대한신장학회지 : 제 19 권 부록 제 1 호 2000

# 단백질에 대한 연구 기법

연세대학교 의과대학 약리학교실

하 헌 주

## 단백질에 대한 연구를 할 때에 고려하여야 할 일반적 사항[1)]

단백질은 세포의 구성 요소일 뿐 아니라 거의 모든 세포기능을 실행하는 물질로서 세포무게의 거의 대부분을 차지한다. 세포를 현미경으로 관찰하고 전기적, 생화학적 활성을 분석하는 것의 핵심은 단백질을 관찰하는 것이다. 단백질의 양, 분포 및 특성 변화는 비정상적 외부 자극에 적절하게 반응하지 못하므로써 초래되는 질병의 지표일 뿐 아니라 이들 변화를 측정함으로써 특정 자극에 의한 특정 단백질의 기능을 검색할 수 있다. 단백질이 여러 다양한 기능을 수행하는 것은 그들이 수없이 다른 3차원 모양을 형성하기 때문으로 각 기능은 구조에 의해 좌우된다. 단백질에 대한 연구의 첫 단계는 대부분 세포나 조직을 조절가능한 방식으로 분쇄하는 것으로 단백질이 세포내에 존재하고 있던 부위의 환경과는 전혀 다른 환경에 노출되기 때문에 대단히 불안정하게 되어 고유의 성상을 잃게된다.

### 1. 완충액(Buffers)

용액의 pH를 유지하기 위하여 완충액을 사용하는데 각 완충액의 적정 pH에서 사용하여야 그의 완충기능을 갖는다. 완충액은 온도에 따라 pH가 변화하므로 사용하는 온도에서 pH를 측정하여야 한다. 또한 실험의 편의상 10-100배 농축된 완충액을 만들어 놓고 희석하여 사용하는데 희석에 따라 pH가 변화하므로(예 : 인산완충액 0.1M, pH 6.7의 인산완충액을 10배 또는 100배 희석하면 pH가 각각 6.8과 7.0이 되고, Tris는 10배 희석할 때마다 pH가 0.1씩 내려간다.) 사용할 때에 보정이 필요하다. 완충액은 미생물의 번식이 용이하여 오염될 수 있으므로 여과하거나 냉장 보관함으로써 오염 방지를 줄일 수 있고 0.02% (3mM) sodium azide를 첨가하기도 한다. 완충액을 사용할 때에는 가능한 낮은 농도를 사용함으로써 비특이적 ionic strength 효과를 방지하여야 한다.

주로 사용하는 완충액인 인산완충액, MOPS; 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid, HEPES; N-2-Hydoxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, Tris; Tris(hydroxymethyl)aminomethane은 각각 다음과 같은 한계가 있다.

**1) 인산완충액**

다가 양이온과 결합력이 크고 이들과 결합하면 완충력이 저하하고 여러 효소(kinases, phosphatase, dehydrogenase 등)가 활성을 잃는다.

**2) MOPS**

Lowry에 의한 단백 정량시 분석을 방해한다.

**3) HEPES**

Lowry에 의한 단백 정량시 분석을 방해하고 piperazine을 함유한 다른 완충액과 같이 free radical을 쉽게 생산하므로 산화/환원 반응 연구에는 적합하지 않다.

**4) Tris**

세포막을 쉽게 통과하고 금속 이온과 결합하여 proton을 분비하고 pH를 낮추며 불용성 침전을 만든다.

### 2. 환원제(Reducing agents)

세포가 파괴되면 국소적으로 존재하던 항산화계가 희석되는 동시에 산소와의 반응 기회가 커짐으로 인위적으로 산화성 스트레스에 노출된다. 많은 단백질이 산화되면 가역적 또는 비가역적으로 기능을 소실하게 되므로 환원제를 첨가하여 산화를 방지할 필요가 있다. 주로 2-mercaptoethanol과 dithiothreitol(DTT 또는 Cleland's reagent)을 사용한다. 이들 환원제는 보관하는 동안 자신이 산화되어 환원제로서의 기능을 손실할 수 있고, 2-mercaptoethanol은 완충액에 투

여후 24시간 이내에 산화된다.

### 3. 세정제(Detergent)

세포막 단백질을 분리하기 위하여 단백질을 용해할 수 있는 세정제를 사용한다. 세정제는 친수성 head 부분이 밖을 향한 cluster인 micelle을 형성하고 용해된 세포막 단백질은 세정제와 함께 micelle을 형성하여 transmembrane domain인 소수성 꼬리부분이 수용액으로부터 보호된다. Critical micelle concentration(CMC)은 각 세정제가 micelle을 형성하는 최저 농도로서 세정제의 순도, 온도, pH, ionic strength, 다가 ion의 존재 등에 의해서 CMC가 변화한다. 세정제는 크게 머리부분이 양전하나 음전하를 띤 sodium dodecyl sulfate(SDS)나 lithium dodecyl sulfate 같은 이온성(ionic) 세정제, 극성을 띠지 않는 Triton X-100(polyethylene [9-10]p-t-octyl phenol), Triton X-114(polyethylene [7-8] p-t-octyl phenol), Nonidet P-40(polyethylene [9]p-t-octyl phenol) 및 Tween 20(PEG [20] sorbitan monolaurate)과 같은 비이온성(nonionic) 세정제 및 양전하와 음전하를 동시에 지닌 CHAPS (3-[(Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propane sulfonate)와 Zwittergent 3-14 같은 Zwitterionic 세정제로 구분된다. 비이온성 세정제는 단백질의 변성을 초래하지만 monomeric 상태로 분리하므로 단백질의 분자량을 측정하는데 이용한다. 반면에 비이온성 세정제는 0.1% 이하에서는 단백질의 변성을 초래하지 않으므로 기능을 유지한 단백질 분리에 사용하지만 단백질의 응고가 일어날 수 있다. Tween 20은 매우 낮은 CMC를 지니고 일반적으로 solid phase 면역화학법(ELISA, RIA 및 immunoblotting)에서 단백질의 비특이적 반응을 억제하기 위하여 사용한다. Zwitterionic 세정제는 비이온성 세정제보다 단백질과 단백질의 상호 작용을 극복하면서 이온성 세정제보다는 단백질의 변성을 덜 초래한다.

