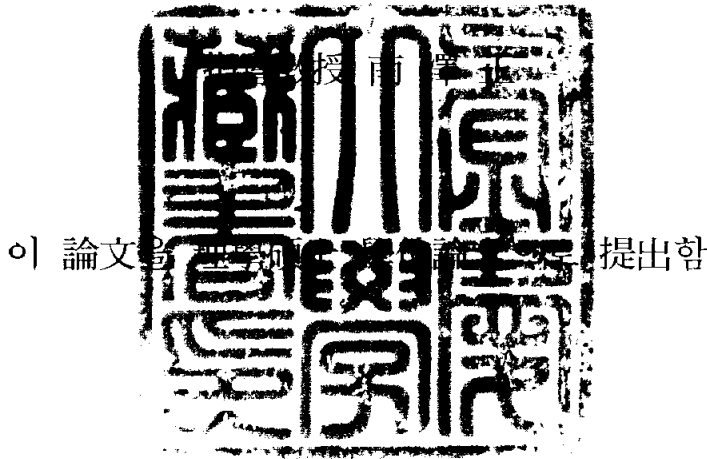


理學碩士 學位論文

GST gene fusion system을 이용한
조피볼락 재조합 IGF-I의
발현과 정제



2004年 2月

釜慶大學校 大學院

食品生命科學科

崔 耀 翰

최요한의 이학석사 학위논문을 인준함

2003년 12월 12일

주 심 이학박사 김 형 락



위 원 농학박사 남 택 정



위 원 약학박사 최 재 수



목 차

Abstract	1
제1장 서론	3
제2장 실험방법	7
1. 재료	7
1.1 시약 및 기구	7
2. 실험방법	9
2.1 올리고뉴클레오타이드 합성	9
2.2 조피볼락 간에서 total RNA 추출	9
2.3 조피볼락 IGF-I 유전자의 증폭	10
2.4 PCR 산물의 클론확인	11
2.5 발현 플라스미드 구축	13
2.6 재조합체 조피볼락 IGF-I 유전자의 발현	14
2.7 Fusion protein(GST/KR IGF-I)의 정제	15
2.8 성숙체 조피볼락 IGF-I 폴리펩타이드 정제	16
2.9 순도확인	16

제3장 결과 및 고찰	17
1. 조피볼락 IGF-I cDNA 합성 및 증폭	17
2. 발현백터 구축	19
3. 대장균내 융합단백질의 발현 및 정제	24
4. 재조합체 조피볼락 IGF-I 폴리펩타이드의 분리 및 정제	29
 제4장 요약	 31
 제5장 참고 문헌	 32

Expression and purification of korea rock recombinant IGF-I on basis of GST gene fusion system

Yo-Han Choi

*Department of Food and Life Science, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

Mature insulin-like growth factor-I(IGF-I) is a single chain polypeptide with 70 amino acid residues. It plays a central role in regulating somatic growth in all vertebrates via the modulation of growth hormone(GH). The IGF-I prepropeptide consists of a signal peptide, B, C, A, D and E domains. Also, the signal peptide and E domains are cleaved from the other domains during post-translational processing of the propeptide, prior to the secretion of the mature IGF-I into serum. In vertebrates, the effects of IGF-I on somatic growth and cell differentiation are regulated by GH and nutritional conditions.

The biological actions of IGFs in fish are diverse. Also, IGF-I has shown to stimulate DNA synthesis, cartilage sulfation and protein synthesis, enhance seawater adaptability, stimulate spermatogenesis and induce final oocyte maturation in fish.

The cDNA sequence for B to D domains of Korean rockfish IGF-I was already elucidated by Kwon. The mature IGF-I nucleotide sequence is amplified by PCR primers, IGF-I B and D domains. PCR products from B to D domains with glutathione-S-transferase were cloned into the pGEX-2T expression vector containing thrombin digestion sequence and three cloning sites based on the GST gene fusion system. This system uses a tac promoter for chemical inducibility and induces high levels of expression. The recombinant KR IGF-I fusion protein, produced following induction of *E. coli* with IPTG and digestion with thrombin, appeared as a major protein band with a molecular mass of 7kDa.

제1장 서 론

인슐린양 성장인자 I (Insulin-like growth factors I; IGF-I)은 1957년 Salmon과 Daughaday등에 의해 발견되었는데 뇌하수체를 제거한 쥐의 연골 배양세포에 성장호르몬(Growth Hormone; GH)을 직접 주입하여서는 연골기질의 증식이 없는 반면 정상쥐의 혈청을 주입하면 연골기질의 증식이 일어남을 확인하면서 GH가 매개하는 표적호르몬을 가정하게 되었고 GH dependent somatomedin으로 명명하게 되었으며 후에 IGF-I과 같은 물질로 확인되었다.

처음 성장호르몬의 작용을 중재하는 인자로 사람의 혈청에 존재한다는 것이 알려졌지만(Daughaday, 1972), 후에 인슐린 항체에 의해서도 억제되지 않는 물질로서(Froesch, 1966) non-suppressible insulin-like activity soluble(NSILA-S)과 아미노산 배열이 동일하다는 것을 알았으며, 그 아미노산 배열이 인슐린과 매우 유사하여 IGFs (IGF-I과 IGF-II)로 불려지고 있다(Rinderknecht와 Humbel, 1978). IGF-I은 70개의 아미노산으로 구성된 분자 내에 3개의 S-S결합을 가지는 약알칼리성 물질이며 7.5KD 정도의 분자량을 가지고 있어서 약산성의 67개 아미노산을 가진 IGF-II와는 다른 성상을 보인다. 특히 IGF-I은 GH에 반응하는(GH dependent) 반면 IGF-II는 GH와는 무관하게(GH independent)활성화되는 점이 두 물질간의 가장 큰 차이점이다. 그러나 이 두 물질간에는 구조적인 유사성이 있어서 IGF-I과 II사이에는 약 70%, proinsulin과는 약 50%의 구조적 동질성을 가지기 때문에 인슐린, IGF-I, IGF-II 그리고 이들과는 약간 다르지만 relaxin을 포함시켜 Insulin Gene Family라고 부르게 되었다(Blundell and Humbel, 1980).

성숙체 IGFs는 70개의 아미노산(B domain 29개, C domain 12개, A domain 21개, D domain 8개)으로 구성되어 있는데 종간의 다양성에도 불구하고 아미노산의 종류에 대한 보존이 척추동물 중에서 가장 잘 보존되어 있다. IGFs의 C말단에는 D와 E domain을 포함하여 성숙체 IGF 펩타이드가 생성될 때 해독후 변형에 의해 제거된다(Daughaday와 Rotwein, 1989 ; Lund, 1994). IGFs는 주로 간에서 생성

되어 연골 황산화(Daughaday와 Reeder, 1966 ; Uthne, 1971), 체성장, DNA, RNA 및 단백질 합성을 촉진시키며(Guler, 1988 ; Pell과 Bates, 1992), 섬유아 세포를 포함한 많은 세포내에서도 생성, 분비되어 autocrine/paracrine 방식으로 세포내 유사분열 촉진효과를 나타낼 뿐만 아니라(Froesch, 1985 ; Ballard, 1986, 1988) 손상된 세포내에서도 치유될 때까지 신속하게 합성, 분비된다(Rotwein, 1987).

최근 어류 IGF-I의 구조와 생물학적 작용에 관한 연구가 많이 진행되고 있다. 은 연어를 비롯하여 무지개송어, 잉어, 메기류, 도미 그리고 상어 등에서 IGF-I cDNA 염기서열이 결정되었고(Bern 등 1991 ; Cao 등 , 1989 ; Nagamatsu 등 , 1991 ; McCormick 등, 1992 ; McRory와 Sherwood, 1994 ; Daguay 등 , 1995 ; Liang 등 , 1996), 사람을 비롯한 포유류 IGF-I과 약 80%의 상동성을 나타내고 있다.

