

단백질의 능률적인 분석실험법 (실험지도를 중심으로)

신 형 준

서강전문대학

The Efficient Analysis Test Method of Protein

Houng-Jun Shin

Seo Kang Junior College

ABSTRACT

Paper chromatography and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation method were used for refinement and separation of proteins.

Color reaction was tested by Biuret test, Million test, Xanthoprotein test, and Ninhydrin test. Precipitation reaction and coagulation of proteins were tested by heating method(Ethanol, HNO_3).

I. 서 론

유기화합물 실험을 하다 보면 매년 단백질에 대한 실험을 하게 되는데 전문대학 과정에 알맞는 실험지도 자료가 부족해 실험지도에 일관성이 없어 주로 교재내용을 기준으로 실험을 해 왔는데 교재에 표시된 내용이 너무 형식적이고 단편적이어서 학생들에게 이해시키기가 어려웠던 점을 감안하여 실험지도를 하면서 단편적으로 실시했던 실험부분을 종합해서 연결시켜주면 학생들이 단백질을 이해하는데 도움이 되리라 믿으며 종래 시범실험으로 끝냈던 부분도 직접 조별로 실험을 할 수 있도록 확인실험을 시도하였다.

II. 재료 및 실험방법

1. 재 료

시중에서 계란을 구하여 흰자를 분리 사용하였다.

2. 실험방법

단백질의 분리 및 정제는 황산암모늄을 이용한 투석법과 paper chromatography 실험에 의해 실시했으며^{1~5)} 정색반응은 Biuret test, Million test, Xanthoprotein test · Ninhydrin test의 실험을 실시했다^{6~7)}. 침전 및 응고반응은 ethanol, HNO_3 , 가열에 의한 실험을 실시하였다⁸⁾.

1) 단백질의 분리 및 정제

황산암모늄침전법: 계란흰자 10 ml를 취하여 50 ml의 물을 가한 후 NaCl 3g을 가하여 투명하게 한 다음 황산암모늄 포화액(물 100 ml에 황산암모늄 74 g) 40 ml를 가하면 백색침전이 생기는데

한시간 방치한 후 여과하여 얻어진 globulin 량*을 측정한다⁹⁾. 남은 여과액에 황산암모늄 8g을 가하여 포화시킨 후 침전물 albumin을 얻어 투석법**에 의해 정제한다¹⁰⁾.

Paper chromatography 법:

① 1차원법: Chromatography 용 거름종이(가로 3cm, 세로 30cm)에 한쪽끝에서 약 1.5cm 높이에 원점을 표시한 후 모세관으로 분리할 시료액을 원점 중앙에 찍어 시료의 원형점을 만들고 바람에 건조시킨 후 전개용매(n-butanol: conc HCl: H₂O = 10:2:3)가 들어있는 통속에 넣어 매달게 되면 이동상인 용매가 종이에 닿는 순간 서서히 스며들어 올라가는데 표시해둔 선단까지 용매가 침투하면 꺼내어 원점을 아래로 하여 건조시켜 거름종이가 축축해지면 25cm쯤 간격을 두고 분무기로 정색시약(황화수소와 수산화암모늄 혼합액)을 뿌어준다^{11~13)}.

② 이차원법: 거름종이 끝에서 5cm의 원점에 시료를 묻히고 바람에 말린 후 2차원법용 유리에 감아서 전개용매 증기를 포화시킨 전개기에 5분 방치후 전개용매용기에 약 1cm의 깊이까지 전개용매(butanol: CH₃COOH: H₂O = 4:1:2)를 넣어 전개시킨다.

상승법으로는 높이 20cm까지 전개후 전개액의 상단에 연필로 표시한 후 원점을 아래로 하여 건조시키고 새로운 전개용 유리에 다시 감아 새로운 전개용매증기에 5분 방치한 후, 물로 포화시킨 석탄산과 마찬가지로 방법으로 전개하고 건조후 석탄산을 증발시킨 다음 Ninhydrin액으로 정색하면 청자색이 나타난다.

2) 정색반응

Biuret test: 시료(흰자 10ml에 물 50ml 섞은 액) 10ml를 취하여 4% NaOH 용액 4ml를 섞은 후 1% CuSO₄ 2방울을 떨어뜨린 후 색조를

관찰한다¹⁴⁾. (Table 1)

Million mercuric Nitrate test: 시료 10ml에 밀론시약*** (수는 4g과 진한 질산 6ml를 섞어 가열하여 녹인 후 물 12ml를 가한 액) 2ml를 가하여 백색침전이 나타나면 50°C로 가열하여 색조를 관찰한다¹⁴⁾ (Table 1).

Xanthoprotein reaction: 시료 10ml에 진한 질산 3ml를 가한 후 40°C로 가온하여 색조를 관찰한다 (Table 1).

Ninhydrin reaction: 시료 10ml에 1% Ninhydrin액 3ml를 가하고(이때 한방울씩 서서히 가함) 묽은 HCl 2ml를 넣어 50°C로 가열하면 청자색을 나타낸다 (Table 1).

