Иммуноблотинг

- **Иммуноблотинг (син. вестернблотинг)** - высокоспецифичный и высокочувствительный референтный метод выявления белков, основаный 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.

Имуннобластинг

- **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.

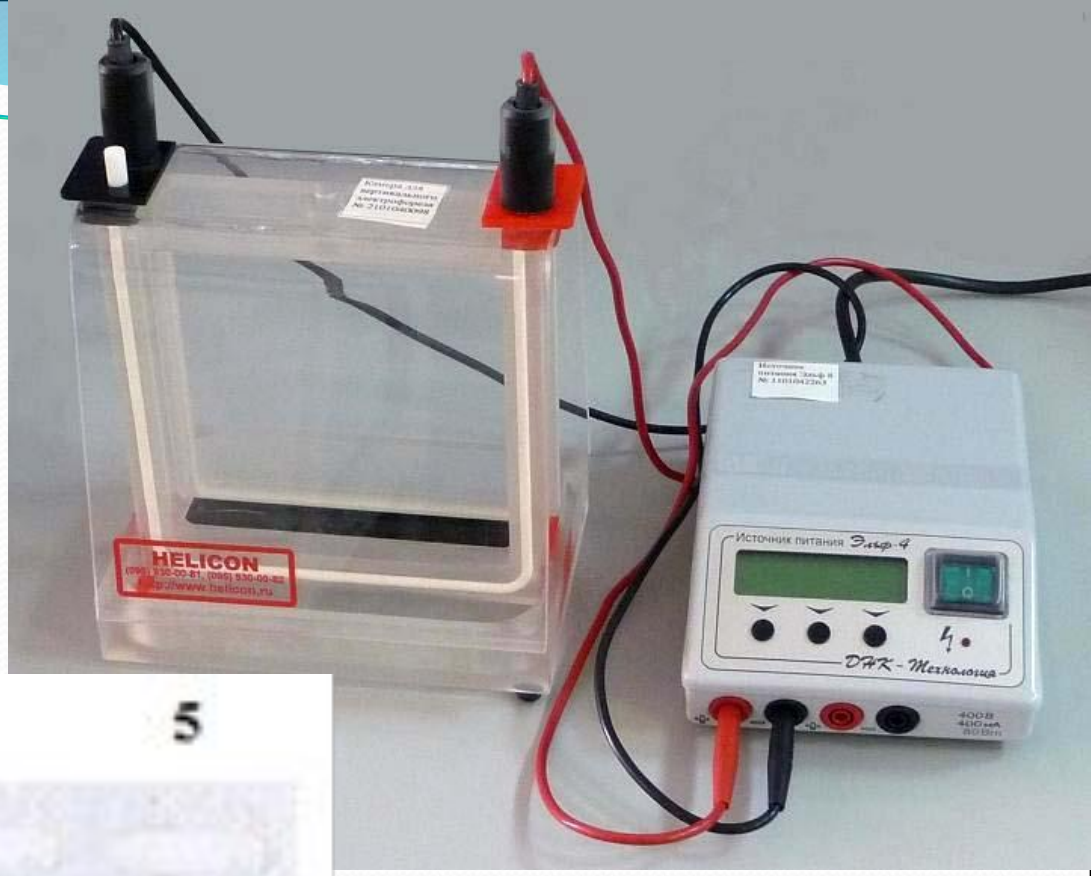
Этапы иммуноблоттинга

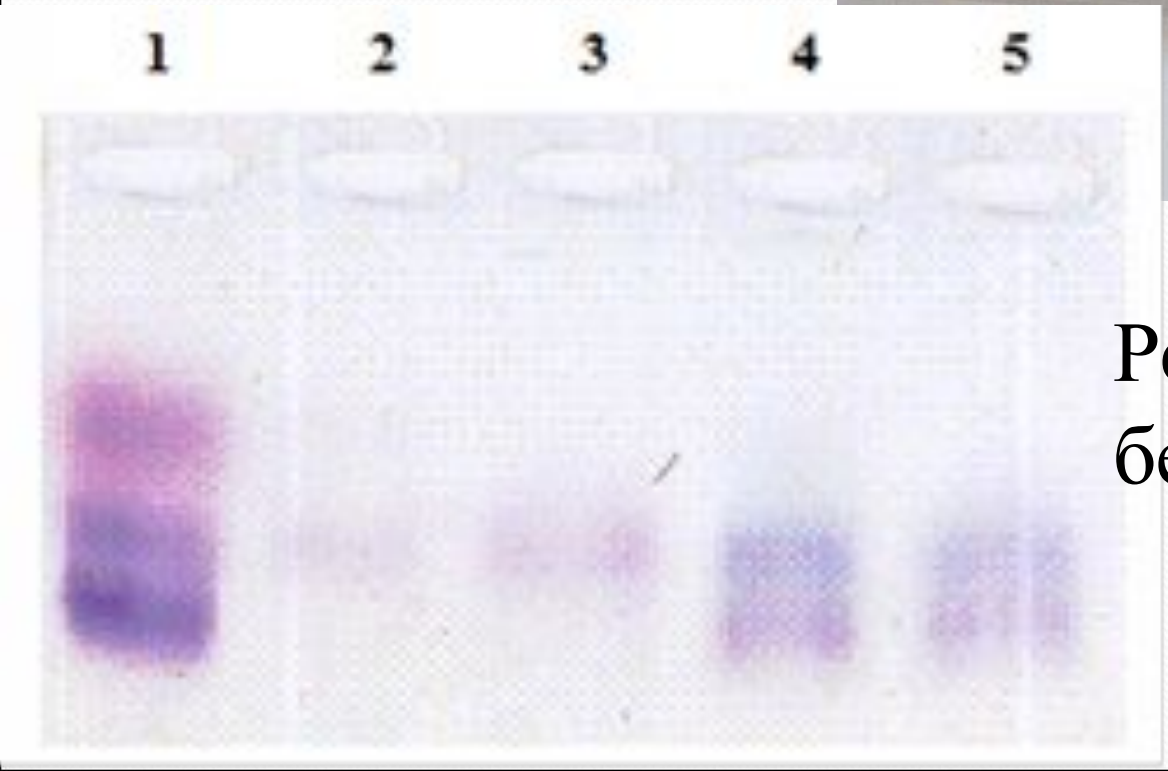
- 1. Разделение белков методом гель-электрофореза
- 2. Перенос белков на мембрану
- 3. Блокирование
- 4. Детекция

