

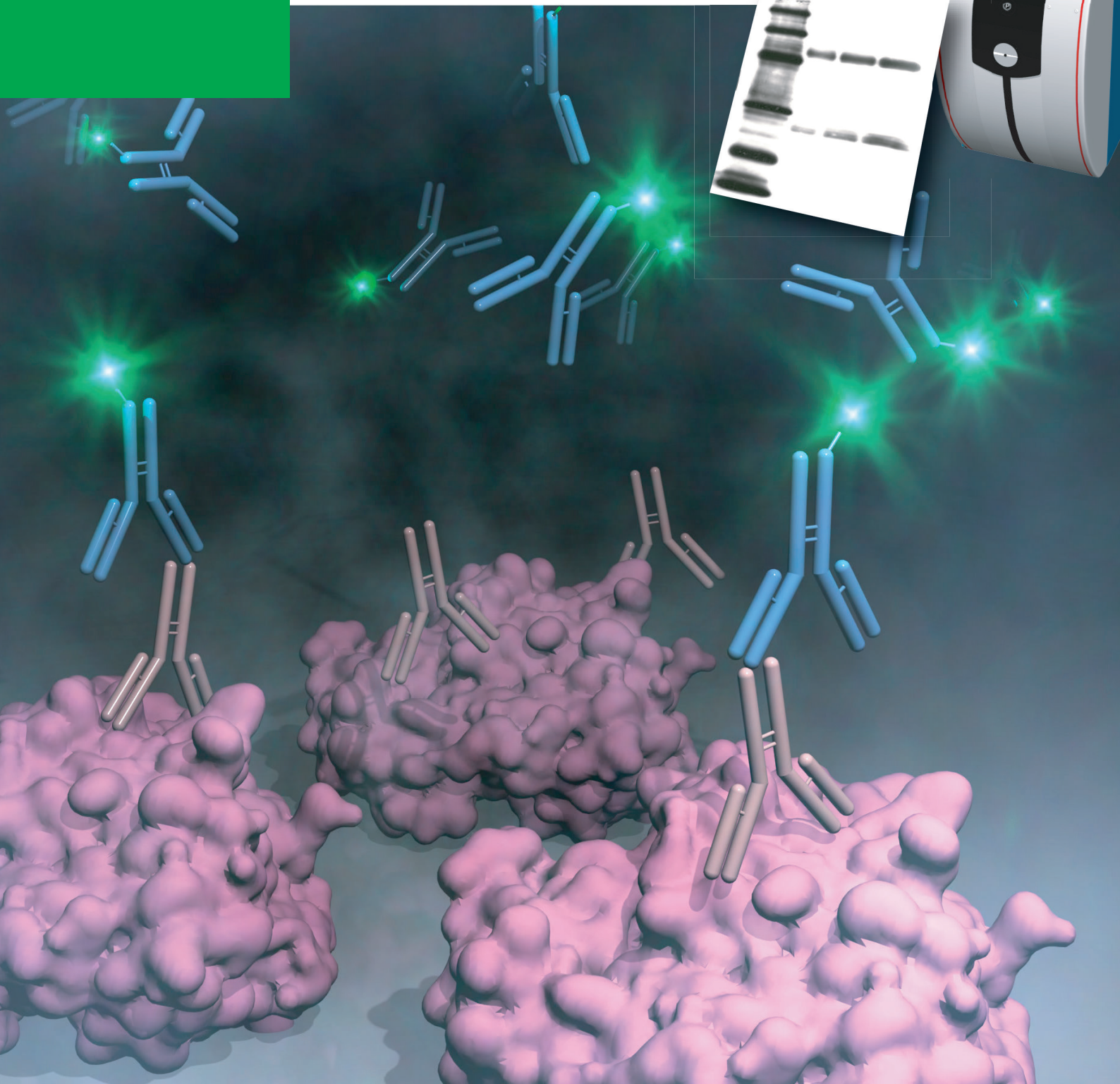
ウ

Western Blotting

エスタン ブロットティング

ver. 4.1

よく解る
実験プロトコール



目次

ウェスタンブロッティングとは	4
ウェスタンブロッティングの流れ	4
Bullet シリーズによる高速化ウェスタンブロッティング.....	5
転写	6
ブロッティング方式の比較	6
ブロッティングメンブレンの比較	6
セミドライ式・従来法	6
実験プロトコール	6
実施例 転写条件	8
セミドライ式・高速化法 Bullet Semi-dry Transfer One	9
実験プロトコール	9
実施例 転写条件	10
タンク式・従来法	11
実験プロトコール	11
実施例 1 転写条件.....	12
実施例 2 タンク式ブロッティングによるウェスタンブロッティング検出例.....	13
転写確認	14
実験プロトコール CBB Stain One を用いたメンブレンの染色方法	14
ブロッキング	15
代表的なブロッキング剤の比較	15
Blocking One / Blocking One-P	15
実験プロトコール	15
実施例 1 Blocking One を使用したウェスタンブロッティング	15
実施例 2 Blocking One-P を使用したウェスタンブロッティング	16
高速化法 Bullet Blocking One	16
実験プロトコール	16
実施例 Bullet Blocking One と Blocking One およびスキムミルクのブロッキング効果	16
抗体反応	17
抗体希釈液の種類	17
抗体希釈倍率の目安	17
従来法	17
実験プロトコール	17
実施例 Bullet Blocking One の抗体希釈液としての使用	18
高感度法 シグナル増強剤 HIKARI	19
実験プロトコール	19
実施例 1 検出感度や特異性への影響.....	19
実施例 2 シグナル増強剤 HIKARI の他社製品との性能比較.....	19
高速化法 Bullet ImmunoReaction Buffer	20
実験プロトコール	20
実施例 1 抗体の反応時間と反応性.....	20
実施例 2 大豆アレルゲンタンパク質(Gly m 4)の検出	20
検出	21
検出方法の種類	21
化学発光検出法 Chemi-Lumi One シリーズ.....	21
化学発光検出試薬(Chemi-Lumi One シリーズ)の比較.....	21
実験プロトコール Chemi-Lumi One Super	22
Chemi-Lumi One L	
実施例 1 Chemi-Lumi One L の検出可能なタンパク質濃度範囲	23
実施例 2 Chemi-Lumi One L の他社製品との感度比較	23
Chemi-Lumi One Super	
実施例 1 Chemi-Lumi One Super の他社製品との感度比較	24
実施例 2 Chemi-Lumi One Super を用いた低バックグラウンド検出	24
Chemi-Lumi One Ultra	
実施例 1 Chemi-Lumi One Ultra の他社製品との感度比較	25
実施例 2 Chemi-Lumi One Ultra を用いた低バックグラウンド検出	25

目次

化学発色検出法	26
化学発色検出試薬の比較	26
実施例 HRP 検出試薬の比較	26
TMB 溶液(ウェスタンブロッティング用)	
実験プロトコール	27
実施例 1 TMB 溶液による大豆タンパク質(Gly m 4)の検出	27
実施例 2 TMB 溶液の定量性	27
ペルオキシダーゼ染色 DAB キット(Brown stain) / エンハンサー	
実験プロトコール	28
実施例 ドットプロットによる DAB 染色液の性能比較	28
ペルオキシダーゼ染色キット	
実験プロトコール	29
実施例 ペルオキシダーゼ染色キットによる HSP90 α の検出	29
BCIP-NBT 溶液キット	
実験プロトコール	30
実施例 1 BCIP-NBT 溶液キットによる GAPDH の検出	30
実施例 2 ドットブロッティングによる感度比較	30

ストリッピング..... 31

従来法と弊社製品の比較	31
WB Stripping Solution と WB Stripping Solution Strong の比較	31
WB Stripping Solution	31
実験プロトコール	31
実施例 WB Stripping Solution 使用例	32
WB Stripping Solution Strong	32
実験プロトコール	32
実施例 WB Stripping Solution Strong 使用例	32

トラブルシューティング..... 33

バンドが出ない	34
バンドが薄い	34
複数のバンドが出る	36
バンドが拡散する・白抜けする	37
バックグラウンドが高い	37
まばらなシミが検出される	39
一部分が検出されない	39

Appendix..... 40

洗浄液について	40
緩衝液の調製方法	41
化学発光検出用マーカー Chemi-Lumi One Markers Kit	43
実験プロトコール	43
実施例	43
RIPA Buffer	44
RIPA Buffer の製品比較	44
実施例 1 RIPA Buffer を用いて抽出した細胞懸濁液のウェスタンブロッティング	44
実施例 2 RIPA Buffer(10x) を用いて抽出したタンパク質溶液のウェスタンブロッティング	45
実施例 3 RIPA Buffer(10x) を用いて抽出したタンパク質溶液の免疫沈降	45
Dispotray	46
Dispotray の製品比較	46
Dispotray-S	
使用例 ミニゲルのウェスタンブロッティング	46
使用方法	46

試薬一覧..... 別紙

ウェスタンブロッティングとは

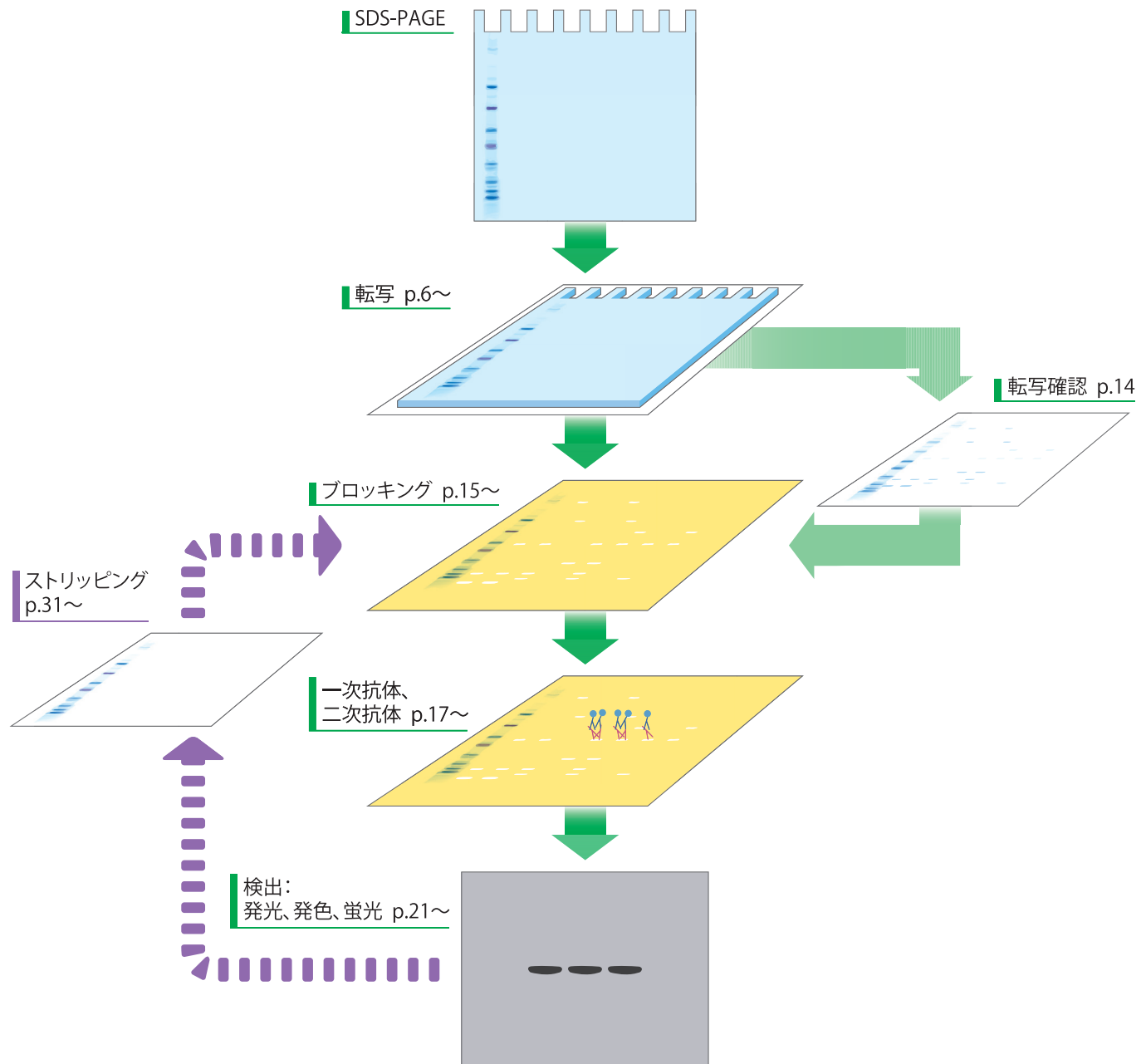
ウェスタンブロッティングは複数のタンパク質を含むサンプルを電気泳動により分離した後、ニトロセルロースメンブレンやPVDFメンブレンに転写し、メンブレンに吸着したタンパク質を、特異的な抗体を使って免疫反応させることにより、目的のタンパク質がサンプルに含まれているかどうかを確認する方法です。ブロッティングの手法は Edwin Mellor Southern が考案し、その名前に由来する DNA 検出法のサザンブロッティング(南)に始まり、その後、開発された RNA 検出法のノーザンブロッティング(北)の流れから、タンパク質検出法である本手法は、ウェスタンブロッティング(西)と名づけられています。

ウェスタンブロッティングの流れ

ウェスタンブロッティングの操作は、おおまかに以下の実験の流れとなります。

- ① ゲルからメンブレンへの転写
- ② メンブレンのブロッキング
- ③ 抗体反応
- ④ 検出

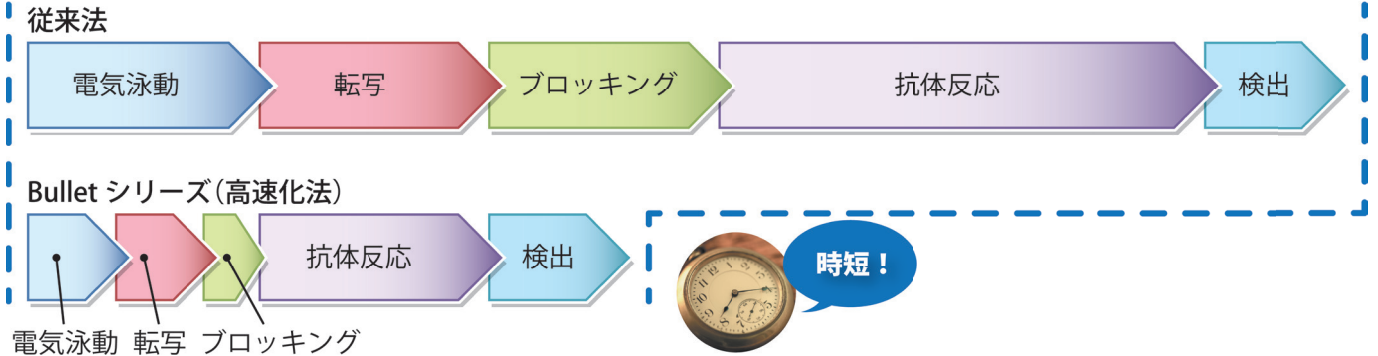
各操作段階でさまざまな手法が存在し、ベストな結果を得るためには適切な方法や試薬の選択、注意点などがあります。本冊子では、実験の流れに従い実験手法の相違点や操作上の注意点などを中心に紹介します。



ウェスタンブロッティングとは

Bullet シリーズによる高速化ウェスタンブロッティング

弊社では電気泳動、転写、ブロッキング、抗体反応の操作を高速化する Bullet シリーズを用意しています。これらを組み合わせることで、電気泳動からウェスタンブロッティングの高速化を実現します。本冊子では、従来法と併せて、高速化法についても紹介します。



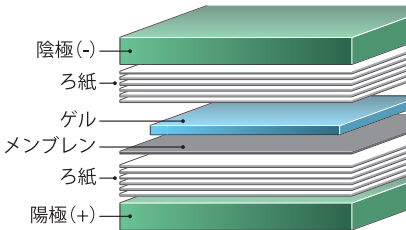
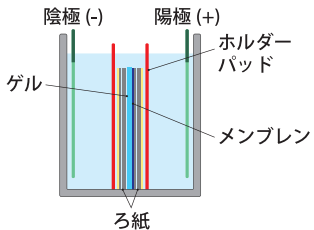
	Bullet シリーズ(高速化法)			従来法		
プロット像						
サンプル	HeLa 細胞タンパク質抽出液 5 μg より 2 倍希釈系列					
電気泳動	Bullet PAGE One Precast Gel, 5-15%, 17wells	400 V	10 分	Laemmli 法組成ゲル 10%, 18 wells	200 V	60 分
転写	Bullet Semi-dry Transfer One	25 V	10 分	セミドライウェスタンブロッティング用転写緩衝液	10 V	45 分
ブロッキング	Bullet Blocking One		5 分	5% スキムミルク		60 分
一次抗体反応 GAPDH Antibody (Novus #NB300-322) 10,000 倍希釈	Bullet ImmunoReaction Buffer で抗体を希釈		30 分	0.1%-tTBS で抗体を希釈		60 分
二次抗体反応 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody [HRP] (Pre-adsorbed) (Novus #NB7187) 200,000 倍希釈	Bullet ImmunoReaction Buffer で抗体を希釈		30 分	0.1%-tTBS で抗体を希釈		60 分
検出	Chemi-Lumi One Super / LAS-3000 (High モード) 露光時間 5 分					
所要時間合計 (洗浄時間を含む)	約 2 時間			約 5 時間 30 分		

転写

電気泳動後のタンパク質を電氣的にゲルからメンブレンに移す操作を転写(ブロッティング)といいます。実験プロトコールとして、セミドライ式の従来法および Bullet Semi-dry Transfer One を使用した高速化法、またタンク式従来法を紹介します。

ブロッティング方式の比較

転写にはセミドライ式およびタンク式の2種類があります。

	セミドライ式ブロッティング	タンク式ブロッティング
使用する転写緩衝液量	少ない(50 ~ 100 mL 程度)	多い(1 L 程度)
転写時間	短時間(2 時間以内)	長時間(1 時間〜一晩)
転写効率	高分子量タンパク質と低分子量タンパク質で転写効率に差が生じる	比較的均一な転写が期待できる
転写イメージ図		

ブロッティングメンブレンの比較

ブロッティングメンブレンとして、下記2種類があります。

また、メンブレンのポアサイズは一般的に 0.45 μm と 0.2 μm のものがあります。0.45 μm ポアサイズが主に利用されていますが、15 kDa 以下の低分子量のタンパク質の場合は、0.2 μm のポアサイズの方が有効だといわれています。

	PVDF (Polyvinylidene Difluoride) メンブレン	ニトロセルロースメンブレン
性質	疎水性 ※使用前にアルコールによる親水化処理が必要	親水性 ※使用前の親水化処理不要
強度	強い	弱い(ちぎれやすい)
タンパク質保持力	250 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 程度	100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 程度