### 4. 단백질 환경(Protein environment)

#### 1) 표면 효과(Surface effects)

희석된 단백액은 종종 단백질의 활성이 감소하는데 이는 아마도 단백질이 유리 등의 표면에 부착한 결과로 생각된다. 약 1 $\mu$g의 단백질이 5cm$^2$의 유리 표면에 부착하는데 이는 또 다른 단백인 BSA를 과량 첨가함으로써 방지할 수 있다. 일반적으로 단백질을 분석할 때에는 0.1mg/ml의 BSA를 보관할 때에는 10 mg/ml BSA를 첨가한다.

#### 2) 온 도

일반적으로 온도가 10℃ 상승하면 효소 반응 속도는 거의 2배로 빨라진다. 그러나 mitochondria ATPase 같은 단백질은 냉온에서 활성을 잃게되고 30-40℃ 이상에서는 대부분 단백질의 안정성이 변화하고 불활성화되지만 TGF-$\beta$는 60℃에서 활성화되어 생물학적 활성을 지닌다.

#### 3) 보 관

원칙적으로 단백의 반감기는 저온에서 증가하여 단백질이 안정화된다. 따라서 단백질을 그 성상과 실험 목적에 따라 4, -20, -80℃ 또는 액체 질소(-200℃)에 보관하는데 4℃에 보관하는편이 freezing-thaw를 반복하는 것보다 낫고 -80℃가 -20℃보다 안전하다. 종종 단백용액이 얼면 변성이 초래되는데 이는 아마도 완충액이 침전하거나 부분적으로 농축되어 pH가 변동된(심한 경우 +/−3 pH) 결과로 여겨진다. Glycerol 사용으로 단백질의 안정성을 유지할 수 있고, ammoniun sulfate 침전 또는 lyophilized powder 상태의 단백질은 안정하다.

### 5. 단백분해제 억제제(Protease inhibitors)

세포가 분쇄되면서 세포내 소기관으로부터 많은 단백분해제가 분비되어 단백질에 작용할 수 있기 때문에 연구하고자하는 단백질을 분리할 때까지 이들 단백분해제를 억제하여야 한다. 다음은 주로 사용되는 단백분해제 억제제로서 각 단백분해제 억제제가 작용하는 조건이 다르기 때문에 최적의 효과를 위하여 여러 종류의 억제제를 cocktail로 하여 사용한다.

#### 1) PMSF(phenylethanesulfonyl fluoride)

17-174 $\mu$g/ml(0.1-1.0mM)에서 serine protease (예 : chymotrypsin, trypsin, thrombin 등)와 thiol protease(예 : papain)를 억제한다. Isopropanol에 10 mg/ml까지 용해되어 상온에서 1년까지 안정하나 수용액에서는 불안정하다.

#### 2) EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid)

0.5-1.5mM(0.2-0.5mg/ml)에서 metalloprotease를 억제한다. pH8-9에서 0.5M까지 물에 용해되고 4℃에서 6개월동안 안정하나 NaOH를 첨가하여 pH를 조절하여야 용해된다.

**3) Pepstatin A**

0.7 μg/ml(1 μM)에서 산성 protease(예 : pepsin, renin, cathepsin D, chymosin)를 억제한다. Methanol에 1mg/ml까지 용해되고 -20℃에서는 6개월 동안 4℃에서는 1주일 동안 안정하다.

**4) Leupeptin**

0.5 μg/ml(1 μM)에서 serine/thiol protease를 억제한다. 물에 10mg/ml까지 용해되고 -20℃에서는 6개월동안 4℃에서는 1주일 동안 안정하다.

**5) Aprotinin**

0.06-2.0 μg/ml(0.01-0.3 μM)에서 serine protease를 억제한다. pH7-8에서 10mg/ml까지 물에 용해되고 -20℃에서는 6개월 동안 4℃에서는 1주일 동안 안정하다. 반복적인 freezing/thaw를 피하고 pH 12.8 이상에서는 활성이 없다.

## 단백질 농도 측정[1)]

### 1. 280nm에서의 흡광도 측정(Wetlaufer 1962)

Tyrosine, phenylalanin 및 tryptophan에 의한 강한 흡광성에 기인한 분석으로 빠르지만 정량분석능이 낮고 핵산에 의해 방해된다. 분석의 sensitivity는 0.2-2mg/ml으로서 microcuvette을 사용하여 0.1ml (0.05mg)까지 측정할 수 있다. 유리나 플라스틱 cuvette은 자외선을 흡수하므로 반드시 quartz cuvette을 사용한다.

### 2. Bradford 분석(1976)

빠르고 믿을수 있는 dye-based 분석으로 Bio-Rad 회사에서 상품화한 후 종종 Bio-Rad 분석으로 불리운다. 측정을 방해하는 물질이 비교적 적지만 단백질의 종류에 따라 염료와의 반응이 조금씩 달라 정확한 의미의 정량은 아니다. 분석의 sensitivity는 25-200 μg/ml으로서 microcuvette을 사용하여 0.1 ml(2.5 μg)까지 측정할 수 있다. Cuvette 벽에 염색이 남기때문에 일회용 플라스틱 cuvette을 사용하는 것이 좋으며 유리 cuvette을 사용할 때에는 methanol을 사용하여 세척하고 강한 염산에 overnight 한다.

### 3. Lowry 분석(1951)

가장 정량적인 분석이지만 완충액, 염, 세정제, 포도당, chelator, 환원제 등에 의하여 분석이 방해되고 반응에 소요되는 시간이 길고 시약이 불안정하다. 분석의 sensitivity는 5-100 μg/ml이다.

### 4. Bicinchoninic acid(BCA) 분석(1985)

비교적 최근에 개발된 Lowry의 변형된 분석법으로 최종산물이 안정하고 Lowry보다 간편하고 방해물질이 적으나 반응시간이 길다. 분석의 sensitivity는 10-1,200 μg/ml으로서 microcuvette을 사용하여 0.1ml(0.5-10 μg/ml)까지 측정할 수 있다.

## Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)[2)]

항원-항체 반응을 이용한 면역화학법은 반응의 특이성이 크고 예민도가 높아 원하는 단백질의 측정에 많은 발전을 주었다. 제한된 양의 특이 항체에 두가지 종류의 항원 즉 추적자로서의 표지항원과 우리가 측정하고자 하는 시료내의 항원을 경쟁적으로 반응시키므로써 항원을 정량 분석하는 immunoassay는 항체의 양을 제한없이 과잉으로 넣어주므로써 시료내에 존재하는 모든 항원이 항체와 결합할 수 있는 immunometric assay로 구별된다.

