

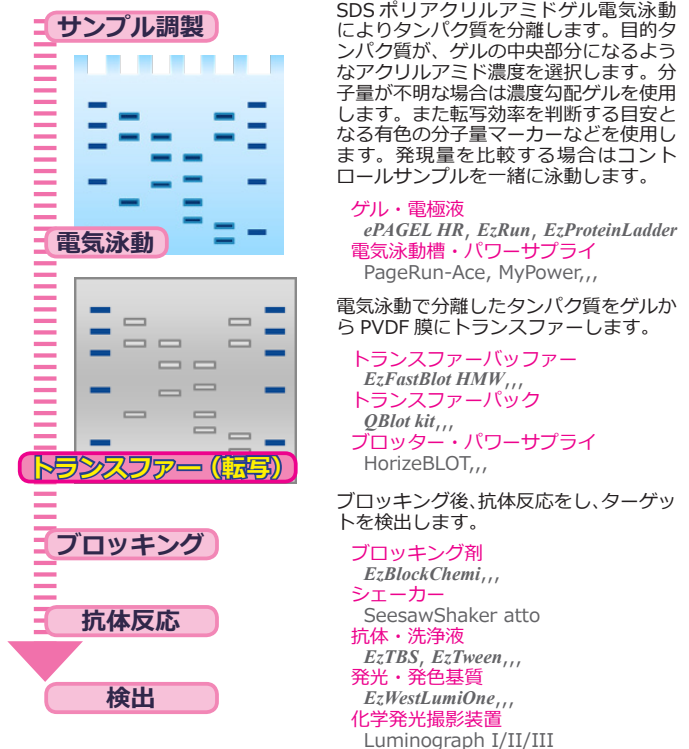
ウェスタンブロットング ～トランスファー～

2019年7月11日

1. 概要

ウェスタンブロットングのトランスファー（転写）はゲル中で分離されたタンパク質を電気的にゲルから引っ張りだしてメンブレン（膜）へと写す工程です。いわば電気泳動ゲルのコピーを作成するような感じです。作業自体は簡単なのですが、膜へトランスファーする際にムラになったり（ゲルと膜が密着していない）、空気が入って穴抜けになったりすることがあり、満足のできる転写膜（ブロットング膜）を得ることは、熟練した研究者でもなかなか難しいと聞きます。今回はアトーの製品を使用したウェスタンブロットングのセミドライ式トランスファーに関してご紹介します。

2. 実験の流れ



3. 実験方法

3-1. 電気泳動

目的タンパク質が中央部分にくるように、ゲルのアクリルアミド濃度を選択します。アイソフォームやリン酸化など僅差の移動度をもつ複数のタンパク質バンドを検出する際は、それぞれのタンパク質が分離できるアクリルアミド濃度もしくは濃度勾配ゲルなどを使用します。

ゲルのアクリルアミド濃度が低い場合は、電気泳動後のゲルが柔らかく、ブロットング操作で取り扱いが難しくなります。またゲルのアクリルアミド濃度が高い場合には、転写効率が下がります。特に 13% 以上のゲルを使用する際は、トランスファーバッファー中にメタノールが含まれると転写効率が下がるため、メタノール濃度を低くする、もしくは入れないようにします。

ターゲットタンパク質が

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。ただし 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。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ング、もしくはタンク式プロッターを使用します。またトランスファー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上がる場合があります。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：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。そこで、10% 前後のアクリルアミドゲルと低分子側のバンドが分離できる泳動バッファー EzRun MOPS を使用してバンドを分離します。アクリルアミド濃度が均一のためゲルの変形が防げるとともに、高効率にトランスファーすることが可能になります。

