

Laemmli 방법을 이용한 Precast SDS PAGE Minigels의 성능 비교 Lonza PAGEr® Gold Precast Gels

■ 서론

SDS PAGE는 일반적으로 단백질의 크기와 양 그리고 순도를 결정하고, 관심 있는 단백질과 disulfide bonds를 확인하며, 다음 연구에 사용될 샘플을 준비 하는데 이용되며, 생화학, 유전학, 분자생물학, 그리고 의학 분야의 심도 있는 연구를 위해 필수적인 기술이다. Precast gels은 SDS PAGE의 매우 중요한 수단이며, 옵션들도 최근에 급격히 증가했다. 본 고에서는 시장 점유율 상위 제품인 타사 Laemmli style precast gels과 Lonza사의 PAGEr® Gold Gels을 비교하고자 한다. 그 결과, Lonza사의 PAGEr® Gold Gels은 우수한 성능을 나타냈고 재현성 있는 결과를 보여주었을 뿐만 아니라 타사 제품에 비해 사용 자-친화적이었다.

■ 재료 및 방법 전기영동

세가지 gel 들을 각각의 회사에서 추천한 chamber에서 전기영동을 함으로써 비교하였다. ProSieve® Protein Markers (TaKaRa Code 50547), ProSieve® Color Protein Markers (TaKaRa Code 50550) 그리고 *E. coli* lysates을 각각의 gel에 로딩하였고, 125 - 200 volts에서 60 - 90 분 동안 (depending upon supplier protocol) 전기영동을 수행하였다. Gel은 Coomassie® Blue로 염색하였고, Syngene® ChemiGenius Imager로 형상화 하였다.

Semi-Dry Electro-Blotting

형광물질로 표지된 단백질을 단계회색하여 각 회사의 4-20% gels에서 분리하였고, gel들은 BioRad TransBlot® SD protocol (25 V at 400 mA for 60 min)에 따라 nitrocellulose로 blot 시켰다. 밴드들은 Dark Reader® transilluminator를 사용하여 excite 되었고, Syngene® ChemiGenius Imager를 사용하여 형상화되었다.

표 1. 비교실험한 gels의 사양

	PAGEr® Gold Gels (Lonza)	Company B Gels	Company C Gels
12 Well Comb Volume	20 ul	20 ul	20 ul
Storage	4°C	4°C	4°C
Shelf Life	3 months	12 weeks**	4-8 weeks**
Gel Size (cm)*	8.1 × 8.3	6.8 × 8.6	8 × 8
Cassette Size (cm)	10 × 10	8.3 × 10	10 × 10
Concentrations tested	4-20% 10%	4-20% 10%	4-20% 10%
Chamber used	PAGEr® Minigel Chamber	Mini-PROTEAN® 3	Novex® Xcell SureLock®

* 1 mm thick gels

** varies depending upon gel concentration

표 2. 장단점 요약

	PAGEr® Gold Gels advantages
PAGEr® Gold Gels	- Fresh gels guaranteed - Marked wells for easy identification - Easy-open cassette - Two sizes compatible with popular chambers - Sharp resolution and highly efficient transfer - Visible comb color to identify well format
	Limitations compared to other supplier' s gels
Company B Gels	- Risk of receiving gels with short shelf life - Wells difficult to see for loading - Poor well formation - Poor or inconsistent resolution - Cassettes lack printed information for traceability - Chamber specific
Company C Gels	- Cumbersome process to prep gel before loading - Shelf life varies - Wells difficult to see for loading - Cassette difficult to open - Chamber specific

■ 결과 : 편리성

테이프 제거

테이프를 제거하여 gel을 노출시킴으로써, gel matrix와 버퍼 시스템을 상호작용하도록 하는 것이 아주 중요하다. PAGEr® Gold Gel tape은 comb 끝이 삽입되어 있는 홈 위에 붙어 있어서 한번에 테이프를 제거할 수 있도록 되어 있다. C사의 gel 테이프는 제거하기 위해서 테이프의 구석부분을 긁어 내는 작업이 필요하다. B사의 gel은 칼로 한 쪽을 잘라낸 후에야 테이프를 벗길 수 있어서 가장 불편하도록 되어 있다.

카세트 오픈

카세트의 양쪽 끝에 있는 슬롯에 도구를 삽입해서 비틀면, 대부분의 카세트가 열린다. PAGEr® Gold Gel comb을 두 카세트 사이에 삽입하여 비틀기만 해도 카세트는 열린다. C사는 카세트를 분리하는 도구(별도로 주문 해야 함)를 제공하고 있다. 아주 어렵게 테이프를 떼고 나면 B사의 gel은 쉽게 열리지만, 너무 쉽게 열린다는 문제점을 가지고 있다(테이프를 떼는 동안 우연히 카세트가 열리는 상황도 발생한다).

웰에 로딩

Vertical minigel의 웰에 로딩하는 것은 아주 번거로운 작업이다. 사용자들은 투명한 웰의 위치를 깨끗한 유리나 플라스틱 layer를 통해 눈으로 확인해야 한다. Lonza는 카세트에 색깔을 입히고 검정색 잉크로 웰에 줄을 그어서, 이 과정을 아주 단순하게 만들었다. 다른 회사의 gel들은 이런 특징들을 제공하지 않아서 로딩하기가 어렵다.

