

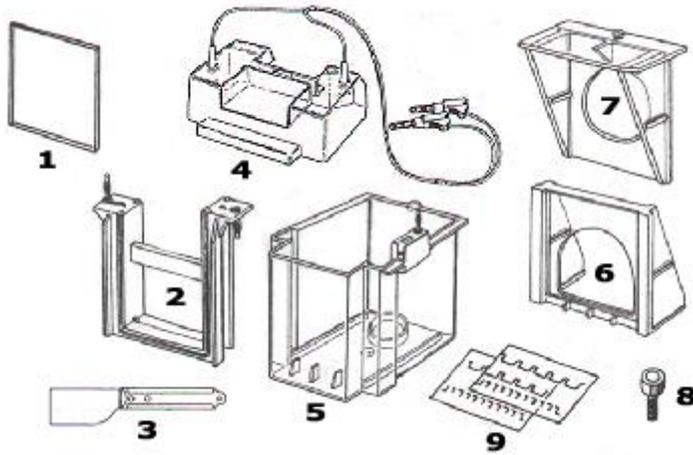
# **KOMA Electrophoresis System**

**EzCell & EzBlot**

**사용설명서**

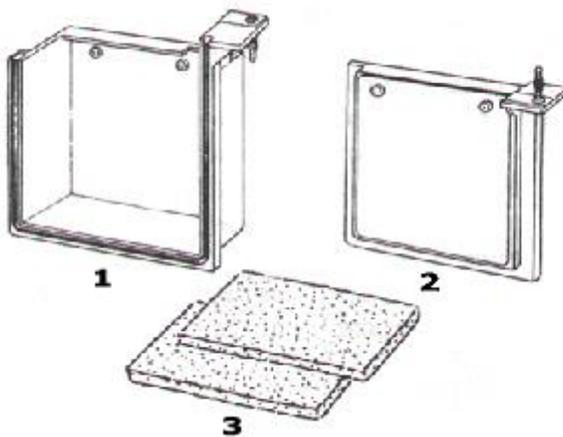
## 1. 기본정보

### A. EzCell Component



1. Buffer Dam
2. Buffer Core
3. Gel Knife
4. Lid
5. 하부 Buffer Chamber
6. 전면썰기 (Front Wedge)
7. 후면썰기 (Rear Wedge)
8. Screw
9. Well Image Film

### B. EzBlot



1. Cathode Core
2. Anode Core
3. Sponge Pad

### C. Kit Specifications

Dimensions:	11 x 12 x 16 cm
상부 Buffer Chamber Capacity:	200 ml
하부 Buffer Chamber Capacity:	600 ml
Material:	Polycarbonate

---

Electrode Wire:	Platinum
Electrical Limits:	1500 VDC or 75 Watts
Temperature Limit:	70°C

## 2. 조립 및 시작

### Gel Cassette 준비

1. 가위를 사용하여 gel cassette pouch를 엽니다.
2. gel packaging buffer를 따라 버립니다.
3. gel cassette를 꺼내어 D.W.로 헹궈냅니다.

**주의:** 항상 Cassette의 모서리를 잡고 작업합니다.

### Sample Loading 준비

1. gel cassette 뒷면 하단의 가로 홈을 덮고 있는 흰색 테이프를 벗겨냅니다.
  2. Loading well이 노출되도록 Gel Cassette에서 Comb을 빼냅니다.
  3. 피펫을 사용하여 1X Running Buffer로 Gel Cassette well을 부드럽게 씻은 다음 Gel을 뒤집거나 흔들어 Buffer를 제거합니다. 이것을 2회 반복합니다. sample wells을 running buffer로 가득 채웁니다.
- 주의:** sample running시 영향을 주지 않도록 모든 sample well에서 air bubble을 제거합니다.

