

구리 결합 펩타이드의 발현에 의한 대장균 균체의 구리 함량 증가

김형기 · 문성현 · 김우연*

중앙대학교 산업과학대학 생명공학과

(2003년 1월 28일 접수, 2003년 2월 11일 수리)

감자 polyphenol oxidase의 구리결합지역 DNA와 histidine 다량 함유 인공 펩타이드를 암호화하는 DNA를 대장균 벡터에 각각 클로닝하여 발현시킨 후 대장균 내의 구리함량 증감을 조사하였다. Polyphenol oxidase의 구리결합지역 DNA를 포함하는 PPOCBpET32 벡터를 함유하는 균주의 경우는 벡터를 함유하지 않는 대장균 대조구보다 오히려 구리 함량이 약간 감소하여 약 600 ppm의 값을 보여주어, 감자 polyphenol oxidase 구리결합지역의 대장균 내에서의 발현이 구리 함량 증가에 기여하지 못함을 알 수 있었다. 반면에 한 개의 hexahistidine 단위 DNA를 포함하는 pET28a 벡터 함유 대장균 균주를 kanamycin 미첨가 배지에서 배양한 경우에는 구리 함량이 약 2,500 ppm으로 높게 나타났다. 한편 hexahistidine 9개로 구성된 polyhistidine을 암호화하는 DNA를 포함하는 pET-his 벡터 함유 균주를 kanamycin 미첨가 배지에서 배양한 경우에 구리함량이 약 3,200 ppm으로 나타나, 하나의 hexahistidine 단위만 발현하는 균주와 비교하여 구리함량이 약 30% 증가됨을 알 수 있었다.

Key words: 구리 chelation, 대장균의 polyhistidine 발현, 구리함량 증가

서 론

구리는 생물체가 필요로 하는 필수 광물질로 cytochrome oxidase, lysyl oxidase, ceruloplasmin, superoxide dismutase, tyrosinase, polyphenol oxidase 등과 같은 여러 효소의 보조인자로 사용되는 물질이며 생물체의 호흡과정에서 발생하는 superoxide를 제거하는 전이금속으로 작용하는 등 생물체에 반드시 필요한 광물질 중의 하나이다. 이러한 구리는 세포 내에 일정 수준으로 유지되면 체내 대사작용 및 세포의 기능 발현에 중요한 역할을 하나 일정 수준 이상으로 존재하면 독성물질로 작용하기도 한다. 구리의 독성을 줄이고 안전하게 사용하는 방법으로 과거에는 EDTA와 같은 무기물질에 구리를 chelation 시키기도 하였으나, 이러한 방식의 chelation은 생체 이용률이 낮아 펩타이드나 아미노산에 chelation 시키는 방법으로 바뀌고 있다. 그밖에 사료에 첨가되는 효모를 이용하여 구리를 chelation 시키는 방법도 가능하다고 하겠다.^{1,5)}

효모는 구리를 보조인자로 사용하는 효소를 가지고 있을 뿐만 아니라 여러 metalloprotein, 특히 metallothionein을 가지고 있어 구리를 안전하게 chelation 시킬 수 있다. 이러한 효모에 구리와 chelation하는 펩타이드를 대량 발현시키면 chelation된 구리를 많이 함유하는 효모 균주를 개발할 수 있으며 향후 이를 사료 첨가물로 이용할 수 있을 것이다. 구리와 chelation하는 펩타이드로서 여러 구리와 결합하는 단백질의 구리결합부위 펩타이드 또는 6개의 histidine이 연속으로 연결된 hexahistidine이 이용될 수 있다. Histidine이 가지고 있는 imidazol ring이

광물질과 결합을 잘 하기 때문에 hexahistidine으로 구성되면 여러 광물질과의 친화력이 증가된다고 보고^{6,7)} 되었으며, 또 polyhistidine을 대장균 외부에 발현시켜 광물질을 chelation하는 방법⁸⁻¹¹⁾도 연구되어 왔다.

