



Title	ウェスタン分析
Author(s)	大西, 岳人; 高橋, 裕一郎
Citation	低温科学, 67, 415-422 光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/39175">http://hdl.handle.net/2115/39175</a>
Type	bulletin (article)
Note	3章 単離・精製・活性測定 6. タンパク質 h
File Information	67-060.pdf



[Instructions for use](#)

## 6. タンパク質

### h. ウェスタン分析

大西 岳人<sup>1)</sup>, 高橋裕一郎<sup>1)</sup>

タンパク質を特異的に検出するウェスタン分析は、化学発光を用いる検出法により微量のタンパク質でも強いシグナルが得られるため、強力な実験手法である。本章では、ウェスタン分析の実験手法と抗体の作製法について紹介する。

### Western blotting

Takahito Onishi and Yuichiro Takahashi

Western blotting is a powerful tool for detecting with high sensitivity a specific protein resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. In this chapter, procedures for western blotting using enhanced chemiluminescence and for generation of antibodies in rabbits are described.

#### 6.h.1 ウェスタン分析とは

組織、細胞および葉緑体などのタンパク質を可溶化し、SDS-PAGEで分析すると、多数のポリペプチドが分離される。目的のタンパク質が多量であれば、その存在を確認することは難しくないが、少量であると検出は容易でない。また、細胞もしくは葉緑体のタンパク質の蓄積量の変化を分析する場合、特定のタンパク質を特異的かつ定量的に検出することが必要となる。目的のタンパク質に対する抗体があれば、ウェスタン分析は特異的で、高感度で、信頼性の高い分析法である。

ウェスタン分析法では、SDS-PAGEで分離したポリペプチドを、ニトロセルロース (NC) や polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に電気泳動的に転写するブロッティングを行う。次に、膜上に結合した目的のポリペプチドとそれに対する抗体 (一次抗体) を抗原抗体反応で結合させる。次に一次抗体を結合したポリペプチドを検出するため、一次抗体に対する抗体 (二次抗体) を結合させる。化学発光法 (ECL, enhanced chemiluminescence) では、二次抗体に結合した HRP (horseradish peroxidase) 活性を利用し、目的のポリペプチドのバンドを高い感度で検出する<sup>1)</sup> (図1)。化学発光はX線フィルムもしくは CCD カメラに露光させて検出・記録する。

ウェスタン分析には、SDS-PAGE, ブロッティング, および化学発光を検出する装置が必要である。二次抗体は市販されている (GE ヘルスケアバイオサイエンス, Anti Rabbit IgG, HRP-linked whole Antibody)。した

がって一次抗体を入手することがウェスタン分析には必須である。可能であれば他の研究者から譲り受けたりする。最近では、商業的に購入可能な光合成タンパク質に対する抗体の種類も増えている (Agrisera 社, <http://www.agrisera.se/>)。新規のタンパク質に対する抗体が必要な場合、費用がかかるが業者に抗体作製を委託することも可能である。費用を節約したい場合、ウサギなどを飼育して自分で作製する。この場合、動物を飼育する施設が必要で、動物の世話も行わなければならない。また、目的のタンパク質にタグ (HA や FLAG など) を融合して発現させた遺伝子組み換え植物を作製し、タグに対する抗体を購入して使用する方法もある。

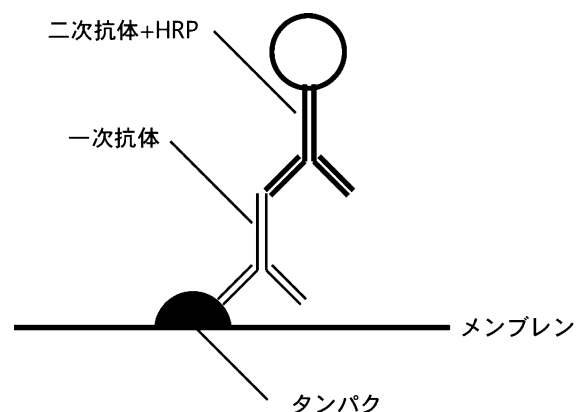


図1: ウェスタン分析におけるシグナルの検出

1) 岡山大学大学院自然科学研究科

## [実験方法]

### 用意する試薬

ブロッキングバッファー (1 L) ; 3.03 g Tris base, 20% (v/v) メタノール.

5.25 g  $\epsilon$ -アミノカプロン酸を加えることもある.

10 倍ボンソ溶液 (100 mL) ; 2 g Ponceau S, 20 g trichloro acetic acid, 20 g sulfosalicylic acid, 水で 10 倍に希釈して使用.

10 倍 TBS-T (1 L) ; 24.3 g Tris-base, 80 g NaCl, 20% (w/v) Tween20, HCl で pH 7.6 にあわせる (Tween 20 は必ずしも必要ないが, 検出時のバックグラウンドを低くする効果がある). 10 倍に希釈して使用.

