

EzSubcell Extract 사용설명서

1. 사용 전 주의사항

본 제품을 안전하게 사용해 주시기 위해서, 우선 본 사용 설명서를 잘 읽어 주십시오. 본 사용 설명서의 내용이 충분히 이해될 때까지, 사용은 삼가 해 주십시오. 또한 본 사용 설명서에서 설명하는 사용법 외 설명서에 기재되지 않고 있는 목적·방법에서의 사용은 삼가 해 주십시오. 만일, 본 사용 설명서에 기재되지 않고 있는 목적, 방법으로 사용의 경우, 필요한 안전대책 및 불측의 사태는 모두 조작하시는 분의 책임이 됩니다. 또한, 동시에 사용하는 장치의 사용 설명서도 숙지 해 주십시오.

2. 사용목적

본 제품은 동물배양 세포로부터 세포질·막·핵 등을 추출하는 kit입니다. 동결 보존된 세포로부터도 각 세포 소기관을 분리·추출할 수 있습니다. 각 세포 소기관 분획의 추출액은 전기영동이나 면역침강, ELISA, 효소활성 실험 등의 생화학적, 면역학적 해석에 사용할 수 있습니다.

3. 제품의 구성

명칭	용량	갯수	보관
<i>Extraction buffer 1</i>	50 mL	1 개	2~8℃
<i>Extraction buffer 2</i>	50 mL	1 개	2~8℃
<i>Extraction buffer 3</i>	25 mL	1 개	2~8℃
<i>Extraction buffer 4</i>	25 mL	1 개	실온
<i>Protease Inhibitor</i>	1.25mL	1 개	-20℃
<i>DNase I</i>	250μL	1 개	-20℃

명칭	주성분
<i>Extraction buffer 1</i>	계면활성제, 완충액
<i>Extraction buffer 2</i>	계면활성제, 완충액
<i>Extraction buffer 3</i>	계면활성제, 완충액
<i>Extraction buffer 4</i>	계면활성제, 완충액
<i>Protease Inhibitor</i>	100×농도, Aprotinin, PepstatinA, Leupeptin, DMSO
<i>DNase I</i>	10kU/mL Deoxyribonuclease I

4. 조성

본 제품은 PRTR법, 노동 안전위생법의 제외 규정을 넘는 통지 대상물은 포함되고 있지 않습니다.

5. 보존방법

- *Extraction buffer 1~3* (추출용액) 냉장보관 (2~8℃). 미개봉 상태라면 사용 기한 내는 안정합니다.
- *Extraction buffer 4*는 실온보존(20~30℃)입니다. 기온이 낮은 상태로 보존하면 성분이 석출할 경우가 있습니다만, 품질에는 문제 없습니다. 30도 전후의 따뜻한 물에서 완전히 용해하고 나서 사용해 주십시오. 미개봉 상태라면 사용 기한 내는 안정합니다.
- *Protease Inhibitor* (단백질 분해 효소조해제) 와 *DNase I* (Deoxyribonuclease: DNA 분해효소) 는 냉동(-20℃) 보존입니다. 미개봉 상태라면 사용 기한 내는 안정합니다.

6. 폐기방법

- 각 시약의 폐기는, 소속 기관의 폐기 방법에 준거하고, 실시해 주십시오.

7. 본 제품 이외에 필요 물품

- Cooled PBS buffer
- Microcentrifuge tube
- vortexer
- See-saw shaker 또는 Rotator
- 냉장 원심분리기

8. 사용상의 주의사항

- 본 제품은 냉장 수송으로 전해 드립니다. 받으신 후, 즉시 개봉하고, 각각의 시약에 적합한 온도로 보존해 주십시오.
- 실험 시작 전에 *Extraction buffer 4* 이외의 시약들은 ice에 보관해 주십시오. 또한 실험 조작은 ice 또는 저온 상태로 해 주십시오.
- *Protease Inhibitor*는 DMSO를 함유하고 있기 때문에, 저온 아래에서 동결할 경우가 있습니다. 이땐 실온에서 완전히 녹인 후 사용해 주십시오.
- *Protease Inhibitor*는 필요에 따라, 첨가량의 증감, 혹은 AEBSF나 Bestatin등의 inhibitor를 추가해 주십시오.
- 동결 보존 세포를 사용할 경우는, 세포를 동결하기 전에 반드시 PBS에서 세정하고, 원심에 의해 PBS를 제거한 세포를 -80℃로 보존해 둔다. (9. 사용 방법의 II. Sample의 준비 참조)

9. 사용방법

I. Extraction buffer의 준비

1. 아래 표를 따르고, 필요한 **Protease Inhibitor** 혹은 **DNase I** 을 혼합합니다. 혼합 후의 **Extraction buffer 1~3** 의 용액은 사용 시 까지 ice에 둡니다. **Extraction buffer 4** 는 저온에 두면 석출되기 때문에, 실온에 둡니다.

