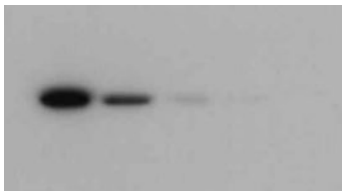


## 1. Western Q 循環パルス法(標準プロトコール)によるウエスタンブロッティング免疫染色

各種抗体を一次抗体として用いたウエスタンブロッティング免疫染色の結果を以下に示す。IGF-1 刺激後(50ng/ml、5分間)のマウス培養細胞 P19 由来全タンパク 10  $\mu$ g から 0.625  $\mu$ g までの 2 倍希釈系列を PVDF 膜にブロッティング。従来法は溶液中における振とう、Western Q では循環パルス法により免疫染色を行った。従来法と Western Q 循環パルス法で、抗体濃度は(一次抗体、二次抗体とも)同じ濃度(抗体メーカー推奨)とした。

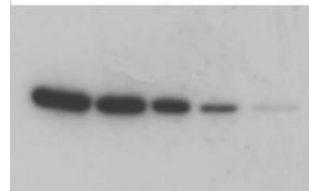
### A) $\beta$ -Actin (C4) (Santa Cruz)

1/3000 希釈



従来法: 4 時間

露光 40 秒



←43kDa

Western Q 循環パルス法: 40 分

露光 40 秒

従来法: ブロッキング 1 時間(5%スキムミルク)、一次抗体 1 時間、二次抗体 1 時間、洗浄 計 60 分 合計 4 時間

Western Q: 標準プロトコール—ブロッキング 5 分(0.5%スキムミルク)、一次抗体 15 分、二次抗体 15 分、洗浄 5 分 計 40 分

二次抗体: Polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins/HRP (Dako)、1/7500 希釈。

化学発光に ECL (GE Healthcare) を使用し、X 線フィルムに露光。

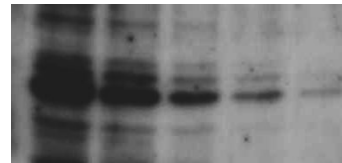
### B) Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (E10) Mouse mAb (Cell Signaling) 1/2000 希釈

抗体メーカー 4°Cオーバーナイト推奨



従来法: 一次抗体 16 時間

露光 2.5 分



← 44kDa

← 42kDa

Western Q 循環パルス法: 40 分

露光 10 分

従来法: ブロッキング 1 時間(5%スキムミルク)、一次抗体 16 時間(4°C)、二次抗体 1 時間、洗浄 計 60 分 合計 18 時間

Western Q: 標準プロトコール—ブロッキング 5 分(0.5%スキムミルク)、一次抗体 15 分(室温)、二次抗体 15 分、洗浄 5 分 計 40 分

二次抗体: Polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins/HRP (Dako)、1/7500 希釈。

化学発光に ECL Plus (GE Healthcare) を使用し、X 線フィルムに露光。

### C) Phospho-Akt (Ser473) (Cell Signaling) 1/1000 希釈

抗体メーカー 4°Cオーバーナイト推奨



従来法: 一次抗体 16 時間

露光 5 分



←60kDa

Western Q 循環パルス法: 85 分

露光 15 分

従来法: ブロッキング 1 時間(5%スキムミルク)、一次抗体 16 時間(4°C)、洗浄 30 分、二次抗体 1 時間、洗浄 30 分 計 18 時間

Western Q: 変更プロトコール—ブロッキング 5 分、一次抗体 1 時間(室温)、二次抗体 15 分、洗浄 5 分 計 85 分

二次抗体: Polyclonal swine anti-rabbit IgG/HRP (Dako)、1/7500 希釈。

化学発光に ECL Plus (GE Healthcare) を使用し、X 線フィルムに露光。

従来法と比較すると、Western Q (循環パルス法) では、数倍～10 数倍の速度で反応が起こっている。

☞ 従来法でオーバーナイトかかる抗体とサンプルの組み合わせでは、抗体反応の時間を増やす、または抗体濃度を上げるといった調整が必要となります。

## 2. メンブレン 2 枚重ねでの使用

メンブレンを 2 枚重ねた状態で(同じ抗体で)Western Q(循環パルス法)による免疫染色を行った。

### 【材料】

サンプル: 各レーンにはヒト培養細胞由来全タンパク質を等量(3.3  $\mu$ g)ずつ電気泳動後、PVDF 膜(80 $\times$ 80mm)にブロッティング

ブロッキング: 0.5% スキムミルク (filtrated)

