

융합 단백질을 이용한 재조합 인간 혈관내피세포 성장인자의 정제공정 개발

성기현 · 김인호[†]

충남대학교 응용화학공학과
34134 대전광역시 유성구 대학로 99
(2017년 1월 16일 접수, 2017년 3월 15일 수정본 접수, 2017년 3월 21일 채택)

Development of Purification Process of Recombinant Human Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) using Fusion Protein

Keehyun Sung and In Ho Kim[†]

Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry Chungnam National University, 99, Daehak-ro,
Yuseong-gu, Daejeon, 34134, Korea

(Received 16 January 2017; Received in revised form 15 March 2017; accepted 21 March 2017)

요 약

혈관 내피세포 성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF)는 혈관 투과율 조절이나 혈관 생성에 관련된 단백질로 임상용으로 쓰일 가능성이 높다. 이 단백질은 고순도와 고효율로 상업적으로 대량생산이 필요하다. 유비퀴틴 융합 단백질로 온화한 조건에서 용해시키기 위해 다양한 조건을 연구하였고, pH와 변성제 변화를 시도하였다. BL21 (DE3) 대장균 숙주세포에서 pET28-a 벡터를 사용하여 재조합 대장균을 제조하여, 20 L의 회분식 배양으로 14 g/L 농도의 세포배양을 하였다. 발효 후 UBPI 효소 분해와 재접힘 단계를 포함한 4단계의 크로마토그래피 공정으로 구성된 정제공정으로 VEGF를 정제하였다. 유비퀴틴 융합단백질로 2 M 요소와 pH10 온화한 조건에서 VEGF의 정제가 가능하였다. 2번의 Ni-affinity 크로마토그래피 컬럼을 이용하여 고효율의 재접힘과 이합체화 공정을 수행하였다. DEAE (Diethyl Amino Ethyl) 음이온 교환 컬럼을 통하여 변형체(multimeric, misfolded)단백질과 endotoxin을 제거 할 수 있었다. 젤 여과 크로마토그래피를 이용하여 dimer와 monomer를 분리 하여 이합체화 VEGF를 제조하였다. 최종 VEGF의 특성분석을 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) 전기영동, RP-HPLC (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography)으로 하여 순도 97% (RP-HPLC기준)를 얻었다.

Abstract – Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent mitogen that stimulates vascular permeability and angiogenesis and has a potential in therapeutic applications. An industrial production method that provides high yield as well as purity is needed. Researches for various factors of mild solubilization with combination of ubiquitin fusion protein to increase solubility were carried out as well as by changing pH and denaturant concentration. Usage of pET28-a bacterial expression vector in BL21 (DE3) host cell was capable of producing approximately 14 g/L VEGF fusion protein in 20L fermentor. A purification process consisting of four chromatography steps including refolding and digestion with UBPI resulted in mild solubilization under the conditions of 2M urea and pH 10.0 due to ubiquitin fusion tag protein that increases in solubility of target protein VEGF. High yield of refolding and dimerization could be obtained between two step Ni-affinity chromatography. Multimeric and misfolded proteins and endotoxin were removed by DEAE anion exchange chromatography. Final monomers were removed from dimers by gel filtration chromatography. Characterization analysis of purified dimeric VEGF was performed using SDS-PAGE and RP-HPLC with a purity of 97%.

Key words: VEGF, Refolding, Purification process

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ihkim@cnu.ac.kr

‡이 논문은 서강대학교 유기풍 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서 론

혈관 내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 간암에 걸린 기니피크 복수의 종양세포로부터 분리된 단백질을 분리하여 이를 혈관투과인자(vascular permeability factor : VPF)라 하였고, 그 후 이와는 개별적으로 혈관내피세포 증식을 초래하는 다른 성장인자가 뇌하수체에서 기인한 folliculostriate cell에서 분리되어 이를 혈관내피성장인자라고 하였다[1]. 그러나 후에 이 두 단백질의 아미노산 배열을 조사한 결과 동일한 구조를 가졌음이 밝혀졌으며, 혈관내피세포의 증식과 혈관투과에 관여한다는 사실이 알려졌다[2].

VEGF는 성체에서의 신생혈관생성(angiogenesis)뿐만 아니라, 배아발생에서의 혈관발달(vasculogenesis)을 조절하는 강력하고 특이적인 세포분열 자극인자이며 다른 platelet-derived growth factor receptors (PDGFRs), epidermal growth-factor receptors (EGFRs)과 마찬가지로 수용체 이합체화, 타이로신 인산화효소의 활성화, 신호변환기의 도킹사이트 형성 등의 기전을 통해 조절되는데, 이를 통해 세포이동, 생존, 증식 등의 유발을 형성할 수 있는 신호를 전달하거나 혈관투과성을 조절하는 기능도 가진다[3-5]. 또한, VEGF는 종양 혈관생성에 대한 강력한 세포분열 자극인자로서, 암세포의 성장은 혈관생성을 유도하는 암세포의 능력에 비례함으로서 VEGF는 유방암, 뇌종양, 난소암 등 알려진 거의 모든 종류의 암세포에서 발현되는 것으로 보고 임상적으로 가까운 미래에 인간 혈액에서 VEGF검출은 암 검출 및 치료와 진단에 사용될 가능성이 크다[6].

VEGF는 이합체(dimer) 당단백질로써 포유동물의 경우 VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, 그리고 태반성장인자(placental growth factor)로 확인되어 있고, 이 중 인간 VEGF-A는 혈관신생에 가장 우월하게 관여하고 이들은 같은 위치에 8개의 cystein 아미노산 잔기를 보유하고 그 중 2개는 분자 상호 간 교차 연결 되어 이황화 결합하여 dimer단백질 형성에 관여한다. 짧은 사슬의 VEGF-121, 145, 165는 혈액으로 분출되는 용해성 isoform이고, 긴 사슬의 VEGF-189, 206은 세포표면 부위에서 VEGF C-말단에 위치한 염기성 아미노산과 결합된 글리칸이 세포바깥 지지체에 흡착되어 존재하며, 이 중 VEGF-165가 가장 많이 발현되는 형태로 중추신경계 종양이나 세포에 잘 나타난다고 한다[7,8]. VEGF-165는 165개 아미노산의 monomer 2개가 이황화 결합하는 형태로 이것이 활성형이다. VEGF-165는 약 45 kDa의 분자량을 가지고 있고, 이론적 pI 값은 7.6이다[9,10].

VEGF는 혈관 관련 세포실험이나 임상관련 실험에 연구목적으로 사용되어 왔다. 그래서 VEGF165를 응집된 단백질인 봉지체로 회수함에 따른 가용화와 재접힘 과정을 거쳐 순도향상과 생물학적 활성 확인에 연구가 진행되었다. 선행연구에 따르면, 고농도의 chotropic agent (Guanidine-HCl, Urea)와 환원제(2-mercaptoethanol, DTT)를 이용하여 봉지체를 용해하는데, Scorfani는[11] 7 mol/L Guanidine-HCl를 사용하였다. Keyt는[12] 8 mol/L urea를 사용하여서 가용화를 하였다. 또 homodimer 형성을 위한 재접힘 방법으로 투석을 주로 채택하였는데 이합체 수율 향상 및 응집 방지에 대한 대책으로 여러 가지 첨가제 사용이 시도되었다. Pizarro는 [13] VEGF165의 치료용 제제로 대량 생산에 성공하였다. 또한 가용화와 재접힘을 하나의 공정으로 진행하였다. 3 L 반응기 안에서 1 M urea, 10 mM CHES, 100 mM L-arginine, 5 mM EDTA, 15 mM L-cysteine,

2 mM dithiotreitol (DTT), pH 9.8의 조건과 교반속도 314 rpm, 기체공급량 5 mL/min로 상업적 생산을 위한 실험을 하였다. 순도는 RP-HPLC기준 84%, SEC (Size Exclusion Chromatography) - HPLC 기준 99%였다. Shen은[14] 정제공정의 단순화를 시도하여 젤 여과, 이온교환 크로마토그래피를 사용하여 VEGF165를 대장균으로부터 정제하였다. 이온교환 크로마토그래피는 단백질 분리에서 범용으로 사용되는 크로마토그래피 도구이며 본 연구에서 순도를 높이는 데 사용된다[15].

