

제조합 *E. coli*로부터 발현되는 철단백질의 분리 및 정제

박현균, 이지원*, 김인호

충남대학교 화학공학과, *생명공학연구원

전화 (042) 821-7675, FAX (042) 822-8995

Abstract

Iron is an essential nutrient for most organisms, which supplied to them in a protein-iron complex known as ferritin. Ferritins are multimeric proteins found in prokaryotes, plants and animals. They are consisted of spherical shell of 24 subunits defining a cavity of about 8nm in diameter, where an iron core is laid down. Expression of ferritin in recombinant *E. coli* at 37°C led to the accumulation of recombinant ferritin. Insoluble form of ferritin was separated from disrupted cells, followed by various primary separation steps with two kinds of buffers. Collected samples from the primary steps were purified by DEAE-cellulose gels packed in a column. The fractions from the DEAE column were assayed to gain the amount and the purity of ferritin by using HPLC and SDS-PAGE.

서론

인체 내에 철의 결핍이 발생하면 면역체계가 약화되어 감기 및 빈혈과 같은 영양학적 질병을 나타내게 된다. 따라서 철분결핍 해소를 위하여 건조 황산 제일철, 산화 제일철 폴리말토스복염 등의 무기물 제제와 동물(말 또는 소) 비장 조직으로부터 추출된 동물 웨리틴이 사용되어 왔다. 그러나 무기물 제제는 복용시 위염, 소화장애 등의 심각한 부작용으로 그 사용이 제한되어서 철분 흡수효율이 증진된 동물추출 웨리틴이 사용되었다. 하지만 동물 웨리틴은 바이러스 내포 가능성이 높아서 그 사용이 금지되었다. 따라서, 유전자 재조합 기술을 이용하여 안전성이 검증된 재조합 인간 웨리틴이 연구되고 있다.

1937년 Laufferberger에 의해 처음으로 말의 비장과 간에서 최초로 분리가 이뤄진 웨리틴은 24개의 유사한 단백질 소단위로 결합되어 있으며 평균 분자량이 450,000 정도이다. 1분자의 웨리틴은 헤모글로빈 1200분자를 생합성할 수 있는 4,500개의 철 원자를 수용할 수 있으며 heavy(H)-chain(21kD) 및 light(L)-chain(19kD)으로 구별된다[1]. 인간 웨리틴을 제조합 대장균을 이용하여 철 단백질을 발현시키고 이온교환 젤과 GFC(Gel filtration chromatography)등을 이용하여 정제를 하는 방법이 이미 연구가 되어져 있다[1,2].

본 연구에서는 수정된 전처리 단계를 이용하여 많은 양의 웨리틴을 용해시키며 오염물질을 제거한 후 DEAE-cellulose[3]를 이용하여 웨리틴을 정제하였다. 얻어진 분획들을 SDS-PAGE, 역상 HPLC와 GF(Gel filtration)-HPLC를 통하여 그 순도와 양을 예측하였다. 최대의 순도와 수율을 얻기 위해 보다 간단하고 실용적인 공정을 개발함에 초점을 맞추었다.

재료 및 방법

균주 및 발효

본 연구에 사용된 재조합 대장균은 생명공학연구소 생물공정실에서 분주된 것으로서 LB 배지에(50ppm Amp^r) 배양하였다. 선택적인 배지에서 재조합된 대장균을 진탕배양(37°C, 200rpm)하여 OD 0.6부근에서 IPTG로(최종농도 1.0mM) 유도 후 계속해서 9시간 동안 배양하였다.

전처리 분리 및 전기영동 분석

배양액을 원심분리(6,000rpm, 20min)하여 균체를 수확하였으며, 얻어진 세포들은 washing buffer A(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.0mM EDTA)에 의해 세척한 후 초음파 파쇄기로 세포파쇄를 수행하였다. 얻어진 상등액과 침전물을 각각 washing buffer B(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.0mM EDTA, 1.0M or 4.0M Urea)로 용해한 후 전기영동을 이용하여 웨리틴을 확인하였다. 그 정제단계는 Fig. 1과 같다.

