


「综合」



第6章 目录	6-1
→ 按用途分类的产品流程图	6-2
→ 关于抗体检测	6-5
→ 免疫反应增强液	
<i>Can Get Signal</i> immunoreaction Enhancer Solution	6-6
<i>Can Get Signal</i> immunostain Immunoreaction Enhancer Solution	6-8

INDEX

「综合」

{ 按用途分类的产品流程图 }

高效率检测分析



想进行抗体检测

想直接进行 mRNA 表达量测定



Western Blot 分析 • ELISA

免疫反应增强剂

→ (6-6 页)

• *Can Get Signal*

Immunoreaction

Enhancer Solution



免疫组织染色

免疫反应促进剂

→ (6-8 页)

• *Can Get Signal* Immunostain

Immunoreaction Enhancer Solution



Realtime PCR 用 Master Mix

高效率 Realtime PCR Master Mix

→ (1-13 页)

• THUNDERBIRD® Next qPCR Mix 系列

• THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix

• Realtime PCR Master Mix

• KOD SYBR® qPCR Mix

• THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix

• SYBR® Green Realtime PCR Master Mix

THUNDERBIRD® Probe One-Step qRT-PCR Kit → (1-8 页)

RNA-direct Realtime PCR Master Mix 系列

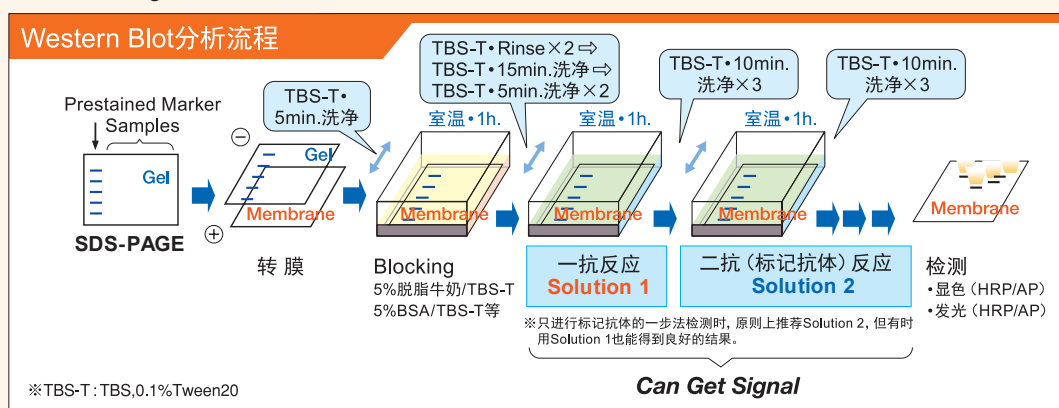
→ (1-12 页)

1. Western Blot 检测

Western Blot分析作为各种蛋白质特异性检测的方法，是蛋白质研究领域不可或缺的技术。

Western Blot分析是使用抗体通过抗原抗体反应进行检测的实验方法，但经常会出现信号弱，背景高，非特异性条带等结果，使得实验者非常苦恼。本公司的*Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution*【以下简称*Can Get Signal*】具有促进抗原抗体反应的功能，使用方法与现在通常使用的TBS-T、Blocking溶液一样，作为抗体稀释液使用即可，如下图，Solution 1用于一抗反应，Solution 2用于二抗反应，非常简便。

该试剂具有很强的增强信号、降低背景的效果，现在已被很多实验室作为Western Blot分析的标准Protocol。这里以使用*Can Get Signal*的实验流程为中心，解说一下Western Blot分析中的注意点。



(1) 关于抗体量

过量的抗体往往会导致高背景，特别是使用*Can Get Signal*，只要少量抗体就能得到充分的信号，因此需要注意抗体浓度。

通过Western Blot分析法检测His-ERK2蛋白质（使用抗His-tag抗体），从右图的结果可见，用以往方法（1抗浓度1:1000）虽然确认到了特异性条带，但背景很高，而且能看到很强的非特异性反应(图1)。

另一方面，使用*Can Get Signal*（1抗浓度1:5000），抗体浓度虽然是以往方法的1/5，但信号强度与以往方法处于同等水平，且非特异性条带明显减少。

