

Expanded Bed Adsorption 크로마토그래피를 사용하여 재조합 *E. coli* 세포 파쇄액으로부터 내포체 단백질을 직접 재접힘하는 공정

¹조 태 훈 · 서 창 우 · *이 은 규
한양대학교 화학공학과 생물공정연구실, ¹삼양제넥스 생명공학연구소
(접수 : 2001. 1. 18., 게재승인 : 2001. 4. 25.)

In Vitro Refolding of Inclusion Body Proteins Directly from *E. coli* Cell Homogenate in Expanded Bed Adsorption Chromatography

Tae Hoon Cho¹, Chang Woo Suh, and Eun Kyu Lee^{*}
Bioprocessing Research Laboratory, Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Ansan 425-791, Korea
¹Samyang Genex Biotech Research Institute, Taejon 305-348, Korea
(Received : 2001. 1. 18., Accepted : 2001. 4. 25.)

To avoid the intrinsic problem of aggregation associated with the traditional solution-phase refolding process, we propose a solid-phase refolding method integrated with expanded bed adsorption chromatography. The model protein used was a fusion protein of recombinant human growth hormone and a glutathione S transferase fragment. It was demonstrated that the EBA-mediated refolding technique could simultaneously remove cellular debris and directly renature the fusion protein inclusion bodies in the cell homogenate with much higher yields and less aggregation. To demonstrate the applicability of the method, we successfully tested the three representative types of starting materials, i. e., rhGH monomer, washed inclusion bodies, and the *E. coli* homogenate. This direct and simplified refolding process could also reduce the number of renaturation steps required and allow refolding at a higher concentration, at approximately 2 mg fusion protein per ml of resin. To the best of our knowledge, it is the first approach that has combined the solid-phase refolding method with expanded bed chromatography.

Key Words : inclusion bodies, refolding, renaturation, solid-phase refolding, expanded bed chromatography

서 론

응집(aggregation) 현상은 내포체 단백질의 대규모, in vitro, solution-phase 재접힘 공정에서 주요한 손실중의 하나이다. 응집 문제를 해결하기 위해 Creighton은 고체 matrix 표면과 단백질사이의 이온 작용을 이용한 solid-phase 재접힘인 'matrix-assisted refolding'의 개념을 도입하였다(1). 이 공정에서는 변성제에 의해 풀린(unfolded) 단백질들은 이온간의 상호작용에 의해 고체 matrix 표면에 결합된 후 변성제를 제거함으로써 단백질이 서서히 재접힘 된다. 이 공정은 단백질 사이의 분자간 작용(intermolecular interaction)을 줄임으로써 응집 문제를 해결하는 방법으로서, horse cytochrome C, ovalbumin, prochymosin, 재조합 돼지성장호르몬과 같은 단백질의 재접

힘에 성공적으로 적용되었다(2). 또한 이온 작용 외에 소수성 상호작용(3)과 His 6x와 니켈 이온들 사이의 친화적 상호작용(4)도 사용되었다. 몇 가지 문제점에도 불구하고 이 기술은 solution-phase 재접힘과 비교해 보았을 때 약 300배 높은 단백질 농도로 재접힘 공정을 수행할 수 있었고, 따라서 공정 부피를 획기적으로 줄일 수 있었다(5).

최근에 expanded bed adsorption (EBA) 크로마토그래피는 세포 파쇄액으로부터 고체 불순물을 제거하는 동시에 목적 단백질을 얻는 단일 단계 공정으로, 따라서 전통적인 원심분리(또는 여과)와 그 다음의 초기 흡착 공정을 대체할 수 있는 공정으로 연구되어져 왔다. 목적 단백질은 일차적으로 이온간의 상호작용에 의해 흡착시킬 수 있으나 protein A와 같은 친화성 상호작용에 의한 것(6, 7)과 소수성 상호작용에 의한 것(8) 또한 사용되었다.

이 연구에서 우리는 EBA 칼럼 내에 세포 파쇄액을 주입하여 그 안에 있는 내포체 형태의 목적 단백질을 solid-phase에서 재접힘시킬 수 있는 공정을 개발하였다. 세포파쇄액 내의 재조합 인성장호르몬과 glutathione S transferase(GST)의 융합 단백질 내포체를 urea로 용해시키고 난 후 풀린 융합단백질

*Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
Hanyang University, Ansan 425-791, Korea
Tel : +82-31-400-5275, Fax : +82-31-408-3779
E-mail : eklee@hanyang.ac.kr

을 음이온 교환 메커니즘을 통해 matrix 표면에 결합시켰다. 그 후 완충액을 밑에서 위로 흘려줌으로써 세포 찌꺼기(cell debris) 및 기타 고형 불순물을 EBA 원리에 의해 제거하고, 칼럼 내 urea 농도를 서서히 낮춰 주어서 solid-phase에서 재접힘시켰다. 이 새롭고 간단한 공정은 우선 재접힘의 수율과 순도를 획기적으로 향상시키며, 고농도에서 재접힘을 할 수 있게 하며, 따라서 공정 부피를 크게 줄이고, 또한 여러 공정 단계를 줄이게 되므로 공정이 단순화되면서 결과적으로 공정 시간을 단축시킬 수 있다.

재료 및 방법

모델 단백질

hGH-GST(69개 아미노산 잔기로 구성된 fragment)의 융합 단백질을 모델 단백질로 사용하였다. Urokinase 절단부위를 포함하는 linker sequence는 hGH의 C-말단과 GST의 N-말단 사이에 위치한다. 융합단백질은 arabinose promotor를 사용한 *E. coli* BL21 안에 내포체 형태로 발현되었고, 융합단백질의 발현율은 전체 단백질의 약 40%이었다.

