

## ÚLOHA č. 3

### SDS-PAGE a Western blot - detekce fosforylace MAPK ERK1/2

#### Chemikálie:

Pro přípravu roztoků používat **MilliQ H<sub>2</sub>O** (nebo ekvivalentní stupeň čistoty - tzn. cca 18.2 MΩ·cm)

#### **20% dodecylsulfát sodný (SDS) (w/v):**

- Rozpustit 20 g SDS v <100 mL H<sub>2</sub>O, míchat, případně zahřívát (max. 65°C!) pro úplné rozpuštění, poté doplnit objem na 100 mL

#### **Akrylamide/Bis-akrylamid 37,5:1 (30:0,8%, w/v):**

- Rozpustit 300 g akrylamidu a 8 g N,N'-metylen-bis-akrylamidu v 1 L H<sub>2</sub>O, filtrovat přes filtr Whatman#1
- Lze zakoupit již hotový filtrovaný roztok (např. Serva SER-1068101)
- Skladovat v lednici a ve tmě
- NEUROTOXICKÝ A MUTAGENÍ!

#### **Pufř pro separační gel: 4X lower Tris, pH 8,8** (1,5M Tris báze, 0,4%SDS, pH 8,8):

- Rozpustit 18,17 g Tris báze (!!!), 2 mL 20%SDS (nebo 400 mg práškového SDS) v přibližně 90 mL H<sub>2</sub>O, upravit pH na 8,8 pomocí 1M HCl (přibližně 6 mL), doplnit objem na 100 mL

#### **Pufř pro zaostřovací gel: 4X upper Tris, pH 6,8** (0,5M Tris báze, 0,4%SDS, pH 6,8)

- Rozpustit 6,06 g Tris báze (!!!), 2 mL 20%SDS (nebo 400 mg práškového SDS) v přibližně 90 mL H<sub>2</sub>O, upravit pH na 6,8 pomocí HCl (přibližně 3,5 mL), doplnit objem na 100 mL

#### **10X Tris-Glycine** (0,25M Tris báze, 1,92M Glycin, pH 8,2-8,5):

- Rozpustit 30,285 g Tris báze (!!!) a 144.134 g Glycinu v 1 L vody, zkontrolovat pH (mělo by být mezi 8,2-8,5, neupravovat - vedlo by ke změně vodivosti!!!)

#### **10X Tris-buffered saline (TBS)** (0,2M Tris base, 1,37M NaCl, pH 7,6)

- Rozpustit 24,23 g Tris báze (!!!) a 80 g NaCl v přibližně 900 mL H<sub>2</sub>O, upravit pH na 7,6, doplnit vodou na objem 1 L

**vodou syčený t-amylalkohol:** smíchat t-amylalcohol s H<sub>2</sub>O v poměru cca 1:1

#### **10% Peroxodisíran amonný (ammonium persulphate, APS) (w/v)** (Připravit čerstvý!!!):

- Rozpustit 20 mg APS ve 200 uL H<sub>2</sub>O

#### **2% azid sodný (w/v)** (100X, skladovat v lednici):

- rozpustit 200 mg azidu sodného v 10 mL H<sub>2</sub>O
- TOXICKÝ!!!

#### **TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)**

**SDS nanášecí pufř** (Laemmli, 1X: 60 mM Tris, pH 6,8, 20% glycerol, 2%SDS, 0,01% bromfenolová modř, + redukční činidlo: 5% B-merkapt ethanol anebo 40 mM dithiothreitol):

- 3X SDS-loading buffer NEB Cat#B7703S: 187,5 mM Tris, 30% glycerol, 6%SDS, 0,03% bromfenolová modř, 125 mM DTT):

!!!Těsně před použitím smíchat 10 dílů 3X SDS pufř B7703S (skladováno při pokojové teplotě) s 1 dílem 1,25M DTT (193 mg DTT v 1 mL H<sub>2</sub>O, skladováno zamražené)

