



Application

FastGene™ Block&Goによるウェスタンブロットの時間短縮

製品名

FastGene™ Block&Go (Cat.No. FG-CH05)

メーカー名

日本ジェネティクス株式会社



下記のデータは、長崎大学 AK様よりご提供いただきました。

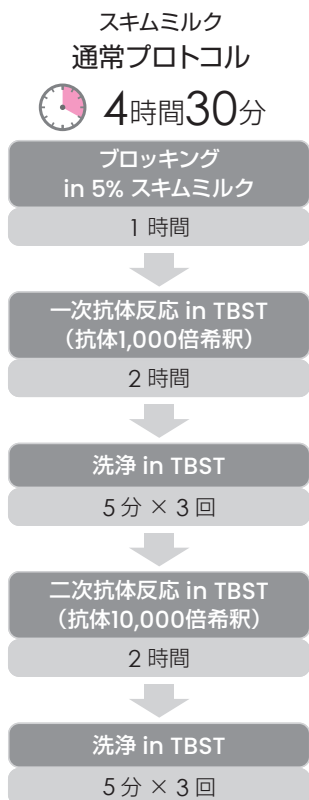
概要

FastGene™ Block&Goは、ブロッキング・一次抗体・二次抗体の反応を同時に行うことができ、ウェスタンブロットの時間と手間を大幅に削減することが出来る製品です。

本アプリケーションノートでは、HCT116細胞で、SMAD2/3タンパク質をターゲットにしたウェスタンブロットを実施いたしました。その結果、FastGene™ Block&Goでは、ウェスタンブロットにかかる時間を短縮でき、顕著な非特異的な反応も見られませんでした。

結果

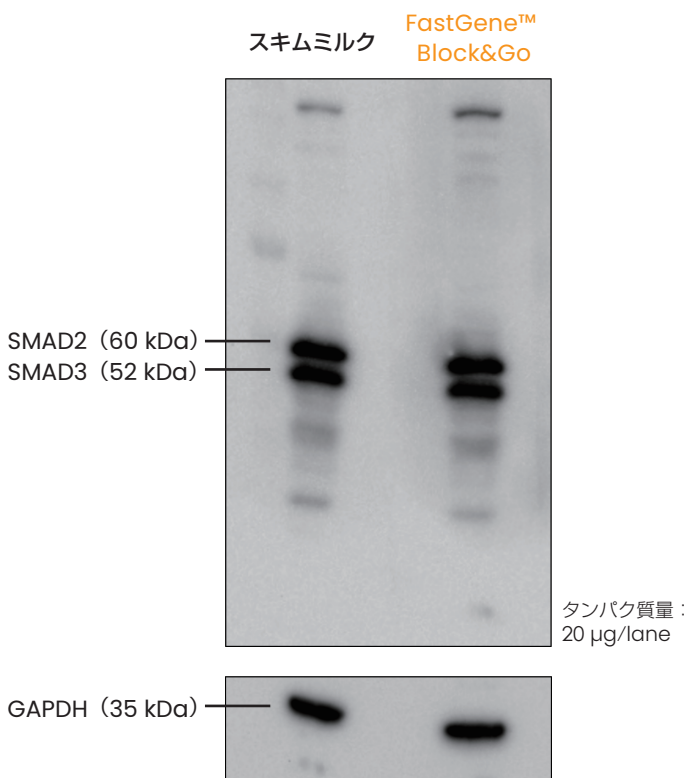
SMAD2/3抗体反応時の反応フロー



FastGene™ Block&Go 2ステッププロトコル



SMAD2/3およびGAPDHのウェスタンブロットの結果



● 結論

FastGene™ Block&Goでは、ウェスタンブロットにかかる時間を1時間短縮でき、顕著な非特異的な反応も見られなかった。



お客様のコメント

この新製品は非常に気に入りました。安心して他の研究者にも勧められます。
1時間短縮できたことで、翌日の実験に使う細胞の播種などの次の実験の準備を余裕を持って行うことができます。
加えて、実験を急いでいる時に同じメンブレンを1日に3種類の抗体（メイン、サブ、コントロール）の反応ができる、などのメリットがあると思います。

実験方法

◆ 泳動用タンパク質および泳動条件

初発サンプル：HCT116細胞
タンパク質泳動量：20 µg/Lane
泳動条件：7.5% SDS-PAGEゲル、200 V定圧、40分間泳動
転写～抗原抗体反応：0.2A、30分で転写後、メンブレンを分割して各反応に使用

◆ 撮影条件

使用機器
ChemiDocMP Imaging System
(BIO-RAD #17001402JA)
露光時間
SMAD2/3：10秒
GAPDH：20秒

◆ SMAD2/3に対するウェスタンブロット

【試薬類】

- 5% スkimミルク：スキムミルク (CST, #9999) をTBST (0.1% Tween20) に溶解して調製
- 一次抗体：Anti-SMAD2/3 Rabbit mAb (CST, #8685)
- 二次抗体：Anti-Rabbit IgG (H+L chain) pAb-HRP (MBL, #458)
- 化学発光試薬：Immobilon Forte Western HRP Substrate (Merck Millipore #WBLUF0100)

【手順】

① ブロッキング～一次抗体反応

〈スキムミルク 通常プロトコル〉

- 5% スkimミルク溶液 で、室温、1時間のブロッキング。その後TBSTでリンス
- TBSTで1,000倍希釈した一次抗体溶液で、室温、2時間の抗原抗体反応

〈FastGene™ Block&Go 2ステッププロトコル〉

- FastGene™ Block&Goで一次抗体を1,000倍希釈した溶液で、室温、2時間のブロッキングと抗原抗体反応を同時に実施

② 二次抗体反応

- メンブレンをTBSTで洗浄
- TBSTで10,000倍希釈した二次抗体溶液で、室温、1時間の抗原抗体反応

③ 化学発光試薬との反応～撮影

- 化学発光試薬 80 µLとメンブレンを1分間反応
- 反応後のメンブレンをラップで包み撮影した

◆ GAPDHに対するウェスタンブロット

【試薬類】

- GAPDH抗体：Anti-GAPDH Mouse mAb Peroxidase Conjugated (FUJIFILM WAKO, #015-25473)
- 化学発光試薬：ImmunoStar Basic (Wako, 291-75103)

【手順】

① 抗体反応

- SMAD2/3で使用したメンブレンをTBSTで洗浄しECLを除去
- TBSTで10,000倍希釈したGAPDH抗体で、室温、1時間の抗原抗体反応

② 化学発光試薬との反応～撮影

- メンブレンをTBSTで洗浄後、化学発光試薬 100 µLとメンブレンを1分間反応
- 反応後のメンブレンをラップで包み撮影した

製品紹介

FastGene™ Block&Go (FastGene™ / Cat.No. FG-CH05)

- ブロッキングおよび一次/二次抗体反応を1ステップで行うことができる“時短”効果の高いブロッキング/抗原抗体反応用バッファー
- ブロッキング剤含有タンパク質に由来するバックグラウンドが生じない“プロテインフリー”
- タンパク質の検出感度を向上させ、抗体使用量を削減できる“シグナルエンハンサー含有”

