

Pichia pastoris GS115(pPIC9K-HBcAg)로부터 재조합B형간염속질항원을 정제하기 위한 연구

문성철, 량명룡, 윤재성

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《진단과 치료방법을 개선하여야 치료예방사업을 높은 수준에 올려세울수 있으며 병을 잘 치료하여 사람의 건강을 빨리 회복시킬수 있습니다.》(《김정일선집》 증보판 제11권 76페이지)

세계적으로 수많은 사람들이 B형간염바이러스(HBV)에 의한 감염[3]으로 고통받고있으나 그에 대한 효과적인 진단과 치료대책이 똑바로 세워져있지 않은 결과 그중의 적지 않은 사람들이 간암과 같은 말기간장질병으로 사망하고있다.

B형간염의 진단 및 치료에서 B형간염바이러스속질항원(HBcAg 혹은 HBc항원)이 널리 리용[2]되고있는데 이로부터 우리는 B형간염바이러스속질항원(HBcAg)유전자를 발현하는 메타놀동화성효모 *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-HBcAg)체계를 구축한데 기초하여 효모균체로부터 재조합HBc항원을 분리정제하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

분리정제할 균체로는 무기합성배지에서 자래운 HBc항원발현메타놀동화성효모(*Pichia pastoris* GS115)를 리용하였으며 HBcAg분리정제에 리용한 시약으로는 효모마쇄완충액(1mmol/L EDTA, 50mmol/L 린산완충액, 5% 글리세롤, pH 8.0), 겔러과완충액(50mmol/L 린산완충액, 150mmol/L NaCl, pH 7.4), 류산암모니움, HBc항체감작지시혈구(RPHA, 의학생물학연구소)를 리용하였다.

설비 및 기구로는 30만려과막카세트(《Advantec》), 한외려과기(《Advantec》), 세파로즈CL-4B담체 및 효모마쇄기(《Dyn0-Mill》), 고속랭동원심분리기(《Tomy》), 항원수욕조(《Advantec》), 덴시토미터(《Advantec DM-303》)를 리용하였다.

단백질정량은 비우레트법(Biuret법)과 브로드호드법(Brsdford법)으로 진행하였고 특이HBc항원의 정량은 HBc항원력가측정과 도데실류산나트륨-폴아겔전기영동(SDS-PAGE)에 의한 순도평가로 진행하였다.

분리정제는 다음의 방법으로 하였다.

효모균체농도(A_{600})가 50~300 되게 마쇄완충액에 풀고 유리알(직경 0.45mm, 균체량의 80%)과 함께 효모마쇄기에 넣은 다음 3~11min동안 마쇄한다. 원심분리하여 균체마쇄상청액을 회수하여 각이한 온도(30~70℃)와 시간(10~80min)에서 처리하고 원심분리하여 상청액을 수집한다. 그다음 30만려과막카세트와 2만한외려과막을 통과시켜 우의 상청액을 투석 및 농축한다. 농축된 시료를 10 000r/min의 속도로 원심분리한 다음 상청액을 세파로즈CL-4B(ϕ 2.5cm×100cm)탑에 적제하여 40mL/h의 속도로 용출한다. 분획들에 대한 평가를 진행하여 순도(SDS-PAGE분석)가 90%이상 보장된 재조합속질항원시료들을 모은다.[1]

결과 및 논의

1) 마쇄조건에 따르는 재조합효모의 마쇄효과

균체농도(A_{600})를 100으로 하고 마쇄시간을 3~11min까지 변화시키면서 마쇄하여 원심 분리한 다음 상청액에서의 총단백질농도와 HBc항원력가를 측정하였다.(표 1)

표 1. 마쇄시간에 따르는 상청액에서의 총단백질농도와 HBc항원력가의 변화

시간/min	3	5	7	9	11
총단백질 농도 /($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$12.3 \pm 0.3^*$	20.6 ± 0.4	21.3 ± 0.3	$23.8 \pm 0.4^*$	$24.1 \pm 0.3^*$
HBc항원력가($-\log_2$)	$12.7 \pm 0.3^*$	15.7 ± 0.3	15.7 ± 0.3	15.7 ± 0.3	15.7 ± 0.3

$n=3$, * $p<0.05$ (5min과 비교)

표 1에서 보는바와 같이 마쇄시간이 길어질수록 총단백질농도는 높아지는 경향성이 있었으나 HBc항원력가는 마쇄시간 5min부터는 15.7 ± 0.3 으로서 더 이상 변화가 없었다.

