

ウエスタンブロッティング プロトコール

1) 器具・機械

セミドライ型ブロッティング装置 (トランスブロット SD セル BIO-RAD)
PVDF メンブレン (Hybond-P, Amersham Biosciences)、ニトロセルロースでも可
濾紙 (FILTER PAPER No. 526, ADVANTEC)
ハイブリバッグ
シェイカー
シーラー

2) 試料・材料

グリシン
Tris
SDS
NaCl
メタノール
スキムミルク (ナカライ)
Tween20 (ストック 20% (w/v) 溶液、4 °C 保存)
アミドブラック 10B
抗体 (Anti-His (C-term)-HRP Antibody, invitrogen)
発色液 (ペルオキシダーゼ発色キット イムノブロッティング用, ナカライ・自
作可)

3) 試薬の調製

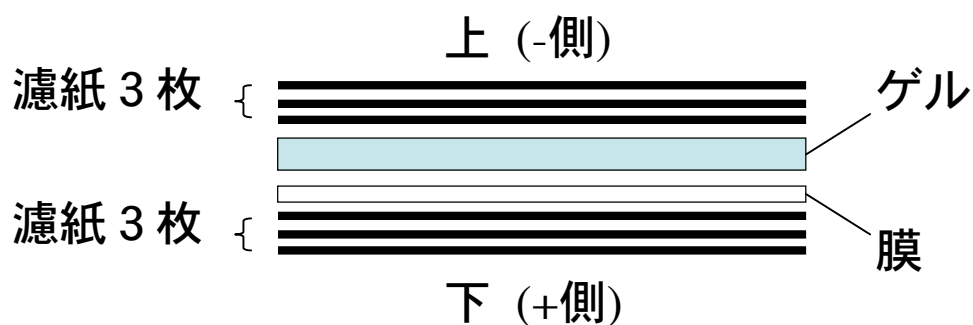
- ・ 濾紙 8 x 10 cm を 6 枚
- ・ PVDF 膜 8 x 10 cm を 1 枚
- ・ トランスファーバッファー
 - グリシン 43.26 g
 - Tris 9.09 g
 - SDS 0.3 g
 - メタノール 600 ml
 - 純水

total 3 L

- ・ 10 x TBS (200 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8.0)
- ・ ブロッキングバッファー (3% (w/v) スキムミルク in TBS)
- ・ T-TBS (0.02% (w/v) Tween20 in TBS)
- ・ アミドブラック染色液 (0.1% (w/v) アミドブラック 10B in 7% 酢酸)
- ・ 発色液 (自作の場合、10 ml の冷メタノール + 30 mg の 4-クロロ-1-ナフトール + 50 ml の TBS + 30 μ l の 30% H_2O_2 ・ 用時調製)

4) 実験操作

- (1) SDS-PAGE を行う
- (2) PVDF 膜をメタノールに 10~20 秒間浸した後 (親水処理)、タッパー中でトランスバッファーに 30 分間以上浸しておく
(ニトロセルロース膜の場合、親水処理は必要ない)
- (3) 泳動終了後、ゲルの方向が分かるように右下端を小さく斜めにカットし、タッパー中でトランスファーバッファーに浸して 15 分間振蕩する (平衡化)
- (4) 図に示すようにトランスファーバッファーを十分にしみ込ませた濾紙 3 枚一組でメンブレン、ゲルを挟みトランスファー装置にセットする
(気泡が入った部分は転写されないので、先を折ったパスツールをのし棒のように用いて気泡を追い出すとよい)



- (5) 通電、15 V 定電圧、30 分間
(濾紙サイズ 1 cm^2 あたり 1 mA 定電流、2 時間でも可。但し 25 V 以下)
- (6) ゲルが当たっていた部分を鉛筆でマーキングする
マーカー一部分に相当する部分をハサミで切り離し、アミドブラック染色を行う (12 参照)。ゲルは必要に応じて CBB 染色を行う

- (7) 膜をタッパー中でブロッキングバッファーに浸して 30 分間以上振蕩する
(ブロッキング) (4°Cで一晩可)
- (8) 抗体を 5~10 ml のブロッキングバッファーで 1/5000 希釈し、ハイブリバ
ツ
グ中でメンブレンを浸して 60 分間振蕩する (抗体反応)
(抗体の希釈倍率は抗体のタイターに依存する)
- (9) T-TBS にメンブレンを浸し、タッパー中で振蕩し 5 分間洗淨する
この操作を 3 回繰り返す
- (10) 5~10 ml の発色液を用意し、タッパー中で膜を浸して発色反応を行う
- (11) 発色が終了したら膜を純水に置換し、乾燥後に保管する
- (12) 切り離れたマーカ一部分の膜は、0.1%アミドブラック 10B in 7% 酢酸に浸
して染色する。7% 酢酸で脱色後に純水に置換し、乾燥後に保管する

* 二次抗体を用いる場合は、8~9 の操作を繰り返す

(実験例)

リコンビナント EGCase (C-His) の検出