## Marker molekulových hmotností

- ColorPlus Prestained Protein Ladder NEB Cat#P7711S

## Methanol

## Tween-20

## Odtučněné práškové mléko (non-fat dry milk) nebo bovinní sérový albumin

0,1% (w/v) Ponceau-S (1 g/L) v 5% octové kyselině

0,1M NaOH (4 g/L)

## Primární protilátky

- **total-ERK1/2** - Rabbit Anti-p44/p42 Mab (137F5), Cell Signaling Cat#4695S
- **fosfo-ERK1/2** - Rabbit Anti-phospho-p44/p42 Mab (T202/Y204), Cell Signaling Cat#4370S

## Sekundární protilátka

- **Protikráličí IgG značená křenuvou peroxidázou (HRP)** - Goat Anti-Rabbit IgG-HRP Antibody, Sigma Cat#A4914

## ECL reagent

- Luminata Forte Western HRP substrate (Millipore)

## Další materiály:

- Pipety, mikrocentrifugační zkumavky, centrifugační zkumavky
- Vyhřívaný blok pro mikrozkušavky, vortex, minicentrifuga
- Magnetická míchačka, míchadla
- Orbitální třepačka
- Zdroj napětí: Bio-Rad PowerPac™ HC High-Current Power Supply
- Elektroforetická aparatura: Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell (stojan pro nalévání gelů, krátká skla, dlouhá skla se spacersy, držák skel pro nalévání gelů, těsnění pro nalévání gelů, hřebínky, tank a komora s elektrodami pro upevnění gelů, víko)
- Blotovací aparatura: Bio-Rad Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (tank, držák s elektrodami pro uchycení kazety s blotovacím sendvičem, chladítko, víko)
- Blotovací membrána - PVDF membrána Millipore 0.45 um Immobilon P (vhodná pro proteiny >20 kDa) (*pro proteiny <20 kDa lze použít např. Millipore 0.2 um Immobilon PSQ, alternativně pak rovněž 0,2 or 0,45 um nitrocelulózoové membrány*)
- Filtrační (blotovací papír): Bio-Rad Thick Blot Paper Cat#170-3932
- Kontejnery na inkubaci s protilátkami
- Potravinová fólie, průsvitky
- Pro detekci pomocí fotografického filmu:
  - Kazeta: 5 x 7in. (např. VWR Cat#RPN11648)
  - Film: CL-XPosure Film 5 x 7in. (12.5 x 17.5cm), Pierce Cat#34088
  - Vývojka: GBX Developer/Replenisher, Sigma Cat#P7042-1GA
  - Ustalovač: GBX Fixer/Replenisher, Sigma Cat#P7167-1GA
- Dokumentační systém pro detekci pomocí CCD kamery: DNR MF-ChemiBIS

## Postup:

### A) Příprava gelů:

- \* Provádět v digestoři, používat ochranné rukavice, dodržovat bezpečnostní pokyny!
- \* Používané roztoky musí být prosté precipitátů, nečistot (ideálně přefiltrované přes 0,22-0,45  $\mu\text{m}$ )
- \* Složky gelů bez APS a TEMED lze připravit předem (skladovat v lednici), APS a TEMED je nutné přidávat těsně před naléváním gelu!
- \* **Separáčn** (separating) **gel (12.5%)**: pro přípravu dvou Mini-PROTEAN separáčních gelů o tloušťce 1.0 mm postačuje 10 mL roztoku

#### Smíchat:

3.33 mL ddH <sub>2</sub> O	
2.5 mL 4X lower Tris-SDS	-> 375 mM-0,1%
4.17 mL akrylamid-N,N'-methylen-bis-akrylamid (30%-0,8%)	-> 12,5%-0,33%
50 $\mu\text{L}$ 10% APS	-> 0,05%
5 $\mu\text{L}$ TEMED	-> 0,05%

#### Konečná koncentrace:

*Poznámka: Podíl (koncentrace) akrylamidu v separáčním gelu se může lišit podle molekulové hmotnosti zájmových proteinů (obvykle od 4-20%)*