본 연구에서는 fusion tag system을 정제에 도입하여 봉지체의 용해도를 높이고 친화성 크로마토그래피를 사용하기 위해 Histidine tag를 도입하였다. 용합 단백질로 Maltose-binding protein (MBP), glutathione S-transferase (GST), thioredoxin (TRX), NUS A, ubiquitin (UB), small ubiquitin-related modifier (SUMO)이 있는데, 본 연구에 사용된 Ubiquitin은 76개의 아미노산으로 구성된 작은 단백질이다. Ubiquitin 용합단백질의 도입으로 인한 용해도 개선을 시도하였다. 이는 낮은 농도의 denaturants 및 detergents가 포함된 가용화 완충 용액 사용이 가능하다.

2. 실험재료 및 방법

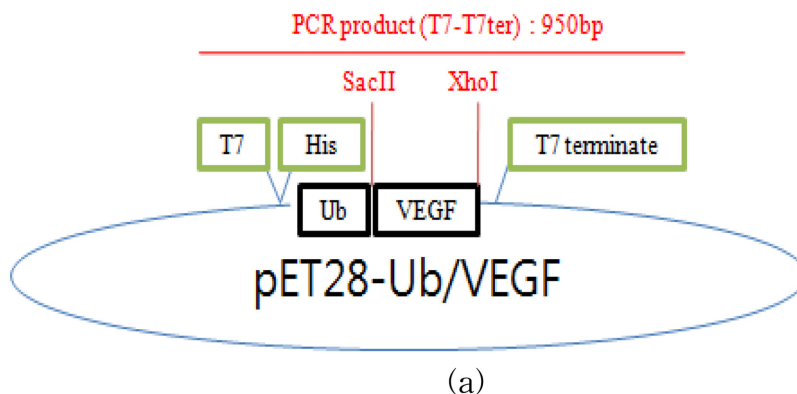
2-1. 재조합 발현벡터의 제조 및 형질전환 확인

전북대학교 사이토카인 뱅크로부터 pGEMT-easy vector에 ubiquitin-VEGF165 gene이 삽입된 균주를 분양 받았고 DNA Extraction Mini Kit (Clontech)를 이용하여 plasmid DNA를 확보하였다. 발현 벡터인 pET-28a vector (Novagen)에 Cloning 하기 위해 삽입하였다(Fig. 1(a)). 예상되는 PCR product 염기서열은 다음과 같다(Fig. 1(b)).

Insert gene (Ub-VEGF165)와 클로닝 Vector (pET28a)를 *SacIII/XhoI* 제한효소(Takara)를 이용하여 각각 37 °C 2시간 반응시켰으며, agarose gel 전기영동을 통해 그 결과를 확인하였다. 확인된 젤을 추출하여 동일한 *SacIII/XhoI* 처리된 조각과 vector를 T4 Ligase Enzyme (Takara)를 이용하여 접합을 수행하였다. 접합된 샘플은 DH5a competent cell을 이용하여 열처리 방법을 통해 형질전환 하였으며, Kan+ 선택배지에서 콜로니를 선택하였다. 선택된 콜로니에서 DNA를 추출하여 T7 Primer를 통하여 서열분석하여 확인하였다. 확인된 pET28a-Ub-VEGF Plasmid의 고발현을 위해 BL21 (DE3)에 형질전환시켰다. 한천배지(Kan+)에서 콜로니를 확인하였고, 독립 콜로니를 10개를 취하여 발현 테스트를 하였다. 각각의 콜로니는 탁도(OD, optical density) 0.8 까지 배양하였으며, IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, LPS, 367-93-1) 1 mM로 5시간 유도하였다. 원심분리 후 SDS-PAGE를 통하여 발현을 확인하였다.

2-2. 회분식 배양 및 발현

1차 종배양을 위해 형질전환된 재조합 대장균 독립 콜로니 한개를 kanamycin (100 ug/ml)이 함유된 2 ml LB 배지(Difco)에 접종하고, 진탕배양기(비전과학, VS-8480SR)에서 37 °C, 6시간, 100 rpm 배양한 후 OD 0.7에서 2차 종배양인 200 ml LB배지(+kanamycin 100 ug/ml)에 1/50 (v/v)로 접종했다. 접종 후 37 °C, 150 rpm, 10시간 동안 진탕배양기로 배양했다. 본 배양을 위하여 30 L 배양기(코바이오택)에 20 L working volume, 2 vvm 통기량, 교반기 속도 180 rpm,



(a)

```

1  TNCTGGAATTCCCTCTGAATATTTGTTTACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGC
                                     I-> Trinscription start
61  AGCAGCCATCATCNTCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCAA
        6 x His                                     I-> Ubiquitin gene
121  ATTTTCGTCAAACCTCTAACAGGGAAGACTGTAACCCTAGAGGTTGAATCTTCCGACACT
181  ATTGACAACGTCAAAAGTAAAATTCAAGATAAAGAAGGTATCCCTCCGGATCAGCAGAGA
241  TTGATTTTGGCTGGTAAGCAACTAGAAGATGGTAGAACCTTGTCTGACTACAACATCCAA
301  AAGGAATCTACTCTTCACTTGGTGTGAGACTCCGCGGTGGTGCACCCATGGCAGAAGGA
        Ubiquitin gene ->I<- VEGF165(1110~)
361  GGAGGGCAGAATCATCACGAAGTGGTGAAGTTCATGGATGTCTATCAGCGCAGCTACTGC
421  CATCCAATCGAGACCCTGGTGGACATCTTCCAGGAGTACCCTGATGAGATCGAGTACATC
481  TTCAAGCCATCCTGTGTGCCCTGATGCGATGCGGGGGCTGCTGCAATGACGAGGGCCTG
541  GAGTGTGTGCCCACTGAGGAGTCCAACATCACCATGCAGATTATGCGGATCAAACCTCAC
601  CAAGGCCAGCACATAGGAGAGATGAGCTTCTACAGCACAAATGTGAATGCAGACCA
661  AAGAAAGATAGACAAGACAAGAAAATCCCTGTGGGCCTTGCTCAGAGCGGAGAAAGCAT
721  TTGTTTGTACAAGATCCGACAGCTGTAATGTTCTGCdAAAAAACACAGACTCGCGTTGCAAG
781  GCGAGGCAGCTTGAGTTAAACGAACGTACTTGCAGATGTGACAAGCCGAGGCGGTGACTC
        VEGF165.(~1607.)->I
841  GAGCACCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAANCTGA
    
```

(b)

Fig. 1. Schematic diagram of the recombinant expression vector pET-28a with Ub-VEGF₁₆₅ gene and sequence of amplified PCR products.

Table 1. Media composition used in 20L-scale fermentation

Component	Concentration (g/L)
D-sorbital	15
Yeast extract	10
Casein peptone	5
MgSO ₄	0.2
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.75
KH ₂ PO ₄	5.5
Citric acid	0.2

압력 0.3 bar pH 7.0으로 맞추어 놓았다. 본배양의 배지 조성은 Table 1과 같다.

2차 종배양 전량을 배양기 안에 무균적으로 접종했다. 접종 후 UV spectrophotometer (동일시마즈, UV-1700)을 이용하여 OD 3.0~4.0까지 성장시켰다. 목적하는 OD값에 도달하면 최종 1 mM가 되도록 유도제로써 IPTG를 이용하여 유도시켰다. 유도후 시간대 별로 발현양을 사전 확인한 결과 4시간째부터 동일한 발현양을 보여 최대 5시간까지 유도조건을 유지하여 배양했다.

