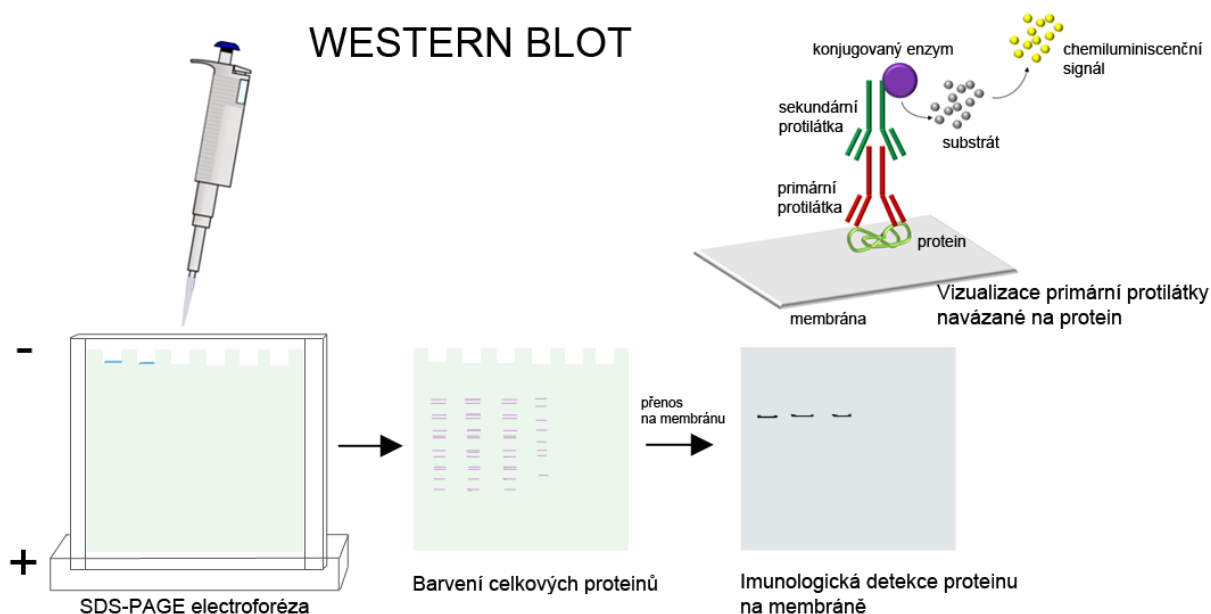


## WESTERN BLOT

Western blot je metoda používaná pro kvalitativní nebo semikvantitativní detekci určitého proteinu ve vzorku. Metoda je tvořena třemi základními kroky: 1. elektroforetickou separací proteinů, 2. přenosem separovaných proteinů, 3. detekcí proteinů.

- Pro separaci proteinů se nejčastěji využívá gelová elektroforéza, nejčastěji je to SDS-PAGE (SDS polyacrylamide gel electrophoresis). Vlivem SDS jsou proteiny denaturovány a proteiny získávají záporný náboj a cestují tak v elektrickém poli od záporného pólu ke kladnému. Při elektroforéze jsou proteiny děleny podle své hmotnosti (udává se v kDa). Malé proteiny cestují akrylamidovým gelem rychleji, proteiny o velké molekulové hmotnosti se pohybují směrem k anodě pomaleji. Někdy je využívána nativní-PAGE, kdy jsou proteiny separovány na základě svého náboje.
- Separované proteiny jsou přeneseny na membránu. Přítomnost daného proteinu je na membráně detekována pomocí protilátky, tzv. primární, vůči tomuto proteinu. Primární protilátka se navazuje na protein a v dalším kroku je rozpoznávána sekundární protilátkou.
- Sekundární protilátka se tedy váže na primární protilátku. Přítomnost sekundární protilátky je detekována fluorescenčně či chemiluminiscenčně, a to v závislosti na značení, které sekundární protilátka nese.
- Velikost signálu je vyhodnocována srovnáním s naneseným proteinovým markerem, což je komerčně dostupná směs proteinů o známé velikosti.

