

2단계 세포 파쇄를 이용한 융합 Ferritin의 생산

허윤석, 김성규, 김인호
충남대학교 공과대학 화학공학과

Production of fused ferritin

Yun Suk Huh, Sung Kyu Kim, In Ho Kim
Department of Chemical Engineering
Chungnam National University, Taejon 305-764

서론

Ferritin은 1937년 Laufflberger에 의해 말의 비장과 간에서 최초로 분리가 이루어졌으며, 24개의 유사한 단백질 소단위로 결합되어 있고 평균 분자량이 450,000 정도이다 [1,2]. Ferritin은 Apoferritin이라는 구상의 단백질각(protein shell)을 구성하고, 중앙에는 20~38%의 철분이 ferric hydroxyphosphate polymer의 형태로 함유되어 있어, 필요시 단백질에서 유리되어 바로 생체 내에 이용될 수 있는 저장 철 형태의 유일한 생리활성형 철 단백질이다. 1분자의 Ferritin은 헤모글로빈 1,200분자를 생합성할 수 있는 4,500개의 철 원자를 수용할 수 있으며 heavy(H)-chain(21kD) 및 light(L)-chain(19kD)으로 이루어져 있다[3].

본 연구에서는 heavy-chain과 light-chain이 융합된 ferritin을 본 실험실에서 기존에 수행했던 방법을 수정 보완한 새로운 방법을 연구하였다. 기존의 방법은 ferritin이 초음파 세포파쇄시 수용성으로 쉽게 얻을 수 있었으므로 세포파쇄 후 다량 존재하는 오염단백질을 제거하기 위해 silica powder를 사용했다. 수용성으로 존재하는 ferritin을 silica powder에 물리적으로 흡착 후, 탈착하는 전처리공정을 통해 오염단백질을 선택적으로 제거할 수 있었다. 그러나 본 실험에서는 새롭게 얻은 균주가 초음파 파쇄시 수용성으로 쉽게 나오지 않음이 확인되었고 이를 통하여 ferritin이 세포내막에 강하게 결합되어 있는 것으로 사료되었다. 따라서 초음파 세포파쇄를 1, 2단계로 구분하여 전처리공정을 수정 보완하였다. 1차 세포파쇄시에는 세포내막에 약한 충격을 주어 약하게 결합되어있는 오염단백질을 제거하였고 2차 세포파쇄시 강하게 결합되어있는 ferritin을 얻는 2단계 세포파쇄를 이용하였다. 전처리 과정을 수행한 샘플은 기존의 방법과 동일하게 젤 여과 크로마토그래피를 이용하여 융합 ferritin을 정제하였다. 정제된 ferritin은 전기영동과 HPLC를 통해 분석하였다.

재료 및 방법

세포배양

본 연구에 사용된 재조합 대장균은 H-chain과 L-chain을 융합시켜 fusion ferritin을 발현시키는 것으로 생명공학연구소 생물 공정실에서 분양 받았다. 균주의 배양은 LB배지(5g/L yeast extract, 10g/L tryptone, 10g/L NaCl)를 사용하였다. 재조합 대장균을 100ml의 LB배지(50ppm Amp⁺)에서 12시간 종균 배양을 하였다. 종배양시 진탕 속도는 250rpm이었고 온도는 37°C를 유지하였다. 종균 배양 후, 0.3% seed를 채취하여 2.5l 발효조(KFC, working

volume; 1.8ℓ)에 접종하였다. 발효의 조건은 37°C, 200rpm이며, 공기의 유속은 1.5vvm, pH의 값은 7.0으로 조절하였다. ferritin의 발현을 위해 유도체 IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalactoside, 최종농도 1.0mM)를 사용하였으며, 주입시기는 비성장 속도가 최대인 부근(약 OD 0.6)이었다. 그리고 IPTG주입 후 4.5시간(OD 2.5) 더 배양하였다.

전처리 분리 및 전기영동 분석

균주배양을 통해 얻은 배양액을 원심분리(8,000rpm, 30min)하여 균체를 수확하였으며, 얻어진 세포들은 washing buffer A(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 M urea)로 세척 후 초음파 파쇄기로 1차 세포파쇄(10min, washing buffer A)를 수행하였다. 1차 세포파쇄 후 원심분리(8000rpm, 20min)를 통해 상등액은 버리고, 얻어진 침전물을 초음파 파쇄기로 2차 세포파쇄(30min, washing buffer B; 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 4 M urea)를 수행하였다.

