

じっけんレシピ

～ウェスタンブロットの方法～

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) のゲルからニトロセルロースメンブレンへのタンパク質の転写は、ウェスタンブロットと呼ばれています。

使用する試薬

1. 0.3 M トリズマベース (Trizma base) 溶液、20%メタノール、pH10.4
2. 0.025 M トリズマベース溶液、20%メタノール、pH10.4
3. 0.02 M トリズマベース溶液、20%メタノール、
5. 25 mg/mL ϵ -アミノカプロン酸 (製品番号: [A2504](#))
4. トリス緩衝化生理食塩水 (TBS) (製品番号: [T6664](#))
5. 0.05% Tween20 含有トリス緩衝化生理食塩水 (TBS/Tween) (製品番号: [T9039](#))
6. 0.05% Tween20 含有リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS/Tween) (製品番号: [P3563](#))
7. ニトロセルロース (NC) 膜、孔径 0.45 μm (製品番号: [N8267](#))
低分子量のタンパク質については孔径 0.2 μm の NC 膜も使用できます。
8. ブロッキングペーパー (製品番号: [P7796](#))
9. 1次抗体
10. アルカリホスファターゼ標識またはペルオキシダーゼ標識の2次抗体
11. ブロッキング溶液: 5%ウシ血清アルブミン (BSA) (製品番号: [A9647](#)) 含有TBSまたはPBS溶液 (その他にカゼイン含有の製品番号: [B6429](#) の 10x ブロッキングバッファーがあります。)
12. 反応用の基質 (2次抗体の標識と検出系に応じて選択)

アルカリホスファターゼ基質:

SIGMA FAST BCIP/NBT タブレット (製品番号: [B5655](#))

BCIP/NBT溶液 (製品番号: [B1911](#)、[B3679](#)、[B3804](#))

ペルオキシダーゼ基質:

AEC染色キット (製品番号: [AEC101](#))、

メンブレン用TMB基質液 (製品番号: [T0565](#))

SIGMA FAST DABタブレット (製品番号: [D4418](#))

電気泳動装置、アクリルアミドゲル、セミドライブロッキング装置などの器具をご用意下さい。

お問い合わせ先:

製品の技術的なご質問 sialjpts@sial.com
価格・在庫のご質問 sialjpcs@sial.com

じっけんレシピ

プロトコール

<SDS-PAGE>

- 10~20%のアクリルアミドゲルを使用して SDS-PAGE (カセットサイズ約 80×80mm) を行います。※ゲルの濃度は目的タンパク質の分子量に応じて選択します
分析用の場合は、1 ウェルに 0.5~10 μg のタンパク質をアプライします
予備実験用の場合は、1 枚のゲルあたり 600~800 μg の全細胞もしくは組織ホモジネートをアプライします。分子量マーカーを 1 レーンアプライします。
(もし、目的バンドが染色されないなどの場合には 1 レーン当たりのタンパク質の量を増やして 20 $\mu\text{g}/\text{well}$ などでご検討ください。)
- 追跡色素がゲルの終点から約 1cm の位置に移動するまで、1~2 時間 200V の定電圧で泳動します。ゲルの調製法は、文献や書籍等に多く記載されています。
参考文献: Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis by H.R. Mauer (de Gruyter; Berlin, New York, 1971)

<タンパク質のブロッティング>

- 以下の手順で陽極 (+) プレート上に重ねていき、転写の「サンドイッチ」を作製します:
0.3 M トリズマベース溶液 (20%メタノール含有、pH10.4) に浸したブロッティングペーパー2 枚
0.025 M トリズマベース溶液 (20%メタノール含有、pH10.4) に浸したブロッティングペーパー1 枚、
脱イオン水であらかじめ湿らせたニトロセルロース膜 (NC 膜)
電気泳動したゲル
0.02 M トリズマベース溶液 (20%メタノール、5.25 mg/mL ϵ -アミノカプロン酸含有) を浸透させたブロッティング紙 3 枚
- 室温、90 mA で 2~3 時間転写します。
- 装置から NC 膜を取り外し、風乾で完全に乾燥させます。
注記: 乾燥した膜は 2 枚のブロッティングペーパーにはさんでプラスチック容器に入れ、28°C で保存できます。

お問い合わせ先:

製品の技術的なご質問
価格・在庫のご質問sialjpts@sial.com
sialjpcs@sial.com

じっけんレシピ

<免疫検出>

以下の反応および洗浄ステップは、室温でオービタルシェーカーの台の上で行います。一次抗体は、二次抗体の宿主動物由来の1%正常血清※を含むTBSまたはPBS溶液で希釈することをお勧めします。

