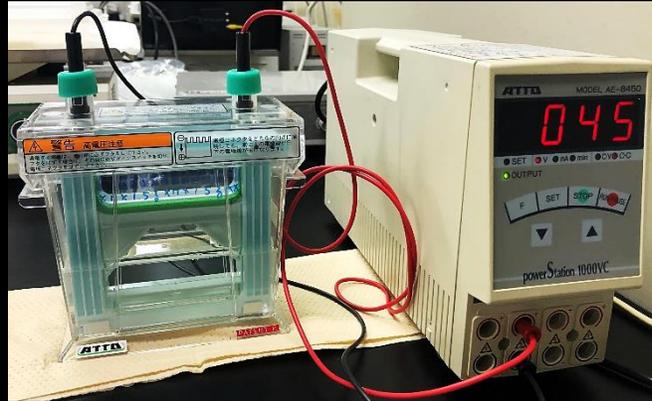
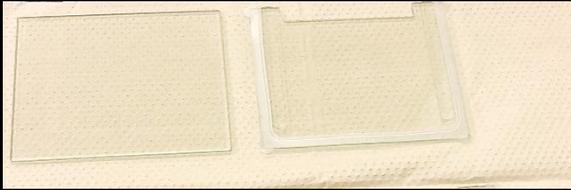


