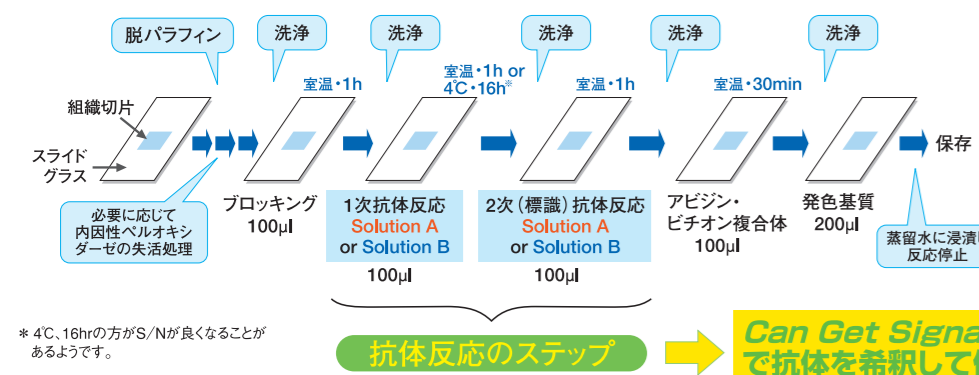


免疫組織・細胞染色用

ABC染色における解析フロー



*4℃、16hの方がS/Nが良くなる場合があります。

Can Get Signal® immunostain で抗体を希釈して使用するだけ

※抗原・抗体反応以外のステップは従来の条件をご使用いただけます。



Can Get Signal® immunostain

●Solution AとBについて
Solution AとBは免疫反応の促進作用が異なります。どちらの溶液が適しているかは、Starter Setを用いて予備検討いただくことをお勧めします。Solution AとBは、それぞれ1次抗体、および2次(標識)抗体反応の両方に対応します。ウェスタンブロット用のCan Get Signal®のSolution 1、2とは異なります。

実施例 1

Schneider 2 (S2) のalpha-tubulin染色における従来法との比較実験

【データご提供】 京都大学 研究員様

実験方法

サンプル: *Drosophila* culture cell line (Schneider 2 (S2) cells)
※抗原タンパク質の発現誘導の有無・なし
Concanavalin A coated glass bottom dishに接着30分

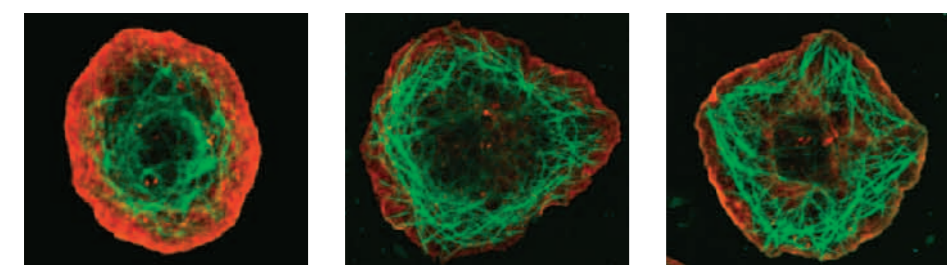
ブロッキング、内因性ペルオキシダーゼ活性阻止:
・ブロッキング溶液: 1% BSA, 0.02% TX-100/PBS
・反応条件: 室温、30分間
・内因性ペルオキシダーゼ活性阻止: なし

抗体反応
〈1次抗体〉
・使用抗体: monoclonal anti-alpha-tubulin, antibody, mouse (Sigma)
・希釈倍率: 1/100
・希釈溶液: (1) 1% BSA, 0.02% TX-100/PBS (従来法)
(2) Can Get Signal® immunostain Solution A
(3) Can Get Signal® immunostain Solution B
・反応条件: 室温・1時間

〈2次抗体〉
・使用抗体: Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L) highly cross adsorbed (Life Technologies)
・希釈倍率: 1/600
・希釈溶液: (1) 1% BSA, 0.02% TX-100/PBS (従来法)
(2) Can Get Signal® immunostain Solution A
(3) Can Get Signal® immunostain Solution B
・反応条件: 室温、1時間

検出方法:
Immunofluorescence (IF)

