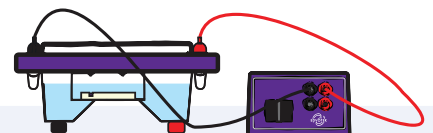


생선단백질의 다양성

Diversity of Fish Proteins

ED253



☎ 02-929-1110 ✉ info@koreasci.com

🛒 www.koreasci.com

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

실험 목표

단백질 프로파일을 기반으로 세 종류의 물고기 간의 관계를 SDS-polyacrylamide 젤 전기영동을 통해 판단합니다.

제품 구성품

시약	보관방법
A 표준 단백질마커 (Standard Protein Marker)	-20°C 냉동보관
B 농어 단백질 (Perch Proteins)	-20°C 냉동보관
C 연어 단백질 (Salmon Proteins)	-20°C 냉동보관
D 월아이피쉬 단백질 (Walleye Proteins)	-20°C 냉동보관

나머지 시약은 실온 보관이 가능합니다.

Tris-Glycine-SDS 버퍼 (10x)

연습용 로딩 용액 (Practice Gel Loading solution)

FlashBlue 단백질 염색약

일회용 피펫

필요 장비 및 준비물

Precast 12% SDS Polyacrylamide gel(3장), 단백질 전기영동 장치, 전원공급장치, 피펫과 피펫팁, 전자저울, 전자레인지(핫플레이트), 250mL삼각플라스크, 안전장갑, 증류수, 염색용 트레이, 에탄올, 비닐랩, 식초, 알루미늄 호일, 비커, 플라스틱 트레이

배경 지식

생선 단백질의 다양성

이 실험은 농어, 연어, 그리고 월아이 생선의 단백질 함량을 조사합니다. 세 종류 생선의 혼합 단백질을 변성시킨 SDS-폴리아크릴아미드 겔에서 분리합니다. 단백질 밴드는 염색되고, 단백질 패턴을 비교합니다. 단백질의 구조와 분자량 분석의 기본적인 절차를 설명하기 전에, 생선에 대한 간단한 배경 정보를 제공합니다.

전 세계에는 크기와 모양이 다양한 20,000종의 뼈 어류가 있습니다. 이들은 뼈로 된 골격을 가지고 있어 "경골어류"로 불립니다. 어류는 특수한 입모양과 훌륭한 기동성을 가지고 있습니다. 경골어류는 지구상의 대부분의 해양 및 담수 서식지를 이용합니다. 이 실험에 사용된 어류는 경골어류 과에 속한 어류입니다.

Perch는 맛이 좋다는 것으로 알려진 민물생선입니다. 수백 종류의 perch가 있으며 대부분의 종류는 평균 무게가 230그램 이하이며 10cm 이상이 되지 않습니다. 이 물고기들은 빠른 바닥 생활자입니다. *Perca flavescens*, 즉 노란색 perch는 미국 동부 및 중서부 지역에서 풍부하게 발견됩니다. 그들의 노란색과 일곱 개의 검은 줄무늬는 이 물고기를 독특하게 만들어 줍니다. 유럽 노란색 perch는 미국 노란색 perch와 매우 유사하여 오랫동안 같은 종으로 여겨졌습니다. Perch는 게, 새우, 수생 곤충의 유충, 벌레, 작은 조개와 달팽이, 그리고 다른 물고기의 알을 비롯하여 모든 것을 먹습니다.

황색 파이크퍼치, 또는 월아이 퍼치 또는 월아이(Walleye), *Stizostedion vitreum*은 무게가 약 1킬로그램인 퍼치과(perch family) 최대 종입니다. 이들은 깊은 물과 호수를 주로 서식지로 선호하며 차가운 물을 선호합니다. 이 생선의 자연적인 색상은 올리브 또는 황색이지만, 사는 장소에 따라 색상이 상당히 달라집니다. 월아이의 측면은 검정색 또는 갈색의 얼룩이 있으며, 정확한 문양이 없고, 첫 번째 등지 지느러미의 마지막 광선에 검정색 또는 갈색의 문양이 있습니다.

연어는 먹이를 포식하는 육식성 물고기로, 연어과(Salmonidae)에 속하는 멤버들은 가장 잘 알려져 있으며 모든 물고기 중에서 중요한 역할을 합니다. 이 그룹의 멤버들로는 송어, 연어, 백어, 드레일링 등이 있습니다. 연어와 그와 관련된 종들은 화석 존재로 1억년 이상의 역사를 지니는 원시 물고기입니다. 연어는 지느러미에 가시가 없습니다. 산소 요구량이 높으며 바다와 밀접하게 연관되어 있습니다. 대서양 연어(*Salmo salar*)는 미지의 강에서 부화되어 염수에서 살고 있습니다. 연어가 염수로 이주한 후에는 산란욕구가 다시 조종하기 전까지 거기에 머무르기가 일반적입니다. 미국 강에서 연어는 10월과 11월에 번식합니다. 연어는 번식을 위해 담수로 돌아가기 전에 장기간 염수에서 지냅니다. 대부분의 큰 연어는 염수에서 약 2년 후에 담수로 들어갑니다. 사실, 특히 큰 물고기인 "메이든maiden"은 처음으로 담수로 돌아가기 전에 더 오랜 기간 동안 염수에서 생활하는 것으로 알려져 있습니다. 그러나 청어와 같은 미성숙한 어종인 "그릴스 grilse"도 때때로 성어들과 함께 번식 여행을 합니다.

