

トランスブロット SD セル セミドライブロットティング装置 取扱説明書

Catalog Numbers

1703940

— ご使用前に —

この取扱説明書を十分お読み下さい。
なお、この取扱説明書は紛失しないよう
に製品の近くに保存して下さい。

BIO-RAD

はじめにお読みください

トランスブロット SD セルをよりよくお使いいただくために、事前にこの取扱説明書を十分にお読みください。

装置の組立て等、操作に慣れてから実際の使用を開始してください。

装置やアクセサリーはご使用前に十分に洗浄してください。バイオ・ラッドでは、実験器具の洗浄に適したクリーニング用洗剤（カタログ番号 1610722）をご用意しています。洗浄した器具類は流水で十分にすすいだ後、脱イオン水でリンスして、よく自然乾燥させてからご使用ください。装置本体の洗浄方法の詳細は、第 1 章のクリーニングをご参照ください。

保 証

バイオ・ラッドはトランスブロット SD セルの性能を 1 年間保証いたします。保証期間内に生じた故障に対し、無償で修理、交換に応じています。ただし下記による故障の場合、保証はいたしかねます。

1. 不適切な使用方法によって生じた故障
2. バイオ・ラッドまたはバイオ・ラッドの認証者以外の者による修理および改造にともなう故障
3. バイオ・ラッド以外のアクセサリー・交換部品の使用による故障
4. 事故もしくは誤った操作方法による故障
5. 天災による損傷
6. 不適当な溶媒、サンプルの使用による腐食・劣化・故障

ただし、以下の部品に関しては保証の対象外となります。

白金コートチタニウム電極

修理はバイオ・ラッドの技術サービスが対応いたします。最寄りの代理店までご連絡ください。カタログ番号と製品名、シリアル番号を確認できるようにお願いいたします。

目 次

第1章 はじめに	1
1-1 仕様	1
1-2 安全にご使用いただくために	2
第2章 トランスプロット SD セルの組立て	3
2-1 転写の準備	3
2-2 標準的な転写方法	4
2-3 酸性条件での転写	6
第3章 バッファー調製	7
第4章 ブロットイングプロトコル例	9
4-1 SDS-PAGE したタンパク質のブロットイング	9
4-2 DNA のブロットイング (ポリアクリルアミドゲル、DNA 250～1,000 bp)	9
第5章 タンパク質ブロットイング用メンブレンの特性	10
第6章 トラブルシューティングガイド	11
6-1 転写効率が悪い	11
6-2 ニトロセルロースメンブレンへの結合性が弱い	12
6-3 検出感度が低い。または全く反応しない。	12
第7章 参考文献	13
第8章 関連製品とアクセサリー	14

第1章 はじめに

ブロットイングは 1975 年 Southern によってアガロースゲルからニトロセルロースメンブレンに DNA の転写を行ったことが始まりです⁽¹⁾。後にアガロースやポリアクリルアミドゲルから RNA⁽²⁻⁴⁾ やタンパク質の転写^(5, 6) も行われるようになりました。メンブレン素材として、タンパク質の結合容量の高い PVDF メンブレンも使用されるようになりました。それまでの毛細管式による不十分な転写効率を改善するために、1979 年に初めて Towbin らはポリアクリルアミドゲルから電氣的にタンパク質を溶出させてブロットイングを行いました⁽⁷⁾。それ以来、電氣的にブロットイングを行う手法は、DNA や RNA にも応用されています⁽⁸⁻¹⁴⁾。

セミドライ条件下でのブロットイングは、Khyse-Andersen によって 1984 年に初めて報告されました⁽¹⁵⁾。このブロットイングでは水平に配置された電極プレートを用い、転写バッファーに十分浸されたフィルターペーパー(ろ紙)にゲルとニトロセルロースメンブレンをはさみ込んだ形で行われました。この時、バッファーを含むフィルターペーパーはバッファータンクの代わりになり、イオンリザーバーの役割を果たしています。さらに、電極間の距離は、ゲルやフィルターペーパーを重ねた厚みだけなので、ゲルに強い電場(V/cm)をかけることができ、高い効率で迅速な転写が可能となります。

トランスブロット SD セルは、迅速なセットアップと簡便な使用方法というセミドライブロットイングの特長が生かされています。白金コートチタニウムとステンレスからなる電極プレートの組み合わせによって、効率良くバックグラウンドの低いブロットイングが可能となります。

1-1 仕様

構成品

トランスブロット SD セル本体	ポリカーボネイト樹脂
電極	陽極 白金コートチタニウム
	陰極 ステンレススチール
陽極固定板	アクリル

サイズ

外寸	37 x 24 x 11 cm (W x L x H)
最大ゲルサイズ	24 x 16 cm 以下

クリーニング

本体を液体中に浸さないで下さい。

陽極板の白金を削ったり、傷つけたりしないようクリーニングの際には特にご注意下さい。研磨剤や強い界面活性剤の使用は避けてください。陰極板(ステンレス製)に付着した塩を除くには、マイルドな洗剤を使用して洗浄して下さい。

本体内部に溶液等が入らないようご注意下さい。入り込んだ場合には、四隅の白いガイドポストを回して陽極板をはずし、内部の溶液をふきとって下さい。なお、陽極板と本体は 1 本のコードでつながっております。陽極板をはずす場合にはこのコードを破損したり、陽極板の表面を傷つけたりしないようにご注意下さい。