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

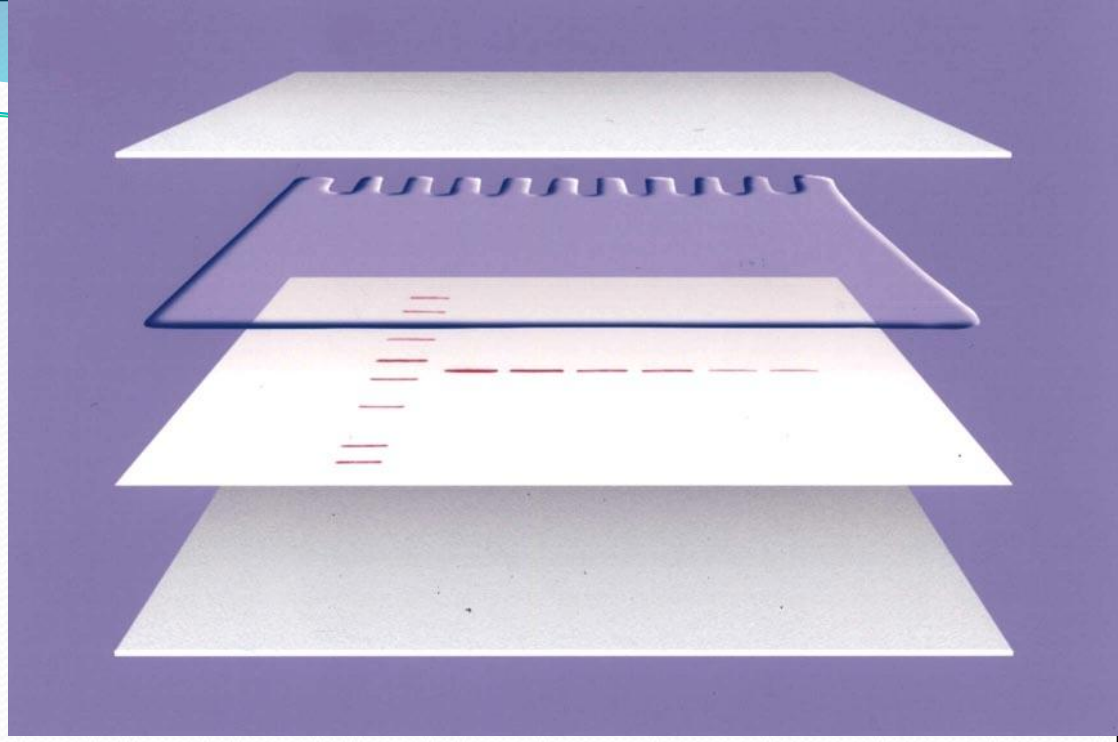


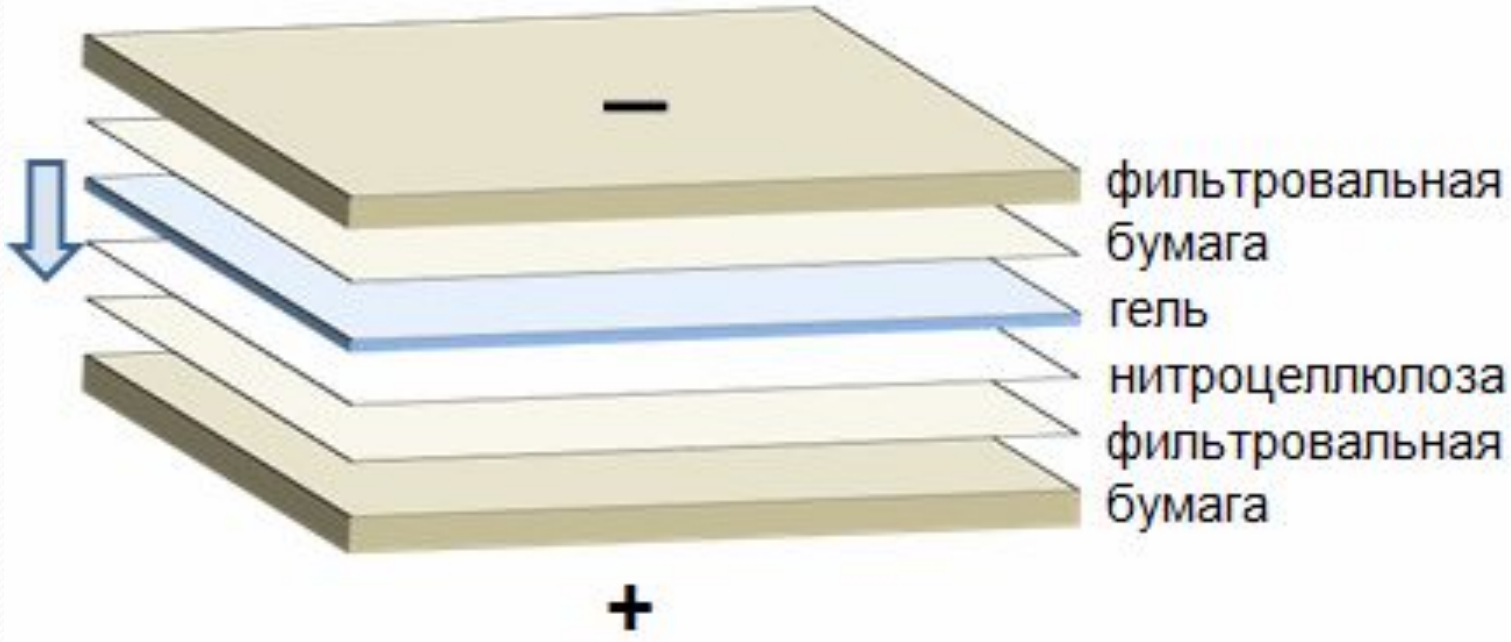


Результат разделения белков

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 ме мбрану (7мин против 2 часов).




