



단 원 개 요

5-1 세포에서 순수한 단백질 추출하기

- 세포에서 단백질을 어떻게 얻어내는가?

5-2 칼럼 크로마토그래피

- 다른 유형의 크로마토그래피로는 무엇이 있는가?

5-3 전기영동

- 아가로오스 젤과 폴리아크릴아마이드 젤의 차이점은 무엇인가?

5-4 단백질의 1차 구조 결정하기

- 단백질의 아미노산 서열을 결정하려면 왜 단백질을 작은 조각으로 절단해야 하는가?

5-5 단백질 확인 기술

- 보편적으로 사용되는 단백질 확인 기술은 무엇인가?

5.1 생화학과의 접목 | 기기
질량분광분석법

5-6 단백질체학

- 단백질체학을 연구하기 위해 각각의 확인 기술들을 어떻게 결합시켜 사용하는가?

단백질의 정제 및 확인

① 세포에서 단백질 추출하기

- 균질화
 - Centrifugation (원심분리)
 - Salting out (염석, 가염석출)

② Column chromatography

- Size-exclusion chromatography (크기별 분리 크로마토그래피)
- Affinity chromatography (친화성 크로마토그래피)
- Ion-exchange chromatography (이온교환 크로마토그래피)

③ Electrophoresis

- Electrophoresis (전기영동)
- Isoelectric focusing (등전점 전기영동)

표 5.1 단백질 정제법의 일례: 균류로부터 잔틴 탈수소효소의 정제

분획	부피(mL)	총 단백질(mg)	전체 활성	비(比)활성	회수율(%)
1. 추출원액	3,800	22,800	2,460	0.108	100
2. 염 침전물	165	2,800	1,190	0.425	48
3. 이온교환 크로마토그래피	65	100	720	7.2	29
4. 분자-체 크로마토그래피	40	14.5	555	38.3	23
5. 면역친화성 크로마토그래피	6	1.8	275	152.778	11

단백질의 분리

1. Homogenization (조직균질법) 세포에서 단백질 추출

- Polytron type homogenizer
- Potter-Elvehjem type homogenizer
- 초음파 교반기
- Mixer
- 막자사발과 막자
- 냉동과 해동을 반복



2. 원심분리법:

- 축을 중심으로 물질을 회전시켜서 원심력을 가하여 물질 분리
- 중력대신 원심력을 이용하면 침전현상을 가속화

1) 분별원심분리법

(Differential centrifugation) :

원심분리의 속도를 달리하여 원하는 물질을 얻는 방법

2) 밀도구배법

(Density gradient centrifugation)

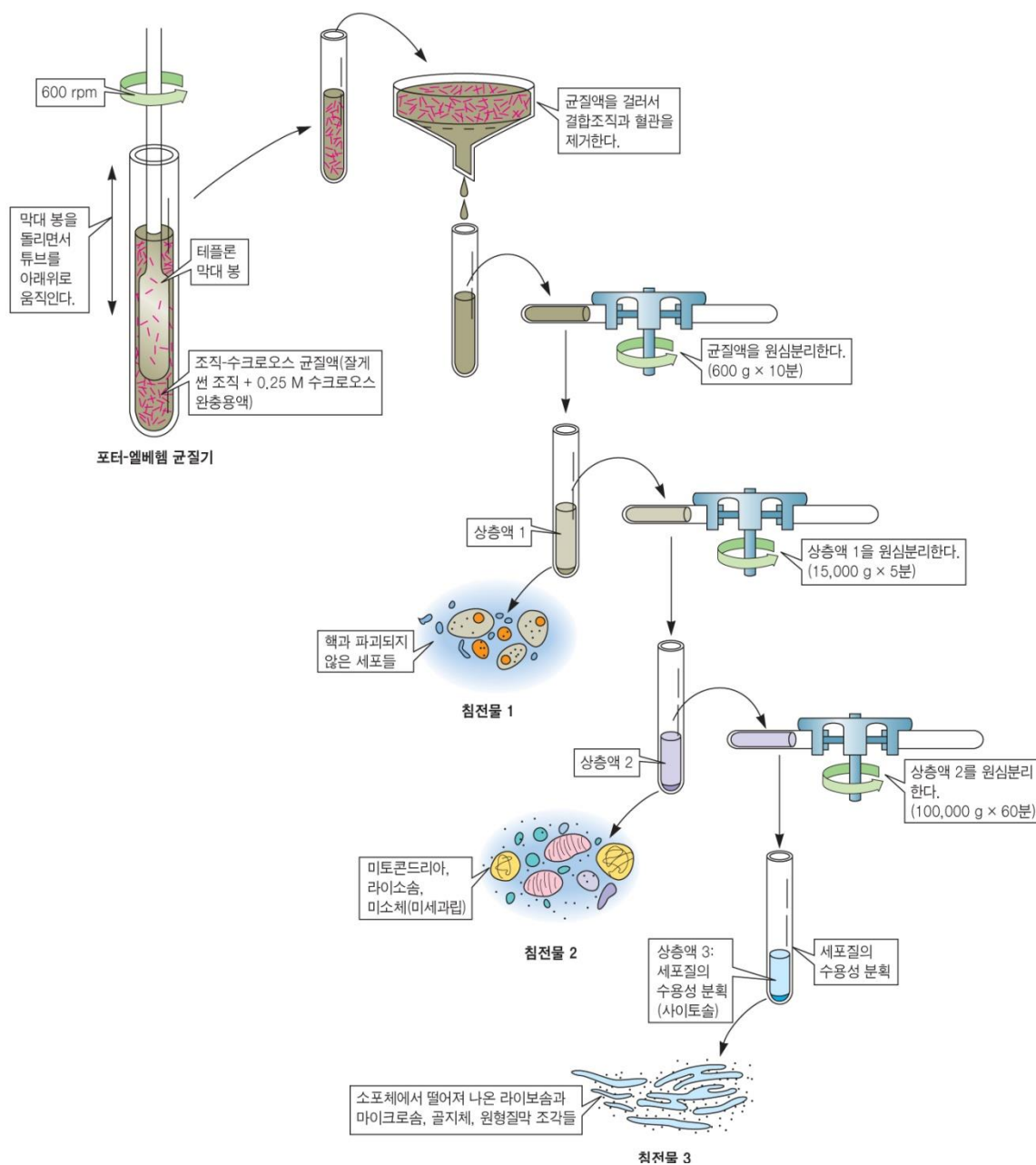
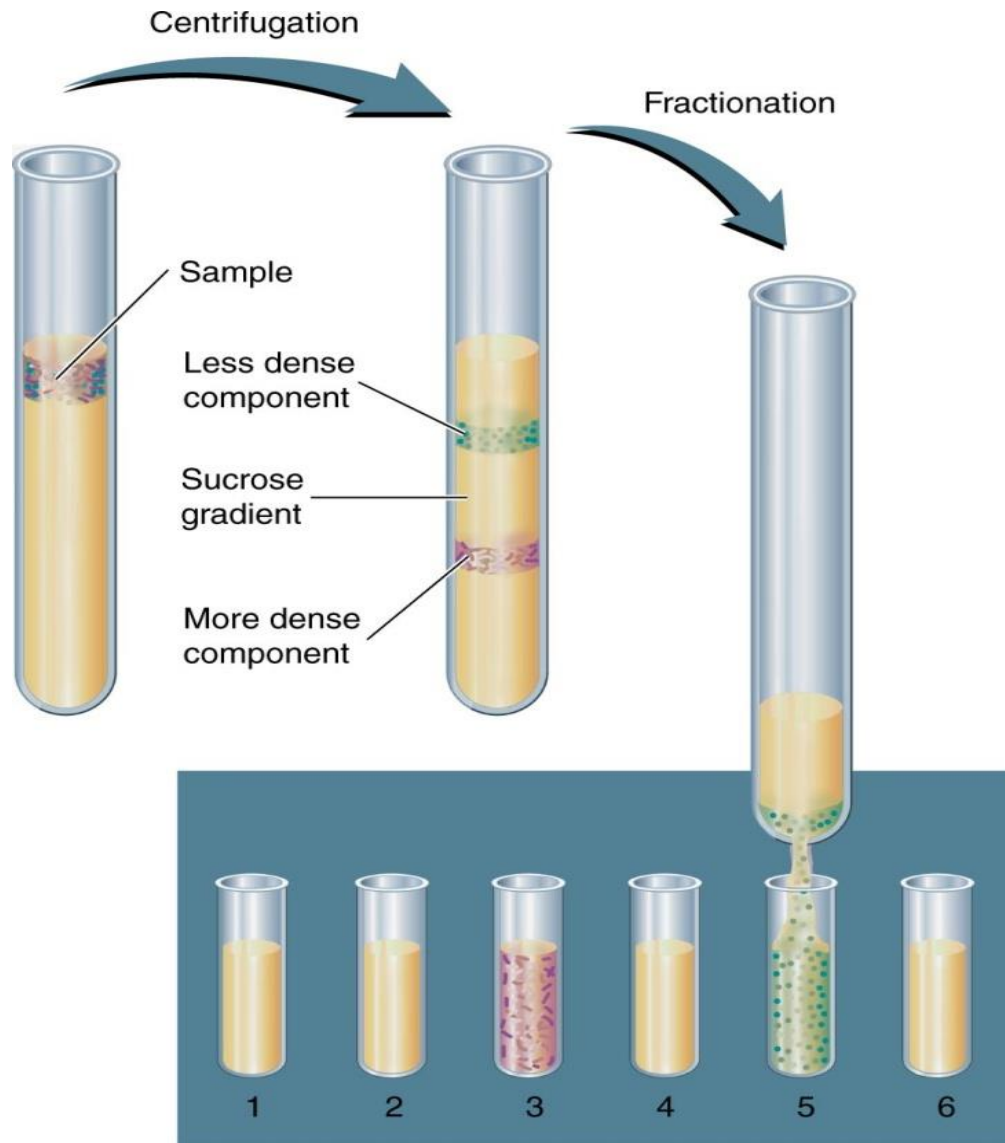


그림 5.1 **분별 원심분리.** 세포 구성물질들을 분리하는 데에는 분별 원심분리법이 사용된다. 원심력을 증가시키면서(g 값을 증가시킴) 단계적으로 세포 균질액을 원심분리하면 각 단계마다 점점 더 작은 세포 구성물질들이 침전된다.



밀도구배원심분리

3. 암모늄 슬페이트 침전법 (가염석출, 염석)

- 액체 속 에서 고체 가 분리되어 생성되는 일

- ① 세포추출액에 암모늄 슬페이트를 넣고 1-2시간 저어준다.
- ② 단백질이 침전된다.
- ③ 원심분리하여 침전되는 단백질을 분리한다.

원리: 암모늄슬페이트가 물에 어울려 녹음으로써 단백질은 물과 회합하지 못하고 단백질분자끼리 뭉쳐 (소수성 결합 발생) 갈아엎게 된다.

단백질의 정제 원리

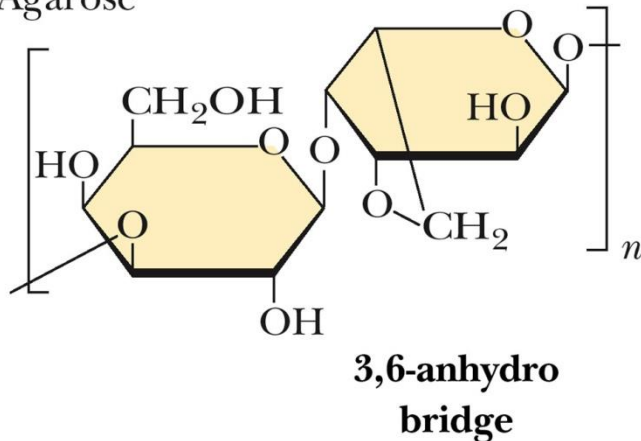
- ① 단백질의 분자량
- ② 전하 (charge)
- ③ 용해도
- ④ 특이적 결합능

4. Column chromatography

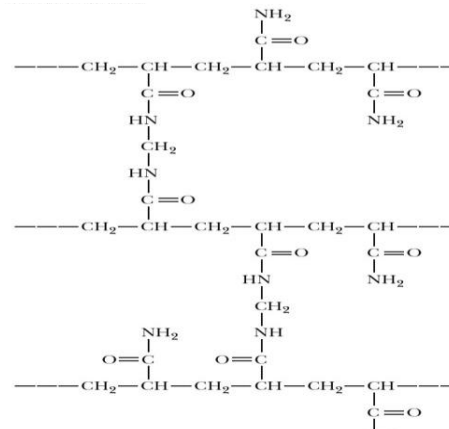
1) 원리: 고정상과 이동상간의 친화력에 따라 분리

- 고정상: 수지, 겔
- 고정상의 종류: 아가로스, 덱스트란, polyacrylamide
- 이동상: 용액 (완충용액, 식염수)

Agarose



Polyacrylamide



칼럼(column)



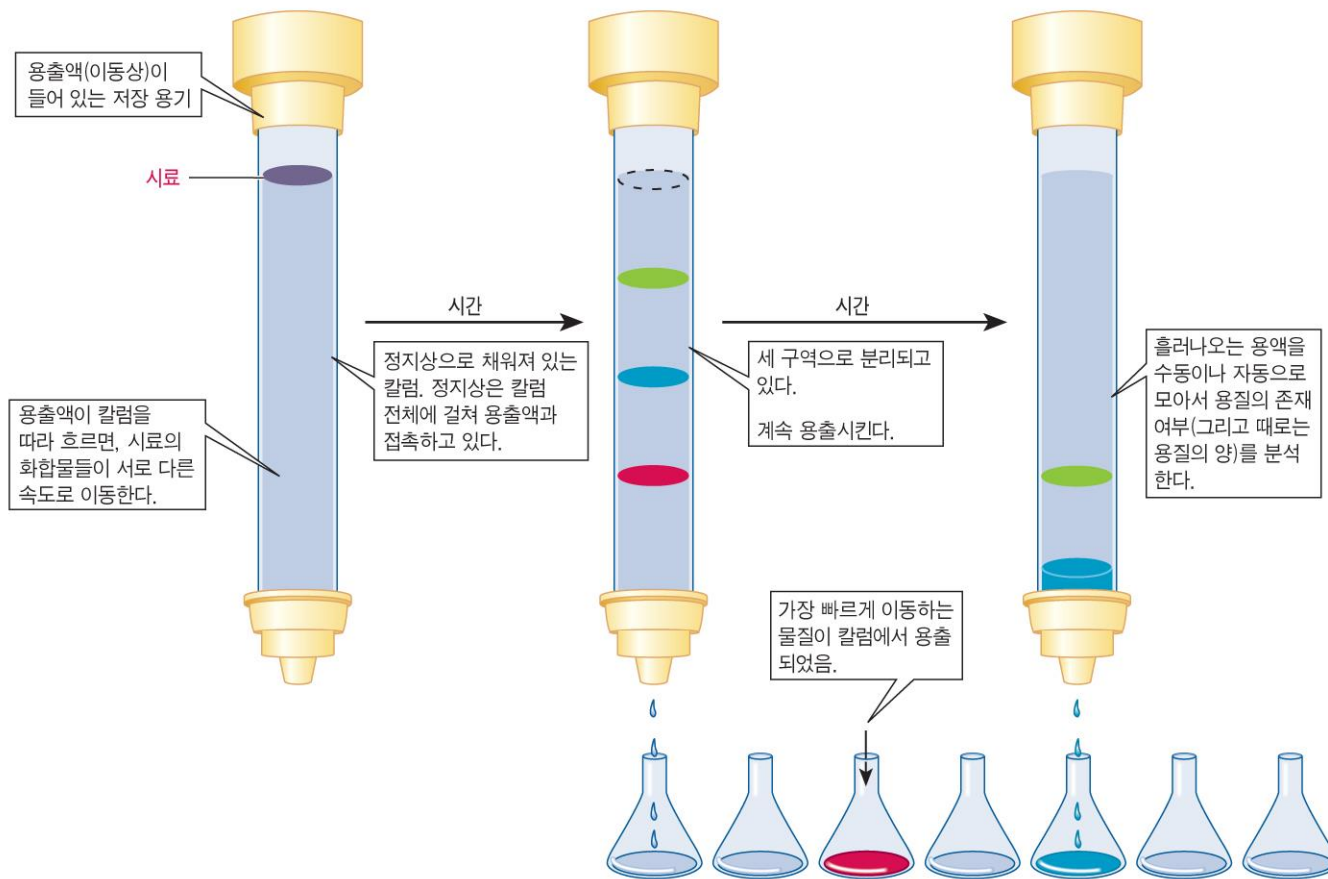


그림 5.2 칼럼 크로마토그래피. 여러 가지 성분들이 포함된 시료를 칼럼에 가하여 통과시킨다. 다양한 성분들이 서로 다른 속도로 이동하므로 따로따로 분리하여 모을 수 있다.

