Bio-Rad News

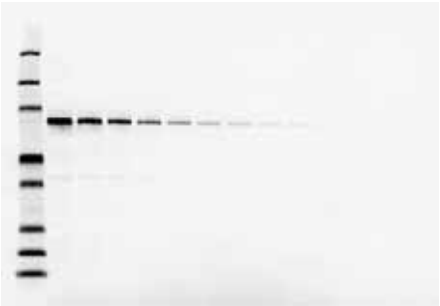
Vol.6
2015年5月

Contents

特　集：電気泳動～ウェスタンブロッティング　見つめ直してみよう！～基礎から応用まで
- サンプル調製　ReadyPrepタンパク質抽出キット / ProteoMinerタンパク質Enrichmentキット / プロテインアッセイ
- タンパク質電気泳動　ミニプロティアンTetraセル / Criterionセル / TGXゲル、FastCast溶液 / プレシジョンPlusスタンダード / プレミックスバッファー
- 染色～転写　Oriole蛍光染色 / ニトロセルロースメンブレン / PVDFメンブレン / StainFreeゲル / ChemiDoc画像解析装置 / トランスブロットTurbo、SD
- 検出～イメージング　PrecisionAB評価済抗体 / Clarity Western ECL
- データ解析　ImageLabソフトウェア
- トラブルシューティング
- お知らせ

特　集
電気泳動～ウェスタンブロッティング　見つめ直してみよう！～基礎から応用まで

ウェスタンブロッティングは、SDS-PAGEという分解能の高いタンパク質の分離に、抗体を用いた特異性の高い検出を組み合わせた、非常に強力な実験手法です。複雑なタンパク質組成のサンプルであっても、電気泳動により分画されることによってより効率的に抗体が反応できるようになることに加え、ゲルという支持体からメンブレンにタンパク質を移し取ることによりさらに抗体との反応性が高まります。
ウェスタンブロッティングはこういった原理によって量的変動（定性的・定量的）を得ることができるため、現在でも目的タンパク質の量的変動を捉えるための非常に有効なツールとして多くの場面で使用されていますが、操作ステップが多く、再現性良く、より正確に目的タンパク質の存在量を反映したデータを得ることはなかなか難しい点もあります。
本特集号では、より効率的にウェスタンブロッティングによるデータを出すためのツール、そしてより正確なデータを導き出すためのヒントを掲載しています。



BIO-RAD

サンプル調製

ウェスタンブロッティングのためのサンプル調製

ウェスタンブロッティングでタンパク質解析をする場合にまず重要なことは、タンパク質がしっかりと溶液に溶けた状態になっていることです。最初のステップとして電気泳動（SDS-PAGE）を行いますが、つまりSDSで溶けないタンパク質は解析対象にすることは難しいといえます。
SDSは非常に強力な界面活性剤で、多くのタンパク質を溶かす（可溶化）ことができます。また同時に強力な負の電荷を持つため、SDSが結合し可溶化されたタンパク質は、それ自体が負の電荷を帯びた分子として振る舞います。これによりSDS-PAGEで電気的に分離することが可能となります。

タンパク質サンプルの可溶化

ウェスタンブロッティングで解析するサンプルには、既に別の方法で抽出や可溶化された状態の溶液状態のものと細胞やオルガネラ、組織といったこれから抽出を行うものに大別されます。

2x Laemmli サンプルバッファー

4x Laemmli サンプルバッファー

溶液状態のサンプルの場合、2x Laemmliサンプルバッファーや4x Laemmliサンプルバッファーと混合し加熱を行います。Laemmliサンプルバッファーに還元剤は含まれていないため、通常は2-メルカプトエタノールやジチオスレイトールを添加し使用します。いずれのサンプルバッファーも同様に使用できますが、4x Laemmliサンプルバッファーはサンプル3容量に対しサンプルバッファーを1容量加えて使用できるため、より多くのタンパク質溶液を処理することが可能です。例えば、タンパク質濃度が低いサンプルの量を多く電気泳動に供することが可能となります。また、総ローディング量が少なくなるため、電気泳動ゲル中での濃縮効果をしっかりと発揮することが可能となり、シャープなバンドを形成させることにつながります（図1）。
別の界面活性剤などで可溶化されたタンパク質溶液の場合、すでに結合している界面活性剤をSDSに置き換えることが重要となります。この置き換え反応が不十分な場合、タンパク質分子毎に結合しているSDS量にバラツキが生じ、バンドが不明瞭（スメア）になりがちです。こういった場合にはタンパク質溶液量を減らし、サンプルバッファー量比を高めること、また加熱処理を十分に行うことで改善できます。
細胞や組織に含まれるタンパク質をSDS-PAGEで分離するには、直接サンプルバッファーで可溶化することが有効です。サンプル状態によっては物理的処理を加えた上で加熱処理を行うとさらに効率的に可溶化することが可能です。

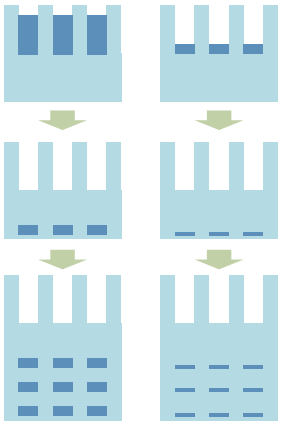


図1

サンプル種類に応じた可溶化

バイオ・ラッドでは、哺乳類細胞、植物、酵母、バクテリア用の細胞可溶化溶液キットを提供しています。

Mammalian Cell Lysis キット

タンパク質可溶化溶液の他、哺乳類細胞用キットには物理的破砕用のグラインダー、植物用にはフェノール類を除去するためのキット、酵母用とバクテリア用には強固な細胞壁を分解するための試薬がセットになっており、それぞれのサンプルから効率的にタンパク質を抽出できるよう設計されています。これら可溶化溶液キットで抽出したタンパク質溶液サンプルは、Laemmliサンプルバッファーで処理することにより、SDS-PAGEやウェスタンブロッティングに使用できます。キット詳細は、http://www.bio-rad.com/microrotofor_kits_jpをご覧ください。

より効率的なサンプル調製

細胞や組織からのタンパク質抽出では、非常に多くの種類・量のタンパク質を得ることが可能です。しかしその半面、多くの場合、研究の対象となるタンパク質の存在比は非常に低く、条件によってはウェスタンブロッティングでの検出が難しいこともあります。タンパク質の存在様式や局在が判明しているのであれば、これら特性を利用した分画抽出も有効です。
Ready Prepタンパク質抽出キットには膜結合型タンパク質の抽出（Membrane Ⅰ）の他、複数回膜貫通型タンパク質の抽出用（Membrane Ⅱ）、シグナル分子を多く含むラフトやカベオラ抽出用（Signal）、核タンパク質と細胞質タンパク質の分画用などがあり、タンパク質の存在様式や物理化学的特性を利用した分画をすることで、効率的に目的タンパク質を検出できるようになります（表1、詳細は http://www.bio-rad.com/fractionation_jpをご覧ください）。

表1　タンパク質の特性を利用した分画と抽出

	ReadyPrepタンパク質抽出キット（Membrane Ⅰ）	ReadyPrepタンパク質抽出キット（Membrane Ⅱ）	ReadyPrepタンパク質抽出キット（Signal）	ReadyPrepタンパク質抽出キット（Cytoplasimc/ Nuclear）
原理と目的	TritonX-114の温度依存性可溶化能の違いによる膜タンパク質（膜結合型）の分画	Na_2CO_3バッファーを用いた超遠心法による膜タンパク質（複数回貫通型）の抽出	TritonX-100の温度依存性可溶化能の違いによる膜タンパク質（ラフト・カベオラ結合タンパク質）の抽出	核とその他の細胞小器官の溶解度の違いによる核内タンパク質の分画
適用サンプル	▲ ▲ ▲ ▲	▲ ▲ ▲	▲ ▲ ▲	▲ ▲
操作時間	3hour	3hour	3hour	3hour

▲ Mammalian tissue or cells. ▲ Plant leaves. ▲ *E. coli*. ▲ Yeast.
注）Ready Prepキットは主に2次元電気泳動を想定した試薬キットになり、SDS-PAGEに使用する場合には使われない試薬も含まれます。

マイナータンパク質の効率的検出のための前処理

また、血清や血漿中のアルブミンやIgG、植物においてはRubisCOタンパク質など、多量に含まれる成分がある場合には、SDS-PAGEに供することができるタンパク量の制限からマイナータンパク質の量が著しく少なくなってしまう場合があります。また、転写を行った際にこういった多量に存在するタンパク質が目的タンパク質をマスクしてしまうケースもあります。
ProteoMinerタンパク質Enrichmentシステムは、過剰に含まれるタンパク質量を抑制し、同時にマイナーに含まれるタンパク質を濃縮でき、微量に含まれるタンパク質をより多くSDS-PAGE、ウェスタンブロッティング実験に用いることが可能となります。

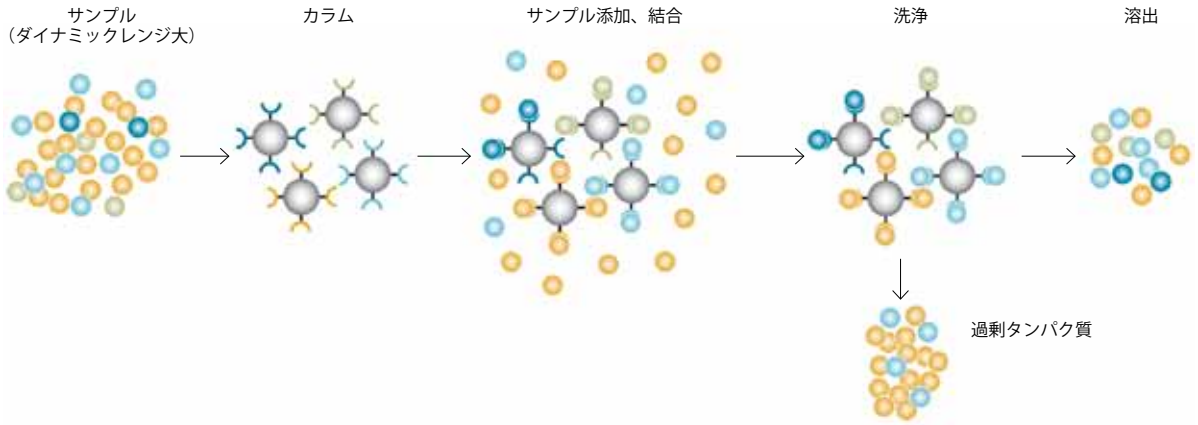
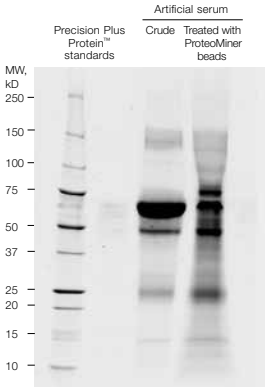


