

## 융합 파트너를 이용한 인간 상피세포성장인자의 재조합 대장균에서 발현과 정제 연구

성기현 · 김인호<sup>†</sup>

충남대학교 응용화학공학과  
34134 대전광역시 유성구 대학로 99  
(2018년 7월 4일 접수, 2018년 7월 27일 수정본 접수, 2018년 8월 14일 채택)

### Expression and Purification of Recombinant Human Epidermal Growth Factor Using Fusion Partners in *Escherichia coli*

Keehyun Sung and In Ho Kim<sup>†</sup>

Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry, Chungnam National University, 99, Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34134, Korea  
(Received 4 July 2018; Received in revised form 27 July 2018; accepted 14 August 2018)

#### 요 약

상피세포 성장인자(Epidermal Growth Factor, EGF)는 세포 분열을 자극하고 의약적 용도가 다양하다. EGF는 3개의 이황화 결합을 갖고 불용성으로, 대장균에서 고효율 발현에 대한 연구가 잘 이루어지지 않았다. EGF 유전자를 작은 유비퀴틴 관련 유전자(small ubiquitin-related modifier gene, SUMO)와 결합하고 DE3 대장균에서 발현시켰다. IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside)로 유도하여 대장균 세포 단백질의 38.9%로 융합단백질이 발현되었고, Ni-NTA 친화성 크로마토그래피로 분리하였다. 그 후 유비퀴틴 분해효소반응으로 융합단백질에서 EGF를 얻은 후 다시 Ni-NTA 크로마토그래피로 분리 하였다. 최종적으로 정제된 EGF의 순도는 HPLC로 분석하였으며, 98%이상의 순도를 얻을 수 있었다.

**Abstract** – Human epidermal growth factor (hEGF) can stimulate the division of various cell types and has potential clinical applications. Since the protein contains three intra-molecular disulfide bonds, the high expression of active hEGF in *Escherichia coli* has not been well researched. We fused the hEGF gene with a small ubiquitin-related modifier gene (SUMO) by synthesizing an artificial SUMO-hEGF fusion gene that was highly expressed in *E. coli* (DE3) strain. The optimal expression level of the soluble fusion protein, SUMO-hEGF with IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside), was up to 38.9% of the total cellular protein. The fusion protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography and cleaved by a SUMO-specific protease to obtain the native hEGF, which was further purified by Ni-NTA affinity chromatography. The result of the reverse-phase HPLC showed that the purity of the recombinant cleaved hEGF was greater than 98%.

Key words: EGF, Refolding, Expression, Purification

#### 1. 서 론

hEGF (인간 상피세포성장인자, Human epidermal growth factor)는 미국의 생물학자 스탠리·코헨(Stanley Cohen) 박사에 의해 발견된 “상피세포성장인자”로 피부의 표면에 있는 수용체와 결합되어 새로운 세포의 생산을 촉진하며 체내에서 형성되는 단백질의 일종이

다[1]. hEGF는 인체 내에 존재하는 천연 피부 재생 물질로서 피부 등에 상처가 나면, 혈액, 땀 또는 침을 통해 공급되어 상처가 흉터 없이 자연적으로 아물게 하는 작용을 하는 생리활성 단백질이다. hEGF의 주요 작용은 표피세포 내에 들어가서 세포의 분열과 증식 속도를 촉진 하는 기능을 한다. 표피세포의 분열증식 속도는 진피 재생 속도까지 조절하며 피부 재생 전과정의 리듬을 주도한다. 또한 기타 재생촉진인자가 분비되도록 도와주고 진피 구성분인 콜라겐을 만들어내는 섬유아세포의 증식도 촉진한다[2,3].

hEGF는 쥐의 악하선으로부터 분리된 폴리펩타이드로서, 다양한 표피세포의 분화와 각질화(keratinization)를 촉진한다. 추가적으로 단백질과 DNA의 합성을 촉진하고, 무세포 단백질 합성에 있어 활

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: ihkim@cnu.ac.kr

<sup>\*</sup>이 논문은 충남대학교 강용 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.

성있는 리보솜을 형성한다. 인간상피세포성장인자의 주요 물리화학적 특징으로는 3개의 이황화결합을 포함하는 53개의 아미노산으로 N-말단에 asparagine과 C-말단에 arginine을 갖고, lysine, alanine, phenylalanine이 결합된 single polypeptide이다. 분자량은 약 6222 이고, 이론적 pI값은 4.78이다. 표면에 음전하를 띠는 Asparagine과 glutamate의 수는 각각 5개와 4개이고, 양전하를 띠는 Arginine과 lysine의 수는 각각 3개, 2개이다[4,5].

외래단백질 생산을 위한 숙주로 가장 많이 이용되는 대장균에서 외래단백질이 과 발현될 경우 활성형인 수용성(soluble form)으로 발현이 되지 않고 비활성형인 불용성 응집체(inclusion body) 형태로 발현되는 경우가 많다. 이렇게 불용성 응집체로 발현된 단백질이 활성을 가지기 위해서는 재접힘(refolding) 단계를 거쳐야만 하는 번거로움이 있다. 그러므로 대장균으로부터 외래단백질을 발현시킬 경우, 발현되는 목적단백질이 불용성 응집체가 아닌 수용성 형태로 발현시키기 위한 다양한 방법들이 연구되고 있다[6]. 이를 위해, 일반적으로 배양온도를 떨어뜨리거나 외래단백질에 융합 파트너를 도입하여 융합 단백질 형태로 발현시키는 방법이 사용되고 있다[7]. 외래단백질의 수용성 발현을 위해 많이 사용되고 있는 융합 파트너로는 Maltose-binding protein (Mbp), thioredoxin, glutathione S-transferase (GST), ubiquitin 등이 있다. 융합 파트너를 이용하여 융합단백질의 형태로 발현된 단백질은 융합 파트너의 절단에 의하여 활성 단백질로 전환된다[8]. 이를 이용하여 유비퀴틴 (ubiquitin)을 인간상피세포성장인자의 N-말단에 융합시킨다. 또한 이를 절단시키기 위한 Mbp-ubp1 (ubiquitin specific protease)을 사용한다.

