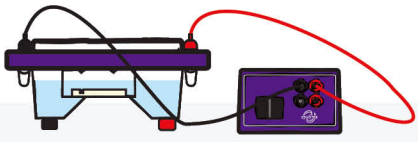
실험 가이드북

2024

겔투과 크로마토그래피 원리

Principles of Gel Filtration Chromatography

ED108



KOREA SCIENTIFICS (주)한국과학

02-929-1110 info@koreasci.com

www.koreasci.com

※ 이 문서는 교육적 목적으로만 사용되어야 하며 그 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

배경 지식

겔 여과 크로마토그래피(분자체 크로마토그래피-molecular sieve chromatography라고도 함)는 분자를 크기와 모양에 따라 분리하는 방법입니다. 혼합시료의 성분 분리는 몇 가지 예외를 제외하고 분자량과 상관관계가 있습니다. 겔 여과는 특성이 밝혀지지 않은 분자의 분자량을 결정하는 분석 방법으로 사용될 수 있습니다. 또한 겔 여과는 단백질, 다당류 및 핵산 정제 과정에서 중요한 크로마토그래피 단계이므로 중요한 분취 기술이기도 합니다.

겔 여과 실험의 기본 구성 요소는 매트릭스, 크로마토그래피 컬럼 및 용리 완충액입니다. 매트릭스는 컬럼 내에서 실제 분리 매체 역할을 하는 물질로, 크로마토그래피의 고정상입니다. 컬럼은 하단에 frit과 용리 주둥이가 장착된 튜브입니다. frit은 매트릭스를 컬럼 내에 지지하고 유지하지만 물과 용해된 용질은 통과시키는 멤브레인 또는 다공성 디스크입니다. 용리 완충액은 크로마토그래피의 이동상이며 매트릭스를 통해 컬럼 밖으로 흐릅니다. 매트릭스와 적용된 시료가 있는 컬럼은 용리 완충액에 의해 "전개"됩니다. 즉, 시료 내 분자들이 완충액의 흐름에 의해 매트릭스로 운반되어 점차 분리됩니다. 분리된 분자 영역은 컬럼 밖으로 흘러나와 분석을 위해 수집됩니다.

크로마토그래피 컬럼에 매트릭스를 채우는 것을 "패킹"이라고 합니다. 패킹된 매트릭스를 "베드"라고 하며, 이것이 차지하는 부피를 "베드 부피"라고 합니다. 베드가 건조되지 않도록 하는 것이 매우 중요합니다. 그렇지 않으면 균열이 생기고 매트릭스를 제거하고 다시 패킹해야 합니다.

겔 여과 매트릭스는 기공과 내부 채널을 포함하는 미세한 구슬로 구성됩니다. 분자가 클수록 기공을 통과하고 구슬 내부로 침투하기 어려워집니다. 따라서 큰 분자는 구슬 주변과 사이로 흐르는 경향이 있습니다. 구슬 사이에 있는 완충액의 총 부피를 "공극 부피(void volume)"라고 합니다. 작은 분자는 베드 내 채널과 기공의 미로 속에서 더 많은 시간을 보내는 경향이 있습니다. 결과적으로, 더 크고 분자량이 높은 분자는 더 작은 분자보다 먼저 컬

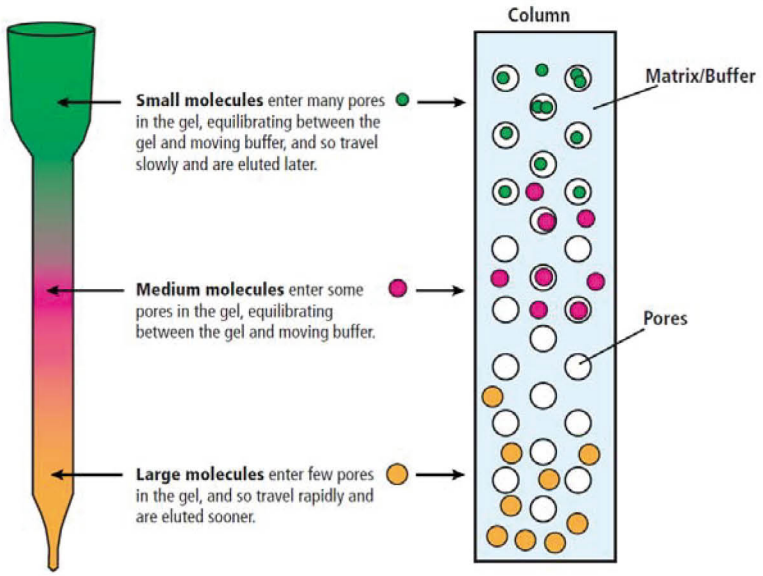


Figure 1:
How Different Sized Molecules Move Through the Matrix.

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

럼에서 용출됩니다. 큰 분자는 구슬 내에서 더 적은 시간을 소비하는 더 빠르고 직접적인 경로를 택합니다 (Figure 1). 이것은 복잡한 미로에서 빠져나오는 방법을 찾거나 미로 밖을 걷고 전체 상황을 완전히 피하는 것과 다소 유사합니다.

