
Immuno-AptamerTM, Rabbit IgG

マニュアル（第二版）

Immuno-AptamerTM, Rabbit IgG Code No. 310-07211 20 回用

I 製品説明

本品は、Rabbit IgG に対して特異的に結合する Aptamer を使用しています。この Aptamer は Native Form の IgG にのみ結合し、変性した IgG には結合しません。従って、免疫沈降後のサンプルのウエスタンブロットにおいて、通常の二次抗体を本品に置き換えることにより、抗体の H 鎖や L 鎖のバックグラウンドが検出されず、きれいな結果が得られます。

また、Aptamer の 5'末端は、biotin で修飾されていますので、streptavidin を介した検出が可能です。

本マニュアルの使用例では、Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate (SA-HRP) と化学発光検出試薬を使用した方法を記載しています。

■ ライセンス情報 : This product is made under licenses from NEC Soft and SomaLogic, Inc.

II 製品内容

Code No. 310-07211

Immuno-Aptamer™, Rabbit IgG	1 本	(凍結乾燥品)
100×Blocking Reagent	0.8 ml × 1 本	
RNase Free Water	1.0 ml × 1 本	
マニュアル	1 部	

本品をご使用になる前に、Immuno-Aptamer™ (凍結乾燥品) が入ったチューブにキット添付の **RNase Free Water 23μl** を添加し、溶解後は、4~5μl ずつ RNase Free チューブに小分けし、-20℃で保存してください。

III 保存条件

-20℃保存。

IV 使用上の注意

- 本品は、North-Western 法による検出以外の目的には使用できません。
- 本品は、試験研究用試薬です。医薬品、体外診断などの用途には使用できません。
- 試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱いしないでください。
- 本品に添付の Immuno-Aptamer™ は RNA をベースに製造されています。RNase の混入がないように、全ての操作は使い捨て手袋着用で行い、実験台、ピンセット、はさみは常に清潔に保ち、可能な限り使い捨てのプラスチック製器具を使用してください。
- コントロールとして細胞ライセート (Input サンプル) を泳動した場合、ライセートに含まれるビオチン化タンパク質が非特異的なバンドとして検出されます。Input サンプルでの検出には使用できませんのでご注意ください。

V 必要な試薬、機器

<本品以外に必要な試薬、機器など>

- 20×TBS (ニッポンジーン #317-90371など) *
*1×TBS組成 : 20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl
- Acetylated BSA (50 mg/ml ; ニッポンジーン #316-07291など) *
*使用するBSAの純度によってはシグナルが検出されないことがあります。
- 1 M MgCl₂ (ニッポンジーン #310-90361など)
- 蒸留滅菌水 (Distilled Water, Deionized, Sterile ; ニッポンジーン #318-90105)
- Tween® 20 (和光純薬工業 #166-21115など)
- Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate (SA-HRP ; GEヘルスケア #RPN2195など)
- HRP用検出試薬 (化学発光検出試薬 ; 和光純薬工業 #292-69903など)
- 目的のタンパク質を認識する一次抗体
- SDS-PAGE装置一式
- ブロッキング装置
- シーソー式シェーカー
- ローテーター
- ヒートブロックまたはサーマルサイクラー
- PVDFメンブレンまたはニトロセルロースメンブレン
- X線フィルム
- 洗浄用プラスチック容器
- ハイブリバッグ
- ハイブリバッグ用シーラー
- ラップ
- ピンセット、はさみ

<試薬の調製>

- Dilution buffer (10 ml) : 0.5 ml の 20×TBS と 50 μl の 1 M MgCl₂ を混合し、蒸留滅菌水または MilliQ 水で 10 ml にメスアップする。
- TBS-T (Mg) (1 L) : 50 ml の 20×TBS と 5 ml の 1 M MgCl₂、最終濃度 0.05% になるように Tween® 20 を加え、蒸留滅菌水または MilliQ 水で 1L にメスアップする。
- Blocking Buffer (3 ml、用時調製) : 0.03 ml の 100×Blocking Reagent (キット添付) と 0.6 ml の 50 mg/ml Acetylated BSA に 2.37 ml の TBS-T (Mg) を加え、混合する。

