Western Blotting Newsletter

より確実なウェスタンブロッティングのためのソリューション

Vol.3

シングル検出（化学発光）から マルチ検出（蛍光）へ

2018. July

ウェスタンブロッティングの検出は、その検出感度の高さから化学発光検出が一般的に用いられています。しかしながら、化学発光検出が万能な方法であるかといえば必ずしもそうではなく、以下に挙げるような課題があります。

化学発光検出の課題

- 複数のターゲットを同時検出することが難しい
- 発光強度が継時的に変化するため、場合によって再現性を得ることが難しい
- 発光基質のコストがかかる

特に、複数のターゲットタンパク質を同時に検出することができない点は、化学発光法における大きな課題です。というのも昨今の研究では複数のターゲットタンパク質を検出することが求められるケースが増えており、またターゲットタンパク質の他に必ずハウスキーピングタンパク質や総タンパク質を同様に検出し、データの信頼性を担保することが求められるようになっているためです。このような場合、メンブレンをカットしたり、ストリッピングやリプロービングが一般的に用いられていますが、これらの方法は抗原抗体反応に要する時間や手間、コスト、再現性の問題などがあります。

一方、蛍光検出は、別々の蛍光色素で標識された抗体を用いターゲットタンパク質を識別することにより、複数のターゲットタンパク質を色分けし検出できます（図1参照）。そのためストリッピングやリプロービング操作が無く、複数のターゲットタンパク質の検出が可能であり、化学発光検出の課題を克服することが可能です。しかしながら、これまでの蛍光検出は化学発光と比べ、検出感度が化学発光に比べ劣るという致命的なウィークポイントがありました。

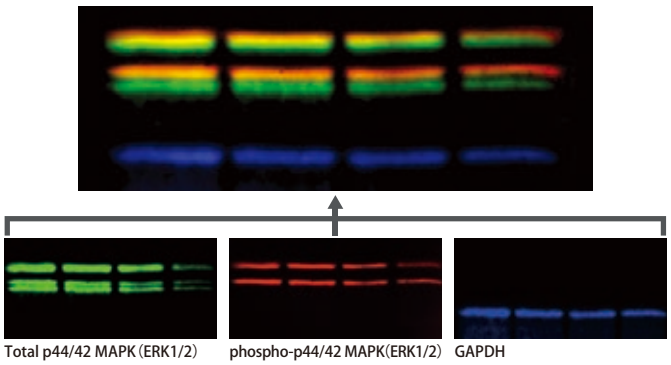

図1. 蛍光を用いたマルチプレックス検出例

この検出感度の問題を解決するためにバイオ・ラッドでは、新しく高感度な蛍光ウェスタンブロッティング検出を可能にする撮影装置および蛍光試薬を開発いたしました。これにより化学発光法に変わる新しいソリューションを提供できるようになりました。

蛍光標識2次抗体　StarBright Blueシリーズ

高感度な蛍光検出を行うためには、バンドのシグナル強度を上げ、バックグラウンドを下げることが必要です。バイオ・ラッドの独自技術により開発されたStarBright Blueシリーズは従来の蛍光色素と比べ、極めて強い光を発する蛍光色素であり、バンドの蛍光シグナルを短時間の露光時間で得ることが可能です。一般的な蛍光色素と比べ短時間露光で検出できるため、結果的にバックグラウンドの上昇も最小限に抑えることができ、超高感度な化学発光検出に匹敵する検出感度を得ることが可能です（図2参照）。

図2. 化学発光と蛍光検出の感度比較例

蛍光・化学発光検出装置　ChemiDoc Touch MPシステム

従来、蛍光検出にはレーザースキャナーが一般的に用いられてきましたが、レーザースキャナーは化学発光の高感度検出は困難なため、蛍光と化学発光の高感度検出を両立できる装置はこれまでありませんでした。ChemiDoc Touch MPシステムはCCDカメラをベースとした検出装置であり、化学発光の高感度検出のみならず、様々な波長領域（Blue,Green, Red,Far-Red,Near-IR）の蛍光を高感度に検出できるよう検出系が最適化された、ウェスタンブロッティングに最適な検出装置です。

より詳しい蛍光ウェスタンブロッティングに関する資料請求はこちら ▶ https://info.bio-rad.com/wb-documents.html
ChemiDoc Touch MPイメージングシステム デモンストレーション受付中！申し込みはこちら ▶ https://info.bio-rad.com/ww-ChemiDocMP-demo.html

BIO-RAD

Hot News

お得情報満載!!! ChemiDocユーザー様限定 ウェブサイト 開設

ChemiDocユーザー様専用ウェブサイトを開設いたしました。
本サイトのご利用には、事前のご登録が必要です。

サイトをご利用いただくメリット

- 関連製品を特別価格でご購入いただける専用注文書のダウンロード
  通常価格～30%オフ（期間限定）
- 装置のマニュアル、クイックガイドのダウンロード
- 最新のソフトウェア情報や新アプリケーション、Q&A、トレーニング情報の入手

シリアル番号確認方法

- ●ChemiDoc Touch / Touch MPの場合
  本体を立ち上げ、画面右上の車輪マーク（Setting）より、About This Imagerを選択し、Serial Numberを確認
- ●ChemiDoc XRS Plus / MPの場合
  本体、コントロール用PCを立ち上げ、ImageLabを起動し、メニューよりEdit>Instrument Setupを選択し、Hardware Informationに記載のSerial Numberを確認

