

Identifikace glykoproteinů krevního séra pomocí SDS-PAGE a Western blot analýzy

TEORETICKÝ ÚVOD

SDS-PAGE je velmi efektivní analytická pomůcka pro separaci proteinové směsi, k analýze čistoty proteinu a jeho přibližné molekulové hmotnosti, ale neposkytuje nám žádná data na základě, kterých bychom mohli provést identifikaci nabarveného proteinu. Barvení stříbrem nebo coomasie nám poskytuje pouze důkaz o přítomnosti molekulové hmotnosti proteinu. Při provádění podrobnějších analýz separovaných proteinů se obvykle setkáváme s problémem málo přístupné a husté matrice polyakrylamidového gelu pro celou řadu detekčních činidel. Proteiny z SDS-PAGE gelu tak mohou být přeneseny (přebloťovány) z gelu na tenkou matici (blotovací membránu), na které jsou daleko více přístupné pro chemická činidla nebo biochemické reagentie. Pokud je přenos proteinů spojen s vysoce specifickou a citlivou detekcí pomocí imunometod, je tento proces nazýván Western-Blottingem. Western blotting má celou řadu výhod zahrnující malou spotřebu reagentií, krátký čas zpracování, nenáročné vybavení a velmi vysokou efektivitu.

V současné době se používají tři základní blotovací matrice: nitrocelulosová, nylonová a PVDF (polyvinylidifluoridová). Vazba proteinů na matici je ne-kovalentní, kdy k nejsilnější interakci dochází u PVDF membrány. Ze všech typů membrán se potom PVDF membrána vyznačuje největší pevností a velmi nízkým pozadím při barvení. Pro přenos proteinů z gelu na membránu využijeme metodu semi-dry elektroblottingu, kdy je gel s membránou umístěn mezi dvě elektrody a dochází k přenosu proteinů pomocí aplikovaného elektrického pole. K vlastní detekci proteinů na membráně se při imunodetekci používají většinou dvě protilátky. Primární protilátka je specifická pro náš protein zájmu. Druhá, sekundární, protilátka je většinou protilátka proti IgG protilátce použité v prvním kroku a je konjugována s enzymem, nejčastěji křenovou peroxidasou nebo alkalickou fosfatasou. Pokud se poté přidá k membráně detekční roztok, enzym konjugovaný se sekundární protilátkou katalyzuje barevnou reakci dávající barevný proužek na membráně.

V našem případě budou použity dvě varianty detekce.

První varianta bude levnější možností detekce, kdy specifická skupina proteinů, glykoproteiny, bude identifikována pomocí lektinů, které se specificky váží na cukerné zbytky. Lektiny jsou třídou proteinů vyskytujících se u bakterií a rostlin schopné vázat se na cukerné zbytky glykoproteinů. V našem experimentu použijeme lektin z fazole Konkavalin A (Con A), který má velmi vysokou afinitu k α -D-manosylovým zbytkům. Tento Con A je konjugován s křenovou peroxidasou, která poskytne po přidání substrátu 4-chloro-1-naftolu/peroxidu vodíku barvenou reakci.

Při druhé variantě bude použita polyklonální protilátka proti lidským IgG protilátkám (specifická k γ -řetězci) konjugovaná s křenovou peroxidasou.

Jako vzorek bude použito lidské sérum

POSTUP PRÁCE

SDS-PAGE elektroforéza

Roztoky:

Proteinový marker – 14-160 kDa

Elektroforetický pufr (25 mM Tris-Cl, pH 8,3, 150 mM glycin, 0.1%SDS)