어류 IGF-I의 생물학적, 구조적 및 면역학적인 연구를 위해서는 많은 양의 IGF-I를 얻는 것이 필요하다. 지금까지 salmon, trout와 hagfish의 재조합체 IGF 펩타이드를 대장균에서 발현시켜왔다(Moriyama 등, 1993 ; Gentil 등, 1996 ; Upton 등, 1997). 하지만 대부분의 실험들에서는 비어류 단백질과 항체를 사용하여 성장을 조절하는 작용들을 어류의 생리학적 면에서 연구되어 왔다(Madsen and Bern, 1993 ; McCormick 등, 1992). 장기간에 걸친 어류생리학적 면에서의 IGFs 연구를 위해서는 IGF-I의 폴리펩타이드를 다량으로 얻어 단일항체 제조 및 다양한 어류에 투여하여 이와 관련된 메커니즘을 밝히는 것이 매우 중요하다. 따라서 정제의 간편성과 상대적으로 다량의 수용성 단백질의 획득을 만족시키기 위해 carrier sequence가 포함된 발현벡터를 사용하였다. 이러한 벡터들에서 발현된 목적단백질들은 polyhistidine tags(E. Hochuli등 1988), FLAG-tags(B.L. Brizzard등, 1994), thioredoxin(E.R. LaVallie등 ,1993), Protein A(J. Nilsson등, 1994), *Strep*-tag(J. Nilsson등, 1996), Maltose-binding protein(H. Bedouelle, 1988)과 함께 융합단백질로 발현되었다. 이미 recombinant coho salmon IGF-I(Moriyama등, 1993),

recombinant barramundi IGF-I(Brian G. Degger, 1999)과 대표적 국내 양식어종인 조피볼락의 재조합체 IGF-I 폴리펩타이드가 polyhistidine을 tag으로 발현시키는 pET vector(Novagen, USA)를 통해 발현 및 정제되어 이의 생물학적 활성이 검증되었다. 하지만 발현된 단백질들의 대부분이 불수용성 단백질이었기 때문에 불수용성 단백질을 refolding 시키기 위해 강력한 변성제를 사용하였고, 여러 단계의 정제과정으로 인해많은 시간과 노력을 요구하였다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 Gene fusion system(Glutathione-S-trnasferase)을 바탕으로 재조합체 단백질이 발현되었다. GST gene fusion system은 효율적이고 간단하게 재조합체 단백질을 “native”형태로 정제할 수 있는 방법이다. pGEX vector를 바탕으로 재조립된 플라스미드는 tac promoter를 가지고 있어서 비교적 저농도의 화학적 유도체인 IPTG에 의해 재조합체 융합단백질을 over-expression시키고, 정제단계도 간단하도록 하였다(Donald B. Smith등, 1988 ; John Hartman등, 1991), 이미 재조합체 tilapia IGF-I이 GST gene fusion system을 통해 "native"형태로 발현되어 정제까지 이루어졌다(Jyh-Yih Chen등, 2000).

조피볼락 IGF-I의 활성도메인 B, C, A와 D 를 포함하는 cDNA를 pGEX-2T벡터에 결합시켜 glutathione-S-tranferase(GST)와 함께 융합되어 발현 되도록 하였다. 발현된 융합단백질은 수용성과 불수용성의 두가지 형태였으며, 상대적인 양은 불수용성이 많았다. 하지만 수용성 단백질을 GST에 친화적인 affinity 칼럼으로 정제한 결과, “native” 형태를 가진 많은 양의 융합단백질을 회수하였고, 이융합단백질을 사용하여 토끼에서 GST(glutathione-S-tranferase)와 조피볼락 IGF-I폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체를 제조하였다. 또한 GST와 목적단백질 사이에 존재하는 cleavage site를 특이적으로 인식하여 절단시키는 효소인 thrombin을 사용하여 칼럼상에 고정된 융합단백질에 처리함으로써 순수한 재조합체 조피볼락 IGF-I만을 정제할 수 있었다.

GST gene fusion system을 바탕으로 발현된 재조합체 단백질들은 변성되지 않은 “native”형태로 간단하게 정제하여 사용할 수 있게 하도록 한다. 이러한 발현체

계를 다양한 어종의 어류 IGF-I 및 성장 인자에 적용시킨다면 제한적이었던 어류의 생리학적인 연구, 병리학적인 연구를 수행할 수 있을 것이다. 특히 어류 소비량이 큰 국내에서 어류 IGF-I 같은 성장 촉진인자를 대량 생산하여, 사료단백질에 적용한다면 수산양식산업에 큰 변화를 가져올 것이다. 따라서 본 연구는 대표적 양식어종인 조피볼락의 IGF-I의 클로닝과 발현 및 정제를 통하여 해양생물공학 연구의 기반이 되며 해양산업적으로는 고부가치의 생산성을 창출할 수 있을 것이다.

제2장 실험 방법

1. 재료

1.1 시약 및 기구

실험에 사용된 균주는 cloning용도인 *E. coli* JM109(Promega, USA)와 발현용인 *E. coli* BL21(DE3)를 Pharmacia Biotech(USA)에서, cloning용 vector는 pGEM-T easy vector(Promega, USA)와 발현용 vector는 pGEX-2T(Pharmacia Biotech, USA)를 구입하여 사용하였다. DNA 조작에 사용된 효소는 EcoR I, BamH I, Tag DNA polymerase, T4 DNA Ligase(TaKaRa, Japan)이며 균배양에 사용된 배지는 bacto-agar, bacto-tryptone, yeast extract, bacto-agar(Difco, USA)였다. Cloning을 위해 형질전환된 균선별에 사용된 chemicals은 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside(X-gal), isopropyl thio- β -D-galactoside(IPTG), ampicilline(Sigma, USA)이었다. DNA와 RNA 전기영동에는 agarose gel(BMA, USA)을 사용하였다. DNA preparation에는 plasmid purification kit(Nucleogen, Korea)을, 젤에서 DNA 용출시에는 gel extraction kit(Qiagen, USA)를 사용하였다. 발현된 단백질을 정제하기 위해 사용된 affinity column은 Redipack Purification Column(Pharmacia Biotech)이었고 융합단백질의 용출과 절단시에 GSH(L-glutathione reduced)와 bovine plasma thrombin(Sigma, USA)을 사용하였다. 발현된 특이적인 단백질을 검출하기 위하여 Western blot에서 사용된 다클론성 1차 항체는 anti-barramundi IGF-I(Gropep, Australia)이며 2차 항체는 alkaline phosphatase conjugate인 anti-rabbit IgG(Sigam, USA)였다. Alkaline phosphatase에 대한 발색시약은 NBT(nitro blue tetrazolium)와 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate)를 Promega(USA)에서 구입하였다. DNA와 RNA 전기영동에 사용된 mini gel migration system에는 Mupid-2(Cosmo Bio Co. LTD, Japan)와 RunOne™ Electrophoresis cell(AmbiTec, USA)이었다. SDS-PAGE상에 분리된 단백질을 PVDF membrane에 전이시키기 위해서

semi-dry blotting system(The W.E.P. company, USA)을 사용하였다. 원심분리기는 micro 17R(Hanil, Korea)과 Ultra centrifuge(Beckman, USA)를 사용하였다. PCR(Polymerase chain reaction)과 RT-PCR(Reverse transcriptase-PCR) 및 sequencing에 사용된 primers들은 genotech(Korea)에 의뢰하여 합성하였거나, Novagen(USA)에서 구입하였다. 그리고 발현하여 정제시킨 융합단백질에 대한 항체는 Koma Biotech에 의뢰하여 제작하였다. 그 외 기타시약은 전기영동용이나 특급시약을 사용하였다.

2. 실험방법

2.1 올리고뉴클레오티드 합성

간조직에서 추출한 total RNA를 사용하여 조피볼락의 활성도메인만을 포함한 IGF-I DNA를 증폭하기 위해, PCR primers를 genotech(Korea)에 의뢰하여 합성하였다. Primers는 조피볼락 IGF-I의 B, C, A, D domain중 B와 D 염기서열의 일부 말단만을 바탕으로 합성하였다(Fig. 1).

B domain primer 5' - CGGAATTTCATATGGGACCGGAGACCCTGTGGGGA -3'

D domain primer 5' - CGGAATTCC**T**CATGCTTTGCTAGTCTTGGCAGG - 3'

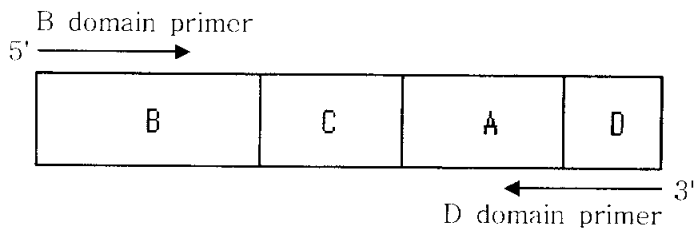


Fig. 1. Oligonucleotides for RT-PCR

The PCR cloning primers were designed for obtaining the mature tilapia IGF-I nucleotide sequence based on known tilapia IGF-I B and D domains.

