

## Microsphere로 충전된 Stirred Cell을 이용한 단백질 분리

윤정열, 이정현, 김우식

연세대학교 화학공학과 및 생물산업소재연구센터

### Protein Separation Using Microsphere-Packed Stirred Cell

Jeong-Yeol Yoon, Jung-Hun Lee, and Woo-Sik Kim

Dept. of Chemical Engineering and Bioproducts Research Center, Yonsei University

#### 서 론

Microsphere란 입자 크기가 균일한 라텍스 입자로서 생의학적인 응용에 주로 사용되는 명칭이다. 일반적으로 입자 크기는 0.1~1  $\mu\text{m}$  정도이며, solid phase IA(immunoassay), IMCS(immunomagnetic cell separation), EHS(extracorporeal and hemoperfusion system), immobilized enzyme/catalyst 등에 이용된다[1].

본 연구에서는 막분리 장치인 stirred cell에 물에 분산된 라텍스 형태로 된 microsphere를 충전하여 혈청 단백질들을 분리하는 새로운 시스템을 고안하였다.

#### 이 론

Microsphere를 이용하여 단백질을 분리하기 위해서는 단백질-microsphere 간에 작용하는 여러 상호작용력들을 완전히 파악하여야만 한다. 단백질-microsphere 계에서 일반적으로 나타나는 상호작용력들로서는 소수성 상호작용력, 수소결합력, 이온결합력을 들 수 있는데, 대부분의 경우 이 세 가지가 동시에 나타나기 때문에 고찰하기가 매우 어려우며, 최근까지도 체계적인 고찰은 이루어지지 못하고 있었다. 본 연구실에서는 이들 중 소수성 상호작용력과 수소결합력이 동시에 나타나는 경우를 고찰하여, 카르복시기가 microsphere 표면 1  $\text{nm}^2$  당 1~2 개 정도 일때 전이점이 나타남을 밝혀낸 바 있다[2]. 그리고 pH 의존성은 소수성 상호작용력이 크게 나타난 반면, 수소 결합력은 거의 pH 의존성을 나타내지 않음도 밝혀 내었다[2,3].

소수성 상호작용력에 의해 단백질이 microsphere에 흡착하는 경우 단백질의 등전점(또는 그 점에서 약간 산 쪽으로 치우친 점)에서 최대 흡착이 나타나고 등전점에서 멀어질수록 단백질의 흡착량이 떨어지기 때문에, 두 단백질의 등전점 차 이만 있다면 흡착량은 분명히 차이가 있을 것이다.

선택도를 올리기 위해서는 흡착하지 않아야 할 단백질(여기서는 BSA)의 흡착량을 최소한도로 낮추어야 하는데, 소수성 상호작용력의 크기를 조절하는 이온 강도나 pH 만으로는 최적화할 수 없다. 때문에 주어진 pH에서 단백질이 갖는 전하와 같은 전하를 갖는 microsphere를 사용하여 정전기적 반발력을 주어야 하는데, 일반적인 경우 이것이 소수성 상호작용력을 감소시키므로 적절한 최적점이 존재할 것이다. 이를 Fig. 1에 도식적으로 나타내었다.

실제적인 분리의 방법으로는, 물에 분산된 microsphere 즉 라텍스에 단백질 혼

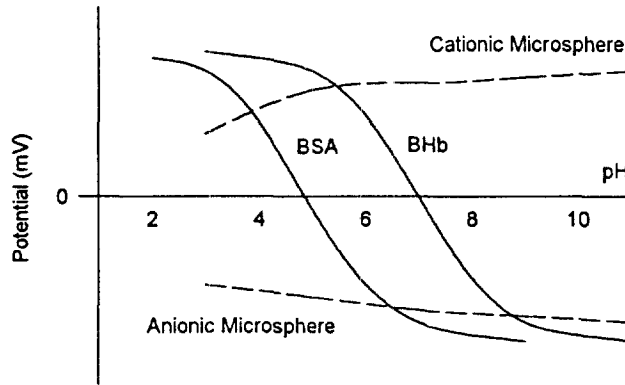


Fig. 1 Zeta potentials of proteins and microspheres.

