

도축혈액으로부터 면역단백질의 효과적인 분리법

최인욱 · 이현정
한국식품개발연구원

An Effective Method of Isolating Immunoglobulins from Bovine Plasma Proteins

In Wook Choi and Hyun Jung Lee
Korea Food Research Institute

Abstract

Immunoglobulins from bovine plasma proteins were isolated by IMAC which Cu^{2+} was chelated on a chelating sepharose fast flow gel. Most plasma proteins were eluted by 1st (0.01 M Na_2HPO_4 , 0.5 M NaCl, pH 4.0) and 2nd elution buffers (0.01 M imidazol). According to the reverse phase HPLC analysis, it was found that proteins which were eluted by 1st elution buffer were mainly composed of serum albumin, while most IgG and transferrin were eluted by 2nd elution buffer. When protein fractions obtained by 2nd elution buffer was applied to ultra filtration system (molecular weight cut off: 100 kD), IgG was further purified. These results indicate that IMAC is an excellent tool for isolating immunoglobulins from plasma proteins.

Key words: immunoglobulins, transferrin, IMAC, plasma proteins

서 론

면역단백질은 특이적으로 병원성 미생물과 같은 이물질을 인식하고 그것에 결합하여 자신이 직접적으로 침입을 막기도 하고 보체와 결합하여 살균 및 용균작용을 하거나 질병의 감염을 수동적으로 억제하는 항체를 제공하는 역할을 하는 고분자의 당단백질이다. 동물체 혈액중의 면역단백질의 80~90%는 IgG의 형태로 존재한다. 이들 면역단백질의 경구투여효과에 관해서 많은 연구가 진행되고 있다. 신생자돈에게 면역단백질을 경구투여한 결과, 수동면역기능을 전이하는 효과를 보여 중체량의 증가, 설사감소 및 도태율 감소 등에 영향을 미치는 것으로 보고되었다^(1,2). 사람에게 있어서도 면역단백질의 경구투여효과가 보고된 바 있는데 면역시킨 소의 초유를 섭취한 유아가 enterotoxin 생산성 대장균에 의한 질병에 대하여 방어효과가 있었다고 보고되고 있다⁽³⁾. 경구 섭취된 항체단백질은 보통 장관으로 흡수되어 혈액으로 이행되는 경우는 없으나 대부분의 경우 항체는 장관내에서 병원

미생물이나 독소 등을 결합하여 이들의 증식이나 소장상피세포에 부착, 각종 활성 등을 저해함으로써 생체방어에 기여하는 것으로 간주된다^(4,5).

면역단백질의 분리는 일반적으로 면역단백질이 다량 함유되어 있는 초유를 이용하여 행하였는데 여기에는 몇가지 문제점이 있다. 즉 개체당 비유량이 한정되어 있고 비유시기도 분만후 48시간으로 제한되어 있어 초유의 확보가 어려운 실정이다. 반면 소나 돼지의 도살시 폐기되는 대부분의 혈액에는 약 16~18% 정도의 단백질이 함유되어 있어 이들을 식품소재로 이용하자는 연구가 세계적으로 활발히 진행중이다.

초유 또는 혈액으로부터의 면역단백질 분리 방법으로는 대개 ion exchange chromatography, 또는 gel filtration법 등을 반복 또는 병행하여 사용하기도 하고 ammonium sulfate, cold ethanol 침전법 등을 이용하여 대량으로 생산하고자 하였으나 분리공정이 효율적이지 못하거나 생산비가 비싼 것 등이 문제점으로 대두된다⁽⁶⁻¹⁰⁾. 따라서 현재 대부분 폐기처분되는 도축혈액으로부터 면역단백질을 효율적으로 분리, 정제 할 수 있는 제반기술이 갖추어지기만 한다면 이를 이용한 면역강화식품 혹은 의약품의 개발이 앞당겨 질 것으로 사료된다. 본 연구는 소의 혈액으로부터 면역단백

Corresponding author: In Wook Choi, Korea Food Research Institute, San 46-1 Baekhyun-dong, Boondang-gu, Seongnam-si, Kyunggi-do 463-420, Korea

질을 효율적으로 분리, 정제하여 식품이나 혹은 의약품제조 개발에 응용할 수 있도록 하기위해 실시하였다.

