

ウェスタンブロットィング ～ブロッキング～

2023年4月30日

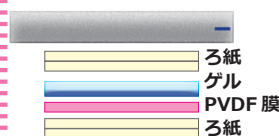
1. 概要

ウェスタンブロットィングのPVDF膜（メンブレン）などはタンパク質が結合しやすい素材です。ブロッキングは転写されたタンパク質バンドがない膜表面に抗体や検出用の酵素、他のタンパク質などが非特異的に結合するのを防ぎます。ブロッキング剤の選択により検出感度やバックグラウンドの出方は大きく影響されるため、実験結果が全く変わったものになります。今回はアトーの製品を使用したウェスタンブロットィングのブロッキングの特徴についてご紹介いたします。

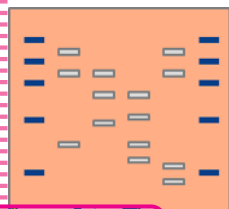
2. 実験の流れ

サンプル調製

電気泳動



トランスファー



ブロッキング

抗体反応

検出

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりタンパク質を分離します。目的タンパク質の分子量が不明な場合は濃度勾配ゲルを使用します。また転写効率の目安となる有色の分子量マーカーなどを使用します。発現量を比較する場合はコントロールサンプルと一緒に流します。電気泳動後、分離したタンパク質をゲルから PVDF 膜に転写します。

ゲル・電極液
ePAGE HR, EzRun, EzProteinLadder
トランスファーバッファー
EzFastBlot HMW
トランスファーパック
QBlot kit M
電気泳動槽・パワーサプライ
PageRun-Ace, MyPower
プロッター・パワーサプライ
HorizeBLOT

タンパク質バンドがない膜表面に、抗体が非特異的に結合しないようにブロッキングします。

ブロッキング剤
EzBlockChemi
シェーカー
SeesawShaker atto

ブロッキング後、抗体反応をし、ターゲットを検出します。

抗体・洗浄液
EzTBS, EzTween
発光・発色基質
EzWestLumiOne
化学発光撮影装置
Luminograph I/II/III/III Lite

3. 実験方法

3-1. 電気泳動～トランスファー

目的タンパク質の分子量が分離できるアクリルアミド濃度のゲルを使用し、目的タンパク質の転写に適した転写バッファーと方法を選択します。

電気泳動

高分子の場合：できるだけ低濃度のアクリルアミドを使用します。7.5% 以下の濃度のアクリルアミドゲルは取り扱いが難しいため、その場合は濃度勾配ゲルを使用します。

低分子の場合：一般的には高濃度のアクリルアミドゲルを使用しますが、転写効率が著しく下がります。電気泳動バッファー EzRun MOPS を使用すると、10% 前後のアクリルアミドゲルでも低分子側のバンドが分離でき、且つアクリルアミド濃度が均一のため、ブロットィング前後でのゲルの変形も防ぐとともに、高効率に転写することが可能になります。

転写

高分子の場合：150kDa 以上の高分子は転写効率が著しく悪いので、高分子専用のトランスファーバッファーである EzFastBlot HMW を用いたセミドライブロットィング、もしくはタンク式プロッターを使用します。また転写前にゲルをトランスファーバッファーで平衡化（約 30 分間）するとタンパク質の転写効率が高くなる場合があります。ただし平衡化の時間が長くなると低分子バンドが消失したりバンドが拡散するので注意が必要です。

低分子の場合：低分子タンパク質（～200kDa）を転写する場合、EzFastBlot を使用すると約 10 分間の短時間で、高効率に転写することができます。QBlot kit シリーズは、ブロットィング膜やブロットィングバッファーの調製が不要なので、作業時間をさらに短縮でき、より高効率に転写することが可能です（最短 5 ～ 10 分の転写時間）。低分子の場合、ブロットィング膜から抜ける場合がありますので、ポアサイズが 0.2 μm の PVDF 膜（P plus 膜）を使用します。またトランスファーバッファーにメタノールを添加すると膜への吸着がよくなります（EzFastBlot シリーズにはメタノールを添加しないでください）。

