

Construction of a Plant Chloroplast Transformation Vector to Produce the Antimicrobial Peptide Stomoxyn

Jin Gyu Go, Hyeon Ho Gil and Soon Young Kim*

Department of Biological Sciences, Andong National University, Andong 36729, Korea

Received June 3, 2024 / Revised June 18, 2024 / Accepted June 18, 2024

Antimicrobial peptides are antimicrobial substances inherent in animals and plants, with strong antibacterial activity even in small amounts and with various other functions such as antiviral and antioxidant actions. Plants can be grown with just water and sunlight, allowing for their mass production at low costs. However, transforming a chloroplast into one that produces antimicrobial peptides, rather than growing plants, increases the amount of protein expression and minimizes contamination of the ecosystem because gene transfer by pollen does not occur. In that context, using transgenic plant chloroplasts to produce recombinant proteins increases protein degradation and reduces the solubility of proteins. To solve this problem, we fused SUMO, a fusion protein, with a recombinant protein. We also used a 6xHis tag to purify the fusion protein. The antimicrobial peptide stomoxyn is an antibacterial substance found in stable flies. Stomoxyn has an α -helix structure and is amphiphilic, which allows it to dissolve bacterial cell membranes. In this study, we constructed a transformation vector to express stomoxyn in both plant chloroplasts and *Escherichia coli* and used this vector to confirm the expression of stomoxyn in *E. coli*. The expression of the protein was then confirmed in *E. coli* using a transformation vector. The expressed stomoxyn was purified by nickel column and SUMOase treatment, and its antibacterial activity was confirmed using an agar diffusion assay. The EGFP gene was used to ensure that the transformed vector was inserted into the chloroplast.

Key words : Antimicrobial peptide, chloroplast, EGFP gene, *Escherichia coli*, stomoxyn

서 론

재조합 단백질은 박테리아, 효모, 포유류, 곤충, 식물 등 다양한 배양방법으로 생산이 가능하다. 일반적으로 재조합 단백질은 동물 세포주나 대장균에서 단백질을 생산하지만[3], 동물 세포주에서 생산되는 단백질은 비용이 많이 들며 과정이 매우 복잡하다. 또한 단백질 생산 시 숙주 내 세포기질이 mycoplasma나 바이러스와 같은 외래성 미생물로 인해 오염될 가능성이 높다. 대장균은 단백질을 생산할 때 봉입체(inclusion body)를 형성할 수 있으며 단백질 번역 과정 중 glycosylation이 되지 않아 단백질이 제대로 기능을 못하는 단점이 있다[20].

식물을 이용하여 재조합 단백질을 생산하는 경우 동물 세포주를 이용하는 경우보다 기간이 단축되고 생산 비용

이 절감되고, 내독소나 인체에 유해한 바이러스에 감염되지 않아 생산되는 단백질이 오염될 가능성이 낮다[11].

식물에서 재조합 단백질을 생산하는 방법은 핵 형질전환과 엽록체 형질전환방법이 있다. 일반적으로 핵 형질전환 방법을 사용하지만, 엽록체 형질전환은 핵 형질전환에 비해 몇 가지 장점이 있다. 첫째, 엽록체는 원핵세포 유래 소기관으로 다수의 외래 유전자를 오페론 형태로 엽록체 genome에 동시 발현이 가능하다[6]. 둘째, 핵 유전자는 꽃가루를 통해 이동되어 생태계를 교란시킬 위험이 있지만, 엽록체 유전자는 모계유전 되어 꽃가루를 통한 유전자 이동을 차단하여 생태계가 오염될 가능성이 적다[16]. 셋째, 엽록체 genome 내에 존재하는 상동재조합 서열을 이용하여 형질전환 된 벡터가 특정 위치에 정확하게 삽입이 되어 단백질의 발현 수준을 높일 수 있다[17].

재조합 단백질을 발현시킬 때 외부 유전자로부터 발현된 단백질은 숙주에 존재하는 단백질 분해효소에 의해 분해가 되거나 봉입체가 형성되어 단백질의 용해도가 감소하는 등 여러 단점이 존재한다. 이를 최소화하기 위하여 융합 단백질이 발현되도록 한다. 융합 단백질은 발현하고자 하는 단백질의 분해를 막고 발현량을 증가시켜 준다[4]. 융합 단백질은 재조합 단백질의 기능을 일시적으로 억제하기 때문에 단백질 발현 시 융합단백질 부분을

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5647, Fax : +82-54-820-7705

E-mail : kimsy@anu.ac.kr

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.

