

WESTERN BLOT EBOOK

コンテンツ

P5

ウェスタンブロッティングについて

P21

ウェスタンブロットイメージング

P31

ウェスタンブロッティングのヒント
とガイドライン

P45

プロトコール集

P65

アプリケーションノート

P91

Azure Biosystem製品を使用した
文献



400 450 500 550 600 650 700 750 800 850
Wavelength (nm)

Azure Biosystemsについて

Azure Biosystems では、ライフ サイエンス研究用の使いやすい高性能イメージング システムと高品質の試薬を開発しています。装置の設計、技術、ユーザーインターフェースに新しいアプローチを導入することで、私たちはこれまで積み重ねてきた改善により科学者の可能性を革新的に高めていっています。低バックグラウンド、高感度検出、堅牢な定量など、これらの装置から最高品質のデータを得ることに焦点を当てることで、一貫して再現性のある結果をもたらし、ワークフローを合理化する試薬群を作り上げました。

世界中の科学者にライフ サイエンス研究用の優れた製品を提供する Azure Biosystems の技術革新は、無限の科学的洞察への扉を開くものです。

詳細はazurebiosystems.comをご覧ください。



Azureイメージングシステム



Sapphire
バイオモレキュラー
イメージャー



Ao Absorbance
マイクロプレート
リーダー



試薬および
ブロットイング
アクセサリー

CORPORATE HEADQUARTERS

6747 Sierra Court
Suite A-B
Dublin, CA 94568
USA

Phone: (925) 307-7127
(9am–4pm Pacific time)
To dial from outside of the US:
+1 925 307 7127
FAX: (925) 905-1816



www.azurebiosystems.com • info@azurebiosystems.com

Copyright © 2021 Azure Biosystems. All rights reserved. The Azure Biosystems logo, Azure Biosystems®, Sapphire™ and Radiance™ are trademarks of Azure Biosystems, Inc. More information about Azure Biosystems intellectual property assets, including patents, trademarks and copyrights, is available at www.azurebiosystems.com or by contacting us by phone or email. All other trademarks are property of their respective owners.

定量化について

単なる測定ではありません：ウェスタンブロットはなぜ常に定量的でなければならないか

ウェスタンブロットのガイドブックで、なぜ定量的の話から始めるのか？

ウェスタンブロットを初めて行う多くの研究者にとって、イメージャーやスキャナーを使って簡単にプロット上のバンドを定量化できることは、時に科学者にとって最悪の悪夢-再現性のない結果や間違った結論-につながる可能性があります。数字で表現できたからといって、それが真実になるとは限りません。しかし、その数字が決して真でないということでもない。

では、ウェスタンブロットから定量的なデータを得ることはできるのでしょうか？プロット上のバンドを定量化する必要がない場合で、気にする必要があるのでしょうか？

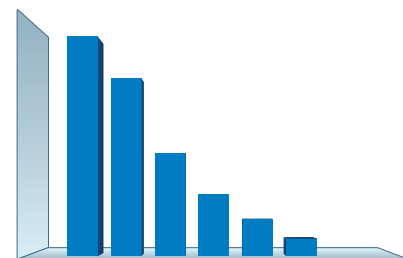
この2つの質問に対する答えは「イエス」であり、私たちが「定量的」という言葉を使うときの意味を見直すことで、その理由を理解することができます。

定量的というのは、本当はどういう意味なのでしょう？

定量的という言葉は辞書で引くと、"can be measured"（測定できる）という以上の定義を見つけるのは意外に難しい。科学者にとって、この言葉は頻繁に使われる言葉であり、誰もがその意味を知っているはずだ、という意味合いもあります。しかし、人によってこの言葉の使い方は様々です。

Azure Biosystems では、統計学者 Samuel S. Wilks¹ が提唱した定義を採用しています。測定値は、以下の基準を満たす必要があります。

- 測定結果は、明確に定義されたプロセス（ウェスタンブロット）を用いて生成されます。
- 測定プロセスが再現性のある結果を生み出すこと、すなわち測定が正確であること。²
- 測定プロセスは、"真の"測定を反映した有効な結果を生成する、すなわち、測定が正確である。³



この定義は、優れた科学的測定の原則を再掲したもので、定量的なウェスタンブロットデータを作成する際に達成すべきこと、すなわち、再現性があり、測定精度を確認できるウェスタンブロットを思い出すのに役立ちます。

このように見てくると、ウェスタンブロットングプロセス中のばらつきを減らす、あるいはコントロールするために十分な注意を払えば、これらの目標は明らかに達成可能なものであることがわかります。さらに、バンドの強度を数値で表すにせよ、単にバンドがあるかどうかを知りたいにせよ、再現性のある結果を求めることに変わりはないことは明らかです。したがって、すべてのウェスタンブロットは定量的であるべきなのです。

すべてのウェスタンブロットを定量化

本書は、ウェスタンブロットングのベストプラクティスと適切な実験条件の選び方に焦点を当て、信頼性と再現性の高いウェスタンブロットを作成することに興味を持つ研究者に優れた出発点とリソースを提供するガイドブックです。最終的なデータがグラフ上の数字であれ、単にプロットの画像であれ、すべてのウェスタンブロットを定量化するための一助となれば幸いです。

参考文献

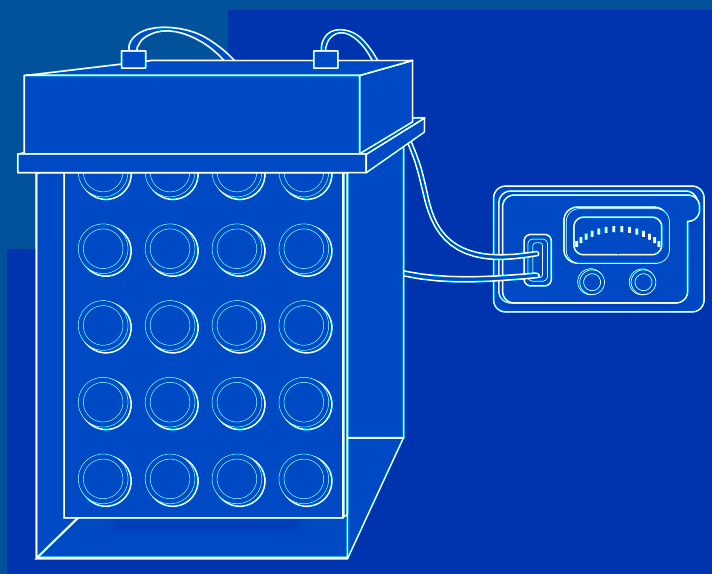
1. SS Wilks. Some Aspects of Quantification in Science. Isis. June 1961. 52:2. p. 135. DOI: 10.1086/349466
2. Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM). International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM). JCGM 200:2012, 3rd Edition 2012. p22. <https://www.bipm.org/en/publications/guides/vim.html>
3. Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM). International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM). JCGM 200:2012, 3rd Edition 2012. p21. <https://www.bipm.org/en/publications/guides/vim.html>

目次

1. ウェスタンブロッティングについて	5
1.1. 背景.....	6
1.2. ゲル電気泳動.....	6
1.3. メンブレンへの転写.....	9
1.4. ブロッキング.....	12
1.5. 抗体との反応.....	13
1.6. 抗体検出.....	16
1.7. 参考文献.....	19
2. ウェスタンブロットイメージング	21
2.1. 暗室からの脱却 - デジタルイメージングでより優れた定量を.....	22
2.2. システムの選択 - CCDイメージャ、スキャナ、ハイブリッドCCD/スキャニングシステム.....	24
2.3. ウェスタンブロット以外のイメージング.....	28
3. ウェスタンブロッティングのヒントとガイドライン	31
3.1. ウェスタンブロットでの転写を成功するためのヒント.....	32
3.2. 化学発光ウェスタンブロッティングの改善法.....	34
3.3. 蛍光ウェスタンブロッティングの改善法.....	36
3.4. 化学発光ウェスタンブロットから蛍光ウェスタンブロットへの移行.....	37
3.5. ウェスタンブロットの正規化.....	40
3.6. トラブルシューティング.....	42
4. プロトコール	45
4.1. Radiance基質によるHRP/化学発光ブロット検出.....	46
4.2. AzureSpectra試薬を用いた蛍光ウェスタンブロッティングプロトコール.....	51
4.3. Azure HRP ストリッピングバッファー.....	58
4.4. AzureRed蛍光タンパク質染色.....	59
5. アプリケーションノート	65
AzureSpectra抗体による3カラーウェスタンブロット.....	66
リン酸化タンパク質の蛍光ウェスタンブロッティングによる効率的検出.....	68
Azure600による3カラーウェスタンブロットの画像化.....	71
Lonzaの試薬とAzure ImagingSystemによる優れた電気泳動結果.....	73
Azure Imager SystemでのDNA色素の検出限界.....	77
ニワトリ胚のウイルス負荷のイメージング.....	79
Sapphire Biomolecular Imagerによる燐光体イメージング.....	81
In-Cellウェスタンブロッティングによるタンパク質のin-Situ検出.....	83
4カラー検出によるアッセイ効率の向上.....	85
AzureRed蛍光タンパク質染色によるウェスタンブロットにおける正確な正規化.....	87
6. Azure Biosystem製品を使用した文献	91

①

ウェスタンブロッティング について



1.1. 背景

1970年代後半から1980年代前半に開発されたウェスタンブロッティングは、タンパク質を含む複雑な試料中の1つまたは複数の特定タンパク質を同定できる分析技術として広く用いられています¹⁻³。ゲル電気泳動でタンパク質を分子量ごとに分離し、固体ニトロセルロース膜支持体に電気泳動で移動させて固定化し、目的のタンパク質に特異的な抗体で膜をプローブし、結合した抗体を放射能標識したブドウ球菌のプロテインAで検出し、オートラジオグラフィーで可視化するというのが従来のプロセスであった。

今日、ウェスタンブロットはタンパク質の発現を解析するための一般的なアッセイであり続け、現在でも最初の3つのステップはオリジナルのプロトコルとほぼ同じである。しかし、その後、多くの技術的進歩があり、このアプローチの威力は増している。これらの進歩には次のようなものがある：

- 低濃度タンパク質の高感度検出を可能にする検出プロセスの改善
- より安全な非放射性同位元素検出法の使用
- 定量アッセイの開発
- 複数のタンパク質を同時に検出する手法
- 高度なデジタルキャプチャシステムを使用し、より簡単に検出・分析できるようになった

そして、多くの有用な方法論と同様に、ウェスタンブロッティング技術も進化を続けている。

本書は、ウェスタンブロッティングに初めて携わる研究者の方々に、その基本を理解していただくとともに、すでにウェスタンブロッティングに携わっている方々には、現在の最先端の技術や手法の概要を理解していただくために作成されたガイドブックです。このページでは、ウェスタンブロッティングのベストプラクティスと、この手法の基礎となる物理、化学、生物学について解説し、長年にわたって使用されてきたこの強力な手法を科学者が最大限に活用できるようにします。

1.2. ゲル電気泳動

ウェスタンブロットの最初のステップでは、ゲル電気泳動と呼ばれるプロセスで、ゲルマトリックスを介してタンパク質が互いに物理的に分離されます（Figure 1.1）。タンパク質試料をローディングバッファーと混合し、ゲルにアプライした後、ゲル/バッファーシステムに電流を流します。実験条件下で負に帯電したタンパク質は、ゲル内を移動して正極に向かいます。

使用するゲルやバッファーの種類にもよりますが、タンパク質がゲルマトリックス中を移動する距離は、主に個々のタンパク質の質/電荷比、または単にタンパク質の分子量によって支配されます。

タンパク質の電気泳動は、NativeまたはDenaturingのいずれかの条件で実行することができます（table 1.1）。変性条件はほとんどのアプリケーションに適しています。しかし、タンパク質の立体構造を保持する必要がある場合は、ネイティブな電気泳動条件を使用する必要があります。

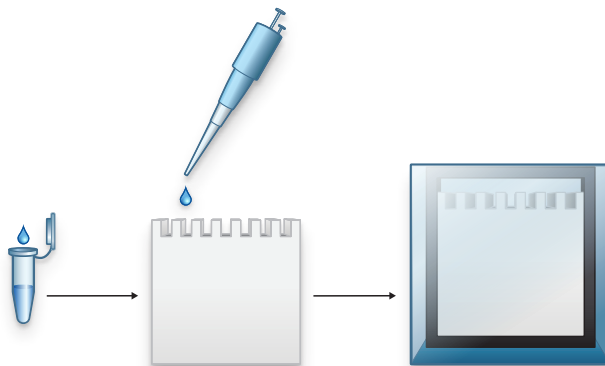


Figure 1.1. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

特徴	用途	方法
ネイティブ	- タンパク質複合体の研究 - 検出抗体が折りたたまれたタンパク質上のエピトープを認識する場合に使用する	- ローディングバッファー、ゲル、ランニングバッファーからSDSを除く - サンプルバッファーから変性剤を除く - ロード前に試料を加熱しない
変性	- タンパク質は、SDS (Figure 1.2) と熱で変性させる - タンパク質は主に分子量によって分離される	- SDSと変性剤を含むサンプルバッファーとタンパク質を混合する - アプライ前にサンプルを加熱

Table 1.1. ネイティブおよび変性電気泳動

ゲルの組成

タンパク質の電気泳動法としては、SDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動）が最も一般的に用いられています。SDS-PAGEゲルは、pH緩衝液、アクリルアミドとビスアクリルアミドの混合物（ゲルマトリックス成分）、およびSDSから構成されています。過硫酸アンモニウム（APS）とテトラメチルエチレンジアミン（TEMED）を用いてアクリルアミドモノマーの重合を触媒し、ビスアクリルアミドを組み込むことでアクリルアミドポリマーの個々の鎖を確実に架橋させることができます。

ゲルの解像性能は、アクリルアミド濃度とビスアクリルアミド架橋剤の濃度に規定されるゲル孔径によって決定されます。一般に、高濃度ゲルは孔径が小さく、分子量の低いタンパク質を分離するのに使用されます。低濃度ゲルは孔径が大きく、高分子量タンパク質の分離に使用されます。Table 1.2にアクリルアミドの割合が異なるゲルの分離能を示します。

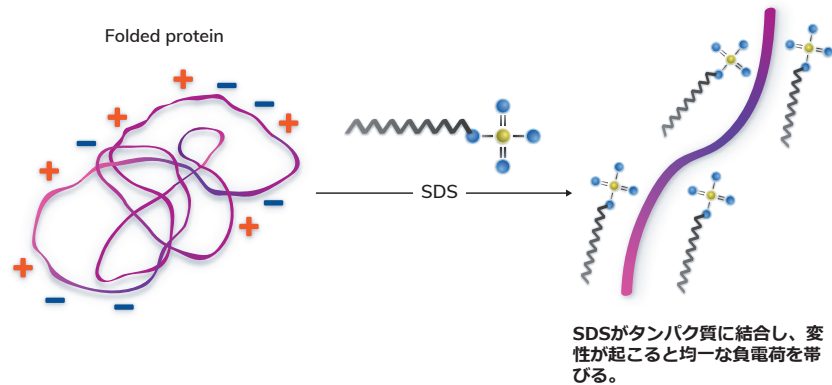


Figure 1.2. SDSによるタンパク変性機構

分子量範囲, kDa	ゲル濃度
10-43	15
12-60	12
20-80	10
30-95	8
50-200	6

Table 1.2. アクリルアミド濃度の違いによる分離能

レムリー不連続ゲル

不連続ゲル（Laemmliゲル）は最も一般的に使用されているゲルシステムの一つで、連続ゲルシステムよりもシャープで明確なバンドを得ることができる⁴。

不連続ゲルシステムは、アクリルアミド濃度とpHが異なる2層のゲルと、両方のゲルとは異なるpHの泳動バッファから構成されている。2つのゲルのpHとバッファの不連続性は、2つのゲルを通過するイオン（特に双性イオン）の移動度を変化させ、その結果、移動するタンパク質の移動度に影響を与える。

一番上のゲル層は、スタッキングゲルまたはフォーカシングゲルと呼ばれます。スタッキングゲルはアクリルアミドを一定量含み、3段階のpHのうち最も低いpHになります。一般的なTris-glycine緩衝系では、スタッキングゲルのpHは6.8、泳動バッファはpH8.3である。スタッキングゲルの目的は、ゲルの下部に入る前にすべてのタンパク質を単一の緊密なバンドに集中させ、分離ゲルでの個々のタンパク質のバンドの鮮明さと明確さを高めることである。

下側のゲル（分離ゲル）には、目的のタンパク質を分離するために必要なアクリルアミドの割合が含まれています。Tris-glycine緩衝液系での一般的な分離ゲルのpHは8.8で、スタッキングゲルや泳動バッファよりもアルカリ性である。分離ゲルの目的はタンパク質をサイズごとに分離することであり、そのためゲルの組成（pH、アクリルアミドの割合）は、タンパク質が主に分子量に基づいてゲル内を移動するように選択される。

グラジエントゲル

"グラジエントゲル"とは、ゲルの上部から下部に向かって濃度が高くなるようにアクリルアミドを勾配して使用することで、ゲルの分離能を向上させることが可能である。グラジエントゲルでは、タンパク質は細孔の大きさによって移動が妨げられるまでゲル内を移動する。

グラジエントゲルは、幅広い分子量に渡る複数のタンパク質を1つのゲルで分離したい場合に最適な選択です。

バッファースystem

ゲルの組成やセットアップを変えるだけでなく、電気泳動バッファースystemを変更することで、ゲル電気泳動中のタンパク質分離を最適化することができます（Table 1.3）。

標準的なSDS-PAGEゲルでは、アルカリバッファのTris-glycineを使用しており、中程度のサイズのタンパク質には十分な分離能が得られます。しかし、ゲルの高いアルカリ性は長い泳動時間中にタンパク質の分解を引き起こし、その結果、タンパク質バンドが不鮮明になるため、Tris-glycineは高分子タンパク質（>150-200 kDa）を分離するには理想的ではありません。また、Tris-glycineゲルでは、スタッキングゲル中にSDSと低分子量タンパク質が混在するため、低分子量タンパク質は容易に分離されません。このような相互作用により、バンドがぼやけ、小さなタンパク質（<10-15 kDa）の分解能が低下します。

Tris-glycineの代わりに使用できるのが酸性のBis-Trisゲルバッファで、2種類のランニングバッファ（小型タンパク質にはMES（2- [N-morpholino] ethanesulfonic acid）バッファ、中型タンパク質にはMOPS（3- [N-morpholino] propanesulfonic acid）バッファ）と併用して使用することが可能です。本システムでは、ランニングバッファに還元剤である重亜硫酸ナトリウムが含まれており、酸性のBis-Trisゲルバッファと協力して、分解能とタンパク質バンドの鮮明さを向上させます。

バッファ	pH	利点
Tris-glycine	<9.5	中程度のタンパク質に適している、安価である
Tris-Bis	6.4	シャープなタンパク質バンド、MWに応じた最適化のための2種類のランニングバッファオプション
Tris-acetate	7.0	高分子量タンパク質での高分離能
Tris-tricine	<9.5	トリシンは低分子量タンパク質とフリーなSDSを分離する

Table 1.3. タンパク質ゲル電気泳動に使用されるバッファースystem

分子量の大きなタンパク質の分離には、Tris-acetateゲルがよく使われます。Tris-acetateゲルのpHは7.0に近く、分子量の大きいタンパク質を十分に分離するために必要な長時間の泳動の間、タンパク質の安定性を維持します。Tris-Acetateゲルは、ネイティブゲルにも変性ゲルにも使用することができます。

1~10kDaの小さなタンパク質を分離するためには、Tris-tricineシステムが推奨されます。Tris-tricineゲルと泳動バッファにより、電気泳動中にゲルフロント先端付近を流れる低分子量タンパク質とフリーSDSを分離することができます。

1.3. メンブレンへの転写

ゲルを使用してタンパク質を電気泳動で分離した後、メンブレンに転写し、その後の工程に使用します。効率的な転写は、膜の選択、使用する転写装置の種類、転写バッファの組成に依存します。

ニトロセルロース VS. PVDF

ウェスタンブロットには、ニトロセルロース膜とポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜の2種類の膜が一般的に使用されています。どちらの膜タイプもうまく機能しますが、実験セットアップやサンプル組成の違いが膜の選択に影響します。また、抗体や検出反応が同じでも、シグナル強度やバックグラウンドは、膜の種類によって全く異なる場合があることに留意する必要があります。

ニトロセルロース膜はタンパク質と強く、ほぼ不可逆的に結合する。PVDF膜よりもコストパフォーマンスが高く、ウェスタンブロッティングに使用された最初のタイプのメンブレンです。ニトロセルロース膜は、特に化学発光検出を用いた場合に、バックグラウンドが低いことが知られています（下記参照）。ニトロセルロース膜はPVDF膜と異なり、使用前の活性化工程が不要です。しかし、ニトロセルロース膜は破れやすいため、特に長期間保存する場合は膜の操作が難しくなります。また、ニトロセルロースは膜が自己蛍光を発するため、蛍光検出方式では使用できません。

PVDF膜はニトロセルロース膜と同様、タンパク質との親和性が高く、ウェスタンブロッティングに適しています。ニトロセルロース膜に比べて耐久性に優れているため、膜を何度も操作するような実験に適しています。PVDF膜は化学発光や蛍光検出に使用され、使用前にメタノールでインキュベートして活性化させる必要があります。低蛍光PVDF膜は、蛍光バックグラウンドが低く、蛍光検出に推奨される膜です。

Azure Biosystems では、使いやすくカットされた高品質の PVDF およびニトロセルロース メンブレンを提供しています。これらの製品およびすべてのウェスタン ブロッティング試薬と消耗品については、azurebiosystems.com/reagents を参照してください。

転写条件

タンパク質の転写効率は、ゲルからのタンパク質の移動と膜上でのタンパク質の保持の両方に依存します。転写はゲル電気泳動と同様に、負に帯電したタンパク質を正に帯電した電極に向かって電氣的に移動させるステップです。転写効率は、使用する転写装置の種類、個々のタンパク質、転写バッファ、転写条件によって影響を受けます。

ウェスタンブロットのヒントとガイドラインの章の32ページで、ウェットとセミドライの転写方法の選択方法について詳しく説明します。

ウェットタイプ、セミドライタイプ

ウェスタンブロッティングでは、ウェットトランスファー（Figure 1.3 およびTable 1.4）とセミドライトランスファー（Figure 1.4 およびTable 1.5）の2種類の転写方式が一般的です。

ウェットトランスファー—ウェットトランスファーでは、ゲルとメンブレンの両側を数枚のろ紙ではさんだ「転写スタック」を組み立てる。ろ紙-ゲル-膜-ろ紙のサンドイッチの両側をスポンジ状の繊維質のパッドではさみ、この転写スタックをカセットまたはホルダーにセットします。

組み立てる前に、転写スタックの部品はあらかじめ転写バッファーで湿らせておきます。組み立てた後、転写スタックを転写バッファーの入ったタンクに沈め、バッファーの中に電流を流してゲルからメンブレンにタンパク質を転写させます。

ゲルからメンブレンへのタンパク質の転写は、バッファーシステム（次項参照）、転写時間、転写電圧を変更することで最適化することができます。

ウェットトランスファーはほとんどのブロットングアプリケーションに採用されており、非常に安定した結果を得ることができます。この方法は、特に分子量範囲の広いタンパク質のトランスファーに有効であり、その安定性から、定量分析を行う場合はウェットトランスファーを推奨します。

ウェットトランスファーの欠点は、転写のたびに大量のバッファが必要なことです。また、特に長時間の転送では熱が発生するというデメリットもあります。過剰な熱は、ゲル間の伝達を不安定にし、タンパク質の変性を引き起こし、さらにはゲルの破壊につながる可能性があります。そのため、保冷材や冷却サーキュレーターを使用したり、冷蔵庫で行うなどして、転写装置を冷却することが強く推奨されます。

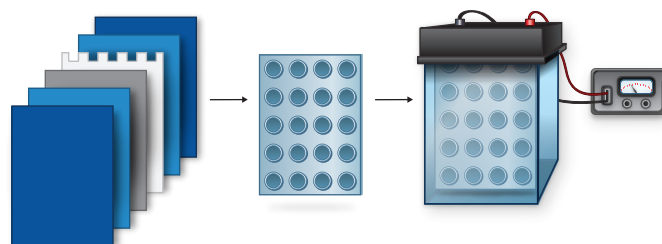


Figure 1.3. 典型的なウェットトランスファーシステム

長所	短所
- フレキシブル - 転送条件の調整が容易 - 複数の転送バッファオプションにより、より多くの転送最適化が可能 - 幅広い分子量領域の転写を一度に行うことが可能 - 高分子量タンパク質の長時間のトランスファーに対応 - 定量的なウェスタンブロットングに使用可能	- バッファーの加熱は転写の妨げになることがある - 転写中に必要な冷却機構やコールドルームのスペース - 大量の転送バッファが必要

Table 1.4. ウェットトランスファーの長所と短所

セミドライトランスファー—セミドライトランスファーは、ウェットトランスファーと同様のトランスファースタックを使用しますが、バッファーを満たしたタンクに浸すのではなく、トランスファースタックを2枚の電極板の間に直接セットします（Figure 1.4）。したがって、この方法では、ウェットトランスファーシステムで必要となる大量のバッファーは必要としません（Table 1.5）。

セミドライトランスファーのセットアップの大きなメリットは、転写速度が速いことです。電極間の距離を最短にすることで、強い電界を発生させ、高速転写を実現しています。

この方法のもう一つの利点は、転写スタックの各面に2つの異なる転写バッファー（ゲル側にはゲルからのタンパク質を溶出を促進するバッファー、メンブレン側にはタンパク質のメンブレンへの保持を促進させるバッファー）を使用できることである。

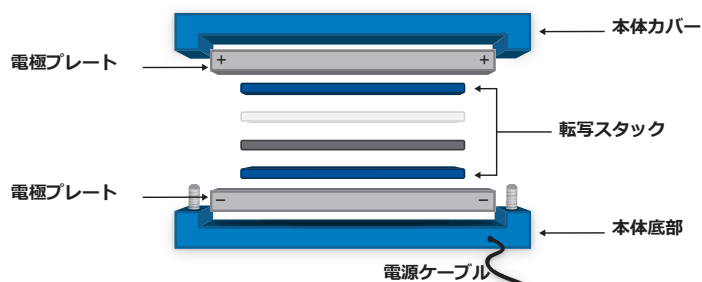


Figure 1.4. 典型的なセミドライトランスファーシステム

しかし、強い電場はこの方法の欠点でもあります。低分子量のタンパク質は転写されすぎて、膜を通過してしまうことがあります。また、分子量の大きなタンパク質に必要な長い移送時間は、少ないバッファー量のため緩衝能力が限られているため実施できません。

長所	短所
• 早い転写速度 • 不連続なバッファーシステムを使用し、タンパク質の転写を最適化することが可能 • 少ないバッファー量 • セットアップが簡単 • 同一タンパク質のブロッティングを大量に行う場合に有効	• 高電界強度により、低分子量タンパク質が膜を通過してしまう可能性がある。 • 高分子量（120kDa以上）タンパク質の転写が難しい • 定量的なウェスタンブロッティングには不適 • ゲルが乾燥する可能性がある

Table 1.5. セミドライトランスファーの長所と短所

転写バッファー

転写バッファーは、タンパク質の移動を促進するためにいくつかの成分を含んでいます（Table 1.6）。バッファーの成分は、使用する転写システムの種類（ウェットまたはセミドライ）、使用するゲルの種類、メンブレンの選択、目的のタンパク質に基づいて最適化されます。

緩衝能—転写バッファーは、転送中に導電性とpHを維持するために、強い緩衝能力を持つ必要があります。緩衝液のpHは、目的のタンパク質の等電点（pI）（タンパク質の正味電荷がゼロとなるpH）と異なっていなければ、転写はされません。

最も一般的なバッファーは、ほとんどのタンパク質のpIより高いpH8.1-8.5のTrisです。CAPSや炭酸塩のような高いpHのバッファーを使用することもでき、高分子量または塩基性タンパク質を移送する場合に推奨されます。

塩基性の強いタンパク質の場合は、酢酸を転写バッファとして推奨します。

重要：酢酸を転送バッファとして使用する場合、タンパク質が正に帯電し、陽極に向かって移動するため、転写スタックの向きを反転させる必要がある。

アルコール—メタノール（場合によってはエタノール）は、ニトロセルロース膜へのタンパク質の結合を減少させるSDSの影響を打ち消すために、転写バッファに添加されます。アルコールはタンパク質からSDSを除去し、ニトロセルロース膜へのタンパク質の保持を促進します。

しかし、アルコールはゲル中のタンパク質の沈殿を誘発したり、塩基性タンパク質が正電荷または中性になり、ゲルからのタンパク質の移動を阻害することもあります。したがって、トランスファーバッファーに使用するアルコールの量は、目的とするタンパク質に応じて最適化する必要があります。

転写バッファーの調製には、高品質の分析用アルコールのみを使用する必要があります。転写バッファーへのアルコールの添加は、SDSとニトロセルロース膜を使用する場合のみ必要であることに注意してください。SDSを使用しない場合（ネイティブタンパクゲルの場合など）やPVDF膜を使用する場合は、転写バッファーにアルコールを添加する必要はありません。

SDS—SDSはニトロセルロース膜へのタンパク質の結合を阻害することができるが、タンパク質の溶解度を高めることによりゲルからのタンパク質の溶出を促進する。しかし、SDSは転写強度を増加させ、一部のタンパク質の抗原性を変化させる可能性があります。SDSを使用する場合、バッファー中のSDS濃度は目的のタンパク質ごとに滴定する必要がありますが、決して0.05%を超えないようにしてください。

SDSはニトロセルロース膜へのタンパク質の結合を阻害するため、転写バッファにSDSが含まれている場合は、PVDF膜を使用してください。

成分	例	使用
バッファー	Tris, CAPS, Carbonate	伝導をサポートし、適切なpHを維持する
アルコール	メタノール、エタノール	タンパク質の膜への結合を増加させる
界面活性剤	SDS	タンパク質のゲル外への移動を促進する
Tris-tricine	最大pH9.5	Tricineは低分子量タンパク質とフリーなSDSを分離する

Table 1.6. 転写バッファーの組成

不連続転写バッファースystem—セミドライ転写の利点の1つは、転写スタックの各側で異なる転写バッファーを使用できること、つまり不連続転写バッファースystemです。ゲルからのタンパク質の溶出を促進するように設計されたバッファーをゲル側で使用し、メンブレンへのタンパク質の保持を促進するように設計された別のバッファーをトランスファースタックのメンブレン側で使用することができるため、不連続トランスファーバッファースystemにより、トランスファーの最適化を行うことができます。

電圧と時間

転送時間や電圧設定は、それぞれの転送に最適化する必要があります。一般に、タンパク質は電圧が高いほど速く移動しますが、移動効率は常に一定ではありません。電流や時間が不十分な場合、タンパク質の移動が不完全になることがあります。通常、転写装置には転写条件のガイドラインが付属しています。しかし、これらの条件は、目的とするタンパク質に応じて調整する必要があります。

一般に、ウェットトランスファーでは長い転写時間、低い電流が使われ、セミドライトランスファーでは短い転写時間、高い電流が使われます。

1.4. ブロッキング

ウェスタンブロッティングに用いられる抗体は、通常、特定のタンパク質に対して高い親和性を持つ一方で、ウェスタンブロッティング膜に対して非特異的に、かつ低い親和性で結合する傾向がある。この非特異的な結合は、プロットを画像化した際に高いバックグラウンドシグナルをもたらし、検出感を低下させることがあります。バックグラウンドシグナルをできるだけ低く抑えるため、転写後のメンブレンはブロッキング液中でインキュベートする必要があります。ブロッキング溶液は、膜上の非特異的な抗体結合部位に結合することで機能し抗体結合を防ぐことができます。ブロッキング条件の最適化は、高品質のウェスタンプロットデータを得るために重要であり、特に定量的な情報が必要な場合に重要です。ブロッキングが不十分な場合、バックグラウンドが高くなり、特定のシグナルを検出する感度が低下することがあります。一方、過剰なブロッキングは正当なエピトープを隠してしまう可能性があり、ブロッキング剤によっては検出試薬に干渉することもあります。ブロッキング剤は数種類用意されており、抗体：抗原の相互作用に応じてブロッキング液を最適化する必要があります。

ブロッキング液の成分

緩衝塩溶液

ブロッキング液には、検出抗体や検出方法に適合した緩衝塩溶液が含まれています。Generally, Tris- or 一般的には、トリスまたはリン酸緩衝生理食塩水（TBS ; PBS）が使用されます。ただし、PBSはアルカリホスファターゼを用いた検出法やリン酸化特異的な抗体を阻害することがあります。これらの試薬を使用する場合は、TBSを選択する必要があります。

界面活性剤

Tween-20のような低濃度のマイルドな非イオン性界面活性剤は良いブロッキング剤となり、緩衝塩溶液に添加することができます。界面活性剤は微生物の繁殖を防ぐために使用直前に添加し、不均一な信号やバックグラウンド信号などのアーチファクトを防ぐために界面活性剤が完全に可溶化されるように注意する必要があります。界面活性剤の中には自己蛍光を発するものがあり、高いバックグラウンドシグナルを引き起こすため、蛍光検出法を使用する場合は、ブロッキング剤として界面活性剤を使用しないでください。

タンパク質を含むブロック剤

ニトロセルロースやPVDF膜はすべてのタンパク質に対して高い親和性を持つため、タンパク質ブロッキング剤は一般的に使用され、高効率で機能します。しかし、タンパク質によっては、抗体：抗原の認識過程を阻害したり、検出方法を阻害したりすることがあります。従って、実験ごとに最適なブロッキング剤を経験的に決定する必要があります。

スキムミルク—スキムミルクは、最もポピュラーなブロッキング剤の一つです。経済的で調製が容易であり、効率的なブロッカーであるタンパク質の混合物を含んでいます。しかし、牛乳にはリン酸化タンパク質であるカゼインが豊富に含まれており、リン酸化特異的な抗体を阻害する可能性があります。さらに、ビオチンは牛乳の成分であり、ストレプトアビジン/アビジンに依存する検出方法を阻害する可能性があります。

血清—全血清は、通常ウマやウシ胎児から得られるもので、タンパク質の混合物を含むもう一つのブロッカーです。血清は他のブロッキング剤に比べてウェスタンブロットにはあまり使用されず、免疫グロブリンが含まれているため、一次抗体や二次抗体と相互作用し、高いバックグラウンドとなる可能性があります。

ウシ血清アルブミン (BSA)—特にリン酸化特異抗体を使用する場合、スキムミルクの代わりにウシ血清から分離したアルブミンタンパク質を使用することが多くあります。しかし、BSAの中にはチロシンリン酸化タンパク質を含むものがあり、抗リン酸化チロシン抗体を用いるとアッセイに支障をきたす場合があります。また、BSAは抗レクチン抗体と併用できません。これらの抗体はBSA中の糖鎖と結合し、高い非特異的バックグラウンドを引き起こすからである。

