

단백질의 정제 및 특성 규명 기술

5

강의 내용

1. 단백질의 분리
2. 단백질의 정제
3. 단백질의 확인
4. 단백질의 1차 구조를 확인하는 방법
5. 기타 단백질 확인 기술

단백질의 정제 및 확인

- ① 세포에서 단백질 추출하기
균질화
원심분리
- ② 단백질 정제하기
크로마토그래피 기술
- ③ 단백질 확인하기
전기영동, 블롯팅

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

1. 단백질의 분리

1) Homogenization (조직균질법): 세포에서 단백질 추출

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



1. 단백질의 분리

2) 원심분리법:

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

1) 분별 원심분리법

(Differential centrifugation) :

원심분리의 속도를 달리하여 원하는 물질을 얻는 방법

2) 밀도구배법

(Density gradient centrifugation)

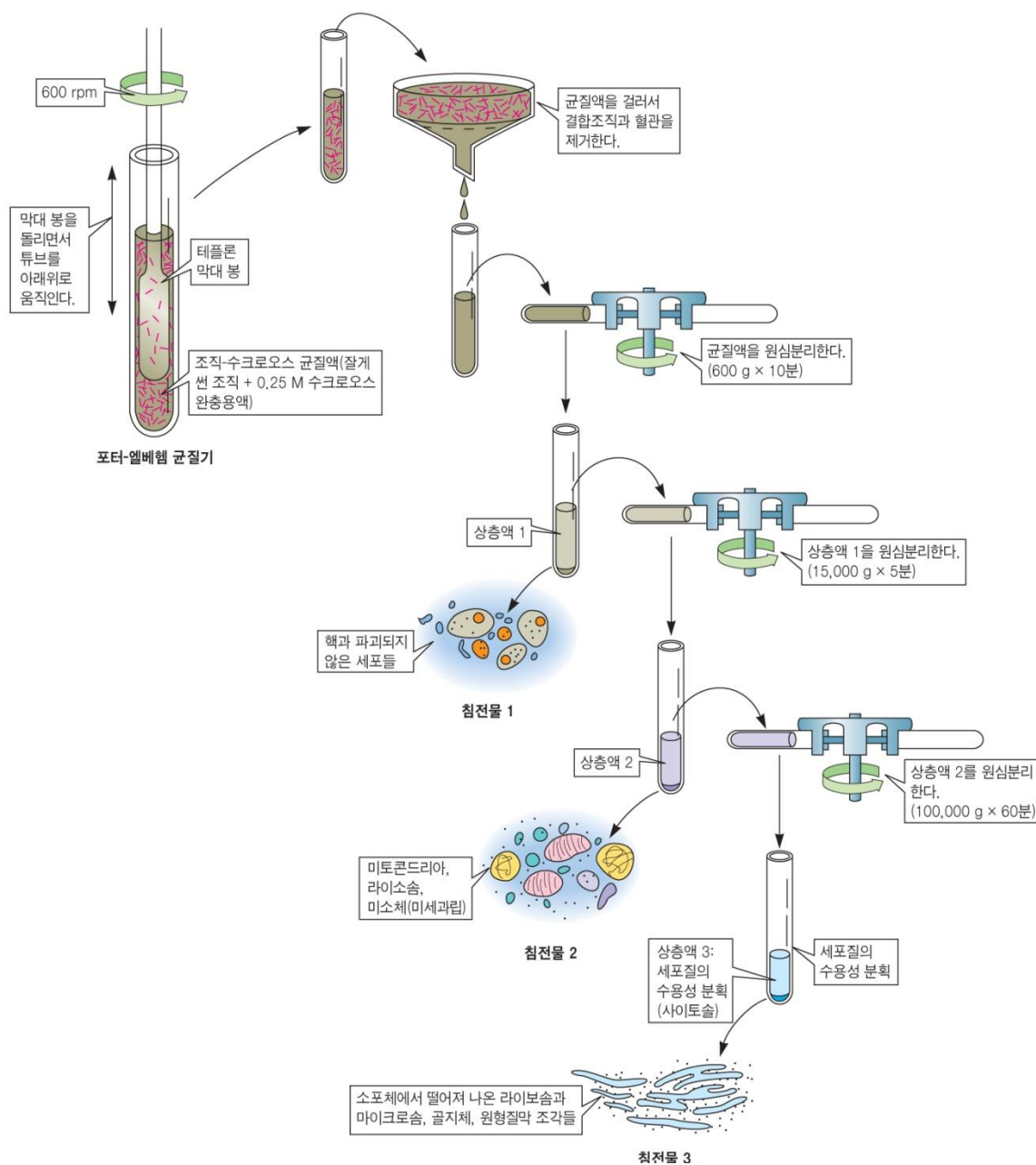
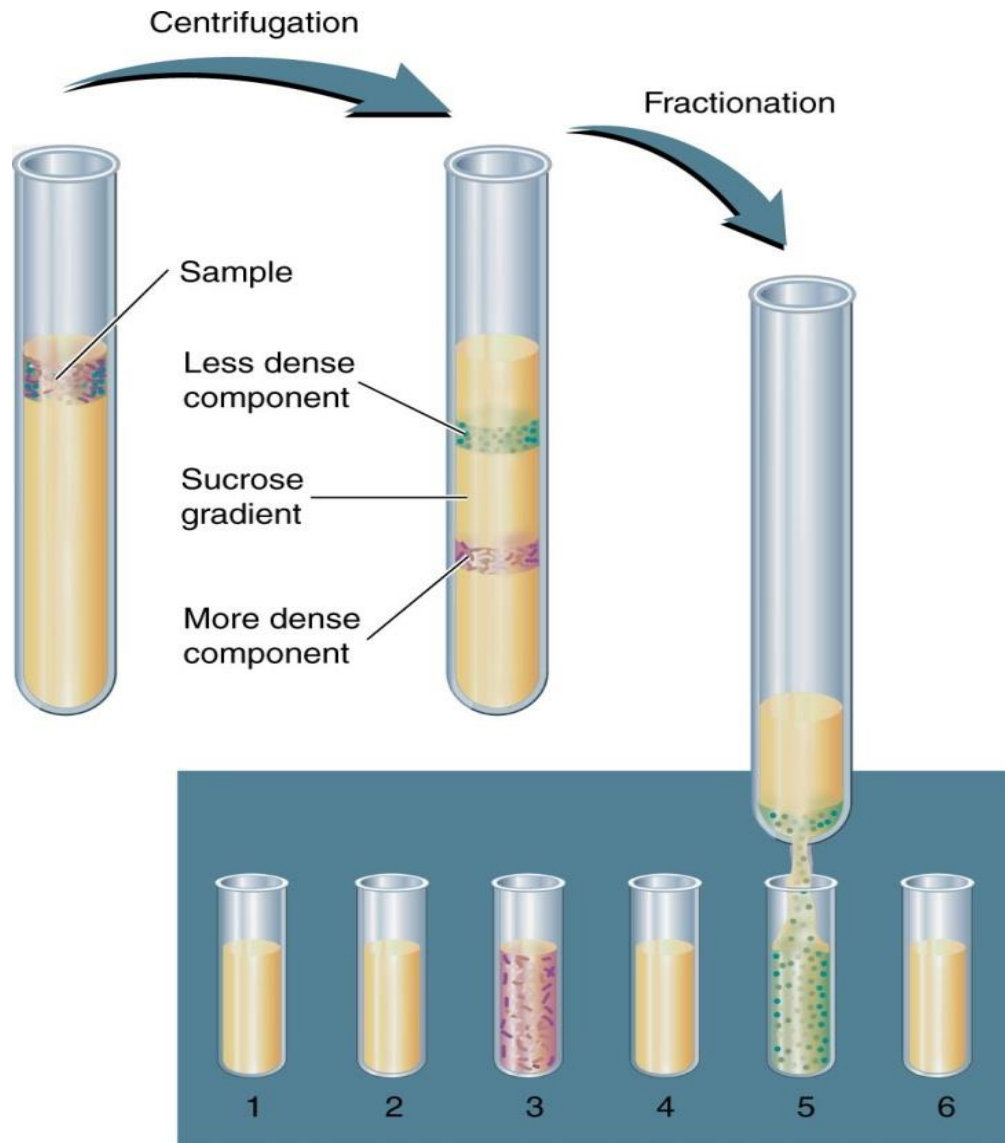


그림 5.1 **분별 원심분리.** 세포 구성물질들을 분리하는 데에는 분별 원심분리법이 사용된다. 원심력을 증가시키면서(g 값을 증가시킴) 단계적으로 세포 균질액을 원심분리하면 각 단계마다 점점 더 작은 세포 구성물질들이 침전된다.



분리기

2. 단백질의 정제

- 단백질의 정제 원리 -

- ① 단백질의 분자량
- ② 전하 (charge)
- ③ 용해도
- ④ 특이적 결합능에 따라 정제

2. 단백질의 정제

1) 암모늄 슬페이트 침전법 (가염석출, 염석)

- 용해도 차이를 이용하여 액체 속 에서 고체를 분리하는 방법

- ① 세포추출액에 황산암모늄을 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) 침전된다.

2. 단백질의 정제

2) 칼럼 크로마토그래피

- 원리: 고정상과 이동상간의 친화력에 따라 분리
- 정지상: 시료의 흐름을 선택적으로 지연시켜
분리에 영향을 미치는 물질 (수지, 겔)
- 이동상: 분리하고자 하는 물질을 이동시키는 물질
용액 (완충용액, 식염수)



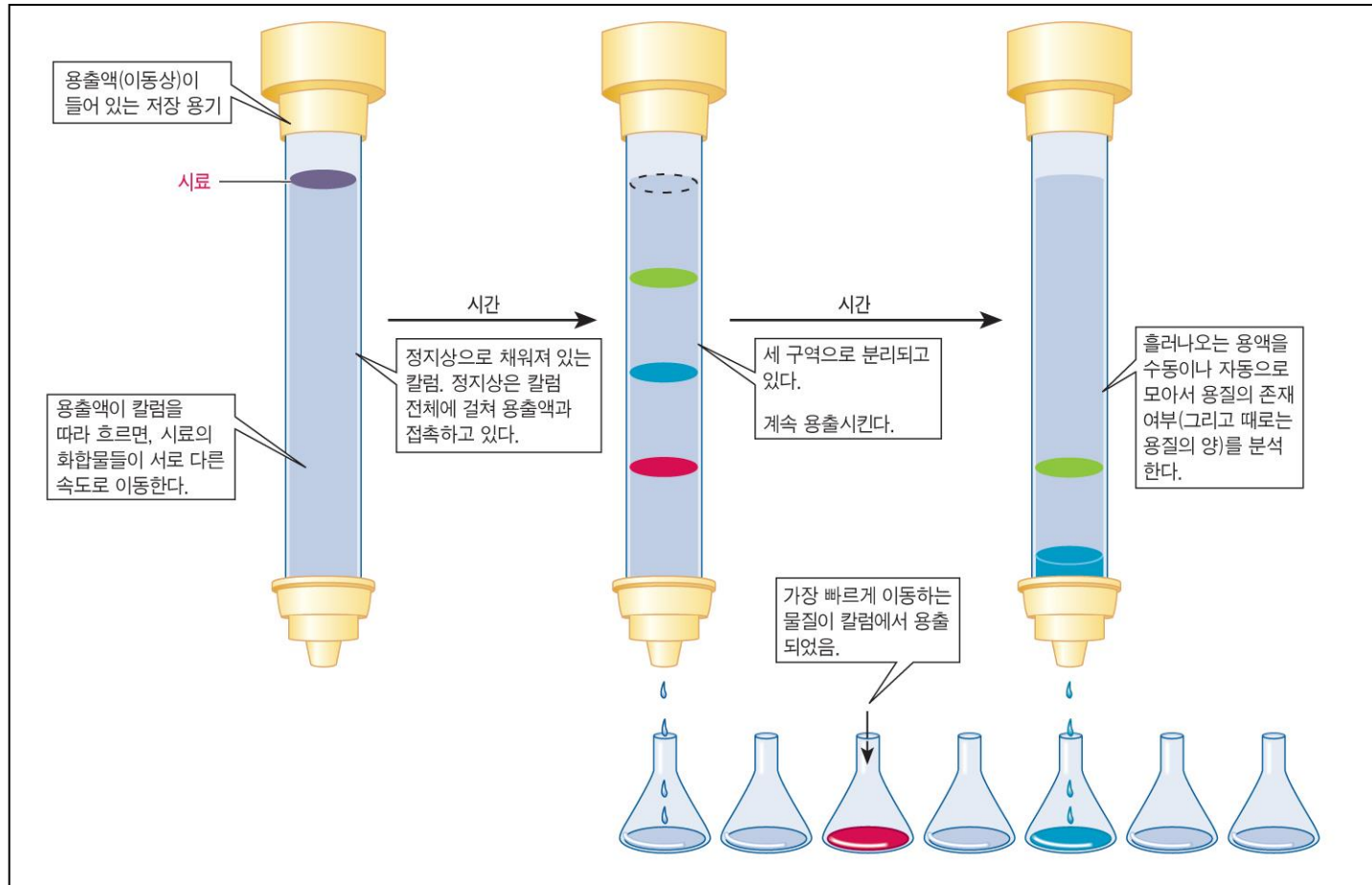
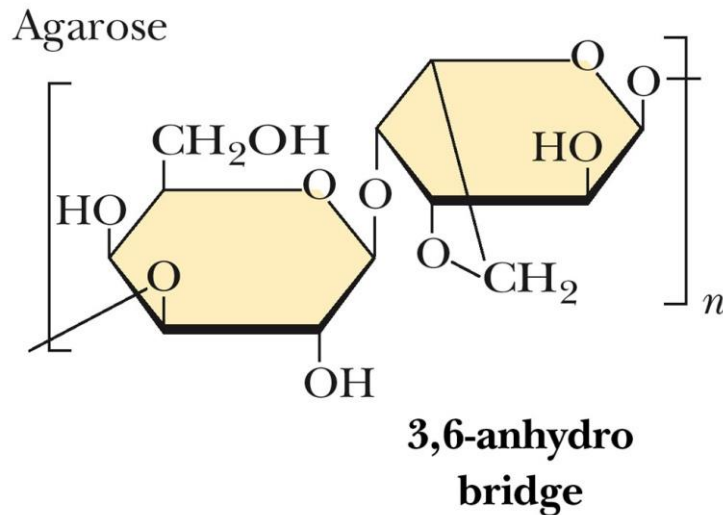


그림 5.2 칼럼 크로마토그래피. 여러 가지 성분들이 포함된 시료를 칼럼에 가하여 통과시킨다. 다양한 성분들이 서로 다른 속도로 이동하므로 따로따로 분리하여 모을 수 있다.

