

His · Tag Monoclonal Antibody 및 His · Tag Western Reagents

His · Tag 융합 단백질을 검출하는 monoclonal antibody, western blot 검출 시약 신발매

His · Tag 서열은 histidine 잔기가 몇 개 이상 연속한 서열로, 금속 이온과 강한 결합 능력을 가지고 있다.

이로 인하여 목적 단백질을 His · Tag 서열과 융합시킨 형태로 발현 시킨 산물은 금속 이온을 고정화한 수지 등에 의해 one step으로 간단하게 정제할 수 있다.

His · Tag 서열은 목적 단백질의 정제에 매우 유용하며 pET Vector를 비롯한 많은 발현 벡터에 삽입되어 있다.

이번에 Novagen사에서 His · Tag 융합 단백질을 Western Blot 등으로 검출하기 위한 His · Tag Monoclonal Antibody 및 His · Tag Western Reagents를 신발매 하였다.

현재 시판되고 있는 대부분의 His · Tag antibody는 His · Tag 서열과 인접한 서열도 epitope로 인식한다.

연속한 His 서열만으로 항원으로 작용하기가 미약하여, 인접하는 서열도 포함한 형태의 항원(항원성이 높다)을 이용한 항체를 제작하기 때문이다. 따라서, 이러한 항체는 대응하는 인접 서열을 포함한 제한된 종류의 plasmid 밖에 사용할 수 없다.

또한 연속한 His 서열만을 인식하는 항체도 시판되고 있지만, affinity가 낮아 검출 감도가 낮은 단점이 있다.

금번 Novagen사에서 신발매한 His · Tag Monoclonal Antibody는 전후 서열에 관계없이 5개 연속한 His 서열만을 인식하며 높은 affinity($K_d=5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ M)을 가지고 있어 기존 His · Tag 항체의 결점을 극복하고 있다.

제품명	Novagen Code	포장량
His · Tag Monoclonal Antibody	70796-4	3 μ g
His · Tag Monoclonal Antibody	70796-3	100 μ g
His · Tag AP Western Reagents	70972-3	25 blots
His · Tag AP LumiBlot™ Reagents	70973-3	25 blots
His · Tag HRP LumiBlot™ Reagents	70974-3	25 blots

■ 특징

- 5개 연속한 His 잔기만을 특이하게 인식하여 affinity가 높다.
- His · Tag 융합 단백질의 Western Blot에 사용할 수 있다.
- Novagen사의 Trail Mix™ Western Markers(Novagen Code 70982-3) 또는 Perfect Protein™ Markers(Novagen Code 69959-3)로 동시에 검출할 수 있다.
- His · Tag 융합 단백질을 발현하는 세포의 면역 조직 염색에 사용할 수 있다.

■ His · Tag Western Blot

그림 1은 His · Tag Monoclonal Antibody를 이용한 Western Blot이다. 그림 1에서 알 수 있는 바와 같이 본 항체는 융합 단백질의 N말단(lane 3~5), C말단(lane 6), 중간부(lane 7)의 어느 쪽에 위치하는 His · Tag 서열도 인식하며, 그 특이성은 His · Tag 서열의 전후 서열에 전혀 영향을 받지 않는다. 사용한 융합 단백질의 종류에 따라 signal의 강도 차이가 나타났으나, 이는 His · Tag epitope의 노출도의 차이에 의한 것이다. 또 유전자를 도입하지 않은 대장균(lane 8), 곤충 세포(lane 9), 포유류 세포(lane 10)의 추출액에서는 교차 반응하는 밴드가 거의 검출되지 않았다.

본 실험에서는 발현이 약한 시료를 정하여, 유도 샘플 추출액을 비유도 샘플 추출액으로 인위로 10배 희석하여 gel에 loading하였다(lane 3~7). 이러한 경우도 목적 단백질을 선명하게 검출할 수 있었다.

