ウェスタンブロッティング実験ハンドブック

2023年8月修正版

効率の良い
実験のために！

目次

ウェスタンブロッティング検出の操作と留意点

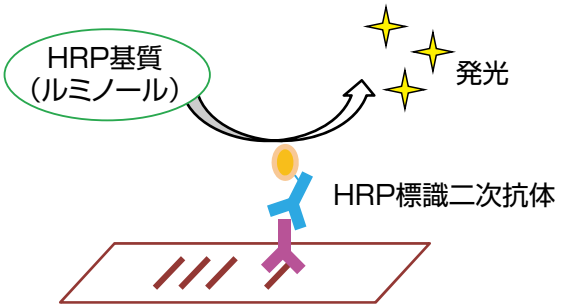
1. 電気泳動（SDS-PAGE）
2. メンブレンへの転写
3. ブロッキング
4. 一次抗体反応
5. 二次抗体反応
6. 検出（化学発光）

トラブルシューティング

実験ノート

ウェスタンブロッティングに使用する試薬

実験サポートツール



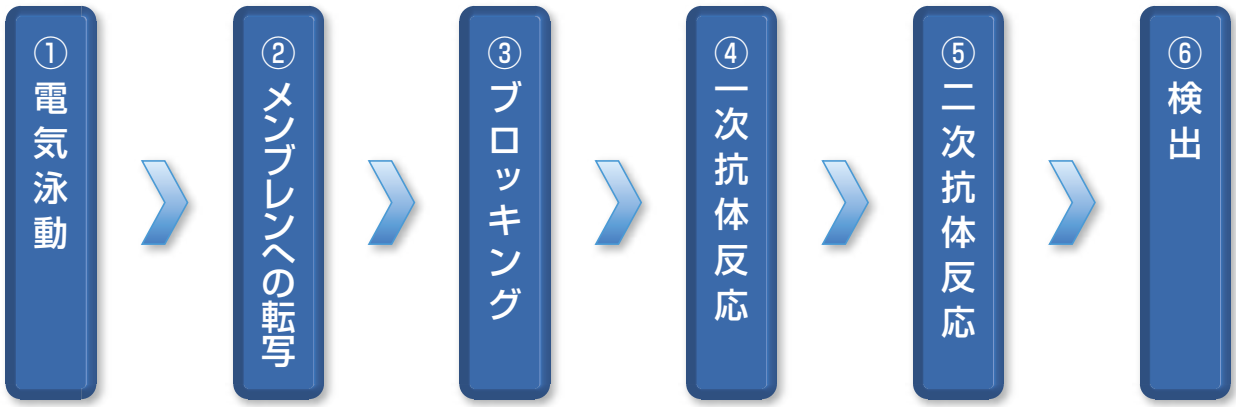
that's GOOD science!™

Clontech TaKaRa cellartis

本冊子では、ウェスタンブロッティングによって目的タンパク質を検出する際の操作のポイントを示しています。

ウェスタンブロッティング法は、タンパク質試料を電気泳動により分離させた後、メンブレンに転写し、抗原抗体反応を用いて目的タンパク質を検出する手法です。この長い実験操作の各ステップが全て成功してはじめて良い結果が得られます。
本冊子では、ウェスタンブロッティング実験の流れに沿って、各ステップの操作方法と留意点をわかりやすく解説しています。
また、トラブルシューティングも充実していますので、問題解決のための手引きとしても本冊子をご活用ください。

【操作の流れ】



ウェスタンブロッティング検出の操作と留意点

①電気泳動 (SDS-PAGE)
1.5 hr

電気泳動には、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）、等電点電気泳動、二次元電気泳動があり、ウェスタンブロッティングにはSDS-PAGEがよく用いられます。

① 電気泳動前の留意点

ゲルの選択
目的タンパク質の分子量が既知なら、そのタンパク質がゲルの中央に来るようにゲル濃度を選択する。不明ならグラジエントゲルを使用する。

サンプルの調製
一般的には還元処理後に電気泳動を行う場合が多いが、DTT やメルカプトエタノールなどの還元剤で処理することでタンパク質の立体構造が変化し、一次抗体が反応しなくなる場合がある。その可能性が考えられる場合には、予め非還元処理のサンプルも用意する。

分子量マーカーの選択
メンブレンに正しく転写されたかどうかの確認ができる着色マーカーを利用するとよい。但し、着色マーカーはタンパク質に色素が結合しているため正確な分子量の測定には適さない。分子量も推定したい場合には、実験に適した発光検出マーカーを選択する。

コントロールサンプルの設定
電気泳動や転写が問題なくできていることを検証するためにも、目的サンプルと同時にネガティブコントロールとポジティブコントロールも用意しておくとよい。

比較サンプルの設定
転写効率や検出系においてメンブレン間に差が出る場合がある。比較すべきサンプルは同一のゲル上で泳動を行う。

②メンブレンへの転写
セミドライ式　1.5 hr
タンク式　O/N

電気泳動ゲルからメンブレンにタンパク質を転写します。
タンパク質の転写には一般的にエレクトロニックトランスファー（通電による転写）が用いられます。

② メンブレンへの転写を始める前の留意点

転写装置の選択
ブロッティング装置にはタンク式とセミドライ式がある。タンク式は転写効率が高く均一な転写が望めるが、バッファー量が多く、冷却しながら長時間を要する。一方、セミドライ式は短時間で転写ができ、少ないバッファー量で済む。高分子タンパク質や塩基性タンパク質は転写効率が低いので、タンク式が適している。

