

## 제 12 장 전기영동 (electrophoresis)

### 12-1. 개요

전기영동은 주로 생체 고분자들의 성질을 연구하고, 그것들을 분석, 분리, 정제하는 중요한 방법중에 하나이다. 전기영동은 DNA, RNA나 단백질 같은 것들이 고유의 전하를 띠고 있고, 그것들이 어떤 전기장에 놓이게 되면 이동할 수 있다는 사실을 기본으로 하고 있다. 이러한 물질들의 이동 정도는 각 물질의 크기나 모양 그리고 전하에 따라 달라진다. 즉, 크기가 큰 물질은 크기가 작은 물질보다 더 천천히 겔을 통과하기 때문에 크기에 따라 물질들이 분리된다.

초기의 전기영동은 수크로오스(sucrose) 용액 같은 액체 상태에서 수행되었지만 점차로 발전하여 종이, 셀룰로오스 아세테이트 막, 전분 겔 전기영동 등을 사용하다가, 현재까지도 널리 쓰이는 아가로오스와 아크릴아마이드를 이용한 겔, 원판형(disk) 겔, 면역체전기영동(immunoelectrophoresis) 등을 거쳐 isoelectric focusing 뿐만아니라 2 차원(two-dimensional) 전기영동까지 발전하였다. 아크릴아마이드는 크기가 작은 물질을 높은 해상도로 구분할 수 있는 장점이 있고, 아가로오스는 해상도는 낮지만 아주 넓은 범위 (200 bp - 50 kb) 의 DNA나 RNA 시료를 분리할 수 있다는 장점이 있다.

### 12-2. 전기영동 이론

완충용액 속에서 거대분자들은 전하를 띠게 된다. 또한 이 분자들의 전하는 그 완충용액의 pH에 따라 달라지는데, 전기영동에서는 전체전하가 중요한 역할을 한다. 왜냐하면 일정한 전기장 안에서 각 분자의 전체 전하나 크기에 따라 이동하는 속도가 달라짐으로 인해 물질의 분리가 일어나기 때문이다. 만약 어떤 전기장에서 분자의 전체전하를  $q$ 라 하면, 힘  $F$ 는 분자의 전하와 전기장의 강도에 따라 작용된다. 이를 수식으로 나타내면

$$F = \frac{E}{d} q \quad (12-1)$$

$E$ 는 전극사이의 전위차이고,  $d$ 는 그 사이의 거리이다.  $E/d$ 는 전기장력(field strength)을 나타낸다. 또한 Stokes의 공식에 의하면 분자의 크기나 모양 그리고 용액의 점성도와 힘  $F$ 와의 관계는

$$F = 6\pi\eta r v \quad (12-2)$$

로 나타낼 수 있는데,  $r$ 는 구형물질의 반지름이고,  $\eta$ 는 용액의 점성도이며  $v$ 는 그 물질이 움직이는 속도이다. 이것을 바탕으로 얻을 수 있는 식은

$$\frac{E}{d} q = 6\pi r \eta v \quad (12-3)$$

이며 이 식을 변형하면

$$v = \frac{Eq}{d6\pi r \eta} \quad (12-4)$$

라는 식을 얻을 수 있다. 즉, 분자의 이동속도  $v$ 는 전기장력과 전체전하에 비례하지만, 그 크기와 용액의 점성도에는 반비례 한다.

### 12-3. 전기영동의 주요 형태 및 분류

#### 1. 존 전기영동 (zone electrophoresis)

##### 1) 겔 전기영동

##### (1) 아가로오스 겔 전기영동

아가로오스 겔은 해상도는 낮지만, DNA 단편을 200 bp에서부터 50 kb까지 분리할 수 있으며 사용이 간편하고, 다루기가 쉽기 때문에 현재 가장 많이 사용되고 있는 전기영동이다. 아가로오스는 해초로부터 추출되는 물질로서 선형 중합체의 형태를 하고 있다. 아가로오스 겔은 적당한 완충용액(buffer)에 녹여서 원하는 크기의 틀에 부어지며, 겔이 굳은 후에 사용된다. 겔이 굳는 동안 아가로오스는 지지체(matrix) 형태가 되며, 그 밀도는 아가로오스의 농도(%)에 따라 정해진다. 이러한 겔에 전기장이 주어지면, 음전하를 띠는 DNA는 양극으로 이동한다. 이때 DNA가 이동하는 정도는 여러가지 요인의 영향을 받는다.



그림 12-1. 핵산을 분리하기 위한 전기영동 (주로 아가로오스 겔에서 사용)

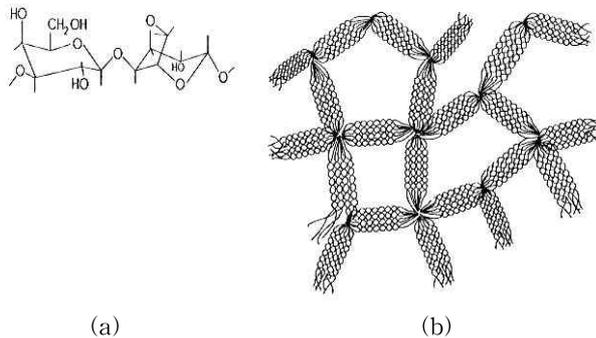


그림 12-2. 아가로오스의 화학적 구조(a)와 겔을 형성할 때 만들어지는 중합체의 구조(b).

아가로오스 겔에서 DNA의 이동에 영향을 주는 요인에는 DNA 크기, 아가로오스 농도, DNA 형태, 전압, 완충용액의 조성 등이다.

일반적으로 DNA 크기와 전기장에서의 이동성(mobility)의 관계는 로그함수로 반비례 한다. 큰 분자는 작은 분자 보다 더 천천히 움직인다. 왜냐하면 큰 분자는 작은 분자 보다 겔의 구멍(pore)을 지나기가 어렵기 때문이다. DNA 단편은 아가로오스의 농도에 따라 각각 다른 속도로 움직인다. 이것이 아가로오스 겔이 넓은 범위의 DNA를 분리할 수 있게 해주는 중요한 요인이다.

