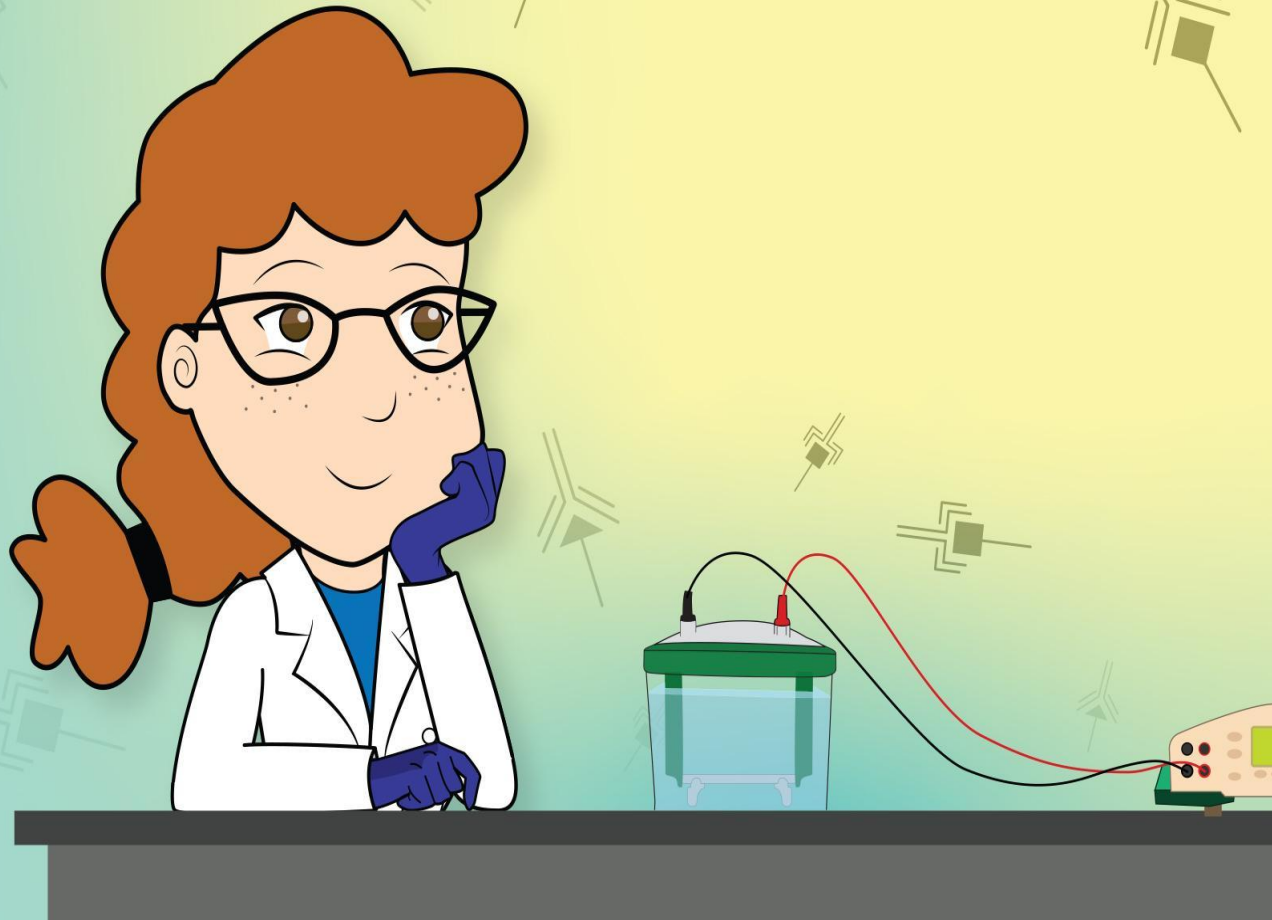
# Western Blotting

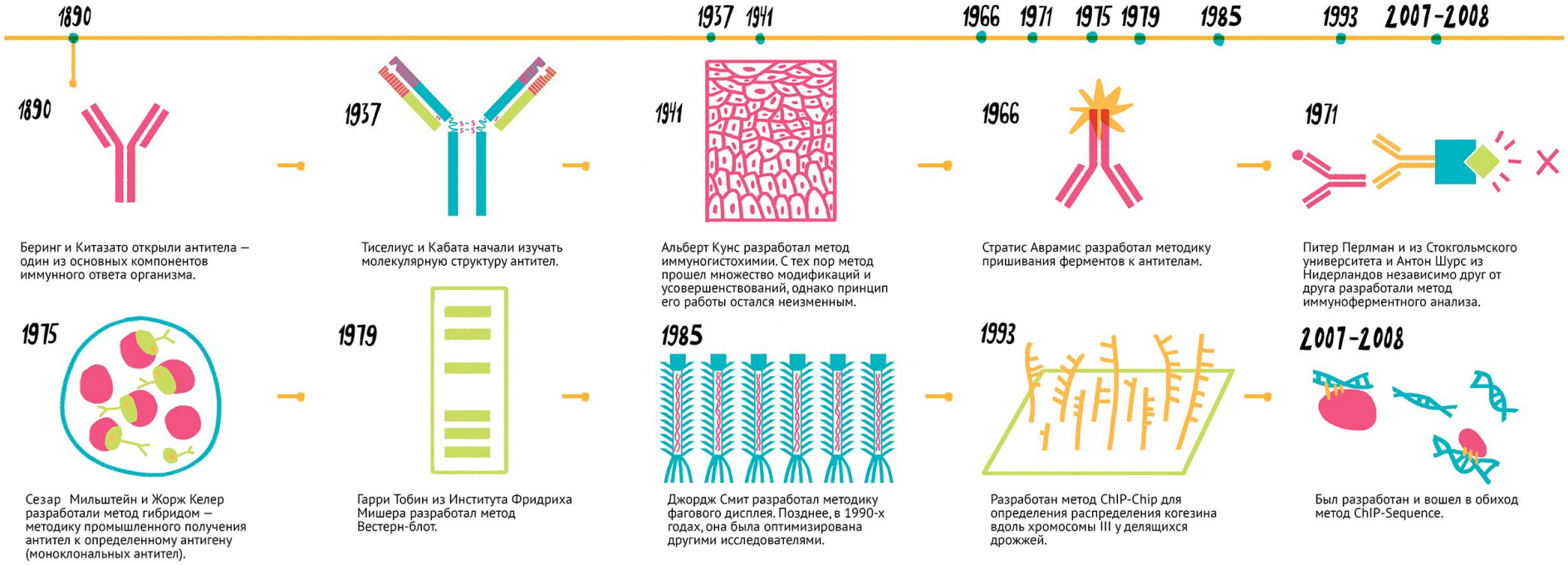
ФГБОУ ВО СПХФУ

**Елизавета Сарсенова**

биолог НОЦ Молекулярных к клеточных технологий



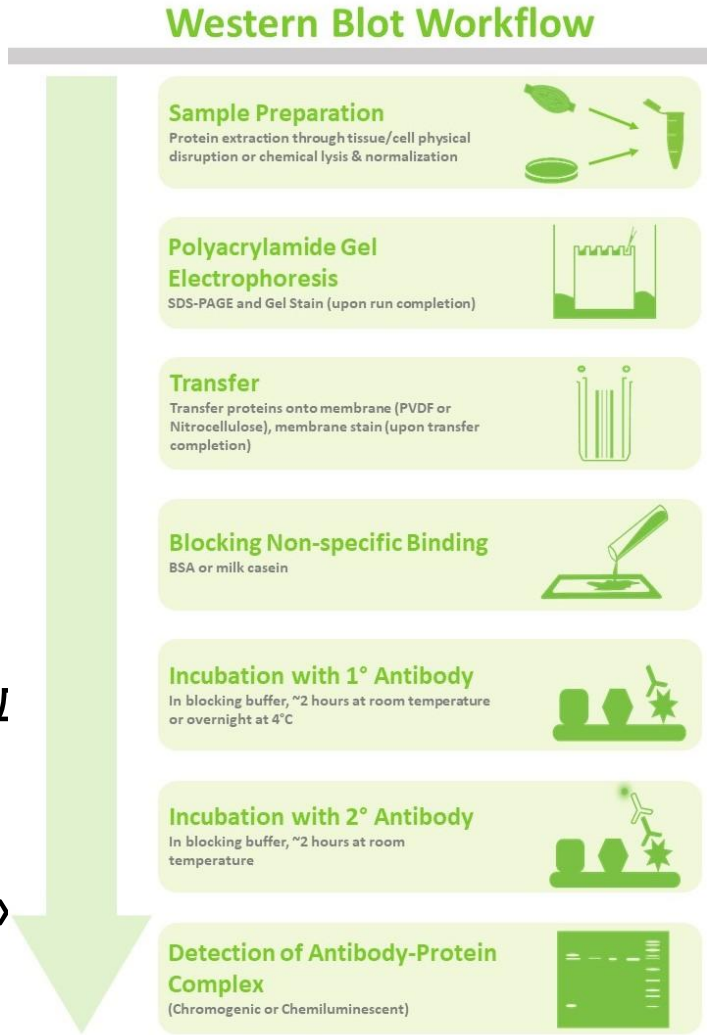
# Иммунологические методы анализа



# Что такое блоттинг?

Блоттинг - перенос НК, белков и липидов на твердую подложку, например, мембрану и их иммобилизация

Вестерн блот - аналитический метод используемый для определения в образце специфичных белков, основанный на технике «блоттинга»

