

## EzWestBlue W 取扱説明書

2020年07月29日 第1版

## 1. 本製品を安全にご利用いただく為の注意事項

本製品を安全にお使いいただくために、まず本取扱説明書をよくお読みください。本取扱説明書の内容を十分に理解されるまで、操作はお控えください。また本取扱説明書は、本製品を指定の目的に使用するのみ記載しております。本取扱説明書で指定していない目的・方法へのご使用はお控えください。万が一、本取扱説明書で指定しない目的、方法にご使用の場合、必要な安全対策及び不測の事態は全て操作する方の責任となります。

## 2. 使用目的

本製品はウエスタンブロッティングに用いるHRP（西洋ワサビペルオキシダーゼ）標識抗体用の発色基質です。ELISA法の発色基質としてはご使用になれません。

## 3. 本製品の構成

名称	容量	個数
EzWestBlue W イージーウェストブルー	200 mL (ブロッティング膜2000cm <sup>2</sup> 分) (ミニゲル約26枚分)	1本

名称	主成分
EzWestBlue W イージーウェストブルー	3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン 過酸化水素 (無色透明～薄青色の液体です)

## 4. 組成

本製品はPRTR法、毒劇物取締法、労働安全衛生法の除外規定量を超える通知対象物は含まれておりません。

## 5. 保存方法

- EzWestBlue Wは直射日光を避け、5～10℃の冷蔵で保存してください。未開封状態では使用期限内であれば（製造日より約1年間）安定です。
- EzWestBlue Wは金属イオンと接触すると褐色に変色します。水道水などの混入にご注意ください。

## 6. 廃棄方法

- 各試薬の廃棄は、ご所属機関の廃棄方法に準拠してください。
- ボトル材質 本体：ポリエチレン  
フタ：ポリプロピレン

## 7. 本製品以外に必要なもの

- 電気泳動用ゲル

- ブロッティング膜、ろ紙
- 電気泳動用試薬（サンプルバッファー、電極液等）
- ウェスタンブロッティング用試薬（トランスファーバッファー、ブロッキング試薬、抗体希釈液、洗浄液等）
- 一次抗体およびHRP標識二次抗体
- 電気泳動装置
- セミドライ式ブロッティング装置
- シーソーシェーカー
- ピンセット
- 蒸留水
- 撮影装置あるいはスキャナー

## 8. 使用上のご注意

- 本製品は調製済みです。試薬の添加や混合・希釈は必要ありません。
- EzWestBlue Wは金属イオンと接触すると褐色に変色しますのでご注意ください。
- 抗体は抗体メーカーの推奨濃度、もしくは一次抗体を1/1,000～1/10,000の希釈率、二次抗体を1/5,000～1/20,000の希釈率でご使用ください。

## 9. 使用方法

1. EzWestBlue Wはご使用前にあらかじめ室温に戻してください。ミニサイズゲル（85mm×90mm）のブロッティング膜1枚あたりの試薬の必要量は約5mLです。  
※検出試薬の必要量は100 μL/cm<sup>2</sup>です。
2. ウェスタンブロッティング反応後のブロッティング膜をTween 20含有EzTBS（WSE-7230）等の洗浄バッファーで洗浄します。  
※洗浄が不十分な場合バックグラウンドが高くなる場合があります。  
※30分以上洗浄液で洗浄するなど、過剰に洗浄するとシグナルが弱くなる場合があります。
3. 清潔なトレイ（メンブレンより大きめ）に必要な量のEzWestBlue Wを入れます。  
※トレイの代わりにプラスチックラップを広げて使用できます。
4. 洗浄後のブロッティング膜をEzWestBlue Wに浸漬します。ブロッティング膜全体に溶液が行き渡ることをご確認ください。  
※この時振とうするとシグナルが流れたり、感度が低下することがあります。必ず静置して行います。
5. 反応時間はサンプルに依存しますが、反応直後からシグナルが検出され始めます。暗所で反応を行うとバックグラウンドの上昇が抑えられます。約5分～30分反応してください。

※反応時間が長すぎるとバックグラウンドが高くなる場合があります。

6. シグナルが検出されたら、蒸留水でプロットング膜を数回洗浄して反応を停止します。

※酸を用いるとシグナルが黄色く変色し、見えにくくなりますので、反応の停止には必ず蒸留水を用いてください。

※ウェスタンプロットングの抗体反応で洗浄液として用いるTBS-T等で洗浄すると、蒸留水よりも早く反応が停止します。

7. 反応停止後のプロットング膜は、乾燥させてから、ピタットクリアなどに密封して遮光保存してください。シグナルは徐々に退色しますので、撮影装置やスキャナーなどで画像を保存してください。

