

MEMO

抗体濃度の至適化

ウェスタンブロットングで最良の結果を得るためには至適抗体濃度を設定することが重要です。抗体濃度が低すぎるとバンドが見えない、抗体濃度が高すぎるとバックグラウンドが高い、エキストラバンドが見えるといったトラブルが起こります。ここでは抗体濃度がはっきりしない場合の検討法をご紹介します。

ECL から ECL Plus、あるいは ECL Plus から ECL Advance へ検出試薬を変更する場合の抗体濃度の目安については 29 ~ 30 ページをご参照ください。

※本文中の 1:100 等の数値は抗体の希釈率を示します。1:100 の場合は抗体 1 容量に対し 100 容量のバッファーで希釈するという意味です。

ドットプロット / スロットプロットを用いた至適抗体濃度の検討

電気泳動やブロットングの操作をせずに、メンブレンに直接サンプルを添加し抗体反応、検出を行う実験をドットプロットと呼びます。図 7 のような点状の画像が得られます。スロットプロットはドットプロットと同じ目的で使用される手法です。専用の装置 図 9 の中にサンプルを入れておき、吸引して一気にメンブレンに吸着させます。サンプルが多くドットプロット作業中にメンブレンが乾燥してしまう場合などに有効な手法です。図 8 のような細い線状のバンドが得られます。得られたプロット画像で最も適したシグナル強度の濃度を元にウェスタンブロットングの実験を行います。

一次抗体の力価を調べる時には二次抗体の希釈率を固定して実験を行います。また、二次抗体の力価を調べる時には逆に一次抗体の希釈率を固定します。

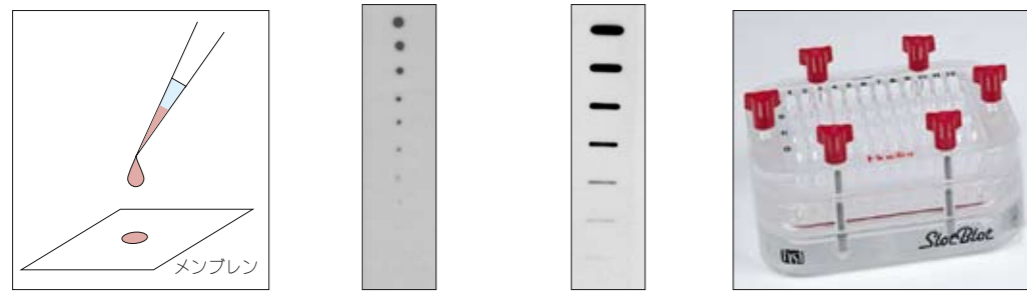


図 6 ドットプロット 図 7 ドットプロット例 図 8 スロットプロット例 図 9 スロットプロット用装置

力価のはっきりしない一次抗体 / 抗血清を用いる場合 - ECL Advance

ECL Advance は非常に高感度な検出試薬のため、抗体濃度が高いと強いバックグラウンドが表れるので、抗体濃度の至適化が特に重要です。

- 1) ニトロセルロースメンブレン、あるいは親水化処理 (参照 71 ページ) を行った PVDF メンブレンを用意します。サンプルをピペットでメンブレン上に垂らし、乾燥させます (図 6)。希釈率の異なる一次抗体それぞれに対して 1 枚のプロットを用意します。
- 2) ECL Advance 用ブロッキングバッファー (参照 18 ページ) を調製し、室温で 1 時間ブロッキングします。(PVDF メンブレンがバッファーをはじくようであれば、再度親水化のため、軽く 100% メタノールをくぐらせてからブロッキングを行います。)
- 3) 洗浄バッファー (PBS-T あるいは TBS-T) で軽く 2 回すすぎを行います。
- 4) 系列希釈した一次抗体溶液中で (例 1:10,000、1:25,000、1:50,000、1:75,000、1:100,000。表 3 をご参照ください。)、室温で 1 時間振盪します。
- 5) メンブレンを洗浄バッファーで 2 回軽くすすいだ後、それぞれ新しい洗浄バッファーで 15 分 × 1 回、5 分 × 3 回洗浄します。
- 6) 希釈した二次抗体溶液中で、室温で 1 時間振盪します。二次抗体の希釈濃度は X 線フィルムで 10 分間露光する場合、1:200,000 を目安に希釈してください。
- 7) ステップ 5) と同じ要領でメンブレンを洗浄します。
- 8) 検出試薬でインキュベート後、フィルムに露光してシグナルを検出します。