상기의 두 primers는 각각 B, D domain 말단의 일부 서열과 EcoR I(이탤릭체) 제한효소 사이트를 포함하고 있으며, D domain primer에만 EcoR I 제한효소 사이트 바로 앞에 종결 코돈(TGA)을 삽입시켰다.

2.2 조피볼락 간에서 Total RNA 추출

조피볼락의 간을 적출하여 총RNA를 추출하기 위해 부경대학교 양어장의 순환식

탱크에서 양식중이던 조피볼락을 무작위로 선택하여 3-Aminobenzoic acid ethyl ester(Sigma)에 마취시켜 간 적출 후 액체질소에 급속동결하고 -70℃에서 RNA추출 전까지 보관하였다. RNA 추출시 사용된 초자기구들은 -180℃에서 2시간 건열 멸균 하고 모든 시약들은 DEPC 처리를 하여 RNase 작용을 방지하였다. 간조직으로부터 total RNA는 guanidium thiocyanate homogenate를 낮아진 pH에서 phenol과 chloroform으로 추출하는 방법을 선택하였다(Chomczynski & Sacchi). 액체질소에 급속 동결된 조피볼락의 간 500mg에 GT 추출용액(4M Guanidinium thiocyanate, 25mM Sodium citrate pH 7.0, 0.5% Sarcosyl, 0.1M 2-Mercaptoethanol) 2ml을 넣고 조직균질기(Wheaton Co. USA)를 얼음에 꽂아 파쇄하였다. 파쇄한 액 700 μ l를 멸균된 2ml 튜브에 옮긴 후, 0.1배인 2M Sodium acetate(pH 4.0) 70 μ l, 동일한 부피의 페놀 : 클로로포름(5:1, pH 4.7) 700 μ l, 0.2배인 클로로포름 : 이소아밀알콜(49:1) 140 μ l 용액과 혼합하여 얼음에 15분간 방치 후 12,000rpm에서 4℃로 15분간 원심분리하였다. RNA가 포함된 상층액만을 조심해서 취하고 차가운 이소프로판올과 RNA precipitation 용액을 함께 혼합하여 실온에서 10분간 방치 후 12,000rpm으로 4℃에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전된 RNA 잔사를 75% 에탄올로 2회 세척한 다음, 에탄올이 완전히 제거되도록 건조시키되 잔사가 완전히 마르지 않도록 하였다. 0.1% Diethyl pyrocarbonate(DEPC)가 포함된 증류수 100 μ l에 RNA 잔사를 녹이고 RNA농도를 정량하였다. RNA 정량은 분광광도계로 260 및 280nm에서 흡광도를 측정하여 RNA함량 및 순도를 계산후 사용전까지 -70℃에 보관하였다.

2.3 조피볼락 IGF-I 유전자 증폭

조피볼락 cDNA합성 및 PCR까지는 onestep RT-PCR kit(Qiagen, USA)를 사용하였다. 멸균된 PCR 튜브에 onestep RT-PCR enzyme mix 2 μ l, 5X onestep RT-PCR buffer 10 μ l, dNTP mix 2 μ l, RNase inhibitor 1 μ l, B domain primer 2 μ l(20pmol), D domain primer 2 μ l(20pmol), RNase-free water 30 μ l, 분리한

total RNA 10 μ g를 혼합하여 50 μ l로 정량후, mineral oil을 한방울 떨어 뜨리고 thermal cycler조건으로 반응을 실시하였다. onestep RT-PCR 조건은 50 $^{\circ}$ C에서 30분간 정치하여 역전사 반응이 일어나게 한 후, 95 $^{\circ}$ C에서 15분간 정치하여 Taq DNA polymerase가 열에 의한 반응을 시작하고 역전사 효소는 비활성화 되게 하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 변성, 62 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 73 $^{\circ}$ C에서 1분간 중합시키는 과정을 한 주기로 35회 반복하고, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 정치하여 반응을 종결시켜 미넬랄 oil을 제거후 사용전까지 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

2.4 PCR 산물의 클론확인

PCR 산물을 1.5% 아가로즈젤에 전기영동 후, gel extraction kit(Qiagen, USA)를 사용하여 DNA를 용출시켰다. 전기영동한 PCR 산물을 젤로부터 분리하기위해 젤 부계의 3배 부피인 solubilization buffer와 2 μ l suspension beads를 가하여 55 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켜 젤을 녹인 후, 12,000rpm에서 10초간 원심분리하여 DNA가 결합된 beads를 모았다. 상층액을 제거하고 남은 잔사에 500 μ l solubilization buffer를 다시 넣고 강하게 vortexing하여 고루 섞이도록 하고 12,000rpm에서 10초간 원심분리하였다. 다시 상층액을 제거하고 Wash buffer 500 μ l를 사용하여 위와 동일한 과정으로 원심분리를 통한 2회 세척 후, 30분 동안 실온에서 건조시켰다. 건조된 잔사를 멸균수 10 μ l에 녹이고 2분간 원심분리하여 beads가 섞이지 않도록 상층액만을 조심해서 회수하였다. 회수된 DNA는 전기영동하여 대략적인 농도를 확인하였다. 조피볼락 IGF-I cDNA를 subcloning하기 위하여 pGEM-T easy vector(Promega, USA) 1 μ l(100ng), T4 DNA ligase(Takara, Japan) 1 μ l, 2X Rapid ligation Buffer 5 μ l와 PCR product를 함께 혼합하여 10 μ l가 되게 정량후 16 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 반응시켰다. 이 산물을 *E. coli* JM109 competent cell 200 μ l와 섞어서 얼음에 30분간 정치시킨 후, 42 $^{\circ}$ C에서 90초간 열처리하고 얼음에서 2분간 정치시킨 다음, 2X YT(1.6% bacto-trypton, 1% yeast

extract, 0.5% NaCl)배지 200 μ l를 가하여 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. α -complementation에 의한 콜로니를 선별하기 위하여 0.1M IPTG 용액 20 μ l와 X-gal 용액 30 μ l를 섞어서 ampicillin이 50 μ g/ml 함유된 luria broth agar plate(LB agar plate ; 1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% NaCl bacto-agar)에 도말하여 37℃에서 12시간 배양하였다.

배양된 평판배지로부터 흰색 콜로니를 ampicillin이 함유된 LB배지(1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)에 접종한 후, 37℃, 270rpm에서 16-18시간 동안 배양하였다. 배양액을 1.5ml 튜브에 넣어 원심분리하여 균체를 회수하고 플라스미드 DNA의 분리는 modified alkaline lysis method(Birnboim과 Doly, 1979 ; Ish-Horowicz와 Burke, 1981)를 사용하였다. 즉, 원심분리하여 침전시킨 균체에 140 μ l의 solution I(50mM glucose, 25mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH8.0)으로 현탁시키고, 240 μ l의 solution II(0.2 NaOH, 1% SDS)를 섞어서 얼음 위에서 5분간 균체의 세포막을 용해시킨 후, 210 μ l solution III(4M potassium acetate, 2M acetic acid, pH 4.8)를 넣고 얼음 위에서 5분간 방치시킨 다음, 4℃, 12,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 페놀 : 클로로포름(5:1) 용액과 클로로포름 : 이소아밀알콜(49:1) 용액으로 단백질을 제거한 후 다시 원심분리하여 상층액을 취하였다. 상층액에 동량의 이소프로판올을 첨가하여 교반한 후, -20℃에서 1시간 방치한 다음, 12,000rpm에서 15분(4℃)간 원심분리하여 플라스미드 DNA를 침전시켰다. 침전된 플라스미드 DNA를 70% 에탄올로 세정한 다음, 건조시켜 100 μ l TE buffer에 녹였다. 여기에 100 μ g의 RNase A를 넣어 37℃에서 1시간 방치하여 RNA를 제거하고, 0.7배 부피의 polyethyleneglycol(PEG : #8000, Sigma co., USA)용액을 가하여 교반하고 얼음에서 1시간 방치한 다음, 12,000rpm에서 15분간 원심분리하여 플라스미드 DNA를 침전시켰다. 침전된 플라스미드 DNA를 70% 에탄올로 세정한 다음 20 μ l 멸균수에 녹였다. 그 중 2 μ l를 취하여 제한효소 EcoR I과 반응시켜 절단한 다음, 1.5% 아가로스 젤에 전기영동하여 UV transilluminator에서 조파볼락 IGF-I cDNA에 해당하는

는 DNA절편을 확인하였다. 또한 구축된 pGEM-T easy/KR IGF-I 플라스미드를 의과학 연구소(대전)에 sequencing의뢰하여 vector에 삽입된 조피볼락 IGF-I DNA의 염기서열이 이미 보고된 조피볼락 IGF-I DNA 염기서열과 일치하는지 확인하였다.