【撮影装置で撮影する場合】

光源：白色落射照明（庫内照明）

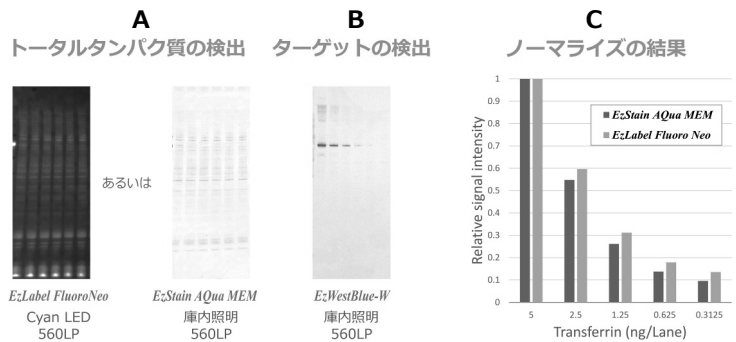
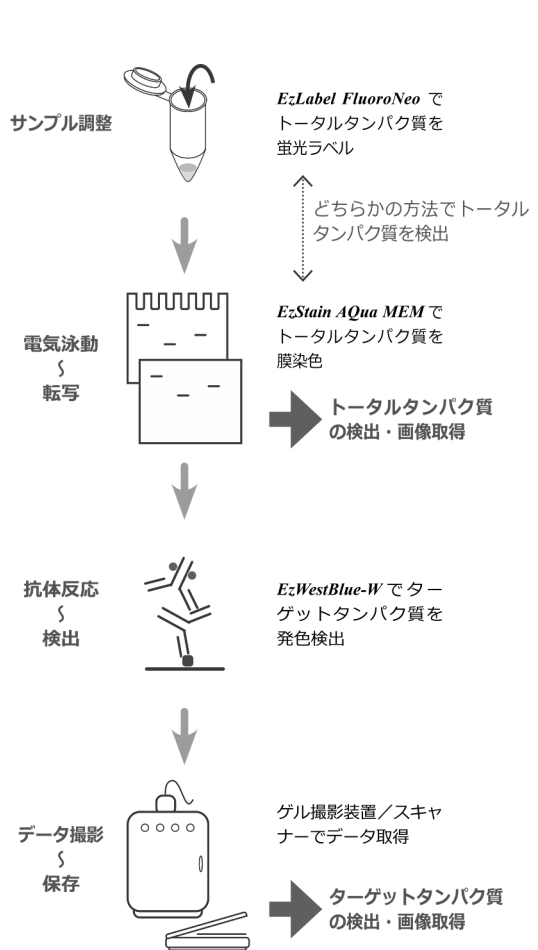
フィルター：オレンジフィルター（560LPF）あるいは、赤フィルター（600LPF）（なくても撮影可能）

## 10. 参考資料

プロットングは同じプロトコルでもちょっとした手技の違いで大きく結果が異なることがあります。最適な結果を得るためには「コツ」も重要です。

アトーホームページより「ウェスタンプロットングのコツ」がダウンロードできますので、ご一読ください。<http://www.atto.co.jp/>

## 11. 応用例 トータルタンパク質によるノーマライズ



サンプルをEzLabelFluoroNeoでラベルするか、あるいは転写後のプロットング膜をEzStainAqua MEMで染色して、撮影装置あるいはスキャナーなどでトータルタンパク質を検出し、画像を保存します(A)。その後、ブロッキング反応～抗体反応を行い、EzWestBlue-Wでターゲットタンパク質のシグナルを検出します。撮影装置あるいはスキャナーなどで検出した画像を保存します(B)。CS Analyzerなどの画像解析ソフトを使用して、トータルタンパク質(A)とターゲットタンパク質(B)の画像を解析し、各レーンの全バンドの輝度値(A)およびターゲットバンドの輝度値(B)を出します。各レーンの全バンドの輝度値(A)からリファレンスバンド比を算出し、ターゲットバンドの輝度値(B)をノーマライズします。

※[リファレンスバンド比 (ref.比)] = [各レーンの全バンドの輝度値] ÷ [基準レーンの全バンドの輝度値]

※[ノーマライズ値] = [ターゲットバンドの輝度値] ÷ [リファレンス比]

【参考ページ】

[https://www.atto.co.jp/technical\\_info/blotting/Note\\_TP-Normalize2](https://www.atto.co.jp/technical_info/blotting/Note_TP-Normalize2)

