

Easy-WESTERN-II Quick

ウェスタンブロットング用一次抗体検出試薬キット

(ワンステップ、同時検出用)

取扱説明書

Beacle, Inc.
KYOTO JAPAN

(試薬の保存と取扱上の注意)

1. 本試薬到着後、抗体検出試薬(MAD 試薬)は速やかに-20℃で保存ください。また、使用後も速やかに-20℃に保存してください。劣化の原因となります。
2. 希釈バッファー(10倍濃縮)は希釈後4℃で保存ください。
3. マーカー検出試薬、及びマウス IgG 増感試薬は-20℃で保存ください。

--- 目 次 ---

(1) はじめに	2
(2) 製品内容	2
(3) 関連製品のご案内	2
(4) 準備と付属試薬の使用法	2
(5) 一般的な使用法	3
(6) ワンステップ法で検出する場合の使用法	3
(7) 複数抗原を同時検出する場合の使用法	3
(8) その他	3
(9)トラブルシューティング	4
(10) お問い合わせ先	4

ご注意

1. 本試薬は研究用試薬です。診断・臨床用試薬としては使用しないでください。
2. Easy-WESTERN 試薬は、劣化を防ぐため上記の保存条件を守ってください。

(1) はじめに

Easy-WESTERN は、独自開発のマルチ抗体検出(MAD)試薬を利用したウェスタンブロットング専用の一次抗体検出試薬キットです。本キットを利用することで、標識二次抗体を用いずに各種一次抗体の検出が可能となります。また、従来法では出来なかった高感度検出、シグナル増強、迅速検出、同時検出等多くのメリットを得ることが出来ます。

Easy-WESTERN-II には、Super と Quick の 2 種があります。どちらの製品も同じ構成ですが、Super は高感度検出、シグナル増強向けのマニュアル、Quick には迅速検出、同時検出向けのマニュアルが添付されています。なお、何れのマニュアルも当社 HP よりダウンロードできます。

【原理】

本試薬の主要成分である MAD 試薬の本体は、高抗体結合能を有するタンパク質を約 100 分子提示するタンパク質粒子です。また、1粒子当たり凡そ 50 分子の HRP が標識されています。こうした性質のため、本試薬は高感度、迅速検出などを可能とします。

●本製品の特長●

1. 二次抗体が不要： 殆どの一次抗体を検出することが可能であり¹⁾、一次抗体の動物種に対する各種二次抗体を準備する必要がありません。
 2. 二次抗体を用いる従来法に比べ高いシグナルを得ることが可能²⁾： 低発現抗原の検出が可能となります。また、一次抗体量を減らすことができ、高価な一次抗体の節約につながります。
 3. 二次抗体で検出したシグナルの増強が可能： 二次抗体利用法で検出したシグナルが弱い場合、メンブレンを洗浄し、本試薬との反応により再度検出することでより高いシグナルを得ることが出来ます。
 4. 使用方法が容易： キット付属の MAD 試薬を希釈し、二次抗体の代わりに使用するだけです。
- 注： 1) 一部検出し難い抗体種(主なものとしてマウス IgG1、Goat IgG)がありますが、マウス IgG1 の場合専用増強試薬によって高感度検出が可能です。
2) 検出する抗原や用いる抗体によって性能は異なります。
3) 血清を含むサンプルを用いる場合、血清中の IgG と反応するため注意が必要です。

(2) 製品内容 (本マニュアルは以下の全製品に適用されます)

製品番号	製品名	構成 (50 回分)
BCL-EZS21	Easy-WESTERN Super 基本セット	MAD 試薬、希釈バッファー
BCL-EZS22	Easy-WESTERN Super マーカー検出セット	MAD 試薬、希釈バッファー、マーカー検出試薬
BCL-EZS24	Easy-WESTERN Super マウス増感セット	MAD 試薬、希釈バッファー、マウス IgG 増感試薬
BCL-EZS23	Easy-WESTERN Super フルセット	MAD 試薬、希釈バッファー、マウス IgG 増感試薬、マーカー検出試薬

使用回数は 10ml の実験系を用いた場合の数値を示しています。

(3) 関連製品のご案内

製品番号	製品名	製品概要
BCL-EZM01	マーカー検出試薬	Easy-WESTERN 用 (50 回分)
BCL-EZE01	マウス IgG 増感試薬	Easy-WESTERN 用 (50 回分)
BCL-EZB21	希釈バッファー	Easy-WESTERN 用 (10 倍濃縮, 60mL)
BCL-125A	Signal Booster Solution A (250mL)	一次抗体反応増強試薬

