

製品コード T7122A

研究用

Takara

Western BLoT Rapid Detect v2.0

説明書

v201705

Western BLoT Rapid Detect v2.0 は、標識二次抗体の代わりに独自の HRP 標識 IgG Detector を利用して一次抗体を検出するウェスタンブロット専用検出試薬キットです。

本製品の主要コンポーネントの IgG Detector は、抗体の Fc 領域に結合するタンパク質約 100 分子を表面に提示したタンパク質粒子で、約 50 分子の HRP によって標識されています。このように特別にデザインされた IgG Detector により、本製品では迅速検出、高感度検出、複数抗体を用いた同時検出など、一般的なウェスタンブロット法では実現できなかった様々なアプリケーションが可能です。

また、Western BLoT Rapid Detect v2.0 では、希釈バッファーにブロッッキング成分を加えることにより、従来品よりさらに簡便な使用が可能となり、さらなる高感度化も実現しました。

本製品は、HRP 用化学発光基質である Western BLoT HRP Substrate シリーズとの組み合わせで検出できることを確認しています。ウェスタンブロットにおいて、高感度検出、迅速検出などが必要な場合、本製品と Western BLoT HRP Substrate シリーズの組み合わせをお勧めします。

I. 内容

1. IgG Detector Solution v2 (HRP labeled)	250 μ l
2. 10 × Dilution Buffer v2	60 ml
3. Enhancer for Mouse IgG v2	250 μ l
4. Marker Detection Reagent v2	50 μ l

II. 保存

− 20°C

注意：IgG Detector Solution v2 (HRP labeled) は、使用直前まで − 20°C で保存し、使用後は直ちに − 20°C に保存してください。本試薬は、4°C や室温で保存すると劣化する可能性があります。

III. キット以外に必要なもの

- ブロッッキング溶液
 - ※ スキムミルクよりタンパク質性のブロッッキング溶液 (1% BSA in TBS-T 等) の方が、より高いシグナルが得られます。スキムミルクをご使用になる場合は、試薬グレードのものをご使用ください。
- TBS-T：Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBS-T) Tablets, pH7.6 (製品コード T9142)
[TBS-T 組成：150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1% Tween20 (pH7.6)]
- その他、ウェスタンブロットングに必要な全ての試薬、機器等をあらかじめ準備してください。
検出は、化学発光による検出をお勧めします。

IV. 操作上の注意

本製品を使用する場合の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. 本製品は一部を除いてほとんどの一次抗体を検出することができますが、一次抗体の免疫動物種およびサブクラスが Mouse IgG₁、Goat IgG および Human IgG₃ の場合は、IgG Detector の結合能が低く、検出が難しくなります。
Mouse IgG₁ の場合は、付属する Enhancer for Mouse IgG v2 を IgG Detector に必ず添加してください。Enhancer for Mouse IgG v2 の添加により、通常通りの検出が可能となります。
Goat IgG、Human IgG₃ の場合は直接的な使用ができないため、V-2c. 二次抗体増感プロトコールに従って行ってください。
2. IgG Detector は Fc 領域結合タンパク質からなる試薬ですので、F(ab')₂、Fab 等の断片化抗体には直接的に使用できませんが、マウス抗体の場合は Enhancer for Mouse IgG v2 の添加により使用が可能です。また、V-2c. 二次抗体増感プロトコールや V-2d. リプローブ増感プロトコールは二次抗体に抗 L 鎖および抗 H+L 鎖を使用すれば検出が可能です。
3. 標識二次抗体を用いる一般的なウェスタンブロット法に比べ高いシグナルが得られるので、高感度検出や貴重な一次抗体をさらに希釈して使用することが可能です。ただし、感度の増強は、抗原、抗体の性質に依存しますので、あらかじめ予備試験が必要です。
4. V-2a. Rapid プロトコールでは、あらかじめ一次抗体と IgG Detector を混合します。一次抗体に防腐剤としてアジ化ナトリウムが含まれる場合は HRP の活性が阻害されるので、アジ化ナトリウムの濃度に注意してください。アジ化ナトリウムの終濃度は 0.001% 以下になるように調整してください。
5. 一次抗体用の反応液中に複数の一次抗体を加えるだけで、複数抗体を同時に検出することが可能です。ただし、抗体により IgG Detector の反応性が異なりますので、あらかじめ各抗体の希釈率を最適化しておく必要があります。
6. ニトロセルロースメンブレンおよび PVDF メンブレンで使用できます。PVDF メンブレンは、ポアサイズ 0.20 μm をお勧めします。ポアサイズ 0.45 μm を使用した場合、バックグラウンドが若干高くなる場合があります。