図２　ProteoMiner技術
それぞれのビーズには、サンプル中の特定のタンパク質に親和性をもつ6アミノ酸から構成される、異なるペプチドリガンドが結合している。サンプルをビーズに添加することでタンパク質はそれらに特異的なビーズに結合する。ビーズに結合しない過剰のタンパク質は洗い流され、ビーズに結合したタンパク質を溶出し、その後の検出に用いる。
※ProteoMinerキットは血清、血しょうサンプルの前処理に最適化されているため、他のサンプルに利用する場合は条件検討が必要になる場合があります。

ProteoMiner技術

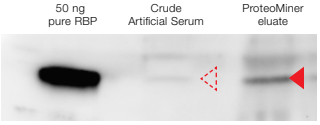
ヘキサペプチドライブラリーが結合したビーズには、特定のペプチド配列が親和性の高い順番にタンパク質と結合します。結合できなかった過剰のタンパク質は洗浄過程で除かれ、同時に微量タンパク質はビーズ上で濃縮されます。これを少量の溶出バッファーで回収することにより、微量タンパク質はその存在量を維持しつつ濃縮され、より効率的に検出することが可能となります（図2）。

下記は人工血清をProteoMiner処理前/処理後に5μgをSDS-PAGEし染色画像を得たもの（図3），またRetinol Binding Protein（RBP）をウェスタンブロッティングで検出を行ったもの（図4）です。



左：プレシジョンPlusスタンダード
中：未処理人工血清
右：ProteoMiner処理後人工血清

図３　電気泳動パターン



左：RBPコントロール
中：未処理人工血清
右：ProteoMiner処理後人工血清

図４　ウェスタンブロッティング像

図3では、大量に含まれるアルブミンとIgG由来のバンドのみが検出されているのに対し、ProteoMiner処理後のサンプルではこれらの量が減少し、検出されていなかったマイナー成分がバンドとして確認できるレベルになっていることがわかります。また、図4においても、ウェスタンブロッティングではほとんど検出されなかったRBPの存在比が上昇したことにより抗体で検出できるレベルに濃縮されたことがわかります。
（その他詳細はhttp://www.bio-rad.com/proteominerをご覧ください）

サンプル調製においては、まず第一に目的タンパク質を含む溶液を効率的に可能な限り抽出することが重要です。場合によってはさらなる前処理により存在比を高くし、その次にこれらタンパク質をできるだけきれいに電気泳動的で分離することにより、ウェスタンブロッティングでの検出を容易にすることが可能になります。

再現性良くウェスタンブロッティングでの検出を行うためにも、サンプル調製の条件はいくつか試し、最良の選択をすることが重要です。

Ordering Information

カタログ番号	品名	価格
1610747	**4x Laemmliサンプルバッファー 10ml**	¥6,500
1610737	**Laemmliサンプルバッファー 30ml（2x）**	¥8,500
1610610	**ジチオスレイトール 1g**	¥10,000
1610710	**2-メルカプトエタノール 25ml**	¥8,000
1632141	**Mammalian Cell Lysisキット**	¥43,000
1632142	**Plant Cell Lysisキット**	¥63,000
1632143	**Yeast Cell Lysisキット**	¥58,000
1632144	**Bacterial Cell Lysisキット**	¥58,000
1632088	**ReadyPrepタンパク質抽出キット（Membrane I）**	¥70,000
1632084	**ReadyPrepタンパク質抽出キット（Membrane II）**	¥31,000
1632087	**ReadyPrepタンパク質抽出キット（Signal）**	¥43,000
1633089	**ReadyPrepタンパク質抽出キット（Cyto/Nuc）**	¥70,000
1633006	**ProteoMinerタンパク質Enrichmentキット（0.2ml用、10回）**	¥58,000
1633007	**ProteoMinerタンパク質Enrichmentキット（1ml用、10回）**	¥80,000

タンパク質定量

ウェスタンブロッティングでは目的タンパク質の定性的・定量的なデータを得ることが目的となりますが、ローディング量に差があると大きく結果が異なってきます。したがってウェスタンブロッティングのデータを扱う上ではデータ補正（後述）が必須となりますが、SDS-PAGEに供する段階である程度量を揃えておく必要があります。

細胞であれば細胞数、組織であれば重量などを揃えることが多いですが、抽出効率が異なるような場合にはタンパク質定量を行って同量を分析することが必要となります。

還元剤に強い定量法はブラッドフォード法（Quick Startプロテインアッセイ）、界面活性剤に強い定量法はローリー法（DCプロテインアッセイ）がありますが、Laemmliサンプルバッファーで可溶化してしまったタンパク質溶液の定量を行いたい場合は、還元剤を除去した後ローリー法でタンパク質定量を行う必要があります（RC　DCプロテインアッセイ）。適切なタンパク質定量試薬を用い、SDS-PAGEのローディング量を揃えることが正確な定性・定量データを得る最初の一歩につながります。

なお、タンパク質定量の際に用いるスタンダードタンパク質は、発色が高いアルブミンよりもタンパク質の平均的発色程度に近いグロブリンが推奨されます。

Ordering Information

カタログ番号	品名	価格
5000204JA	**QuickStartプロテインアッセイキット4**（スタンダード：希釈済IgG）	¥28,500
5000111JA	**DCプロテインアッセイキット I**（スタンダード：IgG）	¥32,500
5000121JA	**RC DCプロテインアッセイキット I**（スタンダード：IgG）	¥49,500

タンパク質電気泳動

ウェスタンブロッティングの基盤となるSDS-PAGE

電気泳動法は1937年にTiseliusによりU字管を用いた自由溶液中で血清タンパク質を分離したことから、タンパク質の分離方法として広く行われるようになりました。中でもSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）は、Laemmliが1970年代にNatureに発表したタンパク質電気泳動法であり、40年近く経つ現在でもタンパク質解析手法の一つとして多くの研究者が実験に取り入れています。

SDS-PAGEは、電気泳動後のポリアクリルアミドゲルを染色してゲル中の分離パターンの検出だけでなく、ウェスタンブロッティングの工程にも用いられています。

定番の泳動槽ミニプロティアンTetraセル 究極のEasy-to-Use Criterionセル

バイオ・ラッドの電気泳動槽は、より簡便に、より高精度にすべく開発・改善に力を注いできました。世代を重ねた電気泳動槽は、現在「ミニプロティアンTetraセル」としてご好評いただいています。その名の通り、最大４枚までのゲルを同時に泳動可能です。シンプルなセッティング方法を採用し、より確実に、より速く泳動を開始することが可能となりました。

泳動槽はプレキャストゲルと自作ゲルともに使用可能であり、目的に合わせてプレキャストゲルと自作ゲルを併用することができます。

さらに簡便性を追求した泳動槽、それがCriterionセルです。泳動槽にゲルカセットを挿しこみ、バッファーを注ぎ、サンプルをアプライするだけですぐに泳動を開始できます。Criterionゲルのカセットには上部バッファー槽が付いており、ゲル１枚でもバッファーダム（ダミープレート）なしにセットすることが可能です。また、ゲルの下端には特別なゲルの形状（J-Foot）をしているため、ゲル下方の気泡トラップの心配がありません。

ミニプロティアンTetraセル

Criterionセル用のゲルは、横幅の広いワイドゲル（Midiゲル）とよばれています。ミニプロティアンTetraセル用のゲル（Miniゲル）が、コームのウェル数が最大15ウェルであるのに対して、Midiゲルは、最大26ウェルで、多検体の処理にも最適です。つまりMidiゲル１枚でMiniゲル2枚分のサンプルをアプライすることができます。

Criterionセルのゲルセッティング方法

ゲルカセットと一体化した上部バッファー槽

J-Foot

注：Criterionセルは自作とプレキャストゲルのいずれも使用できます。ただし、自作ゲル用Criterionカセットは再利用できません。

ゲルの選択：新しい自作ゲルFastCast

SDS-PAGEのゲルは、アクリルアミド溶液から作成することもできますが、プレキャストゲルを用いることで、時間の短縮や高い再現性など高いパフォーマンスを得ることができます。バイオ・ラッドのTGXゲルは、タンパク質がより速くゲル内を移動しますので、電気泳動やブロッティングが短時間で終了します。その上、高分離能のためウェスタンブロッティングに最適なゲルと言われています（表2）。

表２　自作ゲルとプレキャストゲル（TGXゲル）の長所・短所

	自作ゲル	プレキャストゲル（TGXゲル）
長所	・フレッシュなものを使用できる ・目的に合わせて%Tを変更することができる ・低コスト	・高い再現性 ・泳動時間が早い（TGXのみ） ・高い転写効率（TGXのみ） ・ゲル作成の時間を省略 ・劇物のアクリルアミドが不要
短所	・ゲル作成に時間がかかる ・再現性が悪い場合もある（特にグラジェントゲル） ・劇物のアクリルアミドを使用	・高コスト ・%Tの選択肢が限定される

さらに新しい選択肢として、自作ゲルながらプレキャストゲル（TGXゲル）と同等の性能を持つFastCastアクリルアミド溶液キットが登場しました。FastCastアクリルアミド溶液キットは、7.5%、10%、12%濃度になるようにあらかじめ調製された溶液を１：１で混ぜるだけで、簡単に、しかも30～45分で泳動用ゲル作成を行うことができます（図5）。

TGXゲル仕様ですので、プレキャストTGXゲルと同じように、高い転写効率と高速電気泳動の性質を持ちます。また、作成したゲルは１ヶ月保存が可能ですので、まとめて作成して4℃保存をしておき、プレキャストゲルの感覚で使用することもできます。

FastCastアクリルアミド溶液キットのメリット

- 1:1混合で面倒な計算は不要
- 1ステップ重合法で、分離ゲルの重合を待たずに濃縮ゲルを重層
- TGXゲル仕様なので高速電気泳動（30分）と高転写効率を実現
- 自作ゲルでも1か月の保存が可能

Ordering Information

カタログ番号	品名	価格
1658003JA	**ミニプロティアンTetraセル 10well 1.0mm 2枚用**	¥95,000
1658001JA	**ミニプロティアンTetraセル 10well 1.0mm 4枚用**	¥110,000
1658005JA	**ミニプロティアンTetraレディーゲルセル 2枚用**	¥42,000
1658004JA	**ミニプロティアンTetraレディーゲルセル 4枚用**	¥67,000
456-xxxx	**ミニプロティアンTGXゲル 10枚**	¥19,600
1656001	**Criterionセル**	¥60,000
567-xxxxJ10	**Criterion TGXゲル 10枚**	¥26,600
1645050JA	**パワーパック Basic**	¥98,000
1645052	**パワーパック HC**	¥150,000