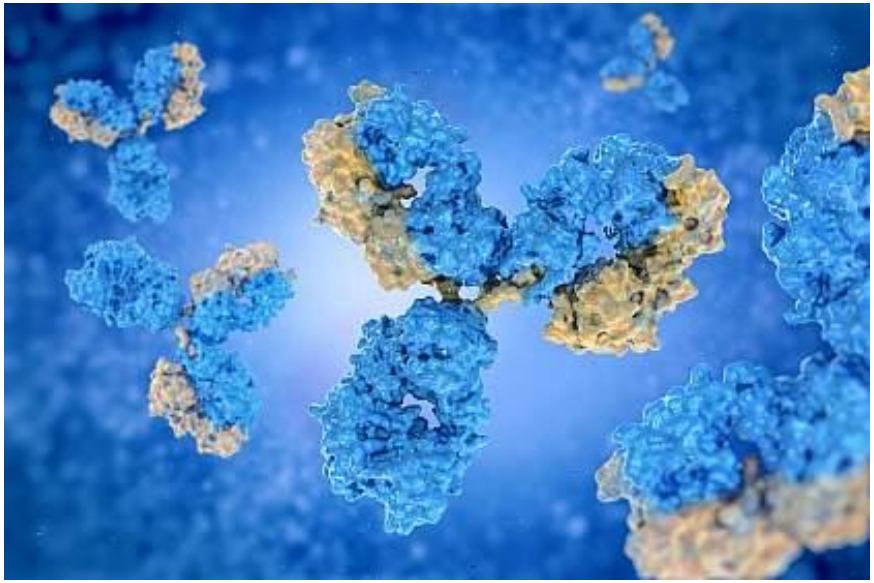


# Виды блоттинга

- Саузерн блот (анализ ДНК)
- Вестерн блоттинг (анализ белков)
- Нозерн блоттинг (анализ РНК)
- Истерн-блотнг (детекция посттрансляционных модификаций белков)
- Саусвестерн блоттинг (анализ белков, связанных с ДНК)

# Применение

- ✔ Оценка изменений концентрации целевого белка
- ✔ Распознавание модификаций целевого белка
- ✔ Выявление взаимодействия целевого белка с другими белками



# Этап №1
# Пробоподготовка

# Выделение белков

- ✔ Из органов и тканей
- ✔ Из клеточной культуры
- ✔ Из физиологических жидкостей
- ✔ Из культуральной жидкости
- ✔ Готовые белковые растворы
- ✔ Оценка качества препаратов

# Выделение белков из клеток

Химические методы

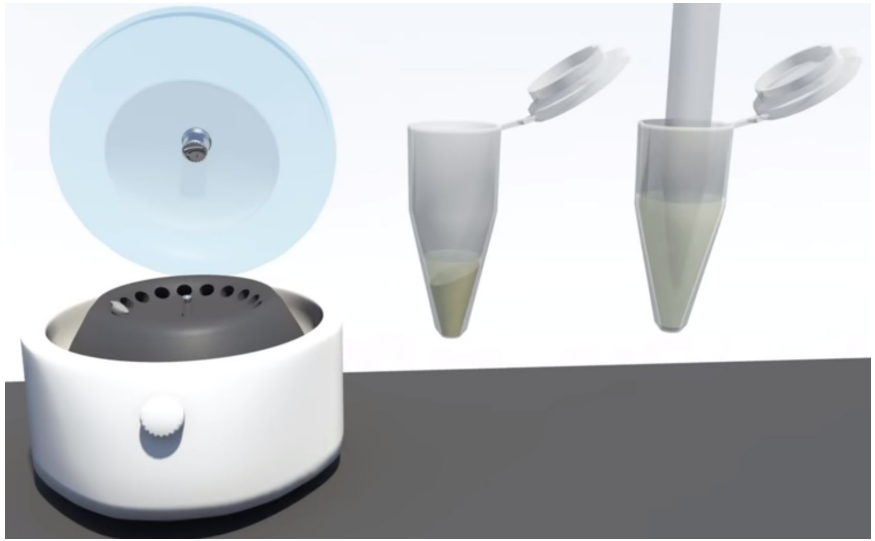
✔ Химический лизис (детергенты)

