

## Silica-based Gel Filtration 크로마토그래피에서의 단백질-실리카 상호작용

최중갑 · 유경수  
전남대학교 약학대학

(Received September 16, 1991)

### Protein-silica Interaction in Silica-based Gel Filtration Chromatography

Jung-Kap Choi and Gyurng-Soo Yoo

College of Pharmacy, Chonnam National University, Kwang-Ju 500-757, Korea

**Abstract**—Silica-based gel filtration chromatography has been used to characterize molecular weight of proteins. However, the molecular weight measured by this method was distorted by protein-silica interactions like hydrophobic and electrostatic forces. Therefore, we characterized protein-silica interaction using two forms of phytochrome (124 kDa) having different hydrophobicity and surface charge. PH and ionic strength affected the retention time of phytochrome suggesting that electrostatic force is the major interaction between protein and silica surface.

**Keywords** □ Silica-based, gel filtration chromatography, protein-silica interactions.

크로마토그래피를 이용한 생체 고분자 물질 특히 단백질의 분리에 관한 연구는 생명과학의 발전과 더불어 매우 활발하게 이루어지고 있다. 크로마토그래피를 이용한 단백질의 분리는 크게 분자 크기의 차이를 이용하는 gel filtration, 이온적 특성을 이용하는 이온교환, 극성도의 차를 이용하는 hydrophobic 또는 reversed-phase 그리고 특이반응을 이용하는 affinity 크로마토그래피로 나눌 수 있다.<sup>1)</sup>

실리카 겔은 가장 많이 이용되는 컬럼 물질로서 작은 입자크기, 높은 강도 및 다공성 등의 장점이 있으나, 표면의 silanol group은 bonded-phase 컬럼에 있어서 이온교환 효과를 나타내어 시료 물질의 회수나 분리에 영향을 미친다. 특히, gel filtration 크로마토그래피에 있어 silanol group의 마스킹을 위하여 hydrophilic organosilan 또는 organic polymer 등을 사용하고 있으나 그 처리효과에는 한계가 있어 gel filtration을 이용한 단백질의 분자량 측정시 실리카 표

면에 의한 흡착 효과로 큰 오차가 발생한다.<sup>2-4)</sup>

실리카 표면에 대한 단백질의 흡착에 기여하는 요인들로는 electrostatic interaction, hydrophobic interaction, hydrogen bonding 그리고 Van der Waals force 등으로 밝혀져 있으나 단백질의 흡착현상을 해석하는데 있어서 각 요인들이 미치는 비중에 대해서는 학자들간에 이견을 나타내고 있다. Messing 등은 실리카 표면의 단백질 흡착현상은 수소결합이 주된 작용이라고 발표하였고, 이에 대해 Mizutani 등은 8M urea 처리 후에도 단백질의 흡착이 유지되는 것으로 보아 최소한 수소결합은 제외된다고 반박하였다. Bresler 등은 porous glass에 대한 influenza virus의 흡착력에 관한 연구에서 엔트로피의 증가는 hydrophobic 작용에 의한 것이라고 주장하였다.<sup>5-7)</sup>

실리카-단백질 흡착현상에 대한 이해는 흡착 및 bonded-phase gel filtration 크로마토그래피의 문제해결에 필요할 뿐만 아니라 최근들어 사용이 급증하고

있는 백신, 호르몬 등의 단백질 제제(e.g. insulin, interferon, interleukin)에 사용되는 유리용기에 의한 약물의 활성저하문제도<sup>8-10)</sup> 동시에 풀어나갈 수 있으리라고 생각된다.

본 실험에 사용된 phytochrome은 tetrapyrrole chromophore를 갖는 chromoprotein으로 식물의 종류에 따라 120~127 kDa의 분자량을 가지는 photoreceptor이다.<sup>11)</sup> 이 단백질은  $\lambda_{\max}=666$  nm 광을 흡수하는 비활성 phytochrome(pr form)과  $\lambda_{\max}=730$  nm를 흡수하는 활성 phytochrome(pfr form)으로 존재하며 상기 파장의 광에 의해 용이하게 photoreversible하다. Pfr form은 활성을 가지며 pr form에 비해 hydrophobic한 것으로 알려져 있으며, 단백질 표면의 charge도 상이한 것으로 밝혀졌다. 본 연구에서는 단백질의 1차 구조는 동일하나 성격이 상반되는 phytochrome의 특징을 이용하여 실리카 표면과 단백질 사이의 상호작용, 특히 hydrophobic 및 electrostatic interaction을 고찰하였으며, 그 결과 주된 상호작용은 electrostatic interaction임을 확인하였다.