발현 벡터로서 사용된 pET-vector는 construct 내에 polyhistidine 서열을 가지고 있다. 이러한 His-tag의 경우 amino acid가 6개밖에 되지 않기 때문에 크기도 작고 원래의 단백질 구조에도 별다른 영향을 주지 않으므로 재조합 단백질을 만든 후에 따로 잘라주지 않아도 된다는 편의성이 있다. 또한 His-tag을 포함하는 vector를 이용하면, 발현하는 단백질이 불용성일지라도 His-결합 레진을 이용하여 변성조건에서도 정제할 수 있기 때문에 매우 편리하다[5]. Histidine tag은 아미노산 중의 하나인 histidine이 5개 또는 6개가

연속으로 결합되어있는 peptide이다. 아미노산 서열이 His-His-His-His-His His-tag은 2개의 금속 이온과 친화성을 가진다. 정제 시에는 주로 니켈 고정화 젤을 사용하게 되는데, 이 방법을 약자로 IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography)이라고 한다[9].

본 연구에서는 대장균 내의 고농도 재조합 hEGF를 대량으로 생산할 수 있는 발현법과 정제기술을 개발하고자한다. 이를 위해 대장균 세포의 고농도 생장을 위한 배양조건과 고농도 재조합 hEGF의 발현을 위한 조건을 선정하고, 재조합 hEGF의 물리화학적인 성질을 이용하여 용해와 재접힘 조건을 선정한다. 그리고 Mbp-ubp1을 이용하여 융합단백질을 절단함으로써 활성형 hEGF 형태로 얻기 위한 조건을 정한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2-1. 사용균주 및 발현 벡터의 제조

균주로 사용된 BL21(DE3)는 형질전환이 가능한 대장균이다. 염색체 DNA안에 있는 lacUV5 promoter에 의해 조절되는 T7 RNA polymerase 유전자를 포함하고, pLysS 플라스미드 내에 있는 T7 lysozyme 유전자를 포함하고 있다. T7 RNA polymerase는 IPTG를 첨가하면 발현된다. 이는 발현벡터에 있는 T7 promoter로부터 단백질 발현을 유도한다. T7 lysozyme은 RNA polymerase의 활성을 억제하는데, E. coli BL21 (DE3)pLysS strain은 대장균 B 유도체이고, 단백질의 분해를 야기할 수도 있는 lon protease와 ompT membrane protease가 포함되어 있다. 발현벡터로서의 PET-15b 벡터는 N-말단 쪽의 His-tag 서열과 thrombine site와 세 개의 cloning site가 있다. 그리고 발현 부위가 T7 promoter에 의해 전사되는 체계를 갖고 있다. T7 promoter는 bacteriophage T7의 RNA polymerase (T7 polymerase)에 특이적으로 발현되는 promoter 서열이다. BL21plyS 균주는 lac promoter에 T7 polymerase를 가지고 있다. 따라서, IPTG 등을 사용해서 lac promoter를 유도하면 T7 polymerase가 만들어지고, 이 T7 polymerase가 pET-15b 발현벡터의 T7 promoter에 재조합된 유전자를 발현시킨다. 상용화 되는 pET-15b vector에 있는 polyhistidine

```

AGCAGCCATCATCNTCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGCAA
                6xHisTag                                I->Ubiquitin gene
ATTTTCGTCAAAACTCTAACAGGGAAGACTGTAACCCTAGAGGTTGAATCTTCCGACACT
ATTGACAACGTCAAAGTAAATTCAAGATAAAGAAGGTATCCCTCCGGATCAGCAGAGA
TTGATTTTTGCTGGTAAGCAACTAGAAGATGGTAGAACCTTGTCTGACTACAACATCCAA
AAGGAATCTACTCTTCACTTGGTGTTGAGACTCCGCGGTGGTAATAGTGACTCTGAATGT
                I->hEGF
CCCCTGTCCCACGATGGGTACTGCCTCCATGATGGTGTGTGCATGTATATTGAAGCATTG
GACAAGTATGCATGCAACTGTGTTGTTGGCTACATCGGGGAGCGATGTCAGTACCGAGAC
CTGAAGTGGTGGGAACTGCGCTGA
  
```

Fig. 1. Genetic code of fusion hEGF.

뒤에 N말단에 NdeI과 C말단에 SacII의 제한효소부위를 갖고 있는 유비퀴틴을 융합시켰고, 그 바로 뒤에 발현백터의 MCS부위 (multiple cloning site)와 Sac II로 연결되어 있다(Fig. 1). 이를 응용하여 hEGF의 N말단에 Sac II와 C말단의 Xho I을 포함하는 primer를 제작하여 hEGF 붙여 유비퀴틴과 융합시켰다.

