

別冊 ウェスタンブロッティング 攻略ガイド
トラブルシューティング 感度アップ編

付録

ECL Primeを用いた 化学発光検出プロトコール



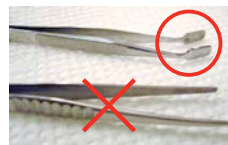
GE imagination at work

▶実験に必要な装置・試薬

ECL Prime を使ったウェスタンブロッティングの実験で必要となる装置・試薬を下記にまとめました。□にチェックを入れつつ準備を進めていただくと確実です。製品の選択、調製などが必要な項目は詳細ページが併記されていますのでそちらをご参照ください。

全実験を通じて用意したほうがよいもの

- ・超純水 …………… 機器の洗浄などに使用します。
- ・ピンセット …… 先端がとがっていないものをご使用ください（右図）。
- ・紙製のウエス（キムワイブなど）
- ・手袋
- ・シェーカー



1. 電気泳動

- ゲル
- 泳動バッファー
- サンプルバッファー
- 分子量マーカー
- 電気泳動装置
- パワーサプライ

2. ブロッティング

- メンブレン
- ブロッティングバッファー
- ブロッティング装置
- ろ紙、ブロッティングペーパー（セミドライ式の場合）
- パワーサプライ
- カッター or ハサミ

3. ブロッキング

- ブロッキング剤
- PBS-T or TBS-T バッファー

4. 抗体反応

- 一次抗体
- 標識二次抗体
- PBS-T or TBS-T バッファー
- ECL Prime

5. 検出

CCD イメージャー使用の場合

- ImageQuant LAS 4000 シリーズなどの CCD イメージャー
- ラップ

X線フィルム使用の場合

- X線フィルム
- フィルムカセット
- ラップ
- X線フィルム現像用試薬・器具（現像液、定着液、バット、廃液瓶）

2. ブロッキング

準備

5. 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 (2 ~ 5% ECL Prime Blocking Reagent (RPN418) in PBS-T or TBS-T または 5% スキムミルク in PBS-T or TBS-T) の調製
- 洗浄バッファー (PBS-T or TBS-T) の調製
- 一次抗体、二次抗体の希釈
- CCD イメージャー or 暗室の予約

1 ブロットリング後のメンブレンをブロッキング剤に浸します。

T 検出後、バックグラウンドが高くなった場合は、PBS-T or TBS-T の Tween 20 濃度およびブロッキング時間、温度を検討します。

i メンブレン上の有色マーカーによりブロッキングの状態を確認できます。



2 室温で1時間振盪します。 () : () ~ () : ()

T メンブレンはブロッキングバッファー中に4℃で一晩浸しておくこともできます。



3 新しい洗浄バッファーに浸して振盪します。(2分間×2)

Check ✓ 2分 2分

T 1cm²あたり4ml以上のバッファーを使用します。8×10cmのメンブレンであれば320mlが目安です。

メモ 実験条件メモ

ブロッキング剤	種類 :	組成 :	調製日 :
洗浄バッファー	種類 :	組成 :	調製日 :

3. 一次抗体反応

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。

T 一次抗体濃度は1mg/mlの濃度で1:1000 ~ 1:50000を目安に実験を始めます。

T バンドが薄い、エキストラバンドが出るなどのトラブルが生じた場合は希釈倍率を検討する必要があります。



2 室温で1時間振盪します。 () : () ~ () : ()

T 最適なインキュベーション時間、温度は抗体により異なるため必要に応じて検討します。



3 メンブレンを新しい洗浄バッファーに浸して振盪して洗浄します。洗浄回数は次の通りです。(2分間×2、15分間×1、5分間×3)

