

# PAGE—두번째 강좌

(Polyacrylamide gel Electrophoresis)

—단백질의 polyacrylamide gel 전기영동편(실습) —

## 1. 단백질 전기영동

단백질 전기영동인 Laemmli법(SDS-PAGE)으로 전기영동할 때의 주의 점에 대해서 소개한다.

### [필요한 기기 · 시약]

Tris, Glycine, SDS(Sodium dodecyl sulfate), HCl, acrylamide, N, N'-methylene-bis-acrylamide(Bis),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , TEMED, Glycerin, 2-mercapto ethanol, Acetic acid, Methanol, CBB(Commassie Brilliant Blue) G-250 또는 R-250, molecular marker, BPB(Bromo phenol blue)

\*이미 조제한 gel을 사용하는 경우에는 acrylamide, bis-acrylamide,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , TEMED는 필요없다.

\*전기영동용 또는 특등급의 시약 사용을 권장한다. Acetic acid, Methanol은 1등급을 사용하여도 무방하다.

\*Molecular marker는 시료의 분자량을 기준으로 결정한다. 정확하지 않을 경우에는 약 10,000 ~ 90,000 또는 200,000 범위를 사용한다.

전기영동장치 ATTO 「Mini-Slab」, 전기영동용 전원공급장치 ATTO 「Power station 1000 VC」 또는 전기영동과 전원공급 일체형 장치 ATTO 「ComPact PAGE」, micropipet(1~20  $\mu\text{l}$ , 20~100  $\mu\text{l}$ ), micropipet tip, pipet, 비커, 메스실린더, micro tube(1.5 ml) 또는 시험관, Tray(gel 염색용), 여과지 등

### [시약 조제]

\*이미 조제된 gel을 사용하는 경우는 ①~④의 과정은 필요없다

① A용액(30% acrylamide 보존액)	냉암소에 보관
acrylamide	29.2 g
N, N'-methylene-bis-acrylamide	0.8 g
H <sub>2</sub> O에 용해하여 100 mL로 만든다.	
② B용액(1.5 M Tris-HCl buffer, 0.4% SDS)	냉암소에 보관
Tris	18.2 g
Sodium dodecyl sulfate(SDS)	0.4 g

H<sub>2</sub>O에 용해하여 100 mL, pH 8.8의 HCl 용액으로 만든다.

③ C용액(0.5 M Tris-HCl buffer, 0.4% SDS)	냉암소에 보관
Tris	6.1 g
Sodium dodecyl sulfate(SDS)	0.4 g
H <sub>2</sub> O에 용해하여 100 mL, pH 6.8의 HCl 용액으로 만든다.	

④ D용액(10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	사용 시 조제
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	100 mg
H <sub>2</sub> O, 1 mL에 용해시킨다.	

⑤ 전기영동(upper, lower)용 buffer	냉암소에 보관
Tris	1.5 g(25 mM)
Sodium dodecyl sulfate(SDS)	0.5 g(0.1%)
Glycine	7.2 g(192 mM)
H <sub>2</sub> O에 용해하여 500 mL로 만든다(Mini Slab 전기영동 1회분, Compact PAGE 전기영동 5회분에 해당). 별도의 pH 조정은 필요없다.	

⑥ Marker(BPB) 용액	냉암소에 보관
Bromo phenol blue(BPB)	1 mg
Glycerin	0.1 mL
H <sub>2</sub> O	0.9 mL

⑦ Commassie Brilliant Blue(CBB) 염색액	밀폐 보관
Commassie Brilliant Blue(CBB)	1 g
Methanol	300 mL
Acetic acid	100 mL
H <sub>2</sub> O	600 mL
Filtration 한 후 사용한다.	

⑧ Commassie Brilliant Blue(CBB) 탈색액	밀폐 보관
Methanol	300 mL
Acetic acid	100 mL
H <sub>2</sub> O	600 mL

⑨ 시료 처리액	냉암소에 보관
Sodium dodecyl sulfate(SDS)	0.1 g(1%)
2-mercapto ethanol	0.1 mL(1%)
C용액(0.5M Tris-HCl buffer pH6.8)	1 mL(50 mM)
Glycerin	2 mL(20%)
H <sub>2</sub> O에 용해하여 10 mL로 만든다.	

\* 각 용액 특히 ①②③을 조제 할 경우에 지나치게 혼합하지 말 것. Acrylamide는 산소(공기)가 중합반응을 저해하기 때문에, 거품이 일게 되면 gel 조제 시에 굳기 어렵다.

\* Acetic acid와 Methanol은 단백질(시료)의 고정 작용을 한다.

\* ⑨는 시료가 고체(결정 등)이건 용액이건 단백질 농도가 높은 경우에 유효. 단백질의 농도는 CBB 염색의 경우는 1~2 mg/mL를 기준으로 한다. 시료의 단백질 농도가 낮은 경우에는 ⑨를 혼합하지 말고 각 용액을 위 농도가 되도록 더해 나간다.

