

면역염색

1. 여러 가지 면역염색법

면역염색은 특정 단백질에 대한 항체를 이용하여 western blotting의 membrane상에 항원항체 반응을 수행하는 것으로 특정 단백질을 검출하는데 사용하는 방법이다. 검출방법은 크게 직접법과 간접법으로 나뉘며, 최근에는 검출감도를 높이는 간접법이 일반적이다.

직접법

특이적 항원에 직접 표식하여 그 표식한 항원을 검출하는 것으로 특정 단백질의 존재를 밝히는 방법.

간접법

특이적 항체(1차 항체)를 항원으로 인식하는 항체(2차 항체)를 표식하고, 그 표식을 검출하는 것으로 특정 단백질의 존재를 밝히는 방법. 2차 항체에는 특정의 동물종의 immuno globulin을 인식하는 항체를 이용하여, 1차 항체를 인식한다. 동일한 동물종 유래의 1차 항체인 경우 동일한 2차 항체를 이용할 수 있어 널리 이용되고 있다.

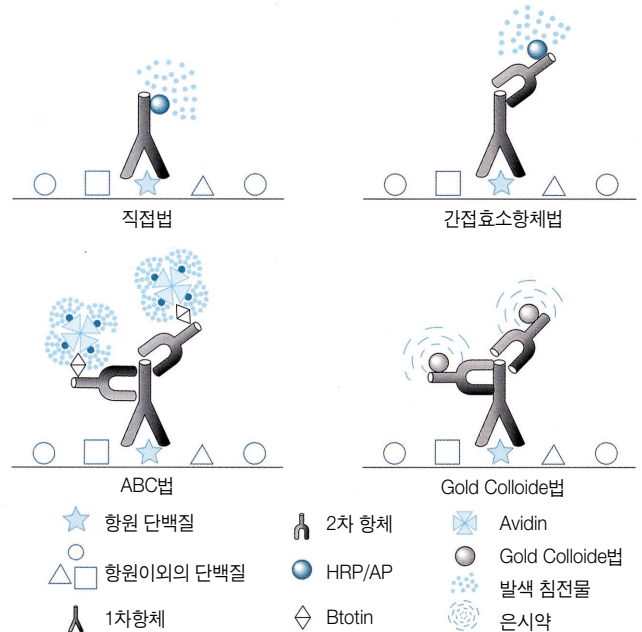


그림 1 여러가지 면역 염색법

1-1 간접법

간접법에도 여러 가지가 있으며, 주요 방법에 대하여 소개하겠다.

① 효소항체법

2차 항체의 표식에 HRP(horseradish peroxidase)와 AP(alkaline phosphatase) 등의 효소를 이용하여 효소 반응의 결과물인 침전물의 색소를 검출한다. Western blotting에 유용하게 이용된다.

② 형광항체법

2차 항체의 표식에는 FITC (fluorescein isothiocyanate; 녹색 형광)과 Rhodamine (적색 형광) 등을 이용하여 각각에 대응하는 파장의 여기광을 발하여 형광을 검출한다. 조직염색에 유용하게 이용된다.

③ ABC법

2차 항체의 표식에 biotin(비타민 복합체의 하나로 난백에 존재하는 avidin이라고 하는 특정 단백질과 강하게 결합한다)을 이용한다. 이 biotin에 avidin-enzyme complex를 결합시킴으로써 항체 한 분자에 결합하는 효소의 양이 증가하여 고감도 검출을 할 수 있다. 그러나 일반적으로 background가 높고, 비특이적인 밴드가 나타나는 경우도 많으므로 효소항체법의 발색방법을 연구하여 감도를 올리는 것이 효과적이다.

④ Gold Colloide법

2차 항체에 금 입자를 결합시킨 후 전자현미경으로 검출한다. 즉, 항체에 charge를 갖게 할 수 있는 방법이다. 금 입자가 결합하면 착색하므로 western blotting이나 광학현미경에서의 면역조직 염색에도 이용할 수 있다. 이 경우에는 은 시약을 이용한 증감법으로 ABD법보다 더욱 고감도 검출이 가능하다.

1-2 HRP 표식 항체와 AP 표식 항체의 특징

여기에서는 ① 효소항체법을 이용한 세가지 방법을 소개하겠다.

