

**FUJIFILM****Wako**

<for Research Use Only> Code No. 290-68603 (10 reactions)  
298-68604 (40 reactions)

## Immuno-enhancer

**[Introduction]**

Immuno-enhancer is a reagent which accelerates antigen-antibody reactions of Western blotting, dot blotting and ELISA by optimizing the reaction conditions. The effect is more noticeable when using a weakly-reactive antibody. It is possible to get high S/N ratio.

Immuno-enhancer contains Reagent A for the reaction of the primary antibody and Reagent B for the reaction of the secondary antibody. The reagents are ready-to-use, so can be used without dilution.

**[Features]**

- 1) Enhancing of signals
- 2) High S/N ratio
- 3) Ready-to-use

**[Reagent contents]**

	10 reactions	40 reactions
Reagent A	50 mL × 1 vial	200 mL × 1 vial
Reagent B	50 mL × 1 vial	200 mL × 1 vial

\*Package size is based on the use when 5 mL of Reagent A and 5 mL of Reagent B are used for 1 reaction.

**[Storage]**

2 ~ 10 °C

**[Protocols]****Western Blotting****< Using primary antibody and secondary antibody >**

- 1) Perform the electrophoresis of the samples. Transfer to the membrane and block the membrane following each protocol.

- It is possible to use the following blocking solutions: skim milk, casein, BSA, synthetics and so on. We recommend using of non-fat skim milk when using skim milk.
- Use the suitable blocking solution for the antibody and the assay because some antibodies may increase non-specific signals depending on the kind of the blocking solution.
- Wash the membrane after the blocking step because the residual blocking solution may cause background signals.  
Washing conditions : TBS-T (rinse × 2, wash for 15 min × 1, for 5 min × 2).

- 2) Dilute the primary antibody with Reagent A.

- Adjust the volume of Reagent A to the membrane.  
Ex : 5-10 mL / 10 × 10 cm membrane.
- Refer to the concentration of the antibody recommended by the supplier.

- 3) Incubate the membrane in the primary antibody solution at room temperature for 1 hour with shaking.

- Change the incubation time as necessary. Refer to the incubation time recommended by the supplier of the antibody.

- 4) Wash the membrane in TBS-T for 10 minutes with shaking.(3 times)

- 5) Dilute the secondary antibody with Reagent B.

- Adjust the volume of Reagent A to the membrane.  
Ex : 5-10 mL / 10 × 10 cm membrane.
- Refer to the concentration of the antibody recommended by the supplier.

- 6) Incubate the membrane in the secondary antibody solution at room temperature for 1 hour with shaking.

- Change the incubation time as necessary. Refer to the incubation time recommended by the supplier of the antibody.

- 7) Wash the membrane in TBS-T for 10 minutes with shaking.(3 times)

- 8) Proceed to the detection.

**< Using labeled antibody, in case of direct detection >**

- 1) Perform the electrophoresis of the samples. Transfer to the membrane and block the membrane following each protocol.

- It is possible to use the following blocking solutions: skim milk, casein, BSA, synthetics and so on. We recommend using of non-fat skim milk when using skim milk.
- Use the suitable blocking solution for the antibody and the assay because some antibodies may increase non-specific signals depending on the kind of the blocking solution.
- Wash the membrane after the blocking step because the residual blocking solution may cause background signals.  
Washing conditions : TBS-T (rinse × 2, wash for 15 min × 1, for 5 min × 2).

- 2) Dilute the antibody with Reagent B.

- Adjust the volume of Reagent B to the membrane.  
Ex : 5-10 mL / 10 × 10 cm membrane.
- Refer to the concentration of the antibody recommended by the supplier.
- When you can not get a good result with using Reagent B, please try to use Reagent A. Because some antibodies may be able to get better result with using Reagent A.

- 3) Incubate the membrane in the antibody solution at room temperature for 1 hour with shaking.

- 4) Wash the membrane in TBS-T for 10 minutes with shaking.(3 times)

- 5) Proceed to the detection.

**[Note]**

Immuno-enhancer may not be able to be used for Western blotting of samples including the antibody for immunoprecipitation, because Immuno-enhancer accelerates antigen-antibody reactions therefore the secondary antibody reacts to the H-chain and L-chain of the antibody for immunoprecipitation.