본 연구에서는 효모의 구리 함유량을 증가시키는 실험의 전 단계로서, 대장균의 구리 함량을 높일 목적으로 감자 polyphenol oxidase의 구리결합지역 DNA와 히스티딘 다량 함유 인공 펩타이드를 암호화하는 DNA를 이용하여 대장균을 형질전환시켰다. 그리고 이 유전자가 대장균에서 발현되는지 알아보았으며 발현된 펩타이드와 구리가 결합하여 대장균 내의 구리 함량이 증가되는지를 조사하였다.

재료 및 방법

대장균 균주와 배양배지. 클로닝을 위한 대장균 균주로는 XL1-Blue MRF(Stratagene, La Jolla, USA)를 사용하였고, 단백질 발현을 위해서는 BL21(DE3)와 BL21(DE3)pLysS(Novagen, Madison, USA)를 사용하였다. 유전자 클로닝과 단백질 발현을 위한 대장균은 LB 배지를 사용하여 37°C에서 배양하였다. 구리결합부위 DNA를 가지는 플라스미드로 형질 전환된 대장균의 선별을 위해서 pET32a, pUC118, pET28a의 경우에, 항생제로 각각 ampicillin(50 µg/ml), ampicillin(10 µg/ml), kanamycin(50 µg/ml)을 사용하였다.

Polyphenol oxidase 구리결합지역 클로닝 및 발현. 감자 polyphenol oxidase의 구리결합 지역 약 500 bp DNA를 얻기 위한 PCR(polymerase chain reaction)에 사용한 primer 서열을 Fig. 1에 표시하였다.¹²⁾ 구리결합지역 DNA의 pET32a 플라스미드의 클로닝 및 BL21(DE3)pLysS에서의 단백질 발현은 Hwang과 Kim¹³⁾이 기술한 대로 수행되었다.

*연락처자

Phone: 82-31-670-3063; Fax: 82-31-675-0405
E-mail: wykim@cau.ac.kr

```

cuA .....593CATTTCCTCGTGGCTTTTCT610
TTCCGTTTTCATAGATGGTACTTGTATT
TC.....
.....
.....
cuB .....985CATACCCCGGTCCATATCTGGA
CTGGTGATAGTCTAGACAAAAAACG
GTGAAAACATGGGTAATTTCTATTTCAG1051
CCGGTTTACACCCGATTTTTTACTGTCA
.....
.....1101
CCACGCAAATGTGGACCGGATGTGGG-3'

```

Fig. 1. Two copper binding sites (cuA and cuB) of potato polyphenol oxidase. Underlined sequences indicate the synthesized primers.

Histidine 다량함유 DNA 제조. Histidine 다량함유 DNA를 제조하기 위한 올리고뉴클레오타이드를 합성할 때 5'쪽에 제한효소 *Bam*HI 자리를 삽입하였고 3'쪽에 제한효소 *Bgl*II 자리를 삽입하였다. 제한효소 *Bam*HI 자리를 가지는 것을 SYHis-1이라 명명하였고 *Bgl*II 자리를 가지는 것을 SYHis-2라 명명하였다.

SYHis-1

5'-GATCC CACCACCACCACCACCAC A-3'

3'-G GTGGTGGTGGTGGTGGTG TCTAG-5'

Hexahistidine

SYHis-2

합성한 두 개의 올리고뉴클레오타이드인 SYHis-1과 SYHis-2를 상보적으로 결합하게 만들어주기 위하여 동일한 농도와 양의 두 올리고뉴클레오타이드를 1.5 ml tube에 넣고 100°C에서 5분간 물 증탕한 후 서서히 냉각시켜 annealing 시켰다. 상보적으로 결합한 올리고뉴클레오타이드는 hexahistidine 한 단위이다. 이런 단위를 여러 개 결합시키기 위하여 T_4 DNA ligase로 반응하여 polyhistidine을 암호화하는 다량체 DNA를 만들었다. 연결된 단위의 수와 방향은 플라스미드에 subcloning한 후 확인하였다. Ligation을 통해 여러 개의 단위로 연결된 DNA 단편과 *Bam*HI으로 절단한 pUC118 벡터를 혼합하고 다시 ligation 반응한 후 이를 XL1-Blue MRF 균주에 도입하였다. 형질전환된 대장균은 pUC118 벡터가 가지고 있는 ampicillin 내성을 이용하여 ampicillin이 함유된 LB plate에서 선별하였다. 형질전환된 균체에서 플라스미드를 분리하고 *Bam*HI과 *Hind*III로 자른 후 전기영동을 통해 polyhistidine을 암호화하는 DNA를 확인하였다.

