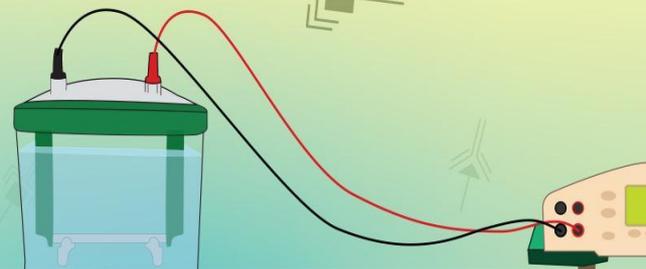


Western Blotting

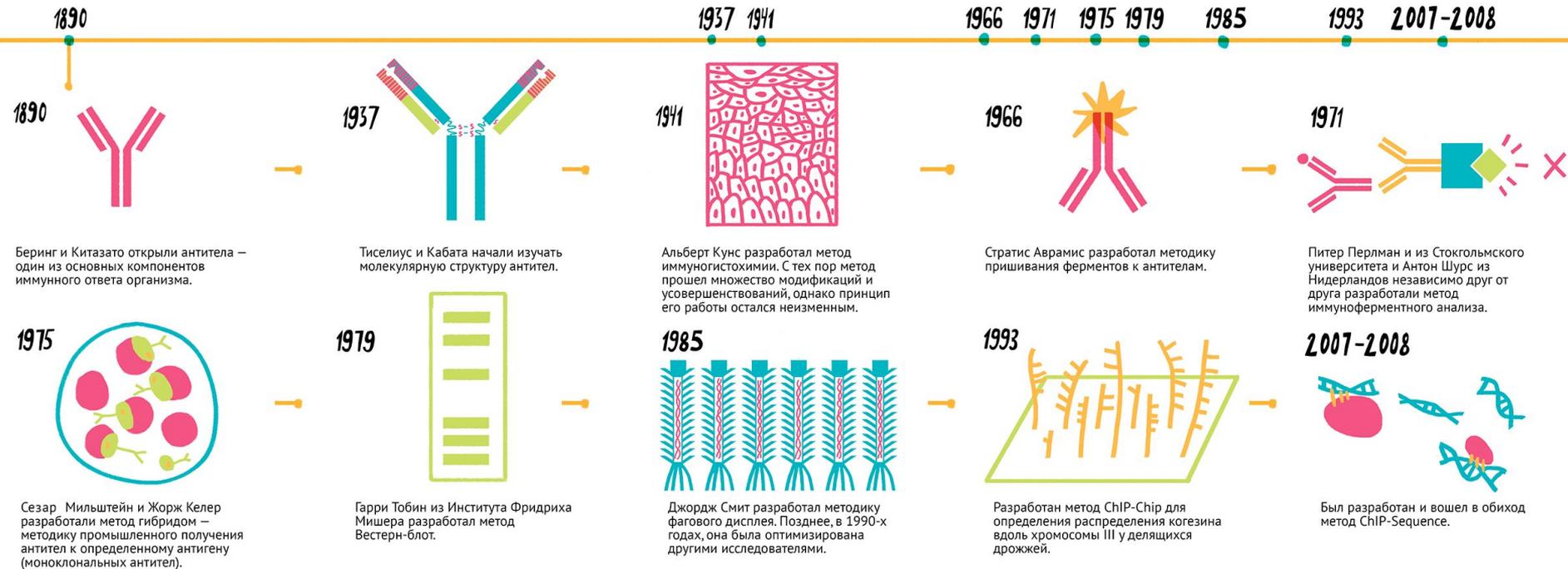
ФГБОУ ВО СПХФУ

Елизавета
Сарсенова

биолог НОЦ
Молекулярных к
клеточных
технологий



Иммунологические методы анализа



Что такое блоттинг?

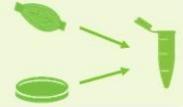
Блоттинг - перенос НК, белков и липидов на твердую подложку, например, мембрану и их иммобилизация

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

Western Blot Workflow

Sample Preparation

Protein extraction through tissue/cell physical disruption or chemical lysis & normalization



Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SDS-PAGE and Gel Stain (upon run completion)



Transfer

Transfer proteins onto membrane (PVDF or Nitrocellulose), membrane stain (upon transfer completion)



Blocking Non-specific Binding

BSA or milk casein



Incubation with 1° Antibody

In blocking buffer, ~2 hours at room temperature or overnight at 4°C



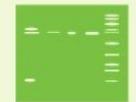
Incubation with 2° Antibody

In blocking buffer, ~2 hours at room temperature



Detection of Antibody-Protein Complex

(Chromogenic or Chemiluminescent)



Виды блоттинга

```
graph TD; A[Виды блоттинга] --- B[Саузерн блот (анализ ДНК)]; A --- C[Вестерн блоттинг (анализ белков)]; A --- D[Нозерн блоттинг (анализ РНК)]; A --- E[Истерн-блотнг (детекция посттрансляционных модификаций белков)]; A --- F[Саусвестерн блоттинг (анализ белков, связанных с ДНК)];
```

Саузерн блот
(анализ ДНК)

Вестерн
блоттинг
(анализ
белков)

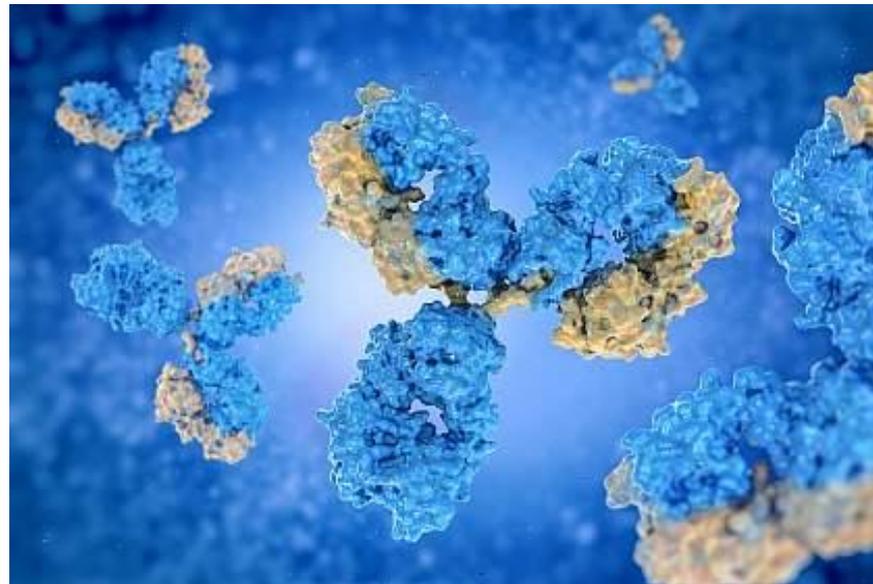
Нозерн
блоттинг
(анализ РНК)

Истерн-блотнг
(детекция
посттрансляц
ионных
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