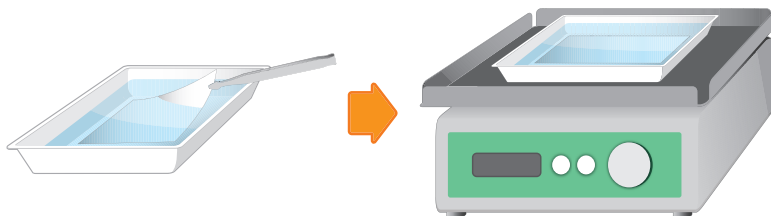
セミドライ式・従来法

実験プロトコール

1. メンブレンの準備(トレイ 1)

PVDF メンブレンの場合

- ① 清潔なトレイ (Dispotray など) に 100%メタノール(またはエタノール) 約 50 mL を注ぎ込み、PVDF メンブレンの端から順次液中に浸み込ませる要領で浸し、約 1 分振とうします。



- ② 約 1 分振とう後アルコールを完全に捨て、セミドライウェスタンブロッティング用転写緩衝液約 50 mL を注ぎ込み、10 ~ 20 分振とうさせて PVDF メンブレンを緩衝液で平衡化させます。

ニトロセルロースメンブレンの場合

トレイにセミドライウェスタンブロッティング用転写緩衝液約 50 mL を注ぎ込み、ニトロセルロースメンブレンの端から順次液中に浸み込ませる要領で浸し、10 ~ 20 分振とうさせて平衡化させます(ニトロセルロースメンブレンはアルコールに浸す必要はありません)。

▶ メンブレンを切るときは、手のタンパク質がつかないように、手袋を着用して行います。

▶ Dispotray → p.46 参照

セミドライ ウェスタン
ブロッティング用転写緩衝液
(#30650-31)

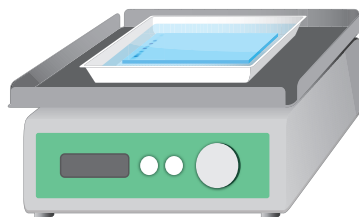


Nacalai オンラインカタログへ

転写

2. ポリアクリルアミドゲルの準備(トレイ 2)

トレイ 1 とは別に、清潔なトレイを準備します。セミドライウェスタンブロッティング用転写緩衝液約 50 mL を注ぎ込み、電気泳動したポリアクリルアミドゲルを浸して、10～20分振とうさせてゲルを緩衝液で平衡化させます。

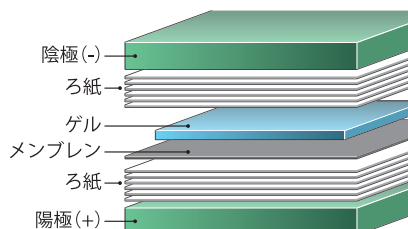


3. 電極板へのセット

- ① メンブレンと同じ大きさに切ったろ紙(例: Whatman 3MM Chr) 12 枚を準備します。

Whatman は Whatman International Ltd. の登録商標です。

- ② トレイ 1、2 とは別に、清潔なトレイを準備します(トレイ 3)。セミドライウェスタンブロッティング用転写緩衝液約 50 mL を注ぎ込みます。
- ③ ろ紙を 1 枚ずつトレイ 3 の転写緩衝液に浸し、トレイ壁で余分な液を拭いて電極板(陽極)上にろ紙端から順次密着させる要領で置いていきます。後の 5 枚も同様の操作を繰り返します(合計 6 枚のろ紙を重ねます)。
- ④ メンブレンをろ紙同様の要領でろ紙上に重ねます。続いて、アクリルアミドゲルをメンブレン上に重ねます。
- ⑤ 残りのろ紙も、同じ要領でゲルの上に重ねていきます。
- ⑥ 電極板を取り付け(このとき、ろ紙、メンブレン、ゲルは下記図のようにセットされています)、電源とブロッティング装置を結線し、定電圧 10 V で 40 分～1 時間通電します。



4. メンブレンの洗浄

- ① 転写終了後、電源とブロッティング装置の結線を取り除き、電極板(陰極)側から順次剥がす要領でろ紙を取り除きます。
- ② メンブレンを tTBS に浸し、シェーカーで 5 分振とうします。この操作をもう一度行います。

▶ ろ紙を切るときは、手のタンパク質がつかないように、手袋を着用して行います。

▶ 転写に使用するろ紙の枚数はろ紙の厚みにより異なります。予備実験により最適条件の設定を行ってください。

▶ ろ紙、メンブレン、ゲルを重ねるとき、気泡が入らないように注意してゆっくり重ねてください。気泡が入った部分は転写されなくなります(p.39 参照)。

▶ 最適な通電時間は、装置の種類、ろ紙の種類・枚数、ゲルやメンブレン、目的タンパク質の特性に応じて変更する必要があります。予備実験により最適条件の設定を行ってください。

▶ 電極でろ紙、メンブレン、ゲルをはさみ、その後、電線をつなぐタイプの装置の場合、ゲルからメンブレンにタンパク質が移るように、プラスマイナスを間違えないようにします。逆につないでしまうと、ゲルからろ紙にタンパク質が転写されます。

▶ 転写の確認には、SDS-PAGE を行う際に、Protein Ladder One, Triple-color (#09547-74) などの Pre-stained Marker を使用すると便利です。その他にも、サンプルの転写の確認は、メンブレンの CBB 染色で行うこともできます(p.14 参照)。

▶ 洗浄液(tTBS など) → p.40 参照

転写

実施例 転写条件

Bullet PAGE One および Extra PAGE One にて電気泳動後、セミドライ式ブロッキングを従来法にて行いました。下記に転写例を示します。ゲルやメンブレン、目的タンパク質の分子量・特性に合わせて、転写緩衝液組成・通電条件を変更する必要があります。

ゲル	Bullet PAGE One 5-15% (#13080-44)	
転写緩衝液	セミドライ ウェスタンブロッティング用転写緩衝液 (#30650-31) ¹	Towbin 法組成 ² 20% メタノール、192 mM グリシン、 25 mM Tris HCl pH 8.3
転写条件	10 V (定電圧)、45 分	
転写後染色像		

ゲル	Extra PAGE One 5-20% (#13064-64)	
転写緩衝液	セミドライ ウェスタンブロッティング用転写緩衝液 (#30650-31) ¹	Towbin 法組成 ² 20% メタノール、192 mM グリシン、 25 mM Tris HCl pH 8.3
転写条件	10 V (定電圧)、45 分	
転写後染色像		

<実験条件>

電気泳動ゲル：表内を参照

サンプル：① HeLa 細胞抽出液 2.5 μg/レーン

②~⑤ タンパク質マーカー (10 倍濃縮) (#29458-24) を② 3 ×、③ 1 ×、④ 1/3、⑤ 1/10 に調製し、各 2 μL/レーン添加

メンブレン：PVDF

転写：セミドライ式ブロッキング 転写条件は表内を参照

染色：CBB Stain One (#04543)

1. Bjerrum, O.J.; Schafer-Nielsen, C. Analytical Electrophoresis. M. J. Dunn, ed. Weinheim, Verlag Chemie, 1986, p. 315.

2. Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979, vol. 76, p. 4350-4354.

転写

セミドライ式・高速化法 Bullet Semi-dry Transfer One

Bullet Semi-dry Transfer One は、セミドライ式ブロッティング用の転写緩衝液です。Bullet PAGE One Precast Gel からウェスタンブロッティングを行う際に、転写緩衝液として使用するだけで、高速で転写が完了できます。
※本製品は Bullet PAGE One Precast Gel 用の転写緩衝液です。他のゲルへの使用については予備検討を行ってください。

実験プロトコール

1. メンブレンの準備(トレイ 1)

清潔なトレイ(Dispotray など)にメタノール(またはエタノール)約 50 mL を注ぎ込み、PVDF メンブレンの端から順次液中に浸み込ませる要領で浸します。約 1 分振とう後、アルコールを完全に捨て、精製水で洗浄します。

※ニトロセルロースの場合は、精製水に浸しておきます(アルコールによる前処理は必要ありません)。

2. 電極板へのセット

① メンブレンと同じ大きさに切ったろ紙(例: Whatman 3MM Chr) 12 枚を準備します。

Whatman は Whatman International Ltd. の登録商標です。

② トレイ 1 とは別に、清潔なトレイを準備します(トレイ 2)。Bullet Semi-dry Transfer One 約 40 ~ 50 mL を注ぎ込みます。

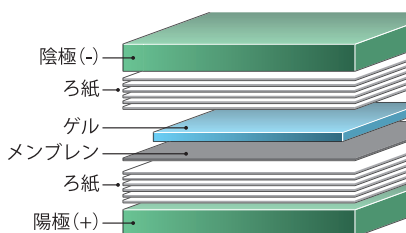
③ ろ紙を 1 枚ずつトレイ 2 の転写緩衝液に浸し、トレイ壁で余分な液を拭いて電極版(陽極)上にろ紙端から順次密着させる要領で置いていきます。後の 5 枚も同様の操作を繰り返します(合計 6 枚のろ紙を重ねます)。

④ メンブレンをろ紙同様の要領でろ紙上に置きます。

⑤ 泳動後のゲルを精製水で 10 秒程度(10 ~ 20 秒)洗浄し、メンブレンの上に重ねます。

⑥ 残りのろ紙も、同じ要領でゲルの上に重ねていきます。

⑦ 電極板(陰極)を取り付け(このとき、メンブレン、ゲルは下図のようにセットされています)、電源とブロッティング装置を結線し、25 V の定電圧で 10 分通電します。



<転写時の電圧と最大電流値>

電圧	転写時間	最大電流値(開始時)
25 V	10 分	約 20 mA/cm ² 約 1.2 A (Bullet PAGE One Precast Gel 1 枚あたり)
10 V	10 ~ 30 分	約 5.5 mA/cm ² 約 330 mA (Bullet PAGE One Precast Gel 1 枚あたり)

※10 V(定電圧)で使用する場合、25 V で 10 分と同等の転写を得るには、30 分転写を行ってください。

3. メンブレンの洗浄

① 転写終了後、電源とブロッティング装置の結線を取り除き、電極板(陰極)側から順次剥がす要領でろ紙を取り除きます。

② メンブレンを tTBS に浸し、シェーカーで 5 分振とうします。この操作をもう一度行います。

Bullet Semi-dry Transfer One
(#15353-01)



Nacalai オンラインカタログへ

▶ Dispotray → p.46 参照

▶ Bullet Semi-dry Transfer One の場合、ゲルやメンブレンの平衡化は不要です。

▶ 転写に使用するろ紙の枚数は、ろ紙の厚みによって異なります。転写時のろ紙層が薄いと本製品の浸潤量が少なく、十分な性能が得られません。また転写時の電流値が上がり、パワーサプライによっては電流が制限されて、十分な転写効率を得られないことがあります。
参考)Whatman 3MM Chr 12 枚分の厚み: 約 4 mm

▶ 転写前に本製品によるゲルの平衡化は、転写効率を低下させるので行わないでください。

▶ 本製品は、低電圧においても高電流での転写が行われるため、高電流を出力できないパワーサプライでは電流が制限され、十分に転写が行われないことがあります。パワーサプライの使用可能な最大電流値を確認の上、ご使用ください。転写時の電流値が低い場合は、転写時間を延ばすと改善されることがあります。

▶ 転写後、陽極側のろ紙が黄色に着色しますが、発熱による焦げなどではありません。またメンブレンへの着色や転写効率の低下、検出などには影響しません。

▶ 洗浄液(tTBS など) → p.40 参照

転写

実施例 転写条件

25 V(定電圧)の場合、10分で転写可能です。10 V(定電圧)で使用する場合、25 Vで10分と同等の転写を得るには、30分転写を行ってください。

電圧	25 V																
電流 (転写開始時)	約 1.2 A (Bullet PAGE One Precast Gel 1 枚あたり)																
転写時間	5 分					10 分											
転写後染色像	M.W. (kDa)	①	②	③	④	⑤	M.W. (kDa)	①	②	③	④	⑤					
	200→						200→										
	45→						45→										
	22→						22→										

電圧	10 V																	
電流 (転写開始時)	約 330 mA (Bullet PAGE One Precast Gel 1 枚あたり)																	
転写時間	10 分					20 分					30 分							
転写後染色像	M.W. (kDa)	①	②	③	④	⑤	M.W. (kDa)	①	②	③	④	⑤	M.W. (kDa)	①	②	③	④	⑤
	200→						200→						200→					
	45→						45→						45→					
	22→						22→						22→					

<実験条件>

電気泳動ゲル：Bullet PAGE One Precast Gel, 5-15% (#13079-84)

サンプル：① Protein Ladder One (#09547-74) 5 μL/レーン

②~⑤ タンパク質マーカー (10 倍濃縮) (#29458-24) を② 3 ×、③ 1 ×、④ 1/3、⑤ 1/10 に調製し、各 2 μL/レーン添加

メンブレン：PVDF

転写：セミドライ式プロットイング 転写条件は表内を参照

染色：CBB Stain One (#04543)

転写

タンク式・従来法

実験プロトコール

1. 転写緩衝液の準備(ここでは Towbin 法組成¹ を紹介しています)

トリス - グリシン緩衝液 (10 倍濃縮)(pH 8.3)、メタノール、精製水を 1:2:7 容量の割合で混合し、あらかじめ冷やしておきます。

※Towbin 法組成：25 mM Tris HCl、192 mM グリシン、20% メタノール pH 8.3

2. メンブレンの準備(トレイ 1)

清潔なトレイ (Dispotray など) にメタノール(またはエタノール)約 50 mL を注ぎ込み、PVDF メンブレンの端から順次液中に浸み込ませる要領で浸します。約 1 分振とう後、アルコールを完全に捨て、転写緩衝液に浸しておきます。

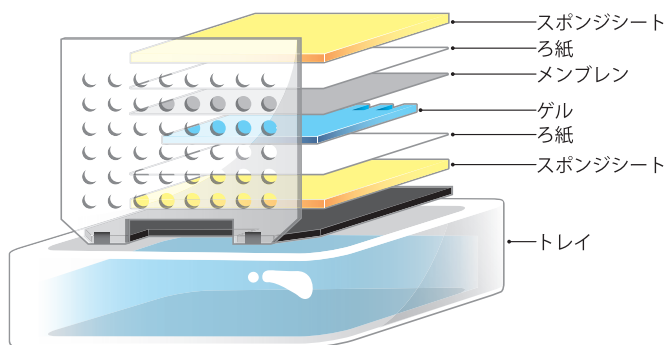
※ニトロセルロースの場合は、アルコールによる前処理は必要ありません。

3. ポリアクリルアミドゲルの準備(トレイ 2)

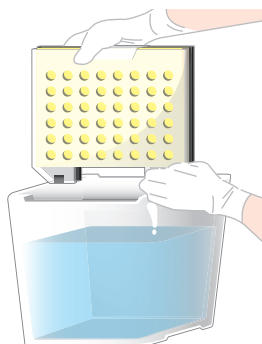
トレイ 1 とは別に、トレイを準備します、転写緩衝液約 50 mL を注ぎ込み、電気泳動したポリアクリルアミドゲルを浸して、10 ~ 20 分振とうさせてゲルを緩衝液で平衡化させます。

4. タンクへのセッティング

- ① タンクに転写緩衝液を注いでおきます。
- ② ゲルより一回り大きく切ったろ紙(例：バイオ・ラッド ラボラトリーズ Thick Blot Filter Paper)を 2 枚準備します。
- ③ サンドイッチ板が入る大きさのトレイに転写緩衝液を注ぎ、サンドイッチ板の黒い面が下になるように置きます。
- ④ サンドイッチ板(黒い面)の上にスポンジシートを置き、ろ紙 1 枚を重ねます。
- ⑤ ゲルをろ紙の上に置き、さらにメンブレンをゲルの上に重ねます。
- ⑥ ゲルの上に残りのろ紙、スポンジシートを重ねます。



- ⑦ サンドイッチ板を閉じ、緩衝液を注いでおいたタンクに移し替えます。



- ⑧ 定電圧 30 ~ 100 V で 30 分 ~ 一晩通電させます。

5. メンブレンの洗浄

転写終了後、サンドイッチ板よりメンブレンを取り出します。tTBS に浸し、シェーカーで 5 分振とうします。この操作をもう一度行います。

1. Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979, vol. 76, p. 4350-4354.