재료 및 방법

혈장 단백질 분획

혈액은 서울시 송파구 가락동 소재 축협공판장 산하 도축장에서 도축 즉시 수거한 우혈을 혈장단백질 분리를 위해 항응고제로 사용한 10% sodium citrate를 전체 혈액의 1%가 되게 첨가하여 1시간 이내에 원심분리(3,000×g, 20 min)하여 상등액을 취한 후 냉동건조하여 냉동실에서 보관하면서 이후의 IgG의 분리를 위하여 사용하였다.

표준 IgG는 Sigma 사의 제품을 사용하였다.

Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC)

IMAC는 FPLC (Pharmacia Biotech Co.)상에서 행하였으며, 먼저 20% ethanol용액에 전처리되어 유통되는 chelating sepharose fast flow (Pharmacia Biotech Co.)를 구입하여 최대한 반복하여 ethanol용액과 gas를 제거하고 증류수로 3회 세척한 후 gel과 증류수의 비율을 각각 75%와 25%가 되도록 준비하였다. XK 16 column (Pharmacia Biotech Co.)에 증류수를 일정량 채워두고 준비한 gel을 서서히 부어 충전하고 이때 유속은 60 mL/hr로 증류수를 3 bed volume이 되도록 흘려준 후에 membrane filter (pore size 0.45 μm)로 여과한 0.1 M CuSO₄용액을 1 bed volume이 되도록 통과 시킴으로써 immobilizing metal인 Cu²⁺을 gel에 흡착시켰다. Cu²⁺이 흡착되어 있는 gel을 0.01 M Na₂HPO₄, 0.5 M NaCl (pH 8.2) 흡착용매(binding buffer)로 평형화하였으며 동결건조한 혈장단백질을 10%가 되도록 완충용액에 녹인 후에 3,000×g에서 10분간 원심분리하여 생성된 curd를 제거하고 membrane filter (pore size 0.45 μm)로 여과 한 후 3 mL을 column에 주입하였다. Gel에 고정화된 Cu²⁺에 흡착된 단백질을 용출시키기 위해 1차 와 2차 용출용매(elution buffer)를 사용하였으며 1차 용출용매는 0.01 M Na₂HPO₄, 0.5 M NaCl, pH 4.0을, 2차 용출용매는 0.01 M imidazol을 이용하였다.

역상 chromatography

IMAC로부터 용출용매에 의해 분리된 단백질의 동정은 HPLC상에서 역상 chromatography를 이용하여

행하였다. PU-980 intelligent HPLC (JASCO Co.)에 CrestPak C18S column (JASCO Co.)을 연결시키고 1번 pump에는 0.1% trifluoroacetic anhydride/H₂O용액을, 2번 pump에는 0.1% trifluoroacetic anhydride/acetonitrile용액을 연결하고 1 mL/min의 유속으로 1번 용액과 2번용액의 비율을 각각 60%와 40%에서 0%와 100%까지 변화시키면서 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

전기영동

면역단백질의 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Phastsystem (Pharmacia Biotech Co.)을 이용하여 행하였다. Phastsystem gel은 Gradient 8-25를 사용하였고 SDS buffer strips를 사용하여 전기영동한 후 Phast Gel Blue R으로 염색하였다.

