

研究助手が日々の業務で得た教訓 【何もかも疑え!】

住友日香^{#1} 牧(黒田)由紀子^{#1} 瀬尾めぐみ^{#1} 大島玲子^{#1} 三ツ井貴夫^{#1}

#1 独立行政法人 国立病院機構 徳島病院 臨床研究部 776-8585 徳島県吉野川市鴨島町敷地1354番地

受付 2022.3.15 受理 2022.3.20 出版受託 2022.3.25

要旨

ウェスタンブロットは、タンパク質の特性を知るための基本的な実験手法である。タンパク質サンプルをメンブレンに転写し、特異抗体を用いて検出することで多くの情報が取得できる。私は研究助手として、ほぼ毎日のようにウェスタンブロットを行っているが、数か月前よりバンドの染色性が悪くなった印象を持っていた。しかし何が原因かも分からず、毎日業務をこなしていたが、今回、その原因究明ができたため報告する。培養細胞より精製したタンパク質をSDS サンプルバッファーで処理し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりタンパク質を分離した。その後、電気泳動で分離したタンパク質をゲルから PVDF 膜に転写し、タンパク質バンドがない膜表面に、抗体が非特異的に結合しないようにブロッキングを行った。ターゲットタンパク質に対する抗体（一次抗体）およびビオチンで標識された抗体（二次抗体）と反応させ、ABC 法を行ったのちに DAB 染色にてバンドの検出を行った。DAB 試薬が古くなっていたため、新たに2つ購入してみたが、変化はなかった。また、抗体希釈液と思って使用していた試薬はなんとブロッキング液であったことが判明し、これが原因だと思ったが、染色性は少し向上した程度であった。そこで、いつも何も考えずに使用していた DAB 発色に用いていた過酸化水素を変えてみたところ、劇的に染色性が飛躍した。毎日の業務で何も疑わずに使用していた試薬の落とし穴に気づいたことで、すべての試薬を疑い、そこで考え、工夫することの大切さをしみじみと感じた。

キーワード：PolyA+, cDNA ライブラリー, 全ゲノムシーケンス PCR

はじめに

ウェスタンブロットは、タンパク質の特性を知るための基本的な実験手法である。¹⁾ タンパク質サンプルをメンブレンに転写し、特異抗体を用いて検出することで多くの情報が取得できる。私は研究助手として、ほぼ毎日のようにウェスタンブロットを行っているが、数か月前よりバンドの染色性が悪くなった印象を持っていた。しかし何が原因かも分からず、毎日業務をこなしていた。今回、染色性が悪くなっていた原因究明ができたため、報告する。

対象と方法

対培養細胞より精製したタンパク質をSDS サンプルバッファーで処理し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりタンパク質を分離した。その後、電気泳動で分離したタンパク質をゲルから PVDF 膜に転写し、タン

パク質バンドがない膜表面に、抗体が非特異的に結合しないようにブロッキングを行った。

ターゲットタンパク質に対する抗体（一次抗体）およびビオチンで標識された抗体（二次抗体）と反応させ、ABC 法を行ったのちに DAB 染色にてバンドの検出を行った。

結果

①従来のウェスタンブロットティングの染色性

図1に方法を示した。DAB 発色液で30minほど反応させるとバンドが見え始め、1hr 染色すると鮮明なバンドが検出された。

②DAB 染色液を新品に変更

新しいDAB 発色液に変えたが、大きな差はなく20minほど反応させるとバンドが見え始め、1hr 染色するとようやくはっきりとしたバンドが検出された。(図2)

Correspondence to: 住友 日香, 独立行政法人 国立病院機構 徳島病院 臨床研究部 776-8585 徳島県吉野川市鴨島町敷地1354番地 Phone: +81-88-324-2161 Fax: +81-88-324-8661 e-mail: sumitomo.nichika.wh@mail.hosp.go.jp

図 1 従来のウエスタンブロットの染色性



図 2 DAB染色液をかえてみた

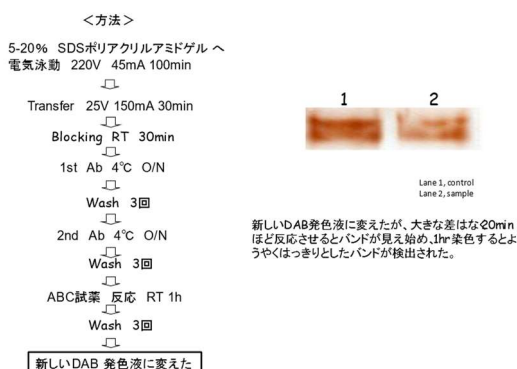


図 3 抗体希釈液をかえてみた



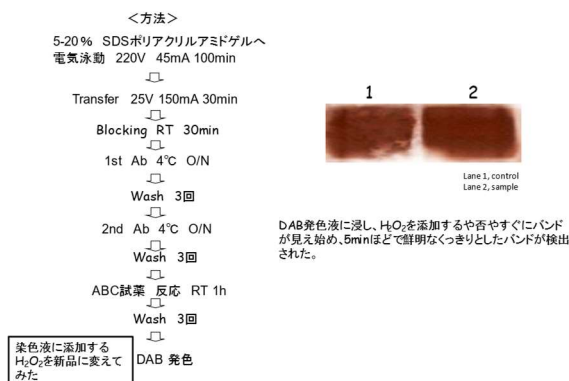
③抗体希釈液を変更

1次抗体、2次抗体の抗体希釈液を変更してみた。しかし、まったく変化は認められなかった。その上、抗体希釈液と思って信じて使っていた試薬はまさかのブロッキング液であることが判明した。(図3)

④過酸化水素 (H₂O₂) を変更

DAB染色液に添加するH₂O₂を新品に変更してみた。すると、添加するや否やすぐにバンドが見え始め、5minほどで鮮明なくっきりとしたバンドが検出された。(図4)

図 4 過酸化水素(H₂O₂)をかえてみた



考察

- ①数か月前よりウエスタンブロットのバンドの染色性が悪くなった印象を持っていたが、何が原因かわからないまま、毎日の業務をこなしていた。
- ②DAB発色試薬や抗体希釈液を変えてみたが、大きな変化は認められなかった。
- ③そこでいつも何も考えず使用していたDAB発色液に添加するH₂O₂を変えてみたところ、

劇的に染色性が飛躍した。

④毎日の業務で何も疑わずに使用していた試薬の落とし穴に気づいたことで、すべての試薬を疑い、そこで考え、工夫することの大切さをしみじみと感じた。

引用文献

- 1) Kuroda Y, Mitsui T, Kunishige M, et al Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. Hum Mol Genet, 2006;15: 883-895.