

실험 가이드북



이온교환 크로마토그래피

#ED243

ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

실험 목표

학생들은 2단계의 염 경사도(two-step salt gradient)를 사용하여 두 개의 하전된 분자를 분리하여 이온 교환 크로마토그래피의 원리를 배웁니다.

제품구성

- A Ion Exchanger, CM-Cellulose
- B Concentrated Potassium Acetate (KOAc) Buffer, pH 6.0
- C Blue/green dye
- D Red Dye

크로마토그래피 컬럼

플라스틱 피펫

15 ml 코니컬튜브

원심분리기 튜브

실험 시 필요한 것

8-10ml 정도의 테스트 튜브

컬럼 고정을 위한 링스탠드

100 또는 200ml 비커 또는 플라스크

증류수

5ml 피펫

스펙트로미터와 큐벳 (권장사항)

배경지식

대부분의 생물학적 화합물은 2-10 범위의 pH에 노출될 때 양전하 또는 음전하를 띕니다. pH가 바뀌면 생체분자의 순전하(net charge)는 중성전하에서 양전하 또는 음전하로 변하게 됩니다. 이온교환 크로마토그래피는 영구적인 양전하(양이온) 또는 음전하(음이온)를 가지는 고체 지지체(흡착제)를 사용합니다. 화합물의 분리는 용출 용매와 교환기에 흡착된 분자의 평형을 기반으로 합니다.

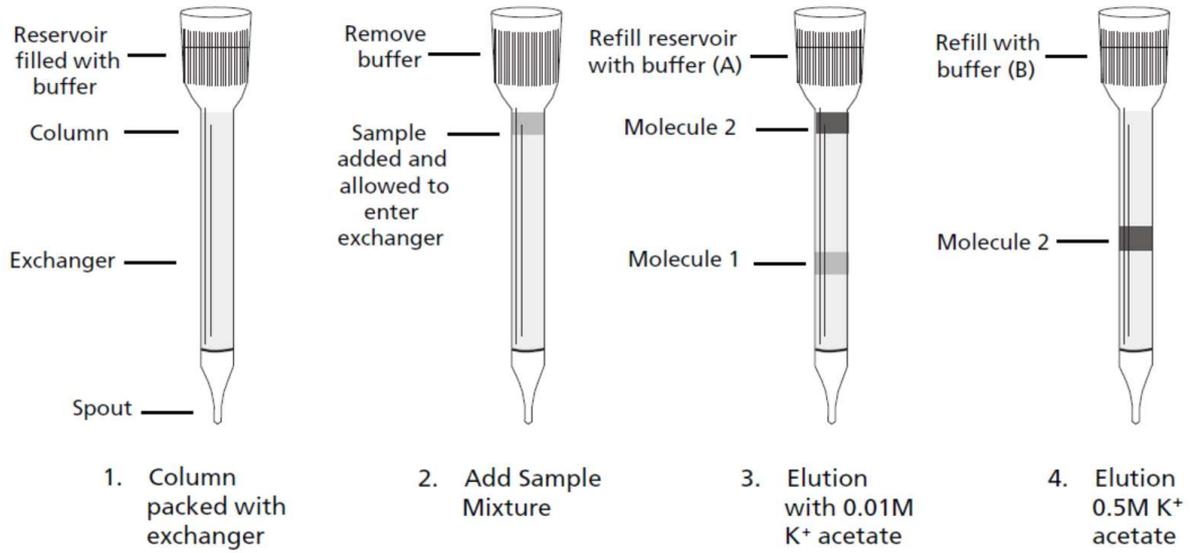
이 평형은 용리 완충액의 이온세기 또는 pH의 변화에 의해 점차적으로 이동되어 교환기에서 정전기력을 약화시키고 분자를 용출합니다. 이를 통해 순전하(net charge)의 작은 차이가 분자를 분리합니다.

고체지지체는 일반적으로 약하거나 강한 이온 교환기를 만들기 위해 작용기에 공유결합된 합성 레진(가교된 폴리스티렌) 또는 셀룰로오스 유도체입니다. 예를 들어 약한 양이온 교환기의 기능적 그룹은 카르복실산이고 강한 교환기는 sulfonate입니다. 마찬가지로 음이온 교환기는 2차 또는 3차 아민의 유도체입니다.