4. Buffer Core 의 음극의 잭이 하부 Buffer chamber 우측 상단의 황동판에 있는 구멍에 맞도록 백금선이 있는 흰색 Buffer Core 를 하부 Buffer chamber 에 장착합니다.

5. 전면 썬치를 Buffer Core 뒤에 삽입하십시오. 수직면이 Buffer Core와 평행을 이루는지 확인하십시오.

6. 하단 Buffer Chamber 에 Gel Cassette 를 삽입하십시오. Gel Cassette 의 짧은 쪽이 Buffer Core 를 향해야 합니다. 한 번에 두 장의 Gel 을 사용하는 경우 하나의 Gel Cassette 를 Core 뒤에 놓고 다른 Gel Cassette 를 Core 앞에 놓으십시오. (이때 Gel cassette 의 짧은 면이 Buffer Core 을 중심으로 마주보아야 합니다.)

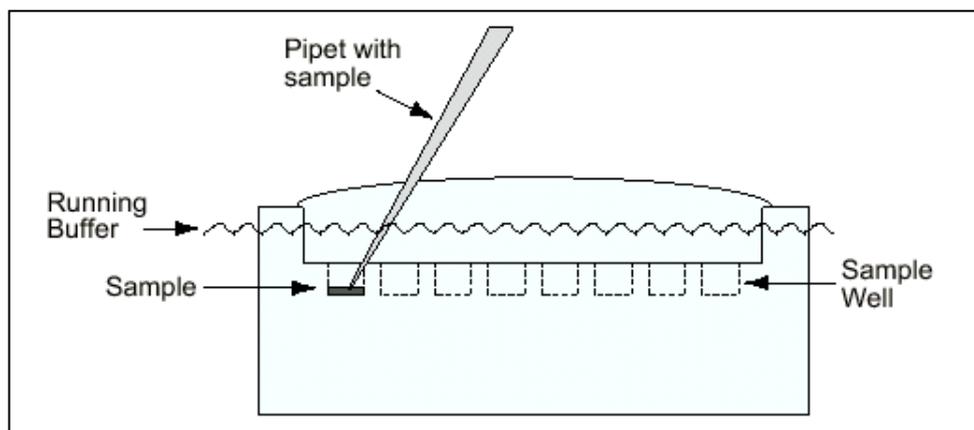
**주의 :**하나의 Gel 만 사용하는 경우 하나의 Gel Cassette 를 제공된 Buffer Dam 으로 교체하십시오.

7. 후면 썬기를 전면 썬기 뒤의 하단 Buffer Chamber로 밀어 넣고 후면 썬기가 안착 될 때까지 아래로 단단히 누릅니다. 엄지손가락으로 누르는 정도의 힘으로도 후면 썬기를 충분히 고정할 수 있습니다.
8. Ezcil 장착 시 시스템에 제공된 나사를 사용하지 마십시오. 나사는 Running 완료 후 썬기를 손으로 풀 수 없는 경우 키트를 분해하는 데 사용됩니다. 완전히 조립되었고 Gel Cassette-Buffer Core 조합이 제 위치에 있는지 확인하십시오.

### 3. SAMPLE LOADING 및 전개 진행방법

1. 원하는 단백질 농도에서 적절한 sample Buffer를 사용하여 sample을 준비하십시오.
2. 적절한 Running buffer를 준비하십시오.
3. 상부 Buffer Chamber (음극)는 Buffer Core 의 각 측면에 2 개의 Gel Cassette (또는 하나의 Gel Cassette 와 Buffer Dam)를 장착했을 때 형성되는 차단된 공간입니다.
4. sample well 이 완전히 잠길 때까지 상부 Buffer Chamber 에 Running Buffer 를 채웁니다. (200 ml)
5. 상부 Buffer Chamber에서 buffer가 새지 않는지 확인하십시오. Running Buffer가 새어서 떨어지면 전기 영동 Core와 Gel Cassette가 제대로 장착되지 않은 것입니다. 조립 및 시작의 5-8 단계를 반복하십시오.
6. Gel loading well에 sample을 Loading 합니다. 팁을 sample well의 바닥으로 내리고 sample과 다른 well을 오염시키지 않고 sample을 well에 천천히 피펫팅 합니다.