結果



蛍光退色防止剤 (FluorSave™ Reagent <CALBIOCHEM® #345789>) を用いてサンプルをマウントし、共焦点顕微鏡観察 (ZEISS LSM 510) を行いました。添付した画像は、共焦点顕微鏡の画像取得条件 (gain やレーザー強度など) は、全く同条件で行い、また、得られた画像のコントラスト等の画像処理は行っていません。

コメント

従来法でも、細胞内のチューブリン構造は可視化できていましたが、Can Get Signal® immunostain を使用した場合は、顕著なシグナル増強が認められ、従来法では、やや diffuse であったチューブリン束のシグナルが、鮮明に検出されました。また、細胞内のバックグラウンドと思われるシグナルが減少傾向にありました。
Solution A, Solution B のどちらも、シグナルの増強が認められましたが、Solution B の方が若干強い印象を受けました。Phalloidin で同時にアクチン骨格を可視化したところ、抗原抗体反応以外の反応には顕著な影響は見られませんでした。ただ、Can Get Signal®

immunostain を使用した場合、細胞が存在しない部分 (Concanavalin A でコートしたガラスディッシュ上) に、非特異的なシグナルが多くみられた点が若干気になりましたが、この点を考慮しても、全体的には Can Get Signal® immunostain は、十分にシグナルを増強させることができると思いました。ちなみに、この非特異的なシグナルが、洗浄過程をより十分にすることで減少するかどうかについては未確認です。
今回使用した抗体は、ごく一般的な抗体でしたが、シグナル検出感度が低いものでは、より一層効果が期待できるのではないかと思います。

実施例 2

CD133免疫染色における従来法との比較検討

【データご提供】 北海道大学大学院 医学研究科 分子細胞病理学分野 野田頭未歩先生、笹井研先生

実験方法

サンプル: ヒト・脳腫瘍 (グリオプラストーマ)
サンプル調製法: Paraffin Embedded Section
ホルマリン固定後、パラフィン包埋し、ミクロトームで厚さ約 1.5-2µm に薄切。抗原賦活なし。

ブロッキング、内因性ペルオキシダーゼ活性阻止:
・ブロッキング溶液名: Protein Block, Serum-Free
・反応条件: 37℃・10分間
・内因性ペルオキシダーゼ活性阻止:
1% H₂O₂ 過メタノールにて室温10分インキュベーション

抗体反応
〈1次抗体〉
・使用抗体: Rabbit polyclonal to CD133-Stem Cell Marker (Abcam)
・希釈倍率: 1/35
・希釈溶液: 1% BSA / PBS or Can Get Signal® immunostain Solution A or B
・反応条件: 室温・0/N

1次抗体だけでも効果があります

〈2次抗体、検出キット〉
・検出試薬: ChemMate Envision (Dako)
・反応条件: 室温・30分間

発色方法・検出方法: DAB (Dako)

結果

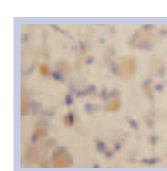


BSA (従来法) Can Get Signal® immunostain Solution A 使用 Can Get Signal® immunostain Solution B 使用

グリオプラストーマに発現するCD133の染色

コメント

従来法では微弱なシグナルが、Can Get Signal® immunostain を使用することで増強されました。ただしSolution A を用いた場合はバックグラウンドが高く、全体的に均一な染まりが見られなかったため、観察には適さないと考えられます。今後は、Solution B を用いて、抗体の希釈倍率を最適化することで、よりよい染色条件を見出すことができると考えられます。



抗体希釈率を上げることができました!

先生から製品モニター終了後、Solution B を用いた実験において、一次抗体を 1/100 希釈 (反応時間: 4℃・0/N) に変更しても十分診断が可能な、良好な結果が得られたとのご連絡をいただきました。抗体の節約も可能です。

●ウェスタンブロット・ELISA用

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
Can Get Signal® Solution 1 (for primary antibody)	各50ml×1本	4℃	NKB-101T	¥10,000
Solution 2 (for secondary antibody)	各250ml×1本		NKB-101	¥30,000
Can Get Signal® Solution 1 (for primary antibody)	250ml×1本	4℃	NKB-201	¥17,000
Can Get Signal® Solution 2 (for secondary antibody)	250ml×1本		NKB-301	¥17,000