3-2. ブロッキングの準備

電気泳動～転写を行っている間にブロッキングの準備をします。

ブロッキング溶液 ミニゲル 1 枚当たり 50mL 準備します。

下表を参照して目的分子の検出法などからブロッキング溶液を選択します。

ブロッキング剤	スキムミルク	EzBlock Chemi	EzBlock BSA	EzBlock CAS
Cat#	-	AE-1475	AE-1476	AE-1477
主成分	牛スキムミルク	合成ポリマー	牛アルブミン	牛カゼイン
反応時間	30-60min	5-60min	15-60min	15-60min
アビジン-ビオチン	NG	OK	OK	NG
リン酸化タンパク質	NG	OK	OK	NG

※ EzBlock Chemi/BSA/CAS は蒸留水で 5 倍希釈して使用します。EzBlock BSA/CAS は試薬に添付された Tween20 も 1/100 量添加します。

※スキムミルクは 1～5% 濃度で TBS-T あるいは PBS-T に溶解してブロッキング溶液とします。

洗浄液 ミニゲル 1 枚当たり 500mL 準備します。

TBS-T: EzTween（あるいは 0.01～0.1% Tween 20）含有 1 × EzTBS（あるいは 50 mM Tris, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl/pH7.4）

PBS-T: EzTween（あるいは 0.01～0.1% Tween 20）含有 1 × EzPBS（あるいは 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 81 mM Na₂HPO₄, 14.7 mM KH₂PO₄）
※リン酸化タンパク質を検出する際は、なるべく TBS-T を使用します。

抗体

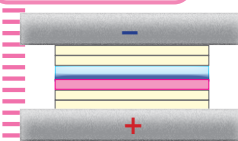
一般的にターゲットタンパク質に対する 1 次抗体と検出用の酵素や蛍光が標識された 2 次抗体を準備します。1 次抗体が直接標識されている場合は 2 次抗体は不要です。

抗体の希釈率は抗体や検出試薬の添付文書を参考にして決めます。サンプルや時間に余裕がある場合は、ドットブロットィングで適切な抗原の検出感度になるように希釈率を検討します。また抗体の希釈は抗体反応の直前に行います。抗体を希釈した状態で長時間置くと失活する場合があります。

3-3. 膜のブロッキング方法

下記に従って膜のブロッキング処理をします。

ブロットィング



ブロットィング終了後、プロッターのふたを外し、ゲルとブロットィング膜を回収します。

ゲルの染色



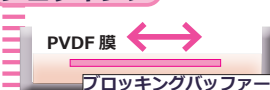
「オプション」
転写ムラや転写効率を調べるために、転写後ゲルに残っているバンドを CBB 染色液で染色します。

膜の洗浄



ブロットィング膜を TBS-T/PBS-T に浸漬し、20～30 秒間軽く洗浄します。
※洗浄後のブロットィング膜は、風乾後、密閉して -20℃ で保存できます。

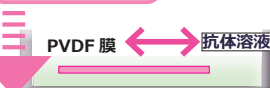
ブロッキング



ブロットィング膜をブロッキング溶液に浸漬し、室温で～30 分間浸透しながらインキュベーションします。

※ブロッキング時間が長くなるとオーバーブロックになり、検出感が悪くなります。逆に短すぎると十分にブロッキングされず、バックグラウンドが上がったり、非特異的バンドが出現する要因になります。