### Dot Blotting

- 1) Spot the samples onto the membrane. Transfer to the membrane and block the membrane following each protocol.

- It is possible to use the following blocking solutions : skim milk, casein, BSA, synthetics and so on. We recommend using of non-fat skim milk when using skim milk.
- Use the suitable blocking solution for the antibody and the assay because some antibodies may increase non-specific signals depending on the kind of the blocking solution.
- Wash the membrane after the blocking step because the residual blocking solution may cause background signals.  
Washing conditions : TBS-T (rinse × 2, wash for 15 min × 1, for 5 min × 2).

- 2) Please follow the Western blotting protocol starting with Step 2).

### ELISA (Sandwich ELISA) in case of using 96-wells plate

#### < Using primary antibody and secondary antibody >

- 1) Coat the plate with antibody. Block the plate following ELISA protocol.

- It is possible to use the following blocking solutions : skim milk, casein, BSA, synthetics and so on. We recommend using of non-fat skim milk when using skim milk.
- Use the suitable blocking solution for the antibody and the assay because some antibodies may increase non-specific signals depending on the kind of the blocking solution.
- Wash the plate after the blocking step because the residual blocking solution may cause background signals.  
Washing conditions : PBS-T (250 µL/well × 3).

- 2) Dilute the antigen in Reagent A.

- 3) Dilute the primary antibody in Reagent A.

- Refer to the concentration of the antibody recommended by the supplier.

- 4) Add 50 µL of the antigen solution and 50 µL of the primary antibody solution to each well and mix.

- 5) Seal the plate with a microplate sealing tape and incubate at 37°C for 1 hour.

- It is possible to incubate at 4°C for 16 hours.
- When performing the antigen reaction and the primary antibody reaction independently, wash the plate 3 times with 250 µL of PBS-T per well after the antigen reaction.

- 6) Carefully remove the solution using a pipette.

- 7) Wash the plate with 250 µL of PBS-T per well. (3 times )

- 8) Dilute the secondary antibody in Reagent B.

- Refer to the concentration of the antibody recommended by the supplier.

- 9) Add 100 µL of the secondary antibody solution to each well.

- 10) Seal the plate with a microplate sealing tape and incubate at 37°C for 1 hour.

- It is possible to incubate at 4°C for 16 hours.

- 11) Carefully remove the solution using a pipette.

- 12) Wash the plate with 250 µL of PBS-T per well. (3 times )

- 13) Proceed to the detection.

#### < Using labeled antibody, in case of direct detection >

- 1) Coat the plate with antibody. Block the plate following ELISA protocol.

- It is possible to use the following blocking solutions : skim milk, casein, BSA, synthetics and so on. We recommend using of non-fat skim milk when using skim milk.
- Use the suitable blocking solution for the antibody and the assay because some antibodies may increase non-specific signals depending on the kind of the blocking solution.
- Wash the plate after blocking step because the residual blocking solution may cause background signals.  
Washing conditions : PBS-T (250 µL/well × 3).

- 2) Dilute the antigen in Reagent A.

- 3) Add 100 µL of the antigen solution to each well.

- 4) Seal the plate with a microplate sealing tape and incubate at 37°C for 1 hour.

- It is possible to incubate at 4°C for 16 hours.

- 5) Carefully remove the solution using a pipette.

- 6) Wash the plate with 250 µL of PBS-T per well. (3 times )

- 7) Dilute the labeled antibody in Reagent B.

- Refer to the concentration of the antibody recommended by the supplier.

- 8) Add 100 µL of the secondary antibody solution to each well.

- 9) Seal the plate with a microplate sealing tape and incubate at 37°C for 1 hour.

- It is possible to incubate at 4°C for 16 hours.

- 10) Carefully remove the solution using a pipette.

- 11) Wash the plate with 250 µL of PBS-T per well. (3 times )

- 12) Proceed to the detection.

