



Nano DSC를 이용한 지질샘플링 변인연구와 샘플간 오차 개선연구

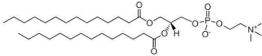
Tae-Jun Won, Dong-Kuk Lee*

Department of Fine Chemistry, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 01811, Korea.
* E-mail: dongkuk@seoultech.ac.kr

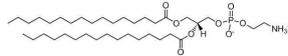
Abstract

실제 세포는 다양한 분자들로 구성되어 있기 때문에 실험데이터를 해석하기에 매우 복잡하다. 따라서 많은 분야에서 특정 조성의 지질을 가진 단순한 모델 세포막을 만들어서 통제된 실험을 진행한다. 하지만 현재 모델 세포막을 만드는 방법은 통일되어 있지 않으며, 2차적인 반응을 관찰하기 위해서 실험군과 대조군에 쓰일 다수의 균일한 샘플을 만들 필요가 있다. 이번 연구에서는 지질막의 상변화에 대한 민감한 정보를 제공하는 Nano DSC를 이용하여, 보편적인 모델 세포막 샘플링과정에서의 변인과 그 영향력을 파악하였다. 이를 이용하여 샘플간의 오차를 개선하고 보다 정밀한 샘플링 방법을 제안한다. Nano DSC를 통해 DMPC, DPPE MLVs의 상전이온도($T_{pre} T_m$)와 엔탈피변화($\Delta H_{pre} \Delta H_m$)를 측정하였다. 클로로폼과 지질의 접촉시간, 샘플링 과정에서의 미열에 따른 상전이온도나 엔탈피변화 값의 변동이 관찰되었고, DPPE의 경우 열처리 여부에 따라 상전이 온도가 달라지는 것을 확인했다. 이를 통해 세부적인 샘플링 방법을 규정하여 상전이온도와 엔탈피변화의 최소화된 오차를 확인하였다.

Materials



(a) DMPC



(b) DPPE

Sampling variables

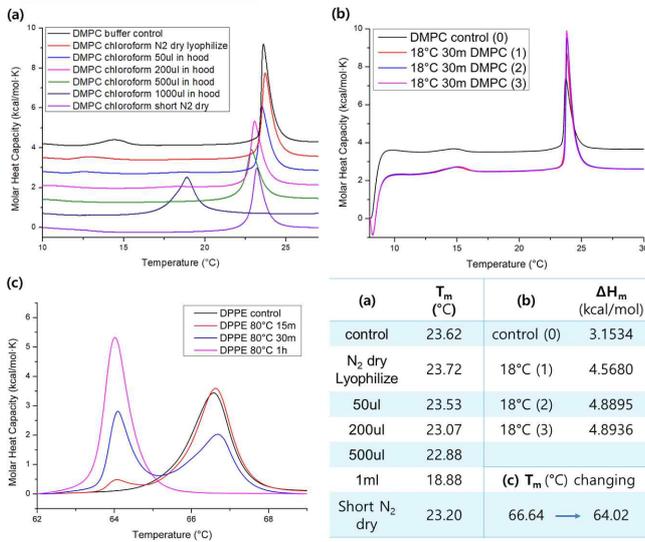


Figure.1 (a) 지질이 클로로폼용액으로 존재하는 시간증가에 따른 막상태 변화. 2days이상 건조시켰으며 최하단의 그래프(보라)는 클로로폼의 잔류영향력 확인. (b) 동일한 샘플의 열노출에 따른 엔탈피 변화 (c) DPPE 80°C 열처리 시간에 따른 상전이온도 변화를 보여주는 DSC 그래프

Table.1 <Figure.1>의 T_m (°C) 및 ΔH_m (kcal/mol)

Experiment

최종 샘플: DMPC or DPPE 0.45mg/0.45ml phosphate buffer (pH7.4 no salt)

