

1. 본 제품을 안전하게 이용하기 위한 주의사항

본 제품을 안전하게 사용하기 위해 우선 본 설명서를 잘 읽어 주십시오. 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 않은 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 전기영동용의 단백질을 SDS 처리와 동시에 형광표식 하는 Kit입니다. 통상의 SDS sample buffer의 대신에 사용하는 것으로, 단백질의 SDS처리와 동시에 아미노기가 형광시약에 의해 표식 됩니다. ($\lambda_{Ex}=330, 470nm$, $\lambda_{Em}=530nm$). 형광시약 자체에는 형광이 없고, 아미노기와와의 결합에 의해 발광하게 됩니다. 그 때문에 미표식의 형광시약을 제외할 필요가 없습니다(column purification 불필요). 표식후의 단백질은 통상의 전기영동법에 의해 분리할 수 있습니다. 또 전기영동후의 젤은 나중 처리가 불필요해서, 곧, UV (312~354 nm) 혹은 청색 LED등 (450~480 nm) 으로 여기하고, 540nm~580nm의 형광을 촬영하고, 관찰할 수 있습니다. (필터는520~560nm LP filter가 적합합니다). 형광색소 (EfBr, SYBR등) 에서 염색한 DNA등의 핵산을 관찰하기 위한 범용적인 젤 촬영장치로 촬영하는 것이 가능합니다. 전기영동 후의 젤 염색이 불필요해서, 관찰 후의 젤은 다른 염색방법 (은염색, CBB염색 등)이나 Western blot 해석 등에도 사용가능합니다.

명칭	주성분
Sample buffer (5x conc.) 샘플 버퍼(5x농도)	계면활성제(SDS), 완충액
RIPA Lysis buffer	계면활성제, 완충액
Reducing agent (DTT) 환원제 (DTT)	DTT, BPB
Labeling reagent labeling 시약	형광시약
MW marker 분자량 마커	단백질, 글리세롤

4. 조성

본 제품은 독극물 단속법의 독물 또는 극물, 노동 안전위생법의 제외 규정량을 넘는 통지 대상물은 포함되고 있지 않습니다. PRTR법 지정 화학물질의 제외 규정량을 넘는 통지 대상물이 일부 포함되어 있습니다. 자세한 내용은 본제품의 MSDS를 요청바랍니다.

5. 보존방법

- 본 제품에 포함되는 시약은 냉동 (-20°C) 보존입니다. 미개봉의 상태라면 사용 기한 내는 안정합니다. 사용기한은 상자겉면 •시약 bottle에 기재하고 있습니다.
- **Labeling reagent** (라벨링 시약)은 에탄올 혹은 acetonitrile에 용해 후 냉동(-20°C)으로 보존해 주십시오. 용해 후는 차광 냉동(-20°C) 보존의 상태로 약6개월간 사용 가능합니다.
- **Reducing agent (DTT)** (환원제 (DTT))는 증류수 용해 후 냉동(-20°C) 으로 보존해 주십시오. 용해 후는 적량에 분주하여 냉동(-20°C) 보존하고, 될 수 있는 한 동결 용해를 피해서 사용해 주십시오.

6. 폐기방법

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

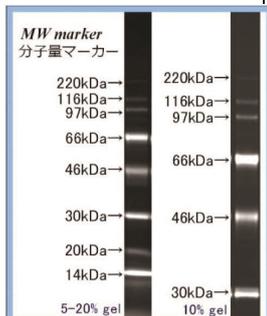
7. 본 제품 이외에 필요한 것

- ब्ल록 인큐베이터 (가온장치)
- 마이크로 원심 튜브

명칭	용량	개수	보존
Sample buffer (5x conc.) 샘플용액 (5x 농도)	12 mL	1 개	-20°C
RIPA Lysis buffer 리파라이시스 버퍼	10 mL	1 개	-20°C
Reducing agent (DTT) 환원제 (DTT)	300 mg	1 개	-20°C
Labeling reagent 라벨링 시약	10 mg	1 개	-20°C
MW marker 분자량 마커	0.6 mL	1 개	-20°C

3. 본제품의 구성

*분자량 Marker는 미표식입니다. 단백질 sample 과 동일하게 처리하여 표식하여 주십시오.



