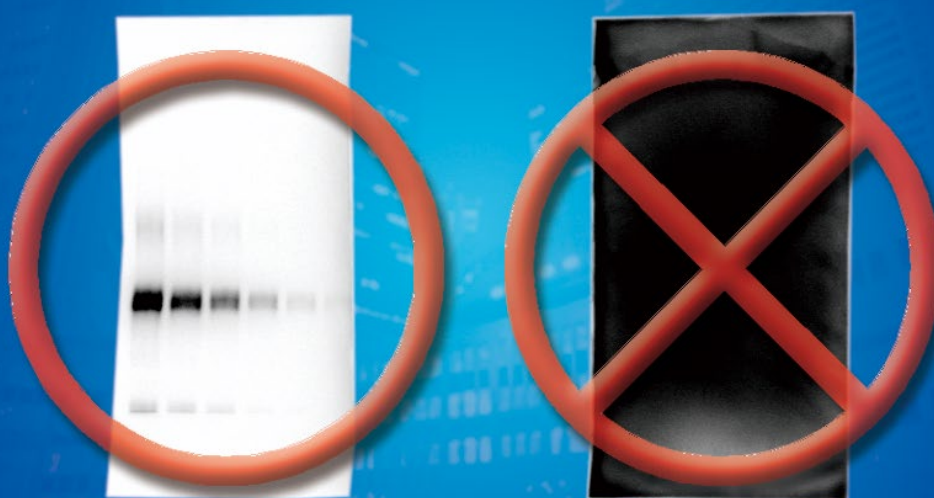


電気泳動～発光検出まで「なるほど！」のコツ (knacks & Tips) 情報が満載！

ATTO Technical Manual

2025年10月 価格改定版

ケミルミ検出のコツ for Western blotting



Supporting Life Research
ATTO corporation

化学発光(ケミルミ)検出のコツ ウエスタンブロッティング編

ATTO Corporation

Tokyo

3-2-2 Motoasakusa Taito-ku Tokyo 〒111-0041

TEL 03-5827-4861 FAX 03-58274-6647

URL <http://www.atto.co.jp/>

Osaka

2-8-1 Higashitenma Kita-ku Osaka-city 〒530-0044

TEL 06-6136-1421 FAX 06-6356-3625



目次	1
はじめに	2
1.電気泳動	3~6
2.ウエスタンブロッティング	7~10
3.ブロッキング	11~12
4.抗原抗体反応	13~14
5.発光基質添加と発光検出	15~16
6.発光パターンの撮影	17~18
7.トラブルシューティング	19~20
ウエスタンブロッティングのコツ	21~23
Knacks & Tips for Western Blotting	

はじめに

本資料は、タンパク質をウエスタンブロッティング法によって検出定量するための基本的な「実験方法の手順」を左ページに記し、関連の特記事項、注意事項などの「実験上のポイント」を右ページに記しています。左右のページを参照しながらお読みください。

なお、ここでは、一般的な試薬のほかに、アトー製 試薬キットや電気泳動装置などを使用し、泳動～抗体反応～検出などの実験方法における細かい注意点などをまとめています。検出にはケミルミネッセンス撮影装置「LuminoGraph」を例にご紹介しています。これらの実験方法は、X線フィルムでの検出、他社ケミルミ撮影装置にも応用できますのでご参考になれば幸いです。

「**ウエスタンブロッティング法**」は、タンパク質抽出試料を電気泳動によって分離したのち、PVDFメンブレン上にトランスファー(転写)し、抗体を用いて目的のタンパク質を特異的に検出する方法です。目的タンパク質に特異的な1次抗体を反応させ、続いてHRPなどの酵素標識した2次抗体を反応させた後、酵素発色、または酵素反応による発光でバンドを検出します。ウエスタンブロッティング法は、特に発光検出と組み合わせた場合、目的のバンドを高感度に検出できます。

ウエスタンブロッティング法は、電気泳動・転写・ブロッキング・抗原抗体反応・発光検出などの全ての実験ステップが成功して初めて良い結果が得られます。しかし、さまざまなトラブルが原因で、綺麗なデータが得られず悩んでいる方も多いと思います。多くの場合、以下のようなケースが見られます。

■バンドの検出状態

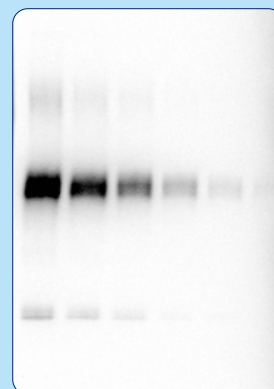
- 目的のバンドが薄く、確認ができない。
- バックグラウンドが高い。
- ムラなどにより目的バンドの確認ができない。
- バンドやパターン全体が歪んでしまう。
- バンドの中心が白抜け(黒抜け)する。
- 汚れのようなものが検出される。

■発光パターンの取り込み方法の問題

- X線フィルムは適正な露光具合の調整が難しい。
- X線フィルムはデータの読み取りや解析が難しい。

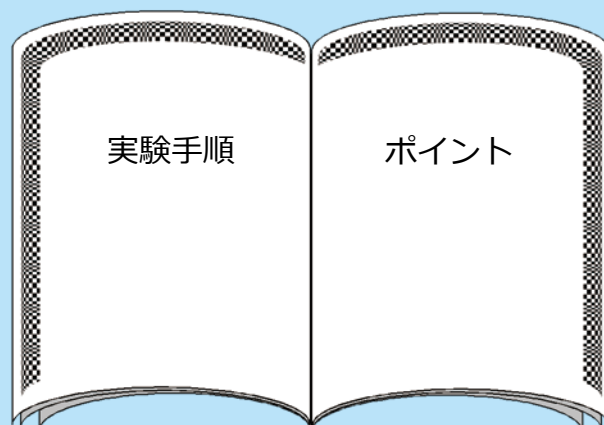
■その他

- ポリクローナル抗体を使用しているので、バンドの分子量を推定したい。
- バンドの濃淡の定量がうまくできない。



上記のような問題点を克服するには、細かいテクニックや工夫が必要です。本書で紹介する、今までと違う実験・検出方法を行うことで解決できる場合もあります。

アトー株式会社



1. 電気泳動 (SDS-PAGE)

① 試料 (サンプル) の調製

- 細胞や組織からタンパク質を抽出し、精製します。
- 電気泳動用試料は脱塩をしっかりとします。
- 溶解しなかった固形成分や脂質は遠心して取り除きます。

お勧め: **WSE-7420 EzRIPA Lysis Kit**→動物細胞用全タンパク質抽出試薬 ¥9,800/kit

② ゲル・バッファの調製

■ SDS-PAGE用泳動バッファの調製

必要な試薬を量り、蒸留水で溶解します。

試薬の種類	組成	保存
SDS-PAGE用泳動バッファ (Laemmliバッファ)	25mM トリス、192mM グリシン、 0.1%(w/v) SDS	室温
	AE-1410 EzRun (¥5,720/10L分 粉末)	室温

■ 電気泳動ゲルの作製

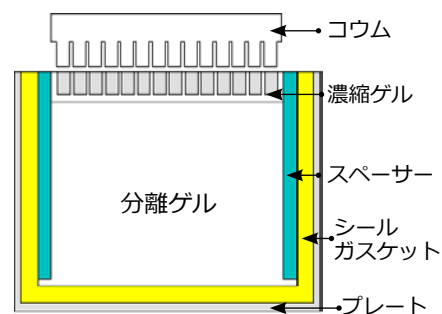
ゲル作製に先立ち、下表ゲル作製用保存液A～Dを調製します。保存液A～Cは4℃で約1ヶ月保存可能です。混合表を参考にしてビーカーなどに保存液を分注し、希望の濃度のゲル溶液を作製します。組上げたプレート(AE-6401など)に分離ゲル溶液注入→固化→濃縮ゲル溶液注入→固化の順にゲルを作製します。作製したゲルは冷蔵で2, 3日保存できますがなるべく早く使用してください。

□ ゲル作製用保存液組成表

種類	組成	保存
ゲル作製保存溶液A アクリルアミド溶液	29.2%(w/v)アクリルアミド 0.8%(w/v)ビスアクリルアミド	冷蔵
ゲル作製保存溶液B 分離ゲル用バッファ	1.5M トリス塩酸(pH8.8) 、0.4%(w/v)SDS	冷蔵
ゲル作製保存溶液C 濃縮ゲル用バッファ	0.5M トリス塩酸(pH6.8) 、0.4%(w/v)SDS	冷蔵
ゲル作製保存溶液D	10%ペルオキシ二硫酸アンモニウム	要時調製

□ アトーミニスラブゲル (8.5×9cm 1mm厚) 2枚用 試薬混合表

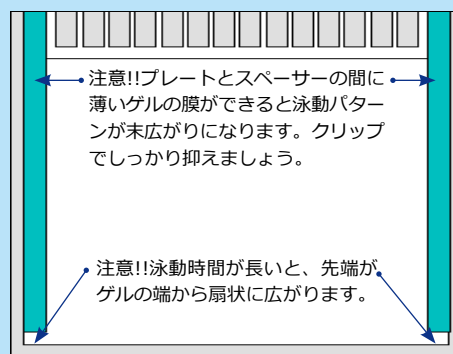
	分離ゲル						濃縮ゲル
T%ゲル濃度	5%	7.5%	10%	12.5%	15%	20%	4.5%
A (mL)	3.0	4.5	6.0	7.5	9.0	12.0	0.9
B (mL)	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	0
C (mL)	0	0	0	0	0	0	1.5
D (mL)	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.018
TEMED(mL)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
蒸留水(mL)	10.5	9.0	7.5	6.0	4.5	3.0	3.6
合計 (mL)	18.08	18.08	18.08	18.08	18.08	18.08	5.28



■ スマイリングの防止のために

スマイリングは、プレートとスペーサーの間に薄いゲルの膜ができてしまうと、電気が横方向にリークし、未広がりパターンになる原因になります。**クリップでスペーサー部分をしっかり押さえてください。**

気泡抜きのため、スペーサーの下両端にゲルができます。泳動先端がここに到達すると、電気は扇状に広がって流れるため下端がスマイリングします。**BPB (泳動用色素) がゲル先端の少し上まで来たら泳動を止めてください。**



1. 電気泳動 (SDS-PAGE)

①サンプル調製

タンパク質の分解・不純物の混在などに注意

タンパク質の分解や糖鎖の分解はバンドの分離パターンに影響し、バンドの計測が困難となります。サンプルの抽出方法、保存方法などによりタンパク質の分解、変性が起こることがある為、これらを最小限に留める事を考慮した実験方法をご検討ください。抽出サンプルの脱塩や精製が不十分な場合もパターンが乱れる原因となります。遠心ろ過などによる不純物の除去などもご検討ください。タンパク質抽出にはアトータンパク質抽出キットのご使用をお勧めします。詳細はお問い合わせください。

■タンパク質抽出試薬

コードNo.	製品名	価格	容量
2332336	WSE-7420 EzRIPA Lysis kit (全タンパク質抽出キット・動物細胞用)	¥ 14,800	100回分
2332339	WSE-7423 EzBactYeasty Crusher (全タンパク質抽出キット・大腸菌・酵母菌用)	¥ 17,800	100回分
2332337	WSE-7421 EzSubcell Extract (オルガネラ分画キット・動物細胞用)	¥49,800	50回分
2332338	WSE-7422 EzSubcell Fraction (オルガネラ抽出キット・動物細胞用)	¥46,800	50回分

②ゲル・バッファの調製

ゲル濃度の最適化・古い試薬は使わないように注意

目的タンパク質のバンドがシャープであるほど、検出後の解析がしやすくなります。適正なゲル濃度を決めるため、予備実験をすることをお勧めします。古くなったゲル調製用保存用液やバッファを使用するとパターンが乱れる場合があります。ゲルやバッファなどは、市販の製品（アトー社製 プレキャストゲル・電気泳動用試薬）の使用をお勧めします。

■ゲル調製用試薬

コードNo.	製品名	価格	容量
2332327	WSE-7310 EzGel Ace (高速ハイレゾゲル作製用バッファ)	¥ 9,800	250mL
2332329	WSE-7155 EzGel Stack (濃縮ゲル用バッファ)	¥5,800	250mL
2332328	WSE-7150 EzGel Sep (分離ゲル用バッファ)	¥5,800	250mL