EBA 크로마토그래피 (STREAMLINE)

STREAMLINE 25 칼럼은 Amersham Pharmacia Biotech AB사(Uppsala, Sweden)으로부터 구입하였고 resin으로는 STREAMLINE DEAE를 사용하였다. 이 resin은 100-300 μm의 다양한 입자 크기를 갖고 있고 (평균 직경은 200 μm) 밀도는 1.20 g/mL이다(9). 사용한 resin 부피는 50 mL이었고 이때 bed의 침강 높이(settled height)는 약 10 cm이었다. 단백질 loading은 50 mL 부피의 resin에 50에서 500 mg의 총 단백질을(즉 1 - 10 mg/mL)로 변화시켰다. Loading 단계의 bed expansion ratio는 2, 3, 4로, urea 세척 단계의 위 방향(upflow) 유속도 80, 120, 168 cm/h로 다양하게 실험하였다.

EBA-mediated 재접힘 공정 순서

정제된 rhGH 단량체, 융합단백질의 세척된 내포체, 그리고 융합단백질 내포체를 포함하는 *E. coli* 세포 파쇄액 등 세 가지의 다른 시작물질을 가지고 재접힘 실험을 수행하였고, 이 모든 재료는 ㈜녹십자에서 제공받았다.

hGH 단량체를 이용하여 urea로 풀린 단백질이 matrix에 흡착되는지, 그리고 urea를 제거함으로써 재접힘이 되는지를 확인하는 실험을 하였다. 동결 건조된 hGH 분말을 sodium bicarbonate buffer(46 mM, pH 8.0)에 1.8 mg/mL 농도로 용해시킨 후 8 M urea로 평형화시켜 풀린 hGH 단량체 용액 20 ml을 10 mL의 STREAMLINE DEAE로 충전된 일반칼럼에 흡착시키기 위해 주입하였다. Matrix에 결합된 단백질을 urea가 없는 같은 완충액(bed volume의 8배)을 이용하여 세척하면서 재접힘 시켰다.

세척된 내포체를 이용하여 8 M urea에 의해 풀린 내포체 안의 융합단백질이 칼럼에 흡착되고 재접힘 되는지, 또 세척된 내포체 내에 융합단백질이 40% 정도로 측정되었으므로 solid-phase 재접힘 공정 중 불순물의 영향도 관찰하였다. 세척된 내포체 46 mg을 sodium bicarbonate buffer(46 mM, pH 9.0)에 넣은 후 8 M urea를 첨가하여 용해하였다. 용해된 내포체 용액 50 mL을 STREAMLINE DEAE resin이 채워진

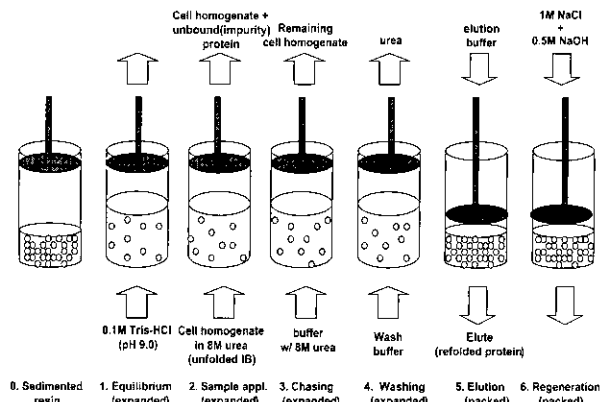


Figure 1. Process sequence of the EBA-mediated refolding of the inclusion body protein from cell homogenate.

STREAMLINE 25 칼럼에 아래에서 위 방향으로 주입하였다. 주입이 끝난 후 용해되지 않은 고형물질들을 제거하기 위해 8 M urea가 포함된 buffer 100 mL(bed volume의 2배)을 위 방향으로 주입하였다. Urea를 세척하여 재접힘을 유도하기 위해 urea가 없는 같은 buffer 400 mL(bed volume의 8배)를 위 방향으로 주입하였다. Resin을 침강시킨 후 불순 단백질을 용출시키기 위해 0.2 M NaCl이 함유된 완충액으로 위에서 아래 방향으로 흐름을 주었다. 재접힘된 융합단백질은 0.4M NaCl에 의해 용출되었다. 그리고 칼럼을 0.5M NaOH와 1.0M NaCl을 사용하여 재생시켰다.

마지막으로 세포 파쇄액을 이용하였는데, 이는 세포 파쇄액 내 고형 불순물의 제거와 동시에 융합단백질이 solid-phase에서 재접힘 되는 것을 보여주기 위한 것이다. 8M urea가 함유된 완충액 100 mL 당 10 g의 *E. coli* 세포(wet cell)를 슬러리 시킨 후 high-pressure homogenizer(model FA-078-E1, SLM Instruments Inc., USA)를 사용하여 800 bar에서 2번 통과시켜 파쇄하였다. 세포 파쇄액(40 mL)은 50 mL의 STREAMLINE DEAE resin이 채워진 STREAMLINE 25 칼럼에 아래에서 위 방향으로 흐름을 주었다. Resin 사이에 끼이거나 물리적으로 부착된 세포 찌꺼기 고체들은 8 M urea가 포함된 sodium bicarbonate buffer(46mM, pH 9.0) 100 mL(또는 2 bed volumes)을 추가로 흘려줌으로써 제거시켰다. 그 이후 urea 세척, 융합단백질 용출, 그리고 칼럼 재생은 위와 동일한 방법을 사용하였다. Figure 1은 세포 파쇄액으로부터의 EBA-mediated 재접힘 공정순서를 도식적으로 나타내고 있다.

