

ECL Select Western Blotting Detection System 検出マニュアル

1. メンブレンの準備

電気泳動の後、メンブレンへの転写を行います。

転写後のメンブレンを保存する場合には、PBS-T or TBS-T で 2~8℃で保存します。

2. ブロッキング以降の準備

検出まで一気に作業するため前もって準備しておきます。

□ ブロッキング剤

ブロッキング剤は PBS-T or TBS-T に溶解し、2~5%濃度で使用します。以下のブロッキング剤を利用できます。

- Amersham ECL Prime Blocking Agent (RPN418)
- Amersham ECL Blocking Agent (RPN2125)
- BSA Blocking Agent
- Non-fat dry milk

□ 洗浄バッファー (PBS-T or TBS-T) の調製

- 一次抗体、HRP 標識二次抗体
- CCD イメージャー or 暗室の予約

3. ブロッキング

1. 転写後のメンブレンをブロッキング剤に浸します。
2. 室温で 1 時間、もしくは 2~8℃でオーバーナイト振盪します。
3. 新しい洗浄バッファーに浸して 2 回すすぎます。



4. 一次抗体反応

準備：

- 一次抗体、二次抗体の希釈

ECL Select で推奨される抗体濃度は次の通りです。1 mg/ml 濃度のストック液の希釈率の場合。

	一般的なガイドライン	一次抗体のアフィニティーの違いによる目安	
		高アフィニティー	低アフィニティー
一次抗体	1:5,000~1:30,000	1:10,000	1:5,000
二次抗体	1:100,000~1:300,000	1:150,000	1:100,000

1. PBS-T or TBS-T で希釈した一次抗体にメンブレンを浸します。
2. 室温で 1 時間、もしくは 2~8℃でオーバーナイトで振盪します。
3. メンブレンを新しい洗浄バッファーに浸して 2 回すすぎます。
4. 新しい洗浄バッファーに浸して室温で振盪して洗浄します。洗浄回数は次の通りです。
(5 分間×4~6 回)
 - 洗浄液はメンブレン 1 cm² あたり 4 ml 使用します。8×10 cm のメンブレンであれば 320 ml が目安です。
 - X 線フィルムで検出する場合は 6 回洗浄することで、バックグラウンドを抑えられます。

5. 二次抗体反応 (HRP 標識二次抗体を使用する場合)

1. PBS-T or TBS-T で希釈した HRP 標識二次抗体にメンブレンを浸します。
2. 室温で 1 時間振盪します。
3. メンブレンを新しい洗浄バッファーに浸して 2 回すすぎます。
4. 洗浄バッファーに浸し、室温で振盪して洗浄します。洗浄回数は次の通りです。
(5 分間×4~6 回)
 - 洗浄液はメンブレン 1 cm² あたり 4 ml 使用します。8×10 cm のメンブレンであれば 320 ml が目安です。
 - X 線フィルムで検出する場合は 6 回洗浄することで、バックグラウンドを抑えられます。

6. 二次抗体反応 (ビオチン化二次抗体と HRP 標識ストレプトアビジンを使用する場合)

1. PBS-T or TBS-T で希釈したビオチン化二次抗体にメンブレンを浸します。
2. 室温で 1 時間振盪します。
3. 新しい洗浄バッファーに浸して 2 回すすぎます。
4. 洗浄バッファーに浸し、室温で振盪して洗浄します。洗浄回数は次の通りです。
(5 分間×4~6 回)
 - 洗浄液はメンブレン 1 cm² あたり 4 ml 使用します。8×10 cm のメンブレンであれば 320 ml が目安で

- す。
- X線フィルムで検出する場合は6回洗浄することで、バックグラウンドを抑えられます。
5. PBS-T or TBS-T で希釈した HRP 標識ストレプトアビジン (RPN1231-2ML) にメンブレンを浸します。
 6. 室温で45分間振盪します。
 7. 新しい洗浄バッファーに浸して2回すすぎます。
 8. 洗浄バッファーに浸し、室温で振盪して洗浄します。洗浄回数は次の通りです。
(5分間×4~6回)
 - 洗浄液はメンブレン1cm²あたり4ml使用します。8×10cmのメンブレンであれば320mlが目安です
 - X線フィルムで検出する場合は6回洗浄することで、バックグラウンドを抑えられます。

7. 検出

準備：

- 検出試薬の調製
 1. ECL Select の Solution A、Solution B を室温に戻します。
 2. Solution A : Solution B = 1 : 1 の割合で混合します。
 - メンブレン1 cm²あたり0.1 mlの検出試薬が必要です。8×10cmのメンブレンの場合は4 ml Solution A、4 ml Solution B を目安に混合します。
 - 試薬は使用直前に混合します。やむを得ずしばらく置く場合はホイルで包むか暗所に保存します。
1. メンブレン上の水気を切ります。
 - 余分な洗浄バッファーが残っているとムラの原因になります。
 2. ラップ上にプロット面が上になるようにメンブレンを置き、全体を覆うように検出試薬をかけます。
 3. 5分間、室温で静置します。
 4. メンブレンをピンセットでやさしくつまみ上げ、端を紙製のウェスにつけて余分な検出試薬を取り除きます。
 - 余分な検出試薬が残っているとバックグラウンドの原因になります。
 5. 新しいラップや OHP シートでメンブレンを包み、プロット面が上になるように設置します。
 - 気泡が入ったり、皺がよらないようにしてください。

8. CCD イメージャーでの検出 (ImageQuant LAS 4000 シリーズの場合)

1. EPI トレイを ImageQuant LAS 4000 本体にいれ、扉を閉じます。
2. メソッドで Chemiluminescence (化学発光) を選択し、その他トレイ位置、感度・解像度、露出方法や時間を実験の目的やサンプルにあわせて調整します。
 - 条件検討開始の推奨露出時間は 60 秒です。
 - 8×10 cm のメンブレンの場合、トレイ位置は 2 段目を設定します。
 - X 線フィルムと同等の感度で撮影したい場合には、感度を High に設定します。
 - 適切な露出時間が分からない場合には、露出方法で Increment (逐次撮影) を用います。
3. ヒストグラムを参考に、適切な露出が得られた画像を保存します。
 - 全体にバックグラウンドがみられる場合は、メンブレンを PBS-T or TBS-T で 10 分間 2 回洗浄した後、再度 7.検出の 1 からくり返します。

9. X 線フィルムでの検出

1. フィルムカセットにメンブレンをプロット面を上 (X 線フィルム側) にして置きます。その上に X 線フィルムをのせてカセットを閉じます。
 - 赤色安全光の下で作業してください。
 - フィルムカセット内に検出試薬がつかないように注意します。
 - X 線フィルムの右端を折るなどして上下、裏表の目印とします。
2. 30 秒～数分間露出します。
 - 目的タンパク質の量が微量である、シグナルが弱い場合は、露光時間を長くします。5 分間以上が目安です。
3. X 線フィルムを現像します。
 - 検出後のメンブレンは PBS-T or TBS-T ですすいだ後、ラップに包んで 2～8℃で 1 週間保存できます。
 - 全体にバックグラウンドが見られる場合は、メンブレンを PBS-T or TBS-T で 10 分間 2 回洗浄した後、再度 7.検出の 1 からくり返します。

©2012 GEヘルスケア・ジャパン株式会社 本書の全部または一部を無断で複製複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問い合わせに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。

GEヘルスケア・ジャパン株式会社

ライフサイエンス統括本部

〒169-0073

東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルチング

お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL: 03-5331-9336 FAX: 03-5331-9370

e-mail: Tech-JP@ge.com



Intertek

ISO 9001:2008
認証取得

71-3557-31