2-3. VEGF165 분리정제

2-3-1. 세포 파쇄와 봉지체(Inclusion body, IB)회수

배양액에서 연속원심분리기(한일사이언스, tubular separator J-1050)로 세포를 회수했다. 회수된 세포는 298 g 이었고, 세포 무게가 15% (w/v)농도가 되도록 완충용액(50 mM tris (J.T. Baker, 4109-02), 5 mM EDTA (덕산), 100 mM NaCl (대정화금), pH 8.5)를 이용하여 재부유시켰다. 세포가 완전히 풀어질 때까지 현탁시켜 homogenizer (HS-2008)를 이용하여 압력을 900~950 bar까지 조절하면서 세포를 파쇄했다. 이것을 총 3회 반복하고, 종료 후 현미경을 확인하여 파쇄 여부를 확인했다. 파쇄액의 부피를 정확히 측정하고, 완충용액을 이용하여 2배로 희석한 후 최종농도가 1%가 되도록 triton X-100 (덕산)을 첨가했다. 첨가 후 냉장 상태를 유지하면서 30 min 동안 교반을 실시했다. 종료 후 원심분리기(한일사이언스, supra22k)를 이용하여 8,000 rpm, 30 min, 4 °C 조건으로 분리 후 상등액과 침전 물을 분리 시켰다. 봉지체 농도가 최종 10% (w/v)가 되도록 세척완충용액(50 mM tris, pH 8.0)을 이용하여 재부유시킨 후 원심분리를 하여 상등액을 제거했다. 이 과정을 총 3회 실시하여 잔여 triton X-100을 씻어낸 후 최종 봉지체 80 g을 얻었다.

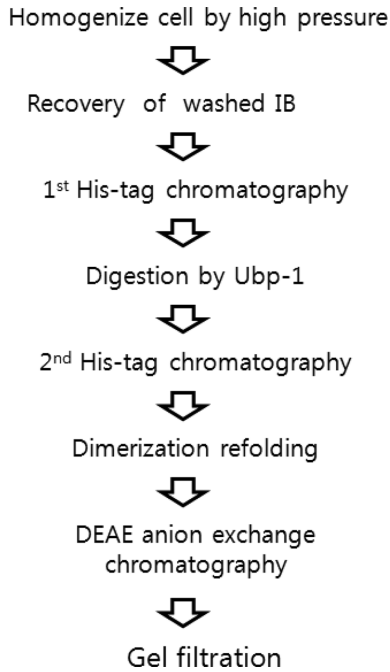


Fig. 2. Schematic of rhVEGF165 purification process for scale-up production.

2-3-2. His-tag 친화성(affinity) 크로마토그래피에서 VEGF165 정제 전체 분리공정의 개요는 Fig. 2에 주어졌다. 세척된 봉지체를 최종농도가 2% (w/v)가 되도록 가용화 완충용액(2 M urea, 20 mM tris, 5 mM 2-mercaptoethanol, 500 mM NaCl, pH10.0)를 이용하여 완전 부유시킨 후 항온수조에 37 °C로 30분 동안 방치 시켰다. 온도를 25 °C 이하로 내린 후 pH를 8.8로 천천히 조정하고 30분 동안 교반 시킨다. 원심분리기를 이용하여 14000 rpm, 20 min, 4 °C 조건으로 원심분리하고 가용화 된 상등액만 취하였다. 그리고 0.45 µm capsule filter (Satorious Korea)를 이용하여 여과하였다.

1차 his-tag 친화성 크로마토그래피를 위해서 BPG100/500 (Amersham Phamasia Biotech)컬럼에 Ni Sephaose 6 fast flow (GE Healthcare)resin 0.5 L을 충전 하였다. 유속 100 ml/min으로 정제수를 흘려서 보존액 20% ethanol을 제거하고, 평형 완충용액(2 M urea, 20 mM tris, 5 mM 2-mercaptoethanol, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.8)를 10 CV 부피로 흘려서 UV 기준선을 영으로 안정 시켰다. 안정화 후 VEGF165 샘플을 투입하면서 비결합된 flow through를 받아 놓았다. 다시 평형 완충용액으로 UV가 기준선으로 떨어질 때까지 세척하였다. Ni 젤에 결합된 VEGF165를 용리 완충용액(2 M urea, 20 mM tris, 5 mM mercaptoethanol, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.8)을 흘려 탈착시켰다.

그후 UF/DF 한외여과장치(pellicon, PLCCC-C, 5k)를 이용하여 효소 분해용 용액(0.5 M urea, 20 mM tris, 1 mM mercaptoethanol, 250 mM NaCl, pH 8.5)를 이용하여 2번씩 10회 완충용액을 교환하여 샘플 내 urea 농도를 낮추고, imidazole을 제거하였다. 이어서 효소 반응을 위해 Ubp1 (ubiquitin specific protease-1, 차바이오펜디오스텍)을 10% (v/v)되도록 처리 후 항온 수조에서 37 °C, 2시간동안 반응시켰다. 반응종료 후 분리된 His-ubiquitin fusion tag와 1차 친화성 컬럼 정제에서 결합되었던 불순물을 제거하기 위하여 2차 친화성 컬럼 정제를 진행하였다. 이미 충전된 친화성 컬럼을 세척용

액(1 M imidazole, 0.5 M NaCl, 1 M NaOH)으로 2 CV (column volume)흘린 후 정제수를 충분히 흘려서 전도도를 낮추었다. 세척 후 100 mM NiSO₄ 용액으로 2 CV 흘린 후 30 min 동안 재순환하며 컬럼을 재생시켰다. 2차 친화성 컬럼의 평형완충용액(0.5 M urea, 20 mM tris, 1 mM mercaptoethanol, 500 mM NaCl, 40 mM imidazole, pH 8.5)을 유속 100 ml/min로 흘려 안정화시킨 후, 바로 샘플을 평형완충용액 조건에 맞추어 재조성하여 투입하고, 친화성 컬럼에 his-ub fusion tag와 기타 불순물은 결합시키고, VEGF가 함유된 flowthrough (FT) 분획을 수집했다. 친화성 컬럼에 결합된 fusion tag과 불순물들은 용리완충용액(0.5 M urea, 20 mM tris, 1 mM mercaptoethanol, 500 mM NaCl, 0.5 M imidazole, pH 8.5)로 제거하고 FT에서 SDS-PAGE 전기영동을 통해서 VEGF165를 확인하였다.

2-3-3. 이온 교환 및 젤 여과 크로마토그래피

이합체화 공정을 위해 2nd His-tag 친화성 컬럼의 FT/세척 분획을 20 mM tris, pH 9.0로 희석하여 부피를 조정했다. 이합체화를 위하여 2 단계로 나누어 투석을 진행했다. 1번째 투석은 20 mM tris, 200 mM NaCl, 0.2 M L-arginine, pH 9.0의 완충용액으로 2번씩 10회 완충용액 교환을 했다. 2번째는 20 mM sodium phosphate, 20 mM NaCl pH 7.6의 완충용액으로 2번씩 10회 완충용액 교환을 했다.

완충용액 교환 후 DEAE sepharose fast flow (GE Healthcare) 50 ml을 XK50 컬럼(Amersham phamasia Biotech)에 충전하고, FPLC (GE Healthcare, Aktaprime plus)에 연결하였다. 유속 20 ml/min로 평형완충용액(20 mM sodium phosphate, 20 mM NaCl, pH 7.6)로 안정화를 시키고, 샘플을 투입하였다. FT를 수집하고, 평형완충용액으로 기준선으로 떨어질 때까지 세척하여 이를 FT와 같이 수집했다. 용리는 NaCl 농도를 50/100/150/200 mM 계단식으로 농도를 높여가며 수행하였다.

FT, 세척 샘플을 모아 젤 여과 크로마토그래피 충전제 부피의 1%가 되도록 농축을 실시하였다. 젤 여과 크로마토그래피를 하기 위한 Sephacryl S-200를 XK16/100 컬럼에 충전하고, FPLC에 연결한 후 평형완충용액(10 mM sodium phosphate, 137 mM NaCl, pH 7.6)를 안정화 될 때까지 충분히 흘려 주었다. 농축 샘플을 투입하고, 유속 1 ml/min으로 설정하여 평형완충용액을 흘려 주었다. UV 신호가 검출되기 시작하면 fraction collector로 10 ml씩 수집하였다. 젤 여과 크로마토그래피의 용리 분획 중 전기영동 순도가 높은 분획을 모아서 Lowry법으로 단백질 농도를 측정하였고, 최종농도가 0.5 mg/ml이 되도록 농축을 실시하였다. 크로마토그래피의 조건은 Table 2에 정리하였다.

2-4. 특성분석

순도와 분자량 비교 및 순도 확인을 위해 환원, 비환원 조건에서의 전기영동을 진행하였다. Laemmli SDS-PAGE 전기영동 방법에 따라 15% 젤 농도의 SDS-PAGE를 조제하여 200 V, 60 mA, 55분동안 전기영동 하였다. 이후 Coomassie blue 염색법으로 젤 염색하였다.