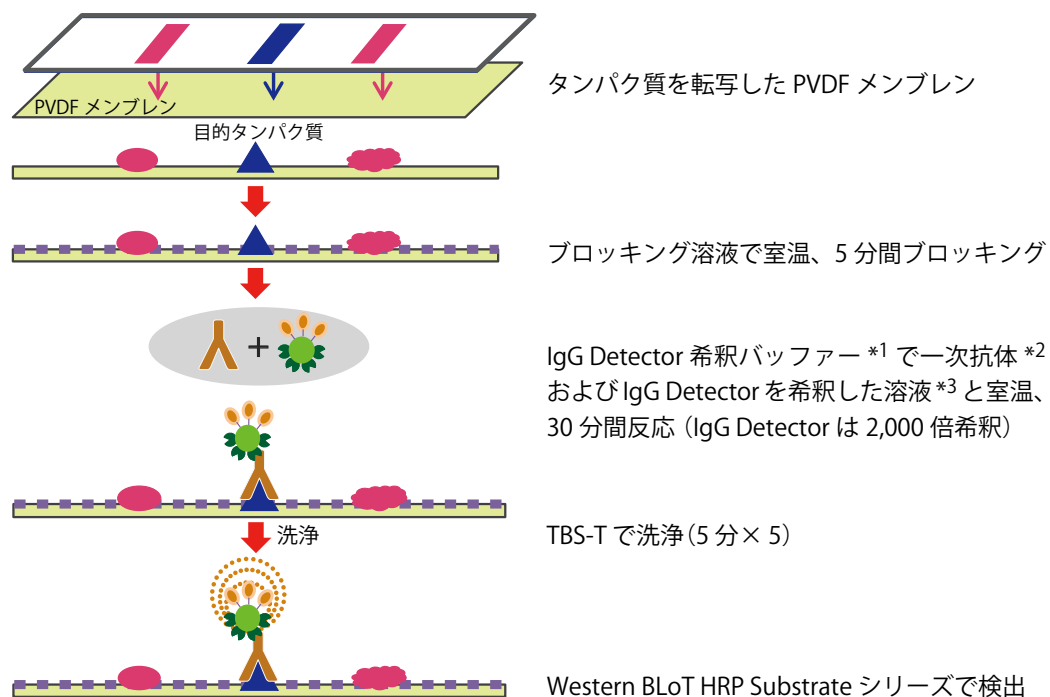
V. 使用方法

本製品は、様々なアプリケーションに対応しています。V-2. に記載の4種類のプロトコールを検討して、目的にあったプロトコールで使用してください。

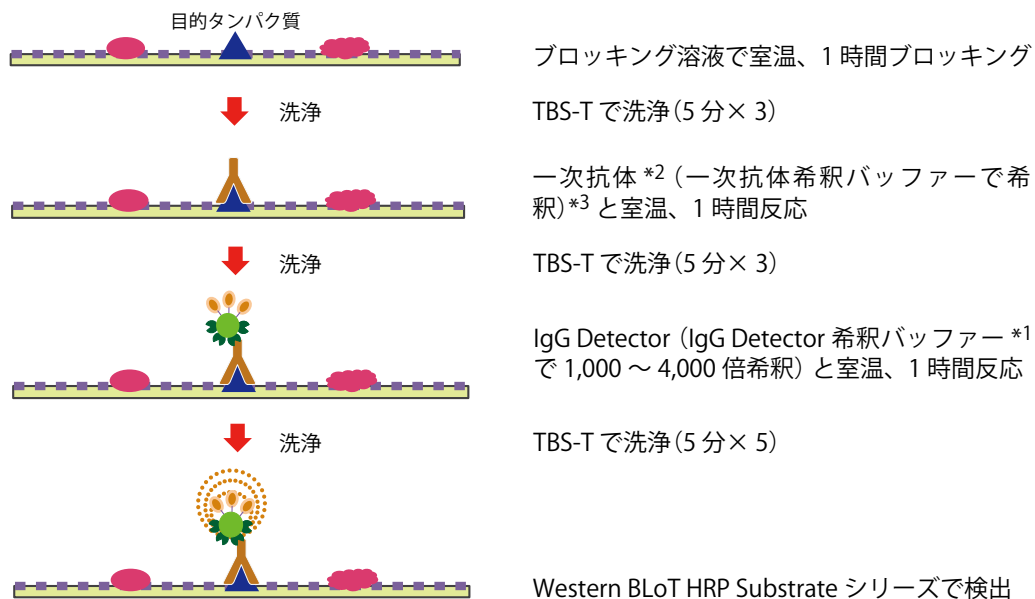
プロトコール	説明
V-2a. Rapid プロトコール	<ul style="list-style-type: none"> 一次抗体と IgG Detector をあらかじめ混合して1ステップで迅速検出を行う。(所要時間:1時間) 高感度検出を行う場合は、ブロッキング時間、抗体反応時間を延長する。(所要時間:2時間) 標識二次抗体は使用しない。 複数の一次抗体の同時検出も可能(免疫動物種が異なってもよい)
V-2b. 2ステップ高感度プロトコール	<ul style="list-style-type: none"> 標識二次抗体の代わりに IgG Detector を使用して、通常法と同じ2ステップの反応を行う。通常法より高感度検出が可能。標識二次抗体は使用しない。 複数の一次抗体の同時検出も可能(免疫動物種が異なってもよい)
V-2c. 二次抗体増感プロトコール	<ul style="list-style-type: none"> 標識二次抗体を用いた通常法を行った後、さらに IgG Detector を追加使用し(3ステップ反応)感度を増強する。 一次抗体の抗体種が Goat IgG、Human IgG₃ の場合は、V-2a.、V-2b. では検出できないが、本プロトコールでは使用可能
V-2d. リプローブ増感プロトコール	<ul style="list-style-type: none"> 標識二次抗体を用いた通常法でシグナルが弱かったメンブレンに対して、IgG Detector を使用して再検出する。通常法で検出できなかった微量の抗原が検出できる場合がある。

