

전 기 영 동

[SDS-PAGE]

개 요

전기영동과 그 목적

실험 전 준비

실험과정

실험결과 및 분석

전기영동과 그 목적

◆ 전기영동

- ▼ 단백질의 순도나 성질의 분석 및 분리 등에 사용하는 방법 -> 단백질의 정성적인 분석
- ▼ SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
: SDS와 Polyacrylamide 를 사용한 전기영동

◆ 전기영동의 목적

- ▼ 원하는 단백질의 유무 확인
- ▼ 분자량을 이미 알고 있는 단백질과 비교하여 분자량 산출

실험 전 준비

◆ 실험에 사용되는 Solution 만들기

Table 1. Solutions for Gel Casting.

Solution A		Solution B (pH 8.8)		Solution C (pH 6.8)	
Acrylamide	146.0 g	Tris(1.5M)	43.43g	Tris(0.5M)	15 g
Bis-acrylamide	4.0 g	Conc. HCl (pH 조절)	7.5 ml	Conc. HCl (pH 조절)	10 ml
D.W	500 ml	SDS(0.4%)	1.0 g	SDS(0.4%)	1.0 g
		D.W	500 ml	D.W	500 ml

Table 2. 염색과 탈색에 사용되는 시약.

Staining solution [CBA solution]		Destaining solution	
Isopropanol	250 ml	Isopropanol(10%)	100 ml
Acetic acid	100 ml	Acetic acid(10%)	100 ml
Coomassie blue R-250	500 ml	D.W.	800 ml
D.W	650 ml	Total volume	1L
Total volume	1 L		

◆ Buffer 만들기

Table 3. Sample buffer와 running buffer.

Running buffer [Laemmli Tray Buffer]		Sample buffer [4X Laemmli Tray buffer]	
Tris(1.5M)	3 g	Tris	1.2 g
Glycine(H ₂ NCH ₂ COOH)	14.4 g	Conc. HCl	0.7 ml
SDS	1 g	SDS	0.8 g
		Glycerol	8.0 ml
		2-mercaptoethanol	4.0 ml
D.W	1 L	1% Bromphenol Blue	2 ml
		D.W	5.3 ml
* Running buffer : 실온보관		Total volume	20 ml

◆ 실험장치 및 준비

- 비커 3개, magnetic bar, 젤 만들 solutions, 에탄올, 증류수 등

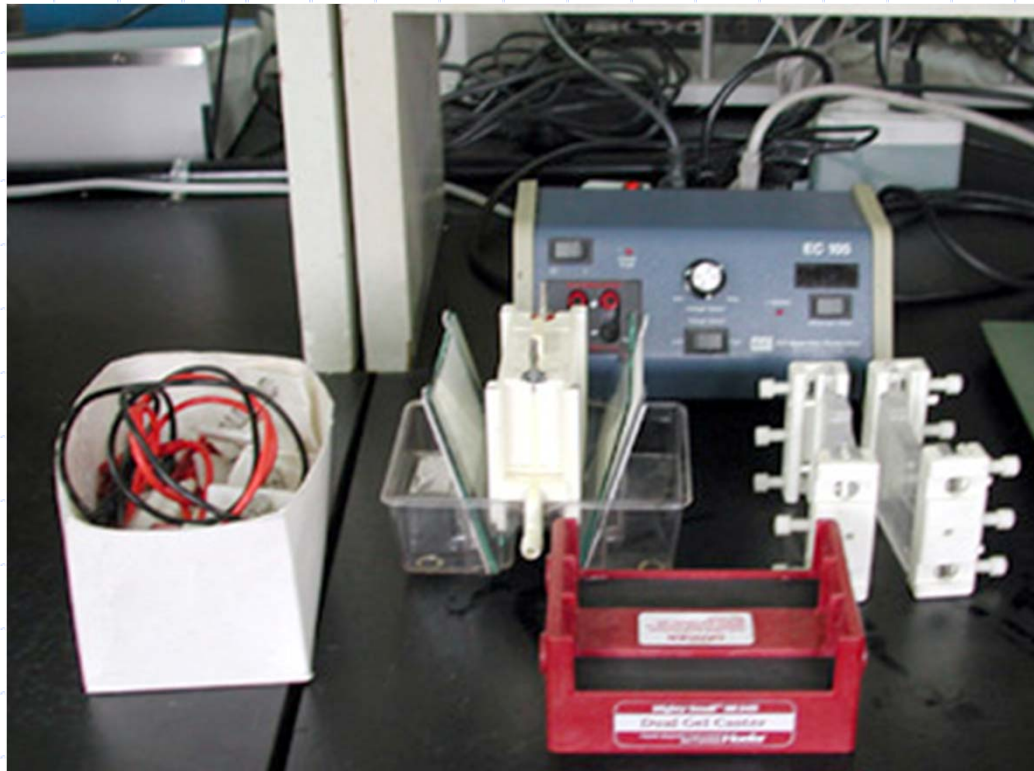


Fig.1. 실험장치.

실험 과정

◆ SDS-PAGE frame 제작

- ① 알루미늄판과 유리판 사이에 spacer 끼움
- ② 밑바닥으로부터 2mm 정도 나오도록 setting함

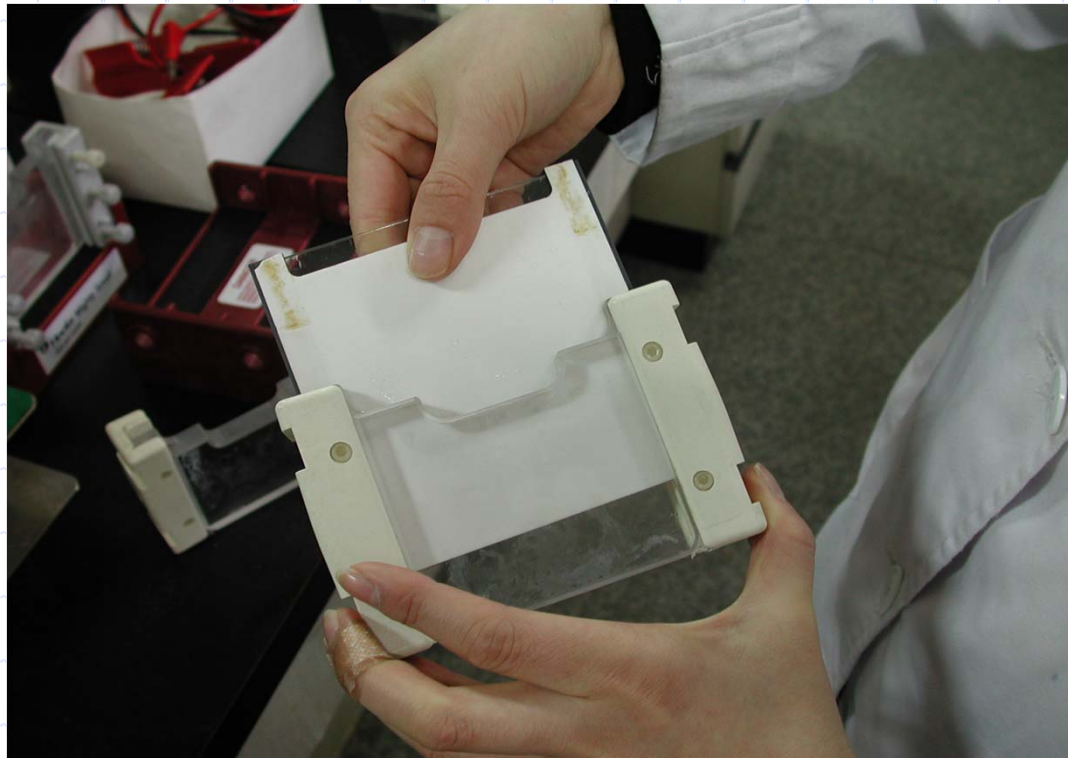


Fig.2. Frame에 판 끼우기.