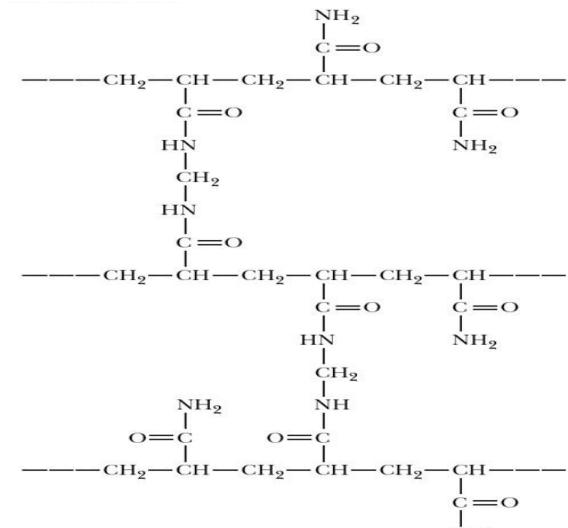
칼럼 크로마토그래피에 사용되는 정지상의 종류

1. 아가로스
2. 덱스트란
3. polyacrylamide (폴리아크릴아마이드)



© 2008 Brooks/Cole - Thomson

Polyacrylamide



Column chromatography의 종류

- ① 크기별 분리 크로마토그래피
= 겔 여과 크로마토그래피
- ② 친화성 크로마토그래피
- ③ 이온 교환 크로마토그래피
- ④ 고성능 액체 크로마토그래피

Column chromatography의 종류

① 크기별 분리 크로마토그래피

- 분자량의 크기에 따라 분리
- 분자량이 작은 단백질은 겔 안으로 확산되어 머물러 있다 천천히 내려온다.
- 분자량이 클수록 먼저 용출한다
- 고정상 : 아가로오스, 덱스트란
- 상품명: sepharose, sephadex)

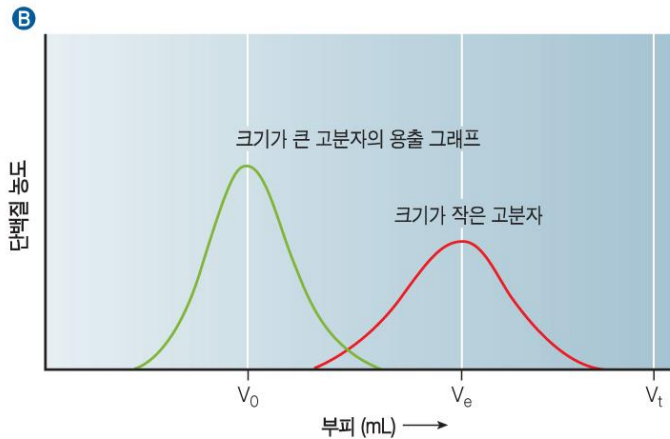
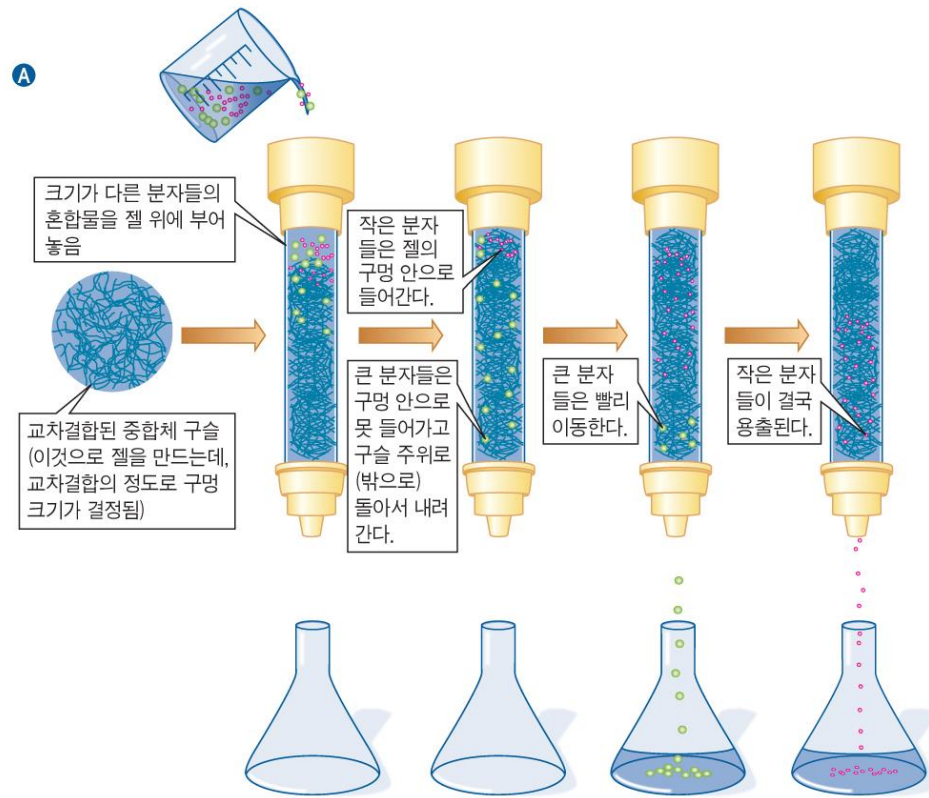


그림 5.5 젤 여과 크로마토그래피. 큰 분자는 젤로 들어가지 못하여 칼럼을 통해 더 빨리 빠져나온다. 작은 분자는 젤 구슬의 내부로 들어갈 수 있으므로, 용출되는 시간이 더 오래 걸린다. 이와 같은 칼럼 크로마토그래피 과정에서는 시료가 칼럼에서 용출될 때 일반적으로 UV 흡광도를 이용하여 단백질 농도를 측정한다.

Column chromatography의 종류

② Affinity chromatography (친화성)

- 특이적 결합능에 따라 분리
- 예: 포도당이나 항체와 친화력이 있는 성질을 이용하여 분리

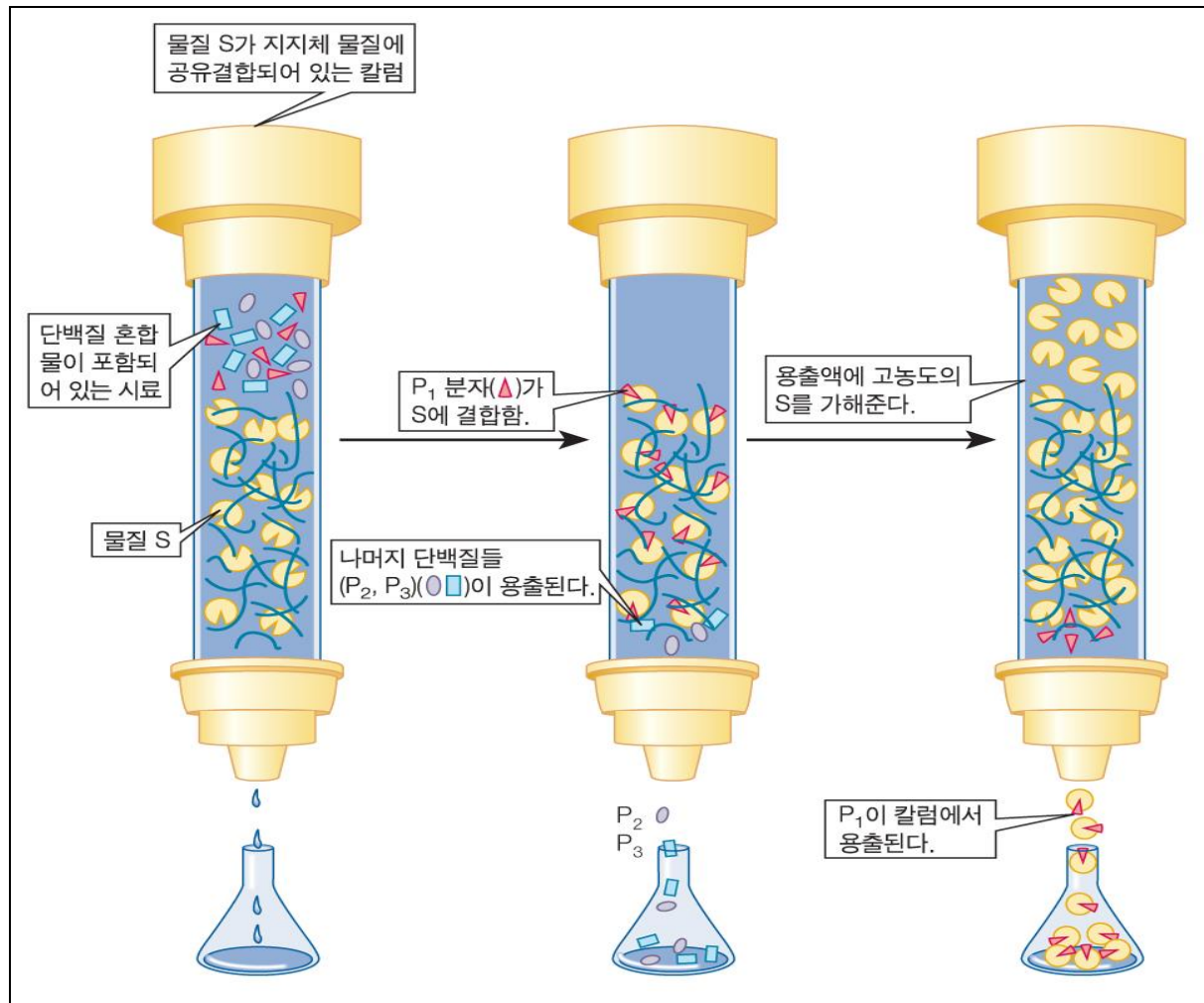


그림 5.6 친화성 크로마토그래피의 원리. 단백질 혼합물 중에서 단지 한 단백질(P_1 이라고 표기함)만이 기질이라 불리는 물질(S)에 결합한다. 기질은 칼럼에 충전되어 있는 지지체 물질에 붙어 있다. 일단 다른 단백질들(P_2 와 P_3)이 씻겨 내려가면, 고농도의 염 용액이나 유리된 S를 가해줌으로써 P_1 을 용출시킬 수 있다.

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
이미노디아세트산(iminodiacetate)-아가로오스	중금속 친화성이 있는 단백질
AMP-아가로오스	NAD ⁺ 보조인자를 가지고 있는 효소, ATP-의존성 인산화효소

Column chromatography의 종류

③ 이온 교환 크로마토그래피

- 전하에 대한 친화도에 따른 분리

- **양이온 교환수지** (음이온을 띠)

양이온을 결합할 수 있는 수지

Carboxymethyl -

- **음이온 교환수지** (양이온을 띠)

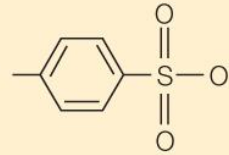
음이온을 결합할 수 있는 수지

DEAE (다이에칠아미노에칠) -

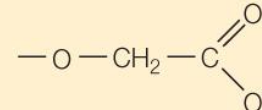
A 양이온-교환 매체

구조

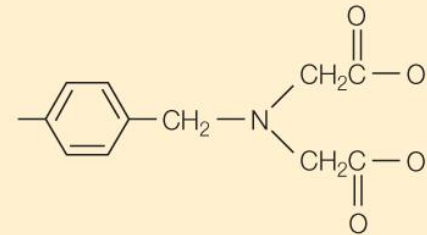
강산성: 폴리스타이렌(polystyrene) 수지[도웁스(Dowex)-50]



약산성: 카복시메틸(carboxymethyl, CM) 셀룰로오스



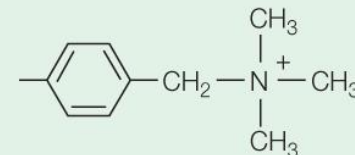
약산성의 킬레이트 화합물 형성: 폴리스타이렌 수지[킬렉스(Chelex)-100]



B 음이온-교환 매체

구조

강염기성: 폴리스타이렌 수지(도웁스-1)



약염기성: 다이에틸아미노에틸(diethylaminoethyl, DEAE) 셀룰로오스

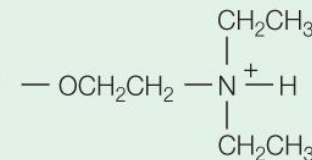
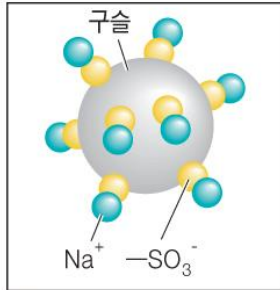


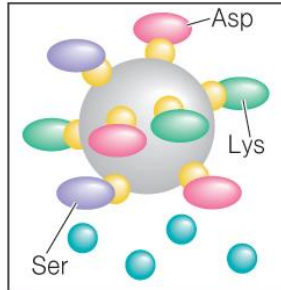
그림 5.7 이온-교환 크로마토그래피에 사용되는 수지. 생화학적 분리에 흔히 사용되는 (A) 양이온-교환수지와 (B) 음이온-교환수지.

시료를 첨가하기 전의 양이온
교환 구슬



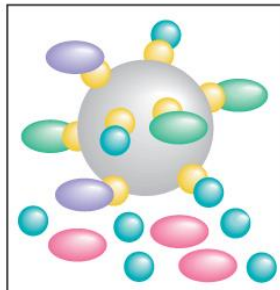
1

Asp, Ser, Lys의
혼합물을 가함



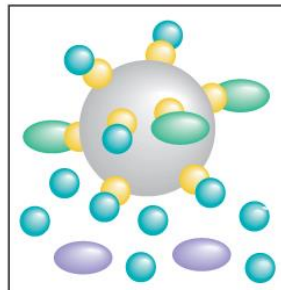
2

Na^+ (NaCl)을 가함



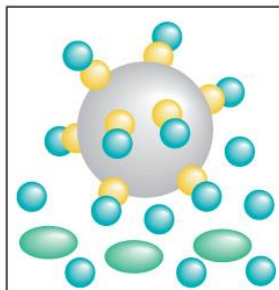
3 양전하가 가장 적은 아미노산인 Asp가 가장 먼저 용출된다.