【操作フロー】 V-2a. ~ 2c. ではブロッキングに至るまでの操作は同じです。

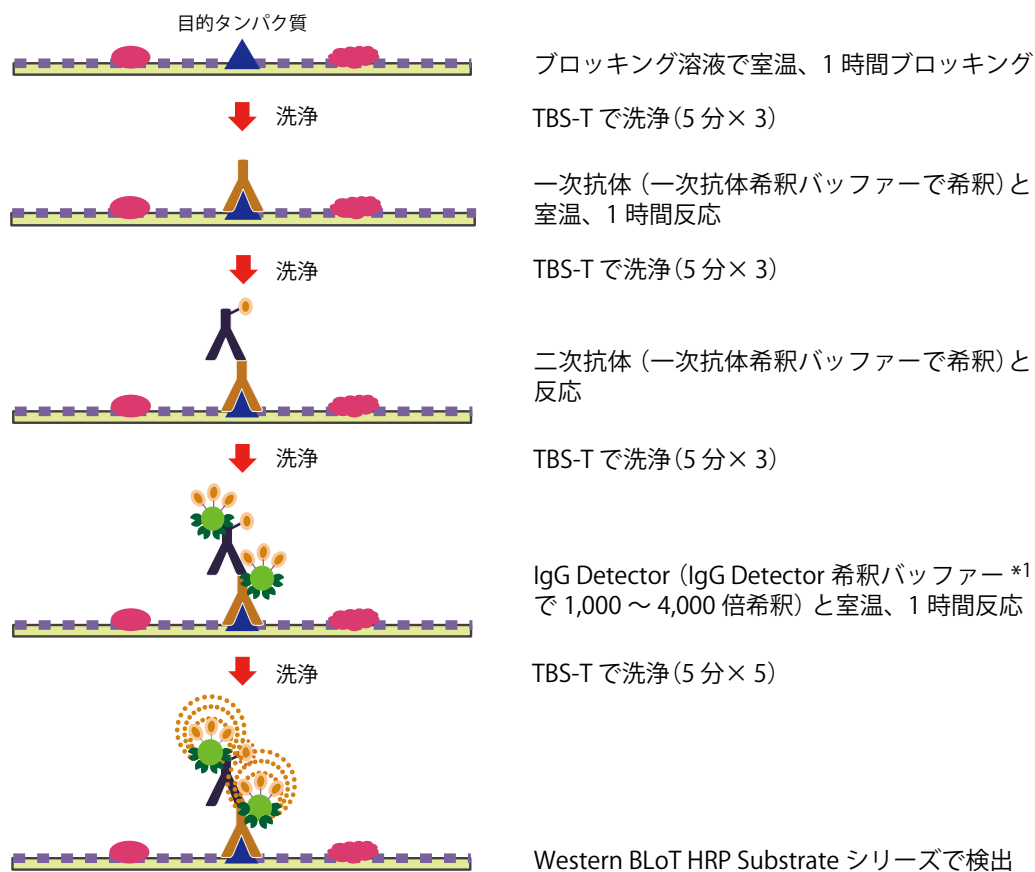
フローチャート -1 : V-2a. Rapid プロトコール



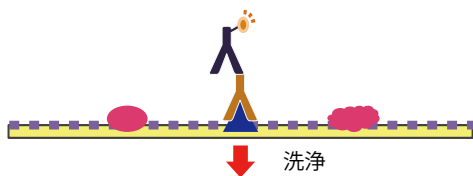
フローチャート -2 : V-2b. 2 ステップ高感度プロトコール



フローチャート -3 : V-2c. 二次抗体増感プロトコール

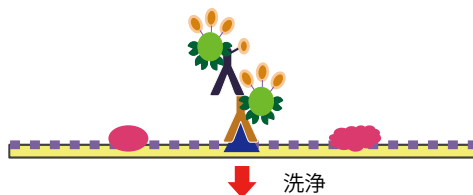


フローチャート -4 : V-2d. リプローブ増感プロトコール



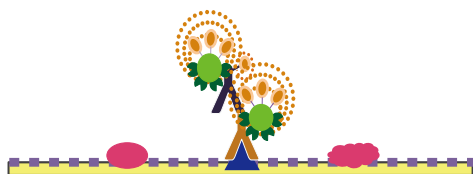
一度検出を行った PVDF メンブレン
(TBS-T に浸しておく：乾燥厳禁)

TBS-T で洗浄 (5分×3)