■電気泳動用試薬

コードNo.	製品名	価格	容量
2332310	AE-1410 EzRun (SDS-PAGE用電気泳動バッファ)	¥ 7,800	10L用/粉末
2332320	AE-1412 EzRun C+ (高分離SDS-PAGE用電気泳動バッファ)	¥16,800	500mL用×10袋
2332325	AE-1415 EzRun T (低分子量SDS-PAGE用電気泳動バッファ)	¥13,800	50サンプル用
2332326	WSE-7065 EzRun MOPS (高速ハイレゾ電気泳動用バッファ)	¥ 9,800	250mL (20×)
2332330	AE-1430 EzApply (SDS-PAEG用サンプル処理溶液キット)	¥10,800	5mL×5回分

ハイレゾ電気泳動用既製ゲル「e-PAGEL HR」

コードNo.	製品名	ゲル濃度	分画範囲	検体数	アプライ量	価格	入数
2331950	EHR-T7.5L	7.5%	40～400kDa	14検体	最大24μL	¥ 21,800	10枚
2331955	EHR-T10L	10%	20～300kDa				
2331960	EHR-T12.5L	12.5%	10～250kDa				
2331965	EHR-T15L	15%	2～200kDa				
2331970	EHR-T520L	5-20%	5～400kDa				
2331975	EHR-T1020L	10-20%	2～300kDa	18検体	最大18μL		
2332050	EHR-R7.5L	7.5%	40～400kDa				
2332055	EHR-R10L	10%	20～300kDa				
2332060	EHR-R12.5L	12.5%	10～250kDa				
2332065	EHR-R15L	15%	2～200kDa				
2332070	EHR-R520L	5-20%	5～400kDa				
2332075	EHR-R1020L	10-20%	2～300kDa				

e-PAGEL HR「まとめ買い」お得情報

e-PAGEL HR (ミニゲルサイズ) は2箱以上をまとめてご注文いただくと割引価格にて購入いただけます。割引価格については右の表を参照ください。

箱数	1箱の価格	割引額	備考
1	21,800円	—	同一ゲルのまとめ買いの場合に適用されます。
2~4	19,300円	2,500円	
5~9	18,800円	3,000円	
10~	18,300円	3,500円	

1. 電気泳動（SDS-PAGE）

③電気泳動用試料調製と泳動準備

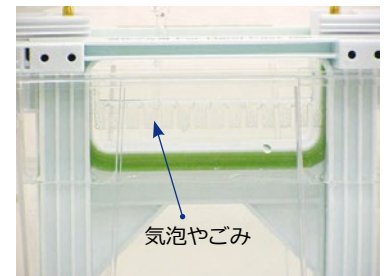
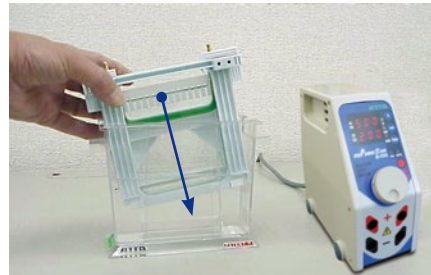
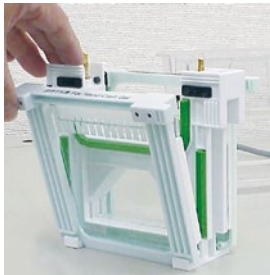
- SDS処理液と試料溶液を混合してサンプル溶液を調製します。
- SDS処理液は出来るだけ新しいものを使用してください。
- 100℃、1～5分間、煮沸して泳動用サンプルとします。

種類	組成
SDS処理液	0.5Mトリス塩酸(pH6.8) 、1%SDS、20%グリセリン 1% 2-メルカプトエタノール（BPB色素添加） AE-1430 EzApply（SDS処理液・高分離タイプ）



WSC-2615 MyMini Block C&H
小型ブロックインキュベータ

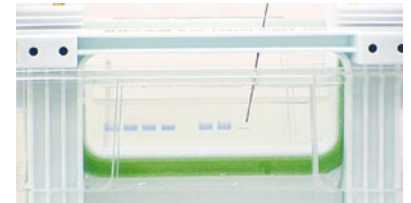
- ホルダーにゲルプレートセットします。
- 泳動槽に泳動バッファを注ぎ、ホルダーを泳動槽にセットします。
- 上部槽に泳動バッファを注ぎます。（写真はAE-6530 ラビダス・ミニスラブ電気泳動槽）



※上部槽は、下部槽を傾けて入れると、ゲルの下部に気泡が入りにくくなります。
ウエルの気泡はピペット等で洗浄するように取り除きます。

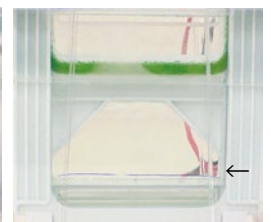
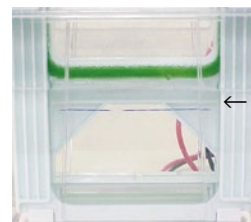
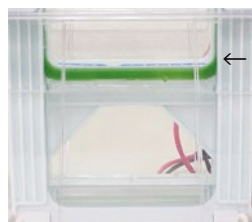
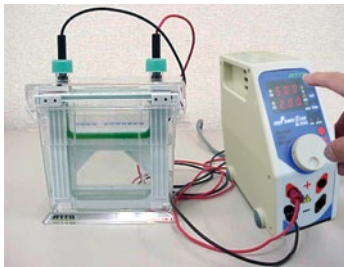
④サンプル溶液の注入

- サンプル溶液は、ウェルにゆっくり注入します。
- サンプル容量は均一にします。（ウェル毎の電流量を揃えるため）



⑤電気泳動 SDS-PAGE

- 泳動槽のリード線付き蓋を装着し、リード線を電源装置に接続します。
- 使用する泳動槽に適した泳動条件（時間/電流/電圧）を設定し電気泳動を開始します。
（通常ゲル1枚/20-30mA定電流。スタート時の電圧は80-120V程度：AE-6530型の場合）
- 電気泳動を開始後、ブロットイング、ブロッキング、抗体反応などの準備を行います。
ブロットイングなどの準備はpage 8以降を参照ください。



「←」は泳動中のBPBの位置。左から開始直後、約20分後、終了直前。

⑥電気泳動終了→ウェスタンブロットイングへ

- 60～90分後、BPB（泳動用色素）がゲル下端近くにきたら電気泳動終了します。
- ただちにブロットイング操作②へ進みます（page 8）。

1. 電気泳動 (SDS-PAGE)

③電気泳動用サンプルの調製と泳動準備

SDS処理液によって検出されるバンドのシャープさが変わります

一般的なSDS処理液は、タンパク質の還元剤として「2-メルカプトエタノール」を使用します。タンパク質のS-S結合が多かったり、タンパク質濃度が高い場合、還元が不十分でバンドが太くなったり、スミアになったりします。AE-1430 EzApplyでSDS処理を行うと、バンドがシャープになります。合わせてAE-1412 EzRun C+を使うと更にシャープなバンドが得られます。

□電気泳動用試薬

コードNo.	製品名	価格	容量
2332330	AE-1430 EzApply (SDS-PAEG用サンプル処理溶液キット)	¥10,800	5mL×5回分
2332320	AE-1412 EzRun C+ (高分離SDS-PAGE用電気泳動バッファー)	¥16,800	500mL用×10袋
2332346	WSE-7020 EzProtein Ladder (有色分子量マーカー) 245~5kDa 13本	¥26,800	250μL×2本

- 膜上の有色分子量マーカーは、アトー社製ケミルミ撮影装置で検出した場合、発光パターンと重ね合わせが可能です。
- 有色マーカーや、タグ付きマーカーは、プレキャストゲルで使用すると泳動パターンが乱れることがあります。
- 分子量マーカーと一緒に光らせる場合は、ビオチン標識分子量マーカーなどを使用します（下表参照/2022年3月現在）。

販売元	citiva(サイティバ)	サーモフィッシャー サイエンティフィック	バイオラッド ラボラトリーズ	ナカライテスク
名称	ECL DualVue Western Blotting Markers	SuperSignal Molecular Weight Protein Ladder	プレジジョン Plus プロテイン™ WesternC™ スタンダード	Chemi-Lumi One Markers
梱包	25回分	50回分	50回分	250μL
分子量 (kDa)	15/25/35/50/75/100/150	20/30/40/50/60/80/100/150	10/15/20/25/37/50/75/100/150/250	6.5/14/22/31/45/66/120/210
標識	S-タグ	IgG結合サイト	Strepタグ	ビオチン
2次抗体	S-Protein-HRP	anti-IgG-HRP	StrepTactin-HRP	Streptavidin-HRP conjugate

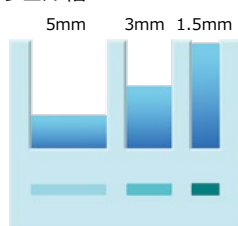
※上表中の試薬についての詳細は販売元メーカーへお問い合わせください。

④サンプル溶液の注入

注入の仕方でパターンが乱れたり、バンドの濃さが変わります。

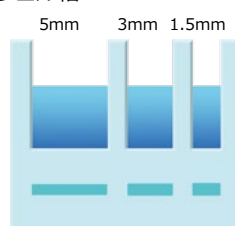
- サンプル注入の仕方によって、バンドパターンが乱れることがあります。
- 勢い良く注入したり、容量が多いとバンドの両端が膨らんだパターン（ひょうたん型）になることがあります。
- サンプルウェルの壁が曲がっているとバンドパターンが乱れる場合があります。
- 注入するサンプル容量を同じにします。サンプルがないレーンにはLoading bufferを注入します。
→サンプル容量を同じにすると、レーンごとの電流量のばらつきが小さくなりパターンの歪みを防ぎます。
- 検出時のバンドの濃さは、サンプル溶液の濃度が同じ場合で比較すると、濃縮率（サンプルウェル中の試料溶液の深さと、泳動・分離したときのバンドの厚みの比）が大きいほど高くなります（下図参照）。

ウェル幅



アプライ量が同じ場合
ウェル幅が狭いほうがバンドが濃く検出されます。
(TOTALタンパク量は同じです)

ウェル幅



サンプル溶液の深さが同じ場合
ウェル幅が違って、バンドの濃さは同じくらいになります。
(TOTALタンパク量は異なります。)

⑤電気泳動 SDS-PAGE

いつも同じ条件での電気泳動を心がけましょう。

- 分離パターンは泳動時の電流・電圧・温度などによって変化します。
- 泳動用バッファーやゲルの作製ロットが異なると微妙に変化することがあります。
- 各サンプルに適正な泳動条件は、ゲルの濃度も含めてそれぞれの実験系で異なるので、予備実験で確立することが重要です。
- 大電流・高電圧、長時間泳動などによるバッファーの加熱・電気分解などが原因で泳動パターンが乱れることがあります。
→アトーAE-6510型レゾルマックス2連ミニスラブ電気泳動槽を使うと恒温電気泳動が可能です。
- 試料溶液に含まれる目的タンパク質の量が少ない場合、サンプル添加量が同じならば、
①ウェル幅(レーン幅)を細くする ②ゆっくり泳動する(ミニゲルは20mA/枚)
等の方法で、バンドを濃くシャープに改善できます（タンパク質の密度が向上、単位体積あたりのタンパク量が增加）。
スラブゲル→ミニスラブ・ミニスラブ→コンパクトスラブと泳動槽を変え、ゲルサイズを小さくしても同様の効果があります。

⑥電気泳動終了→ウエスタンブロッティングへ

ウエスタンブロッティング操作②へ→ゲルを転写バッファーに浸す。(page 8)

2. ウェスタンブロッティング (Western Blotting)

① ウェスタンブロッティングの準備

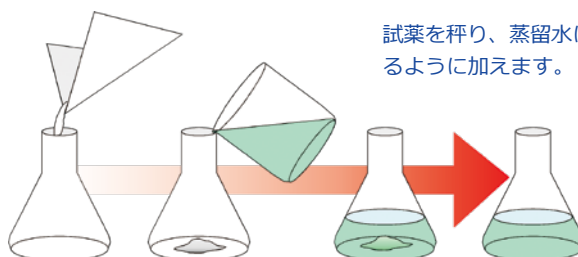
■ ブロッティング試薬の調製

セミドライブロッティング溶液を3種類を調製します。pH調整は必要はありません。

※メタノール濃度はセミドライブロッティングに合わせて5%です。(タンク式では20%程度)

