

全自動キャピラリー ウェスタン システム Jess 紹介 Webinar



プロテインシンプルジャパン株式会社
石橋 淳

本日の内容

1. シンプルウェスタンのメリット
2. 原理、測定手順
3. RePlex (リプレックス) および
総タンパク質ノーマライゼーション

1. シンプルウェスタンのメリット

- ①スピードアップ
- ②高感度・再現性
- ③ELISA並みの定量測定

①スピードアップ

従来法の工程 (1日~2日間)



従来法の工程を
約3時間

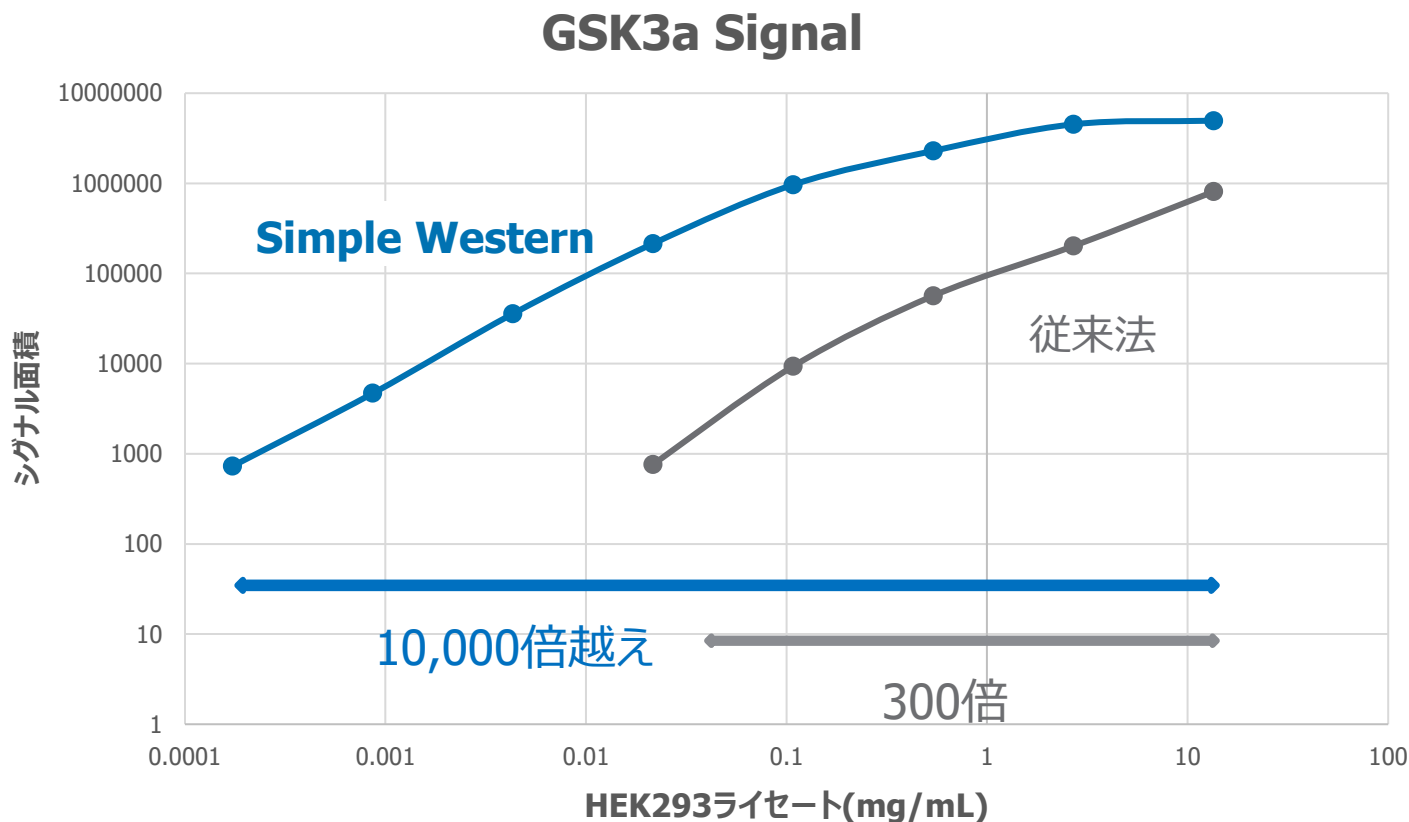


Joseph Klebba, Ph.D

"I have two young children; I am no longer familiar with the concept of free time." Nevertheless, Simple Western's hands-free automation and rapid time to results have given him the flexibility to spend his time working on other experiments or spending time with his family.

From your peers: Targeting Once Inaccessible Phospho-Proteins with RePlex :: ProteinSimple

②高感度・再現性

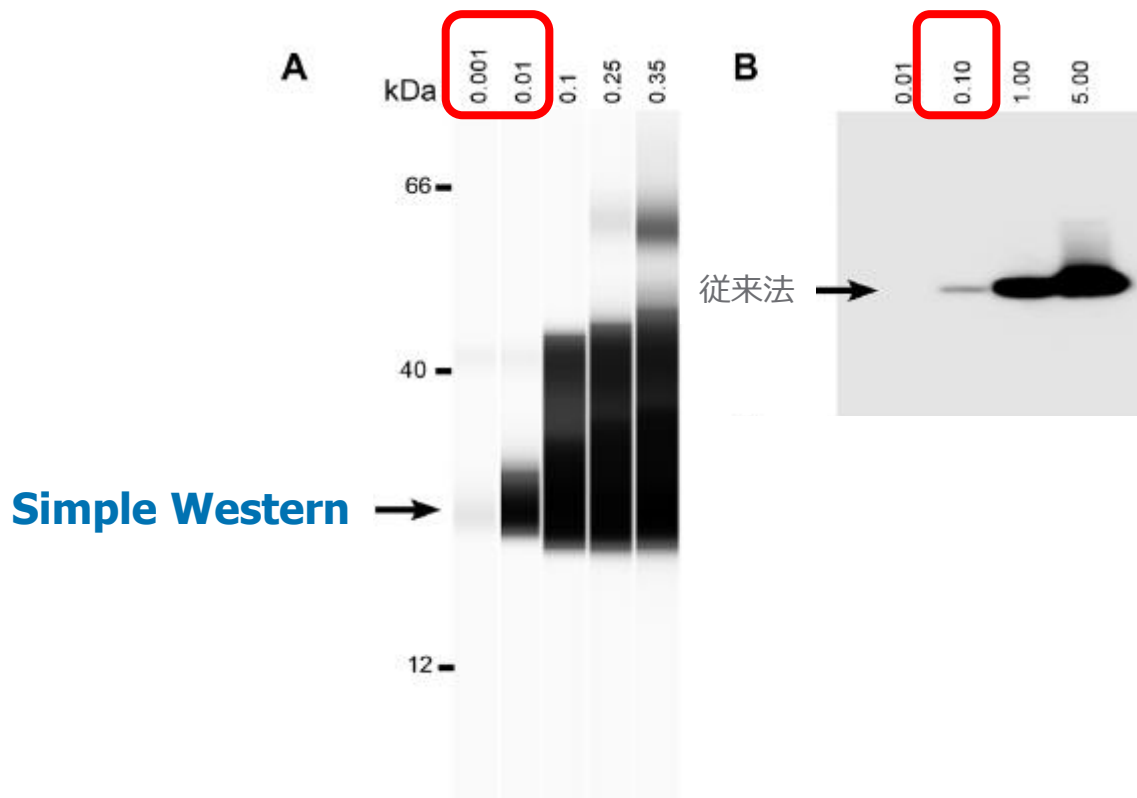


シグナルとタンパク質濃度の関係に直線性 (幅広いダイナミックレンジ)

従来法との比較論文

[Human adipose tissue protein analyses using capillary western blot technology | Nutrition & Diabetes \(nature.com\)](#)

②高感度・再現性

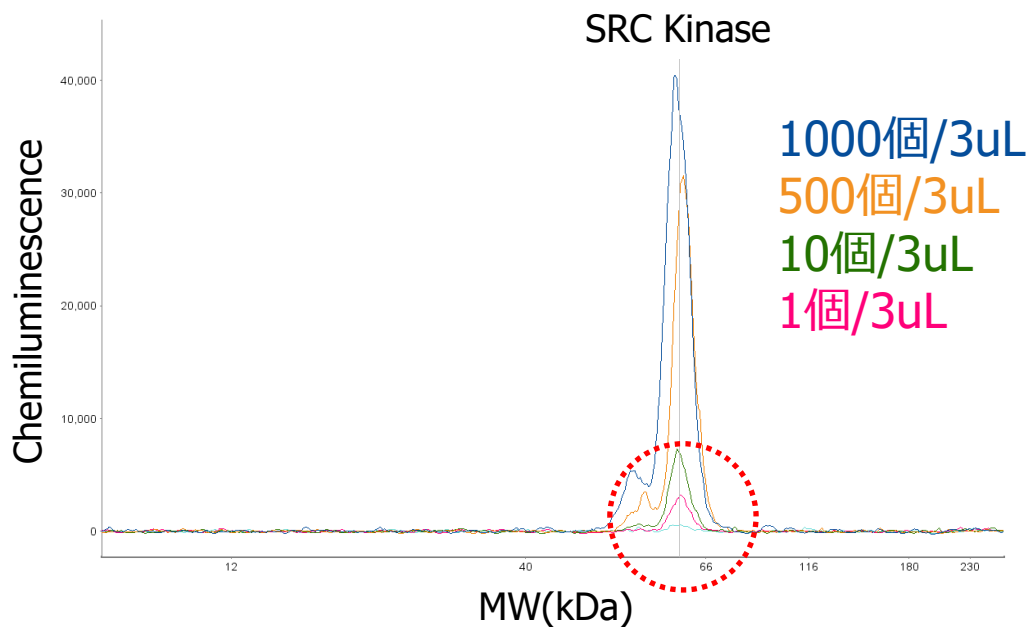


プリオン検出においても、従来法と比べて 10~100倍 の高感度

従来法との比較論文

[Development of an Automated Capillary Immunoassay to Detect Prion Glycotypes in Creutzfeldt-Jakob Disease - Laboratory Investigation \(uscap.org\)](http://uscap.org)