VI 使用例

- ・本使用例は、33 cm² (5.5 cm×6 cm) のメンブレンを使用した場合のものです。
- ・試薬の量は、使用するメンブレンのサイズに合わせて調整してください。

1. SDS-PAGE 及びブロッティング

定法に従って、SDS-PAGE、ブロッティングを行う。

2. ブロッキング

- ① ブロッティング後のメンブレンを TBS-T (Mg) で軽く洗浄する。
- ② メンブレンと 1 ml の Blocking Buffer をハイブリバッグに入れシールし^{*1)}、室温で 1 時間、ローテーターでゆっくり回転させる (15 rpm)。
- ③ ブロッキング中に抗体溶液を準備する。
一次抗体を 1 ml の Blocking Buffer で希釈する^{*2)}。

3. 一次抗体反応

- ① メンブレンをハイブリバッグから取り出し、新しいハイブリバッグにメンブレンと 2. - ③ で調製した一次抗体溶液を入れてシールし^{*1)}、室温で 1 時間、ローテーターでゆっくり回転させる (15 rpm)。
- ② 一次抗体反応中に Immuno-AptamerTM 溶液を準備する。
RNase Free Water で溶解した Immuno-AptamerTM 1 μl と 9 μl の Dilution Buffer を混合し (10 倍希釈)、95°C 2 分間加熱した後、室温で 10 分間放置する。この Immuno-AptamerTM 溶液 (10 μl) に、1 ml の Blocking Buffer を加えて混合し、Immuno-AptamerTM 溶液を調製する。使用するまで室温に置いておく。
- ③ 抗体反応終了後、メンブレンをプラスチック容器に移す。15 ml の TBS-T (Mg) を加え、室温で 5 分間、シーソー式シェーカーで激しく振とうした後、この溶液を捨てる。この洗浄操作をさらに 2 回繰り返す。

4. Immuno-Aptamer™との反応

- ① 新しいハイブリバッグにメンブレンと3. - ②で調製した Immuno-Aptamer™ 溶液を入れてシールし^{*1)}、室温で15分間、ローテーターでゆっくり回転させる（15 rpm）。
- ② Immuno-Aptamer™ との反応終了後、メンブレンをプラスチック容器に移す。15 ml の TBS-T (Mg) を加え室温で5分間、シーソー式シェーカーで激しく振とうした後、溶液を捨てる。この操作をさらに2回繰り返す。
- ③ Immuno-Aptamer™ 洗浄中に SA-HRP 溶液を準備する。SA-HRP を TBS-T (Mg) で希釈し^{*3)}、SA-HRP 溶液（20 ml）を調製する。使用するまで室温に置いておく。

5. SA-HRP 溶液との反応

- ① メンブレンをハイブリバッグから取り出し、プラスチック容器に移す。4. - ③で調製した SA-HRP 溶液を加え、室温で30分間、シーソー式シェーカーでゆっくり振とうする。
- ② SA-HRP 溶液反応中に HRP 用検出試薬を準備する。
- ③ 15 ml の TBS-T (Mg) を加え、室温で5分間、シーソー式シェーカーで激しく振とうした後、溶液を捨てる。この操作をさらに2回繰り返す。

6. 化学発光の検出 ^{*4)}

- ① ラップの上にメンブレンを置いて HRP 用検出試薬を滴下し、室温で5分間放置する。
- ② 余分な溶液を除き、メンブレンをラップで包む。
- ③ X線フィルムに露光し、フィルムを現像する。
最初に1分～数分間露光したフィルムを現像し、露光時間を決める。

（注意）

メンブレンはピンセットで角を軽くつまんで扱い、サンプルを転写した面に触れないようにご注意ください。

- *1) ハイブリバッグをシールする際は、出来るだけ気泡が入らないようにしてください。
- *2) 一次抗体の濃度及び量は、個別に最適化を行ってください。
- *3) 希釈倍率は、ご使用の試薬のマニュアルに従って決定してください。
希釈例：SA-HRP；GEヘルスケア #RPN2195 の場合、5000倍希釈。
- *4) 化学発光の検出は、ご使用の試薬のマニュアルに従って操作してください。