단백질 분석

환원된(또는 풀린) 단백질과 산화된(또는 재접힘된) 단백질을 분리하고 정량화 하는데 C18 칼럼(Macrosphere 300, 5 micron, 4.6x140 mm, Alltech Inc., USA)이 장착된 역상 HPLC와 UV detector(220nm)를 사용하였다(10). Buffer A는 deionized water에 0.1%(v/v) trifluoroacetic acid(TFA)를, buffer B는 acetonitrile에 0.1%(v/v) TFA를 넣어 만들었다. %B를 24~75%까지 35분간 선형 농도구배를 주었다. Figure 2는 RP-HPLC를 사용하여 풀린 단백질과 접힌 단백질이 분리됨을 나타내었다. 용액 내 융합단백질의 순도는 Coomassie로 염색된 SDS-PAGE(Mini Protein II, Bio-Rad, USA) 겔을 스캐

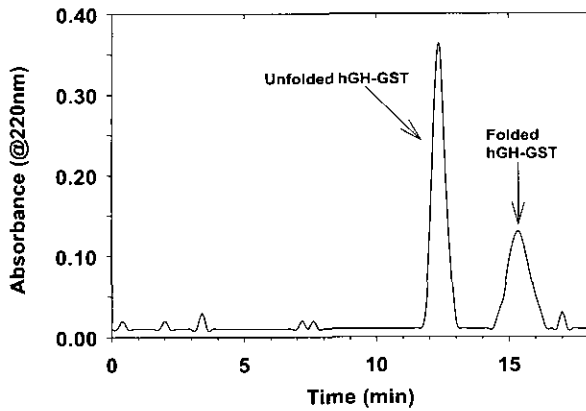


Figure 2. RP-HPLC chromatogram for the resolution of the oxidized and the reduced forms of the fusion protein. Buffer A was 0.1% (v/v) TFA in deionized water and buffer B was 0.1% TFA in acetonitrile. Fifty microliter of the sample containing both oxidized and beta-mercaptoethanol-reduced protein was injected into the C18 column (Macrosphere 300, 5 micron, 4.6 x 140 mm, Alltech Inc., USA). The gradient was 24-75% buffer B in 35 min.

냉한 후 densitometer를 사용하여 결정하였다. 또한 Superose 12 HR10/30 칼럼을 사용한 FPLC 시스템(Amersham Pharmacia Biotech, model P-500)은 재접힘 후 융합단백질 단량체와 응집체의 농도를 비교분석하기 위해 사용되었다.

Far-UV circular dichroism

표준 융합단백질과 EBA에 의해 재접힘된 융합단백질과의 2차 구조를 비교하기 위해 0.5 mm path length로 spectropolarimeter(Jasco, model J-715)를 사용하였다. 표준 융합단백질은 (주)녹십자에서 제공받았다.

결과 및 고찰

위 방향 유속과 bed expansion ratio와의 관계 및 bed의 안정성

위 방향 흐름의 선형유속과 bed expansion ratio와의 관계를 측정하기 위해 8 M urea가 함유된 sodium bicarbonate buffer(46 mM, pH 9.0)를 사용하였다. 이 용액의 밀도는 1.124 g/mL, 점도는 1.216 cp로 측정되었다. Figure 3에서 보듯이 세포 파쇄액에 8M urea를 첨가한 용액(밀도 = 1.370 g/mL)을 사용하여 유속을 변화시키면서 bed expansion ratio를 1부터 4까지 측정된 결과, 선형 유속에 따라 bed expansion ratio가 직선적으로 변함을 볼 수 있었다. STREAMLINE DEAE resin의 밀도는 urea가 미함유된 완충액의 밀도보다는 높기 때문에 평형 단계에서 resin은 칼럼 내부에서 안정화 될 수 있다. 반면에 8M urea가 함유된 세포 파쇄액(밀도 1.37 g/mL)은 resin보다 밀도가 높기 때문에 만약 파쇄액이 연속적으로 공급된다면, 즉 칼럼 내부가 8 M urea가 함유된 세포 파쇄액으로 충전된 경우 resin은 칼럼 내부에서 부유되어 유실될 것이다. 하지만 resin에 흡착되는 융합단백질의 양이 제한되어 있기 때문에 일정한 부피의 파쇄액만을 loading하였다(보통 40에서 150 mL). 이 경우 주입되는 물질이 칼럼 내의 buffer에 의해 희석되기 때문에 이등상의 밀도는 resin보다 더 낮게

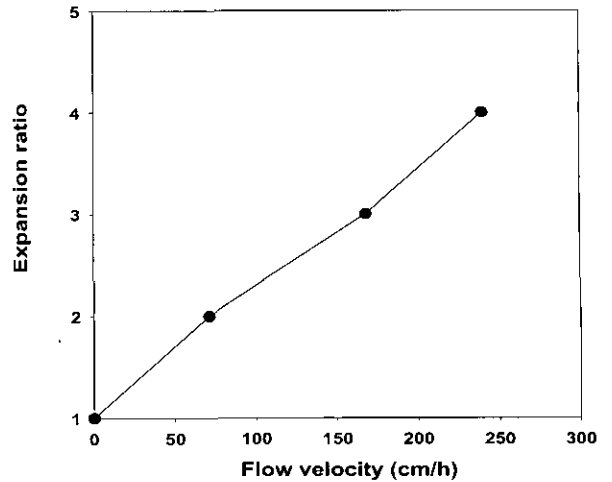


Figure 3. Expanded bed height of STREAMLINE DEAE with flow rate in 8 M urea containing 46 mM sodium bicarbonate buffer, pH 9.0.