$[\text{Na}^+]$ 증가



4 그다음은 세린이 용출된다.

$[\text{Na}^+]$ 증가



5 양전하가 가장 많은 아미노산인 라이신이 마지막으로 용출된다.

양이온교환 크로마토그래피:
양전하는 수지에 결합하여
머물러있고 음이온을 가진
단백질은 칼럼을 그냥 통과한다.
양전하가 많은 단백질이 가장
나중에 용출된다.

그림 5.8 양이온-교환 칼럼으로 아스파르트산, 세린, 라이신의 혼합물을 분리하는 작업. (1) 양이온-교환수지는 처음에는 Na^+ 형이다. (2) 수지로 채워져 있는 칼럼에 아스파르트산, 세린, 라이신의 혼합물을 가한다. (3) 칼럼에 용출염 (예: NaCl)을 가하여 농도 기울기가 생기게 한다. 양전하를 가장 적게 띤 아미노산인 아스파르트산이 가장 먼저 용출된다. (4) 염의 농도가 증가됨에 따라 세린이 용출된다. (5) 염의 농도가 더 증가되면, 양전하를 가장 많이 띤 아미노산인 라이신이 가장 나중에 용출된다.

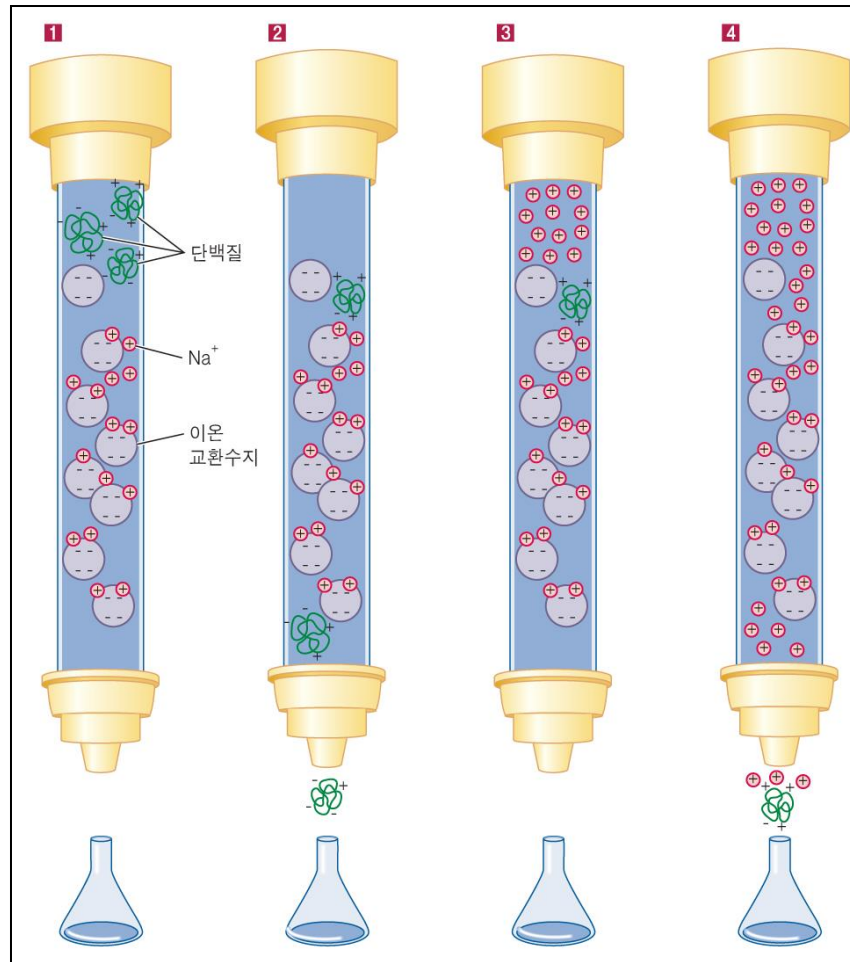


그림 5.9 양이온 교환수지를 사용한 이온-교환 크로마토그래피. (1) 분리과정의 초기에는 다양한 단백질들을 칼럼에 건다. 칼럼 수지에는 반대 이온인 Na^+ (작은 적색 구)가 결합되어 있다. (2) 단백질이 알짜 전하가 없는 것이거나 음전하를 띤 것들은 칼럼을 그냥 통과한다. 단백질의 알짜 전하가 양전하인 것들은 Na^+ 와 교체되어 칼럼에 결합된다. (3) 이제 과량의 Na^+ 를 칼럼에 가한다. (4) 수지의 결합 부위에 대해 Na^+ 와 단백질들이 경쟁적으로 결합할 때 Na^+ 가 수적으로 우세하므로 단백질이 용출된다.

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

1. 정제과정 중 가장 효과적인 방법은 어느 것인가 ?
2. 효소의 손실이 가장 많은 단계는?

Column chromatography의 종류

④ 고성능 액체 크로마토그래피

- High Performance Liquid Chromatography
- HPLC
- 고압
- 단시간 내 분리 가능

3. 단백질의 확인 - 전기영동

- 원리:
 - 알짜전하의 반대전극 쪽으로 이동한다.
 - 단백질의 모양과 분자량에 따라 분리
 - 둥근 모양일수록 빠르게 이동한다.
 - 분자량이 작을 수록 빠르게 이동한다.
- 지지체
 - 아가로오스 젤 : 핵산 분리
 - 폴리아크릴아마이드 젤 : 단백질 분리

전기영동의 종류

- ① 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동
Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)
- ② SDS-PAGE
- ③ Electrofocusing (등전점 전기영동)
- ④ 2차원 전기영동

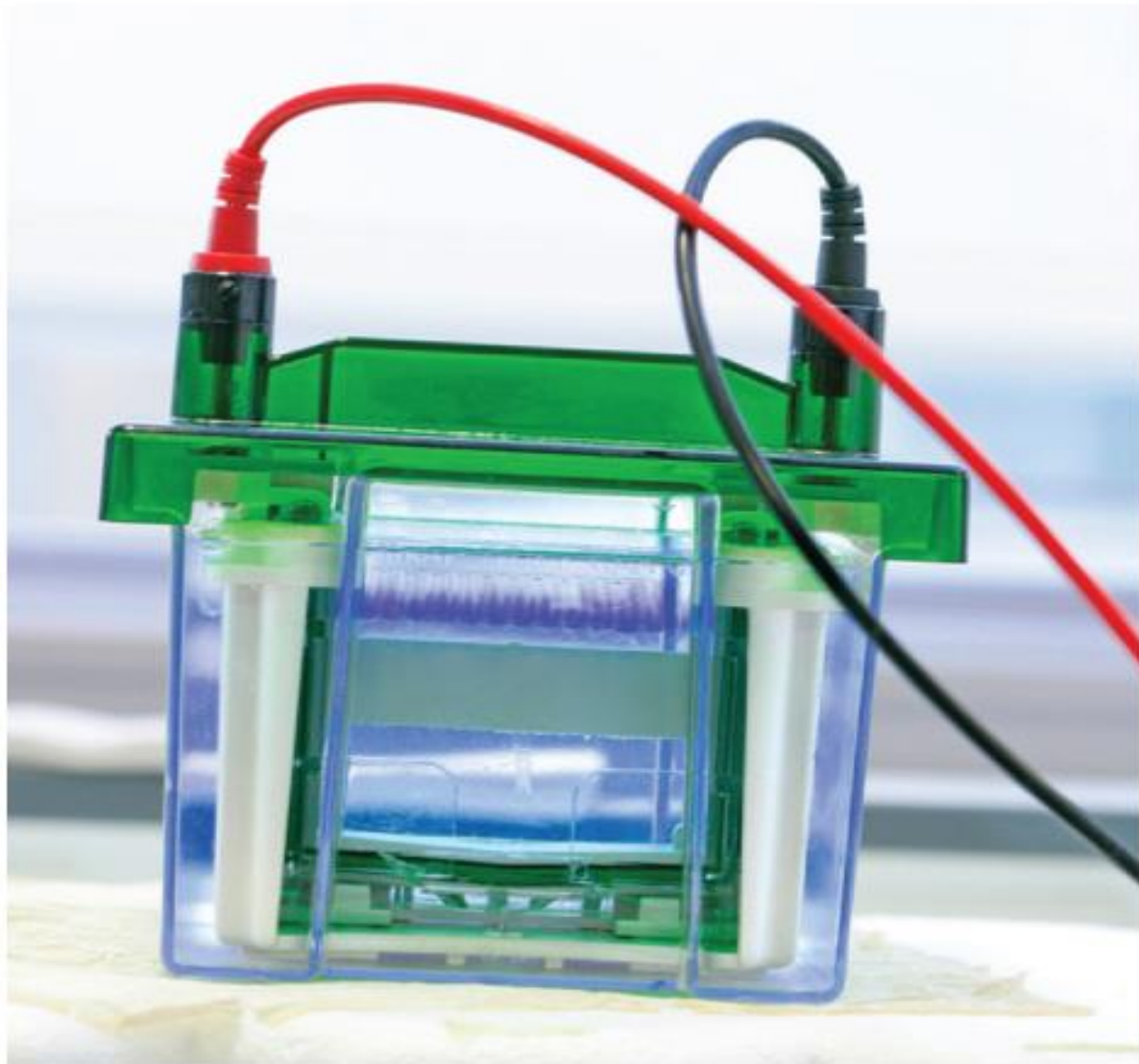
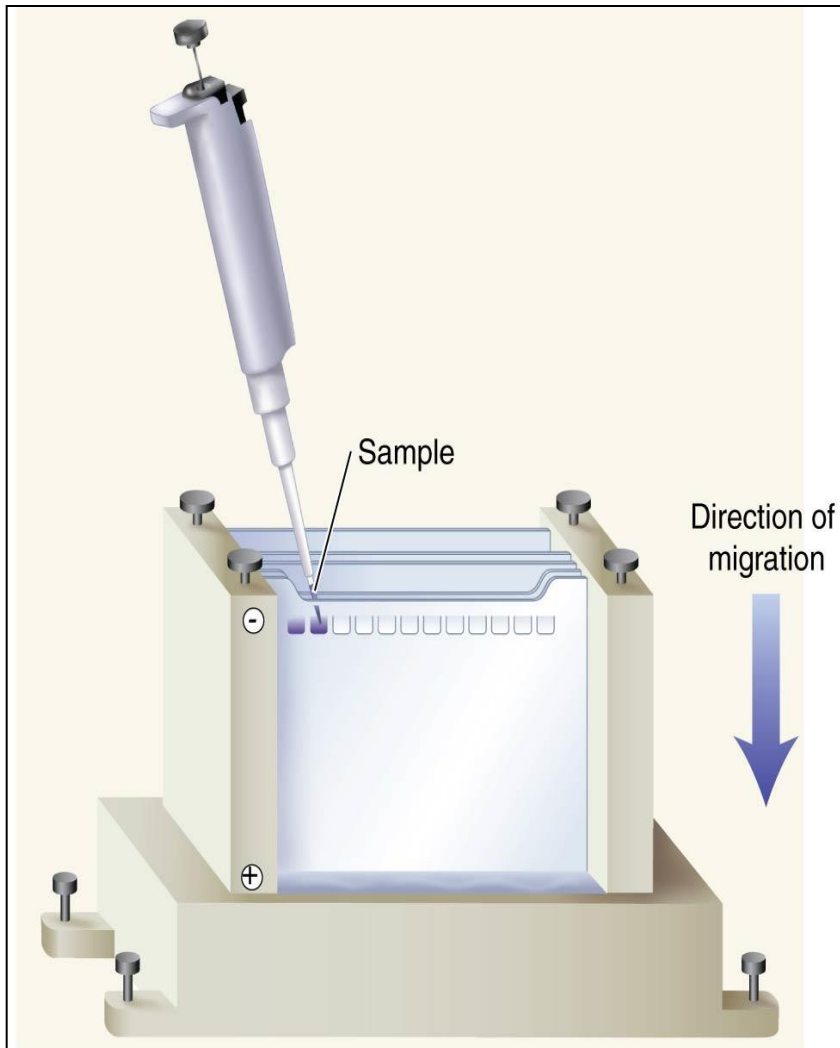


그림 5.10 젤 전기영동의 실험 장치. 시료를 젤의 위쪽에 넣는다. 전류를 걸면 음전하를 띤 단백질들이 아래의 양전극 쪽으로 이동한다.