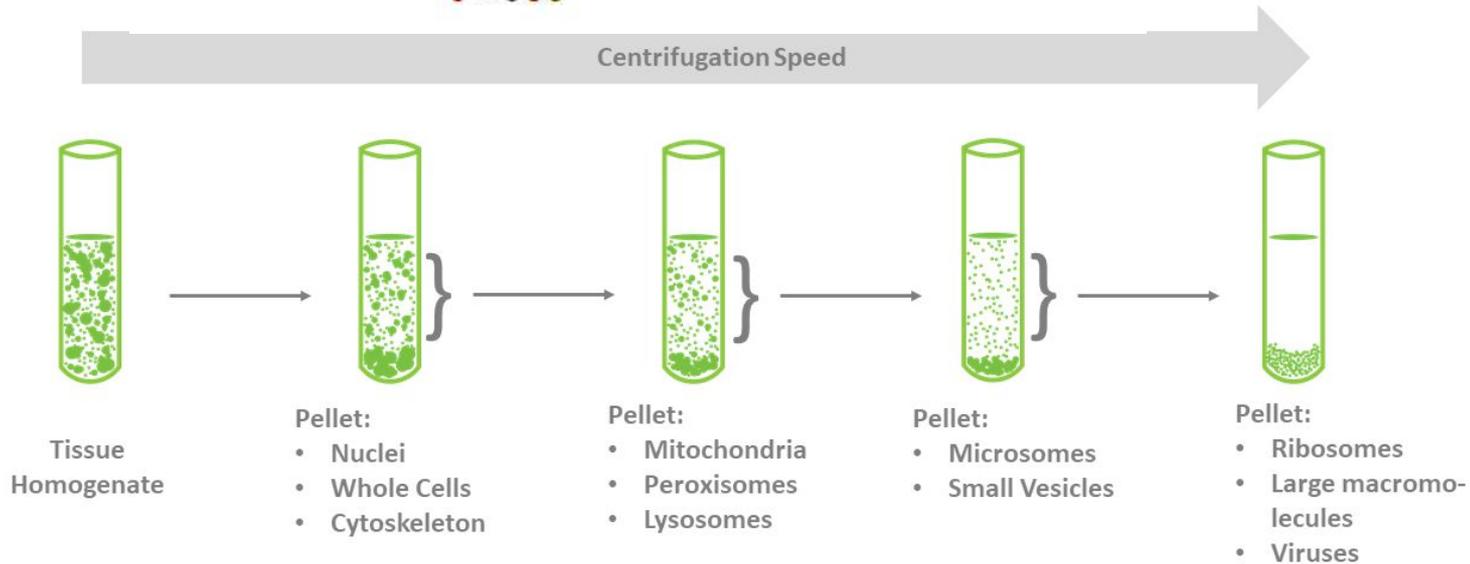
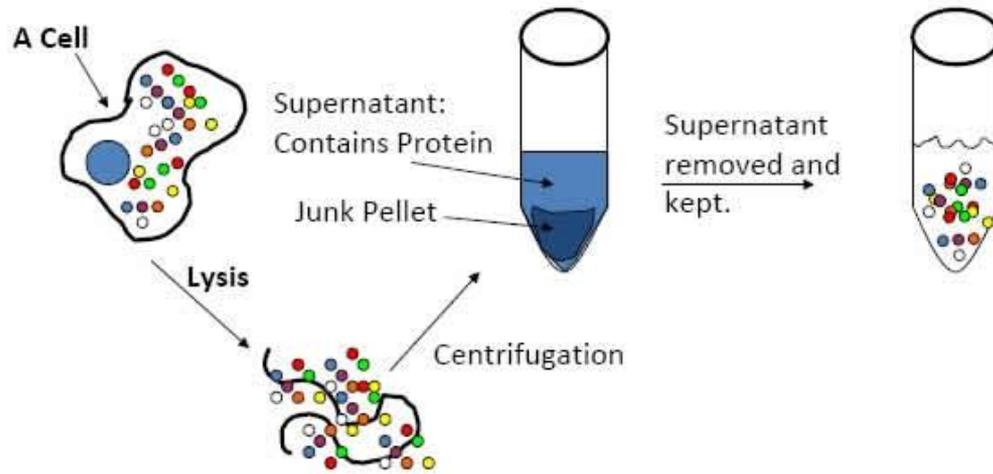
✓ Соникация