▶ 転写緩衝液はゲルやメンブレン、目的タンパク質の特性に応じて変更する必要があります。特にメタノール濃度、SDS 添加の至適化は重要です。メタノールは、メンブレンとタンパク質の結合を促進しますが、一方でゲルの収縮・タンパク質の沈殿を引き起こします。また、SDS 添加はゲルからのタンパク質溶出を促進しますが、一方でメンブレンへの結合阻害(特にニトロセルロースメンブレンの場合)を引き起こします。予備実験により最適条件の設定を行ってください。

トリス - グリシン緩衝液
(10 倍濃縮)(pH 8.3)
(#09422-81)



Nacalai オンラインカタログへ

▶ Dispotray → p.46 参照

▶ 転写に使用するろ紙の枚数はろ紙の厚みにより異なります。必要に応じてろ紙の枚数を増やしてください。

▶ ろ紙、メンブレン、ゲルを重ねるとき、気泡が入らないように注意してゆっくり重ねてください。気泡が入った部分は転写されなくなります(p.39 参照)。

▶ ゲルからメンブレンにタンパク質が移るように、プラスマイナスを間違えないようにします。逆につないでしまうと、ゲルからろ紙にタンパク質が転写されます。

▶ 最適な通電条件は、装置の種類、ゲルやメンブレン、目的タンパク質の特性に応じて変更する必要があります。予備実験により最適条件の設定を行ってください。

▶ 洗浄液(tTBS など) → p.40 参照

転写

実施例 1 転写条件

Bullet PAGE One および Extra PAGE One にて電気泳動後、タンク式ブロッキングを行いました。下記に転写例を示します。ゲルやメンブレン、目的タンパク質の分子量・特性に合わせて、転写緩衝液組成・通電条件を変更する必要があります。

ゲル	Bullet PAGE One 5-15% (#13080-44)	Bullet PAGE One 8% (#13084-04)
転写緩衝液	20% メタノール、192 mM グリシン、25 mM Tris HCl pH 8.3	
転写条件	100 V(定電圧)、60分	
転写後染色像		
ゲル	Extra PAGE One 5-20% (#13064-64)	Extra PAGE One 15% (#13076-14)
転写緩衝液	20% メタノール、192 mM グリシン、25 mM Tris HCl pH 8.3	
転写条件	100 V(定電圧)、60分	
転写後染色像		

<実験条件>

電気泳動ゲル：表内を参照

サンプル：① HeLa 細胞抽出液 2.5μg/レーン

②～⑤ タンパク質マーカー (10 倍濃縮) (#29458-24) を② 3 ×、③ 1 ×、④ 1/3、⑤ 1/10 に調製し、各 2 μL/レーン添加

メンブレン：PVDF

転写：タンク式ブロッキング (転写装置) Mini Trans-Blot® cell (バイオ・ラッド ラボラトリーズ)

転写条件は表内を参照

染色：CBB Stain One (#04543)

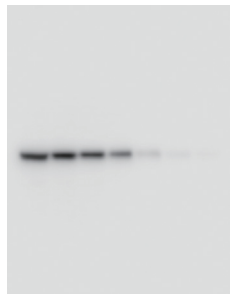
Mini Trans-Blot® は Bio-Rad Laboratories, Inc. の登録商標です。

転写

実施例2 タンク式ブロッキングによるウェスタンブロッキング検出例

Bullet PAGE One を用いて電気泳動後、タンク式ブロッキングを行いました。その後、Bullet Blocking One および、Bullet ImmunoReaction Buffer を用いて β -Actin の検出を行いました。

Bullet PAGE One 泳動後のゲルは、タンク式ブロッキングにも問題なく使用可能であることが示されました。



<実験条件>

- サンプル : HeLa 細胞タンパク質抽出液 10 μ g より 2 倍希釈系列
- SDS-PAGE : (泳動ゲル) Bullet PAGE One 5-15%, 17wells (#13080-44)
(泳動用緩衝液) 泳動用緩衝液 (10 倍濃縮, SDS-PAGE 用, トリス-グリシン系) (#30329) を精製水にて 10 倍希釈して使用
(泳動条件) 400 V、10 分
- 転写 : タンク式ブロッキング
(転写装置) Mini Trans-Blot® cell (バイオ・ラッド ラボラトリーズ)
(転写緩衝液) 組成: 25 mM Tris HCl、192 mM グリシン、20% メタノール
(転写条件) 100 V、60 分
- ブロッキング : Bullet Blocking One for Western Blotting (#13779) 室温 5 分
- 一次抗体 : β -Actin 抗体(C4) (Santa Cruz #sc-47778) 2,000 倍希釈
Bullet ImmunoReaction Buffer (#18439-85) を用いて希釈 室温 30 分
- 二次抗体 : Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody [HRP] (Pre-adsorbed) (Novus #NB7574)
40,000 倍希釈 Bullet ImmunoReaction Buffer (#18439-85) を用いて希釈 室温 30 分
- 検出 : Chemi-Lumi One Super (#02230) 反応時間 1 分
C-DiGit 化学発光スキャナー (LI-COR) 高感度モードにて検出
Mini Trans-Blot® は Bio-Rad Laboratories, Inc.、LI-COR、C-DiGit は LI-COR, Inc. の登録商標です。

データご提供: 京都薬科大学 統合薬科学系 高田 和幸 教授 / 西村 周泰 助教

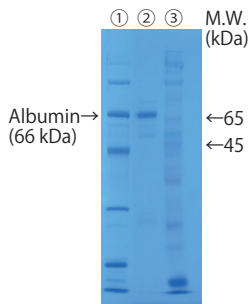
転写

転写確認

ボンソー S や CBB を用いて転写後のメンブレンを染色し、転写効率などを確認することができます。ここでは、CBB Stain One を用いた転写確認方法を紹介いたします。転写確認後は、Rapid CBB Destain Kit を使用して脱色し、引き続きウェスタンブロットティングを行うことが可能です。

実験プロトコール CBB Stain One を用いたメンブレンの染色方法

1. メンブレンの染色と染色像の確認



- ① 清潔なトレイ (Dispotray など) に CBB Stain One を注ぎ、タンパク質を転写したメンブレンを約 15 分浸します。
- ② 染色したメンブレンは精製水で約 5 分×2 回洗浄します。

<実験条件>

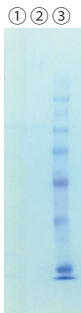
SDS-PAGE : 12% ゲル

サンプル : ① タンパク質マーカー (10倍濃縮) (#29458-24)

② ヒト血清

③ Pre-stained Protein Markers(Broad Range) (#02525-35)

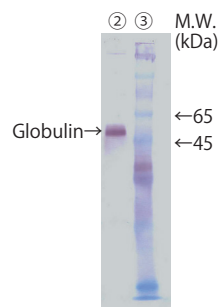
2. メンブレンの完全脱色



- ① トレイに Rapid CBB Destain Kit の A 液 20 容量、B 液 10 容量、および精製水 30 容量を注ぎ込んで混合します。約 10 cm × 10 cm のメンブレンに適用する場合、CBB 脱色液 50 mL 程度が適量です。

- ② CBB 染色したメンブレンをトレイの脱色液に浸して振とうします。通常 5 分程度で完全に脱色できます。

3. 影響の検証



脱色後のメンブレンを使用し、一次抗体とペルオキシダーゼ標識抗体を反応させた後、目的とするタンパク質を検出しました。左図の結果から、CBB Stain One および Rapid CBB Destain Kit の使用により、抗原抗体反応に影響を与えずに目的のタンパク質を検出できました。

CBB Stain One(Ready To Use)
(#04543-51)



Nacal オンラインカタログへ

Rapid CBB Destain Kit
(#30046-74)



Nacal オンラインカタログへ

Dispotray-S
(#16526-82)



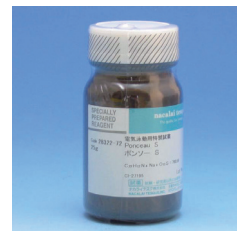
Nacal オンラインカタログへ

Dispotray-M (#16551-84)

Nacal オンラインカタログへ

▶ Dispotray → p.46 参照

ボンソー S
(#28322-72)



Nacal オンラインカタログへ

ブロッキング

タンパク質をメンブレンに転写した後、抗体が非特異的に結合しないように、タンパク質が存在しない部分をあらかじめマスクする必要があり、この操作をブロッキングといいます。不十分なブロッキングは、高いバックグラウンドの原因となります。

本項目では、Blocking One、Blocking One-P を使用した方法および、Bullet Blocking One を使用した高速化法を紹介します。

代表的なブロッキング剤の比較

ブロッキング剤には BSA ベースのものや、ミルク(カゼイン)ベースのもの、魚由来のもの、タンパク質以外の高分子由来のものなどがあり、サンプルの由来や検出タンパク質の特性などを考慮して検討します。以下に主なブロッキング剤を記載します。

				リン酸化タンパク質検出に最適	
製品名	スキムミルク	Blocking One	Bullet Blocking One	BSA ウシ血清アルブミン (グロブリンフリー)	Blocking One-P
製品番号	#31149-75	#03953	#13779	#01281	#05999-84
製品 イメージ					
特徴	1～5% スキムミルク / tTBS で使用される。保存ができないため、用時調製が必要。	合成高分子化合物ベースのブロッキング剤で、迅速かつ効果的なブロッキングが可能。 Ready to use.	Blocking One を改変した製品で、両親媒性化合物の効果によりわずか5分でブロッキングが可能。 Ready to use.	1～5%BSA / tTBS で使用される。保存ができないため、用時調製が必要。	Blocking One のリン酸化タンパク質検出用の製品で、カゼインフリー、内因性ホスファターゼが含まれていないことを保証。 Ready to use.
ブロッキング時間	1 時間程度	30 分	5 分	1 時間程度	20 分
参照資料	—	BULLETIN L-95	BULLETIN L-137	—	BULLETIN L-95

Blocking One / Blocking One-P

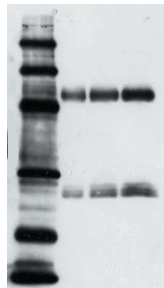
実験プロトコール

- 清潔なトレイ (Dispotray など) に、Blocking One (原液) もしくは Blocking One-P (原液) をメンブレンが浸る程度に注ぎます。
- 室温で Blocking One は 30 分、Blocking One-P は 20 分シェーカーで振とうします。
- tTBS でメンブレンをリンスします。

実施例 1 Blocking One を使用したウェスタンブロッティング

Mouse 血清からの IgG の検出を行いました。バックグラウンドを上げることなく、検出ができています。

① ② ③ ④ <実験条件>



サンプル: ① Chemi-Lumi One Markers 5 μ L
 ② Mouse 血清 1,000 倍希釈 2.5 μ L
 ③ Mouse 血清 1,000 倍希釈 5 μ L
 ④ Mouse 血清 1,000 倍希釈 10 μ L

Blocking One
(#03953-95)

 Nacal オンラインカタログへ

Blocking One-P
(#05999-84)

 Nacal オンラインカタログへ

- ▶ Dispotray → p.46 参照
- ▶ 洗浄液 (tTBS など) → p.40 参照
- ▶ Chemi-Lumi One Markers Kit → p.43 参照

ブロッキング

実施例 2 Blocking One-P を使用したウェスタンブロッティング

HeLa 細胞懸濁液からのリン酸化タンパク質の検出を行いました。バックグラウンドを上げることなく、検出ができています。

- ① ② <実験条件>
サンプル：HeLa 細胞 1.0×10^7 個 + 1 × に調製した RIPA Buffer(10x) (#08714-04) (1 mL)
① 5 μ L、② 10 μ L
一次抗体：p-Tyr抗体 (PY20) (Santa Cruz #sc-508) 2,000 倍希釈
二次抗体：goat-anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz #sc-2005) 10,000 倍希釈
検出：Chemi-Lumi One L (#07880)



高速化法 Bullet Blocking One

実験プロトコール

- 清潔なトレイ (Dispotray など) に、Bullet Blocking One (原液) をメンブレンが浸る程度に注ぎます (10 cm × 10 cm 程度のメンブレンをブロッキングする場合は、本製品 50 mL を使用してください)。
- 室温、5 分シェーカーで振とうします。
- tTBS でリンスします。

実施例 Bullet Blocking One と Blocking One およびスキムミルクのブロッキング効果

超高感度検出試薬 Chemi-Lumi One Ultra を使用し、ウェスタンブロッティングを実施しました。Bullet Blocking One は、わずか 5 分のブロッキング時間で、他の方法と同等の効果を示しました。

ブロッキング剤 ブロッキング時間	Bullet Blocking One 5 分	Blocking One 30 分	5% スキムミルク 60 分
ブロッティング像			

- <実験条件>
サンプル：HeLa 細胞タンパク質抽出液 20 μ g より 2 倍希釈系列
SDS-PAGE：Bullet PAGE One 5-15% (#13080-44) / 泳動用緩衝液 (#30329) 400 V、10 分
転写：セミドライウェスタンブロッティング用転写緩衝液 (#30650-31) 10 V、30 分
洗浄：0.1%-tTBS (#12750-81) を 10 倍希釈で使用
ブロッキング：各ブロッキング剤で各時間ブロッキング
一次抗体：Vimentin 抗体 (C-20)-R (Santa Cruz #sc-7557-R) 2,000 倍希釈 室温 1 時間
二次抗体：goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz #sc-2004) 100,000 倍希釈 室温 1 時間
検出：Chemi-Lumi One Ultra (#11644) 反応時間 5 分
LAS-3000 (High モード) 露光時間 15 分

Bullet Blocking One
for Western Blotting
(#13779-01)



Nacalai オンラインカタログへ

▶ ブロッキング時間の延長は推奨しません。長時間のブロッキングによりシグナル強度が低下する場合があります。

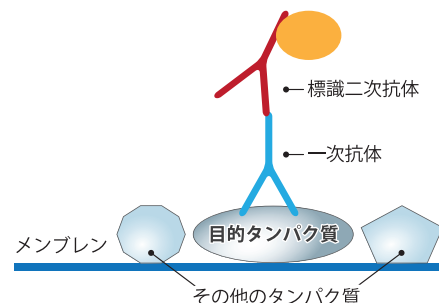
▶ Dispotray → p.46 参照

▶ 洗浄液 (tTBS など) → p.40 参照

抗体反応

目的タンパク質に特異的に反応する抗体を一次抗体として、一次抗体を抗原とする抗体を二次抗体として反応させます。二次抗体は HRP (ホースラディッシュペルオキシダーゼ) や AP (アルカリホスファターゼ) で標識されており、検出工程ではこれら酵素を利用して検出します。

本項目では従来法、シグナル増強剤 HIKARI を使用した高感度法、および Bullet ImmunoReaction Buffer を使用した高速化法を紹介します。



抗体希釈液の種類

	従来法	高感度法	高速化法
組成 (製品名)	・ tTBS などの洗浄液 ・ 上記にブロッキング剤を含有させたもの	シグナル増強剤 HIKARI	Bullet ImmunoReaction Buffer
製品イメージ	—		
特徴	・ 一般的な組成 ・ 非特異反応が出る場合にブロッキング剤を含有させることが多い	・ 抗原・抗体反応を促進し特異性と検出感度を向上	・ 抗体反応時間を約半分へ短縮
参照資料	—	BULLETIN L-108	BULLETIN L-146

抗体希釈倍率の目安

ご使用になる抗体の取扱説明書記載濃度 (希釈倍率)、およびご使用になる検出試薬 (下記表) を参考に抗体希釈倍率を決定してください。あらかじめ予備実験を行い、抗体希釈倍率を至適化することをお勧めします。

<使用検出試薬と抗体希釈倍率の目安>

	Chemi-Lumi One L	Chemi-Lumi One Super	Chemi-Lumi One Ultra
一次抗体希釈倍率の目安	1:1,000 ~ 1:5,000	1:1,000 ~ 1:20,000	1:5,000 ~ 1:100,000
二次抗体希釈倍率の目安	1:20,000 ~ 1:100,000	1:20,000 ~ 1:200,000	1:100,000 ~ 1:500,000

従来法

実験プロトコール

1. 一次抗体を tTBS、もしくはブロッキング剤含有 tTBS で希釈します。
2. ブロッキング後のメンブレンに一次抗体希釈液を注ぎ、室温 (一晩の場合は冷蔵) 30 分 ~ 一晩シェーカーで振とうします。
3. tTBS を用いてメンブレンを洗浄します (5 分 × 3 回)。
※二次抗体を使用しない場合は 7 に進んでください。
4. 二次抗体を tTBS、もしくはブロッキング剤含有 tTBS で希釈します。
5. 洗浄後のメンブレンに二次抗体希釈液を注ぎ、室温で 30 分 ~ 2 時間シェーカーで振とうします。
6. tTBS を用いてメンブレンを洗浄します (5 分 × 3 回)。
7. 検出操作に入ります。

▶ 予備実験により、抗体希釈倍率、抗体反応時間を最適化してください。

▶ 洗浄液 (tTBS など) → p.40 参照

抗体反応

実施例 Bullet Blocking One の抗体希釈液としての使用

Bullet Blocking One もしくは各ブロッキング剤でブロッキングをした後、さらに抗体希釈液として Bullet Blocking One もしくは各ブロッキング剤を使用し、ウェスタンブロットングを実施しました。

● Bullet Blocking One の抗体希釈液としての使用

非特異バンドが出現しやすい抗体を使用した場合(上段)、本製品の原液を抗体希釈液として使用すると効果的に非特異バンドが抑制されました。一方、非特異バンドが出にくい抗体を使用した場合(下段)、抗体希釈液に含有させた本製品によりオーバーブロッキングされ、感度が低下しました。

ブロットング像 抗体：COX4 (Goat Polyclonal Antibody)				
ブロットング像 抗体：β-Actin (Mouse Monoclonal Antibody)				
ブロッキング剤 ブロッキング時間	Bullet Blocking One 5分			
抗体希釈液	Bullet Blocking One 20倍希釈	Bullet Blocking One 5倍希釈	Bullet Blocking One 原液	0.1%-tTBS

● 各ブロッキング剤の使用条件から Bullet Blocking One への移行

5%スキムミルクの使用条件の場合では、本製品でブロッキング後、本製品の原液を抗体希釈液として使用すると同等の効果が得られました。一方で、Blocking One の使用条件の場合では、本製品でブロッキング後、本製品(20倍希釈)を抗体希釈液として使用すると同等の効果が得られました。

使用条件	5% スキムミルクからの移行例		Blocking One からの移行例	
ブロットング像 抗体：COX4 (Goat Polyclonal Antibody)		➡		➡
ブロットング像 抗体：β-Actin (Mouse Monoclonal Antibody)		➡		➡
ブロッキング剤 ブロッキング時間	5% スキムミルク 60分	➡ Bullet Blocking One 5分	Blocking One 30分	➡ Bullet Blocking One 5分
抗体希釈液	5% スキムミルク	➡ Bullet Blocking One 原液	Blocking One 20倍希釈	➡ Bullet Blocking One 20倍希釈

<実験条件>

サンプル : HeLa 細胞タンパク質抽出液 10 μg より 2 倍希釈系列
 SDS-PAGE : Bullet PAGE One 5-15% (#13080-44) / 泳動用緩衝液(#30329) 400 V、12分
 転写 : セミドライ ウェスタンブロットング用転写緩衝液(#30650-31) 10 V、30分
 洗浄 : 0.1%-tTBS(#12750-81) を 10 倍希釈で使用
 ブロッキング : 各ブロッキング剤 表中記載時間で反応
 一次抗体 : (上段) COX4 抗体(D-20) (Santa Cruz #sc-69359) 500 倍希釈 室温 1 時間
 (下段) β-Actin 抗体(C4) (Santa Cruz #sc-47778) 1,000 倍希釈 室温 1 時間
 二次抗体 : (上段) bovine anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz #sc-2350) 5,000 倍希釈 室温 1 時間
 (下段) goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz #sc-2005) 20,000 倍希釈 室温 1 時間
 検出 : Chemi-Lumi One Super (#02230) 反応時間 1 分
 LAS-3000 (High モード) 露光時間(上段)10分、(下段)5分

抗体反応

高感度法 シグナル増強剤 HIKARI

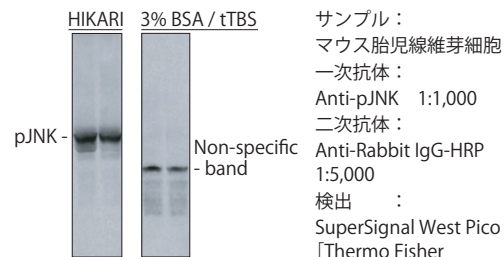
実験プロトコール

1. 一次抗体を A 液で希釈します (二次抗体を使用しない場合は、B 液を用いて希釈します)。
2. ブロッキング後のメンブレンに一次抗体希釈液を注ぎ、室温 (一晩の場合は冷蔵) 30 分〜一晩シェーカーで振とうします。
3. tTBS を用いてメンブレンを洗浄します (5 分×3 回)。
※二次抗体を使用しない場合は 7 に進んでください。
4. 二次抗体を B 液で希釈します。
5. 洗浄後のメンブレンに二次抗体希釈液を注ぎ、室温で 30 分〜2 時間シェーカーで振とうします。
6. tTBS を用いてメンブレンを洗浄します (5 分×3 回)。
7. 検出操作に入ります。

実施例 1 検出感度や特異性への影響

本製品を従来の tTBS や tPBS などの一次抗体および二次抗体の反応液 (希釈液) の代わりに使用するだけで、ウェスタンブロットティングにおける感度・特異性が向上します。

