

제 목	Barley ribosome-inactivating protein의 결정화 및 X-선 실험
연구자	서 세 원
소 속	서울대학교 자연과학대학 화학과
내 용	<p>immunotoxin으로 쓰일 수 있는 리보솜 불활성화 단백질 (RIP, ribosome-inactivating protein)을 보리 씨앗에서 분리하였다. 이 단백질은 분자량이 약 30,000 kDa 정도되고, pI가 9.0 보다 높다. 이러한 성질을 이용하여 Na-phosphate 완충용액으로 추출하고, 황산암모늄 60 - 80 % 포화로 분획화하였다. 다음 CM-cellulose를 이용한 이온 교환 크로마토그래피, Sephacryl S-200 HR 컬럼을 이용한 gel filtration을 하여 순수히 분리하였고, 이를 전기영동하여 확인하였다.</p> <p>결정화는 상온에서 hanging drop vapor diffusion법을 이용하여 시행하였다. 가장 최적화된 결정 성장 조건은 다음과 같다. 저장 용액은 27.5 % (w/v) PEG 1,500, 100 mM Tris-HCl 완충용액 (최종 pH 8.41)이고, 단백질 용액은 24 mg/ml 농도로 50 mM Tris-HCl (최종 pH 8.42) 와 10 mM AMP에 녹아 있을 때였다. 이 조건하에서 1.4 mm x 0.5 mm x 0.3 mm 크기의 결정이 얻어졌다.</p> <p>X-선 실험 결과는 다음과 같다. 단위 격자 상수가 $a = 88.26 \text{ \AA}$, $b = 62.72 \text{ \AA}$, $c = 53.13 \text{ \AA}$, $\beta = 108.52^\circ$인 C2의 공간군이었다. Asymmetric unit 안에 한 분자의 RIP가 들어있고, 이 때 Matthew 상수 (V_M)는 $2.33 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ 이고 결정내의 solvent 함량은 47 % 이었다. 이 결정은 적어도 2.0 \AA 까지 회절하였고, 2.3 \AA Bragg spacing까지 약 90 % complete한 data를 얻었다.</p> <p>이 단백질은 이미 구조가 알려진 단백질인 ricin의 A-체인과 유사한 구조를 가질 것이라고 알려져 있기 때문에 이것의 모델로 이용하여 molecular replacement로 구조를 풀려고 실험을 계속 진행하고 있다.</p>