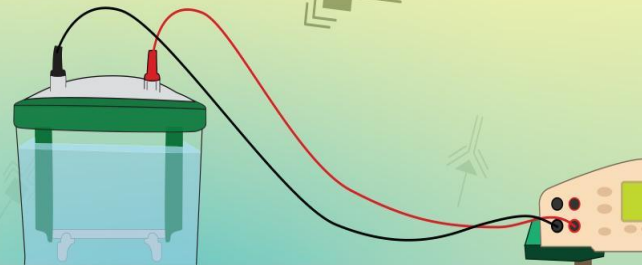


# Western Blotting

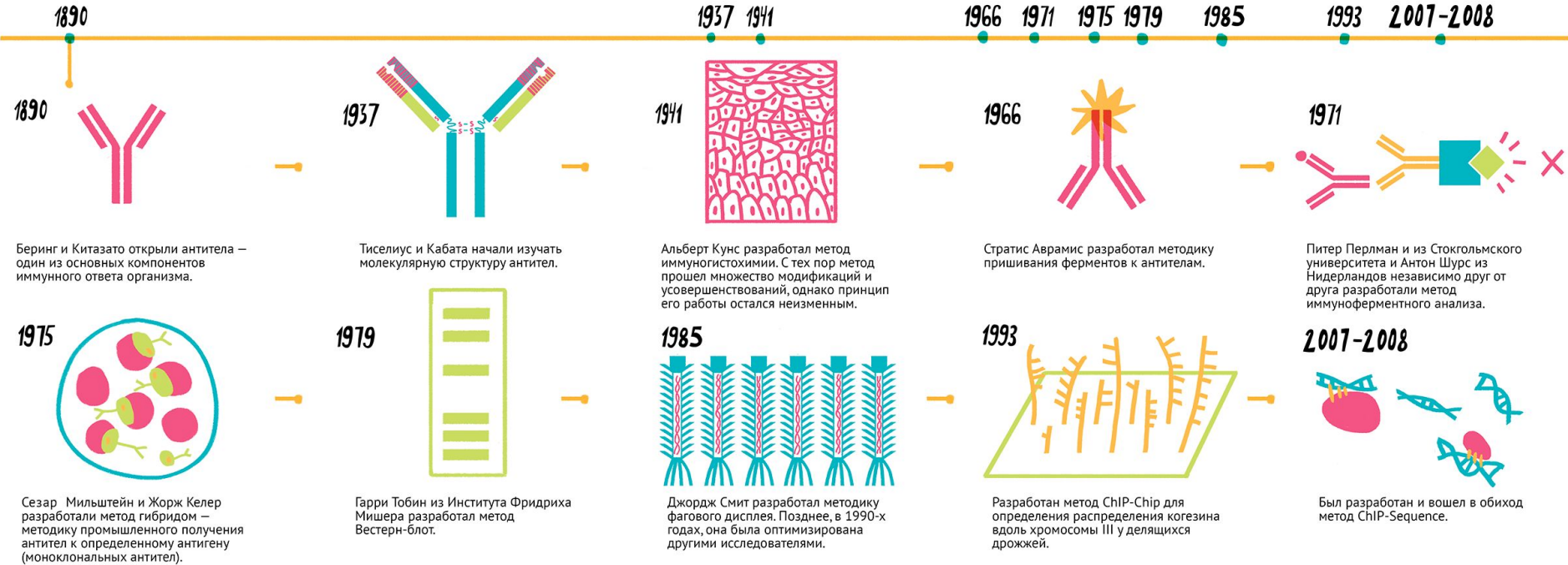
ФГБОУ ВО СПХФУ

Елизавета  
Сарсенова

биолог НОЦ  
Молекулярных к  
клеточных  
технологий



# Иммунологические методы анализа



# Что такое блоттинг?

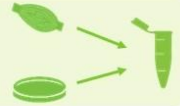
Блоттинг - перенос НК, белков и липидов на твердую подложку, например, мембрану и их иммобилизация

