

# 蛍光検出基礎知識 検出の達人への道 ウェスタンブロットの蛍光検出

Key Word : ウェスタンブロット、化学発光(ケミルミネッセンス)、化学蛍光(ケミフローレッセンス)

## はじめに

ウェスタンブロットリング法は、タンパク質を検出する方法として広く用いられています。ここではウェスタンブロットリングの原理を再確認するとともに、蛍光によるウェスタン検出をご紹介します。

ウェスタンブロットリングは、電気泳動の優れた分離能と抗原抗体反応の高い特異性を組み合わせて、さまざまなタンパク質混合物から特定のタンパク質を検出する手法です。SDS-PAGEや等電点電気泳動、二次元電気泳動後のゲルからタンパク質を電氣的にメンブレンに移動・固定化してブロットを作製します。メンブレンには、タンパク質が結合しやすい疎水性の高いニトロセルロースやさらに疎水性に優れたPVDF (Polyvinylidene difluoride)が用いられます。続いて、ブロットを目的タンパク質に対する抗体と反応させて検出します。検出法には酵素を用いる系、蛍光を用いる系などがあります。酵素を用いる系では、Alkaline Phosphatase (AP) や Horseradish Peroxidase (HRP) など

表1. 化学蛍光基質から得られる蛍光物質の最大励起、蛍光波長と検出時に用いられる酵素

化学蛍光基質	励起波長 (nm)	蛍光波長 (nm)	酵素
ECL Plus <sup>*1</sup>	430	503	HRP <sup>*2</sup>
ECF	440	560	AP <sup>*3</sup>
DDAOPhosphate	646	660	AP <sup>*3</sup>

\*1 化学蛍光と化学発光検出に用いることができる。  
\*2 Horseradish Peroxidase  
\*3 Alkaline Phosphatase

による発色や化学発光(ケミルミネッセンス)または化学蛍光(ケミフローレッセンス)により検出します。化学発光による検出には、X線フィルムへの露光検出、あるいは化学発光を検出可能なスキャナーを必要としますが、発色法に比べて10 ~ 50倍以上も感度が高いため、微量タンパク質の検出が容易になります。蛍光法は、Cy3やCy5で標識した二次抗体を蛍光検出する方法などがあります。

