

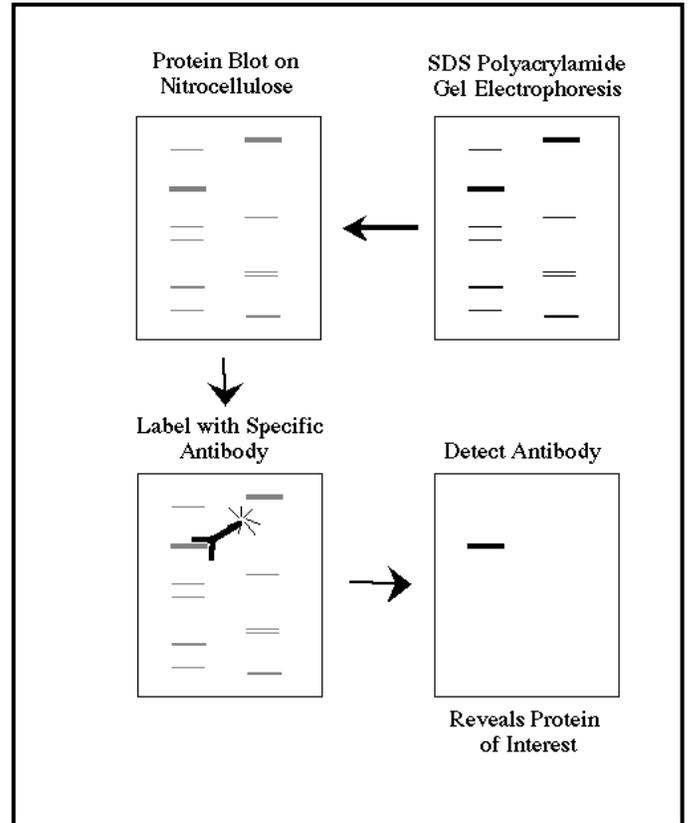
Western Blotting法

基本的な手順は以下のようになっている。

- 1:電気泳動
- 2:Blotting
- 3:Blocking
- 4:一次抗体反応
- 5:二次抗体反応
- 6:検出

基本原理

注意：なお、検出感度をあげるため、3次抗体を用いる方法もある。また、目的のタンパク質や用いる抗体の特性等により、Blocking溶液や反応系・緩衝液の組成を変える場合も多い。更に検出の際にも様々な検出法がある。あくまでも本プロトコールは標準的なプロトコールであるので、注意する事。



1: 電気泳動 (SDSPAGE: SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis法)

(原理)

タンパク質分離法として、代表的な方法が電気泳動法である。目的により様々な電気泳動法があるが、ここでは代表的なSDS-PAGE法、その中でも代表的なLaemmli法の解説を行う。タンパク質は、アミノ酸のペプチド結合による重合体であり、構成するアミノ酸の数や組み合わせはタンパク質によって異なり、更にアミノ酸の残基同士が結合することで立体構造をとっている。この立体構造がタンパク質の機能発現や酵素活性に重要な役割を果たしている。この場合、分子量がそのタンパク質の大きさに比例しない場合がある。

SDS-PAGE法は、2-メルカプトエタノールのような還元剤を用いてタンパク質分子内のジスルフィド結合を切断したタンパク質試料に、負の電荷を持つ界面活性剤であるSDS(Sodium Dodecyl sulfate: ドデシル硫酸ナトリウム)を入れ、タンパク質にSDSが結合することにより、タンパク質の高次構造がほぼ完全に壊れ、一本鎖の状態とな

る。さらに、タンパク質に結合するSDSの量は、タンパク質1gに対して約1.4 gと一定であることから、アミノ酸組成などの関係なく電荷密度が一定となる。つまり、タンパク質分子の形状に違いがなくなり、分子ごとの荷電量がタンパク質の分子量に比例する事から、タンパク質の移動度はその分子量のみに左右され、単純に分子量の違いでタンパク質を分離することが可能となる。

(A)ゲル作成

(原理)

代表的なSDS-PAGE法のゲルは、分離用ゲル(separation gel)と濃縮用ゲル(Stacking gel)の二層よりなり、まず分離用ゲルを固めたのち、濃縮用ゲルを重ねる。分離目的のタンパク質の分子量により、使用するゲル中のアクリルアミドの濃度を変える必要がある。一般に分子量の小さいタンパクほど速く（下に）泳動される。目的とするタンパク質の分子量によってゲルの濃度を変えなければならない。およその範囲は以下の通り。