化学発光用検出試薬 ; 化学発光の持続時間が長い, 感度が高いなどの市販の検出試薬を使用する. 一次抗体の力価が高い場合は, 自分で調製した検出試薬でも検出はうまくいく.

A液 14 mg p-coumaric acid/ml DMSO 400  $\mu$ l に分注し,  $-20$  度で保存

B液 44 mg Luminol/ml DMSO 900  $\mu$ l に分注し,  $-20$  度で保存

I液 90 ml Tris-HCl, pH 8.5 に 30%  $H_2O_2$  溶液 50  $\mu$ l と A液 400  $\mu$ l を混ぜる.

II液 90 ml Tris-HCl, pH 8.5 に B液 900  $\mu$ l を混ぜる. 検出直前に I液 と II液 を 1 : 1 に混合し使用する.

I液 と II液 は 1 週間くらい冷蔵保存できる. Luminol は不安定なので, 鮮やかな黄色の粉末が, 長期間保存することにより褐色になると, シグナルの検出感度が低下することがある.

### 電気泳動的ブロッキング

ポリペプチドを分離する SDS-PAGE は 3 章 6.a を参照する. 泳動が終了した後, ゲルから分離したポリペプチドを NC 膜や PVDF 膜に電気泳動的にブロッキングする装置には, ウェット式とセミドライ式がある. ウェット式では, プロット槽中のブロッキングバッファーにゲルと膜を完全に浸けた状態でプロットを行う. 高電流を発生するプロット用電源や大量のブロッキングバッファーが必要である. 熱がかなり発生するため, プロット中はバッファーを冷却する. ここでは主流になりつつあるセミドライ式でプロットする法を述べる. セミドライ式はブロッキングバッファーが少量で済み, 電源も電気泳動用のものが使用できる. 熱の発生も少ないので, 冷却する必要はなく室温でできる. ここでは, NC 膜を使用した方法を述べる.  $0.44 \mu\text{m}$  と  $0.2 \mu\text{m}$  のポアサイズの NC 膜が販売されているが, 通常は

価格の安い  $0.44 \mu\text{m}$  の膜を用いる.  $10 \text{ kDa}$  以下の低分子タンパクを検出するときには,  $0.2 \mu\text{m}$  の膜を使用するとシグナル強度が強くなることがある. PVDF 膜は, 特に低分子タンパクの保持力が若干高いようである. 特にシグナルが弱いときに使用を検討したらよい. NC 膜と異なり, メタノールに浸透させる前処理が必要となる.

1. SDS-PAGE 後, ゲルをゲル板からはがし, ブロッキングバッファー中で 10–30 分間振とうし, バッファーの置き換えを行う. この操作は省略して, 直接ブロッキングを行ってもよい. しかし, ゲルが Tricine バッファーまたは高濃度の尿素を含むと, ブロッキング時により多くの熱が発生する. 温度が上昇するとゲルが伸びるので, 特に低分子量のポリペプチドのプロットの歪みが無視できなくなる.
2. 厚さ 1 mm のろ紙 6 枚 (アドバンテック, クロマトグラフィー用ろ紙 No.590, 厚さ 0.93 mm), NC 膜 1 枚をブロッキングバッファーに浸す. ブロッキング装置の下側の電極が正の場合, バッファーに浸したろ紙を 3 枚重ね, 次に NC 膜, ゲルの順番で重ねる (下側の電極が負の場合は, NC 膜とゲルの順番は逆にする). さらにゲルの上にバッファーに浸したろ紙を 3 枚重ねる. メスピペットや長めの試験管を転がして, メンブレンとゲル間の気泡を取り除く. (図 2)
3. 1 mm のゲル ( $15 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$ ) なら 300 mA 定電流で 1 時間 (300 mAh), 電気泳動的にプロットする. 高分子のポリペプチド ( $80 \text{ kDa}$  以上) はプロットされにくいので, 電気泳動時のゲル濃度を低くするか, プロット時間を長くする. プロット後のゲルを染色すれば, どれくらいポリペプチドがプロットされたかを確認

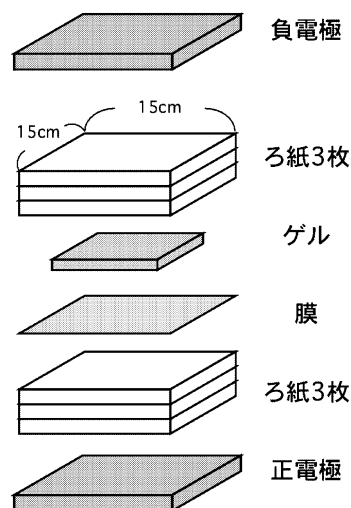


図 2 : セミドライタイプのウェスタンブロッキング

ることができる。電流を 300 mA 以上にすると熱の発生が無視できなくなる。2 mm のゲルの場合は 2 倍の時間プロットするが、ゲルシステムにより熱の発生が多い場合は、電流を上げて長い時間プロットする（例えば 150 mA で 4 時間）。