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

단백질 화학

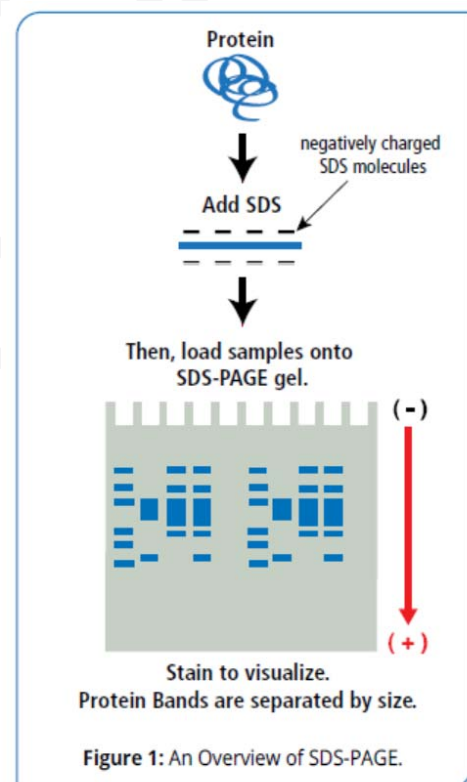
단백질은 매우 다양한 생체분자 중 하나입니다. 전하, 기능성 그룹, 형태, 크기, 용해도 등과 같은 화학적 특성의 차이로 인해 여러 생물학적 기능을 수행할 수 있습니다. 이러한 기능에는 효소 촉매, 대사 조절, 소분자 결합 및 운반, 유전자 조절, 면역 방어 및 세포 구조가 포함됩니다.

시퀀스 변이는 사실상 무한한 수의 폴리펩타이드 집합을 제공합니다. 단백질은 아미노산 조성과 pH에 따라 순수한 음전하거나 양전하를 가질 수 있습니다. 일정한 pH 값에서는 분자가 전반적으로 전하 중성일 수 있으며, 음전하와 양전하가 균형을 이루는 경우입니다. 이 경우, 단백질은 등전점을 갖습니다. 전기장이 존재하는 상황에서, 순수한 전하를 가지는 단백질은 반대 전하의 전극으로 이동합니다.

단백질은 매우 다양한 생체 분자의 일종입니다. 전하, 유기 기능성 군집, 모양, 크기 및 용해도와 같은 화학적 특성의 차이로 인해 많은 생물학적 기능을 수행할 수 있습니다. 이러한 기능에는 효소 촉매, 대사 조절, 작은 분자의 운반, 유전자 조절, 면역 방어 및 세포 구조가 포함됩니다.

아미노산 서열의 차이는 사실상 무제한의 폴리펩타이드 집합을 제공합니다. 단백질은 아미노산 구성과 pH에 따라 순수한 음전하거나 순수한 양전하를 가질 수 있습니다. 특정 pH값에서 분자는 전체적으로 전하가 중성인 즉, 음전하와 양전하가 균형을 이루는 전기적으로 중성인 경우가 있습니다. 이 경우 단백질은 등전점이라고합니다. 전하가 있는 단백질은 전기장이있는 경우 반대 전하의 전극으로 이동합니다.

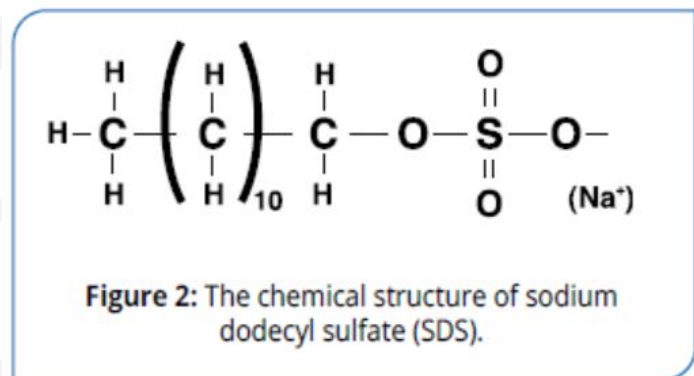
단백질은 그들의 아미노산 서열 및 세포 내 가공에 따라 많은 다른 삼차원 모양과 접힘 패턴을 나타냅니다. 단백질의 정확한 삼차원 구성은 그 기능에 매우 중요합니다. 단백질은 구면, 타원체 또는 막대 모양을 가질 수 있습니다. 분자량은 폴리펩타이드 사슬의 수와 종류의 함수입니다. 하나의 폴리펩타이드 또는 서로 특정하게 연관된 여러 폴리펩타이드로 구성된 단백질이 있습니다. 생물학적으로 활성 상태인 단백질은 비변성단백질이라고합니다.



