

# 4日間で ウェスタンブロット のエキスパート になる方法

## ウェスタン ブロッキング 101

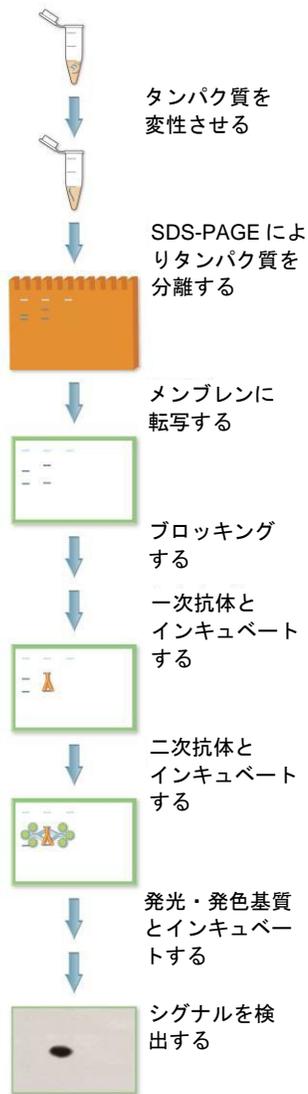
どういう**仕組み**か  
どうすれば**うまくいく**か  
避けるべきことは何か

- ✓ 上司にプレキャストゲルを買ってもらう
- ✓ シグナルが弱すぎるのか強すぎるのかを見極める
- ✓ エチジウムブロマイドの使用をやめる
- ✓ ウェスタンブロットの豆知識
- ✓ ウェスタンブロットのトラブルシューティング



目次	ページ
1. はじめに .....	2
2. 原理 .....	2
• タンパク質の抽出と定量 .....	2
• タンパク質の分離：電気泳動 .....	3
• タンパク質の転写（ブロッティング） .....	6
• メンブレンのブロッキング .....	9
• 一次抗体のインキュベーション .....	10
• 二次抗体のインキュベーション .....	10
• シグナル検出 .....	11
• コントロール .....	13
3. 推奨できるプロトコル .....	15
• 試料調製 .....	15
• 電気泳動 .....	18
• タンパク質の転写（ブロッティング） .....	21
• メンブレンのブロッキング .....	24
• 抗体のインキュベーション .....	24
• シグナル検出 .....	25
4. プレキャストゲルの購入にあたり上司を説得するときのヒント ...	29
5. 安全と GLP .....	30
6. トラブルシューティングガイド .....	32
• バックグラウンドが高い .....	32
• シグナルが弱い／ない .....	34
• ノンスペの存在 .....	36
• 広がってしまったバンド .....	37
7. よくある質問 .....	38
8. 注文情報 .....	43

## はじめに



ウェスタンブロット法 WB（イムノブロット法）は、抗原特異的抗体を用いて試料内の標的タンパク質を検出するために、広く行われている解析手法です。WB には、大きく分けて 2 つのステップがあります：可溶性タンパク質をそれぞれのバンドに分離するステップとこれらのタンパク質を固体基質上に転写し、免疫学的プローブ（抗原）で解析するステップです。

一般的に使われる変性条件下での実験では、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を用いて、ポリペプチドの長さに応じて試料タンパク質を分離します。分離したタンパク質は、ニトロセルロースまたは PVDF のメンブレン基質上に転写（ブロット）し、標的タンパク質抗原に特異的な抗体プローブで検出します。通常、ブロットしたメンブレンは、目的の抗原に対する抗体とともにインキュベートした後、二次抗体を添加してシグナルを検出します。

タンパク質の移動度と、発色、化学発光または蛍光シグナルの強度とを解析することで、細胞または組織ホモジネート中でのタンパク質発現の詳細な情報が得られます。高分解能を有するゲル電気泳動、標的抗原に強力にかつ特異的に結合する抗体、さらに安定したシグナル検出手段を用いれば、ウェスタンブロット法を用いて、ピコグラムレベルの量のタンパク質を検出することができます。

## 原理

### 1. タンパク質の抽出と定量

ウェスタンブロット解析用のタンパク質を抽出するために最初に行うステップは、試料からタンパク溶解液を調製することです。最もよく用いられている試料は、培養細胞と組織です。ウェスタンブロット用の試料を調製する際、変性ステップを行うまでは、試

料を氷上で冷やしておくことをおすすめします。試料の分解を防止するために、プロテアーゼ阻害剤および／またはホスファターゼ阻害剤を添加することが有益な場合もあります。例えば、プロテアーゼの影響を非常に受けやすいリン酸化タンパク質 p53 が良い例です。予防策を講じないと、タンパク質およびリン酸化部位が破壊され、フォールスネガティブという結果につながるようになります。

タンパク質抽出後、タンパク質の濃度を測定して、等しい量がゲル上にロードされたことを確かめる必要があります。Boster 社では、このために3つのタンパク質アッセイキットを開発しました：

- BCA Protein Assay Kit (Boster Catalog# AR0146)
- Micro BCA Protein Assay Kit (Boster Catalog# AR1110)
- Coomassie Plus Protein Assay Kit (Boster Catalog# AR0145)

クーマシープラスタンパク質アッセイは、容易に実施でき、使用する試料がより少なく済みます。しかし、このアッセイでは、タンパク質の種類による変動が大きく、これが直線性に影響をおよぼします。高濃度のトリス、EDTA、尿素、グリセロール、スクロース、アセトン、硫酸アンモニウム、界面活性剤といった様々な構成要素によって pH 値が変わることもあります。pH の変化は発色に影響を及ぼし、タンパク質の定量を妨げることがあります。

BCA タンパク質アッセイは、安定性、感度、が高く、柔軟であることが、高評価を得ています。発色複合体に、干渉する物質はほとんどなく、反応はより安定しています。そのため、このアッセイは、界面活性剤および pH に影響されるクーマシープラスタンパク質アッセイに比べて、明らかな優位性があります。

## 2. タンパク質の分離：電気泳動

電気泳動による分離は、荷電粒子が電場の影響下でゲル基質中を移動する現象にもとづいています。電気泳動は、分子の電荷量、サイズおよび構造に応じた電気泳動移動度によってタンパク質を分離します。ポリアクリルアミドゲル (PAGE) は、架橋結合したアクリルアミドからなる三次元メッシュの重合体です。支持体である PAGE ゲルには、汎用性を考えた場合、望ましい特徴がいくつかあります。PAGE ゲルは熱に安定、透明、強固であり、広い範囲の平均ポアサイズのものを得ることができます。

## (A) 変性タンパク質



変性タンパク質は、ウェスタンブロット法に最もよく使用されます。未変性のタンパク質構造は、そのタンパク質の活性に重要でありうる二次構造または三次構造を形成する鎖間および／または鎖内結合を含んでいる場合があります。しかし、これら多次元構造は、ポリアクリルアミドの架橋によって生じたポアを通過して、タンパク質の移動にも影響を与えます。例えば、複雑な三次構造を有する低分子量のタンパク質は、より単純な構造を有する高分子のタンパク質と同じ速度で移動し、その結果、見かけの分子量がほぼ同じになることがあります。検出に用いる抗体の多くはペプチドに対するものであり、ふつうは変性状態のタンパク質も良好に認識することを覚えておくことが重要です。

タンパク質は以下の3とおりの方法で変性されます：

- (i) 陰イオン界面活性剤である**ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)** は、分子内および分子間の水素結合を切断して、タンパク質の折り畳み構造をほどこき、二次構造および三次構造を壊す変性剤として使用されます。SDSの陰イオン性（または負）の電荷は、直鎖状タンパク質にその長さに比例した負電荷を与えます。SDSの存在下では、電気泳動移動度がほぼ分子量に基づいたものになります。
- (ii)  $\beta$ -メルカプトエタノール (BME) およびジチオスレイトール (DTT) のような強力な**還元剤**は、タンパク質鎖内またはタンパク質鎖間のシステイン残基によるジスルフィド結合を切断します。
- (iii) さらに試料を100°Cまで**加熱**することで、タンパク質変性やSDS結合、直鎖状構造の形成、負電荷をもつものの接着性が促進されます。

電気泳動の実施中にゲルの中でのタンパク質の進行状況を追跡するため、ブロモフェノールブルー色素などの追跡用色素を含有するローディングバッファーをタンパク質溶液に添加することもあります。

## (B) 未変性タンパク質



未変性タンパク質の分離は、タンパク質が有する固有の電荷の総和に基づいており、等電点電気泳動 (IEF) を用いて行われます。IEFは、連続した異なるpH帯をカバーするよう作られたポリアクリルアミドゲルを利用し、タンパク質は、電流が流れている状態でも、電荷が中和されたpH帯、すなわちそのタンパク

質の等電点 (pI) で移動しなくなります。この pI は、同じタンパク質でも、糖 (グリコシル化) またはリン酸 (リン酸化) といった翻訳後修飾の存在によって異なる場合があります。IEF 分離媒体は、ゲルが架橋する前にポリアクリルアミドゲル溶液にアイソフォアを添加すること、pH 勾配を固体支持体 (IPG ストリップ) に固定化すること、または溶液相を用いる技術を用いて作成されます。

### (C) ゲル濃度とポアサイズ



分子量 5~2,000 kDa の範囲にあるタンパク質を分離するのに (PAGE) ゲルが使用できるのは、アクリルアミドが重合する過程で中に均一のポアサイズのメッシュが作られるからです。ポアサイズは、ゲル調製の際に、ビス-アクリルアミドに対するアクリルアミドの比を変えることで調節します。通常、PAGE ゲルは、分離ゲルを固めた後、その上に濃縮ゲル (5%) を注いで固めます。濃縮層は低濃度のゲルで、タンパク質試料が最初にゲルに入った時点で、それらの移動度の差を打ち消すようデザインされています。タンパク質は、分離ゲル中を移動している間のタンパク質の分離が明確となるように、この濃縮・分離 2 つのゲル層の境界面で「濃縮」されます。分離ゲルは、5%、8%、10%、12% または 20% の組成で調製され、それぞれ相当する分子量範囲の様々なタンパク質を分離します。ゲル濃度は、解析を予定している標的タンパク質の分子量 (サイズ) に基づいて選択します。高濃度のゲルは、既知または推定の分子量が小さいタンパク質を分離するのに使用します。タンパク質の分子量が不明である場合、または様々な分子量のタンパク質を分離したい場合には、1 つのゲル内に様々な濃度のゲルを含む濃度勾配ゲルが有用です。タンパク質試料は、ウェルからゲルの中へ入るので、ウェルによってタンパク質が移動するレーンの位置と幅が決まります。非常に小さいサイズのタンパク質を分離する必要がある場合、ゲルの緩衝液系を変えることが有効な場合もあります。

### (D) 緩衝系

PAGE には、様々な緩衝系が使用されます。最も広く知られているのは、pH 6.8 で調製する濃縮ゲルと pH 約 8.3~9.0 の分離ゲルとを使用するトリス-グリシン (「Laemmli」) 不連続緩衝液系です。この系の欠点は、タンパク質の脱アミノ化やアルキル化がおこる可能性があること、サンプルバッファー中の還元剤が分離ゲルに入らないことによって、システインの再酸化がおき、2 つのシステイン残基にジスルフィド結合形成が起こり得ることです。またこの系では、ゲルの陰極側および陽極側

に、異なるバッファーが必要です。進歩した緩衝技術（ビス-トリス）を用いると、わずかに酸性側（pH 約 6.5）の条件でゲルを固め、かつ泳動することができ、またタンパク質より先にゲルに入ることによって還元性環境を維持する還元剤（例：亜硫酸水素ナトリウム）を含ませることができます。アクリルアミドゲルは pH 値が低い方が安定であるため、pH 値が低い緩衝液を使用することで、使用するまでゲルを長期間保存できるという利点も得られます。

トリス-グリシン系に電圧を加えると、陰イオン（および負に荷電した試料分子）は、下側チャンバーにある正極（陽極）の方へ移動します。先行する陰イオンは  $\text{Cl}^-$ （高移動度および高濃度）であり、グリシン塩イオンは追従するイオン（低移動度および低濃度）です。SDS-タンパク質粒子は、ゲル緩衝液の  $\text{Cl}^-$  と陰極バッファーの  $\text{Gly}^-$  との間では自由に移動できません。 $\text{Cl}^-$  とグリシンバッファーの間でおこる電圧降下のため、タンパク質は、濃縮ゲルと分離ゲルとの間でマイクロメートル単位の薄層に圧縮（濃縮）されます。分離ゲルの中で、単位当たりの負電荷がより多いタンパク質は、単位当たりの負電荷がより少ないタンパク質よりも速く移動します。すなわち、分子量の小さいタンパク質は、分子量の大きいタンパク質よりも速く移動します。2つのイオンの境界線はポアサイズ勾配の中を移動してゆき、圧縮されたタンパク質の層は、ゲル基質のポアによる摩擦抵抗が増加していくため、次第に拡散していきます。最終的にゲルの中で異なる位置に来るすべてのタンパク質に対して、この濃縮と拡散が起こることになります。

