

## Product Information

## Chemiluminescent Peroxidase Substrate

製品番号 CPS-1、CPS-1-30、CPS-1-60、  
CPS-1-120、CPS-1-300

保存温度 2~8 °C

## TECHNICAL BULLETIN (使用説明書)

## 製品概要

Sigma の Chemiluminescent Peroxidase Substrate (ペルオキシダーゼ化学発光基質) はウェスタンブロットなど各種用途においてペルオキシダーゼ標識物質の高感度の検出にお使いいただけます。本基質は、安定した過酸化物質を含む改良されたルミノール製品であり、バックグラウンド干渉を最小限に抑えてピコグラム単位の感度を実現します。

## 構成

Chemiluminescent Peroxidase Substrate には 4 種類の包装サイズがあり、それぞれ Chemiluminescent Reagent (製品番号 C9107) および Chemiluminescent Reaction Buffer が含まれています。(製品番号 C9232)

包装サイズ	C9107	C9232
30 mL	10 mL	20 mL
60 mL	20 mL	40 mL
120 mL	40 mL	80 mL
300 mL	100 mL	200 mL

## 注意事項と免責事項

本製品は試験研究用です。危険性と安全な取り扱いについては安全性データシート (MSDS) をご覧ください。

## 使用前の準備

Chemiluminescent Reagent (製品番号 C9107) と Chemiluminescent Reaction Buffer (製品番号 C9232) を 1:2 で混和して、Working Solution を調製します。よく混和して、遮光します。膜の cm<sup>2</sup> あたり 0.043~ 0.125 mL 使用することをお勧めします。発光時間を長くしたい場合は、Chemiluminescent Reagent と Chemiluminescent Reaction Buffer を 1:1 の比で使うことができます。

## 保存/安定性

本製品は 2~8 °C で保存して下さい。本製品は最初の容器に保存して遮光すれば 18 カ月間は安定です。Working Solution は遮光した場合室温で数時間安定です。

## 手順

Sigma の Chemiluminescent Peroxidase Substrate (ペルオキシダーゼ化学発光基質) は高感度なので、個々のアッセイ成分 (抗体、コンジュゲートなど) を最適化するために細心の注意を払う必要があります。ウェスタンブロットの場合、最適化には非特異的な免疫化学的相互作用に関連したバックグラウンド反応を最小限に抑える必要があります。本製品使用についての一般的なガイドラインです。プロトコールは転写した膜から始まっています。

## メモ:

- 最適の結果を得るには、バックグラウンドを最小限に抑え、シグナルを最大限にするように、個々のアッセイ成分で最適化する必要があります。
- 本製品はウェスタンブロット用です。
- 以下のステップは全て、ロッカーまたはオービタルシェイカーでわずかに振盪しながら膜が自由に浮かんでいるような状態で行う必要があります。
- インキュベーションは全て室温で行います。
- コンタミネーションを避けるために膜を取り扱う場合には手袋をしてください。
- アジ化ナトリウムは西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼ (HRP) を阻害するので、アッセイ成分のバッファー保存剤として使用しないで下さい。

1. 膜をウェスタンブロットティングの装置から外し、膜を TWEEN<sup>®</sup> 20 添加の Tris 緩衝生理食塩水 (TBST、製品番号 T9039) または TWEEN 20 添加のリン酸緩衝生理食塩水 (PBST、製品番号 P3563) で 1 分間洗浄します。ウェスタンブロットティングでは TBS または PBS システムを使用するように注意して下さい。
2. 膜を適切なブロッキング剤で 30 分間ブロックします。高感度の検出には、Western Blocker Solution (製品番号 W0138) をお勧めします。
3. ブロッキング剤に一次抗体を加えます。使用可能な一次抗体の溶液中の最終濃度は 0.2~20 µg/mL です。
4. 膜を一次抗体溶液中で少なくとも 30 分間インキュベートします。
5. TBST または PBST で 1 分間洗浄します。
6. TBST または PBST を除去して、膜に適切なブロッキング剤を少なくとも 10 mL 加えます。二次抗体を加えます。ブロッキング剤で 50,000~500,000 希釈して用います。
7. 膜を二次抗体溶液中で少なくとも 30 分間インキュベートします。
8. ブロッキング溶液を除去して、膜を洗浄します。TBST または PBST で 5 分間の洗浄を 5 回行います。
9. 洗浄バッファーから膜を取り出し、膜から余分な液体を切ります。膜を湿った状態に保ちます。乾燥させないようにして下さい。
10. プラスチック製ラップの平らなシート (または清潔なプラスチック製の表面) に膜を置きます。
11. プロットを Working Solution に 5 分間浸して発光させます。
12. 余分な基質溶液を切り、ホルダーまたはプラスチック製ラップに置きます。
13. BioMax light フィルムをプロットに露光させます。露光時間は 30 秒~10 分間です。必要とされる露光時間を決定するために 10~30 秒間の短時間露光を行うことをお勧めします。短時間露光でもシグナルが強すぎる場合は、1~8 時間プロットを放置してシグナルが弱まってから再度フィルムの露光を行います。

#### 関連製品

製品名	包装サイズ	製品番号
TBS	10 パック	T6664
PBS	10 パック	P3813
Western Blocker Solution	400 mL	W0138
TBS + 3% milk	10 パック	T8793
PBS + 3% milk	10 パック	P2194
PBS + 5% milk	10 パック	P4739
TBS + TWEEN 20	10 パック	T9039
PBS + TWEEN 20	10 パック	P3563
抗マウス HRP 抗体	2 mL	A9044

TWEEN は ICI Group の登録商標です。

RBG/MKS/MAM 1/04

## トラブルシューティングガイド

問題	原因	対策
バックグラウンドのシグナルが強すぎる。	ブロットイングの最後の洗浄ステップが十分でない。	洗浄ステップ数を倍にして下さい。
	一次抗体が多すぎる。	使用する一次抗体の量を減らして、一次抗体とのインキュベーション後の TBST での洗浄時間を 1 分間ではなく 5 分間にして下さい。
	二次抗体が多すぎる。	使用する二次抗体の量を減らして下さい。
フィルムの像が逆転している (バックグラウンドが暗く、バンドが明るい)。	二次抗体が多すぎる。	使用する二次抗体の量を減らして下さい。
膜のバンドが褐色または黄色がかっている。	二次抗体が多すぎる。	使用する二次抗体の量を減らして下さい。
膜に非特異的なバンドがある。	一次抗体が多すぎる。	使用する一次抗体の量を減らして、一次抗体とのインキュベーション後の TBST での洗浄時間を 1 分間ではなく 5 分間にして下さい。
	二次抗体が多すぎる。	使用する二次抗体の量を減らして下さい。
膜が小さな斑点で覆われている。	二次抗体が凝集体を形成している。	二次抗体を濾過して下さい。
化学発光反応でシグナルが認められない。	タンパク質量が検出できないほど低い。	フィルムの露光時間を長くするか、用いるタンパク質の量を増やして下さい。
	一次抗体の量が不十分である。	一次抗体の量を増やして下さい。
	二次抗体の量が不十分である。	二次抗体の量を増やして下さい。

Sigma ブランド製品は Sigma-Aldrich, Inc.を通じて販売されています。

Sigma-Aldrich, Inc.は同社製品がこの文書およびその他の Sigma-Aldrich 発行文書に含まれる情報に合致していることを保証します。お客様の個別の用途と製品の適合性についてはお客様にてご判断ください。掲載の品目、製品情報、価格などは予告なく変更される場合がございます。納品伝票または同梱の内容明細書の裏面をご覧ください。