결과 및 고찰

IMAC법은 Cu, Zn, Ni, Fe 등의 금속이온을 고정화시킨 column을 통하여 이들과의 친화력 정도에 따라 단백질을 분리하는 방법으로서 Porath 등⁽¹¹⁾에 의해 1970년대에 소개된 이래 단백질의 유용한 분획수단으로 널리 이용되고 있다⁽⁸⁻¹²⁾. 본 실험에서는 chelating sepharose fast flow gel의 기능기(functional group)인 imino diacetic acid에 Cu²⁺를 chelating시키고 10% 혈장단백질용액을 주입시켜 Cu²⁺와 어느정도 친화력이 있는 혈장단백질을 흡착용매를 통하여 Cu²⁺에 결합시키고 이들의 결합정도에 따라 1차와 2차용출용매를 통하여 column으로부터 용출시켰다(Fig. 1). 용출된 혈장단백질의 역상 column에서의 chromatogram은 Fig. 2와 같았으며, 1차용출용매에 의해서는 주로 혈장단백질의 50%이상을 차지하는 albumin과 소량의 IgG 등이 용출되었다. 1차용출용매에 분리되지 않은 혈장단백질의 분리를 위해 2차 용출용매로 재차 분리를 시도한 결과, 용출된 분획이 대부분 1차 용출용매에 의해 용출되지 않은 IgG와 transferrin으로 구성되었으며 잔존하는 소량의 albumin도 2차 용출용매에 의하여 고정화된 Cu²⁺로부터 분리되었다. HPLC의 peak area결과를 통하여 전체혈장에 포함된 IgG의 농도는 24%이었으며 이 중 2차용출용매에 의해 분리된 분획에 약 64%의 IgG가 회수되었음을 알 수 있었다. 이 분획에서의 IgG의 농도는 혈장에 비해 약 3.2배 증가하였다. 순수한 IgG의 분리 정제를 위하여 2차용출용매획분을 한외여과장치(Amicon Co, molecular weight cut off 100 kD)를 이용하여 농축시켰으며 농축

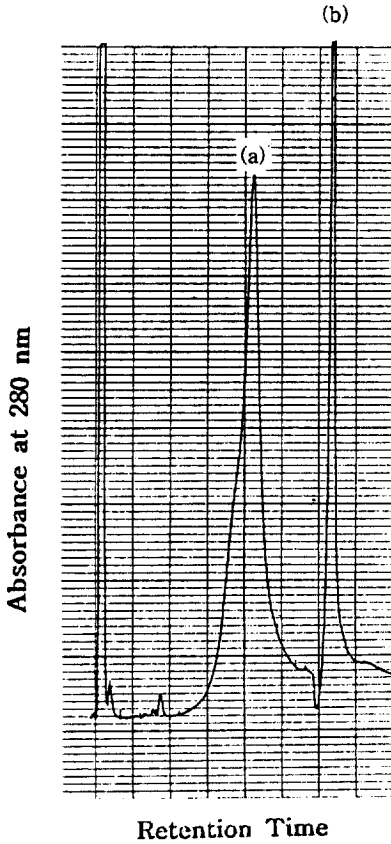


Fig. 1. IMAC chromatogram of bovine plasma proteins. Bovine plasma proteins (0.3 g in 3 ml of 0.01 M Na₂HPO₄, 0.5 M NaCl, pH 8.2) were applied to XK 16 column. (a) was eluted by 1st eluting buffer (0.01 M Na₂HPO₄, 0.5 M NaCl, pH 4.0) and (b) was eluted by 2nd eluting buffer (0.01 M imidazol).

된 분획과 표준 IgG와의 전기영동상에서 분리 pattern 을 비교해본 결과, 이 획분의 대부분(약 90%)이 IgG의 heavy chain (50 kD)과 light chain (30 kD)으로 구성된 순수한 IgG들로 구성되어 있음을 보여주고 있다(Fig. 3). 이상의 실험결과들은 IMAC가 도축혈액으로부터 IgG를 효율적으로 분리할 수 있는 유용한 수단임을 입증하고있다.