③ Frame 나사를 조임

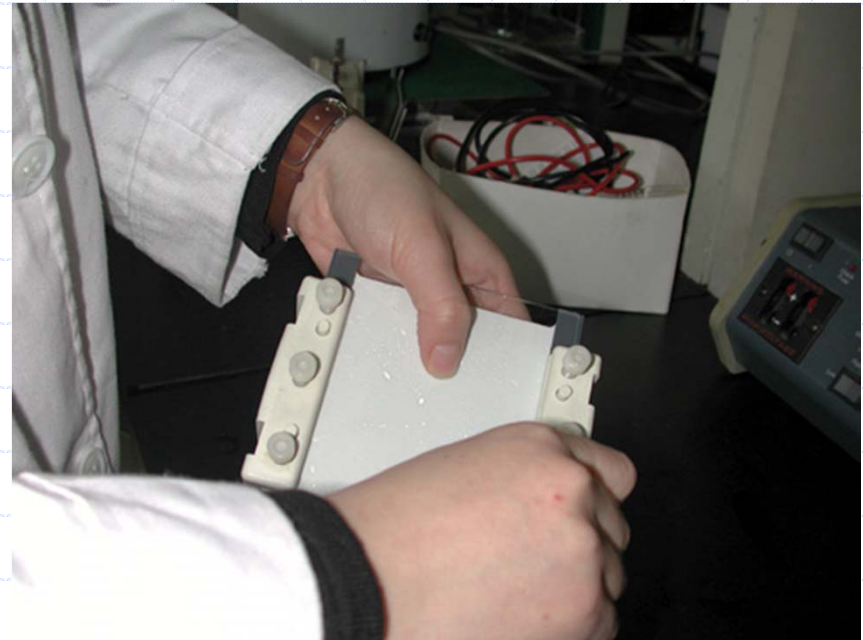
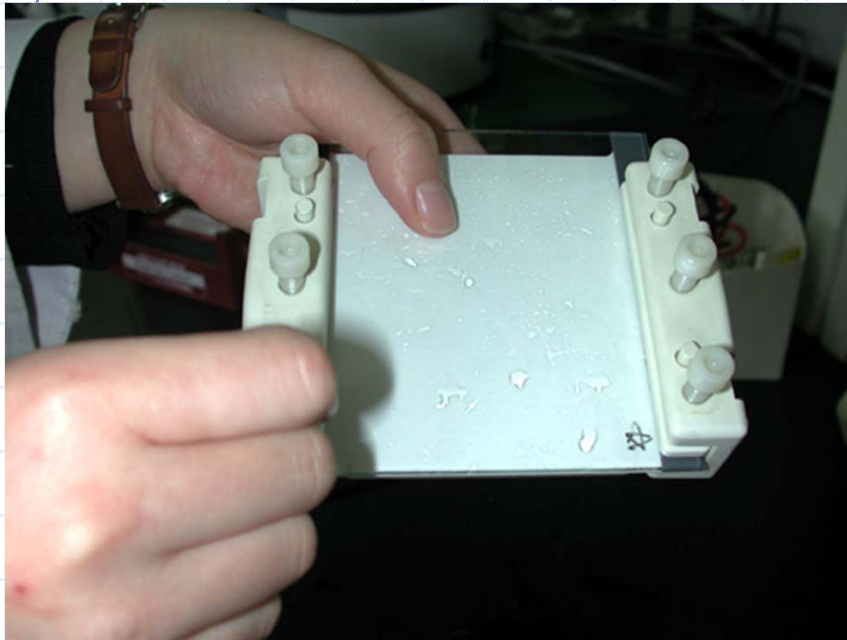


Fig.3. Frame 나사 조이기.

- ④ 한쪽은 고무, 한쪽은 스펀지 깔린 틀에 판 끼움
- ⑤ Lever로 단단히 고정

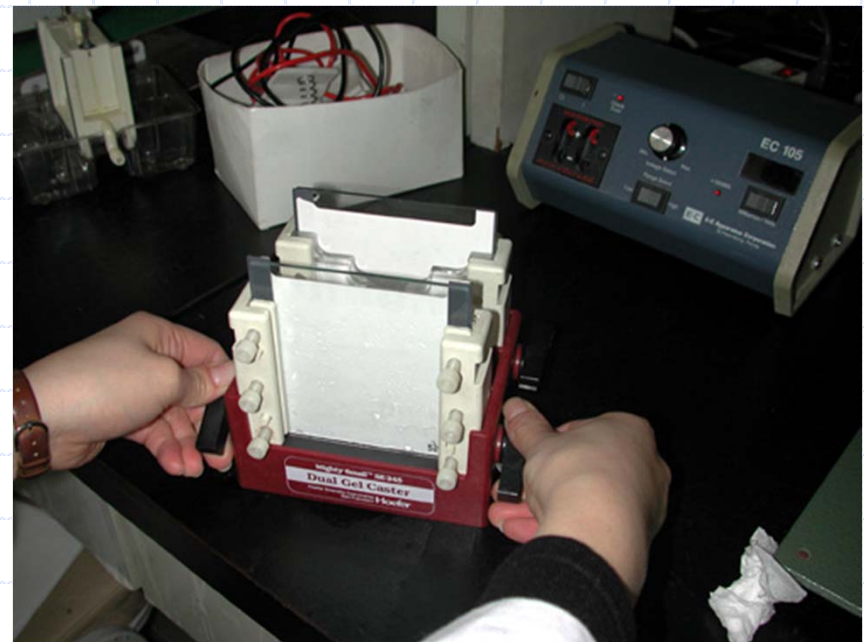
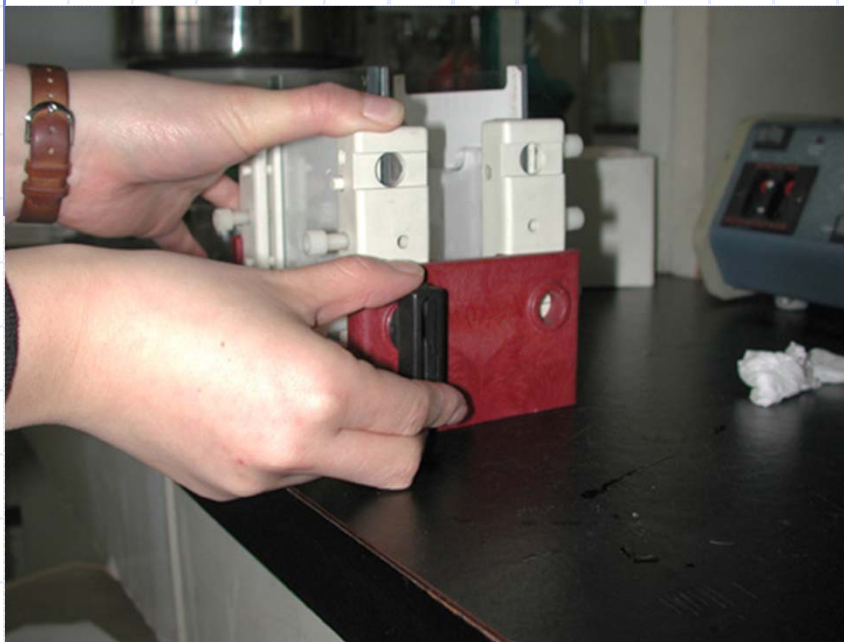


Fig.4. lever로 castor에 고정.