2) Column chromatography의 종류

1. 겔 여과 크로마토그래피
2. 친화성 크로마토그래피
3. 이온 교환 크로마토그래피

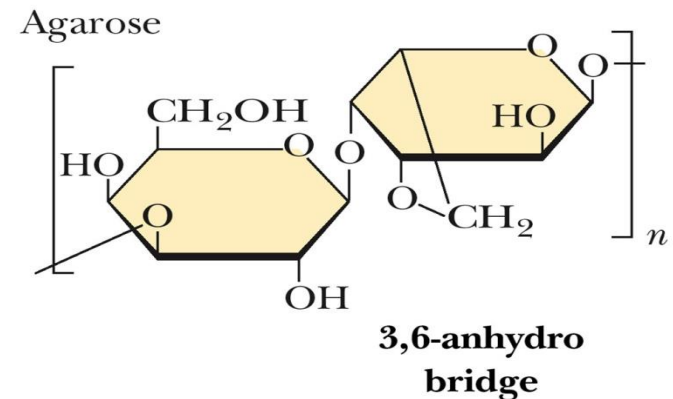
2) Column chromatography의 종류

(1) 겔 여과법 크로마토그래피

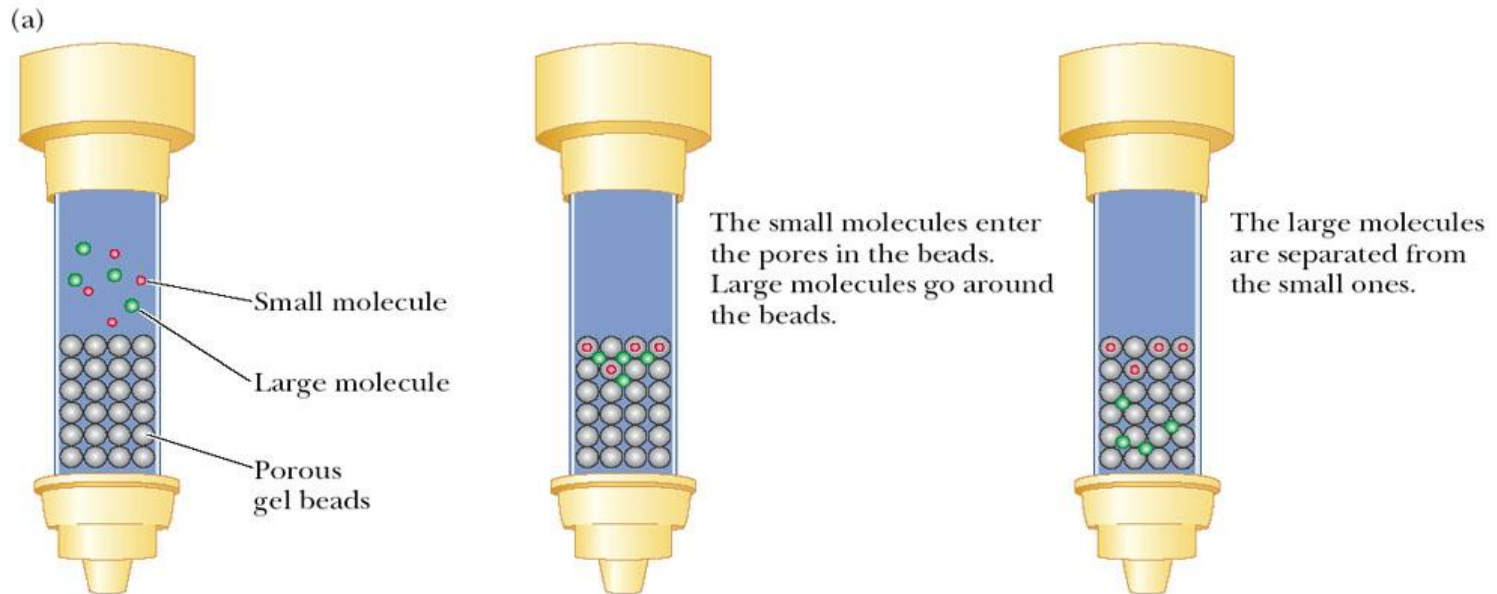
= 크기별 분리 크로마토그래피

- 분자량의 크기에 따라 분리
- 분자량이 작은 단백질은 겔 안으로 확산되어 머물러 있다 천천히 내려온다.
- 분자량이 클수록 먼저 용출한다

- 고정상 : 탄수화물 polymer
(agarose, dextran)
상품명: sepharose, sephadex)



겔-여과 크로마토그래피



© 2006 Brooks/Cole - Thomson

gel beads (겔구슬)

고정상 : 탄수화물 polymer (agarose, dextran)

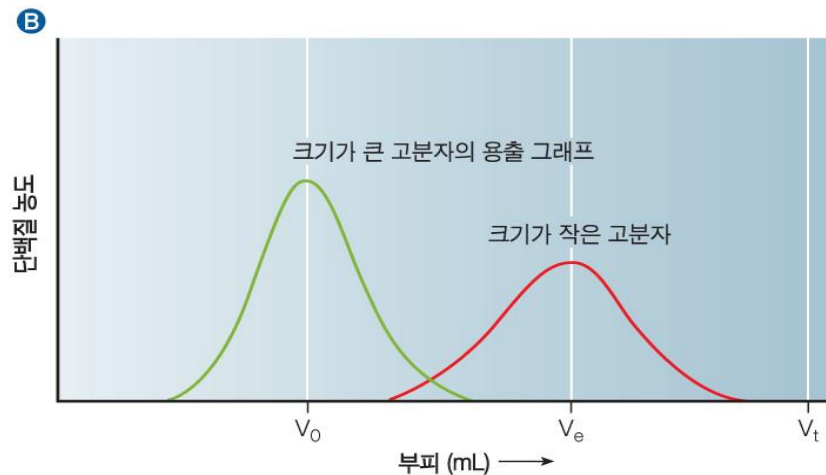
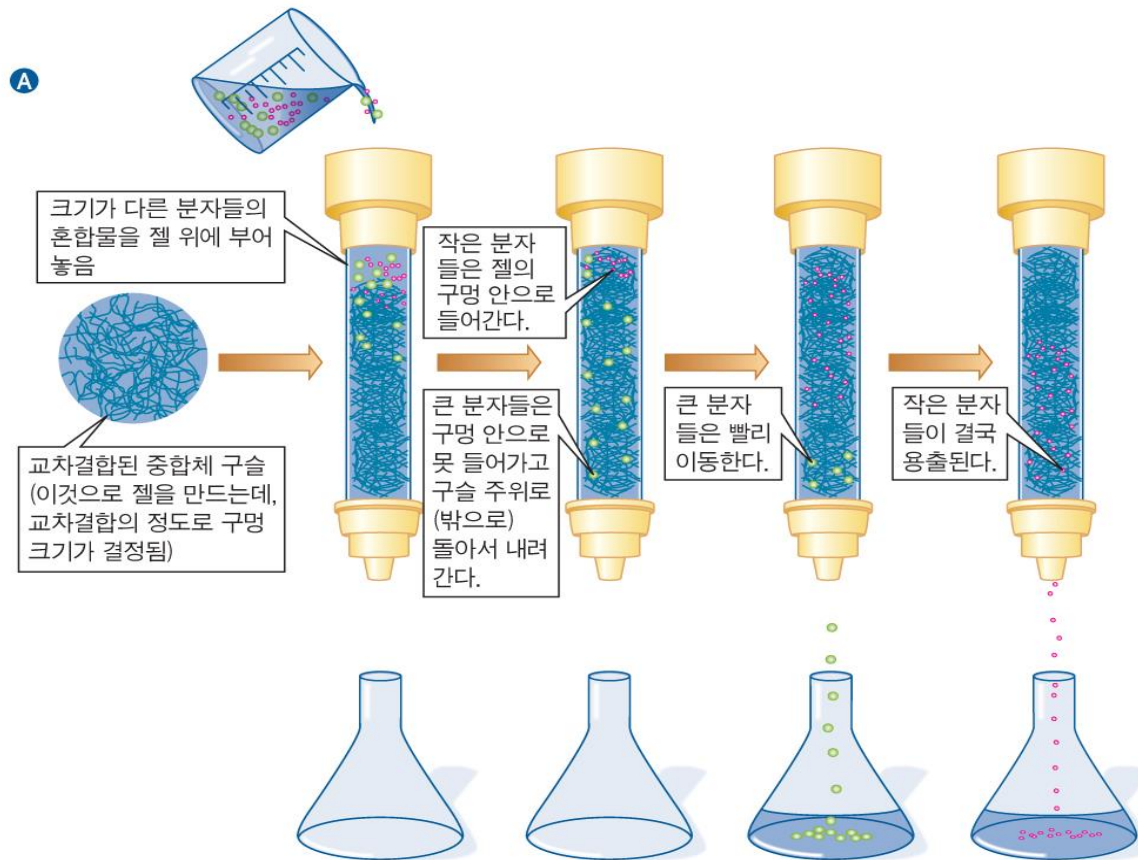


그림 5.5 젤 여과 크로마토그래피. 큰 분자는 젤로 들어가지 못하여 칼럼을 통해 더 빨리 빠져나온다. 작은 분자는 젤 구슬의 내부로 들어갈 수 있으므로, 용출되는 시간이 더 오래 걸린다. 이와 같은 칼럼 크로마토그래피 과정에서는 시료가 칼럼에서 용출될 때 일반적으로 UV 흡광도를 이용하여 단백질 농도를 측정한다.

2) Column chromatography의 종류

(2) Affinity chromatography (친화성)

- 특이적 결합능에 따라 분리
- 예: 포도당이나 항체에 친화력이 있는 성질을 이용

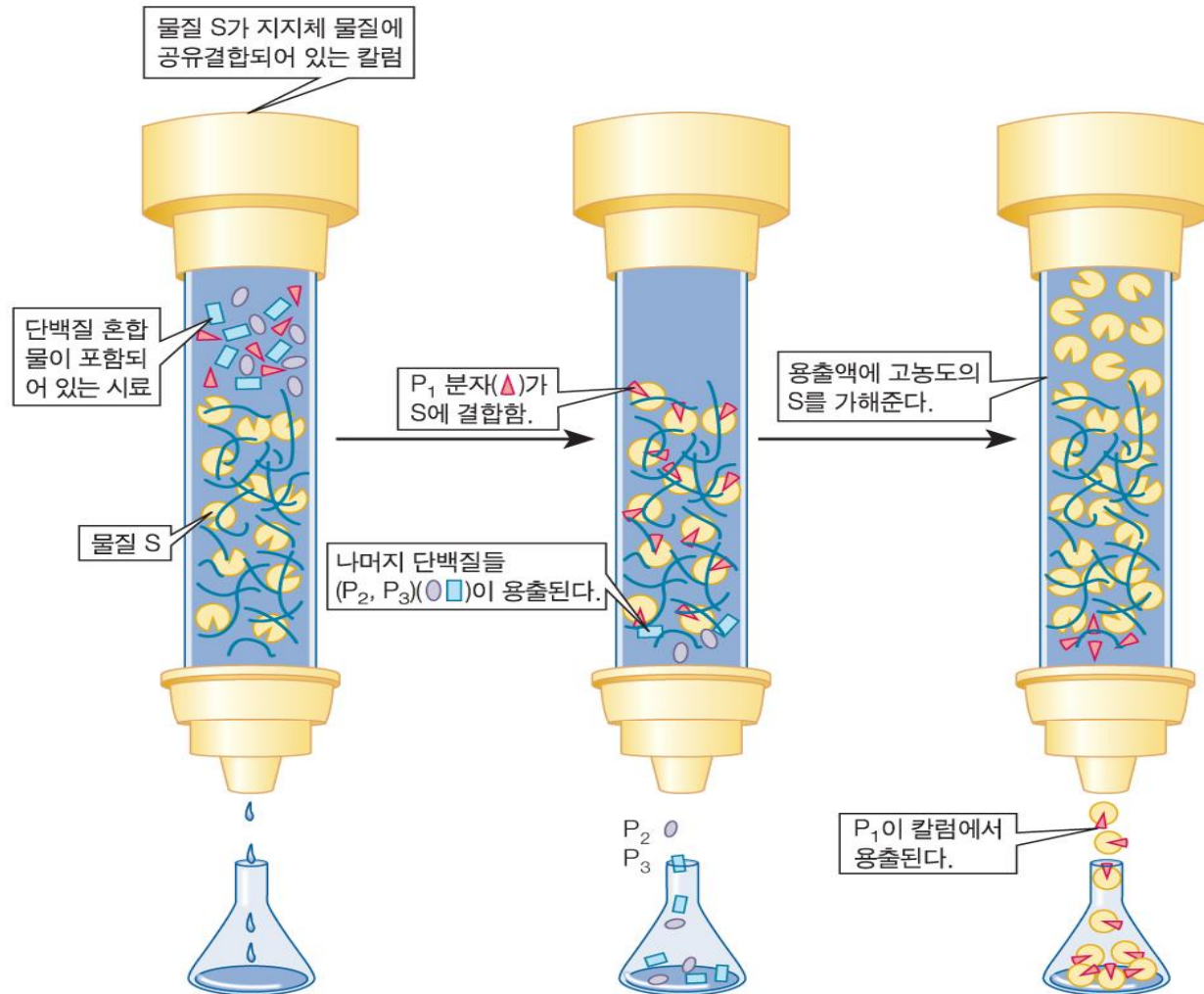


그림 5.6 친화성 크로마토그래피의 원리. 단백질 혼합물 중에서 단지 한 단백질(P_1 이라고 표기함)만이 기질이라 불리는 물질(S)에 결합한다. 기질은 칼럼에 충전되어 있는 지지체 물질에 붙어 있다. 일단 다른 단백질들(P_2 와 P_3)이 씻겨 내려가면, 고농도의 염 용액이나 유리된 S를 가해줌으로써 P_1 을 용출시킬 수 있다.

