

ウェスタンブロッティング

Osakada

<セミドライ式ブロッティング装置使用>

試薬類

◎転写バッファー[pH9.2]

Tris base	5.8 g	(48 mM)
Glycine	2.9 g	(39 mM)
SDS	0.37 g	(0.037%)
Methanol	200 ml	(20%)
DW	fill up to 1 L	

◎ボンソー3R 溶液(和光純薬)

◎10×PBS

NaCl	40 g
KCl	1 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	14.4 g
KH ₂ PO ₄	1 g
DW	fill up to 500 ml

◎PBST(PBS+0.1% Tween20)

Tween20	0.5 ml
PBS	500 ml

◎ブロッキング溶液(5% skim milk+PBST)

Skim milk	2.5 g
PBST	50 ml

◎Amido Black 染色液

Amido Black 10B	20 g	(10%)
Acetic acid	20 ml	(10%)
DW	fill up to 200 ml	

[転写前の準備]

- ・分離ゲルがのるサイズに PVDF メンブレン、ろ紙 6 枚(Whatman 3MM)をカットしておく(通電効率を考慮して、メンブレンやろ紙はゲルがのるぎりぎりの大きさが望ましいが、ゲルを転写バッファーに平衡化したときにアクリルアミド濃度によって多少大きさが変わるので、高濃度のゲルを使用するときは注意する)。
- ・PVDF メンブレンをメタノールに数十秒浸して親水化したのち、転写バッファーに浸しておく。
- ・電気泳動後のゲルを転写バッファー中で 15 分ほど振盪し、平衡化する。
- ・ろ紙を転写バッファーに浸しておく。

メンブレンへの転写

1. 陽電極の上のろ紙 3 枚、PVDF メンブレン、ゲル、ろ紙 3 枚の順に泡が入らないように重ね、陰電極のをせる。PVDF 膜 1cm²あたり 0.8mA の定電流で 45 分～1.5 時間通電する。
2. 転写終了後、メンブレンをメタノールに浸しボンソー 3R 溶液で数十秒染色する。
3. 染色液を回収し、メンブレンを DW または PBST で洗い適当なコントラストが得られるまで脱色する。
4. マーカーの位置、レーンが分かるようにボールペンで印をつける。
(プレステインのマーカーを使用すれば 2～4 の操作は必要ないが、マーカーの精度を重視して通常のマーカーを使う場合や、転写がうまくいったかどうかを確認したい場合にはここでボンソー染色を行うと良い)
5. ブロッキング処理を行う。

ブロッキングと抗体反応～その1～

1. メンブレンをブロッキング溶液に浸し、室温で 1 時間～終夜振盪する(1 時間振盪した後 4℃で一晩おいてもよい)。
2. ブロッキング溶液を捨て、PBST で軽く洗う。
3. プラスチックケースの底にパラフィルムを密着させるように敷き、キムワイプなどで余分なバッファーを除去したメンブレンのをせる。
4. 一次抗体を PBST で希釈し、9cm×6cm のメンブレン 1 枚につき 2 ml の希釈液をメンブレンの上ののせる。ゆっくりと振盪し、1～2 時間反応させる。抗体の希釈液には PBST の他に必要に応じて 1～5% skim milk+PBST、1～3% BSA+PBST などから選択する。メンブレンが乾燥しないように、プラスチックケースの隅に水をしみ込ませたキムワイプを置いておく。
5. PBST で 1 回軽く洗い、さらに PBST で 10 分間×3 回洗う。
6. 二次抗体を一次抗体と同様に希釈し、メンブレンにのせる。1 時間反応させる。
7. PBST で 1 回軽く洗い、さらに PBST で 10 分間×3 回洗う。

ブロッキングと抗体反応～その2～

1. メンブレンをブロッキング溶液(5～10% skim milk/PBS)に浸し、室温で1時間振盪する。
2. 抗体インキュベーション用にブロッキング溶液を一部取り、残りを捨てて PBS で軽く洗う。
3. メンブレンをハイブリバックに入れ、一方向を除きシールする(抗体溶液を入れるため)。ハイブリバック内の余計な PBS は押し出して除く。
4. 一次抗体を 0.1～1% skim milk/PBS/0.1% Tween で希釈し、ハイブリバック内に入れる。9cm×6cm メンブレンにつき 3～4ml の抗体溶液を使用。ハイブリバックから余計な空気を除いて(完全に除ききれない)、完全にシールする。細かい気泡をメンブレンの端に集めてシールし、メンブレンがあるエリアになるべく空気を残さないようにする。抗体溶液をよせて、メンブレンに対してなるべく遊びが無くなるようにシールする。
5. シェーカーなどで一晩振盪(4℃)。(ハイブリバックの四方をビニールテープでとめて振盪)
6. PBS で軽く2回洗い、0.02% Tween/PBS で10分3回洗ったのち、再び PBS で軽く2回洗う。
7. 二次抗体を一次抗体と同様に反応させる。4℃で2～3時間。
8. PBS で軽く2回洗い、0.02% Tween/PBS で10分3回洗ったのち、再び PBS で軽く2回洗う。

