

# 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 (přeblovány) z gelu na tenkou matrici (blotovací membránu), na které jsou daleko více přístupné pro chemická činidla nebo biochemické reagenty. 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 reagentů, krátký čas zpracování, nenáročný vybavení a velmi vysokou efektivitu.

V současné době se používají tři základní blotovací matrice: nitrocelulosa, nylonová a PVDF (polyvinylidifluoridová). Vazba proteinů na matrici 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 křenuvou peroxidase nebo alkalickou fosfatase. 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  $\alpha$ -D-manosylovým zbytkům. Tento Con A je konjugován s křenuvou peroxidase, 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  $\gamma$ -řetězci) konjugovaná s křenuvou peroxidase.

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

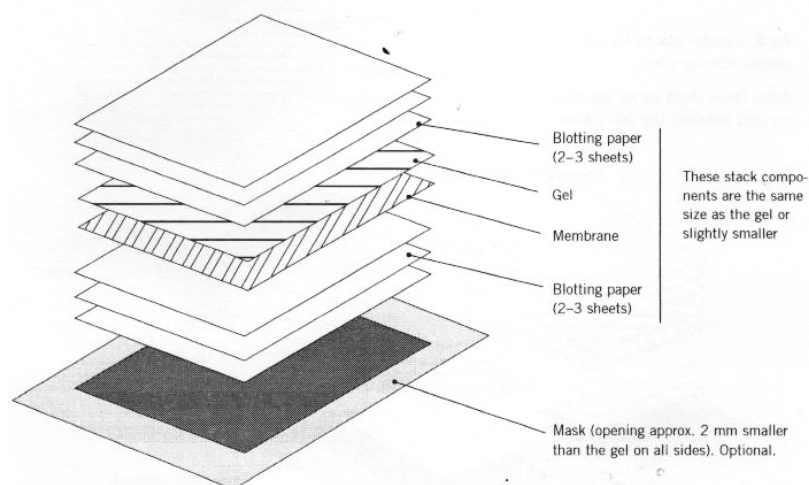
1. Ke 30 ul vzorku krevního séra přidejte 6 ul nanášecího pufru, promíchejte a inkubujte 5 min při 100°C v termostatu
3. Následně zkumavky zchlaďte na ledu
4. Poté naneste na 3 gely po 10 ul vzorku a 5 ul hmotnostního markeru
5. Spusťte elektroforézu, podmínky separace: konstantní proud 30 mA/gel, 40 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.

### Semi-Dry Blotting

Roztoky:

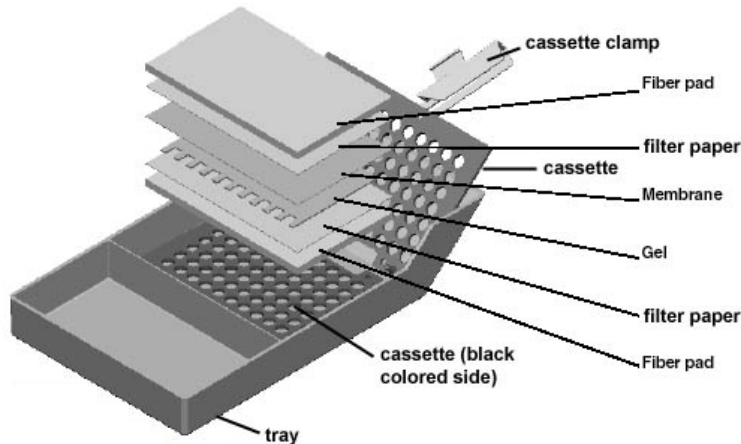
Přenosový pufr (25 mM Tris-Cl, pH 8,3, 150 mM glycin, 20 % metanol, 0.1%SDS)

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. 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 zaznačte marker.



### Wet Blotting

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 a umístěte ho do aparatury Mini-Protean 3.
4. 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 zazačte 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. Nevazebná místa blokuje v 20 ml roztoku 1 x TBST obsahujícím Albumin po dobu 30 minut
2. Dvakrát membránu promyjte 20 ml 1 x TBST pufru po dobu 5 minut
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 5 minut
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 puforem 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 proteinu Konkavalinem A a Anti-Human IgG protilátkami.