4. プロット後、濃縮ゲルのウェルの位置を基にして各レーンの位置をマークする。NC 膜を純水で洗い、ボンソ溶液に浸して 2 分間染色する。
5. NC 膜を水で洗い脱色する。染色された分子量マーカの位置をマークする。

### シグナルの検出

1. 5% (w/v) スキムミルクを溶かした TBS-T 中で NC 膜を 30-60 分振とうして、ブロッキングする。染色されたバンドはこの操作中に脱色する。
2. ブロッキング後、TBS-T で 5 分間 2 回洗う。
3. 5% (w/v) スキムミルクを溶かした TBS-T で希釈した一次抗体溶液に NC 膜を浸し、60 分振とうする。
4. NC 膜を TBS-T で 5 分間 2-3 回洗う。
5. 二次抗体を TBS-T で希釈した溶液に NC 膜を浸し、20-40 分振とうする。
6. NC 膜を TBS-T 溶液で 5 分間 3 回洗う。
7. NC 膜を検出試薬に 1 分間浸す。
8. NC 膜をビニル袋に入れ、ポリシーラーでシールし、液体が外にもれないようにする。
9. NC 膜を X 線フィルムにコンタクトさせ、シグナルを検出する。一般的に検出時間は 30 秒-5 分間である。もしくは、CCD カメラ撮影装置でシグナルを検出する。

## 6.h.2 ウェスタン分析の実験条件の検討項目

検出するタンパク質により、シグナルの検出が難しい場合があるので、実験条件の検討を行う必要がある。

1. SDS-PAGE の最適化；疎水性タンパク質を分離する場合、タンパク質の可溶化、分離ゲルの組成などを最適化しないと、バンドが不均一に広がり、シグナルがうまく検出できないことがある。例えば、6 M 程度の尿素を分離ゲルに加えると改善することがある。また、10 kDa 以下の小型のサブユニットを分離するときには、低分子ポリペプチド用の泳動システムを選択する（3章 6.a 参照）。
2. プロット条件；疎水性タンパク質をプロットする時は、プロットバッファー（1 L）；3.03 g Tris base, 14.4 g glycine, 0.5 g SDS, 20% (v/v) メ

タノールを用いると効率よくプロットされる。また、プロットは、目的のポリペプチドの分子量と分離に用いるゲルのかたさにより、最適化する必要がある。ここで述べた標準条件では、90 kDa 以上のポリペプチドのプロット効率は低い。また、SDS を加えたり、プロットを長くしたりすると、小型のポリペプチドが膜を通り抜けることがあるので注意しなければならない。

3. シグナルの弱い時；目的のポリペプチドの量が少ない時は、ブロッキングと一次抗体溶液のスキムミルク濃度を下げる（0.5%程度）。スキムミルク濃度が高すぎると、目的のポリペプチドが覆われてしまうことがある。
4. 定量的なシグナル検出；一次と二次抗体の濃度設定が重要である（図 3）。抗体濃度が高すぎるとバックグラウンドが高くなり、非特異的な交差反応によるシグナルが強くなることもある。また、一次抗体や二次抗体を結合させた後の膜の洗い条件を強くすると（溶液体積を多くしたり、振とう時間を長くしたりする）、バックグラウンドや非特異的なシグナルが弱くなる。
5. 抗体濃度の設定法；一般的には、一次抗体の力価は大きく異なるので、それぞれの抗体について、最適な希釈度を定める。最適化することにより、力価の低い、もしくは非特異的な交差反応がある一次抗体を用いても、きれいなシグナルが得られることがある。標準的な力価の抗体の場合、二次抗体の希釈度は標準に設定し（例えば 10000 倍）、一次抗体を 500, 1000, 2000 倍に希釈して検出する。最適と判断された一次抗体の希釈条件で、次に二次抗体の希釈を変化させて検出する（この場合 5000, 10000, 20000 倍）（図 3）。市販の二次抗体もロットにより力価が変わるので注意する。

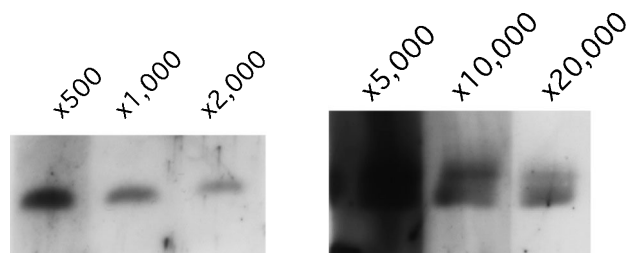


図 3：左；一次抗体の濃度のシグナルへの影響。二次抗体の濃度は一定である。一次抗体 500 倍希釈では少しバックグラウンドが高い。2000 倍希釈ではシグナルが弱くなる。右；二次抗体濃度のシグナルへの影響。一次抗体の濃度は一定にし、二次抗体の濃度を変えた。二次抗体 5000 倍希釈では、バックグラウンドが高い。20000 倍希釈でも強いシグナルが得られる。

