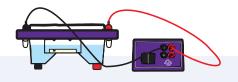
뇌 안의 세포형태

Cell Types in the Brain









www.koreasci.com

실험 목표

이 실험을 통해 학생들은 단백질 프로파일을 기반으로 뇌의 세포 유형 간의 차이를 탐구합니다.

제품 구성품

Α	Prestained Protein Standard Markers (lyophilized)	냉동	보관
В	Oligodendrocyte Proteins - (lyophilized)	냉동	보관
C	Neuron Proteins - (lyophilized)	냉동	보관
D	Astrocyte Proteins - (lyophilized)	냉동	보관
Е	Microglia Proteins - (lyophilized)	냉동	보관

10x Tris-Glycine-SDS buffer

FlashBlue Protein Stain Powder

Practice Gel Loading Solution

Transfer Pipets

필요 장비 및 준비물

- 12% Denaturing Polyacrylamide gels 3개
- 단백질 전기영동장치, 전원공급장치
- 쉐이커 (선택사항)
- 마이크로피펫, 피펫팁
- 비커, 호일, 비닐랩, 스패츌라, 라텍스 장갑, 안전고글,
- 증류수, 무색 식초, 에탄올
- 플라스틱 트레이
- 화이트 일루미네이터 (선택사항)
- ★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

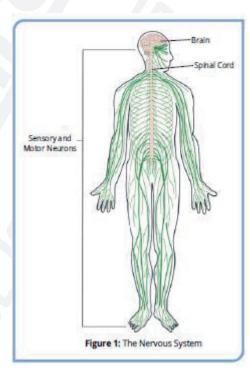
배경지식

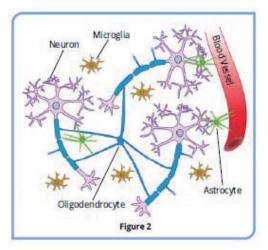
되는 매우 복잡한 기관으로, 우리 몸 내의 모든 것을 조절하는 역할을 담당합니다. 되는 복잡한 사고를 형성하고, 읽고 쓰며, 움직이고, 숨을 쉬며, 스포츠를 하고, 음악을 듣는 등의 기능을 수행할 수 있도록 합니다. 이를 위해 서로 협력하는 세포 네트워크가 작동합니다.

모든 생물은 세포로 구성되어 있습니다. 세포는 생명의 가장 작은 단위이며, 인체는 약 200 가지다른 종류의 세포로 구성됩니다. 뇌는 주로 4 가지 유형의 세포로 이루어져 있습니다: neurons, microglia, oligodendrocytes, and astrocytes (Figure 2). 이러한 세포들은 정보를 저장하고 뇌와 몸을 안전하게 유지하며, 우리 몸이 올바르게 작동하도록 협력합니다.

뉴런은 뇌 내에서 주요한 정보와 통신의 원천입니다. 뉴런은 전기적인 자극을 통해 정보를 전달하며, 한 개의 뉴런은 1 만 개의 다른 뉴런과 통신할 수 있습니다. 뉴런은 매우 크고 복잡한 세포입니다. 평균적인 인간 세포의 직경은 100 마이크로미터이지만, 뉴런은 최대 1 미터까지 길어질 수 있습니다. 그것은 100,000 마이크로미터입니다! 뉴런은 정보를 받아들이고 처리한 후 다른 뉴런에게 전달해야 하는 복잡한 작업을 수행합니다. 이를 위해 뉴런은 세포 내에 특화된 영역을 가지고 있습니다 (그림 3). 세포체에는 모든 세포 정보가 DNA 형태로 포함되어 있는 핵이 위치합니다. 세포체 주변에는 많은 수의 수상돌기가 있으며, 이는 이웃하는 받아들입니다. 충분한 뉴런으로부터 정보를 입력을 받으면 뉴런은 행동전위(action potential)라고도 하는 전기 파동을 세포체를 통해 내려 축삭을 따라 전달합니다.