### 실험방법

**Phytochrome의 정제**—암실에서 4일간 재배된 귀리에서 phytochrome을 분리정제 하였다.<sup>12)</sup> 모든 실험은 4°C green safelight 하에서 ammonium sulfate 침전, HA 크로마토그래피, ammonium sulfate back-extraction 그리고 Bio-Gel A 1.5m 컬럼 등의 과정을 통하여 이루어졌으며, 그 순도는 SDS-PAGE의 단일 band로서 확인하였다.

**Phytochrome의 photoconversion**—666 nm 광은 666 nm interference filter(Oriel C 572-6600)를 730 nm 광은 far-red cutoff filter(Ealing 26-4457)를 그리고 Bausch microscope illuminator를 사용하여 pr ↔ pfr의 photoconversion을 행하였다.

**Steric exclusion HPLC**—HPLC는 Perkin-Elmer Series 4, UV detector는 Perkin-Elmer LC-85를 사용하였다. 컬럼은 TSK 3000 SW(Varian Micropak, silica-based hydrophilic gel, 입자크기 10~13  $\mu$ m, pore 크기 250Å, 0.75×30 cm)를 사용하였고, flow rate는 0.8 ml/min 이었다.

이동상은 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.8) 용액에 KCl 농도 0~0.8 M로 변화시켜, KCl 농도에 따른 ph-

tyochrome의 retention time의 변화를 관찰하였고, pH 변화에 따른 retention time 변화를 관찰하기 위하여 50 mM Tris-HCl buffer의 pH를 6.9에서 8.1까지 변화시켰다. Phytochrome( $A_{666}=0.5$ ) 시료는 10~30  $\mu$ l를 사용하였으며, 이동상의 조성과 동일하게 처리하였다.

**Native 및 denaturing(SDS) PAGE**—Native 및 SDS-PAGE는 Pharmacia(Piscataway, NJ, USA)의 phastsystem gel electrophoresis를 이용하였고, (8~25% gradient gel 3×4 cm) native gel buffer는 0.112 M acetate, 0.112 M Tris, pH 6.4를 사용하였다. Gel staining은 Coomassie brilliant blue R-250을 사용하였고, Hoefer scientific GS 300 densitometer를 이용하여 scanning 하였다.

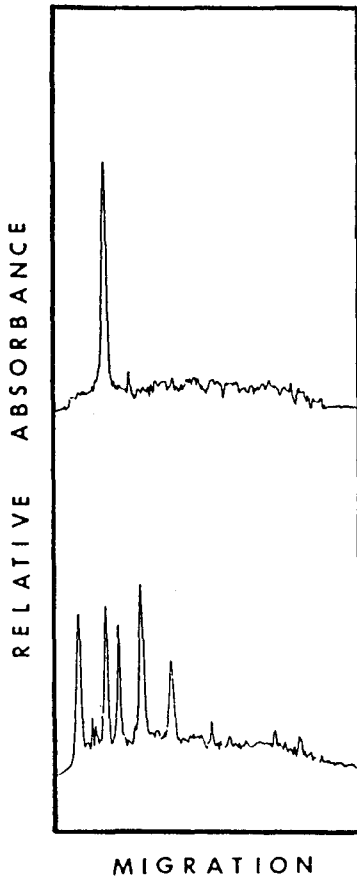
**Fluorescence 측정**—Aminco-Bowman spectrofluorometer(American Instrument Co., Silver Spring, MO, USA)를 이용하여 1 cm 층장의 rectangular cuvette을 사용하여 측정하였다. Hydrophobic probe로 사용된 1 mM의 8-anillino-1-naphthalene sulfonate (ANS)은 1  $\mu$ M pr form과 반응시켜 excitation 410 nm에서 emission spectrum을 얻었다.

