

PAGE와 Transfer 시간을 획기적으로 줄인

ProSieve™ EX Running & Transfer Buffers

서론

Tris-Glycine SDS를 기초로 한 Laemmli 방법은 지난 40여년 동안 PAGE를 이용한 단백질의 크기 분석의 기본적인 방법으로 사용되고 있으며 여러 해 동안 Laemmli gel 방법의 효율을 높이고 시간을 단축 시키기 위한 노력이 계속 되었다.

ProSieve EX Running buffer(Code 00200307)와 ProSieve EX transfer buffer(Code 00200309)는 단백질의 분리능과 transfer 효율 감소 없이 2시간 이상 소요되던 시간을 30분으로 획기적으로 줄일 수 있도록 고안되었다. 본 실험에서는 다양한 Tris-Glycine PAGE precast gel과 ProSieve EX Running buffer를 사용하였을 때, 해상도는 변함없이 스피드를 증가시킬 수 있음을 보여준다. 또한 ProSieve EX transfer buffer를 이용하여 transfer할 경우 시간 단축과 효율의 향상도 나타났다.

재료 및 방법

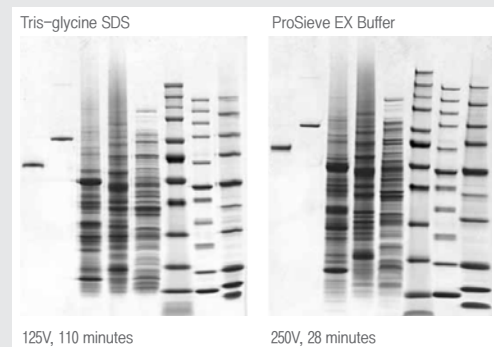
모든 비교는 4-20% gel과 1×Tris-Glycine SDS buffer, 1×ProSieve EX Running buffer를 이용할 경우로 진행하였다. 각 gel 제조사에서 Tris-glycine SDS buffer를 이용할 경우 권장하는 전압을 이용하였으며, ProSieve EX Running buffer를 이용하는 경우는 프로토콜의 표준 권장인 250V에서 실험을 진행하였다. 전기영동 후 ProSieve EX Safe stain 염색하였다. Gel이 잠길 만큼의 stain solution을 넣고 전자레인지에서 25-30초간 가열한 후, 20-45분 동안 gel을 흔들며 주다 이미징 작업 전에 물로 destain 하였다.

Transfer를 위해 gel을 washing 후 transfer buffer에서 10분간 equilibration 시켰다. 표준 Towbin transfer buffer(1×Tris-Glycine with 20% methanol)를 이용한 transfer는 25V에서 60분간 수행하였으며, 1×ProSieve EX transfer buffer를 이용한 transfer는 400m Amps에서 10분간 수행했다. 모든 blot은 nitrocellulose membrane에 Bio-Rad Trans-Blot SD를 사용하여 semi-dry 방법으로 수행하였다. Membrane은 건조시킨 후 물을 이용하여 re-hydrate시켜 이미징 하였다.

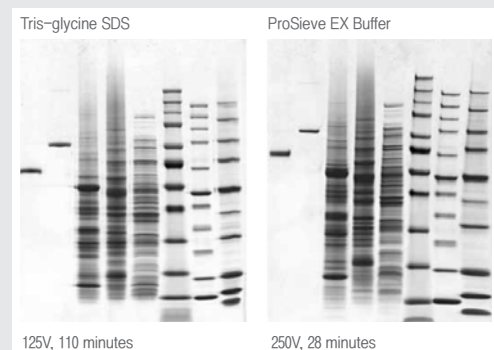
결과

표준 Tris-glycine SDS buffer 또는 1× ProSieve EX Running buffer를 이용하여 다양한 회사에서 만든 gel을 전기영동하였다. 1×ProSieve EX Running buffer를 이용한 경우에 Tris-glycine SDS buffer를 이용한 표준 방법보다 소요 시간을 50% 이상 줄일 수 있었다. 밴드 해상도 및 migration 결과는 그림 1~3에 나타내었다.