**표 12-1. 아가로오스 농도에 따른 DNA 단편의 분리범위**

아가로오스 농도 (% W/V)	DNA의 분리범위 (kb)
0.3	5 - 60
0.6	1 - 20
0.7	0.8 - 10
0.9	0.5 - 7
1.2	0.4 - 6
1.5	0.2 - 3
2.0	0.1 - 2

같은 분자량의 DNA라도 초나선 환상형(supercoiling circular) DNA (I 형), 열린 환상형(nicked circular) DNA (II 형) 그리고 선형(linear) DNA (III 형) 등 DNA 형태에 따라 아가로오스 겔 상에서 다른 속도를 보인다. 0.1 - 0.5 mg/ml의 EtBr(ethidium bromide) 존재하의 아가로오스 겔에서 I 형은 II 형이나 III 형 보다 빨리 움직인다. 그리고 2 kb 이상의 DNA 단편을 효과적으로 분석하기 위해서는 5 V/cm 보다 낮은 전압을 이용해야 한다.

전기장에서의 이동성은 전기영동 완충용액의 이온 강도와 조성에 영향을 받는다. 이온 강도가 너무 낮으면 DNA 이동이 너무 느리고, 이온 강도가 너무 높으면 열이 발생하여 심한 경우 겔이 녹거나 DNA의 원래 구조가 변하게 된다. 실험실에서 많이 사용하는 완충용액은 TAE 와 TBE 완충용액이다. 그 조성은 다음 표와 같으며, 일반적으로 전기영동 완충용액은 농축하여 만들어 상온에서 보관하여 사용한다.

**표 12-2. 전기영동 완충용액의 조성**

완충용액	사용 용액	농축 보관액 조성 (리터당)
Tris-acetate (TAE)	1× : 0.04 M Tris-acetate 0.001 M EDTA	50× : 242 g Tris-base 57.1 ml Glacial acetic acid 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)
Tris-borate (TBE)	0.5× : 0.045 M Tris-borate 0.001 M EDTA	5× : 54 g Tris base 27.5 g Boric acid 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

그리고 포름알데히드(formaldehyde) 아가로오스 겔 전기영동은 변성겔 전기영동이다. RNA는 단일가닥이면서 이차구조를 갖는 경우가 많으므로 주로 변성겔을 이용하여 전기영동을 해야 한다. 아가로오스 겔을 만들 때 변성제(denaturing agent)인 포름알데히드를 넣어 RNA용 변성겔을 만들 수 있다. 포름알데히드는 독성이 있으므로 화학물질 환기구가 있는 곳에서 겔을 만들고 전기영동을 하여야 한다. 그리고 가능하다면 항상 뚜껑을 닫아놓도록 한다.

## (2) 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동

아크릴아마이드는 단량체(monomer)인데 ammonium persulfate(APS)와 TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)같은 자유 전자를 가진 화학물질이 존재하면 연쇄 반응(chain reaction)을 일으켜서 긴 사슬로 중합체화 된다. 이때, 이중기능 작용제(bifunctional agent)로 N,N'-메틸렌비스아크릴아마이드(N,N'-methylenebisacryamide)가 이 중합화 반응에 첨가되면 긴 사슬에 상호 결합이 일어나 겔 형태로 굳어지게 된다. 이 사슬의 길이는 중합화 반응에서의 아크릴아마이드 농도에 좌우되며, 매 29 단량체의 아크릴아마이드마다 1 분자의 상호결합 연결자(cross linker)가 붙게 된다. 각기 다른 폴리아크릴아마이드 농도를 가진 겔의 DNA 분리 범위는 표 12-3과 같다.

**표 12-3. 폴리아크릴아마이드 농도에 따라 효과적으로 분리할 수 있는 DNA 단편의 범위**

아크릴아마이드 (% W/V)	분리범위 (bp)	Xylene cyanol FF	Bromophenol blue
3.5	1,000 - 2,000	460	100
5.0	80 - 500	260	65
8.0	60 - 400	160	45
12.0	40 - 200	70	20
15.0	25 - 150	60	15
20.0	6 - 100	45	12

폴리아크릴아마이드의 준비는 아가로오스 겔보다 까다로운 편이다. 폴리아크릴아마이드 겔은 대부분 스페이서(spacer)로 간격을 만든 2 장의 유리판 사이에 겔을 부어서 만드는데 이것은 아크릴아마이드 용액을 공기에 노출시키지 않기 위해서이다. 왜냐하면 산소에 의해서 중합화 반응이 방해될 수 있기 때문이다. 이러한 점에도 불구하고 아가로오스 겔과 비교하여 3 가지 장점이 있다.

첫째, 해상도가 훨씬 좋다. 아크릴아마이드 농도에 따라서 1 개의 염기쌍 차이도 구분할 수 있다. 둘째, 훨씬 많은 양의 시료를 다룰 수 있다(loading을 많이 해도 해상도에 영향이 적음). 셋째, 겔로부터의 DNA 회수가 쉽고 깨끗한 DNA 를 얻을 수 있다.

이러한 폴리아크릴아마이드 겔에는 비변성용 폴리아크릴아마이드겔과 변성용 폴리아크릴아마이드겔이 있다. 비변성용 폴리아크릴아마이드 겔은 이중가닥 DNA의 분리와 순수정제를 위한 겔로서 아크릴아마이드와 비스아크릴아마이드의 비율은 29 : 1, 1X TBE 를 사용하며 낮은 전

압(1-8 V/cm)에서 겔을 런닝시킨다. 변성용 폴리아크릴아마이드 겔은 단일가닥 DNA 조각의 분리와 순수정제를 위한 겔로서 이 겔은 우레아 또는 포름아마이드 존재하에서 겔을 중합화시킨다. 염기서열용(sequencing) 겔이 대표적인 경우이며, 방사성 표지 DNA 검출자(probe)를 분리할 때, 뉴클리아제 S1 지도 그리기(nuclease S1 mapping) 등에도 사용된다. 아크릴아마이드와 비스아크릴아마이드의 비율은 19 : 1을 사용한다.

