

Moderní metody buněčné biologie



Western blotting

SDS-PAGE a Western blotting

SDS-PAGE Gel Electrophoresis

- Separation based (predominantly) on mass of protein.
- SDS denatures and coats proteins. Because SDS is negatively charged all proteins have a constant charge to mass ratio and migrate based on mass.
- Some proteins migrate abnormally.
- Native gel electrophoresis is similar but without SDS. In native electrophoresis protein migrate based on their charge and mass and can move toward either electrode.

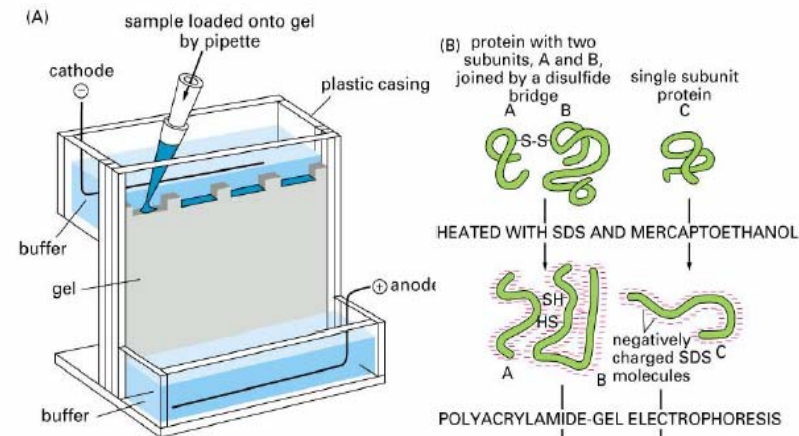


Figure 8-14 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th E

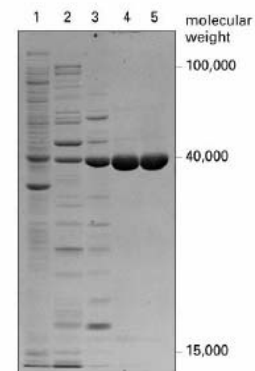


Figure 8-15. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

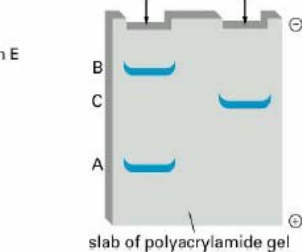
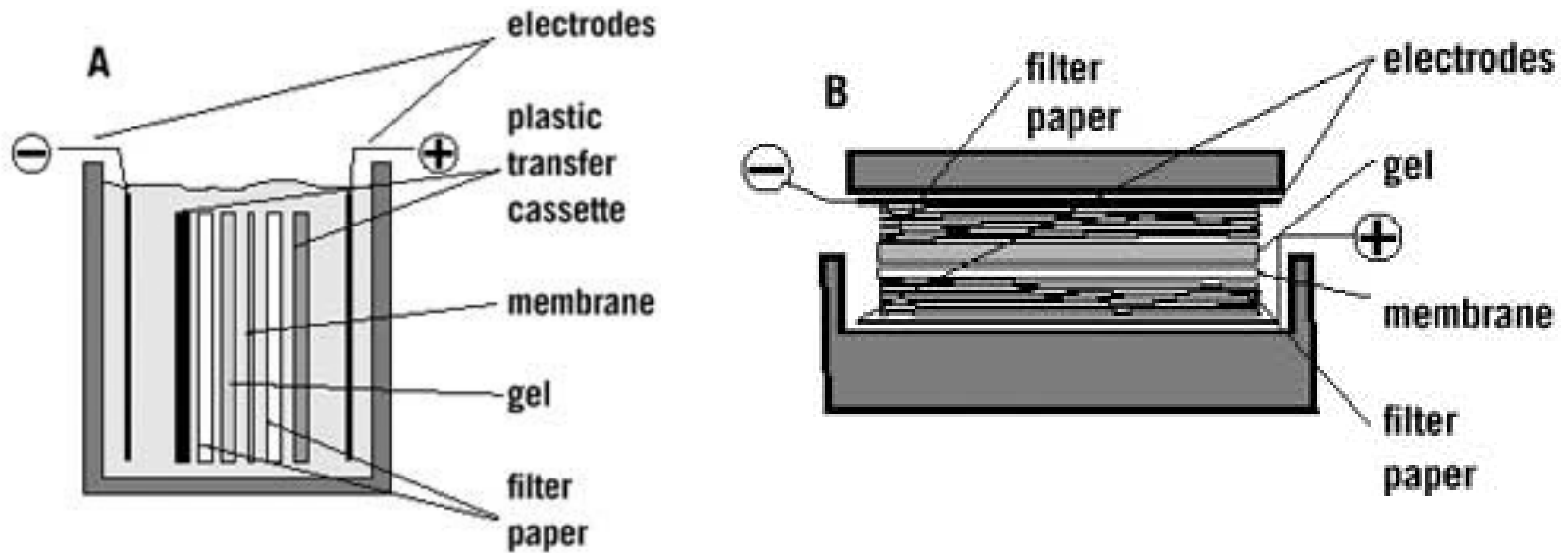