ウェスタンブロットティング法による細胞骨格 タンパク質チューブリンの検出

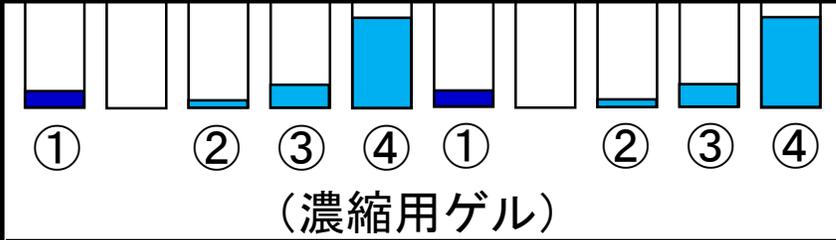
実験テキストを理解のするための写真資料

担当：農学部応用動物学コース 原山 洋



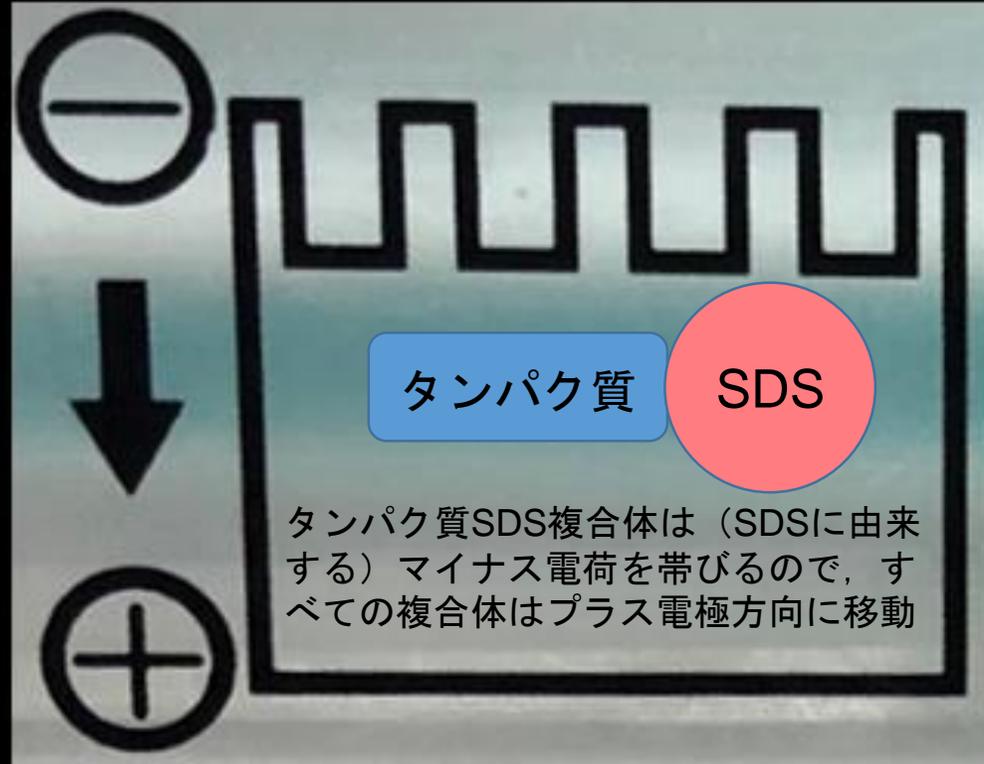
実験テキスト P1
材料 SDS-PAGEゲル
(電気泳動済)の準備

- ✓ 方法については、
前週 (野村先生)
の講義を参照
- ✓ サンプルバッ
ファーは還元剤
(2-メルカプトエタ
ノール)含有
- ✓ 染色済の分子量
マーカーのバンド
はゲル内および
PVDF膜(後述)上で
目視可能



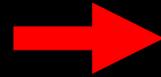
10% ポリアクリルアミドゲル
(分離用ゲル)

- ① 染色済の分子量マーカー (3 μ L)
- ② 雄性生殖細胞抽出液(5.0×10^4 個/ μ L) 1 μ L
- ③ 雄性生殖細胞抽出液(5.0×10^4 個/ μ L) 5 μ L
- ④ 雄性生殖細胞抽出液(5.0×10^4 個/ μ L) 20 μ L

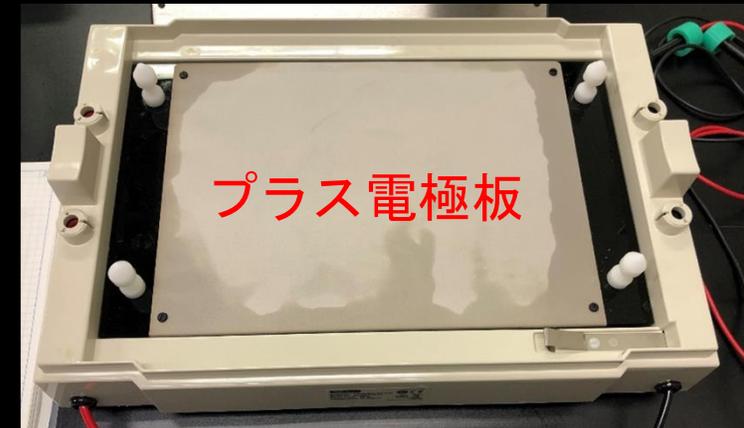
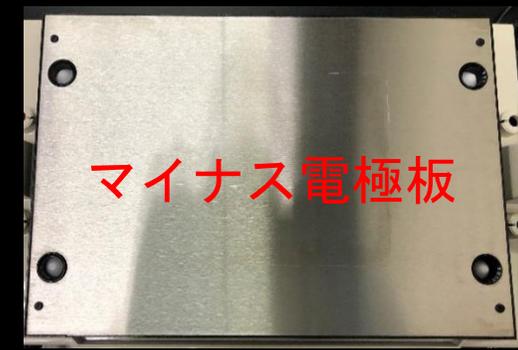