① PAGE



(a)



(b)

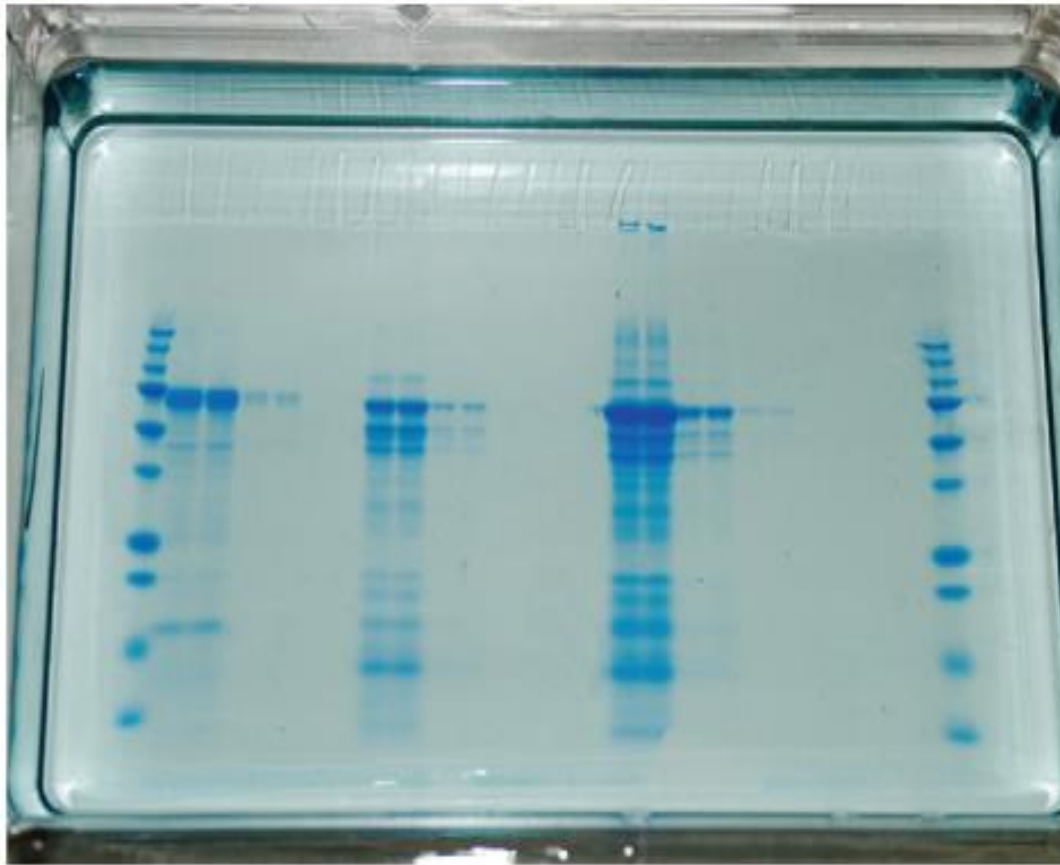


그림 5.11 젤 전기영동에 의한 단백질의 분리. 젤 상에 보이는 각 밴드들은 각각 다른 단백질들을 나타낸다. SDS-PAGE 기술에서는, 시료를 젤에 걸기 전에 이 시료를 미리 세제로 처리한다. 등전점 전기영동에서는 젤을 따라가면서 pH 기울기가 형성된다. 젤 내의 단백질들은 쿠마시 블루로 착색시킨다.

② SDS (sodium dodecyl sulfate)-PAGE

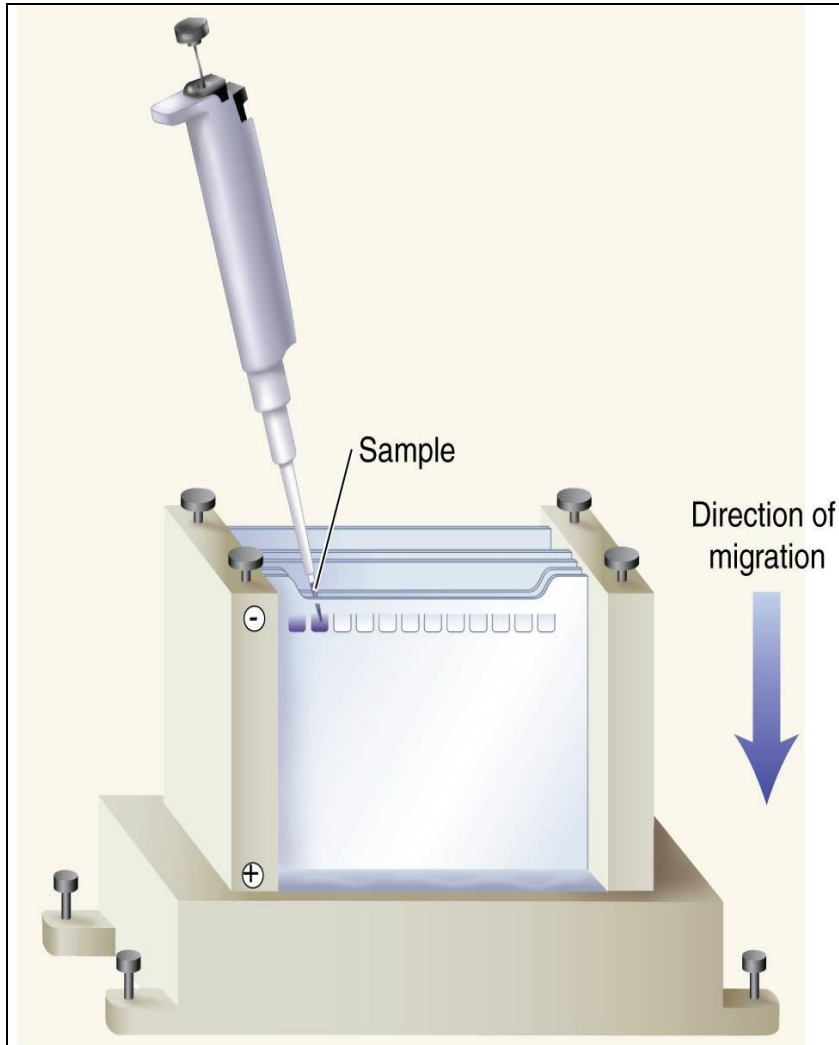
SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동

- SDS의 구조식:

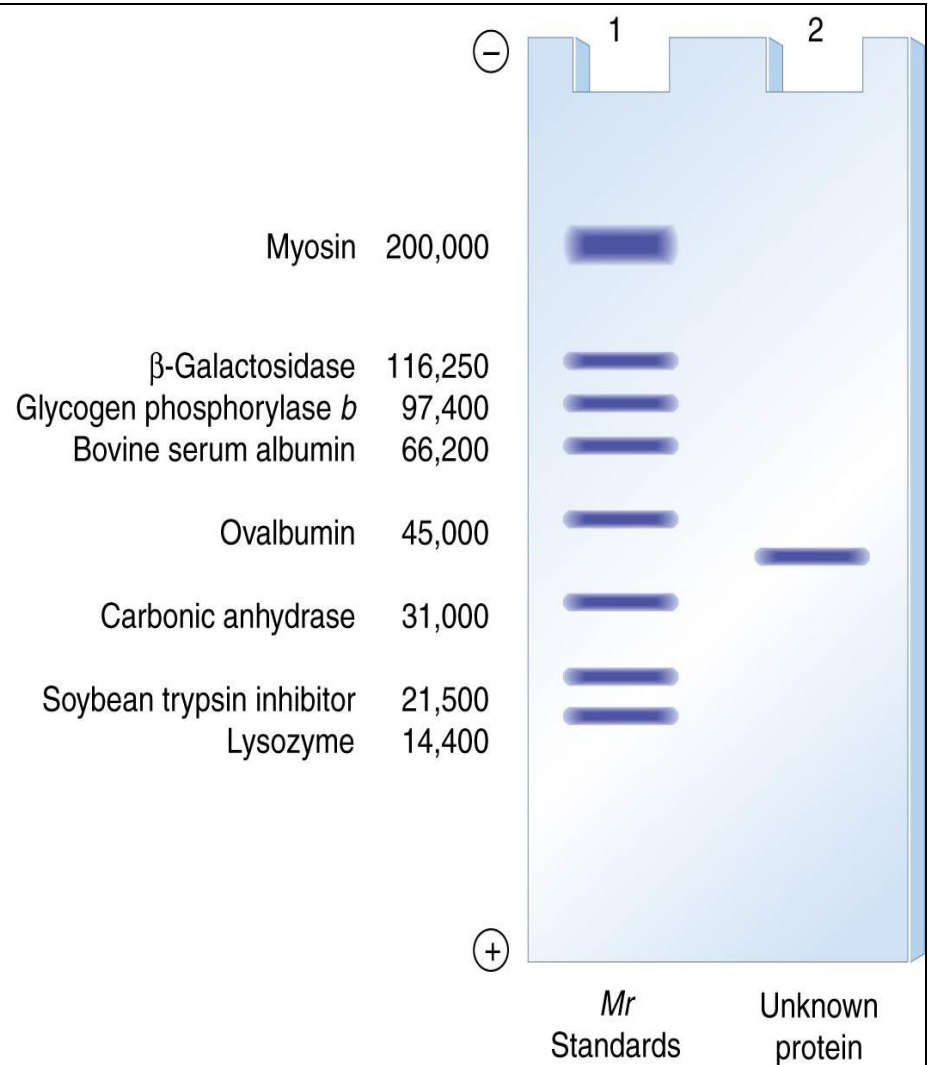


- 용액에서 SDS는 이온화되어 음전하를 띤다
- 단백질에 비특이적으로 흡착되어 단백질이 음전하를 띄게 한다.
- 시료의 단백질들은 모두 음이온을 띤다.
- 시료의 단백질들 전하는 비슷하여 분리의 근거가 되지 못한다.

SDS-PAGE의 원리



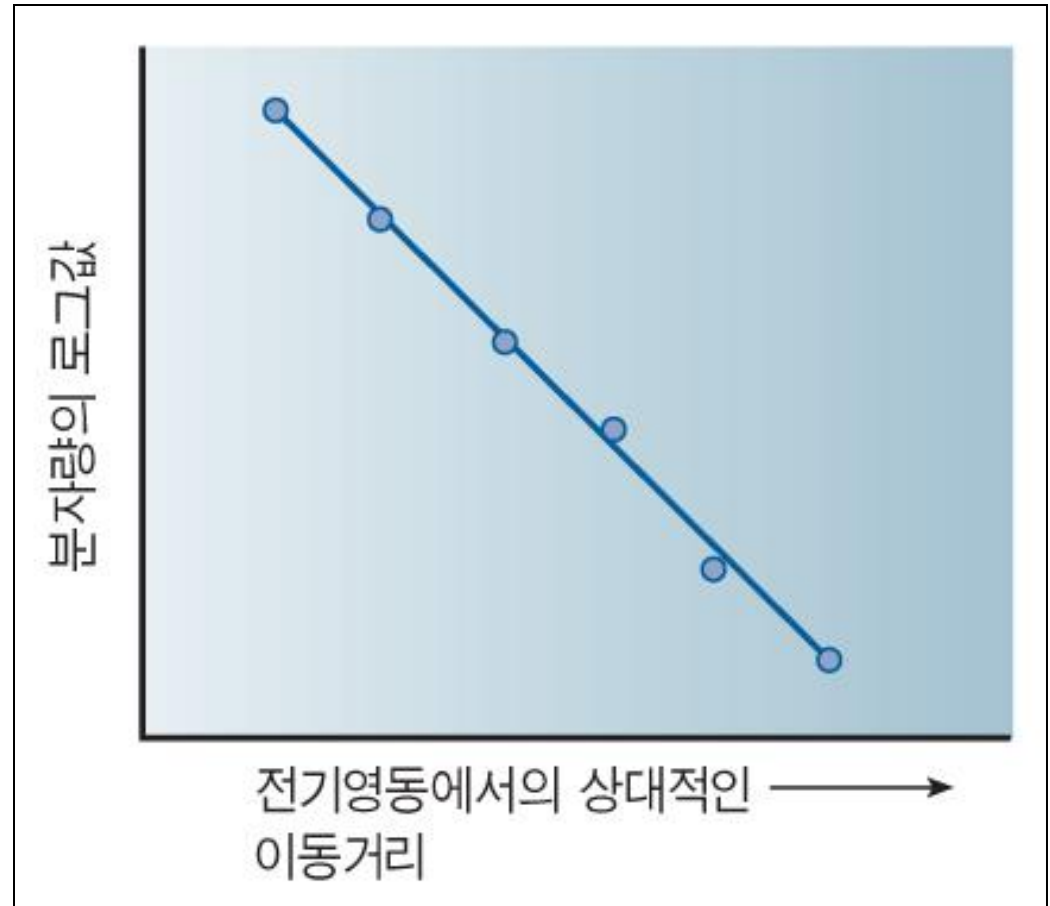
(a)



(b)

SDS-PAGE에 의한 단백질 분자량 결정

- 분자량의 크기에 따라 분리한다.
- 분자량이 작을수록 멀리 이동하게 된다.
- 이동거리와 분자량은 반비례한다
- 단백질의 분자량을 결정하는데 이용된다.

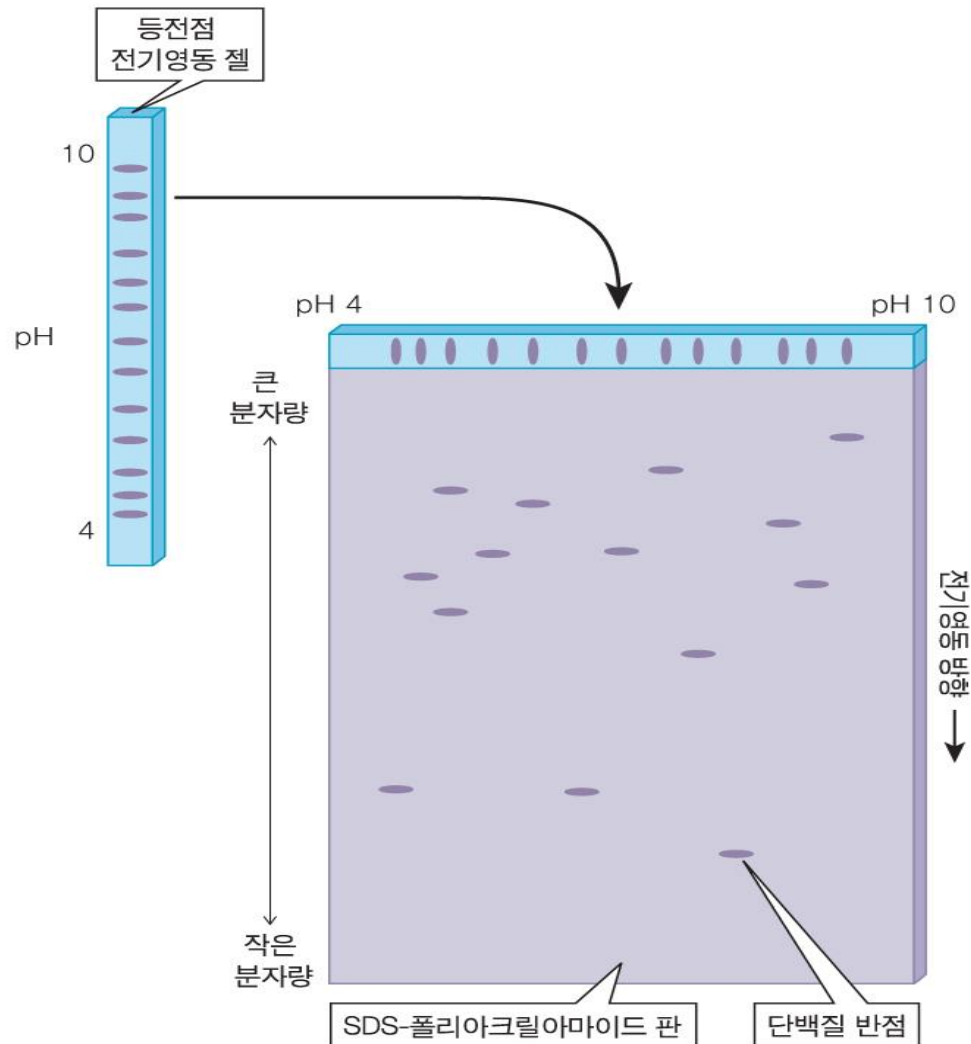


③ 등전점 전기영동 (Electrofocusing)

- 단백질은 고유의 등전점을 가진다는 원리를 이용한 방법
- 단백질은 알짜전하가 0인 지점까지 이동한 뒤 멈춘다.
- 젤이 pH 경사를 가지도록 만든다.