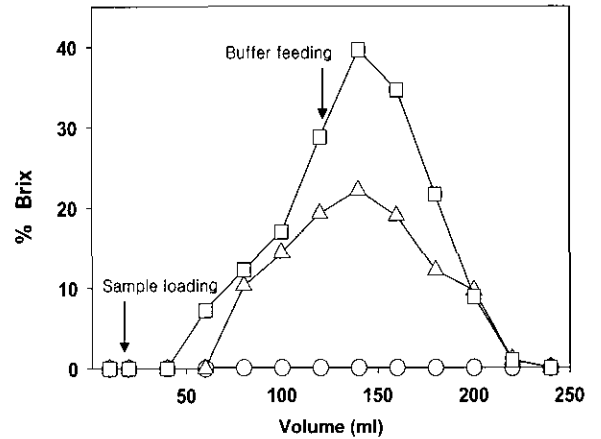


Figure 4. Elution profile of the solid matters from the expanded bed. ○: sodium bicarbonate buffer only, △: the same buffer containing 8 M urea(the feed showed 28.7% Brix), □: cell homogenate containing 8 M urea (the feed showed 47.2% Brix). All the feed was at pH 9.0. The expansion ratio was maintained at 3.0. For △ and □, 100 mL was fed and the column was washed by the buffer.

되고 따라서 bed의 안정성이 유지되게 된다. 이 실험에서 칼럼에 공급되는 40 mL의 세포 파쇄액의 평균 밀도는 약 1.10 g/mL로 계산되어 STREAMLINE DEAE resin의 평균 밀도 1.20 g/mL보다 낮았다.

세포 찌꺼기 고형물과 urea의 제거

Solid-phase 재접힘 공정의 성능은 세포 파쇄액의 loading 후 칼럼 내 고형 불순물을 잘 제거시킬 수 있느냐에 달려있다. 왜냐하면 만약 resin 사이에 끼어 있거나 resin 표면에 약하게 결합되어 있다면, 또 고체입자간의 인력작용으로 응집체를 형성하여 유체의 원활한 흐름을 방해한다면 다음의 재접힘 공정에서 수율을 떨어뜨리는 작용을 할 것이기 때문이다. 따라서 칼럼 내 고형물질을 완전히 제거하기 위해 필요한 완충액 부피를 결정하기 위해 세포 파쇄액 100 mL(% Brix로 측정된 고체 농도는 47.2%)을 칼럼에 주입하였고 용출액의 % Brix가 0이 될 때까지 sodium bicarbonate buffer(46 mM, pH 9.0)로 세척하였다. Figure 4에서 보듯이 bed expansion ratio

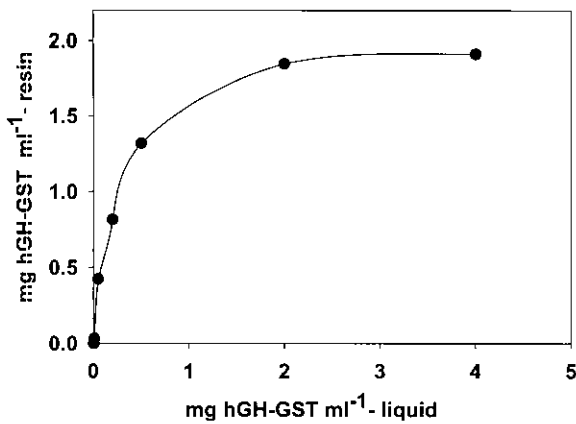


Figure 5. Equilibrium binding characteristics of the unfolded fusion protein to STREAMLINE DEAE at pH 9.0. The fusion protein concentration was 2 mg ml⁻¹ and the buffer was 46 mM sodium bicarbonate containing 8 M urea.

가 3에서 bed volume의 약 2.5배의 완충액에 의해 평균크기 506 nm의 고체찌꺼기의 93.4%가 제거되었다. 이는 세포 찌꺼기와 resin 사이의 상호작용이 비교적 약해서 세포 찌꺼기가 완충액 세척에 의해 효과적으로 제거될 수 있음을 보여주는 것이다. 또한 Figure 4에서 보듯이 urea(8M urea가 함유된 완충액의 Brix 값은 28.7%)는 urea가 함유되어 있지 않은 sodium bicarbonate buffer(46 mM, pH 9.0)를 bed volume의 2.5배 부피로 주입시켜 실질적으로 100% 제거하였다.

용합단백질과 STREAMLINE DEAE 사이의 평형 및 동적 결합능

Resin과 용합단백질 사이의 결합능(binding capacity)을 알아보기 위해 8 M urea가 함유된 sodium bicarbonate buffer (46 mM, pH 9.0)에 10 mg/mL 총단백질 농도로 용해된 내포체를 사용하여 22°C에서 회분식 흡착 실험을 수행하였다. Figure 5에서 보듯이 1 mL resin당 최대 1.9 mg의 용합단백질이 전형적인 Langmuir 등온흡착성을 보여주며 흡착되었다. 그리고 Freundlich 상수를 계산해 보면 다음과 같다.

$$m = k * C^n$$

여기서 m은 단위질량의 resin에 흡착되는 용합단백질의 질량을 나타낸 것이고 C는 단위 용액부피 안에 존재하는 용합단백질의 질량을 나타낸 것이다. k = 2.87, n = 0.63으로 계산되었다(r² = 0.87).

Figure 6에서 보듯이 평형상태의 STREAMLINE DEAE resin에 결합하는 용합단백질의 결합능력은 이온강도에 역비례함을 볼 수 있다(다른 조건들은 이전과 동일할 때). 결합능은 약 0.12 M NaCl equivalent보다 높은 이온강도에서 급격한 감소하였다. 우리가 사용한 46 mM sodium bicarbonate buffer의 이온강도는 약 0.12 M NaCl equivalent이었다.