**2-2. 균주의 회분식 배양조건**

종배양을 위해 본배양 부피의 1.5%가 접종되도록 LB배지 부피를 정하여 플라스크에 넣어 멸균하고, LB배지에 1% 균을 접종하고 Ampicillin 40 mg/mL이 되도록 넣고, 진탕배양기에서 37°C, 180 rpm으로 밤새 배양을 하였다. 이를 대량 배양하기 위하여 30 L, 300 L 생물반응기에 각각 생장 배지(Glucose 1%(별도살균), MgSO<sub>4</sub> 2 mM(별살), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.022 mM, 구연산 0.0086 mM, casein pepton 1%)를 넣고 멸균 후 종배양한 것을 접종하였다. 세포 생장을 위한 발효조 안의 배양 조건은 37°C, 300 rpm, 350 L/min 통기, pH 7.0로 설정하고 5시간 동안 배양하였다. EGF는 세포성장 정지기에 생성을 시작한다. EGF의 induction을 위한 조건으로 유도체를 첨가함으로써 발현 백터에서 목적 단백질을 발현 시키는 방법이 있다. 두 번째로는 catabolite repression을 최소화 시켜 원활한 전사 조건을 만들어 주기 위하여 당 농도가 낮아지는 수준 까지 세포 배양 후 유도에 들어가는 방법이 있다. 본 연구에서 사용한 유도체는 IPTG 1 mM을 첨가해 주었다. IPTG 첨가 후 37°C, 300 rpm, 350 L/min 통기, pH 7.0의 조건으로 5시간을 더 배양하였다. 배양이 끝나면 연속 원심분리기를 이용하여 75,000 rpm, 0.4 L/min의 유속으로 재조합 대장균을 회수하였다.

**2-3. 인간 상피세포 성장인자 분리 정제과정**

회수한 대장균을 증류수로 현탁시킨 후 7,500 rpm, 20 min, 4°C로 원심분리하여 회수된 대장균에 묻어있는 배지성분을 제거하였다. 세척 된 대장균 부피의 15%가 되도록 Lysis buffer (50 mM Tris, 5 mM EDTA, 2% Triton X-100, pH 8.0)에 현탁시켰다. 완전히 현탁되면 homogenizer를 이용하여 900~980 bar에서 세포파쇄를 하였다. 파쇄가 끝나면 현미경을 이용하여 파쇄 여부를 판단하였다.

원심분리(7,500 rpm, 20 min, 4°C)를 하여 봉지체(inclusion body)상 태인 침전물을 회수한다. 봉지체를 먼저 1차구조로 변성(denaturation) 시킨 후 다시 활성을 갖는 정상적인 3차구조로 되돌려야 한다. 이에 대한 여러 가지 방법들이 제시 되는데, 여기에서는 pH를 이용하는 방법을 응용하였다. 먼저 회수된 봉지체를 부피의 1%가 되도록 증류수를 넣고 현탁시켰다. 1 N NaOH를 조금씩 첨가하여 pH를 11.5 까지 상승시키고, 이 상태에서 30분간 저어주며 유지시켰다. 이 상태에서는 단백질이 모두 음이온이 되므로 척력에 의해 자연스레 풀어지게 된다. 이후 다시 pH를 천천히 10으로 낮추고 10분간 반응시켰다. 10분 후에 glycine을 최종 농도 10 mM이 되도록 첨가하고 완전히 녹으면 최종 pH를 9.0까지 내렸다. 침전 여부를 확인 후 원심분리(7,500 rpm, 20 min, 4°C) 후 0.45 um filter를 이용하여 침전물을 제거하였다.

이어서 크로마토그래피 정제 작업을 진행한다. 우선, hEGF에 융합되어 있는 poly-histidine을 이용하여 친화성 크로마토그래피 정제를 진행한다. 작업 전에 사용할 resin종류와 부피를 정한다. resin은 Ni Sepharose 6 Fast Flow를 사용하였다. 부피는 목적단백질의 양과 사용되는 resin의 흡착력을 고려하여 5 L를 사용했다. 또한 유량은

resin과 칼럼이 버틸 수 있는 압력을 확인하여, 20~30 cm/h로 흘러준다. 평형완충용액(10 mM Glycine buffer, pH 9.0)으로 resin 부피의 10배를 흘러준다. 평형상태가 되면 준비된 단백질 샘플을 주입한다. 그리고 붙지 않은 단백질을 제거하기 위한 세척(평형완충용액 +6 mM Imidazole)작업을 5 칼럼부피로 진행한다. 마지막 Ni resin에 붙은 hEGF를 회수하기 위해 용출(평형완충용액 + 60 mM Imidazole) 단계를 4 칼럼부피로 진행한다.

모든 진행이 끝나면 회수 된 hEGF에 Mbp-ubp1효소와 반응시켜 hEGF에 융합되어 있는 유비퀴틴을 제거하여 hEGF를 만들어 준다. 반응조건은 hEGF 부피 대비하여 Mbp-ubp1을 10% 첨가하고 20°C에서 2시간 반응한다. 이 효소는 hEGF에 연결되어 있는 유비퀴틴을 정확하게 인식하여 절단하기 때문에 hEGF와 His-ubiquitin의 식으로 잘리게 된다. 반응이 끝나면, 2번째 친화성 크로마토그래피를 진행한다. hEGF 시료에는 imidazole이 있으므로 2번째 Ni resin과 His-tag과의 결합을 위하여 imidazole 제거용 환외여과처리를 한다. 환외여과는 5 K cellulose membrane을 이용하였다. 또한, 염화암모늄이 첨가된 10 mM glycine, 500 mM 염화암모늄, pH 9.0조성으로 바꾸기 위한 완충용액 교환 작업도 같이 한다. 염화암모늄은 His-tag과 Ni resin과의 결합력을 증가시켜준다.