HRP 反応による検出(化学発光法)

検出試薬は、ECL Western Blotting Detection System(GE)、またはイムノスターLD(Wako)を使用。

1. 洗浄済みのメンブレンの余分なバッファーをキムワイプで除去し、平らに敷いたラップに転写面を上にしてメンブレンを置く。
2. Reagent1 と Reagent2(イムノスターの場合は発光液 A と発光液 B)を 1:1 で混合する。
検出試薬を混合したらすぐにメンブレンにかけ、1 分間静置する。
3. キムワイプで余分な検出試薬を除去し、メンブレンをラップに密着させるように包み、オートラジオグラフィ用のカセットに検出面を上にしてテープで固定する。
4. 暗室で(X 線フィルム用安全光か完全な暗闇のもと)X 線フィルムを 1 枚取り出し、カセットに挟み込む。
抗体の感度、予想される抗原の量などにより適当な時間露光する。10 秒、30 秒の露光から場合によっては数分から数十分まで試す。
5. カセットから X 線フィルムを取り出し、現像液(レンドール FUJIFILM)につける。時々攪拌し、1~5 分間現像する。
6. 停止液(3%酢酸)に約 30 秒つける。
7. 定着液(レンフィックス FUJIFILM)に 1~5 分間つける。定着液につけたら照明をつけてよい。
8. フィルムの白い不透明な部分が完全に抜けたら、定着液からフィルムを取り出し水道水で十分に洗う。
9. フィルムを乾燥する。
10. メンブレンにつけたマーカーやレーンの印をフィルムに写しとったら、メンブレンをカセットから外して DW で軽く洗う。
11. 必要があれば Amido Black 染色液でメンブレンを染色し、10%酢酸か水で脱色する。

BIORAD ChemiDoc™ XRS+を使用して検出する場合(詳細は取扱説明書を参照)

HRP 反応による検出 3 番、メンブレンをラップに包む手順まで同じ。

1. 本体電源(オレンジボタン)を入れ、次に PC を起動させる。
2. スクリーンの上にメンブレンを設置する。
3. Image Lab を起動させる。
4. Start Page の Protocols で New を選択すると、Protocol Setup 画面が表示される。1. Gel Imaging にて以下の設定を行う。
 - Application の Select から Blots > chemi を選択する。(マーカー位置撮影の場合 Custom > White Light を選択する。)
 - Imaging Area を設定する。
 - Image Exposure を設定する。Signal Accumulation Mode を選択した場合、set up で初回撮影時間、最終撮影時間(7200 秒まで)、撮影回数を入力する。
 - Display Options を設定する。Highlight saturated pixels にチェックを入れる(推奨)。Image Color を Gray に設定する(推奨)。
5. Protocol Setup の Position Gel で撮影範囲の確認をする。この時、フィルター確認ウィンドウが開くので、NO FILTER(化学発光検出の場合)になっていることを確認して OK する。
6. Run Protocol で撮影開始する。
7. 撮影終了後、保存したい画像を選択し Select Image and continue をクリックする。選択した画像が表示されるので、Save すると Image Lab Image Document として保存される(この保存方法だと選択した画像以外の画像は破棄される)。保存した画像は、File >Export >Raw Image to Tiff で TIFF file に変換する。
- 7'. 撮影終了後、サムネイルウィンドウで右クリックし save all で保存すると、撮影した全ての画像が Image Lab Image Document として保存される(ただしこの画像は JPEG file にしか変換できないので解像度が下がる)。保存した画像は、File >Export >Display Image で JPEG file に変換する。
8. Image Lab を終了し、PC をシャットダウンする。本体電源を切る。

BAF(分子量; 10kDa)のウェスタンブロッティング

<タンク式ブロッティング装置使用>

セミドライと異なる試薬

◎ウェット用転写バッファー

Tris base	5.8 g	(48 mM)
Glycine	29 g	(390 mM)
Methanol	200 ml	(20%)
DW	fill up to 1 L	

