

**For Research Use Only.  
Not for use in diagnostic procedures.**



## Anti-GFP-HRP-DirecT

Code No.	Quantity	Form
598-7	100 $\mu$ L	Rabbit Polyclonal

### HRP-DirecT シリーズ

HRP-DirecT シリーズは 1 次抗体に HRP を直接標識した製品です。

HRP-DirecT シリーズの抗体は 2 次抗体を必要としないため、次の長所を持っています。

- ① アッセイ時間が半分になる。  
2 次抗体の反応時間が節約できます。抗体の反応時間は振とう法ならわずか 30 分です。忙しい研究者に最適です。
- ② 2 次抗体由来の非特異反応がなくなる。  
免疫沈降の後のウエスタンブロッティングでは、免疫沈降に用いた抗体に 2 次抗体が反応して目的のバンド以外のバンドが検出されてしまいます。2 次抗体を必要としない HRP-DirecT では、目的のバンドだけが検出されます。綺麗なデータが必要な研究者に最適です。

1 次抗体に直接標識をした製品はこのような長所を持っていますが、2 次抗体を使用する場合のように 2 次抗体によるシグナルの増幅が期待できないため、従来の標識方法では①シグナルが不足する。②シグナルを強くしようとするとバックグラウンドが高くなる。という問題がありました。MBL は標識方法を改良することでこの問題を解決しました。MBL の定評のある Tag 抗体に、すぐれた標識法で標識したのが HRP-DirecT シリーズです。

### 検出抗原

GFP (Green Fluorescent Protein) とそのバリエーションを検出します。

\* 標識に用いた抗体は下記の GFP バリエーションとウエスタンブロッティングで反応することが確認されています。

GFP, EGFP, SEGFP, Venus, cpVenus, EBFP, SEBFP, ECFP, SECFP, cpSEGFP, EYFP, R-pericam, Sapphire

### 性状

PBS/保存剤/安定剤

### 保存

4 °C  
出荷日から 1 年間安定

### 注意

本品は研究用試薬です。直接ヒトに用いないで下さい。

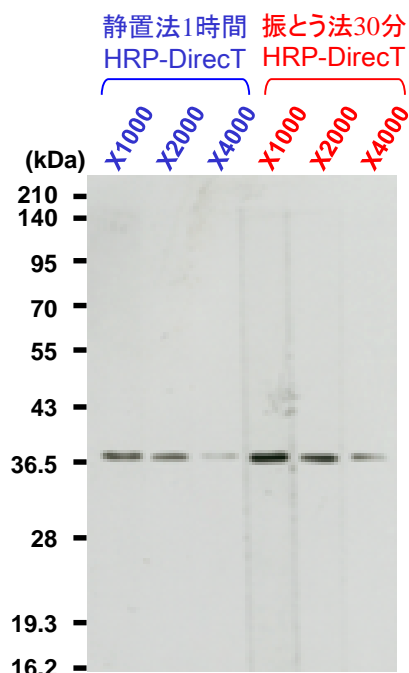
## アプリケーション

- ウエスタンブロッティング

プロトコル	反応時間	希釈倍数	検出
静置法	1時間	1,000~4,000	化学発光
振とう法	30分	1,000~4,000	化学発光

\* 静置法と振とう法の詳細については、プロトコルの項を参照してください。

### 静置法と振とう法の比較



Sample: GFP fusion protein/293T ( $2 \times 10^4$  cells/lane)

