

WESTERN BLOTTING

Analytická metoda

FBMI ČVUT

Mgr. R. Šíroká PhD

2023

TYPY BLOTOVACÍCH TECHNIK

- ▶ Podle druhu detekované molekuly
- ▶ Southern Blotting – Detekce DNA
- ▶ Northern Blotting – Detekce RNA
- ▶ Western Blotting – Detekce Proteinů



WESTERN BLOTTING, NEBOLI IMUNOBLOTTING

LABORATORNÍ METODA PRO **DETEKCI A IDENTIFIKACI SPECIFICKÝCH PROTEINŮ** V KOMPLEXNÍ SMĚSI.

ZAHRNUJE : SEPARACI, PŘENOS A DETEKCI PROTEINŮ.



- **A/ SEPARACE PROTEINŮ**

SDS-PAGE nebo elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným

elektroforetická mobilita proteinů závisí na jejich velikosti

při daném pH a za nedenaturačních podmínek je elektroforetická separace proteinů určena jak velikostí, tak nábojem molekul

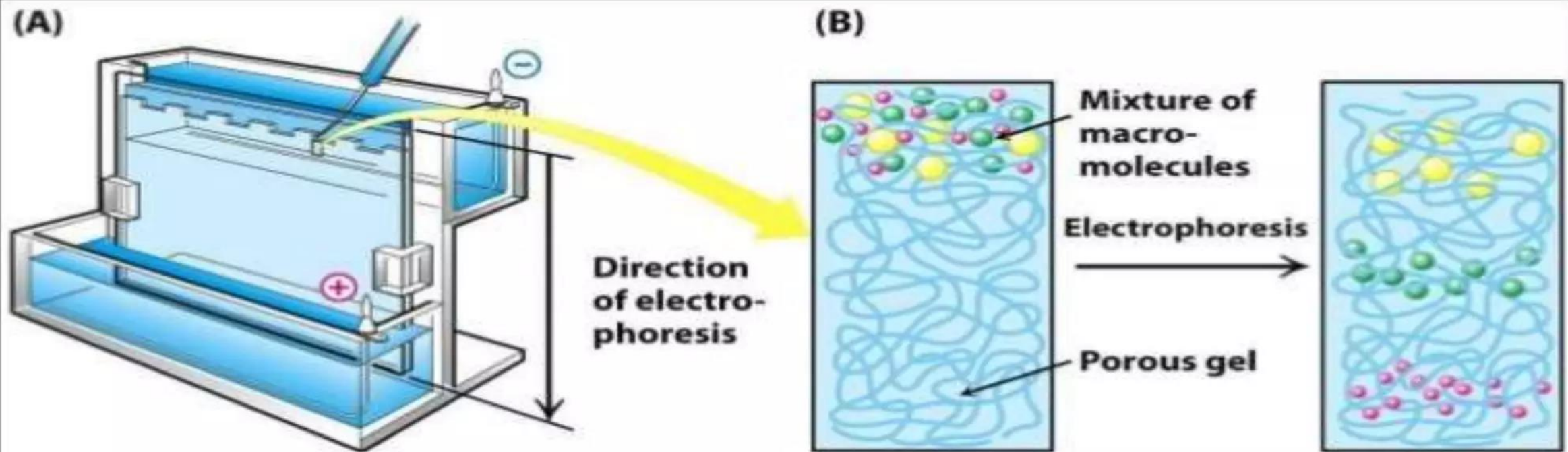


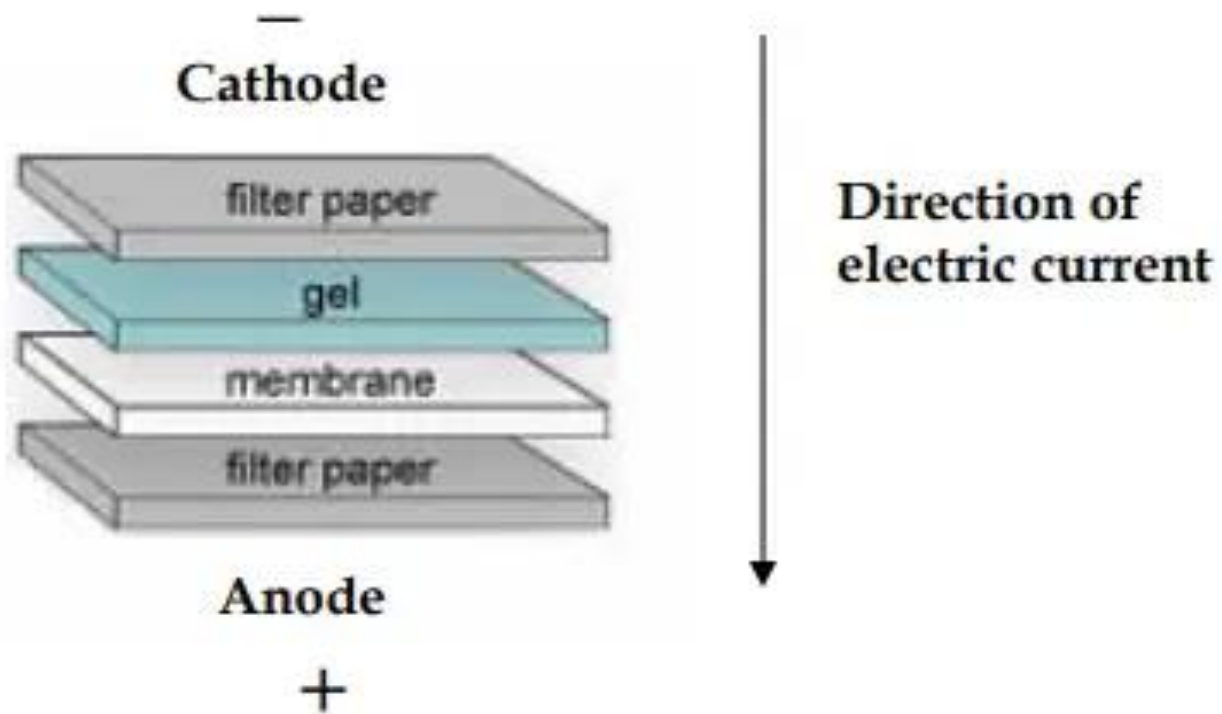
Figure 3.7

Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

B/ WESTERN BLOTTING - PŘENOS

- ▶ proteiny jsou přeneseny z polyakrylamidového gelu na nitrocelulózovou/PVDF membránu v přítomnosti specifického přenosového pufru
- ▶ proteiny jsou po elektroblottingu přeneseny do odpovídajících pozic na membráně.
Požadovaný protein je imunodetekován na membráně.





[HTTPS://MICROBIOLOGYNOTE.COM/CS/WESTERN-BLOT-PROTOCOL-PRINCIPLE-RESULT/](https://microbiologynote.com/cs/western-blot-protocol-principle-result/)

GELOVÉ USPOŘÁDÁNÍ – PŘENOS PROTEINŮ

C/ IMUNODETEKCE

Proteiny, které jsou navázány na membránu po dokončení elektrotransferu, jsou detekovány imunologicky.

Blokovací činidlo (odtučněné sušené mléko/BSA) -
blokování neobsazených míst na membráně