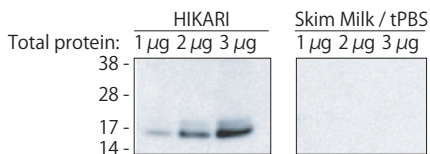
● 特異性と検出感度の向上



サンプル：マウス胎児線維芽細胞
一次抗体：Anti-pJNK 1:1,000
二次抗体：Anti-Rabbit IgG-HRP 1:5,000
検出：SuperSignal West Pico [Thermo Fisher Scientific (Pierce)]

SuperSignal は Pierce Biotechnology, Inc. の登録商標です。

● 検出感度の向上



サンプル：ラット初代皮質ニューロン
一次抗体：Anti-Rac1 1:1,000
二次抗体：Anti-Mouse IgG-HRP 1:2,500
検出：ECL (Cytiva)

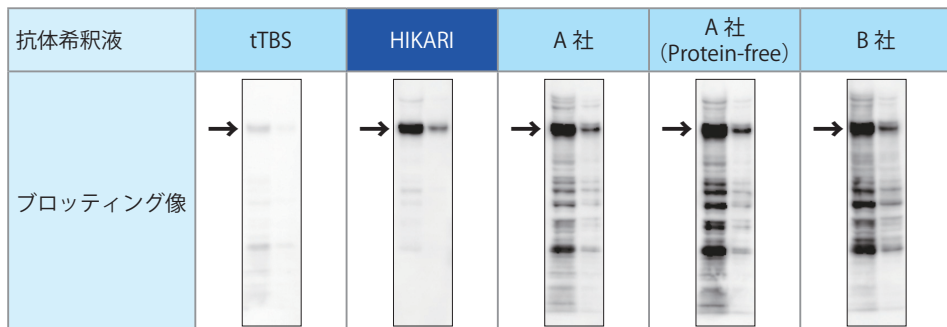
ECL は、Cytiva として事業を行う Global Life Sciences Solutions USA LLC およびその関連会社の商標です。

データご提供：Dr. S. Matsuzawa,
Signal Transduction, NCI Cancer
Center, Burnham Institute for
Medical Research

データご提供：Dr. K. Ishizuka,
Department of Psychiatry,
Johns Hopkins University
School of Medicine

実施例 2 シグナル増強剤 HIKARI の他社製品との性能比較

シグナル増強剤 HIKARI を用いて EGFR の検出を行いました。他社シグナル増強剤と比較し、シグナル増強剤 HIKARI は特異性の向上に優れた効果を示します。



<実験条件>

サンプル：HeLa 細胞タンパク質抽出液 (左) 10 μg、(右) 2 μg
ブロッキング：Bullet Blocking One for Western Blotting (#13779) 室温 5 分
一次抗体：EGF Receptor (D38B1) XP Rabbit mAb (CST #4267) 1,000 倍希釈 60 分
二次抗体：Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody [HRP] (Pre-adsorbed) (Novus #NB7187) 50,000 倍希釈 60 分
検出：Chemi-Lumi One Super (#02230) 反応時間 1 分
LAS-3000 (High モード) 露光時間 3 分



(#02267-41 50 mL)

Nacalai オンラインカタログへ

(#02270-81 250 mL)

Nacalai オンラインカタログへ

▶ 予備実験により、抗体希釈倍率、抗体反応時間を最適化してください。

▶ 洗浄液 (tTBS など) → p.40 参照

抗体反応

高速化法 Bullet ImmunoReaction Buffer

実験プロトコール

1. 一次抗体を Bullet ImmunoReaction Buffer で希釈します。
2. ブロッキング後のメンブレンに一次抗体希釈液を注ぎ、シェーカーで振とうし反応させます。
3. tTBS を用いてメンブレンを洗浄します (5分×3回)。
※二次抗体を使用しない場合は7に進んでください。
4. 二次抗体を Bullet ImmunoReaction Buffer で希釈します。
5. 洗浄後のメンブレンに二次抗体希釈液を注ぎ、シェーカーで振とうし反応させます。
6. tTBS を用いてメンブレンを洗浄します (5分×3回)。
7. 検出操作に入ります。

実施例1 抗体の反応時間と反応性

Bullet ImmunoReaction Buffer を抗体希釈液として用いてウェスタンブロッティングを実施しました。Bullet ImmunoReaction Buffer を使用することにより、0.1%-tTBS と比較し、反応時間を半分 (冷蔵で一晩反応させている場合は室温で 30 ~ 60 分) へ短縮可能でした。

一次抗体反応時間	15分	30分	60分	120分	一晩(冷蔵)
二次抗体反応時間	15分	30分	60分	120分	60分
Bullet ImmunoReaction Buffer					
0.1%-tTBS					

<実験条件>

サンプル : HeLa 細胞タンパク質抽出液 (左) 2 μg、(右) 0.4 μg
 ブロッキング : Bullet Blocking One for Western Blotting (#13779) 室温 5分
 一次抗体 : β-Actin 抗体 (C4) (Santa Cruz #sc-47778) 1,000 倍希釈
 各反応時間、室温にて反応 (一晩反応のみ、冷蔵にて反応)
 二次抗体 : Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody [HRP] (Pre-adsorbed) (Novus #NB7574)
 40,000 倍希釈 各反応時間、室温にて反応
 検出 : Chemi-Lumi One Super (#02230) / LAS-3000 (High モード) 露光時間 5分

実施例2 大豆アレルゲンタンパク質 (Gly m 4) の検出

本製品を用いて、大豆アレルゲンタンパク質 (Gly m 4) の検出を行いました。本製品を使用することにより、抗体反応時間を大幅に短縮できることが分かります。

プロテイング像	短時間プロトコール		通常プロトコール	
	(kDa)	(kDa)	(kDa)	(kDa)
抗体希釈液	本製品	5% スキムミルク	本製品	5% スキムミルク
一次抗体 : Anti Gly m 4 Rabbit Polyclonal Antibody (ST0225) (自家調製) 1,000 倍希釈	30分 (室温)		一晩 (冷蔵)	
二次抗体 : Stabilized Peroxidase conjugated Goat Anti-Rabbit (H+L) (Thermo Fisher Scientific) 400 倍希釈	30分 (室温)		60分 (室温)	

<実験条件>

サンプル : 無調整豆乳 (市販品) 20 倍希釈 検出 : ECL (Cytiva) / X 線フィルム
 ブロッキング : 5% スキムミルク 室温 60分 露光時間 短時間プロトコール 8分 / 通常プロトコール 1分
 ECL は、Cytiva として事業を行う Global Life Sciences Solutions USA LLC およびその関連会社の商標です。

データご提供 : 近畿大学 農学部 応用生命化学科 森山 達哉 教授 / 矢野 えりか 研究員

Bullet ImmunoReaction Buffer (#18439-85)



Nacal オンラインカタログへ

▶ Bullet ImmunoReaction Buffer は一次抗体および二次抗体、どちらの抗体希釈液としてもご使用いただけます。

▶ 抗体反応時間は従来の半分を目安にしてください。一次抗体反応を冷蔵で一晩行っている場合は、室温で 30 ~ 60 分を目安にしてください。

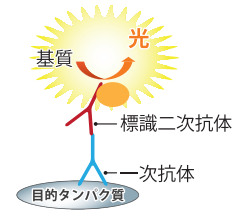
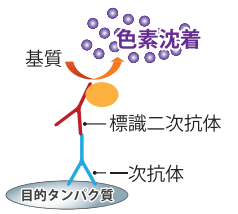
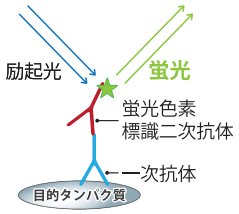
▶ ご使用の抗体・条件によっては、露光時間もしくは抗体濃度の変更が必要となる場合があります。製品取扱説明書に記載しています参考データをご参照ください。

▶ 洗浄液 (tTBS など) → p.40 参照

検出

ウェスタンブロッティングの検出法にはさまざまな方法がありますが、抗体に標識されている HRP (ホースラディッシュペルオキシダーゼ) や、AP (アルカリホスファターゼ) などの酵素と基質との反応により、発光や色素沈着を発生させ、検出させる方法が主流となっています。本項目では化学発光検出法および化学発色検出法の実験プロトコルを紹介します。




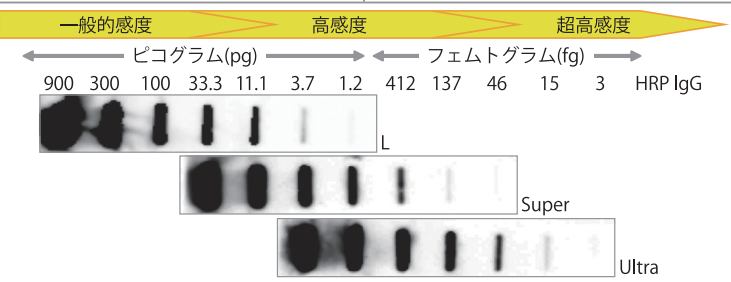
検出方法の種類

	化学発光検出法	化学発色検出法	蛍光検出法
検出イメージ			
長所	<ul style="list-style-type: none"> 検出試薬を選ぶことで、低感度から高感度まで幅広い感度域で検出可能 	<ul style="list-style-type: none"> 検出機器が不要で、目視で観察可能 	<ul style="list-style-type: none"> 定量性に優れている 同一メンブレンで複数のバンドを同時に検出可能 バンドがシャープであり、近接したバンドも検出可能
短所	<ul style="list-style-type: none"> 検出に CCD イメージャーや暗室が必要 	<ul style="list-style-type: none"> 他の2法と比べて感度が劣る ストリッピングを行っても、発色バンドが残る (抗体の除去は可能) 	<ul style="list-style-type: none"> 検出に蛍光スキャナーや蛍光検出機能搭載 CCD イメージャーが必要となる
製品群	HRP 用 : Chemi-Lumi One L Chemi-Lumi One Super Chemi-Lumi One Ultra	HRP 用 : TMB 溶液 ペルオキシダーゼ染色キット ペルオキシダーゼ染色 DAB キット AP 用 : BCIP-NBT 溶液キット	(CF Dye や Alexa など蛍光標識された抗体を使用)

化学発光検出法 Chemi-Lumi One シリーズ

弊社では化学発光検出キットとして、以下の3種類の製品を用意しています。

化学発光検出試薬 (Chemi-Lumi One シリーズ) の比較

製品名	Chemi-Lumi One L	Chemi-Lumi One Super	Chemi-Lumi One Ultra
製品番号	#07880	#02230	#11644
製品イメージ			
推奨用途	一般的な化学発光検出 使いやすい感度設計で、実験条件の検討開始時に適した製品	高感度化学発光検出 Chemi-Lumi One L よりも高感度で検出したい場合に適した製品	超高感度化学発光検出 ターゲットタンパク質や抗体が貴重な場合に適した製品
感度	ピコグラム低域	フェムトグラム中域	フェムトグラム低域
 <p>一般的感度 <math>\leftarrow</math> 高感度 <math>\leftarrow</math> 超高感度</p> <p>← ピコグラム (pg) → ← フェムトグラム (fg) →</p> <p>900 300 100 33.3 11.1 3.7 1.2 412 137 46 15 3 HRP IgG</p> <p>L Super Ultra</p> <p><実験条件> PVDF メンブレンに goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz #sc-2005) を希釈し、スロットブロッティングしました。 発光 : Chemi-Lumi One L (1分)、Chemi-Lumi One Super (1分)、Chemi-Lumi One Ultra (5分) (取扱説明書記載時間で反応) 検出 : LAS-3000 (Super モード) (反応終了から3分後に測定) 露光時間 30分 (高感度、超高感度タイプは、表記より HRP 標識抗体量の多い場合、より短い露光時間で検出可能です。)</p> <p>検出限界は実験条件により異なります。本結果は PVDF メンブレンに HRP 標識抗体を直接スロットブロッティングし検出した左記の結果に基づきます。</p>			

検出

実験プロトコール Chemi-Lumi One Super

Chemi-Lumi One シリーズ 3 製品ともに実験プロトコールは同様ですので、以下では最もよく使用されている Chemi-Lumi One Super を中心に紹介します (Chemi-Lumi One L、Chemi-Lumi One Ultra 使用時の条件は右側の欄外に記載します)。

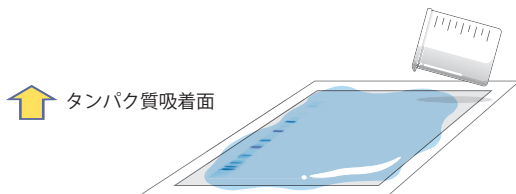
1. Chemi-Lumi One Super の Solution A と Solution B を 1:1 の割合で混合し、Working 溶液とします。



2. プラスチック製ラップフィルムを机の上に敷きます。メンブレンをピンセットでつまみ、メンブレンの角をキムワイブなどに当て、緩衝液を取り除きます。
キムワイブは Kimberly-Clark Worldwide, Inc. の登録商標です。



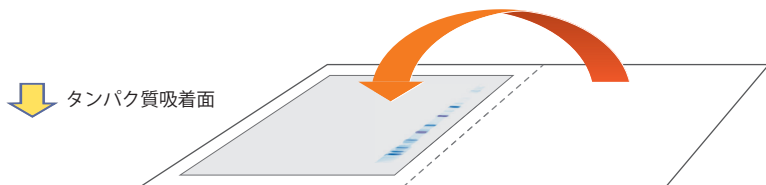
3. 敷いておいたプラスチック製ラップフィルムの上に、メンブレンをタンパク質吸着面が上側になるように置きます。その後、Working 溶液を上からかけ、1 分反応させます。
※Working 溶液はプロットングしたメンブレンに対し約 0.1 mL/cm² になる量を使用します。



4. メンブレンをピンセットでつまみ、メンブレンの角をキムワイブなどに当て、余分な Working 溶液を取り除きます。



5. メンブレンを十分に包める程度の大きさの新しいプラスチック製ラップフィルムを敷きます。その上にタンパク質吸着面が下側になるようにメンブレンを置き、プラスチック製ラップフィルムでメンブレンを包んでください。



6. CCD イメージャーもしくは X 線フィルムを用いて検出します。このとき、タンパク質吸着面が検出器もしくは X 線フィルム側になるようにセットしてください。

Chemi-Lumi One Super (#02230-30)



Nacal オンラインカタログへ

▶ 気泡が入らないように、プラスチック製ラップフィルムの上にメンブレンを置いてください。

▶ Working 溶液の使用量と反応時間
・ Chemi-Lumi One L
使用量 : 約 0.125 mL/cm²
反応時間 : 1 分
・ Chemi-Lumi One Ultra
使用量 : 約 0.1 mL/cm²
反応時間 : 5 分

▶ 気泡が入らないように、プラスチック製ラップフィルムの上にメンブレンを置いてください。また、プラスチック製ラップフィルムでメンブレンを包むときは、プラスチック製ラップフィルムの折れやシワに気をつけてください。

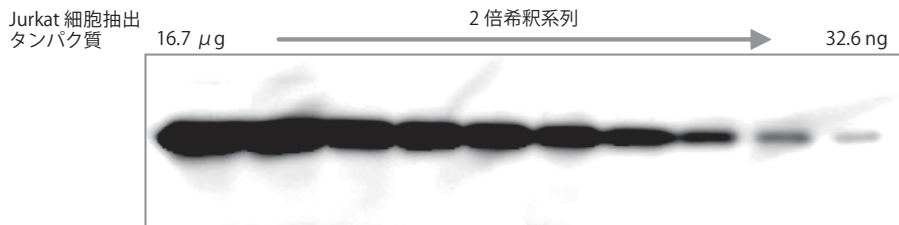
▶ 露光時間の目安
・ Chemi-Lumi One L
3 分から始め適宜検討
・ Chemi-Lumi One Super、Ultra
1 分から始め適宜検討

検出

Chemi-Lumi One L

実施例 1 Chemi-Lumi One L の検出可能なタンパク質濃度範囲

検出可能なタンパク質濃度範囲が広いこと、目的タンパク質の量が不明な場合の検出や、実験条件の検討開始時に向いています。

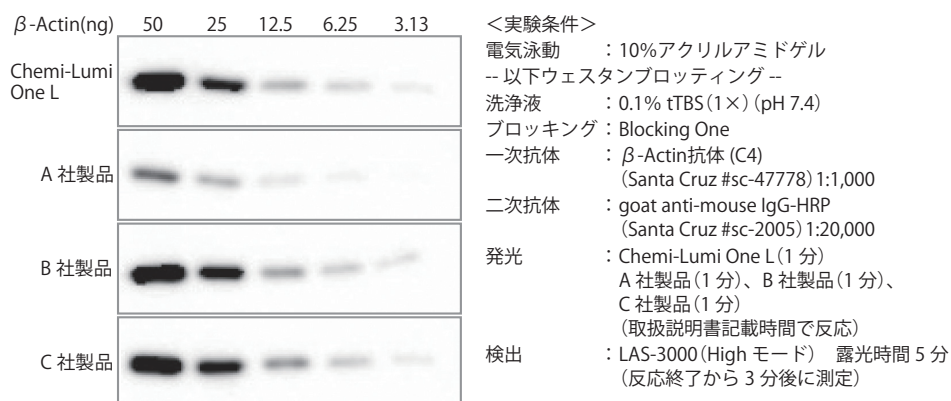


<実験条件>

- 電気泳動 : 10%アクリルアミドゲル
- 以下ウェスタンブロットニング --
- 洗浄液 : 0.1% tTBS (1×) (pH 7.4)
- ブロッキング : Blocking One
- 一次抗体 : β -Actin抗体 (C4) (Santa Cruz #sc-47778) 1:1,000
- 二次抗体 : goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz #sc-2005) 1:20,000
- 発光 : Chemi-Lumi One L (1分)
- 検出 : LAS-3000 (High モード) 露光時間 30分 (反応終了から3分後に測定)

実施例 2 Chemi-Lumi One L の他社製品との感度比較

Chemi-Lumi One L は他社試薬とほぼ同等もしくは同等以上の感度を示します。



Chemi-Lumi One L
(#07880-70)