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

Саузерн блот  
(анализ ДНК)

Вестерн  
блоттинг  
(анализ  
белков)

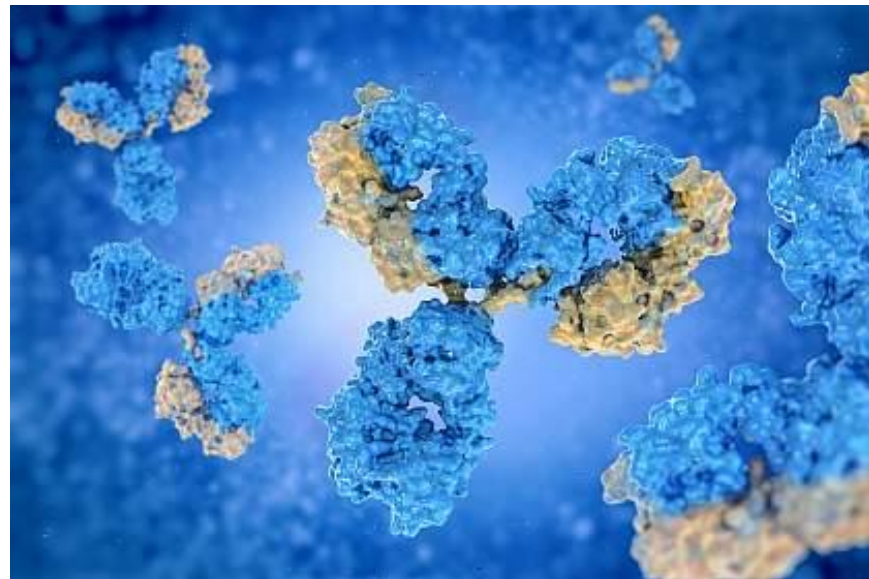
Нозерн  
блоттинг  
(анализ РНК)