### 결과 및 고찰

**Pr 및 pfr form의 hydrophobicity 및 charge difference의 확인**—실험에 사용된 phytochrome이 순수 분리 되었는가를 확인하기 위해 SDS-PAGE를 실시하여 densitometry를 행한 결과, 측정 분자량 122.7 kDa의 단일 peak를 얻었다(Fig. 1). 이후 상기 phytochrome 시료를 사용하여 photoconversion을 통해 pr 및 pfr form으로 분리하여 모든 실험을 행하였다.

ANS는 단백질의 hydrophobicity를 측정하는 probe로 hydrophobicity가 증가하면 형광강도가 상대적으로 증가한다. 본 실험에서는 pr 및 pfr form의 hydrophobicity 차이를 확인하기 위하여 pr form에 ANS를 반응시켜 형광강도를 측정하였고, 이후 동일 용액을 photoconversion에 의하여 pfr 용액으로 변화시켜 형광강도의 변화를 측정하였다. 그 결과 pfr form의 용액이 pr에 비해 형광강도가 증가하는 것으로 나타나(Fig. 2) 이는 pfr form의 hydrophobicity 증가에 기인하는 것으로 해석된다.

Phytochrome 두 form의 전하차이를 측정하기 위

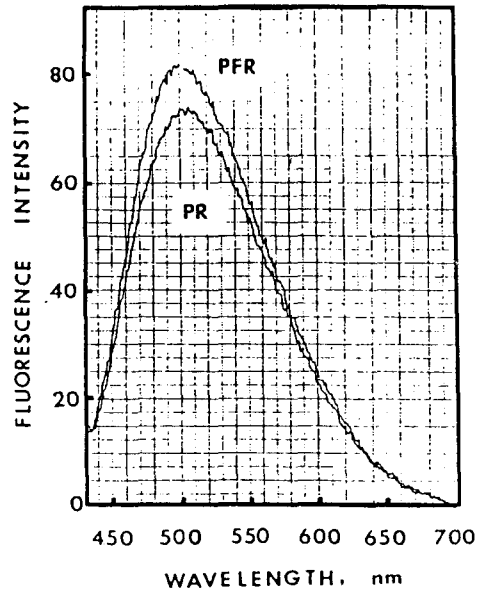


**Fig. 1**—The densitometric trace of phytochrome under SDS-denaturing condition. The gel was 8~25 % linear gradient.

Top: phytochrome (estimated M.W.; 122.7 kDa)  
Bottom: M.W. marker (left to right), myosine (200 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), phosphor-ylase B (92.5 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa)

하여 native-PAGE를 행한 결과 pfr form의 electrophoretic mobility가 pr에 비해 큰 것으로 나타났으며, 이는 양극쪽으로 더 많이 이동하는 pfr form의 negative charge가 pr에 비해 큰 것으로 기인하는 것으로 사료된다 (Fig. 3). 두 단백질간의 크기 차이를 고려할 수 있으나, 이미 두 form의 크기에 있어서는 동일한 것으로 보고된 바 있다.<sup>13)</sup>

상기 두 실험결과 pfr form이 pr에 비해 hydrophobicity와 electro negativity가 더 큰 것으로 추정되어 이를 바탕으로 TSK 3000 SW 컬럼의 실리카 표면



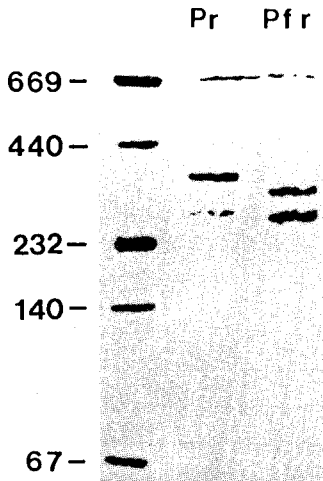
**Fig. 2**—Fluorescence enhancement of ANS by pr to pfr phototransformation.

Fluorescence enhancement of ANS (1 mM) upon phototransformation of intact pr (1  $\mu$ M) to pfr (0.85  $\mu$ M at photostationary equilibrium) in 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.8. Excitation was 410 nm.

과의 interaction을 관찰하였다.