1번째와 동일한 평형완충용액 조건으로 흘린 후 hEGF와 Histidine-ubiquitin으로 나뉘어 있는 시료를 주입한다. 2번째 친화성 크로마토그래피는 Ni resin과 효소에 의해 잘려진 Histidine-ubiquitin을 결합시키고, hEGF를 flow through 분획으로 회수하려는데 그 목적이 있기 때문에 loading 후 회수하여 바로 다음 공정으로 넘어간다. 회수 된 hEGF 시료의 농축과 불순물의 분리를 위하여 고농도의 염화암모늄을 이용한 염석 침전법을 사용한다. 황산암모늄 농도는 hEGF용액 부피대비 30% (v/w)가 되도록 저어가면서 천천히 소량씩 첨가하여 완전히 녹인 후 냉장온도에서 30분 정치시키면 hEGF가 완전히 침전된다. 원심분리(7,500 rpm, 20 min, 4°C)하여 침전물을 회수한다. 젤여과 크로마토그래피 공정에 적절한 주입부피(총진 resin양 대비 3~5%)을 고려하여 100 mL buffer (5 mM Tris buffer, 4 M Urea, pH 7.4)로 현탁한다. 이때 농축 된 상태이므로 단백질 농도가 높아져 발생하는 침전문제를 방지하고, 또한 단백질 분해효소의 활성으로 hEGF의 분해가 발생할 수 있기 때문에 4 M의 Urea가 첨가된다.

젤여과 크로마토그래피 조건은 resin (S-200)에 평형완충용액(5 mM Tris buffer, pH 7.4)를 10 칼럼 부피로 흘려준다. 젤여과 크로마토그래피에서 주입 시료량은 resin양 대비 5% 부피로 하였으며, 주입 후 5 mM Tris buffer (pH 7.4)를 유속 7.5 mL/min으로 흘린다. 통과해 나오는 순서에 의해 분획을 회수하여 불순물 구획을 제거하여 고순도의 hEGF 부분만 선택하였다.

**2-4. 분석방법**

분광 광도계(UV-1700)를 이용하여 세포농도를 600 nm과장에서 측정하였다. 전기영동은 15% SDS-PAGE로 하였고, 총 단백질 정량분석은 Lowry법으로 수행하였다. hEGF의 순도를 확인하기 위하여 RP-HPLC (Reverse phase Hight performance liquid chromatography) 분석을 하였다. 이동상 A (증류수 1L와 TFA 1 mL) 이동상 B (1 L 용기에 ACN 1 L와 TFA 1 mL)을 제조 후 Shimadzu HPLC System (Solvent Delivery System: LC-20AD, UV- VIS Detector: SPD-20A, 유속:1 mL/min, 파장:280 nm, 주입량 : 20 µL)로 준비된 이동상을 주어진

용매구배로 컬럼(Vydac C18, 250 cm×4.6 mm, 5 μm)을 통과시켰다. hEGF 분석을 위한 용매구배는 다음과 같다. 20% 이동상 B-0.01분, 1분당 1% 씩 이동상 B 증가(0.01 to 40 min), 5분 동안 60% 이동상 B 유지, 1분당 12% 이동상 B 감소(45 to 50 min), 20분 동안 0% 이동상 B 유지(50 to 70 min)이다.

3. 결과 및 검토

3-1. 대장균내에서 재조합 인간 상피세포성장인자의 발현

300 L 생물반응기에서 대량배양하였으며, 발현을 위한 induction 시기는 배양 일정에 맞추어 OD 5~6에서 하였다. IPTG 1 mM을 첨가하여 induction 후 5시간을 추가 배양하였다. induction 후 회수 당시 OD는 11.6이고, 균체 무게는 3 kg이다. hEGF는 53개의 아미노산으로 구성되어 있고, 6.2 kDa의 molecule weight이며, 유비퀴틴은 76개의 아미노산으로 8.5 kDa이다. 또한 6개의 Histidine 이 함께 연결되어 있어, Fig. 2와 같이 발현 전과 발현 후의 전기영동 사진을 보이고 있다. 최초 발현 시에 약 17 kDa의 크기로 나타난다.

3-2. 불용성 봉입체의 확인 및 가용화

세포 파쇄 후 hEGF는 과도한 발현에 의한 잘못된 이황화 결합 및

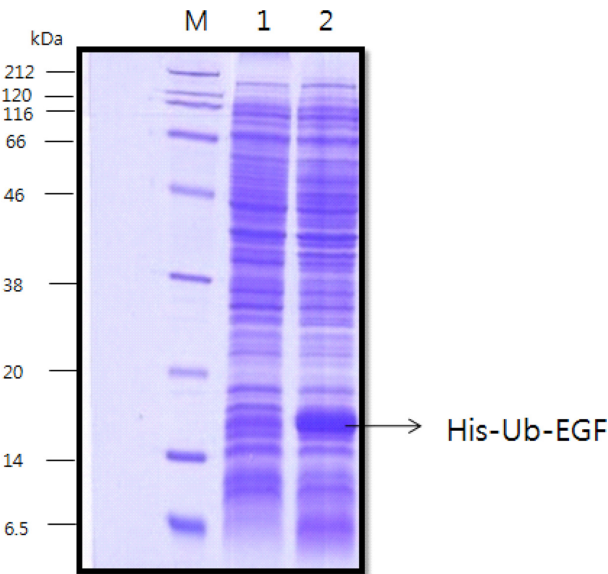


Fig. 2. Expression of hEGF by SDS-PAGE. lane M, protein size marker; lane 1, before induction; lane 2, after induction.