化学耐性

トランスブロット SD セルの構成品は塩素系炭化水素(例. クロロホルム)、芳香族炭化水素(例. トルエン、ベンゼン)、アセトンを使用できません。有機溶媒を使用した場合は、保証の対象外となります。

1-2 安全にご使用いただくために



警告

トランスブロット SD セルでは、外部の直流電源装置を使用します。この電源装置（パワーサプライ）は感電事故を防止するために、必ずアースをとり、トランスブロット SD セル本体の電極や、接続端子、装置とパワーサプライを結ぶコードについても劣化や緩みがないことを必ず確認してください。

バイオ・ラッド製のパワーサプライは種々の安全設計が施されておりますので、安心してご使用いただけます。

この転写装置は下記の条件でご使用になってください。

最大電圧 25 V

周辺温度 50 °C 以下

誤った使用方法による装置の破損や実験者の負傷を防ぐためにも、以下のガイドラインを守ってご使用ください。



注意

外部の電源装置からの電流は、ブロットティング装置にフタをセットする事で通電する、セーフティーインターロックの設計になっています。フタをはずすと電流が流れません。ブロットティング装置や電源ケーブル等に触れる時には、必ず電源を切ってからにしてください。漏電、その他感電により、人体に危害がおよぶことがあります。

1. **陽極と陰極を逆に接続すると陰極のステンレスが腐食します。**
誤って行った場合は、ステンレス陰極板を中性洗剤でクリーニングして、汚れを除いて下さい。
2. **25V を超えない電圧条件でご使用ください。**
電極板が破損する恐れがあります。
3. **特に指示のない場合、転写バッファの pH 調整は行わないでください。**
転写バッファの pH を調整すると、バッファの伝導度が上がり電流値が高くなります。パワーサプライの初期電流値を確認し、バッファが適切な電気伝導性かどうか確認してください。
4. **長時間の転写(2 時間以上)は行わないで下さい。**
装置が故障、破損する可能性があります。
5. **必要とされるパワーサプライの仕様をご確認ください。**
パワーパック HC, Universal のような低電圧、高電流での動作に対応したパワーサプライが推奨されます。
6. **周辺温度が 50°C を超えるような場所では、本装置を使用しないで下さい。**

重要

本製品は理化学機器の国際的安全基準 IEC1010-1 (*) に適合した製品です。この装置は取扱説明書に従っている場合は、安全にご使用になられます。ただし、この製品を改造されたり、不適切な方法で使用されたりした場合、次のようになりますのでご注意ください。

- 保証の対象外となります。
- 安全基準 IEC1010-1 の適応外となります。
- 潜在的な安全上の問題につながります。

この製品を本来の目的以外の用途で使用したり、バイオ・ラッドあるいはバイオ・ラッド認証者以外の者によって改造された製品の使用によるケガあるいは事故に関しては保証いたしかねます。

(*) IEC1010-1 は国際的に認められた実験器具の電気安全規格です。

第2章 トランスブロット SD セルの組立て

ある特定のサンプルに対する転写時の最適条件を決めるためには、転写時間に応じた転写効率の変化を検討する必要があります。転写には分子量、*pI*、ゲルの濃度などの様々な要因が影響してきます。従って、必ずしもある一定の時間に定めて転写を行う必要はありません。サンプルにあった転写時間で転写を行って下さい。

2-1 転写の準備

1. 転写バッファーを用意して下さい(第3章 バッファー調製、参照)。熱の上昇を最小限にするため、あらかじめ転写バッファーを冷蔵しておいて下さい。

注意：バッファー調製は特に重要です。転写バッファーの pH は、特に指示のない限り酸やアルカリを加えて調整しないで下さい。不適切なバッファーは過剰な熱の発生や危険性を招くおそれがあります。また、高純度の特級メタノールのみを使用して下さい。純度の低いメタノールは転写バッファーの電導度を高くするだけでなく、高分子量のタンパク質の転写効率も低下させる恐れがあります。

2. 電気泳動後、転写バッファーにゲルを浸し、平衡化して下さい。平衡化することによって泳動バッファー中の塩や界面活性剤を除くことができます。もし、十分に塩を除けなかった場合、転写中の転写バッファーの電導度が高くなり、熱の発生量が増加します。

