

ウエスタンブロットングのコツ

Tips for Western Blotting

1. はじめに

ウエスタンブロットングは、電気泳動、ブロットング、ブロッキング、抗体反応を経て目的のタンパク質を特異的に検出する実験方法です。しかし、この実験にはたくさんのステップがあり、そのうちのひとつでもうまくいかないと結果がでない非常に面倒な実験でもあります。

ウエスタンブロットングの実験がうまくいくと、目的のタンパク質のバンドが検出され、それ以外のバンドやバックグラウンドのシグナルが抑えられます。このような結果が得られないときは、検出までの多くの実験ステップのうち、どこかがうまくいかなかったことが考えられます。

「ウエスタンブロットングのコツ」とは、色々な失敗から得られた実験成功のための秘訣をまとめたものです。本セミナーでは特にブロットング(セミドライ)、ブロッキング、抗体反応、発光検出における実験操作で“ここを注意すれば成功する”と考えられる部分をクローズアップしてご紹介します。

2. トラブルの原因を推理する

「ウエスタンブロットングがうまくいかない」場合のトラブルシューティングには、まず原因追究が必要です。そのために、「失敗した実験結果」を分析し、実験ステップを遡ってなにが原因だったのかを推理します。実験結果は、「バンドが見えない」、「バンドが見えにくい」、「分析できない」などと分類して分析すると原因を推理しやすくなります。(図1参照)

「バンドが見えない」というのは、バックグラウンドが高く、膜全体が発光(発色)してバンドが確認できないことや、検出してもバックグラウンドも含め何も光らない(何も見えない)様な状態を指します。

「バンドが見えにくい」というのは、基本的に目的のバンドは見えているが、バックグラウンドが不均一に高い、バンドのシグナルが弱く確認しにくい、膜全体に斑点状のスポットが検出されている、バンド自体に抜けや濃さのムラがあるなどの状態を指します。



図1 原因特定のための実験結果分析

「分析できない」というのは、前出の2種類のほかにバンドの一部が消失していたり、定量性が低くダイナミックレンジが狭かったり、検出バンドがたくさん出てしまう特異性の問題などがあります。

ウエスタンブロットングには、大きく分けて6つのステップがあります。トラブルの解決にはこのステップのどこで問題が生じているのかを探る必要があります。(図2)

STEP 6	発光検出	ECL®, Supersignal®など
	↑	
STEP 5	抗体反応	1次抗体 > 酵素標識2次抗体
	↑	
STEP 4	ブロッキング	スキムミルクなどによるブロッキング
	↑	
STEP 3	ブロットング	セミドライ方式、ゲル→膜へ蛋白質を移動
	↑	
STEP 2	電気泳動	蛋白質を分離
	↑	
STEP 1	サンプル処理	電気泳動用に蛋白質を調製

図2 ウエスタンブロットングのステップ

3. トラブルの解決方法

3-1 「バンドが見えない」

「バンドが見えない」トラブルは図3のような実験結果になることがあります。一つは膜全体が発光(発色)してしまうことでバンドが確認できない状態です。図3に示したように、これは発光検出、抗体反応、ブロッキングのステップが原因となるトラブルです。状態としては、酵素標識2次抗体が膜全体に付着して、全体が光っています。特に、抗体反応のあとの洗浄ステップが不十分なときに発生しやすくなります。洗浄ステップ(例: 10分×3回)の前に、洗浄バッファー(TBS-TやPBS-T)で2, 3回すすぎをすると、残留抗体量が減り、洗浄効果が向上します。さらに、2次抗体の希釈率を上げる(濃度を低くする)ことも効果的です。また、ブロッキングが不十分だと、1次抗体が非特異的に結合するため、結果として膜全体が検出されてしまいます。

なにも検出されない場合は、目的蛋白質の量が検出限界よりも少ない場合が考えられます。この場合はサンプル調製、ゲルへの添加量などを再度チェックする必要があります。また、1次抗体の性能やロットの出来によっては検出できない場合があります。抗体をチェックするために予め、ドットプロット等で目的蛋白質の検出ができることを確認しておきます。

プロットは転写効率が低いと検出感度が上がらないため、ゲル、膜、ろ紙の密着度を上げることと、転写溶液を作り直すことをお勧めします。また、転写後のゲルをCBB染色し、プロットが成功していることを確認しておきます。