ミニゲル2枚をブロッティングするのにA～C溶液をそれぞれ100mL調製します。

種類	組成	保存
3液タイプ	A: 300mM トリス、5%メタノール B: 25mM トリス、5%メタノール C: 25mM トリス、40mM 6-アミノカプロン酸、5%メタノール	室温
3液タイプ (市販)	AE-1460 EzBlot (使用前に終濃度5%メタノールを添加) 20回分	室温
高速転写 (市販)	AE-1465 EzFastBlot (使用前に蒸留水で10倍希釈)	室温



試薬を秤り、蒸留水に溶解しメタノールを5%(v/v)になるように加えます。(A, B, C溶液)

■ ブロッティングメンブレンとろ紙の準備

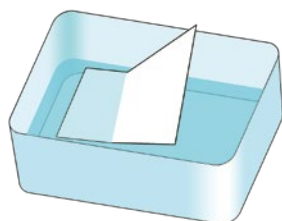
・メンブレンとろ紙はゲルと同じ大きさのもの (ゲルサイズ±5mm以下)を用意します。

・ゲル1枚当たり、PVDF膜×1枚、ろ紙 (厚み0.9mm) ×6枚 (標準)

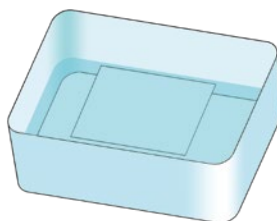
※注: アーのスラブ/ミニスラブ/コンパクトPAGEには、ゲルと同じサイズのメンブレン、ろ紙が用意されています。製品情報は右ページを参照ください。

■ メンブレンの湿潤化

メンブレン(PVDF膜)は100%メタノールに浸漬後、ブロッティングB液 (3液タイプ) または EzFastBlotに浸し、振とうしながら15分以上インキュベーションし馴染ませます。



PVDF膜を端からゆっくり100%メタノールに浸す。湿潤すればよいので、時間は数秒でかまいません。

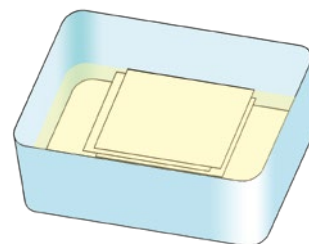


ブロッティングB液 (3液系) または EzFastBlotに浸し、15分以上振とうして馴染ませます。

■ ろ紙の湿潤化

3液系の場合、A: 2枚、B: 1枚、C: 3枚を転写バッファーに浸します。

EzFastBlotを使用する場合は、全てのろ紙を浸します。



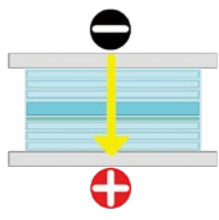
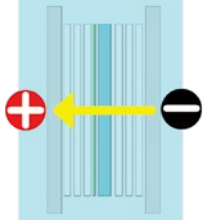
② 電気泳動終了→ゲルの取り出し

泳動終了したゲルをプレートから外し、B溶液を入れたバットに浸漬します。転写バッファーを吸ってゲルの大きさが変わる事があるため、15分未満にしてください。EzFastBlotを使用する場合はバッファーに漬けずに積層作業に進みます。

2. ウェスタンブロッティング (Western Blotting)

セミドライブロッティング法

タンパク質のブロッティング方法にはセミドライ式とタンク（ウェット）式の2種類があります。現在よく用いられているセミドライブロッティング法は、発熱量が少ない、ブロッティング時間が短い、バッファー量が少ないという特徴があります。高分子量のブロッティングが苦手という弱点がありましたが、アトーAE-1460 EzBlot（3液系）やAE-1465 EzFastBlotなどの専用バッファーの登場により250kDaくらいまでの転写が可能になっています。しかし、塩基性タンパク質や250kDaを超えるタンパク質の転写にはタンク（ウェット）式が用いられています。それぞれに特徴があるため、サンプルの性質やサイズによってブロッティング方法を選択ください。

セミドライ式	タンク(ウェット)式
	
発熱量：少ない 時間：短い バッファー量：少ない 低～250kDaタンパク質	発熱量：多い 時間：長い バッファー量：多い 高分子・塩基性タンパク質

□セミドライブロッティング用試薬

コードNo.	製品名	価格	容量
2332600	AE-1460 EzBlot (A : 475mL/B475mL×2本/C : 475mL/ディスポトレイ40枚)	¥16,800	ミニゲル×20回分
2332590	AE-1465 EzFastBlot (10倍濃縮液 : 500mL)	¥14,800	ミニゲル×50回分
2332595	WSE-7210 EzFastBlot HMW (5倍濃縮液 : 500mL)	¥14,800	ミニゲル×25回分
2322443	WSE-4057 QBlot Kit M (ブロッティングキット)	¥22,800	ミニゲル×10回分

※AE-1460は使用前にA・B・Cに25mLずつメタノールを加え終濃度5%として使用します。

※AE-1465/WSE-7210はメタノールを使用しません。高速ブロッティングに対応します。

※WSE-4057はブレウエットろ紙/PVDF膜のバックです。

①ウェスタンブロッティングの準備

ウェスタンブロット用メンブレン

- ウェスタンブロット用メンブレンにはニトロセルロース製、PVDF製のものがあります。
- PVDFメンブレンはタンパク質の吸着能が高く、高感度検出に向いています。適正なブロッキング、抗体反応を行えば、高感度発光基質を使用してもバックグラウンドを低く抑えることが可能です。
- アトー「クリアブロット・P+膜」は材質に低バックグラウンドPVDFを使用し、ゲルサイズにカットされています。

□セミドライブロッティング用メンブレン

コードNo.	製品名	価格	容量
2322450	WSE-4050 クリアブロット・P+膜 6.5×6.5cm	¥23,000	20枚
2322451	WSE-4051 クリアブロット・P+膜 8.5×9.0cm	¥23,000	20枚
2322452	WSE-4052 クリアブロット・P+膜 13×14cm	¥27,000	10枚
2322453	WSE-4053 クリアブロット・P+膜 26cm×3m	¥72,000	1ロール

ウェスタンブロット用ろ紙

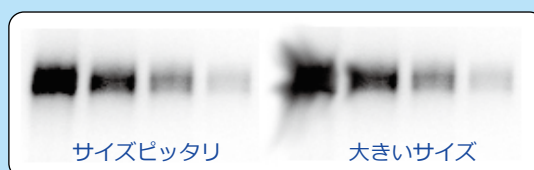
- ウェスタンブロット用ろ紙はバッファーを保持するため厚みがあるものが適しています。
- アトーアブソーベントペーパー（ブロッティング用ろ紙）は厚み0.9mmでしっかりバッファーを保持します。

□セミドライブロッティング用メンブレン

コードNo.	製品名	価格	容量
2322437	CB-06Aアブソーベントペーパー（ブロッティング用ろ紙） 6.5×6.5cm	¥29,000	400枚
2392393	CB-09Aアブソーベントペーパー（ブロッティング用ろ紙） 8.5×9.0cm	¥29,000	400枚
2322436	CB-13Aアブソーベントペーパー（ブロッティング用ろ紙） 13×14cm	¥24,000	200枚
2392493	CB-20Aアブソーベントペーパー（ブロッティング用ろ紙） 20×20cm	¥24,000	100枚

メンブレンとろ紙のサイズ

- メンブレンとろ紙は、ゲルサイズと同じ大きさのものを使用します。
- サイズが異なるとバンドが流れてしまうことがあります。
- アトーのブロッティング用メンブレンとろ紙は、アトー製ゲルと同じサイズのものが販売されています。
- メンブレン・ろ紙のサイズは、ゲルサイズ±5mm以内になるようご用意ください。



ろ紙がゲルよりも大きいと、端のレーンが外に流れてしまうことがあります。

②電気泳動終了→ゲルの取り出し

- 吸水してゲルが膨らみサイズが変わるため、ゲルをバッファーに漬けておく時間は短くします。
- EzFastBlotを使用する場合はゲルはバッファーに漬けず、積層前にバッファーをくぐらせる程度にします。

2. ウェスタンブロッティング (Western Blotting)

③ろ紙・メンブレン・ゲルの積層

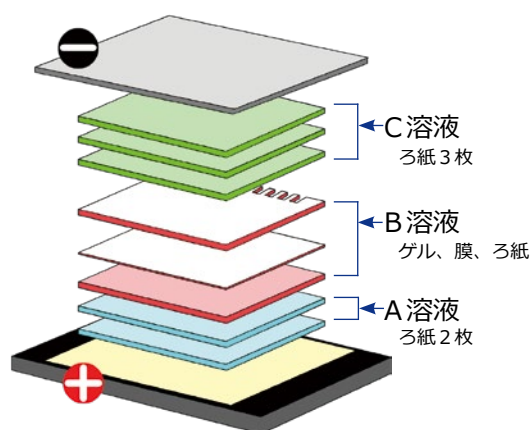
ブロッティング装置の陽極(+)板の上に、試薬の種類により(3液系/1液系)それぞれ転写バッファをしみこませたろ紙と、湿潤したメンブレン、ゲルを重ねていきます。

- ろ紙は1枚ずつ、十分バッファで湿らせたものを気泡が入らないよう重ねます。
- メンブレンを置いたら、転写バッファを少し垂らし、その上にゲルを置きます。

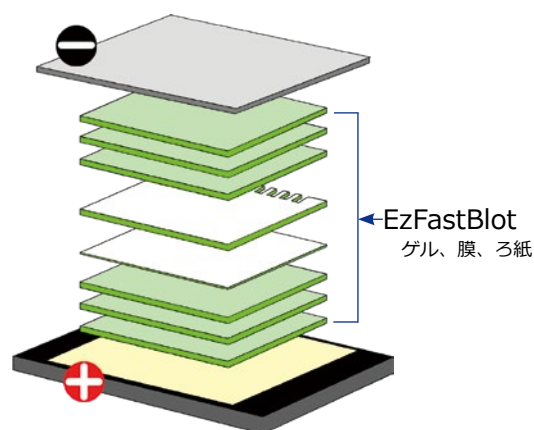
→気泡が入りにくくなり、一瞬ゲルが浮いているので位置の微調整が可能です。

全て重ねたら、グローブをはめた手で全体を押しつぶすように均等に抑えます。気泡が抜け、全体の密着度が上がります。※電極板上にこぼれた余分なバッファは吸い取っておきます。

2枚以上のゲルを同時にブロッティングするには、厚みをそろえ、並べてセットします。電極板からはみ出すようなら、余分な部分をあらかじめ切り取ります。



3液系 (EzBlot) の積層方法



EzFastBlotの積層方法

※ポイント！

ゲル中心部分の転写不良の予防のために、電極板上にこぼれた余分なバッファは吸い取っておきます。

④ブロッティング 転写開始

- 通電条件：標準的には、ゲルの面積1cm²あたり2mAで30分通電します。

→10×10cmのゲルなら、10×10×2=200mA

- 定電流設定の場合、電流は一定ですが、電圧は時間とともに変動します。

EzBlotやEzFastBlotを使ってセミドライブロッティングをする場合は下表を参照ください。

	3液系/EzBlot	EzFastBlot (標準)	EzFastBlot (高速)
電流 (単位面積) 8.5×9cmゲル1枚の設定値	2mA/cm ² c.c 153mA c.c	2mA/cm ² c.c 153mA c.c	6mA/cm ² c.c 459mA c.c
転写時間 (標準)	30分	30分	10分
電圧 (変動します)	15~30V	10~20V	20~50V