Packed 칼럼(5 mL)을 사용하여 다음과 같은 조건에서 동적 결합능(dynamic binding capacity: DBC)을 측정하였다. 단백질은 8 M urea로 용해시킨 내포체를 사용하였고 (총단백질 농도는 10 mg/mL이고 회분식 흡착실험에서 사용하였던 것과

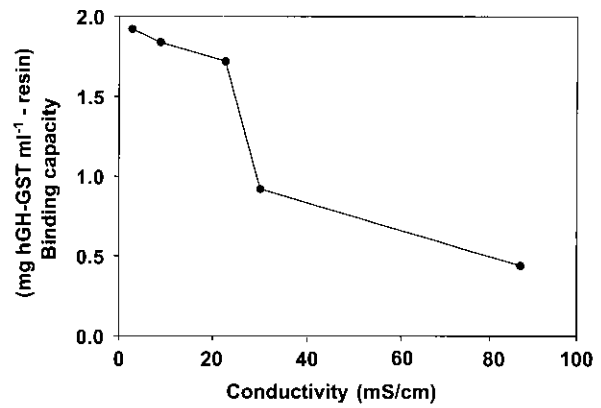


Figure 6. Effect of ionic strength on the equilibrium binding characteristics of the unfolded fusion protein to STREAMLINE DEAE at pH 9.0. The experimental conditions were the same as in Figure 6.

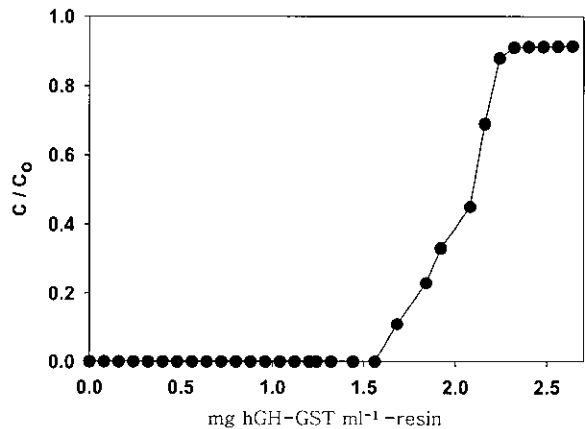


Figure 7. Breakthrough curve for the fusion protein bound to the STREAMLINE DEAE at pH 9.0 in a 5-ml packed bed. Flow rate was 0.2 ml min⁻¹. Other condition were the same in Figure 6.

같은 완충액 사용하였음), 유속은 0.2 mL/min (또는 2.4 bed volume per hour 또는 25분의 체재시간)이었다. Figure 7은 breakthrough curve를 나타낸다. DCB를 breakthrough curve에서 C/C₀ 값이 10%일 때로 하면 mL resin당 약 1.7 mg-용합단백질이었다. 그 값은 평형 결합능보다 큰 차이가 없었다 (Figure 5 참조). 이 결과는 expanded bed에서의 DBC 값은 packed bed에서의 크게 차이를 보이지 않는다는 Yamamoto 등의 결과와 일치하였다(11). 따라서 우리는 연속적인 EBA 크로마토그래피 실험에서 mL resin 당 2.0 mg의 용합단백질을 control loading value로 사용하였다.

HETP 결정

STREAMLINE 25의 HETP(height equivalent to a theoretical plate)값은 bed expansion ratio을 3으로 하고 5 M NaCl을 pulse 주입한 후 용출액의 전도도를 측정하여 residence time distribution(RTD)을 모니터링 하여 결정하였다. Figure 8에 결과를 나타내었다. 8 M urea가 함유된 것과 함유되지 않은 완충액의 HETP 값은 각각 1.13 cm와 1.28 cm로 계산되었다. 이 값은 Yamamoto 등(11)에 의해 발표된 0.5-1.5 cm 범위에

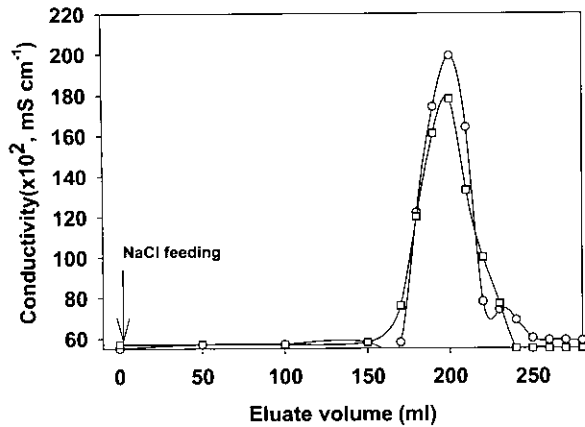


Figure 8. Conductivity measurement profiles of the tracer experiment to determine HETP(height equivalent to theoretical plate) of the expanded STREAMLINE 25 column. The bed expansion ratio was 3.0, and 5 M NaCl (20 ml) was used as a tracer. □: 46 mM sodium bicarbonate buffer only, ○: the buffer containing 8 M urea.

있었고, 8 M urea의 존재는 거의 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

EBA-mediated 재접힘 공정 수율

단량체 hGH의 경우 칼럼으로부터 점차적으로 urea를 제거함으로써 8M urea에 의해 풀린 단백질이 solid phase에서 재접힘 될 수 있었다. 이 재접힘 공정의 hGH 수율은 81%이었다. 이는 in vitro 재접힘에서 비교적 높은 값이다. 같은 방법을 세척된 내포체에 적용해 본 결과 84%의 수율을 얻었다. 단량체의 경우와 거의 차이가 없었고, 이는 내포체 내에 존재하는 불순물들이 solid-phase 재접힘을 방해하지 않는다는 결론을 내릴 수 있었다. 이것은 종래의 solution-phase 재접힘에서의 매우 낮은 수율과 비교 시 많이 향상된 값이다.

