

GENIE BLOTTER 取扱説明書

Idea Scientific Co.

ニッコー・ハンセン株式会社

装置の概要

原理: GENIE の特徴はそのプレート電極にあります。大きな表面積は均一で最適な電場を供給します。通常のブロッターは電極の周囲に発生する泡の膜を通して電流を流すので、電場の大半を無駄にしています。

危険: GENIE には高い電圧がかけられた時に OFF にする安全機能がないので、高電圧(30V 以上)の電源には接続しないで下さい。Idea Scientific 社が提供する電源は、GENIE を使用する上でもっとも安全です。取扱説明書の電圧表はこれらの電源を使用して計算されています。

注意: GENIE にはニッケルクロム合金製陽極(エコミーモデル)または、プラチナコートチタン陽極(プレミアムモデル)とニッケルクロム合金製陰極が提供されます。エコミーモデルのニッケルクロム合金製陽極にはわずかな表面腐食が見られることがあります。この腐食を取り除くために、スコッチブライトなどで拭き取る必要があります。プラチナコートチタン製陽極は、メンテナンスフリーです。

警告: プラチナコート電極を決して陰極として使用しないで下さい。またプラチナコート面を研磨しないで下さい。

警告: 塩素イオンはすべての陽極にダメージを与えます。決してエレクトロブロットングバッファーの pH を HCL で調整してはなりません。SDS-PAGE ゲルのブロットングを行なう時、分離ゲルが塩素イオンを含んでいる時、ゲルの底、またはゲルの上からプロモフェノール・ブルーを使用して下さい。

警告: 伝導性の高いバッファー(低メタノールのウェスタン、核酸ブロットング)で長時間(2時間以上)のブロットングは、オーバーヒートしてニッケルクロム合金製陽極を損傷する可能性があります。これらのバッファーには、プラチナコートチタン陽極の使用をおすすめします。

様々なブロットングについて

ウェスタンブロットング

もっとも一般的なウェスタンブロットングバッファーは、25mM トリスグリシン(pH8.3) / 20%メタノール(Towbin バッファー)¹です。(ブロットングバッファー#1 を参照) SDSゲルは前もって浸さずに直接ブロッターに入れ、ニトロセルロース膜かPVDF膜(こくまれに、ナイロン膜)で、12Vで1時間ブロットします。注意: PVDF膜は非常に疎水性なので最初に 100%メタノール液で濡らして、使用する前に少なくとも 15 分間ブロットングバッファー内で平衡化させておかなければなりません。

大きなタンパク質(200kD 以上)、や厚いゲル(1mm 以上の厚さ)の時は、ブロットングの時間を延長する必要があるかもしれません。大きなタンパク質はブロットング用バッファーの中でメタノールにより沈殿するかもしれません。ブロットングバッファーに 0.01 ~ 0.05% の SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)を加えるか、タンパク質の移動性を維持するためにメタノールを減らします。大きなタンパク質をブロットングする良い方法は 1/2x トリスグリシンバッファーを使用し、電源を 24V で 2 時間にセットすることです。

小さなタンパク質(20kD より小さい)は転写されずに、膜を通り抜けることがあります。電圧を 6V まで下げるか、より小さいポアの膜を使用して下さい。

酢酸(ブロットングバッファー#3 を参照)は酸性尿素や等電点電気泳動(IEF)ゲルのために使用されます。他のウェスタンブロットングとは逆に陰極に向かいます。膜はゲルの陰極(-)側におかなければなりません。電源線は逆にしないで下さい。プラチナコートチタン製陽極は陰極として使用すると損傷します。

タンパク質とペプチドは、CAPS / 10%メタノールバッファー(電気ブロットングバッファー#3 を参照)を使用して、配列決定のために PVDF にブロットすることができます。

核酸のブロットング(タンパク質)

GENIE を使用した核酸のブロットングは、毛細管、真空、加圧法に換わる、迅速で、高解像度のブロットングです。

ノーザンブロッティング (RNA)

2.2Mのホルムアルデヒド、1X MOPS中で行われるRNAゲルは、ホルムアルデヒド(電気泳動ブロッティングバッファー#4を参照)なしに、1/2X MOPS内で、6Vで2時間、12Vで1時間、+に帯電したナイロン膜に直接ブロッティングすることができます。注意:ゲルは、アクリジンオレンジ(15 µg/mL)で染色することができます、写真に撮ることができます。それからブロッティングの前にブロッティングバッファー#5の中で1時間脱色します。TBE中を流れるRNAゲルはTBE⁴でプロットできます。