## 2. 실험방법

### [전기영동(단백질 분리)]

gel 제작(이미 조제된 gel을 사용하는 경우에는 불필요)

유리 plate를 조립한다.

Separating gel 용액을 조제 · 주입

H<sub>2</sub>O을 넣어 굳힌다(30~60분).

Stacking gel 용액을 조제

H<sub>2</sub>O을 버리고 Stacking gel 용액을 소량 주입하여 표면을 세정

Stacking gel 용액을 주입

Comb 삽입, 굳힌다(20~30분)



시료(ex. 혈청, 세포 추출물)를 준비



SDS 처리(단백질 가용화 · 마이너스 하전, 비중)

SDS 용액과 혼합(전량 약 100~500  $\mu$ l)

실온



전기영동조, buffer 등 준비, gel을 전기영동조에 세팅

Lower buffer을 넣고 comb을 빼낸 후 각 well을 세정한 후 gel을 세팅하고 upper buffer을 넣는다.



전기영동용 gel에 시료를 넣는다(약 3~15  $\mu$ l\*)

comb 바닥에 가까운 곳까지 loading.



START

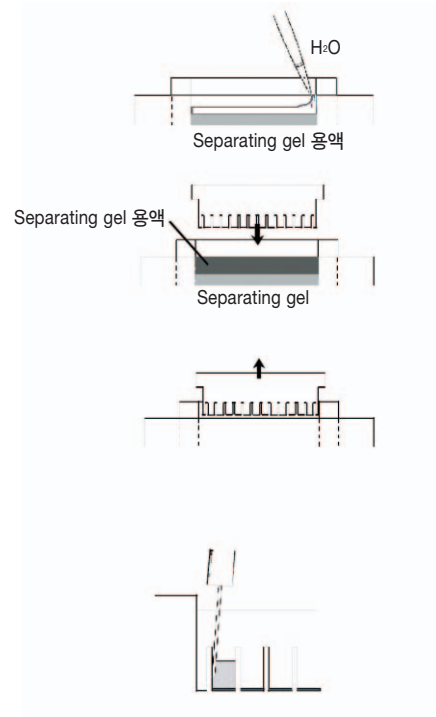
constant current(C. C) 20 mA/gel 1장\*

(약 60~90분간\*)

\*「Mini Slab」의 경우

「Compact PAGE」의 경우에는 시료를 최대 8  $\mu$ l

Constant current(30분간 또는 60분)



### [검출(염색 및 탈색) · 보관]

전기영동 종료



gel을 유리 plate에서 꺼낸다.

gel이 붙어있는 곳을 젖은 spatula로 가른 후 유리 plate를 거꾸로 하여 가장자리를 벗겨낸다.



gel(단백질) 염색 slowly shaking

40~ 60분 기준



탈색(여분의 염색약을 제거한다.)

slowly shaking하면서 용액 교환(2~3회)

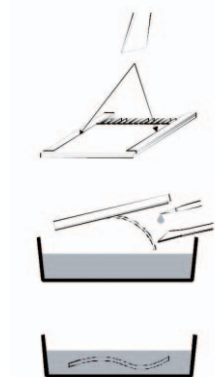
gel이 투명해질 때 까지



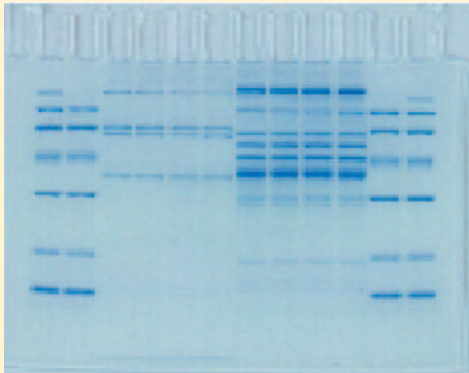
(필요한 경우 사진으로 촬영)



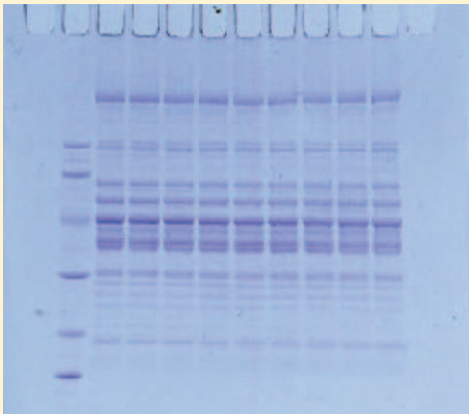
gel 건조 · 보관



### 〈실제로 전기영동 · 검출을 끝낸 gel〉



전기영동장치 : AE-6520 Mini Slab  
gel : Premade Gel NPU-10L (gel 농도 : 10%, gel 두께 : 1mm)  
전기영동용 buffer : Tris-Glycine-SDS  
Power : Constant current 20 mA, 70 min  
시료 : 시판중인 molecular marker  
염색 · 검출 : Commassie Brilliant Blue(CBB)



