

(90 × 190mm Size)

FUJIFILM

Wako

Code No. 295-55201 (for 1,000 cm²)
Code No. 291-55203 (for 5,000 cm²)

ImmunoStar[®] Reagents

(for chemiluminescence detection)

ImmunoStar reagents from Wako are designed for a simple and highly sensitive immunoblotting utilizing detection by enhanced chemiluminescence. Detection levels comparable to those reached with radioactive labels are achieved by use of a unique enhancer. Sensitivity is further enhanced by use of Wako's ABC Solution (Streptavidin and Biotin-conjugated peroxidase complex).

[Features]

1. The immunoblotting assay using these chemiluminescent reagents can detect sub-pg amounts of the target protein within 1-3 minute(s) of exposure, which is 10 to 100 times more sensitive than those utilizing chromogenic detection.
2. The chemiluminescence emission continues for several hours, enabling the detection of additional small amounts of the target protein by prolonging the exposure.
3. The membrane is reusable after washing.

[Contents]

Reagent	1,000 cm ²	5,000 cm ²
Luminescence Solution A	70 mL	330 mL
Luminescence Solution B	70 mL	330 mL
Luminescence Solution C	30 mL	120 mL

[Materials and apparatuses to be prepared for immunoblotting]

- 1) Primary antibody
The titer or dilution rate of the primary antibody should be determined before use.
- 2) Blocking solution
Usually, 5% skim milk solution is used for blocking of the blotting membrane. For detection of phosphotyrosin, BSA or gelatin is recommended as the blocker.
- 3) Secondary antibody
Approximately 0.5 μg/mL of the following listed antibodies (available from FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation.), can be used as the secondary antibody. The dilution rate for each of the secondary antibodies should be determined by an appropriate experiment such as dot blot immunoanalysis of IgG before use.

- 1/8 -

Code No.	Description	Package Size
010-14031	Anti Mouse IgG(H + L), Goat, Affinity Purified, Biotin-conjugated	1 mg
013-14021	Anti Rabbit IgG(H + L), Goat, Affinity Purified, Biotin-conjugated	1 mg
014-16131	Anti Rat IgG(H + L), Goat, Affinity Purified, Biotin-conjugated	1 mg

- 4) ABC solution
ABC solution, composed of streptavidin and biotin-conjugated peroxidase, is useful for intensifying the chemiluminescent signal of the target protein in immunoblotting assays. Dilute ABC solution (Wako 017-15881), 1 : 100, for use as the working solution.
- 5) Wash solution
0.05% (w/v) Tween20 and 50 mmol/L TBS (pH 7.2)
- 6) Diluent
50 mmol/L TBS (pH 7.2)
- 7) Membrane
Nitrocellulose membrane or PVDF. The signal on nitrocellulose membrane is higher than on PVDF.
- 8) Detection apparatuses
X-ray film or luminescence image analyzer such as LAS 1000, (Fujifilm Corp. Tokyo, Japan)

[Immunoblot assay]

1. Preparation of working solution

Just before use, prepare the chemiluminescent solution by mixing Chemiluminescence Reagents A, B and C at a ratio of 6 mL, 6 mL, and 2 mL, respectively, per 100 cm² of membrane.

2. Chemiluminescent staining

- 1) Prepare a protein blotted membrane, 100 cm², by either electrophoretic transfer or dot blotting.
- 2) Immerse the membrane in 50 mL of wash solution for 5 minutes.
- 3) Introduce the membrane into 12 mL of the blocking solution, and incubate for 1 hour at 37 °C.
- 4) Wash the membrane with 50 mL of wash solution for 5 minutes. Repeat.
- 5) Incubate the membrane in 10 mL of the primary antibody solution for 1 hour at 37 °C, or under pre-determined conditions for the antibody.
- 6) Wash the membrane in 50 mL of wash solution for 5 minutes. Repeat twice.
- 7) Incubate the membrane in 10 mL of the biotin-conjugated

- 2/8 -

secondary antibody in 10mL of the antibody solution for 20 minutes at 37 °C.

