



SMP30 (Senescence Marker Protein 30) Regucalcin Gluconolactonase (GNL) WesternBlot · ImmunoStain Kit

Catalog Number : R01K01

Kit component

Antibody : Rabbit anti SMP30 · GNL antibody 0.1 mL
10 mM Tris (pH 7.4), 0.14 M NaCl
This kit does not contain NaN₃

Specimen : SMP30 · GNL Knockout Mouse Liver 2 slides
Wild type Mouse Liver 2 slides

Tissue extract : SMP30 · GNL Knockout Mouse Liver 30 μL
(Protein concentration 0.4 mg/mL)
Wild type Mouse Liver 30 μL
(Protein concentration 0.4 mg/mL)

Storage and Stability : -20 °C, 2 years

【Antibody】

SMP30 (Senescence Marker Protein 30) IgG

Gluconolactonase (GNL) IgG

Regucalcin IgG

★ SMP30, Gluconolactonase and Regucalcin are all identical protein.

Rabbit Polyclonal Antibody (Purified IgG Fraction)

Volume : 0.1 mL

Antigen : Rat SMP30 purified from rat liver, Molecular weight 34 kDa

Host : Rabbit

Supplied As : IgG fraction purified from rabbit serum.
Prepared in 10 mM Tris (pH 7.4), 0.14 M NaCl.

Storage and Stability : -20 °C, 2 years

Tested applications : • Immunofluorescence (1:100-1:500 dilution)
• immunohistochemistry (1:100-1:500 dilution)
• Western Blot (1:1,000-1:3,000 dilution)

Cross Reactivity : Cross reacts with Human, Mouse and Rat SMP30.
Not yet tested in other species.

【Sample Preparation for Western blot】

SMP30 · GNL Knockout Mouse Liver 30 μ L (Protein concentration 0.4 mg/mL)

Wild type Mouse Liver 30 μ L (Protein concentration 0.4 mg/mL)

1. Add 30 μ l SDS-PAGE Lysis Buffer.
2. Boil at 95°C for 5 minutes and cool on ice.
3. Centrifuge at 10,000 rpm for 5 minutes and transfer the supernatant to a fresh tube.
4. Load the sample 10 μ L (Protein 2 μ g) per lane.

2X SDS-PAGE Lysis Buffer

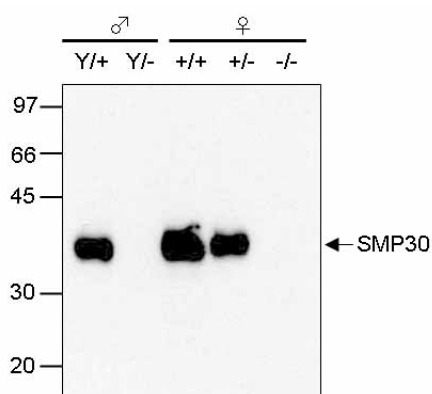
125 mM Tris-HCl, pH 6.8

4% SDS

10% 2-mercaptoethanol

20% glycerol

0.01% bromophenol blue (BPB)

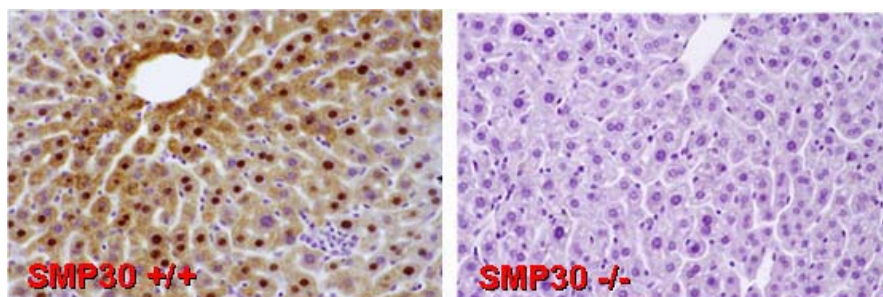


【Western Blot Analysis】

Each lanes : Mouse Liver Extract

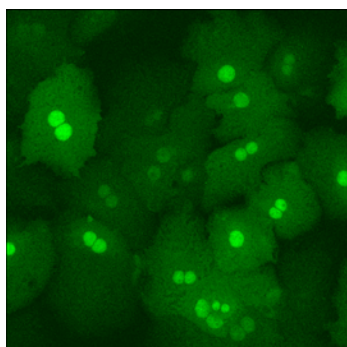
- Wild type Mouse : SMP30Y/+ and SMP30+/+
- SMP30 Knockout Mouse : SMP30Y/- and SMP30-/-
- Heterozygous Mouse : SMP30+/-

SMP30 · GNL antibody at 1:1,000 dilution used.