### 3. タンパク質の転写（ブロッティング）

#### (A) 転写（ブロッティング）の種類



ブロッティングには 2 種類の手法があり、それぞれ、関連する器具を用いて、電気泳動の原理に基づくによるタンパク質のゲルからメンブレンへの転写（ブロッティング）を行います。両者にはそれぞれ利点があり、実験上の必要性および研究室としての好みに応じて選択されます。

#### (i) セミドライブロッティング

タンパク質のセミドライブロッティングは、緩衝液タンクまたはゲルカセットを必要としない迅速、効率的かつ安価な手法です。分離ゲルおよび転写メンブレンを転写バッファー中で平衡化し、バッファー液に浸漬した濾紙のシートの上に挟

み、次に 2 枚の水平板電極の間に締め付けて固定（クランプ）します。転写中に利用できる緩衝液の量を最大限にするため、厚手の濾紙を多めに用いることをお勧めします。電場の下、負に荷電したタンパク質は正荷電の陰極側へ移動し、ゲルから出て、転写メンブレン上に達し、そこで疎水性相互作用によって保持されます。2 つの電極が近接していることで生じる高電場と、バッファーを多量に含む濾紙は電氣的に障害にならないため、セミドライ転写の転写時間は短くなります。高い電場強度が原因となり、一部の小さいタンパク質が転写メンブレンの中を通り抜けてしまうことがある一方で、転写時間が短いため、一部の大きいタンパク質が転写されずに終わってしまう場合があります。タンパク質のセミドライ転写法は、定量的な結果が求められる場合、信頼性に劣ると考えられています。

## (ii) タンク式ブロットイング

タンク式ブロットイングでは、サンドイッチ状に重ねられたゲルメンブレンフィルターを組み合わせを両側からパッドまたはスポンジで挟み、バッファーで満たしたカセットまたは転写タンクの中に垂直に置きます。セミドライブロットイングの場合と同様に、平行する 2 つの電極によって生じた電場の中で、タンパク質はゲルからメンブレンへ移動します。タンク式転写法はバッファーの量が多いので、電圧設定、転写時間および温度条件について柔軟に設定を行うことができます。これらのパラメーターを変えることで、一部のより大きいタンパク質をより効果的に転写できるようになる一方、分子量がより小さいタンパク質でも効率的に保持されるようにできます。タンク式転写法は器具が複雑で、バッファーのコストが高くなりますが、転写条件の最適化が可能であることから、標的タンパク質の定量が必要な場合には、この手法を選択することが望ましいと言えます。

## (B) 転写メンブレン

転写メンブレンは、それぞれの物理的特性に基づいて選択しますが、この性質に基づいて、それぞれ使用方法と使用条件が制限されます。ブロットイングメンブレンを選択するときには、タンパク質結合能、機械的強度や、およびリプロービングやタンパク質シーケンシングなど実験の下流に位置する解析まで考慮に入れる必要があります。

### (i) ニトロセルロース

ニトロセルロースは、転写メンブレンとして使用された最初の素材の 1 つであり、今もなお、汎用ウェスタンブロット法の選択肢の 1 つと考えられています。ニトロセルロースは安価で、タンパク質への親和性が高く、ブロッティングに際しての準備が簡単で、様々な検出系で使用することができます。ニトロセルロースはもろいため、ワークフローのなか繰り返しそれに対する操作または処置を繰り返すような実験系には適していません。ニトロセルロースの持つタンパク質結合に適し、親水性であるという特性を保ちながら強度を高めた合成素材の裏打ち付きニトロセルロースメンブレンも提供されています。転写メンブレンとしてニトロセルロースを使用する場合、タンパク質に結合した SDS を除くために転写緩衝液中にメタノールを加える必要があります。SDS を除くことによってタンパク質と転写メンブレンとの疎水性相互作用によるメンブレンでのたんぱく質の保持が可能となります。メタノールは、分離ゲルを収縮させる作用があり、ゲル基質中のポアサイズを縮小することから、大きなタンパク質の移動が遅くなる場合があります。このため、転写メンブレンとプロトコルを選択するときには、合わせてゲル濃度にも気を配る必要があります。

## (ii) ポリフッ化ビニリデン (PVDF)

PVDF 製メンブレンは、ニトロセルロースに比べて、結合能が高いこと (170~200  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  対 80~100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) や耐久性が高いことなどいくつかの明確な利点があります。結合能が高ければ、発現量の少ないタンパク質の検出に有利ですが、検出の際のバックグラウンドが高くなる恐れがあります。PVDF メンブレンは、使用する前に 100%メタノールに十分に浸漬し、次いで、転写緩衝液で 5 分以上平衡化させる必要があります。PVDF メンブレンの利点は、転写されたタンパク質をストリッピングしリプローブできることです。WB ストリッピング緩衝液 (AR0153) を、結合した一次抗体と二次抗体を除去するのに使用することができます。ストリッピングの過程でメンブレンから一部の標的タンパク質が除去されてしまう可能性があるため、リプローブした場合には、検出したタンパク質の定量解析は推奨されません。

## (C) メンブレンのポアサイズ

市販されているブロッティングメンブレンには、一般的に孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のものと孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のものがあります。20 kDa 以下のタンパク質には孔径 0.2  $\mu\text{m}$  の製品を用い、標的タンパク質が 20 kDa を超える場合には孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のメンブレンを用いること

をお勧めします。標的タンパク質を定量する場合やタンパク質濃度が低い場合には、ポアサイズが小さいメンブレンを使用するのが一般的です。

#### (D) メンブレン形態

(i) プレカットメンブレンは、よく使用されるゲルサイズに応じたものが利用できます。製造者によって裁断および包装されたこれらのメンブレンを用いることで、ロール状または大きなシートから切断されたメンブレンよりも再現性の良いタンパク質転写が期待できる場合があります。

(ii) ロール状のメンブレンは、多様なゲルサイズに合わせて自身の研究室で切断して利用できます。転写のばらつきを防ぐために分離ゲルに合わせて正確にカットするために要する時間は、このメンブレンが低コストであるという利点で相殺されることが考えられます。

#### 4. メンブレンのブロッキング

重要なことは、タンパク質の転写後、不活性タンパク質および／または非イオン性界面活性剤を用いてメンブレン上の未反応の部位をブロックすることにより、アッセイ中に結合する非特異的なタンパク質の濃度を低下させることです。ブロッキング緩衝液は、標的タンパク質-メンブレン相互作用を損なうことなく、すべての未反応の部位をブロックするものでなければなりません。そうでなければ、エピトープ利用能に影響します。最も典型的なブロッキング溶液は、脱脂粉乳、カゼイン、ゼラチンまたは Tween-20 含有の TBS および／または PBS 緩衝液です。

脱脂粉乳は、費用が最もかからない選択肢ですが、ミルク中に糖タンパク質およびビオチンが含まれるため、ビオチン結合抗体を用いたブロッキングには用いるべきではありません。さらに、天然存在のホスファターゼによって、リン酸化タンパク質の標的識別が妨げられ、タンパク質の脱リン酸化をもたらすことがあります。BSA またはカゼイン含有の TBS は、リン酸化された標的の解析、またはアルカリホスファターゼベースの検出法を用いる場合に推奨されます。

注：ペルオキシダーゼ検出系を用いる場合には、ブロッキング試薬中の保存剤である  $\text{NaN}_3$  にオキシダーゼ阻害特性があるため、その使用を避ける必要があります。

## 5. 一次抗体のインキュベーション



転写メンブレンをブロックした後、標的タンパク質上の結合部位に特異的な一次抗体を必要に応じて希釈し、メンブレンとともにインキュベートします。

通常、この方法は、メンブレンを緩衝液中に浸漬させているときに水平に置くことができる大きさの皿またはトレイの中で行います。インキュベーションは、穏やかに攪拌しながら、4°Cで一晩または室温で1~2時間行います。

一次抗体の選択は検出される抗原によって決まります。ポリクローナル抗体もモノクローナル抗体もウェスタンブロット解析に効果的に働きます。モノクローナル抗体は、単一の特異的な抗原エピトープを認識します。特異性が高くなるにつれ、解析の際のバックグラウンドが減少します。モノクローナル抗体をプローブとして使用する場合、標的エピトープがブロックされたり損なわれたりすると、ブロッティングの結果が不十分なものになることがあります。ポリクローナル抗体は、標的上のより多くのエピトープを認識することが可能であり、多くの場合、モノクローナル抗体よりも高い親和性を有します。そのため、特異的なエピトープが知られていない場合や、目的の用途にエピトープの識別を必要としない場合の解析に結果をもたらします。一般に、ポリクローナル抗体は、モノクローナル抗体よりも低いコストで入手できます。

## 6. 二次抗体のインキュベーション



メンブレンを洗浄して、結合していない一次抗体を除去した後、酵素化二次抗体にメンブレンを曝露します。二次抗体は一次抗の特定部位に非常に特異的であり、強く結合するようにデザインされています。

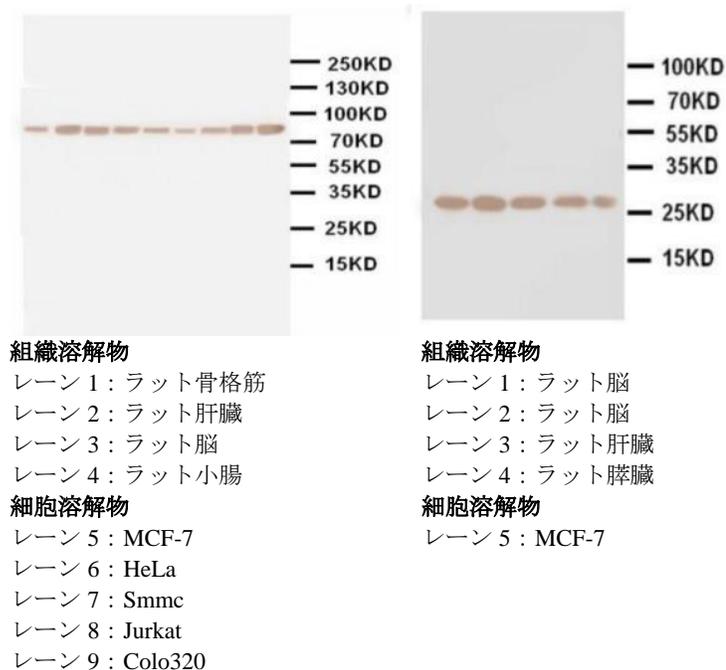
マウスとウサギが一次抗体作成の際の宿主としてよく用いられるため、抗マウス免疫グロブリン (Ig) と抗ウサギ免疫グロブリンが最もよく使われる二次抗体となっています。抗マウスポリクローナル抗体および抗ウサギポリクローナル抗体を作成するにはヤギを用います。そのため、ヤギ抗マウス免疫グロブリンおよびヤギ抗ウサギ免疫グロブリンが最もよく使われる二次抗体です。二次抗体は、一次抗体の作成に用いた動物種によって決まります。例えば、一次抗体がマウスモノクローナル抗体である場合には、二次抗体は抗マウス抗体でなければなりません。一次抗体がウサギモノクローナル抗体である場合には、二次抗体は抗ウサギ抗体でなければなりません。二次抗体は、一次抗体のアイソタイプ (IgG<sub>1</sub>、IgM など) も認識するものでなければなりません。

## 7. シグナル検出

二次抗体に結合した酵素は、ウェスタンブロットのタンパク質の発色検出段階で用いられる基質と反応し、メンブレンに結合する発色沈殿物を生成し、目視で検出できるタンパク質バンドをもたらします。細胞内または組織中の標的タンパク質レベルは、目視で検出できるこれらのタンパク質バンドの位置および濃度を測定することによって求めます。