- ブロッティングは、電圧が低く電流が高い条件なので、ブロッティングに対応した電源装置をご使用ください。

- ブロッティング装置によって、マニュアルに定電圧で使用するよう記載されたものもあります。定電圧設定でもブロッティング可能です。

⑤ブロッティング終了 メンブレン取り出し

ブロッティングが終了したら、メンブレンを取りだし、タッパーなどでTBS-TまたはPBS-Tで浸透しながら3~5分洗浄します。

→ブロッティングへ

※一時的に実験を中断する場合は、メンブレンをラップなどで包み、冷蔵庫で保存します。一晚程度は保存が可能です。

※一日以上保存したい場合は、風乾してメンブレンを乾燥させます。乾燥後ラップなどで包み冷蔵庫で保存します。

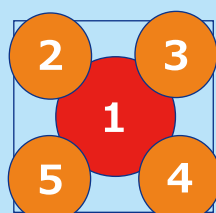
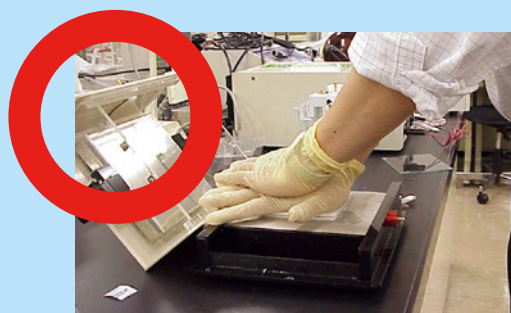
→保存した場合、サンプルによってはブロッティング後すぐに検出した場合よりシグナルが弱くなることがあります。

2. ウェスタンブロッティング (Western Blotting)

③ろ紙・メンブレン・ゲルの積層

ろ紙・メンブレンの準備

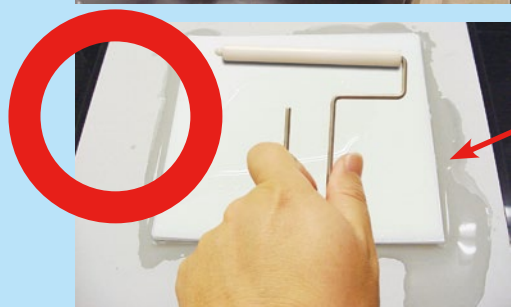
- 積層前の湿潤作業を十分行います。メンブレンが転写バッファーに十分に馴染むよう15分以上振とうします。
- ろ紙およびメンブレンはゲルサイズ $\pm 5\text{mm}$ の大きさのものを使用します。
- セミドライ式ブロッティングでは、ブロッティング溶液のメタノール濃度を5%程度にします。
→メタノール濃度を高くすると、ゲルが脱水されて縮み、特に高分子側の転写効率が悪くなります。
→低分子量のタンパク質を転写する場合は5~10%にメタノール濃度を上げると裏抜けを低減できます。
- なるべく小さいゲルを使用します。転写面積が小さいほうが均一に転写されムラになりにくくなります。
- 積層時に気泡が入らないよう、ろ紙やメンブレン・ゲルは端を合わせてから弓なりに反らせながら重ねます。
- 積層後、メンブレンとゲルの密着度を上げます。
→ろ紙、メンブレン、ゲルを積層し終わったら、グローブを着用した手のひらで全体を押しつぶすように圧着します。
→中心→外側の順番に圧をかけます。気泡が抜け、密着度が上がり転写効率が向上します。
→手で圧をかける代わりに、専用のブロッティング用ローラー (No.2322479/¥4,000) を使用しても同様の効果があります。



押さえる位置は5箇所が基本です。
番号順に手のひらで押してください。

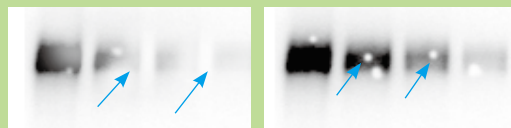


ピペットでこころこする方法は、均一に力を入れることが難しく、厚みにムラができるため、お勧めできません。



電極板上にこぼれた余分なバッファーは吸い取っておきます。

専用のブロッティング用ローラー (No.2322479/¥4,000) を使用して均一に圧をかけながら気泡を抜きます。



しっかりゲルとメンブレンを圧着することで、転写ムラや気泡を防ぐことができます。

④ブロッティング 転写開始

お勧めのセミドライブロッティング装置

- アトー ホライズブロットシリーズは、陽極：白金チタン製/陰極：ステンレス製で、電極板をバネ圧でろ紙を圧着します。
- アトー パワードブロットAceは電源搭載型のブロッティング装置です。

仕様	WSE-4115 パワードブロットAce	WSE-4115 パワードブロット2M	WSE-4025 ホライズブロット2M	WSE-4045 ホライズブロット4M
電極サイズ	98×95mm	205×100mm	205×100mm	205×200mm
電極間距離	3~10mm (バネで押圧)	3~15mm (バネで押圧)	3~15mm (バネで押圧)	3~15mm (バネで押圧)
電源	搭載	搭載	別売	別売
製品姿				

※WSE-4025/4045に使用できる電源についてはアトー株式会社までお問い合わせください。

⑤ブロッティング終了 メンブレン取り出し

- ブロッティングに続いてブロッッキングへ進む場合はメンブレンを乾燥させないでください。
- 一晩程度の保存の場合はラップで包み、乾燥させないようにTBSなどで湿らせて冷蔵庫で保存します。
- 1日以上保存する場合は、洗浄後乾燥させ、ラップなどで包み冷蔵庫で保存します。ブロッッキングを始めるときは、100%メタノールで湿潤したのち、TBS-TまたはPBS-Tに浸して15分以上振とうして馴染ませます。
- 保存期間が長くなると検出感度が低下します。サンプルによっては乾燥保存で抗原性が低下する場合があります。

3. ブロッキング (Blocking)

① ブロッキング準備・試薬調製

■ TBS-Tの調製

TBS-Tは全ての反応溶液の基礎になります。組成・pHを正確に調製することが重要です。TBS-Tは室温で保存できますが、なるべく新しいものを使用してください。

■ ブロッキング溶液の調製

スキムミルク0.3gを100mLのTBS-Tで完全に溶解します。電子レンジや湯せんで暖めると完全に溶解できます。スキムミルクは通常3～5%の濃度で記載されていますが、タンパク質量の少ないサンプルではブロッキングタンパク質が多い場合に、検出できなくなることがあります(右ページオーバーブロッキング参照)。

オーバーブロックがなく、交叉の無い「AE-1475 EzBlock Chemi」なら蒸留水で希釈するだけで簡単に調製できます。

試薬	組成	保存
TBS-T	25mM トリス塩酸 pH7.4、0.15M NaCl、0.1%(v/v) Tween-20	室温
	WSE-7230 EzTBS (10倍濃縮 TBSバッファー) 1L / 8,800円 WSE-7235 EzTween (10% Tween-20溶液) 100mL / 4,800円 EzTBS蒸留水で10倍希釈し、EzTweenを加え、終濃度0.1%とします。	室温
ブロッキング試薬	0.3%スキムミルク/TBS-T TBS-T100mLあたり0.3gのスキムミルクを加え溶解します。電子レンジを使用するか湯せんで完全に溶解します。製精度の高いスキムミルクの場合は0.1%程度まで濃度を下げられます。	室温
	AE-1475 EzBlock Chemi (5倍濃縮) 500mL / 14,800円 EzBlock Chemiを蒸留水で5倍希釈しブロッキング溶液とします。	冷蔵

② メンブレンの洗浄

- TBS-Tを入れたバットにメンブレンを浸し、2分間洗浄します。

■ シェーカーの振とう方式について

◎ : シーソー式・水平式 × : 回転式

抗原抗体反応に用いるシェーカーは、「シーソー式」・「水平式」をお勧めします。これらのシェーカーでは膜全体が同じように液交換されるためムラがでにくくなります。しかし「回転式」はトレイ中央部分の液交換が不十分になり、膜の中央部分のバックグラウンドが高くなる原因となります。



写真:「シーソーシェーカー-atto」
抗原抗体反応にはシーソー式のシェーカーがおすすめです。

③ ブロッキング

- 洗浄用TBS-Tとブロッキング溶液(0.3%スキムミルク or EzBlock Chemi)を交換します。
- 室温にて60分間ゆっくり振とうしながらブロッキングします。
(オーバーナイトでブロッキングを行う場合は4℃で行います。)

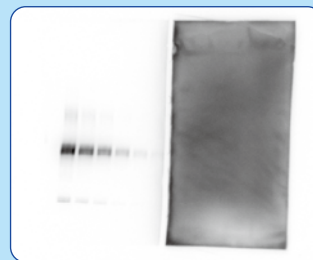
④ ブロッキング終了 → 抗原抗体反応へ

- ブロッキングが終了したら、1次抗体反応へ進みます(次ページ)。
- ※ ブロッキング後のメンブレンは4℃で保存可能です。保存時間が長くなると、検出感度が低下します。
目的タンパク質の量が少ないと考えられる場合は間をおかず、すぐに検出することをお勧めします。

3. ブロッキング (Blocking)

■ブロッキングの必要性

●ウエスタンブロッティングにおけるブロッキングの役割は、転写後のメンブレン上のバンド以外のバックグラウンドに抗体が結合しないよう、使用する抗体と反応しないタンパク質などでバックグラウンドをマスクすることです。ブロッキングが不十分だと、発光検出時にバックグラウンドが高くなり、過剰だと、目的タンパク質の検出感度が悪くなります。



■ブロッキングに用いるタンパク質

●使用する抗体（1次、2次ともに）と結合しない（交叉の無い）タンパク質を選択します。一般的にはスキムミルク（脂質を取り除いた乳性タンパク質）、カゼイン、BSA、ゼラチンなどが用いられます。

アトーでは、交叉のほとんどない非タンパク質系ブロック剤を使用した「**EzBlock Chemi**」をお勧めしています。他にBSAタイプとカゼインタイプがあります。いずれもバックグラウンドを抑え、オーバーブロックしにくい組成になっています。

コードNo.	製品名	価格	容量
2332615	AE-1475 EzBlock Chemi (5倍濃縮・非タンパク質系)	¥14,800	500mL
2332616	AE-1476 EzBlock BSA (5倍濃縮・BSA)	¥14,800	200mL
2332617	AE-1477 EzBlock CAS (5倍濃縮・カゼイン)	¥14,800	200mL

■検出感度に影響する「オーバーブロッキング」を防止する

●バックグラウンドは低い、濃度の低いバンドが検出されない場合、ブロッキング溶液が原因と考えられます。

→原因：スキムミルク3～5%を使用したため、ブロッキングタンパク質で目的バンドがオーバーブロックされてしまう。

→対策1：ブロッキング溶液のスキムミルクの濃度を0.3%にしてオーバーブロックを防ぎます。

→対策2：ブロッキング溶液をATTO EzBlock Chemiに変更してオーバーブロックを防ぎます。

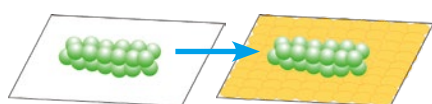
●スキムミルクの濃度を下げる場合、TBS-TのTween-20濃度を0.1%にします。（一般的には0.05%が多い）

→Tween-20の濃度を0.1%とすることで洗浄効果が上がり、ブロッキング効率も向上します。

●低バックグラウンドメンブレンの使用をお勧めします。

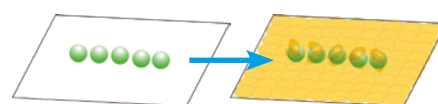
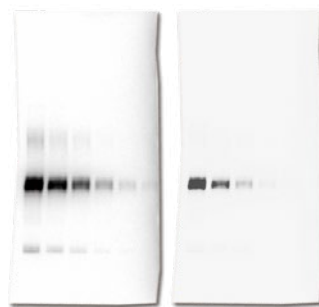
→page 9で紹介しました「クリアプロット・P+膜」をご利用ください。低バック・高感度が特長です。

オーバーブロックのイメージ図



■通常のブロッキング状態

緑のサンプル以外のバックグラウンドをブロッキングタンパク質が埋め尽くします。目的のタンパク質を検出できます。



■オーバーブロッキング状態

低濃度の場合、サンプルまでもブロッキングタンパク質が覆い尽くしています。抗体が結合せず、目的のタンパク質を検出できません。

■発色法EzWestBlue(TMB)などから発光検出へ移行する場合

●発光基質の選択と注意点

発色法による検出に比べて、発光検出は感度が向上します。同時にバックグラウンドも上昇するため注意が必要です。

→対策①：ATTO「EzWest Lumi」など、発光が強すぎない基質を使用する。バックグラウンド上昇を防ぎます。

→対策②：2次抗体の濃度を下げます。例 発色で5,000倍希釈→発光で50,000倍希釈とするなど。

●ブロッキングの条件

●ブロッキングは通常室温で1時間、振とうしながら行います。

●振とうは大きい振幅の水平式か、ゆっくりとしたシーソー式が適しています。

●回転式では中心部と周辺部でブロッキングや抗体反応のムラの原因となることがあります。高感度検出ほど問題になります。

コードNo.	製品名	価格	振とう台サイズ
2312200	WSC-2400 シーソーシェーカー-atto	¥155,000	300×200mm
2312210	WSC-2400用上段振とう台	¥26,000	300×200mm