전기영동장치 : AE-7305 Compact PAGE  
gel : Premade Gel Compact C520L (gel 농도 : 5~20%, gel 두께 : 0.75mm)  
전기영동용 buffer : Tris-Glycine-SDS  
Power : PAGEL-High(30 min) 모드  
시료 : Chicken serum extract, 시판중인 molecular marker  
염색 · 검출 : Commassie Brilliant Blue(CBB)

### 3. 전기영동 요령

#### gel 조제가 어렵다.

전기영동이 잘되고, 깨끗한 데이터를 얻을 수 있는 가장 좋은 요령은 뭐니 뭐니 해도 깨끗한 gel을 제작하는 것이며, 얼룩이 없는 gel을 제작하려면 다음과 같은 사항에 주의해야한다. 첫째, 깨끗한 유리 plate와 comb을 사용한다. 더러워져 있으면 gel화 되기가 어렵다. Gel 용액은 조심스럽게 충분히 섞어야 한다. 균일한 용액이 아니면 균일한 gel을 만들 수 없고, 장 시간 또는 지나치게 섞어주게 되면 공기 중의 산소가 용해되어(산소는 gel화 저해) gel화가 어렵다. 방법에 따라서는 용액을 탈기시키는 경우도 있다(Isoelectric 전기영동 gel은 제외). 또 4°C에서 꺼낸 시약을 즉시 사용하지 않거나 주입하게 되면 온도에 의해 얼룩이 생길 수 있다. 이는 gel화가 온도에 의해 영향을 받기 때문이다(따뜻한 쪽이 gel화가 어렵다). 냉난방이 잘되는 장소는 피하는 것이 좋고, 일반적으로 gel 농도는 낮은 편이 gel화가 어렵고 높을수록 굳어지기 쉽다. 따라서 3~7% 정도의 저농도 gel을 제작하는 경우에는 위 사항에 주의하면서 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 TEMED의 양을 10% 정도 늘려도 좋다. Stacking gel로 comb 사이에 gel이 만들어지지 않는 경우, 이 방법을 사용하기 바란다. 반대로 고농도 gel을 제작하면 유리 plate에서 기포가 들어가는 경우가 있는데, 반대로 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 TEMED의 양을 10% 정도 줄이기 바란다.

#### 밴드가 샤프하게 되지 않는다, 모양이 이상하다.

그 원인은 대부분 buffer나 시료에 있다. Buffer의 시약의 등급이나 농도

를 다시 한번 확인하기 바란다. Laemmli법에서 전기영동용 buffer의 pH는 별도로 조정하지 않아도 된다. 오히려 이온계열에 이상이 생겨 전기영동 결과에 영향을 미치게 된다. 원래 농축작용을 하지 않는 전기영동방법에서는 밴드가 샤프하게 되기 어려운 경우도 있으므로 문헌 등을 참조한다. 시료에 원인이 있는 경우에는 시료 용액 중의 염농도나 시료의 분해 등을 생각해볼 수 있다. 염농도가 높으면 전기영동패턴이 흐트러지는 경우도 있다. 옆 lane의 시료끼리도 서로 영향을 미치기 때문에 염농도나 양 (loading volume, 단백질의 양)도 가급적 맞추는 편이 좋다. 또 시료가 분해되면 밴드가 끌리는 경우(Smear 현상)도 있다. 시료의 보관방법을 확인하고, 분해되기 쉬운 시료는 추출에서 전기영동까지 가급적 단시간에 처리하고 실험은 4°C에서 한다. 또 저분자량(수천) 시료나 당 단백질, 리포 단백질 등은 밴드가 샤프하게 되기 어려운 경향이 있다. 그밖에 시료 comb의 상태를 확인하고, 중합되지 않은 acrylamide 혹은 gel 조각이 남아있지 않도록 깨끗하게 세정한다.

#### Non-Specific 밴드가 나온다.

시료를 loading하지 않은 lane이나 gel 전체에 밴드가 나타나는 현상은 특히 silver staining에서 많이 발생하는데, silver staining이 고농도이면 특이성이 낮기 때문에(단백질이 아니더라도 발색된다) 일어나는 현상이다. 대부분의 경우 물이나 시약의 더러움이 원인이므로 순도가 높은 것을 사용하여 용액을 다시 제조한다. 그밖에 시료처리용액 중 2-mercaptoethanol이 원인이 되는 경우도 있다. 환원제를 다른것으로 변경하는 것도 좋은 방법이다.



**Abnova**  
C o r p o r a t i o n

## Recombinant Protein and Monoclonal Antibody Bank

A Pioneer Achievement That Is Worth Celebrating:  
500 New Monoclonal Antibodies Produced Each Month

- Over 3,000 Full-Length Proteins
- Over 5,000 Partial Proteins
- Monoclonal Antibody Project of 10,000 Human Genes

(<http://www.abnova.com.tw>)

**TAKARA**