- 측량 오차를 최소화 하기위해 대조군과 실험군에 쓸 지질을 한 번에 취득한다.
- 각 실험에 따라 디가싱된 버퍼나 유기용매를 넣어주고 불택싱하여 섞어준다. (두 종류 이상의 지질을 섞어줄 경우 유기용매를 사용하되, 한 종류의 지질을 사용하면 바로 버퍼로 진행하는 것도 고려해본다.) / (소분은 전자저를 마치고 열적안정화를 한 이후에 6번에서 진행한다. 만약 소분시의 농도에서 지질이 버퍼에 잘 분산되지 않는 경우에는 농도를 수정하거나 2번에서 유기용매로 소분한다.)
(2') 클로로폼 등 유기용매를 넣어준 경우
2'-1. 고순도 질소를 이용하여 가능한 빨리 용매를 날려준다.
2'-2. 동결건조기를 이용해 8시간 이상 건조시킨다.
2'-3. 원하는 농도만큼 디가싱 된 버퍼를 채워준다. (상온에서 기화가 빠른 유기용매의 경우, 유기용매와 측량 후 소분할 지질을 담은 에펜드르프를 저온보관하여 소분 직전에 꺼내 쓴다.)
(2'') 버퍼를 바로 넣어준 경우
2''-1. 원하는 농도만큼 디가싱 된 버퍼를 채워준다.
- 위터바스를 이용하여 지질의 상전이온도 이상에서 45~60분 중탕시킨다. (지질이 용해되지 않고 필름상을 유지한다면 사전에 Freeze&Thaw를 1회 해준다)
- Freeze&Thaw 작업을 3~5회 해준다. (thaw 과정에서 고온으로 빠르게 녹이지 않고, 불택싱을 하면서 천천히 녹인다.)
- 4°C 냉장고에서 8시간이상 보관하여 열적안정화 및 수화를 한다.
- 지질을 불택싱하여 섞어준 뒤 소분해준다.
- 샘플을 10분 디가싱한 후에 U자관에 넣는다. (기포가 들어가지 않은 것을 확인한다)
- DSC를 실행시키고, 실험 후에는 지질의 상전이온도보다 고온의 증류수로 15회 이상 세척한 뒤 버퍼로 다시 세척해준다.

Checking for errors between samples

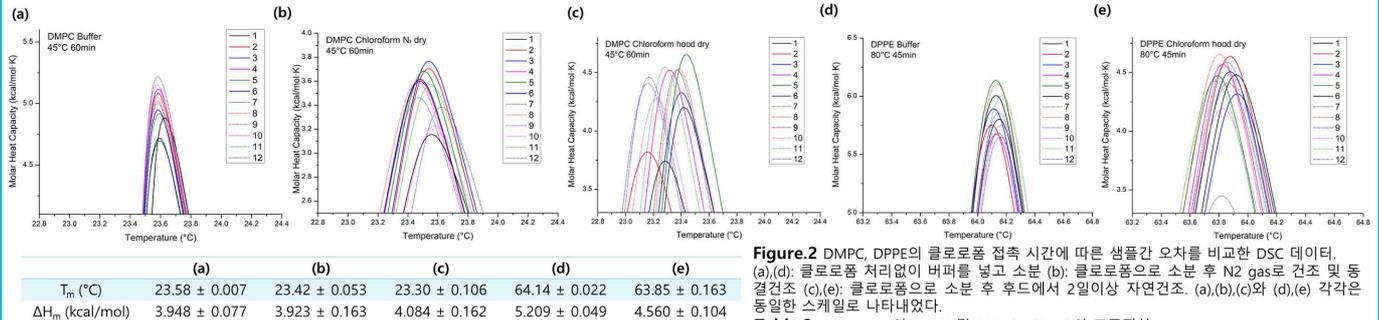


Figure.2 DMPC, DPPE의 클로로폼 접촉 시간에 따른 샘플간 오차를 비교한 DSC 데이터. (a),(d): 클로로폼 처리없이 버퍼를 넣고 소분 (b): 클로로폼으로 소분 후 N₂ gas로 건조 및 동결건조 (c),(e): 클로로폼으로 소분 후 후드에서 2일이상 자연건조. (a),(b),(c)와 (d),(e) 각각은 동일한 스케일로 나타내었다.