- ⑥ 잘 sealing이 되었는지 에탄올을 넣어 관찰
- ⑦ 새지 않으면 에탄올 따라내고 기울여 방치

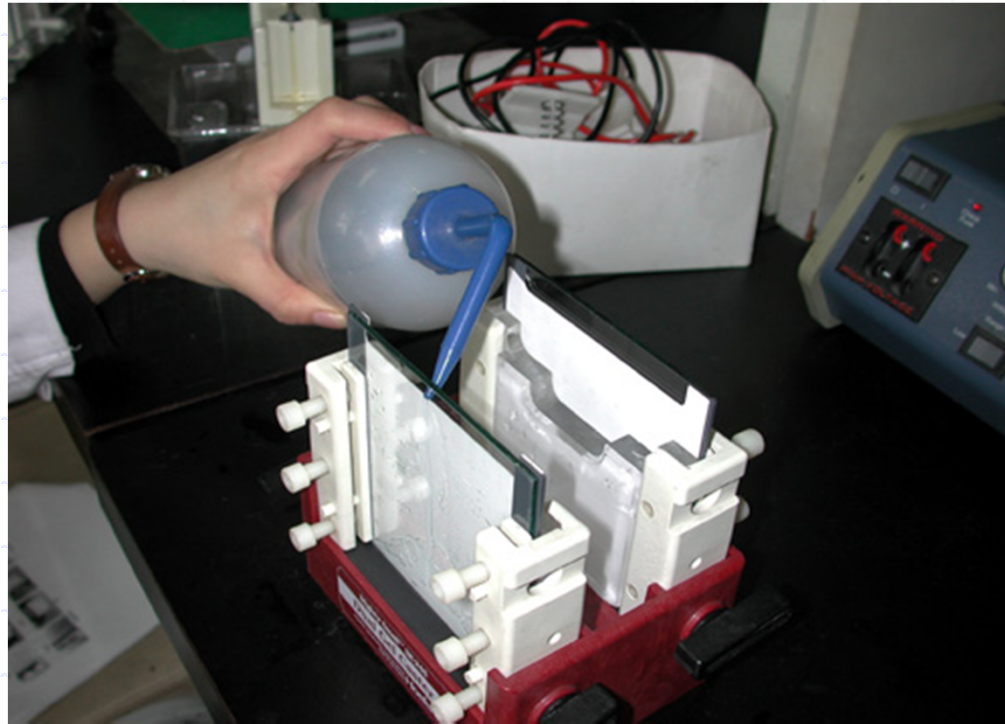


Fig.5. 에탄올로 sealing 확인.

◆ Separating gel 제조

- ① gel 만들 용액을 마이크로 피펫으로 비커에 넣어 gel solution 제조.(TEMED-주입 직전에 넣음)



Fig.6. gel solution 제조 후 주입 준비.

- ② 판에 gel solution을 주입
(1-1.5cm 가량 채우지 않는다)

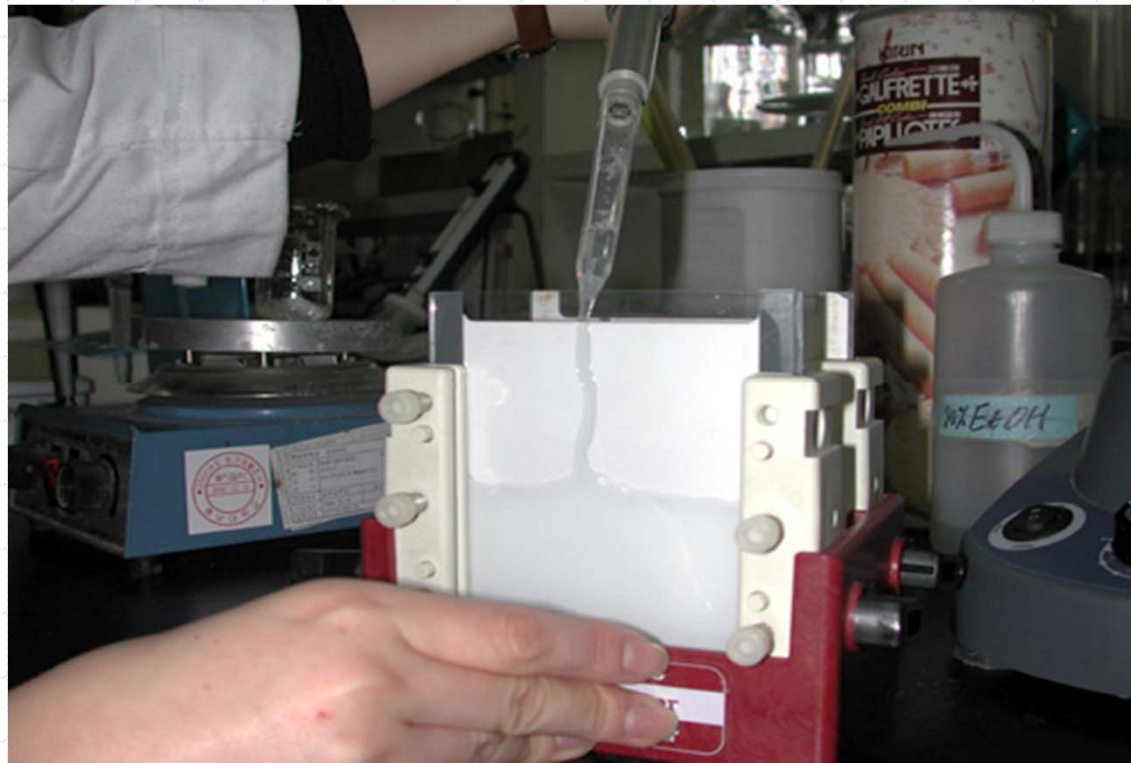


Fig.7. Separating gel solution 주입.

③ gel solution 위에 Isopropyl alcohol을 채움

▼ Isopropyl alcohol의 역할

- bubble 제거
- gel 표면 건조 방지
- 표면을 고르게 정리

④ 실온에서 40-60분간 방치

(* 중합이 되었는지 유리판 기울여 확인)

◆ loading sample 만들기

- ① rack에 0.5ml 용량의 eppendorf tube를 꽂아 둠
- ② 1번 tube에 분자량 marker를 넣음
(* 실험에 따라 marker는 가변적)
 - ▼ BSA(Bovine Serum Albumine) : 10 μ l
 - ▼ lysozyme : 10 μ l
 - ▼ Albumine : 10 μ l
- ③ 나머지 tube에 sample을 30 μ l 넣음