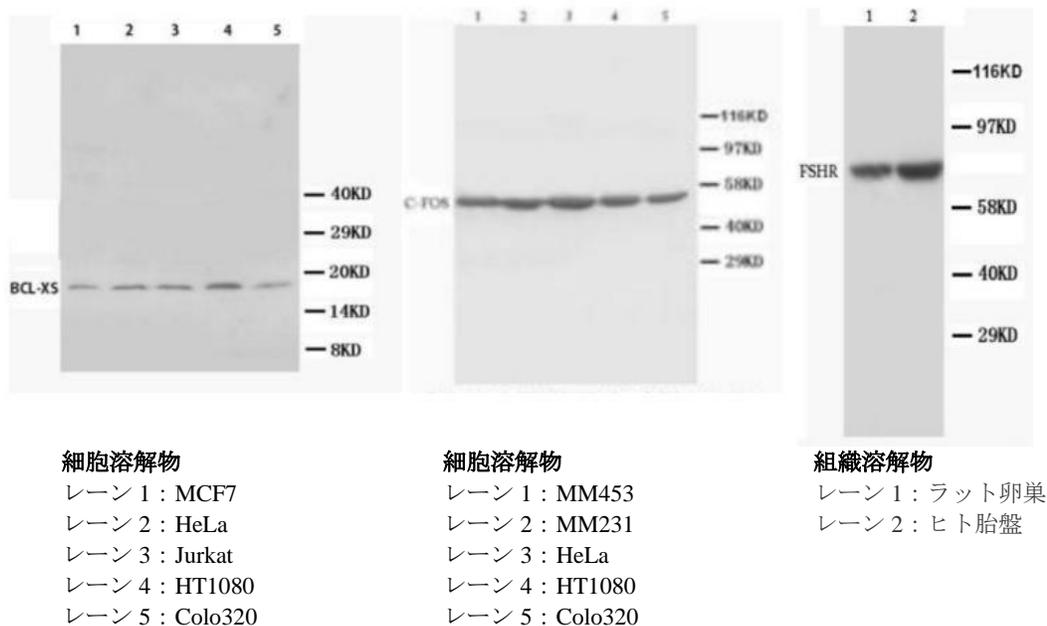
### (A) 発色（比色定量発色）

広く使用されている 2 つの酵素がアルカリホスファターゼ（AP）と西洋ワサビパーオキシダーゼ（HRP）です。アルカリホスファターゼ（AP）の作用で、無色の基質 BCIP が青色の生成物に変わります。パーオキシダーゼの場合、 $H_2O_2$  の存在下で、3-アミノ-9-エチルカルバゾールと 4-塩素ナフトールが酸化され、それぞれ褐色と青色の生成物になります。下図は、Boster 社の DAB 発色検出系を用いたウェスタンブロットの結果です。



## (B) 化学発光

HRP 検出を用いたもう一つの手法が化学発光です。酵素標識である HRP を用い、発光性基質（ルミノール）が  $H_2O_2$  により酸化され、光を発します。この基質と組み合わせる発光増強物質が、光強度を 1000 倍に増加させます。光はフィルムで検出されます。シグナル対ノイズ比（S/N 比）を最適化するため、いくつかの異なる露出時間でフィルムを露光します。下図は、Boster 社の ECL 検出系を用いたウェスタンブロットの結果です。



## (C) 蛍光

蛍光検出では、目的のタンパク質を検出するために、蛍光色素を結合させた一次抗体または二次抗体を使用します。データは、専用の蛍光イメージングシステムを使用して取り込みます。この方法の利点は、酵素反応のステップが不要であることと、多色での検出が可能であることです。この方法は、他の手法より定量的でもあります。

ウェスタンブロットシグナル検出法の選択は、二次抗体に結合した酵素または他の検出に用いる物質によって決まります。通常、ECL（増強化学発光）と DAB 発色検出系が、よく使用されます。発色検出にくらべて感度が高いため、化学発光の方がよく使われています。

## 8. コントロール

ウェスタンブロット解析を成功させるには、適切なコントロールを設定することが不可欠です。適切なコントロールを設定することによって、様々な問題点を迅速かつ正確に特定する音ができ、結果として正確かつ特異的な試験結果が得られます。ここでは、以下の5種類のコントロールについて説明します。

### (A) ポジティブコントロール

標的タンパク質を発現することが知られている細胞株または組織試料から得られた溶解物。ポジティブコントロールは、抗体の効率を確認する目的で設定します。

### (B) ネガティブコントロール

標的タンパク質を発現しないことが知られている細胞株または組織試料から得た溶解物。ネガティブコントロールは、抗体の特異性を確認する目的で設定します。非特異的結合やフォールスポジティブは、ネガティブコントロールを用いることで判断することが可能です。

### (C) 二次抗体に対するコントロール（一次抗体不使用条件下での反応）

二次抗体のみでブロットをインキュベートすることによって、抗体の特異性を確認することができます。非特異的な結合によるシグナルが存在する場合、二次抗体のみによる反応でフォールスポジティブが生じる場合があります。

### (D) ブランクコントロール

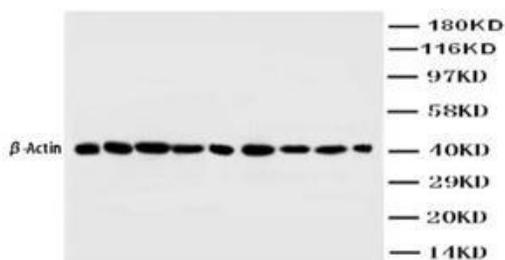
メンブレンを一次抗体も二次抗体もない状態でインキュベートします。この解析は、転写メンブレンそれ自体がフォールスポジティブを引き起こさないことを確認するために実施します。メンブレンのプロッキング効率をチェックするのにも用いられます。

### (E) ローディングコントロール

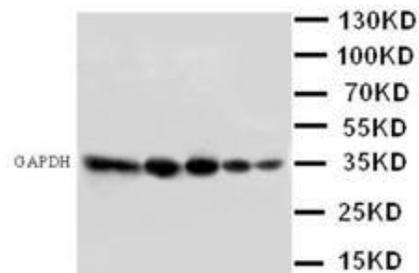
ローディングコントロールは、試料のクオリティと二次抗体のパフォーマンスを確認するのに使用します。ローディングコントロールは、ほとんどすべての組織と細胞において同レベルで発現している「ハウスキーピングタンパク質」に対する抗体です。ローディングコントロールは、とりわけ異なる試料におけるタンパク質発現レベルを比較しなければならない場合に、レーン間で同じ量のタンパク質がロードされたことを確かめるために必要となります。ローディングコントロールは、ゲルからメンブレンへの転写がゲル全体で均等な効率で行われたかを確認するのにも有用です。ロード

された試料の量が均一でなかった場合、または転写が均一ではなかった場合、ローディングコントロールのバンドを用いて各レーンのタンパク質を定量することができます。論文発表レベルの実験には、ローディングコントロールを用いることが必ず必要となります。よく使用されるローディングコントロールは以下のとおりです。

ローディングコントロール	分子量 (kDa)	試料の種類
β-アクチン	43	細胞全体/細胞質
GAPDH	30-40	細胞全体/細胞質
チューブリン	55	細胞全体/細胞質
VCDA1/ポーリン	31	ミトコンドリア
COXIV	16	ミトコンドリア
ラミン B1	16	核 (核膜を除去した試料には不適切)
TBP	38	核 (DNA を除去した試料には不適切)



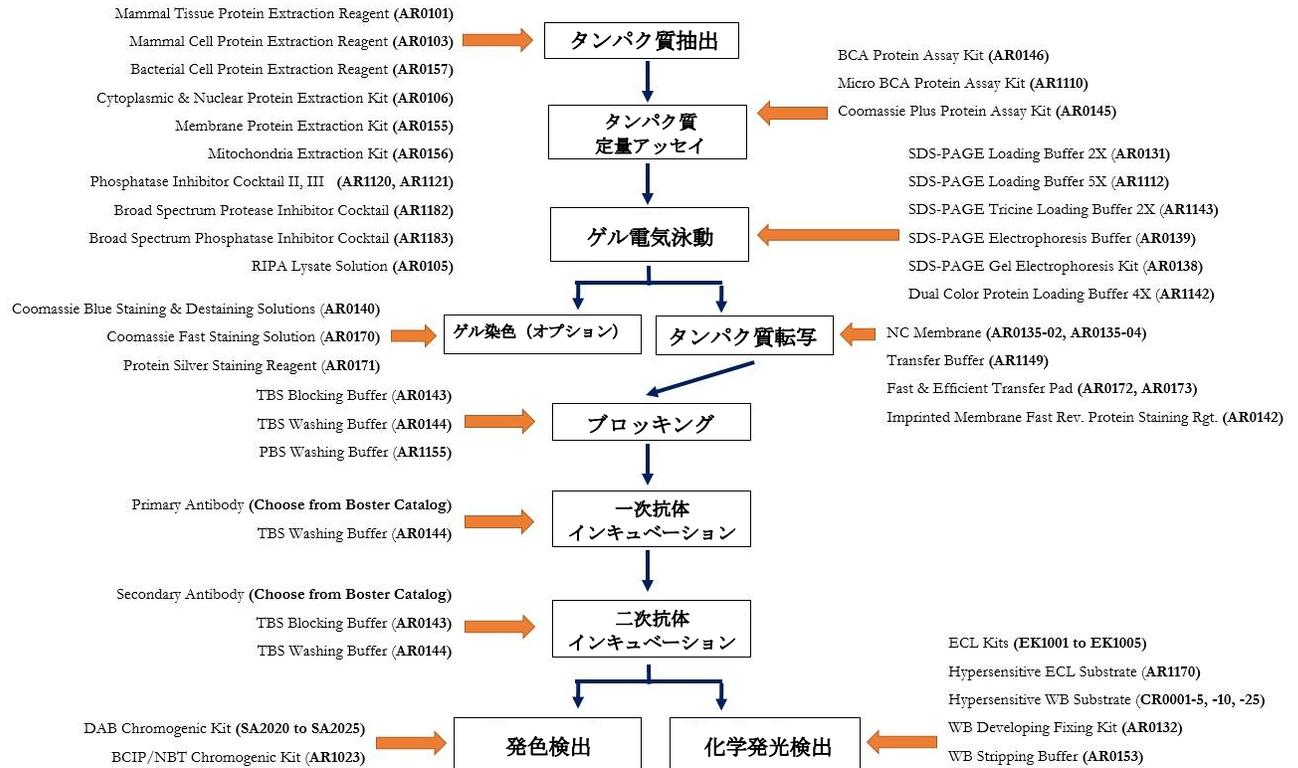
β-アクチンをローディングコントロールとし、Boster 社の化学発光 (ECL) 基質を用いたウェスタンブロット結果



GAPDH ローディングコントロールと Boster 社の化学発光 (ECL) 基質によるウェスタンブロット結果

(次のページに続く)

## 推奨できるプロトコル



## 1. 試料調製

### (A) タンパク質抽出

#### (i) 細胞培養からの抽出

- 細胞を 80%の密集度になるまでディッシュで培養します。
- 氷上にディッシュを置き、氷冷した PBS バッファー (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> および 1.8 mM Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.2% Tween 20 添加、pH 7.4) で細胞をリンスします。
- PBS を吸引除去し、氷冷した溶解バッファー (150 mM NaCl、1% NP-40、50 mM Tris-HCl およびプロテアーゼ阻害剤) を加えます。
- 冷やしたプラスチック製細胞スクレイパーを用いて、ディッシュから付着細胞を剥がすか、または細胞を 0.05% トリプシンで消化し、PBS で洗浄します。細胞ストレス経路の誘発を防止するため、できるだけ細胞を穏やかに扱います。
- 細胞を 4°C で 3,000 rpm、2~3 分間遠心分離します。
- 上清を除去し、氷冷した PBS バッファーで 2 回洗浄します。
- 氷冷した試験管の中に細胞を穏やかに沈ませます。

- Mammal Cell Protein Extraction Reagent (Boster カタログ番号 AR0103) を試験管の中に加え (v/v : 6/1 : 抽出試薬/細胞沈殿物)、強く攪拌して再懸濁します。
- 溶液が濁っている場合は、10~15 秒間超音波処理することでタンパク質の結合を切断します。
- 細胞を氷上の RIPA 細胞溶解液の中で 4~5 時間かけて溶解させます。
- 細胞溶液がまだ濁っている場合、超音波処理をして再び溶解させます。
- 約 10,000 rpm で 4°C、10 分間遠心分離します。回転および時間は細胞のタイプに応じて変わります。
- 脂質 (最上部) と細胞残さ (底部) は破棄し、中央部の溶液を新しい試験管に小分けして-20°C で保存します。