# WESTERN BLOT



## PŘÍPRAVA VZORKŮ

**Lyzační pufrý.** Pro přípravu vzorků pro Western blot jsou využívány lyzační pufrý, které uvolní a rozpustí proteiny obsažené v testovaných buňkách a tkáních.

Při výběru vhodného lyzačního pufru se především řídíme požadavky použité protilátky. Protilátky obvykle rozeznávají na proteinu pouze jeho malou část (označováno jako epitop), ke které se váží. Tato část ovšem může být schovaná terciární strukturou proteinu, proto je třeba tuto strukturu proteinu nejprve rozplést, tj. protein denaturovat. Většina protilátek tedy rozeznává proteiny v jejich denaturované formě, nicméně jsou protilátky, které naopak vyžadují protein v nativní formě a protein nerozeznají, pokud byl připraven v roztoku obsahujícím některý z detergentů (SDS, deoxycholát). Tyto protilátky totiž rozeznávají své epitopy v závislosti na sekvencích aminokyselin, které se na základě troj-rozměrné struktury proteinu nacházejí v blízkosti epitopu. Před započítím Western blotu je proto zcela zásadní zkontrolovat požadavky dané protilátky, a to v materiálech dodaných od výrobce.

**1** Pokud protilátka vyžaduje nativní formu proteinu, je třeba protein připravit v pufru bez detergentu, případně v pufru, který obsahuje některý z mírně působících detergentů, jako je Triton X-100 nebo NP-40.

Při výběru lyzačního roztoku se rovněž řídíme lokalizací testovaného proteinu, viz. tabulka

Lokalizace proteinů	Doporučený pufr
V celých buňkách	NP-40 nebo RIPA
Volně v cytoplasmě	Tris-HCl
V cytoplasmě vázaný na cytoskelet	Tris-Triton
Vázaný na membrány	NP-40 nebo RIPA
Jádro*	RIPA
Mitochondrie*	RIPA

\* Zejména u proteinů, u nichž předpokládáme nízkou expresi a které se nachází pouze v jádru nebo pouze v mitochondriích, se doporučuje připravit lyzát pouze z těchto buněčných částí.

Nonidet-P40 (NP40) buffer (150 mM NaCl, 1% nonidet NP-40, 50mM Tris-HCl, pH8): Je vhodným pufrem pro studium proteinů nacházejících se v cytoplasmě, vázaných na membránách nebo proteinů z extraktů celých jader.

RIPA buffer (Radio Immuno Precipitation Assay buffer) (150mM NaCl, 1% nonidet NP-40, 0,5% deoxycholát sodný, 0,1% SDS, 50mM Tris-HCl, pH8): Je používaným pufrem pro extrakty z celých buněk a proteiny vázané na membrány. Protože obsahuje iontové detergenty, které snadno vedou k rozpuštění proteinů v roztoku, je vhodným pufrem v případě špatně rozpustných tkání. Nicméně také porušuje protein-proteinové interakce, takže není vhodným roztokem při imunoprecipitačních experimentech.

Tris-Triton buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 100mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0,1% SDS, 0,5% deoxycholát sodný): Je vhodným pufrem pro extrakci cytoskeletálních proteinů.

Tris-HCl buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5): je vhodným pufrem pro použití s protilátkami, které vyžadují proteiny v jejich nedenaturované, tj. nativní formě, protože pro minimalizaci denaturace je třeba využít pufrů, které neobsahují iontové detergenty (tj. SDS) a ideálně také neiontové detergenty (tj. Triton – 100).