Fig. 1에서 얻어진 여러 시료들을 15% SDS-PAGE에서 확인하였다.

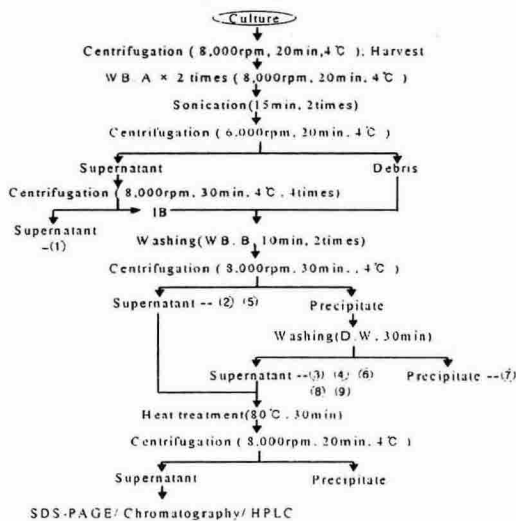


Fig. 1. Scheme of the ferritin purification; WB. A: washing buffer A(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.0mM EDTA), WB. B: washing buffer B(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.0mM EDTA, 1.0M or 4.0M Urea), IB: inclusion body.

이온교환크로마토그래피 샘플의 분석

전처리 시료를 선택하여 이온교환크로마토그래피를 수행하였다. 얻어진 분획들을 역상 HPLC와 GF-HPLC를 통하여 그 양과 분자량 분포등을 확인하였다. 역상 HPLC는 C₁₈ 컬럼에서 이동상으로 50% 증류수와 50% 아세트나이트릴을 사용하여 분석하였다. 또한 GF-HPLC에서 BIOSEP-SEC-S3000의 컬럼을 사용하였으며, 이동상으로 50mM Tris-HCl, pH 8.0을 0.6mL/min의 유속으로 사용하였다.

결과 및 고찰

헤리틴은 37°C, 200rpm 발효조건에서 잘 발현되었다. 수확한 균체를 Fig. 1과 같이 분리(①~⑨)한 SDS-PAGE 결과가 Fig. 2와 같다. 헤리틴은 생체막에 많은 양이 존재한다. 불용성의 헤리틴은 1.0M urea에 의해 약해진 생체막으로부터 4.0M urea(lane 5)와 증류수(lane 6) 처리를 통하여 대부분이 용해되어 나온다는 것을 확인하였다. lane 4에서도 헤리틴이 존재하지만 오염물이 많이 포함되어 있다. 따라서, IEC(Ion exchange chromatography)에 주입할 시료는 오염물질이 적은 lane 5, 6 분획을 선택하였다.

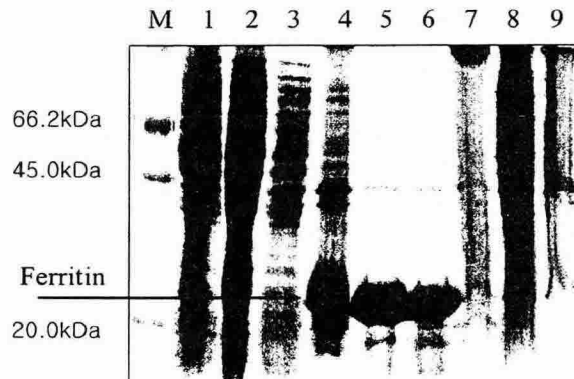


Fig. 2. 15% SDS-PAGE of primary separation samples(Fig. 1; ①~⑨); lane 1: supernatant(sup) of the inclusion body(IB) and debris after sonication, lane 2: sup of IB after treatment with washing buffer B containing 1.0 M urea, lanes 3,4,8,9: sup of the treated debris and IB by D.W, lane 5: sup of the washed debris by washing buffer B with 4.0 M Urea, lane 6: sup of the dissolved debris by D.W, lane 7: suspended precipitate(ppt) by D.W.

