

Product News Letter 1호

2008년 8월

A New Standard for Highly Resolved Protein Gel Electrophoresis

Gradi-Gel II Gradient PAGE Analysis Kit

- ✓ 6kDa에서 240kDa의 모든 단백질을 하나의 Gel에서 분석가능
- ✓ 10kDa 이하 Peptide 분석의 새로운 정석
- ✓ 높은 해상도와 이쁜 Band 모양
- ✓ 사용자의 편의를 위한 쉬운 Casting방법
- ✓ 고효율의 Membrane Transfer
- ✓ 짧은 전기영동 시간과 염색시간
- ✓ 단백질 전기영동의 표준화 실현

Gradi-Gel™ II

7.5% (29:1) Gradi-Gel™ II

10% (29:1) Gradi-Gel™ II

Product	Qty	Cat. No.	가격(₩)
Gradi-Gel™ II Gradient PAGE Analysis Kit	1 Kit	EBA-1056	150,000

- ✓ Kit contents
- Gradi-Gel™ II 2x Stacking Gel Buffer : 20 ml
 - Gradi-Gel™ II 2x Running Gel Buffer : 100 ml
 - 30% Acrylamide Stock Solution (acrylamide:bisacrylamide = 29:1) : 100 ml

⚠ 10x8cm mini-gel의 경우 1.5mm 두께의 gel 25개, 0.75mm 두께의 gel 50개를 준비할 수 있는 용량입니다.
TEMED와 ammonium persulfate는 kit에 제공하고 있지 않습니다.

(주)엘피스바이오텍은
단백질 전문 기술기업입니다
기술혁신형 중소기업입니다
ISO9001 인증기업입니다



고객문의 : 042-581-8448
E-mail : sales@elpisbio.com
URL : www.elpisbio.com

Gradient Gel이란?

일반적인 SDS-PAGE법은 단일 %의 polyacrylamide를 이용하고 있으며 이때 단백질의 이동은 분자량의 로그값에 비례하기 때문에 정확한 분자량 산출이 어려운 단점이 있습니다. 또한 단백질의 크기에 따라 적합한 %농도를 사전에 결정하여야 하기 때문에 연구의 표준화에 있어서 많은 단점으로 제시되어 왔습니다.

전통적인 gradient gel은 polyacrylamide의 %농도 구배를 주어 단백질의 크기별 이동이 단백질의 분자량에 비례하도록 고안된 방법입니다.

Gradient gel은 미세한 분자량의 차이를 관찰하고자 하는 경우 그리고 다양한 크기의 단백질을 하나의 gel 에서 관찰하고자 하는 경우에 많이 사용되어 왔습니다.

그러나 일반적인 gradient gel은 농도 구배를 주는 과정이 필수이기 때문에 gel의 준비과정이 복잡하고 (gradient mixer사용) 재현성이 부족한 단점이 있습니다.

이외에도 gel의 위아래 %가 달라 염색과정이나 transfer 과정 중 gel의 크기가 위아래 달라지는 왜곡현상이 발생하곤 하며 높은 %의 gel 부분이 잘 부서지는 문제로 인해 이후 처리가 어려운 단점도 존재하고 있습니다.

이러한 이유로 Pre-cast gel을 구매하여 사용하시는 연구자 분들이 증가하고 있으나 pre-cast gel은 보존기간이 짧고 가격이 비싼 단점이 있었습니다.

Gradi-Gel II 의 인기 비결

Gradi-Gel II는 기존의 physical gradient 방식이 아닌 chemical gradient원리를 세계 최초로 개발하여 제품화함으로써 단백질전기영동의 새로운 패러다임을 제시한 제품으로서,

- 1. Gel의 준비과정이 간단합니다** : 2x running buffer 1 part와 acrylamide solution 1 part를 섞어 gelling하는 방식으로 최대 10 분 이내에 전기영동에 필요한 gel의 준비가 가능합니다.
- 2. Running time이 짧습니다** : 일반적인 SDS-PAGE의 2/3 시간입니다.
- 3. Gel의 왜곡현상이 없습니다** : 단일 %의 polyacrylamide gel을 사용하므로 염색과정과 transfer 과정에서 acrylamide의 %차이에 의한 gel의 왜곡현상이 없습니다.
- 4. 정확한 분자량 산출이 가능합니다** : 분자량에 비례한 이동도를 보임으로써 Rf값과 표준단백질의 분자량을 양측으로 하는 직선산출이 용이합니다 (Rf는 총 이동거리에서 해당단백질이 이동한 거리를 나눈 값입니다).
- 5. 하나의 gel에서 작은 peptide와 큰 단백질의 동시비교가 가능합니다** : 2-3kDa의 작은 peptide는 물론 300kDa의 고분자량 단백질을 하나의 gel에서 동시에 관찰하는 것이 가능합니다.
- 6. 작은 peptide의 분석에서 새로운 해법을 제시하고 있습니다** : 기존의 SDS-PAGE 에서 불가능하고 Tricine gel 에서 어려웠던 저분자 peptide의 고해상도 분석이 용이합니다.
- 7. 고해상도의 결과를 보장합니다** : 일반적인 SDS-PAGE 에서 흔히 나타나는 band의 퍼짐 현상이 없어 고해상도를 나타내므로 1kDa미만의 차이도 쉽게 분석 가능합니다.
- 8. 일정한 membrane transfer 효율** : 작은 size에서 부터 큰 size에 이르기 까지 동일한 membrane transfer 효율을 보입니다. 큰 단백질의 불완전한 transfer로 인한 결과해석의 어려움을 완벽히 해소할 수 있습니다.

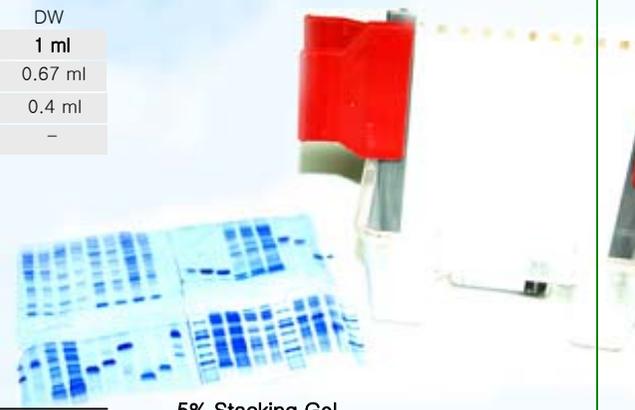
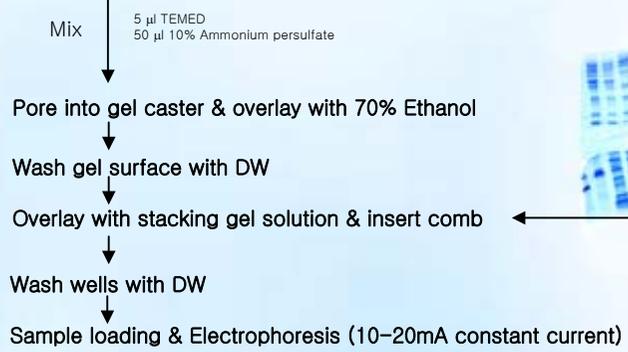
Gradi-Gel II 의 시간효율비교

	Gel Preparation	Total Run	Staining	Membrane Transfer
Gradi-Gel II	10 min	50-60 min	20 min	40-50 min
Laemmli's SDS-PAGE	20 min	80-90 min	> 1hr	> 1 hr
Physical Gradient Gel	40 min	90-120 min	>1 hr	> 1 hr

Gel preparation : Buffer, solution의 준비에서 최종적으로 stacking gel을 준비하기까지의 일반적인 시간
 Total run time : 20mA constant current에서 10x8cm gel의 평균 running time. 일반적인 Tris-Gly-SDS buffer사용
 Staining time : 0.1% Coomassie blue R250, 10% acetic acid, 45% methanol 염색용액을 사용하였을 때의 평균시간
 Membrane transfer time : Nitrocellulose membrane, submerged transfer kit를 이용하여, 90 V constant voltage로 transfer 하였을 때, 240kDa를 포함한 모든 단백질이 membrane에 transfer되는 평균시간

Gradi-Gel II 사용법

	2x Running Gel Buffer	30% Acrylamide	DW
7.5% Gel	2 ml	1 ml	1 ml
10% Gel	2 ml	1.33 ml	0.67 ml
12% Gel	2 ml	1.6 ml	0.4 ml
15% Gel	2 ml	2 ml	-

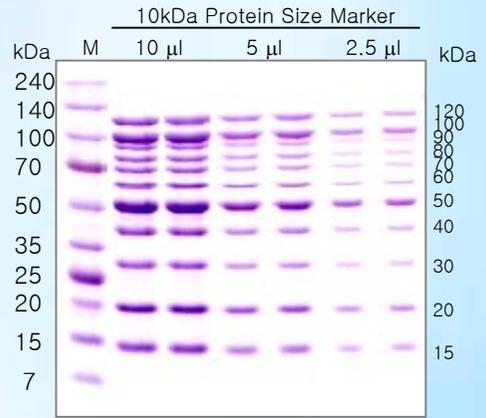


5% Stacking Gel

0.5 ml 2x Stacking Gel Buffer
167 μ l 30% Acrylamide Solution
322 μ l DW
1 μ l TEMED
10 μ l 10% Ammonium persulfate

