

Purification of fusion ferritin using silica powder and DEAE chromatography

허윤석, 김성규, 정은미, 김인호  
충남대학교 화학공학과 생물공정실험실  
전화(042) 821-7675

Abstract

Iron is an essential nutrient for most organisms, which supplied to them in a protein-iron complex known as ferritin. Ferritins are multimeric proteins those are consisted of spherical shell of 24 subunits defining a cavity of about 8nm in diameter. Soluble form of ferritin was separated from disrupted cells, followed by silica powder adsorption. Ferritin was recovered from silica-powder by distilled water, which was applied to DEAE anion exchange chromatography. Collected fractions from the DEAE column were assayed to gain the amount and the purity of ferritin by using GF-HPLC.

Key words; Ferritin, Purification, Ion exchange chromatography(IEC), HPLC

서론

철 원소는 생체에 미량 존재하는 무기 물질이지만 꼭 필요한 원소이다. 그것은 산소의 운반, 산화-환원, 효소반응, 골수에서의 조혈작용에 관여하며 DNA대사나 생태계의 질소순환에도 관여한다. 따라서 철분결핍 해소를 위하여 건조황산 세일철등의 무기를 제제와 동물(말 또는 소) 비장 조직으로부터 추출된 동물 페리틴이 사용되어 왔다. 그러나 무기물제제는 복용시 위염, 소화장애등의 심각한 부작용으로 그 사용이 제한되어서 철분 흡수효율이 증진된 동물추출 페리틴이 사용되었다. 하지만 동물 페리틴은 바이러스 내포 가능성이 높아서 그 사용이 금지되었다. 따라서 최근에는, 유전자 재조합 기술을 이용하여 안전성이 검증된 재조합 인간 페리틴이 연구되고 있다.

단백질 소단위로 결합되어 있으며 평균 분자량이 450,000정도이다. 1분자의 페리틴은 헤모글로빈 1200분자를 생합성할수 있는 4,500개의 철 원자를 수용할수 있으며 heavy(H)-chain(21kDa) 및 light(L)-chain(19kDa)으로 구별된다. [1,2]페리틴을 재조합 대장균을 이용하여 철 단백질을 발현시키고 이온교환 겔과 GFC(Gel filtration chromatography)등을 이용하여 정제를 하는 방법이 이미 연구가 되어져 있다.[1,3]

본 연구에서는 heavy-chain과 light-chain이 융합된 페리틴을 분말상의 silica에 흡착 시킴으로 오염물질을 제거하였고, 다시 흡착된 페리틴을 탈착 시킨후 DEAE-cellulose[4]를 이용하여 페리틴을 정제하였다. 정제된 페리틴은 15% SDS-PAGE로 확인하였고, 분자량 크기는 Gel filtration-HPLC를 이용하였다.

재료 및 방법

균주 및 발효

본 연구에 사용된 재조합 대장균은 생명공학연구소 생물공정실에서 배양된 것을 이용하였다.

전처리 분리 및 전기영동 분석

배양액을 원심분리(8,000rpm, 30min)하여 균체를 수확하였으며, 얻어진 세포들은 washing buffer A(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.0mM EDTA, 0.1N NaCl)에 의해 세척한 후 초음파 파쇄기로 세포파쇄를 수행하였다. 세포 파쇄후 원심분리를 통해 얻어진 상등액에 silica분말을 넣어 페리틴을 흡착하여 오염물질을 제거하였고, 분말상의 silica에 흡착된 페리틴을 distilled water로 1, 2차 용해후 전기영동을 이용하여 페리틴을 확인하였다. 그 정제 단계는 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서 얻어진 여러 시료들은 15% SDS-PAGE에서 확인하였다.

이온교환 크로마토그래피

전처리과정을 통해 얻은 샘플을 80°C에서 25분간 열처리후, 원심분리하여 DEAE-cellulose gel이 충전된 column에 주입하여 크로마토그래피를 수행하였다.

단백질 정량 및 분자량 측정

Carbonic anhydrase(29kDa), IEC를 통해 얻은 샘플분획들을 Lowry 방법을 이용하여 단백질 정량을 하였으며, 분자량 측정은 BIOSEP-SEC-S3000 column을 사용하여 측정하였다. 분자량을 알고 있는 단백질로는 Bovine Serum Albumin(66.2kDa), Obaalbumin(45kDa), Carbonic anhydrase(29kDa), Lysozyme(14.4kDa)이 검량곡선에 사용되었다.

