

アトー株式会社

ウェスタンブロッティングのイメージングのコツ

【セミナー資料】

2015年9月3日(木)

- 資料の学内限定公開についてはアトー株式会社の許可を得ておりますが、資料および音声データの二次配布については固く禁止させていただきます
- 問題が発生した場合、全てのセミナーデータを削除し、以降の公開ができなくなりますので、くれぐれもご注意ください

鹿児島大学 遺伝子実験施設

ウエスタンブロットティングの 発光イメージング

実験のコツと撮影装置の使い方



アトー株式会社
顧客部

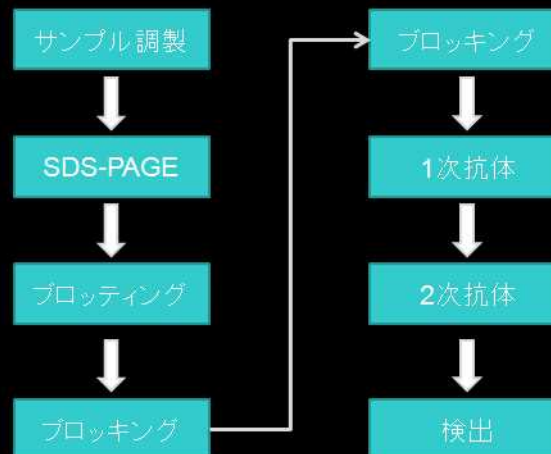
遺伝子実験施設に導入させていただいた「アトー Ez-Capture MG」でウエスタンブロットティングの発光検出をする上での実験のコツなどを解説したいと思います。

最後に実際に操作をしてどのように撮影をするのか簡単にご説明します。

ウェスタンブロッティングの基礎

● 概要

- トラブルポイント
- ・ステップが多い
 - ・検出するまで不明
 - ・汚れが発生
 - ・いろいろな「ムラ」



ウェスタンブロッティングとは、タンパク質の特異的検出法として広く利用されている実験方法で、電気泳動によるタンパク質の分離と、抗体による特定のタンパク質の検出を行うものです。

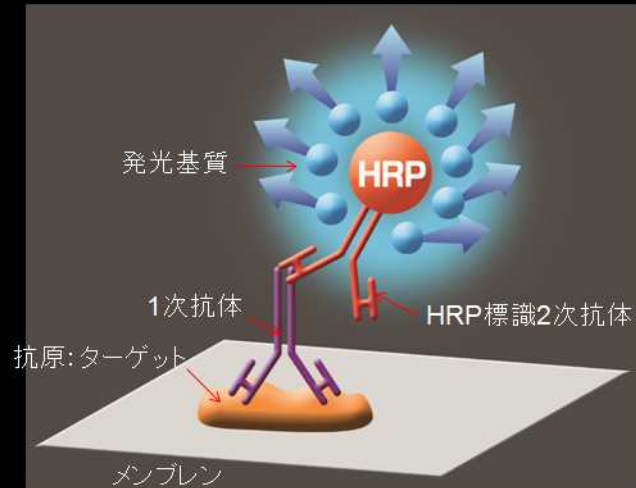
ウェスタンブロッティングのステップは、このように大きく8つに分けることができます。

このようにステップ数が多い実験である上、どこか1つでもうまくいかないと、最後の検出結果が悪くなってしまう、なかなか厄介な実験でもあります。

今回のセミナーでは、最終的な検出結果から見て取れる様々なトラブルから、どのステップに原因があるかをご説明したいと思います。

ウェスタンブロッティングの基礎

● 原理



ウェスタンブロッティングは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動から、メンブレン上にタンパク質をトランスファー（転写）し、その中からターゲットとなるタンパク質を特異的に検出する実験です。

