

phosphoBLOCKER®サンプルテスト報告書

1. 使用目的

Western Blotting によるリン酸化タンパク質の検出感度を上げるために使用した。

2. テスト内容

ウエスタンブロッティングのブロッキング剤としてこれまで利用してきた BSA(Nacalai tesque)の代わりに phosphoBLOCKER®を用い、リン酸化タンパク質の検出感度にどれだけ効果があるか検査した。着眼点は以下の 2 点とした。

- 1) バックグラウンドの高さ(N/S 比)[ブロッキング剤としての性能]
- 2) リン酸化タンパク質のプロットの明瞭さ[リン酸化タンパク質検出感度への影響]

3. 実験条件

サンプル : ヒト微小血管内皮細胞(Human Micro Vascular Endothelial Cell, HMVEC)
タンパク質 : 一酸化窒素合成酵素(endothelial nitric oxide synthesis, eNOS (NOS3))
1 次抗体 : anti-NOS3(Ser635) rabbit IgG (UpState)
メンブレン : PVDF(BIORAD)
検出方法 : AP 反応による発色. Immun-Blot Amplified AP Assay Kit(BioRad)使用
ブロッキング剤 : 2 種

- Phosphor-BLOCKER
- Globulin Free albumin(BSA)(Nacalai tesque)

ブロッキング時間 : 12 h

画像取り込み : スキャナ(HP Officejet 7200)

分子量マーカー : 2 種

- カラー : Kaleidoscope Prestained Standards (BioRad)
- 単色 : Precision Plus protein Standards (BioRad)

4. テスト結果

1) バックグラウンドの高さ(N/S 比)[ブロッキング剤としての性能]

BSAでブロッキングしたメンブレンは発色基質に 10 分程度浸した段階で反応を停止した(バックグラウンドが大きくなり、バンドが見えなくなるため)。対してphospho-BLOCKERでブロッキングしたメンブレンは 20 分以上発色基質に浸してもバックグラウンドの増加は見られなかった(Fig 1 aおよび Fig1 b)。このメンブレンのレーン部分(図中黒線)とレーンの中の領域(図中赤線)をそれぞれImage Jで色値解析すると(Fig 2) , BSAではバンドのシグナルがバックグラウンドによって低減されているのに対して、phospho-BLOCKERではほとんどバックグラウンドは見られないことがわかった。この点によりBSAよりもphospho-BLOCKERの方がブロッキング剤として優れていることがわかった。

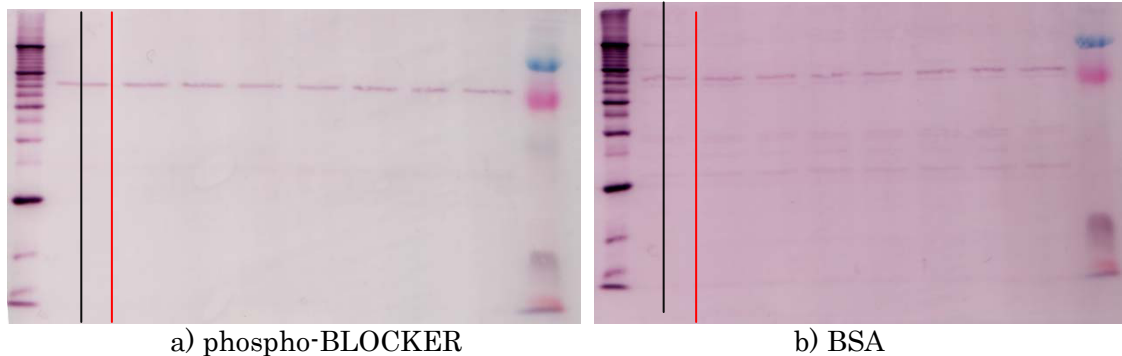


Fig 1 AP 反応による発色後のメンブレン

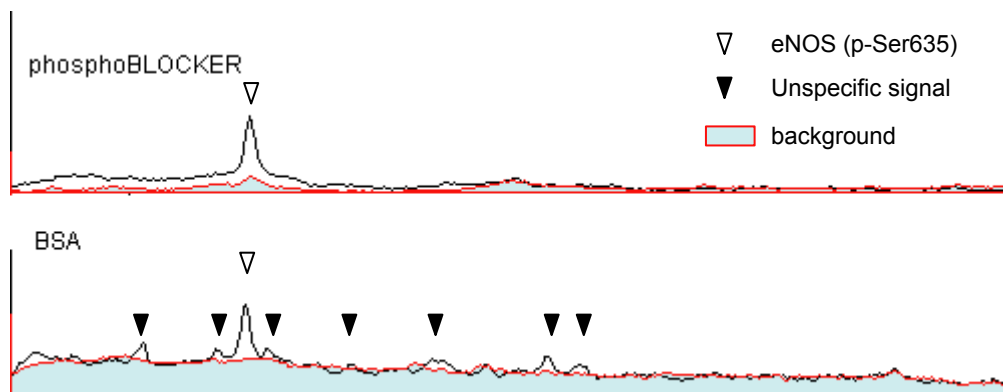


Fig 2 メンブレンのバンドのシグナルとバックグラウンド

2)リン酸化タンパク質のプロットの濃さ[リン酸化タンパク質検出感度への影響]

Fig 2 より phospho-BLOCKERを利用するとBSAでブロッキングした際に見られた非特異的なバンドは見られず、若干ではあるがeNOSのシグナルは感度良く検出されていることが分かった。この点からphospho-BLOCKERはリン酸化タンパク質の検出に適していることがわかった。

5. 結論

これまでブロッキング剤として利用してきた BSA と phospho-BLOCKER との性能を比較したところ、phospho-BLOCKER を利用した場合は

- 1)ほとんどバックグラウンドがないこと
- 2)非特異的なバンドがないこと
- 3)リン酸化タンパク質のシグナルが感度良く検出されること

の 3 点から「phospho-BLOCKER を用いることがリン酸化タンパク質の検出に有用である」ことがわかった。