현재 의약분야 뿐만 아니라 식품분야에서도 면역단백질을 이용한 면역강화 기능성식품의 개발이 활발히 진행되고 있으며 초유나 혈액으로부터 면역단백질을 효율적으로 분리하기위해 많은 연구가 이루어지고 있다. Butler 등⁽¹³⁾은 IgG가 다양함되어 있는 초유로부터 IgG를 분리하고자 ion exchange chromatography, gel filtration법 등을 반복 또는 병행하여 사용하고 이를 다시 DEAE-sephadex A50을 이용하여 순수분리하고자 하였

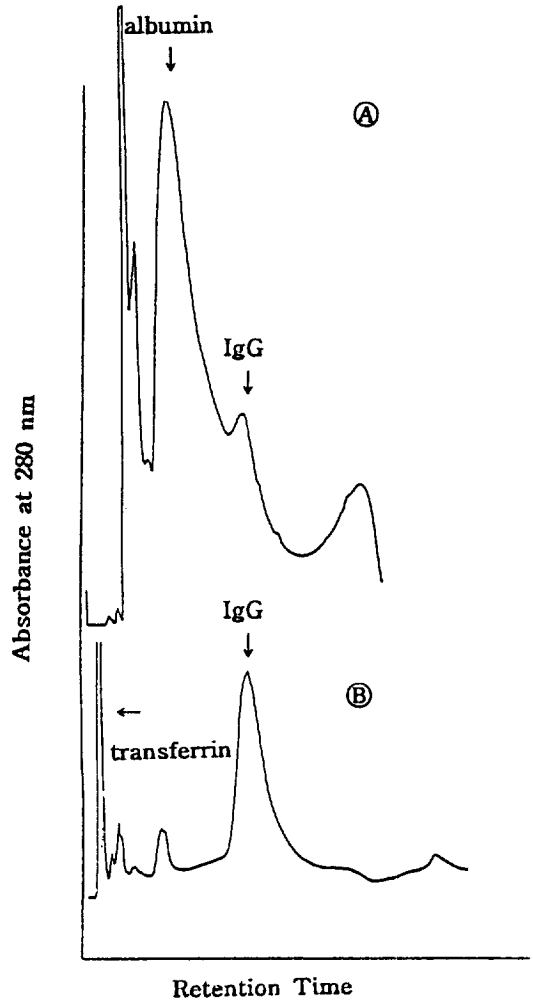


Fig. 2. Reverse phase chromatograms of plasma proteins eluted by 1st (A) and 2nd eluting buffers (B).

으나 분리에 많은 어려움이 있었다. Lee 등^(8,9)은 도축혈액으로부터 IgG를 분리하기 위해 polyphosphate 침전법과 IMAC, 그리고 ion exchange chromatography를 연속적으로 사용하여 crude IgG분획을 얻었다고 보고한 바 있다. 그의 sodium sulfate를 이용한 침전법, cold ethanol을 이용한 분획 방법 등이 발표되었으나 경제적이 못하거나 분리공정이 복잡하여 비효율적인 문제점들을 가지고 있었다. 본 연구에서는 대부분 폐기처분되는 도축혈액으로부터 IgG, transferrin 등과 같은 유용한 소재가 IMAC를 통하여 경제적이고 효율적으로 분리될 수 있음을 보여주고 있으며 장차 이를 이용한 기능성 식품의 개발에 본 연구에서 사용된 분리기술이 유용하게 응용될 것으로 기대된다.