■ 성능

분리능 (그림 1)

단백질 밴드는 뚜렷하고 선명하게 분리되어야 하고 제 크기와 형태를 유지해야 하며, 전개되는 비율이 맞아야 한다.

Gel 바닥에서 lane이 휘거나 밴드들이 넓어지면, 분리는 불명확하고 표준 크기에 비해 상대적으로 band 위치는 수정되어야 한다. 선명한 밴드와 뚜렷한 분리, 그리고 lane이 일직선으로 잘 늘어져 전개 되기 때문에, PAGE® Gold Gel의 밴드 품질은 항상 좋다. C 사 gel의 밴드들도 분리가 잘되지만, 약간 뒤 틀린 lane을 확인할 수 있었다. B 사는 가장 좋지 않은 성능을 보였다. 밴드들은 선명하지 않았고, 바닥으로 갈수록 넓어졌으며, lane도 뒤틀리는 현상을 보였다.

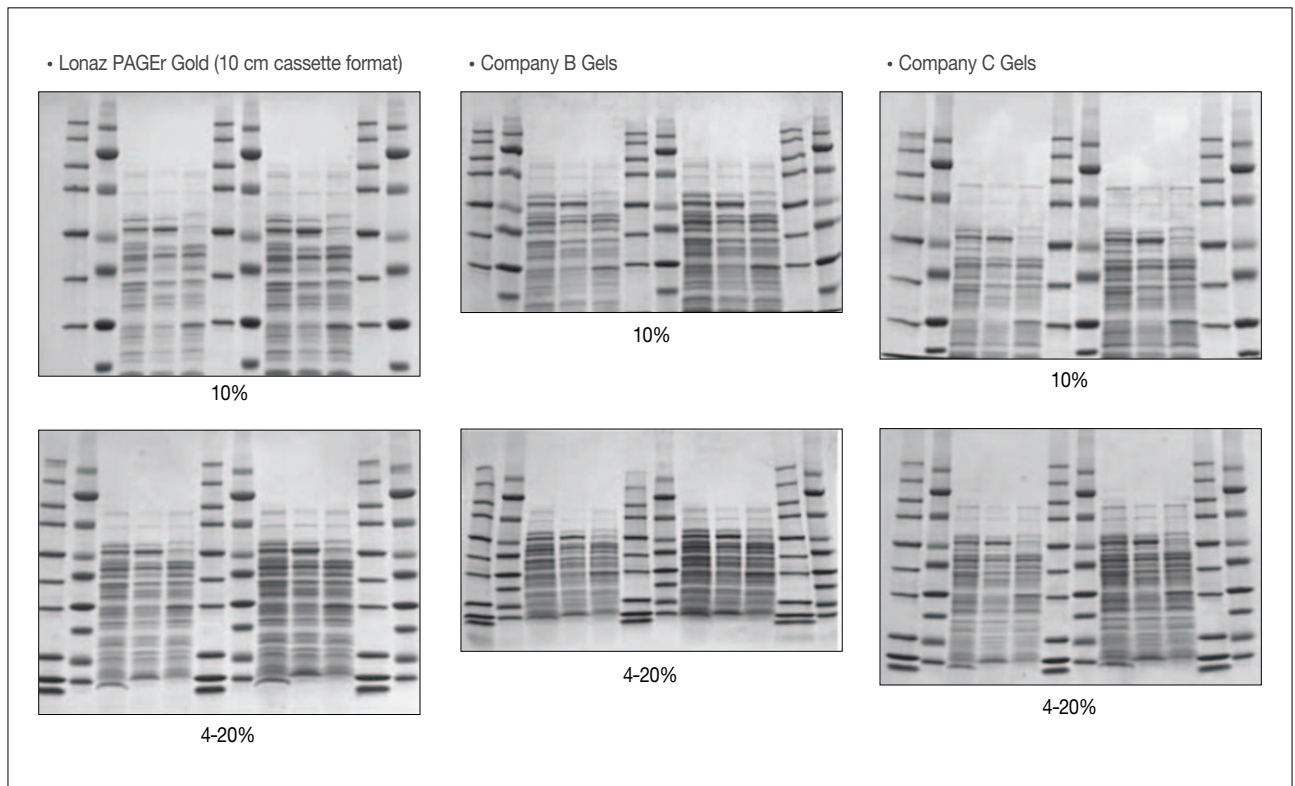
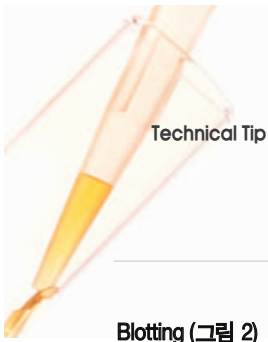


그림 1. Resolution comparisons, Coomassie® stained gels



Blotting (그림 2)

Transfer 효율과 밴드 선명도가 blot의 품질을 결정한다. PAGEr® Gold gel은 희석한 경우에도 가장 높은 밴드 명암도를 나타내어 우수한 transfer 효율을 보여주었고, 다른 회사의 gel에 비해 밴드 선명도가 우수하였다.

