

Western Marker Neo

取扱説明書

Beacle, Inc.
KYOTO JAPAN

目次

(1) はじめに	2
(2) 製品内容	2
(3) 製品詳細	2
(4) 保存	2
(5) 原理	2
(6) 使用方法	3
(7) トラブルシューティング	4
(8) お問い合わせ先	4

ご注意

本試薬は研究用試薬です。診断・臨床用試薬として使用しないでください。

(1) はじめに

Western Marker Neo はウェスタンブロット用マーカーです。ウェスタンで利用する 2 次抗体と反応する分子量マーカータンパク質により Enhanced Chemiluminescence (ECL) による検出が可能で、更に着色タンパク質マーカーが入っているためタンパク質のメンブレンへの転写効率の目視での確認が可能です。Western Marker Neo は 1 つのマーカーで転写効率の確認と ECL による検出が可能な画期的なマーカーです。

●本製品の特長●

1. カラータンパク質入りで、目視の転写効率確認が可能
2. 各種の 1、2 次抗体の組合せで良好なシグナルを発生
3. 使用前の熱処理不要、そのまま電気泳動にアプライ可能
4. 目的に合わせた、低分子量用、高分子用、ワイド用の 3 種の製品を用意
5. 既存品より安価で経済的

(2) 製品内容

本製品には以下の種類があります。本マニュアルは以下の製品総てに適用されます。

製品番号	商品名	分子量範囲	内容量
BCL-WMN-01	Western Marker Neo (low)	21-115 kDa	250 μ L
BCL-WMN-11	Western Marker Neo (high)	45-190 kDa	250 μ L
BCL-WMN-22	Western Marker Neo (wide)	21-190 kDa	250 μ L

(3) 製品詳細

Western Marker Neo は 2 次抗体反応性のマーカータンパク質と、青に着色したマーカータンパク質の両者が一つの製品中に入っています。

●2 次抗体反応性マーカー

3 種の分子量範囲 (右図参照) の製品が選択できます。なお、低分子量用マーカーと広域分子量用マーカーでは 43kDa、高分子量用では 45kDa のタンパク質が入っていますので分子量の違いに注意して下さい。

抗体濃度が高く強いシグナルを発生させた時に、抗体セットによっては、以下に示す分子量にバンドが見える場合があります。

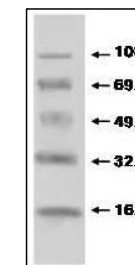
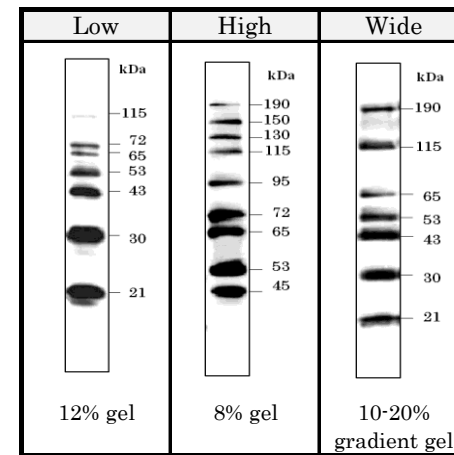
Low: 20, 46, 60 kDa

High: 60, 105 kDa

Wide: 20, 60, 105 kDa

●着色マーカー

何れの製品も 16-108 kDa の分子量を示す青色に着色したタンパク質 (右図参照) が入りおり、泳動時の状態や転写効率確認に利用できます。



(4) 保存 -20°C

5) 原理

Western Marker Neoの原料は遺伝子組換えで製造したIgG結合部位を有する11種のタンパク質です。これらのタンパク質は何れも殆ど総ての動物種のIgGと結合しますので、利用した1次、2次抗体の由来動物に関わらず明瞭なシグナルを得ることが出来ます。目視確認用の5種の着色タンパク質(16-108 kDa)は色素と強く共有結合しており、電気泳動中やメンブレンへの転写中に外れることなく、転写効率の目視での確認が可能です。これらの着色タンパク質は、IgG結合タンパク質とは相互作用しません。

