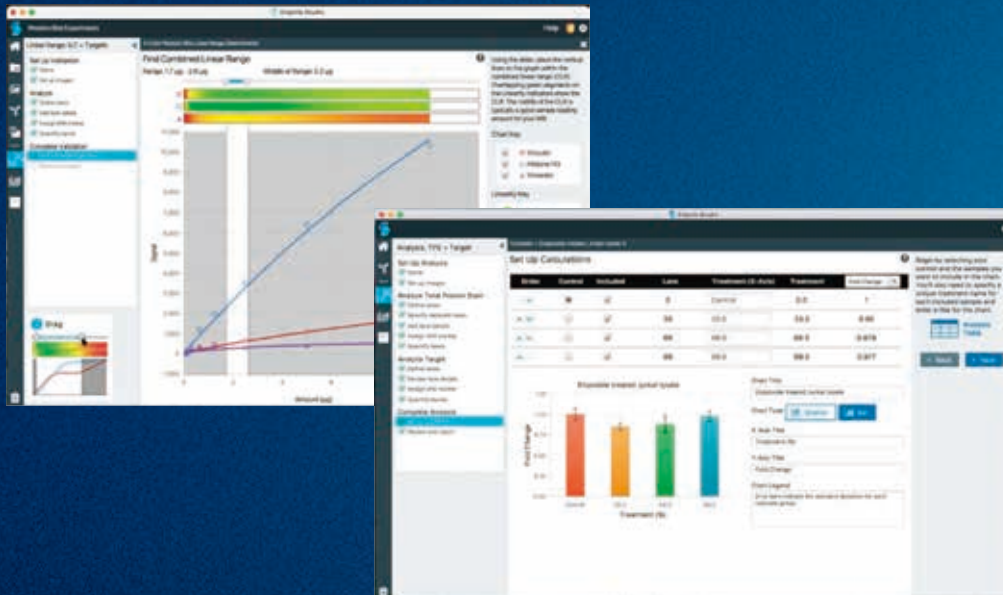
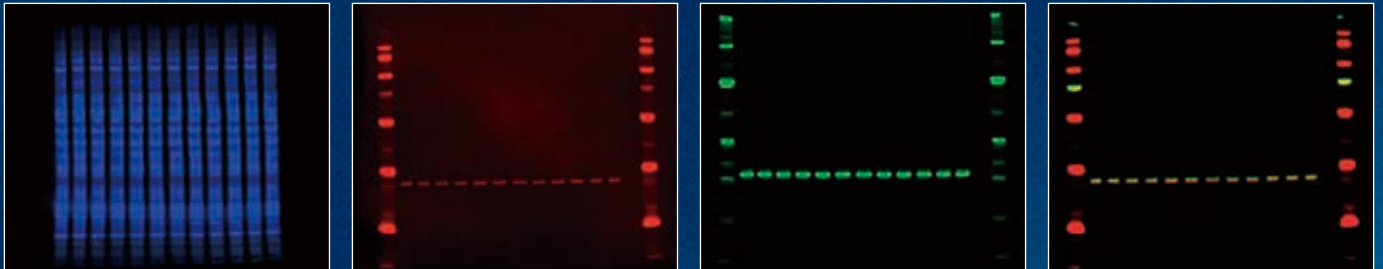


Odyssey® イメージングシステム

蛍光ウェスタンブロット

定量ウェスタンブロットデータの信頼性と再現性を改善しませんか？



A fluorescence Western blot image showing multiple lanes. The top half of the image displays red fluorescent bands, while the bottom half displays green fluorescent bands. The bands are of varying intensity and thickness, set against a dark background.

蛍光ウェスタン ライコアの

蛍光ウェスタンブロットはこんな方に適した実験手法です。

- ウェスタンブロットのデータが安定しないと感じる時がある。
- ウェスタンのデータにいまいち自信を持ってない。
- バンドが白く抜けてしまう。
- バンドがぼやける、あるいは真っ黒になる。
- タンパク質のリン酸化レベルの変化を正確に知りたい。
- 適したハウスキーピングタンパク質が見あたらない。
- 最新の論文投稿規定を満たしたウェスタン解析を行いたい。



ブロットなら Odyssey

蛍光ウェスタンブロット実験をサポートし続けて 22 年

米国 LI-COR（ライコア）社は、蛍光ウェスタンブロット用のイメージング装置を世界に先駆けて販売開始した蛍光ウェスタンブロットのパイオニアです。それ以来、約 22 年にわたり、蛍光ウェスタンブロットの世界的リーダーとして、イメージング装置の販売だけでなく、高品質な試薬の提供、トップジャーナルとのコラボレーションにより開発した解析ソフトウェア、長年の経験に裏打ちされた豊富な実験プロトコルと充実したテクニカルサポートを提供し、新たなファンを獲得し続けています。

なぜ蛍光ウェスタンブロット？

ウェスタンブロットを何のためにを行っていますか？

あなたにとってウェスタンブロットで最も大切なことは何でしょう？

綺麗な画像を撮ることですか？ イメージャーの使い勝手ですか？

それとも、しっかりとした定量性ですか？ 再現性の高い自信の持てるデータを得ることですか？

ウェスタンブロットが変わってきています

ウェスタンブロットは古くから行われているタンパク質発現解析法ですが、ここ数年、その論文投稿ガイドラインに変化が見られます。

過度に意図的な画像補正（切り取り、コントラスト／明るさ調整）が禁止され、一定の解像度以上の生画像の提出が求められるだけでなく、定量方法についても、より正確で再現性の高い方法が求められています。

蛍光ウェスタンブロットはこの要求を満たしやすいウェスタンブロット検出方法です。

LI-COR 社は最新の論文投稿規定を満たすためのイメージングソリューションを提供し、皆様の研究をサポートしています。



そのタンパク質の発現比、どれだけ再現できますか？

化学発光法（ケミルミ法・ECL 法）は、X 線フィルムの時代から使われている優れたウェスタンブロット検出手法です。しかし、発光シグナルの発生に酵素反応を用いるため、バンドのシグナル強度の安定性に欠けるという問題があります。基質との反応を開始してから時間、露光時間、基質の温度など様々な要素により、バンドの強度比（つまり発現比）が変動し、再現性を確保するのが難しい検出方法です。

一方、蛍光標識二次抗体を用いて検出を行う蛍光ウェスタンブロット法は、常に安定したシグナルを得ることが可能で、定量再現性に優れます。



蛍光検出：シグナルが安定（常に一定）

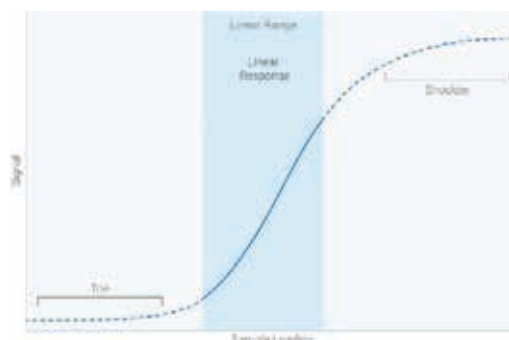
発光検出：シグナルが不安定（時間・温度に依存）

そのバンド、本当に定量的ですか？

定量（タンパク質の発現比較）を目的とするウェスタンブロットにおいて、バンドは検出できればよいわけではありません。また、検出されたバンドは、白抜きさえしていなければ定量性があるわけでもありません。

