

## 융합 페리틴의 요소 농도에 따른 재접힘 특성에 관한 연구

김형원, 신미영, 안은경, 김인호  
충남대학교 공과대학 화학공학과  
전화(042)821-7675, FAX(042)822-8995

### Abstract

Fusion ferritin( $F_H+F_L$ ), an iron-binding protein, was purified from recombinant *E. coli* by two-step sonications with urea. Unfolded ferritin was refolded by gel filtration chromatography with various concentration of urea. 50 mM Tris-HCl(pH 8.0) buffers with 1 M to 4 M urea were used in GFC. Objective was to characterize the structure change with urea concentration. Molecular weight was determined using GF-HPLC and RP-HPLC was used to quantify the unfolded and refolded proteins.

### 서론

Ferritin은 철 저장 단백질로 철분물질대사에서 중요한 역할을 한다. 일반적으로 철 저장 단백질은 두 가지 형태로 존재하는데 동, 식물에 있는 ferritin과 *Escherichia coli*와 같은 원핵생물에서 얻을 수 있는 bacterioferritin으로 구분할 수 있다. 동물성 바이러스 감염의 우려가 있는 말의 이자에서 추출된 ferritin보다는 인간 ferritin과 유사하며 부작용이 없는 재조합 ferritin의 대량생산을 위한 분리정제가 많이 이뤄지고 있다.<sup>1)</sup> Ferritin의 정제 수율은 정제과정에서 변성된 단백질에서 urea와 같은 변성제를 제거하는 공정을 거쳐 원상화(Renature)하면서 크게 변화한다. 즉, 재조합 단백질의 대량생산을 위해 단백질의 변성 그리고 재접힘공정의 최적 설계가 경제성 제고에 있어 관건이다.<sup>2)</sup> 본 연구에서는 젤 여과 크로마토그래피를 통해 ferritin내의 urea가 제거되면서 어떤 구조적 변화가 있는지 알아보았다.

### 재료 및 방법

#### 1. 배양 및 시료 전처리

본 실험에 사용된 재조합 대장균은 H-chain과 L-chain을 융합시켜 ferritin을 발현시킨 것으로 생명공학연구소 생물공정실에서 분양 받았으며 균주의 배양과 2단계 세포 파쇄를 이용한 시료 전처리는 허<sup>3)</sup>의 방법을 따랐으며 순서는 Fig. 1과 같다.

## 2. 크로마토그래피

융합 ferritin을 재접힘 시키기 위해서 젤 여과 크로마토그래피를 하였다. 재접힘 완충액은 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)에 1.0 M에서 4.0 M의 urea 녹여 이동상으로 이용하였다. FPLC system(Pharmacia Biotech.)을 사용하였으며 유속은 0.64 cm/min, 주입량은 500  $\mu$ l이었다. 충전한 젤은 Sephacryl S-200(Pharmacia Biotech.)을 사용하였고 총 부피는 12.96 ml이었다. 역상컬럼(Hypersil C18, 4.5mm I.D. X 150 mm L)을 HPLC system(Young Lin, model M910)에 달아 사용하였다. 이동상은 아세트로니트릴과 증류수를 5대 5으로 섞어 사용했으며 유속은 0.5 ml/min이었다. 파장은 254 nm였으며 시료는 20  $\mu$ l씩 주입하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 2단계 세포파쇄에 의한 전처리

허<sup>3</sup>가 제시한 방법에 따라 시료 전처리를 하였다. Fig. 2에서 알 수 있듯이 2차 파쇄 완충용에 4.0 M의 urea를 사용한 경우에 많은 ferritin이 용해되어 세포내벽으로부터 분리 할 수 있었다.

### 2. FPLC

이동상에 1.0 M의 urea를 섞은 경우에 10분대부터 융합 ferritin이 용출되기 시작했으며 크게 두 개의 피크로 나뉘어져 있다. 즉 분자량 분포가 크게 두 부분으로 나뉘어 있음을 나타낸다. Fig. 3에서 주요한 부분인 첫 번째 피크와 두 번째 피크 그리고 마지막 부분에 완만히 감소하는 부분을 분취하여 역상 크로마토그래피에 주입하였다.

### 3. RP-HPLC

역상 크로마토그램에서 말의 이자에서 추출한 ferritin의 용출 시간은 약 3.7분이었다. 용출시간을 통하여 FPLC에서 분취하여 얻은 시료도 ferritin과 같은 물질임을 확인하였고 갈라진 피크의 면적을 비교하여 재접힘 정도를 알아보았다. 단백질은 3차원 구조가 풀림으로 인하여 소수성이 증가한다. 반대로 풀린 단백질이 재접힘되면 친수성이 증가하고 극성 용매에 잘 녹게되어 역상 크로마토그램에서 재접힘 될수록 빨리 용출 된다. Fig. 4의 갈라진 피크에서 앞에 있는 피크가 재접힘된 ferritin이고 뒤에 있는 피크 약 3.9분대에 용출된 피크는 풀린 상태의 ferritin이다. Fig. 3에서 3번 시료가 역상 크로마토그래피에서는 단일피크로 나타났는데 FPLC에서 늦게 분취한 시료일수록 urea의 농도가 희석되어 재접힘된 즉, 거의 원래의 형태로 산화되었음을 알 수 있다.