図にあるように、メンブレン上にタンパク質が裸になっているところへ、これを認識する1次抗体を結合させます。

実際のメンブレンは、タンパク質を効率よく結合させる性質があるので、抗体反応の前には余白部分に余計な抗体が結合しないようにブロッキングを行います。

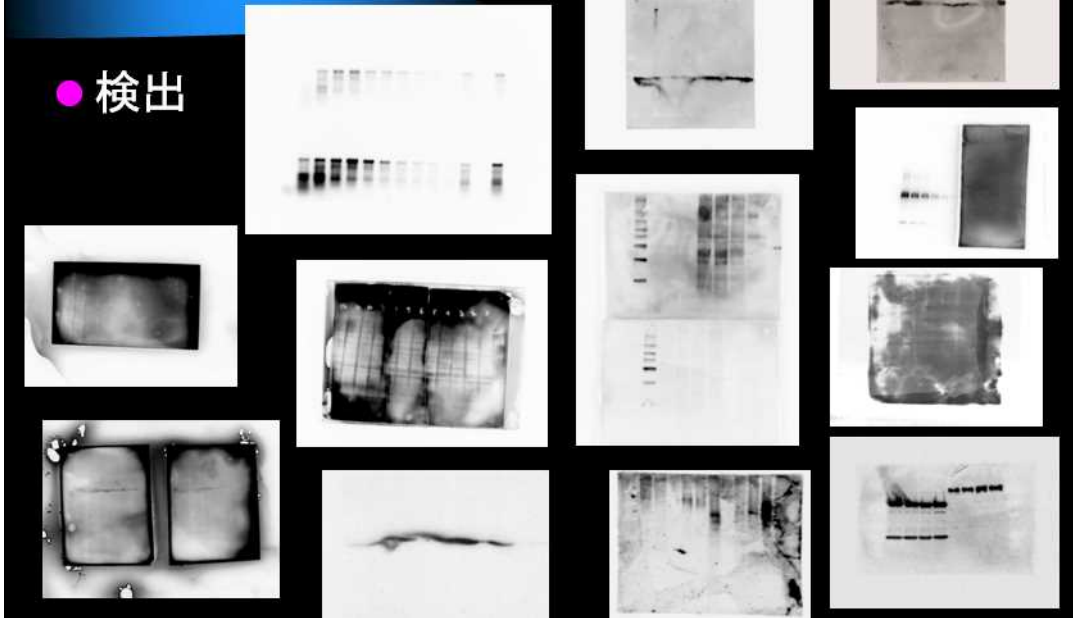
1次抗体を認識する2次抗体には目印としてHRPなどの酵素を標識しておきます。

検出時はこの酵素の触媒作用によって発色や発光反応が促進されてバンドを可視化することが可能になります。

ウェスタンブロッティングでは、電気泳動による分離、ブロッティングによる転写、抗体反応による検出を確実に行うことが重要と言えます。

ウェスタンブロッティングの基礎

● 検出



さてここで、いろいろな検出結果を並べてみました。

非常にステップの多い実験であるウェスタンブロッティングは全国のいろいろな研究者の方々が日夜格闘しています。

様々な失敗には原因があり、それを解決することができればより良い結果が得られ、解析が可能になります。

トラブルとステップの関連性

トラブルシューティングは最終ステップから遡って原因を探ります

	発光検出	2次抗体	1次抗体	ブロッキング	ブロッキング	電気泳動	サンプル調製
バンドが光らない	●	●	●			●	
全体が光る	●	●	△	●			
ムラ・汚れ	△	●	●	●	●		
感度低い	●	●	●	●	△	△	
パターンの乱れ					△	●	●
白ぬけ	●	△				●	●