- 1) Při nalévání gelů používat rukavice! (prevence kontaminace skel, bezpečnost!)
- 2) Sklíčka pro nalévání gelů musí být dokonale čistá, prostá veškeré mastnoty (umytá detergentem a následně destilovanou vodou, případně alkoholem, nedotýkat se rukou), zbavená prachu, precipitovaných solí apod.
- 3) Umístit krátké sklo a dlouhé sklo se spacery požadované tloušťky (1.0 mm) do držáku, zkontrolovat zarovnání spodních hran skel
- 4) Umístit skla na gumové těsnění do stojanu pro nalévání gelů (zkontrolovat utěsnění)
- 5) Vložit hřebínek pro tvorbu zaostřovacího gelu a na sklo udělat fixem značku cca 1 cm pod spodní okraj hřebínku, hřebínek poté oddělat
- 6) Do namíchaného roztoku separáčního gelu přidat APS a TEMED, promíchat, napipetovat do prostoru mezi krátké a dlouhé sklo až do výše značky označující 1 cm od spodního okraje hřebínku
- 7) Nalít separáčn
- 8) Nechat polymerovat cca 1 hodinu (event. i přes noc, zajistit dostatek t-amylalkoholu aby nedošlo k jeho odpaření a vyschnutí gelu)

- \* **Zaostřovací (stacking) gel (4%)**: pro přípravu dvou Mini-PROTEAN zaostřovacích gelů o tloušťce 1.0 mm postačuje 10 mL roztoku

#### Smíchat:

6.17 mL ddH <sub>2</sub> O	
2.5 mL 4X upper Tris-SDS	-> 125 mM-0,1%
1.33 mL akrylamid-N,N'-methylen-bis-akrylamid (30%-0,8%)	-> 4%-0,11%
50 $\mu\text{L}$ 10% APS	-> 0.05%
10 $\mu\text{L}$ TEMED	-> 0.1%

#### Konečná koncentrace:

- 1) Vylít t-amylalkohol převrstvující separáčn

- 2) Připravit si hřebínek odpovídající tloušťce gelu (tj. 1.0 mm) s požadovaným počtem jamek, umístit hřebínek mezi skla
- 3) Do namíchaného roztoku zaostřovacího gelu přidat APS a TEMED, promíchat, mírně povytáhnout hřebínek a napipetovat roztok mezi skla, odstranit případné bubliny pod hřebínkem
- 4) Nechat polymerovat 1-2 hodiny, případně přes noc (v tom případě provést opatření na omezení vysychání!)

### **B) Příprava vzorků:**

- 1) Připravit si potřebné množství SDS-nanášecího pufru s čerstvě přidaným redukčním činidlem
- 2) Rozmrazit marker molekulových hmotností
- 3) Rozmrazit jeden alikvot od každého vzorku proteinů
- 4) Pro každý vzorek vypočítat objem obsahující požadované množství proteinů (15 ug) a toto množství napipetovat do čisté mikrozkušavky (*Poznámka: Pro detekci pomocí Western blottingu se na gel nanáší zpravidla 10-20 (někdy až 50) ug proteinů vzorku*)
- 5) Identifikovat vzorek s nejnižší koncentrací proteinů / největším potřebným objemem
- 6) Objem všech vzorků ve zkumavkách doplnit lyzačním puftrem na stejný objem, jako má vzorek s nejnižší koncentrací
- 7) Ke každému vzorku přidat 1/2 objemu vzorku 3X SDS-nanášecího pufru (již s přidaným redukčním činidlem!)
- 8) Pro každý gel připravit do mikrozkušavky 1x10 uL markeru molekulových hmotností a přidat 5 uL 3X SDS-nanášecího pufru (již s přidaným redukčním činidlem!)
- 9) všechny vzorky zvortexovat a krátce centrifugovat
- 10) všechny vzorky zahřát na termobloku 15 min na 55C (parametry se mohou lišit podle typu stanovovaného proteinu, od vynechání zahřívání až po 98-100C)

