

Western blotting

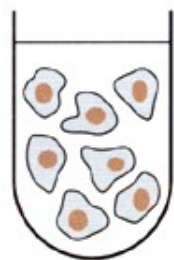
- slouží pro identifikaci polypeptidů prostřednictvím protilátek
- obvykle následuje po rozdělení polypeptidů v elektrickém poli polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (PAGE)

ROZBÍJENÍ BUNĚK A TKÁNÍ

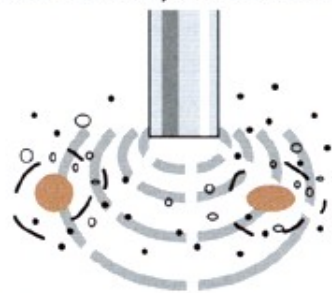
Prvním krokem purifikace většiny proteinů je rozbití buněk nebo tkáně

Použitím jemných mechanických postupů, zvaných homogenizace, lze perforovat plasmatické membrány buněk, takže se z buněk uvolní jejich obsah. Používané čtyři metody jsou tu ukázány schematicky.

Vznikající hustý homogenát nebo extrakt obsahuje větší i menší molekuly z cytosolu, jako jsou enzymy, ribosomy a různé metabolity, ale také membránou uzavřené organely.



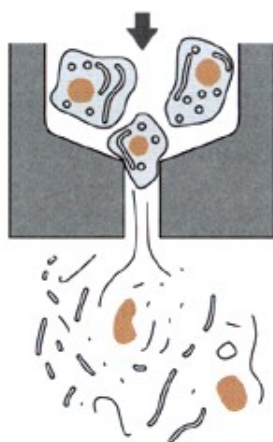
suspenze buněk nebo tkáň



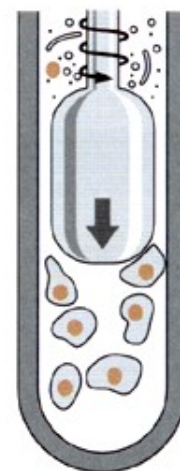
1 rozbití buněk ultrazvukem



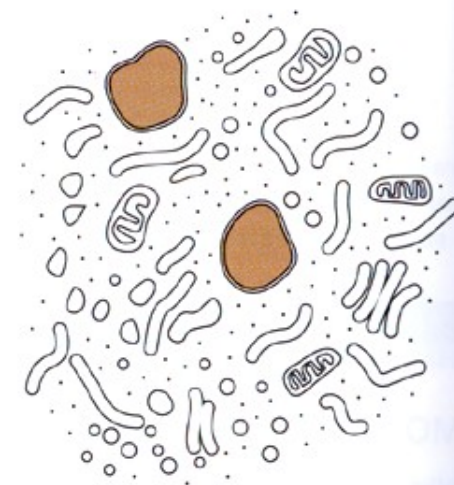
2 použití mírného detergentu na perforaci plasmatické membrány