- 주) 1. Gel의 용량은 사용하고 계신 전기영동키트의 권장용량을 기준으로 결정하여야 합니다.
 2. 키트에는 2x Running gel buffer, 2x Stacking gel buffer, 30% acrylamide solution이 제공되며, TEMED, 10% ammonium persulfate 는 준비하여 사용하셔야 합니다.
 3. 1x Tris-Gly-SDS Running buffer : 25mM Tris-HCl, 192mM Glycine, 0.1% SDS, do not adjust pH

Migration of Proteins in Gradi-Gel II Gradient Gel

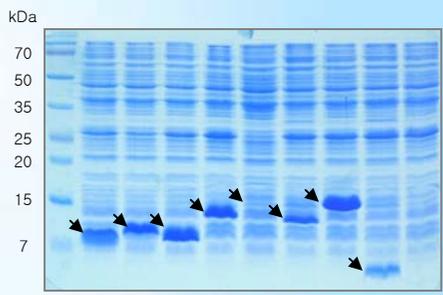


Gel : **7.5% Gradi-Gel II gradient electrophoresis**
 10x 8 cm, 0.75mm thick
 Running Buffer : Tris-Gly-SDS 1x running buffer
 Running Condition : 20mA constant for 60 min

Gel was stained with Coomassie blue R250

M : Broad-range Prestained Marker (EBM-1032, dual color, 3 μ l)
 10kDa Protein Size Marker (EBM-1015)

Low Peptide Analysis in Gradi-Gel II Gradient Gel



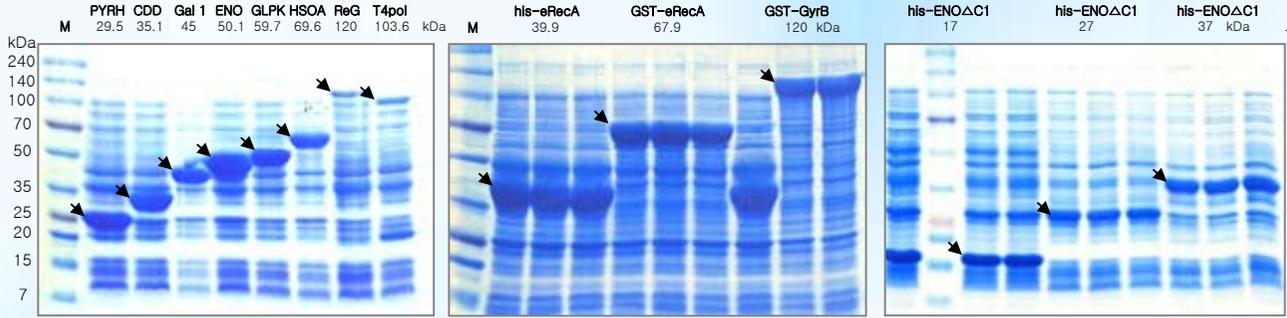
Gel : **15% Gradi-Gel II gradient electrophoresis**
 10x 8 cm, 0.75mm thick
 Running Buffer : Tris-Gly-SDS 1x running buffer
 Running Condition : 20mA constant for 60 min

Gel was stained with Coomassie blue R250

Recombinant genes were expressed in BL21(DE3) cells

M : Broad-range Prestained Marker (EBM-1032, dual color, 3 μ l)

Analysis of Different Sized Proteins in Gradi-Gel II



Gel : **7.5% Gradi-Gel II gradient electrophoresis**

10x 8 cm, 0.75mm thick

Running Buffer : Tris-Gly-SDS 1x running buffer

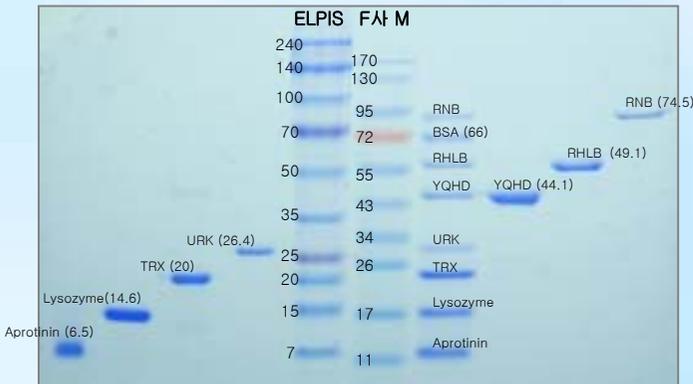
Running Condition : 20mA constant for 60 min

Gel was stained with Coomassie blue R250

M : Broad-range Prestained Marker (EBM-1032, dual color, 3μl)

Recombinant genes were expressed in BL21(DE3) cells, and extracts were analyzed.

Size Exactness of Proteins in Gradi-Gel II



Gel : **7.5% Gradi-Gel II gradient electrophoresis**

10x 8 cm, 0.75mm thick

Running Buffer : Tris-Gly-SDS 1x running buffer

Running Condition : 20mA constant for 60 min

Gel was stained with Coomassie blue R250

Purified proteins were loaded :

URK : Uridine Kinase 26.4kDa(24.4kDa)

YQHD : Alcohol dehydrogenase yqkI 44.1kDa(42.1kDa)

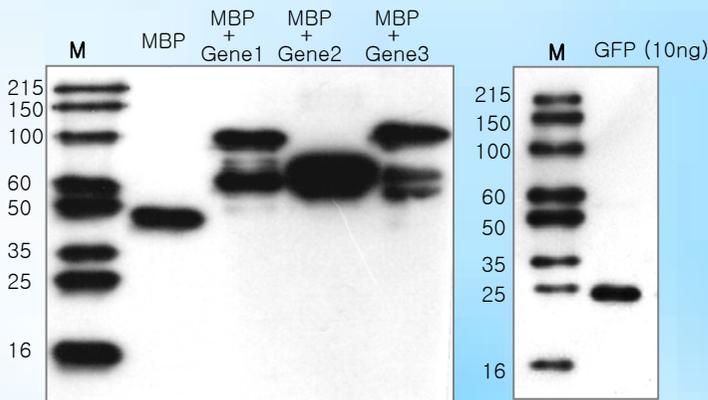
RHLB : ATP-dependent RNA helicase 49.1kDa(47.1kDa)

RNB : Exoribonuclease2 74.5kDa (72.5kDa)

ELPIS : Elpis's broad range marker (EBM-1032, 5μl)

F사 M : F사의 broad range marker (5μl)

Western Blot Analysis in Gradi-Gel II



M : West-view 2 Broad-range (EBM-1037), 5μl loaded

Gel : **7.5% Gradi-Gel II gradient electrophoresis**

10x 8 cm, 0.75mm thick

Running Buffer : Tris-Gly-SDS 1x running buffer

Running Condition : 20mA constant for 60 min

Transfer to NC membrane, 45min at 90 volt constant

Block with 1% skim milk (Difco) in TBST for 1 hr

Anti-MBP monoclonal (1:2,000, #4D8) for 1hr

Anti-GFP monoclonal (1:1,000, #4D3) for 1hr

Anti-Mouse IgG-HRP (1:3,000, Sigma) for 1 hr

Developed on X-ray film by picoEPD (EBP-1073)

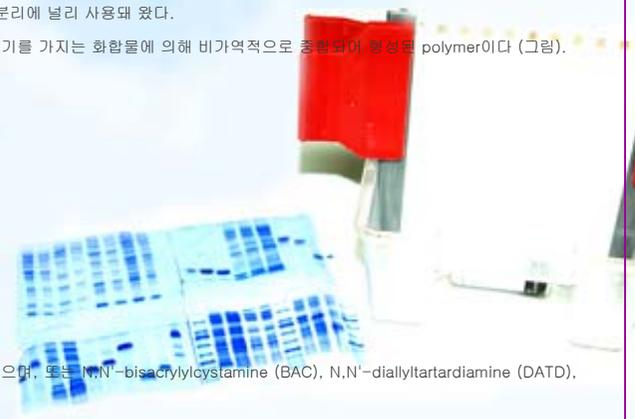
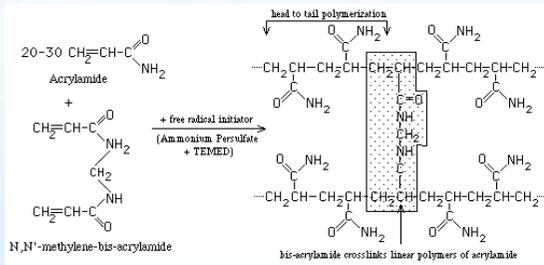
보다 자세한 자료를 원하시면 www.elpisbio.com 을 방문하시거나 이메일 sales@elpisbio.com 또는 전화 042-581-8448로 문의를 주시면 성심껏 답변을 드리겠습니다

Polyacrylamide Gel Electrophoresis

1. 전기영동의 원리

Acrylamide를 가교제 (cross-linker)로 중합한 polyacrylamide gel은 acrylamide와 가교제의 농도 및 비율에 의해 gel내 미세통로의 크기를 조절할 수 있어 다양한 크기의 생체 분자들을 분리할 수 있을 뿐만 아니라 높은 정밀도와 고분해능으로 인해 오래 전부터 단백질, 핵산 등의 분리에 널리 사용돼 왔다.

Polyacrylamide gel은 acrylamide 측쇄 기능기가 N,N'-methylene bisacrylamide와 같은 2개의 기능기를 가지는 화합물에 의해 비가역적으로 중합되어 형성된 polymer이다 (그림).



가교제로는 N,N'-methylene bisacrylamide가 (일반적으로 bisacrylamide라 한다) 많이 사용되고 있으며, 또는 N,N'-bisacrylylcystamine (BAC), N,N'-diallyltartardiamine (DATD), ethylene diacrylate (EDIA) 등도 특수한 목적으로 사용되기도 한다.