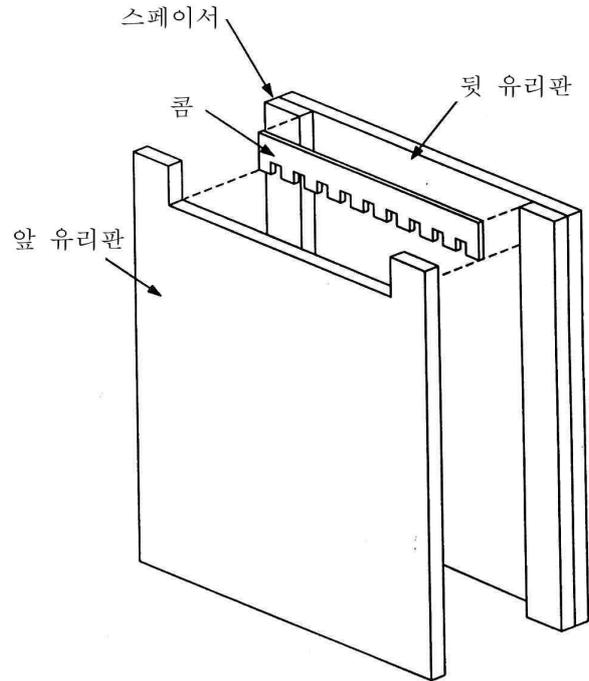


그림 12-3. 수직용 아크릴아마이드 겔을 만들기 위해 필요한 장치.

염기서열용 겔 전기영동은 기본적으로 폴리아크릴아마이드 전기영동과 유사하다. 염기서열용 겔의 특징은 아크릴아마이드 : 비스아크릴아마이드의 비율이 19 : 1이며, 7-8 M의 우레아를 변성제로 넣어 준다는 것이다. 즉 염기서열용 겔은 우레아를 이용한 변성용 폴리아크릴아마이드 겔이다.

염기서열용 겔에 쓰이는 아크릴아마이드의 농도는 분석하고자 하는 DNA 단편의 크기 따라 달라진다. 프라이머(primer)로부터 50 개 핵산(nucleotides) 정도의 염기서열을 읽고 싶다면 12-20% 농도의 아크릴아마이드 겔을 써야 하며, 프라이머로부터 25-400 개 핵산 정도를 읽고 싶다면 6% 아크릴아마이드를 포함하는 겔을 사용하면 된다. 프라이머로부터 보다 멀리 까지 읽고 싶다면 4% 나 5% 아크릴아마이드를 포함하는 겔을 만들어 사용하면 된다.

염기서열용 겔의 또 하나의 특징은 사용하는 콤이 특이하다는 점이다. 염기서열용에는 상어 이빨 모양의 삭스투스(shark's tooth) 콤이 주로 사용된다.

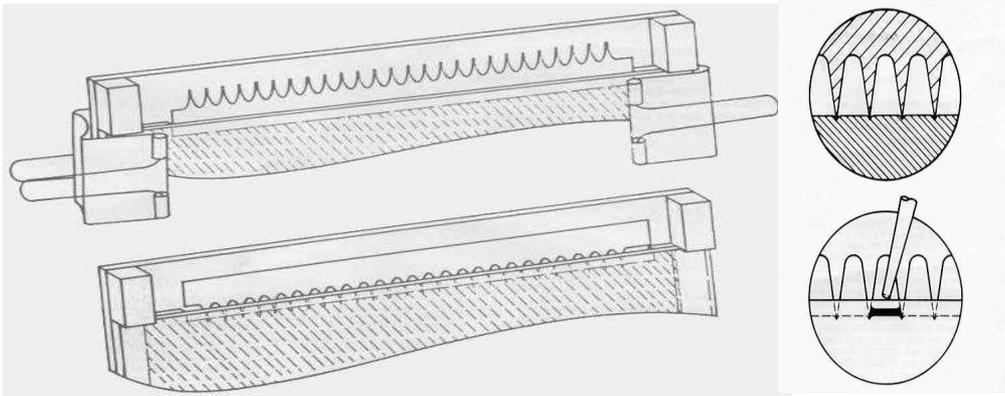


그림 12-4. 삭스투스 콤의 사용법

(상어 이빨과 비슷한 모양으로 생겨서 삭스투스 콤이라고 불리운다. 겔을 만들 때는 편편한 쪽이 겔 쪽으로 향하도록 한다. 겔이 완전히 굳은 뒤에 콤을 빼내어 반대쪽의 상어 이빨같이 생긴 쪽을 겔에 살짝 꽂는다. 겔과 이빨사이의 공간에 시료를 loading한다.)

### (3) SDS-PAGE (SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동)

아크릴아마이드 겔에서 단백질의 이동성은 전체전하나 크기 양쪽의 영향을 모두 받는다. 그렇기 때문에 다른 분자량을 갖는 다른 두 단백질이 상대적으로 비슷한 만큼의 전하를 갖는다면 겔 상에서 같은 속도로 움직일 수도 있다. 이러한 이유로 단순히 아크릴아마이드 겔에 단백질 시료를 주입하는 경우에 별다른 정보를 얻지 못하는 결과를 가져올 수도 있다. 또한 보통의 아크릴아마이드 겔에서는 여러 개의 단위체(subunit)로 이루어져 있는 단백질이 각 단위체로 분리되지 않고 하나의 띠로 나타나기 때문에 정확히 몇 개의 단위체로 이루어져 있는지, 각 단위체의 크기는 얼마나 되는지를 잘 알 수 없다.