1. 2차 항체: HRP 표식 항체

발색시약: Diaminobenzidine (DAB)

기질: H₂O₂

검출방법: 갈색의 침전물 검출

2. 2차 항체: AP 표식 항체

발색시약: nitrobluetetrazolium (NBT)

기질: X 인산 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)

검출방법: 청자색의 침전물 검출

3. 2차 항체 : AP 표식 항체

발광기질: CSPD (disodium3-(4-methoxy Spiro [1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan]-4-yl)phenyl phosphate)

검출방법: 화학발광을 이용한 X선 필름 검출

어느 방법이나 검출감도는 비슷하며, 2차 항체의 상태에 따라 결과가 차이가 발생한다. 단, 일반적으로 다음과 같은 특징이 있다.

· HRP 표식 항체

대체로 검출감도는 낮지만, 조직염색시 해상도가 높고, 미소관의 가는 섬유 등을 염색할 수 있다.

· AP 표식 항체

검출감도는 양호하지만 조직염색 시 해상도는 낮다. 또한 화학발광을 이용할 경우, X선 필름의 광 노출 시간을 조절함으로써 감도를 올릴 수 있다. 단, 화학발광의 경우, 조직염색에는 사용할 수 없다.

2. 실험 예

2-1 Blotting

● 준비

· Blocking 희석 buffer 조제 (실은 보관)

	최종농도(pH 7.5)	사용량
Maleins	0.1 M	11.6 g
NaCl	0.15 M	8.77 g
NilliQ water	-	-
멸균수 (volumn 조절용)	-	-
Total		1,000 ml

NaOH (pH 조정용) - 5.5 g + d¹

*1 가루 형태의 NaOH의 경우 5.5 g을 넣고 난 후 1N NaOH로 조절하면 된다.

· Blocking Stock 용액 (4℃ 보관)

	최종농도	사용량
Blocking Reagent	10%	5 g
Blocking 희석 buffer	-	50 ml
Total		50 ml

· Blocking 용액

Blocking Stock 용액	1 vol
Blocking 희석 buffer	9 vol

· Parafilm chamber

항체를 절약하고, 다른 항체로의 처리를 효율적으로 하기 위하여 Parafilm으로 membrane과 같은 크기로 아래의 그림과 같이 준비한다*2.

*2 Parafilm은 물에 젖지 않기 때문에 항체나 PBS가 membrane 상에 binding하기 쉽도록 처리 용액을 조그만 사용해도 된다.

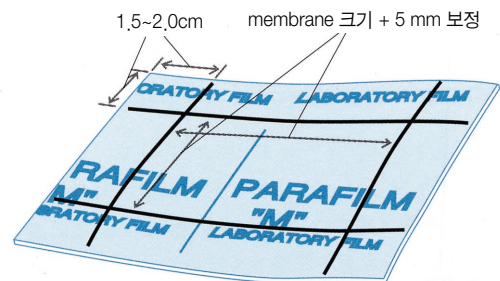


그림 2 Minigel용 Parafilm 설계도

Chamber의 바닥은 membrane의 크기 보다 2~3 mm 여유를 두고 제작한다. Chamber의 깊이는 1.5 cm 정도가 적당하다. Parafilm의 chamber는 다음 그림의 순서로 제작한다.

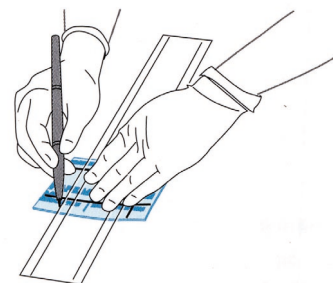


그림 3 Parafilm의 종이 위에 선을 그어 설계한다.

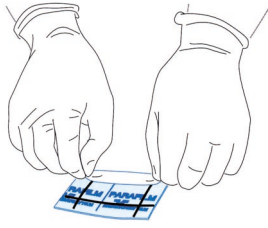


그림 4 Parafilm 네 면을 선을 따라 찢는다.

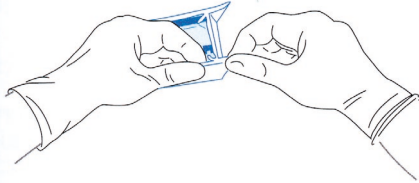


그림 5 접은 부분을 적당히 올려 상자 모양의 각을 만든다.