定量性を確保するためにはそのバンドがリニアレンジにあることが大切です。

蛍光ウェスタンブロット法は化学発光法よりもリニアレンジを広くとりやすい特徴を持つため、定量ウェスタンブロットに適した検出方法です。

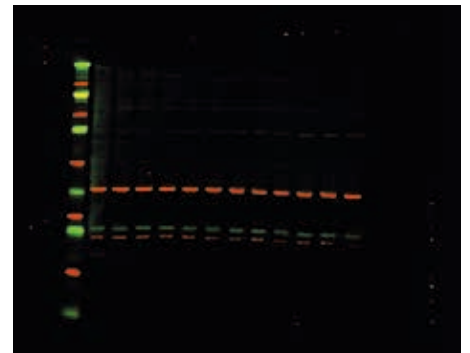


1枚のブロットから複数のタンパク質をマルチプレックス検出

化学発光法で同時に検出できるのは1種類の一次抗体だけです。
そのため、1枚のメンブレンから複数のタンパク質を検出するためには下記
のどちらかの方法を行う必要がありました。

- ストリッピングとリプロービングを行う（例：リン酸化ウェスタンブロット）
- 検出したい2つのバンドの間でメンブレンを切り分けて別々に反応と
撮影を行う（例：ハウスキーピングタンパク質+ターゲットタンパク質）

どちらの方法も定量性を損ねる可能性のある方法でした。



蛍光ウェスタンブロット法では、一次抗体の動物種と蛍光標識二次抗体の波長を変えることにより、1枚のブロットから複数のタンパク質を同時に検出することができます。

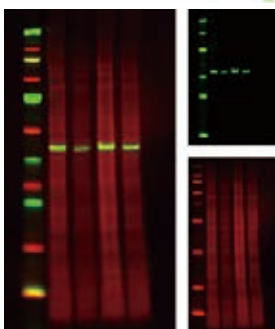
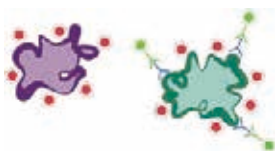
分子量の近いタンパク質を同じメンブレンから検出する必要があるリン酸化ウェスタンブロットをはじめ、多くのウェスタンブロット実験でお役立ていただける蛍光ウェスタンブロット法ならではの利点です。

サンプルと実験の目的に合わせたベストなノーマライゼーション方法を選択

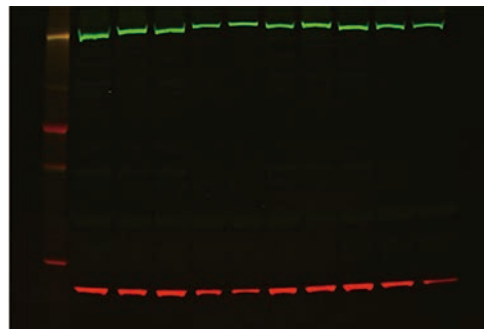
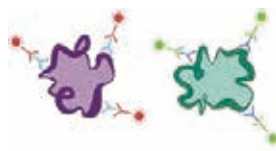
ノーマライゼーションは戦略です。常にすべてのウェスタンブロット実験に通用する万能なノーマライゼーション法は存在しません。
近年の多くの論文で、ハウスキーピングタンパク質 (HKP) の発現量が実験処理間やサンプル間で異なることが示されています。
インターナルコントロールに HKP を使用するにあたっては、比較する実験群間で生理的な発現変動がないことを確認することが
求められています。

最新の論文投稿規定では、HKP に代わる新たなローディングコントロールとして、総タンパク質染色が推奨されています。
総タンパク質による補正は生理学的な変動を受けづらく、直線性のある範囲も広いいため、インターナルコントロールの第一
選択肢として優れています。蛍光ウェスタンブロット法を用いることで、この総タンパク質によるノーマライゼーションを
容易に行うことが可能です。

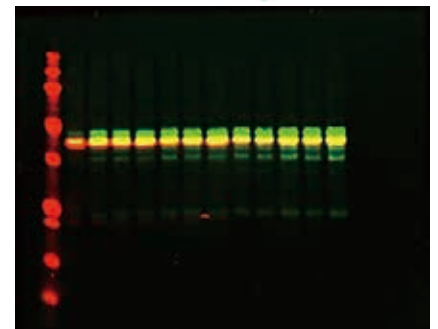
また、翻訳後修飾の代表例であるリン酸化タンパク質の発現解析では、リン酸化タンパク質のシグナルを全ターゲットタンパク質
(リン酸化+非リン酸化タンパク質) のシグナルで補正することで、リン酸化レベルの変化を正確に定量することができます。
蛍光ウェスタンブロット法は、リン酸化バンドと全ターゲットタンパク質のバンドを同じメンブレンから同時に検出できます。
ストリッピングとリプロービングは不要です。



総タンパク質補正



ハウスキーピングタンパク質補正



リン酸化ウェスタンブロット

Odyssey[®] イメージングシステムによる蛍光ウェスタンの利点

Odyssey イメージングシステムには、蛍光ウェスタンプロットを高感度かつ再現性高く行うための多くの特徴と機能が詰め込まれています。

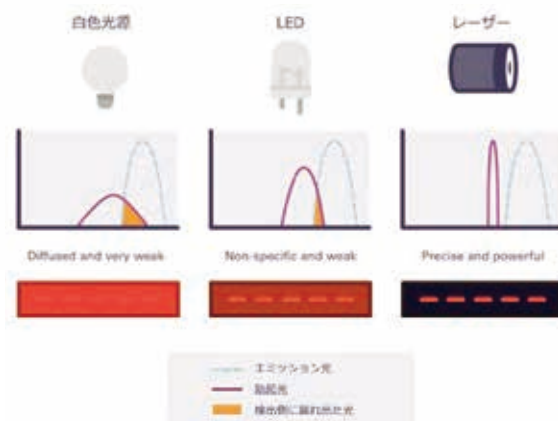
1. Odyssey システムなら高感度な蛍光ウェスタン検出が可能です

Odyssey イメージングシステムでは、励起光源に半導体レーザーを使用しています。

レーザーによる励起は、白色光源やLED光源による励起と異なり波長特異性が高く、励起光の検出側への漏えいが少ない特徴がございます。したがって白色光源やLED光源を用いた装置よりも、バックグラウンドレベルの低い画像（すなわちシグナルノイズ比の高い画像）を得ることができます。また一般に、レーザー光源は励起パワーが強いため、蛍光標識二次抗体をより効率的に励起することが可能で、このこともOdyssey システムの高感度なプロット検出に役立っています。

