

자유유동 전기이동을 이용한 Lentil Lectin의 분리

류 화 원 · *이 동 일 · **장 호 남
전남대학교 공과대학 생물화학공학과 · *환경공학과
**한국과학기술원 생물공정연구센터

Separation of Lentil Lectin Using Free-Flow Electrophoresis

Hwa-Won Ryu, *Dong-Il Lee and **Ho Nam Chang

Department of Biochemical Engineering,

*Environmental Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

**Bioprocess Engineering Research Center, KAIST, Taejon 305-343, Korea

ABSTRACT

A purification device with 30-channel free-flow electrophoresis was assembled to treat samples of 240ml volume for purification of lentil lectin(LcH) from lentil seeds with no impurities in a silver-stained PAGIEF gel. HEPES(50mM)-Tris(50mM), Cycloserine(50mM)-urea(3M), Histidine(50mM)-urea(3M) were used as ampholytes, among which Histidine(50mM)-urea(3M) (pI 7.65) was found best in resolution. LcH is known to be present in the form of LcH-A, LcH-B and the complex of the two. The complex, however, disappeared when urea was added in the ampholytes, which suggested that the complete purification of two isolectins is possible using the present multistep purification device.

서 론

최근 생물 반응 또는 생물체로부터 유용한 단백질이나 아미노산 등을 분리 정제하기 위해 전기이동(또는 전기영동, electrophoresis)에 의한 분리방법이 많이 사용되고 있다. 전기이동은 액체 크로마토그래피가 안고 있는 근본적인 문제점 즉, 대량생산을 위한 스케일-업이 어렵다는 문제를 해결해 줄 수 있을 뿐만 아니라 높은 분리능을 갖고 있으므로 향후 생물공학이나 유전공학, 생명공학 등의 학문의 발전과 함께 분리정제 장치로서의 매우 유력한 개발 잠재력을 가지고 있다.

전기이동은 단백질들의 분자량, 전기이동도(electrophoretic mobility), 등전점(isoelectric point), 또는 이것들의 조합을 이용하여 분리하는 방법으로

서 이미 생명과학의 여러 분야에서 분석용으로 널리 응용되고 있다. 이러한 분석용 전기이동법에서는 대부분의 경우 대류에 의한 분리 교란(separation disturbance)을 방지하기 위해 젤 등의 지지 매체(supporting medium)를 사용하고 있으며 이를 직접 preparative scale의 분리에 응용할 경우 다음과 같은 문제가 예상된다. 즉, 젤을 지지매체로 사용하는 경우 냉각효율이 떨어져 장치의 크기에 제약이 받으며 단백질 상호간의 분리뿐만 아니라 단백질과 젤을 다시 분리해야 하는 문제가 발생한다. 그리고 젤에 단백질이 흡착함으로써 인해 단백질의 손실이 생기며 전기삼투유동(electro-osmotic flow)의 영향이 커지는 문제가 있다(1). 이를 극복하기 위해 제안된 것이 지지매체를 사용하지 않는 자유유동 전기이동법이다.

자유유동 전기이동(free-flow electrophoresis)은 젤 전기이동이나 액체 크로마토그래피법에 비해 훨씬 조작상 융통성이 있고 스케일-업이 용이하므로 단백질, 아미노산, 더 나아가 셀(cell) 등의 분리실험에 응용하려는 시도가 활발하다(2-4). Zheng 등(5)은 등전집속(IEF, isoelectric focusing)인 경우 아미노산의 농축 분리에 관한 수치해를 구하였으며 Ivory와(6) Gobie 등(7)은 띠 전기이동(ZE, zone electrophoresis)에 관하여 연구하였다.