アクリルアミド濃度	5%	10%	15%
タンパク質の分子量(kD)	60-200	16-70	12-45

(準備)

- *ゲル板
- *コーム
- *クリップ
- *スペーサー
- *蒸留水
- *シリンジ

(試薬)

- * トリスヒドロキシメチルアミノメタン（通称：トリス）
- * アクリルアミド(神経毒であるので注意)
- * N,N'-メチレンビスアクリルアミド
- * SDS (Sodium Dodecyl sulfate)
- * 塩酸pH調整用
- * 過硫酸アンモニウム (Ammonium persulfate)
ゲルの重合はラジカルとの反応により起こる。ラジカルの供給源である。
- * N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED : N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine:)

(**暗冷所保存, 共通試薬**) これを入れるとアクリルアミドの重合が始まるので最後に加える。

(溶液)

- * 30%アクリルアミド溶液（暗冷所保存）
29.2gアクリルアミド0.8g メチレンビスアクリルアミドに蒸留水を加えて

100 ml とする。

- * Separation Gel buffer: 1.5 M Tris-HCl pH 8.8
18.17gのTrisと蒸留水に溶かし、塩酸でpH8.8に調整した後、最終容量を100 mlにする
- * Stacking Gel buffer :0.5 M Tris-HCl pH 6.8
6.06gのTrisを溶かし、塩酸でpH6.8に調整した後、最終容量を100 ml にする。
- * 10 % APS (Ammonium persulfate) 溶液 (暗冷所保存)
ペルオキソ硫酸アンモニウムを蒸留水に溶かして作成。用時調整か、-20°Cで保存
- * 10 % SDS溶液

混合比(ml)

分離ゲル	8%	10%	12%	15%
30%アクリルアミド溶液	4	5	6	7.5
Separation Gel Buffer	5	5	5	5
10 % SDS溶液	0.2	0.2	0.2	0.2
10 % APS 溶液	0.2	0.2	0.2	0.2
TEMED		0.02	0.02	0.02
蒸留水		10.58	9.58	8.58

濃縮ゲル

30%アクリルアミド溶液	1.30
Stacking Gel Buffer	2.5
10 % SDS 溶液	0.1
10 % APS 溶液	0.1
TEMED	0.01
蒸留水	6.10

(手順)

- 1 ゲル板をエタノールで洗浄し、液漏れ防止用のスペーサーをはさんでクリップで止める。組み立てたゲル板に蒸留水を注いで、液漏れのないことを確認しておく。(その後、良く水きりをしておかないと、ゲルの濃度が変わってしまうので注意。)
- 2 分離させたいタンパクの分子量をもとにアクリルアミドの量を決め、上に示した割合で試薬をまぜる。この際、APS溶液とTEMED以外を先に入れて泡が出ないようによく混ぜる。いれると、固まり始めるので注意。
- 3 気泡を作らない用にゲルに流し込む。高さは8割位が適当。ゲルの上端が乾燥しないように、蒸留水ある いは、水飽和ブタノールを5mmくらい重層する

- 4 30分位でゲルが固まるので、重層した水あるいはブタノールを良く洗った後、濃縮ゲルを作って、重層し、素早くコームを差し込む。この際、気泡が入らないように気をつける。やはり、30分位でゲルが固まる。
- 5 テフロンチューブをはずし、下に気泡が入らないようにして電気泳動用緩衝液を満たした泳動槽に立てる。上にも電気泳動用緩衝液を入れ、コームを静かに抜く。溝にたまったゲルかすをシリンジ等を用いて取り除く。

(B) サンプル調整

(準備)

- * ヒートブロック

(試薬)

- * トリスヒドロキシメチルアミノメタン (通称：トリス)
- * 塩酸
- * Bromophenol Blue
- * SDS (Sodium Dodecyl sulfate)
- * Glycerol
- * Bromophenol Blue
- * 2-Mercaptethanol

(溶液)

* 2×SDSサンプルバッファー

- * 0.25M Tris-HCl(pH6.8) 25ml (0.125M)
- * 2-Mercaptethanol 5ml (10.0%)
- * SDS 2g (4.0%)
- * Glycerol 15ml (30.0%)
- * Bromophenol Blue 1mg (0.002%)
- * 蒸留水で50mlとする、冷蔵保存 ※ 長期保存の場合は2-Meは入れないほうがよい

(手順)

