

蛍光ウエスタン・ブロッティング

ウエスタン・ブロッティングの検出系に蛍光を用いた手法で、二次抗体に蛍光標識抗体を使用します。

【特長】

- 広く用いられているHRP/化学発光法で必要となる発光の操作やフィルムが必要ありません。
- 化学発光法やHRPによる発色法よりも定量性に優れています。
- 異なるターゲットに対する一次抗体と異なる色の蛍光標識二次抗体を組み合わせることにより、マルチカラー解析を簡単に行うことができます。この解析は比較する二つのタンパク質の分子量が近い場合であっても可能です。
- 化学発光よりもシャープなバンドが得られます。

【こんなことが可能になります！】

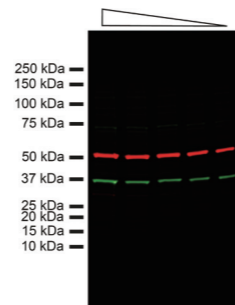
ターゲット・タンパク質の相対定量解析
バンドの蛍光強度を測定することにより、タンパク質の相対的な量を定量(半定量)することが可能となります。例えば、発生、分化、細胞周期などの過程におけるタンパク質発現量の変動、あるターゲット・タンパク質に対するリン酸化タンパク質量の比較などができます。

ゲル内タンパク質量の標準化

同一ゲル/プロット内にハウスキーピング遺伝子産物などの内部コントロールを置くことにより、バンドの強度とタンパク質量を標準化することができます。ストリッピングとリブローピングを行う必要がありません。

【マルチカラー解析におけるヒント】

- 使用する蛍光標識二次抗体は、波長が十分に離れているものを選んでください。(Alexa Fluor® 680とAlexa Fluor® 790やIRDye® 680RDとIRDye® 800CWなど)
- 2種類のターゲット・タンパク質を検出する場合、量が少ない方を緑(Alexa Fluor® 790、IRDye® 800)、多い方を赤(Alexa Fluor® 680、IRDye® 680)にしてください。



標識 二次抗体の 選び方 FAQ

Q1. 一次抗体の「ホスト (Host)」とは何ですか？

抗体の産生に用いられた免疫動物のことです。一次抗体のホスト動物が、二次抗体のターゲットとなります。例えば一次抗体のホストがウサギの場合、二次抗体には抗ウサギIgGなどを選びます。

Q2. Preadsorbedと記載されている製品がありますが、

これは何ですか？ またどのような時に使用するのですか？

「血清吸着処理済み」の二次抗体製品です。抗体を各種動物由来の血清と反応させることにより、動物血清成分と反応するような分子を予め除去してあります。血液、あるいは血液を内在的に多く含むような組織をサンプルとして実験を行う場合に、このような製品を用いると、二次抗体と内在性の成分の反応によるバックグラウンドの上昇を抑えることができます。

Q3. F (ab) および F (ab')₂ フラグメント製品とは何ですか？

またどのような時に使用するのですか？

F (ab) は抗体(イムノグロブリン)分子からFc領域を除いたもので、F (ab')₂ はFabが-S-S-結合でつながり2価になったものです。一次抗体

のFc領域は、サンプル中のマクロファージなどの免疫細胞表面上のFcレセプターと非特異的に結合する可能性があります。F (ab) や F (ab')₂ 製品にはこのような反応はなく、免疫細胞を含んだサンプルを使用する場合に有用です。またF (ab) と F (ab')₂ は共に分子のサイズが小さいため、細胞内や組織内に浸透しやすいという特長もあります。

Q4. 一次抗体の「アイソタイプ (isotype)」とは何ですか？

抗体(イムノグロブリン・タンパク質)の構造上の違いによる分類で、クラス分類(IgG、IgM等)やサブクラス分類(IgG1、IgG2a等)などがあります。一次抗体のアイソタイプが、二次抗体のターゲットとなります。モノクローナル抗体では通常、データシートにアイソタイプが記載されています(その多くがIgGまたはIgMです)。一次抗体がモノクローナル抗体の場合、二次抗体にはそのクラスに対する抗体を選びます。マウスIgGはIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3の4つのサブクラスに分類されますが、データシートにこの情報まで記載されている時には、二次抗体にそのサブクラスに対する抗体を選ぶこともできます。例えば一次抗体のアイソタイプがIgG1であれば、二次抗体として抗マウスIgG1を選べます(もちろんすべてのサブクラスと反応する抗マウスIgGを選ぶこともできます)。

