

Профессор кафедры биохимии
и молекулярной биологии,
Д.м.н. Спирина Людмила
Викторовна



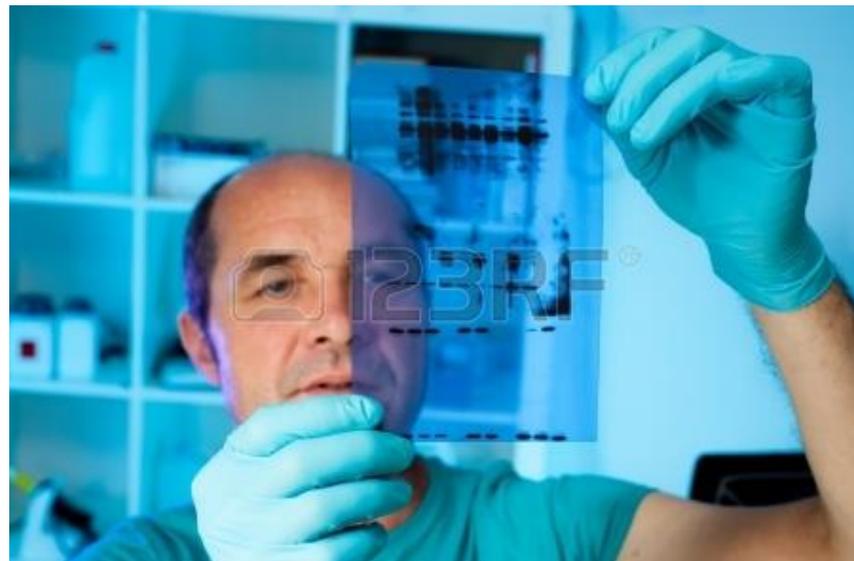
Вестерн блоттинг

Methods for Protein Analysis

- Gel electrophoresis, northern/western blot (fluorescence/radio active label)
- X-ray crystallography
- 2D - mass spectrometry
- Protein microarrays
- **Antibody Array for Protein Expression Profiling**

Определение. **Вестерн-блоттинг** (вестерн-блот, белковый иммуноблот, *Western blotting*)

аналитический
метод,
используемый для
определения
специфичных
белков в образце.



Определение. **Вестерн-блоттинг (вестерн-блот, белковый иммуноблот, *Western blotting*)**

Вестерн-блоттинг был разработан в лаборатории Джорджа Старка (Стенфорд, Великобритания) Название вестерн-блот было дано технике У. Нейлом Бурнеттом и является игрой слов от названия Саузерн Блоттинг (*Southern blotting*).
- методики определения ДНК, разработанной ранее Эдвином Саузерном

Вестерн-блоттинг был разработан в лаборатории Джорджа Старка (Стенфорд, Великобритания)

Western Blotting – метод определения белков

Саузерн блоттинг-методики определения ДНК, разработанной ранее Эдвином Саузерном (***Southern blotting***).

Аналогичный метод определения РНК называется Нозерн Блоттинг (***Nothern blotting***).

Детекция посттрансляционных модификаций белков называется Истерн Блоттингом (***Eastern blotting***).

ПРОТОКОЛ

1. Разделение белков методом SDS-PAGE гель-электрофореза/

С помощью гель-электрофореза белки разделяются в полиакриламидном геле.

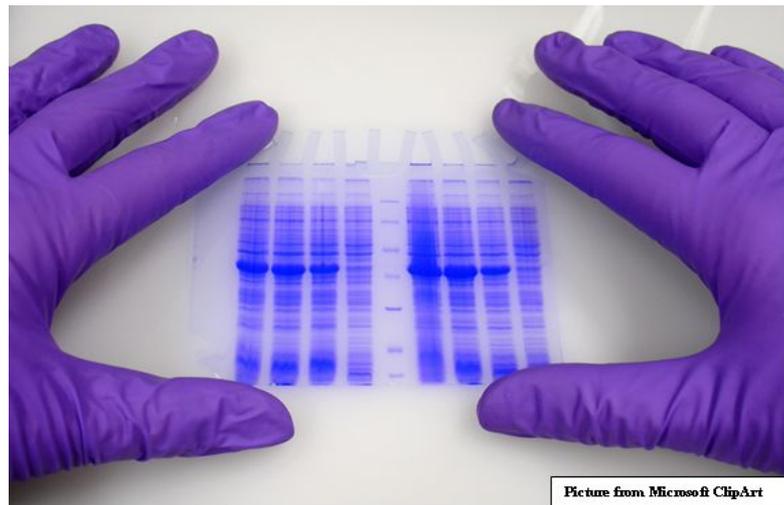
2. Перенос белков на мембрану

3. Блокирование и Детекция

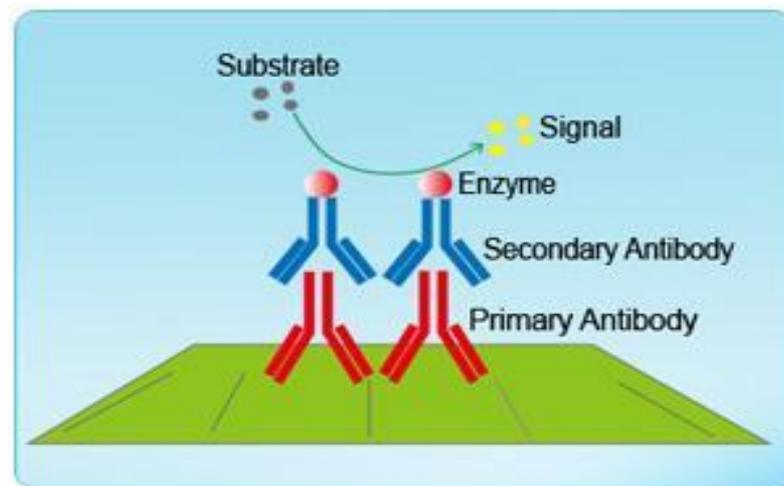
Затем их детектируют с использованием антител:

сначала белки связываются с **первичными** (моно- или поликлональными) антителами, которые в свою очередь связываются

со вторичными антителами, конъюгированными с ферментами (пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой).



Picture from Microsoft ClipArt



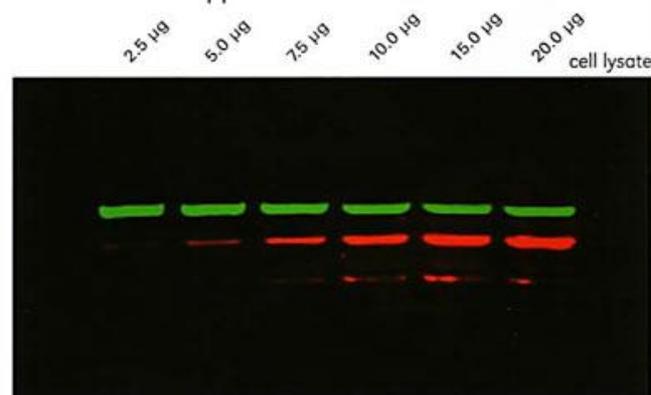
протокол.

Вестерн-блоттингом можно обнаруживать антиген в количествах менее 1нг.

4. Визуализация.

- Высокая степень разрешения достигается за счет электрофоретического разделения белков и специфичности моноклональных антител.
- Визуализация исследуемого белка достигается путем проведения соответствующей биохимической реакции с образованием продукта, который определяется колориметрическим, хемилюминесцентным, флюоресцентным методами детекции.

Two Color Simultaneous Detection of Tubulin & I kappa B



In this pseudocolored image, 700 nm fluorescence (I kappa B) is shown in red and 800 nm fluorescence (Tubulin) is shown in green. The two colors were imaged simultaneously in a single scan.

Data courtesy of Dr. Catrin Albrecht, IUF, Germany



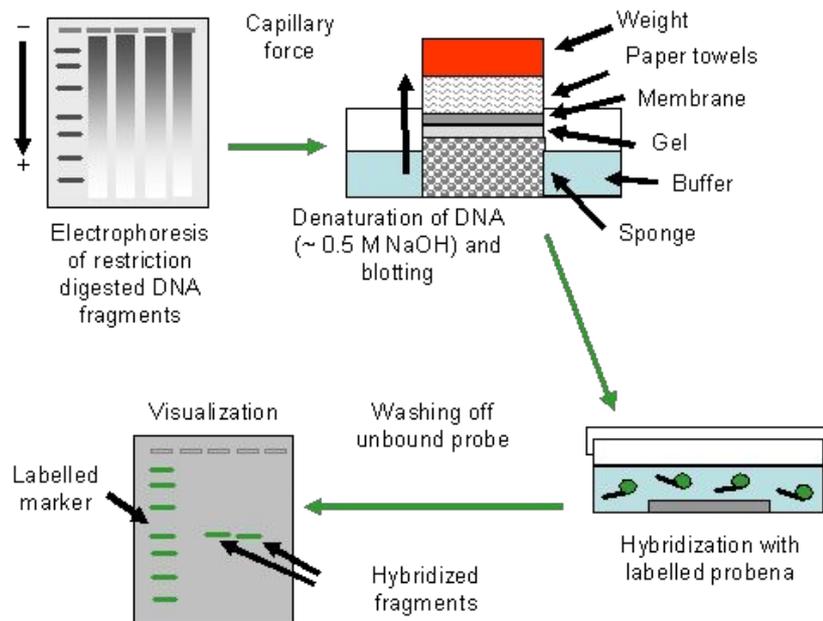
5. Анализ.

- Количество белка оценивается с помощью денситометрии.



Southern Blotting

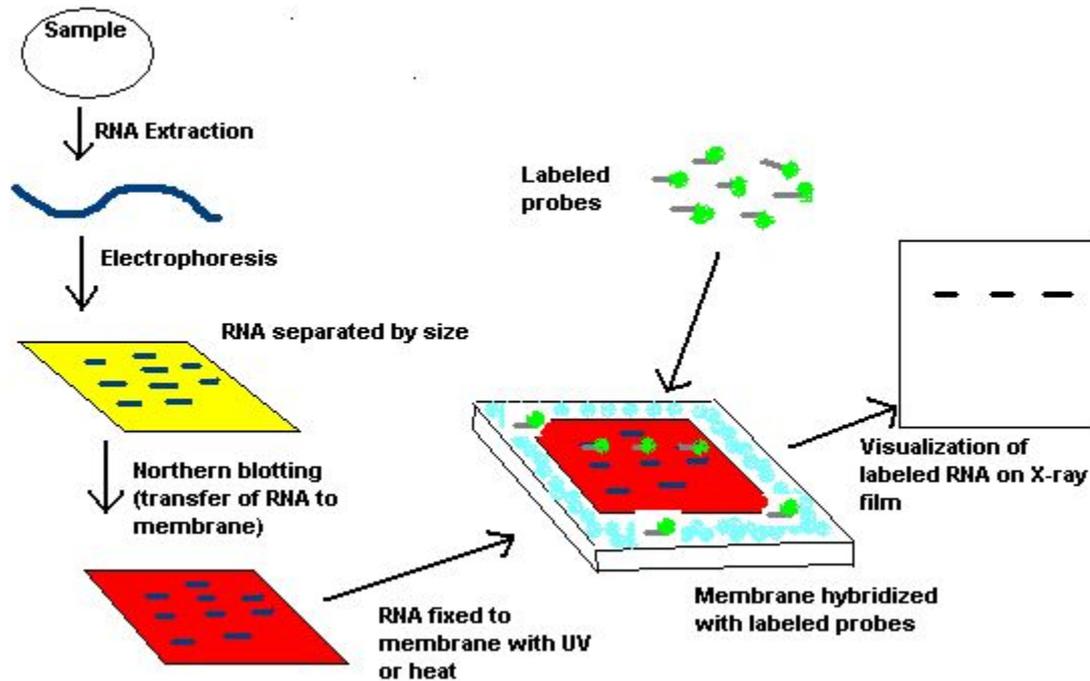
Этим методом выявляют уникальные фрагменты ДНК, размер которых составляет приблизительно одну миллионную часть геном

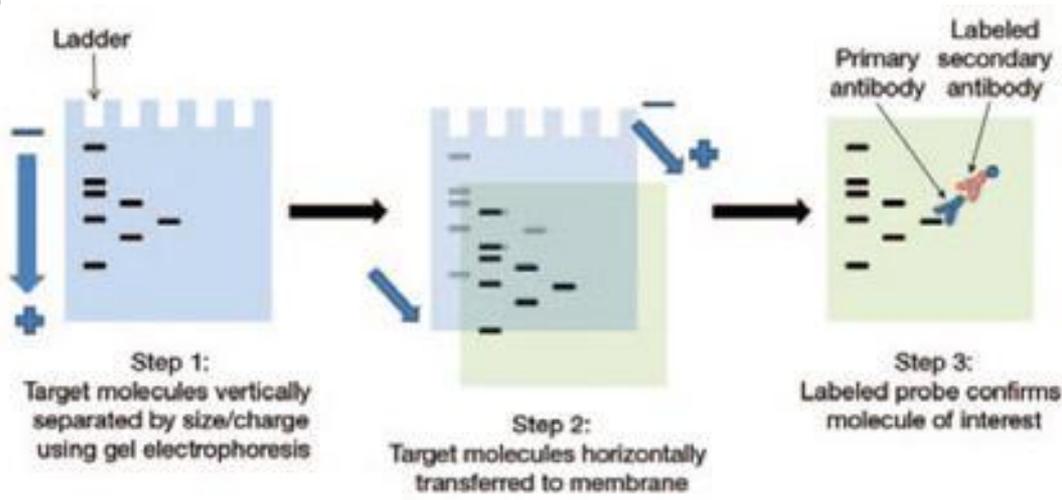


Геномную ДНК (обычно выделенную из лейкоцитов или клеток плода) расщепляют на короткие фрагменты, разделяют их в агарозном геле, переносят на мембрану, после чего идентифицируют специфические участки с помощью гибридизации с олигонуклеотидными зондами.

