



日本ポール株式会社

LP001TS

**バイオダイн&フルオロトランス**  
タンパク（ウエスタン）トランスファー  
**取扱説明書**

## 目次

	<u>ページ</u>
1. はじめに	1
2. 溶液	3
3. ブロッキング操作	4
4. タンパクのドットプロット	5
5. タンパクのゲル電気泳動	8
6. タンパクのゲルからメンブレンへの エレクトロトランスファー	9
7. タンパクの検出	11
・ <sup>125</sup> I 標識抗体による検出	
・ ELISA法による検出	
8. 参考文献	13
補足1. 陰イオン性染色剤を用いたフルオロトランス上での タンパクの直接染色法	14
補足2. 抗体による検出系の例	15
A. モノクローナル抗体による検出系	
B. ポリクローナル抗体による検出系	
補足3. 基質系の例	17
A. アルカリホスファターゼ系	
B. ペルオキシダーゼ系	

# 1. はじめに

- 1.1 バイオダインは、サポート(補強材)付きのナイロン66製多孔質メンブレンで、各種のプロテイン・バインディングアッセイやトランスファーに適しています。(バイオダインは、核酸のトランスファー用メンブレンとしても幅広く使用されています。詳細は、SD1243a(J)『バイオダインA & B 核酸トランスファー 取扱説明書』をご参照ください。) 特別な製膜方法(特許)により、バイオダインは、材質自体が本質的に親水性のメンブレンとなります。また、タンパク結合容量が大きいために高感度です。

バイオダインAは、汎用的なトランスファーメンブレンとして使用されています。バイオダインBは、孔内部表面が強く正に荷電しているため、負に荷電したタンパクをイオン結合等により強く結合します。

フルオロトランスは、疎水性のフッ素系高分子メンブレンで、特に、ウエスタントランスファー、プロテイン・バインディングアッセイおよびプロテイン・シーケンシング等に適しています。純白色の多孔質担体表面に、広範囲な分子量のタンパクを疎水性相互作用により強く結合します。固定化したタンパクは、直接プロテイン・シーケンシングやアミノ酸分析に使用できます。さらに、クマシーブルー、アミドブラック、ボンソーS、インディアインク等の染色剤で直接染色することもできます。フルオロトランスは疎水性メンブレンですので、あらかじめメタノールでプレウェットして親水化処理を行い、適当なバッファーで平衡化してご使用ください。

ポールのメンブレンは、取扱いが容易で、耐熱性、耐薬品性にも優れており、縮みやひび割れ、あるいはカール等が一切ありません。

- 1.2 ポリアクリルアミドゲルからメンブレンへのタンパクのエレクトロトランスファーは、Towbinらにより1979年に初めて報告されました。タンパク(ウエスタン)トランスファーの手法を使うと、簡単な操作で、迅速かつ高感度に、複雑な混合物中から個々のタンパクを検出することができます。

操作手順は、以下の3つのステップから構成されています。

- ①タンパク分子のポリアクリルアミドゲル電気泳動
- ②ポリアクリルアミドゲルからメンブレンへのタンパクのエレクトロトランスファー
- ③エレクトロトランスファーされたタンパクの検出

いろいろなタンパクトランスファーの手法や検出方法を組み合わせることにより、さまざまなゲルシステムに適用することが可能となり、広い用途に利用できます。この説明書では、タンパクのドットプロットも含め、バイオダインA、バイオダインBおよびフルオロトランスを用いて、エレクトロトランスファーおよびタンパク検出に関する一般的な手法を述べています。さらに、代表的な検出方法の例も補足の項で取り上げています。

以下の操作方法は、ポールのメンブレンの特性を活かし、最適な結果が得られるように開発されたものです。

### 1.3 メンブレンの取扱い

ポールのメンブレンは、機械的強度が高く、裂けたり、ひび割れしたりすることはありません。特に、ゲルからメンブレンをはがす際に、メンブレンが破れる心配がありません。ただし、メンブレンの汚染を避けるために、ゴム手袋を着用するか、ピンセットを使用してメンブレンの端を取り扱ってください。また、メンブレンを切る際には、ハサミまたはカッターをご使用ください。