합용액을 회분식으로 교반한 후 입자를 제거하는 방법을 사용하여 간단히 분리를 행하는 방법이 거론될 수 있지만, 실제 응용에서는 연속적인 분리가 중요하다. 본 연구에서는 분리 장치로 stirred cell을 선택하여 연속적인 분리를 행하였으며, 전체 실험 장치도는 Fig. 2에 나타내었다. Stirred cell은 원래 한외여과막을 장착하여 단백질 농축에 주로 사용하지만 정밀여과막을 장착하여 라텍스 세척에도 쓰이고 있다. 본 연구에서는 정밀여과막을 장착하여 단백질은 통과시키고 microsphere 입자만 붙잡아 두게 된다.

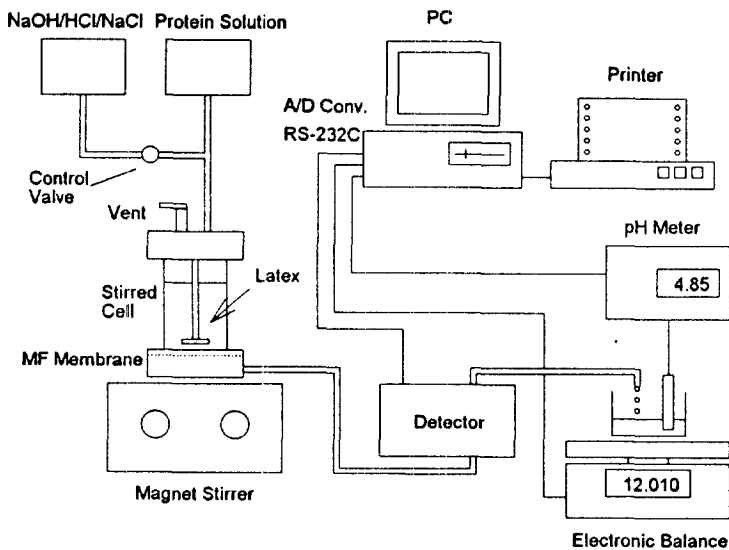


Fig. 2 Schematic diagram of protein separation apparatus

기존의 크로마토그래피 법과 비교한다면[4], metering pump를 사용하지 않으면

서도 빠른 용출 시간을 얻을 수 있다는 장점이 있으며, microsphere 표면의 기능성 기의 양 또는 solid content를 조절함으로써 pH를 조절하는 solid buffer의 개념도 도입시킬 수 있다.

### 실 험

1. Microsphere 제조: 주 단량체로 styrene을 사용하며, 공단량체로 HEA(-OH 기, 음이온성), MAA(-COO<sup>-</sup> 기, 음이온성), DSDM(-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> 기, 양이온성)을 사용하여 무유화제 회분식 공중합을 행하였다. 기능성 기가 다량 도입된 microsphere는 two stage shot growth 방법을 이용하여 중합하였다[5]. 중합된 microsphere는 이온 교환, 세럼 교환의 과정을 통하여 세척된 후, CHDF 및 SEM으로 입자 크기 및 분포를 결정하였고, 전도도 적정으로 표면 기능성 기의 양을 결정하였으며, Zeta Potential Analyzer로 ζ-퍼텐셜을 측정하였다.

2. 회분식 실험: BSA와 BHb를 완충용액에 녹여 단백질 혼합용액을 만든 후, 여기에 microsphere를 분산시킨다. 항온조에서 3시간 교반 후 원심분리, 감압여과하여 입자들을 걸러낸 후 280 nm 및 405 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질들의 농도를 결정하였다. 선택도는 다음 식으로 정의하였다.

$$S_{BSA} = \frac{wt\% \text{ of adsorbed BSA} / wt\% \text{ of adsorbed BHb}}{wt\% \text{ of total BSA} / wt\% \text{ of total BHb}}$$

3. 연속식 실험: Stirred cell로는 Micro Filtraion Systems 사의 UHP-25 (10 mL) 및 UHP-76 (400 mL), Amicon 사의 모델 8050 (50 mL)을 사용하였다. 유량은 전자 저울로 측정하였으며, 배출액의 흡광도를 280 nm 및 405 nm에서 측정하여 단백질의 농도를 결정하였다. 본 실험에 앞서서 순수 단백질 용액만으로 F-curve를 작성하여 평균 체류 시간을 결정하였다.