④ 2차원 전기영동

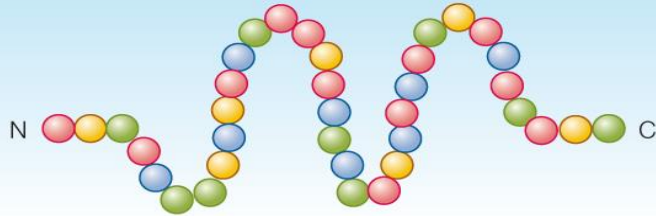
등전점 전기영동과 SDS-PAGE를 90도의 각도 차이로 실시함.



4. 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

아미노산 서열을 결정할 단백질

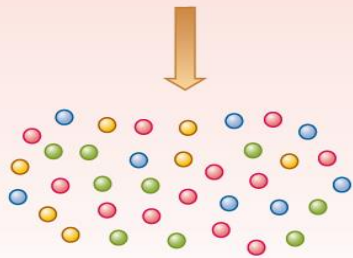


1단계

시료 1



구성 아미노산으로
가수분해함



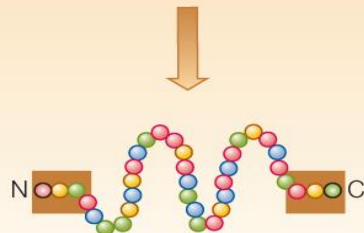
HPLC로 각각의 아미노산을
분리하여 확인함(그림 5.15 참조)

2단계

시료 2



특이적으로
작용하는 시약



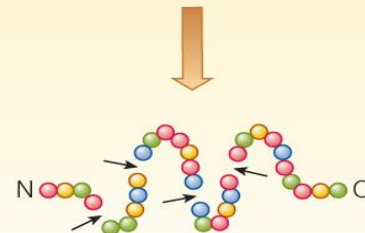
N-말단 및 C-말단의
아미노산을 확인함

3단계

시료 3



단백질의 특정
부위를 절단함



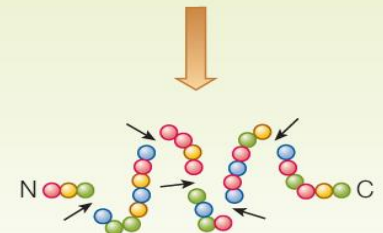
작은 펩타이드의
아미노산 서열을 결정함

4단계

시료 4



시료 3과는 다른 특정
부위를 절단함



작은 펩타이드의
아미노산 서열을 결정함

펩타이드의 중복된 부분으로부터
정보를 조합하여 전체 서열을 얻어냄

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

4. 단백질의 1차 구조 결정하는 법

1) 아미노산의 조성 분석

- 단백질을 아미노산으로 분해
6N HCl at 110°C for 24시간 가열
- 아미노산 분석기로 분석
이온 교환 크로마토그래피
-아미노산의 종류와 상대적인 양을 결정한다.

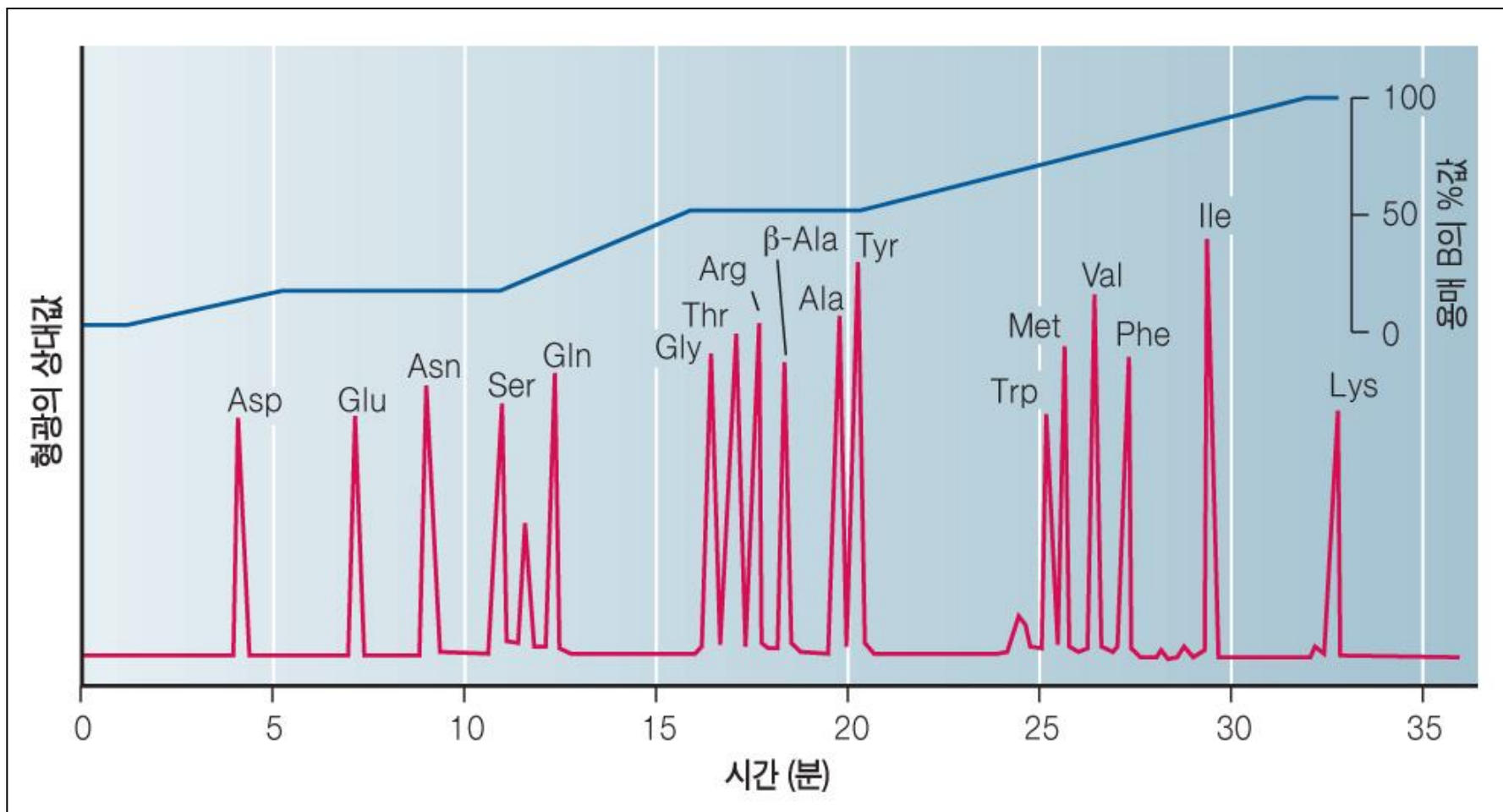


그림 5.15 HPLC로 아미노산을 분리할 때의 크로마토그램(크로마토그래피 도표).

4. 단백질의 1차 구조 결정하는 법

- 2) 단백질 서열의 N 말단과 C말단 결정
폴리펩타이드 사슬이 몇 개인지
확인하는데 사용된다.

4. 단백질의 1차 구조 결정하는 법

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)

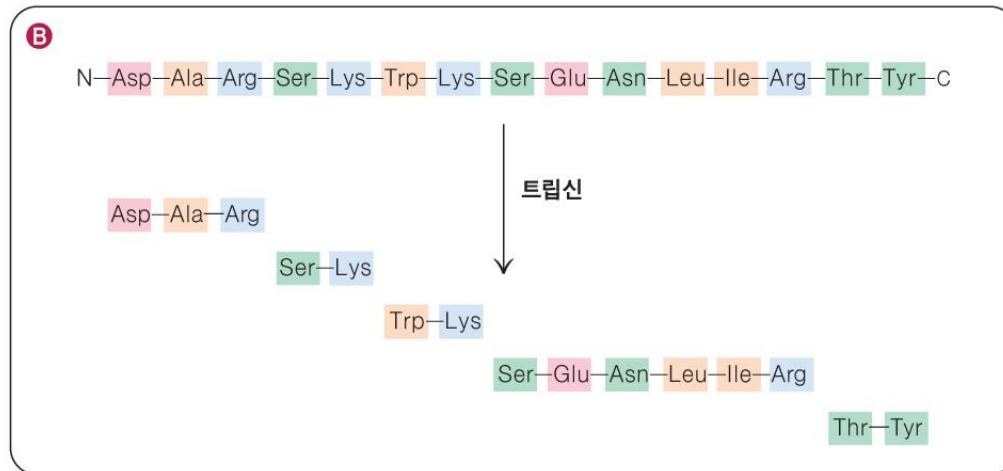
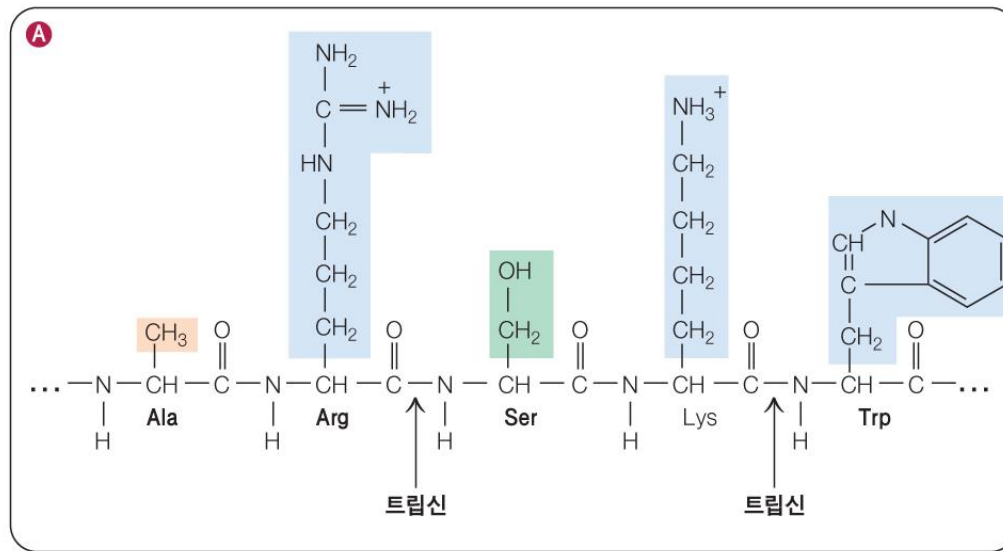


그림 5.16 트립신을 사용한 펩타이드 분해. (A) 트립신은 단백질분해효소(또는 프로티에이스)인데, 아르지닌이나 라이신의 카보닐기가 관여된 펩타이드 결합만을 특이적으로 절단한다. (B) 반응 생성물은 C-말단이 Arg나 Lys인 펩타이드 조각들과 폴리펩타이드의 C-말단에서 유래된 펩타이드 조각의 혼합물이다.