他の単一タンパク質—その他、カゼインプロテインなどの精製された単一タンパク質もブロッキング剤として使用可能です。単一タンパク質を使用することで、スキムミルクや全血清を使用した場合に起こりうる交差反応を防ぐことができます。ブロッキングステップを最適化するために、異なるタンパク質をテストすることができます。

タンパク質を含まないブロッキング剤

タンパク質ブロッカーは、一次抗体との交差反応性、検出試薬の阻害、エピトープのマスキングなどの問題があります。このような問題を解決するために、タンパク質を含まないブロッキング剤が開発されています。水溶性高分子ポリビニルピロリドンは、通常サザンブロットのブロッキング剤として使用されますが、ウェスタンブロットにも使用することができます。また、独自の処方方を施したプロテインフリーのブロッキング剤も複数の会社から発売されています。

ブロッキング条件

ブロッキングの効率は、時間と温度に依存します。ほとんどの実験では、室温で1時間のブロッキングで十分です。しかし、ブロッキング時間が長い場合（2時間以上）、微生物の繁殖を防ぐために4℃でブロッキングを行う必要があります。

1.5. 抗体との反応

ブロッキング後、メンブレンを抗体でブロービングし、結合していない抗体を洗浄する校庭に進みます。ブロービングと洗浄に影響を与える要因としては、直接法か間接法か、使用できる抗体の質と種類、検出する抗原の数、検出に使用する酵素やタグの種類、インキュベーションと洗浄の条件などがあります。

直接法と間接法

直接法

直接検出法では、目的の抗原を認識する一次抗体に検出用の標識（酵素やタグ）を直接結合させます（Figure 1.5）。これは、最もシンプルな検出方法であり、最も少ないステップ数で検出が可能です。直接検出は迅速で簡単な反面、シグナルが増幅される工程が少ないため、間接検出よりも感度が低くなる可能性が高くなります。また、一次抗体に直接ラベルを付加することはコストやリソースの面で不利になる場合がある。

間接法

間接法は直接法よりも一般的で、多くの場合より高感度です。間接法では、一次抗体と呼ばれる目的の抗原を認識する抗体は非標識です（Figure 1.5）。一次抗体上の特定のエピトープを認識する標識二次抗体を添加することにより検出が行われます。このエピトープは通常種特異的で、その種で作られたすべての抗体に存在します。例えば、ウサギで作られた複数の異なる一次抗体は、すべて同じ抗ウサギ二次抗体で認識することが可能です。二次抗体の特異性が広いため、1回の標識反応で広範囲の一次抗体を検出することができ、費用対効果が高い方法でもあります。

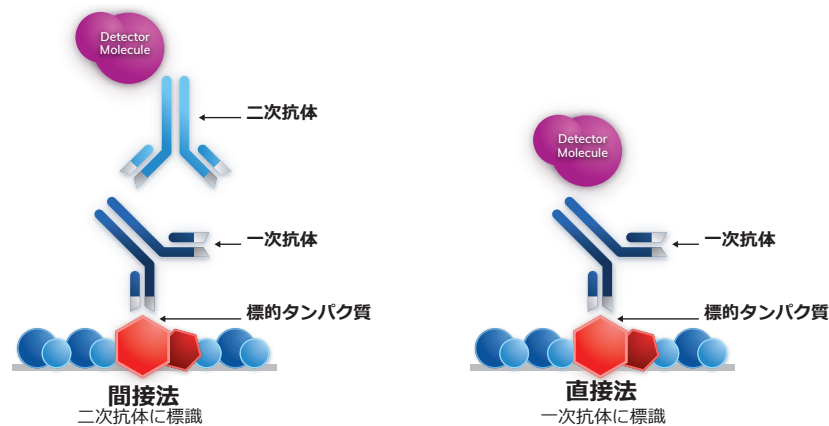


Figure 1.5. 間接法と直接法

一次抗体に複数の二次抗体が結合している場合、一次抗体を直接検出するよりも、二次抗体を用いて検出の方が感度を上げることができます。また、二次抗体の種類を変えることにより、検出するラベルの種類を容易に変更することができます。柔軟性が向上します。

Azure Biosystems の蛍光二次抗体は、優れたS/Nを実現します。詳細については、azurebiosystems.com/antibodies を参照してください。

抗体の品質と種類

ウェスタンブロットの結果を左右する大きな要因の1つは、抗体、特に一次抗体の品質です。高品質の抗体、すなわち高い特異性、高い結合親和性、低いバックグラウンド結合を持つ抗体は、アッセイの特異性と感度を向上させる。一次抗体は、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の両方を使用することができます。

ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体

ポリクローナル抗体—ポリクローナル抗体は、目的とする抗原に対する生物の免疫反応を利用して作られます。ウサギ、ヤギ、ロバ、ヒツジなどの免疫動物の血清から直接分離されるため、その動物が産生するすべての抗体の複合体となっています。免疫反応において、個々のB細胞は、抗原上の特定のエピトープを認識する抗体を生成し、異なるB細胞は異なるエピトープを認識する抗体を生成する。したがって、「単一の」ポリクローナル抗体は、実際には、同じ抗原の異なる領域を認識する個々の抗体の混合物を含んでいます。個々の抗体は抗原上の異なる部位を認識するため、複数の抗体が同時に抗原に結合することができ、ポリクローナル抗体はモノクローナル抗体よりも高感度となります。しかし、このように結合特異性の幅が広いため、時としてポリクローナル抗体ではバックグラウンドシグナルが高くなることがあります。

モノクローナル抗体—モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞株（単一の抗体合成細胞とミエローマ細胞とを融合させて作った細胞株）の上清から採取されます。この細胞株は通常、マウスまたはラット由来です。単一の抗体産生細胞（クローン）が使用されるため、ハイブリドーマ細胞株が産生する抗体はすべて抗原上の同一のエピトープを認識します。モノクローナル抗体は、リン酸化状態などタンパク質の特定の形態を検出する場合や、複数の一次抗体を同時に使用する場合などに用いられます。しかし、タンパク質の一般的な検出にも使用することができます。モノクローナル抗体は、個々のタンパク質に結合する抗体が1つであるため、ポリクローナル抗体に比べてシグナルが弱くなる傾向があります。

二次抗体

ウェスタンブロッティングには、複数の種類の二次抗体を使用することができます。使用する二次抗体の種類は、一次抗体の種類やクラス、検出方法、その他特殊な二次抗体の使用を必要とする考慮事項によって決まります。

一次抗体の種類とクラスタイプ—モノクローナル抗体は通常マウスやラットの細胞から得られるが、ポリクローナル抗体は様々な動物から単離することができます。二次抗体は、一次抗体が由来する動物種に特異的である必要があります。したがって、モノクローナル抗体には抗マウスまたはラットの二次抗体を使用し、一次抗体がウサギから分離された場合は抗ウサギの二次抗体を使用する必要があります。

抗体は、構成する重鎖分子と軽鎖分子の種類によって、異なるクラスとサブタイプ（アイソタイプとも呼ばれる）に分けられます。二次抗体は、一次抗体のクラスおよび/またはサブタイプに適合して、適切に選択される必要があります。二次抗体は、すべてのクラス（すなわちすべてのマウスIgG抗体）またはマウスIgG2aのような特定のクラスを認識するものを購入することができます。一次抗体のクラスやアイソタイプが不明な場合（ポリクローナル抗体を使用する場合など）には、すべての抗体クラスを認識する二次抗体を使用することが最適です。特異的なアイソタイプを持つ二次抗体は、一次抗体のアイソタイプが既知の場合に使用され、アッセイの特異性を向上させることができます。また、特定のアイソタイプを持つ二次抗体は、それぞれの二次抗体が異なるラベルを持つことができるため、複数のタンパク質を同時に検出する場合にも有用です。

ウェスタンブロット用に特化された二次抗体

抗H+L鎖抗体—抗重・軽鎖抗体（H+L）は、標的タンパク質の重鎖部分と軽鎖部分の両方に特異的な抗体です。このタイプの二次抗体は、一次抗体のクラスが不明な場合によく使用されます。

軽鎖特異的抗体—抗体の軽鎖部分のみを認識する抗体は、通常、免疫沈降後にウェスタンブロッティングを行う際に使用されます。この抗体を使用することにより、沈殿している抗体の重鎖を認識することができます。

抗体精製

—抗体二次抗体ともにバックグラウンドを軽減するために精製することができます。

アフィニティ精製—アフィニティ精製は、抗体のエピトープを固体支持体に固定化したカラム（アフィニティカラム）を用いて、目的のエピトープに結合しない抗体を除去する方法です。アフィニティ精製された抗体は、標的外結合抗体が少ないため、特異性が向上します。

吸収抗体—抗体の事前吸収は、結合の特異性を高め、交差反応性を低減するために使用することもできます。例えば、ウサギの抗IgG抗体は、マウス、ラット、ヤギのIgGに対してあらかじめ吸収させ、他の種のIgGが認識されないようにすることができます。吸収済み抗体は特異性が高いため、マルチプレックスウェスタンブロット（複数のタンパク質を同時にプローブするウェスタンブロット）には吸収済み二次抗体の使用が推奨されます。

抗体複合体

一次抗体（直接検出）または二次抗体（間接検出）の選択において重要なことは、その抗体に結合するラベルの種類である。検出用抗体には、酵素（化学発光または蛍光検出用）、蛍光タグ、またはシグナルを増幅するために使用するその他の低分子（ビオチン）を標識することがあります。

酵素標識—検出用抗体は、標識酵素と結合させることができます。酵素は、光（化学発光）、色素または蛍光を生成する生成物を切断するために使用されます。最も一般的に使用される酵素は、アルカリホスファターゼ（AP）と西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）です。酵素標識は、多くの製品が販売されているため、非常にポピュラーな標識です。酵素反応の速度論のため、シグナルの可視化はピークシグナルを捕らえるために適切なタイミングを計る必要がある。また、反応が飽和することもあり、正確に測定できるタンパク質濃度のダイナミックレンジが制限されます。

蛍光標識—検出用抗体は、蛍光標識（フルオロフォア）で直接標識し、イメージングシステムを使用して蛍光を測定することもできます。適切な波長の光で励起されると、蛍光体は少し長い波長の光を放出します。発光した光は、イメージャーによって捕捉され、デジタル信号に変換されます。

酵素に依存する検出方法とは異なり、蛍光体から放出される光の量は一定で、膜上のタンパク質の量に直接比例するため、真に定量的なアッセイとなります。さらに、蛍光ラベルはマルチプレキシング（1枚のプロットで複数のタンパク質を同時に検出すること）にも優れた選択肢です。マルチプレキシングでは、異なる検出抗体を、分光学的に分離した波長で発光する蛍光色素で標識します。

他の標識—ビオチン標識（ビオチン化）検出抗体は、低存在量のタンパク質を高感度に検出するために使用できます。このシステムは、ビオチンと蛍光標識（または化学発光標識）されたアビジン/ストレプトアビジンとの間の強い結合相互作用に依存しています。検出抗体は通常、複数のビオチン分子に結合しており、複数の標識アビジン/ストレプトアビジン分子がビオチン部位に結合すると強いシグナルが得られます。

1.6. 抗体検出

抗体の結合は、発色法、化学発光法、蛍光法などの検出方法を用いて可視化することができます。本ガイドでは、化学発光検出と蛍光検出に焦点を当てます。検出方法の選択は、要求される感度を含む複数の要因に基づいて決定される必要があります。

化学発光

化学発光は、酵素-基質反応による発光を利用したウェスタンブロットティングの間接的な検出法としてよく知られています（Figure 1.6）。西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）とアルカリホスファターゼ（AP）は、一般的に使用される化学発光酵素で、検出感度は基質の選択に依存し、HRPの市販基質はフェムトグラムレベルでタンパク質を検出することができます。化学発光ウェスタンプロットの画像化は、従来プロットをX線フィルムに露光して行われていましたが（Figure 1.7）、CCDベースのイメージングシステムを用いて行うことも可能である。

化学発光検出は、特異性が高く、操作が簡単で、高感度であり、フェムトグラムレベルでタンパク質を検出できるため、よく使用されます（Table 1.7）。この技術は、「目的のタンパク質はそこにあるのか、ないのか」という問いに答えるには非常に優れていますが、「目的のタンパク質は、他のタンパク質に対してどの程度存在するのか」といった問いに答えるには、あまり適していません。あるサンプルに含まれる目的のタンパク質の量は、別のサンプルと比較してどの程度なのか？サンプルのローディングの不一致をどのようにコントロールすればよいのか？化学発光検出の欠点については、次のセクションで説明します。

ウェスタンプロットのヒントとガイドラインの章では、化学発光ウェスタンプロットを最適化する方法をご紹介します（35ページ）。

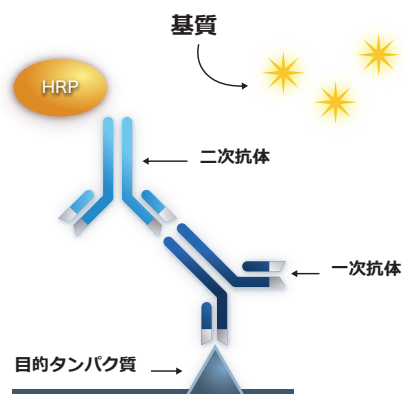


Figure 1.6. 化学発光ウェスタンブロッティング-1シグナル、1タンパク質。化学発光検出では、抗原-一次抗体複合体に、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）などの酵素を結合させた二次抗体を結合させます。酵素は発光基質の存在下で光を発生させる反応を触媒し、その光はX線フィルムへの露光またはCCDベースのイメージングシステムによって検出することができます。

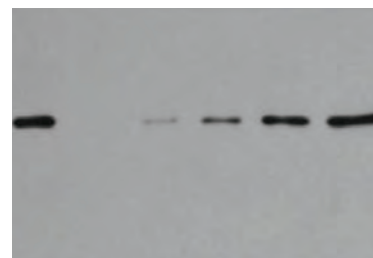


Figure 1.7. X線フィルムで検出された化学発光ウェスタンブロット。

化学発光の欠点

蛍光色素で標識された抗体を用いて1つまたは複数の異なるタンパク質を同時にプローブすることができる蛍光タグとは異なり、化学発光反応は幅広い波長域で光を放出します。そのため、化学発光検出では、発光波長で異なるタンパク質からのシグナルを識別することはできません。また、タンパク質が電気泳動的によく分離されている必要がある。

例えば、翻訳後修飾を受けたタンパク質と受けていないタンパク質のように分子量の差が小さいタンパク質は、電気泳動中に共移動しやすく、バンドが重なる可能性が高いため、化学発光を用いた同時可視化が困難です。

バンドが重なると、標準化およびローディングコントロールの検出にも影響を及ぼします。これらのコントロールが目的のタンパク質と電気泳動的によく分離していない限り、コントロールを検出するために結合している抗体を外し、リプロービングしなければならないため、プロットの定量性は喪失します。もしくは、コントロールを別のプロットで実施する必要があるため真のローディングコントロールとはいえません。

さらに、化学発光は酵素-基質反応に依存しているため、シグナル（発光）量は、反応条件（pH、温度、基質濃度、酵素濃度）により反応速度が変化する事から、結果にばらつきが生じます。このため、化学発光は半定量的な検出化学といえます。

また、従来のX線フィルムによる可視化では、フィルムのダイナミックレンジの制限により、信号が飽和してしまうという問題がありました。

長所	短所
- 高感度 - 簡単で、精通した化学反応 - フィルムまたはデジタルイメージングに対応	- 半定量 - シグナルが酵素の反応速度に依存 - 単一タンパク質のみ、ローディングコントロールはストリッピングと再プロービングが必要です

Table 1.7. 化学発光検出

蛍光

蛍光ウェスタンブロッティングは、二次抗体に蛍光色素を直接結合させたものです。酵素と基質の反応速度が一定でない化学発光ウェスタンブロッティングとは異なり、蛍光色素から放出される光の量は非常に一定で、膜上のタンパク質の量に直接比例します。これは蛍光検出により、目的タンパク質の真の定量分析が可能であることを意味しています。

蛍光ウェスタンブロッティングに使用する蛍光体は、その固有の励起および発光スペクトルに基づいて選択することができます。マルチプレックス（複数のタンパク質を同時に検出すること、Figure 1.8）により迅速かつ効率的に研究を行うことができます。このように、化学発光に対する蛍光検出の最大の利点は、1回のアッセイで複数の抗体を使用できることです。マルチプレックスでは、標準化およびローディングコントロールをサンプルと同じブロット上で同時に画像化することができます。さらに、異なる蛍光色素を使用できるため、電気泳動で分離されないタンパク質を可視化することができ、翻訳後修飾の有無にかかわらず同じタンパク質をより簡単にイメージングすることができます。

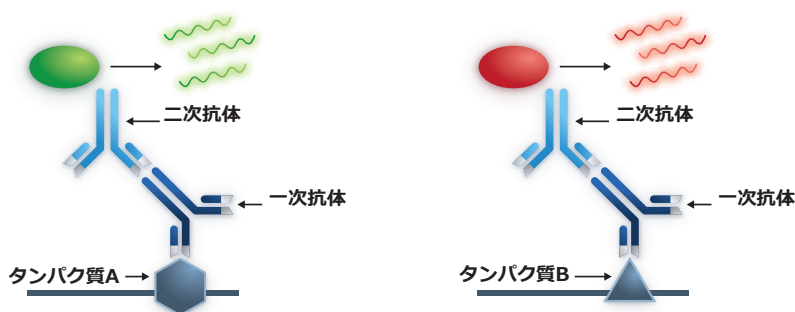


Figure 1.8. 蛍光マルチプレックスウェスタンブロッティング 2種類以上の蛍光色素と、それぞれの色素の光を励起・検出できる装置を使用することで、マルチプレックス検出が可能になる。

ウェスタンブロットのヒントとガイドラインの章では、蛍光ウェスタンブロットを改善する方法を36ページでご紹介しています。

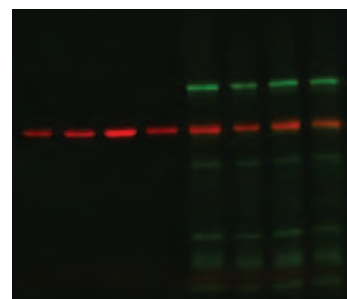


Figure 1.9. 蛍光マルチプレックスウェスタンブロッティング

蛍光ウエスタンには、X線フィルムではなく、デジタルイメージャーで可視化するのが一般的です（Figure 1.9）。新世代のイメージングシステムには、フィルムよりも広いダイナミックレンジを示す高性能カメラが搭載されていることが多く、フィルムのダイナミックレンジを制限するシグナルの飽和の問題を回避することができます。最後に、蛍光色素は比較的安定しているため、蛍光色素の光褪色を避けるための予防措置がとられている限り、ブロットを保存して最初の実験から数ヵ月後に画像化することができます。

蛍光検出の欠点

蛍光検出は定量に最適で、ウェスタンブロッティングで複数のタンパク質を分析するワークフローを大幅に加速することができますが、この方法にはいくつかの欠点があります（Table 1.8）。蛍光検出は、アッセイされるタンパク質によっては、化学発光検出よりも感度が低くなることがあります。試薬（例：プロモフェノールブルー）や消耗品（例：特定のメンブレン）が自家蛍光を発するためバックグラウンドが高くなり、アッセイの検出限界が低くなることがあります。化学発光アッセイから切り替える場合、すべての一次抗体と二次抗体を個別に検定し、最高のS/N比を見つける必要があります。最後に、蛍光ウェスタンブロットは、化学発光検出で確立されたX線フィルムと現像液のパラダイムではなく、デジタルイメージャーを使用して可視化されます。

マルチプレックス蛍光ウェスタンブロットの詳細については、アプリケーションノートをご覧ください。

- AzureSpectra抗体による3色ウェスタンブロット（66ページ）
- Azure 600による3色ウェスタンブロットの画像化（71ページ）
- 4色検出によるアッセイ効率の向上（85ページ）

長所	短所
- マルチプレックス検出可能 - 定量性の向上 - 蛍光ラベルの安定性により、プロットを保存し、後で再イメージングすることができます	- 化学発光より感度が低い場合がある - メンブレンの自発蛍光によりバックグラウンドが上昇する可能性がある

Table 1.8. 蛍光検出

化学発光 VS. 蛍光

化学発光と蛍光ウェスタン：実験に最適なアッセイを選択する

化学発光検出と蛍光検出はどちらも優れた方法であり、併用することで、洞察を深める補完的な情報を提供することができます。従って、研究室は「化学発光ウェスタン研究室」でも「蛍光ウェスタン研究室」でもなく、それぞれの実験に最適なアッセイを使用する研究室であるべきです。Table 1.9は、化学発光検出と蛍光検出が最適と思われる場合の概要を示したものです。

化学発光ウェスタンブロットから蛍光ウェスタンブロットへの移行方法については、ウェスタンブロットのヒントとガイドラインの章（[37ページ](#)）でご確認ください。

化学発光を使用	蛍光を使用
- 単一タンパク質の検出 - タンパク質が存在するか否かの検討 - 抗体反応の評価 - タンパク質精製後 - 発現量の少ないタンパク質検出	- 複数タンパク質の同時検出 - 翻訳後修飾研究 - 同一プロットでローディングコントロール - レーン内正規化 - 定量ウェスタン

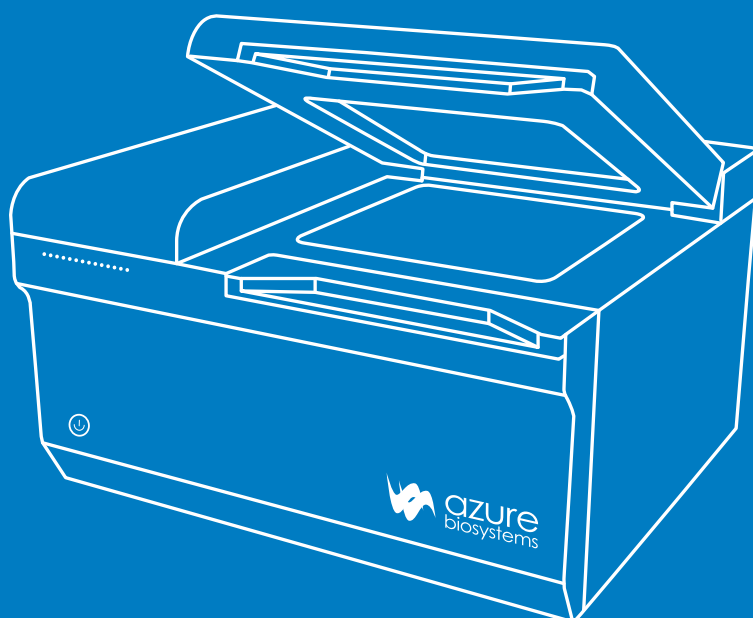
Table 1.9. 化学発光検出 VS. 蛍光検出

1.7. 参考文献

1. Renart J, Reiser J, Stark GR: Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. (1979) PNAS 76:3116-3120.
2. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. (1979) PNAS 76:4350-4354.
3. Burnette WN: Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. (1981) Analytical Biochemistry 112:195-203.
4. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. (1970) Nature 227 (5259): 680-685.

2

ウェスタンブロットイメージング



2.1 暗室からの脱却 – デジタルイメージングでより優れた定量を

デジタルイメージングハードウェアとそれに付随する定量化ソフトウェアは、フィルムを使ったデータ収集方法を凌駕し、ますます普及しています。フィルムに比べ、デジタルイメージングは広いダイナミックレンジ、より正確な定量化、マルチプレックスイメージングが可能で、これら全てがワークフローを大幅に効率化します。

ここでは、暗室を離れ、デジタル画像に移行する主な利点を説明します。

飽和シグナルの検出

フィルムやデジタルイメージャーでウェスタンブロットからデータを取得する場合、プロットの特定の領域に集められたシグナルの強度を測定していることになります。ウェスタンブロット上の特定のバンドに対するシグナルの蓄積が飽和レベルに達すると、それ以上のシグナルの蓄積は不可能になります。つまり、プロット上の2つのバンドが飽和した場合、それらのシグナルレベルが同じなのか、それとも大きく異なっているのかを知る術はないのです。

フィルムを使用する場合、飽和の検出は基本的に推測で行われ、タンパク質レベルの変動を見逃したり、タンパク質の存在量を過小評価したりしがちである。

デジタル画像には2つの利点があります。第一に、デジタルイメージングの定量化用ソフトウェアは、取得した画像に飽和しているバンドがある場合、科学者に通知することができます。(Figure 2.1 A,B) 第二に、デジタル画像処理用のソフトウェアは、最も強いバンドのシグナルが飽和しないような最適な露光時間を決定することができます。この機能により、シグナルの過飽和を防ぎ、データがイメージングシステムの線形範囲内にあることを確認することができます。

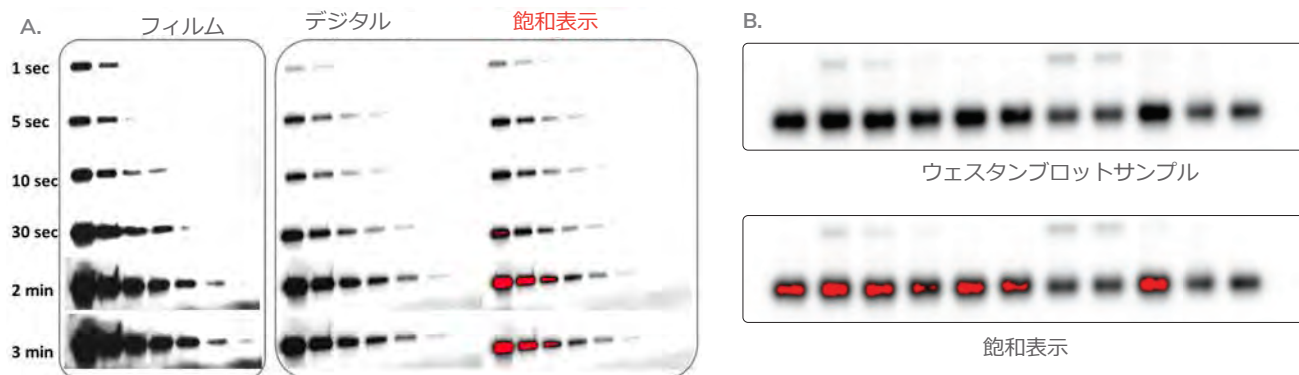


Figure 2.1. 広いダイナミックレンジと自動飽和検出機能により、定量性の向上が図られています。A. 同じプロットをX線フィルムとAzure 600の両方で撮像した。Azure 600は飽和が起こると検出し、飽和したバンドを避けるために自動露光時間を計算します。B. 上のプロットは、様々なバンド強度を示すウェスタンブロットのサンプルである。下図は同じプロットでバンドが飽和しているもので、このプロットはより正確な定量を行うために短時間露光する必要があります。

広いダイナミックレンジ

ダイナミックレンジとは、検出可能な最大信号とバックグラウンド信号（つまりノイズ）の比のことです。2つの異なるシステムを比較する場合、ダイナミックレンジが広い方が、1回の露光で弱いシグナルと強いシグナルの両方を測定できるため、ワークフローが速く、定量性がより強固になるはずです。ダイナミックレンジが広くないと、弱いバンドが検出される前に強いシグナルが飽和してしまい、すべてのバンドを可視化するために複数回の露光が必要となり、定量化の信頼性が低くなるか、あるいは不可能となります (Figure 2.2)。

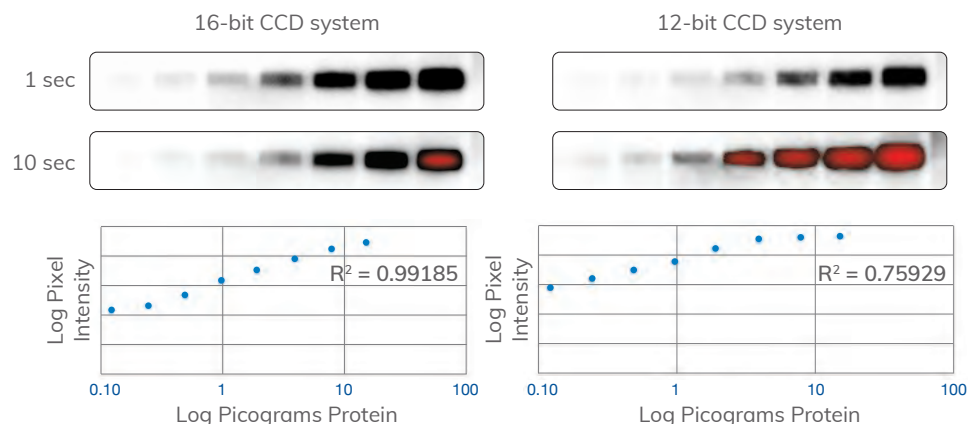


Figure 2.2. 広いダイナミックレンジを実現する16ビットイメージング。ウェスタンブロットを16ビットシステムと12ビットシステムの両方で撮像しました。10秒間の露光はそれぞれのシステムで同じように見えますが、12ビットシステムは飽和した画像を生成し、分析には適していません。

高解像度

CCD カメラベースのシステム、スキャニングイメージャーいずれも解像度は撮像可能な最小の形状を決定します。CCD ベースのイメージャーの場合、解像度は通常メガピクセル (MP) で表示され、MP 数が多いほど解像度が高くなります。スキャニングイメージャーの場合、解像度はミクロン単位で表示され、視覚化できる最小の形状サイズを示します。解像度の高いシステムは、分離の悪いタンパク質バンドを含むプロットのイメージングを容易にし、プロット以外のサンプルの視覚化も容易にすることができます。例えば、高解像度スキャニングイメージャーの中には、組織サンプルや顕微鏡スライドの中の個々の細胞を画像化できるものもあります。

マルチプレックス解析

フィルムや化学発光イメージングでは、ウェスタンブロット1枚につき1つのシグナルが検出されるのが限界です。最新世代のデジタルイメージャーは、これまで一度に1つのタンパク質しか解析できなかったアッセイに、マルチプレックス解析 (Figure 2.3) の可能性を導入しました。可視および近赤外領域の蛍光抗体により、1つのアッセイで複数のサンプルの検出が可能となり、実験内コントロールの実現、新規アッセイの開発、ワークフローの大幅な改善と迅速化が可能となりました。

イメージのデジタル化

ウェスタンブロットの画像を出版物に掲載するためには、画像のデジタル化が必要です。フィルムの場合、画像を解析・定量化するためには、フィルムをスキャンする必要があります。デジタルイメージングでは、得られた画像はすぐにデジタル化され、ソフトウェアによる定量分析が可能になります。

つまり、デジタルイメージャーは、従来のフィルムイメージングに比べ、感度、ダイナミックレンジ、画質が向上しており、大幅な進化を遂げているのです。さらに、自動飽和検出や定量化などのQOLの向上、マルチプレックス能力による新しいアッセイの開発への扉も開かれています。

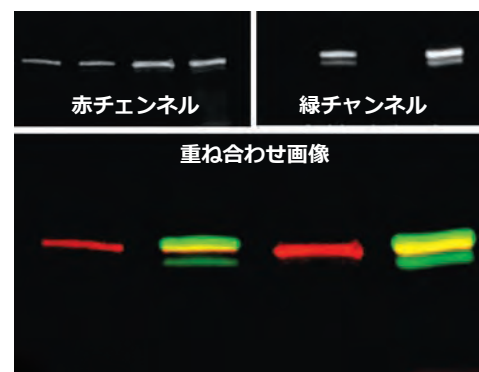


Figure 2.3. マルチプレックスイメージングは、ワークフローを大幅に最適化し、新たなアッセイ開発を可能にします。デジタルイメージャーならではの、1枚のプロット上でのマルチプレキシングです。ここでは、ウェスタンブロットから、蛍光結合した二次抗体を用いて、STAT1 (赤チャンネル) とリン酸化STAT1 (緑チャンネル) の両方をプローブし、Azure 600の赤外線検出で画像化しています。

2.2 システムの選択 - CCDイメージャ、スキャナ、ハイブリッドCCD/スキャニングシステム

ウェスタンブロットティングのワークフローの最後のステップは、画像の取り込みと解析です。信頼性の高い高品質のウェスタンブロットティングデータを作成するためには、正しい電気泳動やブロットティング条件を選択することと同様に、正しいイメージャーを使用し、データ取得や解析のためのベストプラクティスに従うことが重要である。イメージングシステムの選択は、実施する研究の種類、特に使用する検出法、必要な感度と解像度に依存します。

性能に応じて異なる画像処理システム

今日のデジタルイメージャーは、CCDベースのイメージャーとスキャニングシステムの2つのカテゴリーに分類されます。どちらを選択するかは、性能のニーズと、複数のイメージングケミストリーとアプリケーションをサポートする柔軟性が必要かどうかにかかっています。どちらのタイプのシステムでも、最も重要な特徴のひとつは色素の柔軟性です。すべての蛍光色素がすべてのイメージングシステムで利用できるわけではありません。したがって、システムが研究に使用する色素に対応できる十分な柔軟性を持っているかどうかを確認することが重要です。これは、マルチプレックス蛍光ウェスタンブロットを行いたい場合に特に言えることです。マルチプレックスには、複数の励起光源と複数の検出波長を持つシステムを選択することが重要です。さらに、最適な光源が選択されていることを確認することも必要です。例えば、赤外色素は通常レーザーで励起されるが、これはレーザーだけがこの種の色素の励起ピークに近い光を発することができるためです。

ここでは、画像処理システムの評価に用いるべき主な機能について説明します。

CCDイメージャー

CCDイメージャーは、信号の検出にCCDカメラを使用します。ブロット（またはゲル、その他の画像化するサンプル）をチャンバーに入れ、必要に応じて光源で照らします。発せられたシグナルはセンサーに取り込まれ、デジタル化されます。このタイプのシステムでは、試料全体を一度に撮像するため、試料照明の均一性が非常に重要です。そのため、CCDプラットフォームでは撮像視野（FOV）を考慮することが重要で、FOVが大きいほど照明の均一性を制御することが難しくなります。視野が広ければ広いほど、照明の均一性を制御することが難しくなり、視野が狭ければ狭いほど、励起光の均一性を制御することが容易になります。

化学発光ウェスタンブロットのイメージングには、CCDセンサーを使用するのが最も効果的です。CCDセンサーは、光スペクトル全体を同時に効率よくサンプリングし、高感度な検出に必要な長い積分時間（数秒から数分）をサポートします。CCDイメージングは、フィルム露光と同様に、ユーザーが露光時間をコントロールすることができます。

Azure Biosystems は、手頃な価格と性能を兼ね備えた CCD イメージング システムを提供しています。Azure イメージング システムの詳細については、azurebiosystems.com/imaging-systems を参照してください。

CCDイメージャーの評価のための主な機能

高解像度・高感度—CCDカメラによるデジタルイメージングに欠かせない機能のひとつに、ピクセルビニングがあります。隣接する画素を1つの大きな画素（スーパーピクセル）にすることで、高感度化、高S/N化を実現しています（Figure 2.4）。スーパーピクセルのサイズが大きくなると、ノイズを増加させることなく、光子の検出面積が増えるため、感度が向上します（ただし、ノイズが増加しないのはオンチップビニングのみで、データ解析時に計算で行うビニングには当てはまらない）。例えば、2×2のビニングを行うと、隣接する4つの画素が1つのスーパーピクセルに統合され、光に対する感度が4倍に向上しますが、ノイズはビニングされていない1つの画素と同じに保たれます。画素サイズが大きくなることで、検出器の感度は大幅に向上しますが、画素サイズが大きくなることで解像度が低下します。1×1のビニングでは、画素を結合せず本来の画素サイズを使用するため、センサーの解像度をフルに活用することができます。

