

Good Westerns Gone Bad:

化学発光ウェスタンブロットの“感度”とは

Developed for:

Odyssey® Fc Imager and

C-DiGit® Blot Scanner

LI-COR®

株式会社 **エムエス** テクノシステムズ

発行 : 2015/10

化学発光ウェスタンブロットの感度を最大化するために

フィルムを使用する場合と、デジタルイメージで撮影を行う場合のプロトコルにおいて、最も重要な違いは画像撮影における適切な露光時間です。フィルムを使用する場合、シグナルの少ないバンドを検出するために、必要に応じて露光時間を延長することに制限はありませんでした。しかしデジタルイメージングにおいて最もシグナルを感度よく検出するためには、一定時間内に最大のシグナルを捕える必要があります。この時間制限は室温の発光基質をメンブレンに添加した瞬間から始まります（だからといって 5 分間のインキュベーションを省いてはいけません！）。デジタルイメージングにおいて長時間露光したデータと、フィルムにおいて同様に長時間露光したデータは必ずしも一致しません。これは露光時間が長くなればなるほど、撮影装置に由来するノイズがシグナルの検出限界（Limit Of Detection: LOD）に影響を及ぼし始めるからです。

もし微弱なシグナルの検出を行いたい場合、下記のデータがあなたの手助けになるかもしれません。

Possible cause # 1: 発光基質の反応速度が充分ではない (e.g., SuperSignal® West Pico)

解決策：WesternSure™ PREMIUM もしくは SuperSignal West Femto を使用する。

原因：市販されている発光基質は、それぞれに異なる反応速度を持っています。ある基質は短時間に多くの光を放出するように、またある基質は微弱な発光を長時間持続させるように、異なった仕様に設計されています。低濃度のタンパク質のウェスタンブロットをデジタルイメージで撮影する場合、発光基質を選択する必要があるかもしれません。(See Figure 1.)

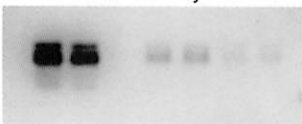
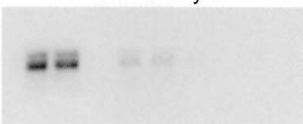
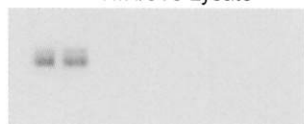
Figure 1	Optimal Blot	Satisfactory Blot	Unsatisfactory Blot
Images	 NIH/3T3 Lysate 2.5µg 312ng 78ng	 NIH/3T3 Lysate 2.5µg 312ng 78ng	 NIH/3T3 Lysate 2.5µg 312ng 78ng ERK
Conditions			
Substrate	SuperSignal West Femto	SuperSignal West Dura ¹	SuperSignal West Pico ²
Substrate Volume	3.0mL substrate	3.0mL substrate	3.0mL substrate
Imaging Method	C-DiGit® プロットスキャナーを用いて撮影 メンブレンは発光基質で 5 分間インキュベートされた	C-DiGit® プロットスキャナーを用いて撮影 メンブレンは発光基質で 5 分間インキュベートされた	C-DiGit® プロットスキャナーを用いて撮影 メンブレンは発光基質で 5 分間インキュベートされた
Scan Setting	High	High	High
Performance	LOD – 78 ng	LOD – 312 ng	LOD-2.5 µg

Figure 1. C-DiGit を用いて分類された異なる 3 種類の発光基質のパフォーマンス評価

全ての画像は、正しく目視で比較できるように Optimal Blot を参照したコントラスト設定値によって正規化された。

¹ 相当品：WesternSure PREMIUM

² 相当品：WesternSure ULTRA

Possible cause # 2: 発光基質の添加量が充分でない

予防措置 / 解決策 :

For C-DiGit® Blot Scanner:

推奨

- 少なくとも 3mL (7 x 4cm blot, 0.1mL/cm²)の発光基質をメンブレンのプロット面に滴下し、5 分間インキュベートした後余分な基質を取り除き、メンブレンのタンパク面を下にしてスキャン面にセットし、High 設定でスキャンする。

もしくは、

- 少なくとも 3mL (7 x 4cm blot, 0.1mL/cm²)の発光基質をスキャナーの撮影面に滴下し、メンブレンのタンパク質がプロットされている面が発光基質に触れるようにセットし、5 分間インキュベートした後、High 設定でスキャンする。

For Odyssey® Fc Imager:

- 少なくとも 3mL (7 x 4cm blot, 0.1mL/cm²) の発光基質をメンブレンのプロット面に滴下し、5 分間インキュベートした後余分な基質を取り除き、メンブレンのタンパク面を上にしてイメージングトレイにセットし、撮影する。

原因：もし充分量の発光基質を加えていない場合、ルミノール反応が激減することによって検出発光量が低下します。(See Figure 2 & 3.)