**Note:** 최상의 실험 결과와 stacking의 균일성을 얻으려면 모든 well에 sample Buffer를 채울 것을 권장합니다 (빈 well에도 sample buffer를 채웁니다.)



7. 하부 Buffer tank의 전면과 상부 buffer chamber 사이에 형성된 공간을 통해 Running Buffer를 주입하여 하부 (양극) Buffer Chamber를 채웁니다. Gel Cassette 하단의 가로 홈을 덮기에 충분하도록 (200ml) Buffer를 채웁니다.

**Note:** 절대로 buffer를 가득 채우지 마십시오.

8. Buffer Core의 덮개를 맞춥니다. (-) 전극이 오른쪽의 바나나 플러그 위에 정확히 삽입된 경우에만 덮개를 단단히 장착 할 수 있습니다.

**Note:** 덮개가 제대로 장착되지 않으면 EzCell을 통해 전원이 공급되지 않습니다.

9. 전원이 꺼져 있는지 확인한 다음 전극 코드를 전원 공급 장치 (빨간색 : (+) 잭, 검은 색 : (-) 잭)에 연결하십시오.

10. 전원을 켜십시오.

## 4. EzCell의 분리

1. 전개를 마친 후, power supply의 전원을 끄고 power supply와 연결된 EzCell의 연결 Jack을 분리합니다.

2. lid 와 후면 썰기(rear wedge)를 제거합니다. 후면 썰기(rear wedge)는 도구를 사용하지 않고 손으로 썰기를 좌우로 흔들어서 제거합니다.

주의: 손으로 후면 썰기를 느슨하게 할 수 없는 경우에만 손잡이 나사(Screw)를 사용합니다. 후면 썰기의 가운데 나사 구멍에 나사를 끼웁니다. 썰기가 느슨해 때까지 부드럽게, 시계 방향으로 돌립니다.

3. gel cassette를 분리합니다. Gel cassette는 각 가장자리를 잡아서 옮깁니다.

4. gel cassettes 를 편평한 바닥에 (well side가 위로 향하게) on a flat surface, such as the benchtop. Allow one edge to hang ~ 1cm over the side of the benchtop.

5. Gel Knife의 경사진 날을 gel cassette의 가장자리의 판과 판사이의 틈에 주의하여 끼웁니다.

주의: 너무 힘주어 the cassette plates사이에 gel knife의 날을 끼우면 gel에 상처가 날수 있으므로 주의합니다.

6. gel knife를 부드럽게 비틀어서 gel cassette의 앞판과 뒷판을 분리합니다. 한번에 크게 힘을 주어 분리하는 것이 아니고 분리하는 위치를 옮겨가며 여러 번 나누어 분리합니다.

7. cassette를 돌려가며 step 5와 6을 반복하여 두 개의 cassette plate를 완전히 분리 합니다.

8. 손으로 주의하여 상단이 요철모양인 “notched” plate를 떼어 내면 gel은 가로 홈이 있는 하단 plate에 남습니다.

**주의:** 이 단계에서 gel을 분리하다가 gel이 찢어지는 경우가 있습니다. Gel의 분리는 step 9에서 하는 것이 좋습니다.

9. Gel Knife를 이용하여 gel의 불필요한 부분을 제거합니다. Gel Knife는 gel이 올려진 하단 plate에 90°각도로 세웁니다. Gel knife를 한번에 눌러서 gel을 자릅니다. 과정을 반복하여 나머지 부분을 모두 자릅니다.

10. 하단 plate를 뒤집어서 gel을 blotting, fixing 또는 염색용액이 담긴 모서리가 둥근 용기에 집어 넣습니다. Gel Knife를 이용하여 gel의 하단 모서리를 살짝 들어 용기로 부드럽게 떨어뜨립니다

11. 이후에는 원하는 대로 Fixing 하거나, 염색하거나 또는 membrane transfer 를 합니다.