注：ミニプロティアンTGXゲル、Criterion TGXゲルのラインアップは、弊社総合カタログ（2015/16）をご参照ください。

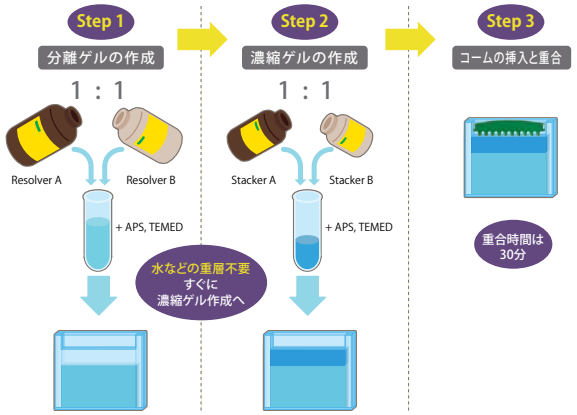


図5　FastCastアクリルアミド溶液キット使用方法

FastCastアクリルアミド溶液キットの使用手順を動画にて公開しています。詳しくは弊社ウェブサイトをご参照ください。

*FastCastアクリルアミド溶液キットには過硫酸アンモニウム、TEMEDが含まれません。別途ご用意ください。
*Stain-Freeは、染色することなくUV照射するだけでタンパク質を可視化することができる新しい技術です。ゲルに含まれるStain-Free化合物がUVによりタンパク質のトリプトファン残基に結合し蛍光を発するようになります。詳しくは6ページをご参照ください。

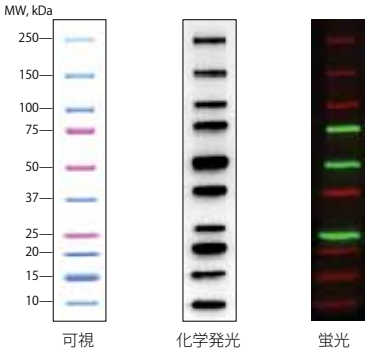
安定した結果、実験を加速させる研究試薬

高品質試薬を用いて調製された電気泳動用の泳動バッファー、サンプルバッファーを用いることで、試薬調製の手間を軽減し、調製ごとの組成誤差などを低減させます。いつもと同じ条件、同じ試薬を安定した条件のもと結果を出すことが可能となります。
一回の電気泳動あたり数百円のコストで、この安定した条件を手に入れることができます。
5Lキューブはストップコック付きの注ぎ口が付いており、片手でも分注が可能。こんなところにも使いやすさが実現しています。

分子量スタンダード

プレシジョンPlusプロテインスタンダードシリーズは、リコンビナントタンパク質を使用したSDS-PAGE用の分子量スタンダードです。
シャープなバンドが得られるようにデザインされています。未着色と着色済みがありますが、着色済みのスタンダードでもロット間の分子量誤差がほとんどありません。

プレシジョンPlus Western Cスタンダードは着色済みのスタンダードとして、泳動からブロッティングまでの目視による確認ができる上に、2次抗体処理のステップでストレプタクチンを混ぜて反応させることによって、スタンダードに酵素標識されたストレプタクチンが結合して化学発光での検出も行うことができます（図6）。



可視ではピンクバンド（3本）でメンブレンの上下の向きも判別可能
化学発光もストレプタクチン-HRPとの併用で可能検出
蛍光では青色バンドは赤色LED、ピンクバンドは緑色LEDで検出が可能

図6　マルチに使えるPrecisionPlus WesternC スタンダード

電気泳動の状況はパワーサプライで確認

バイオ・ラッドでは、SDS-PAGEの推奨電気条件を定電圧としており、初期電流値と最終電流値を記録しておくことをおすすめしています。普段記録している電流値と大きな違いが見られた場合、電流値はその原因を探る大きな手がかりとなります。例えば、電流値が高い場合、バッファーの調製ミスや、上部バッファーと下部バッファーがショートしているなどの可能性があります。
このようなポイントを抑えたうえでウェスタンブロッティングの実験を進めれば、万一やり直しが必要な場合にも、原因をいち早く特定することができて、実験時間や試薬のロスを最小限に抑えることができます。また、バイオ・ラッドのパワーサプライ（パワーパックシリーズ）は、全て国際安全規格に適合しており、使用者の安全も考慮した設計で安心して使用できます。

電気泳動ならびに転写装置の電源として併用する場合はパワーパックHCがお勧めです

転写装置用に電源を必要とせず（トランスブロットTurboなど）、電気泳動のみに使用する場合はパワーパックBasicがお勧めです

Ordering Information

カタログ番号	品名	価格
1610171	**TGX FastCast アクリルアミド溶液キット 7.5%**	¥21,000
1610173	**TGX FastCast アクリルアミド溶液キット 10%**	¥21,000
1610175	**TGX FastCast アクリルアミド溶液キット 12%**	¥21,000
1610181	**TGX Stain-Free FastCast アクリルアミド溶液キット 7.5%**	¥23,000
1610183	**TGX Stain-Free FastCast アクリルアミド溶液キット 10%**	¥23,000
1610185	**TGX Stain-Free FastCast アクリルアミド溶液キット 12%**	¥23,000
1610700	**過硫酸アンモニウム（APS）10g**	¥8,000
1610800	**TEMED 5ml**	¥5,500
1610363	**プレシジョンPlus スタンダード 1000ul**	¥18,600
1610373	**プレシジョンPlus ブルースタンダード 500ul**	¥18,600
1610374	**プレシジョンPlus デュアルスタンダード 500ul**	¥19,600
1610375	**プレシジョンPlus カレイドスコープスタンダード 500ul**	¥24,600
1610376	**プレシジョンPlus WesternC スタンダード 250ul**	¥19,600
1610377	**プレシジョンPlus デュアルエクストラスタンダード 500ul**	¥22,600
1610385	**プレシジョンPlus WesternC プロテインパック**	¥26,000
	構成内容：プレシジョンPlus WesternC スタンダード（250μl），ストレプタクチン-HRP標識（125μl）	
1610380	**ストレプタクチン-HRP標識 300ul**	¥14,000
1610382	**ストレプタクチン-AP標識 300ul**	¥14,000
1610737J1	**タンパク質用サンプルバッファーキット**	¥23,000
	構成内容：Laemmli サンプルバッファー 30ml、2-メルカプトエタノール 25ml、プレミックスバッファー 10×トリス / グリシン / SDS 1L	
1610737	**Laemmli サンプルバッファー 30ml**	¥8,500
1610710	**2-メルカプトエタノール 25ml**	¥8,000
1610732	**プレミックスバッファー 10Xトリス/グリシン/SDS 1L**	¥8,500
1610772	**プレミックスバッファー 10Xトリス/グリシン/SDS 5Lキューブ**	¥30,000

染色～転写

ゲル染色

通常ウェスタンブロッティングでは泳動後のゲルを染色することはあまりありませんが、電気泳動の状態を確認する目的や泳動を行ったタンパク質を染色によって確認、定量する場合があります。

電気泳動→ゲル染色という流れでタンパク質を可視化し定量する場合には、高感度に、かつダイナミックレンジの広い染色方法が適しています。CBB染色は手軽ではありますが、中程度の検出感度で、タンパク量を増やして泳動を行わないと確認できない場合もあります。また、タンパク量を増やすことで、バンドがスメアになったり泳動が乱れてしまうこともあります。

銀染色は高感度にタンパク質を可視化でき、広く用いられている染色方法ですが、タンパク質の違いによる染色程度の差の他に、色の変化など、デンシトメトリーの際に支障となることがあります。ダイナミックレンジは10^2程度とも言われています。また煩雑な操作や廃液の問題など、取り扱う上で面倒な点もあります。

Oriole蛍光ゲルステインは銀染色並みの感度を持ちながら、操作ステップは染色のみ（固定や洗浄操作は不要）で、簡単に高感度タンパク質検出を行えるタンパク質染色剤です（図7）。タンパク量を少なく泳動し、高感度な染色・検出を行うことで幅広い定量性を持った綺麗な泳動パターンを得ることが可能となります。Orioleに含まれる蛍光色素は直接タンパク質に結合せずタンパク質と会合したSDSと結合するため、MS解析においても非常に優れたペプチドカバー率を示します（Bulletin5991）。検出はUV励起で行います。

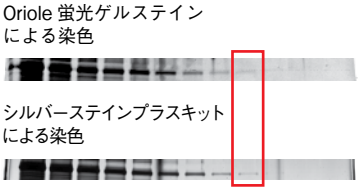


図7　SDS-PAGEスタンダード(1610317)中のOvalbuminバンドの染色
SDS-PAGEスタンダードを２倍ずつ段階希釈し電気泳動を行い、Oriole蛍光ゲルステイン、またはシルバーステインキットで染色を行った。Oriole蛍光ゲルステインによる染色は、シルバーステインプラスキットと同感度であることが確認された（赤枠）。

Ordering Information

カタログ番号	品名	価格
1610496	**Oriole蛍光ゲルステイン 1L**	¥20,000
1610497	**Oriole蛍光ゲルステイン 5Lキット**	¥80,000

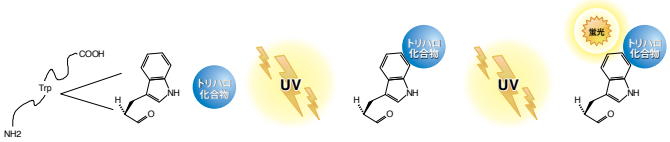
Stain-Freeテクノロジー

電気泳動後の泳動パターン確認は、染色による泳動結果の確認以外にも、ブロッティング前の泳動状態の確認、ブロッティング状態の確認の点においても非常に重要なステップです。

バイオ・ラッドのStain-Freeテクノロジーは、染色色素による染色や固定操作をすることなくタンパク質を可視化できる新しい泳動パターン確認ツールです。

Stain-Freeゲルはゲル中にトリハロ化合物が含まれており、UV照射をするとタンパク質中のトリプトファンとトリハロ化合物が架橋します。さらにUVを照射させると架橋したトリハロ化合物が蛍光を発することで、バンドとして検出することができます（図8）。

架橋されたトリハロ化合物は、ブロッティングしたメンブレン上でも蛍光検出ができるため、転写後のゲルやメンブレンを撮影しバンドの検出をすることも可能です。※



タンパク質中のトリプトファン残基とゲル中に含まれるトリハロ化合物　タンパク質のトリプトファンとゲル中のトリハロ化合物が結合する　UV照射により蛍光を発する

図8　Stain-Free原理（イメージ図）
※ エピトープ部位、もしくは近傍にトリプトファンを含む抗体によるウェスタンブロッティング検出では、抗体反応に影響が出る場合があります。

Stain-Freeゲルを用いたウェスタンブロッティングの工程では、SDS-PAGE後のゲルを ChemiDoc Touch や ChemiDoc XRS plus などにより、UV検出を行います。このステップでSDS-PAGE後のバンドパターンを確認し、電気泳動が問題なく行われているかを確認することができます。次に、ブロッティング後のゲルやメンブレンを同様に撮影します。このステップで、ブロッティングをモニターすることができ、メンブレン上のタンパク質や転写効率を確認することができます（図9）。

