

## *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-HBeAg)배양상청액으로부터 재조합B형간염e항원(rHBeAg)의 정제

문성철, 이정렬

만성B형간염의 예후판정과 수직감염 그리고 항비루스치료약물의 효과판정에서 중요지표인 B형간염비루스e항원(HBeAg)진단체계[4]를 세우기 위하여 우리는 교차반응성이 적고 생산성이 높은 진핵발현체인 분비형메타놀동화성효모 *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-HBeAg)의 배양상청액으로부터 재조합HBe항원을 분리정제하기 위한 연구를 하였다.

### 재료와 방법

원료로는 무기합성배지에서 자래운 분비형재조합HBe항원 메타놀동화성효모(*Pichia pastoris* GS115)의 배양상청액을 리용하였다.

시약으로는 0.9% 식염수, 겔러과 및 음이온교환완충액(5mmol/L EDTA+50mmol/L 린산완충액(pH 7.4)), 음이온교환크로마토그래프용출완충액(0~2mol/L NaCl+0.05mmol/L 린산완충액(pH 8.0))을 리용하였다.

설비 및 기구로는 한외려과기(《Advantec》) 및 고속랭동원심분리기(《Tomy》), 30만려과막카세트(《Advantec》), 덴시토미터(《Advantec》, DM-303), SDS-PAGE전기영동장치, 랭동크로마토잡마(《Advantec》)를 리용하였다.

단백질정량은 브라드호드법(Bradford법)으로 진행하였고 재조합HBe항원정량은 효소면역검사(ELISA)와 도데실류산나트륨-폴아겔전기영동(SDS-PAGE)에 의한 순도평가로 진행하였다. 분리정제에 리용한 담체로는 세파로즈CL-4B(《Sigma》)와 QAE-세파덱스(A-25, 《Pharmacia》)이다.

분리정제는 다음의 방법으로 하였다. 분비형메타놀동화성효모 *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-HBeAg)의 배양상청액을 30만려과막카세트로 려과하고 3만한외려과막을 리용하여 투석 및 농축을 진행한다.[1] 농축시료를 세파로즈CL-4B( $\phi$  2.5cm×100cm)탑에 적재하여 30mL/h의 속도로 용출하고 분획들을 10mL씩 모은 다음 단백질농도와 재조합HBe항원검사를 진행하여 재조합HBe항원농도가 높은 분획들을 취한다.[3] 이 용액들을 다시 QAE-세파덱스크로마토그래프를 리용하여 최종정제를 진행하고 브라드호드법과 ELISA, SDS-PAGE를 리용하여 순도가 90%이상인 재조합HBe항원분획들을 얻는다.[2]

### 결과 및 논의

#### 1) 30만려과막카세트려과전후 총단백질함량과 재조합HBe항원농도의 변화

먼저 단백질함량이 0.374mg/mL인 재조합HBe항원시료 2 500mL를 30만려과막카세트로 려과하였다. 이때 목적단백질이 농축액에 남아있으므로 용출완충액으로 500mL씩 여러차례 용출을 진행하고 려과외액과 용출완충액을 혼합하여 용출차수에 따르는 총단백질농도와 재조합HBe항원농도를 측정하였다.(표 1)

표 1. 30만려과막카세트려과전후 총단백질함량과 재조합HBe항원농도의 변화

구분	려과전	려과후				
		려과외액	려과외액 +1차용출액	려과외액 +1, 2차 용출액	려과외액 +1, 2, 3차 용출액	려과외액 +1, 2, 3, 4차 용출액
체적/mL	2 500	2 430	2 890	3 320	3 790	4 210
총단백질 함량 ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	0.37±0.03	0.23±0.02	0.23±0.05	0.20±0.03	0.23±0.02	0.22±0.04
재조합HBe항원 농도( $A_{450}$ )	2.72±0.02	2.23±0.02*	2.18±0.03*	2.01±0.02	1.77±0.01	1.60±0.01
거둠률/%	100	60.85*	66.00*	78.34	58.72*	46.03*

$n=3$ , \*  $p<0.05$  (려과외액+1, 2차용출액과 비교)

표 1에서 보는바와 같이 30만려과막카세트려과를 진행한 후 려과외액+1, 2차용출액의 거둠률이 높았으므로 30만려과막카세트려과외액과 1, 2차용출액용출액을 합쳐 한외려과를 진행하였다.