サザンブロッティング (DNA)

TBE緩衝液中で電気泳動されたゲルは、TBE緩衝液(もしくは1/2 TBE)(電気泳動ブロッティングバッファー#4を参照)内の+に帯電したナイロンに直接プロットすることができます。CHEFゲルから100万ベースのペアDNAでさえDNAを寸断することなくプロットできます。^{9 10} DNAは天然の二本鎖の状態のプロットされるので、膜を0.4N NaOHに10分間浸すことによって転写した後、変性させなければなりません。それから膜を電極と同様に、2X SSC中で10分間リンスします。注意:TAE中を流れるゲルは、TAE緩衝液中でプロットしなければなりません。詳細は不明⁵

電気泳動ブロッティングバッファー

注意:塩素は電極の接続部を腐食し有毒です。pHを決してHCLで調整しないで下さい。市販の調整済みのバッファーにはしばしばHCLを含んでいることがありますので使用しないでください。

1. 25mM トリグリシン 20% メタノール(pH8.3)。これはほとんどのウェスタンブロッティングに使用される標準のバッファーです。

Tris Base (トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン)	3.03 g
グリシン	14.4 g

20% V/V メタノール 1L で希釈します;このバッファーはpHの調整は必要ありません。もしこの完全な転写ができないときは、トラブルシューティングを参照してください。

2. 0.7%酢酸(1Lに薄めた7mLの氷酢酸)は等電点電気泳動ゲルと酸性尿素ゲルの転写に使用されます。タンパク質は陰極(-)の側にプロットされます。

3. 10mM CAPS / 10%メタノール(pH11.0)

CAPS(3-シクロヘキシルアミノプロパンスルホン酸)	2.213 g
-----------------------------	---------

900mLの蒸留水に溶解

pHをNaOHで11.0に調整

100mLのメタノールを追加

直接シーケンスのため、タンパク質をPVDFに転写します。

4. 89mM Tris-borate、2mM EDTA(pHおよそ8.3)

Tris Base	10.8 g
ホウ酸	5.5 g
EDTA	0.78 g

1Lの蒸留水で希釈。ホウ酸によるpH調整は不要

5. ノーザンブロッティング用のMOPSバッファー(pH7.0)

Morpholino propane sulphonic acid(MOPS)	4.626 g	(20mM)
---	---------	--------

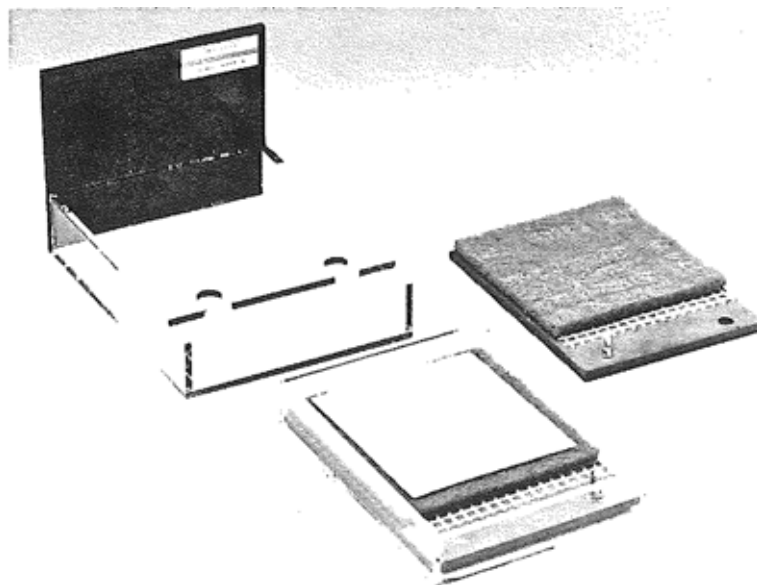
酢酸ナトリウム	0.6805 g	(5mM)
---------	----------	-------

