

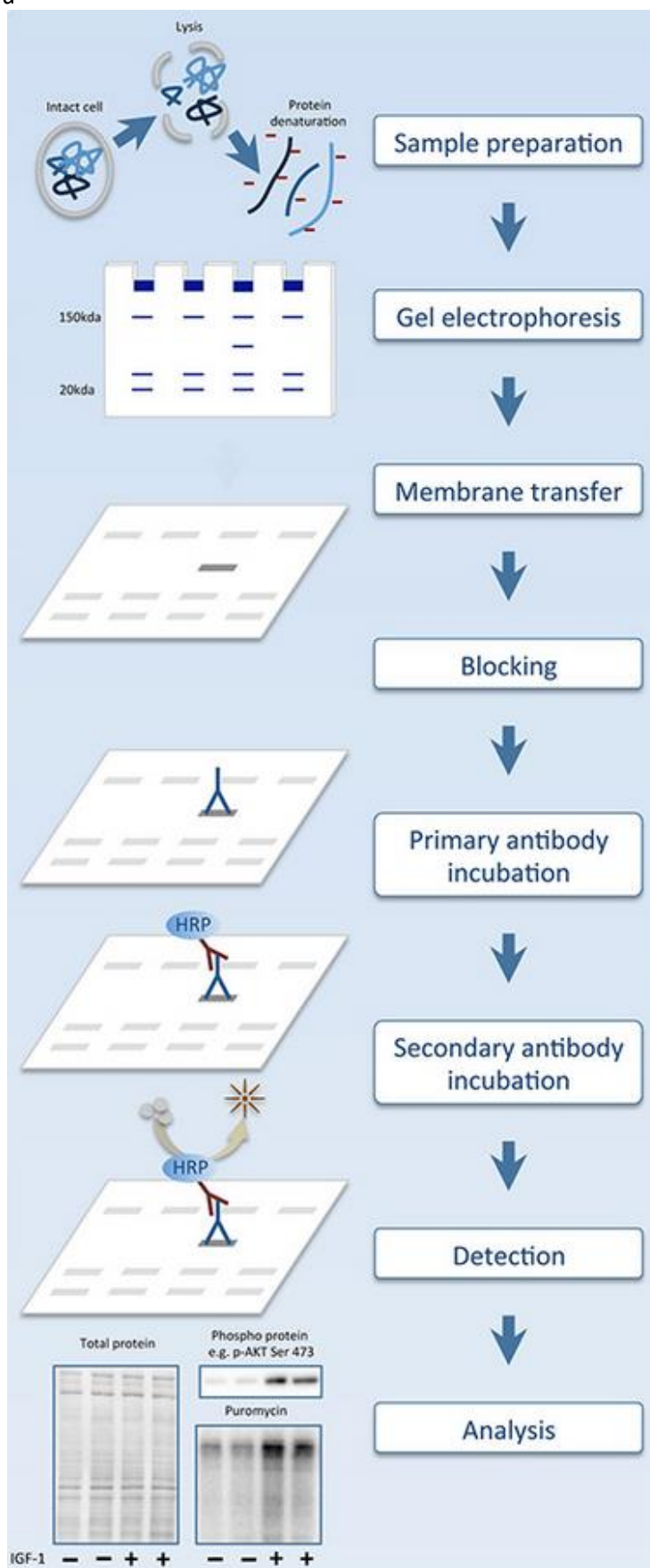
Detekce antigenu metodou Western Blotting II.

Blotování a zobrazení antigenu

Teoretický úvod

Western blotting nebo protein immunoblotting je velmi citlivá a analytická metoda, která zahrnuje detekci specifické bílkoviny v komplexní směsi. Vzorky bílkovin se nejprve oddělí pomocí SDS polyakrylamidgelové elektroforézy (SDS-PAGE) a následně imobilizací proteinů na nitrocelulóze nebo PVDF membránách. Přenos proteinů z gelu do membrány probíhá elektroforeticky. Přenášená bílkovina je detekována pomocí specifických primárních protilátek a sekundárních enzymy označených protilátek a substrátů. Tato metoda využívá princip interakce mezi antigenem a protilátkami pro identifikaci specifických antigenů monoklonálními nebo polyklonálními protilátkami

<https://precisionbiosystems.com/western-blot-troubleshooting-guide/>



obr.č.1 Western Blotting schéma úlohy (<https://precisionbiosystems.com/western-blot-troubleshooting-guide/>)

Princip testu

Western blotting nebo imunoblotting je metoda používaná k identifikaci specifické bílkoviny v komplexní směsi spolu se stanovením její molekulární hmotnosti. Vzorky proteinů jsou nejprve elektroforou nastaveny na SDS-PAGE. V tomto procesu proteiny migrují gelem a jsou odděleny podle své velikosti a náboje. Tyto separované proteiny jsou elektrotransferovány na membránu nitrocelulózy/PVDF pro další analýzu. Pro detekci bílkoviny (antigenu) nanesené na membránu probíhá inkubace s protilátkou (primární) specifickou pro bílkovinu, která je předmětem zájmu. Membrána je pak inkubována s druhou (sekundární) protilátkou, která je specifická pro první protilátku. Sekundární protilátky jsou kovalentně navázány na enzym, např. alkalickou fosfatázu nebo křenuvou peroxidázu. Tyto enzymy po reakci s chromogenním substrátem vytvářejí barevnou sraženinu. Výsledkem je viditelný pás na membráně, kde je primární protilátka navázána na bílkovinu.