### **C) SDS-PAGE**

\* Připravit si **elektroforetický pufr (running buffer):**

<u>Smíchat:</u>	<u>Konečná koncentrace:</u>
100 mL 10X Tris-Glycin pufru	-> 25 mM Tris/192 mM Gly
5.0 mL 20% SDS	-> 0,1%SDS
Doplnit H <sub>2</sub> O do 1 L, možno skladovat v lednici	

- 1) vyjmout hřebínek ze zaostřovacího gelu, jamky lehce vypláchnout H<sub>2</sub>O a následně SDS-PAGE elektroforetickým puftrem
- 2) připravené gely umístit do držáku gelů s elektrodami do elektroforetického tanku Mini PROTEAN (krátkými skly směrem do katodového prostoru, dbát na těsnost)
- 3) naplnit katodový prostor elektroforetickým puftrem až nad úroveň horního okraje krátkého skla / horního okraje gelu! (zkontrolovat těsnost, nesmí docházet k protékání pufru, pokles hladiny by zastavil elektroforetickou separaci)
- 4) napipetovat připravené vzorky a marker molekulových hmotností do jamek gelu (marker zpravidla do krajní jamky gelu nebo do obou krajních jamek)
- 5) naplnit anodový prostor elektroforetickým puftrem nad úroveň spodního okraje gelu (dochází-li k protékání pufru nutno naplnit až do úrovně hladiny pufru v katodovém prostoru)

6) umístit víko tanku, připojit ke zdroji napětí, spustit elektroforézu - doporučuje se aplikovat nízké napětí (cca 50 V) po dobu 15 min, během kterých dojde ke vstupu proteinů do zaostřovacího gelu, následně vyšší napětí (125-200 V) po dobu cca 1-2 hodin

7) během separace průběžně sledovat migrující čelo vzorků značené bromfenolovou modří, případně separaci markeru molekulových hmotností

8) elektroforézu zastavit poté, co migrující čelo vzorků opustí gel, případně poté, co je dosaženo požadované rozdělení proteinů

#### **D) Western transfer na PVDF mebránu - "mokrý přenos"**

\* Připravit si **blotovací pufr (transfer buffer)**:

Smíchat:

100 mL 10X Tris-Glycin pufru

1.0 mL 20% SDS

200 mL MeOH

Doplnit H<sub>2</sub>O do 1 L a zchladit na 4-8°C!!

Konečná koncentrace:

-> 25 mM Tris/192 mM Gly

-> 0,02% SDS

-> 20% MeOH

1) vyjmout gely z elektroforetického tanku, oddělit krátké a dlouhé sklo, odříznout a vyhodit zaostřovací gel

2) separační gel opláchnout pomocí stříčky s H<sub>2</sub>O, odříznout špičku gelu v pravém horním rohu (pravém ve smyslu uspořádání vzorků směrem zleva do prava, horním ve smyslu blízkosti proteinů s nejvyšší molekulovou hmotností)

3) Opatrně gel přenést do lázně s chlazeným blotovacím pufrem, nechat ekvilibrovat 20-30 min

4) nastříhat blotovací filtrační papír a PVDF mebránu na obdélníky o velikosti separačního gelu, napsat rozlišovací číslo membrány do pravého horního rohu membrány tužkou

**Pozor! Nedotýkat se PVDF membrány holou rukou, manipulovat s ní vždy pouze za její okraje pomocí pinzety!**

5) Aktivovat PVDF membránu ponořením do methanolu (na 30-60 s), následně membránu krátce opláchnout v lázni s H<sub>2</sub>O a promýt cca 2 min v čerstvé H<sub>2</sub>O (od tohoto momentu dbát na to, aby nedošlo k vyschnutí membrány! Pokud ano, je nutné ji znovu aktivovat MeOH)

6) Ekvilibrovat membránu 5 min v blotovacím pufrem

7) Nechat nasáknout pěnové podložky a blotovací papíry v blotovacím pufrem

8) Připravit blotovací sendvič:

