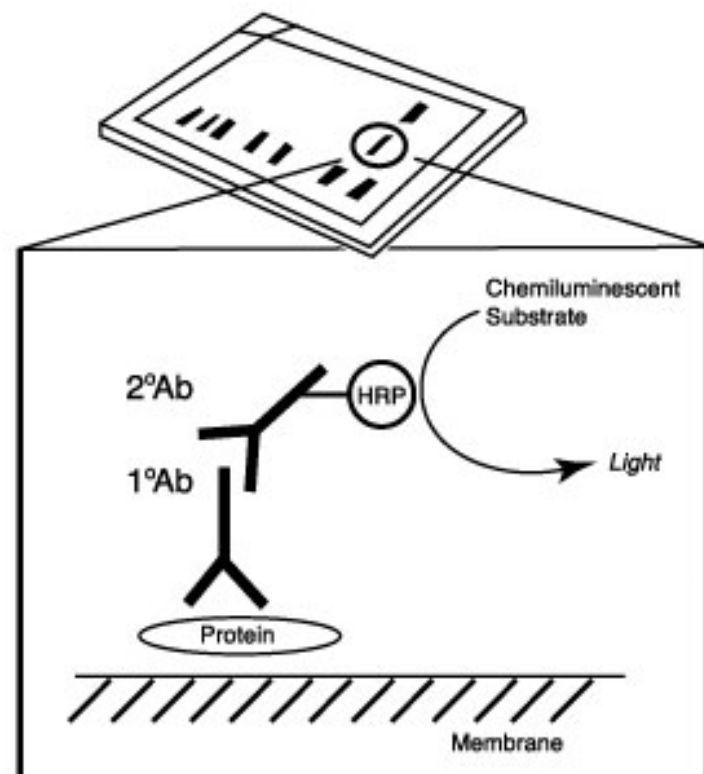
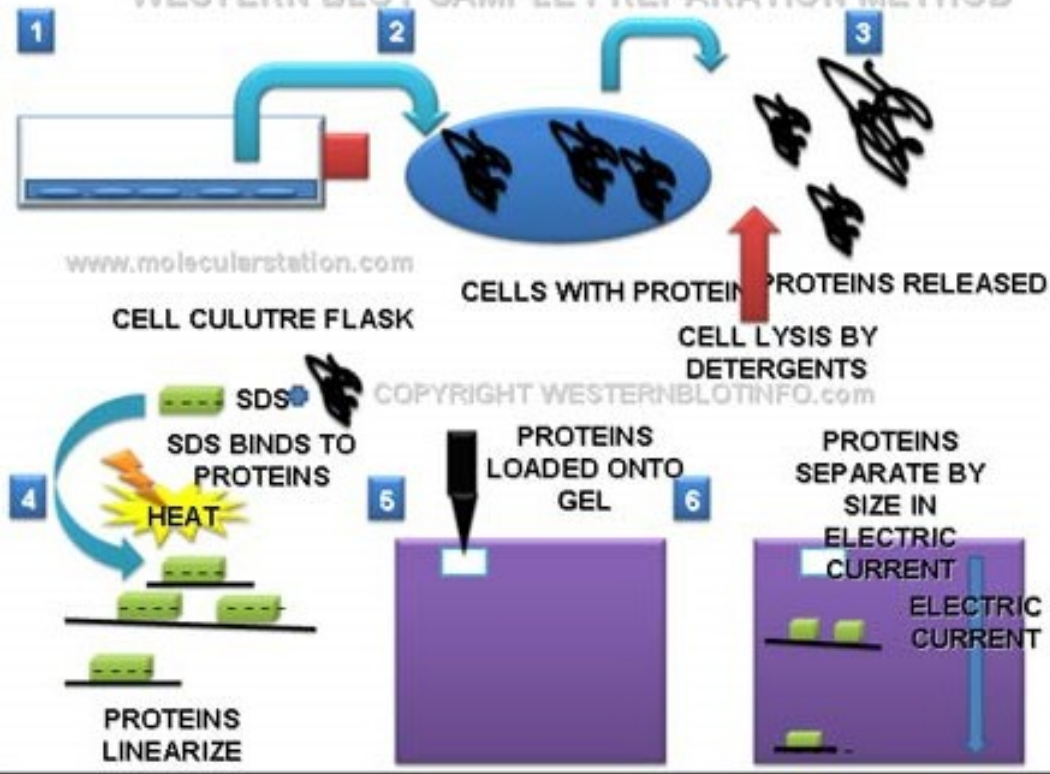


Western blotting

Slouží pro detekci proteinů prostřednictvím protilátek.

