실험 제목	실험교사 성명
Bradford assay를 통한 단백질 정량	

학교명	반	번호	이름

1. 실험 목표

우리 몸에서 호르몬 혹은 효소로 발현하는 단백질을 정량할 수 있는 Bradford assay를 수행하여 우유의 단백질 양을 측정할 수 있다.

2. 배경 이론

1) 단백질 구조

단백질은 생명체의 생존에 핵심적인 기능을 담당하며 생명체의 거의 모든 활동에 참여한다. 단백질의 기본 단위는 아미노산 (Amino acid)이며, 아미노산의 배열 순서에 따라 단백질의 종류가 달라진다. 아미노산의 기본 구조는 탄소 원자가 중심에 있고, 여기에 아미노기($-NH_2$), 카복시기(-COOH), 수소 원자(-H), 작용기(-R)가 결합되어 있다.(그림 1)

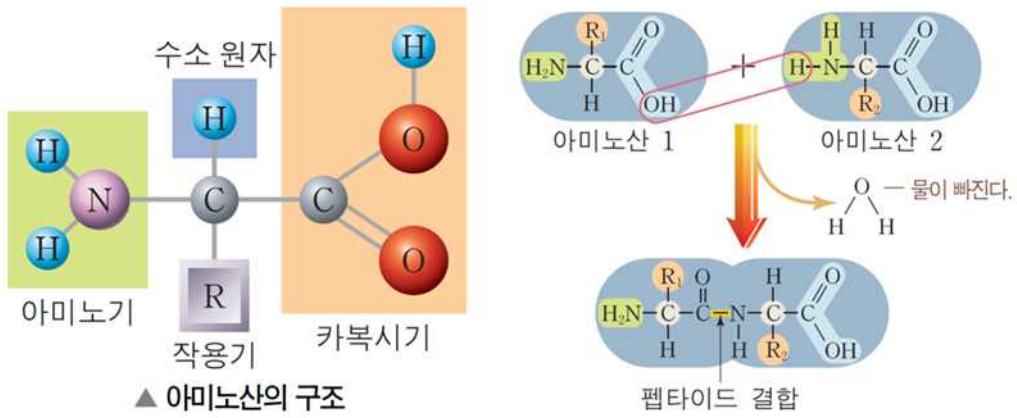


그림 1 아미노산의 구조와 펩티드 결합

작용기의 종류에 따라 20여 종류의 아미노산이 존재한다. (그림 2) 아미노산들의 한쪽 아미노기와 다른 쪽 카복시기가 탈수 축합을 통해 화학결합을 형성한 것을 펩티드 (Peptide)라 부르며, 단백질은 일반적으로 100개 이상의 많은 아미노산이 펩티드결합 (Peptide bond)으로 결합되어 폴리펩티드 사슬(Polypeptide chain)을 이룬다.

