

WSE-7120 EzWestLumi plus 사용설명서

1. 본 제품을 안전하게 이용하기 위한 주의사항

본 제품을 안전하게 사용하기 위해 우선 본 설명서를 잘 읽어 봐 주세요. 본 취급 설명서의 내용을 충분히 이해하기 까지 조작은 피해 주세요. 또한 본 취급설명서는 본 제품을 지정 목적에 사용하는 방법만을 기재하고 있습니다. 본 사용설명서에 기재되어 있지 않는 목적, 사용으로는 이용하지 말아 주십시오. 만일, 본 사용설명서에 기재되어 있지 않은 목적, 방법으로 사용하신 경우, 필요한 안전대책 및 예측 불허한 사태에 대해서는 모두 조작하시는 분의 책임이 됩니다. 또한, 동시에 사용하는 장치의 설명서도 잘 읽고 숙지 후 사용해 주십시오.

2. 사용목적

본 제품은 Western Blotting 분석에 있어, HRP 표지항체로 검출할 때에 이용하는 luminol계 발광기질입니다.

3. 본 제품의 구성

명칭	용량	개수
Reagent A 발광시약 A Luminol/Enhancer solution	50or250mL	1개
Reagent B 발광시약 B Peroxide solution	50or250mL	1개

4. 조성

명칭	주성분
Reagent A 발광시약 A Luminol/Enhancer solution	Luminol, Enhancer, 완충액
Reagent B 발광시약 B Peroxide solution	과산화수소, 안정제, 완충액

본 제품은 PRTR법, 독극물단속법, 노동안전위생법의 제외 규정량을 초과하는 통지대상물은 포함하고 있지 않습니다.

5. 보존방법

- EzWestLumi plus는 차광, 냉장(2-8℃)보존입니다. 미개봉 상태라면 사용기한내에는 안정합니다.
- EzWestLumi plus의 ReagentA와 ReagentB 를 혼합한 working용액은 차광, 냉장보존 가능합니다. 점점 활성이 떨어지므로 빠른 시일내에 사용하여 주시기 바랍니다.

6. 폐기방법

- 각 시약의 폐기는 소속기관의 폐기방법에 준거하여 처리하여 주시기 바랍니다.

7. 본 제품 이외에 필요한 것

- 전기영동용 gel (ePage등)
- Blotting Membrane (AE-6667 PVDF, NC Membrane등)

- Filter paper
- 전기영동용시약(AE-1430 EzApply, AE-1410 EzRun 등)
- Western Blotting 용 시약(AE-1465 EzFastBlot, AE- 1480 EzWash등)
- 목적 단백질에 대한 1차Antibody와 HRP 표지 2차Antibody
- 전기영동장치(AE-6531 PageRun 등)
- Semi dry blotting 장치(WSE-4020 Horize BLOT 2M-R등)
- seesaw shaker
- tweezers
- Chemiluminescence Imaging system (Ez-Capture, Luminograph series 등)

8. 사용상의 주의

- * 본 제품은 차광, 냉장보존하여 주시기 바랍니다. 실온에 장시간 방치하면 열화하는 원인이 되므로 주의 바랍니다.
- * 본 제품은 Reagent A 와 Reagent B를 1:1의 등량으로 혼합하여 사용하여 주시기 바랍니다. Bottle로부터 시약을 채취할 때에는 Reagent A와 Reagent B가 섞이지 않도록 충분한 주의를 부탁드립니다.
- * Antibody의 희석률은 Antibody Maker의 추천농도, 혹은 1차 Antibody를 1/1,000~1/10,000, 2차 Antibody를 1/50,000~1/200,000으로 사용하여 주십시오.

9. 사용방법

1. EzWestLumi plus를 사용직전에 냉장고로부터 꺼냅니다. Mini gel size(85mm X 90mm)의 Blotting membrane 1매 당의 발광시약 A와 발광시약 B의 필요량은 각각 2.5mL씩 입니다. ※발광시약 A와 발광시약 B의 필요량은 각각 30~100 μ l/cm²입니다.
2. Western Blotting 반응후의 Blotting membrane을 EzWash(AE-1480)등의 세정 buffer에서 충분히 씻어줍니다. ※세정이 충분하지 않은 경우에는 background가 높게 되는 경우가 있습니다.
3. 발광시약 A와 발광시약 B를 1:1의 등량으로 혼합하여 EzWestLumi plus 의 working용액을 조제합니다. Mini gel size의 blotting membrane의 경우, 2.5mL의 발광시약A와 2.5mL의 발광시약 B를 혼합합니다.
4. 청결한 tray 에 필요량의 EzWestLumi plus의 working용액을 넣습니다.
5. 세정후의 Blotting membrane을 위에서 말한 EzWestLumi plus working 용액에 수초간 담급니다. Blotting membrane 전체에 EzWestLumi plus working용액이 골고루 미친 것을 확인해 주십시오.
6. Blotting membrane을 투명한 필름 혹은 랩에 공기가 들어가지 않도록 끼웁니다. ※blotting membrane과 필름 사이에 공기가 들어가면, (랩의 경우는 membrane 표면쪽에 주름이 생기면), 기포나 주름이 background나 얼룩이 될 원인이 되므로 주의 하여 주십시오.
7. EzWestLumi plus의 working용액과 반응후의 Blotting

membrane을 chemiluminescence장치에서 촬영합니다.