Obvykle následuje po rozdělení polypeptidů v elektrickém poli polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (PAGE).

WESTERN BLOT SAMPLE PREPARATION METHOD



Detekce proteinů

1. Příprava vzorků

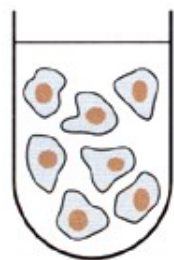
- nutné dezintegrovat (lyzovat) buňky, abychom proteiny dostaly ven do roztoku
- možno připravit lyzáty celobuňěčné, membránové, cytoplazmatické, jaderné – záleží na použitém pufru
- nutno přidat inhibitory proteáz a fosfatáz
- určení koncentrace proteinů (komerčně dodávaný kit) naředit všechny vzorky na stejnou koncentraci
- denaturace – složité sekundární a terciární struktury proteinů – protilátka by se sem nedostala (rozeznává jen malý úsek proteinu (epitop)
 - SDS (sodium dodecylsulphate) a vysoká teplota
 - SDS udělí všem proteinům stejný negativní náboj

ROZBÍJENÍ BUNĚK A TKÁNÍ

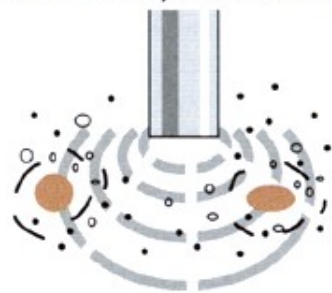
Prvním krokem purifikace většiny proteinů je rozbití buněk nebo tkáně

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.



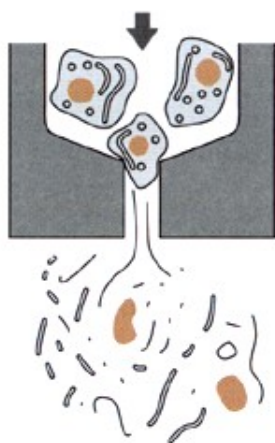
suspenze buněk nebo tkáň



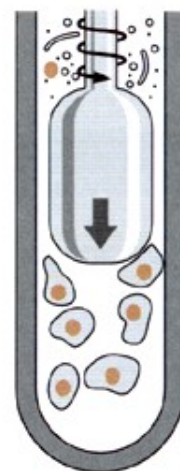
1 rozbití buněk ultrazvukem



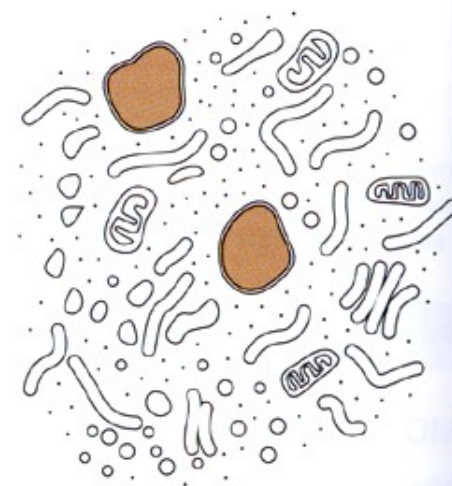
2 použití mírného detergentu na perforaci plasmatické membrány



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.