그림 1 blot의 검출에는 다음에 설명할 His · Tag Western Reagents를 사용하였다. 이 kit에는 이차 항체, buffer, blocking reagents, substrate가 포함되어 있어 목적 단백질에 결합한 일차 항체(His · Tag Monoclonal Antibody)를 백그라운드 적게 고감도로 검출할 수 있다. His · Tag AP Western Reagents(Novagen Code 70972-3)는 NBT/BCIP 기질을 이용한 발색으로 검출한다(그림 1A). 또 His · Tag AP LumiBlot™ Reagents(Novagen Code 70973-3) (그림 1B), His · Tag HRP LumiBlot™ Reagents(Novagen Code 70974-3)는 감도가 훨씬 뛰어난 화학 발광으로 검출한다.

■ His · Tag Western Reagents의 내용

His · Tag AP Western Reagents (Novagen Code NV991)

- 20× TBS 125 ml
- 10× TBSTT 250 ml×2
- 5% Alkali-soluble Casein 225 ml
- Goat Anti-Mouse IgG AP Conjugate(H+L) 40 ml
- Development Substrates(BCIP, NBT, 20× AP Buffer)

His · Tag AP or HRP LumiBlot Reagents

(Novagen Code 70973-3/70974-3)

- 20× TBS 125 ml
- 10× TBSTT 250 ml×2
- 5% Alkali-soluble Casein 225 ml

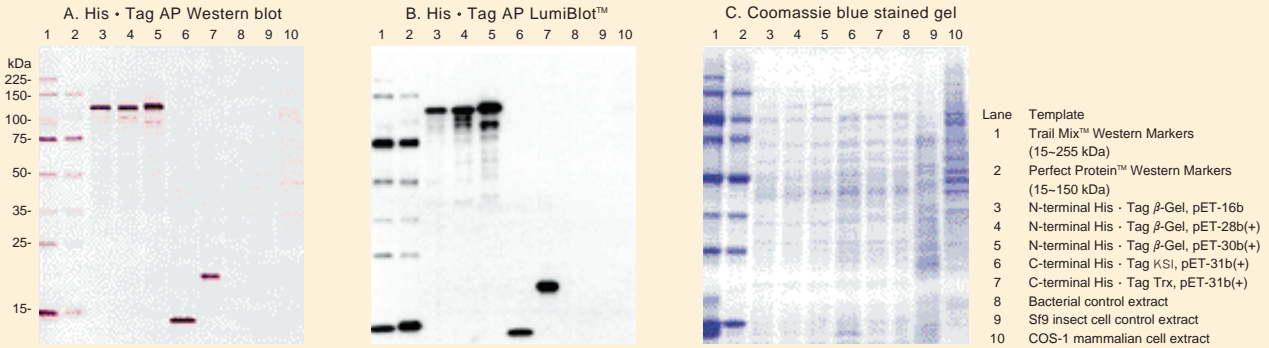


그림 1. His · Tag 융합 단백질의 Western Blot검출

His · Tag 서열이 N말단, 중간부 또는 C말단에 포함되도록 목적 유전자를 조합한 pET Vector를 BL21(DE3) competent cell에 도입하였다. IPTG 존재 하에서 3시간 배양하여 발현을 유도한 후, 초음파 처리로 세포 추출액을 조제하였다. 이 유도 배양 세포 추출액을 비유도 배양 세포 추출액으로 10배 희석하여 전기영동하였다. 약 5 μg 시료를 3장의 4~20% gradient gel로 전기영동하였다. 전기영동 후, 하나는 Coomassie Blue로 염색하고(C), 나머지는 nitrocellulose membrane에 transfer하여 1000배 희석한 His · Tag Monoclonal Antibody와 Western Reagent Kit를 이용하여 검출하였다(A, B).

- Goat Anti-Mouse IgG AP Conjugate(H+L) 40 ml
- Development Substrates (CDP-Star® Substrate with Nitro-Block II™ or SuperSignal® Substrate)
- gLOCATOR™ Luminescent Labels 25개
- Development Folders 25개

■ Marker 동시 검출

His · Tag Monoclonal Antibody 를 이용한 Western Blot은 Novagen사의 Trail Mix™ Western Markers(Novagen Code 70982-3)나 Perfect Protein™ Western Markers(Novagen Code 69959-3)를 동시에 검출할 수 있는 장점을 가지고 있다. Trail Mix™ Western Markers는 15~225 kDa의 8종류, Perfect protein™ Western Markers는 15~150 kDa의 7종류의 His · Tag 융합 단백질로 구성되어 있다. 이 중 75 kDa 및 15 kDa 밴드는 His · Tag Monoclonal Antibody를 이용하여 Western Blot

을 할 경우 다른 밴드보다 더 강하게 염색된다(그림 1A, B). Trail Mix™ Western Marker는 미리 염색된 밴드 3종류(15, 16, 100 kDa)가 포함되어 있어, 전기 영동 중 영동 방향이나 단백질의 이동도를 쉽게 확인할 수 있다.