### 결과 및 고찰

세포과쇄후 페리틴은 수용성 상태로 많이 존재하였고, 이 수용성 페리틴이 녹아있는 상등액에 분말상의 silica를 1/20배의 농도로 첨가하여 페리틴을 흡착하였다. silica 분말에 흡착된 ferritin단백질은 D.W로 탈착시켰으며, silica 분말에 흡착된 ferritin은 1, 2차 D.W washing 단계를 통해 씻겨 나옴을 15% SDS-PAGE를 통하여 확인할 수 있었다.(Fig. 2)

IEC(Ion exchange chromatography)에 준비된 시료를 DEAE-cellulose gel로 충전된 column에 주입하였을 때 얻어진 크로마토그램은 Fig. 3과 같으며, gel에 약하게 결합된 페리틴은 0~1.0M NaCl에서 먼저 용출이 되고 좀더 강하게 결합된 페리틴은 1.0M NaOH에서 나중에 용출되어 나옴을 알 수 있었다. IEC에서 얻은 용출획분을 Fig. 4의 SDS-PAGE에서 확인한 결과 H-chain과 L-chain이 결합된 fusion ferritin(43kDa)이 NaCl로 용출시 먼저 순수하게 정제가 되어 나왔고, 용출 뒷부분에서는 19kDa의 light(L)-chain과 21kDa의 heavy(H)-chain 이 함께 용출되어 나옴을 알 수 있었다.

IEC에서 얻은 용출획분을 Lowry method를 이용하여 단백질 정량을 수행하여 본결과 전처리 샘플로부터 IEC후의 수율은 25%임을 알 수 있었다. 분자량 측정결과 fusion ferritin의 분자량은 128.6kDa이었다. 이는 천연 ferritin의 분자량과 비슷한 정도였다.

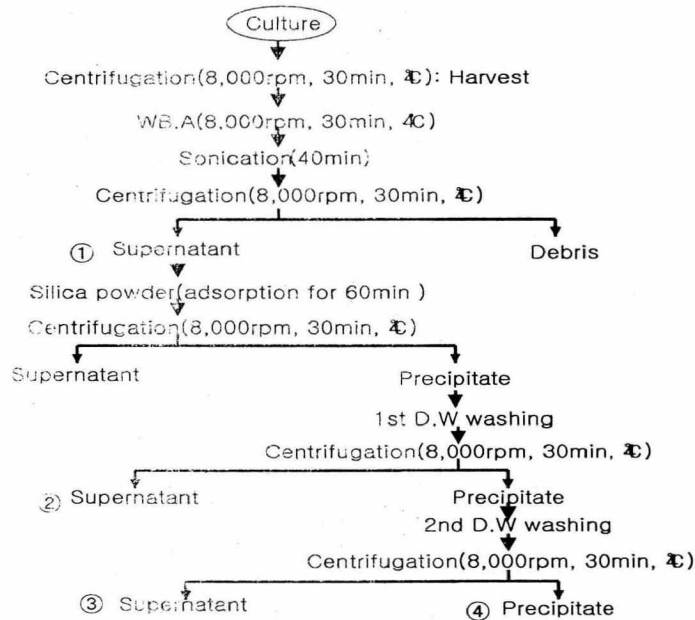


Fig.1. Scheme of the ferritin purification; WB. A: washing buffer A(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.0mM EDTA, 0.1N NaCl).

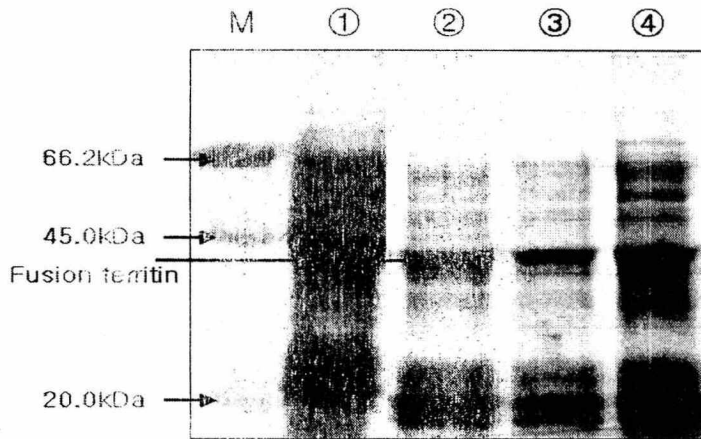


Fig. 2. 15% SDS-PAGE of fusion ferritin obtained from purification steps(see Fig.1): lane M: standard marker, lane ①: sample obtained from disrupted cell, lane ②: the 1st D.W washing, lane ③: the 2nd D.W washing, lane ④: precipitate after treating the 1st and 2nd D.W.