제거해야 한다. Factor Xa, enterokinase 등과 같은 단백질 분해효소는 기존의 아미노산 서열을 인식하여 자르지만 다른 서열을 인식하여 절단하는 단점을 가지고 있다[14]. 이를 보완하여 발현 시 융합 단백질 부분을 쉽게 제거하기 위하여 small ubiquitin-related modifier (SUMO)를 이용하여 융합 단백질을 제작한다. SUMO 단백질 분해효소 (SUMOase)는 단백질의 3차 구조를 인식하여 자르기 때문에 단백질이 잘못 절단되는 것을 방지할 수 있다[21]. 또한 SUMO는 모든 진핵생물에 존재하는 단백질로 특히 식물에서 질소 대사 및 개화 단계를 조절하는 역할을 한다[19]. 그리고 식물에는 SUMO를 분리하는 SUMOase가 존재하여 재조합 단백질을 발현시킬 때 SUMO를 포함한 융합 단백질 부분이 분리되어 원하는 단백질을 바로 얻을 수 있다[9, 19].

Stomoxyn은 칩파리인 *Stomoxys calcitrans*에서 분리된 항균 펩타이드로 42개의 아미노산으로 구성되어 있다[2]. Stomoxyn은 α -helix 구조로 접힐 때 양친매성을 띄고 있으며, 이 양친매성 부위로 인해 박테리아의 막에 붙은 후 구멍을 형성한다. 이러한 기작으로 stomoxyn은 그람 양성균, 그람 음성균, 진균, 효모 등에 넓은 항균 활성을 가지고 있다[2]. 또한 최근 식물의 뿌리와 줄기를 공격하여 식물의 성장을 저해하는 식물 병원균인 *Rhizoctonia solani*에도 활성이 있다고 보고되었다[12]. 이러한 사실을 바탕으로 stomoxyn은 향후 농업 발전 및 의약품 개발에 기여할 수 있는 항균 펩타이드(antimicrobial peptide)로 사용될 수 있다.

재조합 단백질을 발현하는 방법으로 *Escherichia coli*가 자주 사용되어 왔다. *E. coli*는 유전자 조작이 용이하고 가격이 저렴하여 재조합 단백질을 생산하기에 적합하다 [1]. 제작이 완료된 벡터를 이용하여 엽록체를 형질전환시키기 전에 엽록체의 전사 및 번역 기작이 유사한 *E. coli*에서 단백질의 발현을 확인하고, 그람 양성균과 그람 음성균에 대한 stomoxyn의 항균 활성을 수행하였다[5]. 이후, 식물 엽록체에서 유전자가 발현되는지 확인하기 위해 기존의 벡터에 Enhanced green fluorescent protein (EGFP) 유전자를 삽입하여 EGFP의 발현을 확인하였다. 이 연구

결과를 바탕으로 식물 엽록체를 형질전환시켜 stomoxyn을 대량 생산할 수 있을 것으로 기대된다.

재료 및 방법

발현벡터

본 연구에 사용된 발현벡터는 *E. coli* 및 식물 엽록체에 적용 가능한 pKSEC1을 사용하였다[15]. SUMO1 및 stomoxyn의 서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)을 참고하여 작성하였으며, 각각 GenBank에 등록된 NM_003352.4와 AF467987.1의 서열을 참고하였다. *E. coli*에서도 재조합 단백질이 발현될 수 있도록 6xHis-SUMO1-stomoxyn의 순서로 DNA 서열을 작성하였다. 작성된 DNA서열을 pKSEC1의 *PpsbA*와 *TpsbA*의 사이에 삽입하기 위해 6xHis-SUMO1-stomoxyn 서열의 전 후로 *Nde* I 과 *Xba* I 의 제한효소 서열을 추가하였다. 작성된 재조합 stomoxyn의 DNA 서열(Table 1)은 Macrogen (Seoul, Korea)을 통해 주문 제작하여 사용하였다. 준비된 pKSEC1에 재조합 단백질의 DNA를 삽입하고, *E. coli* DH5 α 로 DNA cloning하였다. 식물 엽록체에 pKSEC1가 상동재조합을 통한 형질전환이 가능한지 확인하기 위해 EGFP 유전자가 포함된 pKSEC1을 사용하였다.