④ 모든 tube에 sample buffer를 10 μ l 주입

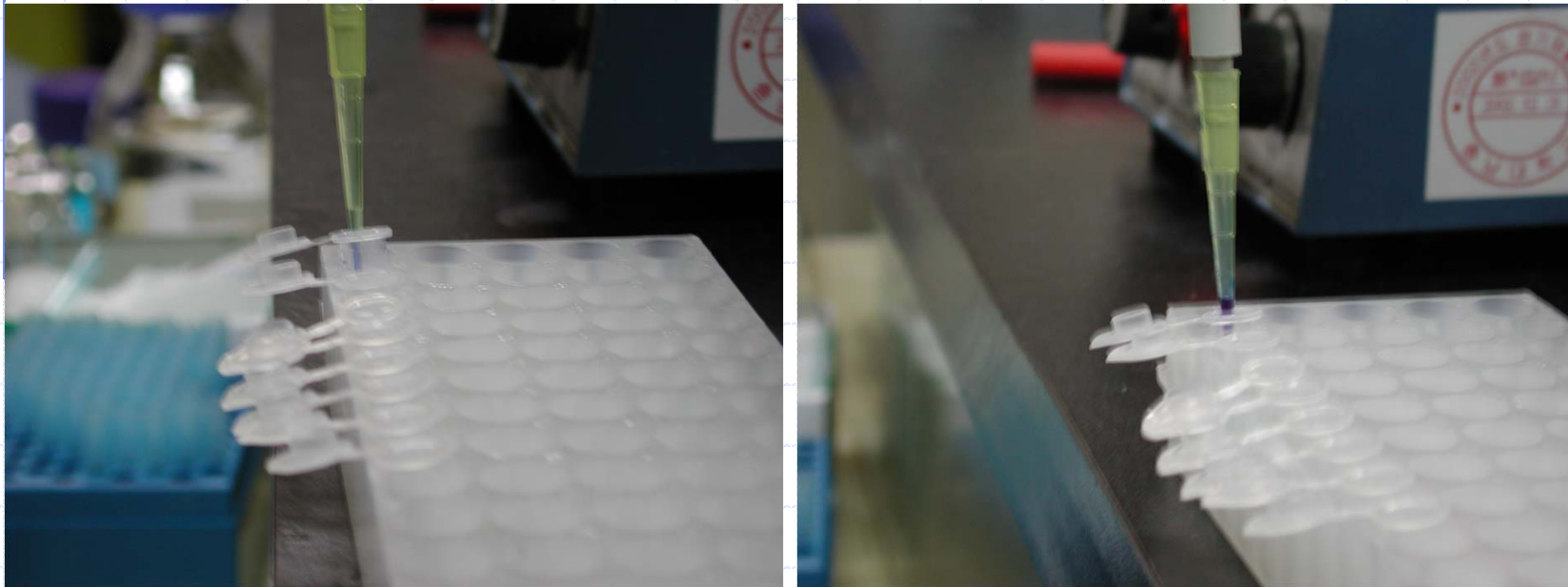


Fig.8. Sample 주입(L), Sample buffer 주입(R) .

- ⑤ Vortex mixer로 sample과 sample buffer 혼합
- ⑥ 원심분리



Fig.9. Vortex mixer로 혼합.(L), Centrifuge(R) .

- ⑦ 미리 끓여 놓은 물에 넣고 5분간 sample들을 끓임
(* 열처리 후 급냉(quenching)하는 것이 좋다)



Fig.10. 열처리 .

⑧ 원심분리 (Centrifuge)

(* tube를 쏘을 때 대칭이 되도록 해야 함.)

⑨ Sample들을 냉동보관

◆ Stacking gel 제조

- ① magnetic plate 위에서 교반시키면서 gel solution 제조
- ② frame의 Isopropyl alcohol을 따라내고 닦음



Fig.11. Isopropyl alcohol 제거.

- ③ TEMED 넣고 stacking gel 주입
- ④ Comb를 separating gel 바로 위쪽까지 끼움
- ⑤ 5-10분 가량 중합되도록 함



Fig.12. Comb 끼우기.

◆ Sample loading

- ① gel이 굳으면 유리판에 있는 comb 제거

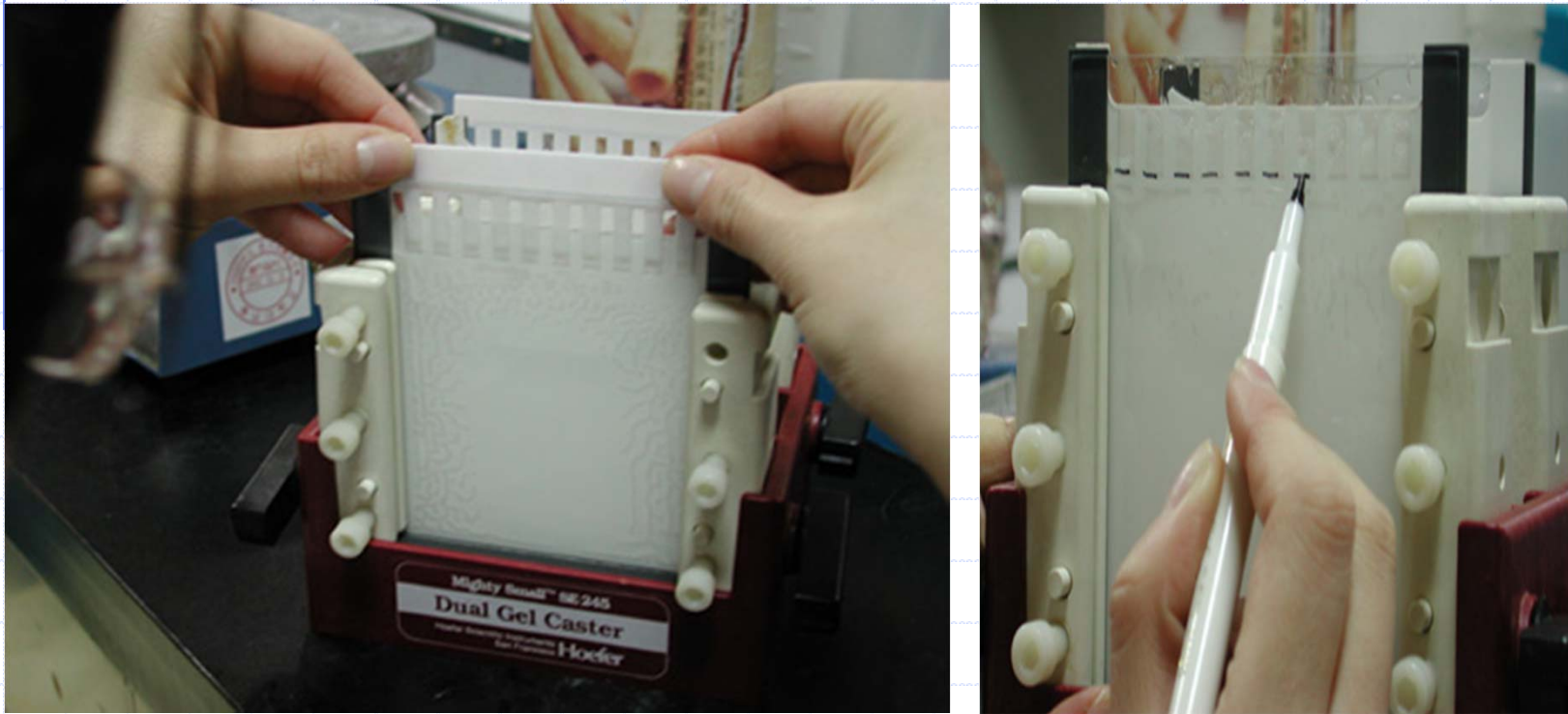


Fig.13. Comb를 제거(L), 각 lane의 위치 표시(R).