EDTA	0.1861 g	(0.5mM)
------	----------	---------

1Lの蒸留水で希釈。PHを酢酸で調整

使用方法

1. トレイを水平に置きます。
2. トレイの底に陰極を置きます。バナナコネクターは、左手上部になければなりません。(注意: プラチナコートチタン製の電極を陰極としては使用してはなりません。)
3. バブルスクリーンのリブ側を下にして、陰極の上に置きます。
4. パッドをトレイに置き、バッファーをパッドと同じレベルになるまでトレイに入れます。泡を排除するため、パッドを圧搾します。
5. パッドと同じ大きさにカットした濾紙をパッド上に置きます。濾紙の下に泡がないか確かめてください。濾紙は薄い(Whatman 3MM のような)事が大切です。
6. 濾紙の上にゲルを置きます。注意: IEF ゲルまたは、酸性尿素ゲルをプロットングする時は、膜がゲルの下側になるように置かなければなりません。
7. 前もって濡らしておいたプロットング膜をゲルの上に置きます。プロットング膜の両端を持って、たるんだ真ん中をまずゲルに触れさせれば、簡単にセットできます。それから、ゆっくりと端をおろしていきます。バッファーのレベルよりわずかに下で行えば、ゲルとプロットング膜の間の泡は残りにくくなります。
8. プロットング膜の表面をこすり、ゲルと膜の間の余分なバッファーを追い出します。そうしなければ、不完全な転写になる可能性があります。これを行うために、ガラス棒をゲルの上で転がしても良いでしょう。これを行うとき、トレイの中にバッファーを入れすぎると、膜が浮きゲルからずれやすくなります。
10. 濾紙を1枚、泡が残らないように注意して膜の上に置きます。
11. パッドを濾紙の上に置きます。(パッドが新しいときは通常上下で2枚使用します。使用する回数により5枚まで増やして使用します。) ほぼいっぱいになるまで、バッファーを入れます。
12. プラスチックバブルスクリーンのリブ側を上にして、パッドの上に置き、陽極(バナナコネクターは、右上部であることをその上に置きます。
13. 陰極の上に、2つ穴が開いた電極カバーを置きます。
14. ゲルの滑り落ちを防ぐため、このサンドイッチ状の物を約 2mm ほど圧縮して下さい。必要に応じパッドを追加してください。(#11 を参照)
15. トレイを水平に保ちながら、トレイをトレイホルダーにスライドさせます。電極のカバーをトレイとトレイホルダーの間に挟まないように注意してください。取り外しにくくなります。
16. ゆっくりと、GENIE を垂直の運転位置になるように傾けていきます。もしバッファー液面がプロットング領域をカバーしていないときは、バッファーを追加してください。
17. GENIE を電源に接続して、プロットングを開始します。左手の接続部は(-)陰極で、右側の接続部は(+)陽極です。
18. プロットング中は、温度をモニターしてください。





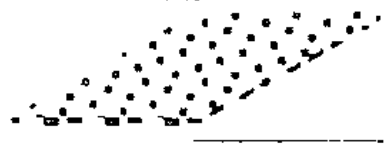
プラスチック電極カバー



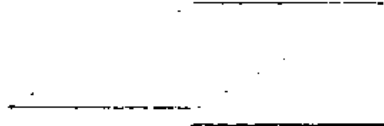
上部電極(陽極(+))



バブルスクリーン(リブは上側)



パッド



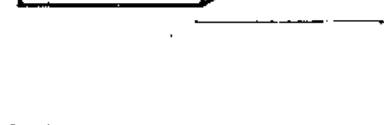
濾紙(Whatman 3MM など)



プロットイング膜(メンブレン)



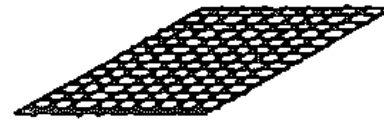
ゲル



濾紙(Whatman 3MM など)



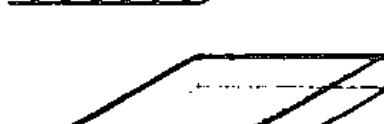
パッド



バブルスクリーン(リブは下側)



下部電極(陰極(-))