3 protlačení buněk malým otvorem



4 rozbití buněk dobře těsnícím rotačním pístem v tlustostěnné nádobce

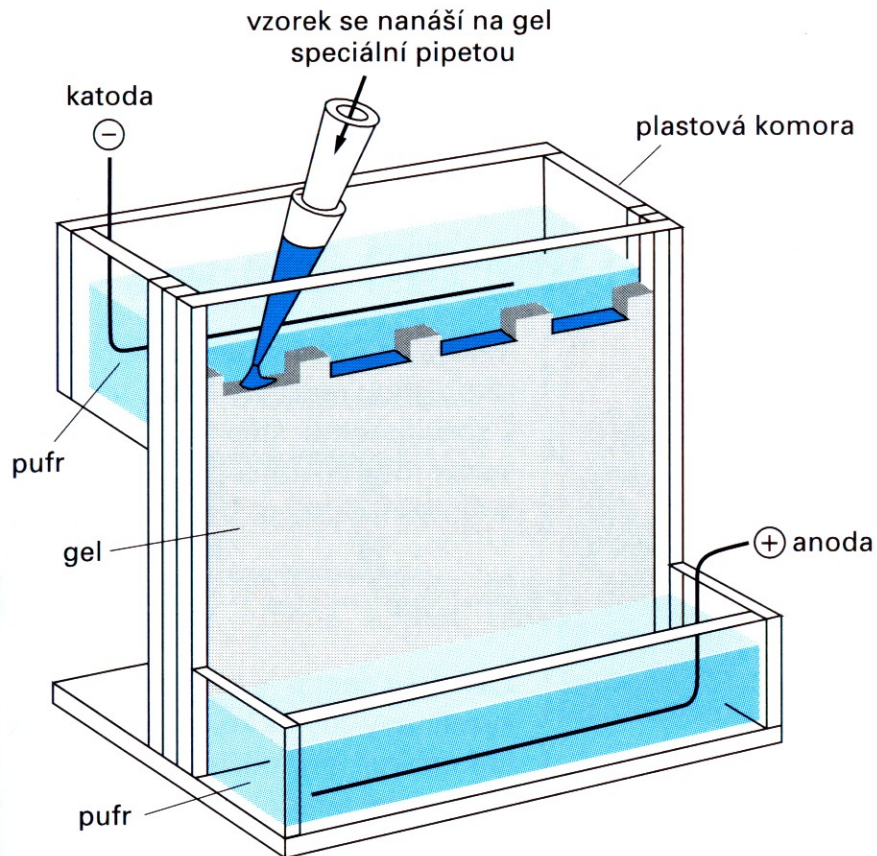


Při opatrné práci lze získat téměř všechny organely v neporušeném stavu.

Elektroforéza

- pohyb nabitých částic v elektrickém poli
- používají se alkalické pufrы, které proteinům udělí **negativní náboj** – v elektrickém poli pohyb směrem k anodě

