



Easy-WESTERN Super

Primary Antibody Detecting Reagent for Western Blotting

(For high sensitivity and strong signal detection)

User 's Manual

Beacle, Inc.
OKAYAMA JAPAN

Storage condition and important information before use

1. The Multi-Antibody Detection (MAD) reagent should be stored at -20°C immediately after receiving, and should be returned to -20°C freezer as soon as possible after the use in order to prevent inactivation.
2. Dilution Buffer (20 x concentrate) should be stored at 4°C .
3. Marker Detection Reagent should be stored at 4°C .

---- Contents ----

| | |
|---|---|
| (1) Introduction | 2 |
| (2) Contents | 2 |
| (3) Related Products | 2 |
| (4) Preparation and the method for attached reagents | 2 |
| (5) Protocol for the use as a substitute for 2nd antibody | 3 |
| (6) Protocol for the use as reprobing enhancer | 3 |
| (7) Protocol for the use as simple signal enhancer | 3 |
| (8) Trouble shootings | 4 |
| (9) Contact infromations | 4 |

Important Notices

1. The reagent should be used only for research purpose, and not for diagnostic or medical purpose.
2. It is important to keep these reagents in appropriate condition (as indicated above) to prevent their inactivation

(1)INTRODUCTION

Easy-WESTERN (EZW) is a primary antibody detecting reagent kit for western blotting. The kit is based on our original Multi-Antibody Detection (MAD) technology. EZW enables you to detect primary antibody without using secondary antibody, and gives you many advantages, such as high sensitivity detection, signal enhancement, quick one-step detection and simultaneous multi antigen detection and more that are not experienced by ordinary western blotting technique.

Two types of Easy-WESTERN kit are available, Easy-WESTERN Super and Easy-WESTERN Quick. Both kits are the same in their composition except for the manual attached. The manual in Easy-WESTERN Super is written such a way that users can easily perform detections with higher sensitivity or signal enhancement, while that in Easy-WESTERN Quick with quick operation and multi-antigens. Both manuals can be downloaded from our webpage.

(Principle): The main component of the kit is MAD reagent that is nano-size protein particles with high affinity to antibodies. Each particle is composed of about 100 antibody-binding proteins and is labeled with HRP of 50 molecules. Because of these properties, MAD reagent enables high sensitivity and quick detection.

Advantages

- 1.No need of secondary antibody: MAD reagent can detect most types of primary antibodies¹⁾, and you do not have to prepare many types of secondary antibodies.
- 2.Can get higher signal as compared ordinary method using 2nd antibody²⁾: You can detect weakly expressed antigen or reduce amount of precious primary antibody needed.
- 3.Can enhance weak signals detected by ordinary 2nd antibody method: You can enhance a weak signal once observed by 2nd antibody, just by processing the same membrane with EZW.
- 4.Easy to use: MAD reagent, the main component of EZW, can be used easily. Just exchange the secondary antibody to MAD reagent and apply to membranes.
 - 1) MAD reagent may not work well with mouse IgG1 and goat IgG. For Mouse IgG1 please use Mouse IgG enhancer that can cover the less sensitivity.
 - 2) EZW's performance depends on the type of antibody, and we do not warrant the higher sensitivity in all cases.

(2)PRODUCT LINEUP AND COMPOSITION (the manual applies to below products)

| Product # | Product name | Content |
|-----------|--|---|
| BCL-EZS01 | Easy-WESTERN Super basic | MAD reagent, Dilution buffer, for 50 tests |
| BCL-EZS02 | Easy-WESTERN Super Marker detector set | Basic plus Marker detector, for 50 tests |
| BCL-EZS04 | Easy-WESTERN Super Mouse enhancer set | Basic plus Mouse IgG enhancer, for 50 tests |
| BCL-EZS03 | Easy-WESTERN Super full set | Basic plus Marker detector and Mouse IgG enhancer, for 50 tests |

(3)Related products

| Product # | Product name | description |
|-----------|-----------------------------------|--|
| BCL-EZM01 | Marker detector | for Easy-WESTERN (for 50 test) |
| BCL-EZE01 | Mouse IgG enhancer | for Easy-WESTERN (for 50 test) |
| BCL-EZB01 | Dilution buffer | for Easy-WESTERN (x20, conc., 50mL) |
| BCL-125A | Signal Booster Solution A (250mL) | Enhancer for antibody-antigen reaction |