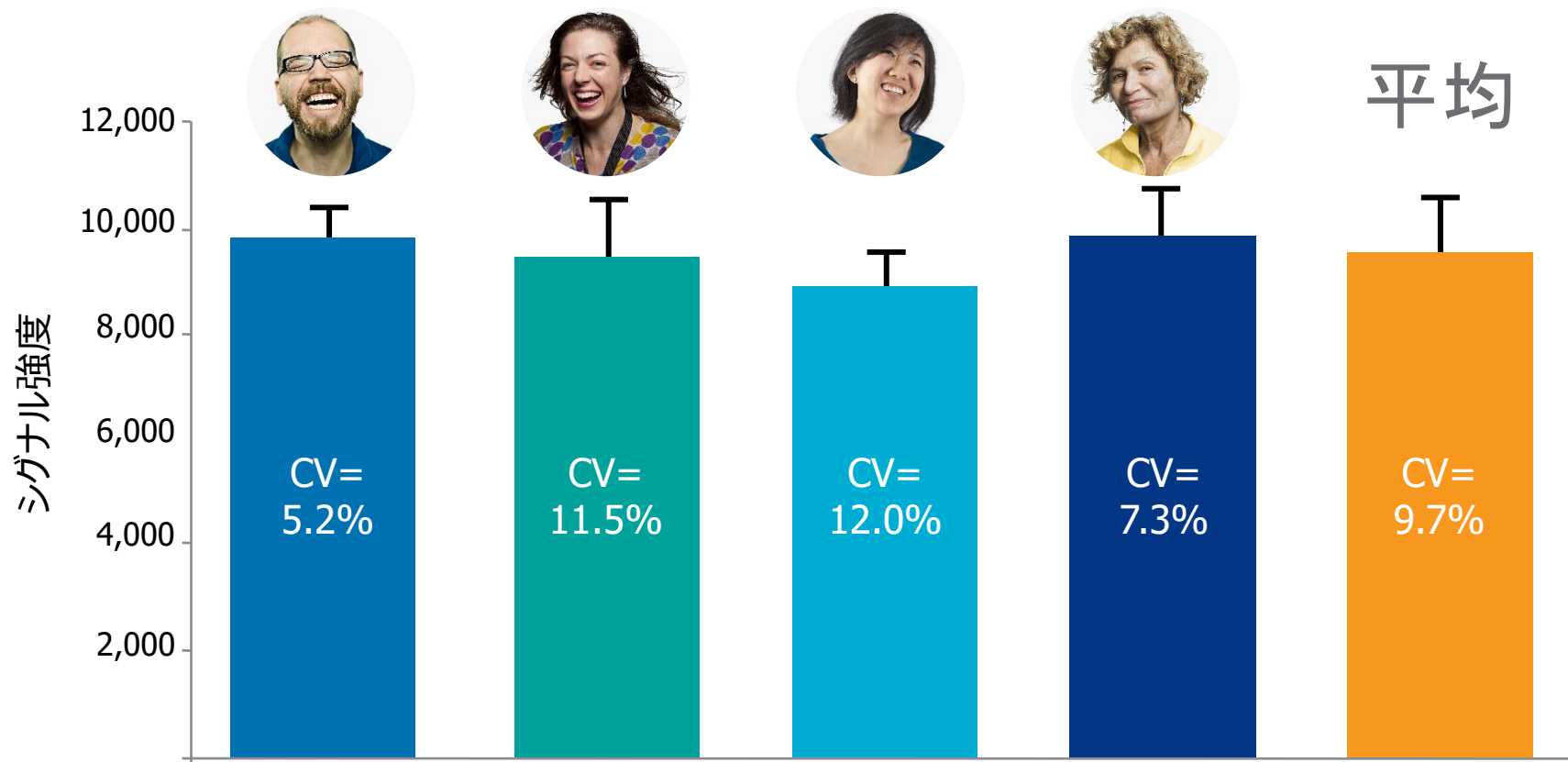
②高感度・再現性



| 標的 | 細胞数限界 (細胞数/ウェル) |
|-------------|--------------------|
| ERK 1/2 | 1-10細胞 |
| Thioredoxin | 1-10細胞 |
| Hsp60 | <1細胞* |
| PI3K | 1-10細胞 |
| PLC-Gamma | 1-10細胞 |
| SRC | <1細胞* |
| 4E-BP1 | 1-10細胞 |

*1細胞で良好なシグナル!

②高感度・再現性

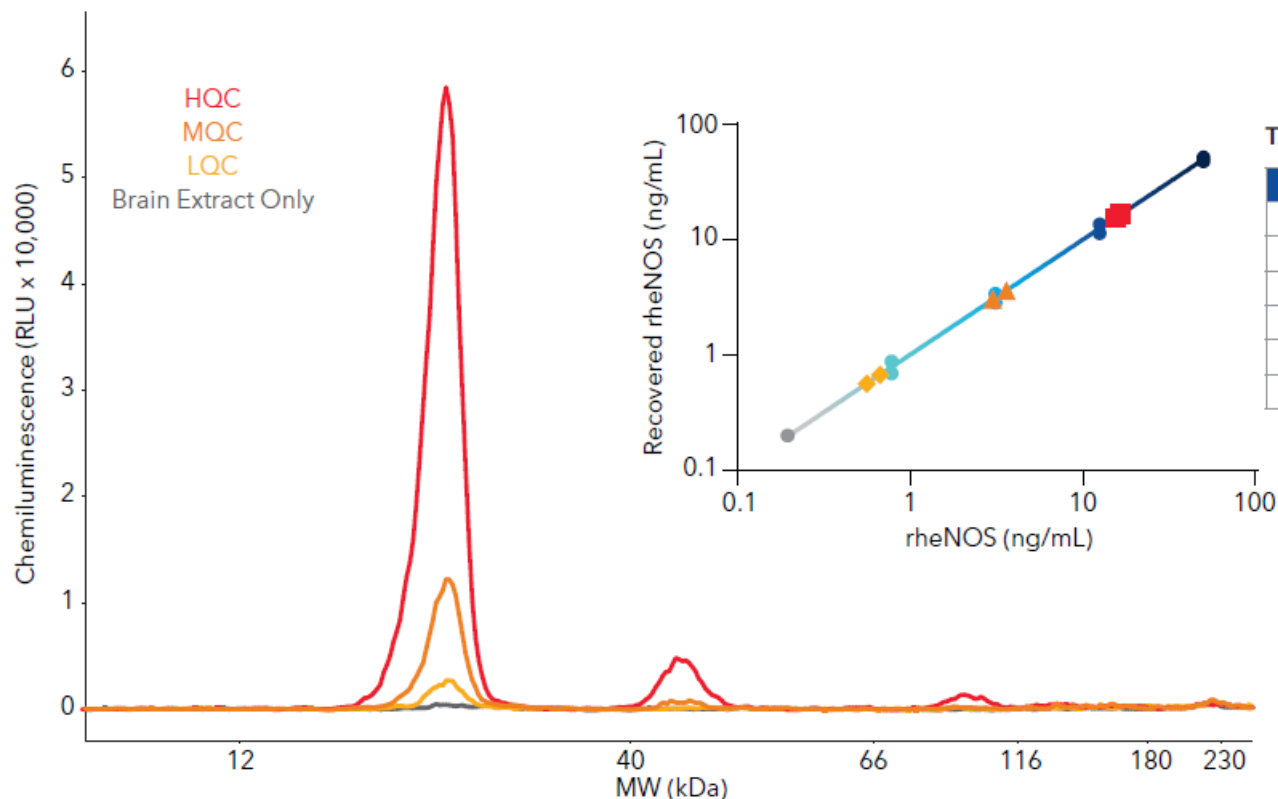


HeLa細胞ライセートのERK検出。n=11

- 日間、測定者間、施設間でのばらつきを大幅に低減
- 異なる施設間でもデータ比較が可能

③ ELISA並みの定量測定

FIGURE 3. Simple Western analysis of HQC, MQC, and LQC samples.



HQC, MQC, and LQC samples contain rheNOS at final concentrations of 15, 3, and 0.6 ng/mL, respectively. Each sample was probed with the anti-eNOS antibody. Each QC sample (n=2) was subtracted by the matrix-only control and then the percent recovery of each sample was calculated and plotted against expected rheNOS concentrations.

検量線作成と定量測定が可能

資料

サンプルとコストのセーブ

実例 : Professor Dr. Rieger

LOEWE Center
for Cell & Gene
Therapy
Goethe University
Hospital Frankfurt,
Germany

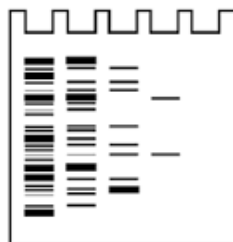


マウスの例 (維持費:2千~5万円/マウス)

- 太ももの骨髄細胞を分離
- 幹細胞を分離
- 7,000個の骨髄細胞あたり
1個の幹細胞
- マウスあたり1,000個の幹細胞

従来法のウェスタン

- 50 μ Lまたは50,000個の細胞が
必要
- マウス50匹くらい必要
- レーンごとに10万~250万円



シンプルウェスタン

- **3 μ L** または3,000個の細胞が
必要
- マウス3匹くらい必要
- レーンごとに6千~15万円



サンプル、コスト (~250万円)、見えないコスト (労力、時間) を節約

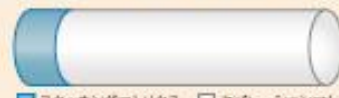
2. 原理、測定手順

原理

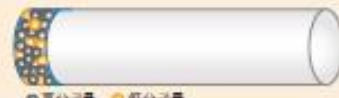


キャピラリーカートリッジと
プレートをWesにセット
スタートボタンを押す

全てのステップはキャピラリー内で行われ、全自動化されています



キャピラリー内に
マトリクス(ゲル)をロード
4分間
■ スタッキングマトリクス □ セパレーションマトリクス



サンプルをロード
1分間
● 高分子量 ● 低分子量



電気泳動
(タンパク質をその分子量に
基づきキャピラリー内で分離)
25分間



UV光でタンパク質を
キャピラリー内に固定
(キャピラリー内型にある化学物質と
タンパク質が光化学反応で共有結合し、
タンパク質が内型にトラップされる)



ゲルマトリクスを洗い出し、
ブロッキング剤、一次抗体と反応
36分間



HRP標識二次抗体と反応
30分間



発光基質をロードし発光を
CCDカメラで検出
15分間



解析データの出力
5分間
カートリッジ(廃液含む)と
プレートを廃棄
終了

3時間

* キャピラリーカートリッジと
プレートのセット → ソフトウェアでSTART

* キャピラリー電気泳動の技術。
• キャピラリー内にマトリクスを充填
• サンプルを充填
• 電気泳動で分離

* **ポイント! (特許)**
電気泳動で分離したタンパク質を、
キャピラリー内に固定。

* ゲルマトリクスを洗い出し。
ブロッキング液、1次抗体、HRP標識2次抗体、
を順次キャピラリー内で反応。

* 発光基質のロード及びCCDカメラで検出。
(蛍光の場合、発光基質は不要)

* 解析データの出力。
分子量 及び シグナル強度を自動解析

装置の中を覗いてみよう



Separation Module

Detection Module



- Antibody Diluent II
: ブロッキング兼抗体希釈液
- Luminol-S & Peroxide
: 発光試薬
- Streptavidin-HRP (or NIR)
ラダー用二次抗体

マトリックス

- 12-230 kDa
- 2-40 kDa
- 66-440 kDa

ホスト

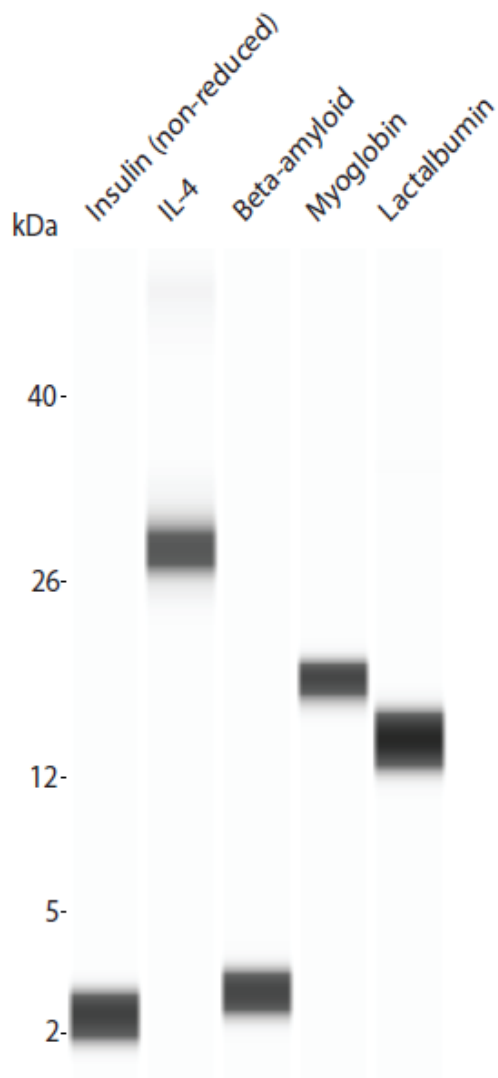
- Mouse
- Rabbit
- Goat
- Human

標識

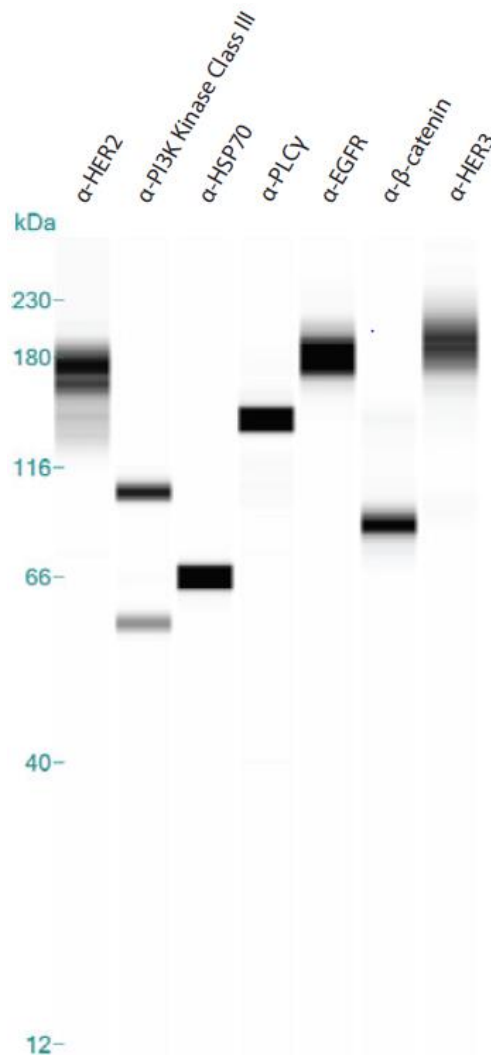
- 発光 (HRP)
- 蛍光 (NIR、IR)

