

WSE-7160 EzStain AQua MEM Instruction Manual

2020년 8월 3일 제 1판

1. 본 제품을 안전하게 사용하기 위한 주의사항

본 제품을 안전하게 사용하기 위해 우선 본 설명서를 잘 읽어봐 주세요. 본 취급 설명서의 내용을 충분히 이해하기 까지 사용은 피해 주세요. 또한 본 취급설명서는 본 제품을 지정 목적에 사용하는 방법만을 기재하고 있습니다. 본 사용설명서에 기재되어 있지 않은 목적, 사용으로는 이용하지 말아 주십시오. 만일, 본 사용설명서에 기재되어 있지 않은 목적, 방법으로 사용하신 경우, 그에 따른 필요 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 blotting에서 Transfer한 Membrane상의 단백질을 검출하기 위한 염색, 탈색 시약 키트입니다.

3. 본 제품의 구성

명칭	용량	개수
Wash (전처리 용액) 2× concentrated	500 mL	1 bottle
Stain (Staining solution)	500 mL	1 bottle
de-Stain (Destaining solution) 2× concentrated	500 mL	1 bottle
Bleach (Complete destaining solution) 2× concentrated	500 mL	1 bottle

Mini-size gel (90 mm×80 mm)용 Membrane 1매 염색에 필요한 용량은 20~25 mL입니다. (0.2~0.3 mL/cm²)

4. 조성

명칭	주성분
Wash (전처리 용액) 2× concentrated	완충액
Stain (Staining solution)	Coomassie brilliant blue, 산성완충제, 안정화제
de-Stain (Destaining solution) 2× concentrated	완충액
Bleach (Complete destaining solution) 2× concentrated	완충액

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

5. 보존방법

- 직사광선을 피해 실온에서 보관하여 주십시오. 미개봉 상태이며 사용기한 내(제조일로부터 1년)에는 안정적입니다.
- Methanol로 2배 희석한 용액은 냉장보관하고, 가능한 한 빨리 사용하여 주십시오.

6. 폐기방법

EzStain AQua MEM의 “Wash(전처리액)”, “de-Stain(Destaining solution)”은 pH 2.0이하의 산성용액입니다. “Bleach(Complete destaining solution)”은 pH 9.0이상의 염기성 용액입니다. 또한 “Stain(Staining solution)”은 색소를 포함하는 pH 2.0이하의 산성 용액입니다. 각 시약의 폐기는 소속기관의 폐기방법에 준하여 처리하여 주십시오.

- Bottle 재질 본체, 뚜껑: 폴리프로필렌

7. 본 제품 이외에 필요한 것

- Staining용 tray * ● 메스실린더
- 비커 ● Methanol
- Shaker

* Membrane이 Shaking에 따라 움직일 수 있는 크기의 Tray

8. 각 용액의 사용 전 준비

다음 3종류의 용액은 2배 농도의 용액입니다. 사용 전에 Methanol로 2배로 희석하여 주십시오. 표는 Mini-size gel 1장에 필요한 용액량 기준입니다.

명칭	용량	Methanol
Wash (전처리 용액) 2× concentrated	10mL	10mL
de-Stain (Destaining solution) 2× concentrated	20mL	20mL
Bleach (Complete destaining solution) 2× concentrated	10mL	10mL

9. 사용방법

A. Membrane 염색

1. Staining용 tray에 Methanol로 2배 희석한 “Wash”용액 20 mL을 부어줍니다. Tray에 Transfer한 직후의 Membrane을 완전히 담가줍니다.
2. 실온에서 2~5분간 흔들어줍니다.
- * Membrane이 Hydrophilization되어 있지 않으면 얼룩이 생길 수 있습니다. Membrane 전체가 Hydrophilization될 때까지 흔들어줍니다.
3. “Wash”용액을 버리고, “Stain”용액 20 mL을 tray에 부어줍니다. Membrane이 완전히 잠기도록 잘 흔들어줍니다.
- * Membrane이 균일하게 잠기지 않으면 얼룩이 생길 수 있습니다. Membrane 전체가 잠기도록 해주십시오.
4. Membrane이 완전히 잠긴 후, 1분간 흔들어줍니다.
5. “Stain”용액을 제거하고, “de-Stain”용액 20 mL을 부어줍니다.
6. Membrane이 완전히 잠긴 후, 2분간 흔들어줍니다.
7. “de-Stain”용액을 버리고, 새로운 “de-Stain”용액 20 mL을 더 부어주고 2분간 흔들어줍니다.
8. Tray에서 Membrane을 꺼내 검출된 단백질 밴드를 확인합니다.

추가: “Stain”용액에 흔들는 시간이 길어지면 단백질이 더 진하게 염색됩니다.

다. 여러 Membrane을 비교할 경우에는 염색 시간을 통일하십시오.