その他の関連製品もあります。当社 HP をご覧ください。

(4) 準備、及び、マーカー検出試薬とマウス IgG 増感試薬の使用法

1. TBS-T (150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 0.1% Tween-20, pH 7.6) を準備下さい
2. キット付属の 10 倍濃縮希釈バッファーを精製水で 10 倍に希釈し、1×希釈バッファーを作製してください。本バッファーは MAD 試薬の希釈に用います。
3. 1×希釈バッファーを TBS-T で 10 倍希釈し、1/10×希釈バッファーを作製してください。本バッファーは 1 次抗体の希釈に用います。
4. PVDF メンブレンはポアサイズ 0.2µm を推奨しています。ポアサイズ 0.45µm をご利用の場合、バックグラウンドが若干高くなる場合があります。

- ブロッキング溶液をご準備下さい。ブロッキング剤の種類は特に問いませんが、skim milk よりもタンパク質性のブロッキング剤の方がより高いシグナルが得られます。なお、skim milk を利用する場合、試薬グレードのものを利用下さい。
- マウス IgG 増感試薬はマウス IgG で反応が弱い時に使用する試薬です。特に、IgG1 を用いる場合には必須です。使用する場合は、本試薬を MAD 試薬希釈液に 2000 倍希釈になるように添加・混合して下さい。
- マーカー検出試薬は MagicMark XP (Invitrogen) など、二次抗体で検出する分子量マーカーを本キットで検出可能とする試薬です。使用する時は、本試薬を一次抗体希釈液に 10000 倍希釈になるように添加・混合して下さい。

(5) 二次抗体の代わりに利用する場合の使用方法

最も一般的な利用方法で、より高い感度や強いシグナルを得る時に利用する方法です。

- SDS-PAGE により目的のタンパク質を分離する。
- SDS-PAGE のゲルからタンパク質を PVDF メンブレンに転写する。
- メンブレンをブロッキング溶液で 1 時間 (室温) ブロッキングする。
- TBS-T で洗浄 (5 分 × 3 回) する。
- 一次抗体を 1/10 × 希釈バッファー溶液で希釈し、1 時間 (室温) 反応させる (メーカー推奨希釈倍率からお試ください。抗体によっては、さらに 5 倍程度まで希釈しても十分なバンドが検出可能です。希釈液に別売の Signal Booster solution A を用いるとさらに増強できます。)
- TBS-T で洗浄 (5 分 × 3 回) する。
- MAD 試薬を 1 × 希釈バッファーで 2000 倍 (推奨: 1000 ~ 4000 倍の範囲) に希釈し、メンブレンと 1 時間 (室温) 反応させる。
 - ＜マウス IgG 増感試薬、マーカー検出試薬を用いる場合は (4) の 6、7 を参照＞
- TBS-T で洗浄 (5 分 × 5 回) する。
- 市販の HRP 検出試薬を用いて、シグナルを検出する。

(6) ワンステップ法で検出する場合の使用方法

65 分間の迅速検出を行う手法です。条件を変えることで高感度検出も可能です。

- (5) の 1~2 まで同じ操作をする。
 - メンブレンをブロッキング溶液で 5 分間 (室温) ブロッキングする。
 - 一次抗体と MAD 試薬を 1 × 希釈バッファーで希釈・混合する。(一次抗体はメーカー推奨希釈倍率からお試ください。MAD 試薬は 2000 倍を推奨します。混合後 5 分で使用可能です。NaN₃ を含有する一次抗体液を利用する場合、一次抗体希釈後に MAD 試薬を混合し、NaN₃ の終濃度が 0.001% 以下になるようにして下さい)
 - ＜マウス IgG 増感試薬、マーカー検出試薬を用いる場合は (4) の 6、7 及び Q&A を参照＞
 - タンパク質を転写したメンブレンと 3. で調製した混合液とを 30 分 (室温) 反応させる。
 - TBS-T で洗浄 (5 分 × 5 回) する。
 - 市販の HRP 検出試薬を用いてシグナルを検出する。
- (重要) 本法で高感度検出する場合、ブロッキング時間を 30 分、4. の反応時間を最大 1 時間まで延長して下さい。

