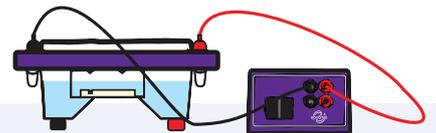

포토당결합 단백질의 친화성 크로마토그래피

Affinity Chromatography of Glucose Binding Proteins

ED277



☎ 02-929-1110 ✉ info@koreasci.com

🛒 www.koreasci.com

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

실험 전 준비

- **Jack Bean Meal(작두콩 분말)**

튜브 B 에 들어있는 Jack Bean meal 0.5g 을 50mL 코니컬 튜브에 넣습니다.

- **Affinity gel**

친화성 겔(튜브 A)를 잘 섞어 균일하게 한 후 튜브나 비커에 1.75mL 씩 넣습니다.

- **1M NaCl**

NaCl 분말(튜브 C)을 550mL 증류수에 용해시킵니다. 각 그룹에 45mL 씩 제공합니다. 60mL 를 추가로 준비하여 아래(NaCl/Dextrose)에서 사용합니다.

- **1M NaCl/ 1M Dextrose**

위에서 준비한 60mL 1M NaCl 에 Dextrose(튜브 D) 모두를 넣고 잘 섞은 후 각 그룹에 5mL 의 1M NaCl/1M Dextrose 를 나눠줍니다.

- **Con A Control (Concanavalin A)**

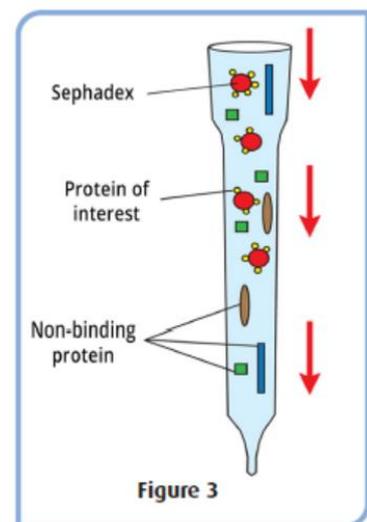
15 μ L Con A Control(튜브 E)를 각 그룹에 나눠줍니다.

(Con A 는 jack bean meal 안에 있는 mannose-binding 단백질입니다. 포도당과 결합은 가능하지만 mannose 결합만큼 강하게 붙지는 않습니다. Con A 가 포도당에 결합하기에 matrix 를 통해 나머지 샘플에서 포도당을 정제합니다.)

- **Membranes**

60mm 페트리디쉬에 맞도록 멤브레인 용지를 3.5 x 3.5 cm 로 자릅니다. 각 그룹에 한 개씩 나눠줍니다. 멤브레인을 취급할 때는 장갑을 끼도록 합니다.

- **Standard Dilution Buffer**



10X Standard Dilution Buffer(튜브 H)를 20mL 10X SDB 와 180mL 증류수와 섞어 희석시킵니다. 희석된 1X SDB 10mL 씩 나눠줍니다. 50mL 는 아래 Horseradish peroxidase 준비에 사용합니다.

· **Horseradish Peroxidase 희석 준비**

Horseradish peroxidase stock (튜브 F)를 1X Standard Dilution buffer 50mL 와 섞습니다. 5mL 씩 각 그룹에 분배합니다.

· **ABTS Substrate**

1. ABTS 반응버퍼(튜브 I) 22mL 를 50mL 코니컬 튜브에 옮겨담고 "ABTS"로 표기합니다.
2. 동결건조된 ABTS(튜브 G)의 뚜껑을 조심스럽게 열고 위 단계의 "ABTS" 0.5mL 를 넣고 뚜껑을 닫은 후 부드럽게 흔들어 섞어줍니다.
3. 3. Re-hydrated(재수화된) ABTS 모두를 'ABTS' 50mL 코니컬 튜브에 옮긴 후 잘 섞습니다.
4. ABTS 2mL 씩 각 그룹에 나눠줍니다.