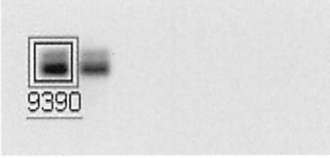
Figure 2	Optimal Blot	Satisfactory Blot	Unsatisfactory Blot
Images	NIH/3T3 Lysate  2.5µg 312ng 78ng	NIH/3T3 Lysate  2.5µg 312ng 78ng	NIH/3T3 Lysate  2.5µg 312ng 78ng
Conditions			
Substrate	SuperSignal West Pico ²	SuperSignal West Pico ²	SuperSignal West Pico ²
Substrate Volume	3.0mL substrate	1.5mL substrate	0.75mL substrate
Imaging Method	C-DiGit®プロットスキャナーを用いて撮影 メンブレンは発光基質で 5 分間インキュベートされた	C-DiGit®プロットスキャナーを用いて撮影 メンブレンは発光基質で 5 分間インキュベートされた	C-DiGit®プロットスキャナーを用いて撮影 メンブレンは発光基質で 5 分間インキュベートされた
Scan Setting	High	High	High
Performance	Bright signal	Moderate signal	Low signal

Figure 2. 異なる容量の SuperSignal West Pico を用いてインキュベートした場合の性能比較

3 種類のプロットはそれぞれ同じ検出限界(2.5µg/well)を示しているが、異なるシグナル強度を示している。プロットは全て C-DiGit を用いて撮影され、画像は正しく目視で比較できるように Optimal Blot の設定値で正規化された。

² 相当品 : WesternSure ULTRA

Figure 3	Optimal Blot	Satisfactory Blot	Unsatisfactory Blot
Images	NIH/3T3 Lysate  2.5µg 312µg 78µg	NIH/3T3 Lysate  2.5µg 312µg 78µg	NIH/3T3 Lysate  2.5µg 312µg 78µg ERK
Conditions			
Substrate	SuperSignal West Dura ¹	SuperSignal West Dura ¹	SuperSignal West Dura ¹
Substrate Volume	3.0mL substrate	1.5mL substrate	0.75mL substrate
Imaging Method	C-DiGit®プロットスキャナーを用いて撮影 メンブレンは発光基質で 5 分間インキュベートされた	C-DiGit®プロットスキャナーを用いて撮影 メンブレンは発光基質で 5 分間インキュベートされた	C-DiGit®プロットスキャナーを用いて撮影 メンブレンは発光基質で 5 分間インキュベートされた
Scan Setting	High	High	High
Performance	LOD – 78 ng	LOD – 312 ng	LOD – 2.5 µg

Figure 3. 異なる容量の SuperSignal West Dura を用いてインキュベートした場合の性能比較
 プロットは全て C-DiGit を用いて撮影され、画像は正しく目視で比較できるように Optimal Blot の設定値で正規化された。

¹ 相当品 : WesternSure PREMIUM

Possible cause # 3: メンブレンが正しくセットされていない

解決策：

For C-DiGit® Blot Scanner:

- メンブレンのタンパク質ブロット面を下にしてセットする

For Odyssey® Fc Imager:

- メンブレンのタンパク質ブロット面を上にしてセットする

原因：もしメンブレンが正しくセットされていない場合、バンドはほとんど見えません。もし見えたとしても、シグナルが大幅に減少してしまっている状態です。(See Figure 4.)

