

PAGE

(Polyacrylamide gel Electrophoresis)

-단백질의 polyacrylamide gel 전기영동편-

1. 전기영동

원리

전기영동이란 용액 중의 전하를 띤 물질이 전기장 내에서 이동하는 현상을 말한다.

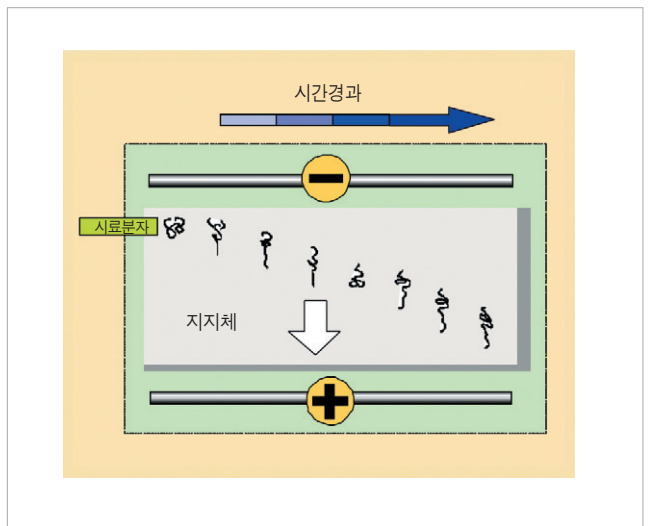
여기서 말하는 하전물질은 buffer 성분을 제외한 peptide, 단백질, 핵산(DNA, RNA) 등 수용액 속에서 +또는 - 전하를 가진 물질을 말하는데, 흔히 말하는 전기영동 시료이다. 단, 수용액 속에서는 시료가 확산되기 때문에 지지체로서 membrane이나 gel을 사용하여 이들 사이를 하전물질(시료)이 이동해 나가는 형태를 취하는 것이 대부분이다. 지지체(membrane, gel) 속의 시료는 직류 전기장 내에서는 그 성질(형태나 하전상태, 분자량 등)에 따라서 자신의 전하와 반대 전극을 향하여 이동한다. 이때 이동속도가 물질에 의해서 다른 성질을 이용하여 분리한다.

지지체인 agarose gel 또는 polyacrylamide gel은 그물 모양의 입체구조를 가지고 있어 시료에 대하여 분자를 걸러내는 역할을 한다. 작은 물질은 빠르게, 큰 물질은 느리게 이동하여 분자량에 따라 분리할 수 있다. 이때 이동거리와 분자량은 거의 반비례하므로 전기영동을 이용하여 분자량을 결정할 수도 있다. 또 분자를 걸러내지 않고도 전하상태나 형상에 따라 분리하는 방법도 있다. 이와 같은 요인을 다양하게 조절하여 시료 속의 각 성분을 분리할 수 있다.

전기영동은 이와 같은 원리를 이용하여 분자량 결정을 비롯하여 등전점이나 순도결정, 각 성분의 정량·정제 등에 이용되고 있으며, 단백질이나 핵산의 주된 분리·분석법이 되고 있다.

종류

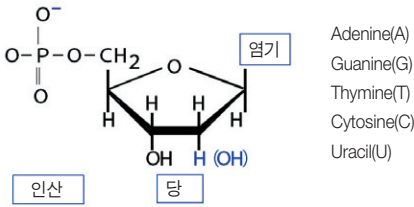
- 시료 : peptide, 단백질, 당단백질, 지질단백질, nucleotide, 핵산(DNA, RNA)
- 지지체 : 여과지, 셀룰로오스 acetate membrane, polyacrylamide gel, agarose gel, 한천
- 형태 및 방법 : Disk gel 전기영동, Slab gel 전기영동, Submarine 전기영동, 등전점 전기영동(IEF), 이차원 전기영동, Capillary 전기영동



★ 참고 : 핵산, 단백질의 구조와 크기

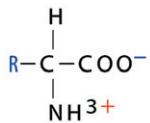
핵산은 인산 잔기에서 항상 (-) 전하를 가지지만 단백질은 아미노산의 종류나 환경(주변의 pH)에 따라 (+)도 (-)도 된다.

「유전자」핵산(DNA, RNA) - nucleotide



「호소」 단백질 - peptide - 아미노산

20종류의 표준 아미노산



핵산과 단백질의 크기는 약 2~10 nm, $10^3 \sim 10^6$ 의 분자량을 가진다.