	1 샘플 당 필요량	Protease Inhibitor (파랑뚜껑)	DNase I (투명뚜껑)
Extraction buffer 1	1 mL	10 μ L	-
Extraction buffer 2	1 mL	10 μ L	-
Extraction buffer 3	0.5 mL	5 μ L	5 μ L
Extraction buffer 4	0.5 mL	-	-

II. Sample의 준비

1. Trypsin 처리 등에 의해 회수한 세포현탁액을 준비합니다.
※Hela의 경우 10 cm Dish 1 장 당의 세포 수는 5~12 \times 10⁶입니다. 세포 수가 5~20 \times 10⁶개의 범위가 되게 준비해 주십시오.
2. 세포 현탁액을 200 \times g로 3~5분간 원심 분리합니다.
3. 원심 분리하여 나온 supernatant를 조심스레 버리고, 세포 (pellet)에 차가운 PBS를 10 mL 첨가해 재 현탁합니다. 세포 현탁액을 일부 채취하여 세포수를 카운트합니다.
4. 세포현탁액을 200 \times g로 3~5분간 원심 분리합니다.
5. 원심 분리하여 나온 supernatant를 조심스레 버리고, 세포 (pellet)에 세포수가 5~20 \times 10⁶/mL이 되도록 차가운 PBS를 첨가합니다.
6. 세포 현탁액을 1 mL 채취하여 microcentrifuge tube에 옮깁니다.
7. 세포 현탁액을 200 \times g로 3~5분간 원심 분리합니다.
8. 원심 분리하여 나온 supernatant를 버리면 sample의 준비는 완료입니다. 다음 실험을 시작할 때까지 ice에서 보관해 주십시오.
※ Sample이 준비된 후에는 될 수 있는 한 빨리 Cell Fraction · Extraction 실험을 해 주십시오.
※ 8. 에서 원심 분리하여 나온 pellet(세포)를 사용 시 까지 -80 $^{\circ}$ C로 보존해 주십시오. 동결 세포를 사용할 때는, III. Cell Fraction · Extraction 실험 대로 해 주십시오.

III. Cell Fraction · Extraction 실험

1. 세포(pellet)을 tapping에 의해 가볍게 풀고, 차갑게 둔 1 mL의 **Extraction buffer 1** 을 첨가합니다.
2. Vortex mixer 로 5초간 혼합합니다.
※ 세포 덩어리가 보이지 않을 때까지, 잘 현탁해 주십시오.
3. See-Saw shaker 또는 Rotator 를 이용하여, 4 $^{\circ}$ C로 10분간 incubation 합니다.
※ See-Saw shaker 나 Rotator가 없을 경우에는 ice에 두고, 1~2분 마다 2, 3회 정도 inverting 해 주십시오.
4. 세포 용해 액을 700 \times g로 5분간(4 $^{\circ}$ C) 원심 분리 합니다.
5. 원심 분리하여 나온 supernatant를 조심스레 새로운 microcentrifuge tube에 회수 합니다. (주로 Cytoplasm 단백질을 포함하는 Fraction 입니다) 잔여 supernatant 는 paper towel 등으로 흡수시켜 제거 시키고, 다음 처리 용액에 혼합되지 않도록 합니다. 회수 액은 ice 상에 보관 합니다.
【옵션】
 단백질의 purity를 높이기 위해서는 pellet을 세정해 줍니다. Pellet에 1mL 의 PBS를 첨가하고, vortex 또는 pipetting에 의해 혼합하여, 700 \times g로 1분간 원심 분리 해 pellet를 세정합니다.
6. Pellet에 차갑게 둔 1 mL의 **Extraction buffer 2** 를 첨가합니다.
7. Vortex Mixer로 5초간 혼합합니다.
※ Pellet 덩어리가 보이지 않을 때까지, 잘 현탁해 주십시오.
8. See-Saw shaker 또는 Rotator를 이용하여, 4 $^{\circ}$ C로 30분간 incubation 합니다.
※ See-Saw shaker 나 Rotator가 없는 경우에는 ice에 두고, 5~10분간 마다 2, 3회 정도 inverting 시켜 주십시오.
9. 세포 용해 액을 4,000 \times g로 5분간(4 $^{\circ}$ C) 원심 분리합니다.
10. 원심 분리하여 나온 supernatant를 조심스럽게 새로운 microcentrifuge tube에 회수합니다. (주로 membrane 단백질을 포함하는 Fraction 입니다) 잔여 supernatant는 paper towel 등으로 흡수시켜 제거 시키고, 다음 처리 용액에 혼합되지 않도록 합니다. 회수 액은 ice 상에 보관 합니다.
【옵션】
 단백질의 purity를 높이기 위해서 pellet을 세정합니다. Pellet에 차가운 1mL 의 PBS를 첨가하고, vortex 또는 pipetting에 의해 혼합하여, 4,000 \times g로 1분간 원심 분리 하여 pellet을 세정합니다.
11. Pellet을 tapping에 의해 가볍게 풀고, 차갑게 둔 0.5mL 의 **Extraction buffer 3** 를 첨가합니다.
12. Pipetting하여 pellet을 잘 현탁합니다.