## [Troubleshooting]

Problem	Possible cause	Solution
Western blotting · Dot blotting		
Weak signal (Faint bands)	Insufficient protein	Increase the amount of total protein loaded on the gel. We recommend the examination of the optimum protein concentration by preparing a dilution series of protein.
	Insufficient antibody	Increase the antibody concentration. We recommend the examination of the optimum antibody concentration by preparing a dilution series of the antibody.
	Poor or incomplete transfer	Increase transfer time or voltage. High molecular weight proteins may require more time for transfer. Ensure that there is good contact between the membrane and gel. Altering transfer method from semi-dry to wet may improve the efficiency of transfer.
	Over transfer	Reduce transfer time or voltage for low molecular weight protein to avoid the protein going through the membrane. Altering the membrane from nitrocellulose to PVDF may get better results.
	Unsuitable blocking solution	Examine the suitable blocking solution for the antibody and the assay, because some antibodies may decrease the signals depending on the kind of blocking solution. Using skim milk including fat may cause weak signals.
Extra bands	Excessive antibody	Reduce the antibody concentration. We recommend the examination of the optimum antibody concentration by preparing a dilution series of the antibody.
	Excessive protein	Reduce the amount of protein loaded on the gel. We recommend the examination of the optimum protein concentration by preparing dilution series of protein.
	Insufficient blocking	Examine the suitable blocking solution for the antibody and the assay, because some antibodies may increase non-specific signals depending on the kind of the blocking solution. Do not use casein when using anti phosphor antibodies, because casein is a phosphorylated protein.
	Insufficient wash	Increase the number of washes.
High background	Excessive antibody	Reduce the antibody concentration. We recommend the examination of the optimum antibody concentration by preparing a dilution series of antibody.
	Excessive protein	Reduce the amount of protein loaded on the gel. We recommend the examination of the optimum protein concentration by preparing a dilution series of protein.
	Insufficient blocking	Examine the suitable blocking solution for the antibody and the assay, because some antibodies may increase non-specific signals depending on the kind of the blocking solution. Do not use casein when using anti phosphor antibodies, because casein is a phosphorylated protein.
	Insufficient wash	Increase the number of washes.
	Film overexposed	Reduce exposure time.

Problem	Possible cause	Solution
White band	Excessive protein	Reduce the amount of protein loaded on the gel. Excessive protein can cause extremely high levels of localized signal, and it results in rapid, complete consumption of substrate at the point. Therefore a part of the band cannot be observed when exposed to film.
	Excessive antibody	Reduce the antibody concentration. Excessive antibody can cause extremely high levels of localized signal, and it results in rapid, complete consumption of substrate at the point. Therefore a part of the band cannot be observed when exposed to film.
ELISA		
Weak signal	Insufficient antigen or antibody	Examine the optimum concentrations of antigen and antibody.
Excessive signal	Excessive antigen or antibody	Examine the optimum concentrations of antigen and antibody.
	Excessive reaction time	Reduce the antigen-antibody reaction time.
High background	Excessive antigen or antibody	Examine the optimum concentrations of antigen and antibody.
	Insufficient blocking	Examine the suitable blocking solution for the antibody and the assay, because some antibodies may increase non-specific signals depending on the kind of the blocking solution. Do not use casein when using anti phosphor antibodies, because casein is a phosphorylated protein.
	Insufficient wash	Increase the number of washes.
Data spread	ELISA plate	The absorption capacity may be very different between the plates. Additionally, some plates may be very different between lots. Be careful selecting the plates.

## 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://fwk.fujifilm.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation	FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH
1600 Bellwood Road Richmond, VA 23237 U.S.A. Telephone : +1-804-271-7677 Facsimile : +1-804-271-7791 <a href="http://www.wakousa.com">http://www.wakousa.com</a>	Fuggenstrasse 12 D-41468 Neuss Germany Telephone : +49-2131-311-0 Facsimile : +49-2131-311100 <a href="http://www.wako-chemicals.de">http://www.wako-chemicals.de</a>

コード No. 290-68603 (10 回用)  
298-68604 (40 回用)

## イムノ・エンハンサー

### 【はじめに】

本品は、ウエスタンブロッティング、ドットプロッティング、ELISA の抗原・抗体反応を最適化し促進する試薬です。特に反応性の低い抗体を用いた場合に効果があり、高い S/N 比を得ることができます。  
本品は、一次抗体反応用の Reagent A と、二次抗体反応用の Reagent B の 2 つから構成されており、原液をそのまま抗体希釈液として用いることができます。