(6) 使用方法

<使用方法の原則>

- ・本製品の標準アプライ量は2~5 µlです。
- ・本製品は前処理の必要はありませんので、そのままゲルへアプライしてください。

<使用方法>

1. SDS-PAGE ゲルへのアプライ

SDSを添加し加熱処理した目的サンプルと一緒に融解した本製品の2~5 µlをSDS-PAGEゲルへアプライし、目的タンパク質と共に電気泳動してください。

【注1】標準アプライ量は2~5 µlですが、実験条件によっては量を加減下さい。

【注2】泳動中泳動フロント付近に残存するブルー色素が見える場合があります。

2. メンブレンへのプロットイング

電気泳動が終了したゲルを取り出し、プロットイング装置へセットし、メンブレンへタンパク質を転写して下さい。転写後、本製品に入っている青色着色マーカータンパク質がメンブレンへ転写されていることを確認下さい。上手く転写が行われている時は左図のように見えます。

【注3】本製品に残存するブルー色素がメンブレンの泳動フロント位置に転写され、青く見える場合がありますが、この色素はその後の工程で消え、抗体反応等に影響を与えません。

3. ブロッキング処理

メンブレンを適切なブロッキング溶液を利用しブロッキングして下さい。

4. 1次抗体反応

メンブレンを目的とするタンパク質に対する1次抗体の希釈液に浸し、反応させます。この時、マーカーにも1次抗体が結合します。

5. 2次抗体反応

メンブレンを酵素標識した2次抗体の希釈液に浸し、反応させます。この時、マーカーにも1次抗体を介して、又は直接的に2次抗体が結合します。

【注4】標識酵素としてはHRP(Horse radish peroxidase)やAP(Alkaline Phosphatase)が利用できます。

6. 検出

酵素標識抗体と結合したタンパク質をECL等、適切な試薬を用いて検出して下さい。目的タンパク質と同様にマーカーも検出されます。

【注5】原理的に、発色法や蛍光試薬標識二次抗体でも検出が可能です。また、ECL発光の場合、CCDカメラ以外にX線フィルムを利用した検出でも問題ありません。

7. マーカー分子量の同定

低分子量用マーカーと高分子量用マーカーでは、65 kDaと72 kDaのバンドは接近して特徴的になっています。これらを目印に分子量を同定下さい。

【注6】抗体濃度が高く、強いシグナルを発生させた時に、抗体セットによっては、エキストラバンドが見えることがあります(詳しくは(3)の製品詳細をご覧ください)。

【注7】マーカーの各分子量バンドの濃さは用いる抗体セットにより多少変化します。

(7) トラブルシューティング

トラブル	原因と対策
マーカーのシグナルが弱い	1. マーカー量が少ない。マーカー量を増やして下さい。
	2. 抗体濃度が低い。抗体濃度を増やして下さい。
	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下さい。
	4. 膜への転写時間・電流量が過剰。ニトロセルロース膜使用時には、タンパク質が透過する場合があります。電流量や時間を調節して下さい。膜の種類をPVDFに代えるのも有効です。
マーカーシグナルが強すぎる	5. マーカー量が多い。マーカー量を減らして下さい。
	6. 抗原または抗体の濃度が高すぎる。抗体量を減らして下さい。
	7. インキュベーション時間が長すぎる。時間を短くして下さい。
マーカーバンドの一部が抜ける	8. 発光検出ではシグナルが強すぎると逆に発光が抑えられてしまいます。マーカー量、抗原濃度を減らして下さい。
バックグラウンドが高い	12. 抗原または抗体の濃度が高い。抗原・抗体濃度の検討を行ってください。目的とするタンパク質のシグナルは見えるがバックグラウンドも高い場合、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。
	13. ブロッキングが不十分。抗原・抗体種により、ブロッキング剤の種類や濃度に依存します。ブロッキング条件を検討してください。
	14. 洗浄が不十分。洗浄回数を調節してください。

(8) お問い合わせ先

株式会社ビークル【製造・発売元】

〒607-8465 京都市山科区上花山坂尻 25-10

TEL: 075-582-8505 FAX: 075-582-6055

E-mail: technical-support@beacle.com

Website: www.beacle.com