Small molecules(작은 분자) : 겔의 많은 기공에 들어가 겔과 이동하는 완충액 사이에서 평형을 이루므로 천천히 이동하여 나중에 용출됩니다.

Medium molecules(중간 크기 분자) : 겔의 일부 기공에 들어가 겔과 이동하는 완충액 사이에서 평형을 이룹니다.

Large molecules(큰 분자) : 겔의 기공에 거의 들어가지 않으므로 빠르게 이동하여 먼저 용출됩니다.

분자들은 동일한 분자량을 가지면서도 모양이 근본적으로 다를 수 있습니다. 구형과 같이 더 컴팩트한 모양의 분자는 막대 모양과 같이 길쭉한 모양의 분자보다 구슬에 더 쉽게 침투할 것입니다. 따라서 막대 모양 분자는 동일한 분자량의 구형 분자보다 먼저 용출됩니다.

다양한 유형의 겔 여과 매트릭스가 있습니다. 매트릭스가 분리할 수 있는 분자량의 범위를 분획 범위라고 합니다. 예를 들어, 분획 범위(분자량)가 1,000~100,000 달톤인 매트릭스를 생각해 보십시오. 평균 분자량이 1,000 이하인 분자는 모두 동일한 효율로 구슬에 완전히 침투하므로 서로 분리되지 않습니다. 이러한 분자들은 용출을 위해 최대 완충액 부피, 즉 하나의 베드 부피와 동일한 부피를 차지합니다. 베드 부피는 구슬의 부피와 공극 부피를 합한 값입니다. 1,000~100,000 달톤 범위의 분자는 다양한 효율성으로 구슬에 들어가 부분적으로 또는 완전히 분리됩니다. 100,000 달톤보다 큰 분자는 구슬에 들어가지 않고 공극 부피에서 용출됩니다. 이 예에서 분자량이 100,000 달톤 이상인 서로 다른 분자는 모두 매트릭스에 의해 체질되지 않으므로 동시에 용출됩니다. 컬럼에서 용출되는 부분적으로 또는 완전히 분리된 분자 영역을 피크라고 합니다. 피크는 분자 농도의 증가 및 감소 기울기로 구성됩니다 (Figure 2).

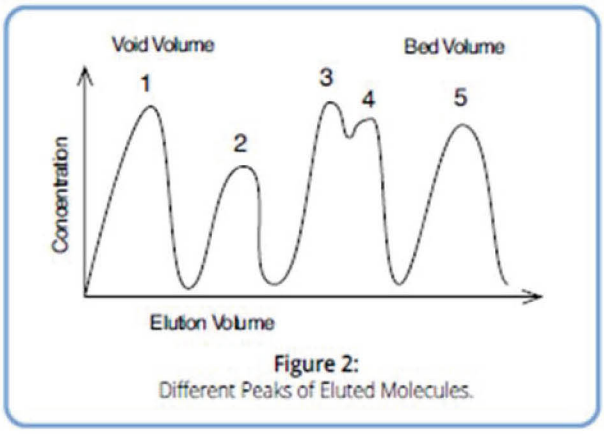


Figure 2:
Different Peaks of Eluted Molecules.

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

이 실험에는 시료 혼합물 분리에 적합한 매트릭스가 채워진 컬럼이 포함됩니다. 이 실험의 시료에는 주황색 및 파란색 분자의 혼합물이 포함되어 있습니다. 주황색 염료는 분자량이 452입니다. 파란색은 평균 분자량이 2,000,000 달톤인 포도당 중합체이며 막대 모양입니다. 매트릭스의 분획 범위는 4,000~150,000 달톤입니다. 더 작은 주황색 염료는 구슬의 기공에 들어가 천천히 통과하는 반면, 매우 큰 파란색 포도당 중합체는 구슬 기공에 들어갈 수 없어 주변을 이동해야 하므로 훨씬 빠르게 움직입니다.

컬럼의 부분	정의
저장소(Reservoir)	용리 완충액을 담는 컬럼 상단의 열린 공간
베드(Bed)	컬럼 내부에 채워진 고정상(겔 매트릭스)
Frit	컬럼 하단에 위치하는 다공성 디스크로, 매트릭스가 컬럼 밖으로 빠져나가는 것을 방지하면서 완충액과 분리된 분자가 통과하도록 합니다.
용리액(Eluant)	컬럼을 통해 흐르는 용액(이동상)으로, 종종 완충액이 사용됩니다.
용리액 주둥이(Elution spout)	컬럼 하단에 위치하며 분리된 분획을 수집하기 위해 용리액이 흐르는 곳입니다.

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

실험 목표

분자를 크기와 모양에 따라 분리하는 방법인 겔 여과 크로마토그래피의 원리를 학습합니다. 두 개의 다른 분자 혼합물이 이 실험을 통해 분리됩니다.