## 5. BLOTING 순서

### 1. Transfer Buffer 준비

Koma Tris-Glycine Transfer Buffer (Cat. No. K0341001)의 사용을 권장합니다. 이 buffer는 EzCell 안에서 성공적인 transfer를 위한 충분한 ionic strength를 제공합니다. Blot Module은 과도한 열을 발생하지 않습니다.

#### **Tris Glycine 또는 Tricine Gels의 blotting:**

Tris-Glycine Transfer Buffer (25X)를 이용한 1000 ml의 Transfer buffer의 제작은 다음과 같습니다. :

Tris-Glycine Transfer Buffer (25X)	40 ml	
Methanol		200 ml
Deionized Water	760 ml	
-----		
Total Volume	1000 ml	

### 2. Blotting Pad의 준비

700 ml의 transfer buffer에 blotting pad를 담가서 완전히 적십니다. until saturated. Transfer buffer에 담가 놓은 상태에서 blotting pad를 짜내어 air bubble을 완전히 제거합니다. air bubble을 제거하는 것은 transfer시 air bubble이 biomolecule의 이동을 저해하는 것을 막는데 효과적입니다.

### 3. Transfer Membrane과 Filter Paper의 준비

선택한 transfer membrane과 filter paper를 gel의 크기에 맞춰 자르거나 Koma pre-cut membrane/filter paper sandwich를 사용합니다.

- **PVDF membrane:** PVDF membrane을 30초간 methanol, ethanol, 또는 isopropanol에 담가 활성화 시킵니다. 즉시 D.W.로 membrane을 헹군 후 50-100 ml의 Transfer buffer가 담긴 용기에 수 분간 membrane을 담급니다.
- **Nitrocellulose/Nylon membrane:** membrane을 Transfer buffer가 담긴 용기에 직접 수 분간 담급니다.
- **Filter paper:** 사용직전에 transfer buffer에 담가서 적시고 즉시 사용합니다.
- **Gel:** gel은 running 직후 바로 Transfer를 진행합니다. Transfer buffer에 미리 담그지 않습니다.

### 4. 전기영동 후 Gel을 분리한 다음 membrane Transfer 절차

전기영동이 종료된 이후에 transfer 하기 위해 Gel을 분리하는 방법이 아래에 나와 있습니다. 만약 즉시 transfer 할 준비가 되지 않았다면 5 V의 낮은 전압으로 전기영동 상태를 유지 할 수 있습니다. transfer준비가 될 때까지 이 상태로 몇 시간 정도 gel을 유지 할 수 있습니다.

1) 전기영동을 마친 후 gel Knife를 이용하여 gel cassette의 3면의 접착면을 분리하고 손으로 주의하여 상단이 요철모양인 "notched" plate를 떼어 내면 gel은 가로 홈이 있는 하단 plate에 남습니다.

**주의:** gel knife를 이용할 때 과도한 힘을 주어 gel이 찢어지지 않도록 합니다.

2) gel의 well 부분을 gel knife를 이용하여 제거합니다.

3) 미리 적셔진 filter paper (이전 내용에서 설명한대로 준비된)를 gel의 상단에 두고 gel의 하단 방향으로 밀착시킵니다. 이때 filter paper 밖으로 덮이지 않은 gel이 남을 수 있는데 그대로 둡니다. Filter paper는 transfer buffer에 완전히 적셔진 상태로 유지되어야 하고 gel과 paper사이에 갇힌 air bubble은 glass pipette같은 도구를 roller 처럼 이용하여 paper 표면을 부드럽게 밀어서 모두 제거 합니다.