### 6.h.3 抗体の作製

抗体はウェスタン分析の他にも免疫沈降、免疫染色などの実験に使われる。ここでは、最もよく使用されるウサギのポリクローナル抗体を自分で作製する方法について紹介する。

2週間ごとに4回ウサギを免疫すると、抗体ができるまで少なくとも2ヶ月かかる。抗体価をチェックするため、3回目以降の免疫の1週後に試採血し、ウェスタン分析でシグナルの様子を調べる。抗体価の上昇が頭打ちになれば全採血する。場合によっては、さらに免疫を繰り返さなければならないが、10回程度行っても効果がないときは、必要な抗原の量にも限りがあるので、あきらめることが多い。

#### 6.h.3.1 抗原の作製

一般に用いられる方法を述べるが、それぞれに利点と欠点があるので、研究目的に応じて選択する。

##### a) 大量発現

目的のタンパク質の全長もしくは部分配列を大腸菌に大量発現させる。大量発現したタンパク質が不溶性であると、精製は容易でない。封入体 (inclusion body) を単離してから精製することもある<sup>2)</sup>。不溶性であっても SDS-PAGE で分離し、ゲルを切り出して抗原として使用できる。タグを融合したタンパク質を発現すれば、アフィニティーカラムクロマトグラフィーで精製できる。

##### b) 合成オリゴペプチド

業者に委託してオリゴペプチドを合成してもらおう。特異性が高い抗体を得ることができるが、抗体の力価は上がりにくいことがある。合成オリゴペプチドは、目的のタンパク質の配列の中から、10-15アミノ酸配列を選ぶ。このとき、キャリアタンパク質の Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)<sup>3)</sup> をマレイミドベンゾイルオキシコハク酸イミド (MBS) で化学架橋させるため<sup>4)</sup>、N末端にシステインを加える。オリゴペプチド溶液 (100-200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) は 1 ml ずつクライオチューブに分注し、冷凍保存する。1回の免疫注射に必要なタンパク質は 100-200  $\mu\text{g}$  である。

##### c) 生体から精製

SDS-PAGE で分離した後、CBB で染色可能な濃度のタンパク質が十分量あれば、精製して抗原として使用できる。タンパク質の全長配列に対する抗体であるので高い抗体力価が得られる可能性が高い。しかし、同サイズの他のタンパク質の混入を許すので、ウェスタン分析による検出の際には交差反応によるシグナルが生じることもある。また、ホモロジーの高い他のタンパク質とも交差反

応する可能性があるため、注意が必要である。

サンプルを調整用電気泳動で分離し CBB で染色し、目的のタンパク質のバンドを切り出す。切り出したゲルを破砕してそのままウサギに免疫すると、力価の高い抗体ができやすいと言われている。しかし、破砕したゲルは粘性が高く、注射しにくい欠点がある。切り出したゲルからポリペプチドを電気泳動的に抽出して抗原に使用してもよい。

#### 6.h.3.2 ウサギ

抗体のしやすさは、ウサギの個体差が大きいので、2 kg 程度の日本白色種ウサギ (Japanese White) オスを2匹使用する。ウサギは購入後、環境に慣れさせるために初回の免疫の1週間程前からケージで飼育する。3-4ヶ月の飼育期間にほぼ2倍の体重に生長する。飼育にはウサギ用のケージを使い (図4)、汚物の掃除が便利のようにケージの底に新聞紙を6枚くらい敷く。1日に1度、ウサギ用飼料を1合と水の補給を行い、新聞紙を交換する。冬場ならエサ以外は2日に1度でもよい。なお動物実験は所属機関の動物実験規則・指針に従って実施する。

#### 6.h.3.3 採血と血清の調整

免疫前チェック採血および3回目以降の免疫1週間後にウサギの耳の静脈から採血する。慣れるまでは、2人で作業するとよい。

1. ウサギが舌を噛まないように固定器に入れる (図5)。
2. ウサギの耳を軽く叩いたり、マッサージしたりして血行を良くし、採血しやすくする。血管が拡張すると耳が赤くなるのでよく分かる。冬場は使い捨てカイロでウサギの耳を暖めたり、事前にウサギを運動させたりするとよい。
3. 70%エタノールを含んだ脱脂綿で血管の周囲を消毒