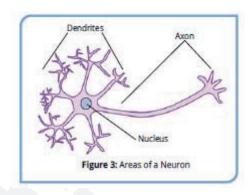
축삭은 매우 길고 정보를 매우 빠르게 전달할 수 있습니다. 행동전위가 축삭의 끝에 도달하면 뉴런은 축삭 말단에서 작은 화학물질을 방출하거나 "발사"합니다. 이러한 작은 화학물질인 신경전달물질은 이웃 뉴런의 수상돌기에 결합합니다. 전기 신호와 신경전달물질의 이런 통로를 통해 뉴런은 서로 통신하고 정보를 저장하며 기억을 형성하며 몸 내모든 기능을 조절할 수 있습니다. 뉴런은 뇌의 주요세포 유형이지만, 혼자서 기능하지는 않습니다. 뇌에는 3 가지 주요한 세포 유형이 더 있으며, 일반적으로





"지지" 세포로 간주됩니다. 연구에 따르면 이러한 세포들도 뇌 내에서 매우 복잡하고 중요한 기능을 가지고 있음이 밝혀졌습니다.

올리고데늄(Oligodendrocytes) 세포는 뉴런들이 서로 통신할 수 있도록 도와줍니다. 위에서 언급한 것처럼, 신경축삭은 매우 길고 전기 신호를 운반합니다. 이는 전기를 운반하는 전선과 유사합니다. 우리가 보는 대부분의 전선은 플라스틱이나 고무로 절연되어 있습니다. 이 절연은 신호가 원활히 전달되도록 보호 역할을 합니다. 신경축삭도 빠른 통신을 보장하기 위해 절연되어 있습니다. 올리고데늄 세포는 뉴런의 축삭 주위로



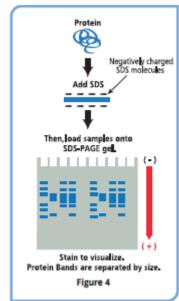
둘러싸여 이러한 절연을 제공합니다. 이를 미엘린이라고 하는 절연체로, 축삭은 초당 150 미터의 속도로 정보를 전달할 수 있게 됩니다.

미엘린이 없는 뉴런은 정보를 전송하는 속도가 약 1 미터/초로 제한됩니다. 올리고데늄 세포는 뉴런의 올바른 작동에 매우 중요하며, 올리고데늄 세포에 문제가 생기면 뇌에 매우 나쁜 영향을 미칠 수 있습니다. 올리고데늄 세포를 대상으로 하는 주요 질병 중 하나는 미엘린 손실에 의해 발생하는 다발성 경화증(Multiple Sclerosis)입니다.

마이크로글리아는 뇌의 면역 시스템입니다. 면역 시스템은 감염으로부터 몸을 보호하며, 마이크로글리아는 뇌 내에서 이와 같은 역할을 합니다. 마이크로글리아는 뇌에서 염증이 발생할때 활성화되며, 사멸한 세포나 쓰레기가 쌓인 부위를 청소하는 역할을 담당합니다. 마이크로글리아의 규칙적인 기능이 굿모닝, 또는 에이즈와 같은 질병에서 장애가 발생할 수 있다는 것이 밝혀져 왔습니다.

아스트로사이트는 뇌에서 혈류와 영양분 회수를 규제하는 데 매우 중요합니다. 뇌의 뉴런들은 많은 에너지와 산소를 필요로 하며, 이는 혈액에서 공급됩니다. 뇌에는 주요 정맥과 동맥뿐만 아니라 더 작은 모세혈관을 포함한 다양한 혈관이 있습니다. 이러한 혈관들은 아스트로사이트에 의해 감싸여 뇌로 들어오는 유해한 세포들과 박테리아가 방지됩니다. 대신, 아스트로사이트는 혈액으로부터 분자의 확산을 규제하여 뉴런과 다른 세포들이 혈액에서 제공되는 산소와 에너지를 사용할 수 있도록 합니다.