● 関連あり △ まれに関連あり

ウエスタンブロッティングの検出時のトラブルはいろいろな症状があります。代表的なものを挙げました。

このトラブルに関連のありそうなステップには●や△の印がついています。

長年の電気泳動やウエスタンブロッティング関連の研究機器・試薬を販売してきたノウハウからこれらの原因について解説したいと思います。

また、トラブルシューティングの時の一番のコツは、「ステップの後ろのほうから確認する」ということです。

そのため表は横方向にステップを逆に記載しています。

次のページから、発光検出時のトラブルについて解説を行います。

トラブルとステップの関連性

バンドが光らない

	発光検出	2次抗体	1次抗体	ブロッキング	プロットイング	電気泳動	サンプル調製
バンドが光らない	●	●	●				

バンドが光らない

期限切れ
保存法間違い

標識酵素種違い
○ = HRP
× = ALP

まずは「バンドが光らない」トラブルの場合の原因を考えてみます。

発光検出のステップで考えられるのは発光基質のトラブルです。

発光基質には通常使用期限があります。期限を過ぎても、直ちに検出ができなくなるわけではありませんが、新品の時よりも検出感度が落ちてきます。

メーカーによっても様々ですが、使用期限前に発光が得られないようならメーカーに問い合わせてください。

また、2次抗体に標識している酵素の種類と、これに対応している発光基質を使用しているかも確認してください。

ほとんどの場合はHRP (POD) 標識のものが利用されていますが、ALPや β GALなども使われることがあり、酵素と基質が合わない場合は発光しません。

基本的なことですが、意外に陥りやすいトラブルです。

トラブルとステップの関連性

バンドが光らない

	発光検出	2次抗体	1次抗体	ブロッキング	プロテイング	電気泳動	サンプル調製
バンドが光らない	●	●	●	●	●	●	●

バンドが光らない	露光時間不足
	
露光時間 1秒	露光時間 5分

続いて、撮影時間に原因がある場合です。今日ご説明する発光イメージング装置「Ez-Capture MG」はシャッタースピードを1/30秒～90分まで設定可能です。

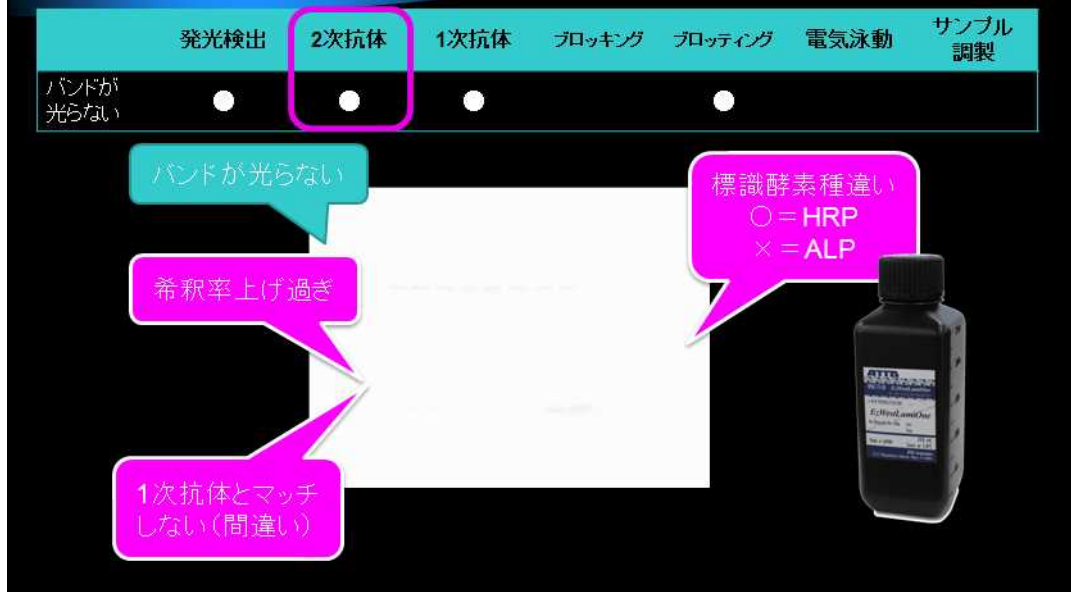
シャッタースピードが短いと検出感度が低く、長くなると感度がアップします。X線フィルムも同様です。

