한국생물공학회지 제15권 제6호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 15, No. 6, 605-608(2000)

고성능 막 크로마토그래피에 의한 Oligodeoxynucleotides의 분리특성

김 정 일 · 홍 승 범 · [1]선 향 · †노 경 호
초정밀분리기술센터, 인하대학교 공과대학 화학공학과, [1]기술표준원 섬유과
(접수 : 2000. 9. 23., 게재승인 : 2000. 11. 14.)

Separation Characteristics of Oligodeoxynucleotides by High-Performance Membrane Chromatography

Jung Il Kim, Seung Bum Hong, Hyang Sun[1], and Kyung Ho Row†
Center of Bioseparation Technology, Dept. of Chem. Eng., Inha University, Inchon 402-751, Korea
[1]Agency for Technology and Standards. MOCIE
(Received : 2000. 9. 23., Accepted : 2000. 11. 14.)

Oligodeoxynucleotides (ODNs) were separated by high-performance membrane chromatography (HPMC), a combined system of chromatography and membrane. The separation mechanism involved anion-exchange, and the stationary phase was cation CIM (Convective Interaction Media) DEAE disk (16×3 mm). Two types of mobile phase were used, buffer A (20mM Tris-HCl, pH 7.4) and buffer B (buffer A + 1M NaCl). As the amount of NaCl dissolved in buffer linearly increased, the retention time shortened, which enabled a gradient elution mode. Based on the number of theoretical plates and resolution observed, the optimum mobile phase and operating condition (Buffer A/Buffer B=50/50 - 20/80 vol%, gradient time 2 min) were experimentally determined. In this experimental condition, ODNs were separated within 2 min at a mobile phase flow rate of 6 ml/min.

Key Words : HPMC, oligodeoxynucleotide, anion-exchange, buffer, resolution

서 론

Oligodeoxynucleotide (ODN)는 생체 내에서 특정 염기서열을 갖고 있기 때문에 면역조절을 할 수가 있다(1). 최근에 antisense 의약품을 이용한 유전자 치료법이라는 것이 있다. 유전자 치료법은 체내의 유전정보의 흐름을 잘 파악하여 정상적인 활동에 꼭 필요한 단백질을 공급하거나, 혹은 불필요한 단백질을 성장 이전의 단계에서 차단하여 생성을 억제해 줌으로써 정상적인 기능을 되찾아 주는 치료법이다(2). 불필요한 단백질의 생성에 기인하는 mRNA의 서열에 상보적으로 결합을 할 수 있는 ODN을 합성하여, 표적세포 내로 전달해 줌으로써 표적 mRNA와 ODN 사이에 강한 수소결합을 유도시켜 mRNA가 불필요한 단백질을 생성하지 못하게 함으로써 그 단백질 때문에 생길 수 있는 각종 질병을 고치는 치료제로 사용이 된다. 또한 면역세포를 활성화시키거나 이들의 기능을 억제하는 특정 염기서열은 ODN 자체의 형태로 이용될 수도 있고 plasmid DNA안에 삽입되어 그 효과를 나타낼 수도 있다. 특히 암, 관상 동맥계 질환 (동맥경화, restenosis 등), 여러 종류의 감염성 질병 등을 위한 백신 보조제 및 치료제로 ODN을 이용할 수 있다는 가능성을 보였으며, 또한 후천성면역결핍증 등이 대표적인 치료대상이 된다(3,4).