2) 열처리조건에 따르는 HBc항원의 추출효과

30~70°C 범위에서 온도를 10°C씩 변화시키면서 60min동안 열처리하였을 때 상청액에서의 총단백질농도와 HBc항원력가의 변화를 보았다.(표 2, 그림 1)

표 2. 열처리온도에 따르는 상청액에서의 총단백질농도 및 HBc항원력가의 변화

온도/°C	대조	30	40	50	60	70
총단백질 농도 /($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$20.6 \pm 0.4^*$	17.6 ± 0.3	$11.4 \pm 0.3^*$	$4.1 \pm 0.2^*$	$1.9 \pm 0.1^*$	$0.6 \pm 0.1^*$
HBc항원력가($-\log_2$)	15.7 ± 0.3	15.7 ± 0.3	15.7 ± 0.3	15.3 ± 0.3	15.3 ± 0.3	$11.7 \pm 0.3^*$

$n=3$, * $p<0.05$, 30°C와 비교

표 2에서 보는바와 같이 60°C에서 총단백질 농도는 $(1.9 \pm 0.1)\text{mg/mL}$, HBc항원력가는 15.3 ± 0.3 이였으며 그 이상에서는 총단백질농도와 HBc항원력가가 급격히 떨어지는 경향성이 있었다.

그림 1에서 보는바와 같이 열처리온도가 높아지면서 상청액에서 불순단백질은 점차 없어지고 목적하는 항원단백질만 남게 되지만 온도를 너무 높이면 목적단백질의 양도 낮아진다는 것을 알 수 있다.

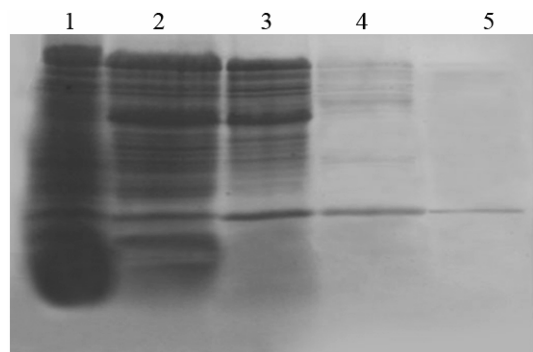


그림 1. 열처리온도에 따르는 HBc항원의 SDS-PAGE상(12.5%)

1-재조합효모마쇄상청액, 2-40°C에서 열처리한 상청액, 3-50°C에서 열처리한 상청액, 4-60°C에서 열처리한 상청액, 5-70°C에서 열처리한 상청액

3) 세파로즈CL-4B를 이용한 HBc항원의 정제

열처리한 시료를 30만카세트와 한외여과막(M_w 20 000)을 통하여 농축한 다음 세파로즈CL-4B 겔크로마토그래프법으로 정제하였다.(그림 2, 3)

그림 2에서 보는바와 같이 4번분획($A_{280}=0.7$)

부터 단백질농도가 높아지기 시작하여 8~9번분획에서 최고($A_{280}=2.5$)에 이르렀으며 19번분획까지 떨어졌다가 그 이후로 다시 높아지기 시작하였다. 단백질농도와 HBc항원력가는