### 【特長】

- 1) シグナルを増強
- 2) 高い S/N 比
- 3) 特別な操作が不要。抗体希釈液の代わりに使用

### 【試薬構成】

	10 回用	40 回用
Reagent A	50mL × 1 本	200mL × 1 本
Reagent B	50mL × 1 本	200mL × 1 本

※使用回数は、1 解析に各試薬を 5mL 使用した場合の回数です。

### 【保存条件】

2 ~ 10°C

### 【使用方法】

#### ウエスタンブロッティング

##### <一次抗体、二次抗体を使用する場合>

- 1) 各プロトコールに従い、SDS-PAGE、膜転写、ブロッキングを行う。

- ・ブロッキング剤は、スキムミルク、カゼイン、BSA、人工合成品などを用いることができます。スキムミルクをご使用の場合は、無脂肪品を推奨しております。
- ・ブロッキング剤の種類によって、解析に用いる抗体により非特異的シグナルが増加する場合がありますので、ご使用の抗体、アッセイ系に最適なものをご使用下さい。
- ・ブロッキング液の残留はバックグラウンド等の原因となりますので、ブロッキング後は必ず膜の洗浄を行って下さい。  
洗浄：TBS-T（リンス×2回、15 分間×1回、5 分間×2回）。

- 2) 一次抗体を Reagent A で希釈する。

- ・液量はご使用の膜の大きさに合わせて変更下さい。目安：5 ~ 10mL / 10 × 10cm 膜。
- ・希釈倍率は、使用する抗体の推奨条件等をご参考下さい。

- 3) 一次抗体希釈液に膜を浸し、室温で 1 時間振とうする。

- ・反応時間は必要に応じて変更下さい。使用する抗体の推奨条件等もご参考下さい。

- 4) TBS-T で 10 分間振とうし、膜を洗浄する。（3 回）

- 5) 二次抗体を Reagent B で希釈する。

- ・液量はご使用の膜の大きさに合わせて変更下さい。目安：5 ~ 10mL / 10 × 10cm 膜。
- ・希釈倍率は、使用する抗体の推奨条件等をご参考下さい。

- 6) 二次抗体希釈液に膜を浸し、室温で 1 時間振とうする。

- ・反応時間は必要に応じて変更下さい。使用する抗体の推奨条件等もご参考下さい。

- 7) TBS-T で 10 分間振とうし、膜を洗浄する。（3 回）

- 8) 検出反応を行う。

### <抗原・抗体反応を 1 段階で行う場合>

- 1) 各プロトコールに従い、SDS-PAGE、膜転写、ブロッキングを行う。

- ・ブロッキング剤は、スキムミルク、カゼイン、BSA、人工合成品などを用いることができます。スキムミルクをご使用の場合は、無脂肪品を推奨しております。
- ・ブロッキング剤の種類によって、解析に用いる抗体により非特異的シグナルが増加する場合がありますので、ご使用の抗体、アッセイ系に最適なものをご使用下さい。
- ・ブロッキング液の残留はバックグラウンド等の原因となりますので、ブロッキング後は必ず膜の洗浄を行って下さい。  
洗浄：TBS-T（リンス×2回、15 分間×1回、5 分間×2回）。

- 2) 抗体を Reagent B で希釈する。

- ・液量はご使用の膜の大きさに合わせて変更下さい。目安：5 ~ 10mL / 10 × 10cm 膜。
- ・希釈倍率は、使用する抗体の推奨条件等をご参考下さい。
- ・抗体の種類によっては、Reagent A を用いた方が良好な結果が得られる場合がありますので、Reagent B で満足な結果が得られない場合は、Reagent A をお試し下さい。

- 3) 抗体希釈液に膜を浸し、室温で 1 時間振とうする。

- ・反応時間は必要に応じて変更下さい。使用する抗体の推奨条件等もご参考下さい。

- 4) TBS-T で 10 分間振とうし、膜を洗浄する。（3 回）

- 5) 検出反応を行う。

### 【注意】

本品は、免疫沈降サンプルのウエスタンブロッティングには使用できない場合があります。抗原・抗体反応を促進するため、二次抗体が免疫沈降用抗体の H 鎮、L 鎮と反応を示す場合があります。