以往方法 (TBS-T) 1:1000 *Can Get Signal* 1:5000

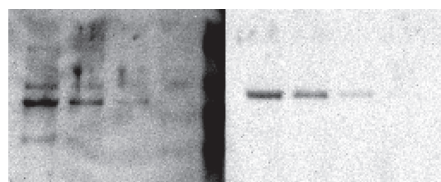


图1 HIS-ERK2蛋白质的检测例（使用抗His-tag抗体）

此外，以检出量多的抗原作为样品时，在发光法检测中有时会出现完全没有条带的情况。其原因是，通过在目的条带中过量浓缩标记抗体的过氧化物酶来进行发光的底物在检测之前基本上已被消耗了。出现这种情况时，应该减少电泳的样品量，同时减少抗体量。

(2) 关于Blocking

使用*Can Get Signal*时仍需Blocking步骤。通过改变Blocking剂的种类有时能够改善检测灵敏度、背景等，因此，无法得到满意的结果时，可尝试改变Blocking剂的种类。另外，检测磷酸化蛋白质时，请避免使用酪蛋白等含磷酸化蛋白质多的Blocking剂。

在这里，以使用5%脱脂牛奶/TBS-T和5%BSA/TBS-T为例进行说明。下图左边为EGFR检测例，可知使用5%脱脂牛奶/TBS-T能减少非特异性条带（图2）。再看下图右Actin检测例，可知以5%BSA/TBS-T为Blocking剂灵敏度更高（图3）。

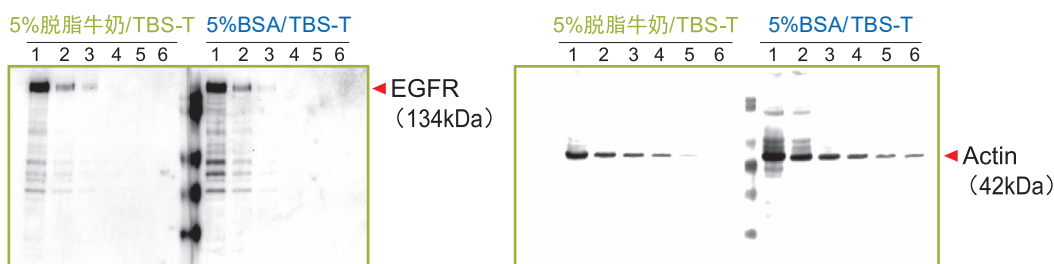
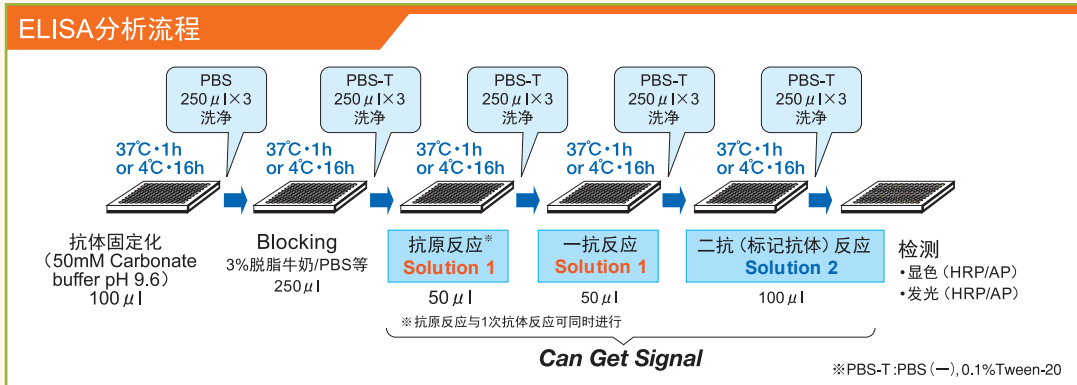


