

*Eshcherichia coli*로부터 inclusion body 형태로 발현한 LK68의 solid-phase refolding 및 정제

최원찬, 서창우, 류강, 정경환¹, 이은규*

한양대학교 화학공학과 생물공정연구실, ¹(재)목암연구소

전화 (031) 400-4072, FAX (031) 408-3779

서론

LK68은 plasminogen의 36kDa 분자량을 갖는 internal fragment이다. 이 단백질은 antiangiogenic endothelial cell 저해제로 작용하는 것으로 알려졌으며(1) 재조합 *E. coli*로부터 내포체(inclusion body: IB) 형태로 과잉 발현시켰다. 전통적인 방법인 액체상 재접힘(solution-phase refolding) 공정은 응집현상으로 인해 재접힘 효율이 매우 낮다(2). 본 실험에서는 응집현상을 해결하기 위해 이온교환표면과 목적단백질에 이온작용을 이용한 고체상 재접힘(solid-phase refolding)이 시도되었다(3). 기본적으로 고체상 재생공정은 3단계로 구성된다. 첫 번째 단계는 용해된 단백질을 고체 matrix 표면에 흡착, 두 번째 단계는 변성제를 제거함으로 고체 matrix 표면에서 refolding, 세 번째 단계는 고체 표면으로부터 용출이다. 이러한 고체상 재생공정은 몇가지 잠재적인 이점을 갖고 있다. 첫째 단백질간에 상호작용을 구조적으로 피할 수 있기 때문에 응집현상을 최소화 할 수 있다. 둘째 재생공정중 상대적으로 높은 농도를 유지할 수 있다(4). 이것은 주어진 matrix에 대해 단백질의 흡착능에 의존한다. 이와 더불어 고체상 재생공정은 전체 재생공정시간과 응집체로부터 monomers를 분리하는 재생공정 후의 단계를 감소시킬 수 있다.

재료 및 방법

Inclusion body의 회수

본 연구에서 사용된 과잉발현된 *E.coli*는 목암연구소로부터 제공 받았다. 발효 후 발효액을 원심분리하여 세포를 회수했다. 회수한 세포는 파쇄 buffer 첨가후 French press로 파쇄했다. 파쇄후 세포파쇄액을 원심분리하여 내포체를 회수하였다. 세척된 내포체를 용해 buffer(8 M urea, 50 mM sodium phosphate, pH 7.0)을 사용하여 용해시켰다.

고체상 재접힘(Solid-phase refolding)

세척된 IB는 8 M urea와 100 mM β -mercaptoethanol를 포함하는 buffer에 용해되었고, Q-Sepharose, DEAE-Sepharose는 Amersham pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden,에서 구입하였다. 전체 단백질의 3 mg을 포함하는 수용액이 8 M urea로 평형을 잡은 Q-Spharose column(HiTrap 1 ml bed volume)에 1 mL/min으로 주입되었다. 10mL의 buffer용액으로 column을 세척하는 것으로 비결합된 단백질을 분리한 후에 25mL의 urea-wash buffer로 urea를 씻어낸다. 이 단계동안 단백질은 컬럼안에서 재접힘된다. 고체상 재접힘 후에, 단백질은 0.7 M NaCl gradient로 용출된다.

목적단백질 정제공정

고체상 재접힘 후에 단백질용액은 추후 정제공정을 위해 20mM Tris-HCl, pH7 로 buffer

exchange 했으며 이렇게 준비된 단백질용액을 20mM Tris-HCl로 평형을 잡은 DEAE column(HiTrap 1 ml bed volumn)에 전체단백질 1.8 mg을 1 ml/min으로 주입된다. loading buffer로 column을 10min동안 washing하고 0.5M NaCl gradient로 용출했다.

목적단백질 분석

환원된 단백질과 산화된 단백질을 분리하고 정량화하는데 C18 칼럼(Jupiter 300, 5 micron, phenomenex Inc., USA)를 사용하였다(5). Buffer A는 deionized water에 1 %(v/v) trifluoroacetic acid(TFA)를, buffer B는 acetonitrile에 0.85 %(v/v) TFA를 넣어 만들었다. %B를 20%-75%까지 40분간 선형농도구배를 주었다. 또한 GPC column인 Superose 12 HR10/30 칼럼을 사용한 FPLC 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)은 재접힘 후 용합단백질의 단량체와 응집체의 농도를 비교분석하기 위해 사용되었다.