자유유동 전기이동법에서는 Joule열과 벽면 조도(roughness)와 굴곡에 기인하는 유동의 불안정성 및 그로 인한 분리도의 저하를 막기 위하여 젤을 사용하지 않는 대신 두 평판 사이의 얇은 필름형 유로에서 유체가 흐르도록 한다. 즉, 유체를 두 평판 사이의 얇은(대개 깊이 1mm 이하) 유로 사이를 통과하도록 하고 전기장은 유체흐름에 직교하도록 유로의 측면에서 가해 준다. 전기장 하에서 단백질은 그 전하에 따라 양극 또는 음극 쪽으로 이동하게 되는데 단백질의 이동속도와 방향은 유체의 유속, 전기장, pH, 단백질의 pI 등과 분자량에 의해 결정된다. 이같은 원리에 근거를 두고 개발된 장치로서 Elphor Vap 22와 Recycling Free Flow Focusing(RF3) 등이 있으며 그 융통성이 뛰어나 동일 장치로써 등전집속, 띠 전기이동법, 등속이동법(IITP, isotachopheresis), 계단장 전기이동법(FSE, field step electrophoresis) 등을 할 수 있고 분리 가능한 단백질의 종류도 매우 다양하여 심지어 살아 있는 미생물도 처리 가능한 것으로 알려져 있다. Wenger 등은 이러한 여러 가지 자유유동 전기이동장치의 성능을 평가하였다(8).

그러나 아직 연속분리에 관한 연구나 최적 조건을 구하려는 연구는 거의 알려져 있지 않다. 현재 국내에서는 생물공학 중 downstream 분리정제방법에 대한 필요성은 절실히 느끼고 있는 있으나 최근 문헌에서 많이 소개되고 있는 전기이동에 관한 연구 특히 preparative scale의 분리 정제에 관한 연구는 거의 없는 형편이다. 따라서 본 연구에서는 우선 평판형 자유유동 전기이동장치를 제작하는데 역점을 두었다. 그리고 이 장치를 이용하여 항암제의 개발과 관련하여 중요한 물질로 주목받고 있는 lentil lectin을 IEF법의 분리 가능성을 살펴 보았다.

한편 렉틴은 식물, 동물, 미생물 등 자연계에 널리 분포되어 있는 단백질성 물질로서 그 기능은 생체 내에서 영양물질의 수송, 저장 및 자기생체 방어수단 등으로 추정되어지고 있다. 이 물질은 그 생화학

적, 면역학적 성질이 특이하고 다양하며 세포의 응집이나 당과의 특이적인 결합능력을 가짐으로써 당 단백질 등 당화물질의 분리, 단백질이나 세포막의 구조 연구, 미생물체의 확인, 사람을 포함한 동물 혈액의 분리나 혈액형의 판정 등에 이용된다. 그리고 임상적인 응용으로서 제약운반체, 면역성 질환 및 암치료를 위한 도구로서 많은 연구가 행해지고 있고 최근에는 친화성 크로마토그래피에도 많이 응용되어지고 있다(9).

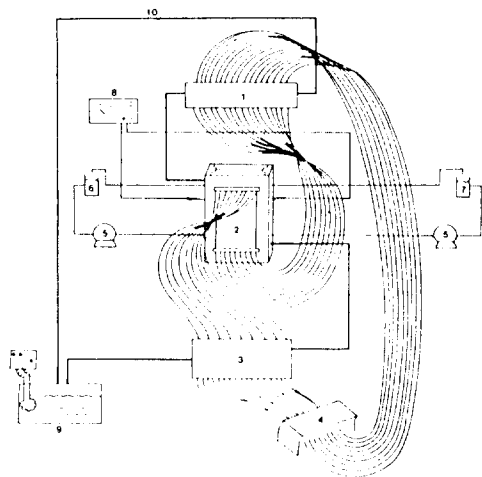
본 연구에서 분리하고자 하는 lentil lectin (즉 *Lens culinaris* hemagglutinin)은 렌즈콩에 존재하는 렉틴으로서 이 콩에는 두 개의 isolectin이 있으며 각각 LcH-A와 LcH-B로 명명된다. 두 isolectin의 분자량은 49,000으로서 동일하나 등전점에 있어서 LcH-A는 8.15, LcH-B는 8.65로서 서로 다르고 전하도 서로 다르다. 또한 두 개의 복합체도 존재하는데 그 pI는 8.45이고 사람의 혈액중의 적혈구와 결합은 하지만 혈액형에 대한 특이성은 갖지 않으며 LcH-A는 mitogenic이다. LcH의 당특이성으로서 당 중에서 D-mannose, D-glucose과 결합하는 성질을 갖고 있음이 알려져 있다.