일차적으로 저농도의 urea로 오염물질을 제거한 후 80°C에서 30분 동안 열처리[4]를 통해 보다 많은 오염물질을 제거할 수 있었다. DEAE-cellulose gel로 충전된 column에 열처리된 시료를 주입하였을 때 얻어진 크로마토그램이 Fig. 3와 같다. Fig. 3에서 1.0M NaCl로 용출을 시킨 후에 1.0M HCl 과 1.0M NaOH에서도 상당

히 높은 피크가 나타났다. 이는 gel과 결합력이 강한 오염물질이 포함되어 있다는 것을 알 수 있다. 그러므로 gel의 재생에 있어서 충분히 buffer로 세척을 해야만 한다. Fig. 3의 각 부분에 대한 웨리틴의 함유 정도를 확인한 결과 대부분의 웨리틴이 ㉔ 부분에 포함되어 있었다(Fig. 4). HPLC와 GF-HPLC로 ㉔ 부분의 웨리틴 순도를 확인한 결과 HPLC에서는 약 3.5분에 단일 피크로 heavy-chain 나타났으며 GF-HPLC에서는 3.2~3.6분의 다양한 분자량 분포를 확인하였다(Fig. 4).

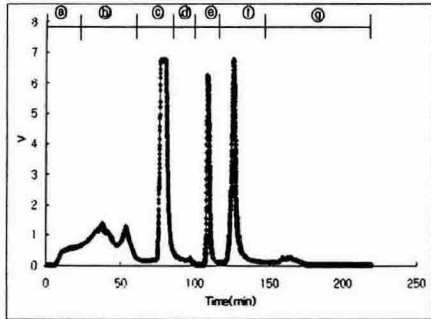


Fig. 3. The DEAE-cellulose ion exchange chromatography(IEC) of sample(㉑) in a column(2.5cm I.D × 1.9cm L) under conditions of 1.8mL/min flow rate and buffer(20mM Tris-HCl, pH 7.4, ㉒), ㉓, 1.0M NaCl(㉔), 1.0M HCl(㉕), 1.0M NaOH(㉖) and buffer(㉗).

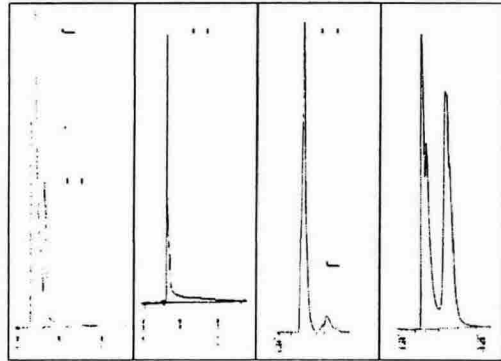


Fig. 4. Reversed phase(1,2; RT about 3.5min) and gel filtration HPLC(3,4; RT about 3.2~3.6min) chromatograms of a fraction from IEC; S.F.: standard ferritin, H: heavy-chain, L: light-chain.

참고문헌

1. A. J. Hudson, S. C. Andrews, C. Hawkins, J. M. Williams, M. Izuhara, F. C. Meldrum, S. Mann, P. M. Harrison and J. R. Guest, "Overproduction, purification and characterization of the *Escherichia coli* ferritin"(1993), *Eur. J. Biochem.*, 218, 85-995.
2. S. R. Chang, Y. T. Kim and K. S. Kim, "Purification and Characterization of Recombinant Tadpole H-chain Ferritin in *Escherichia coli*"(1994), *J. Biochem. Mol. Biol.*, 28(3), 238-242.
3. M. Vondarl, P. M. Harrison and W. Bottke, "Expression in *Escherichia coli* of a secreted invertebrate ferritin"(1994), *Eur. J. Biochem.*, 222, 367-376.
4. F. Raguzzi, E. Lesuisse and R. R. Crichton, "Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*"(1988), *Federation of European Biochemical Societies*, 231(1), 253-258.