단백질의 물리화학적 특성은 젤 전기영동시 이들이 이동하는 방식에 영향을 미칩니다. 전기영동에서 사용되는 젤(agarose, polyacrylamide 등)은 분자의 사이즈를 결정하는 미세한 구멍들로 이루어진 분자 여과장치 역할을 합니다. 전기장이 걸려 있을 때, 순자의 전하를 띄고 있는 분자만 젤을 통과하게 됩니다. 작은 분자들은 큰 분자들보다 미세한 구멍들을 더 쉽게 통과하게 됩니다. 같

은 모양과 크기를 가지는 다른 분자들 중에서, 전하가 더 많이 있는 분자는 더 빠르게 이동하게 됩니다. 같은 질량과 전하를 가지고 있는 분자들도 다른 모양을 가질 수 있습니다. 구면과 같이 더 컴팩트한 모양을 가진 분자는 막대와 같이 덜 컴팩트한 분자보다 더 빠르게 이동하게 됩니다. 요약하면, 크기와 전하는 전기영동 이동 속도에 영향을 미칩니다.

Sodium dodecyl sulfate (SDS)는 Figure 2에 나와있는 것처럼 고도로 음전하게 되는 sulfate 기에 결합된 탄화수소 사슬로 구성된 세제입니다. SDS는 대부분의 단백질에 강하게 결합하여 무작위적인 막대 모양으로 펼치게 만듭니다. 이 과정에서 공유 결합은 깨지지 않으므로, 아미노산 구성과 서열은 그대로 유지됩니다. 하지만, 특정한 세포내 단백질의 형태는 없어지므로, 이는 생물학적인 활성을 가지지 않습니다. 구체적인 접힘 패턴과 생물학적 활성이 손상되었지만, 폴리펩타이드 사슬은 그대로인 단백질을 변성된 단백질이라고 합니다. 여러 개의 폴리펩타이드 체인을 포함하고 있는 단백질은 비공약적인 힘에 의해 결합되어 있으며, SDS에 의해 분리되어 각각 denatured 된 폴리펩타이드 체인으로 분해됩니다. 이러한 결합은 동일한 또는 다른 폴리펩타이드 체인 내의 두 시스테인 아미노산 잔여물 간에 형성됩니다. β -mercaptoethanol과 같은 환원제의 높은 농도는 disulfide 결합을 깰 수 있습니다. 이는 SDS가 단백질을 완전히 해리 및 변성시키게 됩니다. disulfide 결합을 유지하는 단백질은 SDS에 적게 결합하므로 이상적인 이동 거리를 나타냅니다. Figure 2는 이러한 아이디어를 나타내며, 이산화설파이드 결합으로 교차 연결된 두 가지 크기가 다른 폴리펩타이드 체인을 포함하는 단백질을 보여줍니다. 체인은 비공유 결합력으로 연관되어 있습니다. 이 원은 원래의 구조를 나타냅니다.



대부분의 경우, SDS는 단위 단백질당 1.4 그램의 비율로 결합합니다. 평균적으로, 결합된 SDS 분자의 수는 폴리펩타이드의 아미노산 잔기가 절반입니다. SDS에 의한 음전하는 아미노산 잔기의 양의 전하보다 훨씬 큼니다. 결합된 SDS의 대량은 단백질 내재적인 전하를 효과적으로 가려줍니다. 따라서, SDS로 변성된 단백질은 순전하고, 또한 이 계산은 단백질의 질량에 비례하므로, 전하 대 질량 비율은 일정합니다. 또한, SDS로 변성된 단백질은 모양이 같습니다(막대 모양). SDS에 의해 변성된 단백질의 유일한 물리적 차이는 막대같은 체인의 크기입니다. 단백질의 분자량이 클수록 막대같은 체인이 길어집니다. 겔의 작은 구멍들은 이러한 크기 차이를 구별합니다. SDS 전기영동에서, 단백질은 분자량에 반비례하여 양극에 향해 겔을 통해 이동합니다. 즉, 단백질이 작을수록 이동 속도가 빠릅니다.

단백질 샘플

표준 단백질 마커는 다음과 같은 변성된 분자량을 제공하는 단백질의 혼합물입니다: 94,000; 67,000; 38,000; 30,000; 20,000; 그리고 14,000 Da. 변성된 값들은 그래픽 분석을 위해 편의상 반올림되었습니다.