【Immunohistochemical staining】

Mouse liver stained with SMP30 · GNL antibody at 1:300 dilution and developed by 3,3'-diaminobenzidine. Nucleus and cytoplasm of wild type (SMP30+/+) mice stained, but not stained in liver from SMP30 knockout (SMP30-/-) mice.



[Immunofluorescence staining]

Primary cultured mouse hepatocytes stained with SMP30 · GNL antibody at 1:200 dilution. Nucleus and cytoplasm stained in green.

References :

1. Ishigami, A. et al., Senescence marker protein-30 knockout mouse liver are highly susceptible to TNF-alpha- and Fas-mediated apoptosis. *Am. J. Pathol.* 161 1273-1281 (2002)
2. Ishigami, A. et al., Nuclear localization of senescence marker protein-30 (SMP30) in cultured mouse hepatocytes and its homology to RNA polymerase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 158-160 (2003)
3. Kondo, Y. et al., Senescence Marker Protein 30 Functions as Gluconolactonase in L-Ascorbic Acid Biosynthesis and Its Knockout Mice Are Prone to Scurvy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103 5723-5728 (2006)
4. Sato, T. et al., Senescence Marker Protein-30 Protects Mice Lungs from Oxidative Stress, Aging and Smoking. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174 530-537 (2006)

For Research Use Only





品番 R01K01

SMP30・Gluconolactonase (GNL) ウェスタンブロット・免疫組織染色キット

キット内容物

- 抗体： ウサギ抗 SMP30・GNL 抗体 0.1 mL
10 mM Tris (pH 7.4), 0.14 M NaCl (NaN₃ を含まない)
★本キットに含まれる抗体は NaN₃ を含んでいない。
抗体の性質は下記参照*¹⁾。
- 未染標本： SMP30・GNL ノックアウトマウス肝臓 2 枚
野生型マウス肝臓 2 枚
- 組織抽出液： SMP30・GNL ノックアウトマウス肝臓 30 μL (タンパク濃度 0.4 mg/mL)
野生型マウス肝臓 30 μL (タンパク濃度 0.4 mg/mL)
- 安定性、保存： 抗体、未染標本、組織抽出液 -20℃保存、2 年

* 【抗体の性質】

抗ラット加齢指標蛋白質 30 ポリクローナル抗体

Senescence Marker Protein 30 (SMP30) IgG

抗ラットグルコノラクトナーゼ (GNL) ポリクローナル抗体

Gluconolactonase (GNL) IgG

抗ラットレギュカルシンポリクローナル抗体

Regucalcin IgG

★ SMP30, Gluconolactonase, Regucalcin は全て同一分子である。

ウサギ IgG 分画

Rabbit anti-rat SMP30・GNL IgG

容量： 0.1 mL

免疫抗原： ラット SMP30・GNL・Regucalcin (ラット肝臓より精製)、分子量 34 kDa

免疫動物： ウサギ

由来： 血清

性状： 10 mM Tris (pH 7.4), 0.14 M NaCl (NaN₃ を含まない)

安定性、保存： -20℃保存 (融解後、2~8℃保存で 1 年)

用途： 免疫組織染色 (100~500 倍希釈)

ホルマリン固定・パラフィン包埋切片、酵素抗体法

4%パラホルムアルデヒド固定・凍結切片、蛍光抗体法

ウェスタンブロット検出 (1,000~3,000 倍希釈)

種交差性： ラット、マウス、ヒト SMP30・GNL・Regucalcin と反応する。他の種については調べていない。

A. SMP30 免疫組織染色プロトコール

【ホルマリン固定パラフィン包埋切片の場合】

1. 脱パラフィン

キシレン I	5 分
キシレン II	5 分
キシレン III	5 分
100%エタノール	5 分
100%エタノール	5 分
95%エタノール	5 分
90%エタノール	5 分
80%エタノール	5 分
70%エタノール	5 分
PBS で洗淨 (3 回)	5 分

2. 抗原賦活処理

- 加熱処理 (マイクロウェーブ・オートクレーブ・温浴など)