**Inhibitory proteáz a fosfatáz.** Při přípravě lyzátu mohou v lyzované tkáni nastat nežádoucí rozkladné procesy. Při přípravě proteinových lyzátů jsou nežádoucí zejména aktivity proteáz a fosfatáz. Proto pro minimalizaci aktivity proteáz a fosfatáz je doporučováno do lyzačního roztoku, těsně před jeho použitím, přidat inhibitory proteáz a fosfatáz. Vhodné koktejly inhibitorů lze zakoupit komerčně.

**Příprava lyzátu.** Pro další minimalizaci aktivity proteáz a fosfatáz je třeba vzorky připravovat v předem vychlazeném lyzačním roztoku (na 4°C) a vzorky držet při 4°C i dále. Při přípravě tkáně (např. její pitvě) postupujeme rychle, aby se snížilo riziko rozkladných procesů v tkáni. Pro přípravu homogenátu jsou využívány homogenizátory, homogenizaci můžeme zefektivnit tím, že tkáň předem zmrazíme, rozmělníme a urychleně přidáme vychlazený lyzační pufr. Množství přidaného pufru je úměrné množství tkáně a množství tkáně by optimálně mělo být 1-5 mg na 1 ml lyzačního roztoku. Vzorky jsou inkubovány 2 hod. při 4°C. Po následné

centrifugaci je odebrán supernatant a přenesen do čisté zkumavky.

---

## URČENÍ KONCENTRACE CELKOVÝCH PROTEINŮ

Připravený lyzát je třeba vyhodnotit na koncentraci proteinů. Pro vyhodnocení koncentrace proteinů je obvykle využívána Bradfordova nebo BCA metoda. Pro tyto metody existuje celá řada komerčních produktů. Po vyhodnocení koncentrace může být část vzorku nanasena na gel, případně může být vzorek v alikvotech zamražen při  $-20^{\circ}\text{C}$  nebo  $-80^{\circ}\text{C}$  pro pozdější použití.

---

## PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO NANESENÍ NA GEL

### Vzorky v denaturované a redukované formě

Jak již bylo zmíněno, většina protilátek vyžaduje proteiny v jejich denaturované formě. Proto ve většině případů musíme proteiny denaturovat. Denaturace proteinů je docílena jednak působením neiontového detergentu SDS (dodaný součástí nanášecího, tzv. Laemmliho pufru) a také zahřátím směsi na  $95-100^{\circ}\text{C}$  po dobu 5 min.

**2X Laemmliho pufr** (4% SDS, 10% 2-merkaptotanol, 20% glycerol, 0.02% bromfenolová modř, 120 Tris-HCl pH 6,8). Laemmliho pufr je běžně používaný nanášecí, denaturační pufr.

- Součástí pufru je SDS, které jednak zajišťuje denuraci proteinů, ale také zajistí, že proteiny budou mít negativní náboj (proteiny se totiž vážou na anionty SDS). Díky tomu se proteiny v gelu nepohybují na základě svého elektrického náboje, ale na základě své molekulární velikosti.
- $\beta$ -merkaptotanol případně ditiotreitol (DTT) jsou využity k odstranění intramolekulárních a intermolekulárních disulfidických můstků v proteinu, a tedy k „narovnání“ molekuly proteinu.
- Glycerol zvýší densitu nanášeného vzorku a usnadní tak jeho nanasení do jamky.
- V nanášecím roztoku je přítomná také barvička, typicky bromfenolová modř, která umožní vizualizaci vzorku při nanášení a v průběhu elektroforetické separace.

### Vzorky v nativní a ne-redukované formě

Některé protilátky rozeznávají své epitopy v závislosti na sekvencích aminokyselin, které se na základě troj-rozměrné struktury proteinu nacházejí v blízkosti epitopu. V těchto případech je nepřípustné připravovat vzorek za přítomnosti denaturačních látek (jako SDS) a také je nepřípustné zahřívání vzorku na denaturační teplotu. Rovněž některé protilátky protein rozpoznají, jen pokud je ve své ne-redukované formě. V těchto případech nanášecí a elektroforetický pufr nesmí obsahovat redukční látky jako je  $\beta$ -merkaptotanol a DTT. V těchto případech je využíván 2x nanášecí pufr (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 1% bromfenolová modř).