−
фильтровальная бумага
гель
нитроцеллюлоза
фильтровальная бумага
+

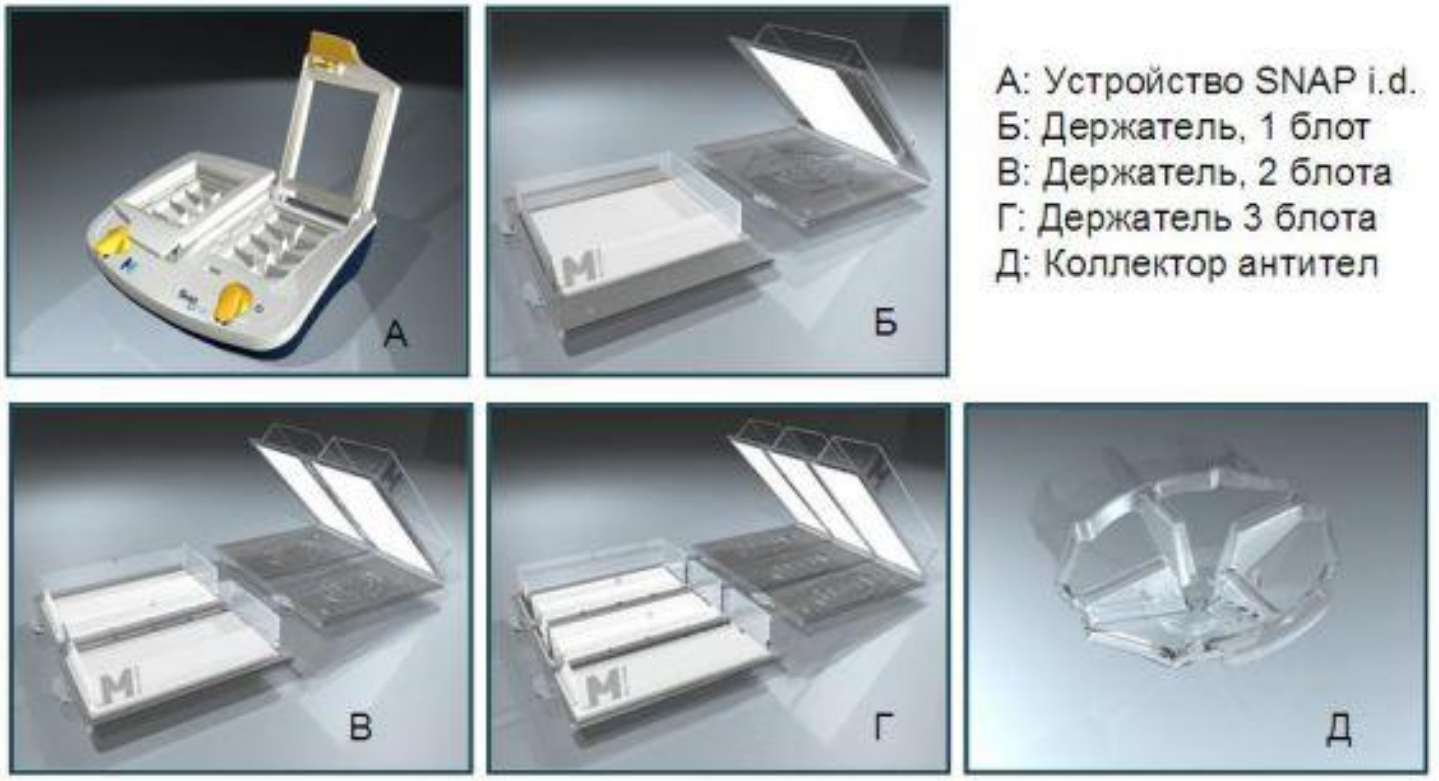
Блокирование

- Блокирование неспецифичных 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.

ROCKLAND
Antibodies and Antibody Tools
www.rockland-inc.com 800-656-ROCK
ROCKLAND