- 8) For signal amplification using ABC solution, repeat step 4), followed by incubation of the membrane in 10mL of ABC solution for 20 minutes at room temperature or 37 °C.
- 9) Repeat step 6).
- 10) Introduce the membrane into 14 mL of the mixed chemiluminescent solution prepared just before use, allow it to react with the chemiluminescent solution for 1 minute. Then wrap the membrane with colorless plastic wrap. Avoid forming bubbles on the membrane.
- 11) Expose the wrapped membrane to x-ray film for approximately 1 minute and develop the film, or apply the wrapped membrane to an image analyzer such as a LAS 1000, (Fujifilm Corp. Tokyo, Japan). When using x-ray film, the exposure time may vary from 0.5 to 60 minutes, depending on the intensities of the signal and backgrounds. As for using image analyser LAS 1000, the wrapped membrane is exposed for initial 5 minutes to estimate optimized exposure time for the sample.

3. Restaining of used membrane

The membrane once immunologically stained can be re-used after removal of the antibodies used for the detection. The procedure is described below.

- 1) Place the membrane in a solution containing 7 mol/L guanidine HCl, 50 mmol/L glycine, 0.05 mol/L EDTA-3Na, 0.1 mol/L KCl, and 20 mmol/L 2-mercaptoethanol. Place the solution and membrane on a rocker for 10 minutes.
- 2) Wash the membrane with 50 mL of wash solution for 10 minutes. Repeat.
- 3) The membrane is ready to be used in the immunoblotting assay protocol described above.

[Notes]

- 1) Before beginning the procedure, calculate the volumes of the solutions needed in each step according to the membrane size (cm²), based on the description in the protocol.
- 2) To conserve the primary antibody, spread several drops of the antibody solution on parafilm, cover the membrane with it and allow the membrane to react with the antibody.
- 3) Use of peroxidase inhibitors such as sodium azide in the solutions and reaction media should be avoided.

[Trouble Shooting]

Possible causes	Treatments
1. No signal detected <ul style="list-style-type: none"> • Failure blotting • Proteolytic digestion of sample 	Check the transfer process Add protease inhibitor in sample preparation

- | | |
|------------------------------------|--|
| • Property of the primary antibody | Determination the titer or optimal conditions for the immunoreaction |
|------------------------------------|--|

2. Low signal

- | | |
|------------------------------|-----------------------------------|
| • Insufficient sample | Increase the sample quantity used |
| • Insufficient exposure time | Prolong the exposure time |
| • The sample causes as in 1 | See the treatment in 1 |

3. Signal Too high

- | | |
|---|-----------------------------|
| • Excess sample amount | Decrease the sample amount |
| • Conditions for immunoreaction of the primary antibody | Optimize the immunoreaction |

4. High background

- | | |
|---|---|
| • Conditions for immunoreaction of the primary antibody | Optimize the immunoreaction |
| • Failure of blocking | Prolong the blocking time or try other blocker |
| • Contamination of apparatuses used | Use clean apparatuses |
| • Longer exposure | Diminish the exposure time or expose the membrane after 5 min on the reaction |
| • Insufficient washing in step 11) | Repeat the wash several times |

5. Non specific signal

- | | |
|--|--|
| • The property of the primary antibody | Optimize the immunoreaction |
| • Insufficient blocking | Prolong the blocking or try another blocking reagent |

Storage 2-10 °C, in the dark

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
 Telephone : + 81-6-6203-3741
 Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://www.wako-chem.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
 Richmond, VA 23237
 U.S.A.
 Telephone : + 1-804-271-7677
 Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggenstrasse 12
 D-41468 Neuss
 Germany
 Telephone : + 49-2131-311-0
 Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

研究用試薬

コード No. 295-55201 (1,000cm² 用)
 コード No. 291-55203 (5,000cm² 用)

**プロットング用
 イムノスター[®] 試薬**

〔はじめに〕

本イムノスター試薬は、独自のエンハンサーを用いたルミノール-ペルオキシダーゼ検出システムに基づいています。ストレプトアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体(ABC)との組み合わせにより、RI法の感度に匹敵するほど高感度に目的のタンパク質を検出することができます。