발현된 재조합 단백질 추출

완성된 벡터는 *E. coli* BL21에 형질전환 하여 재조합 단백질을 발현하였다. 형질전환 된 *E. coli*를 100 μ g/ml ampicillin과 50 μ g/ml spectinomycin이 포함된 LB 배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 180 rpm 조건으로 18시간 배양하였다. 배양된 *E. coli*는 8,000 rpm으로 3분간 원심분리 하여 분리하였다. 분리된 *E. coli*를 lysis buffer (20 mM Tris, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazole)에 현탁하여 초음파분쇄기로 파쇄하였다. 세포 파쇄액을 13,000 rpm으로 10분간 원심분리 하여 상등액과 침전물을 분리하였다. 분리된 상등액을 수용성 단백질, 침전물을 증류수에 재현탁하여 비수용성 단백질로 사용하였다. 각 단백질은 Bovine Serum Albumin (BSA)과 Bradford Reagent (Sigma Aldrich, USA)를 사용하

Table 1. Sequence of recombinant stomoxyn

N→ <i>Nde</i> I -start codon-6xHis-SUMO1-stomoxyn-stop codon- <i>Xba</i> I →C
CAT ^a ATG ^b CACCACCACCACCACCAC ^c TCTGACCAGGAGGCCAAAACCTTCAACTGAGGACTTGGGGGATAAGAAGG AAGGTGAATATATATAAACTCAAAGTCATTGGACAGGATAGCAGTGAGATTCACCTCAAAGTGAAAATGACAACA CATCTCAAGAAACTCAAAGAATCATACTGTCAAAGACAGGGTGTTCGAATGAATTCAGTTCAGTTTCTCTTTGAG GGTCAGAGAATTGCTGATAATCATACTCCAAAAGAACTGGGAATGGAGGAAGAAGATGTGATTGAAGTTTATCA GGAACAAACGGGGGGT ^d AGAGGTTTTTCGCAAACACTTCAATAAATTGGTGAAAAAAGTCAAGCACACCATTTCGG AAACAGCTCATGTGGCCAAGGATACTGCTGTTATAGCTGGAAGTGGAGCTGCTGTAGTTGCTGCCACTG GT ^e TAA ^f TCTAGA ^g
a: <i>Nde</i> I , b: start codon, c: 6xHis, d: SUMO1, e: stomoxyn, f: stop codon, g: <i>Xba</i> I

여 농도를 측정하였다.

추출된 재조합 단백질 정제

분리된 수용성 단백질을 Syringe filter (0.2 μm)를 사용하여 불순물을 제거하였고, His60 Ni Superflow Resin & Gravity Columns (Takara, Japan)을 사용하여 6xHis-SUMO1-stomoxyn을 분리·정제하였다. 분리된 재조합 단백질은 Bovine Serum Albumin (BSA)과 Bradford Reagent (Sigma Aldrich, USA)를 사용하여 농도를 측정하였다. 이후, 분리된 재조합 단백질에 SUMO Protease (Enzymomics, Korea)를 사용지침(30 $^{\circ}\text{C}$, 6시간)에 따라 처리하여 6xHis-SUMO1-stomoxyn을 6xHis-SUMO1과 stomoxyn으로 분리하였다. SUMO Protease를 처리한 재조합 단백질은 western blot을 통해 stomoxyn이 6xHis-SUMO1과 제대로 분리되었는지 확인하였다.

Stomoxyn의 항균활성 확인

Stomoxyn의 항균 활성을 확인하기 위해 agar diffusion assay 및 microtiter broth dilution assay를 수행하였다. Agar diffusion assay는 배양한 *Bacillus subtilis*를 McFaland Standard 0.5에 맞게 희석을 하였다. 그리고 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 stomoxyn 단백질을 농도별로 1/2씩 희석하여 사용하였다. 희석한 균주를 1.5%(w/v) agar를 포함한 LB 배지에 면봉으로 도말한 다음, 구멍을 내어 재조합 단백질을 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 18시간 동안 배양하여 항균 활성을 확인하였다.

Microtiter broth dilution assay는 그람 양성균인 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus xylosus* (KCTC 3342)와 그람 음성균인 *E. coli* JM83 (KCTC 2463) 및 *Acromobacter* sp. 균주를 사용하여 수행하였다. LB broth와 재조합 단백질과 희석한 균주를 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 18시간 배양한 다음 Microplate reader infinite 200 PRO (Tecan, Switzerland)를 이용해 600 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 미생물의 생장을 확인하였다.

유전자 총을 이용한 EGFP 유전자의 일시적인 발현 확인

12주 동안 Magenta box (Sigma, USA)에서 무균 배양(27 $^{\circ}\text{C}$, 16시간 light, 8시간 dark)한 담배 잎을 1/2 MS배지(1/2 MS salt, 20 g/l sucrose, 0.5%(w/v) agar, pH 5.8) 위에 놓았다. 이후, EGFP 유전자가 들어간 벡터를 금 입자(0.6 μm gold particle, Bio-rad, USA)에 입혀 유전자 총을 이용해 담배 잎에 쏘는 다음 이를 동안 배양하였다(27 $^{\circ}\text{C}$, dark).