pET28a 벡터로의 subcloning. pUC118 벡터에서는 reading frame이 맞지 않아서 단백질을 만들 수 없으므로, 제한효소 *Bam*HI과 *Hind*III로 절단 분리한 histidine 다량 함유 DNA를 pET28a 벡터와 ligation 반응시켰다. 이를 이용하여 XL1-Blue MRF을 형질전환하고 kanamycin이 포함된 LB plate에서 형질전환된 균을 선별하였다.

제조합 단백질의 발현 및 전기영동 gel에서의 확인. 대장균 BL21(DE3)을 상기한 제조합 pET28a 벡터를 이용하여 형질전환하고 선별한 후, kanamycin 용액(50 mg/ml) 3 μ l를 함유한

LB 배지 3 ml에 접종하여 600 nm에서 흡광도 0.6에 도달 할 때까지 키운 다음, isopropyl- β -D-thiogalactoside(IPTG)를 최종 농도가 1 mM 되게 첨가하고 추가로 4 시간 더 배양하였다. 균체를 분리한 후 균체 내에 존재하는 유도발현 polyhistidine 펩타이드는 Tricine SDS-PAGE¹⁴⁾를 수행하여 확인하였다. 전기영동 gel은 Coomassie Blue R-250을 이용하여 염색하였다.

대장균 내의 구리 함량 측정. 형질 전환되지 않은 BL21 (DE3) 균주, pET28a만을 함유한 균주, polyhistidine 암호화하는 DNA가 포함된 pET28a을 함유한 BL21(DE3)를 각각 LB 배지 3 ml에 접종하여 600 nm에서 흡광도 0.6에 도달 할 때까지 키운 다음 3 mM CuSO_4 가 함유된 100 ml의 LB배지에 5 ml씩 접종하였다. pET28a 벡터를 함유하는 균주에는 kanamycin 용액(50 mg/ml) 105 μ l를 첨가하고 600 nm에서 흡광도가 0.6에 도달 할 때까지 키운 다음 1 M IPTG를 105 μ l 첨가하여 최종 농도가 1 mM 되게 한 다음 추가로 4 시간 더 배양하였다. 배양액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 침전된 균을 멸균수로 재현탁한 후 동일 조건으로 다시 원심분리하고 마지막으로 침전된 균을 건조시켰다. Polyphenol oxidase의 구리결합지역 약 500 bp를 pET32a 플라스미드에 클로닝한 벡터(PPOCBpET32)를 함유하는 BL21(DE3)pLysS 균주도 kanamycin 대신에 ampicillin을 사용한 것을 제외하고는 동일한 과정으로 펩타이드를 발현시켜 구리함량 분석에 이용하였다. 건조된 시료를 삼각플라스크에 넣고 질산 4 ml에 녹인 후 150°C에서 과산화수소를 소량씩 첨가하며 유기물을 분해하였다. 이 시료에 탈이온수를 가하여 일정 부피로 보정하고 Hitachi Z-6100 Atomic Absorption Spectrophotometer(Tokyo, Japan)를 이용하여 구리 함량을 측정하였다.

결과 및 고찰

Polyhistidine 발현 DNA의 대장균으로의 도입. 여러 광물 질과 결합력이 있다고 알려진 histidine 다량함유 펩타이드를 이용하여 대장균의 구리 함량을 높이고자 하였다. Histidine이 가지고 있는 imidazol ring이 구리와 결합할 수 있고 histidine 다량함유 펩타이드로 구성되면 결합력이 더 증가되므로 이를 대량 발현시키고자 histidine 코돈을 6개 함유하는 DNA를 한 단위로 하는 올리고뉴클레오타이드를 합성하였다. SYHis-1은 *Bam*HI 제한효소자리를 가지며 SYHis-2는 *Bgl*III 제한효소자리를 가진다. 이 두 올리고뉴클레오타이드가 annealing된 시료를 ligation 반응시켜 다량체를 만들었다. 이 시료를 *Bam*HI으로 절단한 pUC118 벡터에 ligation 시킨 후 XL1-Blue MRF 형질전환에 이용하였다. 평판에서 선별된 콜로니를 이용하여 액체 배지에서 형질전환 균을 배양하고 플라스미드 DNA를 분리한 후 제한효소 *Bam*HI과 *Bgl*III로 절단하여 삽입 DNA를 확인하였다. *Bam*HI과 *Bgl*III 두 제한효소로 자른 자리 상호간에는 ligation이 가능하나 ligation 후에는 각각의 제한효소로 절단되지 않는다. 상기에 명시한 올리고뉴클레오타이드의 방향과 동일하게 각각의 단위가 ligation 되면 두 제한효소로 절단되지 않으며 역방향으로 ligation되면 두 제한효소 중 어느 한가지로 반드시 절단되므로 이를 통해 동일 방향으로 연결된 다량체를 확