Figure 8-14 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition

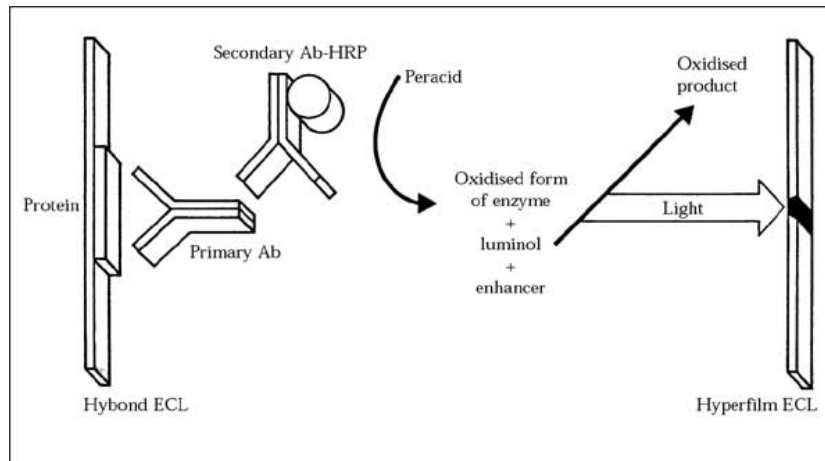
Western blotting - přenos na membránu:



Membrány:

- PVDF
- nitrocelulóza

Western blotting - imunodetekce:



Western blotting je používán pro detekci vybraného proteinu ve vzorku (komplexní směsi proteinů) pomocí polyklonálních nebo monoklonálních protilátek specifických pro daný protein, či určitý typ posttranslační modifikace.

Postup imunodetekce

- **Blokování membrány**

Membrána je blokována, abychom zabránili nespecifickým interakcím mezi membránou a protilátkou. K tomuto účelu lze použít roztok hovězího sérového albuminu (BSA) nebo ředěné odtučněné mléko (non-fat dry milk - NFDM).

- **Inkubace s primární protilátkou**

Membrána je inkubována s primární protilátkou specifickou pro daný protein. Protilátka je ředěna v pufru (PBS nebo TBS), který obsahuje nosič (BSA nebo NFDM) spolu s detergentem. Optimální koncentrace protilátky je zjišťována využitím různých ředění.



- Inkubace se sekundární protilátkou

Po opláchnutí membrány (s cílem odstranit nenavázanou primární protilátku) je membrána inkubována se značenou sekundární protilátkou specificky rozpoznávající daný typ primární protilátky. Sekundární protilátka je většinou značena enzymem který produkuje, po reakci se substrátem, barevný produkt, fluorescenci či světlo.

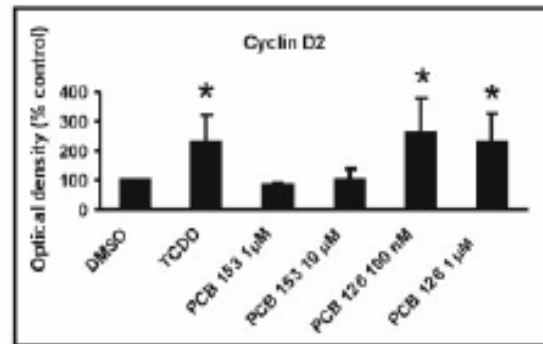
- Detekce

Po odmytí sekundární protilátky, je membrána inkubována se substrátem specifickým pro daný typ enzymu. V případě chemiluminiscenční detekce je emitované světlo detekováno pomocí rentgenových filmů. Výsledné „pruhy“ jsou hodnoceny kvalitativně nebo kvantitativně (denzitografie; pomocí kamer snímajících přímo chemiluminiscenční reakci).

1. [Towbin H., Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Sep;76\(9\):4350-4](#)
2. [Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15;227\(5259\):680-5.](#)
3. [Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem. 1981 Apr;112\(2\):195-203](#)

Western blotting - hodnocení:

studovaný protein



loading control



denzitogram



Podrobný popis a další literatura:

- **Molecular Biology of The Cell (s.469-580),**
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=books>
- **Principles and Techniques of Practical Biochemistry**

<http://www.westernblotting.org/>