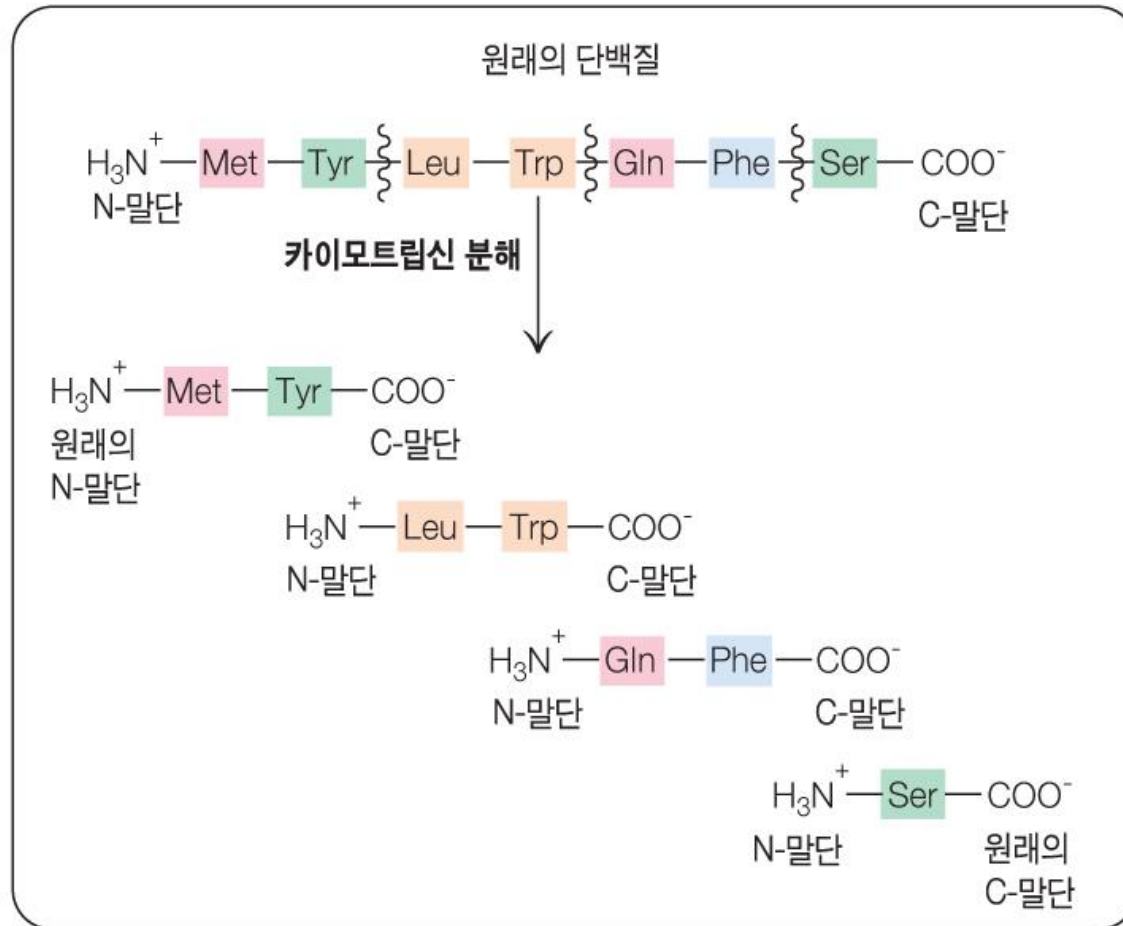
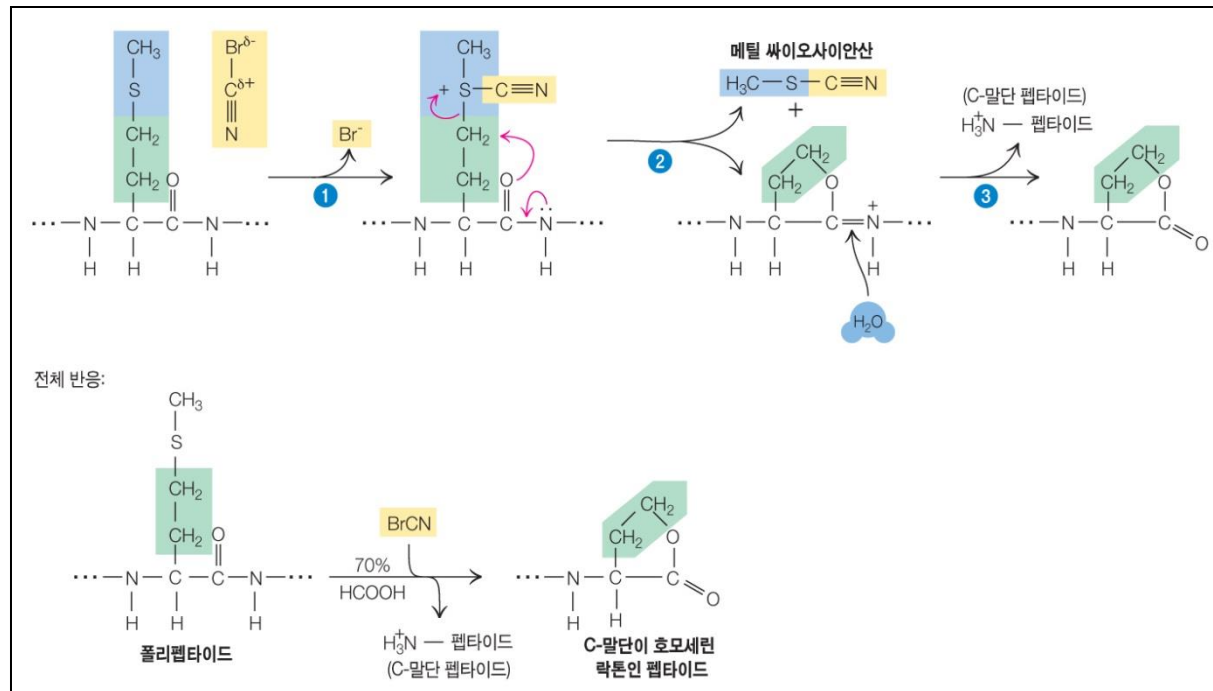


그림 5.17 카이모트립신에 의한 단백질 절단. 카이모트립신은 단백질의 방향족 아미노산 부위를 절단한다.

4. 단백질의 1차 구조 결정하는 법

3) 단백질 절단하는 법

(2) CNBr (사이아노겐 브로마이드)에 의한 분해 Methionine의 COOH기 쪽에서 분해



4. 단백질의 1차 구조 결정하는 법

3) 단백질 절단하는 법

(3) 에드만 분해법

- 단백질 서열결정기기의 원리
- 페닐 아이소싸이오사이안산이 N 말단과 결합하여 분리된다.
- N 말단부터 아미노산 한 분자씩 서열 결정
- 40개 정도의 아미노산 서열을 한번에 결정할 수 있다.

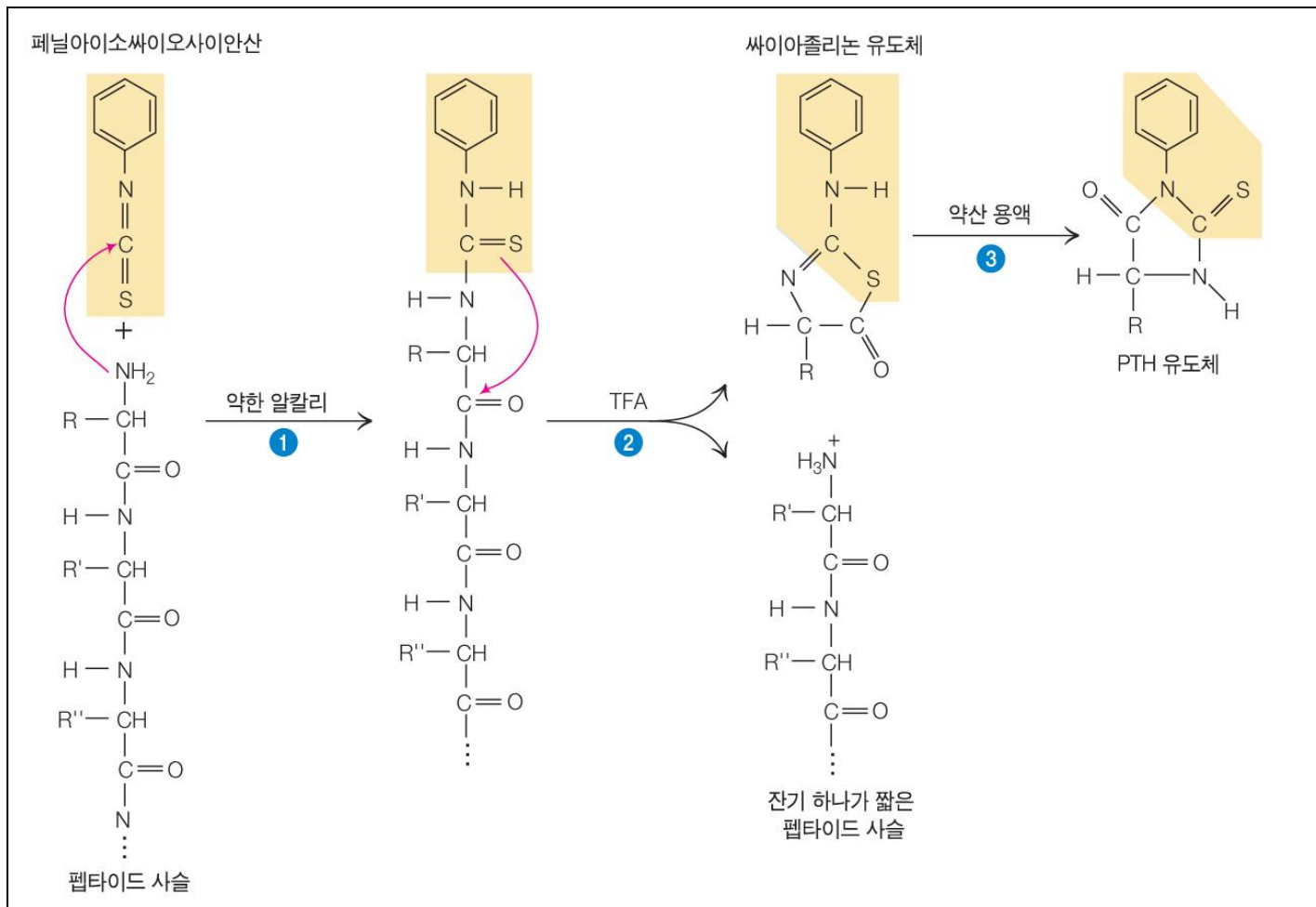


그림 5.20 에드만 분해법을 이용하여 펩타이드의 아미노산 서열을 결정하기. (1) 페닐아이소싸이오사이안산은 약한 염기성 조건에서 펩타이드의 N-말단과 결합하여 페닐싸이오카바모일 치환체를 형성한다. (2) TFA(trifluoroacetic acid, 트라이플루오로아세트산)를 처리하면, 이것이 고리화되어 N-말단 아미노산 잔기가 싸이아졸리논(thiazolinone) 유도체로서 방출되지만 다른 펩타이드 결합들은 가수분해되지 않는다. (3) 유기물질 추출과 산 용액 처리를 하면 N-말단 아미노산이 페닐싸이오하이드란토인(PTH) 유도체로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

4. 단백질의 1차 구조 결정하는 법

4) Peptide sequencing (아미노산의 순서 결정)

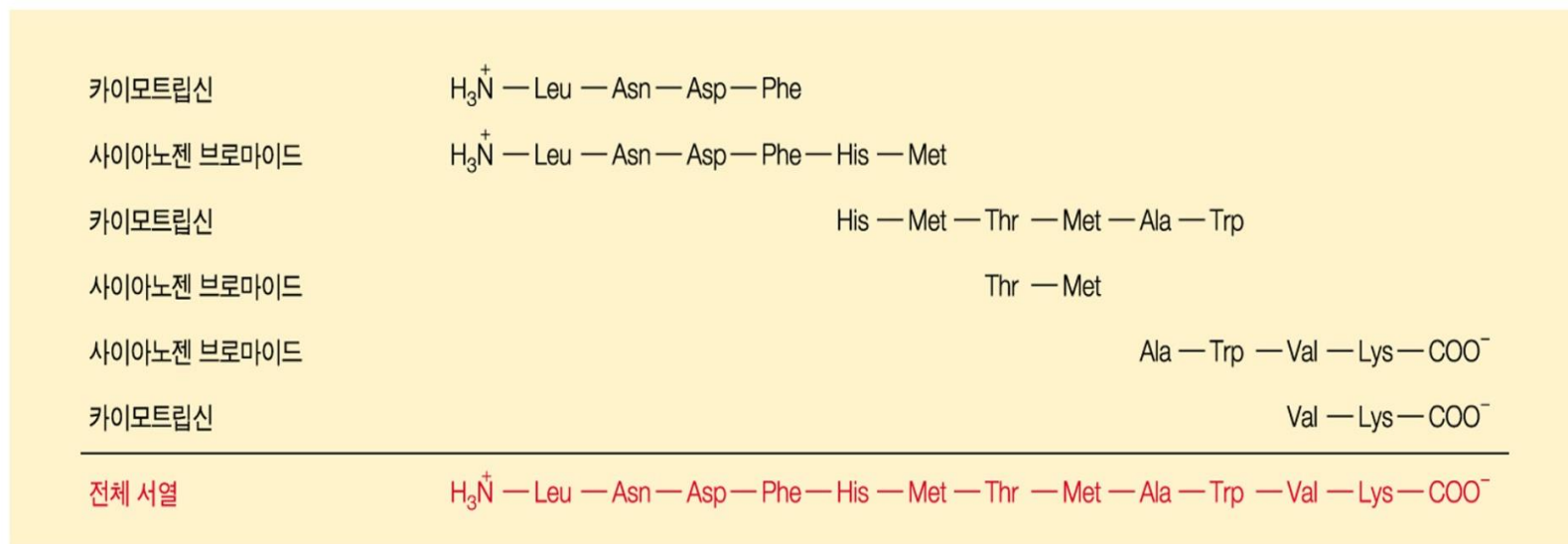


그림 5.19 중복되어 있는 서열을 사용하여 단백질 서열을 결정하기. 카이모트립신과 사이아노젠 브로마이드를 사용하여 부분적인 분해를 실시하였다. 명확하게 나타내기 위해 전체 펩타이드의 원래의 N-말단과 C-말단만을 나타냈다.

Peptide sequencing의 예

다음 단백질의 아미노산 순서를 결정하라. (122쪽)