图2 Human EGFR检测例

图3 Human Actin检测例

2. ELISA

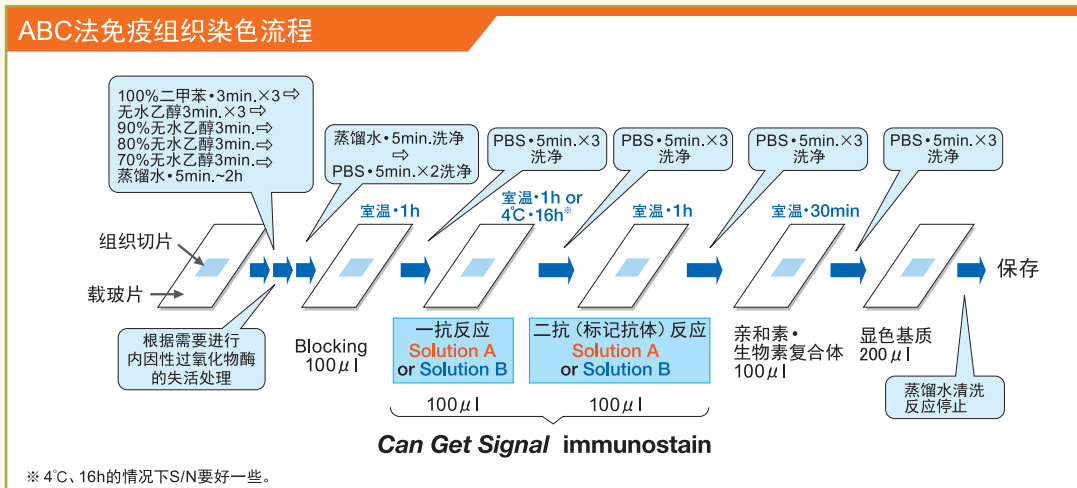
*Can Get Signal*通过三明治ELISA法或使用反应板进行检测的方法，也能降低背景、提高灵敏度。三明治ELISA法中的抗体固定化使用常用的碳酸缓冲液，接下去的Western Blot分析也同样进行Blocking。然后，固相抗体与抗原、及抗原与一抗反应用Solution 1，二抗反应用Solution 2。另外，Solution 1中固相抗体与抗原的反应和一抗反应同时进行可缩短检测时间。反应的抗体浓度，以推荐浓度为标准，或少于推荐浓度，可得到较好的结果。



3. 免疫组织染色

免疫组织染色作为检测（通过组织切片、固化细胞等发现的）蛋白质的局部存在及检出量的方法，是非常有效的。由于该方法使用的样品含有各种成分，因此相比Western Blot分析等，条件设定要详细得多。

Can Get Signal immunostain Immunoreaction Enhancer Solution【以下简称*Can Get Signal* immunostain】和*Can Get Signal*一样具有促进抗原抗体反应的功能，特别适用于免疫组织染色用。使用方法也和*Can Get Signal*一样，只要替换抗原抗体反应步骤中用的溶液即可，可简便地用于各种检测法。下面为采用ABC法的免疫组织染色流程（几乎可用同样的操作进行荧光免疫染色等）