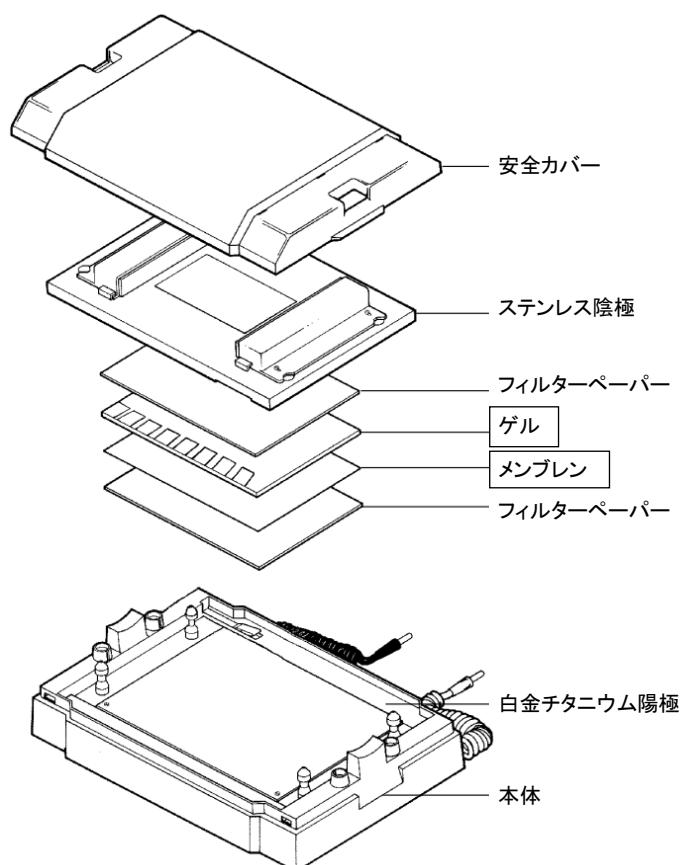
また、アクリルアミド 12%以下のゲルはバッファーにメタノールが含まれていると縮みます。あらかじめ転写バッファーで平衡化することによって、転写中のゲルの縮みを防ぎます。平衡化の時間はゲルの厚さによって異なります。例えば 0.75mm 厚の SDS-PAGE ゲルの場合、15 分間が目安です。

低分子量のタンパク質(10,000 ダルトン以下)はゲルの外へ拡散しやすいため、拡散を最小限に抑えるひとつの方法として、平衡化処理を短時間で何回かのバッファー交換に分けて行うことをおすすめします。この方法はゲルから塩類を取り除くのに効果的で、かつ低分子量のタンパク質の拡散が抑えられます。

3. メンブレンをゲルよりわずかに大きいサイズに切って下さい。転写バッファーにメンブレンの片面のみが濡れるように端から浮かせていきます。濡れた面が均一に浸潤しているのを確認した後、容器を軽く揺らしてメンブレン全体を液中に沈め、10～20 分間浸漬します。メンブレンを十分に浸し、平衡化することはタンパク質の結合を確実にする上で非常に重要です。

メンブレンとして PVDF を使用する場合は、あらかじめ 100% メタノールで親水化してから転写バッファーで平衡化します。また、メンブレンに皮膚由来のコンタミネーションを防ぐため、取扱いの際は常にピンセットおよび手袋をお使い下さい。

4. フィルターペーパーをゲルよりわずかに大きいサイズに切って下さい。1 枚のゲルにつき極厚(2.45mm 厚)フィルターペーパーであれば 2 枚、中厚(0.84mm 厚)であれば 6 枚必要になります。推奨品は、バイオ・ラッドの極厚フィルターペーパーとなります。フィルターペーパーは転写バッファー中に十分浸した上でお使い下さい。



2-2 標準的な転写方法

メンブレンへのコンタミネーションを防ぐため、必ず手袋を着用して下さい。

1. 安全カバーとステンレス陰極をはずします。



2. まず転写バッファーに十分浸した「極厚フィルターペーパー」を白金陽極板の上に置いてください。ローラー(カタログ番号 1651279) やきれいなピペット等をフィルターペーパーの表面で転がして気泡を取り除きます。薄いフィルターペーパーを数枚重ねて使用することもできますが、できるだけ専用の極厚フィルターペーパーの使用をおすすめします。重ねて使用する場合は、同様にフィルターペーパーの間の気泡を取り除いて下さい。



3. あらかじめ転写バッファーに十分浸しておいた「メンブレン」をフィルターペーパーの上に重ねます。ローラーやピペット等を転がして気泡を取り除いて下さい。
4. メンブレンの上に転写バッファーを数滴たらし、平衡化した「ゲル」を十分に注意して丁寧に重ねます。ゲルがメンブレンの中央にきちんとおさまるように重ねます。ゲルがメンブレンからはみ出していると不完全な転写になります。重ねた後はローラーやピペット等を転がしてゲルとメンブレンの間の気泡を取り除いて下さい。メンブレンとゲルが一度接触した後は、やり直したりずらしたりしないで下さい。
5. ゲルの上にバッファーに十分浸した「極厚フィルターペーパー」を重ねます。フィルターペーパーとゲルの間に気泡が入らないよう十分気を付けて下さい。
6. ミニゲルであれば4枚ならべて同時に転写することができます。それぞれのゲルのメンブレンへの密着が不十分な場合、不完全な転写になることがあります。重ねる時には細心の注意を払って下さい。

7. フィルターペーパーを重ねた上から、陰極板を注意して重ねます。フィルターペーパーやゲルがずれないように、四隅の白いガイドポストにラッチ(掛け金)をかみ合わせて押さえます。



8. カバーを本体にかぶせ、プラグをパワーサプライに接続して下さい。転写方向は陰極から陽極になります。赤いケーブルは赤の出力端子へ、黒いケーブルは黒の出力端子へ接続して下さい。

注意： 電極は絶対に逆にししないでください。陰極のステンレスにダメージを与えます。

9. パワーサプライの電源を入れて、次の目安を参考にして電圧、時間を設定して下さい。

	定電圧値	時間	電流値リミット
ミニゲル	10～15 V	15～30 分	5.5 mA/cm ²
ラージゲル	15～25 V	30 分～1 時間	3 mA/cm ²