- 組織染色、細胞染色：未検討

### 免疫沈降の推奨組み合わせ抗体

免疫沈降には次の未標識抗体または、アガロース結合抗体をお使い下さい。

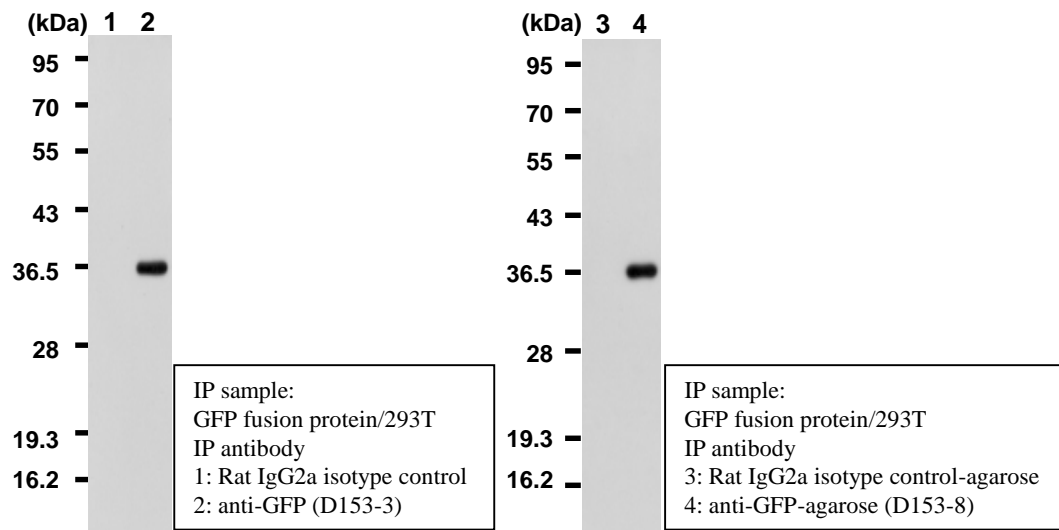
Code no. D153-3 Anti-GFP (clone RQ2)

Code no. D153-8 Anti-GFP-Agarose (clone RQ2)

\* アガロース結合抗体を使用すると、より簡単に免疫沈降ができます。

Code no. 598 anti-GFP (Rabbit Polyclonal) での免疫沈降はお勧めしません。

## 免疫沈降後のウェスタンブロッティングでの使用例



## ウェスタンブロッティング プロトコル

### 1. SDS-PAGE

一般的な方法を用いて SDS-PAGE を行います。

### 2. ブロッティング

一般的な方法を用いてブロッティングを行います。

### 3. ブロッキング

ブロッティング後のメンブレンを 5% スキムミルク/PBS (又は TBS) に浸して室温で 1 時間振とうします。(4°C で一晩静置でもよい)

### 4. 抗体反応

抗体使用量が節約できる静置法と、抗体反応時間が短縮できる振とう法があります。

#### ① 静置法 (抗体量が節約できます)。

平らな平面にラップを敷き、その上にブロッキング済みメンブレンをプロット面が上になるように置きます。

抗体を 1% スキムミルク/PBS (又は TBS) で希釈して全体を覆うようにかけます。抗体希釈液の必要量の目安は 30  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  メンブレンです。抗体の希釈倍数はアプリケーションの欄を参考にしてください。

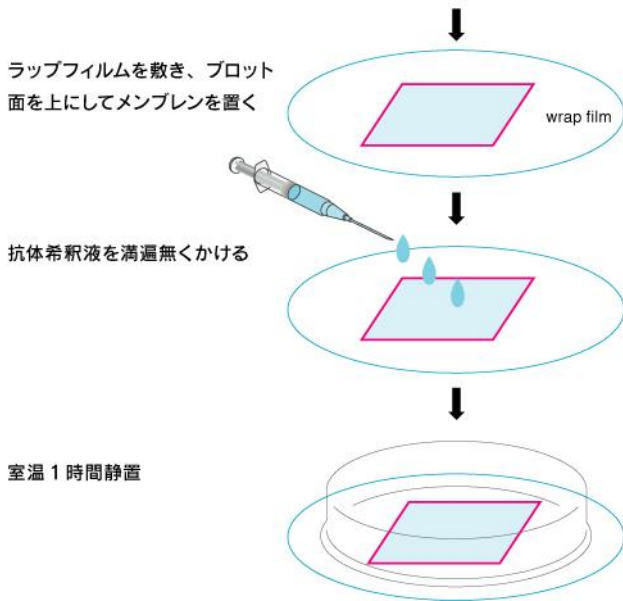
抗体希釈液が乾燥しないよう、プラスチックケースなどを被せ、1 時間室温で静置します。