표 5.2 특정한 그룹에만 작용하는 친화성 수지

특정한 그룹에만 작용하는 흡착제	그룹 특이성
콘카나발린 A-아가로오스(Concanavalin A-agarose)	당단백질과 당지질
시바크론 블루-아가로오스(Cibacron Blue-agarose)	뉴클레오타이드 보조인자를 가지고 있는 효소
붕소산-아가로오스(Boronic acid-agarose)	시스-다이올 작용기를 가지고 있는 화합물
단백질 A-아가로오스	IgG 유형의 항체
폴리(U)-아가로오스	폴리(A) 서열을 갖고 있는 핵산
폴리(A)-아가로오스	폴리(U) 서열을 갖고 있는 핵산
이미노디아아세트산(iminodiacetate)-아가로오스	중금속 친화성이 있는 단백질
AMP-아가로오스	NAD ⁺ 보조인자를 가지고 있는 효소, ATP-의존성 인산화효소

2. Column chromatography의 종류

(3) 이온 교환 크로마토그래피

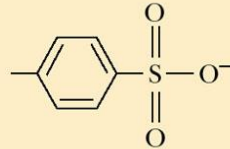
- 전하에 대한 친화도에 따른 분리
- 양이온 교환수지 (Carboxymethyl sephadex)
: 양이온을 결합할 수 있는 수지
- 음이온 교환수지 (DEAE sephadex)
: 음이온을 결합할 수 있는 수지

이온교환 크로마토그래피 수지의 종류

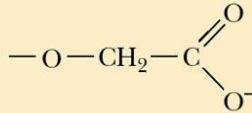
(a) Cation-Exchange Media

Structure

Strongly acidic: polystyrene resin (Dowex-50)



Weakly acidic: carboxymethyl (CM) cellulose



Weakly acidic, chelating: polystyrene (Chelex-100)



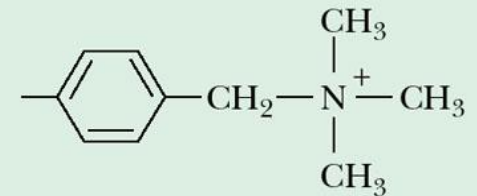
양이온교환수지

음이온교환수지

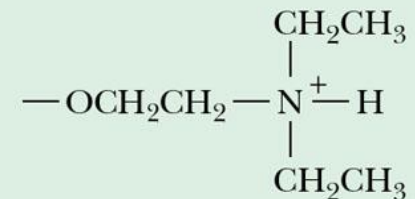
(b) Anion-Exchange Media

Structure

Strongly basic: polystyrene resin (Dowex-1)



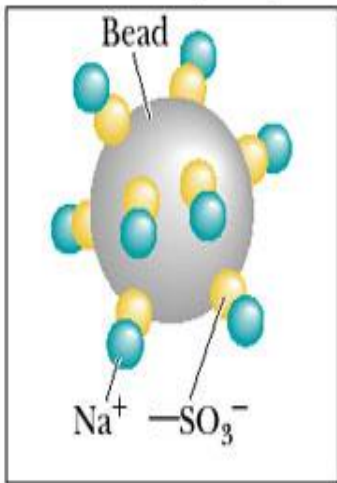
Weakly basic: diethylaminoethyl (DEAE) cellulose



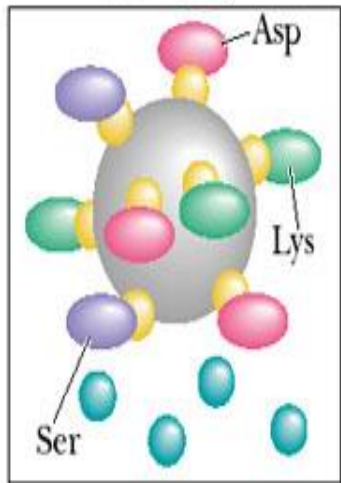
양이온교환 크로마토그래피

양전하는 수지에 결합하여 머물러있고 음이온을 가진 단백질은 컬럼을 그냥 통과한다.

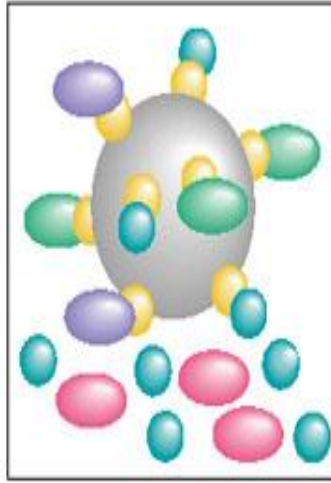
Cation exchange bead
before adding sample



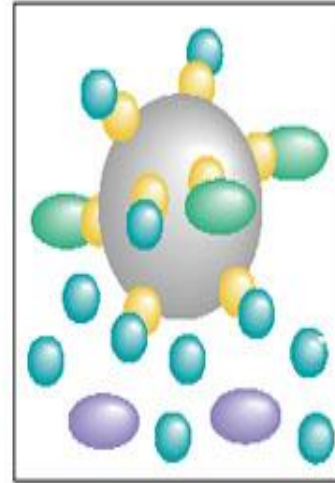
Add mixture of
Asp, Ser, Lys



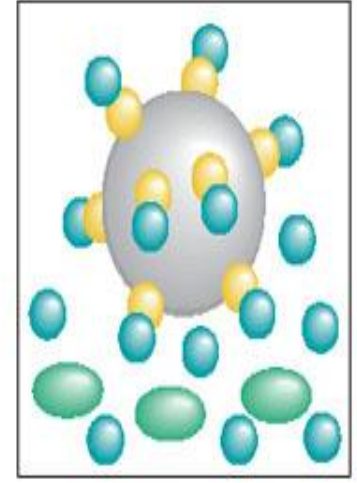
Add Na^+ (NaCl)



Increase $[\text{Na}^+]$



Increase $[\text{Na}^+]$



(a)

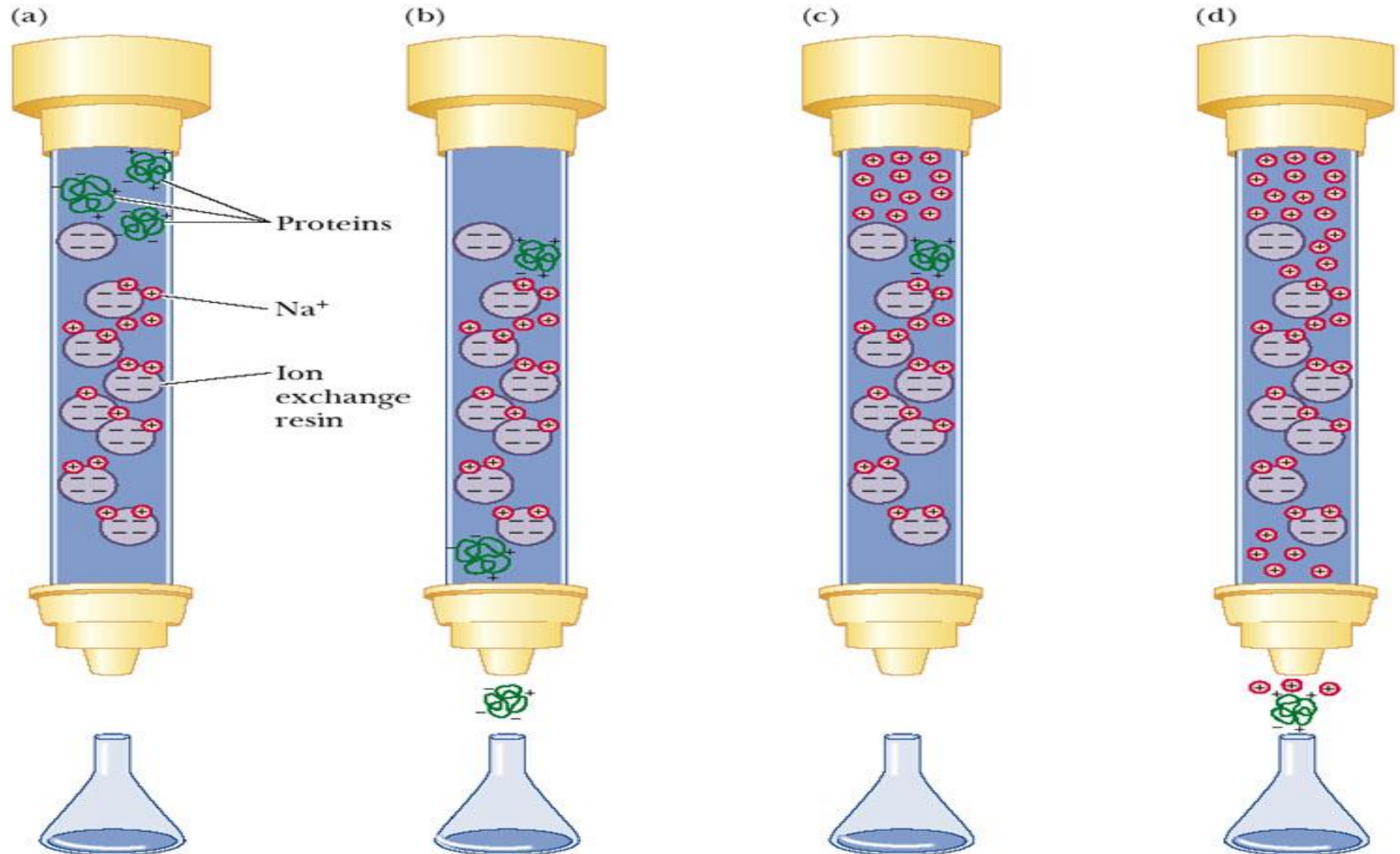
(b)

(c) Asp, the least
positively charged
amino acid, is
eluted first

(d) Serine is eluted next

(e) Lysine, the most
positively charged
amino acid, is
eluted last

양이온교환 크로마토그래피



115쪽 실전 응용문제 해결하기

5. 전기영동

1) Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

2) SDS-PAGE

3) Electrofocusing (등전점 전기영동)

4) 2차원 전기영동

1) Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

- 원리: based on the motion of charged particles in an electric field toward an electrode of opposite charge. 알짜전하의 반대전극 쪽으로 이동한다.
- 단백질의 모양과 분자량에 따라 분리
 - 둥근 모양일수록 많이 이동한다.
 - 분자량이 작을 수록 많이 이동한다.
- Agarose gel (핵산 분리) 과 polyacrylamide gel (단백질 분리)이 가장 많이 사용된다 .

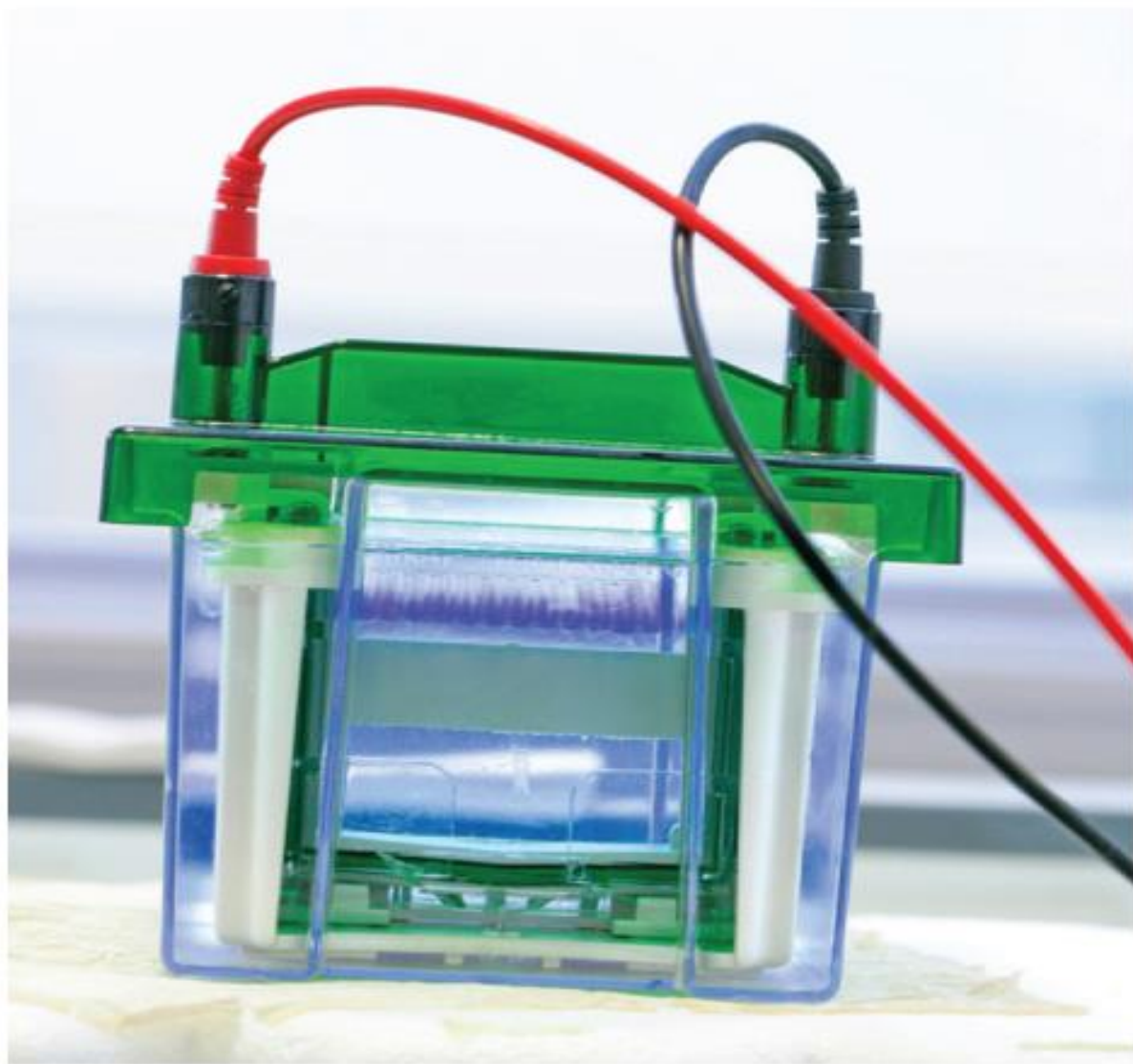


그림 5.10 젤 전기영동의 실험 장치. 시료를 젤의 위쪽에 넣는다. 전류를 걸면 음전하를 띤 단백질들이 아래의 양전극 쪽으로 이동한다.