결과 및 고찰

본 연구에서 사용되어진 단백질은 disulfide bond의 수가 9개인 구조적으로 매우 단단한 단백질이다. 이러한 이유로 IB용해 조건과 시간에 따른 실험을 수행하였으며 25°C pH 8.6 조건에서 가장 용해가 잘되는 것으로 관찰되었지만 용해정도가 크게 차이가 나지 않아 상온보다는 저온을 택하였다. 따라서 IB 용해는 4°C, pH 8.6, 8 M urea, 100 mM β -mercaptoethanol에서 20시간 용해해야 한다는 것을 알았다(Fig. 1). 용해 IB에는 여러 가지 impurity가 존재하기 때문에 DEAE보다 강한 음이온교환수지인 Q-Sepharose를 선택하였으며 pH 10이 근소한 차이로 binding capacity가 높기는 하지만 너무 극단적인 pH 조건을 피하기 위해 pH 9를 공정 pH로 결정하였다. 실험결과 resin은 Q-Sepharose으로, pH는 9로 결정하였다(Fig. 2).

고정상 재접힘 공정을 chromatogram으로 나타내었다(Fig. 3). Chasing 단계에서 흡착하지 않는 단백질과 β -mercaptoethanol이 280nm파장에서 흡광하기 때문에 나타나는 peak이다. 목적단백질은 90%이상 흡착하고 refolding이 됨을 확인하였다. 각 fraction peak는 SDS-PAGE(Fig. 4)와 RP-HPLC(Fig. 7)로 분석하였다. RP-HPLC결과 native form 과 같은 retention time에 용출됨을 확인하였다. 또한 dimer나 trimer의 존재를 확인하기 위해 GPC로 분석하였는데 dimer나 trimer는 형성되지 않음을 확인하였다(Fig. 5). 다음 단계로 음이온 교환을 이용한 정제공정을 수행하였다(Fig. 6). 정제공정후 RP-HPLC로 Native 단백질과의 구조적인 비교를 확인하여 보았는데 순도의 향상과 더불어 같은 retention time에 용출되었음을 확인하였다(Fig.7). 또한 lysine-Sepharose로 lysine pocket이 형성됨을 확인하였다.(1)

요약

재접힘 고체상 재접힘은 높은 재현성을 보였으며 고체상 재접힘된 단백질은 Native와 같은 구조를 형성하였다. 따라서 이 연구는 고체상 재접힘 방법이 분자간의 상호작용을 억제하는 것이 응집현상을 탈피하게된 결과 일 것이라는 것에 의해 재접힘 수율을 높일 수 있다고 기대한다.

감사

본 연구는 인하대학교 초정밀분리공정센터(ERC)의 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Wu, Zhanguai., O'Reilly, Michael S., Folkman, Judah. and Shing, Yuen. "Suppression of Tumor Growth with Recombinant Murine Angiostatin"(1997), Biochemical and Biophysical Research Communications, 236, 651-654
2. Cleland, J. L. and Wang, D. I. C., "Cosolvent assisted protein refolding"(1990), Bio/Technol., 8, 274-278
3. Stempfer, G., B. H. Neugebauer, and R. Rudolph "Improved refolding of immobilized fusion protein"(1996), Nature Biotech., 14, 329-334
4. Lee, E. K., Cho, T. H. and Suh, C. W. "In vitro Refolding of inclusion body proteins directly from *E. coli* homogenate in expanded bed adsorption chromatography"(2001), Korean J. Biotechnol. Bioeng., 16(2), 146-152
5. Lee, E. K. and Kim, C. S., "Effect of operating parameters on in vitro renaturation of a fusion protein of human growth hormone and glutathione S transferase from inclusion body"(2000), Process Biochemistry, 36, 111-17