要時調整し、4°Cに冷やしておく。

*BAF の場合は、SDS(-)の転写バッファーを使用する。タンパク質によって SDS の有無などの条件検討が必要。

[転写前の準備]

- 装置付属のアイスクーリングユニットに DW を注ぎ、氷を作っておく。
- ウェット用転写バッファーSDS(-)を調整し、4°Cで冷やしておく(要時調整が好ましい)。
- PVDF メンブレンをメタノールに数十秒浸して親水化したのち、転写バッファーに浸しておく。
- 電気泳動後のゲルを転写バッファー中で 15 分ほど振盪し、平衡化する。
- ろ紙(BIORAD/1703932)2 枚を転写バッファーに浸しておく。

メンブレンへの転写

1. ゲルホルダーカセットの陽極側(透明の面)の上にファイバーパッド、ろ紙1枚、PVDF メンブレン、ゲル、ろ紙1枚、ファイバーパッドの順に泡が入らないように重ね、ホルダーカセットの陰極側(黒の面)ではさむ。タンクに氷、ゲルホルダーカセットをセットし、バッファーを注ぐ。タンクの中にスターラーを入れ、ゆっくり攪拌しながら 60V(12V/cm)の定電圧で 2 時間通電する。
2. 転写終了後、マーカの位置が分かるようにボールペンで印をつける。
3. ブロッキング反応を行う。(以下、ブロッキングと抗体反応~その2~に従う。)

SNAP id の使用手引き

山根美穂

- **Blocking solution** の濃度について
あまり濃度が濃いと目詰まりを起こすので好ましくない。
自分の使用するブロッキング剤について最適な濃度を調整する必要がある。
(目安は吸引を行った際に 10 から 20 秒で終了するくらい)
 - ✓ スキムミルクについては推奨濃度 0.5%では濃いようなので、0.1%くらい (Wako 使用の場合) がおすすめ。
 - ✓ **0.1% Tween20** を含む PBST 等で作成すること。

- 必要なバッファー等
使用するホルダーにより必要とするバッファー量がことなる。以下の表のとおり。

	Single well (7.5 x 8.4)	Double well (4.2 x 8.4)	Triple well (2.8 x 8.4)
Blocking solution	30 ml / well	15 ml / well	10 ml / well
Antibody solution	3 ml / well	1.5 ml / well	1 ml / well
Wash buffer	30 ml / well	15 ml / well	10 ml / well

- ✓ **Antibody solution** の作成には **Blocking solution** をもちいる。したがって **Blocking solution** は **Single well** の場合で、30 ml + 3 ml (1 次抗体希釈用) + 3 ml (2 次抗体希釈用) = 36 ml をあらかじめ作成しておく必要がある。
 - ✓ **Wash Buffer** は通常用いる **PBST** 等でよい。**Wash** は各 3 回行うので、**Single well** の場合で (30 ml x 3 times) x 2 = 180 ml 必要。
- 抗体希釈液 (**Antibody solution**) について
使用する抗体濃度は通常法の希釈率の 3 から 5 倍が推奨されているが、このシステムでは反応に用いる際の溶液量が 3 分の 1 ほどなので、抗体の使用量自体は同じと思っておけばよい。
実際には通常法にてメンブレン (大) 1 枚あたり 10ml の溶液を用いて x 1000 でインキュベーションを行っていた場合 (抗体 10 μl)、このシステムでは 3 ml の溶液に 10 μl 抗体を加えて **Antibody solution** とすればよい。

➤ 手順

1. プロットホルダーを開け、白い面をミリ Q 水で湿らせる
(double、triple ホルダー使用時で使用しない面がある場合も、全ての面を湿らせる)
2. 転写後のメンブレン (湿った状態) をプロット面を下 (白い面の側) にしてのせる
3. スペーサーを上に乗せてふたを閉め、チャンバーにセットする
4. **Blocking solution** をウェルにそそぎ、すぐに吸引を開始する (10 から 20 秒)
5. 吸引が終了したらノブを回してバキュームをオフにする
6. 1 次抗体をウェルにそそぎ 10 から 13 分ほどインキュベートする
7. 吸引を開始し完全に引き切るまで 10 から 20 秒まつ
8. 続けて **wash buffer** を注ぎ入れ、同様に吸引する (3 回繰り返す)
9. バキュームをオフにして 2 次抗体を加え、10 分インキュベート
10. 7、8 のステップを繰り返す
11. メンブレンをホルダーから取り出し、以降は通常通り検出反応を行う