2.5 발현 플라스미드 구축

재조합체 단백질을 *E. coli* 에서 발현시키기 위해 RT-PCR로 합성증폭한 조피볼락 IGF-I DNA를 pGEX-2T(Pharmacia Biotech, U.S.A)에 삽입하여 pGEX-2T/KR IGF-I 플라스미드를 조립하였다. pGEX-2T vector 1 μ g과 EcoR I 제한효소 15units, 10X 제한효소 반응 완충용액 1 μ l를 넣고 멸균수로 최종 부피를 10 μ l로 만든 후, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시켜 양말단에 EcoR I이 노출되도록 하여 조피볼락 IGF-I DNA가 결합할 수 있는 자리를 만들어 놓는다. 60 $^{\circ}$ C에서 15분간 처리하여 제한 효소를 비활성화 시킨 후 10X loading완충용액을 첨가하여 섞고 1.2% agarose gel에 전기영동을 실시하여 pGEX-2T vector가 linear form으로 풀어졌는지 확인하였다. 또한 pGEM-T easy vector에 subcloning된 KR IGF-I DNA를 EcoR I 제한효소로 처리 절단하여 agarose gel에 전기영동후 gel에서 gel extraction kit를 사용하여 회수하고 EcoR I 제한효소 사이트가 노출된 각각의 pGEX-2T vector와 KR IGF-I DNA 혼합용액 7 μ l와 10X T4 DNA ligase buffer(TaKaRa, Japan) 1 μ l, T4 Ligase(TaKaRa, Japan) 1 μ l를 혼합하고 16 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 반응시켜 ligation 되도록 하였다. 반응물을 *E. coli* JM 109에 형질전환시키고 형질전환된 *E. coli* 로부터 plasmid를 실험방법 2.4에서 시행한 plasmid preparation 방법으로 분리하고, KR IGF-I DNA가 pGEX-2T vector에 삽입되었는지의 여부를 위와 같이 동일한 방법으로 EcoR I 제한효소와 반응시켜 각 DNA 크기에 해당하는 밴드가 나왔는지 확인하였다. 또한 조립된 pGEX-2T/KR IGF-I 플라스미드를 purification plasmid kit(Genotech, Korea)로 정제하여 의과학 연구소에 sequencing의뢰하였다. 분석된 염기서열을 바탕으로 조피볼락 IGF-I

DNA가 GST발현 방향 말단에 바로 삽입되었는지 확인하였다.

2.6 재조합체 조피볼락 IGF-I 유전자의 발현

pGEX-2T/KR IGF-I 플라스미드를 가진 균을 2X YTA배지 5ml에 접종하여 전배양 시킨 후, ampicillin이 $50\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 함유된 2X YTA배지 500ml에 1/100으로 희석하여 600nm에서 흡광도가 1.1이 될 때까지 37°C , 270rpm으로 진탕배양한 다음, IPTG를 0.1mM 농도로 첨가하여 발현을 유도시켰다. IPTG 첨가 후 22°C 에서 3시간 배양한 다음, 6,000rpm으로 4°C 에서 15분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 균체는 1X PBS(10X PBS; 1.4M NaCl, 27mM KCl, 101mM Na_2HPO_4 , 18mM KH_2PO_4 [pH7.3]) 25ml에 현탁시켰으며 대장균의 세포막을 파괴시키기 위하여 -70°C 에 동결시키고 30°C 의 따뜻한 물에서 해동하는 과정을 3회 반복 후, 초음파 파쇄기로 균체액내의 chromosomal DNA와 RNA가 파괴되어 점성이 제거될 때까지 파쇄후, 최종농도가 1%가 되도록 Triton X-100을 넣고 30분간 실온에서 약하게 교반시켜 충분히 혼합되도록 하였다. 균체액을 5,000rpm에서 10분간(4°C) 원심분리후 세포찌꺼기들이 제거된 상층액을 회수하고 12,000rpm에서 15분(4°C)간 다시 원심분리하여 가용성과 불용성 단백질로 분리하여 정제전까지 -70°C 에 보관하였으며 발현된 융합 단백질을 GST/KR IGF-I융합 단백질이라 명명하겠다.

이들 단백질들은 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 확인하였으며, 전기영동 장치는 mighty small 2(Hofer Co., USA)를 사용하였다. Separating gel의 농도는 15%이고, 수용성 단백질 $10\mu\text{l}$ 를 2X Sample buffer 125mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, (0.2% bromophenol blue) $10\mu\text{l}$ 와 섞고 65°C 에서 10분간 끓인 후, 젤에 로딩하여 30mA로 전기영동하였다. 전기영동이 끝나면 30분간 고정(7% acetic acid, 40% methanol, 53% ddH₂O)후 염색(0.025% coomassie brilliant blue R 250, 40% methanol, 7% acetic acid)하고 탈색(10% methanol, 10% acetic acid)하였다.

위와 동일한 방법으로 전기영동후, 항체를 이용한 western immunoblot로 발현된

GST/KR IGF-I 융합단백질을 확인하였다. SDS-PAGE상에 분리된 단백질은 smi-dry Transfer Unit에서 70mA, 90분간 immobilon PS^Q membrane(Millipore, pore size; 0.1 μ m, USA)에 blotting시켰다. 이때 표준분자량은 rainbow low molecular marker(Pharmacia Biotech)를 사용하였다. blotting된 Membrane을 1X TBS(50mM Tris, 200mM NaCl, pH7.4)에 세척하고, 3% bovine serum albumin (BSA)으로 30분간 blocking시킨 후, 1:1500으로 희석시킨 anti-barramundi IGF-I(1차 항체)를 넣어 12시간동안 실온에서 반응시켰다. 1X TBS + 0.1% IGEPALCA-630 + 0.03% Triton X-100으로 10분간 3회 세척하고 다시, 1X TBS로 1회 세척후, 1:1500으로 희석시킨 2차 항체(anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate, Sigma Co., USA)를 넣어 3시간 반응시켰다. 다시 1X TBS + 0.1% IGEPALCA-630 + 0.03% Triton X-100으로 10분간 3회 세척후 1X TBS로 1회 세척하고 AP buffer(100mM Tris-base, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂)로 membrane을 평형화 시킨 다음, NBT/BCIP(Promega Co., USA)용액으로 발색시켰다. 보라색의 밴드를 확인후, stop buffer(20mM Tris, 5mM EDTA, pH8.0)로 반응을 종결시켰다.

2.7 Fusion protein(GST/KR IGF-I)의 정제

GST/KR IGF-I 융합단백질이 포함된 수용성 단백질 약 25ml을 0.45 μ m 실린지 필터로 여과시킨 후, Redipack Purification Module(Pharmacia Biotech)을 이용하여 정제하였다. Redipack Purification Column을 1X PBS(10X PBS; 1.4M NaCl, 27mM KCl, 101mM Na₂HPO₄, 18mM KH₂PO₄ [pH 7.3]) 50ml로 세척하여 평형화 시킨 후, 0.45 μ m 실린지 필터로 여과시킨 수용성 단백질을 칼럼으로 정제하였다. 다시 1X PBS 50ml로 충분히 씻어 비특이적인 단백질들을 제거하고 reduced glutathione(10mM Glutathione, 50mM Tris-HCl, pH8.0) 2ml을 칼럼에 10분간 충전시켜 용출하는 과정을 실온에서 3회 반복하였다. 회수한 GST/KR IGF-I 융합단백질을 KOMA Biotech(Korea)에 의뢰하여 항 GST/KR IGF-I 항체를

제조하였고 이를 사용하여 GST/KR IGF-I 융합단백질에 특이적으로 결합하는지 확인하기 위하여 실험방법 2.5처럼 western immunoblot를 실시하였다.