【関連商品】 免疫反応促進試薬 Can Get Signal® を用いるウェスタンブロット解析に適した人工合成ブロッキング試薬です。

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal®	500ml×1本	4℃	NYPBR01	¥13,500

※本試薬は使用濃度に調整済みの液状試薬です。通常は希釈せず原液のままご使用ください。 ※本試薬は日油株式会社により専用製品として製造されています。

●免疫組織・細胞染色用

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
Can Get Signal® immunostain Starter set Solution A, Solution B	各5ml×1本	4℃	NKB-401	¥12,000
Can Get Signal® immunostain Solution A	20ml×1本 (20ml×1本)×4		NKB-501 NKB-501X4	¥30,000 ¥70,000
Can Get Signal® immunostain Solution B	20ml×1本 (20ml×1本)×4	4℃	NKB-601 NKB-601X4	¥30,000 ¥70,000

*Solution AとBは、それぞれ単品で使用していただく仕様になっています。それぞれの試薬が1次抗体と2次抗体の両方に対応します。

TOYOBO 東洋紡績株式会社

◆◆ 納期・注文に関するお問合せ ◆◆
ライフサイエンス事業部 (大阪)
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
TEL.06-6348-3786 FAX.06-6348-3833
E-mail order_lifescience@toyobo.jp

ライフサイエンス事業部 (東京)
〒141-8633 東京都品川区東五反田2丁目10番2号
東五反田スクエア
TEL.03-6422-4819 FAX.03-6422-4951
E-mail order_lifescience@toyobo.jp

◆◆ 製品内容・技術に関するお問合せ ◆◆
テクニカルライン
TEL.06-6348-3888 FAX.06-6348-3833
開設時間: 9:00~12:00 13:00~17:00
(土・日・祝を除く)
E-mail tech_osaka@toyobo.jp
[URL] http://www.toyobo.co.jp/bio



ウェスタンブロット・免疫組織染色等でお困りの方に!!