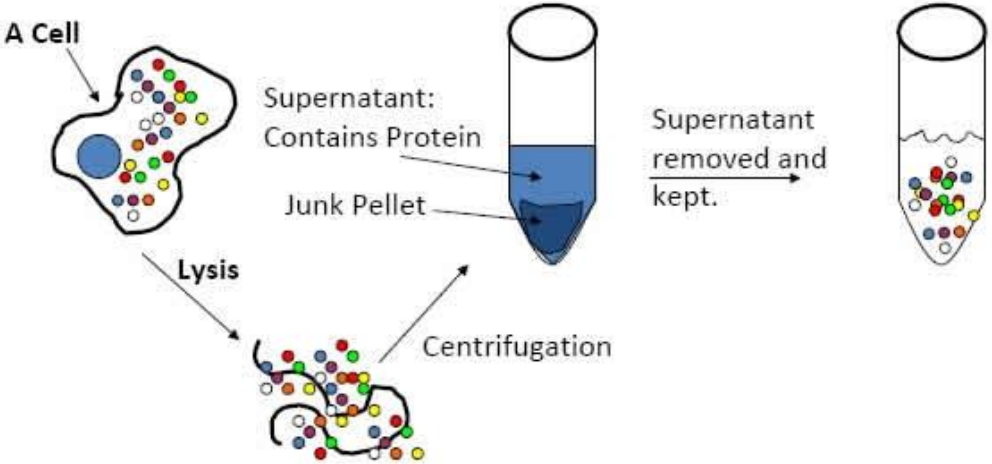
Физические методы

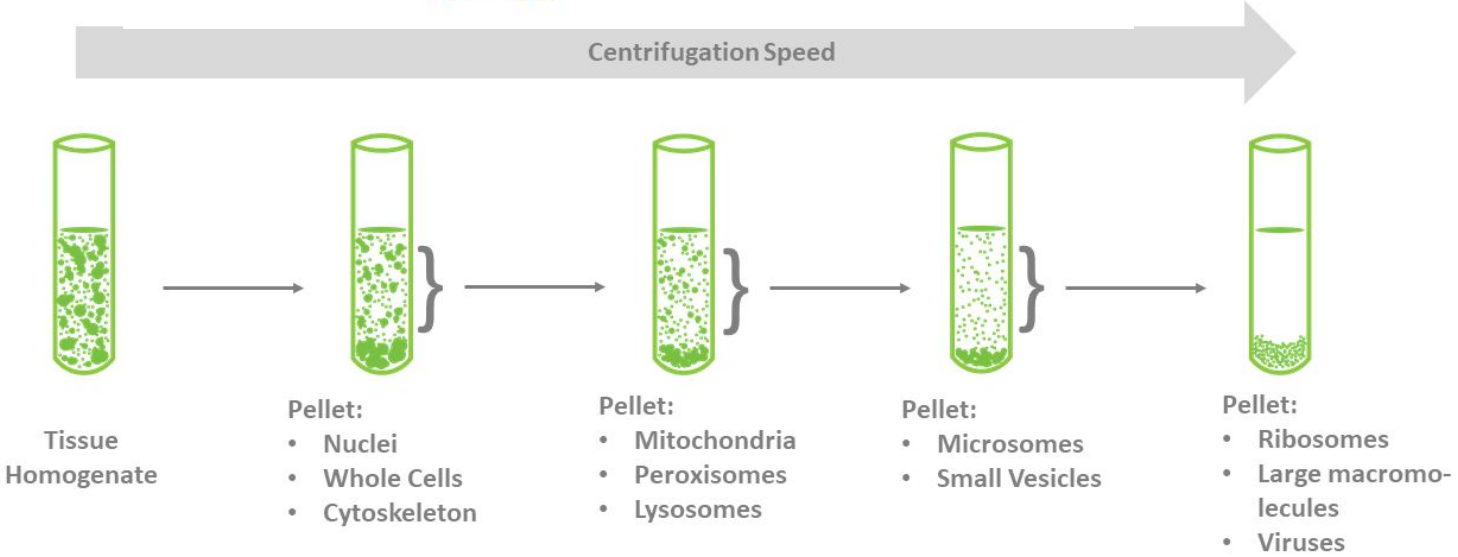
✔ Соникация

✔ Гомогенизирование

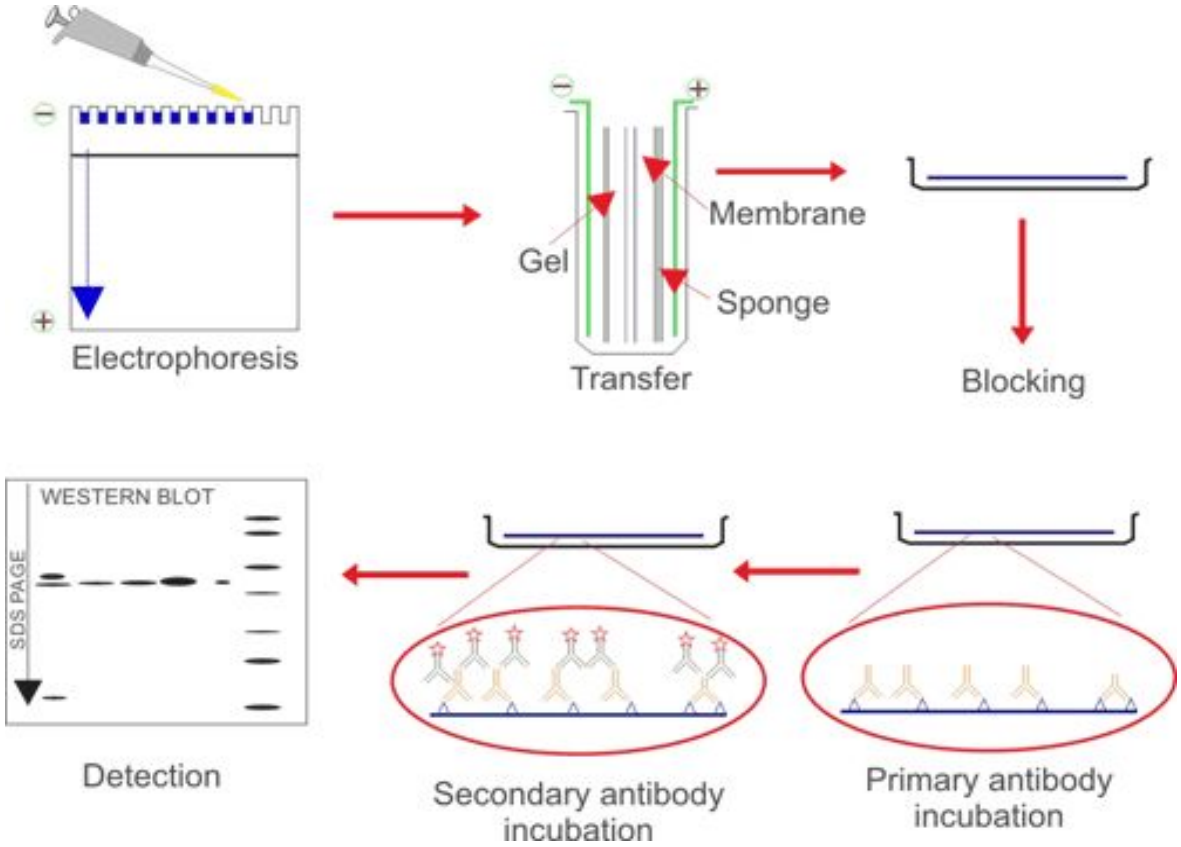
# Центрифугирование

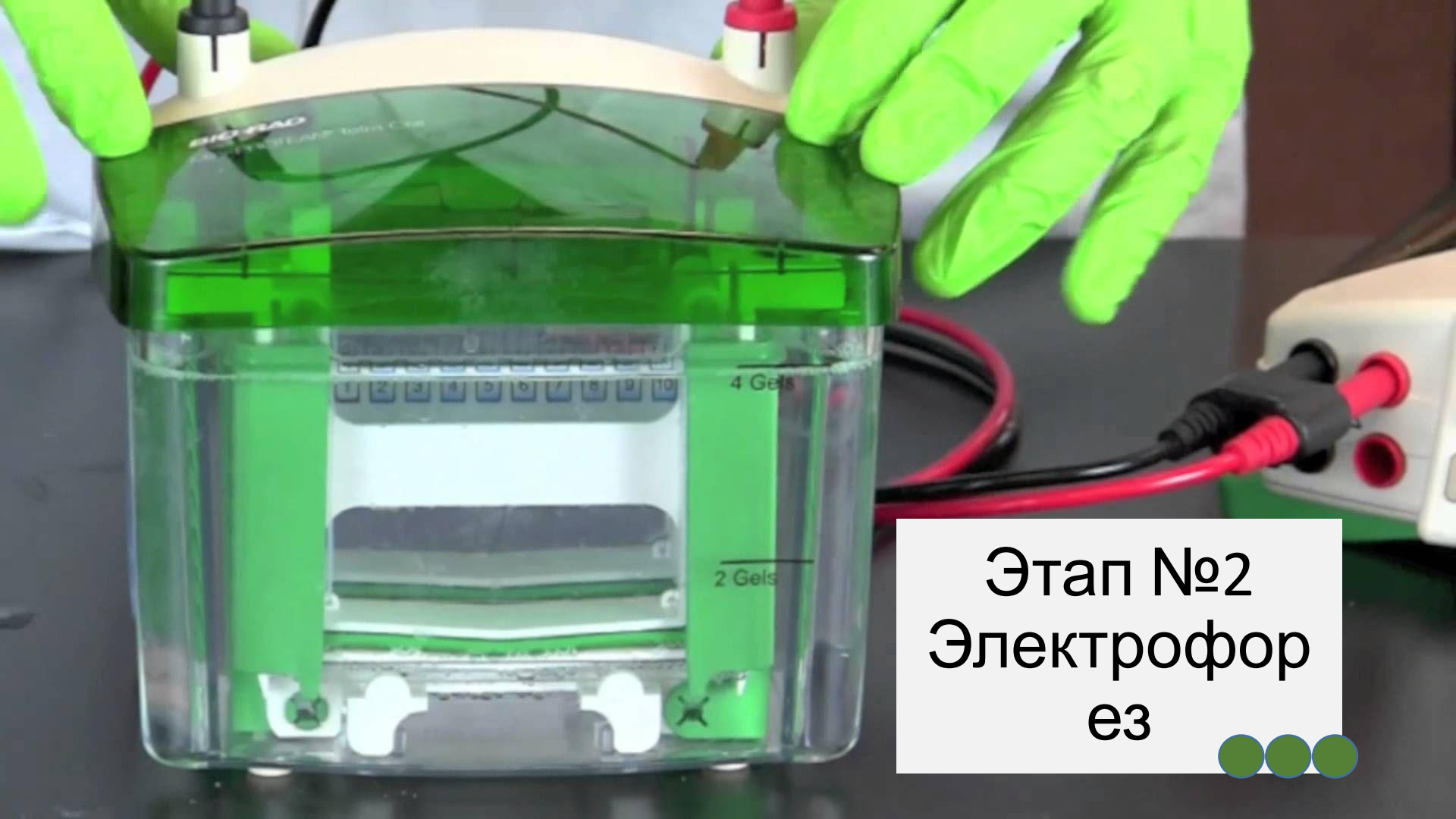



A Cell
Supernatant:
Contains Protein
Junk Pellet
Supernatant
removed and
kept.
Lysis
Centrifugation


Centrifugation Speed
Tissue
Homogenate
Pellet:
• Nuclei
• Whole Cells
• Cytoskeleton
Pellet:
• Mitochondria
• Peroxisomes
• Lysosomes
Pellet:
• Microsomes
• Small Vesicles
Pellet:
• Ribosomes
• Large macromo-
lecules
• Viruses

# Общая схема анализа

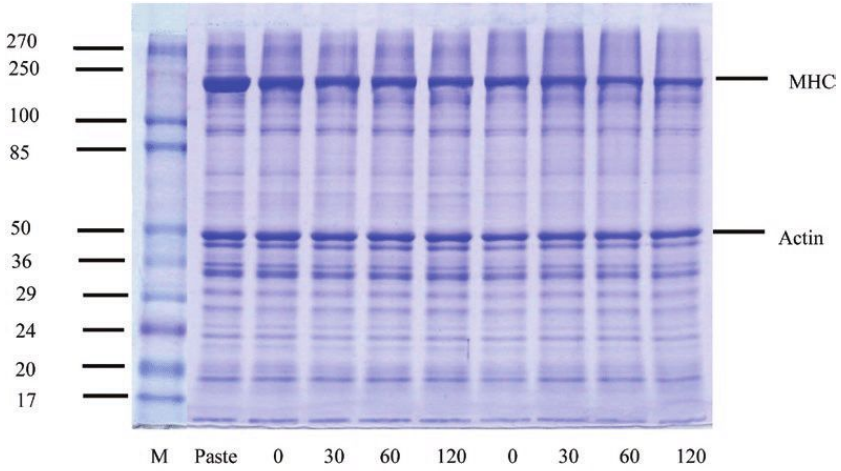




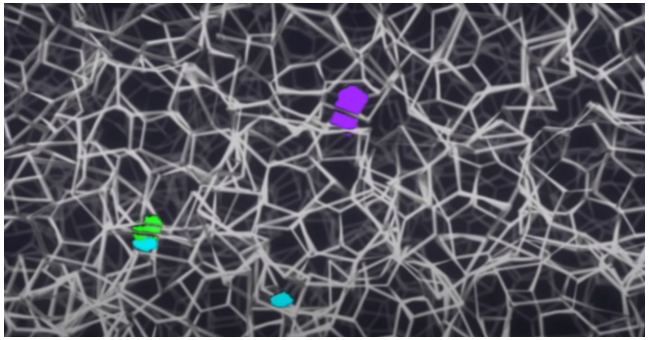

# Этап №2 Электрофорез

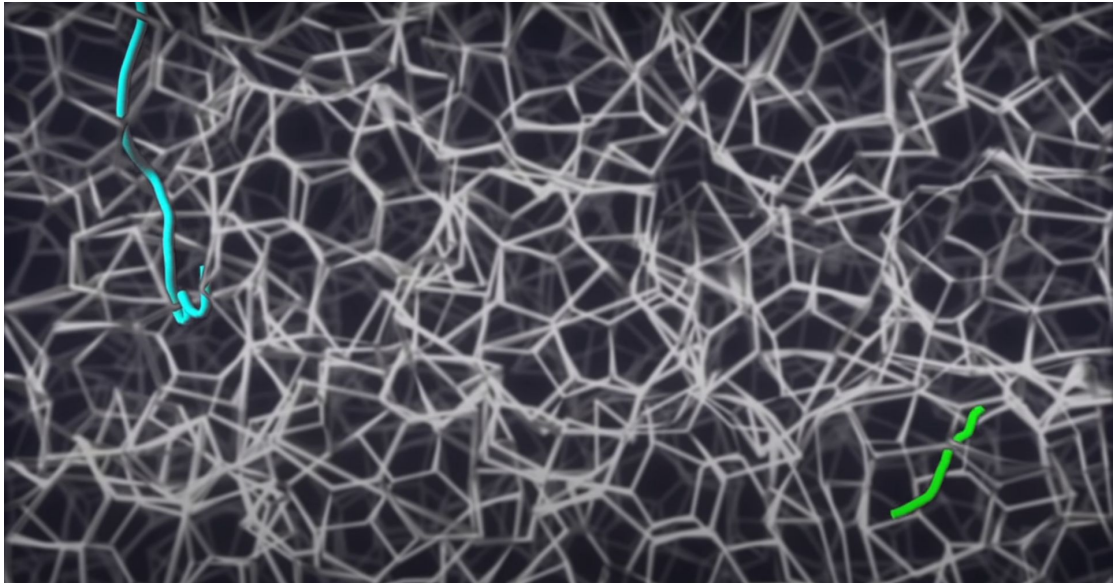
# Электрофорез

- ✔ Разделение белков в клеточном лизате по размеру
- ✔ Полиакриламидный гель – разделяющий гель, по которому белки способны двигаться под действием электрического тока с различной скоростью (в зависимости от их величины, заряда и некоторых других факторов);
- ✔ SDS (натрия додецилсульфат) – детергент, обеспечивающий денатурацию белков и придающий всем полипептидам отрицательный заряд