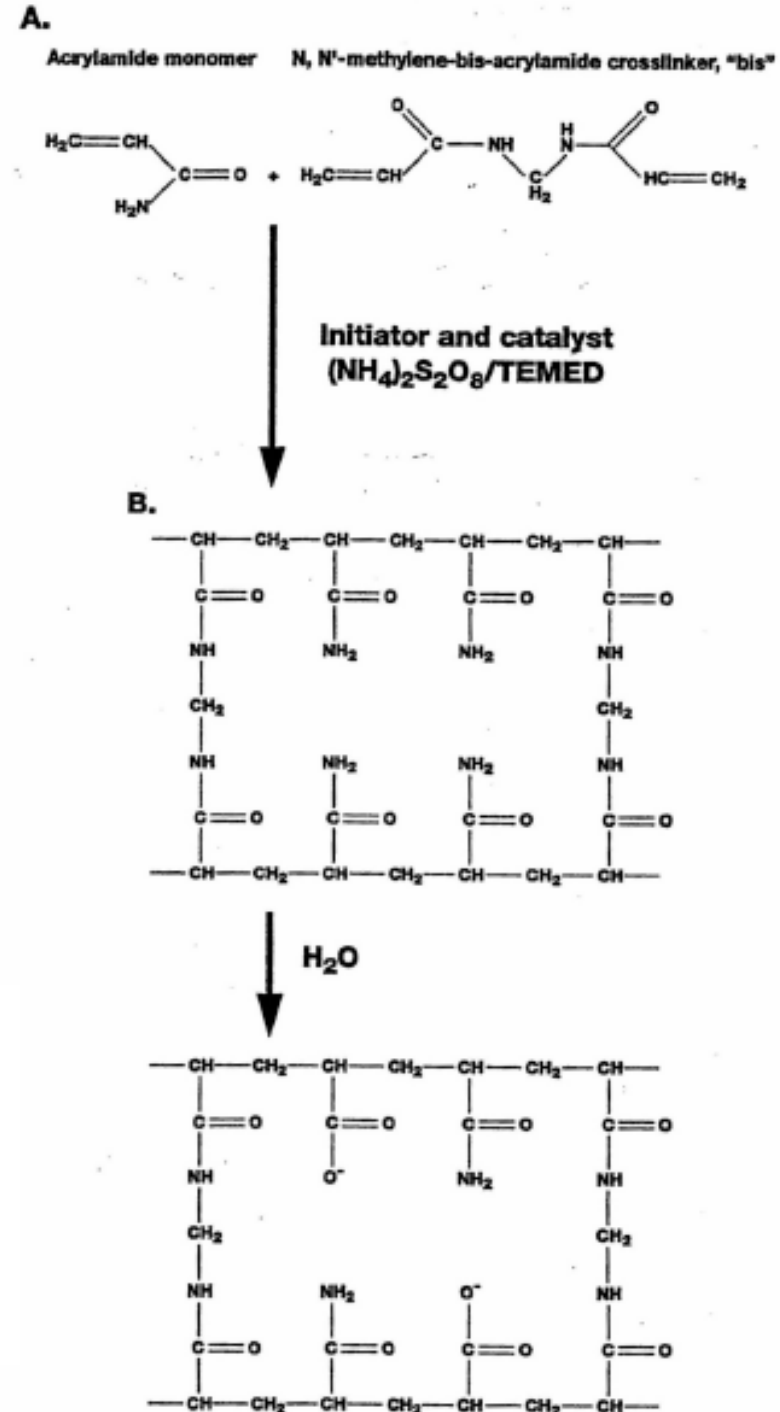
2. Elektroforéza

- pohyb nabitých částic v elektrickém poli
- **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**

Gely

- polyakrylamidové gely
- Akrylamid a bis-akrylamid (ten tvoří kroslinky)
- iniciátor reakce – APS (ammonium persulfát)
- katalyzátor reakce – TEMED (N,N,N ,N tetramethylethyldiamine)
- důležitá je velikost pórů – určuje, jaké proteiny póry projdou
 - čím vyšší je % gelu, tím menší jsou póry, kterými projdou menší proteiny

