

**FUJIFILM****Wako**

Code No. 296-69901 ( 200 cm<sup>2</sup>)  
292-69903 (1000 cm<sup>2</sup>)  
290-69904 (2000 cm<sup>2</sup>)

## ImmunoStar® LD

ImmunoStar® LD is a chemiluminescence reagent which includes a unique luminol derivative L-012 as the substrate. It allows detection of targets with a high signal to noise ratio, minimizing background noise. The substrate produces a signal of long enough duration to be captured by image sensors.

### [Kit Components]

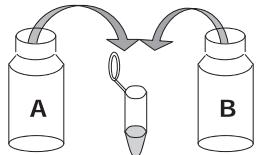
	200 cm <sup>2</sup>	1,000 cm <sup>2</sup>	2,000 cm <sup>2</sup>
Chemiluminescence Solution A	10 mL	50 mL	100 mL
Chemiluminescence Solution B	10 mL	50 mL	100 mL

### [Storage]

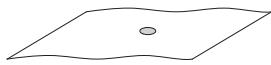
2-10°C in the dark.

### ⟨Protocol Summary⟩

① Just before use, prepare Luminescence Working Solution by mixing Chemiluminescence Solution A and Chemiluminescence Solution B at a ratio of 1:1.



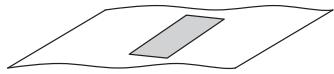
② Add the Luminescence Working Solution onto a plastic wrap by pipette. The volume needed for 100 μL/cm<sup>2</sup>.



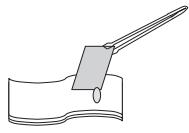
③ Place a blot protein side down with the membrane on the wrap.



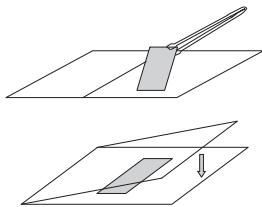
④ Incubate the membrane for a few seconds to 5 minutes.



⑤ Drain excess the Luminescence Working Solution.



⑥ Cover the membrane with a clean wrap and remove any air bubbles.



⑦ Expose the wrapped membrane to X-ray film or image analyzer.

### [Protocol]

#### Membrane Preparation

1. Prepare a protein blotted membrane by electrophoretic transfer or dot blotting.
2. Introduce the membrane into 50 mL of blocking buffer, and incubate for 1 hour at room temperature (RT) or incubate overnight at a cool place.
3. Wash the membrane with 50 mL of wash Solution (e.g. PBS-T or TBS-T) with agitation for 10 minutes, followed by 5 minutes washing, two or three times.
4. Prepare primary antibody with antibody diluent in an appropriate concentration and incubate the membrane with the antibody solution for more than 1 hour at RT or overnight at a cool place.
5. Wash the membrane with 50 mL of wash Solution with agitation for 10 minutes, followed by 5 minutes washing, two or three times.
6. Prepare secondary antibody with antibody diluent in an appropriate concentration and incubate the membrane with the antibody solution with agitation for 1 hour at RT.
7. Wash the membrane with 50 mL of wash Solution with agitation for 10 minutes, followed by 5 minutes washing, two or three times.

#### Detection Procedure

1. Just before use, prepare Luminescence Working Solution by mixing Chemiluminescence Solution A and Chemiluminescence Solution B at a ratio of 1:1.
2. Add the Luminescence Working Solution onto a plastic wrap by a pipette. The volume needed for 100 μL/cm<sup>2</sup>.
3. Place a blot membrane side down with the membrane on the wrap. Be sure to touch the entire protein side with the Luminescence Working Solution on the wrap.
4. Incubate the membrane in the Luminescence Working Solution for a few seconds to 5 minutes.
5. Drain excess the Luminescence Working Solution from the membrane. Use absorbent tissue to remove the excess liquid.
6. Cover the membrane with a clean wrap or polyethylene sheet and remove any air bubbles.
7. a) CCD imager protocol
  - ① Place the membrane on an imager tray with protein side up.
  - ② Place the tray in the CCD imager.
  - ③ Operate the imager as recommended by manufacturer.
- b) X-ray film protocol
  - ① Place the membrane in a film cassette with protein side up.
  - ② Operate the X-ray film processor as recommended by manufacturer in the dark room using red safe lights. A recommended first

exposure time is 15 or 60 seconds as a test to determine optimal exposure time.

## 【Notes】

- Wash solution : Select wash solution A or B depending on your purpose.  
Wash Solution A : PBS-0.1% Tween 20  
Wash Solution B : TBS-0.1% Tween 20
  - The optimal antibody concentration can be varied depending on the antibody titer to be used. Perform a systematic dot blot analysis to determine the appropriate concentration.
  - Immediately before use, prepare blocking buffer, antibody solution and Luminescence Working Solution.
  - The signal cannot be sufficiently detected in streptavidin-biotin system according to circumstances.