✓ Гомогенизирование

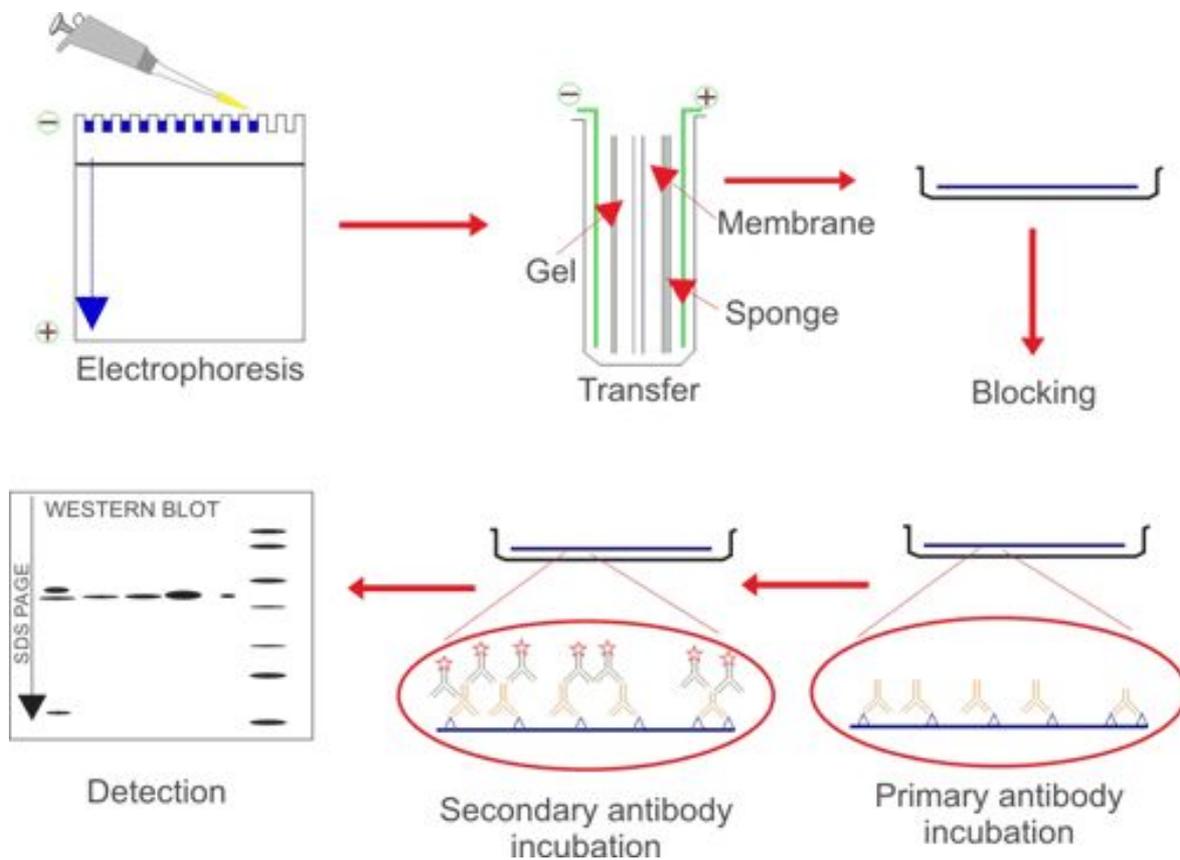


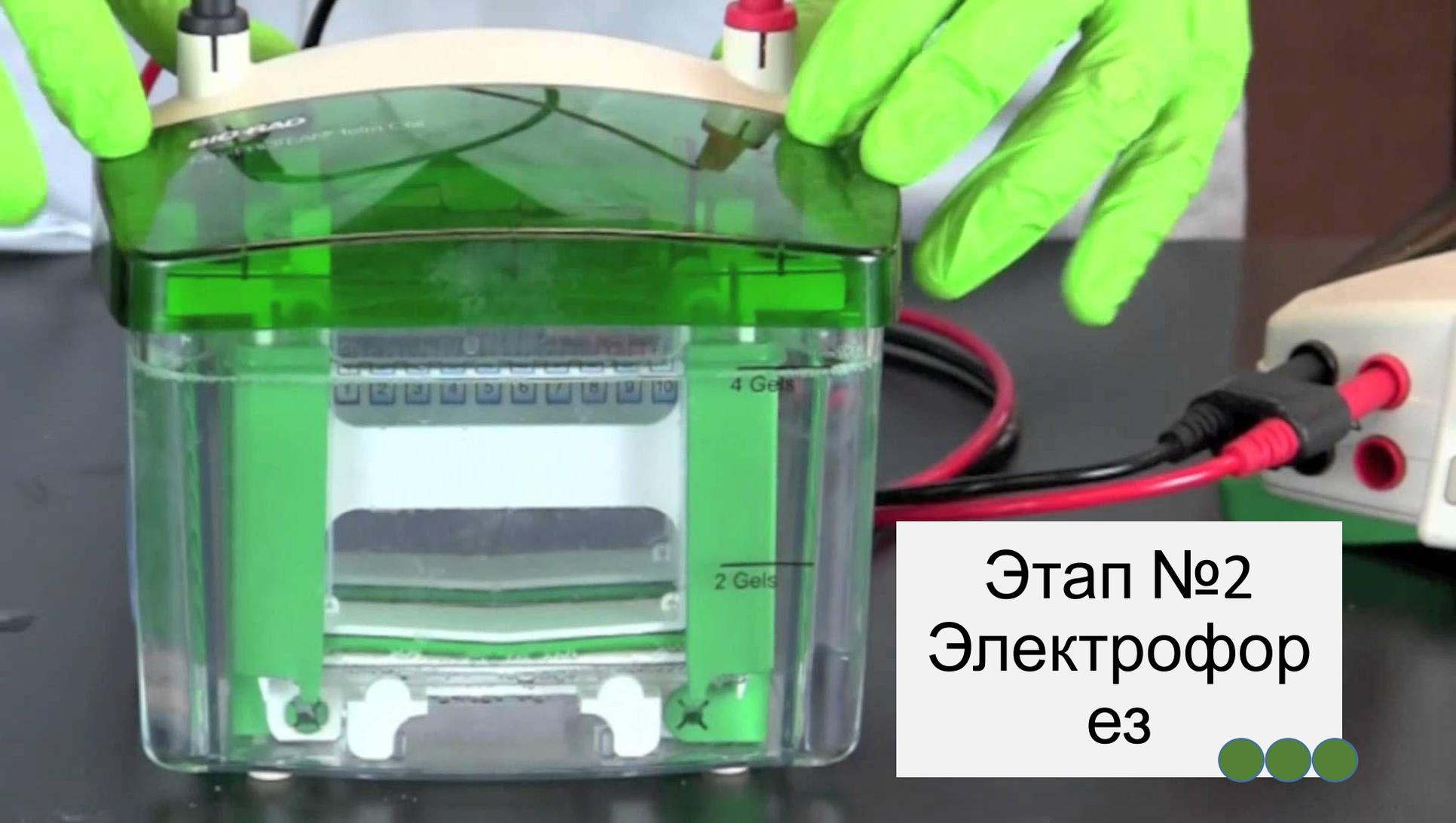
Центрифугирование





Общая схема анализа



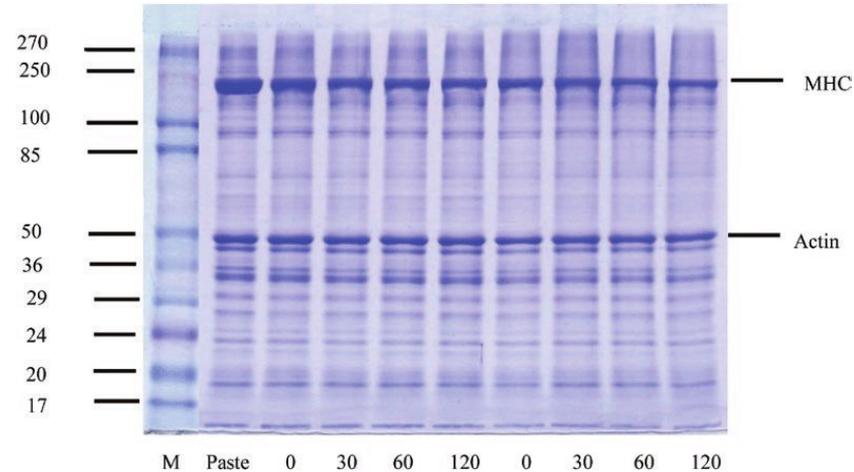


Этап №2
Электрофор
ез

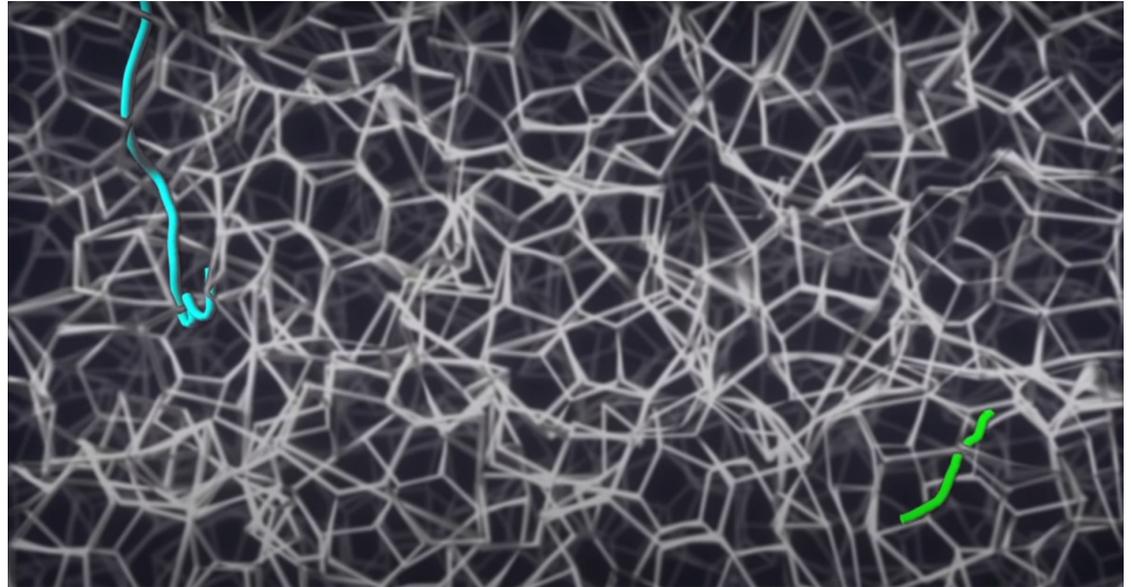
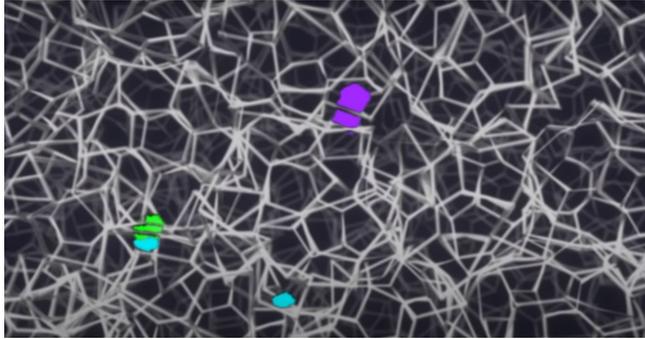


Электрофорез

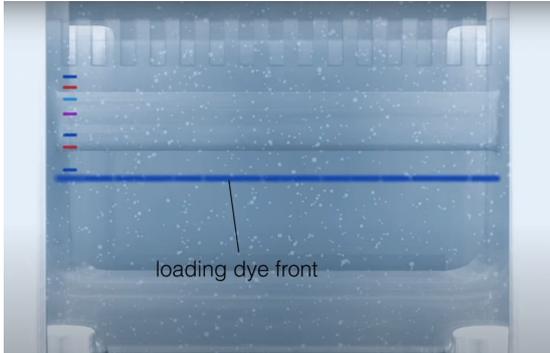
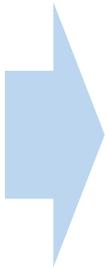
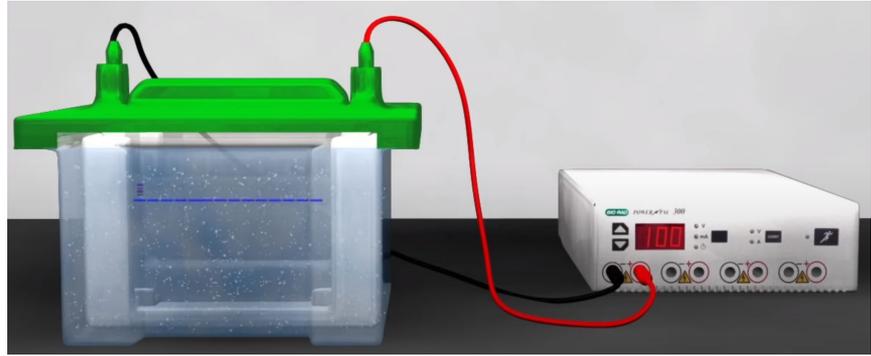
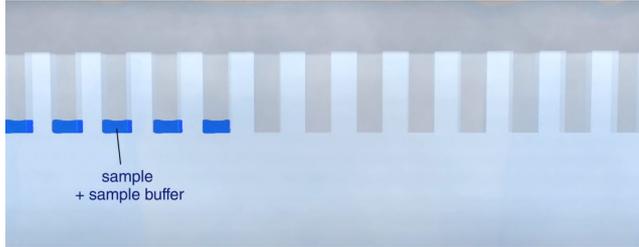
- ✓ Разделение белков в клеточном лизате по размеру
- ✓ Полиакриламидный гель – разделяющий гель, по которому белки способны двигаться под действием электрического тока с различной скоростью (в зависимости от их величины, заряда и некоторых других факторов);
- ✓ SDS (натрия додецилсульфат) – детергент,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