- 1) 既にタンパク質を定量したサンプル溶液に、同量の2×SDSサンプルバッファーを加える。
- 2) ヒートブロックで100°C、5分間処理する。

(C) 電気泳動

(試薬)

- * トリスヒドロキシメチルアミノメタン (通称：トリス)
- * グリシン(Glycine)
- * SDS (Sodium Dodecyl sulfate)

(溶液)

* 10x電気泳動バッファー

- * Tris base 30.3g (250mM)
- * Glycine 144g (1.92M)
- * SDS 10.0g (1.0%)
- * 蒸留水で1 literとする、室温保存

(手順)

- 1)ゲル板を泳動槽にセットし、1x泳動バッファーで泳動槽を満たす。
- 2)サンプル、マーカ―を各ウェルに入れた後、し、パワーサプライにつなぎ、電気を流す。
電圧はだいたい200 V以下で行う。あるいは、20~30mA/1ゲル(定電流)で90~60分泳動する

きれいなバンドを得たい場合は、さらに低い電圧で行う。サンプルが流れきらないように注意して泳動する。

サンプル(1 レーンあたり；全細胞溶解液：40-60 μ g)を目安に泳動する。

2: Blotting

(原理)

細胞内のタンパク質をSDS-PAGE法で分子量の違いにより分離したのち、そのゲルからニトロセルロースなどの膜に電気泳動で転写する。方法として、ウェット式とセミドライ式がある。ドライ式は、ウェット式に比べて短時間で終わるが、高分子量のタンパク質の転写効率があまり良くなく、目的とするタンパク質の分子量や実験によってウェット式と使い分けておこなうと良い。本プロトコールではセミドライ法の代表的なプロトコールを記載する。

(準備)

- * ろ紙 (ゲルより一回り大きいサイズにしたもの)
- * 容器 (タッパーウェア、ハイブリバッグ)
- * プロット用メンブレン (ニトロセルロース、PVDF)
- * パワーサプライ、
- * スパーテル
- * ピンセット
- * ブロティング装置(トランスプロットSD セルBIO-RAD等)

(試薬)

- * トリスヒドロキシメチルアミノメタン (通称: トリス)
- * グリシン(Glycine)
- * NaCl
- * ホウ酸
- * メタノール

(溶液)

- * トランスファーバッファー
Tris (1.51 g)を蒸留水(350 ml)に溶解。ホウ酸でpH9.5に滴定し蒸留水で400 mlとする。
メタノール (100 ml)を加えTotal 500 mlとする。

(手順)

- 1) SDS-PAGEによる泳動が終了後、ゲルを壊さないようにして、トランスファーバッファーに浸し、10分以上平衡化させる。
- 2) PVDFメンブレンをメタノールに30秒浸した後トランスファーバッファーに3分間浸し平衡化させる。
ニトロセルロースメンブレンを用いる場合は、上記の操作は不必要である。
(これらのメンブレンはタンパク質を吸着する能力が高いため、素手で扱わないように注意する)
ろ紙もあらかじめ、トランスファーバッファーに浸しておく。

- 3) 陰極(-) : ろ紙(2~3枚): ゲル: メンブレン: ろ紙: (+)陽極の順で重ね、固定する。この時ゲルとメンブレンの間に気泡が入らないように注意する。
- 4) 9 V、55分間ブロッキングする。時間を長くすると低分子のタンパク質がメンブレンを通り抜けてしまうので分子量にあわせて時間を調節する。通電、15 V 定電圧、30 分間
(ろ紙サイズ1 cm² あたり1 mA 定電流、2 時間でも可。但し25 V 以下)
- 5) ブロッキング終了後、メンブレンをピンセットを用いて取り出しゲルが転写された側を上にして容器に入れる。この際に、ゲルが当たっていた部分を鉛筆でマーキングする

3: Blocking (ブロッキング)

(原理)

SDS-PAGEで分離したタンパク質をブロットしたメンブレンへの、非特異的な抗体の吸着を防ぐために行う。市販のブロッキング溶液を用いる場合もある。以後の一次・二次抗体でのインキュベーションにおいても、このブロッキング溶液で抗体を希釈したものをを用いる。

(準備)

- * 容器 (タッパウエア、ハイブリバッグでも可)
- * 振とう用の器械 (シェーカー等)

(試薬)

- * トリスヒドロキシメチルアミノメタン (通称: トリス)
- * NaCl
- * 塩酸 (pH調整用)
- * スキムミルク
- * Tween20 (必須ではない)