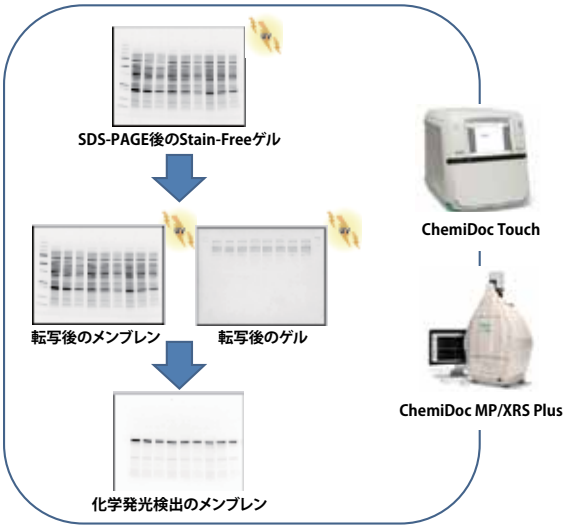


図9　Stain-Freeゲルを利用した確実なウェスタンワークフロー

Ordering Information

カタログ番号	品名	価格
456-xxxx	**ミニプロティアンTGX StainFreeゲル　10枚**	¥19,600
567-xxxxJ10	**Criterion TGX StainFreeゲル　10枚**	¥20,600
1708265J1PC	**ChemiDoc XRS Plus Image Lab システム**	¥2,500,000
1708370J1PC	**ChemiDoc Touch イメージングシステム PC付**	¥5,150,000
1708280J1	**ChemiDoc MP Image Lab システム**	¥5,250,000

注：ミニプロティアンTGXゲル、Criterion TGXゲルのラインアップは、弊社総合カタログ（2015/16）をご参照ください。

転写メンブレン

現在多くの場面で用いられているのはPVDFメンブレンです。PVDFは物理化学的耐性が非常に高く、タンパク質の保持力も非常に高い優れた転写メンブレンです。また疎水性が強いため、SDSを含む転写バッファーにおいても優れたタンパク質吸着能を持ちます。使用前には100% Methanolに浸した後、転写バッファーで平衡化します。

ニトロセルロースメンブレンは古くから用いられている転写メンブレンです。簡単に親水化できる反面、物理的強度が低く破れてしまうこともあります。サポート付きニトロセルロースメンブレンは不活性素材のサポートフィルムの両面にニトロセルロース層がある構造となっており、破れにくく扱いやすい特長があります。

たいていの場合はPVDFメンブレンで十分な結果を得られますが、一部の親水性の高いタンパク質などはニトロセルロースメンブレンの方がよりしっかりとタンパク質を保持することもあるため、実験系を組む際に

は、PVDF、ニトロセルロースの両方を試してみることをおすすめします。また、蛍光検出を行う際には、通常のPVDFが持つ自家蛍光によりバックグランドが高くなってしまいますので、低蛍光PVDFメンブレンが使用されます。
低分子タンパク質（目安　<15kDa）の転写の場合には、0.2μmのポアサイズのものを使用することで、0.45μmのものよりも転写時にメンブレンを通過しにくくなり、効率的な検出につながります（表3）。

表3　メンブレンの種類と特長

メンブレンタイプ	ポアサイズ	結合容量（μg/cm²）	特長
ニトロセルロース	0.45μm, 0.2μm	80-100	一般的な転写
サポート付きニトロセルロース	0.45μm, 0.2μm	80-100	一般的な転写／扱いが容易
PVDF	0.2μm	150-160	高い物理化学的強度 高い結合容量
低蛍光PVDF	0.45μm	155-300	高い物理化学的強度 高い結合容量／低蛍光

Ordering Information

カタログ番号	品名	価格
1620115	**ニトロセルロース ロール（0.45μm, 30cm×350cm）**	¥54,500
1620112	**ニトロセルロース ロール（0.2μm, 30cm×350cm）**	¥54,500
1620094	**サポート付ニトロセルロース ロール（0.45μm, 30cm×300cm）**	¥58,500
1620097	**サポート付ニトロセルロース ロール（0.2μm, 30cm×300cm）**	¥58,500
1620177	**イミュンブロットPVDF ロール（0.2μm, 26cm×330cm）**	¥63,500
1620264	**低蛍光イミュンブロットPVDF ロール（0.2μm, 28cm×380cm）**	¥170,000

転写バッファー

転写バッファーは様々な種類のものが開発されています。最も一般的なバッファーはTowbinバッファー（25mM Tris, 192mM Glycine, 20% Methanol）です。また、この組成を元に、Methanolを減らす（〜0%）、またはSDSを添加（〜0.1%）することで転写効率をコントロールすることができます。Methanolはタンパク質のメンブレンへの吸着効率を上げ、SDSはこれを阻害します。逆にSDSはゲルからのタンパク質をより抜け出させ、Methanolはゲルを収縮させ抜けにくくさせます。それぞれ相反する効果をもっており、両者のバランスを変えることでゲルからの抜けとメンブレンへの吸着を調節でき、劇的に転写効率を改善することが可能です（図10）。

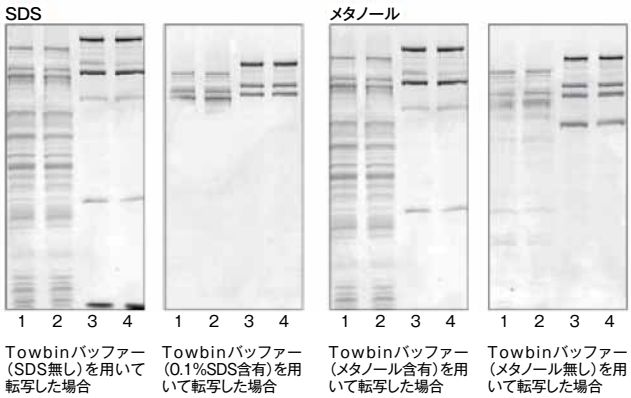


図10　転写におけるSDSとメタノールの影響（いずれも転写後のゲルを染色したもの）

セミドライ式の場合、不連続系バッファー系を用いることで効率的転写を行えるという報告もあります。陽極側バッファーとして60mM Tris, 40mM CAPS, 15% Methanol（濃度は目安）pH9.6、陰極側バッファーとして60mM Tris, 40mM CAPS, 0.1% SDS（濃度は目安）を使用することで、SDSでの作用でゲルからタンパク質を抜けやすくし、陽極側でMethanolによりメンブレンへの吸着を確実に行う仕組みです。

Ordering Information

カタログ番号	品名	価格
1610734	**プレミックスバッファー 10X トリス/グリシン 1L**	¥7,500
1610771	**プレミックスバッファー 10X トリス/グリシン 5Lキューブ**	¥24,000
1610778	**プレミックスバッファー 10X トリス/CAPS 1L**	¥20,000
1610418	**20% SDS溶液 1L**	¥24,000

ゲルの平衡化

電気泳動の終了後はゲルの平衡化を行います。平衡化は次に用いるブロッティング用バッファーにゲル内を置換し、再現性良く転写を行うために重要なステップでもあります。
電気泳動ではTris/Glycine/SDS溶液を用いますが、ブロッティングバッファーの組成が異なる場合、ゲル内のバッファー置換が不十分だと転写効率の再現性が悪くなることにつながります。また、メタノール等のアルコールを添加した転写バッファーを用いる場合には、十分量の転写バッファーで10〜20分間程度振盪します。特に転写バッファーとして代表的なTowbinバッファー（25mM Tris, 192mM Glycine, 20% Methanol）を用いる場合は、平衡化が不十分だと転写中にアルコールの作用によりゲルが収縮し、バンドがにじむ、ずれたようになるなどの結果を引き起こします。

転写

ウェスタンブロッティングの操作ステップの中で、ゲルからメンブレンにタンパク質を移し取る「転写」は検出感度に直接影響する物理的要因となります。転写ステップにおいては、できるだけ多くのタンパク質をゲルから抜けださせ、できるだけ多くのタンパク質をメンブレン上に留めることが、続く検出をより効率的に行うための近道となります。

転写装置には大きく２つのタイプがあります。タンク式（ウェット式）と呼ばれるゲル・メンブレンサンドイッチを転写バッファーに完全に浸してしまうタイプ、セミドライ式と呼ばれる、ゲル・メンブレンサンドイッチ部分にのみ通電するタイプです。（ドライ式と呼ばれる装置もあります）
タンク式ではさらにワイヤー電極とプレート電極の２種類があります。

セミドライ式ブロッティング装置

バイオ・ラッドのトランスブロットSDセルは、20年以上にわたるセミドライ式転写装置のベストセラーモデルで、非常に多くのお客様にご愛顧頂いています。セミドライ式ではゲル・メンブレンサンドイッチ部分だけに通電することで強い電場を効率的に発生させ、タンク式に比べ比較的速

くゲルからメンブレンにタンパク質を移動させることが可能です。使用するバッファー量が少なく済み、手軽に転写を行える反面、高分子タンパク質（目安として100kDa以上）の転写効率が悪く、また転写条件によっては低分子タンパク質がメンブレンを突き抜けてしまうなど、最適な転写条件を設定することが難しいとも言われています。様々なゲルサイズ（最大24cm×16cm）を使用でき、汎用性に優れた装置で、転写バッファーで平衡化したろ紙、メンブレン、ゲル、ろ紙のサンドイッチを作成後余分なバッファーを取り除き、陰極プレートをセットして通電します。過剰なバッファー状況下で転写を行うと、サンドイッチから漏れだし、そこに通電してしまうことがあり転写ムラの原因となりますので注意が必要です。また、電流を発生させるバッファー成分（電解質）はろ紙に含まれたもののみとなり、短時間で移動が完了してしまうことから長時間の転写には向いていません。

トランスブロットTurboブロッティングシステム

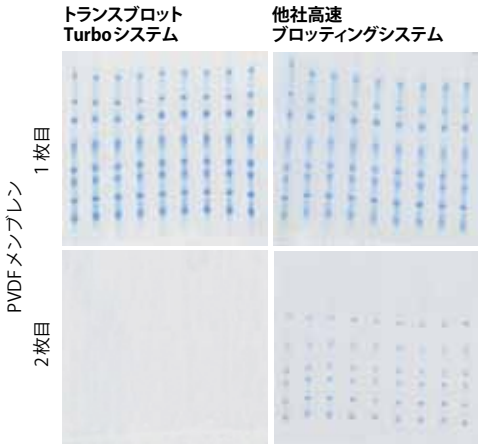
RTAキット　　トランスブロットTurbo ブロッティングシステム

トランスブロットTurboブロッティングシステムは、セミドライ式でありながら、バイオ・ラッドが開発した独自のバッファー組成により、より多くのタンパク質をゲルから転写でき、さらにより多くのタンパク質がメンブレン表面に吸着できるように設計されています。また、高電流での転写の際に発生する熱に対して強い構造となっています。
タンパク質のメンブレンへの転写がしっかりと行われることで、結合する抗体量も増え、結果的に検出感度の向上につながります（図11）。