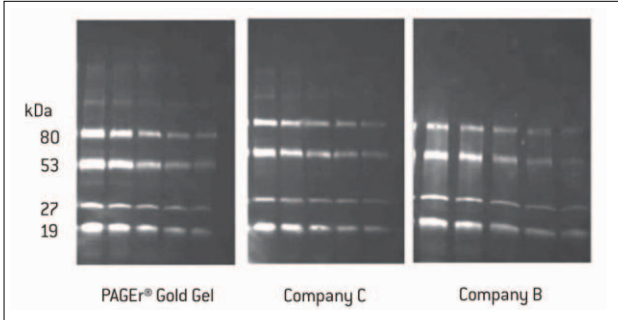


그림 2. Blotting Comparisons. Blots using PAGEr® Gold Gel, and gels from two other suppliers showing 5 lanes with lowest loads. Pattern on the lower two Company B gel bands are skewed, also seen on other Company B gels tested, PAGEr® Gold Gels have the highest intensity of the 80 and 53 kDa bands

표 3. 결과 요약

	PAGEr® Gold Gels	Company B Gels	Company C Gels
Ease of sample loading	Good	Fair	Poor
Quality of well formation	Good	Poor	Good
Ease of access to gel	Good	Fair	Poor
Quality and consistency of resolution	Good	Poor	Fair
Transfer efficiency	Good	Fair	Fair
Ease of use	Good	Fair	Fair
Shelf life	Good	Good	Fair

PAGEr® Gold Precast Gels

10 gels per box

Concentration	Size	2D-well	8+1-well	10-well	12-well	16-well	17-well
4-12%	9 × 10cm	-	-	58520	58522	58524	-
	10 × 10cm	-	-	59520	59522	59524	-
4-20%	9 × 10cm	-	58551	58511	58505	58517	58545
	10 × 10cm	59557	59551	59511	59505	59517	59545
8-16%	9 × 10cm	-	58562	58519	58521	58523	58560
	10 × 10cm	59564	59562	59519	59521	59523	59560
10-20%	9 × 10cm	-	-	58512	58506	58518	-
	10 × 10cm	-	-	59512	59506	59518	-
7,50%	9 × 10cm	-	-	58507	58501	58513	-
	10 × 10cm	-	-	59507	59501	59513	-
10%	9 × 10cm	-	58548	58508	58502	58514	58542
	10 × 10cm	59554	59548	59508	59502	59514	59542
12%	9 × 10cm	-	-	58509	58503	58515	58543
	10 × 10cm	-	-	59509	59503	59515	59543
15%	9 × 10cm	-	58550	58510	58504	58516	58544
	10 × 10cm	59556	59550	59510	59504	59516	59544

* 585 × ×, 595 × ×는 각 제품의 TaKaRa Code입니다.

PAGEr® Gold Scouting Kit

58100	9 × 10cm Select 6 gels of any type
58100	10 × 10cm Select 6 gels of any type

내구성

좀 더 정확한 비교를 위해서 만들어진 시기가 거의 동일한 새 gel이 사용되었다. Laemmli SDS PAGE gel의 내구성은 아주 나쁘다 : 항상 일정한 성능을 보여주지 않는 이러한 형태의 시스템에서 본래의 gel 모습이 빨리 없어진다. 가장 우수한 성능을 얻기 위해서, 가능한 가장 신선한 gel을 사용하는 것이 중요하다. Lonza는 신선한 gel만을 제공한다.

웰 형성

Well이 잘 형성 되는 것도 gel 품질에 요구되는 사항이자, 밴드의 적절한 형태를 유지하는데 도움을 준다. 제대로 well이 형성되지 않으면, 샘플들이 서로 오염될 뿐 아니라 부정확한 샘플 볼륨의 원인이 된다. B사의 gel에서는 기형이거나 부분적으로 막힌 well들도 많이 발견되었기 때문에, 샘플들의 상호 오염을 줄이기 위해 기형적인 well을 손으로 똑바로 펴는 작업을 해주어야 했다. 모든 PAGEr® Gold 와 C사 gel의 well들은 정상적이였다.

결론

Lonza의 PAGEr® Gold Gel은 다른 두 회사의 gel들 보다 성능과 편의성 면에서 더 뛰어났다.

B사의 gel은 준비하기가 힘들었고, load하기가 어려웠으며, well 형성을 제대로 하지 못하는 것으로 나타났다. 분리능과 blotting 결과는 일정치 않았다.

C사의 gel은 좀 더 나은 성능과 함께 일정한 결과를 확인할 수 있었으나, load하기와 open하기가 어려웠다.

반면에, PAGEr® Gold Gel은 항상 선명하고, 똑바른 분리능, 그리고 효과적인 transfer를 보여주었고, 준비, 웰에 로딩, 카세트 오픈 모두가 가장 단순했다.