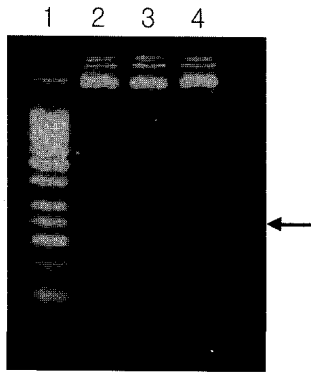


Fig. 2. Subcloning of the DNA fragment for polyhistidine into a pET28a vector. Lane 1, 50 bp DNA ladder size marker; lanes 2-4, digestion of pET-his vector containing the DNA fragment for polyhistidine with BamHI and HindIII. Arrow indicates the inserted DNA fragment for polyhistidine.

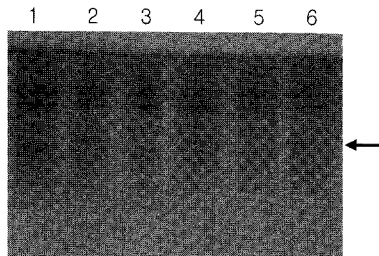


Fig. 3. Tricine SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the polyhistidine produced in *E. coli*. Lanes 1, 3, and 5, total proteins of BL21(DE3) harboring pET-his without IPTG induction; lanes 2, 4, and 6, total proteins of BL21(DE3) harboring pET-his after IPTG induction. Arrow indicates the polyhistidine peptide produced in *E. coli*.

인할 수 있었다. 상기와 같은 방법으로 hexahistidine 9개 단위로 구성된 DNA 단편을 얻을 수 있었다. Hexahistidine 9개 단위 DNA 단편을 BamHI과 HindIII로 절단하여 pET 28a 벡터로 옮겼으며, 이를 이용하여 대장균 XL1-Blue MRF을 형질전환한 후 다시 동일한 제한효소로 절단하여 subcloning을 확인하였으며 이 벡터를 pET-his로 명명하였다. Fig. 2의 화살표로 표시되는 삽입 DNA의 크기가 약 250 bp로 나타나 9개의 hexahistidine을 가지는 DNA가 pET28a에 클로닝된 것을 확인할 수 있었다. 이를 이용하여 단백질 발현 균주인 대장균 BL21(DE3)을 다시 형질전환하고 배양한 후 단백질 발현 여부를 조사하기 위하여 Tricine SDS-PAGE를 실시하였다. 단백질 발현이 유도되도록 IPTG를 처리한 것(lanes 2, 4, 6)과 처리하지 않은 것(lanes 1, 3, 5)을 비교해보아, IPTG를 처리한 균주에서만 벡터 유래 지역을 포함하여 분자량이 약 17,000인 융합단백질이 발현됨을 알 수 있었다(Fig. 3).

