

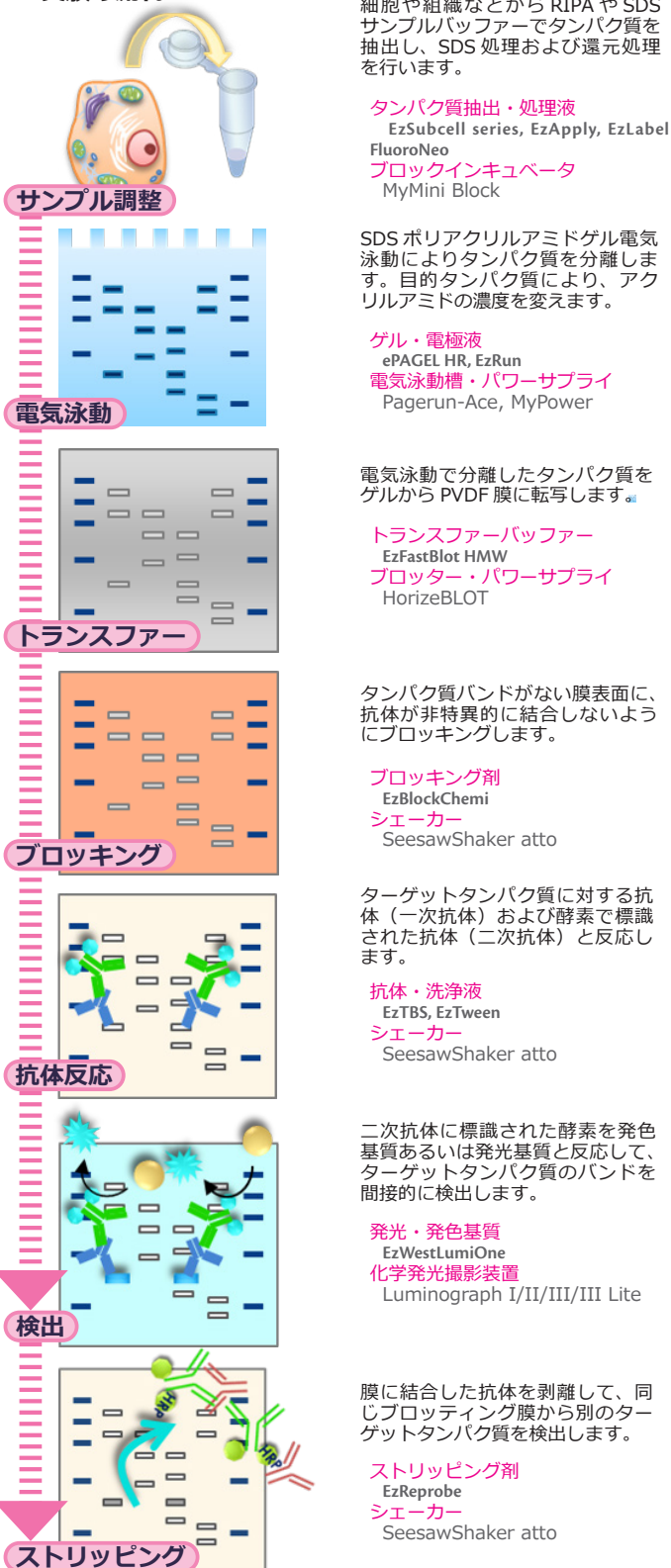
ウェスタンブロットリングの基本操作

2023年4月30日

1. 概要

ウェスタンブロットリングはタンパク質サンプル中に含まれる特定のタンパク質の発現量を確かめるために使われる一般的な手法です。実験操作は簡単ですが、なかなか思うようなデータを取ることができないといった経験を持つ方は多いのではないのでしょうか。今回はアトーの製品を使用したウェスタンブロットリングの基本操作についてご紹介します。

2. 実験の流れ



3. 機器・試薬・材料

- 細胞・組織サンプル等（例：Hela細胞）
- EzApply/EzLabel FluoroNeo・・・タンパク質抽出・処理液
- e-PAGEL-HR・・・プレキャストゲル
- EzRun・・・電極液
- P plus 膜・・・PVDF膜
- アブソベントペーパー・・・ろ紙
- EzTBS・・・洗浄液（Tris buffer saline）
- EzTween・・・洗浄液に添加する界面活性剤
- EzFastBlot・・・トランスファーバッファー
- EzBlockChemi・・・ブロッキング剤
- EzWestLumi plus・・・HRP発光基質
- MyMini BLOCK・・・ヒートブロックインキュベーター
- Rapidus Mini, Pagerun・・・電気泳動槽
- MyPower・・・パワーサプライ
- HorizeBLOT, PoweredBLOT・・・セミドライプロッター
- Luminographシリーズ・・・発光撮影装置
- 一次抗体（例：抗ヒトトランスフェリン-ウサギ抗体）
- HRP標識2次抗体（例：HRP標識抗ウサギIg抗体）
- ピンセット
- サランラップ
- トレイ（ゲルサイズより一回り大きいもの）
- SeesawShaker atto・・・シーソーシェーカー