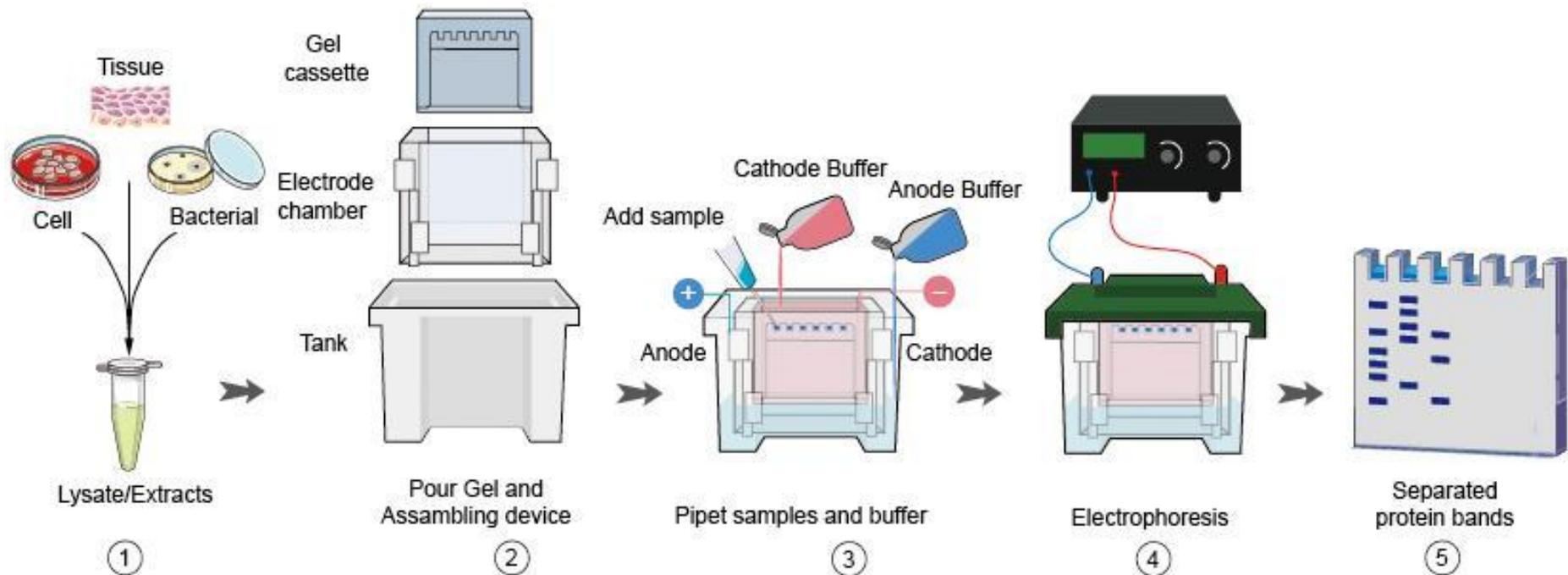


Чем меньше белок, тем быстрее он проходит через полиакриламидный гель



Гель-электрофорез



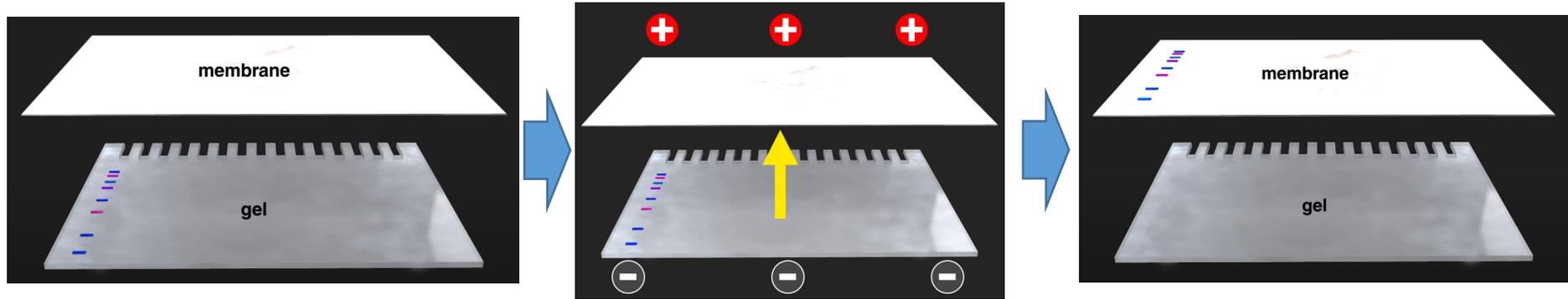


Этап №3 Перенос

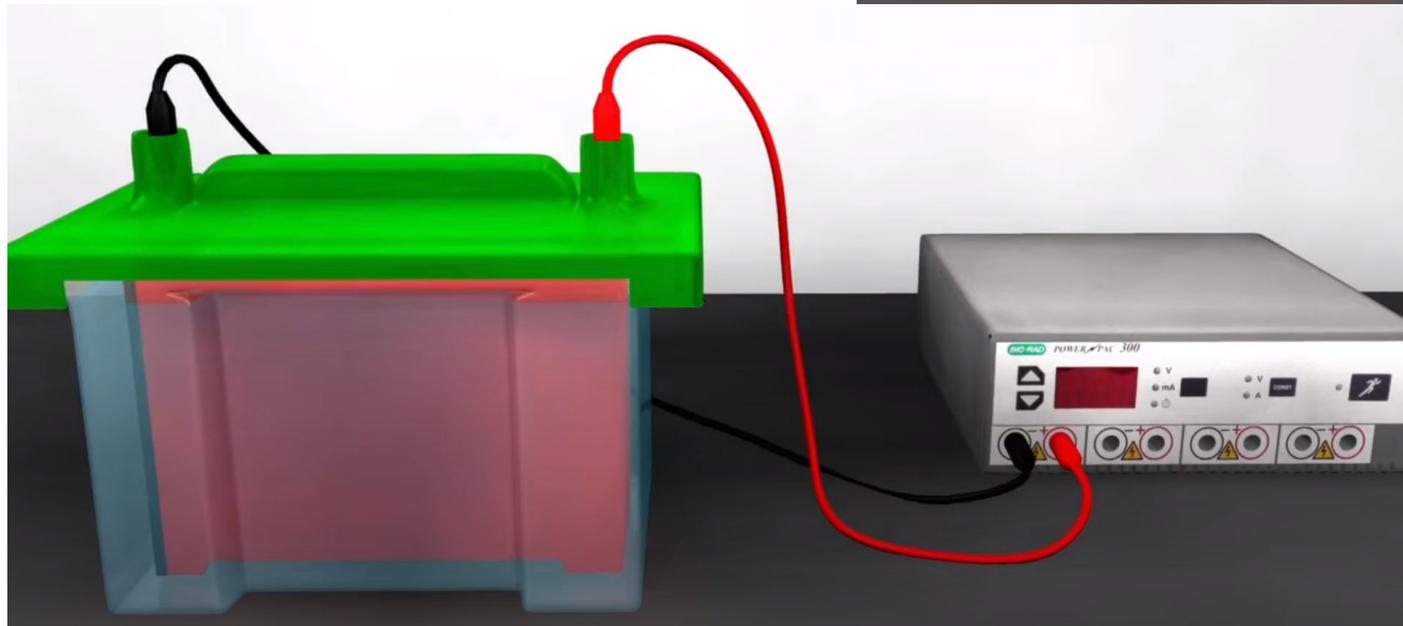
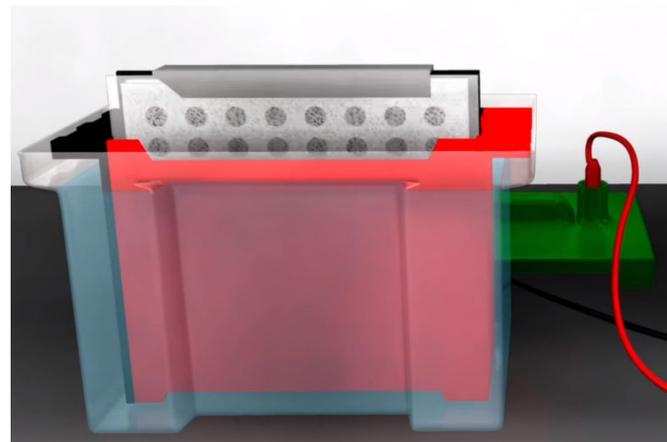
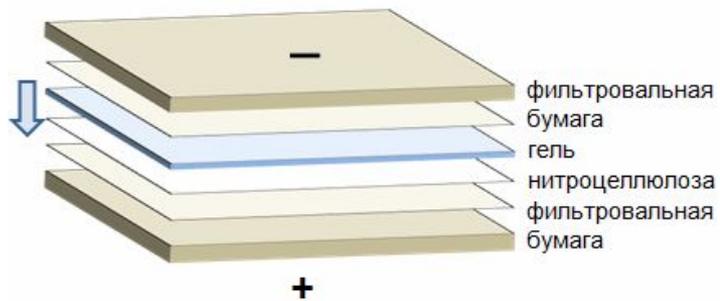