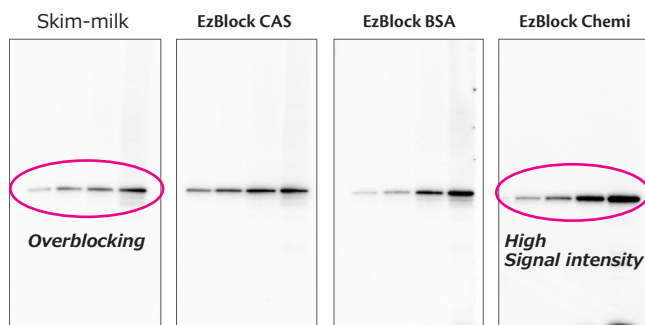
抗体反応



ブロッキング終了後、希釈した抗体溶液に浸漬します。

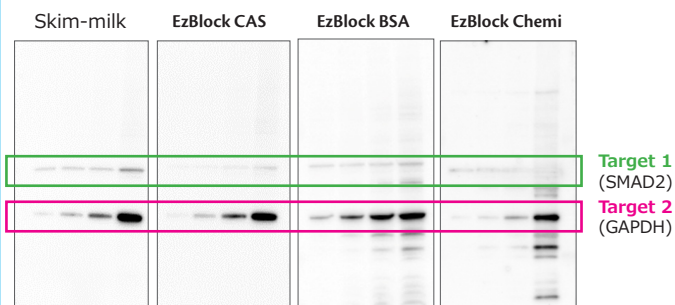
3-4. 参考データ

実験例 1：ブロッキングバッファーによる違い



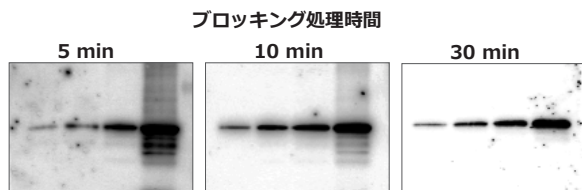
上図はブロッキング剤による違いが（左から3% スキムミルク / TBS-T, EzBlock CAS, EzBlock BSA, EzBlock Chemi）実験結果に与える影響を検討した結果を示しています。Hela 細胞抽出液を段階希釈して電気泳動し、EzFastBlot で P plus 膜に転写後、それぞれのブロッキング剤で 30 分間ブロッキング処理を行なった後、SMAD2 タンパク質に対する抗体で抗体反応を行い、EzWestLumi plus で検出しました。スキムミルクを使用した場合、シグナルが弱くなり、低濃度のバンドが検出しにくくなります（オーバーブロッキング）。EzBlock CAS は主成分がスキムミルクのブロッキングに寄与するタンパク質でもあるカゼインから成りますが、精製カゼインタンパク質を使用しているため、低濃度のバンドもマスクされずに検出できます。一方、EzBlock Chemi は主成分がタンパク質ではなく合成ポリマーから成りますが、バックグラウンドを抑え、非特異的なバンドの出現もなく、マスクされずにタンパク質濃度に比例したシグナルを検出できることを示しています。このように、ブロッキング剤はバンドの検出感度や強度に大きな影響を与えることが判ります。

実験例 3：抗体剥離とブロッキング剤



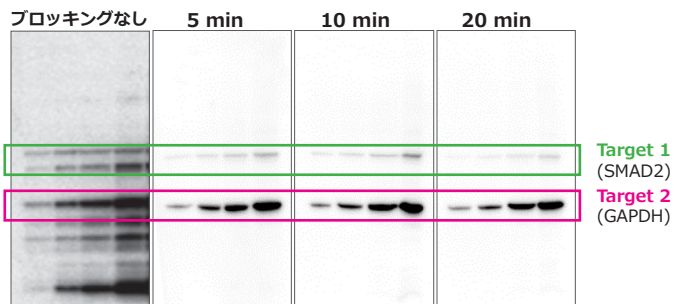
上図は EzReprobe により最初の検出で使用した抗体を剥離した後に、様々なブロッキング剤により（左から3% スキムミルク / TBS-T, EzBlock CAS, EzBlock BSA, EzBlock Chemi）再ブロッキングした際に、実験結果にどのような影響を与えるかを検討した結果です。Hela 細胞抽出液を段階希釈して電気泳動し、EzFastBlot で P plus 膜に転写後、EzBlock Chemi で 30 分間ブロッキング処理を行なった後、SMAD2 タンパク質に対する抗体で抗体反応を行い、EzWestLumi plus で検出しました。EzReprobe と 10 分間インキュベーションして抗体を剥離し、再度上記のブロッキング剤でブロッキングを行いました。その後 GAPDH に対する抗体と反応して、最終的に得たシグナルを EzWestLumi plus で検出した結果を上図は示しています。上記の結果のように、スキムミルクを使用した際は Target 1 の非特異的シグナルが除けず、EzBlock BSA を使用した場合は、非特異的バンドが検出される結果となりました。一方、EzBlock CAS を使用すると、非特異的バンドの出現が抑えられ、2 回目の抗体反応によるシグナル (Target 2) が十分なシグナル強度で検出できます。このように、抗体剥離後のリプロービング前に行うブロッキングには、EzBlock CAS を使用すると非特異的バンドの出現やバックグラウンドを抑えられ、きれいな結果を得ることができます。