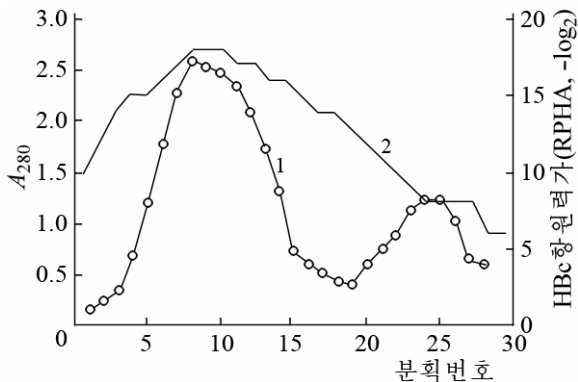


그림 2. 세파로즈CL-4B겔 크로마토그램
1— A_{280} , 2—HBc항원력가

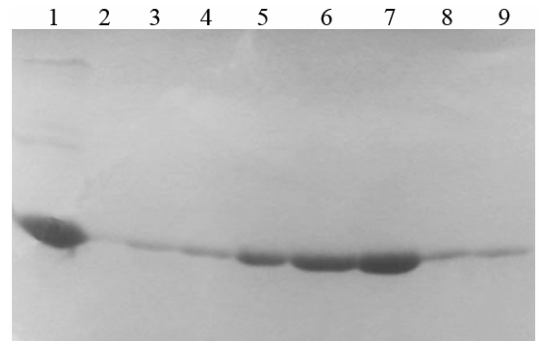


그림 3. 세파로즈CL-4B겔 크로마토그래프
용출분획들의 SDS-PAGE상(12.5%)

1—정제전시료, 2—3번분획, 3—5번분획, 4—7번분획,
5—8번분획, 6—9번분획, 7—11번분획, 8—13번분획,
9—15번분획

일치하였으며 특히 2번째 봉우리에서 단백질농도(23번분획, $A_{280}=0.9$)가 높아져도 속질항원력가($-\log_2$)는 10이하였다.

HBc항원력가가 15이상인 분획들(4—15)을 모아 측정한 순도평가결과는 그림 4와 같다.

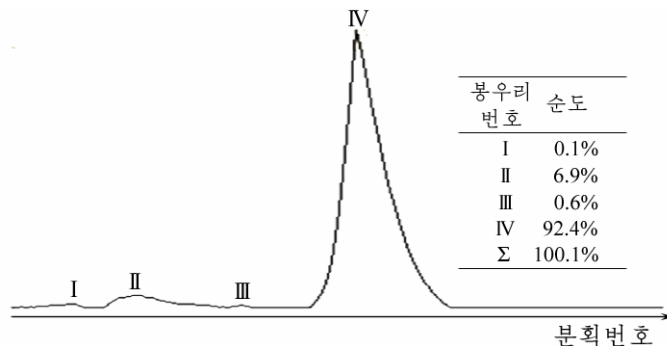


그림 4. 정제한 재조합HBc항원의 덴시토그램

그림 4에서 보는바와 같이 분리정제한 HBc항원의 정제순도는 92%이상이었다.

정제단계별 재조합HBc항원의 순도와 거둬물은 표 3과 같다.

표 3. 정제단계별 HBc항원순도와 거둬물

정제단계	총단백질량 /mg	HBc항원의 순도/%	HBc항원량 /mg	거둬물 /%
마쇄상청	51 500	3.4	1 648	100
열처리	3 040	45.4	1 380	83.7
30만카세트 및 한외여과	1 664	52.3	870	52.7
겔여과	642	92.4	590	35.8

효모균체량 250g

표 3에서 보여주는바와 같이 재조합효모균체 250g으로부터 HBc속질항원을 약 590mg 분리할수 있으며 이때 거둬물은 35.8%이고 정제순도는 92.4%이다.

맺 는 말

Pichia pastoris GS115(pPIC9K-HBcAg)가 발현분비하는 재조합HBc항원을 정제순도 92.4%, 거둢률 35.8%로서 순수하게 정제하였다.

참 고 문 헌

- [1] D. Rolland et al.; Jouunal of Chromatography, B 753, 51, 2001.
- [2] S. M. Akbar et al.; Hepatology, 52, A438, 2010.
- [3] C. A. Hayden et al.; Vaccine, 33, 2881, 2015.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Purification of Recombinant HBcAg from *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-HBcAg)

Mun Song Chol, Ryang Myong Ryong and Yun Jae Song

Recombinant hepatitis B core antigen(rHBcAg) is purified with 92.4% in SDS-PAGE purity and 35.8% in recovery from *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-HBcAg).

Key words: HBcAg, *Pichia pastoris*, purification