図4：ウサギのケージ。ウサギの前にエサ箱、白い入れ物は給水器。

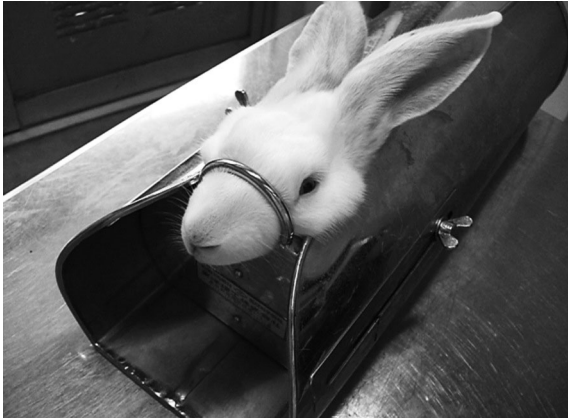
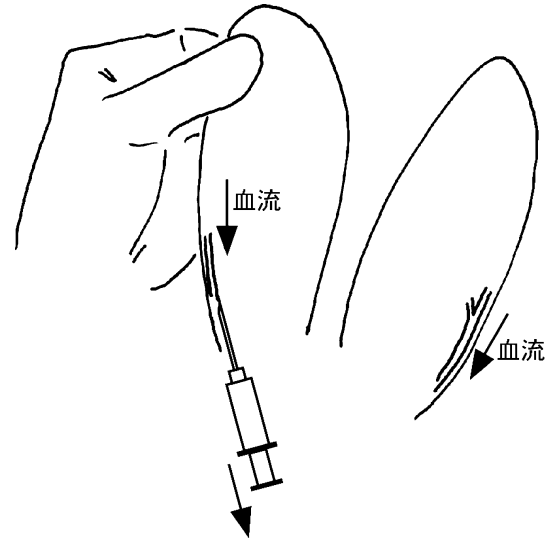


図5：固定器に入れたウサギ



- する。
4. 2 ml シリンジと 26 G x 1/2 (0.45 x 13 mm) の針を用意する。耳の静脈に血流と逆向きに針を刺して少なくとも 1 ml 採血する (図 6)。
  5. 採血後、乾いた脱脂綿で押さえながら針を抜き、出血を抑える。
  6. 注射器から針を外し、マイクロチューブに血液を入れる。
  7. 血液を室温で 1 時間、その後 4°C で一晩静置し、血餅を形成させる。
  8. ピペットで血清を新しいマイクロチューブへ移す。
  9. マイクロ遠心機で 15,000 rpm で 5 分間遠心し血餅を完全に除く。
  10. 血清に 1 mM になるよう  $\text{NaN}_3$  を加え、4°C で保存する。

#### 6.h.3.4 抗原注射液の調製

抗原とアジュバントを 1 mL ずつ混合しエマルジョン (乳濁液) を形成させ、抗原注射液とする<sup>9)</sup>。初回の免疫には加熱滅菌した結核菌体を含み、強力な免疫反応を引き起こす Freund's Complete Adjuvant を使用する。その後の免疫には Freund's Incomplete Adjuvant を使用する。シリンジ中に残るなどして 0.2-0.5 ml ほどロスが出てくるので、少し多めに調製してもよい。

#### [抗原溶液の調整方法]

##### 抗原が溶液の場合

1. 連結部があるガラス製の 2 ml シリンジを 2 つ用意する。一方のシリンジには 19 G の針を、他方には連結管をつける。
2. 針の付いたシリンジでアジュバントを 1-1.2 ml 吸い取り、空気を抜いてから続けて抗原溶液を 1-1.2 ml 吸い取る。



図6：採血の様子。血流に向かって針を刺す。

3. 針を外し、他方のシリンジの連結管と接続する。
4. 一方のシリンジの抗原溶液を他方のシリンジへピストンを押して移動する。
5. いったん連結管を外し、抗原溶液の入ったシリンジから空気を除く。
6. 再度連結管に接続し、2 つのシリンジのピストンを左右交互に押し、エマルジョンを形成させる。
7. エマルジョンが十分に形成され、ピストンが固くなるまで数分間混合を続ける。
8. 注射器に 19 G の針をつけ、免疫注射する。

##### 抗原を含んだゲルを使用する場合

抗原を含むポリアクリルアミドゲルをアジュバントと混合して抗原注射液を調製する。

1. 2 mm 厚のゲルから切り出したタンパク質を含むゲル片 (2 mm x 2 mm x 150 mm) 2 つを乳鉢に入れる。
2. 液体窒素を加えゲルを凍結し、乳棒で粉末になるま