実験例 2：ブロッキング時間による違い



上図はブロッキングの処理時間（左から5分間、10分間、30分間のインキュベーション時間）が実験結果に与える影響を検討した結果を示しています。Hela 細胞抽出液を段階希釈して電気泳動し、EzFastBlot で P plus 膜に転写後、それぞれ EzBlock Chemi で 5～30 分間ブロッキング処理を行なった後、SMAD2 タンパク質に対する抗体で抗体反応を行い、EzWestLumi plus で検出しました。ブロッキング時間が5分間と短いとバックグラウンドが高く、非特異的なバンドが検出されますが、適正な時間行えばバックグラウンドを低く抑えられ、且つ各バンドを明瞭に検出できます。EzBlock Chemi を使用した場合、ブロッキング力が強いので上記の結果のように10分間のブロッキング時間でも十分なブロッキング効果が得られます。もちろん30分間ブロッキング処理を行った方が、非特異的なバンドが検出されず、バックグラウンドも抑えられますが、低濃度のタンパク質バンドはシグナル強度が若干弱くなります。しかしこれらの結果は、一概にブロッキング時間の影響だけでは説明できず、ブロッキング剤と膜およびサンプルによって左右されます。いずれにしても、ブロッキング時間はバンドの検出感度や強度に大きな影響を与えることが判ります。

実験例 4：抗体剥離とブロッキング時間



上図は EzReprobe により最初の検出で使用した抗体を剥離した後に再ブロッキングする際、ブロッキング時間によって実験結果にどのような影響を与えるかを検討した結果です。Hela 細胞抽出液を段階希釈して電気泳動し、EzFastBlot で P plus 膜に転写後、EzBlock Chemi で 30 分間ブロッキング処理を行なった後、SMAD2 タンパク質に対する抗体で抗体反応を行い、EzWestLumi plus で検出しました。EzReprobe と 10 分間インキュベーションして抗体を剥離し、再度 EzBlock CAS で 5 分間、10 分間、20 分間インキュベーションして再ブロッキングを行いました（ブロッキングなし：再ブロッキングをせずに抗体反応を行った）。その後 GAPDH に対する抗体と反応して、最終的に得たシグナルを EzWestLumi plus で検出した結果を上図は示しています。上記の結果のように、再ブロッキングをしない場合は非特異的バンドの出現が顕著になります。逆に再ブロッキングの時間は5分間でも十分な効果が得られ、時間を20分間まで伸ばすことにより、リプロービングした Target 2 のシグナル強度は維持したまま、剥離した抗体 (Target 1) の残存シグナルが弱くなり、きれいな結果が得られることが示されました。このように、抗体剥離後のリプロービング前に行うブロッキングは必須であり、短時間のブロッキング処理でも十分な効果が得られることが判ります。

関連製品

WSE-6300 LuminoGraph III ルミノグラフⅢ

製品情報 (WEB)



ATTO LuminoGraph III は解像力の高い 6M CCD カメラと世界最高峰の明るさ「F0.8」を誇るレンズを搭載したタッチパネル式ケミカル撮影システムです。

カメラ 絶対感度校正 高感度・高解像度冷却 CCD カメラ
撮影画素数 2750 × 2200 16bit
撮影サイズ 10 × 7.5cm/14 × 10cm
18 × 13cm/26 × 20cm
4 ポジション・オートフォーカス

※ アトー HP の「実験のコツ」ページから「ウエスタンブロットティングのコツ」がダウンロードできますので、ご覧ください。
<https://www.atto.co.jp/>

アトー株式会社

■ 東京本社 〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2
☎ (03)5827-4861 ☎ (03)5827-6647
■ 大阪支店 〒530-0044 大阪府北区東天満2-8-1 若杉センタービル別館 5F
☎ (06)6136-1421 ☎ (06)6356-3625
■ メンテナンスサービス 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6
☎ (03)5818-7567 ☎ (03)5818-7563

■ URL <https://www.atto.co.jp/> お問い合わせ WEB会員登録の上お問合わせフォームより