

4.7 크로마토그래피 2

이온교환 크로마토그래피(ion-exchange chromatography)는 이온 또는 하전된 화합물이 정전기적인 힘(electrostatic force)에 의해 이온교환수지에 결합되어 평형을 이루는 것을 이용한다. 이온교환 크로마토그래피의 정지상은 다양한 종류의 기능이 부착된 지지체인 이온교환수지(ion exchange resin)이다(표 1). 이동상에 있는 반대 전하를 띤 용질은 정전기적 인력 때문에 정지상에 이끌린다. 음이온 교환수지에는 양으로 대전된(charged) 기능기(예 : 트리에틸아미노에틸, 디에틸아미노에틸 등)가 지지체에 공유결합으로 붙어 있으며 양이온 교환수지는 음으로 대전된 기능기(예 : 술포메틸, 카르복시메틸 등)가 결합되어 있다. 지지체로 사용되는 물질로서는 폴리스티렌(polystyrene), 폴리아크릴레이트(polyacrylate), 셀룰로오스, 세파셀(Sephacel), 텍스트란, 아가로오스, 토요펄(Toyopearl) 등이 있다.

단백질 용액을 양이온 교환수지인 카르복시메틸-셀룰로오스가 충전된 관을 통과시키면 양이온 단백질들은 교환수지에 결합된다. 그리고 나서 완충액(buffer solution)으로 세척하여 pH 또는 이온력을 증가시키면 결합이 약해져서 단백질들이 교환수지로부터 분리된다.

글리신(glycine), 아스파르테이트(aspartate)와 리신(lysine)의 세 가지 아미노산의 혼합물을 이온교환크로마토그래피로 분리하는 경우를 생각해 보자. 우선 양이온 교환수지를 이용하여 pH 3.5에서 분리하면 아스파르테이트는 음전하를 띠어 크로마토그래프 컬럼을 빠져나오지만 양전하를 띠는 글리신과 리신은 교환수지에 결합된다. 글리신과 리신을 완충용액으로 세척한 후 음이온 교환수지를 이용하여 pH 8.5에서 흘러보내면 글리신은 관을 빠져 나오지만 아스파르테이트는 교환수지에 단단히 결합되게 되어 세 가지 아미노산이 분리된다. 교환수지에 결합된 물질은 pH나 염 농도의 변화같은 적절한 처리를 하여 회수한다.

표 1 이온 교환수지의 종류

		기능기	기능기 명	약어
양이온 교환수지 (Cation exchangers)	강	-SO ₃ ⁻ -CH ₂ SO ₃ ⁻ -C ₂ H ₄ SO ₃ ⁻ -PO ₃ H ⁻	Sulfo- Sulfomethyl- Sulfoethyl- Phospho-	S- SM- SE- P-
	약	-COO ⁻ -CH ₂ COO ⁻	Carboxy- Carboxymethyl-	C- CM-
음이온 교환수지 (Anion exchangers)	강	-CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃ -C ₂ H ₄ N ⁺ (C ₂ H ₅) ₃	Trimethylaminomethyl- Triethylaminoethyl-	TAM- TEAE-
	약	-C ₂ H ₄ N ⁺ H ₃ -C ₂ H ₄ N ⁺ H(C ₂ H ₅) ₂ -CH ₂ -C ₆ H ₄ ⁺ H ₃	Aminoethyl- Diethylaminoethyl- Para-aminobenzyl-	AE- DEAE- PAB-

친화성 크로마토그래피

친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)는 용질분자와 지지체 위에 결합되어 있는 리간드(ligand) 사이의 특이한 친화성에 기초한다(그림 11). 리간드와 용질분자의 상호작용은 효소와 기질 또는 항원과 항체의 상호작용처럼 매우 특이적이다. 즉, 관(column) 내 정지상에 단지 한 용질과만 고유하게 결합하는 리간드를 공유결합으로 붙인 후 혼합액을 이 관에 통과시키면 단지 그 용질만 정지상에 붙게 된다. 그 다음 다른 성분들을 관으로부터 잘 씻어 버린 후, 리간드에 결합된 성분은 용질과 리간드의 결합을 약화시키는 조건으로 바꾸어서 분리한다. 리간드에 결합된 단백질을 분리하는 방법에는 두 가지가 있다. 첫 번째는 지지체에 리간드보다 친화성이 더 큰 물질을 포함하는 용리액(eluent)으로 분리해내는 방법이다. 다음으로 pH를 변화시키거나 온도, 이온세기 등을 변화시키는 방법이다.