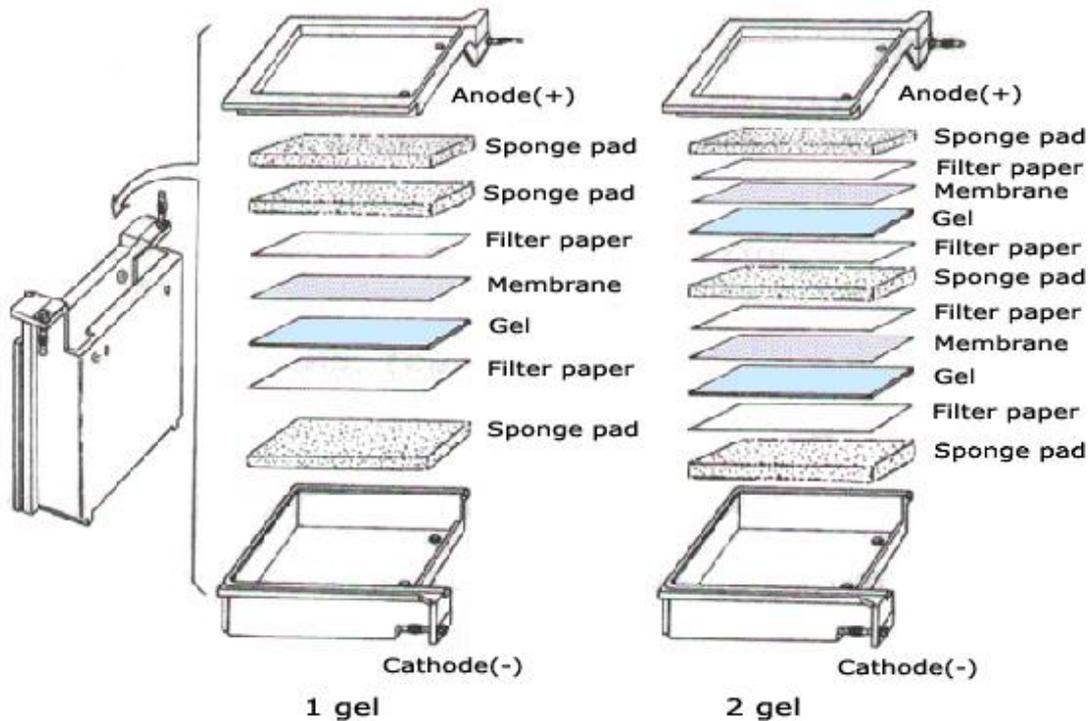
4) plate를 뒤집어서 gel위에 접착된 filter paper가 장갑을 낀 손 또는 깨끗한 Parafilm 조각 위에 향하도록 합니다.

5) 젤 나이프를 사용하여 cassette plate의 긴 가로 홈을 누르면 gel의 올라온 요철부가 밀려나가면서 gel이 쉽게 떨어져 나옵니다.

6) 편편한 표면에 gel을 올려 놓고 gel knife를 이용하여 filter paper로 덮이지 않은 여분의 gel을 잘라 냅니다.

**주의:** gel을 일단 cassette에서 분리하면 즉시 transfer를 진행해야 합니다.

- 7) gel을 Transfer buffer로 적시고 그 위에 Transfer buffer로 미리 적셔진 transfer membrane을 올려놓습니다. glass pipette같은 도구를 roller 처럼 이용하여 paper 표면을 부드럽게 밀어서 air bubble을 모두 제거 합니다.
- 8) 밀 transfer buffer로 적셔진 filter paper를 Transfer membrane 위에 올려 놓습니다. 7)에서와 같이 air bubble을 제거 합니다.
- 9) transfer buffer로 적신 두 개의 blotting pad를 blot module의 음극 core에 넣습니다. 음극 core는 두 개의 core중 보다 깊이가 깊고 전극판은 회색을 띄고 있습니다.  
 앞서 준비한 paper+gel+membrane+paper 조합을 장갑을 낀 손으로 주의하여 blotting pad 위에 순서대로 올려 놓습니다. 그럼 gel이 음극 core에 더 가깝게 위치 합니다. (아래 그림 참조)



- 10) 미리 transfer buffer에 적셔 놓은 blotting pad를 추가로 충분히 넣어서 음극 core의 테두리 위로 0.5cm 나오도록 합니다. 양극 core를 그 위에 올려 놓습니다. gel/membrane 샌드위치는 blot module의 두 절반 사이에 단단히 고정되어 모든 구성 요소가 기포 없이 완전히 접촉되도록 해야 합니다.