이를 뒤, 담배 잎을 잘라 RMOP 배지(MS salt, 500 mg/l spectinomycin, 100 mg/l myo-inositol, 1 mg/l thiamine-HCL, 1 mg/l 6-benzylaleneacetic acid, 0.1 mg/l 1-naphthaleneacetic acid, 0.5%(w/v) agar, pH 5.8)에 옮겨 배양하였다(27 $^{\circ}\text{C}$, 16시간 light, 8시간 dark). 담배의 잎맥을 메스로 얇게 벗겨 내어 잎을 ethanol과 acetic acid를 3:1의 비율로 섞은 용액에

1시간 동안 배양하였다. 이후, 잎을 LEICA DM 2500 Fluorescence Microscope (LEICA, Germany)을 이용하여 EGFP 유전자가 엽록체에서 발현이 되는지 확인하였다.

결과 및 고찰

발현 벡터에 삽입된 stomoxyn 유전자 확인

본 연구에서는 항균펩타이드인 stomoxyn을 생산하기 위해 융합 단백질인 6xHis-SUMO1-stomoxyn을 사용하였으며, 융합 단백질을 재조합 벡터의 promoter와 terminator인 *PpsbA*와 *TpsbA* 유전자 사이에 넣기 위해 양 끝에 *Xba* I 과 *Nde* I 의 제한 효소 자리를 첨가하였다(Macrogen, Korea). Fig. 1A에서 제시한 것과 같이 pUC19 벡터에 필요한 유전자를 삽입하여 재조합 벡터를 만들었고 제한효소인 *EcoR* I 을 처리하여 stomoxyn 유전자가 벡터에 정확하게 삽입되었는지를 확인하였다(Fig. 1B).

6xHis-SUMO1-stomoxyn의 발현

재조합 벡터에서 단백질이 발현이 되는지 확인을 하기 위해 western blot을 진행하였다(Fig. 2A). 6xHis-SUMO의 크기는 12.2 kDa이며[4], stomoxyn의 크기는 약 4.2 kDa이다[2]. 그러므로 예상되는 단백질의 크기는 약 16.4 kDa이다. 실험결과 대조군에서 추출한 수용성과 비수용성 단백질 부분에는 항체 검출에 쓰이는 6xHis가 없어 단백질이 발현되지 않았다. 반면, stomoxyn에서는 수용성과 비수용성 단백질 부분에서 단백질이 예상된 크기(16.4 kDa)보다 높은 위치에서 발현되었다. 이는 일반적인 SDS-PAGE 방법으로 단백질에 양전하를 띠는 arginine과 lysine 함량이 10%이상일 때 SDS의 결합에 영향을 주어 단백질이 예상된 크기보다 크게 나타나게 된다[18]. Stomoxyn은 arginine과 lysine 함량이 20%이기 때문에 예상된 크기(16.4 kDa)보다 크기가 약간 큰 단백질이 발현되었다고 해석할 수 있다.

Stomoxyn의 분리 및 항균 활성

형질전환 된 *E. coli*에서 재조합 단백질인 6xHis-SUMO1-stomoxyn을 발현시킨 다음 His60 Ni Superflow Resin & Gravity Columns (Takara, Japan)을 사용하여 6xHis-SUMO1-stomoxyn을 정제하였다. 분리한 6xHis-SUMO1-stomoxyn에 SUMOase를 6시간 처리하여 6xHis-SUMO1이 분리되었는지 western blot으로 확인하였다(Fig. 2B). Stomoxyn은 양친매성을 띠는 N말단 α -helix와 소수성을 띠는 C말단으로 구성되어 있다[10]. 또한 염기성을 띠고 있어 정전기적 상호작용을 통해 박테리아 표면에 부착하여 세포막을 파괴한다[13]. 이러한 기작을 통해 stomoxyn은 그람 양성균, 그람 음성균, 사상균, 효모 등에 항균 활성을 가진다[2]. 본 연구에서는 재조합 벡터에서 만들어진 stomoxyn의