Northern Blotting

- Аналог Southern Blotting.
- Этот метод позволяет выявить специфическую мРНК и оценить ее размер.

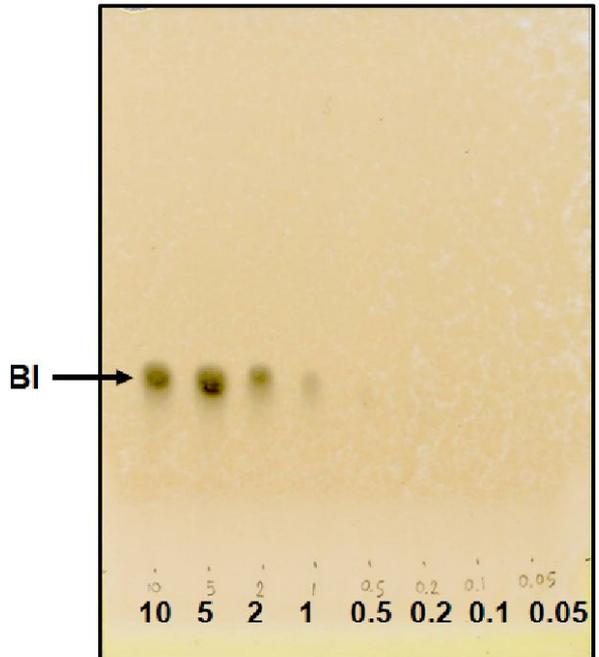




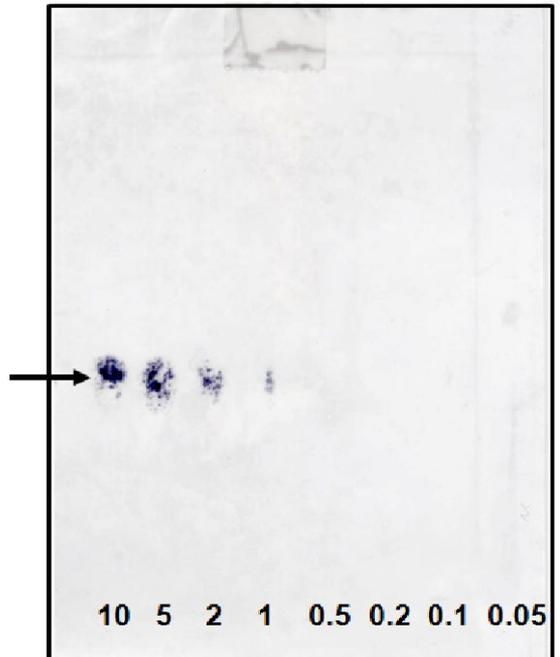
Eastern Blotting

(является продолжением метода Вестерн блоттинг)

TLC (FeCl₃ staining)



Eastern blotting



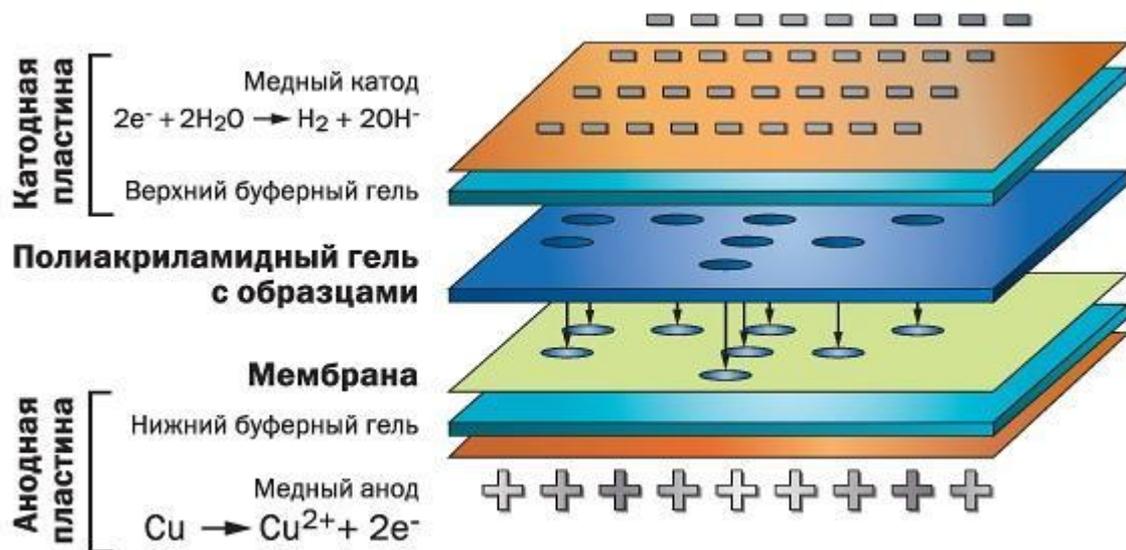
Определение метода Вестерн Блоттинг

Метод основан на комбинации гель-электрофореза и иммунохимической реакции «антиген-антитело».

«Твердая фаза» для иммуноблота

- пористые материалы типа **нитроцеллюлозы (PVDF)** в виде наполнителей в объеме или в виде плоских листов или полосок стрипов
- (англ. strip); стрипы используют в методиках типа иммуноблота и иммунохроматографии;
- в пористых материалах существенно больше площадь, на которой сорбирован один из участников взаимодействия; другие реагенты диффундируют по порам.

Типы твердой фазы для Вестерн блоттинга



Подготовка образца

- Образец может быть взят из цельной ткани или из клеточной культуры. В большинстве случаев, твёрдые ткани сначала измельчаются механически с использованием блендера (для образцов большого объёма), с использованием гомогенизатора (меньшие объёмы), или обработки ультразвуком.
- Различные детергенты, соли и буферы могут быть применены для улучшения лизиса клеток и растворения белков. Ингибиторы протеаз и фосфатаз часто добавляются для предотвращения расщепления образцов их собственными ферментами. Подготовка тканей часто



Цельная
ткань

Клеточная
культура

Механическое
измельчение

Измельчение
гомогенизатором

Обработка
ультразвуком

Измельчение в жидком
азоте

Ингибиторы протеаз,
фосфатаз

Детергенты, соли, буферы

Низкие температуры



КИХ

и белка
ло
в
я
у
у
ш
а
ю
щ
и
пр

производит гомогенизацию образцов за счет их встряхивания в микропробирках или чашах вместе с твердыми

Гель-электрофорез. Наиболее распространенный способ разделения белков — электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS по Лэмми

Гель-электрофорез

- SDS вызывает денатурацию белков и поддерживает их в денатурированном состоянии, для разрушения вторичных и третичных структур белков используют восстановители дисульфидных связей

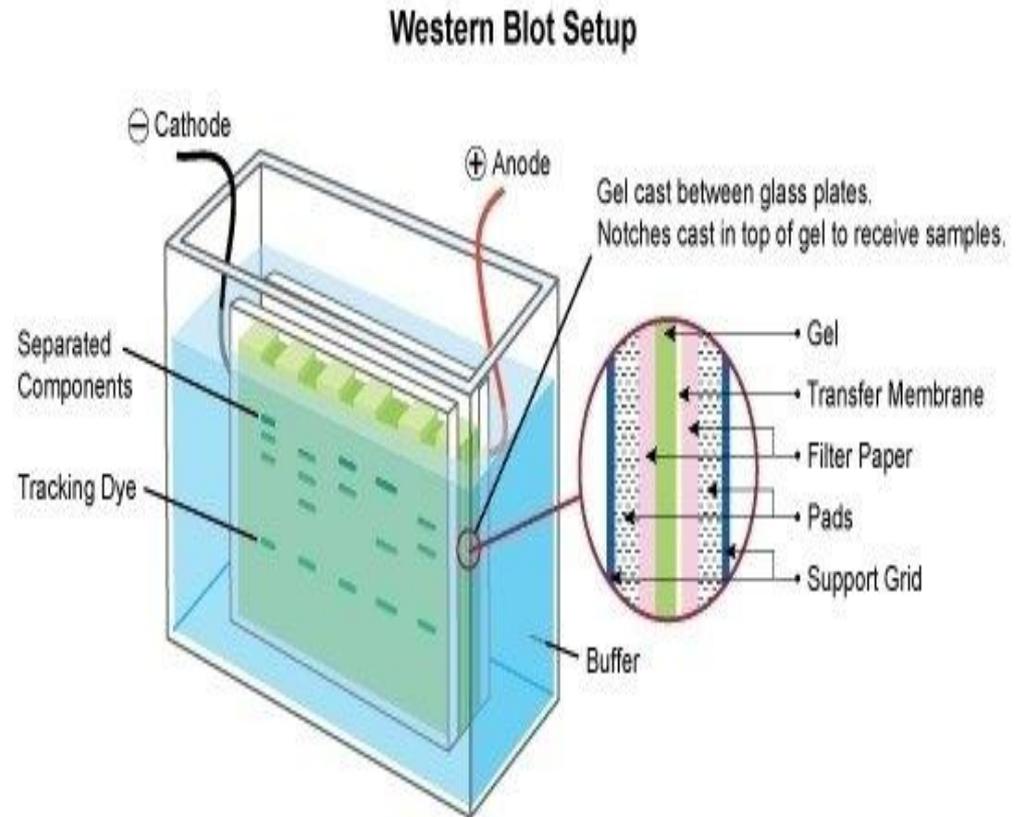
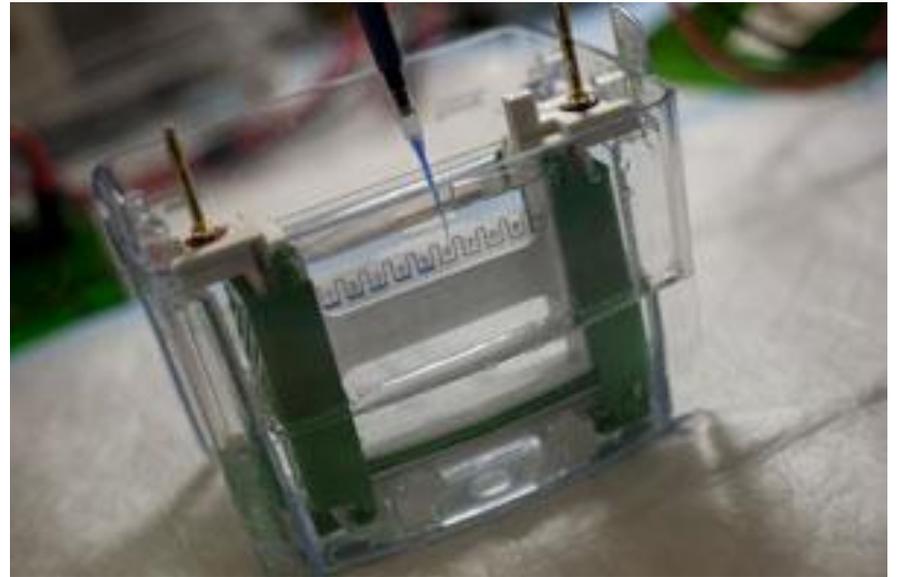


Diagram 1: Illustration of Western Blot Setup.