また、レーザー励起は、蛍光チャンネル間のクロストーク（干渉）がほとんどないことも利点です。リン酸化ウェスタンプロットのような近接したバンドの撮影で特に重要です。

励起光源の種類によるバックグラウンドの違い



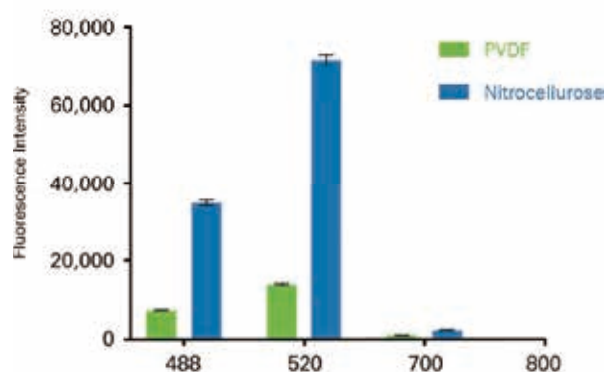
蛍光ウェスタンプロットでは、どの波長でタンパク質を検出するのが適するでしょうか？

右図のように、近赤外蛍光波長（700/800 nm）による検出は、可視蛍光（Red/Green/Blue : RGB）による検出と比べて、メンブレンの自家蛍光に起因するバックグラウンドを著しく低減できることが分かっています。

したがって発現量の低いターゲットタンパク質には、近赤外蛍光波長（特に 800 nm）を使用することが重要です。

一方で、ハウスキーピングタンパク質などの高発現タンパク質は、可視蛍光波長でも十分に検出することが可能で、目的に合わせて使用する波長をうまく組み合わせることで、実験の幅を広げることができます。

励起波長によるバックグラウンドの違い

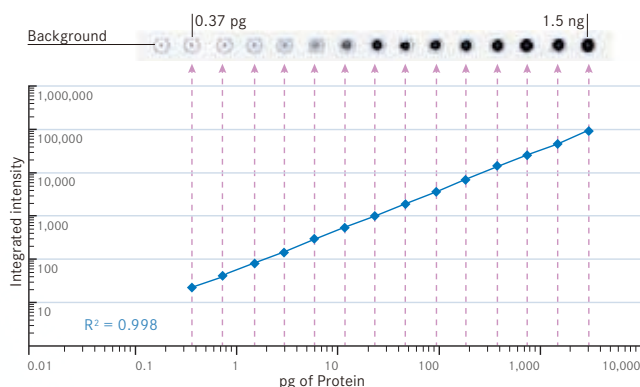


2. 露光調整はもはや不要、サチュレーションは起きません

ウェスタンプロットの撮影には露光時間の調整がつきものと思いませんか？

Odyssey イメージングシステムは 6 桁以上のダイナミックレンジを持つため、弱いバンドから強いバンドまで常にワンショットで撮影が可能です。バンドが飽和する、弱いバンドが見えないなどの理由で露光時間を調整したり、蓄積露光（accumulation や increment）や自動露光の機能を使用する必要はありません。

また、ハウスキーピングタンパク質とターゲットタンパク質の間でメンブレンを切り分けて別々にインキュベーションと撮影をする必要もないため、定量の正確性を高めていただけます。



3. 常に均一な再現性の高い画像取得を実現

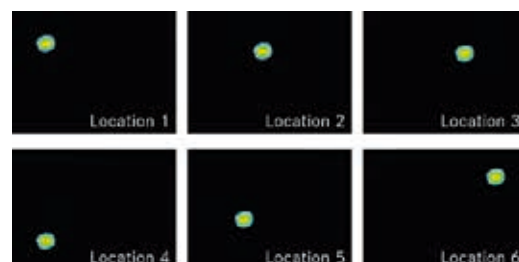
ウェスタンブロットの再現性は様々な実験ステップに依存しますが、画像撮影はその大切な要素です。

Odyssey® イメージングシステムは6桁以上のダイナミックレンジを持つため、常に同じ露光設定で撮影が可能です。バンドの飽和を防ぐために Auto exposure（自動露光機能）を搭載しているイメージャーもございますが、露光を自動で“調整”するのではなく、常に同じ露光で撮影することにより画像撮影の再現性を確保していただけます。

また、Flat-fieldingなどで画像撮影後の補正を行わなくても、撮影エリアの中央から端まで均一な蛍光強度で raw image を取得することができます。スキャナータイプの Odyssey F と Odyssey M はもちろん、CCD カメラタイプの Odyssey XF でも撮影エリア内の蛍光強度均一性は CV3% 以内です。撮影毎にブロットを置く位置が変わっても問題ございません。



常に同じ露光条件で撮影が可能です



4. 常に均一な再現性の高い画像解析を実現

再現性の高い定量ウェスタンブロットデータを手にするには、美しい画像を得ただけでは不十分です。

Odyssey イメージングシステムに付属するウェスタンブロット画像解析ソフトウェアは、主観に頼る部分をできる限り排除し、ブロット間、実験者間、施設間でのバンド定量の再現性を確保できるようデザインされています。

さらに、最新の論文投稿ガイドラインに準じた画像解析を、実験初心者の方からエキスパートの方まで、少ない学習時間で簡単に行っていただけます。

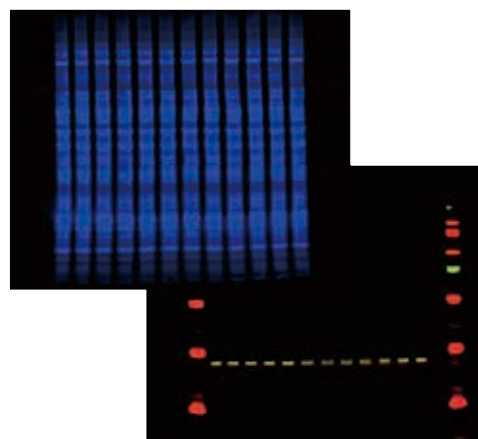


5. 抗体結合を妨げない総タンパク質補正で定量の正確性を確保

総タンパク質染色によるノーマライゼーションは、ハウスキーピングタンパク質（HKP）に変わる新たなバンド強度補正方法として、近年頻繁に使われ始めています。

総タンパク質補正は、HKP の発現量が変動する場合でも使用可能な、より確実性の高いノーマライゼーション法です。

ウェスタンブロットのローディングコントロールのための総タンパク質染色は様々な手法が提案されています。LI-COR 社の Revert™ 520 と 700 は定量ウェスタンブロットの内部標準のために開発された総タンパク質染色試薬です。アミノ酸組成に依らず、すべてのタンパク質を均一に染色することが可能です。さらに、色素の結合に共有結合を用いないため抗体の結合を妨害せず、必要に応じて脱色も可能です。総タンパク質に加えて、2つの目的タンパク質を同じブロットから検出していただくことができます。