### ドットプロッティング

- 1) 各プロトコールに従い、膜へのタンパク質のスポットティング、ブロッキングを行う。

- ・ブロッキング剤は、スキムミルク、カゼイン、BSA、人工合成品などを用いることができます。スキムミルクをご使用の場合は、無脂肪品を推奨しております。
- ・ブロッキング剤の種類によって、解析に用いる抗体により非特異的シグナルが増加する場合がありますので、ご使用の抗体、アッセイ系に最適なものをご使用下さい。
- ・ブロッキング液の残留はバックグラウンド等の原因となりますので、ブロッキング後は必ず膜の洗浄を行って下さい。  
洗浄：TBS-T（リンス×2回、15 分間×1回、5 分間×2回）。

- 2) ウエスタンブロッティングの使用方法 2) 以降に従う。

## ELISA（サンドイッチ法）96穴プレート使用時

### <一次抗体、二次抗体を使用する場合>

- 1) ELISA プロトコールに従い抗体のプレートへの固相化、ブロッキングを行なう。

- ・ブロッキング剤は、スキムミルク、カゼイン、BSA、人工合成品などを用いることができます。スキムミルクをご使用の場合は、無脂肪品を推奨しております。
- ・ブロッキング剤の種類によって、解析に用いる抗体により非特異的シグナルが増加する場合がありますので、ご使用の抗体、アッセイ系に最適なものをご使用下さい。
- ・ブロッキング液の残留はバックグラウンド等の原因となりますので、ブロッキング後は必ずプレートの洗浄を行なって下さい。  
洗浄：PBS-T 250 μL／ウェル×3回。

- 2) 抗原を Reagent A で適宜希釈する。

- 3) 一次抗体を Reagent A で希釈する。

- ・希釈倍率は、使用する抗体の推奨条件等をご参照下さい。

- 4) 抗原希釈液、一次抗体希釈液を各 50 μL／ウェル分注し混合する。

- 5) プレートシールを貼り、37℃で1時間インキュベートする。

- ・4℃で16時間インキュベートすることも可能です。
- ・抗原反応、一次抗体反応を別に行なう場合は、抗原反応後、プレートを洗浄 (PBS-T 250 μL／ウェル×3回) 後、一次抗体反応を行なって下さい。

- 6) 各ウェル中の一次抗体溶液をピベットにより除去する。

- 7) PBS-T を 250 μL／ウェル分注し、洗浄する。(3回)

- 8) 二次抗体を Reagent B で希釈する。

- ・希釈倍率は、使用する抗体の推奨条件等をご参照下さい。

- 9) 二次抗体希釈液を 100 μL／ウェル分注する。

- 10) プレートシールを貼り、37℃で1時間インキュベートする。

- ・4℃で16時間インキュベートすることも可能です。

- 11) 各ウェル中の二次抗体溶液をピベットにより除去する。

- 12) PBS-T を 250 μL／ウェル分注し、洗浄する。(3回)

- 13) 検出反応を行う。

### <標識抗体を用い抗原を直接検出する場合>

- 1) ELISA プロトコールに従い抗体のプレートへの固相化、ブロッキングを行なう。

- ・ブロッキング剤は、スキムミルク、カゼイン、BSA、人工合成品などを用いることができます。スキムミルクをご使用の場合は、無脂肪品を推奨しております。
- ・ブロッキング剤の種類によって、解析に用いる抗体により非特異的シグナルが増加する場合がありますので、ご使用の抗体、アッセイ系に最適なものをご使用下さい。
- ・ブロッキング液の残留はバックグラウンド等の原因となりますので、ブロッキング後は必ずプレートの洗浄を行なって下さい。  
洗浄：PBS-T 250 μL／ウェル×3回。

- 2) 抗原を Reagent A で適宜希釈する。

- 3) 抗原希釈液を 100 μL／ウェル分注する。

- 4) プレートシールを貼り、37℃で1時間インキュベートする。

- ・4℃で16時間インキュベートすることも可能です。

- 5) 各ウェル中の抗原溶液をピベットにより除去する。

- 6) PBS-T を 250 μL／ウェル分注し、洗浄する。(3回)

