

ブロッキング剤

👉 選び方 🖱️ 使い方

👉 ブロッキング剤の選び方

タンパク質をメンブレンにトランスファー（ブロッティング）した後に、抗体やほかのプロープが非特異的に結合しないよう、非特異的な結合部位をあらかじめ飽和させておく必要があります。効果的なブロッキングが行われないと、バックグラウンドが高くなる原因となります（図5）。

ブロッキング剤にはいくつか種類があります（表2）。まずは5%のECL Blocking Agentあるいはスキムミルクで始めていただくことをおすすめします。ECL AdvanceあるいはECL Plexをご使用の方は高感度キット用の2% ECL Advance Blocking Reagentをご使用ください。それでもバックグラウンドが高い、エキストラバンドが見られた場合は次ページ、ブロッキング条件の至適化の項目をご参照ください。

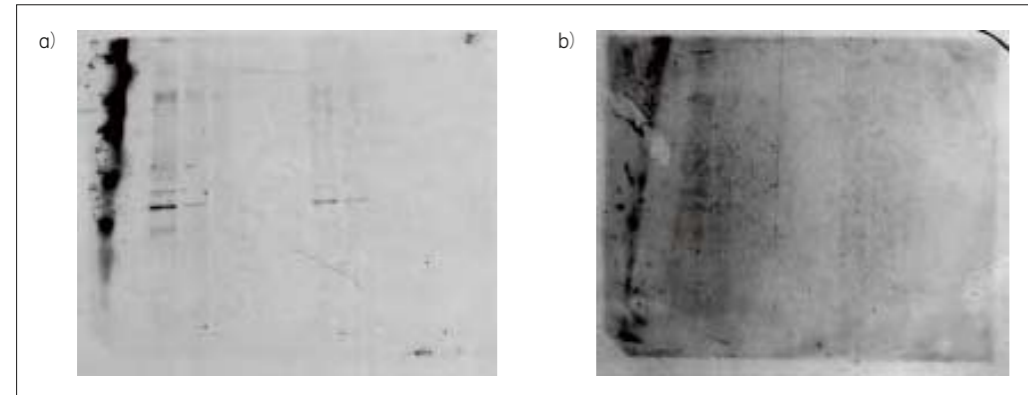


図5 ブロッキングバッファーの違いによるバックグラウンドの比較
ラット肝臓サンプルをSDS-PAGEし、メンブレンにプロットしたものを、抗リン酸化チロシン抗体PY20で検出しました。ブロッキングバッファー：a) BSA in TBS-T、b) スキムミルク in TBS-T

表2 ブロッキング剤の種類

ブロッキング試薬	推奨濃度	特徴
おすすめ ECL Blocking Agents	1～5%	ECL、ECL Plus に至適化されたブロッキング試薬です。TBS-T、PBS-T に溶解して使用します。
おすすめ ECL Advance Blocking Reagent	2%	ECL Advance、ECL Plex に最適化されたブロッキング剤です。高感度検出システム用にバックグラウンドが低くなるように設計されています。
よく使われています スキムミルク	1～5%	最も一般的なブロッキング試薬です。5% スキムミルク in TBS-T/PBS-T の組み合わせで多く使用します。 ⚠️ 保存が利かないため、用事調製の必要があります。 ⚠️ 抗原までマスキングしてシグナルが弱くなる場合があります。このような場合、スキムミルク濃度を1%に下げることによって改善することがあります。改善されない場合は、ほかのブロッキング剤を試します。 ⚠️ スキムミルクにはリン酸化タンパク質が含まれるため、リン酸化タンパク質の検出には適しません。
フィッシュゼラチン	2%程度	動物由来のものより水素結合を形成するアミノ基の含有量が少ないため、バックグラウンドが低くなります。通常2%濃度で用いられます。溶解性もよく、この濃度であれば、4℃でもゲル化しません。 ⚠️ 抗原によってはマスキングされシグナルが弱くなる場合があります。 ⚠️ ビオチンが含まれるためビオチン標識二次抗体を使用する場合の使用は避けます。
BSA	0.3～3%	価格もそれほど高価でなく、良好なシグナル強度が得られます。通常0.3～3%の濃度でPBSに加えて使用します。（参照 文献12～20） ⚠️ 炭水化物の夾雑物があるので、レクチンを用いる場合、バックグラウンドが高くなる可能性があります。 📌 リン酸化チロシンの抗体による検出では、2% BSA がブロッキング剤としてよく用いられます。
血清 (ウマ血清あるいはウシ胎仔血清)	10%程度	0.02% アジ化ナトリウムを添加した10%血清としてよく用いられます。高価で、交差反応を引き起こす免疫グロブリンを含んでいるという欠点があります。免疫グロブリンと反応する二次抗体やProtein Aを用いる系には向きません。（参照 文献12～20）
界面活性剤	0.1%程度	一般的には0.1%濃度で5%スキムミルクと合わせて使用します。 ⚠️ NP-40やTritonのような界面活性剤は、メンブレン上のタンパク質と効率よく置換されてしまうので、使用しないでください。Tween 20は使用できますが、濃度を0.3%以下にします。
混合	—	(例) 1% ECL Blocking Agent + 0.5% BSA 3% フィッシュゼラチン + 10% スキムミルク 1% PVP (Polyvinyl Pyrrolidone) + 3% BSA + 0.3% Tween 20