#### ② 振とう法 (抗体の反応時間を短縮できます)

清潔な容器に 1% スキムミルク/PBS (又は TBS) で希釈した抗体を入れ、メンブレンを浸します。抗体希釈液の必要量の目安は 10 mL です。抗体の希釈倍数はアプリケーションの欄を参考にしてください。

30 分間室温で振とうします。

**抗体使用量が少量で済む  
HRP-Direct：静置法**

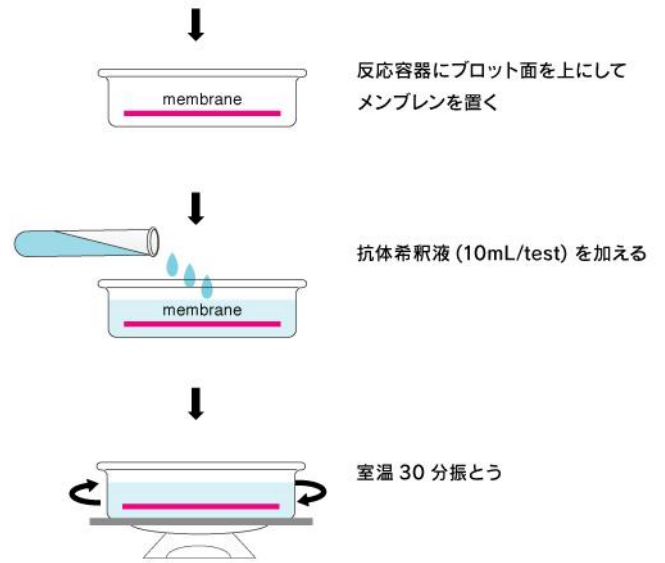


ラップフィルムを敷き、プロット面を上にしてメンブレンを置く

抗体希釈液を満遍無くかける

室温 1 時間静置

**抗体反応時間 30 分  
HRP-Direct：振とう法**



反応容器にプロット面を上にしてメンブレンを置く

抗体希釈液 (10mL/test) を加える

室温 30 分振とう

5. 洗浄

メンブレンを PBS (又は TBS) /0.05% Tween-20 に浸して振とうして洗浄します。(5分間×3回)

6. 検出

化学発光の検出試薬を用いて検出して下さい。

**For Research Use Only.  
Not for use in diagnostic procedures.**



## **Anti-GFP-HRP-Direct**

<b>Code No.</b>	<b>Quantity</b>	<b>Antibody type</b>
<b>598-7</b>	<b>100 µL</b>	<b>Rabbit Polyclonal</b>

### **HRP-Direct Series**

HRP-Direct is a series of HRP conjugated primary antibodies developed by MBL.

HRP-Direct Series products don't need secondary antibodies. That brings the following advantages:

① Total incubation time is cut in half.

The reaction with the secondary antibody becomes unnecessary. In the shaking method, reaction time is only 30 minutes. Spend your evening doing more important things.

② Clear result

No more heavy and light chain bands in Immunoprecipitation. The HRP conjugated primary antibody will not detect your precipitating antibody. Clear result helps your research.

Usually, the secondary antibody amplifies the signal of an unconjugated primary antibody. Therefore, it is thought to be difficult to obtain a strong signal with a directly conjugated antibody. To overcome this hurdle, MBL has improved the HRP conjugation method. MBL's HRP-Direct Series yield strong signal with minimum background. Give it a try - the HRP-Direct Series will not disappoint you.

### **DETECTED ANTIGEN**

GFP (Green Fluorescent Protein) ,GFP Variants

\*Our GFP polyclonal antibody has been confirmed to react with the following GFP Variants (prior to conjugation):

GFP, EGFP, SEGFP, Venus, cpVenus, EBFP, SEBFP, ECFP, SECFP, cpSEGFP, EYFP, R-pericam, Sapphire

### **REAGENT**

PBS/Preservative/Stabilizer

### **STORAGE**

This antibody is stable for one year from the date of purchase when stored at 4°C.