고성능 막 크로마토그래피(High-Performance Membrane Chromatography, HPMC)는 최근 들어 많은 연구가 진행되고 있는 크로마토그래피의 기술 중에 하나로 생 고분자물질의 분리와 정제에서 탁월한 효과가 있다(5,6). 현재 가장 효율적인 HPMC 분리 기술에서 사용하고 있는 막의 형태는 미세공 조직을 가진 평막과 중공사막, membrane stacks, radial flow cartridge 등의 고정상을 사용하여 분리한다(7). 생물학적인 숙주 환경에서 변하기 쉬운 생 고분자 물질을 분리하기 위해서는 그들의 독특한 성격 때문에 상당한 주의가 필요하다. 시간이 많이 소비되는 공정은 많은 유전자 생산물의 분해를 야기한다. 단백질과 nucleic acids의 변이체는 공정 중에 탈아민화, 산화, 단백질 가수분해, nicking과 응집 현상이 일어난다. 이러한 변이체들은 공정 시간이 길수록 더 증가하게 된다(8). 따라서 순도가 높고 더 많은 양의 생물학적 분자를 분리해 내기 위해서는 공정 시간을 단축할 필요가 있다. 이러한 측면에서 볼 때 HPMC의 빠른 분리 시간은 커다란 이점을 가지고 있다. HPMC의 분리 메카니즘은 친화성 상호작용, 이온교환 작용, 소수성 상호작용과 역상이다(9). 적당한 buffer의 선택은

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Inha University, Inchon 402-751, Korea
Tel : +82-32-860-7470
E-mail : rowkho@inha.ac.kr

이온교환 분리방법의 성공에 있어서 상당히 중요한 부분을 차지하고 있다. HPMC의 장점은 큰 규모에서의 생물학적 분자들을 몇 분 안에 분리할 수 있고 유속의 영향이 작아 높은 분리도를 나타내며 매우 높은 유속에서도 낮은 압력을 갖는다. 또한, 장치를 scale-up 하기가 쉬우며, 분석용 CIM(Convective Interaction Media) disk와 같은 물질로 구성된 튜브로 정제와 모니터링 프로세스가 비슷한 조건하에서 가동이 가능하다.

본 연구에서는 ODNs(8, 10, 12, 14, 15, 16 mers)를 고성능 막 크로마토그래피를 이용하여 분리하는 것이다. ODN을 분리하기 위한 메카니즘은 이온교환 작용이며 정지상은 국내에서 처음으로 소개된 CIM DEAE disk를 사용하였다. 실험을 통해서 이동상 조성과 조업방법에 따른 각기 ODN의 이론단수와 이웃물질간의 분리도를 고찰하여 최적 이동상을 구하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

Oligodeoxynucleotides (ODN)는 Sigma에서 구입한 제품을 사용하였으며, 각 oligomers에 대한 염기서열은 다음과 같다. ODN 8 (8 mer), C CAT GTC $T^{3'}$; ODN 10 (10 mer), GTC CAT GTC $T^{3'}$; ODN 12 (12 mer), AC GTC CAT GTC $T^{3'}$; ODN 14 (14 mer), C GAG GTC CAT GTC $T^{3'}$; ODN 15 (15 mer), CC GAG GTC CAT GTC $T^{3'}$; ODN 16 (16 mer), GCC GAG GTC CAT GTC $T^{3'}$. 이동상은 Buffer A (Tris-HCl, pH 7.4)와 Buffer B (buffer A + 1M NaCl)를 사용하였으며 Tris (염기성)는 J. T. Baker (USA)에서 구입하였고 NaCl은 동양화학에서 구입하였다. 증류수는 감압 펌프(Division of Millipore, Waters)와 필터(HA-0.5㎛, Division of Millipore, Waters)를 이용하여 여과한 후에 사용하였다.

실험기기

고정상으로는 BIA Separations (Slovenia)사에서 구입한 직경이 16mm, 두께가 3mm인 Monolithic Convective Interaction Media (CIM) DEAE disk 사용하였고 재질은 poly (glycidyl-methacrylate-co-ethyleneglycoldimethacrylate)이다. HPLC는 Waters 사의 600E 펌프 (multisolvent delivery system), 490 UV-visible tunable wavelength absorbance, 260nm, Rheodyne 주입기 (50 ㎕ sample loop), 데이터 저장 시스템은 Chromate (ver. 3.0, Interface Eng.)를 사용하였다.

실험방법

본 실험에서는 CIM DEAE (diethylaminoethyl) disk를 고정상으로 하고 이동상은 buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7.4)와 buffer B (buffer A + 1M NaCl)를 사용하였다. 각각의 ODNs (8, 10, 12, 14, 15, 16 mers)는 buffer A에 용해시켰으며 농도의 범위는 1.9~4.0 ㎍/㎖이다. 주입부피는 20 ㎕이고 유속은 6 ㎖/min이며 실온에서 실험하였다.

