

재조합 대장균을 이용한 GFP-AFP Chimera 단백질 과량발현 및 특성 파악연구

고지선, 홍순호*

Overexpression of GFP-AFP Chimera Protein using Recombinant *Escherichia coli* and Analysis of Anti-freezing Characteristics

Ji-seun Ko and Soon Ho Hong*

접수: 2013년 9월 12일 / 게재승인: 2013년 10월 17일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Antifreeze peptide from *Myoxocephalus octodecemspinosus* was overexpressed and purified in *Escherichia coli*. Green fluorescence protein-AFP chimera was constructed by integrating *gfp* and *afp* genes. Produced GFP-AFP chimera protein was purified using polyhistidine tag which was inserted at C-terminus. By addition of GFP-AFP chimera protein, freezing point of elution buffer was decreased from -13°C to -20°C . This result suggested that GFP-AFP chimera can be considered as a potential candidate of novel inhibitor for gas hydrates.

Keywords: Antifreeze peptide, Hydrate, Green fluorescence protein, *Escherichia coli*

1. 서론

Antifreeze peptide (AFP)는 동결방지단백질이라고 하며, 얼음에 친화력을 가지는 단백질을 말한다 [1]. 주로 극지방에

존재하는 어류에게서 많이 발견되며 AFP의 존재로 인하여 어류가 저온의 해수에서도 생존할 수 있는 것으로 알려져 있다. AFP의 특성인 얼음에 대한 친화력 때문에 단백질이 얼음표면에 흡착하여 얼음표면의 성장을 저해하며 AFP 수용액내의 얼음결정은 수 시간 또는 수 일 동안까지도 같은 형태를 유지할 수 있다. AFP는 친환경적이고 무해한 특성 때문에 현재 농작물과 양식 어류의 냉해방지, 냉동식품과 유제품의 보관기간 증가 또는 이식세포와 수혈액의 보존 등으로 사용되고 있다. 또한, 최근 진행되는 AFP관련 연구에는 가스 하이드레이트 (gas hydrate)의 억제제 역할에 효율적이라는 연구결과가 나타나고 있다.

최근 원유고갈우려 및 CO₂ 저감 등의 국제적인 흐름에 맞추어 이산화탄소 발생이 적은 친환경 그린에너지원으로서 가스 하이드레이트가 주목을 받고 있다. 가스 하이드레이트는 가스 분자가 저온과 고압 하에서 물 분자와 결합하여 형성되는 수화물의 일종으로, 저장되는 가스가 메탄일 경우 메탄 하이드레이트라고 부른다 [2-4]. 가스 하이드레이트가 관심을 받는 첫째 이유는 막대한 매장량이다. 현재 가스 하이드레이트 매장량은 전 세계에 약 10조 톤에 달하는 것으로 추정되며 이 규모는 메탄 기체 매장량의 약 100 배에 해당하고 석탄, 석유 등 전체 화석연료 매장량의 약 두 배에 달한다. 둘째 이유는 가스 하이드레이트가 이산화탄소의 발생이 매우 적은 친환경 청정에너지라는 점을 들 수 있다. 가스 하이드레이트 연소시 발생하는 이산화탄소의 양은 현재 사용 중인 휘발유에 비하여 0.7배 정도며, 알코올은 물론 다른 탄화수소 가스에 비해서도 이산화탄소를 적게 배출하는 특성을 가지고 있어 청정에너지라 불리기에 손색이 없다.