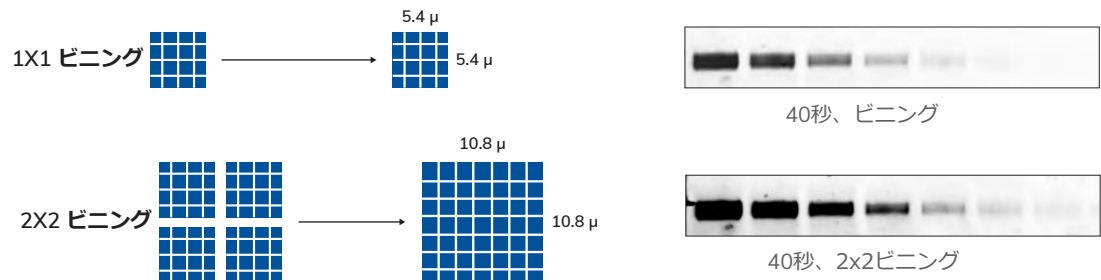


Figure 2.4. 画素ビンニングにより、画像感度が向上します。ピクセルビンニングは、画素を組み合わせることでより大きな "スーパーピクセル" を作ることで感度を向上できるデジタルイメージングの強力な技術です。スーパーピクセルは、ビンニングされていない画素よりもS/N比を有しています。

ビンニングのレベルが高い場合、最終的な画像の解像度は著しく低くなり、低解像度の画像は出版に適さない場合があることを理解することが重要である。アップスケーリング（撮影後の画像操作の一種）は、失われた解像度を回復するために使用できますが、アップスケーリングされた画像は、画像にピクセル（データ）が人為的に追加されるため、定量目的のために使用してはならず、生のデータのみを定量化する必要があります。

化学発光検出のための広い開口度—特に化学発光の場合、F値は重要な値として考慮されます。F値が小さいほど絞りが広くなり、より多くの光を取り入れることができます。F値が小さいイメージャは、より多くの光をセンサに送り込むことができ、露光時間を短縮することができます。

幅広い光源—化学発光は光源を必要としませんが、蛍光イメージングでは特定の光源と検出フィルターの両方が必要である。

蛍光イメージングに使用される光源には、主に発光ダイオード（LED）とレーザーの2種類があります。歴史的に見ると、LEDは波長の自由度が高く、低コストであることから使用されてきました。しかし、レーザーの技術は急速に進歩し、現在では同様の波長の柔軟性があり、価格的にも競争力を付けてきています。レーザーはLEDとは根本的に異なり、いくつかの利点を持っています。レーザーは単色であるため、蛍光体を正確な波長で励起するのに非常に効果的です。マルチプレックス実験では、ブリードスルーを避けるために、特定の励起を正確に行うことが決定的に重要です。広帯域光源であるLEDは、より多くの蛍光体を励起することができますが、実験デザインに適切な注意を払わないと、交差励起/ブリードスルーが発生する可能性があります。

スキャンシステム

スキャンシステムでは、試料の励起にレーザー光を用い、発光信号の検出に光電子増倍管（PMT）またはアバランシェフォトダイオード（APD）を使用します。試料は通常、ベッドエリアに置かれ、光は底部から試料を励起する。その後、発光した光をPMTまたはAPDで検出することができます。プロットなどの試料を一度に撮像するCCDイメージャとは異なり、スキャンシステムは試料をスキャンしながら一度に小さなセクションに照射します。スキャンはカメラベースのイメージングより若干時間がかかりますが、広範囲に照射するよりもピンポイントで照射した方が強度が高くなり、より要求の厳しい研究でも高い感度が得られます。さらに、カメラベースのイメージングアプローチと互換性のないPMTやAPDを使用できるため、検出化学の範囲が広がり、可視および近赤外（NIR）蛍光イメージングにおいて検出下限が低く、全体的に優れた性能を提供することが可能です。

蛍光ウェスタンブロットの画像化はCCDセンサーでも可能ですが、ベッドスキャンシステムでより良い性能を得ることができます。CCD イメージャによる蛍光イメージングは、西洋わさびペルオキシダーゼ結合抗体による酵素的なシグナル増幅を享受できないため、化学発光よりも感度が低くなる 경우가多くあります。しかし、レーザー scanner を用いた蛍光イメージングは、PMTやAPDが内部ゲインを持ち、酵素増幅と同様に発光信号を増幅するため、化学発光の感度と同等かそれ以上の感度を得ることができます。CCDセンサーはPMTやAPDのように発光信号を増幅できないため、高感度蛍光イメージングにはPMTやAPDを用いたレーザー scanner が最適です。

スキャンシステムを評価するための主な機能

解像度—スキャナーの解像度は、アプリケーションの柔軟性を高めるために重要です。スキャンシステムは、空間分解能の微調整が可能であり、ユーザーは特定の実験に適した分解能を選択することができます。ウェスタンブロットでは100~200 μm の解像度が必要ですが、一部のイメージングアプリケーションでは、より高い解像度で詳細な情報を取得する必要があります。例えば、染色された組織切片のイメージング（IHC）では、組織の細部を可視化するために10 μm の解像度が必要となる場合があります。

スキャン速度—一度に全視野を撮影するCCDイメージャーとは異なり、スキャン方式は1ラインずつ画像をスキャンします。スキャンする範囲が広がれば広いほど、スキャンにかかる時間は長くなります。そのため、通常cm/s単位で表示される高速なスキャン速度を持つイメージングシステムを選択することが重要です。スキャン速度が速ければ速いほど、プロットのイメージングにかかる時間は短くなります。

励起光源—蛍光を検出するスキャナ装置では、励起光としてレーザー光を用いることが一般的です。レーザーは平行光源であり、ほぼすべての光子が同じ方向/角度に進み、光源から出たほぼすべての光子が終点（測定対象試料/蛍光体）に効果的に届くような光列を生成します。

一方、発散性の高いLEDは、励起光が多方向に散乱・拡散する拡散パターンを生成します。蛍光体を励起する場合、蛍光体に与えるエネルギーが大きければ大きいほど、発光信号も大きくなります。レーザーは平行光源であり、LEDのように発散しないため、蛍光体に与える励起エネルギーの効率がよく、LED励起と比較してより明るい発光信号を生成し、検出限界も低くなります。この技術的な違いは、高品質の画像とデータを得るために非常に重要です。

もう一つのポイントは、単純に光源の数です。レーザーの数が多ければ多いほど、色素の柔軟性が高まります。例えば、4つのレーザーを持つシステムでは、1つのサンプルから4つの蛍光色素を検出することができます。マルチプレックス能力、アプリケーションの柔軟性、スループットを向上させます。

検出器技術・集光技術—量子効率と分光感度特性は、スキャンシステムを評価する際に重要な要素である。また、スキャンシステムに搭載される検出器の数も重要である。スキャンシステムに使用される検出器には、主に2つのタイプがあります。アバランシェフォトダイオード（APD）と光電子増倍管（PMT）です。

PMT—光電子増倍管は、光子を電気信号に変換する真空管の一種である。光電子増倍管は高い内部ゲインを持ち、低照度での応用に適している。高感度蛍光イメージングには、高い内部ゲインが不可欠である。

光電子増倍管は、光電効果と二次発光を利用して動作します。光電面に光が入射すると、真空管内に電子が放出されます。この電子は電子増倍管（ダイノード）に集められ、二次放出により信号が増倍されます。増倍された電子は、陽極によって出力信号に変換される（Figure 2.5）。PMTは、信号を増幅するために内部ゲインが必要な微弱光イメージングに最適です。このため、蛍光体イメージングや高感度青色光検出、すなわちGFP検出に使用されている。

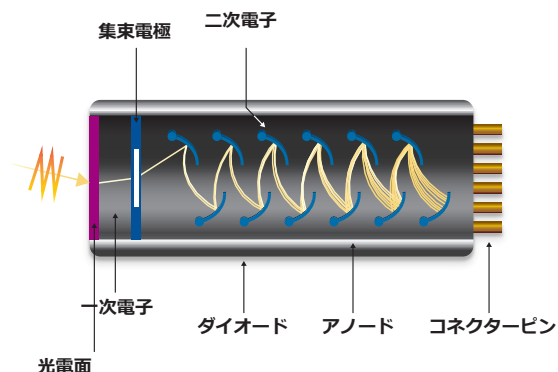


Figure 2.5. PMTの仕組み

APDs—APDは、光電効果を利用して光を電気に変換する高感度な半導体電子デバイスです

(Figure 2.6)。APDは光電子増倍管と同様に発光信号を増幅し、信号の増幅により感度を向上させることができます。しかし、APDは光電子増倍管とは全く異なるものです。APDと光電子増倍管の最も重要な違いは、量子効率です。

APDは、光電子増倍管に比べて長波長側の量子効率が著しく高く、長波長側で光電子増倍管よりも効率よく光を取り込めるため、500nmを超える波長での蛍光イメージングに適しています。

低い自家蛍光の長波長蛍光体とAPDの高い量子効率を組み合わせることで、明るい青色色素と光電子増倍管の組み合わせと同等または類似の性能を提供すること可能な最も感度の高い蛍光検出システムの1つを実現しています。

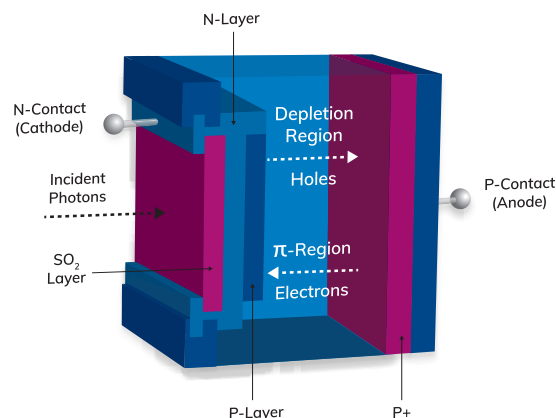


Figure 2.6. APDの仕組み

Z軸のフレキシビリティ—X、Y方向はどのスキャナーでもスキャンできますが、Z軸はどのシステムでも自由にスキャンできるわけではありません。Z軸のスキャン面をコントロールすることで、様々なサンプルの撮影が容易になります。メンブレン、ゲル、培養プレート、スライドは、それぞれ最適なZ軸の焦点面が異なるため、様々なサンプルを最適にイメージングするためには、Z軸を簡単に変更できるシステムを検討することが重要です。

ハイブリッドCCD/スキャニングシステム

ハイブリッドCCD/スキャニングシステムは、様々なケミストリーやサンプルタイプに最適なパフォーマンスを提供する新しいタイプのイメージングシステムです。前述のように、化学発光やゲルのイメージングに最適なCCDシステムは、ゲルイメージングには短時間露光、高感度化学発光イメージングには長時間露光と、露光時間をユーザーがコントロールすることが可能です。しかし、CCD検出器は信号増幅機構を備えていないため高感度蛍光イメージングには不向きです。一方、PMTやAPDを用いたレーザースキャナーは、蛍光信号を増幅することができ、高感度な蛍光イメージングが可能です。しかし、レーザースキャナーは、高感度化学発光検出に必要な長時間露光ができないため、化学発光イメージングには不向きである。ゲルやケミイメージングのためのCCDイメージャーと、高感度蛍光のためのPMTやAPD検出器を使用したレーザースキャン・システムの高性能を組み合わせたもので、両者の長所を生かしたシステムです。ハイブリッドCCD/スキャニングシステムは、複数のイメージングモダリティと多様なサンプルタイプに対応する高いパフォーマンスを実現し、アプリケーションの柔軟性を高めることができる、化学発光イメージングと蛍光イメージングの両方に最適なイメージングシステムです。

Azure Biosystems は、クラス初の CCD/スキャニング ハイブリッド システムである Sapphire Biomolecular Imager を提供しています。詳細については、azurebiosystems.com/sapphire を参照してください。

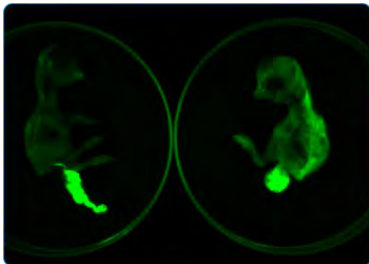
CCDイメージャ vs スキャナ vs ハイブリッドシステム：どう選ぶか

イメージングセットアップをどのように選択するかは、実施する研究の種類によって異なります。多くのラボにとって、CCDベースのシステムの性能は、特にゲルや化学発光ウェスタンブロットティングなど、ほとんどのニーズをカバーしています。しかし、高性能（感度、解像度、ダイナミックレンジ）、大きなサンプルのイメージング、複数のイメージングケミストリー（蛍光体イメージング、化学発光、可視および近赤外蛍光）を必要とするラボでは、スキャニングシステムがより良い選択となる場合があります。

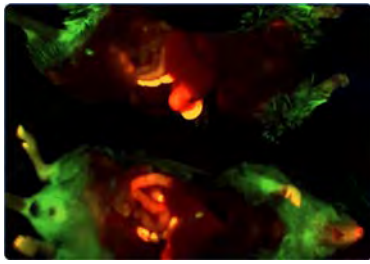
2.3. ウェスタンブロット以外のイメージング

Azure Biosystems は、ウェスタン ブロット以外のものもイメージングできる価値と汎用性を備えた CCD イメージャーとハイブリッド CCD/scanning システムを提供しています。ここでは、Azure イメージング システムと Sapphire イメージャーでイメージングできるさまざまな事例をご紹介します。

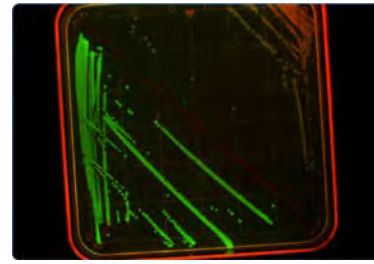
Azure Imager System



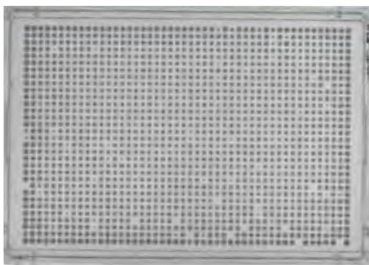
Azure 600で撮影されたニワトリ胚の病原性ニューカッスルウイルスと正常なニューカッスルウイルス。画像提供：Ray Izquierdo-Lara、Ana Chumbe、Katherine Calderon、Manolo Fernandez FARVET SAC、ペルー。



マウスイメージング 撮影はRGB自動モードで、赤チャンネルは704nm、緑チャンネルは703nm、いずれも60μmの分解能で撮影された。Azure Imager Systemで撮像。



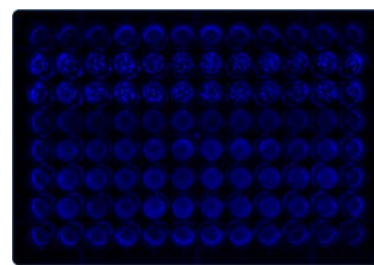
GFPmut3 (緑) と mCherry (赤) を発現させた大腸菌を入れた寒天培地プレート. 赤と緑のLEDを使用してプレートを撮像した。Azure Imager Systemで撮像。



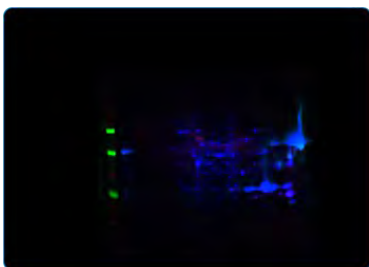
GFPを発現する酵母のコロニーをBlueチャンネルで撮像したもの。Azure Imager Systemで撮像。



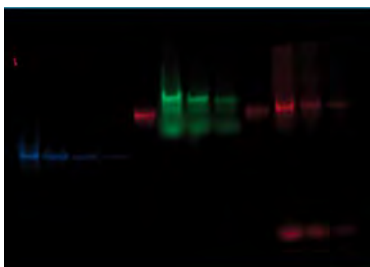
シロイヌナズナ由来FtsZ1およびFtsZ2-1のCy5およびCy3を用いたウェスタンブロット. 植物蛍光ウエスタン。Azure Imager Systemで撮像。



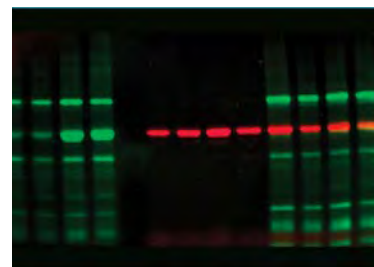
GFP発現細胞モノレイヤーの固定プロトコルを異なるカラムで行ったもの。Azure Imager Systemで撮像。



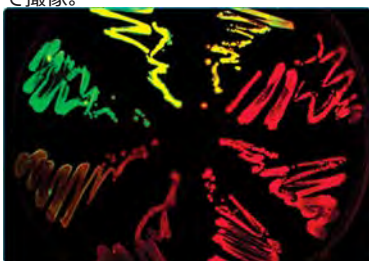
Cy5/Cy3/Cy2でイメージングされた2次元蛍光ゲル。Azure Imager Systemで撮像。



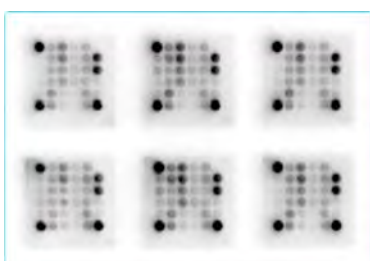
ネイティブゲル Azure Imager Systemで撮像。



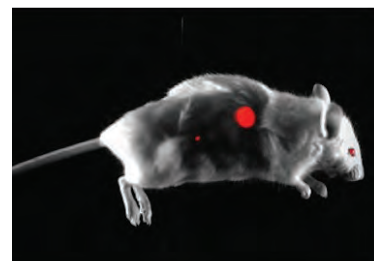
TAMRA/GFP. Azure Imager Systemで撮像。



GFP/mCherry. Azure Imager Systemで撮像。



抗体アレイ Azure Imager Systemで撮像。

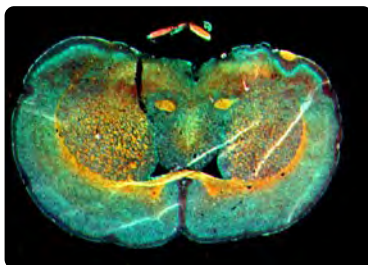


RFP発現皮下腫瘍移植マウス

Sapphire Images



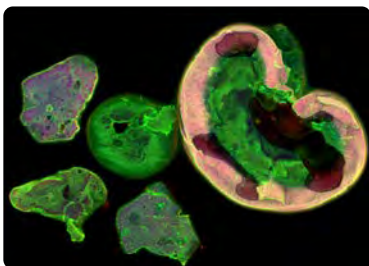
ゲル内蛍光染色（二次元電気泳動） 未処理のHeLaライセートをCy3、処理したHeLaライセートをCy5でそれぞれ標識し、同時に分離した。その後、Sapphire Biomolecular Imagerの520nmと658nmのレーザーを用いて、100μmでスキャンした。



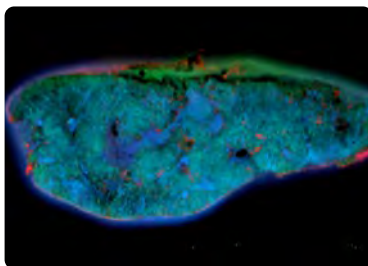
ラット脳
Sapphire Biomolecular Imagerで10μmでスキャンしたラットの脳の3色合成画像。



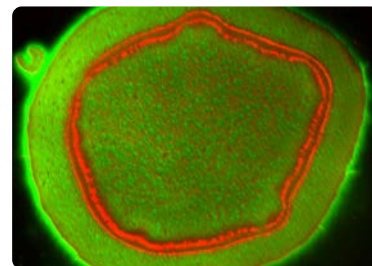
ハチ頭部.
Sapphire Biomolecular Imagerの488nmと785nmのレーザーを用いてスキャンしたハチの頭部の合成画像。



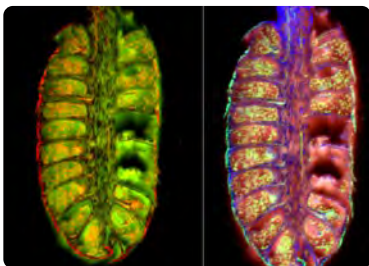
種々の組織
Sapphire Biomolecular Imagerの658nmと785nmのレーザーを用いて20μmでスキャンした種々の組織の合成画像。



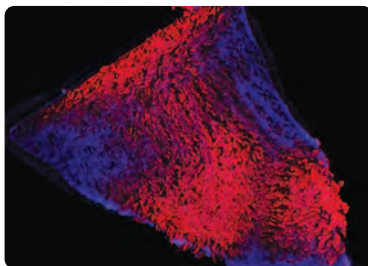
ニワトリ肝臓 クマシー染色したニワトリ肝臓をSapphire Biomolecular Imagerの488nm、520nm、658nmレーザーで10μmスキャンした。



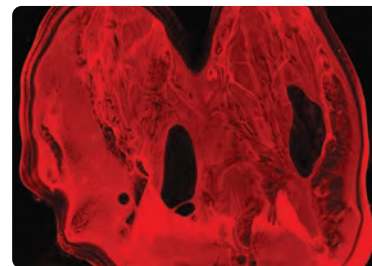
デンジクアオイの茎. Sapphire Biomolecular Imagerの658nmと785nmのレーザーを用いて10μmでスキャンしたデンジクアオイ茎の2チャンネル合成画像。



松ぼっくり. 松ぼっくりスライバーのマルチチャンネルスキャン画像。ドイツのデモ機を使用して、Sapphire Biomolecular Imagerの488nmと785nmのレーザーでスキャンしたもの。



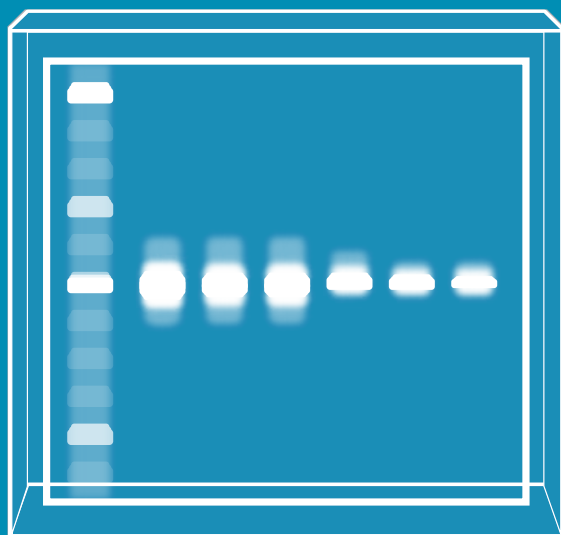
ウシ胃.



ニワトリ心臓.

3

ウェスタンブロッティングの ヒントとガイドライン



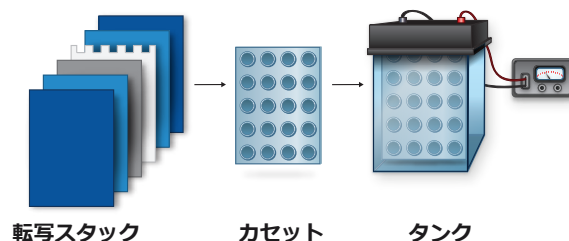
3.1. ウェスタンブロットでの転写を成功するためのヒント

ウェット、セミドライトランスファーを問わず、転写効率を最大限に高めるためには、さまざまな工夫が必要です。

ウェットトランス

ウェットトランスファーの利点

ウェットトランス装置を用いて、高電流（1～2時間）または低電流（一晚）転写を行うことができます。これにより、個々のタンパク質に最適な転写条件を設定することができます。低分子量タンパク質の膜透過を防ぐために転写時間を短くし、高分子量タンパク質のゲルからの完全な移行を促進するために転写時間を長くすることができます。



ウェットトランスファーの弱点

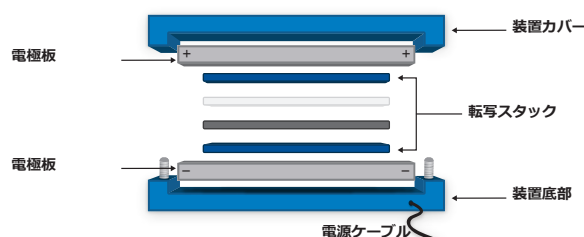
転写の過程で発生する熱により転写バッファの抵抗が減少して、ゲル上での転写が安定しないことがあります。また、発熱はゲル自体の破壊を引き起こす可能性があります。過熱を防ぐために、転写バッファを使用前にあらかじめ冷やしておく必要があります。さらに、トランスファー中はトランスファーバッファを低温に保つ必要があります。長時間転写する場合は、バッファを冷やすためにコールドルームを使用することがよくあります。さらに、内蔵のアイスブロックはタンク内に置くことができ、通常装置と一緒に提供されます。また、外部冷却機構を使用して温度を制御することも可能な場合があります。

長所	短所
- フレキシブル: - 転写条件の調整が容易 - 複数の転送バッファオプションにより、より多くの転写最適化が可能 - 幅広い分子量領域の転写を一度に行うことが可能 - 高分子量タンパク質の長時間のトランスファーに対応 - 定量ウェスタンブロットが可能	- バッファの発熱が転写を緩慢化する場合がある - 転写時に必要な冷却機構やコールドルームのスペース - 大量の転写バッファが必要

セミドライトランスファー

セミドライトランスファーの利点

セミドライトランスファーは、高速で簡単、かつ少ない転写バッファで行えます。転写の難しいタンパク質に対しては、セミドライトランスファーシステム特有の不連続バッファを使用することで最適化できます。不連続バッファシステムでは、スタックの陽極側のろ紙と陰極側のろ紙とで異なるバッファを使用します。。これにより、ゲルからのタンパク質の移動が促進されるとともに、メンブレンへの保持も向上します。



セミドライトランスファーの弱点

セミドライトランスファーシステムは柔軟性に乏しく、高分子量と低分子量の両方のタンパク質を転写することが困難な場合があります。低分子量タンパク質は、高強度のブロッティング条件によりメンブレンを通過してしまう可能性があり、高分子量タンパク質は、移行時間が短くなるため、効率よくゲルから溶出できない場合があります。ただし、高分子量タンパク質は、不連続バッファーを使用することにより、移行を改善することができます。セミドライトランスファーの場合、バッファーの容量に限界があるため、転写時間を長くすることはできません。また、バッファーが不足するとゲルが乾燥します。

Advantages	Disadvantages
• 早い転写速度 • タンパク質の転写を最適化するために不連続バッファー系の使用が可能 • バッファーが少なく済み • セットアップが簡単 • 同一タンパク質のブロッティングを大量に行う場合に有効	• 高電界強度により、低分子量タンパク質が膜を通過して移動する可能性がある • 高分子量（120kDa以上）タンパク質の転写が難しい • 定量的なウエスタンにはお勧めしません • ゲルが乾燥することがある

転写成功への力ギ

- 転送バッファを準備する際には、小さな違いが転写に影響することがあるので注意が必要です
- バッファーの調製には、高品質の試薬グレードのメタノールを使用してください。メタノール中の不純物は、転写効率を低下させる可能性があります。
- 転写バッファーは絶対に希釈しないでください
- 転写バッファーのpH調製はしないでください
- 転写バッファー再利用しないでください
- すべての機器が清浄であることを確認してください
- なるべく厚さの薄いゲルを使用してください(0.5-0.75 mm厚)
- PVDF膜を使用する場合は、転写ファーバッファーで平衡化する前に100%メタノールで膜をプレウェットしてください。
- トランスファーパッド、ろ紙、メンブレン、ゲルをバッファー中で少なくとも15分間平衡化させる。
- スタックの間にある気泡や折り目をすべて取り除く。
- スタックがしっかりと固定され、スタックの表面全体に均等に圧力がかかっていることを確認する
- 電極が接続され、ゴミや損傷がないことを確認する（プレート電極）。
- 電流を正しく流すと、タンパク質が膜に向かって移動することを確認します
- 染色済みの分子量標準を使用することで、トランスファーのモニタリングに役立ちます。
- 転写の状態を確認するため、可逆的な総タンパク質染色（例：Ponceau S）でプロットを染色する。
- 転写されにくいタンパク質の場合、メタノールやSDSの濃度を調整してください。SDSはタンパク質のゲルからの溶出を促進しますが、膜への結合を阻害することがあります。メタノールはタンパク質の膜への結合力を高めますが、ゲルからの溶出を阻害することがあります。

ウェットトランスファー用転写バッファー

Towbin転写バッファー

- ウェットトランスファー用標準転写バッファー
- タンパク質の溶出を容易にするため、SDS (0.025~0.1%) を添加することができる

25 mM Tris, pH 8.3

192 mM グリシン

20% メタノール

+/- SDS

CAPS (3-[cyclohexylamino]-1 propane sulfonic acid) バッファー

- 塩基性タンパク質のブロットティング用
- N末端シーケンス前のブロットティング用

10 mM CAPS, pH 11

10% メタノール

Dunn 炭酸バッファー

- 塩基性タンパク質の高効率ブロットティング用
- 一部の抗原部位を認識する抗体の能力を強化するために使用することができる

10 mM NaHCO₃

3mM Na₂CO₃, pH 9.9

20% メタノール

セミドライトランスファー用転写バッファー

Bjerrum Schafer-Nielsen転写バッファー

- Towbin転写バッファーを基礎とするセミドライトランスファー標準転写バッファー

48 mM Tris, pH 9.2

39 mM グリシン

20% メタノール

不連続Tris-CAPSバッファー系

- タンパク質の転写を促進する目的で2種類の異なる転写バッファーを使用する
- ブロットのメンブレン側（陰極側）のろ紙にはメタノールを含むバッファーを使用する
- ゲル側（陽極側）のろ紙にはSDSを含むバッファーを使用する

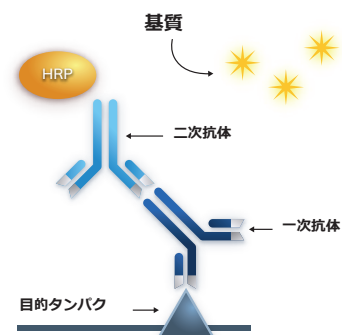
60 mM Tris, pH 9.6

40 mM CAPS

+ 15% メタノール または0.1% SDS

3.2. 化学発光ウェスタンブロットティングの改善法

化学発光ウェスタンブロットティングは、タンパク質の発現を評価するための一般的な手法です。酵素を結合させた抗体と化学発光基質を反応させ、発光させる間接的な検出方法です。発光した光は、X線フィルム（従来型）またはデジタル画像に取り込まれ保存されます。化学発光ウェスタンブロットティングは高感度アッセイであり、フェムトグラムのタンパク質を検出することができます。半定量的な測定にとどまりますが、タンパク質の有無を検出するのに有効です。例えば、化学発光は、外因性タンパク質の発現誘導の検出、既知のタンパク質の精製の確認および検証、または生産中の抗体の確認に使用することができます。



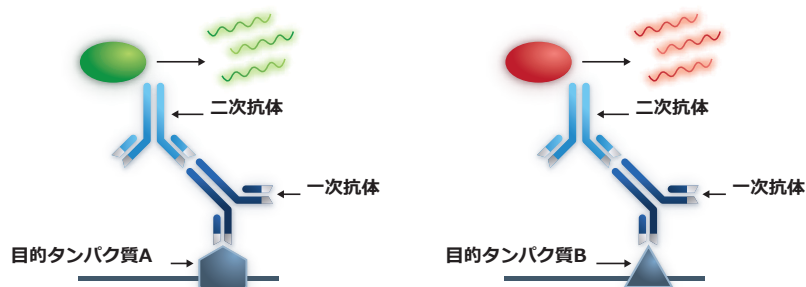
化学発光ウェスタンでは難しい場合があります。最終的な目標は、高いS/N比を持つプロットを得ることです。しかし、化学発光ウェスタンでは高いバックグラウンドに悩まされることがあります。それは、目的のタンパク質からのシグナルを覆い隠す全体的なバックグラウンドとして、あるいはプロット上にランダムに散らばる明るいドットや斑点、汚れとして現れる場合があります。バックグラウンドノイズの増加は様々な要因から生じる可能性があります。また、目的のタンパク質から強いシグナルを得ることが困難な場合もあります。

化学発光ウェスタンを改善させるヒント

- ゲルにアプライするタンパク質の量を最適化する。一般に、20~40 μ gのタンパク質が最適とされています。ただし、タンパク質の総量は、タンパク質と抗体の組み合わせごとに最適化する必要があります。理想的には、飽和することなく、シグナルを容易に捕捉できるような十分な量のタンパク質をロードする必要があります。
- 適したメンブレンを選択する。ニトロセルロース膜とPVDF膜がよく使われますが、それぞれにメリットとデメリットがあります。
- すべてを清浄に保つ。使用前にすべての機器とトレイを徹底的に洗浄し、バックグラウンドを防止してください。ゲルとメンブレンは手袋をした手でのみ取り扱ってください。インキュベーション中はトレイに蓋をしてください。
- すべてのバッファーがよく混ざっていることを確認してください。ブロッキングバッファーや抗体インキュベーションバッファーに含まれる微粒子は、メンブレンに付着し、高いバックグラウンドの原因となることがあります。バッファーは使用前に濾過することを推奨します。
- バックグラウンドが高い場合は、洗浄バッファーの容量を増やし、洗浄回数と時間を増やしてください。
- ブロッキングバッファーを変えてみてください。抗体によっては、ブロッキングバッファー中のタンパク質と反応し、バックグラウンドが高くなるものがあります。また、ブロッキングバッファーによっては、目的のタンパク質を隠してしまい、検出できない場合があります。スキムミルクと牛血清アルブミンは、複数のタンパク質を含む最も一般的なタンパク質ブロッカーです。単一のタンパク質を含むブロッキングバッファーを使用することもできます。一次抗体がバッファーのタンパク質成分と反応する場合、タンパク質を含まないバッファーを使用することができます。
- 一次抗体、二次抗体ともに滴定を行う。ドットプロットとチェッカーボード滴定を使用して、最適な一次抗体と二次抗体の濃度を決定してください。
- 西洋わさびペルオキシダーゼ標識二次抗体は、絶対にアジ化ナトリウムを含むバッファーで希釈しないでください。アジ化ナトリウムはHRPの活性を阻害します。
- 十分量の基質液を使用してください。局所的な濃度差を防ぐために、プロット全体が基質液でコーティングされていることを確認してください。
- 感度と発光の持続時間を上げるために、様々な基質を試してみてください。高濃度、中濃度、低濃度のタンパク質を検出するために、感度の異なる様々な基質が利用可能です。また、基質によって反応速度が異なり、発光する時間も異なります。このことは、多重露光の捕捉能力に影響を与える可能性があります。
- 酵素活性を高めるために、使用前に基質を室温に平衡化する場合がある場合があります。
- フィルムではなく、デジタルイメージャーを使用する。デジタルイメージャーはリニアダイナミックレンジが広く、低濃度タンパク質の検出を容易にし、高濃度タンパク質の検出では飽和を抑制することができます。

