

# 당단백질에서의 아스파라긴 결합형 당쇄의 추출법

당단백질에서 당쇄를 분석하고자할 때, 당쇄를 당단백질에서 추출하여 표식한 후 HPLC 등으로 분석하는 방법이 널리 이용되고 있다.

본 고에서는 당단백질에서 아스파라긴 결합형 당쇄를 추출하는 방법으로 (1)Hydrazin 분해법, (2)Glycopeptidase F를 이용한 효소 추출법에 대하여 소개한다.

## ■ Hydrazin 분해법

### [필요한 시약]

- 무수 Hydrazin(생화학연구용)
- 포화 탄산수소나트륨 수용액  
(NaHCO<sub>3</sub> 0.5 g에 증류수 4 ml 첨가, 실온에서 혼합·냉각한다. 상등액을 포화 탄산수소나트륨으로 사용하고 사용직전 조제)
- 무수초산
- 이온 교환 수지  
(Dowex 50W-X2, 200-400 mesh, H<sup>+</sup> form 등)
- 1-Octanol
- Toluene
- 증류수
- 드라이아이스/EtOH

### [필요한 기구, 장치]

- Glass tube
- 파스퇴르 피펫
- Cold trap 부착 진공 펌프
- 동결건조장치
- 고온 incubator

### [조작]

#### 1) Hydrazin 분해

당단백질 시료 1 mg  
(용액을 glass tube에 분주하여 동결건조 한다)

tube의 상부를 가열해서 가늘게 한다  
← 50~100 μl 무수 Hydrazin  
(파스퇴르 피펫으로 분주한다)  
시료를 완전히 용해한다.  
드라이아이스/EtOH로 동결한다  
진공 펌프로 감압하면서 봉한다(Hydrazin이 증발하지 않도록 신속하게 봉한다).<sup>\*)</sup>

100°C, 8~10시간(고온 incubator)

개봉

진공 펌프로 Hydrazin을 감압건조한다.

Hydrazin의 완전제거를 위해 toluene을 충분히 첨가하고 진공 펌프로 감압건조한다.

Hydrazin 제거조작을 수회 반복한다.

Hydrazin 분해 시료

\*1: 병하기 곤란한 경우는 스크류 캡이 부착된 글라스 튜브를 사용하여 같은 조작을 할 수 있다.

#### 2) 아세틸화

Hydrazin 분해 시료

1 ml의 포화탄산수소 나트륨 수용액을 첨가하고 잘 용해한다.

← 50 μl 무수초산

실온 15분

← 50 μl 무수초산

실온 15분

1 ml의 이온교환수지를 첨가, pH가 산성이 되게 한 후 pH를 확인한다.

파스퇴르관을 통과시켜 회수한다.

5 ml의 증류수로 이온교환수지를 세정하고 세정액을 회수한다.

회수액과 세정액을 합한다.

← 1-Octanol, 1 방울 첨가

Evaporation 또는 동결건조

당쇄 분획

## ■ Glycopeptidase F(GPF)로 당쇄 추출법

### [필요한 시약]

- Glycopeptidase F(Peptide : N-Glycopeptidase F)  
(TaKaRa Code 4450)

[제품내용]

1. Glycopeptidase F (500 mU/ml)	25 mU
2. Glycopeptidase F 첨부시약	
A. Denature Buffer : 1% SDS/1 M Tris-HCl(pH8.6)	500 μl
B. Native Buffer : 1 M Tris-HCl(pH8.6)	500 μl
C. Stabilizer Solution : 5% Nonidet P-40	500 μl
D. Control Glycoprotein : 10 mg/ml Bovine Fetuin	10 μl

### [기타 준비물]

- 2-mercaptoethanol
- 정제수(증류수 또는 초순수)

### [필요한 기구 및 장치]

- Micro 원심 튜브
- Micro centrifuge
- Water bath 또는 heat block
- SDS-PAGE용 기구

### [조작]

#### (변성 조건에서 당쇄 유리)

당단백질 시료(10 mg/ml 용액, sample 완충액 농도는 50 mM 이하인 것) 2.5  $\mu$ l

- ← 2.5  $\mu$ l A' 완충액(100  $\mu$ l의 A 완충액에 2-mercaptoethanol을 1.5  $\mu$ l 첨가한 것)
- 100°C, 3분
- ← 5  $\mu$ l C액
- ← 13  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
- 잘 혼합한다.
- ← 2  $\mu$ l Glycopeptidase F
- 잘 혼합한다.
- 37°C, 15~20시간

반응 후 효소 반응액의 일부를 분취하여 SDS-PAGE로 당쇄 유리를 확인한다.