【マイクロウェーブを用いた加熱処理方法】

耐熱性容器にスライドガラス上の組織が0.01 Mクエン酸バッファー (pH 6.0) に十分に浸るようにする。電子レンジで5分間、加熱する。途中、吹き零れそうになったら、電子レンジを止めて沸騰がおさまってから再び加熱する。加熱後、5分間冷ます。再び、電子レンジで5分間、加熱する。この時、組織が乾かないように、クエン酸バッファーが充分にあることを確認しておく。

- 酵素処理 (トリプシン・ペプシン・Proteinase K など)

3. クエンチング

- Peroxidase で発色する場合、内因性 Peroxidase のブロッキング
1% 過酸化水素/メタノール溶液 15 分
反応後、PBS で洗淨 (3 回) 5 分
- アビジン-ビオチンの系を使用する場合、内因性ビオチンのブロッキング
15 mM NaN₃ 含 0.1%アビジン溶液 10 分
反応後、PBS で洗淨 (3 回) 5 分

4. 非特異的反応の阻止

ブロッキング液 2%BSA/PBS-2%ヤギ血清 30 分
(2%BSA/PBS にヤギ血清が終濃度 2%になるように調製)

5. 一次抗体の反応

一次抗体 ウサギ抗 SMP30・GNL 抗体 100~500 倍希釈
希釈は、ブロッキング液で行う。

湿潤箱で 37°C、2 時間反応させる（4°Cで一晩反応させてもよい）。
反応後、PBS で洗浄（3 回）

6. 二次抗体の反応（各社から様々な抗体、キットが販売されている）

標識（HRP・FITC）二次抗体を使用する方法

ビオチン化二次抗体を使用する方法

ENVISION（DAKO 社製）を使用する方法など

反応後、PBS で洗浄（3 回）

7. 発色（Peroxidase 発色の場合）

DAB（ジアミノベンチジン）タブレット（シグマ社、DAKO 社製）を溶解して調製

DAB 基質溶液を切片上に滴下

発色させた後、蒸留水で反応停止

8. 対比染色（核染色）

マイヤーのヘマトキシリン液（または 3%メチルグリーン）で対比染色

染色後、流水で洗浄脱色 10~15 分

9. 脱水・透徹

80%エタノール 5分

90%エタノール 5分

100%エタノール 5分

100%エタノール 5分

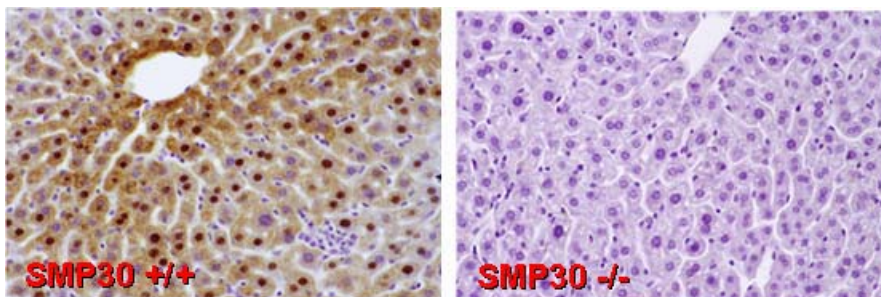
キシレン I 5分

キシレン II 5分

キシレン III 5分

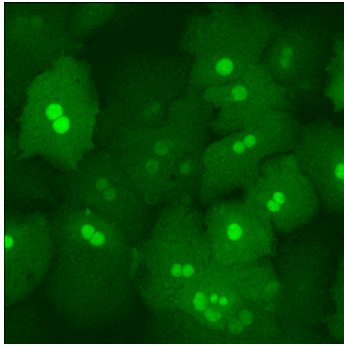
10. 封入

マウントメディウムで封入



【免疫組織染色】

マウス肝臓を 300 倍希釈ウサギ抗 SMP30・GNL 抗体で免疫染色した。発色は、ジアミノベンチジン(3,3'-diaminobenzidine)で行った。野生型マウス(SMP30+/+)の肝臓では核と細胞質が染まっている。一方、SMP30・GNL ノックアウトマウス(SMP30-/-)では全く染まっていない。