예를 들어 공유결합된 리간드가 특정한 단백질에 대한 항체(antibody)인 경우를 보자. 여러 종류의 단백질을 포함한 혼합물이 관을 통과할 때, 단지 항체와 반응하는 하나의 단백질만 관에 결합된다. 다른 모든 단백질이 관으로부터 씻겨 나간 후, pH를 변화시키거나 이온세기를 변화시킴으로써 결합되어 있는 특정한 단백질을 항체로부터 떨어지게 하여 회수한다. 이

러한 방법은 효소, 항원, 특이적 핵산, 비타민 결합 단백질, 의약품, 호르몬 수용체 같은 물질을 순수 분리할 때 자주 이용된다. 친화성 크로마토그래피가 생체 고분자의 분리에 사용된 예는 표 2와 같다.

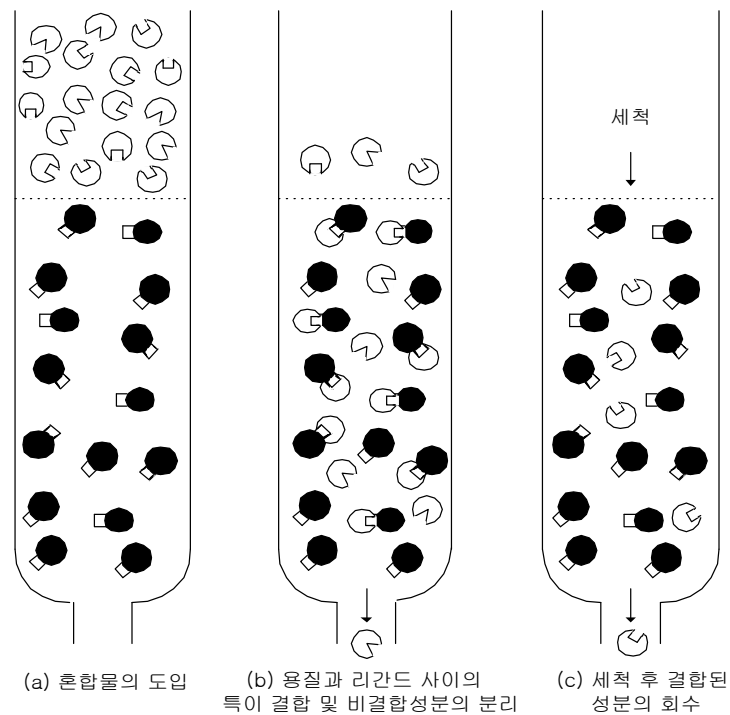


그림 11 친화성 크로마토그래피의 모식도

친화성 크로마토그래피용 지지체로는 아가로오스 담체(agarose beads)가 가장 많이 쓰인다. 폴리아크릴아미드(polyacrylamide) 담체는 여러 조건을 충족시키기는 하지만 다공성이 부족하다. 다공성 유리 담체는 물리 화학적으로 안전해서 다양한 조건에서 전개속도가 좋다. 그러나 비특이적(nonspecific) 단백질 흡착이 많으며 기능이 적다는 단점이 있다. 이 문제는 유리 표면에 덱스트란(dextran) 등의 물질로 표면처리함으로써 극복할 수 있다.

표 2 친화성 크로마토그래피를 이용한 생체 고분자의 분리

생체 고분자	사용한 리간드
Amino peptidase	Hexamethylenediamine
Avidin	Biocytin
α -Chymotrypsin	Tryptophan
Chroismate mutase	Tryptophan
Coagulation factor	Heparin
Follicle-stimulating hormone	Concanavalin A
Interferon	Antibody
Thrombin	Benzamidine

리간드가 지지체에 바로 결합되어 있으면 리간드 길이가 짧아서 거대 분자인 경우 입체장애(steric hindrance) 때문에 리간드에 접근할 수 없다. 그래서 지지체와 리간드 사이에 팔(spacer arms)에 해당하는 분자를 붙인다.