

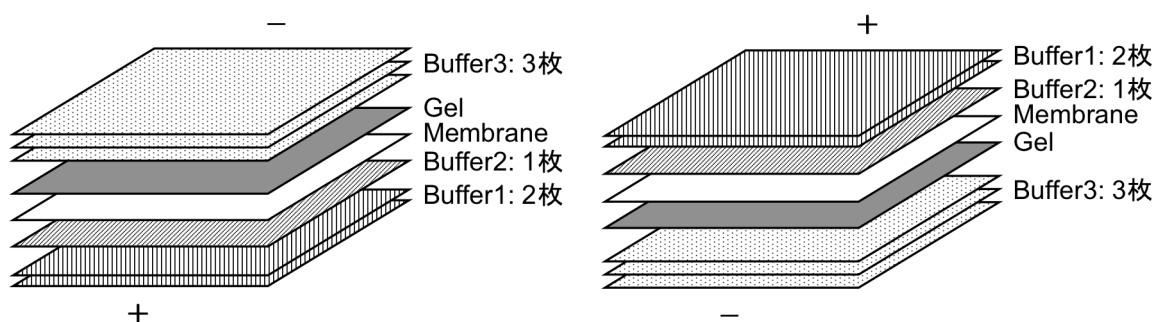
Western Blotting の手順

試薬 4℃で保存

Buffer 1 Tris base 10.9g, MetOH 60 ml / H₂O で 300 ml に fill up

Buffer 2 Tris base 0.9g, MetOH 60 ml / H₂O で 300 ml に fill up

Buffer 3 Tris base 0.91g, Boric acid 10.5 mg, MetOH 60ml / H₂O で 300 ml に fill up



PBS-TS : 0.05% Tween20+1% Skim Milk 入り PBS

TBS-TS : 0.05% Tween20+1% Skim Milk 入り TBS

手順

- 電気泳動後のゲルを Buffer 3 に浸し 15 分、やさしく浸透する。そのあいだに以下の準備を行う。
メンブレン(Milipore の Immobilon Transfer membrane など)をメタノールに浸した後、ただちに Buffer 3 に浸して 5 分間浸透。同じサイズのワットマン濾紙を Buffer 1, 2, 3 にそれぞれ 2 枚、1 枚、3 枚浸しておく。
- 上記の様に重ねる（気泡が入らないように。電極の向きに注意！）。blotter の電極面は水で濡らしておく。
- メンブレンサイズの縦×横(cm)×2.5 mA の定電流で 40 分 blotting（分子量が大きい場合は長めに）。
- メンブレンを PBS-TS or TBS-TS で浸透洗浄(3min×3 回 or 4℃で overnight)。
- 1次抗体処理 in Buffer PBS-S or TBS-S（抗体にもよるが1時間以上室温で、あるいは冷蔵庫で over night）。
- 浸透洗浄(10min×3〜4回)。
- 2次抗体処理 in PBS-S(1時間、室温)。
- 浸透洗浄(10min×3〜4回)。
- 発色液に浸す。発色後は水で洗浄し発色停止、スキャナで取り込み。