

FUJIFILM**Wako**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 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	5,000 cm ²
Luminescence Solution A	330 mL
Luminescence Solution B	330 mL
Luminescence Solution C	120 mL

[Materials and apparatuses to be prepared for immunoblotting]

- 1) Primary antibody
- 2) Blocking solution
Usually, 5% skim milk solution is used for blocking of the blotting membrane. For detection of phosphotyrosine, BSA or gelatin is recommended as the blocker.
- 3) Secondary antibody (Biotin-conjugated secondary antibody or peroxidase-conjugated secondary antibody)
- 4) ABC solution
- 5) Wash solution [0.05 w/v% Tween 20 and 50 mmol/L TBS, pH 7.2.]
- 6) Diluent [50 mmol/L TBS, pH 7.2] (as necessary)
- 7) Membrane
Nitrocellulose membrane or PVDF.
- 8) Detection apparatuses
X-ray film or luminescence image analyzer

Please prepare commercial or homemade products as needed. The dilution rate of the antibody depends on the titer of the antibody used. In addition, the performance of ABC solutions varies depending on the manufacturer and preparation method. It is recommended to consider appropriate conditions of use by performing dot-blot analysis, etc.

[Procedure]

1. Preparation of working solution

Just before use, chemiluminescent solutions are prepared by mixing chemiluminescent reagents A, B, and C at a ratio of 6 mL, 6 mL, and 2 mL per 100 cm² of membrane, respectively.

2. Chemiluminescent staining

- 1) Membrane infiltration according to the instructions for use of the membrane.
- 2) Transfer from gel to membrane by transfer equipment (semi-dry or tank type).
- 3) Shake the membrane in 50 mL of Wash solution for 5 minutes.
- 4) Incubate the membrane in 12 mL of blocking solution at 37°C for 1 hour.
- 5) Shake the membrane in 50 mL of Wash solution for 5 minutes. Change Wash solution and repeat the procedure.
- 6) Incubate the membrane in 10 mL of primary antibody solution at 37°C for 1 hour or under pre-determined antibody conditions.
- 7) Shake the membrane in 50 mL of Wash solution for 5 minutes. Change Wash solution and repeat the procedure twice.
- 8) Secondary antibody reaction:
 - 8-1) Incubate the membrane in 10 mL of biotin-labeled secondary antibody at room temperature or 37°C for 20 minutes.
 - 8-2) If a peroxidase-labeled secondary antibody is used, incubate the membrane in 10 mL of antibody solution for 20 minutes, usually at room temperature or 37°C. Since the following steps 9) and 10) are not necessary, proceed to 11) for washing step.
- 9) Shake the membrane in 50 mL of Wash solution for 5 minutes. Change the Wash solution and repeat the process.
- 10) Perform ABC reaction ; incubate the membrane in 10 mL of ABC solution at room temperature or 37°C for 20 minutes.
- 11) Shake the membrane in 50 mL of Wash solution for 5 minutes. Replace Wash solution and repeat the procedure twice.
- 12) Immerse the membrane in 14 mL of the chemiluminescence solution prepared immediately before for 1 minute. Place the membrane between plastic wrap, remove air, and expose to the X-ray film in a dark room. 30 seconds to 1 hour later, develop the X-ray film.

(Precaution)

1. The exposure time is determined by the strength of the detected image and background. Usually, good results can be obtained in about 1 minute.
2. When using a device such as LAS 1000, first expose for 5 minutes. Adjust the exposure time according to the results.

3. Reuse of used membranes

Once immunologically stained, the membrane can be reused after removing the antibodies used for detection. The procedure is described below.

- 1) Place the membrane in 50 mL of the solution containing 7 mol/L guanidine hydrochloride, 50 mmol/L glycine, 0.05 mol/L EDTA-3Na, 0.1 mol/L KCl, 20 mmol/L 2-mercaptoethanol. Place the solution and membrane in a rocker for 10 minutes.
- 2) Shake the membrane in 50 mL of Wash solution for 10 minutes. Change Wash solution and repeat the procedure.
- 3) The membrane is ready for use in the immunochemiluminescence method described above.

[Notes]

1. Before starting the procedure, calculate the volume of solution required in each step according to the size of the membrane (cm²) based on the instructions provided in the protocol.
2. To save the primary antibody, place a few drops of antibody solution on parafilm, cover with a membrane, and allow the membrane to react with the antibody.
3. Avoid the use of peroxidase inhibitors such as sodium azide.

[Trouble Shooting]

Possible causes	Treatments
1. No signal detected	
• Failure blotting	Check the transfer process
• Proteolytic digestion of sample	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, Doshinachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : +81-6-6203-3741
Facsimile : +81-6-6201-5964
<http://ffwk.fujifilm.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

Fuggerstrasse 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. 291-55203 (5,000cm²用)**プロッティング用
イムノスターTM 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. リプロービングが可能です。
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	5,000cm ² 用
発光溶液 A	330mL
発光溶液 B	330mL
発光溶液 C	120mL

【キット以外に必要な試薬、器材】

- 1) 一次抗体
- 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 (ビオチン標識二次抗体、またはペルオキシダーゼ標識二次抗体)
- 4) ABC 液
- 5) 洗浄液 (50mmol/L TBS - 0.05% Tween 20, pH 7.2)
- 6) 希釀液 (50mmol/L TBS, pH 7.2) (必要に応じて)
- 7) メンプラン
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線フィルムまたは発光イメージアナライザー

必要に応じて市販品や自家調製品をご用意下さい。

抗体の希釀率は、使用する抗体の力価によって異なります。また、ABC溶液は製造社、調液方法により性能が変動します。ドット

プロット解析などを行うなどして適切な使用条件を検討することを推奨します。

【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。メンプラン100cm²を染色する場合には、発光溶液A 6mLに発光溶液B 6mL、発光溶液C 2mLを加え、混合して下さい。

(2) ウエスタンプロッティング**(メンプラン100cm²を染色する場合)**

- 1) メンプランの浸潤
メンプ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プランに転写して下さい。
- 3) 洗浄
洗浄液50mL中でメンプランを5分間振盪させる。
- 4) ブロッキング
ブロッキング溶液12mL中でメンプランを37℃で1時間インキュベートします。
- 5) 洗浄
洗浄液50mL中でメンプランを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10mL中でメンプランを通常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50mL中でメンプランを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10mL中でメンプランを室温または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10mL中でメンプランを通常、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50mL中でメンプランを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10mL中でメンプランを室温または37℃で20分間インキュベートします。
- 11) 洗浄
洗浄液50mL中でメンプランを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14mL中でメンプランを1分間浸します。メンプラン

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

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

2) 洗浄

洗浄液 50mL 中でメンプランを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、ウエスタンプロッティングの4)～12)に従って下さい。

【使用上の注意】

①本説明書には、100cm²のメンプ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、上からメンプ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) プロッティングがうまくいかない	プロッティ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) プロッティングがうまくいかない	プロッティ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) プロッキングが不十分	プロッキングの反応時間を延ばす。他のプロッキング剤を試してみる
3) プロッティ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) プロッキングが不十分	プロッキングの反応時間を延ばす。他のプ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
291-55203	5,000cm 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