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

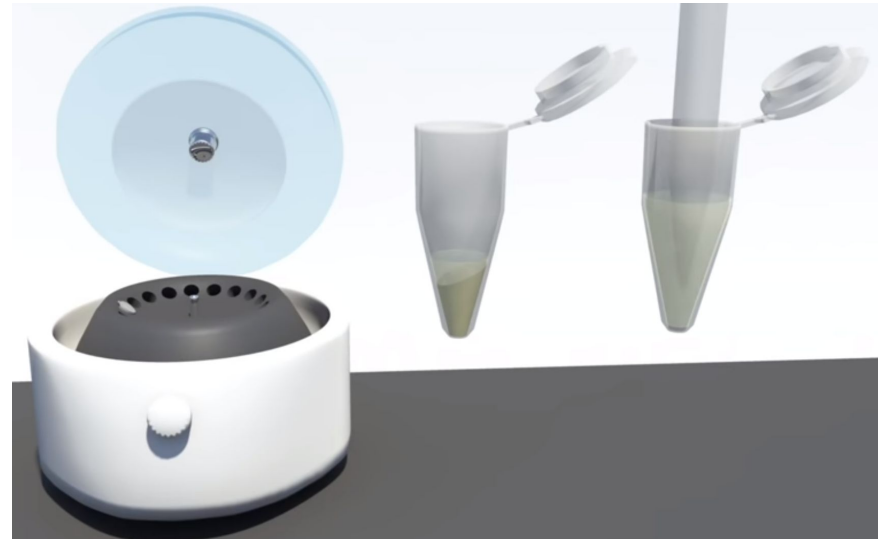
✓ Соникация

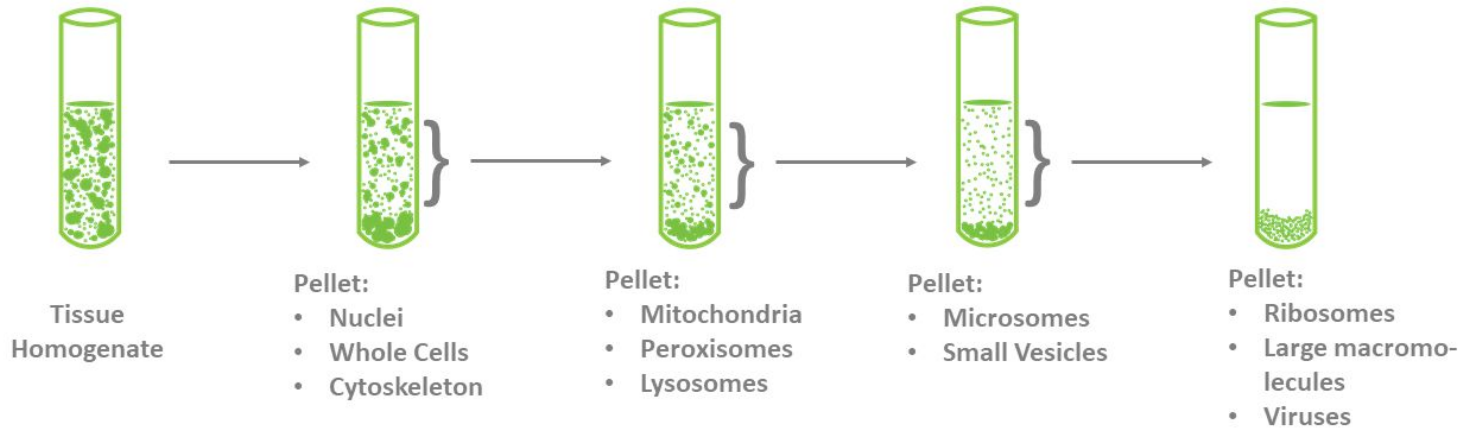
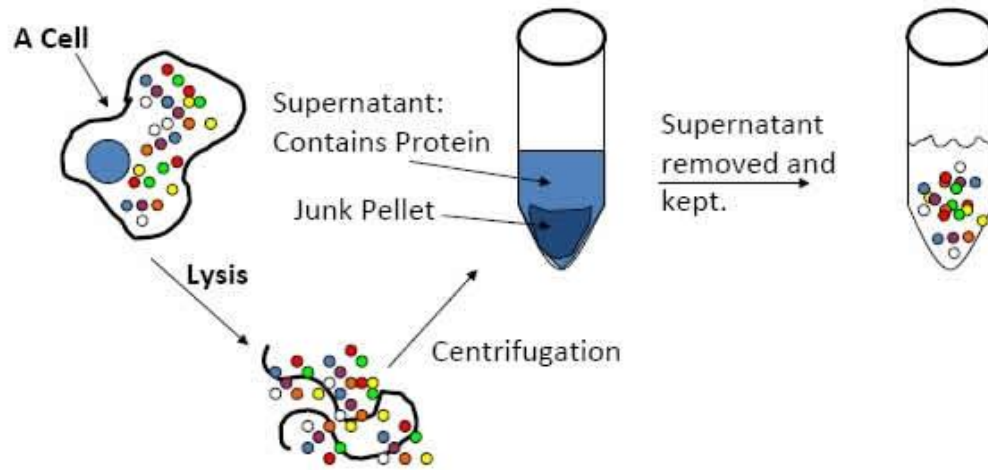
✓ Гомогенизирование