力価のはっきりしない一次抗体 / 抗血清を用いる場合 - ECL Plus / ECL / ECL Plex

- 1) ニトロセルロースメンブレン、あるいは親水化処理 (参照 71 ページ) を行った PVDF メンブレンを用意します。サンプルをピペットでメンブレン上に垂らし、乾燥させます (図 6)。希釈率の異なる一次抗体それぞれに対して 1 枚のプロットを用意します。
- 2) ブロッキングバッファー (例: 5% スキムミルクを含む PBS-0.1% Tween 20 (PBS-T)) を用い、室温で 1 時間ブロッキングします。(PVDF メンブレンでバッファーをはじくようであれば、再度親水化のため、軽く 100% メタノールをくぐらせてからブロッキングを行います。)
- 3) 洗浄バッファー (PBS-T あるいは TBS-T) で軽く 2 回すすぎを行った後、それぞれ新しい洗浄バッファーで 10 分 × 1 回、5 分 × 2 回洗浄します。
- 4) 表 3 を目安に系列希釈した一次抗体溶液中で室温で 1 時間振盪します (ECL Plex は 1.5 時間)。
- 5) ステップ 3) と同じ要領でメンブレンを洗浄します。
- 6) 希釈した二次抗体溶液中で、室温で 1 時間振盪します。二次抗体の希釈濃度は X 線フィルムで 10 分間露光する場合、ECL Plus では 1:25,000、ECL では 1:10,000 を目安に希釈してください。
- 7) ステップ 3) と同じ要領でメンブレンを洗浄します。
- 8) 検出試薬でインキュベーション後、フィルムに露光してシグナルを検出します。
- 9) 実際のウェスタンブロットングでは、ゲルからメンブレンに転写されるタンパク質は一般に半分以下であることを考慮して抗体濃度を絞り込みます。

力価のわからない二次抗体を用いる場合 - ECL Advance / ECL Plus / ECL / ECL Plex

- 1) 力価のはっきりしない一次抗体 / 抗血清を用いる場合のステップ 1)、2) と同様にドットあるいはスロットプロットとメンブレンのブロッキングを行います。
- 2) 一次抗体を希釈後、室温にて 1 時間メンブレンをインキュベートします。
- 3) 力価のはっきりしない一次抗体 / 抗血清を用いる場合のステップ 3) にならってメンブレンを洗浄します。
- 4) 表 4 を目安に二次抗体を系列希釈後、室温で各メンブレンを 1 時間インキュベートします*。
- 5) メンブレンを洗浄バッファーで 2 回軽くすすいだ後、15 分 × 1 回、5 分 × 3 回洗浄します。
- 6) プロトコールにしたがって、ECL Advance / ECL Plus / ECL 検出試薬とインキュベーション後、フィルムに露光してシグナルを検出します。

* ECL Advance を使用する場合には、希釈率に注意する必要があります。また、二次抗体の希釈率を決定する場合は、一次抗体の希釈率を固定して二次抗体の至適濃度を検討します。

表 3 一次抗体希釈濃度の目安

	メンブレンの種類	一次抗体希釈
ECL	ニトロセルロースメンブレン	1:100 ~ 1:1,500
	PVDF メンブレン	1:500 ~ 1:5,000
ECL Plus	ニトロセルロースメンブレン	1:1,000 ~ 1:10,000
	PVDF メンブレン	1:5,000 ~ 1:20,000
ECL Advance	ニトロセルロース・PVDF	1:10,000 ~ 1:100,000
ECL Plex	-	1:100 ~ 1:5,000

表 4 二次抗体希釈濃度の目安

	メンブレンの種類	二次抗体希釈
ECL	ニトロセルロースメンブレン	1:1,000 ~ 1:10,000
	PVDF メンブレン	1:2,500 ~ 1:15,000
ECL Plus	ニトロセルロースメンブレン	1:10,000 ~ 1:100,000
	PVDF メンブレン	1:25,000 ~ 1:200,000
ECL Advance	ニトロセルロース・PVDF	1:50,000 ~ 1:500,000
ECL Plex	-	1:1,250 ~ 1:4,000

MEMO

基礎編

1

電気泳動

2

ブロットング

3

抗体反応

4

検出

基礎編

1

電気泳動

2

ブロットング

3

抗体反応

4

検出

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

弊社トップページ www.gelifesciences.co.jp >>



掲載製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載内容は、予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本社 〒169-0073

東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルヂング

お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL: 03-5331-9336 FAX: 03-5331-9370

e-mail: Tech-JP@ge.com



ISO 9001:2000認証取得