

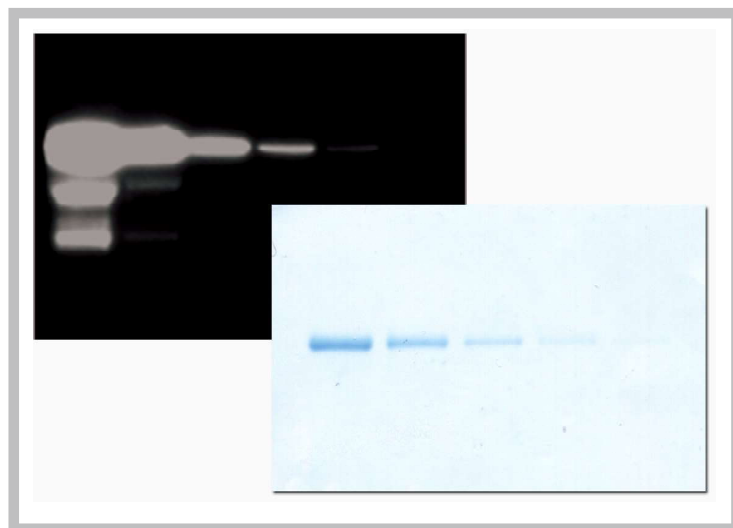
**ATTO**

*BIOSCIENCE &  
BIOTECHNOLOGY*

ATTO Presents

「ウエスタンブロッティングのコツ」基本編

*For Western Blotting*



電気泳動と56年

**ATTO** Since 1964  
Supporting Life Research

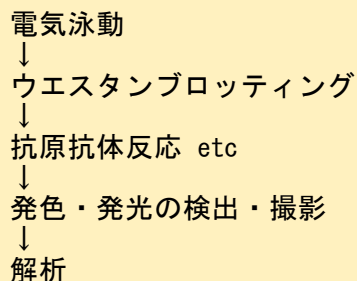
# 1. ウェスタンブロッティング

電気泳動で分離したゲル中のタンパク質を膜（メンブラン）に移す方法をウェスタンブロッティング（Western Blotting）と言っています。わざわざ膜に移すのは、抗原抗体反応等を利用して特異的検出（目的のタンパク質だけを検出）を行なう為。ゲルのままではせっかく分離した試料（タンパク質）が検出反応中に拡散してしまったり、抗体がゲルの中に入って行って反応するのに時間を要したり、その溶液容量も多量に必要となってきたり……。膜上なら試料（タンパク質）は固定され、抗体は膜表面の試料（タンパク質）と反応でき、その溶液容量も少量ですみ時間も短縮できます。ゲルの様に破損する心配もありません。

さて、この便利なウェスタンブロッティングの手法が発表されたのが1979年。DNAをブロッティングするのがサザン（Southern）だから、とタンパク質→ウェスタンと命名されました。検出まで含めてウェスタンブロッティング、ウェスタン法と呼ぶこともあります。従来この Towbin の方法、均一溶液中で電気泳動的にブロッティングする手法が一般的でしたが、1984年 Kyhse-Andersen のろ紙にブロッティング溶液を染み込ませて積層するセミドライ式という方法が発表されてから、操作性・経済性の面で広く受け入れられ最近ではこちらが主流になっています。

\*Kyhse-Andersen, J. (1984) J. Biochem Biophys. Methods, 10, 203-209.

## ー操作の流れー

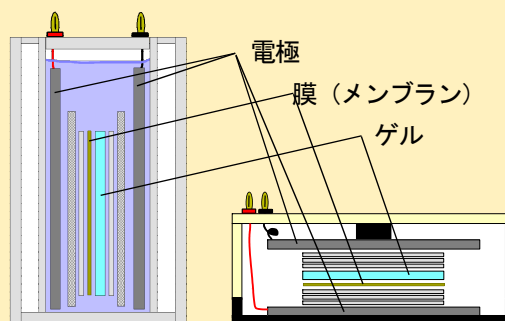


# 2. 装置

通常タンパク質の電気泳動はポリアクリルアミドゲルで行なうので、ブロッティングも（今度は面方向に）電気（泳動）的にゲルから膜に移行させます。従って装置としてはブロッティング装置とその電源が必要です。ブロッティング装置には、タンク式とか垂直式と呼ばれている物とセミドライ式・水平式と呼ばれている物があります。当社の「ホライズブロット」は後者にあたります。