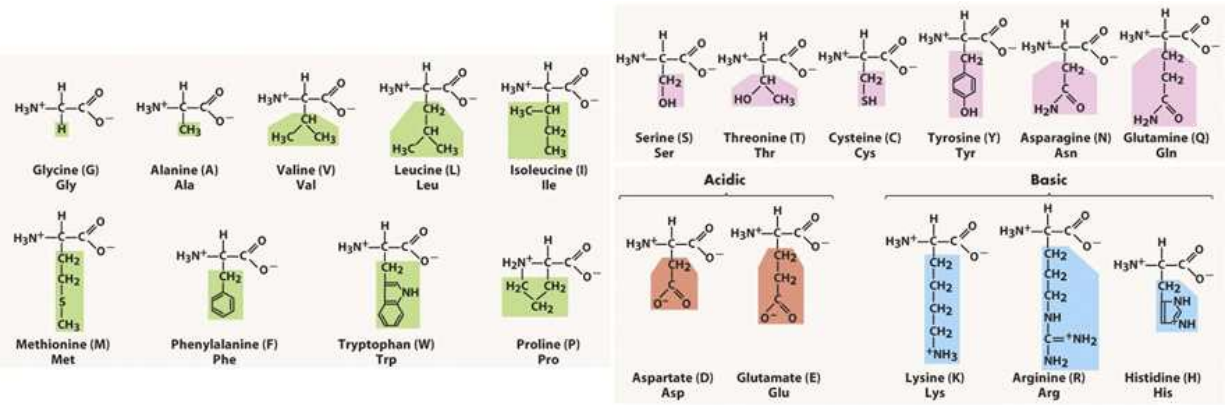


그림 2 아미노산의 종류

2) 단백질 정량

단백질 농도를 정량하는 방법은 크게 amino acid analysis, spectrometric method, colorimetric method, nitrogen analysis 등으로 분류할 수 있으며 각 분류, 세부 시험방법에 따라 측정 원리, 감도, 소요시간, 방해물질에 대한 저항도 등에 차이가 있으므로 측정할 대상에 따라 적당한 방법을 선택하여야 한다.

(1) Biuret method

뷰렛법은 가장 고전적인 비색 정량법이다. 알칼리 조건 하에서 Cu^{2+}를 단백질용액과 반응시키면 Cu^{1+}로 되어 펩티드결합과 적자색의 complex를 형성, 이를 분광광도계로 측정한다. 감도는 낮지만, 단백질의 종류에 따른 발색의 차이가 적고 (구리가 펩티드 nitrogen에 결합하므로 아미노산 조성에 따른 차이 없음), 계면활성제의 영향을 잘 받지 않는다.

(2) Lowry method

로리법은 뷰렛법을 보다 발전시킨 방법이며 두 단계 반응으로 이루어진다. 먼저 단백질용액을 알칼리성 조건 하에서 Cu^{2+}와 반응시킨 후 (뷰렛반응) Folin 시약을 첨가하면(폴린-시오칼토 반응) Cu^{1+}에 의해 phosphate molybdenum acid-tungsten acid complex가 환원되어 파랗게 발색된다. 검액 중 총 단백질 정량에 사용되는 가장 정확한 방법이지만 계면활성제, EDTA 등의 킬레이트제, DTT와 2-mercaptoethanol 등의 환원물질에 의해 방해를 받는다.

(3) Bicinchoninic acid(BCA) assay

BCA법은 로리법을 개량한 것으로 알칼리 조건 하에 Cu^{2+}가 Cu^{1+}로 변화하는 원리 라는 측면에서 유사하다. Folin 시약 반응 대신에 bicinchoninate가 Cu^{1+}와 복합체를 형성해 자색으로 발색하는 반응을 이용한다. 로리법과 비교해서 방해물질, 특히 계면 활성제의 영향을 받지 않으며 알칼리 조건에서 안정적이므로, 두 단계 반응이 필요한 로리법과는 달리 한 단계 반응으로(562 nm 흡광도 측정) 결과 확인이 가능하다는 장점이 있다.

(4) Bradford method

Bradford법은 Coomassie brilliant blue G-250 (CBBG)라고 하는 색소가 단백질의 염기성과 방향족 아미노산 측쇄와 결합하여 흡광도 피크가 465 nm에서 595 nm로 이동하는 것을 이용하는 방법이다. CBBG가 free dye 형태로 있을 때의 최대 흡수 파장은 465 nm (Red)이지만, 아미노산과 결합하면 최대 흡수 파장이 595 nm (Blue)로 변화한다. BCA법과 비교해 보다 간단하고 신속하며 감도가 높으나 계면활성제의 영향을 쉽게 받으며 반응액이 산성이기 때문에 지질을 대량으로 함유하는 검액에서 침전을 형성하기도 한다.

3) Bradford assay의 원리

분광 광도계 (UV-Visible spectrophotometer)를 이용, 흡광도를 측정하여 표준물질(Standard)인 BSA (Bovine Serum Albumin)를 기준으로 측정하고자 하는 시료에 단백질이 얼마만큼 들어 있는지 측정하는 정량 방법이다.
여러 농도의 BSA를 만들어 (반드시 '0' 농도 포함) Bradford 시약을 넣은 후 반응시켜 595nm에서 흡광도 측정을 하고 그 결과값을 이용해 표준곡선 (Standard curve)을 그린다. 이때 표준곡선은 1차함수로 회귀하므로 직선형에 가까울수록 신뢰도가 높아진다. 그런 다음 정량하고자 하는 단백질이 들어있는 시료를 Bradford 시약을 처리해 흡광도를 측정해 이미 농도를 알고 있는 표준곡선에 흡광도 값을 대입함으로써, 농도를 도출하여 단백질을 정량할 수 있다.

