

実験基礎情報

ウェスタンブロット

ウェスタンブロット

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。¹

試薬および装置

- 0.3M トリズマベース、20%メタノール、pH10.4
- 0.025M トリズマベース、20%メタノール、pH10.4
- 0.02M トリズマベース、20%メタノール、5.25mg/mL ϵ -アミノカプロン酸
- トリス緩衝化生理食塩水 (TBS) (シグマ T6664)
- 0.05% Tween20含有トリス緩衝化生理食塩水 (TBS/ Tween) (シグマ T9039)
- 0.05% Tween20含有リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS/ Tween) (シグマ P3563)
- ニトロセルロース (NC) 膜、孔径0.45 μ m (シグマ N8142) 低分子量のタンパク質については孔径0.2 μ mのニトロセルロース膜も使用できます。
- プロットングペーパー (シグマ P7796)
- 一次抗体
- 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
- ブロッキング溶液：5%ウシ血清アルブミン (BSA) (シグマ A9647)、または3~5%脱脂粉乳 (シグマ M7409) 含有TBSまたはPBS溶液
- アルカリホスファターゼ基質：SIGMA FAST BCIP/NBT 基質タブレット (シグマ B5655) または基質液 (シグマ B1911、B3679、B3804)

または

- ペルオキシダーゼ基質：AEC染色キット (シグマ AEC-101)、メンブレン用TMB基質液(シグマ T0565)、またはSIGMA FAST DABタブレット (シグマ D4418)
- ミニゲルシステム
- 2000Vパワーサブライ
- セミドライプロットング装置
- オービタルシェーカー
- トラフ：深さ2~3mm、幅7~10mm

プロトコール

SDS-PAGE

- 高~低分子量のタンパク質に対して、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。分析用の場合は、0.5~10 μ g/wellのタンパク質をアプライします；調製用の場合は、1枚のゲルあたり600~800 μ g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。
- 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。スラブゲル調製法は、文献や書籍等に多く記載されています。: *Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis* by H.R. Mauer (de Gruyter; Berlin, New York, 1971)

タンパク質のプロットング

- 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：

0.3Mトリズマベース (20%メタノール含有、pH10.4) を浸透させたプロットングペーパー2枚

0.025Mトリズマベース (20%メタノール含有、pH10.4) を浸透させたプロットングペーパー1枚

脱イオン水で前処理して湿らせたNC膜

スラブゲル

0.02M トリズマベース (20%メタノール、5.25mg/mL ϵ -アミノカプロン酸含有) を浸透させたプロットング紙3枚

- 室温、90mA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枚のプロット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。

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。

- 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、トラフに置きます。
- 4°C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。
- 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 (3~5mL) を、膜が覆われるように入れます。シェーカー上で1~3時間、室温でインキュベートします。
- 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。
- 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と、1時間インキュベートします。
- 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。
- 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)。
- NC膜を基質混合液中で10~30分間、発色するまでインキュベートします。
- 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。
- 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

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

ウェスタンブロット 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	基質や標識体が弱い、あるいは寿命か保存状態が原因で失活している	標識体と基質の活性を確認して下さい。 例えば、基質溶液に酵素標識体を加えると、色が変わるはずです。
	化学発光検出の場合、フィルム現像液の期限切れである	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	ご使用の酵素標識体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	基質に添付された製品データシートに従って下さい。 必要な場合は新しい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	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 (シグマ 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	別のブロッキング条件を試して下さい。: 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。