撮影してみてバンドが見えない場合、試薬などに間違いがないときは撮影時間を延長してみてください。

もし10分ほど撮影してみても、全く何も映らない場合は、試薬などが原因の可能性が高いと考えられます。

トラブルとステップの関連性

バンドが光らない



2次抗体に関連する場合があります。発光試薬についての説明の時と同じく、標識酵素と発光基質の種類が合わない間違いがあります。

また、2次抗体を希釈しすぎてしまって検出できない場合や、1次抗体とマッチしない2次抗体を誤って使用してしまった場合などが考えられます。

トラブルとステップの関連性

バンドが光らない

	発光検出	2次抗体	1次抗体	ブロッキング	プロテイング	電気泳動	サンプル調製
バンドが光らない	●	●	●	●	●	●	●

バンドが光らない

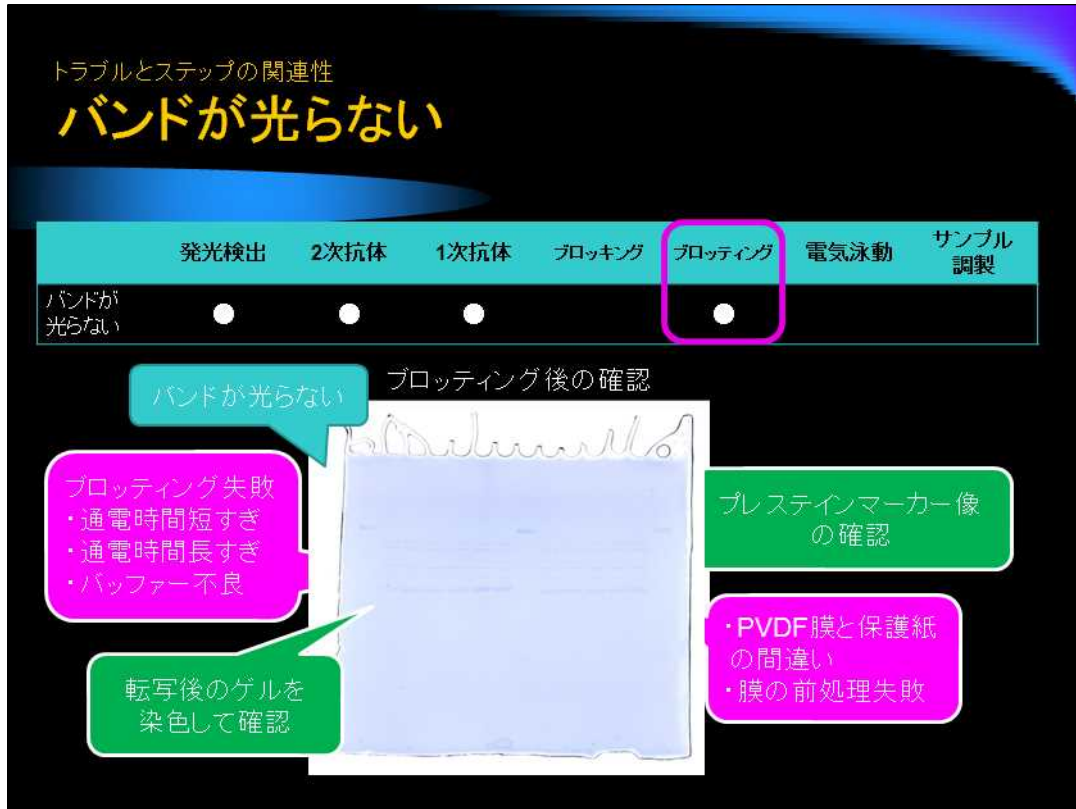
希釈率上げ過ぎ

ロット不良
古くなり劣化

ターゲットタンパク質と
マッチしない(間違い)

1次抗体に関しては、ターゲットタンパク質にマッチしないものを使用してしまう間違いや、希釈しすぎて検出できない場合があります。

まれに、既製品の抗体を使用する場合にロット不良というケースもあります。古くなりすぎて検出できないこともあります。



ブロッキングに原因がある場合です。

ブロッキングがうまくいかない場合、通電時間が極端に短い場合や逆に長すぎて裏抜けした場合があります。

また、ブロッキングバッファーの組成が間違っていたり、希釈率を間違えたり、操作手順などに不良があった場合が考えられます。

PVDF膜を使用している場合は、親水化処理がうまくいかなかった場合や、膜の保護紙を誤って使用することが考えられます。

ブロッキングがちゃんと行われたことを確認するには、プレステインマーカ像の転写具合を目視で確認することや、転写終了後のゲルをCBB染色してゲルに残ったバンドを確認しておくといと思います。