タンク式はマイルドな条件でブロッティング効率が良いのですが、溶液中に膜・ゲル・ろ紙のサンドイッチを入れて通電する為ゲルが大きい場合には溶液量が多量に必要だとか、発熱が大きい為冷却装置や大電流（A単位）を流せる専用電源が必要であるとか、短所もありました。セミドライ式はブロッティング溶液をろ紙に含ませるだけなので少量で済み、過電流が流れず、発熱の心配もないので専用電源も必要ありません。

## ーブロッティング装置模式図ー



タンク式（垂直式）セミドライ式（水平式）

セッティングも簡単でブロッキング時間も短い、という多くの特長が受け入れられ、数多く使用されるようになりました。

製品名	「ホライズプロット2M/4M」	
型式	WSE-4025 型	WSE-4045 型
電極サイズ	205x100mm	205x200mm
製品名	「パワーステーションHC」	
型式・出力	WSE-3500 型 ~ 3A, ~ 150V	



ブロッキング装置  
「ホライズプロット2M/4M」



電源  
「パワーステーションHC」

### 3. 膜・ろ紙

ブロッキングメンブラン(膜)、むかしから使われていたのがニトロセルロース膜ですが、近年PVDF(ポリフッ化ビニリデン polyvinyliden difluoride)膜が主流になってきました。当社の「クリアプロット・P(プラス)膜」もPVDF膜です。これはPVDF膜がタンパク質の結合量が多い(タンパク質の種類によるがニトロセルロース膜の2~4倍)、保持力が強い(一度着いたものが剥がれにくい)、丈夫で扱い易いという特長が受け入れられたからでしょう。耐薬性もありアミノ酸シークエンスが可能なので、泳動(分離)→ブロッキング(膜へ)→シークエンス(アミノ酸決定)も定法になっています。安価なニトロセルロース膜とうまく使い分けている人もいます。当社の「クリアプロット・P(プラス)膜」は見た目には若干差のあることはありますが、材質的には**表裏はありません**。また、ブロッキング後に膜を乾燥して保存する方法がありますが、疎水性のPVDF膜では再親水化処理が必要になる場合がありますので注意してください。一晩程度ならブロッキング溶液中で、1~2日ならごく少量のブロッキング溶液と一緒にラップ等で包んで乾かないようにしておけば、冷蔵庫に入れて保存することは可能です。長期にわたる保存で(他の理由でも)乾燥した場合は、再度メタノール処理(メタノール液に10秒程度浸す)を行なってから緩衝液(ブロッキング溶液、洗浄液)に浸すか、緩衝液に終濃度0.05%程度になるよう界面活性剤(Tween-20, Triton-Xなど)を加えて浸します(若干時間を要する場合があります)。いずれにせよ膜上のタンパク質の抗原性については分かりませんので、予備実験をお勧めします。親水化したらあとは通常操作に移ります。

製品名	「クリアプロット・Pプラス膜」			
材質	PVDF			
型式	WSE-4050 型	WSE-4051 型	WSE-4052 型	WSE-4053 型
サイズ	65x65mm	85x90mm	130x140mm	260mmx 3m
ポアサイズ	0.2μm			

当社附属のろ紙(アブソーベントペーパー)は清潔(コンタミネーションを防ぐ)で、きめ細やかな厚め(0.9mm厚)のものを使用し、ブロッキング溶液量を十分に保つようになっています。他のろ紙、特に薄いものを使用する場合にはブロッキング溶液量に注意してください。**薄い紙や枚数が少ない**とブロッキング溶液量不足となり、ブロッキング効率の低下や電源装置のエラーの原因になることがあります。