で砕く。

- 3 粉末が溶けるとペースト状になるので、マイクロスポーテルでシリンジに移す。
- 4 シリンジにピストンを入れ、連結管をつける。
- 5 もう一方のシリンジに 19 G の針をつけ、アジュバンドを 1-1.2 ml 加え、シリンジを押して空気を抜く。
- 6 2つのシリンジを連結管に接続し、ピストンを左右交互に押し、エマルジョンを形成する。
- 7 エマルジョンが十分に形成され、ピストンが固くなるまで混合を続ける。
- 8 注射器に 19 G の針をつけ、免疫注射する。

#### 6.h.3.5 免疫

ウサギの皮下に抗原溶液を注射する。初回の注射には Freund's Complete Adjuvant を使用しているため、自分の手を刺さないよう注意する。背中に注射する方法もあるが、ここではリンパ節の近い四肢の付け根、脇腹部に注射する方法を紹介する。

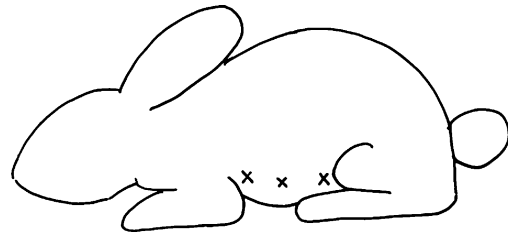
1. ウサギは足が滑ると暴れるので、作業台にタオルを敷くとよい。
2. ウサギを作業台に乗せ、目隠しをして落ち着かせる。目隠しの上から頭を押さえ、もう一方の手でウサギの腰を押さえて動かないようにする。
3. ウサギの脇腹の皮膚を引っ張り、70%エタノールを含む脱脂綿で消毒する。
4. 毛を湿らすと、皮膚が見えてくるので、針をウサギの身体に平行に刺す(図7)。針の先が体腔で止まるようにし、0.3-0.4 ml 注射する。これを左右の脇腹でそれぞれ3カ所注射する。出血したら、脱脂綿で押さえて止血する。

#### 6.h.3.6 抗体価のチェック

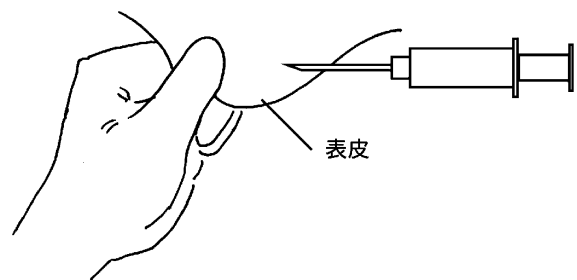
抗体価は免疫回数を重ねるにつれて高くなるが、ピークに達したのちに低下することもある。最も抗体価が高い時期に全採血を行うために、3回目の免疫からは、免疫1週間後に毎回試採血し、抗体価の変化をチェックする。主にウェスタン分析に抗体を使用するなら、ウェスタン分析で抗体価をチェックするのがよい(図8)。オリゴペプチドを抗原とした場合、オリゴペプチド溶液の希釈溶液を NC 膜上に 10  $\mu$ l 滴下しスポットをつくる。この膜を使って、1000 倍希釈した血清と反応させ、ウェスタン分析と同じ方法でシグナルを検出すると抗体価の上昇の様子がわかる。

#### 6.h.3.7 全採血

十分に抗体価が上がった段階で全採血を行う。50-150 ml 採血できる。耳からの採血でも、10-20 ml の採血は可能である。全採血ではウサギに麻酔をかけ、喉を開いて



腹部左右3箇所ずつ抗原を打つ。



表皮を引っ張り体腔に注射する。



図7：注射中の様子

頸動脈を引き出し採血する。煩雑な作業なので少なくとも2名で行うことが望ましい。

- 1 全採血の前日には、ウサギに水は与えるが、エサは与えない。
- 2 ハサミ、カンシ、ピンセット2本、10 cm に切った裁縫糸2本、解剖ハサミ、メスの柄はエタノールに浸けて消毒する。また、21 G の針の先端をU字に曲げたものを用意する。
- 3 ウサギを固定器に入れる。
- 4 ウサギの耳の静脈から注射で麻酔薬ネブタールを 1.5-2 ml 投与する。始めは 1.5 ml 投与し、麻酔の効き

