MAFBX　ウエスタンブロッティング

①試料調整

タンパク質量を1.8mg/mlに調整、SDS Sample Buffer（10%　2メルカプトエタノール）にて　試料：SDS Sample Buffer＝1：1　に混合した後、95℃で熱処理5分。

②電気泳動

泳動バッファーの作成：トリスグリシンSDSバッファー（Bio Rad）をDWで10倍希釈する

7.5%PAGE（Atto）に10μlづつロードする。試料のレーンがスタッキングゲルの下端までくるまで5mAの定電流で泳動。その後分離ゲル中は20mAで泳動し、ゲルの下端まで泳動する。

③転写

転写バッファーの作成：トリスグリシンバッファー（Bio Rad）をDWで10倍希釈し、メタノールを10%含有するように調整。

PVDFメンブレンをメタノールに1分程度浸漬。その後、15分程度、転写バッファーに浸漬。

右図のようにメンブレンが+側になるように転写装置にセットし、70Vの低電圧で60分転写。

④ブロッキング

TBSカゼインブロッカー（0.05% Tween20）の作成：TBSカゼインブロッカー（Bio Rad）にTween 20を加える。

TBSカゼインブロッカー（0.05% Tween20）にメンブレンを1時間、室温にて反応

⑤一次抗体反応

一次抗体の作成：抗ウサギMAFBX抗体（SCB, SC-33782）をTBSカゼインブロッカー（0.05% Tween20）で300倍に希釈。

⑥メンブレンの洗浄

トリスバッファーサリン（0.05 %Tween 20）の作成：トリスバッファーサリン（Bio Rad）をDWで10倍希釈し、Tween 20を加える。

5分×5回

⑦二次抗体反応

二次抗体の作成：抗ウサギIgG-HRP抗体(BET, A120-201P)をTBSカゼインブロッカー（0.05% Tween20）で20000倍に希釈。

メンブレンを浸漬し、室温で1時間反応

⑧メンブレンの洗浄

　⑥と同方法

⑨ECL反応

ECL反応液の作成：ECL Plus(GE Health Care, RPN2132)。Solution A：Solution B＝40：1で混合

メンブレン上に反応液をかけ、5分間反応。レントゲンフィルムに焼く。

1. リプロービング

ストリッピングバッファーの作成：Tris base 0.76 g、SDS 2 gおよびβ-メルカプトエタノール700 μLを精製水に溶解し、HClでpH 6.8に調整後、全量を100 mLにする。

フィルム露光後、トリスバッファーサリン（0.05 %Tween 20）でメンブレンを各5分間、4回洗浄。

ストリッピングバッファー中でメンブレンを軽く振盪しながら、50℃で30分間インキュベート。

トリスバッファーサリン（0.05 %Tween 20）で転写膜を各5分間、6回洗浄。

⑪ブロッキング

TBSカゼインブロッカー（0.05% Tween20）にメンブレンを1時間、室温にて反応

⑫一次抗体反応

Internal Control （GAPDH）：抗マウスGAPDH抗体（ABV, H00002597-MO1）をTBSカゼインブロッカー（0.05% Tween20）で3000倍に希釈。

冷蔵庫内で一晩反応

⑬メンブレンの洗浄

⑭二次抗体反応

二次抗体の作成：抗マウスIgG-HRP抗体(MBL, LOT 361)をTBSカゼインブロッカー（0.05% Tween20）で10000倍に希釈。

メンブレンを浸漬し、室温で1時間反応

⑮メンブレンの洗浄

⑯ECL反応、レントゲンフィルムに感光