Immunoassay를 하기 위해서는 기본적으로 i) 측정하고자 하는 항원과 특이적으로 결합할 수 있는 항체, ii) 표지항원, iii) 시료내에서 측정하고자 하는 항원과 동일한 표준항원(reference)이 있어야 하며 iv) 반응 후 항원-항체 결합형과 유리항원을 분리해 낼 수 있는 분리방법이 있어야 한다.

### 1. 원 리

Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)는 항원이나 항체에 효소(enzyme)를 부착시켜 tracer로 사용하며 substrate를 넣고 반응시켜 비색이 되는 정도를 spectrophotometer에서 알아봄으로써 항원 또는 항체의 양을 정량한다.

ELISA는 첫째 항원 또는 항체가 부착되고 난 후에도 immunological activity를 그대로 간직하고 있어야 하며, 둘째 항원 또는 항체가 효소에 link되어 만들어진 복합체가 immunological activity와 enzymatic activity를 그대로 지니고 있어야 한다. 실제로 항원, 항체는 화학적으로 또는 수동적 흡착(pa-

ssive adsorption)에 의하여 polystyrene과 같은 플라스틱 표면이나 paper disc에 쉽게 부착이 되며 peroxidase, glucose oxidase, β-galactosidase 및 alkaline phosphatase 등과 같은 효소와 쉽게 link 되어 안전한 복합체를 이룬다. ELISA에는 competitive assay와 non-competitive assay가 있다.

## 2. 분 류

### 1) Competitive assay

**(1) Using antigen-enzyme conjugate for antigen** : 측정하고자 하는 항원에 대한 특이 항체를 polystyrene과 같은 solid phase에 부착시키고 난 후 부착이 안된 항체를 깨끗이 제거한 후 항원이 들어있는 시료와 효소로 표시된 항원을 넣고 반응을 시켜주면 항원들은 항체의 결합부위와 경쟁적으로 결합을 한다. 이때 시료내에 측정하고자하는 항원의 양이 증가할수록 항체와 결합하는 enzyme으로 표지된 항원의 양은 감소한다. 결합이 일어나지 않은 항원을 제거하고 다음 단계로 효소에대한 기질을 넣고 반응을 시키면 항체와 결합된 효소로 표지된 항원의 양에 비례하여 비색반응이 나타나고 spectrophotometer로 정량한다.

**(2) Using enzyme-labeled antibody for antigen** : 이 경우에는 항원을 solid phase에 부착시키고 항체를 tracer로 사용한다. 따라서 enzyme으로 표지된 항체가 solid phase에 부착되어 있는 항원과 결합은 측정하고자 하는 시료내에 들어있는 항원의 양에 역비례한다.

### 2) Non-Competitive assay

**(1) Double antibody sandwich method for antigen** : 특이항체를 polystyrene에 부착시킨 후 부착이 안된 항체를 깨끗이 제거한 후 항원이 들어있는 시료를 넣고 반응을 시키면 플라스틱 표면에 부착이 된 항체와 결합을 하게 된다. 결합이 일어나지 않은 항원은 깨끗이 제거하고 효소로 표지된 특이항체를 넣고 반응을 시켜주면 이미 결합된 항원-항체 복합체와 결합한다. 마지막으로 효소에대한 기질을 넣고 반응시키면, 시료내의 측정하고자 하는 항원의 양에 비례하여 비색반응이 나타나고 이때 나타나는 비색반응의 정도를 spectrophotometer로 정량한다.

**(2) Indirect ELISA for antibody** : 측정하고자 하는 항체의 특이항원을 수동적 흡착법(passive adsorption)에 의하여 polystyrene에 부착시킨 후 항체가 들어있는 시료를 넣고 반응시키면 solid phase에 부착되어 있는 항원과 결합한다. 여기에 효소로 표지된 anti-immunoglobulin을 넣고 반응시키면 항원-항체 복합체와 결합된다. Enzyme substrate를 넣고 다시 반응을 시키면 시료내에 존재하는 항체의 양에 비례하여 비색반응이 될 것이며 spectrophotometer에서 정량한다. 이 방법은 측정하고자 하는 항체에 대한 특이항원이 solid phase에 만족할 만큼 흡착만 되면 어떤 종류의 전염성 물질에 대한 항체도 측정할 수 있다. 실제로 virus, parasite, fungi 등의 항체를 측정하는데 이용되고 있다.

## 3. 방 법

### 1) Immobilization of antigen or antibody

항원이나 항체는 polyacrylamide나 agarose, cellulose 등에 공유결합에 의하여 결합하고 polystyrene, polypropylene과 같이 hydrophobic surface에 수동적 흡착된다. 수동적 흡착 기전은 아마도 비극성 단백질 부위와 비극성 플라스틱 matrix 사이의 hydrophobic interaction에 기인하는 것으로 생각된다. 항원이나 항체가 solid phase에 coating 되는 정도는 adsorbing molecule의 diffusion coefficient, coating solution의 용적에 대한 solid phase 면적의 비율, 흡착시키고자 하는 단백질 농도, adsorption reaction 시간 및 온도 등에 따라 다르다. ELISA에서는 polystyrene이 가장 흔하게 solid phase로 사용이 되고 있다. 그러나 이러한 종류의 immunosorbent는 몇가지 단점을 가지고 있다. 첫째 흡착된 항원이나 항체가 항원-항체 반응과정이나 항원-항체 결합형과 유리형을 분리할 때 떨어지거나 또는 흡착된 항원이 변성되어 항체와 결합하는 능력을 잃기도 한다. 결국 항원이나 항체의 desorption이나 변성은 competitive ELISA에서 precision을 떨어뜨려 assay sensitivity에 영향을 준다. 뿐만 아니라 플라스틱 표면은 흡착이 제한되는 단점이 있다. 적절한 pH난 반응시간 등은 분자의 종류에 따라 다르나 실험적 근거에 의하면 인산완충액을 사용하여 3시간 정도 반응시키면 최적의 coating을 할 수 있다.

