

Easy-WESTERN-Multi

ウェスタンブローディング用 1 次抗体検出試薬キット(新型)

取扱説明書

(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 II 試薬)とマーカー検出試薬は速やかに-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。

--- 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	2
(5) 2 次抗体の代わりに利用する方法	2
(6) リプロービング時に利用する方法	3
(7) 2 次抗体反応の増感に利用する方法	3
(8) ワンステップ法で迅速検出する方法	3
(9) 複数 1 次抗体を用いて複数抗原を同時検出する方法	3
(10) その他	3
(11)トラブルシューティング	4
(12) お問合わせ先	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 Multi は、新型のマルチ抗体検出(MAD II) 試薬を利用したウェスタンブローディング専用の1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 2 次抗体を用いずに、実質的に全動物種の各種1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。

(注)：利用可能な IgG の動物種はマウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヤギ、ウマ、ロバ、ブタ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、サル、ヒトです。

【原理】

本試薬の主要成分である MAD II 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. **2次抗体が不要**： 全哺乳動物種の一次抗体(全 IgG 種)が検出できるため、種々の2次抗体を準備する必要がありません。
2. **2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**： 抗原が少ない場合も検出可能、1次抗体を減らすなどができます。
3. **複数1次抗体を用いて複数抗原の検出が可能**： 動物種の異なる複数の 1 次抗体を一つの反応で同時に検出が出来ます。
3. **2次抗体で検出したシグナルの増強が可能**： 2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 II 試薬を希釈し、2次抗体の代わりに使用するだけです。
注： マウスとラットの1次抗体では感度上昇のため増感試薬が別売りで準備されています。

(2) 製品内容 (本マニュアルは以下の製品に適用されます)

製品番号	製品名	構成
BCL-EZU-01	Easy-WESTERN Multi 25	MAD II 試薬、希釈バッファー、マーカー検出試薬 (25 回分)
BCL-EZU-02	Easy-WESTERN Multi 50	MAD II 試薬、希釈バッファー、マーカー検出試薬 (50 回分)

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-EZB21	希釈バッファー	Easy WESTERN Multi 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

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 II 試薬の希釈に用います。
3. ブロッキングメンブレンを準備下さい。推奨は PVDF メンブレン (ポアサイズ 0.2μm) です。
4. ブロッキング溶液をご準備下さい。種類は問いません。skim milk を利用する際は試薬グレードのものを利用下さい。より高いシグナルを得るにはタンパク質性ブロッキング剤を勧めます。
5. Magic Mark XP など2次抗体検出型の分子量マーカーを利用する際にはマーカー検出試薬を使って下さい。本試薬を 1 次抗体希釈液に 10000 倍希釈になるように添加してください。

(5) 2次抗体の代わりに利用する方法

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。

1. SDS-PAGE により目的のタンパク質を分離する。
2. SDS-PAGE のゲルからタンパク質を PVDF メンブレンに転写する。
3. 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。

4. TBS-T で洗浄 (5 分× 3 回) する。
5. 1 次抗体を TBS-T で希釈し、1 時間 (室温) 反応させる。1 次抗体濃度はメーカー推奨希釈率からお試ください。(マーカー検出試薬を用いる場合はこの段階で使います。(4) の 5 を照、また、別売の Signal Booster A を用いるとシグナルを増強できます。)
6. TBS-T で洗浄 (5 分× 3 回) する。
7. MAD II 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。
8. TBS-T で洗浄 (5 分× 5 回) する。
9. 市販の HRP 検出試薬を用いて、シグナルを検出する

(6) リプロービング時に増感用に利用する方法

通常法でシグナルが弱かったメンブレンを再利用して強度を高めて検出する方法です。

2. 2 次抗体による検出でシグナルが弱かったメンブレン (乾燥した場合は使えません)
3. TBS-T で洗浄 (5 分× 3 回) する。
4. 希釈した MAD II 試薬を加え反応させる。<手順は (5) の 7 に記載> (バックを下げるため、2 の洗浄後に短時間 (5 分程度) ブロッキング、又は MAD II 反応液にブロッキング剤を添加して下さい。ブロッキング剤は 5% スキムミルクなどが利用可能です)
5. TBS-T で洗浄 (5 分× 5 回) する。
6. 市販の HRP 検出試薬を用いて、シグナルを再検出する。

(7) 2 次抗体反応の増感に利用する方法

通常の二次抗体反応に追加してシグナルを増強させる場合に利用する手法です。

1. SDS-PAGE、PVDF への転写、ブロッキング、1 次抗体反応、2 次抗体反応を行います。
2. TBS-T で洗浄 (5 分× 3 回) する。
3. 希釈した MAD II 試薬と反応させる。<手順は (5) の 7 に記載>
4. TBS-T で洗浄 (5 分× 5 回) する。
5. 市販の HRP 検出試薬を用いて、シグナルを検出する。

(8) ワンステップ法で迅速検出する方法

1 次 2 次抗体反応を同時に行う迅速検出法です。

1. メンブレンのブロッキングまでは (5) の 3 までと同じです。
2. 1 次抗体と MAD II 試薬を 1×希釈バッファーで希釈・混合する。(1 次抗体や MAD II の希釈率 (5) と同じです。混合後 5 分で使用可能です。マーカー検出試薬はこの段階で入れます。
3. 転写メンブレンと 2 で調製した混合液とを 30~60 分 (室温) 反応させる。
4. これ以降検出までの手順は (5) と同じです。

(9) 複数の 1 次抗体を用いて複数抗原を同時検出する方法

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。

1. (5) の 1~4 と同様の操作を行う。
2. 2 種以上の 1 次抗体を同時にメンブレンと 1 時間 (室温) 反応させる。
3. TBS-T で洗浄 (5 分× 3 回) する。
4. メンブレンを希釈した MAD II 試薬と反応させる。< (5) の 7 参照 >
5. TBS-T で洗浄 (5 分× 5 回) する。
6. 市販の HRP 検出試薬を用いてシグナルを検出する。

(10) 増感試薬の利用方法

別製品 (Easy ELISA Constructor) 用にマウス、ラット増感試薬があり、本製品でも利用も可能です。増感試薬は MAD II 反応液に加えるだけで感度を高めることができます。

(11) その他

上記以外の使用方法もあります。要望があればお知らせしますので、ご連絡下さい。

(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. ブロッキング強すぎ: ブロッキングが強すぎるとシグナルが弱くなる場合があります。 5. MAD II 試薬の吸着: MAD II 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。 6. MAD 濃度が低い: 推奨の MAD 濃度より上げて下さい。
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、時間、あるいは 1 次抗体反応液にブロッキング剤を加えるなど、ブロッキングを強くしてください。 11. MAD II 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 II 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 IgG をプロテイン A カラムなどで除去して下さい。
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 II 試薬の濃度が高すぎる。濃度を下げてください。 16. 1 次抗体希釈液として抗原抗体反応増強剤 (Signal Booster A) 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。1 次抗体反応後の洗浄の回数や時間を増やしてください。
同時検出において、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 1 次抗体と EZW の反応性が異なる。シグナルが弱い方の 1 次抗体濃度を増やしてください。 18. 1 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 II 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。
ワンステップ法で検出不能	<ol style="list-style-type: none"> 20. 精製純度の低い 1 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。精製抗体を用いる、又は 2 段階法で検出してください。

本製品の SDS は、当社 HP (https://beacle.com/download_jp/) よりダウンロードできます。

(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