トラブルとステップの関連性

全体が光る

	発光検出	2次抗体	1次抗体	ブロッキング	プロットイング	電気泳動	サンプル調製
全体が光る	●	●	△	●			

全体が光る



発光試薬の感度が高すぎる
・イムノスターLD
・SuperSignal West Femto

2次抗体の希釈率
・高感度発光試薬を使用する場合は、2次抗体希釈率を高くする

今度は先ほどと打って変わって、光過ぎてしまうトラブルです。

最も多い原因は、非常に強い発光基質を使用している場合です。

この発光試薬を使う場合は、通常よりも大幅に2次抗体を希釈して使用する必要があります。

条件が決まれば、短い露光時間できれいに検出が可能です。

これらの発光基質は、X線フィルムでの検出は露光時間のコントロールが難しいのであまり適さず、

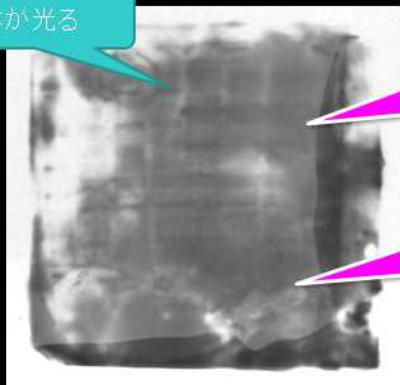
発光イメージング装置での使用をお勧めします。

トラブルとステップの関連性

全体が光る

	発光検出	2次抗体	1次抗体	ブロッキング	ブロッキング	電気泳動	サンプル調製
全体が光る	●	●	△	●			

全体が光る



ブロッキングが不十分
・1次抗体/2次抗体が非特異的にメンブレンに吸着

ブロッキングタンパクと抗体の交差
・1次抗体のターゲットとブロッキングタンパク質が交差している

全体が光る場合、次に多い原因はブロッキングが不十分な場合です。

更に、1次抗体、2次抗体の洗浄が十分でないとバックが非常に高くなります。

1次抗体の種類によっては、ブロッキングタンパク質に結合してしまうことがあります。

リン酸化抗体を使用する場合に、スキムミルクやカゼインを使用するとこのようになることがあります。

1次抗体とブロッキング剤に交差がないかも確認のポイントとなります。

トラブルとステップの関連性

ムラ・汚れ

	発光検出	2次抗体	1次抗体	ブロッキング	プロットイング	電気泳動	サンプル調製
ムラ・汚れ	△	●	●	●	●		

ムラ・汚れ

ピペッティングによるムラ
・発光基質をメンブレンに直接ピペッティングするとムラになる

2次抗体と発光基質
・2次抗体濃度が高く、発光基質の感度が高い組み合わせでピペッティング

バックグラウンドにムラができる原因について解説します。

1つ目は、発光基質のかけ方によるムラです。ピペットを使ってメンブレンに直接発光基質をかけると、

かけた形にムラが出る場合があります。これは、発光基質の感度が高く、また添加量が少ない場合に起こりやすいです。

また、2次抗体濃度が高い場合もムラができやすくなります。

トラブルとステップの関連性

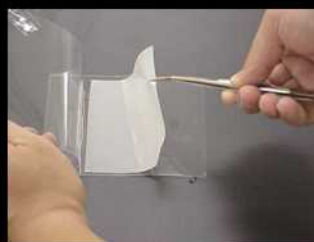
ムラ・汚れ

	発光検出	2次抗体	1次抗体	ブロッキング	プロットイング	電気泳動	サンプル調製
ムラ・汚れ	△	●	●	●	●		

発光基質由来のムラを防ぐ方法



発光基質をクリアポケット
やタッパーに滴下する



検出面を下にして発光基
質に膜を浸す

発光基質をかけるときのムラは、写真のようにクリアポケットやタッパーなどに発光基質を滴下して置き、
発光させる面を下向きにしてかぶせるようにするとムラが出にくくなります。

トラブルとステップの関連性

ムラ・汚れ

発光検出	2次抗体	1次抗体	ブロッキング	プロテイング	電気泳動	サンプル調製
ムラ・汚れ	●	●	●	●		

ブロッキング不良

1次抗体の劣化
・ドット状の汚れ
・特異性の低下

1次抗体反応
・振とう不足
・液量が少なすぎる
・乾燥



改善方法

- ・抗体は小分けにして保存
- ・遠心してから使用
→ドット状の汚れ改善
- ・抗体溶液量を増やす
→ムラ低減・乾燥防止
- ・抗体反応時、振とうする
- ・抗体洗浄を徹底する
- ・ブロッキングは交差のないもの
- ・ブロッキング室温1時間以上