(4) PREPARATION AND METHODS FOR ATTACHED REAGENTS

1. Prepare dilution buffer by diluting 1 part of 20 x concentrate with 19 parts of DW. Before use, add skim milk at 5% to the diluted buffer (5% skim milk/dilution buffer)
2. Prepare TBS-T(150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 0.1% Tween-20, pH 7.6).
3. For membrane blocking we recommend skim milk (not included in the kit), and this manual describes the method using skim milk, but any other blocking reagent may be possible to use.

4. Marker detector is used to detect molecular markers, that are designed to be detected by secondary antibodies (such as MagicMark XP, Invitrogen), by MAD reagent.
 - To use, add 1/10000 volume of Marker detector into primary antibody reaction mixture.
 - The remaining procedure is the same as indicated in the below instructions.
5. Mouse IgG enhancer is used to enhance weak signals detected by using mouse IgGs such as IgG1
 - To use add Mouse IgG enhancer (dilution factor 2000) into 5% skim milk-containing dilution buffer with which MAD reagent is diluted.
 - The remaining procedure is the same as indicated in the below instructions.
 - We recommend pre-examination when you use this reagent in methods other than general method where MAD reagent is merely used as a substitute of secondary antibody.

(5) METHOD TO USE AS A SUBSTITUTE FOR SECONDARY ANTIBODY

This is the most general way of usage and best suited to get higher sensitivity and strong signal.

1. Separate protein sample(s) by general SDS-PAGE procedure.
2. Transfer protein to PVDF membrane from gel by general protocol.
3. Block with 5 % skim milk in TBS-T for 1 hour at room temperature.
4. Wash membrane with TBS-T (5 min x 3 times)
5. Incubate the membrane with primary antibody diluted in 1% skim milk/TBS-T for 1 hr at RT. (The primary antibody's dilution should follow the supplier's recommendation at the first trial. Appropriate dilution should be determined then. Signal Booster, solution A, can be used to further strength the signal)
6. Wash membrane with TBS-T (5 min x 3 times)
7. Dilute MAD reagent to 1/2000 in 5% skim milk/dilution buffer and incubate membrane in it for 1 hr at RT. MAD reagent can be used at 1/4000 to 1/1000 dilution.
8. Wash membrane with TBS-T (5 min x 3 times)
9. Detect signal by commercial HRP detection reagent.

(6) METHOD FOR ENHANCING SIGNALS BY REPROBING

This is a method to enhance weak signals once detected by ordinary detection using the same membrane.

1. Membrane with weak signal detected by ordinary 2nd antibody method. (Membrane have to be still wet with buffer solutions, dried membrane cannot be used)
2. Wash membrane with TBS-T (5 min x 3 times)
3. Incubate membrane with MAD reagent for 1 hr at RT as described in (5)-7.
4. Wash membrane with TBS-T (5 min x 5 times)
5. Detect signal by commercial HRP detection reagent.

(7) METHOD FOR ENHANCING SIGNALS DETECTED BY 2ND ANTIBODY

This is a method to enhance 2nd antibody-detected signals as the 3rd reaction

2. Perform the same procedures as described in (5) 1 to 6.
3. Incubate membrane with HRP-conjugated secondary antibody.
4. Wash membrane with TBS-T (5 min x 3 times)
5. Incubate membrane with MAD reagent for 1 hr at RT as described in (5)-7.
6. Wash membrane with TBS-T (5 min x 5 times)
7. Detect signal by commercial HRP detection reagent.