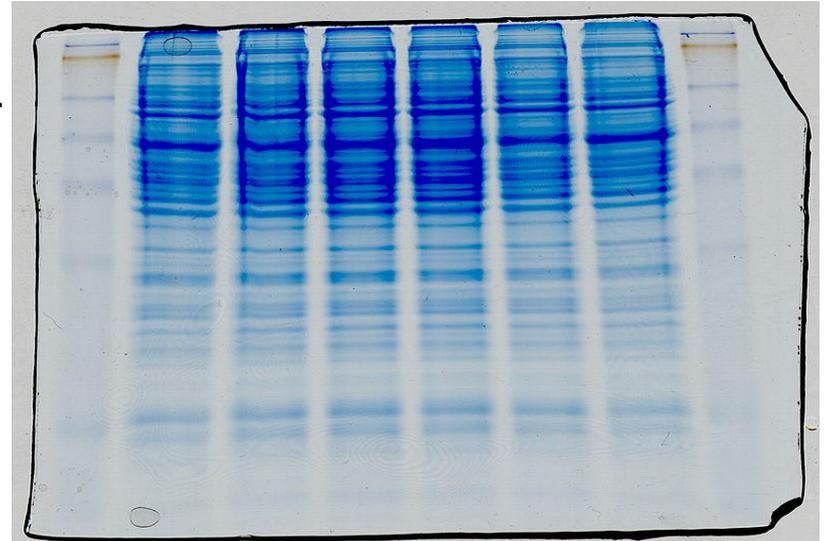
Гель -электрофорез

Подлежащие анализу белки в присутствии додецилсульфата натрия приобретают одинаковый отрицательный заряд, что делает возможным их разделение в зависимости только от молекулярной

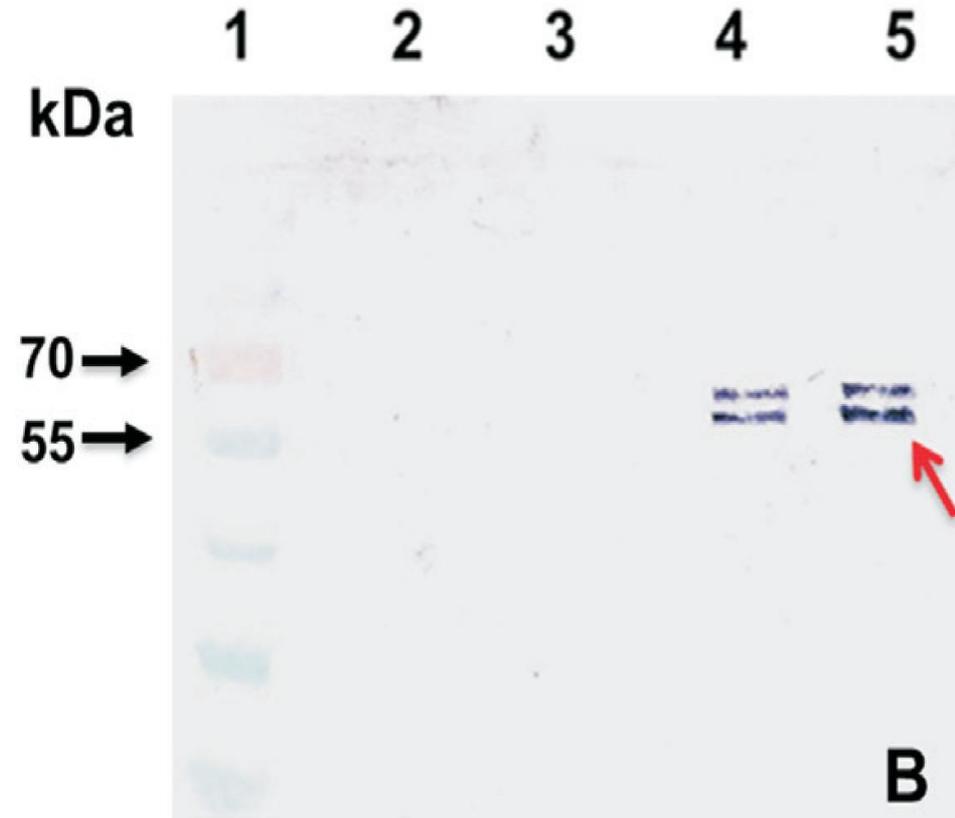
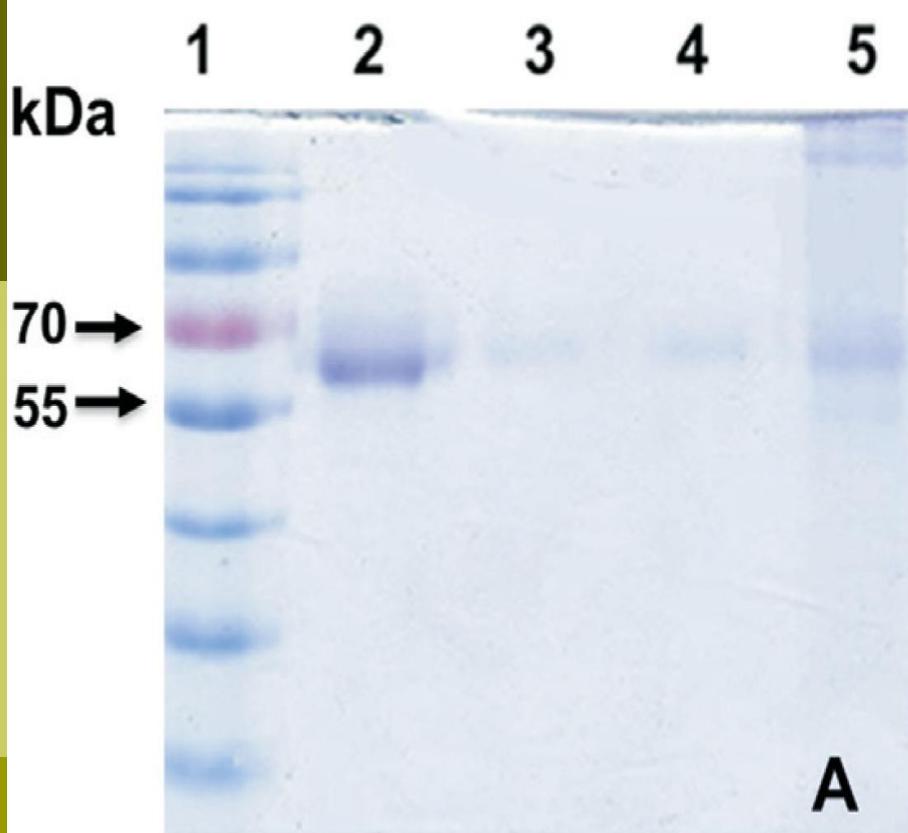


Принцип электрофореза

- Предварительно денатурированные белки вносят в карманы «треков» (дорожек) акриламидного геля с низкой концентрацией (концентрирующий гель), что позволяет их сконцентрировать перед переходом в разделяющий гель (с более высокой концентрацией), где происходит разделение белков в зависимости от молекулярной массы.
- Белки мигрируют в электрическом поле через акриламидный гель к аноду, при этом белки меньшего размера двигаются быстрее.



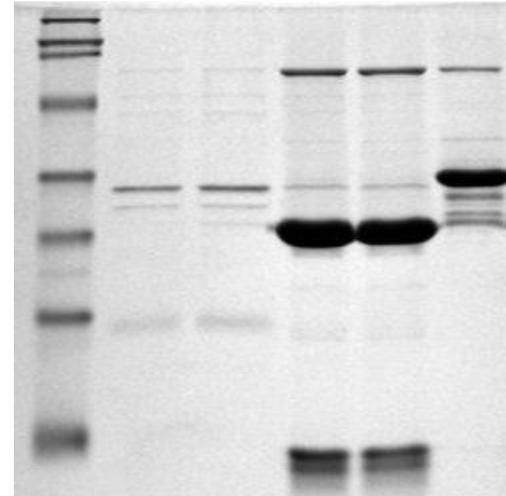
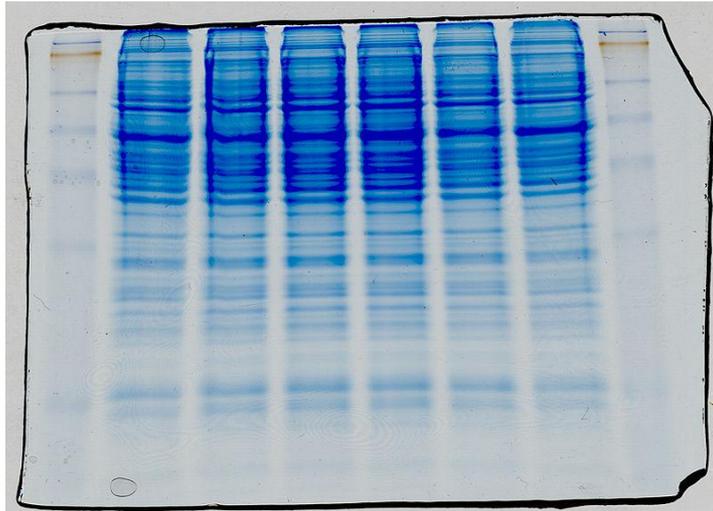
Принцип электрофореза



Отличия в скорости продвижения — электрофоретической подвижности приводит к разделению белков на полосы.

Как правило, одну из «дорожек» оставляют для маркеров молекулярной массы (смеси белков с известными массами).

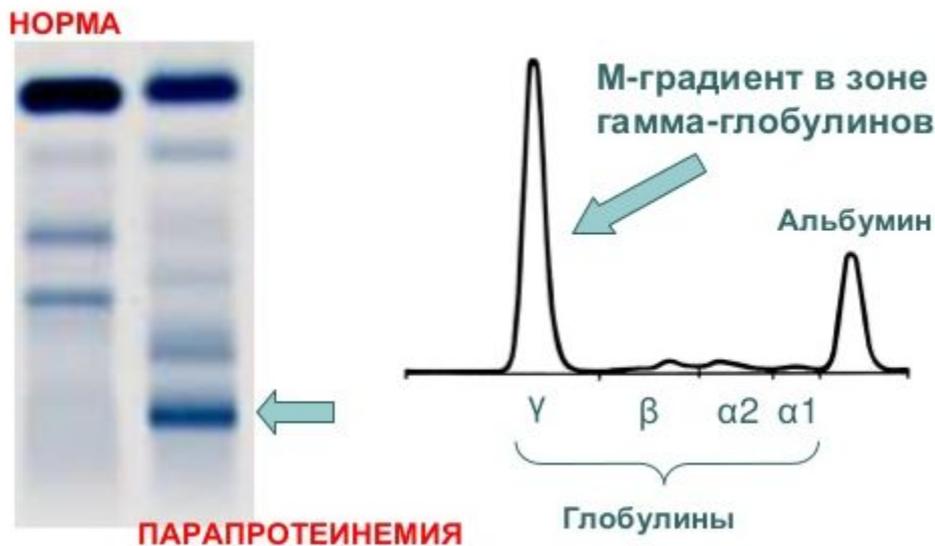
Окрашивание гелей



- окрашивание белков в гелях красителем Кумасси
- Для визуализации результатов электрофореза чаще всего используют окрашивание белков в гелях красителем **Кумасси или серебром**
- окрашивание белков в гелях серебром