단백질 농도 분석은 Lowry법으로 수행하였다. 0.4 mg/ml BSA 표준품을 단백질 샘플에 사용된 동일한 완충용액으로 희석하여 각각 20/40/60/80 µg/ml로 만들었다. 표준품, 단백질 시료, 완충용액을 동일하게 750 µL씩 에펜도르프 튜브에 취했다. 각각의 튜브에 알칼리성 액을 625 µL를 넣고, 잘 섞은 후, 항온수조에서 30 °C, 10분간 방치했다. 반응이 끝나면 각각의 튜브에 페놀시약(folin-ciocalteu

Table 2. Chromatography process details

Parameter	1 st Ni sepharose FF	2 nd Ni sepharose FF	DEAE sepharose FF	SephaARYL S-200
Resin volume	0.5 L	0.5 L	200 ml	4 L
Column	BPG 100/500	BPG 100/500	XK 50	XK 16/100
Volume flow rate (ml/min)	150	150	30	1
Operating mode	Bind-elute	Flow through	Flow through	Flow through
EQ/washing	2 M urea, 20 mM tris, 5 mM 2-mercaptoethanol, 500 mM NaCl, pH8.8	0.5 M urea, 20 mM tris, 1 mM mercaptoethanol, 500 mM NaCl, 40 mM imidazole pH8.5	20 mM sodium phosphate, 20 mM NaCl, pH7.6	10 mM sodium phosphate, 137 mM NaCl, pH7.6
Elution	EQ-200 mM imidazole	EQ-500 mM imidazole	EQ-1 M NaCl	EQ

reagent)을 125 µL씩 넣고 잘 섞은 후, 항온수조에서 30 °C, 30분간 방치했다. 반응이 끝나면 UV-Vis Spectrophotometer로 750 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였고 단백질 샘플의 농도를 결정하였다.

VEGF165의 역상 HPLC 상에서 순도 확인을 위한 실험을 진행하였다. 이동상 A (증류수 1 L와 TFA 1 mL), 이동상 B (Acetonitrile 1 L와 TFA 1 mL.)을 제조하였다. Shimadzu HPLC System (.System controller CBM-20A, Solvent Delivery System LC-20AD .UV-VIS Detector SPD-20A, 역상컬럼 Vydac C18)으로 준비된 이동상을 유속 1 ml/min, 파장 280 nm, Stop Time 70분(데이터를 분석하는 시간), LC Time 70분(기기의 가동시간), 기울기 조건(1. Sample Injection 2. 20% 이동상 B~0.01분 3. 1분당 1% 씩 이동상 B 증가(0.01 to 40 min) 4. 5분 동안 60% 이동상 B 유지(40 to 45min), 5. 1분당 12% 이동상 B 감소(45 to 50 min) 6. 20분 동안 0% 이동상 B 유지(50 to 70 min))을 프로그램하였고, 주입량은 20 µl로 설정하였다. 표준품의 농도가 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml 되도록 10 mM 인산염 saline 완충액(pH 7.6)으로 희석했다.

3. 실험결과 및 토의

3-1. E.coli에서 재조합 human VEGF165 발현 위치확인

BL21 (DE3)에 cloning 된 VEGF165 발현을 배양 및 유도를 하였고, Novagen pET system manual의 verification protocol에 따라 진행하였다. pET28a (+)는 5,369bp, T7 promotor, Kanamycin 저항성을 가지고 있다. 세포 수확 후 대장균 세포의 발현 정도를 Fig. 3 같이 확인하였다.

유도 전-후의 세포 단백질을 전기영동한 결과 발현 확인이 가능했다. 단백질 형태는 6×Histidine (0.84 kDa)-Ubiquitin (8.5 kDa)-VEGF165(약 21.5 kDa)으로 예상 분자량은 약 32 kDa을 띄고 있다. 회수 된 세포에서 발현 위치를 확인한 결과 lane 4번의 periplasm 영역에서는 거의 존재하지 않았고, lane 5번과 6번에서 발현됨을 확인했다. 그 중 목적 단백질이 불용성의 봉지체로 형성됨을 확인하였다. Ubiquitin 융합 단백질의 영향으로 용해성 단백질로 발현될 것이라는 예상과는 달랐다. 봉지체가 protease에 대한 저항성이 있어 단백질이 유지되는 장점을 가질 수 있고, 특히 정제공정에서 온화한 조건으로 가용화 됨을 발견하였다. 따라서 저농도의 urea를 사용할 수 있었다.

3-2. 재조합 대장균의 20 L 배양 및 발현

본배양을 하기 전 2단계의 중배양을 진행하였고, 그 조건 및 결과는 1차 중배양은 20 ml 배양액에 37 °C, 5시간 30분 배양 결과

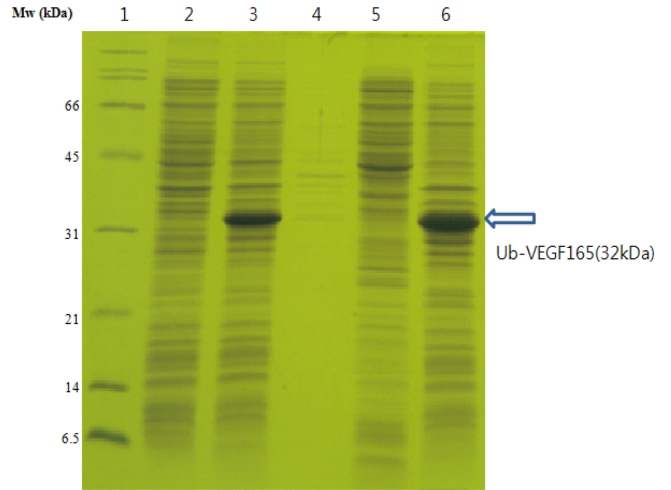


Fig. 3. Verification of localization of recombinant human VEGF165 expressed in E.coli through SDS-PAGE: lane 1, protein size marker; lane 2, total cell protein before induction; lane 3, total cell protein after induction; lane 4, periplasmic space; lane 5, soluble cytoplasm fraction; lane 6, insoluble cytoplasm fraction.

OD 0.8이었고, 2차 중배양의 배양 부피는 본배양 부피의 1%인 200 ml에 37 °C, 6시간 10분동안 배양하여 최종 OD는 1.2를 얻었다. 본배양에 접종 후 유도하기 전까지 OD는 3.4였고, 유도를 위해 최종 농도 1 mM이 되도록 IPTG 첨가 후 5시간 배양하여 최종 OD는 12.7이었다. 회수된 세포양은 280 g (14 g/L)이었다. Fig. 4 전기영동 사진의 lane 1은 유도 들어가기 직전 OD 3.4 상태의 샘플이고, lane 2는 유도 후 5시간 추가 배양한 OD 12.7의 샘플이다. 사전에 cloning 후 발현 확인 때와 동일한 위치의 밴드를 확인하였다.

3-3. 정제 공정 별 SDS-PAGE 순도 확인

3-3-1. 봉지체 가용화

Fig. 5에서 세포 파쇄액(상등액+침전물, lane 2~4) 전기영동 밴드를 lane 5번과 lane 6번과 비교하면 봉지체 세척 후 단백질이 상등액으로 거의 유출되지 않았다. lane 2~4번과 비교해 보았을 때 lane 7번의 최종 3차 봉지체 세척 후 침전물에서 순도가 개선된 봉지체를 확인할 수 있었다. Triton X-100이 cell debris에 부착된 불순 단백질을 잘 제거하기 위해 150 mM NaCl을 첨가하여 봉지체의 순도를 증진시켰다.