이러한 각각의 세포 유형은 뇌의 <mark>올바</mark>른 작동에 특정한 역할을 수행합니다. 그러나 그들을 DNA 코드로 구별하는 것은 불가능합니다. 대신, DNA 서열이 단백질로 번역되는 방식과 세포

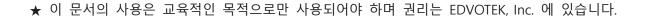


내에서 발현되는 단백질에 따라 각 세포가 고유한 프로필과 기능을 갖게 됩니다. 한 사람의 몸의모든 세포는 정확히 동일한 DNA 서열을 가지고 있습니다 (배아생식세포를 제외하고, 이들은반만 가지고 있습니다). 따라서 동일한 생물체, 동물 또는 인간의 서로 다른 세포 유형을구별하려면 발현되는 단백질의 프로필을 살펴야 합니다.

아가로스 겔 전기영동이 DNA 조각을 크기에 따라 분리할 수 있는 것과 마찬가지로, 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동은 단백질을 크기, 모양 또는 전하에 따라 분리할 수 있습니다. DNA 와 달리, 단백질의 아미노산은 크고 복잡한 형태를 취할 수 있습니다. 이러한 단백질이 크기에 따라 정확하게 분리되기 위해서는 먼저 해방되어 3 차원 구조에서 풀어져야 합니다.

변성된 단백질은 특정한 접힘 패턴과 생물학적 활성을 잃었지만, 아미노산 사슬은 그대로 유지됩니다. 대부분의 경우, 단백질은 SDS 와 2-mercaptoethanol 의 존재 하에서 끓이는 과정을 통해 변성됩니다. SDS 는 탄화수소 사슬과 음이온인 황산 그룹이 결합된 세제입니다. SDS 는 아미노산에 결합하여 전체 단백질에 순전히 음전하 전하를 부여합니다. 또한, SDS 결합은 단백질을 풀어 헤칠 수 있으며 변성 과정에 도움을 줍니다. 그러나 SDS 를 사용하더라도, 아미노산 사이에는 이산화황 결합과 같은 공유 결합을 포함한 매우 강한 결합이 형성될 수 있습니다. 이러한 결합은 같은 또는 다른 폴리펩타이드 사슬에 위치한 두 시스테인 아미노산 잔기 간에 형성됩니다. 2-mercaptoethanol 과 같은 환원제의 높은 농도는 이산화황 결합을 파괴합니다. SDS 와 2-mercaptoethanol 의 조합은 단백질을 완전히 분해하고 변성시킵니다

전기영동 과정에서, SDS 로 변성된 단백질은 분자량과 역비례하는 속도로 겔을 통해 양극으로 이동합니다. 다시 말해, 단백질이 작을수록 이동 속도가 빨라집니다. 이는 폴리아크릴아마이드 겔이 단백질의 이동 경로로서 일종의 미로 역할을 하기 때문입니다. 단백질이 작을수록 겔을 통해 운반되기가 더 쉽고 빠릅니다. 알려지지 않은 단백질의 분자량은 전기영동 후 겔 상의 위치를 표준 SDS 단백질 ladder의 위치와 비교하여 얻을 수 있습니다.



실험 전 준비

이 실험에는 6 조의 학생 그룹이 공유할 12% Denaturing Polyacrylamide Gel 이 3 개 필요합니다. 각 그룹은 5 개의 샘플 well 이 필요합니다. 단백질 표준 마커 (튜브 A) 및 튜브 B, C, D, E 는 복원되어야 합니다.

단백질 변성 및 냉동 건조 단백질의 재구성

- 1. 각각의 튜브 A-E 에 145µl 정제수를 추가합니다. 각 튜브를 완전히 용해될 때까지 30 초 동안 혹은 완전히 용해될 때까지 완전히 혼합합니다.
- 2. 안전 고글을 착용하고 알루미늄 호일로 덮인 물이 담긴 비커를 끓입니다. 불을 끕니다.
- 3. 튜브 뚜껑이 잘 닫혔는지 확인합니다. 튜브를 끓는 물에 10분 동안 매달아 놓습니다.
- 4. 단백질이 따뜻한 상태에서 학생들이 겔에 로딩하도록 합니다. 상단에 응축물이 있는 경우 튜브를 가볍게 두드려 샘플로 돌려놓습니다. 이 실험은 연습용 로딩 용액을 포함하고 있습니다. 겔 전기영동에 익숙하지 않은 경우, 실제 실험을 수행하기 전에 샘플 웰에 로딩하는 연습을 권장합니다.