〔特長〕

1. 化学発光法を用いているため、発色法に比べ数十倍から数百倍の感度が得られます。
2. 発光は数時間持続しますので、長時間の露出によりさらに微量のタンパク質の検出ができます。
3. 発色法や他の化学発光検出法に比べバックグラウンドが低くなっています。
4. 発光検出後、発色法での検出も可能です。
5. リプロビングが可能です。
6. Non-RI法ですので、特別な施設は必要としません。

〔内 容〕

内 容	1,000 cm ² 用	5,000 cm ² 用
発光溶液 A	70 mL	330 mL
発光溶液 B	70 mL	330 mL
発光溶液 C	30 mL	120 mL

〔キット以外に必要な試薬、器材〕

- 1) 一次抗体
 希釈倍率は、予備実験により適宜決定して下さい。希釈には一次抗体の説明書に記載された希釈液または予め決定した適当な希釈液を用いて下さい。
- 2) ブロッキング溶液
 5% スキムミルク溶液を調製して下さい。
 (注意) ホスホチロシンの検出を行う場合には、BSA、ゼラチン等をブロッキングに用いて下さい。
- 3) 二次抗体溶液
 次のビオチン標識抗体を使用する場合には、0.5 μg/mLを目安に希釈して下さい。ペルオキシダーゼ標識抗体を使用する場合には、予備実験により希釈倍率を決定して下さい。

コード No.	品 名	包 装
010-14031	抗マウス IgG (H + L), ヤギ, アフィニティ精製, ビオチン結合	1 mg
013-14021	抗ウサギ IgG (H + L), ヤギ, アフィニティ精製, ビオチン結合	1 mg
014-16131	抗ラット IgG (H + L), ヤギ, アフィニティ精製, ビオチン結合	1 mg

4) ABC 溶液

ABC 溶液 (コード No. 017-15881) を希釈液で 100 倍に希釈して下さい。

- 5) 洗浄液 (50 mmol/L TBS - 0.05% Tween 20, pH 7.2)
- 6) 希釈液 (50 mmol/L TBS, pH 7.2)
- 7) メンブラン

PVDF 膜またはニトロセルロース膜をご使用下さい。

8) 検出器材

X 線フィルムまたは LAS 1000 (富士フィルム株式会社) の様な発光イメージアナライザー

〔使用方法〕

(1) 発光溶液の調製 (用時調製)

発光溶液は、発光溶液 A、B、C を 3 : 3 : 1 の割合で混合して調製して下さい。メンブラン 100 cm² を染色する場合には、発光溶液 A 6 mL に発光溶液 B 6 mL、発光溶液 C 2 mL を加え、混合して下さい。

(2) ウェスタンプロットング

(メンブラン 100 cm² を染色する場合)

- 1) メンブランの浸潤
 メンブランの説明書に従って下さい。
- 2) 転写
 セミドライ式、タンク式の転写装置によりゲルからメンブランに転写して下さい。
- 3) 洗浄
 洗浄液 50 mL 中でメンブランを 5 分間振盪させる。
- 4) ブロッキング
 ブロッキング溶液 12 mL 中でメンブランを 37℃ で 1 時間インキュベートします。
- 5) 洗浄
 洗浄液 50 mL 中でメンブランを 5 分間振盪させた後、洗浄液を捨てます。この操作を再度繰り返します。
- 6) 一次抗体反応
 一次抗体 10 mL 中でメンブランを通常 37℃ で 1 時間インキュベートします。反応温度、反応時間については一次抗体の説明書に従って下さい。
- 7) 洗浄
 洗浄液 50 mL 中でメンブランを 5 分間振盪させた後、洗浄液を捨てます。この操作を更に 2 回繰り返します。

8)二次抗体反応

8-1) ビオチン標識二次抗体 10 mL 中でメンブランを室温または 37℃で 20 分間インキュベートします。

8-2) ペルオキシダーゼ標識二次抗体を使用する場合には、抗体溶液 10 mL 中でメンブランを通常、室温または 37℃で 20 分間インキュベートします。次の 9)、10) の操作は不要ですので、11) 洗浄の操作を行って下さい。