형질전환된 대장균의 구리 함량 분석. 구리결합지역을 포함하는 플라스미드를 함유하는 균주를 3 mM CuSO₄가 함유된 100 ml의 LB배지에서 600 nm 흡광도가 0.6이 되도록 배양하고 최종 농도가 1 mM 되도록 IPTG를 첨가하여 4시간 더 배양한 후 균체 내의 구리 함량을 분석하였다. Fig. 4는 polyphenol oxidase의 구리결합지역 DNA를 포함하는 PPOCBpET32 벡터를 함유하는 BL21(DE3)pLysS 균주의 구리함량을 측정하고 결과

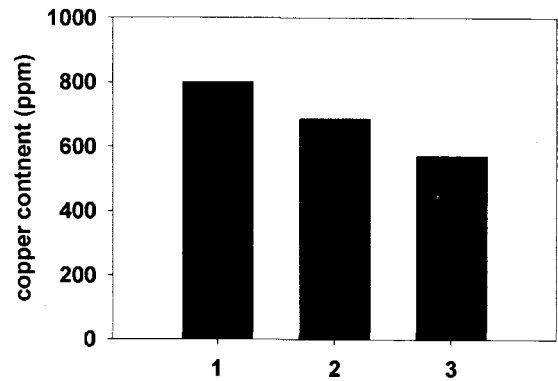


Fig. 4. Copper contents in the *E. coli* strain harboring PPOCBpET32 cultured at 37°C in LB media supplemented with 3 mM CuSO₄. 1, BL21(DE3)pLysS; 2, BL21(DE3)pLysS harboring PPOCBpET32; 3, IPTG-induced BL21(DE3)pLysS harboring PPOCBpET32.

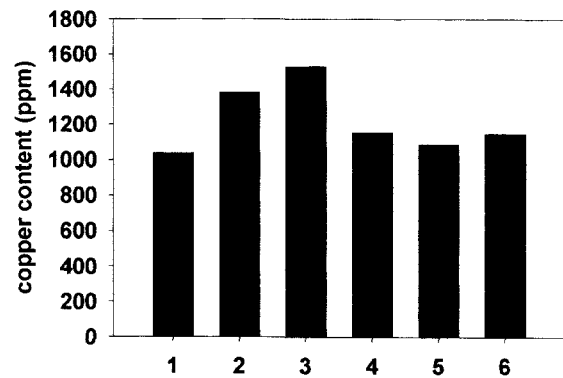


Fig. 5. Copper contents in the *E. coli* strain harboring pET-his cultured at 37°C in LB media supplemented with 3 mM CuSO₄. 1, BL21(DE3); 2, IPTG-induced BL21(DE3); 3, BL21(DE3) harboring pET28a; 4, IPTG-induced BL21(DE3) harboring pET28a; 5, BL21(DE3) harboring pET-his; 6, IPTG-induced BL21(DE3) harboring pET-his.

를 보여준다. BL21(DE3)pLysS 균주(실험 1) 자체만으로도 구리함량이 약 800 ppm 정도로 나타났다. 이는 아마도 대장균이 가지고 있는 metalloprotein이 구리를 다량 함유하고 있기 때문인 것 같다. Polyphenol oxidase의 구리결합지역 DNA를 포함하는 PPOCBpET32 벡터를 함유하는 균주(실험 2)의 경우는 구리함량이 오히려 감소하였으며 이 균주를 IPTG로 유도발현시킨 경우(실험 3)는 600 ppm으로 더 감소하여, 구리결합지역의 발현이 대장균 내의 구리 함량 증가에 기여하지 못함을 알 수 있었다. 앞으로 polyphenol oxidase의 구리결합지역을 보다 넓게 포함하는 DNA를 이용하거나 또는 다른 단백질의 구리결합지역을 이용해보아야 할 것이다.

Polyhistidine이 다량 발현되는 경우의 실험인 Fig. 5에서 보면 BL21(DE3) 균주(실험 1) 자체만으로도 구리 함량이 1,000 ppm 정도로 나타났으며 IPTG를 처리했거나 또는 pET28a를 함유한 BL21(DE3) 균주의 경우는 어느 정도 구리함량 증가를 보여 주었다(실험 2-4). 반면 구리의 함량이 증가할 것이라고 예상했던 9개 hexahistidine 단위를 가지는 polyhistidine을 발현하는 BL21(DE3)의 경우, 실험 대조구인 BL21(DE3)나 hexahistidine