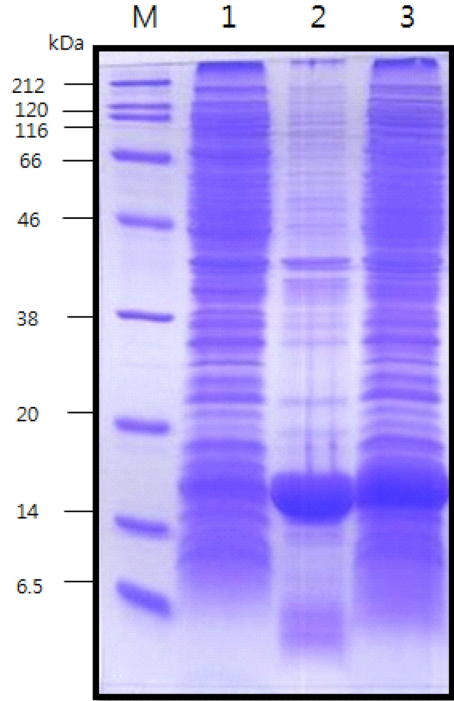


Fig. 3. Solubilization of insoluble expressed hEGF inclusion body. lane M, protein size marker; lane 1, total lysate supernatant; lane 2, total lysate precipitate; lane 3, solubilized inclusion body.

소수성 결합에 의해 불용성인 봉입체 상태로 발현된다. 이는 파쇄 후 원심분리하면 불용성 상태이므로 침전으로 회수할 수 있다. 이는 생물학적 비활성 상태이므로, 이를 풀어서 다시 적절한 3차 구조를 만들어 주어야한다. 여기서는 pH의 극단적인 변화를 이용하여 단백질이 갖고 있는 전하를 동일한 상태로 만들어 1차구조로 풀어준다. 이때 1 N NaOH를 소량씩 첨가하여 용해도를 높여준다. Fig. 3에서 lane 1에 상등액에 존재하는 단백질, lane 2에 침전된 단백질의 전기영동사진을 보여주고 있다. lane 3에서 침전으로 회수되어 용해된 융합 EGF 단백질의 전기영동 사진을 보이고 있다.

3-3. 첫 번째 친화성 크로마토그래피를 이용한 분리 정제

여러 대장균 단백질들로부터 histidine이 연결되어 있는 hEGF만을 분리 정제하기 위한 단계이다. 2가 금속이온인 니켈이 결합된 칼럼 충전 resin은 histidine의 imidazole ring과의 친화력에 의해 his-hEGF 융합단백질과 결합을 한다. 따라서 기타 단백질들과의 분리가 가능

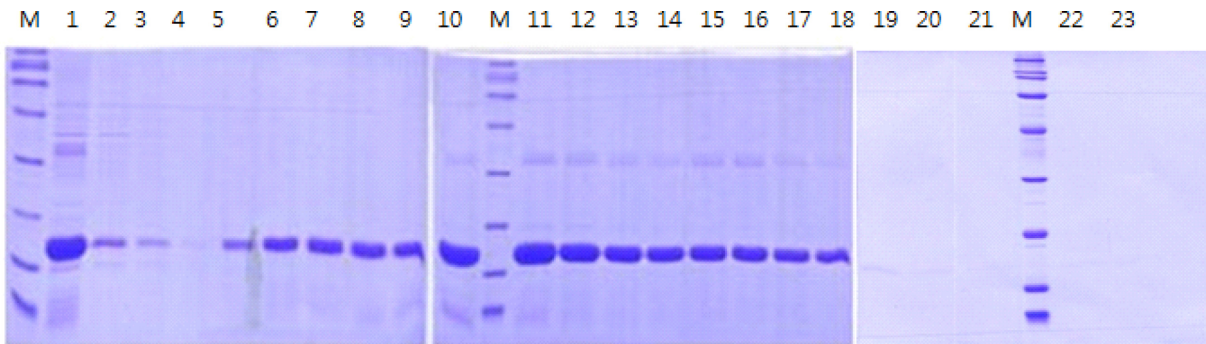


Fig. 4. SDS-PAGE of His-tag purified gradient eluates. lane M, protein size marker; lane 1, hEGF loading sample; lane 2, flow-through; lane 3, washed eluate by 6 mM imidazole; lane 4~23, Gradient elution fractions (10 mM~60 mM).

하다. 또한 결합된 hEGF를 효과적으로 용출시키기 위한 경쟁물질로 고농도의 imidazole을 이용한다. 10~60 mM까지 imidazole 농도 구배로 친화성 크로마토그래피 한 결과 Fig. 4와 같이 여러 용출 분획에서 융합단백질이 발견되었고 특히 lane 10과 11에서 고농도로 용출됨을 알았다.