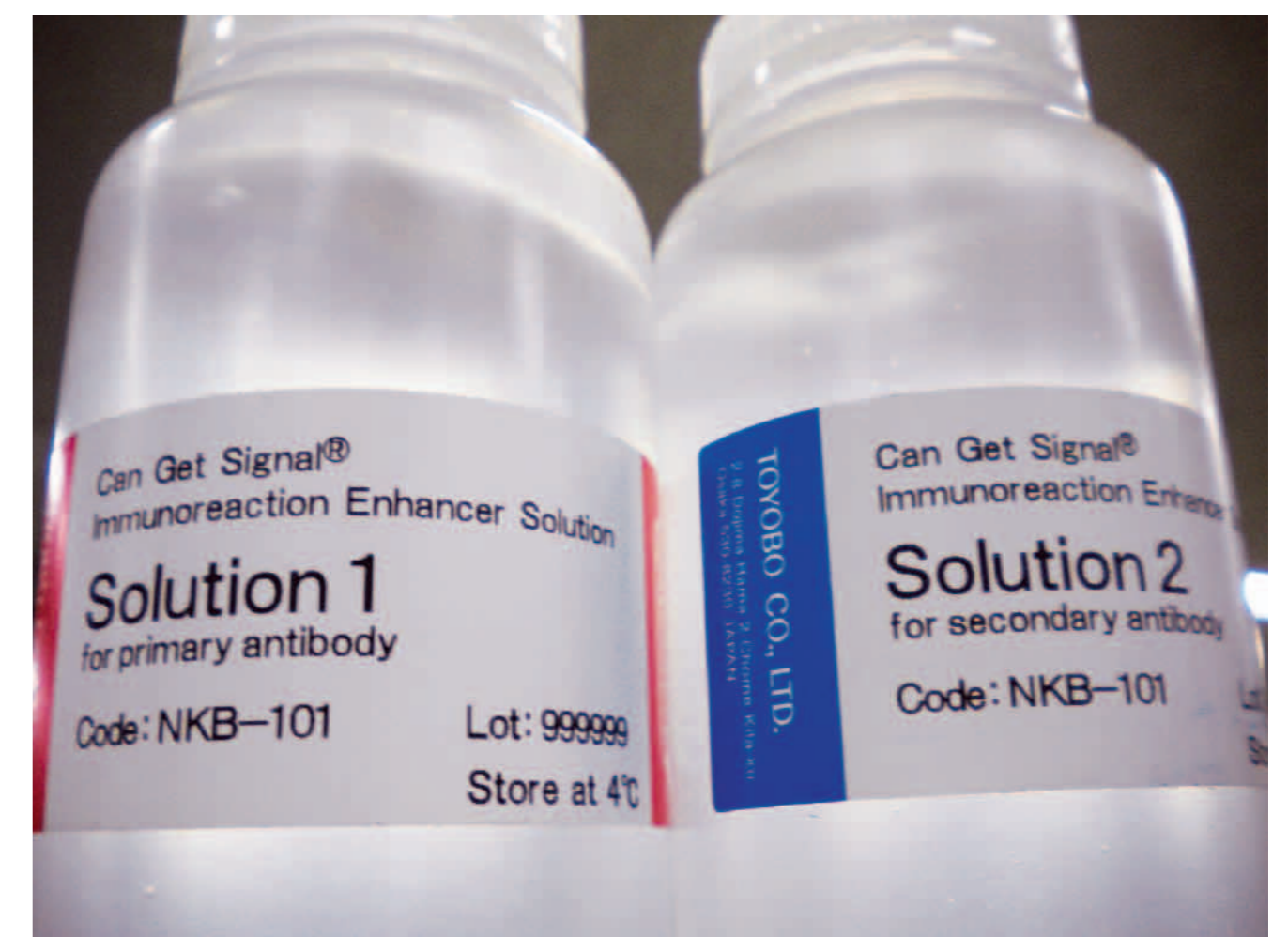
バックグラウンド低減

シグナルアップ

免疫反応促進試薬

Can Get Signal®

実施例集 2



Can Get Signal®シリーズは、



※ブロッキングと検出は従来お使いの条件(試薬)をご使用いただけます。

抗原-抗体反応を最適化するバッファーです。

従来、ウェスタンブロットや免疫組織染色における抗原抗体反応には、TBS-Tやブロッキング溶液、血清希釈液などが用いられてきましたが、それらの溶液は必ずしも抗原抗体反応に至適化された溶液ではありませんでした。本製品は、塩濃度やpH、添加剤などで最適化することにより、シグナルを向上し、バックグラウンドを低減するよう改良されたバッファー溶液です。使用方法は、本試薬を1次抗体、及び2次(標識)抗体の希釈(反応)液として使用するだけで、簡便です。ウェスタンブロット/ELISA用(*Can Get Signal*®)、免疫組織・細胞染色用(*Can Get Signal*® immunostain)から選択いただけます。

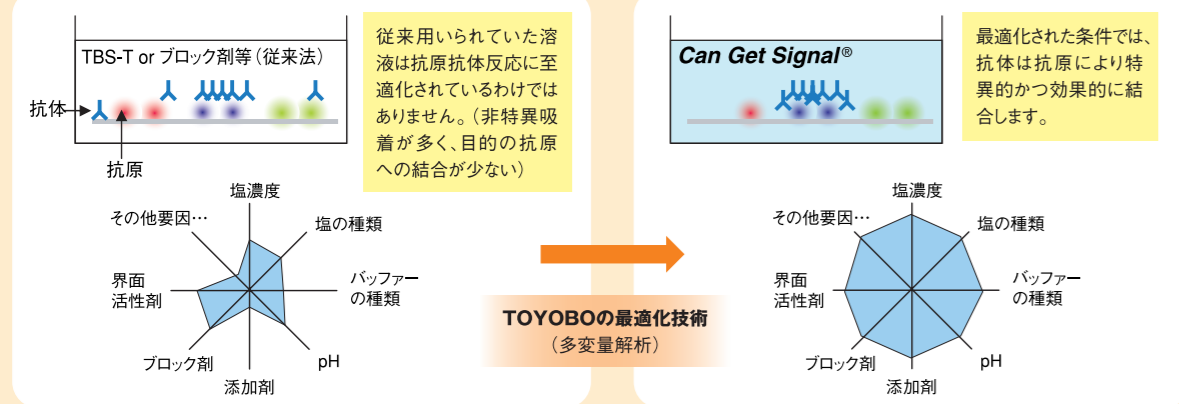


図1. *Can Get Signal*®原理(イメージ図)