결과 및 고찰

ODN을 분리하기 위하여 이동상으로 buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7.4)와 buffer B (buffer A + 1M NaCl)를 사용하였다. 모든 실험에서 유속은 6 ml/min, 시료의 주입부피는 20 ㎕으로 하였다. Figure 1은 buffer A가 50%인 조건에서 일정용매 조성법으로 ODN을 분리한 결과이다. 8, 10, 12, 14 mers는 각기 peak로서 용출되고 분리가 되었으나 15, 16 mers의 peak는 거의 나타나지 않았다. NaCl이 용해되어 있는 buffer B의 양을 Figure 1 (50%)보다 늘려 다른 일정용매 조성법으로 실험한 결과, 체류 시간은 빨라졌지만 ODNs가 분리되지 않았다. 일정용매 조성법에서 가장 좋은 분리도을 보인 것은 Figure 1에서의 buffer B가 50%일 때의 조건이다.

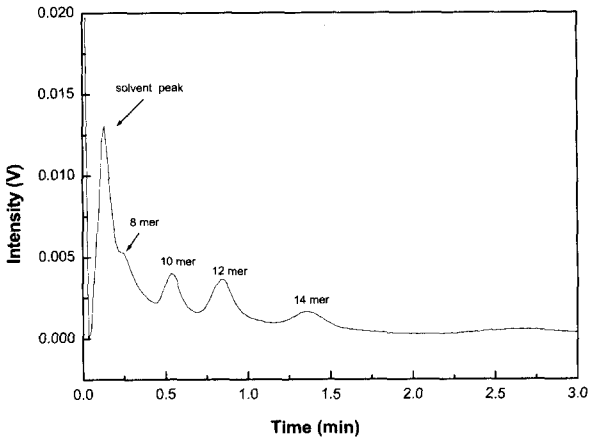

Figure 1. Chromatogram of oligodeoxynucleotides in isocratic mode. (Buffer A/Buffer B=50/50 vol%, inj. volume=20 ㎕)

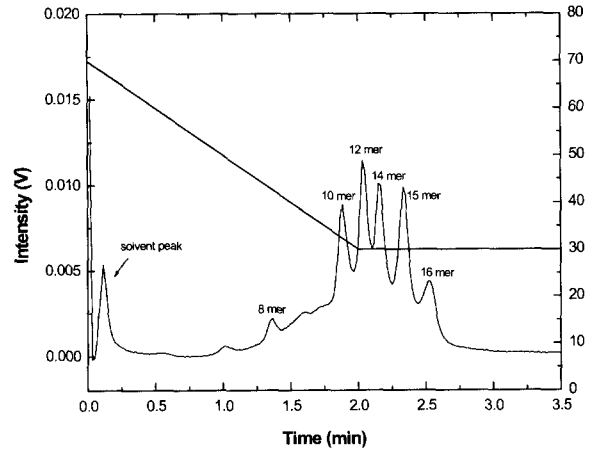

Figure 2. Chromatogram of oligodeoxynucleotides in gradient mode. (Buffer A/Buffer B=70/30 - 30/70 vol%, gradient time 2 min)

일정용매 조성법은 이동상이 일정조성으로 컬럼내를 이동하기 때문에 펌프의 헤드는 1개만이 필요하여 조업이 간단하지만 일정한 이동상의 조성으로 음이온인 ODNs의 정지상 표면의 체류시간을 조절하는데 한계가 있다. 따라서 Figures 2~6에서는 구배용매 조성법을 사용하여 buffers A와 B로 구성된 이동상의 조성을 조업시간동안 조절하였다. Figure 2에서는 buffer A를 70%에서 30%로 하고 구배 시간은 2분으로 하였다. 모든 ODNs에 대하여 일정용매 조성법보다 잘 분리되었고 구배용매 조성법에 의한 분리도를 증가시킬 수 있게 되었다. 구배용매 조성은 buffer A를 기준으로 Y_2축에 나타내

