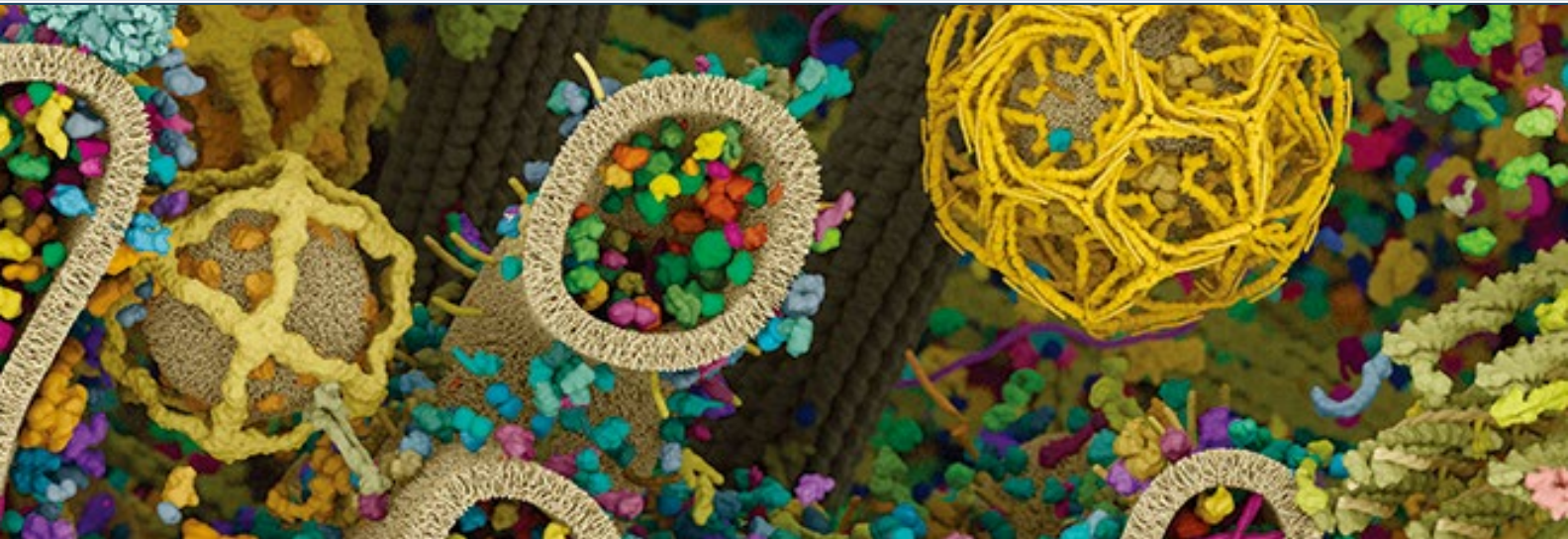


20年の実績に 裏打ちされた CSTの抗体検証

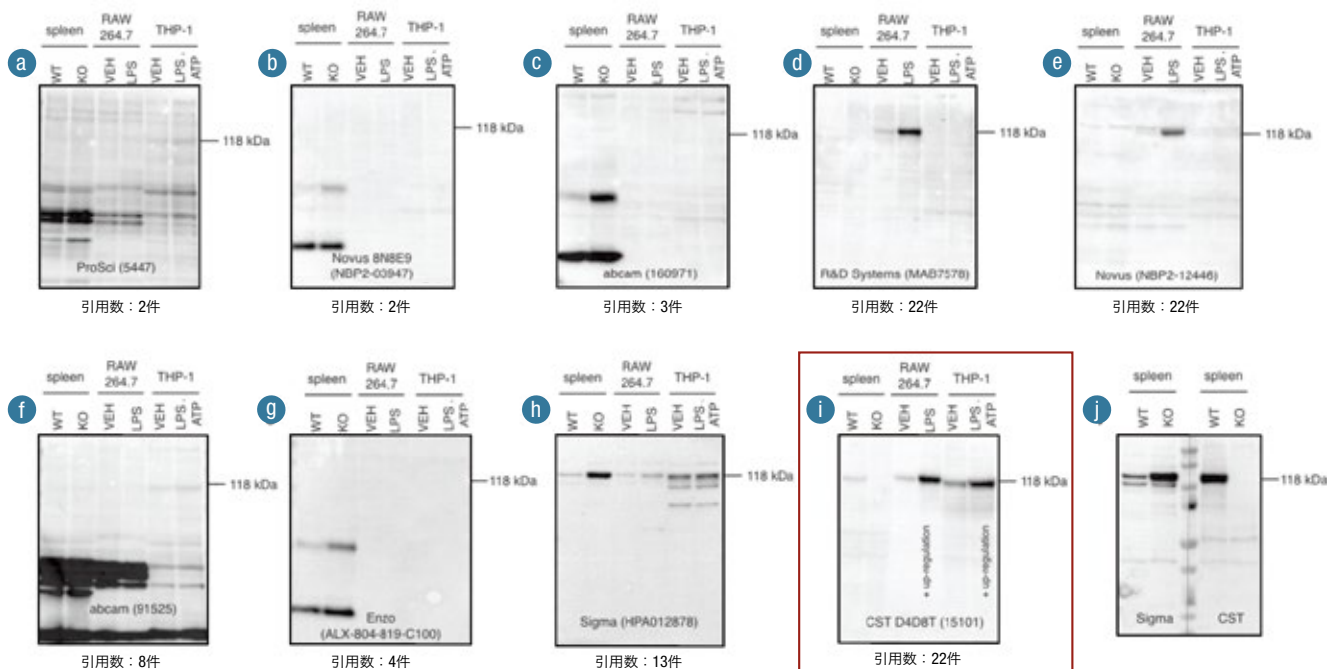


Cell Signaling
TECHNOLOGY®

信頼性が低い、検証不十分な抗体を使用した実例の数々

最近Scientific Reports誌上で、市販されている9種の抗体の厳密な試験が行われ、唯一、Cell Signaling Technology (CST) 製品のみが、全ての評価基準をクリアしました。試験対象となった9種の抗体は全て別個に発表された論文で使用されており、その多くで黄斑変性のメカニズムについて相反する結論が導き出されています。

ウェスタンブロットによる市販されている抗NLRP3抗体の特異性の検証



CitAb(TM) による製品引用情報

	メーカー	交差性	由来	[抗体]	カタログ番号	ロット番号
Anti-NLRP3	Cell Signaling Technology	マウス、ヒト	ラビット	WB 1:1000	D4D8T, 15101	3
	ProSci	マウス、ヒト	ラビット	WB 1:1000	5447	6769-1204
	Novus Biologicals	マウス、ヒト	マウス	WB 1:1000	8N8E9, NBP2-03947	-
	Novus Biologicals	マウス、ヒト	ラビット	WB 1:400	NBP2-12446	080639650-14
	abcam	ヒト	マウス	WB 1:1000	ab160971	GR228391-15
	R&D Systems	マウス	ラット	WB 1:250	MAB7578	-
	abcam	マウス、ヒト	ラビット	WB 1:500	ab91525	GR62279-6
	Enzo Life Sciences	ヒト	マウス	WB 1:100	ALX-804-818-C100	11051424
	Sigma	ヒト	ラット	WB 1:1000	HPA012878	D106015

画像はクリエイティブ・コモンズ・表示4.0国際ライセンス (Creative Commons Attribution 4.0 国際ライセンス) のもとに、利用を許諾されています (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)。Kosmidou C, Efsthathiou NE, Hoang MN, Notomi S, et al. Issues with the Specificity of Immunological Reagents for NLRP3: Implications for age-related macular degeneration. Page 4-7. Sci Rep. 2018;8(1):461.

