

Contents

実験目的にあった検出試薬の選択に → ウェスタンブロットティングで目的の結果を得るには	前付1
よくあるお問合せ例とその検討方法を知るには → 今のウェスタンブロットティングの結果に満足していますか？	前付3
ECL™シリーズ検出試薬の反応系を知る → 化学発光、直接蛍光	前付5
各検出試薬の仕様を調べたい方に → ECL™シリーズ検出試薬	前付6
ウェスタンブロットティング攻略ガイドの構成とマークの説明	1

実践編

実験に必要な装置・試薬	3
ブロッキング～抗体反応で使用する洗浄バッファの作り方  調製方法	4
ECL™ Primeウェスタンブロットティング検出プロトコール  使い方	5
ECL™ ウェスタンブロットティング検出プロトコール  使い方	10
ECL Select™ ウェスタンブロットティング検出プロトコール  使い方	15
ECL Plex™ ウェスタンブロットティング検出プロトコール  使い方	21
時間短縮のためのヒント	27
検出試薬変更時のアドバイス	28
• ECL™ → ECL™ Prime	28
• ECL™ Prime → ECL Select™	29
• 発色法 (DAB 検出法) → ECL™ シリーズ	30
• ECL™、ECL™ Prime、ECL Select™ → ECL Plex™	31

トラブルシューティング



トラブル例	33
トラブルシューティング	34
バンドが検出できない	34
• シグナルが検出できない	34
• 全体的に黒くて (バックグラウンドが高くて) バンドが検出されない	34
• バンドはあるが一部検出されない	35
バンドは検出できるが結果に不満がある	35
• シグナルが弱い	35
• シグナルが強すぎる	35
• シグナルが白く抜けている	36
• 全体的に非特異のバンドが検出される	36
ブルーライトテスト	36

バンド以外に問題がある	37
<ul style="list-style-type: none"> 不規則でまだらなシミが検出される バックグラウンドが高い そのほかの汚れや非特異的な検出 	37
トラブルシューティング参考例	38

基礎編

ウェスタンブロットティング原理	41
ウェスタンブロットティングの流れと使用製品例	43

1 サンプル調製

サンプル調製概要	45
タンパク質抽出方法  選び方	46
サンプルの保護  選び方	48
阻害物質の除去  選び方	49
<ul style="list-style-type: none"> タンパク質以外の阻害物質の除去 血清や血漿サンプルからの含有量の多いタンパク質の除去 脱塩、バッファー交換およびサンプル濃縮 	49
タンパク質の定量  選び方	52
<ul style="list-style-type: none"> タンパク質定量のための製品 	53

2 電気泳動

電気泳動装置  選び方	56
<ul style="list-style-type: none"> 電気泳動装置の選び方 	56
ゲル・バッファー  調製方法	57
<ul style="list-style-type: none"> ゲルの作製方法 サンプルバッファーの調製方法 泳動バッファーの調製方法 	57
タンパク質分子量マーカー  選び方  使い方	59
<ul style="list-style-type: none"> タンパク質分子量マーカーの選び方 ECL Plex™ Fluorescent Rainbow™ Markersの使い方 ECL DualVue™ Western Blotting Markersの使い方 Rainbow™ Molecular Weight Markersの使い方 	59
電気泳動方法	64
ゲル染色試薬  選び方  使い方	66
<ul style="list-style-type: none"> ゲル染色試薬の選び方 CBB 染色 	66

3 プロットニング

プロットニング装置	▼ 選び方	69
• プロットニング装置の選び方		69
• パワーサプライの選び方		69
メンブレン	▼ 選び方 ④ 使い方	70
• メンブレンの選び方		70
• PVDFメンブレンの親水化処理		71
プロットニングバッファー	④ 調製方法	72
• プロットニングバッファーの調製方法		72
TE70 / TE77 PWR Semi-Dry Transfer Unitでのプロットニング方法		73
プロットニングの確認	④ 使い方	74
• 有色マーカーを使用する		74
• プロットニングした後のメンブレンをCBBで染色する		74

4 抗体反応

ブロッキング剤	▼ 選び方 ④ 使い方	79
• ブロッキング剤の選び方		79
• ブロッキング剤の使い方		80
二次抗体	▼ 選び方	81
• 二次抗体の選び方		81
• ECL™検出試薬の選び方		81
抗体濃度	④ 決め方	83
• 抗体濃度の至適化		83
1枚のメンブレンで複数の目的タンパク質を検出する		85

5 検出&解析

検出	▼ 選び方	91
• 検出方法の選び方		91
• 検出方法と特徴		91
• 各ECL™検出試薬に適した検出方法		91
• 検出後のデータの評価		92
CCDイメージャー	④ 使い方	93
• Amersham™ ImageQuant™ 800シリーズによる化学発光検出		93
蛍光スキャナー	④ 使い方	95
• Amersham™ Typhoon™ Scannerによる蛍光検出		95
X線フィルム	④ 使い方	96
• X線フィルムによる化学発光検出方法		96

検出したタンパク質の定量	98
ソフトウェアを用いた定量方法	100
ウェスタンブロットティングのノーマライズについて	101
リン酸化解析におけるCCD Imagerのダイナミックレンジの重要性	102
参考文献リスト	103

ECL™ユーザーの皆さまより

FAQ (製品Q&A) コーナーのご紹介	104
データ紹介～ライフサイエンスフォーラムより～	105
ご注文情報	107
試薬、消耗品サンプルのご案内	113
多様化するニーズにあわせた有料トレーニングプログラム	114
ウェスタンブロットティング関連製品マップ	115

本誌の作成にあたり、実験データの提供などご協力いただきました方々にこの場を借りてお礼申し上げます。なお、各ご所属はご提供いただいた当時のものです。