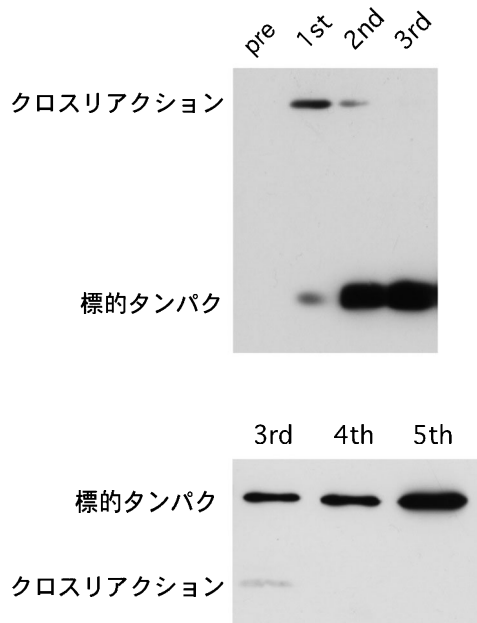


図8：抗体力価のチェック  
上；ウェスタン分析による試採血の血清の力価の検定。免疫前は何もシグナルが出ないが (pre)，免疫回数が増加するに従って抗体力価が上昇するが、交差反応によるシグナル強度は低下している。下；別の抗体のチェック。5回目の免疫まで抗体価が上昇した。

が悪いようであれば残りの 0.5 ml を追加する。麻酔薬は血流に乗せるため、針を血管の流れと同じ方向に刺す。麻酔の濃度が急に上がってウサギがショック死しないように、静脈が麻酔薬で透明にならない程の速さでゆっくりと投与する。

- 5 麻酔が効いてウサギがグッタリしたら固定器から出し、解剖台に仰向け乗せ、四肢と頭を固定する。
- 6 70%エタノールを喉の周りの毛にスプレーして濡らしてからハサミで切る。
- 7 喉の皮を左右からピンセットでつまみ上げ、その真ん中をメスで切る。さらに正中線に沿って顎から胸の鎖骨の根元まで皮を切り開く (図9)。
- 8 皮の内側にある腹膜を同様にピンセットで摘み上げてメスで切る。腹膜の下には血管が多く走っている。細い血管は切っても構わないが、太い血管は切らないように注意する。
- 9 腹膜の下の筋肉を、中心より少し左右どちらかよりに切り開いていくと (図10では右側より)、食道の大きな管が見えてくる。すると、食道の横やや背面よりに、沿うように直径約 1 mm の頸動脈と白い神経が薄い膜に覆われて並んでいる (図10)。メスで傷つけないように注意する。
- 10 頸動脈は丈夫なので、ピンセットで摘んで持ち上げ、