2枚以上積層してブロッキングする場合にコンタミネーション(陰極側ゲル中タンパク質の混雑)を防ぐ為に透析膜やセロハンを用います。これらは市販されている一般的なもので構いません。

## 4. ブロットイング溶液

ブロットイング溶液はセミドライ式ではトリスと6-アミノカプロン酸、メタノールの系で3種類の溶液を使用します。トリスと6-アミノカプロン酸のイオンでタンパク質をサンドイッチし陽極側へ引っ張っていくことから、ムラなくブロットイングされると言われています。また、3種の異なる液を使用することから電圧もかかり、ゲルからタンパク質が抜け易くなっていると思われます。グリシンが入っていない為アミノ酸シークエンスにも有効です。メタノールはタンパク質の膜への吸着力を高める作用がある為使用されます。ただし、逆にタンパク質をゲル中に固定させる作用もある為、濃度があまり高いとゲルからタンパク質が抜けにくくなり転写効率を落とす要因にもなります。通常5～20%ぐらいで使用しますが、吸着力の強いPVDF膜では5%をお勧めしています。ペプチドのような低分子量の場合20%を使用することもあります。最近では高速ブロットイング溶液（仕様）もあり、1種類の溶液でメタノールも不要なことから使用数が増えています。（ATTO **EzFastBlot**シリーズ）

よく聞くトリス-グリシン-メタノールの系はむかしからの垂直（タンク）式のTowbinの方法からきているもので、**セミドライ式に適しているとは言えません**。どうしても、ということであれば100mMトリス（25mMを変更）、192mMグリシン、5%メタノール（20%を変更）で実施してみてください。ただし効率はセミドライ仕様を上回れないかもしれません。

## 5. 操作

### 実験例（セミドライブロットイング）

\*詳細は取扱説明書をご覧ください

ブロットイング溶液（AE-1460 **EzBlot**）

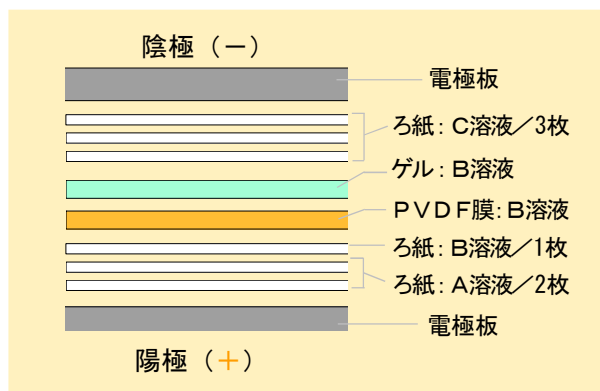
A溶液：0.3M トリス、5% メタノール

B溶液：25mM トリス、5% メタノール

C溶液：25mM トリス、  
40mM 6-アミノカプロン酸、  
5% メタノール

条件：144mA（2 mA/cm<sup>2</sup>）定電流  
（25～35V）、30分間

装置：WSE-4025 ホライズブロット2M、  
WSE-3500 パワーステーションHC



### 実験手順

- ①上記ブロットイング溶液を調製します。A～C液各100 ml 調製すれば、ミニゲル1～2枚、または、スラブゲル1枚分のブロットイングが可能です。
- ②PVDF膜、ろ紙をゲルと同じ大きさに切ります。（アトーの付属品はゲルと同じ大きさです）
- ③PVDF膜はメタノールで湿潤した後、B溶液に浸し、30分以上振とうします。
- ④上の図のように浸すバッファの種類を間違えないようろ紙を用意し、陽極板の上に気泡を入れないよう順番にろ紙、膜、ゲルを重ねます。最後に**グローブをはめた手のひらで全体を押し出すように**気泡を抜き、膜とゲルを密着させます（6-5写真参照）。
- ⑤一番上のろ紙にC液を滴らし、陰極板をセットし、リード線をつなぎます。
- ⑥電源を設定し、**定電流2 mA/cm<sup>2</sup>**ゲル面積（ミニゲルなら144mA定電流、50V（パワーステーションのブロットイングモード設定））で、通電を開始します。
- ⑦30～40分後ブロットイングを終了します。膜を取り出し検出反応（抗原抗体反応）に移ります。