2.8 성숙체 조피볼락 IGF-I 폴리펩타이드 정제

실험방법 2.6과 같이 GST/KR IGF-I 수용성 융합단백질을 RediPack Purification column에 정제하여 수지에 흡착시킨 후 1X PBS로 충분히 씻어 칼럼 내의 불순물을 제거하고 Thrombin 용액 100 μ l(500 cleavage units/1ml H₂O)와 1X PBS 1900 μ l의 혼합액을 칼럼에 충전시키고 실온에서 12시간동안 반응시켰다. Thrombin에 의해 절단된 KR IGF-I polypeptide를 1X PBS 3ml로 용출시킨후 reduced glutathione을 사용하여 실험방법 2.6처럼 칼럼에 흡착된 GST를 제거하였다.

2.9 순도확인

재조합체 조피볼락 IGF-I(이하 rKR IGF-I)이 포함된 획분을 15% SDS-PAGE에 전기영동 하여 단백질 염색과 western immunoblot로 확인하여 순도를 결정하였다 (Meyer등, 1965).

제3장 결 과 및 고 찰

1. 조피볼락 IGF-I cDNA 합성 및 증폭

IGF-I는 GH(growth hormone)가 성장을 촉진시키도록 하는 매개체이며 간에서 일차적으로 생산되어 순환되기 때문에(Duan, 1997 ; Kelly등, 2000 ; LeRoith등, 2001), 어류의 장기들 중에서 total RNA 추출을 위해 간을 선택하였다. 추출된 total RNA를 RT-PCR에 사용하기전, 분해되었는지를 확인하기 위해 1.2% 포름알데히드-아가로즈젤에 전기영동하여 28S와 18S RNA 밴드가 뚜렷이 나타나는 것을 확인후 분해되지 않은 것으로 판단하였다. 추출된 총 RNA를 onestep RT-PCR을 위한 주형으로 사용하여 조피볼락 IGF-I 활성도메인 B, C, A, D만을 포함하는 cDNA를 합성하여 증폭시키기 위해, 활성도메인 양말단의 일부를 포함하는 B와 D 도메인에 상보적인 primers를 이용하여 one step RT-PCR을 실시하였다(Chen J. Y., 2000). 증폭된 PCR 산물에 조피볼락 IGF-I DNA가 존재하는지 확인하기 위해 1.2% 아가로즈젤에 전기영동하여 200bp의 단일밴드를 확인하였다(Fig. 2). 그림 2의 Lane 1과 2에 보이는 크기는 이미 밝혀진 조피볼락 IGF-I cDNA의 활성도메인과 거의 비슷한 크기임을 비교 확인하였다(Moriyama등 1993, Kwon. M. J. 2002). 따라서 증폭된 조피볼락 IGF-I DNA에는 활성도메인 B, C, A, D domain뿐만 아니라, 양말단에 EcoR I 제한효소 자리와 D domain이 끝나는 부분에는 종결 코돈(TGA)이 포함되어 cloning을 시키기 위한 조건이 갖추어졌다.

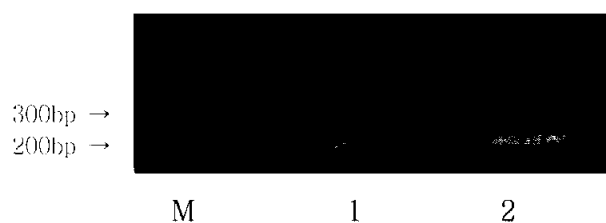


Fig. 1. KR IGF-I DNA on 1.2% agarose gel

KR IGF-I DNA products of about 200bp size was amplified by one step RT-PCR.

M : 100bp DNA ladder

Lane 1, 2 : PCR product containing KR IGF-I DNA

2. 발현벡터 구축

조피볼락 IGF-I cDNA의 전체 염기서열을 기초로 하여 활성 도메인 B, C, A, D만을 대장균에서 발현시키기 위하여 onestep RT-PCR로 증폭된 조피볼락 IGF-I DNA를 pGEM-T Easy vector(Promega, USA)에 ligation하여 cloning용 플라스미드를 구축한 다음(Zhou M.-Y등, 1995), *E. coli* JM 109에 형질전환 시켰다. 제한효소 EcoR I으로 처리하여 pGEM-T Easy vector와 조피볼락 IGF-I DNA에 각각 해당하는 3Kbp와 200bp를 전기영동으로 확인했지만, 같은 크기의 외래 DNA가 삽입되었을 가능성도 있으므로 T7 RNA polymerase promoter를 사용하여 의과학 연구소(대전)에서 염기서열분석한 결과, 활성도메인만을 포함하는 조피볼락 IGF-I DNA가 삽입되었음을 확인하였다(Fig. 3).

GST gene fusion system을 바탕으로 재조합체 단백질을 발현시킬 수 있는 벡터를 구축하기 위하여 이미 조립된 pGEM-T easy/KR IGF-I 플라스미드 가지고 있는 균을 배양하여 DNA preparation을 실시하였다. 제한효소 EcoR I을 처리하여 다량의 조피볼락 IGF-I DNA를 회수하고, 이미 제한효소 EcoR I으로 처리되어 linear form인 pGEX-2T vector와 ligation을 실시하여 융합단백질을 발현시킬 수 있는 pGEX-2T/KR IGF-I 벡터를 구축하였다(Fig. 4). 조립된 pGEX-2T/KR IGF-I 플라스미드를 제한효소 EcoR I으로 절단시켜 약 5.1kb 인 pGEX-2T와 200bp의 KR IGF-I DNA를 확인하고(Fig. 5) sequencing용 pGEX-2T 3'와 5' primers를 사용하여 의과학 연구소에서 염기서열을 분석한 결과, thrombin이 인식할 수 있는 proteolytic site를 사이에 두고 GST말단에 ligation되었음을 확인하였다.

지금까지 재조합체 어류 IGF-I을 GST gene fusion system을 통해 발현시키는 경우는 극히 드물게 보고되었다. 보통 많은 양의 IGF-I을 얻어 생리적인 연구나 의학적인 연구목적에 사용하기 위해서 외래 단백질을 대장균(Moks등, 1987a ; Wong et al, 1988 ; Forsberg등, 1990)이나 효모(Gellerfors등 1989, Elliott등 1990) 같은 다른 체계를 가진 균주를 사용할 수 있기 때문에 재조합체 DNA기술은 여러 가지들 중 선택적인 방법의 하나가 되었다. 본 연구를 포함해 모든 재조합체

IGF-I 발현이 원핵생명체인 효모보다 진핵생명체인 *E. coli*에서 이루어지는 것은 실험상의 간편한 조작성과 배양이 쉽기 때문이며, 또한 매우 많은 양의 재조합체 단백질을 얻을 수 있기 때문이다. 대장균에서 생산된 여러 종류의 재조합체 IGF-I 은 secretion leader sequences가 결합되어 분비되거나(Wong등, 1988), affinity tag과 융합되어 발현된다. 이러한 방법들은 융합단백질들이 바로 봉입체 단백질로 발현되도록 하여 폴리펩타이드의 분해를 막을 수 있게 한다(Saito등, 1987). 하지만 매우 긴 leader sequence와 정제후 tag을 자르는 단계(Peters등, 1985 ; Moks등, 1987b)및 생물학적인 활성을 가지도록 refolding과정을 요구하게 된다. GST gene fusion system도 상기의 affinity tag을 따르지만 이미 tilapia IGF-I 폴리펩타이드를 "native" 형태로 2mg을 정제한 것이 보고되어 있기 때문에(Chen J.-Y., 2000) 이와 같은 system을 이용한 다양한 어종의 재조합체 단백질 발현들이 이루어질 것이다.

GGA CCG GAG ACC CTG TGT GGG GCG GAG CTG
GTC GAC ACA TTG CAG TTT GTG TGT GGA GAG
AGA GGC TTT TAT TTC AGT AAA CCA GGC TAT
GGC CCC AAC GCA CGG CGG TCA CGT GGC ATC
GTG GAC GAG TGC TGC TTC CAA AGC TGT GAG
CTG CGG CGC CTG GAG ATG TAC TGT GCA CCT
GCC AAG ACT AGC AAA GCA

Fig. 3. Korea rockfish IGF-I cDNA containing B to D domains.

