

Western Blot (WB) Protocol

2018.3 ver.4

1. 細胞を PBS で 3 回洗浄した後、1% Triton X-100 Lysis Buffer を添加して、氷上にて 15～30 分間溶解させる。セルスクレーパーにてチューブに細胞を回収した場合には、チューブ内に 1% Triton X-100 Lysis Buffer を添加した後、ピペットマンにて細胞を懸濁する。

☞ Lysis buffer が均一に行き渡るよう 5～10 分置きに軽く攪拌するとよい。

☞ Lysis buffer 添加量の目安：1 ml／90 mm dish、600 μ l／35 mm dish

<u>1% Triton X-100 Lysis Buffer</u>	(final)	(stock)	(500 ml)
Tris-HCl (pH 7.5)	25 mM	1 M	12.5 ml
NaCl	150 mM	5 M	15.0 ml
EGTA	5 mM	0.1 M	25.0 ml
Triton X-100	1%	20%	25.0 ml

☞ 以下のプロテアーゼ阻害剤を使用時に添加する。

	(final)	(stock)
Aprotinin (Roche #10236624001)	5 μ g/ml	1 mg/ml
PMSF (Roche #10837091001)	1 mM	100 mM

2. 15,000 rpm×15～30 分間遠心分離した後に、細胞抽出液（上清）を新しい 1.5 ml チューブに移す。
3. 必要に応じてタンパク定量（BCA Protein Assay Kit, PIERCE #23225）によりサンプルの濃度を測定後、下記のようにして WB 用サンプルを調製する。

細胞抽出液 5～40 μ g

4×SDS Sample Buffer 1/3 vol.

☞ タンパク量は目的に応じて調節する。

4×SDS Sample Buffer (1 ml ずつ分注して凍結保存する。)

5×SDS Sample Buffer	8 ml
1 M DTT	2 ml
Bromophenol Blue (Wako #021-02911)	マイクロスパーテル 1 杯弱程度

<u>5×SDS Sample Buffer</u>	(final)	(stock)	(100 ml)
Tris (pH 6.8)	312.5 mM	1M	31.25 ml
SDS	10%	powder	10 g
Glycerol	50%	100%	50 ml
イオン交換水にて 100 ml とする			

4. アプライする直前に 100℃で 3 分間程度加熱する。

☞ この状態で凍結保存可能です。

ただし、冷凍保存した場合はアプライ前に再度 100℃にて 3 分間加熱する。

5. 8～12% SDS-PAGE (目的タンパク質の分子量に応じて分離ゲルの濃度を適宜変える。)

濃縮ゲル : 10～15 mA (1～2 hr)

分離ゲル : 20～25 mA (4～6 hr)

Over night で泳動する場合 : 8 mA (～12 hr)

1×Running Buffer (5 L)

5×Running Buffer 1 L

イオン交換水 4 L

5×Running Buffer (final) (5 L)

Tris 25 mM 75.71 g

Glycine 192 mM 360.34 g

SDS 0.1% 25 g

イオン交換水にて 5 L とする。

Lower Gel Buffer (final) (1 L)

Tris (pH 8.8) 1.5 M 181.7 g

SDS 0.4% 4.0 g

イオン交換水にて溶解後、HCl で pH 8.8 に合わせた後、全量を 1 L とする。

Upper Gel Buffer

Tris (pH 6.8) 0.5 M 60.6 g

SDS 0.4% 4.0 g

イオン交換水にて溶解後、HCl で pH 6.8 に合わせた後、全量を 1 L とする。

6. Transfer Buffer にてゲルを 10～15 min 平衡化する。

Transfer Buffer (3 L)

10×Transfer Buffer 0.3 L

MeOH 0.6 L

イオン交換水 2.1 L

10×Transfer Buffer (final) (5 L)

Tris 250 mM 151.5 g

Glycine 1920 mM 720 g

SDS 0.15% 7.5 g

イオン交換水にて 5 L とする。

7. メンブラン (ClearTrans PVDF membrane 0.45 μ m, Wako #038-22643) をメタノールに 30 秒程度浸した後、イオン交換水で軽く洗浄し、その後 Transfer Buffer にて 10～15 min 平衡化する。

☞ ブロットティングの方法は以下の特徴を良く理解した上で、目的に応じて使い分けてください。

セミドライブロットティング： 短時間でのトランスファーが可能である。
バッファーが少量ですむ。
分子量の大きなタンパク質のトランスファーの効率があまり良くない。

ウェットブロットティング： 分子量の大きなタンパク質のトランスファーの効率が良い。
バッファーを大量に使用する。

【セミドライブロットティング】

8. 厚ろ紙（4枚／ゲル）と薄ろ紙（1枚／ゲル）を Transfer Buffer に浸す。
ブロットティング装置の電極面をあらかじめ Transfer Buffer で湿らせておく。
9. 厚ろ紙（2枚）／PVDF メンブラン／ゲル／薄ろ紙（1枚）／厚ろ紙（2枚）の順で、気泡が入らないように重ねておき、電極、ふたをする。
10. ミニゲルの場合は 20 V で 70 min 程度トランスファーを行う。

【ウェットブロットティング】

8. あらかじめイオン交換水に浸すことで気泡を除去したファイバーパッド（2枚／ゲル）と厚ろ紙（1枚／ゲル）と薄ろ紙（2枚／ゲル）を Transfer Buffer に浸す。
9. 広げたカセットの上に、ファイバーパッド／厚ろ紙／薄ろ紙／ゲル／PVDF メンブラン／薄ろ紙／ファイバーパッドの順で、気泡が入らないように重ねておいた後にカセットをロックして、タンク内にカセットを設置する。
10. ラージゲルの場合は 30 V で 30 min 程度経過した後、45 V にて 3 hr～Over night、トランスファーを行う。