Tris-Glycine-SDS 버퍼 (전기영동 버퍼만)

- 1. EDVOTEK 10x 농도 버퍼 1부에 증류수 9부 비율로 섞습니다.
- 2. 3개의 전기영동 장비에 필요한 1X 농도 버퍼를 만듭니다 (EDVOTEK® 장비 3대 기준 2리터).

전기영동 시간과 전압

샘플이 전기영동으로 분리되는 데 필요한 전압과 시간의 대략적인 권장 시간은 표 A에 나와 있습니다.

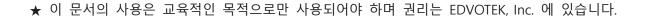
브로모페놀 블루 추적 염료가 젤 하단에 가까워질 때까지 젤을 돌려주세요.

A	time and Voltage Guidelines		
	Recommended Time		
Volts	Minimm	Optimal	
100	80 min.	95 min.	
125	60 min.	75 min.	
150	50 min.	60 min.	

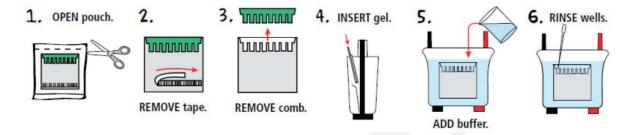
겔 염색을 위한 준비

- 1. 400 mL 의 화이트 식초와 200 mL 의 에탄올을 섞어 화이트 식초와 에탄올 스톡 용액을 준비합니다. 부드럽게 혼합합니다. "염색/탈염 용액"이라고 레이블을 붙입니다.
- 2. 250 mL 플라스크나 비커에 130 mL 의 염색/탈염 용액을 추가합니다. FlashBlue™ 단백질 염색제 파우더 전체를 넣고 가볍게 저어 혼합합니다. 남은 파우더는 추가적인 1 mL 의 염색/탈염 용액을 사용하여 튜브에서 헹구어 낼 수 있습니다.
- 3. 필요할 때까지 두 용액을 실온에서 보관합니다.
- 4. 두 학생 그룹이 공유할 것: 30 mL의 FlashBlue™ 단백질 염색제, 140 mL의 염색/탈염 용액, 물, 염색용 트레이, 플라스틱 랩.

*무색의 식초는 농도가 5-8%이고 pH가 약 2.6 인 쿠킹 및 청소용 식초로 쉽게 구할 수 있습니다. 에탄올은 다양한 농도로 구할 수 있는 일반적인 실험실 용품입니다. 저희 FlashBlue™ 단백질 염색액은 다양한 종류의 흰 식초와 함께 사용할 수 있도록 설계되었습니다. 그러나 95% 이상의 에탄올 사용을 권장합니다.



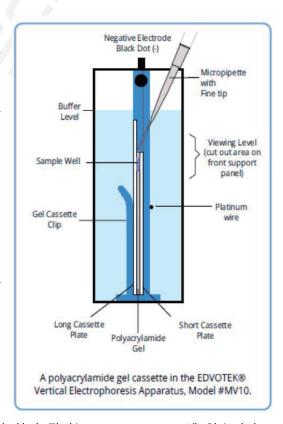
모듈 I-A: 전기영동을 위한 precast Polyacrylamide gel 준비



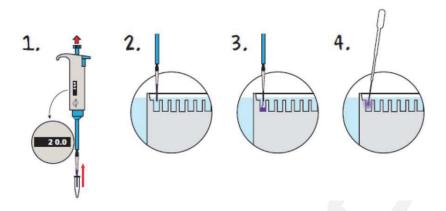
참고: 사전에 만들어진 polyacrylamide gels과 단백질 chambers는 디자인에 따라 약간 다르지만 사용 방법은 유사합니다.