하지만 음이온성 세척제(anionic detergent)인 sodium dodecyl sulfate (SDS)를 포함하는 아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 상에서 단백질은 각각의 단위체로 분리되어지며 각 단백질의 이동성은 로그함수적 크기로 분자량과 반비례하는 함수관계를 이룬다. 이러한 점 때문에 단백질의 분자량이나 단백질의 단위체를 분석할 때 SDS-PAGE를 널리 사용하게 되었다.

이 방법을 사용하기 위해서는 단백질의 이황화 결합(S-S 결합 ; disulfide bond)을 끊어주기 위하여 시료를 loading하기 전에 SDS와  $\beta$ -mercaptoethanol 또는 DTT 존재하에서 가열하여 시료를 준비한다. 그리고 SDS-PAGE를 위한 loading 완충용액은 SDS와  $\beta$ -mercaptoethanol 또는 DTT가 들어있는 SDS-겔 loading 완충용액을 이용한다. 또한 분자량을 알고 있는 단백질을 표시자로 loading하면 시료 단백질의 분자량을 추정해 낼 수 있다.

SDS-PAGE의 또 다른 특징은 불연속 완충용액 시스템(discontinuous buffer system)을 이용한다는 것이다. SDS 겔을 만들 때 각각 다른 pH와 이온 강도의 완충용액을 이용하여 퇴적(stacking)용 겔과 분리(resolving)용 겔을 만들며 런닝 완충용액 또한 다른 pH와 조성을 갖는다.

즉, 시료와 퇴적용 겔은 Tris-Cl (pH 6.8)을 가지며 위쪽과 아래쪽 런닝 완충용액은 Tris-glycine (pH 8.3), 그리고 분리용 겔은 Tris-Cl (pH 8.8)을 갖는다. 이 시스템의 각 성분들은 모두 0.1% SDS를 포함하고 있다. 이 불연속 완충용액 시스템은 퇴적용 겔에서 시료 안의 모든 복합체들을 매우 적은 부피로 농축시켜서 분리용 겔에서 단백질의 해상도를 크게 증가시켜주는 역할을 한다.

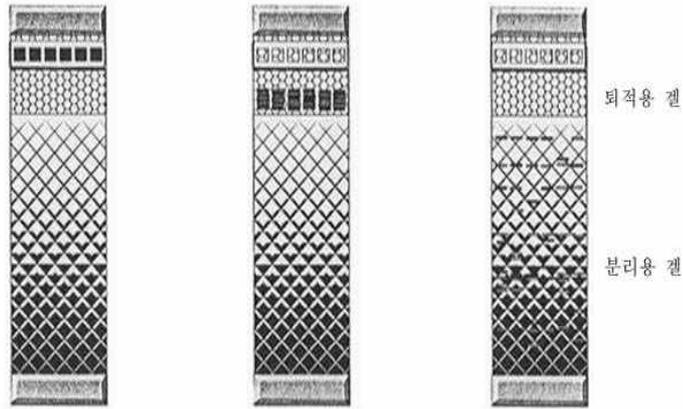


그림 12-5. 불연속 완충용액 시스템을 이용한 SDS-PAGE의 원리

시료가 웰(well)에 넣어진 후 전기영동을 시작한다. 단백질이 퇴적용 겔 안에서 농축된다. 단백질들이 분리용 겔에서 분리된다.

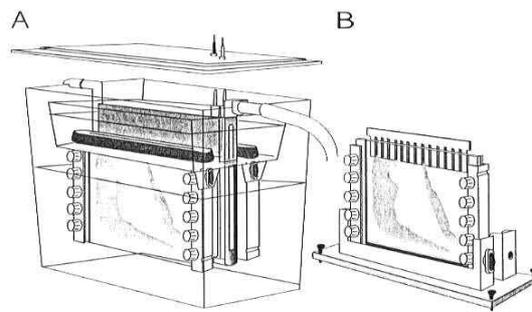


그림 12-6. 수직용 전기영동 장치

(A) 냉각 장치를 포함한 단백질 분리를 위한 전기영동 장치 (B) 겔을 만들기 위한 장치

대부분의 SDS-폴리아크릴아마이드 겔에서 아크릴아마이드 : 비스아크릴아마이드의 비율은 29 : 1이며 각각 다른 아크릴아마이드 농도에서 효과적으로 분리되는 단백질 분자량의 범위는 표 12-4와 같다.

표 12-4. SDS-PAGE에서 효과적으로 분리할 수 있는 단백질의 범위

아크릴아마이드 농도 (%)	단백질의 분리범위 (kD)
15	12 - 43
10	16 - 68
7.5	36 - 94
5.0	57 - 212

단백질 전기영동의 기본원리는 DNA나 RNA 전기영동의 원리와 같다. 다만, 단백질을 변성시키기 위해 우레아나 포름아마이드 대신 SDS를 이용한 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 주로 이용한다는 것과 단백질을 눈으로 확인하기 위하여 EtBr 대신 쿠마시 블루(coomassie blue)나 실버(silver) 염색 방법을 쓰거나 항체를 이용한다는 것 등이 다른 점이다. 쿠마시 블루 염색에 의한 겔 상의 단백질 띠 검출은 염색제(dye)와 단백질 간의 비특이적 결합에 의한 것이며 0.3-1 mg의 단백질까지 인식할 수 있다. 실버 염색은 실버와 단백질 안의 화학잔기 간의 결합에 의한 것으로 2-5 ng 정도의 단백질까지 인식할 수 있다.