## 6. ブロッキングのコツ

ブロッキングには以下の要因が関係します。うまくいかない時などのご参考に！

### 6-1. ブロッキング溶液組成

セミドライブロッキングの原法\*1ではトリスと6-アミノカプロン酸、メタノールの系で3種類の溶液を使用します。トリス-グリシン-メタノールの系は従来からの垂直（タンク）式のTowninの方法からきているもので、セミドライ式には最適とは言えません。トリスと6-アミノカプロン酸、メタノールの系はトリスと6-アミノカプロン酸のイオンでタンパク質をサンドイッチし陽極側へ引っ張っていくことから、ムラなくブロッキングされると言われています。また、3種の異なる液を使用することから電圧もかかり、ゲルからタンパク質が抜け易くなっていると思われる。尚、原法ではメタノール濃度が20%になっていますが、メタノールはゲルからタンパク質が抜けにくくなる作用がある\*2為、弊社では5%にしています。泳動後のゲルはブロッキング溶液に置換しないでください。

\*1:Kyhse-Andersen, J. (1984) J. Biochem Biophys. Methods, 10, 203-209.

### 6-2. メタノール濃度 (\*2)

メタノールはタンパク質をゲル中に固定させる作用があります。従って濃度があまり高いとゲルからタンパク質が抜けにくくなります。当然20% < 10% < 5%とタンパク質がゲルから出易くなります。ところがメタノールはタンパク質の膜への吸着を高める作用もある為必要なものでもあります。低分子（ペプチド等）試料やニトロセルロース膜（PVDF膜より吸着力が弱い\*3）を使用する場合のみ10~20%メタノールをお薦めしています。

### 6-3. ブロッキングメンブラン（転写膜）・ろ紙 (\*3)

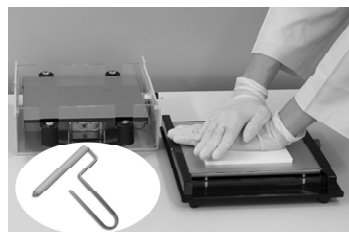
ブロッキングメンブラン（膜）は以前はニトロセルロース膜が主流でしたが、現在ではPVDF膜が出てから操作性の良さ、吸着力・結合保持力の高さなどから広く使われるようになり、こちらが主流となっています。PVDF膜はタンパク質の吸着力や保持力が優れているためブロッキング溶液中のメタノール（タンパク質の膜への吸着を高める作用がある）濃度を低くしブロッキング効率を上げる（タンパク質がゲルから出易くなる）ことができます。また、ろ紙はブロッキング溶液量（イオンの補給、pH保持）を決める大事なものですので、厚みや積層枚数には配慮し分量を保持してください。

### 6-4. 通電

セミドライブロッキングでは一定電流1~2mA/cm<sup>2</sup>で30~90分行なうのが標準です。電圧は電極間距離に比例して設定する為、積層式のセミドライブロッキングでは再現性が得難く、通電（ゲル）面積に比例する電流で設定します。最近ではブロッキング装置の電極位置を固定させ電圧で設定する場合も増えています。電流・電圧値を上げたり単に通電時間を延ばしてもかえって電気浸透により効率が落ちたり電流・電圧上昇により発熱等をおこす場合がありますので注意してください。効率が悪い場合はまずブロッキング溶液\*6-1. 6-2. 6-6について検討してみてください。

### 6-5. パターンが流れる

（陰極側）ろ紙とゲルを同じ大きさに揃えるのは基本として、多くの場合ゲルとブロッキングメンブラン（膜）との接触が不十分な為起こります。セミドライブロッキングではゲル・膜・ろ紙をセッティング後、ゲルと膜の間に1滴水も残さないイメージで上からしっかり（ペタッと貼り付ける感じで）手や専用ローラーで押さえてください。コツはこれだけです。