■ His · Tag Monoclonal Antibody를 이용한 면역 조직 염색

His · Tag Monoclonal Antibody는 Western Blot뿐만 아니라 면역 조직 염색에도 사용할 수 있다.

N말단에 His · Tag 서열이 추가된 firefly luciferase gene(Fluc)과 신규 합성 유전자를 조합한 pTriEx™ Vector를 transient transfection한 COS-1 세포를 His · Tag Monoclonal Antibody를 이용하여 면역 염색하여 단백질 발현을 조사하였다(그림 2). Transfection된 세포는 세포질이 선명하게 염색되어 목적 단백질의 발현을 쉽게 확인하였다(그림 2 A, C). Transfection되지 않은 세포는 백그라운드로 희미하게 염색되었다. 또한 핵 염색(그림 2 B, D)에서는 불특정 세포도 검출되었다.

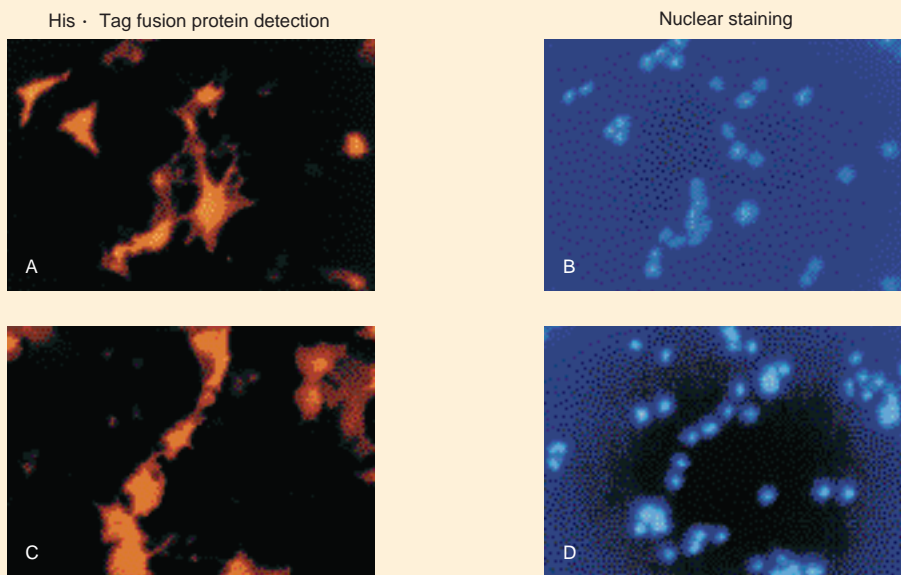


그림 2. 유전자 도입한 COS-1 세포에서 발현된 His · Tag 융합 단백질의 면역 형광 염색 검출

N말단에 His · Tag 서열이 추가된 firefly luciferase gene(Fluc), 신규의 합성 유전자를 조합한 pTriEx™ Vector를, GeneJuice™ Transfection reagent(TaKaRa Code 70967-3)을 이용하여 COS-1 세포에 transfection하였다. 24시간 후 세포를 고정하여 BSA 및 horse serum으로 블로킹한 후, 1000배 희석한 His · Tag Monoclonal Antibody(0.2 mg/ml)와 Cy3™ conjugated Goat anti-Mouse IgG를 순차적으로 처리하여 면역 염색을 하였다. 핵 염색은 Hoechst 33258을 이용하였다.

A: His · Tag Fluc의 형광 염색 ; B: A와 같은 영역의 Hoechst 염색 ; C: His · Tag 융합 신규 합성 유전자의 형광 염색 ; D: C와 같은 영역의 Hoechst 염색