3.3. 蛍光ウェスタンブロットティングの改善法

蛍光ウェスタンブロットは、定量的なウェスタンブロットのゴールドスタンダードです。複数のタンパク質を同時に検出するのに適しており（マルチプレキシング）、レーン内での正規化、目的タンパク質とローディングコントロールの同時検出が可能です。また、翻訳後修飾の検討や定量化も容易に行えます。



蛍光ウェスタンブロットティングでは、二次抗体に直接色素を結合させ、その色素を光で励起させます。放出された光はデジタルイメージャーで検出され、データ解析のためにデジタル化されます。発光スペクトルが重ならないように異なる色素を結合させた二次抗体を用いることで、複数のタンパク質を同時に検出することができます。

化学発光法（Chemiluminescent Western）と似ていますが、蛍光法（Fluorescent Western）を行う際には、さらに考慮しなければならない点があります：

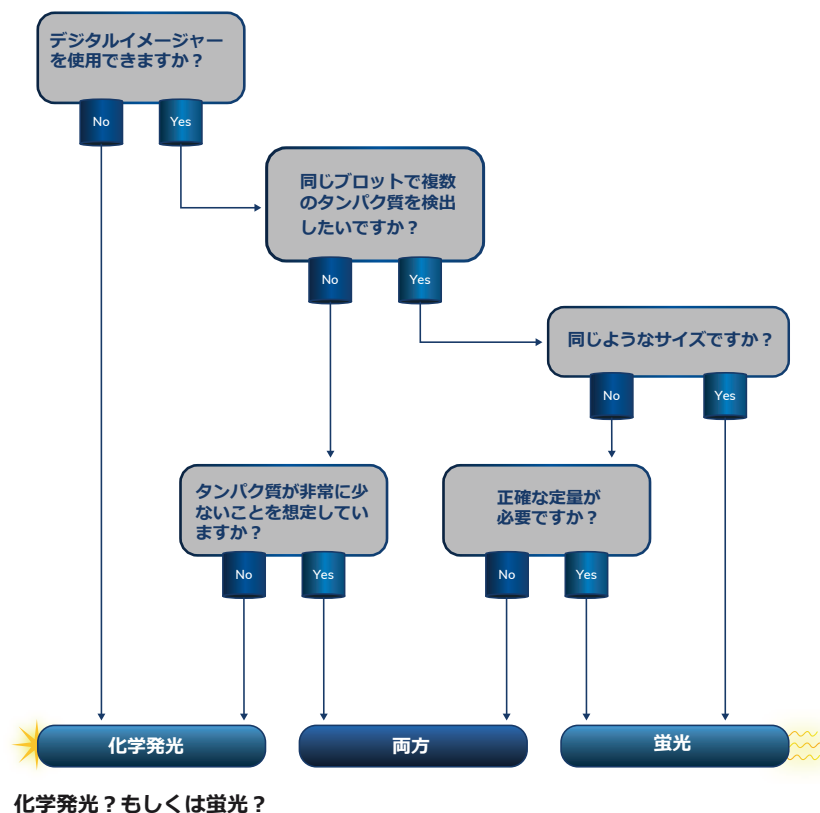
- 一次抗体、二次抗体ともに滴定を行う。ドットブロットとチェッカーボード滴定を使用して、最適な一次抗体と二次抗体の濃度を決定してください。
 - マルチプレキシングの場合、同時検出の前に各ターゲットの検出を個別に最適化する。
 - 一次抗体は、化学発光ウェスタンで使用する濃度に比べ、2～5倍に増やす必要がある場合があります。
 - 二次抗体も増量する必要があるかもしれません（1:5000からが推奨希釈率です）。
- 自家蛍光の少ないPVDF膜を使用する。ニトロセルロースや一部のPVDF膜は自家蛍光を発し、バックグラウンドが高くなる場合があります。
- 蛍光を発するようなインクや染色液は避ける。鉛筆でブロットに印をつけてください。プロモフェノールブルーやクーマシーなどの一般的な染色液は、自己蛍光を発します。
- すべてを清浄に保つ。使用前にすべての機器とトレイを徹底的に洗浄し、バックグラウンドを防止してください。ゲルとメンブレンは手袋をした手でのみ取り扱ってください。インキュベーション中はトレイに蓋をしてください。
- 蛍光分子量マーカーを使用する場合、サンプルをロードする前にレーンを1レーン空けてください。これにより、分子量マーカーからのシグナルがサンプルレーンににじみ出るのを防ぐことができます。
- 蛍光抗体はベンチトップで作業し、ストックは暗所に保管してください。
- マルチプレックス検出を実施する場合は、異なる生物種で作製した一次抗体と、交差反応性の低い二次抗体を使用し、交差反応を防止してください。
- マルチプレックス検出を実施する場合は、スペクトルの重複を避けてください。光学的に異なるスペクトルを持つ蛍光色素を選択してください。
- 特定の信号を増やすために、常に強いターゲットを青チャンネルで、中間を緑チャンネルで、弱いターゲットを赤チャンネルで検出します。
- ブロットを保存する場合は、暗所に保管してください。

3.4. 化学発光ウェスタンブロットから蛍光ウェスタンブロットへの移行

蛍光ウェスタンブロットティングをあなたの研究室に。思ったより簡単です。

化学発光はウェスタンブロットティングで最も馴染みのある検出方法であり、感度も優れています。しかし、多くの科学的な疑問や実験デザインは、蛍光ウェスタンブロットティングが提供する追加情報を必要とします。これは、同一サンプル内の類似したサイズのタンパク質を正確に定量化および可視化することを含みます。

蛍光ウェスタンブロットティングに移行することを決めたら、次は何をするのでしょうか？まず、蛍光ウェスタンブロットティングがあなたの実験に適しているかどうか、下図のフローチャートで確認してください。そして、本書に記載されているヒントやアドバイスを参考に、蛍光ウェスタンブロットティングを始めてみてください。



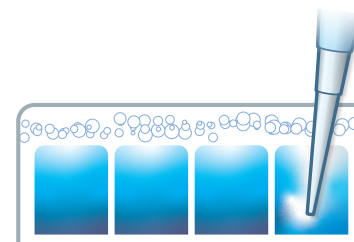
泳動する前に

ラダーマーカーの希釈

染色済みのタンパク質ラダーの中には、強い蛍光を発するものがあり、低レベルで発現したタンパク質の検出を妨害することがあります。ラダーを1~10倍に希釈してからアプライしてみてください。

サンプル濃度の最適化

新しいアッセイと同様に、質の高い結果を得るには、まず使用するサンプルに合わせてアッセイを最適化する必要があります。最良の結果を得るためには、サンプルアプライ量を調整する必要がある場合があります。化学発光ウェスタンから蛍光ウェスタンに切り替えたばかりの時は、サンプルアプライ量を少し多めにして、アッセイがうまく機能していることを確認してください。陽性結果が得られたら、サンプルロード量を下げて、より高感度な結果を得るよう努力することができます。

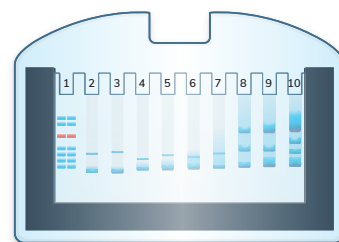


プロテインラダーマーカー、サンプル濃度、ローディング色素に配慮してください。

泳動中は

ローディング色素について

多くのローディング色素は蛍光を発することがあります。これが蛍光ブロットのシグナルに干渉するのを防ぐため、転写前に色素の前面をゲルから流し切るか、切断してください。



転写をセッティングする前に、ローディングダイがデータの邪魔にならないように、可能であれば切り取っておいてください。

メンブレンへの転写

PVDF メンブレン

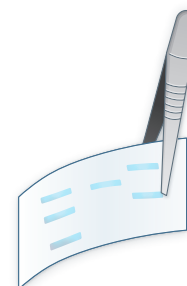
最高のS/N比を得るためには、Azureの低蛍光PVDFメンブレンのように、自家蛍光を最小限に抑えたメンブレンを使用します。

メンブレンの取り扱い

メンブレンの汚染は、蛍光ウェスタンブロットで明らかになります。メンブレンを取り扱う際には、必ず鉗子を使用してください。

製品

- Pre Cut PVDF (AC2108 – AC2109)



PVDFメンブレンを使用し、取り扱う時はピンセットを使用してください。

メンブレンへのプロービング

ブロッキング

化学発光ブロットの場合と同様に、抗体の非特異的結合を避け、バックグラウンドを低減するために、メンブレンを完全にブロックすることが重要である。Azure Protein Free Blocking BufferとAzure Fluorescent Blot Blocking Bufferは、バックグラウンドの低減だけでなく、AzureSpectra二次抗体の蛍光色素を安定化させ、シグナルの検出を強化するために調合されています。

抗体の最適化

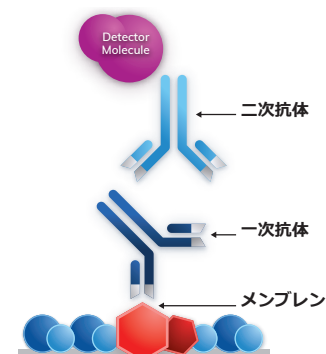
最良の結果を得るためには、抗体濃度の最適化および調整が必要な場合があります。化学発光ウェスタンから蛍光ウェスタンに初めて変更する場合、抗体希釈は製造元の推奨するものを使用してください。

インキュベーション容器

蛍光性二次光は、明るい光に長時間さらされると褪色してしまうことがあります。光に敏感な抗体を用いてサンプルをインキュベートする場合は、ブロットを不透明な素材（Azureの不透明なインキュベーショントレイなど）で覆い、褪色を防いでください。

製品

- Azure Protein Free Blot Blocking Buffer (AC2112)
- Azure Fluorescent Blot Blocking Buffer (AC2190)
- Fluorescent secondary antibodies (AC2128 – AC2139, AC2156 – AC2171)
- Opaque Incubation Trays (AC2120 – AC2123)



ウェスタンブロットング検出における抗原-抗体、抗体-抗体相互作用の図。



ヒント: インキュベーション中は、光に敏感な蛍光体を保護するため、不透明な容器を使用してください。

洗浄

念入りに洗浄

蛍光色素はメンブレンに付着することがあるので、バックグラウンドを低減するために洗浄は非常に重要です。特に近赤外蛍光色素を使用する場合は、必ず念入りに洗浄を行うようにしてください。Azure Fluorescent Blot Wash Buffer は、蛍光ウェスタンブロットに使用するために特別に調合されています。

洗浄液量・時間・回数

また、遊離した色素や抗体を除去するために、洗浄の量と時間も重要です。25mLの洗浄液で2回素早くすすいだ後、25mLの洗浄液で5分間3回洗浄することをお勧めします。

最終洗浄

洗浄バッファーに含まれる洗剤も蛍光を発することがあるので、最終洗浄工程の後、PBSまたはTBSでリンスすることがバックグラウンドシグナルを下げるために重要です。

製品

- Azure Blot Washing Buffer (AC2113)
- Azure Fluorescent Blot Washing Buffer (AC2145)

イメージング

バックグラウンド汚染の低減

多くの人が同じイメージャを使用すると、内部やトレイが汚れる可能性があります。バックグランドクエンチングシートでバックグラウンドの蛍光を吸収し、S/N比を向上させます。

製品

- Quenching sheets (AC2144, AC2147)

始めるにあたって、何かお手伝いできることはありますか？

デモキットは、ご自身のサンプルと一次抗体を用いて、ご自身のラボで蛍光ウェスタンブロットティングをお試しいただくのに最適な方法です。このキットには、シングルカラー蛍光ウェスタンブロットティングを行うために必要なものがすべて含まれています。

- PVDFメンブレン
- Fluorescent Blot Wash Buffer
- Fluorescent Blot Blocking Buffer
- 二次抗体
- 2 Quenching Sheets

AzureSpectra Demo Kits

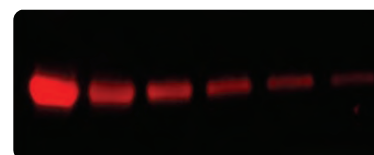
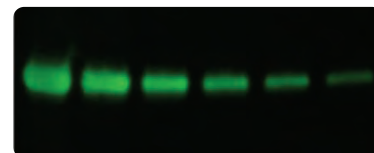
- Goat α -Mouse 700 (AC2172)
- Goat α -Rabbit 700 (AC2173)
- Goat α -Mouse 800 (AC2174)
- Goat α -Rabbit 800 (AC2175)
- Goat α -Mouse 650 (AC2176)
- Goat α -Rabbit 650 (AC2177)
- Goat α -Mouse 550 (AC2178)
- Goat α -Rabbit 550 (AC2179)



バックグラウンドシグナルを防ぎ、最も鮮明なデータを得るためには、抗体インキュベーション後の十分な洗浄などの推奨ステップに従ってください。



バックグラウンド蛍光がシグナルの妨げにならないように、Azureのクエンチングシートをご使用ください。



3.5. ウェスタンブロットの正規化

定量的なウェスタン：ウェスタンブロットをノーマライズする最適な方法とは？

最新のデジタルイメージャーは、ウェスタンブロットティングを再現性のある定量的な手法にすることができます。検出方法のリニアダイナミックレンジ内で作業し、データを正規化してタンパク質ロード量と転写量の変動を制御することで、真に定量的な結果を得ることができます。しかし、ウェスタンブロットを標準化する最良の方法は何でしょうか？過去には、ハウスキーピングタンパク質のレベルは実験条件や細胞株によってかなり一定であるという仮定に基づいて、ゴールドスタンダードな正規化方法として使用しました。しかし、最近の研究により、この仮定が常に正しいとは限らないこと^{1,2}が明らかになり、相対的なタンパク質存在量の測定が不正確になることが分かっています。その代わりに、定量的ウェスタンブロットティングの専門家^{1,2}および彼らが発行する雑誌⁴は、標準化のための新しいゴールドスタンダードとして、各レーンで検出された総タンパク質（できればメンブレン上の染色によって）に標準化することを推奨しています。

正規化法	ハウスキーピングタンパク質	総タンパク質
利点	従来から一般的	- 広いリニアダイナミックレンジ - 小さいばらつき - サンプルの種類によらず一貫している - 実験条件による変動なし
課題	- 狭いリニアダイナミックレンジ - 実験条件により変動する可能性がある - サンプルの種類によって変動 - 大きなばらつき - ハウスキーピングタンパク質がゲル上で目的タンパク質と物理的に分離されていることを確認する必要がある	使用する総タンパク質染色が、抗体結合および検出方法に適合していることを確認する必要がある

ハウスキーピングタンパク質を用いた正規化

ハウスキーピングタンパク質を使用する際の最も大きな欠点は、そのレベルがサンプルや条件によって一貫していない可能性があることです。^{1,2} ハウスキーピングタンパク質を使用して標準化することは可能ですが、最初に選択したものを検証するために時間と労力を費やさなければならず、すべてのサンプルで同じレベルで発現し、実験条件によって変化しないものを見つけるために複数の標準候補を検討する必要があるかもしれません。

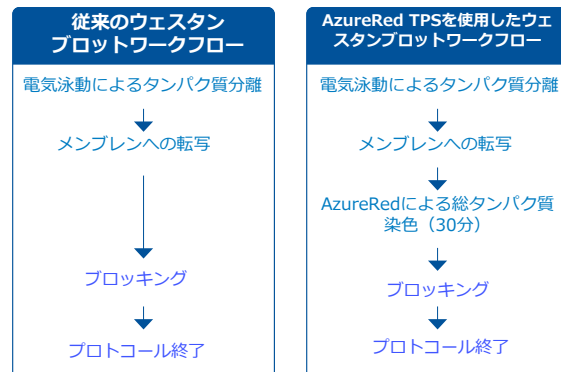
サンプル中にハウスキーピングタンパク質が非常に高いレベルで存在する場合^{1,3}、ハウスキーピングタンパク質のシグナルを飽和させずに検出直線範囲内に収める必要があるため、ゲルにロードできるサンプルの量が制限されます。このことは、目的のタンパク質が同様に高発現していない場合、2つのタンパク質が同じ検出直線範囲に収まらないため、特に問題となります。^{2,3}

同じタンパク質のリン酸化型と非リン酸化型を比較するような多重ウェスタンブロットを行う場合に考慮すべき3つ目の課題は、重複しない種から一次抗体と二次抗体を選択することの複雑さである。

最後に、ハウスキーピングタンパク質の検出が、目的タンパク質の検出を妨害する可能性が常にあります。このことは、同一ブロット上で複数の対象タンパク質を調べる実験では、ますます困難となります。

総タンパク質染色を用いた規格化

総タンパク質染色(TPS)を用いたの正規化では、メンブレンに転写したサンプルの総量を表すことができるタンパク質を探す代わりに、メンブレン上の総タンパク質を直接測定し、この値を正規化の際の分母として使用します。¹⁻⁴ ゲルやメンブレンの染色に使用できる種々の総タンパク質染色があります。総タンパク質染色は、ハウスキーピングタンパク質よりも広いダイナミックレンジと低い変動で正確なデータを得ることができます。^{1,2}



特に化学発光プロットでは、染色工程がプロットのストリッピングやリブロービングよりも短時間で済むため、ハウスキーピングタンパク質を用いるよりも総タンパクによる正規化の方がより迅速に行うことができます。理想的には、総タンパク質の染色は、免疫検出の前または後にメンブレン上で行います。²

AzureRed Fluorescent Total Protein Stainのような染色では、免疫検出の前にプロットを染色し、総タンパク質を目的タンパク質と同時に画像化することが可能です。この最もシンプルなワークフローでは、目的のタンパク質と総タンパク質の画像は自動的にアライメントされるため、異なるタイミングで撮影した画像のリサイズやアライメントが不要になります。画像取り込み後の解析ワークフローは、ハウスキーピングタンパク質を用いた場合とほとんど変わらず、正規化には単一バンドの密度ではなく、レーン全体またはレーンの大部分のシグナル密度が用いられる。またメンブレンを総タンパク質染色で染色することにより、メンブレンの転写が完全に行われ、アーチファクトがないことを確認できるという品質管理が可能であるという利点もあります。

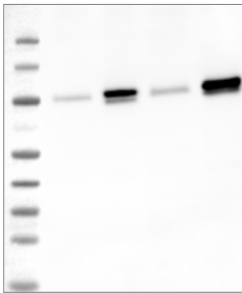
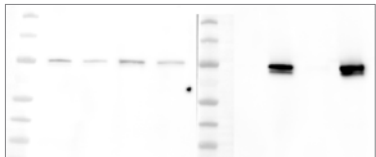
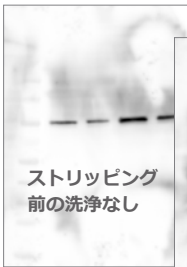
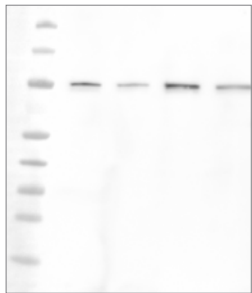
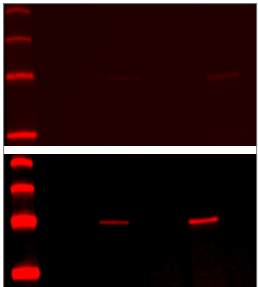
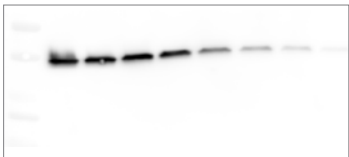
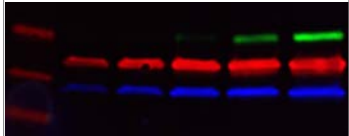
ウェスタンブロットの正規化についてもっと知りたい方はこちら

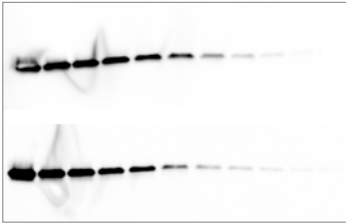
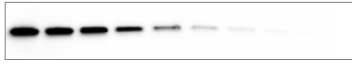
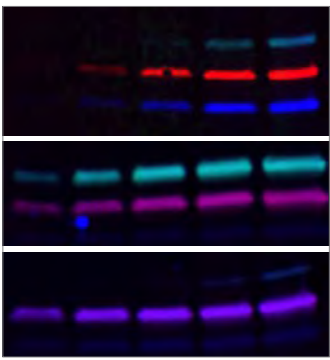
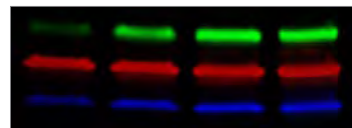
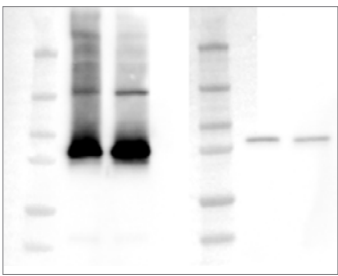
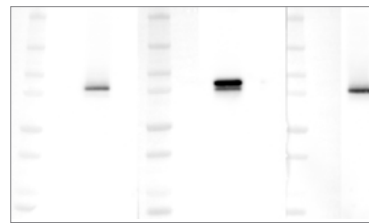
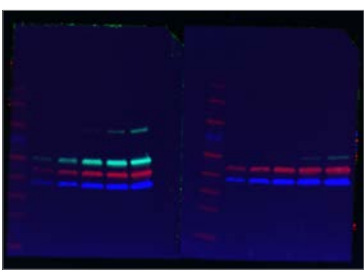
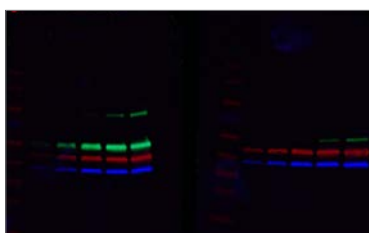
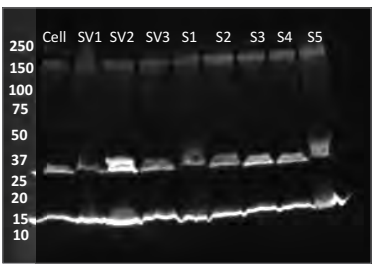
ウェスタンブロットの正規化の様々な方法についての詳細と、お客様のプロットに最適な正規化方法を決定するために、アプリケーションノート「ウェスタンブロット正規化」をご覧ください。AzureRed Fluorescent Total Protein Stainを用いた蛍光ウェスタンブロットの全タンパク質の正規化については、アプリケーションノート「AzureRed Fluorescent Protein Stainを用いたウェスタンブロットの正確な正規化」をご覧ください。

参考文献

1. Moritz CP. Tubulin or not tubulin: heading toward total protein staining as loading control in Western blots. *Proteomics*. 2017;17:1600189.
2. Thacker JS et al. Total protein or high-abundance protein: which offers the best loading control for Western blotting? *Anal Biochem*. 2016;496:76-78.
3. McDonough AA et al. Considerations when quantitating protein abundance by immunoblot. *Am J Cell Physiol*. 2015;308(6):C426-C433.
4. Fosang AJ, Colbran RJ. Transparency is the key to quality. *J Biol Chem*. 2015;209(50):29692-29694.

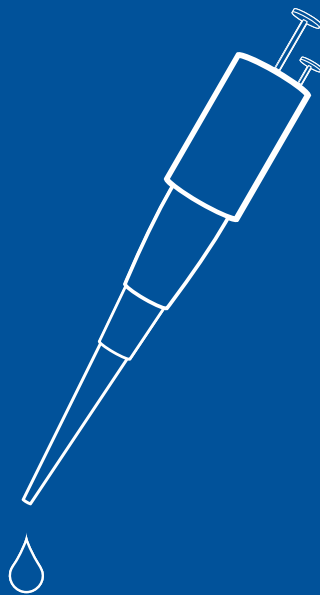
3.6. トラブルシューティング

イメージ	問題点	解決法	解決後
	ストリッピングが不十分	十分なバッファー量とストリッピング時間の確保	
 ストリッピング前の洗浄なし  ストリッピング前に洗浄バッファーで洗浄	ストリッピング前の洗浄が不十分または不正確	- ストリッピング前に最低5分ロットを超純水で洗浄する。 - 洗浄バッファーで洗浄しないでください	
	マーカーが明るすぎる	- 撮像前にマーカーをカバーする - イメージングの前にロットを乾燥させる - アブライする前にマーカーを希釈する。	
  	気泡の混入	- 膜を覆った後、気泡を取り除くためにろ紙を押して滑らかにします。 - カートリッジに十分な転送バッファーがあることを確認します。	

イメージ	問題点	解決法	解決後
	転写時の不十分 もしくは不均一 な圧力	- 転写のセットアップを強くする。 - ゲルとメンブレンをカセットの中央に置く	
	抗体の交反応	- 近すぎる種（例：ラットとマウス）からの抗体は避ける。 - 別の二次抗体が作製された動物の二次抗体は避けてください（例えば、ヤギ抗ウサギを使用する場合、同じアッセイでロバ抗ヤギを使用することは避けてください）。 - 交差反応する可能性のある抗体同士をブロックする。	
	低品質な抗体	- 抗体のスクリーニング - 他の原因： - 非特異結合 - 過剰な抗体 - ブロッキング不足	
	高いバックグラウンド	- 低自家蛍光メンブレンを使用 - 適切な洗浄プロトコール、バッファーを使用 - 洗浄後、水洗する - 過剰な量の抗体を使用しない - イメージング前にメンブレンを乾燥させる	
	細胞凝集塊	- 超音波およびフィルトレーション - サンプル中のDNAについては、シリンジでサンプルをせん断するか、DNaseを添加する。	

4

プロトコール



4.1. Radiance基質によるHRP/化学発光プロット検出

カタログ番号

- AC2100—Radiance サンプル, メンブレン140 cm²分
- AC2101—Radiance, 150 ml, メンブレン1500 cm² 分

用意するもの

- 電気泳動装置とSDS-PAGE用試薬類
- タンパク質をゲルからメンブレンに転写するための転写装置とバッファー類
- ニトロセルロースまたはPVDFメンブレン（ゲルの大きさに合わせてカットしたもの）。Azureから販売されているメンブレン製品（「関連製品」の項を参照）はすべてRadianceに対応しています。
- 洗浄バッファー（PBS-TまたはTBS-T）。最良の結果を得るためには、Azure Fluorescent Blot Washing Buffer を使用してください（関連製品の項を参照）。
- ブロッキングバッ
- 一次抗体
- 一次抗体に対応する西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）を結合した二次抗体（関連製品欄をご参照ください。）
- CCDを用いた検出システム、またはフィルム（「関連製品」の項参照）

背景

Radiance 化学発光西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）基質は、CCDイメージング用に特別に調合されており、Azure イメージングシステムで優れた性能を発揮します。Radiance は強力な長時間のシグナルを発生し、バックグラウンドが非常に低いため、長時間露光が可能で、低濃度タンパク質の検出を可能にします。さらに、Radianceからのシグナルは幅広い濃度範囲でタンパク質量に対してリニアであり、高濃度タンパク質アプライ時の基質の枯渇を示さないため、ユーザーはCCD検出法の線形範囲を最大限に利用することができます。RadianceはX線フィルム検出にも対応していますが、フィルムのダイナミックレンジが限られているため、得られるデータの定量性は低くなります。

1988年以降、ECL (enhanced chemiluminescence) (1) はウェスタンブロットングにおいて最も一般的な検出方法の一つとなっています (2)。この方法では、二次抗体に西洋わさびペルオキシダーゼという酵素を結合させます (1,2)。メンブレンに結合した二次抗体は、HRPとの反応後に発光産物を生成するHRP基質を含む溶液とプロットをインキュベートすることにより検出されます (Figure 4.1、4.2)。化学発光シグナルは、プロットをX線フィルムに露光するか、CCDカメラで撮像することにより検出することができます。Radianceは、CCDイメージング用に特別に開発された強化型化学発光基質です。Radianceは、非常に低いバックグラウンドで明るいシグナルを生成し、非常に高い感度とアトモレベルのタンパク質の検出限界を実現する。さらに、Radianceのシグナルは長時間持続するため、低バックグラウンドと相まって、低濃度タンパク質を検出するための長時間露光が可能です。

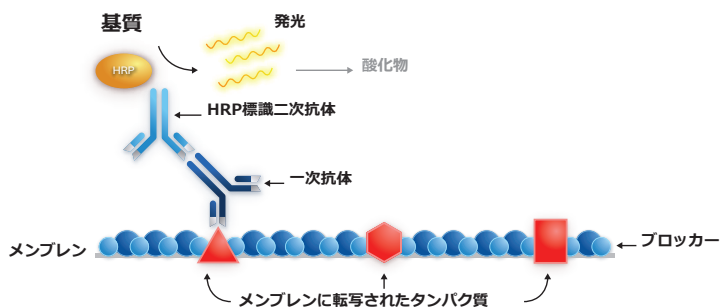


Figure 4.1. 化学発光ウェスタンブロットングの原理

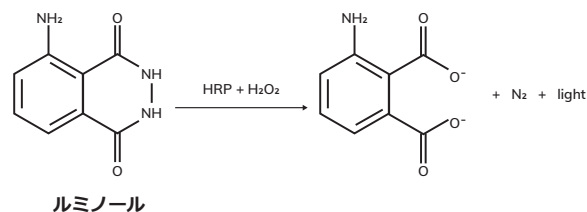
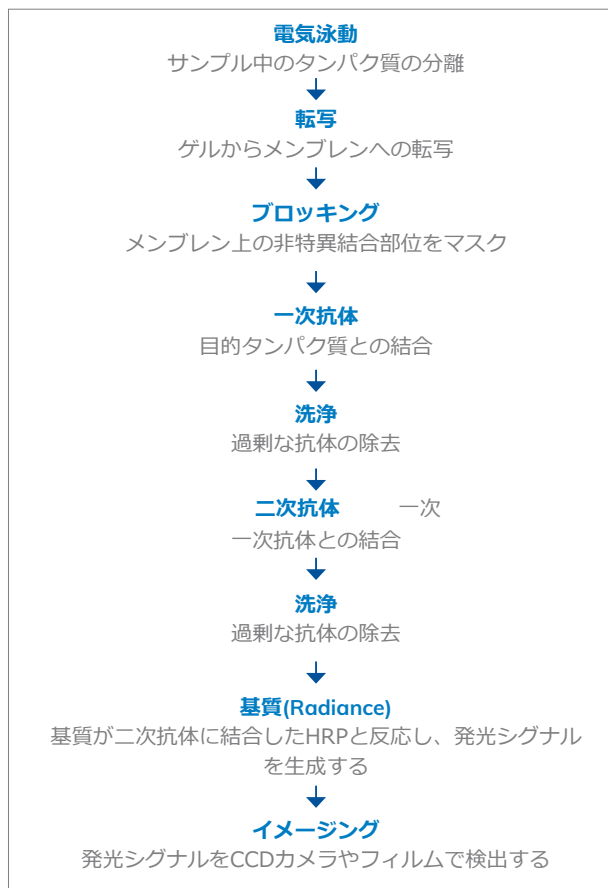


Figure 4.2. ルミノールの化学発光

化学発光ウェスタンブロッティングプロトコールの概要



クイックプロトコール

詳しくは、この後の詳細なプロトコールをご覧ください。

ステップ	備考
1. タンパク質プロットの準備	
2. メンブレンを室温で1時間ブロックする。	
3. 一次抗体とプロットを穏やかに攪拌しながら、常温で1時間インキュベートする。	
4. プロットを洗浄します： 1 x すぐに取り換える 1 x 15 分, 1ml/cm²のブロッキングバッファー 3 x 5 分, 0.5ml/cm²のブロッキングバッファー	
5. 二次抗体とプロットを穏やかに攪拌しながら、常温で1時間インキュベートする。	
6. プロットを洗浄します： 3 x 5 分, 0.5ml/cm²のブロッキングバッファー	
7. ラディアン成分を1：1で混合した0.1ml/cm ² 量の液にプロットに浸漬し2分間静置。	
8. 余分な試薬を捨てる。	
9. 湿ったプロットをラップで覆い、CCDカメラで撮影またはX線フィルムに露光。	

詳細プロトコール

ステップ	備考
1. タンパク質プロットの準備	
1.1. 電気泳動によるタンパク質サンプルの分離	Laemmliなどの電気泳動システムおよびバッファーであれば、ラディアンスに対応可能です。
1.2. タンパク質のメンブレンへの転写	- ウェット方式が望ましいが、セミドライ方式でも対応できます。Boltら(3)が開発したバッファースystemでも可能である事は確認済みです。 - RadianceはニトロセルロースとPVDFのいずれにも対応しています。 - PVDFを使用する場合は、まず100%メタノールで1分間インキュベートし、次に水で5分間、そして転写バッファで5~10分間、メンブレンを濡らします。 - スロットプロットでは、PVDFは気泡を避けることが難しいため、ニトロセルロースの使用をお勧めします。
- メンブレンをトランスファーバッファでプレウェットし、転写装置の説明書に従ってトランスファーサンドイッチを組み立てる。 - ドットプロットやスロットプロットもRadianceで検出することができます。	
2. メンブレンのブロッキング	
プロットをブロッキングバッファ中で穏やかに攪拌しながら、室温(RT)で1時間インキュベートする。プロット1cm²あたり0.2~0.5mlのブロッキングバッファを使用し、十分にブロッキングを行う。	- ブロッキングは、膜上の非特異的なタンパク質結合部位をマスクし、バックグラウンドを減少させ、一次抗体の目的タンパク質への結合の特異性を増加させます。 - 最適なブロッキングバッファは、目的とする抗原の性質や一次抗体の品質に依存する部分があります。スキムミルクを含む一般的なブロッキング剤は、Radianceと適合することが確認されています。 - 一般的な7×9cmのミニプロットには、通常10~20mlで十分です。
3. 一次抗体とプロットをインキュベートする	
- 一次抗体をブロッキングバッファで希釈します。 - 一次抗体溶液とプロットを穏やかに攪拌しながら、常温で1時間インキュベートする。	- 最適な一次抗体の希釈倍率は経験的に決定する必要があります。 - CCDイメージングの場合、一次抗体の希釈倍率は1:1000から1:10,000を推奨します。最初の希釈は1:5000が適当です。 - プロットをフィルムでイメージングする場合は、CCD イメージングの場合よりも 2~5 倍少ない量の一次抗体を使用してください。例えば、一次抗体の1:1000希釈がCCD検出に最適であった場合、フィルム検出には1:5000が適しています。 - 抗体をインキュベーショントレイに入れシェーカーにかけるか、プロットを袋（ハイブリバッグ等）に密封して回転台に置き、少量（5~10ml）を使用することができます。
4. 余剰の一次抗体を洗浄する。	
1×すぐに取り換える 1×15分, 1ml/cm²のブロッキングバッファ 3×0.5ml/cm²のブロッキングバッファ	- 最良の結果を得るためには、化学発光および蛍光プロットに最適化された Azure Fluorescent Blot Washing Buffer (AC2113) をご使用ください。PBS-TまたはTBS-TもRadianceと使用可能です。 - 清潔なトレイに入れてシェーカーで優しく攪拌することをお勧めします。 - 例えば、標準的な7x9のメンブレンを使用する場合、15分間の洗浄には50mlの洗浄液が必要で、5分間の洗浄には20mlの洗浄液が必要です。
5. 二次抗体とプロットをインキュベートする	
- 二次抗体をブロッキングバッファで希釈します。 - 二次抗体溶液とプロットを穏やかに攪拌しながら、常温で1時間インキュベートする。	- 最適な二次抗体の希釈倍率は経験的に決定する必要があります。 - 二次抗体の希釈倍率は1:5,000~1:20,000を推奨します。最初の希釈は1:10,000が適当です。 - フィルムでイメージングする場合は、CCD イメージングの場合よりも 2~5 倍少ない量の 2 次抗体を使用してください。フィルムでの検出には1:50,000の希釈が適しています。 - ステップ3の備考もご覧ください。
6. 余剰の二次抗体を洗浄する。	
3×5分, 0.5ml/cm²のブロッキングバッファ	ステップ4の備考をご覧ください。

7. プロットをRadanceとインキュベートする。

- コンポーネント1とコンポーネント2を1:1の割合で、少なくとも0.1ml/cm² になるように十分な量を混合し、プロットに添加する。
- 基質液は使用直前に調製してください。混合試薬は常温で数時間安定です。
- プロットと基質液を2分間反応させる。
- 非特異的なバックグラウンドの原因となるため、プロットに触れたり圧力をかけたりしないように注意してください。
- 金属製のピンセットはブロックの表面を傷つけ、新たな吸着サイトを作るため、金属製ではなくプラスチック製のピンセットを使用してください。また、微量の金属が非酵素的な基質酸化の触媒として作用し、非常に高いバックグラウンドとなる可能性があります。
- 基質液の最小量は0.1ml/cm²です。例えば、7×9cmのプロットの場合、この最小量は7×9×0.1=6.3mlとなります。
- 最小限の基質液を使用する場合は、攪拌せずにインキュベートすることができます。試薬が表面張力で保持されるように、メンブレンの表面が水平であることを確認してください。
- インキュベーションは、メンブレンより少し大きめのトレイで穏やかに攪拌しながら行うこともできます。メンブレンが十分に試薬で覆われるように、必要に応じて試薬の量を増やしてください。

8. 余剰の基質液を捨てる。

- KimWipe®などの吸収体をプロットの端に触れさせ、毛細管現象で余分な基質を除去する。

9. イメージング

- プロットが湿っている間に、透明なラップで覆い、プロットをCCDイメージャーに入れるか、フィルムに露光します。
- 30秒、2分、5分の3回露光してみることをお勧めします。
- プロットは数時間画像化することができ、60分後には最初のシグナルの70%が残り、8-10時間後でも十分なシグナルが残ります。

トラブルシューティングとFAQ

ウェスタンブロットティングは、複数の工程を必要とするため、かなりの最適化が必要となります。ゲル上にアプライするタンパク質の適切な量、一次抗体と二次抗体の最適な希釈率を経験的に決定する必要があります。以下に、よくある質問について説明します。

問題点	解決法
高いバックグラウンド	- 一次抗体の希釈率を上げて濃度を下げる。 - 他のブロッキングバッファーを試してみる。 - 露光時間を短くする。 - 洗浄時間を増やす。
シグナルが検出されない、もしくは弱い	- 正しい一次抗体を使用しているかどうか確かめる。 - C二次抗体が一次抗体を認識することを確認する（例えば、一次抗体がウサギの場合、二次ヤギ抗ウサギ抗体であること）。
バンド内に白点	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。
斑点状のバックグラウンド	- 二次抗体のフィルトレーション - ブロッキングバッファー、洗浄バッファーのフィルトレーション - 実験室の環境を清潔にし、プロットに接触する可能性のあるほこり、ごみ、その他の粒子を最小にする。インキュベーションや洗浄の工程では、トレイに蓋をしてください。 - パウダーフリー手袋を使用するか、別の種類の手袋に変更する。パウダーフリーニトリル手袋やポリエチレン手袋をお勧めします。

参考文献

1. Thorpe GH, Kricka LJ, Moseley SB, Whitehead TP, Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clin Chem.* 1985 Aug; 31(8): 1335-41.
2. Leong MM, Fox GR., Enhancement of luminol-based immunodot and Western blotting assays by iodophenol. *Anal Biochem.* 1988 Jul; 172(1): 145-50.
3. Bolt M.W., Mahoney P.A., High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 1997 May 1; 247(2): 185-192.