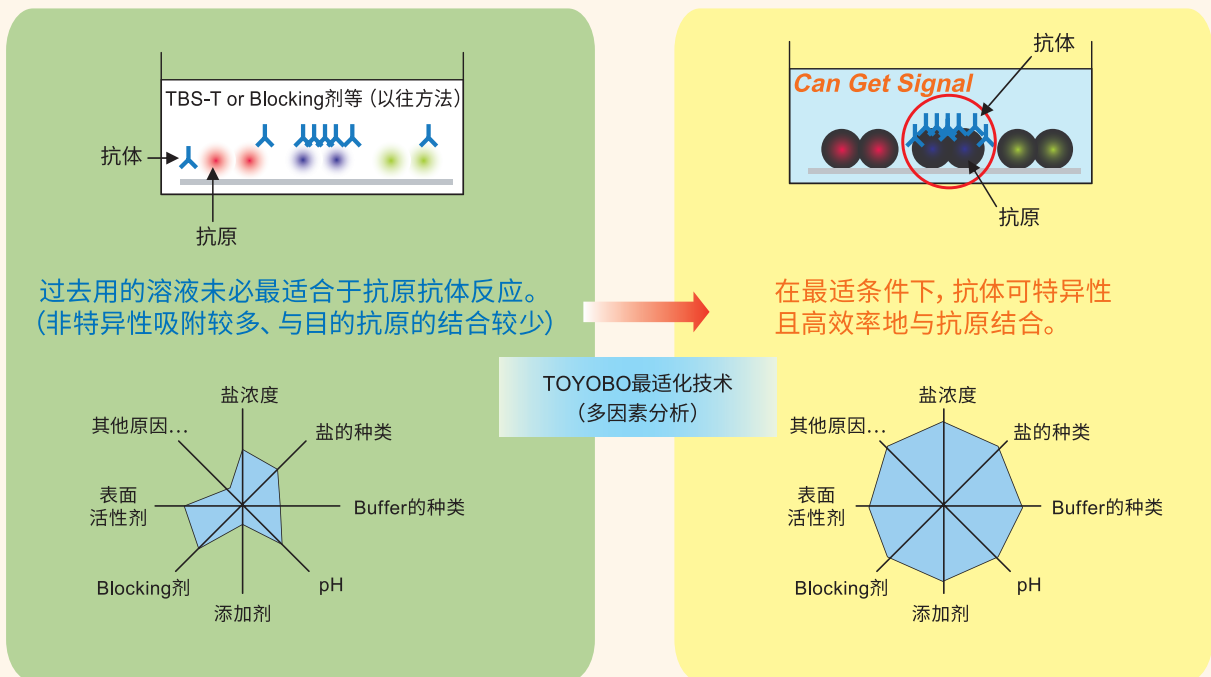


Can Get Signal immunostain中有Solution A和Solution B两种溶液，均可用于一抗及二抗反应。由于各试剂对抗原抗体反应的促进效果不同，对灵敏度及背景的影响也不同，因此，进行最初实验时，建议分别用Solution A和B摸索条件，根据使用的样品和抗体，选择最合适的Solution。反应的抗体浓度，以推荐浓度为标准，或少于推荐浓度，可得到较好的结果。固化组织、冻结切片及固化细胞等都可以作为样品使用；固化和活化用一般方法即可。

4. Can Get Signal 系列产品特性及使用标准

(1) 关于产品特性

Can Get Signal系列产品通过优化盐浓度、pH值、添加剂等，在增强检测信号，降低背景等方面有着显著的效果，是最适合用于抗原抗体反应的Buffer溶液。



(2) 关于使用标准

Can Get Signal		Can Get Signal immunostain	
<ul style="list-style-type: none"> Western Blot Dot Blot ELISA等 	<ul style="list-style-type: none"> Western Blot • Dot Blot分析 <ul style="list-style-type: none"> ●使用2种抗体的情况下 <ul style="list-style-type: none"> 一抗反应→Solution 1 二抗(标记)反应→Solution 2 ●直接使用抗体标记反应的情况下 <ul style="list-style-type: none"> 抗体标记反应→Solution 2 (也可根据情况使用Solution 1) 三明治ELISA <ul style="list-style-type: none"> 固相抗体→用碳酸缓冲液等固定化 抗原反应→Solution 1 一抗反应→Solution 1 二抗(标记)反应→Solution 2 	免疫组化 (组织•细胞等)	<ul style="list-style-type: none"> ●第一步: 试一下Solution A的效果 <ul style="list-style-type: none"> 一抗→Solution A 二抗→Solution A ●第二步: 试一下Solution B的效果 <ul style="list-style-type: none"> 一抗→Solution B 二抗→Solution B <p>※初次使用时, 需要对两种试剂的使用效果进行预测试, 选择使用效果更好的Solution.</p>

增强 Western Blot 及 ELISA 等的检测信号，降低背景。

Western Blot·ELISA 用免疫反应增强液

Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution

Solution 1 & 2	Code: NKB-101T	各 50ml × 1瓶	¥ 200
Solution 1 & 2	Code: NKB-101	各 250ml × 1瓶	¥ 700

Solution 1	Code: NKB-201	250ml × 1瓶	¥ 380
Solution 2	Code: NKB-301	250ml × 1瓶	¥ 380

本试剂可直接作为一抗及二抗的反应液（稀释液）用，是改善 Western Blot 分析、ELISA 的灵敏度及特异性的 buffer。



产品内容:

<NKB-101T, Starter Set>	
Solution 1	50ml × 1瓶
Solution 2	50ml × 1瓶
<NKB-101>	
Solution 1	250ml × 1瓶
Solution 2	250ml × 1瓶
<NKB-201>	
Solution 1	250ml × 1瓶
<NKB-301>	
Solution 2	250ml × 1瓶

保存条件:

4°C

商品使用文献:

- 1) N.Watanabe, et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**(33): 11663-8.(2005)
- 2) M.Katsuno, et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**(46): 16801-6.(2005)
- 3) K.Shimono, et al., *J Biol Chem*, **280**(47): 39436-47.(2005)
- 4) Y.Matsuzono, et al., *J Biol Chem*, **281**(1): 36-42.(2006)
- 5) T.Hanada, et al., *Autophagy*, **2**: 110-118.(2006)