メンブレンの選択
メンブレンには PVDF（ポリビニリデンジフロライド）とニトロセルロースがある。PVDF はタンパク質と結合性が高く、高感度で破れにくく、リプロービングにも適している（使用前にメタノールで親水化が必要）。一方、ニトロセルロースは親水化は不要であるが破れやすい。

③ブロッキング
1.0 hr以上 or O/N

転写したメンブレンに検出用の抗体が非特異的に結合することを防ぐため、メンブレン上の転写されていない部分のブロッキングが重要です。

洗浄
必要に応じて

ウェスタンブロッティングの各工程の間には必ず洗浄工程が必要です。洗浄により未反応の試薬を除去してバックグラウンドを抑えます。

④一次抗体反応
1.0 hr以上 or O/N

目的タンパク質を検出する一次抗体溶液を用いて反応を行います。

洗浄
0.5 hr

⑤二次抗体反応
1.0 hr

一次抗体を検出するために二次抗体を使用します。予め適正使用量をドットブロットで検討しておきます。

洗浄
0.5～1.0 hr

⑥検出（化学発光・発色）

検出方法には化学発光法と発色法があります。発色法は簡便ですが、検出感度の高さは化学発光法がはるかに優れており、よく使用されます。
化学発光検出では、基質が二次抗体のHRPにより分解される際の発光により、目的タンパク質の有無や量を検出します。

③ ブロッキング前の留意点

転写面のマーキング
転写したメンブレンの転写面がわからなくなる場合がある。電気泳動に有色分子量マーカーを加えるか、転写後ブロッキングをする前にメンブレンの一角をほんの少し切り落としておくとよい（切り落とす方向を自分で決めておく）。

ブロッキング剤の選択
特定のブロッキング剤だけでは効果がない場合がある。また、過剰なブロッキングは抗原抗体反応や標識抗体の酵素活性を阻害する場合があるので、数種のブロッキング剤を用意して実験系に適したブロッキング剤をドットブロットで予備検討しておく。

★この先はメンブレンを乾かさないよう注意して作業を行う。

洗浄操作の留意点

洗浄バッファーの選択
PBSまたはTBSバッファーが一般的。目的タンパク質や検出試薬によって選択する。洗浄バッファーにはHRPを阻害するアジ化ナトリウムが含まれない方がよい。リン酸化タンパク質にはTBSまたはTween20入りTBSが適している。

Tween20の添加
必要に応じて洗浄バッファーにTween20（終濃度0.05%）を添加し、メンブレンが十分浸る量で洗浄する。

④ 一次抗体反応の留意点

一次抗体の選択
抗体には、1つのエピトープを認識するモノクローナル抗体と様々なエピトープを認識するポリクローナル抗体がある。また、一次構造を認識するものと立体構造を認識するものとがあり、後者は目的タンパク質を変性または還元すると結合しなくなる。抗体作製時の免疫抗原が変性タンパク質の場合は、変性タンパク質にのみ結合し天然型のタンパク質には反応しない場合がある。
ウェスタンブロッティング用の一次抗体は多数販売されている。購入する際には上記の点を念頭に置いて、同じ抗原名の抗体であっても抗体の特徴を製品データーシートなどで十分調べて選択する。できれば特異性が高いモノクローナル抗体を使用するとよい。

反応方法
最も失敗の少ない方法は、高い希釈率で薄い濃度に調製した抗体溶液をトレイに用意し、メンブレンを浸して振盪しつつ、4℃、O/Nで反応を行う方法である。抗体の使用量が限られる場合はハイブリバッグの使用が便利だが、十分に気泡を抜くことが重要である。

⑤ 二次抗体反応の留意点

二次抗体の選択
様々なホストから得られた二次抗体があるが、バックグラウンドが高い場合はホストが異なる二次抗体に換えるだけでバックグラウンドを低減できる。ホスト以外の動物種由来の血清タンパク質に対する吸収操作を行った抗体も販売されている。動物種を確認して検出方法により最適な抗体を選択する。
HRP（ホースラディッシュペルオキシダーゼ）標識二次抗体を用いて化学発光で検出する方法が一般的である。そのほかAP（アルカリフォスファターゼ）標識抗体（発色物質で検出）、蛍光物質や放射性同位体で標識された二次抗体なども用いられる。

⑥ 化学発光による検出の留意点

各試薬のプロトコールに従って繰り返し実験を行い、最適な条件を検討する。

★転写されたメンブレンをラップ上に置き、全体を覆うように満遍なく検出試薬をかける。

★目的タンパク質の濃度、抗体使用濃度により露光条件が異なるので予備検討が必要である。

発光が持続している間は、露光条件をかえて複数回検出できる。

ストリッピング・リプロービング
専用バッファーを用いて一次抗体、二次抗体および検出試薬をメンブレンから除去することで、同メンブレン上で目的タンパク質や他のタンパク質を再度検出でき、検出条件の最適化や検討を行なうことが出来る。