3-2. トランスファーの準備

電気泳動を行っている間にトランスファーの準備をします。

ブロットング溶液 ミニゲル 1 枚当たり 200mL 準備します。

下表を参照して目的分子の分子量、転写時間などからブロットングバッファーを選択します。

	EzBlot	EzFastBlot	EzFastBlot HMW	EzRun TG (Towbin 法)
Cat#	AE-1460	AE-1465	WSE-7210	WSE-7055
主成分	3 液法（不連続） A: トリス B: トリス C: トリス、 6-アミノカプロン酸 A~C: + MeOH (5%)	1 液法（連続） トリス アミノ酸 MeOH 不含	1 液法（連続） トリス MeOH 不含	1 液法（連続） 25mM トリス、 192mM グリシン、 ~10% MeOH (終濃度)
転写可能分子	~ 300kDa	~ 200kDa	~ 600kDa	~ 200kDa
転写条件	2 mA/cm ² 60 min	20~25V c.v. 5~15 min	25V c.v. 15~30 min	2 mA/cm ² 60 min
使用方法	MeOH を添加する	蒸留水で 10 倍希釈	蒸留水で 5 倍希釈	蒸留水で 10 倍希釈
特徴	広範囲の分子量をシャープなバンドでキレイにトランスファー	約 10 分で 200 kDa 以下の分子を高効率にトランスファー	30 分以内に 200 kDa の高分子も効率よくトランスファー	セミドライ式では低効率だが、タンク式でも使用可

※メタノールは膜へのタンパク質結合効率を上げられます。PVDF 膜 ≤ 15%、ニトロセルロース膜 ≤ 20% で使用します。

※高分子タンパク質の場合、0.01~0.1% SDS を添加すると転写効率が上がる場合があります。

※トランスファー前に泳動後のゲルをトランスファーバッファーで 15~30 分間平衡化すると転写効率が上がる場合があります。ただしバンドが拡散したり、低分子バンドが消失する場合がありますのでご注意ください。

PVDF 膜

- ① 直接手を触れないように清潔な手袋を着用し、ゲルサイズにカットします。
※ポアサイズが 0.2 μm の膜をご使用ください。低分子の場合、ポアサイズが大きいと膜から通り抜ける場合があります。
ミニゲルサイズ： 8.5 × 9 cm
コンパクトゲルサイズ： 6.5 × 6.5 cm
アトー製品： WSE-4050 ~ 4053 クリアプロット・P プラス膜シリーズ
- ② 100%メタノール液に浸漬して親水化します（10 秒以上）。
- ③ ブロットング溶液に浸漬して 10 ~ 30 分平衡化します。

ろ紙

- ① 直接手を触れないように清潔な手袋を着用し、ゲルサイズにカットします。
※トータルの厚みが 4 ~ 6 mm になるように枚数を調整してください。
ミニゲルサイズ： 8.5 × 9 cm
コンパクトゲルサイズ： 6.5 × 6.5 cm
アトー製品： CB-06A,09A,13A,20A アブソーバントペーパーシリーズ
- ② トランスファーの直前にブロットング溶液に浸漬します（10 秒以上）。
※長時間浸漬すると、ろ紙が溶ける場合があります。

ブロッキング溶液 ミニゲル 1 枚当たり 50mL 準備します。

BSA やカゼインなどのタンパク質由来のものと同合成ポリマーなどからなる非タンパク質性のものがあります。一般的にタンパク質由来のブロッキング溶液は 0.5~5% 濃度で TBS-T や PBS-T に溶解して使用します。

洗浄液 ミニゲル 1 枚当たり 500mL 準備します。

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

PBS-T: EzTween (0.01~0.1% Tween 20) 含有 1 × EzPBS (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 ミニゲル 1 枚当たり 5~20mL 準備します。

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。

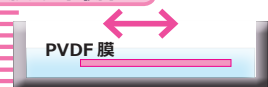
抗体の希釈率は抗体や検出試薬の添付文書を参考にして決めます。サンプルや時間に余裕がある場合は、ドットブロットングで適切な抗原の検出感度になるように希釈率を検討します。また抗体の希釈は抗体反応の直前に行います。抗体を希釈した状態で長時間置くと失活する場合があります。