**3-4. 효소를 이용한 융합 단백질의 절단**

활성형 hEGF를 얻기 위해 융합된 His-ubiquitin을 Mbp-ubp1 효소를 이용하여 앞부분을 제거한다. 효소반응에 있어 농도, 시간, 온도, pH등이 중요한 요인으로 작용하기 때문에 반응조건을 찾았다. 효소의 농도를 hEGF sample 부피 대비 4%에서 10% 범위로 2시간 반응 하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 His-ub-hEGF (약 17 kDa)의 유비퀴틴부분이 절단되면 His-Ub (11.5 kDa)와 hEGF (6.2 kDa)으로 나뉘어진다. 효소의 농도가 높을수록 His-Ub (11.5 kDa)와 hEGF (6.2 kDa)의 양이 증가함을 알 수 있다. 10%의 효소농도로 이 후 절단 반응을 수행하였다.

**3-5. 두 번째 친화성 크로마토그래피를 이용한 분리 정제**

잘려진 hEGF와 His-Ub를 분리하기 위해 다시 친화성 크로마토그래피를 사용하였다. His-Ub는 histidine이 연결되어 있어 Ni sepharose와 결합하고, 나머지 hEGF는 Flow through와 세척 단계 (6 mM imidazole)에서 회수된다. Fig. 6의 lane 2와 3에서 순수한 hEGF를 확인할 수 있다. lane 4와 5의 60 mM, 100 mM 용출 분획은 결합되었다가 고농도의 imidazole에 의해 떨어진 His-Ub-EGF와 His-Ub를 보여주고 있다.

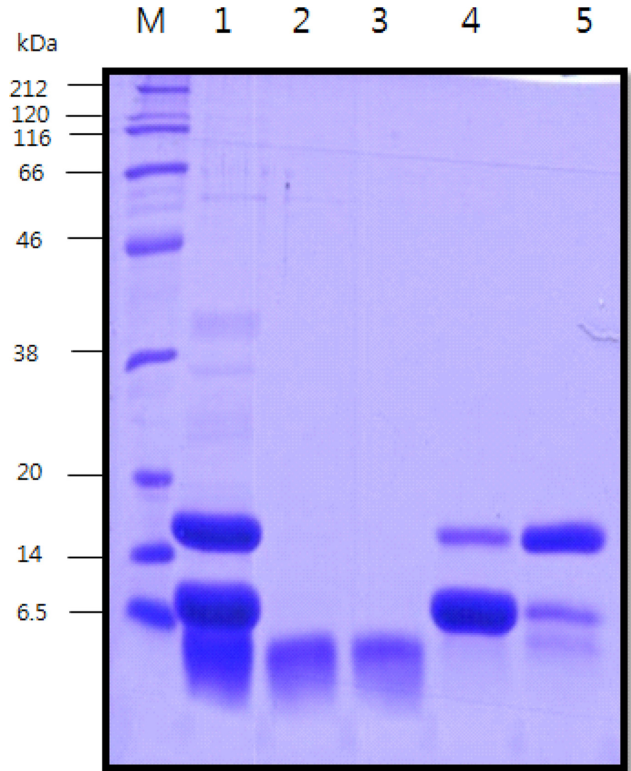


Fig. 6. Second step His-tag purified hEGF. lane M, protein size marker; lane 1, loading sample; lane 2, flow-through; lane 3, washed eluate (6 mM imidazole); lane 4, elution fraction(60 mM); lane 5, elution fraction (100 mM).