市販されている9種の抗NLRP3抗体の特異性を、マウス脾臓組織、マウスおよびヒトのマクロファージ細胞株 (それぞれRAW264.7およびTHP-1) モデルシステムで検証しました。マウス脾臓組織モデルでは、Nlrp3ノックアウトマウスをネガティブコントロールとして、タンパク質の発現を検出することで特異性を評価しました。RAW 264.7細胞モデルでは、細胞をLPS刺激 (10 ng/mL、6時間) し、未処理コントロール細胞と比較検証しました。THP-1細胞モデルでは、細胞をLPS + ATP刺激 (それぞれ10 ng/mL、5 mMで3時間) し、未処理コントロール細胞と比較検証しました。各レーンに細胞 (組織) の総タンパク質50 µgをロードし、抗NLRP3抗体によるウェスタンブロットティングを行いました。NLRP3の推定分子量はおよそ118 kDaです。

CSTの品質管理の原則

全ての抗体に画一的な作業を適用するだけでは、必ずしも十分な性能の検証はできません。CSTの研究者チームが、生物学的に最も適したモデルとアッセイを考案し、抗体ごとにカスタム解析を行っています。さらに、お客様の研究でCST抗体が確実に機能するよう、抗体ごとに最適化したプロトコールと専門的なテクニカルサポートも提供しています。

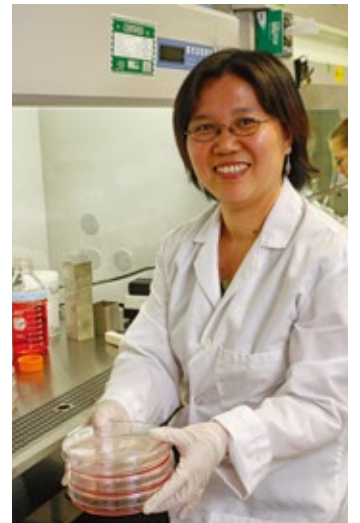
✓ 特異性

- **バイナリーモデル**：適切なコントロールを置き、標的の発現レベルが既知の細胞株 (高、中、低、無発現) で発現が適切に検出できることを確認しています。
- **PTM特異性**：翻訳後修飾 (PTM) について、適切な活性化因子や阻害因子、その他の処理 (ホスファターゼ、アセチラーゼ、PNGaseなど) を用いて特異性を確認しています。また、ペプチドアレイを用いて、部位特異性ならびに近隣のPTMの抗体特異性に対する影響を確認しています。
- **遺伝学的不活性化**：siRNAによるノックダウン、ノックアウトモデル、その他ツールで特異性を確認しています。
- **生物学的に適切な処理**：増殖因子やサイトカイン、化学的活性化因子/阻害剤で処理した細胞株を解析し、標的の発現、局在、翻訳後修飾などの変化を確認しています。
- **抗体結合の特異性**：複数の正常および疾患組織を解析し、多様な組織で抗体が機能することを確認しています。



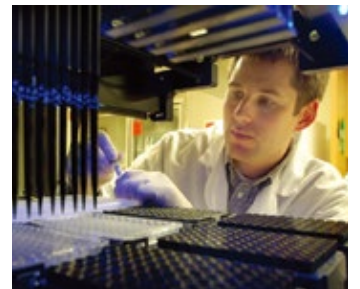
✓ 感度

- 内在性タンパク質を検出する反応性や感度を、多様な細胞や組織サンプルで確認しています。
- 複数のバッファーや反応条件を試験し、アプリケーションごとに最適化を行なっています。
- 力価を測定し、アッセイごとに最適濃度を決定しています。



✓ 一貫性

- ロットごとの検証 (新ロットと旧ロットとの比較) を行い、一貫した性能を確認しています。
- リコンビナントモノクローナル抗体技術によって、製品ロットを問わず再現性の高い製品の製造が可能になりました。
- 全製品に対して、年に1回の品質管理試験を実施しています。
- 新製品はどれも最低3つの社内チームが検証を行い、複数のサンプル、利用者、実験で一貫して機能することを確認しています。



✓ 方法論

- 製品ごとに最適化されたプロトコールを作成しています。
- 最適な希釈液と希釈率の検証を行なっています。

✓ サポート

- トップレベルのグローバルテクニカルサポートを提供しています。
- 製品がお客様の研究室で機能するよう、抗体を検証した科学者がサポートいたします。
- お客様のフィードバックとご要望に応じて、新規アプリケーションでの製品試験と検証を常に行っています。