Loading 단계에서 단백질 및 고형물의 농도와 유속의 영향

Urea에 의해 풀린 용합단백질을 STREAMLINE DEAE resin 표면에서 높은 수율로 재접힘을 시킬 수 있다는 것을 확인한 후 같은 방법을 세포 파쇄액에 적용시켰다. 단백질 loading, 고형물 (cell debris) loading, 그리고 loading 단계와 urea 세척 단계에서의 유속(또는 bed expansion ratio)과 같은 중요한 변수를 변화시키면서 이 변수들이 재접힘 수율과 순도에 미치는 영향을 조사하였다.

단백질 loading은 expansion ratio 3에서 총단백질 양을 ml resin 당 1.0, 3.0, 5.12, 그리고 10 mg까지 변화시키며 loading하였고(이것은 ml resin당 0.4, 1.2, 2.05, 4.0 mg 용합 단백질에 해당함), 이 때 urea는 168 cm/h의 선 속도로 세척하였다.

Figure 9에서 보듯이 단백질 loading양이 감소할수록 수율과 순도는 증가하였다. 1과 10 mg/ml-resin의 사이에서 수율은 큰 폭의 차이를 보였다(82 vs. 57%). 이 수율 값은 동일한 용합단백질의 solution-phase 재접힘 결과인 약 28%와 비교 시 훨씬 높은 값이다(10). 또한 비록 수율은 비교적 낮지만 매우 높은 단백질 농도(10 mg/ml-resin)에서도 재접힘이 잘 진행되는 흥미로운 사실을 발견하였다.

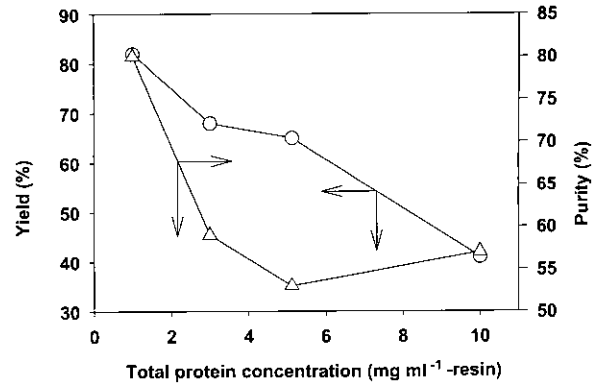


Figure 9. Effect of protein loading on the yield(○) and the purity(△) of the EBA-mediated refolding of the fusion protein from the cell homogenate. The expansion ratio was 3.0, pH was at 9.0, and the urea wash flow rate was 168 cm h⁻¹.

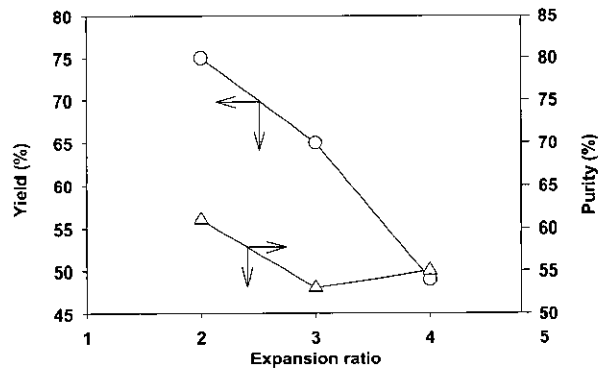


Figure 10. Effect of expansion ratio in the protein loading step on the yield(○) and the purity(△) of the EBA-mediated refolding of the fusion protein from the cell homogenate. The protein loading was 5 mg total protein per ml of the resin and 3.0, respectively, and pH was at 9.0.

Figure 10에서는 expansion ratio를 2부터 3, 그리고 4까지 변화시킨 경우 ratio가 낮을수록 높은 수율을 얻었다. 이 수율의 차이는 비교적 컸으며, 이는 풀린 단백질의 효율적인 흡착을 위해서는 충분한 체류시간을 주어야 한다는 사실을 보여주는 것이다. Expansion ratio가 3일 때의 평균체류시간은 약 10.8 분이다.

Urea 세척 단계에서 유속의 영향

풀린 상태에서 중간체를 거쳐 접힌 상태로 가는 전이속도(transition rate)는 각 단백질에 따라 다르며 재접힘 수율에 영향을 미친다고 알려져 있다. Creighton(2)에 의하면 bovine pancreatic trypsin inhibitor(BPTI)의 solid-phase 재접힘에서 urea를 급격히 제거시키면 매우 낮은 수율을 가져오고 대부분이 생물학적 활성이 없는 형태로 재접힘 된다고 보고하였다. 반면에 Misawa(12)에 따르면 recombinant arginine deiminase의 경우에는 급격히 희석(100배)시킴으로써 보다 효과적으로 renaturation시킬 수 있었다. 본 실험의 경우 전이속도는 EBA 칼럼 내의 urea 제거속도에 의해 결정된다. 전체 400 mL의 완충액을 위 방향으로 80, 120, 그리고 168 cm/h (이것은 400, 600, 그리고 800 mL/min에 해당함)의 유속으로