図3 バンドが見えない例

(左)バックが高くバンドが見えないパターンと関連の深いステップ。(右)バックを含め何も見えないパターンと関連の深いステップ。

3-2 「バンドが見えにくい」

「バンドが見えにくい」トラブルは、膜上の汚れが原因となります。これは、多くの場合抗体反応とプロットステップに原因があります。(図4参照)バックグラウンドが模様のように汚れている場合は、抗体溶液量が少ないこと、振とうが十分でないことなどが原因となります。これを防止するには、抗体量は同じで、溶媒(ブロッキング溶液)の量を増やし抗体溶液量を増加させ、シーソー式や水平式の振とう器を使って膜全体に溶液を均一に動かすように振とうします。合わせて洗浄ステップのすすぎをよく行うことでバックグラウンドが抑えられます。

膜全体に斑点状のスポットが検出される場合は、抗体溶液の保存中に抗体同士が凝集してしまったものが膜に付くことが原因です。抗体溶液のチューブを軽く遠心してから溶液を分注することでこの斑点状のスポットを防ぐことができます。

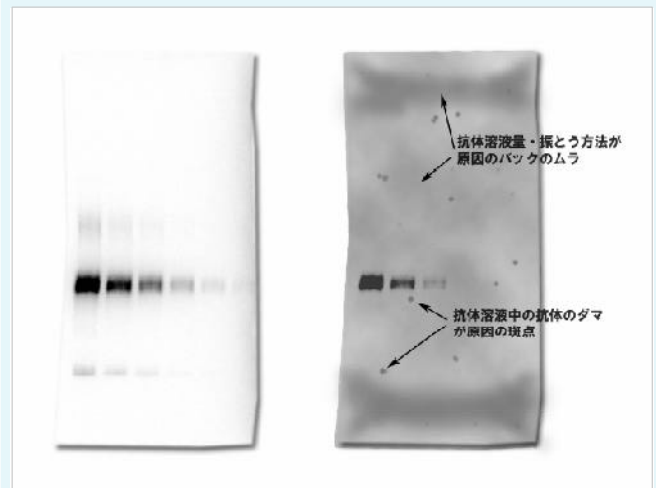


図4 抗体反応が原因の汚れ

(左)適正な検出例

(右)バックのムラや斑点状の汚れが付いた例

バンドのムラやスポット状の抜け、流れた様にしている場合は、プロットステップが原因と考えられます。(図5参照) これらは、ゲル、膜、ろ紙の密着度が十分ではないときに起こります。セミドライプロットでは、ゲル、膜、ろ紙を重ねたら、グローブをはめた手で全体を圧着して(図6参照)密着度を向上させることでムラや抜けなどを防ぐことができます。

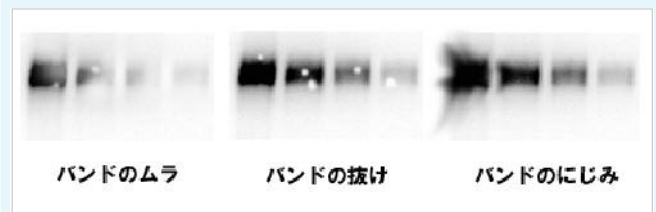


図5 プロットが原因の汚れ

プロットステップのゲル、膜、ろ紙の密着度が十分でない場合に発生するバンドの異常

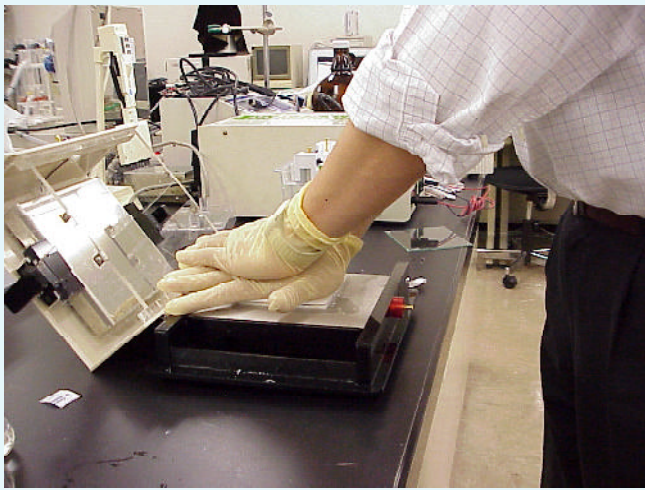


図6 ゲル、膜、ろ紙の圧着方法

「バンドが見えにくい」トラブルでは、バックグラウンドが十分低いにもかかわらず目的の蛋白質のバンドの検出感度が低い場合があります。(図7参照)これは、抗体反応、ブロッキングのステップに原因があると考えられます。特に、ブロッキング蛋白質にスキムミルクの濃度を3~5%にしてブロッキングを行うと、濃度の低い目的蛋白質のバンドはブロッキング蛋白質でオーバーコートされてしまい(オーバーブロッキングの状態)検出感度が低下します。これを防ぐには、スキムミルクの濃度を0.3~0.5%まで落とし、界面活性剤Tween-20を0.1%としたTBS-Tを使用します。抗体反応後のすすぎを十分に行うことと合わせてバックグラウンドが抑えられ、適正な検出が可能となります。