Cation exchangers		Anion exchanger	
-CH ₂ COO	R-SO ₃	-CH ₂ NHR ₂	-CH ₂ NR ₂

양이온 교환기 카르복시메틸셀룰로오스 또는 CM-cellulose는 -CH₂OCH₂COOH로 변형된 셀룰로오스의 -CH₂OH 그룹을 갖습니다. 해당 교환기는 -CH₂OCH₂CH₂N(CH₂CH₃)₂로 대체됩니다. 교환기의 용량은 흡착할 수 있는 표준 물질의 meq/ml 수에 의해 결정됩니다. 셀룰로오스의 경우 단위당 만들 수 있는 치환 횟수에 제한이 있습니다. 너무 많이 치환되면 지지체가 수용성이 됩니다. 셀룰로오스는 합성 수지만큼 쉽게 단백질을 변성(비활성화)하지 않기 때문에 생물학적 활성 단백질에 선호되는 지지체입니다.

흡착과 분리는 분자와 지지체의 정전기적 상호 작용의 차이를 기반으로 합니다.



Molecule 2는 molecule 1보다 큰 힘을 가져야합니다. 이온 강도 또는 pH가 바뀌면 Molecule 1의 용출 점이 molecule 2보다 먼저 얻어집니다. 이온교환 크로마토그래피는 아미노산과 같은 작은 분자와 단백질, RNA, DNA와 같은 큰 분자 모두를 분리하는데 사용할 수 있습니다. 분리할 분자는 서로 다른 전하(양 또는 음) 또는 다양한 정도의 동일한 전하를 가져야 합니다.

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

실험 전 준비 (교사 참고)

A. 버퍼 준비

1. 10개의 작은 비커 또는 플라스크에 “0.5M KOAc” (potassium acetate)라고 표기합니다.
2. Potassium Acetate Buffer, pH6.0 (튜브 B)에서 25mL를 100mL의 증류수와 섞어 희석합니다. 이것은 이제 0.5M KOAc 버퍼입니다.
3. 만들어진 버퍼를 “0.5M KOAc”로 표기한 비커에 10mL씩 옮겨 담습니다.
4. 10개의 작은 비커나 플라스크에 “0.1M KOAc”로 표기합니다.
5. 2번에서 만든 0.5M KOAc버퍼 15mL와 증류수 735mL를 섞어 희석합니다. 이것은 이제 0.01M KOAc 입니다.
6. 만들어진 0.01M KOAc 30mL를 준비한 10개의 비커에 30mL씩 옮겨 담습니다.

Each group requires:

- 1 column attached to a ring stand
- 1 beaker of 0.01 M KOAc, 30 ml
- 1 beaker of 0.5 M KOAc, 10 ml
- 1 tube "sample", 0.5 ml
- 1 test tube of "standard", 6 ml
- 1 tube of ion exchange matrix (slurry), 6 ml
- 3 transfer pipets
- 1 small empty beaker
- 5 ml pipet and pump
- 6 microcentrifuge tubes
- Test tube (8-10 ml capacity) and rack for Sample Quantification (optional)

B. 이온교환 매트릭스(Slurry) 준비

1. 중형 비커(250mL)에 CM-cellulose ion exchanger (튜브 A) 모두를 넣습니다.
2. 0.01M KOAc 150mL를 추가하여 5분간 저어줍니다. 스푼이나 스패츨러로 단단한 덩어리를 부숩니다. 10분간 exchanger가 안정되도록 합니다.
3. Exchanger 대부분이 가라앉고 나면 액체를 조심스럽게 따라내 버립니다. (바닥에 가라앉아 있는 Exchanger가 나오지 않게 각별히 주의합니다.)
4. 0.01M KOAc 150mL를 넣고 간단히 저어 섞어주고 10분간 놔둡니다. 가라앉으면 액체를 조심스럽게 따라냅니다.
5. 0.01M KOAc 50mL를 추가하고 잘 섞이게 저어줍니다.
6. 잘 섞어가면서 6mL씩 키트에서 제공한 15mL 코니컬 튜브에 넣습니다. 마개를 끼우고 각 그룹에 나눠 줍니다.

C. 샘플 혼합물과 스탠다드 준비

1. 10개의 원심분리기 튜브에 “sample”로 표기합니다.
2. 청색/녹색 염료 (튜브C) 2mL를 빨간색(튜브D)에 넣은 후 뚜껑을 닫아 잘 섞습니다. “sample”로 표기한 튜브에 0.5mL씩 넣습니다.