#### (ii) 組織からの抽出

- 外科的に切除された組織を、予冷した (4°C) 生理食塩水の中に入れます。組織から血液が完全に洗い落とされていることを確認してください。
- 組織を切断して小片 (それぞれ 0.1~1 g) にします。
- Broad Spectrum Protease Inhibitor Cocktail (Boster カタログ番号 AR1182) を加えます。
- Mammal Tissue Protein Extraction Reagent (Boster カタログ番号 AR0101) を組織 1 g 当たり 10 mL を加えます。
- 組織を細かく切り刻み、切り刻んだ組織をホモジナイザーの中に入れます。
- 氷冷した溶解バッファーを加えます (組織片 5 mg 当たりバッファー 300  $\mu$ L を加えます。バッファー量は、組織の量に応じて調節する必要があります)。
- 組織ホモジネートを氷上で 4~5 時間または 4°C (高速) で 5 分間かけて溶解させます。
- 必要に応じて、組織塊がなくなるまで超音波処理します。
- 約 10,000 rpm で 4°C、10 分間遠心分離します。回転および時間は試料のタイプに応じて変わります。
- 脂質 (最上部) と細胞残さ (底部) は破棄し、中央部の溶液を新しい試験管に小分けして-20°C で保存します。

## (B) タンパク質定量

ここでは、Boster 社の BCA Protein Assay Kit (Boster カタログ番号 AR0146) を用いた試験管用プロトコルを示します。マイクロプレート用プロトコルについては Boster 社データシートを参照してください。

### (i) 試薬調製

- アルブミン (BSA) スタンダードのアンプルの内容を 0.9% NaCl または PBS に溶解し、2000  $\mu\text{g/mL}$  のワーキングソリューション (試験管 A) を調製します。
- BCA 試薬 A 50 mL を BCA 試薬 B (希釈剤) 1 mL と十分に混合します。
- 以下のように希釈剤と BSA を混合することで、BSA 希釈系列スタンダードを調製します。

試験管	希釈剤容量 ( $\mu\text{L}$ )	BSA 液容量 ( $\mu\text{L}$ )	BSA 濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
A	0	600 (試験管 A から)	2000
B	100	300 (試験管 A から)	1500
C	300	300 (試験管 A から)	1000
D	200	200 (試験管 B から)	750
E	300	300 (試験管 C から)	500
F	300	300 (試験管 E から)	250
G	300	300 (試験管 F から)	125
H	400	100 (試験管 G から)	25
I (ブランク)	300	0	0

### (ii) 定量 (試験管プロトコルでは、試料と各ワーキングレンジの比は、1:20 です。)

- スタンダードとおよび未知試料の各 0.1 mL を、ラベルした試験管にピペットで移します。それぞれについてレプリケートを作成します。
- 相当するワーキングレンジ (WR) の反応液 2.0 mL を各試験管に加え、十分に混合します。
- 試験管に蓋をし、以下のプロトコルのうちの 1 つに従ってインキュベートします。
  - 標準プロトコル : 37°C で 30 分間 (WR : 25~2,000  $\mu\text{g/mL}$ ) 。
  - 室温プロトコル : 室温で 2 時間 (WR : 25~2,000  $\mu\text{g/mL}$ ) 。
  - エンハンスプロトコル : 60°C で 30 分間 (WR : 5~250  $\mu\text{g/mL}$ ) 。

注：インキュベーション時間を延長し、温度を上げると、各試験の正味の 562 nm 吸光度は増加し、試薬の最小検出濃度およびプロトコルのワーキングレンジの双方が低下します。標準（37°C インキュベーション）プロトコルまたはエンハンスト（60°C インキュベーション）プロトコルのいずれの場合も、試験管を加熱するのに恒温水槽（ウォーターバス）を使用します。通気式のインキュベーターを使用すると、熱伝導が不均一なため、発色に大きな誤差をもたらすことがあります。

- すべての試験管の温度を室温まで下げます。
- 分光光度計を 562 nm に設定し、水のみで満たしたキュベット（セル）を用いて機器の「ゼロ」合わせをします。続いて、10 分間以内にすべての試料の吸光度を測定します。

注：BCA アッセイは真のエンドポイントに到達しないため、発色は、室温まで温度が下がった後も続きます。しかし、室温での発色速度は低いため、すべての試験管の 562 nm 吸光度測定が 10 分間以内で実施される場合は、大きな誤差は生じません。

- ブランクのスタンダードの平均 562 nm 吸光度測定値を、その他すべての個々のスタンダードおよび未知試料の 562 nm 吸光度測定値から引きます。
- 各 BSA スタンダードのブランクを差し引いた 562 nm 測定値の平均値を、BSA 濃度（ $\mu\text{g/mL}$ ）に対してプロットすることで、検量線を作成します。検量線を用いて、未知試料それぞれのタンパク質濃度を算出します。

## 2. 電気泳動

### (A) ゲル作成

ゲル調製の最初のステップは、目的のタンパク質試料の分子量に基づいて、ゲル濃度を決めることです。

タンパク質サイズ (kDa)	> 200	15-200	10-70	12-45	4-40
ゲル濃度	5%	8%	10%	12%	20%

目的のタンパク質サイズが確実でない場合または様々な分子量のタンパク質を調べる場合には、濃度勾配ゲルを用いることが最良の解決策かもしれません。

注：

- Boster 社の SDS-PAGE Gel Electrophoresis Kit (Boster カタログ番号 AR0138) をお勧めします。このキットは、ゲル調製用のほとんどの試薬が入っており、SDS-PAGE ゲルおよび非変性 PAGE ゲル双方の調製に使用できます。
- ゲル作成には多くのプロトコルが存在します。製品の使用については、製造者のガイドラインを参照してください。
- ご自身でゲルを作成する代わりに、プレキャストゲルを使用することもできます。

#### (i) 分離ゲル作成

- 必要な容量を決め、選択した濃度の分離ゲルの成分を穏やかに混合します。
- 溶液をゲルキャスティングフォームに注ぎ込みます。
- ゲルの上部に蒸留水を注いで層にします。
- ゲルが完全に重合するまで約 30 分間待ちます。
- 重合した分離ゲルから水層を除去します (紙タオルで余分な水を吸収します)。

#### (ii) 濃縮ゲル作成

- 必要な容量を決め、成分を穏やかに混合し、泳動ゲルの上部に濃縮ゲルを注ぎます。
- 試料コームを (泡が入らないようにしながら) 挿入します。
- 完全にゲルが重合するのに 30~60 分間を要します。

### (B) 電気泳動用試料調製

- 抽出されたタンパク質試料を、Dual Color Protein Loading Buffer 4X (Boster カタログ番号 AR1142) と 3:1 の比で混合します (すなわち、試料 300  $\mu\text{g}$  をローディング緩衝液 100  $\mu\text{L}$  に加えます)。

デュアルカラータンパク質ローディングバッファーは、電気泳動前の試料加熱中のタンパク質分解を防止するようデザインされており、また SDS-PAGE 泳動中の pH 変化を防ぎます (多くのタンパク質は、電気泳動中のトリス緩衝液の温度変化に依存する pH 変化に影響を受けます)。このローディングバッファーは、2 つの追跡用色素を含みます：電気泳動の進行を追跡するための青色 (プロモフェノールブルー)、およびメンブレンへのタンパク質転写をモニターするための桃色 (ピロニン Y) です。より詳細な情報については、Boster 社ウェブサイトにあるデータシートを参照してください。

- デュアルカラータンパク質ローディングバッファの代わりに、以下の試薬／方法のうちの1つを用いることもできます。
  - SDS-PAGE Loading Buffer 2X (Boster カタログ番号 AR0131) と 1:1 の比で混合 (すなわち、試料 100 µg をローディング緩衝液 100 µL に加えます)。
  - SDS-PAGE Loading Buffer 5X (Boster カタログ番号 AR1112) と 4:1 の比で混合 (すなわち、試料 400 µg をローディング緩衝液 100 µL に加えます)。
  - SDS-PAGE Tricine Loading Buffer 2X (Boster カタログ番号 AR1143) と 1:1 の比で混合 (すなわち、試料 100 µg をローディング緩衝液 100 µL に加えます)。分子量 10 kDa 未満のタンパク質を検出する場合にお勧めします。
  - Laemmli 2×バッファ (4% SDS、10% 2-メルカプトエタノール、20%グリセロール、0.004%ブロモフェノールブルー、0.125 M Tris-HCl、pH 6.8) と 1:1 の比で混合 (すなわち、試料 100 µg をローディング緩衝液 100 µL に加えます)。
- ローディングバッファ混合液を 100°C の恒温水槽中で 5 分間インキュベートしてタンパク質を変性させます (または製造者の取扱説明書に従います)。この混合液は、使用前に小分けして-20°C で数カ月間または 4°C で 1~2 週間保存することができます。

### (C) サンプルローディングおよび電気泳動

- ゲルを電気泳動装置にセットします。
- 2つのバッファ槽を、SDS-PAGE 電気泳動緩衝液 (25 mM トリスベース、190 mM グリシン、0.1% SDS、pH 8.3) で満たします。Boster 社のバッファ (Boster カタログ番号 AR0139) を使用されることをお勧めします。
- 慎重にゲルからウェル作製コームを取り除き、ウェルを電気泳動バッファでリンスします。
- ウェル内でのサンプルの拡散を防止するため、サンプルをピペットで素早くウェルの中に移します (最大容量 30 µL のウェルの場合、1 µg/µL の試料をウェル当たり 20~25 µL ロードします)。
- 適切なリファレンスおよび／または分子量スタンダード 10 µL をピペットで別のウェルに入れます。
- 電気泳動電源の陽極と陰極を適切に接続します。
- 電源をオンにして、100V/130V\*でブロモフェノールブルー色素がゲル底部に到達するまで電気泳動を行います (この泳動には 1.5~3 時間を要します)。ゲル装置

底部からの微細な気泡の出現がみられますが、これは十分な電流が流れていることを示しています。

- タンパク質の移動が終わったら、電源をオフにします。

注：

- 不連続系では、タンパク質が分離ゲルに達する前に必ず同じレベルに濃縮されるよう、濃縮ゲルの泳動電圧は分離ゲルよりも低く設定します。
- \* 電圧は、ゲル厚や使用する電源、必要とされる分解能に応じて調節する必要があります。

### 3. タンパク質の転写（ブロットティング）

#### (A) タンパク質の転写（メンブレンへ）

##### (i) ゲル染色（オプション）

電気泳動の後、Boster 社のゲル染色溶液を用いて、電気泳動での分離が正しく行われたかを確認することをお勧めします。より詳細な情報については、Boster 社ウェブサイトにあるデータシートを参照してください。

- Coomassie Blue Staining & Destaining Solutions (Boster カタログ番号 AR0140)
- Coomassie Fast Staining Solution (Boster カタログ番号 AR0170)
- Protein Silver Staining Reagent (Boster カタログ番号 AR0171)

注：染色したゲルは、その後のタンパク質転写処理には使用できません。

##### (ii) タンク式転写

###### (a) ブロットティングメンブレン調製

- 使用するゲルのサイズにあわせて、ブロットティングメンブレン（NC または PVDF）を切ります（Tips：あらかじめ複数のメンブレンを切っておくことをお勧めします。メンブレンは低温で乾燥した場所で保存します。）。
- 注意深く角を切るか鉛筆で印を付けることにより、メンブレンの方向がわかるようにマークします。

- メンブレンをメタノールに 1 分間浸漬します。
- メンブレンを 1×転写バッファー (25 mM トリスベース、190 mM グリシン、20%メタノール、pH 8.3) [Boster カタログ番号 AR1149] に 5 分間浸漬します。メンブレンが沈んで、メンブレンの上で水滴が動き回ることがなくなるまでゆっくりと攪拌します。

(b) 転写カセット

- 下図に基づいて、転写カセットを以下の順序で組み立てます：フォームパッド→濾紙→ゲル→メンブレン→濾紙→フォームパッド

Boster 社の下記の転写パッドのいずれかを使用することをお勧めします：

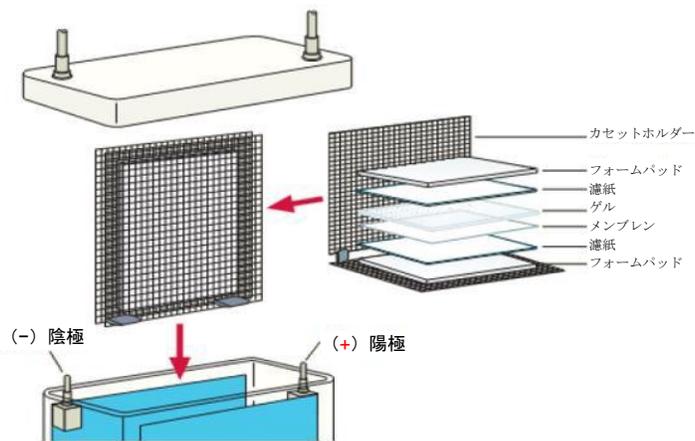
- Fast & Efficient Transfer Pad (12.5 cm X 12.5 cm) (Boster カタログ番号 AR0172)
- Fast & Efficient Transfer Pad (9 cm X 7.5 cm) (Boster カタログ番号 AR0173)