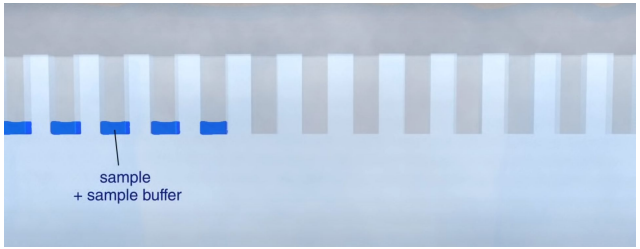


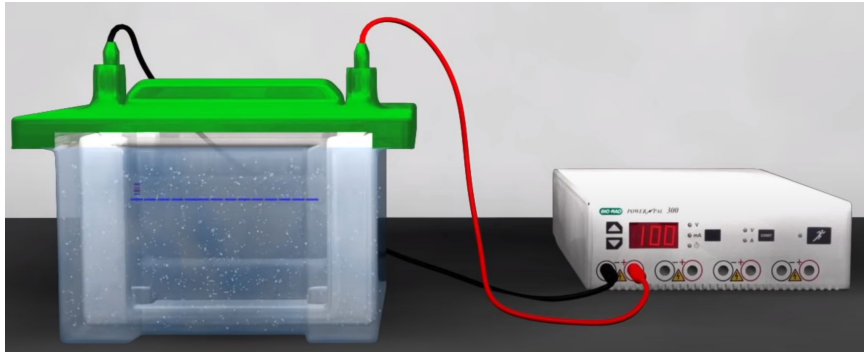
# Чем меньше белок, тем быстрее они проходит через полиакриламидный гель

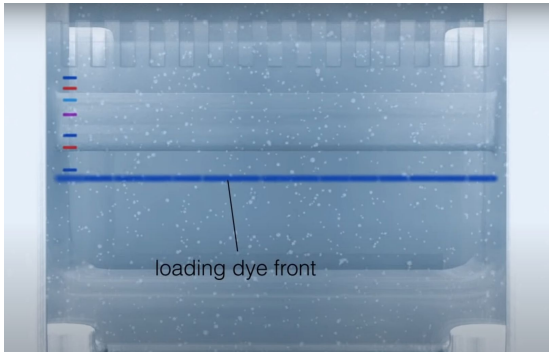


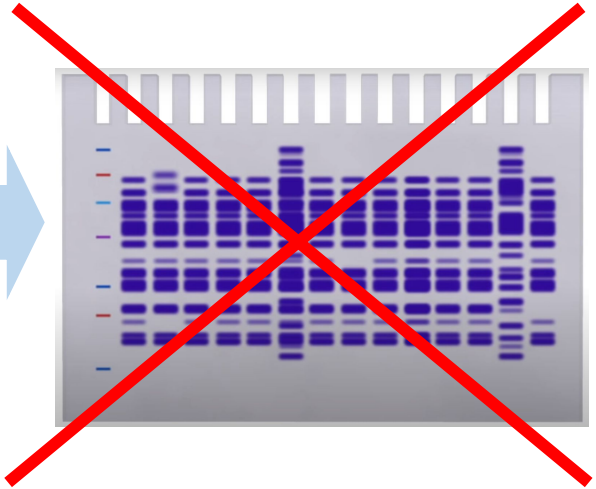


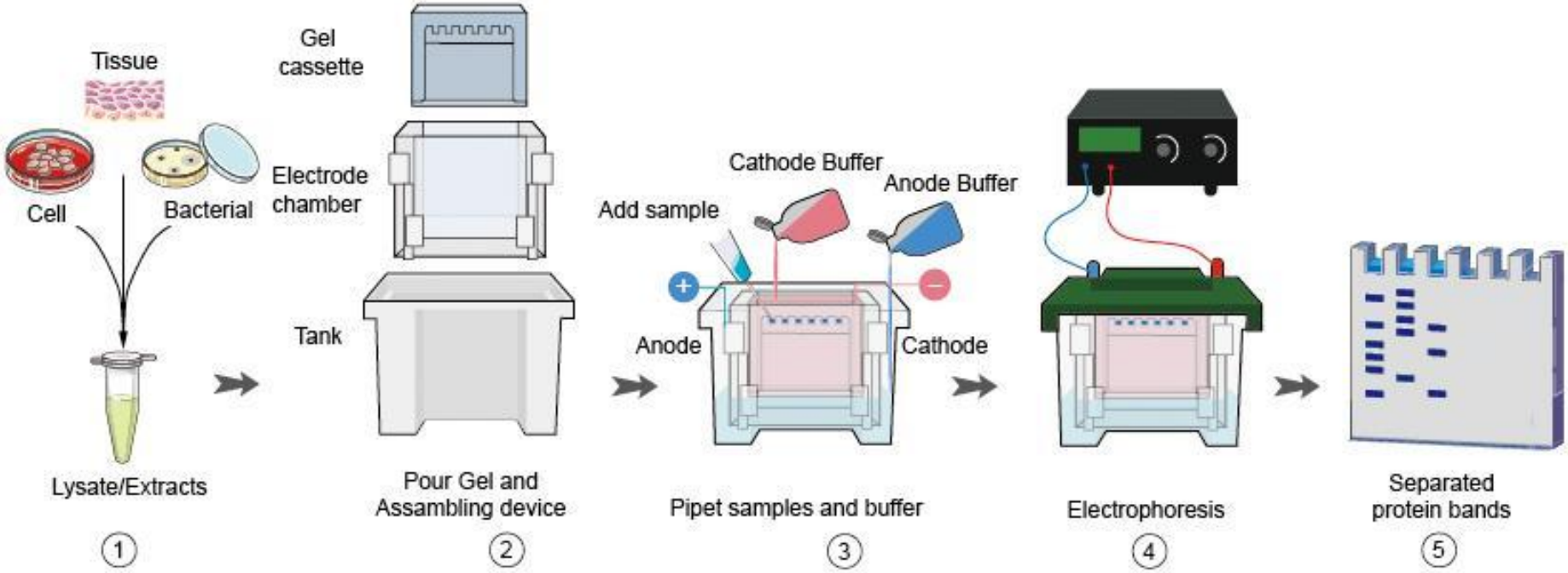
# Гель-электрофорез





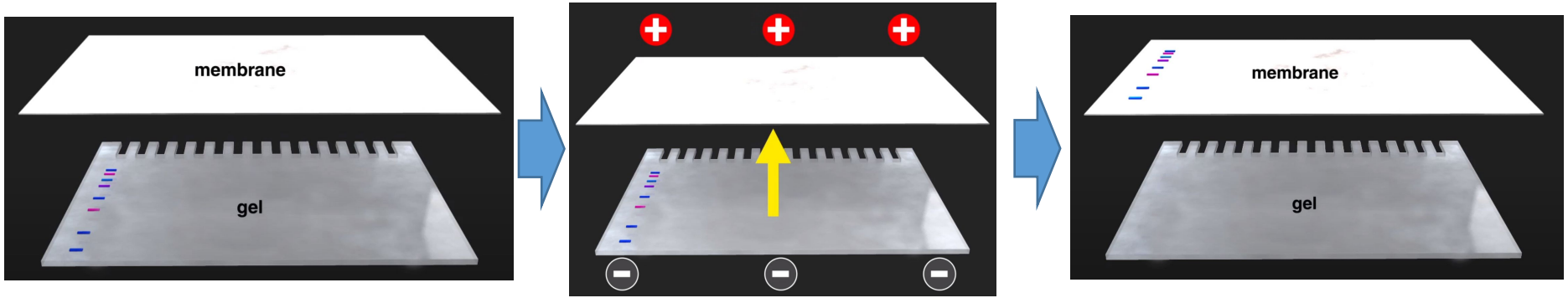



Tissue
Cell
Bacterial
Lysate/Extracts
1
Gel cassette
Electrode chamber
Tank
Pour Gel and Assambling device
2
Cathode Buffer
Anode Buffer
Add sample
Anode
Cathode
Pipet samples and buffer
3
Electrophoresis
4
Separated protein bands
5