Trypsin 처리 시

Leu-Ser-Tyr-Ala-Ile-Arg

Asp-Gly-Met-Phe-Val-Lys

Chymotrypsin 처리 시

Val-Lys-Leu-Ser-Tyr

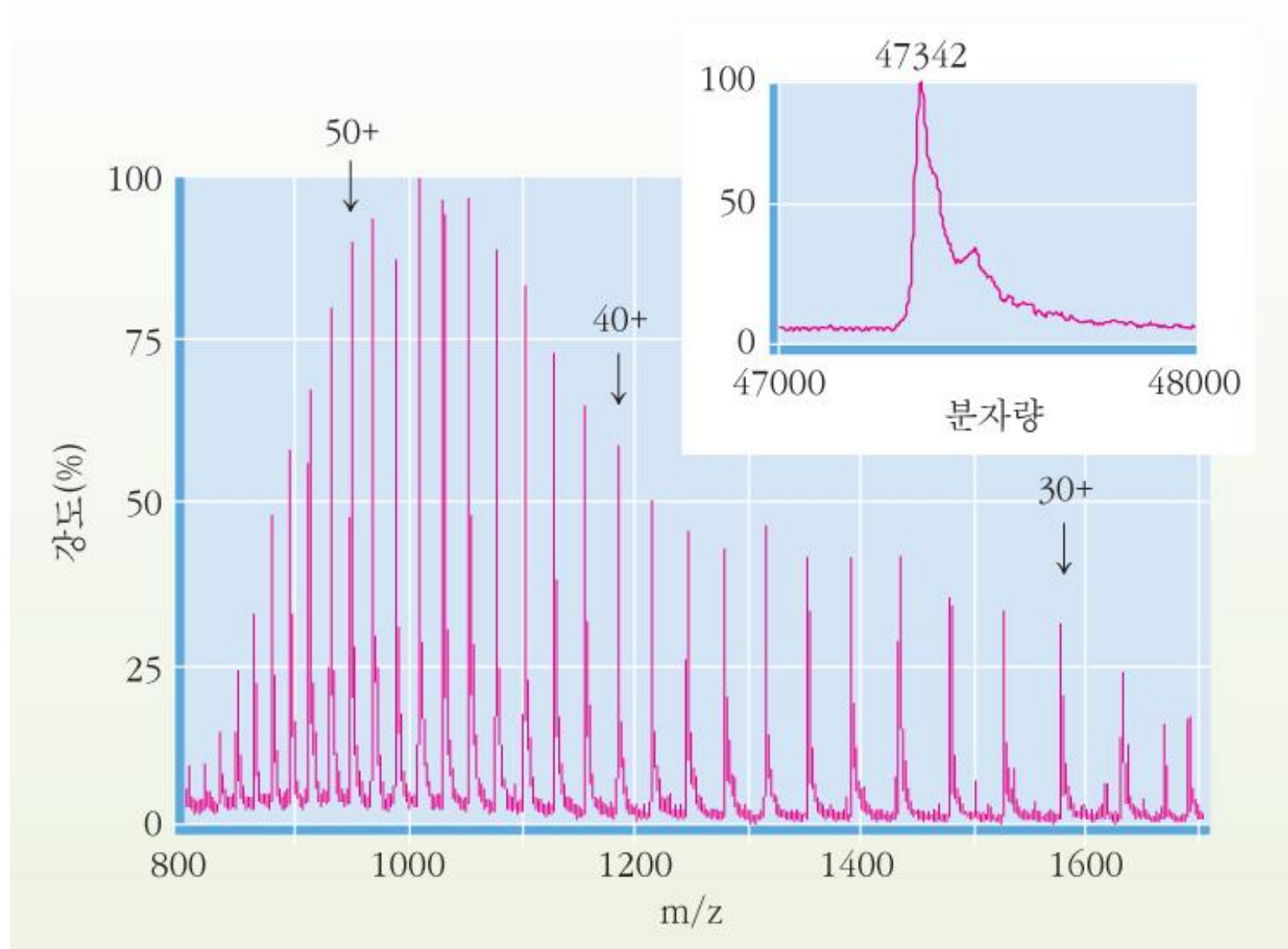
Ala-Ile-Arg

Asp-Gly-Met-Phe

5. 기타 단백질 확인 기술

- 1) 질량분광분석법(Mass Spectroscopy: MS)
- 2) 효소-연계 면역흡착법 (Enzyme linked Immunosorbent assay: ELISA)
- 3) 웨스턴 블롯(Western blot)
- 4) 단백질 칩, 마이크로어레이

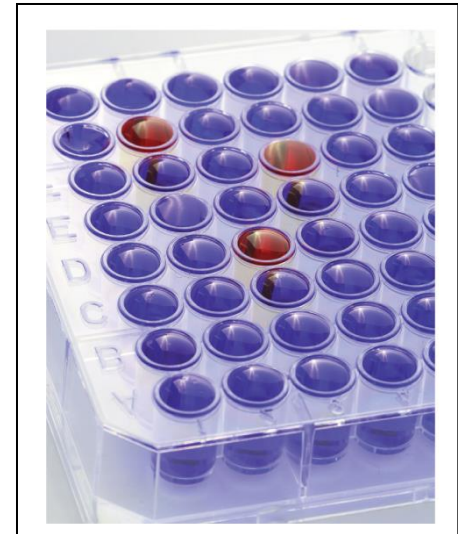
1) 질량분광분석법(Mass Spectroscopy:MS)



2) 효소-연계 면역흡착법 (Enzyme linked Immunosorbent assay: ELISA)

간접적 ELISA에 필요한 물질

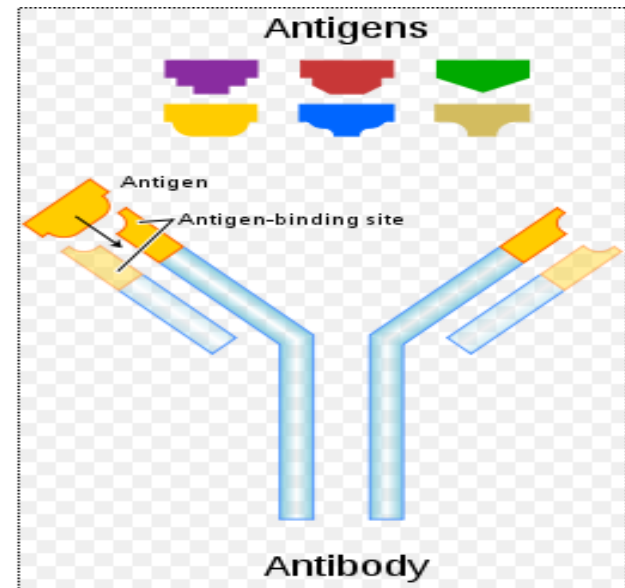
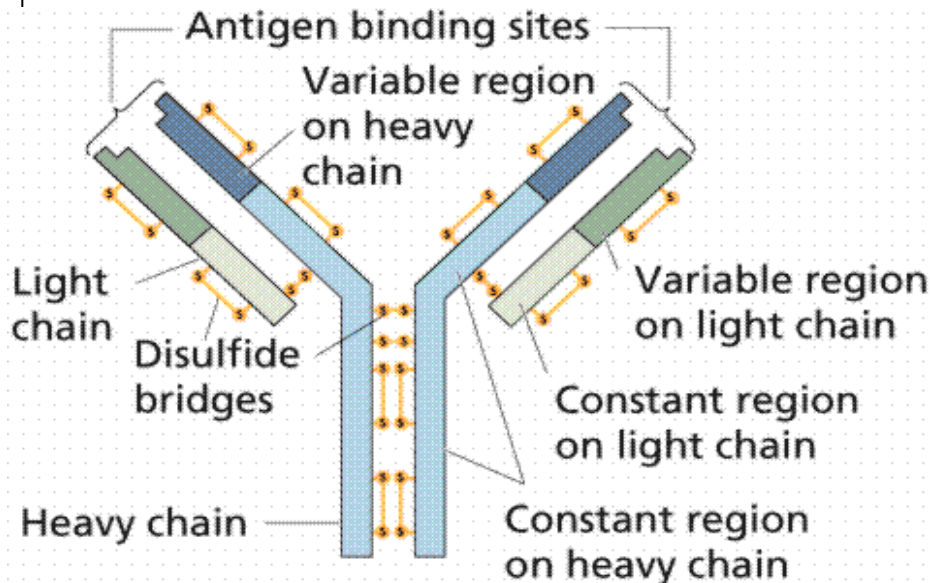
- 1차 항체
- 2차 항체
- 표지물질
 - ① 발색효소
 - ② 형광물질
- 마이크로타이터 평판



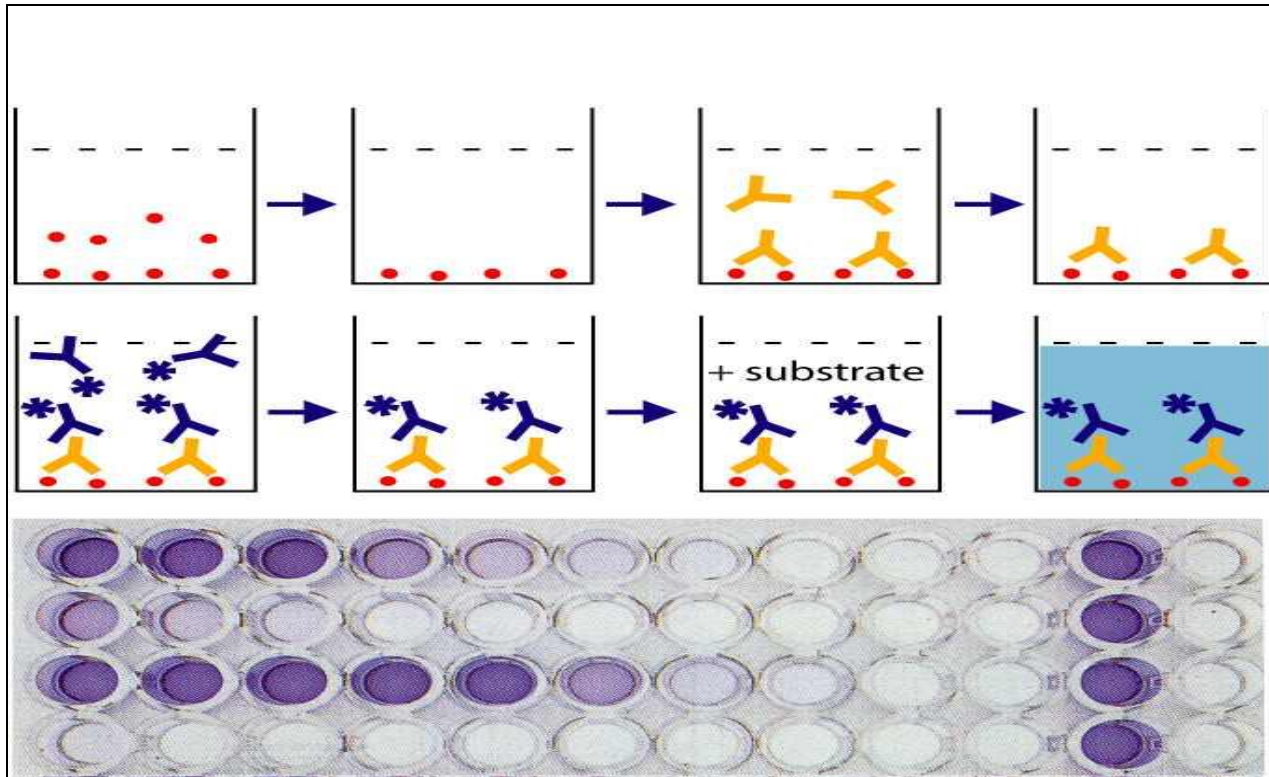
항체의 구조와 항원항체 반응 특성

1. 항체 구조(Ig) :

두 개의 동일한 light chain과 두 개의 동일한 heavy chain으로 구성

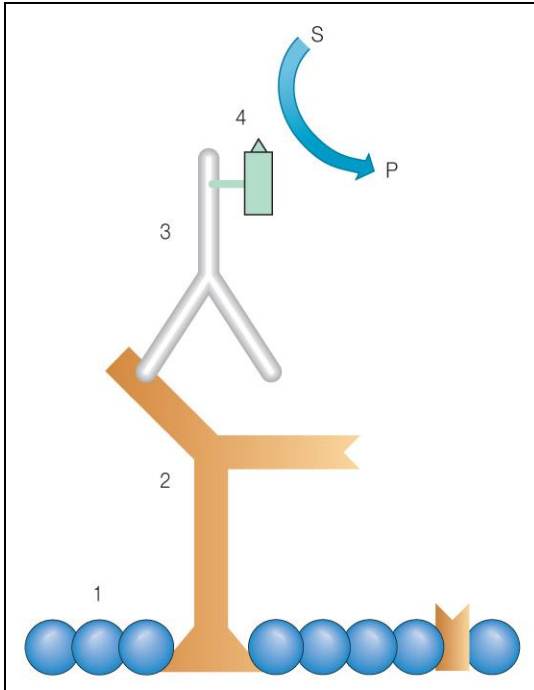


ELISA



plate안의 용액 색깔의 진한 정도를 흡광도로 읽고 정량한다.

3) 웨스턴 블롯



- 전기영동으로 분리된 단백질을 셀룰로오즈막으로 옮긴다.
- ELISA와 같은 방법으로 단백질을 발색시킨다.

그림 5.21 웨스턴 블롯으로 분리한 단백질을 눈에 보이게 만드는 데 쓰이는 1차, 2차 항체의 이용. (다음 문헌에서 인용함. Farrell/Taylor, Experiments in Biochemistry, 2E. © 2006 Cengage Learning.)

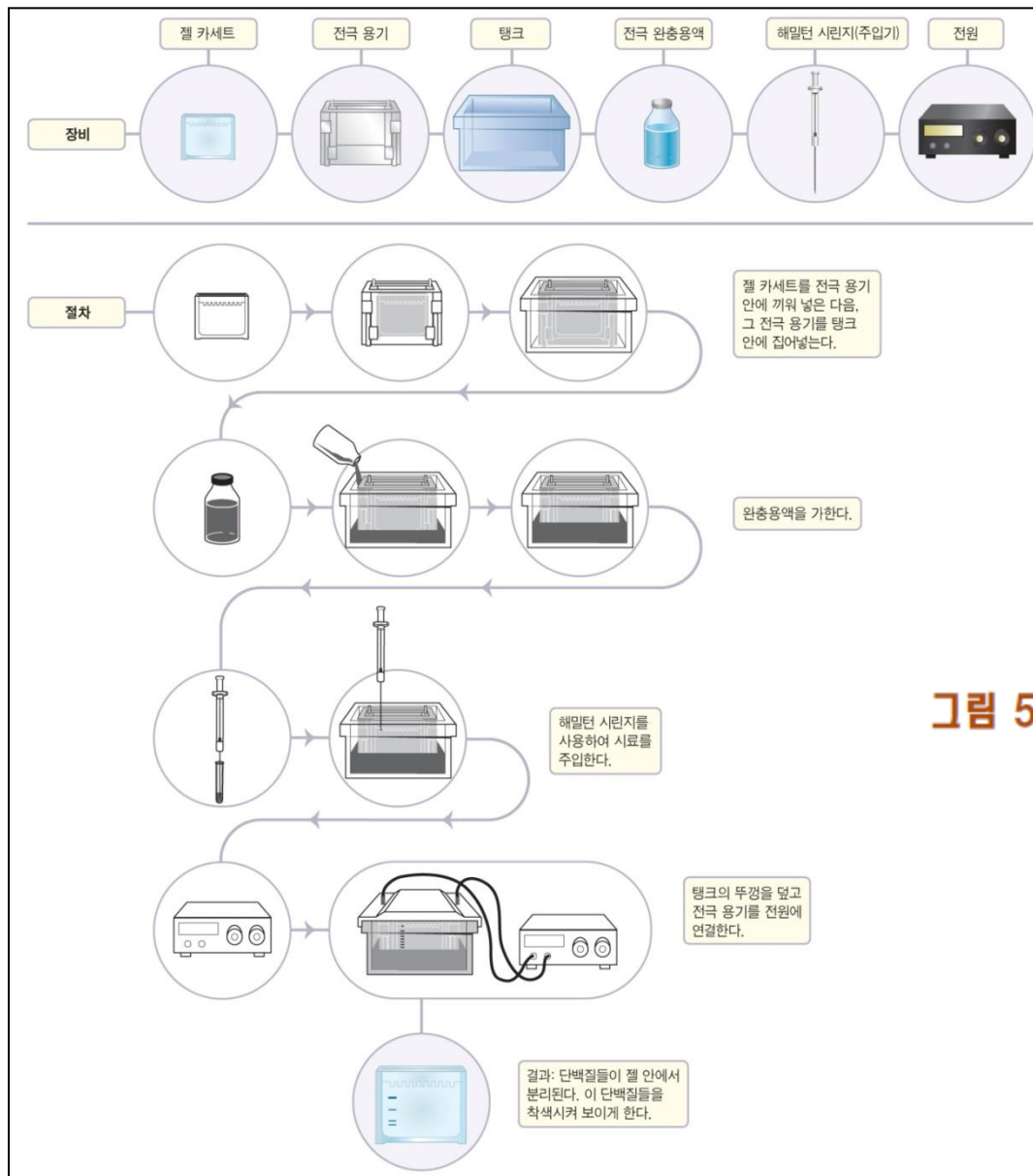


그림 5.23 웨스턴 블롯 실험의 기본적인 구상.