---

## ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE PROTEINŮ

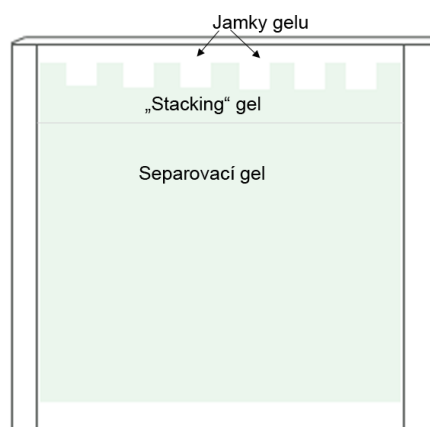
Pro separaci proteinů je využívána PAGE elektroforéza, tj. elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.

**Polyakrylamidové gely.** Polyakrylamid (poly(2-propenamid)) je polymer tvořený z akrylamidových podjednotek zesíťovaných N,N'-methylenbisakrylamidem (zkráceně bisakrylamidem). Směs akrylamidu a bisakrylamidu polymerizuje při pokojové teplotě pomocí volných radikálů, které dodává persulfát amonný (APS) způsobující homolytické štěpení vazeb O-O. K urychlení polymerizace se používá volná zásada TEMED (tetrametylendiamin), který katalyzuje tvorbu volných radikálů persulfátu amonného. Při práci s akrylamidem je třeba obezřetnosti, protože působí jako neurotoxin.

Při přípravě polyakrylamidového gelu lze výběrem vhodné koncentrace akrylamidu a bisakrylamidu ovlivňovat velikost pórů gelu a tím optimální separaci proteinů o určité velikosti. Se zvyšující se koncentrací těchto látek se póry gelu stávají menšími a gel se hodí pro separaci menších molekul, viz. tabulka. Gely mohou být zakoupeny komerčně nebo se mohou připravit v laboratoři.

Velikost proteinu (kDa)	Koncentrace gelu (%)
4-40	20
12-45	15
10-70	12.5
15-100	10
25-200	8

**„Stacking“ a separovací gel.** Při přípravě gelu pro separaci proteinů se velmi často využívá kombinace dvou gelů. Gel je tvořen horním úsekem (blíže ke startu migrace) tzv. „stacking“ gelem o nízké koncentraci akrylamidu a nízkém pH (6,8), v úseku dále od startu je tzv. separovací gel o vyšším pH (8,8) a vyšší koncentraci akrylamidu. „Stacking„ gel svou nízkou koncentrací umožní vysokomolekulárním molekulám snadnější „rozjezd“ a tím jim zabrání, aby svou velikostíablokovaly póry gelu a znesnadnily tak vstupu a rozjezdu nízkomolekulárních molekul.



**SDS-PAGE.** Pokud separujeme proteiny v denaturované formě (nejčastěji), využíváme

techniku tzv. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), tj. připravujeme gel přidavkem SDS. Působením SDS dochází jednak k denaturaci proteinů a také proteiny získávají negativní náboj, tím, že se navazují na anionty SDS. Díky tomu se pohybují od kladného pólu k zápornému a rychlost jejich migrace závisí na jejich molekulové hmotnosti. Pomocí SDS-PAGE jsou tedy proteiny separovány na základě jejich molekulové hmotnosti.

**Nativní-PAGE.** Pokud separujeme proteiny v jejich nativní formě (méně často), využíváme techniku tzv. Nativní-PAGE (gel připravujeme bez SDS). Při Nativní PAGE jsou proteiny separovány na základě svého celkového náboje a své hydrodynamické velikosti. Náboje proteinu závisí na skladbě aminokyselin (poměrem kyselých a zásaditých aminokyselin) a také post-translačních modifikací. Většina proteinů má izoelektrický bod v oblasti kyselé či mírně zásadité a migruje směrem k zápornému pólu.