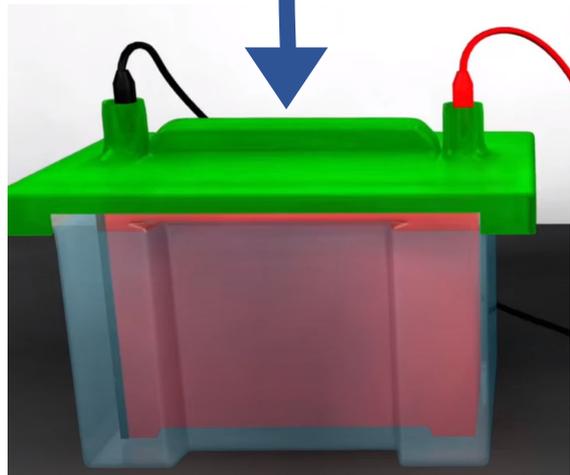
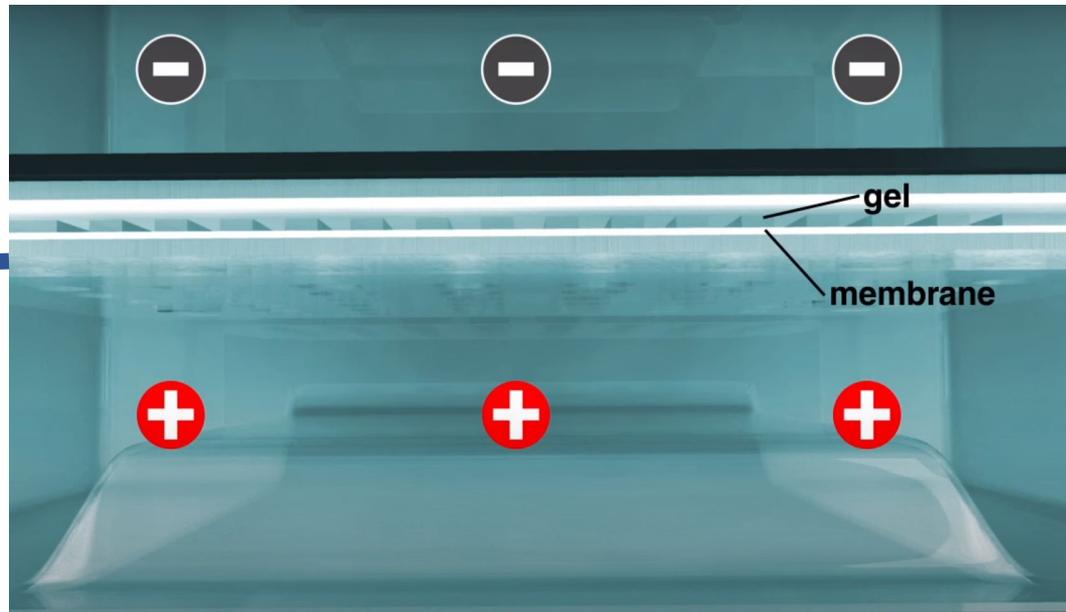
Перенос

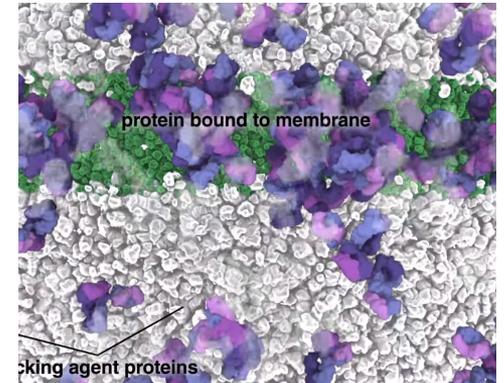
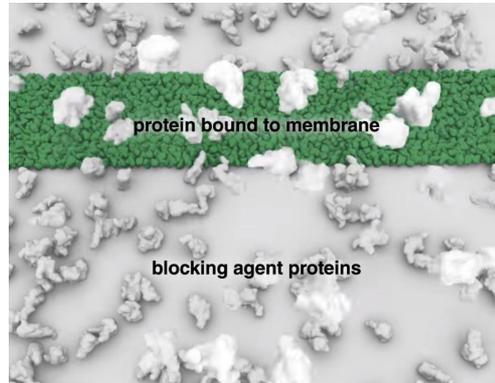
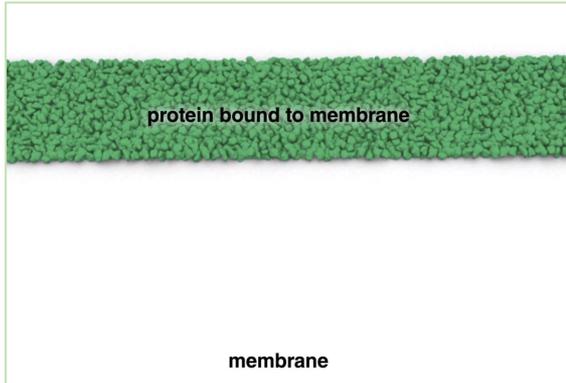
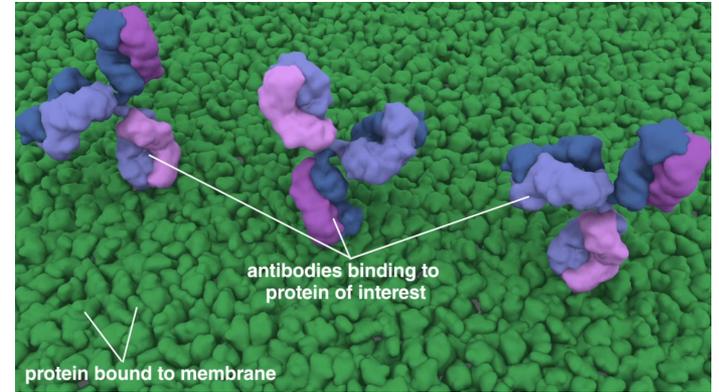
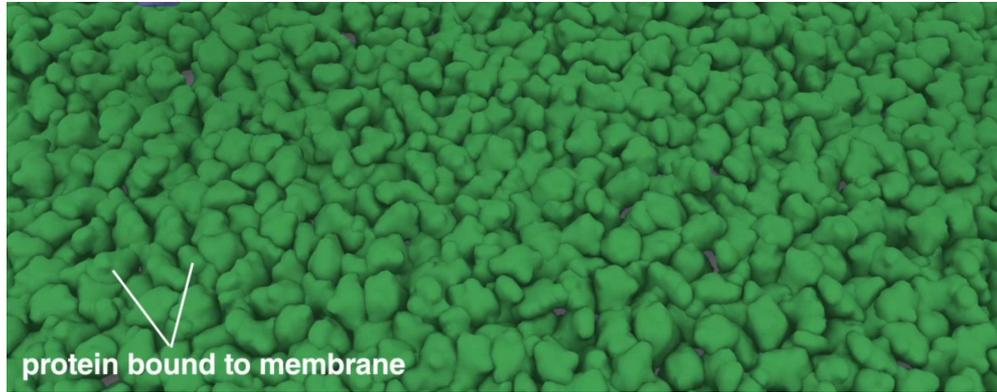
- ✓ Под действием электрического тока белки мигрируют из геля на мембрану
- ✓ Мембраны с высокой способностью связывания белков (обычно это нитроцеллюлоза или PVDF)