図11　4つの代表的転写装置比較
トランスフェリン（◀約80kDa）をCriterion TGXゲルで分離後、転写を行い検出。

転写条件：**A.**トランスブロットTurboシステム（25V、7min）
B.タンク式ブロッティングシステム（100V、30min）
C.セミドライブロッティングシステム（25V、30min）
D.他社高速ブロッティングシステム（P3、7min）

高電流下のような非常に強い電場での転写を行った際には、一般的に高分子タンパク質の転写効率は上がりますが、低分子タンパク質はより移動しやすいことによりいったんメンブレンへ移動し吸着してもさらに移動をしつづけてしまい、素通りするということが起きます（図12）。トランスブロットTurboで使用する転写パック（平衡化済みメンブレンとろ紙のセット）は、多くのタンパク質をゲルから抜け出させるだけでなく、メンブレンの表面にしっかりとタンパク質を保持するよう調製されており、結果的に感度の高い検出を行うことができるようになります。



着色済みタンパク質スタンダードを泳動し、共に7分プロトコールで転写。PVDFメンブレンは2枚重ねてセットし、タンパク質の通過を確認した。

図12　トランスブロットTurboシステムによる転写時の低分子タンパク質補捉の様子

ミディアムサイズゲルまで（ミニゲルなら２枚）セットできる転写カセットは熱に強い構造で、独自のロック機構を採用しているのでゲル/メンブレンサンドイッチを均一にしっかりと保持します。この機構により、均一な、ムラの無い転写を行うことが可能となります（図13）。

トランスブロットTurbo転写カセット

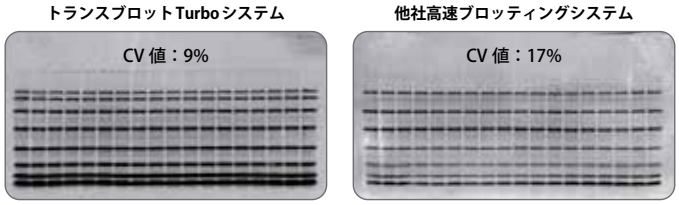


図13　均一性の高い、ムラのない転写
バイオ・ラッドSDS-PAGEスタンダード（Broad）をCriterion TGXゲル4-20%で分離後、推奨プロトコール（7分）でニトロセルロースメンブレンに転写。転写後のメンブレンを蛍光染色し、VersaDoc4000MPシステムで各バンドを定量し、同一分子量バンドの定量値のバラツキ（CV値）を求めた。

電源内蔵のトランスブロットTurboブロッティングシステムは、予め独自の転写バッファーで平衡化されたメンブレン・ろ紙のセット（転写パック）を使用することで最短３分（ミニプロティアンTGXゲル使用時）の高速転写と高効率転写を行えますが、ランニングコストを抑えたい場合には、乾燥ろ紙、乾燥メンブレン、転写バッファーがセットになったRTAキットを利

用することで転写パック使用時と同様の高速・高効率転写を行うことも可能です。また、一般的セミドライ式転写装置としての利用も可能なため、いつも使用しているメンブレンやろ紙、転写バッファー、いつもの転写プロトコールを入力して転写を実施することも可能です。
トランスブロットTurboブロッティングシステムは、専用試薬とのセットで効率的なウェスタンブロッティングを行うことも電源内蔵セミドライ式転写装置として使用することも出来る非常にフレキシブルな転写システムです。

転写条件にこだわる（タンク式転写装置）

転写条件を目的タンパク質の転写が最良になるように調整したい、あるいは転写を可能な限り均一に再現性よく行いたい場合は、タンク式が最も優れていると言われています。
タンク式転写装置はバッファー中にゲル・メンブレンサンドイッチを沈め、バッファー槽全体に電場を形成し、比較的マイルドにタンパク質をゲルからメンブレンに移動させます。移動したイオンはバッファー槽の中で再利用することができるため、長時間の転写も可能です。
バイオ・ラッドでは、ミニゲル（最大２枚）用のミニトランスブロットセル、ミニゲル（最大４枚）またはミディアムゲル（最大２枚）用のCriterionトランスブロットセルがあります。ミニトランスブロットセルとCriterionワイヤートランスブロットセルは電極に白金線電極を採用、Criterionプレートトランスブロットセルはステンレス/チタニウムのプレート電極を採用しています。プレート電極を利用した転写では、電子が面から面に移動することによりワイヤー電極タイプに比べ、非常に密で均一かつ強力な電場を形成させることができます。これによりワイヤータイプに比べよりいっそう高効率で均一な転写を行えます。

タンク式の場合、タンク内のバッファー自身が熱を吸収することにより発熱は比較的抑えられますが、強い電気条件や長時間の転写では熱が発生するため、クーリングユニットを用いて冷却しながら転写を行います。

転写用パワーサプライ

バイオ・ラッドでは定電圧での転写を推奨していますが、セミドライ式では初期電流値が高く、その後時間の経過とともに電流値が下降、タンク式では電流値自体が比較的高く発生し、かつ時間とともに電流値が上昇していきます（表4）。したがって、いずれの方式の転写装置を使用する場合でも高電流の出力が可能なパワーサプライが必要です。

表４　電気状態目安

アプリケーション/装置	ゲルサイズ・枚数	初期電気状態	最終電気状態	時間
ミニトランスブロットセル	ミニゲル・２枚	100V(C) / 250mA	100V(C) / 450mA	1時間
Criterion ワイヤートランスブロットセル	ミディゲル・２枚	100V(C) / 250mA	100V(C) / 450mA	1時間
Criterion プレートトランスブロットセル	ミディゲル・２枚	100V(C) / 650mA	100V(C) / 1600mA	30分
トランスブロットSDセル	ミニゲル・２枚	15V(C) / 200mA	15V(C) / 80mA	15〜30分

バイオ・ラッドのパワーパックHCなら3.0A、パワーパックUniversalなら2.5Aまで出力が可能でブロッティングアプリケーションをストレスなく安心して行えます。

Ordering Information

カタログ番号	品名	価格
1703940JA	**トランスブロットSDセル**	¥140,000
1704150J1	**トランスブロットTurbo with PVDF（ミニ）**	¥280,000
1704150J2	**トランスブロットTurbo with NC （ミニ）**	¥280,000
1704270J1	**トランスブロットTurbo w/RTA NC （ミニ）**	¥306,000
1704272J1	**トランスブロットTurbo w/RTA PVDF （ミニ）**	¥306,000
1704150J10	**ベストパッケージforトランスブロットTurbo PVDF（MINI）**	¥433,000
1704150J11	**ベストパッケージforトランスブロットTurbo PVDF（MIDI）**	¥454,000
1704156	**トランスブロットTurbo転写パック PVDF （ミニ） 10個**	¥16,800
1704156B03	**トランスブロットTurbo転写パック PVDF（ミニ） 10個 3セット**	¥47,500
1704157	**トランスブロットTurbo転写パック PVDF（ミディ） 10個**	¥23,600
1704157B03	**トランスブロットTurbo転写パック PVDF（ミニ） 10個 3セット**	¥67,000
1704158	**トランスブロットTurbo転写パック NC（ミニ） 10個**	¥16,800
1704158B03	**トランスブロットTurbo転写パック NC（ミニ） 10個 3セット**	¥47,500
1704159	**トランスブロットTurbo転写パック NC（ミディ） 10個**	¥23,600
1704159B03	**トランスブロットTurbo転写パック NC（ミディ） 10個 3セット**	¥67,000
1704270	**トランスブロットTurbo用 RTA転写キット NC（ミニ） 40セット**	¥46,000
1704271	**トランスブロットTurbo用 RTA転写キット NC（ミディ） 40セット**	¥66,000
1704272	**トランスブロットTurbo用 RTA転写キット PVDF（ミニ） 40セット**	¥46,000
1704273	**トランスブロットTurbo用 RTA転写キット PVDF（ミディ） 40セット**	¥66,000
1704274	**トランスブロットTurbo用 RTA転写キット 低蛍光PVDF（ミニ） 40セット**	¥54,000
1704275	**トランスブロットTurbo用 RTA転写キット 低蛍光PVDF（ミディ） 40セット**	¥78,000
1704070JA	**Criterionプレートトランスブロットセル**	¥115,000
1704071JA	**Criterionワイヤートランスブロットセル**	¥100,000
1645052	**パワーパックHC**	¥150,000
1645070JA	**パワーパックUniversal**	¥250,000

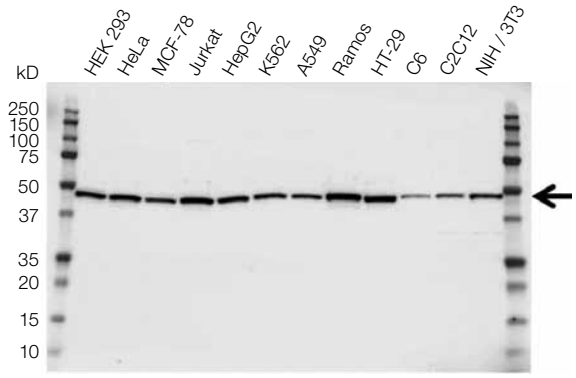
検出〜イメージング

抗体

ウェスタンブロッティング実験の成功を左右する最も重要なファクターが抗体、および抗原抗体反応です。

抗体のターゲットとなるタンパク質やペプチドの抗体結合部位（エピトープ）は非常に限られた大きさや部位にあり、一口に抗ＸＸ抗体と言ってもウェスタンブロッティングにおいてそのタンパク質と確実に、高い親和性をもって、特異的に反応するかはわかりません。特にウェスタンブロッティングでは多くの場合変性したタンパク質に対する反応性が求められ、ネイティブタンパク質に対する抗体（例えばフローサイトメトリー用）がうまくウェスタンブロッティングに使えるかどうかは不明です。そこで使用する抗体はサプライヤーによりウェスタンブロッティングでの反応性が確認されたものを使用するのが望ましいです。

バイオ・ラッドでは、ウェスタンブロッティングで安心してご使用いただける抗体をお届けすべく、12種類の代表的なセルラインにおいて内在性の目的タンパク質を検出できることを確認した抗体の発売を開始します※1、2。



PrecisionAb評価済み抗体シリーズは、定性的にシグナルが確認できることはもちろん、一定以上のシグナル強度が得られ、文献等で報告されている分子量などの情報と一致することを確認した抗体ラインアップです。反応チェック用の小容量製品や、ポジティブコントロールの提供の他、評価に使用した機器や条件なども全て公開されているので、確実に検出を行うことが可能です。

また、1万種類以上の抗体ラインアップを持つAbD Serotec社抗体もバイオ・ラッドブランドのもと継続してワールドワイドに提供中※3です。

Ordering Information

カタログ番号	品名	価格
—	**PrecisionAb 評価済み抗体シリーズ**	Coming Soon

※1　主に抗ヒトタンパク質抗体を予定しています。
※2　2015年夏頃より順次発売を予定しています。
※3　日本国内でのAbD製品の販売・サポートについてはコスモ・バイオ株式会社様、フナコシ株式会社様、DSファーマバイオメディカル様（順不同）にお問い合わせください。

