

Refolding and Characterization of Recombinant Fusion Ferritin by Gel Filtration Chromatography

Hyoungh-Won Kim, Eun-Kyoung An, Mi-Young Shin and In-Ho Kim

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University

TEL: +82-42-821-7675, Fax: +82-42-822-8995

Abstract

Fusion ferritin(F_H+F_L), an iron-binding protein, was purified from recombinant *E. coli* by gel filtration chromatography after two-step sonications. Unfolded ferritin was refolded by GFC with various refolding enhancing additives. 50 mM Tris-HCl(pH 7.4) buffers containing 2 M urea and additive was used in GFC. Objective was to characterize the structure change at various conditions. Molecular weight was determined using GF-HPLC and RP-HPLC was used to quantify the unfolded and refolded proteins. Activity was confirmed by iron-uptake reaction

서 론

Ferritin은 1937년 Lauffberger에 의해 처음으로 말의 비장과 간에서 분리가 되어진 대표적인 철 저장 단백질로 외피와 내공으로 구성되어 있다. 단백질의 외피는 24개의 subunit이 조합되어 구형을 이루고 그 내공(직경 약 8 nm)에는 분자 당 최대 4500개 원자까지 축적할 수 있다. 20~38 %의 철분이 ferric hydroxyphosphate polymer의 형태로 함유되어 있어, 필요시 단백질에서 유리되어 바로 생체 내에 이용될 수 있는 저장 철 형태가 된다. 즉 내공에 철을 Fe(III) 상태로 보유함으로써 유리된 철에 의한 세포 내 독성으로부터 세포를 보호할 수 있고 또한 철을 필요로 할 때는 Fe(II)상태로 환원시켜 공급한다^{1,2,3}.

Ferritin의 정제 수율은 정제과정에서 변성된 단백질에서 urea와 같은 변성제를 제거하는 공정을 거쳐 원상화하면서 크게 변화한다. 즉, 재조합 단백질의 대량생산을 위해 단백질의 변성 그리고 재접힘 공정의 최적 설계가 경제성 제고에 있어 관건이다.⁴ 본 연구에서는 젤 여과 크로마토그래피를 통해 재접힘 완충용액에 포함되어 있는 여러 가지 refolding enhancing additive에 따른 수율 변화와 구조적 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 배양 및 시료 전처리

본 실험에 사용된 재조합 대장균은 H-chain과 L-chain을 융합시켜 ferritin을 발현시킨 것으로 생명공학연구소 생물공정실에서 분양 받았다. 균주의 배양과 2단계 세포파쇄를 이용한 시료 전처리는 허 등⁵⁾의 방법을 따랐다. 세포파쇄 후 불순물을 제거하기 위해 유리 컬럼(40 mm I.D. × 500 mm L)에 Levasep G-L(Bioprogen, Korea) 수지를 채워 GFC를 수행하였다.

2. 재접힘

융합 ferritin을 재접힘 시키기 위해서 GFC를 하였다. 재접힘 완충용액은 50 mM Tris-HCl(pH 7.4)에 2.0 M의 urea 와 Tween-20을 사용하였다. FPLC system(Pharmacia Biotech.)을 사용하였으며 유속은 2.0 ml/cm²h, 주입량은 500 μ l이었다. 충전한 젤은 Sephacryl S-200(Pharmacia Biotech.)을 사용하였고 젤의 총 부피는 12.96 ml이었다.

3. 분석

GF-HPLC(Phenomenex, 7.8 mm I.D. × 600 mm L) 컬럼을 HPLC system(Young Lin, model M910)에 달아 사용하였다. 이동상은 50 mM NaH₂PO₄(pH 6.8)사용했으며 유속은 0.5 ml/min이었다. 파장은 254 nm였으며 시료는 20 μ l씩 주입하였다. 검량곡선을 그리기 위해서 thyroglobulin(669 kDa), apoferritin(445 kDa), β -amylase(200 kDa), alcohol dehydrogenase(150 kDa), albumin(66 kDa)와 carbonic anhydrase(29 kDa)를 사용하였다.

4. Iron-uptake reaction

Levi 등⁶⁾이 고안한 방법을 이용하였다. 0.1 M HEPES(pH 7.0)을 이용하여 정제된 ferritin의 농도가 0.1 μ M 되도록 한다. 여기에 ferrous ammonium sulfate의 최종농도가 0.1 mM이 되도록 한 뒤 310 nm에서 흡광도 값을 읽었다.