C.1/ FIXACE PROTEINU VAZBOU S PROTILÁTKOU

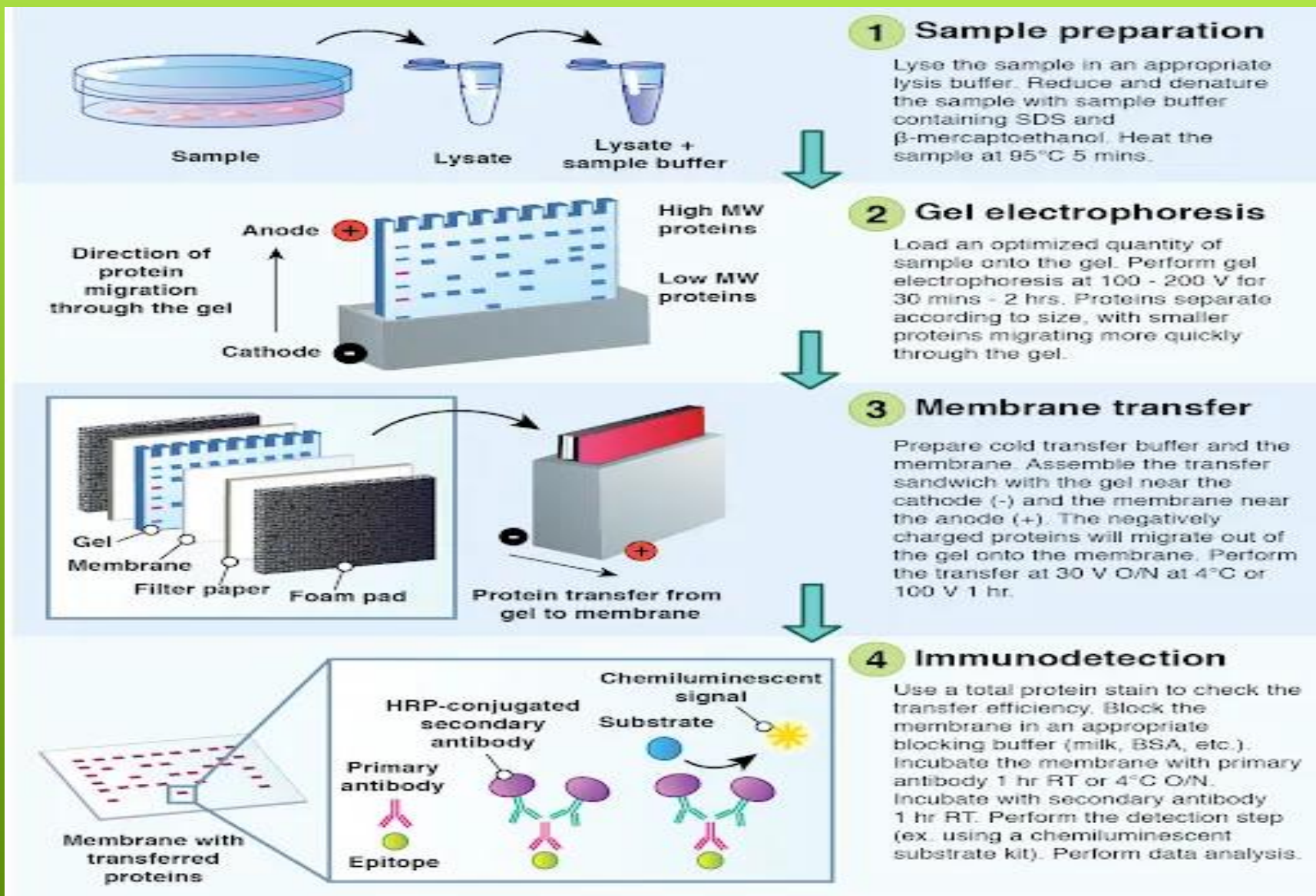
Membrána sondována primární protilátkou specifickou pro hledaný protein

Primární protilátka – navázána na protein nebo antigen a na membráně vznik komplexu antigen (Ag)-protilátka (Ab).

Membrána – **promytí** - odstranění přebytku nenavázané primární protilátky.

Vazba enzymem značené sekundární protilátky (alkalická fosfatáza/křenová peroxidáza) na primární protilátku komplexu Ag-Ab.





C.2 PROMYTÍ – VŽDY NUTNÉ 2X OPAKOVAT – PROČ?

- ▶ Promývací pufry: tween 20 v TBS pufru nebo PBS pufr
- ▶ Odstranění nenavázaných protilátek
- ▶ Nenavázané protilátky – silný background - zhoršení detekce hledaného proteinu