(1) 회귀분석

두 변수 간의 관계를 하나의 직선 (선형의 식)으로 추정하여 두 변수 간의 인과관계를 분석하는 기법을 선형회귀분석 (linear regression analysis)이라고 한다. 선형회귀분석을 수행하고자 할 때에는 종속변수(Y)와 독립변수(X) 간의 관계를 가장 잘 나타낼 수 있는 직선을 구해야 하며 이를 추정된 회귀직선 (Estimated regression line)이라고 한다. 회귀분석에서 독립변수

와 종속변수 간의 추정된 회귀직선은 일차식인 'Y = aX + b'의 형태로 표현하며 이때 Y는 종속변수의 예측치, X는 독립변수, a와 b는 각각 추정된 회귀직선의 기울기와 Y 절편을 나타내는 추정된 회귀계수라 한다.

(2) Bradford assay 에서의 Standard Curve 그리기

표준물질 희석액과 시료를 동일한 버퍼와 시약을 사용하여 동일한 시험과정을 거쳐 흡광도를 측정하면 최종 흡광도 값은 단백질함량과 종류에 따라 다르게 나타난다. Bradford assay에서의 회귀분석은 함량을 알고 있는 표준물질 희석액의 흡광도를 Y값으로, 표준물질 희석액의 단백질함량을 X값으로 하여 회귀직선을 구해 a, b값을 추정한다. 희석한 표준물질의 반응값(Y, 흡광도)과 표준액 중 함유된 단백질 함량(X)을 이용하여 회귀직선을 그리고 흡광도와 단백질함량 간의 관계를 예측한다.
예를 들어 표준 희석액을 이용한 검량선이 'Y = 0.004X - 0.016' 이라면 X는 'X = (Y + 0.016) / 0.004'의 수식에 의해 측정 흡광도(Y)가 0.6일 때 검액 중 단백질함량 X는 약 154 μg/mL이 된다. 시료 준비 시 희석과정이 있었으면 희석배수를 곱하여 단백질 함량을 계산한다. (그림 3)

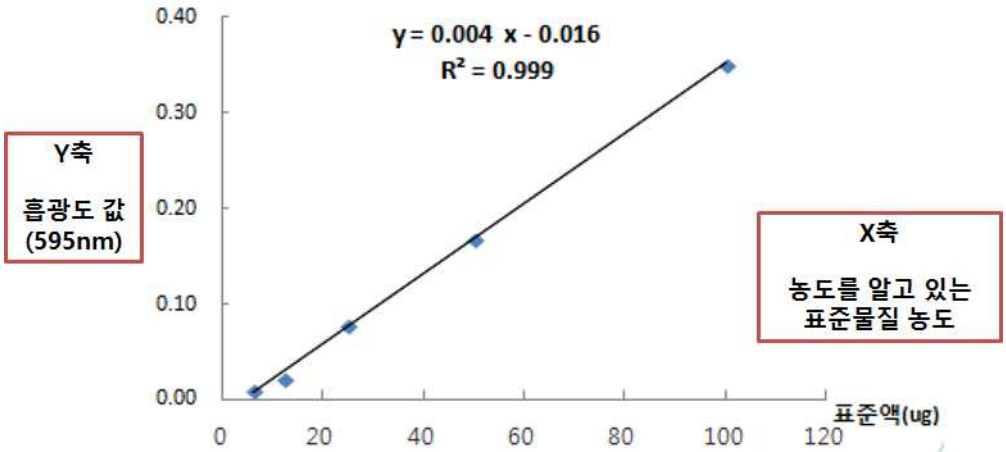


그림 3 BSA의 표준곡선의 예

3. 실험 재료 및 기구

분광광도계 (Spectrophotometer, 사용조건 : 595 nm) & 96 well plate
표준 단백질: 1mg/mL의 BSA (Bovine Serum Albumin)
피펫 & 피펫팁, micro tube & rack, 우유

4. 실험 방법

1) 가장 먼저 다음과 같이 먼저 시약을 제조하여 준비한다.