4. 抗原抗体反応（Antibody）

① メンブレンの洗浄

ブロッキングが終了したら、タッパーにメンブレンを入れ、続いてTBS-Tを加え、数分間振とうします。



② 1次抗体溶液の調製

チューブを軽く遠心し、上清から1次抗体を分注し、ブロッキング溶液（0.3%スキムミルク/TBS-Tなど）で希釈し、1次抗体溶液とします。

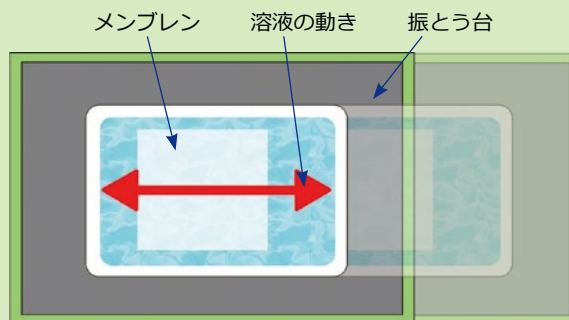
※希釈した1次抗体溶液は保存が利きません。

写真：ATTO「シーソーシェーカー」
抗原抗体反応にはシーソー式のシェーカーがお勧めです。

③ 1次抗体反応

- TBS-Tを捨て、1次抗体溶液を加えます。室温で1時間、ゆっくり振とうします。
→バックグラウンドのムラを防ぐため、シーソー式または水平式のシェーカーを使用します。
→溶液量は振とうできるように、やや多め（膜が浸る程度）とします。
→1次抗体溶液の容量を増やすため、多少希釈率が高くなります。
→2次抗体量や発光基質で検出感度は補えます。
※使用できる抗体量に合わせて、バッグに入れたり、静置したり方法を選択ください。

■ 振とう方法による溶液の動きの違い



「シーソー式」または「水平式」では、メンブレン全体を溶液が同じように動きます。このためムラを防ぐことが可能です。



「回転式」の場合、外側は溶液が早く動き、中心部分は遅く動きます。スピードの違いでムラが発生します。

④ すすぎ・洗浄

- 抗体溶液を捨て、TBS-Tでメンブレンをすすぎます。3回繰り返します。
→すすぎをすることで、残った抗体の濃度が大幅に下がり、洗浄効果が上がります。
- 新しくTBS-Tを加え、5分間振とう・洗浄します。3回繰り返します。

⑤ 2次抗体溶液の調製

チューブを軽く遠心し、上清から2次抗体を分注し、ブロッキング溶液（0.3%スキムミルク/TBS-Tなど）で希釈し、2次抗体溶液とします。

※希釈した2次抗体溶液は保存が利きません。

⑥ 2次抗体反応

- TBS-Tを捨て、2次抗体溶液を加えます。室温で1時間、ゆっくり振とうします。
→溶液量は振とうできるように、やや多め（膜が浸る程度）とします。

⑦ すすぎ・洗浄

- 抗体溶液を捨て、TBS-Tでメンブレンをすすぎます。3回繰り返します。
→すすぎをすることで、残った抗体の濃度が大幅に下がり、洗浄効果が上がります。
- 新しくTBS-Tを加え、5分間振とうします。3回繰り返します。

⑧ 発光撮影の準備へ

4. 抗原抗体反応 (Antibody)

■抗原抗体反応について

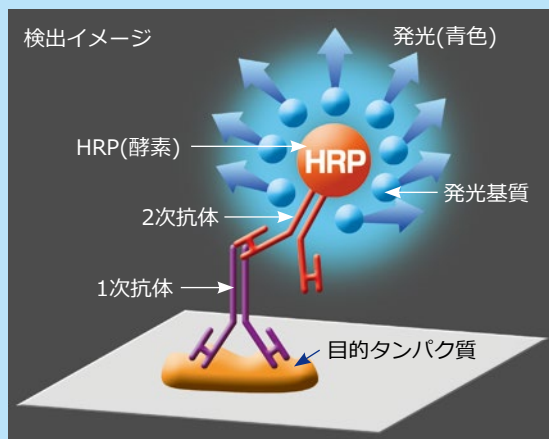
●1次抗体

ターゲットタンパク質を標的とする抗体を使って、メンブレン上のタンパク質の中から、目的とするものを特異的に標識します。

1次抗体には、大きく分けてポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の2種類があります。モノクローナル抗体は特異性が高く、検出時のバンド数が少なく、容易にターゲットを見つけられます。抗体を作る場合のコストが高くなります。ポリクローナル抗体は、検出時のバンドが多くなりますが比較的低コストで作製できます。検出時は分子量マーカーを利用して目的タンパク質のバンドを推定する必要があります。

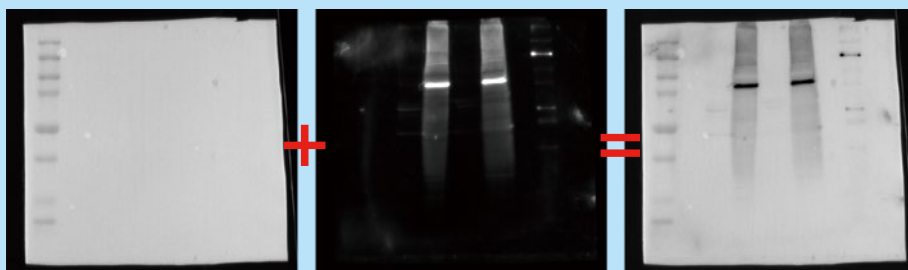
●2次抗体

2次抗体は、1次抗体を標的とし、HRP（ホースラディッシュペロキシダーゼ）やALP（アルカリフォスファターゼ）などの酵素で標識したものを使用します。動物種が同じなら、色々な1次抗体に対応します。使用する濃度によって、バックグラウンドや検出感度に大きな影響を与えます。



■ウェスタンブロットの撮影と画像合成

アトーのケミルミ撮影装置は、ブレステインマーカーの見えるメンブレンと、発光パターンを撮影し合成することが可能です。ポリクローナル抗体を利用する場合など、分子量情報が必要な検出では、以下のように撮影した画像を解析します。



■写真の説明
AE-9300H Ez-CaptureMGで撮影し、解析ソフトCS Analyzerの画像演算機能を使って合成しました。マーカーレーンを使って分子量計測が可能です。

①～⑦抗原抗体反応の注意点

- 抗体溶液は、室温に戻し、軽く遠心してから上清を分注します。メンブレン上の**斑点状のゴミを防止**できます。
- 1次抗体溶液（1次抗体：100～1000倍希釈）はやや多めの液量で反応させるとムラが出にくくなります。
- 1次抗体の希釈率を上げると感度が下がるため、発光基質は高感度タイプ（EzWestLumi plusなど）を使用します。
- 2次抗体溶液（2次抗体：数千～数万倍希釈）は濃度が低い方がバックグラウンドが低くなります。
- 特に高感度な発光基質（SuperSignal West Femt/イムノスターLD/ECL selectなど）を使う場合は、2次抗体の希釈率を数万～数十万倍まで上げて使用します。
- 抗体濃度は検出感度とバックグラウンドに影響するため、予備実験を行い慎重に検討します。
- バックグラウンドが高い場合は、①2次抗体濃度を低くする、②抗体反応後のすすぎを徹底することで改善できます。
- TBS-T(PBS-T)に加えるTween-20は、0.1%濃度とし洗浄効果を十分にします（一般的には0.05%が多い）。
- 抗体反応後の「すすぎ×3回」はバックグラウンド低減に効果的です。それから5分～10分×数回の洗浄ステップを行います。
- 洗浄ステップはなるべく多量のTBS-Tを使用し、強く振とうします。
- 抗体濃度のコントロールとその容量、洗浄操作を改善することで低バックグラウンド高シグナルが得られます。
- 抗体反応には水平式またはシーソー式のシェーカーを使用するとムラを防止できます。

ケミルミ検出に見られる汚れ

- メンブレン端のムラ
・振とうスピードの速すぎが原因
・抗体溶液はゆっくり全体に浸透させる
・振とうスピードもゆっくり目にする
- メンブレン上の斑点
・2次抗体による非特異的スポット
・抗体溶液のチューブを遠心して防止
・2次抗体は分注して保存する
- バックのムラの原因
・1次抗体溶液が少なく静置して反応した
・抗体反応時の振とう不足
・すすぎをしなかった
- 高バックグラウンド対策
・2次抗体を更に希釈する
・2次抗体溶液のボリュームアップ
・すすぎを3回以上行う

5. 発光基質添加と発光検出（Chemiluminescence Detection）

①発光撮影の準備

- ケミルミ撮影装置（Ez-Capture MGなど）を起動し、撮影準備をします。
- 発光基質を室温に戻します。
- [ピタットクリア](#)（Pitatt Clear）・ラップなどを用意します。

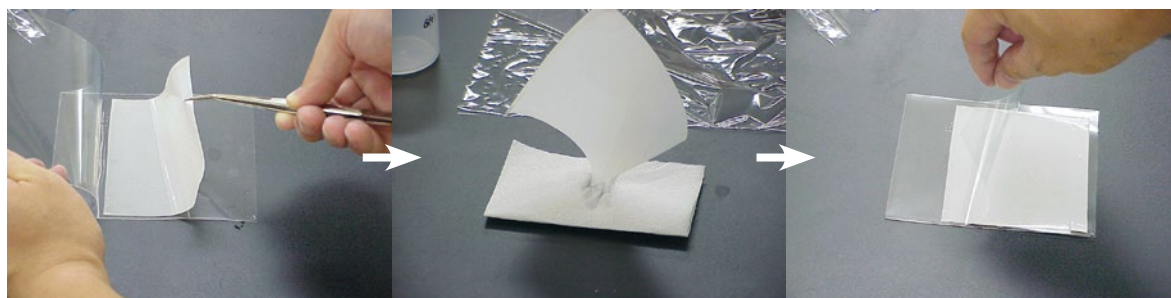
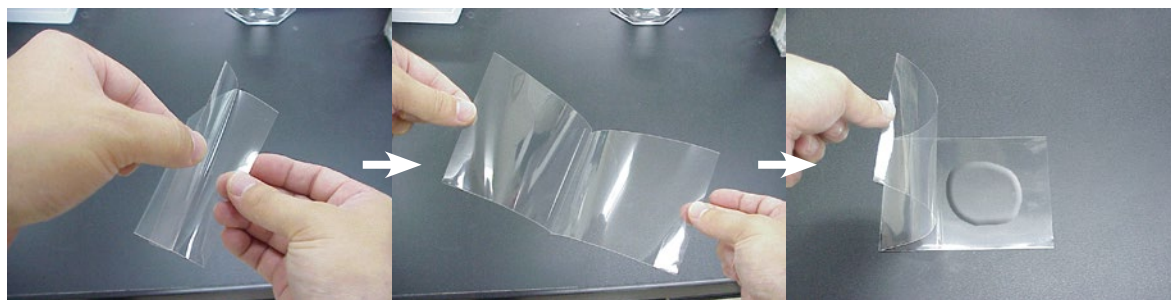
②発光基質の調製

発光基質は室温に戻して使用します。
ATTO EzWestLumi plusは、A : B = 1 : 1で混合します。
メンブレンの面積によって使用する試薬量を算出します。

基準量：0.05mL/cm²（EzWestLumi plusの場合）
8×9cmの膜→8×9×0.05 = 3.6mLが使用量です。
※使用量は発光試薬に付属のマニュアルを参照してください。



③メンブレンへ発光基質を添加



●ピタットクリアについて

メンブレンのシーリングには、

- ①透明である
 - ②適度に張りがあり、しわが寄らないこと
- などの条件が要求されます。

ATTO「ピタットクリア」は全ての条件を満たし、非常に便利に使用できます。

ピタットクリア（90枚入り） 3,000円

ピタットクリアL（90枚入り） 3,500円

コードNo.	製品名	価格
2322433	ピタットクリア（Pitatt Clear） 100×151mm 90枚入り	¥ 3,200
2322439	ピタットクリアL（Pitatt Clear L） 100×151mm 90枚入り	¥ 3,700