関連商品

カタログ番号	商品	容量
AC2113	Azure Fluorescent Blot Washing Buffer	500 ml
AC2114	Goat-anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody	500 µl
AC2115	Goat-anti-mouse HRP-conjugated secondary antibody	500 µl
AC2105	Low Fluorescence Western Membrane (PVDF) 7x9 cm	10枚
AC2106	Nitrocellulose Transfer Membrane 0.45 µm 7x9 cm	10枚
AC2107	Nitrocellulose Transfer Membrane 0.22 µm 7x9 cm	10枚

4.2. AzureSpectra試薬を用いた蛍光ウェスタンブロットティングプロトコール

マルチカラー、近赤外定量ウェスタンブロットティングキット。

カタログ番号

- AC2193—AzureSpectra rb650/ms550 Kit
- AC2191—AzureSpectra IR rb700/ms800 Kit
- AC2192—AzureSpectra IR ms700/rb800 Kit

すべてのキットに含まれるもの

- 低蛍光PVDメンブレン 9x7 cm. 10枚
- クエンチングシート, 10 枚
- Azure Fluorescent Blot Blocking Buffer, 1x 濃度, 300 ml
- Azure Fluorescent Blot Washing Buffer, 10x 濃度, 250 ml

AC2093に含まれるもの

- Goat-anti-rabbit IgG 650, 40 µl
- Goat-anti-mouse IgG 550, 40 µl

AC2191に含まれるもの

- Goat-anti-rabbit IgG IR700, 40 µl
- Goat-anti-mouse IgG IR800, 40 µl

AC2192に含まれるもの

- Goat-anti-mouse IgG IR700, 40 µl
- Goat-anti-rabbit IgG IR800, 40 µl

輸送および保管条件

開封前のキットは+4°Cで保存することができます。AzureSpectra蛍光二次抗体結合体は、+4°Cで1ヶ月間保存可能です。長期保存の場合は、抗体結合体を-20°Cで保存してください。溶液を採取する前に、チューブを軽く攪拌し、短時間スピンさせてください。

Azure Fluorescent Blot Blocking Buffer は +4°C で保存してください。Azure Fluorescent Blot Washing Solution は 4°C から 25°C の間で保存して下さい。濃縮液を指定された希釈率以上に希釈しないでください。各アッセイに必要な量だけ調製してください。PVDF メンブレンは密封して光や湿気から保護し、常温で保存してください。バックグラウンドクエンチングシートは密閉した袋に入れ、室温で保存してください。

その他必要なもの

- 一次抗体：マウスおよび/もしくはウサギIg
- SDS-PAGE用電気泳動装置、ゲル、バッファー、試薬類
- 転写装置および転写バッファー⁴
- メタノール
- 1x PBS またはTBS (Tween不含)
- 先端が平らで滑らかなピンセット。プラスチック製（非金属製）のピンセットを強く推奨します。
- 蛍光実験系に対応したパウダーフリーの手袋。ポリエチレン製の手袋を強く推奨します。
- Azure社製など、内部が滑らかなインキュベーション・トレイや洗浄トレイなど (製品番号 AC2120, AC2123, AC2150 and AC2153).
- オービタルまたはシーソー式シェーカー：シーソー式の方がバックグラウンドが均一になるので望ましい。
- AzureSpectra rb650/ms550 Kit (AC2193)の場合：緑色（530nm～560nm）および赤色（600nm～650nm）に励起される色素に対応した蛍光イメージャー。詳細は、「イメージング」の項で説明します。

- AzureSpectra IR rb700/ms800 and ms700/rb800 Kits (AC2191 and AC2192)の場合：遠赤（630nm～700nm）、近赤外（750nm～780nm）に励起される色素に対応したイメージャー。詳しくは、「イメージング」の項で説明します。

マルチカラー蛍光ウェスタンブロッティングについて

ウェスタンブロッティングは、複雑な混合物中の目的タンパク質の存在と発現レベルをアッセイする手段です。タンパク質を電気泳動で分離し、メンブレンに転写した後、目的のタンパク質を特異的な抗体で検出します^(1, 2)。目的のタンパク質に特異的な抗体は、例えば放射能を使って直接標識することも、標識された二次抗体を用いて検出することもできます。よく用いられるのは、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）と結合した2次抗体で、化学発光によりタンパク質のバンドを検出方法です⁽³⁾。

化学発光を使用する場合、1枚のプロットにつき1つのタンパク質しか検出できません。2つ目のタンパク質のアッセイには、抗体を一度外し（ストリッピング）、再度別の抗体と反応させる（リプロービング）が必要があり、時間のかかる作業となります。蛍光を用いたウェスタンブロットのイメージングでは、固有の励起および発光スペクトルを持つ蛍光色素で標識された二次抗体を使用することにより、1枚のプロットで複数のタンパク質をアッセイすることができま

す⁽³⁾。

AzureSpectra rb650/ms550 キットおよび AzureSpectra IR rb700/ms800 と ms700/rb800 キットは、1枚のウェスタンブロットで2つのタンパク質をアッセイするためのキットです。各キットには、それぞれ異なる蛍光レポーターであらかじめ標識された2種類の二次抗体が含まれています。AzureSpectra rb650/ms550 キットで使用されている蛍光レポーターは、可視蛍光領域で励起可能です。AzureSpectra 550 および 650 のコンジュゲートの励起および発光スペクトルをFigure 4.3 および 4.4 に示します。AzureSpectra rb700/ms800 および ms700/rb800 キットに使用されている蛍光レポーターは、近赤外光で励起される。AzureSpectra NIRコンジュゲートの励起および発光スペクトルをFigure 4.5 および4.6 に示す。

これまで蛍光レポーターは、様々な理由からウェスタンブロッティングの用途に広く使用されていませんでした。ウェスタンブロッティングに通常使用されるメンブレンは、高いレベルの自家蛍光を持ち、適切なイメージング装置が容易に入手できず、典型的なプロットの画像を取得するのに長い時間が必要でした。ウェスタンブロッティングに使用する蛍光レポーターを使用できなかった最も重要な要因は、これらのタンパク質が高いレベルの蛍光を維持するために水和状態を保つ必要があることでした。ウェスタンブロット用のメンブレンはすぐに乾燥し、蛍光を維持するために必要な水分を失ってしまいます。残念ながら、膜を再水和させても、特定の検出用蛍光レポーターの蛍光を回復させることはできません。

今日、これらの問題はすべて解決できるようになりました。自家蛍光の少ないPVDF膜が入手可能になり、レーザーベースのスキャナーやLEDベースのゲルドキュメンテーションイメージャーなど、高速かつ高解像度の蛍光イメージング装置の選択肢も増えてきました。最も難しい問題は解析に必要な画像を得るために必要な時間、蛍光レポーターの水和状態を維持することになりました。

この問題を解決するために、Azure Protein Free Blocking BufferとAzure Fluorescent Blot Blocking Bufferを開発しました。キットに付属するブロッキングバッファーには、PVDF膜を非特異的なタンパク質結合から効率的にブロッキングする成分が含まれています。

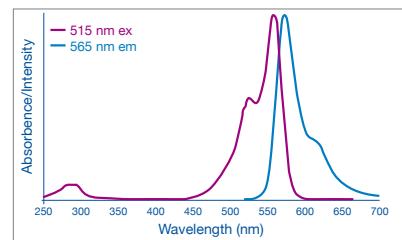


Figure 4.3. AzureSpectra 550 ヤギ-抗マウスIgG抗体コンジュゲートの吸収・発光スペクトル (AC2159)

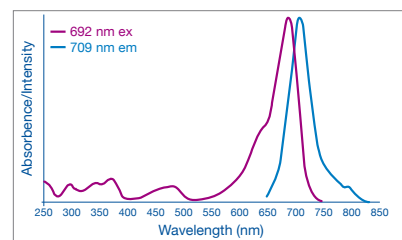


Figure 4.4. AzureSpectra 700 IgG 抗体コンジュゲートの吸収・発光スペクトル (AC2128 and AC2129)

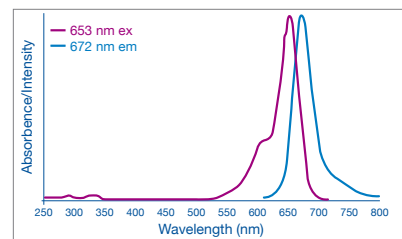


Figure 4.5. AzureSpectra 650 ヤギ-抗ウサギIgG抗体コンジュゲートの吸収・発光スペクトル (AC2165)

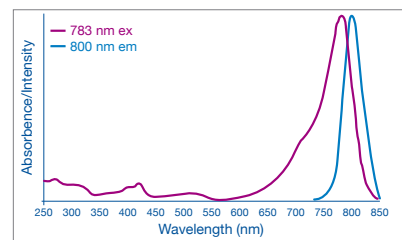


Figure 4.6. AzureSpectra 800 IgG 抗体コンジュゲートの吸収・発光スペクトル (AC2135 and AC2136)

同時に、メンブレン内の水和環境を十分に保つことで、タンパク質の水和を保護し、その蛍光を安定化させることができます。この安定化効果により、メンブレンが完全に乾燥したように見えても、蛍光強度の大部分は維持されます。残存蛍光はピーク値より20~40%低いだけであり、ナノグラム以下の量の目的タンパク質を確実に検出するのに十分です。高品質の一次抗体を使用し、アッセイ条件を最適化すれば、ピコグラムレベルの検出が日常的に可能になります。

AzureSpectra rb650/ms550 Western KitおよびAzureSpectra IR rb700/ms800とms700/rb800 Kitsに含まれる二次抗体は、標識抗マウスIgGおよび抗ラビットIgG結合体です。したがって、AzureSpectraキットは、マウスおよび/またはウサギで生産された、最も入手しやすい一次抗体を使用する実験に適しています。

Figure 4.7に、2色ウェスタンブロットの模式図を示します。

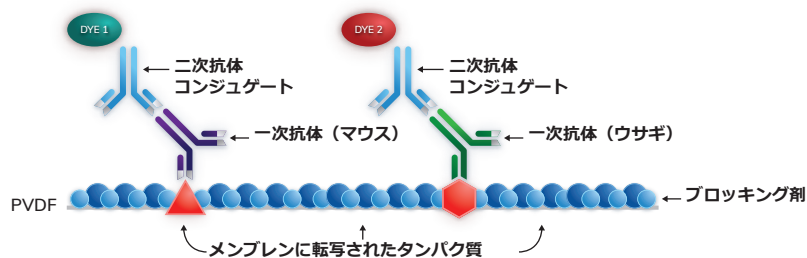
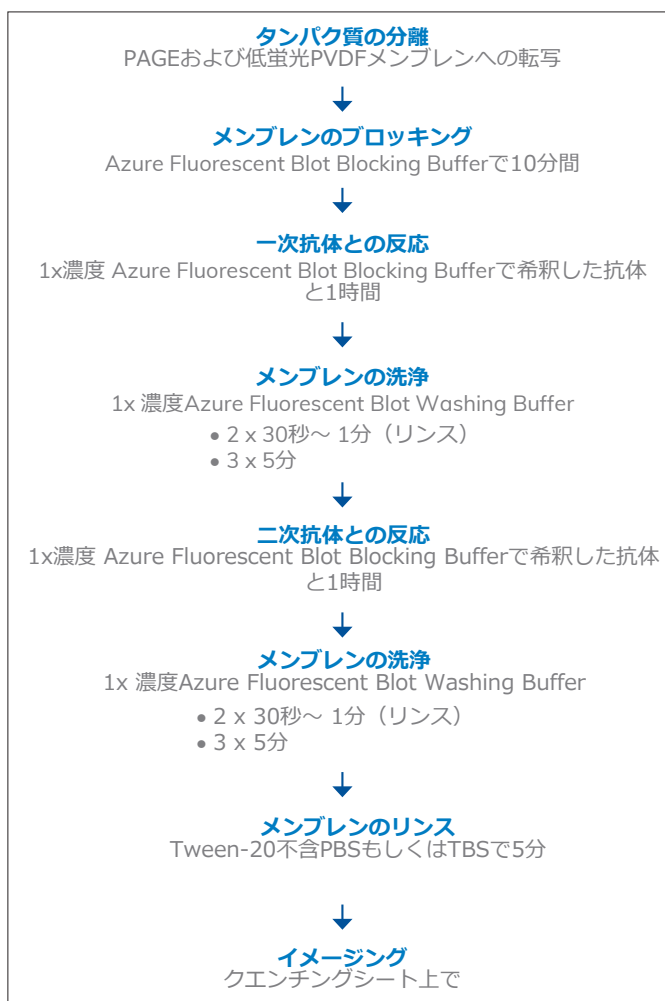


Figure 4.7. AzureSpectra Western Kitsの2色アッセイの模式図

蛍光ウェスタンブロットプロトコルの概要



クイックプロトコル

詳しくは、この後の詳細なプロトコルをご覧ください。

ステップ	備考
1. タンパク質プロットを準備する。	
2. 室温で10分間メンブレンをブロッキングする。	
3. 一次抗体とプロットを穏やかに攪拌しながら、常温で1時間インキュベートする。	
4. 1 x 濃度の洗浄バッファーで洗浄する • 2 x 素早く • 3 x 25mlの洗浄バッファーで5分	
5. 二次抗体とプロットを穏やかに攪拌しながら、常温で1時間インキュベートする。	
6. 1 x 濃度の洗浄バッファーで洗浄する • 2 x 素早く • 3 x 25mlの洗浄バッファーで5分 • Tween-20不含PBSもしくはTBSで5分	
7. メンブレンをクエンチングシート上に置き、余分な液を除去する。	
8. CCDカメラで撮影。	

詳細プロトコル

ステップ	備考
1. タンパク質の分離と転写	
1.1. ミニサイズゲル（例：8×10cm）を用いて、ポリアクリルアミドゲル電気泳動でタンパク質サンプルを分離する。 1.2. メンブレンの一角から小さな切り欠きを入れて、転写されたタンパク質を含むメンブレンの向きと表面側を適切に識別できるようにします。 1.3. メンブレンが完全に濡れるまで、数分間メタノールで予備湿潤させる。 1.4. 湿潤メンブレンをメタノールから精製水（Milli-Q qualityまたは蒸留水）に移し、ロッカーまたはシェーカー上で少なくとも5分間インキュベートします。メンブレンが完全に水に浸かり、水面に浮いていないことを確認します。 1.5. メンブレンを水からトランスファーバッファーに移し、5分間インキュベートします。 1.6. トランスファーサンドイッチの組み立ては、ご使用の製品に合わせて行ってください。 1.7. 転写は15Vで一晩、または保冷材を入れて70Vで1～2時間行ってください。	• セミドライ方式では、特に緑色光で励起されたチャンネルで、比較的高い不均一なバックグラウンドが発生するため、蛍光アプリケーションではうまく機能しません。特に緑色光で励起されたチャンネルでは、比較的高いバックグラウンドが発生します。蛍光色素を使用する場合は、ウェット（タンク）方式を推奨しています。 • 転写時間を長くすると、特に70Vで行った場合、バックグラウンドが増加することがあります。転写時間を短縮するために70Vを超えて電圧を上げると、特に赤色光で励起されたチャンネルでバックグラウンドが増加し、不均一になります。 • 蛍光プロットに有効な高速トランスファー法としては、Azure Transfer Buffer（Azure社から入手可能、製品番号AC2127）をお勧めします。Azure Transfer Buffer を使用する場合は、12V/cm で 15～30 分間の転写を行う必要があります。
2. メンブレンのブロッキングと一次抗体との反応	
2.1. トランスファーが完了したら（ステップ1.7）、メンブレンをサンドイッチから取り出し、Milli-Qまたは蒸留水の入ったトレイに5分間置きます。	• インキュベーションと洗浄はすべてシーソーまたはオービタルシェーカーで、室温で穏やかに攪拌しながら行う。オービタルよりもシーソーの方が好ましい。私たちの経験では、シーソーによるミキシングは、オービタルシェーカーによるミキシングよりも均一なバックグラウンドを形成します。

- 2.2. 1x Azure Fluorescent Blot Blocking Buffer を 10 ml インキュベートトレイに移します。トレイはメンブレンに適した大きさであることを確認してください。
- 2.3. メンブレンを水から Azure Fluorescent Blot Blocking Buffer に移し、穏やかに攪拌しながら 10 分間ブロッキングします。
- 2.4. メンブレンを Azure Fluorescent Blot Blocking Buffer に浸している間に、10 ml の 1 x Azure Fluorescent Blot Blocking Buffer で希釈した一次抗体または一次抗体の適切な混合物を含むインキュベーション混合物を準備します。チューブを数回転倒させ、インキュベーション溶液をゆっくりと混ぜる。ボルテックスしないで下さい。
- 2.5. ブロッキング終了後（ステップ 2.3）、トレイから溶液を取り出し、一次抗体の溶液をメンブレンに添加します。
- 2.6 一次抗体の溶液とメンブレンを室温で 1 時間、穏やかに攪拌しながらインキュベートする。

- ブロッキングの前にメンブレンを水に浸しておく、転写されたタンパク質に対する保持力が向上します。
- インキュベーションと洗浄のすべてのステップにおいて、転写されたタンパク質を含むメンブレンの側を上に向けることが非常に重要である。
- 一次抗体の最適な希釈倍率は、滴定実験を行い、実験的に決定する必要があります。出発点としては、抗体供給元が提案する希釈倍率が良いと考えます。私たちの経験では、一次抗体の最適濃度は、一般的な発色系ウェスタンブロットティングの手順で提案されている濃度よりも低いことが多く、多くの場合、かなり低くなっています。多くの場合、一次抗体の濃度が高くて、蛍光シグナルの濃度が高くなりません。むしろ、一次抗体の濃度が高いと、バックグラウンドが高くなり、多くの非特異的なバンドが現れます。

3. メンブレンの洗浄

- 3.1. インキュベーションステップ終了の約 10 分前に、1x Azure Fluorescent Blot Washing Buffer 300 ml を調製する。キットに含まれる Azure Fluorescent Blot Washing Buffer 濃縮液 30 ml を 270 ml の精製水 (Milli-Q quality または蒸留水) と混合する。この量は、実験を完了するのに十分な量です。
- 3.2. 新しいトレイに Azure Fluorescent Blot Washing Buffer 25 ml を加える。
- 3.3. インキュベーション（ステップ 2.6）終了後、メンブレンをインキュベートトレイからステップ 3.2 で調製した Azure Fluorescent Blot Washing Buffer の入ったトレイに移します。メンブレンの移し替えには、清潔な鉗子を使用します。メンブレンの移したタンパク質を含む側が上を向くように、オリエンテーションノッチの位置が同じであることを確認してください。
- 3.4. メンブレンを 2 回、毎回 30 秒から 1 分間、穏やかに攪拌しながらリンスする。
- 3.5. Azure Fluorescent Blot Washing Buffer を完全に除去するか、メンブレンを新しい清潔なトレイに移します。
- 3.6. メンブレンをさらに 3 回、それぞれ 5 分間穏やかに攪拌しながら洗浄し、その都度新しい Azure Fluorescent Blot Washing Buffer 25 ml に交換する。

- 3.4 のすぎは、ロッカーやシェーカーを使わず、手動で行った方が効率的です。メンブレンを均一にすぎ、余分な一次抗体インキュベーション溶液の大部分を除去するようにしてください。ただし、メンブレンの表面に傷がつかないように、攪拌はすべて静かに行う必要があります。メンブレンのブロックされた表面に傷やその他の損傷があると、蛍光性の二次抗体コンジュゲートを吸着する活性部位ができ、蛍光性のアーチファクトや高いバックグラウンドの原因となります。

4. AzureSpectra 二次抗体蛍光コンジュゲートによるメンブレンのプロロービング

- 4.1. 最後の洗浄工程で、二次抗体蛍光標識体混合物を調製します。Azure Fluorescent Blot Blocking Buffer 10 ml を新しい 15 ml チューブに移します。キットに含まれる標識コンジュゲートを 4 μ l ずつ加えます（希釈倍率 1:2500）。AzureSpectra NIR キットを使用する場合は、キットに含まれる IR700 および IR800 標識コンジュゲートをそれぞれ 1 μ l（希釈倍率 1:10,000）使用することができます。
- 4.2. 最後の洗浄工程が終了したら、Azure Fluorescent Blot Washing Buffer を取り除き、二次コンジュゲートミックスをメンブレンのあるトレイに加える。
- 4.3. メンブレンを二次抗体結合液と一緒に室温で 1 時間、穏やかに攪拌しながらインキュベートします。

- 二次抗体結合物を希釈する際は、チューブを数回転倒させながら穏やかに混合してください。ボルテックスは行わないでください。

5. 最終洗浄

- 5.1. インキュベーション溶液を除去し、Azure Fluorescent Blot Washing Buffer を用いて、ステップ 3.4-3.7 と同様にメンブレンを穏やかに攪拌しながら洗浄します。
 - 5.2. Azure Fluorescent Blot Washing Buffer を取り除き、Tween-20 やその他の洗剤を含まない PBS または TBS を 20~50 ml 加え、穏やかに攪拌しながら 5 分間メンブレンを洗浄します。
 - 5.3. メンブレンを清潔な鉗子で溶液から取り出し、ブラックバックの急冷シートの上に移します。メンブレンの付いたプラスチックシートを垂直に持ち、余分な液体をメンブレンから流出させます。
- ステップ 5.2 の目的は、Azure Fluorescent Blot Washing Buffer に含まれる Tween-20 をメンブレンから除去することです。Tween-20 を除去することで、AzureSpectraコンジュゲートの構造が安定し、メンブレンが乾燥したときに蛍光が保持されます。
 - メンブレンは濡れたままプラスチックシートに付着しているで、落ちることはありません。余分な液体を拭き取ったり、ティッシュで拭いたりすると、バックグラウンドが高くなり、ランダムな蛍光のアーチファクトが発生する可能性があります。余分な液体を拭き取ることは、バックグラウンドの増加やランダムな蛍光アーチファクトを引き起こす可能性があります。

最終洗浄工程の後、すぐにメンブレンをイメージングすることができます。AzureSpectra rb650/ms550 Western Kit で実施したプロットの場合、メンブレンが乾燥したときに最高の感度を得ることができます。これは通常15~30分かかり、メンブレンの外観が半透明から均一な白色に変化します。その後、周囲の温度と相対湿度により、30 分から 1 時間で蛍光は変化しないか、わずかに増加します。2 時間後、蛍光は最初の強度と最後の洗浄工程で Tween-20 がどれだけ除去されたかに応じて 20 ~ 40% 減少することがある。AzureSpectra IR rb700/ms800 および ms700/rb800 キットを使用して実施したプロットは、ウェットまたはドライでイメージングすることが可能です。

キットに含まれるAzureSpectraコンジュゲートの吸収および発光スペクトル（図1~図4）を確認し、イメージング装置の適切な設定を選択してください。ほとんどの場合、Cy3 および Cy5 蛍光色素のイメージングに適した設定は AzureSpectra 550 および 650 コンジュゲートのイメージングに適しており、IR680 および IR800 蛍光色素のイメージングに適した設定はそれぞれ AzureSpectra IR700 および IR800 コンジュゲートのイメージングに適しています。

トラブルシューティングとFAQ

ウェスタンブロットリングは、複数の工程を必要とするため、かなりの最適化が必要となります。ゲル上にロードするタンパク質の適切な量、一次抗体と二次抗体の最適な希釈率を経験的に決定する必要があります。以下に、よくある質問について説明します。

質問	回答
一次抗体の推奨希釈率を教えてください。	抗体の希釈は、メーカーの推奨する希釈率に従ってください。一次抗体の一般的な抗体希釈率は、1:250~1:5000です。高濃度の一次抗体および二次抗体を使用すると、プロット上のバックグラウンドレベルが高くなる可能性があります。
ニトロセルロース膜は使えますか？	ニトロセルロース膜は、自家蛍光が非常に強く、微量のタンパク質を検出することが不可能、あるいは非常に困難です。さらに、特殊な「低蛍光」PVDF膜のみが、高感度蛍光ウェスタンブロットリングアプリケーションに適しています。当社の経験では、最も性能の良いメンブレンはキットに付属しているものです。別のサイズのメンブレンが必要な場合は、ミリポア社の Immobilon-FL（カタログ番号：IPFL00010）を使用することができます。
キットで利用できる転写方式にはどのようなものがありますか？	現在、蛍光ウェスタンブロットリングのアプリケーションには、標準的なタンクトランスファー法を使用することを推奨しています。セミドライトランスファーは、特に緑色光で励起されたチャンネルで、比較的高い、不均一なバックグラウンドを発生させるため、蛍光アプリケーションには適していません。AzureのAzure Transfer Bufferは、迅速なウェットトランスファーに使用することができます。
ウェスタンアッセイを行った後、プロットを乾燥させ、何日後までイメージングを行うことは可能ですか？	プロットを乾燥させてから2時間以内に最高のパフォーマンスを得ることができます。AzureSpectra rb650/ms550 Western Kit を使用する際、乾燥したプロットの蛍光を保持するために、Tween-20 を完全に除去することが重要です。詳細はステップ 5.2 を参照してください。必要であれば、ステップ 5.2 をもう一回繰り返してください。この時点でメンブレンを乾燥させることができます。ただし、長期の保存により、タンパク質のシグナルレベルが低下することが予想されます。

現在使用しているブロッキングシステムで使用しているブロッキング液や洗浄液を使用することはできますか？	ブロッキング液や洗浄液を別のものにすることはお勧めしません。別の成分を使用すると、バックグラウンドが高くなったり、感度が低下したりすることがあります。他のブロッキング液を使用した後にメンブレンを乾燥させると、蛍光強度と蛍光色素の安定性がより低下することがあります。ご使用のブロッカーを使用する場合、メンブレンのブロッキングにはAzure Protein Free Blocking BufferまたはAzure Fluorescent Blot Blocking Bufferを使用し（ステップ2.4）、一次抗体のインキュベーション溶液の調製にはご使用のブロッカーを使用することをお勧めします（ステップ2.5）。
プロット上でシグナルを検出しない。	タンパク質標準物質を用いて、転写が成功したかどうかを確認します。陽性であれば、イメージングシステムの励起・発光フィルターが正しく設定されているか確認します。通常、AzureSpectra 550および650コンジュゲートではCy3およびCy5色素に最適化されたイメージングチャンネル、AzureSpectra 700および800コンジュゲートではIR680およびIR800色素の設定が機能します。少量のターゲットタンパク質を検出しようとする場合、まず一次抗体の濃度を上げてみてください。これがうまくいかない場合、二次コンジュゲートの濃度も上げてください。
私たちの研究室では、一般的にTris/Phosphateベースのバッファーを使用していますが、このキットで使用できますか？	最高の性能を保証するために、キットに付属のブロッキング液および洗浄液を使用することをお勧めします。ただし、異なるバッファー条件を必要とする場合は、大量のキット構成成分を使用する前に小規模のプロットをテストしてください。ただし、Azure Protein Free Blocking Buffer または Azure Fluorescent Blot Blocking Buffer 試薬を使用しない場合、メンブレンの乾燥時に蛍光の安定性を保護する効果のメリットが失われることがあります。

参考文献

1. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979; 76 (9): 4350-4354.
2. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem. 1981; 112(2):195-203.
3. Patton, Wayne F. A thousand points of light: The application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. Electrophoresis. 2000; 21: 1123-1144.