### 2) Conjugation of enzyme to antigen or antibody

Alkaline phosphatase와 horse radish peroxi-

dase가 대개 이용되고 있으며 정량을 위한 ELISA에서는 효소복합체가 크면 efficiency가 떨어지므로 비교적 작은 효소복합체를 만든다. 또한 효소복합체를 만든 후에는 반드시 효소와 복합체가 안된 항원이나 항체는 gelfiltration을 하여 제거한다. 항원이나 항체에 효소를 표지하기 위해서는 glutaraldehyde와 p-benzoquinone과 같은 cross-linking agent를 사용한다.

**3) Enzyme-substrate reaction**

Alkaline phosphatase를 사용한 경우 비색 기질로 p-nitrophenyl phosphate(1mg/ml)를 사용하고 peroxidase를 사용한 경우에는 o-phenylenediamine (OPD)을 사용한다. 일반적으로 spectrophotometer의 optical density는 1.0을 초과해서는 안되기 때문에 효소-기질 반응이 너무 진행되기 전에 NaOH 또는 $H_2SO_4$로 정지시켜야 한다.

## Immunoblot 분석 : Western blot 분석[3)]

전기영동하여 분리시킨 거대분자를 immobilizing matrix로 전이하여 고정하는 것을 blotting이라고 하며 polyacrylamide gel상의 단백질을 전이하는 경우를 Western blotting이라 한다. 흡착지로 전이된 단백질은 면역화학법으로 측정한다. 2-20fmoles 또는 50kD 단백질의 경우 0.1-1ng의 단백질을 감지할 수 있다.

Tables 1-7은[4)] 면역화학법을 성공적으로 수행하기 위하여 고려하여야 할 사항들의 요약된 참고 자료이다.

### 1. 겔 전기영동(Gel electrophoresis)

단백질은 크기, 형태, 하전, 소수성 그리고 다른 분자와의 친화력에 있어 매우 다양하다. 이러한 성질을 이용하여 단백질을 서로 분리한 후 연구에 사용하는데 전기영동은 단백질을 포함한 용액을 전기장에 두고 분자들의 크기와 순 하전에 따라 방향과 속도가 달리하여 이동하는 것을 이용한 분리법이다. SDS-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)의 경우 단백질의 폴리펩타이드 사슬 각각은 음전하를 띤 SDS 분자와 복합체를 형성하여 다공성의 폴리아크릴아마이드 겔판을 통해 이동한다. 단백질이 크다해도 강한 음전하를 띠고 있다고 하면 자신보다 더 작은 단백질보다 전기영동에서 빨리 양극 쪽으로 이동할 수 있는데 원래 세정제로 사용되는 물질인 SDS는 단백질과 결합하면 강한 음전하로 둘러 싸 버려서 단백이 원래 가지고 있던 전하는 거의 무시된다. 결국 단백질은 자신의 크기에 따라서만 이동 속도를 달리하게 된다. 또한 단백질을 전기영동하기 전에 강력한 환원제인 mercaptoethanol을 넣고 가열하면 단백질의 3차 구조를 유지하는 단백질내 또는 단백질들간의 S-S 결합을 끊으므로 이 역시 단백질의 이동을 순전히 단백질의 크기에 의해서만 좌우될 수 있도록 한다.

단백질은 쉽게 변성되어 분해될 수 있으므로 전기영동은 일반적으로 저온(4℃)에서 시행하는 것이 좋다. 보통 cold room에서 시행하거나 냉각수가 순환되도록 만들어진 전기영동 장치를 사용한다. 또한 전기영동을 시행할 때 전압을 높게 올리지 않는 것이 겔의 온도를 올리지 않는데 도움이 되고, 전기영동은 2-4시간 내로 단시간 내에 종료하는 것이 바람직하다.

전기영동할 검체의 양은 검출하고자 하는 단백질이 세포 내에서 얼마나 발현되고 있는가에 따라 좌우된다. 일반적으로 사용되는 0.5cm×1mm 정도 크기의 well에는 100 $\mu$g 이하의 단백질을 전기영동하는 것이 좋은 결과를 볼 수 있다.

폴리아크릴아마이드와 비스아크릴아마이드의 비율은 29 : 1 정도가 일반적이다. 검출하고자 하는 단백질의 예상되는 크기가 작으면 비율을 낮출 수도 있다. 폴리아크릴아미이드 겔은 단백을 분리하기 위하여 아크릴아마이드 농도가 서로 다른 두 부분으로 구성되어 있다. 상부 약 1/10 정도는 stacking 겔이라 하여 대개 5% 내외의 아크릴아마이드로 되어 있고, 아래 부분은 separating 겔이라 하여 10% 정도로 되어 있고 아래 부분에 가서 다시 분자량의 적은 차이에 의하여서도 구분이 나도록 분리된다. 원하는 단백질의 크기에 따라 아크릴아마이드의 농도를 달리하는데 15-45kD의 단백질은 15% 겔을 60-212kD의 단백은 5% 겔을 사용한다. Linear slab gel은 같은 겔판에서 여러 시료를 동시에 분석하므로 동일한 polymerization, staining 및 destaining을 할수 있어 단백질의 정량, 비교 및 특화에 흔히 이용된다. 단백질은 coomassie blue나 silver staining으로 염색되는데 각각은 0.1-1 $\mu$g/band 2-10ng/band의 단백질을

염색한다.

### 2. 흡착지로의 전이(Membrane Transfer)

전이 방법으로는 겔을 두장의 여과지 사이에 sandwich가 되도록 넣고 완충액에 의해 diffusion 시키는 방법과 완충액의 mass flow에 의해 겔로부터 elution 시키는 convection법이 있다. 겔에서 단백질을 흡착지로 이동할 때도 저온에서 시행하는 것이 좋다. 이동완충액에는 반드시 메탄올을 포함하여 단백질을 고정하여 변성되지 않도록 하여야 한다.

### 3. 면역화학 분석(Immunochemical analysis)

흡착지로 이동한 단백질을 원하는 일차항체와 결합시키전에 우선 비특이적인 결합을 없애기 위하여 차단용액(blocking solution)으로 처리한다. 일차 항체와 결합시킬 때는 항체의 친화력이나 검출할 단백질의 농도 등을 고려하여 항체를 희석하여야 하는데, 일반적으로 1 : 1,000-2,000 정도의 희석 배율을 사용한다. 일차항체와 결합반응은 대개 실온에서 시행하며 결합 시간은 2-3시간 정도인데 경우에 따라서는 4℃에서 12-16시간을 시키는 수도 있다. 일차항체를 반응시키고 난 후 잘 닦지 않으면 이차항체에 결합된 페록시다아제가 발색을 유도하여 지저분한 배경을 보이게된다. 가장 많이 사용되는 것이 horseradish peroxidase(HRP)를 이용한 발색법인데, 장기간 보관하면 색깔이 탈색되므로 즉시 사진을 찍어 보관하는 것이 좋다. Chemiluminenscence를 이용한 방법이 더욱 예민하여 최근 이용되고 있다.