ポリクローナル抗体には複数のアイソタイプが含まれている可能性があります。したがって一次抗体がポリクローナル抗体の場合、二次抗体には抗IgG抗体を選べば問題ありません。

アブカム株式会社

〒103-0012 東京都中央区日本橋堀留町2-2-1
Tel : 03-6231-0940 Fax : 03-6231-0941
E-mail : orders@abcam.co.jp
URL : www.abcam.co.jp/2AbJP

販売店・取扱店

abcam

IHCなら、HRP、
HPR Polymer、
Alexa Fluor®

二次抗体……
たくさん標識物があるけど
何を選んだらいいの？

Flow cytometryや
ICCなら
Alexa Fluor®、
FITC

WBやELISAなら
HRP、AP、
増幅させたいなら
Biotin

Alexa
Fluor®

Alexa Fluor®

- 異なる蛍光波長を持つ9種類の色素からなるシリーズです。
- FITC、Cy3®, Cy5®, APCなどの色素よりも高い蛍光強度を持ちます。そのため低い濃度で使用することができ、結果としてバックグラウンドが低くなります。
- FITCなどで問題となる、光照射後の退色が小さいため、イメージングにおいて長時間の観察およびキャプチャーが可能となります。
- 9種類もの色素があるので、お手元の装置のレーザーやフィルターのあらゆる組み合わせに対応できます。また多重染色における組み合わせに高い自由度があります。

FITC

Fluorescein isothiocyanate

- 標識された状態であっても高い量子収率と安定性を保つという性質を有するバイオの分野で広く用いられている蛍光色素です。
- 色は黄橙色をしています。黄緑色の蛍光を発します。
- 励起波長の極大は495nmで、蛍光波長は525nm。
- タンパク質やペプチドの遊離したアミノ基に結合し、安定なチオウレア結合を形成します。

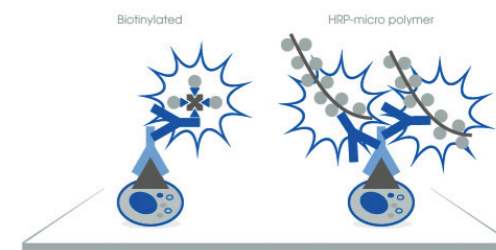
Horseshoe Peroxidase

HRP

- 安価、安定性が高い、反応が早いといった特長のある酵素です。
- 抗体に標識される酵素の中では最も多用されており、ウエスタン・ブロッティング、ELISA、免疫組織染色など、多くのアプリケーションで用いられています。
- 赤血球などに存在する内在性酵素の影響を受けやすいため、免疫組織染色の際、ブロッキング処理が必要な場合があります。
- ELISAで使用する水溶性の発色基質としてはTMBやABTS、免疫組織染色などで使用する不溶性の発色基質としてはDABやAECなどがあります。

HRP-polymer

- HRP標識二次抗体ではシグナルが足りない際に利用する方法です。
- ビオチン標識二次抗体を用いる方法と比較し、感度が高い、操作ステップが少ない、内在性ビオチンを考慮する必要がない、といった特長があります。



HRP-
polymer

AP

Alkaline Phosphatase

- サンプル中の内在性酵素の影響を受けにくく、特異性が高い酵素です。
- ELISAや免疫組織染色などで用いられています。
- ELISAで使用する水溶性の発色基質としてはpNPP、免疫組織染色などで使用する不溶性の発色基質としてはBCIP/NBTなどがあります。