- blotovací kazeta - černá strana kazety vespod
- pěnová podložka
- blotovací papír
- gel (uříznutý roh směrem k hřbetu kazety, marker vpravo)
- PVDF membrána - tak, aby číslo v pravém horním rohu bylo nad uříznutým rohem gelu
- blotovací papír
- pěnová podložka
- blotovací kazeta - průhledná strana kazety nahoře

9) Dbát na zarovnání všech částí sendviče, pečlivě vytlačit bubliny vzduchu mezi gelem a membránou - pomocí válečku nebo centrifugační zkumavky

10) Zavřít kazetu, umístit do držáku s elektrodami do tanku s nalitým blotovacím pufrem - dbát na správnou orientaci kazety: gel (černá strana kazety) směrem ke katodě, membrána (průhledná strana kazety) směrem k anodě

11) Umístit chladítko!!! Umístit magnetické míchadlo a zapnout míchačku!!! (důležité pro zajištění uniformity tepla a distribuce iontů během transferu!)

12) Zkontrolovat hladinu blotovacího pufru (gel s membránou musí být pod hladinou)

13) Zavřít víko, připojit ke zdroji, blotovat při nízkém napětí (20-30 V) přes noc (15-18 h). Optimální podmínky transferu závisí na tloušťce gelu, % akrylamidu, molekulové hmotnosti proteinu (těžší migrují pomaleji) - nutno zjistit optimalizací. Transfer lze provádět i při vysokém napětí (100 V) či vysokém proudu (350 mA) po dobu 1 h, případně (nutno velmi dobře chladit!), případně kombinovat transfer přes noc při nízkém napětí následovaný intenzivním transferem při 100 V (vhodné pro vysokomolekulární proteiny).

## E) Imunodetekce pomocí HRP-značené protilátky, ECL a dokumentačního systému

\* Připravit si **promývací pufr (TBST0.1%)**:

Smíchat:

100 mL 10X TBS

1 mL Tween-20

Doplnit H<sub>2</sub>O do 1 L, dobře promíchat (míchačka)

*(Poznámka: Tween-20 je velmi viskózní, pipetovat špičkou s ustřiženým koncem, velmi pomalu, důkladně vypláchnout obsah špičky)*

Konečná koncentrace:

-> 20 mM Tris/137 mM NaCl

-> 0,1% Tween 20

\* Připravit si **blokovací roztok (5%NFDM v TBST0,1%)**:

Rozpusť 5 g odtučněného sušeného mléka v 100 mL TBST0,1%

Nechat míchat na míchačce alespoň 30 min

Skladovat v lednici maximálně 2-3 dny

1) Vyjmout kazetu z blotovací aparatury, vyjmout gel a membránu (vždy manipulovat pouze pinzetou!) ze sendviče

2) Opláchnout membránu v H<sub>2</sub>O v lázni na orbitální míchačce (odstranění zbytků blotovacího pufru)

3) Zkontrolovat kvalitu transferu obarvením membrány v lázni 0,1% Ponceau-S (v 5% kys. octové) - cca 1-5 min

4) Odmýt nenačnanou Ponceau-S v lázni H<sub>2</sub>O

5) Vložit membránu mezi průsvitky a naskenovat / vyfotit CCD kamerou

6) Membránu odbarvit v lázni 0,1M NaOH

7) V tomto kroku je možné membránu usušit -> zlepšit vazbu nasorbovaných proteinů: Membránu ponořit do lázně s MeOH, pak na průsvitku a nechat schnout cca 30-60 min. Po usušení znovu aktivovat v lázni s MeOH, opláchnout ve vodě a pokračovat blokováním

8) Povrch membrány před imunodetekcí blokovat inkubací v blokovacím roztoku 5%NFDM na orbitální míchačce po dobu 1 h při pokojové teplotě

\* **Připravit dva roztoky primárních protilátek** ředěných v blokovacím roztoku:

- total-ERK1/2 - Rabbit Anti-p44/p42 Mab (137F5), Cell Signaling Cat#4695S

- fosfo-ERK1/2 - Rabbit Anti-phospho-p44/p42 Mab (T202/Y204), Cell Signaling Cat#4370S