Separation Module と Detection Module
を組み合わせて使用

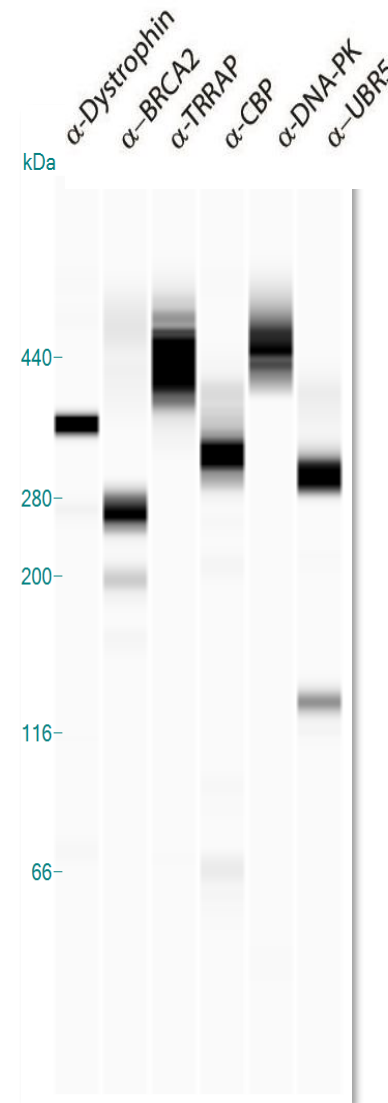
プレート3種 : 2~440 kDa をカバー



2-40 kDa



12-230 kDa

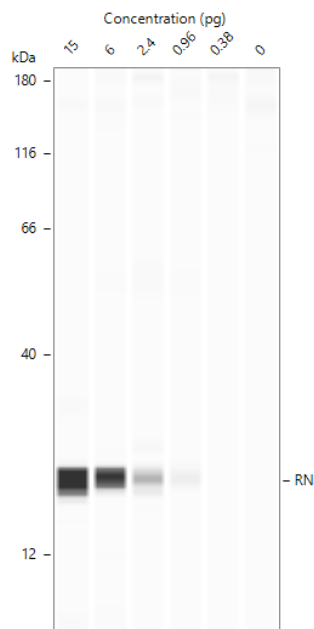


66-440 kDa

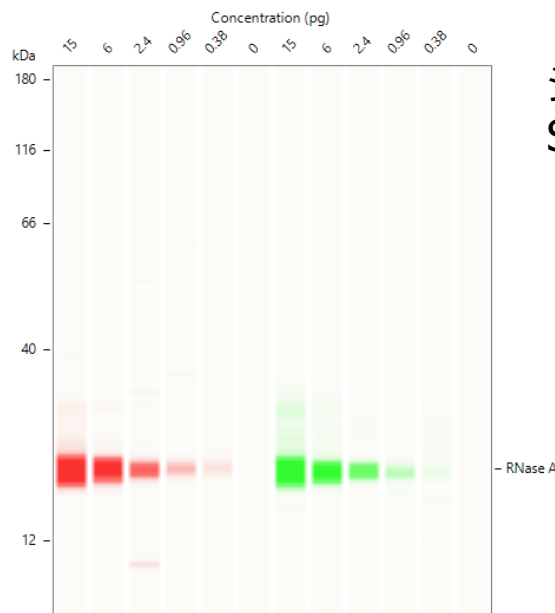
高感度蛍光検出 Detection module Stellar (ステラ)



発光



Stellar
NIR (赤) & IR (緑)



Jessのみ

シンプルウエスタンの化学発光に匹敵する
Stellar の NIR と IR の検出感度

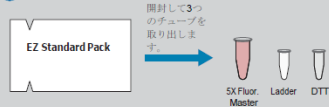


| | Jess with Chemiluminescence | Jess with Stellar NIR | Jess with Stellar IR | Competing Fluorescence Western Blotting Technology |
|----------------|-----------------------------|-----------------------|----------------------|--|
| LOD of RNase A | 1.1 pg | 0.4 pg | 0.7 pg | > 50 pg |

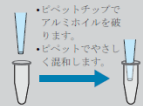
測定手順

1. 試薬の準備

A STANDARD PACKに含まれている試薬の準備

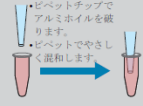


DTT (透明なチューブ)



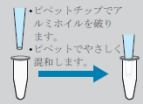
- 40 μ Lの脱イオン水を入れ、400 mM溶液を作成します。

Fluorescent 5 × Master Mix (ピンクのチューブ)



- 20 μ Lの10 × Sample Bufferを加えます。
- 20 μ Lの調整済みの400 mM DTT溶液を加えます。

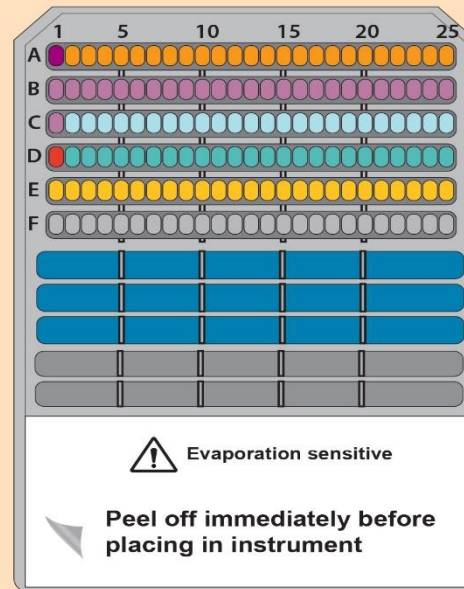
Biotinylated Ladder (ピンクのペレットの入った透明なチューブ)



- 20 μ Lの脱イオン水を加えます(変性済)。

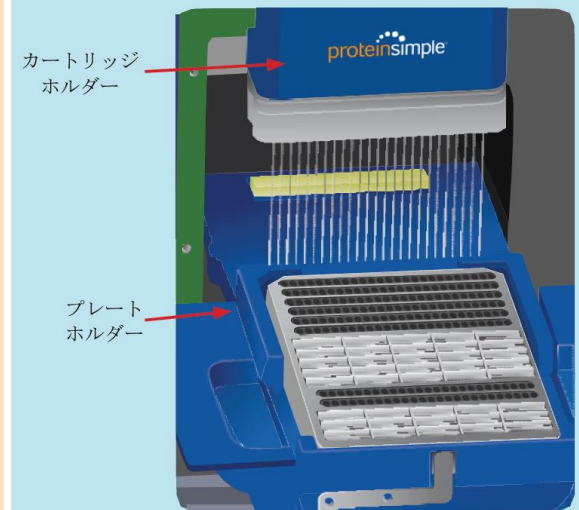
試薬、サンプル、抗体などの調製

2. プレートの準備



専用プレートへの分注

3. Jess、Abby、Wesの開始



電気泳動～解析まで
全自動測定

プレートの準備

● Biotinylated Ladder, 5 μL ; ● 調整済みのサンプル, 3 μL
● Antibody Diluent (2またはMilk-Free), 10 μL
● Antibody Diluent (2またはMilk-Free), 10 μL ; ● 1次抗体, 10 μL
● Streptavidin-HRPまたはNIR, 10 μL ; ● Secondary Conjugate, 10 μL
● Luminol-Peroxide ミックス, 15 μL (蛍光検出のみ)

■ Wash Buffer
 1区画につき 500 μL

Luminol + H₂O₂ → 光
 HRP
 Biotin Streptavidin
 分子量マーカー

Jess/Wes detection module insertより

Evaporation sensitive
 Peel off immediately before placing in instrument

A~Fまで試薬を分注後、プレートを 2,500 rpm (~1,000xg) で室温 5分間 遠心。
Wash Buffer 500 ul を上の図の青い Well に分注。

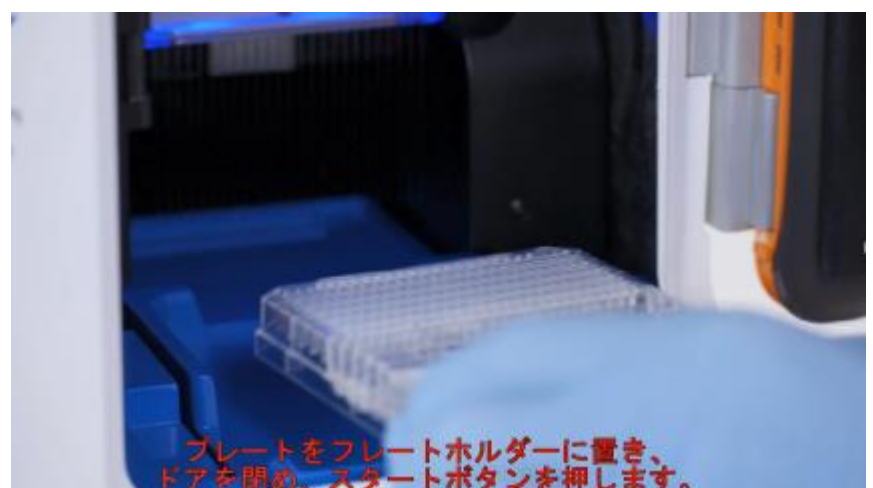
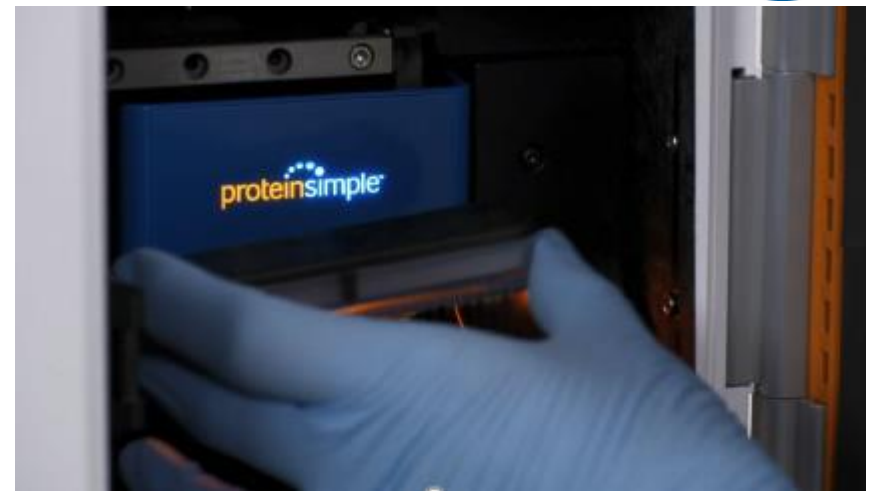
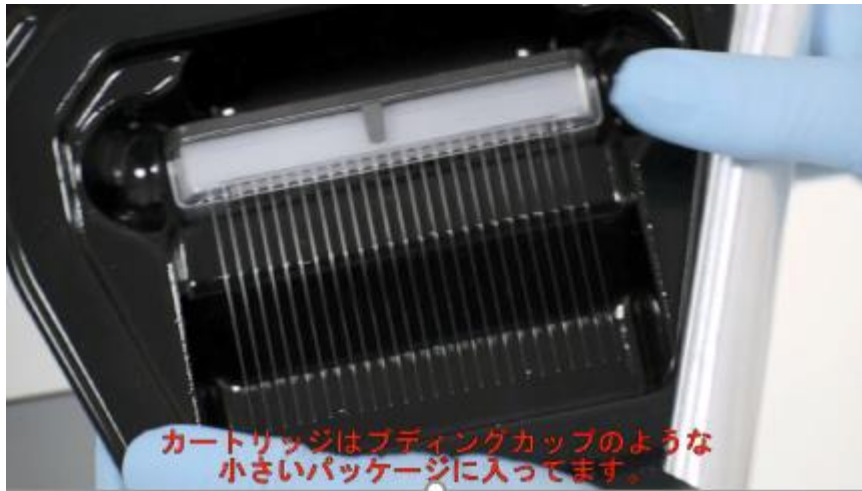
プレート準備 (連続ピペッターの使用をお勧め)