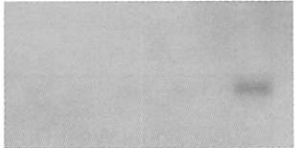
Figure 4	Correctly Imaged Blot	Incorrectly Imaged Blot
Images	NIH/3T3 Lysate  625 312 156 78 39 (ng)	NIH/3T3 Lysate  39 78 156 312 625 (ng)
Conditions		
Substrate	SuperSignal West Dura ¹	SuperSignal West Dura ¹
Imaging Method	タンパク質面を下にして撮影	タンパク面を上にして撮影
Performance	LOD – 156 ng	LOD – 625 ng

Figure 4. C-DiGit Blot Scanner における、メンブレンを表裏それぞれにセットした場合の性能比較
ブロットは全て C-DiGit を用いて撮影され、画像は正しく目視で比較できるように Correctly Imaged Blot の設定値で正規化された。

¹ 相当品：WesternSure PREMIUM

Possible cause # 4: プロットの撮影を、抗体処理もしくは発光処理と同日中に行っていない

予防措置 / 解決策: プロットの作成とイメージングは同日中に行うことが推奨されます。二次抗体のインキュベートは撮影と同日に行い、また発光基質の添加は撮影の直前に行う必要があります。

原因: 二次抗体もしくは発光基質は、処理の翌日にイメージングした場合でも十分に検出できるほど安定的ではありません。(See Figure 5 & 6.)

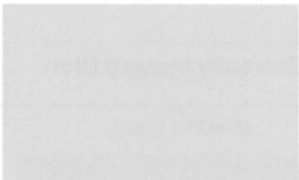
Figure 5	Optimal Blot	Unsatisfactory Blot	Unsatisfactory Blot
Images	NIH/3T3 Lysate  10,5,2.5,1.25,0.64 (μg)	NIH/3T3 Lysate  10,5,2.5,1.25,0.64 (μg)	NIH/3T3 Lysate  10,5,2.5,1.25,0.64 (μg) ERK
Conditions			
Substrate	SuperSignal West Dura ¹	SuperSignal West Dura ¹	SuperSignal West Dura ¹
Processing Time	Same day	Next day	Next day
Detection Process	HRP 標識二次抗体のインキュベート、ウォッシュ、そして発光基質の添加は撮影の直前に行った	HRP 標識二次抗体のインキュベート、ウォッシュ、そして発光基質の添加は撮影の前日に行った	HRP 標識二次抗体のインキュベート、ウォッシュ、そして発光基質の添加は撮影の前日に行った さらに、撮影の直前に二次抗体の再インキュベートと、基質の再添加を行った
Storage Conditions		ブロットは室温・乾燥状態で overnight 保存された	ブロットは室温・乾燥状態で overnight 保存された
Performance	LOD – 640 ng	LOD – None detected	LOD – 1.25 μg

Figure 5. 同じブロットを作成の直後に撮影した場合と、乾燥状態で overnight 保存された後に撮影された場合の状態比較

ブロットは全て C-DiGit を用いて撮影され、画像は正しく目視で比較できるように Optimal Blot の設定値で正規化された。

¹ 相当品 : WesternSure PREMIUM

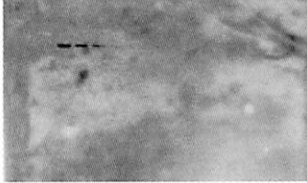
Figure 6	Optimal Blot	Unsatisfactory Blot	Unsatisfactory Blot
Images	NIH/3T3 Lysate  10,5,2.5,1.25,0.64 (μg)	NIH/3T3 Lysate  10,5,2.5,1.25,0.64 (μg)	NIH/3T3 Lysate  10,5,2.5,1.25,0.64 (μg)
Conditions			
Substrate	SuperSignal West Dura ¹	SuperSignal West Dura ¹	SuperSignal West Dura ¹
Processing Time	Same day	Next day	Next day
Detection Process	HRP 標識二次抗体のインキュベート、ウォッシュ、そして発光基質の添加は撮影の直前に行った	HRP 標識二次抗体のインキュベート、ウォッシュ、そして発光基質の添加は撮影の前日に行った	HRP 標識二次抗体のインキュベート、ウォッシュ、そして発光基質の添加は撮影の前日に行った さらに、撮影の直前に二次抗体の再インキュベートと、基質の再添加を行った
Storage Conditions		プロットは室温・wet 状態のまま overnight 保存された	プロットは室温・wet 状態のまま overnight 保存された
Performance	LOD – 640 ng	LOD – None detected	LOD – 1.25 μg