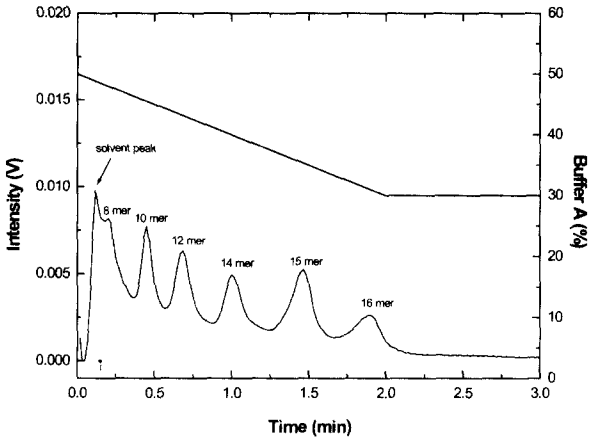

Figure 3. Chromatogram of oligodeoxynucleotides in gradient mode. (Buffer A/Buffer B=50/50 - 30/70 vol%, gradient time 2 min)

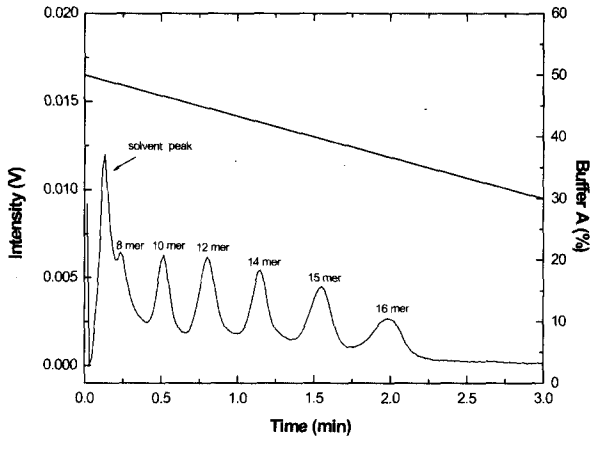

Figure 4. Chromatogram of oligodeoxynucleotides in gradient mode. (Buffer A/Buffer B=50/50 - 30/70 vol%, gradient time 3 min)

었다. Figure 3에서는 buffer A를 50%에서 30%로 하고 구배 시간은 2분으로 하여 분리한 결과이다. Figure 2와 비교하여 같은 구배시간에서 buffer B의 양을 증가시켰다. Buffer내의 NaCl의 농도가 높을수록 ODNs의 체류 시간이 빨라지게 된다. 이는 ODNs와 buffer내의 이온들이 경쟁적으로 음이온 교환막에 흡착-탈착을 반복하기 때문이다. Figure 4에서는 buffer A를 50%에서 30%로 하고 구배 시간을 3분으로 하여 Figure 3보다 NaCl의 증가속도를 서서히 하였고, Figure 5에서는 buffer A를 50%에서 20%로 하고 구배 시간은 2분의 실험조건에서 분리한 결과이다. NaCl 양의 증가 속도를 Figure 3보다 빠르게 한 결과 체류 시간도 빨라지고 분리도가 증가하였다. Figure 6에서는 buffer A를 50%에서 20%로 하고 구배 시간은 3분으로 한 결과이다. 구배 시간을 2분에서 3분으로 증가하여 NaCl의 증가 속도를 낮춘 결과 분리도에 큰 영향을 미치지 못하였다.

CIM DEAE disk를 정지상으로 하여 구배용매 조성법으로 분리한 결과 8 - 16mers의 ODNs는 일정용매 조성법에 비해서 분리가 잘 되었다. 각 peak의 관 효율 (column efficiency, N)과 분리도 (R)를 계산하여 비교하였다. N과 R은 각각 다음과 같이 정의된다.