良い抗体が無いときこそ *Can Get Signal*®の出番です。

タグ抗体やリン酸化タンパク質抗体などで改善されたとの声を多くいただいております。

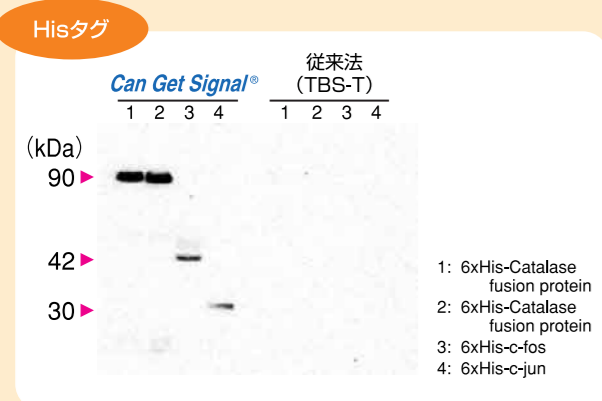


図2. His-tagタンパク質の検出例

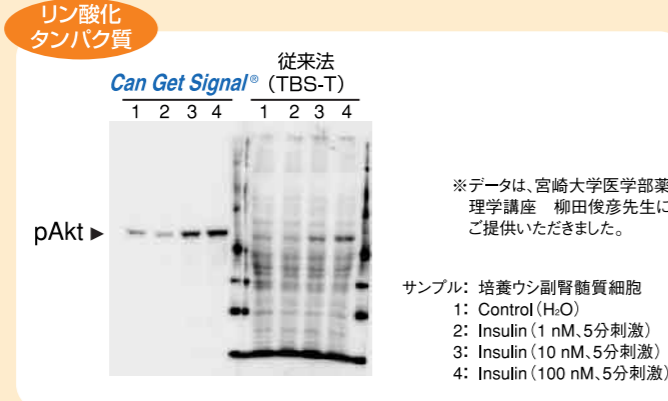


図3. 抗phospho-Akt抗体による、Aktリン酸化の検出

数多くの論文は
信頼のあかしです。

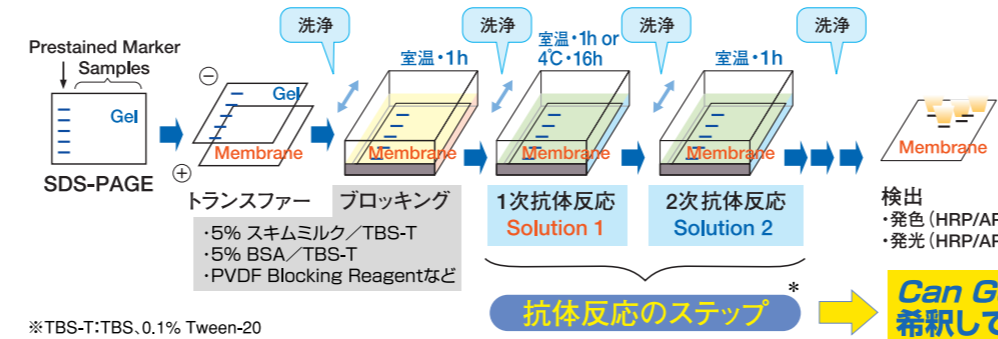
検索サイトで“Can Get Signal”を検索してみてください。数多くの引用論文をご確認いただけます。

“Can Get Signal”