Анализ электрофоретического разделения белков

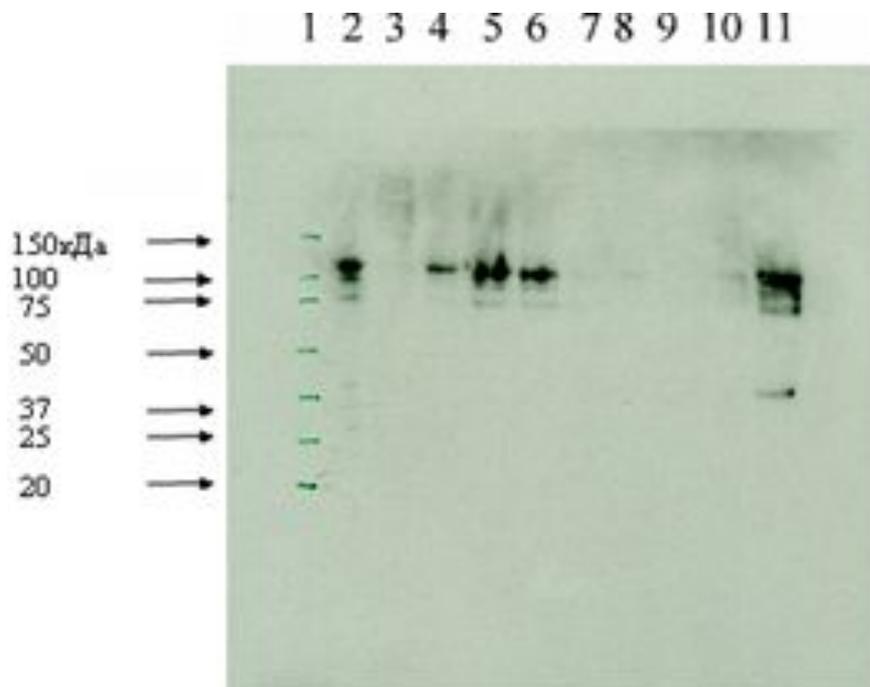
- ▣ **В большинстве случаев результаты электрофоретического разделения достаточно получить путем визуальной оценки геля.**
- ▣ Однако, с целью получения достоверных данных и надлежащего документирования результатов гель сканируют на просвет при помощи высокочувствительного денситометра, что позволяет **надежно** определять **не только положение белков в геле, но и оптическую плотность белкового пятна.**



Окрашивание мембраны более надежно

Анализ электрофоретического разделения белков, БЛОТТИНГ

- С помощью специального программного приложения можно определить такие параметры как **электрофоретическая подвижность белка, его чистота, количество белка в пятне** и др.
- Чаще используют хемилюминесцентную систему детекции белков – использование рентгеновских пленок (Блоттинг)



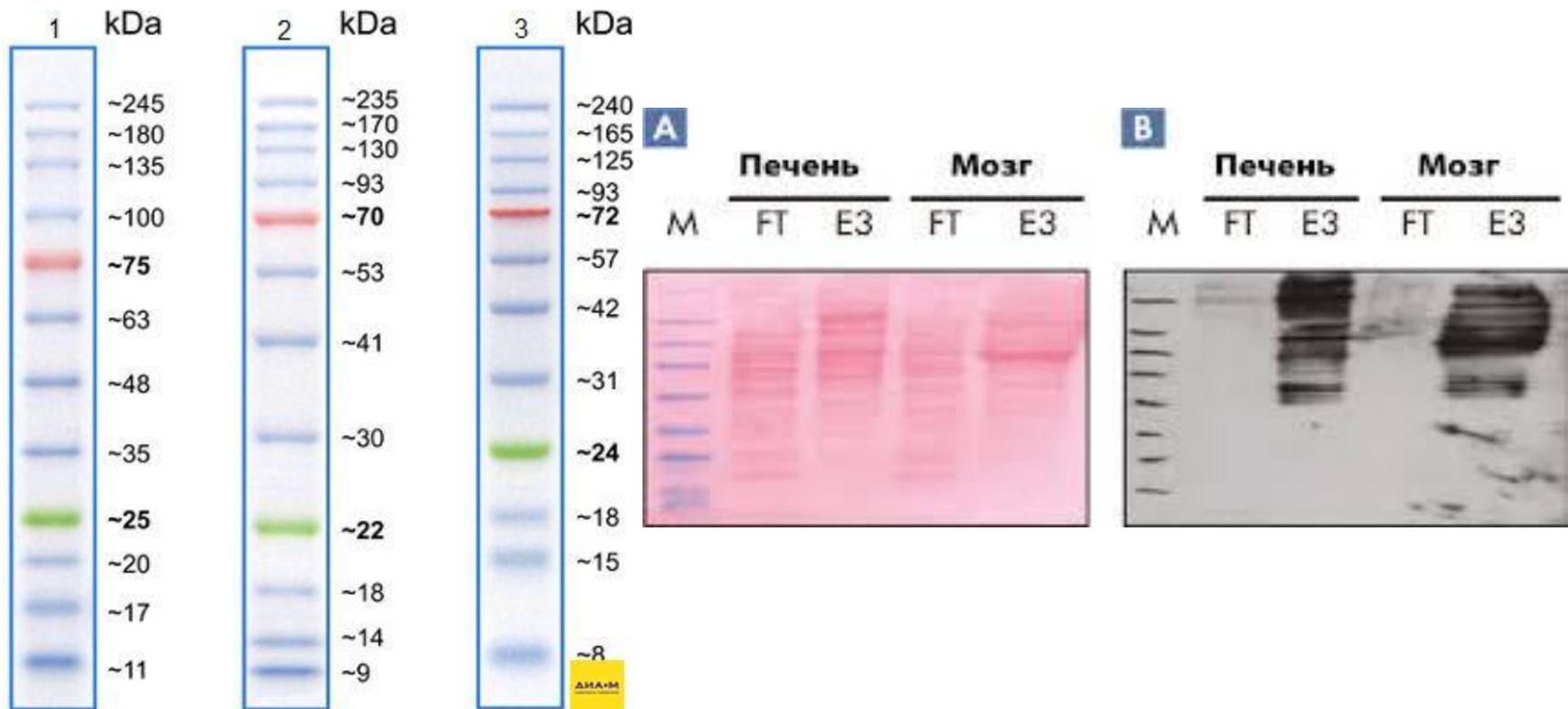
Используют
программное
приложение ImageJ

Применение системы визуализации для WB (см. ниже)



Анализ электрофоретического разделения белков

- Определение молекулярной массы исследуемого белка предполагает необходимость калибровки геля по молекулярным массам. Калибруют гель относительно **молекулярных масс белков-маркеров**, которые разделяют параллельно с исследуемым образцом.



Выбор % разрешающего геля.

- *концентрация акриламида определяет разрешающую способность геля — чем выше концентрация акриламида, тем лучше разделение низкомолекулярных белков. Низкая концентрация акриламида улучшает разрешающую способность геле-электрофореза для высокомолекулярных белков*

<i>Размер белка, kDa</i>	<i>%AA</i>
36-205	5%
24-205	7.5%
14-205	10%
14-66	12.5%
10-45	15%

Перенос на мембрану

Чтобы сделать белки доступными для антител и дальнейшей детекции, их вместе с полоской геля переносят на мембрану, изготовленную из нитроцеллюлозы или *PVDF*.

Мембрана накладывается поверх геля, а поверх неё кладут стопку фильтровальной бумаги.

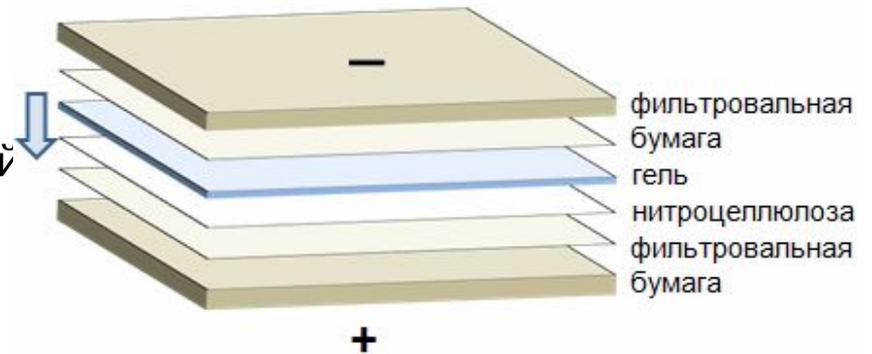
Метод переноса белков называется **электроблоттингом** и использует электрический ток, который переносит белки из геля на мембрану.

Белки перемещаются из геля на мембрану с сохранением своего расположения. В результате этого «промакивания» (*blotting*) процесс белки удерживаются на тонком поверхностном слое мембраны для детекции.

Оба варианта мембран используют из-за их свойства неспецифично связывать белки.

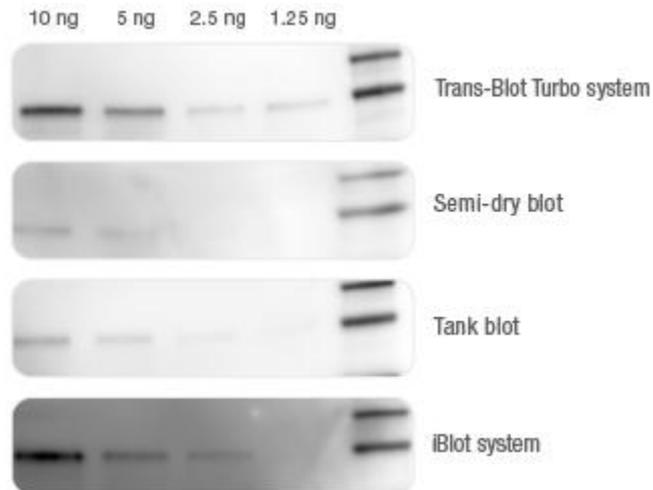
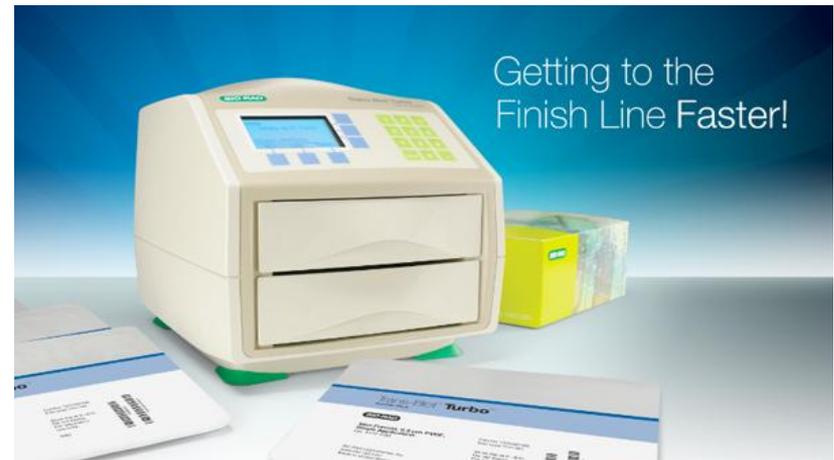
Связывание белков основано как на гидрофобных взаимодействиях, так и на электростатических взаимодействиях между мембраной и белком.

Нитроцеллюлозная мембрана дешевле *PVDF*, но гораздо более хрупкая и хуже выдерживает повторное нанесение меток.



