

1) ブロットイング方法

目的のタンパク質をブロットイング装置によりPVDF膜へ転写して下さい。使用する膜は、ミリポア製イモビロンPを推奨しております。ニトロセルロース膜は、絶対に使用しないで下さい。ブロットイングの際は以下の点に留意して下さい。タンパク質がPVDF膜に十分に転写されたら、下記の2)の操作を行ってください。

- ・転写緩衝液は、一般的な緩衝液（例：3.3 g/l Tris、14.4 g/l グリシン、10-20%メタノール）を使用して下さい。その他の緩衝液（アミノカプロン酸、ホウ酸）でもかまいません。
- ・メタノール濃度は高分子（5万以上）の場合は低めに、低分子（2万以下）の場合は多めにした方が効率良く転写されます。
- ・十分に転写されるようであれば、特に添加物は必要ありません。塩基性蛋白質や高分子（10万以上）の場合、0.01%SDSを加えると転写効率が改善する場合があります。
- ・低分子（1万以下）の場合は、イモビロンP_SQという厚めの膜の方が良いと言われております。

2) 転写後の操作について

1. 転写済みPVDF膜を0.1%クマシーブリリアントブルーR250、50%メタノール溶液に浸漬します。染色液は使い回したものを使用しないでください。また、容器とピンセットも清浄なものを使用してください。
2. 1分間程度緩やかに振盪し、膜全体が染まったら、染色液を捨てます。
3. 50%メタノールを加え、30秒間程度緩やかに振盪した後、液を捨てます

4. バックグラウンドが脱色され、タンパク質のバンドが見えるまで3. の操作を繰り返します。タンパク質のバンドが消えないように注意してください。
5. 新しい容器に膜を移し替え、超純水（例：Milli-Q水）ですすぎます。1分間程度振盪した後、液を交換します。これを10回繰り返してください。すすぎはとても重要な工程です。
6. 濾紙上でPVDF膜を乾燥させます。濾紙を交換しつつ、濾紙が濡れなくなるまで良く乾かしてください。PVDF膜は濡れていると透明感がありますので、白くなるまで乾燥させてください。
7. 乾いたPVDF膜から、ディスポーザブルの剃刀で目的のバンドを切り取り、エッペンドルフチューブに入れて常温で保管してください。膜の乾燥が不完全でも、冷蔵保管であれば問題ありません。

以 上