备注:

请另行准备 Blocking 试剂和检测试剂。本试剂不适合用于 Blocking。免疫组织染色和免疫细胞染色推荐使用 Can Get Signal Immunostain(→ 6-8 页)

→ 特征

① 改善了灵敏度及特异性

在保持高特异性的基础上，对抗原抗体反应具有很强的促进效果，与以往的方法相比可得到高几倍到几十倍的信号。特别是对反应性低的抗体的效果更为显著。

② 广泛的适用性

可用于各种使用标记抗体的化学发光检测体系、化学显色检测体系以及荧光检测体系等。

③ 使用方便的 Ready-to-use 型

已经按照使用浓度进行了配制，无须进行稀释。

→ 用途: Western Blot、Dot Blot、ELISA (参照 6-5 页相关说明)

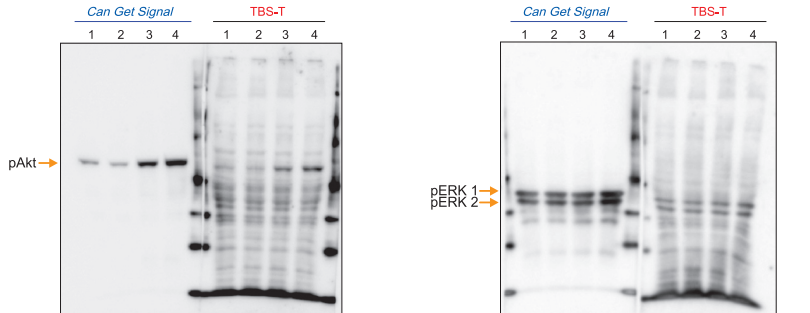
→ 说明

本产品含有 Solution1 和 Solution2 分为一抗用及二抗用，其溶液都经过最优化处理，故可得到低背景、高信号的结果。

→ 结果示例

① 通过 Western Blot 检测磷酸化蛋白质

往培养牛肾上腺髓质 chromafin 细胞培养液里添加任意浓度的胰岛素，进行 5 分钟刺激后以细胞的裂解物为样品，通过 Western Blot 法检测磷酸化 Akt 及 ERK 蛋白质。结果可见，与以往方法(使用 TBS-T)相比，使用 Can Get Signal 得到的信号明显增强而背景很低。



样品: 培养牛肾上腺髓质细胞
 1. Control (H₂O) 3. Insulin (10nM, 刺激5分钟)
 2. Insulin (1nM, 刺激5分钟) 4. Insulin (100nM, 刺激5分钟)
 通过抗Phospho-Akt抗体, Akt磷酸化的检测结果 通过抗Phospho-ERK抗体, ERK磷酸化的检测结果

※数据由宫崎大学医学部药理学教研室的柳田俊彦老师提供。

2 通过 Western Blot 检测 EGFR

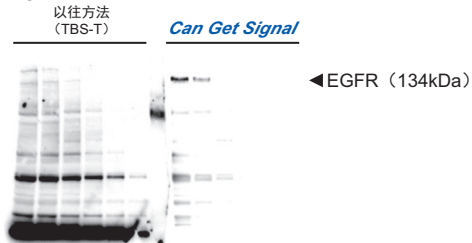
通过 Western Blot 检测从人的扁平上皮细胞 (A431) 中发现的 EGFR (Epidermal Growth Factor)。

以 A431 细胞的裂解液为样品, 一抗应用 *Can Get Signal* Solution 1 [一抗: 抗人 EGFR 抗体 (mouse IgG1)],