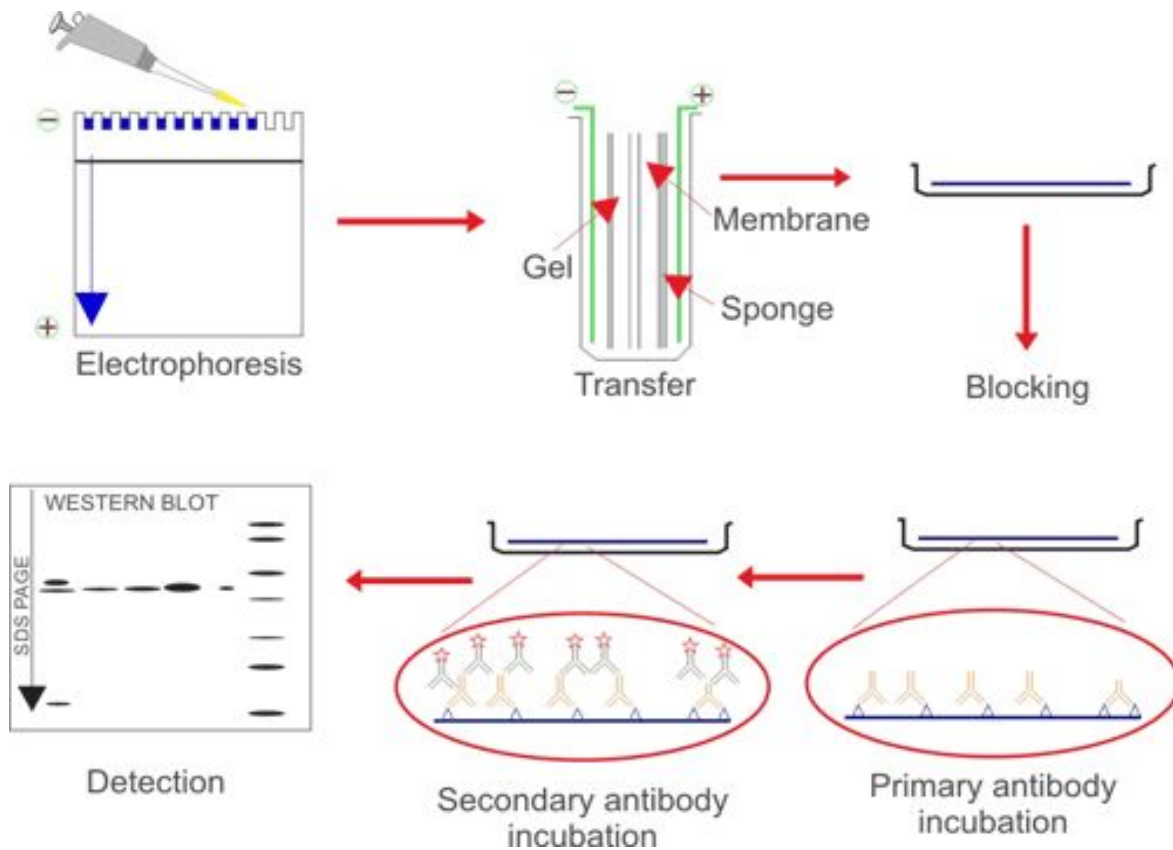


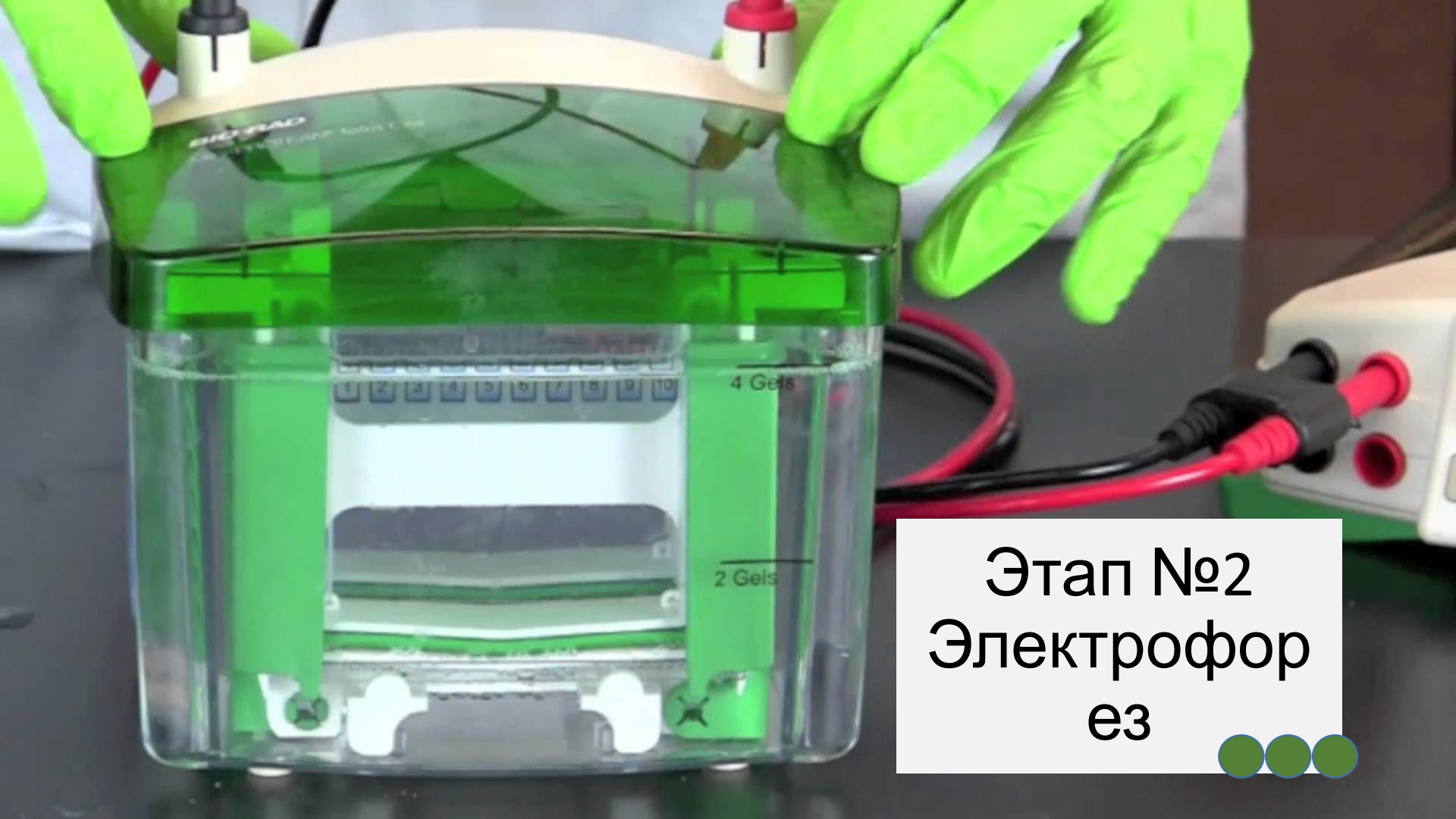
# Центрифугирование





# Общая схема анализа