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

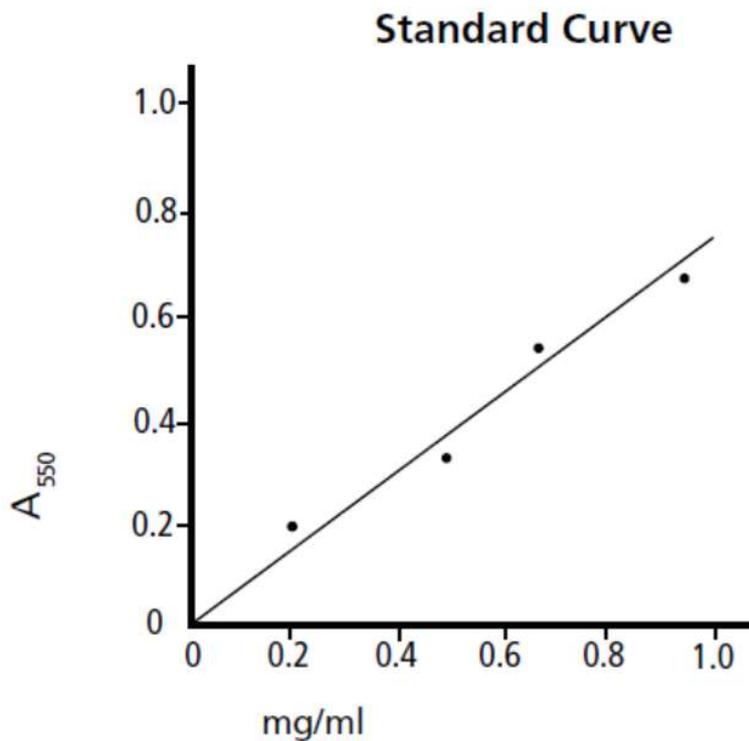
3. 10개의 테스트 튜브에 “standard”라고 표기합니다.
4. 파란색/녹색(튜브C) 6mL씩 “standard” 테스트 튜브에 넣습니다.

실험실패를 줄이기 위해

1. 버퍼를 적절하게 희석합니다.
2. 혼합물에서 물을 따라낼 때 슬러리가 함께 나오지 않게 주의합니다.
3. 컬럼을 쌓을 때 기포와 공기방울이 안생기게 합니다. 이것은 샘플의 흐름을 방해합니다.

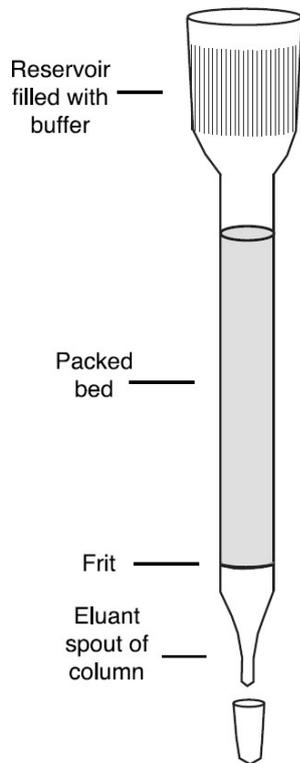
예상 결과

적색 염료는 0.01M KOAc를 첨가한 후 먼저 용출될 것입니다. 0.5M KOAc를 추가한 후 파란색/녹색이 뒤 따라 나올 것입니다.



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

학생 실험 과정



실험 시작 전에 아래의 각 과정들을 한 번 읽어보고 시작합니다.

A. 컬럼 패킹

1. Figure 1과 같이 컬럼을 수직으로 고정시킵니다. 마개를 컬럼 하단의 주둥이에 끼웁니다.
2. 빈 시험관에 물 1mL를 넣습니다. 이것은 나중에 참조 가이드로서 사용됩니다.
3. 컬럼 헹구기 위해 0.01M KOAc로 채웁니다.
4. 아래 마개를 제거해 채운 버퍼를 빼냅니다. 마개를 다시 끼웁니다.
5. 피펫을 사용해 슬러리(slurry) 전체를 잘 섞어가며 컬럼 내벽을 따라 흐르도록 넣습니다. 만약 슬러리가 reservoir 부분에 막힌다면 피펫으로 잘 풀어주면서 컬럼을 채웁니다. 채우는 동안 공기방울이 들어가면 빠질 때까지 컬럼을 두드려줍니다. 공기방울이 빠져나가면 다시 채웁니다.
6. 0.01M KOAc 버퍼를 reservoir에 붓습니다. 컬럼 아래에 빈 비커를 놓고 뚜껑을 열어 슬러리가 잘 쌓이도록 합니다.
7. 0.01M KOAc 버퍼를 추가적으로 부어 슬러리의 윗 부분이 마르지 않도록 합니다.
8. 슬러리가 모두 정렬이 된 후 마개를 닫습니다. Reservoir에 남아 있는 버퍼를 피펫으로 빼냅니다.