8. 사용상의 주의

- 본 제품은 냉장 수송으로 전해 드립니다. **받으신 후, 즉시 냉동(-20°C)으로 보존해 주십시오.**
- **Labeling reagent** 은 에탄올 혹은 acetonitrile에 용해하고 냉동(-20°C) 으로 보존해 주십시오. 용해 후는 6개월 이내 사용해 주십시오. 노랗게 변색되었을 경우는, 시약이 열화하고 있을 가능성이 높기 때문에 사용은 삼가해 주십시오.
- **Reducing agent (DTT)** 은 증류수에 용해하고(청녹색), 냉동(-20°C) 으로 보존해 주십시오. 용해 후는 적정량 분주하여 냉동(-20°C) 보존하고, 될 수 있는 한 동결 용해를 피해 사용해 주십시오. (5회까지).
- **Labeling reagent** 첨가 후의 Sample buffer는 보존할 수 없습니다. 사용 직전에 실험에 필요한 양만 혼합해 주십시오. 또 혼합후는 되도록 빨리 (30분이내) 사용해 주십시오.
- **Sample buffer**는 5x의 농도입니다. **Sample buffer** 는 실온에서 고착화하고 있어, 완전히 용해할 수 없습니다. 사용전에 37-60°C 가열하여 완전히 용해해 주십시오. 증류수에서 2x의 농도에 희석해서 사용 •보존하는 것도 가능합니다. 2x의 농도에 희석한 **Sample buffer**는 실온에서 용해할 수 있습니다.
- 본 시약은 아미노기에 표식되기 때문에, 아미노기를 포함한 용매를 사용했을 경우, 단백질의 표식이 저해 될 경우가 있습니다. 자세한 내용은 9-VII.를 참조해 주십시오.
- 고농도의 환원제가 존재하는 용매에 단백질이 용해되고 있을 경우, 단백질의 표식이 저해 될 경우가 있습니다. 자세한 내용은 9-VII. 를 참조해 주십시오.

9. 사용방법

9-I . 실험준비

1. **Labeling reagent** 를 550µL의, acetonitrile 혹은 에탄올에 용해합니다. 용해 후는 차광하고, 얼음에 식혀 주십시오. 또 조제후의 용액은 냉동(-20°C) 보존해 주십시오.
2. **Reducing agent (DTT)** 을 2mL의 증류수에 용해합니다. (갈색~청녹색이 됩니다.) 용해 후는 얼음에 식혀 주십시오. 용해가 어려울 경우는 40~60°C 가온해 주십시오. 또 조제 후의 용액은 냉동 (-20°C) 보존해 주십시오.
3. **Sample buffer (5x conc.)** 를 40~60°C로 완전히 용해합니다. 고농도의 SDS가 포함되어 있으므로 실온에서는 용해할 수 없으므로 주의해 주십시오.

※**Sample buffer(5x conc.)**는 전자레인지에서 가열해서 용해할 수도 있습니다. 500W 로 5~10초 정도 가열해 주십시오.

(상태를 체크하면서, 가열을 1~3회 되풀이해 주십시오.) 이때, **뿔뿔 끊이지 않도록** 주의해 주십시오. (500W 이상의 전자레인지 일 경우 3초 단위로 가열하여 용해상태를 체크해주세요)

※**Sample buffer(5x conc.)**는 증류수에서 2x의 농도에 희석해서 사용 • 보존하는 것도 가능합니다. 2x의 농도에 희석한 **Sample buffer**는 실온에서 용해할 수 있습니다.

