



IMMUNO SHOT

An immuno-reaction enhancing solution

Instruction

Product series

Cat number	IS-012-20S	IS-012-100	IS-012-250	IS-001-100	IS-002-100	IS-001-250	IS-002-250
Component	20ml	100ml	250ml	100ml	100ml	250ml	250ml
Reagent 1	○	○	○	○		○	
Reagent 2	○	○	○		○		○

---- Contents ----

(1) Introduction	2
(2) How to use IMMUNO SHOT	2
(3) Western Blotting	3
(4) ELISA	3
(5) Trouble shooting	4

Cautions

1. Research use only. Do not use for medical purpose.
2. Do not dilute or add other agents in IMMUNO SHOT solutions to get the best.
3. The color of Reagent 2 is slightly yellowish as compared to Reagent 1, and not due to denaturizing.

(1) Introduction

IMMUNO SHOT is an enhancer of antigen-antibody reaction. In Western blotting and ELISA, researchers often experiences weak signal or high background. IMMUNO SHOT improves these problems by just using it as antibody diluents. Due to the principle of working mechanism, IMMUNO SHOT can be used in many assay systems that use antigen-antibody reaction.

How IMMUNO SHOT Works

IMMUNO SHOT contains a polymer which, by changing the physicochemical properties of antigen and antibody, enhances the mutual accessibility, and facilitate the specific reaction. The other ingredient, protein, reduces non-specific binding of antibody. Thus, IMMUNO SHOT enhances the antigen-antibody reaction while reduces background.

Features of IMMUNO SHOT

1. High signal with low background

IMMUNO SHOT enhances the antigen-antibody reaction. Comparing with the method using detergent-containing buffer, several to over 10-fold stronger signal can be obtained while the background level is low. Thus, you can get much higher S/N ratio than usual method.

2. Effective for saving antibody usage and time of reaction time

Because higher signal can be obtained using IMMUNO SHOT, you can reduce the amount of antibody used and the time required for reactions.

3. Can be used for many reactions

IMMUNO SHOT can be used not only for Western blotting and ELISA, but also for other assay systems using antigen-antibody reactions. In addition, IMMUNO SHOT does not affect activities of HRP (horse radish peroxidase) or AP (alkaline phosphatase), and can be used for assay systems using these enzymes.

4. Easy to use

IMMUNO SHOT is formulated as to Ready to Use. Just exchange your dilution buffer of antibodies to the solutions of IMMUNO SHOT.

(2) How to use

- IMMUNO SHOT is consisted of Reagent 1 and Reagent 2. Use Reagent 1 for the dilution of the 1st antibody. Use Reagent 2 for the dilution of the 2nd antibody. No change is required for the other assay protocol. For details see the later instructions.
- In some assay systems, only one antibody is used. For example some ELISA uses only one enzyme-conjugated antibody. In such case, try using Reagent 2 for the antibody dilution. In some cases, however, Reagent 1 gives better result. For details see the later instructions.
- IMMUNO SHOT has been successfully used in Western blotting, antibody sandwich ELISA with either the 1st or 2nd antibody-labeled type, antigen sandwich ELISA.

(3) Western Blotting (WB)

WB is a method to detect proteins by specific antibodies. Usually, proteins are separated by SDS-PAGE and transferred to membrane made by nitrocellulose or PVDF (polyvinylidene fluoride). The way to use IMMUNO SHOT in WB is described below.

- 1) SDS-PAGE and transfer of protein to PVDF membrane should be done by usual method.
- 2) Blocking and the washing should be done by usual method.
- 3) Dilute the 1st antibody with Reagent 1 of IMMUNO SHOT. The dilution factor is influenced by many factors, such as antibody species, amount of antigen, etc. Though you can reduce antibody concentration by using IMMUNO SHOT, we recommend performing a pre-test to determine the best antibody concentration.
- 4) Dilute the 2nd antibody with Reagent 2 of IMMUNO SHOT. The best dilution factor is influenced by many factors, such as antibody species, amount of antigen, etc. Refer to the supplier's instruction to determine the best antibody concentration.
- 5) When using the enzyme-labeled 1st antibody and not using 2nd antibody, try using Reagent 2 for dilution. In some cases, however, Reagent 1 works better.
- 6) For visualization, many users use HRP-, or AP-labeled antibody. In both cases, please watch the strength of staining or luminescence and stop the reaction. Longer reaction gives you high background or appearance of extra band.