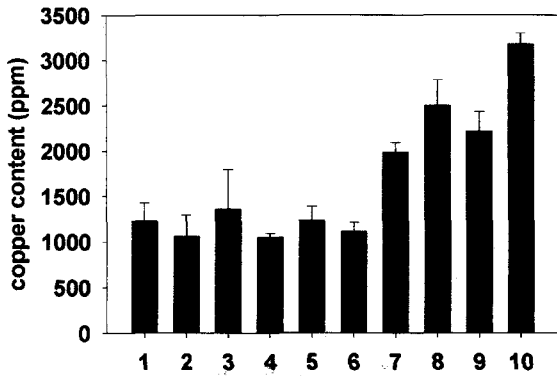


Fig. 6. Copper contents in the *E. coli* strain harboring pET-his cultured at 37°C in LB media supplemented with 3 mM CuSO₄ in the presence and absence of kanamycin, respectively. 1, BL21(DE3) without kanamycin; 2, IPTG-induced BL21(DE3) without kanamycin; 3, BL21(DE3) harboring pET28a with kanamycin; 4, IPTG-induced BL21(DE3) harboring pET28a with kanamycin; 5, BL21(DE3) harboring pET-his with kanamycin; 6, IPTG-induced BL21(DE3) harboring pET-his with kanamycin; 7, BL21(DE3) harboring pET28a without kanamycin; 8, IPTG-induced BL21(DE3) harboring pET28a without kanamycin; 9, BL21(DE3) harboring pET-his without kanamycin; 10, IPTG-induced BL21(DE3) harboring pET-his without kanamycin.

을 1 단위만 가지고있는 pET28a 벡터를 함유하는 균주와 비교하여, 유의적 차이를 보이지 않거나 오히려 감소하였다(실험 5, 6).

pET28a를 함유하는 균주와 형질전환되지 않은 균주의 실험상의 조건은 kanamycin의 첨가 이외에는 모두 동일하였으므로, pET28a 함유 균주를 동일한 조건인 kanamycin 미처리 조건에서 배양하여 비교하였다. Kanamycin을 처리하지 않으면 벡터가 배양 중에 소실될 가능성이 있으므로, LB plate와 kanamycin이 함유된 LB plate에 동일한 양의 대장균을 도포한 후 두 LB plate에서의 균수를 비교하였다. 적어도 본 실험 배양 시간 중에는 배양 세포에서 벡터가 제거되지 않음을 확인하였기 때문에 kanamycin을 첨가하지 않는 조건에서 상기의 실험을 수행하였다. Polyhistidine을 발현하는 플라스미드(pET-his)를 가지는 균주를 kanamycin을 첨가하지 않은 배지에서 IPTG 유도 배양한 경우(Fig. 6의 실험 10)에는 구리함량이 약 3,200 ppm으로 나타났다. 이 수치는 kanamycin을 첨가한 배지에서 IPTG 유도 배양한 경우(Fig. 5의 실험 6, Fig. 6의 실험 6)의 1,100 ppm과 비교하여 구리 함량이 약 3배 증가한 값이다. 이는 아마도 kanamycin이 단백질 합성저해 항생제이기 때문에 polyhistidine이 발현됨에 따라 대장균의 다른 구리 함유 단백질 발현이 감소되어서 일부 구리 함량 증가 효과가 상쇄되었기 때문일 것이다. 하지만 kanamycin이 없는 배지에서는 구리를 함유할 수 있는 단백질뿐만 아니라 polyhistidine이 충분히 발현되어 구리 함량 증가가 뚜렷이 나타난 것으로 생각된다. 한편 hexahistidine 하나만을 발현하는 pET28a 벡터를 가지는 균주를 kanamycin을 첨가하지 않은 배지에서 IPTG 유도 배양한 경우(Fig. 6의 실험 8)에는 구리 함량이 약 2,500 ppm으로 나타났다. 따라서 hexahistidine 단위를 9개 가지는 polyhistidine을 발현하는 균주를 kanamycin을 첨가하지 않은 배지에서 IPTG 유

도 배양하면 실험 대조구(Fig. 6의 실험 8)에 비교하여 약 1.3 배 증가된 구리를 측정시킬 수 있었다. Hexahistidine 단위를 9 배나 많이 가졌음에도 불구하고 구리 함량이 30% 밖에 증가하지 않은 것은 아마도 배지 내의 histidine 양이 부족하여 polyhistidine이 충분히 발현되지 않았기 때문일 것이다.