※비변성조건에서 사용할 경우는, 본 제품의 **Sample buffer (5x conc.)** 대신 아미노기, SDS등의 변성제 및 환원제를 포함하지 않은 샘플 처리액을 사용하여 주십시오.

9-II . 표식반응①

※마스터 믹스를 제작하고 나서 샘플과 반응하는 방법 (표식반응①), 각각의 시약을 직접 샘플과 혼합해서 반응하는 방법 (표식반응②), **Sample buffer** 을 2x농도로 희석해서 나서 사용하는 방법 (표식방법③) 에 관하여 설명합니다.

《마스터 믹스를 사용할 경우》

1. **Sample buffer (5x conc.)** 를 40~60°C (혹은 전자레인지에서 3~5초) 로 완전히 용해합니다.
2. 100 µL의 **Sample buffer (5x conc.)** 와 5 µL의 **Labeling reagent** 을 혼합해서 마스터 믹스를 제작합니다.

※마스터 믹스는 보존 할 수 없습니다. 제작한 마스터 믹스는 바로 사용해 주십시오. 10분 이상 방치할 경우는 차광해 주십시오.

3. 20 µL의 단백질 샘플과 5 µL의 마스터 믹스를 혼합합니다.

※ 분자량 마커도 단백질 샘플과 같이 처리합니다. 표식후의 마커는 -20°C에서 보관 가능합니다.

3. 3.의 혼합액을 95°C에서 3분간 가온합니다.

※표식후 단백질 sample은 황색으로 변화합니다.

※95°C로 10분 이상 반응하면 단백질이 분해될 경우가 있으므로 주의해 주십시오.

※반응 온도는 37°C~95°C로 할 수 있습니다. 37°C로 반응할 경우는 30분 이상, 65°C로 반응할 경우는 5~30분간 반응해 주십시오.

5. 4.의 혼합 액에 **Reducing agent (DTT)**을 1µL 첨가해서 혼합합니다.

※ 환원하지 않을 경우는 이 스텝은 불필요 합니다.

5. 5.의 혼합액을 95°C로 3분간 가온합니다.

※환원하지 않을 경우는 이 스텝은 불필요 합니다.

7. 표식반응은 끝났습니다. 전기영동을 할 때까지 차광하여 보관합니다.

※ 표식 후의 단백질 샘플은 -20°C로 차광 냉동 보존할 수 있습니다. (약1~3개월).

9-III . 표식반응②

《마스터 믹스를 사용하지 않을 경우》

1. **Sample buffer (5x conc.)** 를 40~60°C (혹은 전자레인지에서 3~5초)로 완전히 용해합니다. 이때 펄펄 끓이지 않도록 주의해주시시오.
2. 20 μ L의 단백질 샘플과 5 μ L의 **Sample buffer (5x conc.)** 를 혼합합니다.

※ 분자량 마커도 단백질 샘플과 같이 처리합니다. 표식 후의 마커는 -20°C에서 보관 가능합니다.

3. 2.의 혼합액에 **Labeling reagent** 을 0.25 μ L을 첨가해서 혼합합니다.

※**Labeling reagent**를 acetonitrile 혹은 에탄올로 희석하면 조각이 용이합니다.

《희석방법》

I -1로 제작한 **Labeling reagent** 용액에 5 μ L acetonitrile 혹은 에탄올을 15 μ L 첨가해서 4배 희석합니다. 2.의 혼합액에 희석한 **Labeling reagent** 을 1 μ L 첨가합니다.

※희석한 **Labeling reagent** 은 -20°C로 차광 보존할 수 있습니다

4. 3.의 혼합액을 95°C로 3분간 가온합니다.

※표식 후 단백질 sample은 황색으로 변화합니다.

※95°C로 10분 이상 반응하면 단백질이 분해될 경우가 있으므로 주의해주시시오.

※반응온도는 37°C~95°C로 할 수 있습니다. 37°C로 반응할 경우는 30분 이상, 65°C로 반응할 경우는 5~30분간 반응해 주십시오.

