

抗体検出ガイド

目次

抗体検出用試薬

ウェスタンブロットに使用する検出用試薬	2
抗体の標識がペルオキシダーゼ(HRP)の場合	2
抗体の標識がアルカリホスファターゼ(ALP)の場合	2
免疫染色に使用する検出用試薬	4
抗体の標識がペルオキシダーゼ(HRP)の場合	4
抗体の標識がアルカリホスファターゼ(ALP)の場合	4
ELISAに使用する検出用試薬	5
抗体の標識がペルオキシダーゼ(HRP)の場合	5
抗体の標識がアルカリホスファターゼ(ALP)の場合	5

抗体検出用おすすめセット

ウェスタンブロットの検出セット	6
ウサギ用 (一次抗体がウサギで作られている場合)	6
マウス用 (一次抗体がマウスで作られている場合)	6
ニワトリ用・IgY抗体用 (一次抗体がニワトリで作られている場合)	7
免疫染色の検出基本セット	8
ウサギ用 (一次抗体がウサギで作られている場合)	8
マウス用 (一次抗体がマウスで作られている場合)	8
ニワトリ用・IgY抗体用 (一次抗体がニワトリで作られている場合)	9

実験の参考

免疫染色のヒント	10
対比染色	10
内在性のペルオキシダーゼ阻害	10
ペルオキシダーゼ標識抗体の検出における注意点	10
内在性のアルカリホスファターゼ阻害	10
蛍光染色用の封入剤	10

Sigma-Aldrich ウェブサイト
[グローバルサイト](#)
[日本サイト](#)
[じっけんレシポ](#)

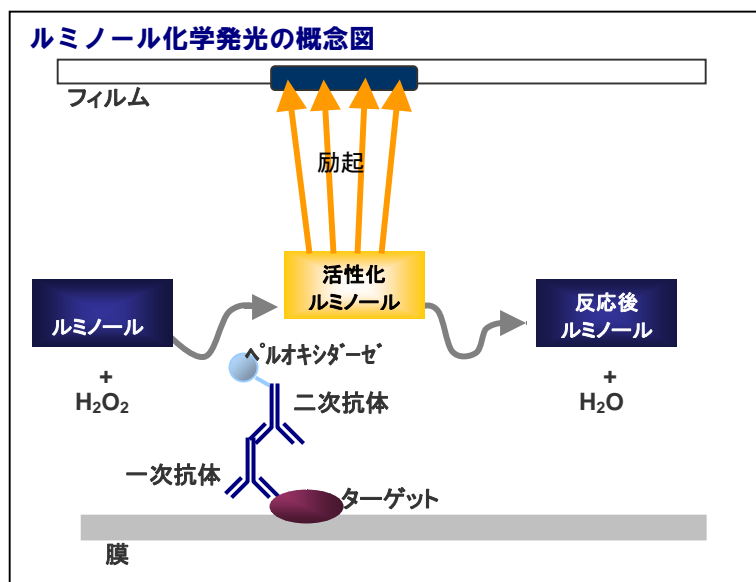
ウェスタンブロットに使用する検出用試薬

抗体の標識がペルオキシダーゼ (HRP) の場合

基質	製品番号	形状	製品の特徴	用途	検出結果	基質の性質
TMB	T0565	溶液	そのまま使用できる溶液タイプ	プロット専用	可視 (濃紺)	より安全・安定な DAB の代替品
DAB	D6815	溶液	DAB 溶液とバッファーが付属 (1 セット= バッファー100 ml が 4 本 と DAB 溶液 15 ml)	免疫染色、 プロット専用	可視 (茶色)	DAB は AEC より高 感度
	D4168	錠剤	タブレットなので高安定性 バッファー成分が含まれ、調整は水 に溶かすだけ (1 錠=1mL 用)	免疫染色、 プロット専用		
	D4293	錠剤	D4168のサイズ違い (1 錠=5mL 用)	免疫染色、 プロット専用		
	D4418	錠剤	D4168のサイズ違い (1 錠=15mL 用)	免疫染色、 プロット専用		
DAB + 増感剤	D0426	錠剤	通常の DAB より高感度 バッファー成分が含まれ、調整は水 に溶かすだけ (5mL 用)	免疫染色、 プロット専用	可視 (黒青)	
AEC	AEC101	溶液	約 1,000 回分 (150mL 基質溶液) バッファー、色素溶液、過酸化水素 溶液が入っています	免疫染色、 プロット専用	可視 (赤色)	TMB や DAB と異 なる色で検出
化学発光用 基質 (ルミノール)	CPS160	溶液	2 種類の溶液を混ぜるだけで、合計 60mL の基質溶液が調整できます (使用回数は膜の大きさによって変 わる)	プロット専用 (BioMax light フィ ルムなどに感光し て検出)	感光	発色法に比べ超 高感度