Protein 샘플은 SDS에 의해 denatured 되었습니다. 실험 조건에서 단백질은 탄수화물, 지질 또는 다른 생체 분자를 포함하지 않는 것으로 가정하고, 겔에서의 이동성은 단백질의 분자량의 로그에 반비례합니다. 알려진 분자량의 단백질들이 병렬로 전기영동되어 그래피컬 분석을 통해 알 수 없는 것들의 분자량을 추정하는 데 사용됩니다. 모든 단백질 샘플은 버퍼, SDS, 이산화황 결합을 줄이기 위한 환원제, 전극 버퍼보다 높은 밀도를 만들기 위한 수크로스 및 음이온으로 이동하는 bromophenol blue 추적 염료를 포함합니다. 추적 염료는 가장 작은 단백질보다 먼저 양극(하단) 전극쪽으로 이동합니다.

단백질이 이미 염색되어 있으므로, 전기영동 중에 단백질 밴드가 보입니다. Protein InstaStain®으로 겔을 염색하여 미리 염색된 단백질을 더 잘 볼 수 있습니다. 단백질은 고정에 의해 겔 매트릭스 내에서 침전됩니다. 흐린 밴드와 감소된 강도를 일으키는 단백질 확산을 방지하기 위해 고정이 필요합니다.

실험 전 준비

단백질 샘플준비

1. 튜브(A-D) 각각에 130 μ L 의 증류수를 넣고, 샘플이 녹도록 몇 분간 놔둡니다. 튜브를 세게 흔들거나 볼텍싱하여 혼합합니다. 복원된 단백질은 즉시 사용하기 위해 실온에 둘 수 있고, 필요할 때까지 냉동보관할 수 있습니다.
2. 단백질 샘플은 사용하기 전에 원래의 스크류뚜껑이 있는 1.5 ml 원심분리기튜브에서 가열되어야 합니다. 이 단계는 실험실 선생님이 실험 수업 직전에 완료할 수도 있고, 학생들이 수업 도중에 직접 수행할 수도 있습니다. 단백질 샘플을 변성시키는 방법에 대한 지시사항은 모듈 II, 페이지를 참조하십시오.
3. 각각의 6 개 학생 그룹에 샘플을 줄 수 있습니다. 또는, 학생들은 복원된 샘플 stock 튜브를 공유할 수도 있습니다. 학생들은 응집을 피하기 위해 샘플을 따뜻한 상태에서 폴리아크릴아마이드 젤에 넣을 수 있도록 합니다. 각 well 당 넣을 샘플 용량은 20 μ L 입니다.
4. 복원된 샘플의 사용하지 않은 양은 -20°C 에 보관하고, 나중에 사용할 때는 단계 2 를 반복합니다.

전기영동 버퍼 준비

전기영동용 버퍼를 준비하기 위해, Tris-Glycine-SDS 10 배 농도 버퍼 1: 증류수 9 비율을 섞어서 혼합합니다.

Table B Tris-Glycine-SDS Electrophoresis (Chamber) Buffer			
EDVOTEK Model #	Total Volume Required	Concentrated Buffer (10x)	+ Distilled Water
MV10	580 mL	58 mL	522 mL
MV20	950 mL	95 mL	855 mL

EDVOTEK 단백질 전기영동 장치에서 사용되는 1x 전기영동용 버퍼의 대략적인 용량은 Table B 에 나열되어 있습니다. 버퍼는 젤 캐세트의 후면 판을 덮을 정도로 사용합니다.

전기영동 시간과 전압

전기 영동에 의해 샘플이 분리되는 데 필요한 전압과 시간의 길이를 결정할 것입니다. 권장하는 대략적인 시간은 표 A 에 나와 있습니다. 브로모페놀 블루(Bromophenol blue) 추적 염료가 젤의 하단 가장자리 근처에 있는 때까지 젤을 운영하세요.

Table 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.

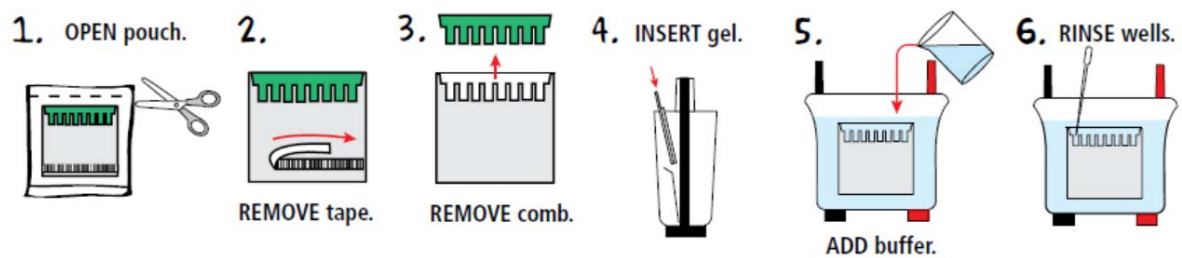
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