## 면역조직화학법(Immunohistochemistry)[5]

### 1. 원 리

어떤 유전자가 발현된다면 해당되는 단백질이 세포질 내에 만들어지게 되므로 슬라이드 위의 조직에다 그 단백질에 대한 항체(일차항체)를 결합시키고 그 항체에 대한 항체(이차항체)에 어떤 표식을 하여 다시 결합시킨 후 그 표식을 예민한 검출방법을 이용하여 육안적으로 알아 볼 수 있도록 하는 방법이다. 특정 단백질의 발현이 어떤 세포의 어느 부위에서 발현되는지를 밝히는 방법으로서 전령 RNA가 실제 단백질을 만드는지 확인을 할 수 있는 장점이 있는 반면에 드물지만 항체가 유사한 단백질과 교차반응을 할 경우 원하는 단백질이 아닌 단백질이 검출될 수도 있다는 단점도 가지고 있다. 각 세포에 국소적으로 1,000-10,000개의 항원이 있으면 감지할 수 있다.

현재 검출방법으로서 가장 널리 사용되고 있는 것은 아비딘-바이오틴-효소 복합체(avidin-biotin enzyme complex, ABC) 검출법이다. 달걀의 흰자위(egg white)에 존재하는 아비딘이라는 분자량 68,000의 당단백(glycoprotein)은 분자량이 매우 작은 비타민의 일종인 바이오틴과 매우 친화력이 강하며(affinity constant>$10^{15}M^{-1}$), 동시에 4개의 바이오틴 분자들과 결합을 할 수 있다는 특성을 이용하는 것이다. 즉 이차항체를 바이오틴으로 표지하여 일차 항체와 결합시키고, 알칼리성 인산 분해효소(alkaline phosphatase), 페록시다아제(peroxidase), 글루코오스 산화효소(glucose oxidase), 갈락토시다아제(galactosidase) 같은 효소를 역시 바이오틴으로 표지한 후 아비딘을 첨가하면 항원단백+일차항체+이차항체+(아비딘/바이오틴/효소)혼합체가 형성된다. 이후 효소가 분해할 수 있는 기질과 발색 염료를 함께 첨가하면 조직의 특정 부위에 발색되는 부위를 현미경하에서 관찰할 수 있다. 효소 활성 검출법 이외에도 fluorescein 같은 형광물질을 아비딘에 직접 결합시켜 바이오틴으로 표지된 이차항체와 직접 반응을 시키면 일차 항체와 이차항체가 결합된 부위에서 나오는 형광을 형광 현미경으로 관찰할 수 있다.

### 2. 용 도

Western blotting이 단백질이 어떤 조직에서 발현되는지를 정량하는데 비하여 면역조직화학법은 조직의 어떤 부위에서 단백질이 발현되는가를 밝히는 방법이다. 마치 Northern blotting이 전령 RNA의 발현 여부만을 밝히는 것임에 비하여 in situ hybridization이 전령 RNA가 발현되는 정확한 부위를 밝힐 수 있는 방법이 된다는 것과 유사한 비유가 된다.

### 3. 방 법

신선한 조직의 냉동절편을 만들거나 고정액에 고정된 조직을 파라핀에 굳혀서 절편을 만들어서 슬라이드 위에 붙혀 놓는다. 냉동절편을 만든 경우 조직을 건조시킨 후 고정액에 잠시 담가서 고정한 후 -70℃에 보관하거나 곧이어 실험에 이용한다. 파라핀 속에

굳힌 조직은 우선 파라핀을 제거하고 나서 항체 결합 반응을 시행한다. 관찰의 대상이 변성되기 쉬운 단백질이므로 조직의 절편은 원칙적으로 신선한 냉동 조직으로부터 신속하게 만들어 고정하는 것이 바람직하다. 그 단백질이 많이 발현되는 경우에는 일반적인 파라핀 고정으로부터 절편을 만들어서 사용하여도 충분히 관찰할 수 있으나, 발현이 많지 않은 단백질일 경우는 생체에서 적출 즉시 냉동 절편을 하여 고정하는 것이 좋다. 경우에 따라서는 고정액을 어떤 것을 사용하는가에 따라 세포내의 단백질이 빠져 나가거나 파괴될 수도 있어 고정액 선택에 있어서도 신중하여야 한다. 대부분의 경우 10% formalin이나 4% paraformaldehyde이면 적당하다.

항체 결합반응을 위한 많은 kit들이 상품화되어 있어 적당한 것을 선택하여 그 곳에 소개되어 있는 실험 절차와 주의사항에 따라 사용하면 된다. Horseradish peroxidase(HRP)가 ABC의 효소로서 가장 흔히 사용되고 있는 것으로 먼저 조직이 고정되어 있는 슬라이드를 적절한 완충액으로 세척하여 고정액을 제거한다. 그 조직이 원래 가지고 있는 페록시다아제의 활성을 없애기 위하여 과산화수소가 포함된 완충액 속에서 잠시 처리한 후 다시 완충액으로 세척한다. 조직의 특성에 따라 원래 페록시다아제의 활성 정도가 다르므로 과산화수소 희석액으로 처리할 필요가 없을 수도 있고 반드시 처리하여야 할 수도 있다. 효소의 활성이 많은 경우에는 나중에 조직에 광범위한 비특이적 배경이 많아지므로 이런 경우에는 과산화수소 처리 시간을 증가시키거나 농도를 다소 증가시키는 것이 바람직하다.

결합항체의 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 일차항체나 이차항체와 아무런 반응이 없는 동물의 혈청을 5-10% 농도로 완충액에 타서 실온에서 1-2시간 정도 반응시킨 다음 다시 완충액으로 남아있는 혈청을 세척한다. 일차항체와 반응은 대개 실온에서 2-4시간 정도 시행하지만 단백의 발현이 적으리라고 예상되는 경우에는 더 시간을 연장하거나 4℃에서 1-2일까지 시행하는 수도 있다.