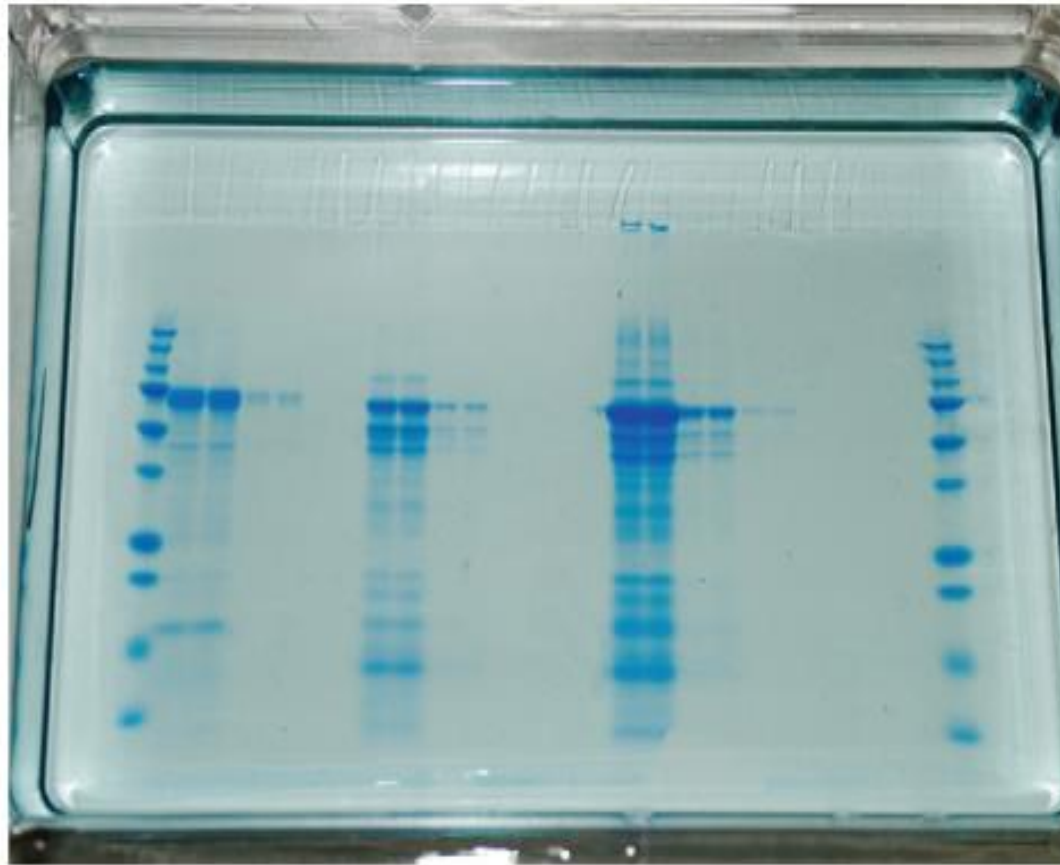
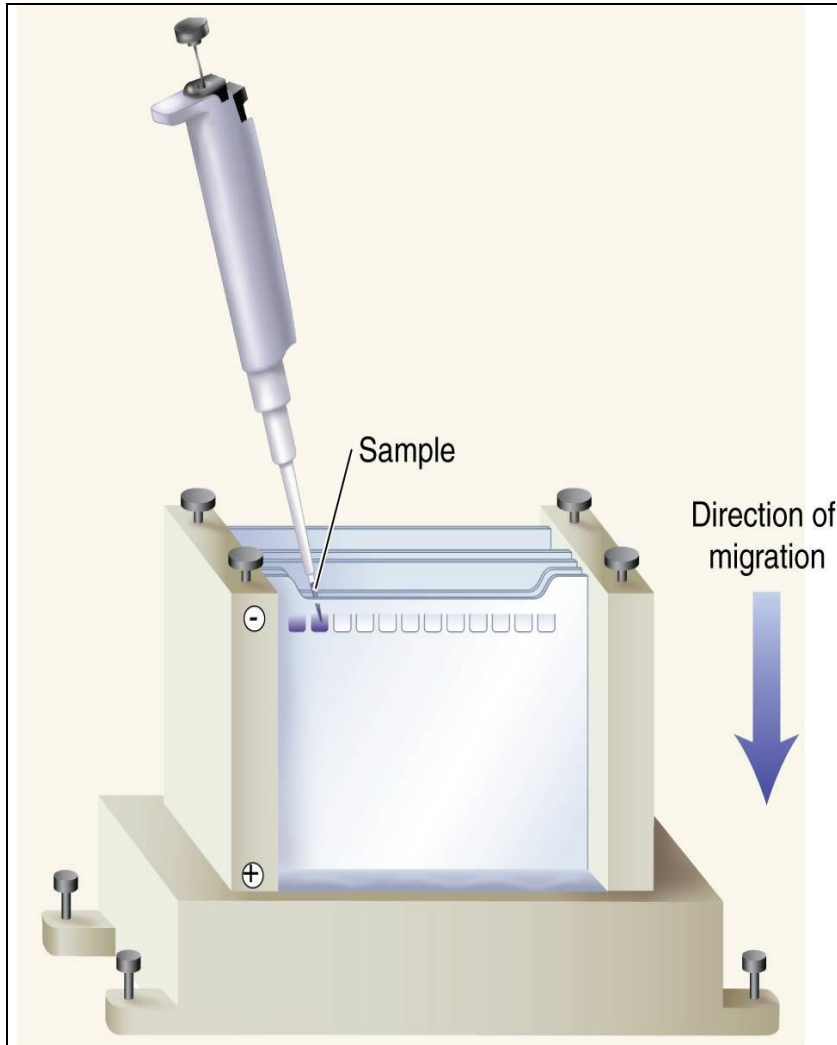
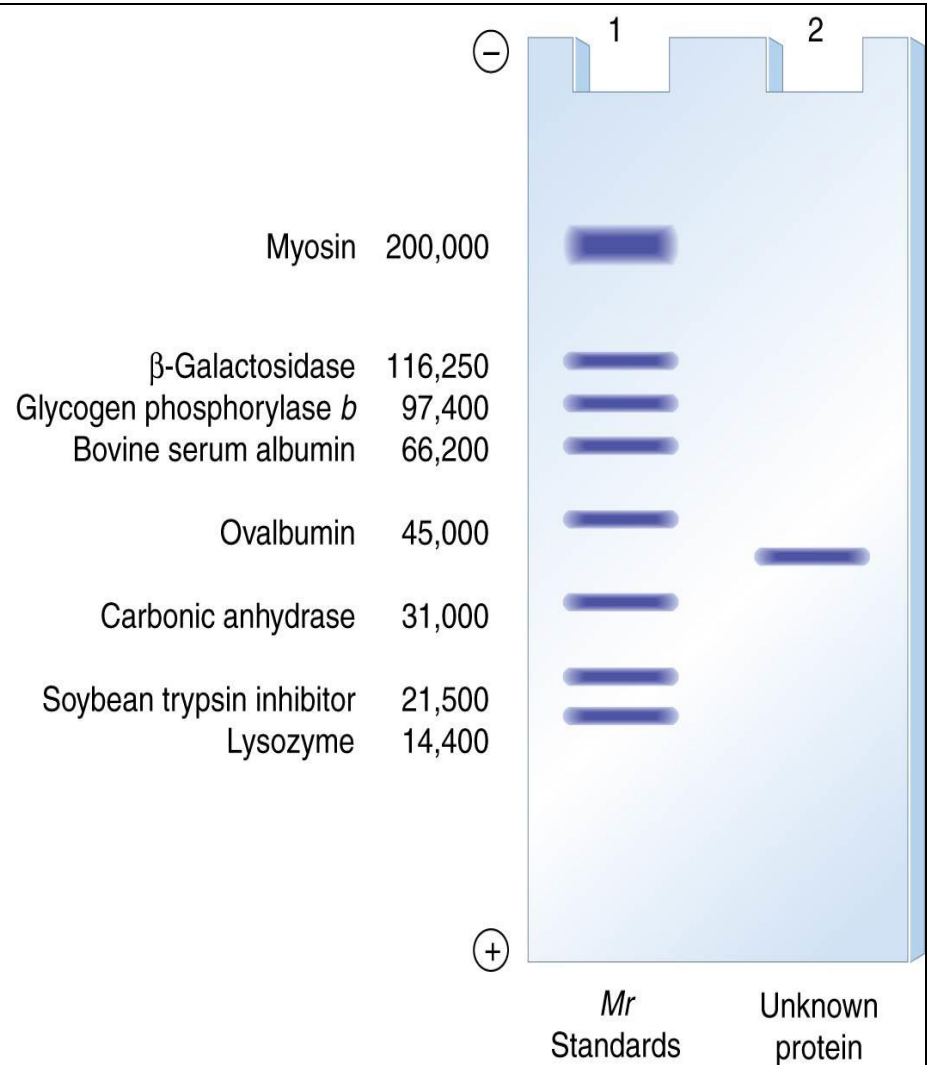


그림 5.11 젤 전기영동에 의한 단백질의 분리. 젤 상에 보이는 각 밴드들은 각각 다른 단백질들을 나타낸다. SDS-PAGE 기술에서는, 시료를 젤에 걸기 전에 이 시료를 미리 세제로 처리한다. 등전점 전기영동에서는 젤을 따라가면서 pH 기울기가 형성된다. 젤 내의 단백질들은 쿠마시 블루로 착색시킨다.

Gel Electrophoresis (전기영동의 원리)

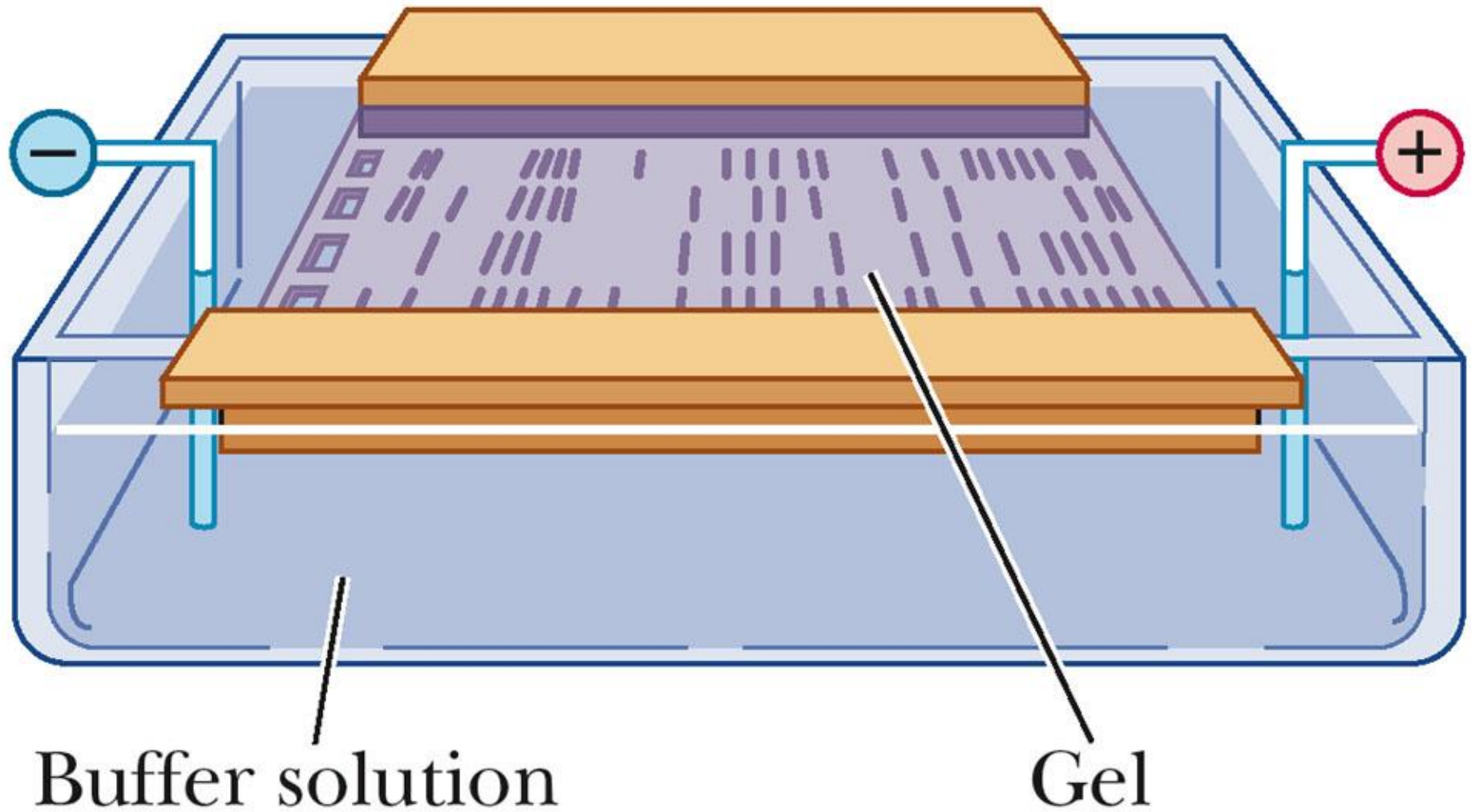


(a)



(b)

gel electrophoresis

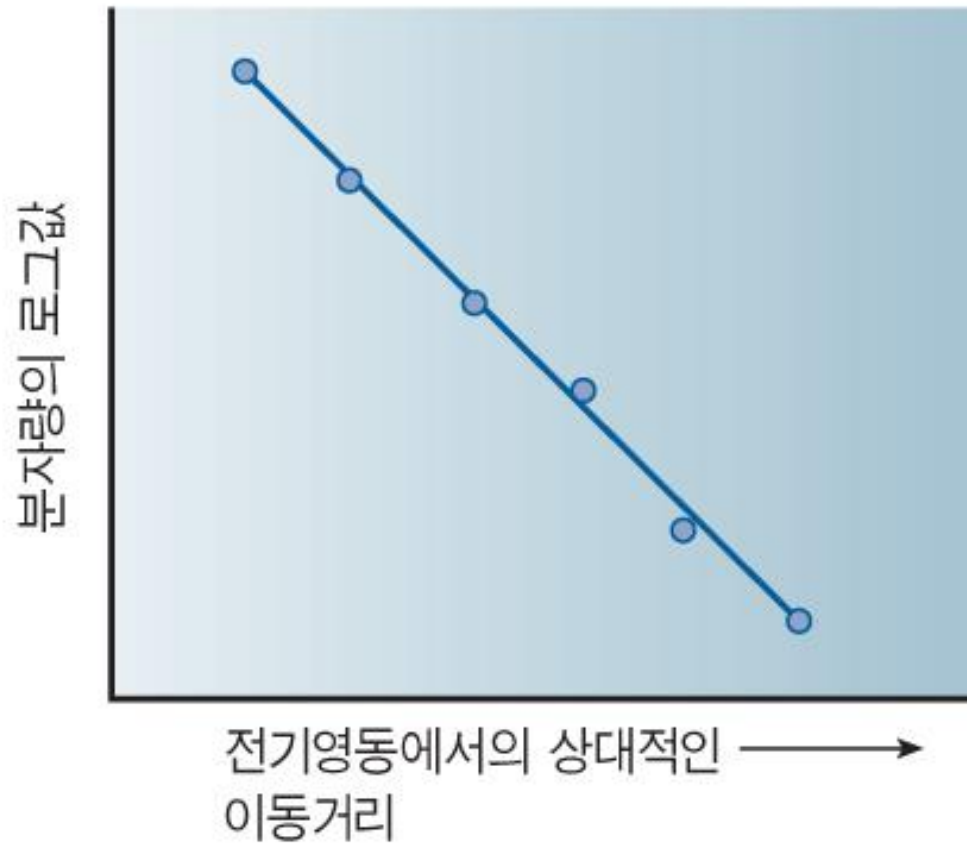


2) SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate)-polyacrylamide gel electrophoresis

- SDS가 단백질에 비특이적으로 흡착되어 단백질의 3차 구조를 파괴하고 단백질이 음전하를 띄게 한다.
- 분자량의 크기에 따라 분리
- 분자량이 작을수록 멀리 이동하게 된다. 즉 이동거리와 분자량은 반비례함.
- 단백질의 분자량을 결정하는데 이용된다.

