

Comparison of various cell lysis methods for *Pichia pastoris*

Kyung-Ah Han^{1,3,4}, Sun Yong Kim^{2,3,4}, and Jong Il Rhee^{2,3,4}

Department of Material and Biochemical Engineering¹, Faculty of Applied
Chemical Engineering², BioProcess Technology lab.³, Research Center for
BioPhotonics⁴, Chonnam National University, Gwangju 500-757,
Republic of Korea

Tel : +82-062-530-0847, Fax : +82-062-530-0846

Abstract

Cell lysis method is very important to study intracellular metabolites in microorganisms. In this study, various cell lysis methods were compared to find a good method analysing intracellular metabolites in *P. pastoris*. *P. pastoris* was cultivated in YPD medium at 30 °C, 200 rpm for 24 hours and its morphology as well as the change in strain's shape were observed by microscopy. The UV/vis spectrophotometer was used to measure intracellular protein concentrations.

서론

효모는 응용 미생물학상 극히 중요한 미생물군으로서 알코올 발효능이 강한 종류가 많아서 예로부터 주류의 양조, 알코올제조, 제빵 등에 이용되어 왔다. 균체는 식·사료용 단백질, 비타민류, 핵산물질, 핵산물질 분해에 의해 생산되는 이노지닌 산과 같은 정미물질의 공급원으로서 매우 중요하다. 또한 당질원료 및 탄화수소원으로 하여 잘 생육할 수 있는 효모도 있어서 주목을 받고 있다. 그리고 biomass분야, 병리학 제어 관련 분야, 대체 연료 연구 분야 등에서 다양하게 활용되고 있다. 최근에는 특별히 재조합 단백질 분야의 연구가 활발하게 진행되고 있을 뿐만 아니라 효모의 대사연구 역시 하나의 중요한 연구 분야로 인식되고 있다. 미생물의 대사 연구에서 세포 내 대사물질의 연구는 얼마나 세포를 효과적으로 파쇄할 수 있는지가 중요한 문제로 대두되어진다. 하지만 효모 세포는 두꺼운 세포벽과 그 내면의 얇은 세포질막에 둘러 싸여있다. 특별한 효

모 세포의 구조적인 특징 때문에 효과적인 세포의 파쇄 개발의 필요성을 인식하였다. 본 연구에서는 몇 가지 다른 세포 파쇄 방법을 사용하여 효모의 형태에 미치는 영향을 현미경으로 관찰하고, 파쇄 정도를 알아보기 위한 방법으로 세포 내 단백질 농도를 측정하여 가장 효율적인 방법을 조사하였다.

재료 및 방법

Pichia pastoris 배양

Pichia pastoris X-33과 KM71H를 각각 10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L dextrose가 첨가된 YPD 배지를 사용하여 배양하였다. 각 균주들은 200 rpm, 30 °C에서 배양하였고 대수증식기에 균을 채취하여 실험에 사용하였다.

시료채취 및 전처리

채취한 시료는 4000 g, 4 °C에서 5분간 원심분리하여 펠릿만을 얻어낸 후 멸균된 증류수를 넣고 원심분리하여 2-3회 세척하여 보관하여 각각의 필요한 데이터를 위한 분석에 사용하였다.

현미경관찰

채취한 시료를 슬라이드글라스에 떨어뜨려 현미경을 이용하여 형태를 관찰하였다.

균질화

보관해 둔 시료에 멸균 증류수를 넣어 호모게나이저를 이용하여 세포를 파쇄하고 현미경을 통해 형태를 관찰하고, 원심분리하여 상등액을 이용하여 분석하였다.

글라스비드를 이용한 물리적 파쇄

보관해둔 시료에 멸균 증류수를 넣고 glass 비드를 넣은 후 고루 섞고 현미경을 이용하여 형태의 변화를 관찰한 후, 원심분리하여 상등액을 분석에 사용하였다.

열처리

보관해둔 시료에 멸균 증류수를 넣고 121 °C , 1.5기압에서 30분간 열처리하여 현미경으로 형태 변화를 관찰하고, 원심분리한 후 상등액만 분석하였다.