BIO-RAD社製の転写装置
トランスブロットSDセル



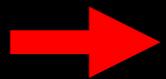
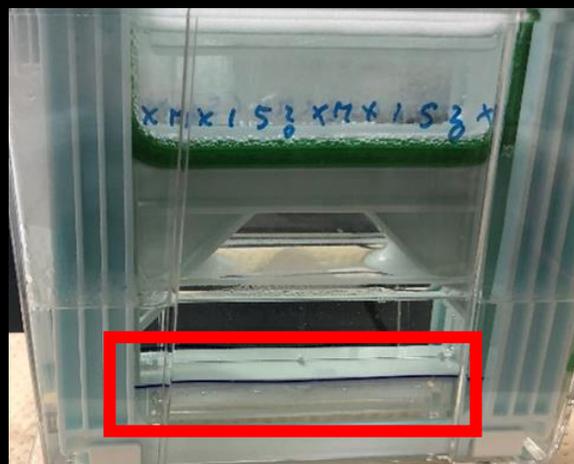
外蓋を外した転写装置



<https://www.bio-rad.com/ja-jp/product/trans-blot-sd-semi-dry-transfer-cell?ID=b92801aa-76b7-45c9-825e-672589d01b00>

実験テキスト P3 実験方法 1)

- ✓ 転写装置の外蓋とマイナス電極版を外す。
- ✓ マイナス電極板および土台面のプラス電極板を超純水を湿らせたキムワイプ紙で拭く。



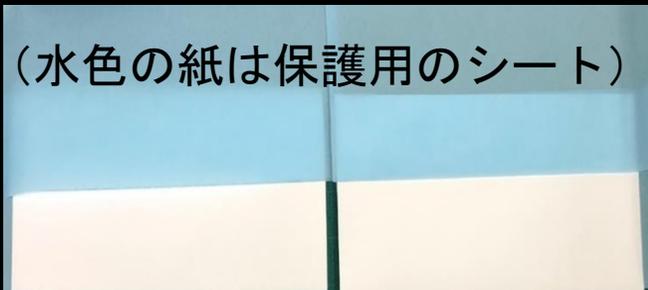
膜転写バッファー (Membrane transfer buffer)	
Tris	5.82 g
Glycine	2.93 g
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	37.5 mg
Ethanol	200 ml
超純水で 1000 ml にメスアップ	

実験テキスト P3 実験方法 2) および3)

- ✓ 手に由来するタンパク質の混入を防止するためにディスポーザブル手袋を着ける。
- ✓ ブロモフェノールブルーのラインが分離用ゲルの底部付近に達した段階で電気泳動を終了し、ゲルをガラス板からはずす。
- ✓ 分離用ゲルだけを膜転写バッファーの入った反応容器に入れ、5分間振盪してゲルをバッファーに十分なじませる。
- ✓ ゲルは壊れやすいので丁寧に扱う。

PVDF (PolyVinylidene DiFluoride) 膜

(水色の紙は保護用のシート)



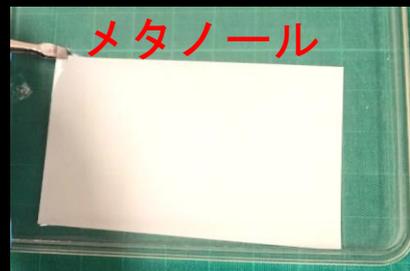
https://www.merckmillipore.com/JP/ja/product/Immobilon-P-PVDF-Membrane,MM_NF-IPVH00010