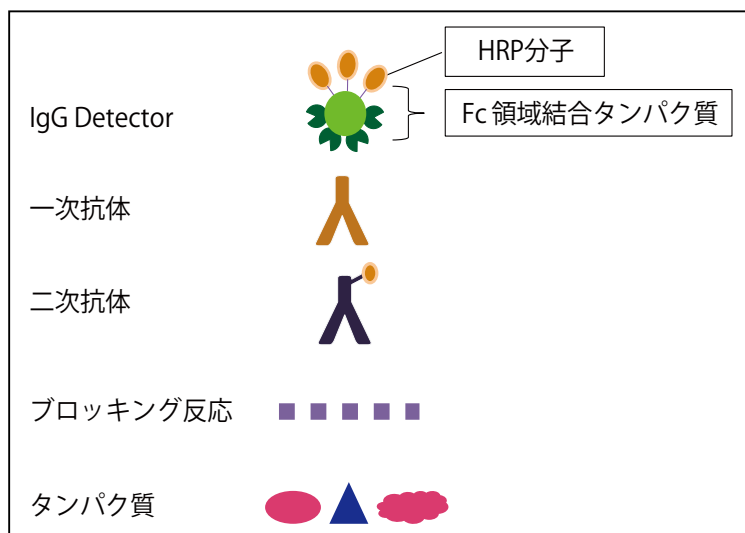
IgG Detector (IgG Detector 希釈バッファー *1
で 1,000 ~ 4,000 倍希釈) と室温、1 時間反応

TBS-T で洗浄 (5分×5)



Western Blot HRP Substrate シリーズで検出

- * 1 : 一次抗体に Mouse IgG1 を用いる場合は、IgG Detector 希釈バッファーに Enhancer for Mouse IgG v2 を 2,000 倍になるように加えてください。
- * 2 : 一次抗体の反応液に複数の一次抗体を加えると、複数抗体を同時に検出することが可能です。
- * 3 : IgG 結合配列をもつタンパク質分子量マーカを検出する場合は、一次抗体反応液に Marker Detection Reagent v2 を 10,000 倍になるように加えてください。



V-1. 各試薬の調製方法・使用方法

- a. IgG Detector 希釈バッファの調製方法
各プロトコールにおいて、IgG Detector Solution v2 (HRP labeled) を希釈するために使用する。
10 × Dilution Buffer v2 を必要量分注し、滅菌精製水で 10 倍希釈する。調製後、4℃ 保存可能。
- b. 一次抗体希釈バッファの調製方法
V-2b. 2 ステップ高感度プロトコールおよび V-2c. 二次抗体増感プロトコールで一次抗体を希釈するために使用する。
a. と同様に 10 × Dilution Buffer v2 を滅菌精製水で 10 倍希釈して、1 × Dilution Buffer を作製し、さらに TBS-T で 10 倍希釈して 1/10 × Dilution Buffer を調製する。
- c. Enhancer for Mouse IgG v2 の使用方法
一次抗体として Mouse IgG を使用する場合、IgG Detector に添加して使用する。特に Mouse IgG₁ の場合は、必須である。
 1. 必要量の IgG Detector 希釈バッファ (a. で調製) に Enhancer for Mouse IgG v2 を希釈率が 2,000 倍になるように加え、混合する。
 2. 各プロトコール中の IgG Detector Solution v2 (HRP labeled) を希釈するステップにおいて、IgG Detector 希釈バッファの代わりに、1. で調製した溶液を用いる。
- d. Marker Detection Reagent v2 の使用方法
IgG 結合配列を持つタンパク質分子量マーカー (Thermo Fisher Scientific 社 MagicMark など) を、目的タンパク質と同時に検出するために使用する。IgG 結合配列を持たない一般的な分子量マーカーは検出できない。
 1. 一次抗体反応液に、希釈率 10,000 倍になるように Marker Detection Reagent v2 を加える。
 2. その後の操作は、各プロトコールに従う。

V-2. 各種プロトコールの詳細

各プロトコールの概要はフローチャートで示しています。(4～6ページ)ご参照ください。

V-2a. Rapid プロトコール

タンパク質を転写したメンブレンから、約1時間で検出を行う迅速検出プロトコールである。

条件を変更し、時間を延長することで1ステップの高感度検出*も可能となる。

1. SDS-PAGE を行う。
2. SDS-PAGE のゲルから、適切なプロトコールに従い、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5分間(室温)ブロッキングする。
4. あらかじめ調製した IgG Detector 希釈バッファーを用いて、一次抗体、IgG Detector Solution v2 (HRP labeled) を希釈、混合する。一次抗体の希釈率は、メーカーの推奨濃度から始めて最適化が必要である。IgG Detector の希釈率は、2,000 倍とする。混合後5分で使用可能となる。