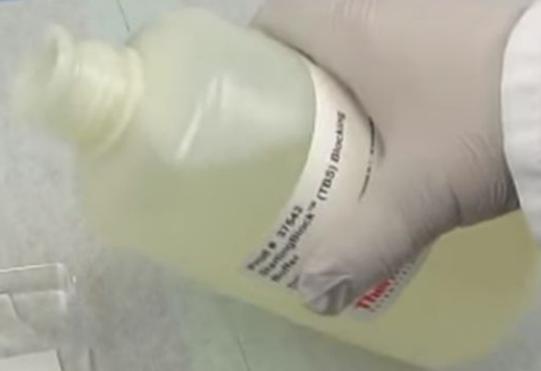
перенос





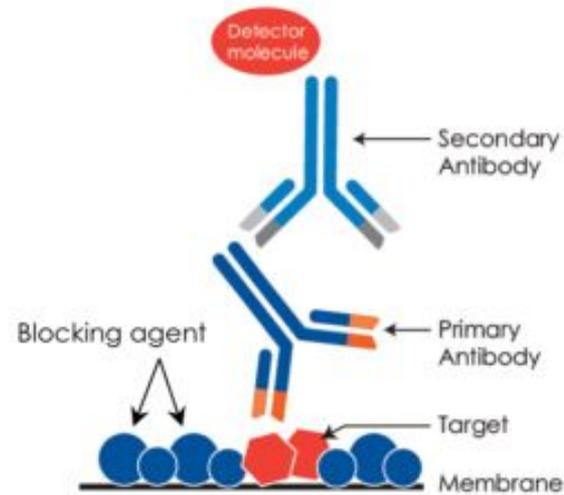
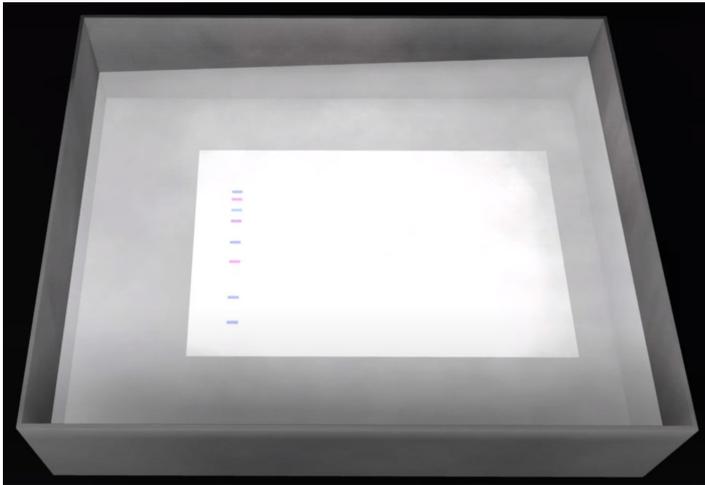