- ② Castor에서 판만 분리, 전기영동 kit에 유리판을 대고 집게로 고정
- ③ Running buffer를 빈 공간에 채움

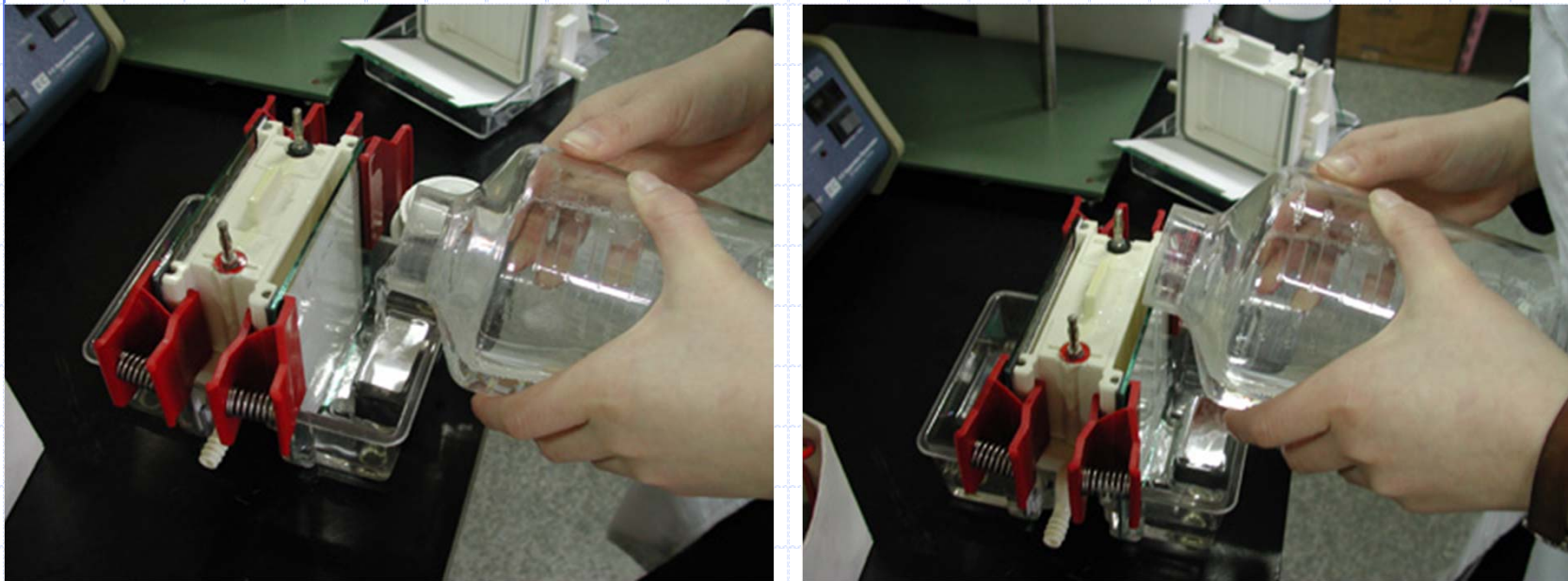


Fig.14. Running buffer로 빈 공간 채우기.

④ 준비해 둔 sample을 micro syringe로
각 lane에 주입

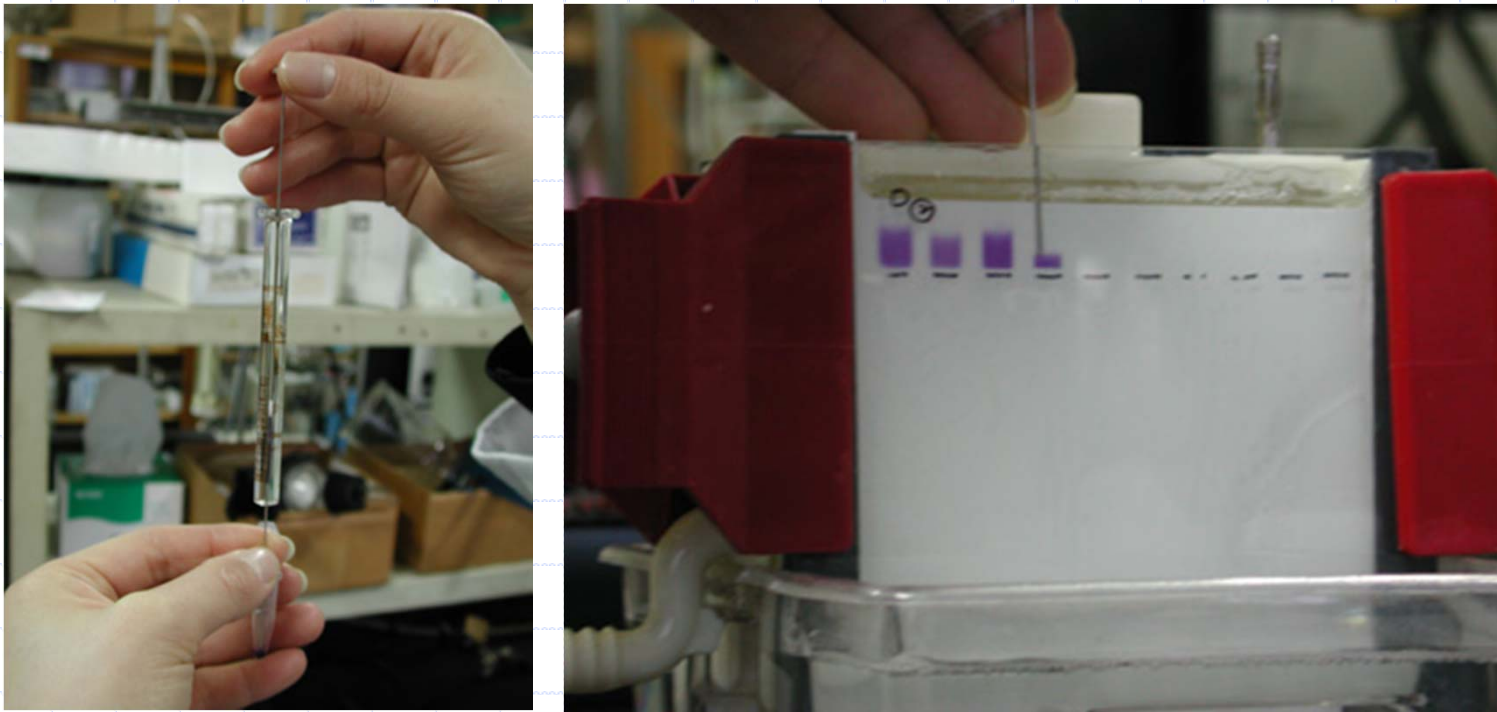


Fig.15. Micro syringe로 각 lane에 sample 주입.