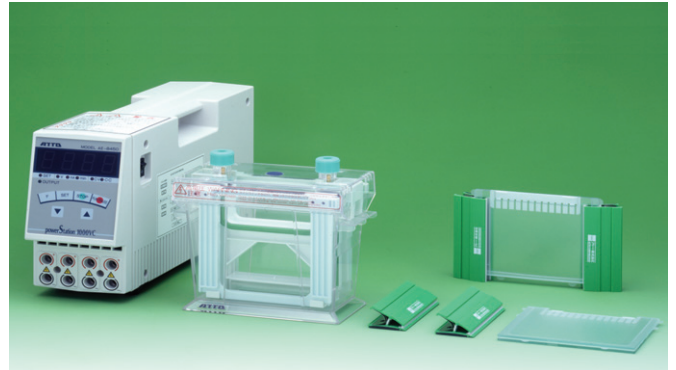
2. 전기영동 조작

일반적인 전기영동은 시료나 전기영동방법, 검출방법에 따라서 달라지지만 빠른 경우는 약 1.5시간, 검출에 시간을 요하는 경우에는 하루 이상이 걸리는 경우도 있다.

일반적인 전기영동의 전반적인 조작의 흐름

- ① 시약 · 시료의 준비
 - ↓ 시료, 전기영동용 buffer, gel용 stock액 등을 준비한다.
- ② 전기영동용 gel의 제작
 - ↓ 목적으로 하는 시료의 분자량에 따라 gel 농도를 결정하여 gel을 만든다.
- ③ 시료의 전처리
 - ↓ 시료를 완전하게 용해시킨다. 비중을 준다.
- ④ 시료 loading
 - ↓ gel을 전기영동조에 설치하고 시료를 loading한다.
- ⑤ 전기영동
 - ↓ 전기영동조를 전원장치에 접속하여 적당한 시간을 출력한다.
- ⑥ 염색
 - ↓ Dye 속에 gel을 담고 염색한다.
- ⑦ 탈색
 - ↓ 시료성분과 결합하지 않는 여분의 dye를 씻어낸다.
- ⑧ 검출
 - ↓ 색소염색, 발색의 경우에는 성분이 눈에 보인다.
 - 또는 형광색소염색의 경우에는 자외선으로 검출한다.
- ⑨ 보존
 - ↓ Gel dryer로 gel을 건조시켜 필름모양을 만들어 보존하거나 사진을 찍어둔다.
 - ↓ 카메라나 스캐너를 사용하여 컴퓨터에 저장한다.
- ⑩ 해석
 - 데이터로부터 내용을 해석한다.

그밖에 전기영동 후 blotting(membrane으로 transfer)하여 특이적으로 검출하는 방법, gel에서 성분(분리된 시료)을 회수하는 방법 등도 있다.



3. polyacrylamide gel 전기영동

가장 일반적인 전기영동으로는 단백질이나 핵산의 polyacrylamide gel 전기영동 및 agarose gel 전기영동을 들 수 있다. Polyacrylamide gel과 agarose gel의 차이(구분 사용)는 pore 사이즈가 다르다는 것인데, 주로 polyacrylamide gel은 pore가 작아 저분자량용으로, agarose gel은 pore가 크기 때문에 고분자량용으로 사용된다. 예를 들어 1~700 bp 크기의 DNA에는 polyacrylamide gel을 사용하고 약 500 bp 이상의 핵산에는 agarose gel을 사용하는 것이 일반적이다. 또 단백질은 수백 Da 정도의 peptide에서 수십 kDa의 단백질(대부분의 단백질은 이 범위에 포함된다)인 경우라면 polyacrylamide gel 전기영동으로 대응할 수 있다.

종류

단백질의 polyacrylamide gel 전기영동에는 다양한 종류가 있다. 형태로 구분하면 Disk형, Slab(수직)형, 수평형 등이 있는데 전기영동에 따라 구분해서 사용한다. 방법에서는 분자량 사이즈로 나누는 SDS polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE), 등전점으로 나누는 등전점 전기영동(IEF), 2가지 원리(예를 들어 상기의 분자량 사이즈와 등전점)를 2차원으로 전개하는 2차원 전기영동 등이 있다.