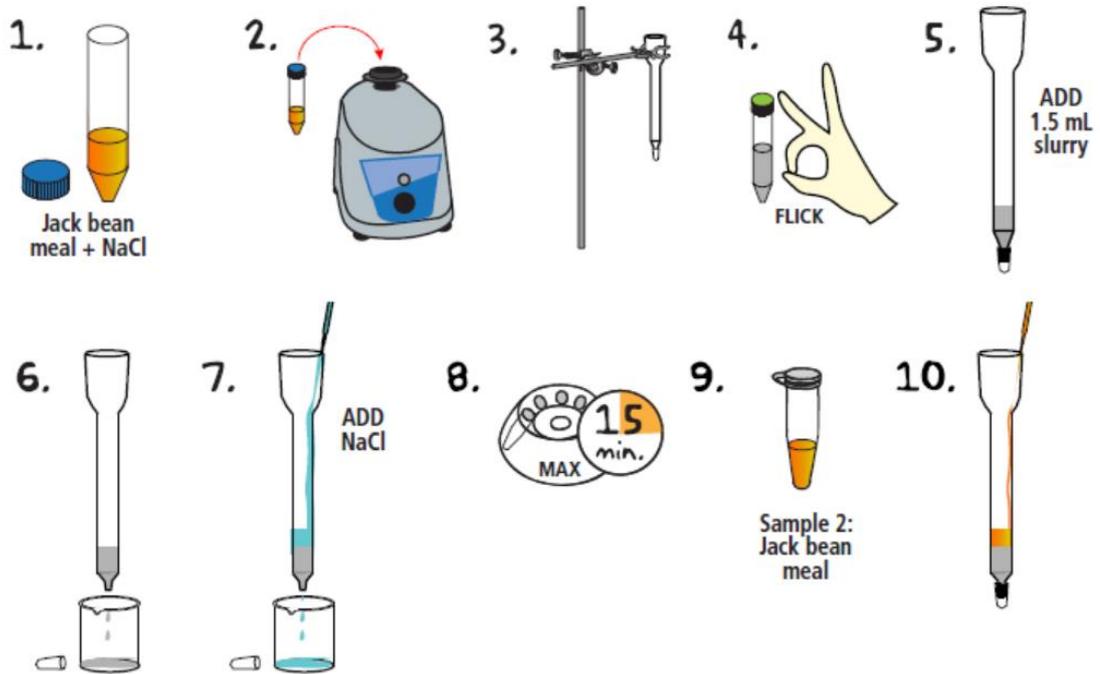
· **Filter Paper**

여과지를 4x4cm 크기로 자르고 각 그룹에 한 장씩 배포하십시오.