検索

Western blot / ELISA用

ウェスタンブロットの解析フロー



※TBS-T:TBS, 0.1% Tween-20
*1次抗体をSolution 1、2次抗体をSolution 2で希釈します。



Can Get Signal®

Can Get Signal®に抗体を希釈して使用するだけ

実施例 1

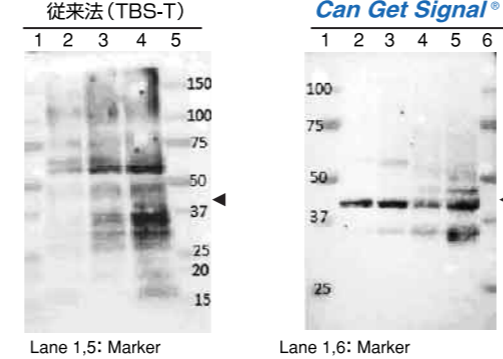
細胞に発現するCytokeratin 19タンパク質の検出

【データご提供】 京都大学大学院 薬学研究所 病態機能分析学 平沢真樹

実験方法
サンプル: ヒト扁平上皮癌細胞
サンプル調製法: Cytokeratin 19 (40kDa)
ブロッキング方法: セミドライ法
ブロッキング溶液: ブロッキング液: ブロッキング ワン (ナカライテスク社製)
反応条件: 室温・1時間
抗体反応
 <1次抗体>
 ・使用抗体: anti-Cytokeratin 19 (RCK108) (Santa Cruz Biotechnology)
 ・希釈倍率: 1/200
 ・希釈液: (1) Control: TBS-T (2) *Can Get Signal*® Solution 1
 ・反応条件: 4°C・O/N
 <2次抗体>
 ・使用抗体: Goat anti-mouse IgG1-HRP (Cat No.STAR81P)
 ・希釈倍率: 1/4,000
 ・希釈液: (1) Control: TBS-T (2) *Can Get Signal*® Solution 2
 ・反応条件: 室温・1時間
検出方法
 ECL Plus (Frontier Science) (GEヘルスケア・ジャパン株式会社)

結果及び考察

従来法では目的タンパクのバンドはほぼ見られず、非特異的結合が多かったが、*Can Get Signal*®使用時には、目的タンパクのバンドが強く確認でき、非特異的結合も格段に減少しました。また、別のヒト扁平上皮癌細胞においても目的タンパクが確認できました。



Lane 1,5: Marker
2: サンプル 2µg
3: サンプル 4µg
4: サンプル 10µg
5: 別の細胞サンプル 20µg

コメント

従来法と同じ方法で、抗体希釈液を変えただけでここまで変わることにごく驚きました。

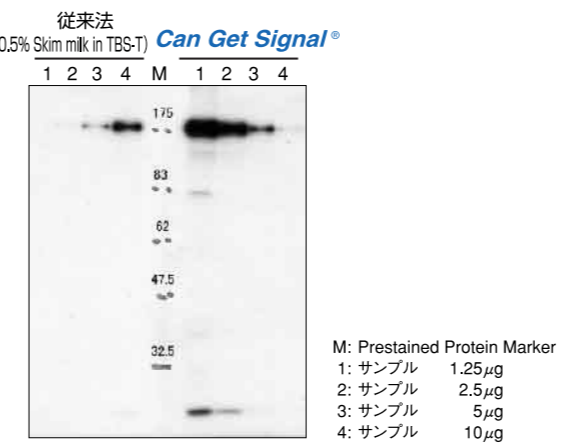
実施例 2

ウェスタンブロットによる海馬内のNR2A (NMDA receptor subunit) の発現量の検出

【データご提供】 東京大学医科学研究所 神経ネットワーク分野

実験方法
サンプル: マウス海馬のホモジネート
ブロッキング方法: セミドライ法
ブロッキング溶液: ブロッキング液: 0.5% Skim milk in TBS-T
反応条件: 室温・1時間
抗体反応
 <1次抗体>
 ・使用抗体: Anti NR2A (Frontier Science)
 ・希釈倍率: 1/500
 ・希釈液: (1) 0.5% Skim milk in TBS-T (2) *Can Get Signal*® Solution 1
 ・反応条件: 4°C・O/N
 <2次抗体>
 ・使用抗体: anti-rabbit IgG HRP (GEヘルスケア・ジャパン株式会社)
 ・希釈倍率: 1/4,000
 ・希釈液: (1) 0.5% Skim milk in TBS-T (2) *Can Get Signal*® Solution 2
 ・反応条件: 室温・1時間
検出方法
 ECL Plus (GEヘルスケア・ジャパン株式会社)

結果



M: Prestained Protein Marker
1: サンプル 1.25µg
2: サンプル 2.5µg
3: サンプル 5µg
4: サンプル 10µg