## 2) 한외려과막의 종류에 따르는 총단백질함량과 재조합HBe항원의 함량

우리는 30만려과막카세트려과를 진행한 시료를 여러가지 종류의 한외려과막으로 투석 농축하고 농축시간과 총단백질함량, 재조합HBe항원농도를 평가하였다.(표 2)

표 2. 한외려과막종류에 따르는 총단백질함량과 재조합HBe항원농도

측정지표		UF-10K	UF-20K	UF-30K
농축액	려과속도/( $100\text{mL} \cdot \text{h}^{-1}$ )	103.36±9.09*	83.68±5.37*	48.29±4.32
	총단백질 함량/( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	12.16±0.09	11.98±0.53	11.38±0.56
	재조합HBe항원농도 ( $A_{450}$ , 15배 희석)	2.67±0.03	2.59±0.02	2.46±0.02
려과외액	총단백질 함량/( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	0.17±0.03	0.23±0.63	0.48±0.26
	재조합HBe항원 농도( $A_{450}$ )	1.78±0.01	1.83±0.01	2.19±0.01

$n=3$ , \*  $p<0.01$  (UF-30K과 비교)

표 2에서 보는바와 같이 3만한외려과막(UF-30K막)과 여러가지 종류의 한외려과막을 비교하였을 때 총단백질함량과 HBe항원농도에서는 유의한 차이가 없었으나 려과시간에서는 큰 차이가 있었다.

## 3) 세파로즈CL-4B정제분획에 따르는 총단백질함량과 재조합HBe항원의 농도

3만한외려과막을 리용하여 농축한 시료를 세파로즈CL-4B겔크로마토그래프로 정제한 다음 분획별로 총단백질함량과 재조합HBe항원농도를 평가하였다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 6번 분획( $363.28\mu\text{g/mL}$ )부터 단백질농도가 높아지기 시작하여 11번 분획에서 최고( $560.87\mu\text{g/mL}$ )에 이르렀으며 12번 분획에서부터 떨어졌다. 단백질농도와 재조합HBe항원농도는 대부분 일치하였으며 정제순도는 52.3%였다.

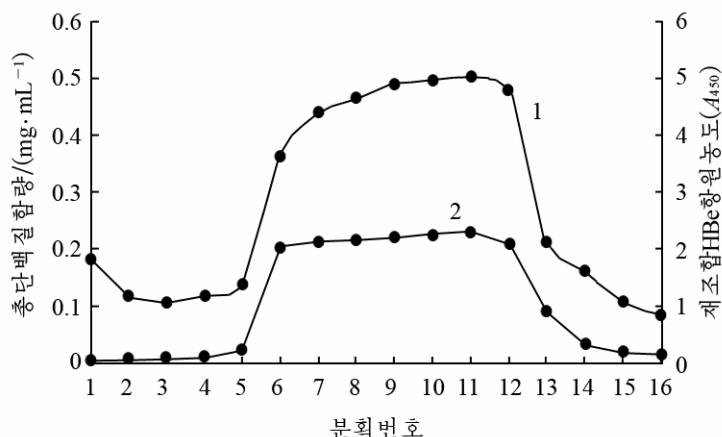


그림 1. 세파로즈CL-4B정제분획에 따르는 총단백질함량과  
제조합HBe항원의 농도

1—총단백질함량, 2—제조합HBe항원농도( $A_{450}$ , 8배 희석)

#### 4) QAE-세파덱스를 리용한 제조합HBe항원의 정제

우리는 세파로즈CL-4B크로마토그래프로 정제한 분획들중에서 HBe항원농도가 비교적 높은 6—12번 분획들을 합하여 QAE—세파덱스크로마토그래프정제를 진행하고 용출액에서 염농도구배에 따르는 총단백질함량과 제조합HBe항원농도를 측정하였다.(그림 2)