### **INTENDED USE:**

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

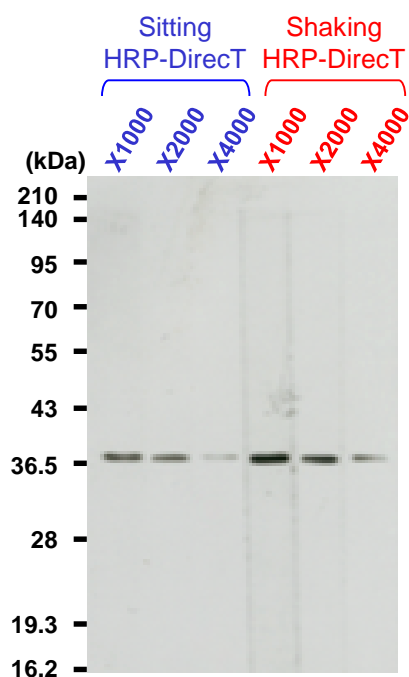
## APPLICATION

Western blotting

Method	Reaction times	Dilution	Detection
Sitting	1 hour	1,000~4,000	chemiluminescence
Shaking	30 minutes	1,000~4,000	chemiluminescence

\* Detailed procedure is provided in the following protocols.

Comparison of Sitting method and Shaking method



**Sample: GFP fusion protein/293T ( $2 \times 10^4$  cells/lane)**

Immunocytochemistry; Not tested

Immunohistochemistry; Not tested

## ANTIBODY for Immunoprecipitation.

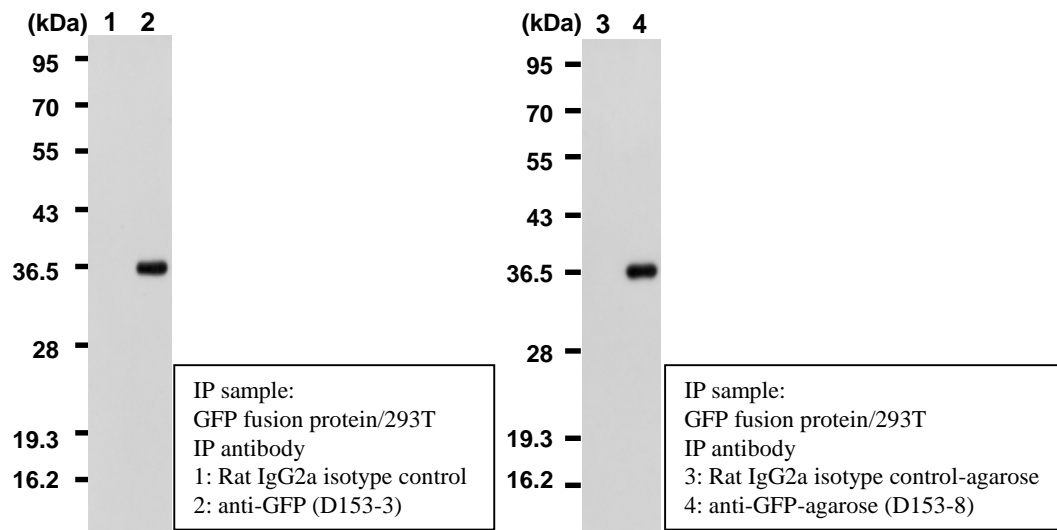
For Immunoprecipitation, we recommend the following MBL antibodies:

D153-3 Anti-GFP (monoclonal antibody)

D153-8 Anti-GFP-Agarose (monoclonal antibody)

Note: MBL does not recommend Anti-GFP polyclonal antibody (MBL; Code no. 598) as an Immunoprecipitation pair.

WB analysis of Immunoprecipitated sample.



## PROTOCOL

### Western Blotting

#### 1. SDS-PAGE and Western Blotting

Perform SDS-PAGE electrophoresis on the protein samples and transfer the protein to a PVDF membrane according to standard techniques.