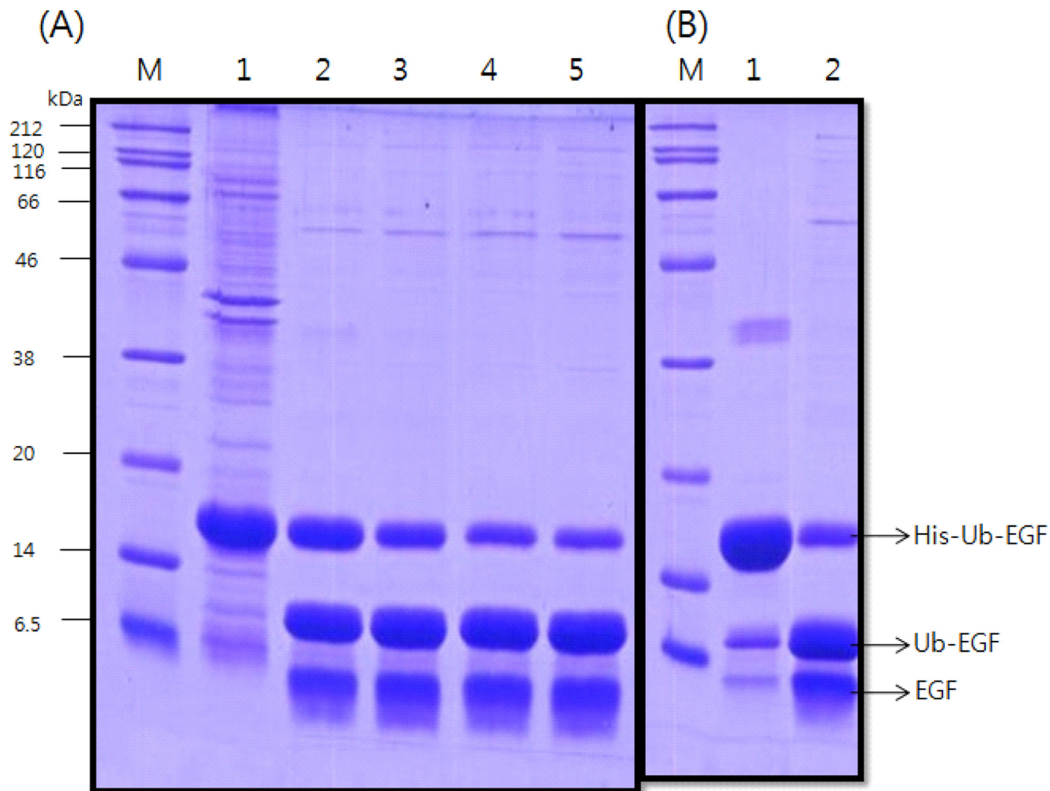


Fig. 5. (A) Effect of digestion enzyme concentration. lane M, protein size marker; lane 1, fused hEGF (uncut); lane 2, 4% enzyme cut; lane 3, 6% enzyme cut, lane 4, 8% enzyme cut; lane 5, 10% enzyme cut. (B) Contrasted digestion SDS-PAGE. lane M, protein size marker; lane 1, before enzyme digestion; lane 2, after 10% enzyme digestion.

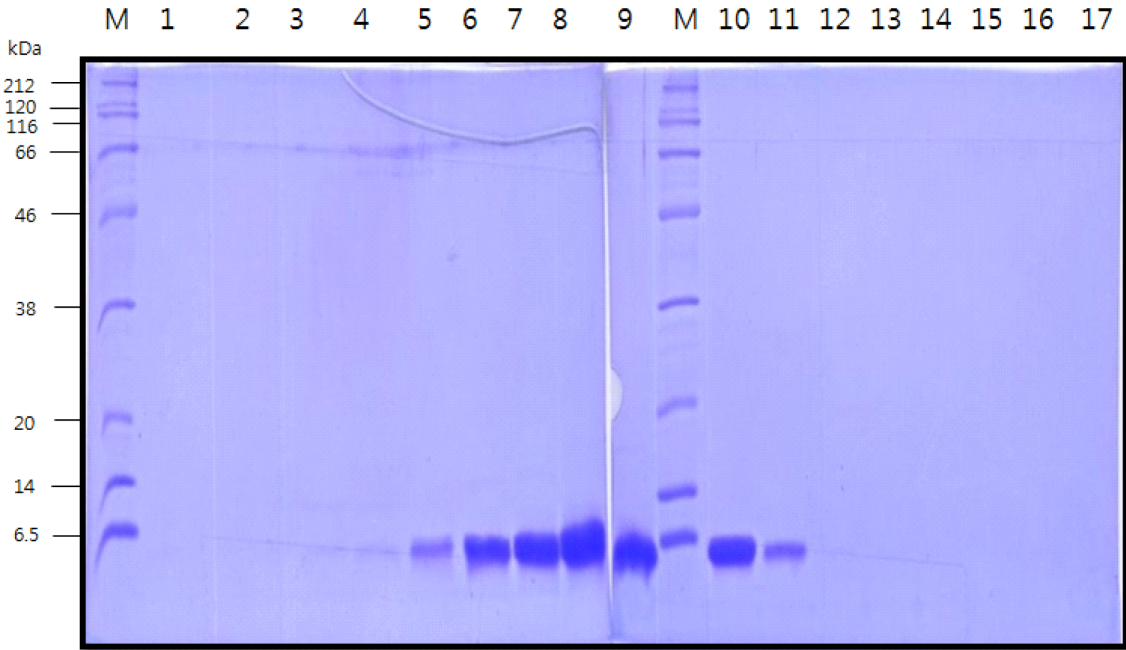
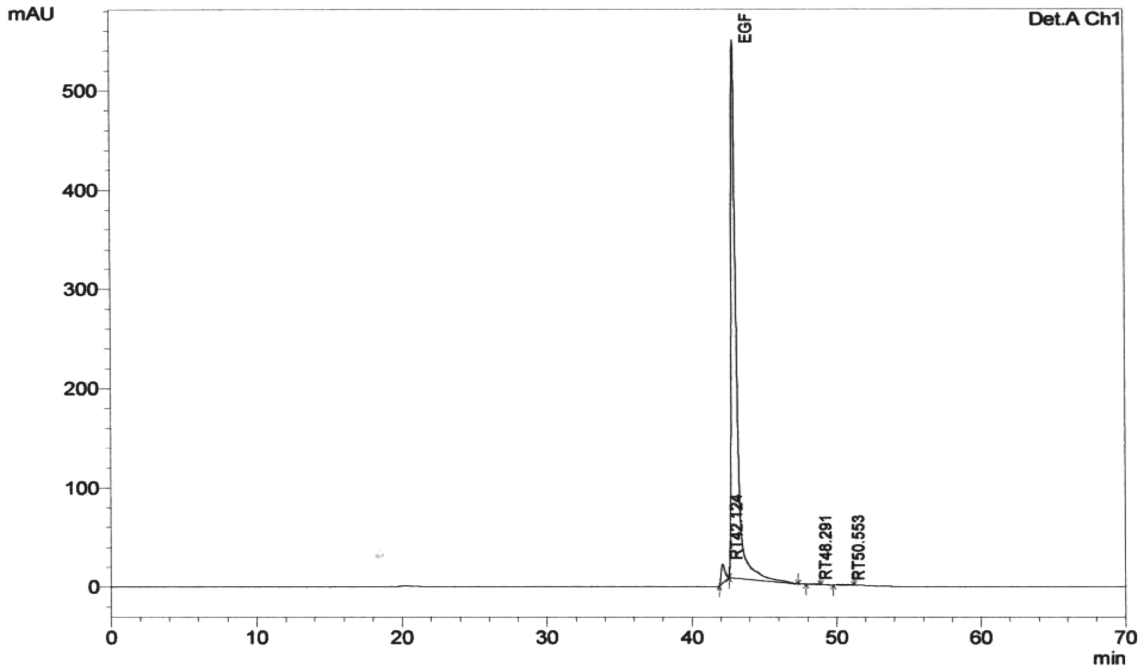


Fig. 7. hEGF fractions from gel filtration chromatography; lane M, protein size marker; lane 1~17, hEGF fractions.

