

## WESTERN BLOT

### 1. PŘÍPRAVA ELEKTROFORETICKÉ APARATURY

- Saponátem a vodou se důkladně umyjí skla, plastové vložky a hřebínek, poté se důkladně opláchnou deionizovanou/destilovanou vodou a etanolem a nechají se uschnout.

**I** Se skly se manipuluje jen v rukavicích, přičemž se skla drží za jejich okraje. Skla nesmí být jakkoliv znečištěna, aby bylo zabráněno tvorbě bublin při nalévání gelu.

- Skla se sestaví k sobě, vloží boční vložky, okraje skel se mohou olepit izolepou pro ujištění, že nedojte k vytečení roztoku gelu. Skla se zajistí svorkami a vloží se vertikálně do připravené aparatury.

### 2. PŘÍPRAVA GELU

- Dle velikosti separovaných molekul připravíme separovací gel s vhodnou koncentrací. Jednotlivé komponenty přidáváme v uvedeném pořadí, viz. tabulka. Po přidavku TEMEDu, roztok ihned rychle promícháme a vlijeme mezi připravená skla. Horní okraj gelu by měl být 1 cm od spodního okraje hřebínku. Gel převrstvíme vrstvou vody nebo isopropanolu a necháme polymerizovat ve vertikální poloze asi 30 min.

**!** Přídavkem TEMEDu akrylamid začíná rychle polymerizovat.

**?** Převrstvení gelu brání difúzi kyslíku do gelu. Kyslík by v horní části gelu potlačoval polymerizaci.

Koncentrace gelu (%)	6	8	10	12	15
Rozsah velikostí (kD)	50-200	30-95	20-80	12-60	10-43

# PROTOKOL

Separovací gel (20 ml). Připravujte v uvedeném pořadí.

30 % směs akrylamidu	Koncentrace gelu	6 %	8 %	10 %	12 %	15 %
	H <sub>2</sub> O	10.6 ml	9.3 ml	7.9 ml	6.6 ml	4.6 ml
30 % směs akrylamidu	4 ml	5.3 ml	6.7 ml	8 ml	10 ml	
Tris (1.5 M, pH 8.8)	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	
10 % SDS* <i>pouze pro SDS-PAGE !</i>	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	
10 % APS*	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	
TEMED**	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	
40 % směs akrylamidu	Koncentrace gelu	6 %	8 %	10 %	12 %	15 %
	H <sub>2</sub> O	11.6 ml	10.6 ml	9.6 ml	8.6 ml	7.1 ml
40 % směs akrylamidu	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	7.5 ml	
Tris (1.5 M, pH 8.8)	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	
10 % SDS* <i>pouze pro SDS-PAGE !</i>	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	
10 % APS*	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	
TEMED**	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	

\* před přidáním komponenty roztok řádně promíchejte.

\*\* řádně promíchejte a ihned vlijte mezi připravená skla a převrstejte izopropanolem

- Z připraveného gelu odstraníme vrstvu izopropanolu či vody. Z povrchu gelu odstraníme nezpolymerizovaný akrylamid několikerým propláchnutím vodou. Vodu odstraníme a povrch gelu dokonale vysušíme vložení filtračního papíru.
- Připravíme „stacking“ gel (viz. tabulka). Jednotlivé komponenty přidáváme v uvedeném pořadí. Po přidání TEMEDu, roztok rychle zamícháme a vlijeme mezi skla k připravenému separačnímu gelu. Vložíme hřebínek (dbáme na to, abychom do gelu nevtačili bubliny) a necháme polymerovat cca 30 min.

„Stacking“ gel (typicky 5%). Připravujte v uvedeném pořadí.