(8) TROUBLE SHOOTINGS

| Trouble | Causes and Measures |
|--|---|
| Weak signal | 1. Low amount of antigen: Increase the concentration of antigen |
| | 2. Low primary antibody concentration: increase the concentration of primary antibody. |
| | 3. Low protein transfer: Increase the electric current or transfer time. |
| | 4. Strong blocking: over blocking reduced the signal intensity. Reduce the time or lower the concentration of blocking agents |
| | 5. Primary antibody is either mouse IgG ₁ or Goat IgG: Consider the usage of EZW for enhancing signal method. |
| | 6. Adherence of MAD reagent: When dilute MAD reagents in buffer without blocking agents, use low protein binding tubes. |
| whited out of signal band | 7. Too much antigen or antibody: Too much signal inhibits luminescence, reduced the antigen or antibody to appropriate concentrations. |
| Many extra-bands | 8. Too much antibodies: excess antibody resulted in increases non-specific signals. Reduced the antibody to appropriate concentration. |
| | 9. Too much protein: Reduces the amount of protein in electrophoresis. |
| | 10. not enough blocking: block the membrane with 5% skim milk /TBS-T for over 1 hrs. |
| | 11. MAD reagent inactivated: Inappropriate storage of MAD reagents causes inactivation, and sometimes produces non-specific signal. Reduce the concentration of MAD reagents or replace with new one. |
| High background High background | 12. not enough washing: increase the number and the duration of washing. |
| | 13. High antibody concentration or long incubation: When high background with enough signal band visible, reduce the antibody concentration or reaction time with antibody. |
| | 14. Too much MAD reagent: Reduce the concentration of MAD reagents. |
| | 15. When using antigen-antibody reaction enhancer, insufficient washing causes high background: Increase the number and the duration of washing. |
| By simultaneous detection, one band shown weak signal. | 16. One primary antibody weakly binds to antigen or MAD reagent: increase the concentration of the antibody with weak signal. |
| | 17. Insufficient washing of primary antibody: Increase the number and the duration of washing. |
| | 18. Washing of multiple primary antibodies conducted in the same chamber: A trace amount of antibody by reacting with MAD reagent resulted in weaker signal in non-balanced signals one, Please wash membrane separately. |
| No signal with one-step method | 19. With not purified antibody, such as serum, one-step method may not work due to contaminated IgGs. Use purified antibodies or detect by two-step method. |

The Q&A contains items related to Easy-WESTERN Quick

(9) CONTACT

Beacle Inc. [Manufacturer]

5303 Haga, Kita-Ku, Okayama 701-1221, Japan

Tel/FAX: +81-86-268-8091

E-mail: technical-support@beacle.com

Website: www.beacle.com

【Distributor】



COSMO BIO CO., LTD.

Inspiration for Life Science

TOYO EKIMAE BLDG. 2-20, TOYO 2-CHOME, KOTO-KU, TOKYO 135-0016 JAPAN

URL: <http://www.cosmobio.com>

e-mail: export@cosmobio.co.jp

[International/Outside Japan] Phone: +81-3-5632-9617 [国内連絡先] Phone: 03-5632-9610

FAX: +81-3-5632-9618

FAX: 03-5632-9619

Easy-WESTERN Super

ウェスタンブローディング用一次抗体検出試薬キット

(高感度 Western Blotting 用)

取扱説明書

Beacle, Inc.

OKAYAMA JAPAN

(試薬の保存と取扱上の注意)

1. 本試薬到着後、抗体検出試薬(MAD 試薬)は速やかに-20℃で保存ください。また、使用後も速やかに-20℃に保存してください。劣化の原因となります。
2. 希釈バッファー(20 倍濃縮)は 4℃で保存ください。
3. マーカー検出試薬、及びマウス IgG 増感試薬は-20℃で保存ください。

--- 目 次 ---

| | |
|----------------------------|---|
| (1) はじめに | 2 |
| (2) 製品内容 | 2 |
| (3) 関連製品のご案内 | 2 |
| (4) 準備と付属試薬の使用方法 | 2 |
| (5) 一般的な使用方法 | 3 |
| (6) リブロービング時に利用する方法 | 3 |
| (7) 二次抗体反応の増感に利用する方法 | 3 |
| (8) その他 | 3 |
| (9) トラブルシューティング | 4 |
| (10) お問い合わせ先 | 4 |

ご注意

1. 本試薬は研究用試薬です。診断・臨床用試薬としては使用しないでください。
2. Easy-WESTERN 試薬は、劣化を防ぐため上記の保存条件を守ってください。