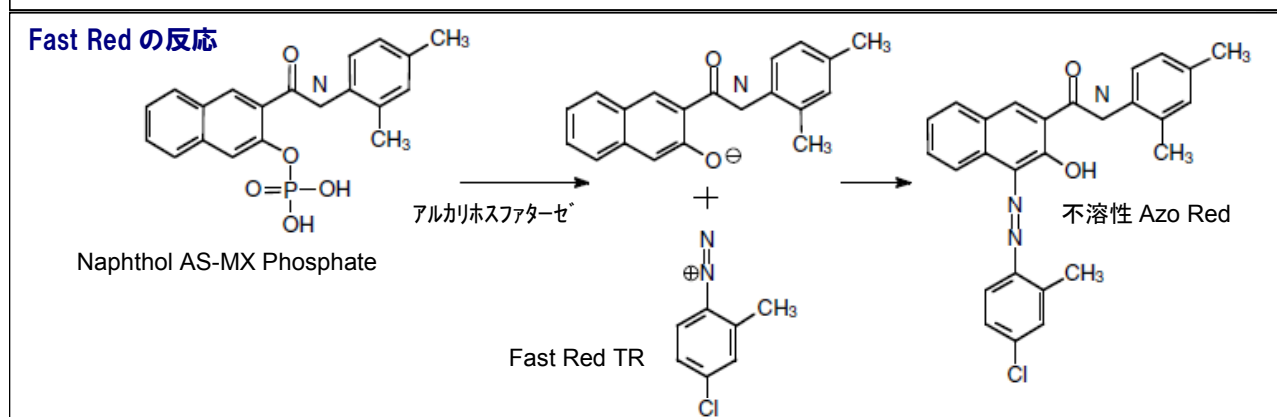
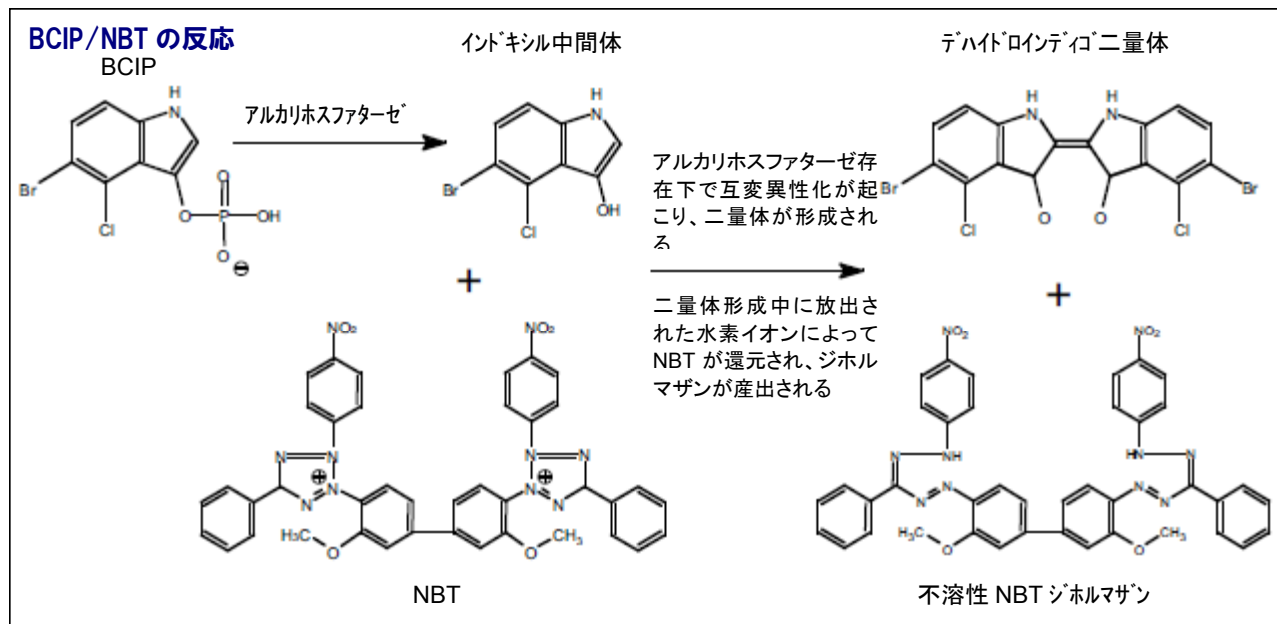
☆こちらでも使われています☆

