

Western Blotting

Příprava blotovacího sendviče	1
Blotování	2
Kontrola přenesení proteinů na membránu	2
Blokování membrány	2
Aplikace protilátek	2
Vizualizace	3
Vyvolání filmu	4
Chemikálie a roztoky	5
Poznámky	7

Upozornění! – Během práce používat nitrilové ochranné rukavice.

Příprava blotovacího sendviče

S filtračními papíry a membránou je nutno manipulovat pinzetou s tupým koncem.

- 1) Připravit 6 ks tlustých filtračních papírů (280 g/m²) nebo 2 ks blotovacích papírů, blotovací membránu, 3 nádoby na pufrý a blotovací přístroj. Filtrační papíry a membrána musí mít stejné rozměry jako gel.
- 2) Gel a membránu namočit zvlášť alespoň na 15 minut do blotovacího pufru.
- 3) První 3 filtrační papíry nebo 1 blotovací papír namočit do blotovacího pufru, poté je postupně naskládat na sebe do blotovací kazety. Každou vrstvu přejet válečkem.
- 4) Opatrně přenést blotovací membránu z blotovacího pufru do blotovací kazety tak, aby pod membránou nebyly vzduchové bubliny. Nesahat na povrch membrány. Nepoužívat váleček.
- 5) Pomocí zeleného nástroje přenést gel na blotovací membránu. Opatrně jej přejet válečkem.
- 6) Poslední 3 filtrační papíry nebo 1 blotovací papír namočit do blotovacího pufru a naskládat je do blotovací kazety na gel. Každou vrstvu přejet válečkem.
- 7) Přebytky blotovacího pufru v kazetě opatrně odsát buničinou.
- 8) Přiklopit sendvič v kazetě víkem a zajistit. Vložit kazetu do blotovacího přístroje.

Blotování

- 1) Vybrat „List“ – „Bio-Rad“ – „1 mini gel“ pro jeden gel v kazetě nebo „1 midi/2 mini gels“ pro dva gely v jedné kazetě – „Standard SD“.
- 2) Vybrat „Run“ a poté „A:Run“, případně „B:Run“ dle pozice kazety.
- 3) Po ukončení blotování otevřít kazetu a pinzetou přenést membránu do nádoby tak, aby strana membrány, která se dotýkala gelu, byla nahoře. **Membrána se nesmí nechat vyschnout!**
- 4) Molekulový marker na membráně označit tužkou nebo propiskou (fix se vymyje).

Kontrola přenesení proteinů na membránu

- 1) Do nádoby s membránou přidat roztok 0.1% Ponceau S (viz chemikálie a roztoky) a barvit do objevení proužků (cca 1 min).
- 2) Barvicí roztok slít zpět do zásobní lahve, membránu odbarvit 10% kyselinou octovou.
- 3) Opláchnout TBS-T.

Blokování membrány

- 1) Slít TBS-T a přidat blokovací pufr. Na orbitální třepačce třepat na cca 80 rpm po dobu 90 minut.

Aplikace protilátek

- 1) Blokovací pufr vrátit zpět do zásobní lahve a membránu 2× promýt TBS-T.
- 2) Přidat roztok primární protilátky (koncentrace je různá pro každou protilátku) a nechat přes noc na orbitální třepačce (80 rpm) v chladící místnosti.
- 3) Protilátku vrátit zpět do zásobní zkušavky, lze ji použít až 5×, a uchovávat v mrazáku na -20°C.
- 4) Opláchnout membránu 3× TBS-T a poté 3× 10 minut TBS-T na orbitální třepačce.
- 5) Přidat roztok sekundární protilátky (koncentrace je různá pro každou protilátku) a nechat 90 minut na orbitální třepačce při laboratorní teplotě.
- 6) Protilátku vrátit zpět do zásobní zkušavky, lze ji použít až 5×, a uchovávat v mrazáku na -20°C.
- 7) Opláchnout membránu 3× TBS-T a poté 3× 10 minut TBS-T na orbitální třepačce. Membránu nechat v TBS-T.

Vizualizace

Krabici s fotofilmem otevřít pouze v temné komoře, jinak by došlo k jeho zničení.