결과 및 고찰

허 등⁵⁾이 제시한 방법에 따라 시료 전처리를 하였다. 전처리한 후 GFC를 통해 10분 간격으로 분취하였고 전기영동의 결과는 Fig. 1과 같다. 불순물이 적으면서

농도가 높은 9번 시료를 재접힘에 사용하였다. 9번 시료의 최종 urea 농도가 8 M 이 되도록 한 뒤 12 시간 동안 실온에서 방치하여 완전히 풀림이 되도록 하였다. 재접힘 시키기 위해 FPLC(Fig. 2)를 실행하였고 이를 통해 얻은 시료를 전기영동(Fig. 3)한 결과 순수한 ferritin을 얻을 수 있었다. 또한 GF-HPLC(Fig. 4)의 결과를 보면 분자량이 약 445 kDa으로 자연계에 존재하는 ferritin과 분자량이 유사하였다. 동시에 12.1 μ M Fe/min(Ref. human liver ferritin : 8.4 μ M Fe/min)로 높은 활성도를(Fig. 5) 가지고 있는 융합 ferritin을 얻을 수 있었다.

감 사

본 과제는 생명공학연구원과 인하대 초정밀 생물분리기술 연구센터의 지원에 의해 연구가 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

References

1. Harrison, P. M. and Arosio, P. (1996), "The ferritin : molecular properties, iron storage function and cellular regulation", *Biochimica et Biophysica Acta* **1275**, 161-203.
2. Barcelo, F., Miralles, F. and Areal, C. O. (1997), "Purification and characterization of ferritin from alfalfa seeds", *J. Inorganic Biochemistry* **66**, 23-27.
3. Theil, E. C. (1987), "Ferritin; structure, gene, regulation and cellular function in animal, plants and microorganism", *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 289-315.
4. Kim, I. H. and Chung, B. H. (2001), "Improved large-scale refolding techniques for inclusion body proteins", *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 11-14.
5. Huh, Y. S., Kim, I. H. (2003), "Purification of fusion ferritin from recombinant *E. coli* using two-step sonications", *Biotech. Lett.* **25**, 993-996.
6. Levi, S., Luzzago, A., Cesareni, G., Cozzi, A., Franceschinelli, F., Albertini, A. and Arosio, P. (1988), "Mechanism of ferritin iron uptake: activity of the H-chain and deletion mapping of the ferro-oxidase site", *J Biol. Chem.* **263**, 18086-18092.

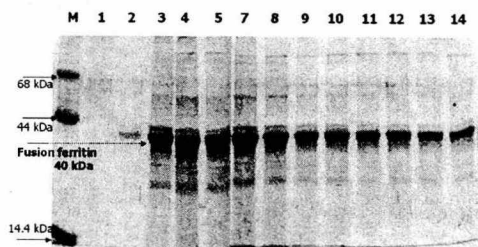


Fig. 1. 15% SDS-PAGE. Each sample was fractionated from GFC.

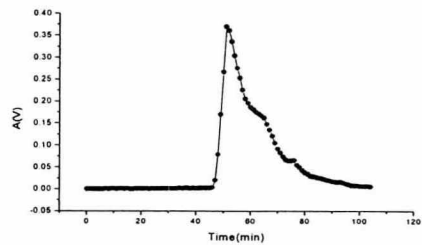


Fig. 2. Chromatographic refolding profile(Buffer : 50 mM Tris-HCl(pH 7.4) containing 2 M urea and tween 20, flow rate : 0.5 ml/min, fraction : every 5 min).

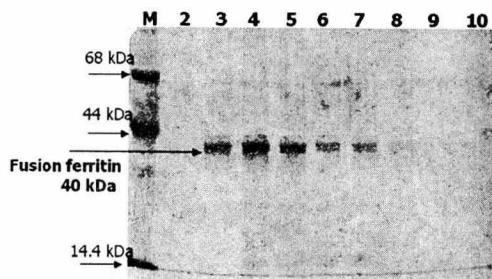


Fig. 3. 15% SDS-PAGE. Each sample was fractionated from Fig. 2.

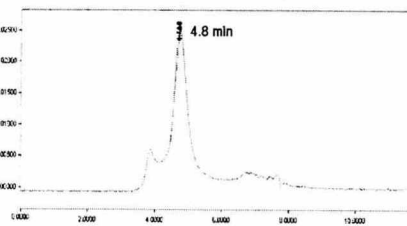


Fig. 4. GF-HPLC chromatogram(Buffer :50 mM NaH₂PO₄(pH 6.8) flow rate : 0.5 ml/min RT of horse ferritin(450 kDa) : 4.8 min)