3-3-2. 1차 his-tag 친화성 크로마토그래피

단백질의 histidine 잔기들이 고정화된 금속들에 결합하는 현상을

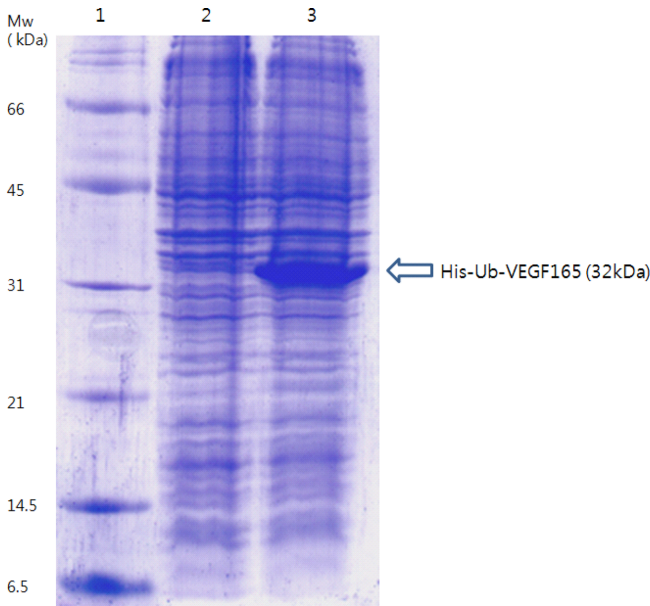


Fig. 4. 15% SDS-PAGE analysis of expressed his-ub-VEGF₁₆₅ in 20 L scale - fermentation.: lane 2, cell growth step before induction; lane 3, expression of VEGF165 after induction.

이용하여 his-tag 친화성 크로마토그래피를 수행하였다. 상기 실험을 위해서 예비실험으로 결합 여부 및 용리 조건을 확인하였다. 먼저 젤을 XK16/20 컬럼에 충전하여 테스트하였다. Urea나 2-mercaptoethanol, EDTA는 결합능을 떨어뜨리기 때문에 기준 부피(12 mg His-tag protein/ml 젤)보다 1.5배 더 충전하였고, 용리는 imidazole 농도 기준으로 50/100/150/200/250 mM 계단식 용리를 하였다. 예비 실험 결과(Fig. 6) his-tag 단백질이 Ni 젤에 대한 친화성을 가지고 손실 없이 잘 결합하였다. 하지만 100 mM와 200 mM 사이에서 나왔다는 것은 urea와 mercaptoethanol의 간섭 효과로 융합단백질이 약하게 결합됨을 의미한다.

이 데이터를 가지고 실제 scale-up공정에서는 용리 조건을 250 mM imidazole 농도로 정하여 실험을 하였다(Fig. 7) Scale up

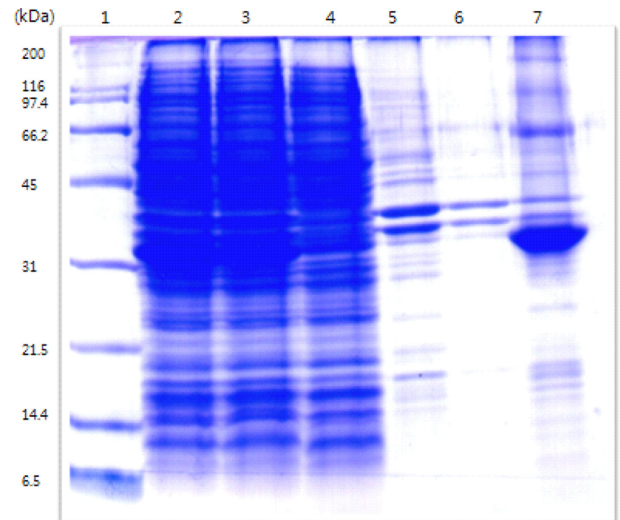


Fig. 5. 15% SDS-PAGE analysis of washed inclusion body after cell disruption : lane 1, protein size marker; lane 2, total cell protein before disruption(cell conc. 15%); lane 3, total cell protein after disruption; lane 4, total cell protein treated by triton X-100; lane 5, soluble fraction after 1st washing step; lane 6, soluble fraction after 2nd washing step; lane 7, insoluble fraction after 3th washing step.

공정 상에서 샘플 투입시에 FT으로 약간의 손실이 발생하였고, 용리 시에 분리 되지 않는 불순물이 있었다.

3-3-3. Ubp1에 의한 ubiquitin-fusion tag 절단

기존 Ubp-1관련 논문이나 실제 활성조건을 측정한 데이터를 기반으로 실험해본 결과 중요 요인은 NaCl 농도, pH, 온도, 시간이었다. 하지만 이합체화 전까지 환원되고 비활성 상태의 샘플은 효소반응이 되지 않았다. 이는 ubp-1이 샘플 안에서 urea와 mercaptoethanol에 의해 효소 활성이 저하되는 것으로 사료되었다. 그래서 urea농도를 희석하여 실험한 결과 0.5 M urea 조건에서 샘플의 침전도 거의 없고, 반응 수율이 높았다. 그래서 UF/DF system을 이용하여 최적 조

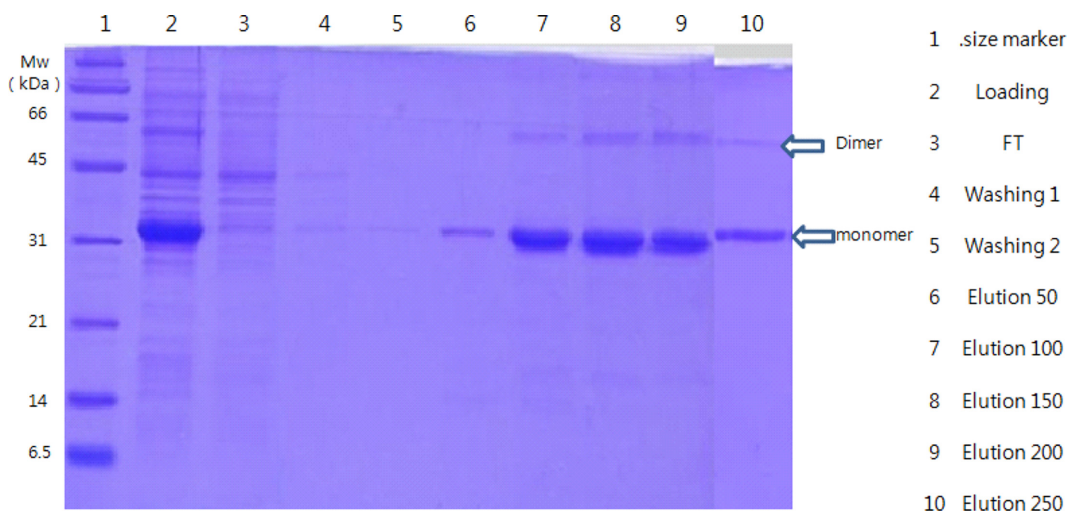


Fig. 6. Preliminary 1st Ni chromatography test in XK 20 column by using stepwise elution: lane 1, protein size marker, lane 2, loading, lane 3, flow through, lane 4, 1st washing fraction (2 CV); lane 5, 2nd washing (2 CV); lane 6, elution 50 mM (3 CV); lane 7, elution 100 mM (3 CV); lane 8, elution 150 mM (3 CV); lane 9, elution 200 mM (3 CV); lane 10, elution 250 mM (3 CV).

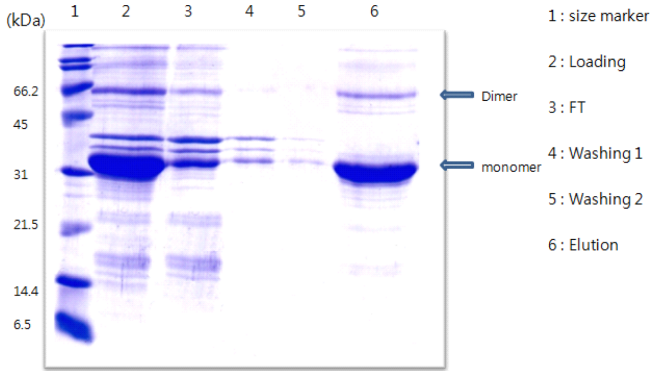


Fig. 7. 1st Ni chromatography fractions in scale-up stage: lane 1, protein size marker; lane 2, loading; lane 3, flow through; lane 4, 1st washing (2 CV); lane 5, 2nd washing (2 CV); lane 6, step elution 250 mM (5 CV).