일차항체가 어떤 동물에서 만들어진 것인가에 따라 이차항체를 결정하는데 토끼의 혈청으로 만든 일차항체라면 반드시 이차항체를 토끼에 대한 항체(anti-rabbit IgG)로 선택하여야 할 것이다. 이차항체를 처리한 후 세척을 잘하여 일차항체와 결합하지 않은 것은 완전히 제거하여야 한다. 이차항체는 바이오틴으로 표지가 되어 있기 때문에 ABC를 첨가하였을 때 약간의 바이오틴만 있어도 결합하여 비특이적인 지저분한 배경을 만든다.

아비딘-바이오틴-효소 복합체를 완충액에 희석하여 조직 위에 떨구고 1시간 정도 실온에서 반응시킨 다음 완충액으로 철저히 세척해서 특이적 결합을 하지 않고 남아 있는 효소를 제거해버려야 기질과 발색제를 넣었을 때 지저분한 비특이적 배경이 생기지 않는다.

페록시다아제의 기질이 되는 과산화수소수를 희석한 완충 용액을 다시 조직위에 떨구어서 5-30분간 반응시켜 발색시킨 다음 물로 세척하여 발색 반응을 정지시킨다.

세포 개개의 세포 윤곽을 파악하기 위하여 충분히 발색된 슬라이드를 대조 염색한 후, 커버 슬립을 덮어 영구 보관하는 슬라이드를 만들어 광학 현미경하에서 관찰한다. 대조 염색(counter stain)은 사용하는 효소의 작용으로 발색되는 색조에 따라 대조가 잘 될 수 있는 염색제를 선택하는 것이 관찰을 용이하게 해준다.

## Confocal(다중 공촛점) Laser Scanning Microscope[6)]

Confocal laser scanning microscope(CLSM)은 기존 현미경의 한계를 극복한 첨단 장비로서 세포 구조나 조절 기전을 연구하는데 없어서는 안되는 기기로서 세포생물학, 신경생리학, 의학, 약학, 식품, 금속, 반도체 등의 광범위한 분야에 걸쳐서 활용되고 있다. 특히 생물 분야에서는 FITC나 Rhodamine, Fluo-3와 같은 다양한 형광 염료의 개발 덕분으로 세포내 $Ca^{++}$ 농도, $H_2O_2$와 pH의 변화를 살아있는 세포에서 직접 측정할 수 있을 뿐아니라 면역화학 염색을 이용한 세포내 구조물의 형태적 변화 관찰, 염색체 분석, 세포막 성분의 이동 현상 연구, 소포체나 mitochondria 등의 세포내 소기관의 연구, 세포간의 signal 전달의 가시화, immunochemical markings을 통한 면역계의 연구 등이 가능하다. 주로 이용되고 있는 분야는 크게 2가지로 나눌 수 있는데 cellular localization, 세포막 단백질의 세포내 이동, colocalization 등에 이용되는 3-D construction과 세포

내 물질의 양적 변화와 구조적 변화를 측정하는 time series이다.

## 1. 서 론

광학현미경과 전자현미경은 세포의 기능, 구조 및 생리적 특성을 연구하는데 널리 이용되지만 분석의 한계로 인해 새로운 형태의 현미경 개발이 필요하게 되었다. 초미세구조를 관찰하는데 중요한 기능을 수행하는 전자현미경은 시료의 고정과 절편을 만드는 과정에서 시료에 인위적 변화를 줄 수 있으며 초고압 전자현미경을 제외한 일반 투과전자현미경의 경우 연속적인 절편에 의한 3차원적 분석이 불가능하다. 일반현미경의 경우 전자현미경과는 달리 살아있는 세포와 고정된 시료를 관찰할 수 있지만 해상도가 0.2 $\mu$m에 불과해 미세구조를 관찰할 수 없고 특히 초점면 이외에서 오는 image에 의한 산란현상으로 인해 두꺼운 시료는 관찰하는데 많은 어려움이 있다. 이어서 개발된 현미경이 Video-enhanced fluorescent microscope인데 일반현미경에 비해 contrast와 detection이 개선되었으나 산란현상을 해결하지 못하는 문제점을 가지고 있다. 이와 같은 산란현상을 해결하기 위해 computer deconvolution technique을 이용한 현미경이 개발되었는데 deconvolution 기술에 의해 촛점면 이외에서 오는 image를 제거할 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러나 deconvolution 기술은 주로 computer에 의한 작업인데 많은 시간이 소요되는 단점을 가지고 있다.

공촛점 현미경(confocal microscopy)의 원리는 point source로부터 나오는 광을 사용해서, 시료의 초점과 detector pinhole상의 초점을 일치(confocal)시켜 촛점면 이외의 부분은 현미경 상에 나타나지 않도록 함으로써 기존의 형광 현미경에서 나타나는 flare 현상을 제거한 것이라고 볼 수 있다. 이렇게 할 경우 일반 형광 현미경과 비교해 해상도가 이론적으로 1.4배 증가한다. 그러나 point source로부터 나온 광원은 detector pinhole을 지나 상을 형성하는 과정에서 대부분의 빛을 소모하기 때문에 광원이 아주 밝아야 되거나, 시료 자체가 상당한 형광을 발해야만 되는 단점이 있다. 이러한 어려움을 극복하기 위하여 광원으로 laser를 사용하고, 아울러 시료 전체를 scanning해야 되기 때문에 scaning의 속도를 증가시키기 위해 beam steering method가 개발되었다. 또한 computer-controlled moto-driving focusing system을 응용함으로써 automatic optical sectioning이 가능하게 되어 3차원 image의 구성이 용이하게 되었다.

## 2. 시료의 염색

### 1) 염색 방법

**(1) 면역화학 염색** : 주로 3차원적 구조, 특정 단백질의 세포내 분포도, 세포막 단백질의 세포내 이동 등을 분석하기 위해 이용하는데 coverslip에서 배양한 세포를 고정하고 Triton X-100 등으로 permeabilization한 후 염색한다.