SDS-PAGE에 의한 단백질 분자량 결정

분자량이 작을수록 멀리 이동하게 된다. 즉 이동거리와 분자량은 반비례함.

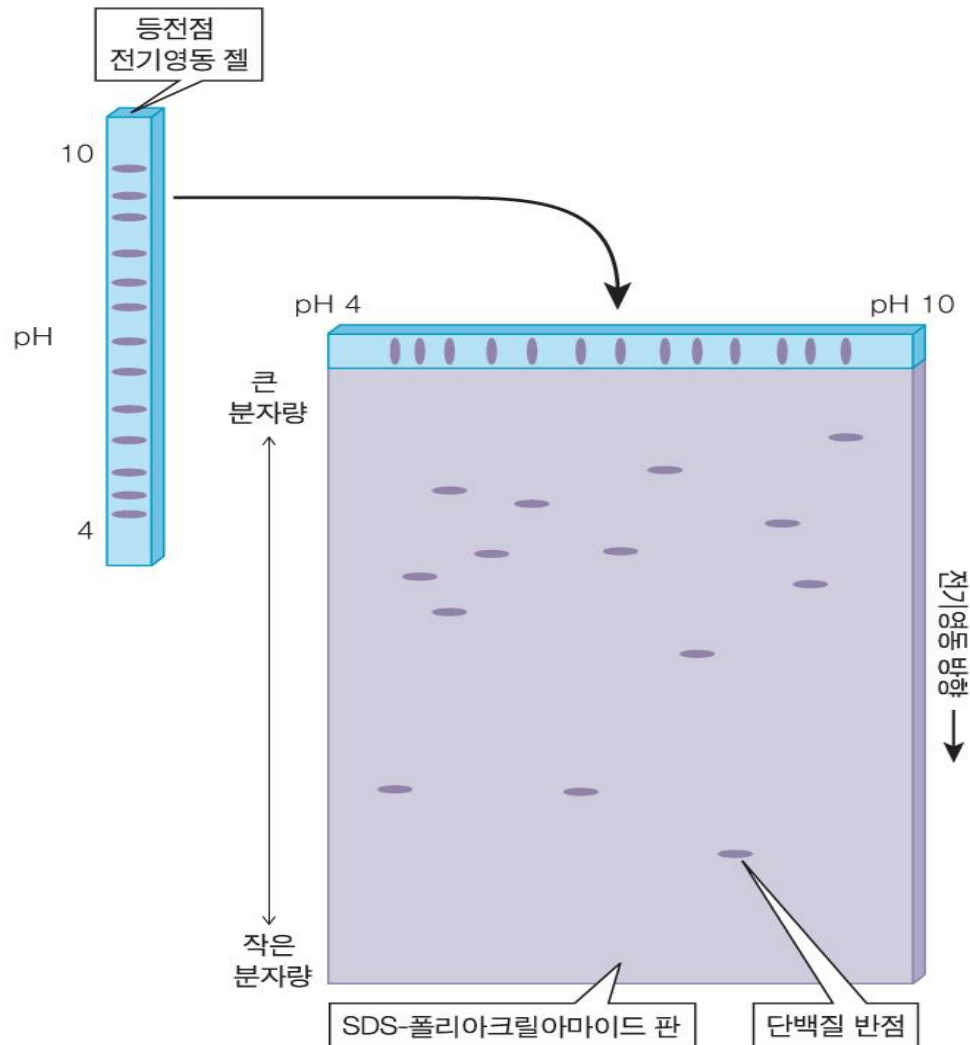


3) Electrofocusing

- 단백질은 고유의 등전점을 가진다는 원리를 이용한 방법
- 단백질은 net charge가 0인 지점까지 (등전점) 이동하는 원리 이용
- gel is prepared with pH gradient

4) 2차원 전기영동

- electrofocusing과 SDS-PAGE를 90의 각도 차이로 실시함.



단백질의 1차 구조 결정하는 법

- 1) 아미노산의 존재 비율을 먼저 결정
아미노산 분석기 이용 (이온교환, HPLC)
- 2) N-말단과 C- 말단 아미노산을 확인
- 3) 단백질을 작은 조각으로 절단한 다음
아미노산의 서열(결합순서)을 결정

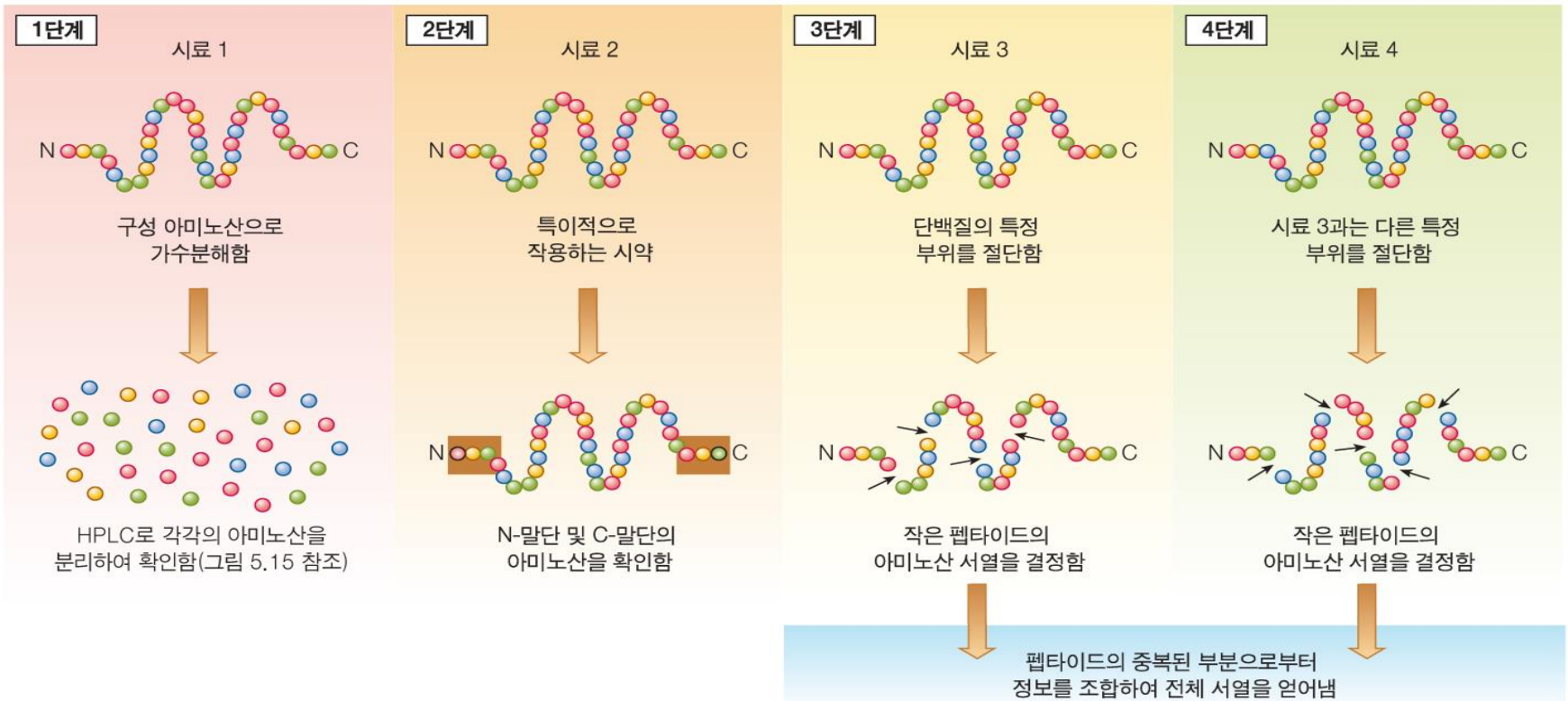
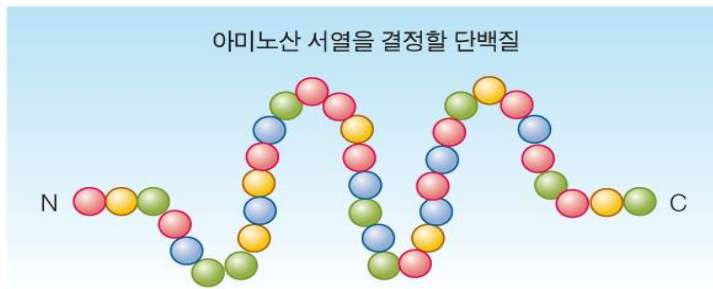


그림 5.14 주어진 단백질의 1차 구조를 결정하는 전략.
동일한 단백질 시료 4개에 대해 네 가지 방법으로 다르게 분석하여 아미노산 서열을 결정할 수 있다.

1) 아미노산의 조성 분석

- 단백질을 6N HCl at 110°C for 24시간 가열
→ 아미노산으로 분해
- Chromatography
 - 이온 교환 크로마토그래피
 - 아미노산의 종류와 양을 결정한다.

