

3.8 過酸化水素によるホースラディッシュペルオキシダーゼの不活性化

ECLウェスタンブロットリング検出システムは、高感度で簡便な化学発光検出試薬です。ここでは、

HRP標識二次抗体を用いた抗原の標識と検出
HRPの不活性化
最初に検出したタンパク質による妨害のない別のタンパク質の標識 / 検出

について行った実験を紹介します。

- 1) ラット腎臓溶解液 (20 µg/lane) を電気泳動し、Hybond-ECLにエレクトロブロットリングします。
- 2) メンブレンは10%スキムミルクを含むPBS-T (Tween0.1%) で1.5時間室温でブロッキングをおこなった後、PBS-Tで5分×3回洗浄します。
- 3) メンブレンを2つのセクションに切り、別々に処理します。
 メンブレン : 抗アクチンマウスモノクローナル抗体と抗 チューブリンマウスモノクローナル抗体を各々1 : 3,000希釈PBS中にて1時間反応
 メンブレン : 抗アクチンマウスモノクローナル抗体を1 : 3,000希釈PBS中にて1時間反応
- 4) メンブレン 、 ともPBS-Tで5分間×3回洗浄します。
- 5) HRP標識二次抗体を反応させます。
 メンブレン : 抗マウスIgG-HRP標識二次抗体と抗マウスIgM-HRP標識二次抗体をPBS-Tに1 : 3,000希釈で30分反応
 メンブレン : 抗マウスIgM-HRP標識二次抗体をPBS-Tに1 : 3,000希釈で30分反応
- 6) メンブレン 、 ともPBS-0.3%Tween20で5分間×3回洗浄します。
- 7) メンブレン 、 ともPBS-Tで5分間×3回洗浄します。
- 8) ECLで1分間反応後、ラップに包み、Hyperfilmに30秒露光します。
- 9) PBS-TあるいはPBS-0.3%Tween20で10分×2回洗浄し、検出試薬を除去します。
- 10) メンブレン を15% H_2O_2 in PBS (30% H_2O_2 とPBSを1:1で混合) に30分インキュベートし、HRPを不活性化します。
 メンブレン はPBS中で一晩保存します。
- 11) メンブレン 、 ともPBS-Tで5分間×3回洗浄します。
- 12) メンブレン をECLで1分間反応後、ラップに包み、Hyperfilmに1分露光します。
- 13) PBS-Tで10分×2回洗浄し、検出試薬を除去します。
- 10) メンブレン を抗 チューブリンマウスモノクローナル抗体 1 : 3,000希釈PBS-Tで30分インキュベートします。
- 15) PBS-Tで5分間×3回洗浄します。
- 16) 抗マウスIgG-HRP標識二次抗体をPBS-Tに1 : 3,000希釈で30分反応させます。
- 17) PBS-0.3%Tween20で5分間×3回洗浄後、PBS-Tで5分間×3回洗浄します。
- 18) メンブレン 、 をECLで1分間反応後、ラップに包み、Hyperfilmに1分露光します。

HRPの不活性化に必要なペルオキシドの濃度は、HRPの量やインキュベート時間によって異なります。このサンプルでは15%のペルオキシドが必要でしたが、これによるメンブレンの損傷や処理後の抗体反応への影響は見られませんでした。この方法を使うことで、検出系を変えることなく、別のタンパク質に関する情報を得ることができました。



図3-2

Rat Kidney Lysate を20 µg/レーンで泳動しHybond-ECLニトロセルロースメンブレン (RPN202QD) にプロットした。

ブロッキングは0.1% Tween 20を含むPBSに10%スキムミルクを加えたバッファーを用いた。ブロッキング後、メンブレンは2つに分けて以下の条件下で抗体反応を行った。

(メンブレン I) 抗チューブリン抗体と抗アクチン抗体を含む反応液で1時間インキュベートした後、メンブレンを洗浄し、二次抗体抗-mouse IgG-HRP (Sigma) と IgM-HRP (Cappel) を含む反応液でさらに30分インキュベートした。

(メンブレン II) 抗アクチン抗体で1時間インキュベートした後、メンブレンを洗浄し、二次抗体 抗-mouse IgM-HRP で30分間インキュベートした。

各メンブレンは ECL 検出試薬で1時間の反応後、Hyperfilm ECL (RPN2103) に露光した。



図3-3

メンブレン II は15%のH₂O₂を含んだPBS中で30分間インキュベートした後、ECL 検出試薬に1分間反応させて Hyperfilm ECL に1分間露光して検出した。

メンブレン I は PBSで一晩漬けて保存した。



図 3-4

メンブレン II は抗チューブリン抗体で1時間インキュベートした後、Anti-mouse IgG-HRPで30分間インキュベートした。

メンブレン II とメンブレン I (PBSで一晩保存したもの) をECL検出試薬 による反応後、Hyperfilm ECLに30 秒露光して検出。