11. 1×TBS にてメンブランを 10～15 min 洗淨する。
12. ブロッキング溶液にてメンブランのブロッキングを行う。(RT/30 min 以上 ～ 4℃/Over night)
 - ☞ 10 ml/ラージゲルを目安とすると良い。
 - ☞ 使用する 1st antibody に応じたブロッキング溶液を使用する。

5% スキムミルク/TBS-T

スキムミルク (雪印) 500 mg を 10 ml の 0.1% Tween20/TBS に溶解する。

5% BSA/TBS-T

BSA (Bovine Serum Albumin Fraction V, Roche #10735094001) 50 g

0.1% Tween20/TBS 約 900 ml

4℃にて一晩静置後、0.1% Tween20/TBS で 1 L とする。NaN₃ (final 0.01%)を添加する。

13. 0.1% Tween20/TBS (RT 5 min×3) にてメンブランを洗淨する。
14. 1st antibody solution (RT/3 hr 以上 ～ 4℃/Over night)
 - ☞ データシート等に記載された抗体の特異性に応じて反応時間を決める。

1st antibody solution

1st Antibody を 5% BSA/TBS-T で希釈する。

☞ データシート等に記載された抗体の特異性に応じて、希釈率とブロッキング溶液を決める。

15. 0.1% Tween20/TBS (RT 5 min×3) にてメンブランを洗淨する。
16. 2nd Antibody solution (RT 45～60 min)
 - ☞ 抗体に応じて適宜反応時間を調整する。

2nd Antibody solution

2nd Antibody を 5% スキムミルク/TBS-T で 1/2000 ～ 1/10000 に希釈する。

☞ ブロッキングに使用したものを回収しておき再利用すると良い。

☞ HRP 検出の際には **NaN₃** を使用しないこと！！

2nd Antibody 【発光検出用】

Anti-Rabbit IgG HRP-linked Antibody (Cell Signaling # 7074)

Anti-Mouse IgG HRP-linked Whole Antibody Sheep (GE # NA931)

Anti-Rat IgG HRP-linked Whole Antibody Sheep (GE # NA935)

2nd Antibody 【発色検出用】

Goat Anti-Rabbit IgG (Fc) AP Conjugate (Promega # S3738)

Goat Anti-Mouse IgG (H+L) AP Conjugate (Promega # S3728)

17. 0.1% Tween20/TBS (RT 5 min×3) にてメンブランを洗淨する。

【発光検出の場合】

18. TN-TN buffer (RT 10 min×2) にてメンブランを洗浄する。

☞ この操作は ECL 検出時にバックグラウンドが高い場合に行うと良い。

<u>TN-TN buffer</u>	(final)	(stock)	(1 L)
TBS	1×	10×	100 ml
Tween20	0.3%	20%	15 ml
NP40	0.05%	20%	2.5 ml
EDTA	10 mM	0.5 M	20 ml

イオン交換水にて 1 L とする。

19. ECL solution I と ECL solution II を等量混合した後、メンブランのタンパクがブロットされている面にまんべんなく行き渡るように振りかけ、1 分間反応させる。

<u>ECL solution I</u>		(stock)	(200 ml)
Tris (pH 8.5)		2 M	10 ml
Luminol (Sigma #A8511)	(0.44 g / 10 ml DMSO)	250 mM	2 ml
P. Coumaric Acid (Sigma #C9008)	(0.15 g / 10 ml DMSO)	90 mM	880 µl

イオン交換水にて 200 ml とする。

<u>ECL solution I (HG; High Grade)</u>		(stock)	(20 ml)
Tris (pH 8.5)		2 M	1 ml
Luminol Sodium Salt HG (Wako #123-04021) (100 mg / 2 ml H ₂ O)		250 mM	200 µl
P. Coumaric Acid (Sigma #C9008)		90 mM	88 µl

イオン交換水にて 20 ml とする。

<u>ECL solution II</u>	(stock)	(200 ml)
Tris (pH 8.5)	1 M	20 ml
H ₂ O ₂ (Sigma #216763-100ML)	30%	120 µl

イオン交換水にて 200 ml とする。

20. 速やかに LAS-4000 にて検出する。

【発色検出の場合】

18. AP buffer (RT 10 min×2) にてメンブランを洗浄する。

<u>AP buffer</u>	(Final)	(Stock)	(5 L)
Tris (pH 9.5)	100 mM	2 M	250 ml
NaCl	100 mM	5 M	100 ml
MgCl ₂	5 mM	2 M	12.5 ml
イオン交換水にて 1 L とする。			

19. メンブランを発色液に浸し、適度にバンドが発色されたらメンブランを水洗した後に乾燥させる。

<u>発色液</u>	(Stock)	(10 ml)
NBT	100 mg/ml	33 μ l
BCIP	50 mg/ml	33 μ l
AP buffer		10 ml

NBT (Nitro Blue Tetrazolium, Wako #148-01991, 100 mg)

70% DMFA (N,N-Dimethylformamide, Wako #045-02916) 1 ml に溶解して-20℃にて保存する。

BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indorylphosphate-p-toluidine salt, Wako #02208661, 100 mg)

100% DMFA 2 ml に溶解して-20℃にて保存する。