### 1.4 メンブレンの前処理

バイオダインは、親水性のメンブレンですので、乾いたまま直接ゲルに載せることができます。しかし、使い慣れるまでは、使用前にトランスファーバッファーの水面に数秒浮かべた後、全体を浸漬(水没)させて十分にプレウエットすることをお勧めします。

フルオロトランスは、疎水性メンブレンですので、使用前に100%メタノール溶液でプレウエットして親水化処理を行い、トランスファーバッファーで平衡化してご使用ください。操作方法は次の通りです。(ドットプロットの場合には、一部修正した方法でプレウエットを行います。詳細は4.1をご参照ください。)

- 1)メンブレンを適当な大きさに切り、100%メタノール溶液に浮かべる。3~5秒後に全体を浸漬(水没)させる。
- 2)メンブレンをメタノール溶液から取り出し、直ちにトランスファーバッファー中に全体を浸漬(水没)させ、5~15分間平衡化する。
- 3)メンブレンを親水性に変えるタンパク溶液でブロッキング(7.1参照)するまで、メンブレンを乾燥させないように注意する。

## 2. 溶液

### 2.1 タンパクの電気泳動用サンプルバッファー

- 0.125M トリス-塩酸 (pH6.8)
- 2%(w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)
- 10%(v/v) グリセロール
- 2%(v/v) 2-メルカプトエタノール
- 0.001%(w/v) ブロモフェノールブルー

} 含有

### 2.2 トランスファーバッファー

- 0.025M トリス-塩酸 / 0.192M グリシン (pH8.3)
- 20%(v/v) メタノール溶液含有

### 2.3 PBS (Phosphate Buffered Saline) 溶液, (pH7.4)

- 40mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 8mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
- 150mM NaCl

### 2.4 カゼイン・ブロッキング溶液

0.5%(w/v)カゼイン (Hammarsten grade, BDH製 Cat.No. 44020  
あるいはSigma製 Cat.No. C-5890) / PBS溶液を次のいずれかの方法  
で調製します。

方法1. PBS溶液(2.3)を60°Cに加温し、カゼインが溶解するまで  
攪拌する。室温まで冷却し、0.45  $\mu\text{m}$ のメンブレンフィル  
ターでろ過して不溶物(析出凝集物)を取り除く。必ず、  
新たに調製したものを使用する。

方法2. 室温で、0.5%(w/v)カゼインをPBS溶液(2.3)に懸濁させ  
る。攪拌しながら、5M 水酸化ナトリウム溶液を徐々に  
滴下し、pH12に調整する。(この処理により溶液は透明  
になる。)直ちに2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 溶液を滴下し、pH7.4に  
調整した後、0.45  $\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターでろ過す  
る。必ず、新たに調製したものを使用する。

### 3. ブロッキング操作

- 3.1 ブロッキング操作には、0.5%(w/v)カゼイン/PBS溶液(2.4)の使用をお勧めします。このブロッキング溶液を使用すると、モノクローナル抗体やポリクローナル抗体を用いた両検出系で、常に安定した良い結果が得られています。(操作手順は、7.1をご参照ください。)

非特異的吸着由来のバックグラウンドには、検出に用いる抗体(第一抗体および酵素標識第二抗体)の希釈率が大きく影響します。バックグラウンドが高い場合には、0.1~0.5%カゼイン/PBS溶液を用い、抗体濃度をさらに希釈した上で、0.45 $\mu$ mのメンブレンフィルターでろ過して使用すると効果があります。

- 3.2 フルオロトランスの場合には、3.1の他に、  
a) 5%(w/v)牛血清アルブミン/PBS溶液、あるいは、  
b) 5%(w/v)ゼラチン/PBS溶液  
のようなブロッキング剤も使用できます。