Отмывка

После блокировки мембрану 3х-кратно промывают буфером

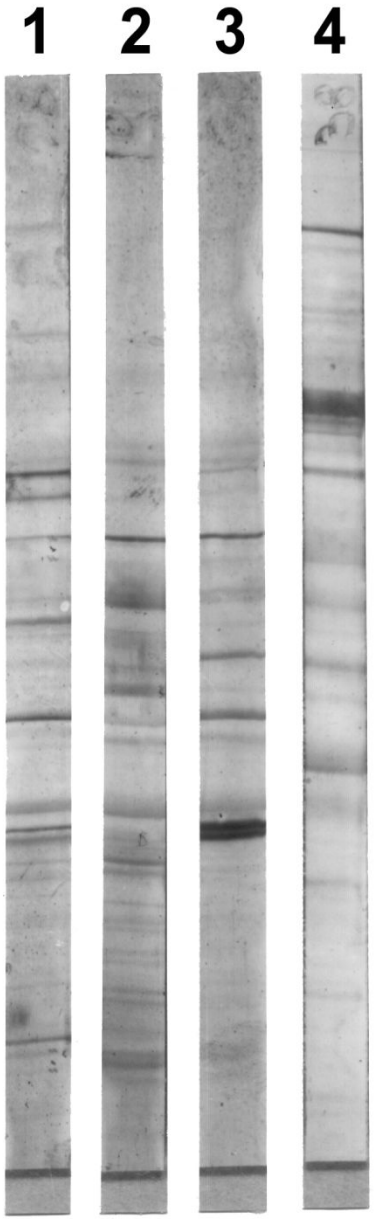


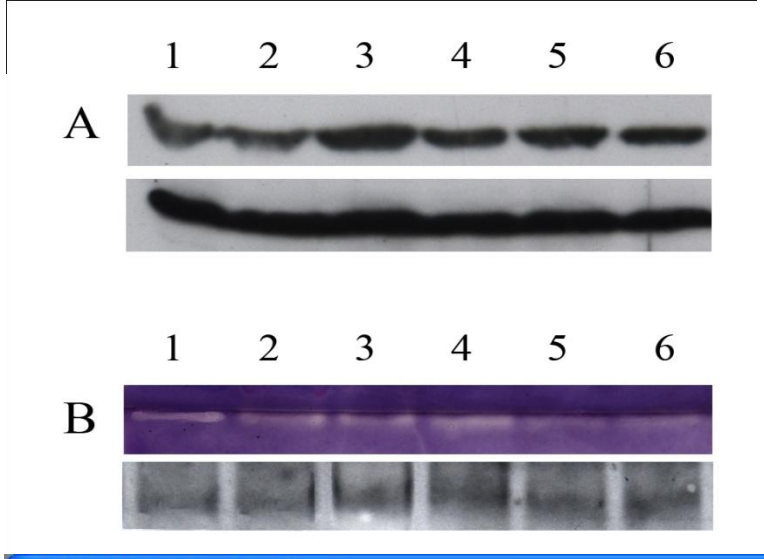
А: Устройство SNAP i.d.
Б: Держатель, 1 блот
В: Держатель, 2 блота
Г: Держатель 3 блота
Д: Коллектор антител

