

ウエスタン・ブロッティング (Western Blotting)

試薬 :

2x Sample Buffer

125mM Tris-HCl (pH6.8), 4% SDS, 20% Glycerol, 10% 2-Mercaptoethanol, 0.02% BPB

HRP 標識 2 次抗体

Anti-Rabbit IgG (H+L) Goat IgG Fab' HRP (IBL, #17502) あるいは
Anti-Mouse IgG (H+L) Goat IgG Fab' HRP (IBL, #17601)

ブロッキング溶液

3 % milk, 1 % BSA, 0.05 % NaN_3 /PBS

洗浄液

0.05% Tween20/PBS

ECL western detection kit

(GE healthcare, #RPN2106)

方法 :

1. PAGE :

調製済みサンプル 10 - 20 μ L を 7-12 %濃度のアクリルアミドゲルにアプライし、電気泳動

2. ブロッティング : 泳動操作によりナイロンメンブランなどの膜に転写

3. 転写膜のブロッキング : ブロッキング溶液 37°C で 2 時間

4. 洗浄液で洗浄 : 5 分、3 回

5. 1 次抗体の反応 (指定の濃度で) : 37°C で 2 時間 あるいは 4°C で一昼夜

6. 洗浄液で洗浄 : 5 分、3 回

7. 2 次抗体の反応 (製品指定の濃度で) : 37°C で 1 時間

8. 洗浄液で洗浄 : 5 分、3 回

9. ECL による検出 : 浸透時間 : 1 分間、感光時間は 1 分間~1 時間 (サンプルによる)

サンプル調製例

1) 細胞 Lysate

- ① 培養細胞を PBS で洗浄、必要であればトリプシン処理
- ② トリプシン停止後、PBS で洗浄 (細胞数を計測しておく)
- ③ 2x Sample Buffer に懸濁(1 - 5 x 10⁵ cells/10 μ L)
- ④ ソニケーション
- ⑤ 沸騰処理 : 3 分間
- ⑥ 遠心分離 : 14000rpm, 4°C で 3 分間
- ⑦ 上清を使用する

2) 細胞培養上清

そのまま使用する