울산대학교 화학공학부
Department of Chemical Engineering, University of Ulsan, 93 Daehakro, Nam-gu, Ulsan 680-749, Korea
Tel: +82-52-259-1293, Fax: +82-52-259-1689
e-mail: shhong@ulsan.ac.kr

이렇듯 가스 하이드레이트가 새로운 대체 에너지로 각광 받고 있지만, 당장 사용하기에는 몇 가지 문제점이 있다. 심해저에 매장된 가스 하이드레이트를 압력과 온도를 그대로 유지한 채 채취하는 기술적 어려움과 이에 따른 경제성이 실용화의 걸림돌이 되고 있다. 또한 시추와 생산 시 파이프라인, 노즐 등에서 막힘 현상이 유발되는 문제를 해결해야 한다. 이 때문에 가스 하이드레이트 개발 기술은 아직까지 상용 기술이 개발되지 못하고 있는 것이 현실이지만, 해결방안으로, 최근 저해제 주입법이 많은 관심을 얻고 있다. 현재 메탄올 또는 mono-ethylene glycol 등의 저해제를 사용하고 있지만, 매우 많은 양의 메탄올을 주입하여야 하므로 (연간 미화 2억 2천만 달러), 이를 대체하는 경제적인 저해제로서 AFP의 연구가 활발히 이루어지고 있다 [5-7].

연구에 따르면 AFP의 물에 친화력을 가지고 있는 특성과 가스하이드레이트가 생성되는 온도와 압력 조건에 AFP이 효율성을 나타내는 것으로 보고되었지만, AFP 자체도 현재 굉장히 고가이기 때문에 산업에 적용이 곤란한 상황이다. AFP의 유사체인 수용성 고분자의 개발이 진행되고 있지만 여러 연구를 통하여 고분자보다 AFP이 효율적이라는 연구 결과가 나타나고 있기 때문에 AFP를 대량생산하기 위한 여러 연구가 활성화되고 있다 [8-10].

따라서 본 연구에서는 유전자 재조합을 통하여 AFP단백질을 대량 생산할 수 있는 시스템을 개발하며, 특히 AFP유전자와 형광단백질인 green fluorescence protein (GFP)를 결합하여 단백질의 발현을 시각적으로 더 쉽게 확인할 수 있는 시스템을 구축하고자 한다. 또한 대장균에서 상대적으로 발현이 용이한 GFP와 외래단백질인 AFP를 융합함으로써, AFP의 발현량도 증가시키고자 한다. 그리고 재조합 GFP-AFP chimera (복합체) 발현 후 단백질의 어는점을 분석하여

동결방지특성을 확인하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주 및 배지

유전자 재조합과 단백질 발현에 사용된 균주 및 플라스미드는 Table 1에 정리하였다. 균주배양을 위한 배지는 Luria-Bertani (LB) 배지 (10 g/L bacto-tryptone, 5 g/L bacto-yeast extract and 5 g/L NaCl)가 사용되었다. 항생물질로 kanamycin (30 mg/L)을 첨가하였으며, 균주는 37°C, 200 rpm에서 배양되었다.

2.2. 플라스미드 제작

Clupea harengus (*afp11*), *Liparis atlanticus* (*afp15*), *Myoxocephalus octodecemspinosus* (*afp16*) 유래의 3종의 *afp* 유전자를 재조합하였으며 사용한 oligonucleotide의 염기서열은 Table 2에 정리하였다. 3종의 *afp* 유전자와 *gfp* 유전자는 polymerase chain reaction (PCR)기법을 통하여 확보하였다. PCR은 Expand High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Germany)을 이용하여 MJ mini Personal Thermal Cycler (BioRad Laboratories, USA)에서 수행하였다. *KpnI*, *SalI* 제한효소를 사용하여 *gfp* 유전자를 pZE21MCS 플라스미드에 삽입하였다. *SalI*과 *HindIII* 제한효소를 사용하여 3종의 *afp* 유전자를 *gfp* 유전자 다음부분에 도입하여 pZEGfpAFP11 (*C. harengus*), pZEGfpAFP15 (*L. atlanticus*), pZEGfpAFP16 (*M. octodecemspinosus*) 플라스미드를 제작하였다 (Fig. 1). 제작된 플라스미드를 *Escherichia coli* BL21 (DE3)균주에 형질전환하여 GFP-AFP chimera 단백질 발현 실험을 수행하였다.