제품구성

튜브 A Sample Mixture

튜브 B Dry Matrix

튜브 C Concentrated Elution Buffer

플라스틱 피펫, 원심분리기 튜브, 크로마토그래피 컬럼

실험 시 필요한 것

50ml 또는 100ml 비커나 플라스크 10개

10ml 또는 25ml의 작은 비커 또는 플라스크 1개

링스탠드

증류수

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

실험 전 준비

A. 10개의 칼럼 준비

- 각 컬럼을 링-스탠드에 수직으로 고정합니다. 위, 아래 마개가 잘 닫혀 있는지 확인합니다.

B. 용리 완충액(Elution buffer) 준비

i. 농축된 Elution 버퍼 (튜브 C) 전부와 540ml 증류수를 잘 섞습니다.

ii. 희석된 위의 버퍼를 50ml씩 개별 비커에 옮겨 담습니다. 남은 버퍼는 실험 중 부족한 경우를 위해 남겨둡니다.

iii. 샘플 혼합물(튜브 A) 0.2ml를 원심분리기 튜브에 넣습니다. 이 튜브에 "X"로 표기합니다.

C. Dry Matrix 준비

i. Dry Matrix (튜브 B)를 플라스크 또는 비커에 넣습니다. 희석된 elution 버퍼 52ml를 추가합니다.

ii. 비커를 돌려가며 matrix를 섞습니다.

iii. 최소 2시간동안 실온에서 부풀어 오르게 합니다. (실험 전날 미리 해도 됩니다)

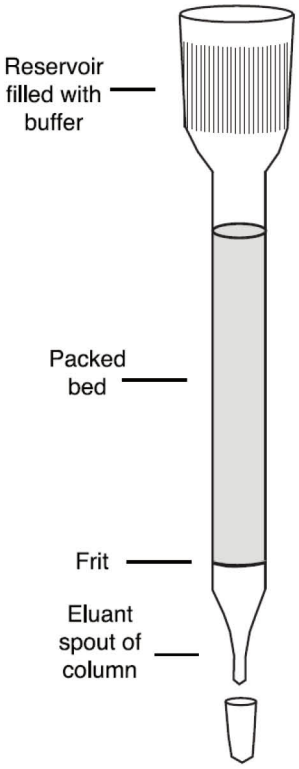
iv. Matrix가 불룩해지면 작은 비커나 플라스크 또는 튜브에 5ml씩 옮겨 담아 각 실험조에 분배합니다.

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

크로마토그래피: 컬럼 채우기

1. Matrix(매트릭스)를 부드럽게 흔들어 완전히 섞습니다.
2. 피펫을 사용해 걸쭉한 용액을 컬럼 관의 내부 벽면으로 흘러내리면서 조심스럽게 넣습니다.

   만약 matrix를 붓는 도중에 공기방울이 껴서 아래로 흘러가지 않는다면 잠시 멈추고 컬럼을 살살 쳐서 공기가 빠진 후 나머지를 다시 채워 넣습니다.
3. 피펫으로 용리 완충액(elution buffer)를 컬럼 저장소 관에 채웁니다.
4. 컬럼 아래에 빈 비커를 놓아둡니다.
5. 컬럼의 주둥이에서 마개를 제거합니다.
6. 약 10분간 버퍼가 컬럼을 통과해 매트릭스가 컬럼의 아래로 모이게 기다립니다.
7. 컬럼의 마개를 끼웁니다.
8. 압착이 멈출 때 매트릭스가 다 채워진 것입니다.



크로마토그래피: 분획 분취 (Fraction collection)

1. 8개의 튜브를 1부터 8까지 표기하고 실험조를 적습니다.
2. 피펫으로 조심히 충전층(packed bed)의 위부터 버퍼를 제거합니다. 충전층의 윗면은 공기에 노출되어야 합니다.

   버퍼를 제거하면서 충전층의 피해를 최소화 합니다.
3. 피펫으로 "X"로 표기된 샘플 튜브의 샘플 방울이 컬럼의 내부벽을 따라 흐르도록 하여 충전층 위에 쌓이도록 합니다.
4. 컬럼 아래에 비커를 놔둡니다.
5. 컬럼 아래 마개를 제거합니다. 샘플은 충전층으로 천천히 들어갈 것입니다. 모두 충전층으로 스며들면 마개로 다시 막습니다.
6. 피펫으로 충전층에 버퍼를 여러 방울 떨어뜨립니다. 마개를 열고 버퍼가 컬럼에 들어가게 합니다.
7. 한 번에 여러 방울씩 계속 버퍼를 추가하고 충전층에 버퍼가 들어가도록 기다립니다.
8. 컬럼의 아래 가까이 파란 염료가 도달하면 0.5ml씩 튜브에 수집하기 시작합니다.
9. 컬럼 바로 아래에 1번 튜브를 잡고 있습니다. 튜브에는 눈금이 있어 0.5ml 측정이 가능합니다.

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

10. 2번부터 8번 튜브까지 각각 0.5ml 씩 수집을 계속 합니다.

11. 모든 튜브에 컬럼의 추출물이 수집이 된 후 주둥이에 뚜껑을 끼웁니다.

12. 어느 튜브가 파란색 덱스트란(dextran)이 가장 많은지 확인합니다.

13. 어느 튜브가 오렌지색 염료가 가장 많은지 확인합니다.

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.