最良の製品だけがCSTの検証プロセスを通過

1 抗原のデザイン

2 抗体開発 と 検証

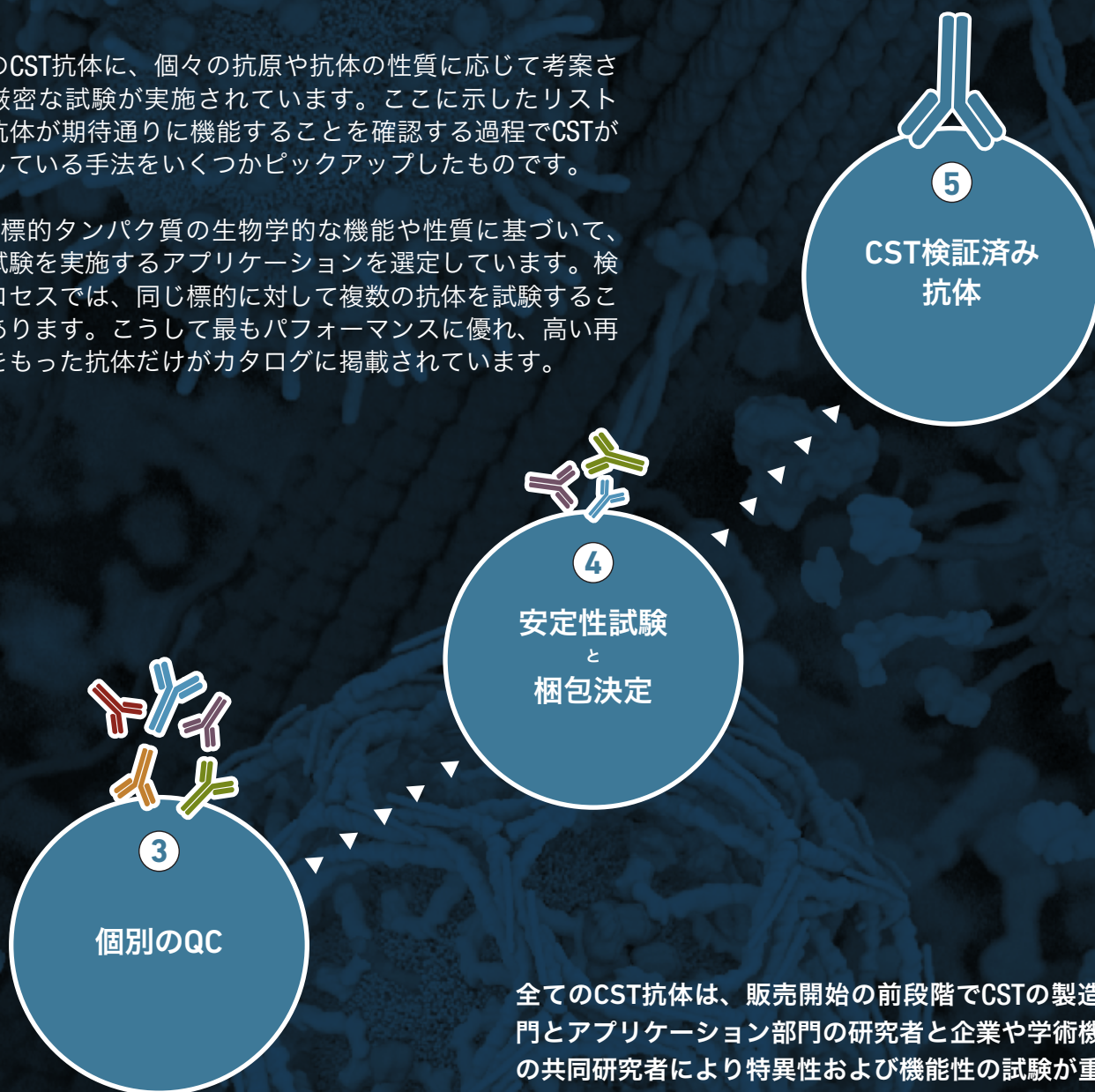


各アプリケーションで行われる試験

IHC	ChIP	Flow	IF	WB/IP	遺伝学的モデル: ノックアウト個体由来の組織、CRISPR-Cas9によるノックアウト細胞株
IHC	ChIP	Flow	IF	WB/IP	内在性バイナリーモデル: 陽性 vs. 陰性発現細胞/組織
IHC	ChIP	Flow	IF	WB/IP	ノックダウン戦略、siRNA/shRNA
IHC	ChIP	Flow	IF	WB/IP	発現レベルの異なる様々な組織や細胞株を用いた試験
IHC	ChIP	Flow	IF	WB/IP	同じ標的 (抗原部位が異なる) に対する抗体を用いた個別の抗体検証
IHC	ChIP	Flow	IF	WB/IP	公表されているデータとの比較
IHC	ChIP	Flow	IF	WB/IP	コントロール: アイソタイプ/二次抗体、ローディング品質など
IHC	ChIP	Flow	IF	WB/IP	個々の試験を複数回行うことで一貫性と再現性を検証
IHC	ChIP	Flow	IF	WB/IP	標的タンパク質の過剰発現
IHC		Flow	IF	WB/IP	組織アレイとげっ歯類組織
	ChIP	Flow	IF	WB/IP	初代培養細胞/分化誘導した幹細胞
IHC	ChIP		IF	WB/IP	発現量、PTM、細胞内局在の変化を誘導する処理
IHC		Flow	IF	WB/IP	ホスファターゼ処理
IHC			IF	WB/IP	疾患の動物モデル
IHC			IF	WB/IP	細胞周期依存的発現、局在性
IHC			IF	WB/IP	ペプチドブロッキング
IHC			IF		異種移植片モデル (薬剤処理とコントロール)
IHC				WB/IP	ヒトの正常組織とがん組織
	ChIP			WB/IP	ペプチドELISA、ペプチドアレイ、ドットプロット
				WB/IP	組換えタンパク質
	ChIP				ポジティブ遺伝子座 vs. ネガティブ遺伝子座
	ChIP				複合体サブユニットの個別検証

全てのCST抗体に、個々の抗原や抗体の性質に応じて考案された厳密な試験が実施されています。ここに示したリストは、抗体が期待通りに機能することを確認する過程でCSTが採用している手法をいくつかピックアップしたものです。

CSTは標的タンパク質の生物学的な機能や性質に基づいて、検証試験を実施するアプリケーションを選定しています。検証プロセスでは、同じ標的に対して複数の抗体を試験することもあります。こうして最もパフォーマンスに優れ、高い再現性をもった抗体だけがカタログに掲載されています。



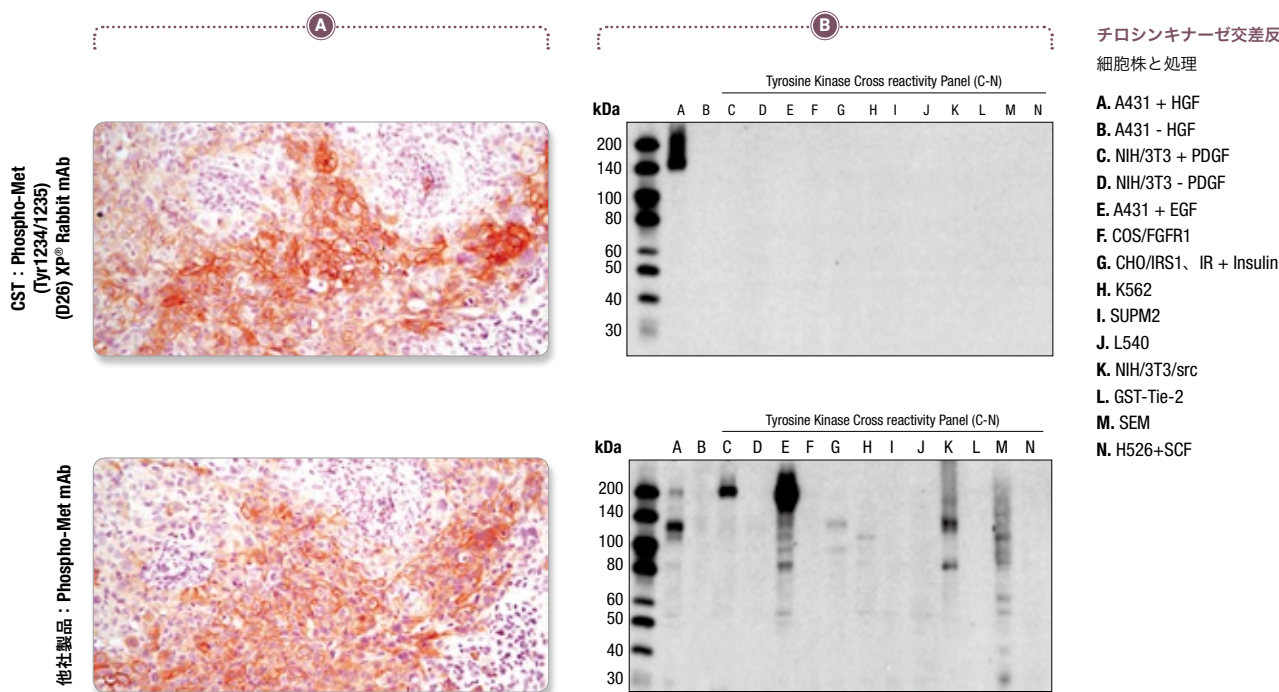
全てのCST抗体は、販売開始の前段階でCSTの製造部門とアプリケーション部門の研究者と企業や学術機関の共同研究者により特異性および機能性の試験が重ねられ、推奨アプリケーションでの使用条件が最適化されているかどうかを検証されています。



IHC (免疫組織化学染色)

抗体の特異性に不安はありませんか？

一見、適切に機能しているように見える抗体も、本当に標的を特異的に認識しているとは限りません。ほとんどの場合、抗体の特異性の確認を得るには、複数のアプリケーションで検証する必要があります。2種類のリン酸化Met (Tyr1234/1235) 抗体によるIHC染色像を(A)に示しました。ここでは類似した染色パターンがみられますが、さらにウェスタンブロットで解析した結果(B)から、CSTの抗体(#3077)はリン酸化Metを特異的に検出するのにに対し、他社製品は広範のリン酸化RTKと交差反応することが分かります。この様なリン酸化チロシン残基に対する広範な交差反応は、多くの抗体でよくみられる共通の問題とされています。



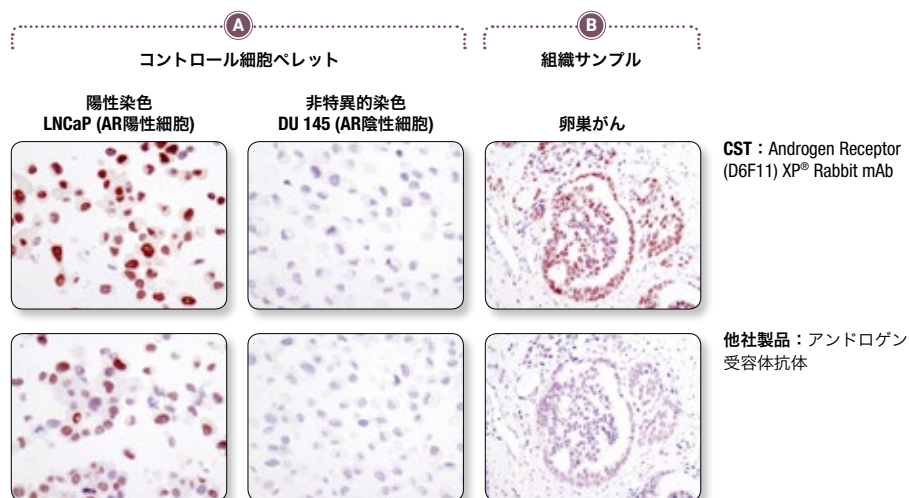
Phospho-Met (Tyr1234/1235) (D26) XP® Rabbit mAb #3077と他社製品の比較：HCC827異種移植片の組織染色(A)では、一見、CSTの#3077(上)と他社製品(下)でもともに特異的な染色像が得られるようにみえます。一方、培養細胞を増殖因子処理して様々なRTKのリン酸化を誘導したサンプルをウェスタンブロット解析した場合(B)、CSTの#3077ではHGF誘導性の単一バンド(145 kDa)だけが観察されました(A-431細胞、レーンA、B)。増殖因子でMet以外のRTKを活性化した場合や、他のRTKや細胞質チロシンキナーゼを過剰発現した場合には、これらに対するCSTの#3077の交差反応は見られませんでした(上)。これに対し、他社製品では同様の解析で、いくつか非特異的な交差反応が観察されました(下)。イメージは、両方の転写膜を同一フィルムに同じ時間(10秒間)露光したものです。