- 2 枚の濾紙をそれぞれ別の容器を用いて同じ転写バッファーに浸漬します
- スパチュラを用いて転写カセットを開き、カセットホルドを完全に緩めてから慎重に 2 つに引き離します。(ゲルに、切断などの処置を施す前に、レーン番号 1 の位置を確認しておいてください)。
- メンブレンのサイズに応じ、かみそりの刃でゲルをカットし、次に、レーン番号 1 がある側のゲルの角を切りおとします。
- ゲルを 1×転写バッファーに 15~30 分間浸漬します。
- 転写カセットの灰色または黒色のほうのプレートを、清潔な表面の上に置きます。
- あらかじめ湿らせたフォームパッドを、その上 (カセットの灰色側) に置きます。

- 湿らせた濾紙のシートを、フォームパッドの上に置きます。
- ゲルカセットから慎重にゲルを剥ぎ取り、それを濾紙の上に置きます（ゲルを転写バッファーで湿らせ、結果に影響を及ぼさない清潔なピペットまたは Falcon チューブをのし棒のように転がして、メンブレンから気泡を追い出します）。
- 角を合わせてメンブレンをゲルの上に置きます（いったんメンブレンがゲルに接触したら、動かしてはいけません。そうしないと「ゴーストバンド」が生じることがあります）。
- 濾紙 1 枚をメンブレンの上に置いて、サンドイッチ構造を完了させます。
- 第 2 のフォームパッドを濾紙の上に重ねます。
- 転写カセットを白いラッチでしっかり固定します（ゲルや濾紙のサンドイッチ構造を動かさないように注意し、フォームパッド、濾紙およびメンブレンが転写緩衝液に完全に濡れていることを確認します）。

(c) タンパク質の転写



- 転写タンクを、十分な量の 1×転写バッファーで満たします。
- 転写カセットを、転写装置のスロットの中へしっかりと挿入します。
- 転写タンクの上部に蓋をし、電極が正しく接続されていることを確認します（ゲルは陰極側になければならず、メンブレンは陽極側になければなりません。負に荷電したタンパク質は、陽極側に移動します）。
- 電源を定電圧に設定し、25V で 30 分間\*作動させます。
- メンブレンを染色して、タンパク質転写効率をチェックします：ポンソーS 染色（0.2% w/v ポンソーS、5%氷酢酸）または Boster 社の転写済みメ

ンブレン高速可逆的タンパク質染色試薬 (Boster カタログ番号 AR0142) の中にメンブレンを 5~10 分間置きます (目視で確認できる赤色のバンドが現れます。洗浄バッファーで繰り返し洗浄することで、メンブレンは完全に脱染色することができます)。

注 :

- より低い電圧、例えば 10V を用い、一晩かけて転写を行うこともできます。
- 転写時間および電圧は、ゲル濃度に応じて最適化する必要があります。ゲル濃度が高いほど多くの時間が必要です。

#### 4. メンブレンのブロッキング

- TBS 洗浄緩衝液 (20 mM トリス、pH 7.5、150 mM NaCl、0.05% Tween 20) [Boster カタログ番号 AR0144] を用いて、ブロッキングメンブレンを室温で、3 回、それぞれ 10 分間リンスします。
- リンス後、ブロッキングメンブレンを TBS ブロッキング緩衝液 (5% スキムミルク・20 mM トリス緩衝溶液、pH 7.5、150 mM NaCl) [Boster カタログ AR0143] に浸漬し、振盪しながら室温で 1.5~2 時間 (または 4°C で一晩) インキュベートします。この他にも、ゼラチンまたは BSA を含むバッファーが使用できます。ビオチン系を用いる場合やリン酸化タンパク質の検出を行う場合には、スキムミルクの使用はお勧めできません。

#### 5. 抗体のインキュベーション

ブロッキング後、メンブレンを一次抗体 (標的タンパク質と結合します) とインキュベートし、その後、HRP または AP 結合二次抗体とインキュベートします。

- 一次抗体を TBS 洗浄バッファー (Boster カタログ番号 AR0144) で希釈します。最適な希釈率については、製造者提供の抗体処理プロトコルに従います。
- 一次抗体およびメンブレンを 4°C で一晩または室温で 1~2 時間インキュベートします。最良の結果を得るために、インキュベーション時間および抗体濃度の最適化を必要とする場合があります。
- メンブレンを TBS 洗浄緩衝液で 3 回、それぞれ 10 分間洗浄し、結合していない抗体を除去します。

- 二次抗体を TBS ブロッキングバッファー (Boster カタログ番号 AR0143) で希釈します。最適な希釈率については、製造者提供の抗体処理プロトコルに従います。
- 二次抗体およびメンブレンを 4°C で一晩または室温で 1~2 時間、シェーカーに載せてインキュベートします。
- メンブレンを TBS 洗浄バッファーで 3 回、それぞれ 10 分間洗浄することで、結合していない抗体を除去します。

## 6. シグナル検出

このセクションでは、化学発光検出 (ECL) および比色検出 (DAB または BCIP/NBT) 法のプロトコルを記載しています。お好みの手法をご使用ください。

### (i) 化学発光検出 (ECL)

#### (a) ECL 基質の調製

- 一次抗体を作成した生物種に基づいて適切な ECL キット<sup>†</sup>を選択します。

一次抗体の種	ECL キット*のカタログ番号
マウス IgG	EK1001
ウサギ IgG	EK1002
ヤギ IgG	EK1003
ラット IgG	EK1004
マウス IgM	EK1005

\*各キットには、800 cm<sup>2</sup> メンブレン用の十分な試薬が含まれています。

<sup>†</sup> 1) 発色試薬 A および B (20×、5 mL)、2) ブロッキング緩衝液、および 3) HRP 結合二次抗体が含まれる ECL キットを用いる代わりに、Boster 社の以下の発色試薬 A および B を単独で用いることもできます。

製品	試薬 A		試薬 B		カタログ番号
	濃度	容量	濃度	容量	
Hypersensitive ECL Substrate (Ready-to-Use)	1×**	100 mL	1×**	100 mL	AR1170
Hypersensitive WB Substrate (20X Concentrated)	20×	5 mL	20×	5 mL	CR0001-5
Hypersensitive WB Substrate (20X Concentrated)	20×	10 mL	20×	10 mL	CR0001-10
Hypersensitive WB Substrate (20X Concentrated)	20×	25 mL	20×	25 mL	CR0001-25

\*\*そのままで使用可能

- 以下のものを混合して ECL 基質溶液を調製し、調製後 2 時間以内に使用します。
  - 20×発色試薬 A (ルミノールおよび発光促進剤) 50  $\mu$ L
  - 20×発色試薬 B (ペルオキシダーゼおよび安定剤) 50  $\mu$ L
  - 蒸留水 1 mL

(b) メンブレン処理

- メンブレンを基質溶液に完全に浸します (メンブレン 10  $\text{cm}^2$  当たり溶液 1 mL を使用します)。
- バンドが現れるまで室温でメンブレンをインキュベートします (通常、1~5 分間。インキュベーション時間は暗室で確認することができます)。
- 余分な基質溶液を完全に除去するため、メンブレンの縁に紙片を軽く当てて吸い取らせます。
- 透明な保護フィルムまたは透明な紙でメンブレン全体を覆い、目に見える気泡をすべて除去します。

(c) フィルムの現像定着

Boster 社推奨の WB 現像・定着キット (Boster カタログ番号 AR0132) を用いて、直ちに暗室でフィルムの現像と定着を行います。これ以外に、蛍光 CCD スキャナー、デジタルイメージャーまたはルミノメーターも使用できます。

- X線フィルムをメンブレン全体を覆うように載せ、露光します。
- フィルムを現像液に 10 秒~10 分間浸漬して現像します (赤色光の下で観察して時間を決め、フィルムが実験の目的を果たすに十分であれば現像を止めます。最適なシグナル対ノイズ比 (S/N 比) を達成するのに何度も露光が必要となる場合もあります)。
- (完全に現像液を除去するため) フィルムを水で洗浄します。
- フィルムを定着液に 3~5 分間浸漬させます。
- フィルムを水で洗浄して定着液を除去します。

**注：**

- メンブレン上のタンパク質を再使用する必要がある場合に、メンブレンに付着した一次抗体および二次抗体を除去するには、WB ストリッピングバッファー（Boster カタログ番号 AR0153）を用いることをお勧めします。
- コントロールタンパク質のシグナルを用いて、標的タンパク質のシグナルを標準化します。

(ii) 比色検出

以下に述べる DAB または BCIP/NBT 基質溶液を調製します。

(a) DAB 基質調製（HRP 結合二次抗体用）

- 一次抗体を作成した生物種と希望する発色に基づいて、適切な DAB キットを選択します：

一次抗体の種	色	DAB キットのカタログ番号
マウス IgG	黄色	SA2020
ヤギ IgG	黄色	SA2021
ウサギ IgG	黄色	SA2022
ラット IgG	黄色	SA2023
マウス IgG	青色	SA2024
ウサギ IgG	青色	SA2025

- 以下のものを混合して DAB 基質溶液を調製します：
  - 40×発色試薬 A（DAB） 50 μL
  - 40×発色試薬 B（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>） 50 μL
  - 40×発色試薬 C（TBS 洗浄バッファー） 50 μL
  - 蒸留水 2 mL

(b) BCIP/NBT 基質調製（AP 結合二次抗体用）

- 以下のものを混合して BCIP/NBT 基質溶液を調製します：
  - 20×発色試薬 A（BCIP/NBT） 50 μL
  - 20×発色試薬 B（トリス濃縮バッファー、pH 9.4） 50 μL
  - 蒸留水 1 mL

(c) メンブレン処理

- メンブレンを基質溶液に完全に浸します（メンブレン 10 cm<sup>2</sup> 当たり溶液 1 mL を使用します）。
- バンドが現れるまでメンブレンを室温でインキュベートします（通常、10～30 分間）。BCIP/NBT のインキュベーションは、暗所で行わなければなりません。
- 蒸留水でメンブレンを洗浄することで、反応を止めます。
- バンドを観察し、写真を撮ります。

## プレキャストゲルの購入にあたり上司を説得するときのヒント



1. 手作りのゲルは出来にばらつきがあり、調製するのに何時間もかかり、調製してから数日以内に使用する必要があります。プレキャストゲルは、質が安定しており、数分で泳動を開始でき、数ヶ月間の耐久性があります。
2. プレキャストゲルは、世界中の大学や民間の研究施設で利用されるようになっており、査読を受けた 1,000 本以上の論文で言及されています。
3. ゲルの成分は、神経に対する有毒物質ですので、ゲル作製に携わることは危険であり、不必要です。スタッフ（技師、大学院生、ポスドクなど）のことが心配ではないのですか？
4. Laemmli？ そうだ、ずっと昔に私の祖父から Laemmli のゲル化学の話聞いたことがあります。
5. 失礼ですが、手作りのゲルなんて 1970 年代の話です。昔話だけにしてください。

## 安全と GLP



Boster 社はユーザーの安全に配慮しています。そのため、このセクションでは、GLP について説明いたします。これらは一般的なガイドラインです。所属する研究施設の規則および規定については、所属施設の関係部署にご相談ください。