#### 2. Blocking

Block the membrane with 5% skimmed milk in PBS (or TBS). Incubate for 1 hour with shaking at room temperature or over night at 4°C.

#### 3. Incubate the membrane with HRP-DirecT antibody as follows:

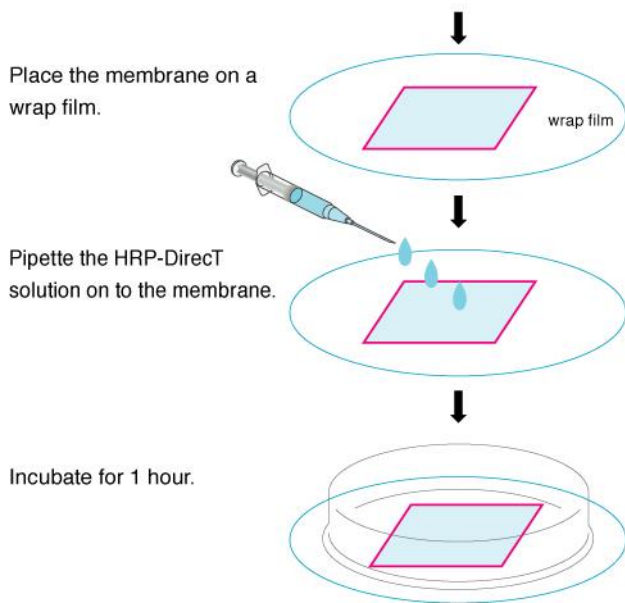
##### ① Sitting Method (Saving type: amount of antibody)

Dilute the HRP-DirecT antibody with 1% skimmed milk in PBS (or TBS). Use at least 30  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  membrane. Antibody dilution ratio is suggested in the APPLICATION. Drain the excess blocking buffer from the membranes and place them, protein side up, on a wrap film or other suitable clean surface. Pipette the HRP-DirecT solution on to the membrane. Cover the membrane with plastic case to avoid drying. Incubate for 1 hour at room temperature.

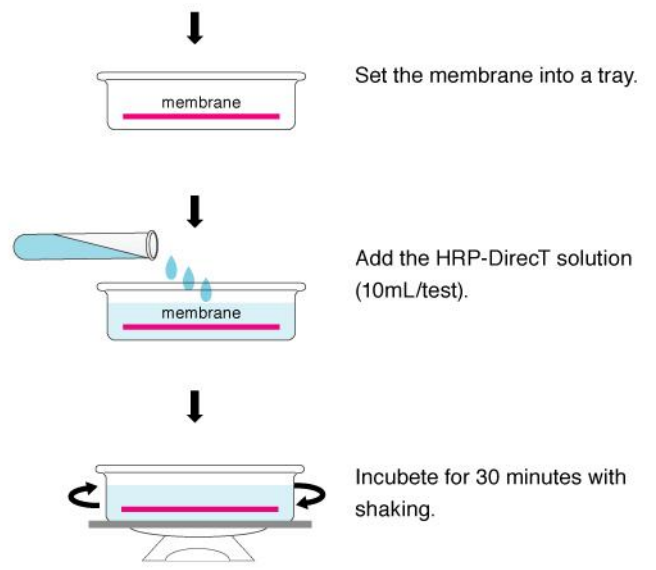
##### ② Shaking Method (Saving type: reaction time)

Dilute the HRP-DirecT antibody with 1% skimmed milk in PBS (or TBS). Use at least 10mL. Antibody dilution ratio is suggested in the APPLICATION. Transfer membrane to a tray containing HRP-DirecT antibody. Incubate for 30 minutes with shaking at room temperature.

**Saving type : amount of antibody  
HRP-Direct : sitting method**



**Saving type : reaction time  
HRP-Direct : shaking method**



4. Washing

Wash the membrane in PBS (or TBS) with 0.05% Tween-20 three times for 5 minutes each.

5. Detection

Detect with a chemiluminescence substrate according to the manufacturer's instructions.