抗体の感度に不満はありませんか？

CSTの検証プロセスでは、陽性/陰性の組織および細胞株を用いて様々な希釈率で抗体試験を行なっています。これによって各アッセイにおける最適濃度が決定されます。最適濃度の決定は、適切なS/N比と最高感度を両立するために極めて重要です。

Androgen Receptor (D6F11) XP® Rabbit mAb #5153と他社製品と比較：CSTの#5153と他社のIHC推奨アンドロゲン受容体マウスモノクローナル抗体をIHCで比較しました。まず、各抗体の最適希釈率を個別に決定しました。アンドロゲン受容体 (AR) を発現するLNCaP細胞で染色の最適化を、ARの発現が無いDU 145細胞で非特異的染色の最小化を行いました (A)。こうして決められた最適希釈率でパラフィン包埋ヒト卵巣がんのIHC解析を行いました (B)。



プロトコールと試薬の最適化にお悩みではありませんか？

最適化されたCSTのプロトコールと関連試薬をご利用いただくことで、再現良く染色像を得ることができます。

数年前のPLK1 (208G4) Rabbit mAb #4513発売当初、CSTのIHCグループは社内検証で染色が得られなかったため、IHCでの使用を推奨できませんでした。当時のIHC解析で使用した試薬は以下の通りです。

SignalStain® Antibody Diluent #8112を使用することで、当初の条件に比べて多少のシグナルの改善がみられました。

さらに、検出システムを**SignalStain® Boost IHC Detection Reagent (HRP, Rabbit) #8114**に変更することで、シグナルが改善されました。しかし、この時点でもCSTの厳格な基準を満たすシグナルは得られなかったため、この抗体はIHCでの使用を推奨していませんでした。

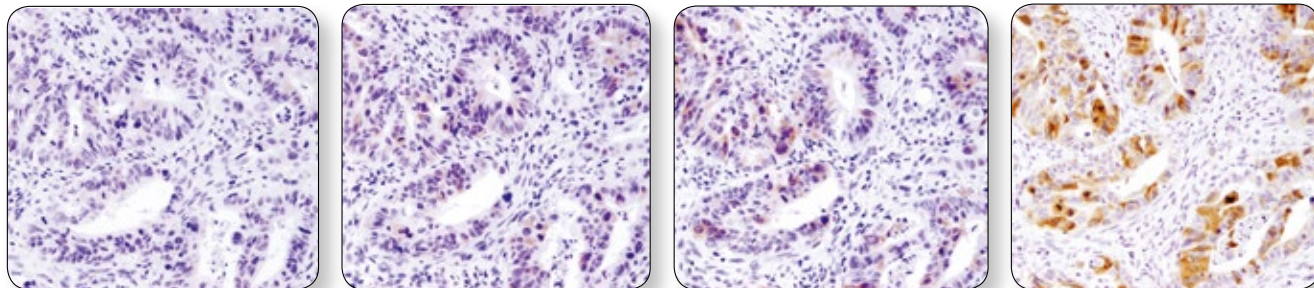
最終的に、色素原を**SignalStain® DAB Substrate Kit #8059**に変更することで、CSTの基準を満たすシグナルが得られるようになり、IHCでの使用を保証できるようになりました。当初の検証以降、抗体希釈率の変更はありません。

希釈液：TBST/5% NGS
検出：ビオチンベース
色素原：NovaRed™

希釈液：#8112
検出：ビオチンベース
色素原：NovaRed™

希釈液：#8112
検出：#8114
色素原：NovaRed™

希釈液：#8112
検出：#8114
色素原：#8059



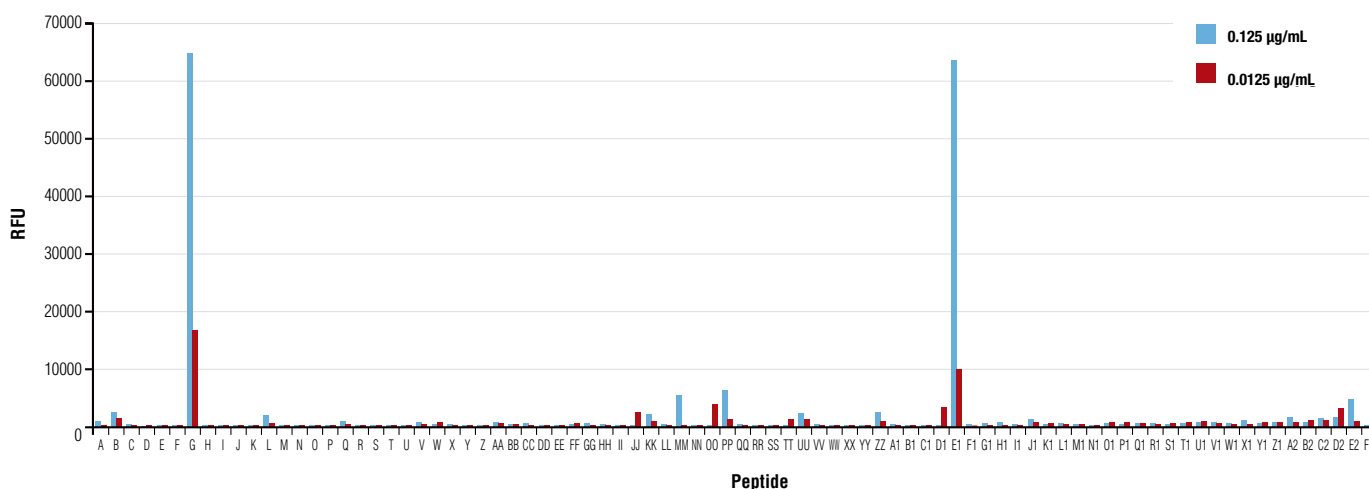
PLK1 (208G4) Rabbit mAb #4513を用いたIHC解析の最適化：さまざまなIHC試薬 (上記) を用いて行なった、#4513によるパラフィン包埋ヒト結腸がん組織のIHC解析

試薬の交換のみで染色像の改善がみられました。当初の検証以降、抗体希釈率の変更はありません。すなわち、抗体の希釈率のみならず、抗体希釈液、検出系、色素試薬の重要性を端的に示す結果となりました。

ChIP (クロマチン免疫沈降)

抗体の特異性に不安はありませんか？

ヒストン修飾を標的とする抗体は、類似するが標的とは異なるヒストン修飾に非特異的に結合する可能性があります。逆に、隣接する残基の修飾に起因する立体障害により、抗体の特異的結合が阻害される可能性もあります。CSTはヒストン修飾抗体の検証にペプチドアレイを採用し、全てのヒストンタンパク質の既知修飾に対する反応性と同時に、単一修飾部位の検出に近傍の修飾が及ぼす影響を評価しています。