Виды электроблоттинга

- Сухой
- Влажный
- Полусухой (semidry)

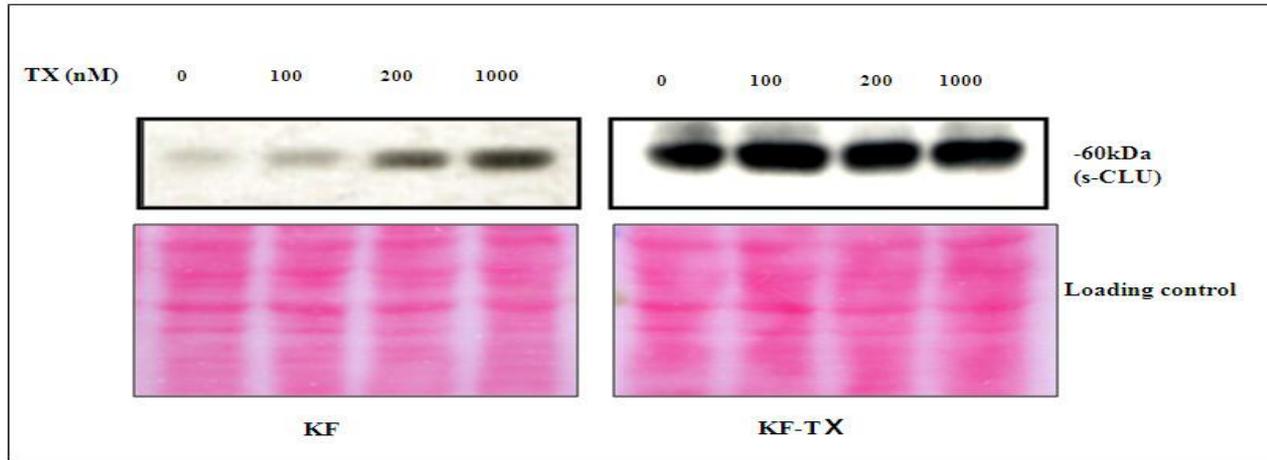


Окрашивание белков на фильтре

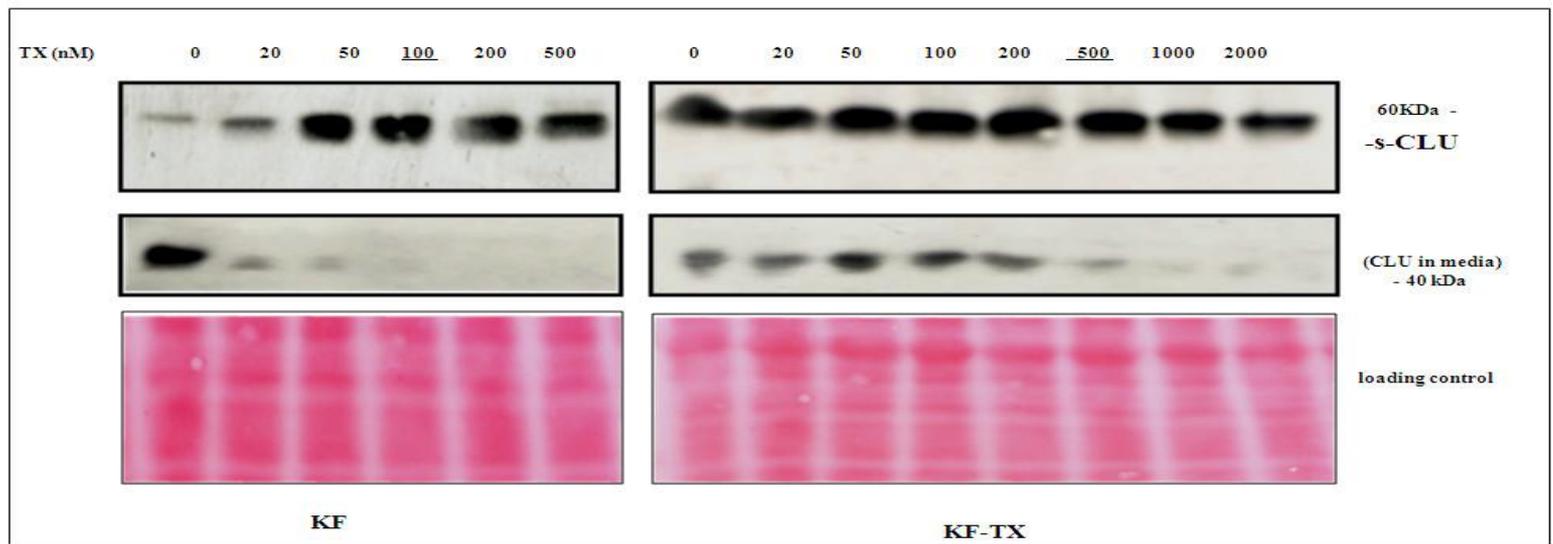
Способ окраски	Чувствительность, количество белка	Нитроцеллюлоза	Нейлон	PVDF	Окрашивание
Ponceau S	1-2μg	+	-	+	обратимое
Amido Black	1.5 μ g	+	-	+	постоянное, низкий фон
Comassie blue	1.5μg	+	-	+	постоянное, высокий фон
India ink	100ng	+	-	+	постоянное
Biotin-avidin	30ng	+	+	+	постоянное, бледнеет со временем
Colloidal gold	3ng	+	-	+	постоянное

Подтверждение переноса белков на фильтр (окраска Ронсеус)

A.

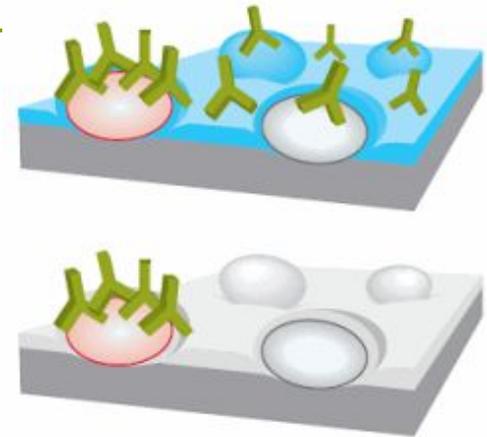


B.



Блокирование

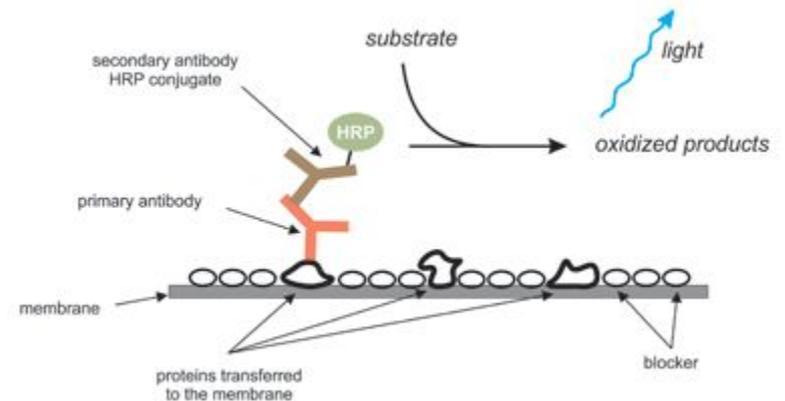
- Как только выбрана мембрана, выбраны антитела и целевой белок, должны быть приняты меры по *исключению взаимодействия между мембраной и антителом*, используемым для детекции целевого белка (ибо антитело само по себе белок).
- Блокирование неспецифических связываний достигается помещением мембраны в разбавленный раствор белка — обычно это **бычий сывороточный альбумин или нежирное сухое молоко или желатин с небольшим процентом детергента типа Tween-20.**



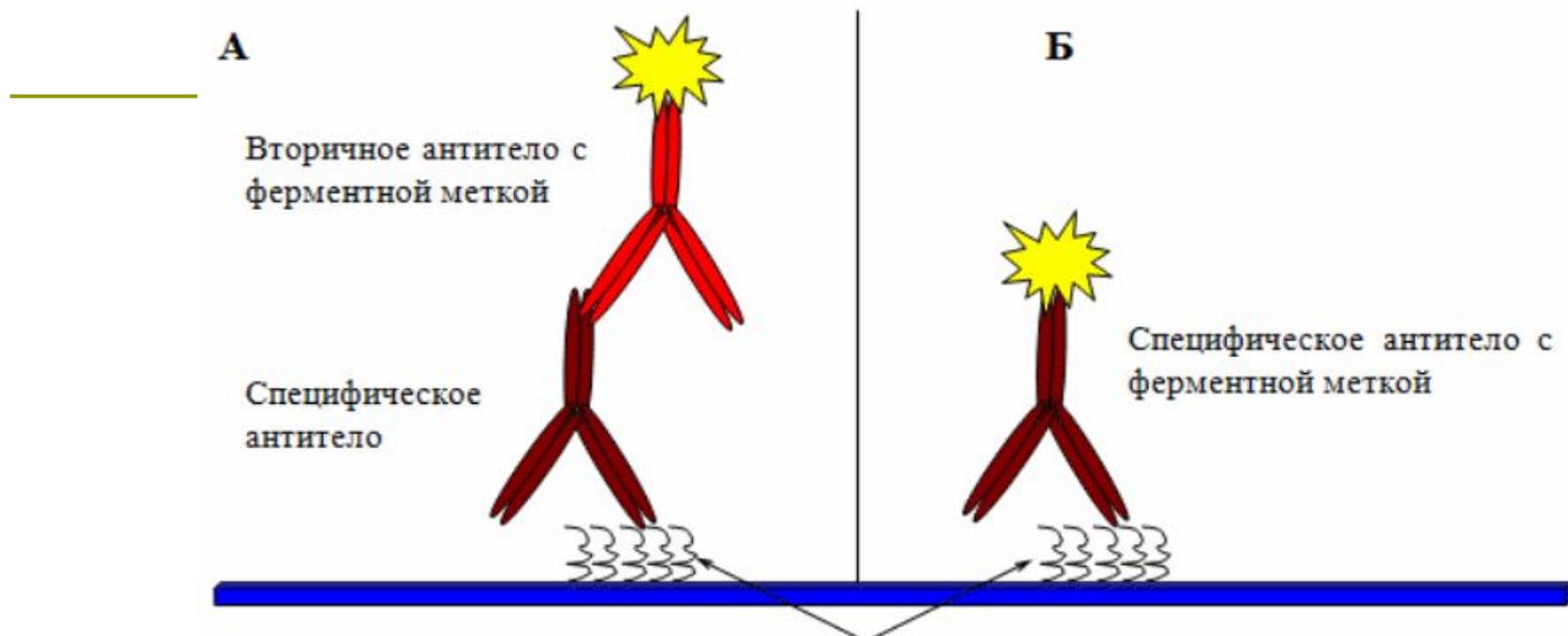
Блокирование — один из важных этапов проведения эффективного Вестерн блоттинга

Механизм блокирования

- Белок из разбавленного раствора прикрепляется к мембране во всех местах, где не прикрепился целевой белок. Поэтому, при добавлении антител, им (антителам) нет свободного места на мембране, куда бы они могли прикрепиться, кроме сайтов связывания на специфичных целевых белках. **Этот фоновый «шум» в окончательном продукте вестерн блота приводит к чистым результатам и исключению ложно-положительных.**



Детекция. Непрямой и прямой WB



преимущества

- Вторичное антитело усиливает сигнал (несколько вторичных антител могут связываться с одним первичным)
- Имеется широкий выбор вторичных антител
- Одно вторичное антитело может быть использовано для детекции различных специфичных антител
- связывание с ферментативной меткой вторичного антитела не влияет на иммунореактивность первичного антитела
- Замена вторичного антитела может способствовать изменению метода детекции

недостатки

- Вторичные антитела способствуют образованию сайтов неспецифичного связывания
- Дополнительные этапы работы

преимущества

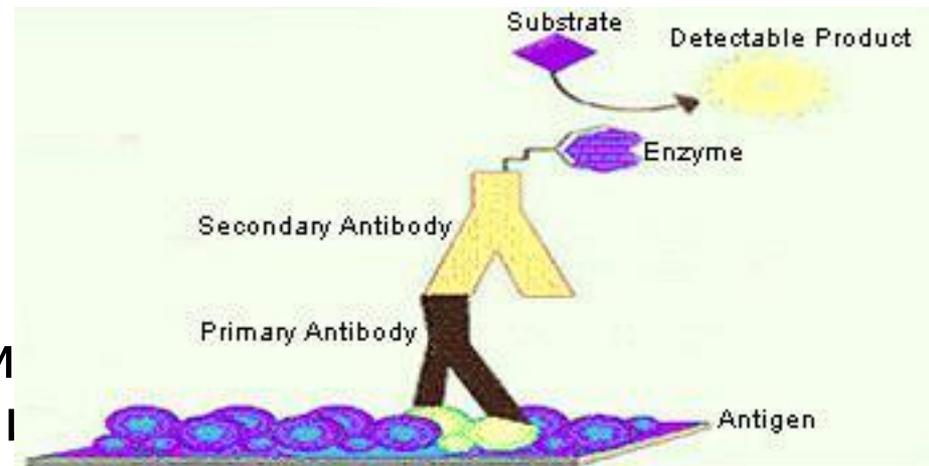
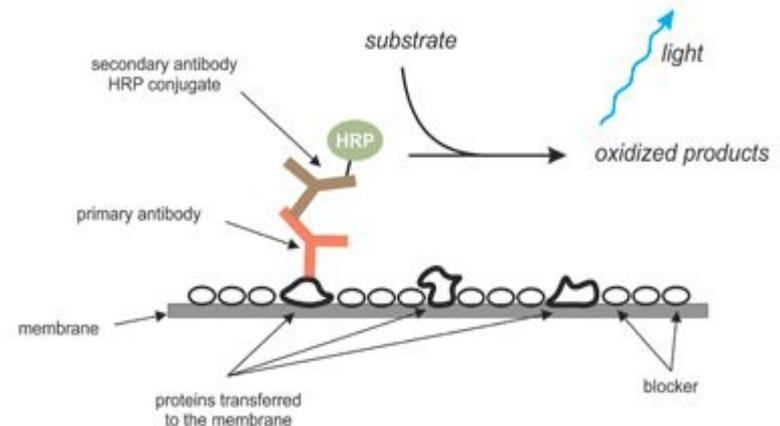
- необходимость использовать только первичные антитела, что ускоряет процесс
- возможность использовать первичные антитела с разными метками

Недостатки

- связывание с ферментативной меткой может снижать иммунореактивность первичного антитела
- высокая стоимость первичных антител
- проблема выбора антитела и низкий сигнал

Детекция. Следующим этапом является реакция связывания исследуемого белка со специфическим антителом (первичным).