3-6. 크기배제 크로마토그래피를 이용한 분리 정제

마지막 고순도 정제를 위하여 소량씩 fraction collector (Frac-920 Fraction Collector, GE healthcare)를 이용하여 분리하였다. resin (Sephacryl S-200 HR) 6.7 L, 유속 7.5 mL/min, 각 fraction을

tube에 45 mL씩 80개를 나누어 분리하였다. SDS-PAGE로 분석 시에는 모든 분획을 다 확인하지 않고 5개씩 확인하였다. Fig. 7에서 보듯이 분자량이 큰 분산물 단백질들이 1번에서 6번까지 나오고, hEGF는 4번 분획에서 나오기 시작한다. 이 중에서 고농도인 7~11



1 Det.A Ch1/280nm

<Results>

Detector A

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units	Area %
1	RT42.124	42.124	341964	19040	2.448	mg/L	2.448
2	EGF	42.915	13604373	542018	97.405	mg/L	97.405
3	RT48.291	48.291	9670	259	0.069	mg/L	0.069
4	RT50.553	50.553	10744	213	0.077	mg/L	0.077

Fig. 8. HPLC chromatogram of final hEGF.

번에 해당하는 분획을 회수하여 모았다.

**3-7. HPLC 분석**

정제된 최종 제품에 대한 순도를 확인하기 위하여 RP-HPLC를 이용하였다. 이동상A인 HPLC급 증류수(0.1% TFA)로 완전히 평형화를 시켜준 후 준비된 검액을 20 µL 주입하여 Fig. 8의 크로마토그램을 얻었다. hEGF 표준품과 비교하여 같은 체류시간인 42 min에서 정제된 hEGF를 확인하였다. Fig. 8에 보인 것 같이 최종 hEGF 순도는 98%이었다.

**4. 결 론**

EGF 유전자를 작은 유비퀴틴 관련 유전자(small ubiquitin-related modifier gene, SUMO), histidine 유전자와 결합하고 DE3 대장균에서 발현하였다. 발현된 융합단백질을 용해시켰고 세단계의 크로마토그래피를 거쳐 분리하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- (1) IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside)로 유도하여 대장균 세포 단백질의 38.9%로 융합단백질을 발현시켰다.
- (2) Histidine과 결합하는 Ni 친화성 크로마토그래피로 EGF를 2번 분리하였다. 첫번째 친화성 크로마토그래피에서 대장균 단백질과 융합 단백질을 분리하였다. 그 후 분해효소반응으로 융합단백질에서 EGF를 얻은 후 두 번째 친화성 크로마토그래피에서 효소로 질려진 EGF와 융합파트너를 분리하였다.
- (3) 최종 단계로 젤여과 크로마토그래피로 EGF의 순도를 증가시켰고 순도 98%를 역상 HPLC로 측정하였다.

**References**

1. Kim, B.-L., Baek, J. E., Kim, C. S., Lee H.-W., Ahn, J. O., Lee, H. W., Jung, J.-K., Lee, E. G. and Kim, I. H., "Study of Soluble

Expression of Recombinant Human Epidermal Growth Factor using Various Fusion Partners in *E. coli*," *KSBB Journal*, **23**(3), 205-212(2008).

2. Ferrer, S., Cedano, J., Querol, E. and de Llorens, R., "Cloning, Expression and Purification of Human Epidermal Growth Factor using Different Expression Systems," *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, **788**(1), 113-23(2003).

3. Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., Robbins, S. L. and Cotran, R. S., Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease (7th ed.). Elsevier Saunders, St. Louis, Mo (2005).

4. Ma, Y., Yu, J., Lin, J., Wu, S., Li, S. and Wang, J., "High Efficient Expression, "Purification, and Functional Characterization of Native Human Epidermal Growth Factor in *Escherichia coli*," *Biomed Res Int.*, 3758941, Epub (2016).

5. Hollenberg, M. D. and Gregory, H., "Epidermal Growth Factor-Urogastrone: Biological Activity and Receptor Binding of Derivatives," *Molecular Pharmacology*, **17**(3), 314-320(1980).

6. Zhou, Y., Wu, Q., Wu, Z., Zheng, X., Ding, C., Li, X. and Su, Z. "High-level Expression and Purification of Human Epidermal Growth Factor with SUMO Fusion in *Escherichia coli*," *Protein Pept Lett.*, **13**(8), 785-92(2006).

7. Sung, K. H. and Kim, I. H., "Development of Purification Process of Recombinant Human Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) using Fusion Protein," *Korean Chemical Engineering Research*, **55**(3), 369-378(2017).

8. Herbst, R. S., "Review of Epidermal Growth Factor Receptor Biology," *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, **59**(2 Suppl), 21-26(2004).

9. Kim, J. H., Hwang, W. S. and Kim, I. H., "Simple Preparation of Immobilized-metal Affinity Chromatography Media," *Korean Journal of Chemical Engineering*, **26**(6), 1693-1695(2009).