실험장치 및 방법

실험장치의 개략도는 Fig. 1과 같다. 장치의 주요 구성 요소로는 전기이동분리조와 여기에 전압을 가해 주기 위한 DC Power Supplier, Joule열을 제거하기 위한 순환냉각조, 전기이동 분리조 내의 30개의 분획으로 이루어진 작은 유로로 유체를 순환시키기 위한 연동펌프(peristaltic pump) 등으로 구성되어 있다.

전기이동 분리조

전기이동 분리조는 30mm 두께의 아크릴판에 평평한 홈을 파서 유로를 만든 후 벽면의 조도를 가능한 한 줄이기 위해 1mm 두께의 유리판을 부착하여 제작하였다. 마주 보는 아크릴 평판에도 유리판을 부착함으로써 그 결과 형성되는 두 유리판 사이의 간격은 0.75mm가 되도록 하였다. 그리고 가로 40mm인 유로의 입구와 출구에 서로 대칭적으로 깊이 0.75mm, 폭 1.0mm씩, 길이 약 20mm의 작은 홈 30개를 파서 작은 유도 유로를 만들으로써 전기이동 분리조에 출입할 때에 유체가 안정되도록 하고 균일한 유속을 가질 수 있도록 하였다. 입구와 출구에서의 작은 유로를 제외하고 전기장이 걸리는 순수



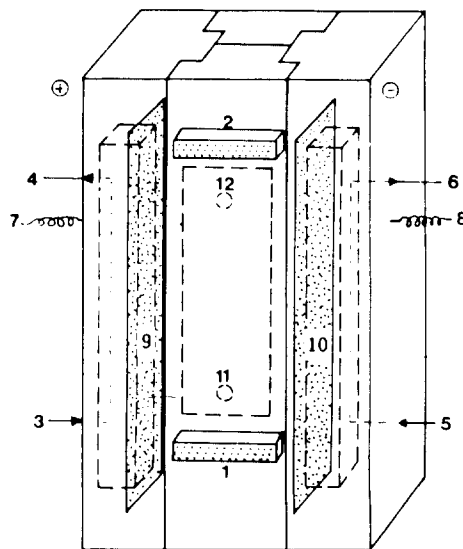
- | | |
|----------------------------|------------------------------|
| 1. Fraction collector | 6. Analyte tank |
| 2. Electrophoretic chamber | 7. Catholyte tank |
| 3. Cooling system | 8. Power supply |
| 4. Peristaltic pump | 9. Constant temperature bath |
| 5. Pump | 10. Cooling water |

Fig 1. A Schematic diagram of the recycling free-flow electrophoresis apparatus.

한 분리조 내부 길이는 180mm이고 폭은 40mm이었다(Fig. 2). 이러한 유도 유로들은 입구와 출구에서 각각 내경 1mm의 실리콘 튜브를 거쳐 연동펌프에 연결되어 유체가 순환하도록 하였다. 분리조는 조립한 후 수직으로 세워 사용하였고 유체는 아래에서 위로 흐르도록 하여 기포 제거가 용이하도록 하였다. 이동조를 포함하여 시스템 내부의 전체 부피는 150ml로부터 500ml까지 조절이 가능하도록 하였다.

연동펌프

유체를 순환시키기 위한 연동펌프는 총 40개의 channel을 가지도록 설계하여 자체 제작하였다. 두께 10mm, 직경 약 120mm의 두 개의 원판 사이에 직경 10mm, 길이 180mm인 10개의 stainless steel 봉이 등 간격으로 부착된 것을 roller로 사용하고 1/4마력 DC Motor를 사용하여 구동시켰다. 반원형 아크릴판과 roller 사이에 밀착된 내경 1.5mm의 실리콘 튜브를 roller가 스치면서 그 내부의 유체가 강제로 한 방향으로 밀리며 흐르도록 제작하였다. 40개의 채널 중 30개만 분리액의 순환에 사용하였다.