1. 化学用安全メガネ、ニトリル手袋、前または後ろをボタンで上から下まで閉じた状態の白衣、およびつま先の閉じた靴を常に着用してください。
2. メンブレン、フィルムまたは試薬に手が触れるのを防止するため、手袋と、先がとがっていない清潔なピンセットを使用してください。
3. 有害な化学物質のすべての取扱いは、化学用ドラフト内で行わなければなりません。口の開いたチューブは常に顔と逆の方向に向け、内容の吸入を最小限に抑えてください。
4. モノマーのアクリルアミドは、有毒で発がん性があると考えられており、中枢神経系障害を誘発することがあります。モノマーのアクリルアミドは、水溶液から無傷の皮膚を通して容易に吸収されます。一度重合すれば、固体のポリアクリルアミドはかなり安全と考えられていますが PAGE ゲルには、未反応のアクリルアミドモノマーが含まれている可能性があるためと想定して手袋を装着して取り扱うべきです。
5. アッセイキットの製品説明書（製品同梱物）は保管し、実験担当者が確実に利用できるようにしてください。現在使用中のキットに付属の製品説明書を利用し、旧版の製品説明書は利用しないように注意してください。
6. アッセイを行う前に、手法または品質管理法の変更についてチェックする目的で、製品説明書に目を通してください。
  - a. 試験法に慣れてください。使用方法を説明する言葉の違いは大切です。『常に』、『するものとする』、『なければならない』および『必要がある』といった言葉は、規制上の必要事項であり、必ず実施されなければならない指示であることを意味しません。『べきである』または『勧める』は規制上の拘束力はありませんが、こうした行為を実施することが、GLP に合致していると言えます。
  - b. 各ステップを個別に検討し、適切な順番でそれらを実施してください。
  - c. 実験全体を実施し、最良の結果を得るのに必要な時間を把握してください。

- d. 実際にアッセイを実施する前に、必要なすべての試薬および装置の準備ができていることを確認してください。
7. 電気泳動装置が安全に使用できる状態であることを確認してください。
    - a. 装置の物理的な完全性をチェックし、注意深く取扱説明書に従ってください。
    - b. 水道栓から離すなど、物理的な手段を用いて、不注意による危険をおよぼす原因と装置との接触を防止してください。
    - c. 必ず絶縁されたリード線を使用してください。
    - d. 電気のリード線を接続するとき、蓋を開けるとき、そして容器の中に手を入れるときには、あらかじめ電源をオフにしてください。
    - e. 一度に1本のリード線を片手（手袋着用、乾燥状態）だけを使用して接続します。
    - f. 感電の危険があり得ることを他の人に警告するため警告表示を付けるようにしてください。安全装置を解除状態で使用してはいけません。
  8. 発火源を避け、吸収材を用いてこぼれた液体が広がらないように回収し、適切な表示をほどこした有害廃棄物容器の中に廃棄物を廃棄します。

## トラブルシューティングガイド

WB アッセイを行うときによく起こる問題の、考えられる原因と解決方法についてのチェックリストです。

### 1) バックグラウンドが高い

	考えられる原因	解決方法
1	抗体濃度が高すぎる	▶ 抗体濃度を最適化し、低くします
2	二次抗体の凝集体が形成される	▶ 二次抗体を 0.2 μm フィルターでろ過します ▶ 新しい二次抗体を使用します
3	抗体のインキュベーション温度が高すぎる	▶ 抗体を 4°C でインキュベートします
4	非特異的な二次抗体結合またはブロッキング剤との交差反応	▶ 二次抗体コントロール実験を（一次抗体無し）を行います ▶ 二次抗体濃度を下げます
5	一次抗体または二次抗体とブロッキング剤との交差反応	▶ インキュベーションバッファーおよび洗浄バッファーに Tween-20 を添加します
6	ブロッキング剤が適合していない	▶ 異なるブロッキング緩衝液を選択します
7	ブロッキングが不完全	▶ ブロッキング緩衝液の選択を見直します ▶ ブロッキング剤中のタンパク質濃度を上げます ▶ ブロッキングの時間および/または温度を最適化します。常温で 2 時間または 4°C で一晩ブロッキングします ▶ 0.05% の Tween 20 をブロッキング剤に添加します ▶ 0.05% の Tween 20 を抗体希釈容液に添加します
8	ブロッキングが不十分	▶ ブロッキング時間を延ばすか、または適合するブロッキング剤（例：スキムミルク、BSA、血清など）を使用します

9	抗体と他のタンパク質との交差反応	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 異なるブロッキング剤を使用します（スキムミルクとビオチン系を併用してはいけません）</li> <li>▶ 二次抗体濃度を下げます</li> <li>▶ 二次抗体とメンブレン自身との交差反応を調べます</li> </ul>
10	洗浄が不十分	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 洗浄回数およびバッファー量を増やします</li> <li>▶ 0.05% の Tween 20 を洗浄緩衝液に添加します</li> </ul>
11	露光時間が長すぎる	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 露光時間を短くします</li> </ul>
12	メンブレンの問題	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 清潔なピンセットを使用し、手袋をはめて操作します</li> <li>▶ 新しいメンブレンを使用します</li> <li>▶ メンブレンを湿らすのに十分な量の液体が存在していることを確認します</li> <li>▶ シェーカー上でインキュベーションを行います</li> <li>▶ メンブレンが重なるのを防止します</li> <li>▶ メンブレンの損傷を防止するために慎重に取り扱うようにします</li> </ul>
13	メンブレンの洗浄が不十分	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 洗浄回数を増やします</li> </ul>
14	メンブレンが適合していない	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ バックグラウンドは、ニトロセルロースメンブレンの方が PVDF メンブレンよりも低くなります</li> </ul>
15	メンブレンの乾燥	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ メンブレンが必ず十分な量の液体で覆われるようにし、乾燥するのを防止します</li> </ul>
16	バッファーの汚染	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 新しいバッファーを使用するか、または使用前にバッファーをフィルターろ過します</li> </ul>
17	装置の汚染	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ すべての装置が汚染されておらず、メンブレン上にゲルが残存していないことを確認します</li> </ul>

2) シグナルが弱い／ない

	考えられる原因	解決方法
1	メンブレンへのタンパク質転写が不適切	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 転写の完了後、ゲルを染色することで、転写が効率的であるか確かめます</li> <li>▶ ポンソーS を用いてメンブレンを染色することで、転写が効率的であるか確かめます</li> <li>▶ 転写中、必ずゲルとメンブレンが十分に接触しているようにします</li> <li>▶ 転写サンドイッチ構造を正しく組み合わせているか確かめます</li> <li>▶ 取扱説明書に従ってメンブレンを湿らせます</li> <li>▶ 転写中の過熱を防止します</li> <li>▶ ポジティブコントロールまたは分子量マーカーを使用します</li> <li>▶ 転写時間および電流を最適化します</li> <li>▶ Boster 社のメンブレン転写バッファー (AR1149) を使用します</li> <li>▶ 試料 (抗原決定基) の破壊をまねくことをしていないか確認します</li> </ul>
2	タンパク質とメンブレンの結合が不十分	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 20%メタノールを転写バッファーに加えます</li> <li>▶ 小さいポアサイズのメンブレンを使用します</li> </ul>
3	抗体が不十分	▶ 抗体濃度を上げます
4	抗原が不十分	▶ より多くのタンパク質をロードします
5	ブロッキング緩衝液による抗原マスキング	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ いくつかの異なるブロッキングバッファーを試してみます</li> <li>▶ ブロッキング剤のタンパク質濃度を最適化します</li> <li>▶ ブロッキング時間を短くします</li> </ul>
6	緩衝液中のアジ化ナトリウムの存在	▶ 緩衝液からアジ化ナトリウムを除去します
7	露光時間が短すぎる	▶ フィルム露光時間を長くします

8	基質のインキュベーション時間が短すぎる	▶ 基質インキュベーション時間を5分間に延長します
9	メンブレン上のタンパク質の消化（断片化）	▶ ブロッキング剤の量を最適化します
10	保存中のタンパク質の分解	▶ タンパク質試料を再調製します
11	一次抗体と二次抗体が適合していない	▶ 一次抗体、二次抗体、基質、酵素系および試料が適合していることを確かめます  ▶ ローディングコントロールを用いて、二次抗体検出系の有効性を試験します
12	一次抗体および／または二次抗体の濃度が低い	▶ 抗体濃度を上げます  ▶ インキュベーション時間を長くします
13	ブロッキング剤と抗体（一次または二次）との交差反応	▶ Tween20などのマイルドな界面活性剤を使用します  ▶ ブロッキング剤（スキムミルク、BSA、血清またはゼラチンがよく使用されます）を変更します
14	一次抗体が試料中のタンパク質を認識できない	▶ 取扱説明書を確認します  ▶ ポジティブコントロールを使用します
15	標的タンパク質が含まれていないか含量が低い（無効な抗原）	▶ ポジティブコントロールを使用します  ▶ ローディング量をウェル当たりタンパク質 20～30 μg に増やします  ▶ プロテアーゼ阻害剤または粗精製を行った標的タンパク質を使用します
16	転写が不十分・洗浄が過剰	▶ ボンソーSを用いて転写を確認します  ▶ PVDFメンブレンをメタノールに浸漬します  ▶ 過剰な洗浄を防止します
17	ブロッキングが過剰	▶ 0.05%スキムミルクまたはスキムミルク以外のブロッキング剤を使用します  ▶ ブロッキング剤を変更します  ▶ ブロッキング時間を短くします
18	一次抗の劣化	▶ 新しい抗体を用意し、適切に保存します  ▶ 凍結と解凍の繰返しを避けます

19	アジ化ナトリウムによる二次抗体の阻害	▶ アジ化ナトリウムと HRP 結合抗体との併用を避けます
20	酵素結合体（二次抗体）と反応基質の劣化または無効	▶ 酵素結合体と反応基質を混合します（酵素が不活性の場合は発色しません） ▶ 活性のある酵素結合体および新鮮な基質を使用します
21	メンブレンへのタンク式転写が不適切	▶ PVDF メンブレンを 100%メタノールに浸漬します
22	標的タンパク質の分子量が不十分（10 kDa 未満）	▶ 小さいポアサイズのメンブレンを使用します ▶ 転写時間を短くします
23	標的タンパク質の等電点値と転写緩衝液の pH 値が同じ、または近い	▶ CAPS 緩衝液（pH 10.5）のような他の緩衝液を試します ▶ 酢酸緩衝液のような pH 値の低い緩衝液を試します
24	メタノール濃度が高すぎる	▶ メタノール濃度を下げるか、イソプロパノールを使用します

### 3) ノンスペの存在

	考えられる原因	解決方法
1	SDS による固定化タンパク質バンドへの非特異的な結合	▶ 転写後、プロットを洗浄します ▶ SDS の使用を避けます
2	細胞株の頻繁な継代によって、タンパク質発現プロファイルの差異が徐々に蓄積した	▶ 未継代の最初の細胞株を使用し、最初の細胞株の試料と現在の細胞株の試料とを並べて泳動します
3	タンパク質試料の劣化	▶ 新鮮な試料を使用します ▶ プロテアーゼ阻害剤を使用します
4	類似のエピトープを共有する新しいタンパク質または異なるスプライズバリエーションが存在する（同じタンパク質ファミリーが検出される可能性がある）	▶ 他のレポートがあるか文献を調べます（BLAST 検索も実施します） ▶ レポートにある細胞株または組織を使用します
5	抗体の不純物が存在する	▶ モノクローナル抗体を使用します

		▶ アフィニティ法などにより抗体を精製します
6	タンパク質標的が多量体を形成している	▶ SDS-PAGE ゲルの泳動を行う前に、タンパク質を10分間煮沸して多量体を破壊します
7	異なる分子量を持つ複数の異なるタンパク質サブタイプが形成されている	▶ 文献を調べ、バイオインフォマティクス解析を用いて、タンパク質の正しいサイズを推定します
8	タンパク質における多くの修飾因子および修飾サイトの存在	▶ 文献を調べ、バイオインフォマティクス解析を用いて、修飾因子と修飾サイトの存在およびそれらの分子量を確認します
9	一次抗体濃度が高すぎる	▶ 一次抗体濃度を下げます
10	二次抗体が原因で生じた非特異的なバンド	▶ 一次抗体に蛍光標識を使用します
11	ゲル上の過剰なタンパク質	▶ ゲルにロードする全タンパク質量を減らします
12	洗浄が不十分	▶ 洗浄回数を増やします
13	ブロッキングの問題	▶ ブロッキング時間を長くします ▶ ブロッキング剤の選択を最適化します

#### 4) 広がってしまったバンド

	考えられる原因	解決方法
1	抗体濃度が高すぎる	▶ 抗体濃度を下げます
2	ゲル上の過剰なタンパク質	▶ ゲルにロードする全タンパク量を減らします
3	過度に速いタンパク質転写 (および/または電気泳動中のゲルの過熱)	▶ 転写時間を長くします ▶ 電気泳動に冷却システムを適用します