Biotin

Biotin

- 分子量244.3の低分子化合物で、卵白由来のタンパク質アビジン、あるいはバクテリア由来のタンパク質ストレプトアビジンと特異的に結合し、多数の酵素を含む複合体を形成させることができます。
- 形成された複合体はシグナルが増幅されますので、発現の少ないタンパク質を免疫組織染色で検出する場合など、高感度を必要とする場合に有用です。
- Biotin標識抗体は、このような増幅系を用いる場合の二次抗体として用います。

アブカムの多彩な標識二次抗体



Target antibody	Host	Preadsorbed	Unconjugated	Alexa Fluor® 405	Alexa Fluor® 488	Alexa Fluor® 555	Alexa Fluor® 568	Alexa Fluor® 594	Alexa Fluor® 647	Alexa Fluor® 680	IRDye® 680RD	Alexa Fluor® 750	Alexa Fluor® 790	IRDye® 800CW	AP	HRP	HRP Polymer	Biotin	FITC	
	Donkey		ab182020	ab175651	ab150073	ab150074	ab175470	ab150076	ab150075	ab175772		ab175731	ab175780		ab97061	ab205722		ab207999	ab97063	
		✓	ab7078	ab175648	ab150061	ab150062	ab175692	ab150064	ab150063		ab186692	ab216779	ab175728	ab186693		ab7084	ab7083		ab7082	ab7079
		✓	ab97081	ab175649	ab150065	ab150066	ab175693	ab150068	ab150067							ab97082	ab97085		ab97083	
Rabbit IgG H&L	Donkey F(ab') ₂		ab98437													ab98440			ab98439	
		✓	ab98486		ab181346	ab150070	ab175694	ab150072	ab181347				ab175730		ab98487	ab98493			ab98492	
			ab182016	ab175652	ab150077	ab150078	ab175471	ab150080	ab150079		ab175773		ab175732	ab175781		ab97048	ab205718	ab214880	ab207995	ab97050
	Goat	✓	ab7085	ab175653	ab150081	ab150082	ab175695	ab150084	ab150083	ab186696	ab216777	ab175733	ab186697	ab216773	ab7091	ab7090		ab7089	ab7086	
		✓	ab97071	ab175654	ab150085	ab150086	ab175696	ab150088	ab150087						ab97072	ab97080		ab97073	ab97079	
			ab97196		ab150089	ab150090	ab175697	ab150092	ab150091				ab175735		ab97197	ab97200		ab97198	ab97199	
Rabbit IgG Fc	Goat	✓	ab98460		ab150097	ab150098	ab175698	ab150100	ab150099					ab98461	ab98467			ab98466		
Rabbit IgM	Goat	✓	ab97191		ab150093				ab150095					ab97192	ab97195			ab97193		
			ab98451											ab98452	ab98459			ab98458		
Mouse IgG H&L	Donkey		ab182022	ab175658	ab150105	ab150106	ab175472	ab150108	ab150107	ab175774		ab175738	ab175782		ab97027	ab205724		ab208001	ab97029	
		✓	ab98791	ab175659	ab150109	ab150110	ab175700	ab150112	ab150111		ab186698	ab216778	ab175739	ab186699	ab216774	ab98792	ab98799		ab7060	ab98770
	Donkey F(ab') ₂		ab98661		ab181289		ab175699		ab181292				ab175737					ab98665	ab98663	
	Goat		ab182017	ab175660	ab150113	ab150114	ab175473	ab150116	ab150115		ab175775		ab175740	ab175783		ab97020	ab205719	ab214879	ab207996	ab97022
		✓	ab97031	ab175661	ab150117	ab150118	ab175701	ab150120	ab150119		ab186694	ab216776	ab175741	ab186695	ab216772	ab97032	ab97040		ab97033	ab97039
	Rabbit	✓	ab97042												ab97043	ab97046			ab97045	
Rabbit F(ab') ₂		ab98782	ab175663	ab150125	ab150126	ab175703	ab150128	ab150127						ab7077	ab98790			ab98784	ab98789	
Mouse IgM	Goat		ab97226	ab175662	ab150121		ab175702		ab150123						ab97227	ab97230		ab97228	ab97229	
		✓	ab98671												ab98672	ab98679		ab98673	ab98678	