抗体反応と検出

抗体反応の原理

ウェスタンブロッティングでは、メンブレン上に転写された複数のタンパク質の中から特定のタンパク質のみを検出するために、抗原抗体反応を利用しています。一般に、図14に示すような2種類の抗体を用いた検出方法をとります。こうすることで、ターゲットを認識する抗体（一次抗体）のすべてについて標識抗体を用意する必要がなくなり、その動物種の抗体を認識する標識抗体（二次抗体）を用意するだけで、様々なターゲットの検出（一次抗体）にも対応できるようになります。二次抗体への標識としては、HRP（Horseradish Peroxidase）またはAP（Alkaline Phosphatase）といった酵素を用いる方法と、蛍光色素やRIを直接標識する方法があります。酵素標識法では、反応に伴う生成産物が目視可能な着色物質であれば「A. 発色法」となり、発光を伴った反応産物が生じる場合には「B. 化学発光法」となります。さらに、酵素ではなく蛍光色素を二次抗体に直接標識した場合には「C. 蛍光標識法」となります。

それぞれの検出方法の特長を表5にまとめて示しました。発色法では、基質を添加して発色度合いを目で確認しながら、バックグラウンドが上がりすぎないように、最適な状態で反応を止めることができます。特殊な装置や消耗品なしにバンドを確認できるので、感度を必要としないサンプルの検出において広く用いられています。ターゲットの検出にあたって感度を重視する必要がある場合には、化学発光法が最も優れています。APとHRPの両方の基質がありますが、ルミノールと過酸化水素からHRPによって触媒される反応の方が、APよりも高感度に検出できます。バイオ・ラッドの Clarity Western ECL Substrate ならfg（フェムトグラム）中域という高感度で検出できる基質なので、微量なターゲットを検出したい場合や、抗体を希釈して使用することで節約したい場合などに有効なキットです。他社の同等品と比較してもコストパフォーマンスに優れた化学発光用の試薬キットです。

また近年では検出技術の進歩に伴って、蛍光標識抗体を用いる方法も行われるようになってきました。蛍光標識法はダイナミックレンジが広く、定量の直線性も高いという特長がある上に、複数の蛍光標識抗体を用いることで、複数のターゲットを同時に検出するという応用も可能です。ただし、感度としては化学発光に劣るので、化学発光法から蛍光法に切り替える場合には、抗体の希釈倍率などの条件検討が必要となります。

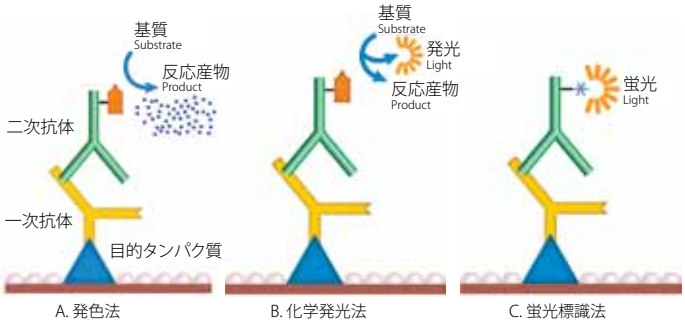


図14　検出のしくみ
ウェスタンブロッティングでは、目的タンパク質に特異的に結合する抗体（一次抗体、二次抗体）を用いて、何らかの検出可能なシグナルを発生させます。「A. 発色法」では目視可能な反応産物を、「B. 化学発光法」では発光を伴う反応産物を生じます。「C. 蛍光標識法」ではあらかじめ蛍光標識した二次抗体を用いることで、シグナルの検出を行います。

表5　二次抗体の標識と検出方法のまとめ

検出方法	酵素	検出試薬（製品例）	検出方法	感度	長所	短所
発色法	AP	BCIP/NBT（イミュンブロットAP発色キット）	目視確認 可視スキャナー	低（100 pg）	退色が起こりにくい	内在性のAPの影響 HRPより高価
	HRP	4CN（イミュンブロットHRP発色キット）		低（500 pg）	最も経済的 速やかな発色反応	退色が起こる アジ化物が反応を阻害
		DAB				
化学発光法	AP	CDP-Star（イミュンスターAPキット）	X線フィルム CCDイメージャー	中〜高（10pg）	高感度	内在性のAPの影響
	HRP	ルミノール（Clarity Western ECL Substrate）		高（fg中域）	高感度	アジ化物が反応を阻害
蛍光標識法	なし	蛍光色素（フルオレセイン等）を二次抗体に直接標識	CCDイメージャー（蛍光光源に対応）	中（1pg-1ng）	定量性が高い 多重検出も可 シグナルが安定	抗体使用量が多くなる

抗体反応のフロー

ゲルから転写したメンブレンは、抗体が非特異的に結合しないように抗原抗体反応とは無関係のタンパク質でブロッキングを行います（1時間〜O/N）。ブロッキング剤としては、スキムミルク（0.5-5%）、ゼラチン（1-3%）、BSA（1-5%）などが用いられます。このとき、転写後のメンブレンをすぐにブロッキング剤に入れるよりは、いったんTBS※中で5分程度の振とう後にブロッキングを行った方が、メンブレン表面の付着物などを除去できるのでバックグラウンドの低減に有効です。

次に、一次抗体溶液にメンブレンを移して、1時間振とうします（またはO/Nで静置）。抗体はブロッキングバッファーまたはTBS-T※で希釈します。希釈倍率は、検出方法、抗体の力価などに応じて決定します。市販の抗体の場合には、メーカーの推奨条件を参考にしてください。適当な希釈倍率が分からない場合はドットブロット等で条件検討を行って、非特異的反応が少なく、目的タンパク質を感度よく検出できる最適な条件を検討します。

一次抗体や二次抗体で処理した後のメンブレンは、TBS-T※などの洗浄バッファーで5〜10分の振とう洗浄を3〜6回繰り返します。洗浄バッファーの液量や洗浄回数は、検出方法、抗体の力価などに応じて検討を行ってください。二次抗体の希釈倍率も、一次抗体と同様に予備検討によって、ターゲットの検出に適した条件を決定してください。二次抗体溶液中で1時間振とう処理を行って、再びメンブレンを洗浄した後に検出試薬を用いてバンドの検出を行います。

※ウェスタンブロッティングで用いられる洗浄バッファー
TBS: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4
TBS-T: 20mM Tris, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4
注）TBSの代わりにPBS（10mM Sodium Phosphate, 150mM NaCl, pH7.4）を用いることもあります。
ただし、AP標識抗体を用いる場合にはPBSではなくTBSを使用してください。

実験手順の詳細はTechNote 6376 ならびに 2895 をご参照ください。

検出結果のイメージング

発色法で検出したメンブレンは、デンシトメトリーまたは落射白色光源を搭載したCCDイメージャーで撮影することができます（表6）。画像を電子化することによって、データの長期保存や数値化も可能となります。化学発光の検出にはX線フィルムまたはCCDイメージャーが必要になります。X線フィルムは高感度な検出が可能ですが、ダイナミックレンジが狭いため定量的な解析には適しません。近年ではCCDカメラの進歩に伴って、X線フィルム並みに高感度で定量的な撮影が可能なイメージャーも登場してきています。また蛍光法の検出のためには、従来は高価なレーザースキャナーが必要でしたが、適切な励起光源（落射LED光源など）と検出フィルターを搭載したタイプならCCDイメージャーでも検出できるようになりました。

表6　各種検出法と撮影方法のまとめ

	X線フィルム	デンシトメトリー	CCDイメージャー		
定量性	△	◎	◎		
感度	◎	△	○		
消耗品	必要	不要	不要		
暗室	必要	不要	不要		
検出方法					
発色	×	◎	○	○	○
化学発光	○	×	×	◎	◎
蛍光	×	×	×	×	◎
RI	◎	×	×	×	×
撮影装置例	なし	GS-900	Gel Doc XR+, EZ	ChemiDoc XRS+ Touch	ChemiDoc MP

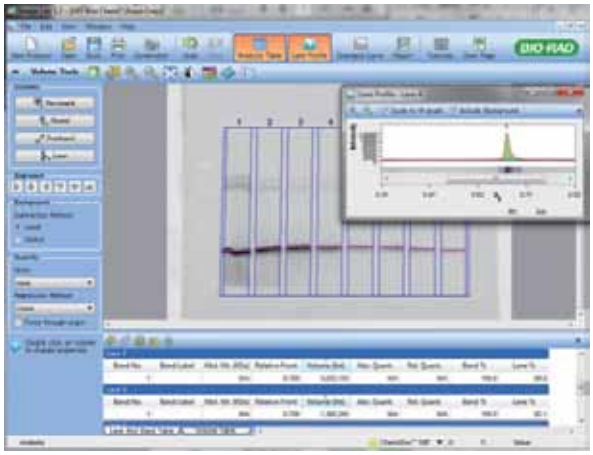
Ordering Information

カタログ番号	品名	価格
1705060	**Clarity Western ECL Substrate 200mL**	¥20,000
1705018	**イミュンスターAP 基質 125mL**	¥45,000
1706431	**HRP発色キット**	¥20,000
1706432	**AP発色キット**	¥33,000
1706435	**プレミックスバッファー 10xTBS 1L**	¥7,000
1610780	**プレミックスバッファー 10xPBS 1L**	¥15,000
1610781	**EIAグレード10% Tween-20 1L**	¥8,500
1706531	**EIAグレードTween-20 100mL**	¥8,500
1706537	**EIAグレードゼラチン 200g**	¥8,000
1610782	**プレミックスバッファー 1XTBS/ 1%カゼイン 1L**	¥26,000
1707990J1NPC	**GS-900 Calibrated Densitometer Note PC システム**	¥2,380,000
1708265J1PC	**ChemiDoc XRS Plus Image Lab システム**	¥2,500,000
1708370J1PC	**ChemiDoc Touch イメージングシステム PC付**	¥5,150,000
1708280J1	**ChemiDoc MP Image Lab システム**	¥5,250,000

データ解析

検出したデータを用いて定量を行うにはソフトウェアを使用します。
バイオ・ラッドのイメージ撮影装置に付属するImageLabソフトウェアは、装置コントロールの他、簡便かつ強力な解析機能を持っています。