- 1. gel cassette를 담고 있는 비닐포장을 열어주세요. cassette를 뺀 다음 앞면이 짧은 부분을 위로 놓아 벤치에 올려 놓습니다.
- 2. Gel 아래쪽에 스티커나 테이프가 있을 수 있습니다. 있으면 제거하세요.
- 3. 조심스럽게 comb를 천천히 위로 당겨 제거합니다. comb를 제거할 때 wells가 손상되지 않게 comb를 수직으로 뽑아냅니다.
- 4. Gel을 전기영동 챔버에 넣습니다. 제조사의 지시에 따라 Gel을 위치시키킵니다. 참고: EDVOTEK® 세로 전기영동 챔버의 경우, 짧은 부분이 장비 중앙을 향하도록 해야합니다.
- 5. 전기영동 챔버에 희석된 전기영동 buffer를 넣으세요. Buffer가 짧은 plate 위쪽을 덮도록 해야합니다.
- 6. 각 well을 전기영동 buffer로 씻겨줍니다. 마이크로 피펫을 사용하여 well에 buffer를 주입하여 well을 정리합니다. comb를 제거하거나 씻기는 동안 변형된 well이 있는 경우, 피펫으로 조심스럽게 원래 모양으로 펴줍니다.

Gel은 이제 연습용 gel loading을 위해 사용할 준비가 되었습니다.



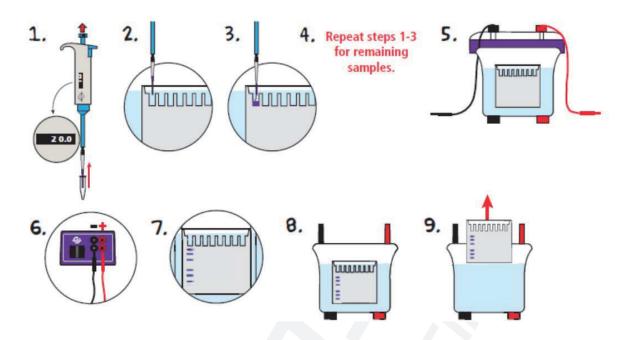
모듈 I-B: 젤 로딩 연습 (선택사항)



<u>참고: 폴리아크릴아마이드 젤에 샘플을 주입은 마이크로 피펫팁을 사용하는 것이 좋습니다. 일반</u>적인 피펫은 캐세트를 손상시켜 단백질 샘플을 잃을 수 있습니다.

- 1. 마이크로 피펫에 새로운 팁을 끼우세요. 20 µL의 연습용 젤 로딩 용액을 빨아 당깁니다.
- 2. 피펫 팁의 하부를 버퍼 표면 아래에 놓고 well웰 바로 위에 위치시킵니다. 팁은 웰을 향해 틀어진 각도로 되어야 합니다. 팁은 젤 카세트의 후면 플레이트에 부분적으로 닿아야하지만, 팁의 배출구멍은 샘플 웰 위에 있어야 합니다. 피펫 팁을 젤 카세트의 플레이트 사이로 강제로 밀어 넣지 마세요.
- 3. 피펫의 플런저를 꾹 눌러 샘플을 모두 배출합니다. 모든 샘플이 배출될 때까지 플런저를 놓지 마세요. 플런저를 너무 일찍 놓으면 버퍼가 마이크로 피펫 팁의 샘플과 혼합됩니다. 샘플이 전달되고 피펫 팁이 버퍼 밖으로 나간 후에 플런저를 놓습니다.
- 4. 샘플 웰에서 연습용 젤 로딩 용액을 제거합니다. 피펫에 버퍼를 채우고 다시 샘플 웰에 배출시킵니다. 이렇게 하면 연습용 젤 로딩 용액이 버퍼로 희석되어 실험에 방해되지 않게 됩니다. 참고: 샘플 로딩 전에 연습용 젤 로딩 용액은 샘플 웰에서 제거되어야 합니다.

모듈 II: SDS-PAGE로 단백질 샘플 분석하기



PROTEIN SAMPLES LOADING: 두 조당 하나의 젤을 공유할 수 있습니다. 1조는 1~5번 웰을, 2조는 6~10번 웰을 사용해 샘플을 로딩할 수 있습니다. (Table 1.)