【蛍光免疫染色】

マウス初代培養肝実質細胞を 200 倍希釈ウサギ抗 SMP30・GNL 抗体で蛍光染色した。肝細胞の核と細胞質が緑色に染まっている。

B. SMP30 ウェスタンブロットプロトコール

1. 泳動用サンプル調製（キット内容物）

- ① SMP30・GNL ノックアウトマウス肝臓（タンパク濃度 0.4 mg/mL）30 μ L
 - ② 野生型マウス肝臓（タンパク濃度 0.4 mg/mL）30 μ L
- ①、②に同量の 2X SDS-PAGE Lysis Buffer（30 μ L）を加え、95°C、煮沸水浴中で 5 分間加熱する。直ぐに氷上で冷却し、遠心分離（10,000 rpm、5 分間）後、上清を別のチューブに移し、泳動用サンプルとする。
- 1 レーンあたり 10 μ L（1 レーンあたりのタンパク量は 2 μ g）泳動する。

2X SDS-PAGE Lysis Buffer（泳動時には 1X 濃度）

125 mM Tris-HCl, pH 6.8
4% SDS
10% 2-mercaptoethanol
20% glycerol
0.01% bromophenol blue (BPB)

2. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

3. 膜への転写（膜は各社から販売されている）

ニトロセルロース膜
PVDF 膜 など

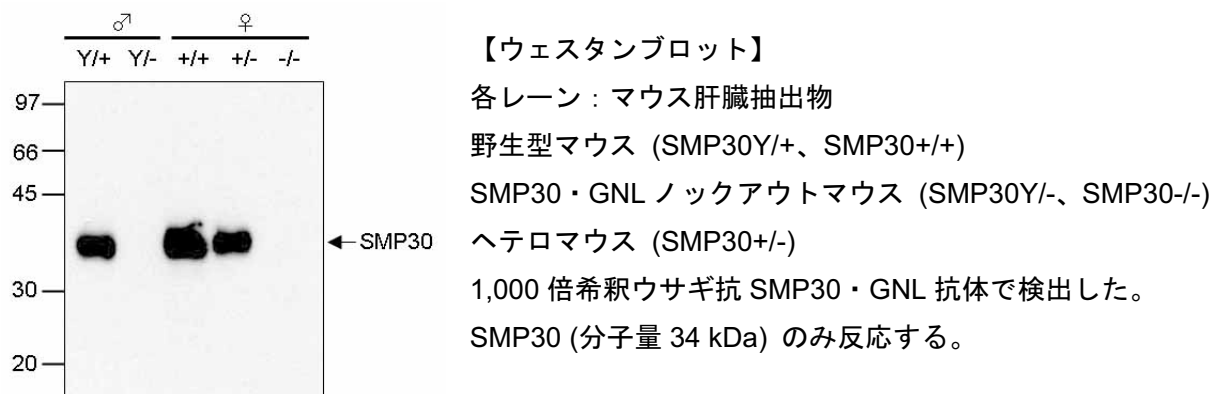
4. 一次抗体の反応

一次抗体 ウサギ抗 SMP30・GNL 抗体 1,000~3,000 倍希釈
ブロッキング液 5%スキムミルク/TBS（0.1% Tween 20 を含む） 30 分
室温、3 時間反応させる（4°Cで一晩反応させてもよい）。

TBS

10 mM Tris-HCl, pH 7.5
140 mM NaCl

5. 二次抗体の反応（二次抗体は各社から販売されている）
ヤギ抗ウサギ HRP 標識 IgG を二次抗体に使用する方法
ブロッキング液 5%スキムミルク/TBS（0.1% Tween 20 を含む） 30 分
室温、1 時間反応させる。
6. 検出方法（各社から検出試薬が販売されている）
ケミルミネッセンス（化学発光）を使用する方法



参考文献：

1. Ishigami, A. et al., Senescence marker protein-30 knockout mouse liver are highly susceptible to TNF-alpha- and Fas-mediated apoptosis. *Am. J. Pathol.* 161 1273-1281 (2002)
2. Ishigami, A. et al., Nuclear localization of senescence marker protein-30 (SMP30) in cultured mouse hepatocytes and its homology to RNA polymerase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 158-160 (2003)
3. Kondo, Y. et al., Senescence Marker Protein 30 Functions as Gluconolactonase in L-Ascorbic Acid Biosynthesis and Its Knockout Mice Are Prone to Scurvy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103 5723-5728 (2006)
4. Sato, T. et al., Senescence Marker Protein-30 Protects Mice Lungs from Oxidative Stress, Aging and Smoking. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174 530-537 (2006)

〒174-0063 東京都板橋区前野町 3-6-10
株式会社シマ研究所