

PIERCE HRP용 화학발광 기질과 signal 증강 시약을 사용한 고감도 Western Blot 해석

-Luminoshot™ 400 Jr을 사용한 해석 예-

Western Blot이란 단백질 혼합물에서 목적하는 단백질을 특이적 항체를 사용하여 검출하는 것으로, 목적 단백질의 발현량과 siRNA 효과 확인에 자주 사용됩니다.

본 고에서는 Western Blot 해석에서 고감도 검출에 적합한 Supersignal® 시리즈(HRP용 화학발광 기질)와 Qentix™ Western Blot Signal Enhancer(signal 증강 시약) 및 Luminoshot™ 400 Jr(고감도 CCD image analyzer)을 사용한 실험 예를 소개한다.

Supersignal® 시리즈

기존 기질에 비해 발광 강도가 강하고 백그라운드 낮으며, 발광 지속시간이 긴 HRP(Peroxidase)용 화학발광 기질이다. 검출감과 발광시간의 차이에 따라 세 종류의 제품이 있다(표 1).

본 고에서는 Supersignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate(이하 Supersignal®)를 사용하고 있다.

Qentix™ Western Blot Signal Enhancer의 개요

Western Blot에서 화학발광 signal 및 발색 signal을 증강시키는 시약이다. 전기영동한 단백질을 transfer 한 membrane(Nitrocellulose, PVDF 등)을 본 시약에 넣어 세척하는 조작을 반복하는 것으로 화학발광 반응 또는 화학발색 반응의 signal을 증강할 수 있다. 본 고에서는 Qentix™를 사용하고 있다.

LuminoShot™ 400 Jr의 개요

화학발광 검출을 하기 위한 CCD image analyzer이다. 경제적이면서 고성능으로, 고감도, 고해상도 검출이 가능하다.

Supersignal®과 Qentix™와의 조합에 의한 고감도 Western Blot 분석과 각 시약 성능의 검토

Heme oxygenase(HO-1)은 각종 스트레스에 대하여 세포 내 발현하는 효소로, 산화 스트레스 marker로 알려져 있다. 화학발광 기질의 성능과 signal 증강 시약의 효과(타사 제품도 포함)를 알아보기 위하여 흰쥐 비장 중 HO-1을 목적으로 Western Blotting을 하였다. 또한 검출용 항체로서 peroxidase 표식 항 HO-1 항체를 사용하였다.

【방법】

6주된 SD 흰쥐에서 비장을 적출하고 습중량 0.25 g에 대해 1 ml의 비율로 1 % NP40/PBS를 첨가하여 가용화하고 원심분리하였다. 그 상층의 일부를 단계적으로 희석하여 HO-1 양성 시료(10, 20, 40, 80, 160배 희석액)로 하였다. 이 시료에 대해 SDS-PAGE(5~20 % gel)를 한 후, gel 위의 전기영동 단백질을 PVDF membrane에 transfer하고, Qentix™로 처리하였다. 또한 대조군으로 미처리군도 준비하였다. Membrane을 blocking 처리 한 후, peroxidase 표식 항 HO-1 항체(항체 농도 1 μl/ml)의 1,000배 희석액을 첨가하여 반응시키고 세척하였다. 세척 후 membrane에 Supersignal®

표 1 Supersignal® 시리즈

제품명	Supersignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Supersignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate*	Supersignal® West Dura Extended Duration Substrate*
단백질의 검출 한계	picogram(10^{-12} g)	femtogram(10^{-15} g)	femtogram(10^{-14} g)
발광 지속시간	6~8 시간	8 시간	24 시간
주요 검출방법	Film	Film 또는 image analyzer	Film 또는 image analyzer
권장하는 항체 희석 배율 (항체 농도가 1 mg/ml인 경우)	1차 항체 1/1,000~1/5,000 2차 항체 1/20,000~1/100,000	1차 항체 1/5,000~1/100,000 2차 항체 1/100,000~1/500,000	1차 항체 1/1,000~1/50,000 2차 항체 1/50,000~1/250,000
조제 후 시약의 안정성	실온에서 24 시간	실온에서 8 시간	실온에서 24 시간
제품의 안정성	실온에서 1 년간	실온에서 6 개월 4℃에서 1 년간	실온에서 1 년간
권장하는 membrane	Nitrocellulose	Nitrocellulose 또는 PVDF	Nitrocellulose 또는 PVDF
1 Kit로 처리할 수 있는 membrane의 면적	4,000 cm ²	800 cm ²	800 cm ²

*: HRP 표식 anti rabbit antibody와 HRP 표식 anti mouse antibody가 1 ml씩 포함되어 있다.