3-3. プロッターのセッティング



下記に従ってプロッターをセットします。

膜の平衡化



ブロッキング膜を 100% メタノールに 10 秒間浸漬して親水化処理した後に、トランスファーバッファーで 10 分以上平衡化します。

ゲルの洗浄



電気泳動後のゲルをトランスファーバッファーで洗浄し、ゲルの周囲の泳動バッファーを除去します。高分子タンパク質をトランスファーする場合、15 分以上浸漬すると転写効率が上がることがあります。

ろ紙の浸漬



電極板にセットする直前にろ紙をトランスファーバッファーに 10 秒以上浸漬します。十分に浸漬されていないと転写ムラの原因になります。また長時間浸漬すると、ろ紙が溶ける場合があります。

ろ紙



電極板の陽極側にろ紙を 2~3 枚 (厚み 2~3 mm) 重ねておきます。ろ紙とろ紙の間には空気が入らないようにピッタリ重ねます。ろ紙の上にトランスファーバッファーを 2~3mL 滴下します。

PVDF 膜



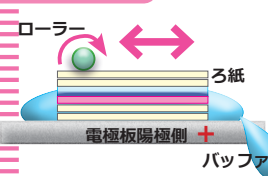
滴下したトランスファーバッファーの上に PVDF 膜を軽く載せ、ろ紙の四隅にピッタリ合うように重ねます。トランスファーバッファーの上で浮いた状態にすると、ろ紙の上に膜を重ねて置きやすくなります。膜の上にトランスファーバッファーを 2~3mL 滴下します。

ゲル

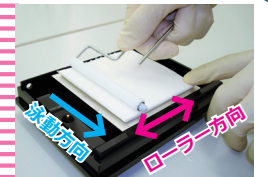


滴下したトランスファーバッファーの上にゲルを浮かせるように載せ、膜の四隅にピッタリ合うように重ねます。トランスファーバッファーの上で浮いた状態にすることで、ゲルを動かすことができ、PVDF 膜の上にゲルをピッタリ重ねて置きやすくなります。

ろ紙



ろ紙をさらに 2~3 枚重ねておきます。ろ紙とゲルと膜のサンドイッチがずれないようにしっかり片手で押さえ、もう片方の手で軽く押した状態でローラーを転がし、空気と余分なトランスファーバッファーを除去します (写真参照)。



電極板を傾け、電極板上の余分なトランスファーバッファーを除去します。サンドイッチがずれないように注意し、さらにローラーをかけて、サンドイッチを密着させます。バッファーが多く含まれると、ブロッキング像が流れる原因になります。また空気が除去されないと穴抜けの原因になります。ローラーはサンドイッチの端で止めずに、転がし切るようにしてください。ローラーは泳動方向に対して垂直に掛けてください。

電極板陰極側 -



陰極側の電極板を載せて、ブロッキング装置をセットし、電源につないで通電し、トランスファーを開始します。

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、陽極側に移動してトランスファーされます。

※トランスファーパック「QBlot kit」はろ紙や膜の準備が不要です (Ready to use)。専用ブロッキングバッファーにより転写効率も高く、短時間で高効率のウエスタンブロッキングが可能です。