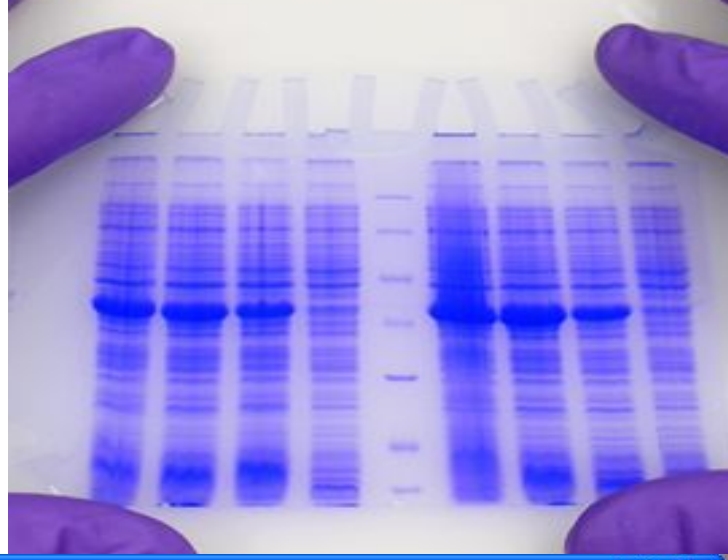
Детекция

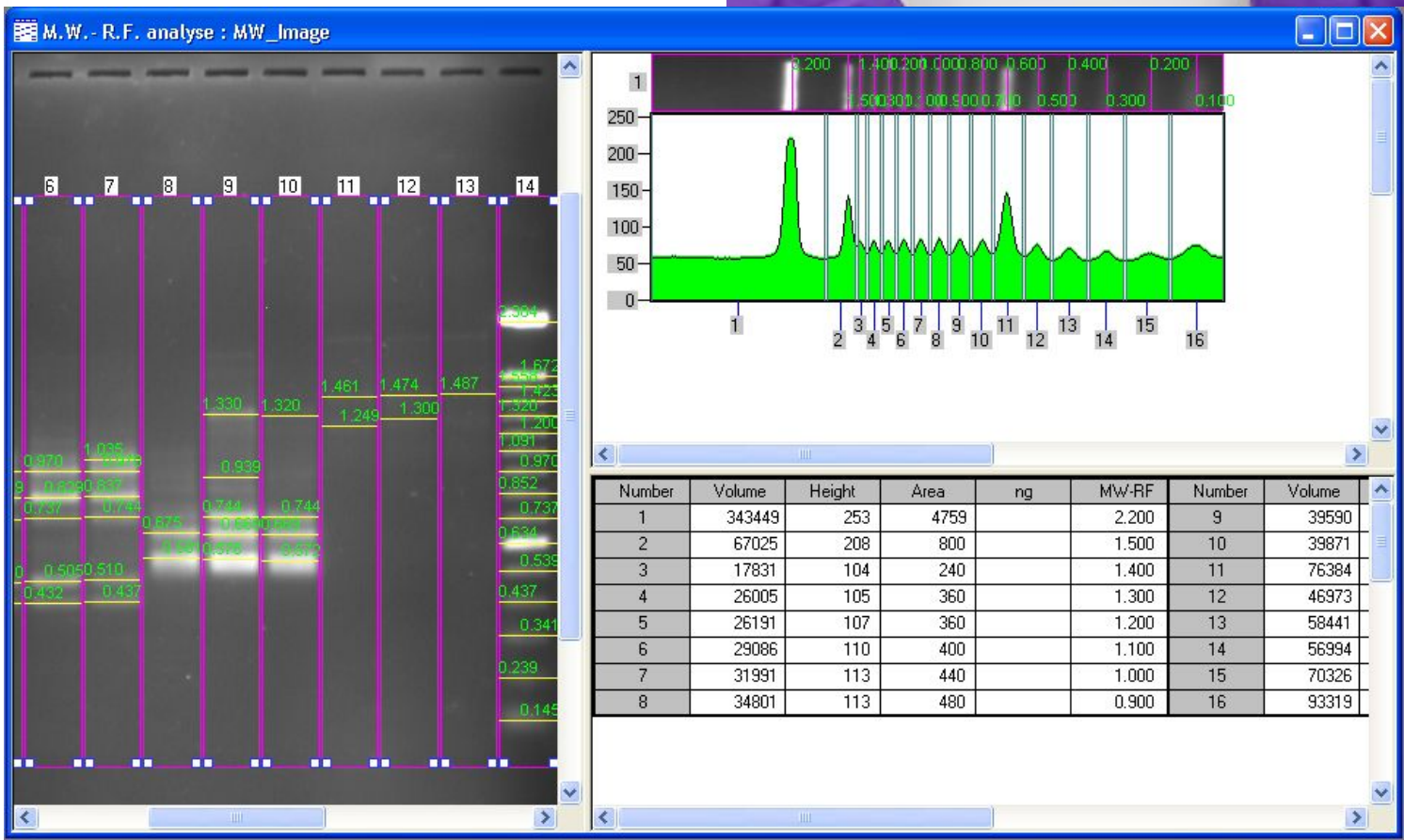
- Исследуемые белки детектируют с использованием антител методом «сэндвича»:
- сначала белки связываются с первичными (моно- или поликлональными) антителами
- затем связываются со вторичными антителами, конъюгированными с ферментами.

- 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









Number	Volume	Height	Area	ng	MW-RF	Number	Volume
1	343449	253	4759		2.200	9	39590
2	67025	208	800		1.500	10	39871
3	17831	104	240		1.400	11	76384
4	26005	105	360		1.300	12	46973
5	26191	107	360		1.200	13	58441
6	29086	110	400		1.100	14	56994
7	31991	113	440		1.000	15	70326
8	34801	113	480		0.900	16	93319

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.