Table 1. List of bacterial strains and plasmids used in this study

Strain/Plasmid	Genotype and/or property	Source
Escherichia coli strains		
XL1- Blue	SupE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac F'(proAB ⁺ lacI ^q lacZM15 Tn10 (tet ^R))	Stratagene
BL21 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) ë(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Novagen
Plasmids		
pZEGfp	pZE21MCS containing <i>gfp</i>	This work
pZEGfpAFP11	pZE21MCS containing <i>gfp-afp11</i>	This work
pZEGfpAFP15	pZE21MCS containing <i>gfp-afp15</i>	This work
pZEGfpAFP16	pZE21MCS containing <i>gfp-afp16</i>	This work

Table 2. Oligonucleotide primers used in this study

Name	Sequence
GFP_F_ <i>KpnI</i>	5'-GGGGT ACC ATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTG-3'
GFP_R_ <i>SalI</i>	5'-ACG T CGACTCTACCTTCAATCAAAGTCAAGAAGGACCATGTGGT-3'
AFP11_F_ <i>SalI</i>	5'-G T CGACATGCTGACCGTGAGCCTGCTGG-3'
AFP11_R_ <i>HindIII</i>	5'-CCA AGCT TTTATGTTGGTGGTGATGATGATGTTTCAGCGGTTTCGCGCAAATGC-3'
AFP15_F_ <i>SalI</i>	5'-G T CGACATGGCGGCGGCGACCCC-3'
AFP15_R_ <i>HindIII</i>	5'-CCA AGCT TTTATGTTGGTGGTGATGATGATGCAGCGCCGCCAGCGCC-3'
AFP16_F_ <i>SalI</i>	5'-G T CGACATGAAATTTAGCCTGGTGGCGACCATTTGT-3'
AFP16_R_ <i>HindIII</i>	5'-CCA AGCT TTTATGTTGGTGGTGATGATGATGTTTCAATCGCCATGGTCTGATCG-3'

^aRestriction enzyme sites are shown in bold.

2.3. 재조합 GFP-AFP chimera 단백질 발현 및 정제

플라스미드를 포함한 *E. coli* 균주의 단일 콜로니를 37°C에서 overnight 배양했다. 배양된 균주는 새로운 복합배지 (LB)에 100배 희석한 후 흡광도 600 nm (OD₆₀₀)에서 0.5에 도달할 때까지 37°C에서 배양하였다. 단백질 발현 유도제인 doxycycline을 주입한 후, 균주농도 및 형광도를 측정하였다. 균주의 성장은 spectrophotometer (Shimadzu, Japan)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하는 것을 통해 확인하였다. 균주의 GFP 형광발광 정도는 RF-5301PC Spectrofluorimeter (Shimadzu, Japan)를 이용하여 측정되었다. Spectrofluorimeter의 excitation 파장은 490/10 nm, 그리고 emission 파장은 510/10 nm로 작동하였다. Specific fluorescence intensity (SFI)는 각각의 시점에서 측정된 형광도를 그에 상응하는 600 nm에서 측정된 흡광도로 나눈 값으로 각각의 시료로부터 최소한 3개의 측정치를 구하였다.

재조합 GFP-AFP 단백질의 정제를 위하여 플라스미드를 포함한 *E. coli* 균주를 OD₆₀₀이 1.2에 도달할 때 까지 배양하였다. 배양액을 5,000 rpm으로 20분 동안 원심분리시킨 후, 균주 pallet을 5 mL의 lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 1 mM imidazole, pH 8.0)에 용해하였다. Lysozyme을 주입한 후 30분 동안 ice에서 incubation한 후, sonication하였다. 4°C에서 5,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 상층액만 채취하였다. 600 µL의 lysis buffer를 Ni-NTA spin column (Qiagen)에 주입한 후 2분 동안 2,000 rpm으로 column을 통과시켜 평형화시킨 후, lysate supernatant를 600 µL씩 column에 주입하여 동일한 조건에서 원심분리를 실행하였다. 600 µL의 wash buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0)를 column에 주입하여 동일한 원심분리 조건으로 실행한 후, elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0)를 100 µL 주입하고 원심분리하였다. Elution 시킨 AFP 단백질 정제 시료는 2X sample buffer (Bio-rad)와 mix하여 37°C에 10분 동안 incubation 시킨 후 SDS-PAGE로 측정하였다.