4.3. Azure HRP ストリッピングバッファー

化学発光ウェスタンブロットティング用のストリッピングバッファー

カタログ番号

- AC2154—HRP Stripping Buffer

保管

Azure HRP Stripping Buffer は室温（4℃～25℃）で少なくとも 1 年間は安定です。

警告及び注意事項

- Azure HRP Stripping Bufferは、研究用としてのみ使用できます。
- メンブレンや試薬を取り扱う際は、必ず手袋を着用してください。
- その他の安全情報については、MSDSを参照してください。
- 本製品は、製造上の欠陥がなく、適切な訓練を受けた担当者が提供されたプロトコルに従った場合に、説明どおりに機能することが保証されています。

ショートプロトコール

ステップ	備考
1. ブロットを20mLの水で5分間、室温で攪拌しながらリンスする。	
2. 20 mL HRP Stripping Buffer を使用し、室温で 5 分間攪拌しながらブロットを剥離する。ブロットが完全にストリッピングバッファーに覆われていることを確認する。	
3. ブロットを1x PBSTまたは1x TBSTで5分間攪拌しながら洗浄します。これを2回繰り返し、合計3回洗浄する。	
4. メンブレンをブロックし、抗体インキュベーションを行う。	

ヒント

- Azure HRP Stripping Bufferは、ニトロセルロース膜とPVDF膜の両方に適合します。
- ブロットのストリッピングはシグナル強度を低下させる可能性があるため、最良の結果を得るためには、発現量の低い抗原を最初にプローブしてください。

4.4. AzureRed蛍光タンパク質染色

ゲルおよびプロット用の蛍光性総タンパク質染色液です。

カタログ番号

- AC2124—AzureRed Fluorescent Protein Stain

保管

AzureRed Dyeは、付属の茶色いボトルに入れ、遮光して-15°C~-30°Cの冷凍庫で保存してください。AzureRed Powder AおよびPowder Bは、室温で1年間安定です。

警告および注意事項

- AzureRed total protein stainは研究用です。
- メンブレンや試薬を取り扱う際は、必ず手袋を着用してください。
- その他の安全情報については、MSDSを参照してください。
- 本製品は、製造上の欠陥がなく、適切な訓練を受けた担当者が同封のプロトコルに従った場合に、説明どおりに機能することが保証されています。詳しくは、保証の項をご覧ください。

キット内容(AC2124) AzureRed

染色液, 5 ml分

- AzureRed Powder A 4パック, 10.1g/パック
- AzureRed Powder B 23.4 g
- AzureRed Dye 5 ml

AzureRed Stain, 5 ml, キットは、20枚のSDS-PAGEミニゲル（8 cm x 11 cm）、4枚のフィルサイズ2Dゲル（17 cm x 17 cm）、または40枚のミニプロット（9 cm x 7 cm）の染色に十分である。

輸送および保管条件

製品は冷蔵または冷凍でブルーアイスまたはドライアイスで発送することができます。常温（27°C以下）での発送は、総発送日数が5日以内であれば可能です。受領後、AzureRed Dye は付属の茶色いオリジナルボトルに入れて、遮光し、-15 °C から -30 °C の冷凍庫で保管します。AzureRed Powder A および Powder B は、乾燥した場所で室温で保管することができます。

その他用意するもの

- 高純度水（蒸留水、Milli Q、または同等品）
- 100%エタノール
- 染色トレー
- ロッキング（シーソー）シェーカー

AzureRedについて

AzureRedは、タンパク質やペプチド中のリジン、アルギニン、ヒスチジン残基に可逆的に結合し、強い赤色蛍光を発する天然由来の小さな蛍光化合物であるエピコノ¹に基づいています²。この独自のメカニズムは、あらゆる化学組成の1Dおよび2Dゲル、PVDFおよびニトロセルロースプロット³⁻⁵上のタンパク質を高感度に定量し、質量分析との比類ない互換性を実現しています⁶⁻⁸。

励起・発光スペクトル

AzureRedの励起および発光スペクトルはFigure 4.8に示すとおりである。

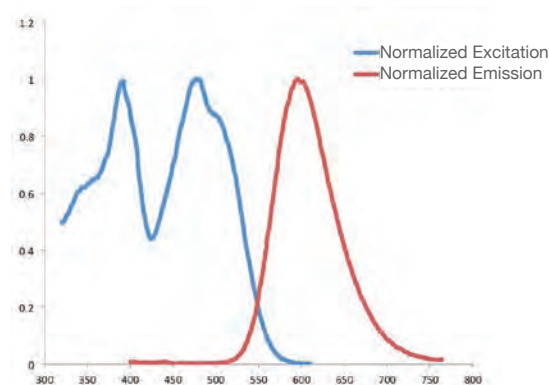
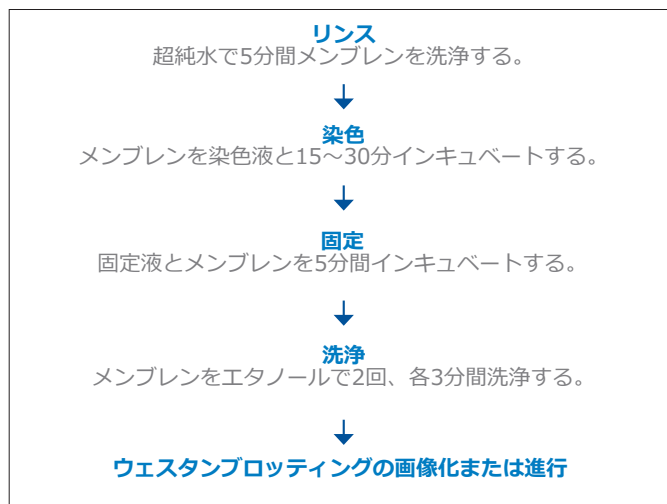


Figure 4.8. AzureRed Dyeの励起および発光スペクトル

AzureRedメンブレン染色プロトコルの概要



溶液の調製

染色前に、以下のようにFix, Stain, Washの各液を調製してください。これらの溶液は、室温で保存した場合、1年間は安定です。溶液に含まれる沈殿物や塵は、ゲル上に斑点を生じさせる。そのような場合は、使用前に溶液をろ過してください。AzureRed Powder A または B の各パッケージに含まれる試薬の量は、1L の溶液を調製するのに十分です。分包はしないでください。開封後は全量使用してください。大量に調製する場合は、複数のパッケージを使用してください。

- **固定液**—1Lのボトルに入れた高純度水850mlにAzureRed Powder A 1包（10.1g）を加え、溶けるまで混ぜる。150mlの100%エタノールを加え、よく混ぜる。
- **染色バッファー**—1Lのボトルに入れた高純度水1LにAzureRed Powder B 1包（23.4g）の内容物を加え、完全に溶けるまで混ぜる。
- **洗浄液**—1L瓶に高純度水850mlと100%エタノール150mlを入れ、混合する。

ゲルサイズ	溶液				
	固定	Stain		洗浄	固定
		染色バッファー	AzureRed 液		
8 cm x 11 cm x 1 mm (ミニゲル)	100 ml	50 ml	250 µL	100 ml	100 ml
13.3 cm x 8.7 cm x 1 mm (ミニ2Dゲル)	200 ml	100 ml	500 µL	200 ml	200 ml
17 cm x 17 cm x 1 mm	500 ml	250 ml	1.25 ml	500 ml	500 ml
17 cm x 17 cm x 1.5 mm	500 ml	250 ml	1.25 ml	500 ml	500 ml
15 cm x 19 cm x 1 mm	500 ml	250 ml	1.25 ml	500 ml	500 ml
15 cm x 19 cm x 1.5 mm	500 ml	250 ml	1.25 ml	500 ml	500 ml
20 cm x 25 cm x 1 mm	750 ml	375 ml	1.875 ml	750 ml	750 ml
20 cm x 25 cm x 1.5 mm	750 ml	375 ml	1.875 ml	750 ml	750 ml

Table 4.1. ゲルサイズに応じた溶液の量

Azure Imaging System	推奨する検出チャンネル
150, 200, 280, 300, 500	UV365
400, 600	Cy3
Sapphire Biomolecular Imager – RGB, RGBNIR	520

Table 4.2. AzureRedは、紫外光と緑色光の両方で画像化可能です。ただし、緑色の光で検出した場合に最も良い感度が得られます。

詳細プロトコール（プロット染色）

ステップ	備考
1. 洗浄 - 転写後、水洗を 5 分間行う。 - PVDF (2)またはニトロセルロース (3) のプロトコールに進んでください。	- 電気泳動中にゲルの底面からバッファーフロントを流すと、転写前に最良の結果を得ることができます。 - 染色中はメンブレンを乾燥させないでください - すべてのステップにおいて、小さなプロットには50ml、大きなプロットには400mlを使用します。
2. PVDF用プロトコール	
2a. 染色 - プロットのタンパク質の面を下にして染色液に入れます。 15～30分間、穏やかに振とうしながらプロットを染色する。	- 染色液を調製する：AzureRed Dyeを室温まで温める。よく混ぜる。小さなプロットの場合、125 μl の AzureRed Dye を 50 ml の Stain Buffer で希釈する。よく混ぜてください。 - 大きなプロットの場合、AzureRed Dye 1 ml を 400 ml の Stain Buffer で希釈してください。よく混ぜてください。
2b. 酸性化 プロットを 固定液に入れ、穏やかに振とうしながら 5 分間インキュベートする。	プロットは緑色になります。
2c. 洗浄 プロットの緑色のバックグラウンドが完全に除去されるまで、100%エタノールで3回、各2～3分間リンスします。	エタノールの代わりにメタノールを使用することも可能です。
2d. 乾燥 - プロットをペグに吊るすか、金網の上で乾燥させると、プロットが均一に乾燥します。 - プロットを完全に乾燥させてからイメージングを行います。	マルチプレックスウェスタンプロットに使用する場合、染色後のメンブレンは乾燥させないでください。洗浄が終わったら、そのままメンブレンのブロッキングを行います。
3. ニトロセルロース用プロトコール	
3a. 染色 - プロットのタンパク質の面を下にして染色液に入れます。 15～30分間、穏やかに振とうしながらプロットを染色する。	- 染色液を調製：AzureRed Dyeを室温まで温め、よく混ぜます。小さなプロットの場合、125 μl の AzureRed Dye を 50 ml の Stain Buffer で希釈し、よく混ぜます。 - 大きなプロットの場合、AzureRed Dye 1 ml を 400 ml の Stain Buffer で希釈し、よく混ぜます。
3b. 酸性化 プロットを 固定液に入れ、穏やかに振とうしながら 5 分間インキュベートする。	プロットは緑色になります。
3c. 洗浄 - 洗浄バッファーで1回、5分間、穏やかに振とうしながら洗浄します。 - 高純度水で2回、穏やかに振とうしながら5分間洗浄する。	

3d. 乾燥

- プロットを完全に乾燥させてからイメージングを行います。
- マルチブレイクスウェスタンブロットに使用する場合、染色後のメンブレンは乾燥させないでください。洗浄が終了したら、そのままメンブレンのブロッキングを行ってください。

詳細プロトコール（ゲル染色）

Step	Notes
1. 固定	• ゲルを 固定液 で穏やかに振とうしながら最低 1 時間固定する。 • 各ステップでの正しい容量は、Table 4.1 を参照してください。 • 1mm以上の厚いゲルや裏打したゲルの場合は、固定時間を1.5時間まで延長してください。 • 固定時間は一晩まで延長可能です。
2. 染色	• 染色直前に染色液を調製します。 • 固定液からゲルを取り出し、固定液のキャリーオーバーを最小限に抑えながら、染色液に入れる。 • 穏やかに振とうしながら1時間ゲルを染色する。 • 染色液を調製：AzureRed Dyeを室温まで温める。十分に混合した後、1容の AzureRed Dye を 200 容の 染色バッファーで希釈する。よく混ぜる。異なるゲルサイズに使用する溶液の容量については、Table 4.1 を参照してください。 • 染色液は時間の経過とともに劣化します。必要な分だけ調製し、すぐに使用してください。 • 厚さ1.5mmのゲルや裏打ちされたゲルの場合は、染色時間を1.5時間まで延長してください。染色時間を2時間まで延長しても、結果に影響はありません。 • 2時間以上放置しないでください。
3. 洗浄	• 染色液からゲルを取り出し、高純度水でリンスした後、洗浄バッファーで 30 分間、穏やかに振とうしながら洗浄する。 • 厚さ1.5mmのゲル、またはバックグラウンド蛍光が強いゲルの場合、洗浄時間を45分に延長してください。
4. 酸性化	• 洗浄液からゲルを取り出し、固定液に入れる。 • 固定液で 30 分間、穏やかに振とうしながらインキュベートする。 • バックグラウンド染色を減らすためにはこのステップを繰り返す、もしくは一晩に延長することができます。 • このステップを夜間に行う場合は、ゲルを遮光してください。
5. イメージング	• 標準的な蛍光スキャナーやCCDカメラシステムを用いて、610 nmの蛍光を検出します。推奨されるイメージング設定については、Table 4.2 を参照してください。 • 対応する励起光源は、緑色光、紫外光です。 • 610nmのバンドパスまたは560nmのロングパスフィルターを用いて蛍光を検出してください。

脱色

AzureRed 染色は可逆的であり、ウェスタンブロットティングなどのその後の解析のために染色を除去することができます。

1. **タンパク質の損失を最小限に抑えながら脱色するためには**—50 mM炭酸アンモニウムで一晩ブロットを洗浄します。
2. **PVDF膜を迅速に脱色するためには**—30mM炭酸アンモニウムを含む50%アセトニトリルでブロットを15分間洗浄する。
3. **ニトロセルロース膜を迅速に脱色するためには**—50%エタノールまたは50mM炭酸アンモニウムを含むメタノールで15分間ブロットを洗浄する。
4. **タンパク質ゲルを迅速に脱色するためには**—50%エタノールまたは50mM炭酸アンモニウム含有メタノールでゲルを15分～1時間洗浄する。

保存

ゲルは1%クエン酸に浸し、遮光して4℃で保存することができます。長期保存（6ヶ月まで）の場合は、AzureRed Dyeを1:200の割合で保存液に添加する。イメージング前には、ゲルをWash Solutionで15分×2回リンスしてください。固定液で15分間インキュベートすると、バックグラウンドが減少します。

プロットは乾燥した状態で、暗所、室温で保存することができます。

トラブルシューティングとFAQ

問題点	解決法
バックグラウンドが高い	- ゲルの取り扱いには、清潔なパウダーフリー手袋を使用し、粉塵の混入を避ける。 - 濃縮されたAzureRed Dyeは、希釈前に室温に戻し、十分に混合されていることを確認してください。 - ゲルを入れるに、染色液が完全に混合されていることを確認してください。 1つのトレイに1つのゲルだけを染色します。 - 高純度水（蒸留水、Milli-Q、または同等品）を使用してください。
シグナルが弱い、検出されない	- 染色工程でpHを確認します。pHは9.5から10.5の間である必要があります。固定液からの酸のキャリアオーバーにより、染色性が悪くなることがあります。 - CCDを使用した装置では、長時間の露光とそれに伴う加熱により、蛍光が弱くなることがあります。 - 染色濃縮液が室温に戻され、十分に混合されたことを確認してから希釈してください。 - アルカリ性条件下で2時間以上染色すると、タンパク質が不安定になり、ゲルマトリックスからタンパク質バンドが拡散してしまいます。
ネガティブ染色	- ゲルの作製には、高品質のSDSを使用してください。 - 固定時間を一晩に延長する。 - 固定液と洗浄バッファーを正しい容量で使用する。 - 洗浄時間を長くする。
斑点状のバックグラウンド	- ゴミや沈殿物を除去するためにバッファーをろ過する。 - ゲルを空気中の粒子から保護する。

参考文献

- Bell, P.J.L. and Karuso, P. (2003). Epicocconone, a novel fluorescent compound from the fungus *Epicoccum nigrum*. *Journal of the American Chemical Society*. 125, 9304-9305.
- Coghlan, D. R., Mackintosh, J. & Karuso, P. (2005). Mechanism of reversible fluorescent staining of protein with Epicocconone. *Organic Letters*. 7, 2401-240.
- Mackintosh, J.A., Veal, D.A. and Karuso, P. (2005). FluoroProfile, a fluorescence based assay for rapid and sensitive quantification of proteins in solution. *Proteomics*. 5, 4673-4677.
- Malmport, E., Mackintosh, J., Ji, H., Veal, D. & Karuso, P. (2005). Visualization of proteins electro-transferred on Hybond ECL and Hybond-P using Deep Purple Total Protein Stain. *GE-Healthcare Life Science News*. 19, 12-13.
- Mackintosh, J.A., Choi, H.-Y., Bae, S.-H., Veal, D.A., Bell, P.J., Ferrari, B.C., van Dyk, D., Verrills, N.M., Paik, Y.-K. & Karuso, P. (2003). A fluorescent natural product for ultra sensitive detection of proteins in 1-D and 2-D gel electrophoresis. *Proteomics*. 3, 2273-2288.
- Tannu, N.S. Sanchez Brambila, G.S., Kirby, P., Andacht, T.M. (2006). Effect of staining reagent on peptide mass fingerprinting from in-gel trypsin digestions: A comparison of Sypro Ruby and Deep Purple. *Electrophoresis*. 27, 3136 - 3143.
- Nock, C.M., Ball, M. S., White, I. R., Skehel, J. M., Bill, L. and Karuso P. (2008). Mass Spectrometric Compatibility of Deep Purple and SYPRO Ruby total protein stains for high throughput proteomics using large format two dimensional gel electrophoresis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 22, 881-886.
- Ball, M. S., Karuso, P. (2007). Mass Spectral Compatibility of Four Proteomics Stains. *Journal of Proteome Research*. 6, 4313-4320.

5

アプリケーションノート



AzureSpectra抗体による 3カラーウェスタンブロット

3つのタンパク質を一度に可視化 - AzureSpectra標識抗体で

化学発光検出を用いた従来のウェスタンブロットティング技術は、通常、一度に1つのタンパク質を検出するのに有効です。化学発光を使用して複数のタンパク質を評価するには、通常、ストリッピングしてリブロービングするか、サンプルを別々のアッセイに分割する必要があります。

蛍光抗体では、同一サンプル内の複数の目的タンパク質を同時に可視化すること、すなわちマルチプレキシングが可能です。適切なイメージングシステムを用いれば、異なる蛍光色素を持つ（スペクトルが重ならない）抗体を同時に検出することができます。Azure 600のようなデジタルイメージャーを使えば、3つのタンパク質を同時に可視化することができます。

なぜ、複数のタンパク質を一度に可視化する必要があるのでしょうか？ウェスタンブロットのデータにはしばしばローディングコントロールが使用されるため、マルチプレックスの利便性は明らかなメリットです。目的のタンパク質に対して異なる蛍光標識二次抗体をローディングコントロールとともに使用することで、分子量が近いタンパク質であっても、明確で定量可能な結果をすぐに解析することができます。さらに、タンパク質の発現データを発表する際には、定量性がますます望まれるようになっていきます。リン酸化タンパク質と非リン酸化タンパク質のように、2種類の異なるタンパク質がある場合はどうすればよいのでしょうか？異なるレーンを正確に比較するためにローディングコントロールを含めるには、3色目が必要になります。AzureSpectra標識抗体とAzure 600システムを使用すれば、3色ウェスタンブロットティングを簡単に行うことができます。

Azure 600イメージングシステムは、近赤外（NIR）2チャンネルと可視蛍光3チャンネルを搭載し、マルチカラー蛍光ウェスタンブロットティング用に設計されています。このアプリケーションノートでは、Azure 600とAzureの幅広い蛍光標識二次抗体を使用して、3色のウェスタンブロットを取得する手順を紹介します。あらかじめ標識された抗体だけでなく、Azureは一次抗体や二次

抗体を蛍光標識するために必要な抗体標識キットも提供しています。それぞれの蛍光色素の発光スペクトルは重複しないため、多重アッセイを容易に実施することができます。

材料と方法

電気泳動と転写

HeLa細胞ライセートを調製し、4-15% Mini-Protean TGXゲルで電気泳動した。各レーンにそれぞれ1、2、5、10、20 µgのライセートをアプライした。電気泳動後、Azure transfer buffer を用いてタンパク質を低蛍光PVDFメンブレンに転写した。

ウェスタンブロットティング

転写後、メンブレンを10分間ブロックし、5µgのマウス抗GAPDH、5µgのウサギ抗β-actin、5µgのラット抗tubulinと1時間反応させた。

ブロットを2回リンスし、25 mLのAzure IR洗浄バッファで5分間ずつ3回洗浄した。次に、ブロットを標識二次抗体（2µgのヤギ抗マウス-550、4µgのヤギ抗ラビット-700、および4µgのヤギ抗ラット-800）とともに1時間インキュベートした。インキュベーション後、ブロットをAzure IRウォッシュバッファで前と同様に洗浄し、25 mLのPBSで5分間リンスした。

ステップ	材料	カタログ番号
電気泳動	SDSポリアクリルアミドゲル	
転写	PVDFメンブレン	AC2105
	Azure Transfer Buffer	AC2127
ブロック	AzureSpectra Fluorescent Blot Blocking Buffer	AC2190
抗体	一次抗体	目的タンパク質に特異的な抗体
	Azure IR Wash Buffer	AC2145
	Goat-anti-rat 800	AC2138
	Goat-anti-rabbit 700	AC2128
	Goat-anti-mouse 550	AC2159
	PBS	

Table 1. 材料とカタログ番号

イメージング

PBS でリンスした後、ブロットを乾燥させてから Azure Biosystems 600 デジタル イメージャーでイメージングを行いました。

結果および結論

Azure 600抗体とAzureSpectra抗体により、同一サンプル中の3種類のタンパク質を同一ウェスタンブロット上で迅速かつ容易に検出することができます。蛍光ウェスタンブロットの正確な定量解析は、イメージング後すぐに行うことができます。

Figure 2は、3種類の一次抗体（抗Tubulin、抗 β -actin、抗GAPDH）と蛍光標識した二次抗体で検出したウェスタンブロットのデジタル画像です。個々のチャンネルはグレースケールで表示され、3色画像では3チャンネルを重ね合わせています（左上）。3種類のタンパク質を一度に可視化できることで、個々のウェスタンブロット実験から得られる潜在的な情報が増加します。より多くの情報を得ることで、より優れた定量分析が可能になり、データと理が強化されます。

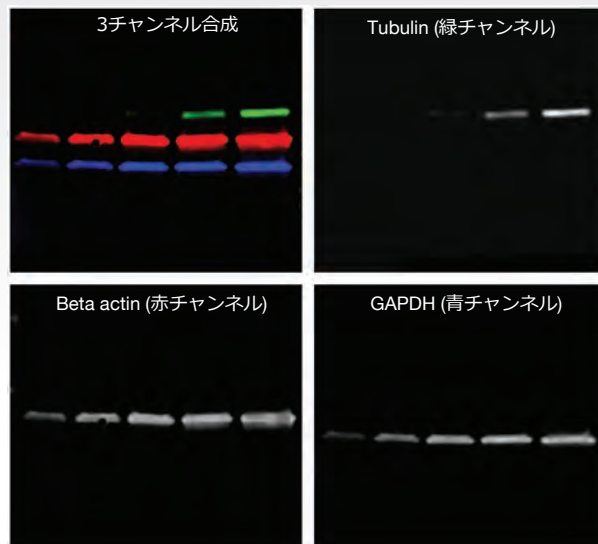


Figure 2. Azure Biosystems 600 イメージャーによる3色ウェスタンブロットのデジタル画像。1, 2, 5, 10, 20 μ gのHeLa細胞ライゼートをアプライしたレーン（左から右へ）。Tubulin（右上）、 β -actin（左下）、GAPDH（右下）についてブローピングした。以下の設定を使用した。光源 6/7/4、露光時間 1s/13s 204ms/677ms、フィルター位置 6/7/4、Aperture 6400、Focus 5000/5250/5000、bin level 1x1。

一次抗体	二次抗体	励起波長/ 検出波長	イメージング チャンネル
ラット抗Tubulin	AzureSpectra ヤギ抗ラット -800	785 nm/ 815 nm	IR800
ウサギ抗 β -actin	AzureSpectra ヤギ抗ウサギ -700	660 nm/ 720 nm	IR700
マウス抗GAPDH	AzureSpectra ヤギ抗マウス -550	551 nm/ 565 nm	Cy3

リン酸化タンパク質の 蛍光ウェスタンブロッティング による効率的検出

はじめに

リン酸化タンパク質の検出には、通常、非リン酸化種とリン酸化種の両方を表示することが必要である。従来の化学発光法では、リン酸化タンパク質と非リン酸化タンパク質のサイズ差が非常に小さいため、抗リン酸化抗体で検出し、次にストリッピングし、タンパク質特異的抗体でリプロービングする必要がありました。このためデータ品質に悪影響を及ぼす可能性があるほか、剥離と再プロービングに多大な時間と試薬が必要となる。

従来の化学発光法による検出の欠点は、蛍光二次抗体を使用することで克服することができます。救くとの重ならない2つの異なる蛍光色素で標識された二次抗体により、リン酸化種と非リン酸化種を同時に検出するマルチプレキシングが可能となります¹。

マルチプレックス機能はIR検出を目的のタンパク質のリン酸化バージョンと非リン酸化バージョンをより迅速に可視化するためだけではなく、定量をより正確に行うことを可能にしました。さらに、ストリッピングの過程で元のタンパク質が除去されることもあります²。ストリッピング前後のタンパク質の定量は、ストリッピングを行わない場合よりも精度が落ちます。したがって、修飾タンパク質と非修飾タンパク質を同時に可視化するプロトコルは、スピードの利便性だけでなく、正確性も向上させます (Table 1)。

方法

マルチプレキシングプロトコル。同じ分子量の2つのタンパク質を検出する

未処理およびIFN α 処理HeLa細胞ライセートをSDSポリアクリルアミドゲルにアプライし、電気泳動により分離した。タンパク質をAzure Transfer Bufferを用いてPVDFメンブレンに転写した。メンブレンを分割し、一方のメンブレンを化学発光検出プロトコルで検出し、もう一方のメンブレンを以下に詳述する蛍光抗体によるプロトコルでリプロービングした。

メンブレンを以下に詳述する蛍光抗体によるプロトコルで検出した。

化学発光検出

転写後、最初にリン酸化STAT1の検出を行った。まず、メンブレンを30分間ブロッキングした後、4 μ gのウサギ抗リン酸化STAT1抗体と1時間インキュベートした。次にメンブレンを25 mL Azure Fluorescent Wash Buffer (AFWB) で2回洗浄し、その後AFWBで5分間3回洗浄した。次に、3 μ gのHRP標識抗ラビット抗体と1時間インキュベートし、その後、前と同様にAFWBで洗浄した。洗浄後、プロットを10 mLの化学発光基質Radianceと2分間インキュベートした。プロットをAzure Imaging Systemで直接画像化した。

ウェスタンブロットの所要時間		
プロトコール	化学発光 時間 (分)	蛍光 時間 (分)
ブロッキング	30	10
一次抗体との反応	60	60
洗浄	15	15
二次抗体との反応	60	60
洗浄	15	15
基質との反応	2	–
PBS洗浄または水洗	–	5
	5	–
ストリッピング	5	
洗浄	15	
ブロッキング	30	
一次抗体との反応	60	
洗浄	15	
二次抗体との反応	60	
洗浄	15	
基質の反応	2	
総所要時間	6時間29分	2時間45分

Table 1. それぞれの検出法の所要時間

まず、メンブレンを高純度水で5分間リンスし、次にメンブレンをAzure HRP Stripping Bufferに5分間浸漬した。ストリッピング後、メンブレンを25 mL AFWBで2回手早く洗浄し、その後5分間ずつ3回洗浄した。

STAT1を検出するために、メンブレンを再度30分間ブロッキングし、4 µgのマウス抗STAT1抗体と1時間インキュベートした。メンブレンを25 mL AFWBで2回洗浄し、その後AFWBで5分間3回洗浄した。次に、3 µgのHRP標識抗ラビット抗体と1時間インキュベートし、その後、前と同様の方法でAFWBで洗浄した。洗浄後、プロットは10 mL Radianceと2分間インキュベートした。プロットをAzure Imaging Systemで再度画像化した。

蛍光抗体と赤外光による(IR)検出

転写後、メンブレンを室温で 10 分間ブロッキングした。目的のタンパク質をプローブするために、メンブレンを4 µgのウサギ抗リン酸化STAT1抗体および4 µgのマウス抗STAT1抗体とともに1時間インキュベートした。その後、メンブレンを25 mL Azure IR Fluorescent Wash Buffer (AIWB) で2回洗浄し、その後AIWBで5分間洗浄を3回行った。洗浄後、メンブレンを4µgの抗ラビット抗体-800および4µgの抗マウス抗体-700と1時間インキュベートした。プローブされたメンブレンは、前と同じ方法でAIWBで洗浄された。AIWB洗浄後、プロットを25mLのPBSで5分間リンスしてからイメージングを行った。プロットはAzure Imaging Systemで、IR-800 (緑) と IR-700 (赤) のフィルターを使用してイメージングした。

結果お結論

このアプリケーションノートでは、リン酸化STAT1の解析のために、2つの対応するウェスタンブロットメンブレンを化学発光検出またはIR検出を行った。IFNaで処理してSTAT1のリン酸化を誘導したHeLa細胞のライセート、未処理細胞のライセートを、それぞれゲル電気泳動で分離し、ウェスタンブロットのためにメンブレンに転写した。各プロットは、同じ一次抗体を用いてSTAT1およびリン酸化STAT1をプローブしたが、検出方法に応じて、HRP標識 (Figur 1) または蛍光標識 (Figure 2) された二次抗体を使用した。

ここ示す比較は、従来の化学発光法と比較して、蛍光検出は利便性と精度が向上していることを示すことを目的としています。方法間の主な違いは、使用する二次抗体と工程数です。化学発光検出法では、抗体のストリッピングなどの余分なステップがあるため、抗体の除去にムラが生じ、標的タンパク質が失われる可能性があります。また、化学発光検出ではネイティブなSTAT1およびリン酸化STAT1のデータを得るために約6.5時間の時間を要しました。蛍光二次抗体では、デジタルイメージャーで異なるIRフィルターを用いてSTAT1とリン酸化STAT1を同時に3時間以内にイメージングすることができました (Table 1参照)。どちらのプロトコルでも質の高い結果を得ることができるので、ニーズに合わせてプロトコルを選択することが重要です^{1,2}。

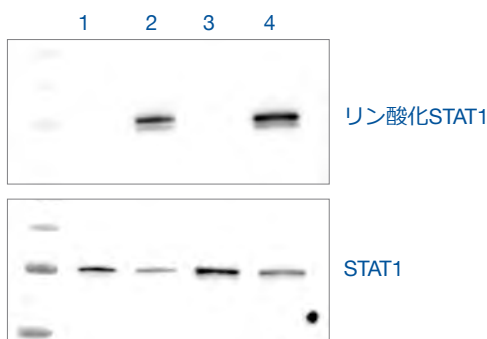


Figure 1. STAT1およびphospho-STAT1の化学発光ウェスタンブロット。プロットはまず抗リン酸化STAT1抗体でプローブされ、画像化された。ストリッピング後、プロットは抗STAT1抗体でリプロービングされ、画像化された。レーン Ladder, 1) 10 µg 未処理 HeLa ライセート, 2) 10 µg IFNα処理, 3) 20 µg 未処理, 4) 20 µg IFNα処理

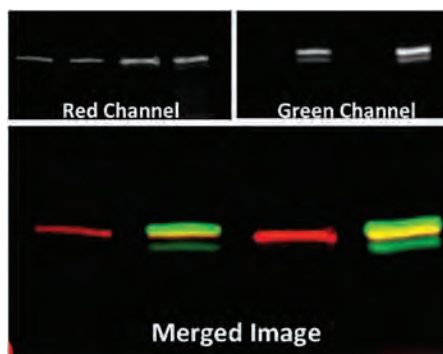


Figure 2. リン酸化STAT1およびSTAT1の蛍光ウェスタンブロット このプロットは抗リン酸化STAT1抗体および抗STAT1抗体、続いて蛍光二次抗体でプローブした後、Azure Imaging Systemで画像化された。右上はIR-800を使用した緑チャンネルの画像、左上はIR-700を使用した赤チャンネルの画像である。下の画像は両チャンネルを合成したもの。レーンは図1と同じ。

参考文献

1. Gingrich, J.C., Davis, D.R., Nguyen, Q. Multiplex Detection and Quantitation of Proteins on Western Blots Using Fluorescent Probes. *BioTechniques*. 2000. 29:636-642
2. MacPhee, D.J. Methodological Considerations for Improving Western Blot Analysis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2010. 61: 171-177.

製品および試薬	カタログ番号
Low Fluorescence PVDF Membrane	AC2105
Azure Transfer Buffer	AC2127
Azure Fluorescent Wash Buffer	AC2113
Azure IR Fluorescent Wash Buffer	AC2145
Goat-Anti Rabbit HRP Secondary Antibody	AC2114
Goat-Anti Mouse HRP Secondary Antibody	AC2115
AzureSpectra 700 Goat-anti-mouse Secondary Antibody	AC2129
AzureSpectra 800 Goat-anti-rabbit Secondary Antibody	AC2134
Radiance Chemiluminescent Substrate	AC2101
Azure HRP Stripping Buffer	AC2154

Azure 600による 3カラーウェスタンブロットの画像化

マルチカラー検出は、蛍光ウェスタンブロッティングの強力なアプリケーションです。異なる蛍光色素で標識された抗体を用いて、1枚のブロット上に2つ以上のタンパク質を検出することができます (Figure 1)。ウェスタンブロット上で複数のタンパク質を同時にアッセイできることは、化学発光検出と比較して蛍光検出の大きな利点です。化学発光検出では、ブロットをストリッピングしてリプロービングしたり、2つのタンパク質を検出するためにブロットを2枚使用したりする必要がありますが、この方法ではエラーやばらつきが生じる可能性があるからです。

定量的なウェスタン実験では、2つ以上のタンパク質を測定することが重要です。マルチカラー検出では、目的のタンパク質の量をハウスキーピングタンパク質の量に正規化することができ、サンプル間の目的のタンパク質のレベルを比較することが可能です。また、リン酸化タンパク質と非リン酸化タンパク質のように、サイズが似ていてゲル上で空間的に分離しにくいタンパク質も、マルチカラー蛍光検出を使えば同時に測定することができます。

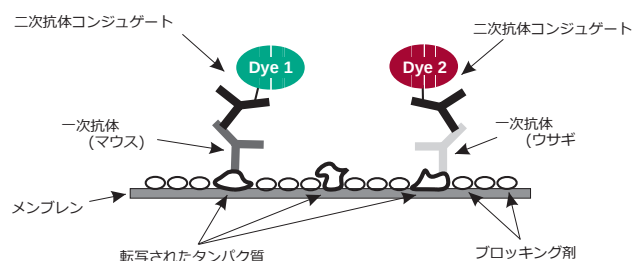


Figure 1

Azure 600イメージングシステムは、近赤外線 (NIR) 2チャンネルと可視光線3チャンネルのマルチカラー蛍光ウェスタンブロッティング用に設計されています。このアプリケーションノートでは、WesternDot® 試薬を用いて3色の蛍光ブロットを得るための手順を説明します。WesternDot® 試薬は、VIVID® テクノロジーで強化された Qdot® ナノクリスタルに結合した二次抗体です。WesternDot® 試薬 WesternDot® 585、WesternDot® 655 および WesternDot® 800 は、これらの蛍光色素がよく分離され、重複しない発光スペクトル

を持つため、3カラーウェスタンブロッティング実験に最適な組み合わせとなっています (Figure 2)。WesternDot® 試薬はすべて青色光または紫外線で励起されるため (Figure 2)、マルチプレックス蛍光ブロットで各タンパク質を個別にイメージングするには、各 WesternDot® 試薬の発光に対応した発光フィルターを備えた Azure 600 などの装置が必要です。

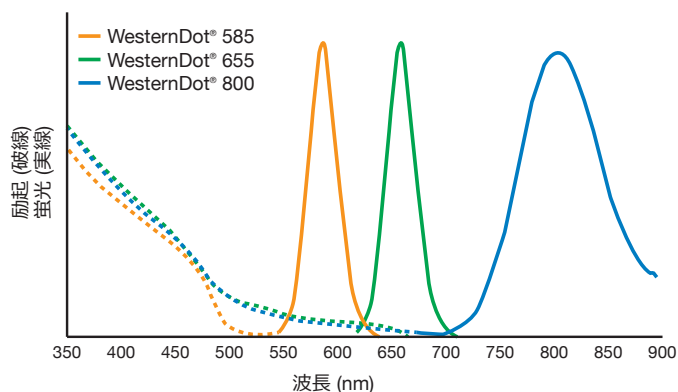


Figure 2

方法

EGFR またはリン酸化 AKT を発現するように誘導した細胞のライセート各約 10µg を混合し、Novex® Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus 10-well ゲルにロードした。電気泳動分離後、iBlot® 2 Gel Transfer Device を用いてニトロセルロースメンブレンにタンパク質を転写した。ウェスタンブロット処理は、iBind™ Western Deviceを用い、iBind™ FD Solutionの標準プロトコルで実施した。メンブレンは、3つの一次抗体：マウス抗EGFR (1:200希釈)、ウサギ抗リン酸化AKT (1:400希釈)、ニワトリ抗GAPDH (1:400希釈) を含むiBind™ FD溶液2mlでプローブされた。使用した二次抗体は、WesternDot® 585 ヤギ抗マウス、WesternDot® 800 ヤギ抗ウサギ、WesternDot® 655 ヤギ抗ニワトリ (表1)。すべての二次抗体は、iBind™ FDで1:100に希釈した。このブロットをTable 2に示す4つのイメージングシステムで撮像した。

結果

同じ3カラープロットを4種類のイメージングシステムで撮像した画像をFigure 3に示します。Odyssey装置

(Figure 3a) は可視蛍光色素を検出する機能がないため、IR800チャンネルで検出されたリン酸化AKTという1つのタンパク質のみが見えている。Typhoon 装置 (Figure 3b) にはQdot® 800 と Qdot® 655 を検出する設定があり、両チャンネルの合成画像が表示されます。655 nm で検出される GAPDH のみが表示され、リン酸化 AKT からのシグナルは表示されません。LAS-1000 装置 (Figure 3c) は、3 種類の WesternDot® 試薬すべてを励起できる青色光源を備えていますが、検出フィルターは 1 つだけなので、すべての蛍光シグナルが 1 枚の画像で検出されます。EGFR (585 nmで検出) とGAPDHは見えますが、リン酸化AKTは見えません。