この装置では 25 V 以上の電圧がかからないよう注意してください。転写中の過度の発熱を防ぐため、定電圧設定下では、電流値のリミット(5.5 mA/cm² ミニゲル、3 mA/cm² ラージゲル)も設定する事をお勧めします。この装置による強い電場の条件下では、タンパク質がメンブレンを通過してフィルターペーパーまで達してしまうことがあります。こうなると定量性にも影響しますので、設定する転写条件にはご注意ください。

バイオ・ラッドのパワーパック HC は 5～250 V、0.01～3 A までの出力が可能です。もし電流値のリミットを設定しなかった場合、電導度変化のコントロールができなくなります。その結果、トランスブロット SD セルに対して最大の電流出力が起こってしまい、ゲルサンドイッチや電極に過剰な熱が発生して大変危険です。転写中は電流値をモニタリングすることをおすすめします。

ご使用のパワーサプライの取扱説明書をよくお読みになった上で、電流値のリミット、時間の設定を行い、それぞれモニタリングして下さい。

10. 転写終了後、パワーサプライの電源を切り、パワーサプライと本体との接続をはずして下さい。カバーをはずし、陰極板をはずしてフィルターペーパーを取り除きます。

ゲルから転写されたかどうかは、残ったゲルをクマシーブルーやシルバーステイン Plus キット等で染色することによって確認できます。また、着色済み分子量スタンダードを使用することでも確認できます。その他、メンブレンの一部をポンソー S やアミドブラックのような酸性色素、または金コロイド染色等で総タンパク染色をすることによっても確認できます。

2-3 酸性条件での転写

酸性の転写バッファー(0.7% 酢酸)を用いて転写する場合、転写方向は陽極から陰極へと逆向きになります。そのため、通常とは逆に、メンブレンはゲルの上側(陽極板やカバーの側)にセッティングする事になります。

1. カバーと陰極板を本体からはずして下さい。
2. 転写バッファー中に十分浸した「極厚フィルターペーパー」を陽極板にのせ、気泡を除いて下さい。
3. 転写バッファー中で平衡化した「ゲル」を注意してフィルターペーパーの上に重ねます。気泡を除いて下さい。
4. 転写バッファーに十分浸した「メンブレン」をゲルの上に重ね、気泡を除きます。
5. メンブレンの上からバッファーに浸した「極厚フィルターペーパー」を重ね、気泡を除きます。
6. 注意して陰極板を重ね、四隅の白いガイドポストにラッチをかみ合わせます。フィルターペーパーやゲルがずれないように気を付けて下さい。
7. カバーを本体にかぶせ、パワーサプライにプラグを接続します。赤いケーブルは赤の出力端子へ、黒いケーブルは黒の出力端子へ接続して下さい。
注意: ケーブルの赤黒は絶対に逆にししないでください。陰極のステンレスにダメージを与えます。
8. パワーサプライの電源を入れて、次の目安を参考にして電圧、時間を設定して下さい。

	定電圧値	時間	電流値リミット
ミニゲル	10～15 V	15～30 分	5.5 mA/cm ²
ラージゲル	15～25 V	30 分～1 時間	3 mA/cm ²

この装置では 25 V 以上の電圧がかからないよう注意してください。転写中の過度の発熱を防ぐため、定電圧設定下では、電流値のリミット(5.5 mA/cm² ミニゲル、3 mA/cm² ラージゲル)も設定する事をお勧めします。

第3章 バッファー調製

トランスブロット SD セルを使用するにあたってのバッファー調製法を記します。

タンパク質の転写には、3 種類のバッファーを使用する Khyse-Andersen⁽¹⁵⁾ のバッファー系より効率的な Bjerrum と Schafer-Nielsen⁽¹⁶⁾ の単一バッファー系を使用します。また Towbin の転写バッファーも様々なタンパク質のブロッティングに広く用いられています。炭酸バッファーは、塩基性タンパク質などのブロッティングで効率よく転写できる場合があります。

1. Bjerrum と Schafer-Nielsen の転写バッファー⁽¹⁶⁾

SDS-タンパク質をニトロセルロースまたは PVDF メンブレンに転写します。

48 mM トリス、39 mM グリシン、20% メタノール、pH 9.2

精製水にトリス 5.82 g、グリシン 2.93 g を溶解し、メタノール 200 ml を加え、精製水で 1L にします。

酸やアルカリを加えて、pH を調整しないで下さい。

バッファーの pH 範囲は pH 9.0~9.4 で、これはトリス、グリシン、精製水、メタノールの品質によります。もし pH が 9.0 以下になった場合は、バッファーを調製し直して下さい。

金属イオンのコンタミのあるグレードの低いメタノールは電極をメッキしてしまいますので、分析用のグレードの高いメタノールを使用して下さい。

メモ: pH 電極について

pH 電極の中には、トリスバッファーの pH 測定に対応していないものもありますので、トリスバッファーの pH が予想される範囲を逸脱するような場合には、トリスバッファーの pH 測定に対応した電極かどうか確認してください。もし対応した電極であるにも関わらず、このバッファーの pH が 9.0 未満だった場合には、バッファーを再調製してみてください。