양이온 교환 크로마토그래피

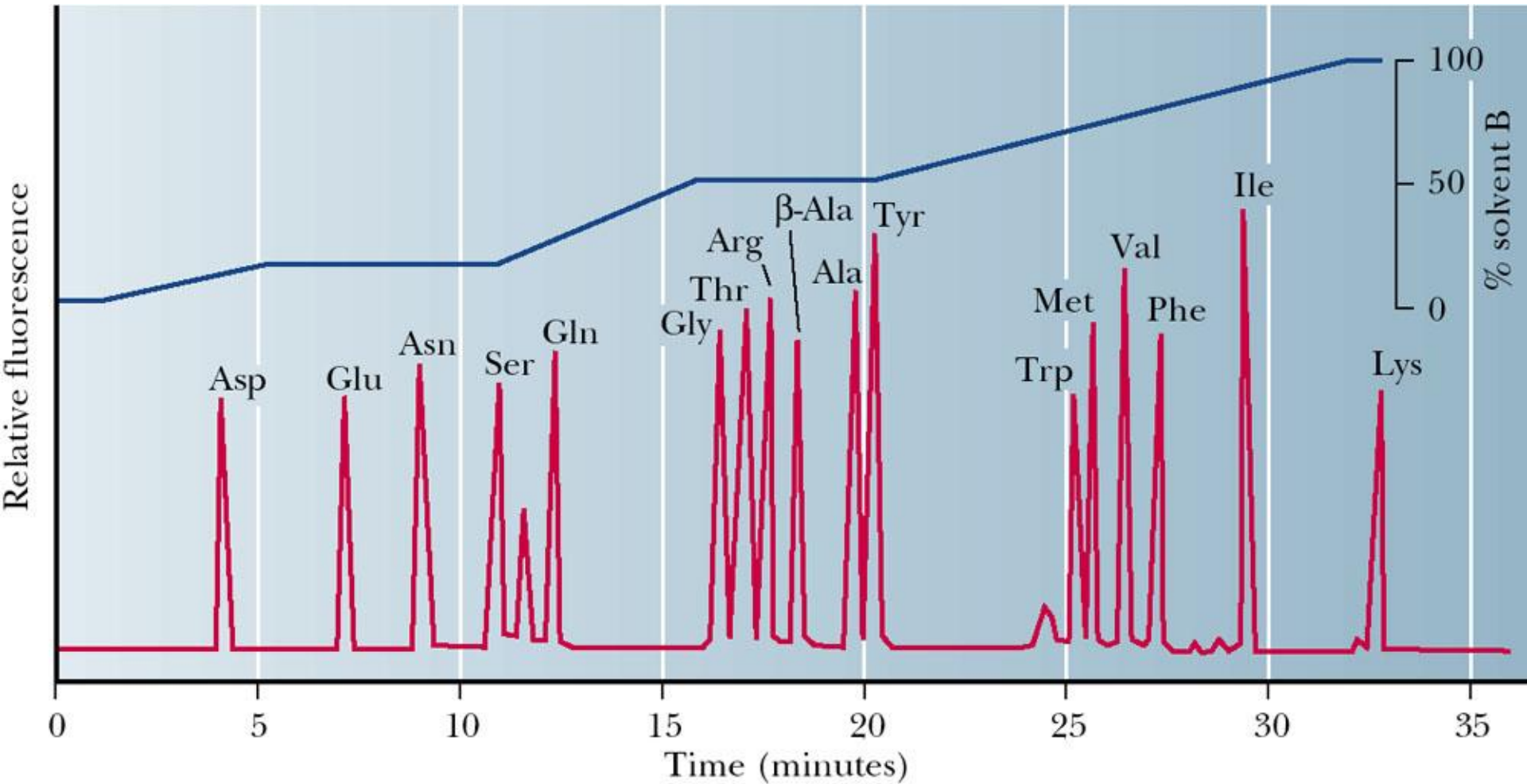


Fig. 5-15, p.123

3) 단백질 절단하는 법

(1) 효소에 의한 분해

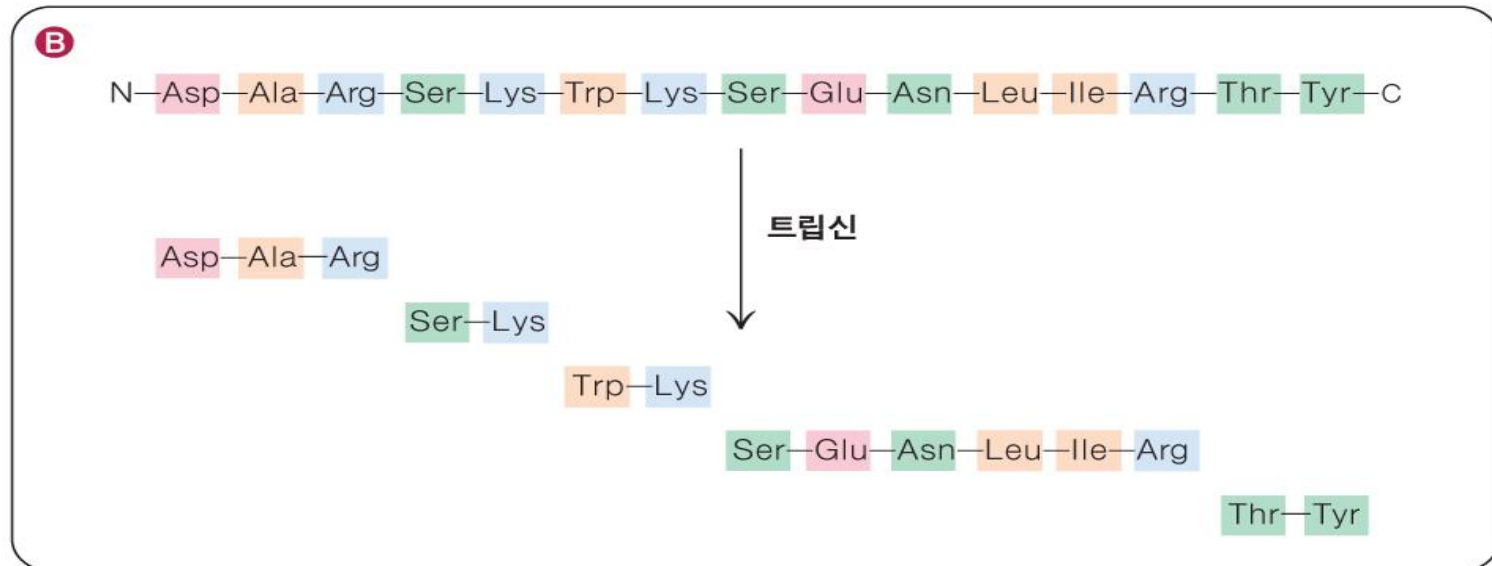
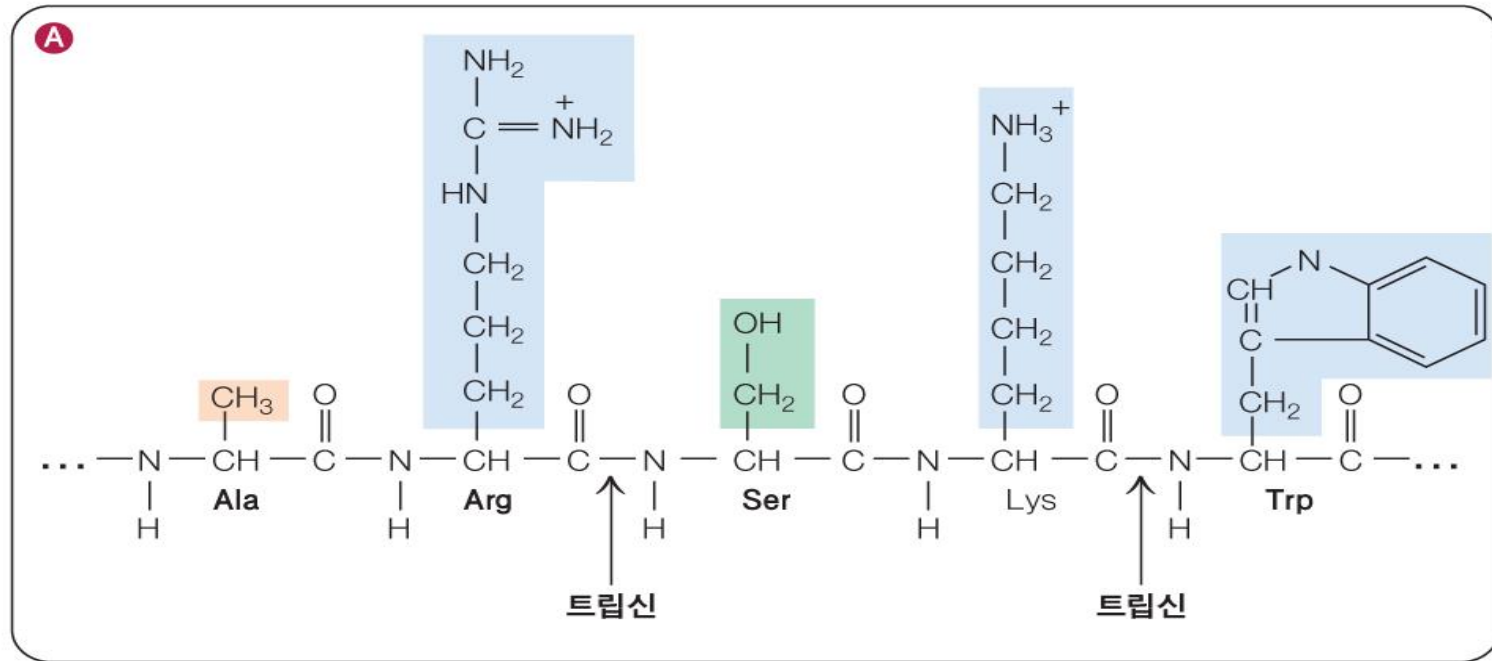
- Trypsin : Arg, Lys의 COOH기 쪽에서 쪼갬다
- Chymotrypsin :

Aromatic 과 bulky nonpolar 잔기의 COOH기 쪽에서 쪼갬다 (Phe, Tyr, Trp, Val, Leu)

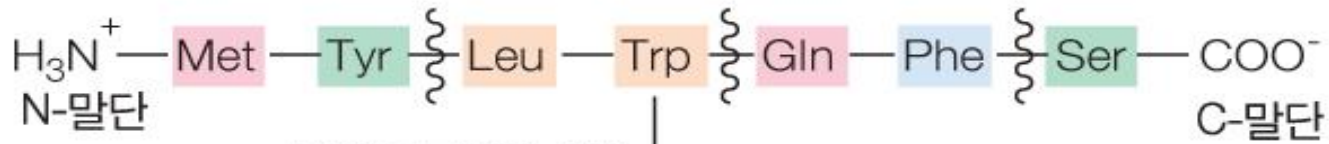
(2) CNBr에 의한 분해

methionine의 COOH기 쪽에서 분해

Trypsin의 분해자리



원래의 단백질



카이모트립신 분해

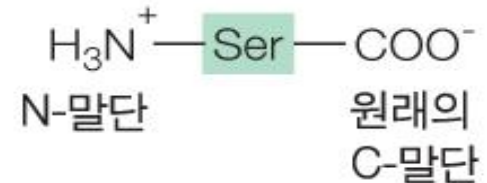
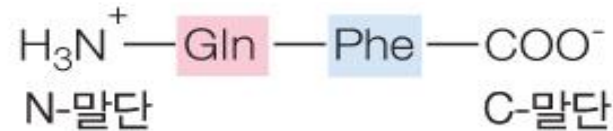
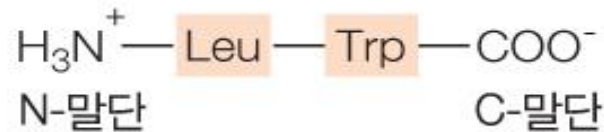
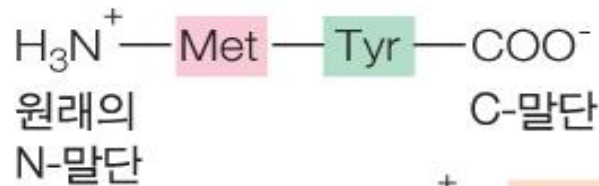
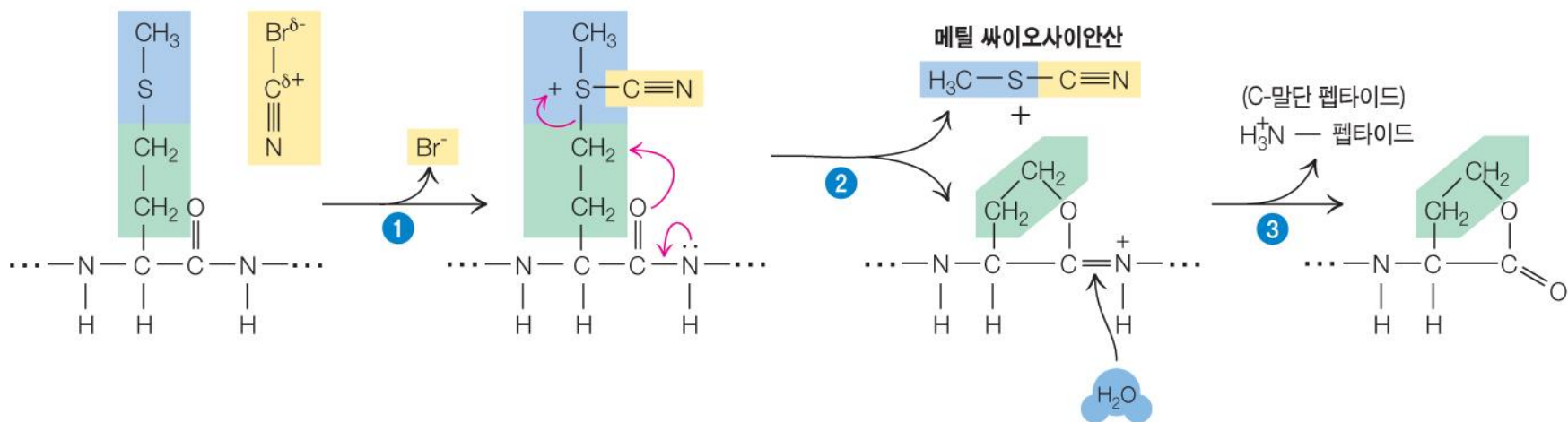


그림 5.17 카이모트립신에 의한 단백질 절단. 카이모트립신은 단백질의 방향족 아미노산 부위를 절단한다.



전체 반응:

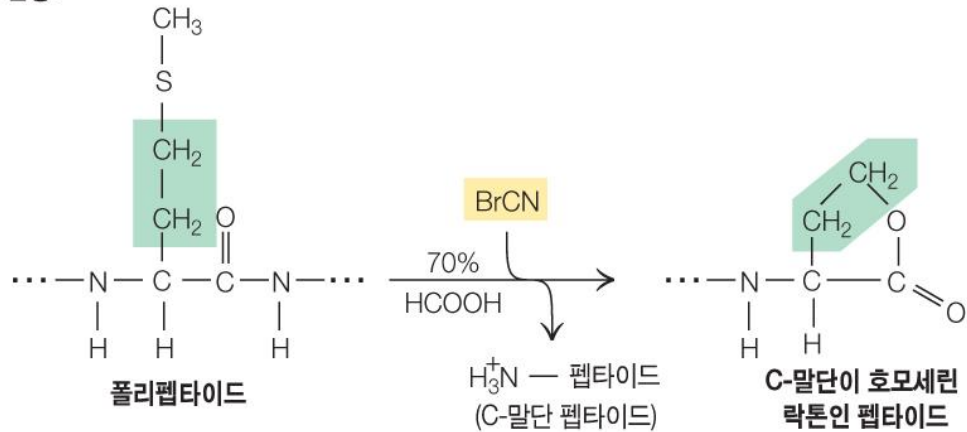


그림 5.18 내부 메티오닌 잔기 부위에서 사이아노젠 브로마이드에 의한 단백질 절단.

Peptide sequencing (아미노산의 순서 결정)

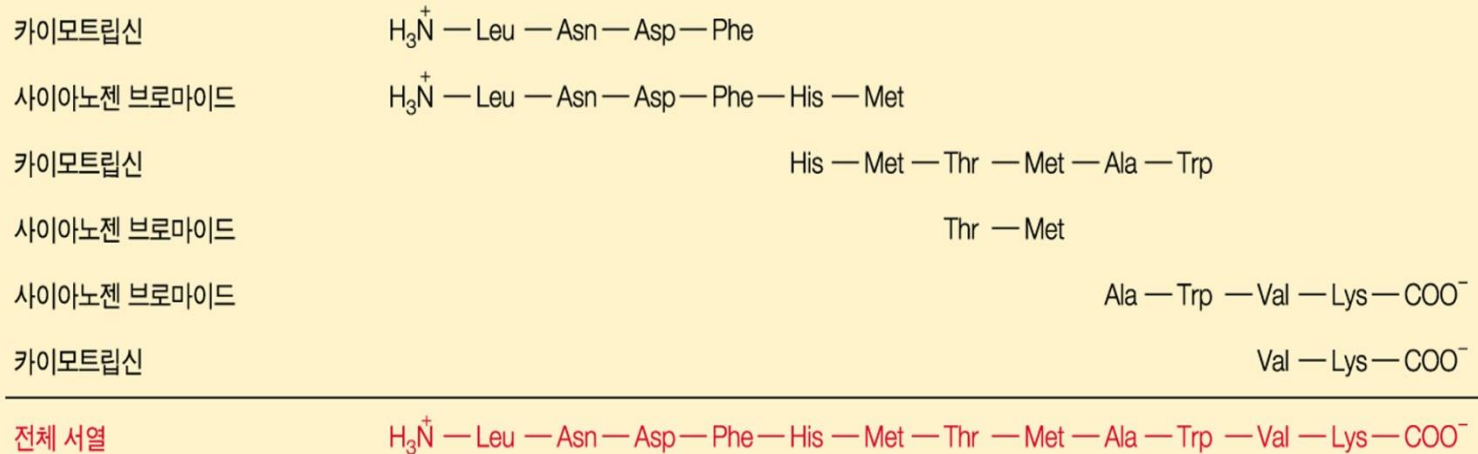
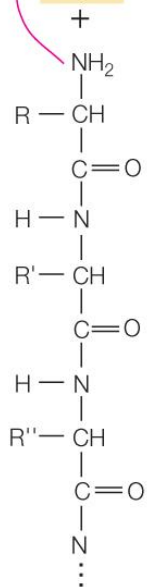
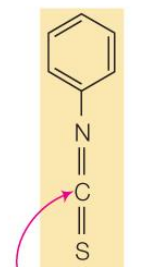


그림 5.19 단백질 서열을 결정하는 데에 중복되는 서열을 사용함.