### 결과 및 토론

1. 회분식 실험 결과: BSA의 농도 증가에 따라 BSA의 선택도가 감소하였으며, 선택도와 기능성 기의 영향은 Fig. 3에 나타내었다. 그림에서의 값은 여러 실험 조건에서의 평균값들을 나타낸 것이며 pH는 4.5이다. 선택도는 양이온성이 음이온성에 비해 높는데, 이는 pH 4.5가 BSA의 등전점인 4.7 근방이어서 BSA의 전하는 0, BHb의 전하는 양이 되기 때문에(Fig. 1 참조), 같은 양이온성 microsphere와 BHb가 반발하여 BSA의 선택도가 크게 증가하는 것이다. 기능성 기는 그 양이 많을 수록 선택도는 떨어지고 있는데, 이는 수소 결합력이 증가할 수록 선택도가 떨어짐을 의미하는 것이다. (친수성 기능성 기의 양이 많아질 수록 수소 결합력은 증가한다[1].) 결국 단백질 분리의 주요 구동력은 소수성 상호작용력임을 보여주는 것이다.

2. 연속식 실험결과: Fig. 4는 BSA만으로 stirred cell을 통과하는 경우의 F-curve이다. Cell은 MFS 사의 UHP-25 (10 mL), 장착된 막은 0.22 μm이었으며, 그림에서 보듯 cell 부피인 10 mL가 통과되었을 때 거의 평형 농도에 다다르고 있다.

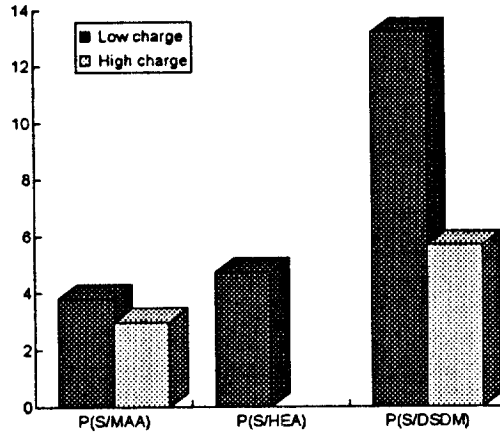


Fig. 3 Average selectivities of BSA at pH 4.5.

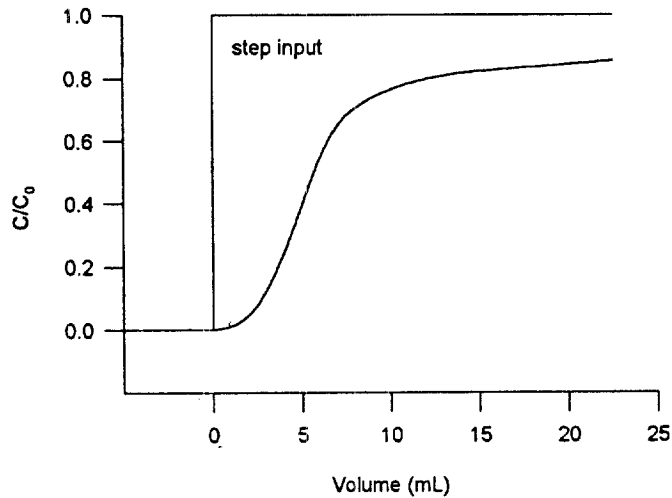


Fig. 4 F-curve of BSA in microsphere-packed stirred cell (cell volume 10 mL).

### 참고문헌

1. A. Rembaum and Z. A. Tokes (Eds.), "Microspheres: Medical and Biological Applications," CRC Press, 1988.
2. J.-Y. Yoon, H.-Y. Park, J.-H. Kim, and W.-S. Kim, *J. Colloid Interface Sci.*, accepted and in press.
3. J.-Y. Yoon, M. S. thesis, Yonsei Univ., 1993.
4. D. J. Holme and H. Peck, "Analytical Biochemistry," 2nd Ed., Longman Scientific & Technical, 1993.
5. J. H. Kim, M. Chainey, M. S. El-Aasser, and J. W. Vanderhoff, *J. Polym. Sci.: Polym. Chem. Ed.*, **27**, 3187 (1989)