コメント

175kDaにあるバンドがNR2Aのバンドを示しています。およそ2~4倍くらい感度が上がりました。この抗体はもともと特異性の高い抗体だったのですが、希釈倍率が低く、抗体の消費が激しかったので、*Can Get Signal*®を使えば、抗体の使用量を減らせそうなので、抗体の節約に役立ちそうです。

実施例 3

ミリポア社吸引式免疫反応システム「SNAP i.d.」と免疫反応促進試薬「*Can Get Signal*®」を用いる迅速・高感度ウェスタンブロット

【データご提供】 神戸大学大学院 農学研究科 生命機能科学専攻 生物化学研究室 小島志織様、金丸研吾先生

当研究室で行っているSNAP i.d. (ミリポア社製) と免疫反応促進試薬 *Can Get Signal*® (東洋紡製) を用いる迅速・高感度ウェスタンブロット法をご紹介します。当研究室では、マニュアルに記載の方法を経験に基づいて若干改変して行っています。各研究室でのご研究の参考にしていただければ幸いです。

準備するもの (シングルウェルプレートホルダーを用いる場合*)
 *ダブルウェルプレートホルダーを用いる場合、液量は半分になります。

- ・ブロッキング液: 30 ml (ブロッキング ワン [ナカライテスク社製] をTBS-Tで20倍希釈したものなどを使用)
- ・*Can Get Signal*® solution 1: 4~6 ml, solution 2: 6 ml [東洋紡製]
- ・TBS-T (洗浄用): 180 ml
- ・発色用試薬 (NBT/BCIP) <発光試薬も使用可>

設定

バキューム: 15~20 kPa*, 25L/min. *メーカー推奨 40.63kPa 30L/min以上

若干低めに設定しています。バキュームのコックは、ウェルが空になってから15秒ほど余分に引くことです。

プロトコール

ブロッキング (通常の方法で行います)

TBS-T溶液にメンブレンを数分間浸す

SNAP i.d.にメンブレンをセット

← 上記ブロッキング溶液: 30 ml*
*メーカー推奨 30 ml

すぐに吸引する

← 1次抗体 4~6 ml*
(*Can Get Signal*® solution 1にて希釈)
*メーカー推奨 3 ml

10分間静置・吸引

TBS-T 30 ml × 3回洗浄
(TBS-T添加と吸引を繰り返す)

← 2次抗体 6 ml*
(*Can Get Signal*® solution 2にて希釈)
*メーカー推奨 3 ml

10分間静置・吸引

TBS-T 30 ml × 3回洗浄
(TBS-T添加と吸引を繰り返す)

検出

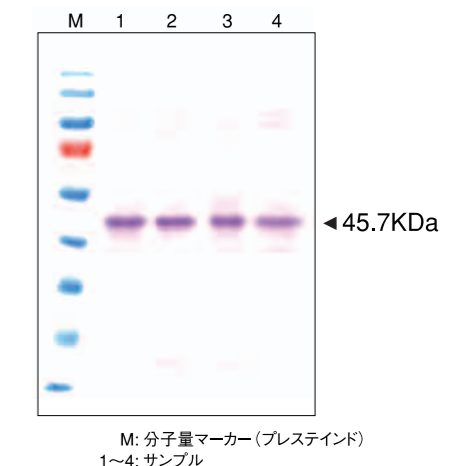


SNAP i.d. (ミリポア社)

解析条件

- サンプル:** シロイヌナズナから抽出した粗タンパク質 (5µg)
- ターゲット:** 5-Aminolevulinic acid dehydrogenase (45.7kDa)
- 1次抗体:** Rabbit 抗5-Aminolevulinic acid dehydrogenase抗体 (1:5,000希釈)
- 2次抗体:** Affinity Purified Antibody Phosphatase Labeled Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Liquid Conjugate (KPL社) (1:5,000希釈)
- 検出方法:** NBT/BCIP (発色用)

結果



M: 分子量マーカー (プレステインド)
1~4: サンプル

コメント

本ターゲットは *Can Get Signal*® を用いないと検出できないターゲットであり、SNAP i.d. と併用することで、迅速・高感度な検出が可能になりました。作業時間も3時間以上かかっていたものが、約30分に短縮できました。本事例は発色法で行っていますが、当然、発光法にも応用できると思われます。ブロッキング剤はターゲットにあわせて検討されることをおすすめします。