このような結果が出たときは、いろいろな原因が考えられます。

バックが高くなるのは主にブロッキング不良が原因です。

膜全体にごま塩状の斑点が出ているのは、抗体が古くなると抗体同士がくっつき、膜上の特異的でない場所に結合してしまい検出されるためです。

また抗体溶液のボリュームが少ないと、膜全体に均等に行き渡らず、部分的なムラとして検出されることがあります。

これらを防ぐためには、抗体を小分けに保存する、使用前にかかるく遠心してから上澄みを使用することで斑点上のムラが防げます。

抗体溶液は多少希釈率が上がってもボリュームを増やして、膜全体に均等に行き渡らすようにします。

抗体濃度が下がることによる感度低下は、発光基質で補うことが可能です。

抗体反応時はよく振とうし、ムラが出ないように注意します。抗体洗浄も、すすぎ過程を入れてから洗浄ステップに進むと効果的です。

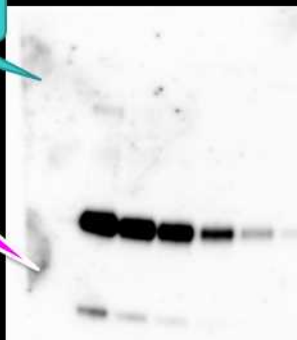
トラブルとステップの関連性

ムラ・汚れ

	発光検出	2次抗体	1次抗体	ブロッキング	プロテイング	電気泳動	サンプル調製
ムラ・汚れ	△	●	●	●	●		

ムラ・汚れ

膜の汚れ
・素手で触る
・プレートの汚れ



改善方法

- ・膜はピンセット等で扱う
- ・ガラスプレートをきれいに洗浄
- ・トレイ等容器もきれいに洗浄

これはPVDF膜を素手で触った時の汚れです。皮脂やタンパク質による汚れはこのような結果になります。

膜を扱う場合はピンセットを使用する、ゲル用のガラスプレートや、膜を入れるトレイやタッパーなどもきれいに洗浄して使用します。

トラブルとステップの関連性

感度が低い

	発光検出	2次抗体	1次抗体	ブロッキング	プロットイング	電気泳動	サンプル調製
感度低い	●	●	●	●	△	△	

感度が低い

露光時間不足

露光時間 1秒

露光時間 5分

いざ検出！となったら思ったように感度が出なかったというのは、今まで紹介してきたことが原因かもしれません。

もし撮影時間が数秒程度だった場合は、時間を延長してみてください。

発光イメージング装置の感度は撮影時間に比例しますので、感度がほしいときは長時間撮影を行います。

トラブルとステップの関連性

感度が低い

	発光検出	2次抗体	1次抗体	ブロッキング	プロットイング	電気泳動	サンプル調製
感度低い	●	●	●	●	△	△	

感度が低い

高感度タイプ発光基質へ変更

発光基質の感度不足

検出感度のアップ

ある程度の時間撮影をしてもバンドが見えるほど感度が得られない場合は、発光基質を変更してみます。

高感度をうたって発売されている発光試薬に変えるだけで見違えるほど感度アップすることがあります。

場合によっては多少条件を変える必要がありますが、比較的簡単な方法と言えます。

発光基質の感度不足が、使用期限を超えたことによる場合は、新しいものと交換してください。

トラブルとステップの関連性

感度が低い

	発光検出	2次抗体	1次抗体	ブロッキング	プロットイング	電気泳動	サンプル調製
感度低い	●	●	●	●	△	△	

感度が低い

抗体希釈率の上げ過ぎ

抗体がターゲットとマッチしない
(使用する抗体の間違い)