- | | |
|---------------------------|---|
| 1. Inlet connector | 8. Cathode |
| 2. Outlet connector | 9. Cation-exchange membrane (or cellulose membrane) |
| 3. Inlet cationic buffer | 10. anion-exchange membrane (or cellulose membrane) |
| 4. Outlet cationic buffer | 11. Inlet cooling water |
| 5. Inlet anionic buffer | 12. Outlet cooling water |
| 6. Outlet anionic buffer | |
| 7. Anode | |

Fig 2. Details of the electrophoretic chamber.

냉각장치

전기이동분리조 내에 가해지는 전압과 전류 때문에 발생하는 Joule열을 제거하기 위해 HAAKE Model FK2 냉각순환장치를 사용하였으며 냉각수의 온도는 4~5℃를 유지하도록 하였다. 전기이동분리조에서 나온 30개의 실리콘 튜브들과 두 개의 전해액 튜브들은 폭 30cm, 길이 50cm의 열교환기를 거치는 동안 냉각수와 접촉하면서 충분히 냉각이 되도록 하였다. 그리고 좀더 냉각의 효율을 기하기 위해 전기이동 분리조의 아크릴판 뒷면에 별도의 홈을 파서 냉각수가 출입하도록 하였고 분획수집기도 냉각함으로써 펌프로부터 수송되는 도중에 전달된 열을 제거해 주었다.

분획수집기

연동펌프에서 수송된 유체에 포함될 수도 있는 기포를 제거하고 연동펌프의 맥동과 시스템의 압력의

완충을 위해 전기이동분리조 직전에 분획수집기를 설치하였다. 즉 5cc용 플라스틱 주사기 30개를 나란히 설치하여 펌프에서 나온 액이 대기중에 열려 있는 튜브들을 통해 방울 방울 떨어져 약 5cm 정도 높이로 고이게 한 후 전기이동분리조에 들어가도록 하였다. 집속이 완료되어 시료를 수집할 때에는 대기중에 열린 관을 30개의 시험관 위에 놓고 연동펌프를 작동시킴으로써 실리콘 튜브 내의 30개의 분획을 따로따로 모을 수 있었다.

DC Power Supply

전기이동분리조 양쪽에 양극실과 음극실을 만들어 양전해액과 음전해액을 각각 흐르도록 하였고 전해액은 냉각조에서 냉각을 시킨 후 순환되게 하였으며 이온교환막으로써 전기이동 분리조 내의 용액과 구분이 되도록 하였다. DC Power Supplier는 국산 Sangwoo사에서 제작한 3000V, 150mA의 범위의 것을 사용하였고 길이 약 15cm의 백금선을 양극실과 음극실의 전해액에 각각 연결하여 분리조 전체에 걸쳐 골고루 전압이 가해지도록 설치하였다.

시약 및 재료

사용한 시약은 Sigma사의 Tris-hydroxymethyl-amino-methane (Tris), acryl-amide, L-Histidine, TEMED 및 Bio-Rad사의 Bis, ammonium persulfate와 Pharmaceutical사의 Coomassie Brilliant blue 등이었다. 그외 boric acid, phosphoric acid, sodium hydroxide, sodium ammonium phosphate, acetic acid 등은 모두 EP급 이상의 순도를 갖는 시약을 사용하였다.