- Раствор антител и мембрана могут быть вместе закрыты и инкубированы от 30 минут до оставления на ночь. Также они могут быть инкубированы при различных температурах, при повышенной температуре наблюдается лучшее связывание.
- После удаления несвязавшихся первичных антител, мембрану выдерживают со вторичными антителами и в соответствии с их целевыми свойствами, как правило называются по



Антитела для вестерн блоттинга.

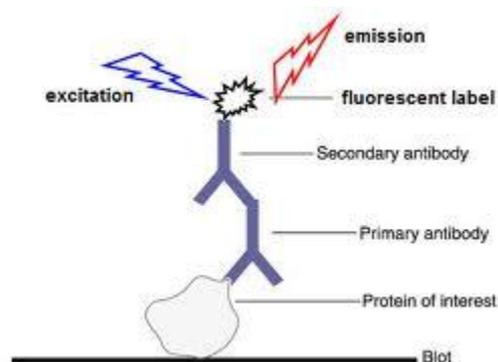
Механизм детекции.

- Антитела получают из животного источника и связываются с большинством первичных антител. Вторичные антитела обычно связывают щелочной фосфатазой или пероксидазой хрена.
- Наиболее распространенные, связанные с пероксидазой хрена вторичные антитела используются для разрезания хемилюминесцентного агента, и продукт реакции производит люминесцентное излучение пропорционально количеству белка.
- Лист светочувствительной фотографической пленки помещается напротив мембраны и подвергается действию излучения реакции, создавая изображение полос антител на блоте.
- Более дешевый, но менее чувствительный подход с использованием 4-хлорнафтольного окрашивания в смеси с 1 % перекисью водорода, что дает темно-коричневое окрашивание, которое регистрируется без использования специальной фотографической пленки.

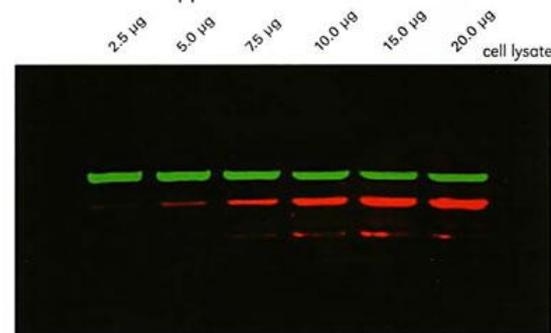


Детекция. Другие методы детекции.

Другой метод детекции вторичными антителами использует антитела со связанным флюорофором, который излучает в ближней инфракрасной области (NIR). Свет, излучаемый флюорофесцентным красителем, постоянен и делает флюорофесцентную детекцию более точным и чувствительным способом измерения разницы в сигнале, производимом белками, которые мечены антителами, на вестерн блоте.



Two Color Simultaneous Detection of Tubulin & I kappa B

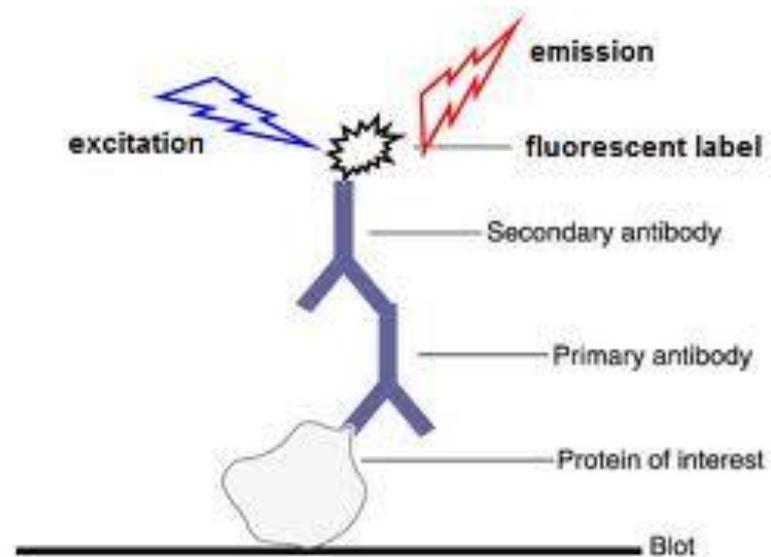


In this pseudocolored image, 700 nm fluorescence (I kappa B) is shown in red and 800 nm fluorescence (Tubulin) is shown in green. The two colors were imaged simultaneously in a single scan.

Data courtesy of Dr. Catrin Albrecht, IUF, Germany

Детекция. Другие методы детекции.

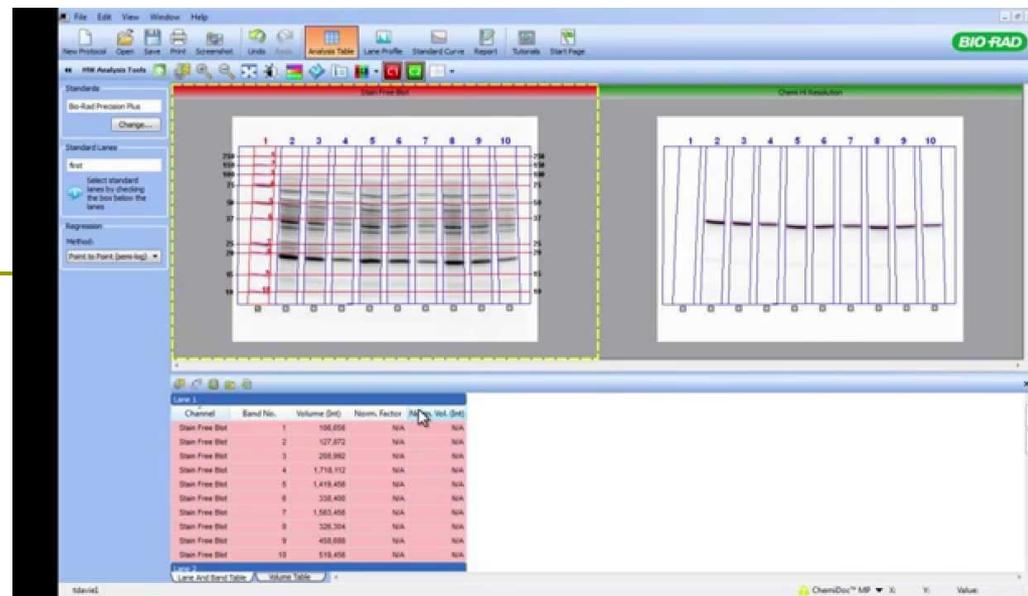
Третий альтернативный метод использует радиоактивную метку вместо фермента, связанного с вторичным антителом (с радиоактивным изотопом йода). Другие методы безопаснее, быстрее и дешевле, поэтому радиоактивная детекция используется редко.



Визуализация.

Визуализация осуществляется с помощью геле-документирующих систем или цифровой камерой.



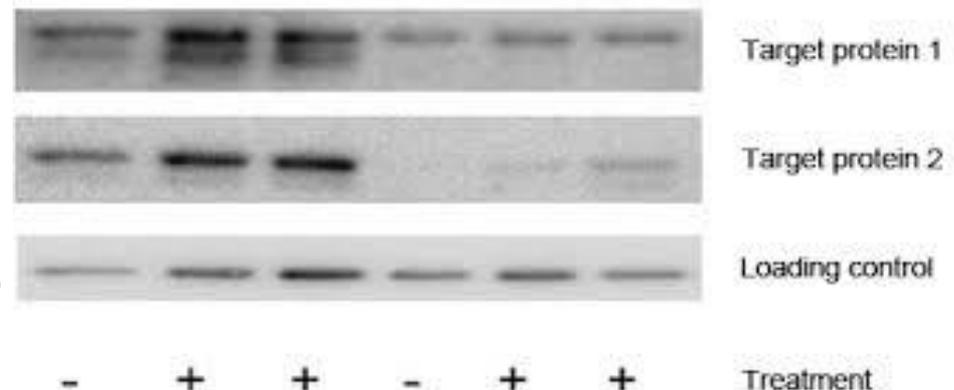
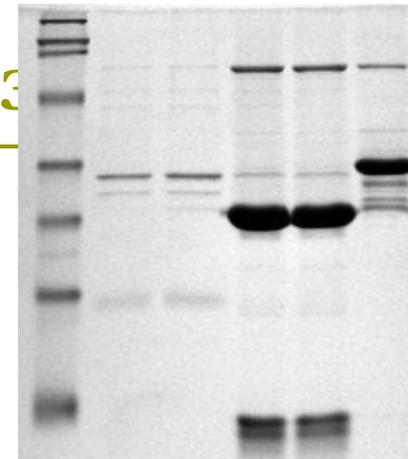


Представление фильма

- Stain free technology

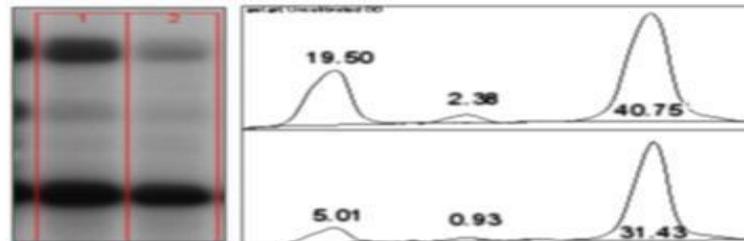
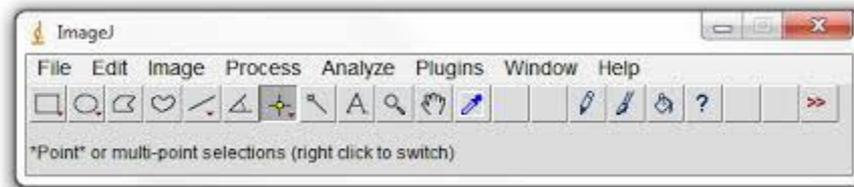
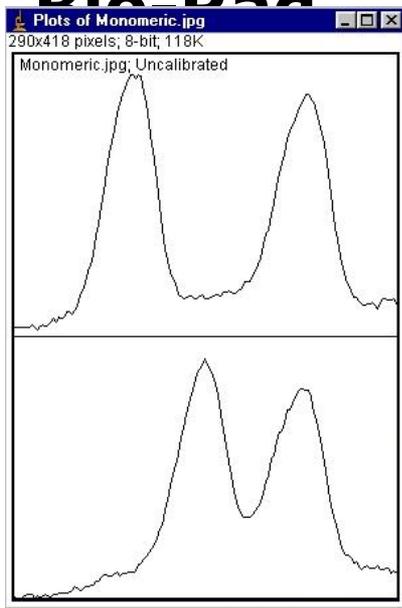
Анализ и представление результатов

- На практике, не во всех вестернах обнаруживают белки лишь по одному бэнду на мембране. Приблизительный размер вычисляют сравнивая окрашенные бэнды с маркерами молекулярной массы, добавленными при электрофорезе.
- **Процесс повторяют с структурными белками, такими как актин или тубулин**, которые не меняют между экспериментами. Количество целевого белка зависит от количества контрольного структурного белка между группами. Этот прием обеспечивает коррекцию количества общего белка на мембране в случае ошибки или неподного переноса

