SDS-PAGE

(주)다인바이오 연구소

1. SDS-PAGE

• SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)는 생화학과 유전학 및 분자생물학 등에 이용되는 단백질 분리 기술로, 그들의 전기 영동 이동성(polypeptide chain의 길이 또는 분자량 뿐만 아니라 protein folding, posttranslational modification과 다른 인자들에 의한)을 이용한 기술이다.

• SDS는 Sodium Dodecyl Sulfate($C_{12}H_{25}NaO_4S$, MW: 288.38)의 약어로 음이온성 계면활성제의 일종으로 native protein을 individual polypeptides로 denature하는 데에 가장 자주 사용되는 agent이다. 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. 이 단백질들의 이동성은 분자량에 대수적으로 선형인 함수 관계를 가진다.

2. Polyacrylamide gel의 종류

• 단백질의 polyacrylamide gel 전기영동에는 다양한 종류가 있다. 형태로 구분하면 Disk형, lab(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.

3. SDS-PAGE에서 단백질이 분리되는 원리

• 처음 단백질 solution은 음이온화 detergent인 SDS가 첨가된 후에 2차 구조와 non-disulfide bond에 의한 4차 구조가 denature된다. 또한 단백질의 질량에 따라 일정 비율로 각 단백질이 (-) charge를 띄게 된다. SDS가 없이는 분자량이 비슷한 다른 단백질들이 protein folding의 차이로 인해서 다르게 이동하는데, folding 방식의 차이에 따라 어떤 단백질들은 gel에서 다른 단백질보다 더 빠르게 이동할 수 있다. SDS를 첨가함으로 이러한 문제점들을 해결하고 선형으로 단백질을 만들어 분자량(1차조 또는 아미노산 수)의 크기에 따라 분리할 수 있게 된다.

• SDS가 단백질에 결합하는 비율은 대략 1.4g SDS에 1.0g 단백질이다. 이 비율은 대략 전체 질량에 비례한다. 대부분 단백질은 이에 따라 오직 단백질의 size만 gel 내 이동거리와 관련되어 gel 속을 움직이게 된다. Tracking dye가 단백질 solution에 첨가되어 전기영동 시에 단백질의 이동을 구분할 수 있게 된다.

Denature된 단백질은 전류가 gel을 통해 흐르면 (-) charge의 단백질이 anode(+)로 이동하게 된다.

B-B205, Woolimlions Valley II, 146-8 Sangdaewon-dong, Jungwon-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea 462-120
www.dynebio.co.kr / dyne@dynebio.co.kr / Tel : +82-2-571-1305

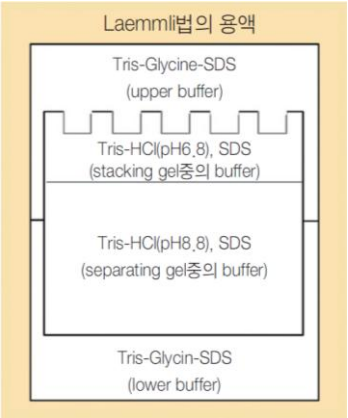
Size에 따라서 각 단백질은 다르게 gel을 통과하며 작은 단백질은 쉽게 gel의 pore를 통과하고 더 멀리 이동하게 된다. 따라서 정해진 얼마의 시간(전압의 크기에 따라 해상도가 다르며, 수 시간이 소요될 수 있다)이 지나면 size 별로 이동성이 다르게 분리되어 있다. 큰 단백질은 시작점에 가까운데 반해 작은 단백질은 더 많이 이동하게 된다. 후에 Coomassie Briliant Blue나 silver stain으로 염색한다. Marker 단백질을 사용하여 각 단백질들의 크기를 측정할 수 있다.

4. 시료

• 단백질 SDS-PAGE에서는 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 융해는 바람직하지 않다.

5. Buffer

• 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 buffer을 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.



6. Stacking gel과 running(resolving) gel의 역할

- 불연속 buffer system은 이온 농도차를 만들어 전기영동의 1차 단계에서 모든 단백질이 하나의 예리한 band를 만들게 해준다. 이것은 큰 pore를 갖고 있는 gel matrix가 focusing 또는 stacking gel에서 단백질 이동을 방해하지 않기 때문이다. (-) ion이 stack 되어 있는 단백질들을 넘어서 1차 buffer를 넘어가면, 이온 농도차가 사라지고 단백질들은 일제히 resolving 구간으로 넘어가서 단백질 분리가 시작된다.
- Stacking gel

  - Large pore의 polyacrylamide gel(4%)이다. Tris buffer는 pH 6.8을 사용하며 전기영동 buffer보다 2 pH unit이 적은 값을 사용한다. 이 환경은 Kohlrausch reaction을 제공한다. 결과적으로 단백질은 몇 겹으로 뭉치게 되어 Starting zone에 19um 정도로 수분간 쌓이게 된다. 이 gel은 resolving gel을 감싸게 된다. Stacking gel 부분은 언제나 sample의 높이와 양보다 두 배 이상 많아야 한다.
- Friedrich Kohlrausch reaction

  - 움직이는 이온의 각각 타입은 특정한 전기 저항성에 의한 것이며, 원래의 분자 조합이 어떤 것인가는 관련이 없다. 따라서 주어진 물질에 관한 이온 이동은 오직 solution의 전기 저항에 영향을 받는다. SDS-PAGE의 경우에는 단백질 역시 크기에 상관 없이 stacking gel에서 동일하게 움직이게 되며, 이용되는 buffer들 간의 이온 이동속도는 pH 조건을 사용하여 조절할 수 있다.
- Running(resolving) gel

  - 작은 pore의 polyacrylamide gel(3~30%)이다. Tris buffer는 pH 8.8을 사용한다. 고분자는 이 gel 안에서 size대로 분리된다. 현재 실험에서 8% gel은 24-205kDa, 10% gel은 14-205kDa, 12% gel은 14-66kDa 단백질을 분리하는데 주로 사용된다.

7. 검출

- 전기영동된 시료는 눈에 보이지 않기 때문에 전기영동 후에는 신속하게 검출 해야 한다. 단백질은 일반적으로 CBB(Commassie Brilliant Blue)로 염색한다. Dye염색은 용액 속에 gel을 담궈두기만 해도 되므로 간단하고 저렴한 방법으로, CBB는 수백 ng을 검출할 정도로 감도가 높다. 이 밖에도 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 감도의 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.

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

8. 해석 · 보존

- 얻어진 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 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.

9. References

- Takara-실험강좌(PAGE)
- http://www.wikipedia.org/