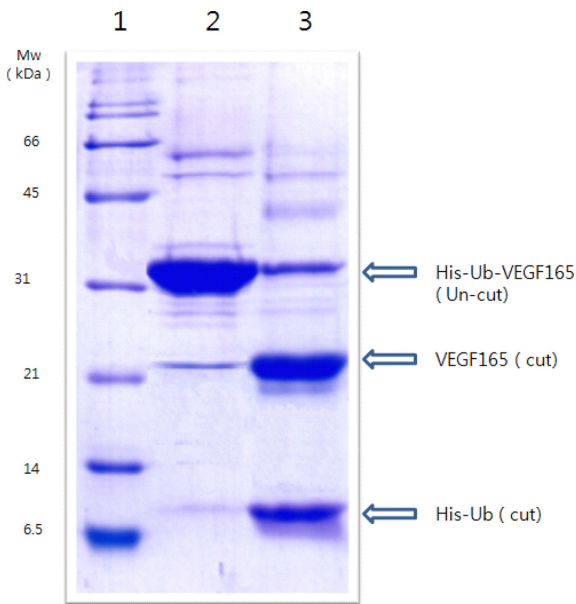


Fig. 8. Identification of enzyme digestion reaction with 10% Ubp1: lane 1, protein size marker; lane 2, dialysis of Ni column pooling for enzyme reaction; lane 3, truncated VEGF165 after enzyme reaction at 37 °C for 2 hours.

건인 0.5 M urea, 20 mM tris, 1 mM mercaptoethanol, 250 mM NaCl, pH 8.5로 완충용액 교환 후 ubp1 10% (v/v) 처리하였다. 실험결과 Fig. 8를 보면 약 70%의 반응 수율을 보였다. 완충용액 교환 과정에서 urea와 2-mercaptoethanol의 농도가 낮아지면서 VEGF에서 유도된 이합체 및 폴리머 등의 불순물들이 보였고, 효소반응 후에 그 불순물 밴드에서 잘린 밴드를 관찰할 수 있었다.

3-3-4. 2차 his-tag 친화성 크로마토그래피를 이용한 fusion tag 제거
이 공정에서 반응되어 잘려진 VEGF165만 회수하고, 1st his-tag 정제 공정에서 비특이적으로 결합되었던 불순 단백질과 잘려진 his-ubiquitin fusion tag를 Fig. 9에서 보듯이 분리하였다. loading에서 보이는 밴드는 uncut-VEGF monomer, uncut-VEGF dimer, cut-VEGF monomer, cut-VEGF dimer 그리고 his-ub tag 밴드가 있는데, 이 중 VEGF monomer와 목적하는 VEGF dimer가 FT, washing fraction으로 빠져나왔고, 용리 분획에서 histidine-ubiquitin fusion tag를 확인하였다.

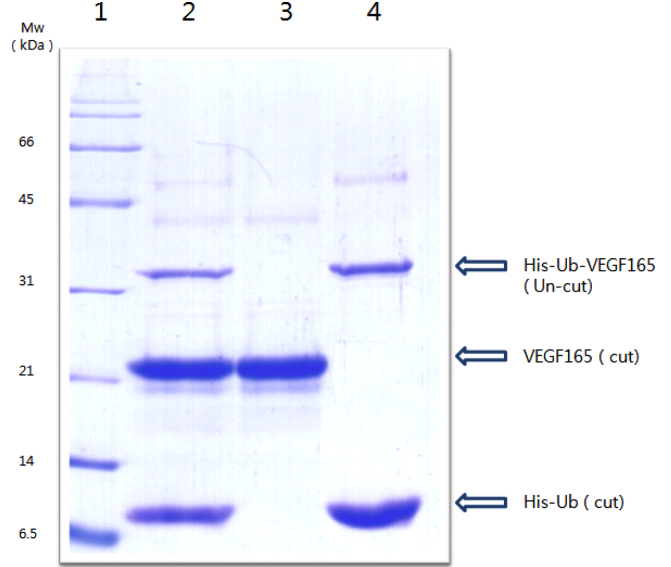


Fig. 9. 2nd Ni chromatography fraction for purified monomer VEGF165: lane 1, protein size marker; lane 2, loading sample; lane 3, flow through fraction; lane 4, elution fraction.

3-3-5. DEAE 음이온 교환 크로마토그래피

이 단계에서 이합체화(dimerization)와 재접힘(refolding)을 수행하고 이온교환크로마토그래피 주입 샘플을 만들었다. 변성제와 환원제가 제거되면서 이합체외에도 응집체 및 oligomer 형태가 되는데 이를 막기 위해서 2단계로 나누어 막을 이용해 완충용액 교환을 진행하였다. 1번째는 20 mM tris, 0.2 M L-arginine, 0.2 M NaCl, pH 8.5의 조건으로 수행하여 샘플의 urea와 2-mercaptoethanol을 완전히 제거하며 응집체를 방지하였고, 2번째는 20 mM sodium phosphate, 20 mM NaCl, pH 7.6으로 완충용액을 교환하며 이합체화의 수율을 높였다.

이합체화 후 농축과정에서 보이지 않았던 oligomer protein들의 제거가 필요한데, DEAE 음이온 교환 크로마토그래피가 그 oligomer들의 제거에 탁월한 효과를 보여 주었다. Fig. 10 결과 중 lane2와 lane5는 각각 농축 후의 DEAE 음이온 교환 크로마토그래피 투입샘플의 환원형 비환원형이다. 이전에 수행한 이합체화 공정 샘플과 달리 많은 변형체(VEGF monomer or aggregate species, misfolds)가 확연히 나타났다. 이 정제공정을 통해 monomer를 제외한 나머지 변형체는 제거가 가능했다. 이는 pH 7.6에서 제대로 접혀진 VEGF는 표면의 총 전하값이 0에 가까워지면서 DEAE 젤과 상호작용을 하지 못하여 FT로 빠져나왔다. 변형체들은 pH 7.6 근처 구간에서 상대적으로 더 강한 음성(-) 전하를 갖게 됨으로써 이온 교환 젤에 결합되어 제거가 가능하였다.

3-3-6. 젤 여과 크로마토그래피

앞선 DEAE 크로마토그래피에서 분리하지 못한 monomer를 제거하기 위한 공정으로 젤 여과 크로마토그래피를 채택하였다(Fig. 11). 젤 여과 크로마토그래피의 경우 투입샘플의 부피가 젤 부피의 5% 이하가 되어야 목적하는 해상도를 얻을 수 있기 때문에 DEAE 음이온 교환 크로마토그래피 FT와 세척 분획을 모아서 젤 부피의 1% 인 40 ml까지 농축하였다. 농축과정에서 oligomer가 생기지만 분자 크기의 차이가 많이 나는 oligomer의 경우 젤 부피(4 L)의 약 50%

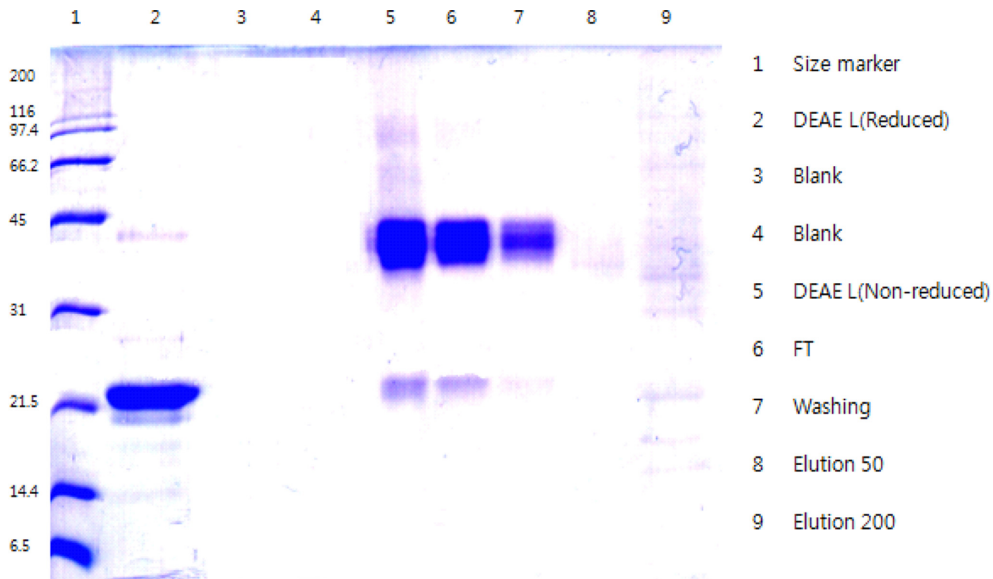


Fig. 10. DEAE ion exchange chromatography for removing oligomer and endotoxin : lane 1, protein size marker; lane 2, concentrated DEAE loading sample (reduced form); lane 3~4, blank; lane 5, concentrated DEAE loading sample (non-reduced form); lane 6, flow through fraction; lane 7, washing fraction (2 CV); lane 8, 50 mM elution fraction (3 CV); lane 9, 1M elution fraction (3 CV).