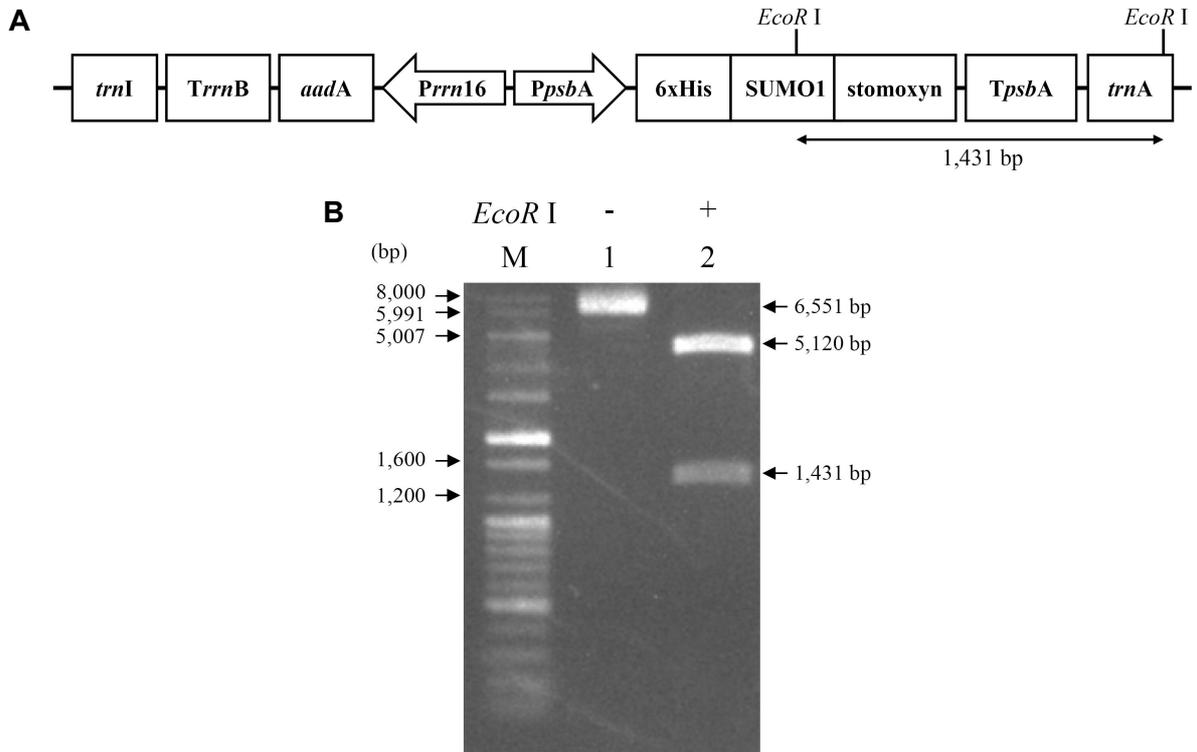


Fig 1. Construction of expression vector. (A) The schematic diagram of 6xHis-SUMO1-stomoxyn in pKSEC1. *trn I*, isoleucyl-tRNA; *trnA*, alanyl-tRNA; *Prrn16*, rRNA operon promoter; *TrrnB*, terminator of *rrnB*, *aadA*, aminoglycoside 3'-adenyltransferase gene; *PpsbA*, 5' UTR of *psbA* gene; *TpsbA*, 3' UTR of *psbA* gene. (B) The expression of 6xHis-SUMO1-stomoxyn in pKSEC1. M, DNA size marker; Lane 1, cloning of 6xHis-SUMO1-stomoxyn into pKSEC1 (6,551 bp). Lane 2, double digestion of 6xHis-SUMO1-stomoxyn into pKSEC1 with *EcoRI* (5,120 bp, 1,431 bp).