一次抗体溶液: Mouse monoclonal  $\beta$ -Tublin (Sigma)、1/2000 希釈

二次抗体溶液: Polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins/HRP (Dako)、1/7500 希釈

### 【反応条件】

反応条件は Western Q 取扱説明書の標準プロトコールに従った。

ブロッキング: 8ml, Speed 2 で循環、5 分間

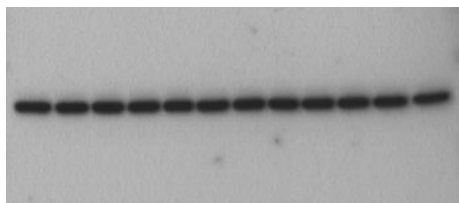
一次抗体: 8ml, Speed 2 でパルスフロー循環、15 分間

二次抗体: 8ml, Speed 2 でパルスフロー循環、15 分間

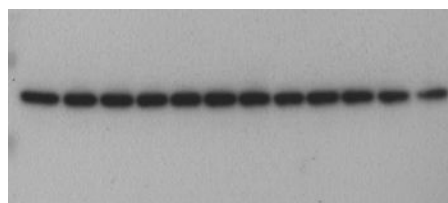
洗浄: 100ml, Speed 3 で排出

検出試薬は ECL (GE Healthcare) を使用。X 線フィルムで 10 秒露光

### 【結果】



上側のメンブレン



下側のメンブレン

全体にほぼ均等に免疫染色が進んでいると考えられる。

## 3. Western Q インキュベーション法(簡易法)によるウエスタンブロッティング免疫染色

Western Q を用いたウエスタンブロッティング免疫染色の簡易法である「インキュベーション法」により免疫染色を行った。

### 【材料】

サンプル: 各レーンには IGF-I 刺激後(50ng/ml、5 分間)のマウス培養細胞 P19 由来全タンパク質 10  $\mu$ g から 0.625  $\mu$ g までの 2 倍希釈系列を PVDF 膜(45 $\times$ 75mm)にブロッティング

ブロッキング: 0.5% スキムミルク (filtrated)

一次抗体溶液:  $\beta$ -Actin (C4) (Santa Cruz)、1/2000 希釈( $\times$ 1)または 1/700 希釈( $\times$ 3)

二次抗体溶液: Polyclonal goat anti-mouse IgG/HRP (Dako)、1/7500 希釈( $\times$ 1)または 1/2500 希釈( $\times$ 3)

一次抗体および二次抗体の濃度をともに $\times$ 1とする免疫染色、ならびに濃度をともに $\times$ 3とする免疫染色の 2 種類のインキュベーション法による実験を行った。

## 【反応条件】

反応条件は Western Q 取扱説明書のインキュベーション法プロトコールに従った。

ブロッキング: 3ml、5 分間インキュベーション後、Speed 2 で排出

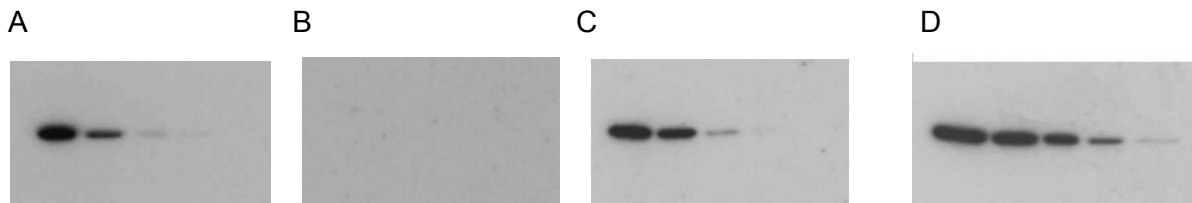
一次抗体: 3ml、10 分間インキュベーション後、Speed 2 で排出

二次抗体: 3ml、10 分間インキュベーション後、Speed 2 で排出

洗浄: 100ml、Speed 3 で排出

検出試薬は ECL Plus (GE Healthcare) を使用。X 線フィルムで 40 秒露光

## 【結果】



従来法	Western Q インキュベーション法	Western Q インキュベーション法	Western Q 循環パルス法(参考)
抗体濃度 ×1	抗体濃度 ×1	抗体濃度 ×3	抗体濃度 ×1
露光はすべて 40 秒			

$\beta$ -Actin の場合、抗体濃度を一次、二次ともに 3 倍にすることにより、従来法とほぼ同等の結果を得た。インキュベーション法で感度を上げるためには、抗体濃度を上げる必要がある。