ただし、上記a)およびb)、あるいはエタノールアミンのようなブロッキング剤は、バイオダインAおよびバイオダインBにはお薦めできません。

## 4. タンパクのドットプロット

### 4.1 装置を用いないドットプロット

- 1) 汚染を避けるように注意しながら、必要なメンブレンを適当な大きさに切る。
- 2) 必要であれば、鉛筆で1cm角程度の格子を記入し、試料を滴下する際の目印とする。
- 3) バイオダインA、バイオダインB：  
プレウェットせずに次の操作に進める。

フルオロトランス：

80%(v/v)メタノール/蒸留水溶液に浮かべた後、全体を浸漬(水没)させてプレウェットする。次の操作に進むまで、80%(v/v)メタノール溶液中に保存する。

- 4) バイオダインA、バイオダインB：  
乾燥状態のメンブレンを非吸水性の支持体上に置く。マイクロピペットで、濃度1~10mg/mlのタンパク溶液を1~3 $\mu$ lメンブレン上にスポットする。室温で5分間風乾する。その後7.の操作に進み、ブロッキングおよび免疫化学的な検出を行なう。

フルオロトランス：

メンブレンを80%(v/v)メタノール溶液から取り出し、湿っている程度に余分な溶液を除く。予め80%(v/v)メタノール溶液で湿らせておいたろ紙上に、湿った状態のメンブレンを置く。直ちにマイクロピペットで、濃度1~10mg/mlのタンパク溶液を1 $\mu$ lメンブレン上にスポットする。スポット後、メンブレンを

- ・直接ブロッキング溶液に浸すか、あるいは、
- ・非吸水性の支持体上に移し、室温で5分間風乾した後、再び80%(v/v)メタノール溶液で手早く濡らし、ブロッキング溶液に浸す。

その後7.の操作に進み、ブロッキングおよび染色操作あるいは免疫化学的な検出を行なう。

## 4.2 バキューム・ドットプロット

疎水性メンブレンであるフルオロトランスは、この方法には推奨できません。親水性メンブレンであるバイオダイナAあるいは、バイオダイナBをご使用ください。

- 1) 汚染を避けるように注意しながらメンブレンを適当な大きさ(例えば9cm×12cm)に切る。PBS溶液に浮かべた後、全体を浸漬(水没)させてプレウエットを行なう。濡れた状態で次の操作に進める。
- 2) バキューム・ドットプロット装置にメンブレンを注意してセットし、液漏れや横方向への拡散等がないように確実にシールされていることを確認する。
- 3) 各ウェルに、希釈したタンパク溶液10~100  $\mu$  lを加える。ネガティブ・コントロールとするウェルには、等量のPBS溶液を加える。
- 4) 30分間放置した後、600~700mbarで吸引ろ過する。  
注) 吸引状態でタンパク溶液を加えることもできる。  
詳細は、使用する装置の取扱い説明書に従う。

注) 以下の操作では、溶液中でのタンパク凝集に由来するメンブレンへの非特異的吸着の影響を避けるために、ブロッキング溶液、希釈後の第一抗体および酵素標識抗体溶液を0.2  $\mu$ mのフィルターで再度ろ過して使用することが推奨される。

- 5) 0.5%カゼイン/PBS溶液(2.4)100  $\mu$  lを各ウェルに加え、30分間インキュベートを行ってメンブレンをブロッキングする。ブロッキング溶液を吸引ろ過した後、吸引したまま各ウェルにPBS溶液(2.3)を100  $\mu$  l加えてリンスする。
- 6) 各ウェルに、適当に希釈した第一抗体溶液100  $\mu$  lを加え、1時間インキュベートした後、吸引ろ過する。