생체물질의 효과적인 분리 범위는 polyacrylamide의 농도와 가교제와의 중합 정도에 의해 결정되며 가교제에 의해 중합되어 생긴 gel은 적절한 강도와 탄성을 유지하고 polypeptide가 통과할 작은 구멍을 형성한다. 이 구멍의 크기는 가교제와 polyacrylamide의 비율이 증가할수록 감소하여 약 1:20 정도에서 가장 작게 된다. 대부분의 polyacrylamide gel은 1:29의 비율로 제조하며 사용하고 있으며 이 비에서 분자량이 3% 정도의 차이가 있는 polypeptide를 분리할 수 있다.

Polyacrylamide gel은 %T와 %C로 표현되는데 %T는 acrylamide와 bisacrylamide의 %중량이며 %C는 가교제인 bisacrylamide의 %중량이다. 따라서 %T와 %C가 커지면 그만큼 미세통로의 크기는 작아지게 되어 작은 물질의 분리에 이용할 수 있게 된다.

Acrylamide의 중합은 ammonium persulfate (APS) 또는 riboflavin의 첨가에 의해 개시된다. APS를 사용하는 경우에는 촉매제로 N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)를 사용하며 TEMED는 persulfate로부터 자유라디칼의 생성을 촉매하므로써 중합을 개시한다. Riboflavin은 광조사 (photoactivation)에 의해 자유라디칼을 생성하여 acrylamide의 중합을 개시한다. Polyacrylamide의 중합이 해리된 자유라디칼에 의해 시작되므로 gel용액 내의 산소는 중합반응을 방해하게 되는데 gel용액을 사전에 degassing 해주는 이유이다.

Polyacrylamide gel을 사용하는 단백질 전기영동법은 크게 두 가지로 나눌 수 있는데 하나의 gel만을 사용하는 연속적 시스템(continuous buffer system)과 buffer조성이 다른 두 개의 겔을 사용하는 불연속적 방법이다 (discontinuous buffer system). 연속 시스템은 pH 3-11 사이의 완충용액을 한가지 선택하여 겔과 음전극액 내 전해질 조성 및 농도를 동일하게 만들어 전기영동하는 방법이고 불연속 시스템은 흔히 우리가 알고 있는 stacking gel을 사용하는 경우이다. 또한 단백질 전기영동법은 ionic detergent의 사용유무에 따라 dissociating 또는 non-dissociating 법으로 구분하기도 한다. Dissociating법은 sodium dodecyl sulfate (SDS)와 같은 ionic detergent나 수소결합을 끊어주는 urea등을 단백질 시료에 첨가한 후 열을 가해 denature시킨 후 단백질복합체를 개별 단백질로 해리하여 분석하는 방법으로 disulfide bond를 해리 시켜주는 reducing agent (β-mecaptoethanol 또는 DTT)의 사용유무에 따라 reducing 또는 non-reducing법으로 구분하기도 한다. Non-dissociating 법은 단백질변성을 주지 않고 단백질 복합체를 단백질의 고유한 전하에 의해서만 분리하는 방법이다. (흔히 Native PAGE라고 한다).

단백질 분리를 위한 전기영동에 있어서 오늘날 가장 광범위하게 쓰이고 있는 SDS-불연속 전기영동법 (SDS-discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE)은 1970년 Laemmli, U.K.에 의해 개발되었다 (Laemmli, U.K. 1970, Nature 227, 680-685). 불연속 전기영동법의 가장 큰 장점은 많은 용적의 시료를 로딩하더라도 좋은 해상도로 얻을 수 있다는데 있다.

전기영동용 완충용액(running buffer)에 포함된 glycine은 의약산으로서 음전하와 양전하를 동시에 띌 수 있다. 이와 같은 zwitter 이온의 성질을 이용하면 겔내의 pH조건에 따라 glycine의 net charge와 이로 인한 전기영동속도를 조절할 수 있다. 전기영동을 시작하면 leading 이온인 Cl⁻이온과 단백질, glycine 이온이 모두 양극을 향해 출발하게 된다.

Glycine은 stacking gel의 낮은 pH 조건에서는 거의 중성을 띠므로 극부적인 전류의 감소현상이 유발된다. 따라서 낮은 pH 조건에서도 이동도가 빠른 Cl⁻이온과 이동도가 느린 glycine 이온 사이에 매우 높은 전위차가 형성되는데 이러한 전위차에 의해 glycine 이온이 Cl⁻이온을 빠르게 따라가게 된다. 이때 상대적으로 이동속도는 glycine < 단백질 < Cl⁻이 되며 따라서 단백질은 Cl⁻와 glycine 이온사이에 축적되어 이동하게 된다. Cl⁻와 glycine 이온의 간격은 수 mm로서 많은 용적의 시료에 있던 단백질도 running gel에 들어가기 전에 이 사이에 축적되어 해상도를 높이는 효과를 나타내게 된다. Stacking gel은 large-pore gel이므로 단백질의 molecular sieving현상은 나타나지 않는다 (겔내의 미세통로 크기에 따라 단백질이 분리되는 현상).

이동 중인 이온들이 running gel에 이르게 되면 running gel의 높은 pH는 glycine 이온을 음전하로 강하게 대전시켜 glycine의 이동속도가 단백질보다 빠르게 되어 단백질은 겔내에서 molecular sieving현상에 의해 분리된다.

Stacking gel은 acrylamide 농도가 3~5%인 것을 사용하며 pH는 6.8이다. Running gel (resolving gel 또는 separating gel)은, 분리하고자 하는 단백질의크기에 따라 6~15%를 주로 사용하며 pH는 8.8이다

2. SDS-discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE

- Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685
- Stacking, high resolution

3. Critical points to be considered before experiment

- Separation : Size가 다른 두 단백질의 분리 정도를 나타내는 지표로서 사용시약의 chemical grade, gelling condition, gel thickness & length에 의해 영향을 받을 수 있다.
- Resolution : Band의 sharp한 모양을 결정하는 요인으로 protein purity, loading volume, loading amount, heating, current & voltage, gel thickness & length에 영향을 받는다.

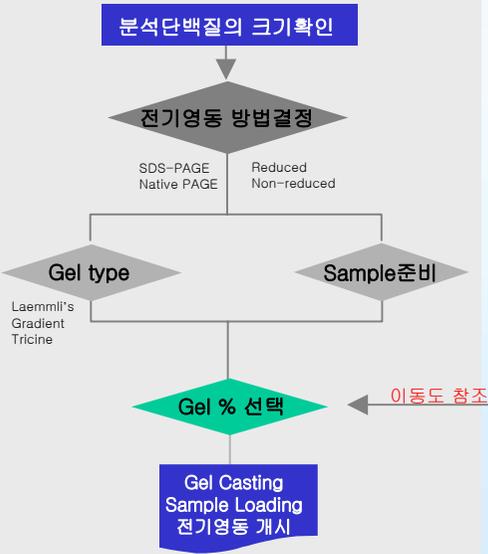
4. Selection of gel %

- %T, %C (전체 acrylamide의 농도 및 cross-linker인 bisacrylamide의 농도를 나타내는 수치로 cross-linker의 %가 높을 수록 pore size는 작아져 작은 peptide의 분석에 용이함)
- Single % (전기영동 이동도 참조)

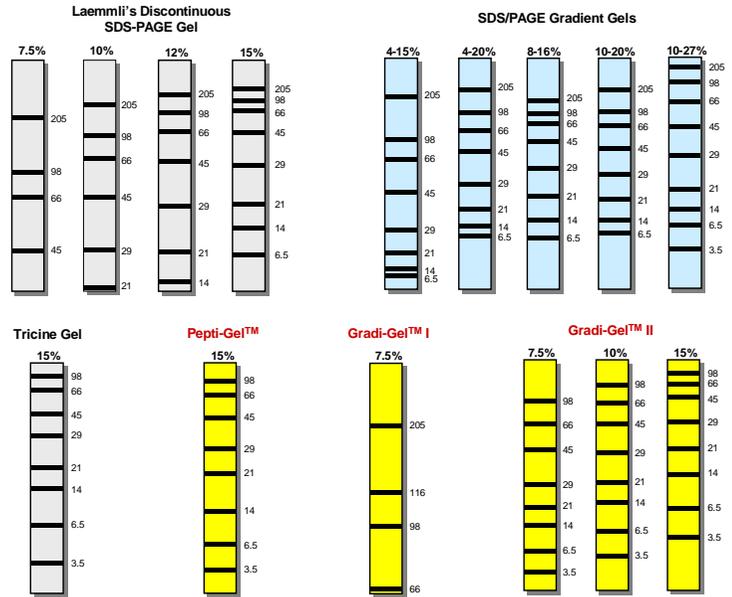
5%	100-300Kda
7.5%	40-250Kda
10%	20-200Kda
12%	14-150Kda
15%	4-100Kda

- Linear gradient %

전기영동 흐름도



전기영동 이동도



4. Reagents

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	18.17g Tris base in 100 ml DW and adjust pH with HCl 상온보관
1 M Tris-HCl, pH 6.8	12.11g Tris base in 100 ml DW adjust pH with HCl 상온보관
10% SDS	10g/100ml DW 상온보관
TEMED	상온보관
10% Ammonium persulfate	1g/10ml DW, fresh prepare 상온보관
30% acrylamide/bisacrylamide stock solution (29:1 mix)	29g acrylamide (ultra pure) 1g bisacrylamide dissolve in 100ml DW and filter store at 4°C in dark
2x Sample Loading Buffer	125 mM Tris-HCl, pH 6.8 20% Glycerol 2% b-mecaptoethanol 0.04% bromophenol Blue 4% SDS
Running Buffer (1x)	10x로 만들어 장기 보관할 수 있다 0.025M Tris-HCl (pH8.3) 0.192M Glycine 0.1% SDS