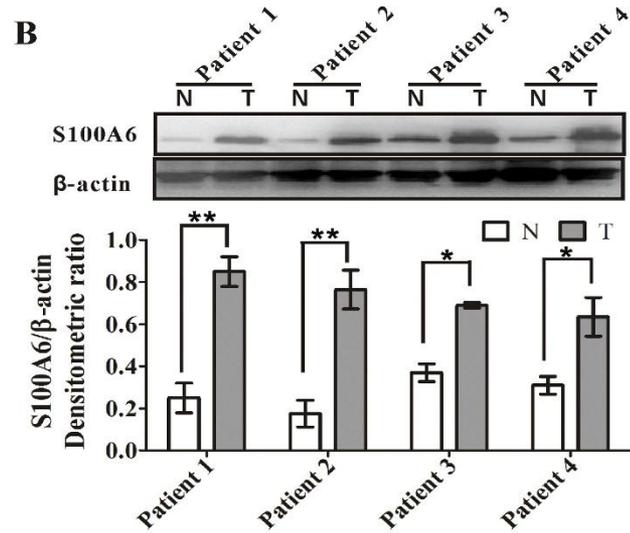
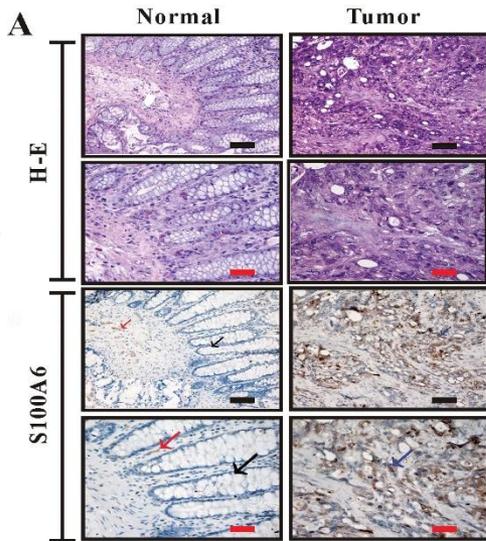


Анализ и представление результатов.

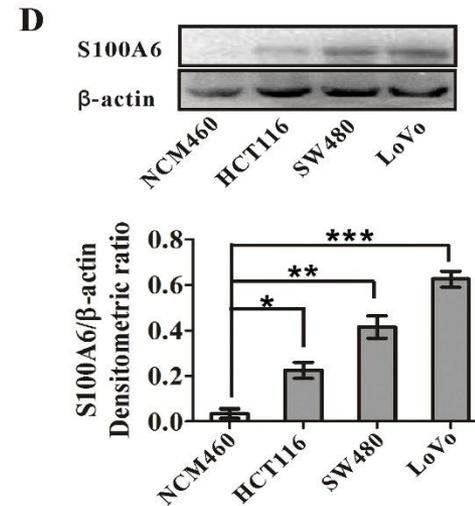
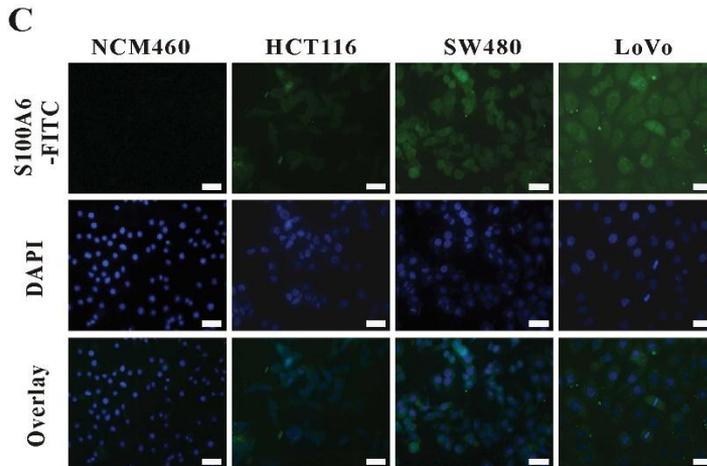
- Использование программного приложения Image J.
- Программного приложения Bio Rad



ИГХ



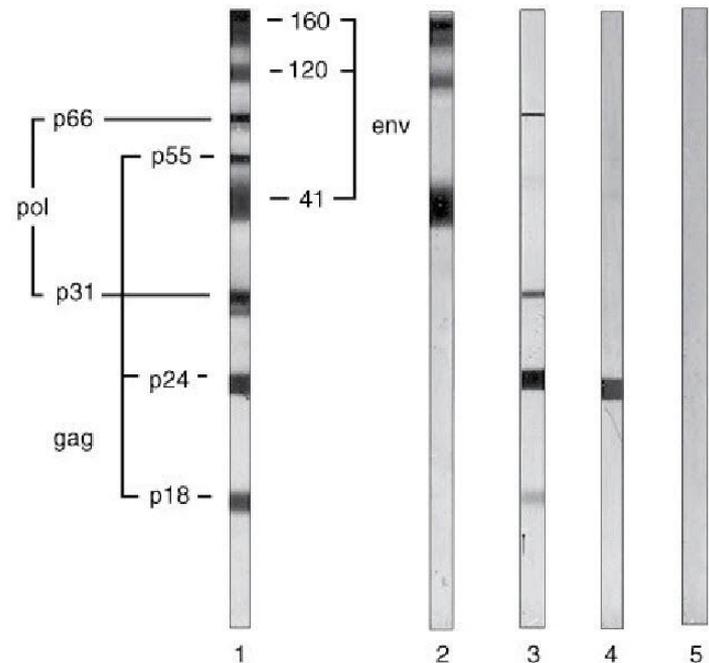
Вестерн
блоттинг



Иммунная
флюоресценция

Применение метода

- Вестерн-блоттинг используется в молекулярной биологии, биохимии, генетике и в других естественно-научных дисциплинах.
- **В медицине:**
диагностика ВИЧ (СПИД), болезнь лайма, Helicobacter Pylori, вирус Эпштейн-Барр



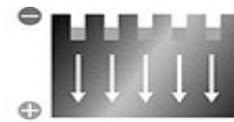
1. Положительный на ВИЧ 1
2. После иммунизации вакциной gp 160 у добровольца. Вич отрицательный.
3. Сомнительный на ВИЧ1, но положительный на ВИЧ 2
4. Сомнительный тест - перекрестная реакция с p24
5. Отрицательный блот на ВИЧ

Адаптировано из Харрисона 17 издание

Полный протокол

- 1. электрофорез
- 2. перенос
- 3. блокирование
- 4. инкубация с первичным антителом
- 5. отмывка
- 6. инкубация со вторичным антителом
- 7. отмывка
- 8. обработка хемилюминесцентной системой детекции
- 9. детекция с помощью рентгеновской пленки
- 10. анализ

Step 1
Perform
electrophoresis



Step 2
Transfer



Step 3
Block with ScanLater
5X Blocking Buffer



Step 4
Incubate with
primary antibodies



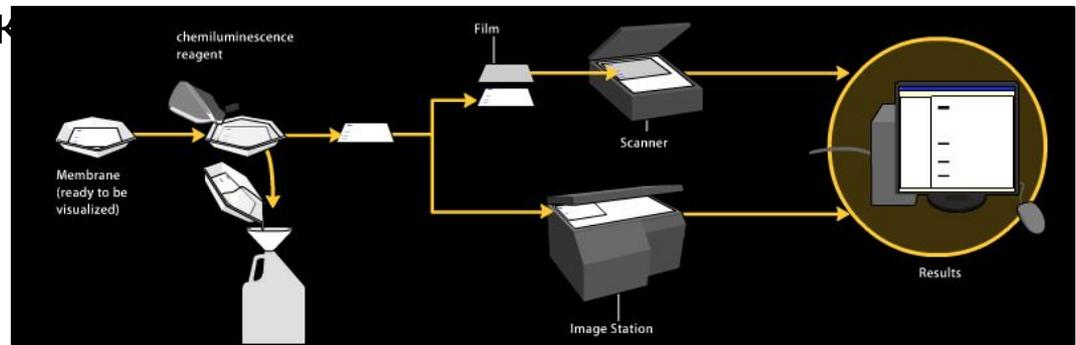
Step 5
Wash with
ScanLater Wash Buffer



Step 6
Incubate with ScanLater
Secondary Antibody



Step 7
Wash with ScanLater
Wash Buffer



Применение в практической медицине

- Подтверждение инфицированности ВИЧ
- Диагностика клещевого боррелиоза (болезнь Лайма)
- Диагностика сибирской язвы
- Диагностика токсоплазмоза (**T**);
- группу инфекций – гепатиты, сифилис, хламидиоз, листериоз и др. (**O**);
- краснуху (**R**);
- цитомегаловирусную инфекцию (**C**);
- герпес (**H**).
- Вирус Эпштейн-Барр

В этом случае на тестовые стрип-мембраны нанесены только клинически значимые антигены (нативные, синтетические или рекомбинантные) в определенном порядке. Такой подход используют для дифференциальной диагностики нескольких инфекций на одном стрипе

Иммунный блоттинг

Лабораторное экспертное заключение об инфицированности ВИЧ выносится только на основании положительного результата иммуноблотинга (Western blot). При проведении экспертной диагностики необходимо пользоваться предложенными в 1990 г. группой экспертов ВОЗ номенклатурой генов и генных продуктов ВИЧ

MyShared

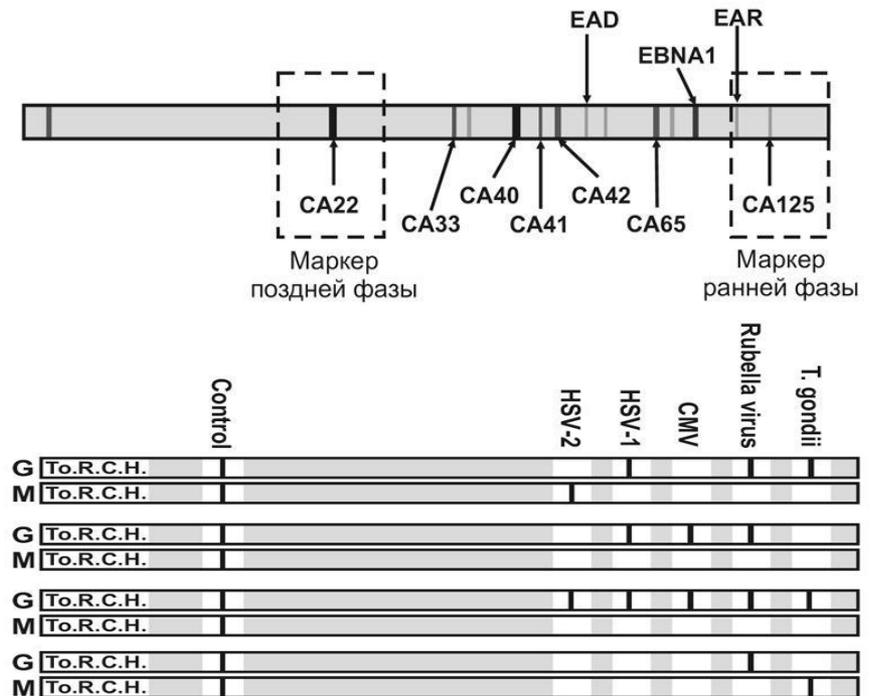


Рис. 2. Лайн-блот для диагностики TORCH-инфекций.