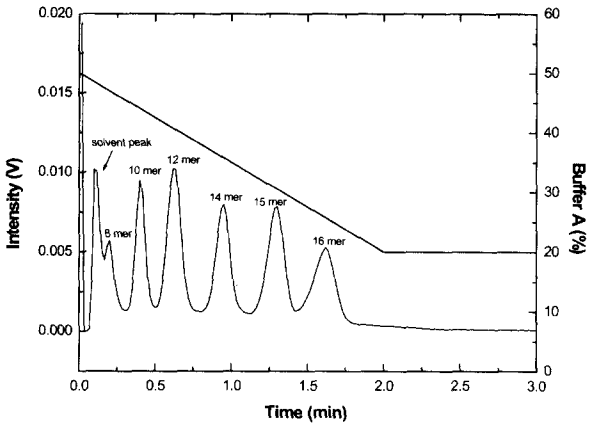

Figure 5. Chromatogram of oligodeoxynucleotides in gradient mode. (Buffer A/Buffer B=50/50 - 20/80 vol%, gradient time 2 min)

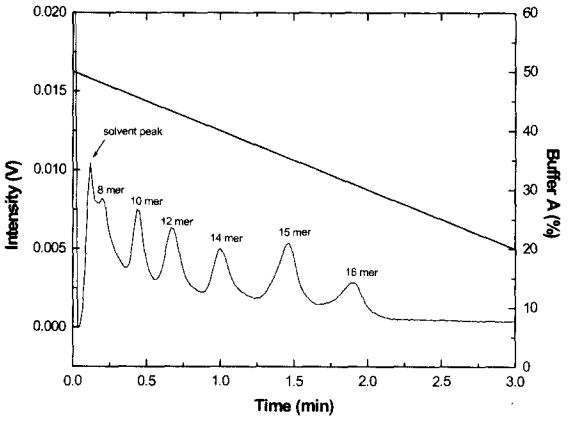

Figure 6. Chromatogram of oligodeoxynucleotides in gradient mode. (Buffer A/Buffer B=50/50 - 20/80 vol%, gradient time 3 min)

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (1)$$

여기서 N은 이론단수, t_R은 체류 시간, 그리고 $W_{1/2}$은 peak 높이를 기준으로 1/2지점에서의 peak의 폭을 나타낸다.

$$R = \frac{2 \times (t_{R,B} - t_{R,A})}{W_A + W_B} \quad (2)$$

여기서 R은 분리도, $t_{R,A}$와 $t_{R,B}$는 성분 A, B의 체류 시간, 그리고 W_A, W_B는 성분 A, B의 peak 너비를 나타낸다. (1), (2)식에 의하여 계산된 ODN에 대한 R과 N값을 각각 Tables 1, 2에 나열하였다. Table 1에서 계산된 이론단수는 액체 크로마토그래피의 이론단수에 비해서 매우 작았다. 일반적으로 기체 크로마토그래피에서는 10^4 - 10^5, 액체 크로마토그래피에서 분석용에서는 10^3, 제조용에서는 10^2으로, 제조용 액체 크로마토그래피의 이론단수와 유사하였다. 이는 고성능 막 크로마토그래피에서 체류 시간이 매우 빠르기 때문에 이론단수가 작게 되었다. 8 mer는 용매 peak와 중첩될 정도로 거의 dead time에 용출되어서 이론단수는 모든 조건에서 다른 ODNs에 비해 낮은값을 가졌다. 분자량이 큰 ODN

Table 1. Comparison of number of theoretical plates with the mobile phase compositions

	Figure 3	Figure 4	Figure 5	Figure 6
N_8	16	9	31	5
N_{10}	103	114	199	77
N_{12}	127	192	236	114
N_{14}	220	443	542	234
N_{15}	444	523	686	355
N_{16}	428	478	630	475

Table 2. Comparison of resolution with the mobile phase compositions

	Figure 3	Figure 4	Figure 5	Figure 6
$R_{8\text{-}10}$	1.00	0.90	1.37	0.70
$R_{10\text{-}12}$	1.03	1.15	1.44	0.94
$R_{12\text{-}14}$	1.16	1.31	1.68	1.07
$R_{14\text{-}15}$	1.46	1.36	1.62	1.36
$R_{15\text{-}16}$	1.18	1.14	1.21	1.14

에서 이론단수가 큰 것은 buffers A, B를 선형적 구배용매 조성법에 의해서 이루어 졌기 때문이다. Table 2에서는 Figures 1-6에서의 이동상 조성에 따라 ODNs간의 분리도의 계산된 결과이다. 대부분의 ODNs에서 분리도가 1.0이상으로 기준선에서 분리가 일어남을 알 수 있다. 각각의 이론단수와 인접한 peak에 대한 분리도를 계산한 결과 Figure 5에서의 이동상 조성이 바람직한 조건이었다. Buffer A가 50%인 이동상 조성에서 NaCl의 양을 buffer A가 20%일 때까지 증가시키면서 구배 시간을 2분으로 한 결과 2분내에 ODN을 분리할 수 있었다.