젤 여과 크로마토그래피

초음파 세포파쇄를 통해 얻어진 샘플 속의 용합 ferritin의 재접힘(refolding)과 순도를 높이기 위해 젤 여과 크로마토그래피를 이용하였다. 사용한 젤은 천연고분자인 Levan을 가교 결합시켜 만든 젤 여과용 크로마토그래피 담체인 LevaSep(LevaSep G-L, Bioprogen, Korea)을 사용하였으며, 젤의 분자량 분획 범위는 3,000-90,000이다. 젤 여과 크로마토그래피는 공칼럼(4cm X 40cm)에 수지를 채웠고, 장치는 UV-검출기(Spectrum), Digital multimeter(Proteck 506), notebook 컴퓨터로 구성되어 있다. 주입한 샘플의 양은 25ml이고 이동상으로 사용한 완충액은 50mM Tris-HCl (pH 8.0)이었다.

단백질분석

젤 여과 크로마토그래피를 통해 얻은 샘플 분획들은 전기영동을 통하여 ferritin을 확인하였고, Lowry 방법을 이용하여 단백질 정량을 하였다. 정제된 단백질의 순도를 확인하기 위하여 RP-HPLC(Reversed phase HPLC)를 사용하였으며, 컬럼은 Hypersil사의 분석용(4.5 mm I.D. × 150 mm L) C4 컬럼을 사용하였다. 이동상으로는 증류수와 아세트나이트릴을 50 : 50으로 하여 용출되는 시간, 즉 컬럼에 머무르는 시간을 비교 분석하였다. 컬럼의 세척은 메탄올을 사용하였다.

결과 및 고찰

초음파 세포 파쇄를 통해 cell로부터 수용성의 ferritin을 쉽게 얻을 수가 없었다. 이는 용합 ferritin이 세포 내막에 단단히 결합되어 있기 때문으로 사료되었다. 그래서 수확된 세포를 10분간 1차 세포파쇄(washing buffer A; 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 1M urea)후 세포 내막에 약하게 결합되어있는 오염된 단백질을 제거하였고, 30분간 2차 세포파쇄(washing buffer B; 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 4M urea)를 통해 강하게 결합되어있는 용합 ferritin을 얻을 수 있었다(Fig. 1).

2차 세포파쇄의 전처리 분리과정을 통해 얻은 샘플 25ml를 젤 여과크로마토그래피 칼럼에 주입 후 이동상의 변화에 따른 ferritin 크로마토그램은 Fig. 2A와 같다. Fig. 2A에서 보는 바와 같이 이동상이 170ml정도 흘러 나왔을 때부터 시작되는 큰 피크가 용합 ferritin이며(Fig. 2B), 뒤쪽으로 끌리는 작은 피크는 전기 영동상에서는 단백질 밴드가 잡히지 않았지만 이는 발색단을 띠는 불순물로 생각이 된다. 전처리된 샘플을 젤 여과 크로마토그래피를 수행함으로써 용합 ferritin의 refolding 및 정제효과가 있음을 Fig. 2B를 통해 확인할 수 있었다.

젤 여과크로마토그래피(GFC)를 통해 얻은 분획들을 RP-HPLC를 통해 체류시간을 이

용하여 정성적인 분석을 수행하였다. 이동상의 유속은 1ml/min, 흡광도의 측정 파장은 280nm, 시료 주입량은 20 μ l이었다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이 1, 2차 세포파쇄의 전처리 과정을 통해 얻은 샘플은 체류시간이 약 2분대 보이는 용합 ferritin 이외에도 3분대에서 오염 단백질의 피크가 보이고 있다. GFC를 통해 얻은 분획중 1, 2번 샘플의 피크를 보면 체류시간은 약 2분대로 같았으며 3분대에 나타났던 오염단백질이 정제되었음을 확인 할 수 있었다.

젤 여과 크로마토그래피를 통해 얻은 분획들을 단백질 분석(Lowry method)을 통해 수확률을 계산한 결과 97.7%이었다.