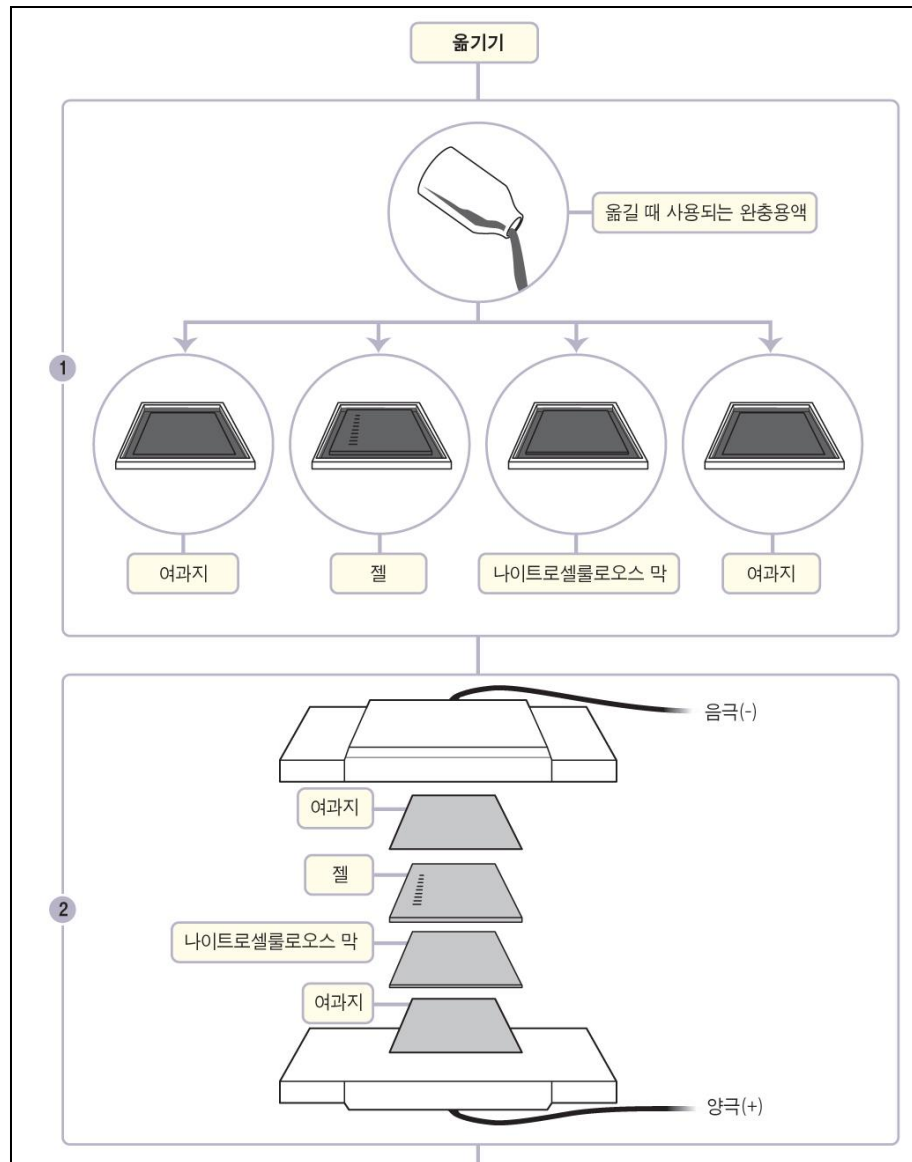


그림 5.23 웨스턴 블롯 실험의 기본적인 구상.

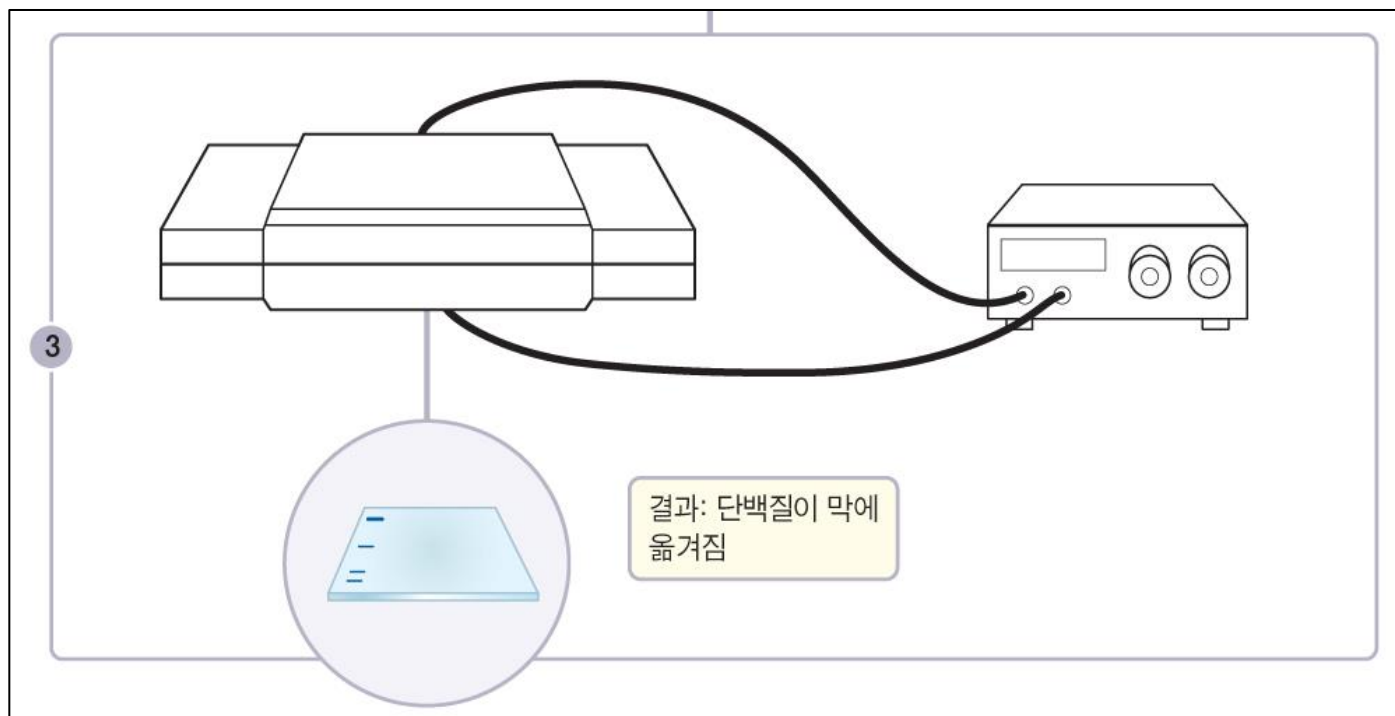


그림 5.23 웨스턴 블롯 실험의 기본적인 구상.

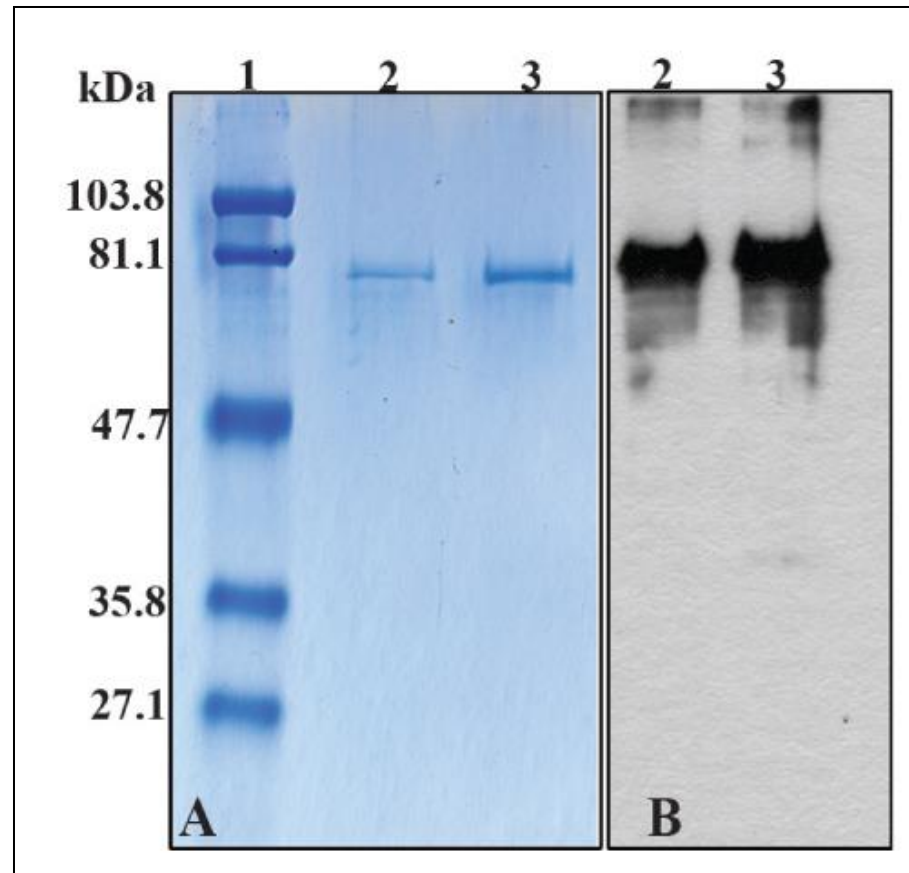
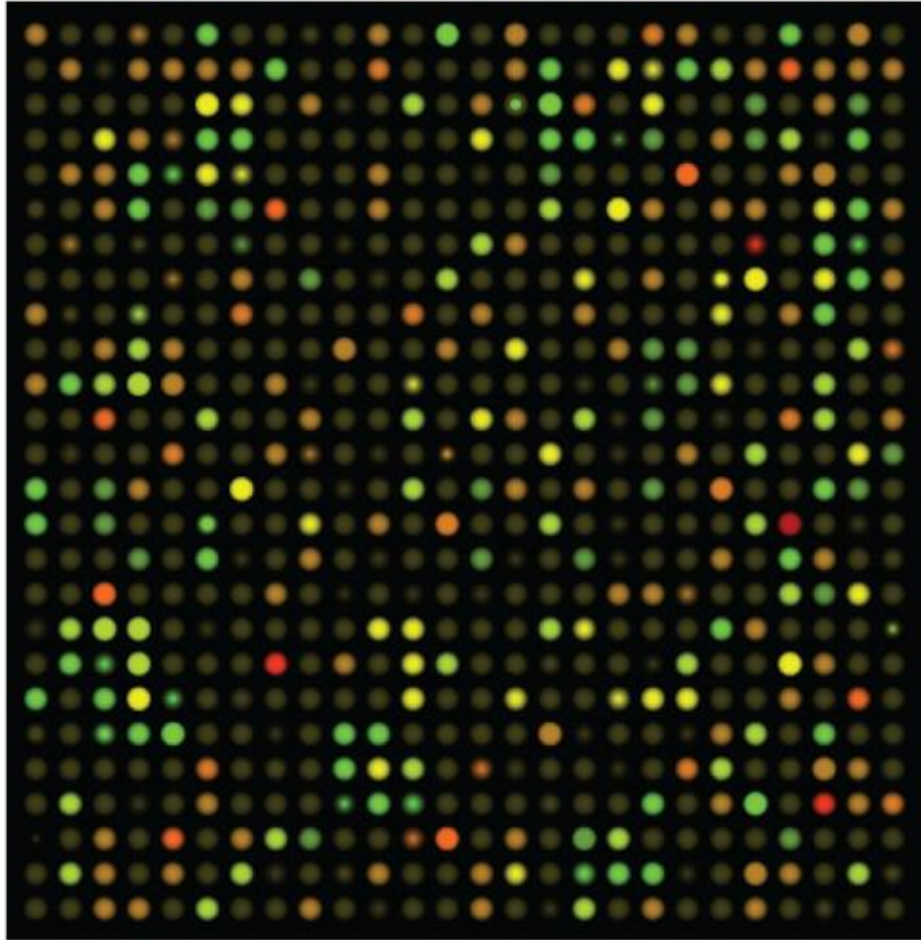


그림 5.24 쿠마씨 블루 착색 젤(A)과 같은 젤에서 만든 웨스턴 블롯(B)의 비교. 특정한 항체와 그 항체들을 보이게 만들어주는 표지물질을 이용함으로써, 웨스턴 블롯 상에서 특정 단백질의 위치를 결정할 수 있다. (A는 다음에서 인용함. Gustoimages/Science source/ Photo Researchers; 2009 Azza et al, licensee BioMed Central Ltd.)

4) 단백질 칩(chip) 마이크로어레이 (microarray)



작은 기판 위에 수십 개에서 수천 개, 또는 수만 개의 단백질을 고정시킨 후, 그 단백질들의 결합을 동시에 분석하는 자동화 분석장치

3만개의 단백질 분석 가능

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.

단백질 칩 (chip, microarray) system과 활용