2. SDS を添加した Bjerrum と Schafer-Nielsen の転写バッファー

48 mM トリス、39 mM グリシン、20% メタノール、1.3 mM (0.0375%) SDS、pH 9.2

1.のバッファーに SDS 0.0375 g (または 10% SDS 3.75 ml) を加え 1L にします。

酸やアルカリを加えて、pH を調整しないで下さい。

SDS を加えることにより、ゲルからのタンパク質の溶出を促進しますが、発熱により気泡が生じ、転写ムラを生じる場合がありますので、ご注意下さい。

3. Towbin の転写バッファー⁽⁷⁾

SDS-タンパク質をニトロセルロースまたは PVDF メンブレンに転写します。

25 mM トリス、192 mM グリシン、20% メタノール、pH 8.3

精製水にトリス 3.03 g、グリシン 14.4 g を溶解し、メタノール 200 ml を加え精製水で 1L にします。

酸やアルカリを加えて、pH を調整しないで下さい。

4. Dunn の炭酸バッファー⁽¹⁷⁾

SDS-タンパク質をニトロセルロースまたは PVDF メンブレンに転写します。

10 mM NaHCO₃、3 mM Na₂CO₃、20% メタノール、pH 9.9

NaHCO₃ 0.84 g、Na₂CO₃ (無水物) 0.318 g を精製水に溶解し、メタノール 200 ml を加え、精製水で 1L にします
酸やアルカリを加えて、pH を調整しないで下さい。

5. DNA 転写バッファー

DNA をナイロンメンブレンに転写します。

0.5xTBE (44.5 mM トリス、44.5 mM ホウ酸、1 mM EDTA、pH 8.3)

5xTBE ストック溶液

精製水にトリス 54 g、ホウ酸 27.5 g を溶解し、0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml を加え、精製水で 1L にします。

5x ストック溶液 100 ml を精製水で 1L にし、0.5xTBE として使用します。

※プレミックスバッファーもご用意しております。

酸やアルカリを加えて、pH を調整しないで下さい。

6. 0.7% 酢酸 (酸性条件下での転写)

氷酢酸 7 ml に精製水 993 ml を添加して、よく混合します。

第4章 ブロットイングプロトコル例

ある特定のサンプルに対して、最適条件を決定するためには、転写時間の条件検討から始める必要があります。転写に影響を及ぼす要因には、分子量、等電点、ゲルの多孔性など様々な要素が考えられますので、転写時間いっぱい転写を行ったり、強い条件で転写を行ったりする必要はありません。様々なタンパクに対する最終的な転写条件は、個別に条件検討した結果に基づいて決定するのが望ましいと言えます。

4-1 SDS-PAGE したタンパク質のブロットイング

PVDF, ニトロセルロースメンブレンへのブロットイング

1. Towbin の転写バッファー（第 3 章 バッファー調製、参照）を調製して、あらかじめ冷蔵しておきます。
2. 泳動の終わったゲルを転写バッファー中で、10～20 分間平衡化させます。
3. メンブレンとフィルターペーパーを転写バッファー中で、10～20 分間平衡化させます。メンブレンとして PVDF を使用する場合は、あらかじめ 100% メタノールで親水化してから転写バッファーに浸します。
4. 第 2 章「2-1 転写の準備」で述べたように、フィルターペーパー、メンブレン、ゲルを重ねてサンドイッチをつくり、装置を組み立てます。
5. ラージゲル、ミニゲルのどちらの場合も、第 2 章「2-2 標準的な転写方法」の転写条件で転写を行います。

4-2 DNA のブロットイング（ポリアクリルアミドゲル、DNA 250～1,000 bp）

ナイロンメンブレンへのブロットイング

1. 5xTBE バッファーを精製水で 10 倍希釈し、0.5xTBE を調製します。あらかじめ冷蔵保存しておきます。
2. ゲル、ナイロンメンブレン、極厚フィルターペーパーを 0.5xTBE に浸け、15 分間平衡化します。

ノート: ナイロンメンブレンは未変性の核酸と結合します。そのため、必ずしも転写前に変性する必要はありません。
未変性の核酸を転写した場合は、ハイブリダイゼーションの前に NaOH で処理する必要があります。
詳しくはメンブレンの取扱説明書をご参照下さい。
3. 第 2 章の手順でフィルターペーパー、メンブレン、ゲルを重ねます。
4. 400 mA 定電流で 1 時間転写します。電圧が 25 V を超えないようにして下さい。
5. 転写後、メンブレンを 0.5xTBE で軽くゆすぎます。
6. 0.4 N NaOH を含ませたフィルターペーパーの上にメンブレンを 10 分間置いて DNA を固定します。
7. メンブレンを 2xSSC に浸し 10 分間洗浄します。すぐにプロービングを行う場合は、80℃で 1 時間 ベーキングします。
これでメンブレンは、ハイブリダイゼーションの工程に進める事ができます。
ハイブリダイゼーションの方法については、メンブレンの取扱説明書もご参照下さい。

第5章 タンパク質ブロッティング用メンブレンの特性

PVDF メンブレン

PVDF (polyvinylidene difluoride) メンブレンは転写したタンパク質を免疫的に検出したり、エドマン法でアミノ酸配列を解析したりするのに適しています。物理的強度が高く化学耐性に優れています。イムンブロット PVDF メンブレンは高いタンパク質結合容量($160 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)をもちながら非特異的吸着は少なく、免疫検出に最適なメンブレンです。シーケブロット PVDF メンブレンはタンパク質保持力に特に優れており($170\text{--}200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)、プロテインシーケンスに適したメンブレンです。更に、PVDF メンブレンは SDS を含む転写バッファーを使用しても、メンブレンへの高い結合効率を保つ事ができます。PVDF メンブレンはまず 100%メタノールで親水化する必要がありますが、その後使用する転写バッファーでは、メタノールを含まないバッファーを使用する事も可能です。