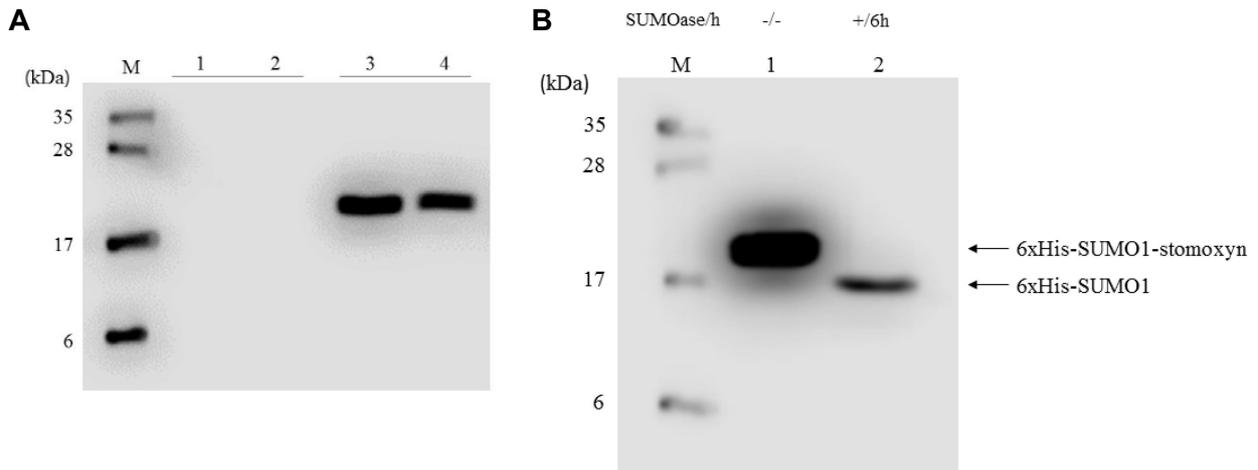


Fig 2. Western blot analysis for detection of recombinant protein. (A) Analysis of expressed 6xHis-SUMO1-stomoxyn fusion protein in *Escherichia coli*. The size of the expressed 6xHis-SUMO1-stomoxyn is about 16.4 kDa. There is no 6xHis tag proteins in original *E. coli*. The fusion proteins expressed in soluble and insoluble part were detected using anti-His antibody. Each lane was loaded with 20 μ g of protein. M, Protein size marker (kDa); Lane 1, *E. coli* soluble protein; Lane 2, *E. coli* insoluble protein; Lane 3, 6xHis-SUMO1-stomoxyn soluble protein; Lane 4, 6xHis-SUMO1-stomoxyn insoluble protein. (B) Analysis of expressed stomoxyn fusion protein treated by SUMOase. The fusion protein of lane 1 was not treated by SUMOase. The fusion protein of lane 2 was treated by SUMOase, dividing into 6xHis-SUMO1 and stomoxyn. The fusion protein of lane 1 and lane 2 were detected using anti-His antibody. Stomoxyn was not detected because it does not have a 6xHis. Each lane was loaded with 20 μ g of protein. M, Protein size marker (kDa).

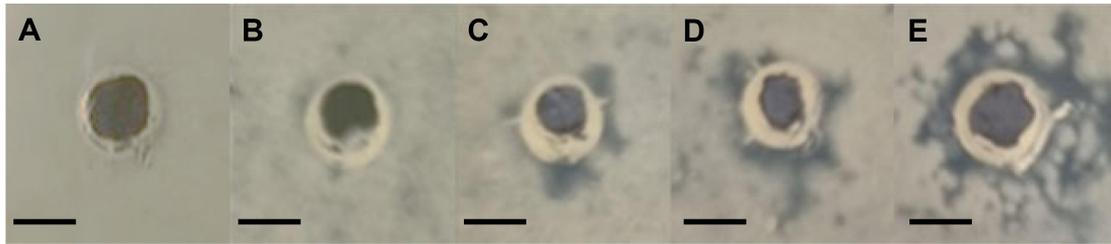


Fig 3. Antimicrobial activity of stomoxyn against *Bacillus subtilis*. To test the antimicrobial activity of stomoxyn, the fusion protein (6xHis-SUMO1-stomoxyn) were divided from 6xHis-SUMO1 and stomoxyn by the treatment of SUMOase. A minimum inhibitory concentration (MIC) of stomoxyn was shown between 0.25 and 0.5 µg/µl. The size of scale bar was 5 mm. (A) control; (B) 0.25 µg/µl stomoxyn; (C) 0.5 µg/µl stomoxyn; (D) 1 µg/µl stomoxyn; (E) 2 µg/µl stomoxyn.

항균 활성을 검증하기 위해 agar diffusion assay 및 microtiter broth dilution assay를 진행하였다. Agar diffusion assay에서는 *Bacillus subtilis*를 McFaland 0.5의 기준으로 희석하여 LB 배지에 면봉으로 도말한 결과 0.5 µg/µl stomoxyn에서부터 항균활성이 있는 것으로 확인하였다(Fig. 3).

Microtiter broth dilution assay는 그람 양성균인 *Bacillus subtilis*와 *Staphylococcus xylosus* (KCTC 3342), 그람 음성균인 *E. coli* JM83 (KCTC 2463)와 *Acromobacter* sp.를 사용하여 실험을 진행하였다. Stomoxyn의 minimum inhibitory concentration (MIC)은 *Bacillus subtilis*에서 0.25 µg/µl, *Staphylococcus xylosus*에서 1 µg/µl, *E. coli* JM83에서 1 µg/µl, *Acromobacter* sp.에서는 2 µg/µl 이상으로 확인하였다 (Table 2).

유전자총을 이용한 EGFP 유전자 일시적인 발현 확인

Stomoxyn 유전자를 엽록체에 삽입하기 전에 유전자 총을 이용하여 식물 엽록체에서 EGFP 유전자가 발현이 되는지 확인하였다. EGFP는 강한 빛을 발산하는 단백질로 자가 형광을 내어 관찰하고자 하는 단백질이나 세포 소기관에 위치를 확인하는데 사용이 된다[22]. 엽록체 내에 존재하는 엽록소는 특정한 파장(470 nm)을 받으면 적색광(680-750 nm)을 방출하는 자가 형광을 가진다[7]. 따라서 식물 엽록체에 EGFP가 발현이 된다면 EGFP가 발산하는 녹색과 엽록소가 방출하는 적색을 합치게 되어 결과적으로 엽록체 부분이 노란색을 띄게 되는 것을 확인할 수 있다. 이를 통해 식물 잎에서 EGFP가 발현된 사진과 엽록