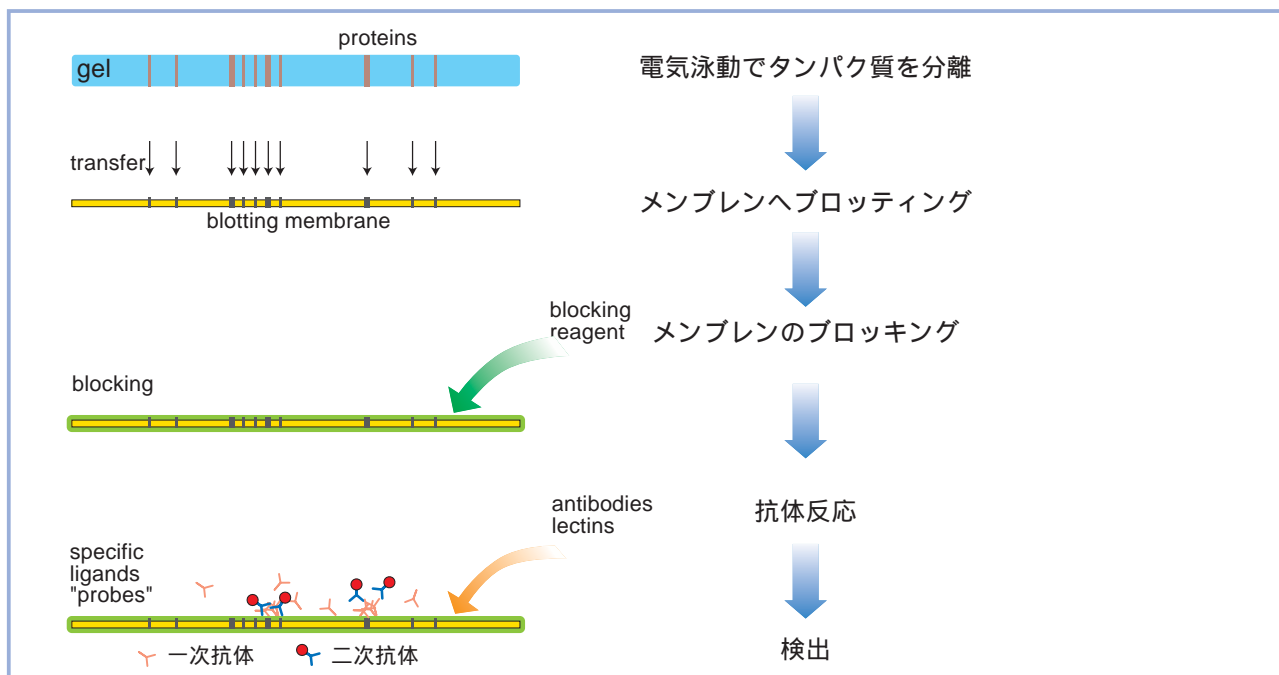


図1. ウェスタンブロットリングの原理

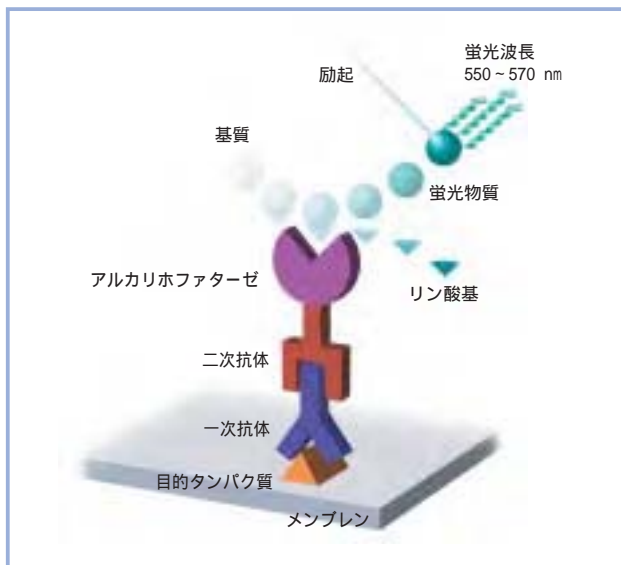


図2. ECF Western Blotting Kitの酵素反応模式図

アルカリホスファターゼ標識した二次抗体を用いてタンパク質を検出します。アルカリホスファターゼはECF基質よりリン酸基を奪い、蛍光物質を発生させます。

## 蛍光による検出

### (1) 標識法の違い

蛍光検出の場合、同一メンブレンを繰り返し検出することもできるため、経時的測定による感度調整も可能です。特にAP系の化学蛍光の場合、メンブレン上に蛍光物質を蓄積できるのが特長です。

一方で、メンブレンはゲルに比べてバックグラウンドが高いため、一般的な蛍光で抗体を直接標識して検出を行っても、化学発光やRI標識なみの感度を得ることは困難です。

感度を得るために使用されている方法のひとつが化学蛍光法(間接標識法)です。この方法は酵素反応により蛍光物質をメンブレン上に生成して増感を行う手法です。

### (2) 化学蛍光の2つの方式

化学蛍光も化学発光と同様にAPまたはHRPを利用することができます。HRPの基質であるECL Plusは、HRPにより発光する過程で蛍光物質を生成するので、化学発光・化学蛍光2種類の検出法による結果の比較も可能です。

現在市販されているAP基質には ECF Substrate (弊社) やDDAO-Phosphate (Invitrogen)があります。いずれもAPによる脱リン酸化により蛍光物質に変化します。AP活性はMg<sup>2+</sup>を必要とするため、EDTAによるキレートで反応を止めることも可能です。

## 蛍光検出のポイント

### (1) エレクトロブロットング装置の種類

ブロットング専用の電気泳動装置では、ブロットングバッファの用量が少なく、短時間でブロットングができるセミドライ式が一般的です。ほかに、タンク式とセミウェット式があります(図3、表2)。

### (2) メンブレンの選択

メンブレン材質は、ニトロセルロース、PVDF、ナイロンがよく知られています。ウェスタンブロットングには、ニトロセルロースのほか、物理的強度に優れ、タンパク質の保持能も高いPVDFが多く用いられています。

先述のとおり、通常用いられている蛍光検出波長(400 ~ 600 nm)ではメンブレン自体の蛍光が強く検出されます。その中でも比較的バックグラウンドを低く抑えられるのが、PVDFメンブレンです。

検出はメンブレンが湿った状態を維持して行います。乾燥したメンブレンは湿ったものよりも全般的にバックグラウンドが高くなり、感度低下の原因になります。スキャンに時間がかかる場合には無蛍光ガラスに挟んだり、ハイブリバックにいれて検出を行うこともおすすめします。また、市販されているラップ類により、乾燥を防ぐ方法もあ