[W0138](#) ウェスタンブロット用ブロッキング溶液 (HRP用)
PVDF 膜やニトロセルロース膜に適用



ウェスタンブロットに使用する検出用試薬(続き)
抗体の標識がアルカリホスファターゼ (ALP) の場合

基質	製品番号	形状	製品の特徴	用途	検出結果	基質の性質
BCIP/NBT	B1911	溶液	そのまま使用できる溶液タイプ	免疫染色、 プロットング用	可視 (青～紫色)	BCIPはFast Redより 高感度
	B3679	溶液	そのまま使用できる溶液タイプ	プロットング用		
	B3804	溶液	そのまま使用できる溶液タイプ	プロットング用		
	B5655	錠剤	タブレットなので高安定性 バッファー成分が含まれ、調整は水に溶かすだけ (1錠=10mL用)	免疫染色、 プロットング用		
Fast Red	F4648	錠剤	タブレットなので高安定性 バッファー成分が含まれ、調整は水に溶かすだけ (1錠=1mL用)	免疫染色、 プロットング用	可視 (赤色)	BCIP/NBTと異なる 色で検出
	F4523	錠剤	F4648のサイズ違い (1錠=10mL用)			



免疫染色に使用する検出用試薬

抗体の標識がペルオキシダーゼ（HRP）の場合

基質	製品番号	形状	製品の特徴	用途	検出結果	基質の性質
DAB	D7304	溶液	DAB 溶液とバッファーが付属 (1 セット=合計 250mL)	免疫染色、 プロットング用	可視 (茶色)	DAB は AEC より高 感度
	D4168	錠剤	タブレットなので高安定性 バッファー成分が含まれ、調整は水に溶 かすだけ (1 錠=1mL 用)	免疫染色、 プロットング用		
	D4293	錠剤	D4293のサイズ違い (1 錠=5mL 用)	免疫染色、 プロットング用		
	D4418	錠剤	D4293のサイズ違い (1 錠=15mL 用)	免疫染色、 プロットング用		
	D3939	溶液	DAB 溶液とバッファーが付属 (1 セット=合計 100mL) DAB 溶液がドロップ式の容器	免疫染色用		
	D7679	溶液	DAB 溶液とバッファーが付属 (1 セット=合計 100mL)	免疫染色用		
DAB + 増感剤	D0426	錠剤	DABに増感剤が加えられ、通常のDABより高感度 バッファー成分が含まれ、水に溶かす だけで使用可能(5mL 用)	免疫染色、 プロットング用	可視 (黒青)	
AEC	AEC101	溶液	約 1,000 回分(150mL 基質溶液) バッファー、色素溶液、過酸化水素溶液 が入っています	免疫染色、 プロットング用 (有機溶媒と同時に 使用不可)	可視 (赤色)	TMB や DAB と異 なる色で検出

抗体の標識がアルカリホスファターゼ（ALP）の場合

基質	製品番号	形状	製品の特徴	用途	検出結果	基質の性質
BCIP/NBT	B1911	溶液	そのまま使用できる溶液タイプ	免疫染色、 プロットング用	可視 (青～紫 色)	BCIP は Fast Red より高感度
	B5655	錠剤	タブレットなので高安定性 バッファー成分が含まれ、調整は水に溶 かすだけ (1 錠=10mL 用)	免疫染色、 プロットング用		
Fast Red	F4648	錠剤	タブレットなので高安定性 バッファー成分が含まれ、調整は水に溶 かすだけ (1 錠=1mL 用)	免疫染色、 プロットング用 (有機溶媒と同時に 使用不可)	可視 (赤色)	BCIP/NBT と異な る色で検出
	F4523	錠剤	F4648のサイズ違い (1 錠=10mL 用)			