トレイ

GENIE の一般的なプロット条件

ゲル	メンブレン	バッファー	時間と電圧	備考
SDS-PAGE または Native ゲル (20kD ~ 200kD)	ニトロセルロース膜または PVDF 膜	25mM Tris-Glycine / 20% MeOH (バッファー #1)	12V で 60 分 24V で 30 分 6V で 30 分の後 24V で 90 分	PVDF 膜は少なくとも 15 分間プロットングバッファーに浸ける。
小さなタンパク質 (5kD ~ 20kD)	0.2u ニトロセルロース膜または小さいポアの PVDF 膜	同上	6V で 30 分	
ペプチド (5kD 未満)	0.05u ニトロセルロース膜	同上	6V で 10 分間	ニトロセルロース膜は Schleicher and Schuell の #BA75
大きなタンパク質 (200kD 以上)	ニトロセルロース膜または PVDF 膜	12.5mM Tris-Glycine / 10% MeOH(1/2X buffer #1) もし転写が悪いときはバッファーを調整する	24V で 1 ~ 2 時間	0.01 ~ 0.05% の SDS をプロットングバッファーに加える、または MeOH を除去する。
酸性尿素ゲル、IEF または Native ゲル	ニトロセルロース膜	0.7% 酢酸 (バッファー #2)	12V で 1 時間	メンブレンは必ずゲルの陰極 (-) 側にする。
直接シーケンスのためのタンパク質	小さいポアの PVDF 膜	10mM CAPS / 10% MeOH (バッファー #3)	12V で 30 分 6V で 1 時間	CAPS は一部タンパク質を沈殿させる。
RNA アクリルアミドゲル	+帯電したナイロン	89 mM TBE (バッファー #4)	12V で 30 分	帯電していないナイロンでは働かない。
RNA アガロースゲル		同上	12V で 1.5 時間	同上
RNA アガロースゲル		MOPS アセテート (バッファー #5)	6V で 2 時間	同上
DNA アクリルアミドゲル		89 mM TBE (バッファー #4)	12V で 30 分	同上
DNA アガロースゲル		同上	12V で 1 時間	1/2X TBE がしばしば使用される ¹¹

GENIE プロッター用標準電源

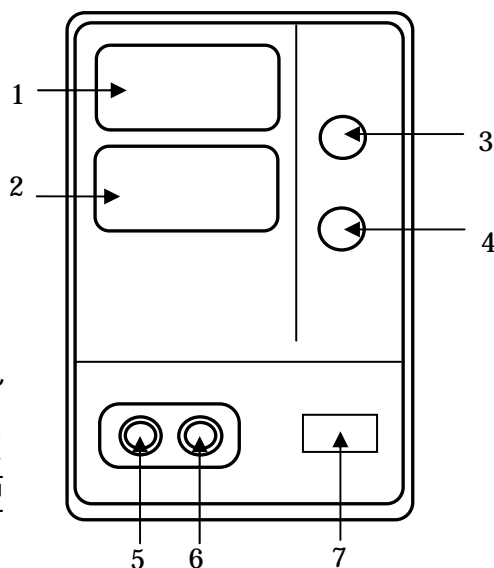
0 ~ 19V パワーサプライ #4019

1. 電流計
2. 電圧計
3. 電流調整ノブ
4. 電圧調整ノブ
5. - 出力
6. + 出力
7. 電源スイッチ

使用方法

プロッターの準備の後、出力ターミナルを取付け電源を入れて下さい。

GENIE プロッターを使用する場合は定電圧モードをご使用ください。定電圧モードを使用する為には、電流調整ノブを右いっぱいに戻し切り、電圧調整ノブで希望する電圧にして下さい。



ナイロンメンブレンのブランド例

Some brand names of nylon membranes

Positively charged nylon membranes (should work for electroblotting): HyBond N+ (Amersham), Zeta-Probe, Zeta-Probe GT (Bio-Rad), BioBlot N+ (Costar), ZetaBind (AMF-Cuno), GeneScreen Plus (DuPont/NEN), Bio Trace HP (Gelman), OptiBLOT (IBI), BIOTRANS+ (ICN), MAGNACHARGE (Micron Separations), Immobilon-NY+ (Millipore), Biotryne+, Biotryne B (Pall), Maximum Strength Nytran + (Schleicher and Schuell), Flash (Stratagene).

Neutral charged nylon membranes (will not work for electroblotting): Hybond N (Amersham), Immun-lite (Bio-Rad), BioBlot N (Costar), Gene Screen (DuPont/NEN), BIOTRANS (ICN), MAGNA (Micron Separations), Biotryne A (Pall), Maximum Strength Nytran (Schleicher and Schuell), Duralon (Stratagene).