B. 단백질 밴드의 확인

ATTO "Pitatt Clear" 등의 필름에 Membrane을 넣고, 스캐너 또는 촬영 장비를 이용하여 이미지를 촬영해 결과를 보존합니다. Membrane을 완전히 건조하면 Background와의 차이가 더 분명해져서 더욱 선명한 밴드를 확인할 수 있습니다.

Membrane의 건조는 깨끗한 핸드타올 등으로 표면의 수분을 제거한 후, 건조 열록이 없어질 때까지 5분 정도 바람에 건조시킵니다.

다음에 나오는 "D. Total protein에 의한 Normalization"을 수행할 경우, Membrane을 완전히 건조한 후 이미지를 촬영하여 데이터를 보존해주시십시오.

C. 항체 반응을 위한 단백질 밴드의 탈색

항체 반응을 수행하는 경우에는 단백질 밴드를 완전히 탈색해줍니다.

1. Tray에 "Wash" 용액 20 mL을 부어주고 Membrane을 완전히 담가서 5분간 Washing합니다.

* Membrane이 건조된 경우, 완전히 Hydrophilization될 때까지 흔들어주시십시오.

2. Tray의 "Wash" 용액을 제거하고, "Bleach" 용액 20 mL을 부어줍니다.

3. 2.의 용액에 Membrane을 완전히 담근 후, 5분간 흔들어줍니다.

4. Membrane 상의 단백질 밴드가 탈색됩니다.

* 이 때, Membrane 전체가 연한 청색으로 변할 수 있으나, 항체 반응 및 검출에는 영향이 없습니다.

* Pre-stained marker의 색소는 탈색되지 않습니다.

5. "Bleach" 용액을 제거한 후 증류수로 행구어 줍니다. Blocking 조작부터 시작하여 평소 실험과정대로 항체반응부터 검출까지 실시해 주십시오.

* 바로 실시하지 않는 경우에는 TBS-T (또는 PBS-T)에 담가서 냉장고에 보관합니다.

D. Total protein에 의한 Normalization (응용 예시)

1. CS Analyzer 등의 이미지 분석 소프트웨어를 이용하여 B에서 촬영한 이미지로 Total protein의 Signal값 (Brightness value)을 산출합니다.

2. 항체 반응 후 검출된 Target protein의 Signal값 (Brightness value)을 산출합니다.

3. Total protein의 분석

각 Lane마다 모든 밴드의 Signal값을 산출합니다. 임의의 Lane의 Total protein Signal값을 기준으로 모든 Lane 간의 비율 (Reference 비, Ref. 비)을 산출하여 이것을 각 Lane별 편차의 보정계수로 합니다.

* [Reference 비 (Ref. 비)] =

$$\frac{[\text{각 Lane(X)의 Total protein Signal 값}]}{[\text{임의의 Lane(N)의 Total protein Signal 값}]}$$

4. Target protein의 분석

각 Lane별 Target protein의 Signal값을 산출합니다. (Target protein의 Signal 값)

5. 각 Lane의 Normalization

3에서 산출한 각 Lane별 [Reference 비]를 이용하여 4.에서 산출한 각 Lane별 Target protein의 Signal 값을 나누어 Normalization합니다.

* Lane N의 Normalization=

$$\frac{[\text{Lane N의 Target protein의 Signal 값}]}{[\text{Lane N의 Ref. 비}]}$$

Blotting 후 Membrane상의 Total protein 확인

Step	용액	조작
2. 전처리	"Wash" 용액	2~5분간 Shaking
3. Staining	"Stain" 용액	1분간 Shaking
4. Destaining	"de-Stain" 용액	2분간 Shaking, 2 times

항체 반응을 위한 단백질 밴드의 탈색

Step	용액	조작
2. 전처리	"Wash" 용액	2~5분간 Shaking
3. 완전 탈색	"Bleach" 용액	5분간 Shaking
4. Rinse	증류수	증류수로 행구

10. 참고자료

Blotting은 같은 protocol이라도 미세한 조작의 차이로 결과에 큰 차이가 있을 수 있습니다. 최적의 결과를 얻기 위해서는 요령도 중요합니다. 아토코리아 홈페이지에서 "Western blotting에 관한 Tip"을 확인하실 수 있으므로 읽어보시기 바랍니다.

<https://www.attokorea.co.kr/technical-info/>



アト一株式会社

生化学・分子生物学・遺伝子工学研究機器
開発/生産/販売/サービス

主要製品

- 発光・蛍光イメージングシステム
- 画像解析ソフトウェア
- 電気泳動装置・関連試薬
- ウェスタンブロット試薬
- ペリスタブポンプ
- 細胞培養・観察システム

- 東京本社 〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2 Tel(03)5827-4861 Fax(03)5827-6647
- 大阪支店 〒530-0044 大阪市北区東天満2-8-1 Tel(06)6136-1421 Fax(06)6356-3625
若杉センタービル別館5階
- 技術開発センター 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6 Tel(03)5818-7560 Fax(03)5818-7563
- メンテナンスセンター 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6 Tel(03)5818-7567 Fax(03)5818-7563

■ URL <http://www.atto.co.jp/>