製品リンク

[Eppendorf Xplorer®/Eppendorf Xplorer® plus - マイクロピペット & ディスペンサー, 手動リキッドハンドリング - Eppendorf Japan](#)

カートリッジとプレートのセットアップ



注：手袋を使用ください

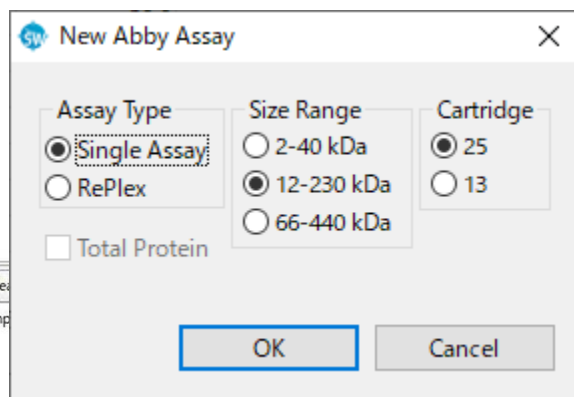
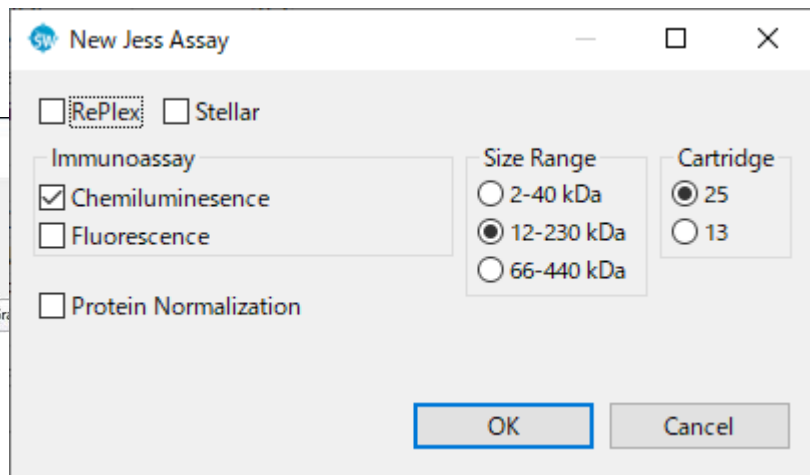
簡単セットアップ

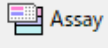

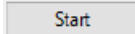
①



をダブルクリックします。

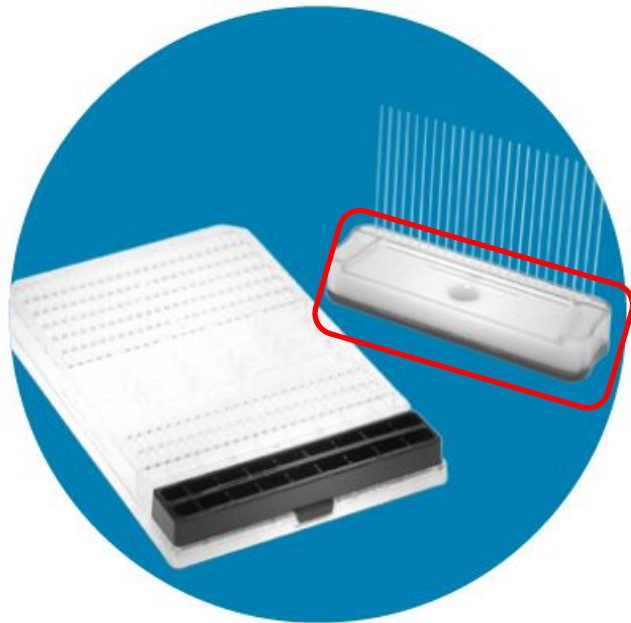
②



-  Assay をクリックします。
- File -> New Assay
- 適切なAssay type、size(分子量)範囲、キャピラリー数を選んで OKをクリック
-  をクリックします。
-  をクリックします。

メンテナンスについて

- ディスポーザブルのプレートとキャピラリーを使用
(機械内に溶液が入らない設計)
- すべての廃液はキャピラリーカートリッジに吸収



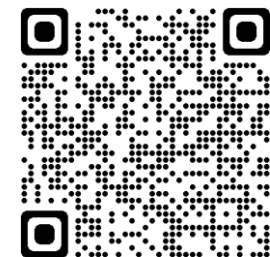
プレートとキャピラリーを
捨てるだけです!

データ解析 (ソフト : Compass for SW)



・ソフト入手先

[Instrument Software Download Center | Bio-Techne](#)



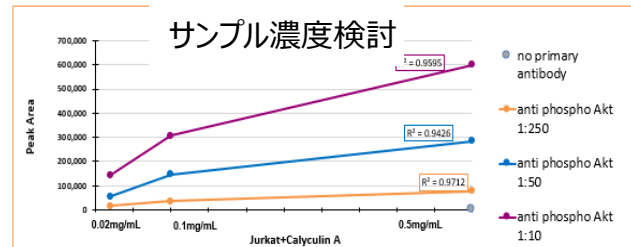
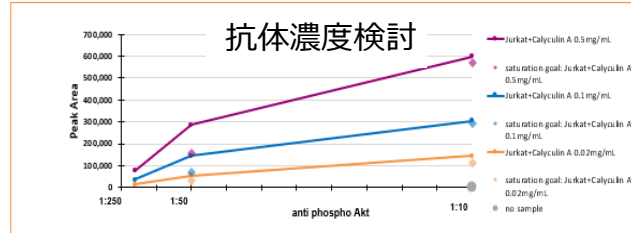
サンプルや試薬の調整 サンプル、抗体の条件検討

サンプル調製

A: 試薬の調製 (Standard Pack)

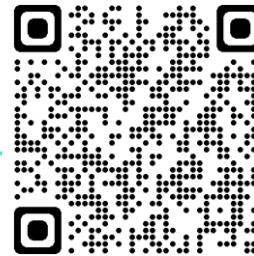
* 透明、ピンクのチューブとピンクベレット入りの透明なチューブはアルミフィルムでシールされています。
ナップ等で穴を開けてご使用下さい。
ビベッティングでゆっくゆっく操作

- ① DTT (透明チューブ) の調製**
 - 40 μ l の脱イオン水を添加 (400mM DTT溶液作成)
- ② 5X Fluorescent Master Mix (ピンクのチューブ) の調製**
 - 20 μ l の400mM DTT溶液 (①の溶液)を添加
 - 20 μ l の10X Sample Buffer 2を添加
- ③ Biotin Ladder (透明な青いチューブ)**
 - 20 μ l の脱イオン水を添加
 - ビベッティング
 - 氷中に保存

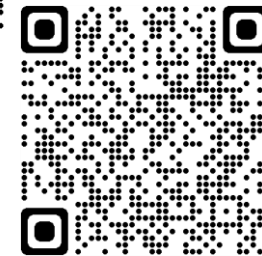
1. 測定編 (基本編)

<https://youtu.be/aFgkXrvO6EU>



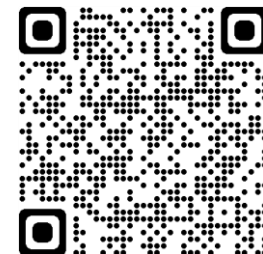
2. 解析編 (基本編)

<https://youtu.be/dtQMNHfyn7g>



3. 検量線の書き方

<https://youtu.be/uTzdYDM1mWI>



説明動画

2. トラブルシュート

抗体情報の収集

protein simple[®]

a biotechne brand

* 抗体データベース

Simple Western Antibody Database | Bio-Techne

Simple Western Validated Antibodies

Filter Antibodies: (3864)

| Protein Target | Antibody Type | Vendor / Cat # | Protein Isoform | Citations & Supporting Data | Host Species | Sample | Separation | Dilution | kDa on Simple Western |
|----------------|---------------|----------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------|--|------------|----------|-----------------------|
| α-Nucleocapsid | Primary | Novus Biologicals NB100-56683 | SARS Nucleocapsid Protein | Datasheet | Rabbit Polyclonal | Recombinant SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein (Novus Biologicals PN 10474-CV); Lysates of SARS-CoV-2 | Size | 25 mg/mL | 60 kDa |
| 14-3-3 γ | Primary | Novus Biologicals NB100-406 | 14-3-3 gamma (γ) | Datasheet | Mouse Monoclonal | HeLa lysate 1.0 mg/ml | Size | 1:12.5 | 36 kDa |



* 論文データベース

Instrument Citation Search Tool | Bio-Techne

Instrument Citation Search

At Bio-Techne, we're changing the way scientists analyze proteins. Our innovative product portfolio helps researchers reveal new insight into proteins, advancing their understanding of protein function. As a result, our products are rapidly increasing in the scientific literature across many applications. Use this citation database to find scientific articles that feature our instruments.

Showing 1 - 25 of 1407 citations

Filter by:

Instrument Platform Research Areas Year Clear filters X

Search Title:

Instrument Platform:

Simple Plex

Research Category:

Cell Therapy

Bourbon E et al. (2022) HLA-DR expression on monocytes and outcome of anti-CD19 CAR-T cell therapy for large B-cell lymphoma Blood Adv.

PMID: 35439292

Instrument Platform:

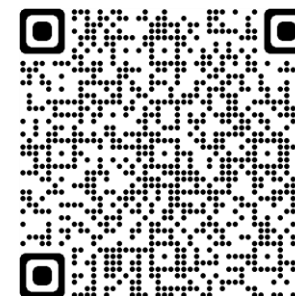
Simple Plex

Research Category:

COVID-19

Fabris M et al. (2022) High T-cell response rate after COVID-19 vaccination in belimumab and rituximab recipients J Autoimmun.

PMID: 35427999

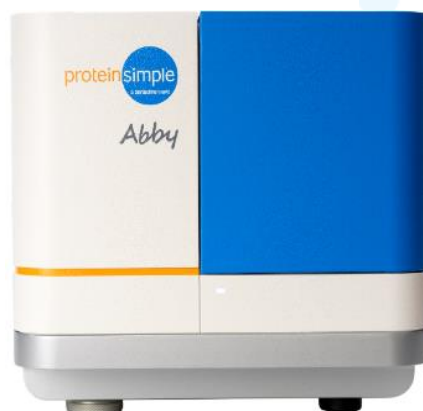


3. RePlex (リプレックス) および 総タンパク質ノーマライゼーション

RePlex ストリッピングとリプロービング

1本のキャピラリーで2ラウンドの免疫プロ
ローブと検出（2連続シングルプレックス
アッセイ）

Simple Westernテクノロジーの中核で独
自の技術であるタンパク質のキャピラ
リーの内壁への共有結合を活用します



マトリクスとサンプルのロード



蛋白質の分離と固定



抗体1のイムノプローブ



検出と標的1の定量



RePlex (1回目のイムノプローブ由来の抗体除去)



抗体2のイムノプローブ(もしくは総タンパク質アッセイ)



検出と標的2の定量



結果まで約5.5時間

選択画面、プレートレイアウト

The screenshot shows the 'New Jess Assay' configuration window. On the left, the 'RePlex' assay is selected, and 'Chemiluminescence' is chosen for both Probe 1 and Probe 2. The '2 IMMUNOASSAYS' plate layout is shown on the right, with wells A-K and 1-25. A legend on the right lists the reagents for each well, with red boxes highlighting the reagents for E and F rows, and the reagents for J and K rows.