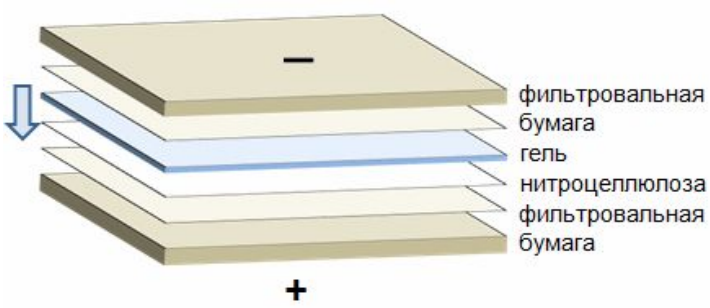
# Этап №3
# Перенос

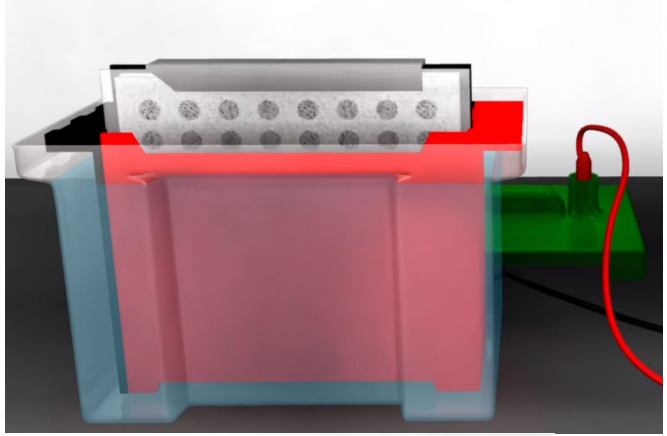
# Перенос

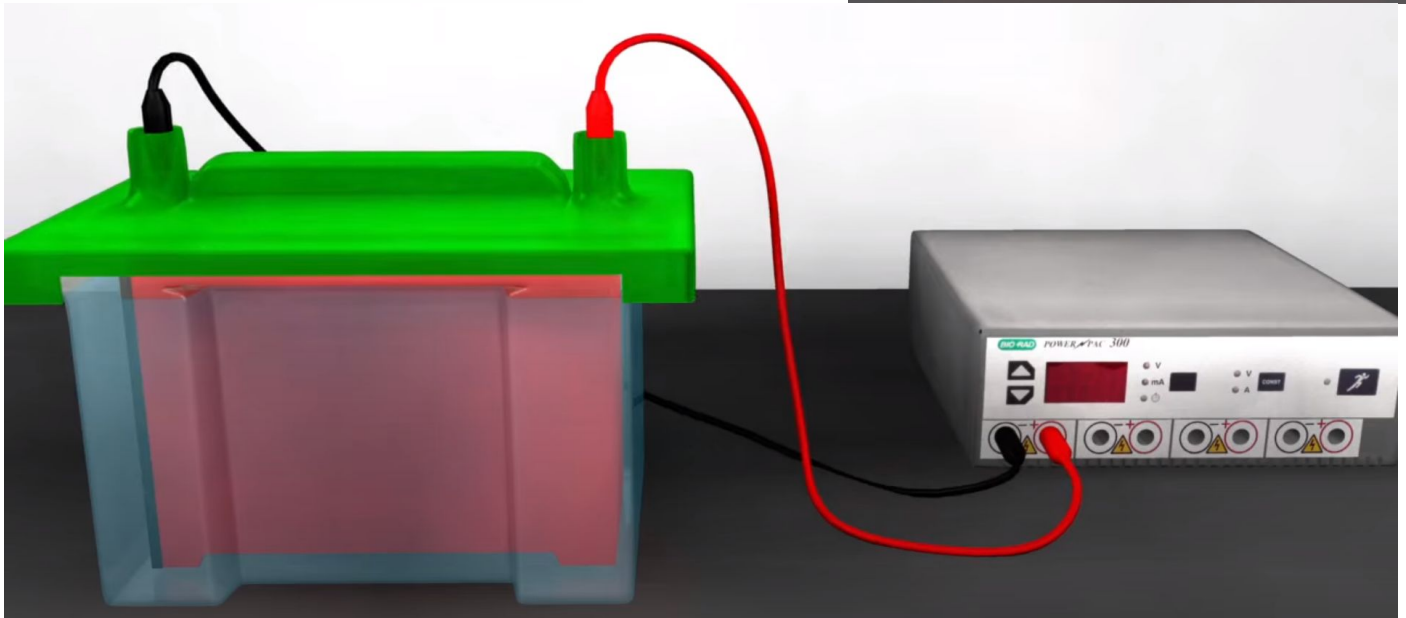
- ✔ Под действием электрического тока белки мигрируют из геля на мембрану
- ✔ Мембраны с высокой способностью связывания белков (обычно это нитроцеллюлоза или PVDF)