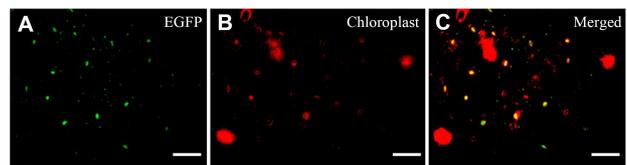


Fig 4. Confirmation of EGFP transient expression in chloroplast. The expression of the EGFP gene delivered into the chloroplast of plants was confirmed by fluorescence microscope. A is a fluorescence emitted from EGFP. B shows the red fluorescence emitted by chlorophyll. C is a merger of A and B. Chlorophyll in chloroplast emits red fluorescence at wavelengths between 680 and 750 nm when it receives a wavelength of 470 nm. The yellow color in C represents the merged image of A and B. The size of scale bar was 40 µm.

소가 방출하는 자가 형광사진을 하나로 합쳐서 확인을 하였다. 실험결과 노란색을 띄게 되는 것을 확인할 수 있다(Fig. 4). 세포 소기관을 확인할 수 있었으며, 그 주변에는 엽록소가 풍부한 공변세포를 육안으로도 볼 수가 있었다(Fig. 4). 또한 식물 엽록체의 크기는 대략 5 µm이므로 [8] 식물 엽록체에서 EGFP가 발현되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 그 이외에도 노란색을 띄지 않은 여러 세포 소기관을 볼 수가 있는데 이는 식물 잎에서 관찰을 하였기 때문에 엽록체만을 보기가 어려워 엽록체보다 크거나 작은 다른 세포 소기관도 같이 관찰이 된 것으로 생각이 된다.

항생제 내성 박테리아가 등장하면서 기존의 항생제의 효능이 떨어짐에 따라 항균 펩타이드가 새로운 대체제로 주목받고 있다. Stomoxyn은 항균 펩타이드 중 비교적 넓은 범위의 미생물에 항균활성을 가지기 때문에 장점이 있다[2]. 본 연구의 결과는 해당 벡터를 통해 발현되는 재조합된 stomoxyn이 항균 능력이 있으며, 식물 엽록체에서 발현될 수 있음을 제시한다. 추후 연구를 통해 재조합된 stomoxyn의 서열을 갖는 형질전환 식물체가 제작되면 식물을 통한 stomoxyn의 대량 생산이 가능할 것이다. 또한, 형질전환 식물체를 이용한 백신, 면역물질 등의 의료목적

Table 2. MIC test of stomoxyn through microtiter broth dilution assay

Microorganism	MIC (µg/µl)
Gram positive	
<i>Bacillus subtilis</i>	0.25
<i>Staphylococcus xylosus</i> (KCTC 3342)	1
Gram negative	
<i>E. coli</i> JM83 (KCTC 2463)	1
<i>Acromobacter</i> sp.	>2