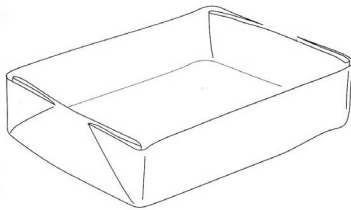


그림 6 상자 모양의 chamber를 완성한다.

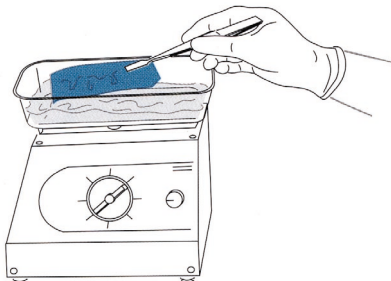
- 플라스틱 용기
- PBS
- 핀셋
- 자
- 칼

●방법

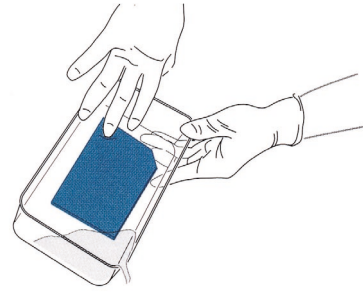
1) Blocking을 종료한 후 membrane 또는 blocking buffer에 보존해 두었던 membrane을 PBS가 충분히 들어있는 플라스틱 용기에 넣는다*3.

*3 단백질이 binding되어 있는 부분을 아래로 하여 넣는다. 이렇게 하지 않으면 membrane이 위로 떠서 건조될 위험성이 있다.

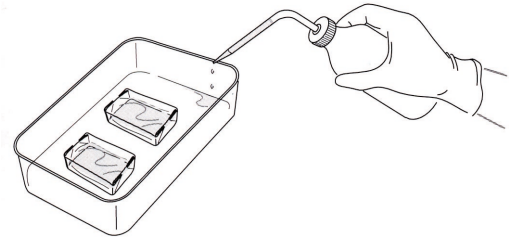
- 2) 실온에서 5분간 shaking하여, buffer를 잘 세정한다.
- 3) Membrane에 PBS가 흡수되어, 위로 떠오르지 않게 되면 단백질 binding 면을 위로 오도록 뒤집는다.



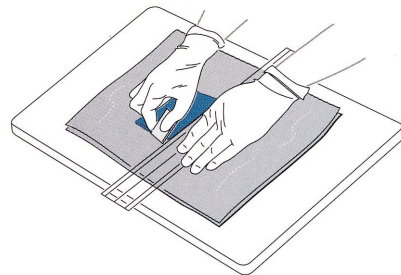
4) 손가락으로 membrane을 잡고 플라스틱 용기를 기울여 PBS를 제거한다.



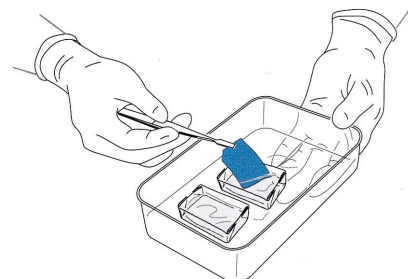
- 5) PBS를 충분히 넣고, 실온에서 5분간 shaking 한다.
- 6) PBS를 제거한다.
- 7) Blocking 용액을 넣고 실온에서 1시간 shaking 한다.
- 8) 플라스틱 용기에 Parafilm chamber를 넣고 그 안에 PBS를 넣는다.
- 9) 플라스틱 용기 안에 chamber 밖에도 PBS를 적당히 넣는다. Membrane을 자르지 않아도 될 경우 step 13)으로, 자를 경우에는 step 10)으로 진행한다.



- 10) 평평한 곳에 둔다.
- 11) Membrane의 단백질이 binding 되어 있는 면을 아래로 하여 wattmann paper에 올려 놓는다.



- 12) 깨끗한 자를 적당한 곳에 두고, 깨끗한 칼로 자른다.
- 13) PBS를 충분히 넣고 chamber에 각각의 membrane을 넣는다. 이때 각도를 잘 맞추어 membrane이 chamber 가운데 위치하도록 하여 항체 용액이 membrane 전체에 반응할 수 있도록 한다.