추출물의 전처리

미국산 렌즈콩 250g을 상온에서 1 liter의 Tris (85mM) /boric acid(293mM) 완충용액에서 4시간을 담근 후 믹서에서 5분간 분쇄하고 4°C에서 밤새 저장하였다. 그 후 15 μ m의 세공을 갖는 나일론 여과지를 통해 진공 여과시켰으며 이때 1 liter의 완충용액을 세척용으로 추가하였다. 여액(filtrate)은 용액 1g당 60mg의 건조고형물을 함유하였고 Fisher Model 325 pH미터로 측정된 pH는 7.3, ECO Instrument Co. Model 1481-90 전기전도도계로 측정된 전기전도도 K는 1.4mS이었다. 여액을 5mM Histidine에 대해 투석하고 9,000rpm에서 30분간 원심분리하여 고형물을 제거하였다. 이때 상등액으로 pH=6.8, K=19.3 μ S의 매우 낮은 전기전도도

를 갖는 투명한 추출액을 얻게 되었으며 이것을 공급액으로 사용하였다.

등전집속 실험

Feed & bleed 방법을 사용하는 연속적 방법은 각 성분의 출구와 집속시간, 가해지는 전압과 유량 등 시스템의 변수 상호간의 관계가 충분히 확립된 후에야 가능하므로 본 연구에서는 회분식 등전집속법으로 운전하였다. 이는 feed & bleed 방법에 비해 연속적인 생산은 할 수 없지만 재순환이 가능하며 고순도의 정제된 단백질을 얻을 수 있는 장점이 있다. 집속의 관정은 흐르는 전류가 점점 떨어져 정상상태에 이르는 것을 기준으로 하였으며 대개 2시간에서 3시간이 소요되었다. 세 종류의 ampholyte를 사용하였으며 이는 HEPES (50mM) -Tris(50mM), Cycloserine(50mM)-urea (3M) 및 Histidine(50mM)-urea(3M)이다. 그리고 양전해액(anolyte)으로서 1M H₃PO₄를 사용하였고 음전해액(catholyte)으로서 1M NaOH를 사용하였다.

공급액은 ampholyte 240ml에 전처리된 렌즈콩의 추출액 60ml를 첨가(즉 20vol%)하여 사용하였으며, 분리조 및 30개의 연결 튜브에 용액이 다 채워지고 나면 다시 60ml를 뽑아낸 후 나머지 240ml로써 실험을 행하였다.

결과 및 고찰

HEPES-Tris를 사용한 경우

HEPES(50mM)-Tris(50mM)를 ampholyte로 사용하여 집속시킨 후 얻은 pH 분포는 Fig. 3과 같이 9.90부터 5.25까지 S자 모양의 분포곡선을 가지고 있으며 pH 7.9 부근과 5.1 부근이 각각 비교적 넓은 channel에 걸쳐 있는 경향을 보였다. 이것은 Tris의 pK1인 8.1, HEPES의 pK1 1.3 및 pK2 7.5의 평균인 4.4에 각각 근접한 값들로 생각된다. Fig. 4는 silver stained 된 PAG(polyacrylamide gel)-IEF(pH 범위: 3.5~9.0)에서의 1, 3, 5, ... 등 해당 channel의 sample 밴드를 보여 준다. 그림에서 1번부터 3번 channel까지는 산성 단백질의 band가 약간 있기는 하지만 lectin의 분리가 어느 정도 잘 이루어지고 있음을 알 수 있으며 27번 이후의 channel에서는 lectin은 전혀 검출되지 않고 산성 단백질만으로 된 band가 나타나고 있어 그 분리가 잘 되어 있음을 보여 주고 있다. 그러나 중간 부분의 많은 channel에서 전혀 분리가 되어지지 않고 있는데 이

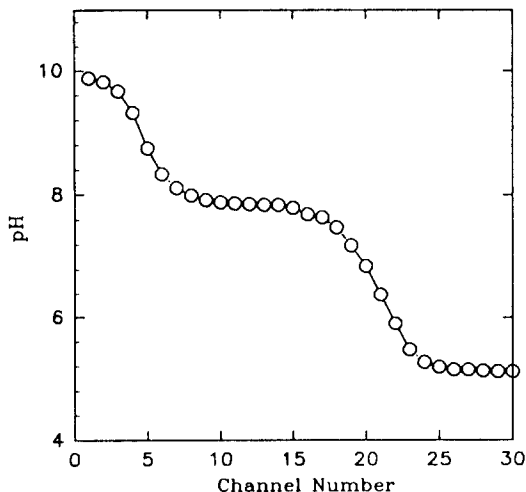


Fig 3. pH profile of samples with ampholytes of HEPES(50mM)-Tris(50mM) (left : cathode right : anode).