젤을 위한 염색 준비

1. 400 mL 의 무색의 식초와 200 mL 의 에탄올을 섞어 화학약품용기에 넣어 "염색/염색제거용 용액"으로 라벨을 붙입니다. 부드럽게 섞어줍니다.
2. 250 mL 의 플라스크나 비커에 125 mL 의 염색/염색제거용 용액을 넣고, FlashBlue™ 단백질 염색 가루 전체를 넣어 잠시 저어주거나 흔들어줍니다. 남아있는 가루는 추가적으로 1 mL 의 염색/염색제거용 용액으로 튜브에서 씻어낼 수 있습니다.
3. 필요할 때까지 두 용액을 실온에서 보관합니다.
4. 2 개의 학생 그룹이 30 mL 의 FlashBlue™ 단백질 염색액, 140 mL 의 염색/염색제거용 용액, 물, 염색용 트레이, 비닐 포장을 공유합니다.

무색의 식초는 간단히 구할 수 있는 조리 및 청소 식초이며, 아세트산 농도는 5-8%이며 pH 는 약 2.6 입니다. 에탄올은 다양한 농도로 구할 수 있는 일반적인 실험실 용품입니다. FlashBlue™ 단백질 염색액은 다양한 화이트 식초와 함께 작동하도록 설계되었습니다. 그러나 95% 이상의 에탄올을 사용하는 것이 좋습니다.

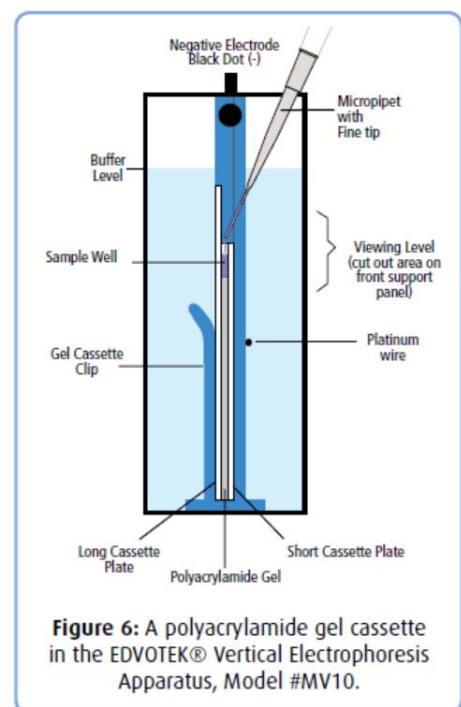
모듈 1: 전기영동을 위한 precast Polyacrylamide gel 준비



참고: precast 폴리아크릴아마이드 젤과 단백질 챔버의 디자인은 약간 차이가 있을 수 있지만, 사용 과정은 유사합니다.

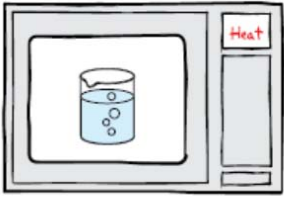
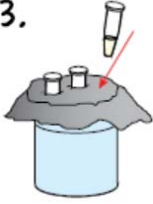
1. 젤 카세트가 든 파우치를 엽니다. 카세트를 꺼내고 짧은 전면 플레이트가 위로 오도록 벤치에 놓습니다.
2. 젤의 전면 플레이트 하단에 스티커나 테이프가 붙어 있을 수 있습니다. 있을 경우 테이프를 제거하여 젤 하단을 드러냅니다.
3. 조심스럽게 콤(comb)을 위로 끌어올려 제거합니다. 콤을 수직으로 올려서 젤이 손상되지 않도록 합니다.
4. 젤을 전기영동 챔버에 넣습니다. 제조업체의 지시에 따라 젤을 배치합니다. 참고: EDVOTEK® 단백질 전기영동 챔버의 경우 짧은 플레이트가 장치 중앙을 향하도록 배치합니다.
5. 희석된 전기영동 버퍼를 챔버에 첨가합니다. 버퍼는 짧은 플레이트 위쪽을 덮도록 합니다.
6. 마이크로피펫을 사용하여 전기영동 버퍼를 각 젤의 웰(well)에 뿌려서 행굽니다. 피펫을 사용하여 콤 제거나 행굽 과정에서 웰(well)을 조심스럽게 펴줍니다.

이제 젤은 연습용 겔 로딩이나 샘플 로딩을 위해 사용할 준비가 되었습니다.



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

모듈 II: SDS-PAGE로 단백질 샘플 분석하기

1. 
2. Cover with foil. 
3. 
4. 
5. Proceed to Gel Loading.

참고: 선생님이 단백질 샘플을 이미 가열한 경우 다음페이지 젤 로딩 단계부터 진행하세요.