- 7) 各ウェルに、0.1%(v/v)Triton X-100/PBS溶液を100 $\mu$ ℓ加え、メンブレンを洗浄した後、吸引ろ過する。この洗浄操作をもう一度繰り返す。吸引を止めて各ウェルにPBS溶液(2.3)のみを100 $\mu$ ℓ加えた後、吸引ろ過する。
- 8) 各ウェルに、適当に希釈した酵素標識抗体溶液(補足2参照)100 $\mu$ ℓを加え、1時間インキュベートした後、吸引ろ過する。
- 9) 7)で述べた洗浄操作をもう一度繰り返す。各ウェルに蒸留水100 $\mu$ ℓを加えた後、吸引ろ過する。
- 10) 基質溶液を調製(補足3参照)し、0.2 $\mu$ mのフィルターでろ過しておく。各ウェルに基質溶液100 $\mu$ ℓを加え、5分間インキュベートして、吸引ろ過する。  
注) 基質として4-クロロナフトール(4CN)を使用する場合には、10分間インキュベートを行う。
- 11) 吸引したまま蒸留水100 $\mu$ ℓで各ウェルを2回洗浄する。
- 12) 吸引を止めてメンブレンを装置からはずし、室温で風乾する。
- 13) 7.の操作に進み、ブロッキングおよび免疫化学的な検出を行なう。

## 5. タンパクのゲル電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法の概略は、次の通りです。  
注) 別の方法でも代用できます。

### 5.1 タンパクの処理

- 1) タンパク試料を $10\text{ ng/ml} \sim 10\ \mu\text{g/ml}$ に希釈する。
- 2) 希釈したタンパク試料に等量のサンプルバッファー(2.1)を加える。
- 3) タンパク溶液を $100^\circ\text{C}$ で10分間加熱する。

### 5.2 電気泳動

- 1) 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(SDS-PAGE)は、Laemmliによって1970年に開発されたシステムを利用して、適当な濃度のポリアクリルアミドゲルで行う。  
注) 操作は、使用する電気泳動装置の取扱説明書に従って行う。
- 2) 冷却システム(装置)を水道水に接続する。
- 3) 初期電流をゲル当たり $25\text{ mA}$ に設定し、マーカークが分離用ゲルに移動後、電流を $35\text{ mA}$ に上げる。
- 4)  $18\text{ cm} \times 1.5\text{ mm} \times 16\text{ cm}$ のゲルに対し3時間(または、マーカークが分離用ゲルの予定しておいた距離に移動するまで)電気泳動を行う。

## 6. タンパクのゲルからメンブレンへのエレクトロトランスファー

ウェット・エレクトロトランスファー・システム

注) 操作は、使用するエレクトロトランスファー装置の取扱い説明書に従って行ってください。

- 6.1 ゲル全体を使用するか、トランスファーに用いるゲルのレーンを切り分ける。
- 6.2 ゲルの大きさに合わせてメンブレンを切り取る。
- 6.3 ゲル表面をトランスファーバッファー(2.2)で濡らす。
- 6.4 ゲルを次の要領でサンドイッチ状にセットする。
  - 1) ろ紙\*をトランスファーバッファー(2.2)で十分に濡らす。  
(ゲル1枚につきろ紙を2枚使用)
  - 2) ゲルを1枚目のろ紙上に置く。
  - 3) メンブレンをトランスファーバッファー(2.2)で十分に濡らす。
  - 4) 濡らしたメンブレンをゲル上に置く。
  - 5) メンブレン上にもう1枚の濡らしたろ紙をかぶせる。  
注) 清潔なピペットをろ紙およびメンブレン上で転がして気泡を取り除く。
  - 6) これらを2枚のScotch Brite\*\* パッドの間に挟んでサンドイッチにする。

\* ここで述べているろ紙は、ワットマンに代表される純セルロース製の化学実験用のものを指している。ろ紙も汚染を避けるためにゴム手袋を着用して扱う。

\*\* Scotch Britelは、3M Corporationの登録商標。

- 6.5 これらを2枚のプラスチックグリッド(格子)の間にサンドイッチ状に固定してカセットを組み立てる。
- 6.6 トランスファーバッファー(2.2)をエレクトロトランスファー装置に満たす。
- 6.7 ゲルと陽極との間にメンブレンが位置するようにカセットを装置に組み込む。
- 6.8 熱交換器を水道水に接続する。  
注) 最適なトランスファーの結果を得るためには、冷却システム(装置)を必ず使用する。
- 6.9 18cm×1.5mm×16cmのゲルに対し、0.3Aで、2時間通電する。  
注) 分子量の大きいタンパク(MW 100Kd以上)の場合には、トランスファーの時間を長くする。