## 6-6. でもブロッキング効率が悪い

分子量の大きいタンパク質や塩基性タンパク質、糖タンパク質・リポタンパク質はブロッキング効率が悪い場合があります。上記のような検討をしても効率に改善がみられない場合には陰極側転写溶液に0.01~0.02% SDSを添加します。あまり濃度が高いとタンパク質の膜への結合を妨げてしまいます。通電時間を延ばす場合は90分後一度通電を止め新しいブロッキング溶液を膜にかけてから（ゲル・膜をずらさないように）再度通電してください。ゲル濃度を下げるのも一つの手です。また泳動後のゲルをブロッキング溶液に置換しないだけでもブロッキングされ易いです。

## 7. 検出

通常、目的とする試料（タンパク質）だけを検出、つまり特異的検出を行ないます。が、その前に・・・全試料（タンパク質）やブロッキング条件の確認等を目的として非特異的検出（染色）を行なう場合もあります。一般にゲルの染色に使われるCBB（クマシーブリリアントブルー）の色素染色を一例として紹介しておきます。

### 実験例（CBB染色）

染色液 \*1 : 0.001% CBB、10%酢酸、30%メタノール

脱色液 \*2 : 10%酢酸、50%メタノール

\*1 通常ゲル染色に用いるCBBの1/10~1/100薄い。

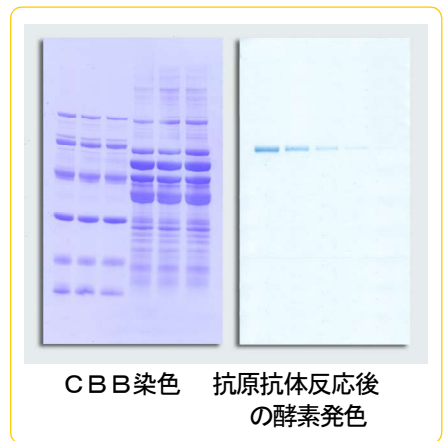
\*2 メタノール濃度が50%程度であること。

(10%酢酸、30%メタノール100mLにメタノール45mLを加えると終濃度約52%。酢酸濃度が薄くてもよい。)

### 実験手順

染色	5~10分	1回	ゆっくり
↓			
脱色	2~5分	2回	激しく
↓			
検出			

\* バックグラウンドが若干青いままでも



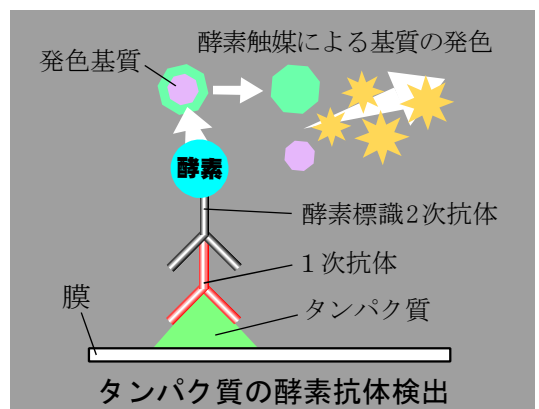
膜用CBB染脱色溶液キット WSE-7160 *EzStainAQuaMEM* (イージーステインアクアMEM)

ブロッキングした膜上のタンパク質のCBB染色検出のための試薬キットです。脱色液も付属しています。完全脱色液を使用すればタンパク質に結合したCBB色素もとれ、抗原抗体反応～特異的検出も可能です。

### ●目的のタンパク質の特異的検出

通常、ブロッキング後タンパク質の目的とするものだけを検出（特異的検出）します。

一般的には、まず膜自体が反応（発色・光）しないようにブロッキングを行ない、洗浄後目的タンパク質に対する抗体（一次抗体）を結合させさらに発色・光系の酵素等を標識した抗体（二次抗体）を結合させて、基質を加えて発色・発光させます。