#### (비 변성 조건에서의 당쇄 유리)

당단백질 시료(10 mg/ml 용액, sample의 완충액 농도는 50 mM 이하인 것) 2.5  $\mu$ l

- ← 2.5  $\mu$ l B 완충액
- ← 20  $\mu$ l Glycopeptidase F
- 잘 혼합한다.
- 37°C, 15~20시간

반응 후 효소 반응액의 일부를 분취 SDS-PAGE로 당쇄 유리를 확인한다.

SDS-PAGE로 Glycopeptidase F로 반응 후 시료의 밴드가 shift 되었는지 확인하여 당쇄가 유리된 것을 알 수 있다.

그후 Cellulose Cartridge column을 이용하여 Hydrazin 분해로 얻어진 당쇄 분획 또는 Glycopeptidase F 반응으로 유리된 당쇄에서 단백질이나 아미노산 유도체 등의 물질을 제거한다.

### ■ Cellulose Cartridge에 의한 Hydrazin 분해물 및 Glycopeptidase F 효소반응액에서 당쇄 분획의 정제

#### [필요한 시약]

- 정제수(증류수 또는 초순수)

- EtOH(특급)
- 1-BuOH(특급)

#### [필요한 기구]

- Cellulose Cartridge Glycan preparation Kit(TaKaRa Code 4403)
- Glass 튜브 또는 플라스틱 튜브(10 ml 용량 이상의 것 2개)
- 원심 농축기

#### [용매 조제]

- 용매 1 : BuOH/EtOH/H<sub>2</sub>O = 4/1/1 (v/v/v)
- 용매 2 : EtOH/H<sub>2</sub>O = 1/1 (v/v)

#### [조작]

##### 1) 시료 용액의 조제

Hydrazin 분해물 또는 Glycopeptidase 반응액\*

농축 건조

- ← 400  $\mu$ l 정제수
- 10,000 r.p.m. 2분간 원심분리한 후 상층을 Glass 혹은 플라스틱 튜브로 이동
- ← 400  $\mu$ l EtOH
- ← 1.6 ml BuOH
- 잘 혼합한다.

시료 용액

##### \*2: 시료준비의 유의점

- Cellulose Cartridge로 가능한 시료량은 당단백질 10 mg 정도
- 시료에 계면활성제나 고농도의 염류가 함유되어 있지 않을 것
- 시료에 염이 함유되어 있는 경우 400  $\mu$ l의 정제수에 용해하여 그 염 농도가 10~20 mM 정도 되도록 한다.
- 계면 활성제를 함유한 시료나 PA화 당쇄 시료의 정제 protocol은 보한바이오 메디칼(주) 기술지원팀(TEL : 02-577-2002, E-mail : support@takara.co.kr)로 문의

##### 2) 당쇄 정제

Cellulose Cartridge (adaptor, 실린지 부착)

- 30 ml 정제수로 cartridge를 세정
- 10 ml 용매 2로 cartridge를 세정
- 10 ml 용매 1로 cartridge를 중성화
- 2.4 ml 시료용액을 apply 한다
- 10 ml 용매 1로 cartridge를 세정
- 2 ml 용매 2로 당쇄를 용출하고 플라스틱 튜브에 회수한다.

원심 농축기로 감압 건조

정제된 당쇄 분획

회수한 당쇄 분획은 GlycoTAG® 또는 PALSTATION® 을 이용한 pyridylamino(PA)화로 형광 표식한다  
PA화 당쇄는 이온교환, 순상 및 역상 HPLC(PALPAK® Type N, S, R)로 분석 할 수 있다.