糸で3重に縛る (図11)。そこから数 mm 距離をおいてもう一カ所糸で同様に縛る。

- 11 心臓に近い方で縛った糸をカンシではさんで頸動脈を少しもち上げる (図12)。
- 12 縛った2カ所の間で、頸動脈をハサミで切る (図

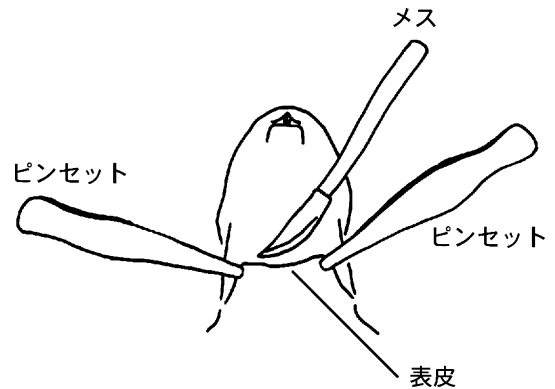


図9：表皮を左右からつまみ上げ、メスで切る

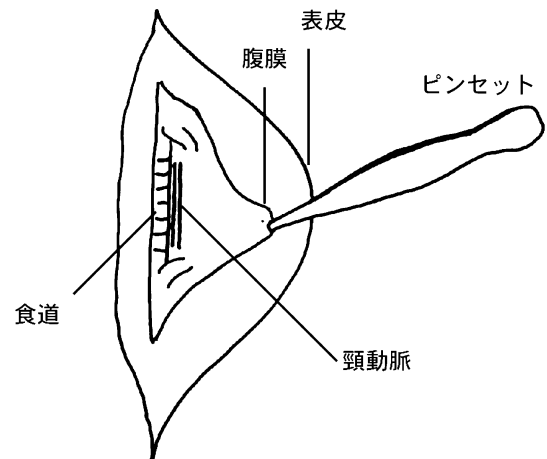


図10：筋肉を切り開くと、食道の脇に頸動脈が走っているのがみえる。

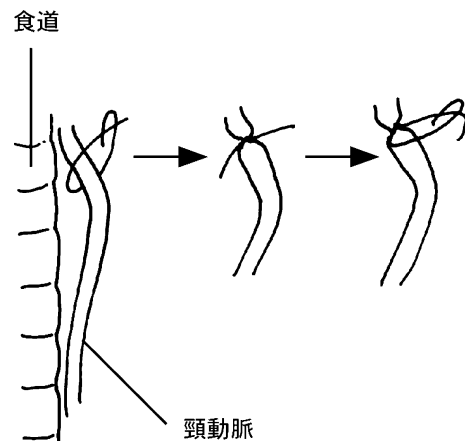


図11：頸動脈を頭に近い部分二カ所で三重に縛る



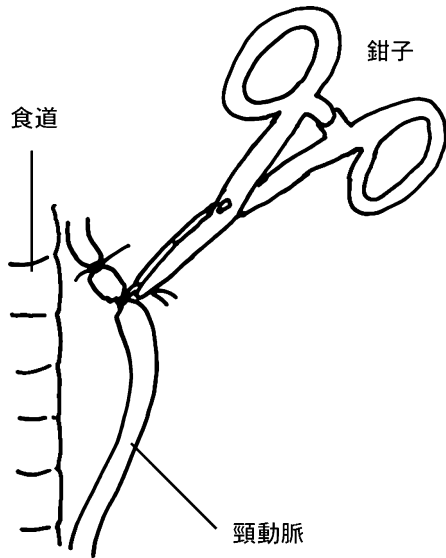


図 12：鉗子で心臓側の縛った糸をつかんで持ち上げる

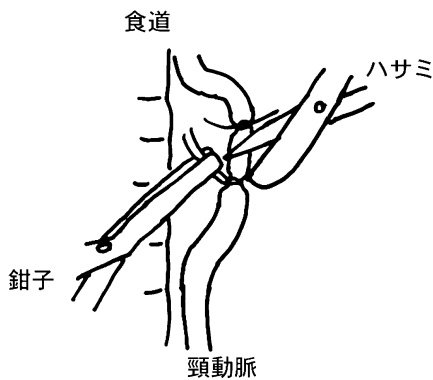


図 13：二カ所で縛った動脈の間を切る

- 13).
- 13 カンシで頸動脈(心臓側の切り口)を 50 ml 遠沈管の口に近づける (図 14).
- 14 U字に曲げた針で頸動脈に穴を開ける。このとき、血液が遠沈管の方向に飛び出るように穴を開ける (図 15).
- 15 血液が勢いよく出すぎると、血圧が急激に下がり心臓が止まることがある。ピンセットで動脈をつまめば、血流を調整できる。血が抜けるにつれウサギの唇が紫に変わっていく。動脈に開けた穴が塞がって血液の出が悪くなったなら、もう一度針で穴を開けてみる。また、心臓を手で押してマッサージすると、血液が出ることもある。さらに、ウサギの脚の固定を外して下半身を持ち上げると、より多くの血液が回収できることがある。

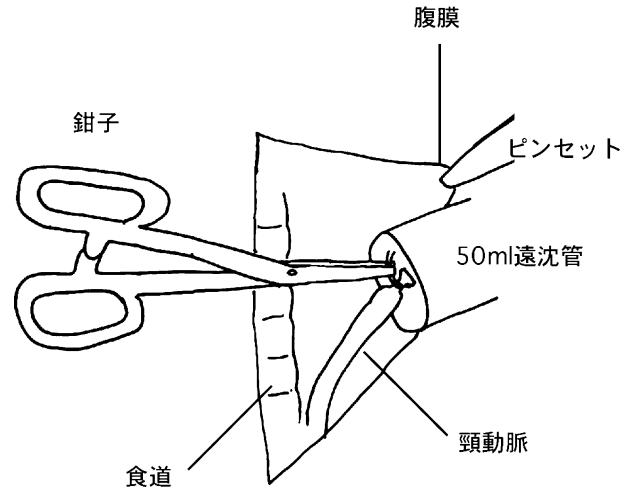


図 14：頸動脈を鉗子で遠沈管に誘導する

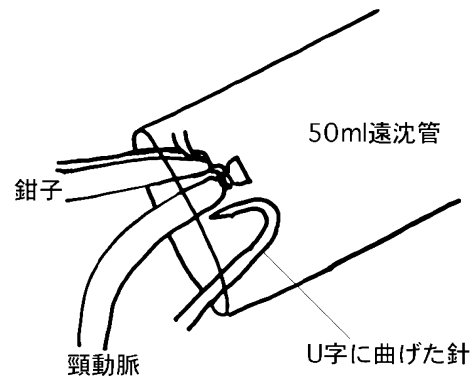


図 15：針で頸動脈に穴を開け、採血する

- 16 採集した血液は室温に 1 時間、4 °C で一晩静置し、翌日に血清を回収する。

## 参考文献

- 1) G. H. Thorpe and L. J. Kricka, *Methods Enzymol.*, 1986, 331-53
- 2) J. Sambrook and D. W. Russell, *Molecular cloning: 3<sup>rd</sup> ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001, 15. 9-11
- 3) R. D. Swerdlow, R. F. Ebert, P. Lee, C. Bonaventura and K. I. Miller, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 1996, 537-48
- 4) T. Kitagawa and T. Aikawa, *J. Biochemistry*, 1976, 233-6
- 5) E. Harlow and D. Lane, *Antibodies: Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1988, 98*