**I** Akrylamid je neurotoxin. Práce s ním vyžaduje obezřetnost.

---

## NANÁŠENÍ VZORKŮ

Množství vzorků, které se nanáší na jednu jamku (mini-gelu) by mělo obsahovat 20-40 µg celkových proteinů. Pro snadnější nanášení se vzorky nanáší speciálními, dlouhými a tenkými špičkami.

---

## ELEKTROFORETICKÝ PUFR

Jako elektroforetický pufr se standardně využívá 1X Tris-glycin-SDS pufr (25 mM Tris base 190 mM glycin, 0.1% SDS, pH 8.3) při SDS-PAGE a 1X Tris-glycin pufr (25 mM Tris, 190 mM glycine) při Nativní-PAGE.

---

## PROTEINOVÝ MARKER A NANÁŠECÍ KONTROLY

**Proteinový marker.** Do jedné z jamek je rovněž třeba nanést proteinový marker, což je komerčně dostupná směs proteinů o známé velikosti. Proteinový marker nám slouží pro vyhodnocení velikosti signálů v testovaných vzorcích.

**Nanášecí kontroly.** V případech, kdy protein potřebujeme kvantifikovat, je doporučováno využití také protilátky proti strukturálnímu proteinu (jako je GAPDH, aktin nebo tubulin). Expres strukturálních proteinů by měla být u všech testovaných vzorků stejná, tzn.,

intenzita výsledného signálu pro tyto proteiny by po imunodetekci měla být také stejná. Pokud byly jednotlivé vzorky naneseny v rozdílném množství, nebo by došlo k nerovnoměrnému přenosu z gelu na membránu, můžeme za použití strukturálních proteinů provést normalizaci.

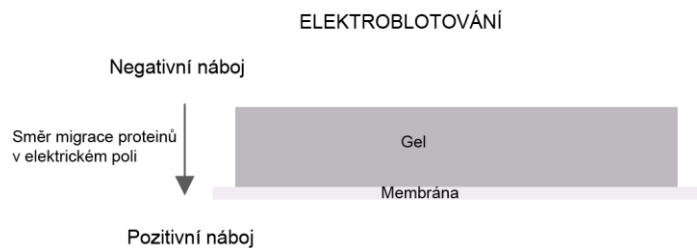
---

## ELEKTROFORETICKÝ PŘENOS A PŘENOS VZORKŮ Z GELU NA MEMBRÁNU

Při elektroforéze dbáme podmínek stanovené výrobcem elektroforetické aparatury.

Pro přenos proteinů z gelu na membránu se v současné době nejvíce využívá elektroforetického transferu,

tzv. elektroblotu, tj. působení elektrického proudu. Jako membrány jsou využívány nitrocelulosové nebo častěji polyvinylové (PVDF). Při přenosu dbáme podmínek stanovené výrobcem aparatury.



---

## ZVIDITELNĚNÍ CELKOVÝCH PROTEINŮ

Vizualizace celkových proteinů lze dosáhnout několika způsoby. Jedním z nich je barvení proteinů pomocí **Coomassie blue** (0.25% Coomassie Brilliant Blue R-250 v 10% kyselině octové / 50% metanolu). Pomocí Coomassie blue barvíme proteiny přímo v gelu po jejich elektroforetické separaci. Citlivost barvení pomocí Coomassie blue není nijak velká, detekční limit je 0,3 – 1 ug proteinu v proužku. Barvení pomocí Coomassie blue ukazuje úspěšnost separace a stejně tak abundanci celkových proteinů v jednotlivých vzorcích. Coomassie blue zůstává navázaná na proteinech.