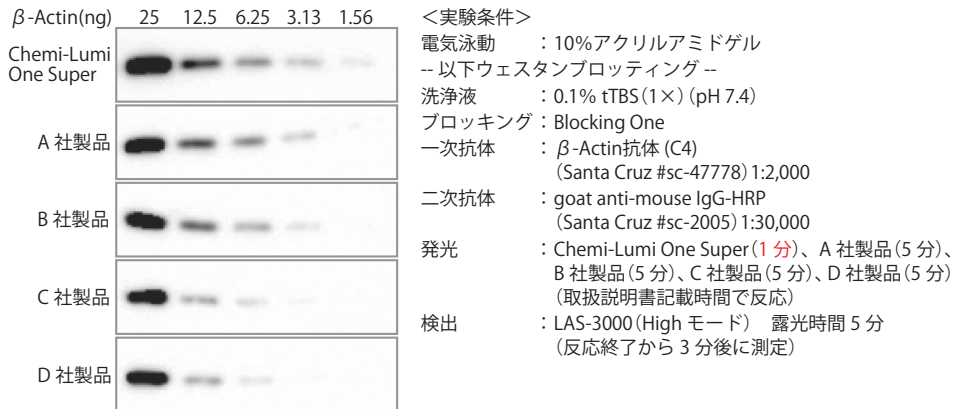
Nacal オンラインカタログへ

検出

Chemi-Lumi One Super

実施例 1 Chemi-Lumi One Super の他社製品との感度比較

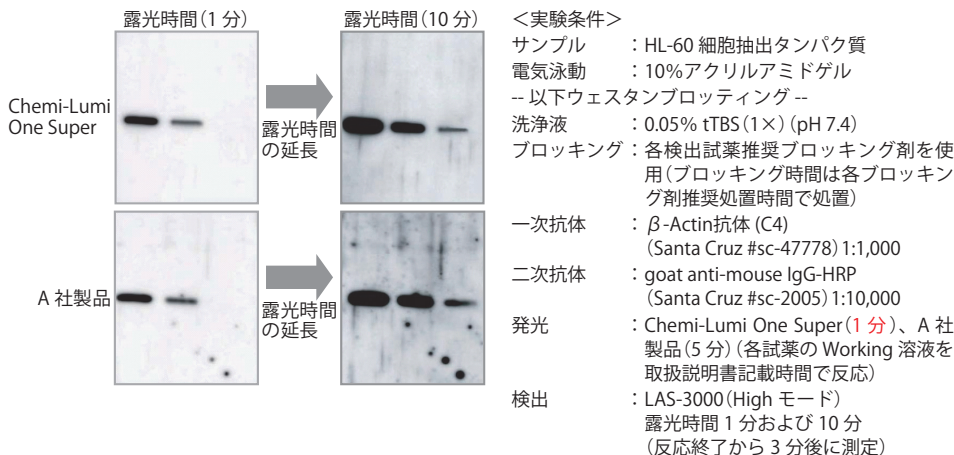
Chemi-Lumi One Super は他社高感度試薬と比較し、高感度であることが分かります。また Chemi-Lumi One Super は最高発光強度までの到達が速やかであるため、他社製品が Working 溶液との反応が 5 分必要である一方、Chemi-Lumi One Super は 1 分で検出開始が可能となります。



Nacal オンラインカタログへ

実施例 2 Chemi-Lumi One Super を用いた低バックグラウンド検出

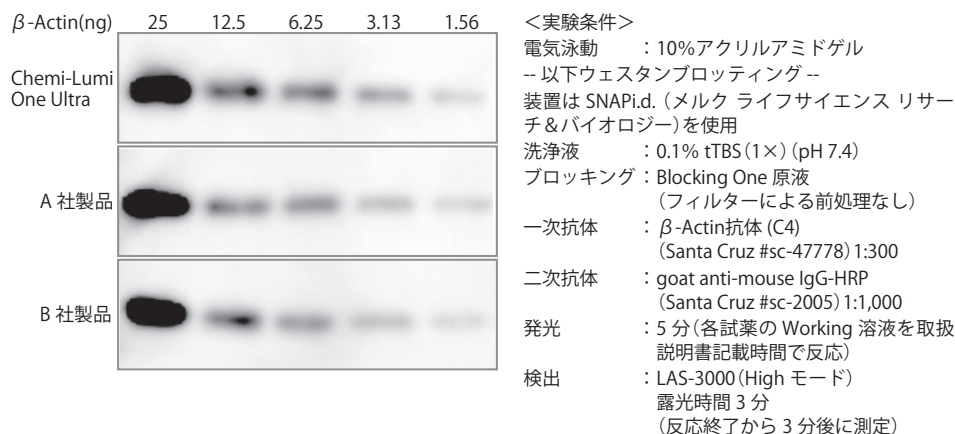
Chemi-Lumi One Super は、低バックグラウンドであるため、露光時間の延長が可能です。



Chemi-Lumi One Ultra

実施例 1 Chemi-Lumi One Ultra の他社製品との感度比較

Chemi-Lumi One Ultra は他社試薬とほぼ同等もしくは同等以上の感度を示します。



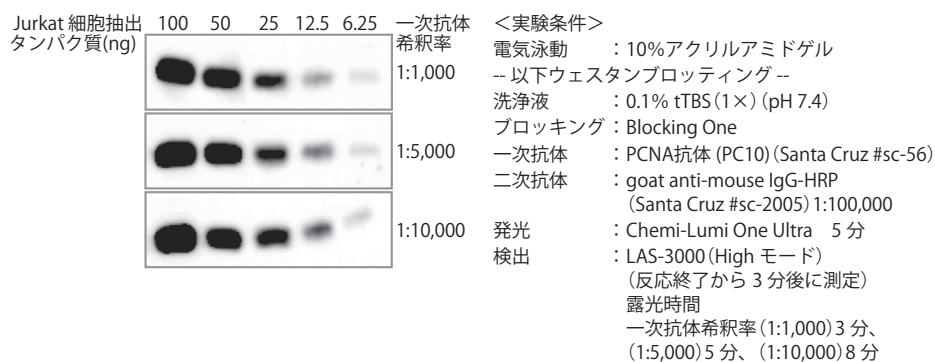
Chemi-Lumi One Ultra
(#11644-40)



Nacalai オンラインカタログへ

実施例 2 Chemi-Lumi One Ultra を用いた低バックグラウンド検出

バックグラウンドが低いため、幅広い一次抗体濃度に対応可能であり、実験条件の至適化が容易です。



検出

化学発色検出法




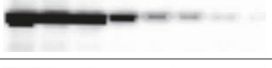

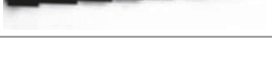
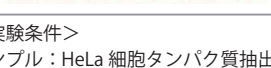
弊社では化学発色検出試薬として以下の製品をラインアップしています。

化学発色検出試薬の比較

製品名	TMB 溶液 (ウェスタンブロットティング用)	ペルオキシダーゼ染色 DAB キット (Brown stain)	ペルオキシダーゼ染色キット	BCIP-NBT 溶液キット
製品番号	#18186-24	#25985-50	#26652-70	#03937-60
製品 イメージ				
検出酵素	HRP			AP
特長	<ul style="list-style-type: none"> Ready to use 他の発色法と感度は同等以上、かつ視認容易な色調 	<ul style="list-style-type: none"> DAB 染色用メタルエンハンサー (#07388-24) を併用することで容易に色調変更が可能 	<ul style="list-style-type: none"> Naphthol と Diamine との反応 (Nadi 反応) を利用した定番品 	<ul style="list-style-type: none"> ブロットティングに最適な高感度なアルカリホスファターゼ検出試薬 染色に必要な試薬はすべて含まれており、簡単な調製ですぐに使用可能
色調	青紫色	茶色 灰色(メタルエンハンサー使用時)	赤紫色	紫色

実施例 HRP 検出試薬の比較

化学発色検出試薬および化学発光検出試薬で感度比較を行いました。化学発色検出試薬でも、化学発光検出試薬(一般的感度)と比較して遜色のないレベルでの検出が可能です。

化学発色検出試薬		化学発光検出試薬	
	TMB 溶液 (#18186-24)		Chemi-Lumi One L (#07880)
	ペルオキシダーゼ染色 DAB キット (#25985-50)		A社製品 1
	ペルオキシダーゼ染色 DAB キット + DAB 染色用メタルエンハンサー (#07388-24)		A社製品 2
	ペルオキシダーゼ染色キット (#26652-70)		

<実験条件>

サンプル: HeLa 細胞タンパク質抽出液 12 μg より 2 倍希釈系列

一次抗体: Anti-β-Actin mAb (MBL #M177-3) 5,000 倍希釈

二次抗体: Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep (Cytiva #NA931) 10,000 倍希釈

検出: (発色)各発色検出試薬 反応時間 10 分

(発光)各発光検出試薬 反応は各取扱説明書記載時間に従う LAS-3000 (Super モード) 露光時間 10 分

検出

TMB 溶液(ウェスタンブロットティング用)

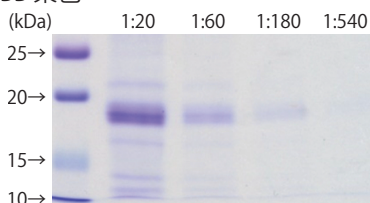
実験プロトコール

1. HRP 標識抗体などを反応させ洗浄したメンブレンを、清潔なトレイ (Dispotray など) もしくはプラスチック製ラップフィルムの上にタンパク質吸着面が上になるように置き、上から本製品をゆっくりと注いでメンブレンを浸します。
※ブロットティングしたメンブレンに対して約 0.1 mL/cm² に相当する量を使用してください。
2. 5 ~ 15 分程度静置し、反応させます。
3. メンブレン上に適当な染色像が得られたら、メンブレンを発色液から取り出して、蒸留水で数回洗浄し反応を停止させます。

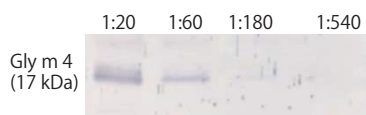
実施例 1 TMB 溶液による大豆タンパク質 (Gly m 4) の検出

大豆タンパク質 (Gly m 4) を TMB 溶液 (ウェスタンブロットティング用) により検出しました。本分子は CBB 染色では確認できませんが、本製品を用いたウェスタンブロットティングでは検出が可能でした。

● CBB 染色



● ウェスタンブロットティング



サンプル：豆乳を 20 倍、60 倍、180 倍、540 倍希釈

検出：(ウェスタンブロットティング) TMB 溶液 (ウェスタンブロットティング用) 反応時間 5 分

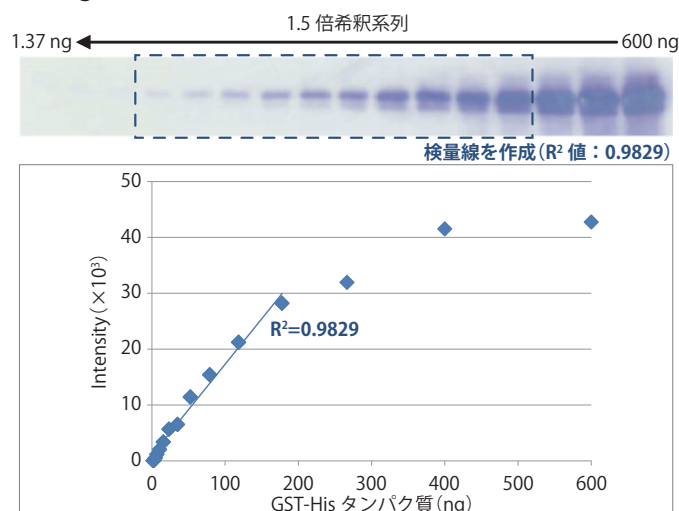
【使用者の評価】

TMB 溶液 (ウェスタンブロットティング用) による検出は、化学発光検出試薬 (一般的感度) と比較しても、十分な感度で検出が可能であった (データ省略)。また、他社発色検出試薬と比べ高感度な印象であり、ready to use かつ、化学発光のように操作の手間や検出機器を必要としないことから、学生実習や簡易検出に適している。

データご提供：近畿大学 農学部 応用生命化学科 森山 達哉 教授 / 矢野 えりか 研究員

実施例 2 TMB 溶液の定量性

TMB 溶液 (ウェスタンブロットティング用) の定量性を確認しました。4.62 ~ 178 ng (約 1.6 桁) の間で高い直線性 (R^2 値: 0.98) を示しました。



<実験条件>

サンプル：GST-His タンパク質 600 ng より 1.5倍希釈系列

一次抗体：Anti-GST(Mouse IgG2a- κ), Monoclonal(GS019), AS (#04435) 2,000 倍希釈

二次抗体：Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep (Cytiva #NA931) 10,000 倍希釈

検出：TMB 溶液 (ウェスタンブロットティング用) 反応時間 5 分

解析：スキャナー (セイコーエプソン) で取り込み、ImageJ にてバンド強度を測定

TMB 溶液
(ウェスタンブロットティング用)
(#18186-24)



Nacalai オンラインカタログへ

▶ 反応中は振とうせず、静置してください。振とうすると、感度が低下する場合があります。

▶ 洗浄は必ず蒸留水で実施してください。tBS などの洗浄液で洗浄を行うと、感度が低下します。

▶ 染色後の膜を保存する場合は、風乾させ、プラスチック製バックなどに入れ、遮光して保存してください。ただし、染色後の膜は徐々に退色しますので、一週間以内にスキャナーなどで得られた像を保存することをお薦めします。

Dispotray-S
(#16526-82)



Nacalai オンラインカタログへ

Dispotray-M (#16551-84)

Nacalai オンラインカタログへ

▶ Dispotray → p.46 参照

検出

ペルオキシダーゼ染色 DAB キット (Brown stain) / エンハンサー

実験プロトコール

1. 試薬の調製

試薬の調製は使用直前に行い、調製後 10 分以内に発色反応を開始してください。試薬の調製後 30 分以上経過すると、良好な染色性能が得られない可能性があります。

【発色液の調製 (10 cm × 10 cm のメンブレン用)】

清潔な 50 ~ 100 mL 用メスシリンダーに精製水 40 mL を分取します。点眼容器のキャップおよび中栓を取り、緩衝液 900 μ L、発色原液 900 μ L、基質試薬 900 μ L を加えて十分に混和します。

※灰色に染色する場合 (DAB 染色用メタルエンハンサーとの併用方法)

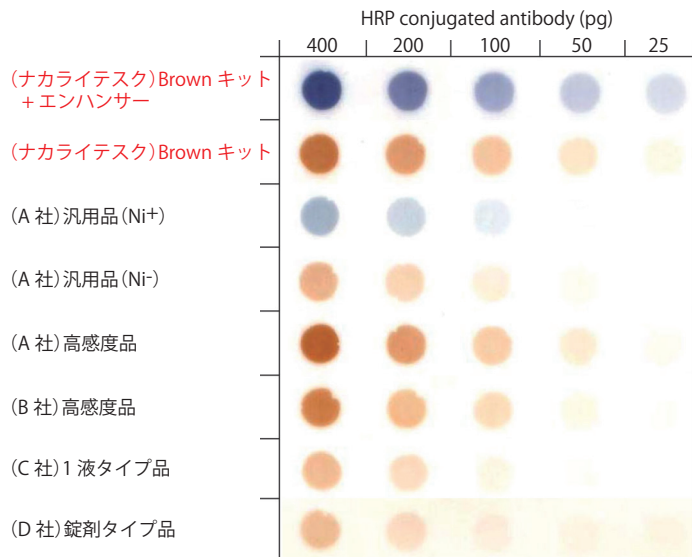
清潔な 50 ~ 100 mL 用メスシリンダーに DAB 染色用メタルエンハンサー 40 mL を分取します。点眼容器のキャップおよび中栓を取り、緩衝液 900 μ L、発色原液 900 μ L、基質試薬 900 μ L を加えて十分に混和します。

2. 操作手順

- ① HRP 標識抗体などを反応させ洗浄したメンブレンを、清潔なトレイ (Dispotray など) にタンパク質吸着面が上になるように置き、上から調製した発色液をゆっくりと注いでメンブレンを浸します。
- ② 10 ~ 60 分室温で振とうします。
- ③ メンブレン上に泳動像の適当な染色が得られたら、メンブレンを発色液から取り出して流水で 10 分以上洗浄して反応を停止します。

実施例 ドットプロットによる DAB 染色液の性能比較

エンハンサーを併用することにより、未使用に比べて感度が 2 倍程度上昇します。もちろん Brown 単独でも、他社製品よりも感度よく検出できます。



ペルオキシダーゼ染色
DAB キット (Brown stain)
(#25985-50)



[Nacalai オンラインカタログへ](#)

DAB 染色用メタルエンハンサー
(#07388-24)



[Nacalai オンラインカタログへ](#)

▶ 変異原性物質を含んでいますので、取り扱いにはゴム手袋および保護メガネなどを着用してください。

▶ 発色液を入れるトレイは、プラスチック製を推奨します。ステンレス製トレイを用いた場合、トレイに色素が析出する場合があります。

Dispotray-S
(#16526-82)



[Nacalai オンラインカタログへ](#)

Dispotray-M (#16551-84)

[Nacalai オンラインカタログへ](#)

▶ Dispotray → p.46 参照

検出

ペルオキシダーゼ染色キット

実験プロトコール

1. 試薬の調製

試薬の調製は使用直前に行い、調製後 10 分以内に発色反応を開始してください。試薬の調製後 30 分以上経過すると、良好な染色性能が得られない可能性があります。

【発色液の調製 (10 cm × 10 cm のメンブレン用)】

- ① まず、緩衝液を十分に転倒攪拌します。
- ② 清潔な 50 ~ 100 mL 用メスシリンダーに緩衝液 50 mL を分取し、マイクロピペットで発色原液 2.5 mL を加えて十分に混和します。
※上記以外のスケールで発色液を調製する場合は、緩衝液 20 容量と発色原液 1 容量の割合で混和してください。

2. 操作手順

- ① HRP 標識抗体などを反応させ洗浄したメンブレンを、清潔なトレイ (Dispotray など) にタンパク質吸着面が上になるように置き、上から調製した発色液をゆっくりと注いでメンブレンを浸します。
- ② 室温で振とうもしくは静置して反応させます。
- ③ メンブレン上に泳動像の適当な染色が得られたら、メンブレンを発色液から取り出して流水で 10 分以上洗浄して反応を停止します。

実施例 ペルオキシダーゼ染色キットによる HSP90 α の検出

HSP90 α を、ペルオキシダーゼ染色キットを用いて検出しました。ペルオキシダーゼ染色キットは HRP 標識抗体を使用したウェスタンブロットティングにおいて使用可能です。



<実験条件>

サンプル : HeLa 細胞タンパク質抽出液 12 μ g より 2 倍希釈系列
ブロッキング : Bullet Blocking One for Western Blotting (#13779) 室温 5 分
一次抗体 : HSP 90 α 抗体 (F-2) (Santa Cruz #sc-515081) 500 倍希釈 室温 60 分
二次抗体 : Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep (Cytiva #NA931) 10,000 倍希釈 室温 60 分
検出 : ペルオキシダーゼ染色キット (#26652-70) 反応時間 10 分

ペルオキシダーゼ染色キット
(#26652-70)



[Nacalai オンラインカタログへ](#)

▶ 発色液を入れるトレイは、プラスチック製を推奨します。ステンレス製トレイを用いた場合、トレイに色素が析出する場合があります。

Dispotray-S
(#16526-82)



[Nacalai オンラインカタログへ](#)

Dispotray-M (#16551-84)

[Nacalai オンラインカタログへ](#)

