

Иммуноблотинг

- **Иммуноблотинг (син. вестернблотинг)** - высокоспецифичный и высокочувствительный референтный метод выявления белков, основанный на комбинации гель-электрофореза и иммунохимической реакции «антиген-антитело».
- Метод иммуноблотта как правило, необходим после обнаружения положительных антител класса IgG инфекционного процесса, т.к. именно в такой комбинации происходит более правильная лабораторная интерпретация результатов и дальнейшая тактика лечения пациента.

Имунноблотинг

- **Вестерн-блот:** Это надежный подтверждающий метод, исключает ложноположительные ответы и перекрестные реакции.
- **Лайн-блот.** Это дифференциальная диагностика нескольких инфекций на одном стрипе.

Иммуноблоттинг применяется

- в диагностике заражений и инфекций вирусами: ВИЧ, коронавирус, вирус простого герпеса (HSV), гепатита В, С.
- можно диагностировать некоторые паразитические болезни, а также генетические заболевания.
- возможно проведение подробного анализа антигенспецифических-IgE (АС-IgE) к различным компонентам сложных аллергенов.

Подготовка образца

- Образец из цельной ткани или из клеточной культуры.
- Твёрдые ткани сначала измельчаются механически с использованием гомогенизатора или обработки ультразвуком.
- Различные детергенты, соли и буферы применяются для улучшения лизиса клеток и растворения белков.
- Ингибиторы протеаз и фосфатаз добавляются для предотвращения расщепления образцов их собственными ферментами.
- Подготовка тканей часто выполняется при низких температурах, чтобы избежать денатурации белка.