VII トラブルシューティング

トラブル	予想される原因	対策
シグナルが出ない。	Immuno-Aptamer™ が分解している。	使用する試薬・器具は RNase free のものを使用する。 実験中、使い捨て手袋を着用する。
	Immuno-Aptamer™ が外れている。	マグネシウムイオン (Mg ²⁺) のないバッファで洗浄すると Immuno-Aptamer™ が外れるので、バッファにマグネシウムイオンが入っていることを確認する。
	ゲルからメンブレンへの転写がうまくいっていない。	ブロッキング操作を再確認する。
	検出系の問題。	一次抗体の濃度を検討する。 使用している検出試薬のトラブルシューティングを確認する。
シグナルが弱い。	露光時間が短い。	露光時間を長くする (5 分間以上)。
	検出系の問題。	一次抗体の濃度を検討する。 より感度の高い検出試薬を使用する。
シグナルが強い。	露光時間が長い。	露光時間を短くする。
バックグラウンドが高い。	ブロッキングが不十分。	ブロッキング時間を長くする。
		Blocking Buffer に添加する 100×Blocking Reagent を通常の 2 倍量使用する。 調製方法 (3 ml、用時調製) : 0.06 ml の 100×Blocking Reagent と 0.6 ml の 50 mg/ml Actylated BSA に 2.34 ml の TBS-T (Mg) を加え、混合する。 100×Blocking Reagent が不足する場合は、単品でご購入ください (IX 関連製品, p.8 参照)。
	洗浄が不十分。	洗浄バッファの量や洗浄の回数を増やす。
	露光時間が長い。	露光時間を短くする。

非特異的バンドが出る。	ビオチン化タンパク質を認識している。	Immuno-Aptamer™ なしのコントロール実験を行う（一次抗体反応後、SA-HRP 反応を行う）。
		細胞ライセート（Input サンプル）には、ビオチン化タンパク質が含まれるので、検出に Input サンプルを使用しない。
	一次抗体濃度が高い。	一次抗体濃度を下げる。
	IP サンプルに、免疫沈降に使用したビーズの Protein A や G が切れてコンタミしている。	免疫沈降の際に、抗体なしのコントロール実験を行う。

VIII 参考資料

1. Yoshida Y, Sakai N, Masuda H, Furuichi M, Nishikawa F, Nishikawa S, Mizuno H, Waga I, “Rabbit antibody detection with RNA aptamers”, *Anal Biochem*, **375**, 217-22 (2008)
2. Sakai N, Masuda H, Akitomi J, Yagi H, Yoshida Y, Horii K, Furuichi M, Waga I, “RNA aptamers specifically interact with the Fc region of mouse immunoglobulin G”, *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, **52**, 487-8 (2008)

IX 関連製品

Code No.	製品名	包装単位	希望納入価格(円)
313-07201	Immuno-Aptamer™, Mouse IgG	20 回用	28,000
316-07291	Acetylated BSA	600 mg	26,000
315-07261	100×Blocking Reagent	0.8 ml	12,000
317-90371	20×TBS (pH 7.4)	500 ml	9,000
310-90361	1 M MgCl ₂	100 ml	5,000
318-90105	Distilled Water, Deionized, Sterile	500 ml	9,000
316-90101	Distilled Water, Deionized, Sterile	100 ml	4,000
312-90103	Distilled Water, Deionized, Sterile	100 ml×6	15,600
312-90321	SDS-PAGE 10×Running Buffer	1 L	9,000
318-90323	SDS-PAGE 10×Running Buffer	5 L	32,000

(販売元)

和光純薬工業株式会社

TEL 0120-052-099

FAX 0120-052-806

E-mail labchem-tec@wako-chem.co.jp

URL [http : //www.wako-chem.co.jp](http://www.wako-chem.co.jp)

(製造元)

株式会社ニッポンジーン

TEL 076- 451-6548

FAX 076- 451-6547

E-mail info@nippongene.com

URL [http : //www.nippongene.com](http://www.nippongene.com)