**(2) Real-time measurement** : 살아있는 세포의 염색을 위해서는 세포막을 통과시킬 수 있는 형광 염료를 이용해야 하는데 일반적으로 acetoxy methylester(AM)가 붙어 있는 형광 물질을 이용한다. AM이 붙어있는 형광 염료는 세포막을 통과한 후 세포질에 존재하는 esterase에 의해 AM이 분리되고 AM이 분리된 염료는 세포내에 존재하면서 정량하고자 하는 물질의 농도에 비례하는 형광도를 보이게 된다. AM이 붙어 있는 염료에는 $Ca^{2+}$이나 pH의 변화를 측정하기 위한 Fluo-3, AM : Fura Red, AM : SNARF-1, AM : SNAFL-1, AM : BCECF, AM 등이 있다. 또한 AM 대신 diacetate를 이용하기도 하는데 $H_2O_2$를 정량하는 2′7′-dichlorofluorescein diacetate가 이 부류에 해당한다. cAMP를 정량하는 FICRhR는 microinjection을 통해서만 가능하다.

## 3. 응 용

3-D construction은 CLSM과 일반 형광 현미경을 구분해 주는 가장 중요한 특징 중의 하나로 CLSM의 기능 중에서 가장 많이 쓰이고 있는 부분이다. CLSM은 shallow depth field와 optical sectioning을 기본적 특징으로 가지고 있기 때문에 시료를 0.1에서 수 $\mu$m까지 광학적으로 연속적인 절편(sectioning)을 만들 수 있는데 이러한 기능은 일반 형광 현미경으로는 불가능하다. 3-D construction을 위해 가장 이상적인 시료의 두께는 50-100 $\mu$m이며 빛이 투과할 수 있어야 한다. 3-D image는 scanner unit를 통해 얻어진 연속적 절편들을 "3-D projection"으로 processing 해서 만들 수 있으며, "stereo images"와 "depth coding"이라는 software를 이용

해 좀 더 선명한 3-D image를 얻을 수 있고 여러 가지 색상을 이용해 depth를 나타낼 수 있다. 3-D construction에서 가장 흥미로운 부분은 "animate"라는 기능을 이용해 3-D image를 X, Y, 또는 Z 축을 중심으로 회전시킬 수 있다는 점이다.

3-D construction을 통해 얻을 수 있는 정보는 다양하지만 가장 널리 이용되고 있는 것을 설명하면 크게 3가지로 나눌 수 있다. 첫째는 특정 물질의 세포내에서의 위치(Intracellular lacalization)를 정확히 결정할 수 있음으로 그 물질이 핵내부, 세포질 또는 세포막에 존재하는지를 구분할수 있다. 세포내에 있는 특정 물질을 항체 등을 이용해 형광 물질로 염색거나 식물의 경우 자체 형광이 있어 염색하지 않고 직접 관찰할 수도 있다. 둘째는 세포막과 세포내부를 구분할 수 있기 때문에 세포막 단백질의 세포내 이동을 관찰할 수 있고 이는 세포내 신호전달 기전을 가시화할 수 있다. 셋째는 colocalization인데 두가지 이상의 세포내 물질을 염색하여 각각을 구분할 수 있기 때문에 각 image를 분리해서 관찰할 수 있다. 이 기능은 세포내 소기관에 특정 단백질이 존재하는지를 연구하는데 아주 적절하다.

## Flow cytometry(FACS)[7]

형광 염료로 세포를 표지하고 흐르는 액체(flow) 속에서 세포의 물리적 또는 화학적 특징을 측정하고 세포를 분리하는 방법이다. 세포(입자)의 내부나 표면에 있는 분자와 특 이하게 반응하여 형광을 나타내는 형광 염료를 이용하여 세포를 염색한 후 적절한 파장의 laser 광으로 세포를 활성화하면 세포는 형광을 띠고 그 때에 방출하는 광을 모아 detector에서 빛의 양을 electronic signal로 변화시켜 정량함으로써 세포가 발현하는 특정 단백질의 양, 세포내 DNA의 양, 특정 효소의 활성도및 세포의 대사 상태 등을 분석 비교할 수 있다. 세포의 크기나 세포의 과립성에 따라 laser beam의 산란 방향이 변화하므로 산란된 빛의 강도를 해석하여 세포의 물리적 특성을 파악할 수 있다. 세포에 의하여 방해받지않고 직진된 빛(10° 이내의 산란율)의 양은 세포의 크기를 나타내며(forward light scatter : FSC) 10° 이상 산란된 빛은 90° 방향에서 측정하는데(side light scatter : SSC) 세포의 과립성을 나타낸다. 이 방법은 여러 가지 지표를 동시에 측정할 수 있고, ELISA나 Western blot 분석과 비교할 때 세포당 500 분자만 있으면 개개의 세포를 매분 10,000개 이상의 분석할 수 있는 장점이 있고 상당히 정량적 분석이다.

## 참 고 문 헌


1) Bollag DM, Edelstein SJ : Protein methods. New York, NY, Wiley-Liss, 1991
2) 유경자 : Immunoassay and blotting. *대한면역학회지* 9:121-131, 1987
3) 양인명 : 웨스턴 블롯팅. 최영길 편저. 임상분자생물학 기법, 고려의학, pp.197-205, 1993
4) Harlow E, Lane D : Using antibodies : A laboratory manual. Cold Spring Harber, NY, Cold Spring Harber Laboratory Press, 1999
5) 양인명 : 면역조직화학법. 최영길 편저. 임상분자생물학 기법, 고려의학, pp.207-215, 1993
6) 하권수 : Confocal laser scanning microscope의 원리와 응용. 기초과학지원연구소 중앙분석기기부 생체고분자그룹, 1997
7) http://facs.scripps.edu


**Table 1. Commonly Used Sources of Antibodies**

| Antibody source | Antibody type | Total antibody concentration | Specific antobody concentration | Contaminating antibodies |
|---|---|---|---|---|
| Serum | Polyclonal | 10mg/ml | Normally less than 0.5mg/ml | Other serum antibodies |
| Tissue culture supernatant with 10% FBS | Monoclonal | 1mg/ml | 0.05mg/ml | Calf antibodies |
| Ascites | Monoclonal | 1~10mg/ml | 0.9mg/ml | Mouse antibodies |