5. 発光基質添加と発光検出 (Chemiluminescence Detection)

①発光撮影の準備

化学発光撮影装置（アトーLuminoGraphなど）は冷却CCDカメラを使っており、使用前にウォーミングアップが必要です。装置によって5～30分、ウォーミングアップを行います。

②発光基質の調製

●発光基質は、HRP（ペルオキシダーゼ）用と ALP（アルカリフォスファターゼ）用の2種類があります。一般的にウエスタンブロットではHRP用がよく利用され、サザンブロット・ノーザンブロットではALP用が利用されます。

●HRP用の発光基質はGEヘルスケア社のECLが有名で古くから使われています。アトー「EzWestLumiシリーズ」をはじめ、各社から多くのHRP用発光基質が発売されています。

コードNo.	製品名	価格	容量
2332637	WSE-7120S EzWestLumi plus (HRP発光基質・高感度)	¥14,800	50mL×2本
2332638	WSE-7120L EzWestLumi plus (HRP発光基質・高感度)	¥49,800	250mL×2本
2332632	WSE-7110 EzWestLumiOne (HRP用発光基質・スタンダード)	¥14,800	250mL×1本

※EzWestLumi plus/LumiOneは4℃/1年間保存可能です。

●超高感度検出が必要な場合のお勧め発光基質（他社製品）

Thermo Fisher Scientific社：PIRCE SuperSignalWest Femto（検出感度：fg低域）

和光純薬工業：イムノスターLD（検出感度：fg低域）

※超高感度発光基質を使用する場合は、2次抗体濃度を低くする必要があります。予備実験で至適濃度を検討ください。

●発光基質の種類によって、バックグラウンドの高さが異なります。必ずしもシグナル強度と比例しないため、ブロッキングや2次抗体の濃度など至適条件を検討してください。

●発光基質の種類によって、ダイナミックレンジ（濃度と発光量に比例関係がある範囲）が異なります。発光が弱い試薬はダイナミックレンジが広く、高感度になるほどダイナミックレンジが狭くなります。

③メンブレンへ発光基質を添加

●発光基質添加後のトラブルシューティング

★バックグラウンドが高くなる

⇒ブロッキング溶液、抗体反応溶液、洗浄液全てに0.1%Tween-20を添加する。

⇒メンブレンは低バックグラウンド型のPVDF膜へ切り替える。→[WSE-4050/1/2/3 クリアブロット・P+膜](#)

⇒2次抗体濃度を低くする。

⇒抗体反応後、すすぎを行ってから洗浄操作を行う。

⇒検出感度が高い発光基質を使っている場合、感度が低いものに変えてみる。→[WSE-7110 EzWestLumiOne](#)

★ムラになってバックグラウンドが光る

⇒2次抗体濃度を低くする。

⇒2次抗体をチューブごと遠心してから上清をそっと分注して使用する。

⇒抗体反応後のすすぎと洗浄を十分行う。

⇒回転式のシェーカーを使用すると 中心部分のバックが高くなります。[水平式かシーソー式のシェーカーを使用してください。](#)

★基質のかけ方でバックグラウンドがムラになる

⇒発光基質をメンブレンに直接かけると発光ムラになることがあります。[ラップなどに基質を溜めておき、転写面を下にしたメンブレンを浸す](#)とムラを防止できます。

★気泡や余分な発光基質の影響

⇒基質添加後、メンブレンをピンセットでつまみ上げ、端から垂れる余分な基質をキムタオルなどに吸わせませう。

⇒メンブレンのシーリングは[クリアポケット](#)を使うと気泡が入りにくくなります。

⇒過剰に発光基質を残してシールすると、バックグラウンドが高くなる場合があります。

★メンブレンをシーリングするもの

◎ピタットクリア：張りがありしわにならず、気泡が入りにくく取り扱いが楽。低コスト。

×ハイブリバック：厚みがあり、折癖がつきやすい。ホットシーラーを使うとプリーツ状のしわが寄る。高コスト。

△ラップ：しわがでやすく、気泡も入りやすい。平らになりにくくシールに時間がかかる。

★消えるバンドの謎？

★発光基質添加後、撮影すると濃度の高いバンドの中心部分の発光が消えることがあります。

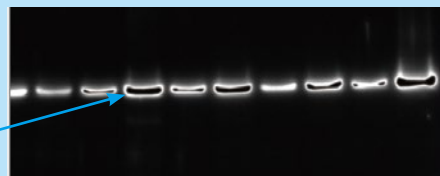
⇒発光基質を低感度のものに変更します。

⇒中抜け対策されたアトー「[WSE-7120 EzWestLumi plus](#)」を使用する。

⇒ゲルにアプライするサンプル量を減らします。

⇒2次抗体濃度を低くします。

検出すると濃度の高いバンドの中心部分が消えてしまう。



6. 発光パターンの撮影（Documentation）

発光撮影方法

発光基質を添加したメンブレンは、2次抗体が結合した部分が光ります。目で確認することはできませんが、以下の方法で発光像を撮影することが可能です。

- 化学発光（ケミルミネッセンス）撮影装置による撮影
- X線フィルムによる検出
- インスタントフィルムによる検出

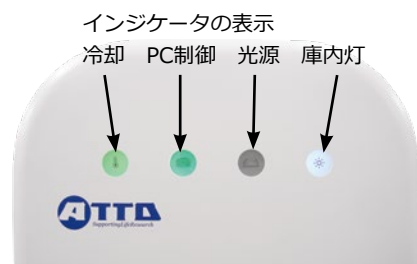
撮影方法	メリット	デメリット
化学発光撮影装置	定量性の高いデジタルデータ 自動露光機能 実験室で撮影が可能 ランニングコストが低い 高感度発光試薬に対応	初期費用（装置）が必要
X線フィルム	露光時間は自由 分解能が高い	暗室が必要 現像しないと見えない 定量性が低い 露光時間の調整が難しい ランニングコストが高い 論文掲載にはスキャンが必要
インスタントフィルム	露光時間は自由 実験室で撮影可能 現像時間は30秒	定量性が低い 露光時間の調整が難しい ランニングコストが高い 論文掲載にはスキャンが必要

化学発光撮影装置を使った撮影方法

①発光撮影の準備

1-1.装置の起動

LuminoGraph本体右側の電源スイッチを「-」方向へ押し、電源を入れます。PC起動に関係なく、本体電源を入れると、自動的に冷却を開始します。使用環境温度は20～30℃を推奨します。



インジケータ表示の意味

- ・冷却＝緑⇄黄点滅：冷却中、緑点灯：-30℃、赤点灯：0℃
- ・PC制御＝緑点滅：PCからの制御中
- ・光源＝庫内にセットしたLED光源の点灯状態の表示
- ・庫内灯＝庫内灯の点灯状態を示す。庫内灯は扉に連動します。

1-2.ImageSaver6の起動

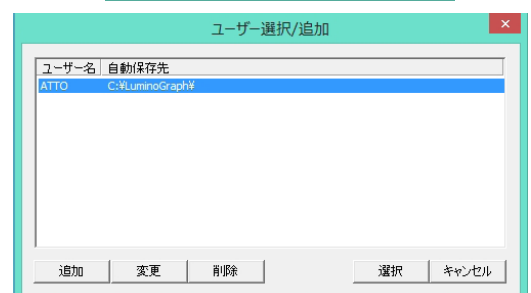
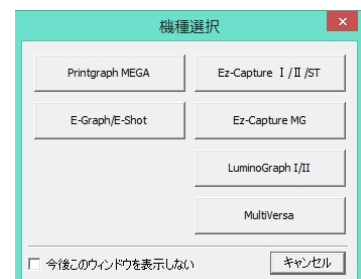
PCデスクトップのショートカットから「ImageSaver6」を起動します。機種選択ウィンドウが現れたら「LuminoGraph I / II」を選択します。「☐今後このウィンドウを表示しない」に✓を入れると次回以降、機種選択は表示されません。再表示させるには、「ファイル→各種設定」を選択し「☐機種選択ダイアログを起動時に表示」に✓を入れます。

電源スイッチ



電源投入後、冷却インジケータは「緑⇄黄」に点滅し冷却温度下降中であることを示します。およそ3～5分ほどで-30℃まで温度が下がります。

冷却が完了すると、冷却インジケータが「緑の点灯状態」になります。



6. 発光パターンの撮影 (Documentation)

1-3. フォーカス調整

LuminoGraphは短焦点レンズのため、撮影サイズを変更するにはサンプルとレンズの距離を変更する必要があります。上の表を参考に、サンプルサイズ・数量に合わせて棚位置を選択します。棚（左側）には番号が振ってあるので、レンズの番号を棚の番号と合わせます。

サンプルに厚みがある場合はPCの画面を見ながら微調整をします。1mm程度までのものにフォーカスが合うように調整されています。

ステージ位置	フォーカス	幅	奥行
④（最上段）	4	80mm	60mm
③	3	105mm	75mm
②	2	120mm	90mm
①	1	130mm	100mm
底位置（最下段）	B・UV	150mm	110mm

絞り「F0.95」

LuminoGraph II で撮影を行う場合は「0.8」に合わせます。



② 発光撮影

発光撮影（自動露光）

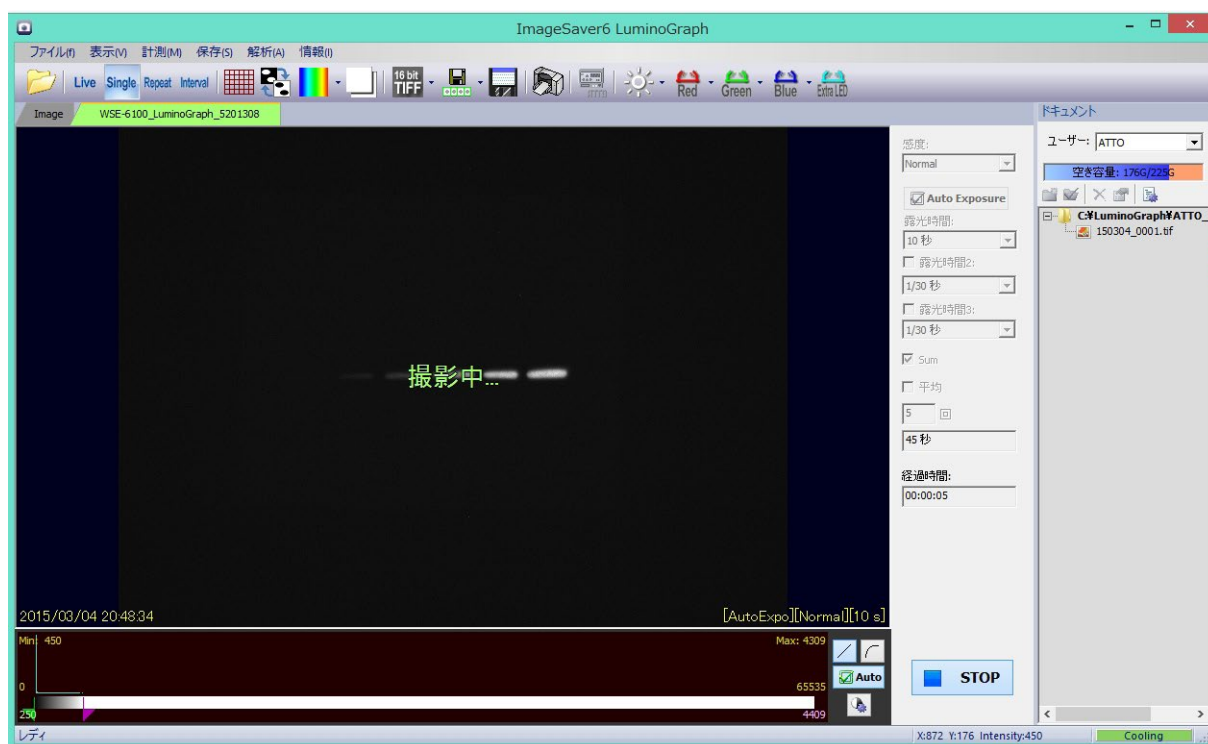
自動露光モード＝「AutoExpo」は、画像飽和が起こらず、もっともコントラストが高い露光時間を自動で設定して撮影するモードです。プレ撮影と本撮影の2回撮影を行います。条件設定ではプレ撮影の露光時間を選択します。