2-2 항체 반응

● 준비

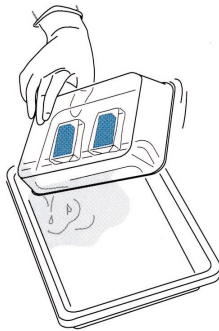
- 항체 용액 (1차 항체액, 2차 항체액)
Ice 위에서 작업을 수행한다.
Tube에 필요량의 PBS 또는 Blocking buffer를 넣고 ice에 보관
항체 원액을 냉장고에서 꺼낸다.
필요한 희석 배율에 따라 항체 원액을 희석한다.

반응시 필요한 항체 희석액

6×8 cm 정도의 membrane	4~5 ml
6×3 cm 정도의 membrane	2~3 ml

● 방법

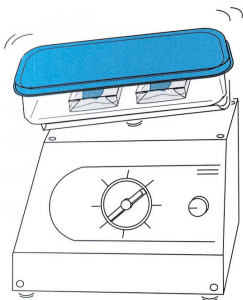
- 1) 플라스틱 용기의 PBS를 제거 한다.



- 2) 1차 항체

준비된 1차 항체액을 disposable pipette으로 넣는다.

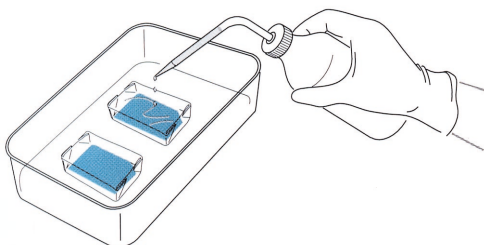
- 3) 플라스틱 용기의 뚜껑을 닫고 실온에서 1시간 동안 천천히 shaking 한다.



- 4) Disposable pipette을 이용하여 항체액을 제거한다.

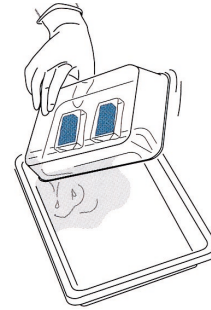
- 5) 세정

Membrane이 마르지 않도록 즉시 세정액 (PBS)을 첨가한다.



- 6) 손으로 플라스틱 용기를 1분 정도 흔든다.

- 7) PBS를 제거한다.
- 8) 세정액 (PBS)을 충분히 첨가한다.
- 9) PBS 교체가 끝나면 실온에서 10분간 shaking 한다.
- 10) 조심스럽게 플라스틱 용기에서 PBS를 제거한다.



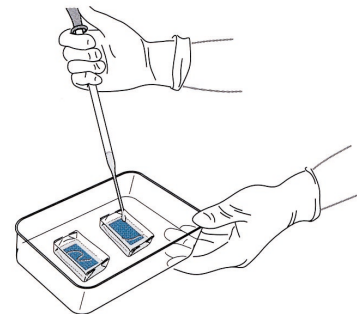
- 11) PBS를 충분히 첨가하고 20분간 shaking 한다.
약 30분간 PBS로 3회 세척하는 것과 같은 효과를 나타낸다.

- 12) Shaking 하는 사이에 2차 항체를 준비한다.

- 13) step 10) 과 같은 방법으로 PBS를 제거한다.

- 14) 2차 항체

준비된 2차 항체를 disposable pipette으로 넣는다.



- 15) step 3)~11) 과 같은 방법을 반복한다.

- 16) PBS를 교환 하고 실온에서 10분간 shaking 한다.

2-3. HRP 발색반응

● 준비

- Diaminobenzidine: DAB

효소반응의 결과로 생성된 효소와 반응하여 흑갈색의 침전물을 생성한다.
발암성 물질이므로 취급주의 할 것. Light sensitive 이므로 호일 등으로 싸서 4℃ 보관.

- 10% 과산화수소수 (H₂O₂)

HRP의 기질이 되며 분해되어 H₂O 와 O₂를 생성한다.

시판되는 과산화수소수는 35% 이므로 250 μl의 증류수에 100 μl의 35% 과산화수소수를 넣어 조제한다. 과산화수소수는 휘발성이 있으므로 4℃에서 보관하고 약 1개월 마다 새로 만들어서 사용하도록 한다.