ニトロセルロース、サポート付ニトロセルロース

ニトロセルロースメンブレンは、タンパク質のブロッティングで最初に確立されたメンブレンです^(7,19-22)。

ニトロセルロースメンブレンは、アミドブラック、クマシーブルー、ポンソーS などの酸性色素、もしくはより高感度な金コロイド染色などの総タンパク質検出法でも使用することができ、RIA や EIA(イムンブロットキット)にも適応しています。ニトロセルロースは高いタンパク質結合容量 ($80\text{--}100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) を持ちながら、バックグラウンドを抑えるためのブロッキング処理も簡便かつ速やかに行えます。

低分子(20kDa 以下)タンパク質は転写後のメンブレンの洗浄の際に結合が外れ、検出感度が低下するものもあります⁽²¹⁾。このような場合、グルタルアルデヒドで固定したり、ポアサイズの小さいニトロセルロースメンブレン($0.2 \mu\text{m}$)を用いることによって改善されます⁽²²⁾。転写バッファーにアルコールを添加すると、100kDa を越える大きなタンパク質は転写効率が低下します。アルコールは SDS で変性させたタンパク質のニトロセルロースへの結合を増大させますが、ゲルのポアサイズを小さくしてしまいます。また、SDS 変性タンパクの転写の際に転写バッファーからアルコールを除くと、ニトロセルロースへの結合が低下します。トランスブロット SD セルでは、プレート電極による強い電場下で転写が行われるため、タンパク質が結合せずにニトロセルロースメンブレンを通過してしまう場合があります。ポアサイズの小さい($0.2 \mu\text{m}$)ニトロセルロースメンブレンを使用することで結合率を上げることができます⁽²³⁾。

サポート付ニトロセルロースは、ニトロセルロースを不活性の高分子支持体の両面にコートしてあるもので、機械的強度にすぐれ、取り扱いが容易です。

ナイロンメンブレン

ナイロンメンブレンでは、アルコールを含まない条件下で SDS-タンパク質複合体を結合します^(24, 25)。

また脱色できないため、色素による総タンパク質染色などには使用できません。高いタンパク質結合容量を持ちますが、高バックグラウンドの問題があるためタンパク質のブロッティングには推奨しておりません。

第6章 トラブルシューティングガイド

6-1 転写効率が悪い

ゲルにタンパク質が残っている。転写後のゲルをクマシーブルー等で染色すると検出されるバンドがある。

1. 転写時間が短い。
転写時間を少し長めにして下さい。
2. 質量に対する電荷が不適當である。
バッファの pH 近くの pI をもつタンパク質は転写されにくいので、タンパク質の移動度が増すように転写バッファの pH をより酸性側またはアルカリ側にして転写を行ってください。
3. フィルターペーパーが乾燥している。
フィルターペーパーへのバッファ浸透が不十分であり、バッファが転写の初期に乾いてしまっています。
転写前に、フィルターペーパーを十分にバッファに浸して下さい。
フィルターペーパーの枚数を増やす、または厚いフィルターペーパーを使用してください。
4. パワーサプライの回路が断絶している。
ヒューズの確認をして下さい。
5. ゲル濃度が高い。
総モノマー濃度 (%T)、または架橋度 (%C) を下げて下さい。一般的に、ゲルのポアサイズは、ビスによる架橋度(%C)が 5%の時に最も小さくなると言われています。このため架橋度を下げることによってゲル孔径が大きくなり、転写効率が良くなります。
6. メタノールの影響
転写バッファ中のメタノールはゲルからのタンパク質の溶出を制限してしまいます。メタノールを除去すると転写効率はよくなりますが、ニトロセルロースメンブレンとの結合性も弱めてしまいます。このような場合は、PVDF を使用して下さい。
7. タンパク質がゲル中で沈殿(凝集)している。
転写バッファに SDS を加えたものを使用して下さい。SDS は転写効率を高めます。ただし、ニトロセルロースメンブレンとの結合性を弱くし、タンパク質と抗体との反応性にも影響を及ぼしますのでご注意下さい。

転写パターンの歪み、拡散

1. メンブレンとゲルとの密着が悪い。気泡や過剰の水分がメンブレンとゲルの間に残っている。
完全に密着するまで試験管やローラーを、ゲルとメンブレンを重ねた上から注意しながら転がして、気泡や過剰の水分を取り除いて下さい。フィルターペーパーには極厚タイプを使用して下さい。フィルターペーパーとゲル、メンブレンの間に気泡が残らないようにして下さい。
2. ゲルが転写バッファで完全に平衡化されていない。
ゲルが転写中に縮んだり、膨張したりするのを防ぐため転写バッファ中で十分に平衡化して下さい。時間を長くしたり、回数を増やしたりして完全に平衡化して下さい。
3. パワーサプライの設定値が高すぎる。
電圧を下げて下さい。バッファの電導度を確認して下さい。
電導度の高い(塩濃度が高い)バッファを使用すると、結果的に出力される電力値が高くなってしまいます。