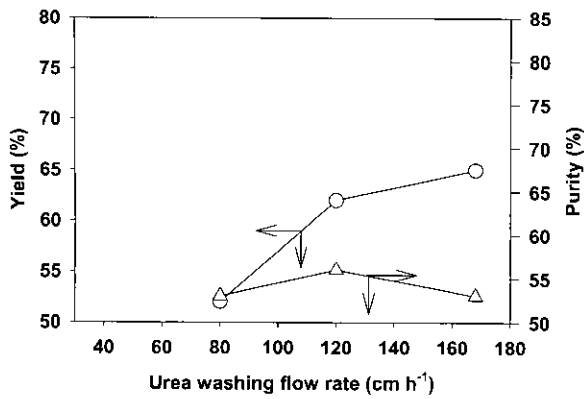
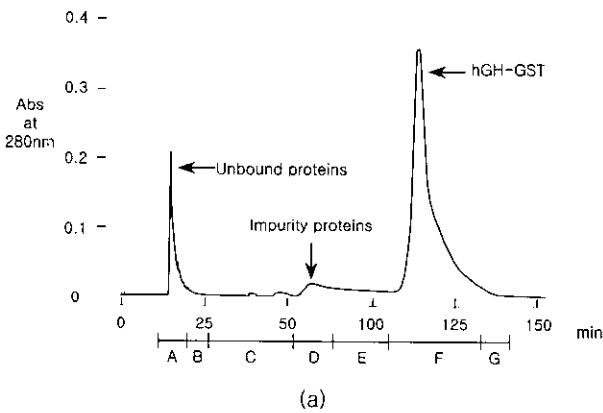


Figure 11. Effect of urea washing flow rate on the yield(○) and the purity(△) of the EBA-mediated refolding of the fusion protein from the cell homogenate. The protein loading and the expansion ratio was 5 mg total protein per ml of the resin and 3.0, respectively, and pH was at 9.0.



1 2 3 4 5 6 7

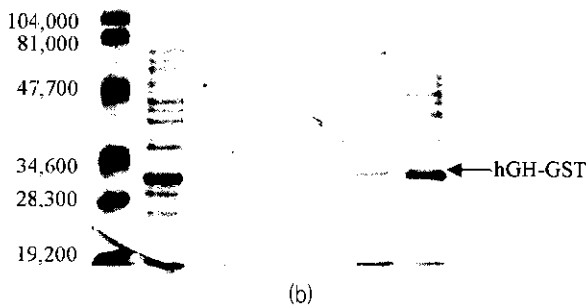


Figure 12. (a) UV monitoring (at 280 nm) profile of the elution from the EBA-mediated refolding monitored, A: loading, B: chasing, C: urea washing D: 0.2 M NaCl elution E: 0.3 M NaCl elution, F: 0.4M NaCl elution, G: 1 M NaCl, and (b) the SDS PAGE of each eluate, lane 1: molecular weight markers, 2: cell homogenate in 8 M urea, 3: loading step eluate, 4: chasing step eluate, 5: urea-wash step eluate, 6: 0.2 M NaCl eluate, 7: 0.4 M NaCl eluate.

유입시켰다. Figure 11에 보면 유속의 변화에 따른 수율과 순도는 큰 차이가 없었다. 세척속도를 높이면 수율이 높아지는 경향을 보였으나 이는 추후 보강실험을 통하여 확인해 볼 필요가 있다.

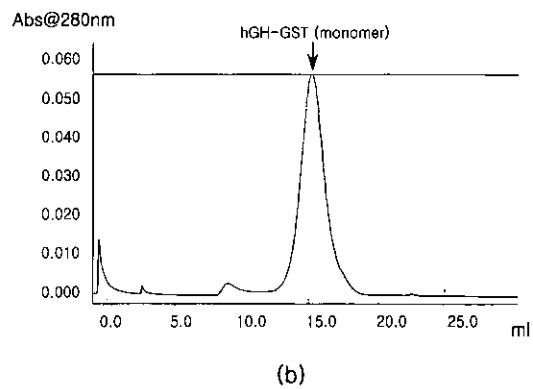
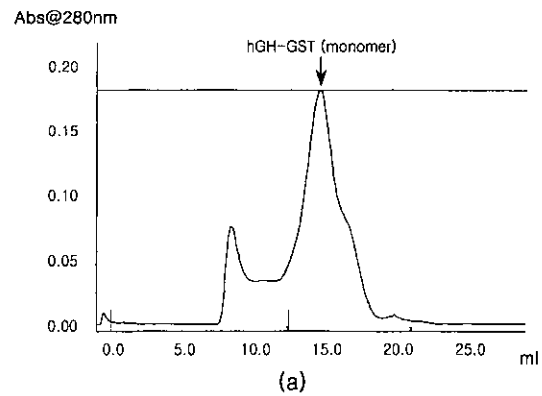


Figure 13. FPLC (Superose 12 HR10/30) chromatogram of the initial fraction(a) from the 0.4 M NaCl elution, and the fractionated peak(b).

STREAMLINE chromatography에서의 용출 profile

Figure 12(a)와 (b)에는 280 nm에서 모니터링한 EBA-mediated 재접힘공정에서의 elution profile과 각 단계 용출액의 SDS PAGE 결과를 나타내었다. Loading 단계에서 결합하지 못한 단백질은 완충액 chasing 단계에서 용출되었고, 대부분의 불순 단백질들은 0.2 M NaCl(5)에서, 융합단백질은 0.4 M NaCl에서 용출되었다. Figure 13(a)에서는 0.4 M NaCl에서의 용출액을 FPLC에 의해 분석한 것이다. 응집체의 농도는 융합단백질 단량체 농도보다 현저히 낮음을 볼 수 있다. 융합단백질의 fraction을 동일한 FPLC로 2차 정제하였을 때 비교적 대칭적인 단일 peak를 얻었고(Figure 13(b)), 이 peak의 융합단백질 농도는 0.87 mg/mL이었다. 즉, EBA-mediated 재접힘 공정을 통해 높은 수율과 함께 높은 순도의(또는 aggregation이 덜 일어나는) 단백질용액을 얻을 수 있었다. 이 방법에 의해 aggregation이 일어나는 문제점을 본질적으로 해결할 수 있었기 때문에 aggregate 제거와 같은 재접힘 후 정제공정을 줄일 수 있고, 회석과정이 필요없으므로 공정 부피가 획기적으로 줄어들 것으로 기대된다.