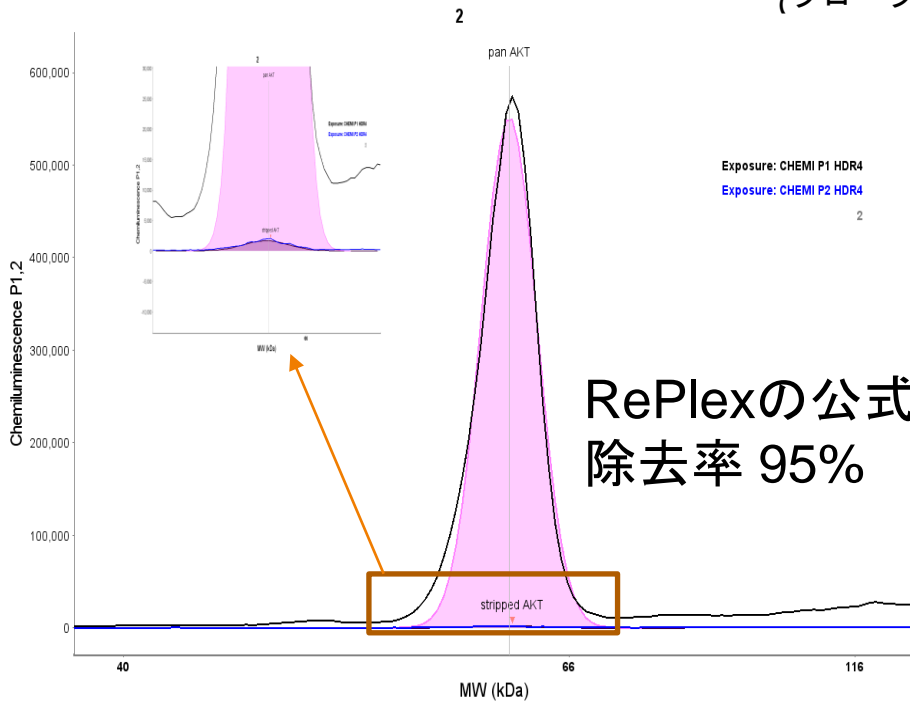
Legend:

- Biotinylated Ladder, 5 μL ; ● Prepared Samples, 3 μL
- Antibody Diluent (2 or Milk-Free), 10 μL
- Antibody Diluent (2 or Milk-Free), 10 μL ; ● Primary Antibody for Probe 1, 10 μL
- Streptavidin-HRP or NIR, 10 μL ; ● Secondary Antibody for Probe 1, 10 μL
- Antibody Diluent (2 or Milk-Free), 10 μL ; ● Primary Antibody for Probe 2, 10 μL
- Antibody Diluent (2 or Milk-Free), 10 μL ; ● Secondary Antibody for Probe 2, 10 μL
- Wash Buffer 500 μL /compartment
- Luminol-Peroxide Mix, 170 μL /compartment (for chemiluminescence only)
- RePlex[®] reagent mix, 300 μL /compartment

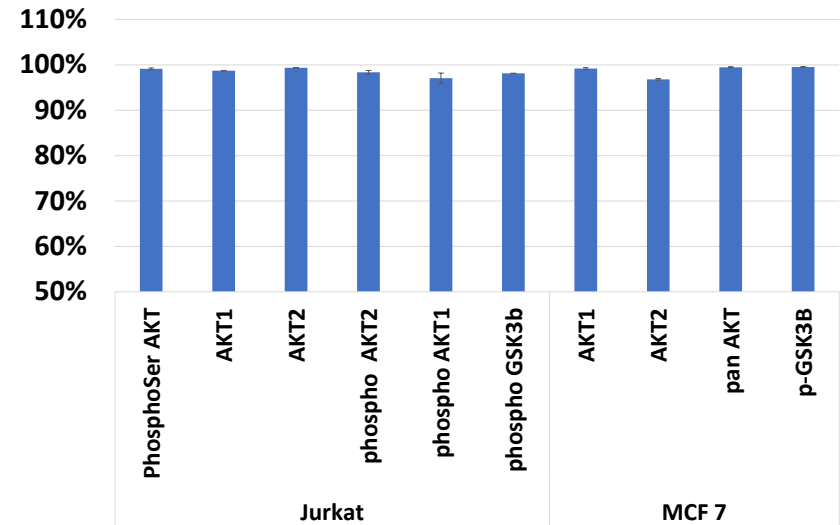
- E段とF段に2回目の一次抗体、二次抗体 各 10 μl を分注
- J段に発光試薬 170 μl を分注
(Luminol 450 μl と Peroxide 450 μl 混合)
- K段に RePlex試薬 300 μl を分注
(RePlex Reagent 1 1,400 μl と RePlex[™] Reagent 2 350 μl 混合)

RePlex ターゲットタンパク質の除去

$$\frac{(\text{プローブ1のピーク面積} - \text{プローブ2のピーク面積})}{(\text{プローブ1のピーク面積})} \times 100 = \text{抗体除去率 (\%)}$$



Probe1の除去率



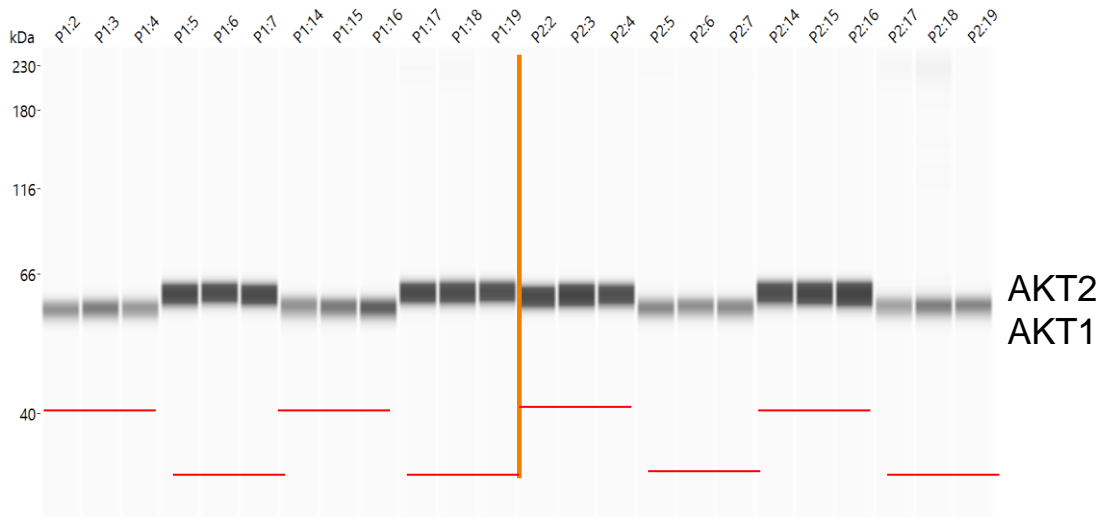
Jurkat細胞ライセートのAKTをマウスpan-AKT (CS# 58295) で検出。抗体除去後、2回目のプロービングで残留抗体を検出。

RePlex

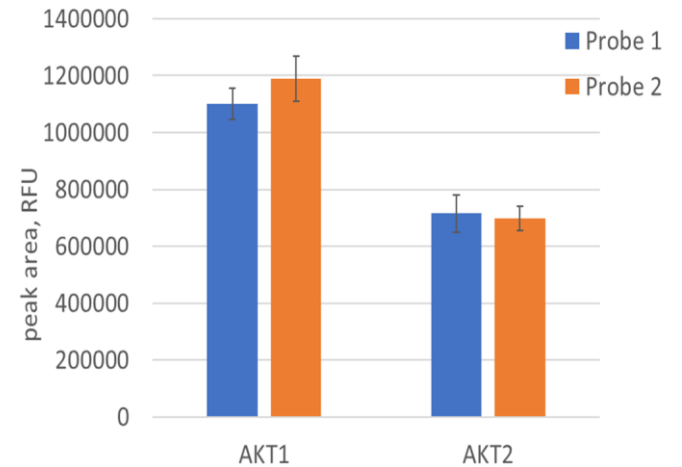
標的タンパク質の保持

プローブ1

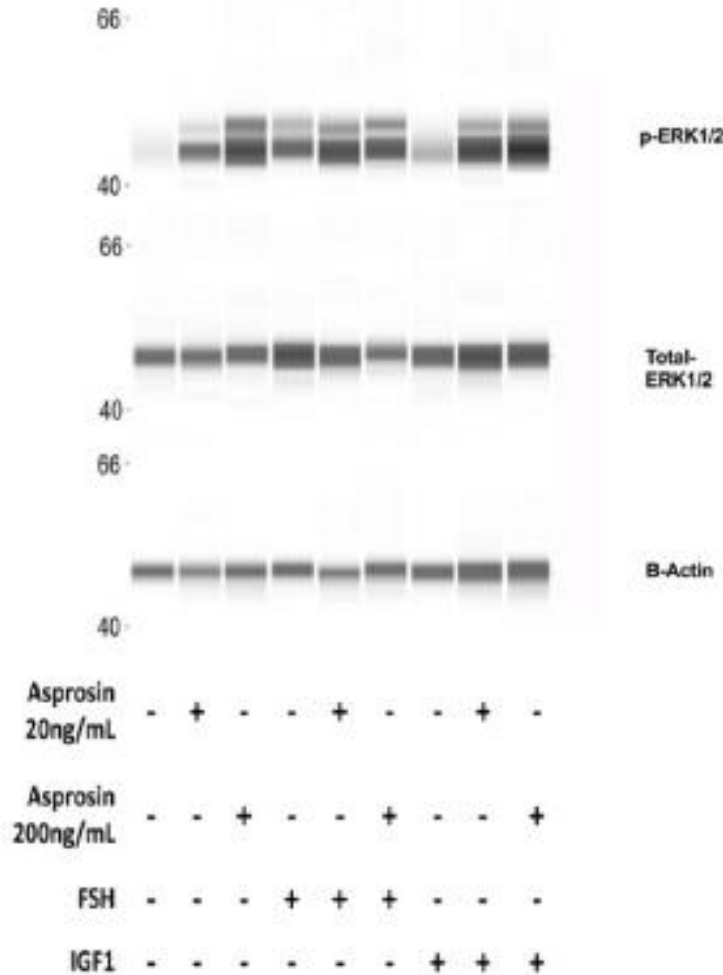
プローブ2



リプローブ前後のAKT1とAKT2のピーク面積



ハウスキーピングでのノーマライゼーション



2.8. Simple Western analysis

For analysis of PKA, total-ERK1/2, and ratio of p-ERK1/2/Total ERK1/2 protein abundance, simple Western analyses were performed using the RePlex method for Jess capillary Western blot system (Protein Simple, San Jose, Ca) following the manufacturer's protocol. The total-ERK1/ERK2 and p-ERK1/ERK2 relative abundance measurement were performed in the same plate, but in separated wells using 0.108 µg per reaction. PKA relative abundance analyses were performed using 0.216 µg per reaction. Briefly, samples were mixed with a master mix (Protein Simple, San Jose, Ca), heated at 95 °C for 5 min, and 3 µL of each sample were loaded. Each capillary from the 12–230 kDa cartridge (Protein Simple, cat#SM-W004) aspirated the separation matrix followed by the stacking matrix and the protein lysates. Capillaries were lowered to be in contact to running buffer and voltage was applied for appropriate protein separation by molecular weight. Following, UV light immobilized the protein to the capillary wall and target proteins were immunoprobed with primary antibodies (ERK1/2, Novus Biological cat # NBP2-12728; p-ERK1/ERK2, R&D Systems cat#AF1018; or PKAc-α, Cell Signaling, cat# 4782S) diluted in antibody diluent 2 buffer (Protein Simple, cat#042-203) followed by HRlabeled secondary antibody for improved chemiluminescent detection. For each analysis, the target protein antibody from the first immunoassay was removed using the RePlex reagent (Protein Simple, cat#RP-001) and a second immunoassay was performed in the same capillary using the anti-BActin antibody (R&D Systems, cat#MAB3929) and used for standardization. Data were generated using Compass for SW 6.0 for Windows (Protein Simple, San Jose, Ca). For data analysis, the area of spectra that matched the target protein was used.

