

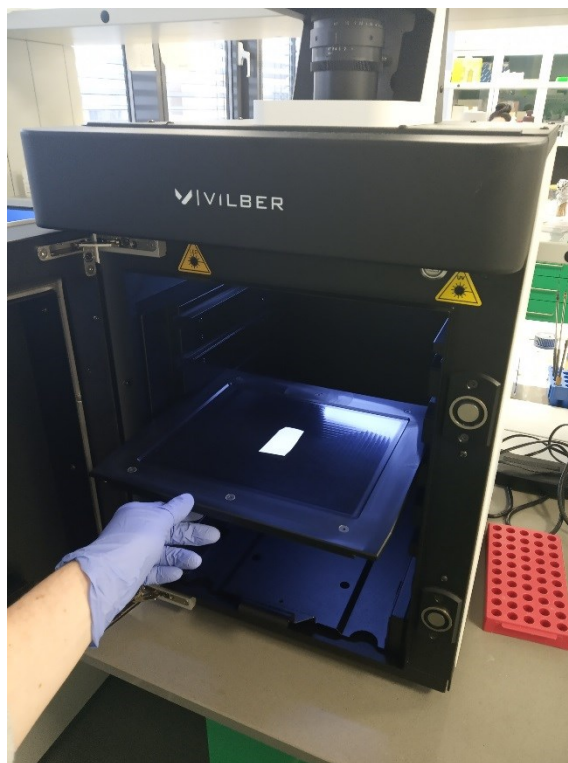
Úloha 5 – immunoblotting

Tuto úlohu jste si zvládli projít skoro celou – tvorba lyzátů, elektroforéza, western blott, nastříhání membránky i na zkoušku nakapání mléka na membránku.

Poté, co jste v úterý odešli, se vaše membránky hodinu kývaly na třepačce (blokování nescifických vazebných míst, aby se protilátka navázala skutečně jen na rozdělené proteiny). Na membránky jsme potom nakapaly vaše připravené protilátky a nechaly je inkubovat v ledničce přes noc.

Vyvolání protilátek:

Membránky byly promyty 3x5 minut v TBS-Tween, pak byly inkubovány 1 hodinu se sekundární protilátkou (membránka s anti- α -tubulinem s myší protilátkou a membránky s anti-E-kadherinem a anti-štěpeným PARPem s králičí protilátkou; vždy 1 μ l protilátky do 15 ml 5% mléka). Po hodině byly opět promyty 3x5 minut v TBS-Tween, osušeny a přeneseny na desku zařízení Vilber.

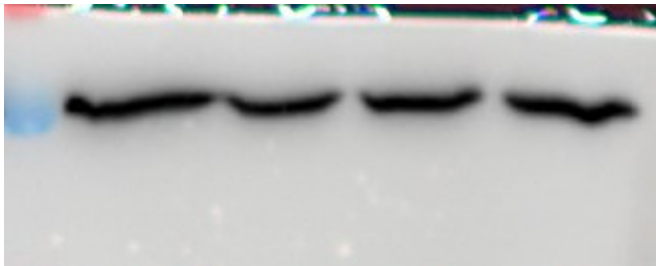


Tam na ně byl nakapaný vyvolávací roztok – ten se skládá z dvou vodiček smíchaných 1:1, které obsahují luminol a enhancer (zvyšuje senzitivitu). Sekundární protilátky na sobě mají navázanou křenovou peroxidázu, která katalyzuje oxidaci luminolu, při níž se uvolňuje světlo. Tuto chemiluminiscenci pak umí detekovat právě ten detekční systém Vilber. Na něm si uživatel může nastavit různé časy snímání a pak už jenom čeká na PC na obrázky 😊

Vaše vyvolané snímky:

Na všech membránkách je vždy zleva: marker (žebříček)
vzorek s EtOH (kontrola)
vzorek s perifosinem
vzorek s NaHCO₃
vzorek s NaHCO₃ a vzorek s kombinací perifosinu a NaHCO₃

α-tubulin: slouží jako kontrola, že bylo od všech vzorků naneseno stejné množství proteinů; to se vám povedlo, proužky jsou u všech vzorků stejně silné, proto rozdíly v intenzitě proužků na dalších membránkách jsou dány opravdu biologicky a ne technickou chybou při nanášení 😊



Štěpený PARP: PARP (poly(ADP-ribóza) polymeráza) je jedním z významných substrátů kaspáz, který je v průběhu apoptózy štěpen a z původního proteinu o velikosti 116 kDa vznikají fragmenty, přičemž my jsme detekovali fragment o velikosti 89 kDa. Štěpený PARP nám tedy slouží jako marker probíhající apoptózy. Jak je vidět na vaší membránce, signál pro tento protein je ve srovnání s kontrolou zvýšený pouze v případě použití kombinace – takže tam apoptóza probíhá výrazněji než u ostatních vzorků.



E-kadherin: je protein zajišťující mezibuněčnou adhezi – jeho snížení tedy značí pokles adhezivní síly buněk. Tento proces bývá využíván jako marker epiteliálně-mezenchymální tranzice, která je pro nádorové buňky charakteristická při metastázování. Z vašich výsledků plyne, že se E-kadherin ve srovnání s kontrolou snižuje u všech vzorků. Ačkoliv to tedy vypadá, že chemoterapeutikum perifosin zejména v kombinaci s alkalizací prostředí je superskvělý na zničení nádorových buněk, je nutné si uvědomit, že přeživší buňky se mohou stát agresivnějšími.