5. 4.의 혼합 액에 **Reducing agent (DTT)**을 1 μ L 첨가해서 혼합합니다.

※환원하지 않을 경우는 이 스텝은 불필요합니다.

6. 5.혼합액을 95°C로 3분간 가온합니다.

※환원하지 않을 경우는 이 스텝은 불필요합니다.

7. 표식반응이 끝났습니다. 전기영동을 할 때까지 차광해서 보관합니다.

※표식 후의 단백질 샘플은 -20°C로 차광 냉동 보존 할 수 있습니다.(약1~3개월).

9-IV . 표식방법③

《2xSample buffer를 사용할 경우》

1. **Sample buffer (5x conc.)** 를 40~60°C (혹은 전자레인지에서 3~5초) 로 완전히 용해합니다.

2. 40 μ L의 **Sample buffer (5x conc.)** 에 60 μ L의 증류수를 더해서 2x농도의 2x **Sample buffer** 를 제작합니다.

3. 100 μ L의 2x **Sample buffer**와 2 μ L의 **Labeling reagent** 를 혼합해서 마스터 믹스를 제작합니다.

※마스터 믹스는 보존할 수 없습니다. 제작한 마스터 믹스는 바로 사용해 주십시오. 10분 이상 방치할 경우는 차광해 주십시오.

※마스터 믹스를 사용하지 않을 경우 20 μ L의 단백질 샘플과 20 μ L의 2x **Sample buffer**을 혼합하고, 거기에 **Labeling reagent**을 0.4 μ L 첨가해서 혼합합니다.

3. 20 μ L의 단백질 샘플과 20 μ L의 마스터 믹스를 혼합합니다.

※ 분자량 마커도 단백질 샘플과 같이 처리합니다. 표식 후의 마커는 -20°C에서 보관 가능합니다.

4. 3.의 혼합액을 95°C로 3분간 가온합니다.

※표식 후 단백질 sample은 황색으로 변화합니다.

※95°C로 10분 이상 반응하면 단백질이 분해될 경우가 있으므로 주의해 주십시오.

※반응온도는 37°C~95°C로 할 수 있습니다. 37°C로 반응할 경우는 30분 이상, 65°C로 반응할 경우는 5~30분간 반응해 주십시오.

5. **Reducing agent (DTT)**을 1 μ L 첨가해서 혼합합니다.

※환원하지 않을 경우는 이 스텝은 불필요합니다.

6. 5.의혼합액을 95°C로 3분간 가온합니다.

※ 환원하지 않을 경우는 이 스텝은 불필요합니다.

7. 표식반응이 끝났습니다. 전기영동을 할 때까지 차광해서 보관합니다.

※표식 후의 단백질 샘플은 -20°C로 차광 냉동 보존할 수 있습니다.(약1~3개월).

9-V . 전기영동 젤의 촬영

1. 형광표식 후의 단백질 샘플을 전기영동에 의해 분리합니다.

※일반적인 전기영동장치 및 방법으로 분리할 수 있습니다. 2~3시간 이내로 영동이 종료될 경우 차광할 필요는 없습니다. 장시간이 될 경우는 형광등 등의 빛의 영향을 받아서 퇴광할 경우가 있습니다.

2. 전기영동 후의 젤을 젤 플레이트에서 꺼내, 증류수가 가볍게 행굽니다.

※청색LED로 촬영할 경우는, 젤 플레이트를 뺄 필요는 없습니다. 젤 플레이트마다 물로 가볍게 행구고, 영동 버퍼(buffer)를 세정한 후에, 페이퍼 타올(paper towel)등으로 플레이트를 깨끗이 닦아 주십시오.

2. 젤 촬영 장치에 젤을 설치하고 아래 조건으로 촬영합니다.

《촬영조건》

UV여기: 312nm/365nm 필터: 520~560LP

청색LED여기: 440~500nm 필터: 520~560LP

※고정액으로 고정하고 나서 촬영할 수도 있습니다. 고정 후에도 형광은 없어지지 않습니다.