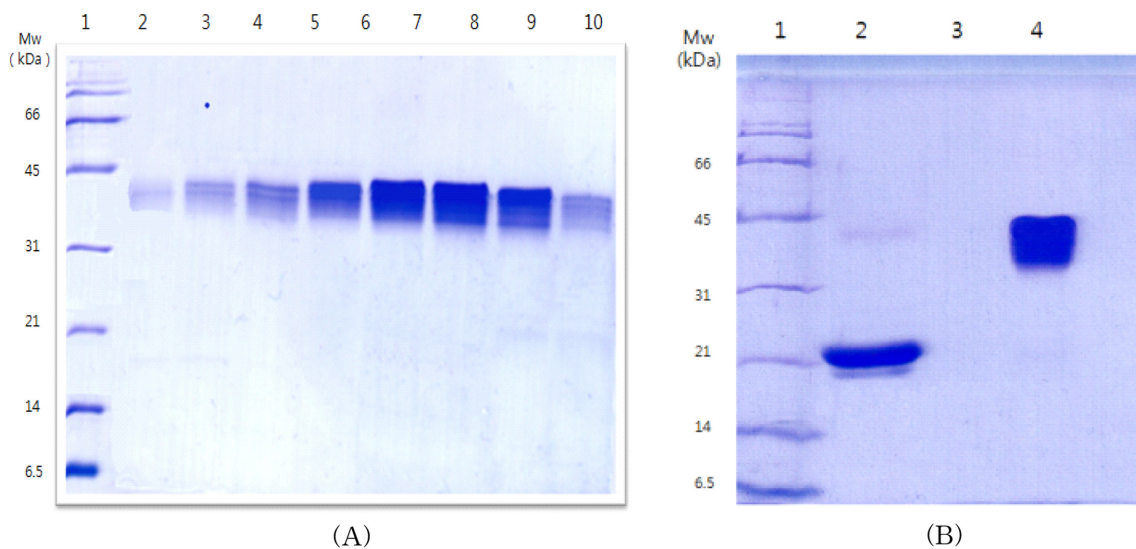


Fig. 11. Gel filtration analysis through SDS-PAGE with reduced and non-reduced form : (A) lane 1, protein size marker; lanes 2~10, elution fractions. (B) lane 1, protein size marker; lane 2, reduced form of concentrated gel filtration pool; lane 3, blank; lane 4, non-reduced form of concentrated gel filtration pool.

되는 양(2 L)의 용액이 흐르면 먼저 나오기 시작하여 용이하게 분리할 수 있었다. 분자량 차이가 작은 dimer와 monomer의 경우 Sephacryl s-200으로 완전 분리하지 못하였다. UV recorder상에서는 한 개의 peak로 확인되었지만 Fig. 11의 SDS-PAGE로 확인 결과 dimer VEGF가 먼저 용출되었고, lane 9에서부터 희미하게 monomer 밴드가 보이기 시작하여 dimer 밴드와 겹쳐 나왔다. 그러나 이합체화 수율이 높아서 monomer 비율은 낮았다. 회수 된 fraction을 모두 모아 단백질 농도를 분석한 결과 0.3 mg/ml이 나왔다. TFF lab scale system (Millipore)을 이용하여 최종 0.5 mg/ml 농도로 농축하고, SDS-PAGE를 통해서 젤 여과 크로마토그래피 정제 후 샘플 순도를 조사하였다.

3-4. 특성분석

VEGF165의 순도분석 목적으로 SDS-PAGE 전기영동을 실시하였다(Fig. 12). 15%의 젤 농도 상에서 목적하는 단백질을 1~32배까지 순차적 희석을 하여 최초 원액의 존재하는 총 불순물 밴드의 합이 마지막 32배에 존재하는 VEGF165 목적 단백질과 대비하여 간접적으로 순도확인을 해 보았다. 이때 최초 원액의 VEGF165 band를 100%라 보았을 때 32배 dilution band는 약 3.13%정도 된다고 볼 수 있다. 이때 원액 VEGF165에 존재하는 불순물 band가 32배에 해당하는 VEGF165와 같은 band size라면 원액의 불순물 band는 3.13%가 존재한다고 판단하여 순도는 96.87%가 된다. Fig. 12의 결과에서 보듯이 (a)의 경우 환원 처리 된 샘플인데, 정확하게 dimer 위치에 나타난 밴드는 환원 sample buffer 조성 중 2-mercaptoethanol

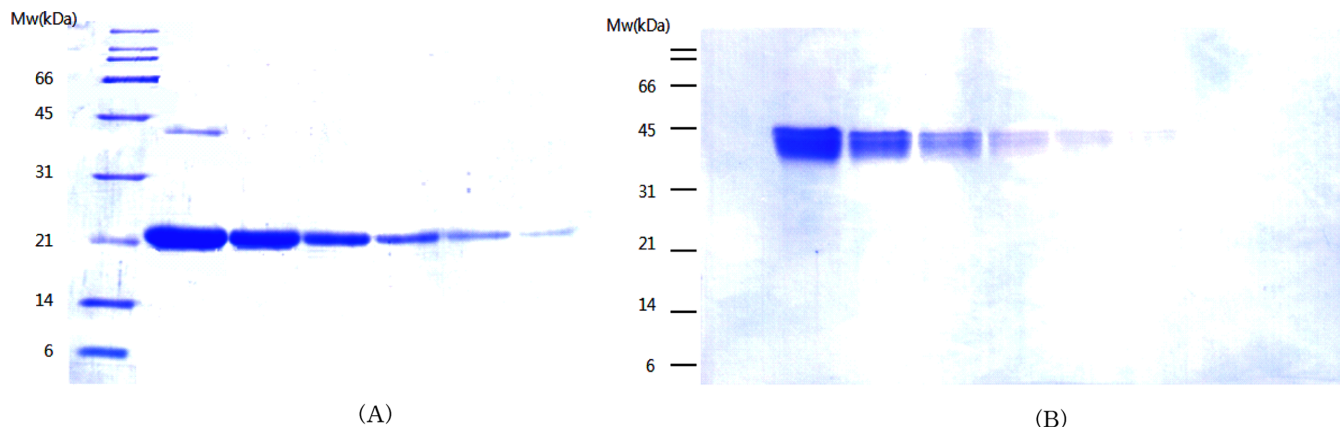


Fig. 12. Purity analysis of finally purified VEGF165 by 2-fold serial dilution. (A) reduced-form. lane 1, size marker; lane 2, 1-fold; lane 3, 2-fold dilution; lane 4, 4-fold; lane 5, 8-fold; lane 6, 16-fold; lane 7, 32-fold. (B) non-reduced form. lane 1, blank; lane 2, 1-fold; lane 3, 2-fold dilution; lane 4, 4-fold; lane 5, 8-fold; lane 6, 16-fold; lane 7, 32-fold.