Odyssey® イメージングシステム

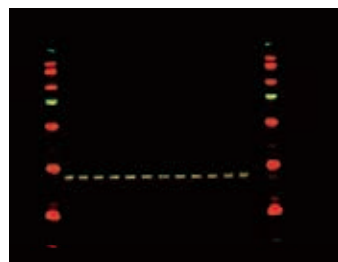
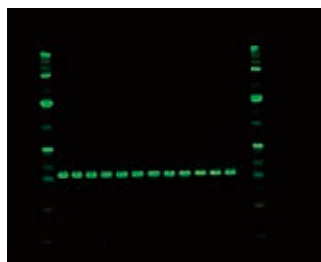
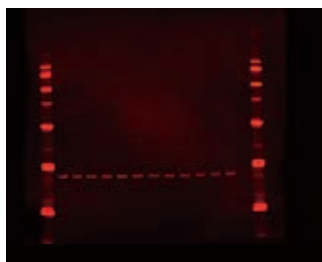
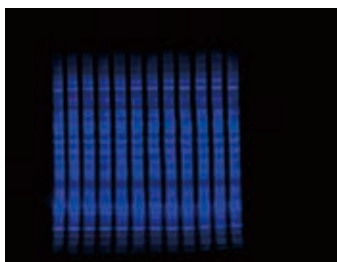
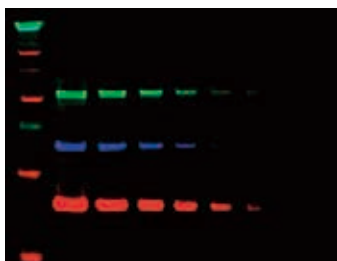
Odyssey Family には、XF、F、M の3機種がラインナップされています（右ページ）。

最上位モデルの Odyssey M は、近赤外蛍光に加えて可視蛍光の撮影も可能で、3色での蛍光ウェスタンブロットを行うことができるスキャナータイプのイメージングシステムです。また、ケミルミ撮影にも対応し、化学発光ウェスタンブロットの検出が可能なモデルもございます。明視野撮影も可能で、解像度に優れ画像取得スピードも速いため、非常に多くのアプリケーションに対応しています（10 ページ参照）。

Odyssey F には2レーザーモデルと4レーザーモデルがございます。

2レーザーモデルは最大2色、4レーザーモデルは最大3色での蛍光ウェスタンブロットと In-Cell Western™ アッセイが可能です。

Odyssey XF は、近赤外蛍光波長での2色蛍光ウェスタンブロットと化学発光ウェスタンブロットの撮影が可能な CCD カメラタイプのイメージング装置です。





Odyssey® XF イメージングシステム (製品番号 2802-00)

- 冷却 CCD カメラタイプ
- 最大 2 色による蛍光ウェスタンブロット
- 化学発光ウェスタンブロットにも対応
- その他の用途: CBB ゲル、DNA ゲル撮影



Odyssey F イメージングシステム (製品番号 9150-00 / 9180-00)

- 蛍光専用のスキャナータイプのイメージングシステム
- 近赤外蛍光のみの 2 レーザーモデルと可視蛍光も可能な 4 レーザーモデルの 2 機種
- 最大 2 色 (2 レーザーモデル) あるいは 3 色 (4 レーザーモデル) による蛍光ウェスタンブロット
- 広いイメージングエリア
- その他の用途: In-Cell Western Assay™、EMSA など



Odyssey M イメージングシステム (製品番号 3340-00 / 3350-00)

- 近赤外蛍光に加えて可視蛍光と明視野の撮影にも対応したスキャナータイプのイメージングシステム
- CCD カメラを搭載した化学発光対応モデルあり (3350-00)
- 最大 3 色による蛍光ウェスタンブロット
- その他の用途: In-Cell Western Assay、細胞アッセイ、組織切片スライド、EMSA など多様なアプリケーションに対応



Odyssey® シリーズの比較

	3350-00	3340-00	9180-00	9150-00	2802-00
	Odyssey M (Fluor & Chemi)	Odyssey M (Fluor)	Odyssey F (4 レーザーモデル)	Odyssey F (2 レーザーモデル)	Odyssey XF

イメージングモード

近赤外蛍光	685/785 nm レーザー励起	685/785 nm レーザー励起	685/785 nm レーザー励起	685/785 nm レーザー励起	685/785 nm レーザー励起
可視蛍光	488/520 nm レーザー励起	488/520 nm レーザー励起	488/520 nm レーザー励起	—	—
発光 (ルミネッセンス)	可	—	—	—	可
明視野/吸光	透過/反射	透過/反射	—	—	—

その他の主要なスペック

タイプ	ラインスキャナー* ¹	ラインスキャナー	ポイントスキャナー	ポイントスキャナー	冷却 CCD カメラ イメージング
最大イメージングエリア	25 x 18 cm* ²	25 x 18 cm	25 x 18 cm	25 x 18 cm	12 x 10 cm
ダイナミックレンジ	> 6 桁	> 6 桁	> 6 桁	> 6 桁	> 6 桁
解像度	5-100 μm	5-100 μm	21-337 μm	21-337 μm	125 μm

主な対応アプリケーション

蛍光ウェスタンブロット	✓	✓	✓	✓	✓
化学発光ウェスタンブロット	✓				✓
In-Cell Western™ アッセイ	✓	✓	✓	✓	
On-Cell Western アッセイ	✓	✓	✓	✓	
細胞増殖アッセイ	✓	✓			
ELISA	✓	✓			
タンパク質ゲル	✓	✓	✓	✓ ^{*3}	✓ ^{*3}
DNA/RNA ゲル	✓	✓	✓		✓
ゲルシフトアッセイ (EMSA)	✓	✓	✓	✓	
プロテインアレイ	✓	✓	✓	✓	
組織切片イメージング	✓	✓	✓		
Ex vivo イメージング	✓	✓	✓	✓	

* 1. 発光撮影は冷却 CCD カメラで行います。

* 2. 発光撮影のエリアは 15 x 11 cm です。

* 3. クマシー染色ゲルのみ対応しています。

LI-COR Acquisition Software

すべての Odyssey[®] イメージングシステムは、新たにデザインされたソフトウェア LI-COR Acquisition Software で画像の取得を行います。

