and its fluorescent homologs from *Anthozoa* corals have become invaluable tools for imaging of cells and tissues. In this study various fluorescent protein such as green fluorescent protein (GFP), yellow fluorescent protein (YFP) and red fluorescent protein (RFP) have been expressed in *Escherichia coli*. Growth of recombinant cells and production of fluorescent proteins were investigated in shake flasks. Some characteristics of fluorescent proteins was also studied.

서 론

Human genome sequencing이 완결됨에 따라 각종 gene의 실제 기능 및 발현에 관련된 protein에 관해 많은 관심이 집중되고 있다. 많은 학자들이 gene level 또는 protein level에서 유전질환이나 불치병들을 연구하고 있는데, 이러한 genomics나 proteomics 연구분야에서 In situ hybridization (ISH)방법이 많이 사용된다. 초기 ISH 방법은 염색체를 연구하는 방법으로 개발되었는데 염색체 표본 슬라이드에서 특정 유전자를 인식할 수 있는 probe를 hybridization하여 염색체 상에 위치하는 특정 유전자의 위치를 연구하는데 초창기에는 hybridization signal을 방사성 동위원소를 사용하여 확인하였으나 최근에는 다양한 종류의 형광 물질들을 이용하여 염색체의 band 염색과 FISH signal을 동시에 확인할 수 있는 효과적인 연구기법들이 개발되고 있다. 미생물에 각종 형광 물질을 이용한 gene level에서의 연구가 활발하게 이루어지고 있는 현시점에서, 본 연구에서는 각종 형광 유전자를 이용하여 형질전환 시킨 대장균의 단백질 발현 정도와 진탕배양기에서 성장 및 생산 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

형질전환

GFP (green fluorescent protein), RFP(red fluorescent protein), YFP(yellow fluorescent protein) 각각 Clontech과 Evrogen에서 구입하였다.

각각의 형광 재조합 플라스미드를 *E. coli* JM109와 BL21(DE3)에 적정 농도로 혼합하여 transformation시키고 항생제가 든 배지에 도말하여 일정시간 배양 후 관찰된 colony를 채취하여 사용하였다.

미생물 배양 및 특성관찰

각각의 미생물은 *E. coli* JM109와 BL21(DE3)에 transformation 시킨 것과 시키지 않은 것으로 나누어 LB배지와 항생제가 첨가된 LB배지에 전배양하여 각각 1%(w/v)가 되게 접종하여 배양하였다. 미생물이 성장하는 동안의 생리적인 변화를 관찰하기 위하여 각 플라스크에서 샘플을 취하여 pH, 흡광도(600 nm)를 측정하여 미생물 성장 곡선을 작성하였다. 이를 대장균의 성장속도와 관련하여 형광 단백질의 발현정도를 조사하였다. 또한 미생물을 원심분리하여 배지성분을 제거하고 phosphoric buffered saline (PBS)를 이용하여 세척한 후, buffer에 cell을 풀어서 ultrasonication하였다. 원심분리하여 가라앉은 pellet을 제거하고 형광 단백질의 형광세기를 형광분광광도계를 이용하여 측정하였다.

형광단백질 크기측정

Plasmid DNA preparation kit을 이용하여 transformation된 대장균으로부터 형광 단백질을 분리하고 agarose gel에 전기영동하였다. 이를 size marker와 비교하여 크기를 측정하였다.

결과 및 고찰

세포성장

GFP가 포함된 BL21(DE3)균주와 wild type BL21(DE3)의 경우 24시간 배양하였다. 배양 중 6~9시간에 급속도로 성장하였으며 점차로 시간이 지남에 따라 균주의 성장속도가 느려짐을 관찰하였다. 반면, GFP가 포함된 균주의 경우 흡광도 값이 상대적으로 낮게 관찰되었다. YFP가 포함된 JM109와 RFP가 포함된 JM109 균주의 경우, cell내에서 발현되어 색이 육안으로 관찰되기까지 30시간 이상이 소요되기 때문에 wild type JM109와 함께 54시간까지 배양하면서 그 특성을 조사하였다. YFP가 포함된 JM109와 RFP가 포함된 JM109, wild type JM109 전체적으로 유사한 형태의 성장

곡선을 나타내었다. 하지만 특별히, YFP가 포함된 JM109의 경우 3시간 이후부터 가장 높은 흡광도를 보였다.