Этап №4 Блокирование

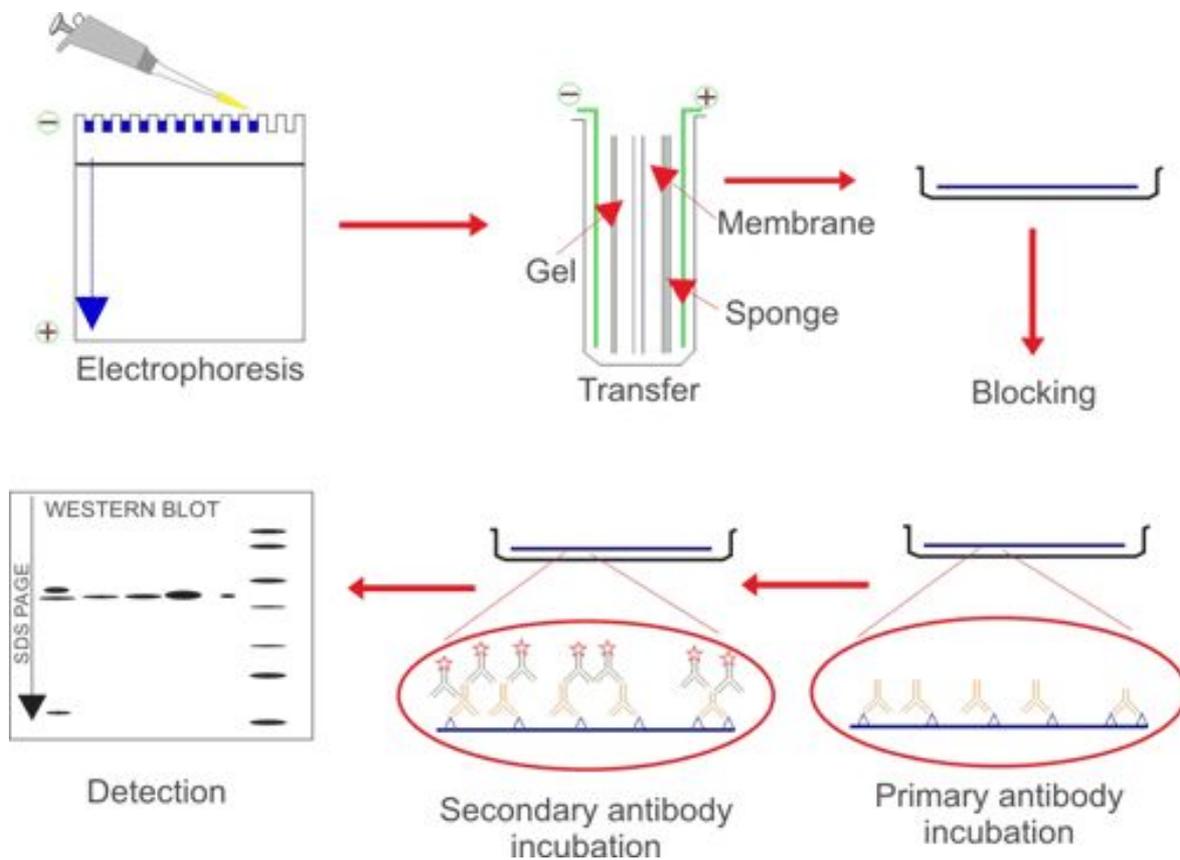


Блокирование

- ✓ 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



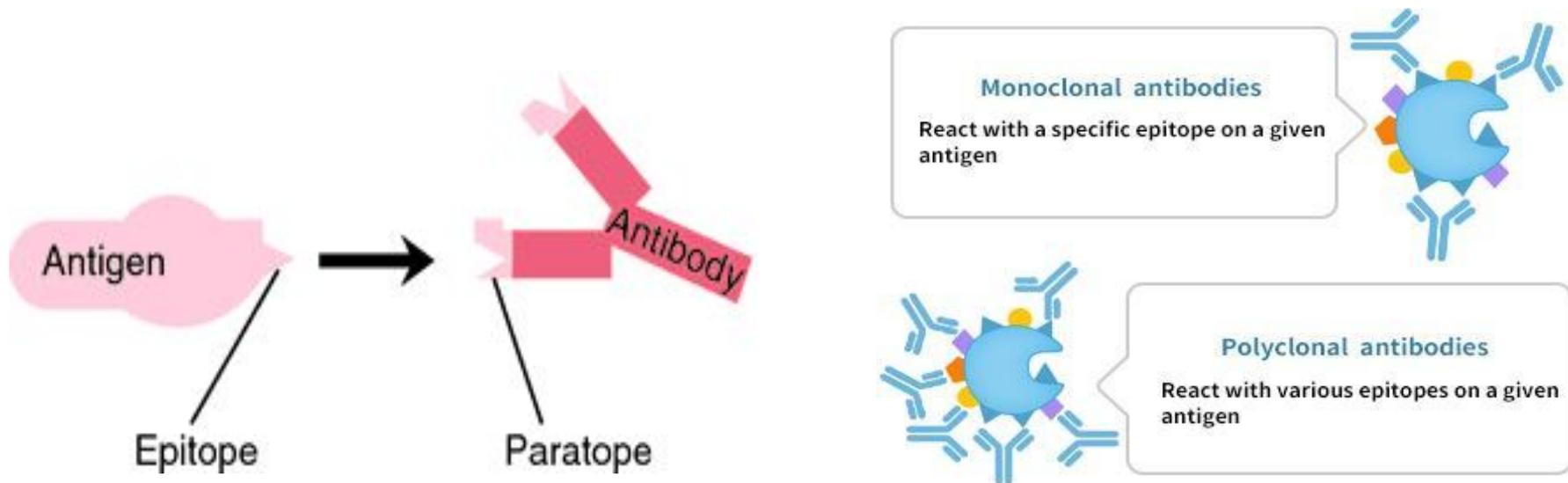
The image features a 3D molecular model of antibody-antigen complexes. The antibodies are depicted as blue, Y-shaped structures with a textured surface, while the antigens are shown as smaller, brownish-yellow irregular shapes. They are scattered across a blue background with a subtle light gradient and small white specks, suggesting a microscopic or molecular environment. The text is overlaid on a semi-transparent white box in the lower right corner.

Этап №5
Обработка
антителами



Антитела

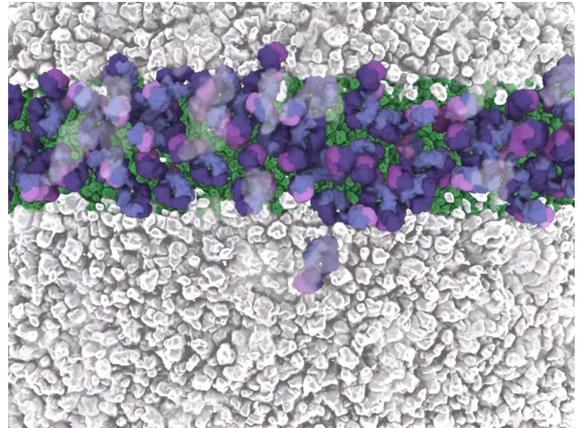
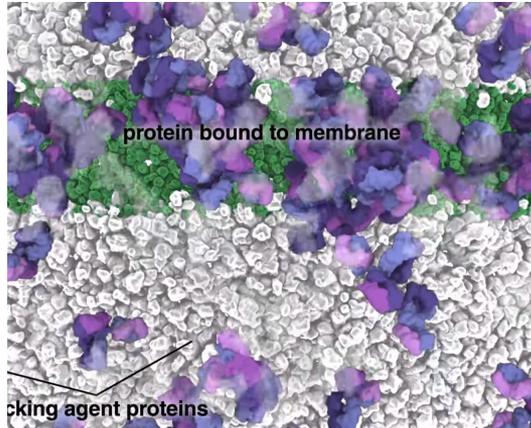
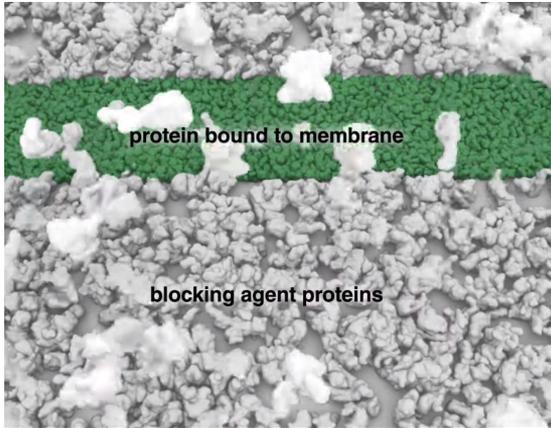
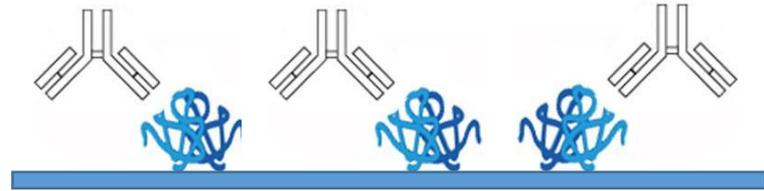
- ✓ Моноклональные – к одному конкретному антигену патогена
- ✓ Поликлональные – ко всем антигенам патогена



Инкубация с первичными антителами

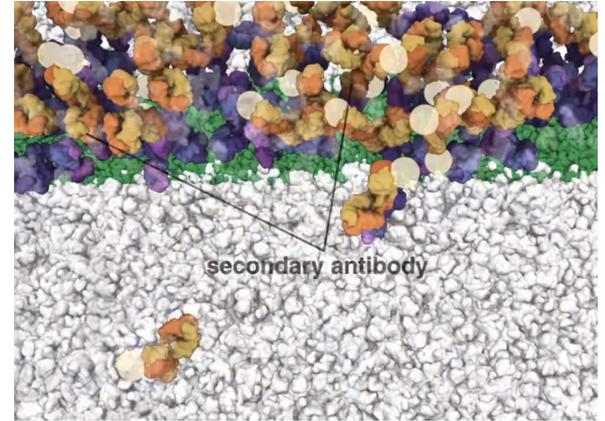
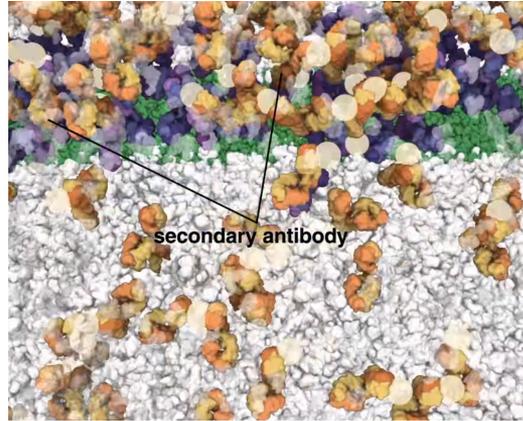
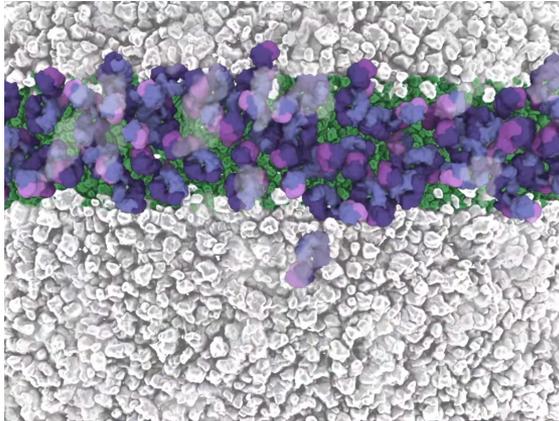
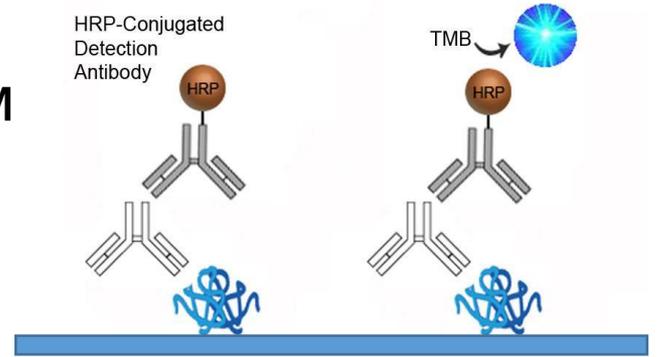
1) Инкубация мембраны с раствором первичных антител к искомому белку