- Bradford stock solution (5X, 5배 농축액) = 100mL의 95% 에탄올 + 200mL의 88% Phosphoric acid + 350mg Coomassie brilliant blue G-250 (CBBG)
  → 미리 만들어져 제공될 수 있음.

- 1mg/mL의 BSA = 100mg의 BSA를 저울에 재어 준비한 후 100ml의 PBS Buffer에 녹여 준비 (Buffer가 없을 경우, 증류수에 녹여도 됨)
  → 미리 만들어져 제공될 수 있음.

2) 표준곡선 (Standard curve) 그리기 위한 표준물질을 다음과 같이 준비한다.

1mg/mL BSA	0㎕	5㎕	7.5㎕	10㎕	12.5㎕	15㎕
증류수(DW)	800㎕	795㎕	792.5㎕	790㎕	787.5㎕	785㎕
Total	800㎕					

3) 단백질 정량을 하고자 하는 시료 (Sample)를 다음과 같이 희석하여 준비한다.

주의: 한 가지 시료에 대해 두 가지의 희석배수로 희석하여 준비하여 표준곡선 내에 단백질 정량값이 들어오도록 한다. 만약에 흡광도 측정 시에 표준 곡선 내에 들어오지 않아 측정이 안 되면, 정량범위 내에 들어오도록 희석배수를 조정하여 다시 준비한다.

Sample	10㎕	20㎕
증류수(DW)	790㎕	780㎕
Total	800㎕	

4) 위에서 준비 한 표준물질과 시료가 있는 각각의 microtube에 Bradford solution (5X)을 200㎕ 씩 넣어 최종 농도가 1X가 되도록 한 후에 바로 섞어 준다.

5) 2분간 반응시키는 동안, 분광광도계 (Spectrophotometer)를 595 nm로 Setting해 둔다.

6) 4)에서 준비한 sample을 96 well plate에 duplicate로 200㎕ 씩 넣어주고 다른 well에 증류수를 200㎕ 씩 넣어서 Blank 흡광도를 측정할 수 있도록 하여 분광광도계의 Reference를 맞춰 줄 수 있도록 한다.

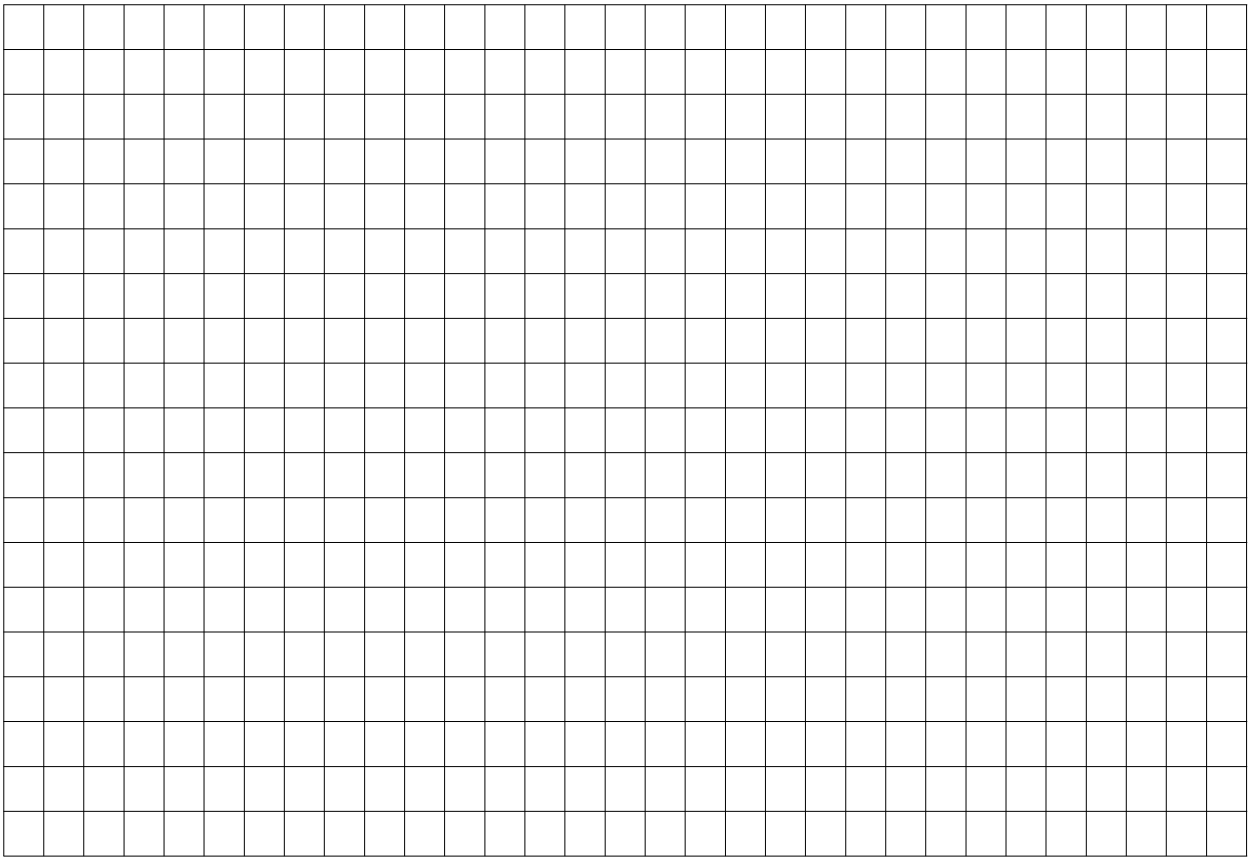
7) 96 well plate에 옮겨 담은 표준물질과 시료를 595nm에서, 흡광도를 측정하여 아래의 표에 기록한다.