厚手のろ紙



ろ紙を膜転写バッファの入った反応容器に入れ、振盪してバッファに十分なじませる。

PVDF膜：SDS-PAGEによりゲル内で分離させたタンパク質(バンド)を転写(移動させて表面に張り付け、不動化)させるための膜



乾燥状態のPVDF膜は疎水性を示すので、PVDF膜をメタノールに5秒間浸漬して親水化処理



親水化処理後のPVDF膜を膜転写バッファの入った反応容器に入れ、5分間振盪してバッファに十分なじませる。

転写装置のマイナス電極板

ろ紙

分離用ゲル

タンパク質

SDS

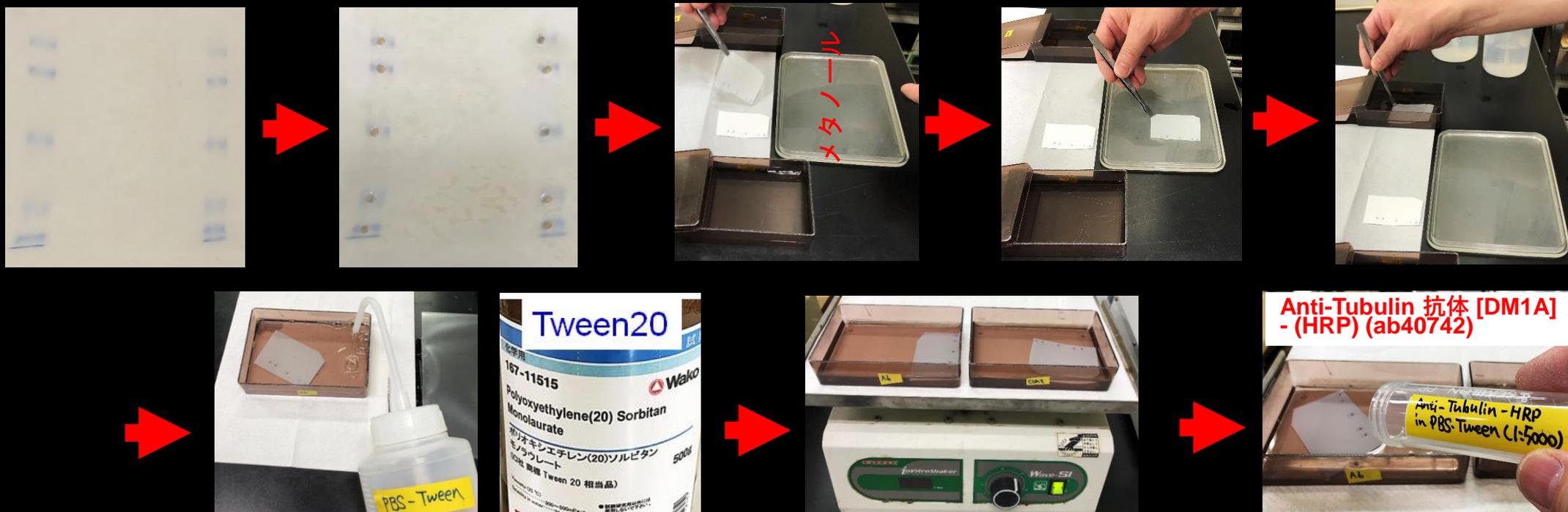
PVDF膜

ろ紙

転写装置のプラス電極板

実験テキスト P3 実験方法 4)～10)

- ✓ 膜転写バッファーになじませたろ紙を転写装置のプラス電極板上に載せる。その際にろ紙と電極板の間に空気の層ができないように注意する。
- ✓ 膜転写バッファーになじませたPVDF膜をろ紙の上に、空気の層ができないように載せる。
- ✓ 膜転写バッファーになじませた分離用ゲルを、PVDF膜の上に、空気の層ができないように載せる。
- ✓ 膜転写バッファーになじませたろ紙を分離用ゲルの上に、空気の層ができないように載せる。
- ✓ 土台面のプラス電極板に溢れ出た膜転写バッファーをキムワイプ紙で拭きとる。
- ✓ マイナス電極板をセットする。その際に空気の層ができないように注意する。
- ✓ 外蓋をセットする。
- ✓ リード線で転写装置と電源を接続する。プラス・マイナスの誤接続が無いように注意する。
- ✓ 電源の電流値リミットを500 mAに、電圧値リミットを22 Vに設定し、出力ボタンをONにする。
- ✓ 30～60分後に出力ボタンをOFFにする。



Anti-Tubulin 抗体 [DM1A]
- (HRP) (ab40742)



抗体の情報
<https://www.abcam.co.jp/alpha-tubulin-antibody-dm1a-loading-control-hrp-ab40742.html>

