

중공사막 흐름장 흐름 분획법을 이용한 단백질의 분리

남현희, 위은영, 민병렬
연세대학교 화학공학과

Protein separation in Hollow Fiber Flow Field-flow fractionation

Hyun Hee Nam, Eun Young Wey, Byuong Ryul Min
Department of Chemical Engineering, Yonsei University

1. 서론

모든 생물은 생체구성물질과 생리기능물질로써 물, 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질 등을 함유하고 있다. 20가지의 아미노산으로부터 무수한 종류의 단백질이 합성되며, 이들은 다양한 구조와 기능을 갖고 있다.

단백질에 대한 연구를 위해서는 먼저 어떤 세포 또는 조직에 있는 다양한 물질로부터 단백질을 분리, 정제하여 순수한 단백질을 얻는 것은 필수적이고 특성분석을 위해서는 분해되거나 변질되지 않는 조건에서 빠른 분리 분석이 이루어져야한다.

본 연구에서는 flow FFF방법을 선택하여 단백질의 용리거동을 고찰하고 최적 분리 조건을 설정하기 위한 기초연구를 수행하고자 한다. Flow FFF는 단백질분석에 있어서 생체 내에서의 유사한 조건에서 분리가 이루어지기 때문에 변성되지 않고, 빠른 시간에 분석이 이루어질 수 있으며, 구조에 대한 많은 정보를 얻을 수 있는 장점이 있다. 중공사막을 이용할 경우 분리관의 제작에 비용이 대폭 절약됨은 물론 크로마토그래피용 칼럼처럼 소모품처럼 저렴하게 교체할 수 있는 분리관으로의 응용이 가능하다.

2. 이론

장 흐름 분획법(field-flow fractionation, FFF)은 액체크로마토그래피의 경우 정지상에서 유발되는 분석물질들의 흡착 또는 변형을 제거할 수 있는 장점을 지니고 있다. 이 방법은 액체 크로마토그래피와 유사하나, 분리가

일어나는 분리관은 정지상을 이용하는 컬럼대신 속이 빈 채널을 사용한다는 점이 크게 다르다. 컬럼의 막힘 현상이 없으며, 분리 메커니즘을 규명하여 정확히 머무름 시간을 예측할 수 있다. 장 흐름 분획법을 이용하여 분리 가능한 영역은 분자량이 약 10^3 Da에서부터 10^{14} Da이고 입자의 크기는 수nm에서부터 약 $100\mu\text{m}$ 까지이다.

중공사막의 벽쪽의 유속은 점성 끌림에 의해 느려지고 가운데 쪽으로 갈수록 유속이 빠른 포물선형 흐름이 형성된다. 그리고 외부에서 걸어주는 힘이 분리의 추진력(driving force)이며 이 외부장은 이동상의 흐름 방향에 대해 수직으로 작용하면서 분석물질의 흐름을 각 분석물질의 특성에 따라 지연시키게 된다. 외부장이 가해지면 채널 내에서 분석물질들은 누적벽으로부터는 분석물질들의 브라운 확산에 의해 반대로 이동하여 정류상태(steady-state)를 이루게 된다. 크기가 작은 입자들은 큰 입자들보다 상대적으로 확산이 커서 채널 누적벽에서부터 높은 위치에 평형을 이루게 되며 빠른 흐름층에 속하여 작은 입자들이 먼저 용리되고 큰 입자들이 나중에 용리된다.

흐름장 흐름 분획법은 입자의 유체 역학적 부피에 의해 머무름 시간이 결정되며 외부장으로 채널 흐름과 직각방향으로 이동상과 같은 조성의 교차흐름을 주어 분석물질들을 누적벽으로 밀어준다. 각 분석물질들의 확산계수(diffusion coefficient)와 Stokes 직경등의 인자에 의해 크기별로 분리가 가능하며, 이 방법은 콜로이드 및 입자형태의 물질의 분리에 이용되면 특히 이동상의 적용범위가 넓고 생체 내에서의 유사한 조건에서 실험을 수행할 수 있기 때문에 생체 고분자, 단백질 응집체, 수용성 고분자들의 분석에 매우 유용하다.

3. 실험

분획 분자량이 50,000, 내부 지름이 0.83mm인 중공사막(Polyacrylonitrile, KMST)을 Teflon tube에 삽입한 후 reducing union 및 Tee를 사용하여 24cm인 채널을 제작한다. 이렇게 제작한 채널에 유체를 일정하게 pumping 하면서 metering valve를 이용하여 흐름을 조절하여 흐름장(flow-field)을 형성한다. 이동상은 0.02%의 NaN_3 을 첨가한 0.25mM의 Phosphate buffer solution(pH=6.5)을 사용하였다.

4. 결과 및 토론

중공사막내에서의 유체의 흐름조건을 최적화하여 기존의 방식인 평판형 컬럼의 장 흐름 분획법과 대등한 분리능과 분리효율을 얻을수 있었다.

Acknowledgments

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(No. R01-2001-00420)지원에 의하여 연구되었기에 이에 감사드립니다.

5. 참고문헌

1. K.G. Wahlund and J.C. Giddings, *Anal. Chem.*, 59, 1332 (1987)
2. J.C. Giddings, *Science*, 260, 1456 (1993)
3. W.J. Lee, B.R. Min, and M.H. Moon, *Anal. Chem.*, 71, 3449 (1999)
4. M.H. Moon, K.H. Lee and B.R. Min, *J. Microcol. Sep.*, 22, 676 (1999)
5. J.A. Carlshaf, *Anal. Chem.*, 61, 11 (1989)
6. M.H. Moon, I.M. Hwang, *J. Liq. Chro. & Technol.*, 24(20), 3669 -3083(2001)

Table 1. Molecular Weight and Isoelectric Point(pI) of Proteins Used in This Work.

Proteins	M.W.	pI	Source
Albumin(BSA)	66,000	4.9	Bovine Serum
γ -globulin	150,000	7.0	Bovine
Ferritin	443,000	5.0	Horse Spleen
Thyroglobulin	667,000	4.4	Bovine

Figure 1. Schematic diagram of HF⁵ system.