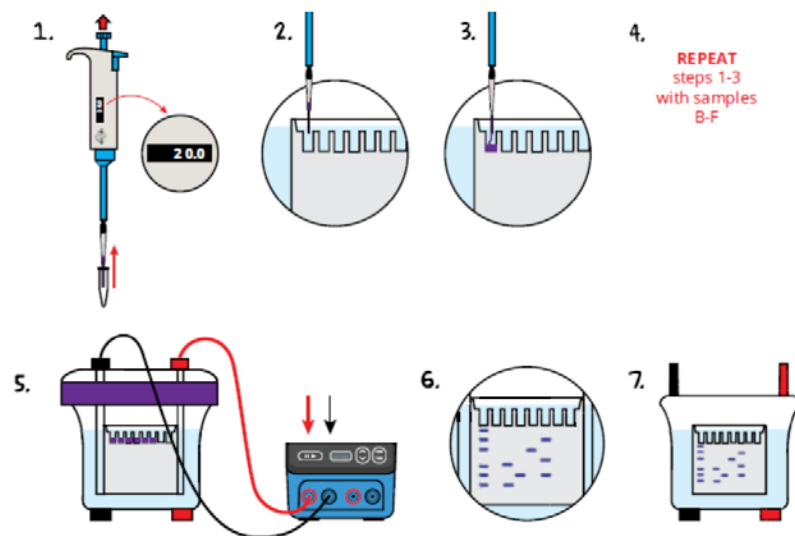
1. 핫플레이트 또는 전자레인지에 물을 끓일 때까지 끓입니다..
2. 알루미늄 호일로 덮습니다.
3. 선생님이 나눠준 샘플 튜브들을 꼭 눌러 닫으세요. 호일에 구멍을 뚫어 튜브를 끼워 물에 떠 있도록 하세요.
4. 샘플들을 5 분간 놔두도록 합니다.
5. 바로 젤 로딩을 진행하세요. 샘플을 개별 원심분리기 튜브에 나누어 담거나 학생들이 공유할 수 있는 곳에 놓아둘 수 있습니다.

경고: 샘플튜브는 스크류 뚜껑으로 잘 닫혀있는 상태로 가열되어야 합니다.



Samples must be boiled in screw top microcentrifuge tubes!

모듈 II: SDS-PAGE로 단백질 샘플 분석하기



PROTEIN SAMPLES LOADING:

1. 새로운 피펫팁을 사용하여 표준 단백질 마커 (튜브A) 20µL을 채취합니다.

2. 버퍼 밑으로 피펫팁을 넣고 샘플을 well 바로 위까지 넣습니다. 뒷면의 접착 판에 부드럽게 당도록 합니다.

3. 서서히 마이크로피펫의 스위치 플런저를 눌러 샘플을 분주합니다.

4. Table 1의 각 샘플마다 팁을 교체하면서 1-3 단계를 반복합니다.

5. 모든 샘플을 로드한 후, 전극 단자 덮개를 조심스럽게 놓고 전기 연결선을 전원 공급 장치에 연결합니다.

6. 전원 공급 장치의 전압을 설정하고 전기 영동을 수행합니다. (시간과 전압 지침은 Table A를 참조하십시오). 단백질이 권장된 시간 동안 격리되도록 하거나 트래킹 염료가 젤의 하단에 도달할 때까지 젤에서 분리되도록 합니다.

7. 전원 공급 장치를 끄고 덮개를 조심스럽게 제거합니다. 이제 젤을 챔버에서 제거하여 염색할 수 있습니다.

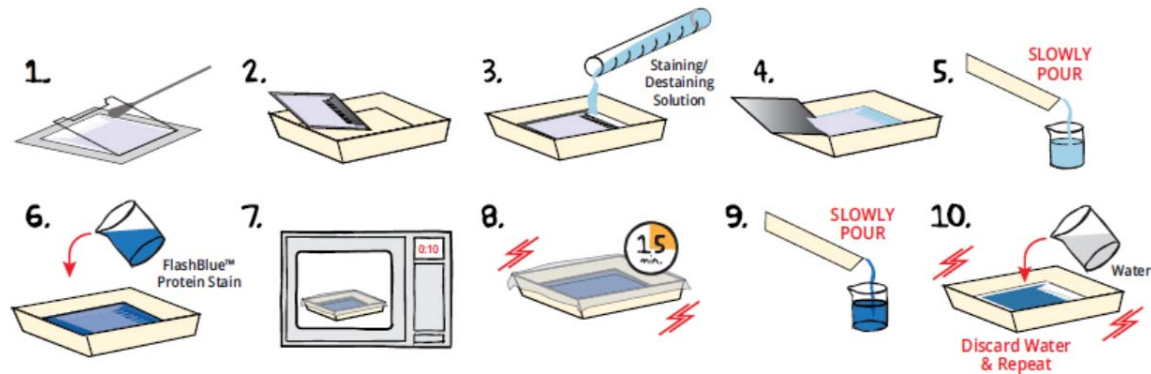
TABLE 1: GEL LOADING		
Lane 1	Tube A	Standard Protein Markers (Group 1)
2	Tube B	Perch Proteins (Group 1)
3	Tube C	Salmon Proteins (Group 1)
4	Tube D	Walleye Proteins (Group 1)
5	---	---
6	Tube A	Standard Protein Markers (Group 2)
7	Tube B	Perch Proteins (Group 2)
8	Tube C	Salmon Proteins (Group 2)
9	Tube D	Walleye Proteins (Group 2)
10	---	---

Table 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.

