

# Western blot protocol

## 1. 電気泳動

- 1) 下記の組成の通りにゲルを作製する。
- 2) まず、Separating Gel を作製する。
- 3) TEMED 以外の組成を混合し、最後に TEMED を入れ軽く混ぜた後、セットしておいた泳動板へと流し込み、その上に 75% EtOH を上乘せすることでゲルが空気に接しないようにして静置する。(動かさないこと)
- 4) 約 10-15 分後 Separating Gel が固まったら EtOH を注射器により除く。
- 5) 次いで、Stacking Gel を作製する。
- 6) Separating Gel と同様の方法でゲルを作製した後、Separating Gel の上にややあふれる程度に流し込む。
- 7) この時、泡が浮いていれば注射器により取り除いた後、コームを指し込む。(曲がらないように注意)
- 8) 余分なゲルをキムワイプ等で吸い取った後、30 分ほど静置する。(動かさない)
- 9) ゲルが固まったら、泳動装置にゲル板を設置し、泳動バッファーを満たす。
- 10) コームを抜いた後、ゴミがウエルに残存することがあるので、注射器により空気を噴射することで取り除く。さらに、泳動板の下に空気があれば注射器により抜くこと。
- 11) サンプルをマーカーが一番左になるように各ウエルにアプライする。(左右の端はスマイリングにより曲がることがあるため、余裕があれば流さない)
- 12) 泳動を開始する。ゲル 1 枚あたり 30-35 mA で泳動するが、Separating Gel に入っただけしばらくたってからは、1 枚あたり 60-70 mA へ上げる。(constant current)
- 13) Loading dye が流れきる直前で、泳動を止める。

## 2. 転写

- 1) あらかじめ冷しておいた転写バッファーに転写板(黒)、スポンジ(x 2)、濾紙の順で重ね合わせる。(転写バッファーは濾紙まで完全に浸るまで満たす)
- 2) また同時に、メンブレンをメタノールに 1-2 分間浸し振騰させた後、転写バッファーに浸し揺らしておく。
- 3) 濾紙の上にゲルをマーカーが右になるように置き、その上にメンブレンを重ねる。(この時、ゲルとメンブレンとの間に空気が入らないように注意が必要)
- 4) さらに濾紙、スポンジ(x 2-3)、転写板(赤)の順で重ね合わせ、転写装置へセットする。(氷をつめた上で氷水を流し込み極力冷す)
- 5) 冷蔵庫中にて転写を開始する。ゲルの枚数に関係なく 18 V で O.N. 行う。(constant voltage)

## 3. 転写後

- 1) 転写終了後、赤色の転写板を下にしてメンブレンを取り出す。(この時できるだけメンブレンを小さく切ってしまうとよい)
- 2) あらかじめ作製しておいた 5% FCS 溶液にて 30 分以上振騰する。

- 3) 余分なスキムミルクを落とすため、PBS により 5-10 分間振騰する。
- 4) 1 次抗体希釈液によりメンブレンを浸し、4 で 1 時間振騰する。
- 5) PBS により洗浄を行う。(少なくとも 5 min x 3)
- 6) 2 次抗体希釈液によりメンブレンを浸し、室温で 1-2 時間浸透する。
- 7) PBS により洗浄を行う。(少なくとも 5 min x 3)
- 8) 洗浄後、サランラップの上にメンブレンを並べその上に ECL 液を 2 種類等量ずつたらし 1-2 分間浸す。
- 9) フィルム上にメンブレンを並べ、サランラップにより包装した後、暗室にて感光、現像を行う。

### 各種バッファー

Separating Gel	
6%	15 ml (2 枚)
H <sub>2</sub> O	6 ml
30% acrylamide mix	3 ml
1.0 M Tris (pH 8.8)	5.7 ml (950 $\mu$ l x 6)
10% SDS	150 $\mu$ l
30% ammonium persulfate (APS)	50 $\mu$ l
TEMED	12 $\mu$ l
8%	15 ml (2 枚)
H <sub>2</sub> O	5 ml
30% acrylamide mix	4 ml
1.0 M Tris (pH 8.8)	5.7 ml (950 $\mu$ l x 6)
10% SDS	150 $\mu$ l
30% ammonium persulfate (APS)	50 $\mu$ l
TEMED	9 $\mu$ l
10%	15 ml (2 枚)
H <sub>2</sub> O	4.1 (820 $\mu$ l x 5)
30% acrylamide mix	5 ml
1.0 M Tris (pH 8.8)	5.7 ml (950 $\mu$ l x 6)
10% SDS	150 $\mu$ l
30% ammonium persulfate (APS)	50 $\mu$ l
TEMED	6 $\mu$ l
12%	15 ml (2 枚)
H <sub>2</sub> O	4.9 ml (980 $\mu$ l x 5)
30% acrylamide mix	6 ml
1.0 M Tris (pH 8.8)	5.7 ml (950 $\mu$ l x 6)
10% SDS	150 $\mu$ l
30% ammonium persulfate (APS)	50 $\mu$ l
TEMED	6 $\mu$ l

Stacking Gel	
5%	6 ml (2 枚)
H <sub>2</sub> O	4.1 (820 μl x 5)
30% acrylamide mix	1 ml
1.0 M Tris (pH6.8)	750 μl
10% SDS	60 μl
30% ammonium persulfate (APS)	20 μl
TEMED	6 μl

Running Buff.	final	x 10 (3 L)
Tris	25 mM	90.9 g
Glycine	192 mM	432 g
SDS	0.1%	30 g

Transfer Buff.	final	x 10 (3 L)
Tris	25 mM	90.9 g
Glycine	192 mM	432.4 g