30 % směs akrylamidu	Objem gelu	1 ml	3 ml	5 ml	8 ml	10 ml
	H <sub>2</sub> O (ml)	0.68 ml	2.1 ml	3.4 ml	5.5 ml	6.8 ml
30 % směs akrylamidu	0.17 ml	0.5 ml	0.83 ml	1.3 ml	1.7 ml	
Tris (1.0 M, pH 6.8)	0.13 ml	0.38 ml	0.63 ml	1 ml	1.25 ml	
SDS (10 % roztok) * <i>pouze pro SDS-PAGE !</i>	10 µl	30 µl	50 µl	80 µl	100 µl	
APS (10 %) *	10 µl	30 µl	50 µl	80 µl	100 µl	
TEMED**	1 µl	3 µl	5 µl	8 µl	10 µl	
40 % směs akrylamidu	Gel volume	1 ml	3 ml	5 ml	8 ml	10 ml
	H <sub>2</sub> O	0.725 ml	2.185 ml	3.645 ml	5.84 ml	6.3 ml
40 % směs akrylamidu	0.125 ml	0.375 ml	0.625 ml	1 ml	1.25 ml	
Tris (1.0 M, pH 6.8)	0.13 ml	0.38 ml	0.63 ml	1 ml	1.25 ml	
SDS (10 %) * <i>pouze pro SDS-PAGE !</i>	10 µl	30 µl	50 µl	80 µl	100 µl	
APS (10 %) *	10 µl	30 µl	50 µl	80 µl	100 µl	
TEMED **	1 µl	3 µl	5 µl	8 µl	10 µl	

\*\* před přidáním komponenty roztok řádně promíchejte.

\*\* řádně promíchejte a ihned vlijte mezi připravená skla a vložte hřebínek.

## 3. PŘÍPRAVA VZORKU

Testovaný vzorek i proteinový marker smícháme s nanášecím pufrem tak, aby celkový objem vzorku byl 10-15 µl. Testovaný vzorek by měl obsahovat 20-40 µg celkových proteinů na jamku.

- Pokud provádíme SDS-PAGE, tj. proteiny denaturujeme, smícháme vzorky i marker v poměru 1:1 s 2X Laemmliho pufrem (4% SDS, 10% 2-merkaptoetanol, 20% glycerol, 0.02% bromfenolová modř, 120mM Tris-HCl, pH 6,8). Vzorky i marker zahřejeme na 100°C po dobu 3 min.

## PROTOKOL

Pokud testované proteiny jsou extrémně hydrofobní, např. proteiny obsahující mnohonásobné transmembránové domény, mohou při zahřívání precipitovat. Aby se této precipitaci zamezilo, je doporučeno denuraci provádět při teplotě 45-50°C po dobu 1 hod.

- Pokud provádíme Nativní-PAGE smícháme vzorky v poměru 1:1 s 2X nanášecím pufrům (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 0,02% Bromfenolové modře).

---

### NANESENÍ VZORKU NA GEL A ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE

- Z gelu odstraníme hřebínek. Z jamek důkladně odmyjeme veškerý nezpolymerizovaný akrylamid, a to buď proudem vody pomocí kádinky, nebo promýváním pipetou v jednotlivých jamkách.

? Nepropláchnutí jamek způsobí nerovnou separaci proteinů v dané jamce a tím křivé výsledné proužky po imunodetekci.

- Připravený gel vložíme do elektroforetické aparatury. Do horního a spodního zásobníku nalijeme elektroforetický pufr:

SDS-PAGE: 1X Tris-glycin-SDS pufr (25 mM Tris base 190 mM glycin, 0.1% SDS, pH 8.3)

Nativní-PAGE: 1X Tris-glycin pufr (25 mM Tris, 190 mM glycine)

- Připojíme elektroforetickou aparaturu ke zdroji napětí tak, že záporný pól je nahoře a kladný dole. Aplikujeme napětí o 8 V/cm mezi elektrodami. Ve chvíli, kdy vzorky (bromfenolová modř) postoupí z „stacking“ pufru do separačního, zvýšíme napětí na 15 V/cm.

- Elektroforézu ukončíme ve chvíli, kdy se bromfenolová modř dostane ke spodnímu okraji gelu. Rozebereme elektroforetickou aparaturu, rozebereme skla s gelem a gel překlopíme na filtrační papír. Pro pozdější orientaci gelu, jeden roh gelu odstříhneme.