(7) 複数抗原を同時検出する場合の使用方法

複数の抗原を一度に検出する場合の手法です。2 段階反応法で検出します。

- (5) の 1~4 と同様の操作を行う。
- 2 種以上の一次抗体を同時にメンブレンと 1 時間 (室温) 反応させる (メーカー推奨希釈倍率からお試ください。各一次抗体を 1/10 × 希釈バッファー中で希釈して下さい)。
- TBS-T で洗浄 (5 分 × 3 回) する。
- メンブレンを希釈した MAD 試薬と反応させる。< (5) の 7 参照 >
 - ＜マウス IgG 増感試薬、マーカー検出試薬を用いる場合は (4) の 6、7 を参照＞
- TBS-T で洗浄 (5 分 × 5 回) する。
- 市販の HRP 検出試薬を用いてシグナルを検出する。

(9) トラブルシューティング

トラブル	原因と対策
シグナルが弱い	<ol style="list-style-type: none"> 1. 抗原タンパク質濃度が低い。できる限り濃い試料を電気泳動してください。 2. 抗体濃度が低い。最適な抗体濃度を検討してください。 3. 膜への転写が不十分。電流量を上げるか、転写時間を延長してください。 4. ブロッキングが強すぎる。オーバーナイトなどでブロッキングを強くしすぎるとシグナルが弱くなる場合があります。 5. 一次抗体が、Easy-WESTERN では検出し難い抗体種 (マウス IgG₁、Goat IgG) である。マウスの場合「マウス IgG 増感試薬」を利用下さい。また、これら抗体種に対する標識二次抗体をお持ちの場合は「増感試薬としての利用法」を検討してください。 6. MAD 試薬が吸着した。MAD 試薬は吸着し易い性質があります。本試薬をブロッキング剤非含有バッファーで希釈する場合は低吸着チューブを利用ください。
バンドの一部が抜ける	<ol style="list-style-type: none"> 7. 抗原量が多すぎる、又は抗体濃度が高すぎる。過剰なシグナルにより発光が抑えられることがあります。最適な抗原量・抗体濃度を検討してください。
エキストラバンドが多い	<ol style="list-style-type: none"> 8. 抗体濃度が高すぎる。過剰な抗体により、非特異的なシグナルが増大することがあります。最適な抗体濃度を検討してください。 9. タンパク質量が多すぎる。電気泳動するタンパク質量を減らしてください。 10. ブロッキング不足。ブロッキング剤の種類、濃度あるいはブロッキング時間を長くし、ブロッキングを強くしてください。 11. MAD 試薬の劣化。室温又は 4℃ で長期保存した場合、劣化しエキストラバンドが出る場合があります。MAD 試薬の濃度を下げるか新しいものに代えてください。 12. 血清含有サンプルを用いると 50kDa 付近にエキストラバンドが出現する。血清中 IgG と反応したバンドです。血清中の IgG をプロテイン A カラムなどで除去してください。
バックグラウンドが高い	<ol style="list-style-type: none"> 13. 洗浄が不十分、又はブロッキングが不十分。洗浄回数や洗浄時間を増やす、又はブロッキング剤濃度や時間を増やしてください。 14. 抗体濃度が高い、又は反応時間が長い。抗体濃度を低くするか、抗体との反応時間を短くしてください。 15. MAD 試薬の濃度が高すぎる。濃度を下げてください。 16. 一次抗体希釈液として抗原抗体反応増強剤を使用した場合、洗浄を十分に行わないとバックグラウンドが高くなる場合があります。一次抗体反応後の洗浄の回数や時間を増やしてください。
同時検出時に、一方のバンドが通常検出時よりシグナルが弱い	<ol style="list-style-type: none"> 17. 各種一次抗体と EZW の反応性が異なる。シグナルが弱い方の一次抗体濃度を増やしてください。 18. 一次抗体反応後の洗浄が不十分。洗浄回数や時間を増やしてください。 19. 別の抗体を用いて WB を行っているメンブレンと同一洗浄液内で洗浄している。微量残存する抗体と MAD 試薬の相互作用により、一方のシグナルが弱くなる場合があります。各メンブレンは独立して洗浄してください。
ワンステップで検出不能	<ol style="list-style-type: none"> 20. 精製純度の低い一次抗体 (抗血清など) を使用する場合、目的のバンドが検出されないことがあります。その場合は、通常の方法で行ってください。
マーカーの検出が弱い	<ol style="list-style-type: none"> 21. 時として、弱くなる場合があります。マーカー検出試薬濃度を上げるか、抗体・MAD 試薬反応前に、TBS-T で通常希釈して PVDF 膜を 15 分程度反応させてください。

(Easy-WESTERN Super 用のトラブルシューティングも含まれています)

(10) お問い合わせ先

株式会社ビークル【製造発売元】

〒606-8305 京都市左京区吉田河原町 14-1

TEL: 075-762-5055 FAX: 075-762-3055

E-mail: technical-support@beacle.com

Website: www.beacle.com