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

MEMO

🖱️ ブロッキング剤の使い方

1 推奨濃度になるようにブロッキング試薬を量り、洗浄バッファー（参照 4ページ）で希釈します。

2 メンブレンを1に浸し室温で30分～1時間振盪します。
🔄 4℃で1晩つけておくことも可能です。

3 各検出試薬のプロトコールの4.一次抗体反応に従って作業を進めます。

ブロッキング条件の至適化

ECL 検出試薬のような高感度な検出系では、ブロッキング条件の至適化はバックグラウンドが低く、良好なS/N比の結果を得るための重要なポイントです。目的タンパク質の性質は個々によりさまざまです。また、抗体との結合性も、抗体の種類や抗原タンパク質との組み合わせにより異なります。したがって、すべてのタンパク質に対して最良の結果を出すプロトコールというものはありません。以下に、ウェスタンブロッティングでよく用いられるブロッキング条件至適化フローをご紹介します。

1 各検出試薬でおすすめしているブロッキング剤・条件。
📌 バックグラウンドが高い/エキストラバンドが見られる場合は2以降をお試しください。

2 ブロッキングの時間の延長・加温。
⚠️ 濃度を高くしすぎると反応にムラが生じることがあります。

3 ブロッキング試薬の濃度を検討する。
⚠️ 濃度を上げすぎるとメンブレン上の目的タンパク質までマスキングされ、バンドが薄くなる場合があります。

4 異なるブロッキング試薬を試す。
📌 表2をご参照ください。

■ ご注文情報

製品名	包装	コード番号
ECL Blocking Agent *1	40 g	RPN2125
ECL Advance Blocking Reagent *2	20 g	RPN418
TWEEN 20	500 ml	17-1316-01

*1 ECL と ECL Plus 用です。
*2 ECL Advance と ECL Plex 用です。

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

MEMO

基礎編

1 電気泳動

2 ブロッティング

3 抗体反応

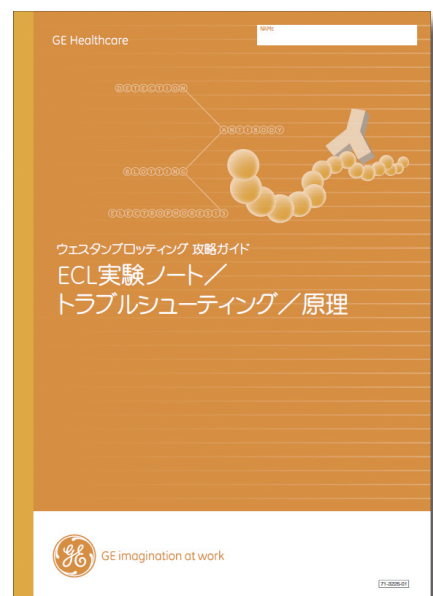
4 検出

このPDFはウェスタンプロットティング攻略ガイドの抜粋です。
プロトコル本文中の参照ページは印刷版の攻略ガイドをご参照ください。
まだお持ちでない方は下記からご請求いただけます。

弊社トップページ www.gelifesciences.co.jp >>

ECL 攻略ガイド

検索



掲載製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載内容は、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。

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