(1) はじめに

Easy-WESTERN は、独自開発のマルチ抗体検出(MAD) 試薬を利用したウェスタンブローディング専用の一次抗体検出試薬キットです。本キットを利用することによって、標識二次抗体なしで、各種の一次抗体の検出が可能となります。また、本キットを利用することによって従来法では出来なかった高感度検出、シグナル増強、迅速検出、同時検出等多くのメリットを得ることが出来ます。

Easy-WESTERN には Easy-WESTERN Super と Easy-WESTERN Quick の 2 種が用意されています。どちらの製品も同じ成分と構成ですが、Easy-WESTERN Super は高感度検出、シグナル増強向けのマニュアルが添付されており、Easy-WESTERN Quick には迅速検出、同時検出向けのマニュアルが添付されています。なお、何れのマニュアルも当社 HP よりダウンロードできます。

【原理】

本試薬の主要成分である MAD 試薬の本体は、高抗体結合能を有するタンパク質を約 100 分子提示するタンパク質粒子です。各粒子はそれぞれ凡そ 50 分子の HRP が標識されています。こうした性質のため、本試薬は高感度、迅速検出などを可能とします。

●本製品の特長●

1. 二次抗体が不要: 殆どの一次抗体を検出することが可能であり^{1)*}、一次抗体の動物種に対する各種二次抗体を準備する必要がありません。
2. 二次抗体を用いる従来法に比べ高いシグナルを得ることが可能^{2)*}: 低い発現量の抗原検出が可能となります。また、一次抗体量を減らすことができ、高価な一次抗体の節約につながります。
3. 二次抗体で検出したシグナルの増強が可能: 二次抗体利用法で検出したシグナルが弱い場合、メンブレンを洗浄し、本試薬との反応により再度検出することでより高いシグナルを得ることができます。
4. 使用方法が容易: キット付属の MAD 試薬を希釈し、二次抗体の代わりに使用するだけです。

注: 1) 一部検出し難い抗体種(主なものとしてマウス IgG1、Goat IgG)がありますが、マウス IgG1 の場合専用増強試薬によって高感度検出が可能です。
2) 検出する抗原や用いる抗体によって性能は異なります。
3) 血清を含むサンプルを用いる場合、血清中の IgG と反応するため注意が必要です。

(2) 製品内容 (本マニュアルは以下の全製品に適用されます)

| 製品番号 | 製品名 | 内容 |
|-----------|------------------------------|-----------------------------------|
| BCL-EZS01 | Easy-WESTERN Super 基本セット | MAD 試薬、希釈バッファー、50 回分 |
| BCL-EZS02 | Easy-WESTERN Super マーカー検出セット | 基本セット+マーカー検出試薬、50 回分 |
| BCL-EZS04 | Easy-WESTERN Super マウス増感セット | 基本セット+マウス IgG 増感試薬、50 回分 |
| BCL-EZS03 | Easy-WESTERN Super フルセット | 基本セット+マウス IgG 増感試薬+マーカー検出試薬、50 回分 |

使用回数は 10ml の実験系を用いた場合の数値を示しています。

(3) 関連製品のご案内

| 製品番号 | 製品名 | 製品概要 | 参考価格 |
|-----------|-----------------------------------|------------------------------|---------|
| BCL-EZQ01 | Easy-WESTERN Quick 基本セット | One-step、同時検出用 (50 回分) | ¥30,000 |
| BCL-EZM01 | マーカー検出試薬 | Easy-WESTERN 用 (50 回分) | ¥3,500 |
| BCL-EZE01 | マウス IgG 増感試薬 | Easy-WESTERN 用 (50 回分) | ¥3,500 |
| BCL-EZB01 | 希釈バッファー | Easy-WESTERN 用 (20 倍濃縮、50mL) | ¥3,500 |
| BCL-125A | Signal Booster Solution A (250mL) | 一次抗体反応増強試薬 | ¥9,500 |