Figure 6. 同じプロットを作成の直後に撮影した場合と、wet 状態で overnight 保存された後に撮影した場合の状態比較

プロットは全て C-DiGit を用いて撮影され、画像は正しく目視で比較できるように Optimal Blot の設定値で正規化された。

¹相当品 : WesternSure PREMIUM

Possible cause # 5: 撮影の間、プロットが均一な wet 状態を保たれていない**予防措置 / 解決策 :**

- 撮影の前により多くの発光基質を使用する
- 撮影の前に発光基質を除ききらない

For C-DiGit® Blot Scanner:

- プロットをラップで包む、もしくはプラスチックシートでカバーする
- 発光基質とのインキュベーションをスキャン面上で行う

原因 : 発光基質の量が不十分な場合、メンブレンは次第に乾燥してしまい、酵素活性が失われてしまいます。(See Figure 7.)

Figure 7	Optimal Blot	Optimal Blot	Unsatisfactory Blot
Images	 NIH/3T3 Lysate 10, 5, 2.5, 1.25, 0.64 (µg)	 NIH/3T3 Lysate 10, 5, 2.5, 1.25, 0.64 (µg)	 NIH/3T3 Lysate 10, 5, 2.5, 1.25, 0.64 (µg) ERK
Conditions	Wet blot	Damp blot	Dry blot
Imaging Method	C-DiGit スキャン面上において 3.0mL の発光基質でインキュベートした メンブレンはプラスチックシートでカバーされた	過剰分の発光基質を取り除いた上で撮影した メンブレンはプラスチックシートでカバーされた	撮影前にプロットを乾燥させた
Performance	LOD – 640 ng	LOD – 640 ng	LOD – None detected

Figure 7. 同じプロットを wet, damp, dry の状態で撮影した場合の性能比較

プロットは全て C-DiGit を用いて撮影され、画像は正しく目視で比較できるように Optimal wet blot の設定値で正規化された。

Possible cause # 6: デジタルイメージャーで撮影を行う前にフィルムで露光した

予防措置 / 解決策 : 先にデジタルイメージャーで撮影し、その後にフィルムで露光を行う

原因 : デジタルイメージングでは、最も発光量が多くなるタイミングで撮影を行う必要があります。このタイミングは、大抵の場合、発光基質を加えてから 5 分後から始まりますが、発光基質の種類によって異なります。(See Figure 8, 9 & 10.)

Figure 8	Optimal Blot	Unsatisfactory Blot	Unsatisfactory Blot
Images	NIH/3T3 Lysate  338 625, 312, 156, 78, 39, (ng)	NIH/3T3 Lysate  114 625, 312, 156, 78, 39, (ng)	NIH/3T3 Lysate  32.2 625, 312, 156, 78, 39, (ng) ERK
Conditions			
Imaging time	SuperSignal® West Pico によるインキュベーションの直後	インキュベーションの 26 分後	インキュベーションの 51 分後
Scan Setting	High	High	High
Performance	LOD – 625 ng, Signal - 338	LOD – 625 ng, Signal - 114	LOD – 625 ng, Signal – 32.2

Figure 8. 同じブロットを SuperSignal®West Pico² を用い、長時間置いて撮影した場合の発光量変化
発光基質によるブロットのインキュベーションは 5 分間行われ、全て C-DiGit を用いて撮影された。画像は正しく目視で比較できるように、Optimal blot の設定値で正規化された。

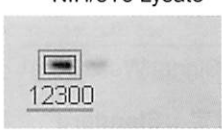
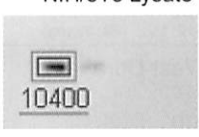
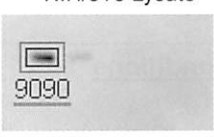
Figure 9	Optimal Blot	Satisfactory Blot	Satisfactory Blot
Images	NIH/3T3 Lysate  12300 625, 312, 156, 78, 39, (ng)	NIH/3T3 Lysate  10400 625, 312, 156, 78, 39, (ng)	NIH/3T3 Lysate  9090 625, 312, 156, 78, 39, (ng) ERK
Conditions			
Imaging time	SuperSignal® West Dura によるインキュベーションの直後	インキュベーションの 24 分後	インキュベーションの 48 分後
Scan Setting	High	High	High
Performance	LOD – 156 ng, Signal– 12,300	LOD – 156 ng, Signal – 10,400	LOD – 156 ng, Signal – 9,090