- ⑤ 주입 후, 전기를 걸어줌 (검은색은 (-)극, 빨간색은 (+)극이며 같은 극끼리 연결)

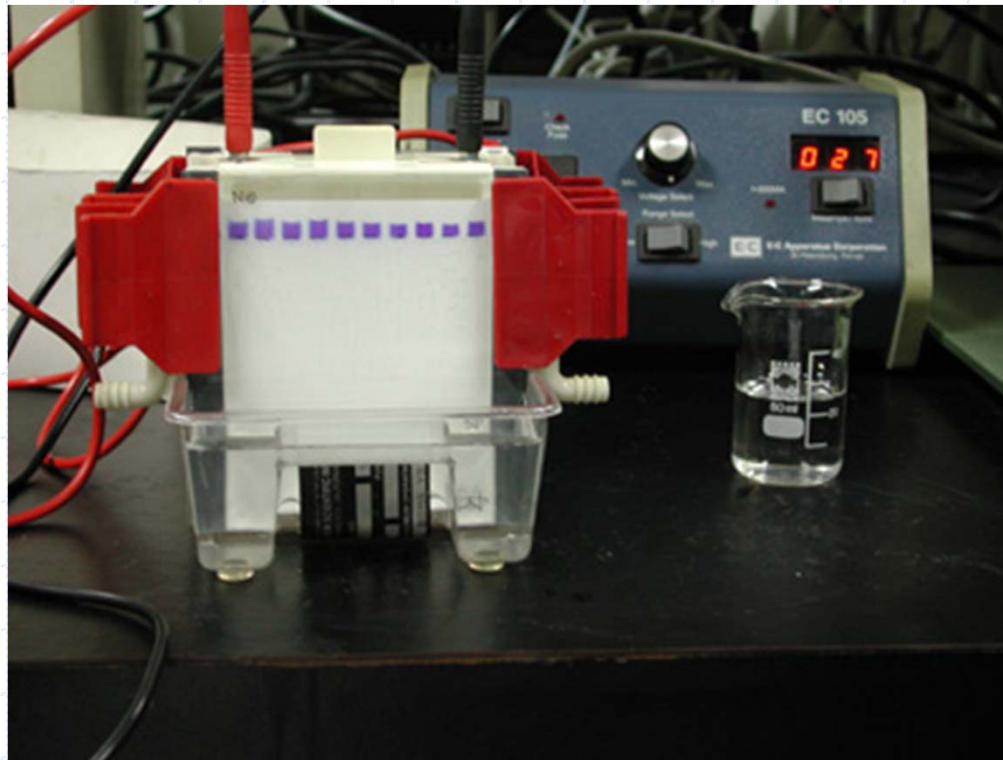


Fig.16. Sample loading.

- ⑥ Sample이 이동하는 동안 전류가 일정하게 유지되도록 조정 (보통 20 - 40 mA)
- ⑦ Sample이 gel의 밑부분 5mm정도까지 내려가면 전기를 차단, loading을 마침

◆ Staining

- ① 전기영동 kit에서 판을 분리
- ② Gel 찢어지지 않도록 조심하면서 spacer와 유리판 제거
- ③ Spacer를 이용하여 알루미늄 판에서 gel을 떼냄

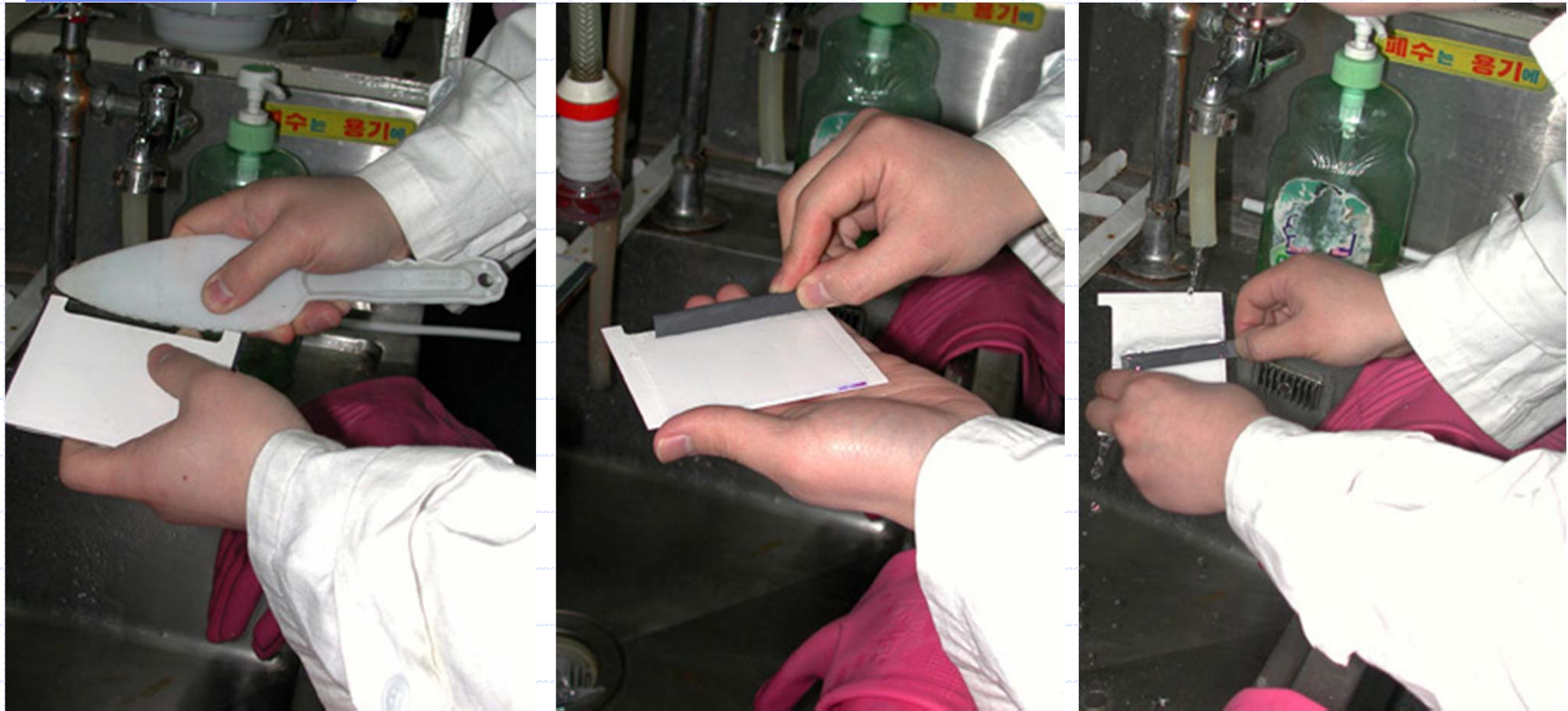


Fig.17. 알루미늄판에서 젤 떼어내기.

- ④ 떼어낸 gel을 통에 넣고 staining solution을 gel이 잠길 정도 채움
- ⑤ Shaker에 올려 놓고 회전속도 50rpm 정도로 회전하면서 1시간 정도 염색

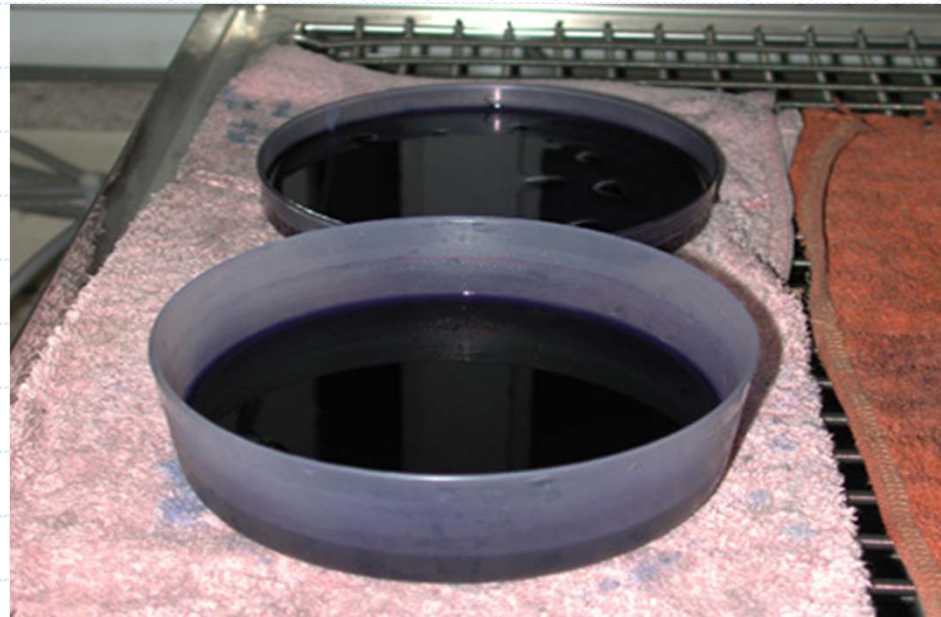


Fig.18. 염색하기.