ELISAに使用する検出用試薬

抗体の標識がペルオキシダーゼ (HRP) の場合

基質	製品番号	形状	製品の特徴	反応時の色 (測定する吸光度)	反応停止後の色 (測定する吸光度)	基質の性質
OPD	P9187	錠剤	タブレットなので高安定性 バッファー成分が含まれ、調整は 水に溶かすだけ (1錠=20mL用)	黄～オレンジ (450nm)	オレンジ (492nm)	超高感度
TMB	T8665	溶液	そのまま使える溶液タイプ	青色 (370nm または 655nm)	黄色 (450nm)	OPD より安全で高 感度
	T0440	溶液	そのまま使える溶液タイプ T8665 より低ハザード性 (DMSO・DMF 不含)			
	T4444	溶液	そのまま使える溶液タイプ 高反応速度(40%増)			
	T4319	溶液	そのまま使える溶液タイプ 低反応速度(25%減速)			
	T5569	溶液	そのまま使える溶液タイプ 超低反応速度(60%減速)			
AzBTS	A3219	溶液	そのまま使える溶液タイプ	青緑 (405nm)	青緑 (405nm)	OPD や TMB とは 異なる色で検出

反応の停止方法(例):

OPD---基質溶液 200 μ L あたり 50 μ L の 3 M HCl または 3 M H₂SO₄ を添加

TMB---基質溶液と等量の 1 M H₂SO₄ を添加

TMB 反応停止液

製品番号 [S5814](#) 反応を 450nm で止める

製品番号 [S5689](#) 反応を 620~650nm で止める

AzBTS---基質溶液と等量の 1% SDS 溶液を添加

抗体の標識がアルカリホスファターゼ (ALP) の場合

基質	製品番号	形状	製品の特徴	反応時の色 (測定する吸光度)	反応停止後の色 (測定する吸光度)
pNPP	N1891	錠剤	タブレットなので高安定性 バッファー成分が含まれ、調整は水に溶かすだけ (1錠=5mL用)	黄色 (405nm)	黄色 (405nm)
	N2770	錠剤	N1891のサイズ違い (1錠=20mL用)		
	N7653	溶液	そのまま使える溶液タイプ		
	P7998	溶液	そのまま使える溶液タイプ (N7653 と類似)		

反応の停止方法(例): 基質溶液 200 μ L あたり 50 μ L の 3N NaOH を添加

※ELISA 用基質の使用量目安=96 ウェルプレートで 1 ウェル 200 μ L

ウェスタンブロットの検出セット

ウサギ用 (一次抗体がウサギで作られている場合)

条件		おすすめ製品		
標識	検出方法(基質)	二次抗体	検出試薬	基本的な試薬
HRP	発色 (TMB)	A0545-1ML	T0565-100ML 溶液。プロット用	セット A と セット B
	化学発光 (ルミノール)		CPS160-1KT 溶液	
ALP	発色 (BCIP/NBT)	A9919-.25ML	B1911-100ML 溶液	セット A と セット C

マウス用 (一次抗体がマウスで作られている場合)

条件		おすすめ製品		
標識	検出方法(基質)	二次抗体	検出試薬(またはキット)	基本的な試薬
HRP	発色 (TMB)	A9044-2ML	T0565-100ML 溶液。プロット用	セット A と セット B
	化学発光 (ルミノール)	キットに付属 注 1	PQ0201-1KT キット	セット A と セット D
ALP	発色 (BCIP/NBT)	キットに付属 注 2	PQ0111-1KT キット	セット A と セット C

注 1: キットを使わない場合 = A9044-2ML + CPS160(発光基質) + セットA + セットB

注 2: キットを使わない場合 = A3562-.25ML + B1911(基質溶液) + セットA + セットC

セット A: プロット基本セット(転写)

T4904 -1L: プロット転写用バッファー(Tris-Glycine)。10x溶液
P4188 -10EA: PVDF膜。10x10cm
P7796 -100EA: プロット用ペーパー(厚めのろ紙でも代用可能)。7x10cm
19-2400: メタノール
01-0280: 酢酸

セット B: プロット基本セット HRP 用(ブロッキング・洗浄)

T6664 -10PAK: TBS粉末(pH 8.0)。1 パックで 1L調整
P5927-100ML: Tween 20
W0138 -400ML: HRP用ブロッキング溶液。プロット専用

セット C: プロット基本セット ALP 用(ブロッキング・洗浄)

T6789 -10PAK: TBS(pH 8.0) + BSA (1%) のブレンド粉末。
1 パックで 1L 調整
P5927-100ML: Tween 20

セット D: プロット基本セット(洗浄)