ウェスタンブロッティング　トラブルシューティング

◆シミまたは斑点があり、バックグラウンドが全体的に高い

原　因	対　策
洗浄が不十分	・洗浄回数を増やす。洗浄に使用するバッファー量を増やす。 ・Tween20を含まないバッファーを用いている場合は、最終濃度0.05%となるようにTween20を添加する。 （注：Tween20の濃度が高すぎると、メンブレンからタンパク質が溶離する危険性がある。）
抗体濃度が高すぎる	・一次抗体、二次抗体の濃度が高すぎるとバックグラウンドの原因となる。抗体濃度を下げる。
露光時間が長すぎる	・メンブレンをフィルムに露光させる時間を短縮する。
ブロッキングが不十分	・ブロッキングバッファーを至適化する。使用する検出システムによってそれぞれ最適なブロッキング方法は異なる。 ・ブロッキングバッファー中のタンパク質濃度を上げる。 ・ブロッキングの時間、温度を至適化する。少なくとも室温で１時間以上、あるいは４℃で一晩ブロッキングする。 ・ブロッキングバッファーにTween20を加える（終濃度0.05%）。
ハイブリバッグを用いた抗体反応で、バッグ内に気泡が残っていた	・ハイブリバッグをシールする前に気泡を確実に除去する。一度にシーラーをかけずに、一か所少しだけ残した開封部から空気を抜くようにすると、気泡を除きやすい。
ブロッキングバッファー中の成分との交差反応が起きている	・組成の異なるブロッキングバッファーを使用する。 ・スキムミルクにはビオチンが含まれているため、ビオチン-アビジンを利用した検出システムを用いるメンブレンのブロッキングには使用できない。 ・ブロッキングバッファーの交差反応試験を行う。新しいメンブレンをブロッキングし、実験に使用する抗体とインキュベートし、実験に用いる検出試薬を用いて検出する。 ・HRPコンジュゲートの濃度を下げる。
ブロッキングバッファーが不適切	・組成の異なるブロッキングバッファーを検討する。
HRP標識抗体に凝集が生じた	・HRP標識抗体に凝集が生じると、斑点の原因となる。 ・0.2 μMのフィルターでろ過する。 ・新しく、品質のよい抗体を使用する。
メンブレンに問題がある	・製造元のプロトコールに従って、メンブレンを確実に湿潤させる。 ・新しいメンブレンを使用する。 ・乾燥を防ぐため、操作中のメンブレンは確実に十分量の液体に浸しておく。 ・すべてのインキュベーションは振盪しながら行う。 ・メンブレンは慎重に取り扱う。メンブレンに損傷を与えるとバックグラウンドの原因となる。 ・メンブレンは素手で取り扱わない。必ず清潔なグローブを着用するか、ピンセットを使用する。
器具類の汚染	・電気泳動装置、ブロッティング装置およびインキュベーショントレーは清潔に保ち、異物が混入しないように注意する。
バッファーのコンタミネーション	・新しいバッファーを調製する。 ・バッファーを使用前に濾過する。

◆バンドが白く抜ける

抗体濃度が高すぎる	・抗体濃度、特にHRP標識抗体の濃度を下げる。バンドが白抜きになる現象は、HRPの量が多すぎる時に起こる。

◆非特異的バンドが見られる

抗体濃度が高すぎる	・抗体濃度を下げる。
SDSがタンパク質バンドに対して非特異的吸着を引き起こした	・転写後にメンブレンを洗浄する。 ・イムノアッセイの工程にSDSを使用しない。