使用した4つのイメージングシステムのうち、Azure 600 (Figure 3d) だけが3つのWesternDot®コンジュゲートをすべて検出できました。600は一般的な蛍光色素のデフォルト設定がされており、また手動で設定することも可能です。WesternDot® コンジュゲートをイメージングするために、カスタム設定を使用しました。プロットはCy2イメージング用の設定 (460 nm) で励起され、3種類のエミッションフィルター (Table 2) を使用して検出しました。Figure 3dの画像では3つのチャンネルが合成されており、WesternDot® 655は青、WesternDot® 585は赤、WesternDot® 800は緑で表示されています。

1枚のプロットで3つのタンパク質を検出できるようになったことでウェスタンブロット実験で得られる情報量が飛躍的に増加しました。例えば、2つのタンパク質とローディングコントロールを同時検出することもできます。

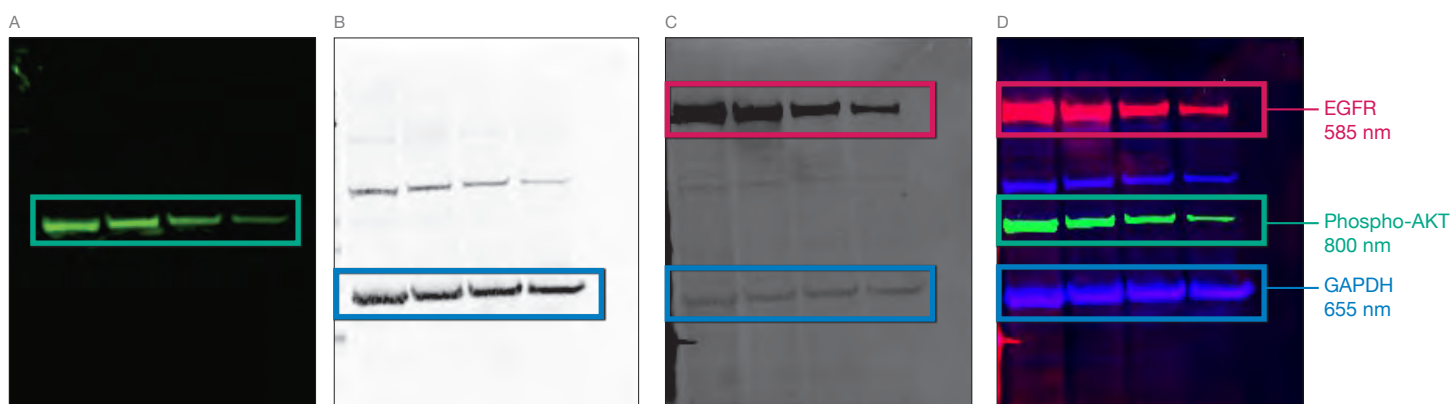


Figure 3. WesternDot® 試薬 WesternDot® 585、WesternDot® 655、WesternDot® 800 で検出した同じ 3 色のウェスタンブロットを、4 種類のイメージングシステムで取得した画像。

一次抗体	二次抗体	励起波長/蛍光波長
マウス抗EGFR	WesternDot® 585 ヤギ抗マウス	405-485 nm/585 nm
ウサギ抗リン酸化 AKT	WesternDot® 800 ヤギ抗ウサギ	405-485 nm/800 nm
チキン抗GAPDH	WesternDot® 655 ヤギ抗チキン	405-485 nm/655 nm

Table 1: 目的タンパク、一次抗体および二次抗体

イメージング システム (メーカー)	EGFR (WesternDot® 585)	GAPDH (WesternDot® 655)	Phospho-AKT (WesternDot® 800)
Odyssey (LI-COR)	NA	NA	800 channel
Typhoon™ FLA 9000 (GE Healthcare)	NA	Qdot® 655, PMT 1000	Qdot® 800, PMT 1000
LAS-1000 (Fujifilm Life Science)	Blue-light excitation 3-second exposure	Blue-light excitation 3-second exposure	Blue-light excitation 3-second exposure
600 (Azure)	Excite Cy2/ detect orange filter	Excite Cy2/ detect red filter	Excite Cy2/ detect 800 filter

Table 2: イメージングシステムと各ターゲットタンパク質に使用される設定

それによりタンパク質間やサンプル間の定量的な比較を行うことができます。WesternDot® 試薬は、3カラー実験を柔軟にデザインできるよう、様々な生物種特異性を持つものが用意されています。Azure 600と WesternDot®試薬を使用すれば、3カラーウェスタンブロットを簡単に行うことができます。

Lonzaの試薬とAzure Imaging Systemによる優れた電気泳動結果

はじめに

電気泳動試薬のリーダーカンパニーである Lonza と、ゲルおよびウェスタンブロットイメージングシステムのメーカーである Azure Biosystems が共同で、優れた DNA およびタンパク質ゲル電気泳動データを簡便に取得する方法を実演します。Lonzaは、迅速かつ信頼性の高い電気泳動を実現するために、プレキャストゲル、バッファー、染色キット、マーカーなど、ヌクレオチドおよびタンパク質電気泳動用の試薬一式を提供しています。プレキャストゲルを使用することにより、時間を節約し、厳密な品質管理により再現性のある結果を得ることができます。Azure Biosystems のデジタル画像処理システムである Azure Imaging System ファミリーには、ゲルの記録からマルチカラー蛍光ウェスタンブロットの定量イメージングまで、画像処理のニーズに応じたさまざまな装置が用意されています。各装置は、一般的に使用される DNA およびタンパク質染色をイメージングでき、白色透過光およびデュアル UV トランスイルミネーター、白色およびブルー ライトなどの落射照明光源を備えています。Azure Imaging Systemの装置は、ユーザーフレンドリーなインターフェースを備えており、最適な画像を簡単に撮影することができます。

このアプリケーションノートでは、DNAやタンパク質の電気泳動と分析において、両社の専門知識を組み合わせることで得られる高感度かつ高品質な結果を紹介しています。

FlashGel™ システムとAzure Imaging Systemによる高速ヌクレオチド電気泳動と高感度検出

Lonza社のFlashGel™システムは、プレキャストされたアガロースゲルカセットで構成され、付属のドックで泳動します。電気泳動では、ランニングバッファーの調製や個別の染色過程は必要ありません。各ゲルには、エチジウムブロマイドの5~20倍の感度を持つ独自の染色色素が含まれており、エチジウムブロマイドと同じ設定とフィルターで、ブルーライトまたはUVライトを使って画像化することができます。

Azure Imaging Systemには、FlashGel™ 染色の

イメージング用に、UV 透過光源、UV光源を青色透過光源に変換するブルーコンバージョンプレート付きの UV 透過光源、および青色落射光源といった複数のオプションが用意されています。

Figure 1にFlashGel™の2段ゲルをAzureイメージングシステムでUVトランスイルミネーターとブルーコンバージョンプレートを使用して取得した画像の分、感度、および品質が優れていることを示しています。露光時間はいずれも10秒としました。50 bpから1500 bpのサイズの断片が、2.2%アガロースゲル上で5分以内に良好に分離されました。ゲル全体および両段で高い再現性が見られ、画像はゲル全体で均一な強度を示し、優れたS/N比が得られています。サンプルとイメージングの詳細については、アプリケーションノートの最後にある実験の詳細を参照してください。

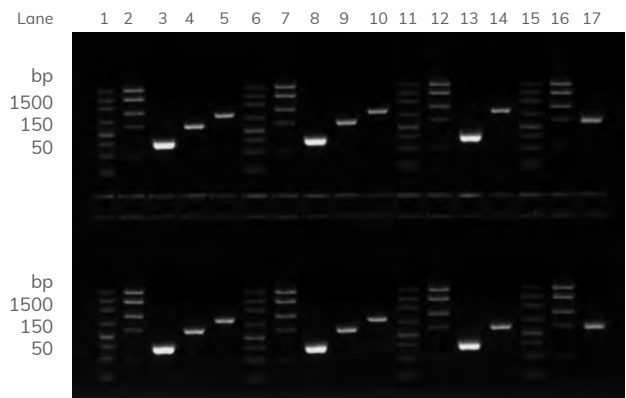


Figure 1. Azure Imaging SystemのUVトランスイルミネーターとブルーコンバージョンスクリーンを用いてイメージングされたFlashGel™。

Figure 2は、ブルーコンバージョンスクリーンとUVトランスイルミネーター (Figure 2A)、UVトランスイルミネーター (Figure 2B)、青色落射光源 (図2C) を用いて、FlashGel™システムとAzure Imaging Systemイメージングシステムをイメージングした際の検出限界の比較です。ブルーコンバージョンスクリーンによるイメージングでは、感度と低バックグラウンドの最適なバランスが得られており、どの画像でも0.2 ng以下の核酸を含むバンドが容易に検出されました。

アプライしたサンプルとイメージング設定の詳細については、後述の実験詳細をご覧ください。

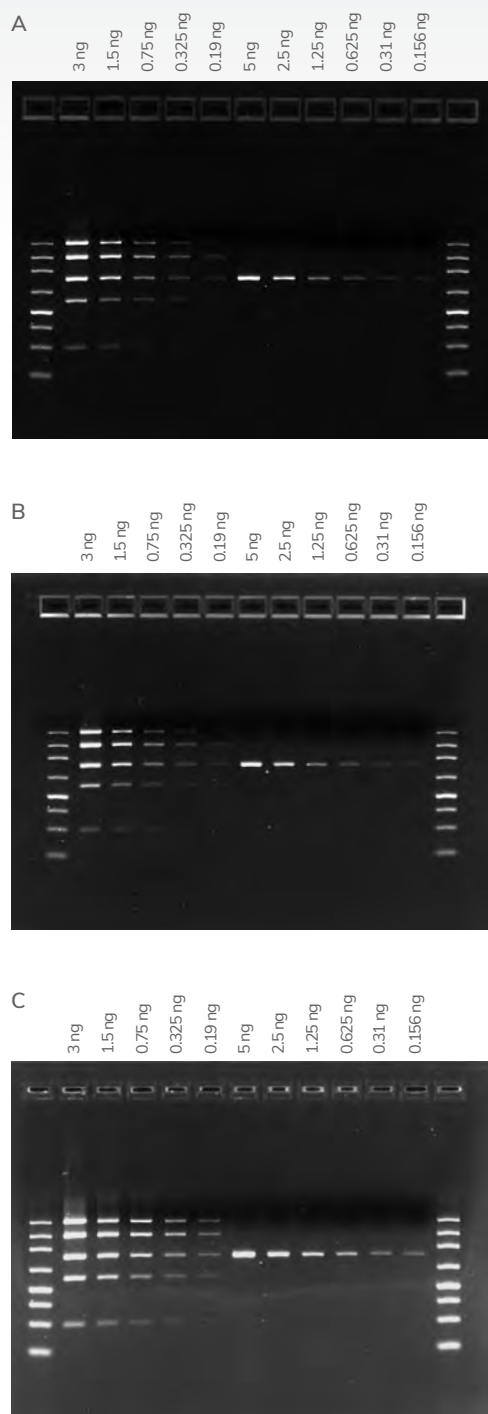


Figure 2. Azure Imaging SystemでFlashGel™をイメージングした際の感度を、(A) ブルーコンバージョンスクリーン付きUVトランスイルミネーター、(B) UVトランスイルミネーター（UV302）、(C) 青色落射光源で比較したもの。

Azureイメージング・システムによる、より大きなフォーマットLatitude™ゲルの正確な電気泳動と高感度検出

Latitude™ ゲルは、臭化エチジウムを含むプレキャストアガロースゲルです。このゲルは、高い精度と再現性のために厳密に作製されています。Figure 3は、Azureイメージング・システムとUVトランスイルミネーターを使用して撮影したミディ1%SeaKem™ LE Plusゲルを示しています。Azure Imaging Systemの広いイメージングエリアは、より大きなフォーマットのゲル（10x15cm）に対応し、均一な照明と露光により、ゲル全体および上下のウェル間でのサンプルの再現性の高い電気泳動を名確認示しています。アプライしたサンプルとイメージング設定の詳細については、後述の実験詳細をご覧ください。

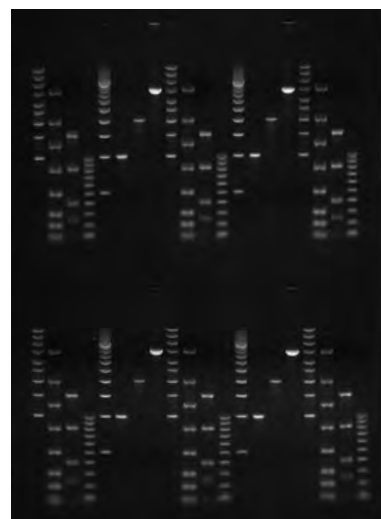


Figure 3. Azure Imaging SystemによるLatitude™ Midigelのイメージング

ProSieve™ EX Safe Stainで染色したタンパク質ゲルのAzure Imaging Systemによるイメージング

ルーチンのタンパク質電気泳動では、PAGEr™ Goldプレキャストトリス-グリシンゲルが便利で使いやすいパッケージでシャープな分解能を提供します。Figure 4は、LonzaのProSieve™ EX Safe Stainで染色したPAGEr™ GoldゲルをAzure Imaging Systemの白色透過照明で画像化したものです。この画像は、高感度と優れたS/N比を実証しています。アプライしたサンプルとイメージング設定の詳細については、後述の実験詳細をご覧ください。

Figure 5は、ProSieve™ EX Safe Stainで染色したPAGEr™ Goldゲルの検出限界を示しています。炭酸脱水酵素の2倍連続希釈液をゲルにアプライした。10 ng 未満のタンパク質を含むバンドが、画像で容易に可視化されています。

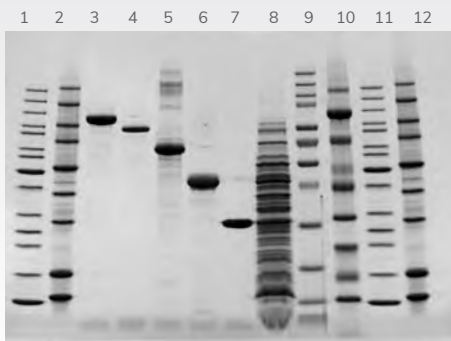


Figure 4. ProSieve™ EX Safe Stainで染色したPAGEr™ Goldタンパク質ゲルを、Azure Imaging Systemの白色透過照明で画像化した。

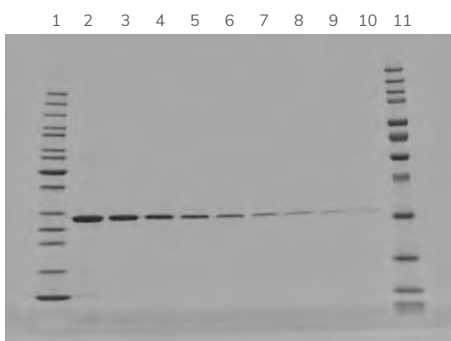


Figure 5. ProSieve™ EX Safe Stainで染色したゲルをAzure Azure イメージングシステムで高感度撮影したもの。

品質を犠牲にすることなく、 利便性を最大化

今回発表されたデータは、ロンザ社のプレキャストゲルやその他の試薬の利便性と、Azure Imaging Systemの柔軟で高解像度のイメージングを組み合わせることで、高品質の結果が得られることを実証しています。Azure Imaging SystemはLonza社独自のヌクレオチド FlashGel™に含まれる染色色素やタンパク質用 ProSieve™EX Safe Stainなど一般的に使用されているすべてのヌクレオチドおよびタンパク質染色に対応した光源とフィルターを提供します。Azure Imaging Systemの広いイメージングエリアは、小さなゲルから大きなゲルまでイメージングが可能で、ユーザーフレンドリーなインターフェースにより、画像の取り込みが簡単にできます。Lonza社の電気泳動製品についてはLonza社のウェブサイト、Azure Imaging Systemsについては www.azurebiosystems.com をご覧ください。

実験法詳細

Figure 1

DNAサンプルは、2.2% 16+1 well double tier

FlashGel™ DNA Cassette (Lonza product : #57032)で分離しました。サンプルは以下のようにアプライしました： レーン 1、4 µL 50-1500 bp FlashGel™ Marker (Lonza product #57033); レーン 2、4 µL FlashGel™ QuantLadder (Lonza product #50475); レーン 3、5 µL 150 bp DNA Fragment; レーン 4、5 µL 250 bp DNA fragment; レーン 5、350 bp DNA Fragment。もう一方の段にも同様にアプライしました。DNA fragmentは1X FlashGel™ Sample Buffer (Lonza)で希釈しました。ゲルは 275 V で 4.5 分間泳動しました。イメージングには、302 nm の UV トランスイルミネーターとブルーライトコンバージョンプレート (Azure AC1025) を使用しました。Azure Imaging System を使用し、露光時間は10秒で撮影しました。

Figure 2

DNA サンプルは 2.2% 12+1 ウェルシングルティア FlashGel™ DNA Cassette (Lonza product #57031) 上で分離されました。サンプルは以下のようにアプライしました： レーン 1、50-1500 bp DNA マーカー (Lonza 製品 #57032); レーン 2-6, FlashGel QuantLadder (Lonza 製品 #50475) の連続 2 倍希釈品 (レーン 2 の最小バンド (100 bp) 3 ng から) ; レーン 7-12, 400 bp DNA 断片の連続 2 倍希釈品 (レーン 7 5 ng から) ; レーン 13, 50-1500 bp DNA マーカー。ゲルは 275 V で 8 分間泳動しました。UVトランスイルミネーターとブルーコンバージョンプレート(Azure SKU AC1025)を用いたイメージングを10秒露光で実施しました。UVトランスイルミネーター (302nm) による撮影は、Azure Imaging SystemのAutoExposure機能を使用して実施しました。青色落射光によるイメージングを、2秒の露光時間で実施しました。

Figure 3

DNAサンプルは、エチジウムブロマイドを含む1% SeaKem LE Plusゲル (Lonza製品#57230)で分離した。サンプルは以下のようにアプライしました： レーン 1、4 µL 1-10 kb DNA Marker (Lonza 製品 #50471); レーン 2、8 µL FlashGel™ 100-4000 bp DNA Marker (Lonza 製品 #50473); レーン 3、8 µL FlashGel™ QuantLadder (Lonza 製品 #50475)。レーン 4, SimplyLoad™ 100 bp DNA ladder (Lonza product #50327); レーン 5, SimplyLoad™ 500 bp DNA ladder (Lonza product #50329); レーン 6, 1 kb DNA 断片 (BioVentures); レーン 7, 2 kb DNA 断片 (BioVentures); レーン 8, 4 kb DNA 断片 (BioVentures)。その後、他のゲルにも同様にアプライしました。ゲルはOwl B2泳動槽で1X TBE (0.5 µg/mL EtBr入り)を泳動バッファーとして115V (約5V/cm) 85分間泳動しました。ゲルを302 nmのUVトランスイルミネーター、露光時間6秒で画像化しました。

Figure 4

タンパク質サンプルは、4-20% PAGEr™ Gold gel (Lonza product #58105) で分離した。サンプルは以下のようにアプライしました： レーン 1、5µL PageRuler マーカー (Thermo Fisher)、レーン 2、4µL ProSieve™ Unstained マーカー (Lonza)、レーン 3、1µg β-galactosidase; レーン 4、2.5µg Phosphorylase B; レーン 5、2µg BSA; レーン 6、2µg Ovalbumin; レーン 7、2µg carbonic anhydrase; レーン 8、4.5 µL E. coli LE 392 lysate; レーン 9、5 µL ProSieve™ QuadColor™ Protein Marker (Lonza 製品番号 193837); レーン 10、6.5 µL ProSieve™ Color Marker (Lonza); レーン 11、5 µL PageRuler Marker (Thermo Fisher); レーン 12、3 µL ProSieve™ Unstained Marker (Lonza)。

ゲルは200Vで40分間泳動しました。電気泳動後、ゲルを直ちに ProSieve™ EX Safe Stain (Lonza 製品番号 00201455) に入れ、電子レンジで 55 秒間加熱し、20 分間振とうして染色を行いました。その後、染色液を捨て、水を加え、余分な染色液を除去するためのペーパータオル1枚とともに電子レンジで温め脱色しました。ゲルは、White Light Table (Azure AC1029) を使用して開口度と焦点距離のデフォルト設定で、Azure Imaging Systemにより画像化した。

Figure 5

タンパク質サンプルは、4-20% PAGEr™ Gold gel (Lonza product #58105) で分離した。サンプルは以下のようにアプライしました： レーン 1、PageRuler Marker (Thermo Fisher); レーン 2-10、レーン 2 の 2 µg のタンパク質から始まる炭酸脱水酵素の 2 倍連続希釈; レーン 11、ProSieve™ QuadColor™ Protein Marker (Lonza 製品#193837)。ゲルは200Vで40分間泳動しました。電気泳動後、Figure 4と同様にゲルを染色し画像化した。



www.azurebiosystems.com • info@azurebiosystems.com

Copyright © 2018 Azure Biosystems. All rights reserved. The Azure Biosystems logo and Azure Biosystems® are trademarks of the Company. All other trademarks, service marks and trade names appearing in this brochure are the property of their respective owners. Some components and technology of the FlashGel™ System are sold under licensing agreements. The nucleic acid stain in this product is manufactured and sold under license from Molecular Probes, Inc. and the FlashGel™ Cassette is sold under license from Invitrogen IP Holdings, Inc. and is for use only in research applications or quality control, and is covered by pending and issued patents. Dark Reader is a trademark of Clare Chemical Research, Inc. The FlashGel™ Dock technology contains Clare Chemical Research, Inc. Dark Reader® transilluminator technology and is covered under US Patents 6,198,107; 6,512,236; and 6,914,250. The electrophoresis technology is licensed from Temple University and is covered under US Patent 6,905,585. All other FlashGel™ trademarks herein are marks of the Lonza Group or its affiliates.

Lonza

Azure Imager Systemでの DNA色素の検出限界

はじめに

ゲルを用いたDNAの検出は、1972年にAaijとBorst¹によって初めて報告され、その後、分子生物学の基礎となる技術となっています。DNAの高感度化に伴い、低濃度DNAの正確な定量がますます望まれています。

ゲルを用いたDNA検出は、従来、ゲルキャスティング時にエチジウムブロマイド (EtBr) を添加する方法が一般的でした。しかしながら、EtBrは二本鎖DNAのインターカレーションに起因する変異原性があり、DNAの複製や転写に影響を与える可能性があるため、EtBrの使用は好まれなくなってきています。

また、EtBrは低濃度では有害廃棄物に分類されないが、多くの組織で有害廃棄物として扱われ、多大な費用がかかります。泳動後のゲルをEtBrで染色することで、有害廃棄物の発生量を減らすことはできますが、作業者が変異原にさらされることから生じる問題には対処できません。このため、様々な非変異原性DNA色素が開発されているが、普及するにはEtBrの感度に匹敵するか、それを上回るものである必要があります。デジタル画像処理技術の進歩に伴い、非変異原性DNA色素 (Safe Dye) は、その使いやすさとダイナミックレンジの広さから人気が出てきています。そこで、Azure Biosystems 社の Azure Imagers を使用して、さまざまな DNA 染料の検出限界 (LoD) を評価しました。

方法

サンプル調製

各バンドの DNA 濃度が既知の New England Biolabs Quick Load 1kb DNA Ladder を水と 6X ゲルローディング色素で 1:1 に連続希釈しました (希釈率はTable 1 を参照のこと)。

ゲル作製と電気泳動

1x TAEで0.8%アガロースゲルを作製し、各希釈液10 μ L をアプライした後、1x TAEを泳動バッファーとして70Vで120~150分間泳動しました。1枚のゲルにEtBrを1:10,000の割合で加え作製し、他のゲルは色素なしで作製して後染色した。後染色は、EtBr、EZ-Vision[®] Bluelight、SYBR[®] Gold、SYBR[®] Green、SYBR[®] Safe のいずれかをTAEバッファーで1:10,000に希釈し、30分間染色した。

ゲルイメージング

染色後、ゲルはAzure 200と600の両方のイメージャーで画像化しました。EtBrで染色したゲルはUVトランスイルミネーター (302nm) で、それ以外のゲルはオレンジフィルター付きの青色落射光で撮像しました。すべての場合において、画像は自動露出設定を使用して撮影しました。Azure 200と600で作成された画像の間に感度の違いは検出されず、検出限界の違いは色素に依存することが確認されました。

バンド	4kb	3kb	2kb
レーン	DNA量 (pg)/10 μ L		
1	4125	15625	6000
2	2063	7813	3000
3	1031	3906	1500
4	516	1953	750
5	258	977	375
6	129	488	188
7	64	244	94
8	32	122	47

Table 1. DNAラダー希釈.

結果および結論

このアプリケーションノートでは、様々なDNA色素の感度を評価しました。濃度既知の1kbのDNAラダーを連続的に希釈し、サンプルをアガロースゲル電気泳動で分離しました。1つのゲルはEtBrで染色し、他のゲルは全て後染めしました。2kb のバンドを検出したサンプルゲル画像をFigure 1に、DNA 染色試薬の LoD の要約をTable 2に、それぞれ示します。。

簡単に説明すると、EtBrによるゲルの後染めは、EtBrを加えたゲルと同じLoDを得ることはできなかった。すべての代替DNA色素は、大きなDNA断片を観察する場合、EtBrの後染色と同様のLoDを示した。EtBrは、EZ-Vision® Bluelight、SYBR® Gold、SYBR® Greenと比較して、小さな断片を検出する際に低いLoDを示し、SYBR® Safeは同一のLoDを示しました。

これらの結果は、作業者が変異原性EtBrにさらされる機会を減らすと同時に、有害廃棄物の量を減らそうと考えているラボが、検出限界の低いDNA色素を受け入れる必要がないことを示唆しています。

参考文献

1. Aaij, C. & Borst, P. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta* 269, 192-200 (1972).

バンド	4kb	3kb	2kb
検出限界 (pg)			
EtBr (ゲル作製時)	32	122	47
EtBr (後染色)	64	244	94
EZ-Vision® Bluelight	32	244	188
SYBR® Gold	32	122	94
SYBR® Green	32	244	94
SYBR® Safe	32	122	47

Table 2. DNA色素のLoDのまとめ。グレーの網掛けは検出限界の高さを示す。

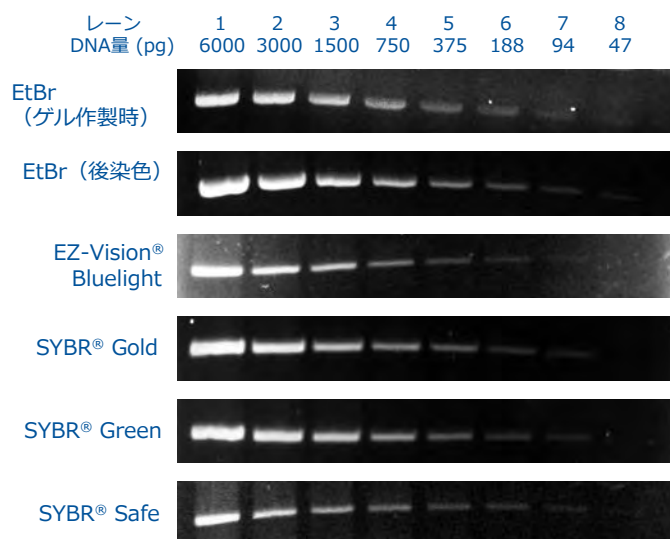


Figure 1. サンプルのゲル画像。DNAラダーの2kbバンドを示す代表的なプロット。

ニワトリ胚のウイルス負荷のイメージング

はじめに

ニューカッスル病ウイルス（NDV）は、鳥類、特に一般的に高密度で飼育されている家禽類において、ヒトへの感染が可能で、深刻な伝染病となる危険性が高い病気です。

NDVの影響は、ヒトでは軽度ですが、鳥類ではより顕著で、宿主の年齢や種、ウイルスの株によって異なります。NDVの3つの株は、病原性のレベルが異なり、鶏卵での特徴がよく分かっています。中程度の病原性を持つ株は主にニワトリ胚の臍の部分に感染し、より病原性の高い株は他の組織に無差別に感染することが知られています。

そのため、家禽のウイルス負荷のメカニズムとともに、さまざまなウイルス株の影響を調べる研究が数多く行われてきました。しかし、このような研究は、生体内のウイルス量を正確かつ迅速に評価する能力にしばしば限界がありました。Azure 600のような高感度高解像度イメージングシステムの開発により、ニワトリ胚の蛍光タグ付きNDVを迅速かつ容易に画像化し、様々な胚組織におけるウイルス負荷をある程度定量化することが可能になりました。

方法

ニワトリの胚をE10にウイルス感染させ、さらに72時間インキュベートしました。胚をeGFPでタグ付けされた100-1000PFUの強毒または非病原性の組み換えNDVに感染させ、非感染のコントロールと比較した。胚をペトリ皿に置き、Azure 600で青色落射光イメージングモードを使用して、自動キャプチャーでイメージングを行った。

結果

Figure 1は、非病原性ウイルスに感染した胚と、感染していない胚（陰性対照）を並べて示したものです。感染胚では、非病原性ウイルス株が主に臍帯組織に局限していることがわかります。

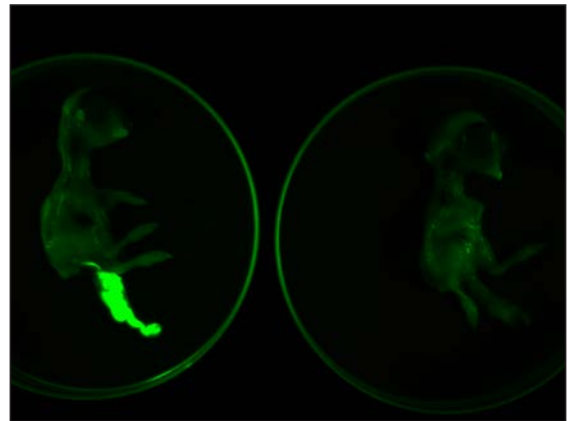


Figure 1. NDV eGFP No-VIR (left) and Negative Control (right).

Figure 2は、同じ非病原性ウイルスに感染した胚と、より強毒なNDVに感染した胚を並べて撮影したものです。強毒型のウイルスは、無差別に胚に感染し、胚のいたるところでウイルスが検出されます。

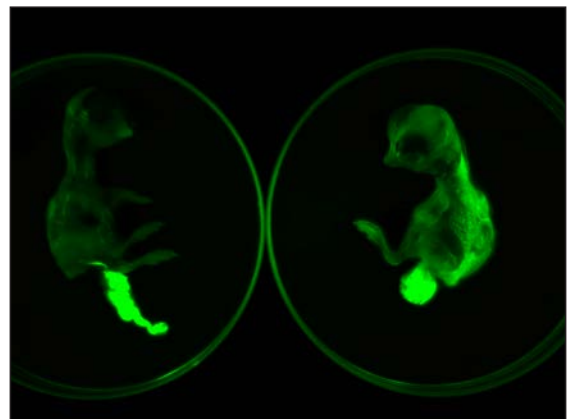


Figure 2. NDV eGFP No-VIR (left) and NDV eGFP VIR (right).

Figure 3は、陰性対照である非感染胚と比較した病原性感染の程度を示したものです。

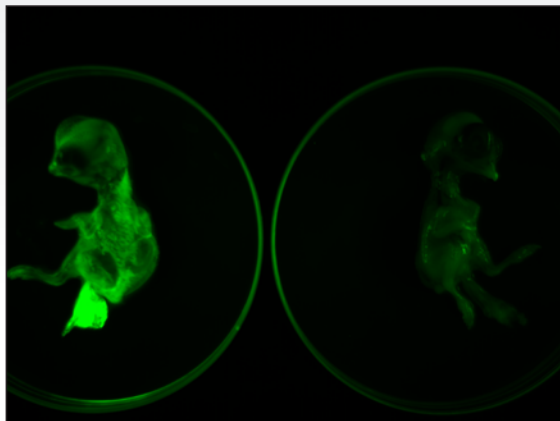


Figure 3. NDV eGFP VIR (left) and Negative Control (right).