表2. ブロットング装置の特徴

	タンク式	セミドライ式*	セミウェット式
利点	<ul style="list-style-type: none"> <li>冷却できる</li> <li>転写効率が高い</li> <li>アガロースゲル・ポリアクリルアミドゲルの両方に使用できる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>短時間で転写できる</li> <li>使用するバッファ量が少ない</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>タンク型でありながらバッファ量が少ない</li> <li>アガロースゲル・ポリアクリルアミドゲルの両方に使用できる</li> </ul>
考慮点	<ul style="list-style-type: none"> <li>必要とするバッファ量が多い</li> <li>長時間・高電流を要する</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>冷却ができない</li> <li>アガロースゲルには不向き</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>高電流を要する</li> <li>冷却効率が低く、転写時間が限定される</li> </ul>

\* 短時間で高い転写効率を得られるため、タンパク質のブロットング装置としては最も一般的。

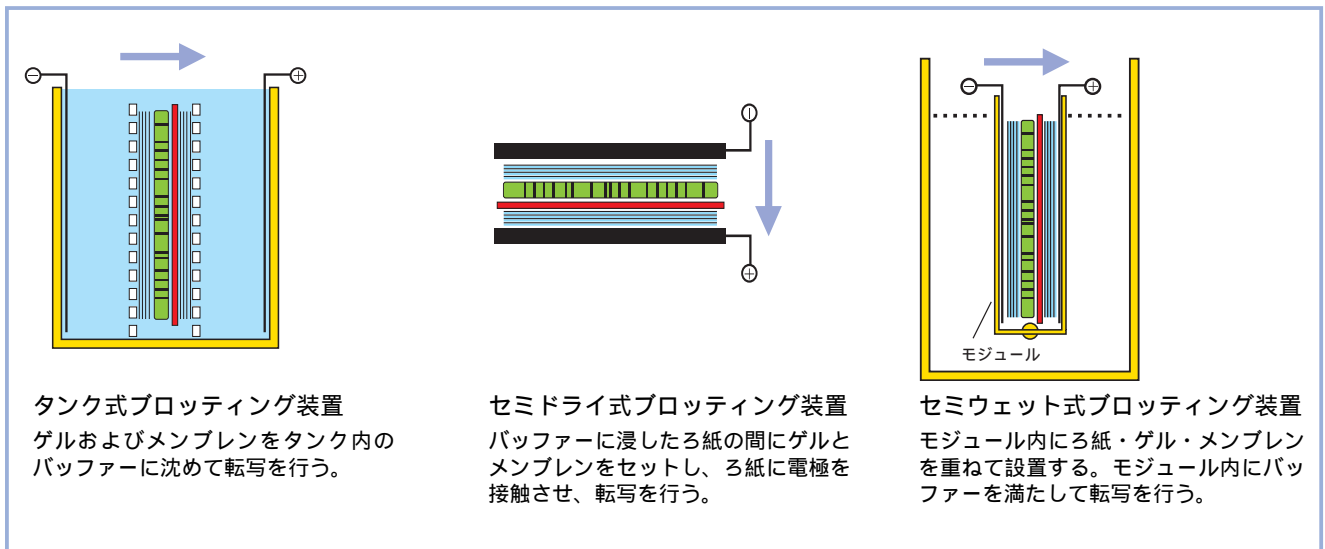


図3. プロットング装置の種類

ります。ただし、ラップ自体にも蛍光があることが多いため、比較的自家蛍光が低いラップとしてポリメチルペンテン樹脂のラップをおすすめします。メンブレンの乾燥を防ぐことで、化学蛍光の特性、すなわち蛍光物質をメンブレン上に蓄積して励起する方法であることを利用して、検出感度を調整することも可能です( 詳細は2003年12月配信の蛍光検出基礎知識 を参照 )。

また、メンブレンによっては肉眼では見えない程度に線などの模様が入っている製品もあります。このような模様がバンド上に重なると、定量的な解析に支障をきたすので、プロットング前に一度スキャンを行い、線模様が入っていないことを確認することをおすすめします。

### (3) 検出に用いる抗体の選択

メンブレンにプロットングした特定のタンパク質に反応する抗体を用いて検出を行います。目的タンパク質に特異的に結合する抗体を一次抗体と呼びます。一次抗体を直接蛍光標識し、検出に用いることもできますが、一般的には、一次抗体に対する酵素標識二次抗体、ビオチン-ストレプトアビジン複合体などを用いて感度を向上させて検出を行います( 図1、図2 )。

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本社 〒169-0073

東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング

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 9001:2000認証取得

Home Page <http://www.gehealthcare.co.jp/lifesciences>

掲載されている製品の名称、仕様、価格などは、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。