3) 침전 및 응고반응

시료(흰자 10ml에 물 50ml 섞은 액) 40ml를 취하여 4개의 시험관에 각각 10ml씩 넣은 후 ethanol 1ml, 진한 질산 0.5ml, 1% 제이수는 0.1ml를 각각 넣으면 유백색¹⁵⁾으로 응고하며 남은 시험관에 황산암모늄 4g을 넣으면 백색침전이 생긴다****.

III. 결과 및 고찰

정색반응의 결과 색조는 Table 1과 같다.

Biuret test에서 주의해야할 사항은 황산용액을 많이 넣을 경우 황산동 자체색인 파란색으로 정색을 혼동할 우려가 있다.

침전 및 응고반응에서는 10~80°C까지의 온도별 응고량과 질산 0.5~10ml까지 가했을때의 응고량을 측정된 결과는 Table 2와 Table 3과 같다 (실험지도할 때는 온도와 HNO₃량을 조별(8개조)로 다르게 실험하도록 한다).

Table 2에서는 70~80°C에서 가장 많은 응고현상을 보였으며 Table 3에서는 0.5~1ml의 소량

*측정치: 7g(조별로 측정하여 비교)

**투석법: 조별 실험에서는 반투막으로 세로판 주머니를 사용한다.

***밀론시약주성분: [Hg(NO₃)₂] [Hg₂(NO₃)₂] [HNO₂]조별로 색 비교

****4개조에 각각 다른 시약을 주어 결과를 비교

Table 1. 정색반응의 색조

반응명	반응시약	색조
Biuret test	NaOH · CuSO ₄	자색
Millon mercuric Nitrate test	Hg(NO ₃) ₂ Conc HNO ₃	적색
Xantho protein test	HNO ₃	황색
Ninhydrin test	Ninhydrin액	청자색

Table 2. 온도별 응고량

온도(°C)	응고량(g)	온도(°C)	응고량(g)
10	0	50	6.2
20	0	60	6.5
30	0.4	70	7.5
40	2.5	80	8.3

(시료: 온도별 10 ml)

Table 3. HNO₃량별 응고량

HNO ₃ (ml)	응고량(g)	HNO ₃ (ml)	응고량(g)
0.5	8.5	4	2.5
1	7.5	6	2.0
2	6.0	8	1.5
3	4.5	10	0

(시료: 각 10 ml)

의 HNO₃에서 많이 응고한 단백질이 과량의 HNO₃에 의해 다시 녹는 현상을 보였다.

IV. 결 론

본 실험을 하기 전에는 유기화합물 실험중 단백질 관계 실험을 교재내용에 주로 의존해서 Paper chromatography 법, Biuret test, 가열법실험 등 단편적인 실험을 하거나 여건상 시범실험으로

만족하는 경우가 많았는데 본 실험결과로 단편적으로 했던 실험을 종합해서 연결실험을 할 수 있게 되었고 시범실험을 하였던 부분을 학생조별로 직접 실험을 할 수 있도록 구성했으며 기존교재에 간단히 표시된 부분도 확인실험을 통하여 자세히 알게 되어 학생들이 단백질을 이해하는데 도움이 되리라 믿는다.

더 큰 의미는 실험교재 참고자료로 이용되어 실험지도하는데 있다고 본다.

V. 참고문헌

- Murray, R.K.: *Harper's Biochemistry*, 21th ed., Appleton & Lange(1988)
- Greighton, T.G.: *Proteins*, W.H. Freeman(1983)
- Cooper, T.G.: *The Tools of Biochemistry*, Wiley(1977)
- Bender, D.A.: *Amino Acid Metabolism*, 2nd ed., Wiley(1985)
- Meister, A.: *Biochemistry of the Amino acids*. 2nd ed., Academic press(1965)
- Murray, R.K.: *Harper's Biochemistry*, 2th ed., Appleton of Lange(1988)
- Stryer, L.: *Biochemistry*, 3th ed., Freeman(1989)
- Mathews, C.K.: *Biochemistry*, Benjamin(1990).
- Webber, T.J.N. and McKerrell: *J. Chromatogr.*, **147**, 59(1978)
- Cassidy, R.M., Le Gay, D.S. and Frei R.W.: *Anal Chem.*, **46**, 340(1974)
- Cox, G.B., Liscomb, C.R., Slncutt, M.L., Sadger, K. and Upfield, J.A.: *J. chromatogr.*, **117**, 269(1976)
- Linder, H.R., Keller, H.P. and Frei,

- R. W. : *J. Chromatogr. Sci.*, **14**, 234 (1976)
13. Chang, S.H., Gooding, K.M. and Regnier, F.E. : *J. Chromatogr.*, **125**, 103 (1976)
14. Bristow, P.A. and Knox, J.H. : *Chromatographia*, **10**, 279 (1977)
15. McNair, H.M. and Chandler, C.D. : *J. Chromatogr. Sci.*, **4**, 477 (1976)
-
- (1990년 10월 11일 수리)