Table.2 <Figure.2>의 T_m (°C) 및 ΔH_m (kcal/mol)와 표준편차

Conclusion

모든 실험에서 제시한 샘플링 방법을 기준으로 특정 변인을 달리하였다. DMPC와 DPPE 모두 지질이 클로로폼 용액에 체류하는 시간이 길수록 $T_{pre} T_m$ 이 더 감소하였다 <Fig.1.a>. 클로로폼의 잔류 영향(보라)보다 변화가 커지는 점으로 보아, 클로로폼에 의해 막의 상태가 변했고 상전이가 더 쉽게 일어났음을 알 수 있다. 또한 샘플 측정 전에 모델막에 열이 가해졌을 경우 base line(용액의 열용량)의 감소와 ΔH 의 증가가 관찰되었으며 <Fig.1.b>, -20°C 냉동 보관되어 있던 DPPE의 경우 열처리 시간에 따라 상전이 온도가 달라졌다 <Fig.1.c>. 따라서 샘플링과정에서 특정 온도 열적안정화를 시키고, 측정 전까지 열적 변화에 주의해야 한다. 제시된 샘플링 방법으로 12개의 샘플을 한꺼번에 소분하여 측정한 결과, 저용 측량시의 ΔH 오차가 발생했지만 샘플간의 표준편차는 적었다. 2종류 이상의 지질을 사용하는 등의 이유로 유기용매 사용이 불가피한 경우 가능한 빨리 기화시키는 것이 바람직하며 샘플이 많을 수록 건조시간이 길어져 T_m 이 감소할 수 있다.

제목 :

Nano DSC를 이용한 지질샘플링 변인연구와 샘플간 오차 개선연구

초록 :

실제 세포는 다양한 분자들로 구성되어 있기 때문에 실험데이터를 해석하기에 매우 복잡하다. 따라서 많은 분야에서 특정 조성의 지질을 가진 단순한 모델 세포막을 만들어서 통제된 실험을 진행한다. 하지만 현재 모델 세포막을 만드는 방법은 통일되어 있지 않으며, 2차적인 반응을 관찰하기 위해서 실험군과 대조군에 쓰일 다수의 균일한 샘플을 만들 필요가 있다. 이번 연구에서는 지질막의 상변화에 대한 민감한 정보를 제공하는 Nano DSC를 이용하여, 보편적인 모델 세포막 샘플링과정에서의 변인과 그 영향력을 파악하였다. 이를 이용하여 샘플간의 오차를 개선하고 보다 정밀한 샘플링 방법을 제안한다. Nano DSC를 통해 DMPC, DPPE MLVs의 상전이온도(T_{pre} , T_m)와 엔탈피변화(ΔH_{pre} , ΔH_m)를 측정하였다. 클로로폼과 지질의 접촉시간, 샘플링 과정에서의 미열에 따른 상전이온도나 엔탈피변화 값의 변동이 관찰되었고, DPPE의 경우 열처리 여부에 따라 상전이 온도가 달라지는 것을 확인했다. 이를 통해 세부적인 샘플링 방법을 규정하여 상전이온도와 엔탈피변화의 최소화된 오차를 확인하였다.

결론 :

모든 실험에서 제시한 샘플링 방법을 기준으로 특정 변인을 달리하였다. DMPC와 DPPE 모두 지질이 클로로폼 용액에 체류하는 시간이 길수록 T_{pre} , T_m 이 더 감소하였다(Fig.1.a). 클로로폼의 잔류 영향(보라)보다 변화가 커지는 점으로 보아, 클로로폼에 의해 막의 상태가 변했고 상전이가 더 쉽게 일어났음을 알 수 있다. 또한 샘플 측정 전에 모델막에 열이 가해졌을 경우 base line(용액의 열용량)의 감소와 ΔH 의 증가가 관찰되었으며(Fig.1.b), -20°C 냉동 보관되어 있던 DPPE의 경우 열처리 시간에 따라 상전이 온도가 달라졌다(Fig.1.c). 따라서 샘플링과정에서 특정 온도로 열적안정화를 시키고, 측정 전까지 열적 변화에 주의해야 한다. 제시된 샘플링 방법으로 12개의 샘플을 한꺼번에 소분하여 측정한 결과, 저울 측량시의 ΔH 오차가 발생했지만 샘플간의 표준편차는 적었다. 2종류 이상의 지질을 사용하는 등의 이유로 유기용매 사용이 불가피한 경우 가능한 빨리 기화시키는 것이 바람직하며 샘플이 많을 수록 건조시간이 길어져 T_m 이 감소할 수 있다.