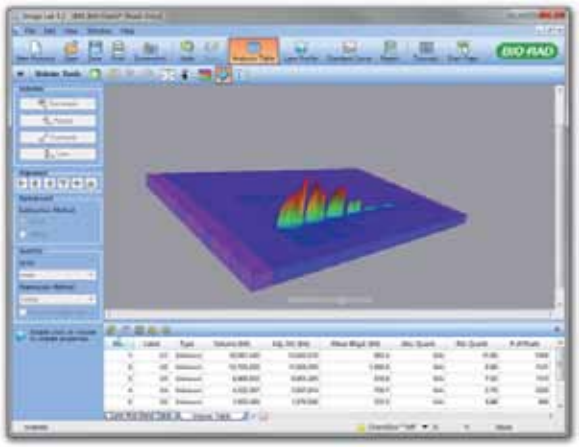
ImageLabでは、２通りの方法でバンド定量を行うことが可能です。
１つ目は右図のバンド認識パラメーター設定を用いて目的バンドを認識させる方法です。この方法により下図のようにバンドが認識され、同時にシグナル値（Volume値）が計算され表示できます。この方法は主に電気泳動パターンの解析やレーン毎にそれぞれ含まれるバンドの定量に役立ちます。



ウェスタンブロッティングのように単一のバンドを定量する場合には、もう一つの方法である、ボリューム解析機能（バンドを囲い、囲った部分のVolume値を求める方法）が役立ちます。

下図のように定量したいエリアを囲うだけでそのバンドのボリューム値が求められます。また、図中の左から５番目のバンドをリファレンスバンドとして設定するとその他のバンドが何倍となっているかも瞬時に計算されます。

近接したバンドの確認には、疑似カラー表示と立体表示が便利です。



バンドのピークの識別が色でわかりやすくなる他、立体画像を360度回転させることができるため、ピークトップに谷があるかどうか容易に判別することが可能です。

この他、検量線作成と濃度定量機能、アノテーション機能（図へのテキスト追加や数値表示など）、ニーズに応じた画像出力機能など、泳動染色像やウェスタンブロッティング画像の解析に必要な機能が全て搭載されています。

ウェスタンブロッティングデータの正確な補正

ウェスタンブロッティングでは、目的タンパク質とローディングコントロールをリニアダイナミックレンジ内で正確に測定することにより、目的タンパク質の変化を高い信頼度で把握することが可能になります。

この際にローディングコントロールとして一般的に用いられるハウスキーピングタンパク質には、β-アクチンやβ-チューブリン、GAPDHなどがありますが、これらタンパク質の検出では直線性や正確性に欠ける場合があります。これに対し、近年ローディングコントロールとして注目されているのが「総タンパク量」です。

総タンパク量は電気泳動を行う前に濃度定量を行ったり、細胞数を合わせて調整を行います。しかし実際に泳動、転写された量は手技的、実験的誤差が生じるため、転写後のメンブレン上にあるタンパク質を検出、定量することが望ましいと言われています。タンパク質染色剤を用いた方法もありますが、感度や定量性の問題の他、メンブレン上のタンパク質に与える影響があります。

バイオ・ラッドのStain-Freeゲルは、泳動後のゲルにUVを照射するだけで、ゲル中のタンパク質が蛍光ラベルされ、転写後もタンパク質を蛍光で検出することが可能です。実際に、HeLa細胞ライセートを50μg〜10μg Stain-Freeゲルで泳動し、転写後の膜上のタンパク質の検出を行った結果が**図15**です。

Stain-free blot image

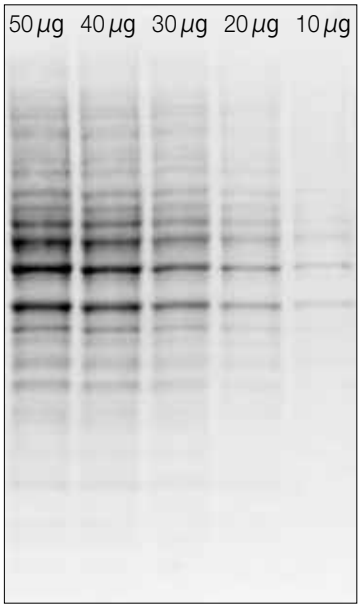


図15 Stain-Freeを用いた、膜上タンパク質の検出
HeLa細胞ライセートを50μg~10μgの希釈系列をCriterion TGX Stain-Freeゲルで泳動し、泳動後に1分間UVを照射。その後、トランスブロットTurboを用いニトロセルロース膜に7分間転写。転写後の膜にUVを照射し、ブロットイメージを得た。

一般的にローディングコントロールとして用いられる、β-アクチン、β-チューブリン、GAPDHの検出を同膜上にて行いました。(**図16**) また、ローディングコントロールとしての有用性を検討するために、図1、2で得られたシグナルを定量し、グラフ作成を行いました。(**図17**)

β-アクチン、β-チューブリン、GAPDHは濃度依存性はある程度見られるものの、本来2倍、3倍といったローディング量に応じたレスポンスが低く、また、直線性も悪いことがわかります。一方、Stain-Freeゲルを用いた総タンパク量の検出は、理想値に近い傾きが得られ、またその直線性も非常に高いことがわかります。

Stain-Freeテクノロジーを用いた総タンパク量検出は、これまで一般的に用いられているハウスキーピングタンパク質よりも非常に安定したローディングコントロールとして用いることができ、さらにこの値を用いたウェスタンブロッティングのデータ補正(ノーマライジング)は、目的タンパク質の真の変動を明らかにすることができる非常に有用な手法でもあります。

(本内容は、バイオ・ラッド技術資料 Bulletin 6360より抜粋してご紹介しております。)

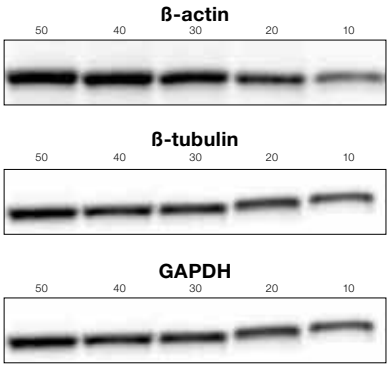


図16 β-アクチン、β-チューブリン、GAPDHの検出結果

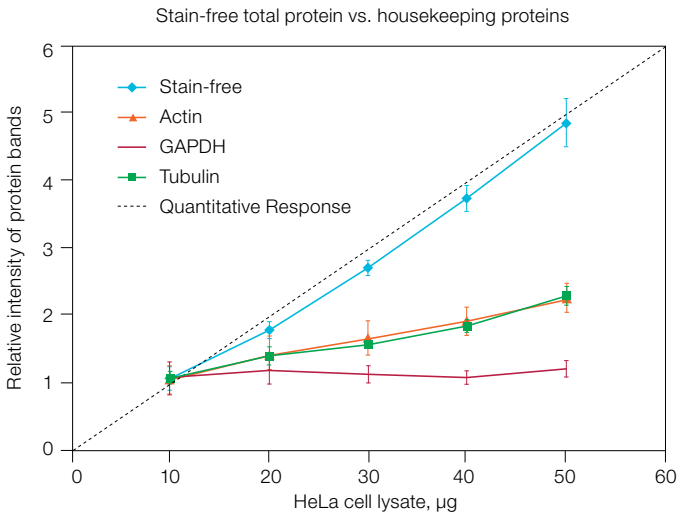
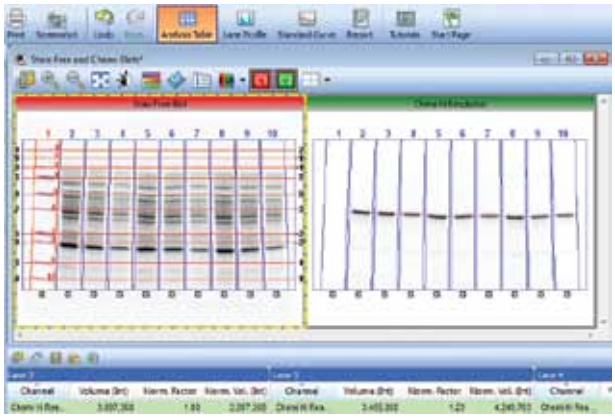


図17 4種類のローディングコントロール比較

ImageLabソフトウェアは従来のハウスキーピングタンパク質を用いた補正だけでなくStain-Freeを用いた総タンパク質量によるデータ補正機能を完全サポートしています。

化学発光画像とStain-Free画像を読み込み、画像セットを作成します。その後、それぞれの画像でレーン認識を行った後、化学発光画像上でバンド認識を行います。後は、Stain-Free画像をデータ補正用としてセットすることで、総タンパク質量により補正されたデータを得ることができます。



Channel	Lane Number	Band Number	Volume (Intensity)	Normalization Factor	Normalized Volume (Intensity)
Chemi	Lane 2	1	3860064	1	3860064
Chemi	Lane 3	1	3406560	1.29	4416034
Chemi	Lane 4	1	2331168	1.89	4408112
Chemi	Lane 5	1	3782112	1.05	3981556
Chemi	Lane 6	1	3383328	1.31	4445670
Chemi	Lane 7	1	2444832	1.97	4822224
Chemi	Lane 8	1	3445536	1.09	3739923
Chemi	Lane 9	1	2851872	1.38	3934866
Chemi	Lane 10	1	1940544	2.03	3937656

トラブルシューティング

ウェスタンブロッティングは非常に複雑な実験です。サンプル調製、電気泳動、転写、抗原抗体反応、検出といくつもの実験を行う必要があります。最終的にメンブレンを撮影した時に期待した結果が得られなかった場合、どの実験工程に問題があったのかを絞り込むことも大変です。

今回はウェスタンブロッティングで起きやすいトラブルと、その典型的な原因をまとめました。

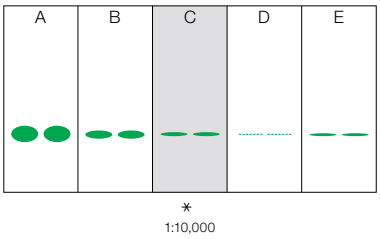
バックグラウンドが高い

原因と対策

1）抗体濃度が高すぎる

▶**抗体の最適希釈率を検討**

ターゲットの検出に適した抗体希釈倍率を検討するために、段階希釈した抗体溶液を用いた予備実験を行います。抗体希釈倍率の検討方法については、TechNote 6359 をご参考ください。
また、サンプルのブロッティングをドットブロット（バイオドットなど）で行えば、より効率的に希釈倍率のスクリーニングを実施できます。



抗体希釈倍率の検討例（TechNote 6359より）

2）メンブレンのウオッシュ不足

▶**ウオッシュの回数や液量を増やす**

メンブレンの大きさに対して洗浄バッファーの液量が少ないと十分な洗浄効果が得られません。十分な液量と回数の洗浄を行ってください。

▶**洗浄バッファーのTween20（～0.1％）の濃度を検討**

Tween20濃度を上げると、より強い洗浄効果が期待できます。ただし上げ過ぎると目的タンパク質がメンブレンからはがれてしまう可能性もありますのでご注意ください。

3）ブロッキング剤の濃度や相性が悪い

▶**ブロッキング剤の濃度を最適化**

ブロッキング剤の濃度を上げるか、処理時間を長くしてください。

▶**ブロッキング剤の変更**

抗体によってはブロッキング剤に反応してしまうものがあるため、別のブロッキング剤も検討してください。

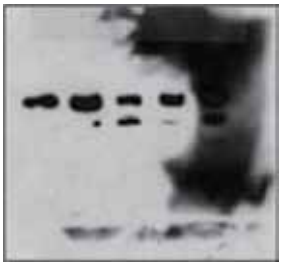
4）メンブレンが乾燥

▶**実験中PVDFメンブレンを乾かさないように注意**

5）バッファー類へのコンタミネーション

▶**ブロッキングバッファー、洗浄バッファーの再調製**

シグナルにムラがある



原因と対策

1）抗体液量が不足

▶**メンブレンが十分に浸る量の抗体溶液を使用**

抗体量に限りがある場合には、必要最小量の抗体液量で処理することもありますが、メンブレンは必ず均一に浸る必要があります。抗体液量を増やしたり、振とう方法の検討を行ってください。