5. Stock solution : 아래 solution을 stock을 만들어 사용하면 gel을 casting하는 시간을 줄일 수 있음

- 2x Running gel buffer (750mM Tris-HCl, pH8.8)
- 2x Stacking gel buffer (125mM Tris-HCl, pH6.8)
- 30% acrylamide stock (Acrylamide/bisacrylamide 29:1)

6. Gel running

1. 사용하고 있는 전기영동 키트의 고유한 방법에 따라 유리판을 casting한다.
2. Stacking gel과 running gel 용액을 준비한다 (stock으로 제조).
 - Mini-gel (10x8cm, 0.75mm thick)의 경우 running gel 4 ml과 stacking gel 0.6 ml이 소요된다.
3. Running gel 용액에 ammonium persulfate와 TEMED를 첨가한 후 거품이 나지 않을 정도로 신속히 섞고 pipette를 사용하여 조심스럽게 유리판 사이의 공간에 붓는다.
4. Stacking gel의 높이를 고려하여 running gel용액을 부어준 후 그 위에 증류수 또는 alcohol을 조심스럽게 가해준다 (이는 running gel의 뒷 표면을 고르게 해주는 효과 외에 공기를 차단하여 gel이 고르게 중합되게 하기 위한 것이다). Gel이 굳을 때까지 방치한다.

주의 : Overlay alcohol로 문헌에는 isopropanol이나 butan올을 권장하고 있지만 소독용으로 사용하는 70% ethanol 용액을 사용해도 전혀 무방하다. Ethanol을 사용하면 냄새로 인한 스트레스를 줄일 수 있다.
5. Gel이 굳으면 상층에 가한 ethanol과 acrylamide사이에서 뚜렷한 경계가 보이는데 이때 ethanol을 제거하고 증류수로 수차례 씻어준다.

주의 : APS와 TEMED가 정상인 경우 gel은 보통 5분내에 굳어야 하며 시간이 지연된다면 APS나 TEMED에 문제가 있는 것으로 생각해야 한다.
6. 미리 준비해 놓은 stacking gel 용액에 ammonium persulfate와 TEMED를 첨가한 후 신속히 섞고 pipette를 사용하여 조심스럽게 유리판 사이의 공간에 붓고 comb을 끼운다.

주의 : gel 내부, 표면, comb과 gel 사이의 기포는 좋은 전기영동결과를 얻는데 치명적이므로 세심한 주의가 필요하며 특히 comb밑의 기포를 주의해야 한다. 기포는 gel 용액에 첨가한 SDS에 의해 더욱 심해지므로 gel 용액에서 SDS를 생각하는 것도 고려해 볼만하다

8. Gel이 다 굳으면 조심스럽게 comb을 빼낸 후 형성된 well을 증류수로 여러 차례 세척한다.
 9. Casting한 gel을 전기영동장치에 장착하고 전기영동용 완충용액을 위와 아래의 완충용액탱크에 붓는다.
 10. Well에 조심스럽게 시료를 가한다.
- 주의 : 사용하지 않는 well에도 시료와 같은 용량의 1x sample loading buffer를 가하는 것이 좋다. 단백질의 양이 많은 경우에 단백질 이동 lane이 퍼짐으로써 왜곡되는 경우를 방지하기 위함.**
11. 전기영동 기구를 전원에 연결시킨 후 정전압 또는 정전류에서 전기영동을 한다. Mini-gel의 경우에 100V 정전압에서 1시간 30분이 소요되며 과도한 열발생이 되지 않는 한 200V 이상도 가능하다.
 13. 이동지표인 bromophenol blue가 gel의 끝부분에 도달하면 전원을 내리고 전기영동 장치로부터 유리판을 분리한다.
 15. Gel을 고정하거나, Coomassie brilliant blue로 염색하거나, 형광사진의 촬영 또는 Western blot 등 용도에 따라 이용한다.

!!! 주의사항 !!! Acrylamide와 bisacrylamide는 피부로 흡수되어 매우 강력한 **신경독성**을 나타내며 이 효과는 축적되기 때문에 무게를 잴 때는 장갑과 마스크를 착용해야 한다. 일단 굳은 polyacrylamide는 무해하다고 여겨지지만 polymer 형성이 안된 acrylamide 또는 bisacrylamide monomer가 남아 있을 수 있으므로 조심스럽게 다루어야 한다.

7. Trouble shooting

1. **Gel이 전혀 굳지 않는다.** APS를 만든 지 오래된 경우 나타날 수 있는 전형적인 경우로서 APS를 새로 만들어 사용한다.
2. **Gel이 굳기는 하지만 강도가 적어 마치 젤랙질의 액체 같다.** Acrylamide와 bisacrylamide의 농도와 비율이 적합하지 않은 경우에 나타날 수 있으며 gel용액에 불순물이 많은 경우도 있을 수 있다. 또한 산성조건에서는 APS에 의한 자유라디칼 생성이 방해 받으므로 gel이 굳는 속도가 늦어질 수 있다. Gel을 굳히는 실내 온도가 낮아 gel이 굳는 속도가 늦어질 수 있다. Acrylamide의 deamination에 의한 경우도 있을 수 있으므로 stock solution은 빛이 차단된 밀폐용기에서 저온으로 잘 보관해야 하며 1년 이상된 용액은 예비실험이 꼭 필요하다.
3. **Gel의 표면이 갈라진다.** High % gel에서 흔히 발생하는 문제로 중합속도가 너무 빨라 생성되는 열이 많은 경우이므로 차가운 용액을 사용하거나 APS와 TEMED의 첨가량을 조절하여 굳는 속도를 늦추면 된다. (polyacrylamide의 중합반응은 발열반응이다).
4. **Well형성이 잘되지 않는다.** Comb은 polyacrylamide의 중합을 방해하는 Teflon재질로 만드는 것이 일반적으로 이는 comb와 유리판 사이의 gel이 중합되는 것을 최대한 막기 위한 것이다. 과도한 APS를 사용하는 경우에는 comb과 유리판사이에서도 얇은 막의 형태로 중합이 이루어지므로 세심한 주의가 필요하다. APS의 양이 적은 경우에는 well 벽이 없어지는 경우도 있다.
5. **유리판에서 gel이 잘 떨어지지 않는다.** 유리판에 묻어있는 오염물 때문인 경우가 많으므로 유리판을 잘 세척해 주어야 한다 (부드러운 스펀지로 세심히).
6. **단백질 시료의 로딩이 안되고 퍼져 버린다.** Sample loading buffer에 침강제인 glycerol이나 sucrose가 빠진 경우이다.
7. **단백질이 well에 걸린다.** 대부분이 insoluble protein에 의한 것으로 protein streaking으로 나타난다. 1) Sample loading buffer, running buffer의 ionic strength가 낮거나 (buffer에서 단백질침전이 일어나는 지 확인이 필요) 2) Insoluble protein이 포함되어 있거나 (원심분리로 제거) 3) 단백질 정제과정에서 buffer의 pH가 낮아졌거나 4) 과도한 양의 단백질을 로딩했거나 5) Buffer내에 SDS나 reducing agent의 양이 적을 경우에 발생할 수 있다.
8. **단백질 밴드가 끝난 형태이다.** Gel내에 먼지나 기포가 있는 경우 또는 7번에서처럼 단백질의 불용성이 원인이 되어 나타날 수 있다.
9. **명확한 단백질 밴드가 보이지 않고 전반적으로 smear되어 나온다.** 시료가 단백질분해 효소에 오염되어 단백질들이 심하게 분해된 경우이다. 샘플링을 주의하여 다시 하여야 함.
10. **전기영동이 전혀 되지 않거나 이동속도가 무척 느리다.** Laemmli 방법을 사용하는 경우에 있어 100V 정전압에서 이동속도는 평균적으로 1.5 hr이다. 2시간이상 시간이 소요된다면 1) Running buffer의 이상유무 2) Acrylamide용액의 변성 유무를 확인해 봐야 한다. Acrylamide는 높은 pH에서 가수분해되어 amine기가 해리되어 떨어진다. 이는 gel 용액의 pH를 바꿈으로써 buffering 기능을 방해하여 비정상적인 전기영동을 초래할 수 있다. 따라서 acrylamide stock용액의 pH는 중성을 유지해야 한다.
11. **Master mix gel 용액을 만들어 사용할 수 있는지?** Stacking gel 용액의 pH는 6.80이므로 acrylamide의 변성이 최소화되어 모든 성분이 포함된 상태로 오래 보관할 수 있으므로 master mix의 제조가 가능하나 running gel용액은 pH가 8.80이므로 사용할 때마다 혼합하여 제조해야 한다. 단 2x buffer mix와 2x acrylamide stock solution을 따로 제조하여 장기적으로 보관하면서 사용할 수 있다. Gel 용액을 3가지 1) Stacking gel mix (모든 성분을 미리 혼합) 2) 2x running gel buffer (acrylamide를 제외한 모든 성분을 혼합) 3) 2x acrylamide stock으로 냉장보관하면서 사용하면 과도한 팽창으로 인한 파로를 줄일 수 있다.
12. **Gel용액에 SDS를 넣지 않아도 괜찮은지?** SDS를 빼도 해상도에는 큰 영향을 주지 않으며 오히려 SDS로 인한 기포생성 등을 줄일 수 있다.
13. **단백질 밴드의 smiling현상이나 측면에 끌림 현상이 나타난다.** 단백질 로딩양이 많거나 stacking gel부위가 짧은 경우, 전기영동시 온도가 과도하게 올라간 경우에 일어날 수 있다. 끌림 현상은 핵산 등 high charge, high molecular mass를 갖는 물질들에 의해 일어날 수 있다. 잘 정제된 단백질을 사용하고 로딩하는 시료의 양을 줄이는 방법이 최선이다.
14. **Coomassie염색정도가 약하다.** 단백질의 양이 적은 경우일 수도 있고 staining 용액이 적어 나타날 수도 있다. Gel내의 SDS는 단백질 염색을 방해하므로 staining 용액으로 충분히 희석 시켜주어야 하며 염색을 2차례에 걸쳐 하면 염색강도가 증가한다.
15. **Coomassie염색시 background 염색정도가 심하거나 destaining이 잘 되지 않는다.** Gel의 표면에 이물질이 오염된 경우로 gel plate와 staining 용기를 잘 세척해 주어야 한다. 특히 맨손으로 gel을 다룰 때 data에는 실험자의 지문이 영구 보존된다.
16. **염색 전에 전기영동이 잘 되었는지 확인해 볼 방법은 없는지?** 한쪽 유리판만을 떼어낸 채 gel표면을 전등 빛에 비스듬히 비추면 gel내에서 단백질이 있는 부위와 없는 부위의 빛 굴절률이 다르므로 단백질 밴드를 확인해 볼 수 있다.
17. **Gel을 말리는 과정에서 gel이 잘 갈라진다.** %농도가 높은 gel에서 자주 일어나는데 destaining후 증류수에서 일정시간 동안 swelling해주면 된다.
18. **전기영동시 bromophenol blue의 색이 누렇게 변한다.** 양극에서 생성되는 H⁺ 이온이 과도하여 양극에 있는 running buffer의 pH가 내려간 경우로서 running buffer의 조성을 체크 해봐야 한다.