論文:

[Effects of asprosin on estradiol and progesterone secretion and proliferation of bovine granulosa cells - ScienceDirect](#)

RePlex 総タンパク質ノーマライゼーション

Separation module と Detection module に加え

- Total Protein Detection Module (DM-TP01)
- RePlex Module (RP-001)

* サンプル濃度 : 0.005~0.2 µg/µl

Separation Module



Detection Module



+

Total Protein
(DM-TP01)



RePlex (RP-001)



* RePlexは、Stellar非対応

RePlex

総タンパク質ノーマライゼーション

Jessの画面

New Jess Assay

RePlex Stellar

Immunoassay

Chemiluminescence Fluorescence

Probe 1 Probe 2

Total Protein

Well Plate Legend:

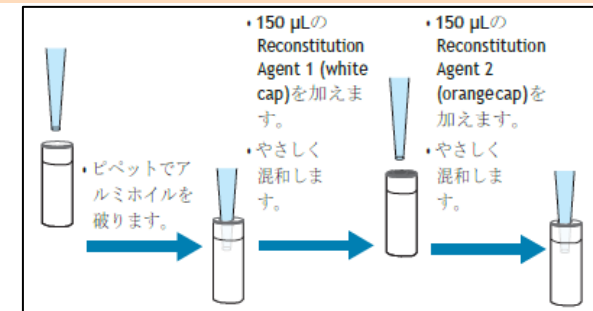
- A: Biotinylated Ladder, 5 μ L; Prepared Samples, 3 μ L
- B: Antibody Diluent (2 or Milk-Free), 10 μ L; Total Protein labeling reagent, 10 μ L
- C: Antibody Diluent (2 or Milk-Free), 10 μ L
- D: Antibody Diluent (2 or Milk-Free), 10 μ L; Primary Antibody for Probe 1, 10 μ L
- E: Streptavidin-HRP or NIR, 10 μ L; Secondary Antibody for Probe 1, 10 μ L
- F: Total Protein Streptavidin-HRP for Probe 2, 8 μ L
- G: Wash Buffer
- H: Wash Buffer
- I: Wash Buffer
- J: Luminol-Peroxide Mix, 170 μ L/compartiment
- K: RePlex™ reagent mix, 300 μ L/compartiment

• B段に 総タンパク質ラベリング試薬 10 μ l を分注 (右図参照)

• F段に 総タンパク質検出 Streptavidin HRP 10 μ l を分注

• J段に 発光試薬 170 μ l を分注
(Luminol 450 μ l と Peroxide 450 μ l 混合)

• K段に RePlex試薬 300 μ l を分注
(RePlex Reagent 1 1,400 μ l と RePlex™ Reagent 2 350 μ l 混合)

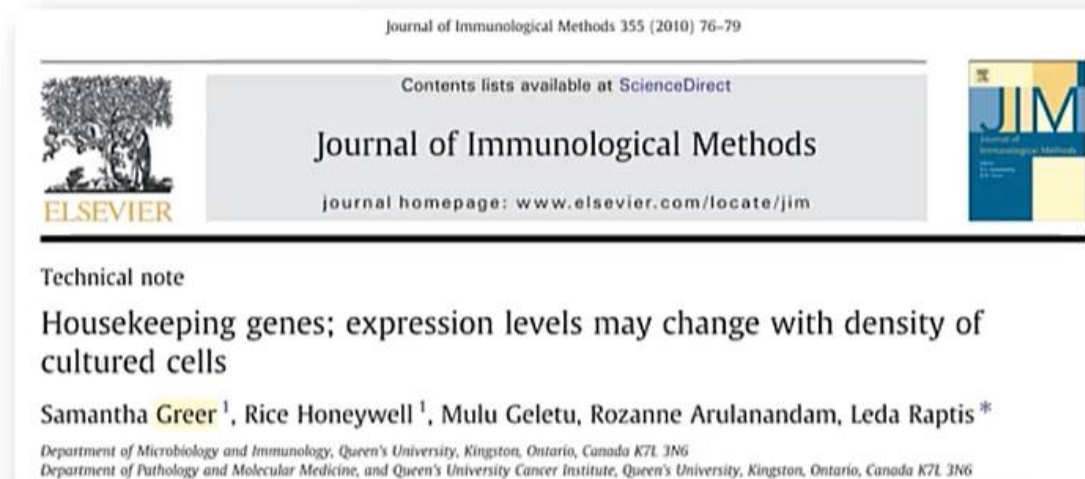


RePlex

総タンパク質ノーマライゼーション

Case 3 : Housekeeping proteins *versus* Total Protein

HSP90やBeta-actinは、細胞の密度の影響を受けにくかった



«Cell confluence significantly affects the levels of α -tubulin and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH)

Levels of **heat-shock protein-90** (α and β) and **β -actin** remained unchanged at a wide range of cell densities»

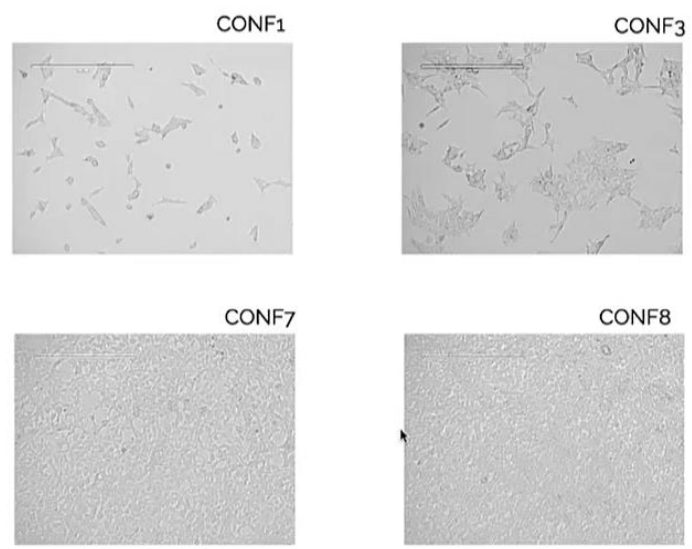
論文

[Housekeeping genes; expression levels may change with density of cultured cells - ScienceDirect](#)

RePlex

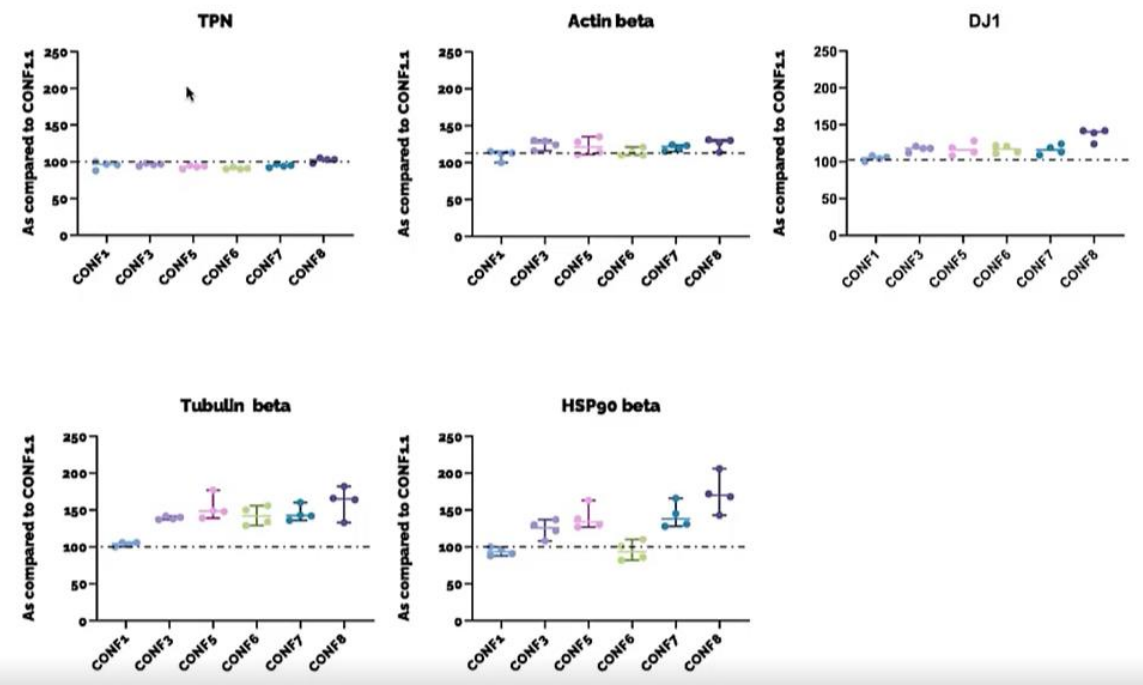
総タンパク質ノーマライゼーション

Séverine Lorrain博士のRePlexを用いた測定事例
 総タンパク質のノーマライゼーションが、最も細胞密度の影響を受けにくかった



Case 3

«Housekeeping» protein signal depends on cell density



RePlex Webinar:

[The Benefits of Sequential, Multiplexed Westerns using RePlex on Simple Western: 3 case studies from University of Lausanne | ProteinSimple](#)

総タンパク質ノーマライゼーション

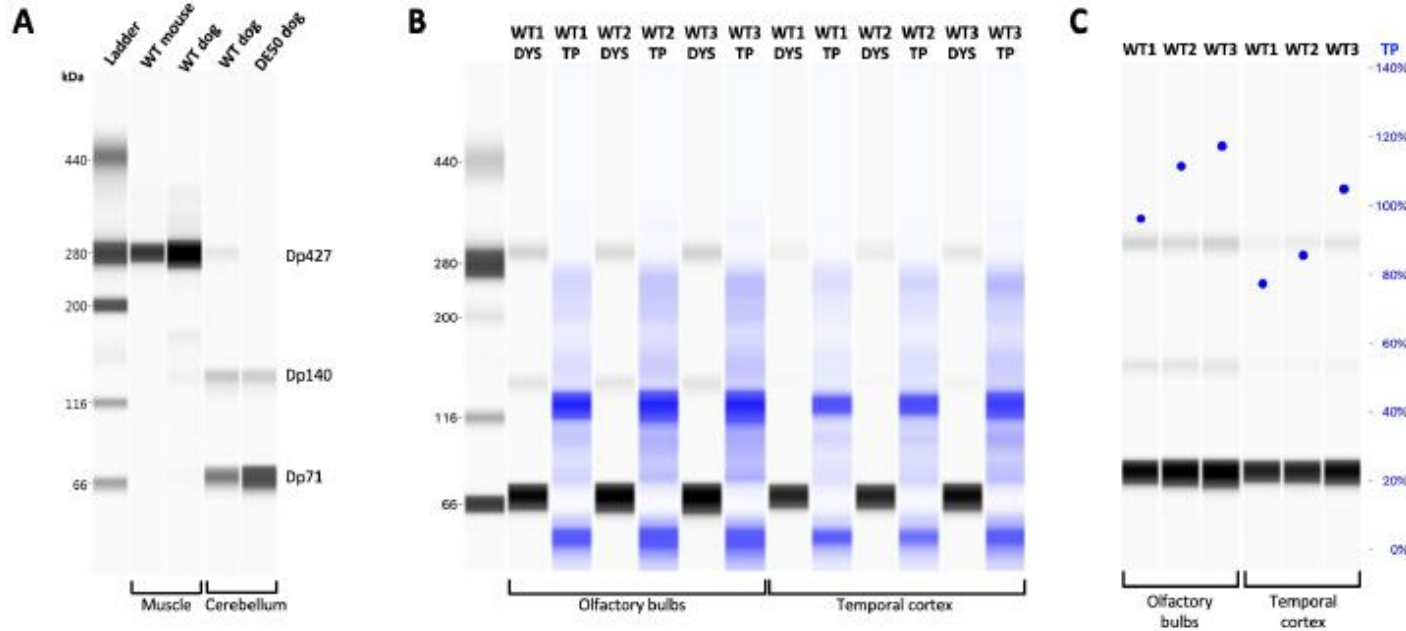


Fig. S1. Western blotting for dystrophin using capillary immunoelectrophoresis with total protein assay. A) WT mouse (cranialis tibialis) and dog (vastus lateralis) skeletal muscle express only full-length dystrophin, confirming that the band detected at ~280kDa is Dp427, as has been previously reported and likely a consequence of the molecular weight ladder used, which underestimates molecular weights above 280 kDa (Beekman et al., 2018).

B) Total protein loading (TP) per lane is shown adjacent to dystrophin labelling of each sample. C) Dystrophin protein expression was evaluated via capillary immunoelectrophoresis (ProteinSimple Jess), using a C-terminal antibody (AbCam154168, 1:250) and anti-mouse HRP (ProteinSimple). Lysates were loaded at $0.1\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, and all dystrophin signal intensities were normalized to total protein load (determined via Total Protein RePlex assay as per the manufacturer's instructions). Relative abundance was calculated for the full data set by using the maximum value across all isoforms.