適切な条件に変更

この項目は判断が難しいのですが、露光時間を長くしてもバックグラウンドが全くないような場合に

抗体の種類や濃度を再検討してみてください。古くなった抗体も感度が落ちていることがあります。

トラブルとステップの関連性

感度が低い

	発光検出	2次抗体	1次抗体	ブロッキング	ブロッキング	電気泳動	サンプル調製
感度低い	●	●	●	●	△	△	

低濃度バンドの感度が低い



過剰なブロッキング操作
・3～5%スキムミルク
・長時間のブロッキング
オーバーブロッキング

意外なことかもしれませんが、ブロッキングのせいで特に濃度が低いバンドが検出できないケースがあります。

アトーでは「オーバーブロッキング」と呼んでいます。濃度が低いバンドを、ブロッキング剤がマスクすることで

1次抗体が結合できなくなっている状態です。こうなると、濃度の高いバンドは検出できるが、

低濃度のバンドが見えないという状態になります。

トラブルとステップの関連性

感度が低い

	発光検出	2次抗体	1次抗体	ブロッキング	ブロッキング	電気泳動	サンプル調製
感度低い	●	●	●	●	△	△	

ブロッキング改善策



- ・0.3%スキムミルク
- ・室温1時間
- ・オーバーブロック対策された市販のブロッキング溶液使用

オーバーブロッキングを防止することで検出限界を向上。

オーバーブロッキングが原因の場合は、ブロッキング剤の濃度を下げて対応します。
一般的にスキムミルクを使用している場合は、通常3～5%で使用していると思いますが、この1/10程度の濃度に下げ、
界面活性剤Tween-20の濃度を0.1%とします。
あるいは、ATTOのEzBlock Chmeiのようにオーバーブロッキングを考慮したブロッキング剤を使用してください。

トラブルとステップの関連性

感度が低い

	発光検出	2次抗体	1次抗体	ブロッキング	プロッティング	電気泳動	サンプル調製
感度低い	●	●	●	●	△	△	

部分的に感度が低い



プロッティング不良
・転写ムラ

電気泳動
・サンプル希釈率
・サンプル添加量

濃度に関係なく、部分的にバンドが見えない、一部分が欠けているような場合は、プロッティングの転写ムラが原因と考えられます。

ゲルとメンブレンの密着度を上げるように実験を行います。

電気泳動のサンプルの濃度や添加量などもCBB染色で確認をしておくで安心です。

トラブルとステップの関連性

パターンの乱れ

発光検出	2次抗体	1次抗体	ブロッキング	プロットイング	電気泳動	サンプル調製
パターンの乱れ				△	●	●

パターンの乱れ

プロットイング不良
・転写ムラ

電気泳動
・ゲルの未重合/劣化
・スマイリング

サンプル調製の不良
・精製度が低い・不純物
・脱塩不足・分解

写真のように、本来バンド上になるはずのパターンが波打ったり、ぐちゃぐちゃになることがあります。

バンドが溶け出したように流れている場合は、プロットイング不良が考えられます。ゲルとメンブレンの間に隙間があり

転写がうまくいかずにタンパク質が流出したためにこのような結果になります。

気泡ではなく、ゲルとメンブレンの間に転写バッファーが多く残っている場合にこのようなことが起きます。

電気泳動パターン全体が波打ったり歪んでいる場合は電気泳動に問題があると考えられます。

ゲルの未重合などによる乱れや、サンプルとなるタンパク質溶液の精製に問題がある場合も

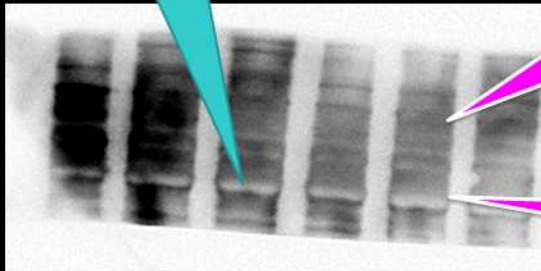
パターンに乱れが見られます。コストが高くなりますが、既製ゲルを用いるのも解決法の1つです。

トラブルとステップの関連性

バンドの白抜け

	発光検出	2次抗体	1次抗体	ブロッキング	プロットイング	電気泳動	サンプル調製
白ぬけ	●	△				●	●

バンドの城抜け



強すぎる発光試薬の使用
・イムノスターLD
・SuperSignalWest Femto

2次抗体濃度が高すぎる

濃度の高いバンド部分で発光基質が短時間に消費されてしまう。

全体的に検出がうまくいったのに、濃いバンドの部分が城抜けすることがあります。光っていないわけではないのですが、発光反応が短い時間で終了してしまったため、撮影を行った時に周囲よりも極端に光が弱くなったことが原因です。