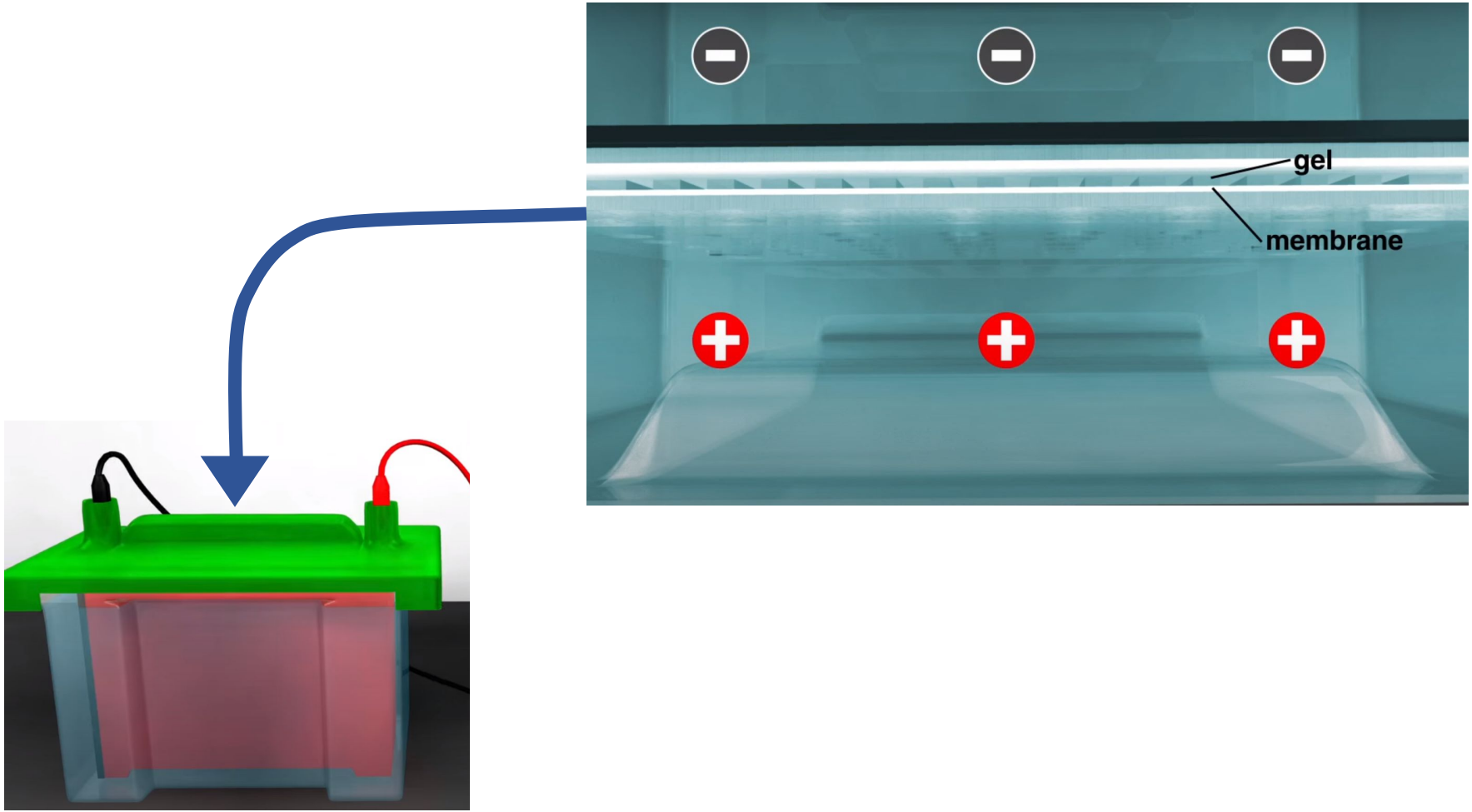


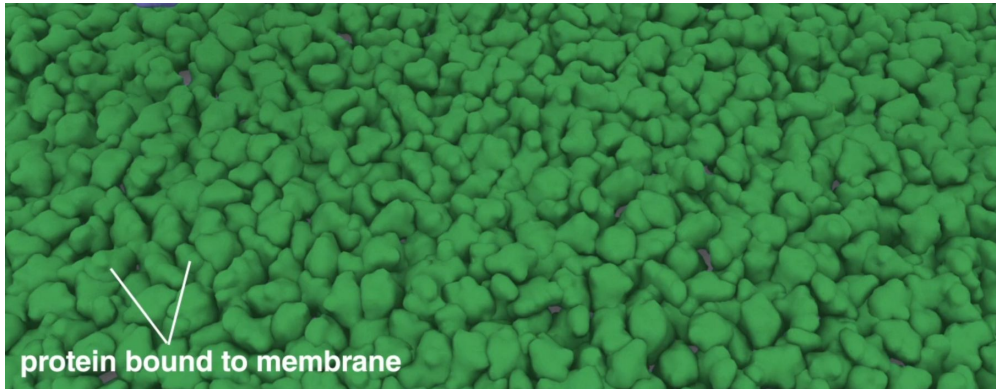
# перенос

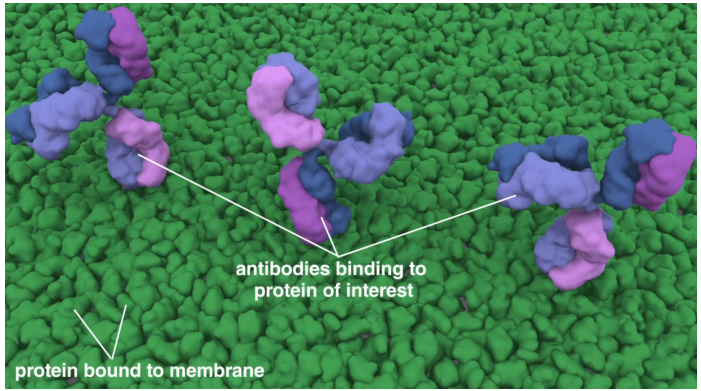

–
фильтровальная
бумага
гель
нитроцеллюлоза
фильтровальная
бумага
+

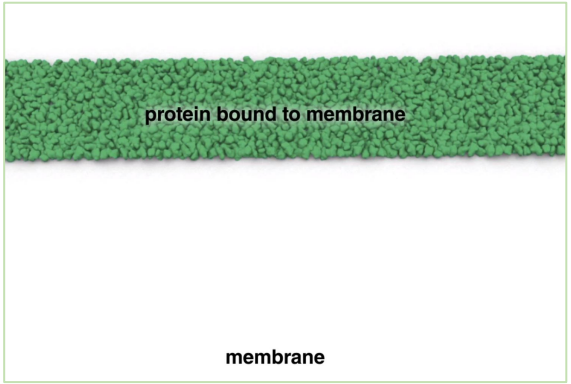


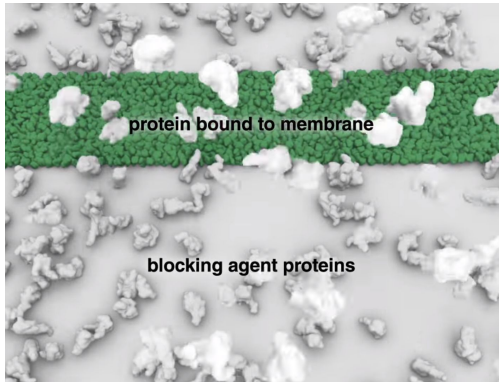

BIO-RAD
POWER PAC 300

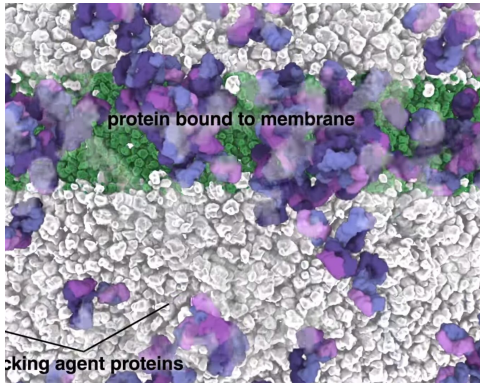

gel
membrane


protein bound to membrane

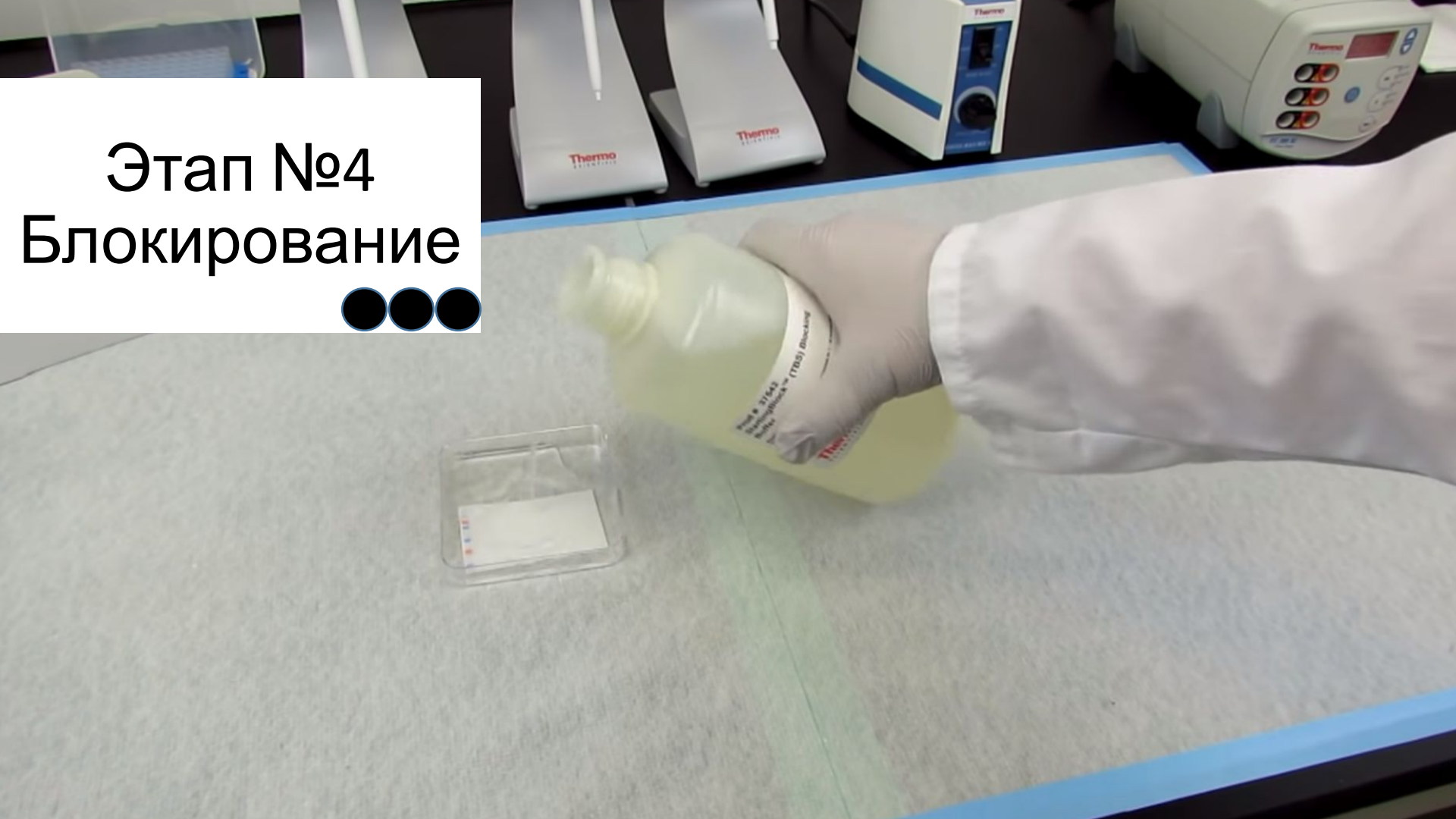

antibodies binding to
protein of interest
protein bound to membrane


protein bound to membrane
membrane


protein bound to membrane
blocking agent proteins

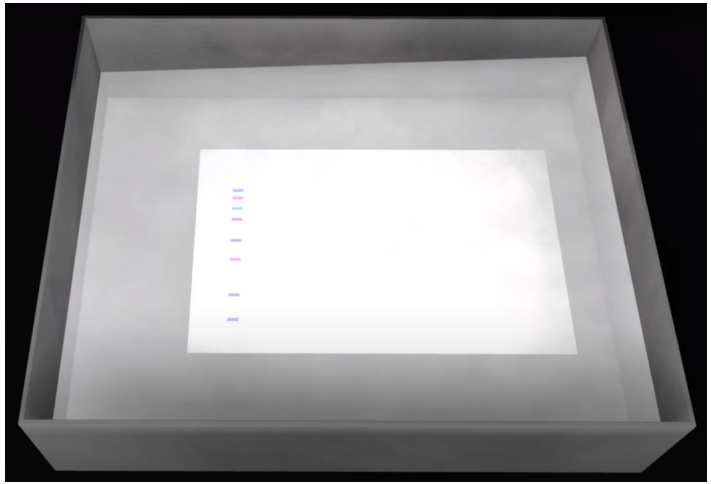

protein bound to membrane