注意：一次抗体にアジ化ナトリウムが含まれる場合は、アジ化ナトリウムの終濃度が0.001%以下になるように、IgG Detector と混合すること。

5. タンパク質を転写したメンブレンと4.で調製した混合液を30分間(室温)反応させる。
6. TBS-T で洗浄(5分×5回)する。
7. Western BLoT HRP Substrate シリーズなどの HRP 用化学発光基質を用いて検出を行う。

*：本プロトコールを用いて、1ステップ高感度検出を行う場合、3.のブロッキング時間を30分、5.のメンブレンとの反応時間を1時間に設定する。ただし、検出までの時間は約2時間となる。

V-2b. 2ステップ高感度プロトコール

二次抗体の代わりに IgG Detector を使用方法であり、本製品の最も一般的なプロトコールである。二次抗体で検出する場合に比べ、高感度検出が可能である。

1. SDS-PAGE を行う。
2. SDS-PAGE のゲルから、適切なプロトコールに従い、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. 一次抗体をあらかじめ調製した一次抗体希釈バッファーで適当な希釈率に希釈する。一次抗体の希釈率は、あらかじめ最適化が必要である。希釈液として、別売の Western BLoT Immno Booster (製品コード T7111A) の Western BLoT Immno Booster Solution 1 を用いることで、さらにシグナル強度が増強される。
6. タンパク質を転写したメンブレンと希釈した一次抗体を1時間(室温)反応させる。
7. TBS-T で洗浄(5分×3回)する。
8. あらかじめ調製した IgG Detector 希釈バッファーを用いて、IgG Detector Solution v2 (HRP labeled) を希釈し、メンブレンと1時間(室温)反応させる。なお、IgG Detector の希釈率は、1,000～4,000 倍の範囲で最適化が必要である。
9. TBS-T で洗浄(5分×5回)する。
10. Western BLoT HRP Substrate シリーズなどの HRP 用化学発光基質を用いて検出を行う。

V-2c. 二次抗体増感プロトコール

通常通り二次抗体反応を行った後に、さらに IgG Detector を使用することによって感度を増強するプロトコールである。

1. SDS-PAGE を行う。
2. SDS-PAGE のゲルから、適切なプロトコールに従い、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. 一次抗体をあらかじめ調製した一次抗体希釈バッファーで適当な希釈率に希釈する。一次抗体の希釈率は、あらかじめ最適化が必要である。希釈液として、別売の Western BLoT Immno Booster (製品コード T7111A) の Western BLoT Immno Booster Solution 1 を用いることで、さらにシグナル強度が増強される。
6. タンパク質を転写したメンブレンと希釈した一次抗体を 1 時間 (室温) 反応させる。
7. TBS-T で洗浄 (5 分× 3 回) する。
8. 二次抗体を適当なプロトコールに従い希釈した後、メンブレンと反応させる。
9. TBS-T で洗浄 (5 分× 3 回) する。
10. あらかじめ調製した IgG Detector 希釈バッファーを用いて、IgG Detector Solution v2 (HRP labeled) を希釈し、メンブレンと 1 時間 (室温) 反応させる。なお、IgG Detector の希釈率は、1,000 ~ 4,000 倍の範囲で最適化が必要である。
11. TBS-T で洗浄 (5 分× 5 回) する。
12. Western BLoT HRP Substrate シリーズなどの HRP 用化学発光基質を用いて検出を行う。