(4) ELISA

ELISA is a method to determine the amount of antigen or antibody in samples by using labeled antigen or antibody. The sandwich ELISA is most widely used, where antigen sample is applied on solid phase antibody and bound antigen is reacted by 1st antibody and visualized by labeled 2nd antibody. In some system, methods to use enzyme-labeled 1st antibody alone is also used. The way to use IMMUNO SHOT in these sandwich ELISAs are described below.

- 1) Antibody attachment (solid phase), blocking and the washing procedure should be done by usual method.
- 2) Dilute the antigen and 1st antibody with Reagent 1 of IMMUNO SHOT. The dilution factor is influenced by many factors, such as antibody species, amount of antigen, and other factors, and is important to get good sensitivity. Please refer to the supplier's instruction to determine the best antibody concentration. Pour appropriate amount of these dilutes into each well, mix and incubate for appropriate time. Alternatively, in some method, antibody diluent is added after the addition of antigen samples.
- 3) Dilute the 2nd antibody with Reagent 2 of IMMUNO SHOT. The best dilution factor is influenced by many factors, such as antibody species, amount of antigen, etc. Refer to the supplier's instruction to determine the best antibody concentration.
- 4) When using the enzyme-labeled 1st antibody and not using 2nd antibody, try using Reagent 2 for dilution. In some cases, however, Reagent 1 works better.
- 5) For detection, many users use HRP-, or AP-labeled antibody. In both cases, please perform pre-test to determine the best reaction time. Longer reaction gives you higher background.

(5) Trouble shooting

Trouble	Cause and resolutions
Western blotting	
Weak signal	1. Low antigen conc.: Use higher antigen conc.
	2. Low antibody conc.: Survey best antibody conc.
	3. Not enough transfer: Use higher current or longer transfer time.
	4. Blocking too strong: Do not use long time blocking.
	5. Too much transfer: When using nitrocellulose, proteins pass through the membrane by strong transfer manipulation. Check the procedure or exchange membrane to PVDF.
Partial whitening (lumines.)	6. Too much antigen or antibody: Over signaling often suppress the luminescence and cause partial whitening of a band. Control the amount of antigen or antibody concentration.
Too many extra-bands	7. Too much higher antibody conc.: Higher antibody conc. often causes non-specific signaling. Control the antibody conc.
	8. Too much antigen: Higher antigen often causes non-specific signaling. Control the amount of antigen.
	9. Not enough blocking: Some antigen and antibody have preference of blocking agents, change the blocking agents or check the blocking conditions.
	10. Not enough washing: Increase the number and time of washing.
High background	11. High antibody conc. Or too long incubation: Reduce the antibody conc. or shorten the incubation time.
ELISA	
Weak signal	1. Too low antigen or antibody conc.: Increase the concentrations.
Too strong signal	2. Too high antigen or antibody conc.: Check the antigen and antibody concentration by performing the titration.
	3. Too long incubation: shorten the incubation time.
High background	4. Too high antigen or antibody conc.: check antigen and antibody concn.
	5. Not enough blocking: Some antigen and antibody preference of blocking agents, change the blocking agents or check the blocking conditions.
	6. Not enough washing or too much washing: check the number and time of washing.



COSMO BIO Co., LTD.

Inspiration for Life Science

TOYO 2CHOME, KOTO-KU, TOKYO, 135-0016, JAPAN

http://www.cosmobio.co.jp e-mail : export@cosmobio.co.jp

Phone : +81-3-5632-9617 FAX : +81-3-5632-9618

IMMUNO SHOT

An immune reaction enhancing solution

取扱説明書

カタログ品番

品番、容量	IS-012-20S	IS-012-100	IS-012-250	IS-001-100	IS-002-100	IS-001-250	IS-002-250
構成	20ml	100ml	250ml	100ml	100ml	250ml	250ml
Reagent 1	○	○	○	○		○	
Reagent 2	○	○	○		○		○

* IS-012-20Sは試供用サンプル品です。

--- 目 次 ---

(1) はじめに	2
(2) 一般的な使用方法	2
(3) ウェスタンブロッティング(WB)	3
(4) ELISA	3
(5) トラブルシューティング	4
(6) 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. 本試薬は組成濃度が最適化されていますので、希釈やブロッキング剤の添加等を行うと本来の性能が出ない場合がありますので、ご注意ください。
3. 本試薬は Reagent 2 の方が Reagent 1 より僅かに黄色が強くなっていますが、品質には問題ございません。