▶ Dispotray → p.46 参照

検出

BCIP-NBT 溶液キット

実験プロトコール

1. 試薬の調製

試薬の調製は使用直前にいき、調製後 10 分以内に発色反応を開始してください。試薬の調製後 30 分以上経過すると、良好な染色性能が得られない可能性があります。

【発色液の調製(10 cm × 10 cm のメンブレン用)】

- ① まず、緩衝液を十分に転倒攪拌します。
- ② 清潔な 50 ~ 100 mL 用メスシリンダーに緩衝液 50 mL を分取し、マイクロピペットで発色原液 0.5 mL を加えて十分に混和します。

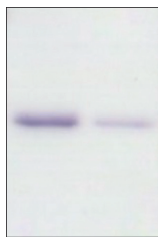
※上記以外のスケールで発色液を調製する場合は、緩衝液 100 容量と発色原液 1 容量の割合で混和してください。

2. 操作手順

- ① AP 標識抗体などを反応させ洗浄したメンブレンを、清潔なトレイ (Dispotray など) にタンパク質吸着面が上になるように置き、上から調製した発色液をゆっくりと注いでメンブレンを浸します。
- ② 室温で振とうもしくは静置して反応させます。
- ③ メンブレン上に泳動像の適度な染色が得られたら、メンブレンを発色液から取り出して流水で 10 分以上洗浄して反応を停止します。

実施例 1 BCIP-NBT 溶液キットによる GAPDH の検出

GAPDH を BCIP-NBT 溶液キットを用いて検出しました。BCIP-NBT 溶液キットは AP 標識抗体を使用したウェスタンブロッティングにおいて使用可能です。

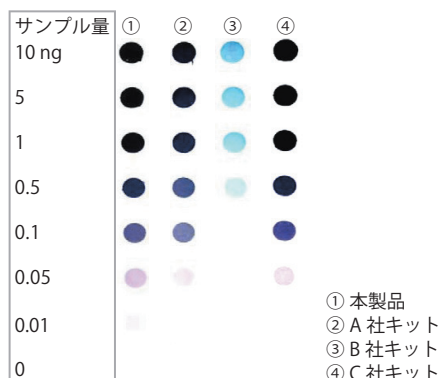


<実験条件>

サンプル : HeLa Cell lysate (左) 2 µg、(右) 0.4 µg
ブロッキング : Bullet Blocking One for Western Blotting (#13779) 室温 5 分
一次抗体 : GAPDH Antibody (Novus #NB300-322) 10,000 倍希釈 室温 60 分
二次抗体 : Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody [Alkaline Phosphatase] (Pre-adsorbed) (Novus #NB7181) 50,000 倍希釈 室温 60 分
検出 : BCIP-NBT 溶液キット 反応時間 10 分

実施例 2 ドットブロッティングによる感度比較

本製品は他社製品よりも感度よく検出可能です。



<実験条件>

サンプル : Alkaline Phosphatase (ウシ小腸由来)
メンブレン : PVDF
発色時間 : 15 分

BCIP-NBT 溶液キット
(#03937-60)



Nacalai オンラインカタログへ

- ▶ アルカリホスファターゼ標識抗体を反応させた後のメンブレンの洗浄に、tPBS を使用することはできません。アルカリホスファターゼがリン酸と反応することにより酵素活性を失います。メンブレンの洗浄は、tBBS で行ってください。

- ▶ 洗浄液 (tBBS など) → p.40 参照

- ▶ 発色液を入れるトレイは、プラスチック製を推奨します。ステンレス製トレイを用いた場合、トレイに色素が析出する場合があります。

Dispotray-S
(#16526-82)



Nacalai オンラインカタログへ

Dispotray-M (#16551-84)

Nacalai オンラインカタログへ

- ▶ Dispotray → p.46 参照



ストリッピング

ストリッピングとは、検出後に反応させた一次抗体および二次抗体をタンパク質から剥がす(ストリップする)ことをいいます。これにより、同一メンブレン上でウェスタンブロッティングを繰り返し行うことができ、複数の異なるタンパク質検出が可能となります。従来は毒物である 2-メルカプトエタノール(2ME)を含む試薬を用いて、高温処理が必要でしたが、弊社では加温が不要な WB Stripping Solution、WB Stripping Solution Strong を用意しています。

従来法と弊社製品の比較

手法	従来法	WB Stripping Solution & WB Stripping Solution Strong
2ME(毒物)	含有	不含(不快な匂いがしない)
加温	50℃	不要
処理時間	30分	15分程度(場合により適宜増減してください)
使用可能なメンブレン	PVDF メンブレン	

WB Stripping Solution と WB Stripping Solution Strong の比較

	WB Stripping Solution	WB Stripping Solution Strong
製品番号	#05364-55	#05677-65
製品イメージ		
原理	酸性にすることで抗体をストリッピングします。	界面活性剤と還元剤により抗体をストリッピングします。
実験上の注意	トレイ・ピンセットなどは、金属・樹脂製品ともにご使用いただけます。 両製品を混合すると反応して白い沈殿を生じます。両製品を交互に使用される場合は、剥離したブロッティングメンブレンを適当な緩衝液、あるいは精製水で十分に洗浄(3～5回程度)して試液を完全に取り除いてから次の製品を使用してください。なお、使用されるトレイなどはそれぞれ別のもので用いてください。 化学発色検出後のストリッピングにもご使用いただけますが、ストリッピングにより既に得られている染色像は消えません。	トレイ・ピンセットなどは、樹脂製品を使用してください。金属製品は本製品の性能を劣化させます

※WB Stripping Solution 40 mL と WB Stripping Solution Strong 40 mL をセットにした Trial Set(#05680-21)も用意しています。

WB Stripping Solution

実験プロトコール

1. 化学発光検出に使用したメンブレンを、tTBS を用いて洗浄します(5分×1回)。
2. メンブレンが浸る程度の WB Stripping Solution を注ぎます。
※ミニゲルサイズの場合は 20 mL で使用ください。
3. 5～15分室温で緩やかに振とうします。
4. トレイから液を除去し、tTBS を用いてメンブレンを洗浄します(5分×1回)。
5. 洗浄したメンブレンにて新たに抗体反応が可能です。ブロッキングから始めてください。

WB Stripping Solution
(#05364-55)



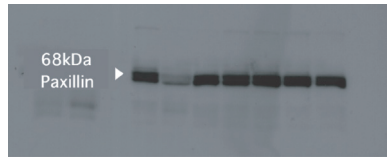
Nacalai オンラインカタログへ

▶ トレイやピンセットなどは、金属・樹脂製品ともにご使用できます。

ストリッピング

実施例 WB Stripping Solution 使用例

1回目



2回目



<実験条件>

ブロッキング : Blocking One (#03953) 30分
洗浄 : tTBS
一次抗体 : Anti-Paxillin (mouse IgG)
二次抗体 : Anti-Mouse IgG-POD
検出 : 光学発光検出キット

↓

ストリッピング

WB Stripping Solution 室温 15分処理

↓

ブロッキング : Blocking One (#03953) 30分
洗浄 : tTBS
一次抗体 : Anti-Vinculin (mouse IgG)
Anti-Actin (mouse IgG)
二次抗体 : Anti-Mouse IgG-POD
検出 : Chemi-Lumi One

データご提供 : 東京工業大学 生命理工学部 赤池研究室

▶ 抗体が残存していると、以前の染色像が検出されてしまいます。残存抗体の確認方法は取扱説明書をご参照ください。抗体が残存する場合は、処理時間の延長(30分~数時間)、加温処理(37~60℃)も可能です。

WB Stripping Solution Strong

実験プロトコール

1. 化学発光検出に使用したメンブレンを、精製水を用いて洗浄(1分程度)します。
2. メンブレンが浸る程度の WB Stripping Solution Strong を注ぎます。
※ミニゲルサイズの場合は 20 mL で使用ください。
3. 5~15分室温で緩やかに振とうします。
4. トレイから液を除去し、tTBS を用いてメンブレンを洗浄します(5分×1回)。
5. 洗浄したメンブレンにて新たに抗体反応が可能です。ブロッキングから始めてください。

実施例 WB Stripping Solution Strong 使用例

β -Actin を検出後、WB Stripping Solution Strong を用いてストリッピングを行い、同一メンブレン上で β -Tubulin の検出を行いました。 β -Tubulin 検出時に β -Actin のバンドは検出されておらず、一次抗体および二次抗体ともに剥離されていることが分かります。

1回目

β -Actin



2回目

β -Tubulin



<実験条件>

サンプル : HL-60 細胞タンパク質抽出液(3.2 μ g/レーン)
メンブレン : PVDF
ブロッキング : Blocking One (#03953) 室温 30分
一次抗体 : Anti- β -Actin (Santa Cruz) 1:10,000 室温 1時間
二次抗体 : Anti-Mouse IgG HRP conjugated (Santa Cruz) 1:10,000 室温 1時間
検出 : Chemi-Lumi One L (#07880) / LAS-3000

↓

ストリッピング

WB Stripping Solution Strong 60分

↓

ブロッキング : Blocking One (#03953) 室温 30分
一次抗体 : Anti- β -Tubulin (Santa Cruz) 1:200 室温 1時間
二次抗体 : Anti-Mouse IgG HRP conjugated (Santa Cruz) 1:10,000 室温 1時間
検出 : Chemi-Lumi One L (#07880) / LAS-3000

WB Stripping Solution Strong
(#05677-65)



Nacalai オンラインカタログへ

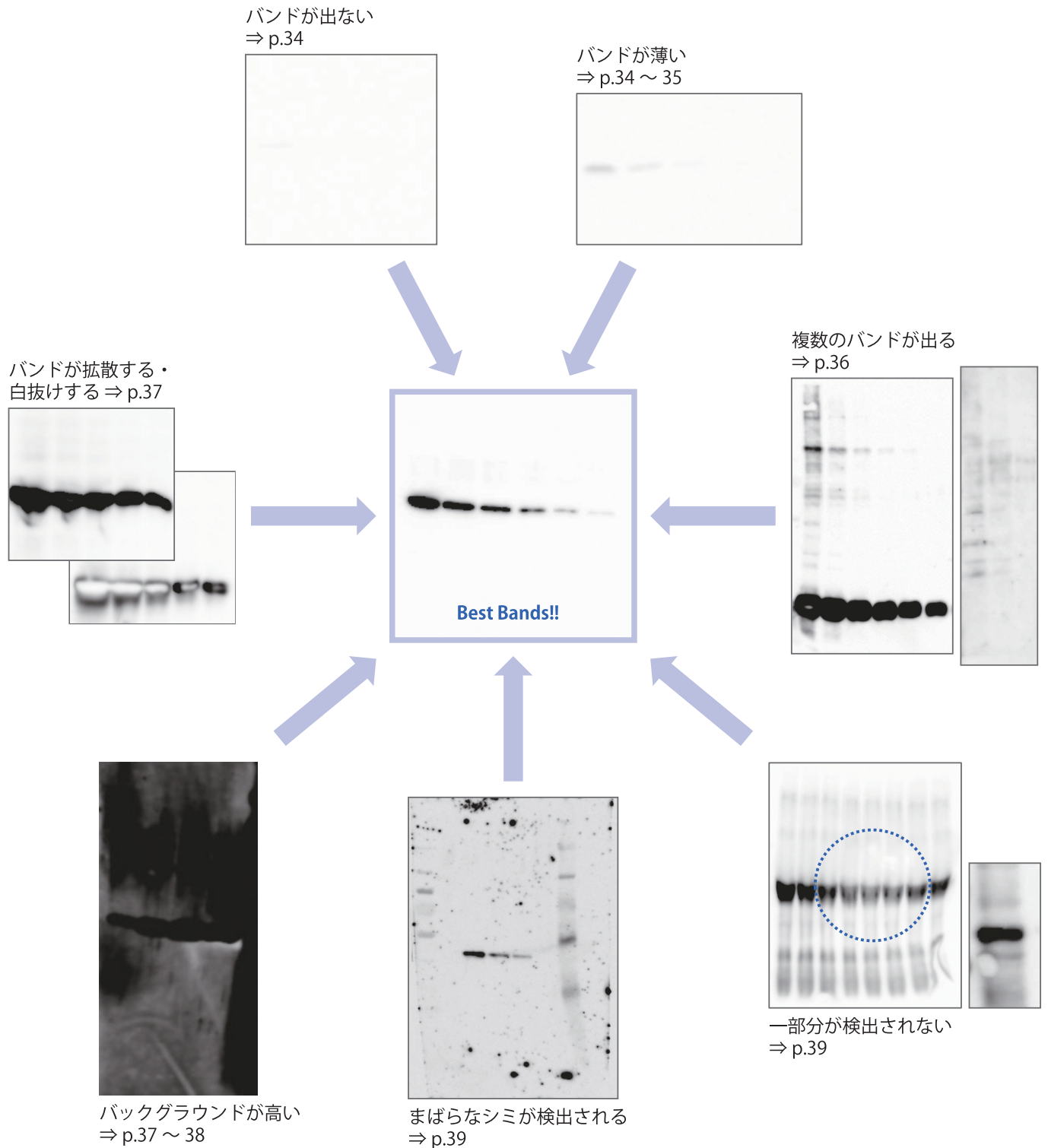
▶ トレイやピンセットなどは、樹脂製品を使用してください。

▶ 本製品は室温に戻してからご使用ください。本製品は冷蔵保存ですが、保存環境によっては界面活性剤が析出する場合があります。析出物が存在すると組成濃度が変わりますので、析出物を溶解してから使用してください。

▶ 抗体が残存していると、以前の染色像が検出されてしまいます。残存抗体の確認方法は取扱説明書をご参照ください。抗体が残存する場合は、処理時間の延長(30分~数時間)、加温処理(37~60℃)も可能です。

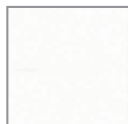
トラブルシューティング

本項目ではウェスタンブロッティングにおけるトラブルおよびその原因・解決方法について説明します。



トラブルシューティング

バンドが出ない



まずは、下記確認事項に従って実験条件の確認を行ってください。
その後、実験条件を再検討してください。
すべてクリアな場合は「バンドが薄い」をご参照ください。

実験操作	確認事項
電気泳動	✓ プレステインドマーカ―は分離されていましたか？ タンパク質が分離していない可能性があります。
転写	✓ プレステインドマーカ―はメンブレンに転写されていましたか？ 転写方向が逆向きになっている可能性があります。
抗体反応	✓ 一次抗体の取扱説明書をご確認ください。 ウェスタンブロッティングに適用していない一次抗体を使用している、抗原と交差性がない一次抗体を使用している可能性があります。 ✓ ご使用の一次抗体と二次抗体の組み合わせを再確認してください。 一次抗体と二次抗体の組み合わせが間違っている可能性があります。 ✓ 抗体もしくは抗体希釈液にアジ化ナトリウムが含有されていないか確認してください。 アジ化ナトリウムは HRP の活性を阻害します。
検出	✓ 検出機器の設定を再度ご確認ください。 検出機器の設定が間違っている可能性があります。 ✓ 検出試薬と二次抗体に標識されている酵素の組み合わせを確認してください。 二次抗体の標識酵素とご使用の検出試薬の組み合わせが間違っている可能性があります。 ✓ ご使用の検出試薬が劣化していないか確認してください。 検出試薬が劣化している可能性があります。 (ご使用の検出試薬反応溶液に HRP 標識抗体を少量添加し、青白く光るか確認してください。)

バンドが薄い



実験操作	原因	解決策
サンプル調製	目的タンパク質が分解している。	サンプル調製時にプロテアーゼ阻害剤カクテル、ホスファターゼ阻害剤カクテルをご使用ください。
電気泳動	泳動したタンパク質量が少ない。	1 レーンに 10 ~ 30 μg (総タンパク質量) を流してください。
<p>DATA</p> <p>泳動タンパク質量 (μg)</p>		
転写	目的タンパク質の転写効率が悪い。	<ul style="list-style-type: none"> 電圧、時間、転写緩衝液の再検討を行ってください。 目的タンパク質の分子量が小さい場合、メンブレンを通り過ぎてしまっている可能性があります。その場合は、電圧、時間、転写バッファ―の再検討もしくは 0.2 μm のメンブレンをお試しください。
<p>Check!!</p> <p>CBB Stain One でメンブレンを染色し、タンパク質の転写効率を確認してください。(p.14 をご参照ください。)</p>		

トラブルシューティング

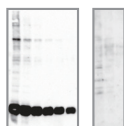
バンドが薄いっつき



実験操作	原因	解決策
ブロッキング	オーバーブロッキングしている。	ブロッキング条件を検討してください。 (Bullet Blocking One 室温 5分もしくは Blocking One 室温 30分をお試しください。)
一次抗体	一次抗体濃度が薄すぎる。	<ul style="list-style-type: none"> 一次抗体濃度を濃くしてください。 一次抗体の使い回しをしている場合は新しく調製しなおしてください。
<p>DATA</p> <p>一次抗体希釈倍率 ※二次抗体濃度は一定</p>		
二次抗体	二次抗体濃度が薄すぎる。	二次抗体濃度を濃くしてください。
<p>DATA</p> <p>二次抗体希釈倍率 ※一次抗体濃度は一定</p>		
検出	露光時間が短すぎる。	露光時間の延長を行ってください。
<p>DATA</p> <p>露光時間</p>		
	使用した検出試薬の感度が低すぎる。	より高感度の検出試薬をお試しください。
<p>DATA</p> <p>検出試薬</p>		
<p>TIPs!!</p> <p>バンドが薄い(出ない)場合、検出後のメンブレンを tTBS で軽くすすぎ、より高感度な検出試薬と再度反応させることができます。(発色試薬をご使用の場合は、別の発色試薬もしくは発光試薬を用いての再検出はできません。)</p> <p>Chemi-Lumi One L</p> <p>tTBS で軽くすすぎ、 Chemi-Lumi One Super を再反応させた。</p> <p>Chemi-Lumi One Super</p>		

トラブルシューティング

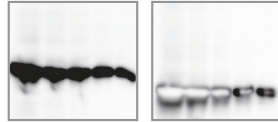
複数のバンドが出る



実験操作	原因	解決策
サンプル調製	目的タンパク質が分解している。	サンプル調製時にプロテアーゼ阻害剤カクテル、ホスファターゼ阻害剤カクテルをご使用ください。
	目的タンパク質が複合体を形成している。	サンプル調製時に、SDS などの変性剤を添加し、5分煮沸してください。
電気泳動	泳動したタンパク質量が多すぎる。	泳動するタンパク質量を減らしてください。
<p>DATA</p> <p>泳動タンパク質量 (μg)</p>		
抗体反応	抗体濃度が濃すぎる。	抗体濃度を薄くしてください。
	抗体が非特異的に反応している。	<ul style="list-style-type: none"> 別の抗体をお試しください。 ブロッキング剤もしくはブロッキング剤含有 tBS を抗体希釈液としてお試しください。 シグナル増強剤 HIKARI をお試しください。
<p>DATA</p> <p>抗体希釈液としてのブロッキング剤の使用</p> <p>シグナル増強剤 HIKARI の使用</p> <p>抗体希釈液 tBS Bullet Blocking One (1x) 抗体希釈液 tBS HIKARI</p>		
検出	露光時間が長すぎる。	露光時間を短くしてください。
	使用した検出試薬の感度が高すぎる。	より感度の低い検出試薬をお試しください。