GELOVÁ ELEKTROFORÉZA



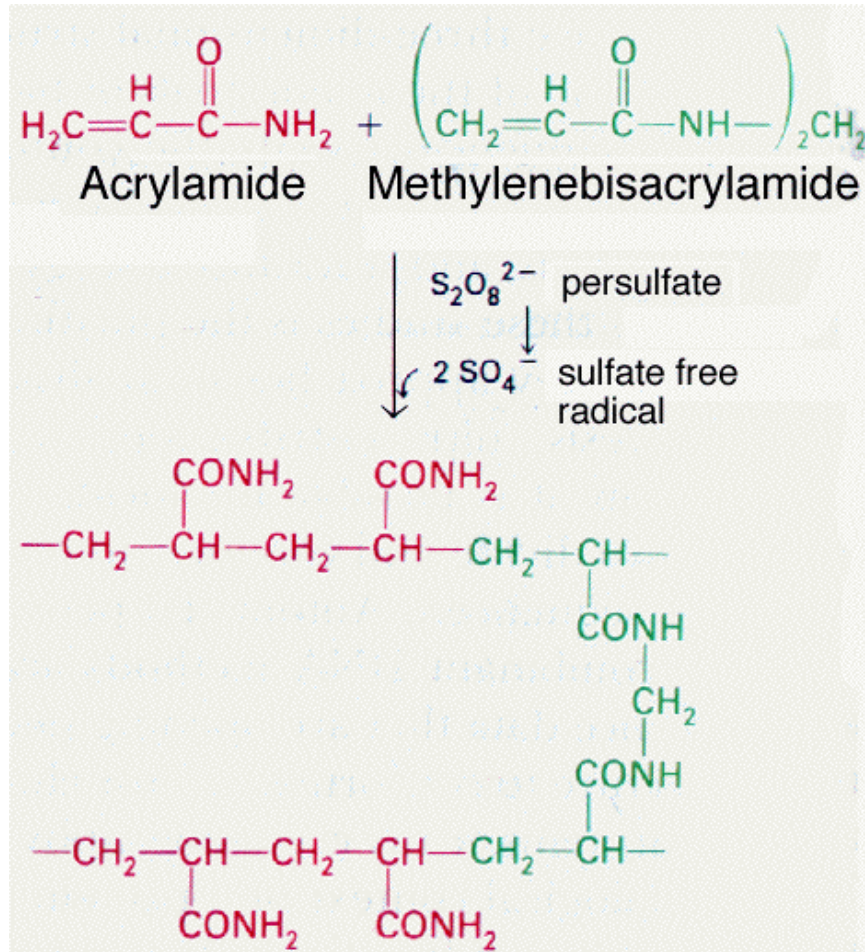
Gelová elektroforéza

- Gelová elektroforéza je všestrannější než běžně používané - papírová nebo celulozaacetátová elektroforéza.
- Provádí se převážně na podle účelu preferován polyakrylamidový nebo agarosový gel.
- Při přípravě gelu je možné ovlivňovat stupeň polymerace (zesíťování) - tedy velikost pórů. U gelů s velmi velkými póry lze docílit stavu podobnému volné elektroforéze v roztoku, u malých pórů se uplatňuje **efekt gelové filtrace**.
- Do jisté míry i **iontoměničové efekty**, lze využít ke zlepšení dělení (afinitní elfo, imunoelektroforéza).

Polymerace akrylamidu

- Smísením roztoku monomeru a dimeru (bis-akrylamidu). Pozor jde o látky škodlivé zdraví. **Akrylamid je karcinogenní a neurotoxický s kumulativním účinkem.**
- **Radikálová polymerace**
-
- **iniciátorem** je persíran amonný (peroxodisulfát $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$), **katalyzátorem** je N, N,N ,N -tetramethylendiamin (TEMED). Tyto látky lze ve funkci nahradit riboflavinem za přítomnosti světla a malého množství kyslíku. Inhibitory polymerace jsou kyslík (O_2) v nadbytku, látky s SH-skupinami.
- Koncentrace monomeru ovlivňuje délku řetězců, obsah dimeru stupeň zesíťování.