(1) はじめに

IMMUNO SHOT はウェスタンブロッティング(WB)やELISAなどの抗原・抗体反応を用いた解析で問題になる感度不足や高いバックグラウンドを改善するための反応促進試薬です。さまざまな免疫アッセイ系に用いることができます。

●本製品の特長●

1. 従来法に比べ高いシグナル・低いバックグラウンド

IMMUNO SHOT は、抗原抗体反応を促進する効果があり、界面活性剤含有バッファーを用いる従来法に比べ数倍から数十倍の高いシグナルを得ることができます。また、バックグラウンドが低くなるように設計されていますので、高いS/N比を得ることができます。

2. 既存品に比べ高いシグナルを得ることが可能

IMMUNO SHOT は、高いシグナルが得られるように設計されていますので、多くの場合で既存品に比べ高いシグナルを得ることが出来ます。なお、このため従来の条件で行うとバックグラウンドが高くなる場合もありますので、使用時には抗体濃度や反応時間等を調節し、最適の条件でご使用ください。

3. 抗体使用量の節約や反応時間の短縮に効果

IMMUNO SHOT は、抗体使用量を減らしたい場合、少量の抗原を検出したい場合、検出時の検出時間を短くしたい場合などに有効です。

4. 高い汎用性

IMMUNO SHOT は、WBやELISAなど抗原抗体反応を用いたさまざまなアッセイ系に広く用いることが可能です。また、HRP(ペルオキシダーゼ)やAP(アルカリフォスファターゼ)などの標識酵素の活性に影響を与えませんので、これらの標識抗体を用いたアッセイ系にも使用することができますし、発色検出、発光検出のいずれにも使用可能です。

5. 使用方法が容易

IMMUNO SHOT は、希釈せずにそのまま使用できるように調製されています。使用方法は、通常使用している抗体希釈液を本試薬へ替えるだけです。

(2) 一般的な使用方法

- ・ 本試薬のセット品は、一次抗体反応用Reagent 1と二次抗体反応用Reagent 2で構成されており、それぞれの反応に最適化された組成となっています。それぞれの抗体反応において本試薬により目的とする濃度に抗体を希釈し、そのままアッセイに用いてください。アッセイ方法は従来のままで行って下さい。詳細は後述の使用方法をご覧ください。
- ・ 抗体を一種類しか用いないアッセイ系(一次抗体に標識が付加されている場合など)の場合は、Reagent 2の使用をお勧めします。但し、抗体の種類やアッセイ系によっては、Reagent 1を用いた方が良い場合もあります。詳細は後述の使用方法をご覧ください。
- ・ *IMMUNO SHOT* を使用して効果が見られた実験実績として以下のものがあります。WB、抗体サンドイッチELISA(一次抗体標識型、二次抗体標識型)、抗原サンドイッチELISA(抗原標識型)など。

(3) ウェスタンブロッティング(WB)

WB法は、SDS-PAGEなどで分離したタンパク質を、ニトロセルロース膜やPVDF(ポリフッ化ビニリデン)膜に転写し、特異的抗体を用いて検出する方法です。以下に、WBにおける**IMMUNO SHOT**の使用方法を記載します。

- 1) SDS-PAGEとPVDF膜へのタンパク質転写は通常の方法により行って下さい。
- 2) ブロッッキングやその後の洗浄も通常の方法で行って下さい。
- 3) 一次抗体を**IMMUNO SHOT**の Reagent 1で希釈します。一次抗体の最適な希釈倍率は、抗体種、抗原の量、検出系の感度等に大きく依存します。本試薬を用いた場合、通常用いる濃度より低い抗体濃度、或は短時間で十分な反応が得られる場合が多いですが、予備検討により最適濃度を決定ください。
- 4) 二次抗体を**IMMUNO SHOT**の Reagent 2で希釈します。二次抗体の最適な希釈倍率は、抗体種、抗原の量、検出系の感度等に大きく依存しますので、抗体の供給元の推奨条件等を参考にしてください。
- 5) 予め標識した一次抗体を用いる場合など、一次抗体のみで検出する場合は、原則、Reagent 2を用いてください。抗体の種類によってはReagent 1の方が良い結果を得られる場合がありますので、お試しください。
- 6) 検出はHRPやAP標識抗体を用いる場合が多いですが、何れの場合も、発色・発光の度合いを見ながら反応・露光を止めてください。長時間の反応はバックグラウンドの上昇やエキストラバンドの出現を起こします。