9) 洗浄

洗浄液 50 mL 中でメンブランを 5 分間振盪させた後、洗浄液を捨てます。この操作を再度繰り返します。

10) ABC 反応

ABC 溶液 10 mL 中でメンブランを室温または 37℃で 20 分間インキュベートします。

11) 洗浄

洗浄液 50 mL 中でメンブランを 5 分間振盪させた後、洗浄液を捨てます。この操作を更に 2 回繰り返します。

12) 発光反応

発光溶液 14 mL 中でメンブランを 1 分間浸します。メンブランをラップに挟み、空気を抜き、暗室にて X 線フィルムに露出させます。30 秒から 1 時間程度経過してから現像処理します。

(注意)

1. 露出時間は検出像、バックグラウンドの強弱により決めて下さい。通常 1 分で良好な結果が得られます。
2. LAS 1000 を用いる場合には、まず 5 分間露出して下さい。その結果に応じて、露出時間を調整して下さい。

(3) リプロービング

1) 抗体の除去

メンブランを 7 mol/L 塩酸グアニジン、50 mmol/L グリシン、0.05 mmol/L EDTA・3Na、0.1 mol/L 塩化カリウム、20 mmol/L 2-メルカプトエタノール 50 mL 中で室温で 10 分間振盪処理します。

2) 洗浄

洗浄液 50 mL 中でメンブランを 10 分間振盪させた後、洗浄液を捨てます。この操作を再度繰り返します。

3) 以下の操作は、ウエスタンブロットングの 4) ~ 12) に従って下さい。

〔使用上の注意〕

- ① 本説明書には、100 cm² のメンブランに使用する液量が記載されていますので、大きさの異なる膜を用いる場合には、その表面積から計算して下さい。
- ② 一次抗体を少量使用する場合には、パラフィルム上に一次抗体を少量滴下し、上からメンブランをかぶせて下さい。
- ③ アジ化ナトリウム等ペルオキシダーゼ阻害剤を反応液、緩衝液などに用いないで下さい。

〔トラブルシューティング〕

1. シグナルが出ない

原因	対処法
1) プロットングがうまくいっていない	プロットング操作を再度確認
2) サンプルの分解	再調製
3) 一次抗体、二次抗体の条件が不適	抗体濃度の条件を再検討する

2. シグナルが弱い

1) サンプル量が少ない	十分量のサンプルを使用する
2) 露出時間が短い	長くする
3) プロットングがうまくいっていない	プロットング操作を再度確認
4) サンプルの分解	再調製
5) 一次抗体の条件が不適	抗体濃度の条件を再検討する

3. シグナルが強すぎる

1) 一次抗体、二次抗体の条件が不適	抗体濃度の条件を再検討する
2) サンプル量が多すぎる	サンプル量を減らす

4. バックグラウンドが高い

1) 一次抗体、二次抗体の条件が不適	抗体濃度の条件を再検討する
2) ブロッキングが不十分	ブロッキングの反応時間を延ばす。他のブロッキング剤を試してみる
3) プロットングに使用する器具の汚れ	きれいな器具を使う
4) 露出時間が長すぎる	露出時間を短くする。または、X 線フィルムに露出する前に 5 分間静置した後、露出する
5) 11) 洗浄の操作が不十分	洗浄をさらに数回くりかえして下さい

5. 非特異反応が出る

1) 一次抗体、二次抗体の条件が不適	抗体濃度の条件を再検討する
2) 内因性アビジン、ビオチンの存在	ABC 法を使用せず、ペルオキシダーゼ標識抗体を用いる
3) ブロッキングが不十分	ブロッキングの反応時間を延ばす。他のブロッキング剤を試してみる

〔貯 法〕 2~10℃、遮光保存

〔包 装〕

コード No.	包 装
295-55201	1,000 cm ² 用
291-55203	5,000 cm ² 用

製造発売元

富士フィルム 和光純薬株式会社
 大阪市中央区道修町三丁目 1 番 2 号
 Tel : 06-6203-3741