ウエスタンブロッティング（転写装置、バッファー、メンブレン）

Frequently Asked Questions

FAQ リスト

このリストには、バイオ・ラッド製品に関するよくあるお問い合わせを掲載しております。ここに掲載している製品は研究用途として販売しており、医療・診断目的でのご使用はできません。

#	Question	Answer
1	[ミニトランスブロットセル] 転写バッファーには様々な種類がありますが、どのように使い分けたら良いですか。	一般には第一選択として Towbin バッファー(25mM Tris, 192mM Glycine, 20% Methanol, pH8.3) がよく用いられます。しかし、目的タンパク質の転写効率は分子量、等電点にも影響される点に留意する必要があります。 目的タンパク質が高分子量タンパク質だった場合には、Towbin バッファーに 0.01～0.05% 程度の SDS を添加すると、ゲルからのタンパク質の溶出が改善されます。ただし、低分子量タンパク質はメンブレンへの親和性が低下して、抜け出てしまう恐れがありますのでご注意ください。 また、メタノールはメンブレンへのタンパク質の親和性を高める効果がある反面で、ゲルを収縮させてタンパク質のゲルからの溶出を抑えてしまう働きもあります。そのため、Towbin バッファーのメタノール濃度を下げたり、(PVDF メンブレンの場合)メタノールを除いたりする事で、ゲルからのタンパク質の溶出が改善されます。 もし、使用するタンパク質の等電点(pI)が転写バッファーの pH に近い場合には、タンパク質の持つチャージが低くなり転写効率が低下します。そのような場合には、より pH の高い次のような転写バッファーを使用すると改善する場合があります。 Bjerrum & Schafer-Nielsen バッファー: 48mM Tris, 39mM Glycine, 20% Methanol, pH 9.2 CAPS バッファー: 10mM CAPS, 10% Methanol, pH11
2	[ミニトランスブロットセル] 転写ムラが認められました。どのような原因が考えられますか。	次のような原因が考えられます。 1)ファイバーパッドの劣化 劣化によって十分な厚さではないファイバーパッドを使用すると、ゲルとメンブレンの密着が悪くなり、転写ムラの原因となります。 ファイバーパッドの厚さが 6.5mm 程度であるか確認してください。 2)転写バッファーの発熱 転写バッファーは前日から冷蔵庫にいれて、十分に冷却したものをご使用ください。また、前日から冷凍しておいたアイスクーリングユニットを使用して、転写中にバッファーが熱くならないようにしてください。 3)スターラーバーによる温度ムラの解消 転写中は、バッファー槽にスターラーバーをいれて撹拌することによって、転写バッファーの温度ムラが生じないようにしてください。温度ムラは転写のばらつきの原因となります。

