

3.7 ブロッキング条件の至適化

抗体濃度の至適化とブロッキング条件の至適化は、ECLシリーズのような高感度な検出系で、バックグラウンドが低く、良好なS/N比の結果を得るための重要なポイントです。

タンパク質をメンブレンにトランスファーした後に、抗体や他のプローブが非特異的に結合しないよう、非特異的な結合部位をあらかじめ飽和させておく必要があります。効果的なブロッキングがおこなわれないと、高いバックグラウンドをもたらします。

目的タンパク質の性質は個々のタンパク質によりさまざまです。また、抗体との結合性も、抗体の種類や抗原タンパク質との組み合わせにより異なります。したがって、すべてのタンパク質に対して最良の結果をだすプロトコルというものはありません。以下に、ウェスタンブロッティングでよく用いられるブロッキング溶液とその特徴をご紹介します。これらのブロッキング剤は、ECLシリーズに用いることができます。

通常ブロッキングは、室温30分～1時間、あるいは4 ー晩でおこないます。

ブロッキング剤濃度、反応温度を上げることで、効果が改善される場合もあります。

ECL Blocking agent (コード番号：RPN2125)

ECLおよびECL Plus専用のブロッキング剤です。高感度な検出系に至適化したブロッキング剤で、バックグラウンドの低い良好な結果が得られます。

注意) ECL Advanceで検出する場合は、キットに付属の専用ブロッキング剤をご使用ください。

スキムミルク / Tween 20

安価で効果の高いブロッキング剤です。通常5%スキムミルクと0.1%Tween20をPBSまたはTBSに加えて使用します。多くの場合、バックグラウンドの非常に低い良好な結果が得られますが、抗原によっては、抗体結合部位までマスキングされる場合があります。ECL、ECL Plusの推奨ブロッキング剤のひとつです。

スキムミルク

タンパク質実験操作で最も一般的なブロッキング剤です。非常に安価であり、多くの場合、バックグラウンドの低い良好な結果が得られます。通常5%スキムミルク濃度になるよう、PBSまたはTBSに加えて使用します。スキムミルクの欠点は、保存が利かないため、用事調製の必要があることと、抗原までマスキングしてしまうことがある点です。このような場合、スキムミルク濃度を1%まで下げることにより、シグナルが強くなる場合がありますが、改善されない場合は、他のブロッキング剤を試します。

Fish Gelatin (コード番号：RPN416)

フィッシュゼラチンは動物由来のものより水素結合を形成するアミノ基が少ないため、低バックグラウンドになります。通常2%濃度で用いられ、溶解性もよく、この濃度であれば、4 ーでもゲル化しません。欠点は、抗原によってはマスキングされてしまう点と、ビオチンのような競合する物質が含まれる点です。また、比較的高価な試薬になります。

BSA

価格もそれほど高価でなく、良好なシグナル強度が得られます。通常PBSに0.3～3%の濃度でPBSに加えて使用します。炭水化物の夾雑物があるので、レクチンをプローブに用いた場合、バックグラウンドが高くなる可能性があります。リン酸化チロシンの抗体による検出では、2%BSAがブロッキング剤としてよく用いられます。

血清 (ウマ血清あるいはウシ胎仔血清)

0.02%アジ化ナトリウムを添加した10%血清としてよく用いられます。このブロッキング剤は高価で、潜在的に交差反応を引き起こす免疫グロブリンを含んでいるという欠点があります。二次抗体やProtein Aをプローブとして用いる系には向きません。

界面活性剤

NP-40やTritonのような界面活性剤は、メンブレン上のタンパク質と効率よく置換されてしまうので、使用は避けるべきです。Tween-20は使用できますが、濃度を0.3%以上にすべきではありません。一般的には0.1%濃度で5%スキムミルクと組み合わせて使用します。

ブロッキング剤のミックス

複数のブロッキング剤を組合わせて使用することで、良好な結果が得られる場合があります。

例)

- ・ 1% ECL blocking agent (RPN2125)、 0.5% BSA
- ・ 3% Fish Gelatin (RPN416)、 10% スキムミルク in PBS

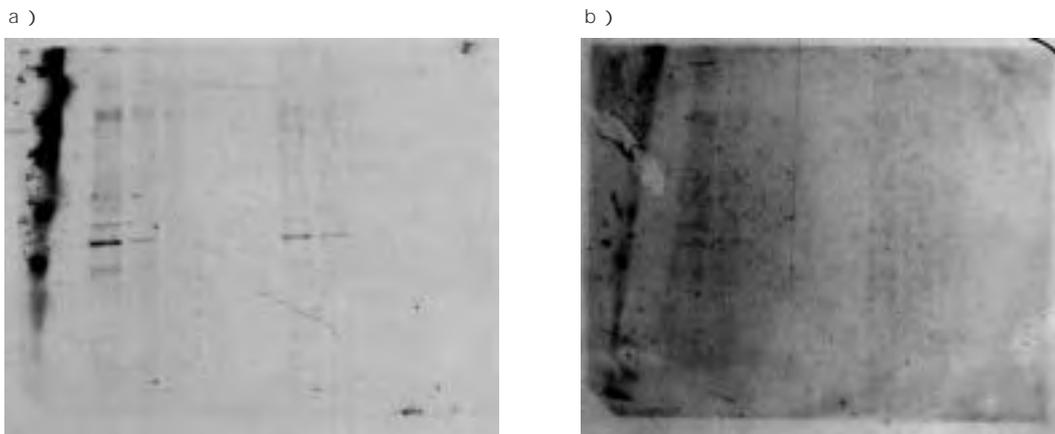


図3-1 ブロッキングバッファーの違いによるバックグラウンドの比較

ラット肝臓サンプルをSDS-PAGEし、メンブレンにプロットしたものを、抗リン酸化チロシン抗体PY20で検出しました。

ブロッキングバッファー：a) BSA in TBS-T b) スキムミルク in TBS-T

スキムミルクにはリン酸化タンパク質が含まれるため、リン酸化タンパク質の検出には適しません。