

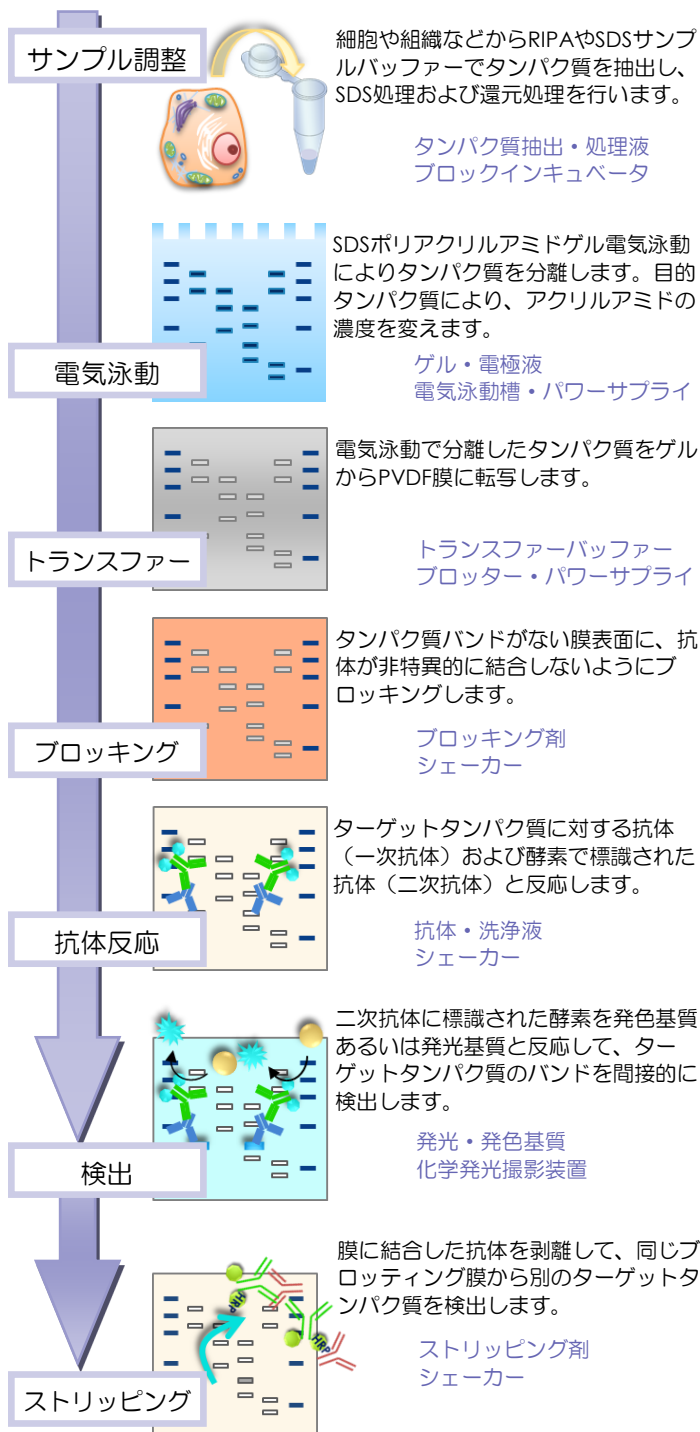
ウェスタンブロッティングの基本操作

2014年05月30日

1. 概要

ウェスタンブロッティ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ティ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）
- **EzLabel FluoroNeo**・・・タンパク質抽出・処理液
- **e-Pagel**・・・プレキャストゲル
- **EzRun**・・・電極液
- P plus 膜・・・PVDF膜
- アブソーベントペーパー・・・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
- **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**・・・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標識二次抗体（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）

4. 実験方法

4-1. サンプル調整

- ① 50μLのサンプルに50μLの**EzApply**（2×濃度、DTT添加済み）を加えて混合します。
- ② 95℃で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。

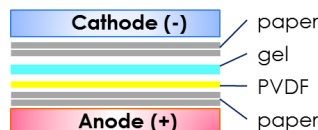
4-2. 電気泳動

- ① **e-PAGEL**（プレキャストゲル）を**Pagerun**（電源付電気泳動装置）にセットします。
- ② 1レーンあたり5～10μL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～1μg/lane、抽出液では1～50μg/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。
 ※20mA/gelで約80分間泳動します。

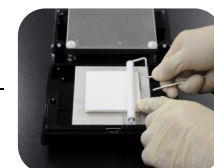


4-3. トランスファー

- 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。
 ※20～25V/gelで10～15分通電します。



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（50mL/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
アピジーン ピオチン	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

HRP検出試薬	EzWestBlue	EzWestLumiOne	EzWestLumi plus
Cat#	AE-1490	WSE-7110	WSE-7120
検出方法	TMBによる呈色	Luminollによる発光	Luminollによる発光
使用方法	PVDF膜を溶液に浸漬して10~30分	PVDF膜を溶液に浸漬してすぐに検出	使用直前にA液とB液を等量混合する
検出感度	pg	pg低域	fg中域
発光持続時間	-	1時間<	3時間<

- 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。

※EzWestBlueを使用する場合、PVDF膜と10~30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100~200μL/cm²です。ミニゲルサイズの場合、5mL以上準備してください。

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、EzWash (Tween 20含有)等のWash buffer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EzWash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。

5. その他

プロットングは同じプロトコー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。http://www.atto.co.jp/