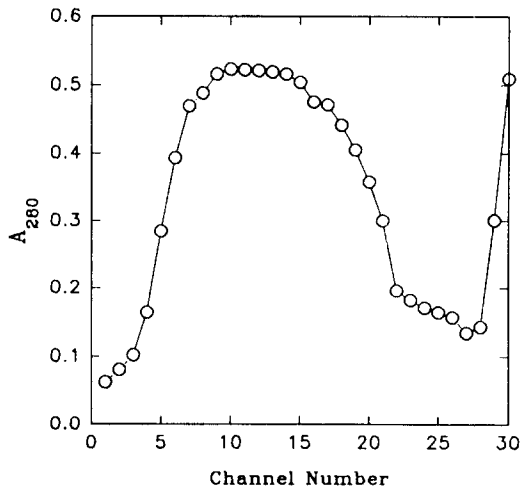
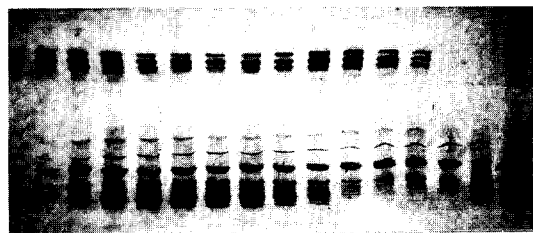


Fig 5. UV-spectrum of samples with ampholytes of HEPES(50mM)-Tris(50mM).



1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 Crude

Fig 4. Silver stained PAGIEF gel(pH range: 3.5~9.0) distribution of samples with ampholytes of HEPES(50mM)-Tris(50mM). The upper three bands are LcH-B(pI 8.65), the coplex(pI 8.45), and LcH-A(pI 8.15), respectively.

는 주어진 완충용액으로 비록 pH구배는 전체 시스템에 걸쳐 고르게 이루어졌다 할지라도 sample 내의 단백질들의 이동에 필요한 추진력이 약하기 때문으로 생각된다.

Fig. 5는 각 channel에서의 UV 흡광도를 나타낸 것으로서 channel 1에서부터 점점 증가하여 channel 8~15에서 최대값에 이르고 점점 감소하여 channel 27에서 최저가 된 후 다시 channel 30에까지 급격하게 증가하고 있다. 즉 lectin이 있는 channel의 흡광도는 낮는데 비해 산성 단백질이 많

을 경우 그 값이 커짐을 알 수 있다. UV-흡광도가 렉틴의 농도보다는 산성 단백질에 주로 영향을 받았으므로 UV-흡광도로는 렉틴의 순도나 정량을 알 수 없었다. 따라서 이하의 분석에서 UV-흡광도 측정은 하지 않았다.

Cycloserine-urea를 사용한 경우

Cycloserine은 그 pI값이 5.9이지만 본 실험에서는 Fig. 6에서 보여 주듯이 channel의 양 끝부분을 제외하고는 전체에 걸쳐 pH 6.1 부근에서 균일한 분포를 가졌다. IEF로 재순환시켜 얻은 여러 channel에서 시료 분석을 위한 Fig. 7의 PAG-IEF젤에서 각 band의 중간 부분의 단백질들의 이동은 거의 없었으나 산성 단백질과 염기성 단백질들은 각각 양극과 음극 쪽으로 점점 이동해 갔음을 알 수 있다. Band 중간 부분의 단백질들이 거의 이동하지 않은 것은 완충용액의 pH가 약 6.1이므로 단백질의 pI 값이 6.0 부근에 있는 단백질들은 전하를 띠지 않게 되고 이로 인해 전기장의 영향을 거의 받지 않았음을 의미한다. 따라서 이러한 경우 시료를 주입할 때 이 실험에서와 같이 ampholyte와 시료를 미리 혼합하여 시스템에 넣는 것은 바람직하지 않게 보인다. pI 6.0 부근의 단백질들은 lentil lectin(복합체인 경우 pI=8.45)에 비해 상대적으로 산성이므로 시료를 양극 부근의 한 channel에서 서서히 주입함으로써 산성 단백질들은 양극 쪽으로 또는 정지하도록 하고 염기성 단백질인 렉틴만 음극쪽으로 이동하도록 하