#### **[Trouble Shooting]**

Problems	Possible causes	Solutions
Weak or no signal	Insufficient protein was loaded to the gel.	Increase the amount of protein loaded to the gel.
	Transfer efficiency to a membrane was poor.	Stick the gel, membrane and blotting papers each other. Use fresh transfer buffer. Check protein transfer by staining the gel and membrane.
	The concentration of antibody is too low.	Increase the amount of antibody.
	Incubation time of antigen-antibody reaction was too short.	Increase incubation time of antigen-antibody reaction.
	The Luminescence Working Solution activity is reduced.	Immediately before use, prepare the Luminescence Working Solution.
Excessive signal	Exposure time was too short.	Increase exposure time.
	Too much protein of interest was loaded to the gel.	Decrease the amount of protein loaded to the gel.
	The concentration of antibody was too high.	Decrease the amount of antibody.
Spots in the protein bands	The incubation time of antigen-antibody reaction was too long.	Shorten incubation time of antigen-antibody reaction.
	Too much protein was loaded on the gel and/or the too high concentration of antibody was used.	Decrease the amount of protein loaded on the gel and/or lower the concentration of antibody. It is recommended to perform a systematic dot blot analysis.
High background	The exposure time is too long.	Shorten the exposure time.
	The concentration of antibody was too high.	Decrease the amount of antibody.
	Incubation time of antigen-antibody reaction was too long.	Shorten incubation time of antigen-antibody reaction.
	The volume of antibody solution was inadequate.	Increase the volume of antibody solution to cover the whole membrane and agitate the membrane in antibody solution sufficiently.
	Blocking was insufficient.	Increase blocking duration, numbers or volume of washes. Use a different blocking reagent.
	Washing was insufficient.	Add additional washing steps or increase washing duration.

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://ffwk.fujifilm.co.jp>

**FUJIFILM Wako Chemicals**  
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>

コード No. 296-69901 ( 200cm<sup>2</sup>)  
292-69903 (1000cm<sup>2</sup>)  
290-69904 (2000cm<sup>2</sup>)

## イムノスター® LD

ルミノール誘導体である L-012 を基質として使用した発光試薬です。パックグラウンドノイズを低く抑えられるため、高い S/N 比で化学発光を検出できます。また、発光シグナルが安定しており、持続性に優れています。

### 【キット内容】

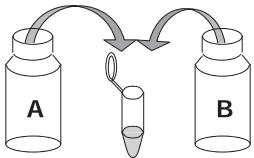
	200cm <sup>2</sup>	1,000cm <sup>2</sup>	2,000cm <sup>2</sup>
Chemiluminescence Solution A	10mL	50mL	100mL
Chemiluminescence Solution B	10mL	50mL	100mL

### 【保存条件】

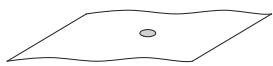
遮光・2-10°C 保存

### 〈使用方法概要〉

①発光液 A と発光液 B を等量混合して下さい。使用直前に混合するよう注意して下さい。



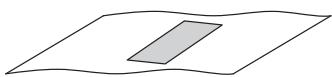
②広げたラップの上に混合した発光液をピペットで移して下さい。必要量の目安は 100 μL/cm<sup>2</sup> です。



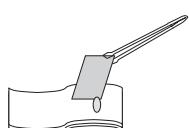
③膜のタンパク質を転写した面を下にし、混合発光液と接触させて下さい。



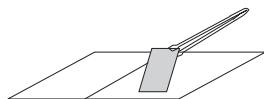
④混合発光液が膜全体に広がっていることを確認して下さい。数秒から 5 分間反応させて下さい。



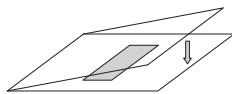
⑤反応後、膜をピンセットで持ち上げ、端を清潔な布や紙につけて余分な混合発光液を取り除いて下さい。



⑥新しいラップの上に反応させた膜を移して下さい。膜のタンパク質結合面を下にしてラップがしわにならないようにして下さい。また、ラップと膜の間に空気が入らないよう注意して下さい。