(溶液)

- * ブロッキング溶液
市販のブロッキング溶液か、1%~5%のスキムミルク-TBSかPBSに Tween20 (界面活性剤)を数%入れる。
- * TBSかPBS
TBS : 1M Tris-HCl (pH 7.5) 10ml、NaCl 4.38gを加えて、蒸留水で

500mlにする。

- * メンブレンの洗いに用いる。以下の操作にも使用するので多めに用意する。
- * ブロッキング溶液と同じものを用いる。

(操作)

- 1) ブロッキング溶液を入れて1時間；室温 あるいは 4度；一晩 (overnight)で 振とうする。
- 2) 洗い 3分を3回～5回程洗う、PBS あるいは、TBSを用いるが、ブロッキング溶液と同じものを用いる。

4: 一次抗体反応

(原理)

ブロッキング操作に続き、メンブレンにブロットした目的のタンパク質を、特異的な抗体と反応させる。

抗体の希釈倍率はそれぞれ異なるので、市販の抗体の場合は添付されたデータシートに従う。しかしながら、

Lot によって差が出るので、自分で濃度の検定を行うことが望ましい。データシートはあくまでも目安である。

(準備)

- * 容器 (ハイブリバッグでも可)
- * 振とう用の器械 (シェーカー等)

(試薬)

- * 一次抗体反応溶液
ブロッキング溶液と同じものを用いる。この溶液に抗体を希釈して入れる。
- * *PBS あるいは、TBSを用いる。
メンブレンの洗いに用いる。多めに用意する。 ブロッキング溶液と同じものを用いる。
Tween20等の界面活性剤を、0.1～0.5%入れる場合もあるが、必須ではない。

(操作)

- 1) 一次抗体溶液を入れて1時間；室温 あるいは 4度；一晩 (overnight)で 振とうする

2) PBS あるいは、TBSで、3分を3回～5回程、メンブレンを洗う。

5: 二次抗体反応

(原理)

一次抗体に特異的な抗体を、反応させる。2次抗体には、酵素が結合されており、この酵素の様々な基質との反応により、目的のタンパク質を検出する。2次抗体の希釈率も、メーカーの添付したデータシートを参考にするが、実際に、様々な希釈率で設定した方がよい。

(準備)

- * 容器 (ハイブリバッグでも可)
- * 振とう用の器械 (シェーカー等)

(試薬)

- * 2次抗体反応溶液
ブロッキング溶液に、二次抗体を希釈して入れる。
horseradish peroxidase標識か、Alkaline Phosphatase標識された二次抗体がよく用いられる。
- * PBS あるいは、TBS。
メンブレンの洗いに用いる。ブロッキング溶液と同じものを用いる。
Tween20等の界面活性剤を、0.1～0.5%入れる場合もあるが、必須ではない。

(操作)

- 1) 2次抗体溶液を入れて30分～1時間；室温で 振とうする
- 2) PBS あるいは、TBSで、5分を3回～5回程、メンブレンを洗う。メンブレンを5分×3回洗浄する

6: 検出

(原理)

発色あるいは発光反応により、目的のタンパク質を検出する。発色か発光かは、2次抗体の酵素と基質により選択する。発色反応の場合はメンブレン上で行うが、発光の場合は、フィルムに感光させたり、専用のスキャナーで検出させる必要がある。ここでは、二次抗体にhorseradish peroxidase標識抗体を用いた、

代表的なECL法による化学発光反応による検出方法のプロコールを紹介する

(準備)

- * フィルム
容器
- * ラップ (サランラップ)

(試薬)

- * 化学発光検出試薬
- * 蒸留水 (洗い)
- * X線フィルム用現像液(マニュアルに沿って調整する)
- * 停止液(1.5%酢酸、氷酢酸を希釈して作成する)
- * X線フィルム用定着液(マニュアルに沿って調整する)

(操作)

- 1 洗ったメンブレンをラップ上に置き、調整しておいた検出試薬をかける。
5分間程、静置する。
- 2 検出試薬を除去し、気泡をいれないようにしてメンブレンをラップで包む。
- 3 暗室にて、メンブレンの表をフィルム側にして置く。
- 4 30秒～数分間露光した後にフィルムを現像する。シグナルの強さにより露光時間を調節する。
- 5 適当な露光時間の見当がつかないときは、とりあえず15秒と60秒の露光の2種類を試してみる
(ア)その結果により適正な露光時間を決定する