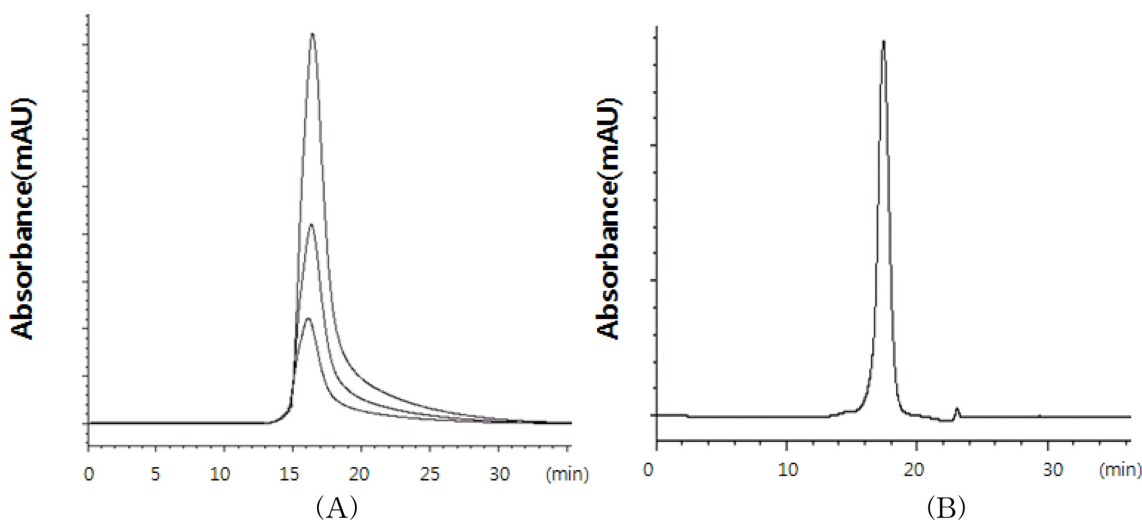


Fig. 13. RP-HPLC chromatograms of final sample in comparison with NIBSC standard. (A) internal standard injection with concentrations of 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, and 0.125 mg/ml. (B) finally purified VEGF165 sample.

의 성분이 약하여 공유적으로 결합된 이황화 결합을 완전 끊어내지 못한 것으로 판단된다. 그 이유는 그것이 만약 VEGF165 이외의 불순물이라고 간주 시에 (b)의 결과인 비환원 form에서도 그 분자량 이외의 위치에서 밴드를 보였을 것인데, dimer위치의 단일밴드만 확인 할 수 있기 때문이다.

최종 정제 된 VEGF165의 순도를 측정하기 위한 RP-HPLC를 진행하였다. Fig. 13에서 VEGF165의 체류시간을 확인하기 위해 표준품 샘플을 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml의 농도로 만들어 각각 주입하여, 표준품의 체류 시간을 조사하였다. 약 18분 대에서 3개의 표준품이 동일하게 나오는 것을 확인하였다. 최종 정제된 VEGF165 샘플을 주입한 결과 표준품과 동일한 시간대에 나옴을 확인하였지만 약 23분 대에 약한 피크가 보였다. 이것은 SDS-PAGE gel 분석 결과를 참고하면 monomer form으로 예측하였다. 최종 순도는 >97%임을 확인하였다.

4. 결 론

pET28a 발현 벡터를 이용한 재조합 대장균을 제조하여 20L-scale의 회분식 배양에 최적화 된 배양배지를 이용하여 wet cell weight

14 g/L의 세포배양을 하였고, 6×histidine-ubiquitine-VEGF165 (MW: 32 kDa)형태의 융합 단백질을 약 80 g의 inclusion body 형태(세척 후 purified IB)로 회수하였다.

융합단백질의 his-tag과 Ni 친화성을 이용하여 Ni-affinity 크로마토그래피를 수행하였다. 첫 번째 친화성 칼럼에서 250 mM imidazole 용액으로 용리하여 고순도의 융합단백질을 monomer 형태로의 정제를 하였고 효소반응을 통하여 his-ubiquitine tag를 제거 하였다. 그 후 투석을 통하여 재접힘을 하였다. 투석 중 응집방지를 위한 알칼리 pH (9.0)상태에서 200 mM NaCl, 200 mM L-arginine을 사용하였고, 두 번째로 pH 7.6으로 내리면서 VEGF165를 활성형의 dimeric form으로 만들었다.

DEAE 음이온 교환 컬럼을 통하여 재접힘과 농축 이후 발생된 변형체(monomer, polymer, misfolding) 단백질과 endotoxin까지 분리할 수 있었다. 젤 여과 크로마토그래피를 이용하여 최종 dimer와 monomer를 분리 하여 고순도의 fraction pool을 원하는 제품 농도에 맞게 제조하였다. 최종 목적 단백질의 특성분석을 하였고, SDS-PAGE 전기영동, RP-HPLC 을 진행하여 RP-HPLC 기준으로 97% 이상의 순도를 얻었고, VEGF165의 제조를 위한 분리공정을 개발하였다.

감 사

본 연구는 충남대학교 자체 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Abe, T., Okamura, K., Ono, M., Mori, T., Hori, S. and Kuwano, M., "Induction of Vascular Endothelial Tubular Morphogenesis by Human Glioma Cells : a Model System for Tumor Angiogenesis;" *J. Clin. Invest.*, **92**, 54-61(1993).
2. Ferrara, N., "Role of Vascular Endothelial Growth Factor in the Regulation of Angiogenesis;" *Kidney Int.*, **56**, 794-814(1999).
3. Ferrara, N., "Molecular and Biological Properties of Vascular Endothelial Growth Factor;" *J. Mol. Med.*, **77**, 527-543(1999).
4. Drake, C. J., LaRue, A., Ferrara, N. and Little, C. D., "VEGF Regulates Cell Behavior during Vasculogenesis;" *Dev. Biol.*, **224**, 178-188(2000).
5. Nissen, N. N., Polverini, P. J., Koch, A. E., Volin, M.V., Gamelli, R. L. and DiPietro, L. A., "Vascular Endothelial Growth Factor mediates Angiogenic Activity during the Proliferative Phase of Wound Healing;" *Am.J. Pathol.*, **152**, 1445-1452(1998).
6. Ferrara, N., "Vascular Endothelial Growth Factor : Basic Science and Clinical Progress;" *Endocrine Reviews.*, **25**, 581-611(2004).
7. Houck, K. A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B. and Leung, D. W., "The Vascular Endothelial Growth Factor Family: Identification of a Fourth Molecular Species and Characterization of Alternative Splicing of RNA;" *Mol. Endocrinol.*, **5**, 1806-1814(1991).
8. Xie, K., Wei, D., Shi, Q. and Huangb, S., "Constitutive and Inducible Expression and Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor;" *Cytokine & Growth Factor Reviews.*, **15**, 297-24(2004).
9. Lee, S.-B., Park, J. S., Lee, S., Park, J., Yu, S. Kim, D., Kim, H., Byun, T. H., Baek, K., Ahn, Y.-J. and Yoon, J., "Overproduction of Recombinant Human VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) in Chinese Hamster Ovary Cells;" *J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 183-87(2008).
10. Wiesmann, C., Fuh, G., Christinger, H. W. Eigenbrot, C., Wells, J. A. and de Vos, A. M., "Crystal Structure at 1.7 Å Resolution of VEGF in Complex with Domain 2 of the Flt-1 Receptor;" *Cell*, **91**, 695-704(1997).
11. Keck, R. G., Berleau, L., Harris, R. and Keyt, B. A., "Disulfide Structure of the Heparin Binding Domain in Vascular Endothelial Growth Factor: Characterization of Posttranslational Modifications in VEGF;" *Arch. Biochem. Biophys.*, **344**, 103-113(1997).
12. Pizarro, S. A., Gunson, J., Field, M. J., Dinges, R., Khoo, S., Dalal, M., Lee, M., Kaleas, K. A., Moiseff, K., Garnick, S., Reilly, D. E., Laird, M. W. and Schmelzer, C. H., "High-yield Expression of Human Vascular Endothelial Growth Factor VEGF (165) in *Escherichia coli* and Purification for the Therapeutic Applications;" *Protein Expr Purif.*, **72**(2), 184-193(2010).
13. Scrofani, S. D. B., Fabri, L. J., Xu, P. Maccarone, P. and Nash, A. D., "Purification and Refolding of Vascular Endothelial Growth Factor-B;" *Protein Science*, **9**(10), 2018-2025(2000).
14. Lee, I. L., Li, P. S., Yu, W. L. and Shen, H. H., "Prokaryotic Expression, Refolding, and Purification of Functional Human Vascular Endothelial Growth Factor Isoform 165: Purification Procedures and Refolding Conditions Revisited;" *Protein Expr Purif.*, **76**(1), 54-58(2011).
15. Ko, K. Y. and Kim, I. H., "Moment Analysis (MA) of Lysozyme in Cation Exchange High Performance Liquid Chromatography (HPLC);" *Korean Chem. Eng. Res.*, **54**(4), 487-493(2016).