◆ Destaining

- ① 1시간 후에 destaining solution으로 바꿈
- ② shaker에서 50rpm로 회전하면서 탈색
- ③ 탈색용액을 자주 갈아주고 12시간정도 후에 마침

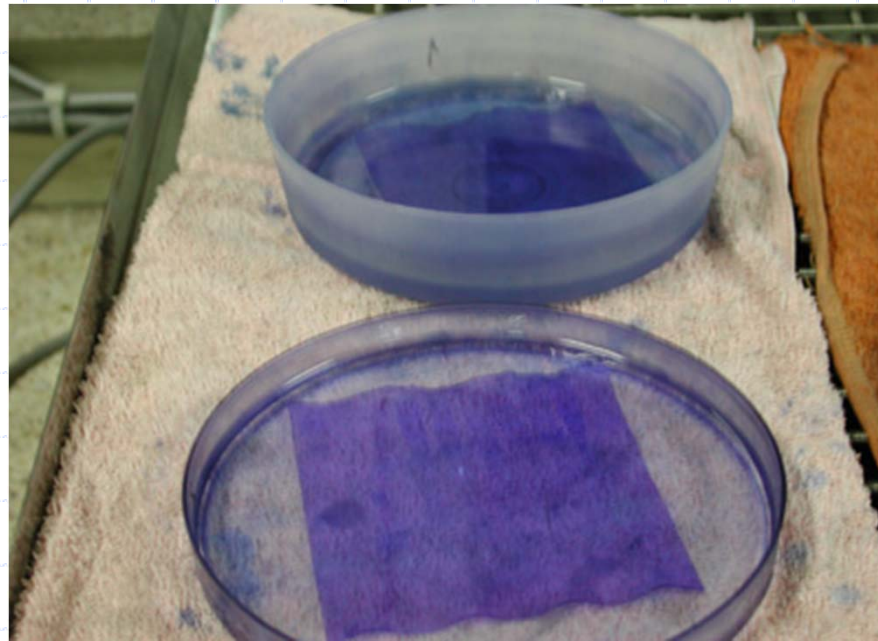


Fig.19. 탈색하기.

◆ Coating & drying

- ① 셀로판지에 물을 묻혀 사각 아크릴 판에 잘 펴고
기포 제거
- ② 그 위에 탈색을 끝낸 gel을 놓고, 다시 물 묻힌
셀로판지를 그 위에 잘 펴서 덮음
- ③ 아크릴판 덮개 덮고 집게로 모서리를 고정

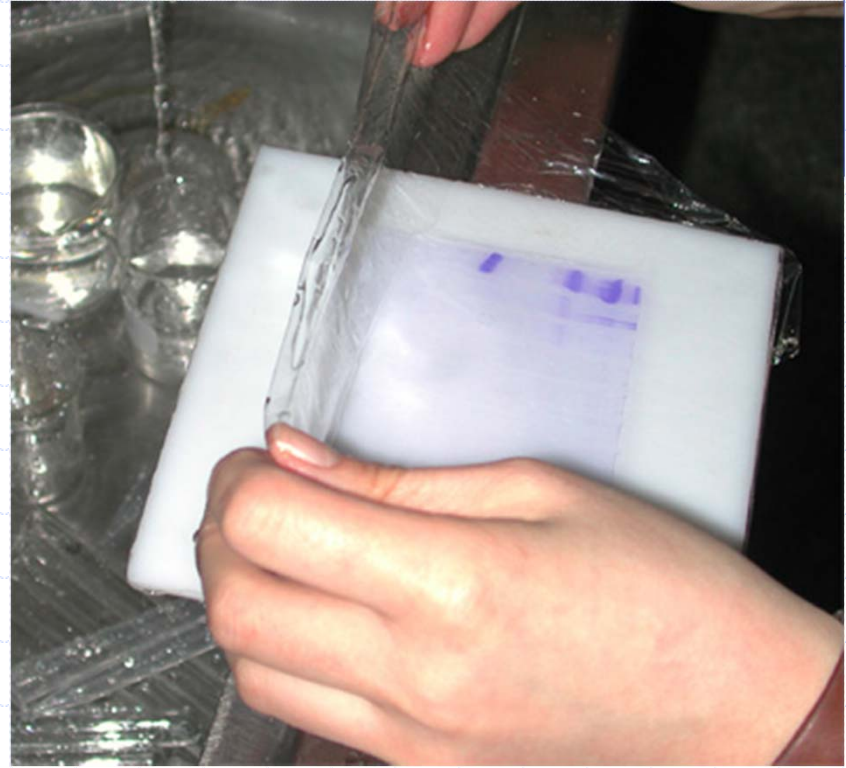
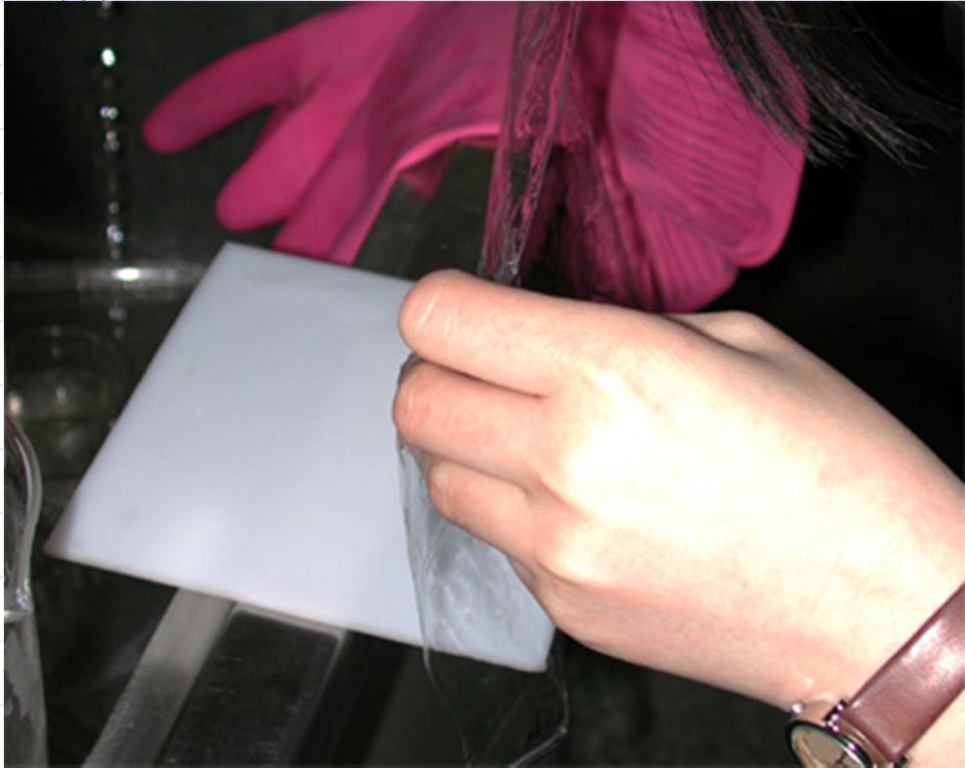


Fig.20. 젤 코팅하기.