#	Question	Answer
3	[トランスブロット SD セル] 中央部分の転写効率が低いなどの転写ムラが認められます。	次の原因が考えられます。 1)使用しているバッファー量が多い。 電極板に余分なバッファー成分が残っている場合や、過剰のバッファーがフィルターペーパーに含まれている場合には、中央の転写効率が低下する場合があります。 上部電極板でフタをする前に、必ずゲル、メンブレン、フィルターペーパーを重ね合わせてから、ガラス棒などを用いて、ローラーをかけ、過剰なバッファー成分をフィルターペーパーから出してください。 また、下部電極板に出てきたバッファーは完全にふき取ってからフタをしてください。 2)電極が劣化している。 電極板が歪んだり、劣化による錆や傷などによる原因が考えられます。 この場合には弊社の修理サービスにご連絡ください。新しい電極に交換いたします。 3)ろ紙が薄い。 ろ紙が薄いと保持されている転写バッファーが少なくなり、また、ゲルとメンブレンの密着性が低下します。 トランスブロット SD セルでは極厚フィルターペーパー(厚さ 2.45mm)をお使いください。 トランスブロット SD セル取扱説明書
4	[トランスブロット SD セル] 使用後の洗浄はどのようにすればよいですか。	ご使用後は、上下の電極板の表面に精製水をかけて、キムワイプなどで拭き取る洗浄を繰り返し行って、電極板上にバッファー成分が残らないようにください。 また、転写バッファーなどがトランスブロット SD セルの内部に入り込んでしまった場合、次のように黒い陽極プレートを取り外して内部の清掃を行う事も可能です。 1）四隅の白いネジを反時計方向に手で回して取り外してください 2）陽極プレートを取り外して、電極面を傷つけないように、柔らかい布やペーパータオルの上に置いてください。この時、陽極プレートと本体は1本のコードでつながっていますので、コードに無理な力をかけたり、陽極板を傷つけたりしないように慎重に取り外してください。 3）内部の溶液を拭き取り、必要に応じて精製水をかけて、キムワイプ等で拭き取り洗浄を行ってください。 4）四隅に白いワッシャー、バネの順にセットし、その上に陽極プレートを置いてください。 5）白いネジを元のように締めてください。
5	[トランスブロット Turbo] 使用後に、どのようなメンテナンスが必要ですか。	ご使用の後は、残留バッファーを除去し塩の析出を防ぐために、以下の手順で転写カセットを洗浄してください。 1) カセットとフタを流水洗浄します 2) カセットとフタをイオン交換水ですすぎます。 3) 洗浄後、カセットとフタは自然乾燥するかペーパータオルを使用して水をふき取ります。フタ内部に水が残らないようにフタは立てて乾燥します。カセット、フタともに乾燥機には入れないでください。 もし、ボトムカセットの周囲の隙間に転写バッファー析出物が溜まってしまった場合は、ぬるま湯を貯めおき数分間放置すると、溶解して取り除くことができます。バッファー析出物が残ったまま使用を続けると、局所的に塩濃度が高くなり、異常な発熱につながる可能性がありますのでご注意ください。 その他のメンテナンス方法は、メンテナンスガイドをご参照ください。使用方法の概要は、取扱説明動画をご参照ください。
6	[トランスブロット Turbo] カセット上側（陰極側）のステンレス電極板に、白い析出物が生じてしまいました。	これはブロッティングを行った際にバッファー成分が付着したものです。ブロッティングを行うと徐々に生じてくるものであり、多くの場合は転写に影響はありません。 ただし、大量に付着してきた場合には、7%酢酸をしみこませたキムワイプで拭き取ることで、取り除くことができます。酢酸使用後は、イオン交換水で十分にすすぎを行ってください。

#	Question	Answer
7	[トランスブロット Turbo] 自作バッファー系（別途ご用意されたメンブレン、ろ紙を使用）で転写すると、転写ムラが認められました。	次の原因が考えられます。 1)ろ紙厚が薄い。 ろ紙が薄いと保持されている転写バッファーが少なくなり、また、ゲルとメンブレンの密着性が低下します。トランスブロット Turbo では極厚フィルターペーパー(厚さ 2.45mm)をお使いください。 2)使用しているバッファー量が多い。 電極板に余分なバッファー成分が残っている場合や、過剰のバッファーがフィルターペーパーに含まれている場合には、中央の転写効率が低下する場合があります。 上部電極板でフタをする前に、必ずゲル、メンブレン、フィルターペーパーを重ね合わせてから、ローラーを使用して、過剰なバッファー成分をフィルターペーパーから出してください。 また、下部電極板に出てきたバッファーは完全にふき取ってからフタをしてください。 3)転写カセットの破損 転写カセットに亀裂などの破損があると、均一な押さえつけができなくなり、転写ムラにつながる可能性があります。転写カセットは単品販売も行っておりますので、新しいカセットへの買い替えをご検討ください。
8	[RTA 転写キット] 構成品の単品販売は行っていますか。	転写メンブレンについては、次のように単品販売しているものもあります。 スタックと 5xRTA 転写バッファーについては、単品販売は行っておりません。 ・転写メンブレン PVDF ミニ：1620174　イミュンブロット PVDF 7x8.4cm 10 枚 PVDF ミディ：同一サイズで該当品はありません（対策例：1620175<10x15cm>を 8.5x13.5cm にカットして使用する） ニトロセルロース ミニ：1620146 ニトロセルロースメンブレン(0.2um) 7x8.4cm 10 枚 ニトロセルロース ミディ：1620168 ニトロセルロースメンブレン(0.2um) 8.5x13.5cm 10 枚 ・スタック、5xRTA 転写バッファー 単品販売なし
9	[トランスブロット Turbo] DNA, RNA などの核酸を泳動したゲルを、トランスブロット Turbo で転写できますか。	ポリアクリルアミドゲルで泳動した DNA, RNA を、トランスブロット SD セルと同じ条件でナイロンメンブレンに転写することは可能です。 例） 1. 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 で 15 分間平衡化します。 2. カセットにゲル、メンブレンサンドイッチをセットします。 3. 3mA/cm2 定電流（ミニゲルの場合およそ 0.2A 相当）で 1 時間転写します。 4. 転写後のメンブレンを 0.5xTBE で軽くゆすぎます。 5. 0.4N NaOH を含ませたフィルターペーパー上にメンブレンを 10 分間置いて、DNA を固定します。 6. 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。 アガロースゲルで泳動したゲルを転写することはできません。 また、通常のセミドライ式転写装置よりも転写時間を早くすることはできません。