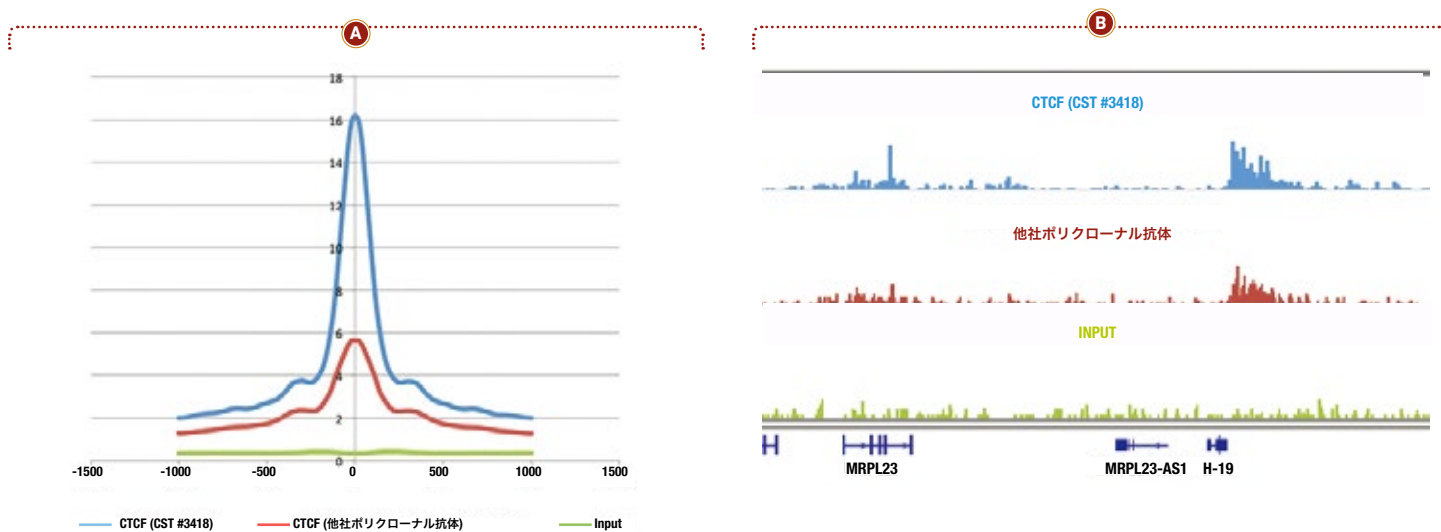


Peptide

A	H3 (Lys4) non-methyl	V	H4 (Lys20) mono-methyl	QQ	H3 (Lys9) tri-methyl/(Ser10) phospho	L1	H1.4 (Lys26) mono-methyl
B	H3 (Lys4) mono-methyl	W	H4 (Lys20) di-methyl	RR	H3 (Arg26) asymmetric-di-methyl/(Lys27) mono-methyl	M1	H1.4 (Lys26) di-methyl
C	H3 (Lys4) di-methyl	X	H4 (Lys20) tri-methyl	SS	H3 (Arg26) asymmetric-di-methyl/(Lys27) di-methyl	N1	H1.4 (Lys26) tri-methyl
D	H3 (Lys4) tri-methyl	Y	H2A (Lys5) non-methyl	TT	H3 (Arg26) asymmetric-di-methyl/(Lys27) tri-methyl	O1	H1.4 (Lys26) mono-methyl/(Ser27) phospho
E	H3 (Lys9) non-methyl	Z	H2A (Lys5) mono-methyl	UU	H3 (Lys27) mono-methyl/(Ser28) phospho	P1	H1.4 (Lys26) di-methyl/(Ser27) phospho
F	H3 (Lys9) mono-methyl	AA	H2A (Lys5) di-methyl	VV	H3 (Lys27) di-methyl/(Ser28) phospho	Q1	H1.4 (Lys26) tri-methyl/(Ser27) phospho
G	H3 (Lys9) di-methyl	BB	H2A (Lys5) tri-methyl	WW	H3 (Lys27) tri-methyl/(Ser28) phospho	R1	H2B (Lys5/Lys12/Lys15/Lys20)
H	H3 (Lys9) tri-methyl	CC	H3 (Thr3) phospho/ (Lys4) mono-methyl	XX	H3 (Lys9) mono-methyl/(Ser10/Thr11) phospho	S1	H2B (Lys5) mono-methyl
I	H3 (Lys27) non-methyl	DD	H3 (Thr3) phospho/ (Lys4) di-methyl	YY	H3 (Lys9) di-methyl/(Ser10/Thr11) phospho	T1	H2B (Lys5) di-methyl
J	H3 (Lys27) mono-methyl	EE	H3 (Thr3) phospho/ (Lys4) tri-methyl	ZZ	H3 (Lys9) tri-methyl/(Ser10/Thr11) phospho	U1	H2B (Lys5) tri-methyl
K	H3 (Lys27) di-methyl	FF	H3 (Arg2) symmetric-di-methyl/(Lys4) mono-methyl	A1	H3 (Lys4) mono-methyl/(Thr6) phospho	V1	H4 (Lys5/Lys8/Lys12/Lys16)
L	H3 (Lys27) tri-methyl	GG	H3 (Arg2) symmetric-di-methyl/(Lys4) di-methyl	B1	H3 (Lys4) di-methyl/(Thr6) phospho	W1	H4 (Lys5) mono-methyl
M	H3 (Lys36) non-methyl	HH	H3 (Arg2) symmetric-di-methyl/(Lys4) tri-methyl	C1	H3 (Lys4) tri-methyl/(Thr6) phospho	X1	H4 (Lys5) di-methyl
N	H3 (Lys36) mono-methyl	II	H3 (Arg2) asymmetric-di-methyl/(Lys4) mono-methyl	D1	H3 (Thr6) phospho/(Lys9) mono-methyl	Y1	H4 (Lys5) tri-methyl
O	H3 (Lys36) di-methyl	JJ	H3 (Arg2) asymmetric-di-methyl/(Lys4) di-methyl	E1	H3 (Thr6) phospho/(Lys9) di-methyl	Z1	H4 (Arg3) asymmetric-di-methyl/(Lys5) mono-methyl
P	H3 (Lys36) tri-methyl	KK	H3 (Arg2) asymmetric-di-methyl/(Lys4) tri-methyl	F1	H3 (Thr6) phospho/(Lys9) tri-methyl	A2	H4 (Arg3) asymmetric-di-methyl/(Lys5) di-methyl
Q	H3 (Lys79) non-methyl	LL	H3 (Arg8) symmetric-di-methyl/(Lys9) mono-methyl	G1	H3 (Lys56) non-methyl	B2	H4 (Arg3) asymmetric-di-methyl/(Lys5) tri-methyl
R	H3 (Lys79) mono-methyl	MM	H3 (Arg8) symmetric-di-methyl/(Lys9) di-methyl	H1	H3 (Lys56) mono-methyl	C2	H4 (Arg3) symmetric-di-methyl/(Lys5) mono-methyl
S	H3 (Lys79) di-methyl	NN	H3 (Arg8) symmetric-di-methyl/(Lys9) tri-methyl	I1	H3 (Lys56) di-methyl	D2	H4 (Arg3) symmetric-di-methyl/(Lys5) di-methyl
T	H3 (Lys79) tri-methyl	OO	H3 (Lys9) mono-methyl/(Ser10) phospho	J1	H3 (Lys56) tri-methyl	E2	H4 (Arg3) symmetric-di-methyl/(Lys5) tri-methyl
U	H4 (Lys20) non-methyl	PP	H3 (Lys9) di-methyl/(Ser10) phospho	K1	H1.4 (Lys26)	F2	H3 (Lys9) non-methyl

抗体の感度に不満はありませんか？

SimpleChIP® Plus Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads) #9005を用いて 4×10^6 個のHeLa細胞からクロスリンクしたクロマチンサンプルを調製し、CTCF (D31H2) XP® Rabbit mAb #3418と他社のポリクローナル抗体をChIPアプリケーションで比較しました (それぞれ1 μ gを使用)。NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina®を用いてChIPで濃縮されたDNA 5 ngからDNAライブラリーを調製し、Illumina NextSeqでNGS解析しました。全ゲノム解析 (A) と、個々の遺伝子解析 (B) の両方で、CSTのリコンビナントラビットモノクローナル抗体は、他社のポリクローナル抗体に比べて高いシグナルと低いバックグラウンドを示しました。CSTのChIP検証済み抗体は、感度に対しても厳正な検証を実施していますので、微量なタンパク質や不安定な分子間相互作用の検出にもご利用いただけます。

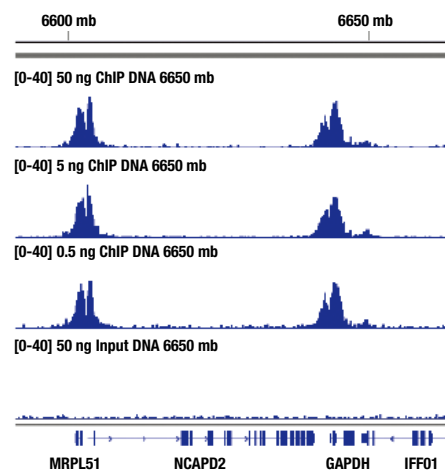


プロトコールと試薬の最適化にお悩みではありませんか？

SimpleChIP® Plus Chromatin IPキット

この例では、SimpleChIP® Plus Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads) #9005を用いて 4×10^6 個のHCT 116細胞からクロスリンクしたクロマチンを調製し、Tri-Methyl-Histone H3 (Lys4) (C42D8) Rabbit mAb #9751によるクロマチン免疫沈降を行いました。SimpleChIP® ChIP-seq Multiplex Oligos for Illumina® (Dual Index Primers) #47538を使用して、Input DNA 50 ng、または50、5、0.5 ngのChIP濃縮DNAからDNAライブラリーを調製し、1つのサンプルにプールしてIllumina® Next-SeqプラットフォームでNGS解析しました。H3K4me3修飾されることが知られるGAPDH遺伝子の全体を図示しました。クロマチンの完全性を保護し、アッセイの信頼性を高める試薬を使用しました。