## 実験例 (抗原抗体法)

\* 詳細は取扱説明書、文献等をご覧ください

### ブロッキング溶液

AE-1475 **EzBlockChemi** (イージーブロックケミ) (非タンパク質性)

AE-1476 **EzBlockBSA** (イージーブロックBSA) (BSA)

AE-1477 **EzBlockCAS** (イージーブロックCAS) (カゼイン)

### 洗浄液

WSE-7230 **EzTBS** (イージーティービーエス) (TBS バッファー)

+ WSE-7235 **EzTween** (イージートゥイーン) \*1

### (標識) 抗体

HRP (西洋わさびペルオキシダーゼ) \*2 標識 I g G (× 1/1000) / T T B S

### 基質\*3

WSE-7140 **EzWestBlueW** (イージーウエストブルーW) (TMB発色基質) → 発色

AE-1495 **EzWestLumi plus** (イージーウエストルミプラス) (発光基質) → 発光

\*1 バックグラウンドを下げる為に界面活性剤Tween-20を加えている。

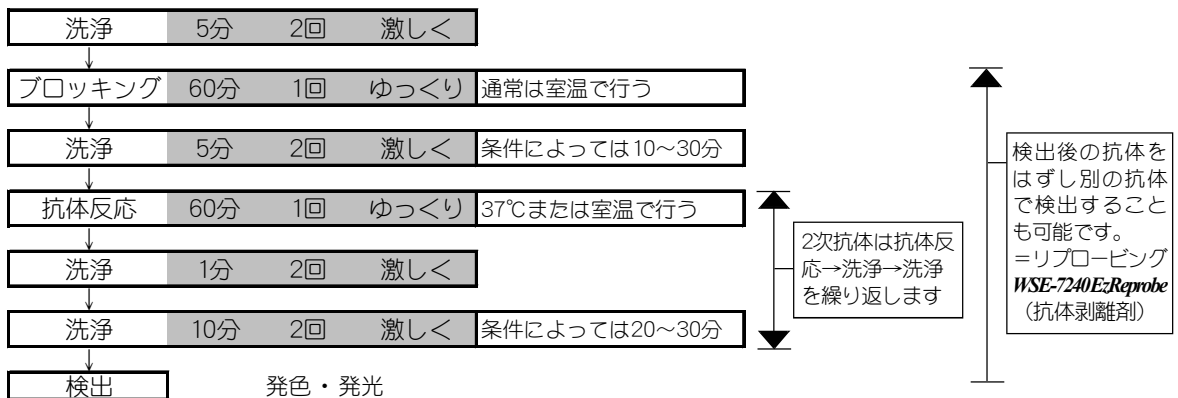
\*2 他にA1p (アルカリフォスファターゼ) 等の酵素も用いられる。

\*3 発色・発光いずれもの場合も基質には多数種類がある。

メーカーによっても発色・発光強度、発光継続時間、試薬の安定性などが異なる。

\* バックグラウンドが高い場合は、ブロッキングを37℃で行なったり、各洗浄時間を長くする。

## 実験手順



\* 詳細は別途「化学発光検出のコツ ウェスタンブロッティング編」をご参照ください。  
ご希望の方には差し上げます。当社までご請求ください。

## 発光検出

最近ではウェスタンブロッティングの検出には発光検出が多く利用されています。抗原抗体反応を用いた場合、2次抗体にペルオキシダーゼ(POD/HRP)を標識したものをを用いれば、最後に発光基質を添加することで発光検出が行えます。この発光は微弱なため、目で見えることは出来ないのでX線フィルムや高感度冷却CCDカメラを用いてパターンを取り込みます。現在では暗室が不要で操作が容易で、簡単にデジタル化が可能な冷却CCDカメラシステムが広く使われるようになりました。この装置は、発光基質を添加したメンブランを暗箱内にセットし、一定時間撮影するだけで発光パターンを取り込むことが可能です。