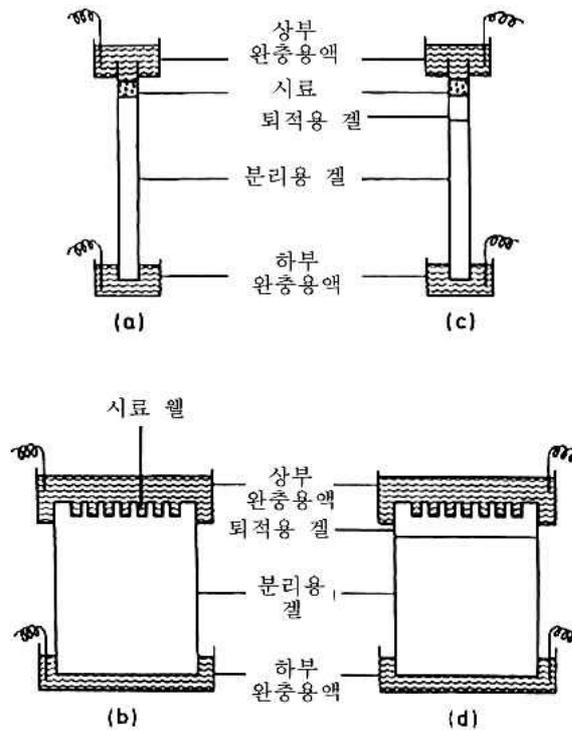


그림 12-7. 연속 완충용액과 불연속 완충용액 시스템을 이용한 원통형(rod)형 겔과 판형(slab)형 겔

- (a) 연속 완충용액 시스템을 이용한 원통형 겔 (b) 연속 완충용액 시스템을 이용한 판형 겔  
 (c)와 (d) 불연속 완충용액 시스템을 이용한 원통형 겔과 판형 겔

(4) 간헐 전기장(pulsed field) 겔 전기영동

일반적으로 사용되는 DNA의 아가로오스 겔 전기영동은 DNA 크기가 50 kb 이상이 되면 분리가 어려워진다. 하지만 간헐 전기장 겔 전기영동을 사용하면 DNA를 2000 kb(2 Mb) 길이까지도 분리할 수가 있다.

이 방법에서는 DNA가 두개의 전기장의 영향하에서 농축되어진 아가로오스 겔로 이동된다. 두 전기장이 거의 수직이며, 전기장력은 고르지 않고 서로 바뀌거나 간헐적으로 된다. 일반적으로 높은 겔 농도와 전압 기울기(gradient) 하에서 DNA 분자가 겔의 구멍으로 들어가기 위해서 전기장 방향으로 뺏어나가게 된다. 그런데 DNA 분자가 길어지면 길어질 수록 새로운 방향을 찾아서 나가기 위해 시간이 더욱 많이 필요하게 되고 DNA 분자들이 겔에 많이 남아 있게 된다. 이런 점을 이용하여 거대 DNA 분자를 분리해 내는 기술이 간헐 전기장 겔 전기영동이다.

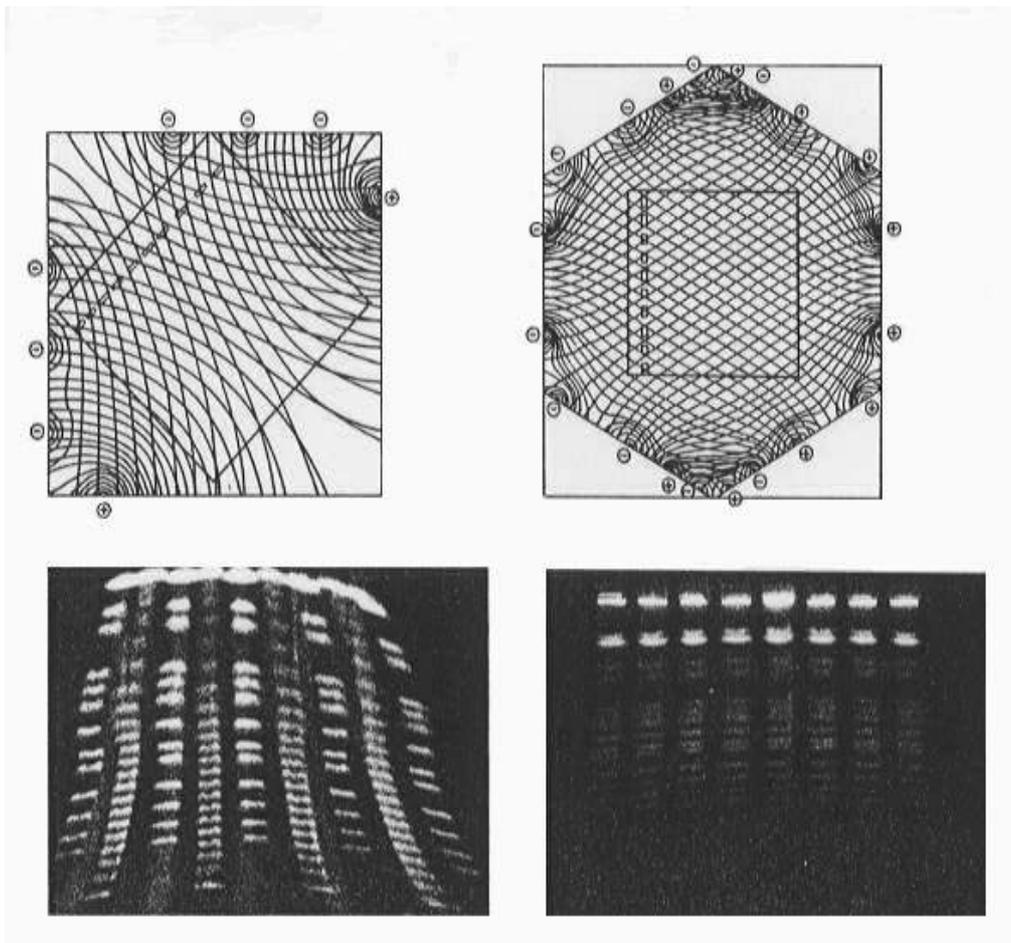


그림 12-8. 간헐 전기장 겔 전기영동을 이용한 DNA 분리  
(왼쪽은 직각형 비균질 전기장이고  
오른쪽은 육각으로 배열된 전극점을 이용한 균질 전기장이다)