**Note:** 여러 번 사용한 blotting pad는 복원력이 저하됩니다. 이런 경우에 충분한 고정을 위해 추가 pad를 사용해야 합니다. Pad가 복원력이 저하되고 변색되기 시작하면 교체해야 합니다.

- 11) gel membrane 샌드위치와 blotting pad를 포함한 blot module의 음극 core는 장치의 바닥에 수평으로 맞도록 위치해야 합니다. pad와 membrane 샌드위치가 제 위치에 있을 때 전극 상단으로부터 약 1cm의 간격이 있어야 합니다.
- 12) 조합된 blot module 을 앞뒤로 단단히 잡고 하부 buffer chamber 의 유도 홈에 밀어 넣습니다. Blot module 은 단 한 방향으로만 장치에 끼워지므로 (+) 기호는 Blot module 의 왼쪽 상단 모서리에서 볼 수 있습니다. blot module 의 음극의 잭이 하부 Buffer chamber 우측 상단의 황동판에 있는 구멍에 맞도록 하부 Buffer chamber 에 장착합니다.
- 13) 사용 중인 EzCell에 따라 (나사 구멍 없는) 전면 썬치를 먼저 끼워 썬치의 수직면이 Blot Module에 맞도록 하십시오. 후면 썬치를 밀어 넣고 단단히 눌러 고정합니다.  
**주의:** 썬치들을 적절히 끼우면 후면 썬치가 하부 buffer chamber의 상단에 수평으로 밀착되지 않습니다. 후면 썬치와 하단 buffer chamber 사이에 간격이 있는 것이 정상적으로 설치된 것입니다.
- 14) blot module에 gel/membrane sandwich 가 잠길 때까지 transfer buffer 채웁니다. 과전류와 열을 발생시킬 수 있기 때문에 transfer buffer를 blot module에 완전히 가득 채우면 안됩니다.
- 15) blot module 전면과 하단 buffer chamber 사이의 틈새에 약 650ml의 D.W.를 채웁니다. 수위가 하단 buffer chamber의 상단에서 약 2 cm에 도달해야 합니다. 이것은 transfer 도중에 발생하는 열을 냉각시키는 역할을 합니다.  
**Note:** 실수로 하단 buffer chamber에 transfer buffer를 채워도 transfer에 악영향을 주지는 않습니다. 다만 냉각수 역할로 D.W.를 첨가하는 것을 권장하는데 EzCell 장비는 메탄올에 취약하기 때문에 메탄올이 첨가된 transfer buffer 보다는 D.W.가 좋습니다.
- 16) 뚜껑을 blot module이 장착된 unit의 위에 Jack의 위치에 맞게 덮습니다.
- 17) power가 꺼진 상태에서, 뚜껑의 검정 cable과 빨강 cable의 전극코드를 power supply의 Jack에 삽입하고 전원을 올립니다.