T9039-10PAK: TBS(pH 8.0) + Tween 20 (0.05%) のブレンド粉末。
1 パックで 1L 調整

必要ありませんか？

ポジティブコントロール

製品番号C2242 -1VL
・TMB、BCIP/NBT、ECL、CPS などの
基質に使用可能
・発色法の場合はマーカーとしても使えます

化学発光法(ケミルミネッセンス)用フィルム

Kodak® BioMax™ light film (13cm x 18cm)
製品番号Z370398-50EA

PBS はリン酸が含まれるため、アルカリホスファターゼによる検出には不適です

ウェスタンブロットの検出セット(続き)

ニワトリ用・IgY抗体用 (一次抗体がニワトリで作られている場合)

条件		おすすめ製品		
標識	検出方法(基質)	二次抗体	検出試薬	基本的な試薬 ※
HRP	発色 (TMB)	A9046-1ML	T0565-100ML 溶液。プロットイング用	セット A と セット B
	化学発光 (ルミノール)		CPS160-1KT 溶液	
ALP	発色 (BCIP/NBT)	A9171-.25ML	B1911 -100ML 溶液	セット A と セット C

※セットの内容は前ページ参照

免疫染色の検出基本セット

ウサギ用 (一次抗体がウサギで作られている場合)

発色法用		おすすめ製品			
標識	基質	検出試薬	二次抗体	ブロッキング	PBS
HRP	DAB	D6815 -1SET 溶液	A0545 -1ML	G9023 -5ML(正常ヤギ血清) または A9647 -10G(BSA)	P3813 -10PAK (1PAK = 1L 調整用の粉末)
	AEC	AEC101 -1KT 溶液			
ALP	BCIP/NBT	B5655 -5TAB タブレット	A9919 -.25ML	G9023 -5ML(正常ヤギ血清) または A9647 -10G(BSA)	P3813 -10PAK (1PAK = 1L 調整用の粉末)
	Fast Red	F4648 -5SET タブレット			
蛍光染色用		おすすめ製品			
標識	励起波長	測定波長	二次抗体	ブロッキング	PBS
FITC	495nm	525nm(緑)	F9887 -5ML	G9023 -5ML(正常ヤギ血清) または A9647 -10G(BSA)	P3813 -10PAK (1PAK = 1L 調整用の粉末)
TRITC	552nm	570nm(赤)	T6778 -1ML		

マウス用 (一次抗体がマウスで作られている場合)

発色法用		おすすめ製品			
標識	基質	検出試薬	二次抗体	ブロッキング	PBS
HRP	DAB	D6815 -1SET 溶液	A2304 -1ML	G9023 -5ML(正常ヤギ血清) または A9647 -10G(BSA)	P3813 -10PAK (1PAK = 1L 調整用の粉末)
	AEC	AEC101 -1KT 溶液			
ALP	BCIP/NBT	B5655 -5TAB タブレット	A2179 -.25ML	G9023 -5ML(正常ヤギ血清) または A9647 -10G(BSA)	P3813 -10PAK (1PAK = 1L 調整用の粉末)
	Fast Red	F4648 -5SET タブレット			
蛍光染色用		おすすめ製品			
標識	励起波長	測定波長	二次抗体	ブロッキング	PBS
FITC	495nm	525nm(緑)	F2012 -5ML	G9023 -5ML(正常ヤギ血清) または A9647 -10G(BSA)	P3813 -10PAK (1PAK = 1L 調整用の粉末)
TRITC	552nm	570nm(赤)	T7782 -1ML		
Cy3	552nm	570nm(赤)	C2181 -1ML		

免疫染色の検出基本セット(続き)

ニワトリ用・IgY抗体用 (一次抗体がニワトリで作られている場合)

発色法用		おすすめ製品			
標識	基質	検出試薬	二次抗体	ブロッキング	PBS
HRP	DAB	D6815 -1SET 溶液	A9046 -1ML	G9023 -5ML(正常ヤギ血清) または A9647 -10G(BSA)	P3813 -10PAK (1PAK=1L 調整用の粉末)
	AEC	AEC101 -1KT 溶液			
ALP	BCIP/NBT	B5655 -5TAB タブレット	A9171 -.25ML	G9023 -5ML(正常ヤギ血清) または A9647 -10G(BSA)	P3813 -10PAK (1PAK=1L 調整用の粉末)
	Fast Red	F4648 -5SET タブレット			
蛍光染色用		おすすめ製品			
標識	励起波長	測定波長	二次抗体	ブロッキング	PBS
FITC	495nm	525nm(緑)	F8888 -5ML (免疫動物ウサギ)	R9133 -5ML(正常ウサギ血清) または A9647 -10G(BSA)	P3813 -10PAK (1PAK=1L 調整用の粉末)
			F4766 -5ML (マウスモノクロ)		