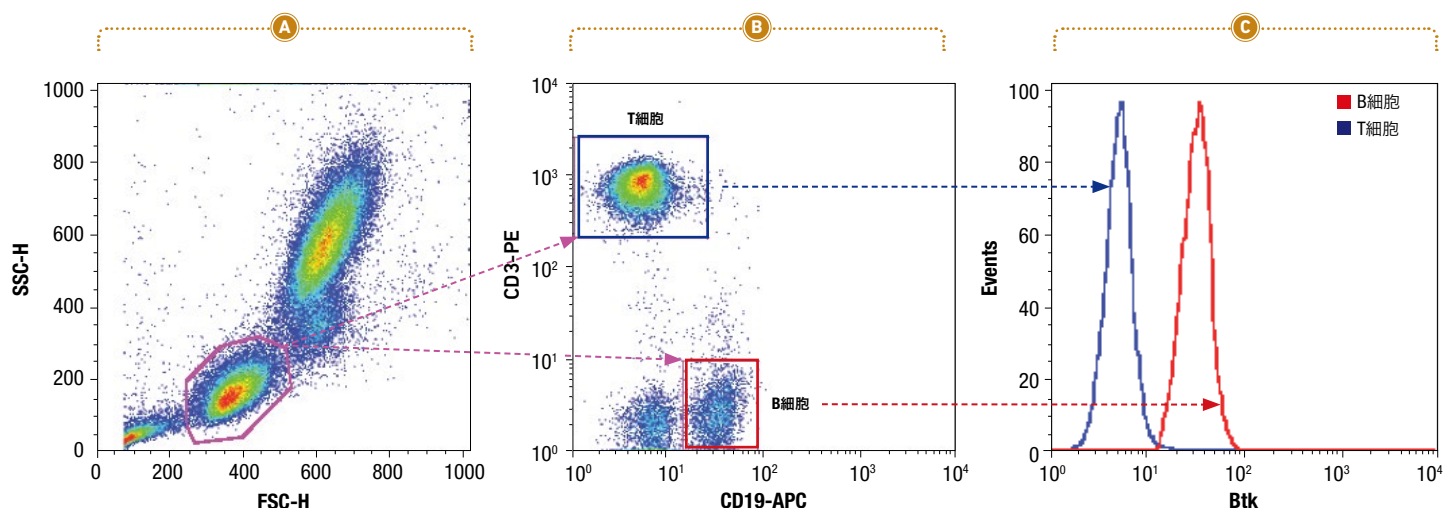
CSTは、全てのChIP検証済み抗体でChIPでの力価測定を実施し、最適な抗体希釈率を決定しています。それぞれの抗体ごとに最適化したプロトコールを作成しており、実験を成功させるために必要な情報を提供しています。



フローサイトメトリー

抗体の特異性に不安はありませんか？

Btk (D3H5) Rabbit mAb #8547を用いることで、ヒト全血からB細胞を選択的に単離できます。



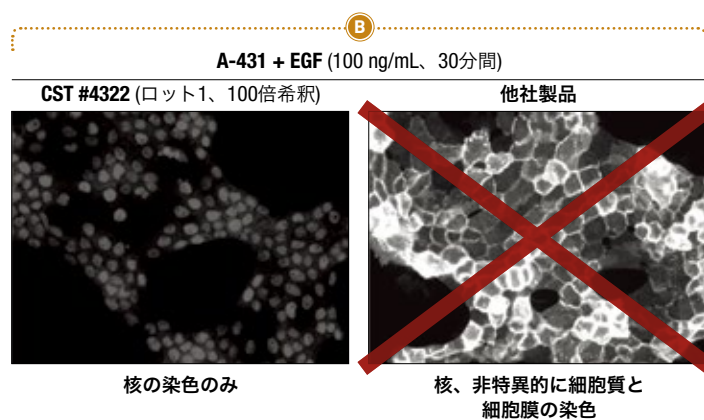
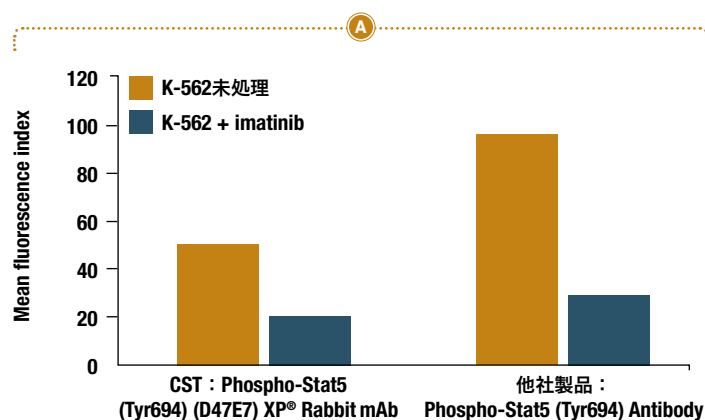
Btk (D3H5) Rabbit mAb #8547 : CSTのFlow Alternateプロトコールに従って、ヒト全血サンプルの固定、赤血球溶解、透過処理を行い、Btk (D3H5) Rabbit mAb #8547を用いて染色しました。散乱光の情報から、(A) に示したようにゲートを設定し、また、細胞を同時にCD3-PEとCD19-APCで染色することで、T細胞とB細胞の亜集団を (B) に示したように分離しました。B細胞集団 (赤)、T細胞集団 (青) にそれぞれゲートを設定し、Btkの蛍光強度のヒストグラムを (C) に描出しました。二次抗体には、Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate) #4412を使用しました。

複数のアプリケーションによる抗体の検証

CSTのPhospho-Stat5 (Tyr694) (D47E7) XP® Rabbit mAb #4322と他社製品との比較において、CSTのフローサイトメトリーチームは、他社製品でより強いシグナルが得られることを見出しました。しかし、さらに調査を進めると、他社のPhospho-Stat5抗体は、免疫蛍光染色 (B) やウェスタンブロット (データ非掲載) でRTKへの交差反応があることが分かりました。このことは、抗体の特異性を検証する際、複数のアプリケーションで試験することの重要性を示しています。