의 단백질의 생산 방법에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 국립안동대학교 기본연구지원사업에 의하여 연구되었음.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Ahamd, I., Nawaz, N., Darwesh, N. M., Rahmen, S. U., Mustafa, M. Z., Khan, S. B. and Patching, S. G. 2018. Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **144**, 12-18.
- Boulanger, N., Munks, R. J. L., Hamilton, J. V., Vovelle, F., Brun, R., Lehane M. J., and Bulet, P. 2002. Epithelial innate immunity: A novel antimicrobial peptide with anti-parasitic activity in the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *J. Biol. Chem.* **277**, 49921-49926.
- Burnett, M. J. B. and Burnett, A. C. 2019. Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *Plants People Planet.* **2**, 121-132.
- Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P. and Mattern, M. R. 2005 SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr. Purif.* **43**, 1-9.
- Daniell, H. 1993. Foreign gene expression in chloroplasts of higher plants mediated by tungsten particle bombardment. *Method Enzymol.* **217**, 536-556.
- Daniell, H., Singh, N. D., Mason, H. and Streatfield, S. J. 2009. Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends Plant Sci.* **14**, 669-679.
- Donaldson, L. 2020 Autofluorescence in plants. *Molecules* **25**, 2393.
- Jeong, W. J., Park, Y. I., Suh, K. H., Raven, J. A., Yoo, O. J. and Liu, J. R. 2002. A large population of small chloroplasts in tobacco leaf cells allows more effective chloroplast movement than a few enlarged chloroplasts. *Plant Physiol.* **129**, 112-121.
- Kerscher, O., Felberbaum, R. and Hochstrasser, M. 2006. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 159-180.
- Landon, C., Meudal, H., Boulanger, N., Bulet, P. and Vovelle, F. 2006. Solution structures of stomoxyn and spinigerin, two insect antimicrobial peptides with an α -helical conformation. *Biopolymers* **81**, 92-103.
- Marsian, J. and Lomonosoff, G. P. 2016. Molecular pharming – VLPs made in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **37**, 201-206.
- Molla, K. A., Karmakar, S., Molla, J., Bajaj, P., Varshney, R. K., Datta, S. K. and Datta, K. 2020. Understanding sheath blight resistance in rice: the road behind and the road ahead. *Plant Biotechnol. J.* **18**, 895-915.
- Moravej, H., Moravej, Z., Yazdanparast, M., Heiat, M., Mirhosseini, A., Moghaddam, M. M. and Mirnejad, R. 2018. Antimicrobial peptides: features, action, and their resistance mechanisms in bacteria. *Microb. Drug Resist.* **24**, 747-767.
- Mossesso, E. and Lima, C. D. 2000. Ulp-1 SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol. Cell* **5**, 865-876.
- Park, A. R., Kim, S. W., Kim, S. Y. and Kwon, K. C. 2021. Expression of antimicrobial peptide (AMP) cecropin B, in a fused form to SUMO tag with or without three-glycine linker in *Escherichia coli* and evaluation of bacteriolytic activity of the purified AMP. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **13**, 1780-1789.
- Ruf, S., Karcher, D and Bock, R. 2007. Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 6998-7002.
- Tien, N. Q. D., Huy, N. X. and Kim, M. Y. 2019. Improved expression of porcine epidemic diarrhea antigen by fusion with cholera toxin B subunit and chloroplast transformation in *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **137**, 213-223.
- Tiwari, P., Kaila, P. and Guptasarma, P. 2019. Understanding anomalous mobility of proteins on SDS-PAGE with special reference to the highly acidic extracellular domains of human E- and N-cadherins. *Electrophoresis* **40**, 1273-1281.
- Yates, G., Srivastava, A. K. and Sadanandom, A. 2016. SUMO proteases: uncovering the roles of deSUMOylation in plants. *J. Exp. Bot.* **67**, 2541-2548.
- Yin, J., Li, G., Ren, X. and Herrler, G. 2007. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J. Biotechnol.* **127**, 335-347.
- Zhou, X. F., Zhang, C. L., Gao, X. P., Wang, W. L., He, Z. F., Jiang, F. Y., Pang, Y. L., Li, J. H., Ren, X. J., Zhou, H. B., Tan, G. Q., Lyu, J. X. and Wang, W. 2020. A simple and rapid protein purification method based on cell-surface display of SUMO-fused recombinant protein and Ulp1 protease. *AMB Express* **10**, 65.
- Zimmer, M. 2002. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem. Rev.* **102**, 759-782.

초록 : 대장균에서 항균 펩타이드 stomoxyn을 생산하기 위한 형질전환 벡터 제작

고진규 · 길현호 · 김순영*
(안동대학교 생명과학과)

항균 펩타이드는 동물과 식물이 가지고 있는 고유의 항균 물질로 적은 양으로도 강한 항균활성을 나타내며 이외에도 항바이러스, 항산화 등 다양한 기능을 가지고 있다. 식물은 물과 햇빛으로 키울 수 있어 적은 비용으로 대량 생산이 가능하다. 식물의 엽록체를 형질전환 시켜 항균 펩타이드를 생산하면 단백질 발현량이 증가하고 꽃가루에 의한 유전자 이동이 일어나지 않기 때문에 생태계가 오염될 가능성이 적다. 그러나 형질전환 된 엽록체를 이용하여 재조합 단백질을 생산하면 단백질이 분해되고 용해도가 감소한다. 이를 해결하기 위해 융합 단백질 종류 중 하나인 SUMO를 발현시킬 재조합 단백질과 융합하여 제작하였다. 항균 펩타이드 stomoxyn은 침파리(stable fly)에 있는 항균물질이다. Stomoxyn은 α -helix 구조이고 양친매성이어서 박테리아 세포막에 부착된 후 세포막을 용해시킨다. 본 연구에서는 stomoxyn을 식물 엽록체와 대장균에서 발현시키기 위한 형질전환 벡터를 제작하였고, 이 벡터를 이용하여 대장균에서 stomoxyn의 발현을 확인하였다. 대장균에서 발현된 stomoxyn을 nickel column과 SUMOase를 처리하여 정제한 후 agar diffusion assay를 이용하여 항균 활성을 확인하였다. 또한 식물 엽록체에서 벡터의 삽입을 확인하기 위해 EGFP 유전자를 사용하여 확인하였다.