9-VI . 옵션

《형광표식 하지 않을 경우》

- Sample buffer(5x conc.)에 Labeling reagent를 첨가하지 않고, 9-I ~IV에 기재된 방법으로 사용하여 주십시오.

《세포 · 조직 용해 방법》

※본 제품 첨부 **RIPA Lysis buffer**는 아미노기가 포함되어 있지 않습니다. 세포용해 후 직접, 형광표식반응에 이용할 수 있습니다.

1. 세포 및 조직 샘플을 얼음에 식힌 PBS로 세정합니다.
2. **RIPA Lysis buffer**를 적당량 첨가해 homogenize합니다.
※세포의 가용화에 필요한 **RIPA Lysis buffer**의 용량은, $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 에 대하여 1 mL입니다.
3. 얼음 위에서 15분간 인큐베이션(incubation)합니다.
4. 14,000×g로 5~15분간 원심분리합니다.
5. 원심분리 후의 상등액을 새로운 마이크로 원심튜브에 회수합니다.
6. 상기의 II. ~IV.에 따라서 형광표식합니다.

《비변성, 비환원조건에서 사용할 경우》

- 본 제품에 첨부된 **Sample buffer (5x conc.)**를 대신해서 아미노기, SDS등의 변성제 및 환원제를 포함하지 않는 샘플버퍼(buffer)를 사용합니다. 사용 방법은 상기의 II. ~IV.에 따라서 형광표식합니다.

《Western blotting에 사용할 경우》

- 표식한 샘플의 전기영동 후의 겔을 상기 V.에 기재된 방법으로 촬영합니다. 촬영 후의 겔을 통상의 방법으로 Western blotting 합니다.
- 사용하시는 일차항체에 따라서는, 단백질을 표식하는 것으로 항원항체반응이 저해될 경우가 있습니다.

《2차원 전기영동에 사용할 경우》

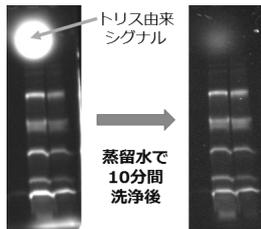
※Agarose gel 2차원 전기영동의 경우, 다음의 방법으로 표식할 수 있습니다.

1. 1차원제의 등전점 전기영동을 통상의 방법으로 합니다.

※1차원제의 겔은 등전점 전기영동 후, 통상의 방법으로 TCA에 의해 고정하고, 증류수에서 세정해 주십시오.

2. **Sample buffer (5x conc.)**를 1x농도로 희석합니다.

※예를 들면 **Sample buffer (5x conc.)** 1 mL에 증류수를



4 mL첨가해서 혼합합니다.

3. 2.에 **Labeling reagent**를 1/100 용량 첨가합니다.

※예를 들면 2.의 **Sample buffer (1x conc.)** 5 mL에 **Labeling reagent**을 50 μ L첨가해서 혼합합니다.

4. TCA고정 및 세정 후의 1차원제의 겔을 3.의 혼합액에 담급니다.
5. 차광해서 30분간, 천천히 침투시키면서 인큐베이션(incubation)합니다.
6. **Reducing agent (DTT)**을 3.의 혼합액의 1/20용량 첨가해서 혼합합니다.
※환원하지 않을 경우는 이 스텝은 불필요합니다.
7. 차광해서 10~30분간, 천천히 침투하면서 인큐베이션(incubation)합니다.
8. 2차원제의 전기영동을 통상의 방법으로 합니다.

9-VII . 표식반응의 저해에 관하여

본 제품은 아미노기를 형광표식하는 시약입니다. 단백질의 용매 중에 아미노기가 포함되면, 표식반응이 저해될 수 있습니다. 샘플 조정 후에 사용하는 전기영동 겔이나 버퍼(buffer)중의 Tris 등의 성분의 영향은 받지않습니다. 또 용매 중에 환원제가 포함되면 형광시약의 형광발광이 저해될 수 있습니다. 이러한 표식반응 저해가 생기는 샘플을 처리하는 방법에 관해서 설명합니다.