The KR IGF-I cDNA was constructed with pGEM-T easy vector. Then this was sequenced by T7 polymerase promoter primer.

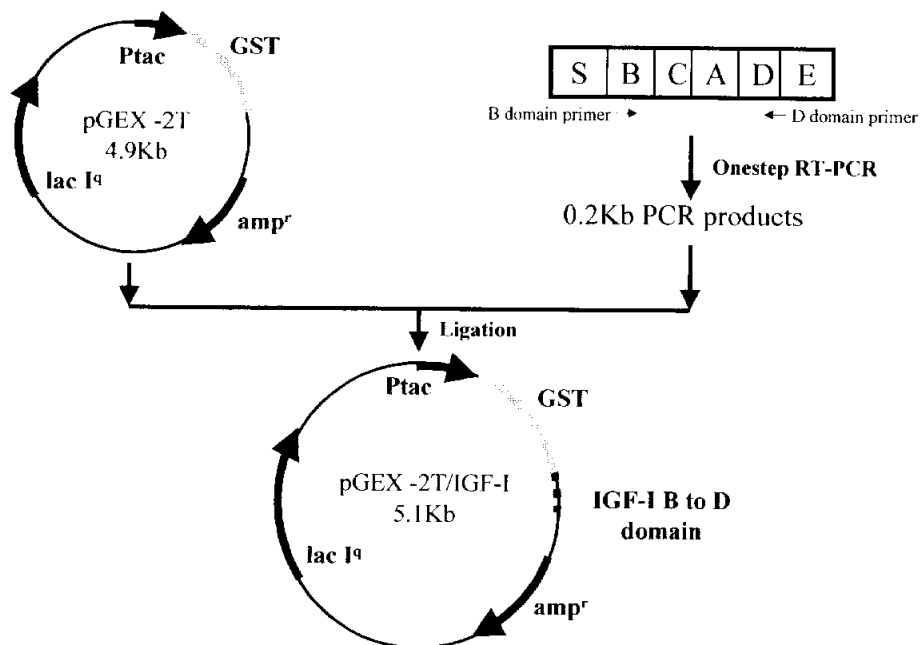


Fig. 4. Construction of the expression plasmid for korea rockfish IGF-I mature peptide(from B to D domain).

The IGF-I B to D domains were ligated with the histidine gene, and this produced a fusion protein.

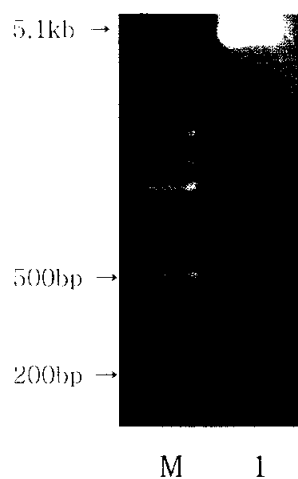


Fig. 5. The construction of expression vector harboring KR IGF-I cDNA(down) was cleaved from ligated pGEX-2T vector(up).

M : 100bp DNA ladder

Lane 1 : KR IGF-I and pGEX-2T

3. 대장균내 융합단백질의 발현 및 정제

포유동물과의 상황을 비교해보면, 어류 IGFs(Insulin-like growth factors)가 성장과 발생에 관여하는 역할을 연구한 내용은 매우 부족하며, 일부의 어류 재조합체 IGF-I만을 사용하여 실험이 이루어졌다(Moriyama등, 1993, 1995). 그러나 비어류 IGF-I 처리만으로도 IGF-I이 어류에서 중요하다는 것이 점점 밝혀지고 있다. 실제로, in vivo의 연구에서 GH-IGF axis가 어류에서 발견되었으며 포유동물에서 발견된 IGF-I의 성장촉진역활이 어류에서도 확인되었다(McCormick등, 1991 ; Moriyama, 1995). 지금까지 연어, 송어, 먹장어, 틸라피아, 조피볼락의 재조합체 IGF-I이 대장균에서 발현되어 어류의 생리학적, 양식학적 면에서 연구가 이루어졌다(Moriyama등, 1993 ; Gentil등, 1996 ; Upton등 1997 ; Chen J.-J., 2000 ; Kwon, 2002). 하지만 발현된 대부분의 재조합체 IGF-I 단백질들이 불수용성 형태를 가져서 guanidine이나 urea같은 변성제를 사용하여 refolding시켰고 여러 단계의 정제 과정을 거쳐야 했다.

GST gene fusion system을 바탕으로 발현된 재조합체 단백질들은 수용성이 되도록 유도됨으로서 "native"형태를 가지게 된다. 이 상태에서 곧바로 친화적 칼럼으로 정제를 할 수 있도록 실험의 간편성과 효율성을 증가시킨 실험법이다(Donald B. Smith, 1988). pGEX 발현 벡터는 기생성의 helminth *Schistosoma japonicum*에 의해 encoding된 26kDa의 GST(glutathione-S-transfersase)가 외래단백질과 융합된 형태로 발현되도록 만들어진 plasmid expression vecotor이다. 발현된 대부분의 융합단백질들은 수용성 형태로 존재하며 affinity column이나 immobilised glutathione을 사용함으로써 비변성 상태로 정제할 수 있다. 이 벡터는 GST carrier가 thrombin이나 factor Xa 와 같은 특정 부위를 특이적으로 인식하여 절단하는 단백질 분해효소에 의해 융합단백질로부터 절단될 수 있도록 구축되어져 있으며 분해효소에 의해 절단되고 남은 carrier나 절단되지 못한 융합단백질들은 glutathione-agarose나 sepharose에 흡착되도록 하였다. 흡착된 GST나 융합단백질은 reduced glutathione에 의해 용출되도록 하였다. 따라서 이러한 특징을 갖는

발현vector를 사용하여 재조합체 조피볼락 IGF-I이 발현되도록 하였다.

조피볼락 IGF-I DNA는 상기의 발현벡터 조건을 갖춘 pGEX-2T vector에 삽입되었다. 단, pGEX-2T vector는 thrombin으로만 융합단백질로부터 목적 단백질과 carrier인 GST가 절단되도록 하는 특징을 가지고 있다. 구축된 pGEX-2T/KR IGF-I 플라스미드를 가진 균으로부터의 배양액에서 수용성 단백질을 분리하고 칼럼에 고정된 융합단백질을 용출시킬 수 있는 GSH(L-reduced glutathione)를 처리하여(Simons등, 1977 ; Mannervik, 1985) 용출된 융합단백질을 15% SDS-PAGE에 전기영동한 결과, 약 33kDa의 밴드가 확인되었다(Fig. 6). 정제된 밴드가 재조합체 조피볼락 IGF-I 폴리펩타이드를 가지고 있는지 확인하기 위하여 anti-barramundi IGF-I항체를 사용하여 western immunoblot으로 확인한 결과 SDS-PAGE에서 확인된 동일한 크기의 33kDa이 확인되었다(Fig. 7). 이러한 결과는 조피볼락 IGF-I 염기서열과 대부분 일치하는 틸라피아 IGF-I DNA가 삽입된 pGEX-2T vector에서 발현된 융합단백질과 같은 크기였다(Chen J.-J., 2000). 정제된 융합단백질에 대한 항체를 생산하기위해 KOMA Biotech(Korea)에 의뢰하여 rabbit에서 whole serum형태로 제조되었고 순도를 결정하기 위해 항원으로 사용되었던 융합단백질에 대하여 western immunoblot을 실시하여 33kDa에 해당하는 밴드가 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 8). 이 항체가 가지는 특징은 GST와 조피볼락 IGF-I 펩타이드에 특이적으로 결합하기 때문에 GST와 조피볼락 및 다른 어종의 IGF-I을 면역학적인 방법으로 관찰할 수 있을 것으로 사료된다.

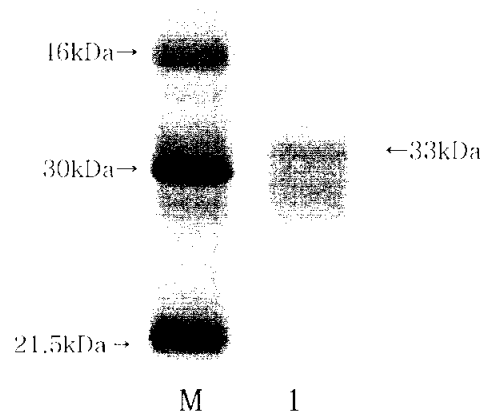


Fig. 6. The expression protein with the pGEX-2T ligated KR IGF-I insert.