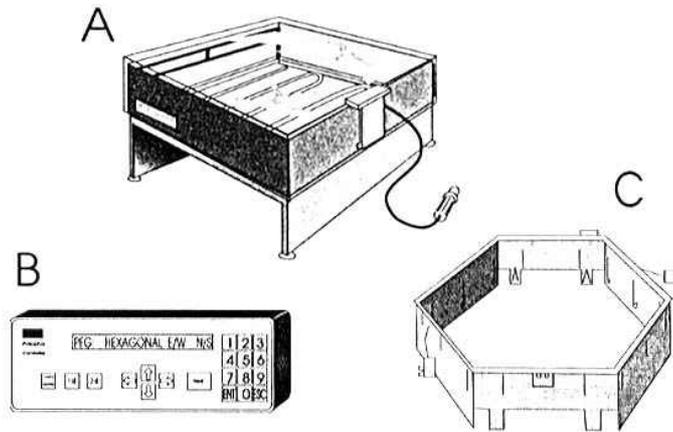


그림 12-9. 간헐 전기장 겔 전기영동을 위한 시스템  
 (A) 완충용액을 순환시킬 수 있는 겔 전기영동 chamber,  
 (B) 변조전과 조절 장치, (C) 육각형의 전극

(5) 면역체 전기영동 (immunoelectrophoresis)

면역체 전기영동은 아가로오스 겔이나 폴리아크릴아마이드 겔의 전기영동을 수행한 후에 그 겔에 있는 항원 띠를 특이한 항체 용액 (antiserum)을 이용하여 검출하는 것이다. 간단한 방법으로는 전기영동을 수행한 겔을 항체용액이나 분리된 항체가 들어있는 용액에 담그는 것이다. 그러면 항원과 항체가 결합하여 침전물을 형성하여 띠를 나타낸다. 또 다른 방법으로는 전기영동을 수행한 후 겔에 대한 면역체 사본(replica)을 떼내어 면역 화학물질 검출을 수행하는 방법이다. 면역체 사본에는 아가로오스 사본, Diazopaper 사본, 니트로셀룰로오스 사본 등이 있다.

면역체 전기영동의 원리는 항원과 그에 대한 항체가 같은 비율로 침전체들을 형성하는 것을 이용한다. 그렇기 때문에 면역체 전기영동에서는 항원과 상응하는 항체 사이의 비율이 매우 중요하다. 항체가 과량으로 존재하면 대부분 한 개의 항원이 각각 항체에 결합하며, 반면에 항원이 과량으로 존재하면 대부분 한 개의 항체가 각 항원에 결합하여 침전물을 형성하지 못한다. 그러나 특이한 항원/항체 비율(equivalent point)에서는 커다란 거대분자가 형성된다. 이 거대분자는 항원-항체-항원-항체-.... 의 형태로 구성되며, 면역 침전체로써 겔 기반상에 고정된다. 이 침전물질은 겔 상에서 육안으로 확인되며, 단백질 염색 방법으로 볼 수 있다. 이 방법은 매우 특이하며 민감도가 높은 것이 특징이다. 면역체 전기영동은 크게 3 가지로 나누어 볼 수 있다.

① 카운터 면역체 전기영동 (counter immunoelectrophoresis)

높은 전기적 삼투압(electro-osmosis)이 존재하는 아가로오스 겔 상에서 완충용액을 pH 6.8 정도로 고정하면 항체는 어떤 전하도 띠지 않는다. 시료(항원)와 항체는 각각 반대쪽의 웰에 위치하며 서로를 향하여 움직인다. 전하를 띤 항원은 전기영동적으로 이동하며, 항체는 전기적 삼투압류에 의해서 움직인다. 항체와 항원이 만나는 부위에서 침전이 형성된다.

A

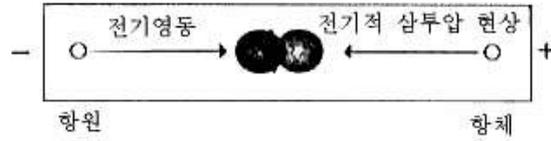


그림 12-10. 카운터 면역체 전기영동의 원리

② 존 전기영동/면역체 확산(immunodiffusion)

우선 아가로오스 겔 상에서 존 전기영동을 수행한 후 항원을 항체를 향해 확산되도록 한다. 항체는 겔을 수행한 양쪽으로 평행하게 겔을 잘라내어 웰을 만들어서 주입하여 둔다. 확산되던 항원이 항체를 만나면 침전을 형성한다.

B

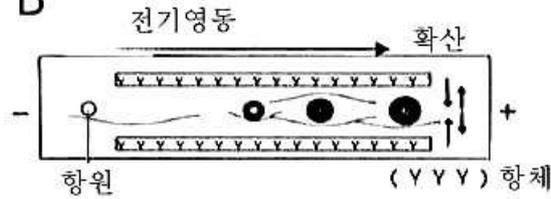


그림 12-11. 존 전기영동/면역체 확산의 원리.

③ 로켓 방법(rocket technique)

일정한 농도의 항체를 포함하고 있는 아가로오스 겔을 만들어서 그 겔에 항원을 주입하여 전기영동을 수행한다. 그러면 침전체가 로켓 형태를 형성하기 때문에 로켓 방법이라고 한다.

C

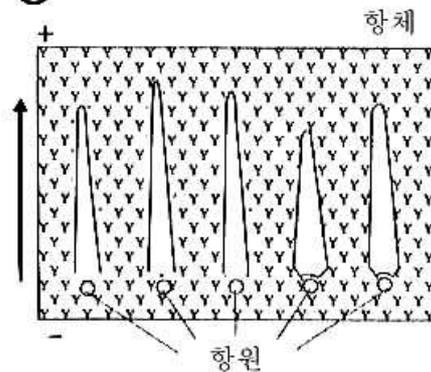


그림 12-12. 로켓 방법의 원리

④ 2 차원(two-dimensional) 겔 전기영동

2 차원 겔 전기영동은 2 개의 높은 해상능을 갖는 전기영동 과정 즉 isoelectric focusing과 SDS-PAGE을 결합시켜 한 과정만을 사용했을 때 보다 더 높은 분해 능력을 갖도록 한 것이다. 이 전기영동 방법의 결과로 나타나는 2 차원 겔에는 서로 잘 분리된 수많은 단백질 반점(spots)이 나타난다. 시료에 따라서는 실버 염색이나 방사성 사진으로 탐색할때 1500 개의 단백질 반점을 찾을 수도 있다.

