

Metoda: Western blot

Kateřina Urbánková, Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví, 2. ročník

Školitel: Mgr. Robin Klieber

Princip:

Western blot je kvantitativní nebo spíše semikvantitativní biochemická metoda pro zpracování proteinů, vyvinutý v roce 1979 Harrym Towbinem a jeho kolegy. Směs proteinů je nejprve nutné rozdělit pomocí gelové elektroforézy. Proteiny jsou separovány SDS-PAGE a následně přeneseny na nitrocelulózovou nebo polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu.

Barvení na membráně se provádí pomocí Ponceau S, Fast Green nebo Amidoperni10 B. Specifická detekce proteinů se provádí použitím primárních protilátek, vzniklý imunokomplex se vizualizuje vazbou značené sekundární protilátky nebo značeného proteinu A či G. Značení probíhá nejčastěji vazbou enzymu - např. alkalické fosfatázy a peroxidázy, ale i koloidním zlatem, radioaktivně, luminiscenčně či fluorescenčně. Detekce glykoproteinů se děje modifikovanou Schiffovou reakcí, alcianovou modří, vazbou lektinů. Některé enzymy lze prokázat běžnou reakční směsí, protože při blottingu často dochází k renaturaci již denaturovaných bílkovin.

Uplatnění metody:

Tato metoda je vhodná pro diagnostiku řady infekčních onemocnění díky své vysoké specificitě.

Úskalí metody:

Metoda může poskytnout falešně negativní výsledek vlivem velkých proteinů, které mohou obtížně procházet gelem při elektroforéze. Výsledky měření mohou být ovlivněny mnoha nepřesnostmi, způsobenými například přidáním různých chemických látek, použitím různých snímacích zařízení a v neposlední řadě i použitím jiného softwaru pro zpracování nasnímaného obrazu. Western blot je také omezen faktem, že se proteiny denaturují. Mezi další nevýhody této metody patří její časová náročnost a počet kroků, které je třeba udělat. Oproti dalším metodám spotřebuje velké množství vzorku a automatizace je složitější než v případě dalších metod. Je nutné mít primární protilátku, jinak je Western blot neuskutečnitelný.

Přístrojové vybavení:

mikropipeta, set na elektroforézu, laboratorní kývačka

Odběr a transport:

Western blot je možné provést za použití vzorků čištěného proteinu. Nejběžněji se však používají tkáňové nebo buněčné extrakty, které obsahují směs různých proteinů. V případě tkáňových nebo buněčných extraktů musí být buňky nejprve pečlivě rozrušeny nebo lyžovány, aby se uvolnily proteiny, aniž by došlo k degradaci nebo proteolýze. Vzorky bílkovin z buněčných extraktů, často savčích buněk pěstovaných v buněčné kultuře, se připravují relativně snadno. Příprava vzorku proteinu z tkáně může vyžadovat jinou strategii, protože tkáň je obtížnější narušit. Kromě toho typ přípravy vzorku závisí také na buněčné poloze proteinu (cytoplazmatický / rozpustný nebo vázaný na membránu).

Je však třeba poznamenat, že veškerá příprava vzorku, ať už z tkáně nebo buněk, musí být provedena co nejrychleji, při nízké teplotě – v ledu a za použití chlazeného zařízení a za použití nejmírnějšího možného pufro, aby se zabránilo poškození nebo degradaci bílkoviny ve vzorku.