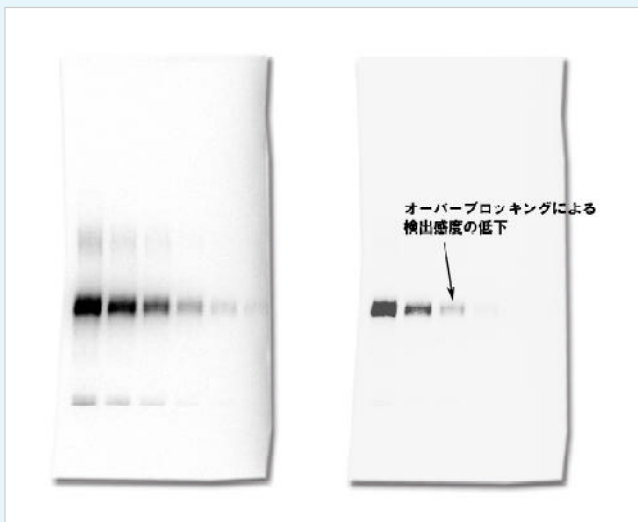


図7 オーバーブロッキングによる感度低下
ブロッキング蛋白質の濃度が高いと、オーバーブロッキングによって濃度の低いバンドが検出されにくくなります。ブロッキング蛋白質の濃度を低くしてオーバーブロッキングを防止します。

3-3 分析できない

「分析できない」トラブルは、主に定量解析を行うとしたときに起きます。十分な濃度があるはずな

のに、検出したときにはバンドが消えてしまっている場合や、濃度差がほとんど出ない場合、検出されたバンドが多すぎて目的のバンドが特定できない場合などがあります。

濃度の高いバンドは、多くの1次抗体が結合します。その結果2次抗体もたくさん結合するため、部分的に酵素濃度の高い状態になります。そうすると、発光基質をかけた後、非常に短い時間でバンド周辺の基質を消化してしまいます。膜のシーリングなどに手間取っていると図8のようにバンドの一部が消失してしまふことがあります。これを防ぐには、ゲルにアプライするサンプル濃度を低くする、またはアプライする量を少なくして、結果として酵素標識2次抗体の量を減らすことで解決します。

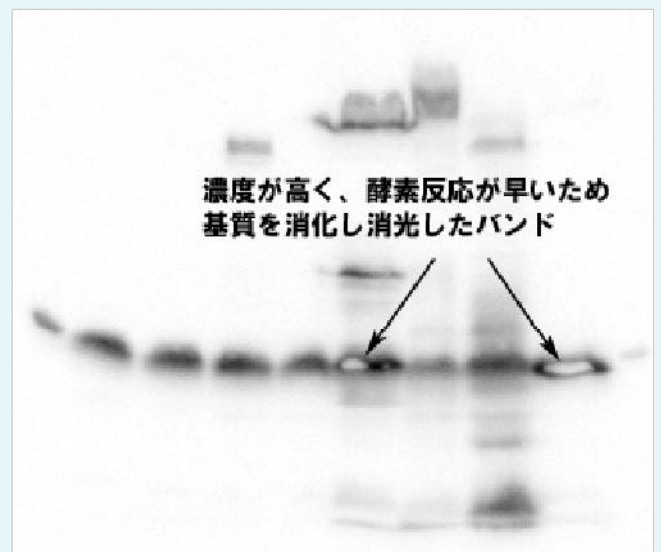


図8 消えた高い濃度のバンド

ウエスタンブロットティングの結果、相対的な目的蛋白質の量を測定する場合には、発光検出(ケミルミ)を利用します。発行検出の場合は、X線フィルムに露光する方法が多く利用されていますが、発光基質などの改良も進んだ現在では、発光撮影装置(冷却CCDカメラシステム)を利用することでデータ解析を容易にすることが可能となります。しかし、いままでに述べてきたような点に注意してサンプルを作っても、実際に発光量を計測してみると、思ったような結果が得られない場合があります。