Druhým častým způsobem je barvení pomocí **Ponceau S** neboli **Ponceau S red** (0.1% (w/v) Ponceau S v 5% kyselině octové). Barvení pomocí Ponceau S je po transferu proteinů na membránu. Barvíme tedy proteiny na membráně. Barvení pomocí Ponceau S je reverzibilní a je odstraněno při promývacích krocích. Vizualizací celkových proteinů pomocí Ponceau S jednak vyhodnotíme účinnost transferu a jednak podobně jak s Coomassie blue získáme informaci o celkovém množství nanesených proteinů v jednotlivých vzorcích a poloze

proužků proteinového markerů. Citlivost barvení s Ponceau S je asi 2x silnější než s Coomassie blue.

---

### **BLOKOVÁNÍ NESPECIFICKÉHO VÁZÁNÍ PROTILÁTEK NA MEMBRÁNU**

Membrány, které jsou využívány pro Western blot mají obvykle vysokou afinitu k proteinům, tedy i k protilátkám. Proto je třeba zajistit to, aby se protilátky při inkubaci s membránou navazovaly specificky ke svým antigenům na vzorcích a ne celkově k povrchu membrány. Provádí se proto tzv. blokování membrány v blokovacích roztocích, které zaplní volná místa na membráně a protilátka se váže pouze na svůj specifický antigen. Existuje široká škála blokovacích roztoků, od těch, které obsahují sušené odtučněné mléko či BSA (boviní sérum albumin) k těm s vysoce purifikovanými proteiny. Účinnost blokování může záviset na použité protilátce, tzn. v některých případech je třeba účinnost vhodnost blokovacího roztoku zjistit empiricky. Nejčastěji jsou ovšem použitelné blokovací roztoky 5% sušeného mléka či 5% BSA. Obecně ovšem platí, že sušené mléko není vhodné při detekci fosforylovaných proteinů.

Blokování membrány v blokovacím roztoku probíhá obvykle 1 hod. při 4°C za konstantního, lehkého protřepávání.

---

### **PROMÝVACÍ ROZTOKY**

V průběhu procedury je membrána s navázanými proteiny nebo po inkubaci s protilátkami promývaná v promývacích roztocích. Promývání membrány zajistí odstranění či snížení pozadí, které je způsobené nespecifickým navázáním protilátek a zajistí tak čistotu signálu. Nedostatečné promývání má za následek zvýšení nechtěného pozadí, naopak příliš intenzivní promývání vede ke ztrátě citlivosti detekce.

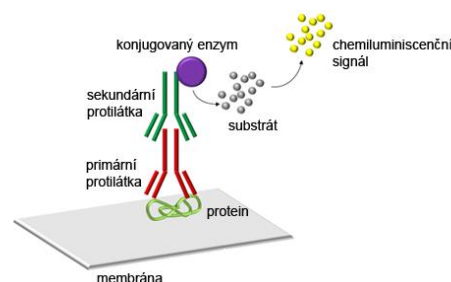
Jako promývací roztoky jsou nejčastěji využívány TBS (Tris buffered saline) nebo PBS (phosphate buffered saline) s přidavkem detergentů (pro snížení nespecifického pozadí) jako nejčastěji 0,05% Tween 20. Koncentrace detergentu může být ovšem různá v závislosti na individuálním experimentu, a může se pohybovat od 0,05 % do 0,5%. Typicky, promývací roztoky obsahují i blokovací roztok (v ředění 1:10). Zahrnutí blokovacího roztoku do promývacího roztoku vede k zabránění vyvazování blokovacího proteinu z membrány do promývacího roztoku, což opět vede k minimalizaci nespecifického pozadí.



Co se týče přípravy promývacích roztoků s detergenty a zvláště s těmi obsahujícími blokovací roztok, je doporučována příprava vždy čerstvých roztoků před samotnými experimenty. Skladování těchto roztoků narůstá nebezpečí vzniku mikrobiální kontaminace, která může výrazným způsobem přispět k nespecifickému pozadí.