V-2d. リプローブ増感プロトコール

二次抗体を用いる通常法でシグナルが弱かったメンブレンを再利用して、本製品によって増感、再検出するプロトコールである。

1. 二次抗体を用いた従来法で検出し、シグナルが弱かったメンブレンを用意する。メンブレンは、乾燥を防ぐため TBS-T に浸しておくこと。乾燥したメンブレンは使用できない。
2. TBS-T で洗浄 (5 分× 3 回) する。
3. あらかじめ調製した IgG Detector 希釈バッファーを用いて、IgG Detector Solution v2 (HRP labeled) を希釈し、メンブレンと 1 時間 (室温) 反応させる。なお、IgG Detector の希釈率は、1,000 ~ 4,000 倍の範囲で最適化が必要である。
4. TBS-T で洗浄 (5 分× 5 回) する。
5. Western BLoT HRP Substrate シリーズなどの HRP 用化学発光基質を用いて検出を行う。

VI. 使用例

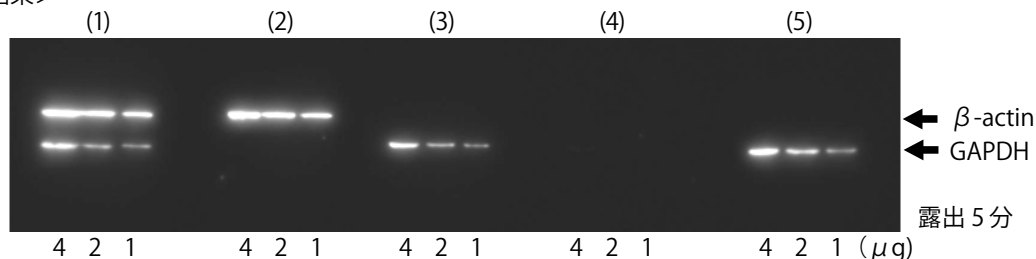
HeLa 細胞ライセート中の β -アクチンおよび GAPDH の検出 (V-2b.2 ステップ高感度プロトコール)

<方法>

- サンプル： HeLa 細胞ライセート
 転写： PVDF メンブレン (Pore size 0.45 μm)
 ブロッキング溶液： Western BLoT Blocking Buffer (Protein Free) (以下 PFB)
 一次抗体： Monoclonal Mouse Anti- β -actin (isotype IgG₁)
 Mouse Anti-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (isotype IgG₁)
 二次抗体： Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Peroxidase conjugated
 検出試薬： Western BLoT Rapid Detect v2.0
 Western BLoT Chemiluminescence HRP Substrate (製品コード T7101A)
 検出法： CCD カメラ

		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
HeLa 細胞ライセート		各項目：4 μg 、2 μg 、1 μg / レーン				
ブロッキング溶液		PFB				
一次抗体 終濃度 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Mouse anti- β -actin (IgG ₁)	○	○	-	-	-
	Mouse anti-GAPDH (IgG ₁)	○	-	○	○	○ PFB 希釈
二次反応 終濃度 0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$	IgG Detector	Enhancer for Mouse IgG v2 添加 IgG Detector			IgG Detector	-
	二次抗体	-	-	-	-	○ PFB 希釈

<結果>



本検討における HeLa 細胞ライセート中の β -アクチンおよび GAPDH の検出レベル

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
β -アクチン	1.0 μg 以下	1.0 μg 以下	-	-	-
GAPDH	1.0 μg	-	1.0 μg	検出不能または 4.0 μg 以上	1.0 μg

(3)、(5) の結果より、Western BLoT Rapid Detect v2.0 は二次抗体使用の一般的なウェスタンブロット法と同等に使用が可能です。

(1)、(2)、(3) の結果より、複数抗原同時検出でも、1 抗体検出法と同等の検出が可能です。

(3)、(4) の結果より、Mouse IgG₁ 抗体使用の場合も Enhancer for Mouse IgG v2 を添加すれば検出できます。

VII. トラブルシューティング

ウェスタンブロッティングには複数のステップがあるため、条件の最適化が必要となる場合があります。使用するタンパク質の量、一次抗体や IgG Detector の最適な希釈率などの予備検討を行うことで実施することをお勧めします。