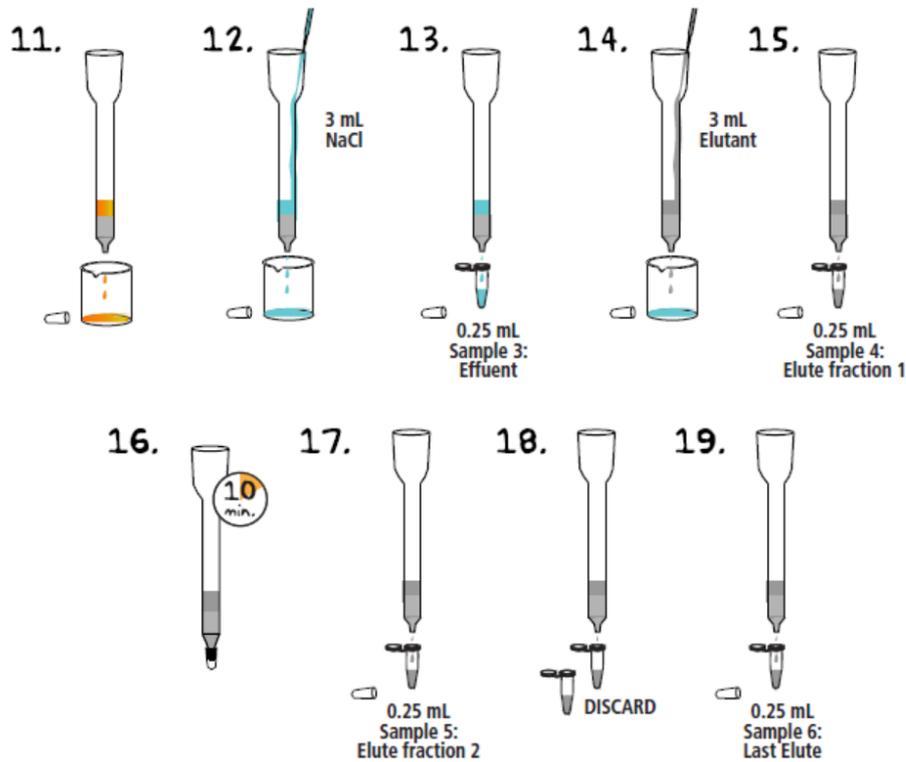
각 그룹 준비물

EACH GROUP WILL RECEIVE:	
Components	Amount
• Jack bean meal	0.5 grams
• Affinity Gel	1.75 mL
• 1 M NaCl	45 mL
• 1 M NaCl/1 M Dextrose	5 mL
• Con A Control	15 µL
• Membrane strip (3.5 x 3.5 cm)	1 piece
• SDB	10 mL
• Horseradish Peroxidase	5 mL
• ABTS Substrate	2 mL
• Filter Paper (4 x 4 cm)	1 piece
• Petri plates	3
• Column/ring stand	1

실험 과정



1. 0.5g의 Jack bean meal 이 들어있는 튜브에 1M NaCl 12mL 를 넣습니다.
2. 볼텍스를 사용해 30 초간 잘 섞도록 합니다.
3. 링스탠드에 컬럼을 수직방향으로 고정시킵니다. 움직이지 않는지 마개가 잘 닫혀있는지 확인합니다.
4. Affinity gel 튜브를 손가락으로 톡톡치며 잘 풀어줍니다.
5. 컬럼안으로 1.5mL affinity 겔을 넣고 겔이 잘 채워지도록 기다립니다.
6. 컬럼 아래에 빈 비커를 놓고 뚜껑을 열어 용출을 시작하여 액체가 흐르게 합니다.
7. Affinity gel 표면이 촉촉하고 액체가 보이지 않으면 1M NaCl 3mL 를 컬럼 벽면에 흘려주면서 넣습니다. 그 후에 겔의 표면은 촉촉해야하며, NaCl 용액이 매우 조금 남아 있어야 합니다.
8. 깨끗한 코니컬 튜브에 Jack bean meal 추출물을 붓고 원심분리기에 2000rpm 15 분간 돌려줍니다. 상층액을 깨끗한 새 튜브로 옮기고 용해되지 않은 조각이 있다면 다시 돌립니다. 펠릿은 버립니다.
9. 추출물 중 0.25mL 를 튜브에 별도로 보관하고 "Sample2"로 표기합니다. 여기에는 침전물이 없어야합니다.
10. 추출물 2mL 를 컬럼에 조심스럽게 부어 충전합니다.



11. 뚜껑을 열어 추출물이 컬럼을 통과하게 합니다. 추출물이 컬럼에 모두 들어가도록 기다립니다. 겔의 표면은 촉촉하게 있어야 하며 추출물은 남아있지 않아야 합니다.
12. 1M NaCl 3mL 로 컬럼을 세척합니다. 2 번을 더 진행합니다. (총 3 회)
13. 컬럼을 1M NaCl 3mL 로 한 번 더 세척합니다. 용출액이 컬럼에 들어가면 추출액 0.25mL 을 튜브에 수집하고 "Sample 3: Effluent"로 표기합니다.
14. 용리액(elutant 1M NaCl/1M Dextrose) 3mL 를 컬럼에 붓습니다.
15. 컬럼서 흐름이 유지되게 하고 첫 0.25 mL fraction 을 튜브에 모아줍니다.
16. 마개를 막아 흐름을 중지하고 컬럼을 10 분간 놔둡니다.
17. 마개를 열어 다시 흘러보내 0.25mL fraction 을 튜브에 수집하고 "Sample 5: Eluate fraction 5"로 표기합니다.
18. 1mL fraction 2 번을 수집한 후 버립니다.
19. 마지막 fraction 0.25mL 를 수집하고 "Sample 6: Last eluate"로 표기합니다.
20. 효소 결합 반응을 위한 다음의 fraction 들이 확보됩니다.

Sample 1 : Con A Control (교사로부터 제공)

Sample 2 : Jack Bean meal 추출물 (9 단계)

Sample 3 : Effluent (13 단계)

Sample 4 : Eluate fraction 1 (15 단계)

Sample 5 : Eluate fraction 5 (17 단계)

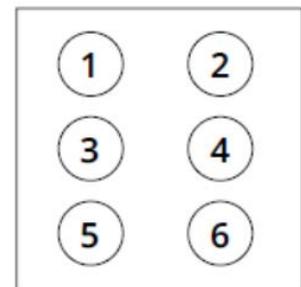
Sample 6 : Last eluate fraction collected (19 단계)

멤브레인에 샘플이동

모든 과정에서 장갑과 집게를 사용해 멤브레인을 다루도록 합니다.