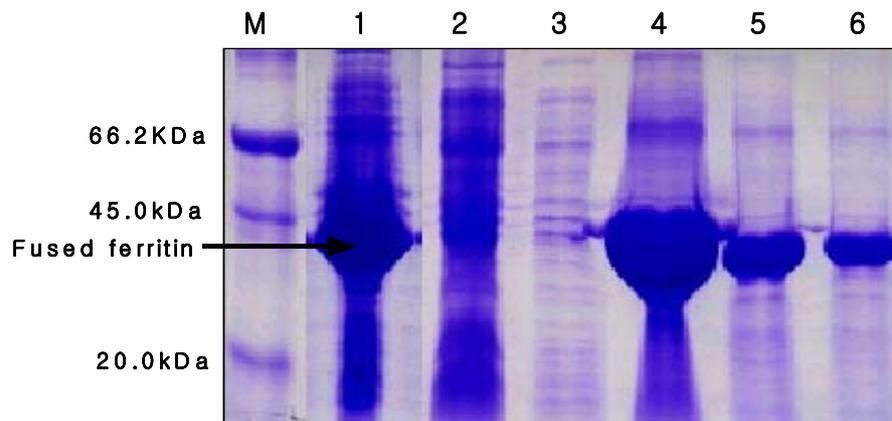
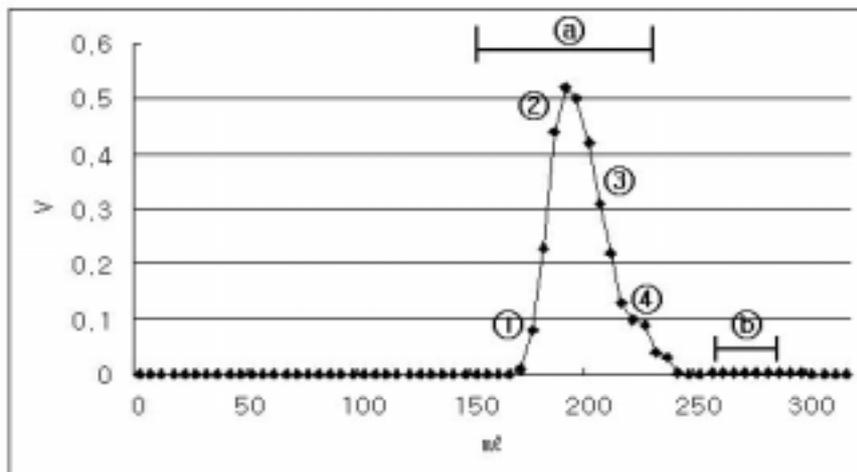
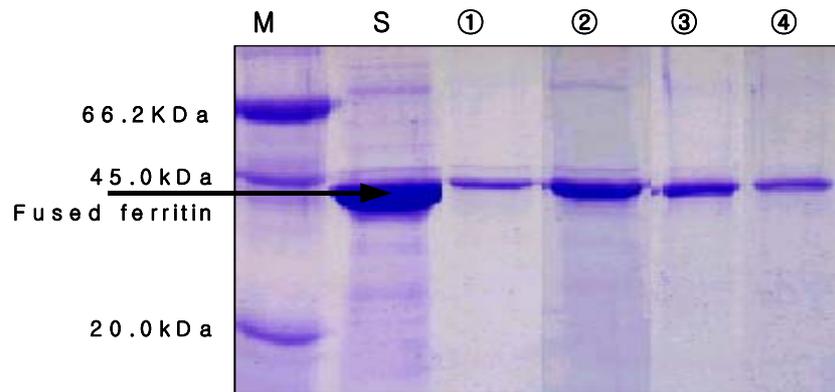


Fig. 1. 15% SDS-PAGE of fused ferritin obtained from sonication; lane M: standard marker, lane 1: sonicated cell from fermentation, lane 2: sample obtained from the 1st sonication, lane 3: diluted sample of lane 2, lane 4: sample obtained from the 2nd sonication, lane 5: 5times diluted sample of lane4, lane 6: 10times diluted sample of lane 4.



(A)



(B)

Fig. 2. (A):Gel filtration chromatogram; Buffer: 50mM Tris-HCl(pH8.0), ②: sample fractions ① ~ ④, (B): 15% SDS-PAGE of gel filtration chromatography fractions (see Fig. 2A); lane M : Standard marker, lane S : sample obtained from the 2nd sonication , lane ① ~ ④: eluted fraction② from gel filtration chromatography.

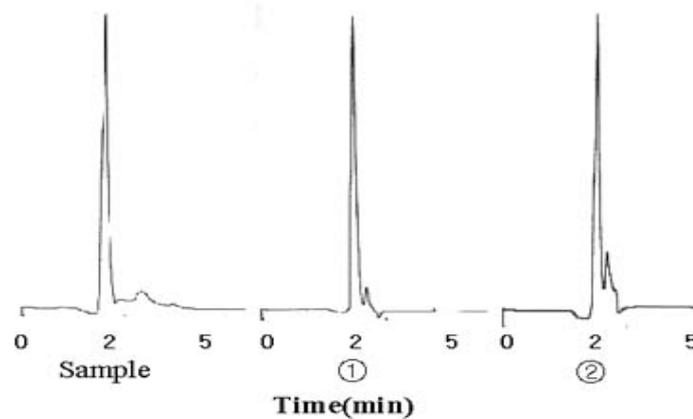


Fig. 3. RP-HPLC chromatograms of fractions from GFC; S: sample obtained from the 2nd sonication , ①, ②: eluted fraction②.

참고문헌

1. Harrison, P. M. and Arosio P.: The ferritins; molecular properties, iron storage function and cellular regulation, *Biochim. Biophys. Acta* 1275, 161-203(1996).
2. Barcelo, F., Miralles, F. and Arian, C. O.: Purification and characterization of ferritin from alfalfa seeds, *J. Inorg. Biochem.* 0162-0134(1997).
3. Theil, E. C.: Ferritin; Structure, gene regulation and cellular function in animals, plants and microorganism, *Ann. Rev. Biochem.* 56, 289-315(1987).