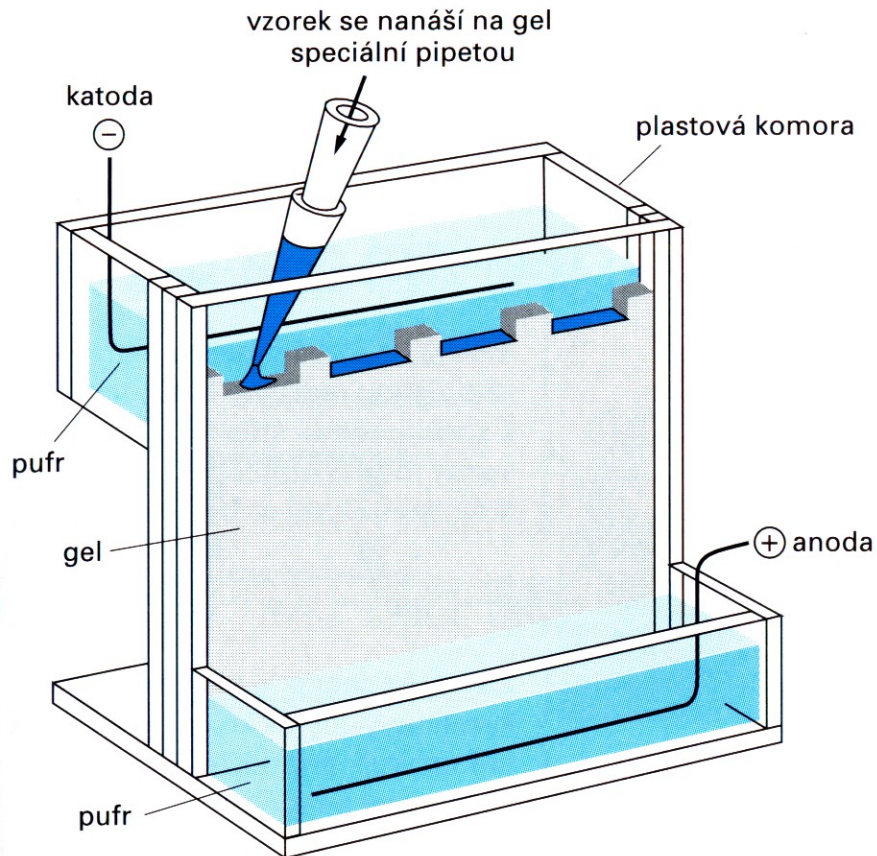
Protein size (kDa)	Gel percentage (%)
4-40	20
12-45	15
10-70	12.5
15-100	10
25-200	8



Elektroforéza

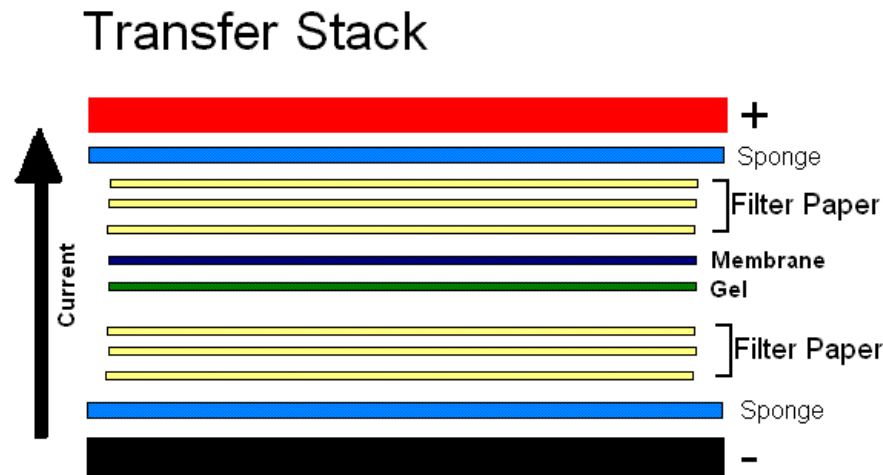
- pohyb nabitých částic v elektrickém poli
- používají se alkalické pufrы, které proteinům udělají **negativní náboj** –
v elektrickém poli pohyb směrem k anodě