D/ DETEKCE PROTEINU

- Chromogenní
- Chemiluminescenční
- Fluorescenční
- Radioaktivní



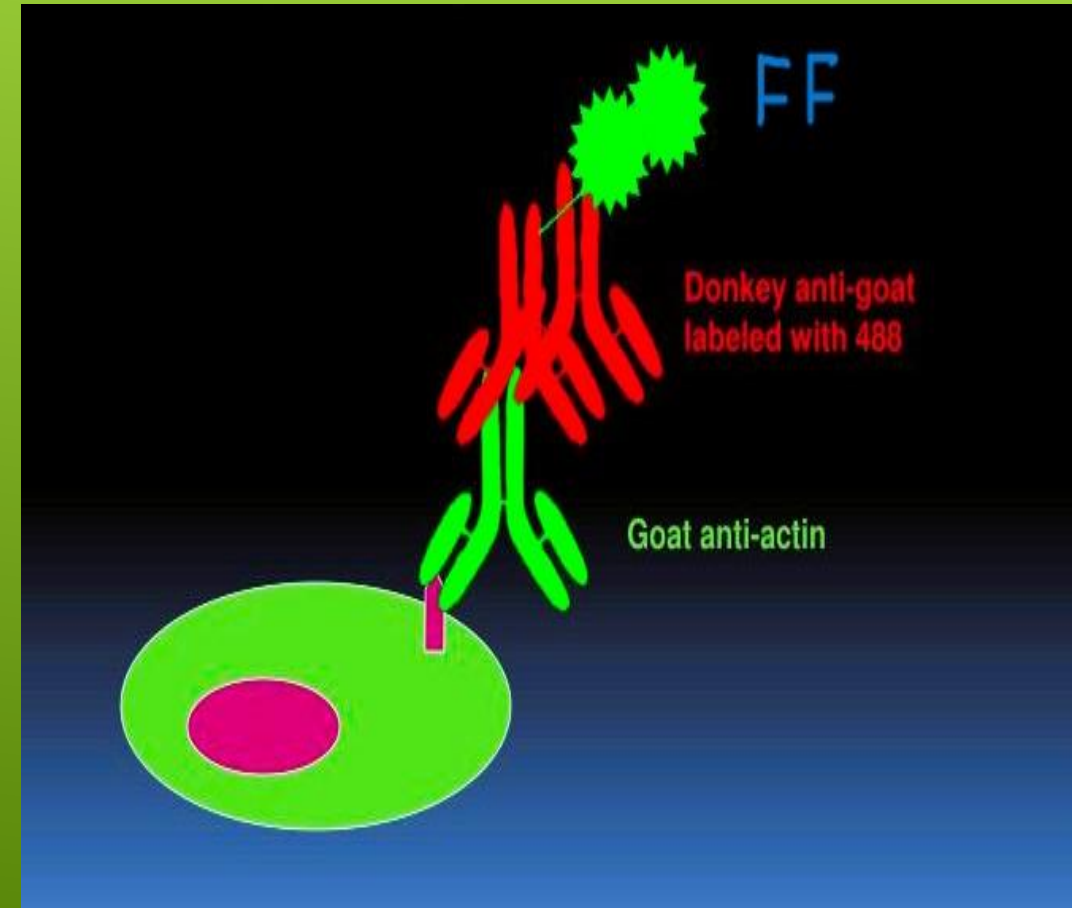
CHROMOGENNÍ DETEKCE PROTEINU

1. Průkaz přítomnosti hledaného proteinu pomocí enzymatické barevné reakce při použití chromogenního substrátu
2. V přítomnosti proteinu dojde k barevné změně substrátu po reakci s enzymem navázaným na sekundární protilátku
3. Typy chromogenního substrátu pro HRP enzym (horseradish peroxidázu): Diaminobenzidin (DAB) nebo tetramethylbenzidin (TMB)

CHEMILUMINESCENČNÍ DETEKCE PROTEINŮ

1. Reakční směs obsahující chemiluminescenční substrát je přidána k membráně
2. Enzym navázaný na protilátce katalyzuje reakci substrátu za emise světla detekovatelného na gelu osvětleném UV nebo X ray

<https://the-basics-of-immunohistochemistry.com>
modifikováno Šíroká R.