Polyakrylamidový gel - příprava

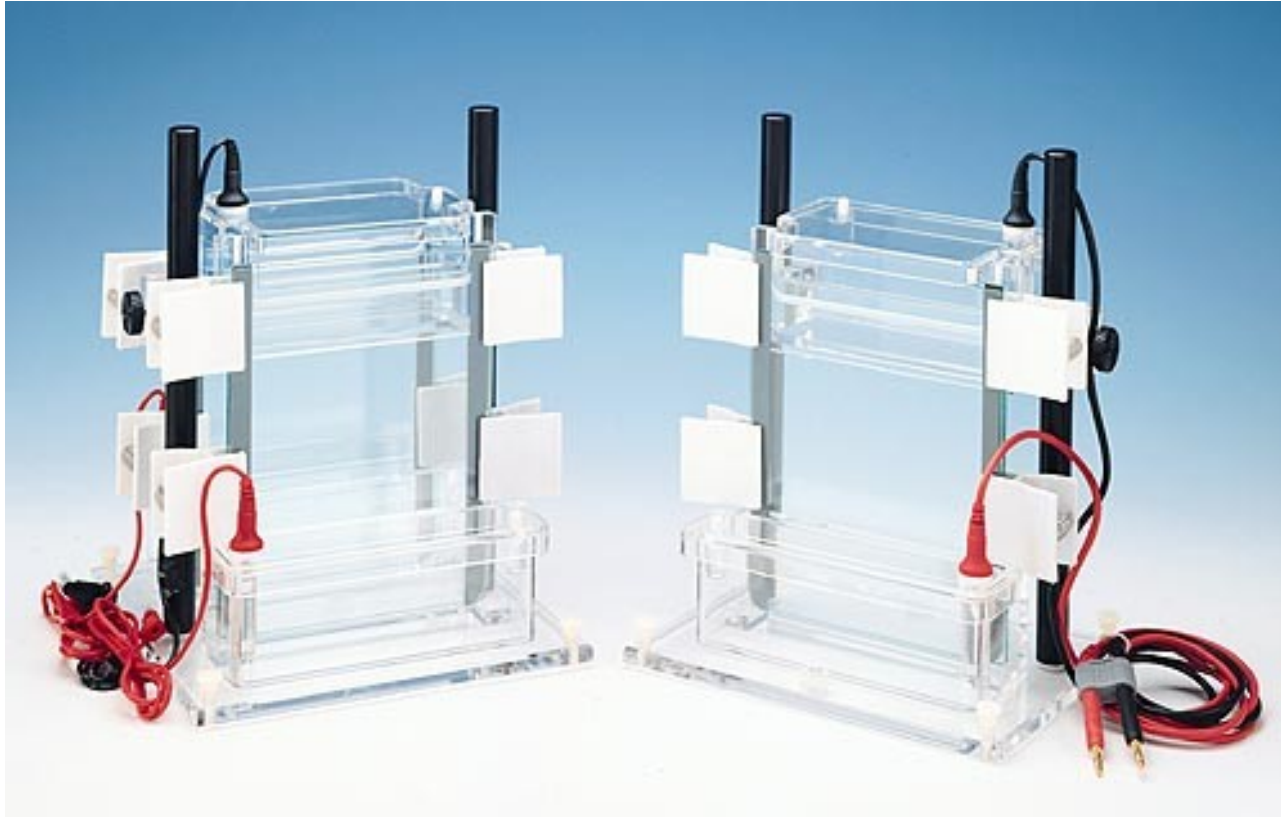


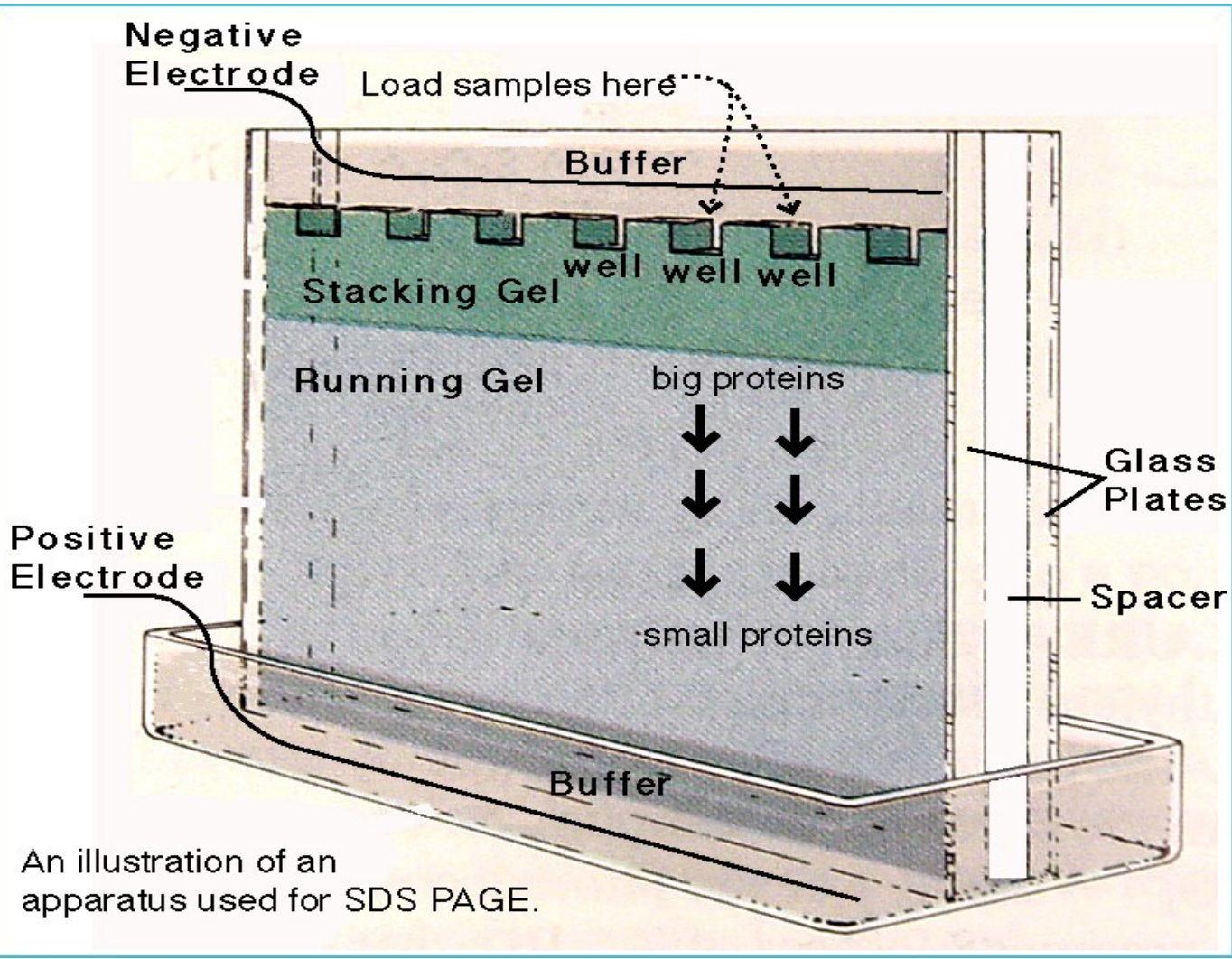
PAGE - elfo v polyakrylamidovém gelu

Provedení PAGE

- Nejčastěji se PAGE provádí ve vertikálním uspořádání, i když běžně i v horizontálním (použití tzv. „precast“ gelů).
- Podle tvaru rozlišujeme **trubičkové gely** („tube gels“) a **deskové gely** („slab gels“). Trubičkové gely se připravují ve skleněných trubičkách, slab gely se nalévají mezi plochá skla oddělená vymezovači tzv. spacers, tím se volí tloušťka gelu. Jamky pro vzorky se tvoří hřebínkem („comb“).
- Trubičkové jsou obvykle v rozměrech 0.3-0.5 x 15 cm, deskové gely od minigelů (4 x 5 cm) po sekvenační gely (20-30 x 50-100 cm s tloušťkou mezi 0.05 a 1.5 mm).

Aparatury pro deskové gely





An illustration of an apparatus used for SDS PAGE.

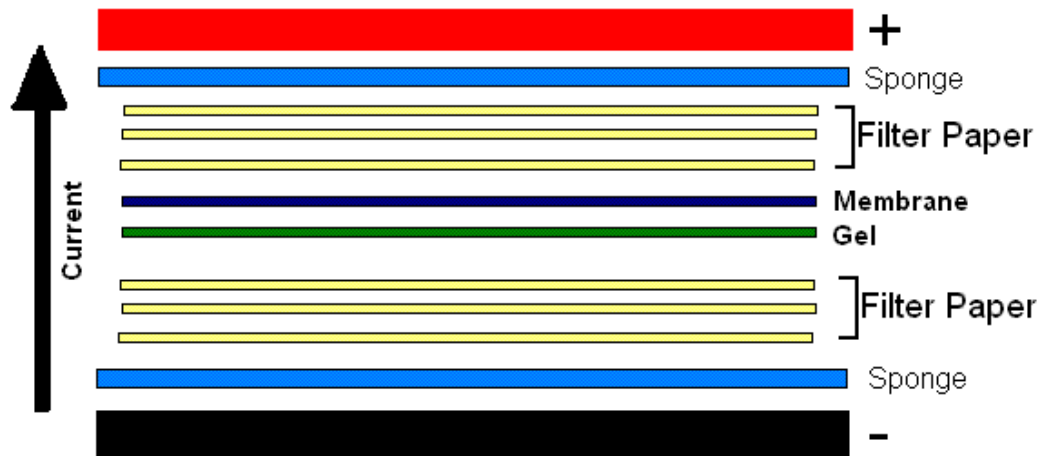
SDS-PAGE

- Pohyblivost proteinů v gelu při nativní elektroforéze ovlivněna
 - tvarem (globulární, vláknité)
 - hustotou náboje
 - velikostí
- **SDS-PAGE – denaturační varianta**
 - proteiny se před nanesením na gel denaturují detergentem SDS (laurylsíran sodný)
 - disulfidové vazby se eliminují redukčním činidlem β -mercaptoethanol
 - denaturace je dokončena krátkým varem
 - SDS - obklopí protein – záporný náboj – odpuzování – natažení molekuly
 - počet molekul SDS navázaných na protein je zhruba úměrný jeho molekulové hmotnosti – každý protein má za přítomnosti SDS ekvivalentní hustotu náboje
 - **jediným faktorem, který ovlivňuje pohyblivost proteinů v gelu při SDS PAGE je molekulová hmotnost**

Elektroblotting

- přenos proteinů rozdělených v gelu na pevnou membránu
- membrány - PVDF (polyvinylidendifluorid) – vyšší vazebná kapacita
 - nitrocelulóza
- hnací silou je elektrické pole – kolmé k el. poli použitým při elektroforéze
 - proteiny nabitý záporně – pohyb směrem ke kladné elektrodě (anodě)
- dělení - tankový (wet) blotting
 - polosuchý (semi-dry) blotting