その他の関連製品もあります。当社 HP をご覧ください。

(4) 準備、及び、マーカー検出試薬とマウス IgG 増感試薬の使用方法

1. キット付属の 20 倍濃縮希釈バッファーの必要量を取り精製水で 20 倍に希釈し、最終 5% となるようにスキムミルクを溶解してください。本バッファーは MAD 試薬の希釈に利用します。
2. PVDF メンブレンはポアサイズ 0.20µm を推奨しています。ポアサイズ 0.45µm をご利用の場合、バックグラウンドが若干高くなる場合があります。

- TBS-T (150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 0.1% Tween-20, pH 7.6)、ブロッキング用スキムミルク (スキムミルク以外のブロッキング剤も利用可能です) を準備下さい。
- マーカー検出試薬は MagicMark XP (Invitrogen) などの二次抗体で検出する分子量マーカーの検出を本キットで可能とする試薬です。使用する時は、本試薬を一次抗体反応液中に 10000 倍希釈になるように添加して下さい。以降は後述の各手順に従って操作して下さい。
- マウス IgG 増感試薬はマウス IgG で反応が弱い時に使用する試薬です。特に、IgG1 を用いる場合には必須です。使用方法は下記の通りです。
 - ① 本増感試薬を 5% スキムミルク含有バッファーに 2000 倍希釈になるよう添加・混合します。
 - ② これに MAD 試薬を加え MAD 試薬希釈液を調製します。これ以降は下記の各操作手順に従って下さい。なお、「二次抗体の代りに利用する方法」以外の手法で利用される場合には、予め予備検討を行うことをお勧めします。

(5) 二次抗体の代わりに利用する場合の使用方法

最も一般的な利用方法で、より高い感度や強いシグナルを得る時に利用する方法です。

- SDS-PAGE により目的のタンパク質を分離する。
- SDS-PAGE のゲルからタンパク質を PVDF メンブレンに転写する。
- メンブレンを 5% スキムミルク/TBS-T で 1 時間 (室温) ブロッキングする。
- TBS-T で洗浄 (5 分 × 3 回) する。
- 一次抗体を 1% スキムミルク含有 TBS-T で希釈し 1 時間 (室温) 反応させる (メーカー推奨希釈倍率からお試ください。抗体によっては、さらに 5 倍程度まで希釈しても十分なバンドが検出可能です。希釈液に別売の Signal Booster solution A を用いるとさらに増強できます。TBS-T で洗浄 (5 分 × 3 回) する。
- MAD 試薬を 5% スキムミルク含有希釈バッファーで 2000 倍に希釈し、メンブレンと 1 時間 (室温) 反応させる。なお、MAD 試薬は 1000 倍～4000 倍の希釈範囲で最適倍率を決定ください。
- TBS-T で洗浄 (5 分 × 5 回) する。
- 市販の HRP 検出試薬 (化学発光) を用いて、シグナルを検出する。

(6) リブロービング時に増感用に利用する場合の使用方法

通常法でシグナルが弱かったメンブレンを再利用して強度を高めて検出する方法です。

- 二次抗体を用いた従来法で検出シグナルが弱かったメンブレン (乾燥したメンブレンは利用できません)
- TBS-T で洗浄 (5 分 × 3 回) する。
- 希釈した MAD 試薬と反応させる。((5) の 7 に記載した手法で行います)
- TBS-T で洗浄 (5 分 × 5 回) する。
- 市販の HRP 検出試薬 (化学発光) を用いて、シグナルを検出する。

(7) 二次抗体反応の増感に利用する方法

通常の二次抗体反応に追加してシグナルを増強させる場合に利用する手法です。

- (5) の 1～6 と同様の操作を行う。
- 二次抗体と反応させる (一次抗体の動物種に対する二次抗体を選択して下さい)。
- TBS-T で洗浄 (5 分 × 3 回) する。
- 希釈した MAD 試薬と反応させる。((5) の 7 に記載した手法で行います)
- TBS-T で洗浄 (5 分 × 5 回) する。
- 市販の HRP 検出試薬 (化学発光) を用いて、シグナルを検出する。

(8) その他

本試薬は非常に多くの可能性を秘めています。マニュアルに示した以外の使用方法もあります。多くは未だ検討中であり、且つユーザーが少ないと判断されるため公開しておりません。要望があればお知らせしますので、具体的な目的を沿えてご連絡下さい。

