



IMMUNO SHOT -Platinum-

Protein-free immuno-reaction enhancing solution

Instruction

---- Contents ----

(1) Introduction	2
(2) Products	2
(3) How to use IMMUNO SHOT -Platinum-	2
(4) Western Blotting	3
(5) ELISA	3
(6) Trouble shooting	4
(7) Contact Information	4

Cautions

1. Research use only. Do not use for medical purpose.
2. Do not dilute or add other agents in IMMUNO SHOT -Platinum- solution to get the best result.

(1) Introduction

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

IMMUNO SHOT -Platinum- is, unlike IMMUNO SHOT, consisted of all chemical components and contains no proteins. So this product is useful for assay systems that have to be avoided protein contamination.

How IMMUNO SHOT -Platinum- Works

IMMUNO SHOT -Platinum- contains polymers. One polymer, by changing the physicochemical properties of antigen and antibody, enhances the mutual accessibility, and facilitate the specific reaction. The other polymer reduces non-specific binding of antibody. Thus, IMMUNO SHOT -Platinum- enhances the antigen-antibody reaction while reducing background.

● Features of IMMUNO SHOT -Platinum- ●

1. High signal with low background

IMMUNO SHOT -Platinum- 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 -Platinum-, you can reduce the amount of antibody used and the time required for reactions.

3. Can be used for many reactions

IMMUNO SHOT -Platinum- can be used not only for Western blotting and ELISA, but also for other assay systems using antigen-antibody reactions. In addition, IMMUNO SHOT -Platinum- does not affect activities of HRP or ALP, and can be used for assay systems using these enzymes.

4. Easy to use

IMMUNO SHOT -Platinum- is one solution format and formulated as to Ready to Use. Just exchange your dilution buffer of antibodies to IMMUNO SHOT -Platinum- solution.

(2) Products

IMMUNO SHOT family has following products. This manual applies all these products.

Cat number	Product name	Quantity
CSR-IS-P-250	IMMUNO SHOT -Platinum-	250ml
CSR-IS-P-500	IMMUNO SHOT -Platinum-	500ml

(3) Related products

Some of related products are listed below. To make 100% protein-free assay system we recommend Blocking Reagent for WB / ELISA-Chemically Defined-.

Cat number	Product name	Quantity
CSR-IS-CD-500W	Blocking Reagent for WB-Chemically Defined-	500ml
CSR-IS-CD-500E	Blocking Reagent for ELISA-Chemically Defined-	500ml

(4) Principle of usage of IMMUNO SHOT -Platinum-

- IMMUNO SHOT -Platinum- is one solution format. Just use the same solution for the dilution of the 1st and 2nd antibody. No change is required for the other assay protocol. For details see the later instructions.
- Do not dilute the IMMUNO SHOT -Platinum- solution. The solution is optimized. Dilution causes loss of IMMUNO SHOT -Platinum-'s ability.
- IMMUNO SHOT -Platinum- can be used in Western blotting, antibody sandwich ELISA with either the 1st or 2nd antibody-labeled type, antigen sandwich ELISA.

(5) 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. The way to use IMMUNO SHOT -Platinum- 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 IMMUNO SHOT -Platinum-. 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 -Platinum-, we recommend performing a pre-test to determine the best antibody concentration.
- 4) Dilute the 2nd antibody with IMMUNO SHOT -Platinum-. 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) 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.

(6) 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 HRP-labeled detection antibody. The way to use IMMUNO SHOT -Platinum- in the 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 with PBS-T. Pour appropriate amount of these diluents into each well, mix and incubate for appropriate time. IMMUNO SHOT -Platinum- may be used for antigen dilution in order to facilitate reaction of antigen and solid phase antibody.
 - 3) Dilute the HRP-labeled detection antibody with IMMUNO SHOT -Platinum-. 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) For substrate reaction, follow the ordinary method.
 - 5) In some case 1st antibody and HRP-labeled 2nd antibody system is used. In such a case use IMMUNO SHOT -Platinum- for dilution of both antibodies.
- In other ELISA system, use IMMUNO SHOT -Platinum- for reaction buffer for antigen-antibody.