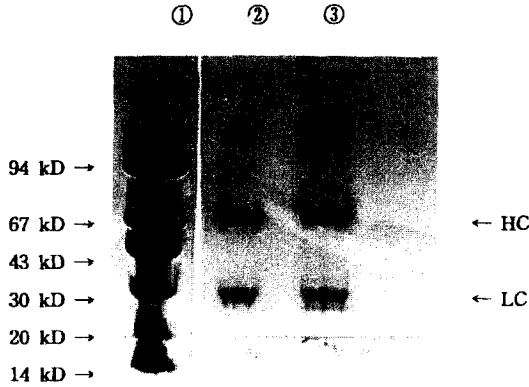


Fig. 3. Electrophoretic pattern of plasma proteins which were eluted by 2nd eluting buffer from IMAC and then concentrated by ultra filtration (mwco: 100 kD). ①: molecular weight standards ②: standard IgG ③: plasma proteins (2nd eluting buffer → UF).

요 약

Chelating sepharose fast flow gel에 Cu²⁺을 고정화시키고 이들과 단백질과의 친화력 정도에 의해서 용출용매를 통해 단백질을 분획하는 방식의 IMAC법을 이용하여 소의 혈장단백질로부터 IgG의 분리를 시도하였다. 대부분의 혈장단백질은 1차(0.01 M Na₂HPO₄, 0.5 M NaCl, pH 4.0)와 2차 용출용매(0.01 M imidazol)에 의하여 용출되었으며 역상 chromatography를 이용하여 각 분획의 단백질조성을 조사한 결과, 1차 용출용매에 의해서는 주로 albumin이, 그리고 2차 용출용매에 의해서는 IgG와 transferrin 등이 IMAC column으로부터 용출되었다. 2차 용출용매에 의해 얻어진 분획으로부터 분자량 100 kD이상의 단백질을 한외여과장치를 이용하여 농축하였을 때, IgG가 효과적으로 분리 정제 되었다.

문 헌

1. Kennelly, J.J., Ball, R.Q. and Aherne, F.X.: Influence of

porcine immunoglobulin administration on survival and growth on pigs weaned at two and three weeks of age. *Can. J. Ani. Sci.*, **59**, 63 (1979)

2. McCallun, I.M., Elliot, J.I. and Owen, B.D.: Survival of colostrum -derived neonatal piglets fed gamma-globulin. *Can. J. Ani. Sci.*, **57**, 151 (1977)

3. Ballabriga, A.: Immunity of the infantile gastrointestinal tract and implication in modern infant feeding. *Acta Paediatr. Jpn.*, **24**, 53 (1986)

4. Sugita-Konishi, Y.S., Shibata, K., Yun, S.S., Hara-Kudo, Y., Yamaguchi, K. and Kumagai, S.: Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**(5), 886 (1996)

5. Al-Mashiki, S. and Nakai, S.: Separation of immunoglobulin and transferrin from blood serum and plasma by metal chelate interaction chromatography. *J. Dairy Sci.*, **71**, 1756 (1988)

6. Baick, S.C. and Yu, J.H.: Separation of immunoglobulin from holstein colostrum and its immunological response. *Food and Biotechnol.*, **4**(2), 117 (1995)

7. 김정우, 여상건, 이효종 : 소의 immunoglobulin G1에 대한 단 clone성 항체의 생산에 관한 연구. I. 소의 immunoglobulin G1의 순수분리. *한국축산학회지*, **28**(12), 747 (1986)

8. Lee, Y.Z., Sim, J.S., Al-Mashikhi, S. and Nakai, S.: Separation of immunoglobulins from bovine blood by polyphosphate precipitation and chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 922 (1988)

9. Lee, Y.Z., Aishima, T., Nakai, S. and Sim, J.S.: Optimization for selective fraction of bovine blood plasma proteins using polyethyleneglycol. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 958 (1987)

10. Mach, J.P. and Phaud, J.J.: Secretory IgA, a major immunoglobulin in most bovine external secretions. *J. Immunol.*, **106**, 552 (1971)

11. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. and Belfrage, G.: Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, **258**, 598 (1975).

12. Porath, J. and Olin, B.: Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochem.*, **22**, 1621 (1983)

13. Butler, J.E.: Synthesis and distribution of immunoglobulins. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **163**, 795 (1973)

(1997년 6월 16일)