(4) ELISA

ELISA法は、酵素で標識された抗体あるいは抗原を用いて、試料溶液中にある抗原あるいは抗体の量を定量する方法です。特に、抗原に対する抗体を固相化し、抗原を含む試料溶液を加え、固相化抗体に結合した抗原を固相化抗体とは別の抗体(一次抗体)と反応させ、最後に、一次抗体に対する酵素標識二次抗体で検出する方法(一次抗体を酵素標識して検出する場合もあります)、即ち、「抗体サンドイッチ法」は感度と特異性に優れているため、現在主流のELISA法です。なお、抗体を検出する際には抗原によるサンドイッチ法もあります。ここでは、「抗体サンドイッチELISA」における**IMMUNO SHOT**の使用方法を記載します。

- 1) 抗体の固相化とブロッッキングは通常の方法により行って下さい。
- 2) 抗原サンプルをPBS等の希釈液で適宜希釈し、固相化抗体と反応させ洗浄します。一次抗体を**IMMUNO SHOT**の Reagent 1で希釈します。一次抗体の最適希釈倍率は、抗体種、抗原の濃度、検出系の感度等に大きく依存しますので、抗体の供給元の推奨条件等を参考にしてください。これを各ウェルに分注・混合し、インキュベーションします。インキュベーション後PBS-Tなどで洗浄します。なお、抗原と一次抗体を同時に混合し、反応させる方法もあります。
- 3) 二次抗体を**IMMUNO SHOT**の Reagent 2で希釈します。二次抗体の最適希釈倍率は、抗体、抗原の濃度、検出系の感度等に大きく依存しますので、抗体の供給元の推奨条件等を参考にしてください。二次抗体希釈液をウェルに分注し、インキュベーション後、PBS-T等で洗浄します。
- 4) 酵素標識した一次抗体を用いる場合、標識二次抗体は用いませんが、その場合には一次抗体はReagent 2で希釈ください。なお、場合によってはReagent 1の方が良い結果を得られる場合がありますのでお試しください。
- 5) 検出はHRPやAP標識抗体を用いる場合が多いですが、何れの場合も、予め予備実験により発色の度合いを見ながら反応時間を決定してください。長時間の反応はバックグラウンドを高くします。

(5) トラブルシューティング

トラブル	原因と対策
ウェスタンブロッティング(WB)	
シグナルが弱い	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ください。 2. 抗体濃度が低い。最適な抗体濃度を検討してください。 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ください。 4. 膜への転写時間・電流量が過剰。特にニトロセルロース膜使用時には、過剰な転写操作により、タンパク質が透過する場合があります。電流量や時間を調節してください。膜の種類をPVDFに代えるのも有効です。
バンドの一部が抜ける(発光検出)	5. 抗原量が多すぎる、あるいは抗体濃度が高すぎる。過剰なシグナルにより逆に発光が抑えられてしまうことがあります。最適な抗原量・抗体濃度を検討してください。
エキストラバンドが多い	6. 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ください。 7. 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ください。 8. ブロッッキングが不十分。抗原や抗体によっては、ブロッッキング剤に大きく依存します。ブロッッキング剤の種類、濃度やブロッッキング時間の検討を行ってください。 9. 洗浄が不十分。洗浄回数や洗浄時間を増やしてください。
バックグラウンドが高い	10. 抗体濃度が高い、或いはインキュベーション時間が長い。シグナルが見えるがバックグラウンドも高い場合、抗体濃度を低くするか、抗体との反応時間を短くしてください。
ELISA	
シグナルが弱い	1. 抗原または抗体の濃度が低すぎる。抗原・抗体濃度の検討を行ってください。
シグナルが強すぎる	2. 抗原または抗体の濃度が高すぎる。抗原・抗体濃度の条件検討(タイトレーション)を行ってください。 3. インキュベーション時間が長すぎる。時間を短くしてください。
バックグラウンドが高い	4. 抗原または抗体の濃度が高い。抗原・抗体濃度の検討を行ってください。 5. ブロッッキングが不十分。抗原・抗体種によっては、ブロッッキング剤の種類や濃度に大きく依存します。ブロッッキング剤の種類、濃度、ブロッッキング時間を検討してください。 6. 洗浄が不十分か、過剰洗浄によるブロッッキング効果の低下が考えられます。洗浄回数を調節してください。



コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

〒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