Этапы иммуноблоттинга

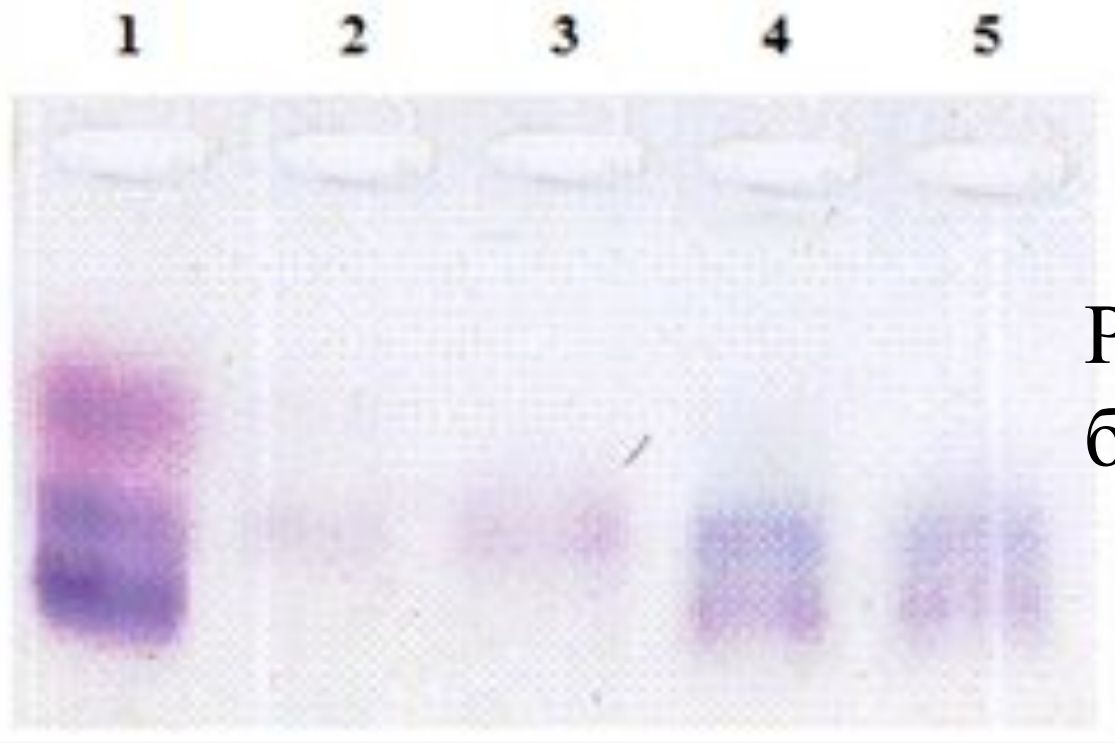
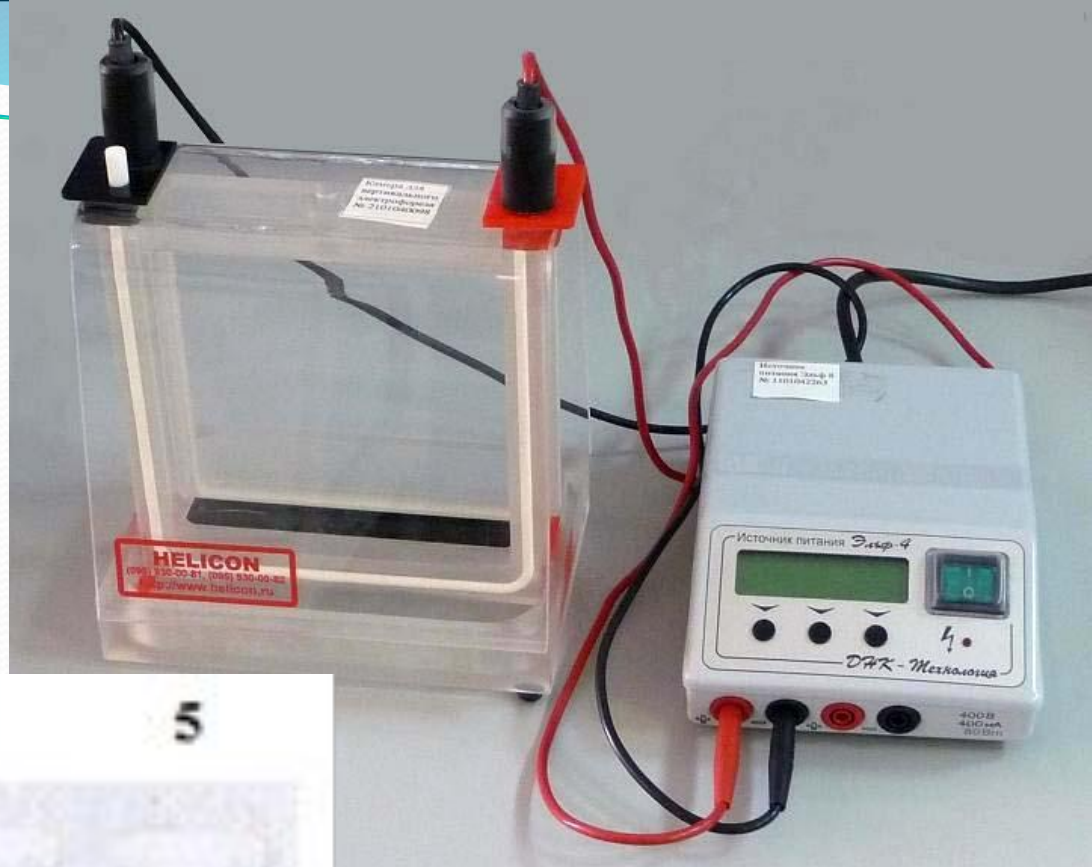
- 1. Разделение белков методом гель-электрофореза
- 2. Перенос белков на мембрану
- 3. Блокирование
- 4. Детекция

Разделение белков методом гель-электрофореза.



- Наиболее распространенный способ разделения белков — электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (англ. SDS) по методу Лэммли.
- Подлежащие анализу белки в присутствии додецилсульфата натрия приобретают одинаковый отрицательный заряд, что делает возможным их разделение в зависимости только от молекулярной массы.