《Tris등의 아미노기에 관해서》

영동한 젤의 윗쪽(200kDa)에 Tris의 아미노기 유래의 signal이 나옵니다. 증류수나 고정액으로 10~30분간 세정하면 사라집니다. (왼쪽의 lane). 혹은 샘플을 TCA나 아세톤에 침전하고, 버퍼(buffer)치환을 하고나서 표식반응을 하여 주십시오 (오른쪽 lane) .

《DTT등의 환원제에 관해서》

- 1mM까지의 환원제는 표식효율이 통상보다도 약간 뒤떨어집니다만, 표식이 됩니다.
- 1~10mM의 환원제가 샘플 중에 포함될 경우는, 표식반응 전에 10mM 과산화 수소소로 5분간 (실온) 처리해 주십시오. 표식효율은 통상보다도 약간 뒤떨어집니다만, 표식됩니다.
- 10mM이상의 환원제가 샘플 중에 포함될 경우는, 샘플을 TCA 혹은 아세톤 침전을 하고, 버퍼(buffer)치환을 하고나서 표식 반응을 해 주십시오.

《기타의 저해제에 관해서》

- imidazole이나 요소 등은 표식효율에 영향을 줍니다. 고농도의 경우에는 표식반응이 저해되기 때문에 샘플을 TCA 혹은 아세톤에 침전하고, 버퍼(buffer)치환을 하고나서 표식반응을 해 주십시오.
- 표식반응은 인산 · 탄산 · 붕산 · 초산 등의 완충 액에 의한 영향은 없습니다. 또 소금농도 · EDTA · Mg²⁺ · Ca²⁺ 등의 금속 이온도 영향을 주지 않습니다.

실험방법의 개요

실험준비 Labeling reagent:

- 550 μ L의 EtOH or acetonitrile에 용해한다 (보존은 -20°C)
- Reducing agent(DTT) 2ml 의 증류수에서 용해한다. (보존은 -20°C)
- Sample buffer : $40\sim 60^{\circ}\text{C}$ 에서 용해한다(또는 전자레인지에서 10초)

Labeling 반응①

Master mix 조제방법
Master mix를 만든다.

↓
단백질과 혼합한다.
↓
가열처리
↓
DTT 첨가
↓
가열처리
↓
Labeling 종료

Sample buffer: 100 μ L
Labeling reagent: 5 μ L

단백질 sample: 20 μ L
Master Mix: 5 μ L

 95°C 에서 3분간

Reducing agent(DTT):1 μ L

 95°C 에서 3분간

보존은 -20°C 차광

Labeling 반응②

Master mix 를 조제하지 않는 방법
단백질과 혼합

↓
가열처리
↓
DTT 첨가
↓
가열처리
↓
Labeling 종료

단백질 Sample : 20 μ L
Sample buffer: 5 μ L
Labeling reagent: 0.25 μ L
※ Labeling reagent 을 EtOH/acetonitrile에 희석해도 좋다.

 95°C 에서 3분간

Reducing agent(DTT):1 μ L

 95°C 에서 3분간

보존은 -20°C 차광



アトー株式会社

生化学・分子生物学・遺伝子工学研究機器

主要製品

●ペリスタポンプ

- DNA分析装置
- 画像分析システム
- 発光分析装置
- クロマトグラフ

■本 社 〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2
◆技術サービス
■技術開発 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6
センター

TEL (03) 5827-4861 (代表)
TEL (03) 5827-4873 (代表)
TEL (03) 5818-7560 (代表)

Fax (03) 5827-6647
Fax (03) 5827-4874
Fax (03) 5818-7563

(東京都)

■本社 e-mail: info@atto.co.jp