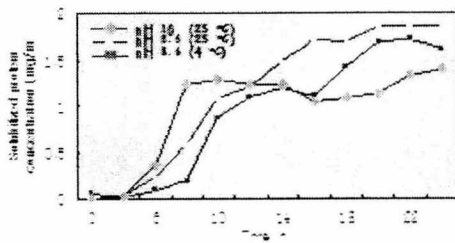


Fig. 1. Effect of Time and pH on solubility of IB

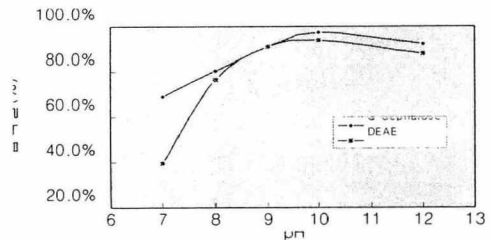


Fig. 2. Effect of resin and pH on binding capacity

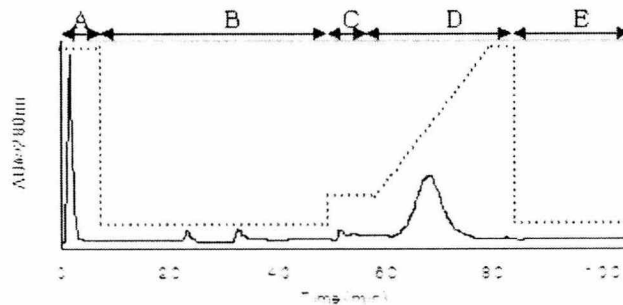


Fig. 3. Solid-phase refolding process chromatogram

A: loading/chasing, B: Urea washing, C: 0.14M NaCl elution, D: linear gradient elution,

E: regeneration

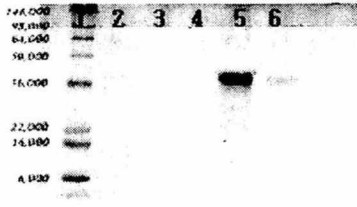


Fig. 4. The SDS-PAGE of Refolding processd eluate

1: Molecular weight marker, 2: chasing, 3: 20min peak, 4: 0.14M NaCl elution, 5,6: linear gradient elution

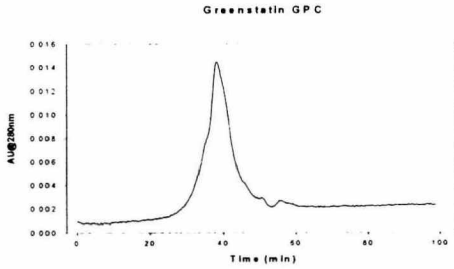


Fig 5. Analysis of refolding eluate using GPC

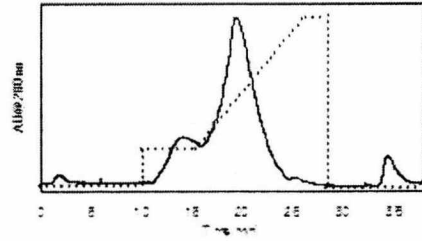
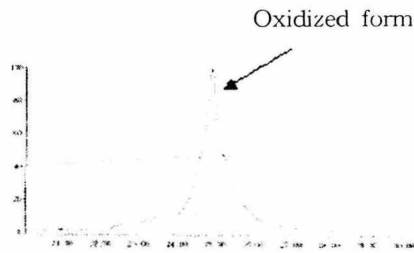
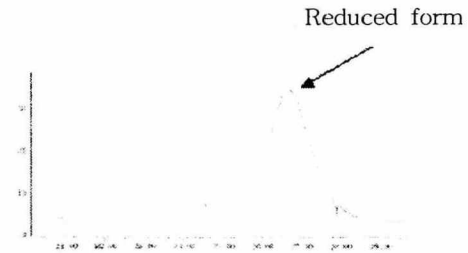


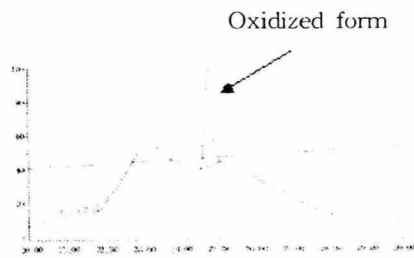
Fig 6. Purification chromatogram of anion ion-exchange chromatography(DEAE)



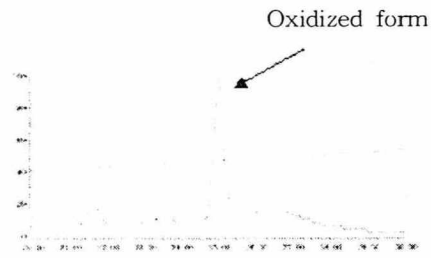
(a) LK68의 Native form



(b) LK68 IB



(c) LK68의 refolding eluate



(d) IEX 정제후

Fig 7. RP-HPLC chromatogram