◆シグナルが弱い、またはシグナルがない

IB **Western BLoT Immuno Booster**（製品コード T7111A）でレスキューできる場合がある。

RD **Western BLoT Rapid Detect v2.0**（製品コード T7122A）でレスキューできる場合がある。

→これらの製品は7～9ページで紹介しています。

原　因	対　策
タンパク質が適切に転写されなかった IB RD	・転写終了後、ゲルのタンパク質染色を行い転写効率を調べる。 （注：タンパク質染色では少量の抗原は検出できない可能性がある。） ・転写中、ゲルとメンブレンが確実に密着するように注意する。 ・転写用装置を正しく組み立て、電極の向きとゲル、メンブレンを重ねる順番に注意する。 ・製造元のプロトコールに従って、メンブレンを確実に湿潤させる。 ・エレクトロブロッティング中に転写用装置が加熱しないように注意する。 ・陽性コントロールや分子量測定用マーカーとともに有色マーカーを加える。 ・転写時間と電流を至適化する。 ・サンプル調製の過程でサンプルの抗原性が失われていないことを確認する。 （一部のタンパク質は非還元条件下では泳動されない場合がある）
目的タンパク質量が不十分 IB RD	・電気泳動に用いるタンパク質量を増やす。
抗体量が不十分 IB RD	・抗体濃度を上げる。目的タンパク質に対する抗体の親和性が低い可能性がある。 ・抗体活性が失われている可能性がある。ドットブロットを実施し、抗体活性を調べる。
標識抗体が失活している	・アジ化ナトリウムが含まれていない抗体を用いる。アジ化ナトリウムはHRPの活性を阻害する。
基質が劣化している	・基質の活性を調べるには、少量のWorking Solutionを調製し、暗室内で少量のHRP標識抗体を加えて青い光の有無を観察する。発光が観察されなければ、基質またはHRP標識抗体のどちらかが劣化している。 ・キットに含まれるボトル間でコンタミネーションが起こらないように注意する。保存中の基質試薬に他の試薬が混ざると、劣化の原因となる。
メンブレンのストリッピング、リプロービングを行った	・メンブレンのストリッピングを行うと、目的タンパク質が剥がれたり変性したりする可能性がある。ストリッピングの手順を最適化する。 ・必要な時にのみリプロービングを行う。 ・同じメンブレンに対するリプロービングの繰り返しは避ける。
目的タンパク質がブロッキングによってマスクされている	・別の種類のブロッキングバッファーを検討する。 ・ブロッキングバッファーのタンパク質濃度を至適化する。
基質とのインキュベーションが短すぎる	・基質とのインキューベーション時間を最適化する。 ・検出試薬の活性を調べる。
露光時間が短すぎる	・フィルムへの露光時間を延長する。
メンブレン上で抗原が分解された	・ブロッキング用試薬の成分にプロテアーゼ活性が含まれている可能性がある（例：ゼラチン）。
メンブレンの保存中にタンパク質が分解された	・新たなブロットを作製する。

◆メンブレン上に現像できない部分がある

転写が不完全であった	・転写時に、ゲルとメンブレンの間に気泡が入らないように注意する。 ・製造元のプロトコールに従って、メンブレンを確実に湿潤させる。 ・メンブレンは素手で取り扱わない。必ず清潔なグローブを着用するか、ピンセットを使用する。 ・新しいメンブレンを使用する。 ・メンブレンを分けてインキュベートし、メンブレン同士がインキュベーション中に重ならないようにする。

◆拡散したバンド

抗体濃度が高すぎる	・抗体濃度を下げる。
電気泳動に用いたタンパク質量が多すぎる	・電気泳動に用いるタンパク質の量を減らす。

ウェスタンブロッティング　実験ノート　（コピーしてご利用ください）

実験メモ（実験タイトル、サンプル名、アプライ量など）：	
1. 電気泳動	**1-1.　電気泳動を行う**
	・ゲル濃度（　　%）
	・泳動バッファー（　　Lot No.　　）　調製日（　　）
	・泳動条件：電流一定の場合（　　mA）　or　電圧一定の場合（　　V）
	時間（　　：　　）～（　　：　　）
	＜電気泳動を行っている間に転写の準備をする＞
	・トランスバッファーを調製する　　バッファー（　　Lot No.　　）
	・メンブレンを準備する（PVDF膜の場合：メンブレンをメタノールに20～30秒浸し、トランスバッファーに置換しておく）
	・ろ紙をトランスバッファーに浸しておく
	・ブロッキング剤を用意する　　ブロッキング剤（　　Lot No.　　）
2. 転写 （セミドライ式）	**2-1.　電気泳動終了後、すぐにゲル板からゲルを外してトランスバッファーで平衡化する**
	10分振盪　（　　：　　）～（　　：　　）
	2-2.　トランスバッファーに浸しておいたゲル・ろ紙・メンブレンを気泡が入らないよう転写装置にセットする
	陰極（－）　→　ろ紙　→　ゲル　→　メンブレン　→　ろ紙　→　陽極（+）
	2-3.　パワーサプライの電源を入れて転写を開始する
	電流一定の場合（　　mA）　or　電圧一定の場合（　　V）
	時間（　　：　　）～（　　：　　）
	2-4.　パワーサプライの電源を切り、ピンセットでメンブレンを取り出す
	・メンブレンの表・裏・上・下がわかるように印をつける
3. ブロッキング	**3-1.　メンブレンをブロッキングバッファーに移して室温で１時間振盪する**
	時間（　　：　　）～（　　：　　）
	＊ すぐに抗体反応を行わない時はブロッキングバッファーに浸したまま4℃で一晩振盪することができる
	＜ブロッキングの間に一次抗体を準備する＞
	・一次抗体をブロッキングバッファーで希釈する
	抗体（　　Lot No.　　希釈倍率　　）
	・洗浄バッファーを調製する　　種類（　　Lot No.　　）
4. 一次抗体反応	**4-1.　希釈済みの一次抗体液にメンブレンを移し、振盪反応する（室温１時間～4℃ O/N）**
	時間（　　：　　）～（　　：　　）
	4-2.　メンブレンを洗浄バッファーに移して５分間以上置く。 バッファーを交換して５回洗浄する
	＜一次抗体反応の間に二次抗体を準備する＞
	・二次抗体をブロッキングバッファーで希釈する
	抗体（　　Lot No.　　希釈倍率　　）
5. 二次抗体反応	**5-1.　希釈済みの二次抗体液にメンブレンを移し、室温１時間振盪する**
	時間（　　：　　）～（　　：　　）
	5-2.　メンブレンを洗浄バッファーに移して５分間以上置く。 バッファーを交換して５回洗浄する
6. 検出 （化学発光法）	使用する検出試薬の説明書に従って操作する
	・検出試薬（　　）
	★【Western BLoT基質シリーズ（タカラバイオ製品）】を用いる場合は以下の通りに行う
	6-1.　Working Solution（Luminol/Enhancer SolutionとPeroxide Reagentを等量混合）を調製する
	6-2.　メンブレンから余分なバッファーを除き、Working Solutionをメンブレン全体にかけて均等に行きわたらせる
	6-3.　室温で２分、静置
	6-4.　余分なWorking Solutionを除去し、メンブレンを新しいラップやハイブリバックなどで挟む
7. 検出結果の取得	**7-1.　検出機器の使用方法に従って操作する**
	・露光条件（　　）