3-4. ブロッキング

- ① プロッターと電源を接続します。
- ② 下表を参考にして電流 / 電圧条件をセットし、通電します。

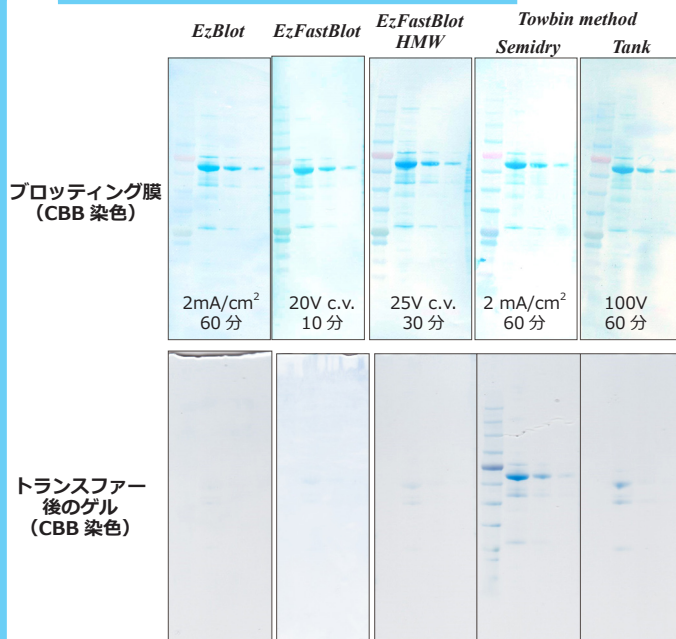
	EzBlot	EzFastBlot	EzFastBlot HMW	EzRun TG (Towbin 法)
Cat#	AE-1460	AE-1465	WSE-7210	WSE-7055
転写条件	2 mA/cm ² 60 min (~40V)	20~25V c.v. 5~15 min (500mA/gel)	25V c.v. 15~30 min (500mA/gel)	2 mA/cm ² 60 min (~40V)

3-5. ブロッキング終了後の操作

- ① 電源をオフにし、プロッターから電源を外します。
- ② プロッターの上部電極板を外し、ろ紙を除去して、ブロッキング膜をピンセットを使って回収します。
※ゲルは CBB 染色液で染色します (オプション)
※ゲルに残っているバンドを染色することで、転写効率や転写ムラを確認することができます。
- ③ TBS-T でブロッキング膜を洗浄します。
※洗浄後のブロッキング膜は風乾した後に密閉し、-20℃で保存可能です。保存期間は抗原の安定性に依存しますが、通常は 1 か月程度です。保存後のブロッキング膜は 100% メタノールに浸漬して素早く親水化し、TBS-T で洗浄した後に、ブロッキング以降の反応を通常通り行います。
- ④ ブロッキング溶液に浸漬し、ブロッキング反応を行います。
- ⑤ 抗体反応を行い、検出試薬でシグナルを検出します。

3-6. 参考データ

実験例：転写バッファーによる違い



様々なトランスファーバッファーを用いてブロッキングを行った後のブロッキング膜とゲルを EzStain AQUA (CBB) で染色した結果です。従来の Towbin 法によるトランスファーバッファーよりも EzBlot、EzFastBlot、EzFastBlot HMW はセミドライ式でも高効率にタンパク質バンドをトランスファーできます。EzFastBlot は約 10 分の短時間で ~200kDa までのタンパク質をトランスファーするのに適しており、EzFastBlot HMW は 200kDa 以上の高分子タンパク質も約 30 分間という短時間で、タンク式のブロッキングと同等以上の効率でトランスファーできます。また EzBlot はタンパク質をシャープなバンドで明瞭にトランスファーするのに適しています。

今までの面倒なろ紙やメンブレンの準備から解放されます!

簡単! きれい! 速い! アトーのトランスファーパック

WSE-4055 QBlot kit



親水化・平衡化済みの PVDF 膜とバットがセットになったセミドライブロッキング用のトランスファーパックです。1 回分のパックの封を切り電気泳動後のゲルを乗せればすぐにブロッキングが可能です。最短 5~10 分の転写ができます。各種セミドライブロッキング装置に対応します。

キット内容 Top/Bottom Stack : 90 x 85mm (10 パック)
Gel Wash Buffer (5 x) : 100mL

分子重量範囲 ~250kDa
保存期間 1 年間 (冷蔵)
容量 10 回分 / 箱
価格 16,800 円

製品情報

操作動画



アトー株式会社

■本社 〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2
TEL(03)5827-4861 FAX (03)5827-6647
■大阪支店 〒530-0044 大阪市北区東天満2-8-1
TEL(06)6136-1421 FAX (06)6356-3625

■URL <http://www.atto.co.jp/>