- Ředění 1:2000: Pipetovat 2,5 uL protilátky do 5 mL blokovacího roztoku (5%NFDM v TBST0,1%)

- Roztoky protilátek nechat mírně míchat/třepat cca 30 min

9) Po ukončení blokovacího kroku přenést membránu do lázně s příslušnou nařaděnou primární protilátkou, inkubovat na orbitální míchačce přes noc, v lednici (dobu inkubace a ředění protilátky je nutné optimalizovat)

10) Nenačnanou primární protilátku odmyt:

- 3x rychlý oplach membrány větším objemem (20-30 mL) H<sub>2</sub>O
- 3x 10 min oplach v lázni s promývacím pufrem TBST0.1% na orbitální míchačce

\* **Připravit roztok sekundární protilátky** ředěný v blokovacím roztoku:

- Protikráličí IgG značená křenovou peroxidázou (HRP) - Goat Anti-Rabbit IgG-HRP Antibody, Sigma Cat#A4914
- Ředění 1:1000: Pipetovat 10 uL protilátky do 10 mL blokovacího roztoku (5%NFDM v TBST0,1%)
- Roztok protilátky nechat mírně míchat/třepat cca 30 min

11) Inkubovat membránu v lázni se sekundární protilátkou 1 h při pokojové teplotě na orbitální míchačce (dobu inkubace a ředění protilátky je nutné optimalizovat)

12) Nenavázanou primární protilátku odmyt:

- 3x rychlý oplach membrány větším objemem (20-30 mL) H<sub>2</sub>O
- 3x 10 min oplach v lázni s promývacím pufrem TBST0.1% na orbitální míchačce
- Po oplachu přenést membránu do lázně s 1XTBS bez Tween-20

13) Zapnout dokumentační systém pro gely, vložit zásuvku pro snímání chemiluminiscence, spustit ovládací software a přepnout do režimu fluorescence

\* **Připravit si ECL reagent** - Luminata Forte Western HRP substrate (Millipore) (Poznámka: Luminata je dodávána jako jednosložkové činidlo, avšak reagenty od jiných výrobců se zpravidla smíchají ze dvou složek (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, luminol/kumarát) v požadovaném objemu těsně před ECL detekcí)

14) Vyjmout membránu z oplachovací lázně, nechat okapat nadbytek pufru (přiložením hrany membrány na savý papír), umístit membránu mezi čisté průsvitky

15) Umístit membránu do detekčního systému - nastavit zoom a zaostření

16) Umístit membránu do plastové krabičky a přidat ECL reagent v objemu 0,1 mL/cm<sup>2</sup> membrány, inkubovat 1-5 min, dbát aby povrch membrány byl rovnoměrně pokryt (možno mírně míchat)

17) Vyjmout membránu, nechat okapat nadbytek ECL reagentu (přiložením hrany membrány na savý papír), umístit membránu mezi čisté průsvitky

18) Vložit do dokumentačního systému, při viditelném světle zkontrolovat polohu membrány a zaostření, spustit dokumentaci chemiluminiscence

19) Nechat vyvíjet 1-20 min (možnost průběžného snímání), v případě slabého signálu možno zvýšit GAIN a BINNING (snížit rozlišení), případně optimalizovat proceduru (množství proteinů, ředění a dobu inkubace s protilátkami etc.). Po ukončení detekce chemiluminiscence zdokumentovat polohu membrány (markeru) pořízením snímku při viditelném světle!

20) Membránu přenést zpět do lázně s TBS, zvážit její další využití (detekce dalšího proteinu - reprobing, případně stripping). Membrány je možné skladovat v lednici v lázni s TBS (s přídatkem 0,02%Na<sub>3</sub> pro omezení růstu mikroorganismů), případně usušit a skladovat při pokojové teplotě nebo zamražené (Pozor - usušením dojde k víceméně permanentnímu navázání protilátek na membránu => znemožní případný stripping)