二抗应用 Solution 2 [二抗: 抗小鼠 IgG (Fab Specific、HRP 标记)] 进行检测。

同时, 作为对照, 用 TBS-T (以往方法) 进行同样的实验。

结果可见, 用以往方法非特异性条带很浓, 几乎无法检测出目的条带, 而用 *Can Get Signal* 则非特异性条带显著减少, 同时可确认到信号增强。



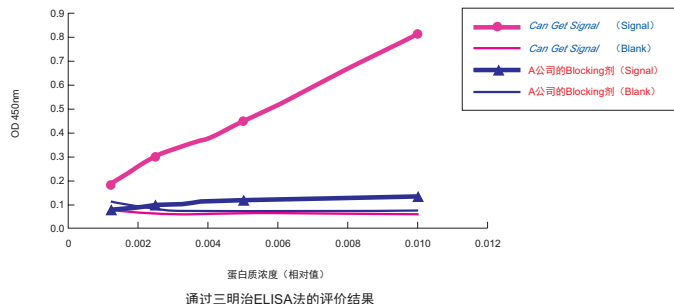
Human EGFR 的检测例

3 通过 ELISA 检测 His-tag-融合型 ERK2 蛋白质

通过三明治 ELISA 法 (固相抗体: 抗 ERK2 单克隆抗体、1 抗: 抗 His-tag-多克隆抗体、2 抗: 抗兔 IgG-HRP 抗体), 对用无细胞蛋白质合成法合成的人源由来的 His-tag-融合型 MAP 激酶 (His-ERK2) 进行检测。

结果可见, 通过在市售的封闭液中进行抗体反应的原方法, 几乎得不到检测结果。

而使用 *Can Get Signal*, 则无论在低浓度区域还是在高 S/N 比的条件下均可得到高灵敏度的检测结果。



→ 相关产品

1 组织免疫染色用免疫反应增强液

Can Get Signal immunostain	-	-	-	→ 6-8 页
----------------------------	---	---	---	---------

增强免疫组织染色的检测信号，降低背景。

免疫组织染色用免疫反应增强剂

Can Get Signal Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution

Starter set(Solution A&B)	Code: NKB-401	各 5ml × 1瓶	¥ 400
Solution A	Code: NKB-501	20ml × 1瓶	¥ 1,000
Solution B	Code: NKB-601	20ml × 1瓶	¥ 1,000

本试剂可直接作为免疫组织染色抗体的反应液（稀释液）用，是改善免疫组织、免疫细胞染色实验灵敏度及特异性的 buffer。



产品内容:

<NKB-401, Starter Set>	
Solution A	5ml × 1瓶
Solution B	5ml × 1瓶
<NKB-501>	
Solution A	20ml × 1瓶
<NKB-601>	
Solution B	20ml × 1瓶

保存条件:

4°C

商品使用文献:

- 1) K.Moriguchi, et al., *Plant Cell*, **17**(2): 389-403.(2005)
- 2) Tokuda M, et al., *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, **76**: 130-141.(2007)
- 3) K.Tamura, et al., *The Plant Cell* **19**: 320-332.(2007)
- 4) H.li, et al., *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **31** (3): 363.(2008)
- 5) K.Tokuhiro, et al., *Asian J Androl* **10**(5): 711-718. (2008)

备注:

Western Blot ELISA 推荐使用 Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution (→ 6-6 页)。

→ 特征

① 灵敏度及特异性得到改善

在保持高特异性的基础上，对抗原抗体反应具有很强的增强效果，与以往的方法相比可得到高 S/N 比的良好信号。另外，减少 2 抗的使用量，可抑制背景，得到明亮的图象。

② 广泛的适用性

可用于化学显色、化学发光以及荧光等检测体系。也可与 ABC 法、Polymer Complex 法等增强灵敏度的系统一起使用。

③ 使用方便的 Ready-to-use 型

已经按照使用浓度进行了配制，无须进行稀释。

→ 用途: 免疫组织染色、免疫细胞染色 (参照 6-5 页相关说明)

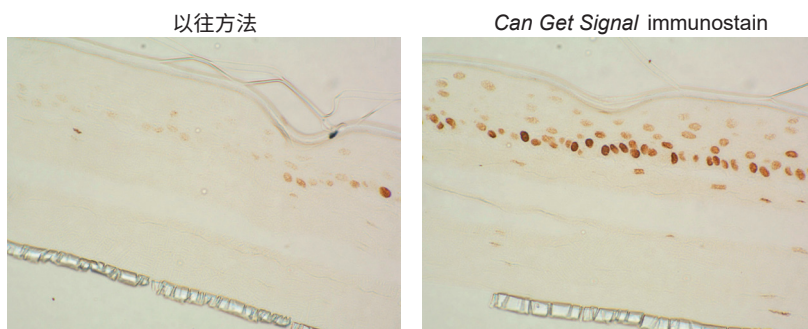
→ 说明

Can Get Signal immunostain 是在广受好评的 Western Blot、ELISA 用 Can Get Signal (→ 6-6 页) 的基础上改良的免疫染色专用抗体反应缓冲液。本试剂备有不同反应促进效果的 Solution A 和 B，最初探讨时就可使用 Starter Set (Code No.NKB-401) 进行评价。Solution A 和 B 都可用于一抗及二抗（标记抗体）的反应，和分别对应于 1 抗和 2 抗的 Can Get Signal 的 Solution 1 和 2 不同。