A. PAGEr Gold Gel(Lonza)로 전기영동 비교



B. 1사 gel로 전기영동 비교



C. B사 gel로 전기영동 비교

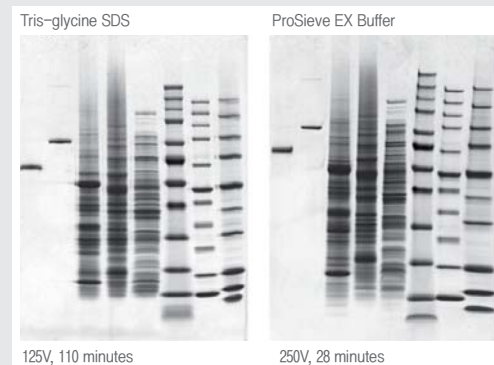


그림 1. Sample loaded from left to right BSA, Phosphorylase B, plant lysate, yeast lysate, *E.coli* lysate, ProSieve QuadColor Protein Ladder, ProSieve Unstained Marker II, ProSieve Unstained Marker I

다양한 제조사에서 만든 gel을 이용하여 표준 Towbin buffer 또는 1× ProSieve EX Transfer buffer의 추천 조건에 따라 단백질 transfer 시간을 비교하였다.

Prestained protein ladder를 단계별로 희석하여 gel에서의 protein transfer를 관찰하였다. ProSieve EX Running buffer와 ProSieve EX transfer buffer를 이용하여 단백질 전기영동과 transfer를 진행한 경우, 시간은 일반적인 running buffer와 transfer buffer를 이용한 시간보다 2/3 정도 줄일 수 있었다(그림 2). Pre-stained protein band로 비교하여 볼 때, transfer 효율은 유사하였다.

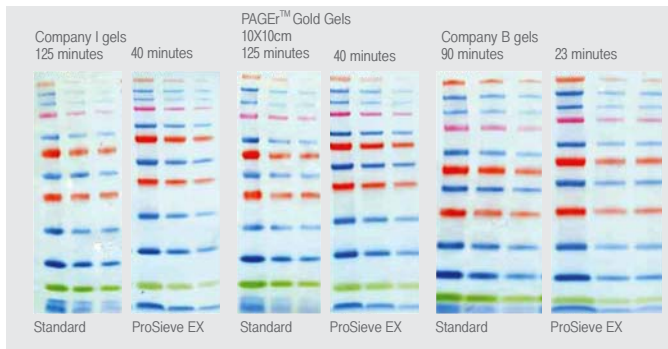


그림 2. Dilutions of ProSieve QuadColor Protein Marker, each dilution a 1:1 from the lane previous, were run on the indicated gel using standard or ProSieve EX Running and Transfer Buffers. The total time to run and transfer is indicated above the image of the blot.

요약

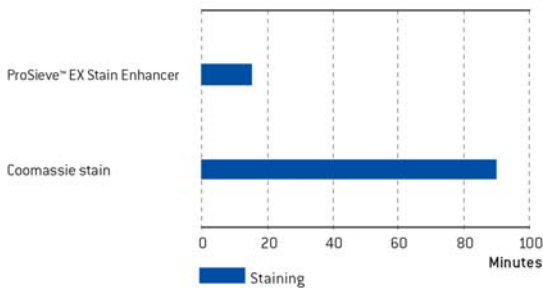
ProSieve EX Running buffer와 ProSieve EX transfer buffer를 이용하면 효율과 해상도는 유지하면서 실험 시간을 단축시킬 수 있다는 것을 확인하였다. 또한 이 버퍼는 시중에 판매되고 있는 표준 Tris-Glycine gel에 이용할 수 있고 각 제조사에서 권장하는 전기영동 조건보다 시간을 절약할 수 있다.

Code	제품명	용량
00200307	ProSieve EX running buffer	1 L
00200309	ProSieve EX western blot	1 L
00201455	ProSieve EX Safe Stain	1 L
00201369	ProSieve EX Stain Enhancer	1 L
00193837	ProSieve QuadColor Protein Marker, 4.6–300 kDa	2 x 250 ul
50550	ProSieve Color Protein Marker, 10–190 kDa	500 ul

License Notice [Buffer technology]

15분 이내에 Protein Staining

Staining in Less than 30 Minutes



제품리스트

Code	제품명	용량	특징
00201455	ProSieve EX Safe Stain	1 L	10분 이내에 protein 염색 가능 non-toxic 1 step
00201369	ProSieve EX Stain Enhancer	1 L	Coomassie stain 과 함께 사용 (염색속도 및 band 선명도 향상) 15분 이내에 protein 염색 가능 2 step

Lonza

- ProSieve EX Safe Stain은 전통적인 protein stain 방법보다 빠르고 안전
- ProSieve EX Stain Enhancer를 CBB 염색전에 추가하면 염색 시간을 단축 시며, intensity를 향상시킴 (destain 과정 필요 없음)

