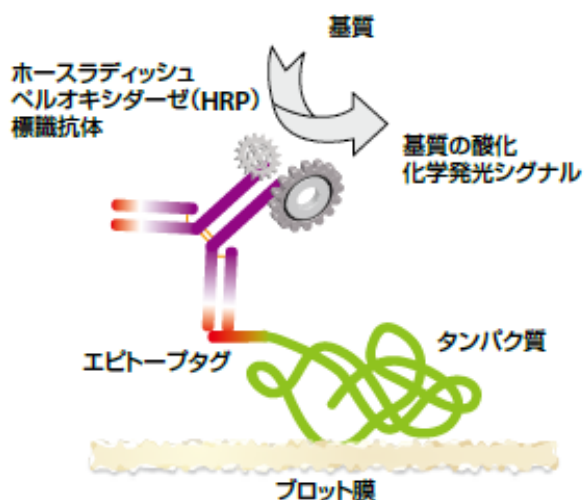


イムブロットング (ウェスタンブロットング)

イムブロットングの原理 (HRPの例)



イムブロットングの中でもっともよく利用される手法はウェスタンブロットングです。ウェスタンブロットングは電気泳動 (主にSDS-PAGE) を行って分離したタンパク質をメンブレン (膜) に転写し、メンブレン上のタンパク質を抗体で検出する方法です。

抗体の検出は酵素や蛍光色素が用いられますが、イムブロットングの検出に最も多く利用されている酵素はホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) です。

HRPはルミノールまたはTMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン) の酸化を触媒し、発光 (化学発光) または発色 (比色法) の形で検出可能なシグナルを生じさせます。化学発光による検出は比色法に比べて何倍も感度が高いものですが、コストと手間がかかります。比色法による検出は実験台の上で行うことができ、またシグナルの発生を直接観察することができます。

HRP標識抗体による検出は間接的または直接的に行うことができます。直接検出法の場合は目的のタンパク質に対する抗体にHRP標識 (HRPラベル、HRP結合) したものを使用し、間接検出法は2段階で行われます。間接検出法は目的のタンパク質に対する標識していない抗体“一次抗体”と一次抗体に対する抗体にHRP標識したものの“二次抗体”を利用します。二次抗体を用いることで、標識していない様々な一次抗体を検出することが可能になります。

ウェスタンブロットング プロトコル例

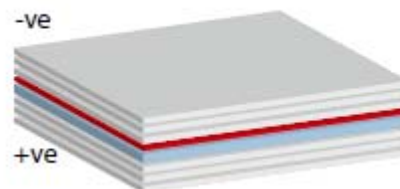
ブロットング

1. ブロットング装置の陽極 (+極) プレート上にブロットングペーパーと膜を次のようにサンドイッチ状になるように重ねて置きます。

転写用バッファー1に浸漬したブロットングペーパー2枚
 転写用バッファー2に浸漬したブロットングペーパー1枚
 脱イオン水であらかじめ湿らせたPVDF※またはニトロセルロース膜1枚
 タンパク質を電気泳動したゲル
 転写用バッファー3に浸漬したブロットングペーパー3枚

※ PVDF膜の場合は、先に100%メタノールに10秒間浸漬してから使用

2. 1.5mA/cm²、室温で1.5時間通電して転写 (タンパク質の分子量によって最適な時間が異なる場合があります)。
3. 装置から膜を取り出し、検出ステップに進みます。



使用する主な試薬

転写バッファー1 (Transfer Buffer 1)
0.3M トリス, pH 10.4 (Trizma base 製品番号T1503)
20% メタノール
転写バッファー2 (Transfer Buffer 2)
0.025M トリス, pH 10.4 (Trizma base 製品番号T1503)
20% メタノール
転写バッファー3 (Transfer Buffer 3)
0.02M トリス, pH 10.4 (Trizma base 製品番号T1503)
20% メタノール
25 mg/mL ε-アミノカプロン酸 (製品番号A250)
バッファー
TBS-T (0.05% TWEEN 20含有TBS) (製品番号T9039)
PBS-T (0.05% TWEEN 20含有PBS) (製品番号P3563)