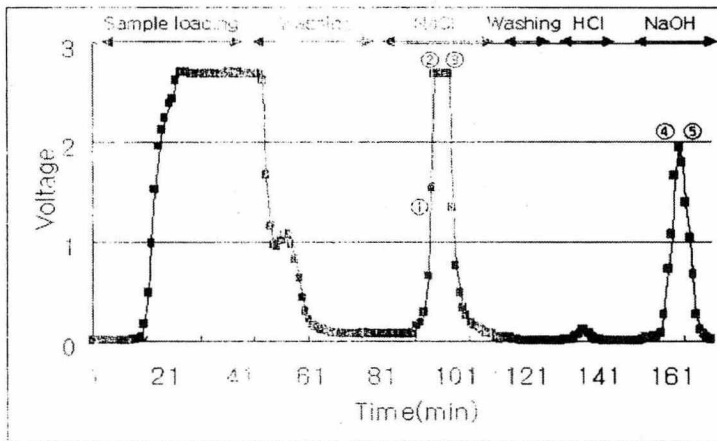


Fig. 3. DEAE-cellulose ion exchange chromatography(IEC) of sample in a column under conditions of 1.41ml/min flow rate and buffer(20mM Tris-HCl, pH8.0), elution buffer: 0~1.0M NaCl gradient and 1.0 N NaOH.

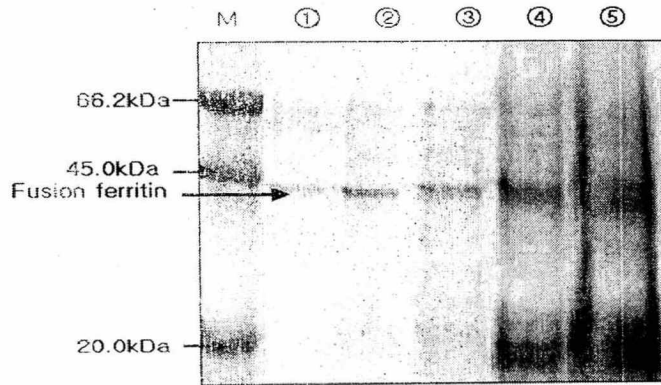


Fig. 4. 15% SDS-PAGE of the DEAE-cellulose ion exchange chromatography fractions(see Fig.3); lane M: standard marker, lane ①~③: eluted fractions with 0~1.0M NaCl gradient, lane ④~⑤: eluted fractions from 1.0M NaOH.

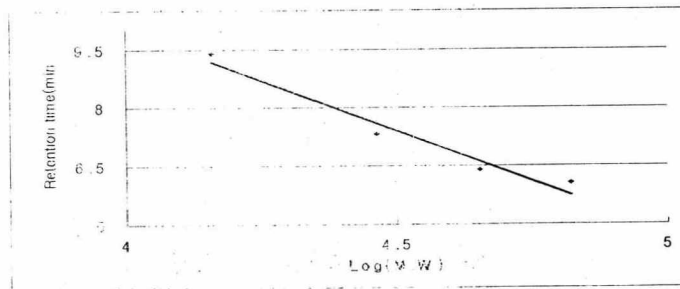


Fig. 5. Calibration curve of retention time with molecular weight.

#### 감사

본 과제는 생물공학연구원과 인하대 초정밀 생물분리기술 연구센터의 지원에 의해 연구가 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. A.J. Hudson, S. C. Andrews, C. Hawkins, J. M. Williams, M. Izuhara, F. C. Meldrum, S. Mann, P. M. Harrison and J. R. Guest, "Overproduction, purification and characterization of the *Escherichia coli* ferritin", *Eur. J. Biochem.*, **218**, 85-995(1993).
2. Theil, E.C. *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 289-315(1987).
3. S. R. Chang, Y. T. Kim and K. S. Kim, "Purification and Characterization of Recombinant Tadpole H-chain Ferritin in *Escherichia coli*", *J. Biochem. Mol. Biol.*, **28(3)**, 238-242(1994).
4. F. Raguzzi, E. Lesuisse and R. R. Crichton, "Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*", *Federation of European Biochemical Societies*, **231(1)**, 253-25(1988).