**KCl 농도에 따른 pr 및 pfr의 retention time 변화**—이동상의 KCl 농도를 변화시켜 실리카 gel exclusion 컬럼에 대한 phytochrome pr 및 pfr form의 retention time을 관찰하였다. KCl 농도 0에서 0.2 M까지 pr 및 pfr 공히 retention time의 급한 증가를 보였으며, 0.2 M 이후 큰 변화를 볼 수 없었다 (Fig. 4). 상기 결과에서 우선 pfr form이 pr에 비해 전반적으로 retention time이 빠른 것은 pfr의 더 많은 negative charge와 실리카 표면의 silanol group의 negative charge 사이의 repulsion으로 설명될 수 있으며, 이는 native-PAGE의 결과와도 일치된다.

Ionic strength의 증가와 함께 retention time이 증가하는 현상은 KCl ion에 의한 silanol 및 단백질 charge의 masking에 기인하는 것으로 특히 negative-negative repulsion 현상이 KCl 농도증가로 감소되는 것으로 추정되며, 0.8 M KCl 농도에서의 pr 및 pfr의 retention time의 역전은 charge masking 현상과 더



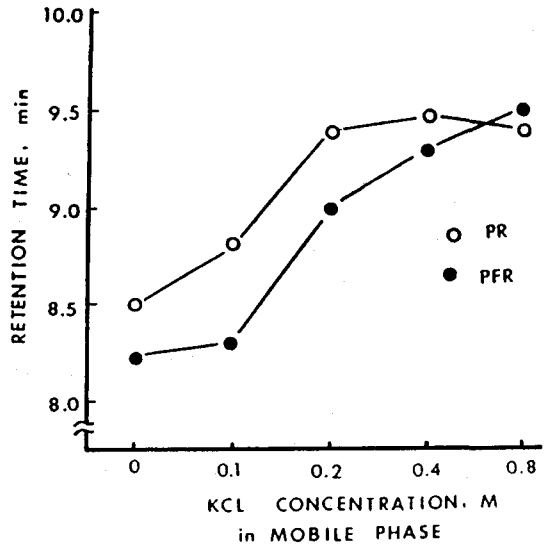
**Fig. 3**—The electrophoretic pattern of pr and pfr forms of phytochrome under native-PAGE condition(8~25% linear gradient). Each lane has two bands. Upper bands are intact phytochromes and lower bands are degraded products during electrophoresis.

Molecular marker: thyroglobulin(669 kDa), ferritin(440 kDa), catalase(232 kDa), lactate dehydrogenase(140 kDa), albumin(67 kDa)

All operations were done under a green safety light and gel temperature was 8°C.

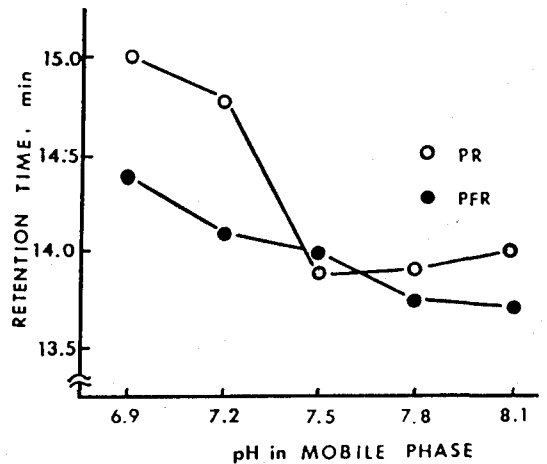
불어 pfr의 상대적으로 높은 hydrophobicity에 의한 retardation으로 보여진다. 상기 결과에서 실리카 표면과 단백질 사이의 상호작용은 주로 electrostatic interaction임을 확인할 수 있다.