フローサイトメトリー解析のみでは、どちらの抗体でも適切なシグナルが得られているようにみえます

さらにIF試験を行うことで、CST抗体のみで適切な細胞染色像が得られ、その特異性が実証されました



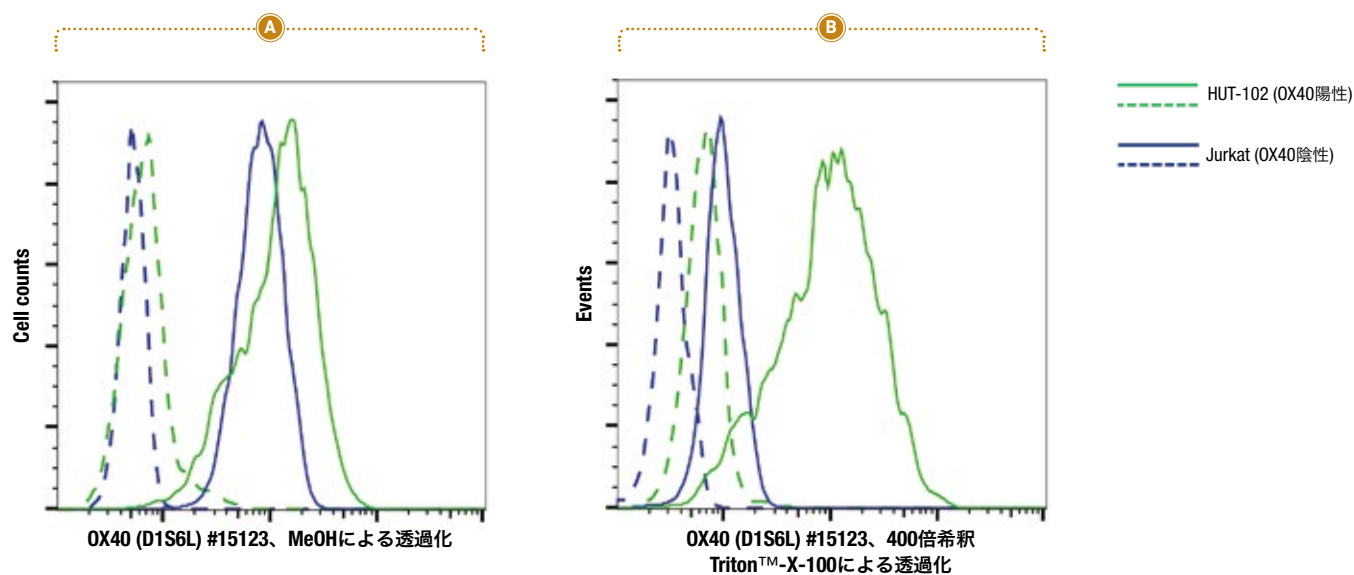
他社のPhospho-Stat5 (Tyr694) 抗体を用いたフローサイトメトリー解析では、Phospho-Stat5 (Tyr694) (D47E7) XP® Rabbit mAb #4322より強いシグナルが検出されました (A)。しかしながら、免疫蛍光染色による解析では、他社製品では細胞質と細胞膜に不適切な染色がみられます。一方で、#4322では核のみの適切な染色がみられました (B)。

プロトコールと試薬の最適化にお悩みではありませんか？

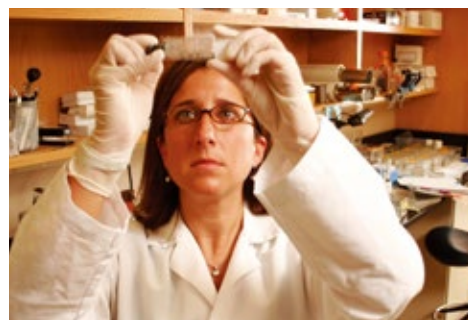
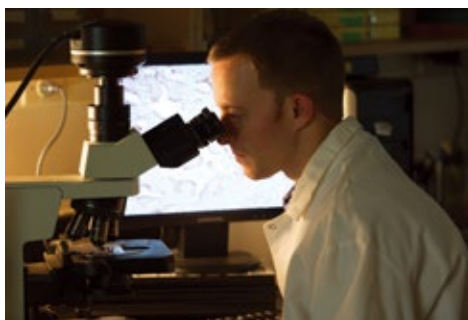
CSTは検証プロセスの一環として、それぞれの抗体ごとに最適な希釈率と染色プロトコールを特定し、この情報をお客様へ提供しています。

抗体性能を最大化させるためのプロトコールの最適化

S/N比を最大化するために、複数のプロトコールで試験を実施しています。



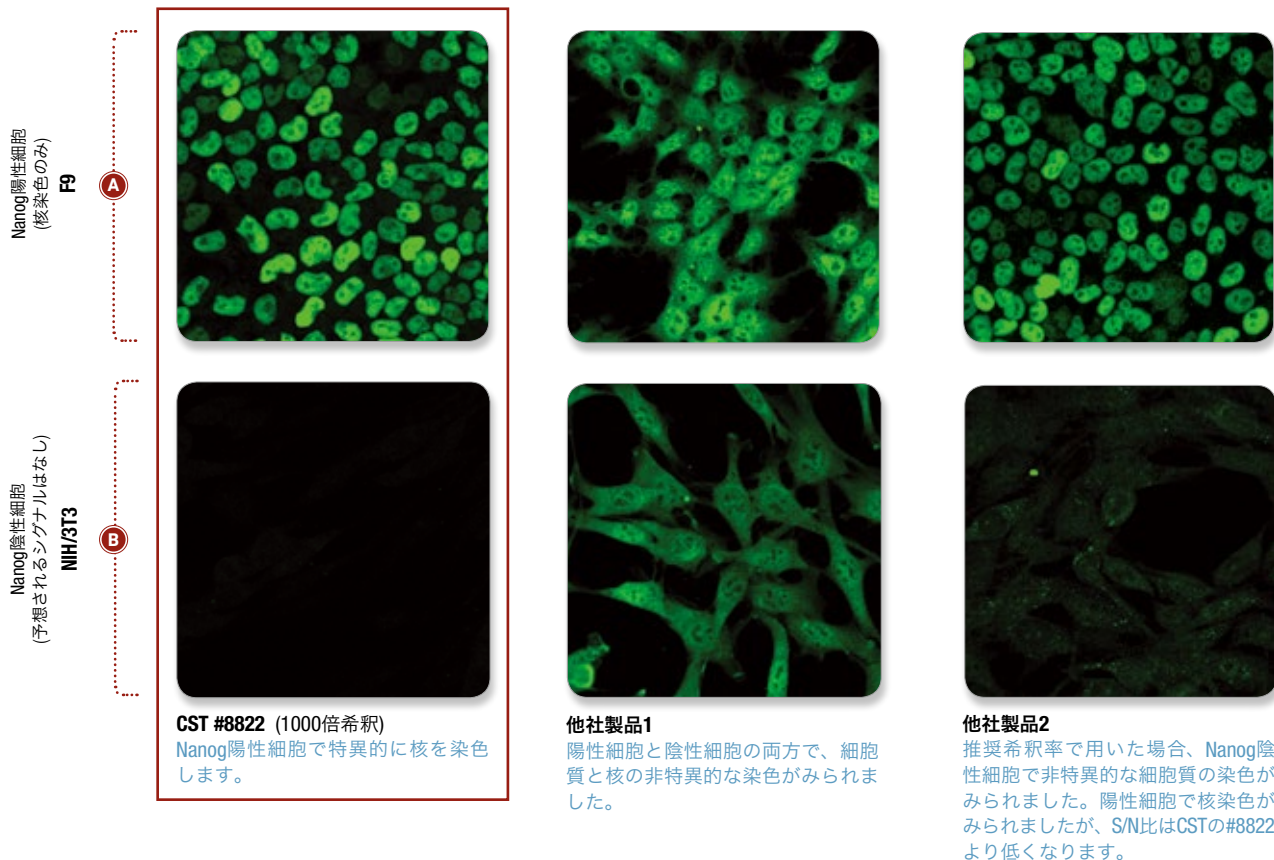
メタノールで透過化しOX40 (D1S6L) Rabbit mAb #15123で染色した場合、Jurkat細胞 (OX40陰性) でHUT-102 (OX40陽性) に匹敵するシグナルがみられ、非特異的結合が示唆されます (A)。一方、Triton™ X-100で透過化した場合は、非特異的結合は著しく低減し、同じ濃度の抗体で高いS/N比が得られました (B)。



IF (免疫蛍光染色)

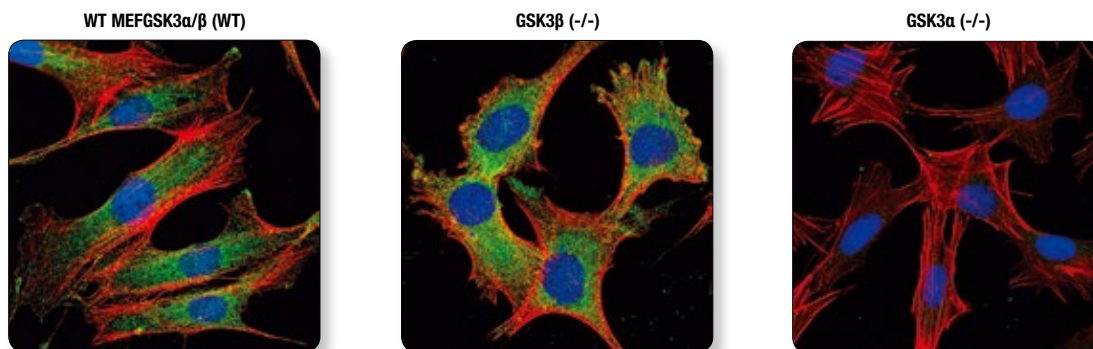
抗体の特異性に不安はありませんか？

Nanog陽性 (F9) 細胞と陰性 (NIH/3T3) 細胞の染色像を比較することで、CSTのNanog (D2A3) XP® Rabbit mAb #8822は他社製品より優れた特異性を持つことが分かります。