この問題では、発光試薬の特性や撮影までの所要時間などに原因があります。ウエスタンブロットティングでよく利用される発光試薬は、POD(HRP)用のもので、ルミノールと過酸化水素とエンハンサーで構成されています。製造メーカーにより、発光継続時間、発光強度などが異なりそれぞれに特徴があります。しかし、どの発光試薬であっても、膜へ添加後の数分間が最も濃度に依存した相対的な発光量が得られ、この時間帯の発光を撮影すると、直線性の高いデータが得られやすくなります。

そのため、発光は試薬添加直後に撮影することが重要です。ここで問題となるのは試薬添加後の膜のシーリングで、ここに時間が掛かってしまうと発光量と濃度との直線性が低下した状態の発光を撮影することになってしまいます。発光時間の短い発光試薬では感度自体も下がってしまいます。そこでシーリングにクリアポケット（図9）を使用します。クリアポケットは発光試薬を添加した膜を挟むだけで膜をシーリングすることができ、シーリングに掛かる時間の問題を解決できます。クリアポケットは文房具店で購入できる、写真などを入れるポリプロピレン製のビニールバッグです。ハイブリバッグよりも安価（A6版30枚：300円程度）で、張りがあるため非常に使いやすいのが特徴です。

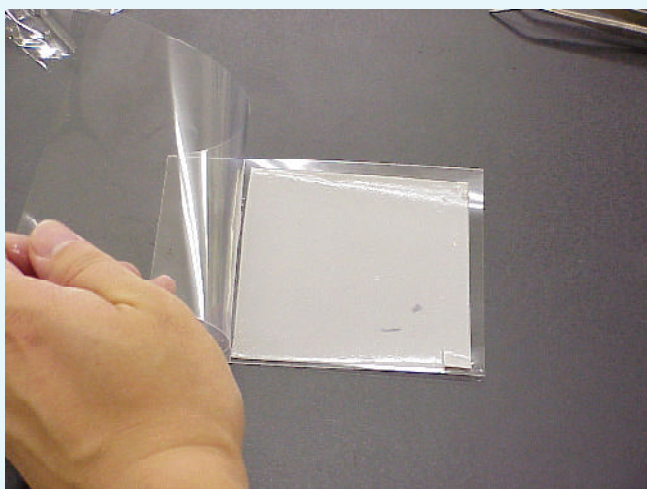


図9 クリアポケットに膜をシーリング
ポリプロピレン製のクリアポケットはA6サイズで30枚300円程度と非常に安価。

検出すると、バンドがたくさん現れる場合は抗体の特異性が低いことが原因と考えられます。このときは特異性の高い1次抗体に変更することをお勧めします。しかし、目的蛋白質の分子量が分かっている場合はピオチン標識分子量マーカーを用いることで、サンプルの検出と同時に分子量マーカーの検出を行うことが可能です。分子量マーカーが検出できればそれを基に分子量推定を行い、目的蛋白質のバンドを特定すればよいのです。目的蛋白質のバンド近傍にほかのバンドが多い場合は電気泳動条件の変更で分離を良くして対応します。

4.まとめ

以上のようにウエスタンブロットングにおけるいろいろなトラブルシューティングをご紹介してきましたが、それでもすべてが上手くいくわけではないと思います。アトー株式会社ではいろいろなトラブルについてサポートできるような資料を作成・配布しています。これらの情報が多くの研究者のかかえる実験に関するトラブルシューティングの一助になれば幸いです。



図10 Western Blotting 発光検出を成功させる方法
セミナーで紹介した実験方法そのほかを記載した資料です。
作製アトー株式会社 製品戦略グループ



アトー株式会社

主要製品
ペリスタポンプ
クロマトグラフ
電気泳動分析機器
DNA分析機器
画像分析システム
発光分析装置
バイオ研究機器
医療分析装置

本社 〒113-8425 東京都文京区本郷1-25-23 TEL(03)3814-4861(大代表) FAX(03)3814-4868
大阪支店 〒530-0054 大阪市北区南森町2-1-7 TEL(06)6365-7121(代表) FAX(06)6365-7125
工場 〒113-8425 東京都文京区本郷1-25-23 TEL(03)3814-4899(代表) FAX(03)3814-4764
研究センター TEL(03)5684-6644(代表) FAX(03)3814-4856
技術サービス TEL(03)3814-4794(代表) FAX(03)3814-4856

生化学・分子生物学・遺伝子工学研究機器
開発/生産/販売/サービス