2）メンブレンが部分的に乾燥

▶**実験中PVDFメンブレンを乾かさないように注意**

3）シェーカーで振とうが足りない、ムラが生じている

▶**シェーカーの振とうスピードを検討／機種を変更**

振とうのスピードや方法は洗浄効率を左右するので、必要に応じて検討を行ってください。また、ロータリーシェーカーは中央と外周で差が生じることもあります。

4）メンブレンの平衡化が均一に行われていない

▶**メンブレンは一枚ずつ重ならないように平衡化する**

複数のメンブレンをまとめて平衡化すると、重なりあった面が溶液に触れないことがあります。平衡化は重ならないように一枚ずつ行い、水面に浮かびあがった状態ではなく、沈んだ状態で振とうしてください。

バンドがゆがんでいる

原因と対策

1）泳動の時点でゆがんでいる

▶**泳動後のゲルの総タンパク質染色**

検証のために、泳動後のゲルをCBB等の総タンパク質染色してください。その結果、泳動の時点でバンドがゆがんでいた場合には、サンプルのバッファー成分に由来する問題が考えられます。脱塩や希釈によって影響が最小限となるように調製してください。

2）転写時にゲルとメンブレンの密着が悪い

▶**ろ紙やファイバーパッドの厚さを確認**

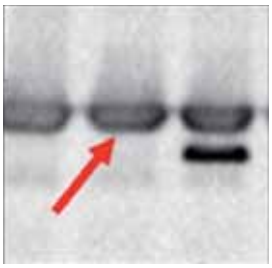
ご使用されている機器に適したろ紙をご使用ください。不適切なろ紙を使用すると、薄いために隙間が生じたり、厚いためにゲルを傷つけたりする可能性があります。

3）転写時に異常発熱している

▶適切な冷却方法か確認

あらかじめよく冷蔵しておいた転写バッファーを使用してください。タンク式の転写装置の場合は、転写バッファーの冷却とスターラーによる撹拌を行ってください。

バンドが化学発光検出時に白抜けする



原因と対策

1）酵素の量が多く、撮影までに基質を消費しきった

サンプルのタンパク量または抗体量が多すぎたため、目的バンド部分に過剰量の酵素（HRPまたはAP）が集まってしまい、結果的に基質をすぐに消費してしまったものと思われます。発光が続いているうちに撮影するか、それが難しい場合には、次のような対策をご検討ください。

▶SDS-PAGEでのサンプルアプライ量を減らす

▶抗体濃度を薄くする

▶感度の低い検出試薬に変更する

シグナルが弱い、出ない

シグナルが弱い、出ないという場合には原因は様々です。

▶転写がうまくいっていない

▶抗体が反応していない

▶検出試薬が発光していない

▶撮影条件に問題がある

などが考えられますが、改善するためには原因の絞り込みが必要となります。そのために以下のような検証を行うことを推奨します。

トラブルシューティングフロー

電気泳動
- ✓ ウェスタン用とは別に泳動したゲルをCBB染色

↓

転写
- ✓ 転写後のメンブレンをPonceau S 染色
- ✓ 残りのゲルをCBB染色

↓

抗原抗体反応
- ✓ 抗体の仕様を再確認
- ✓ 抗体の反応性をドットブロットで確認

↓

検出反応
- ✓ 発光試薬と標識抗体をチューブで混合して発光することを確認
- ✓ 発光後のメンブレンをTBS-Tでよく洗浄し、CBB染色する

↓

イメージング
- ✓ ポジティブコンロールを撮影し、撮影装置の動作を確認する

このような検証実験の結果から、適切な対応策を絞り込みます。

検証結果に応じたトラブルシューティング

1）泳動後のゲルをCBB染色しても、バンドが検出されない場合

▶アプライするタンパク量の見直し

タンパク定量がうまくいっていなかった可能性もあります。測定の際に、バッファー成分の干渉を受けなかったか確認して、適切なタンパク量をアプライしてください。

▶サンプル抽出方法の見直し

可溶化バッファーの組成、組織の破砕手順等を見直してください。

2）転写後のゲルに大量のタンパク質が残っている場合

次のような、より強い転写条件をお試しください。これによりタンパク質はゲルから抜けやすくなりますが、メンブレンを抜ける可能性も生じます。

▶転写時間を延長する（タンク式転写装置の場合）

▶ターゲットが塩基性タンパク質と予想される場合は、pHの高い転写バッファー※ にする

▶転写バッファーにSDSを0.01～0.05% となるように添加する

▶アクリルアミドゲルの濃度を下げる

▶セミドライ式からタンク式転写装置に変更する

3）転写後のゲルにタンパク質は残っておらず、メンブレン上にもタンパク質が検出されない場合

目的タンパク質がメンブレンを抜けてしまった可能性と、ゲルからメンブレンに転写される途中で拡散した可能性が考えられます。2枚重ねのメンブレンで転写を行い、シグナルが2枚目でも検出されないかチェックしてください。

▶メンブレンを抜けてしまった可能性

次のような、よりマイルドな転写条件をお試しください。

- 転写時間を短くする
- 転写バッファーのメタノール濃度を～20%まで上げる※
- 転写バッファーにSDSが入っている場合は除く※

▶途中でバンドが拡散した可能性

- メンブレンとゲルの密着性（ろ紙の厚さが適切か）を確認
- ファイバーパッドを新しいものに交換（タンク式転写装置）

4）コントラスト調整によりメンブレンの輪郭は検出される場合

化学発光の反応、検出はできているので、次の工程をチェックします。

▶抗体の変性が疑われるため、抗体溶液を再調製する

▶コンタミネーションが疑われるため、ブロッキング洗浄バッファーを再調製する

▶抗原と抗体の反応性をドットブロットにより確認する

5）コントラスト調製してもメンブレンの輪郭も検出されない場合

化学発光の反応、検出の工程をチェックします。

▶コンタミネーションが疑われるため、ブロッキング洗浄バッファーを再調製する

▶希釈した標識抗体を検出試薬と反応させ発光を確認し、発光しなければ検出試薬または抗体を新しい物に変える

▶撮影装置の動作を確認する、レンズの絞りを確認する

6）バンドは検出できるものの全体的にシグナルが弱い

▶化学発光試薬をより高感度なものに変更する

▶撮影時間を延長する、撮影条件を高感度モードに変更する

▶転写効率に問題がないか、発光後のメンブレンを総タンパク質染色して検証する

※転写バッファー等の詳細は、TechNote 2895 をご参考ください。

転写便利グッズ

ブロッティングローラー

セミドライ式ブロッティング装置を使用する際は余分なバッファーを搾り取る必要がありますが、このローラーを使えば、ゲル・メンブレンスタックをずらすことなく簡単に行えます。（ローラー部分はおよそ8cmです）
また、タンク式、セミドライ式問わず、ゲルとメンブレンサンドイッチを作成する際に気泡が入ると、その部分の通電は行われず、メンブレン上に小さな丸い穴のような跡が発生します。サンドイッチを作成した際も表面をこのローラーで軽くしごくことで気泡を追い出し、綺麗な転写を行うことが可能となります。（トランスブロットTurboブロッティングシステム、Criterionトランスブロットセルには付属しています）

Ordering Information

カタログ番号	品名	価格
1651279	**ブロッティング用ローラー**	¥7,000

Criterionゲル/ブロットアッセンブリートレイ

タンク式転写装置用ゲル・メンブレンサンドイッチを作成し、ホルダーにセットする際、家庭用プラスチック容器などを使うと深すぎて扱いづらかったり、別容器でメンブレンやろ紙を平衡化したりと何かと不便です。このCriterionゲル/ブロットアッセンブリートレイは下図のように、メンブレンやろ紙を平衡化しておくためのスペースと、適度な角度と深さのアッセンブリー部位からなり、想像以上に簡単にセッティングすることが可能です。ミディアムゲル（Criterionゲル）の大きさまで対応していますので、ミニゲル用としても使用可能です。（Criterionトランスブロットセルには付属しています）

Ordering Information

カタログ番号	品名	価格
1704089	**Criterionゲル/ブロットアッセンブリートレイ**	¥13,000

バイオ・ラッドでは様々なサービスを通してお客様のウェスタンブロッティング実験をサポートしております。

ETUS（Easy-to-Use Solutions）サービス

Easy-to-Use Solutionsはバイオ・ラッド製品のユーザー様向け有料トレーニングコースの名称です。ウェスタンブロッティング関連では、Basicコースとして「電気泳動からウェスタンブロッティングA to Z」が、画像解析関連ではBasicコースとして「使ってみよう！画像撮影装置＆解析ソフトウェア」コースが設定されています。
お申込み、開催日程、その他トレーニングコースは、検索していただくか、直接URLを入力いただき、"Bio-Rad Easy-to-Use Solutions"のサイトをご覧ください。

Bio-Rad ETUS　検索　URL: http://pdbu-support.bio-rad.co.jp/ETUS.html

各種ガイドブック

電気泳動やウェスタンブロッティングのアプリケーションガイドブックを販売しています。基本的操作と原理からトラブルシューティングまで、役立つ内容が満載です。

カタログ番号	品名	価格
MNLGEP1653301	**ゲル電気泳動ガイド**	¥2,000
MNLGWB1703940	**ウェスタンブロッティングガイド**	¥2,000

定量ウェスタンV3ワークフローセミナー（無料）

Stain-Free技術を用いた総タンパク質量によるデータ補正ワークフローについての無料セミナーです。データ補正の必要性からハウスキーピングタンパク質による補正との比較、Stain-Free技術を利用した補正の利点などをご紹介します。

BIO-RAD

バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社
ライフサイエンス事業部

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
大阪営業所 〒532-0025 大阪市淀川区新北野 1-14-11 第一生命ビル　TEL：06-6308-6568
福岡営業所 〒812-0013 福岡市博多区博多駅東 2-5-28　TEL：092-475-4856
＊学術的お問い合わせは　TEL：03-6404-0331

取扱店

＊価格、仕様などは予告無く変更することがありますので、ご了承ください。
＊価格は 2015 年 5月現在のもので、メーカー希望小売価格（税別）です。
※本カタログに記載されている会社名、商品名は各社の商標または登録商標です。

C10704 1505A