⑦ラップを膜で包んで下さい。



⑧CCD イメージャーや X 線フィルムで検出して下さい。

### 【使用方法】 検出までの準備

- (1) SDS-PAGE など電気泳動を終えた後、PVDF 膜またはニトロセルロース膜にターゲットを転写して下さい。
- (2) 転写後の膜を適量のブロッキング液で室温 1 時間以上振とうするか、あるいは冷蔵で一晩浸してブロッキングして下さい。
- (3) ブロッキング液を捨て、約 50mL / 枚の洗浄液 (PBS-T や TBS-T など) で膜を 10 分間振とうして下さい。続いて洗浄液で 5 分間 2 ~ 3 回振とうして下さい。
- (4) ブロッキング後の膜を洗浄液で適切な濃度に希釈した一次抗体液に浸して下さい。室温で 1 時間以上振とうするか、あるいは冷蔵で一晩浸して反応させて下さい。
- (5) 一次抗体液を捨て、約 50mL / 枚の洗浄液で膜を 10 分間振とうして下さい。続いて洗浄液で 5 分間 2 ~ 3 回振とうして下さい。
- (6) 一次抗体反応を終えた膜を洗浄液で適切な濃度に希釈したペルオキシダーゼ標識二次抗体液に浸して下さい。室温で 1 時間以上振とうして反応させて下さい。
- (7) 二次抗体液を捨て、約 50mL / 枚の洗浄液で膜を 10 分間振とうして下さい。続いて洗浄液で 5 分間 2 ~ 3 回振とうして下さい。

### 検 出

- (1) 発光液 A と発光液 B を等量混合して下さい。
- (2) 広げたラップの上に混合した発光液をピペットで移して下さい。必要量の目安は 100 μL/cm<sup>2</sup> です。
- (3) 膜のタンパク質を転写した面を下にし、混合発光液と接触させて下さい。
- (4) 混合発光液が膜全体に広がっていることを確認し、およそ 5 分間反応させて下さい。膜を少し動かし、混合発光液を膜に馴染ませて下さい。
- (5) 余分な混合発光液を、ティッシュなどで吸い取って除去して下さい。
- (6) 膜を新しいラップあるいは透明なポリエチレンシート、ビニールシートなどに挟んで包んで下さい。
- (7) a) CCD イメージアナライザーを使用する場合  
ターゲットを転写した面を上に向け、CCD イメージアナライザーにセットして検出して下さい。  
b) X 線フィルムの場合  
暗室でターゲットを転写した面と X 線フィルムを密着させて検出して下さい。適切な露光時間がわからない場合は、15 秒や 60 秒で試してみることをお勧めします。

**【備考】**

洗浄液：洗浄液は目的に応じて下記洗浄液 A もしくは洗浄液 B をご使用下さい。

洗浄液 A : PBS-0.1% Tween 20

洗浄液 B : TBS-0.1% Tween 20

- 抗体の希釈率は、使用する抗体の力価によって異なります。ドットプロット解析を行うなどして適切な希釈率を検討することを推奨します。
- ブロッキング液、抗体液、混合発光液は必要量を用時調製して下さい。
- ストレプトアビシン - ビオチン検出系では、十分な感度を得られないことがあります。

**【トラブルシューティング】**

問題	原因	解決方法
シグナルが弱い、もしくは検出されない	ゲルにアプライするタンパク質の量が不十分	アプライするタンパク質の量を増やして下さい。
	膜への転写効率が低い	ゲル、膜及びプロッティングろ紙を互いにしっかりと重ねて下さい。 作りたての転写バッファーを使用して下さい。 ゲルと膜を染色するなどして転写効率を確認して下さい。
	抗体濃度が低い	使用する抗体量を増やして下さい。
	抗原抗体反応のインキュベート時間が短い	抗原抗体反応時間を延ばして下さい。
	混合発光液が失活している	混合発光液を調製後はなるべく早くご使用下さい。
	露光時間が短い	露光時間を延ばして下さい。
シグナルが強すぎる	ゲルにアプライする目的タンパク質の量が多すぎる	アプライするタンパク質の量を減らして下さい。
	抗体濃度が高すぎる	使用する抗体量を減らして下さい。
	抗原抗体反応のインキュベート時間が長すぎる	抗原抗体反応のインキュベート時間を短くして下さい。
バンドにスポットが生じる	タンパク質の量が多すぎる、あるいは抗体濃度が高すぎる	タンパク質の量を減らすか、あるいは抗体量を減らして下さい。プロット解析などをを行い、適切な条件を検討して下さい。
バックグラウンドが高い	露光時間が長すぎる	露光時間を短くして下さい。
	抗体濃度が高すぎる	使用する抗体量を減らして下さい。
	抗原抗体反応のインキュベート時間が長すぎる	抗原抗体反応のインキュベート時間を短くして下さい。
	抗体溶液量が適切ではない	抗体溶液量を膜全体に行き渡るように増やし、十分な抗体溶液中で振とうさせて下さい。
	膜のブロッキングが不十分	ブロッキングの時間を長くする、ブロッキング回数を増やす、ブロッキング剤の量を増やすなどして下さい。 ブロッキング剤の種類を変更して下さい。
	膜の洗浄が不十分	洗浄回数を追加して下さい。または洗浄時間を延ばして下さい。

**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

2304KA2