① AutoExpo ボタンを押す。感度は「Normal」を選択します。

② サンプルをセットし、露光時間を選択（1/30 秒～ 5 分）し「Start」ボタンを押します。
はじめて使用するときには **10 秒** で試してください。

※ 10 秒で画像飽和が起きるときは、1 秒に設定し Start ボタンを押してください。

③ プレ撮影が終わると画像が表示され、本撮影の露光時間を自動設定し、続けて撮影します。



詳しい撮影方法は、装置に付属のマニュアルを確認ください。

見たいバンドが感度不足だった場合は、本撮影よりも露光時間を長くすることで、感度アップが可能です。

自分で露光時間を設定したい場合は、「Single」モードを選択し、好きな露光時間で撮影可能です。

7. トラブルシューティング

検出感度に関するトラブルシューティング

トラブルの状態	主な原因	対処方法	関連ページ
低濃度バンドの検出感度不足	ブロッキング	スキムミルク3~5%を使用している場合、オーバブロックにより抗体反応を阻害して検出感度を低下させることがあります。 →スキムミルク濃度を0.3%、Tween-20 0.1% →ATTO EzBlock Chemiを使用	11~12
	抗体濃度の不足	まず2次抗体濃度を上げてみます。変化がないようなら1次抗体濃度を上げます。抗体希釈液としてTOYOBIO社のCan Get Signalを使用してみます。	13~14
	発光基質	発光基質の感度が低い場合は高感度タイプに変更します。 →ATTO EzWestLumi plusを使用	15~16
高濃度バンド消失	発光基質+サンプル濃度	高濃度バンドは結合したHRP量が多く、基質消化が早い傾向にあります。サンプル濃度を低くする、発光基質を低感度タイプに変更します。 →ATTO EzWestLumiを使用	15~16
発光基質追加した場合の感度不足	HRPの失活	一度発光させたメンブレンは、HRPが徐々に失活して2度目以降の基質添加では感度が低下します。追加発光させる場合は、1度目の発光検出後、速やかにTBS-Tなどでメンブレンを洗浄してから基質を添加します。発光基質の種類によって結果が異なります。 →ATTO EzWestLumi plusを使用 →ATTO EzWestLumiを使用	15~16
保存メンブレンでの感度不足	抗体の剥離 HRPの失活	抗体反応後保存していたメンブレンは、抗体の剥離やHRPの失活などが原因で感度が低下します。高感度発光基質を使用して感度不足を補います。 →ATTO EzWestLumi plusを使用 ※抗体反応後はなるべく早く検出することをお勧めします。	15~16

発光撮影に関するトラブルシューティング

トラブルの状態	主な原因	対処方法	関連ページ
露光時間の適正値が分からない	撮影方法	LuminoGraphなら、AutoExpoモードを使用して撮影します。またはSingleモードで30秒~1分撮影し、その時の最大輝度とカメラの最大感度を比較して決定します。 例：1分で15000カウント→最長4分撮影可能（LuminoGraphの場合） ※目的バンドが確認できることを判断材料にします。	17~18
バンドの濃淡がうまく出ない	撮影方法	シーリング作業の遅延などで、発光基質添加から時間が経ちすぎた後から撮影すると、バンドの濃淡と発光量の差が小さくなり、濃淡がうまく出ない場合があります。 →発光基質添加後すぐに撮影します。	17~18
しわや気泡が見える	メンブレンのシール方法	ラップやハイブリバッグを使用するとしわや気泡が入りやすくなります。 →クリアポケットを使用します。	15~16
発光が消えてしまう	メンブレンのシール方法	ラップでメンブレンをシールする場合、しわや気泡を追い出す作業で時間を費やし、発光反応が進みすぎてしまうことがあります。 →クリアポケットを使用します。	15~16
発光が消えてしまう	発光基質+サンプル濃度	高濃度バンドは結合したHRP量が多く、基質消化が早い傾向にあります。サンプル濃度を低くする、発光基質を低感度タイプに変更します。 →ATTO EzWestLumiを使用	15~16

7. トラブルシューティング

バックグラウンドに関するトラブルシューティング

トラブルの状態	主な原因	対処方法	関連ページ
バックグラウンドが高い	2次抗体濃度と発光基質	2次抗体濃度が高いとバックグラウンドが高くなります。使用している数分の1～1/10に希釈します。発光基質の種類によって、バックグラウンドが高くなることがあります。 →ATTO EzWestLumi plusを使用します。	13～16
	抗体洗浄	抗体反応後の「すすぎ」ステップを追加します。5～10分×数回の洗浄に入る前に、2,3回すすぎをします。洗浄効果が高くなります。	13～14
	ブロッキング	ブロッキングが不十分だと、バックグラウンドが高くなります。ブロッキング効果の高いブロッキング試薬を使用します。ただし、オーバーブロックによる感度低下に注意する必要があります。 →ATTO EzBlock CASを使用します。	11～12
バックグラウンドのムラ	振とう方法	回転式のシェーカーを使用するとメンブレンの中心部分のバックグラウンドが高くなります。シーソー式または水平式のシェーカーを使用します。 →ATTO シーソーシェーカーを使用します。	13～14
	振とうスピード	メンブレンの両端にバックグラウンドが高い部分ができる場合、抗体反応の振とうスピードが速すぎる場合があります。 →膜全体に抗体溶液が行き渡る程度にゆっくり振とう。	13～14
	抗体溶液の容量	1次抗体が貴重で液量が少ない場合にムラになる場合があります。抗体量は同じで、溶媒量を数倍に増やし振とうできる程度にします。膜全体に抗体溶液が行き渡るようにゆっくり振とうします。	13～14
斑点状のスポット	抗体の劣化	2次抗体が古くなると抗体同士でくっつき、IgGと結合せずメンブレン上に残ることがあります。 →チューブを軽く遠心してから上清を分注します。	13～14

パターンの乱れに関するトラブルシューティング

トラブルの状態	主な原因	対処方法	関連ページ
部分的にパターンにムラがある	ブロッキング	バンドの一部分が欠けていたりする場合、ブロッキングに原因があります。 →気泡が入らないようにメンブレンとゲルを重ねます。 →ろ紙・ゲル・メンブレンを重ねたら全体をつぶすように圧をかけ気泡を追い出します。	9～10
しわがある	シーリング	発光基質を添加した後のシーリングにラップを使用するとしわが見える場合があります。 →クリアポケットを使用します。	15～16
バンドが流れている	ブロッキング	ゲルとメンブレンの圧着が不十分で隙間がありパターンが流れたように成ります。 →ろ紙・ゲル・メンブレンを重ねたら全体をつぶすように圧をかけ気泡を追い出します。	9～10
	シーリング	発光基質を添加した後のシーリング時に気泡を追い出そうと強くしごいてしまうと、バンドが尾を引いたように流れる場合があります。 →クリアポケットを使用し、指でしごいたりせずにシーリングします。	15～16
パターン全体が曲がっている	電気泳動	ゲルの出来が悪い場合、サンプルの脱塩不足や不純物が多い場合などで泳動パターンが乱れることがあります。泳動バッファーが適正な組成でない場合にも乱れることがあります。 →ゲルやバッファーを作り直します。 →サンプルの調整をやり直します。	3～6

ウェスタンブロットिंगのコツ

Knacks & Tips for Western Blotting

1.はじめに

ウェスタンブロットINGは、電気泳動→ブロットING→ブロッキング→抗原抗体反応を経て目的のタンパク質を特異的に検出します。この実験にはたくさんのステップがあり、ひとつでうまくいかないの良い結果が得られない、面倒な実験です。

ウェスタンブロットINGの実験がうまくいくと、目的のタンパク質のバンドが検出され、それ以外のバンドやバックグラウンドのシグナルが抑えられます。このような結果が得られないときは、検出までの多くの実験ステップのうち、どこかがうまくいかなかったことが考えられます。

「ウェスタンブロットINGのコツ」とは、様々な失敗から得た成功の秘訣をまとめたものです。本資料では特に、ブロットING、ブロッキング、抗原抗体反応、発光検出における実験操作で“ここを注意すれば成功する”と考えられる部分をクローズアップしてご紹介します。

2.トラブルの原因を推理する

「ウェスタンブロットINGがうまくいかない」場合のトラブルシューティングは、原因の追究が必要です。そのため「失敗した実験結果」を注意深く分析し、実験ステップを遡り、何が原因だったのかを推理します。結果からは、「バンドが見えない」、「バンドが見えにくい」、「分析できない」などと分類して分析すると原因を推理しやすくなります。（図1参照）

「バンドが見えない」というのは、バックグラウンドが高く、膜全体が発光（発色）してバンドが確認できないことや、検出してもバックグラウンドも含め何も光らない（何も見えない）様な状態を指します。

「バンドが見えにくい」というのは、基本的に目的のバンドは見えているが、バックグラウンドが不均一に高い、バンドのシグナルが弱く確認しにくい、膜全体に斑点状のスポットが検出されている、バンド自体に抜けや濃さのムラがあるなどの状態を指します。



図1 原因特定のための実験結果分析

「分析できない」というのは、前出の2種類のほかにバンドの一部が消失していたり、ダイナミックレンジが狭く、定量性が低かったり、バンドがたくさん出てしまうなどの問題があります。

ウェスタンブロットINGには、大きく分けて6つのステップがあります。トラブルの解決にはこのステップのどこで問題が生じているのかを探る必要があります。（図2）

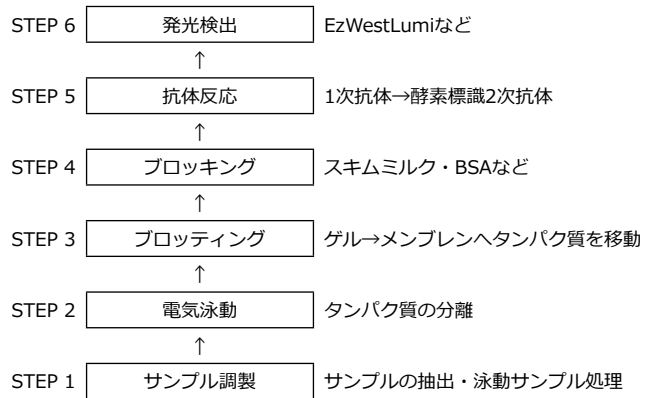


図2 ウェスタンブロットINGのステップ

3.トラブルの解決方法

3-1 「バンドが見えない」

「バンドが見えない」トラブルは図3のような結果になることがあります。膜全体が発光（発色）してしまうことでバンドが確認できない状態です。図3に示したように、これは発光検出、抗体反応、ブロッキングのステップが原因と考えられるトラブルです。この状態は、酵素標識2次抗体が膜全体に付着して、全体が光っているためです。これは、抗体反応後の洗浄ステップが不十分な場合に発生します。洗浄ステップ（例：10分×3回）の前に、洗浄バッファー（TBS-TやPBS-T）で2,3回すすぎをすると、残留抗体量が減り、洗浄効果が向上します。さらに、2次抗体の希釈率を上げる（濃度を低くする）ことも効果的です。また、ブロッキングが不十分だと、1次抗体が非特異的に結合するため、結果として膜全体が光ってしまいます。

バックがきれいで、何もバンドが検出されない場合は、目的蛋白質の量が検出限界よりも低い事が考えられます。この場合はサンプル調製、ゲルへの添加量などを再度チェックします。またこの他に、抗体の抗原性が低い（性能が悪い）場合やロットの不良などによって検出できない場合があります。使用する抗体は、予めドットプロット等で目的蛋白質の検出ができることを確認しておきます。

ブロットINGの転写効率が低いと十分な検出感度が得られないため、ゲル・膜・ろ紙の密着度を上げることをお勧めします。また、転写後のゲルをCBB染色し、ゲルにタンパク質が残っていないことを確認しておきます。

（バンドがほとんど無ければブロットING成功）



図3 バンドが見えない例

（左）バックが高くバンドが見えないパターンと関連の深いステップ
（右）バックを含め何も見えないパターンと関連の深いステップ

3-2 「バンドが見えにくい」

「バンドが見えにくい」トラブルは、膜上の汚れが原因となります。これは、抗体反応とブロッティングに原因があります（図4参照）。バックグラウンドに縞模様やムラがある場合は、1次抗体の液量が少ないことや、振とうが十分でないことに起因します。これを防止するには、使用する抗体量は同じで、溶媒（ブロッティング溶液）の量を増やします。そして、シーソー式や水平式の振とう器を使って膜全体に抗体溶液を均一に行き渡らせるように振とうします。合わせて洗浄ステップのすすぎを加え、よく行うことでバックグラウンドが低く抑えられます。