21. 페이퍼타올 위에 멤브레인 한 조각을 올립니다.

22. 마이크로 피펫을 사용해 각 샘플 10 μ L 씩을 멤브레인에 떨어뜨립니다. 다음 그림처럼 옮겨야 합니다.



All samples are applied as shown in the diagram above.

샘플 번호

#1 : Con A Control, 1mg/ml

#2 : Jack Bean meal 추출물

#3 : Effluent

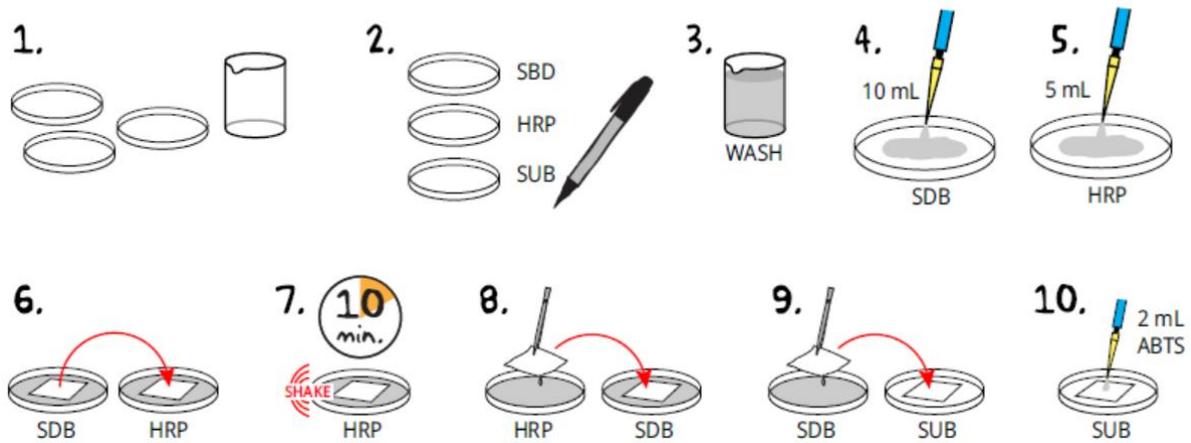
#4 : Eluate fraction 1

#5 : Eluate fraction 5

#6 : Last eluate fraction collected

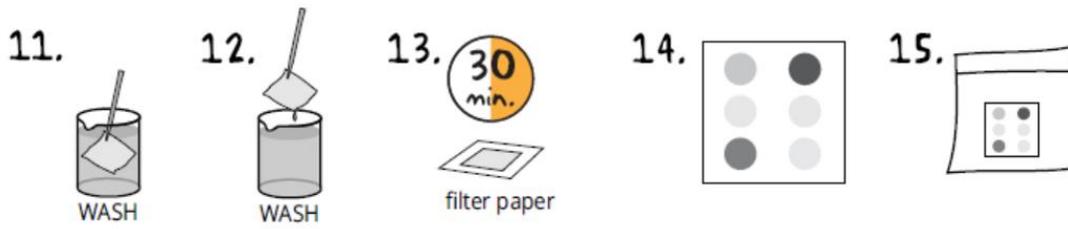
주의: 샘플을 천천히 옮기도록 합니다. 10 μ L 는 대략 10-11mm 지름의 원 보다 작습니다.

23. 15 분간 실온 또는 37°C 인큐베이터에서 멤브레인이 완전하게 마르도록 합니다.