#	Question	Answer
10	[バイオドットシリーズ] 使用にあたって、本体のほかに何が必要ですか。	バイオドットの使用にあたっては、次のような機器が別途必要になります。 ・吸引ポンプ 通常はゲージ圧が −500 ～ −600 mmHg（約 −67 ～ −80 kPa）の吸引圧を持つポンプを使用します。サンプルによってはアスピレーター等、より強い吸引圧のポンプを使用する事もあります。 ・廃液トラップ 三角フラスコ、ゴム栓、ガラス管などより自作し、吸引ポンプとバイオドットのフローバルブの間にセットしてご使用ください。
11	[バイオドットシリーズ] PVDF メンブレンは使用できますか。	バイオドットで PVDF メンブレンにブロットすることは、全くできないわけではありませんが、メンブレンの特性上お勧めしていません。 仮に PVDF メンブレンをバイオドットで使用する場合は、乾燥しないよう十分に注意する必要があります。 PVDF メンブレンは使用前に 100%メタノールで親水化した後に適切なバッファーで平衡化して使用する必要があります。 バイオドットで吸引を行ったときに万が一メンブレンが完全に乾燥してしまうと親水性がなくなってしまいます。 吸引中に乾燥した場合には、再びメタノールによる親水化から行い直す必要があります。
12	[PVDF メンブレン] CBB で染色することはできますか？	クーマシーブルーR-250 を用いて調製した PVDF メンブレン用の染色液にて、PVDF メンブレンの染色を行うことが可能です。 1) 精製水による洗浄（5 分 x 3 回） 2) 染色液(0.025% Coomassie Blue R-250, 40% MeOH solution) による染色（5 分 x 1 回） 3) 脱色液(50% MeOH) による脱色（10-15 分 x 1 回） なお染色液、脱色液として酢酸を含むものを使用すると、タンパク質の N 末端アミノ酸がブロックされてしまう可能性が考えられます。
13	[PVDF メンブレン] Ponceau S によるメンブレンの染色はどのように行えばよいですか。	次のような手順で Ponceau S 染色を行なうことができます。 1) Ponceau S 溶液 (0.2%w/v Ponceau S in 3% TCA and 3%w/v sulfosalicylic acid)にて 1-2 分間の染色を行います。 2) 1% 酢酸にてバックグラウンドが低くなるまで脱色を行います。 なお、Ponceau S 染色にはいくつかの方法が知られており、その他にも染色液として 0.1%w/v Ponceau S in 5% 酢酸を、脱色液として TBS や蒸留水を用いる方法もあります。

Visit bio-rad.com/ja-jp/lsg/product-manuals-jp for more information.

BIO-RAD バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

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 TEL : 03-6361-7000
※学術的お問い合わせは TEL : 03-6404-0331 MAIL: life_ps_jp@bio-rad.com