④ 그늘진 곳에서 하루 이상 건조 후 보관

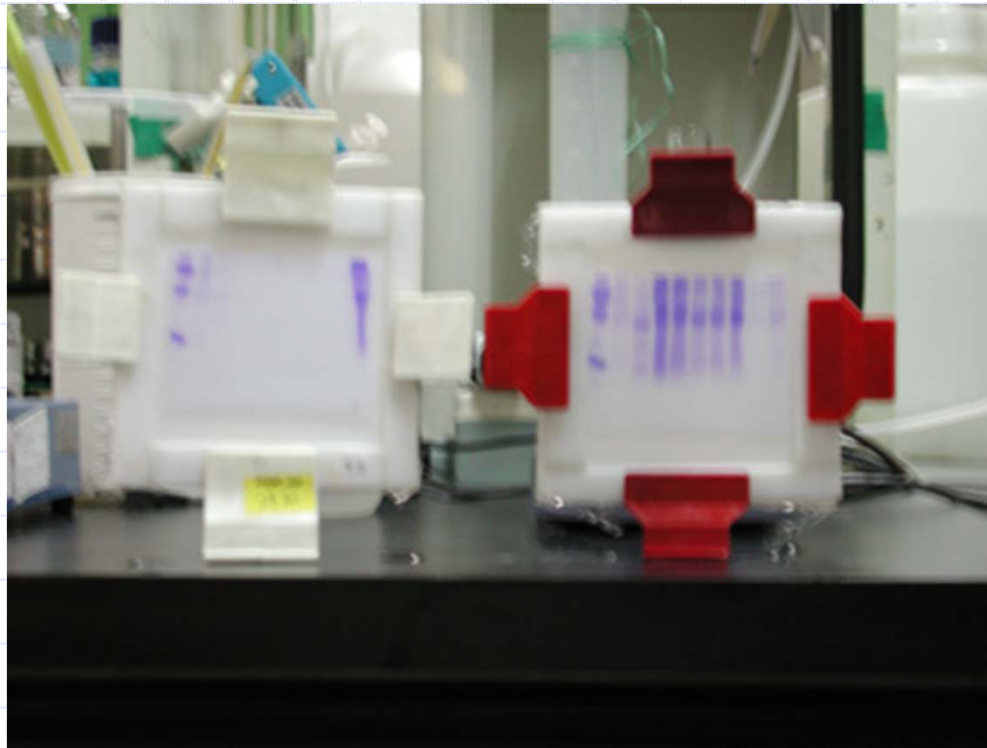


Fig.21. 코팅한 젤 건조.

실험결과 및 분석

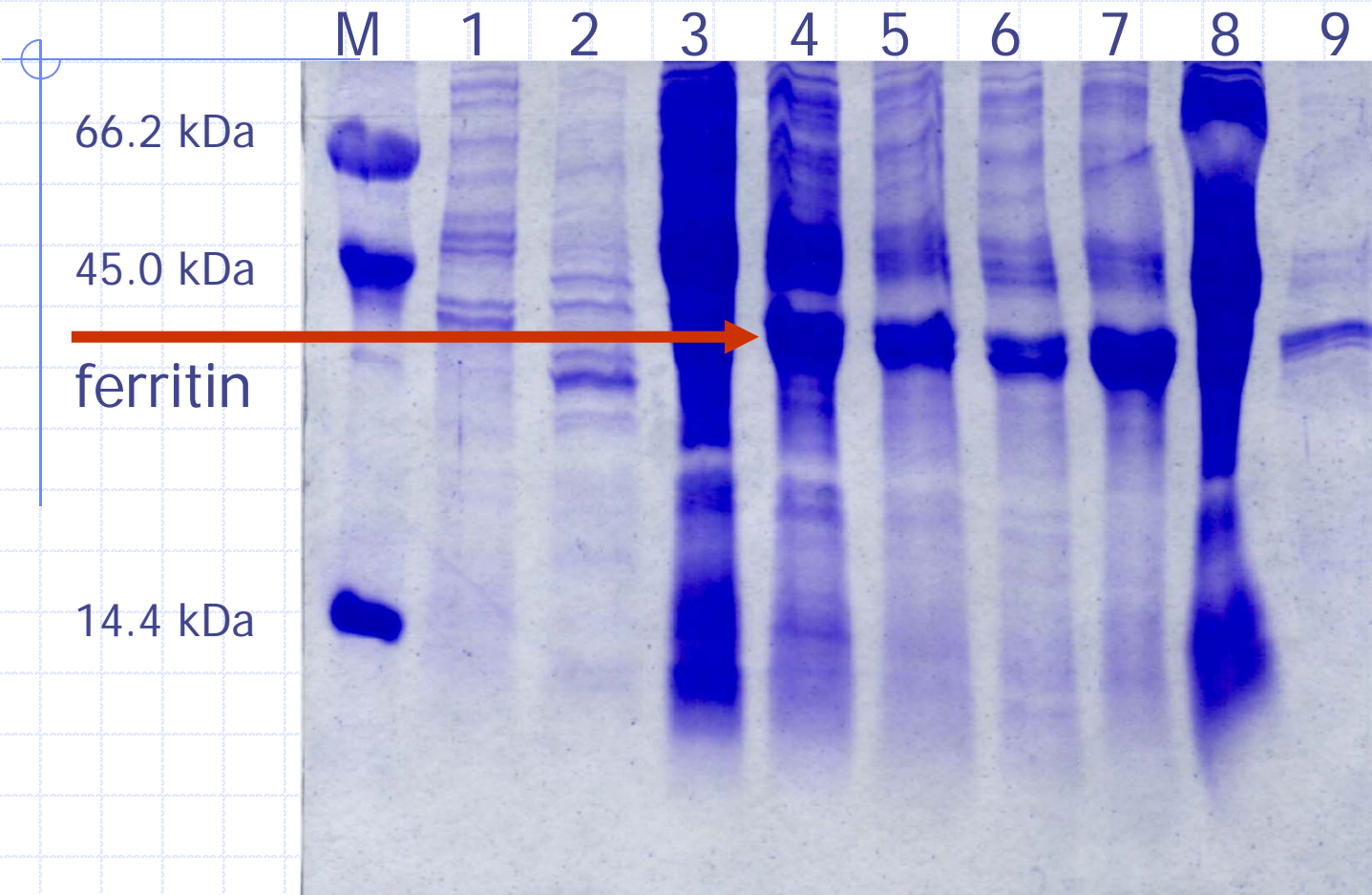


Fig.22. 전기영동실험 결과.

Table 4. Separating gel 과 Stacking gel의 조성,

	Separating gel	Stacking gel
Solution A (ml)	5.0	0.67
Solution B (ml)	2.5	—
Solution C (ml)	—	1.0
D.W (ml)	2.5	2.3
10% Ammonium Persulfate (μ l)	50	30
TEMED (μ l)	30	20