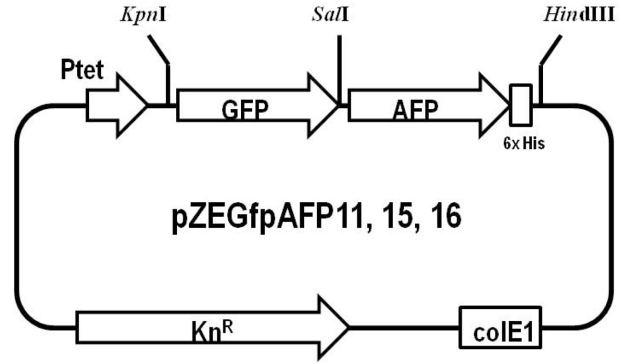


Fig. 1. Schematic diagram of antifreeze peptide expression plasmids.

2.4. DSC 분석

정제된 GFP-AFP chimera 단백질의 동결방지 특성을 확인하기 위하여, 0.1 mM 농도의 단백질용액의 어는점을 Differential Scanning Calorimeter (DSC)를 이용하여 측정하였다. GFP-AFP chimera 단백질의 대조군으로 비교하기 위하여 증류수, GFP 단백질의 어는점을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 재조합 GFP-AFP chimera 단백질 발현 및 정제

재조합 GFP-AFP chimera 단백질 유전자를 pZE21MCS에 도입하여 pZEGfpAFP11, pZEGfpAFP15, pZEGfpAFP16 plasmid를 제작하였다 (Fig. 1). 재조합 GFP-AFP chimera 단백질의 발현은 tet 프로모터에 의하여 조절되며, 발현유도제인 doxycycline의 도입에 의하여 발현이 유도된다. GFP-AFP chimera 단백질의 발현을 확인한 결과 *C. harengus*와 *L. atlanticus* 유래의 AFP 단백질을 발현시킨 균주는 성장이 심각하게 저해됨을 확인하였으며, *M. octodecemspinosus* 유래의 AFP는 상대적으로 양호한 수준의 균주상태를 보여주었

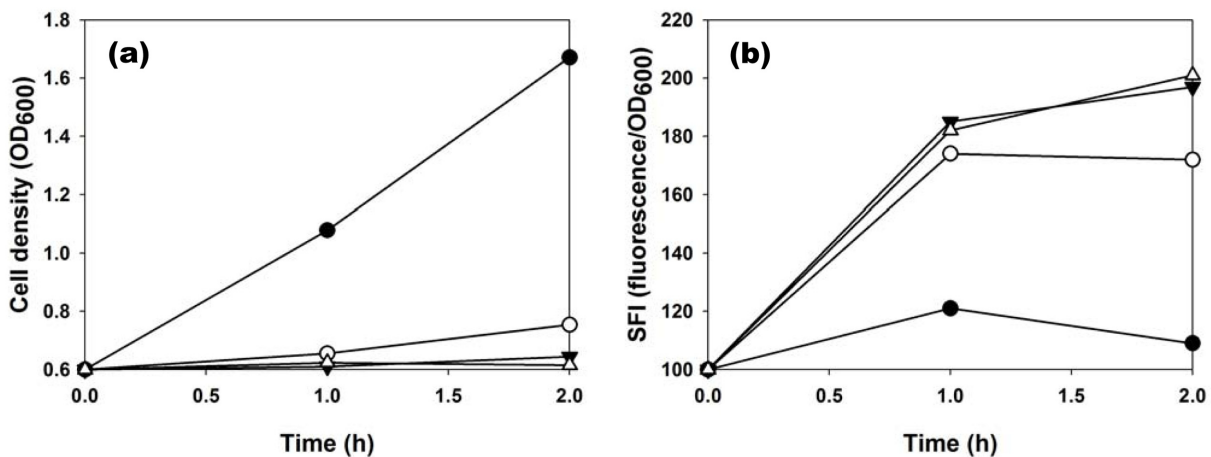


Fig. 2. Time profile of (a) cell density and (b) fluorescence of *E. coli* (pZEGfpAFP16) with various concentration of doxycycline; 0 mM (●), 0.1 mM (○), 0.5 mM (▼) and 1 mM (△).