## 7. タンパクの検出

ドットプロットや、エレクトロトランスファーした後、メンブレンに結合した未標識のタンパクは、 $^{125}\text{I}$ や酵素で標識した抗体を用いる免疫学的な検出方法等で検出します。

もし、分離したすべてのタンパクを直接染色する必要がある場合には、フルオロトランスを使用します。補足1で紹介する手法を用いて、クマシーブルーやインディアインク等で、直接染色できます。バイオダインA、バイオダインBには、これらの陰イオン性染色剤を使用できませんが、ピオチン/アビジン-ペルオキシダーゼ系を使って検出できます(ピオチンプロットキット; Bio-Rad カタログ No.170-6512等)。

### 7.1 ブロッキング (“3. ブロッキング操作” 参照)

メンブレン上の遊離のタンパク結合部位を次の手順でブロッキングする。

- 1) ゲル表面からメンブレンをはがし、ヒートシールできるポリ袋(または適当な容器)に入れる。
- 2) 0.5%カゼイン・ブロッキング溶液(2.4)、または、適当なブロッキング溶液を、メンブレン100 $\text{cm}^2$ 当たり最低10 $\text{mL}$ ポリ袋(容器)の中に加える。室温 $\sim 40^\circ\text{C}$ で、少なくとも30分間振盪しながらインキュベートする。

### 7.2 第一抗体の結合

- 1) ポリ袋(容器)からブロッキング溶液を取り除く。
- 2) 第一抗体をPBS溶液(あるいは、0.1 $\sim$ 0.5%カゼイン/PBS溶液)で希釈する。希釈率は、メーカーの推奨に従うか、予備試験を行って決める。第一抗体として $^{125}\text{I}$ 標識抗体を使用する場合は、カウント数が $5 \times 10^4 \text{cpm/mL}$ を越えないようにする。
- 3) ポリ袋(容器)内にメンブレン100 $\text{cm}^2$ 当たり最低3 $\text{mL}$ の第一抗体溶液を加える。
- 4) ロータリーシェーカーに、ポリ袋(容器)を固定し、室温で1時間振盪(250 rpm)した後、未結合の第一抗体を次の要領で除去する。

- 5) メンブレンをポリ袋(容器)から取り出す。
- 6) 0.1%(v/v)Triton X-100/PBS溶液にメンブレンを短時間浸漬する。
- 7) 大きめのポリ袋(容器)にメンブレンを入れる。メンブレン100 $\text{cm}^2$ 当たり100 $\text{ml}$ の0.1%(v/v)Triton X-100/PBS溶液を加える。
- 8) ロータリーシェーカーにポリ袋(容器)を固定し、室温で5分間振盪(100 rpm)した後、バッファーを取り除く。
- 9) 上記7)および8)の操作を3回繰り返した後、最後にPBS溶液(2.3)のみで同様に洗浄する。

### 7.3 $^{125}\text{I}$ 標識抗体による検出

以下の検出方法は、Gershoniらが1982年に報告したものです。

- 1) 液を吸い取ってメンブレンを乾かす。
- 2) DuPont製クロネックス増感スクリーンを用いて、 $-70^\circ\text{C}$ で2日間オートラジオグラフィーを行う。

### 7.4 ELISA法による検出

- 1) 適当な酵素標識第二抗体をメーカーの推奨する濃度に、PBS溶液(2.3)あるいは、0.1~0.5%(w/v)カゼイン/PBS溶液で希釈する。
- 2) 新しいポリ袋(または容器)にメンブレンを入れる。
- 3) ポリ袋(容器)内にメンブレン100 $\text{cm}^2$ 当たり最低8 $\text{ml}$ の酵素標識第二抗体溶液を加える。
- 4) ロータリーシェーカーにポリ袋(容器)を固定し、室温で1時間振盪(250 rpm)した後、前述7.2の5)から9)に従って、未結合の酵素標識第二抗体を除去する。ただし、最後の洗浄は2段蒸留水を用いて行う。