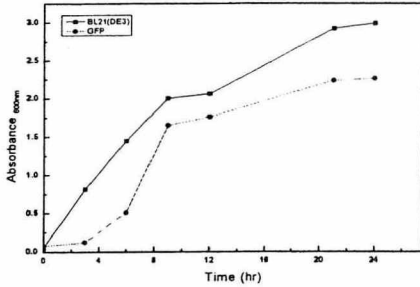


Figure 1. Absorbance of during cultivation with a LB medium, in the shake flask(BL21(DE3), GFP)

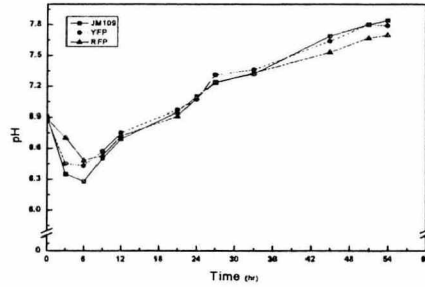


Figure 4. pH of during cultivation with a LB medium, in the shake flask (JM109, YFP, RFP)

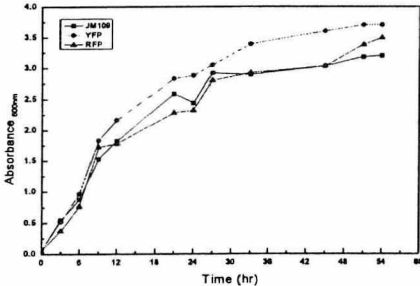


Figure 3. Absorbance of during cultivation with a LB medium, in the shake flask (JM109, YFP, RFP)

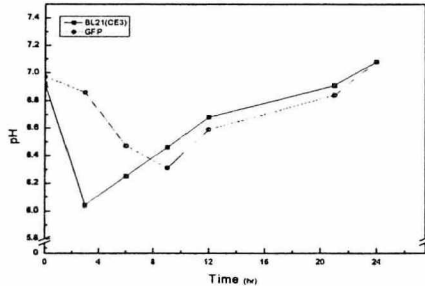


Figure 2. pH of during cultivation with a LB medium, in the shake flask (BL21(DE3), GFP)

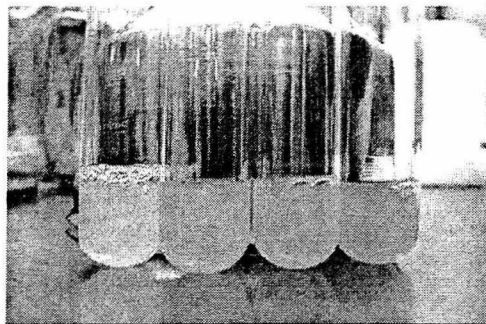


Figure 5. Cultivation medium contain the fluorescent proteins
(from left : wild, GFP, YFP, RFP)

pH

전체적으로 균주가 성장함에 따라 pH는 감소하다가 증가하는 경향을 보였다. GFP가 포함된 BL21(DE3)균주는 점차 감소하여 9시간째 가장 낮은 pH값을 보이다가 이후에 증가하는 경향을 보였다. wild type BL21(DE3)의 경우, pH가 점차로 감소하여

3시간 이후 증가하는 것으로 관찰되었다. YFP가 포함된 JM109와 RFP가 포함된 JM109와 wild type JM109에서 동일하게 6시간째 가장 낮은 pH를 나타내었고, 그 이후 증가하였다.

형광데이터분석

일정 시간 간격으로 채취한 시료를 phosphoric buffered saline (PBS)에 현탁하여 원심분리한 후, 상등액을 버리고 다시 PBS에 현탁하여 형광분광광도계를 이용하여 형광을 측정하였다.

Intracellular 형광데이터분석

균주 내 형광 측정을 위하여 시료를 PBS에 현탁하여 원심분리하고, 상등액은 버린 후, PBS에 현탁하여 ultrasonication (20 sec, 3 times)을 실시하였다. 원심분리 후 상등액만 취하여 형광분광광도계로 형광을 측정하였다.

형광단백질크기측정

균주로부터 plasmid DNA preparation kit을 이용하여 형광단백질을 분리하고 그 크기를 agarose gel을 이용하여 측정하였다.

요 약

대장균을 이용하여 형광단백질을 형질전환하고 배양하면서 그 특성을 관찰하고 형광세기 및 형광 단백질의 크기를 조사하였다.

감사의 글

본 연구는 2002년 과학재단 특정기초연구 (과제번호 R01-2002-000-00024 -0)에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

References

1. V. V. Verkhusha & K. A. Lukyanov (2004), "The molecular propertise and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins", *Nature Biotechnology*, **22**(3) : 289-296.
2. N. G. Gurskaya, A. F. Fradkov, K. A. Lukyanov & S. A. Lukyanov (2001), "GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins", *FEBS Letters*, **507** : 16-20.
3. D. A. Shagin, E. V. Barsova, S. A. Lukyanov and M. V. Matz (2004), "GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily : Evolution of functional features and structural complexity", *Mol. Biol. Evol.*, **21**(5) : 841-850.
4. J. Sambrook & D. W. Russell, "Molecular cloning a laboratory manual" (3rd), 5.36-5.39.