6-2 ニトロセルロースメンブレンへの結合性が弱い

1. SDS-PAGE で分離したタンパク質の転写の場合、20% メタノール含有の転写バッファーが、タンパク質のメンブレンへの結合に最適です。正しいメタノール濃度になるようバッファー調製は確実に行って下さい。
2. プレート電極による強い電場下で転写を行うため、タンパク質がニトロセルロースを通過してしまうことがあります。 $0.2\ \mu\text{m}$ のニトロセルロースメンブレンを使用して下さい。または、白金線電極の Criterion トランスブロットセル、ミニトランスブロットセルを試してみても良いかもしれません。
3. 15kDa 以下のタンパク質は $0.45\ \mu\text{m}$ のニトロセルロースメンブレンへの結合が弱く、アッセイ中にメンブレンから離脱してしまうことがあります。このような場合は、 $0.2\ \mu\text{m}$ のニトロセルロースメンブレンを使用して下さい。また、グルタルアルデヒドの使用により、ニトロセルロースとタンパク質の安定した結合を得ることができます⁽²²⁾。
4. タンパク質は SDS や NP-40 等の界面活性剤によってニトロセルロースメンブレンから離脱しやすくなってしまいます。洗浄、抗体反応時には Tween 20 を使用して下さい。またバッファー中の界面活性剤の濃度を下げてください。グルタルアルデヒドでタンパク質の固定を行うと、メンブレンからのタンパク質の離脱を防ぐことができます。
5. 転写バッファー中の SDS はタンパク質のメンブレンへの結合力を弱めます。20% メタノール含有の転写バッファーを使用して下さい。また、転写前にメタノール含有のバッファー中でゲルを十分に平衡化させて下さい。

6-3 検出感度が低い。または全く反応しない。

1. 抗原の結合が不完全である。
トラブルシューティング 6-1, 2 をご覧下さい。
2. 抗体反応時間が不十分である。
反応時間を長くして下さい。
3. サンプル量が不十分である。
ゲルにアブライするサンプル(タンパク質)の濃度を上げて下さい。
4. 抗原によっては変性防止のために転写中、一定の温度範囲に保つ必要がある。
転写中の温度調節が必要なタンパク質の場合には、転写バッファーの温度をコントロールできるタイプの転写装置をご検討下さい。
5. モノクローナル抗体が変性した抗原を認識しない
他のモノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体で結合するかどうか確認して下さい。
6. 使用した検出キットのマニュアルをご参照ください。

第7章 参考文献

1. Southern, E. M., J. Mol. Biol., 98, 503 (1975).
2. Alwine, J. C., Kemp, D. J., Parker, B. A., Reiser, J., Stark, G. R. and Wahl, G. W., Methods Enzymol., 68, 220 (1979).
3. Thomas, P. S., PNAS, 77, 5201 (1980).
4. Seed, B., Nuc. Acids Res., 10, 1799 (1982).
5. Renart, J., Peiser, J. and Stark, G. R., PNAS, 76, 3116 (1979).
6. Bowen, P., Steinberg, J., Laemmli, U. K. and Weintraub, H., Nuc. Acids Res., 8 (1980).
7. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J., PNAS, 76, 4350 (1979).
8. Bittner, M., Kupferer, P. and Morris, C. F., Anal. Biochem., 102, 459 (1980).
9. Stellwag, E. J. and Dahlberg, A. E., Nuc. Acids Res., 8, 299 (1980).
10. Kutateladze, T. V., Axelrod, V. D., Gorbulev, V. G., Belzhelarskya, S. N. and Vartikyan, R. M., Anal. Biochem., 100, 129 (1979).
11. Peudelhuber, T. L., Ball, D. J., Davis, A. H. and Garrad, W. J., Nuc. Acids Res., 10, 1311 (1982).
12. Danner, D. B., Anal. Biochem., 125, 139 (1982).
13. Bio-Rad Technical Bulletin 1110 “Zeta-Probe Blotting Membranes” (1987).
14. Holland, L. J. and Wangh, L. J., Nuc. Acids Res., 10, 3282, (1983).
15. Khyse-Andersen, J., Biochem. Biophys. Meth., 10, 203, (1984).
16. Bjerrum, O. J. and Schafer-Nielsen, C., Analytical Electrophoresis, M. J. Dunn, ed., p. 315; Verlag Chemie, Weinheim, (1986).
17. Dunn, S. D., Anal. Biochem., 157, 144 (1986).
18. Bio-Rad Laboratories, Zeta-Probe Instruction Manual (1986).
19. Anderson, N. L., Nance, S. L., Pearson, T. W. and Anderson, N. G., Electrophoresis, 3, 135 (1982).
20. Howe, J. G. and Hershey, J. W. B., J. Biol. Chem., 256, 12836 (1981).
21. Erickson, P. F., Minier, L. N. and Lasher, P. S., J. Immun. Meth., 51, 241 (1982).
22. Polvino, W. J., Saravis, C. A., Sampson, C. E. and Cook, R. B., Electrophoresis, 4, 368 (1983).
23. Tovey, E. and Baldo, B. A., Electrophoresis, 8, 384 (1987).
24. Gershoni, J. M. and Palade, G. E., Anal. Biochem., 131, 1 (1983).
25. Gershoni, J. M. and Palade, G. E., Anal. Biochem., 124, 396 (1982).
26. Bio-Rad Laboratories, Biotin-Blot Total Protein Stain Instruction Manual (1985).
27. LaRochelle, W. J. and Froehner, S. C., J. Immun. Meth., 92, 65 (1986).
28. Johnson, D. A., Gautsch, J. W., Sportsman, J. R. and Elder, J. H., Gene Anal. Tech., 1, 3 (1984).