※血清の代わりにBSA、脱脂粉乳、ゼラチン、ヘモグロビン、もしくはオボアルブミンのようなタンパク質で代用することもできます。

1. NC膜を細長く切断します。これを、転写時にゲルに接していた面を上向きにして、適当な染色バットに置きます。
2. 4℃で一晩、または、室温で2時間ブロッキングします。ブロッキング剤は、後に反応させるプローブの種類に合わせて選択して下さい。
3. 適当な濃度（製品データシート等に従います）に希釈した一次抗体（3～5 mL）を、膜が覆われるように入れます。1～3時間、室温でインキュベートします。（抗体の希釈倍率は何種類か用意し、最適な希釈率をご検討ください。）
4. NC膜を十分量のTBS/TweenまたはPBS/Tweenで5分間ずつ4回洗浄します。
5. NC膜を、TBS/TweenまたはPBS/Tweenで適当な濃度に希釈したアルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼ標識二次抗体で1時間インキュベートします。
6. NC膜をステップ4の方法で洗浄し、TBS中で5分間ずつ3回リンスします。
7. 基質を調製します。
アルカリホスファターゼの場合：
添付の製品データシートに従って、SIGMA FAST BCIP/NBT 基質タブレットを調製します（または液体BCIP/NBT基質を使用します）。
ペルオキシダーゼの場合：
キットの製品データシートに従ってAECまたはDAB基質を調製します（または液体のTMBをそのまま使用します）。
8. NC膜を基質溶液中で10～30分間、発色するまでインキュベートします。

お問い合わせ先：

製品の技術的なご質問
価格・在庫のご質問

sialjpts@sial.com
sialjpcs@sial.com

じっけんレシピ

9. 蒸留水を何回か交換しながら NC 膜を洗浄し、反応を停止させます。

10. NC 膜を風乾し、プラスチック容器に入れて暗所で保存します。

注記：ペルオキシダーゼ化学発光基質（ルミノール + 増感剤など）を使用する場合、一般的に二次抗体の反応溶液は、通常の色素性基質より 5~10 倍希釈します。

参考文献

1. Burnette, W.N., Anal. Biochem., 112, 195-203 (1981)
2. Hames, B.D., and Richwood, D. (eds.), Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach, IRL Press Ltd., Oxford (1981)
3. Gershoni, J.M., and Palade, G. E., Anal. Biochem., 131, 1-15 (1983)

トランスルシューティング

・ シグナルが検出されない、もしくは弱い場合

考えられる原因	解決策
基質か標識体が失活している	基質溶液に酵素標識体を加えて、色が変わるか確認する
化学発光の場合、現像液の期限切れ	新しい現像液を使用してください
基質やその調整方法が誤っている	<ul style="list-style-type: none"> ・ 基質の選択が正しいか確認をする ・ 基質の中には過酸化水素を添加する場合があります
1 次抗体や 2 次抗体の希釈倍率が誤っている	文献やデータシートを参照し、希釈倍率を数種類検討し、最適濃度を確認する
目的タンパク質が存在しない、または量が少ない	<ul style="list-style-type: none"> ・ 陽性コントロールで泳動したタンパク量を確認する ・ 目的タンパク質の由来が適しているか文献などでお調べください ・ 必要な場合は、濃縮や精製をする
インキュベーション時間が十分ではない	インキュベーション時間を延長し、検討する
酵素阻害剤があるため	アジ化ナトリウムはペルオキシダーゼ反応を阻害することがあります
過度の洗浄	洗浄回数を減らし、洗浄バッファーから界面活性剤を除きます

お問い合わせ先:

製品の技術的なご質問
価格・在庫のご質問sialjpts@sial.com
sialjpcs@sial.com

じっけんレシピ

<p>タンパク質の転写量が少ない</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ブロッキング前にポンソS（品番：P7170）で膜やゲルのタンパク量を確認する ・転写時間の検討<低分子のタンパク質（分子量が1万以下）膜を通過することがありますし、高分子のタンパク質はサイズにより転写時間を長くする必要があります ・転写バッファの確認をするー高濃度のメタノールがゲルからのタンパク質の移動を妨げる場合があります
----------------------	---

・バックグラウンドが高い、または非特異なバンドがでる場合

考えられる原因	解決策
ブロッキングが十分でない	<ul style="list-style-type: none"> ・別のブロッキング試薬を使用したり、ブロッキング時間を延長する ・抗体希釈の際にブロッキングタンパク質を使用する
1次抗体の濃度が高い	文献やデータシートを参照し、希釈倍率を検討する
2次抗体の濃度が高い	2次抗体のみをサンプルと反応させた場合に非特異な染色が認められた場合には、別の2次抗体に変更する
2次抗体がサンプル中の他のタンパク質と交差している	サンプルと同じ動物種由来の1~5%正常血清を含むバッファで2次抗体を希釈する
複数のバンドがでており、目的タンパク質の分解産物である	サンプル調整の最初の段階でプロテアーゼ阻害剤が入っているか確認する（サンプル調整時や保存中に分解された可能性があります。サンプルを新しく調整します。）
抗体のインキュベーション時間が長い	インキュベーション時間を短くする
色素性気質溶液のインキュベーション時間が長い	染色時間を短くする
洗浄が十分でない	洗浄の回数を増やす
サンプル中に酵素が混入している	サンプルに基質のみを入れて反応させ、サンプル中に酵素活性が存在するかを確認する