4. SDS 전기영동(Laemmli법)

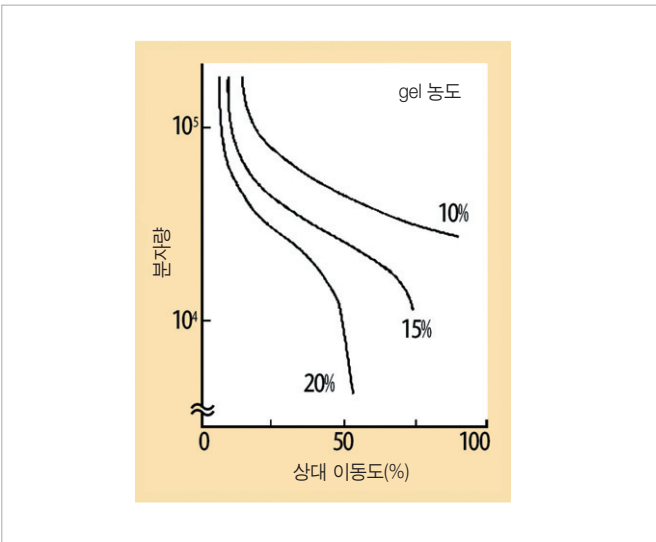
SDS 전기영동(SDS-PAGE)

SDS는 Sodium Dodecyl Sulfate($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$)의 약어로 음이온성 계면활성제의 일종이다. SDS는 단백질의 가용화제로서 이용되고 있으며, 단백질의 전기영동에서는 SDS-PAGE(SDS polyacrylamide gel 전기영동법) 가장 일반적인 방법으로 이용된다. SDS는 단백질에 이온적 결합하는 다른 micelle을 형성하는 경우도 있어 그 결합량은 polypeptide 사슬(단백질) 1에 대하여 1.2~1.5로 알려져 있다. 단백질은 구성하는 아미노산에 의해서 (+), (-) 상관없이 어느 쪽이건 전하를 띄지만 SDS가 결합(SDS 처리)함으로써 일시적으로 (-)하전을 띄어 모든 분자를 양극으로 이동시키고, gel의 pore 사이즈에 의해서 분자량의 크기에 따라 각각의 단백질을 분리할 수 있다. 전기영동 후에는 세로축에 분자량을 지수함수로, 가로축에는 단백질의 이동도를 나타낸 그래프로 분자량을 이미 알고 단백질의 이동도를 측정하여 검량선을 제작하여(아래 그림 참조) 미지의 단백질 분자량을 측정할 수 있다. 이 SDS-PAGE에도 많은 종류가 있는데, 가장 많이 이용되고 있는 것은 Laemmli 방법이다. Laemmli법은 실제로 분리하는 gel 위에 농축 gel을 제작하여 Cl^- 과 glycinate 이온을 이용하고 있어

시료를 농축하기 위한 밴드가 샤프해 지는 것이 특징이다. Gel에는 Tris-HCl을, 전기영동용 buffer로는 Tris-Glycine을 사용하여 SDS 존재 하에서 전기영동을 한다. (아래그림 참조)

시료

전기영동을 하기 전에 시료를 미리 용해해야 한다. 단백질에서는 SDS가 가용화제로 작용하기 때문에 우선 SDS를 처리하여 침전물이 있으면 원심분리로 이를 제거한다. SDS는 SDS 용액(시료 처리액)과 혼합시킨 후 2~3분간 가열하는 것이 일반적이지만, 열을 가하지 않고 실온에서 하룻밤 방치하는 방법도 있다. 시료에 따라 적합한 방법을 검토하기 바란다. 시료의 보존방법은 SDS 처리 전후에 상관없이 일반적으로 냉동 보존하지만 반복적인 용해는 바람직하지 않다.