< Odyssey XF >



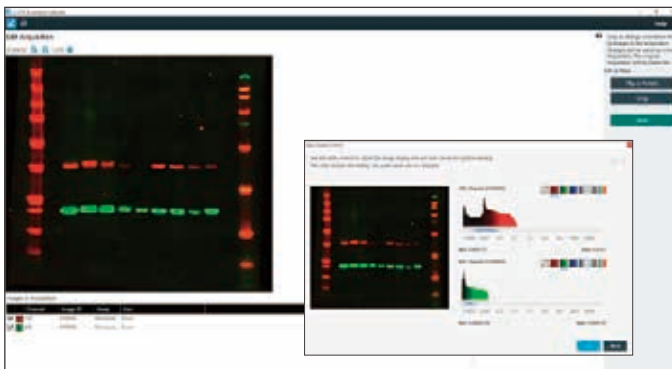
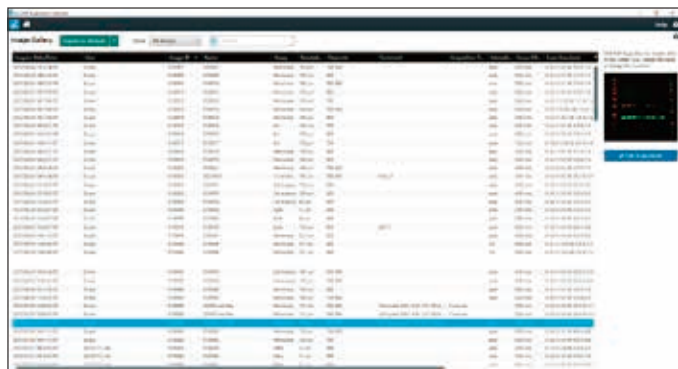
< Odyssey F / Odyssey M >



LI-COR Acquisition Software では、アプリケーションごとに推奨の画像取得パラメーターがプリセットされています。ユーザーは、設定に迷うことなく画像撮影を行うことができ、最適ではない設定で画像取得を行うことによるデータ品質の低下を避けることが可能です。

画像取得開始までのプロセスはステップ・バイ・ステップのワークフローで進み、初めてソフトウェアを触る方でも操作に手間取ることはありません。

また、同じソフトウェアで画像の管理と編集（コントラスト調整・切り取り・左右反転・上下反転など）も可能です。生画像は指定ホルダーに自動保存されます。画像編集を行うと、オリジナル画像を保持したまま別の画像 ID として保存されるので、データインテグリティの観点でも安心です。



製品カタログとウェスタンブロット以外のアプリケーションのカタログもご用意しています。



Empiria Studio[®] Software

正確で再現性の高い定量ウェスタンブロットデータを取得するには、美しいきれいな画像を得ただけでは不十分です。画像データからの数値化を正しい方法でコンスタントに行う必要があります。

Odyssey[®] イメージングシステムには次世代定量ウェスタンブロット解析ソフトウェア Empiria Studio が標準付属します。従来のウェスタンブロット解析ソフトウェアは、いわば「バンド強度数値化」を行うソフトウェアでした。Empiria Studio は違います。バンド強度の数値化にとどまらず、最新の論文投稿規定に従い、あなたの定量ウェスタンブロットデータをトータルプロデュースします。

エキスパートレベルの解析をあなたの手に！

- 最新の論文投稿ガイドラインに準拠した解析法を誰でも簡単に実行可能
- リニアレンジ等のバリデーション～ノーマライゼーション計算～グラフ化まで
- 主観的になる要素をできる限り排除して客観的解析を実現
- ソフトウェア解析に要する時間を大幅に削減



Empiria Studio[®]の機能

Empiria Studio は LI-COR とトップジャーナルのコラボレーションにより生まれたソフトウェアです。Empiria Studio を用いると最新の論文投稿規定に準拠した画像解析を誰でも簡単に行うことができます。

バリデーション機能

最新の論文投稿規定で求められるバリデーション実験のデータ解析を行うための機能です。本実験の前にアッセイ系の検証を行うことで信頼性の高い定量ウェスタンブロット実験を行うことが可能になります。



- 抗体バリデーション

一次抗体が目的のタンパク質の分子量を検出できているかを検証します。検証完了後はソフトウェア内の抗体データベースに登録され、いつでも呼び出して使用できます。



- ハウスキーピングタンパク質の検証

内部標準として使用するハウスキーピングタンパク質（HKP）が実験群間（処理間）で生理学的な発現変動がないことをバリデーションします。LI-COR 社では HKP 検証のためのプロトコルおよび試薬と合わせてソリューションを提供しています。



- リニアレンジの検証

定量性の確保には常にリニアレンジで実験をすることが求められます。このリニアレンジ検証実験のデータの解析を視覚的に簡単に行うことができます。LI-COR 社ではリニアレンジ検証方法のプロトコルと合わせてソリューションを提供しています。

発現比較解析とデータレポーティング機能

バリデーション実験を終えた後に、本実験で実際に実験群間での目的タンパク質の発現比較解析を行い、実験レポートあるいは論文投稿データを作成するための機能です。



- ノーマライゼーション

バンド強度の数値化だけでなく、ノーマライゼーション計算と実験群間での発現差のグラフ化まで行うことができます。ノーマライゼーション法は、総タンパク質補正、HKP 補正、翻訳後修飾タンパク質のための全ターゲットタンパク質補正の 3 種類の方法すべてに対応しています。



- 反復実験

正しい反復実験（リプリケーション実験）は定量ウェスタンブロットのキーのひとつです。複数のプロットにまたがる結果から、実験群間の発現比（fold change）の算出とグラフ化を簡単に行うことができます。



- データレポート

PDF 形式あるいはエクセル形式で解析結果のレポートをエクスポートします。また、Empiria Studio を所有する方間で解析経過と生画像を含めたすべてのデータを容易に共有していただけます。





抗体バリデーション

ウェスタンブロットによるタンパク質発現解析において、抗体による目的タンパク質の認識の検証は大切な第一歩です。Empiria Studio® は一次抗体が目的の分子量を認識しているかどうかを検証し、その結果をデータベース化する機能を持ちます。データベースには、一次抗体と二次抗体の情報（製造会社名、製品番号、製品名、ロット番号）および反応条件（ブロッキング条件、抗体希釈率など）を登録することが可能です。登録された情報はいつでも参照することが可能で、ラボ内あるいは共同研究者間で簡単に受け渡しができます。

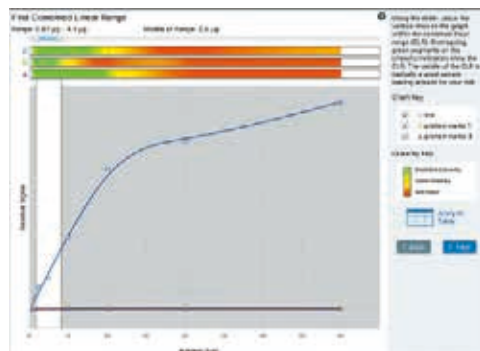


Name	Host Species	Isotype	Concentration (µg/ml)	Reaction Time (min)	Blocking Solution	Validation Status	Batch Number	Lot Number
Anti-Human IgG	Human	IgG	1.000	30.0	Casein	Valid	123456789	123456789
Anti-Mouse IgG	Mouse	IgG	1.000	30.0	Casein	Valid	123456789	123456789
Anti-Rabbit IgG	Rabbit	IgG	1.000	30.0	Casein	Valid	123456789	123456789
Anti-Human IgG	Human	IgG	1.000	30.0	Casein	Valid	123456789	123456789
Anti-Mouse IgG	Mouse	IgG	1.000	30.0	Casein	Valid	123456789	123456789
Anti-Rabbit IgG	Rabbit	IgG	1.000	30.0	Casein	Valid	123456789	123456789