2) 자유용액(free solution)에서의 전기영동

자유용액에서의 전기영동에는 이동 경계면 전기영동(moving boundary electrophoresis), 연속 자유흐름식 존 전기영동(continuous free flow zone electrophoresis), 모세관 전기영동(capillary electrophoresis) 등이 있다.

이동 경계면 전기영동은 U자형 튜브의 완충용액 안에서 수행되며, 전기영동을 마친 후에는 굴절률(refractive index)의 변화로 시료가 어디에 있는지 검출할 수 있다. 장치는 다음과 같다.

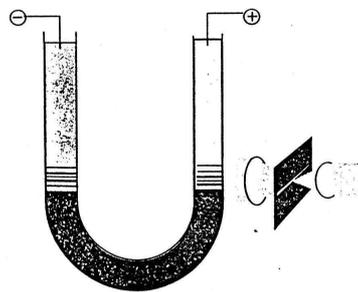


그림 12-13. 이동 경계면 전기영동 장치

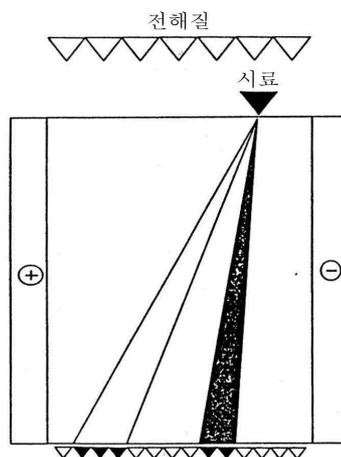


그림 12-14. 연속 자유흐름식 존 전기영동

연속 자유흐름식 존 전기영동은 수직적 상태에서 이루어지며, 세포기관과 세포막 또는 전체 세포의 확인, 정제 그리고 분리까지 해결되는 편리한 방법이다(그림 12-14). 또한 이 전기영동의 장점은 아주 작은 차이를 가진 시료조차도 분리가 가능하기 때문에 매우 효과적이고 연속적으로 행하여 질 수 있으므로 많은 양도 분리할 수가 있다.

모세관 전기영동은 아주 가느다란 관, 즉 모세관에서 수행되는 방법이다. 실리카로 된 모세관은 길이가 약 20~30 cm이고 지름(두께)은 약 50~100  $\mu\text{m}$ 정도가 된다. 전기영동을 수행하는 시간은 10~20 분이다. 주의해야 할 사항은 관내의 구성성분의 흡착과 전기 삼투압 효과(electroosmotic effect)가 생길 수 있기 때문에 그것을 방지하기 위하여 내부에 폴리아크릴아마이드나 메틸셀룰로스로 코팅을 해주어야 한다. 이 전기영동은 상대적인 이동성이나 분자량으로 분리한다. 장점은 자동화가 가능하다는 것과 다른 분석장치에 연결하여 같이 사용할 수 있다는 것이며, 검출방법은 UV를 통한 방법으로 260 nm(DNA)나 280 nm(단백질)에서 하고 모세관에서 직접하고 싶다면 185 nm에서 관찰하면 된다.

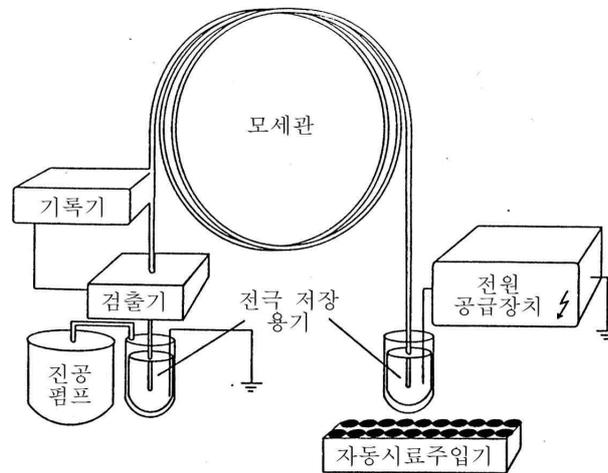


그림 12-15. 모세관 전기영동 장치

### 3) 기타 전기영동

일반적으로 겔 전기영동이 더 많이 사용되지만 다당류나 지질 다당류 같이 고분자량을 가지는 것들의 분석에서는 종이 및 얇은 막 전기영동을 더 많이 사용한다. 왜냐하면, 이런 분자들은 겔의 구멍(pore)을 막을 수 있기 때문에 구멍 크기가 큰 종이를 사용하는 것이 좋다. 그리고 셀룰로오스 아세테이트 막 전기영동은 셀룰로오스 아세테이트 막이 종이처럼 큰 구멍 크기를 가지기 때문에 걸림 효과(sieving effect)가 거의 없다. 이것의 단점은 분리되는 부분이 넓으며, 해상능이 낮다는 것이고 장점은 다루기 쉽고, 분리와 염색이 빠르다는 것이다.

## 2. Isotachopheresis

Isotachopheresis(ITP)는 존 전기영동과는 달리 두 개의 다른 전해질 시스템을 가지는 것이 가

장 큰 차이점이다(그림 12-16). 전해액에는 선도 전해액과 마감 전해액으로 구분된다. 만약 음이온 시료들을 분리하려고 한다면 선도 전해액은 양극실쪽에 채워져야 하며 전해액의 어떤 이온도 시료 음이온들 보다 전기 이동도가 커야 한다. 음극실의 경우 마감 전해액으로 채워지며 시료의 어떤 음이온들 보다 전기 이동도가 작아야 한다. 시료들을 선도 전해액과 마감 전해액의 경계에 loading을 한 뒤 전기장을 걸어주게 되면 전체 전기장의 세기는 일정하게 되며, 시료들 중 이동도가 큰 것은 앞으로 먼저 나가게 된다. 하지만 선도 전해액은 알지르지 못하고 반면 가장 늦게 이동하는 이온 또한 마감 전해액에 대해서 추월당하지 않게 된다. 이로써 모든 시료 이온들은 선도 전해액과 마감 전해액내에 갇히게 된다. 이후 시료의 혼합띠 내에서 분리가 계속되어 어느 정도 시간이 지나면 연속적인 띠를 형성하게 된다. 이 단계가 지나게 되면 계에는 더 이상의 변화가 없게 되는 정상상태에 도달하게 된다. 즉 모든 시료들이 같은 속도를 가지고서 진행되는 등속 영동 분리를 이루게 되는 것이다.