5. Buffer와 전기영동조건

Buffer

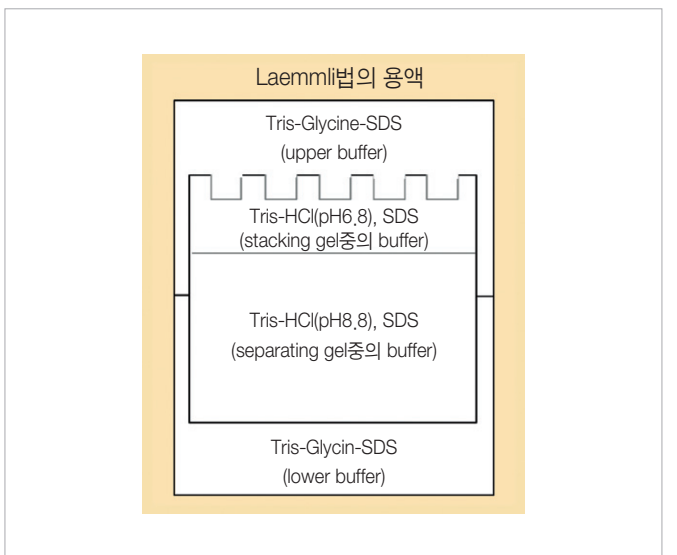
시료나 전기영동방법에 따라 사용되는 buffer는 다양하다. (등전점 전기영동에서는 buffer를 사용하지 않는다). 단백질 polyacrylamide gel 전기영동에서는 Phosphate buffer나 Tris buffer가 많이 사용된다. SDS-PAGE의 Weber-Osborn법은 Phosphate buffer, Laemmli법에서는 Tris buffer계열이 사용되므로 모두 알칼리성 조건이다. Laemmli법은 gel에 Tris-HCl을, 전기영동용 buffer로 Tris-Glycine을 사용하여 Cl⁻과 glycinate 이온의 이동도의 차이를 이용하여 시료를 농축하고 있어 샤프한 밴드를 얻을 수 있는 장점이 있다. 따라서 전기영동용 buffer에 pH를 맞추려고 HCl을 첨가하거나 일단 사용한 전기영동용 buffer를 다시 사용하면 이온계에 이상이 발생하여 전기영동결과에 영향을 주는 경우가 있기 때문에 피하는 것이 좋다. 또 조제나 희석할 경우 농도를 잘못 맞추면 전기영동 패턴이 흐트러지거나 전기영동시간이 매우 길어질 수 있다. 만약을 위해 전기영동시의 전류, 전압, 전기영동시간 등은 메모 해 두는 편이 좋다.

전기영동 조건

시료가 전기장을 이동해 나가는 것이 전기영동의 원리인데, 일반적으로

이 전기장은 직류 전기장을 뜻한다. 전기영동 전용전원이 그 제어와 공급을 하는 장치가 된다. 전기영동방법에 따라 필요한 전기용량은 달라지지만 단백질의 PAGE(Slab형) 전기영동에서는 전류 100 mA, 전압 500 V만 있으면 충분하다. 전기영동을 할 때 「일정한 전류, 일정한 전압 설정에 대한 적합한 조건」에 관한 질문이 많은데, 전기영동조건은 거의 관습적이라고 해도 과언이 아니다. 일정한 전압 설정을 위하여 흔히 이용되는 것은 Submarine형 아가로스 전기영동을 들 수 있다. Submarine형은 전기영동면적(gel 두께나 buffer량)을 일정하게 하기 어렵기 때문에 일정한 전류 설정이 어려워 재현성이 떨어진다. 또 sequencing이나 등전점에서는 일정한 전력 설정을 사용하면 된다. 전기영동시작 직후에는 전류가 흐르기 쉬워 발열이 발생하며, 일정한 전력으로 해 두면 전류가 높은 동안은 전압이 억제되고 전류가 낮아지면 전압이 높아져 자동조절과 같은 기능을 나타내게 된다. SDS-PAGE에서는 일정한 전류 설정이 이용되고 있다. 일반적으로 전기영동은 천천히 하는 것이 결과가 깨끗하다고 한다. 그러나 시간적 효율을 감안하여 결과에 영향을 미치지 않을 정도로 진행하는 것이 좋다. 어느 쪽이건 Joule열(전기영동 시 발생하는 열)에 의한 영향을 고려하여, 열에 의해 시료가 확산되거나 분해·불활성화 등의 영향이 발생하는 경우에는 전기영동조건을 변경하거나 gel의 온도를 일정하게 유지하여 대처해 나간다.