(9) トラブルシューティング

| トラブル | 原因と対策 |
|--------------------------------|---|
| シグナルが弱い | <ol style="list-style-type: none"> 1. 抗原タンパク質濃度が低い。できる限り濃い試料を電気泳動して下さい。 2. 抗体濃度が低い。最適な抗体濃度を検討して下さい。 3. 膜への転写が不十分。電流量を上げるか、転写時間を延長して下さい。 4. ブロッキングが強すぎる。オーバーナイトなどでブロッキングを強くしすぎるとシグナルが弱くなる場合があります。 5. 一次抗体が、Easy-WESTERN では検出し難い抗体種 (マウス IgG₁、Goat IgG) である。マウスの場合「マウス IgG 増感試薬」を利用下さい。また、これら抗体種に対する標識二次抗体をお持ちの場合は「増感試薬としての利用法」を検討して下さい。 6. MAD 試薬が吸着した。MAD 試薬は吸着し易い性質があります。本試薬をブロッキング剤非含有バッファーで希釈する場合は低吸着チューブを利用ください。 |
| バンドの一部が抜ける | <ol style="list-style-type: none"> 7. 抗原量が多すぎる、又は抗体濃度が高すぎる。過剰なシグナルにより発光が抑えられることがあります。最適な抗原量・抗体濃度を検討して下さい。 |
| エキストラバンドが多い | <ol style="list-style-type: none"> 8. 抗体濃度が高すぎる。過剰な抗体により、非特異的なシグナルが増大することがあります。最適な抗体濃度を検討して下さい。 9. タンパク質量が多すぎる。電気泳動するタンパク質量を減らして下さい。 10. ブロッキング不足。5% スキムミルク/TBS-T で 1 時間ブロッキングするなど、ブロッキングを強くして下さい。 11. MAD 試薬の劣化。室温又は 4℃ で長期保存した場合、劣化しエキストラバンドが出る場合があります。MAD 試薬の濃度を下げるか新しいものに代えてください。 12. 血清含有サンプルを用いると 50kDa 付近にエキストラバンドが出現する。血清中の IgG と反応したバンドです。血清中の IgG をプロテイン A カラムなどで除去して下さい。 |
| バックグラウンドが高い | <ol style="list-style-type: none"> 13. 洗浄が不十分、又はブロッキングが不十分。洗浄回数や洗浄時間を増やす、又はブロッキング剤濃度や時間を増やして下さい。 14. 抗体濃度が高い、又は反応時間が長い。抗体濃度を低くするか、抗体との反応時間を短くして下さい。 15. MAD 試薬の濃度が高すぎる。濃度を下げてください。 16. 一次抗体希釈液として抗原抗体反応増強剤を使用した場合、洗浄を十分に行わないとバックグラウンドが高くなる場合があります。一次抗体反応後の洗浄の回数や時間を増やして下さい。 |
| 同時検出において、一方のバンドが通常検出時よりシグナルが弱い | <ol style="list-style-type: none"> 17. 各種一次抗体と EZW の反応性が異なる。シグナルが弱い方の一次抗体濃度を増やして下さい。 18. 一次抗体反応後の洗浄が不十分。洗浄回数や時間を増やして下さい。 19. 別の抗体を用いて WB を行っているメンブレンと同一洗浄液内で洗浄している。微量残存する抗体と MAD 試薬の相互作用により、一方のシグナルが弱くなる場合があります。各メンブレンは独立して洗浄して下さい。 |
| ワンステップ法で検出不能 | <ol style="list-style-type: none"> 20. 精製純度の低い一次抗体 (抗血清など) を使用する場合、目的のバンドが検出されないことがあります。精製抗体を用いる、又は 2 段階法で検出して下さい。 |

(Easy-WESTERN Quick 用のトラブルシューティングも含まれています)

(10) お問い合わせ先

株式会社ビークル【製造発売元】

〒701-1221 岡山市北区芳賀 5303

TEL/FAX: 086-286-8091

E-mail: technical-support@beacle.com

人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
 URL: <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部 (お問い合わせ)
 TEL: (03) 5632-9610 FAX: (03) 5632-9619
 TEL: (03) 5632-9620

 **Beacle, Inc.**