## よくある質問

### 1. ウェスタンブロット法とは何ですか？

ウェスタンブロット法 (WB) とは、分子量に基づいてタンパク質を分離する手法です。一般に、より小さなタンパク質は、より大きなものよりも速くゲルの中を移動します。目的とするタンパク質を抽出し、その量を測定した後、WB では、ゲル電気泳動を行います。ゲル電気泳動によって、細胞ライセートまたは組織ホモジネート試料中のタンパク質が分離されます。ライセートおよびホモジネートは、慎重に調製してタンパク質の分解や変性を避けるようにしなければなりません。次に、分離したタンパク質はメンブレンに転写し、ブロッキングステップにより非特異的な結合を防止します。次いで、タンパク質を酵素標識抗体でプローブします。最後に、基質を加えると、基質が酵素と反応して、検出可能な産物が生じます。

### 2. バンドのサイズが予想したサイズと異なるのはなぜでしょうか？

一般的な理由としては以下のものが挙げられます。

- タンパク質サイズを増大させる翻訳後修飾には、リン酸化、グリコシル化、ニトロシル化などがあります (多くのタンパク質は、タンパク質の活性をブロックする余分なアミノ酸鎖を有する非活性型の前駆体タンパク質として合成されます)。
- タンパク質サイズを低下させる翻訳後修飾には、切断などがあります (前駆体タンパク質転換酵素による切断は、これら抑制的なアミノ酸鎖を除去するので、分子量低下の原因となります)。
- スプライスバリエーションおよびアイソフォームが存在すると、同じ遺伝子から異なる分子量のタンパク質が産生される可能性があります。
- アミノ酸の相対荷電 (荷電対非荷電) は、タンパク質の等電点を変化させます。
- 還元条件が不十分だと、タンパク質の凝集体形成が可能となり、それによって多量体が形成され、その結果、高分子量のバンドが生じます。

### 3. どれくらいの量の試料をロードするべきですか？

タンパク質の適切なロード量は、試験予定の試料における、目的とするタンパク質の発現量に基づいて、研究者が最適化しなければならないものです。これはゲルが許容できる試料量にも左右されます。例えば、より大型のゲルは、ローディングバッファ中の資料を最大 30  $\mu\text{L}$  収容できるのに対し、他のゲルは 15  $\mu\text{L}$  しか収容できません。幅広い範囲

のローディング量でテストをすることをお勧めします。例えば、組織ホモジネートおよび細胞ライセートの場合はウェル当たり全タンパク質 10~50 µg、精製タンパク質試料の場合は全タンパク質 10~100 ng とします。

**4. 組換えタンパク質を検出するとき、バンドを得るのに苦労しています。これはなぜでしょうか？**

組換えタンパク質を検出する場合、考えなければならない多くの課題があります。例えば、試料中に発現される組換えタンパク質は、使用予定の抗体に対する免疫抗原性の配列を必ず含んでいなければなりません。組換えタンパク質の折り畳みは、内在性のものとは異なる場合があります、そのため、エピトープに抗体が接近するのを妨げている可能性があります。このようなことは、特にタグ化タンパク質でよく起こります。このような問題が起こる可能性を減らすため、可能な限り、組換えタンパク質の C-または N-末端にタグを付けることをお勧めします。また、WB で組換えタンパク質を検出する際は、実験デザインの一環として、内在性タンパク質のポジティブコントロールを用いることを強くお勧めします。

**5. 試料の還元や変性は必要ですか？**

抗体データシートを調べ、お使いの抗体が、還元および変性条件下で試験されているかどうかを調べてください。これが当てはまるならば、還元および変性条件を用いることをお勧めします。

**6. スキムミルクブロッキングと BSA ブロッキングとの間に違いはありますか？**

抗体は、使用するブロッキング剤の影響を非常に受けやすい場合があるため、推奨されるブロッキング剤について、データシートを調べることをお勧めします。BSA は、スキムミルクに比べて交差反応を起こすタンパク質が少ないため、通常、スキムミルクよりクリアな結果をもたらします。しかし、BSA にくらべてより多様なブロッキングタンパク質を含有しているスキムミルクの方が良好に機能する抗体もあります。

**7. 一次抗体を 4°C で一晩インキュベートする代わりに、室温で 1 時間インキュベートしてもよいですか？**

抗体のデータシートを調べてみることをお勧めします。データシートには、最適化されたインキュベーション条件が記載されているはずです。通常、4°C で一晩インキュベートすると、より効率的かつ特異的な染色が得られます。しかし、実際は、多くの抗体は、室温における 1 時間または 2 時間のインキュベーションで問題なく機能します。

**8. なぜ、シグナルがない／弱いのですか？**

このハンドブックのトラブルシューティングガイドのセクション（シグナルがない／弱い）をご参照ください。

**9. なぜ、バックグラウンドが高いのですか？**

このハンドブックのトラブルシューティングガイドのセクション（高いバックグラウンド）をご参照ください。

**10. なぜ、複数のバンドがあるのですか？**

複数のバンドを生じさせる理由として、以下のような多くのことが考えられます。

- 一次抗体および／または二次抗体の濃度が高い場合があります。この場合は、抗体の力価測定をして最適な使用濃度を見つけることをお勧めします。一次抗体を用いない二次抗体だけのコントロール実験もお勧めします。
- 過剰の試料がゲルにロードされた結果、抗体による非特異的な結合が生じる場合があります。幅広い範囲の全タンパク質ローディング量を試みて、適切なローディング量を決定することをお勧めします。
- タンパク質に対する以下のような実際の修飾：
  - ✓ タンパク質分解の結果、予想より低い分子量のバンドが生じることがあります（これを防止するには、プロテアーゼ阻害剤を使用し、試料を氷上に保持します）。
  - ✓ タンパク質の凝集および二量体化によって、予想より高い分子量バンドが生じることがあります（これを防止するには、変性剤 [例：ジチオスレイトール、β-メルカプトエタノール] を含有する SDS-PAGE 緩衝液の中で試料を煮沸するか、または煮沸時間を延ばします。還元ゲルと非還元ゲルの結果を比較することも役に立つ場合があります）。

#### 11. なぜ、プロット上に斑点／点があるのですか？

転写中にメンブレンに捕捉された気泡が原因となり、メンブレン上に抗体の不均一な分布が生じ、不均一な白色の斑点がプロット上に現れることがあります。これを防止するため、転写前に falcon チューブをローラーとして用いることで、転写用ゲルをメンブレンに重ねる際に捕捉された可能性のある気泡をすべて追い出すことをお勧めします。一方、黒色の斑点は、抗体がブロッキング剤と結合して生じた可能性があります。この場合、ブロッキング剤をフィルターでろ過することでこの問題を防止することをお勧めします。

#### 12. なぜ、MW レーンが黒くなるのですか？

抗体が MW マーカーと反応している可能性があります。MW マーカーと最初の試料との間にブランクのレーンを設けることをお勧めします。

#### 13. なぜ、スマイリングが起こるのですか？

電気泳動が速過ぎるか、ゲルが過熱している可能性があります。電圧を低下させ、泳動時間を延長し、かつ／または冷蔵室内／氷上で電気泳動を行うことをお勧めします。

#### 14. 同じタンパク質のバンドが異なるサイズになるのはなぜでしょうか？

ゲルを固める際に、あまりにも速く固めた結果、レーン間のアクリルアミド濃度が不均一になった可能性があります。ゲルのレシピ（処方）を調べることをお勧めします。また、TEMED をゲルに添加し、少量の 0.1% SDS 水溶液を泳動ゲルの上部に添加してみてください（SDS 溶液はゲルを乾燥から守ります）。

#### 15. どのようにすれば、分子量に基づいた転写が適切に行われるようにすることができますか？ どのようにすれば、不完全な転写を改善できますか？

不完全な転写は、転写にかける時間を長くするか、電圧を高くすることで改善できます。一般論として、20%メタノールを転写緩衝液に添加し、70 V で 1.5 時間転写することをお勧めします。転写は、低電圧（10 V）で一晩実施することも可能です。高分子量のタンパク質の場合、(a)メタノール濃度が高くなると、より大きいタンパク質はゲル基質の中で動けなくなることがあるため、転写緩衝液中のメタノールの濃度を 5%に抑えること、

(b)転写時間を延長すること [例：70 V で 3 時間] をお勧めします。注意いただくべき重要な点として、メンブレンをゲルから引き離した後に、不十分な転写を修復しようと試みることは、お勧めできません。修復しようと試みても、転写した際と同一になるように正確にメンブレンをゲル上に置くことはほぼ不可能なため、ゴーストバンドを発生させる結果となります。

**16. タンパク質を分離するのに、何パーセントのアクリルアミドゲルを使用すべきですか？**

ゲルのポアサイズは、使用するアクリルアミドの量に反比例します。例えば、4%ポリアクリルアミドゲルは、12%ゲルよりも大きいポアサイズになります。アクリルアミドの濃度が低いゲルは、一般に、大きいタンパク質に使用し、濃度が高いゲルは、小さいタンパク質を分離するのに使用します。また、勾配ゲル（ポリアクリルアミドの濃度が上部で低く、ゲル底部に向かって 4%～20%と次第に高くなるように調製されます）を使用すれば、幅広いサイズのタンパク質を分離することが可能になります。

**17. どの程度に希釈した一次抗体を WB に使用すればよいですか？**

抗体濃度を最適にすれば、良好なシグナルが得られ、バックグラウンドは最小限に抑えられます。コストを抑えるには、可能な限り希釈した抗体を用いて、抗体を節約すると同時に十分なシグナルを得るとというのが望ましい方法です。そのため、一般に、製造者の提案した希釈率を含む幅広い濃度を用いて、新しい抗体で希釈実験を行うのがよいでしょう。例えば、製造者が、1:100 の希釈率を提案している場合、1:50、1:200、1:500 および 1:1000 も試験するとよいでしょう。こうすることで、目的の条件に合った最適な希釈率を決定することが容易になります。抗体の希釈率に関する提案がない場合、抗体のタイプに基づき、以下の範囲で希釈実験を行うとよいでしょう。

- 組織培養上清：1:10 程度
- 腹水：1:100
- 全抗血清：1:50～1:100
- 精製された抗体：5 µg/mL

## 注文情報

ウェスタンブロットに基づくタンパク質分析の成功率を最大限に高めるうえで、高品質かつ革新的な製品は不可欠です。これらは、社内の研究者が抗体と合わせて実際に開発して使用し、お客様にお届けするために社内の QC チームがリリースした試薬です。Boster 社には WB 実験のあらゆるステップをサポートするための経験があります。

### 1. タンパク質抽出

製品	サイズ	カタログ番号
Mammal Tissue Protein Extraction Reagent	100 mL	AR0101
Mammal Cell Protein Extraction Reagent	100 mL	AR0103
Bacterial Cell Protein Extraction Reagent	50 mL	AR0157
Cytoplasmic & Nuclear Protein Extraction Kit	1Kit	AR0106
Membrane Protein Extraction Kit	1Kit	AR0155
Mitochondria Extraction Kit	1Kit	AR0156
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	80 mg	AR1120
Phosphatase Inhibitor Cocktail III	80 mg	AR1121
Broad Spectrum Protease Inhibitor Cocktail	1 mL	AR1182
Broad Spectrum Phosphatase Inhibitor Cocktail	80 mg	AR1183
RIPA Lysate Solution	50 mL	AR0105

### 2. タンパク質の定量アッセイ

製品	サイズ	カタログ番号
BCA Protein Assay Kit	1Kit	AR0146
Micro BCA Protein Assay Kit	1Kit	AR1110
Coomassie Plus Protein Assay Kit	1Kit	AR0145

### 3. 試料ローディングおよび電気泳動

製品	サイズ	カタログ番号
SDS-PAGE Loading Buffer 2X	6 mL	AR0131
SDS-PAGE Loading Buffer 5X	3 mL	AR1112
SDS-PAGE Tricine Loading Buffer 2X	6 mL	AR1143
SDS-PAGE Electrophoresis Buffer	1 L (Powder)	AR0139
SDS-PAGE Gel Electrophoresis Kit	1Kit	AR0138
Dual Color Protein Loading Buffer 4X	6 mL	AR1142

#### 4. ゲル染色

製品	サイズ	カタログ番号
Coomassie Blue Staining & Destaining Solutions	1Kit	AR0140
Coomassie Fast Staining Solution	1Kit	AR0170
Protein Silver Staining Reagent	1Kit	AR0171

#### 5. タンパク質の転写

製品	サイズ	カタログ番号
NC Membrane (0.22 $\mu$ m, 9 cm X 10 cm)	20 Pieces	AR0135-02
NC Membrane (0.45 $\mu$ m, 9 cm X 10 cm)	20 Pieces	AR0135-04
Transfer Buffer	1 L (Powder)	AR1149
Fast & Efficient Transfer Pad (12.5 cm X 12.5 cm)	100 Pieces	AR0172
Fast & Efficient Transfer Pad (9 cm X 7.5 cm)	100 Pieces	AR0173
Imprinted Membrane Fast Reversible Protein Staining Reagent	12 mL	AR0142