8. Sample preparation

1. Critical point to be considered

- pH
- Detergent : non-ionic or ionic
- Ionic strength
- Lysis capacity

2. Reagents : Homogenization Buffer

- 50mM Tris-HCl (pH8.0), 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% NP-40, 1mM PMSF (100mM의 stock으로 -20C에 보관하며 사용직전에 첨가)

3. Total Protein Extraction

1. 10mg tissue/1ml homogenization buffer의 비율로 떼어낸 조직을 얼음 위에서 미리 차게 해둔 homogenization buffer에 넣고 glass homogenizer 또는 tissue tearer를 이용하여 파쇄해준다 (파쇄 중 발생하는 열을 막기 위해 얼음 위에서 작업).

주의 : Homogenization buffer의 lysis capacity를 넘는 과도한 조직이나 세포를 사용한 경우, 단백질 추출이 효과적이지 못하며, 단백질이 기타 물질들에 의해 심하게 오염될 수 있어 전기영동의 해상도에 많은 영향을 줄 수 있다.

2. 얼음 위에서 10분간 방치한다.
3. 12,000rpm, 4C로 20분간 원심분리하고 상층액만을 모아 새튜브로 옮긴다.

4. 단백질 정량을 하거나 또는 차후 사용하기 위해 -20C에 보관한다.

주의 : Homogenization buffer내의 단백질은 냉동/해동과정중 응집현상이 발생하여 침전될 수 있으므로 가끔씩 작은 냉동/해동은 피하는 것이 좋으며 단백질 정량후 1x sample buffer에 넣어 끓인 후 보관하는 것이 가장 바람직하다. 한번 침전된 단백질은 좀처럼 원상으로 회복되지 않는다.

RIPA buffer : 핵단백질을 포함한 모든 단백질의 효율적 추출에 이용

- 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC(deoxycholic acid), 0.1% SDS

9. Protein Assay

Bradford Reagent (home made) : 0.1g brilliant Blue G-250 in 1ml methanol (high purity), add 100ml 85% phosphoric acid (H₃PO₄)

BSA (bovine serum albumin) : 10mg/ml in protein extraction buffer or DW

- Bradford reagent를 1:10의 비율로 증류수에 희석한다 (working solution). (10ml 용액을 만드는 경우 1ml Bradford reagent와 9ml 증류수를 섞어준다)
- BSA standard를 준비한다 (1μg, 2μg, 4μg, 6μg, 8μg, 10μg, 12μg, 14μg, 16μg, 18μg, 20μg)
- 1ml Bradford reagent working solution에 BSA standard를 넣어주고 5분간 상온에 방치한 후 spectrophotometer를 이용하여 595nm에서 흡광도를 측정한다.
- 최신 spectrophotometer는 자체적으로 regression curve를 그려주고 샘플의 단백질량을 찾아주는 프로그램이 내장되어 있으나 옛버전인 경우에는 계산기를 이용하여 linear regression curve에서 기울기와 y절편을 직접 계산해야 한다.
- 시료단백질을 같은 방법으로 처리하여 step4에서 얻은 standard curve로 부터 단백질량을 도출한다.

주의 : Bradford 방법은 다른 단백질 정량법에 비해 민감도가 우수하나 단백질간의 차이가 많기 때문에 정제된 단백질의 절대량을 구하기는 어려운 방법이다. 그러나 단순히 전기영동을 위한 목적이라면 아주 간편하고 우수한 방법이다. Bradford reagent를 20배 희석하여 100ml 용액을 사용하면 100ng까지 정량이 가능하다. High pure reagent를 사용하지 않는 한 home made reagent는 시약회사로부터 구입한 reagent보다 다소 성능이 떨어지나 큰 지장은 없다.

10. Polyacrylamide Gel Staining with Coomassie R250

Staining Solution : 1g Coomassie blue R250 completely dissolved in 450ml Methanol, Add 100ml glacial acetic acid, Add 450ml DW

Destaining Solution : Same as staining solution without R250 dye

- 전기영동이 끝난 후 gel을 조심스럽게 gel판으로부터 분리한 후 플라스틱 또는 유리용기 (시장에서 살 수 있는 반찬통이 적함)에 옮기고 staining solution을 붓는다 (gel volume의 5배 정도가 적당, 10x8 cm mini-gel인 경우에 25ml 정도)
- Shaker에 올려놓은 후 30분-1시간 염색한다 (전반적으로 gel이 파랗게 보이고 단백질 밴드가 좀더 진하게 보이는 상태가 가장 좋다).
- staining/destaining 용액에는 과량의 methanol이 들어 있으므로 무게를 잘 받아주지 않을 경우에 methanol이 증발하여 염색이 잘 되지 않을 뿐더러 gel의 크기가 커진다.
- 수돗물로 가볍게 세척해 주고 destaining solution을 부어준 후 shaker에 올려 놓는다.
- Destaining solution을 수차례 교환하면서 gel의 염색시약이 모두 빠지도록 한다.

Staining Kits	Brilliant Blue R250 Staining Solution	Destain free G250 Staining Solution	Reversible Membrane staining solution	Rapid Silver Staining Kit	Silver Staining Kit (Low background)
Cat. No.	EBP-1011	EBP-1021	EBP-1032	EBP-1052	EBP-1051
Components	1 L ready-to-use	1 L ready-to-use	1 L ready-to-use	500 ml SolA 500 ml SolB 500 ml SolC	500 ml SolA 500 ml SolB 500 ml SolC
Protein Stain	O	O	O	O	O
DNA Stain	X	X	X	O	O
Sensitivity	25-100 ng	5-10 ng with fixing 20 ng without fixing	100-200 ng	5-10 ng	1-5 ng
Staining Time	1 hr	> 2 hr	10 min	1 hr	>2 hr
Background	Low	Low	Low	Mid	Low
Staining Step	1. Staining (20min) 2. Destaining (30min)	1. Fixing (20min, optional) 2. Staining (1-4hr) 3. Destaining (DW, optional)	1. Staining (10min) 2. Destain (DW, optional)	1. Fixing (20min) 2. washing (10min) 3. Binding (20min) 4. Washing (1min) 5. Developing (10min)	1. Fixing (>20min) 2. Washing (20min) 3. Enhancing (1min) 4. washing (1min) 5. Binding (20min) 6. Washing (1min) 7. Developing (10min)

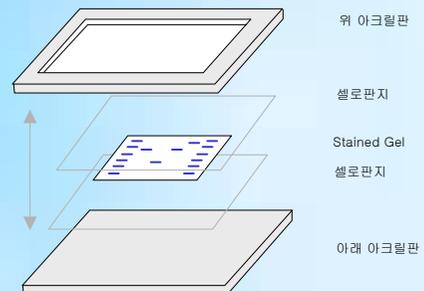
9. Gel Drying

- 미리 Drying plate에 맞게 재단해 놓은 셀로판지 두 장을 수돗물에 충분히 적셔준다.
- 염색이 끝난 gel을 수돗물에 가볍게 씻어주고 세로판지 위에 올려 놓은 후 다시 셀로판지를 덮고 gel과 셀로판지 사이의 기포를 완전히 제거한다.
- Dry plate의 사면을 클램프로 고정한 후 상온 또는 dry oven에서 완전히 말려준다.

주의 : 상온에서는 보통 하루, dry oven에서는 3시간이면 완전히 마르며 마른 gel은 가위로 잘 잘라 실냉노트에 부착하여 보관한다.

수돗물로 세척하는 정도와 또는 methanol을 처리하는 정도에 따라 dried gel의 크기를 임의로 조절할 수 있음 (탈수가 되면 gel의 size는 작아짐).