Transfer Stack



Imunodetekce

- detekce proteinů pomocí specifické protilátky
- před vlastní imunodetekcí je membrána blokována
 - zabránění nespecifickým interakcím mezi membránou a protilátkou
 - redukce pozadí
 - roztok hovězího sérového albuminu (BSA) nebo ředěné odtučněné mléko (unfatty dry milk)

Primární protilátky

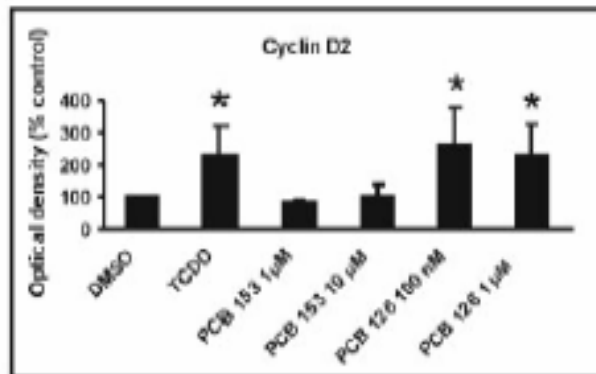
- monoklonální - protilátky produkované jen jedním určitým klonem B-lymfocytů
 - specifické pro jeden jediný epitop
 - produkce – hybridomy (fúze maligních myelomových buněk a zdravých lymfocytů produkujících Ab)
- polyklonální - produkované po opakované imunizaci zvířete, jeho krev využita jako zdroj protilátek
 - imunoglobuliny jsou produkty různých klonů B-lymfocytů

- Membrána je inkubována s primární protilátkou specifickou pro daný protein.
Protilátka je ředěna v pufru, který obsahuje nosič a detergent
- optimální koncentrace primární protilátky je stanovena vyzkoušením různých ředění

Sekundární protilátky

- po inkubaci s primární protilátkou je membrána opláchnuta (odstraněny zbytky nenavázané primární protilátky)
- sekundární protilátka specificky rozpoznává daný typ primární protilátky
- sekundární protilátka je značena většinou enzymem (nebo radioaktivní sondou), který po reakci s příslušným substrátem produkuje barevný produkt, fluorescenci nebo světlo
- Chemiluminiscentní reakce – HRP (horseradish peroxidase, křenová peroxidáza)
 - HRP oxiduje specifický substrát – emitované světlo detekováno pomocí fotografického filmu

studovaný protein



denzitogram

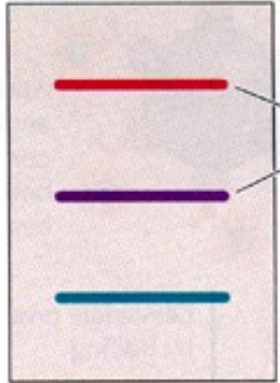
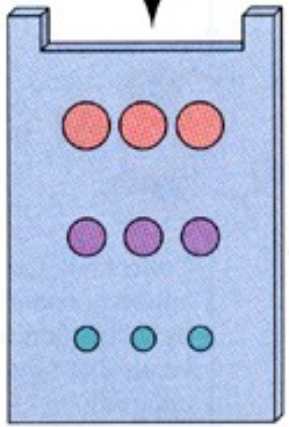


loading control



Mixture of proteins

Gel electrophoresis (SDS-PAGE)

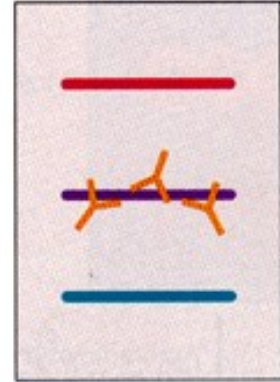


Protein bands

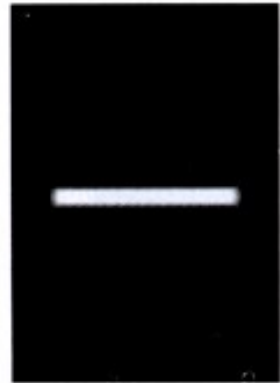


Antibody

Incubate filter with antibody against protein of interest



Antibody bound to specific protein



Detect bound antibody by radioactivity or staining

Transfer to filter

Literatura

- Molecular Biology of The Cell
- Principles and Techniques of Practical Biochemistry
- Metody molekulární biologie