実験テキスト P3~4 実験方法 11)~13)

- ✓ 転写装置の外蓋およびマイナス電極板をはずし、ろ紙およびゲルを丁寧にはがす。
- ✓ 先のとがった鉛筆を用いてマーカースポットに穴をあける。PVDF膜を乾燥させた状態で一時保存できる。
- ✓ 一時保存されたPVDF膜を使用する場合にはメタノールに5秒間浸漬して親水化処理を施す。
- ✓ PVDF膜をPBS-Tweenを含む反応容器に入れ、シェーカーで5分間振盪して洗浄する。
- ✓ PBS-Tweenを取り除き、ブロッキングバッファー(BB)を入れてシェーカーで30分間振盪する。
- ✓ BBを取り除き、抗体溶液(HRP標識-抗tubulin抗体, 5000倍希釈)を入れてシェーカーで30分間振盪する。



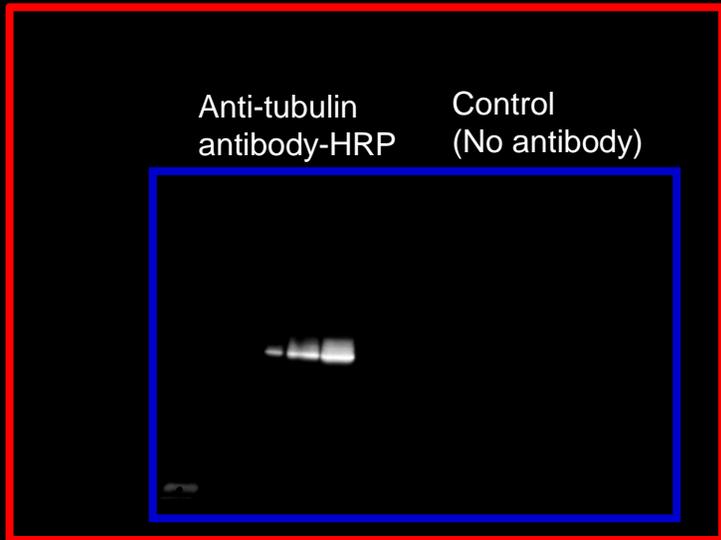
実験テキスト P4 実験方法 14)~17)

- ✓ 抗体溶液を取り除き，適量のPBS-Tweenを加えてシェーカーで5分間振盪することでPVDF膜を洗浄する。この洗浄処理を3回行う。
- ✓ 強化化学発光試薬 (ECL) でPVDF膜を処理したのちに，高感度化学発光撮影装置に入れる。
- ✓ 明視野でPVDF膜を撮影したのちに，ECL発光を暗視野で撮影する。
- ✓ ウェスタンブロッティング後にPVDF膜をCBB染色する。

ECL 検出試薬 (ECL Prime Western Blotting Detection Reagent) <https://www.cytivalifesciences.co.jp/catalog/1634.html>

高感度化学発光撮影装置 (新機種) <https://www.atto.co.jp/products/geldocumentation/highsensitivitychemi/WSE-6200H>