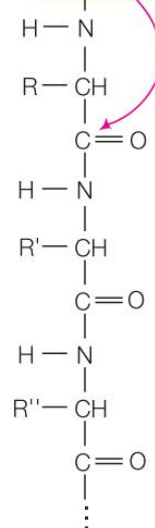
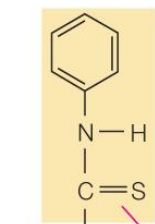
2) N-말단과 C- 말단 아미노산 확인

- 에드만법 : N-말단 결정법
- phenyl isothiocyanate를 이용
- 아미노산 sequencer의 원리에 활용

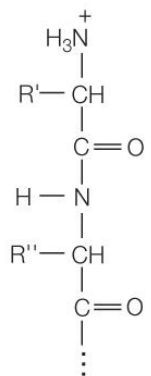
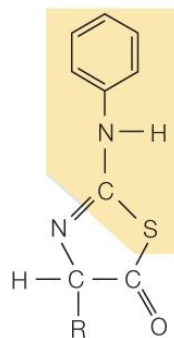
페닐아이소싸이오사이안산



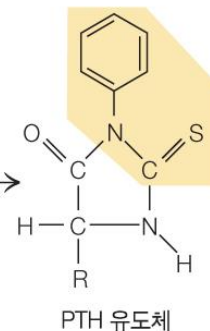
펩타이드 사슬



싸이아졸리논 유도체



잔기 하나가 짧은 펩타이드 사슬



PTH 유도체

그림 5.20 에드만 분해법을 이용하여 펩타이드의 아미노산 서열을 결정하기. (1) 페닐아이소싸이오사이안산은 약한 염기성 조건에서 펩타이드의 N-말단과 결합하여 페닐싸이오카바모일 치환체를 형성한다. (2) TFA(trifluoroacetic acid, 트라이플루오로아세트산)를 처리하면, 이것이 고리화되어 N-말단 아미노산 잔기가 싸이아졸리논(thiazolinone) 유도체로서 방출되지만 다른 펩타이드 결합들은 가수분해되지 않는다. (3) 유기물질 추출과 산 용액 처리를 하면 N-말단 아미노산이 페닐싸이오하이드란토인(PTH) 유도체로 된다. 펩타이드 사슬의 나머지 부분에도 이 과정을 반복하면 각 단계에서 노출된 N-말단의 서열이 결정되어 결국 전체 펩타이드의 아미노산 서열이 결정된다.

Peptide sequencing의 예

- 122쪽 다음 단백질의 아미노산 순서를 결정하라.

Trypsin 처리 시

Leu-Ser-Tyr-Ala-Ile-Arg

Asp-Gly-Met-Phe-Val-Lys

Chymotrypsin 처리 시

Val-Lys-Leu-Ser-Tyr

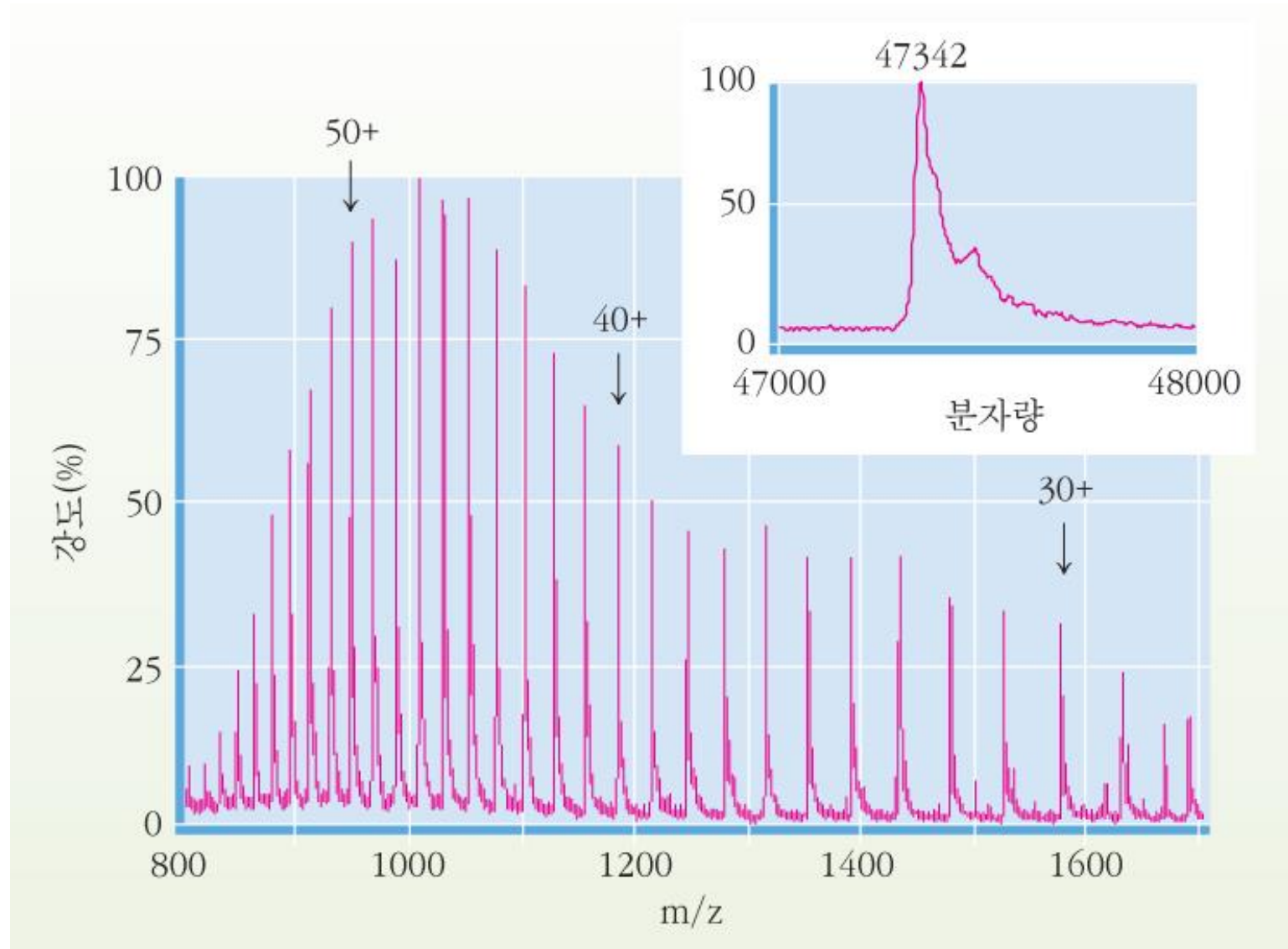
Ala-Ile-Arg

Asp-Gly-Met-Phe

단백질 확인 기술

- 질량분광분석법(Mass Spectroscopy:MS)
- 효소-연계 면역흡착법 (Enzyme linked Immunosorbent assay)
- 웨스턴 블롯(Western blot)

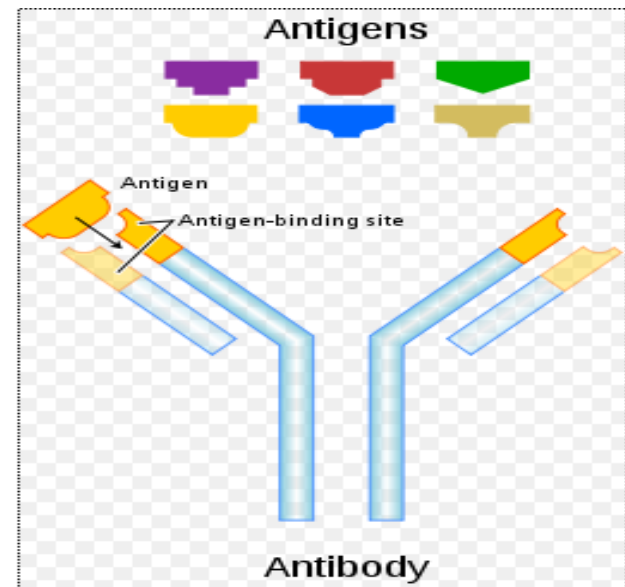
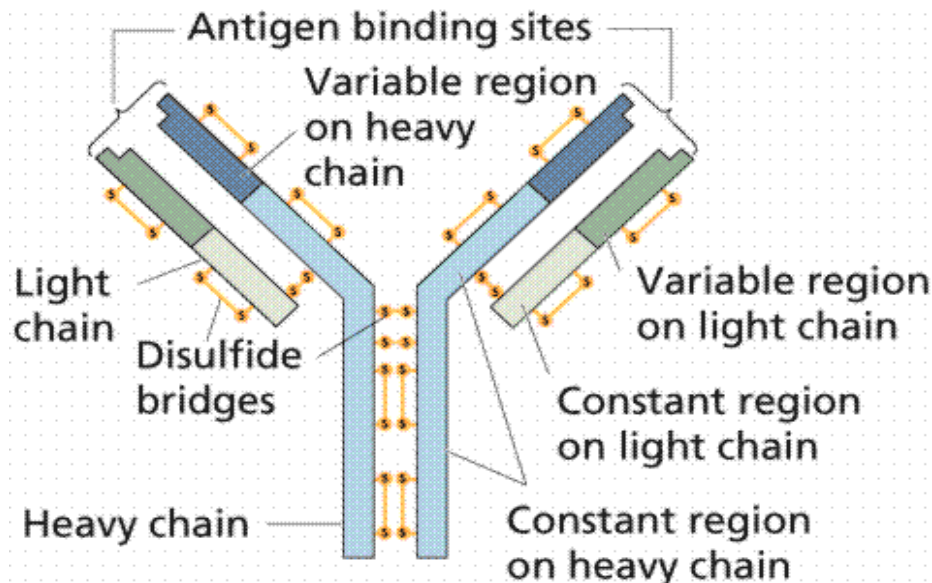
질량분광분석법(Mass Spectroscopy:MS)



항체의 구조와 항원항체 반응 특성

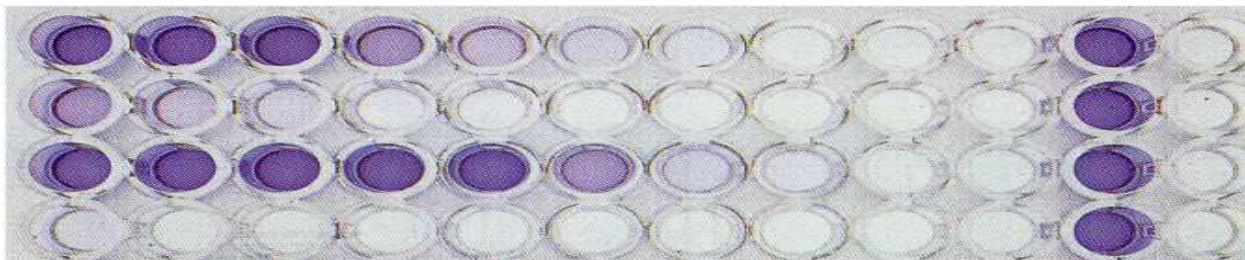
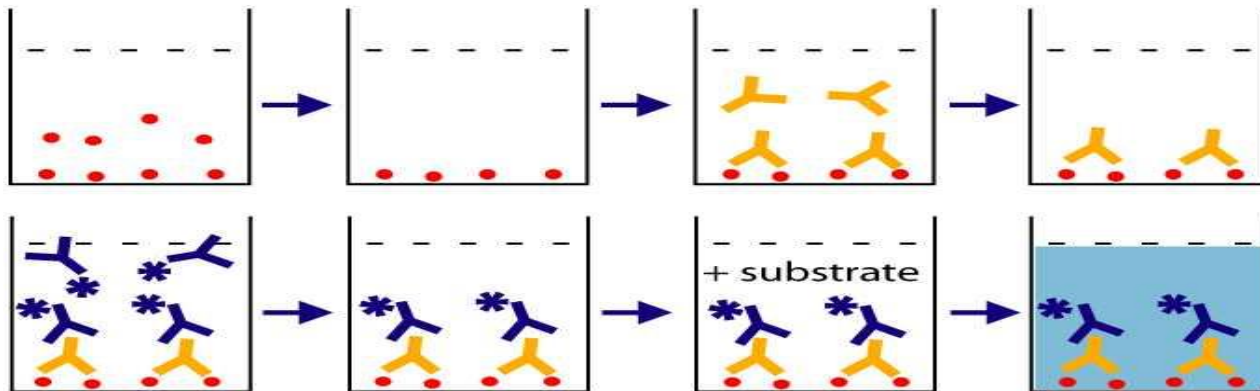
1. 항체 구조(Ig) :

두 개의 동일한 light chain과 두 개의 동일한 heavy chain으로 구성



Indirect ELISA

- 결과는 plate안의 용액 색깔로 나타나며
이 색깔의 진한 정도를 흡광도로 읽고 정량함



ELISA의 marker enzyme

- 항체에 결합되는 효소가 기질과 반응하여 색깔을 띄는 특성을 이용함
- 대표적인 효소 :
염기성 인산분해효소 (alkaline phosphatase)
양고추냉이 과산화효소 (HRP, horseradish peroxidase)
- 항체 기능에 영향을 주지 않으면서 활성을 유지



그림 5.22 ELISA 검정법의 결과를 보여주는 마이크로타이터 평판.

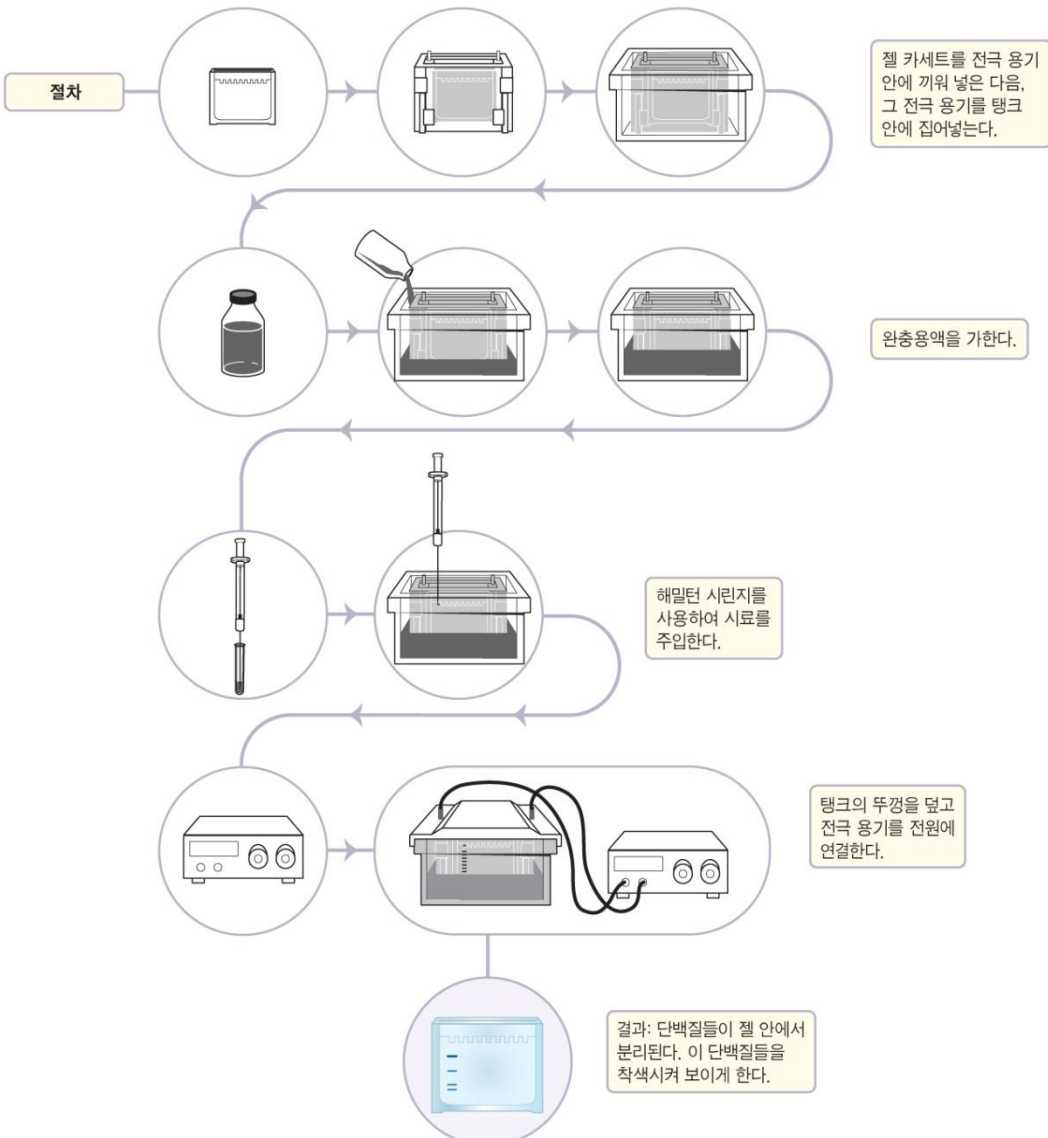
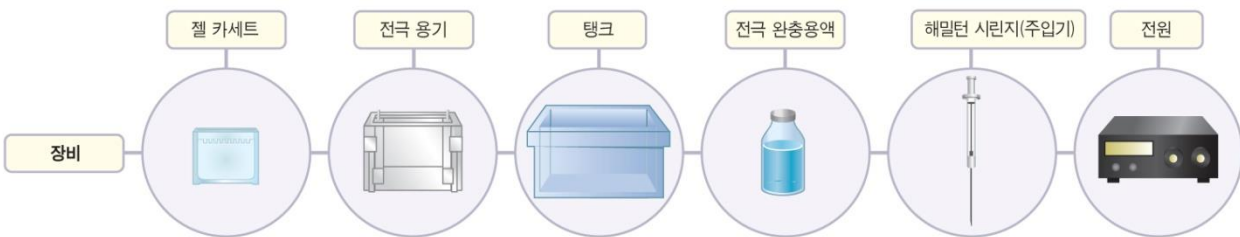