- 5) 基質溶液を調製する。(補足3参照)
- 6) メンブレンを2段蒸留水中から取り出し、適当な大きさの容器(ペトリ皿、シャーレ等)に入れる。
- 7) 直ちに、メンブレン100 $\text{cm}^2$ 当たり10 $\text{m}l$ の基質溶液を加える。
- 8) 1~2分、あるいはメンブレン上にバンドが現れるまで、静かに振盪する。  
注) この反応(現像)時間が長すぎると、バックグラウンドが高くなる原因となる。
- 9) 直ちにメンブレンを蒸留水中で洗浄し、丁寧に液を吸い取った後、80°Cで1~2分間乾燥する。遮光して保存する。  
注) 呈色反応は不安定であることから、結果の永久保存が必要な場合には、なるべく早くデンストメーターで発色強度を測定しておくか、写真を撮っておく。

## 8. 参考文献

- 1) Gershoni, J.M., and Palade, G.E., *Anal. Biochem.* 124:396(1982)
- 2) Laemmli, U.K., *Nature(London)* 227:680(1970)
- 3) Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 76:4350(1979)

## 補足1. 陰イオン性染色剤を用いたフルオロトランス上での タバコの直接染色法

### 1) アミドブラック

染色液：Sigma製 Cat.No.9002 ナフトールブルーブラックの  
0.5%(w/v)溶液を、50%(v/v)メタノール/5%(v/v)酢酸  
/脱イオン水で調製する。

脱色液：5%(v/v)酢酸/50%(v/v)メタノール/脱イオン水

操作法：①トランスファー後、メンブレン100cm<sup>2</sup>当たり40mLの染  
色液中で、3~15分間インキュベートする。

②1~10分間脱色する。

### 2) インディアインク

染色液：BDH製 Cat.No.36044-Windsor and Newtonの0.05%(v/v)  
溶液を、以下のバッファー(PBS-TRITON\*)で調製する。

\* PBS-TRITON：

0.15M NaCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.2) ,

0.5%(v/v) Triton X-100

操作法：①トランスファー後、メンブレンをバッファー(PBS-  
TRITON)中で5分間、2回洗浄する。

②希釈した染色液中で、メンブレンを20分間インキ  
ュベートする。

③脱イオン水を数回交換して洗浄することにより脱色す  
る。

### 3) クマシーブルー (CBB)

染色液：Bio-Rad製 Cat.No.161-0406の0.1%(w/v)溶液を、40%  
(v/v)メタノール/10%(v/v)酢酸/脱イオン水で調製  
する。