CON A Protein 추출

1. 60mm 페트리 디쉬 3 개와 2~9 단계에 사용할 50mL 비커를 준비합니다.
2. 각 페트리 디쉬에 다음과 같이 표기합니다.
SDB (Standard dilution buffer), HRP (Horseradish peroxidase), SUB (Substrate)
3. 40-45mL 증류수를 비커에 붓습니다. 이 비커에 "Wash"로 표기합니다.
4. 피펫으로 10mL Standard dilution buffer 를 "SDB"로 표기한 페트리디쉬에 넣습니다.
5. "HRP"이 표기된 페트리디쉬에 희석된 Horseradish peroxidase 5mL 를 넣습니다.
6. "SDB" 페트리디쉬에 멤브레인을 담그고 적혀진 멤브레인을 "HRP" 페트리디쉬로 옮겨 담습니다.
7. "HRP"페트리디쉬를 실온에 10 분간 살짝 흔들며 배양합니다.
8. 집게를 사용해 "HRP" 페트리디쉬에서 멤브레인을 들어올립니다. 멤브레인에 스며든 과도한 양의 액체를 떨어뜨려 줍니다. "SDB"페트리디쉬에 멤브레인을 넣습니다.
9. 집게를 사용해 다시 멤브레인을 들어올려 액체를 적당히 떨어뜨린 후 "SUB" 페트리디쉬에 넣습니다.
10. 멤브레인 중앙 위에도 ABTS 기질을 2mL 조심스럽게 떨어뜨립니다. (이 기질은 멤브레인 모든면에 골고루 퍼져야합니다.) 페트리디쉬에 충격을 가해져 멤브레인에서 기질이 튀어나오지 않도록 조심합니다. 30~90 초간 멤브레인이 충분히 흡수가 되어 발색이 되도록 합니다. 멤브레인이 너무 오래두면 색이 어두워지므로 조심합니다.



11. 기질 용액에서 멤브레인을 건져 올리고 곧바로 증류수가 담긴 비커에 담급니다. 올렸다 내렸다 하며 1 분동안 멤브레인을 세척합니다.
12. 멤브레인을 건져 올리고 떨어지는 물방울이 없도록 합니다.
13. 여과지(filter paper)에 멤브레인을 올려 실온에서 30 분간 놔둡니다.
14. 멤브레인이 건조가 되면 1~6 샘플 안의 침전된 기질을 관찰하고 기록합니다. 처음에는 어둡게 보이지만 건조되면서 밝은색을 띄게 됩니다.
15. 밀봉이 가능한 지퍼팩에 멤브레인을 보관합니다.

실험 탐구

1. 0.5mL effluent fraction 을 분석했다면 어떤 패턴의 효소(HRP*) 결합 활성을 예상합니까?
2. Dextrose 는 친화성 겔 컬럼에서 결합된 Con A 를 elute 하는데 사용됩니다. 하지만 결합된 dextrose 는 fraction 을 멤브레인에 흡착하시키기 전에 eluate fraction 을 가진 Con A 에서 제거되지 않았습니다. Dextrose 가 여전히 Con A 결합 부위에 존재하는 경우 Con A 가 HRP*에 결합하는 이유는 무엇입니까?
3. Con A 는 멤브레인에 강하게 흡착되지만 HRP* 단백질은 약간만 결합됩니다. 만약 HRP 가 Con A 만큼 멤브레인에 강하게 결합되면 중간 단계가 수행되지 않는 한 분석이 불가능해질 수 있습니다. 그 중간 단계는 무엇입니까?

실험 결과 분석

침전된 생성물의 점들은 peroxidase substrate solution 에 멤브레인을 담그면 바로 나타납니다. 30~90 초 이후가 강하게 나타납니다.

1. 1mg/ml 의 Con A control 는 적은 양의 침전물을 보여줄 것입니다. 이것은 Con A-HRP 분석이 진행 중이라고 알려주는 대조군입니다.
2. Jack bean meal 추출물은 침전물이 없는 것에서부터 아주 가벼운 침전물에 이르기까지 다양한 명암의 점을 보여줍니다. 이것은 추출물의 Con A 의 농도와 멤브레인에 결합하는 다른 비특이적 jack bean meal 단백질의 농도에 따라 달라집니다.
3. 컬럼을 완전히 세척했다면 effluent 내에 침전물이 없어야합니다. Jack bean meal 에서 약간의 endogenous peroxidase 활성으로 매우 희미한 점이 나올 수 있습니다.
4. 용리액(elutant)이 컬럼을 통과하지 않았기 때문에 Eluate fraction 1 에는 침전물이 없습니다.
5. Eluate fraction 5 에는 강한 양의 침전물이 있고 마지막 eluate fraction 에는 덜 강한 침전물의 점이 있을 것입니다. Eluate fraction 5 는 순수한 Con A 의 가장 많은 양을 가지고 있습니다. 얼마나 많은 Con A 가 컬럼에 붙어 있는지에 따라 Con A 를 가지는 subsequent fraction 이 결정됩니다.
6. 마지막 fraction 은 얼마나 많은 Con A 가 마지막 eluate fraction 에 있는지에 따라 명암이 달라집니다.

- 1: Con A Control
- 2: Jack bean meal extract
- 3: Effluent
- 4: Eluate fraction 1
- 5: Eluate fraction 5
- 6: Last eluate fraction collected

