

強親水性タンパクのブロッティング

転写したタンパクが膜から離れていきます

一般的なプロトコール

ブロッティング終了

↓
メンブレン洗浄

↓
検出（一次&二次抗体）

推奨プロトコール

ブロッティング終了

↓
メンブレン洗浄（注1）

↓
メンブレン完全乾燥

↓
メンブレン浸潤

↓
検出（一次&二次抗体）

タンパク質のメンブレンへの吸着は、主として疎水的親和性に基づいていると考えられます。従って、**親水性の高いタンパク質の場合、①転写時の電気条件が強いとメンブレンを通過してしまう、②転写後の洗浄時にメンブレンから離脱してしまう、この2つ原因により、親水性の高いタンパク質は、メンブレンに固定されず、より薄いバンドとすることがあります。**

問題点②の改善法

- （1）メンブレンへの転写終了後、TweenやTritonなどの界面活性剤を含まないPBSやTBなど、次いで精製水で洗浄する。
- （2）洗浄の終了したメンブレンを、無塵紙上で風乾後、デシケーター中で、オーバーナイトで乾燥させる。
- （3）界面活性剤やブロッキング剤を含む溶液で、メンブレンを浸潤させる。
- （4）通常のメンブレンEIAの手法で検出を行う

- ・ 問題点①の「転写条件」については、電気条件が低い程、メンブレンに固定される可能性は大きくなりますが、非特異的吸着も増えることがあり、注意が必要です。
- ・ 「本推奨法」のブロッティング後の洗浄は、強親水性タンパクの離脱を防ぐため、界面活性剤を使用せず、ブロッキング剤も入れないPBSやTBなどで5分程度の短時間洗浄します。次の精製水洗浄も同様です。
- ・ 「本推奨法」では、乾燥後にメンブレンを再浸潤させる必要がありますので、PVDF膜では行えません。