**Table 2. Factors Affecting the Strength of Antibody Binding**

| | |
|---|---|
| Cell staining | 1. Affinity, $10^6$ liter $mol^{-1}$(weak signal) to $10^8$ liter $mol^{-1}$(strong signal)<br>2. Possible bivalent binding<br>3. Possible multivalent binding to secondary reagent<br>4. Possible local concentration effects |
| Immunoprecipitation | 1. Affinity, $10^7$ liter $mol^{-1}$(weak signal) to $10^9$ liter $mol^{-1}$(strong signal)<br>2. Possible polyclonal binding<br>3. Possible multivalent binding to secondary reagents |
| Immunoblotting | 1. Affinity, $10^6$ liter $mol^{-1}$(weak signal) to $10^8$ liter $mol^{-1}$(Strong signal)<br>2. Possible bivalent binding<br>3. Possible multivalent binding to secondary reagents<br>4. Possible local concentration effects |

**Table 3. Using Appropriate Controls**

| Technique | Positive controls | Negative controls | Other needed controls |
|---|---|---|---|
| Cell staining | Stain known source of antigen for pattern | | Omit primary antibody |
| Immunoprecipitations | Immunoprecipitate known source of antigen for size comparison | Nonimmune antibody | |
| Immunoblots | Immunoblot known source of Ag for size comparison | Nonimmune antibody | |
| Immunoaffinity purification | Run pure antigen on gel for size control | Nonimmune antibody | Resin alone |

**Table 4. Choice of Polyclonal, Monoclonal, or Pooled Monoclonal Antibodies**

| Method | Polyclonal antibodies | Monoclonal antibodies | Pooled monoclonal antibodies |
|---|---|---|---|
| Immunoblots | Good choice, if correct antibodies are available | Good choice, if correct antibody is available | Best choice, if multiple specific monoclonal antibodies are available |
| Immunoprecipitations | Good choice, if correct antibodies are available | Good choice, if correct antibody is available | Best choice, if multiple specific monoclonal antibodies are available |
| Immunostaining | Good choice, if correct antibodies are available | Better choice, because of specificity | Not recommended, unless signal strength a problem |
| Immunoaffinity purification | Not recommended, unless antipeptide antibodies | Best choice | Not recommended; dissociating the antigen is very difficult |

**Table 5. Success of an Immunochemical Technique**

| Technique | Antibody-antigen avidity requirements in the different immunochemical techniques | | | | Antibody specificity in the different immunochemical techniques | | | Epitope quality in the different immunochemical techniques | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Affinity requirements | High local concentration of epitopes | Bridging through epitopes | Bridging through secondary reagents | Cross reactions | Cautions | Comments | Location of epitopes available for antibody binding | Types of epitopes displayed | Complicating issues |
| Staining | Lower-affinity antibodies often sufficient | With some antigens | Common | Common | Common | Difficult to recognize, because secondary method to confirm antigen identity is difficult | Controls such as two independent antibody important | Surface epitopes | Some native; some denatured | Extensive loss of epitopes during fixation Many epitopes masked by other cellular structures |
| Immunoprecipitation | Requires high-affinity antibodies | No, antigen in solution | Very rare | Only with polyclonal antibodies | Occasional | Important to distinguish between cross-reactiona and association | Good controls needed | Surface epitopes | Most native | Some loss of epitopes during extraction Some epitopes blocked by associated molecules |
| Immunoblots | Lower-affinity antibodies often efficient | With some antigens | Occasionally | Common | Common | Easy to recognize, because antigen also identified by size | | All linear epitopes | All denatured | Little or no renaturation of denatured epitopes |
| Immunoaffinity purification | Requires high-affinity antibodies | No, antigen in aolution | Try to avoid | Try to avoid | Occasional | Cross-reacting antibodies should be avoided | | Surface epitopes | Most native | Antibody-antigen interaction must be easily reversible |

**Talbe 6. Antibody Access in the Different Immunochemical Techniques**

| Technique | Multimeric interactions | | Protein modification | | Orientation of antigen | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Frequency | Common solution | Frequency | Common solution | Common frequency | Solution |
| Immunopreci-pitations | Commonly seen | Change antibodies | Possible | Change antibodies, enzymatic removal | Never a problem | N/A |
| Immunoblots | Never a problem | N/A | Possible | Change antibodies, emzymatic removal | Never a problem | N/A |
| Immunoaffinity purification | Commonly seen | Change antibodies | Possible | Change antibodies, enzymatic removal | Never a problem | N/A |
| Staining | Possible seen | Change antibodies, partial proteolysis, microwave | Possible | Change antibodies enzymatic removal | Commonly seen | Change antibodies |

**Table 7. Selecting the Right Antibody**

| Technique | Kinetics of antibody-antigen interaction in the various immunochemical techniques | | | | | Methods for changing epitope display in the various immunochemical technique | | | Factors that influence the success of immunochemical techniques | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Local epitope concentration | Antigen fixed | Antibody fixed | Binding kinetics | Comments | Method | Rationale | Comments | Antibody-antigen avidity a problem | Specificity requirements | Eptope damage |
| Staining | Concentrations mixed | Fixed | Fixed | Slow | Regular display allows affinity antibody to work Possible higher local concentration allows lower affinity antibody to work | Protease treatment | Light protease treatment will remove sterically hindering proteins and may allow antibody access | Difficult to standardize Many new epitopes displayed so excellent controls are required | Normally no, but severe problems with architecture | Severe problems, controls difficult | Medium |
| | | | | | | Microwave | Light irradiation distorts the local environment of the antigen and may allow antibody access | Many new epitopes displayed so excellent controls are required | | | |
| Immunoprecipitations | Generally very low | Free | Free | Fast | | Alter extraction conditions | Different lysis buffers will alter the presentation of the antigen | | Needs high-affinity antibody for antigen clearance | Examine antibody binders by SDS-PAGE | In most cases, antibody must see native structure |
| | | | | | | Boil samples in SDS prior to immunoprecipitation | Denaturation will expose epitopes | Need antibodies against denatured antigen Will lose native interactions | | | |
| Immunoblots | Mixed | Fixed | Fixed | Slow, incubation times greater than 1 hr are recommended | Possible higher local concentration promotes high avidity interactions | None | | | Generally no | Must see denatured structure | All antigen completely denatured |
| Immunoaffinity | Generally very low | Free | Free | Slow, but high local concentrations of the antibody drive the reaction | | Alter extraction conditions | Different lysis buffers will alter the presentation of the antigen | | Must see native structure | Can examine binders by SDS-PAGE | In most cases, antibody must see native structure |
| | | | | | | Boil samples in SDS prior to adding beads | Denaturation will expose epitopes | Need antibodies against denatured antigen Will lose native interactionsz | | | |