GELOVÁ ELEKTROFORÉZA



3. 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 nabity záporně – pohyb směrem ke kladné elektrodě (anodě)
- dělení - tankový (wet) blotting – lepší pro větší proteiny
 - polosuchý (semi-dry) blotting – rychlejší, ale může vyschnout pufr
- „sandwich“ – těsný kontakt mezi gelem a membránou



4. Vizualizace proteinů - imunodetekce

- detekce proteinů pomocí specifických protilátek
- 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)

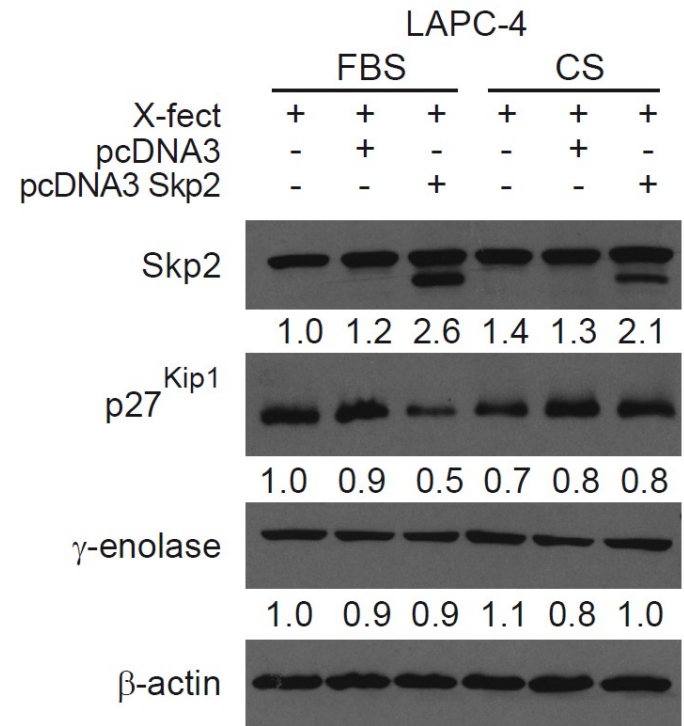
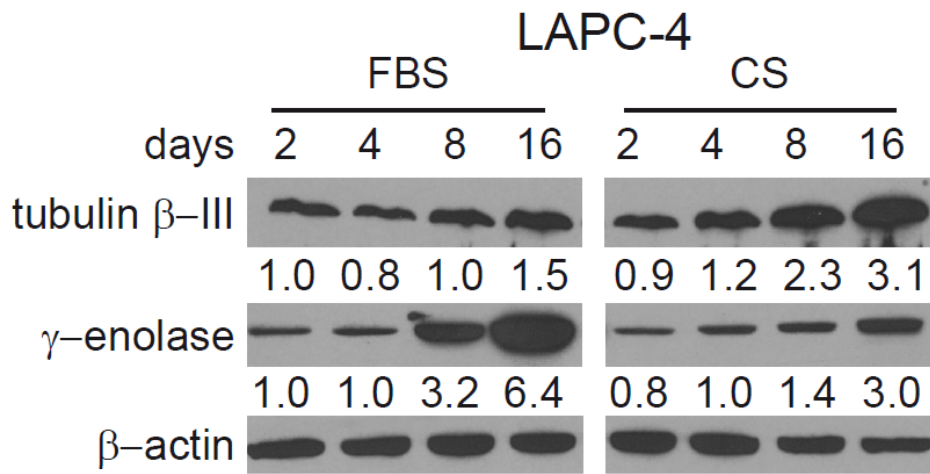
Primární protilátky