앞으로 polyhistidine을 암호화하는 DNA 단편을 효모 벡터에 클로닝한 후 형질전환하여 효모에서도 구리 함량 증가 효과가 나타나면, 이를 이용하여 함량이 높게 구리가 chelation된 효모 사료 첨가제의 개발이 가능할 것이다.

감사의 글

본 연구는 1999년 농림부에서 시행한 첨단 농림기술개발사업에 의해 수행된 연구 결과이며, 연구비 지원에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Waldrop, G. L. and Ettinger, M. J. (1990) Effects of albumin and histidine on kinetics of copper transport by fibroblasts. *Am. J. Physiol.* **259**, 212-218.
2. De Rome, L. and Gadd, G. M. (1987) Measurement of copper uptake in *Saccharomyces cerevisiae* using a Cu²⁺-selective electrode. *FEMS Microbiol. Lett.* **43**, 283-287.
3. Lin, C.-M. and Kosman, D. J. (1990) Copper uptake in wild type and copper metallothionein-deficient *Saccharomyces cerevisiae*: Kinetics and mechanism. *J. Biol. Chem.* **265**, 9194-9200.
4. Glusker, J. P., Katz, A. K. and Bock, C. W. (1999) Metal ions in biological systems. *The Rigaku J.* **16**, 8-16.
5. Butt, V. S. (1980) In *The Biochemistry of Plant*, Vol. 2 (Davies, D. D. ed) Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 81-123.
6. Schmidbauer, S.B. and Strobel, O. K. (1997) Rapid purification of histidine-tagged glutathione S-transferase fusion protein by metal chelate perfusion chromatography media. *Front. Biosci.* **2**, 6-8.
7. Lindner, P. (1992) Purification of native proteins from the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli* using IMAC and histidine tails: A comparison of proteins and protocols. *A Companion to Meth. Enzymol.* **4**, 41-56.
8. Sousa, C., Cebolla, A. and de Lorenzo, V. (1996) Enhanced metaladsorption of bacterial cells displaying poly-His peptides. *Nature Biotechnol.* **14**, 1017-1020.
9. Pack, D. W., Chen, G., Maloney, K. M., Chen, C.-T. and Arnold, F. H. (1997) A metal-chelating lipid for 2D protein crystallization via coordination of surface histidines. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 2479-2487.
10. Pack, D. W. and Arnold, F. H. (1997) Langmuir monolayer characterization of metal chelating lipids for protein targeting to membranes. *Chem. Phys. Lipids* **86**, 135-152.
11. Maloney, K. M., Shnek, D. R., Sasaki, D. Y. and Arnold, F. H. (1996) Fluorescence signaling of ligand binding and assembly in metal-chelating lipid membranes. *Chem. Biol.* **3**, 185-192.
12. Hunt, M. D., Eannetta, N. T., Yu, H., Newman, S. M. and Steffens, J. C. (1993) cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.* **21**, 59-68.

13. Hwang I. G. and Kim, W.-Y. (1996) Overexpression of a copper binding site of the polyphenol oxidase in *E. coli*. *J. Gen. Eng. Res.* **9**, 1-8.
14. Schagger, H. and Jagow G. V. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.

Copper Content Increase in *E. coli* Expressing Copper-Binding Peptide Genes

Hyung-Kee Kim, Sung-Hyun Moon and Woo-Yeon Kim* (*Department of Biotechnology, Chung-Ang University, Ansong 456-756, Korea*)

Abstract: Cloning and expression of copper-binding peptide gene in *E. coli* was carried out to enhance the copper-chelation capacity. *E. coli* was transformed with pET vector containing the copper-binding region of potato polyphenol oxidase gene and polyhistidine-coding DNA, and the copper content of *E. coli* harboring each vector was measured. No increase in intracellular copper was observed in *E. coli* harboring PPOCBpET32 vector, which contains DNA for polyphenol oxidase copper-binding region. Intracellular copper content of *E. coli* harboring pET28a vector, which contains one hexahistidine unit DNA, was 2,500 ppm after culturing without kanamycin, whereas *E. coli* harboring pET-his vector, which contains nine hexahistidine unit DNAs was 3,200 ppm.

Key words: chelated copper, polyhistidine expression in *E. coli*, copper accumulation

*Corresponding author