cking agent proteins

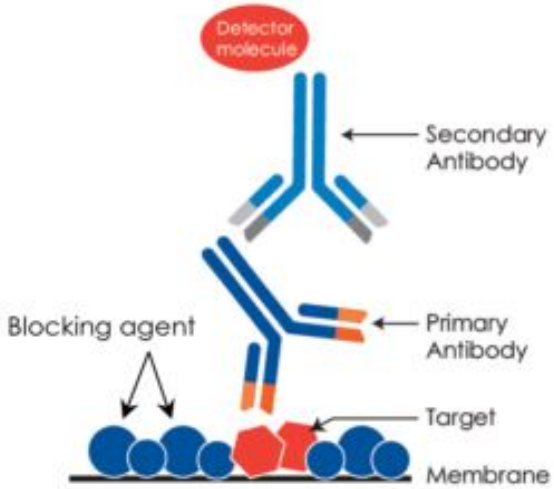
# Этап №4
# Блокирование



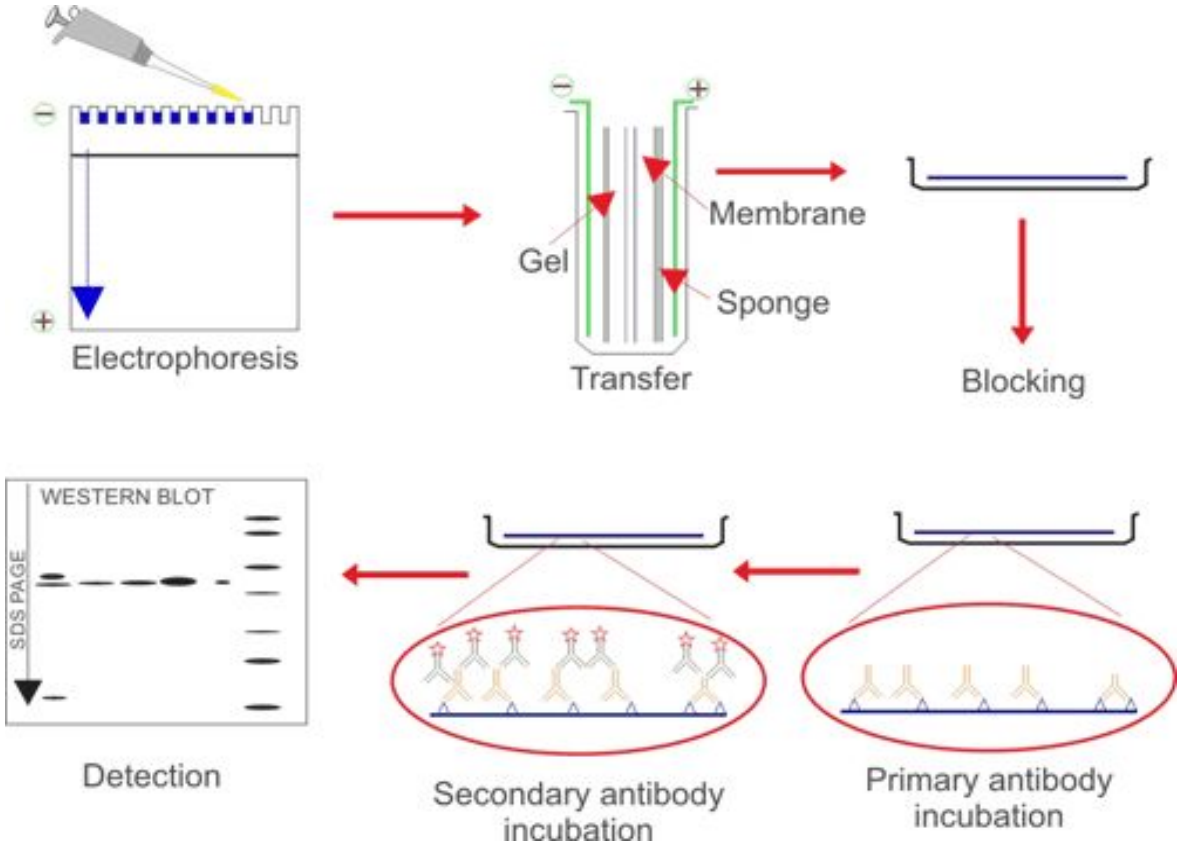
# Блокирование

- ✔ Процесс, используемый для исключения неспецифического связывания мембраной антител, используемых для детекции белка
- ✔ Обычно с этой целью мембрану помещают в разбавленный раствор БСА (бычий сывороточный альбумин)





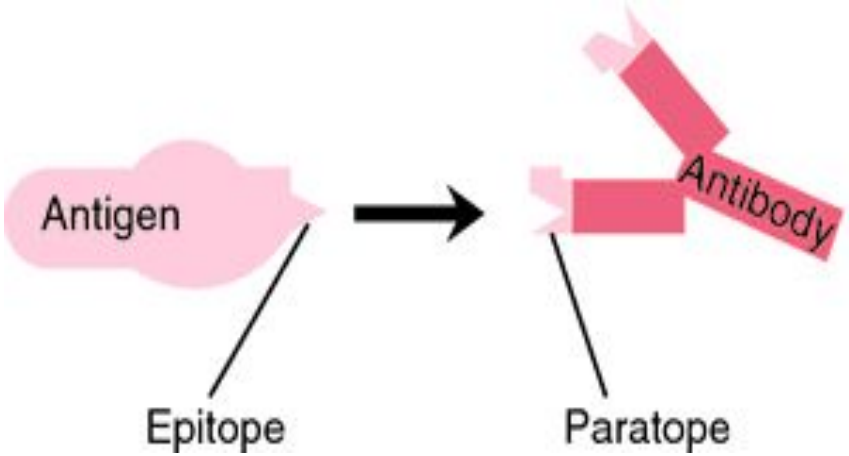
# Общая схема анализа

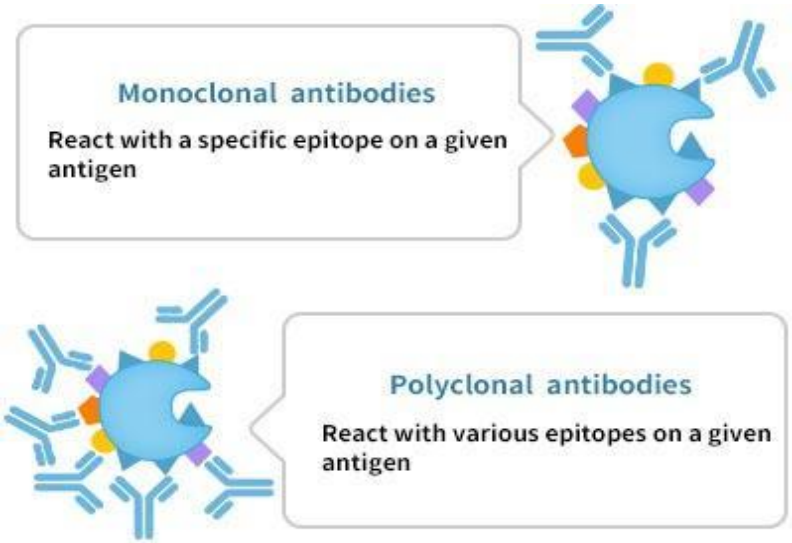


# Этап №5 Обработка антителами

# Антитела

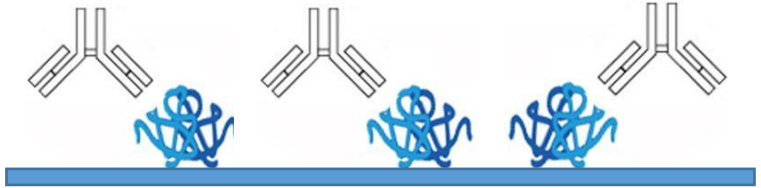
- ✔ Моноклональные – к одному конкретному антигену патогена
- ✔ Поликлональные – ко всем антигенам патогена