Nanášecí pufr

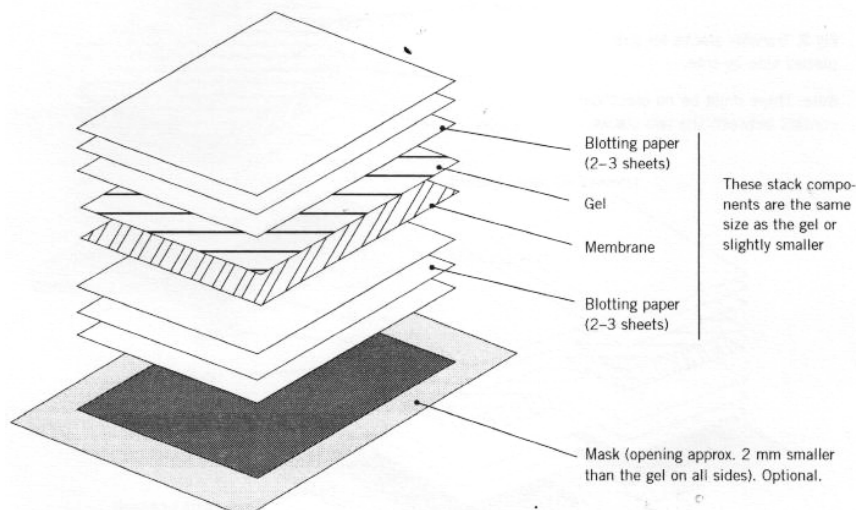
1. Ke 30 ul vzorku krevního séra přidejte 6 ul nanášecího pufru, promíchejte a inkubujte 5 min při 100°C v termostatu
3. Následně zkumavky zchladte na ledu
4. Poté naneste na 3 gely po 10 ul vzorku a 5 ul hmotnostního markeru
5. Spusťte elektroforézu, podmínky separace: konstantní proud 30 mA/gel, 40 minut
6. Po elektroforéze první gel propláchněte 15 minut v MiliQ vodě a následně ponořte do 50 ml barvy koloidní coomasie BioSafe, s druhým a třetím gelem proveďte blotting.
7. Gel ponořený do koloidní coomasie po dvou hodinách vyjměte a propláchněte vodou a naskenujte.

Blotting

Roztoky:

Přenosový pufr (25 mM Tris-Cl, pH 8,3, 150 mM glycin, 20 % metanol, 0.1%SDS)

1. připravte si dvě membrány PVDF a 8 papírů Whatman 3MM o rozměrech 7x5 cm.
2. Ponořte PVDF membrány na 20 s do MeOH (snížení hydrofobicity membrány) a poté je inkubujte 5 min v přenosovém pufru společně s 8 papíry Whatman 3MM
3. Sestavte sandwich dle obrázku níže.
4. Spusťte semi-dry elektro transfer, 8. Provádějte přenos 1 h při konstantním napětí 30V
5. Po skončení blotting vyndejte membrány a ponořte je na 5 min do barvičky Ponceau S.
6. Poté je opláchněte ve vodě a pomocí propisky zznačte marker.



Detekce pomocí Konkavalinu A a Anti-Human IgG protilátek

Roztoky:

TBST pufr (20 mM Tris-Cl (pH 7,6), 100 mM NaCl, 0,1 % Tween-20)

Con A-HRP konjugát (1mg/ml)

Roztok DAB

30% peroxid vodíku

Detekce pomocí Konkavalinu A

1. Neobsazená vazebná místa blokuje v 20 ml roztoku 1 x TBST obsahujícím 5% sušené mléko (nízkotučné) po dobu 30 minut
2. Dvakrát membránu promyjte 20 ml 1 x TBST pufru po dobu 5minut
3. Inkubujte membránu ve 20 ml TBST pufru s 50ul Con A-HRP konjugátu po dobu 2 hodin.
4. Dvakrát membránu promyjte 20 ml TBST pufru po dobu 5minut
5. Ponořte membránu do 20 ml TBS s 0.05% DAB a přidejte 20 ul 30% peroxidu vodíku
6. Inkubujte membránu v roztoku, dokud se neobjeví barevné proužky – asi 10-15 minut
7. Poté zastavte reakci promytím v Mili-Q vodě
8. Naskenujte membránu

Detekce pomocí Anti-Human IgG protilátek

1. Neobsazená vazebná místa blokuje v 20 ml roztoku 1 x TBS obsahujícím 5% sušené mléko (nízkotučné) po dobu 30 minut
2. Inkubujte membránu ve 20 ml protilátky ředěné TBST pufrům v poměru 1:30000 po dobu 2 hodin.
3. Dvakrát membránu promyjte 20 ml TBST pufru po dobu 5minut
5. Ponořte membránu do 20 ml TBS s 0.05% DAB a přidejte 20 ul 30% peroxidu vodíku
6. Inkubujte membránu v roztoku, dokud se neobjeví barevné proužky – asi 10-15 minut
7. Poté zastavte reakci promytím v Mili-Q vodě
8. Naskenujte membránu

VYHODNOCENÍ

1. Uveďte výsledek elektroforézy a blottingu (výsledný obarvený gel a membránu)
2. Na základě hmotnostního markeru sestrojte kalibrační křivku a odečtěte hmotnosti proteinů detekovaných na membráně.
3. Popište a zdůvodněte barvení jednotlivých proteinů Konkavalinem A a Anti-Human IgG protilátkami.