リニアレンジバリデーション

ウェスタンブロットによるタンパク質発現解析では、リニアレンジで実験することで初めて定量性を確保することができます。すなわち、シグナル強度が直線性を持つ泳動サンプル量の範囲を決めることが大切です。

直線性はターゲットタンパク質だけでなく、インターナルコントロールにも求められます。ターゲットタンパク質とインターナルコントロールのどちらもが直線性のあるサンプル量（Combined Linear Range）で実験することによって、定量の正確性と信頼性をさらに高めることができます。



Empiria Studio は、このリニアレンジの検証実験における画像解析を、バンド検出から直線性のある範囲の算出まで簡単に行うことができます。エクセルなどによる計算は不要です。

3種類のノーマライゼーション法のすべてに対応しています。

- 総タンパク質補正
- ハウスキーピングタンパク質補正
- リン酸化タンパク質の全ターゲットタンパク質による補正

ハウスキーピングタンパク質 バリデーション

インターナルコントロールは比較したい実験群の間で発現量が一定であることが求められます。ハウスキーピングタンパク質（HKP）を用いてターゲットタンパク質のバンド強度を補正する際には、インターナルコントロールとして使用する HKP に生理学的な発現変動がないことを確認することが求められます。



Empiria Studio は、この HKP 検証実験における画像解析を、バンド検出から数値化まで簡単に行うことができます。エクセルなどによる計算は不要です。

発現比較解析

ターゲットタンパク質の実験群間における発現比較解析では、バンドの数値化だけでなく、ノーマライゼーション計算から実験群ごとの平均値と標準偏差の算出、発現比（fold change）の数値化、グラフ化までを簡単に行うことができます。発現比較グラフは、棒グラフとスキャッターグラフに対応しています。



ノーマライゼーションは下記の3種類の方法に対応しています。

- 総タンパク質補正
- ハウスKEEPINGタンパク質補正
- リン酸化タンパク質の全ターゲットタンパク質による補正

さらに、一枚のプロットの解析だけでなく、複数のプロットにまたがった実験においても、発現比の数値化とグラフ化をソフトウェア上で行うことができます。

比較する実験群が多い場合、反復実験（バイオロジカルリプリケートとテクニカルリプリケート）を正しく行うには、複数のプロットにまたがった実験が必要になりますが、その場合でも最終結果のレポートまで間違いなく簡単に実施いただけます。

画像解析に起因する定量データのバラつきを最小化

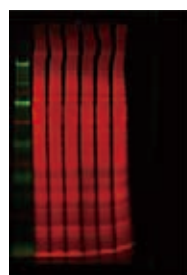
ウェスタンブロットの画像解析において、レーン検出とバックグラウンド補正は解析者による主観が入りやすいステップです。Empiria Studio® では、この2つのステップに起因するデータのバラつきを最小にするための方法を開発し採用しています。主観的な要素を排除しているため、常に均一な画像解析が可能です。

6人の解析者で3つのバンドのバンド強度を定量し、これまでの一般的なバックグラウンド補正法におけるデータのバラつきと Empiria Studio におけるデータのバラつきを比較した。

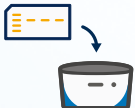
- Empiria Studio :
Adaptive Background Subtraction (ABS) 法によるバックグラウンド補正
- Local : Local Background 補正法
- Global/User : User Defined Background 補正法

6人の解析者で6つのレーンのレーン強度を定量し、ソフトウェア間でデータのバラつきを比較した。

- Empiria Studio v3.2 :
Adaptive Lane Finding (ALF) 法による自動レーン検出
- Empiria Studio v1.1 :
マニュアルによるレーン検出
- Traditional Analysis Software :
従来のソフトウェアによるマニュアルレーン検出



蛍光ウェスタンブロッティング 実験ワークフロー

1.	タンパク質抽出		組織あるいは細胞からタンパク質を抽出します。
2.	濃度定量		Bradford 法、BCA 法、Lowry 法などでサンプルのタンパク質濃度を定量します。
3.	電気泳動		SDS-PAGE を行います。各ウェルに同じ量のサンプルをアプライします。このとき、ゲルの両端あるいは片方の端のレーンに分子量マーカーを流します。青色分子量マーカーあるいは LI-COR 社の Chameleon® 分子量マーカーを使用してください (LI-COR 社以外の青色分子量マーカーを使用する際は従来の 1/3 ~ 1/5 量をアプライします)。Odyssey®M の場合は、可視分子量マーカーもお使いいただけます。また、LI-COR 社のオレンジ色ローディングバッファーを使用すると、700 nm のバックグラウンドの低減に役立ちます。
4.	転写		転写を行います。ニトロセルロースあるいは低蛍光の PVDF メンブレンを使用します。化学発光ウェスタンブロットで使われる通常タイプの PVDF メンブレンは使用できないことがほとんどです。ご注意ください。メルク社 Immobilon®-FL がおすすめです。メンブレンのポアサイズと転写法は特に問いません。転写後のメンブレンを一度乾燥させると、より強いシグナルを得ることができます。
5.	ブロッキング		ブロッキングを行います。ブロッキングで使用するブロッキング剤はアッセイごとに最適化するのが基本です。スキムミルクや BSA は蛍光ウェスタンブロットに適さないことがあるのでご注意ください。LI-COR 社の Intercept® Blocking Buffer は、多くの蛍光ウェスタンブロットアッセイでバックグラウンドを効果的に低減することが知られています。ブロッキングには Tween® 20 等の界面活性剤を入れません。
6.	一次抗体反応		一次抗体との反応を行います。一次抗体の濃度はアッセイごとに最適化します。複数のタンパク質を同時に検出する場合は抗体を混ぜて反応させます。分子量が近いターゲットには異なる動物種の一次抗体を使用してください。一次抗体の希釈にはブロッキングバッファーを使用し Tween 20 を終濃度 0.1-0.2% で加えます。
7.	洗浄		洗浄を行います。短時間の洗浄を 4-5 回繰り返し、余剰な一次抗体を十分に洗い流します (しかし過度な洗浄は NG)。ブロッキングと抗体希釈に TBS を使用している場合は TBS-T、PBS を使用している場合は PBS-T で洗浄します。
8.	二次抗体反応		蛍光標識二次抗体との反応を行います。LI-COR 社の IRDye® 標識二次抗体と VRDye® 標識二次抗体は Odyssey イメージングシステムに最適化されています。IRDye 標識二次抗体は通常 1/20,000、VRDye 標識二次抗体は通常 1/10,000 で使用しますが、最適条件はアッセイごとに異なる可能性があります。波長が合えば他社の蛍光標識二次抗体も使用可能です。複数のタンパク質を同時に検出する場合は二次抗体を混ぜて反応させます。クロストークを起こさないようにターゲット IgG の動物種と二次抗体の種間交差に注意してください。二次抗体の希釈にはブロッキングと同じバッファーを使用し終濃度 0.1-0.2% の Tween 20 と終濃度 0.01-0.02% の SDS を加えます (SDS は PVDF メンブレンの時だけ、ニトロセルロースメンブレンは不要)。
9.	洗浄		洗浄を行います。短時間の洗浄を 4-5 回繰り返し、余剰な二次抗体を十分に洗い流します (しかし過度な洗浄は NG)。ブロッキングと抗体希釈に TBS を使用している場合は TBS-T、PBS を使用している場合は PBS-T で洗浄します。最後の洗浄は Tween 20 なしの PBS/TBS で行います。
10.	イメージング		LI-COR Acquisition Software により、画像の取得を行います。化学発光法とは異なり基質 (検出試薬) の添加は不要です。蛍光ウェスタンブロットは乾燥後も画像取得が可能です。乾燥後の方がシグナルノイズ比が上昇する傾向にあります (ただし、ストリッピングを行うときはメンブレンの乾燥禁止)。
11.	画像解析と統計		Empiria Studio® ソフトウェアにより画像解析を行います。