Rat IgG H&L	Donkey		ab102178												ab102179	ab102182		ab102180	ab102181	
		✓	ab102257	ab175670	ab150153	ab150154	ab175475	ab150156	ab150155	ab175777		ab175750			ab102258	ab102265		ab102259		
	Donkey F(ab') ₂	✓			ab150149	ab150150	ab175708	ab150152	ab150151									ab102237		
	Goat		ab182018	ab175671	ab150157	ab150158	ab175476	ab150160	ab150159	ab175778		ab175751	ab175786		ab97054	ab205720	ab214882	ab207997	ab97056	
		✓	ab98412	ab175673	ab150165	ab150166	ab175710	ab150168	ab150167						ab7098	ab98425		ab98414	ab7093	
	Goat F(ab') ₂	✓	ab98393			ab150162		ab150164										ab98401	ab98395	ab98400
Rabbit	✓	ab102200														ab102172		ab6733	ab6730	
Rabbit F(ab') ₂		ab102248																ab102250	ab102255	
Rat IgG Fc	Goat F(ab') ₂	✓	ab6252		ab150161				ab150163						ab6258	ab98364		ab6256	ab6253	
Goat IgG H&L	Donkey		ab182021	ab175664	ab150129	ab150130	ab175474	ab150132	ab150131	ab175776		ab175744	ab175784		ab97107	ab205723	ab214881	ab208000	ab97109	
		✓	ab97111	ab175665	ab150133	ab150134	ab175704	ab150136	ab150135			ab175745		ab216775	ab97112	ab97120		ab97113	ab97119	
	Donkey F(ab') ₂	✓			ab150137	ab150138		ab150140	ab150139									ab98519	ab98518	
	Rabbit		ab97096	ab175667	ab150141	ab150142		ab150144	ab150143						ab97097	ab97100			ab97098	ab97099
		✓	ab97101		ab150145	ab150146	ab175707	ab150148	ab150147						ab97102	ab97105			ab97103	ab97104
Rabbit F(ab') ₂	✓	ab5748			ab169344			ab169347											ab47846	
Chicken IgY H&L	Goat		ab182019	ab175674	ab150169	ab150170	ab175477	ab150172	ab150171	ab175779		ab175754	ab175787		ab5756			ab102348	ab102353	
		✓	ab97141	ab175675	ab150173	ab150174	ab175711	ab150176	ab150175						ab6878	ab205721		ab207998	ab6873	
Sheep IgG H&L	Donkey		ab97121	ab175676	ab150177	ab150178	ab175712	ab150180	ab150179			ab175756			ab97142	ab97150		ab7117	ab97149	
	Rabbit		ab97126		ab150181	ab150182	ab175713	ab150184	ab150183			ab175757			ab97127	ab97130	ab214884	ab97123	ab97124	
Guinea pig IgG H&L	Goat		ab97151	ab175678	ab150185	ab150186	ab175714	ab150188	ab150187			ab175758			ab97152	ab97155		ab6907	ab97154	
		✓													ab102367	ab102379		ab102368	ab7135	
Rabbit		ab102356												ab102357	ab102360		ab6770	ab6767		
Armenian Hamster IgG H&L	Goat		ab5738	ab175680	ab173003		ab175716		ab173004			ab175760			ab5746			ab5744	ab5739	
Syrian Hamster IgG H&L	Goat		ab102304		ab180063		ab175715		ab180117						ab102305	ab102308		ab102306	ab6888	
		✓	ab102314													ab102327		ab7145		
Human IgM	Goat		ab97201												ab97202	ab97205		ab97203	ab97204	
		✓	ab98541												ab98542	ab98549		ab98543	ab98548	
	Rabbit		ab97206		ab150189				ab150191						ab97207	ab97210		ab97208	ab97209	
Human IgG H&L	Goat		ab97161												ab97162	ab97165		ab7152	ab209701	
		✓	ab97166												ab97167	ab97175		ab97168	ab97147	