総タンパク質ノーマライゼーション **protein simple** Protein Normalization Module (DM-PN02)使用

a biotechne brand

サンプルの総タンパク質濃度 **0.2~1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$**

AM-PN01 (2022年1月で販売終了) と
Detection Module との組み合わせに該当

Jessのみ

- New** • 蛍光 Separation Module (SM-FL001~006)
&
- New** • Protein Normalization Module (DM-PN02)
&
- Detection module
 - * 発光検出 : DM-001~006
 - * 蛍光検出 : DM-007~010



注意 : Stellar Detection Moduleとの併用不可

総タンパク質ノーマライゼーション Protein Normalization Module (DM-PN02)使用



New Jess Assay

RePlex Stellar

Immunoassay

Chemiluminescence

Fluorescence

Protein Normalization

Size

2

1

6

OK

● Biotinylated Ladder, 5 μ L ● 希釈済みサンプル, 3 μ L

● Milk-Free Antibody Diluent, 10 μ L ● Protein Normalization Reagent, 10 μ L

● Milk-Free Antibody Diluent, 10 μ L

● Milk-Free Antibody Diluent, 10 μ L ● 1次抗体, 10 μ L

● Streptavidin-HRPまたは-NIR, 10 μ L ● 2次抗体, 10 μ L

● Luminol-Peroxide混合液, 15 μ L (該当するときのみ)

● Wash Buffer

1区画につき500 μ L

F: 総タンパク質ノーマライゼーション試薬の調製

① 保存溶液の調整

- ピペットチップでアルミホイルを破ります。
- 1つのチューブにつき100 μ LのProtein Normalization Reconstitution Agentを加えます。
- 15回ピペッティングして混合します。

② 希釈保存液の調整

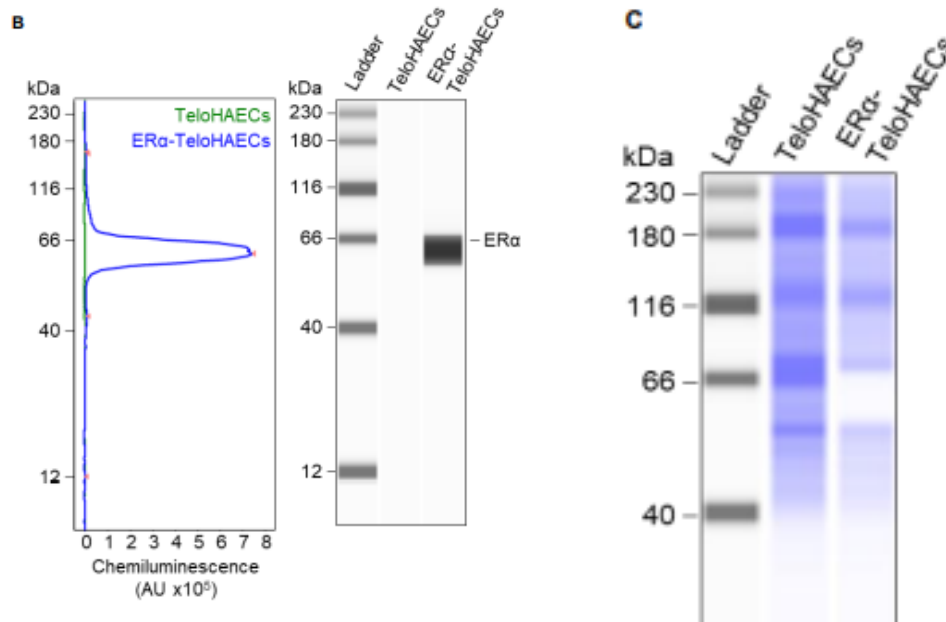
下表に従って、Protein Normalization Reagent保存溶液をReconstitution Agentでさらに希釈し、希釈標準溶液を準備します。

Protein Normalization Reagent - 使用するまで室温で保存

| LYSATE CONCENTRATION | 2-40 kDa | | 12-230 kDa | | 66-440 kDa | |
|----------------------|----------------|----------------------|----------------|----------------------|----------------|----------------------|
| | Stock Solution | Reconstitution Agent | Stock Solution | Reconstitution Agent | Stock Solution | Reconstitution Agent |
| 0.2-1.2 mg/mL | 50 μ L | 250 μ L | 50 μ L | 250 μ L | 100 μ L | 200 μ L |

総タンパク質ノーマライゼーション **protein simple** Protein Normalization Module (DM-PN02)使用

a biotechnie brand



Supplemental Figure 4: Validation of Proximity Ligation Assay (PLA) technique in endothelial cells with stable ER α expression. (A) Representative ER α (green) and DAPI (blue) staining on control endothelial cells (TeloHAECs) or endothelial cells expressing ER α (ER α -TeloHAECs); Obj: X40. (B) Representative ER α protein expression and (C) total proteins analysed by Simple Western in TeloHAECs or ER α -TeloHAECs. (D) Representative images of PLA performed with ER α and SRC antibodies or with single antibodies in ER α -TeloHAECs incubated with E2 for 5min. (E) Representative image of PLA performed with ER α and SRC antibodies in TeloHAECs incubated with E2 for 5min. The detected dimers are represented by red dots. Nuclei were counterstained with DAPI (blue) (Scale bar: 20 μ m). (F) Quantification of the number of dots per cell. The experiments were reproduced 2 times.

論文

[NRXN1 depletion in the medial prefrontal cortex induces anxiety-like behaviors and abnormal social phenotypes along with impaired neurite outgrowth in rat | Journal of Neurodevelopmental Disorders | Full Text \(biomedcentral.com\)](#)

総タンパク質ノーマライゼーション 高感度蛍光検出モジュール Stellar 使用



サンプルの総タンパク質濃度 **0.005~0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$**

Jessのみ

New 蛍光 Separation Module (SM-FL001~006)



&

New Stellar Detection Module (DM-013~016)

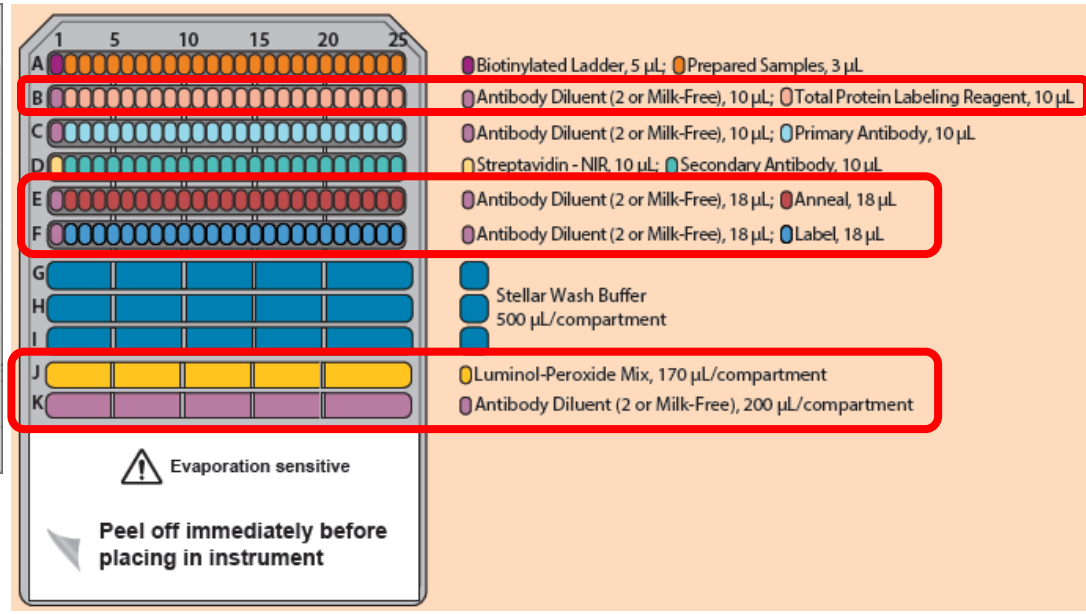
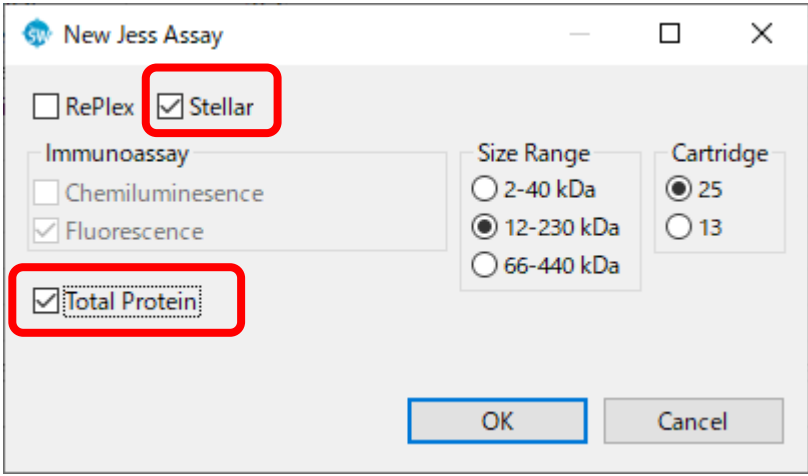


&

New Stellar Total Protein Detection Module (DM-TP03)



総タンパク質ノーマライゼーション **protein simple** 高感度蛍光検出モジュール Stellar 使用



• Stellar 試薬 (オリゴ)、二次抗体、総タンパク質検出試薬を調整

| REAGENTS | NO MULTIPLEX (ONE COLOR) | MULTIPLEX (TWO COLORS) |
|---|--------------------------|---------------------------|
| Stellar Total Protein Streptavidin-HRP | 288 µL | 276 µL |
| Secondary Antibody | 6 µL (Rabbit or Mouse) | 6 µL Rabbit 6 µL Mouse |
| Oligo | 6 µL (Rabbit or Mouse) | 6 µL Rabbit 6 µL Mouse |
| Total Volume | 300 µL | 300 µL |

- Vortex mixture for 30 seconds to mix thoroughly.
- Combine 450 µL Luminol-S and 450 µL Peroxide in a microcentrifuge tube.



• The Biotin Labeling Reagent should only be prepared immediately before loading the plate.