Figure 9. 同じブロットを SuperSignal®West Dura¹ を用い、長時間置いて撮影した場合の発光量変化
発光基質によるブロットのインキュベーションは 5 分間行われ、全て C-DiGit を用いて撮影された。画像は正しく目視で比較できるように、Optimal blot の設定値で正規化された。

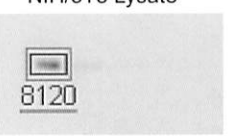
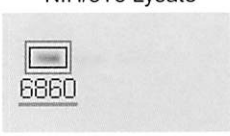
Figure 10	Optimal Blot	Satisfactory Blot	Satisfactory Blot
Images	NIH/3T3 Lysate  11500 625, 312, 156, 78, 39, (ng)	NIH/3T3 Lysate  8120 625, 312, 156, 78, 39, (ng)	NIH/3T3 Lysate  6860 625, 312, 156, 78, 39, (ng) ERK
Conditions			
Imaging time	SuperSignal® West Femto によるインキュベーションの直後	インキュベーションの 24 分後	インキュベーションの 48 分後
Scan Setting	High	High	High
Performance	LOD – 156 ng, Signal– 11,500	LOD – 156 ng, Signal – 8,120	LOD – 156 ng, Signal – 6,860

Figure 10. 同じブロットを SuperSignal®West Femto を用い、長時間置いて撮影した場合の発光量変化
発光基質によるブロットのインキュベーションは 5 分間行われ、全て C-DiGit を用いて撮影された。画像は正しく目視で比較できるように、Optimal blot の設定値で正規化された。

Possible cause # 7: プロットに対して適切な感度設定で撮影していない

予防措置 / 解決策 :

- C-DiGit® Blot Scanner では、感度を High (12 分間) に設定すると、より感度よく撮影できる
- Odyssey® Fc Imager では、より長い露光時間設定を行う (最大 10 分間まで)

原因 : C-DiGit Blot Scanner もしくは Odyssey® Fc Imager によるイメージングでは、ほとんどの場合サチュレーションを起こすことはありません。最適感度を確実に得るためには、最初に長時間の露光設定を行い、次に撮影時間をより短くしていき最適化を図ることが推奨されます。(See Figure 11.)

Figure 11	Optimal Blot	Satisfactory Blot
Images	NIH/3T3 Lysate  ERK 625, 312, 156, 78, 39 (ng)	NIH/3T3 Lysate  ERK 625, 312, 156, 78, 39 (ng)
Conditions	SuperSignal West Dura ¹ 感度設定 : High	SuperSignal West Dura ¹ 感度設定 : Standard
Performance	Signal – 12,300	Signal – 5,030

Figure 11. C-DiGit Blot Scanner と SuperSignal West Dura を使用し同じウェスタンブロットを撮影した際の感度設定 High と Standard での性能比較

画像は正しく目視で比較できるように、Optimal blot の設定値で正規化された。

¹ 相当品 : WesternSure PREMIUM

² 相当品 : WesternSure ULTRA

Possible cause # 8: 発光基質の温度が低すぎる

- 予防措置 / 解決策：
- デジタルイメージを撮影する前に、発光基質を室温に戻す

原因：酵素活性は低温下において大幅に低下するため、デジタルイメージを撮影する前に発光基質を室温に戻す必要があります。これはフィルム撮影時にも必要ですが、フィルムを用いて長時間露光を行う際には撮影中に発光基質が室温に戻ることもあります。(See Figure 12.)

Figure 12	Optimal Blot	Unsatisfactory Blot
Images	NIH/3T3 Lysate  1740 10, 5, 2.5, (μg) ERK2	NIH/3T3 Lysate  200 10, 5, 2.5 (μg) ERK2
Conditions	SuperSignal West Pico ² 感度設定：Standard 発光基質：室温	SuperSignal West Pico ² 感度設定：Standard 発光基質：低温
Performance	Signal – 1,740	Signal – 200

Figure 12. SuperSignal West Pico を室温もしくは 4℃で使用し、同じウェスタンブロットを撮影した場合の性能比較
ブロットは全て C-DiGit を用いて撮影され、画像は正しく目視で比較できるように Optimal blot の設定値で正規化された。

Possible cause # 9: 発光基質のインキュベートを 5 分間行っていない

- 予防措置 / 解決策：デジタルイメージャーで撮影を行う前に、発光基質で 5 分間インキュベートする

原因：5 分間のインキュベーションは、大抵のメーカーが最適な発光状態を実現するために推奨しています。これは、フィルムとデジタルイメージの両方に適用されます。(See Figure 13.)

