

Easy-WESTERN-II Quick & Super

ウェスタンブローディング用一次抗体検出試薬キット

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°C で保存ください。また、使用後も速やかに -20°C 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°C 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°C 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方法	3
(5) 二次抗体の代わりに利用する場合の使用方法.....	3
(6) ワンステップ法で検出する場合の使用方法.....	3
(7) 二次抗体反応の増感に利用する方法.....	4
(8) 複数抗原を同時検出する場合の使用方法.....	4
(9) リプロービング時の増感用に利用する場合の使用方法.....	4
(10) その他.....	4
(11) トラブルシューティング.....	5
(12) お問い合わせ先.....	5

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ーディ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。

【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. 使用方法が容易： 殆どの動物種の一次抗体を検出することが可能であり¹⁾、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。
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できます。
4. 迅速な検出が可能： キット付属の MAD 試薬と一次抗体を混ぜて使用することで、ワンステップでの検出することができます。

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*)
BCL-EZ21	Easy-WESTERN-II Quick& Super , Basic set	抗体検出試薬、希釈バッファー
BCL-EZ23	Easy-WESTERN-II Quick& Super , Full set	抗体検出試薬、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回数を示しています

(3) 関連商品のご案内

本製品を使う際に一緒に利用すると効果のある製品または姉妹品として以下のものがあります。

製品番号	製品名	容量	製品概要
BCL-EZU-01 BCL-EZU-02	Easy WESTERN Multi 25 Easy WESTERN Multi 50	25 回分 50 回分	新型抗体検出試薬(MAD II)を使用することで、Easy WESTERN-II に比べより多くの IgG サブタイプが検出可能
BCL-BKSW-01	Blocking solution Trial set (western)	20mL ×4 種	カゼイン、変性カゼイン、BSA、化学物質を主成分とする 4 種のウェスタン用ブロッキング溶液のトライアルセット
BCL-PSS-01	Ponceau-S staining solution	500mL	膜に転写したタンパク質を赤く染める染色液で、転写の確認に広く利用されます。容易に脱色できるため、ウェスタンプロットに最適です。
BCL-125A	Signal Booster Solution A	250mL	抗原・抗体反応の増強試薬です。一次抗体反応時に利用できます。

(4) 準備と付属試薬の使用法

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。本バッファーは一次抗体の希釈に用います。
4. PVDF メンブレンはポアサイズ 0.2 μ m を推奨しています。ポアサイズ 0.45 μ m 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。
5. 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。
6. 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、一次抗体に 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・混合してください。
7. 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・混合してください。

(5) 二次抗体の代わりに利用する場合の使用法

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. 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。)
6. TBS-T で洗浄 (5 分× 3 回) する。
7. 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。
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。

注: 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

(6) ワンステップ法で検出する場合の使用法

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。

1. (5) の 1~2 まで同じ操作をする。
2. 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。
3. 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ください)
4. 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。
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。

(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 時間まで延長してください。

注: 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 及びトラブルシューティングを参照

(7) 二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、一次抗体反応、二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 試薬と反応させる。 < (5) の 7 に記載した手法で行います >
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。

注: 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

(8) 複数抗原を同時検出する場合の使用法

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ください)。
3. TBS-T で洗浄 (5 分 × 3 回) する。
4. メンブレンを希釈した MAD 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。

注: 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

(9) リプロービング時の増感に利用する方法

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。

1. 二次抗体を用いた従来法で検出シグナルが弱かったメンブレン (乾燥したメンブレンは利用できません)
2. TBS-T で洗浄 (5 分 × 3 回) する。
3. 希釈した MAD 試薬と反応させる。 < (5) の 7 に記載した手法で行います >
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。

注: 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

(10) その他

本試薬は非常に多くの可能性を秘めています。マニュアルに示した以外の使用方法もあります。多くは未だ検討中であり、且つユーザーが少ないと判断されるため公開しておりません。要望があればお知らせしますので、ご連絡下さい。

(11) 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	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 IgG ₁ 、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、マウス以外の抗体種を一次抗体に使用している場合は、Easy WESTERN Multi のご使用をご検討ください。
	6. MAD 試薬が吸着した。MAD 試薬は吸着しやすい性質があります。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	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	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	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 (Signal Booster Solution A, code: BCL-125A 等) 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	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。
ワンステップで検出不能	19. 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	20. マーカー検出試薬濃度を上げるか、抗体・MAD 試薬反応前に、マーカー検出試薬を TBS-T で希釈して PVDF 膜を 15 分程度反応させてください。

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。

(12) 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