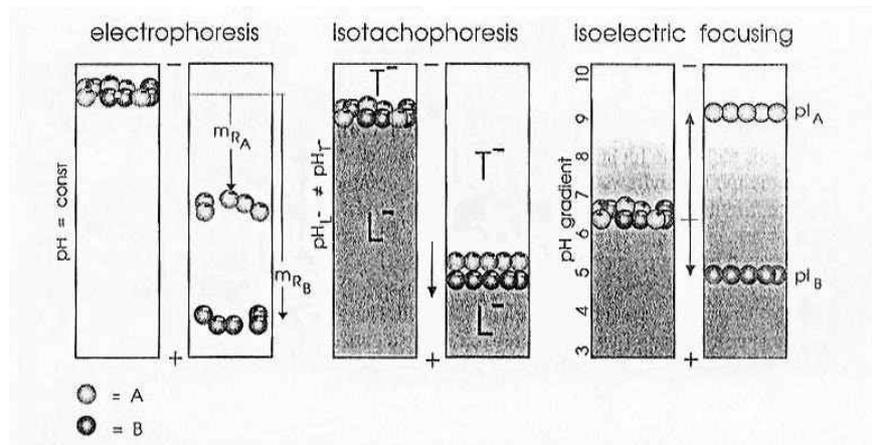


그림 12-16. 전기영동적 분리방법의 비교

### 3. Isoelectric focusing (IEF)

단백질 전기영동 방법 중 가장 최근에 발전한 방법으로 단백질을 분리, 정제하는데 있어서 가장 효과적이고 일반적인 방법이다. 전기영동과 IEF의 차이점은 전기영동은 단백질의 크기와 일정한 pH에서의 전체 전하에 의해 결정되는 이동속도에 따라 단백질을 분리하지만 IEF는 단백질의 등전점(isoelectric point = pI ; net charge가 0일 때의 pH값)을 이용하여 단백질을 분리한다는 점이다. IEF는 pH 차이에 의해 이루어진다. 단백질, 효소, 펩티드는 pH 차가 존재하는 겔 상에서 그들의 전체전하가 0이 되는 위치까지 음극이나 양극 쪽으로 이동한다. 이 지점에서는 더 이상 전하를 갖지 않으므로 전기장에 영향을 받지 않고 위치한다. IEF에 사용되는 pH 차는 양쪽성 자유 운반자(free carrier ampholytes)를 이용하여 형성한다. 처음에 양쪽성 운반자를 넣은 겔은 균일한 pH 값을 갖는다. 그러나 양쪽성 운반자는 거의 모두 전하를 갖고 있으므로 전기장에서 (+) 전하를 가진 양쪽성 운반자는 음극쪽으로, (-) 전하를 띤 양쪽성 운반자는 양극쪽으로 이동하여 pH 차를 만든다. 이러한 양쪽성 운반자는 pI 값에서 높은 완충용량과 용해도, 그리고

균일한 전도율을 갖으며, 생물학적 효과가 없고 낮은 분자량이라는 등의 특징을 갖고 있다. 이러한 IEF는 2 차원 전기영동의 일차원(first dimensional) 전기영동에도 이용된다.

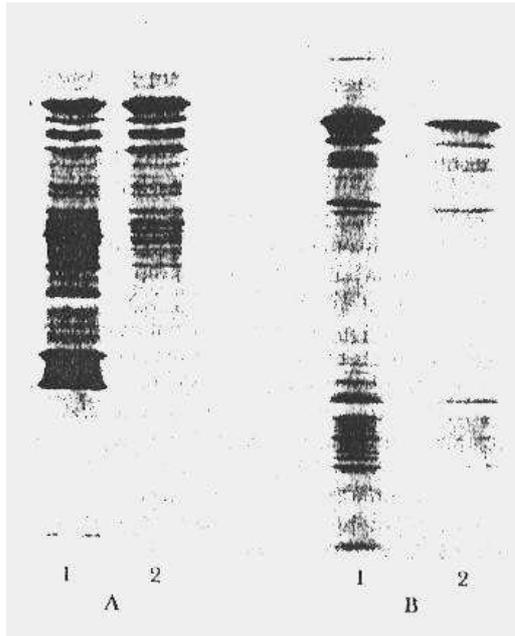


그림 12-17. Isoelectric focusig에 의하여 분리된 두 단백질 혼합물 (1 과 2)  
(A) 일반적 실험체계; (B) 고해상력 실험체계

#### 12-4. 전기영동 관련 기타사항

전기영동에 사용되는 몇 가지 화학물질은 몸에 몹시 좋지 않으므로 사용에 주의하여야한다. 아크릴아마이드는 신경계에 유해하므로 취급에 주의하여야 한다. 하지만 폴리아크릴아마이드 겔은 중합화 반응에서 빠진 단량체가 남아 있지 않으면 위험하지 않다. 또한 DNA와 RNA를 염색하는데 주로 사용되는 EtBr (Ethidium Bromide)은 돌연변이원 (mutagen)이면서 발암물질 (carcinogen)이므로 사용시 항상 비닐장갑을 착용하기를 권한다. 또한 전기영동 장치는 고압의 전기를 발생시키는 경우가 많으므로 항상 감전의 위험을 배제하도록 주의를 기울여야 한다.