トラブルシューティング

バンドが拡散する・白抜けする



実験操作	原因	解決策
電気泳動	泳動したタンパク質量が多すぎる。	泳動するタンパク質量を減らしてください (1/10 量程度)。
	<p>DATA</p> <p>泳動タンパク質量 (μg)</p>	
	<p>DATA</p> <p>泳動タンパク質量 (μg)</p>	
転写	転写時にゲルとメンブレンの密着が不十分であった (バンドの拡散)。 転写時に気泡が入っていた (バンドの白抜け)。	ゲルとメンブレンをしっかりと密着させ、気泡が入らないようにしてください。
抗体反応	一次抗体、二次抗体濃度が濃すぎる。	一次抗体、二次抗体濃度を薄くしてください。
検出	使用した検出試薬の感度が高すぎる。	より感度の低い検出試薬をお試しください。
	<p>DATA</p> <p>検出試薬</p>	

バックグラウンドが高い



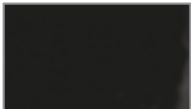

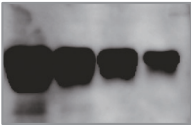



実験操作	原因	解決策
ブロッキング	ブロッキングが不十分。	ブロッキング時間の延長もしくはブロッキング剤の変更をご検討ください。
	ブロッキング時の振とうが不十分もしくは不均一。	十分に振とうを行ってください。
	ブロッキング剤と抗体が交差反応を起こしている。	ブロッキング剤を変更してください。 スキムミルクおよび Blocking One をご使用の場合、本ブロッキング剤にはりん酸基含有タンパク質が含まれており、リン酸化タンパク質検出には不向きです。Blocking One-P もしくは BSA をお使いください。

トラブルシューティング

バックグラウンドが高い
つづき

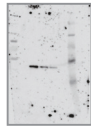


実験操作	原因	解決策
抗体反応	抗体濃度が濃い。	抗体濃度を薄くしてください。
<p>DATA</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;"> <p>一次抗体濃度検討</p>  <p>1:50</p> </div> <div style="font-size: 2em; color: #00AEEF; margin: 0 10px;">➔</div> <div style="text-align: center;">  <p>1:500</p> </div> <div style="margin-left: 20px;"> <p>一次抗体希釈倍率 ※二次抗体濃度は一定</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;"> <p>二次抗体濃度検討</p>  <p>1:500</p> </div> <div style="font-size: 2em; color: #00AEEF; margin: 0 10px;">➔</div> <div style="text-align: center;">  <p>1:10,000</p> </div> <div style="margin-left: 20px;"> <p>二次抗体希釈倍率 ※一次抗体濃度は一定</p> </div> </div>		
<p>TIPs!!</p> <p>バックグラウンドが高い場合、一次抗体よりも二次抗体に由来するケースが多いため、まずは二次抗体の希釈倍率を最適化することをお勧めします。</p>		
	抗体希釈液が不適切。	抗体希釈液中の Tween 20 濃度を 0.1% まで上げてください。もしくはブロッキング剤やブロッキング剤含有 tBS を抗体希釈液としてお試しください。
	抗体反応時の振とうが不十分もしくは不均一。	十分に振とうを行ってください。
検出	使用した検出試薬の感度が高すぎる。	より感度の低い検出試薬をお試しください。
	露光時間が長すぎる。	露光時間を短くしてください。
洗浄	各ステップ間の洗浄が不十分。	<ul style="list-style-type: none"> ・洗浄回数、洗浄時間を増やしてください。 ・Tween 20 を 0.05 ~ 0.1% になるように洗浄液に添加してください。 ・洗浄を行う前に、洗浄液で数回メンブレンをすすいでください。
<p>DATA</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>洗浄のみ</p> </div> <div style="font-size: 2em; color: #00AEEF; margin: 0 10px;">➔</div> <div style="text-align: center;">  <p>tBS で 2 回メンブレンを すすいだから、洗浄</p> </div> </div>		
	洗浄時の振とうが不十分もしくは不均一。	十分に振とうを行ってください。
実験過程 すべて	器具が汚れている。	使用している器具をよく洗浄してください。もしくはディスポーザブルの器具をご使用ください。
	メンブレンが操作途中で乾燥してしまった。	メンブレンを乾燥させないようにしてください。

Tween は、クローダ インターナショナル ピーエルシーの登録商標です。

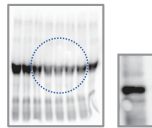
トラブルシューティング

まばらなシミが検出される



実験操作	原因	解決策
ブロッキング	ブロッキング剤に塊がある。	スキムミルクをご使用の場合は、完全に溶解させ、その後ろ過してご使用ください。
抗体反応	抗体が凝集している。	抗体を遠心し、上清をご使用ください。
実験過程 すべて	器具が汚れている。	使用している器具をよく洗浄してください。もしくはディスポーザブルの器具をご使用ください。

一部分が検出されない



実験操作	原因	解決策
転写	ゲルとメンブレンの間に気泡が入り、その部分が転写されていない。	メンブレンもしくはゲルを重ねる際、気泡が入らないように注意してゆっくり重ねてください。
	DATA	
抗体反応	抗体処置時の振とうが不十分もしくは不均一。	十分に振とうを行ってください。
洗浄	膜に直接洗浄液をかけてしまっている	直接洗浄液をかけることで、物理的に抗原、抗体を剥がしてしまっている可能性があります。洗浄液は膜に直接かけないようにしてください。
	DATA	

Appendix

洗浄液について





各ステップの間には、その前過程の溶液の持ち込みを防ぐために、洗浄を行います。洗浄液としては下記のものが入用されています。

- トリス緩衝生理食塩水 (TBS) 系
TBS もしくは 0.05 ~ 0.1% Tween 20 含有 TBS (tTBS) が使用されます。
- リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 系
PBS もしくは 0.05 ~ 0.1% Tween 20 含有 PBS (tPBS) が使用されます。

Tween は、クローダ インターナショナル ピーエルシーの登録商標です。

<tTBS の調製方法>


TBS に最終濃度 0.05 ~ 0.1% になるように Tween 20 を添加してください。下記表のように ready to use 製品、10 倍濃縮 tTBS、もしくは 10 倍濃縮 TBS のご使用が便利です。

	0.05%-tTBS	0.1%-tTBS		0.05 / 0.1%-tTBS
製品名	0.05%-tTBS (10x)(pH 7.4)	0.1%-tTBS (10x)(pH 7.4)	0.1%-tTBS (1x)(pH 7.4)	TBS (10x)(pH 7.4)
製品番号	#12749-21	#12750-81	#08284*	#12748-31
製品イメージ				
調製方法	精製水で 10 倍に希釈します。	精製水で 10 倍に希釈します。	そのままご使用いただけます。	TBS を精製水で 10 倍希釈し、最終濃度 0.05 もしくは 0.1% になるように Tween 20 を添加します。

*#08284 には酵素活性に影響を与えない防腐剤が含まれています。

<tPBS の調製方法>

PBS に最終濃度 0.05 ~ 0.1% になるように Tween 20 を添加してください。下記表のように 10 倍濃縮 PBS のご使用が便利です。

	0.05 / 0.1%-tPBS
製品名	リン酸緩衝生理食塩水 (10 倍濃縮) (pH 7.4)
製品番号	#27575-31
製品イメージ	
調製方法	PBS を精製水で 10 倍希釈し、最終濃度 0.05 もしくは 0.1% になるように Tween 20 を添加します。

▶ 洗浄効果を高めるため、界面活性剤である Tween 20 が含有される tTBS もしくは tPBS が一般的です。

▶ アルカリホスファターゼ標識抗体を反応させた後のメンブレンの洗浄に PBS 系洗浄液を使用することはできません。アルカリホスファターゼがリン酸と反応することにより酵素活性を失います。アルカリホスファターゼを用いて検出する場合は TBS 系洗浄液をご使用ください。

▶ TBS の調製方法 → p.41 参照

0.05%-tTBS(10x)(pH 7.4)
(#12749-21)

 [Nacalai オンラインカタログへ](#)

0.1%-tTBS(10x)(pH 7.4)
(#12750-81)

 [Nacalai オンラインカタログへ](#)

0.1%-tTBS(1x)(pH 7.4)
(#08284-15 500 mL)
(#08284-44 5 L)

 [Nacalai オンラインカタログへ](#)

(#08284-15 500 mL)

 [Nacalai オンラインカタログへ](#)

TBS(10x)(pH 7.4)
(#12748-31)

 [Nacalai オンラインカタログへ](#)

Polyoxyethylene Sorbitan
Monolaurate [Tween 20 相当品]
(#28353-14)

 [Nacalai オンラインカタログへ](#)

▶ PBS の調製方法 → p.42 参照

リン酸緩衝生理食塩水
(10 倍濃縮) (pH 7.4)
(#27575-31)

 [Nacalai オンラインカタログへ](#)

Polyoxyethylene Sorbitan
Monolaurate [Tween 20 相当品]
(#28353-14)

 [Nacalai オンラインカタログへ](#)

Appendix

緩衝液の調製方法

<転写緩衝液(Towbin 法組成) 約 5 L>

25 mM Tris、192 mM グリシン、20% メタノール pH 8.3

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris) (121.14 g/mol)	15.1 g
グリシン(75.07 g/mol)	72.1 g
精製水	—
メタノール	1.0 L
Total	約 5 L

Tris とグリシンを精製水に溶解させ、精製水で 4.0 L にします。その後、メタノール 1.0 L を混合します。

※トリス - グリシン緩衝液 (10 倍濃縮)(pH 8.3)(#09422-81) をご使用いただくと便利です。トリス - グリシン緩衝液 (10 倍濃縮)(pH 8.3)、メタノール、精製水を 1:2:7 容量の割合で混合してください。

<トリス緩衝生理食塩水(TBS) 1 L>

25 mM Tris、137 mM NaCl、2.68 mM KCl pH 7.4

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris) (121.14 g/mol)	3.0 g
塩化ナトリウム(NaCl) (58.44 g/mol)	8.0 g
塩化カリウム(KCl) (74.55 g/mol)	0.2 g
精製水	—
Total	1 L

Tris、NaCl、KCl を精製水に溶解させ、精製水で 0.9 L 程度にします。塩酸で pH 7.4 に調整し、その後、精製水で 1 L にします。

※TBS(10x)(pH 7.4)(#12748-31) をご使用いただくと便利です。精製水で 10 倍希釈してください。

トリス(ヒドロキシメチル)
アミノメタン
(#35434-05)

 [Nacalai オンラインカタログへ](#)

グリシン
(#17141-95)

 [Nacalai オンラインカタログへ](#)

メタノール
(#21915-93)

 [Nacalai オンラインカタログへ](#)

▶メタノールと水を混合するので、Total量は5Lよりも少なくなります。

▶pH調整を行う必要はありません。

トリス - グリシン緩衝液
(10 倍濃縮)(pH 8.3)
(#09422-81)



 [Nacalai オンラインカタログへ](#)

トリス(ヒドロキシメチル)
アミノメタン
(#35434-05)

 [Nacalai オンラインカタログへ](#)

塩化ナトリウム
(#31333-45)

 [Nacalai オンラインカタログへ](#)

塩化カリウム
(#28538-75)

 [Nacalai オンラインカタログへ](#)

TBS(10x)(pH 7.4)
(#12748-31)



 [Nacalai オンラインカタログへ](#)

Appendix

<りん酸緩衝生理食塩水 (PBS) 1 L>

10 mM Na₂HPO₄、2 mM KH₂PO₄、137 mM NaCl、2.68 mM KCl pH 7.4

りん酸水素二ナトリウム (Na ₂ HPO ₄) (141.96 g/mol)	1.4 g
りん酸二水素カリウム (KH ₂ PO ₄) (136.09 g/mol)	0.3 g
塩化ナトリウム (NaCl) (58.44 g/mol)	8.0 g
塩化カリウム (KCl) (74.55 g/mol)	0.2 g
精製水	—
Total	1 L

Na₂HPO₄、KH₂PO₄、NaCl、KCl を精製水に溶解させ、精製水で 0.9 L 程度にします。塩酸で pH 7.4 に調整し、その後、精製水で 1 L にします。

※りん酸緩衝生理食塩水 (10 倍濃縮) (pH 7.4) (#27575-31) をご使用いただくと便利です。精製水で 10 倍希釈してください。

<ブロッキング剤 5%BSA 含有 tTBS 50 mL>

ウシ血清アルブミン (BSA)	2.5 g
tTBS	—
Total	50 mL

BSA を tTBS に溶解させ、tTBS で 50 mL にします。

<ブロッキング剤 5% スキムミルク含有 tTBS 50 mL>

スキムミルク	2.5 g
tTBS	—
Total	50 mL

スキムミルクを tTBS に溶解させ、tTBS で 50 mL にします。

りん酸水素二ナトリウム
(#31738-55)

 Nacalai オンラインカタログへ

りん酸二水素カリウム
(#28736-75)

 Nacalai オンラインカタログへ

塩化ナトリウム
(#31333-45)

 Nacalai オンラインカタログへ

塩化カリウム
(#28538-75)

 Nacalai オンラインカタログへ

りん酸緩衝生理食塩水
(10 倍濃縮) (pH 7.4)
(#27575-31)



 Nacalai オンラインカタログへ

▶ 用時調製してください。

ウシ血清アルブミン
(グロブリンフリー)
(#01281-84)



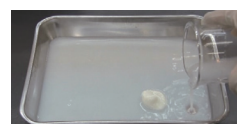
 Nacalai オンラインカタログへ

▶ 用時調製してください。

スキムミルク
(#31149-75)

 Nacalai オンラインカタログへ

▶ スキムミルク溶解時、塊ができてしまう場合があります。十分に溶かすようにしてください。また必要に応じてろ過を行ってください。



Appendix

化学発光検出用マーカー Chemi-Lumi One Markers Kit

通常の Protein Ladder One (Triple-color #09547-74 / Multi-color #09549-25) は化学発光法では検出できませんが、Chemi-Lumi One Markers Kit (#06456-70) を使用すると、サンプルと同じフィルム上での検出が可能になります。

※ただし、マーカータンパク質にはビオチンが標識されているため、未修飾のマーカータンパク質と多少泳動状況が異なる場合があります。正確な分子量を測定する場合は Protein Markers (M.W. 6,500~200,000) (10x) (#29458-24) を使用してください。

実験プロトコール

1. Chemi-Lumi One Markers の調製

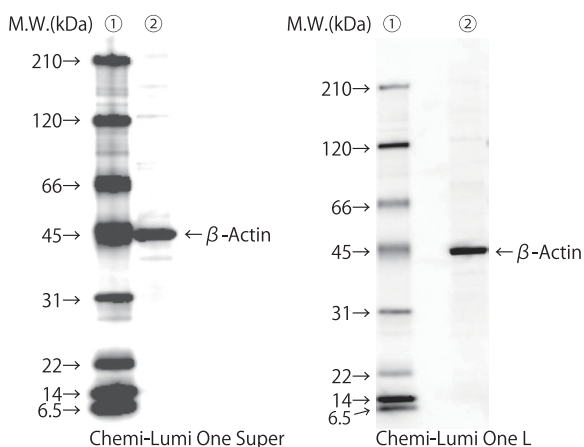
- ① 蓋つきプラスチック容器に精製水、試料緩衝液 (SDS-PAGE 用, 2 倍濃縮, 2-ME 含有)、Chemi-Lumi One Markers を容量比 4:5:1 で混合してください。
- ② プラスチック容器の蓋をして、90°C 程度の水浴中で 4 分、加熱処理をします。
- ③ 水浴から取り出して、約 10 分冷やします。

2. 操作方法

- ① 調製した溶液 2 ~ 10 μ L を分取し、電気泳動ゲルに添加してください。
- ② 電気泳動、メンブレンへの転写、ブロッキング、一次抗体 (必要に応じて) の反応を行ってください。
- ③ 一次抗体反応後、メンブレンを tTBS で洗浄します (5 分 \times 3 回)。
- ④ 二次抗体希釈時に抗体希釈液と Streptavidin (HRP Conjugate) を容量比 10,000:1 になるように二次抗体希釈液に添加してください。
- ⑤ 洗浄後のメンブレンに Streptavidin (HRP Conjugate) 含有二次抗体希釈液を注ぎ、反応させます。
- ⑥ 二次抗体反応後、メンブレンを tTBS で洗浄します (5 分 \times 3 回)。
- ⑦ HRP 検出試薬を用いて、検出を行います。

実施例

HeLa 細胞タンパク質抽出液より β -Actin の検出を行いました。Chemi-Lumi One Markers をサンプルと同時に泳動し、Streptavidin (HRP Conjugate) を二次抗体反応時に二次抗体と共に添加することで、化学発光検出にて β -Actin とマーカーを同時に検出することができます。



- ① Chemi-Lumi One Markers
- ② HeLa 細胞タンパク質抽出液から β -Actin の検出

<実験条件>

- 電気泳動 : SDS-PAGE (4-20% グラジエントゲル)
Chemi-Lumi One Markers (5 μ L)
- 転写 : PVDF メンブレン 10 V、30 分
- ブロッキング : Blocking One (#03953) 60 分
- 一次抗体 : 抗 β -アクチンモノクローナル抗体 (マウス) 200 倍希釈 60 分
- 二次抗体 : 抗マウス IgG (H+L) (ヤギ), HRP 標識 5,000 倍希釈
+ Streptavidin (HRP Conjugate) 10,000 倍希釈 60 分
- 検出 : Chemi-Lumi One Super (#02230)
Chemi-Lumi One L (#07880)

Chemi-Lumi One Markers Kit
(#06456-70)



Nacalai オンラインカタログへ

- ▶ Chemi-Lumi One Markers を使用前に十分に混合します。

試料緩衝液 (SDS-PAGE 用,
2 倍濃縮, 2-ME 含有)
(#30566-22)



Nacalai オンラインカタログへ

- ▶ ご使用の検出試薬により、マーカーの検出感度が異なります。予備実験により Chemi-Lumi One Markers の希釈倍率、および Streptavidin (HRP Conjugate) の希釈倍率を最適化してください。
- ▶ ビオチンを含む試薬 (スキムミルクなど) の使用においては、Chemi-Lumi One Markers と Streptavidin (HRP Conjugate) の反応に影響することがあります。必要に応じて予備検討を行ってください。



Appendix

RIPA Buffer

RIPA Buffer は界面活性剤を含んだタンパク質抽出用の緩衝液で、タンパク質の可溶化・抽出に使用されます。抽出されたタンパク質は、ウェスタンブロッティングや免疫沈降などのアプリケーションに使用できます。