- 1. 새로운 피펫팁을 사용하여 표준 단백질 마커 (A) 20μL을 채취합니다.
- 2. 버퍼 아래에 피펫팁을 넣고 샘플 웰 바로 위까지 넣습니다. 뒷면의 접착 판에 부드럽게 닿도록 합니다.
- 3. 서서히 마이크로피펫의 스위치 플런저를 <mark>눌</mark>러 샘플을 분주합니다.
- 4. 각 새로운 샘플마다 팁을 교체하면서 1-3 단계를 반복합니다.

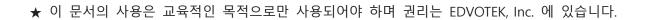
Table 1: Gel Loading				
Lane	Sample			
1	Protein Standard Markers (Group 1)			
2	Oligodendrocyte Proteins (Group 1)			
3	Neuron Proteins (Group 1)			
4	Astrocyte Proteins (Group 1)			
5	Microglia Proteins (Group 1)			
6	Protein Standard Markers (Group 2)			
7	Oligodendrocyte Proteins (Group 2)			
8	Neuron Proteins (Group 2)			
9	Astrocyte Proteins (Group 2)			
10	Microglia Proteins (Group 2)			

- 5. 모든 샘플을 웰에 로딩한 후, <mark>전</mark>극 단자 덮개를 조심스럽게 놓고 전기 연결선을 전원 공급 장 치에 연결합니다.
- 6. 전원 공급 장치에 연결하고 전압을 설정해 전기 영동을 수행합니다. (시간과 전압 지침은 표A를 참조하십시오).
- 7. 단백질이 권장된 시간 동안 격리되도록 하거나 트래킹 염료가 젤의 하단에 도달할 때까지 젤
- ★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

에서 분리되도록 합니다.

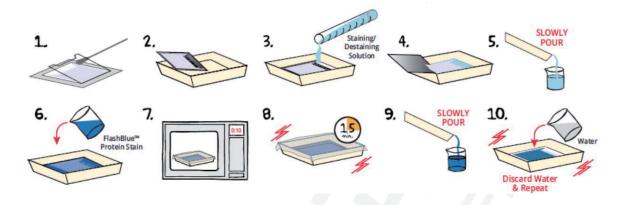
- 8. 전원 공급 장치를 끄고 덮개를 조심스럽게 제거합니다.
- 9. 젤을 챔버에서 꺼내 다음 염색 과정을 진행합니다.

A	time and Voltage Guidelines		
	Recommended time		
Volts	Minimum	Optimal	
100	80 min.	95 min.	
125	60 min.	75 min.	
150	50 min.	60 min.	

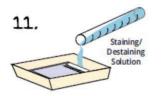


모듈 III: FlashBlue Protein Stain (선택적)

선생님이 나눠준 단백질 샘플은 이미 염색된 형태이지만, FlashBlue™ 단백질 염색을 사용하여 밴드의 강도를 높일 수 있습니다. 염색은 빠르고 민감합니다. 전기영동 중 폴리아크릴아마이드 젤을 공유한 학생 그룹은 함께 이 젤을 염색해야 합니다.