- 1) Připravit ták: nádobku s membránou, nitrilové rukavice, pracovní karton potažený folií, pinzetu s tupým koncem, papírový ručník, detekční systém, mikroskopavku nebo malou kádinku dle množství detekčního systému, pipetu se 2 špičkami, stopky, folii na membránu, osvitovou kazetu, nůžky, fotofilm, 2 prázdné nádobky na vývojku a ustalovač, 2 nádobky s ultračistou vodou, vývojka, ustalovač.
- 2) Zkontrolovat stav vývojky a ustalovače – nesmí být výrazně žluté.

Následující část probíhá v temné komoře při bezpečném světle (safe light).

- 3) Namíchat detekční systém – roztok A a roztok B v poměru 1:1. Celkový objem v ml vypočítat dle rovnice: šířka membrány × výška membrány × 0.05. Pro každý roztok použít čistou špičku! Promíchá se pipetou.
- 4) Membránu rohem okapat na papírový ručník a přenést na pracovní karton.
- 5) Celý objem detekčního systému nanést kapáním na membránu. Nechat inkubovat nejméně 5 minut.
- 6) Během inkubace připravit fotofilm. S filmem manipulovat pouze v suchých rukavicích v temné místnosti. Opatrně vyklepnout jeden list z krabice. Ustříhnout potřebnou část fotofilmu, ustříhnout jeden roh pro označení a zavřít jej do osvitové kazety. Zbytek fotofilmu vrátit do krabice a důkladně uzavřít.

Při zhasnutém bezpečném světle lze zjistit intenzitu svitu detekčního systému na membráně.

- 7) Inkubovanou membránu nechat rohem okapat na papírový ručník a vložit ji do folie tak, aby mezi membránou a folií nezůstaly vzduchové bubliny. Folii s membránou vložit do osvitové kazety, na ni položit fotofilm (již s ním nehýbat) a osvitovou kazetu zavřít.
- 8) Fotofilm exponovat po potřebnou dobu. Liší se dle intenzity svitu detekčního systému od 1 do 10 minut.

Vyvolání filmu

- 1) Do prázdných nádobek již během expozice fotofilmu přelít vývojku a ustalovač.
- 2) Osvícený film přenést do vývojky a klepat do objevení proužků. Poté jej pinzetou přenést do nádoby s ultračistou vodou.
- 3) Opláchnutý fotofilm přenést do nádoby s ustalovačem a klepat do odbarvení pozadí. Poté opět opláchnout v ultračisté vodě.
- 4) Fotofilm nechat okapat a oschnout postavený na hranu na papírovém ručníku nebo za roh pověšený na šňůru.

Chemikálie a roztoky

10× zásobní TBS pufr

24 g Tris

88 g NaCl

Přidat 900 ml ultračisté vody, upravit pH na 7.6 pomocí HCl. Doplnit do 1000 ml ultračistou vodou. Uchovávat při laboratorní teplotě.

1× TBS-T pufr

100 ml 10× zásobního TBS pufru doplnit do 1000 ml ultračistou vodou.

Přidat 1.0 ml TWEEN 20. Uchovávat při laboratorní teplotě.

10% kyselina octová

10.1 ml kyseliny octové doplnit do 100 ml ultračistou vodou.

Blotovací pufr

25mM Tris 1.51 g

192mM glycin 7.21 g

20% methanol 100 ml

Doplnit ultračistou vodou do 500 ml. pH se neupravuje (cca 8.2). Uchovávat v lednici.

Barvicí roztok 0.1% Ponceau S

0.1 g Ponceau S rozpustit ve 100 ml ultračisté vody. Uchovávat při laboratorní teplotě.

5% Blokovací pufr

5 g blokovacího mléka nebo 5 g BSA (bovine serum albumin) rozpustit ve 100 ml TBS-T.

3% Blokovací pufr

3 g blokovacího mléka nebo 3 g BSA (bovine serum albumin) rozpustit ve 100 ml TBS-T.

Vývojka

6 ml Fomadonu LQN smíchat s 84 ml ultračisté vody.

Ustalovač

15 ml Fomafixu smíchat se 75 ml ultračisté vody.

Detekční systém (připraví se v čas potřeby)

Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent

Roztok A smíchat s roztokem B v poměru 1:1. Celkový objem vypočítat dle rovnice:

Množství v ml = šířka membrány × výška membrána × 0.05

Poznámky



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Publikace je spolufinancovaná Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky. Registrační číslo projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0235, název projektu: TEAB.