을 첨가하고 5 분간 방치하였다. 남은 시약을 제거한 후, Luminoshot™400 Jr에서 signal을 검출하였다.

또한 비교를 위하여 타사의 화학발광 기질(A사), signal 증강 시약(T사)을 사용하여 동일한 실험을 실시하였다.

[결과]

(1) Supersignal®의 고감도성

발광 기질로서 Supersignal®을 사용하였을 경우는 목적인 HO-1(분자량 약 31,000)과 그 분해물 밴드가 A사 제품보다도 높은 감도로 검출되었다(그림 1).

(2) Qentix™의 signal 증강 효과

Supersignal®을 사용하여 발광반응을 하기 전에 Qentix™로 처리함으로써 검출 감도가 더욱 뚜렷하게 향상되었다(그림 1). 또한 Qentix™을 A사의 발광 기질과 조합시킨 경우에도 동일한 signal 증강 효과가 나타났으며, Supersignal® 이외의 발광 기질에도 유효한 것으로 확인되었다(그림 1).

(3) Supersignal®+Qentix™의 조합과 타사 제품 조합(A사+T사)과의 성능 비교

Supersignal®과 Qentix™를 조합시켰을 경우, 타사 제품(A사의 화학발광 기질과 T사의 signal 증강 시약)을 조합시킨 경우보다도 검출 감도가 훨씬 높은 것으로 확인되었다(그림 2).



그림 1 Supersignal®의 고감도성과 Qentix™의 signal 증강 효과
signal 검출시간: 30 초

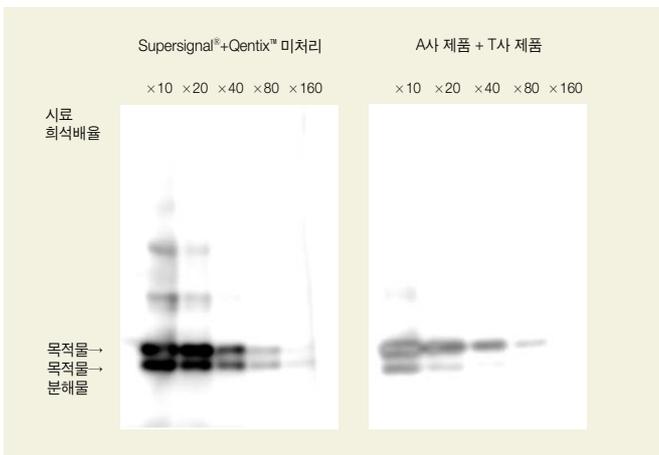


그림 2 PIERCE 제품(Supersignal®+Qentix™)과 타사 제품(A사+T사) 성능 비교
signal 검출시간: 1 분

본 실험에서는 peroxidase(HRP)로 직접 표식한 특이항체를 사용하여 Supersignal®을 발광 기질로서 검출하였지만, 1차 항체(특이항체)와 HRP 표식 2차 항체를 조합시킨 경우에도 사용할 수 있다. 또한 Qentix™는 발광반응 뿐 아니라 발색반응의 signal 증강에도 놀라운 효과를 나타낸다.

본고에서 소개한 제품

[Supersignal® 시리즈]

- Supersignal® West Pico Chemiluminescent Substrate
TaKaRa Code P7447 1 Kit
- Supersignal® West Pico Trial Kit
TaKaRa Code P74004 1 Kit
- Supersignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate
TaKaRa Code P7448 1 Kit
- Supersignal® West Dura Extended Duration Substrate
TaKaRa Code P7484 1 Kit
- Qentix™ Western Blot Signal Enhancer
TaKaRa Code P7487 1 Kit
- Luminoshot™400 Jr
TaKaRa Code AS410 1 set



[사양]

Code: AS410
 화소 수: 400만 화소
 화소 크기: 7.4×7.4 μm
 해상도: 2,048×2,048 pixels

*본 장치에 대해서는 당사 카탈로그를 참조하
기 바랍니다.

- Anti-Heme Oxygenase-1(GTS-1) Monoclonal, POD
TaKaRa Code M177 0.05 mg