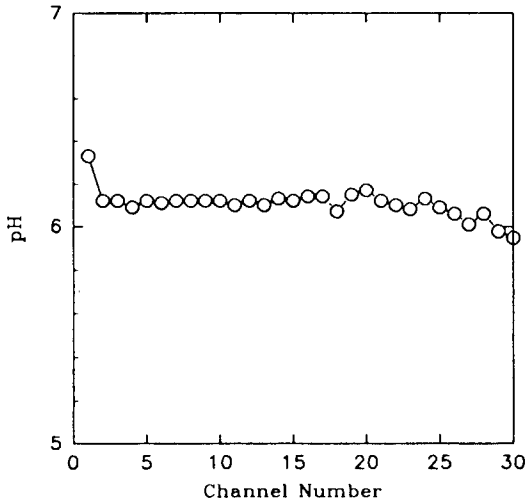


Fig 6. pH profile of samples with ampholytes of Cycloserine(50mM)-urea(3M).

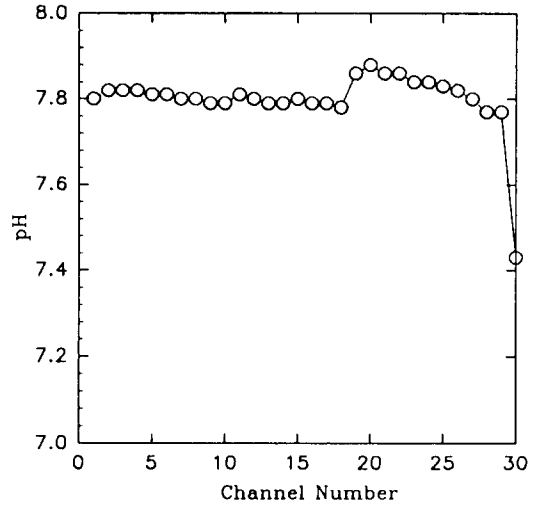


Fig 8. pH profile of samples with ampholytes of Histidine(50mM)-urea(3M).

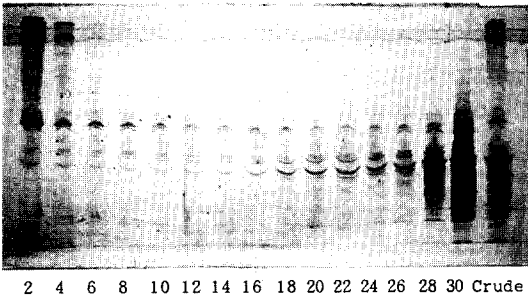


Fig 7. Silver stained PAGIEF gel(pH range: 3.5~9.0) distribution of samples with ampholytes of Cycloserine(50mM)-urea(3M).

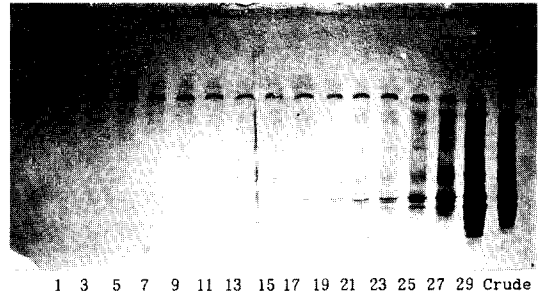


Fig 9. Silver stained PAGIEF gel(pH range: 3.5~9.0) distribution of samples with ampholytes of Histidine(50mM)-urea(3M).