ハウスキーピングでの ノーマライゼーション

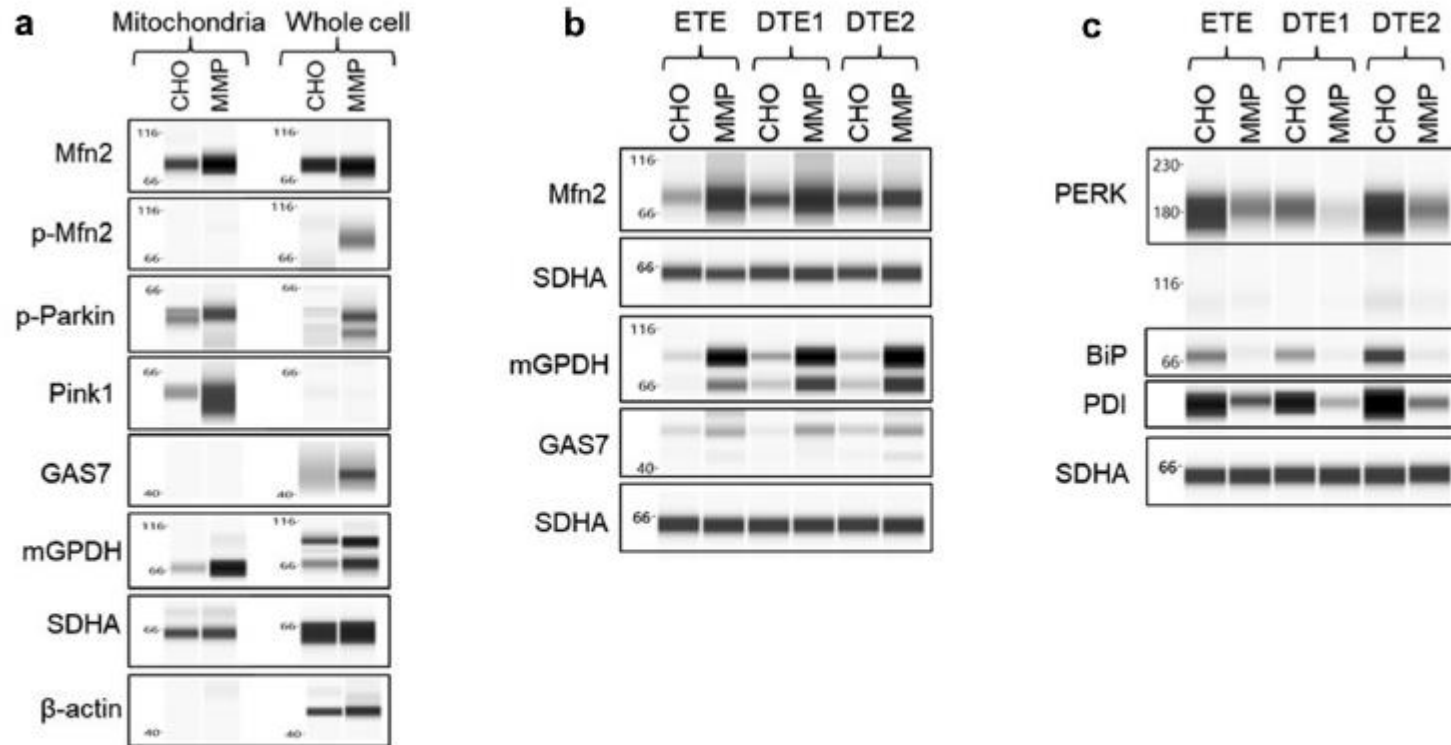


Figure 10. Western blot analysis of mitochondria and ER-associated proteins. (a) Whole cell lysates and mitochondrial lysates of parental CHO and MMP-enriched host cells were analyzed for proteins involved in mitochondrial function and high MMP phenotype. (b and c) Whole cell lysates of stable pools generated from parental CHO and MMP-enriched hosts were analyzed for mitochondrial and ER-stress proteins. Beta-actin and succinate dehydrogenase subunit A were used as loading controls. Western blot analysis of the lysates of host cells and pools demonstrating upregulation of proteins associated with mitochondrial functions and downregulation of ER-stress related proteins in MMP-enriched host cells and pools.

論文

[Mitochondrial membrane potential-enriched CHO host: a novel and powerful tool for improving biomanufacturing capability \(nih.gov\)](https://doi.org/10.1038/nbt.3488)

ハウスキーピングでの ノーマライゼーション (マルチプレックス)

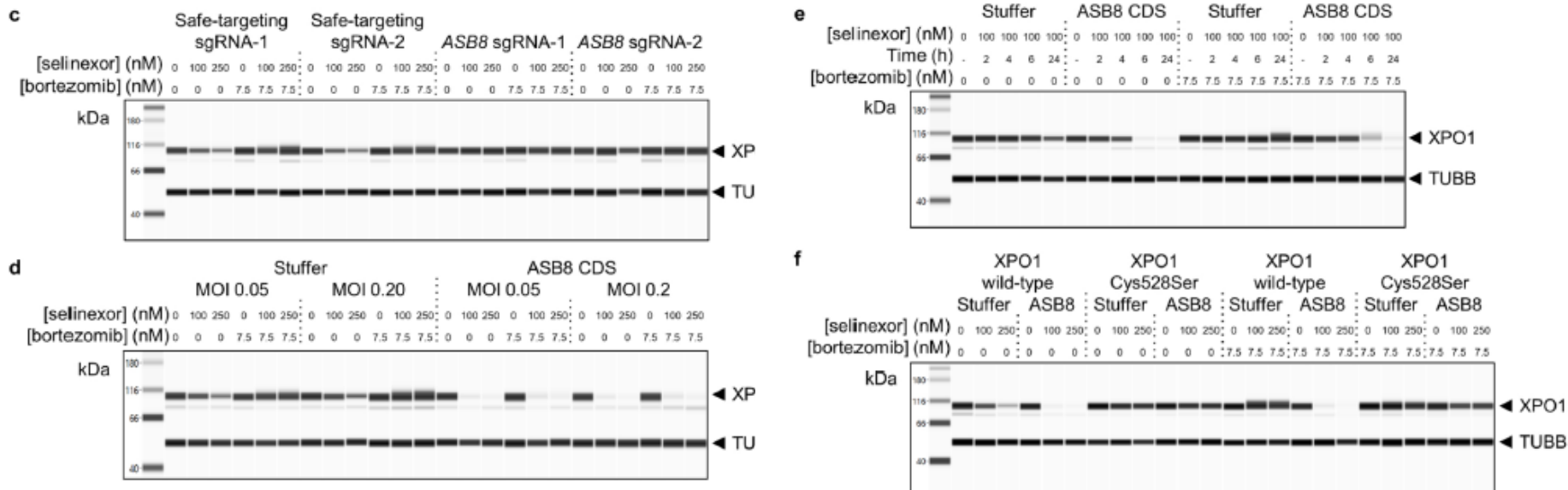


Fig. 5. XPO1 protein degradation is regulated by ASB8. a-b Sensitization profile of HAP1 cells with either knockout or overexpression of ASB8 under selection with selinexor. Cell viability when transduced with a safe-targeting or ASB8 targeting sgRNA (a). Cell viability when trans-

論文

マルチプレックス (3ターゲット以上の同時検出)

Calnexin, Annexin V, CD9

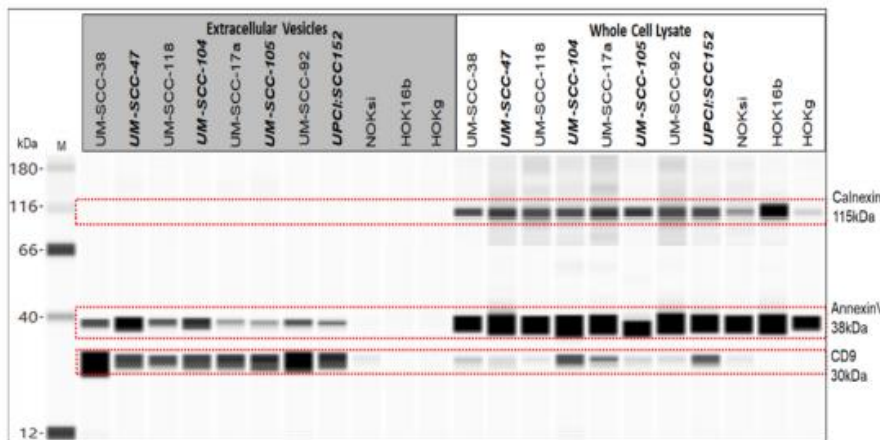


Figure 3. Wes protein analysis. Calnexin 1:50, 1 µg/µL protein; annexinV 1:200, 0.25 µg/µL protein; CD9 1:2 protein. Bold italics: HPV-positive.

RB, p53, Cyclin D1, p16, HPV16E7

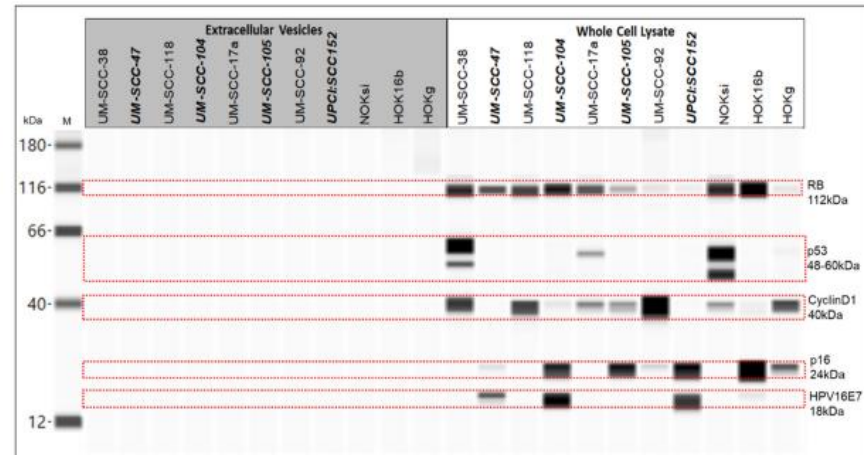


Figure 8. Wes protein gel for extracellular vesicles and whole cell lysates from HNSCC, normal keratinocyte, and transformed cell lines. RB detected at 112 kDa, 1:100 antibody dilution, 0.5 mg/mL protein; p53 detected at 60 kDa, 52 kDa, and 48 kDa, 1:50 antibody dilution, 0.25 µg/µL protein; CyclinD1 detected at 40 kDa, 1:200 antibody dilution, 0.25 µg/µL protein; p16 detected at 24 kDa, no antibody dilution, 0.25 µg/µL protein; and HPV16E7 detected at 18 kDa, 1:100 antibody dilution, 1 µg/µL protein. Bold italics: HPV-positive.

論文

[Cancers | Free Full-Text | Differences in Extracellular Vesicle Protein Cargo Are Dependent on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell of Origin and Human Papillomavirus Status \(mdpi.com\)](https://www.mdpi.com/1918-4746/11/1/1)

4/17 アンケートご協力お願い

ご回答頂きました方へ、条件検討を簡便に行えるExcelテンプレートと使用方法、などの資料をご提供いたします。

1. 今回のセミナーへの評価をお願い致します。 *



2. 今回のセミナーで、良かった点を教えてください。 *

- 研究効率の向上
- 測定の流れについて理解できた
- RePlex (2回測定)
- 総タンパク質ノーマライゼーション
- その他

3. 今後のセミナー、弊社へのご要望やご意見をお願いいたします。

↓ アンケートURL (もしくは右バーコードより)

<https://forms.office.com/r/Zb2W4Rbkrb>



シンプルウェスタン トレーニング Webinar :

～ サンプル調製からデータ解析まで ～

4月19日（水） 12:15～13:00

サンプルや試薬の調整
サンプル、抗体の条件検討

proteinSimple
a biotechne brand

サンプル調製

A: 試薬の調製 (Standard Pack)

抗体温度検討

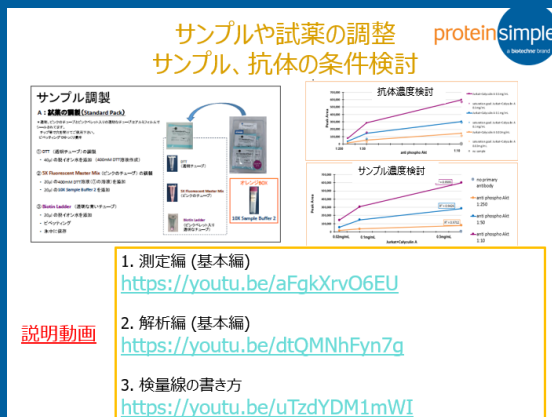
サンプル温度検討

1. 測定編 (基本編)
<https://youtu.be/aFqkXrvO6EU>

2. 解析編 (基本編)
<https://youtu.be/dtQMhFyn7q>

3. 検量線の書き方
<https://youtu.be/uTzdYDM1mWI>

説明動画



proteinSimple®

a biotechne® brand

< 申込みサイト >

<https://forms.office.com/r/z5fE0erM07>



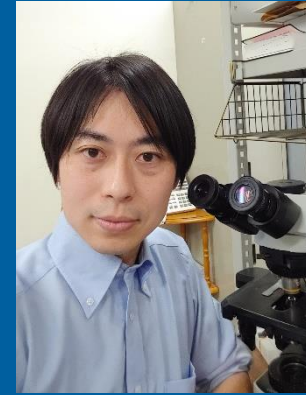
お問い合わせ

info.japan@proteinsimple.com

オンラインセミナー：5/19（金）12:15～13:00

<演題>

卵巣がん組織におけるSMARCA4/A2蛋白質
の発現多様性の検討～卵巣がんのプラチナ
抵抗性に関与する特殊な細胞群を同定～



大阪大学大学院医学系研究科 病態病理学講座
城戸 完介 先生

<申込みサイト>

<https://forms.office.com/r/zvZZwAFuSW>



お問い合わせ

info.japan@proteinsimple.com

protein**simple**[®]

a **biotechne**[®] brand

お問い合わせ

info.japan@proteinsimple.com