

# Western Blotting Protocol

## サンプル調製

1. マイクロ遠心チューブに細胞を移し、遠心して細胞ペレットを集めます。
2. 細胞ペレットに100 $\mu$ Lのライシスバッファーを加え、氷冷中で30分間おきます。(1 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞に対してライシスバッファー100 $\mu$ L)
3. 14,000 rpm (16,000  $\times$  g)10分間4 $^{\circ}$ C遠心します。
4. 上清を新しいチューブに移し、ペレットは廃棄します。20 $\mu$ Lの上清に対して20 $\mu$ Lの2 $\times$ サンプルバッファーを加え混和します。
5. 5分間ボイルし、室温5分間冷やし、5分間遠心します。
6. 1.5 mm厚のゲルの各ウエルに40 $\mu$ Lのサンプルをロードします。タンパク質の分子量とゲル濃度は以下がガイドラインです。  
4-5% gel, >200 kD; 7.5% gel, 120-200 kD; 8-10% gel, 40-120 kD; 13% gel, 15-40 kD; 15% gel, < 20 kD
7. 泳動条件は機器の取扱い説明書に準じます。ニトロセルロースもしくはPVDFメンブレンにタンパク質を転写します。転写条件は使用する機器の取扱い説明書に準じます。

## メンブレン ブロッキング

1. 転写装置からプロットしたメンブレンを外し、速やかにブロッキングバッファー(5%脱脂粉乳/TBS-T)に移します。
2. 振盪し室温で1時間もしくは4 $^{\circ}$ Cオーバーナイトのインキュベートします。

## 抗体反応

1. 1次抗体を推奨濃度(通常1 $\mu$ g / mL)に5%脱脂粉乳/TBS-Tで希釈します。メンブレンを1次抗体溶液中に置き振盪し室温2時間もしくは4 $^{\circ}$ Cオーバーナイトのインキュベートします。
2. Wash buffer (0.1% Tween-20 / TBS)で5分間3回洗浄します。
3. 5%脱脂粉乳/TBS-Tで1:1000に希釈したペルオキシダーゼ標識2次抗体でメンブレンを室温30分間インキュベートします。
4. Wash buffer (0.1% Tween-20 / TBS)で10分間4回洗浄し、PBSで2分間洗浄します。

## タンパク質検出

1. 転写面を上にして10mL ECL (enhanced chemiluminescence substrate)で1~2分間インキュベートします。最終量は0.125 mL / cm<sup>2</sup>です。
2. 余分な検出試薬を除いて気泡を除きながらラップして下さい。
3. ラップしたプロット膜をX線フィルムに感光してください。露光時間は5秒~60分間で変えることができます。

## Tips :

### バックグラウンドが高い

1. トランスファーバッファーのコンタミネーションの可能性がります。コンタミネーションは電気泳動やプロット操作の際に起きることがあります。
2. 抗体反応後の洗浄が回数の不足や十分な量で無い場合に起きることがあります。
3. ブロッキングやインキュベーションに使った試薬が、新鮮な調整ができていない、もしくは薄すぎる可能性があります。

### シグナルがない場合、低い場合

1. トランスファー効率が低い可能性があります。ゲルもしくはメンブレンの染色によって、トランスファーしているタンパク質を確認してください。
2. 抗体やECLウエスタンブロットティング検出試薬の不適切な保管は、シグナルの低下を招く可能性があります。
3. 不十分なタンパク質は、ゲルにロードされている可能性があります。目的タンパク質の部位に依存して、細胞膜や細胞核の調整は、全細胞可溶化物の代わりに必要になる可能性があります。
4. フィルム露光時間は短すぎたかもしれません。

## Solutions and Reagents :

### 1X Cell Lysis Buffer:

20 mM Tris-HCl, pH 7.5  
150 mM NaCl  
1% NP-40  
2 mM EDTA  
1 µg/ml leupeptin  
1 µg/ml aprotinin  
1 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
1 mM PMSF  
5 mM NaF  
3 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

### 5X SDS sample Buffer:

312.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)  
10% SDS (w/v)  
250 mM DTT  
50% Glycerol  
0.05% Bromophenol Blue (w/v)  
Use at 1X

### 10X SDS Running Buffer

Dissolve 144 g of Glycine, 30 g of Tris base and 10 g SDS in 800 ml of distilled H<sub>2</sub>O.  
Add distilled H<sub>2</sub>O to 1 liter  
Use at 1X

### Transfer Buffer:

2.25 g Tris base  
10.5 g Glycine  
1 g SDS  
200 ml Methanol  
Add distilled water to 1.0 L

### 10X TBS-T (Tris-buffered saline containing Tween-20):

Dissolve 80 g of NaCl, 2 g of KCl, 30 g of Tris base and 10 ml Tween-20 in 800 ml of distilled H<sub>2</sub>O.  
Adjust the pH to 7.4 with HCl. Add distilled H<sub>2</sub>O to 1 liter.  
Use at 1X (containing 0.1% Tween-20).

### Blocking Buffer:

1X TBS-T with 5% nonfat dry milk

### Wash Buffer:

1X TBS-T

**Primary and Secondary Antibody Dilution Buffer:**

1X TBS-T with 5% nonfat dry milk

\*\*リン酸化特異的抗体が使用されている場合、メンブレンのブロッキングバッファーと抗体希釈バッファーは、ミルクを含んではいけません。

**Alternate Blocking Buffer:**

1X TBS-T with 4% Bovine Serum Albumin (BSA)

**Alternate Primary and Secondary Antibody Dilution Buffer:**

1X TBS-T with 4% Bovine Serum Albumin (BSA)

**Blotting Membrane:**

Nitrocellulose or PVDF membrane

トミーデジタルバイオロジー株式会社  
カスタマーサポート  
〒110-0008東京都台東区池之端2-9-1  
TEL : 03-5834-0843 Fax : 03-5815-0813  
mail : [Biolegend@digital-biology.co.jp](mailto:Biolegend@digital-biology.co.jp)