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

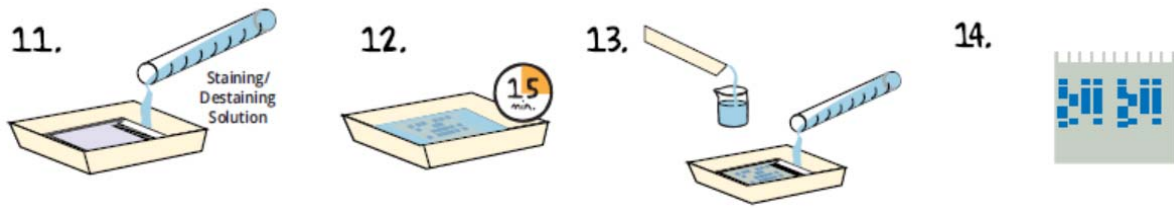
모듈 III: FlashBlue Protein Stain (추가 선택)

선생님이 나눠준 단백질 샘플은 이미 염색된 형태이지만, FlashBlue™ 단백질 염색으로 밴드의 강도를 높일 수 있습니다. 염색은 빠르고 민감합니다.



1. 전기영동 후, 카세트를 눕혀 놓고 얇은 나사드라이버를 측면 가장자리에 놓고 큰 뒷 판에서 부드럽게 들어올리면서 앞 판을 제거합니다. 대부분의 경우, 젤은 뒷 판에 붙습니다. 만약 일부가 앞 판과 함께 떨어진다면, 뒷 판 위로 떨어뜨려주세요. 얇은 젤은 굉장히 부서지기 쉬우므로 매우 조심스럽게 다룹니다.
2. 뒷 판에 있는 젤을 깨끗한 트레이로 옮겨주세요.
3. 충분한 양(약 75 mL)의 염색/염색제거용 용액을 넣어 젤과 뒷 판이 모두 잠기게 합니다.
4. 주의해서 뒷판을 트레이에서 제거합니다. 이 때, 염색/염색제거용 용액이 든 트레이에는 젤만 남아있어야 합니다. 카세트가 제거되면 밴드를 보기 더 쉬울 수 있습니다. 계속하기 전에 젤을 관찰하고, 노트북에 밴드 패턴을 사진을 찍습니다. 참고: 젤이 판에 붙어있다면, 장갑을 끼고 손가락 2개를 사용해 부드럽게 젤을 떼어냅니다.
5. 염색/염색제거용 용액을 버립니다. 이때 젤이 트레이 안에 남아있게 천천히 따르세요.
6. FlashBlue™ 단백질 염색 용액 30 mL을 넣습니다.
7. (선택사항) 비닐랩으로 덮고 10초간 전자레인지에 데워서 용액을 부드럽게 가열합니다.
8. 실온에서 15분간 가끔씩 흔들어가며 염색 용액에서 검은색의 염색 반응을 일으킵니다.
9. FlashBlue™ 단백질 염색 용액을 버립니다. 이때 이 용기 안에 남도록 천천히 따릅니다.
10. 트레이에 물을 추가로 붓고 앞뒤로 가볍게 흔들며 젤을 세척합니다. 물을 버리고 다시 깨끗한 물로 반복합니다.

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



11. 색/염색제거용 용액 30 mL을 추가합니다.
12. 실온에서 15분 동안 인큐베이션 합니다.
13. (선택 사항) 사용한 염색/염색제거용 용액을 버리고 추가적으로 30 mL의 염색/염색제거용 용액을 넣습니다. 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. 결과사진을 찍습니다.

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, 연실 노트에 테이프로 고정합니다.

연구 질문

1. 어떤 생선 단백질의 정제된 제품을 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동으로 분리하였고 염색 후에는 3 개의 주요 밴드가 관찰되었습니다. 같은 단백질이 변성되어 SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동을 하고 염색 후에는 밴드가 3 개 이상이 관찰되었습니다. 결과가 다른 이유를 설명하세요.
2. 단백질의 네이티브 분자량을 DNA 서열에서 구조 유전자를 통해 추정할 수 있습니까? (힌트: DNA 가 전사되고 번역됩니다. 평균 아미노산은 분자량 100 dalton 으로 추정됩니다.)
3. 변성 SDS-폴리아크릴아마이드 젤 분석으로 단백질 혼합물을 분리하고 염색 후에 서로 다른 단백질 밴드를 얻는 이유는 무엇인가요?
4. 만약 β -mercaptoethanol 과 같은 환원제의 존재 유무에 따라 원형 단백질이 SDS 로 변성되면 패턴에 차이가 있을까요?

