

Detekce antigenu metodou Western Blotting I.

Gelová elektroforéza

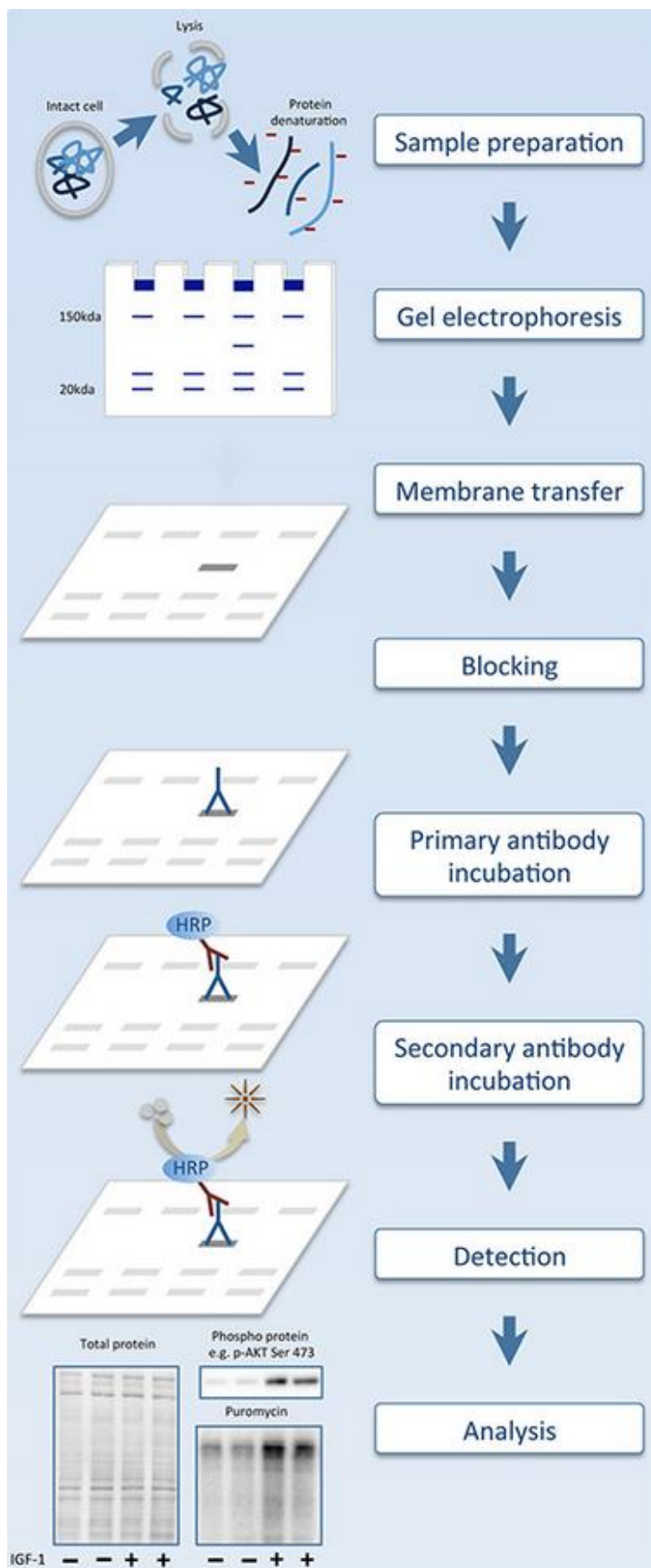
Cíl

Naučit se techniku Western Blottingu pro detekci specifického proteinu.

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 substrátu. 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 elektrotransfery 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 Gely

Dithiothreitol (DTT)

Lambda Protein Phosphatase

Laemmli Sample pufr

Precision Plus All Blue Standardy

Precision Plus Unstained Standardy

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 napětí

Mini Trans Blot Module – elektroforéza, blotování

Centrifuga

Pracovní postup:

1. Příprava lysátů a reagensů

1.1. Příprav TBST Wash Buffer (1x TBS s 0.1% Tween 20 v poměru 1:1)

Použij 10% Tween 20, 10x TBS, a destilovanou vodu

1.2. Příprav Casein Tween Blocking Buffer (1x Casein Blocking Buffer +

0.1% Tween 20) použij 1x TBS 1% Casein Blocking Buffer a 10% Tween 20

1.3. Příprav fosfátový pufr (smíchej 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 2 mM DTT pH 7.9 při 25°C)

1.4. Příprav 1x TGS naředěním 10x TGS 1:10

1.5. Příprav Transfer Buffer (obsažen v Trans-Blot Turbo RTA Mini/Midi Transfer Kitu)

1.6. Příprav lysáty antigenů naředěním 0.5 ml PBS

2. Gelová elektroforéza

2.1. Připravte 1x TGS Running Buffer pomocí naředění 10x TGS Running Buffer destilovanou vodou 1:10

2.2. Odstraňte 18jamkový gel Criterion 4-15% TGX Stain-Free z obalu (zajišťující zelený hřeben a bílou pásku odstraňte), opláchněte jamky gelu pomocí dest. H₂O, abyste zajistili, že veškeré vzduchové bubliny jsou odstraněny.

Vložte gel do komory. Vyplňte vnitřní komoru s 1x TGS Running pufrem, který zajistí, že jamky jsou překryté.

2.3. Smíchejte a vložte Precision Plus All Blue Standards a Precision Plus nebarvené standardy v poměru 1:1 a zatížení 10 µl na jamku do vhodných jamek gelu

2.4. Vložte lyzáty do vhodných jamek gelu.

2.5. Připojte článek Criterion Cell k napájecímu zdroji a nastavte napětí do 300 V. Pokračujte, v napájení dokud přední část barviva nedosáhne spodní části gelu (přibližně 20-25 min).

2.6. Vyjměte gel z kazety. Použijte gelové separátory.

2.7. Odřízněte dobře "třásně" z horní části gelu a "nohy" ze spodní části gelu. Umístěte gel do velkého savého otvoru krabičky s 1x TGS Running pufrem.

3. Přenos membrány a proteinů bez skvrn

3.1. Pro zobrazování je nutná UV aktivace gelu bez skvrn.

3.2. Použijte přenosovou sadu Trans-Blot Turbo RTA Midi

která zahrnuje PVDF membránu, potřebnou pro zobrazení blotu pro celkový protein bez zabarvení

3.3. Postup normalizace :. Použití nízké fluorescenční membrány PVDF místo normálního PVDF nebo nitrocelulózy - umožňuje vizualizaci fluorescence emitované z aktivované tri-halo sloučeniny vázané na Tryptofanová rezidua proteinů na gelu, které byly nyní přeneseny do membrány.

3.4. Po dokončení přenosu pořídte snímek membrány.

4. Blotování membrány - příprava

4.1. Vložte membránu do velkého savého boxu s 15 ml blokovacího vyrovnávacího pufru pro doplnění kaseinu.

4.2. Pomocí tužky označte roh každé membrány, takže můžete rozlišovat mezi nimi později. Inkubace 30 min při pokojové teplotě (RT).

4.3. Membrána je nyní připravena pro blotování

Hodnocení testu:

A/ Popiš umístění jamek na membráně

B/ Vlož obrázek membrány před blotováním.

Kontrolní otázky:

A/ O jaký typ metody detekce se jedná?

B/ Proč je nutné přípravot lysáty až na místě?

C/ Jakou má funkci enzym v této metodě?