ペルオキシダーゼ基質
メンブレン用TMB基質液 (製品番号T8665)、DAB (製品番号D6815)、AEC染色キット (製品番号AEC101) など
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B3804) など
その他
膜 (ニトロセルロース膜、PVDF膜など)
ブロットングペーパー
一次抗体
二次抗体
ブロッキング剤: ウシ血清アルブミン (BSA) (製品番号A7906などをTBSまたはPBSで5%に溶解して調製)

(ウェスタンブロットプロトコルの続き)

検出

以下の反応および洗浄ステップは、室温でシェーカーの上で行います。

1. 転写した膜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。ブロッキング剤はスキムミルクや5%BSA溶液、市販のブロッキング剤などを使用。
3. 適当な濃度に希釈した一次抗体を膜が覆われるように入れ、1～3時間、室温でインキュベート。
4. 膜を十分量のTBS-Tween 20 (TBS-T) または PBS-Tween 20 (PBS-T)で5分間ずつ4回洗浄。
5. TBS-T または PBS-Tで適当な濃度に希釈した二次抗体で膜を1時間インキュベート。化学発光基質は検出力が高いため、発色系で行う場合の5～10倍の希釈で二次抗体を用います。
6. 膜を手順4と同様の方法で洗浄し、TBSで5分間ずつ3回リンスします。

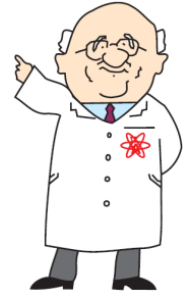
以下はペルオキシダーゼ標識二次抗体を使用し、TMB基質で検出する例です。

1. 膜が入っているバットにTMB溶液 (製品番号T8665は調製済み溶液のためそのまま使用可能) を適量入れ、5～15分間発色するまで室温でインキュベートします。
2. 蒸留水で膜を1分間×数回洗浄します。
3. 膜を風乾してスキャナーなどで取り込むか、プラスチック容器に入れて暗所で保存します。

以下はアルカリフォスファターゼ標識二次抗体を使用し、BCIP基質で検出する例です。

1. SIGMA FAST BCIP®/NBT 基質タブレット (製品番号B5655) を10mLの蒸留水に溶解します。溶けるまでボルテックスを2～5分を行います。
2. 膜が入っているバットに手順1で溶かした溶液を適量入れ、5～10分間発色するまで室温でインキュベートします。
3. 蒸留水で膜を1分間×数回洗浄します。
4. 膜を風乾してスキャナーなどで取り込むか、プラスチック容器に入れて暗所で保存します。

初めて使用する一次抗体の場合は、各製品のデータシートなどに記載された希釈率を中心にいくつかの希釈率で予備実験を行って、最適な希釈率を決めておく方が良いでしょう。



アルカリホスファターゼの場合はPBSのリン酸が検出に影響を与えるため、TBS-Tを用いるのじゃ。

バックグラウンドが強くなり過ぎる前に取り出すのがコツじゃよ。

一次抗体の希釈バッファーについて

一次抗体の希釈にはTBSまたはPBSを用います。その際、TBSまたはPBSに二次抗体の宿主動物と同じ生物種由来の正常血清 (normal serum) を1%加えることで非特異的反応を抑制する効果が期待されます。