総タンパク質補正の実験ワークフロー

Revert™ 総タンパク質染色試薬による総タンパク質補正を行う場合は、転写後に Revert 総タンパク質染色試薬で総タンパク質を染色し、洗浄した後に、Odyssey® イメージングシステムで総タンパク質を検出します。そのあと、ブロッキングから抗体反応までを通常通り行い、ターゲットタンパク質を 800 nm で検出します。

2 つのターゲットタンパク質の検出を行いたいときは、Revert の検出後に色素を脱色し、700 nm と 800 nm の両波長でそれぞれのターゲットを検出します。

Revert 総タンパク質染色試薬には Revert 700（すべての Odyssey システムで使用可能）と Revert 520（すべての Odyssey M と Odyssey F 4 レーザーモデルで使用可能）がごございます。



Step 1

タンパク質をゲルからメンブレンに転写しメンブレンを超純水で洗浄する。



Step 2

Revert 総タンパク質染色液で 5 分インキュベートする。
Revert 洗浄液で 2 回洗浄する。



Step 3

700 nm あるいは 520 nm の蛍光チャンネルで Revert を検出する。



Optional

(2 ターゲット検出の場合)
Revert 脱色液で脱色する。



Step 4

ブロッキング



Step 5

一次抗体でインキュベーション
↓↓
IRDye 標識二次抗体でインキュベーション



Step 6

ターゲット・タンパク質を 800 nm あるいは 700 nm 蛍光チャンネルで検出する。

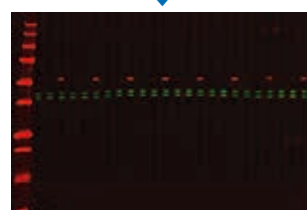
MPX™ ブロットングツール (製品番号: 2801-00)

MPX ブロットングツールは、一次抗体のセレクションや最適抗体濃度のスクリーニングを効率的に行っていただくためのオプションツールです。

幅広のコームで作成したウェルにサンプルをアプライして電気泳動を行います。抗体反応時にメンブレンの上にガラス製のマルチレーン・トッププレート置いて抗体をアプライすることで、一枚のメンブレン上で多数の抗体条件を同時にテストしていただけます。

メンブレンはミニゲルサイズ (7 x 8.5 cm) に対応しています。

マーカー数	サンプル数	サンプル量 / ウェル	デザイン	サンプルあたりのレーン数
1	1	100-500 µL		24
1	2	20-225 µL		11
1	3	5-150 µL		7
1	4	5-100 µL		5



近赤外蛍光および可視蛍光標識二次抗体

- 近赤外蛍光標識二次抗体 (IRDye® 標識二次抗体): 700 nm (680RD) および 800 nm (800CW)
- 可視蛍光標識二次抗体 (VRDye® 標識二次抗体): 488 nm および 548 nm
- 抗ウサギ/マウス/ラット/ヤギ/ニワトリ/モルモット/ヒト IgG
- 高度な交差吸収
- 抗マウスサブタイプ IgG 抗体あり
- 抗体動物種: ヤギ or ロバ



Revert™ 総タンパク質染色試薬

総タンパク質染色ノーマライゼーションのための試薬です。総タンパク質染色液と洗浄液からなります。脱色液を使用すると、総タンパク質 + 2 ターゲットの解析が可能になります。染色液、洗浄液、脱色液の単品販売、あるいはセット販売品をご選択いただけます。



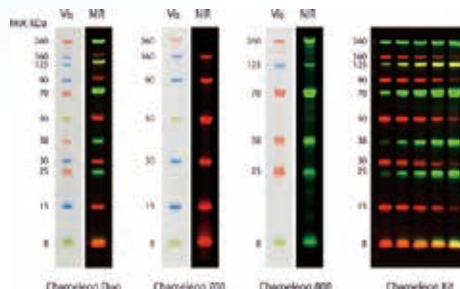
Intercept® ブロッキングバッファー

蛍光ウェスタンブロットに適したブロッキングバッファーです。プロテイン含有タイプ（通常はこちらを選択）とプロテインフリータイプがございます。それぞれに TBS ベースと PBS ベースがあります。また、抗体希釈液としてすぐに使用できる Tween®-20 入りの製品（TBS-T および PBS-T）もございます。



Chameleon® 染色済分子量マーカー

近赤外蛍光波長で検出が可能な分子量マーカーです。レーンマーカーを兼ねているので目視での確認も可能です。700 & 800 nm のミックスタイプと、700 nm および 800 nm それぞれの専用タイプがあります。



その他の蛍光ウェスタンブロット関連試薬

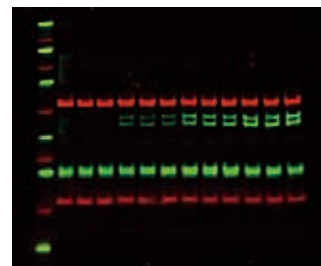
	4x タンパク質ローディングバッファー	電気泳動の際に使用するサンプルローディングバッファーです。近赤外蛍光波長で蛍光を発しないオレンジ色のためゲルあるいは転写後のメンブレンにおけるバックグラウンドを低減することができます（特に 700 nm のバックグラウンドに効果的です）。
	NewBlot™ 5x ストリッピングバッファー	蛍光ウェスタンブロット用のストリッピングバッファーです。ストリッピングは定量目的の実験におススメではありませんが、「どうしても」時にはストリッピングすることもできます。ECL 用のストリッピングバッファーはワークしないことが多いのでご注意ください。
	Odyssey® ローディングインジケーター	ハウスキーピングタンパク質のパリデーションを行う際に使用する近赤外蛍光試薬です。ゲルへのローディングの際にサンプルに混ぜて使用することで外部標準として機能します。分子量 28 kDa の位置で 700 nm あるいは 800 nm（製品による）の蛍光シグナルを発します。このローディングインジケーターのバンド量がレーン間で異なる場合は、ゲルへのサンプルアプライのパラツキが疑われます。
	Odyssey ウェスタンブロットキット	IRDye 標識二次抗体 2 種類、ニトロセルロースあるいは PVDF メンブレン、ブロッキングバッファーがセットになった近赤外蛍光ウェスタンブロットキットです。
	クイックウェスタンキット	免疫沈降サンプルのウェスタンブロットでは、免疫沈降で使用した IgG の重鎖あるいは軽鎖を、ウェスタンブロットのステップで二次抗体が認識してしまうことがあります。この問題を解決することができるワンステップウェスタンブロットキットです。