### 요 약

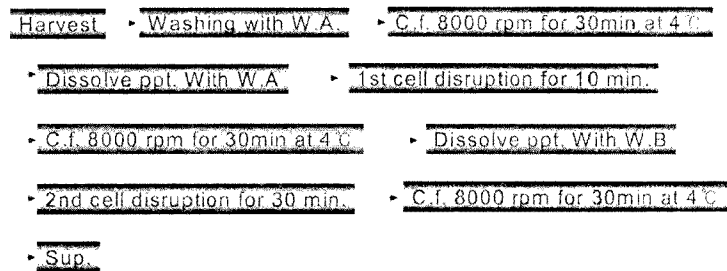
세포 전처리 과정으로 융합 ferritin을 2단계 세포파쇄하여 주입시료로 이용하였으며, 변성된 단백질용액을 젤 여과 크로마토그래피를 통하여 urea의 농도를 희석시켜 재접힘 시켰다. 여기서 분취한 시료를 역상 크로마토그래피에 적용한 결과 FPLC 크로마토그램에서 뒤에 분취한 시료일수록 재접힘 정도가 높은 것으로 나타났다.

### 감 사

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

### 참고문헌

1. Harrison, P.M. and P. Arosio, "The ferritins : molecular properties, iron storage function and cellular regulation"(1996), *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 161-203.
2. Kim, I. H., B. H. Chung, "Improval large-scale refolding techniques for inclusion body proteins"(2001), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 11-14.
3. Huh, Y. S., 'Production of fusion ferritin(F<sub>H</sub>+F<sub>L</sub>) from recombinant *E. coli*' (2002), M. S. Thesis, Dept. of chem. eng., Chungnam National University, Daejeon.



**Fig. 1.** Flow chart of two-step sonications(W.A. : 50mM Tri-HCl(pH 8.0) containing 1.0 M uera, W.B. : 50mM Tri-HCl(pH 8.0) containing 4.0 M uera)

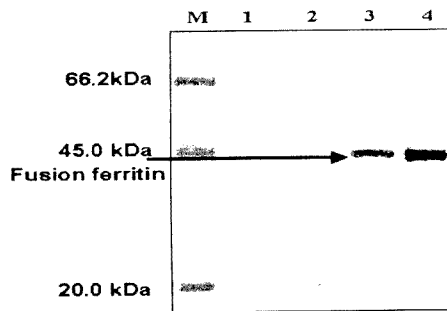


Fig. 2. Effect of urea concentration at the 2nd sonication(M : marker, 1 : 1.0 M urea, 2 : 2.0 M urea, 3 : 3.0 M urea, 4 : 4.0 M urea).

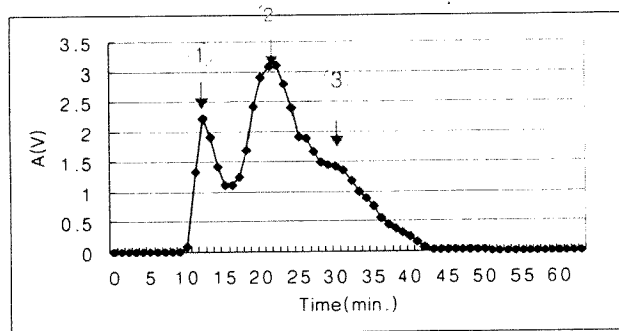


Fig. 3. FPLC chromatogram using 50 mM Tris-HCl(pH 8.0) containing 1.0 M urea.

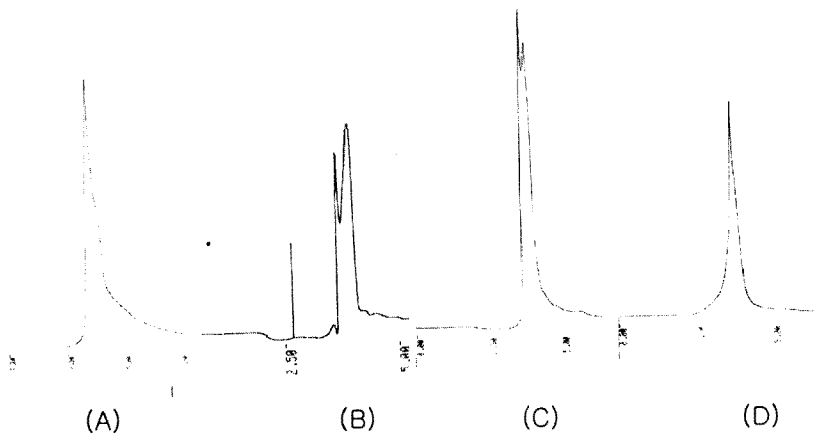


Fig. 4. RP-HPLC chromatograms of fractions from Fig. 2( A : standard ferritin from horse spleen, B : ①, C : ②, D : ③).