Dry plate는 시중의 아크릴상점에서 크기에 맞추어 주문이 가능하며, 셀로판지는 화방에서 저렴한 가격으로 쉽게 구할 수 있음. 클램프는 문구점에서 구입가능.



Western blotting

1. Antibody & Antigen Reaction

- Affinity & titer & epitope
- Specificity & blocking
- Cross-reactivity

2. Critical points to obtain best results

- Best antibody
- Best qualified antigen
- Chemical purity
- Detection methods
- Transfer method
- Blocking and antibody titer

3. Reagents

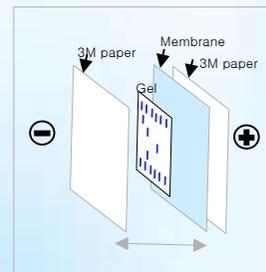
1x Transfer buffer	3.03g/L Trizma-base, 14.4g/L Glycine, 20% MeOH (200 ml/L) → MeOH없이 10x buffer로 만들어 보관
10x TBS (Tris-Buffered Saline)	0.2M Tris pH 8 (24.2g Trizma base), 1.37M NaCl (80g NaCl), Adjust pH7.6 by conc. HCl
TBST	1x TBS, 0.1% Tween 20
Blocking Solution	1-5% Nonfat milk in 1x TBST or 1-5% BSA in 1x TBST

실패 없는 Western 실험명

1. 일차항체는 최소 titer가 1:1,000 이상인 것만을 구매
2. 카탈로그에 반드시 Western blot data가 있는 제품만을 구매
3. 이차항체는 양이 많고 가격이 저렴한 제품을 구매하되 검증된 것을 구매
4. 항체는 반드시 분주하여 사용할 만큼만 보관
5. 새로 구매한 항체는 반드시 titer 예비실험을 수행
6. Wash는 충분히 그리고 자주 반복해 줌
7. 전기영동은 단백질 권장량과 권장부피를 준수
8. Transfer 시간과 전압은 사용 kit에 맞게 예비실험을 통해 표준화
9. 나만의 Trouble shooting 매뉴얼을 제작
10. Data에는 반드시 일자와 자세한 실험조건을 기록하여 발생할 문제에 대비

4. Western Transfer

1. PVDF 또는 Nitrocellulose membrane을 gel 크기에 맞게 자른 후 100% methanol에 1-5 분간 담가둔다.
 - Mini-gel 전기영동 장치를 사용하는 경우 membrane을 6x8cm로 미리 잘라 놓고 보관하는 것이 편리하다.
 - Methanol을 처리하는 것을 membrane activation이라 하며 gel내의 단백질이 membrane과 hydrophobic interaction을 할 수 있게 만들어 주는 과정이다. Nitrocellulose를 사용할 경우에는 이 과정이 필요없다.
2. Methanol 처리를 한 membrane을 1x transfer buffer로 옮겨준 후 10분간 방치한다.
 - 이후 membrane에서 절대 물기를 말려서는 안 된다.
3. Transfer할 gel을 1x transfer buffer로 살짝 적셔주고 membrane위에 기포가 생기지 않도록 주의하며 올려 놓는다.
4. Gel과 membrane을 밀착 시킨 후 양면에 1x transfer buffer로 미리 적셔준 3M paper 또는 두꺼운 도화지를 대고 transfer 키트에 장착한다.
 - 3M paper는 상당히 고가로 도화지를 사용해도 무방하다 (단 coating된 도화지는 사용불가).
 - 반드시 음극과 양극을 확인 (음극 → 빨간색).
5. Mini-gel transfer kit인 경우, 100V에서 1시간 transfer한다. 이때 발생하는 열을 막아주기 위하여 transfer tank를 얼음 속에 놓아두어야 한다.
 - Bio-Rad kit인 경우 ice tray를 사용하는 것이 편리하다.
 - Transfer 시간은 단백질의 크기와 gel%, 그리고 transfer kit의 종류에 의해 영향을 받는다. 단백질의 크기가 클 수록, gel%가 높을 수록 효율은 떨어진다. Laemmli's gel의 경우에는 각 %에 따른 control data를 만들어 표준화 해놓는 것이 중요하다.
 - 단백질의 transfer 정도는 pre-stained marker의 transfer여부로 쉽게 확인이 가능하다.
6. Transfer가 끝난 후 장치를 해제하고 membrane을 분리하여 1x TBST로 살짝 씻어준다.
 - 그런데 membrane을 옮기가 없을 정도로 살짝 말려서 membrane의 후면을 TBST에 띄우면 단백질 band가 보이는데 이로써 transfer가 잘 되었는지를 확인할 수 있다, 이는 단백질이 있는 부위가 없는 부위보다 먼저 수화 (hydration)되기 때문으로 오래 관찰할 수는 없다.
7. Transfer가 제대로 되었는지 확인하기위해 transfer한 gel을 염색하거나 membrane을 Ponceau S로 염색하기도 한다.
 - 개인적으로 나는 이러한 일을 해본 적이 없다. 아무리 큰 단백질이라도 (Laminin A 400kDa) transfer가 문제가 되어 western 결과가 많나온 적은 없기 때문이다.
8. Transfer한 membrane은 즉시 사용하거나 또는 1x TBST에 넣어 4C에서 보관할 수 있으며 (2-3주) 장기 보관을 원하는 경우엔, membrane을 말려 3M paper사이에 넣고 상온보관 하면 된다.



5. Blot Hybridization

1. Membrane을 blocking solution에 담그고 1시간동안 shaker위에 올려 잘 흔들어 준다.
 - 수분증발을 막기 위해 tray의 우경은 반드시 덮아두어야 하며,
 - Blocking reagent의 종류와 농도는 전적으로 경험에 의한 것으로 사용하는 항체들의 affinity와 specificity에 의해 결정된다.
 - BSA를 사용하는 경우에는 non-specificity가 많이 나타나 가급적 우리 lab에서는 BSA의 사용을 자제하고 있으며 1-5% Skim milk를 주로 사용하고 있다.
 - TBST 또는 PBST를 사용해도 무관하지만 phosphate관련 일차항체를 사용하는 경우에는 TBST를 사용해야 한다.
2. 검출하고자 하는 단백질에 대한 1차 항체를 판매회사의 권장 희석비율에 따라 blocking solution에 희석하고 membrane에 1시간 동안 처리한다 (5-15 ml가 적당).
 - 항체를 membrane이 있는 blocking solution에 직접 넣어서는 안 된다 (high background spotting의 원인이 됨)
 - 8x6cm membrane에 가장 적합한 tray는 플라스틱 명함 박스로서 항체의 손실을 최소화할 수 있다.
3. 1x TBST로 15분씩 4회 세척한다.
 - 많은 양의 TBST도 중요하지만 가능한 자주 (예를 들면 10분씩 6번) 세척하는 것이 background를 줄이는데 도움이 된다.
4. 1차 항체를 인지하는 2차 항체를 권장 희석비율에 따라 blocking solution에 희석하고 membrane에 처리한다. 보통 shaking을 하며 1시간이면 충분하다.
5. 1x TBST로 15분씩 4회 세척한다.
 - 전과정에서 shaking이 원활히 되지 않을 경우엔 background가 심해지거나 negative staining이 될 수 있으므로 shaking이 제대로 되고 있는 지 수시로 확인해 볼 필요가 있다. 특히 tray의 좌우측 면에 membrane이 걸쳐 있게 되면 처음부터 실험을 다시 해야 한다.
 - 1차 항체의 affinity와 specificity가 좋다면 1차 항체에 직접 peroxidase나 alkaline phosphatase 등의 효소를 직접 cross-link하여 사용하는 것도 시간적으로 생각해 볼 만하다.
 - 사용했던 blocking solution과 항체는 -20C 에 보관하며 수차례 재사용이 가능하다 (항체 가격이 워낙 비싸서!!!).
 - 0.01% thimerosal을 방부제로 사용하여 4C에 보관할 수 있으며 sodium azide와는 달리 peroxidase-ECL 반응에 영향을 주지 않는다.
 - 처음 사용하는 항체의 적절한 titer를 잡는 일 또한 아주 중요하데 실제로 본 실험을 수행 하기에 앞서 사용하고 있는 항체의 적절한 titer를 산출하는 방법을 소개하고자 한다 (개인적으로 사용하는 방법이나 효과를 많이 보았음)

ECL (enhanced chemiluminescence)는 peroxidase의 기질인 luminol이 peroxidase에 의해 산화되면서 푸른색 빛을 내는 것을 x-ray film상에 감광 시키는 방법으로서 ng수준의 단백질을 검출할 수 있다. ECL용액은 구입하거나 직접 제조하여 사용할 수도 있다.

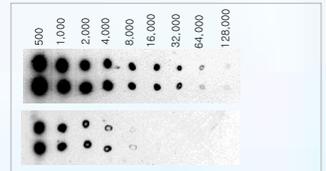
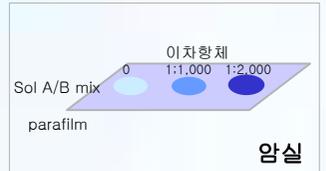
1. Solution A (luminol과 enhancer 포함)와 Solution B (Hydrogen peroxide포함)를 동량으로 섞어준 후 1분간 잘 흔들어 준다.
 - 8x6cm membrane인 경우에 각 1ml 이면 충분하다.
2. TBST 에서 membrane을 꺼내 물기를 적당히 제거해 준 후 혼합한 ECL용액에 담그고 1분간 흔들어주면서 고루 적신다.(반응시간은 ECL의 조성과 종류에 따라 다르므로 주의).
3. Membrane을 꺼내 물기를 적당히 제거한 후 랩으로 싸서 필름카세트에 잘 붙이고 암실에서 현상한다.
 - 랩 대신에 overhead project film 두 장을 겹쳐 사용하면 구겨지지도 않으면서 다루기 편하고 재사용까지 가능하다.
 - 필름에 노출시키는 시간은 signal의 강도에 따라 달라지며 membrane위에서 파란 빛이 눈으로 확인될 정도라면 10-20초가 적당하다. (자세히 보면 대부분의 band가 보인다).
 - 오랜 시간을 노출시켜도 signal을 볼 수 없으면 좀 더 효과적인 ECL제품을 구입해서 사용한다.