Nanog (D2A3) XP® Rabbit mAb (Mouse specific) #8822の特異性の検証：F9 (Nanog陽性) 細胞 (上) と NIH/3T3 (Nanog陰性) 細胞 (下) を、CSTの#8822と他社の2製品で免疫蛍光染色し、染色像を共焦点顕微鏡で解析し比較しました。全ての抗体は、メーカーの推奨する条件に従って使用しました。

マウス胚性線維芽細胞 (MEF) を用いたGSK3α (D80D1) XP® Rabbit mAb #4818の特異性の検証

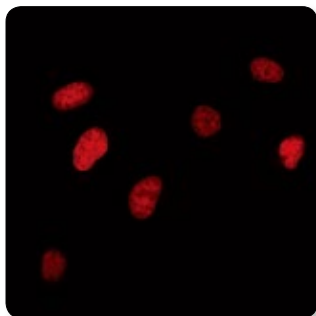


遺伝子改変MEFを用いたGSK3α (D80D1) XP® Rabbit mAb #4818の特異性の検証：MEF/GSK-3野生型細胞 (左)、MEF/GSK-3β (-/-) 細胞 (中央)、MEF/GSK-3α (-/-) 細胞 (右) をCSTの#8418 (緑) で免疫蛍光染色し、染色像を共焦点顕微鏡で解析しました。アクチンフィラメントをDY-554 Phalloidin (赤) で可視化し、DRAQ5® #4084によるDNA染色像を青色の擬似カラーで示しました。野生型、GSK-3α (-/-)、GSK-3β (-/-) MEF細胞は、トロント大学Jim Woodgett博士のご厚意によりご提供いただきました。

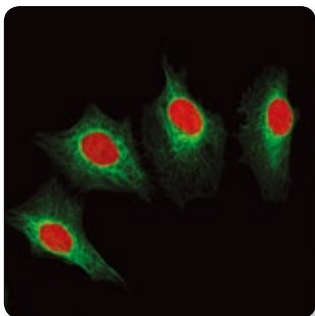
免疫蛍光染色プロトコルの最適化にお悩みではありませんか？

CST製品を使用することでプロトコルの最適化に費やす時間と試薬を節約することができます。CSTは、様々な固定と透過化の条件を試験して、それぞれの抗体で最適な結果が得られるプロトコルを作成しています。

ホルムアルデヒド



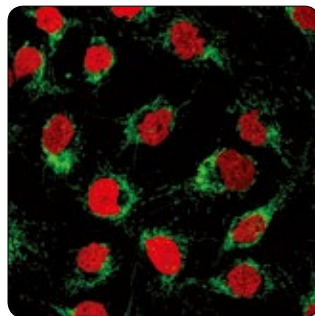
メタノール



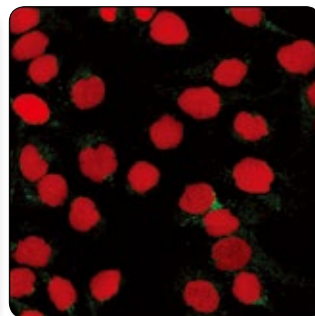
メタノール固定が最適

Keratin 8/18 (C51) Mouse mAb #4546の固定と透過化の条件の検討：HeLa細胞をそれぞれホルムアルデヒド (左) とメタノール (右) で固定し、CSTの#4546 (緑) で染色しました。赤色はPropidium Iodide (PI)/RNase Staining Solution #4087による染色像です。

ホルムアルデヒド

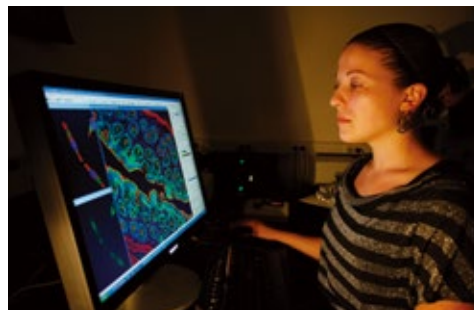
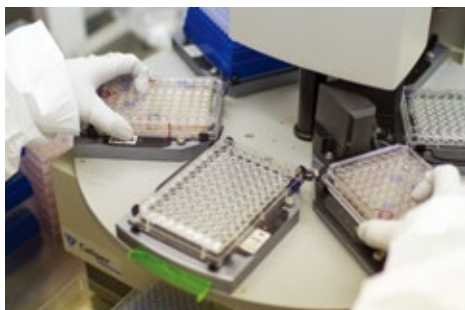


メタノール



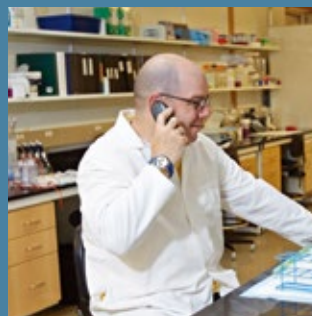
ホルムアルデヒド固定が最適

AIF (D39D2) XP® Rabbit mAb #5318の固定と透過化の条件の検討：HeLa細胞をそれぞれホルムアルデヒド (左) とメタノール (右) で固定し、CSTの#5318 (緑) で染色しました。赤色はPropidium Iodide (PI)/RNase Staining Solution #4087による染色像です。



科学的再現性と抗体の検証に関する詳細情報のリソースと参考文献

- Bordeaux J et al (2010) Antibody Validation. *Biotechniques* 48(3), 351.
- Prinz F et al (2011) Believe it or not: how much can we rely on published data on potential drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery* 10, 712-3
- Begley CG and Ellis LM (2012) Raise standards for preclinical research. *Nature* 483, 531-3
- Freedman LP et al (2015) The Economics of Reproducibility in Preclinical Research. *PLoS Biology* 13(6), e1002165
- Baker M (2016) Is There A Reproducibility Crisis: A Nature survey lifts the on on how researchers view the 'crisis' rocking science and what they think will help. *Nature* 533, 452-4
- Baker M (2017) Reproducibility project yields muddy results. *Nature* 541, 269-70
- Schonbrunn A (2014) Editorial: Antibody Can Get It Right: Confronting Problems of Antibody Specificity and Irreproducibility. *Mol Endocrinol* 29(9), 1403-7
- Baker M (2015) Blame it on the antibodies. *Nature* 521, 274-6
- Weller MG (2016) Quality Issues of Research Antibodies. *Analytical Chemistry Insights* 11, 21–27
- Howat WJ et al (2014) Antibody validation of immunohistochemistry for biomarker discovery: Recommendations of a consortium of academic and pharmaceutical based histopathology researchers. *Methods* 70(1), 34-8
- Roncador G (2015) The European antibody network's practical guide to finding and validating suitable antibodies for research. *mAbs* 0(0), 1-10
- Uhlen M et al (2016) A proposal for validation of antibodies. *Nature Methods* 13(10), 823-7
- GBSI Workshop Report: Antibody Validation Strategies, Policies and Practices (2016)



テクニカルサポート

CSTが最も優先すること、それは優れた顧客サービスとテクニカルサポートを提供することです。日々実験台に向い、抗体の製造と検証に取り組んでいるCSTの研究者は、それぞれの抗体の性能について実践的な経験と知識を備えています。テクニカルサポートにおいては、これらの研究者自身が、この過程で培った経験と知識を駆使して電話や電子メールでお客様の質問にお答えし、実験のトラブルシューティングをお手伝いいたします。

テクニカルサポート：
www.cellsignal.jp/support

Cell Signaling Technology (CST) は、研究者によって設立された株式非公開の家族経営の研究組織で、高品質な生物医学研究ツールを開発、提供することに全力で取り組んでいます。米国マサチューセッツ州にある本社の他、日本、中国、オランダにオフィスを構え、全世界で従業員が働いています。

テクニカルサポート : www.cellsignal.jp/support

www.cellsignal.jp

CST Antibody Performance Guarantee: To learn more, please visit: www.cellsignal.jp/abguarantee.