結論

Azure Biosystems 600 のような蛍光イメージャの有用性は、ウェスタン ブロットティングにとどまらず、蛍光励起を利用した数多くのアプリケーションに広がっています。このアプリケーション ノートでは、そのようなアプリケーションの 1 つである、高解像度の定量化可能な画像の生成を可能にする、動物モデルにおける蛍光タグ付きウイルスのイメージングを紹介します。

謝辞

画像を提供していただきましたRay Izquierdo-Lara、Ana Chumbe、Katherine Calderon、Manolo Fernandez（FARVET SAC（ペルー））に感謝します。

Sapphire Biomolecular Imager による燐光体イメージング

はじめに

蛍光・化学発光イメージング技術とその検出器はより高感度・高選択的になってきているが、ストレージホスファースクリーンからの光刺激発光は、特に電気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA)、酵素アッセイ、in vivo イメージングなどの用途で、多くの研究者にとって依然として重要なアプリケーションである。

従来の燐光体イメージャーは単機能であることが多く、大きな設置面積を必要としました。Azure Biosystems の Sapphire Biomolecular Imager は、レーザー励起と光子増倍管 (PMT) 検出の使用により、非常に優れたダイナミックレンジとイメージ品質で、フィルムレスオートラジオグラフィ用のストレージホスファースクリーンをスキャンする機能を提供します。コンパクトな Sapphire Biomolecular Imager は、卓越した可視蛍光および近赤外スキャン、化学発光および白色光イメージングも搭載しており、ラボの主力製品として活躍します。

材料と方法

サンプル調製

^{14}C 標準試料 (American Radiolabeled Chemicals) のスライス ($1000 \sim 0.004 \mu\text{Ci/g}$) を BAS-MS ストレージホスファースクリーン ($0.9 \text{DPM/mm}^2/\text{hr}$ 感度) に 3 時間照射した。

ストレージホスファースクリーンイメージング

露光後、Sapphire Biomolecular Imager の Phosphor Imaging モジュールを用いて、標準的な励起および検出設定でストレージホスファースクリーンを画像化した。サンプルの定量と検出限界 (LOD)、ダイナミックレンジ (DR) を算出した。

結果および結論

Sapphire Biomolecular Imager は、標準的なストレージホスファースクリーンから、広いダイナミックレンジで高品質な画像を取得できます (Figure 1)。AzureSpot 解析ソフトウェアを用いたサンプルの定量を行いました。結果、American Radiolabeled Chemicals ^{14}C 標準試料を 3 時間照射した場合の LOD は $0.036 \mu\text{Ci/g}$ とわかりました。さらに、 1000 から $0.036 \mu\text{Ci/g}$ までの高い線形ダイナミックレンジが得られました ($r^2 = 0.99$ [Figure 2])。

結論として、Sapphire Biomolecular Imager は、蛍光体、化学発光体、近赤外線のサンプルを単一のコンパクトなフットプリントで迅速にイメージングする能力を提供しながら、後の定量化のための高品質の画像を生成するストレージホスファースクリーンをイメージングすることが可能です。



Figure 1. American Radiolabeled Chemicals Carbon-14 標準試料を Storage Phosphor Screen に 3 時間暴露し、Sapphire Biomolecular Imager で画像化した。

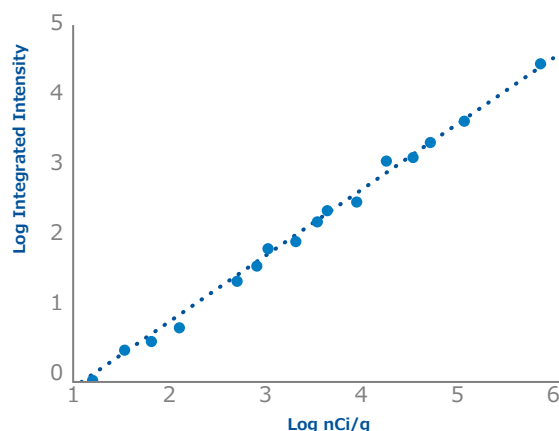


Figure 2. 試料: ^{14}C オートラジオグラフィ標準試料; イメージング: リン光; LOD: $0.036 \mu\text{Ci/g}$; DR: 5.4 桁; 直線性: $R^2 = 0.99$

ステップ	製品	カタログ番号
サンプル調製	American Radiolabeled Chemicals – ¹⁴ C standard	ARC0146F
ストレージ ホスファースクリーン	BAS-IP-MS – Storage phosphor screen	IS1011
	Cassette for Phosphor Imaging	IS1012
ホスファースクリーン プレート イメージング	Azure Biosystems – Sapphire Biomolecular Imager with Phosphor Imaging Upgrade	IS1002, IS1004

Table 1. 材料とカタログ番号

In-Cellウェスタンブロッティング によるタンパク質のin-Situ検出

はじめに

ウェスタンブロッティングは、1979年に3つのグループによって初めて報告されました。それ以来、基本的な手法や使用する試薬、画像処理技術に多くの改良が加えられ、ウェスタンブロッティングの用途は大きく広がり、今日のライフサイエンスの基礎となるプロトコルとなっています。

しかし、ウェスタンブロットの一般的なワークフローは、この間ずっと変わっていません。サンプルは単離され、タンパク質が抽出され、標準化されます。その後、ゲル電気泳動でタンパク質を分離し、転写し、一次抗体と二次抗体でプロービングしてから可視化します。このように多くのステップを経るウェスタンブロッティングのプロトコルは、設備、トレーニング、試薬、そしておそらく最も重要なこととして、時間に対して大きな投資を必要とします。

標準的なウェスタンブロットのプロトコルは、サンプルから画像までの作業に2日間を要します。したがって、多数のサンプルを分析する場合や最適化を行う場合、ウェスタンブロッティングが研究ワークフローのボトルネックになることは容易に想像がつきます。

細胞内ウェスタンブロッティングは、細胞内タンパク質を正確に定量するウェスタンブロッティングと、ELISA法の再現性、迅速な処理、ハイスループットを組み合わせた標準プロトコルを根本的に見直したものです。

細胞は滅菌プレート上で培養され、その場で固定・透過処理されます。その後、一次抗体とアイソタイプ特異的蛍光結合二次抗体を用いて通常通りラベリングを行います。近赤外線（NIR）スペクトルのコンジュゲートは、組織培養プラスチックによく見られる自家蛍光やノイズを低減するために一般的に使用されています。

Azure Biosystems Sapphire™ Biomolecular Imager は、可視蛍光波長 (488 nm と 520 nm) だけでなく、2つの近赤外線チャンネル (658 nm と 785 nm) で可視化できるように設計されていて、ウェル内で多重イメージングを行うことが可能です。このマルチプレックス機能により、1つのウェルで複数のタンパク質を評価することができ、タンパク質のトータルバージョンとリン酸化バージョンを見る場合や、ウェル内の標準物質を検出してプレート全体の定量を可能にする場合などに有効です。

光電子増倍管 (PMT) とアバランシェフォトダイオード (APD) 検出器を用いたレーザー励起システムにより、Sapphireはシグナル選択性、感度、イメージング速度において、インセルウェスタンブロッティングに理想的な選択肢を提供します。

材料と方法

培養細胞

HeLa細胞を連続希釈し、滅菌済み96ウェル組織培養プレートに0.2 mL/ウェルで播種し、約80%コンフルエントになるまで培養した。

すべてのウェルを100%メタノールで固定し、室温で15分間透過処理を行った。

In-cellウェスタンブロッティング

固定と透過処理後、細胞をPBSで洗浄し、PBS中の1%魚肝ゼラチンで室温・1時間ブロッキングしました。その後、4℃で一晩抗 α -Tubulin抗体と抗 β -Actin抗体と反応させました。サンプルは、AzureSpectra 550 および AzureSpectra 800 結合二次抗体と 60 分間インキュベートする前に PBS で 3 回洗浄しました。

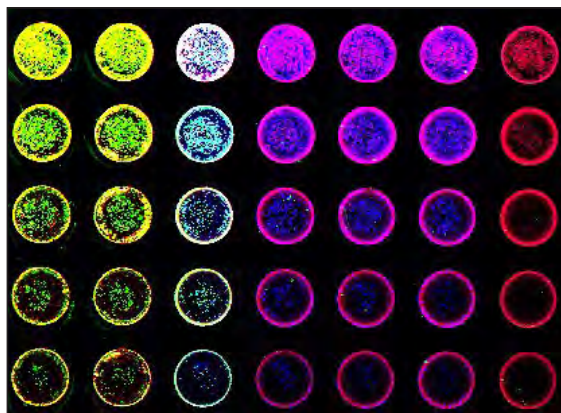


Figure 1. 細胞内ウェスタンブロットの代表的な画像

二次抗体は、RedDot™1 Nuclear Stainと共にインキュベートし、全細胞数の標準化を行いました。プレートは、イメージングの前に前述のように洗浄しました。

イメージング

洗浄後、プレートをAzure Biosystems Sapphire™ Biomolecular Scannerでプレートフォーカス設定を用いてイメージングした。

結果および結論

このノートでは、Azure Biosystems の Sapphire™ Biomolecular Scannerを使用して、細胞内タンパク質をin situ で定量できることを実証しています。HeLa 細胞を96 ウェルプレートで培養し、 α -Tubulin抗体と β -Actin抗体、そしてそれぞれ AzureSpectra 550 と AzureSpectra 800 で結合したアイソタイプの二次抗体でプロービングしました。すべてのウェルに RedDot™1 Nuclear Stain をインキュベートし、全細胞数の標準化を行いました。画像は、Azure Biosystems Sapphire™ Biomolecular Scanner を使用して取得され、Figure 2 に示されています。Figure 2 に示す代表的な画像は、高い感度と特異性が達成されていることを示しています。

96ウェルプレートでインセルウェスタンブロッティングを行うことにより、細胞内タンパク質の発現をin situで正確に測定することができ、1枚のプレートで複数の刺激、エンドポイント、目的のタンパク質、複製を評価するハイスループットな方法論を提供します。NIR 抗体と Azure Biosystems Sapphire™ Biomolecular Scanner を使用することにより、インウェル マルチプレックス分析の可能性も広がり、スループットのさらなる向上が期待されます。

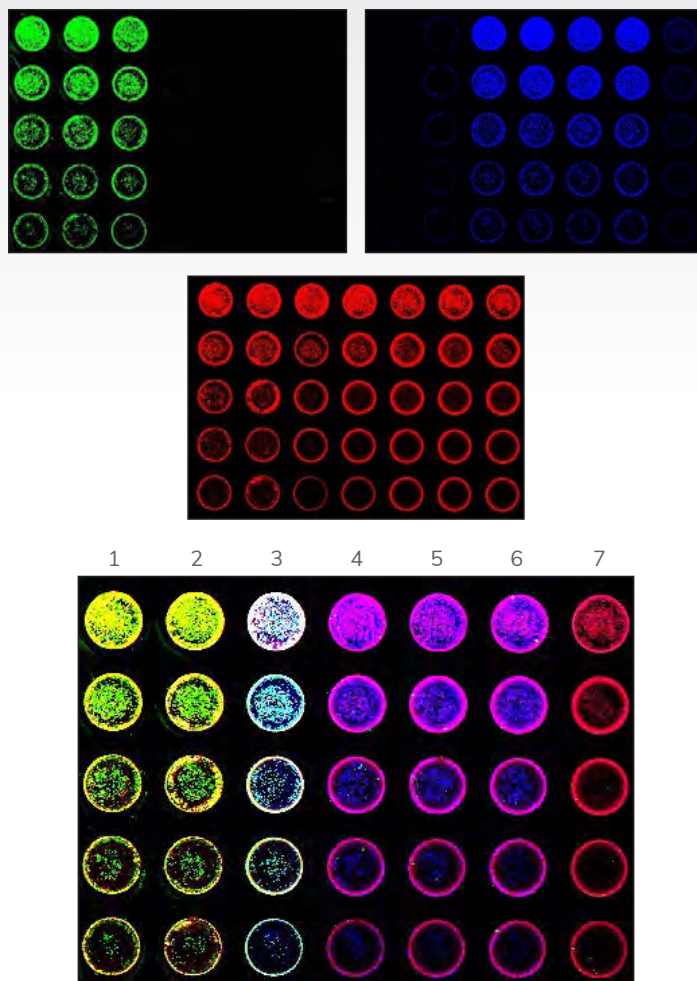


Figure 2. 連続希釈したHeLa細胞を96ウェルプレートに播種し、培養、固定、透過処理を行った。A) カラム1-3は、AzureSpectra 550（緑）を用いて β -Actinのプロービングを行った。B)カラム3-6は、AzureSpectra 800（青色）を用いて Tubulin のプローブを行った。C) プレート全体を、正規化コントロールとして RedDot1 Nuclear Stain で染色した（赤）。D) 個々のチャンネルを同時にスキャンし、Sapphire Capture Softwareを使用して1つの合成画像に合成した。

4カラー検出による アッセイ効率の向上

はじめに

ウェスタンブロットのマルチプレキシング（1枚のブロット上で複数のタンパク質を同時に検出する手法）の分野は、急速に発展しています。化学発光アッセイでは、1つのタンパク質を検出した後、時間をかけて何度もストリッピングとリプロービングを繰り返すため、タンパク質とそれに対応するシグナルが失われる可能性があります。初期のウェスタンブロットマルチプレックスイメージングシステムでは、1つのブロット上に2つのスペクトル的に異なる蛍光色素をイメージングすることができた。研究者はこの技術を利用して、1枚のブロット上でローディングコントロールと目的のタンパク質をアッセイしたり、2つの異なるタンパク質を比較したり、他のアプリケーションノートで説明されている多くの方法論を考案したりすることができました。

我々は以前、Azure Biosystems 600デジタルイメージャーが提供する蛍光および近赤外線（NIR）イメージング機能を組み合わせることにより、3つのタンパク質を同時にイメージングして、この2チャンネルの方法論を改良したことを説明しました。

このノートでは、Azure Biosystems Sapphire™ Biomolecular Imager を使用した 4カラーウェスタンブロット マルチプレキシングというさらなる改良について説明します。一度に 4 色の画像を同時に取得できるため、ウェスタンブロットの効率が大幅に向上し、有意義な定量比較が可能になります。4 色のウェスタンブロットティングは、4 つのスペクトル的に異なる蛍光色素と Sapphire の選択的レーザーベースの励起および高感度光電子増倍管 (PMT) とアバランシェ フォトダイオード (APD) 検出システムの使用によって実現されます。

材料と方法

電気泳動と転写

1.25から5μgのHeLa細胞ライセート（一部は様々な量のトランスフェリンを添加）を4-15% Tris-Glycineゲルで電気泳動しました。電気泳動後、Azure Transfer Buffer を用いて、タンパク質を低蛍光PVDFメンブレンに転写しました。

4カラーウェスタンブロットティング

その後、メンブレンをAzure Fluorescent Blot Blocking Bufferで30分間ブロッキングし、ラット抗チューブリン、ウサギ抗ベータアクチン、ニワトリ抗GAPDH一次抗体、AzureSpectra Labeling Kitを用いてあらかじめ AzureSpectra 490色素で標識した抗トランスフェリン（青）抗体と反応させました。

ブロットを Azure Fluorescent Blot Washing Buffer でリンス・洗浄した後、AzureSpectra 標識二次抗体（ヤギ抗ラット 550（緑）、ヤギ抗ウサギ 700（赤）、ヤギ抗チキン 800（灰））とインキュベートしました。インキュベーション後、ブロットをAzure Florescent Blot Washing Bufferで洗浄し、最後にPBSでリンスしました。

4カラーウェスタンブロットの画像化

PBS でリンスした後、ブロットを乾燥させてから Azure Biosystems Sapphire™ Biomolecular Imager でイメージングを行いました。

結果および結論

このアプリケーションノートでは、1枚のウェスタンブロットで4つのタンパク質を同時に検出しています。HeLa細胞サンプル、またはトランスフェリンを添加したHeLa細胞サンプルは、チューブリン（緑）、β-アクチン（赤）、GAPDH（灰）抗体と、アイソタイプの二次抗体、および直接分析用にあらかじめAzureSpectra 490色素を結合したトランスフェリン（青）抗体でプローブされました。

ウェスタンブロットは Azure Biosystems Sapphire™ Biomolecular Scanner を使用して画像化され、Figure 1 はトランスフェリン (a)、チューブリン (b)、ベータアクチン (c) および GAPDH (d) の各波長で取得したグレースケール画像、および合成したカラー化画像 (e) を示しています。これらの画像から、本手法により、高い感度、特異性、バックグラウンド信号の少なさが実証され、迅速かつ正確な定量分析が可能となりました。

1枚のプロットに4つのタンパク質を画像化できるため、ウェスタンブロッティングの効率が大幅に向上し、時間と貴重なサンプルの節約、より良い定量分析が可能になりました。また、この方法論は、タンパク質：タンパク質相互作用の研究やオンプロットの総タンパク質とリン酸化タンパク質のアッセイなど、新しいアッセイの使用も可能にします。

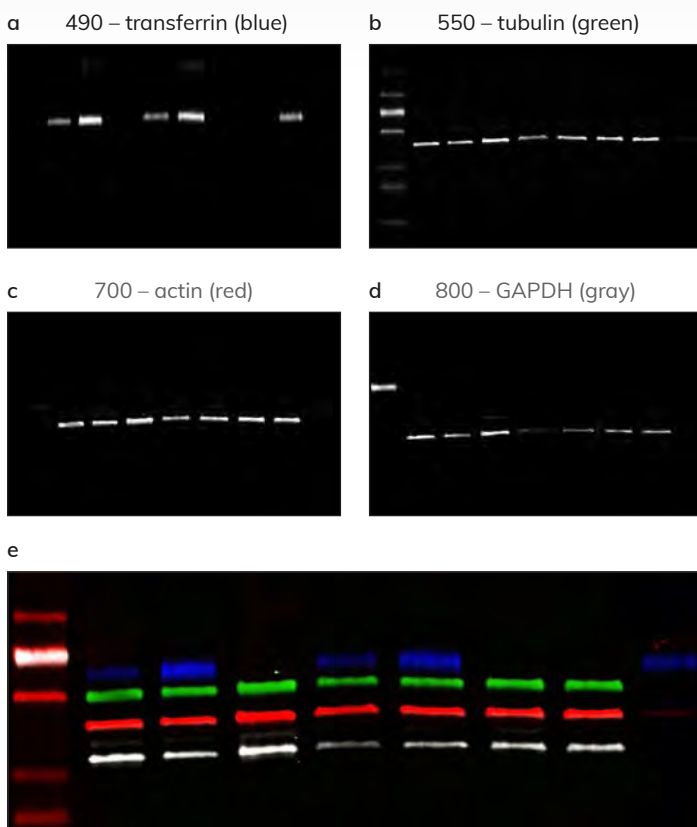


Figure 1. Azure Biosystems Sapphire™ Biomolecular Imager で撮影した 4-color Western Blot のデジタル画像。トランスフェリン (a)、チューブリン (b)、アクチン (c)、GAPDH (d) は、蛍光抗体と近赤外線ターゲット抗体を用いて1枚のプロット上でプローブした。画像は、Azure Biosystems Sapphire™ Biomolecular Imager を使用して指定波長で撮影し、4 色マルチプレックス画像 (e) に統合しました。4 つのタンパク質すべてを、バックグラウンドの自家蛍光やチャンネル間の漏れを示すことなく、高感度かつ特異的に検出することが可能であった。

ステップ	製品	カタログ番号
電気泳動・転写	4-15% Tris-Glycineゲル	N/A
	PVDF メンブレン	Azure, AC2105
	Azure Transfer Buffer	Azure, AC2127
ブロッキング・抗体標識	AzureSpectra Fluorescent Blot Blocking Buffer	Azure, AC2190
	AzureSpectra Labeling Kit - 490	Azure, AC2185
抗体反応	一次抗体	目的タンパク質に特異的な抗体
	AzureSpectra Goat-anti-rat-550	Azure, AC2162
	AzureSpectra Goat-anti-rabbit-700	Azure, AC2128
	AzureSpectra Goat-anti-chicken-800	Azure, AC2137
	PBS	N/A

Table 1. 材料とカタログ番号

AzureRed蛍光タンパク質染色による ウェスタンブロットにおける正確な正規化

はじめに

定量ウェスタンブロッティングの重要な要素は、標的タンパク質から得られたバンド強度を、サンプル中の物質質量に比例してのみ変化するはずの参照物質に対して正規化することです。従来は、「ハウスキーピングタンパク質」（異なる種類のサンプル間で一貫して発現していると考えられるタンパク質）がこのような基準として使用されてきました。しかし、場合によっては、ハウスキーピングタンパク質はサンプル間で一貫して発現していない可能性があり、実験条件によって、一般的に使用されているハウスキーピングタンパク質の発現が変化する可能性があることを示す研究も発表されています。¹ また、ハウスキーピングタンパク質が、目的のタンパク質と十分に類似したレベルでサンプル中に存在せず、検出の線形範囲に収まらない場合もあります。²⁻³

最近ではハウスキーピングタンパク質に依存する欠点の多くを回避する代替正規化方法として、Total Protein Normalization (TPN) が一般的になってきています。この方法では、目的のタンパク質の量をレーンにロードされたタンパク質の総量と比較します。TPN は、単一のタンパク質を標準とする場合と比べて、サンプル間の標準タンパク質量の予期せぬ変化の影響を受けにくいなどの利点があります。1 つのタンパク質の強度を見るのではなく、各レーンの合計密度を測定します。TPN テクノロジーはシグナルの正規化に関連する多くの問題を排除するため、出版物では正規化に総タンパク質シグナルを使用することが推奨されています。⁴

AzureRed Fluorescent Protein Stainは、ゲルやブロット用の定量的な総タンパク質染色液で、ウェスタンブロッティングなどのダウンストリームタンパク質分析に適合しています。AzureRedは、ゲルからメンブレンへの均一なタンパク質転写を確認するための転写後染色や、TPNプロトコルの一部として定量ウェスタンブロットを染色するなどの染色アプリケーションに最適です。

このアプリケーションノートでは、AzureRed Fluorescent Protein Stainが、その広くリニアなダイナミックレンジと感度から、TPNに理想的であることを実証しています。さらに、標準的なウェスタンブロットワークフローと完全に互換性があり、AzureRed ステインを使用した3カラー蛍光ウェスタンブロット（3種類のタンパク質が検出）を総タンパク質で正規化することによって実証しています。

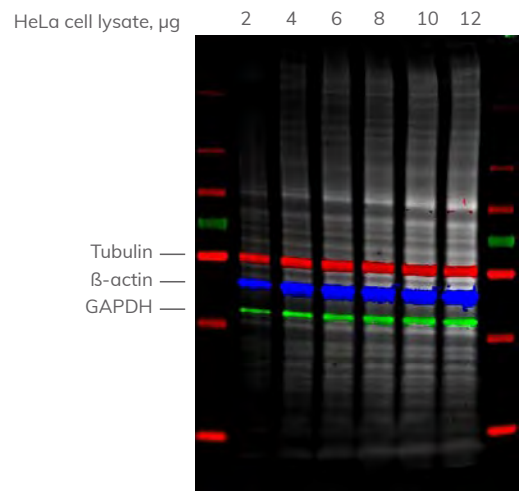


Figure 1. AzureRedは、3つの標的タンパク質と同時に画像化されます。ゲルには、HeLa細胞ライセートの希釈液をロードしました。転写後、ブロットをAzureRed で染色し、脱色工程なしに、Tubulin、β-actin、GAPDHの検出を行いました。ブロットはSapphire Biomolecular Imagerの4つのレーザーでそれぞれスキャンされました。この4チャンネルのオーバーレイでは、総タンパク質 (AzureRed 染色) を灰色で、Tubulinを赤で、β-actinを青で、GAPDHを緑で表示しています。

方法

HeLa ライセートのサンプルをポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、ゲルから低蛍光 PVDF メンブレン (Azure Biosystems; AC2105) にタンパク質を転写しました。タンパク質転写後、ブロットをAzureRed Fluorescent Protein Stain (Azure Biosystems; AC2124) で染色し、PVDF 染色プロトコルに従って染色しました。

転写後、プロットを水で短時間洗浄し、プロトコルにしたがってAzureRed 染色液で30 分間の染色手順の後、プロットを AzureFluorescent Blot Blocking Buffer (Azure Biosystems; AC2190) を用いてブロッキングし、ウェスタンブロット検出用の一次抗体とインキュベートしました(Table 1)。

このプロットをSapphire Biomolecular Imager で4 つのレーザーでプロットを同時にスキャンすることにより画像化した。3 種類の標的タンパク質についてはTable 1 に示す波長のレーザーで検出し、AzureRed は520nm レーザーで検出しました。

得られた画像はAzureSpot ソフトウェアを用いて解析しました。

目的タンパク質	一次抗体	二次抗体	検出レーザー
Tubulin	Rat anti-tubulin	Goat anti-rat AzureSpectra 700	658nm
β -actin	Rabbit anti- β -actin	Goat anti-rabbit AzureSpectra 490	488nm
GAPDH	Chicken anti-GAPDH	Goat anti-chicken AzureSpectra 800	784nm

Table 1 標的タンパク質と使用抗体及び検出波長

結果

AzureRed Fluorescent Protein Stain で染色した3 色ウェスタンブロットをSapphire Biomolecular Imager でスキャンすると、4 チャンネルの合成画像が得られます (Figure 1)。4 つのチャンネルをすべて画像化し、画像取得と同時に位置合わせを行うため、後から画像の位置合わせをする必要がなく、ワークフローに画像処理のステップを追加することはありません。得られた4 つの画像を重ね合わせた合成画像では、3 つのタンパク質同士や総タンパク質を簡単に比較することができます。

シングルチャンネルイメージを見ることで、AzureRed と3 つのタンパク質のダイナミックレンジを視覚的に確認することができます (Figure 2 A-D)。各レーンの総タンパク質と標的タンパク質のシグナル強度はAzureSpot ソフトウェアを使用し量しました。Figure 2E は各シグナル強度とロードされたタンパク質量との関係を示しています。AzureRed 染色の定量性は、ロードしたタンパク質量に対して優れた相関性 ($R^2 = 0.994$) を示しています。この相関は、ハウスキーピングタンパク質として頻繁に使用される3 つのタンパク質のいずれよりも優れていました。

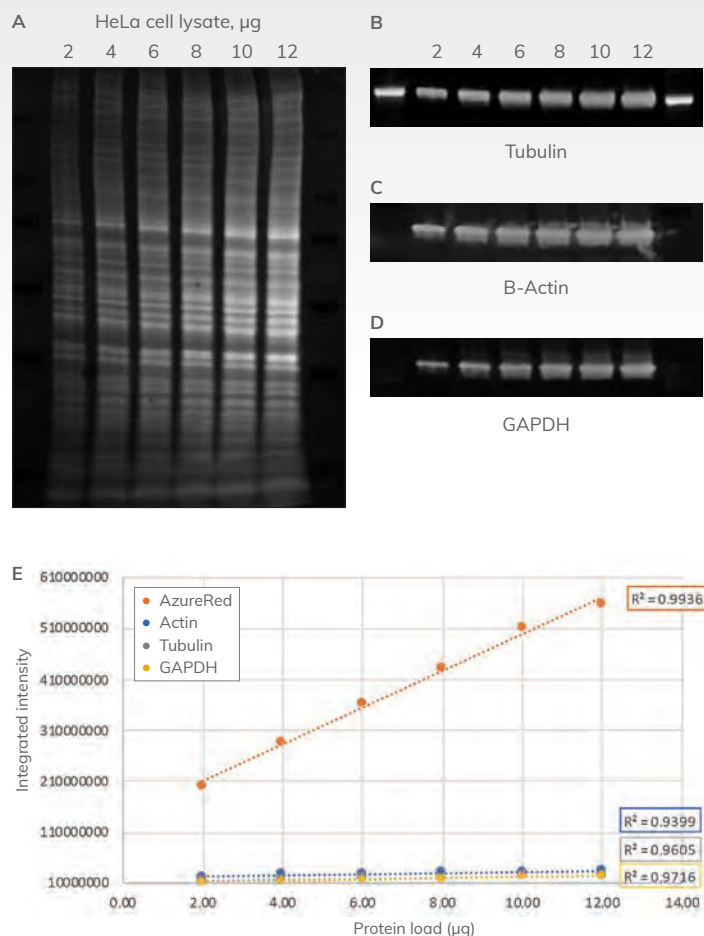


Figure 2. AzureRedは、一般的なハウスキーピングタンパク質と比較して、より広い線形ダイナミックレンジを有しています。A) 全タンパク質に対するAzureRed染色 B) Tubulin C) β -actinおよびD) GAPDHのシングルカラーチャンネル画像。実際のタンパク質搭載量に対するAzureRedシグナルの優れたダイナミックレンジが画像(A)に表示されています。総タンパク質とハウスキーピングタンパク質のシグナルをAzureSpotソフトウェアで定量し、得られた値を各サンプルのロードしたタンパク質量に対してプロットしました(E)。AzureRedは、一般的なハウスキーピングタンパク質よりも優れた相関性とはるかに広いダイナミックレンジを示しました。

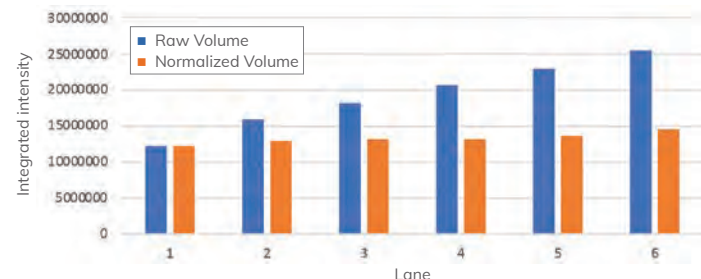


Figure 3. AzureRed Fluorescent Protein Stain を使用して評価した、総タンパク質に対して正規化されたTubulin シグナル
Tubulin バンドはAzureSpot ソフトウェアを用いて定量化しました。正規化前のTubulin 量 (青色バー) および総タンパク質に対して正規化した量 (オレンジ色バー) を示しています。AzureRed を用いてシグナル量を正規化することで、サンプルのローディングの誤差やメンブレンへの転写の差を補正することができます。

タンパク質のシグナルを正規化するための基準として、総タンパク質のAzureRed シグナルを使用した場合を Figure 3 に示しています。各レーンのTubulin シグナルを同じレーンの総タンパク質シグナルで正規化すると、正規化値のサンプル間での変動係数はわずか4% と優れた結果が得られました。

結論

AzureRed Fluorescent Protein Stain は、定量的な蛍光ウェスタンブロットングに理想的な製品です。広く直線的なダイナミックレンジにより、AzureRed はロードされたタンパク質量の変動を考慮した効果的な標準物質として機能します。AzureRed の主な特徴は、既存のワークフローに簡単に組み込む（転写後、ブロッキング前 Figure 4）ことができることです。AzureRed 色素は、一般的に使用されている蛍光プローブと干渉することなく同時に検出できるため、1 枚のプロットで複数のタンパク質を評価することが可能です。マルチカラープロットの総タンパク

質正規化に定量的なAzureRed シグナルを使用することで、ストリッピングや脱色をせずに、1 枚のプロット上で複数のタンパク質を定量することが可能になります。プロトコルは短時間で終了し、イメージングも目的のタンパク質と同時に行われます。

AzureRed Fluorescent Protein Stainの詳細については、www.azurebiosystems.comを参照ください。

参考文献

1. R. E. Ferguson, H. P. Carroll, A. Harris, E. R. Maher, P. J. Selby, R. E. Banks, *Proteomics* 2005, 5, 566.
2. J. Petrak, R. Ivanek, O. Toman, R. Cmejla, J. Cmejlova, D. Vyoral, J. Zivny, C. dD. Vulpe, *Proteomics* 2008, 8, 1744.
3. M. Wilhelm, J. Schlegl, H. Hahne, A. M. Gholami, M. Lieberenz, M. M. Savitski, E. Ziegler, L. Butzmann, S. Gessulat, H. Marx, T. Mathieson, S. Lemeer, K. Schnatbaum, U. Reimer, H. Wenschuh, M. Mollenhauer, J. Slotta-Huspenina, J.-H. Boese, M. Bantscheff, A. Gerstmair, F. Faerber, B. Kuster, *Nature* 2014, 509, 582.
4. A.J. Fosang, R.J. Colbran, *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290, 50.

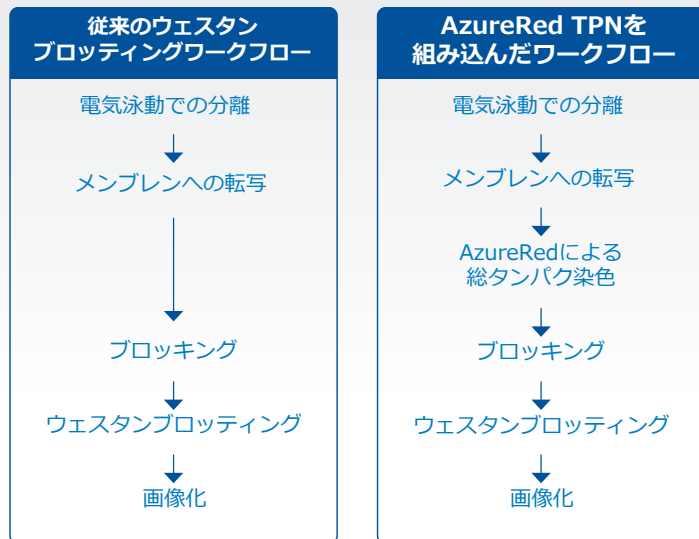


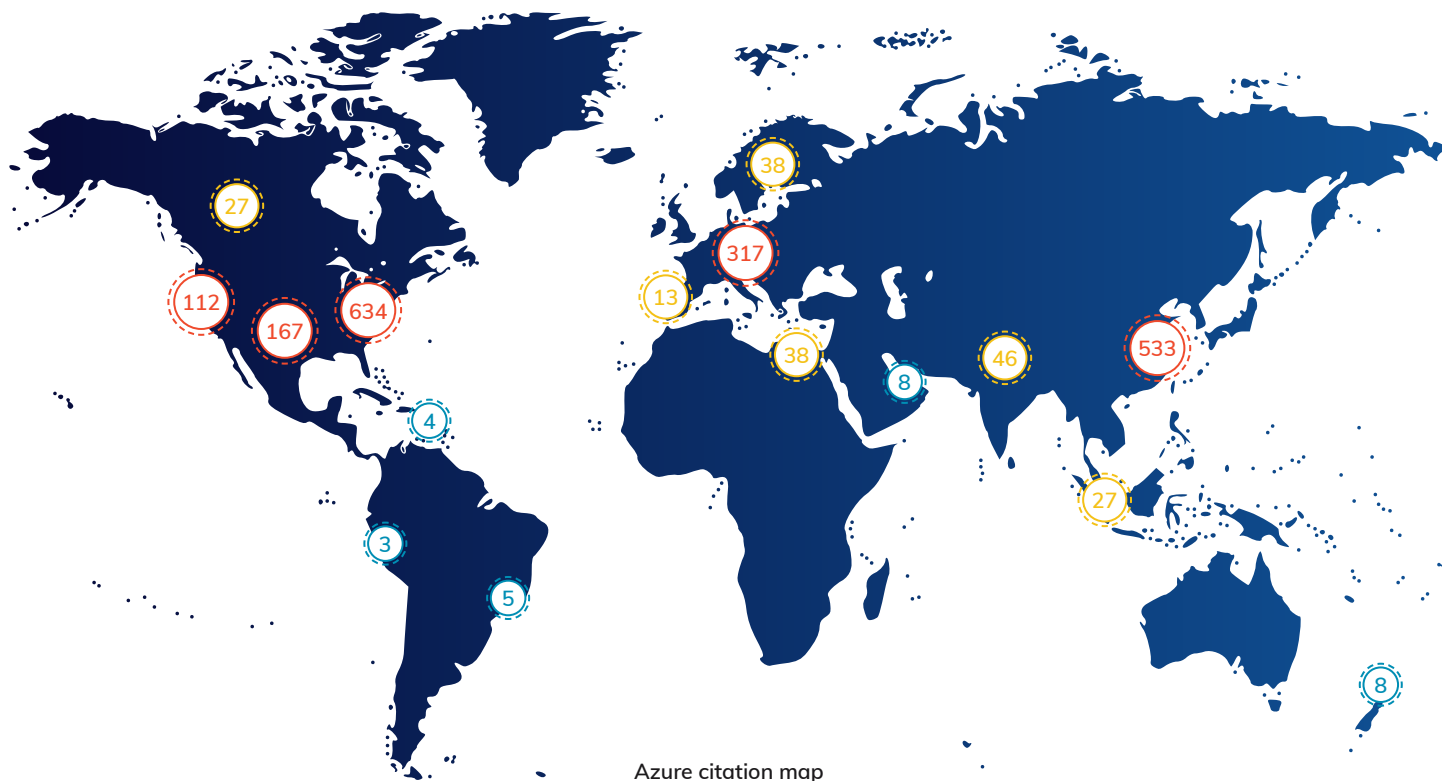
Figure 4. AzureRedによる全タンパク質の標準化は、あらゆるウェスタンブロットングのワークフローに容易に組み込むことができます。

6

Azure Biosystem製品を使用した文献



Azure Biosystems 製品が掲載された査読付き出版物の検索は、
<https://www.azurebiosystems.com/learn/publications/>
 で行ってください。



www.azurebiosystems.com • info@azurebiosystems.com

Copyright © 2021 Azure Biosystems. All rights reserved. The Azure Biosystems logo, Azure Biosystems®, Sapphire™ and Radiance™ are trademarks of Azure Biosystems, Inc. More information about Azure Biosystems intellectual property assets, including patents, trademarks and copyrights, is available at www.azurebiosystems.com or by contacting us by phone or email. All other trademarks are property of their respective owners.

MM_0052, Revision 1_JP

BMBio ビーエム機器株式会社 商品についてのお問い合わせ TEL : 03-6666-5903 FAX : 03-6666-5907
在米・在米文についてのお問い合わせ TEL : 03-6666-5902 FAX : 03-5677-4081
 〒135-0016 東京都江東区東陽2丁目2番20 東陽駅前ビル | WEB: www.bmbio.com | e-mail: sales@bmbio.co.jp