(7) 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 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

IMMUNO SHOT -Platinum-

Protein-free immuno-reaction enhancing solution

取扱説明書

--- 目 次 ---

(1) はじめに	2
(2) 製品内容	2
(3) 関連製品	2
(4) 使用方法	3
(5) 使用例:ウェスタンブロッティング	3
(6) 使用例:ELISA	3
(7) トラブルシューティング	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。

(1) はじめに

IMMUNO SHOT -Platinum-はウェスタンブロッティングや ELISA などにおける感度不足や高いバックグラウンドを改善する抗原抗体反応促進試薬です。本製品は 100%化学成分で出来ており、リン酸化タンパク質の検出やその他タンパク質を反応系に入れたくない場合のさまざまな免疫アッセイ系利用できるように設計されています。

●本製品の特長●

1. タンパク質フリー

IMMUNO SHOT -Platinum-は 100%化学成分だけで出来ており、リン酸化タンパク質の検出やその他のタンパク質を反応系に入れたくない場合に利用できるように設計されています。

2. 使用方法が簡単

IMMUNO SHOT -Platinum-は1液構成となっており、1次、2次抗体反応で使い分けする必要がありません。使用方法是、通常使用している抗体希釈液を本試薬へ代えるだけです。

3. 高いシグナル・低いバックグラウンド

IMMUNO SHOT -Platinum-は抗原抗体反応を増強する効果があり、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。

4. 抗体使用量の節約や反応時間の短縮

IMMUNO SHOT -Platinum-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。

5. 高い汎用性

IMMUNO SHOT -Platinum-は、ウェスタンブロッティングや 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。また発色検出、発光検出にも使用可能です。

(2) 製品内容

本製品には以下の種類があります。本マニュアルは以下の製品に適用されます。

品番	品名	容量
IS-P-250	IMMUNO SHOT -Platinum-	250ml
IS-P-500	IMMUNO SHOT -Platinum-	500ml

(3) 関連製品

Blocking Reagent -Chemically Defined-は ready-to-use のブロッキング溶液でタンパク質フリーのアッセイ環境を提供しますので IMMUNO SHOT -Platinum-との併用をお勧めします。ウェスタンブロッティング用、ELISA 用がございますので、用途に合わせてご使用ください。

品番	品名	容量
IS-CD-500W	Blocking Reagent for WB-Chemically Defined-	500ml
IS-CD-500E	Blocking Reagent for ELISA -Chemically Defined-	500ml

(4) 使用方法

- ・ 本製品は 1 液構成となっています。1 次、2 次抗体を本製品で希釈し使用して下さい。アッセイ方法は従来のままで行って下さい。
- ・ 本製品は最適化されていますので希釈しないで利用下さい。

(5) 使用例:ウェスタンブロッティング(WB)

SDS-PAGE と PVDF へのタンパク質転写は一般的な手法で行って下さい。

- 1) メンブレンのブロッキング (推奨: #IS-CD-500W) や洗浄も通常の方法で行って下さい。
- 2) 1 次抗体を IMMUNO SHOT・Platinum で希釈し、メンブレンと反応させます。
- 3) 2 次抗体を IMMUNO SHOT・Platinum で希釈し、洗浄したメンブレンと反応させます。
- 4) 検出のための発色・発光は、そ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。

注: 1 次、2 次抗体の最適希釈倍率は抗体種、抗原の量等に大きく依存します。本製品を用いた場合、通常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ます。抗体の最適希釈倍率は抗体の製造元の推奨条件等を参考に予備検討により最適濃度を決定ください。

(6) 使用例:ELISA

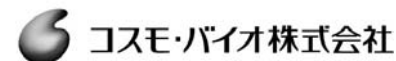
サンドイッチ ELISA の場合

- 1) 抗体の固相化とブロッキング (推奨: #IS-CD-500E) は通常の方法により行って下さい。
- 2) 抗原を通常バッファー (PBS-T など) で希釈し、固相化抗体と反応させます。
- 3) 1 次抗体を IMMUNO SHOT・Platinum で希釈し、各ウェルに分注・混合させ 1 次抗体反応を行います。
- 4) 2 次抗体を IMMUNO SHOT・Platinum で希釈し、1 次抗体反応後に洗浄したウェルに 2 次抗体希釈液を分注・混合させ反応させます。
- 5) 以降は通常の方法により発色させます。

(7) 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	
シグナルが弱い	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。
	抗体濃度が低い。最適な抗体濃度を検討してください。
	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。
	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。
	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)	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	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。
	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。
	ブロッキングが不十分。抗原や抗体によっては、ブロッキング剤に大きく依存します。ブロッキング剤の種類、濃度やブロッキング時間の検討を行ってください。
	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	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	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	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。
	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	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。
	ブロッキングが不十分。抗原・抗体種によっては、ブロッキング剤の種類や濃度に大きく依存します。ブロッキング剤の種類、濃度、ブロッキング時間を検討してください。
	洗浄が不十分か、過剰洗浄によるブロ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。

お問い合わせ先



〒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