4. 実験方法

4-1. サンプル調整

- ① 50 μ L のサンプルに 50 μ L の EzApply (2 \times 濃度、DTT 添加済み) を加えて混合します。
- ② MyMiniBlock で 95 $^{\circ}$ C 5 分間加熱します（煮沸でも OK）。
- ③ 15,000rpm で 5 分間遠心し（しなくても OK）上清を回収します。

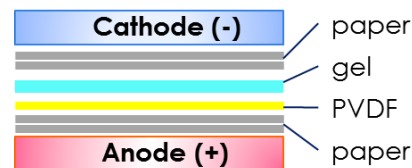
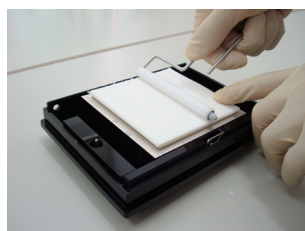
4-2. 電気泳動

- ① e-PAGEL-HR（プレキャストゲル）を Pagerun Ace（電源付電気泳動装置）にセットします。
- ② 1 レーンあたり 5 ~ 10 μ L のサンプルをアプライします。
※サンプル濃度は精製タンパク質では 100ng ~ 1 μ g/lane、抽出液では 1 ~ 50 μ g/lane が適当です。
- ③ スタートボタンを押して電気泳動を開始します。
※ High mode (24W) で 35 分、もしくは Standard mode (20mA/gel) で約 80 分間泳動します。



4-3. トランスファー

- ① あらかじめ P plus 膜をメタノールで浸水処理し（5 秒）、EzFastBlot に浸漬しておきます（15 分以上振とうします）。
- ② 電気泳動後のゲルを EzFastBlot で洗浄し、下図のように陽極側（下）からろ紙 2 枚、P plus 膜、ゲル、ろ紙 2 枚の順に重ねます。ろ紙は重ねる直前に EzFastBlot に浸漬します。
※空気を専用ローラーを使って押し出し、ろ紙、膜、ゲルを密着します。
- ③ スタートボタンを押してトランスファーを開始します。
※ Rapid mode (20 ~ 25V/gel) で 10 ~ 15 分通電します。



ローラーで軽く押さえて密着します。このときローラーは端で止めず、転がし切ると空気が抜けず。

陰極側（上部）にゲル、陽極側（下部）に PVDF 膜がくるように重ねます。タンパク質は負電荷を帯びているため、陽極側に移動して転写されます。

4-4. ブロッキング

- ①トランスファー後の **P plus** 膜をブロッキング剤に浸漬し、室温で 30 分振とうします (50 mL/gel)。

| 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 |

※スキムミルクは 3%前後の濃度で TBS-T に混合して使用します。
 ※ EzReprobe を使用する場合は EzBlockCAS の使用を推奨します。

4-5. 抗体反応

- ①一次抗体を 0.1% Tween 含有の **EzTBS** (TBS-T) もしくは EzPBS で希釈します (10mL/gel)。
 ※抗体の希釈率は抗体によって異なります。各抗体に添付された取扱説明書をご参考ください。一般的には数百~数千倍希釈です。
- ② **P plus** 膜よりも一回り大きい容器に①の抗体溶液を入れ、室温で 1 時間振とうしながら **P plus** 膜と反応します。
 ※抗体の反応時間と温度は抗体によって異なります。各抗体に添付された取扱説明書をご参考ください。一般的には室温および 37 度で 30 分~1 時間、もしくは 4℃で一晩反応します。
- ③抗体を捨てて 0.1% Tween 含有 **EzTBS** (TBS-T) を 50mL 添加し、5 分間振とうします (洗浄操作)。洗浄操作は 3 回以上繰り返して行います。
- ④ HRP 標識二次抗体を 0.1% Tween 含有の **EzTBS** (TBS-T) もしくは EzPBS で希釈します (10mL/gel)。
 ※抗体の希釈率は抗体によって異なります。各抗体に添付された取扱説明書をご参考ください。一般的には数千~数万倍希釈です。
 ※バックグラウンドが高い場合は抗体の希釈率を上げる、もしくは抗体希釈溶液にブロッキング剤を通常の 1/10 量添加すると軽減されます。
- ⑤洗浄後の **P plus** 膜に④の抗体を添加し、室温で 30 分間振とうしながら反応します。
 ※抗体の反応時間と温度は抗体によって異なります。各抗体に添付された取扱説明書をご参考ください。一般的には室温で 30 分~1 時間、もしくは 4℃で一晩反応します。
- ⑥抗体を捨てて 0.1% Tween 含有 **EzTBS** (TBS-T) を 50mL 添加し、5 分間振とうします (洗浄操作)。洗浄操作は 3 回以上繰り返して行います。
 ※洗浄しすぎるとシグナルが弱くなる場合があります。