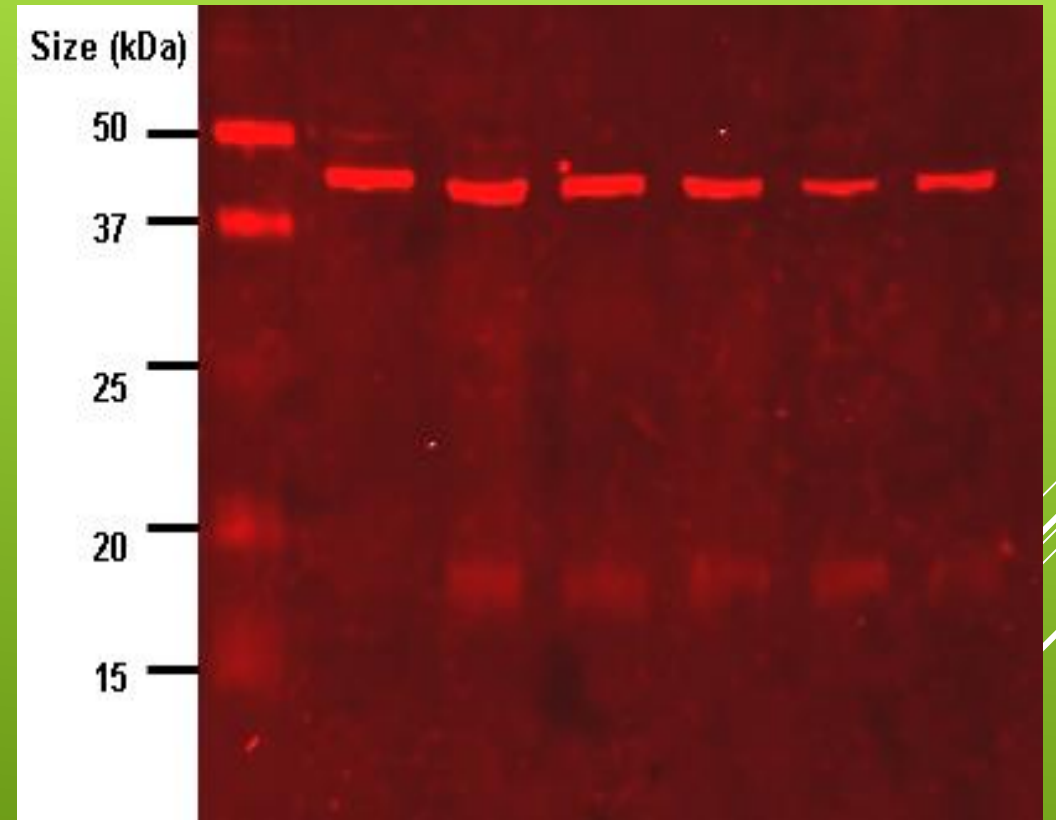


FLUORESCENČNÍ DETEKCE PROTEINŮ

Detekce fluoreskujícího produktu
vzniklého ze substrátu, pomocí
fluorescenčního detektoru

Výsledek western blotu z extraktu
prvoka rodu *Leishmania* (viz scan
gelu)