※촬영시간은 sample의 농도와 Antibody의 희석을 등에 따라 달라집니다. 각 실험마다 검토하여 주십시오.

10. 참고자료

Blotting은 같은 Protocol이라도 사소한 기술의 변동에 큰 결과 차이가 발생할 수 있습니다. 참고 사항이 필요하시면 저희 회사 042)822-1117로 문의 주시면 성심껏 도와 드리겠습니다.

11. Trouble shooting

원인	해결책
Trouble ① Band가 보이지 않아요	
Blotting이 빠르게 행해 지지 않았습니다	고분자량의 단백질을 blotting할 경우에는 blotting시간의 연장 및 영동 gel의 acrylamide 농도의 저하에 의해 개선됩니다. 저분자량의 단백질을 blotting할 경우, blotting시약에 첨가하는 메탄올의 양을 1.5~2배정도로 증가하면 개선됩니다.
검출계가 바르지 않습니다	EzWestLumi plus는 HRP의 발광기질입니다. HRP이외의 표지항체를 이용한 경우에는 검출되지 않으므로 주의하여 주십시오.
Apply하는 sample양이 적습니다	Sample 중 target 단백질의 함유량이 검출한계 이하의 경우 바르게 조작되었다 하더라도 검출되지 않습니다. Apply하는 sample 양을 검토하여 주십시오.
항체의 힘 값이 낮다/ 실패하고 있습니다.	항체가 target단백질과 반응하는 것을 dot blot법 등에서 확인하여 주십시오. 항체의 적절한 희석율도 함께 검토하여 주시기 바랍니다.
Blocking반응이 너무 강합니다.	장시간의 blocking나 blocking시약의 농도가 높으면 over blocking의 원인이 되어 검출감도가 저하합니다. blocking시약의 종류나 blocking시간의 검토를 행해 주십시오.
항체의 농도가 너무 낮습니다.	항체의 힘값이 낮은 경우에는 너무 많이 희석함에 의해 검출이 되지 않는 경우가 있습니다. 항체의 희석률 및 희석액의 검토를 부탁드립니다.
Trouble ② band가 흐르고 있습니다.	
sample양이 많습니다.	과잉량의 단백질이 혼재하면 전기영동 패턴이 일그러진다든지, blotting시에 band가 흘러버릴 원인이 됩니다. 1 lane 마다 apply할 단백질의 양은 5 μ g이하를 기준으로 하십시오
Gel과 membrane의 밀착이 불충분합니다.	Filter paper, gel, membrane을 겹친 후, 장갑을 낀 손으로 위에서부터 눌러 충분히 blotting용액과 기포를 제거합니다. Gel과 membrane사이에 blotting용액이 많이 존재하면 용액중에 단백질이 확산하여 밴드가 흘러가는 원인이 됩니다.

	다.
Trouble ③ 비특이적인 band가 검출됩니다.	
세정이 불충분합니다.	세정용액의 세정의 강도는 계면활성제농도, 염농도와 pH에 의존합니다. 비특이적인 band가 많은 경우에는 계면활성제농도와 염농도를 검토하여 주시기 바랍니다.
목적 단백질의 분해 혹은 중합체입니다	Sample 처리액(EzApply등)에 포함되어 있는 환원제(DTT등)이 실패하는 가능성을 생각해 볼 수 있습니다. 불안정한 환원 sample은 중합체를 형성하고, 비특이적인 band로서 검출될 경우가 있습니다. 또한, 단백질 sample 조제시에 분해가 생긴 경우, 분해산물이 검출되었을 가능성이 있습니다. Sample의 재조정을 검토하여 주십시오.
항체의 비특이적인 반응입니다.	항체의 epitope이 다른 단백질에 비특이적으로 반응할 경우가 있습니다. 항체의 희석률이나 blocking조건의 검토를 행하여도 개선되지 않는 경우, 다른 항체로 변경하시는 것을 추천합니다.
Trouble ④ background가 높습니다.	
Blocking이 불충분합니다.	blocking반응이 불충분한 경우, background가 높아지는 원인이 됩니다. 적절한 blocking제의 선택, 계면활성제나 염농도의 검토, blocking의 반응시간 등을 검토하여 주시기 바랍니다.
세정이 불충분합니다.	Background를 저감하기 위해서는 세정조작전의 [rinse] step이 중요합니다. 세정직전의 반응에서 사용한 반응액을 용기로부터 완전히 제거하여 주십시오. 똑같이 세정액의 교환시에는 전 step의 세정액이 남아 있지 않도록 주의 바랍니다. 세정조작을 확실히 하여 주십시오.
항체농도가 높습니다.	항체의 힘값이 높을 경우, 충분히 세정조작을 하여도 미량의 항체가 남아 있어, background의 원인이 될 수 있습니다. 사전에 사용하시는 항체의 적절한 항체농도를 검토해 주십시오.
Trouble ⑤ background에 모양이 있습니다.	
용액량이 적습니다.	blocking용액, 항체용액, 세정용액 등의 용액량이 불충분한 경우, background의 상승이나 반응 얼룩이 될 원인이 됩니다. 사용하시는 용액량을 충분히 준비해 주십시오.
흔드는 속도가 부적절합니다.	흔드는 속도가 부적절한 경우, 용액중에 삼각파가 발생합니다. 삼각파의 직하는 액교환이 불충분하게 되어 반응 얼룩의 원인이 됩니다. 삼각파가 발생하지 않도록 흔드는 속도를 검토해 주십시오.