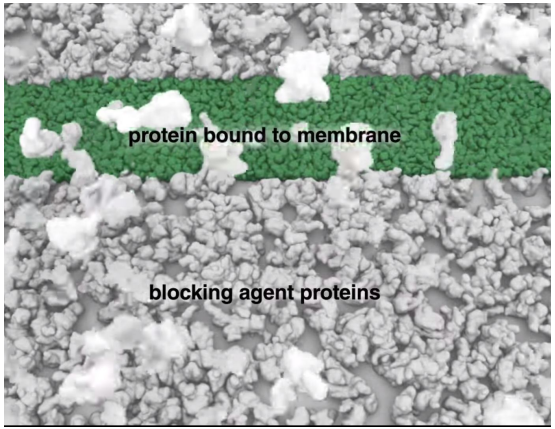


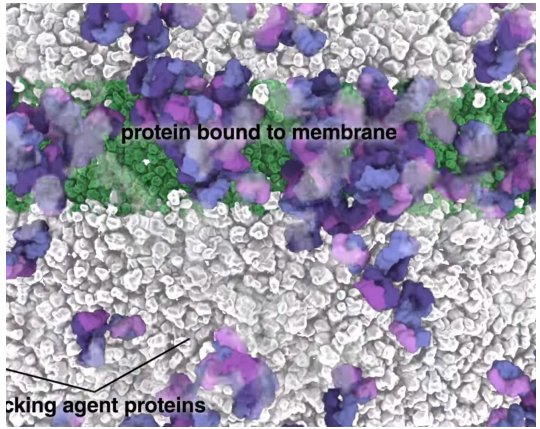



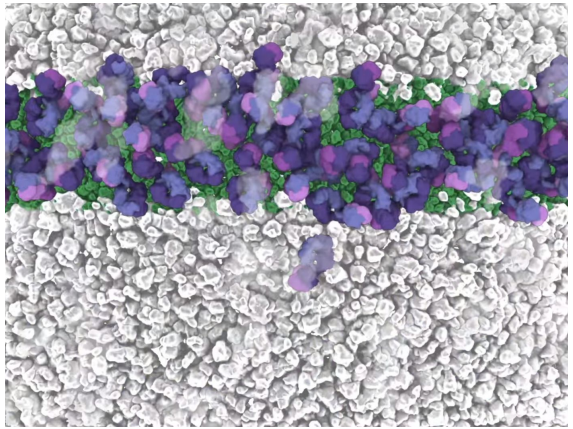
# Инкубация с первичными антителами

1) Инкубация мембраны с раствором первичных антител к искомому белку
2) Промывка



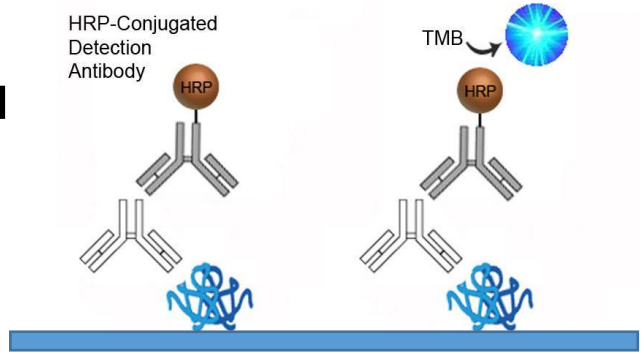


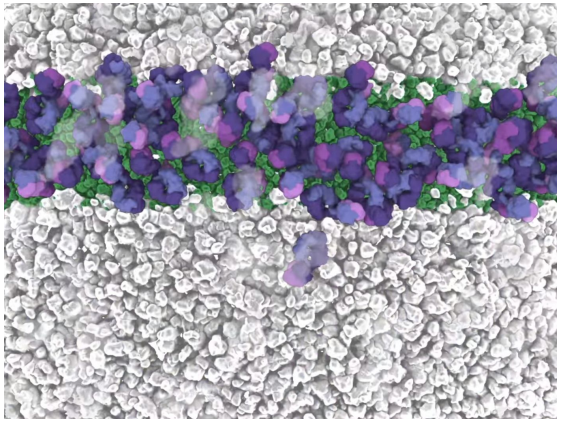



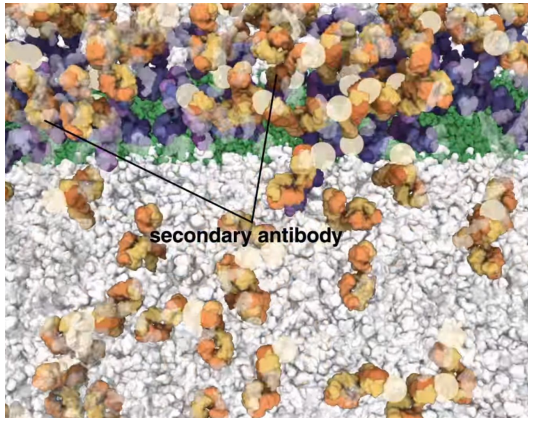



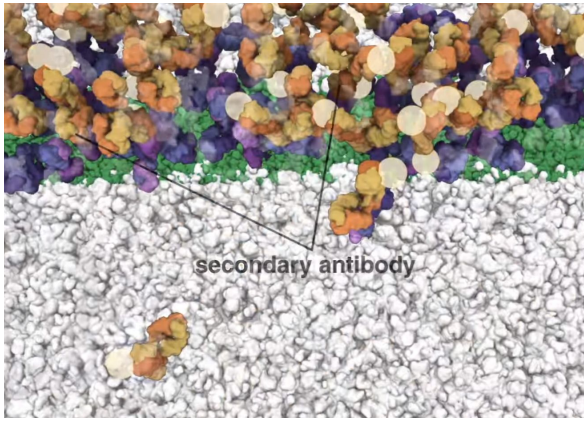
# Инкубация со вторичными антителами

1) Инкубация мембраны с раствором вторичных антител
2) Промывка



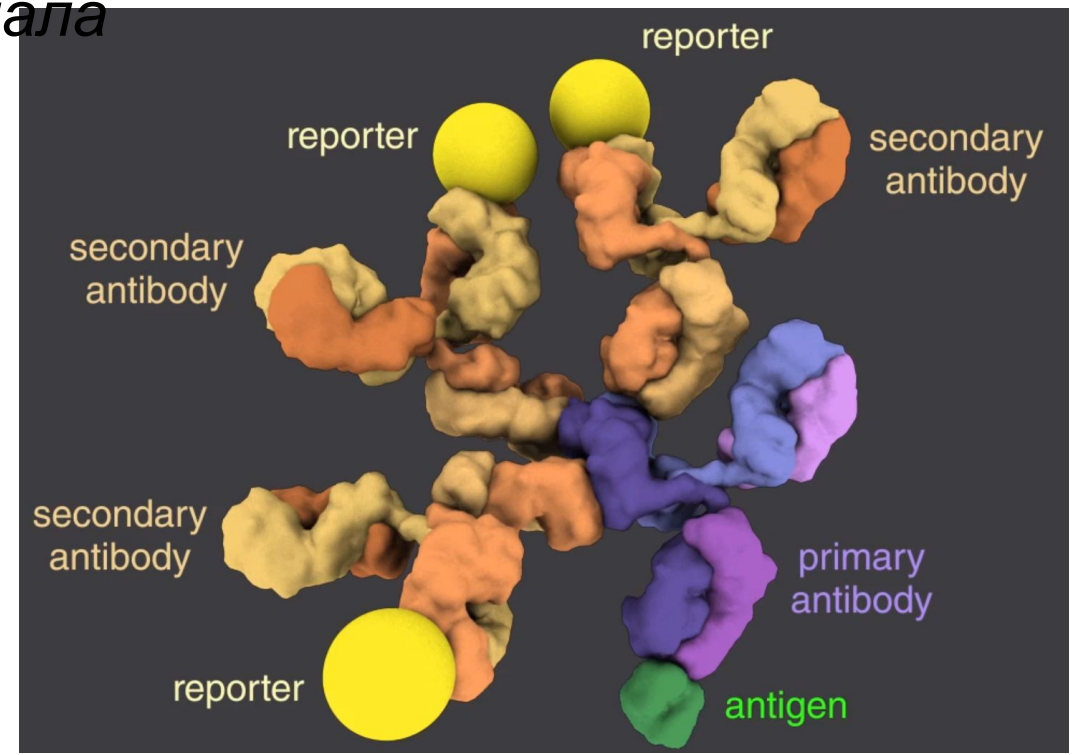





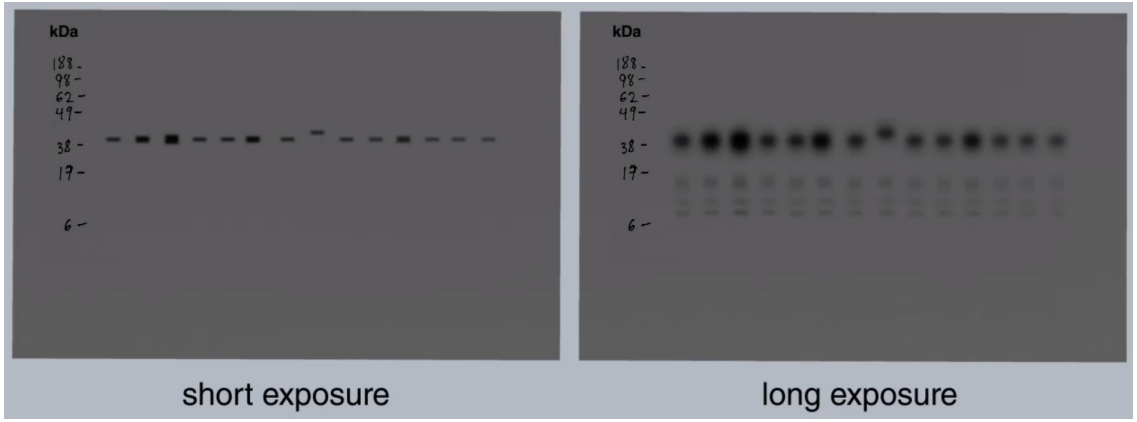
# Зачем использовать вторичные антитела?

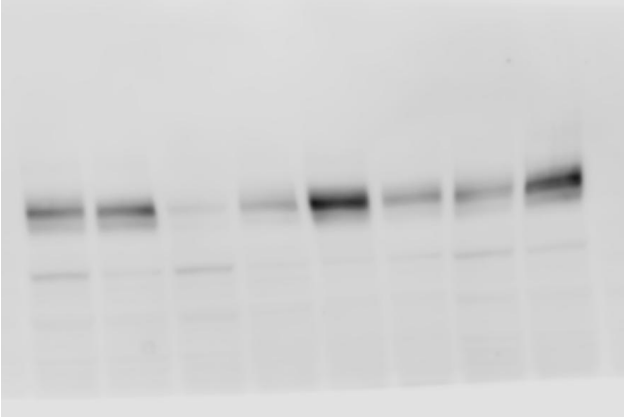
*Усиление сигнала*



# Детекция

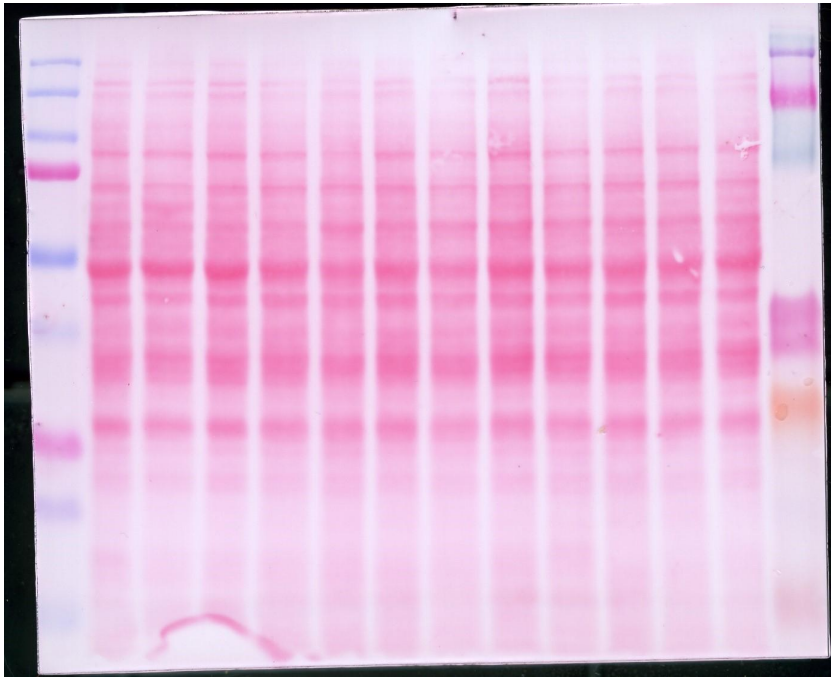
- ✔ Хемилюминисцентная детекция
- ✔ Флуоресцентная детекция
- ✔ Колориметрическая детекция



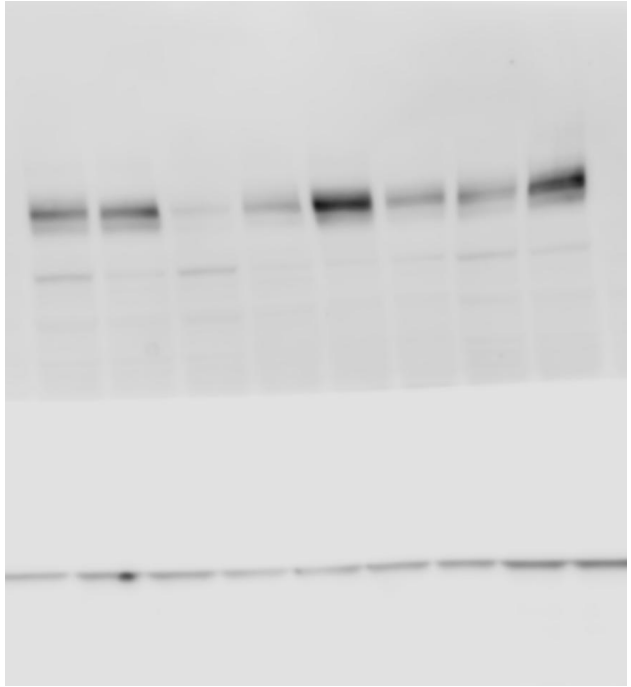
# Контроль загрузки

Ponceau S



Housekeeping gene proteins

Белки генов «домашнего хозяйства»



https://www.youtube.com/watch?v=CEEekahiqMo

Спасибо за внимание!
До встречи!