もしくは血清の代わりに BSA、脱脂粉乳、ゼラチン、ヘモグロビン、もしくはオブアルブミンなどのタンパク質で代用することもできます。

ウェスタンブロットング トラブルシューティングガイド

問題点	考えられる原因	解決策
シグナルが検出されない、シグナルが弱いまたは非特異的なバンドが出る	基質や標識された酵素の活性が弱いか長期間の保存によって失活している	標識体と基質の活性を確認して下さい。酵素標識された抗体と基質を混ぜて色が変ることなどで確認します。
	化学発光検出の場合、フィルム現像液の使用期限切れ	新しいフィルム現像液を使って下さい。
	使用する基質を誤っている	酵素に対して基質の選択が適切であるかを確認して下さい。
	基質の調製を誤っている	基質の製品データシートをご参照下さい。また必要に応じて新しいH ₂ O ₂ を加えて確認して下さい。
	一次抗体または二次抗体の希釈を誤っている	抗体の推奨希釈率について文献や製品データシートで確認し、希釈範囲を変えてみて下さい。特に化学発光のような高感度の検出システムにおいては、高濃度での使用が必ずしもよいとは限りません。弊社抗体製品のほとんどは色素性基質を用いて試験されておりますので、化学発光検出にご使用いただく場合、推奨濃度より5~10倍の希釈が必要となると思われます。
	使用する一次抗体を誤っている	ウェスタンブロットに使用できる抗体であるかを確認して下さい。各抗体が、すべてのアプリケーションには対応していません。ご使用の一次抗体と対象の動物種由来タンパク質との反応が不可能な場合もあります。文献、製品データシート、タンパク質の配列に関する情報を確認して下さい。
	目的とするタンパク質が存在しない、あるいは量が少ない	陽性コントロールがあれば、泳動したタンパク量をチェックして下さい。必要な場合は免疫沈降や精製により、泳動するサンプル中の目的タンパク質を濃縮して試して下さい。
		目的タンパク質の由来が、最適であるかを文献等で調べてみて下さい。また、下記「タンパク質の転写量が少ない」の項目もご参照下さい。
	使用する二次抗体が不適切である	二次抗体の結合能が低い、あるいはない場合が考えられます。一次抗体を膜の小片にスポットして乾燥後、ブロッキングを行い、希釈した二次抗体を滴下、洗浄して基質を入れ発色させて試験して下さい。二次抗体が一次抗体に結合していればスポットが確認されます。
	インキュベーション時間が十分でない	最低1時間一次抗体とインキュベートして下さい。
	酵素阻害剤が存在している	抗体の保存剤として用いられることがある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いて下さい。
	タンパク質の転写量が少ない	ブロッキング前に、Ponceau S (Sigma製品番号P7170)で膜を染色してタンパク質の転写をチェックします。転写前に、膜が均一に湿っているかを確認して下さい。また、転写時間もテストして下さい。低分子のタンパク質(分子量 < 10,000)は、膜を通過することがあります(最初の膜の後ろに2枚目の膜をおいて転写して下さい)。高分子のタンパク質はサイズに応じて転写時間を長くする必要があります。また、転写バッファーをチェックして下さい。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。転写バッファー中に0.005~0.01%のSDSを添加すると、ゲルから移動するタンパク量の増加が期待できますが、タンパク質が膜へ結合する妨げにもなります。タンパク質のpIが9.0より高い場合は、pH9のCAPSを転写バッファーとして試して下さい。
バックグラウンドが高い、または非特異的なバンドが出る	ブロッキングが十分でない	ブロッキング時間を長くする、ブロッキング試薬の濃度を高くする、別のブロッキング試薬を使用する、抗体の希釈の際にブロッキングタンパク質を入れる、あるいは同じブロッキング試薬の新しいロットを試すなどブロッキング条件の検討を行って下さい。
	一次抗体の特異性が低い	モノクローナル抗体、あるいはアフィニティー精製のポリクローナル抗体を試して下さい。
	一次抗体の濃度が高い	文献や製品データシートで推奨された一次抗体の希釈倍率を確認して下さい。実験系を最適化するため、希釈倍率をご検討いただくことをお奨めします。
	二次抗体の濃度が高い	余分のサンプルレーンを立てて電気泳動し、一次抗体のインキュベーションを手順から省略してテストして下さい。もし、この「二次抗体のみ」のコントロールに非特異的な染色が認められたときは、二次抗体の希釈倍率をさらに上げるか、別の二次抗体を試して下さい。
	二次抗体がサンプル中の他のタンパク質と交差反応している	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ーで、二次抗体を希釈して下さい。
	複数のバンドが目的タンパク質の分解されたフラグメントである	サンプル調製の最初の段階からプロテアーゼ阻害剤が入っているか確認して下さい。保存やサンプル調製処理時におけるタンパク分解の可能性が低くなります。できれば新しいサンプルを試して下さい。
	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して下さい。
	色素性基質溶液のインキュベーション時間が長い	染色時間を短くします。ポジティブなシグナルが出るまで基質に膜をさらして、バックグラウンドが発色する前に膜を洗浄して反応を停止して下さい。
	洗浄が十分でない	洗浄の回数を増やすか、または厳しい条件にして下さい。
	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をテストし、そのサンプル中に酵素活性が存在するかをチェックして下さい。