* クマシー (Coomassie) は Imperial Chemical Industries 社の登録商標です。

第8章 関連製品とアクセサリー

機器とアクセサリー

カタログ番号	製品名
1703940	トランスプロット SD セル 本体(1)、極厚フィルターペーパー 7 x 8.4 cm (60 枚)、7 x 13.5 cm (60 枚)、14 x 16 cm (30 枚)、 19 x 18.5 cm (30 枚)
1645052M	トランスプロット SD セル PP HC システム トランスプロット SD セル (1703940)、パワーパック HC
アクセサリー	
1651279	プロットング用ローラー
パワーサプライ	
1645052	パワーパック HC
1645070JA	パワーパック Universal

関連製品

カタログ番号	製品名
ミニゲル用 電気泳動槽	
1658004JA	ミニプロティアン Tetra レディゲルセル(4 枚用) 下部バッファー槽(1)、ケーブル付フタ(1)、電極アッセンブリ(1)、バッファーダム(1) コンパニオンランニングモジュール(1)
1658005JA	ミニプロティアン Tetra レディゲルセル(2 枚用) 下部バッファー槽(1)、ケーブル付フタ(1)、電極アッセンブリ(1)、バッファーダム(1)
アクセサリー	
1658040	ミニプロティアン Tetra フタ付下部バッファー槽
1658037	ミニプロティアン Tetra 電極アッセンブリ
1658038	ミニプロティアン Tetra コンパニオンランニングモジュール

ブロットイング用メンブレン

カタログ番号	
ニトロセルロースメンブレン (0.45 μ m)	
1620145	シート、7×8.5 cm、10 枚
1620167	シート、8.5×13.5 cm、10 枚
1620117	シート、9×12 cm、10 枚
1620114	シート、9.2×15 cm、10 枚
1620116	シート、15×15 cm、10 枚
1620113	シート、20×20 cm、5 枚
1620251	シート、26.5×28 cm、10 枚
1620215	サンドイッチ、7×8.5 cm、50 セット
1620235	サンドイッチ、8.5×13.5 cm、50 セット
1620115	ロール、30×350 cm、1 ロール

サポート付ニトロセルロースメンブレン (0.45 μ m)	
1620094	ロール、30×300 cm、1 ロール

カタログ番号	
イミュンブロット PVDF メンブレン	
1620174	シート、7×8.5 cm、10 枚
1620175	シート、10×15 cm、10 枚
1620176	シート、20×20 cm、10 枚
1620255	シート、25×28 cm、10 枚
1620219	サンドイッチ、7×8.5 cm、50 セット
1620239	サンドイッチ、8.5×13.5cm、50 セット
1620177	ロール、26×330 cm、1 ロール

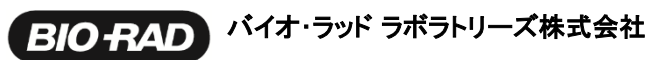
シーケブロット PVDF メンブレン	
1620184	ロール、26×330 cm、1 ロール

低蛍光PVDFメンブレン	
1620260	ろ紙付き、7×8.5 cm、10 セット
1620261	ろ紙付き、7×8.5 cm、20 セット
1620262	ろ紙付き、8.5×13.5 cm、10 セット
1620263	ろ紙付き、8.5×13.5 cm、20 セット
1620264	ロール、28×380 cm、1 ロール

カタログ番号	
ニトロセルロースメンブレン (0.2 μ m)	
1620146	シート、7×8.5 cm、10 枚
1620168	シート、8.5×13.5 cm、10 枚
1620147	シート、13.5×16.5 cm、10 枚
1620150	シート、20×20 cm、5 枚
1620252	シート、26.5×28 cm、10 枚
1620213	サンドイッチ、7×8.5 cm、50 セット
1620233	サンドイッチ、8.5×13.5cm、50 セット
1620112	ロール、30×350 cm、1 ロール

サポート付ニトロセルロースメンブレン (0.2 μ m)	
1620097	ロール、30×300 cm、1 ロール

カタログ番号	
ブロットアブソorbentフィルターペーパー 2.45 mm (極厚)	
1703966	シート、7×8.4 cm、60 枚
1703965	シート、7.5×10 cm、60 枚
1703967	シート、8.6×13.5 cm、60 枚
1703968	シート、14×16 cm、30 枚
1703969	シート、19×18.5 cm、30 枚
1703958	シート、10×15 cm、30 枚
1703959	シート、15×15 cm、30 枚
1703960	シート、15×20 cm、30 枚



ライフサイエンス www.bio-rad.com

本 社 〒140-0002 東京都品川区東品川 2-2-24 天王洲セントラルタワー Tel : 03-6361-7000 Fax : 03-5463-8480

※ 学術のお問い合わせは Email: life_ps_jp@bio-rad.com Tel : 03-6404-0331 Fax : 03-6404-0334

※本製品は研究用であり、診断目的にはご利用いただけません。

M13512L 2311a