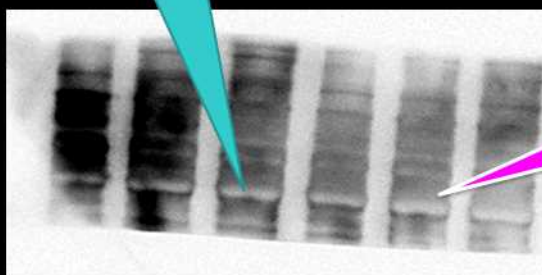
非常に強い発光力を持った高感度発光基質を使った場合などに発生するトラブルです。

トラブルとステップの関連性

バンドの白抜け

	発光検出	2次抗体	1次抗体	ブロッキング	プロットイング	電気泳動	サンプル調製
白ぬけ	●	△				●	●

バンドの白抜け



サンプル濃度が高すぎる

濃度の高いバンド部分で発光基質が短時間に消費されてしまう。

サンプル濃度が非常に高い場合は、発光基質が高感度タイプではなくても同様のことが起きることがあります。

いずれもサンプル濃度を下げることで回避可能です。また電気泳動パターンもシャープになるため、検出結果が評価しやすくなります。

発光イメージング

● X線フィルムとの違い

コスト(お金)について

イニシャルコスト(初期費用)

X線フィルム < イメージング装置

ランニングコスト

X線フィルム > イメージング装置

発光イメージング装置について、X線フィルムとどのように違うものなのかご説明します。

まずはコストに関して比較すると、発光イメージング装置はたいへん高価なため、イニシャルコストがかかります。

しかし、使い始めるとイメージングに使用する消耗品がほとんどないので、ランニングコストはフィルムよりも安くなります。

発光イメージング

● X線フィルムとの違い

撮影時の違い

	X線フィルム	イメージング装置
撮影場所	暗室	実験室
撮影方法	カセット内でフィルムに密着させる	キャビネット内にセット PC制御
露光時間	複数枚のフィルムに時間を変えて露光する	自動設定 マニュアル設定
現像	自動現像機 マニュアル操作	不要
画像取得	現像後スキャナ入力	撮影時自動保存

撮影する時にどんなことが違うか比較します。

まずは場所についてです。フィルムはその特性上必ず暗室での作業が必要です。発光基質をかけたメンブレンをカセット内でフィルムに密着させて一定時間露光します。この時点ではどの程度のパターンかわからないので、時間を変えて何回か露光します。現像して初めてどのようなパターンなのか確認が可能です。

対してイメージング装置では通常の実験室に設置して使用が可能です。

乾かないようにシールしたメンブレンをキャビネット内にセットしたらあとはほぼ自動で撮影し

画像データが保存されます。撮影後すぐにパターンの確認が可能ですので再撮影なども容易に行えます。

撮影時に最も異なるのは、発光基質をメンブレンにかけてから撮影をするまでの所要時間です。

フィルムは露光開始までに結構な時間がかかりますが、発光イメージング装置ではすぐに撮影可能です。

発光イメージング

● X線フィルムとの違い

撮影データの違い

	X線フィルム	イメージング装置
解像度	銀塩粒子に依存 スキャナ入力高画質	Ez-CaptureMG 350dpi~240dpi
低濃度バンド	細くシャープ	細くシャープ
高濃度バンド	太く広がる	細くシャープ
定量性	低: ダイナミックレンジ狭い	高: ダイナミックレンジ広い
検出感度	高い(露光時間制限がないため)	高いが露光時間限界あり (最長90分)

撮影データの違いについて説明します。X線フィルムは銀塩粒子の集合体としてパターンが作られるので解像度が高いことが特徴です。

これをスキャナで取り込めば高解像度の画像が得られます。

発光イメージング装置Ez-CaptureMGは撮影した画像の解像度がおよそ350dpi~240dpiとなり、実寸大で使用する場合は十分な解像度を持っています。

フィルムはメンブレンと接して撮影を行うため、発光が強いバンドは大きく膨らんで写りません。

発光イメージング装置では、レンズに届いた光だけが撮影されるので、濃いバンドもシャープなままです。

また、撮影されたパターンは発光の強さとともに「輝度」が比例して大きくなり、濃度を比較するための情報が非常に豊富です。

フィルムをスキャナで取り込む場合は、ある程度の濃さのバンドになると、膨らみ具合以外の輝度情報はほとんど変わらず

幅広い濃度範囲の比較は得意ではありません。

発光イメージング

● Ez-Capture MG

装置の紹介

Ez-Capture MG	
解像度	1392×1040ピクセル 350dpi～240dpi
カメラ	冷却CCDカメラ(-30℃)
レンズ	F0.95 単焦点レンズ
操作	WindowsPC
露光制御	自動露光(AutoExpo) 積算撮影など



最後にEz-CaptureMGの仕様を説明します。

この後、実機を動かしながら、撮影方法について説明を行います。