## 6. 전개 조건

Gel Type	Running Condition	Transfer Condition		
		Transfer Buffer (1x)	Membrane	Transfer Condition
Tris-Glycine Gel	Voltage: 125V constant Current: Power Supply의 최대치로 전류 설정 Run Time: ~ 90 min	Transfer Buffer 에는 20% methanol 을 첨가한다. 1X Transfer Buffer는	Nitrocellulose or PVDF	25 V constant for 1-2 hours Current: Power Supply 의 최대치로 전류 설정
Tricine Gel	Voltage: 125V constant Current: Power Supply의 최대치로 전류 설정 Run Time: ~ 90 min	SDS or methanol첨가 이전에 pH 8.3이어야 한다. 산과 염기를 써서 pH를 조정할 필요는 없다.		
IEF pH 3-7	Voltage: 100V 1hr 200V 1hr 500V 30 min Current: Power Supply의 최대치로 전류 설정 Run Time: ~ 2.5 hours	0.7% acetic acid, pH 3.0	Nitrocellulose or PVDF	10 V constant for 1 hour Current: Power Supply 의 최대치로 전류 설정
IEF pH 3-10	Voltage: 100V 1hr 200V 1hr 500V 30 min Current: Power Supply의 최대치로 전류 설정 Run Time: ~ 2.5 hours			

## 7. TECHNICAL QUESTION

### A. EzCell

**질문: 전개시간이 평소보다 오래 걸립니다.**

원인:

- a. Buffer가 너무 희석되었습니다.
- b. 상부 buffer chamber가 썩습니다.

해결 방법:

- a. buffer recipe 확인 : 필요하면 다시 제조합니다.
- b. buffer core를 정 위치에 맞게 장착하고 gel cassette와 전면쌈지를 넣고 후면 쌈지를 눌러서 잘 고정합니다.

**질문: power supply에 전류가 0이거나 매우 낮게 표시됩니다.**

원인:

- a. cassette 하단의 흰색 tape을 떼지 않았습니다.
- b. power supply의 연결이 잘못 되었습니다.
- c. Buffer 높이가 충분하지 않습니다.

해결 방법:

- a. cassette 하단의 흰색 tape을 제거합니다.
- b. volt meter를 이용하여 Power supply의 연결을 확인합니다.
- c. upper buffer (음극)의 수위가 gel의 well을 잠기도록 합니다.  
lower buffer의 수위를 gel 하단의 가로 홈이 잠기도록 유지합니다.

**질문: Running 속도가 빠르고 전개 해상도가 나쁩니다.**

원인:

- a. Buffer가 너무 농축되었거나 적절하지 않은 buffer입니다.
- b. 전압, 전류 또는 전력이 너무 높습니다.

해결:

- a. buffer recipe를 확인하고 희석하거나 다시 만듭니다.
- b. power 조건을 낮춰서 running 조건에 맞도록 조정합니다.

## B. EzBlot

**질문: membrane에 단백질이 전혀 옮겨지지 않습니다.**

원인:

Gel/membrane sandwich 조합의 방향이 반대방향으로 되어 단백질이 buffer로 이동되어 빠져나갔습니다

해결:

Gel/membrane sandwich 를 정확한 방향에 맞춰 조합합니다.

**질문: 상당한 양의 단백질이 membrane을 통과해 빠져 나갔음이 filter paper위에 나타난 단백질로 확인되었습니다**

원인:

너무 장시간 transfer하였거나, SDS 또는 methanol의 양이 적절치않았거나 sample 양이 너무 많았습니다

해결:

사용하는 gel의 acrylamide percentage를 다시 확인합니다.

15분 단위로 transfer 시간을 줄여 봅니다.

transfer buffer에 SDS가 포함되어 있다면 제거 합니다.

만약 nitrocellulose membrane을 사용 중이라면 단백질 결합력이 높은 PVDF membrane으로 교체합니다.

Methanol을 첨가하면 membrane의 결합력을 높일 수 있습니다.

Gel에 loading하는 sample의 양을 줄입니다.

**질문: 상당한 양의 단백질이 transfer 후에도 gel에 남아 있음이 염색을 통해 확인됩니다.**

원인:

너무 단시간 transfer하였거나, SDS 또는 methanol의 양이 적절치 않았습니

다 분자량이 큰 단백질은 일반적으로 저분자 단백질에 비해 완벽하게 transfer 되지 않고 남아 있습니다.