"좋은 Signal과 낮은 Background는 전적으로 실험자의 몫이다"

6. Titer Determination (Peroxidase-ECL system에서)

ECL solution의 활성확인 및 이차항체의 titer 결정 (drop method)

1. 2차 항체 (HRP-conjugated)를 PBS에 연속적으로 희석한다 (1/100, 1:200, 1/500, 1/1,000, 1:2,000, 1/5,000, 1/10,000 등등).
2. ECL solution의 SolA 5 µl와 SolB 5 µl를 parafilm 위에 올려놓고 섞어 준다.
3. 희석한 항체를 1 µl씩 SolA와 SolB의 혼합액에 섞어 주고 암실에서 각 농도에서 파란 빛의 밝기를 가능해 본다.
4. 빛이 거의 느껴지지 않는 희석농도를 꼭 기억해 두기 바란다.
 - 사용하고 있는 ECL용액의 불활성 정도를 쉽게 알아 볼 수 있는 방법이다.
5. 앞서 확인한 파란 빛이 약모이기 시작하는 농도를 기준으로 다시 희석한다.
 - 일반적인 2차 항체에서는 1:1,000-5,000 정도의 titer를 가지고 있다.
6. PVDF membrane을 준비하고 (methanol-activated, rinsed with 1x transfer buffer, 물기를 적당히 제거한다, 완전히 말리면 안 된다), membrane위에 희석한 항체 1 µl 씩을 일정한 간격을 두고 loading한다 (loading error를 줄이기 위해 개당 2번씩 반복 loading하는 것이 좋다).
7. Loading한 항체용액이 완전히 마른 것을 확인하였으면 이를 1x transfer buffer로 살짝 씻어주고 미리 준비해 놓은 ECL 혼합용액에 담근다.
8. X-ray film에 1분간 노출시킨 후 현상하여 나타나는 signal의 강도를 살펴본다.
 - Signal의 강도가 saturation되기 시작하는 희석 농도가 2차 항체의 titer로서는 가장 좋다 (본인의 경험임).



1차 항체의 dot blotting을 통한 2차 항체의 titer 결정 (Blot Method)

1. 1차 항체를 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1,000등의 비율로 PBS에 희석한다.
2. 희석한 항체를 위와 같은 요령으로 PVDF 막에 loading해 주고 완전히 말린다.
3. 2차 항체를 위에 기술한 방법대로 결정된 농도로 (결정농도를 기준으로 x1/2, x2 배도 함께 준비) blocking solution (5% skim milk in 1x TBST)에 희석해주고 1차 항체를 blotting한 membrane을 담근 후 30분간 shaker위에서 흔들어 준다.
4. 1x TBST로 2분씩 3회 세척한 후 ECL반응을 시킨다.
 - PVDF membrane은 단백질과 membrane의 hydrophobic interaction에 의해 결합하므로 methanol을 완전히 말린 membrane에는 단백질이 붙지 않는다. 따라서 세척하는 과정을 생략할 수 있다. 그러나 서서히 hydration되며 결과적으로 2차 항체의 background binding이 증가할 수 있는데 이는 membrane이 서서히 투명해 지는 것으로 확인할 수 있다. (성질이 급한 나 같은 사람은 실제 western blotting도 이러한 방법으로 하고 있다).
 - Nitrocellulose membrane을 사용하는 경우에는 반드시 blocking과 washing을 정상적으로 해주어야 한다.
5. Signal의 강도가 1차 항체의 농도에 비례해서 나와야 한다. 본 방법은 washing step을 최소화하여 비교적 시간이 짧으나 실제 western blotting 실험에서 membrane의 non-specific binding에 의한 background를 추정할 수는 없다.
 - 이차항체는 peroxidase를 IgG에 공유결합으로 붙여 놓은 것으로서 drop방법에서 signal이 강했던 반면 일차항체의 blot 방법에서 signal없거나 약했다면 peroxidase와 IgG가 따로 놓고 있다는 증거이다. 이는 제조사의 문제로서 signal이 미약하게는 나올 수 있지만, background가 높아질 수 있기 때문에 교환을 요청하는 것이 좋다.

항원의 dot blotting을 통한 1, 2차 항체의 titer 결정 (Blot Method)

1. 단백질 항원 또는 Western blot으로 검출하고자 하는 단백질 추출물을 일정한 비율에 따라 희석한다 (참고: 1,2차 항체를 사용하는 indirect immunochemiluminescence의 경우 ECL로 검출 가능한 항원의 농도는 1ng수준이다) 정제된 항원 (100 ng, 50 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng) 단백질 추출물 (항원이 있을 것으로 확인되는 total extract 10 µg, 5 µg, 1 µg, 500 ng, 100 ng)
2. 앞서 설명한 방법에 따라 희석한 항원 단백질 또는 단백질 추출물들을 PVDF membrane에 일정한 간격으로 1 µl씩 dot blot한다. 이때 dot blot을 하는 membrane의 크기는 작을수록 좋으며 여러 장을 준비해야 한다.
3. Membrane들이 마르고 있는 동안 1차 항체를 blocking buffer (1-5% skim milk in 1x TBST)에 다음의 비율로 희석한다. (1:100, 1:200, 1:500, 1:1,000, 1:2,000 등)
4. 완전히 마른 membrane들을 하나씩 각각의 희석된 항체 용액에 넣고 30분간 shaking해주면서 반응시킨다.
5. 1x TBST로 2분씩 3회 세척해주고 membrane 들을 모두 모아 2차 항체 용액에 넣어준 후 30분간 shaking해주면서 반응시킨다.
6. 1x TBST로 2분씩 3회 세척해주고 ECL반응을 시킨다.
7. 결과들 중에서 가장 signal이 강하면서 항원의 농도에 따라 signal의 비례적인 증감이 가장 명확히 보이는 1차 항체의 농도가 최적의 농도라 할 수 있다.
 - 이 방법은 실제 본 실험에 앞서 조건을 결정하는데 도움을 줄 수는 있으나 모든 경우에 적용될 수는 없고 결국은 실험자가 시행착오를 거쳐 자기만의 시스템을 세워야 한다.

항체 찾기

명명예 (일차항체): Monoclonal anti-mouse CDK2 IgG1
 면역개체 → mouse 항원단백질 isotype

Anti-mouse CDK2 rabbit antiserum
 항원단백질 면역개체 미정체 유형

"일차항체는 target 항원단백질과 결합하며 이차항체는 일차항체와 결합하므로 연쇄적인 결합반응을 생성하면 일차 및 이차항체의 선별이 쉽다"

명명예 (이차항체): Anti-mouse IgG, peroxidase conjugated, developed in goat
 일차항체 isotype 사용 효소 면역개체

"Mouse IgG를 goat에 항원으로 주사하여 얻은 항체로서 peroxidase 효소를 붙인 이차 항체를 의미함"

응용: WB (western blot), IP (immunoprecipitation), ELISA (immunoassay), IF (immunofluorescence), IHC (immunohistochemistry)

Isotype: Mouse IgG1, G2a, G2b, Rabbit IgG, Goat IgG → isotype을 알면 이차항체를 결정할 수 있음

Species: m (mouse), r (rabbit), h (human), s (sheep), g (goat) → 종간 검출여부를 나타내는 것으로 항체에 m, r, h가 표시되어 있으면 mouse, rabbit, human의 항원단백질을 모두 검출할 수 있음을 의미

"WB는 denaturing조건을 사용하는 점에서 다른 방법들과 다르며, intact한 단백질을 검출하는 IP가 잘 된다면 ELISA, IF, IHC도 잘 될 가능성이 높다"

7. Trouble Shooting

1. Transfer가 잘 되지 않는다.

- Transfer기트의 효율성을 확인해 봐야 한다. 특히 semi-dry방법인 경우 transfer에 문제점이 발생하곤 하는 것을 자주 목격하고 있다.
- 전에는 잘 되던 것에 문제가 있는 경우는 시약을 잘못 만든 경우가 대부분으로서 시약의 성분 및 희석비율을 꼼꼼히 따져본다. 분명 어딘가 잘못된 점이 있다.
- PVDF membrane을 pre-activation시키지 않은 경우이거나 전류의 흐름방향이 맞지 않는 실수를 한 경우 (음극 → 양극).

2. 큰 단백질을 transfer하는 경우.

- Transfer buffer에서 methanol을 빼주면 효율이 증가.
- 낮은 전압을 적용하였거나, buffer의 이상으로 효율이 감소한 경우.

3. 작은 단백질을 transfer하는 경우.

- 0.45µm membrane에서는 transfer시간을 조정하여 작은 단백질들이 membrane을 빠져나가지 않도록 주의해야 한다. 반드시 marker control을 사용해야 함.