다 (data not shown). 이는 *C. harengus*와 *L. atlanticus* 유래의 AFP 단백질이 *E. coli*에서 발현되기 어려운 특성을 가지고 있으며, 이에 의하여 균주성장이 저해되기 때문으로 추측된다. 또한 AFP의 단독발현이 아닌 GFP 단백질과의 chimera 발현도 단백질의 발현에 영향을 주었을 것이라 고려된다. *M. octodecemspinosus* 유래의 GFP-AFP chimera의 발현조건을 최적화하기 위하여 다양한 농도의 doxycycline을 첨가하여 이의 영향을 분석하였다 (Fig. 2). 발현유도제인 doxycycline을 첨가하지 않은 경우, 2시간 동안 균주농도 (OD₆₀₀)가 0.6에서 1.67로 약 3배 증가하였다. 그러나 0.1, 0.5, 1 mM의 doxycycline을 첨가하였을 경우, 균주의 성장이 거의 이루어지지 않았음을 확인하였다 (Fig. 2(a)). 본 결과로부터 GFP-AFP chimera의 발현이 균주의 성장에 미치는 부정적인 영향을 다시 확인할 수 있었다. Doxycycline을 첨가한 경우, 상대형광도 (SFI)가 거의 증가하지 않음 반면, doxycycline을 첨가에 의하여 상대형광도가 시간에 따라 증가함을 확인하였다 (Fig. 2(b)). 이를 통하여 GFP-AFP chimera 단백질이 성공적으로 발현되었음을 확인하였다.

3.2. DSC를 이용한 AFP 동결방지특성 분석

재조합 GFP-AFP chimera 단백질의 동결방지 특성을 파악하기 위하여 이의 정제연구를 수행하였다. 효율적인 정제를 위하여 *afp* 유전자의 말단에 polyhistidine tag를 삽입하였다 (Fig. 1). 재조합 GFP-AFP chimera 단백질을 1 mM의 doxycycline으로 발현시킨 후, Ni-NTA column를 사용하여 정제하였다. SDS-PAGE로 14.7 kDa 크기의 재조합 GFP-AFP chimera

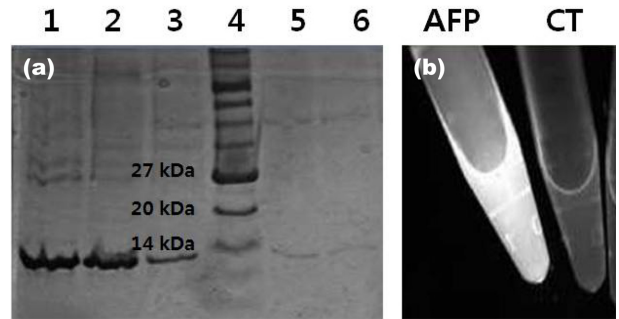


Fig. 3. (a)SDS-PAGE expression analysis of AFP16 protein extracts in the culture medium of *E. coli* BL21(DE3) strain harboring pZEG-fpAFP16. Lane1: supernatant, 2: flowthrough, 3: wash, 4: protein marker, 5: 1st elution, 6: 2nd elution. (b) Fluorescence picture of purified GFP-AFP16 chimera solution.

단백질이 정제되었음을 확인하였다 (Fig. 3).