膜全体に斑点状のスポットが検出される場合は、抗体溶液の保存中に抗体同士が凝集してしまったものが膜に付くことが原因です。抗体溶液のチューブを軽く遠心してから上清の抗体溶液を分注すること防ぐことが可能です。

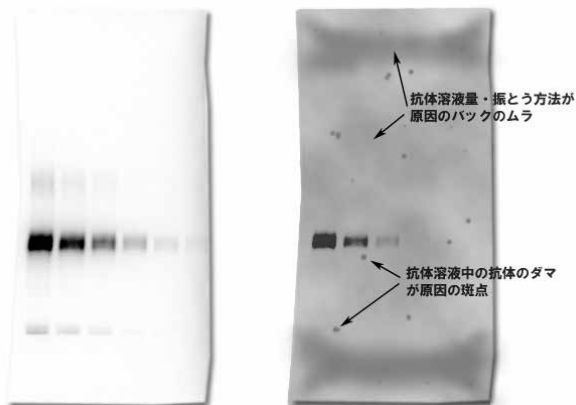


図4 抗体反応が原因の汚れ
(左) 適正な検出例 (右) バックのムラや斑点状の汚れが付いた例

バンドのムラやスポット状の抜け、流れた様ににじんでいる場合は、ブロッティングのステップが原因と考えられます。（図5参照）これらは、ゲル、膜、ろ紙の密着度が十分ではないときに起こります。セミドライブロッティングでは、ゲル、膜、ろ紙を重ねたら、ブロッティングローラーで全体を平にして（図6参照）密着度を向上することでムラや抜けなどを防ぐことができます。

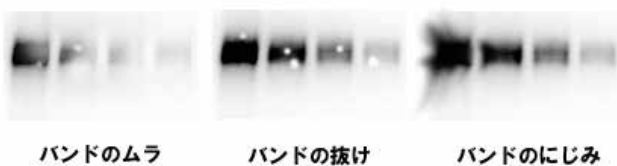


図5 ブロッティングが原因の汚れ
ゲル・膜・ろ紙の密着度が十分でない場合に発生するパターンの異常例

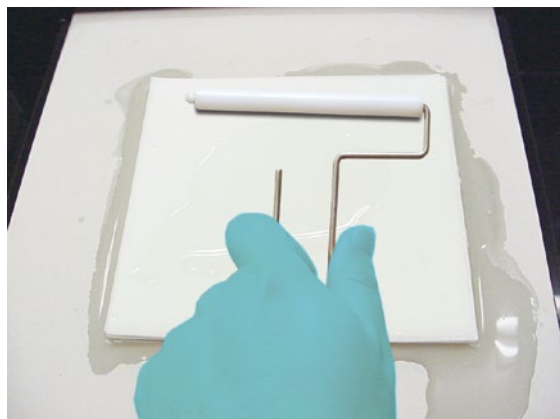


図6 ゲル、膜、ろ紙とブロッティングローラー

「バンドが見えにくい」トラブルでは、バックグラウンドが十分低いにもかかわらず目的のバンドが見えない場合があります（図7参照）。これは、抗体反応とブロッティングのステップに原因があると考えられます。特に、スキムミルクの濃度を3~5%にしてブロッティングを行うと、濃度の低いバンドはブロッティング蛋白質でオーバーコートされてしまい（オーバーブロッティングの状態）、検出感度が低下します。これを防ぐためには、Tween-20の濃度を0.1%としたTBS-T使用し、スキムミルクの濃度を0.3~0.5%とするブロッティング溶液を使用します。また、抗体反応後のすすぎを十分に行うと、バックグラウンドが低く抑えられ、適正な検出が可能となります。

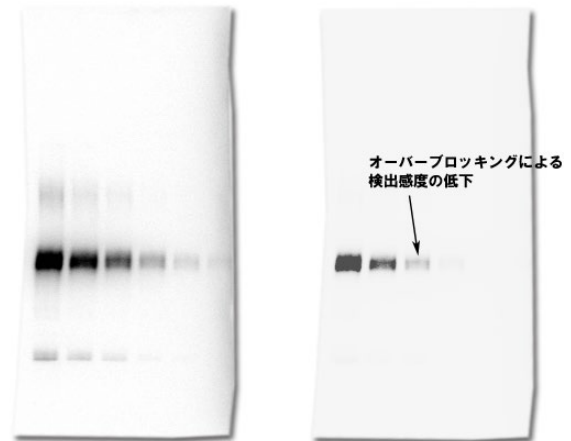


図7 オーバーブロッティングによる感度低下
ブロッティング剤の濃度が高いと、オーバーブロッティングによって濃度の低いバンドが検出されにくくなります。

3-3 「分析できない」

「分析できない」トラブルは、定量解析を行おうとしたときに確認されます。十分な濃度があるはずのバンドが、検出時に消えてしまう場合や、差があるはずのバンド同士の濃度差がほとんど出ない場合、検出されたバンドが多すぎて目的のバンドが特定できない場合などがあります。

濃度の高いバンドは、多くの1次抗体が結合します。そして2次抗体もたくさん結合するため、部分的に酵素濃度が高い状態になります。そうすると、発光基質をかけた直後、非常に短い時間でバンド周辺の基質を消化してしまいます。膜のシーリングなどに手間取っていると図8のようにバンドの一部（とくに中心部）の発光が消えてしまうことがあります。これを防ぐには、ゲルにアプライするサンプル量を減らすか濃度を低くします。その結果として酵素標の量を減らすことになり、中抜けのトラブルが解決します。



図8 消えた高い濃度のバンド

ウエスタンブロッティングの検出には発光法（ケミルミネッセンス法）が良く利用されます。従来は発光基質の感度が低く、X線フィルムに露光して検出する方法が一般的でした。今では発光基質の改良が進み、桁違いに検出感度が上がったことから発光撮影装置（冷却CCDカメラシステム）を使って発光パターンを撮影することができます。しかし、いままでに述べてきたような点に注意してサンプルを作っても、実際に発光量を計測してみると、思ったような結果が得られない場合があります。

この問題では、発光試薬の特性や、撮影までの所要時間などに原因があります。ウエスタンブロッティングでよく利用される発光試薬は、POD（HRP）用のもので、ルミノールと過酸化水素とエンハンサーで構成されています。製造メーカーにより発光持続時間・発光強度などが異なり、それぞれに特徴があります。しかしいずれも、膜へ添加後の数分間が最も発光が強く、また濃度に依存した相対的な発光量が得られます。この時間帯の発光を撮影すると、濃度と発光量に比例関係のある、直線性の高いデータが得られます。

上記のことから、発光試薬添加後すぐに撮影することをお勧めします。そこで問題となるのは試薬添加後の膜のシーリングで、これに時間が掛かってしまうと、せっかくの定量性の良い状態の発光を撮影できなくなってしまいます。発光時間の短い発光試薬では感度自体も下がってしまいます。そこでシーリングに**ピタットクリア**（Pitatt Clear）（図9）を使用します。ピタットクリアはポリプロピレン製のビニールバッグで、発光試薬を添加した膜を挟むだけで膜をシーリングすることができ、シーリング時間を短縮できます。ハイブリバッグよりも安価（A6版：約3.1円/枚）で、張りがあるため非常に使いやすいのが特長です。

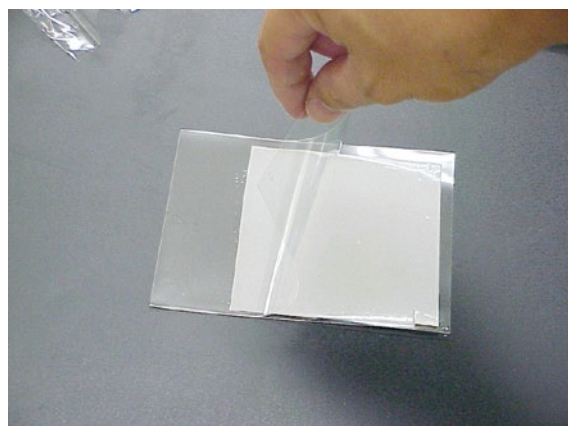


図9 ピタットクリアに膜をシーリング
ピタットクリアは100×151mm 90枚入り 3,200円
アトー株式会で発売中

ポリクローナル抗体を使用すると、どうしても目的タンパク質以外のバンドも検出されます。発光撮影装置によっては、有色分子量マーカー像と発光パターンの合成機能があるので、これを利用して分子量を求めることも可能です（図10）。また、ビオチン標識分子量マーカーを用いると、サンプルと同時に発光検出が可能です。分子量マーカーが検出できればそれを基に分子量推定を行い、目的蛋白質のバンドを特定すればよいのです。目的蛋白質のバンド近傍にほかのバンドが多い場合は電気泳動条件の変更で分離を良くして対応します。

検出されるバンド数を少なくするには特異性の高いモノクローナル抗体に変更します。検出されるバンド数が減り、定量解析なども容易になります。解析が容易なパターンが得られると、再現性も高くなり、データの信頼性が向上します。

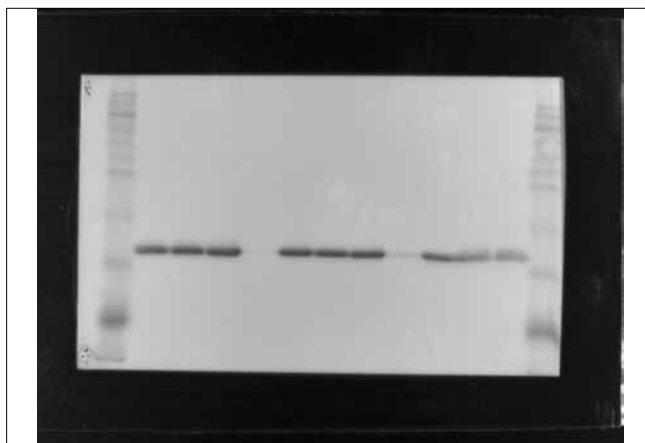


図10 有色マーカー像と発光パターンの合成画像
アトーEz-Capture MGで撮影し、CS Analyzer3で合成しました。

4.まとめ

以上のようにウエスタンブロッティングにおけるいろいろなトラブルシューティングをご紹介してきましたが、それでもすべてが上手くいくわけではないと思います。アトー株式会社ではいろいろなトラブルについてサポートできるよう資料を作成・配布しています。これらの情報が多くの研究者のかかえる実験に関するトラブルシューティングの一助になれば幸いです。

「発光検出のコツ for Western Blotting」
アトー株式会社のラボに眠る様々な「コツ」を集めた資料集です。

作製：アトー株式会社 製品情報グループ

$0.1=10^{-1}$	deci	d	one tenth of
$0.01=10^{-2}$	centi	c	one hundredth of
$0.001=10^{-3}$	milli	m	one thousandth of
$0.000\ 001=10^{-6}$	micro	μ	one millionth of
$0.000\ 000\ 001=10^{-9}$	nano	n	one billionth of
$0.000\ 000\ 000\ 001=10^{-12}$	pico	p	one trillionth of
$0.000\ 000\ 000\ 000\ 001=10^{-15}$	femto	f	one quadrillionth of
$0.000\ 000\ 000\ 000\ 000\ 001=10^{-18}$	atto	a	one quintillionth of



アトー株式会社

生化学・分子生物学・遺伝子工学研究機器
開発/生産/販売/サービス

主要製品

- 発光・蛍光イメージングシステム
- 画像解析ソフトウェア ●電気泳動装置
- 電気泳動関連試薬 ●ウエスタンブロット試薬
- ペリスタポンプ ●細胞培養・観察システム

- 東京本社 〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2 ☎(03)5827-4861(代表) ☎(03)5827-6647
- 大阪支店 〒530-0044 大阪市北区東天満2-8-1 ☎(06)6136-1421(代表) ☎(06)6356-3625
若杉センタービル別館 5F
- 技術開発センター 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6 ☎(03)5818-7560(代表) ☎(03)5818-7563
◆メンテナンスサービスグループ ☎(03)5818-7567(代表) ☎(03)5818-7563

■URL <https://www.atto.co.jp/>

お問い合わせ WEB会員登録の上お問い合わせフォームをご利用ください。