- 7) 抗体を Reagent B で希釈する。

- ・希釈倍率は、使用する抗体の推奨条件等をご参照下さい。

- 8) 抗体希釈液を 100 μL／ウェル分注する。

- 9) プレートシールを貼り、37℃で1時間インキュベートする。

- ・4℃で16時間インキュベートすることも可能です。

- 10) 各ウェル中の抗体溶液をピベットにより除去する。

- 11) PBS-T を 250 μL／ウェル分注し、洗浄する。(3回)

- 12) 検出反応を行う。

## 【トラブルシューティング】

トラブル	予想される原因	対 策
ウエスタンプロッティング・ドットプロッティング		
シグナルが弱い	試料タンパク質濃度が低い 抗体濃度が低い 膜転写が不十分	濃い試料を電気泳動して下さい。 希釈系列を作成し、最適濃度を検討されることをお奨めします。 最適な抗体濃度を検討下さい。 転写時間を延長するか、電流量をあげて下さい。また、転写方法をセミドライ式からウエット式に変更すると転写効率が改善される場合があります。
膜転写が過剰		転写時間を短くするか、電流量を下げて下さい。過剰な操作によりタンパク質が膜を透過する場合があります。また、ニトロセルロース膜を PVDF 膜に変更すると改善される場合があります。
ブロッキング剤が不適		ご使用の抗体、アッセイ系に最適なブロッキング剤の種類や濃度を検討下さい。ブロッキング剤の種類によって、シグナルが低下する場合があります。 スキムミルクは無脂肪品でない場合、シグナルが弱くなる場合があります。
エキストラバンドが多い	抗体濃度が高い 試料タンパク質濃度が高い	最適な抗体濃度を検討下さい。 試料濃度を薄めて電気泳動して下さい。 希釈系列を作成し、最適濃度を検討されることをお奨めします。
ブロッキングが不十分		ご使用の抗体、アッセイ系に最適なブロッキング剤の種類や濃度を検討下さい。ブロッキング剤の種類によって、非特異的シグナルが増加する場合があります。 りん酸化タンパク質の検出時には、カゼインは使用しないで下さい。
洗浄が不十分		洗浄回数を増やして下さい。

トラブル	予想される原因	対 策	
バックグラウンドが高い	抗体濃度が高い 試料タンパク質濃度が高い プロッキングが不十分 洗浄が不十分 露光時間が長い	最適な抗体濃度を検討下さい。 試料濃度を薄めて電気泳動して下さい。 希釈系列を作成し、最適濃度を検討されることをお奨めします。 ご使用の抗体、アッセイ系に最適なプロッキング剤の種類や濃度を検討下さい。プロッキング剤の種類によって、非特異的シグナルが増加する場合があります。 りん酸化タンパク質の検出時には、カゼインは使用しないで下さい。 洗浄回数を増やして下さい。 露光時間を短くして下さい。	
バンドの色が抜けた	試料タンパク質量が多い 抗体濃度が高い	試料濃度を薄めて電気泳動して下さい。バンドのタンパク質濃度が高い場合、酵素濃度が高くなり、発光基質が短時間で消化されることによりバンドの一部が消失する場合があります。 最適な抗体濃度を検討下さい。バンド上の酵素濃度が高い場合、発光基質が短時間で消化されることによりバンドの一部が消失する場合があります。	
ELISA	シグナルが弱い シグナルが強すぎる バックグラウンドが高い 値のプレが大きい	抗原濃度または抗体濃度が低い 抗原濃度または抗体濃度が高い 反応時間が長い 抗原・抗体反応時間を短くして下さい。 抗原濃度または抗体濃度が高い プロッキングが不十分 洗浄が不十分 ELISA プレート	条件検討を行って下さい。 条件検討を行って下さい。 条件検討を行って下さい。 ご使用の抗体、アッセイ系に最適なプロッキング剤の種類や濃度を検討下さい。プロッキング剤の種類によって、非特異的シグナルが増加する場合があります。 りん酸化タンパク質の検出時には、カゼインは使用しないで下さい。 洗浄回数を増やして下さい。 プレートの種類によりタンパク質の吸着効率が大きく異なる場合があります。また、ロット間差が大きいプレートがあります。

#### 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

2306KA2