정제된 GFP-AFP chimera 단백질의 동결방지특성을 확인하기 위하여 DSC를 이용하여 어는점 변화를 관찰하였다. GFP-AFP chimera 단백질의 대조군으로 elution buffer와 GFP 단백질이 사용되었다. DSC는 시료물질을 가열/냉각시킴으로서 시료의 열 출입을 측정하는 기계이며, 이를 통하여 시료의 발열과 흡열특성을 분석하여 어는점, 녹는점 유리전이온도, 결정화온도 등을 확인할 수 있다. DSC 그래프의 발열반응 피크를 분석하여 액체에서 고체로 상변화가 이루어지고 있는 온도를 확인할 수 있다. DSC분석 결과 elution buffer의 어는점은 -12~13°C, GFP 단백질 용액의 어는점은 -16~17°C,

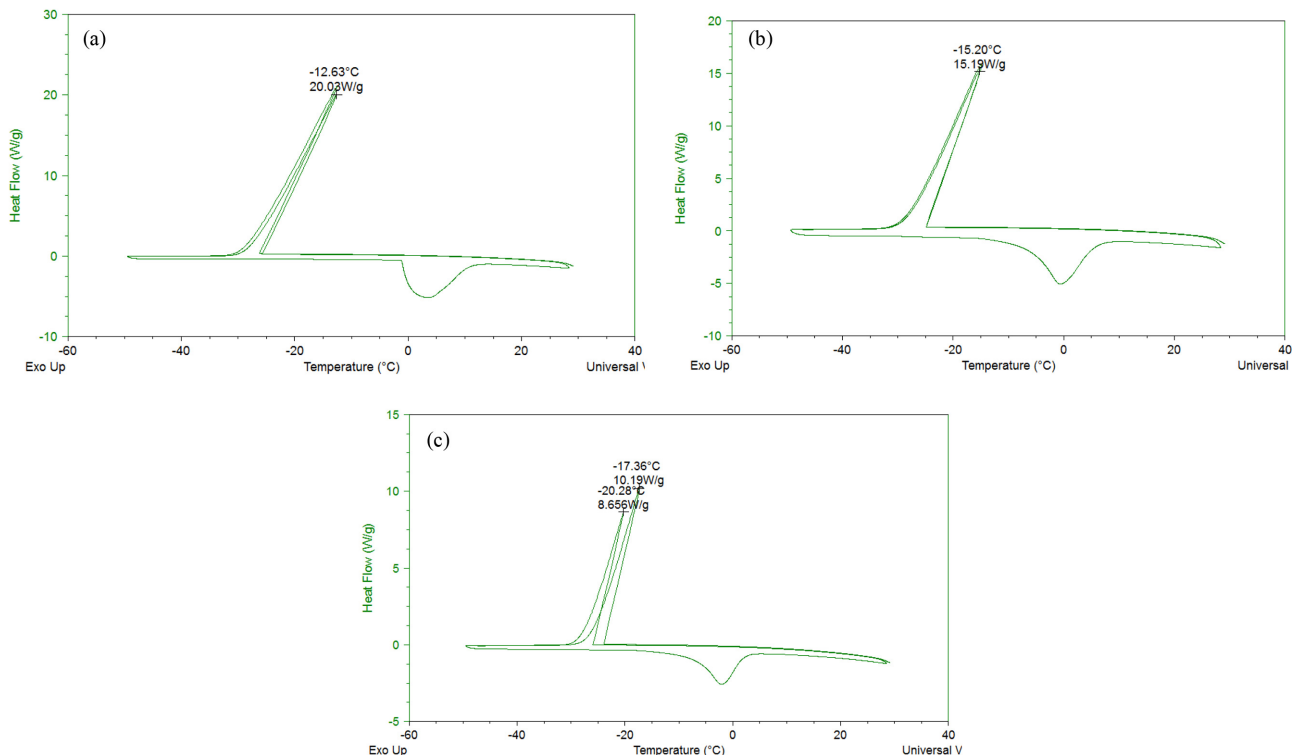


Fig. 4. DSC analysis results of (a) elution buffer (b) GFP solution and (c) GFP-AFP16 chimera solution.