4. Film에 non-specific dot이 많이 나온다.

- Blocking agent가 완벽하게 colloid 성상을 띠지 않고 덩어리로 뭉쳐 있는 경우, 또는 blocking agent에 lipid나 salt가 많아 antibody가 고루 퍼지지 않은 경우에 나타날 수 있는 현상이다. 양질의 blocking agent를 사용하는 것이 좋다.
- 장기간 보관한 항체의 경우, blocking solution에 침전이 발생하기 쉬우며 이는 membrane에 들러붙기가 쉽다. 오래되고 침전이 발생한 항체용액은 사용하지 않는 것이 좋다.
- 실험과정 중 membrane이 말라버려 antibody가 비특이적으로 들러 붙은 상태에서도 나타날 수 있다. 실험 중에 membrane은 절대 말려선 안된다.
- ECL처리 전 또는 처리 후 membrane이 과도하게 마르는 경우에도 발생할 수 있다. Membrane의 물기를 제거하지 않는 것이 좋다.
- 랩과 x-ray film사이에 정정기가 발생하여 x-ray film에 감광되는 경우로서 x-ray film을 조심스럽게 랩으로부터 떼어내야 한다.
- 랩이나 x-ray film에 물기가 묻은 경우, 이는 x-ray film에 고스란히 나타날 수 있다. 물기를 잘 닦아주어야 한다.

5. Film전체가 까맣게 나온다.

- Antibody의 titer가 맞질 않거나 blocking이 잘 안된 경우, ECL의 성능이 저하된 경우, x-ray film developer를 잘못 만든 경우에 발생할 수 있다. Antibody의 titer를 다시 설정해야 하고 ECL이나 developer는 별도의 성능테스트를 해보아야 한다 (양부분 참조).

6. Signal은 나오는데 약하다.

- Antibody의 titer가 맞질 않는 경우이거나 또는 단백질의 상태가 좋지 않은 경우, 그리고 antibody의 affinity가 극히 낮은 경우에 발생할 수 있다.

7. Multi signal이 나온다.

- Antibody의 titer가 맞질 않는 경우이거나 blocking agent의 종류 및 농도를 잘못 결정된 경우이다. 항체의 품질과도 관련이 크다.

8. Band의 모양이 이상하게 나온다.

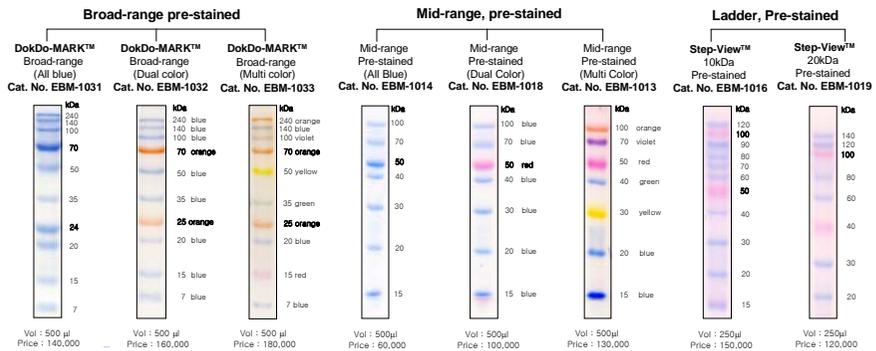
- Band가 smear하거나 위아래로 broad하게 나오는 경우 : 샘플에 문제가 있을 수 있음.
- Band가 겹치거나, 휘거나, 물결 치거나, 풀리는 경우 : 전기영동의 문제로서 샘플의 로딩 양에서부터 전반적인 전기영동 조건을 다시 확인해야 함 (Band 이쁘게 만드는 방법은 case별로 정리하여 이후 News letter에 게재할 계획임).

Protein Research Products

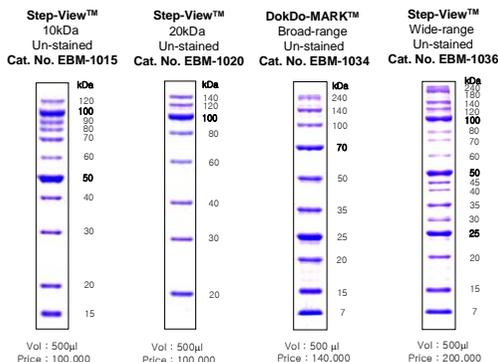
NEW! Color+ Pre-stained Cat. No. EBM-1035



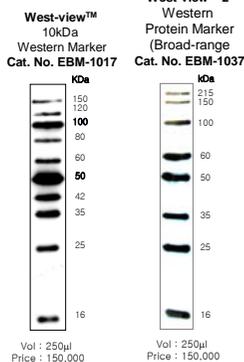
Pre-stained Protein Markers For Easy and Clear Band Identification



Un-stained Protein Markers For Exact & Sharp Band Identification



Western Markers On X-ray Film



1. Elpis-Biotech의 Protein Marker가 좋은 이유:

- 첫째, 선명한 색상
- 둘째, 99%의 정제 단백질 사용
- 셋째, 정확한 크기

2. Elpis-Biotech의 Protein Marker가 정확한 이유:

- 첫째, 아미노산 서열에 근거한 정확한 크기선택
- 둘째, Modification 없는 재조합 발현단백질
- 셋째, Linear migration

Protein Research Products

Protein Markers

Products	Qty (application)	Cat. No.	Price (W)
Color plus Pre-stained Marker NEW!	500 µl (100 applications)	EBM-1035	160,000
Step-view™ 10kD Pre-stained Marker	250 µl (50 applications)	EBM-1016	150,000
Step-view™ 10kD Un-stained Marker	500 µl (100 applications)	EBM-1015	100,000
Step-view™ 20kD Pre-stained Marker	250 µl (50 applications)	EBM-1019	120,000
Step-view™ 20kD Un-stained Marker	500 µl (100 applications)	EBM-1020	100,000
Mid-range (Dual color) Pre-stained Marker	500 µl (100 applications)	EBM-1018	100,000
Mid-range (Blue color) Pre-stained Marker	500 µl (100 applications)	EBM-1014	60,000
Mid-range (Multi color) Pre-stained Marker	500 µl (100 applications)	EBM-1013	130,000
Step-view™ Wide-range (Un-stained) Marker	500 µl (100 applications)	EBM-1036	200,000
Broad-range (All blue) Pre-stained Marker	500 µl (100 applications)	EBM-1031	140,000
Broad-range (Dual color) Pre-stained Marker	500 µl (100 applications)	EBM-1032	160,000
Broad-range (Multi color) Pre-stained Marker	500 µl (100 applications)	EBM-1033	180,000
Broad-range (Un-stained) Marker	500 µl (100 applications)	EBM-1034	140,000
West-view™ Western Marker	250 µl (50 - 500 applications)	EBM-1017	150,000
West-view™ 2 Western Marker (Broad-range)	250 µl (50 - 500 applications)	EBM-1037	150,000

Protein Gel Electrophoresis

Products	Qty (application)	Cat. No.	Price (W)
Gradi-Gel™ I High-size PAGE Analysis Kit	1 Kit (25 mini-gels)	EBA-1055	150,000
Gradi-Gel™ II Gradient PAGE Analysis Kit	1 Kit (25 mini-gels)	EBA-1056	150,000
Pepti-Gel™ Peptide PAGE Analysis Kit	1 Kit (25 mini-gels)	EBA-1053	100,000
Acrylamide/Bisacrylamide Stock Solutions			
30% (29:1) Stock	500 ml	EBA-1002	64,000
30% (19:1) Stock	500 ml	EBA-1006	64,000
30% (37.5:1) Stock	500 ml	EBA-1004	64,000
40% (29:1) Stock	500 ml	EBA-1010	80,000

Protein Gel Electrophoresis Buffers

Products	Qty (application)	Cat. No.	Price (W)
Tris-Glycine-SDS Running Buffer	1 L (10x)	EBA-1041	40,000
Tris-Glycine Running Buffer	1 L (10x)	EBA-1042	40,000
Tris-Tricine-SDS Running Buffer	1 L (10x)	EBA-1043	100,000
1 M Tris-HCl (pH6.8)	500 ml	EBA-1044	20,000
1.5 M Tris-HCl (pH8.3)	500 ml	EBA-1045	20,000
10% SDS	100 ml	EBA-1046	40,000
TBE (10x)	1 L (10x)	EBA-1047	30,000
TAE (20x)	1 L (20x)	EBA-1048	30,000
Protein Extraction Solution (RIPA)	100 ml	EBA-1049	40,000
Sample Buffer (Laemmli's 2x)	50 ml	EBA-1051	40,000

Protein Stains

Products	Qty (application)	Cat. No.	Price (W)
Silver Stain kit (low background)	1 Kit (25 applications)	EBP-1051	50,000
Rapid Silver Stain kit	1 Kit (25 applications)	EBP-1052	50,000
Reversible Membrane Staining Solution	1 L (50 applications)	EBP-1022	40,000
Brilliant Blue R 250 Protein Staining Solution	1 L (50 applications)	EBP-1011	40,000
Destain free G 250 Protein Staining Solution	1 L (50 applications)	EBP-1021	80,000

Western Detection Reagents

Products	Qty (application)	Cat. No.	Price (W)
EPD Western Reagent	1 Kit (Sol A 100ml, Sol B 100ml)	EBP-1071	80,000
PicoEPD Western Reagent	1 Kit (Sol A 100ml, Sol B 100ml)	EBP-1073	100,000

ELPIS-Biotech. Inc.
www.elpisbio.com

보다 자세한 자료를 원하시면 www.elpisbio.com 을 방문하시거나 이메일 sales@elpisbio.com 또는 전화 042-581-8448로 문의를 주시면 성심껏 답변을 드리겠습니다