https://cs.wikipedia.org/wiki/Western_blot

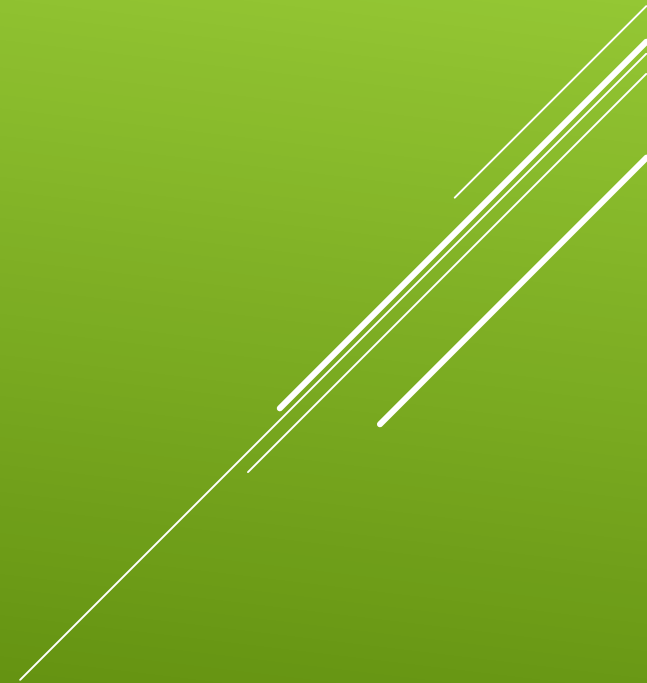


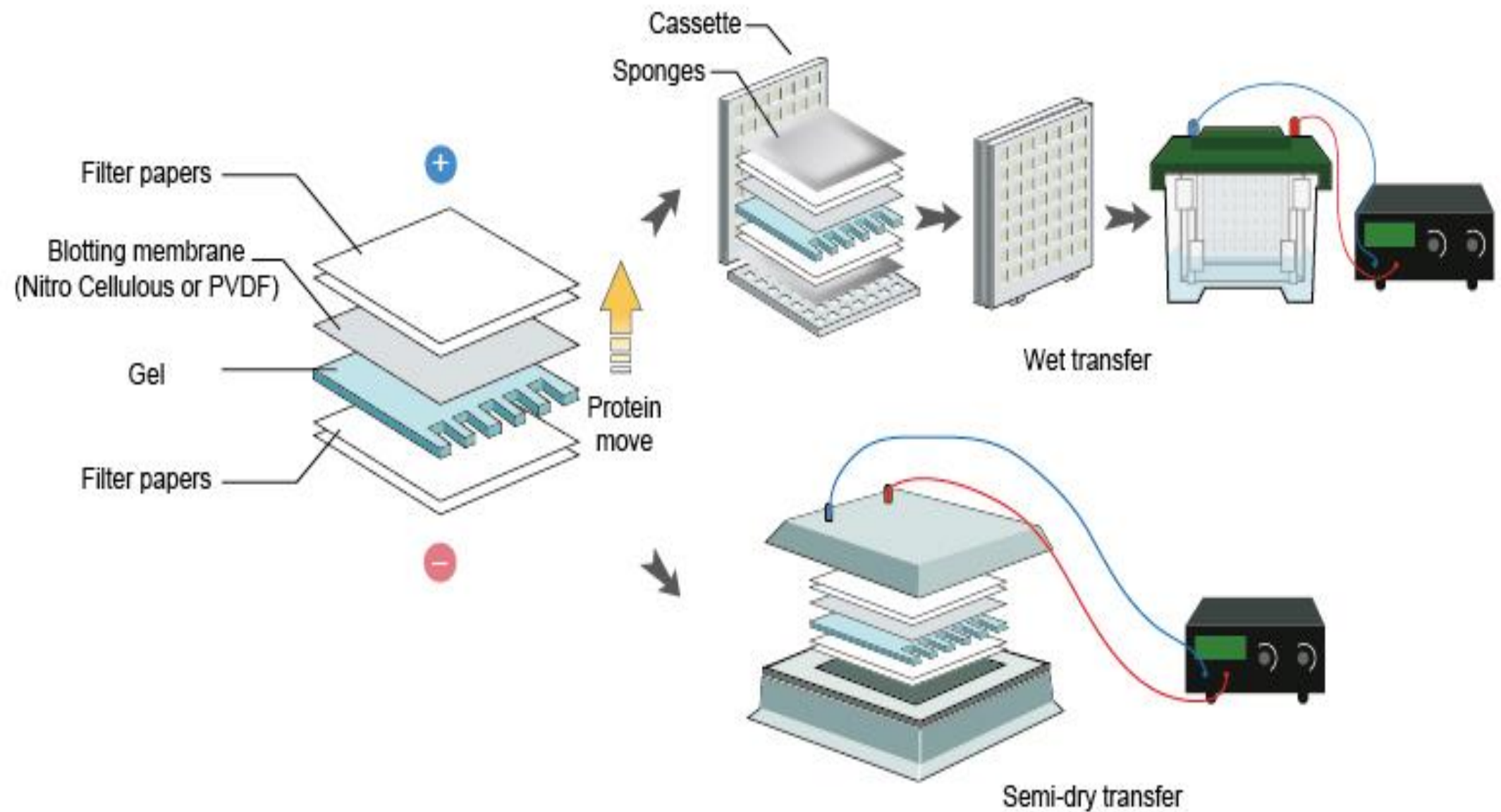
RADIOAKTIVNÍ DETEKCE PROTEINŮ

1. kompetitivní imunoreakce, tzn. značený antigen soupeří o vazebná místa na protilátce, která se v reakční směsi nachází v omezeném množství, s neznačeným antigenem.
2. Stanovovaná látka je neznačený antigen, další antigen je značen např. radioaktivním izotopem jodu (^{125}I , ^{131}I) pro proteinové antigeny, či **tritnem** nebo ^{14}C pro nízkomolekulární látky.

GOETZ, Pavel, et al. Vybrané kapitoly z lékařské biologie II. 1. vydání. Praha : Karolinum, 2002. 139 s. ISBN 80-246-0320-9.

SHRNUTÍ METODY WESTERN BLOTTING





https://wellfound.com/projects/452711-western-blot-dry-transfer?src=user_profile

“

WESTERN BLOTTING V PRAXI

”

VIDEO UKÁZKA FIRMY BIO-RAD

<https://youtu.be/VgAuZ6dBOfs>



APLIKACE WESTERN BLOTTINGU

1. Analýza frakcí IgG proteinů z lidského séra
2. Diagnostika různých typů lidského HIV
3. Detekce různých forem Lymfské boreliózy
4. Testování, screening onemocnění BSE (nemoc šílených krav)
5. Potvrzení onemocnění Hepatitidou B
6. Genové inženýrství – exprese a izolace cílených genů



LIMITY A NEVÝHODY WESTERN BLOTTINGU

1. Časově a technicky náročné
2. Pravděpodobnost falešného zbarvení proteinu
3. Preciznost provedení – nutnost vyškoleného personálu



POUŽITÁ LITERATURA

<https://www.bio-rad-antibodies.com/western-blot-protocol.html>

<https://www.bio-rad-antibodies.com/static/2019/protocols/detection-of-phosphorylated-proteins-by-western-blotting.pdf>

Kingsmore S.F. Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays: Nature Reviews Drug Discovery 5 (4), s. 310-320, 2006

http://www.raybiotech.com/protein_array.asp#3