- 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

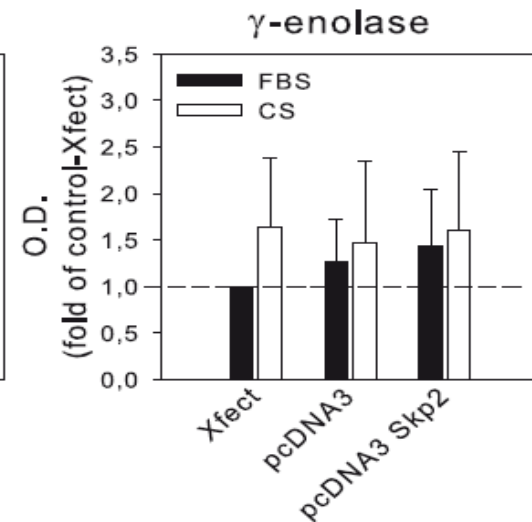
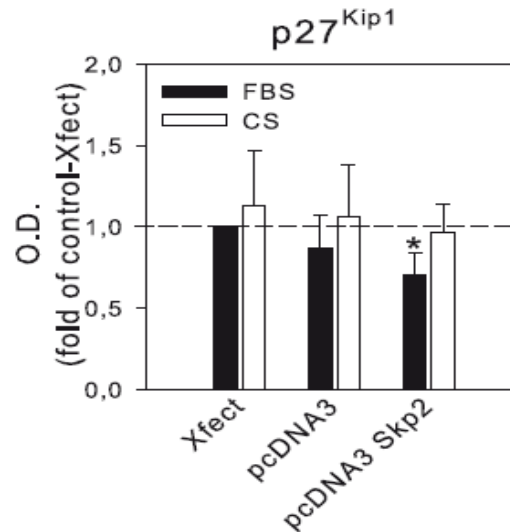
Sekundární protilátky

- 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
- Chemiluminisceční reakce – HRP (horseradish peroxidase, křenová peroxidáza)
 - HRP oxiduje specifický substrát – emitované světlo detekováno pomocí fotografického filmu



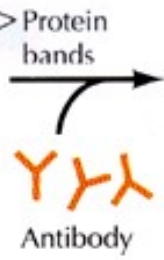
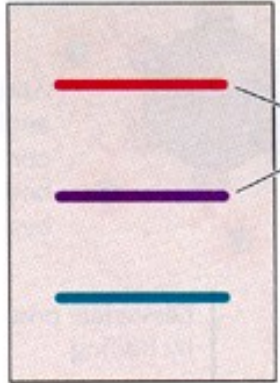
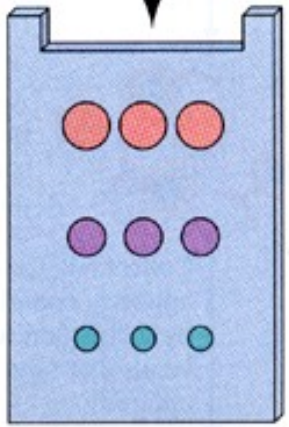
Loading control – β -actin

- kontrola, že v každé jamce bylo naneseno stejné množství lyzátu
- proteiny, které jsou produkty house-keeping genů (uniformní exprese, nemění se)

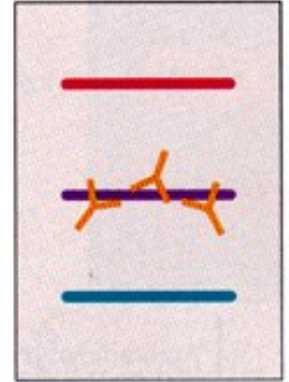




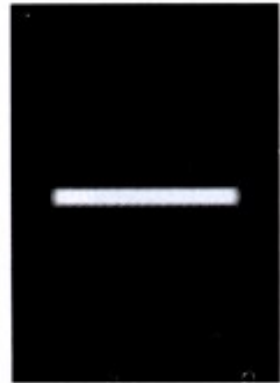
Gel electrophoresis (SDS-PAGE)



Incubate filter with antibody against protein of interest



Detect bound antibody by radioactivity or staining



Literatura

- Molecular Biology of The Cell
- Principles and Techniques of Practical Biochemistry
- Metody molekulární biologie
- Abcam - Western blotting - A beginner s guide

<http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/WB-beginner.pdf>