RIPA Buffer の製品比較

RIPA の基本組成で構成される 1 × 調製済み (ready to use タイプ) の製品と、プロテアーゼ阻害剤カクテルを含有し、免疫沈降時に悪影響を与える可能性のある SDS を別添付した 10 倍濃縮タイプの 2 製品を販売しています。

製品名	RIPA Buffer	RIPA Buffer(10x)
製品番号	#16488-34	#08714-04
製品イメージ		
濃縮	1 × (ready to use)	10 ×
プロテアーゼ阻害剤カクテル	不含	含有
SDS	含有	不含 (1% SDS 溶液を添付)
保存	冷蔵	冷凍
組成	<ul style="list-style-type: none"> 50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.6) 150 mmol/L NaCl 1% Nonidet P40 Substitute 0.5% Sodium Deoxycholate 0.1% SDS 	1 × 溶液調製後 (SDS 添加) <ul style="list-style-type: none"> 50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.6) 150 mmol/L NaCl 1% Nonidet P40 Substitute 0.5% Sodium Deoxycholate Protease Inhibitor Cocktail (1 ×) (0.1% SDS)
容量 / セット内容	100 mL	<ul style="list-style-type: none"> RIPA Buffer (10x) : 2 mL × 5 本 SDS Solution (1% SDS) : 2 mL × 5 本

Nonidet は、シエルブランドズインターナショナルアクチングゼルの登録商標です。

実施例 1 RIPA Buffer を用いて抽出した細胞懸濁液のウェスタンブロッティング

RIPA Buffer (#16488-34) にホスファターゼ阻害剤カクテル (#07574-61) を添加することにより、HL-60 細胞由来のリン酸化タンパク質は、ホスファターゼによる影響を回避することができました。

① ② <実験条件>

- サンプル : ① RIPA Buffer+1% ホスファターゼ阻害剤を用いてタンパク質抽出を行った HL-60 細胞懸濁液
 ② RIPA Buffer を用いてタンパク質抽出を行った HL-60 細胞懸濁液
 電気泳動 : Bullet PAGE One Precast Gel, 5-15%, 17wells (#13080-44) 400 V、10 分
 転写 : Bullet Semi-dry Transfer One (#15353-01) 25 V、10 分
 ブロッキング : Blocking One-P (#05999-84) 20 分
 抗体 : p-Tyr 抗体 (PY20)HRP (Santa Cruz #sc-508 HRP) 2,000 倍希釈 60 分
 検出 : Chemi-Lumi One Super (#02230)



RIPA Buffer
(#16488-34)

 Nacalai オンラインカタログへ

RIPA Buffer(10x)
(#08714-04)

 Nacalai オンラインカタログへ

プロテアーゼ阻害剤カクテル
(動物細胞抽出物用)
(#25955-11)

 Nacalai オンラインカタログへ

プロテアーゼ阻害剤カクテル
(一般用)(100倍濃縮)
(#04080-11)

 Nacalai オンラインカタログへ

プロテアーゼ阻害剤カクテル
(EDTAフリー)(100倍濃縮)
(#03969-21)

 Nacalai オンラインカタログへ

ホスファターゼ阻害剤カクテル
(#07574-61)



 Nacalai オンラインカタログへ

ホスファターゼ阻害剤カクテル
(EDTAフリー)(#07575-51)

 Nacalai オンラインカタログへ

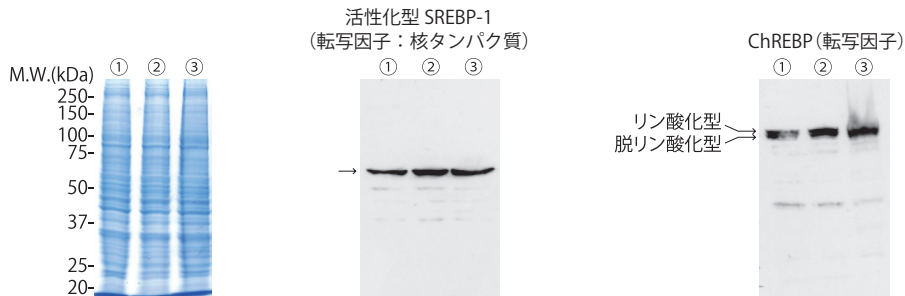
Appendix

実施例 2 RIPA Buffer(10x) を用いて抽出したタンパク質溶液のウェスタンブロッティング
 RIPA Buffer(10x) により細胞質や核などさまざまなタンパク質を抽出後、転写因子 SREBP-1、ChREBP について Chemi-Lumi One L により検出しました。

● CBB 染色

● ウェスタンブロッティング

染色 : CBB Stain One (#04543) ブロッキング : Blocking One (#03953)、検出 : Chemi-Lumi One L (#07880)



① SDS(+), ② SDS(-), ③ A社(SDS入り)

データご提供 : 近畿大学 農学部 応用生命化学科 応用細胞生物学研究室 森山 達哉 准教授

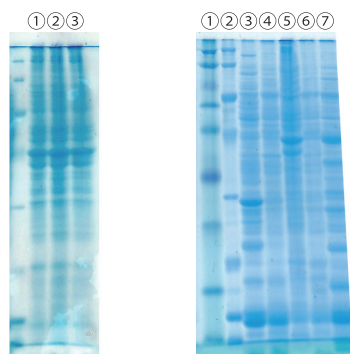
細胞質や核などに存在している抽出しにくいタンパク質が、効率良く抽出できました。

実施例 3 RIPA Buffer(10x) を用いて抽出したタンパク質溶液の免疫沈降

ここでは、細胞や組織溶解用の弊社 RIPA Buffer(10x) を用いて抽出したサンプルを免疫沈降後、Chemi-Lumi One L により検出した例を示します。弊社 RIPA Buffer(10x) は、免疫沈降に悪影響を与える可能性のある SDS を別添付した製品です。

抽出時の細胞溶解性は SDS(+)の方が高く、どのような組織でも問題なく抽出できています。一方、免疫沈降は、SDS(-)の方が効率良く行えています。このように、本製品では SDS を含まない条件でもご使用いただけます。

● 抽出



抽出条件 : 冷 PBS で洗浄した組織切片 100 mg に対して、RIPA Buffer 300 μ L を氷上で 30 分処理

染色 : CBB Stain One (#04543)

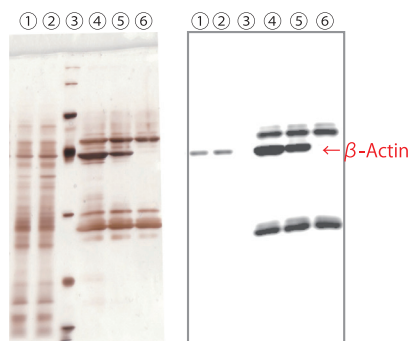
左図 : マウスの胃から各 RIPA を用いてタンパク質を抽出した溶液

- ① SDS(-)RIPA
- ② SDS(+)RIPA
- ③ B社 RIPA (SDS入り)

右図 : ① Pre-stained Protein Markers (Broad Range) (#02525-35)

- ②タンパク質マーカー (10倍濃縮) (#29458-24)
- 各組織から SDS(+)RIPA を用いてタンパク質を抽出した溶液
- ③ Mouse Liver
- ④ Mouse Kidney
- ⑤ Mouse Stomach
- ⑥ Mouse Brain
- ⑦ Mouse Heart

● 免疫沈降



抽出条件 : Jurkat Cell 1.0×10^7 個に対して、RIPA Buffer 1 mL を氷上で 15 分処理

- ① SDS(-)RIPA を用いてタンパク質を抽出した溶液
- ② SDS(+)RIPA を用いてタンパク質を抽出した溶液
- ③タンパク質マーカー (10倍濃縮) (#29458-24)
- ④ SDS(-)RIPA を用いてタンパク質を抽出した溶液から免疫沈降した溶液
- ⑤ SDS(+)RIPA を用いてタンパク質を抽出した溶液から免疫沈降した溶液
- ⑥ アガロースコントロール

一次抗体 : β -Actin抗体 (C4) (Santa Cruz #sc-47778)

二次抗体 : goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz #sc-2005)

左図染色 : Sil-Best Stain One (#06865-81)

右図検出 : Chemi-Lumi One L (#07880)







Appendix

Dispotray

弊社では電気泳動ゲルの染色やブロットイングメンブレンの洗浄など、さまざまな用途に使用できるディスポーザブルトレイを用意しています。

※Dispotray (#06563-44) は Dispotray-M (#16551-84) に製品名、製品番号が変わりました。

Dispotray の製品比較

製品名	Dispotray-S			Dispotray-M		
製品番号	16526-82			16551-84 (旧 06563-44)		
外寸	横 150 mm	縦 105 mm	高 19 mm	横 200 mm	縦 140 mm	高 25 mm
底面サイズ	横 122 mm	縦 80 mm	—	横 155 mm	縦 105 mm	—
使用可能なゲルサイズ	横 110 mm×縦 80 mm 以下			横 140 mm×縦 105 mm 以下		
Bullet PAGE One Precast Gel での使用例						
使用可能な液量*1	20 ~ 80 mL			30 ~ 160 mL		
液量別の使用状況*2,*3	 液量 20 mL	 液量 80 mL	 液量 30 mL	 液量 160 mL		

*1 使用可能な液量は、振とうの強さ、液の物性(有機溶媒、界面活性剤などの有無)により異なります。

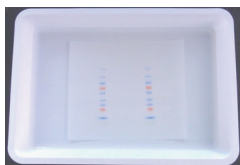
*2 トレイ内の液量が少ない場合、振とうを少し強くした方がゲル全体を均等に染めることができます。

*3 トレイ内の液量が多い場合は、強く振とうするとトレイからこぼれることがあるので、注意してください。

Dispotray-S

使用例 ミニゲルのウェスタンブロットイング

ミニゲルのウェスタンブロットイングには Dispotray-S がおすすめです。



メンブレンに転写したタンパク質の反応

泳動ゲル : Bullet PAGE One Precast Gel
メンブレン : PVDF (横 85 mm×縦 70 mm)
トレイ : Dispotray-S (#16526-82)

使用方法

1. 本製品に、染色液などを 20 ~ 80 mL 入れ、電気泳動後のゲルを破損しないように移します。
2. 染色終了後、廃液用容器に本製品の角から、少しずつ液を除去し、本製品内の液量が約 15 mL になるまで減らします。
3. 本製品の対角線に沿って角を合わせるように、本製品を折り曲げます(図 1、図 2)。
4. 溶液排出側を図 3 のように手で押さえ、ゲルが落下しないよう注意しながら、液を除去します。

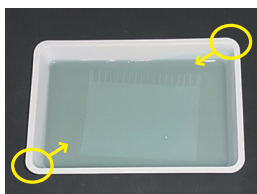


図 1. 対角に折り曲げます。

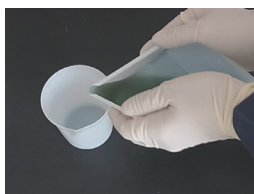


図 2. 少し折り曲げ、トレイ内の液を少量除去します。

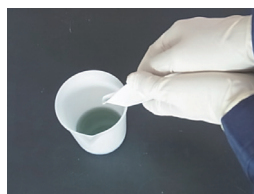


図 3. さらに折り曲げて、ゲルが落下しないように、トレイ内の液を除去します。

Dispotray-S
(#16526-82)



 Nacalai オンラインカタログへ

Dispotray-M
(#16551-84)



 Nacalai オンラインカタログへ

ご注意 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になる場合があります。

ナカライテスク株式会社

■販売取扱店

〒604-0855 京都市中京区二条通烏丸西入東玉屋町 498

ウェブサイト

<https://www.nacalai.co.jp/>

価格・納期のご照会

試験はここに
0120-489-552

製品に関する技術的なご照会

<https://www.nacalai.co.jp/ss/Contact/>
TEL:075-211-2703

製品名	規格	製品番号	容量	価格
Albumin, Bovine Serum, Globulin Free	GR	01281-97	10 g	6,750
		01281-84	50 g	24,150
		01281-26	100 g	41,900
BCIP-NBT Solution Kit for Alkaline Phosphatase Stain, Nuclease tested	SP	03937-60	1 kit	13,500
【代替品】BCIP-NBT Solution(Ready To Use)	SP	19880-84	100 mL	10,000
Blocking One	SP	03953-66	100 mL	3,600
		03953-95	500 mL	7,300
Blocking One-P	SP	05999-84	200 mL	4,800
Bullet Blocking One for Western Blotting	SP	13779-56	50 mL	2,000
		13779-14	200 mL	4,800
		13779-01	1 L	19,700
Bullet ImmunoReaction Buffer	SP	18439-85	500 mL	18,000
Bullet Semi-dry Transfer One	SP	15353-01	1 L	9,000
CBB Stain One(Ready To Use)	SP	04543-51	1 L	13,000
		04543-64	5 L	55,000
Chemi-Lumi One L	SP	07880-54	2 X 50 mL	8,000
		07880-70	1 kit	24,100
Chemi-Lumi One Markers Kit	SP	06456-70	1 kit	27,000
Chemi-Lumi One Super	SP	02230-14	2 X 10 mL	8,000
		02230-30	1 kit	29,700
Chemi-Lumi One Ultra	SP	11644-24	2 X 10 mL	12,000
		11644-40	1 kit	49,000
Dispotray-M	—	16551-84	20 pieces	2,000
Dispotray-S	—	16526-82	25 pieces	2,000
Ethanol(99.5)	JIS 試薬特級 GR	14713-95	500 mL	2,450
		14713-53	3 L	11,500
Glycine	SP	17141-95	500 g	4,550
Metal Enhancer for DAB Stain	SP	07388-24	100 mL	4,300
Methanol	劇 JIS 試薬特級 GR	21915-93	3 L	3,900
Peroxidase Stain DAB Kit(Brown Stain)	SP	25985-50	1 kit	17,000
Peroxidase Stain Kit for Immuno-blotting, Nuclease tested	SP	26652-70	1 kit	11,000
Phosphatase Inhibitor Cocktail	SP	07574-61	1 mL	16,000
Phosphatase Inhibitor Cocktail(EDTA free)	SP	07575-51	1 mL	16,000
Phosphate Buffered Saline(10x)(pH 7.4)	—	27575-31	1 L	5,200
Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate	SP	28353-14	50 g	2,450
		28353-85	500 g	3,950
Ponceau S	SP	28322-72	25 g	13,950
Potassium Chloride	SP	28538-62	25 g	1,700
		28538-75	500 g	3,850
Potassium Dihydrogenphosphate	SP	28736-75	500 g	5,950
Pre-stained Protein Markers(Broad Range) for SDS-PAGE	SP	02525-35	500 μ L	16,500
Pre-stained Protein Markers(High Range) for SDS-PAGE	SP	26039-75	500 μ L	17,000
Pre-stained Protein Markers(Low Range) for SDS-PAGE	SP	28941-75	500 μ L	17,000
【代替品】Protein Ladder One Plus, Triple-color for SDS-PAGE	SP	19593-25	500 μ L	19,500

製品名	規格	製品番号	容量	価格	
Protease Inhibitor Cocktail(EDTA free)(100x)	SP	03969-21	5 X 1 mL	25,500	
		03969-34	15 X 1 mL	72,000	
Protease Inhibitor Cocktail for General Use(100x)	SP	04080-24	1 mL	7,000	
		04080-11	5 X 1 mL	25,500	
Protease Inhibitor Cocktail for Use with Mammalian Cell and Tissue Extracts	SP	25955-24	1 mL	8,500	
		25955-11	5 X 1 mL	31,000	
Protein Ladder One, Multi-color(Broad Range) for SDS-PAGE	SP	09549-25	500 µL	26,500	
Protein Ladder One, Triple-color(Broad Range) for SDS-PAGE	SP	09547-74	250 µL	19,500	
【代替品】 Protein Ladder One Plus, Triple-color for SDS-PAGE	SP	19593-25	500 µL	19,500	
Protein Markers(M.W. 6,500~200,000)(10x) for SDS-PAGE	SP	29458-24	200 µL	28,000	
Rapid CBB Destain Kit	SP	30046-74	1 set	9,800	
RIPA Buffer(10x)	SP	08714-04	1 set	14,500	
RIPA Buffer	SP	16488-34	100 mL	10,500	
Sample Buffer Solution with 2-ME(2x) for SDS-PAGE	毒	SP	30566-22	25 mL	5,700
Sample Buffer Solution without 2-ME(2x) for SDS-PAGE	SP	30567-12	25 mL	5,600	
Sample Buffer Solution with Reducing Reagent(6x) for SDS-PAGE	SP	09499-14	5 mL	6,200	
Sample Buffer Solution without Reducing Reagent(6x) for SDS-PAGE	SP	09500-64	5 mL	5,600	
Semi-dry Blotting Buffer Solution for Western Blotting	SP	30650-31	1 L	6,200	
Signal Enhancer HIKARI for Western Blotting and ELISA (50ml)	SP	02267-41	1 set	10,000	
Signal Enhancer HIKARI for Western Blotting and ELISA (250ml)	SP	02270-81	1 set	30,000	
Signal Enhancer HIKARI for Western Blotting and ELISA Solution A	SP	02272-74	250 mL	17,000	
Signal Enhancer HIKARI for Western Blotting and ELISA Solution B	SP	02297-64	250 mL	17,000	
Skim Milk	SP	31149-75	500 g	4,300	
Sodium Chloride	SP	31333-45	500 g	2,200	
di-Sodium Hydrogenphosphate	SP	31738-55	500 g	4,700	
TBS(10x)(pH 7.4)	SP	12748-31	1 L	7,000	
TBS(10x)(pH 7.4)(High Salt)	SP	12751-71	1 L	7,000	
TMB Solution for Western Blotting	SP	18186-24	200 mL	11,500	
Tris-Glycine Buffer Solution(10x)(pH 8.3)	SP	09422-81	1 L	7,000	
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	SP	35434-76	100 g	4,250	
		35434-05	500 g	10,500	
0.05%-tTBS(10x)(pH 7.4)	SP	12749-21	1 L	8,700	
0.1%-tTBS(10x)(pH 7.4)	SP	12750-81	1 L	8,900	
0.1%-tTBS(1x)(pH 7.4)	SP	08284-15	500 mL	2,200	
		08284-44	5 L	12,000	
WB Stripping Solution	SP	05364-55	500 mL	16,700	
WB Stripping Solution Strong	SP	05677-65	500 mL	20,400	
WB Stripping Solution Trial Set	SP	05680-21	1 set	3,600	

ご注意 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になる場合があります。

※掲載価格は2023年4月現在のものです(消費税は含まれていません)。

ナカライテスク株式会社

■販売取扱店

〒604-0855 京都市中京区二条通烏丸西入東玉屋町 498

URL <https://www.nacalai.co.jp/>

価格・納期のご照会

試薬はここに
0120-489-552

製品に関する技術的なご照会

<https://www.nacalai.co.jp/ss/Contact/>
TEL:075-211-2703