² 相当品：WesternSure ULTRA

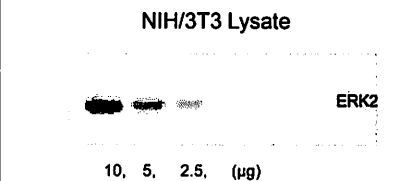
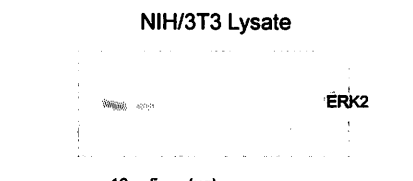
Figure 13	Optimal Blot	Unsatisfactory Blot
Images		
Conditions	SuperSignal West Pico ² Incubation 5 min 発光基質：室温	SuperSignal West Pico ² No Incubation 発光基質：室温
Performance	LOD – 2.5 µg	LOD – 5 µg

Figure 13. SuperSignal West Pico を使用し同じウェスタンブロットを撮影した際の、5 分間のインキュベートの有無による性能比較
ブロットは全て C-DiGit を用いて撮影され、画像は正しく目視で比較できるように Optimal blot の設定値で正規化された。

Possible cause # 10: 発光基質が希釈されている

予防措置 / 解決策：発光基質を希釈してはいけません

原因：反応効率は、酵素と基質の存在比によって決定されます。発光基質を希釈すると、発光量に重大な影響を与えます。(See Figure 14.)

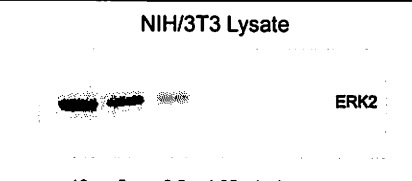
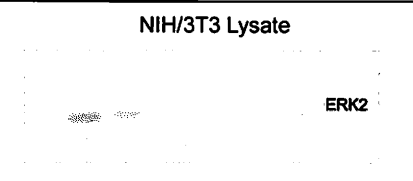
Figure 14	Optimal Blot	Unsatisfactory Blot
Images		
Conditions	SuperSignal West Dura ¹ 発光基質の希釈無し	SuperSignal West Dura ¹ 発光基質の希釈有り(1:1, in water)
Performance	LOD – 1.25 µg	LOD – 2.5 µg

Figure 14. SuperSignal West Dura を使用し同じウェスタンブロットを撮影した際の、発光基質の希釈の有無による性能比較
ブロットは全て C-DiGit を用いて撮影され、画像は正しく目視で比較できるように Optimal blot の設定値で正規化された。

LI-COR 社

近赤外蛍光 & ケミルミ撮影装置

- ・ケミルミ 1ch+可視蛍光 1ch+近赤外蛍光 2ch 標準装備
- ・近赤外波長光による高感度・低バックグラウンド検出
- ・蛍光 600nm, 700nm, 800nm の 3 波長検出
- ・従来装置の 64 倍のダイナミックレンジ

→ワイドダイナミックレンジで条件検討不要に
起動が早く、シンプルな設定で撮影スタートまで
スムーズです。



ODYSSEY® Fc

LI-COR 社

ケミルミ専用ウェスタンブロットイメージャー

C-DiGit Blot Scanner



- ・革新的なスキャナー型ケミルミ撮影装置
- ・サンプルに対して検出部が密着し鮮明な画像が得られます
- ・シンプルな撮影メニューと定量解析機能など充実のソフトウェア
- ・リーズナブル

株式会社 **エムエステクノシステムズ**

LI-COR®



東日本 〒162-0805 東京都新宿区矢来町 113 番地
TEL (03)3235-0673 FAX (03)3235-0669
西日本 〒532-0005 大阪市淀川区三国本町 2 丁目 12 番 4 号
TEL (06)6396-6616 FAX (06)6396-6644
e-mail: technosales@technosaurus.co.jp

※ 会社名および商品名は、各会社の商標または登録商標です。

● 本価格表記載の規格・仕様および価格は、予告なく変更する場合がありますので御了承下さい。

<http://www.technosaurus.co.jp/techno/>