재접힘된 융합단백질의 2차 구조 분석

Figure 14는 표준 융합단백질과 재접힘된 융합단백질의 far-UV spectra를 보여주고 있다. 두 spectra는 최대흡수파장, 흡수광도 및 분광학적 profile에서 동일함을 볼 수 있다. 208 nm와 220 nm에서 관찰되는 α -helix의 조성은 동일하였다. 195 nm에서 관찰되는 β -sheet의 경우 약간의 차이가 남

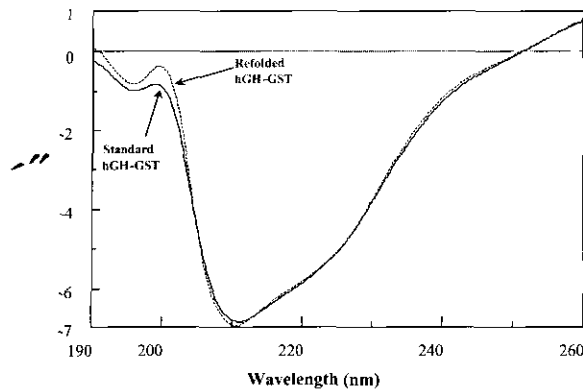


Figure 14. Far UV CD spectra of the standard fusion protein and the refolded protein from the EBA-mediated refolding.

에도 불구하고 두 가지 형태는 같은 2차원적 구조를 갖는다고 볼 수 있다.

요 약

rhGH-GST 융합단백질을 사용하여 재조합 대장균 세포 파쇄액으로부터 직접적으로 내포체의 solid-phase 재접힘을 수행할 수 있는 새로운 공정을 개발하였다. 그것은 고체 입자를 제거하는 동시에 초기에 목적단백질을 흡착 포집할 수 있는 expanded bed adsorption 크로마토그래피의 장점을 이용한 것이다. 세포 파쇄액 내 용해된 내포체로부터의 풀린 융합단백질은 expanded bed adsorption 원리에 의해 STREAMLINE DEAE resin에 흡착되고 세포 찌꺼기 등 고체 입자들은 위 방향 흐름에 의해 효과적으로 제거된다. Urea를 점차적으로 제거함으로써 융합단백질은 고체 matrix 표면에서 재접힘 된 후 염 농도 구배에 의해 용출된다. 이 새로운 EBA-mediated 재접힘 방법은 응집현상을 획기적으로 줄이고 공정수율을 향상시킬 뿐 아니라 공정단계 수를 줄일 수 있다. 이 공정은 우리가 알고 있는 한 세계에서 최초로 개발된 공정이며, 현재 single-chain polypeptide, affinity-tagged protein 등과 같은 다른 형태의 단백질에 EBA를 사용한 재접힘 공정을 적용시키기 위한 연구가 진행되고 있다.

감 사

Circular dichroism 관련 데이터는 (주)녹십자백신의 기기를 사용하였으며 최성철 과장께 감사드립니다. 또한 조태훈은 한양대학교 국책 신소재공정공학원의 장학금 지원에 감사합니다.

REFERENCES

1. Creighton, T. E. (1985), Folding of protein adsorbed reversibly to ion exchange resins, in UCLA Symposia on molecular and cellular biology new series, vol. 39, Oxender, D. L.(ed.).
2. Creighton, T. E. (1990), Process for the production of a protein, US Patent 4,977,248.
3. Geng, X. and X. Chang (1992), High-performance hydrophobic interaction chromatography as a tool for protein refolding, *J. Chromatography*, **599**, 185-194.
4. Sinha, N. K. and A. Light (1975), Refolding of reduced, denatured trypsinogen and trypsin immobilized on agarose beads, *J. Biol. Chem.*, **250**, 8624-8629.
5. Stempfer, G., B-N. Neugebauer, and R. Rudolph (1996), Improved refolding of an immobilized fusion protein, *Nature Biotechnology*, **14**, 329-334.
6. Lali, A., R. Kaul, I. Y., and B. Mattiason (1997), Purification of L-lactate dehydrogenase from crude homogenate of porcine muscle by expanded bed affinity chromatography (EBAC), *Isolation and Purification*, **2**, 289-300.
7. Thommes, J., A. Bader, M. Halfar, A. Karau, and M-R. Kula (1996), Isolation of monoclonal antibodies from cell containing hybridoma broth using a Protein A coated adsorbent in expanded beds, *J. Chromatography*, **752**, 111-122.
8. Smith, M. P., M. Bulmer, R. Hjorth, and N. J. Titchener-Hooker (1996), A comparative engineering study of the use of expanded bed and packed bed routes for the recovery of labile proteins from crude feedstocks, *Proceedings of 5th World Congress of Chemical Engineering*, vol. 2, 565-570.
9. Chang, Y. K. and H. A. Chase (1994), Expanded bed adsorption for the direct extraction of proteins, *Separation for Biotechnology*, **3**, 106-112.
10. Kim, C. S. and E. K. Lee (2000), Effect of operating parameters on in vitro renaturation of a fusion protein of human growth hormone and glutathione S transferase from inclusion body, *Process Biochemistry*, **36**, 11-117.
11. Yamamoto, S., N. Akazaki, O. Kaltenbrunner, and P. Watler (1999), Factors affecting dispersion in expanded bed chromatography, *Bioseparation*, **8**, 33-41.
12. Misawa, S., M. Aoshima, H. Takaku, M. Matsumoto, and H. Hayashi (1994), High-level expression of *Mycoplasma arginine deiminase* in *Escherichia coli* and its efficient renaturation as an anti-tumor enzyme, *J. Biotechnol.*, **36**, 145-155.