해결:

보다 적합한 낮은 %의 gel로 바꿉니다.

Blotting 시간을 15분 정도 늘립니다.

단백질의 이용이 용이하도록 0.01% 에서 0.02% SDS를 transfer buffer에 첨가합니다.

transfer buffer내의 methanol의 양을 줄입니다.

**질문: transfer buffer 의 pH가 Transfer시 0.2 pH단위만큼 오차가 있습니다.**

원인:

Buffer가 적절하게 만들어지지 않았습니

다

사용시약과 수질을 확인 후 buffer를 다시 만듭니다.  
산이나 염기를 써서 pH를 조정하지 않습니다.  
이것은 전기전도도를 증가시켜서 결과적으로 transfer시 고전류 상태를 만듭니다.

**질문: 시작전류보다 transfer시 전류가 많이 높습니다.**

원인:

농축된 buffer를 사용하였습니다. Concentrated buffer used  
Buffer 제작 시 Tris Base 대신 Tris HCl을 사용하였습니다.

해결:

Buffer를 희석 시 주의합니다.  
제작 시 필요한 시약을 다시 확인하고 정확한 시약을 이용하여 buffer를 다시 제작 합니다.

**질문: 시작전류에 비해 transfer시 전류가 많이 낮습니다.**

원인:

Buffer가 많이 희석되어 저항은 높아지고 전류는 낮아졌습니다.  
장치의 전기회로에 단락이 있습니다. (전극파손)  
blot module에 균열이 있어서 buffer의 양이 줄어 드는 것이 육안으로 확인됩니다.

해결:

transfer buffer 를 정확하게 다시 만듭니다.  
blot module확인하고 전극의 결합을 다시 확인합니다  
blot module이 정확히 잘 맞물려 조립되어 새는 곳이 없는지 확인합니다.

**질문: Power supply가 blotting 조건 사용 중에 꺼집니다.**

원인:

transfer buffer가 높은 이온 강도를 지닙니다.  
Power supply가 장비의 전류 한계치 근처에서 작동합니다.

해결:

정확한 buffer 조성으로 buffer를 다시 만듭니다.  
더 높은 한계치를 가진 power supply를 사용합니다.

**질문: band가 퍼지거나 membrane에 소용돌이 무늬가 생깁니다.**

원인:

gel과 membrane의 밀착이 제대로 되지 않았습니다.  
Gel과 membrane에 가해진 압력이 너무 세거나 너무 약합니다.

해결:

gel과 membrane이 잘 밀착하도록 합니다.  
blotting pad는 모든 기포를 제거하고 transfer buffer로만 채웁니다.

blotting pad를 추가하거나 제거하여 gel에 가해지는 압력이 적절하도록 조절합니다.

**질문: membrane상에 비어 있는 점이 생깁니다.**

원인:

Gel과 membrane사이에 기포가 있어서 단백질의 이동을 방해하였습니다.  
유효기간이 지났거나 변질된 membrane을 사용하였습니다.

해결:

gel과 membrane을 잘 밀착하도록 합니다.  
변질되지 않은 새로운 membrane을 사용합니다.

**질문: PVDF membrane의 transfer 효율이 낮습니다.**

원인:

Membrane에 적절한 전처리를 하지 않았습니다.  
membrane과 gel의 밀착이 잘되지 않았습니다.  
과도한 압력으로 gel이 눌러서 납작해졌습니다

해결:

methanol 또는 ethanol에 PVDF membrane을 미리 적십니다.  
오래 사용한 blotting pad를 새것으로 교체 합니다.  
blotting pad를 줄여서 gel과 membrane에 과도한 압력이 가해지지 않도록 합니다.

**질문: western blot의 background가 높습니다.**

원인:

비특이적 결합에 대한 blocking이 충분하지 않습니다.

해결:

blocker의 농도를 높이거나 blocking 시간을 늘립니다.