## PROTOKOL

### BARVENÍ POMOCÍ COOMASSIE BLUE

- Nejprve inkubujeme gel ve fixačním roztoku (50% metanol, 10% ledová kyselina octová) po dobu 1 hodiny až přes noc, za mírného protřepávání. Po první hodině vyměníme fixační roztok za čerstvý.
  - Gel barvíme v barvicím roztoku (0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250), 50% metanol, 10% ledová kyselina octová), za mírného protřepávání. Barvíme tak dlouho, až gel získá barvu barvicího roztoku.
  - Gel inkubujeme v odbarvovacím roztoku (40% metanol, 10% ledová kyselina octová) tak dlouho, dokud není pozadí na gelu plně odbarveno a proužky nejsou jasně viditelné.
  - Gel můžeme uchovat ve skladovacím roztoku (5% ledová kyselina octová)
- 

### PŘENOS NA MEMBRÁNU

- Připravíme 1X elektrotransfer pufr (100 ml 10x Electrotransfer Buffer, 200 ml metanol, 700 dH<sub>2</sub>O)  
10x Electrotransfer Buffer (30.3 g Tris Base, 144 g Glycin, doplnit do 1 l)
  - Připravíme přenosovou aparaturu dle instrukcí výrobce.
  - Připravíme PVDF membránu: membránu namočíme do 100% methanolu na 20 sec, poté vložíme do dH<sub>2</sub>O na 2 min a poté do 1x Transfer pufru na 5 min.
  - Provedeme transfer, obvykle při 35-40 V přes noc. Přenosovou aparaturu chladíme, např. pomocí chladicího gelu či ji provádíme v chladné místnosti.
- 

### BARVENÍ POMOCÍ PONCEAU-S

- Membránu ponoříme do roztoku Ponceau-S (0,1% Ponceau S, 1% kyselina octová) a necháme barvit po dobu 5 min.
  - Membránu odbarvíme použitím odbarvovacího roztoku (1% kyselina octová po dobu 5 min, poté odbarvíme použitím kyselé dH<sub>2</sub>O, tak aby se odbarvilo pozadí a vyjevily se proužky proteinů.
-

## PROTOKOL

### **BLOKOVÁNÍ MEMBRÁNY A INKUBACE S PRIMÁRNÍ PROTILÁTKOU**

- Membránu inkubujeme 1-3 hodiny v 1x PBS, 5% sušeného, odtučněného mléka, 0.05%

**!** Tween 20.

**TIP** Membrána nesmí uschnout!!!

Membránu lze s blokovacím roztokem a následně i s protilátkou inkubovat v plastovém sáčku se zavařenými či zalepenými okraji.

- Promyjeme 3 x 5 min v 1x PBS, 0.05% Tween 20.
- Inkubujeme s primární protilátkou (ředění 1 : 1000 v 1x PBS, 5% milk,+ 0.05% Tween 20. Inkubujeme 1 hodinu při 4 °C).

---

### **PROMYTÍ MEMBRÁNY A INKUBACE SE SEKUNDÁRNÍ PROTILÁTKOU**

- Promyjeme 3 x 5 min v 1x PBS + 0.05% Tween 20 za pokojové teploty
- Inkubujeme v 1x PBS + 10% milk + 0.05% Tween 20 po dobu 10 min.
- Inkubujeme se sekundární protilátkou (ředění 1 : 5000), po dobu 30 min za pokojové teploty v 1x PBS, 5% sušeného netučného mléka, 0.05% Tween 20).
- Promyjeme 3 x 5 min v 1x PBS + 0.05% Tween 20 za pokojové teploty.

---

### **PROMYTÍ MEMBRÁNY A INKUBACE SE SEKUNDÁRNÍ PROTILÁTKOU**

Detekujeme sekundární protilátku s použitím příslušného systému.