問題	原因	解決策
バックグラウンドが高い	使用した抗体の濃度が高すぎる	抗体の希釈倍率を上げて抗体濃度を下げる。
	IgG Detector の濃度が高すぎる	IgG Detector の希釈倍率を上げて濃度を下げる。
	ブロッキングが不十分	ブロッキング条件を最適化する。
	抗体との反応時間が長すぎる	抗体との反応時間を短くする。
	洗浄が不十分	洗浄の時間や回数、洗浄バッファの量を増やす。特に一次抗体希釈液として Immuno Booster を使用した場合は、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る。
バンドが見えない、またはシグナルが弱い	使用した抗体の量が不十分	抗体の希釈倍率を下げる。
	使用した抗原の量が不十分	抗原の量を増やす。
	メンブレンへの転写が不十分	転写条件を最適化する。
	一次抗体が Goat IgG、Human IgG ₃ 、断片化抗体（マウス抗体以外）である	Rapid プロトコール、2ステップ高感度プロトコールでは検出できない。二次抗体増感プロトコールで行う。
	一次抗体が Mouse IgG ₁ または断片化抗体（マウス抗体）である	Enhancer for Mouse IgG v2 を IgG Detector の希釈バッファに加える。
	IgG Detector が吸着した	IgG Detector は、吸着しやすい性質があるため、IgG Detector 希釈バッファで希釈する際には、タンパク質低吸着仕様チューブを使用する。
エキストラバンドが多い	使用した抗体の濃度が高すぎる	抗体の希釈倍率を上げて抗体濃度を下げる。
	洗浄が不十分	洗浄の時間や回数、洗浄バッファの量を増やす。
	ブロッキングが不十分	ブロッキング条件を最適化する。
	IgG Detector の劣化	IgG Detector は 4℃または室温で長時間保存すると劣化する。
	サンプルが血清由来であった	血清含有サンプルを用いると 50 kDa 付近にエキストラバンドが出る場合がある。血清中の IgG と反応したバンドであるため、血清中の IgG をプロテイン A カラムなどで除去する。
Rapid プロトコールで検出できない	一次抗体の純度が低い	抗血清などの精製純度が低い一次抗体を使用すると目的のバンドが検出されない場合がある。抗体を精製するか、2ステップ高感度プロトコールに変更する。
複数の抗体を用いた同時検出において、通常検出時よりシグナルが弱いバンドがある	一次抗体反応後の洗浄が不十分	洗浄回数や時間を増やす。
	複数の一次抗体の反応性が異なる	複数の一次抗体を用いて同時に検出する場合、各一次抗体と IgG Detector の反応性が異なる。シグナルが弱いバンドに対する一次抗体濃度を増やす。

VIII. 関連製品

< Western BLoT HRP Substrate シリーズ >

Western BLoT Chemiluminescence HRP Substrate (製品コード T7101A/B)

Western BLoT Quant HRP Substrate (製品コード T7102A/B)

Western BLoT Hyper HRP Substrate (製品コード T7103A/B)

Western BLoT Ultra Sensitive HRP Substrate (製品コード T7104A/B)

< 抗原抗体反応促進剤 >

Western BLoT Immuno Booster (製品コード T7111A)

< バッファータブレット、パウダー >

Tris-Glycine-SDS Buffer (TG-SDS) Powder, pH8.3 (製品コード T9101)

Tris-Glycine Buffer (TG) Powder, pH8.3 (製品コード T9102)

Tris Buffered Saline (TBS) Tablets, pH7.6 (製品コード T9141)

Tris Buffered Saline with Tween20 (TBS-T) Tablets, pH7.6 (製品コード T9142)

Phosphate Buffered Saline (PBS) Tablets, pH7.4 (製品コード T9181)

Phosphate Buffered Saline (PBS) Tablets without Potassium, pH7.4 (製品コード T9182)

Phosphate Buffered Saline with Tween20 (PBS-T) Tablets, pH7.4 (製品コード T9183)

< タンパク定量キット >

TaKaRa BCA Protein Assay Kit (製品コード T9300A)

TaKaRa Bradford Protein Assay Kit (製品コード T9310A)

IX. 注意

- ・ 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・ タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・ 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社