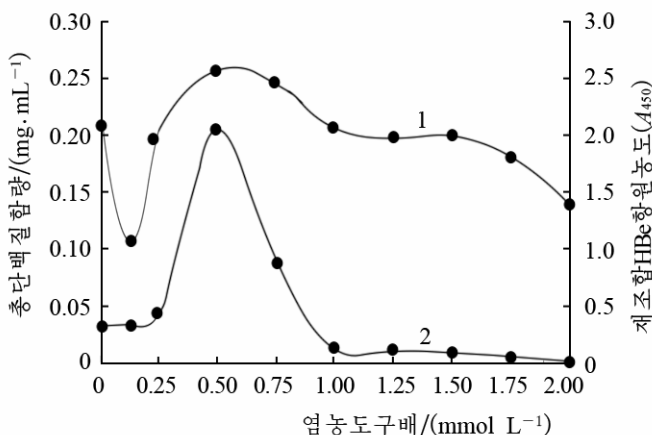


그림 2. 염농도구배에 따르는 총단백질함량과  
제조합HBe항원의 용출곡선

1—총단백질함량, 2—제조합HBe항원농도( $A_{450}$ , 8배 희석)

그림 2에서 보는바와 같이 QAE—세파덱스크로마토그래프를 리용하여 시료를 최종정제하고 농도구배에 따르는 총단백질함량과 제조합HBe항원농도를 측정하였을 때 염농도 0.5mmol/L 구간에서 총단백질함량과 항원농도가 가장 높았다.

#### 5) 항원의 정제단계별정제도와 거동률

우리는 30만려과막카세트와 3만한외려과막으로 투석농축한 시료를 세파로즈CL-4B크로마토그래프로 정제하고 QAE—세파덱스크로마토그래프를 리용하여 최종정제를 진행하였다.(그림 3, 4, 표 3)

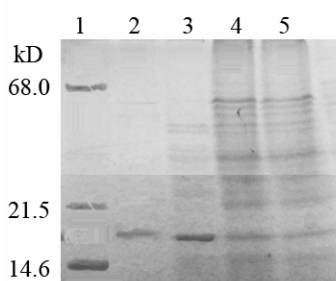


그림 3. 최종정제한 재조합HBe항원의 SDS-PAGE(15%)분석  
1-단백질분자량표식자, 2-QAE-세파로즈크로마토그램, 3-세파로즈CL-4B크로마토그램, 4, 5-30만막카세트려과 및 3만한외려과

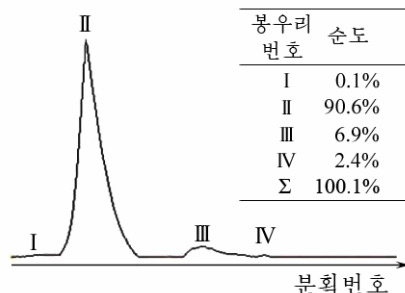


그림 4. 최종정제한 재조합HBe항원의  
덴시토그램

표 3. 정제단계별 재조합HBe항원정제도와 거둬들(효모배양상청액 2 500mL)

정제단계	시료체적 /mL	총단백질 함량/mg	재조합HBe 항원함량/mg	재조합HBe항원 정제도/%	거둬들/%
배양상청액	2 500	937.50	115.87	12.36	100.00
30만막카세트려과 및 3만한외려과	36	409.97	104.09	25.39	89.83
세파로즈CL-4B정제	91	57.32	34.13	58.27	25.14
QAE-세파덱스정제	86	22.19	20.50	90.6	17.69

표 3과 그림 3, 4에서 보는바와 같이 재조합효모배양상청액 2 500mL로부터 재조합HBe항원을 20.50mg 분리하였으며 이때 정제도는 90.6%, 거둬들은 17.69%였다.

## 맺 는 말

*Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-HBeAg)가 발현분비하는 재조합HBe항원을 여러 정제단계를 거쳐 순수하게 정제하였다.(정제도 90.6%, 거둬들 17.69%)

## 참 고 문 헌

- [1] D. Rolland et al.; Jouunal of Chromatography, 753, 51, 2001.
- [2] G. Y. Hwang et al.; Virus Research, 59, 203, 1999.
- [3] 李朝霞 等; 中华检验医学杂志, 29, 9, 807, 2006.
- [4] 许同华; 国际检验医学杂志, 39, 14, 1763, 2018.

주제109(2020)년 4월 5일 원고접수

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

Mun Song Chol, Ri Jong Ryo

Recombinant hepatitis B e antigen(rHBeAg) is purified with 90.6% in SDS-PAGE purity and 17.69% in recovery from *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-HBeAg).

Keywords: HBeAg, *Pichia pastoris*, purification