ウェスタンブロッティングに使用する試薬〈1〉

① 電気泳動（SDS-PAGE）

■分子量マーカー

製 品 名	容　量	製品コード	価格（税別）
CLEARLY Protein Ladder (Unstained)	500 µl	3453A	¥18,000
	500 µl×3	3453B	¥47,000
CLEARLY Stained Protein Ladder	500 µl	3454A	¥18,000
	500 µl×3	3454B	¥47,000

■電気泳動バッファー　Tris-Glycine Buffer（プレミックスパウダー）

製 品 名	調製可能なバッファー量	容　量	製品コード	価格（税別）
Tris-Glycine Buffer (TG) Powder, pH8.3	1包を蒸留水に溶解し1 LのTGバッファーを作製。 最終濃度：25 mM Tris、192 mM Glycine	10 pouches	T9102	¥22,000
Tris-Glycine-SDS Buffer (TG-SDS) Powder, pH8.3	1包を蒸留水に溶解し1 LのTG-SDSバッファーを作製。 最終濃度：25 mM Tris、192 mM Glycine、0.1% SDS	10 pouches	T9101	¥26,000

② メンブレンへの転写

■ブロッティング用メンブレン

※Porablotはマッハライ・ナーゲル社の製品です。

製 品 名	メンブレンの種類	容　量	製品コード	価格（税別）
Porablot PVDF (0.25×3 m, 1 roll)	PDVF	1ロール	741260	¥63,000
Porablot NCP (0.3×3 m, 1 roll)	ニトロセルロース	1ロール	741280	¥58,000
Porablot NCL (0.3×3 m, 1 roll)	支持体を用いて補強されたニトロセルロース	1ロール	741290	¥64,000
Porablot NCL (200×200 mm, 10 sheets)		10シート	741291	¥35,000

【特長】
- Porablot PVDF ： タンパク質の吸着に優れ、特にウェスタンブロットなどタンパク質のブロッティング用に推奨
- Porablot NCP ： 低バックグラウンド
- Porablot NCL ： 低バックグラウンドとナイロンメンブレン並みの強度を合わせ持つ

③ ブロッキング

■ブロッキング バッファー　… カゼインやBSAのほか、下記製品もお勧めです。

◆ ブロック剤として魚類由来のゼラチンを使用　Ready-to-use

・スキムミルク、BSA など動物由来のブロック剤に比べて動物由来抗体との非特異的な交差反応が極めて低く、クリアな検出が可能

製 品 名	容　量	製品コード	価格（税別）
Western BLoT Blocking Buffer (Fish Gelatin)	1 L	T7131A	¥14,000

◆ 全成分が化学成分からなるプロテインフリーのブロッキング剤　Ready-to-use

・非特異的シグナルを最低限まで抑制
・一般的に使用されるスキムミルクより検出感度が高い設計
・通常のサンプルのほか、リン酸化タンパク質の検出にも優れた効果を発揮

製 品 名	容　量	製品コード	価格（税別）
Western BLoT Blocking Buffer (Protein Free)	500 ml	T7132A	¥16,000

ウェスタンブロッティングに使用する試薬〈2〉

④ 一次抗体反応

・一次抗体、HRP 標識二次抗体　各種

洗浄

⑤ 二次抗体反応

洗浄

便利なオンラインツールをご利用ください。

豊富な抗体ラインナップからお探しの抗体を素早く検索!

https://www.takara-bio.co.jp/research/antibody_search/

抗体検索サイト

■洗浄バッファープレミックス（タブレット）

製品名	調製可能なバッファー量	容量	製品コード	価格（税別）
Phosphate Buffered Saline with Tween®20 (PBS-T) Tablets, pH7.4	1錠を蒸留水に溶解し、1 Lの PBS-T を作製	100 tablets	T9183	¥44,000
Tris Buffered Saline with Tween®20 (TBS-T) Tablets, pH7.6	1錠を蒸留水に溶解し、500 ml のTBS-T を作製	100 tablets	T9142	¥37,000

お勧め試薬 -1　抗原抗体反応促進剤

こんなご希望にお応えします
- ✔ 少ない抗体量でも抗体反応を効率よく行いたい
- ✔ シグナルが弱い／シグナルが検出されなかったので、レスキューしたい

Western BLoT Immuno Booster / Immuno Booster PF

抗体反応時に用いて検出感度アップを実現!