Fusion protein was purified by RedPack Module. This protein of about 33kd size was analyzed by SDS-PAGE on 15% gel.

M : Low Rainbow marker

1 : GST/KR IGF-I fusion protein

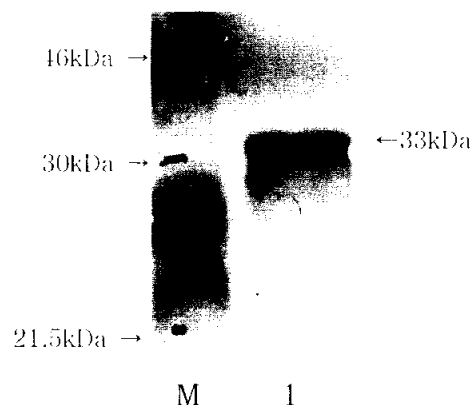
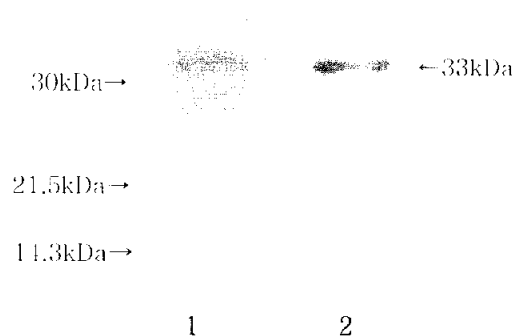


Fig. 7. Western immunoblot analysis of fusion protein

The expressed fusion proteins were submitted to 15% SDS-PAGE and transferred to a immobilon-PS² membrane. The membrane was incubated with anti-barramundi IGF-I antibody and the protein was detected by immunoenzymetic reaction.

M : Low Rainbow marker

Lane 1 : GST/KR IGF-I fusion protein



**Fig. 8. Western immunoblot analysis of fusion protein
by anti-GST/KR IGF-I anitbody**

The expressed fusion proteins were submitted to 15% SDS-PAGE and transferred to a immobilon-PS⁴ membrane. The membrane was incubated with anti-GST/KR IGF-I antibody and the protein was detected by immunoenzymetic reaction.

Lane 1 : GST/KR IGF-I fusion protein on 15% SDS-PAGE

Lane 2 : GST/KR IGF-I fusion protein on membrane

4. 재조합체 조피볼락 IGF-I 폴리펩타이드의 분리 및 정제

pGEX-2T/KR IGF-I 플라스미드를 가진 균에서 배양되어 분리된 수용성 단백질을 Redipack Purification column(Pharmacia Biotech, USA)을 통해 정제하였다. 이 칼럼은 sepharose에 glutathione이 결합되어 GST(glutathione-S-transferase)를 포함하는 융합단백질이 결합하도록 제조되어 있다.

칼럼상에 고정된 융합단백질에서 재조합체 조피볼락 IGF-I 폴리펩타이드만을 분리하기 위해서 GST와 재조합체 단백질을 연결하는 아미노산 사슬을 끊어 주어야 한다. 혈액응고에 관여하는 물질인 Plasma bovine thrombin(Sigam, USA)은 Arginine과 Lysine의 펩티드고리를 특이적으로 인식하여 절단한다. 수용성 단백질을 정제후 1X PBS로 충분히 씻어주고 thrombin을 2NIH(unit)가 되게 1X PBS와 혼합하여 칼럼에 충전시키고 12시간 동안 실온에 세워 두었다. 다시 1X PBS로 용출하여 SDS-PAGE 및 western immunoblot으로 7kDa의 단일밴드를 확인하였으며(Fig. 9), 정제된 재조합체 조피볼락 IGF-I 폴리펩타이드(이하 rKR IGF-I)의 크기는 이미 보고된 rsIGF-I(recombinant coho salmon IGF-I), recombinant tilapia IGF-I과 일치하였다.

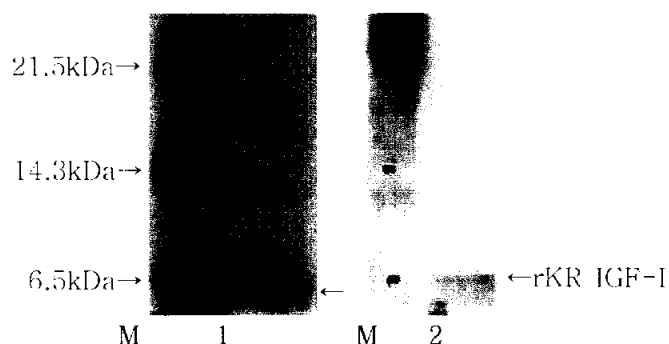


Fig. 9. The expression protein after thrombin digestion and appearing as a single band 7kDa.

The mature KR IGF-I polypeptide was analyzed by SDS-PAGE on 15% gel(left), then the gel was transferred to a immobilon-PS⁴ membrane(right). The membrane was incubated with anti-barramundi IGF-I antibody and the protein was detected by immunoenzymetic reaction.

M : Low Rainbow marker

Lane 1 : GST/KR IGF-I fusion protein on 15% SDS-PAGE

Lane 2 : GST/KR IGF-I fusion protein on membrane

제4장 요약

본 연구는 GST gene fusion system을 바탕으로 조피볼락 IGF-I cDNA를 클로닝하고 발현벡터에 삽입시켜 재조합체 조피볼락 IGF-I을 분리 및 정제하도록 하였다.

1. 조피볼락 B, C, A, D의 활성도메인만을 포함하는 cloning vector를 구축하여 다량의 IGF-I DNA를 얻을 수 있게 되었다.
2. 발현벡터인 pGEX-2T에 삽입하여 재조합체 조피볼락 IGF-I 펩타이드를 포함하는 융합단백질을 발현시킬 수 있게 되었다. 하지만 GST가 단백질의 수용성을 유도한다고 해도 수용성보다 불용성 단백질 형태로 많이 발현되었다.
3. Onestep affinity column을 사용하여 'native'형태인 수용성 단백질을 간단하게 정제할 수 있게 되었다.

재조합된 어류 IGF-I을 정제하는 기술이 발전하면서 기존의 비어류 IGF-I을 사용하던 실험법을 점점 대체하고 있다. 정제된 순수 단백질은 혈중내 IGF-I의 농도를 측정할 수 있는 RIA(radioimmunoassay)법을 개발시켜 다양한 어류의 건강과 영양상태 및 염농도의 변화와 같은 생리적 변화에 따른 IGF-I 수준을 측정할 수 있게 할 것이며, 항체를 개발하여 어류의 발생학적인 변을 연구할 수 있는 조직면역학적인 방법을 개발시킬 것이다. 또한 양식산업에 이용되어 유전자 조작으로 형질전환된 어류의 한계를 극복할 수 있는 도구가 될 것으로 기대된다.

제5장 참고문헌

- Ballard. F. J., Read L. C., Francis G. L., & Wallace J. C. 1986. Binding properties and biological potencies of insulin-like growth factors in L6 myoblasts. *Biochemical Journal*. 233:223-230
- Bern H. A., McCormic S. D., Kelley K. M., Gray E. S., Nishioka R. S., Madsen S. S. & Tasi P. I. 1991. Insulin-like growth factors 'under water' : role in growth and function of fish and other poiklothermic vertebrates. In *Morden Concept of Insulin-like Growth Factors*, pp85-96, Ed. E. M. Spencer, New York: Eisevier
- Blundell TL & Humbel RE. 1980. Hormone families: Pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature* 287:781-787
- Bolton J. P., Collie N. L., Kawauchi H. & Hirano T. 1987. Osmoregulatory actions of growth hormone in rainbow trout(*Salmon gairdneri*). *J. Endocrinol* 112:63-68
- Brian G. Degger, Neil Richardson, Chris Collet, F. John Ballard & Zee Upton. 1999. In Vitro characterization and in vivo clearance of recombinant barramundi(*Lates calcarifer*)IGF-I. *Aquaculture*. 177:153-160
- Cao Q. P., Duguay S. J., Plisctsxaya E., Steiner D. F. & Chan S. J. 1989. Nucleotide sequence and growth hormone-regulated expression of salmon Insulin-like growth factor-I mRNA. *Molecular Endocrinology* 3:2005-2010
- Chomczynski P. and Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. 162:156-159
- Daughaday WH. & Rotwein P. 1989. Insulin-like growth factor-I and II, peptide, messenger ribonucleic acid tissue concentrations. *Endocrine*