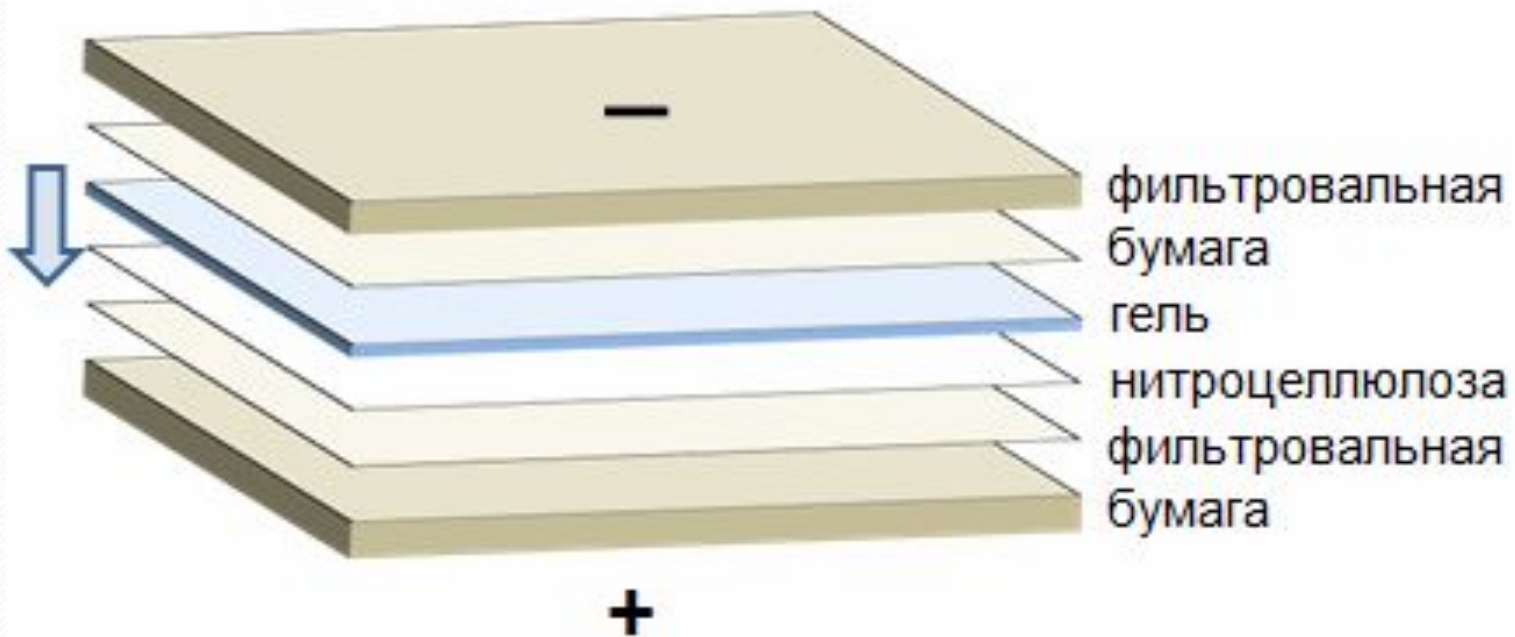
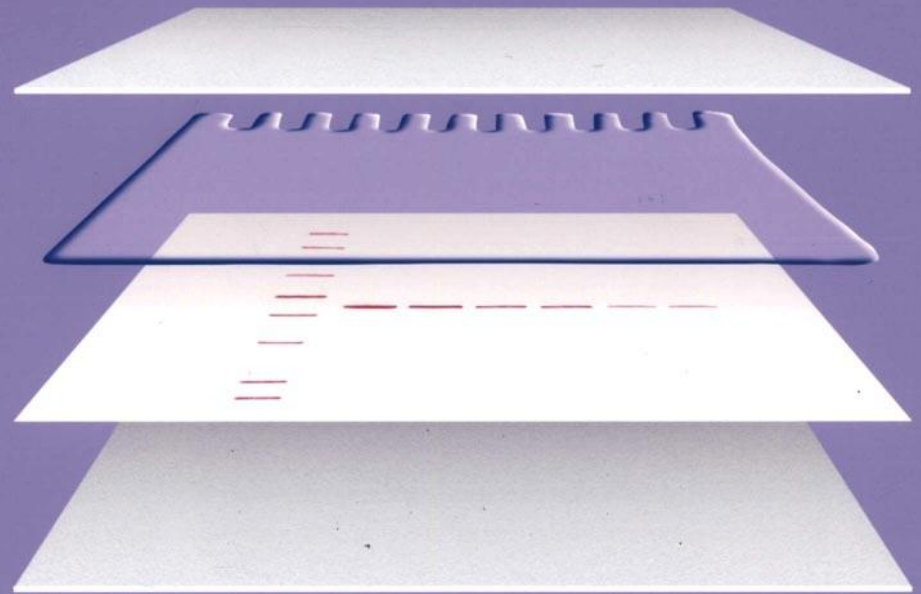
Установка электрофореза



Результат разделения
белков

Перенос белков на мембрану.