4-6. 検出

- ① 検出方法および目的の検出感度に合わせて HRP 検出試薬を選択します (表参照)。
- ② PVDF 膜を HRP 検出試薬に浸漬して反応します。
 ※ **EzWestBlueW** を使用する場合、PVDF 膜と 5 ~ 30 分間、遮光しながら反応し、スキャナー等でスキャンしてデータを記録します。
 ※ **EzWestLumiOne** は PVDF 膜を浸漬した後、すぐに発光撮影装置で撮影し、データを取得してください。
 ※ **EzWestLumi plus** は Reagent A と Reagent B を 1 : 1 の等量で混合し、PVDF 膜を浸漬した後、すぐに発光撮影装置で撮影し、データを取得してください。
 ※検出試薬の使用量は 100 ~ 200 μ L/cm² です。ミニゲルサイズの場合、5mL 以上準備してください。

| HRP 検出試薬 | EzWestBlueW | EzWestLumiOne | EzWestLumi plus |
|----------|-------------------------|---------------------|----------------------|
| Cat# | WSE-7140 | WSE-7110 | WSE-7120 |
| 検出方法 | TMB による呈色 | Luminol による発光 | Luminol による発光 |
| 使用方法 | PVDF 膜を溶液に浸漬して 5 ~ 30 分 | PVDF 膜を溶液に浸漬してすぐに検出 | 使用前に A 液と B 液を等量混合する |
| 検出感度 | pg 低域 | pg 低域 | fg 中域 |
| 発光持続時間 | - | 1 時間 < | 3 時間 < |

4-7. ストリッピング

- ① 検出反応後のプロットング膜は、0.1% Tween 含有 **EzTBS** (TBS-T) でリンスした後、ストリッピングを行うまで TBS-T 中で冷蔵保存してください。
- ② 100mL の **EzReprobe** に対して、0.6g の Enhancer を添加して溶解します。
- ③ プロットング膜を **EzReprobe** に浸漬し、室温で 5 ~ 15 分間振とうします。
 ※抗原量が多い場合や抗体のタイターが高い場合には反応時間の延長する、もしくは反応温度を上げるとストリッピング効率が向上します。
- ④ **EzReprobe** を廃液し、**EzTBS**(Tween 20 含有) 等の洗浄液を数 mL 加えて容器の内壁を軽くすすぎます。
- ⑤ 約 30mL の Tween 20 含有 **EzTBS** を注ぎ 3 分間振とうします。
- ⑥ プロットング膜を **EzBlock CAS** 等のブロッキング溶液でブロッキングします。
- ⑦ 新たな一次抗体、二次抗体を順次反応させます。

実験例：EzReprobe とブロッキング試薬



左図の実験は **EzReprobe** とブロッキング剤の影響を検討した結果を示しています。まず HeLa 細胞から **EzRIPA Lysis kit** により抽出した細胞抽出液を **EzApply** と混合し、**MyMiniBlock** を用いて 95 度で 10 分間反応して泳動サンプルとしました。サンプルを段階希釈して 10% ePAGEL ゲルで泳動分離し、**EzFastBlot** で **P plus** 膜に 20V 定電圧で 10 分間転写しました。その後、**EzBlockChemi** で 30 分間ブロッキングし、抗 SMAD ラビットモノクローナル抗体と反応して、**EzWestLumi plus** でシグナルを検出しました。発光イメージを **Luminograph** で撮影後、**EzReprobe** と室温で 10 分間反応してストリッピングし、図示した各ブロッキング剤で 15 分間ブロッキングしました。抗 GAPDH ラビットポリクローナル抗体で反応した後、**EzWestLumi plus** でシグナルを検出し、**Luminograph** で撮影しました。左図の結果のように、**EzReprobe** でストリッピングした後は **EzBlockCAS** でブロッキングすると、バックグラウンドが低く抑えられ、非特異的なバンドが検出されず、きれいなデータが得られることが示されました。

その他

プロットングは同じプロトコルでもちょっとした手技の違いで大きく結果が異なることがあります。最適な結果を得るためには「コツ」も重要です。アトー HP「実験のコツ」ページより「ウエスタンプロットングのコツ」がダウンロードできますので、ご一読ください。 <https://www.atto.co.jp/>

アトー株式会社
ATTO

■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 大阪市北区東天満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