Reagencie

Clarity Western ECL Substrate Kit

Criterion 4-15% TGX Stain-Free Gels

Dithiothreitol (DTT)

Lambda Protein Phosphatase

Laemmli Sample pufr

Precision Plus All Blue Standard

Precision Plus Unstained Standard

1x TBS 1% Casein Blocking pufr

10x TGS Running pufr

Trans-Blot Turbo RTA Mini/Midi Transfer Kit,

10x Tris-Buffered Saline (TBS)

10x Tris/Glycine/SDS (TGS; running pufr))

10% Tween 20

Pomůcky

nitrocelulosová membrána

PVDF membrána

nádoba na promývání gelu

destilovaná voda pro ředění promývacího roztoku

odměrný válec pro přípravu promývacího roztoku

mikropipety,

skleněné pipety

mikrozkumavky

pipetovací špičky

kádinka nebo vanička s vodou

odpadní nádoba

zkumavky eppendorf

gáza/filtrační papír/buničitá vata na osušení stripů po promývání

popisovač

Přístroje

Mini Protean Biorad– zdroj stejnosměrného proudu

Mini Trans Blot Module – elektroforéza, blotování

Třepačka

Pracovní postup

1. Aplikace fosfatázy

1.1. Připravte si 20 ml 1x fosfatázového pufru na gel, přidejte 2 µl 5 M MnCl₂ a 10 µl 2 M DTT na 10 ml pufru

Fosfatázový pufr připravte těsně před použitím.

1.2. Označte komory 6jamkového mini proužkového savého boxu takto:

Číslo skvrny:

- Komora 1 A proteinová protilátka, falešná
- Komora 2 A proteinová protilátka, ošetřená PP
- Komora 3 Fosfo-specifická protilátka, falešná
- Komora 4 Fosfo-specifická protilátka, ošetřená PP

1.3. Přidejte 3 ml 1x fosfatázového pufru do každé komory blotovacího boxu.

1.4. Přidejte 5 µl destilované H₂O do každé komory, která bude obsahovat membránu, která není ošetřena fosfatázou (false).

1.5. Přidejte 5 µl lambda proteinfosfatázy (LambdaPP) do každé komory, která bude obsahovat membránu, která má být ošetřena fosfatázou.

1.6. Odřízněte membránu mezi každou sadou standardních pruhů.

1.7. Umístěte každý proužek do odpovídající komory savého boxu a inkubovat 2 hodiny při 37°C na kolébce

1.8. Opatrně vylijte fosfatázový pufr

2. Western blotting

- 2.1. Zřed'te všechny požadované primární protilátky na požadované pracovní ředění (použijte ředění 1:1 000) v blokovacím pufru Casein Tween.
- 2.2. Opatrně slijte poslední zbytky TBST pufru z každé komory a přidejte 3 ml zředěné primární protilátky do boxu.
- 2.3. Inkubujte přes noc při 4°C na kolébce nastavené na 30 ot./min.
- 2.4. Následující den opatrně vylijte primární protilátku, pro zamezení kontaminace mezi komorami.
- 2.5. Přidejte 10 ml promývacího pufru TBST a inkubujte při laboratorní teplotě po dobu 5 minut na třepačce nastaveném na 150 ot./min.
- 2.6. Slijte promývací roztok a celkem 5x promyjte.
- 2.7. Připravte vhodnou sekundární protilátku na požadované pracovní ředění v blokujícím pufru s doplněním kaseinu.
- 2.8. Přidejte 3 ml zředěné sekundární protilátky do příslušné komory svého boxu a inkubujte po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě.
- 2.9. Opatrně vylijte sekundární protilátku, vyhněte se kontaminace z komory do komory.
- 2.10. Přidejte 10 ml promývacího pufru TBST do každé komory a inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 5 minut na třepačce.
- 2.11. Slijte promývací roztok a opakujte celkem 5x bod 2.10.

3. Detekce antigenu

- 3.1. Smíchejte komponenty sady Clarity Western ECL Substrate Kit v poměru 1:1 poměr v čisté zkumavce. Celkem 1 ml namíchaného substrátu je potřebný pro každý pás membrány.
- 3.2. Zvedněte membránu čistými kleštěmi a jemně protřepejte až přebytečný promývací pufr TBST odteče.
- 3.3. Jemně naneste 1 ml namíchaného ECL substrátu přímo na horní část každé membrány, pokrývejte membránu rovnoměrně pokud je to možné.
- 3.4. Nechte inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě.
- 3.5. Výsledkem je viditelný pás na membráně, pouze v místě kde je primární protilátka navázána na protein.

Hodnocení testu

A/ Zakresli a popiš polohu proteinů na membráně.

B/ Vlož obrázek membrány po blotování.

Kontrolní otázky

A/ O jaký typ metody detekce antigenu se jedná?

B/ Proč je nutné připravovat fosfatázový pufr těsně před použitím?

C/ Jakou má funkci ECL substrát v této metodě?