표준물질 농도	표준물질의 흡광도 값	시료의 표기	시료의 희석배수	시료의 흡광도 값
0 ㎍/㎖				
5 ㎍/㎖				
7.5 ㎍/㎖				
10 ㎍/㎖				
12.5 ㎍/㎖				
15 ㎍/㎖				

8) 표준곡선을 작성하여 보고, 시료의 단백질의 정량값을 계산하여 본다.

5. 실험 결과 및 고찰

1) 표준곡선을 아래의 모눈종이에 X축은 BSA의 농도, Y축은 흡광도 값으로 하여 대략의 표준곡선을 그려 보도록 하고 추정된 회귀직선의 일차식 'Y = aX + b'을 구해보자. 또한 R제곱 값을 구하고 이 값이 의미하는 바가 무엇인지 말해보자.



2) 농도를 모르는 시료의 농도를 위에서 구한 회귀직선의 일차식 'Y = aX + b' 에 흡광도 값을 넣어 농도를 구해보자.

고찰이란?

실험을 통하여 결과를 얻었을 때, 실험 과정과 결과에 대해 생각하고 연구하는 것을 의미한다. 실험 결과가 좋던 나쁘던 관계없이 실험 과정에서 발생할 수 있는 오류에 대해 생각하여 기재하고, 실험 결과에 대해 전체적인 정리를 하고, 더 나아가 실험과정과 결과를 이용하여 더 깊이 연구할 수 있는 실험에 대해 생각하고, 어떤 분야에 응용할 수 있는지에 대해 생각해 보도록 하자.

6. 토론

우리 주변에 있는 모든 물질은 분석기기를 사용하여 ‘Qualification’ 즉, 정성분석을 통해 명명 될 수 있다. 정성분석을 통해 그 물질이 무엇인지 알게 되면 그 명명된 물질이 얼마만큼 있는지 ‘Quantification’ 즉, 정량분석을 통해 그 양을 정확히 알 수 있다.
특히, 우리 몸의 구성성분인 탄수화물, 지방, 단백질 중에서 우리는 단백질의 정량분석에 대해 수행해 보았는데 단백질을 정성분석할 수 있는 방법에 대해 생각해 보고, 나머지 탄수화물과 지방에 대해서도 정량, 정성분석할 수 있는 방법에 대해 생각해 보자.
그리고 이런 정성, 정량 분석의 의의가 무엇인지 토론해 보자.

7. 실험 후 느낀 점 및 배운 점