Check ✓ 2分 2分 15分 5分 5分

T 1cm²あたり4ml以上のバッファーを使用します。8×10cmのメンブレンであれば320mlが目安です。

メモ 実験条件メモ

一次抗体	種類 :	組成 :
------	------	------

T …ご注意 **T** …トラブルシュート **T** …プロトコールを変更できる箇所 **i** …より詳しい情報

MEMO

4. 二次抗体反応

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。

! ECL DualVue Western Blotting Markers 使用時には HRP 標識 S-protein を希釈液に加えます。

i 二次抗体の希釈倍率は 1 mg/ml の濃度で 1 : 50000 ~ 1 : 250000 が目安です。

【ビオチン化二次抗体 -HRP 標識ストレプトアビジンの系で検出する場合】

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。 () : () ~ () : ()

+ 最適なインキュベーション時間、温度は抗体により異なるため必要に応じて検討します。

3 メンブレンを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。(2 分間× 2、15 分間× 1、5 分間× 3)

Check ✓ 2 分 2 分 15 分 5 分 5 分 5 分

! 1cm² あたり 4 ml 以上のバッファーを使用します。8 × 10 cm のメンブレンであれば 320 ml が目安です。

i ビオチン化抗体を使用しない方は次のページに進みます。

【**1** でビオチン化二次抗体をご使用の場合、以下の操作で行います】

4 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。

5 室温で 45 分間振盪します。 () : () ~ () : ()

T 検出後のバンドが薄かった場合は 45 ~ 60 分に変更可能です。

6 新しい洗浄バッファーに浸して振盪して洗浄します。洗浄回数は次の通りです。(2 分間× 2、15 分間× 1、5 分間× 3)

Check ✓ 2 分 2 分 15 分 5 分 5 分 5 分

! 1cm² あたり 4 ml 以上のバッファーを使用します。8 × 10 cm のメンブレンであれば 320 ml が目安です。

メモ 実験条件メモ

二次抗体

種類 :

組成 :

5. 検出

ここでは ImageQuant LAS 4000 シリーズのような CCD イメージャーを用いた検出方法と X 線フィルムでの検出方法をご説明します。メンブレンを CCD イメージャーで検出することで定量性を高めることができます。

準備

検出試薬の調製

- (1) ECL Prime 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。

i メンブレン 1 cm² あたり 0.1 ml の検出試薬が必要です。8 × 10 cm 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。

i 混合時に検出溶液が白濁しますが問題ありません。

i 検出試薬は使用前に混合してください。やむを得ずしばらく (2 時間以内) 置く場合はホイルで包むか暗所に保存します。

CCD イメージャーの起動 (CCD イメージャーでの検出の場合)

本体と読みとりソフトウェア ImageQuant LAS 4000 control software を起動し、CCD の冷却を開始します。

1 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。

! メンブレン上に余分な洗浄バッファが残っているとバックグラウンドの原因になりますので水気を切ってから行います。

2 5 分間、室温で静置します。

3 メンブレンをピンセットでやさしくつまみ上げ、端を紙製のウエス (キムワイプなど) 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。

4 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 EPI トレイに置きます。

! 気泡が入ったり、皺がよらないようにしてください。

【CCD イメージャーでの検出】

5 EPI トレイを ImageQuant LAS 4000 本体にいれ、扉を閉じます。

6 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サンプルの場合には、露出方法で Increment (逐次撮影) を用います。

7 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。

i 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 あるいは TBS-T で 10 分間 2 回洗浄した後、再度 5. 検出の **1** からくり返します。

! …ご注意 **i** …トラブルシュート **+** …プロトコールを変更できる箇所 **i** …より詳しい情報

バイオダイレクトライン（テクニカルのお問合せ）

● TEL : 03-5331-9336

ウェスタンブロッティング関連のお問合せは応答メッセージの後に ③ を押してください。

● FAX : 03-5331-9370

● e-mail : Tech-JP@ge.com

ウェスタンブロッティング Web サイト

[>> www.gelifesciences.co.jp](http://www.gelifesciences.co.jp)

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 サンケンビルディング

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



ISO 9001:2008 認証取得

取扱店