参考文献

REFERENCES:

- ¹Proc Nat Acad Sci. **76**, 4350-4354, (1979). (The classic Western blot publication).
- ²Biotechniques **12**, 650-654, (1992). (30 minute Western blots with the GENIE)
- ³J. Cell Biology **110**, 1623-1633, (1990). (30 minute Western blots with the GENIE).
- ⁴Biochem. Biophys. Res. Comm., **238**, 277-279, (1997). (A unique 1.5 hour Northern blot with a very low background that does not use formaldehyde)
- ⁵EMBO Journal **13**, 3368-3377, (1994). (Northern blots from urea sequencing gels transferred with TAE)
- ⁶J. Bact. **176**, 3820-3823, (1994). (tRNA northern blots)
- ⁷Gene **151**, 209-214, (1994). (tRNA northern blots)
- ⁸J. Biol. Chem. **268**, 14045-14053 (1993) (Northern blots of yeast RNase P RNAs from acrylamide gels).
- ⁹The Plant Cell **10**, 1349-1359, (1998). (Blotting of native 200 kb DNA from CHEF gels with the GENIE).
- ¹⁰Dr. Robert Haire, personal communication. (Blotting of one million base pair DNA from CHEF gels)
- ¹¹Science **279**, 349-352, (1998). (Electroblot with GENIE to measure telomere length)

トラブルシューティング

問題点	転写がうまくできない。染色ゲルが分子のゲルを離れていないことを示している。
考えられる原因	領域が小さすぎる。転写時間が短すぎる。メタノールに前もって浸けたことで、タンパク質がゲルの中に固定されている。転写バッファの pH がプロットされるタンパク質の pI である。プロテイングペーパーが厚すぎるまたは枚数が多すぎる。タンパク質が、分子が動けない高い濃度のアクリルアミドの領域に押しやられるまで、勾配ゲルが流されている。バッテリーチャージャーの動作不良。陽極の表面が酸化されている(合金陽極)かプラチナの劣化(消耗)。プロテイングバッファと併用する際の PVDF 膜の不十分な平衡化。プロテイングバッファへのメタノールの入れすぎ。

問題点	膜にうまく結合しない
考えられる原因	膜のポアサイズが大きすぎる。ニトロセルロース膜に対してウェスタンの場合 MeOH が必要。ニトロセルロースのグレードが低い。小さなタンパク質に対して電圧が高すぎる。プロットングバッファの中に SDS が多すぎる。プロットングバッファに十分なメタノールが入っていない。タンパク質がメタノールとの相性が悪く、エタノールにかえる必要がある(まれ)。
問題点	転写の後、タンパク質の媒質が洗い流されている。
考えられる原因	メディア洗浄における洗剤はタンパク質を取り除くので、Tween, NP-40 に変えるか、洗剤の除去が必要。
問題点	機器のオーバーヒート
考えられる原因	その電圧をかけるには、バッファの濃度が高すぎる。1/2X バッファを使うか電圧を下げる。(ウェスタンの場合 10~20%メタノールと 1/2 トリスグリシンが一般的に使用されている。)
問題点	汚れまたは不鮮明なプロット
考えられる原因	ゲルと媒質の間に液体が多すぎる。パッドが古すぎるか薄くなっている。プロット中にゲルが滑り落ちている。ゲルまたはプロット中に不適切に平衡化されたか収縮している。手順が適切でない。入れすぎたゲルが 0.2 ミクロンのニトロセルロースの上でポアをふさぐように汚している。プロットングバッファと併用する PVDF 膜の平衡化が十分でない。
問題点	合金陽極(+)の腐食
考えられる原因	プロットング時間が長すぎる(24V で最大 2 時間、6V または 12V で最大 4 時間)。
解決策	プラチナチタン陽極を使用する。
問題点	極端な合金陽極(+)の腐食
考えられる原因	塩素イオンが存在する(供給源; バッファの pH が HCL で調整されている。Toris Base ではなく、Toris CL を使用している。ゲルが十分長く電気泳動されていないため、マーカー線の前の分離ゲル塩化物がプロットングバッファにプロットされている。給水系統に微量の塩素がある。
問題点	タンパク質が CAPS バッファにプロットしない。
考えられる原因	CAPS バッファは配列決定のためにタンパク質を PVDF にプロットングするのは非常に一般的である。タンパク質の中には CAPS バッファによってゲルの中で沈殿する物もある。CAPS で濃縮することでこの問題が解決することもあるが、プロッターは非常に熱くなりうる。あるいは、borate バッファかトリスグリシンバッファを使って、プロットのグリシンがなくなるまでですすぐ。

輸入元
 ニッコー・ハンセン株式会社
 ハンセン事業部
 〒530-0043
 大阪市北区天満4丁目15-5
 TEL 06-4801-7751
 FAX 06-6358-5580