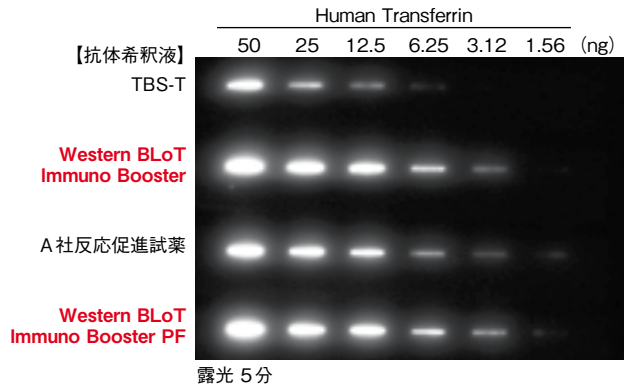
● Immuno Boosterを抗体希釈液として使用するだけで、通常法に比べて数倍～数10倍に感度がアップします。

製品名	試薬使用時の最適なブロッキング条件	容量	製品コード	価格（税別）
Western BLoT Immuno Booster	特に制限なし	各250 ml	T7111A	¥29,000
Western BLoT Immuno Booster PF	プロテインフリー★	250 ml	T7115A	¥24,000

★ **Western BLoT Immuno Booster PF**は、全成分が化学成分からなるプロテインフリーの抗原抗体反応促進試薬です。プロテインフリー条件専用の試薬のため、ブロッキング剤も同様にプロテインフリーを使用することを推奨します。

プロテインフリー環境は、リン酸化タンパク質の検出や、サンプルに含まれる特殊タンパク質の検出、試薬由来のタンパク質を反応系に持ち込みたくない場合に最適です。

Immuno Boosterによる検出感度アップ



露光 5分

ブロッキング剤：
Western BLoT Blocking Buffer (Protein Free)
（製品コード T7132A）
一次抗体：
Goat anti-Human Transferrin affinity purified
（終濃度 0.5 µg/ml）
二次抗体：
Affinity Purified Antibody Peroxidase Label
Rabbit anti-Goat IgG (H+L)
（終濃度 0.1 µg/ml）
基質：
Western BLoT Chemiluminescence HRP Substrate
（製品コード T7101A）
洗浄液：TBS-T

（弊社比較データ）

ウェスタンブロッティングに使用する試薬〈3〉

お勧め試薬 -2　迅速・高感度検出試薬

こんなご希望にお応えします
- ✔ 抗体反応を短時間で効率よく行いたい
- ✔ 動物種ごとにHRP標識二次抗体を準備する手間を省きたい
- ✔ シグナルが弱い／シグナルが検出されなかったので、レスキューしたい

Western BLoT Rapid Detect v2.0

HRP標識二次抗体の代わりに用いて、迅速・高感度検出を実現！

- 転写後１時間で検出まで可能（Rapidプロトコール）。検出感度を上げる各種プロトコールも用意しています。
- HRP標識二次抗体の代わりにRapid Detectを用いれば、動物種ごとの二次抗体の準備は不要です。

製 品 名	容　量	製品コード	価格(税別)
Western BLoT Rapid Detect v2.0	50回	T7122A	¥44,000

★本製品は、9ページで詳しくご紹介しています。

⑥ 化学発光検出用HRP基質

サンプル品ご提供中

■Western BLoT HRP Substrate シリーズ

利用目的に応じた４タイプをご用意しています。

製 品 名	特　長	容　量	製品コード	価格(税別)
Western BLoT Chemiluminescence HRP Substrate	他社同等品に比べて発光が強く、明瞭なシグナルを示す。【検出限界】ピコグラム	250 ml (※1)	T7101A	¥22,000
		500 ml	T7101B (A×2)	¥39,000
Western BLoT Quant HRP Substrate	安定した発光が長く持続。高感度で３オーダーの定量性【検出限界】低ピコグラム	100 ml (※2)	T7102A	¥27,000
		200 ml	T7102B (A×2)	¥50,000
Western BLoT Hyper HRP Substrate	少量の抗体で感度良く検出可能【検出限界】中フェムトグラム	100 ml (※2)	T7103A	¥33,000
		200 ml	T7103B (A×2)	¥61,000
Western BLoT Ultra Sensitive HRP Substrate	非常に感度良く検出可能【検出限界】低フェムトグラム	100 ml (※2)	T7104A	¥51,000
		200 ml	T7104B (A×2)	¥95,000

※1：2種の溶液（各125 ml）を混合して反応液を調製（250 ml）→ メンブレン面積 2,500 cm^2 分の検出に使用できます。
※2：2種の溶液（各50 ml）を混合して反応液を調製（100 ml）→ メンブレン面積 1,000 cm^2 分の検出に使用できます。

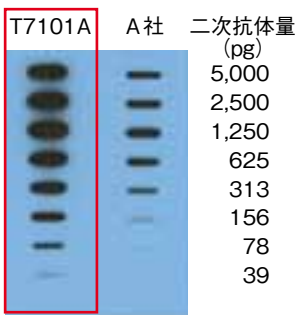
【使用可能なメンブレン】ニトロセルロース、PVDF
【検出】Chemiluminescence；X線フィルム
　　Quant、Hyper、Ultra Sensitive；CCDカメラ、X線フィルム