脱色液：10%(v/v)酢酸/40%(v/v)メタノール/脱イオン水

操作法：①トランスファー後、メンブレン100cm<sup>2</sup>当たり40mLの染  
色液中で、数分間インキュベートする。

②15分間、またはバックグラウンドが抜けるまで、脱色  
する。

### 4) ポンソーS

染色液：Sigma製 Cat.No.P7767の濃縮液20mLを、脱イオン水で  
200mLに希釈する。

脱色液：5%(v/v)酢酸/脱イオン水

操作法：①トランスファー後、メンブレン100cm<sup>2</sup>当たり40mLの染  
色液中で、10分間インキュベートする。

②1~10分間脱色する。



## 補足2. 抗体による検出系の例

操作手順の詳細は、本文をご参照ください。

### A. モノクローナル抗体による検出系

次のモデル系には、通常バイオダインBをご使用ください。

- (1) 試料タンパク  
2.5%(w/v)ラット脳ホジネート溶液を、サンプルバッファー(2.1)で調製し、10% SDS-PAGEゲルの5mmサンプルウェルに0.5 $\mu$ l滴下する。その後、電気泳動(5.)およびエレクトロトランスファー(6.)、ブロッキング操作(7.1)を行う。
- (2) 第一抗体  
マウスモノクローナル抗体(anti- $\beta$ -tubulin, Amersham製)をブロッキング溶液(2.4)で100~1000倍に希釈する。メンブレンを第一抗体溶液と共に、室温で1時間インキュベートする。
- (3) 検出
  - ① 酵素標識したポリクローナル抗体による直接検出法
    - a. またはb. のいずれかの方法で行う。
      - a. Goat anti-mouse IgG-alkaline phosphatase(Sigma製A-5153)を1000倍に希釈したものを、メンブレンと共に室温で30分間インキュベートする。
      - b. Goat anti-mouse IgG-peroxidase(Sigma製A-4416)を1000倍に希釈したものを、メンブレンと共に室温で30分間インキュベートする。
    - ② 2ステップ検出法  
Rabbit anti-mouse immunoglobulin(Ig)(Sigma製M-9639)を1000倍に希釈したものを、メンブレンと共に室温で30分間インキュベートした後、以下のa. またはb. のいずれかの方法で行う。
      - a. Goat anti-rabbit Ig-alkaline phosphatase(Sigma製A-8025)を1000倍に希釈したものを、メンブレンと共に室温で30分間インキュベートする。
      - b. Goat anti-rabbit Ig-peroxidase (Sigma製A-6154)を1000倍に希釈したものを、メンブレンと共に室温で30分間インキュベートする。

## B. ポリクローナル抗体による検出系

次のモデル系には、通常バイオダインBをご使用ください。

- (1) 試料タンパク  
ヒト血清アルブミン(HSA, Sigma製)溶液の5 $\mu$ l当たりが、HSAで0.5 $\mu$ gまたは1 $\mu$ gになるようにサンプルバッファー(2.1)で調製する。10% SDS-PAGEゲルの5mmサンプルウェルに、このHSA溶液を5 $\mu$ l滴下する。その後、電気泳動(5.)およびエレクトロトランスファー(6.)、ブロッキング操作(7.1)を行う。
- (2) 第一抗体  
アフィニティー精製していないGoat anti-HSAポリクローナル抗体(Sigma製 A-1151)をブロッキング溶液(2.4)で10,000倍に希釈する。メンブレンを第一抗体溶液と共に室温で1時間インキュベートする。
- (3) 酵素標識したポリクローナル抗体による直接検出法  
a. またはb. のいずれかの方法で行う。
  - a. Rabbit anti-goat-peroxidase(Sigma製8150)を1000倍に希釈したものを、メンブレンと共に室温で1時間(または30分間)インキュベートする。
  - b. Rabbit anti-goat-alkaline phosphatase(Sigma製7650)を1000倍に希釈したものを、メンブレンと共に室温で1時間(または30分間)インキュベートする。

### 補足3. 基質系の例

#### A. アルカリホスファターゼ系

基質：ニトロブルーテトラゾリウム (NBT)

5-ブromo-4-クロロ-3-インドイルホスフェート (BCIP)

- (1) NBTストック溶液  
75mg / ml NBT / 70% (v/v) ジメチルホルムアミド (DMF) 溶液
- (2) BCIPストック溶液  
50mg / ml BCIP / 70% (v/v) DMF 溶液
- (3) トリスバッファー  
0.1M トリス, 0.1M NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub> (pH 8.5)
- (4) 使用直前に、33  $\mu$  l のNBT溶液と25  $\mu$  l のBCIP溶液とを、7.5mlのトリスバッファーに添加する。

#### B. ペルオキシダーゼ系

基質：ジアミノベンチジン (DAB)

- (1) DABストック溶液  
0.278 g のDAB (Sigma製 D-8001) を、50mMリン酸バッファー (pH 7.2) の100mlに溶解する (1.3mM溶液)。小分けして冷凍保存しておき、使用前に10倍希釈する。
  - (2) 使用直前に、DAB希釈液10ml当たり30% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液を6  $\mu$  l 加え、終濃度0.02% (v/v) とする。
- 注) その他、次の基質も使用できます。
- (a) 3-アミノ-9-エチルカルバゾール (AEC)
  - (b) 4-クロロナフトール (4CN)

**PALL** 日本ポール株式会社