※ 점성이 생기는 경우가 있을 수 있지만, pellet 덩어리가 없어질 때까지 천천히 현탁하여 주십시오.

13. See-Saw shaker 또는 Rotator를 이용하여, 4℃로 60분간 이상 incubation 합니다.

※ See-Saw shaker나 Rotator가 없는 경우에는 ice에 두고, 10~15분간 마다 2, 3회 정도 inverting 해 주십시오.

※ 점성이 없어질 때까지 incubation 해 주십시오. 점성이 없어지지 않을 경우는, 4℃에서 밤새 incubation, 혹은 **DNase I**의 첨가량 늘리기, 혹은 **Extraction buffer 3**의 양을 늘려 주십시오.

14. 세포 용해 액을 9000×g로 5분간(4℃) 원심 분리합니다.

15. 원심 분리하여 나온 supernatant를 조심스레 새로운 microcentrifuge tube에 회수합니다. (주로 nuclei 단백질을 포함하는 Fraction 입니다. 잔여 supernatant는 paper towel 등으로 흡수시켜 제외 시키고, 다음 처리 용액에 혼합되지 않도록 합니다. 회수 액은 ice 상에 보관합니다.

【옵션】

단백질의 purity를 높이기 위해서 pellet을 세정합니다. Pellet에 차가운 1mL의 PBS를 첨가하고, vortex 또는 pipetting에 의해 혼합하여, 9,000×g로 1분간 원심 분리하여 pellet을 회수 합니다.

16. Pellet에 0.5mL의 **Extraction buffer 4** 를 첨가해서 현탁합니다. 용해 액은 주로 Cytoskeleton 단백질로 이루어진 Insoluble Fraction 입니다.

10. 참고

① SDS-PAGE 용 sample의 준비

1. 각 추출액과 동량의 **EzApply (AE-1430)** 또는 2×SDS sample buffer를 첨가해 잘 혼합합니다.
2. 혼합액을 100℃로 10분간 가열 처리합니다.
3. 14,000×g에서 10분간(4℃) 원심 분리합니다.
4. 원심 분리하여 나온 supernatant를 SDS-PAGE 용 sample로써 사용합니다.

② 단백질의 Acetone 침전 (2D 전기영동 용)

1. 각 추출액에 4 Vol.의 차가운 Acetone(100%) 을 첨가해 혼합합니다.
2. Ice에서 15분간 incubation 합니다.
3. 14,000×g에서 15분간(4℃) 원심 분리합니다.
4. Supernatant를 버리고, pellet에 80% Acetone을 첨가해 현탁합니다.
5. 14,000×g에서 5분간(4℃) 원심 분리합니다.
6. Supernatant를 버리고, pellet을 말립니다.

7. 2D 전기영동 용 sample buffer에 현탁하여 사용합니다.

※ **Extraction buffer 3**과 **4**는 저농도의 음이온성 계면활성제를 함유하고 있기 때문에, 등전점 전기영동을 방해할 가능성이 있습니다. **Extraction buffer 3** 및 **Extraction buffer 4**에 의해 추출한 단백질의 2D 전기영동을 할 때는, 반드시 Acetone 침전 등으로 용매치환을 해 주십시오.

11. ATTO 관련제품

SDS-PAGE 용 Sample Buffer

AE-1430 **EzApply**

2D 전기영동 용 Sample Kit

AE-1435 **EzApply 2D kit**

세포 Lysis Kit

WSE-7420 **EzRIPA Lysis buffer**

세포 소 기관 Fraction Kit

WSE-7422 **EzSubcell Fraction**

SDS 제거 시약

AE-1390 **SDS-eliminant**

전원 일체형 전기영동 장치

WSE-1020 compact PAGE • Twin R
WSE-1100 PAGE -R

※ 실험은 같은 Protocol 상에서도 대수롭지 않은 작은 요령의 차이로 결과가 달라질 수 있습니다. 최적의 결과를 얻기 위해서는 어느 정도 숙련된 노하우가 필요합니다.

Simple Protocol