明瞭な発光シグナル

Western BLoT Chemiluminescence HRP Substrate（製品コード T7101A）および他社同等品HRP基質製品を用いて、HRP標識二次抗体（39～5,000 pg）のスロットブロットでの発光シグナルを検出した。

・抗体：Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Peroxidase conjugated
・メンブレン：ニトロセルロース

★**Western BLoT Chemiluminescence HRP Substrate使用で、非常に明瞭なシグナルを感度良く検出できました。**

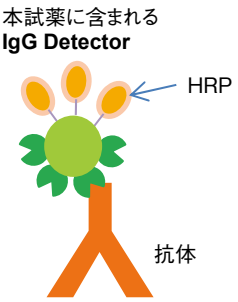


露光時間 5秒、 X線フィルム使用　（弊社比較データ）

ウェスタンブロッティングに使用する試薬〈4〉

Western BLoT Rapid Detect v2.0（製品コード T7122A）を詳しくご紹介

Western BLoT Rapid Detect v2.0は、独自のHRP標識IgG Detectorを標識二次抗体として利用し、一次抗体を検出するウェスタンブロッティング専用の検出試薬キットです。本製品の主要コンポーネントであるIgG Detectorは、抗体のFc領域に結合するタンパク質約100分子を表面に提示したタンパク質粒子で、約50分子のHRPによって標識されています。
この特別にデザインされたHRP標識粒子により、Rapid Detect v2.0は**迅速検出、高感度検出、複数抗体を用いる同時検出**など、一般的なウェスタンブロット法では実現できなかった様々なアプリケーションが可能となりました。



◆HRP標識二次抗体の代わりに用いて実験時間を短縮!

v2.0は、従来品よりハンドリングのしやすさ・検出感度がさらにアップしました。

■ 迅速

・転写後1時間で検出可能（Rapidプロトコール、右図参照）

	一般的な方法	Rapidプロトコール
① ブロッキング	60分	**5分**
② 一次抗体反応	60分	**30分**
③ 洗浄	30分	**不要**
④ 二次抗体反応	60分	**不要**
⑤ 洗浄	30分	**25分**
⑥ 検出	検出基質使用	**HRP検出基質使用**
①〜⑤合計所要時間	240分	**60分**

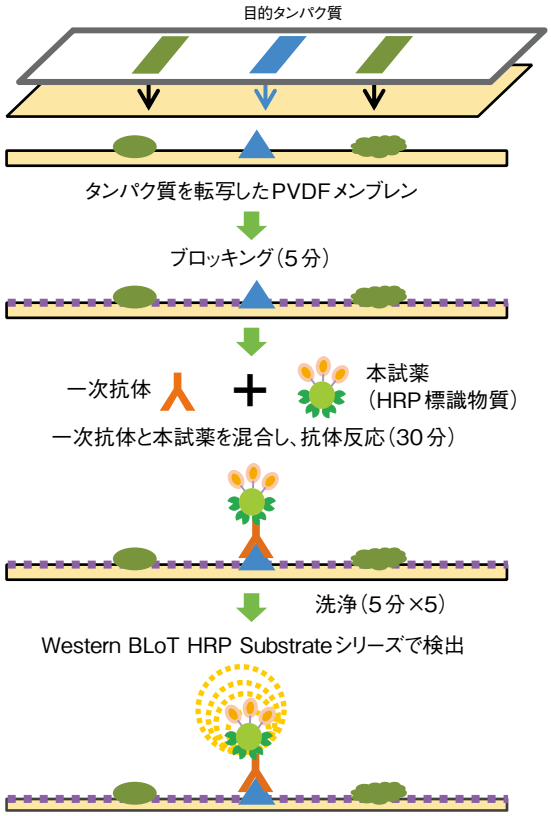
■ 使用法が簡単

・一次抗体反応の際に本試薬を混合するだけ（Rapidプロトコール）
・動物種ごとのHRP標識二次抗体は不要

■ Rapidプロトコールの他、検出感度を上げる各種プロトコールもご用意

・2ステップ高感度プロトコール（下記使用例を参照）
・二次抗体増感プロトコール
・リプローブ増感プロトコール

Rapidプロトコールの操作フロー



HeLa細胞ライセート中のβ-アクチンおよびGAPDHの検出（2ステップ高感度プロトコール）

電気泳動 → 転写 → ブロッキング → 一次抗体反応 → 本試薬と反応 → 検出

【方法】 HeLa細胞ライセートをサンプルとして電気泳動を行い、PVDFメンブレンに転写後、Western BLoT Blocking Buffer (Protein Free)（製品コード T7132A）を用いてブロッキングを行った。一次抗体反応は、マウス抗β-アクチン抗体、マウス抗GAPDH抗体を使用して1時間行い、続いて、本試薬または二次抗体を使用して1時間インキュベートした。

① 抗 β-アクチン抗体+抗GAPDH抗体 ⇒ 本試薬　② 抗β-アクチン抗体 ⇒ 本試薬　③ 抗GAPDH抗体 ⇒ 本試薬
④ 抗GAPDH抗体 ⇒ HRP標識二次抗体

検出はWestern BLoT Chemiluminescence HRP Substrate（製品コード T7101A）を使用し、CCDカメラで露出5分の条件で行った。