- В методе *электроблоттинга* перенос белков из геля на мембрану (изготовленную из нитроцеллюлозы или поливинилиденфторида) происходит под действием электрического тока.
- Белки перемещаются из геля на мембрану с сохранением своего расположения. В результате этого процесса белки оказываются в тонком поверхностном слое мембраны и доступны для дальнейшего связывания с антителами.
- Эффективность электроблоттинга значительно повышается при использовании системы Транс-блот Turbo, позволяющей существенно уменьшить время переноса белков из геля на мембрану (7мин против 2 часов).



Блокирование

- Блокирование неспецифических связываний достигается инкубацией мембраны в разбавленном растворе белка — обычно бычьего сывороточного альбумина или обезжиренного сухого молока с небольшим процентом детергента типа Tween 20 или Triton X-100.
- Блокирование позволяет достигать чистого фона и исключает получение ложноположительных результатов.

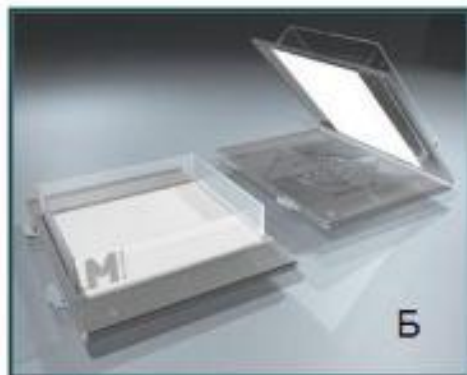


Отмывка

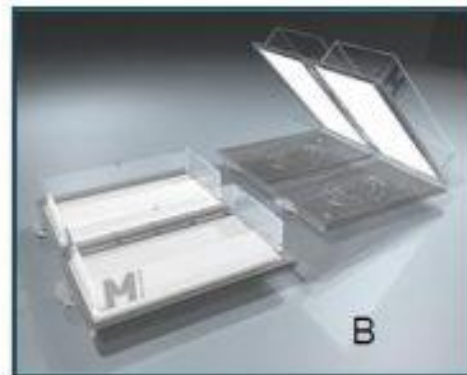
После блокировки мембрану 3х-кратно промывают буфером