対象となるお客様

ChemiDoc Touch / Touch MP、ChemiDoc XRS Plus / MPをご利用のすべてのお客様。

ご登録方法

以下のサイトからお客様、およびご使用の機器のシリアル情報のご登録をお願いいたします。

➡ ご登録用URL
https://info.bio-rad.com/cd_user_reg_jp.html

Technical Tips for Western Blotting　～ 低バックグラウンドの蛍光ウェスタンのために ～

蛍光検出によるウェスタンブロッティングでも、基本的には化学発光とよく似た実験プロトコールを用いることになります。しかし、次のような点に留意しながら、最適な検出条件を見つけるようにすると、バックグラウンドの低い、より良いデータが取得できるようになります。

1. 着色済分子量スタンダード
プレシジョンPlus ブルースタンダードのような青色の着色済スタンダードは、Red-LEDで励起するとバンドを検出できます（図3）。ターゲットが微量の場合にはサンプルバッファーで希釈して、検出に適したアプライ量とします。

2. ゲル下端の先端色素（Bromophenol Blue: BPB）
BPBは高波長側で蛍光を持つので、ゲル下端から流出するまで泳動するか、ゲル下端のBPB部分をカットして転写します。

3. メンブレン
ニトロセルロースメンブレンも使用されますが、低蛍光PVDFメンブレンの方が自家蛍光も低く、タンパク質結合量が高いので、S/N比の高いデータを期待できます。

4. ブロッキング剤
1-5% カゼイン、3-5% BSAなど化学発光検出と同様のブロッキング剤も利用可能です。バックグラウンドやシグナル強度にも影響しうる要素なので、必要に応じて検討を行います。

5. 蛍光標識抗体の選択（その①）
低い波長のチャンネルはメンブレンの自家蛍光の影響を受けやすいので、微量なターゲットの検出には、高い波長で検出する蛍光色素を割り振るようにします。マルチ蛍光ウェスタンブロッティングでは、各ターゲットに対する一次抗体として、それぞれホスト動物の異なる抗体を使用します（図4ではラットとウサギ）。二次抗体には、各ホスト動物の抗体に特異的な蛍光標識二次抗体を用いて検出します。

6. 蛍光標識抗体の選択（その②）
マウスとラットのような近縁のホスト生物種の抗体を組み合わせると交差反応する可能性があります。近縁ではないホスト生物種を組み合わせるのがよいですが、二次抗体の特異性によっては、抗ウサギの二次抗体でもマウスの抗体をわずかに検出してしまうことがあります（図5）。このようなトラブルを回避するためにも、可能なら、他の動物種の抗体と反応する画分を除去した「吸着済み抗体（cross-adsorbed）」を使用するのが望ましいです。マルチ蛍光検出する場合には、できるだけ吸着済み抗体を選択するようにしてください。

7. 二次抗体の希釈溶液
二次抗体の希釈溶液には、終濃度0.01-0.02%のSDSを添加します。これにより、PVDFメンブレンへの非特異的な吸着を抑えることができます。メンブレンがニトロセルロースの場合にはSDSは添加しません。

8. 撮影時のメンブレンの状態
メンブレンはウェットなまま撮影するとバックグラウンドは小さくなりますが、乾燥させて撮影した方が一般にターゲットのシグナル強度は強くなります。ラップフィルムは自家蛍光が高いので、撮影中のメンブレンには使用できません。

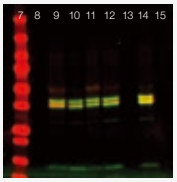

図3. プレシジョン Plus ブルースタンダードの蛍光検出

Lane 7：
サンプルバッファーで10倍希釈し、5 μLをアプライ
Imager：
ChemiDoc MP Epi-Green, Epi-Redにて撮影

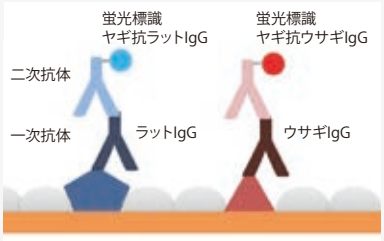

図4. マルチ蛍光検出における抗体のホスト動物種の例

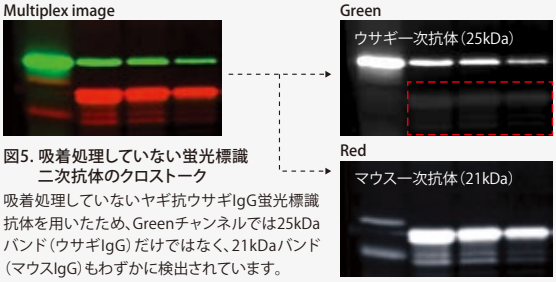

図5. 吸着処理していない蛍光標識二次抗体のクロストーク

吸着処理していないヤギ抗ウサギIgG蛍光標識抗体を用いたため、Greenチャンネルでは25kDaバンド（ウサギIgG）だけではなく、21kDaバンド（マウスIgG）もわずかに検出されています。

BIO-RAD　バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

取扱店

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
大阪営業所	〒532-0025	大阪市淀川区新北野 1-14-11	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

※価格（税抜き）、仕様は2018年7月現在のもので、予告なく変更することがあります。
※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。

C11682L 1807a