【結果】
・①②③ ⇒ 複数抗原同時検出でも、一抗原検出と同等の検出結果が得られたことが分かります。
・③④ ⇒ 本試薬を用いることで二次抗体使用の一般的なウェスタンブロッティングと同等の結果が得られました。

関連試薬

～ その他、ウェスタンブロッティングに関連するお勧め試薬をご紹介 ～

コストパフォーマンスで選ばれています

◆ ストリッピングバッファー

ストリッピングとは?
専用バッファーを用いて一次抗体および検出試薬をメンブレンから除去することです。
ストリッピングを行うことで、同じメンブレン上で目的タンパク質や他のタンパク質を再度検出することが可能になり、検出条件の検討や最適化を行うことができます。

Western BLoT Stripping Buffer

Ready-to-use

- ウェスタンブロットを行ったメンブレン上の一次抗体および二次抗体を除去するためのバッファー
- 温和な条件でストリッピングが可能
  比較的マイルドな条件下(室温、30分)で反応を行うため、メンブレン上に固定された抗原タンパク質への影響を軽減できます。

製 品 名	容 量	製品コード	価格(税別)
Western BLoT Stripping Buffer	500 ml	T7135A	¥12,000

◆ タンパク質定量キット

電気泳動前には定量を!
タンパク質を抽出・精製後、電気泳動を行う前にそのサンプル中に含まれるタンパク質量を定量しておくことは、電気泳動を成功させるために重要です。
タカラバイオでは、タンパク質定量に汎用されるBCA法、Bradford法の定量試薬をお求めやすい価格でご提供しています。実験のコストダウンにご活用ください。

BCA法タンパク質定量キット

- タンパク質の種類による測定値の変動が少なく、20～2,000 µg/mlの広い範囲で直線性を示す。
- 界面活性剤や各種バッファーなどの影響を受けにくい。
  (～5% Triton X-100、～5% SDS、～4 M Guanidine-HCl など。詳しくは弊社ウェブカタログをご覧ください。)
- 2種類のプロトコールを用意
  ・標準プロトコール (1 ml 反応系／200 µl 反応系)　　：定量範囲　50～2,000 µg/ml
  ・低濃度測定プロトコール (1 ml 反応系／200 µl 反応系)：定量範囲　～50 µg/ml

製 品 名	容 量	製品コード	価格(税別)
TaKaRa BCA Protein Assay Kit	500回 (1 ml反応系の場合)	T9300A	¥17,000

Bradford法タンパク質定量キット

- 簡単な操作で迅速に、1～1,000 µg/mlのタンパク質を定量可能
- 還元剤による影響を受けにくい。
  (～100 mM DTT、～1 M Glucose、～1 M 2-MEなど。詳しくは弊社ウェブカタログをご覧ください。)
- 2種類のプロトコールを用意
  ・標準プロトコール (1 ml 反応系／200 µl 反応系)　　：定量範囲　25～1,000 µg/ml
  ・低濃度測定プロトコール (1 ml 反応系／200 µl 反応系)：定量範囲　1～25 µg/ml

製 品 名	容 量	製品コード	価格(税別)
TaKaRa Bradford Protein Assay Kit	500回 (1 ml反応系の場合)	T9310A	¥14,000

実験サポートツール　★タカラバイオウェブサイトにてご利用ください！

★実験フローチャート「タンパク質　定量・電気泳動・ウェスタンブロッティング」

実験フローチャートを見ながら試薬選択ができるツールです。視覚的にとらえやすく、試薬検索もラクラク!

フローチャート検索へのアクセス方法

① タカラバイオウェブサイトバイオ産業支援TOPページ
https://catalog.takara-bio.co.jpにアクセスし、
「フローチャート検索」バナーをクリック

ココ
です

②「タンパク質　発現・検出」を選択
③「定量・電気泳動・ウェスタンブロッティング」を選択

★実験コンシェルジュ

バイオ実験のプロトコールや手技に関するご質問に経験豊富なスタッフがお答えします。
お悩みの際はお気軽にご相談ください。
https://www.takara-bio.co.jp/research/concierge/
または、タカラバイオウェブサイト バイオ産業支援TOP ＞ お問い合わせ ＞ 実験コンシェルジュ

実験コンシェルジュ ―― Experiment Concierge

実験プロトコールの総合サポート!

バイオ実験のプロトコールや手技に関するご質問に経験豊富なスタッフがお答えします。
※実験目的に適した実験プロトコール、試薬、受託等をご提案いたしますが、実験の成功を保証するものではないことを予めご了承下さい。

実験手技お問い合わせはこちらから（入力フォーム）

お問い合わせ例&実験プロトコール紹介例

・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
・本パンフレットに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。
・ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。
・本パンフレット記載の価格は2023年8月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

タカラバイオ株式会社

首都圏支店・西日本支店　TEL 03-3271-8553　FAX 03-3271-7282
関西支店・営業第2部　TEL 077-565-6969　FAX 077-565-6995
テクニカルサポートライン
TEL 077-565-6999　FAX 077-565-6995

Website　https://www.takara-bio.co.jp
Facebook　https://www.facebook.com/takarabio.jp

取扱店

2023年8月修正20K