Q & A

Q. Odyssey® システムは 3 色以上のウェスタンブロット検出はできますか？

Odyssey M と Odyssey F (4 レーザーモデル) は 3 色でのウェスタンブロットが可能です。Odyssey F (2 レーザーモデル) と Odyssey XF は、3 色以上でのウェスタンブロット検出はできません。

しかし、分子量が違うタンパク質であれば同じ動物種の一次抗体で同じ波長の二次抗体を使用してもマルチプレックス検出は可能です。3 つ以上の動物種の一次抗体を探す必要がない点で利点があります。

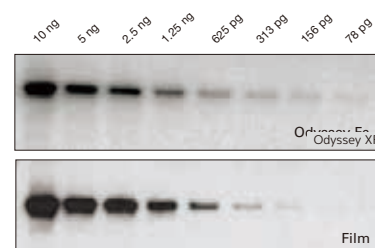


Q. Odyssey XF と Odyssey M の化学発光撮影の感度は？

他社の通常のイメージャーと同等の感度を持ちます。

Odyssey システムはケミルミ撮影でも 6 桁以上のダイナミックレンジを持ちます。したがって露光時間を調整しなくても、装置の検出上限によりバンドが飽和する心配がありません。

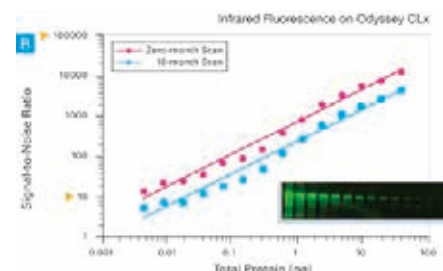
尚、Odyssey F では化学発光の撮影はできません。



Q. 蛍光は褪色しませんか？

LI-COR 社の IRDye® 標識二次抗体は蛍光強度が長時間安定しています。

撮影中に褪色してしまう心配はありませんし、遮光下でブロットを保存していただければ、数ヶ月～数年後でもシグナルを検出できます。



Q. 蛍光ウェスタンブロット実験のランコストは？

蛍光ウェスタンブロットでは検出に基質を使用しません。また、蛍光標識二次抗体の価格は HRP 標識二次抗体よりも高いですが、抗体希釈率を HRP 標識二次抗体よりも大きくしていただくことができます。そのため、化学発光ウェスタンよりも少ないコストあるいは同等のコストでご実験が可能です。ローディングコントロールに総タンパク質補正を利用いただくと、試薬コストをさらに下げることが可能です。

Q. レーザー光源は交換費用が高いので寿命が心配です。

レーザーの平均寿命は 40,000 時間あるいは 20,000 時間です。機種と波長により異なります。撮影していない間は劣化しません。

Q. ソフトウェアはのライセンス数は？

LI-COR Acquisition Software と Empiria Studio® Software が 1 ライセンス標準付属します。

Q. ソフトウェアは Mac に対応していますか？

Empiria Studio Software は Mac® OS にも対応しています。

LI-COR Acquisition Software は Windows® のみに対応です。

Q. Odyssey システムは GLP/GMP 基準の IQ/OQ と 21 CFR Part 11 に対応できますか？

Odyssey システムは IQ/OQ に対応することができます。また、21 CFR Part 11 対応ソフトウェアがごございます。詳細はお問い合わせください。

Q. 機器点検や保守契約は可能ですか？

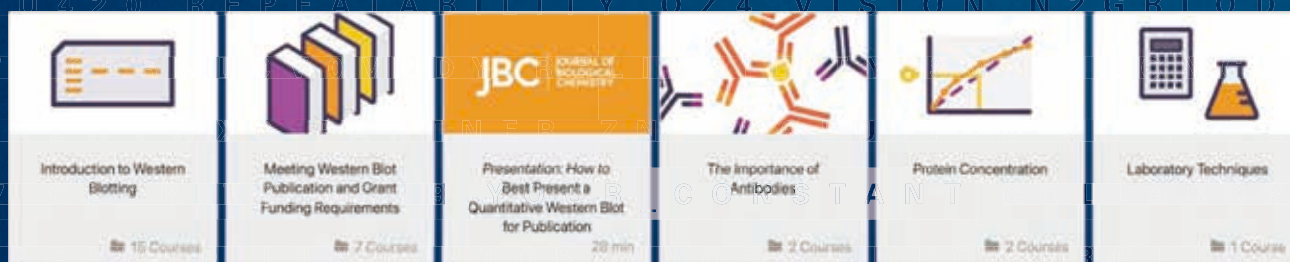
スポット定期点検プランと保守契約プランをご用意しています。詳細はお問い合わせください。



あなたの実験をフルサポートします

Lambda Uは、ウェスタンブロット実験（特に定量ウェスタンブロット実験）について、その理論から、最新の論文投稿ガイドライン、実験手技までオンラインビデオで学ぶことができるポータルサイトです。

ウェスタンブロット実験の基礎から、実験書には書いていないラボワークにおけるヒントまで、ウェスタンブロットデータを用いて研究を行う皆さまにお役立ちいただける情報が揃っています。オンデマンド形式なので必要なパートを好きな時に自由にセルフ学習できます。



バリデートされた実験プロトコルと豊富なテクニカル資料

ウェスタンブロット実験あるいはソフトウェア解析の詳細について、豊富なプロトコルとテクニカルノートをご用意しております。株式会社スクラムは、皆様のタンパク質発現解析をお手伝いするために、日本語資料のご提供と日本語での充実したテクニカルサポートをご提供しています。



LICORbio™

<https://www.licor.com/bio>

※ 本製品は試験研究用です。医療や診断目的にはご使用いただけません。
※ 価格、外観、仕様などは、予告なしに変更することがあります。
※ それぞれの商標や登録商標、製品名は各社の所有する名称です。

代理店

輸入元



株式会社 スクラム

本社 〒135-0014 東京都江東区石島 2-14
Imas Riverside 4F
Tel. (03)6458-6696 Fax. (03)-6458-6697
西日本営業所 〒532-0003
大阪市淀川区宮原5-1-3 NLC新大阪アースビル403
Tel. (06)6394-1300 Fax. (06)6394-8851
Web Site : www.scrum-net.co.jp

LC20240930