- 0.1M Phosphate buffer (pH 6.4)

0.2M Na₂HPO₄ 25.5 ml

0.2M NaH₂PO₄ 74.5 ml

증류수 100 ml

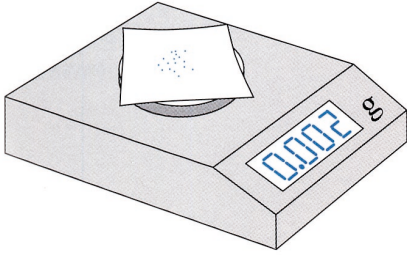
Total 200 ml

4℃ 보관

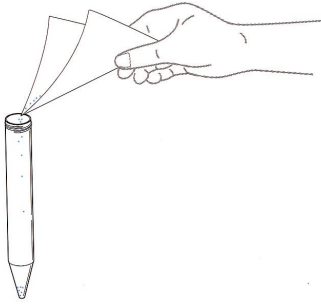
- 발색액

	최종농도	사용량1	사용량 2
DAB	0.2 mg/ml	2 mg	6 mg
10% H ₂ O ₂	0.06%	60 μ l	180 μ l
증류수	-	극소량	극소량
0.1M Phosphate Buffer (pH6.4)	-	10 ml	30 ml

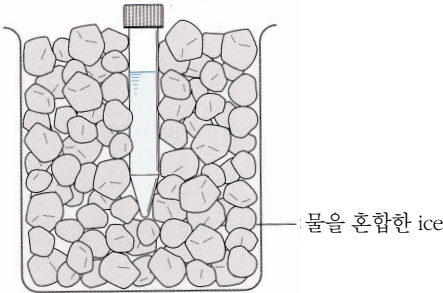
필요한 DAB 양을 저울로 잰다.



Tube에 DAB를 넣는다.



전체 용액의 1/10 ~ 1/100 정도 증류수를 첨가하고, DAB를 완전히 용해한다.



Phosphate buffer를 필요량까지 첨가한다.

Ice에 넣고 충분히 냉각한다.

10% H₂O₂를 첨가하고 잘 섞어 Ice 위에 보관

●방법

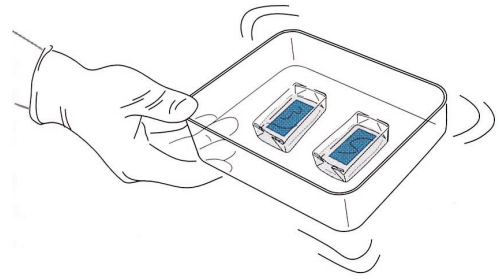
1) 2-2. 항체반응 step 16)에서 2차항체를 세정한 PBS를 제거한다.

2) 발색

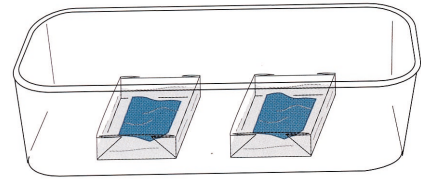
아래의 발색액을 disposabl pipette으로 넣는다

mini gel 전체를 blotting 한 membrane (6 cm × 8 cm 정도)	15~20 ml
mini gel 3~4 lane을 blotting 한 membrane (6 cm × 3 cm 정도)	5~10 ml

3) 발색액을 membrane 전체에 균일하게 붙도록 손으로 흔들어 준다.

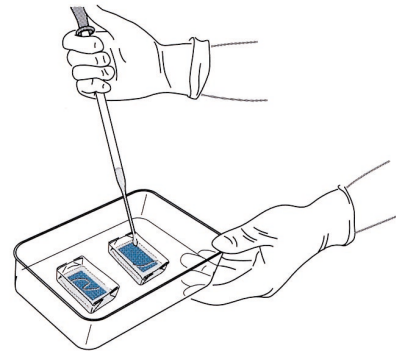


4) 가만히 둔다.



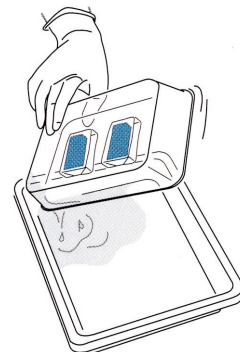
5) 발색되는 양상을 확인하면서 적당한 시점이 되면 반응을 종료시킨다.

6) 발색액을 disposable pipette으로 제거한다.



7) Ice-water를 넣는다

8) 2-2. 항체반응 step6)~11)과 같은 방법으로 증류수를 교환하면서 membrane을 세정한다.



9) 증류수를 넣고 5분간 shaking 한다.

10) Paper towel 위에 membrane을 건조시킨다.