Review. 10:68-91

- Donald B. Smith and Kevin S. Johnson. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion with glutathione S-transferase. *Gene*. 67:31-40
- Duan C. & Hirano T. 1992. Effects of Insulin-like growth factor-I and insulin on the in vitro uptake of sulfate by eel branchial cartilage : sulphation factors. *Journal of Endocrinology* 133:211-219
- Duan C. & Inui Y. 1990. Evidence for the presence of a somatomedin-like plasma factor(s) in the Japanese eel, *Anguilla japonica* Gen. Comp. Endocrinol. 79:326-331
- Duan C. & Plisetskaya E. M. 1993. Nutrition regulation of insulin-like growth factor-I mRNA expression in salmon tissue. *J. Endocrinol.* 139:243-252
- Duan C. and Hirano T. 1990. Effects of insulin-like growth factor-I and insulin on the in vitro uptake of sulfate by eel branchial cartilage : evidence for the presence of independent hepatic and pancreatic sulphation factors. *J. Endocrinol.* 133:211-219
- Duan, C. 1997. The insulin-like growth factor system and its biological actions in fish. *Amer. Zool.* 37:491-503
- Elliott S., Fagin K. D., Narhi L. O., Miller J. A., Jones M., Koski R.L, Peters M., Hsieh P., Sachdev R., Rosenfeld R. D., Rohde M. F. and structural characterization. *J. Protein Chem.* 9:95-104
- Forsberg G., Palm G., Ekebacke A., Jasephson S. and Hartmanis M. 1990. Separation and characterization of modified variants of recombinant human insulin-like growth factor I derived from a fusion protein secreted from *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 271:357-363

- Gellerfors P., Axelsson K., Helander A., Johansson S., Kenne L., Linqist S., Pavlu B., Skottner A. and Fryklund L. 1989 Isolation and characterization of a glycosylated form of human insulin-like growth factor I produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 264:11444-11449
- Gentil V., Martin P., Smal J. Le-Bail P. Y. 1996. Production of recombinant insulin-like growth factor-II in the development of a radiomunoassay in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 104:156-167
- Gray E. S., Kelley K. M., Law S. Tase R., Yung G. & Bern H. A. 1992 Regulation of hepatic growth hormone receptors in coho salmon(*Oncorhynchus kisutch*). *General and Comparative Endocrinology* 88:243-252
- Guler HP., Zapf J. Scheiwiller E. & Froeschm E. R. 1988. Recombinant human insulin-like growth factor-I stimulates growth and has distinct effects on organ size in hypophysectomized rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4889-4893
- John hartman, Paru Daram, Raymond A. Frizzell, Thomas Rado, Dale J. Benos, and Eric J. Sorscher. 1992. Affinity Purification of Insoluble Recombinant Fusion Proteins Containing Glutathione-S-Transferase. *Biotechnology and Bioengineering.* 39:828-832
- Jyh-Yih Chen, Jian-Chyi Chen, Chi-Yao Chang, Shih-Chieh Shen, Meng-Shu Chen and Jen-Leith Wu. 2000. Expression of recombinant tilapia insulin-like growth factor-I and stimulation of juvenile tilapia growth by injection of recombinant IGFs polypeptides. *Aquaculture.* 181:347-360
- Kelly K. M., Desai P., Roth J.T. Haigwood J.T., Arope S. A., Flores R.M., et al. 2000. Evolution of endocrine growth regulation: the insulin like growth growth factors(IGFs), their regulatory binding proteins(IGFBPs) and IGF

- receptors in fishes and other ectothermic vertebrates. In: Fingerman, M., Nagabhushanam R. Recent Advances in Marine Biotechnology, Science Publishers, Enfield. 4:189-228
- LeRoith D., Bondy C., Yakar S., Liu J.-L., Butler A. 2001. The somatomedin hypothesis. *Endo. Rev.* 22:53-74
- Maden S. S. & Bern H. A. 1993. In vitro effects of insulin-like growth factor-I on gill $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase in coho salmon, *Oncorhynchus Kisutch*. *J. Endocrinol.* 138:23-30
- Mannervik B. 1985. The isoenzymes of glutathione S-transferase. *Adv. Enzymol.* 57 : 357-417
- McCormick S. D. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on salinity tolerance and gill $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase in Atlantic salmon(*Salmo salar*) : interaction with cortisol. *Gen. Comp. Endocrinol.* 101:3-11
- McCormick S. D., Tsai P. I., Kelley K. M., Young G., Nishioka R. S. and Bern, H. A. 1991. Stimulation of coho salmon growth by insulin-like growth factor-I. *Gen. Comp. Endocrinol.* 86:398-409
- McRory J. E. & Sherwood N. M. 1994. Catfish express two form of insulin-like growth factor-I(IGF-I) in the brain. Ubiquitous IGF-I and brain-specific IGF-I. *J. Biol. Chem.* 269:18588-18592
- Moks T., Abrahmsen L., Osterlof B., Josephson S., Ostling M., Enfors S. -O., Persson J., Nilsson B. and Uhlen M. 1987a. Large-scale affinity purification of human insulin like growth factor I from culture medium of *Escherichia coli*. *BioTechnology* 5:379-382
- Moriyama S. 1995. Increased plasma insulin-like growth factor-I(IGF-I) following oral and intraperitoneal administration of growth hormone to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 99:221-229

- Moriyama S. D., Duguay S. J., Conlon J. M., Duan C., Dickhoff W. W. 1993. Recombinant coho salmon insulin-like growth factor I. Expression in *Escherichia coli*, purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* 218:205-211
- Moriyama S., Swanson P., Nishi M., Takahashi A., Kawauchi H., Dickhoff W. W. & Plisetakata E. M. 1994. Development of a homologous radioimmunoassay for coho salmon insulin-like growth factor-I. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96:149-161
- Niu P-D. & Le Bail P-Y. 1993. Presence of insulin-like growth factor binding protein(IGFBP) in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) serum. *J. Exp. Zool.* 265:627-636
- Peters M. A., Lau E. P., Snitman D. L., Van Wyk J. J., Underwood L. E., Russel W. E. and Svoboda M. E. 1985. Expression of a biologically active analogue of somatomedin-C insulin-like growth factor I. *Gene.* 35:83-80
- Rinderknecht E. and Humbel R. E. 1978. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.* 253:2769-2776
- Saito Y., Yamada H., Niwa M. and Ueda I. 1987. Production and isolation of recombinant somatomedin. *Chin. J. Biochem.* 101:123-134
- Sakamoto T. & Hirano. T. 1993. Expression of insulin-like growth factor-I gene in osmoregulatory organs during seawater adaptation of the salmonid fish : Possible mode of somoregulatory action of growth hormone. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.* 90:1912-1916
- Salmon Jr. WD & Daughaday WH. 1957. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab*

and Clin Med 49:825-83

- Shamblott M. J., Cheng C. M., Bolt D. & Chen T. T. 1995. Appearance of insulin-like growth factor mRNA in the liver and pyloricera of a teleost in exogenous growth hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:6943-6946
- Simons P. C. and Vander Jagt D. L. 1981. Purification of glutathione S-transferase by glutathione-affinity chromatography. Methods Enzymol. 77 : 235-237
- Upton Z., Francis G. L., Chan S. J., Steiner D. F., Wallace J. C., Ballard F. J. 1997. Evolution of insulin-like growth factor(IGF) function:production and characterization of recombinant hagfish IGF. Gen. Comp. Endocrinol. 105:79-90
- Wong E. Y., Seetharam R., Kotts C. E., Heeren R. A., Klein B.K., Bradford S. R., Mathis K. J., Bishop B. F., Siegel N.R., Smith C.E. and Tacon W.C. 1988. Expression of secreted insulin-like growth factor-I in *Escherichia coli*. Gene 68:193-203
- Zhou M.-Y., Clark S.E. and Gomez-Sanchez C. E. 1995. Universal cloning method by TA strategy. BioTechniques 19:34
- Meyer T. S. and Lamberts B. L. 1965. Use of Coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide gel strips. Biochim. Biophys. Acta 107:144-145