**pH 변화에 따른 pr 및 pfr의 retention time 변화**  
 -pH의 변화가 단백질의 retention time에 미치는 영향을 검토하기 위하여 시료용액 및 이동상의 pH를 6.9에서 8.1까지 변화시키며 pr 및 pfr의 retention time을 관찰하였다. pH 7.5를 제외한 전영역에서 pfr의 retention time이 pr에 비해 짧았고, 이는 KCl 농도변화 결과와 일치되는 것으로 pfr의 negative charge에 기인되는 것을 다시한번 확인하였다. 또한 pH의 증가와 함께 pr 및 pfr 공히 retention time이 감소하는 현상을 나타내는데(Fig. 5) 이는 pH 증가에 따른 단백질 carboxyl group의 negative charge의 증가로 silanol group과의 negative-negative repulsion이 증가되기 때문으로 해석된다. 상기 실험에서도



**Fig. 4**—Retention time of phytochrome in pr and pfr depending upon KCl concentration in mobile phase of SEC-HPLC

HPLC condition; column: TSK 3000 SW(7.5×300 mm), uv detector: 280 nm, eluent: Tris 50 mM pH 7.8, flow rate: 0.8 ml/min, injection vol.: 10~30 μl



**Fig. 5**—Retention time of phytochrome in pr and pfr depending upon pH in mobile phase of SEC-HPLC. The condition of SEC-HPLC was same as in Fig. 4.

단백질-실리카 interaction은 주로 electrostatic interaction임을 확인할 수 있다.

## 결 론

분자크기는 동일하나 hydrophobicity 및 negative charge의 정도가 상이한 pr, pfr 두 form의 phytochrome 단백질은 분자크기 요인을 배제하여야 하는 본 실험 목적에 매우 적합한 시료로 간주되었다. pH 및 KCl 농도변화의 실험에서 공히 pfr form의 상대적으로 많은 negative charge에 의한 silanol group과의 negative-negative repulsion이 TSK 3000 SW 실리카 based 컬럼에 대한 단백질 retention time에 주된 영향을 주는 것으로 나타났으며, hydrophobic interaction의 영향은 거의 없는 것으로 확인되었다.

## 감사의 말씀

이 논문은 1990년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유 공모과제 학술 연구구성비로 수행된 것으로 동 재단에 감사한다.

## 문 헌

- 1) Seipke, G., Mullner, H. and Grau, U.: High pressure liquid chromatography of protein. *Angewandte Chemie* **25**, 535(1986).
- 2) Cooke, N.H.C. and Olsen, K.: Some modern concepts in reversed-phase liquid chromatography on chemically bonded alkyl stationary phases. *J. of Chrom. Sci.* **18**, 512(1980).
- 3) Mori, S.: Secondary effect in aqueous size exclusion chromatography of sodium poly (stylenesulfonate) compounds. *Anal. Chem.* **61**, 630(1989).
- 4) Dubin, P.L. and Principi, J.M.: Hydrophobicity parameter for aqueous size exclusion chromatography gels. *Anal. Chem.* **61**, 780(1989).
- 5) Mizutani, T.: Protein adsorption on glass surfaces using porous glass. *J. of Colloid & Interface Sci.* **79**, 284(1981).
- 6) Mizutani, T.: Adsorption and chromatography of protein on porous glass. *American Chemical Society* **343**, 63(1987).
- 7) Mizutani, T. and Brash, J.L.: A Thermodynamic study of albumin adsorption onto some solid surfaces. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 2711(1988).
- 8) Mizutani, T. and Mizutani, A.: Estimation of adsorption of drugs and proteins on glass surface with controlled pore glass as a reference. *J. Pharm. Sci.* **67**, 1102(1978).
- 9) Hirsh, J.I., Wood, J.H. and Thomas, R.B.: Insulin adsorption to polyolefin infusion bottles and polyvinyl chloride administration sets. *American J. Hosp. Pharm.* **38**, 995(1981).
- 10) Mizutani, T.: Estimation of protein and drug adsorption onto silicon-coated glass surfaces. *J. Pharm. Sci.* **70**, 493(1981).
- 11) Lagarias, J.C.: Structure and function studies on phytochrome. *Photochem. Photobiol.* **42**, 811(1985).
- 12) Choi, J.K.: *Protein topography and binding properties of phytochrome*. Ph. D. Dissertation, Texas Tech University, Lubbock, TX (1987).
- 13) Sarkar, H.K., Moon, D-K., Song, P.S. and Yu, H.: Tertiary structure of phytochrome probed by Quasi-Elastic light scattering and rotational relaxation time measurements. *Biochemistry* **23**, 1882 (1984).