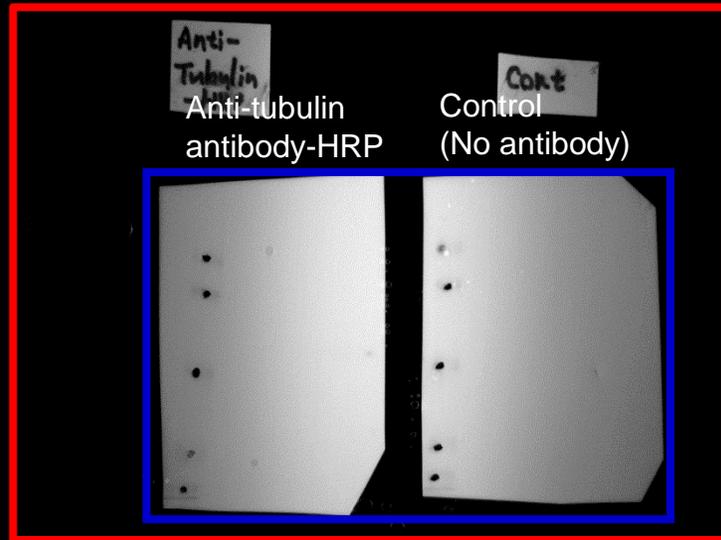
暗視野でECLの発光を撮影



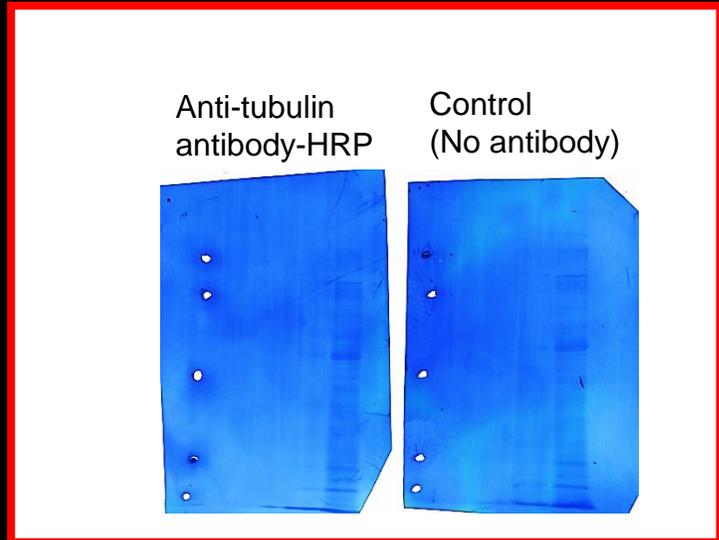
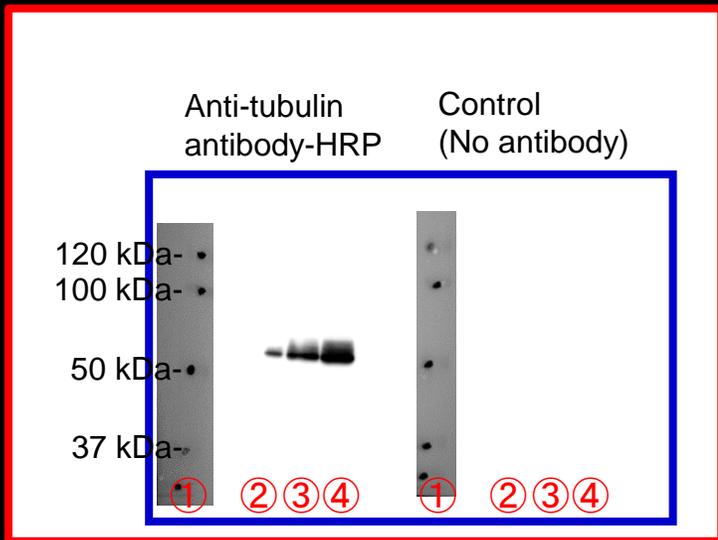
ECL発光像を白黒反転



明視野でPVDF膜を撮影



ECL発光像の白黒反転像にマーカーの位置情報を追加



ウェスタンブロットティング後のPVDF膜のCCB染色像

レポートとして以下の問に答えなさい。

- 問1. 本実験のウェスタンブロッティングにより検出されたチューブリンのバンドの相対分子マス（分子量）を答えなさい。
- 問2. 本実験で使用した「SDS-PAGE分離用ゲル中のタンパク質バンドのPVDF膜への電気転写」の原理を説明しなさい。
- 問3. 本研究では、HRP標識抗体およびECLを用いたウェスタンブロッティング法によりチューブリンを検出したが、その原理を説明しなさい。