되었다 (Fig. 4). 이를 통하여 제작된 GFP-AFP chimera 단백질이 동결방지특성을 가지고 있음을 확인하였다.

GFP, GFP-AFP chimera 단백질 용액은 증류수보다 낮은 어는점을 가지고 있음을 확인할 수 있었으며, GFP와 GFP-AFP chimera 단백질 용액의 어는점을 크게 차이가 나지 않았으며, 이는 다른 논문에서 보고된 것 바와 같이 GFP 단백질만으로도 어느 정도의 동결방지기능을 나타내기 때문으로 고려된다.

4. 결론

본 연구진은 AFP 단백질의 동결방지특성과 GFP 형광단백질의 특성을 이용하여 단백질의 발현을 시각적으로 확인 가능한 GFP-AFP chimera 단백질 생산시스템을 제작하였다. GFP-AFP chimera 단백질 생산시스템을 *E. coli*에 도입하여 *E. coli*의 빠른 번식 특성을 이용하여 재조합 단백질을 대량생산하였다. AFP 단백질의 경우 고가이기 때문에 가스 하이드레이트 저해제로써의 산업 적용이 현실적으로 불가능하였다. 본 연구진이 개발한 GFP-AFP chimera 단백질의 대량생산시스템을 활용한다면, 기존의 화학제품기반 저해제보다 친환경적이며 경제적인 가스 하이드레이트 저해제의 생산을 앞당길 수 있으리라 기대된다. 또한, 현재 다양한 AFP가 보고되어 있으므로, 보다 효율적인 GFP-AFP chimera 단백질의 개발이 가능할 것으로 예상된다.

감사

본 연구는 한국연구재단을 통한 교육과학기술부 일반연구자

사업 연구비 (2011-0022392)의 지원으로 이루어졌습니다.

REFERENCES

1. Davies, P. L., J. Baardsnes, M. J. Kuiper, and V. K. Walker (2002) Structure and function of antifreeze proteins. *Philos. Trans. R. Soc.* 357: 927-935.
2. Khokhar, A. A., J. S. Gudmundsson, and E. D. Sloan (1998) Gas storage in structure H hydrates. *Fluid Phase Equilib.* 150-151: 383-392.
3. Lee, J. D., R. Susilo, and P. Englezos (2005) Kinetics of structure H gas hydrate. *Energy Fuels* 19: 1008-1015.
4. Linga, P., R. Kumar, and P. Englezos (2007) Gas hydrate formation from hydrogen/carbon dioxide and nitrogen/carbon dioxide gas mixtures. *Chem. Eng. Sci.* 62: 4268-4276.
5. Lederhos, J. P., J. P. Long, A. Sum, R. L. Christiansen, and E. D. Sloan (1996) Effective kinetic inhibitors for natural gas hydrates. *Chem. Eng. Sci.* 51: 1221-1229.
6. Kelland, M. A. (2006) History of the development of low dosage hydrate inhibitors. *Energy Fuels* 20: 825-847.
7. Koh, C. A. and E. D. Sloan (2007) Natural gas hydrates: Recent advances and challenges in energy and environmental applications. *AIChE J.* 53: 1636-1643.
8. Ohno, H., R. Susilo, R. Gordienko, J. Ripmeester, and V. K. Walker (2010) Interaction of antifreeze proteins with hydrocarbon hydrates. *Chem. Eur. J.* 16: 10409-10417.
9. Jensen, L., H. Ramløv, K. Thomsen, and N. von Solms (2010) Inhibition of methane hydrate formation by ice-structuring proteins. *Ind. Eng. Chem. Res.* 49: 1486-1492.
10. Zeng, H., I. L. Moudrakovski, J. A. Ripmeester, and V. K. Walker (2006) Effect of antifreeze protein on nucleation, growth and memory of gas hydrates. *AIChE J.* 52: 3304-3309.