2) Промывка



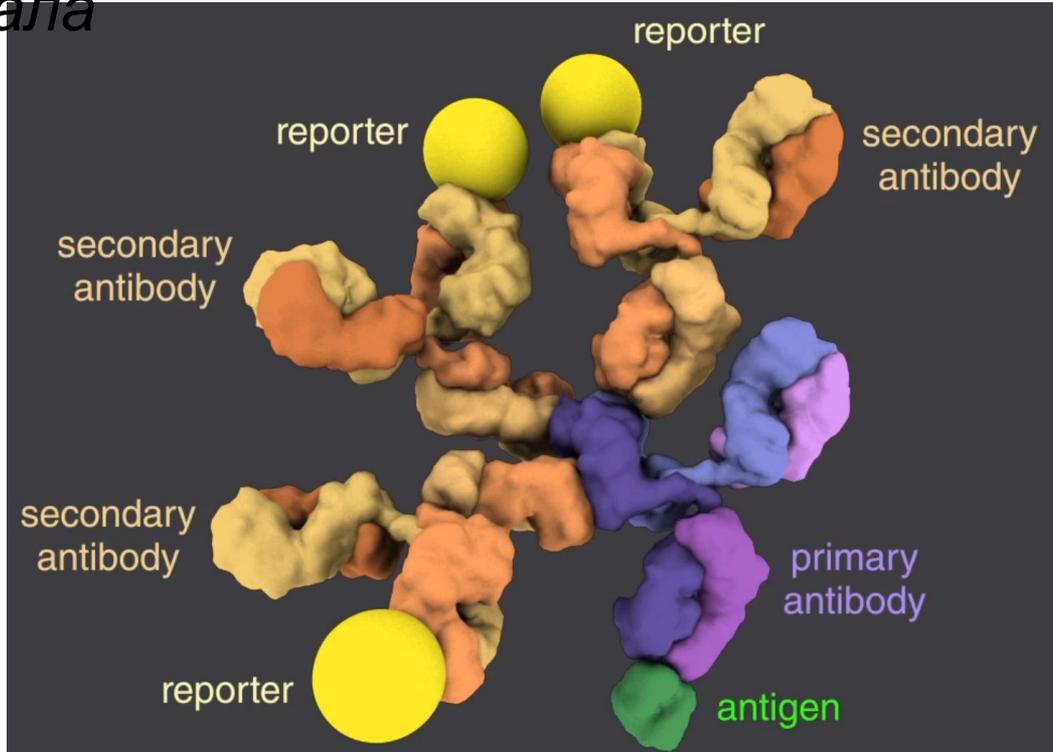
Инкубация со вторичными антителами

- 1) Инкубация мембраны с раствором вторичных антител
- 2) Промывка



Зачем использовать вторичные антитела?

Усиление сигнала

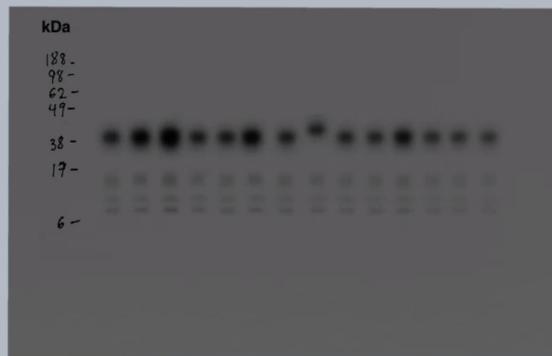


Детекция

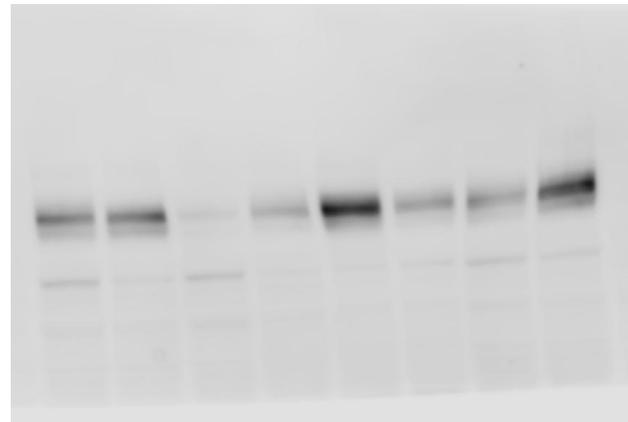
- ✓ Хемилюминисцентная детекция
- ✓ Флуоресцентная детекция
- ✓ Колориметрическая детекция



short exposure



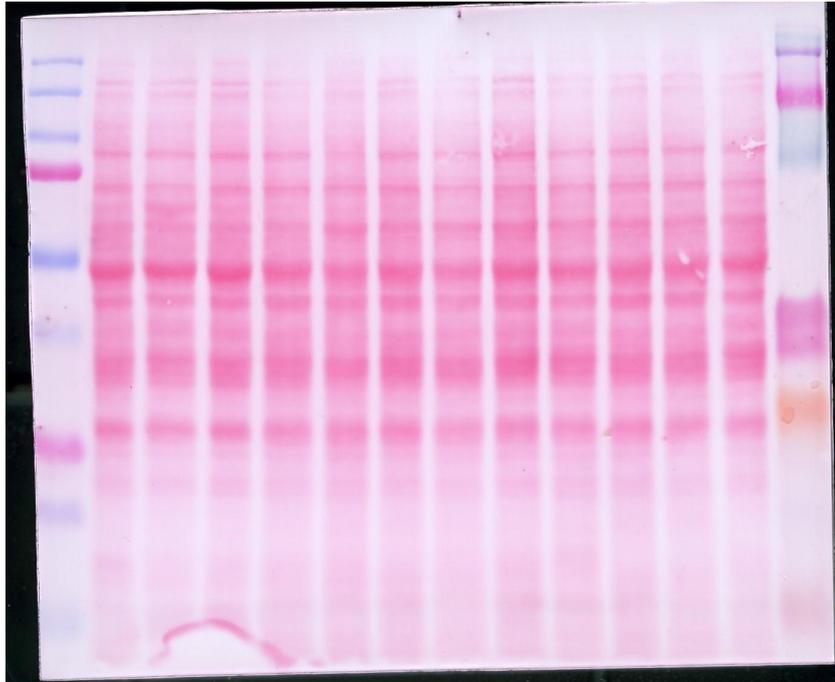
long exposure



Контроль

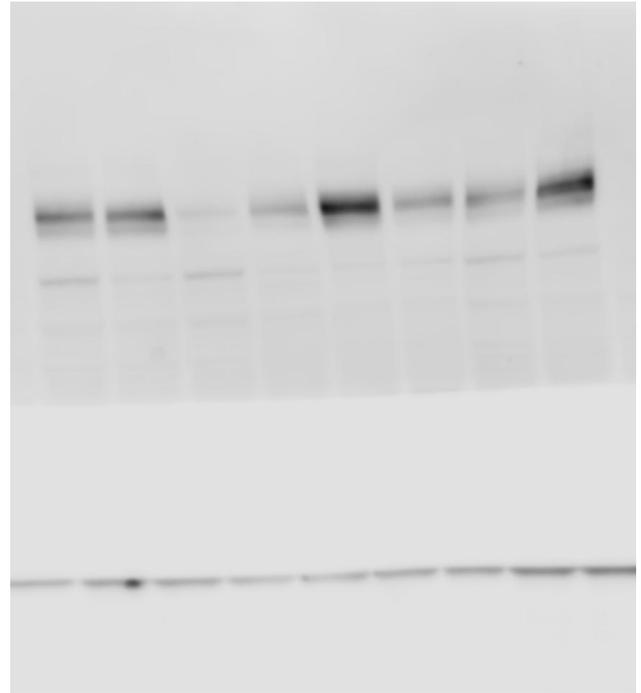
загрузки

Ponceau S



Housekeeping gene proteins

Белки генов «домашнего хозяйства»



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

Спасибо за
внимание!
До встречи!