

Western blotting

1. Příprava gelu

- složení aparatury
- hustotu gelu volit podle velikosti proteinů
- příprava **rozdělovacího gelu**:

	10%			12%		
počet gelů	1	2	4	1	2	4
objem	6 ml	12 ml	24 ml	6 ml	12 ml	24 ml
40% akrylamid	1,5 ml	3 ml	6 ml	1,8 ml	3,6 ml	7,2 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,6)	1,5 ml	3 ml	6 ml	1,5 ml	3 ml	6 ml
H₂O	2,94 ml	5,88 ml	10,6 ml	2,64 ml	5,28 ml	10,56 ml
10% SDS	60 μl	120 μl	240 μl	60 μl	120 μl	140 μl
10% APS	20,28 μl	40,56 μl	81,12 μl	20,28 μl	40,56 μl	81,12 μl
TEMED	5,25 μl	10,5 μl	21 μl	5,25 μl	10,5 μl	21 μl

- nanést asi 4,5 ml + zalít 350 μl isopropanolu
- nechat zatuhnout, vylít isopropanol, vysušit
- příprava „**stacking**“ gelu:

	1	2	4
počet gelů	1	2	4
objem	2 ml	4 ml	8 ml
40% akrylamid	189 μl	378 μl	756 μl
2 M Tris-HCl (pH 6,8)	124 μl	248 μl	496 μl
H₂O	1,64 ml	3,28 ml	6,56 ml
10% SDS	20 μl	40 μl	80 μl
10% APS	17 μl	34 μl	68 μl
TEMED	2 μl	4 μl	8 μl

- nanést do plna (≈ 1,5 ml), vložit hřebínek

2. Příprava vzorků

Princip: obarvení (bromfenolová modř), zahuštění (glycerol) a denaturace vzorku (SDS, teplota).

- vzorky smíchat s loadovací barvou (5× SDS Loading Buffer)
- do předehřátého bloku: 70 °C/5 min.

3. Elektroforéza – SDS-PAGE

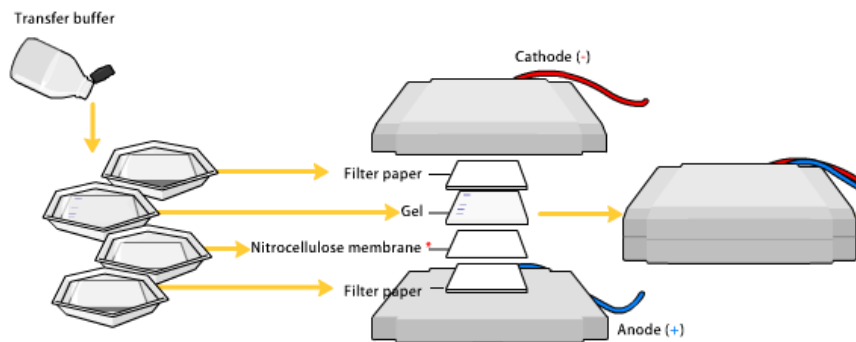
Princip: dělení proteinů dle molekulové hmotnosti v elektrickém poli v polyakrylamidovém gelu s přidavkem SDS.

- složit aparaturu a zalít 1× Running bufferem
- nanést ladder (4 μl)
- vzorky – množství vzorku závisí na koncentraci proteinu, do jamky max. 50 μl
- spustit elektroforézu: 180V/ ≈ 70 min (podle hustoty gelu a velikosti proteinů)
- po skončení elektroforézy: vylít pufr a skla opláchnout vodou

4. Semi-dry transfer

Princip: přenos proteinů na membránu.

- **PVDF membrána** – aktivovat v methanolu × **nitrocelulózová membrána** – bez aktivace
- předvlhčit v 1× Transfer bufferu: membránu, 2 filtrační papíry, 1 tenký filtrační papír
- Transfer buffer - recyklovat
- ořezání gelu na velikost membrány, přenos tenkým filtr. papírem
- složit sandwich, vytlačit bubliny, navlhčit Transfer bufferem



- volba programu – dle počtu gelů a velikosti transferovaných proteinů

5. Příprava membrány

Princip: obarvení membrány k vizualizaci proteinů, zablokování nespecifických vazebných míst membrány.

- připravit si blokovací roztok (5% BSA v 1× TBST nebo 5% mléko v TBST)
- promýt membránu v 1× TBST

- obarvit membránu v roztoku Ponceau S (barvu recyklovat)
- promýt/odbarvit membránu v 1× TBST
- ořezat membránu a popsát
- blokovat membránu v blokovacím roztoku min. 30 minut při laboratorní teplotě na kývačce

6. Vazba protilátek

Princip: vazba primární protilátky na cílový protein, vazba sekundární značené protilátky na primární protilátku.

- příprava primární protilátky – naředit dle doporučení výrobce do blokovacího roztoku (10 ml)
- membránu stočit do zkumavky s roztokem protilátky
- inkubace přes noc při 4 °C
- primární protilátku recyklovat! uchovat při –20 °C
- promytí v 1× TBST (3 min./5 min./5 min.)
- příprava sekundární protilátky: GAM = goat anti mouse, GAR = goat anti rabbit, naředit 1:2000 do blokovacího roztoku (10ml)
- na rotátor na 1 hod. při laboratorní teplotě
- promytí 3 × 10 min. v 1× TBST

7. Detekce

Princip: sekundární protilátka v konjugaci s enzymem umožňujícím vizualizaci (HRP);

kolorimetrická detekce: reakce s chromogenním substrátem – přeměna rozpustného bezbarvého substrátu na nerozpustný barevný; **chemiluminiscenční detekce:** reakce s chemiluminiscenčním substrátem – vzniká nestabilní produkt, který se stabilizuje vyzářením světelného kvanta – detekce použitím CCD kamer; denzitometrické stanovení množství proteinu.

- kolorimetrická: příprava detekčního roztoku dle návodu výrobce (9 ml H₂O + 1 ml diluent + 0,2 ml substrate) → na kývačce – sledovat zbarvení → zastavit reakci opláchnutím ve vodě → vyfotit membrány
- chemiluminiscenční (ECL): příprava detekčního roztoku dle návodu výrobce (1 ml + 1 ml) → roztokem několikrát opláchnout membrány → membrány do folie i s roztokem → ke snímání signálu použít přístroj SYNGENE PXi4
- použít program pro denzitometrickou analýzu

Složení pufků

5× SDS Loading Sample Buffer		
		finální koncentrace
2M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml	0,25 M
SDS	1 g	10%
glycerol	3 ml	30%
β-merkptoethanol	0,5 ml	5%
0,5% bromfenolová modř	0,8 ml	0,04%
voda	ad 10 ml	

10× Running buffer (1 L) (Tris-glycine SDS electrophoresis buffer)			
		finální koncentrace (10×)	finální koncentrace (1×)
Tris base	30,3 g	250 mM	25 mM
glycin	144,1 g	1,92 M	192 mM
SDS	10 g	1% (w/v)	0,1% (w/v)
voda	ad 1 L		
1× Running buffer (1L)	100 ml 10× buffer + 900 ml vody		

10× Transfer buffer (1 L)			
		finální koncentrace (10×)	finální koncentrace (1×)
Tris base	58,2 g	480 mM	48 mM
glycin	29,3 g	390 mM	39 mM
voda	ad 1 L		
1× Transfer buffer (1L)	100 ml 10× buffer + 200 ml Met-OH + 700 ml vody		