분석 물질의 분자량이 커짐에 따라 기존의 실리카 또는 알루미나의 무기질 충진제를 사용하는 HPLC 컬럼으로 분리하는 것은 한계가 있다. 그러므로 컬럼을 다공성 막으로 대체함으로써 매우 빠른 시간 내에 분리가 가능해지고 좋은 분리도를 얻을 수 있다. 앞으로 더 많은 HPMC의 발전이 이루어지기 위해서는 단백질과 막간의 흡착 용량, 선택성, 흡착-탈착 속도를 높이기 위하여 다공성 막의 구조와 다양한 리간드의 형태가 개발되어야 한다.

요 약

크로마토그래피와 막의 혼합형태인 HPMC를 사용하여 ODNs를 분리하였다. 분리 메카니즘은 음이온 교환작용이며 정지상은 양이온의 CIM DEAE disk (16×3 mm)이었다. 이동상은 buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7.4)와 buffer B (buffer A + 1M NaCl)를 사용하였으며 ODNs를 분리하기 위해서 구배용매 조성법을 사용하였다. Buffer내 NaCl의 양이 선형적으로 증가할수록 체류 시간이 빨라졌기 때문에 구배용매 조성법으로 ODNs의 체류인자를 조절하여 분리하였다. 각 이동상의 조성에 따른 이론단수와 분리도를 비교한 결과 최적의 이동상 조성 (Buffer A/Buffer B=50/50 - 20/80 vol%, gradient time 2 min)을 실험적으로 얻었고 6ml/min의 이동상 유속에서 2분내에 ODNs를 분리할 수 있었다.

감 사

본 연구는 인하대학교 고순도분리연구실에서 수행하였으며, 인하대학교와 기술표준원 산업기반 연구 프로젝트의 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Jack S. Cohen (1989), *Oligodeoxynucleotides*, p211, MACMILLAN Press, London.
2. B. Mui, Q. F. Ahkong, L. Chow, and M. J. Hope (2000), Membrane perturbation and the mechanism of lipid- mediated transfer of DNA into cells, *J. Biochem. et Biophys. Acta.*, **1467**, 281-292.
3. Rey-Heng Hu and Shu-Hsun Chu (2000), Suppression of tumor necrosis factor secretion from white blood cells by synthetic antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides, *Int. J. of Immunopharma.*, **22**, 445-452.
4. Erik T. Rump and Remco L. A. (2000), Modification of the Plasma Clearance and Lover Uptake of Steroid Ester-Conjugated Oligodeoxynucleotides by Association with (Lactosylated) Low-Density Lipoprotein, *J. Biochem. Pharma.*, **59**, 1407-1416.
5. Dongmei Zhou, Hanfa Zou, Jianyi Ni, Hailin Wang, Li Tang, and Yukui Zhang (1999), Membrane Affinity Chromatography for Analysis and Purification of Biopolymers, *Chromatographia*, **50**, 27-34.
6. J. Thommes and M.-R. Kula (1995), Membrane Chromatography-An Integrative Concept in the Downstream Processing of Proteins, *Biotech. Prog.*, **11**, 357-367.
7. Catherine Charcosset (1998), Purification of Proteins by Membrane chromatography, *J. Chem. Tech. Biotech.*, **71**, 95-110.
8. X. Zhang, R. D. Whitley, and N.-H. L. Wang (1991), presented at the *AIChE Annual Meeting, Los Angeles, CA, November,* 17-22.
9. Xianfang Zeng and Eli Ruckenstein (1999), Membrane chromatography: Preparation and Applications to Protein separation, *Biotech. Prog.*, **15**, 1003-1019.