그림 5.23 웨스턴 블롯 실험의 기본적인 구상.

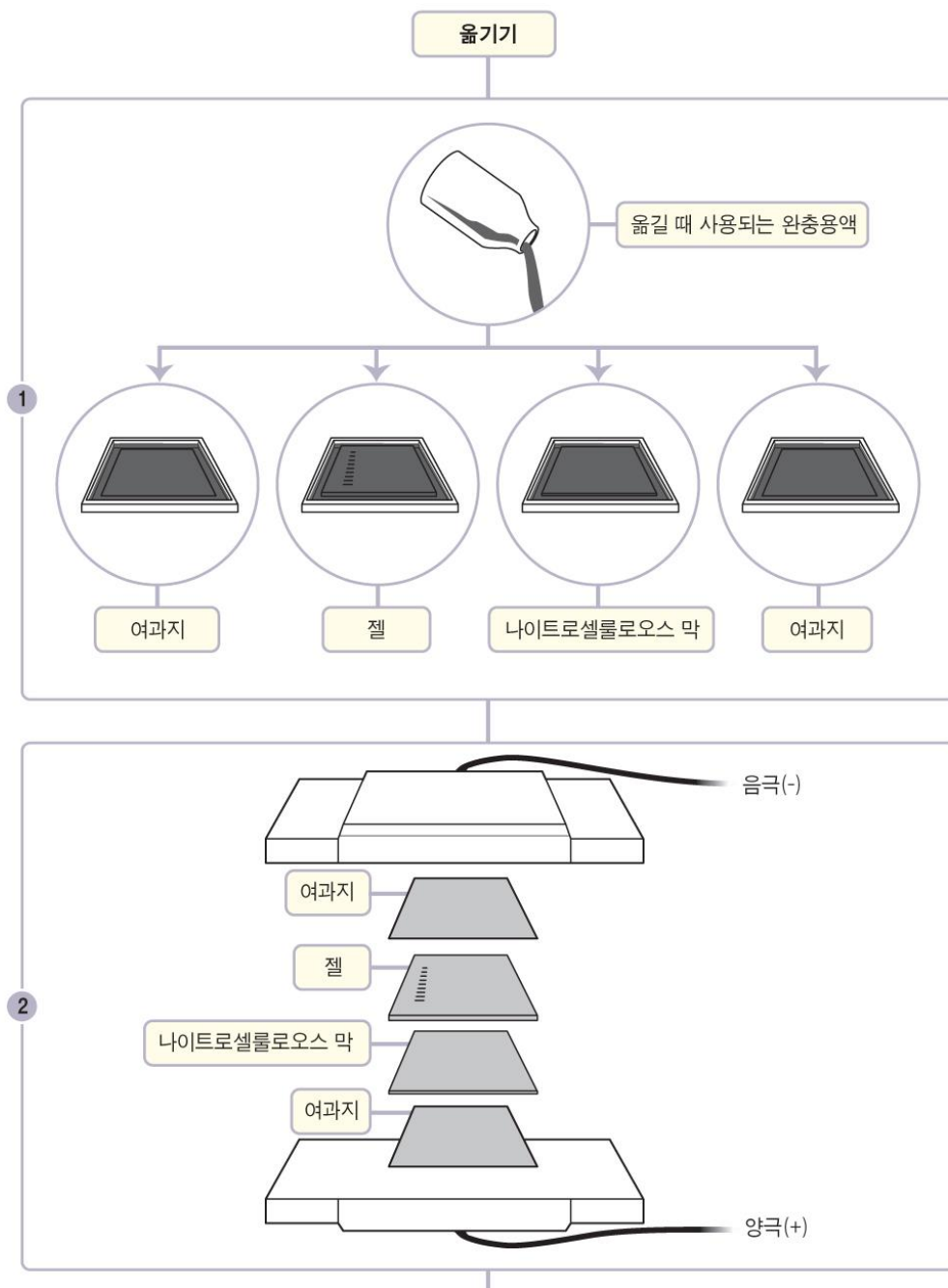


그림 5.23 웨스턴 블롯 실험의 기본적인 구상.

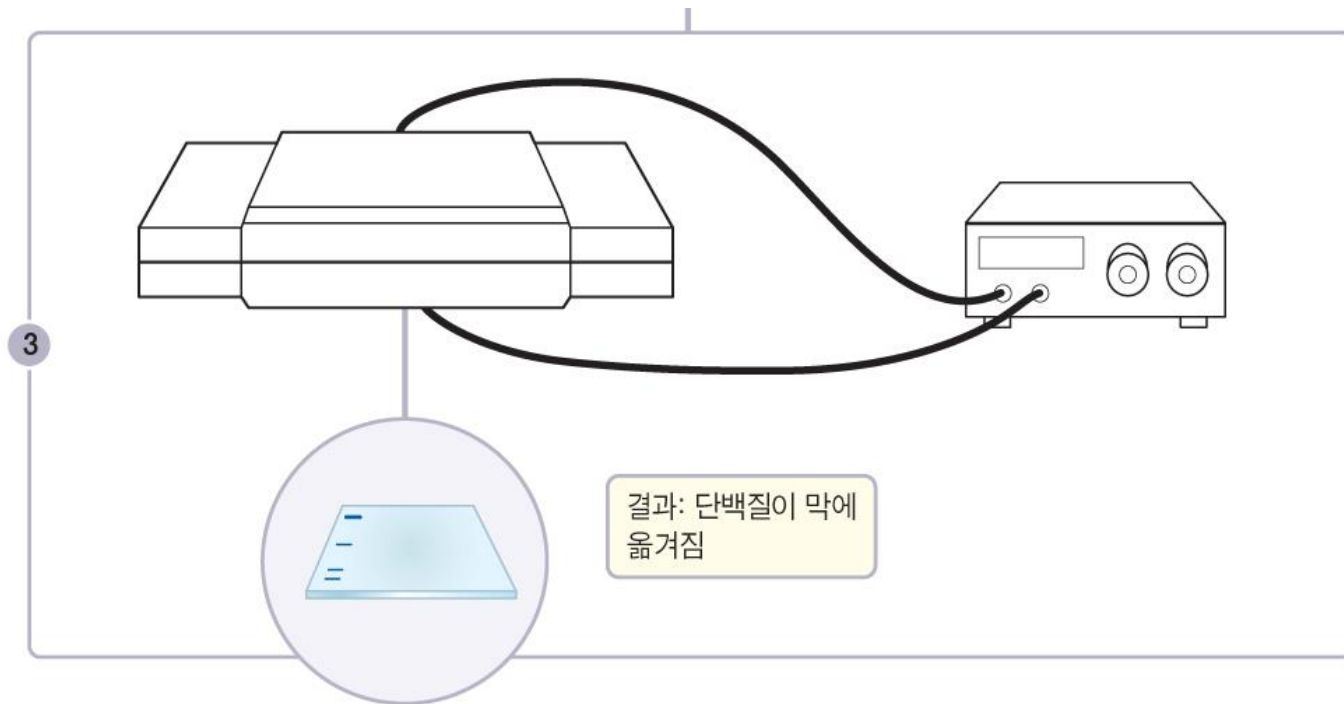


그림 5.23 웨스턴 블롯 실험의 기본적인 구상.

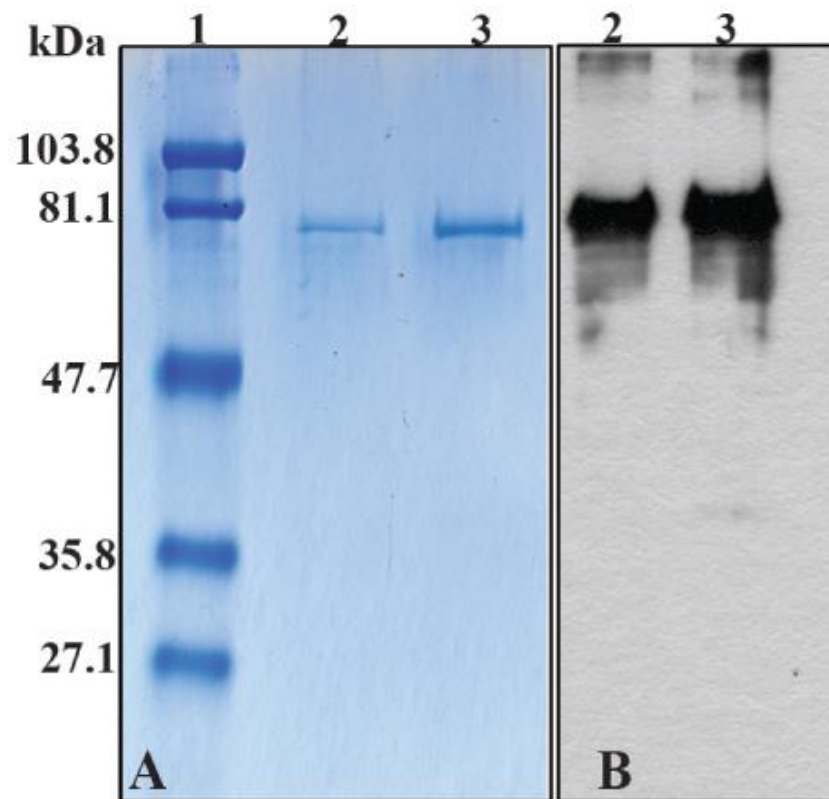


그림 5.24 쿠마씨 블루 착색 젤(A)과 같은 젤에서 만든 웨스턴 블롯(B)의 비교. 특정한 항체와 그 항체들을 보이게 만들어주는 표지물질을 이용함으로써, 웨스턴 블롯 상에서 특정 단백질의 위치를 결정할 수 있다. (A는 다음에서 인용 함. Gustoimages/Science source/ Photo Researchers; 2009 Azza et al, licensee BioMed Central Ltd.)

단백질 칩

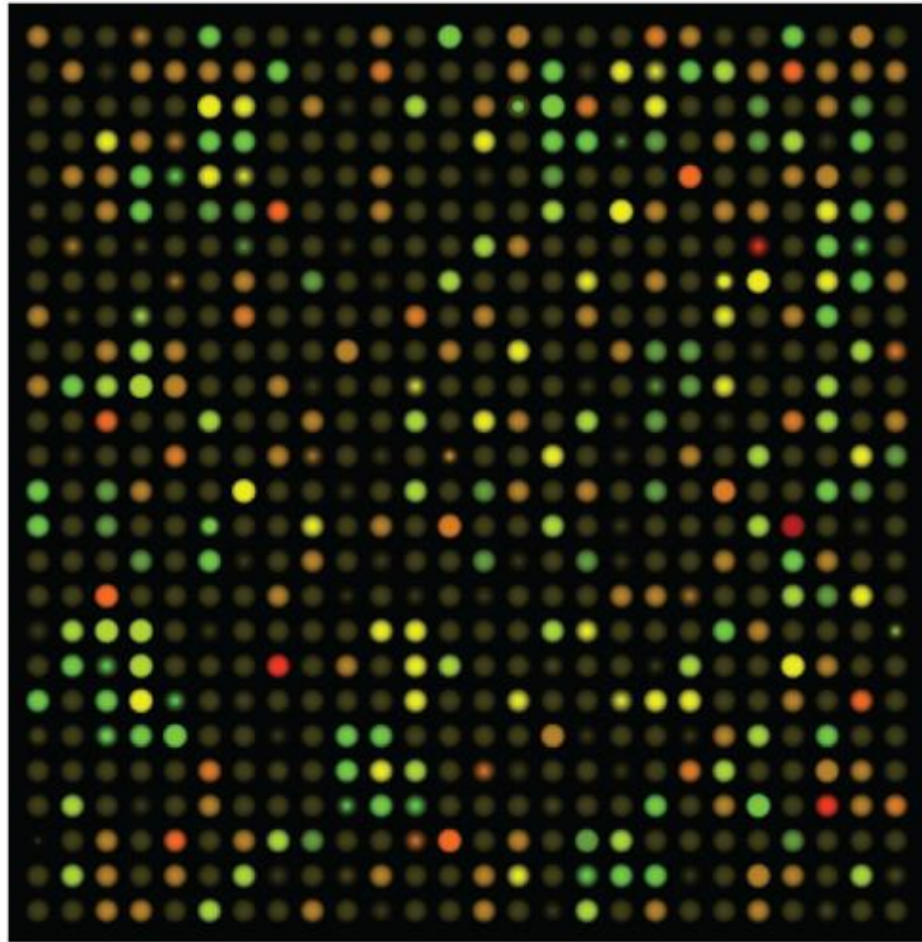


그림 5.25 단백질 칩. 연구자들은 상대적인 색깔과 강도를 보고 여러 지점에서 각각 어떠한 단백질들이 발견되며 그 각각의 양이 얼마나 많이 있는지를 알 수 있다.