→ 结果示例

① 通过免疫组织染色检测 PCNA (增殖细胞核抗原)

用通过人皮肤组织为模型配制的石蜡包埋切片作为抗原，分别使用抗 PCNA mouse 单克隆抗体 (1 抗)，生物素标记的抗 mouse IgG 的 2 抗，通过免疫组织化学染色对 PCNA 进行检测 (ABC 法)。分别使用 Can Get Signal immunostain 和含 1.5% 马正常血清的 PBS (以往方法) 对抗体的反应进行染色效率的比较。结果可见，与以往方法相比，用 Can Get Signal immunostain 可得到高信号、低背景、明亮的染色图象。

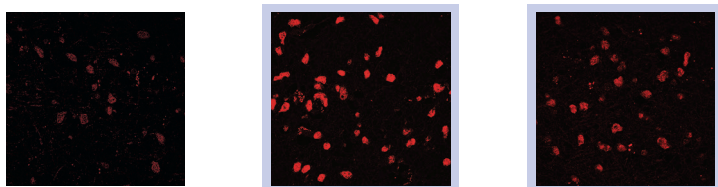


通过抗 PCNA 抗体法的免疫组织染色

2 Olig2 染色与以往方法的比较探讨

用 1%BSA/PBS、Solution A 或 Solution B 稀释 Anti-Human Olig2 Rabbit IgG 和 Alexa 594 goat anti-rabbit IgG (H+L)，来检测人·脑肿瘤（恶性胶质瘤 glioblastoma）[石蜡包埋切片]的 Olig2 的染色。

结果可见，用以往方法信号很微弱，而用 Can Get Signal immunostain 信号可得到增强。特别是用 Solution A 的情况下，染色非常明亮，且抑制了背景。但考虑到非特异性反应，从观察角度来讲用 Solution B 也足够了。



以往方法

Can Get Signal immunostain
Solution A使用

Can Get Signal immunostain
Solution B使用

恶性胶质瘤 glioblastoma 中表达的 Olig2 的荧光染色

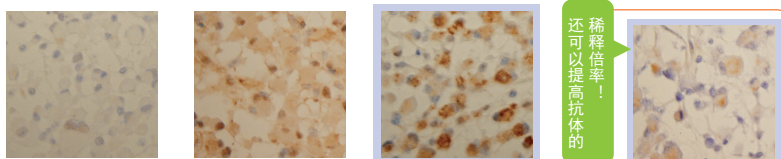
※ 数据由北海道大学研究生院 医学研究科 分子细胞病理学领域
野田頭未步 老师、笹井研 老师提供

3 CD133 免疫染色与以往方法的比较探讨

用 1%BSA/PBS、Solution A 或 Solution B 稀释 Rabbit polyclonal to CD133-Stem Cell Marker 和 Envision (Dako ChemMate)，来检测人·脑肿瘤（恶性胶质瘤 glioblastoma）[石蜡包埋切片]的 CD133 的染色。

结果可见，用以往方法信号很微弱，而用 Can Get Signal immunostain 信号可得到增强。但是，用 Solution A 的情况下背景很高，整体来看染色程度与以往方法差不多，不适合观察。

而用 Solution B，通过优化抗体稀释倍率，可看到更好的染色条件。



以往方法

Can Get Signal immunostain
使用Solution A

Can Get Signal immunostain
使用Solution B

还可以提高抗体的
稀释倍率！

本实验的老师之后在 Solution B 实验条件的基础上，将一抗稀释 100 倍（反应时间：4°C·O/N），仍得到良好的充分诊断的结果。由此可节约抗体。

恶性胶质瘤 glioblastoma 中表达的 CD133 的染色

【数据提供】

※ 数据由北海道大学研究生院 医学研究科 分子细胞病理学领域
野田頭未步 老师、笹井研 老师提供

→ 相关产品

1 Western Blot·ELISA 用免疫反应增强液

Can Get Signal	-	-	-	→ 6-6 页
----------------	---	---	---	---------

Note