B. 샘플 분리

1. 피펫을 이용해 “sample”로 표기한 튜브에서 샘플을 컬럼 표면 층에 넣습니다.
2. 마개를 제거해 샘플이 천천히 들어가도록 합니다. 모두 들어갔다면 표면 층은 공기에 노출될 것입니다.
3. 피펫으로 reservoir에 0.01M KOAc 버퍼를 조심스럽게 천천히 떨어 뜨립니다. (회당 2-3방울씩) 샘플이 컬럼 내부에 완전히 들어간 후 버퍼가 흐르도록 합니다.
4. 적색 염료가 포함된 분획(fraction) 수집
 - 2개의 튜브에 “R”을 표기합니다.
 - 빈 튜브를 컬럼 아래에 잡고 대략적으로 1mL 분획을 수집합니다. (A-2 단계의 튜브를 참조용으로 사용합니다.)
5. Reservoir 안의 버퍼를 모니터링하고 필요한 경우 0.01M KOAc로 다시 채웁니다.

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

6. 빨간색이 컬럼에서 완전히 용출(elute)된 후 컬럼 아래에 비커를 놓고 나머지 0.01M KOAc가 reservoir에서 비워지기를 기다립니다.
7. 피펫으로 천천히 조심스럽게 0.5M KOAc 버퍼를 reservoir에 채웁니다.
8. 청색/녹색 염료가 포함된 분획(fraction) 수집
 - 6개의 튜브에 “G”를 표기합니다.
 - 빈 튜브를 컬럼 아래에 잡고 대략적으로 1mL 분획을 수집합니다. (A-2 단계의 튜브를 참조용으로 사용합니다.)
9. Reservoir의 버퍼를 모티너링하면서 0.5M KOAc를 다시 채웁니다.
10. 녹색 염료가 컬럼에서 완전히 용출된 후 뚜껑을 닫습니다.
11. 각 염료를 용출하는데 필요했던 버퍼의 부피를 측정하여 결과를 각 그룹과 비교합니다.

C. 샘플 정량 (부가실험: 스펙트로미터가 있을 시에)

1. Standard curve를 준비합니다.

A. 표준용액은 1mg/ml 입니다. 다음 과정으로 희석합니다.

1 mg/ml	=	stock	
0.5 mg/ml	=	3 ml of 1 mg/ml	+ 3 ml distilled water
0.25 mg/ml	=	3 ml of 0.5 mg/ml	+ 3 ml distilled water
0.125 mg/ml	=	3 ml of 0.25 mg/ml	+ 3 ml distilled water
0.0625 mg/ml	=	3 ml of 0.125 mg/ml	+ 3 ml distilled water

B. 스펙트로미터에 증류수 샘플을 넣고 파장을 550nm에서 blank 합니다.

C. A_{550} 을 기록하고 Y축에 흡광도를 X축에 청색/녹색 농도를 표시합니다.

2. 샘플

A. 녹색 크로마토그래프 분획을 큐벳에 넣습니다.

B. 각 분획에 대한 A_{550} 을 값을 읽고 기록합니다.

C. 기록을 마친 녹색 분획 모두를 비커나 큰 테스트튜브에 수집합니다. 총 부피를 기록합니다.

D. 섞인 분획의 일부를 큐벳으로 옮기고 A_{550} 값을 읽고 기록합니다.

E. 스탠다드 커브에서 섞인 분획 안의 파란색/녹색 염료의 농도를 계산합니다.

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

- F. 수율을 계산하려면 mg/ml의 농도를 총 부피(mL)에 곱합니다.
- G. 샘플은 0.4mg(1mg/ml의 0.4mL) 파란색/녹색 염료가 들어있는 컬럼에 로드되어 있습니다. 컬럼에서 percentage recovery를 계산합니다.