3. 발색에 관한 Trouble-shooting

■ 1. 건조시키면 band가 보이지 않게 된다.

- 원인 : 상당히 흐린 band가 잘 보이지 않게 되는 것은 정상적인 변화이다.
- 대책 : 사진 등에 기록할 때에는 증류수로 적신 상태에서 사용하면 된다. 단, 근본적인 해결을 위해서는 밴드를 진하게 하는 실험이 필요하다.

■ 2. 발색액을 넣으면 바로 발색액에 색이 부착하고, 백그라운드가 높아져 버린다.

- 원인 : ① 2차 항체의 세정이 충분하지 않아 여분의 HRP나 AP가 남아있다.
② 발색액의 온도가 높았다.
③ 발색 시약이나 기질의 농도가 상당히 진해져 있었다.
- 대책 : ① 곧바로 발색액을 버리고, PBS로 충분히 세정 후 다시 발색액을 새로 넣음으로써 어느 정도 부활시킬 수는 있다. 그러나 백그라운드가 높아져 깨끗한 염색은 되지 않는다.
② 충분히 식힌 후 발색액을 추가한다.
③ 발색액을 정확하게 다시 만든다.

■ 3. 발색액은 지저분하지 않은데 band의 발색이 급격하고 새까맣게 되어 버린다.

이 경우에도 점차 발색액도 색이 변해 간다.

- 원인 : 이상이 없는 올바른 실험 결과로, 진하고 명료한 밴드가 검출되었다는 것이다.
- 대책 : 발색액을 흐리게 함으로써 발색반응을 어느 정도 지연하는 것도 가능하다. 그러나 가장 좋은 방법은 전기영동시, 단백질 양을 줄인 후 다시 한번 적당한 밴드를 얻을 수 있는 조건을 검토하는 것이다.

■ 4. Gel을 염색하면 깨끗한 band가 보이는데, membrane 상에서는 band가 폭넓게 검출된다

- 원인 : ① 1차 항체가 인식하고 있는 항원이 여러 개의 분자이거나, 당 단백질 등인 경우에는 이렇게 되는 경우가 많다.
② 항원이 조금 분해되어 분자량이 흐트러져 있다.
- 대책 : ① 정상적인 결과이므로 크게 문제 되지 않으나 전기영동시의 단백질 양을 줄임으로써 major한 band만을 검출하도록 하면 외형이 좋아지는 경우도 있다. 그러나 당단백질의 경우, 당쇄 부분을 제외한 시료를 blotting함으로써 원인이 당단백질인 것을 증명하는 것이 중요하다.
② 전기영동 시료를 제조할 때부터 단백질이 분해하지 않도록 주의한다. 만일 band가 너무 진하면 전기영동시의 단백질 양을 줄임으로써 band의 남는 부분을 검출하지 않도록 할 수 있는 경우도 있다.

■ 5. 아무리 기다려도 밴드는 보이지 않지만, 발색액에는 점차 색이 드러난다.

- 원인 : ① 1차 항체가 인식하는 단백질이 없거나 또는 적다.
② 1차 항체나 2차 항체가 실패 했거나, 2차 항체가 1차 항체를 인식할 수 없었다.
- 대책 : ① 전기영동시, 단백질 양을 늘리면 검출할 수 있는 경우가 있다.
② 항원항체 반응이 일어나지 않아도 HRP나 AP의 효소활성은 남아있는 경우가 많으며, 약간 남은 2차 항체가 발색반응을 진행해 버린다. 우선, 1차 항체와 2차 항체의 조합 (동물 종류, immuno globline의 등급이 맞는가)을 확인한다. 이후, 항체 역가를 다시 확인하거나 또는 -80℃의 냉동고에서 보존해 둔 새로운 항체를 사용해 본다.

■ 6. 아무리 기다려도 발색액이 계속 투명하다.

- 원인 : ① HRP나 AP가 전혀 없다.
② 발색액에 문제가 있다.
- 대책 : ① 2차 항체가 잘못되지 않았는가 확인한다. 발색액을 충분히 씻어 버린 후 2-2. 항체반응 step14)부터 다시 해보는 것도 좋지만, 백그라운드가 높아지는 등 좋지 않은 경우가 많다.
② DAB가 다 녹지 않아 농도가 낮아져 있지는 않은가, 시약 넣는 것을 잊지는 않았는가를 확인한 후 발색액을 다시 만든다.