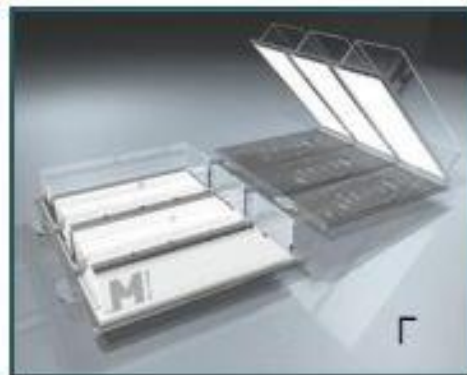
А



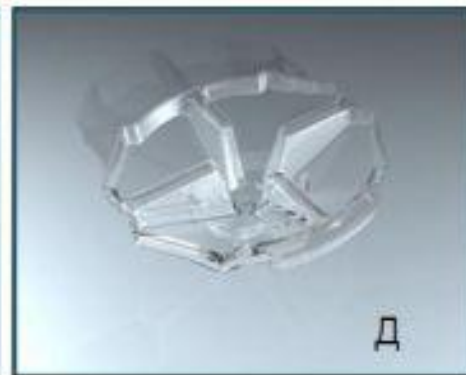
Б



В



Г



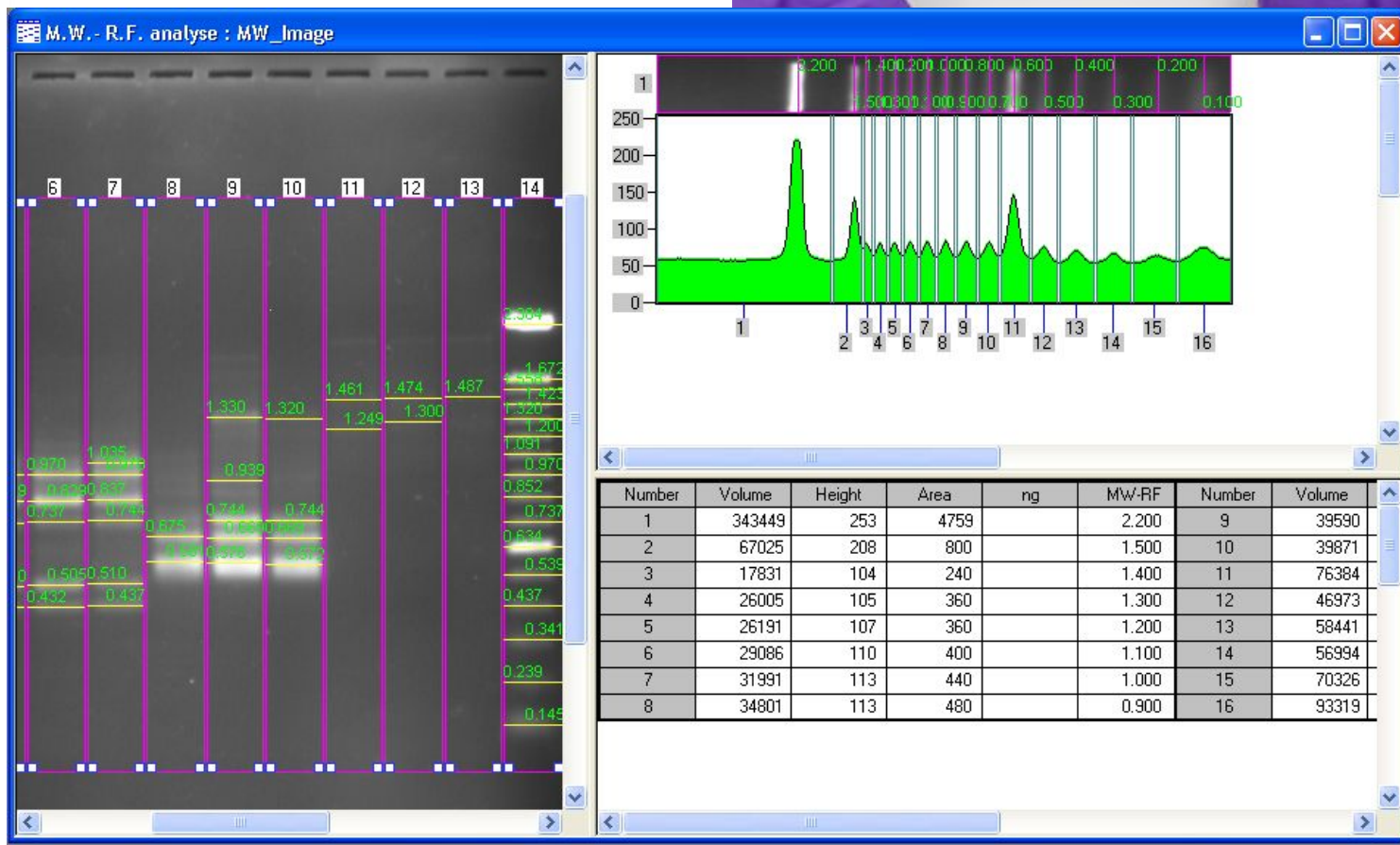
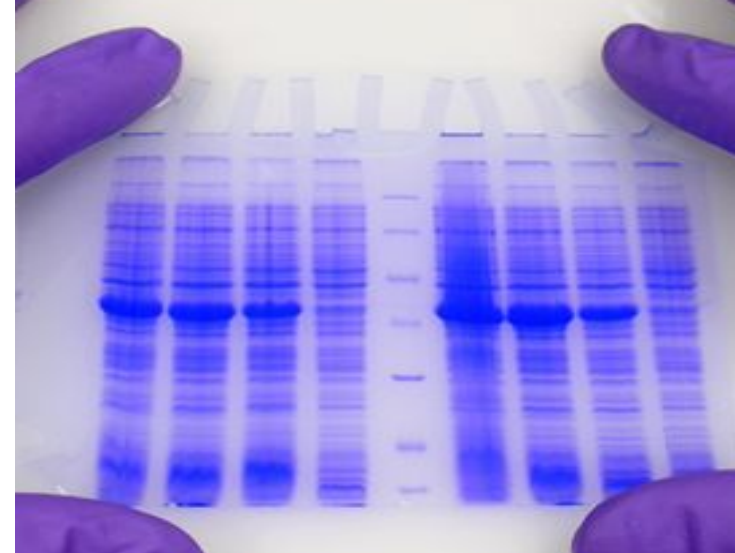
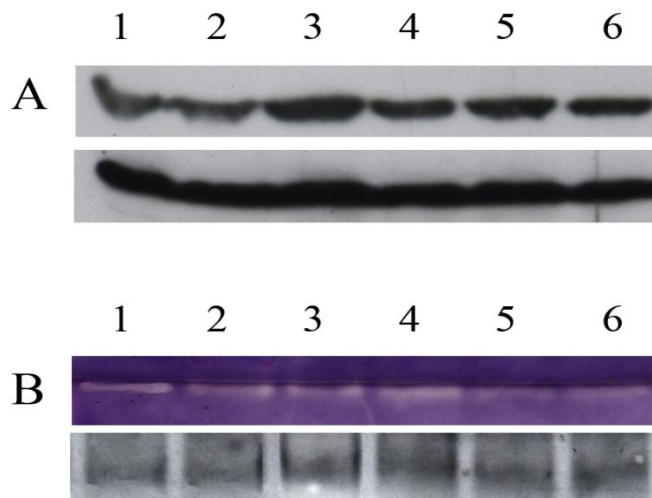
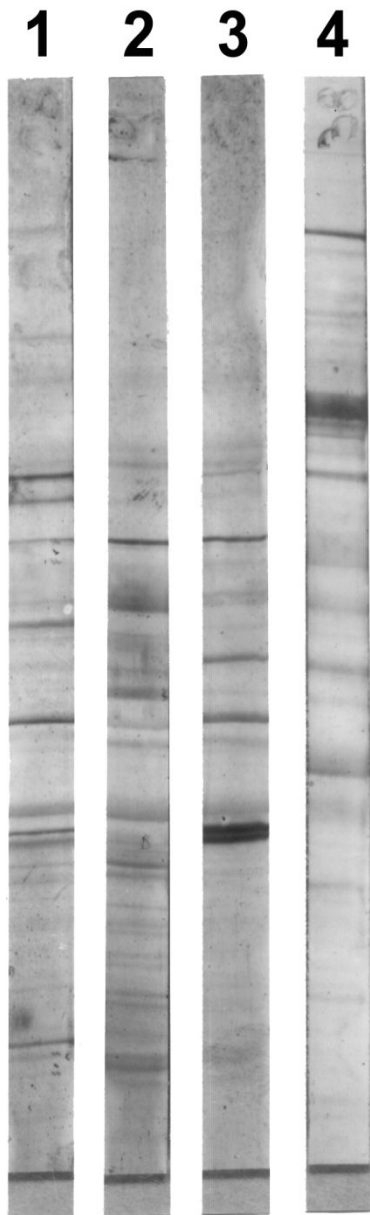
Д

А: Устройство SNAP i.d.
Б: Держатель, 1 блот
В: Держатель, 2 блота
Г: Держатель 3 блота
Д: Коллектор антител

Детекция

- Исследуемые белки детектируют с использованием антител методом «сэндвича»:
- сначала белки связываются с первичными (моно- или поликлональными) антителами
- затем связываются со вторичными антителами, конъюгированными с ферментами.

- Наиболее распространенные вторичные антитела , связанные с пероксидазой хрена.
- Другой метод детекции вторичными антителами использует антитела со связанным флюорофором, который дает излучение в ближней инфракрасной области
- Третий альтернативный метод использует радиоактивную метку вместо фермента



Недостатки

- Классический иммуноблот – неколичественный метод. Некоторые биотехнологические компании создали наборы, которые позволяют исследователям определить количества, но это работает только с чистыми образцами одного и того же белка.
- Иммуноблот может быть выполнен только при наличии первичных антител к исследуемому белку. Хотя сейчас возможно получить специфические антитела против многих белков, они, как правило дорогие. Если белок имеет модификации, то необходимы АТ, специфичные именно к данной модификации белка.