LABOR • DIAGNOSTIKA

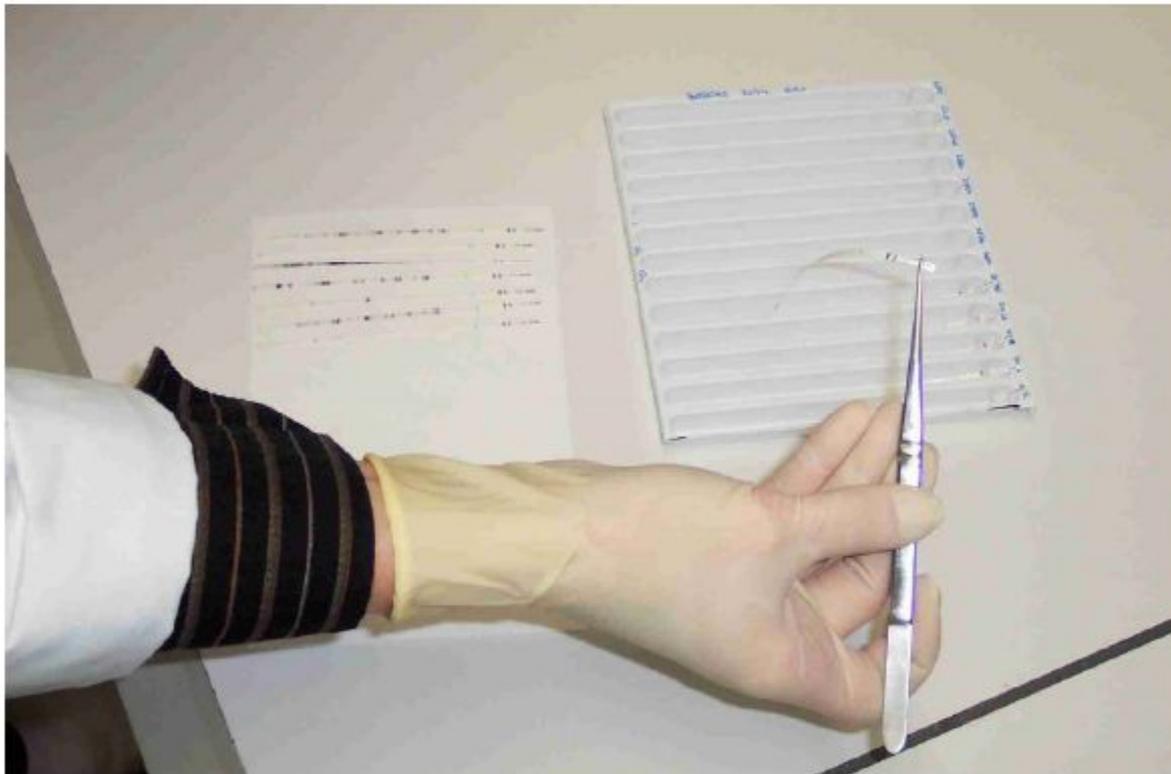
ViraStripe® и ViraBlot®

Техника проведения

Viramed Biotech AG
Behringstr. 11, D-82152 Planegg
Germany
Phone: ++49-89-899 336
Fax: ++49-89-859 9949
E-mail: viramed@viramed.de

9. Остановка реакции

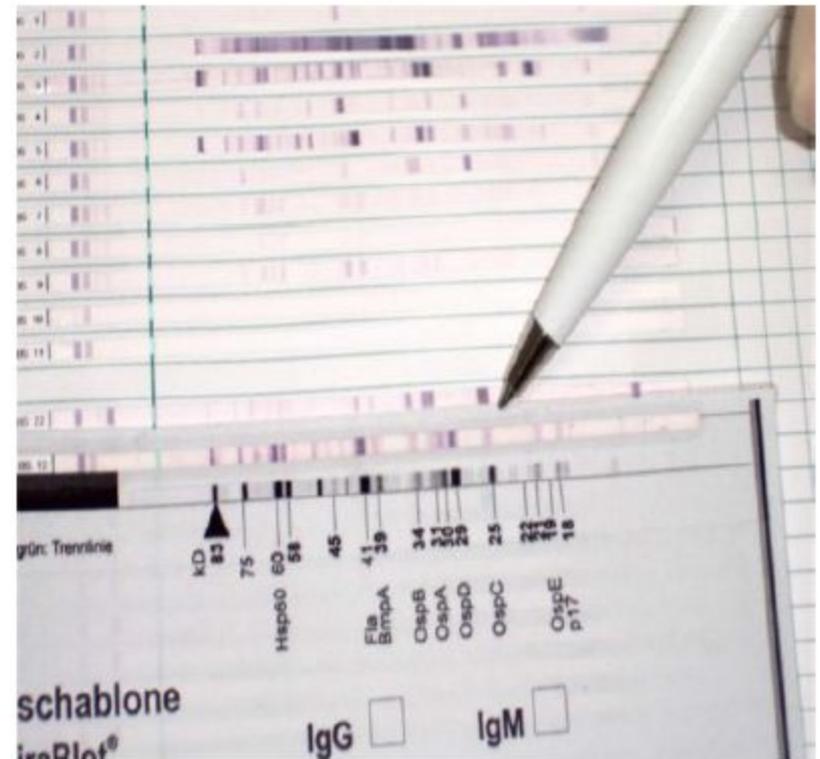
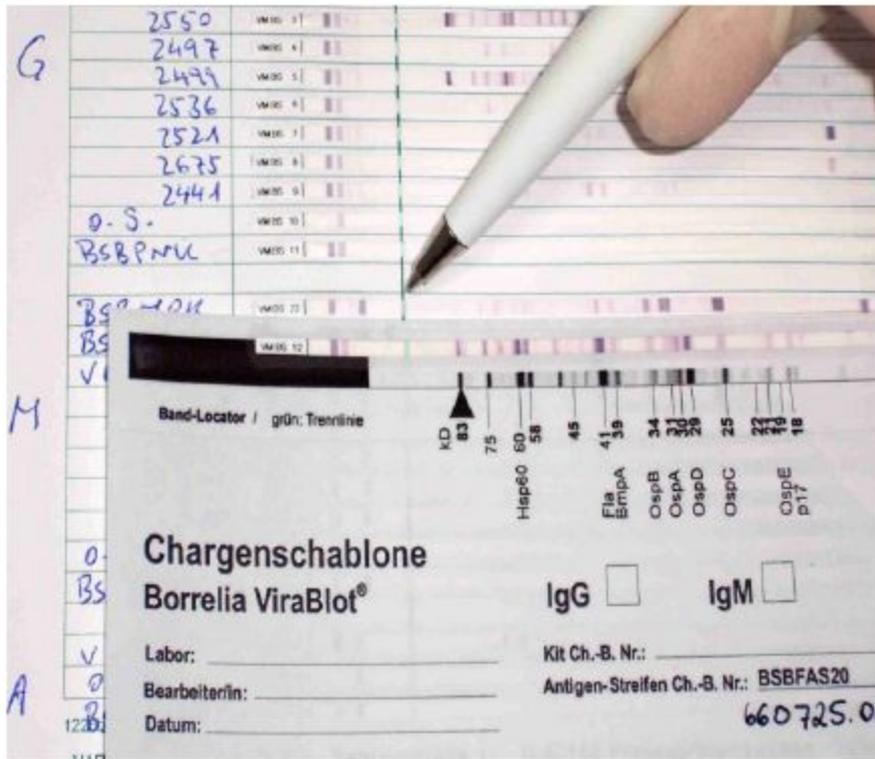
9.3. Поместите стрипы на впитывающую бумагу и дайте высохнуть на воздухе.



10. Интерпретация ViraBlot®

10.3. Совместите шаблон со стрипом пациента совмещая зеленые линии разделения вместе

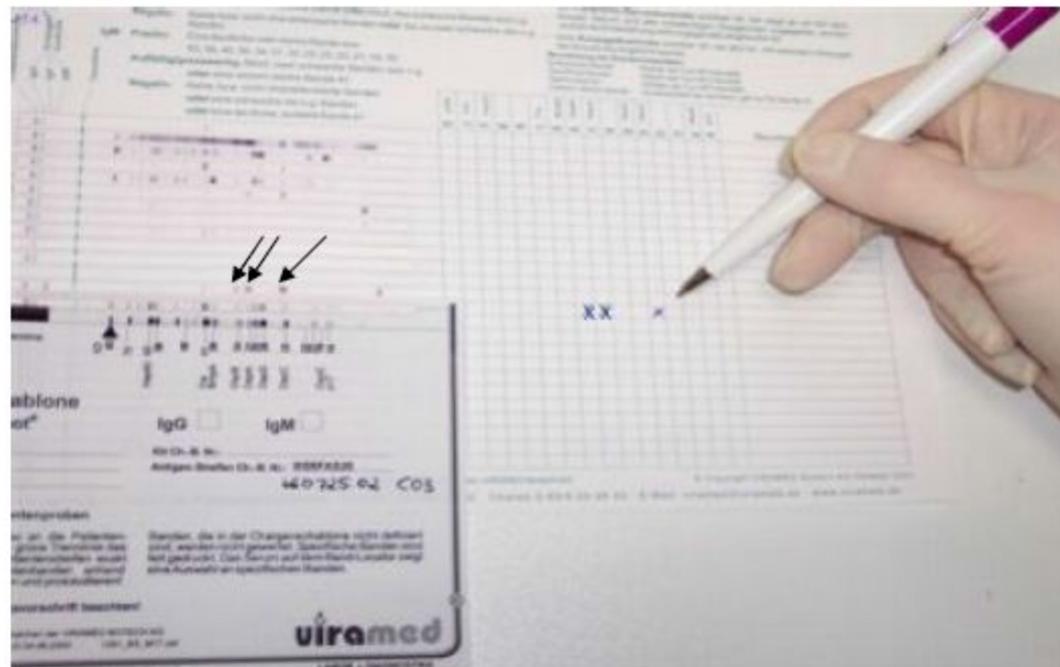
10.4. Идентифицируйте полосы на стрипе пациента сравнивая с шаблоном.



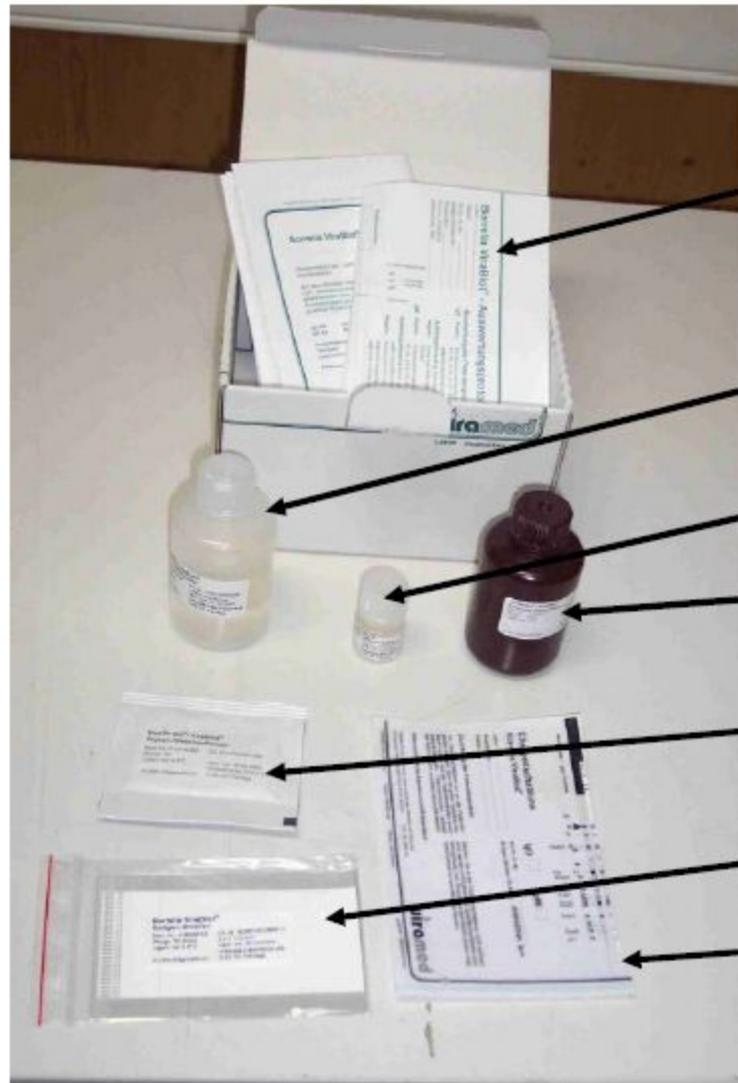
10. Интерпретация

10.5. Отметьте идентифицированные полосы в протоколе оценки.

Обратитесь к критериям интерпретации испытания как упомянуто в инструкциях для проведения качественной оценки результата теста.



Состав комплекта



Инструкции и протокол
оценки использования

Буфер 10x концентрат

Конъюгат концентрат

Субстрат (готовый к
применению)

Буферная соль

Стрипы антигена (готовые)

Шаблон партии (только в
комплектах ViraBlot)