※抗ニワトリ IgY 抗体 F8888 は免疫動物がウサギなので、二重染色でもう一方の一次抗体がウサギで作られている場合には適しません。

※抗ニワトリIgY抗体F4766はマウスモノクローナル抗体なので、二重染色でもう一方の一次抗体がマウスで作られている場合には適しません。

★こちらでも便利です 免疫染色用の封入剤

発色法: グリセリン-ゼラチン (製品番号GG1-15ML)

温めてからスライドに乗せて封入

蛍光染色: Fluoromount (製品番号F4680-25ML)

スライドに水が残っている状態で2~3滴たらし乾かすだけ

【豆知識】

～ブロッキング剤の選択(免疫染色)～

ブロッキングには二次抗体が作られた動物と同じ種の正常血清、または BSA が使われます。

(一次抗体反応の前にブロッキングすることで、非特異的に結合する部分が先にマスクされます)

- ・正常血清の使用濃度は5~10%(典型的には10%)
- ・BSAの使用濃度は5%が一般的

動物組織の免疫染色では、ブロッキング剤として正常血清がよく使われます。

～バックグラウンドを抑える～

吸収処理をした抗体を使うと非特異的な反応を抑えることができます。

(例)ヒトの血清で吸収した二次抗体をヒトの培養細胞で使用

免疫染色のヒント

染色法は基質、サンプル、二重染色、対比染色(カウンター染色)など組み合わせによって方法・条件は様々です。実際にはサンプルに応じて各条件を検討する必要があります。

対比染色

AEC染色の対比染色

基質としてAECやFast Redを使用する場合、有機溶媒を同時に用いることができません。そのため、同時に核や細胞質を染色する、いわゆる対比染色にはハリスのヘマトキシリンや酸アルコールは不適です。封入剤にもキシレンやトルエンを含むものは用いられません。

Fast Redの対比染色

AEC染色の対比染色の項をご覧ください。

対比染色用おすすめ製品

水性なのでAECやFast Redの対比染色にも適しています

[MHS16-500ML](#): マイヤーのヘマトキシリン溶液(ヘマトキシリン 1g/1L含有) [使用方法](#) (英語のみ)

[HT110216-500ML](#): エオシンY水溶液(エオシンY 0.5%含有) [使用方法](#) (英語のみ)

AECやFast Redにも使えるおすすめの封入剤

[GG1-15ML](#): 水性の封入剤(マウント剤)。グリセロール-ゼラチン溶液。55-60°Cに温めて溶かして使用

内在性のペルオキシダーゼ阻害

ペルオキシダーゼ標識抗体を用いた組織染色の際、組織に内在しているペルオキシダーゼによりバックグラウンドが生じることがあります。

一次抗体反応の前に、3%の過酸化水素(H₂O₂)溶液をサンプル切片全体に滴下し、5分間インキュベートすることでバックグラウンドを低減されます。

※3%過酸化水素水は使用直前に調整します

インキュベート後はPBSでリンスして、抗体反応に進みます。

ペルオキシダーゼ標識抗体の検出における注意点

ペルオキシダーゼ(HRP)と基質の反応はアジ化ナトリウムに阻害されます。

保存剤としてアジ化ナトリウムを使っていない抗体が推奨されます。

ここで紹介したHRP標識の二次抗体は、アジ化ナトリウム以外の保存剤(チメロサルなど)が使われています。

内在性のアルカリホスファターゼ阻害

アルカリホスファターゼ標識抗体を用いた組織染色の際、組織に内在しているアルカリホスファターゼによりバックグラウンドが生じることがあります。

アルカリホスファターゼに対する基質溶液に1mMのレバミゾールを加えることで、バックグラウンドを抑えることができます。

※腸由来のサンプルは阻害できません

[L9756-5G](#): レバミゾール、(-)-Tetramisole hydrochloride

蛍光染色用の封入剤

Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium(製品番号[F4680](#))は、蛍光染色に適した封入剤です。

FITCやフィコエリスリンなど様々な蛍光色素による観察に使用できます。

免疫染色したスライドに2~3滴たらし、カバーガラスを乗せてから室温30~45分で完了します。