- 1. 전기영동이 끝나면, 젤 캐세트를 바닥에 놓고 얇은 스패츌러, 또는 스크루드라이버를 캐세트 측면 가장자리에 대고 조심스럽게 큰 뒷판에서 분리합니다. 대개 젤은 뒷판에 붙어있을 것입니다. 만약 젤이 일부분 앞판과 함께 떨어진다면 뒷판 위로 떨어뜨려주세요. 젤이 매우 파괴적으로 부서지기 쉬우므로 매우 조심스럽게 다루시기 바랍니다.
- 2. 뒷판에 붙어 있는 젤을 깨끗한 판 위로 옮겨주세요.
- 3. 젤과 뒷판을 완전히 덮을 정도로 충분한 양의 염색/탈염액 (약 50-75 mL)을 판에 부어주세요.
- 4. 젤이 포함된 액체만 남도록 염색/탈염액이 든 판에서 조심스럽게 뒷판을 제거합니다. 캐세트를 제거하면 밴드가 눈에 잘 보일 것입니다. 계속하기 전에 젤을 관찰하고 밴드 패턴을 노트 북에 사진 또는 스케치로 남겨주세요. 참고: 젤이 판에 붙어 있으면 글러브로 된 두 손가락으로 조심스럽게 젤을 떼어내주세요.
- 5. 염색/탈염액을 버려주세요. 젤이 용기에서 빠져나가지 않도록 천천히 따르세요.
- 6. 30 mL의 준비된 FlashBlue™ Protein Stain을 부어주세요.
- 7. (선택사항) 용기에 비닐랩을 덮고 10초간 전자레인지에 넣어 용액을 부드럽게 데워주세요.
- 8. 15분간 주기적으로 흔들어가며, 상온에서 INCUATE합니다.
- 9. FlashBlue™ Protein Stain 용액을 버리세요. 젤이 용기에서 빠져나가지 않도록 천천히 따르세요.
- 10. 용기에 물을 일부 담아서 몇 번 기울여서 젤을 세척해주세요. 사용된 물은 버리고 새 물로 다시 세척을 반복하세요.
- ★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.









- 11. 젤에 염색/염색제거용 용액 30 mL을 추가하세요.
- 12. 실온에서 15분 동안 인큐베이션 합니다. 젤을 살펴보세요.
- 13. (선택 사항) 사용한 염색/염색제거용 용액을 버리고 추가적으로 30 mL의 염색/염색제거용 용액을 넣으세요. 단백질 밴드의 외관과 배경 대비가 개선될 때까지 실온에서 15-60분 동안 인큐베이션 합니다.
- 14. 염색 후, 단백질 밴드는 연한 배경에 대해 중간에서 어두운 파란색으로 나타납니다. 단백질 밴드를 더 잘 시각화하기 위해 흰색 라이트 박스를 사용할 수 있습니다. 결과를 사진으로 찍으세요.

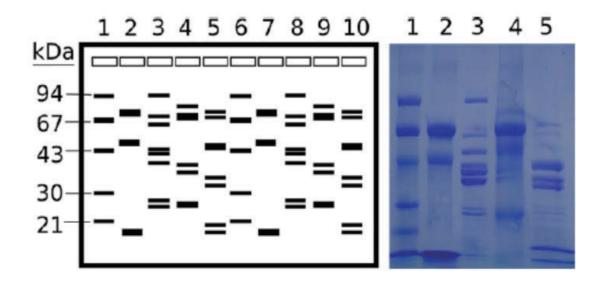
젤 보관

- 젤은 몇 시간 동안 증류수에 두어도 됩니다. 이 단계는 원하는 배경과 염색된 단백질 밴드가 얻어졌을 때 수행해야 합니다. 12단계 (또는 13단계)의 탈색용액을 따르고, 젤을 덮을 충분한 양의 증류수를 추가합니다.
- 영구 저장을 위해, 젤은 자수프레임에 늘어뜨린 셀로판지 두 장 사이에 고정시켜 말릴 수 있습니다. 젤은 종이처럼 얇아질 때까지 몇 일간 건조합니다. 건조된 젤 주위의 여분의 셀로판지를 자르고, 젤이 말아 올라가는 것을 방지하기 위해 하나 이상의 무거운 책 사이에 젤을 밤새 두고, 연구실 서적에 테이프로 고정합니다.

실험결과 및 분석

다음 연구 문제에 대한 답을 실험 노트북이나 별도의 작업지에 작성하세요.

- 1. 뇌에서 다양한 세포 유형은 무엇인가요?
- 2. 신경세포는 어떤 기능을 하나요?
- 3. 우리는 왜 인간의 특정 세포의 정체성을 그 DNA를 기반으로 판단할 수 없을까요?
- 4. SDS-변성 폴리아크릴아마이드 젤에서 단백질은 어떻게 분리되나요?



Lanes	Contents		
1 and 6	A	Standard Protein Markers	
2 and 7	B	Oligodendrocyte Proteins	
3 and 8	C	Neuron Proteins	
4 and 9	D	Astrocytes Proteins	
5 and 10	E	Microglia Proteins	