## PROTILÁTKY

Příslušný protein navázaný na membráně je detekován pomocí primární protilátky. Výběr primární protilátky je vázán příslušným antigenem a komerční dostupností dané protilátky. Protože primární protilátky nelze obvykle přímo vizualizovat,



je třeba pro vizualizaci použít značenou sekundární protilátku, která rozpoznává primární protilátku a váže se na ni. Sekundární protilátka je označena nějakou značkou (např. biotinem) nebo konjugována s nějakým reportérovým enzymem umožňující vizualizaci - např. s peroxidázou (HRP, z angl. horseradish peroxidase) či alkalickou fosfatázou (AP, z angl. alkaline phosphatase). Komerčně je dostupná celá škála sekundárních protilátek, nicméně při výběru sekundární protilátky musíme respektovat hostitelský organismus, ve kterém byla připravena primární protilátka. Takže např. pokud je primární protilátka připravena v myši, sekundární protilátka musí být proti myši (anti-mouse) a získaná v jiném hostitelském organismu než je myš.

## Inkubace s primární protilátkou

Primární protilátky jsou pro experimenty ředěny, a to nejčastěji v rozsahu 1/100 – 1/500 000 ze zásobního roztoku 1mg/ml. Optimální ředění pro daný experiment je nutné zjistit empiricky. Inkubace s primární protilátkou je obvykle v blokovacím roztoku, méně častěji v PBS nebo TBS s přísadkou 0,1% Tween 20 (roztoky PBST a TBST), případně v PBST nebo TBST s nízkou koncentrací sušeného mléka nebo BSA (0,5-0,25%). Vhodnost použití blokovacího roztoku nebo PBST či TBST je vhodné otestovat pro danou protilátku. Je třeba si uvědomit, že přítomnost blokovacího agens jednak vede ke snížení nespecifického pozadí, ale na druhou stranu snižuje i specifický signál.

Inkubační čas je závislý na vazebné schopnosti protilátky k proteinu a také množství proteinu. Obvykle se inkubační doba s primární protilátkou pohybuje od několika málo hodin

až do 18 hodin. Inkubace probíhá obvykle při 4°C za konstantního lehkého protřepávání. Při déle trvající inkubaci je teplota 4°C podmínkou pro zamezení mikrobiální kontaminace a tím degradace proteinů.

### **Inkubace se sekundární protilátkou**

Sekundární protilátka je obvykle naředěna v promývacím roztoku (ředění sekundární protilátky v blokovacím roztoku sice snižuje nespecifické pozadí, ale také snižuje intenzitu specifického signálu). Vhodné ředění je obvykle udáno v manuálu od výrobce a obvykle se pohybuje v rozsahu od 1:1000 – 1:20 000. Inkubační doba je 1-2 hodiny při 4°C za konstantního promíchávání. Pro optimální výsledek je obvykle zjistit vhodné ředění empiricky. Příliš velké ředění vede k nízkému signálu, příliš nízké ředění vede k velkému nespecifickému pozadí.

---

### **DETEKČNÍ SYSTÉMY**

V minulosti se pro detekci hojně využívaly radioizotopy, nicméně v současné době již využívány nejsou a detekce je založena nejčastěji na enzymatických reakcích a také fluorescenci. Pro enzymatickou detekci je nejčastěji využíván systém na základě alkalické fosfatázy (alkaline phosphatase, AP) nebo křenové peroxidázy (horseradish peroxidase, HRP). Hojně je využíván chemiluminiscenční systém, kdy enzym reaguje s dodaným chemiluminiscenčním substrátem a přeměňuje jej na nestabilní produkt, který se stabilizuje vyzářením kvanta světla a vzniká tak chemiluminiscenční signál. Množství signálu je poté úměrné množství navázaného enzymu, které je přímo úměrné množství detekovaného proteinu. Uvolňované světlo je pak detekováno použitím CCD-kamerou. Obdobně je využívána kolorimetrická reakce.