여 보다 분리도를 높힐 수 있을 것으로 생각된다.

Histidine-urea를 사용한 경우

Histidine의 pI는 7.65로서 LcH-A의 pI인 8.15 보다 약간 낮은 값을 가지고 있다. Fig. 8에서 볼 수 있듯이 Histidine-50mM의 경우 대부분의 channel에서 pH분포는 7.8에서 7.9 사이에 매우 균일한 값을 가지고 있다. Channel 전체에 걸쳐 거의 일정한 pH 분포를 갖는 점에서는 Cycloserine의 경우와 동일하다. 그러나 Fig. 9는 Histidine이 렉틴분리를 위한 완충용액으로서 적합함을 보여준다. 즉, 각 channel 및 feed의 band를 보여주는 이 그림에서 렉틴

의 분리가 매우 잘 이루어졌음을 확인할 수 있는데 channel 14까지는 아주 순수한 렉틴이 분리되었음을 알 수 있다. 한편 이 실험에서 3M urea를 함께 넣음으로써 LcH-A와 LcH-B의 복합체가 없어지는 대신 각각 LcH-A와 LcH-B로 분해되었음을 보여 주고 특히 channel 8부터 14까지는 LcH-A 한 가지만 함유하는, 즉 고순도의 단일물질을 얻을 수 있었다. 따라서 단일성분 또는 두세 가지의 혼합하여 ampholyte로 사용할 경우 분리하기를 원하는 단백질의 pI와 가장 근접한 pI를 갖는 ampholyte가 가장 높은 분리도를 나타낼 것으로 보인다.

요 약

240ml의 시료를 정제할 수 있는 30channel의 preparative-scale 자유유동전기이동 분리장치를 제작한 후 렌즈콩으로부터 lentil lectin(LcH)을 전기집속법으로 분리하였다. 분리된 각 분획을 PAGIEF 젤에서 silver staining했을 때 불순물이 전혀 검출되지 않을 정도의 고순도 lectin을 얻을 수 있었다. 이 때 ampholyte로서 HEPES(50mM) -Tris(50mM), Cycloserine(50mM)-urea(3M), Histidine(50mM) -urea(3M) 등을 사용하였으며 50mM Histidine(pI 7.65)인 경우 가장 분리도가 가장 좋았다. LcH는 보통의 조건하에서 LcH-A와 LcH-B 및 그 복합체로 존재하지만 urea(3M)를 첨가할 경우 그 복합체는 사라지고 단지 LcH-A와 LcH-B의 두 가지 순수한 형태로만 나타났으며 따라서 이 장치를 사용하여 다단 분리 정제를 할 경우 두 성분의 완전한 분리도 가능성을 보여 주었다.

감 사

본 연구는 1990년도 전남대학교 학술연구비와 1991년도 한국과학재단 일반목적기초연구비(911-

1005-030-2)의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 대하여 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. R. A. Mosher, W. Thormann, N. E. Egen, P. Couasnon and D. W. Sammons(1987), *New Directions in Electrophoretic Methods*, (J. D. Jorgenson and M. Phillips, eds.), 247, ACS, Washington, D. C.
2. K. Hannig(1978), *J. Chromatogr.*, **159**, 183.
3. K. Hannig(1982), *Electrophoresis*, **3**, 235.
4. R. Kuhn and H. Wagner(1989), *Electrophoresis*, **10**, 165.
5. S. N. Zheng, T. Hanai, T. Yonemoto and T. Tadaki(1992), *J. Chem. Eng. (Japan)*, **25**, 686.
6. C. F. Ivory(1980), *J. Chromatogr.*, **195**, 165.
7. W. A. Gobie, J. B. Beckwith and C. F. Ivory(1985), *Biotechnology Progress*, **1**, 60.
8. P. Wenger, A. Heydt, N. B. Egen, T. D. Long and M. Bier(1988), *J. Chromatogr.*, **455**, 225.
9. N. Sharon and H. Lis(1972), *Science*, **177**, 949.