효소처리

보관해둔 시료에 효소를 처리하여 일정시간 반응시킨 후 현미경으로 형태의 차이를 확인한 후, 원심분리하여 상등액만 분석에 사용하였다.

세포 내 단백질 분석

각기 다른 방법으로 처리한 상등액을 Bradford 방법을 이용하여 세포 내 단백질을 분석하였다.

결과 및 고찰

① *Pichia pastoris* 배양

Pichia pastoris X-33과 KM71H를 각각 10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L dextrose가 첨가된 YPD 배지에서 배양하였다. 각 균주는 200 rpm, 30 °C에서 48시간동안 배양하였다. 배양한 균주는 많은 양의 세포를 얻기 위해 대수 증식기에 시료를 채취하였다.

② 시료채취 및 전처리

대수증식기에 채취한 시료는 4000 g, 4 °C에서 5분간 원심분리하여 상등액과 펠릿을 구분하여 상등액은 버리고 펠릿에 멸균된 증류수를 500 μ l 넣고 12000 g, 4 °C에서 10분간 원심분리하여 2-3회 세척한 후 보관하여 각각의 필요한 데이터를 위한 분석에 사용하였다.

③ 현미경관찰

채취한 시료를 슬라이드글라스에 10 μ l 정도 떨어뜨려 광학현미경을 이용하여 균주의 형태를 관찰하였다.

④ 균질화

보관해 둔 시료에 600 μ l 멸균 증류수를 넣어 울트라소니케이션 (30 sec, 3 times)을 이용하여 세포를 파쇄하고 현미경을 통해 형태의 변화를 관찰한 후 12000 g, 4 °C에서 10분간 원심분리하여 상등액을 이용하여 세포 내 단백질을 분석하였다.

⑤ 글라스비드를 이용한 물리적 파쇄

보관해둔 시료에 600 μl 멸균 증류수를 넣고 글라스비드 (직경 0.5 mm)를 넣은 후 5분간 잘 섞고 현미경을 이용하여 형태의 변화를 관찰한 후 12000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 원심분리하여 상등액을 세포 내 단백질 분석에 사용하였다.

⑥ 열처리

보관해둔 시료에 600 μl 멸균 증류수를 넣고 121 $^{\circ}\text{C}$, 1.5기압에서 30분간 열처리하여 현미경으로 형태 변화를 관찰하고 12000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 원심분리한 후 상등액으로 세포 내 단백질을 분석하였다.

⑦ 효소처리

보관해둔 시료에 600 μl 멸균 증류수를 넣고 라이소자임 효소를 처리하여 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시킨 후 현미경으로 형태의 차이를 확인한 후 12000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 원심분리하여 상등액만 분석에 사용하였다.

⑧ 세포 내 단백질 분석

위의 몇 가지 방법으로 세포를 파쇄하여 얻은 상등액을 Bradford 방법을 이용하여 분광광도계를 이용하여 595 nm에서 세포 내 단백질을 분석하였다.

요약

10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L dextrose가 첨가된 YPD 배지를 이용하여 200 rpm, 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양한 *Pichia pastoris* x-33과 KM71H를 각각 대수증식기에 시료를 채취하여 4000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 원심분리하여 펠릿에 멸균된 증류수를 500 μl 넣고 4000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 원심분리하여 2-3회 세척한 후 보관하여 각기 다른 4가지 방법으로 세포를 파쇄하여 얻은 시료를 현미경관찰을 통하여 형태의 변화를 관찰하였다. 12000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액에 시약 500 μl 와 시료 500 μl 를 넣고 상온에서 10분간 반응하여 분광광도계를 이용하여 595 nm에서 세포 내 단백질 농도를 측정하였다. 이 결과를 바탕으로 효모를 가장 효과적으로 세포를 파쇄할 수 있는 방법을 조사하였다.

감사

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업(RTI04-03-03) 지원으로 수행되었음.

References

1. S. R. Shepard, C. Stone, S. Cook and J. Schrimsher (2002), " Recovery of intracellular recombinant proteins from the yeast *Pichia pastoris* by cell permeabilization" , *J. Biotechnol.*, 99 : 149-160.
2. M. Boettner, B. Prinz, C. Holz, U. Stahl and C. Lang (2002), "High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*" , *J. Biotechnol.*, 99 : 51-62.