모듈 IV: 분자량 계산

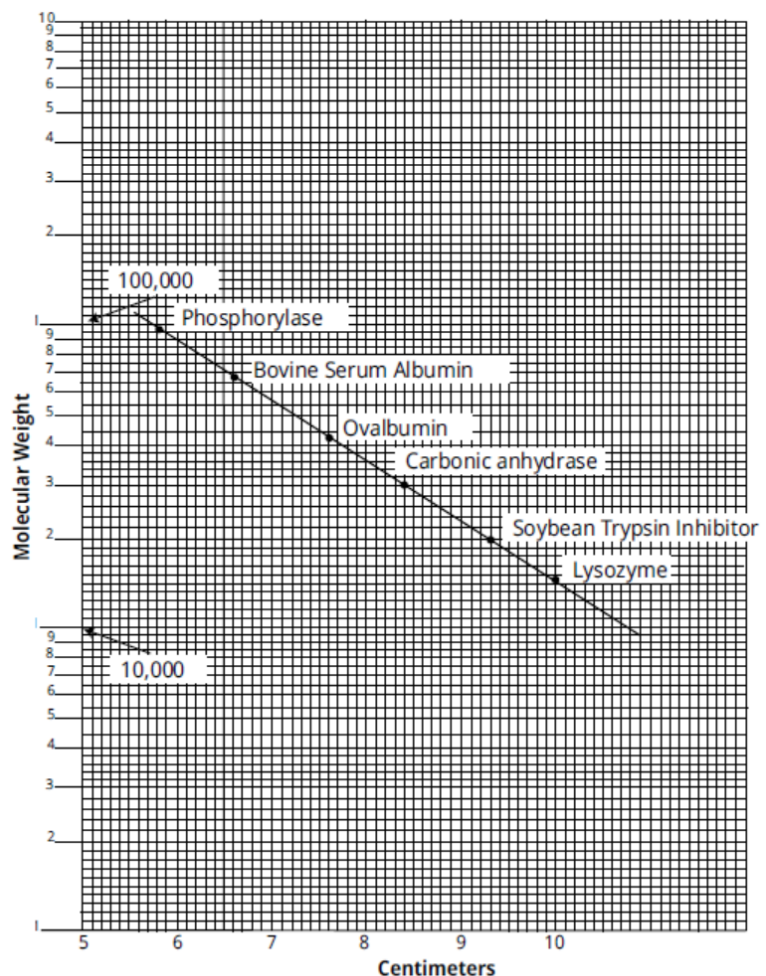
- 모든 주요 밴드의 이동 거리를 센티미터 단위로 측정하십시오 (가장 가까운 밀리미터까지). 모든 측정값은 샘플 well의 하단에서 단백질 밴드의 하단까지 이루어져야 합니다.
- 그래프 용지를 사용하여, 각 표준 단백질의 이동 거리나 상대 이동성(Rf)을 비로그 x-축에, 분자량을 로그 y-축에 그래프로 나타내세요. 데이터 포인트가 잘 분포되도록 축 척도를 선택합니다.

	Migration Distance (cm)	Molecular Weight (daltons)
Marker Protein 1 (Phosphorylase)		94,000
Marker Protein 2 (Bovine Serum Albumin)		67,000
Marker Protein 3 (Ovalbumin)		38,000
Marker Protein 4 (Carbonic anhydrase)		30,000
Marker Protein 5 (Soybean Trypsin Inhibitor)		20,000
Marker Protein 6 (Lysozyme)		14,000
Protein Sample 1		
Protein Sample 2		
Protein Sample 3		

- 모든 점을 통과하는 최상의 평균 직선을 그리십시오. 이 직선은 대략적으로 선의 양쪽에 골고루 분산된 점의 수를 가지고 있어야 합니다. 예를 들어 오른쪽의 그림을 참조하십시오. 이 방법은 선형 근사법(linear approximation)입니다.

- 표준 그래프를 사용하여 3가지 미지의 단백질의 분자량을 결정하십시오. 이를 위해 x 축에서 미지의 밴드의 Rf(또는 이동 거리)를 찾아 표준선과 교차할 때까지 수직선을 그린 후, 교차점에서 y 축을 가로지르는 직선을 그리십시오. 이렇게 하면 대략적인 분자량을 결정할 수 있습니다.

- 그러면 교차하는 부분에서부터 y축까지 직선을 긋고, 그 직선 상에서 근사적인 분자량을 결정할 수 있습니다.



실험결과 및 분석

아래 이상적인 결과물은 해당 단백질 밴드의 상대적인 위치를 나타냅니다. 실제로 밴드는 더 약하게 나타날 것입니다. 상대적인 위치를 보이지만 크기에 대한 비율은 보여주지는 않습니다.