전기영동조건에 관하여 「전류는 전기영동면적에 비례하고 전압은 전극간 거리(gel 길이)에 비례한다」는 원칙을 기억 하자. 예를 들어 2개로 연결된 전기영동조에서 gel 1장 당 20 mA에서 전기영동을 하고 계속해서 동일한 조건 하에 2 mm 두께의 gel을 전기영동하고자 하는 경우에는 처음부터 40 mA로 설정한다. 1 mm의 gel 두께로 20 mA에서 전기영동한 후 계속해서 2 mm 두께의 gel을 전기영동하고자 한다면 40 mA로 설정하라는 뜻이다. 또 1대의 전원에 전기영동조 2대(전원단자에서 각각 1대)를 연결하는 경우에는 전원내부가 병렬이 된다는 점에서 일정한 전류 설정이라면 전류값을 2배로, 일정한 전압 설정이라면 전압값은 그대로 두면 된다. 전압에 관해서는 전기영동거리가 긴 경우나 온도가 낮은 경우 등은 저항이 크기 때문에 높은 전압을 필요로 하는 경우가 많다. 일반적으로 일정한 전류를 C.C(Constant Current), 일정한 전압을 C.V(Constant Voltage)로 많이 표시되고 있다.



6. 검출

검출방법

전기영동된 시료는 눈에 보이지 않기 때문에 전기영동 후에는 신속하게 검출 해야 한다. 단백질은 일반적으로 CBB(Commassie Brilliant Blue)로 염색한다. Dye 염색은 용액 속에 gel을 담귀두기만 해도 되므로 간단하고 저렴한 방법으로, CBB는 수백 ng을 검출할 정도로 감도가 높다. CBB에는 G-250과 R-250이 있는데, 다소 색이 다르지만 어느 쪽을 사용하건 상관없다. 이밖에도 dye를 이용하여 염색할 때는 Amido Black 10B라는 감도는 다소 뒤떨어지지만 단백질의 검출에 좋은 것도 있다. 이들은 모두 acetic acid · methanol이 있을 때 염색과 탈색이 이루어 지며, 단백질을 고정시킬 수도 있다. 최근에는 형광 색소도 이용되고 있으나 이는 별도의 검출장치가 필요하다. Negative 법이란 백그라운드(gel)가 흰색으로 단백질(밴드)이 투명하게 남기 때문에 이와 같이 불리고 있다. 또한 더욱 높은 감도 검출법으로 silver stain이 이용되고 있다. CBB의 약 100배 정도의 감도로 수 ng의 검출도 가능하다. 염색법과 비교하면 조작 과정이 복잡하고, 재현성이 다소 떨어지는 등의 문제도 있지만, 많은 회사에서 다양한 제품이 출시되어 사용하기 편리해졌다.

해석 · 보존

언어진 전기영동 결과로 목적에 맞게 해석한다. 예를 들어 어떤 단백질의 분자량을 측정하고자 할 때, 이미 알고 있는 분자량 단백질(분자량 마커)의 이동도를 측정하여 검량선을 제작하고(4. SDS 전기영동 그림 참조) 이것을 이용하여 분자량을 측정한다. 또 시료를 비교하는 경우에는 밴드의 유무나 농도를 살펴본다. 데이터는 사진으로 촬영하거나 gel 그 자체를 건조시켜 보관하는 방법 등이 있다. 최근에는 CCD 카메라로 촬영하고 컴퓨터에 저장하여 전용 소프트웨어로 해석하는 방법이 널리 이용되고 있다. 이와 같은 기기를 사용하면 해석(분자량 측정, 패턴비교, 정량 등), 데이터(전기영동패턴, 해석결과) 보존, 프린트 아웃이 간단하여 gel을 따로 보관해 둘 필요가 없어 편리하다.

검출법	반응	구체적 예	조작성	감도
색소염색	유색 색소의 단백질 결합	CBB(Commassie Brilliant Blue) Amido Black10B	◎ ◎	○ △
	형광색소의 단백질 결합	Sypro Orange	△	○
	Negative 법	SDS와 양이온의 혼합	Zu, K, Ca 등 *백그라운드가 흰색	○
Silver stain	은의 침착	Silver stain	△	◎
표식법	단백질 표식물의 검출	Ri, 형광색소	×	◎~◎

***다음호에는 전기영동 실제 실험법 강의가 계속됩니다.

Power Supply 일체형
Mini-slab Size Electrophoresis System

■ Power supply module



정전류 10/20/30/40mA 선택 가능
타이머 1~200분, 연속 가능



Plate setting



One-touch sealing

Power Supply

더 이상 필요하지 않습니다.