#### 6. ブロッキング

製品	サイズ	カタログ番号
TBS Blocking Buffer	1 L (Powder)	AR0143
TBS Washing Buffer	1 L (Powder)	AR0144
PBS Washing Buffer	1 L (Powder)	AR1155

#### 7. 一次抗体

Boster 社では、WB アプリケーションについてバリデートされた抗体として、2100 を超える品揃があります。Boster 社の **Picoband™**抗体（カタログ番号は「PB」で始まります）は、最小限の交差反応性と最大限の親和性を確保するために、最良の免疫原を用いて注意深く開発されています。Boster 社の幅広い一次抗体製品の中で、最も優れた WB 一次抗体の一部を下表に記載します。

製品名	交差種	サイズ	カタログ番号
Adiponectin: Picoband, Polyclonal Rabbit IgG	Human	100 $\mu$ g	PB9001
ALK: Polyclonal Rabbit IgG	Human, Mouse, Rat	100 $\mu$ g	PA1741
BCL-2: Monoclonal Mouse IgG1	Human	100 $\mu$ g	MA1004
BDNF: Polyclonal Rabbit IgG	Human, Mouse, Rat	100 $\mu$ g	PA1041
BRCA1: Picoband, Polyclonal Rabbit IgG	Human, Mouse, Rat	100 $\mu$ g	PB9015

製品名	交差種	サイズ	カタログ番号
CCR5: Polyclonal Rabbit IgG	Human, Mouse, Rat	100 µg	PA1016
CD45: Polyclonal Rabbit IgG	Human	100 µg	PA1596
EGFR: Picoband, Polyclonal Rabbit IgG	Human, Rat	100 µg	PB9016
HDAC1: Polyclonal Rabbit IgG	Human, Mouse, Rat	100 µg	PA1349
ICAM-1: Picoband, Polyclonal Rabbit IgG	Human	100 µg	PB9004
Integrin Beta 3: Picoband, Polyclonal Rabbit IgG	Human, Mouse, Rat	100 µg	PB9806
Interferon Gamma: Picoband, Polyclonal Rabbit IgG	Rat	100 µg	PB9024
Ki-67: Picoband, Polyclonal Rabbit IgG	Human	100 µg	PB9026
Macrophage Inflammatory/CCL4: Polyclonal IgG	Mouse	100 µg	PA1379
P27 KIP 1: Monoclonal Mouse IgG	Human, Mouse, Rat	100 µg	MA1076
PARP: Polyclonal Rabbit IgG	Human, Mouse, Rat	100 µg	PA2227
S-100 (β-Subunit): Monoclonal Mouse IgG1	Human, Rabbit, Rat	100 µg	MA1088
TNF: Picoband, Polyclonal Rabbit IgG	Rat	100 µg	PB9010

## 8. 二次抗体（ビオチン結合）

製品	サイズ	カタログ番号
Biotin-Conjugated Goat Anti-Mouse IgG Secondary Antibody	0.5 mg	BA1001-0.5
Biotin-Conjugated Goat Anti-Mouse IgG Secondary Antibody	1 mg	BA1001-1
Biotin-Conjugated Goat Anti-Mouse IgM Secondary Antibody	0.25 mg	BA1004-0.25
Biotin-Conjugated Goat Anti-Mouse IgM Secondary Antibody	0.5 mg	BA1004-0.5
Biotin-Conjugated Goat Anti-Rabbit IgG Secondary Antibody	0.5 mg	BA1003-0.5
Biotin-Conjugated Goat Anti-Rabbit IgG Secondary Antibody	1 mg	BA1003-1
Biotin-Conjugated Mouse Anti-Rabbit IgG Secondary Antibody	0.5 mg	BM2004-0.5
Biotin-Conjugated Mouse Anti-Rabbit IgG Secondary Antibody	1 mg	BM2004-1
Biotin-Conjugated Rabbit Anti-Rat IgG Secondary Antibody	0.5 mg	BA1005-0.5
Biotin-Conjugated Rabbit Anti-Rat IgG Secondary Antibody	1 mg	BA1005-1
Biotin-Conjugated Rabbit Anti-Goat IgG Secondary Antibody	0.5 mg	BA1006-0.5
Biotin-Conjugated Rabbit Anti-Goat IgG Secondary Antibody	1 mg	BA1006-1
Biotin-Conjugated Rabbit Anti-Human IgG Secondary Antibody	0.5 mg	BA1020-0.5
Biotin-Conjugated Rabbit Anti-Human IgG Secondary Antibody	1 mg	BA1020-1
Biotin-Conjugated Goat Anti-Human IgM Secondary Antibody	0.25 mg	BA1022-0.25
Biotin-Conjugated Goat Anti-Human IgM Secondary Antibody	0.5 mg	BA1022-0.5
Biotin-Conjugated Mouse Anti-Human IgG Secondary Antibody	0.5 mg	BM2001-0.5
Biotin-Conjugated Mouse Anti-Human IgG Secondary Antibody	1 mg	BM2001-1
Biotin-Conjugated Protein A	0.5 mg	BA1025-0.5
Biotin-Conjugated Protein A	1 mg	BA1025-1
Biotin-Conjugated Protein G	0.5 mg	BA1026-0.5
Biotin-Conjugated Protein G	1 mg	BA1026-1

## 9. 二次抗体 (HRP 結合)

製品	サイズ	カタログ番号
HRP-Conjugated Goat Anti-Mouse IgG Secondary Antibody	0.5 mg	BA1050-0.5
HRP-Conjugated Goat Anti-Mouse IgG Secondary Antibody	1 mg	BA1050-1
HRP-Conjugated Goat Anti-Mouse IgM Secondary Antibody	0.25 mg	BA1075-0.25
HRP-Conjugated Goat Anti-Mouse IgM Secondary Antibody	0.5 mg	BA1075-0.5
HRP-Conjugated Goat Anti-Rabbit IgG Secondary Antibody	0.5 mg	BA1054-0.5
HRP-Conjugated Goat Anti-Rabbit IgG Secondary Antibody	1 mg	BA1054-1
HRP-Conjugated Rabbit Anti-Rat IgG Secondary Antibody	0.5 mg	BA1058-0.5
HRP-Conjugated Rabbit Anti-Rat IgG Secondary Antibody	1 mg	BA1058-1
HRP-Conjugated Rabbit Anti-Goat IgG Secondary Antibody	0.5 mg	BA1060-0.5
HRP-Conjugated Rabbit Anti-Goat IgG Secondary Antibody	1 mg	BA1060-1
HRP-Conjugated Goat Anti-Human IgA Secondary Antibody	0.25 mg	BA1066-0.25
HRP-Conjugated Goat Anti-Human IgA Secondary Antibody	0.5 mg	BA1066-0.5
HRP-Conjugated Rabbit Anti-Human IgG Secondary Antibody	0.5 mg	BA1070-0.5
HRP-Conjugated Rabbit Anti-Human IgG Secondary Antibody	1 mg	BA1070-1
HRP-Conjugated Goat Anti-Human IgM Secondary Antibody	0.25 mg	BA1077-0.25
HRP-Conjugated Goat Anti-Human IgM Secondary Antibody	0.5 mg	BA1077-0.5
HRP-Conjugated Protein A	0.5 mg	BA1080-0.5
HRP-Conjugated Protein A	1 mg	BA1080-1
HRP-Conjugated Streptavidin	0.5 mg	BA1088-0.5
HRP-Conjugated Streptavidin	1 mg	BA1088-1
HRP-Conjugated Avidin	0.5 mg	BA1081-0.5
HRP-Conjugated Avidin	1 mg	BA1081-1
HRP-Conjugated Rabbit Anti-Avidin	0.5 mg	BA1082-0.5
HRP-Conjugated Rabbit Anti-Avidin	1 mg	BA1082-1

## 10. 二次抗体（未結合）

製品	サイズ	カタログ番号
Un-Conjugated Goat Anti-Mouse IgG Secondary Antibody	1 mg	BA1038-1
Un-Conjugated Goat Anti-Mouse IgG Secondary Antibody	5 mg	BA1038-5
Un-Conjugated Rabbit Anti-Mouse IgG Secondary Antibody	1 mg	BA1048-1
Un-Conjugated Rabbit Anti-Mouse IgG Secondary Antibody	5 mg	BA1048-5
Un-Conjugated Goat Anti-Rabbit IgG Secondary Antibody	1 mg	BA1039-1
Un-Conjugated Goat Anti-Rabbit IgG Secondary Antibody	5 mg	BA1039-5
Un-Conjugated Rabbit Anti-Goat IgG Secondary Antibody	1 mg	BA1040-1
Un-Conjugated Rabbit Anti-Goat IgG Secondary Antibody	5 mg	BA1040-5
Un-Conjugated Rabbit Anti-Human IgG Secondary Antibody	1 mg	BA1041-1
Un-Conjugated Rabbit Anti-Human IgG Secondary Antibody	5 mg	BA1041-5
Un-Conjugated Rabbit Anti-Rat IgG Secondary Antibody	1 mg	BA1042-1
Un-Conjugated Rabbit Anti-Rat IgG Secondary Antibody	5 mg	BA1042-5
Un-Conjugated Human IgG Secondary Antibody	1 mg	BA1043-1
Un-Conjugated Human IgG Secondary Antibody	5 mg	BA1043-5
Un-Conjugated Goat IgG Secondary Antibody	1 mg	BA1044-1
Un-Conjugated Goat IgG Secondary Antibody	5 mg	BA1044-5
Un-Conjugated Rabbit IgG Secondary Antibody	10 mg	BA1045
Un-Conjugated Mouse IgG Secondary Antibody	1 mg	BA1046
Un-Conjugated Rat IgG Secondary Antibody	1 mg	BA1047

## 11. タンパク質検出（高感度基質およびフィルム現像／定着試薬）製品

製品	サイズ	カタログ番号
Hypersensitive ECL Substrate (Ready-to-Use)	100 mL	AR1170
Hypersensitive WB Substrate (20X Concentrated)	5 mL	CR0001-5
Hypersensitive WB Substrate (20X Concentrated)	10 mL	CR0001-10
Hypersensitive WB Substrate (20X Concentrated)	25 mL	CR0001-25
WB Developing Fixing Kit	1Kit	AR0132
WB Stripping Buffer	100 mL	AR0153

(次のページに続く)

## 12. タンパク質検出 (化学発光キット)

製品	サイズ	カタログ番号
ECL Kit (Mouse IgG)	1Kit	EK1001
ECL Kit (Rabbit IgG)	1Kit	EK1002
ECL Kit (Goat IgG)	1Kit	EK1003
ECL Kit (Rat IgG)	1Kit	EK1004
ECL Kit (Mouse IgM)	1Kit	EK1005

## 13. タンパク質検出 (発色 DAB キット)

製品	色	サイズ	カタログ番号
DAB Kit (Mouse IgG)	Yellow	1Kit	SA2020
DAB Kit (Goat IgG)	Yellow	1Kit	SA2021
DAB Kit (Rabbit IgG)	Yellow	1Kit	SA2022
DAB Kit (Rat IgG)	Yellow	1Kit	SA2023
DAB Kit (Mouse IgG)	Blue	1Kit	SA2024
DAB Kit (Mouse IgG)	Blue	1Kit	SA2025

## 14. タンパク質検出 (発色 BCIP/NBT キット)

製品	サイズ	カタログ番号
BCIP/NBT Kit	1Kit	AR1023

連絡先

# エムエス機器株式会社

■東京

162-0805 東京都新宿区矢来町 113

電話 : 03-3235-0661

FAX : 03-3235-0669

■大阪

532-0005 大阪市淀川区三国本町 2 丁目 12 番 4 号

電話 : 06-6396-0501

FAX : 06-6396-0508

■福岡 電話 : 092-631-1012 FAX : 092-641-1285

◆Email: [info@lab.technosaurus.co.jp](mailto:info@lab.technosaurus.co.jp)

Boster Biological Technology

3942 Valley Ave., Suite B, Pleasanton, CA 94566

Tel: +1(888) 466-3604 Fax: +1 (925) 485-4560

Sales and customer support: [orders@bosterbio.com](mailto:orders@bosterbio.com)

Product and technical support: [support@bosterbio.com](mailto:support@bosterbio.com)