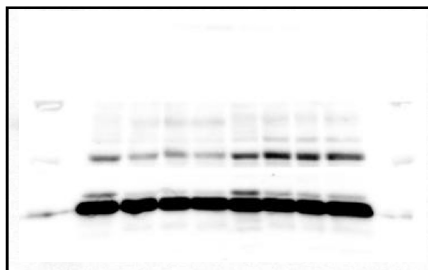


アトー冷却CCDカメラシステム  
WSE-6200HルミノグラフII

実際に発光検出を行った膜のイメージ

電気泳動後ポリアクリルアミドゲルを  
ブロッティングした膜での発光検出

撮 影：アトー 発光検出撮影装置



## 8. システム紹介

製品の詳細はカタログ、Webサイトをご覧ください

「non-RI ウェスタンブロッティングシステム」 発色・化学発光法によるタンパク質の検出

### 電気泳動



電源付泳動装置  
WSE-1150P/M  
パジェランAce  
¥112,000



既製ゲル  
EHR-520L  
e・パジェルHR  
¥15,800  
(ゲルは各種あり)



試料調製溶液  
(SDS-PAGE用)  
AE-1430 *EzApply*  
(イーザーアプライ)  
¥7,800



泳動用緩衝液  
(SDS-PAGE用)  
AE-1410 *EzRun*  
(イーザーラン)  
¥5,200

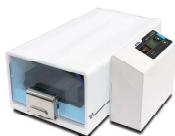


有色マーカー  
(SDS-PAGE用)  
WSE-7020  
*EzProtein Ladder*  
(イーザープロテインラダー)  
¥21,000

### ブロッティング



電源付ブロッティング装置  
WSE-4115  
パワードブロットAce  
¥123,000



WSE-4125  
パワードブロット2M  
¥188,000



ブロッティング用溶液  
(3種溶液系) AE-1460  
*EzBlot* (イーザーブロット)  
¥12,800



ブロッティング用溶液  
(高速系) AE-1465  
*EzFastBlot* (イーザーファスト  
ブロット) ¥10,000



振とう器  
シーソーシェー  
カーatto  
¥112,000

### 検出



膜染脱色キット  
(CBB溶液他)  
WSE-7160  
*EzStainAQuaMEM*  
(イーザーステイン  
アクアMEM)  
¥20,000



ブロッキング用溶液  
(非タンパク質性)  
AE-1475 *EzBlockChemi*  
(イーザーブロックケミ)  
¥9,800



洗浄用溶液  
(TBS溶液)  
WSE-7230 *EzTBS*  
(イーザーティービー  
エス) ¥5,800



発色基質溶液  
(HRP用発色基質)  
WSE-7140 *EzWestBlueW*  
(イーザーウエスト  
ブルーW) ¥12,800



発光基質溶液  
(HRP用発光基質)  
WSE-7120 *EzWestLumipluse*  
(イーザーウエストルミ  
プラス) ¥9,800



発光撮影装置  
WSE-6200H *LuminoGraph II*  
ルミノグラフII

その他、消耗品(抗体)などが別途必要になります。

2020.10

# アトー株式会社

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



主要製品

- 発光・蛍光イメージングシステム
- 画像解析ソフトウェア
- 電気泳動装置
- 電気泳動関連試薬
- ウェスタンブロット試薬
- ペリスタブポンプ
- 細胞培養・観察システム

- 東京本社 〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2 ☎(03)5827-4861(代表) ☎(03)5827-6647
- 大阪支店 〒530-0044 大阪市北区東天満2-8-1 ☎(06)6136-1421(代表) ☎(06)6356-3625  
右杉センタービル別館 5F
- 技術開発センター 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6 ☎(03)5818-7560(代表) ☎(03)5818-7563  
◆メンテナンスサービスグループ ☎(03)5818-7567(代表) ☎(03)5818-7563

■URL <http://www.atto.co.jp/>

お問い合わせ WEB会員登録の上お問い合わせフォームをご利用ください。