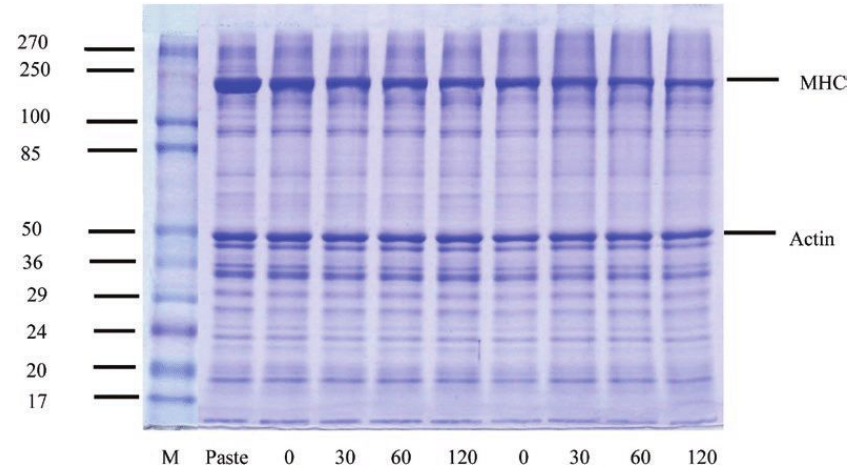


Этап №2  
Электрофор  
ез

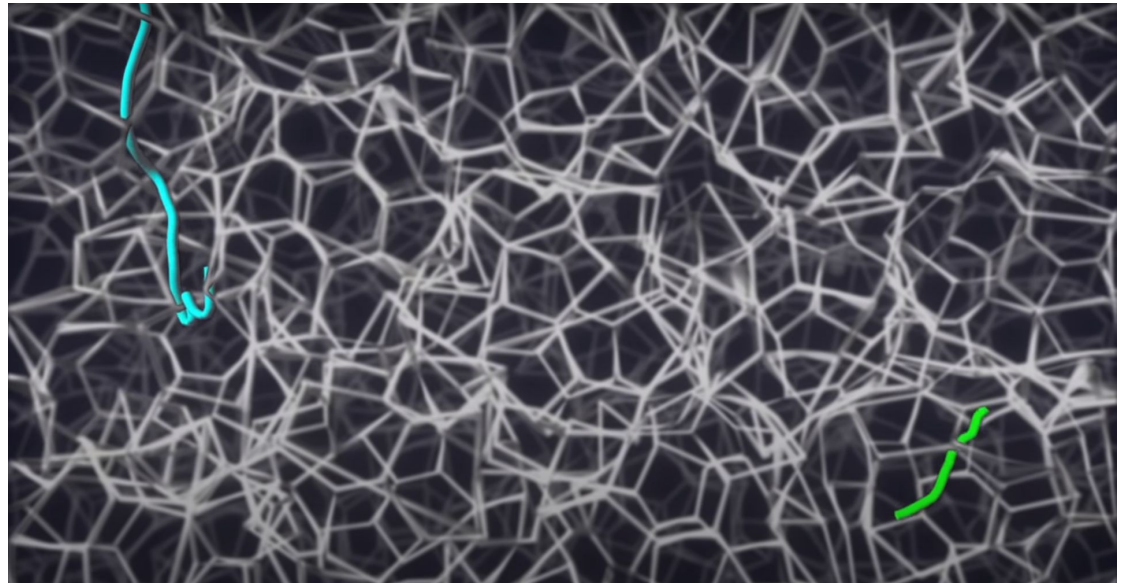
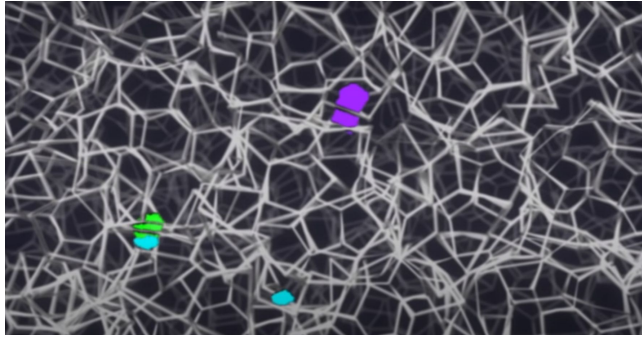


# Электрофорез

- ✓ 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

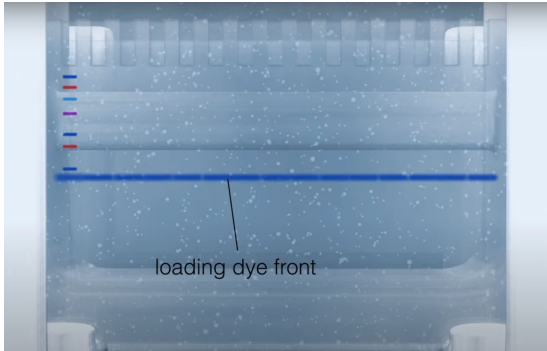
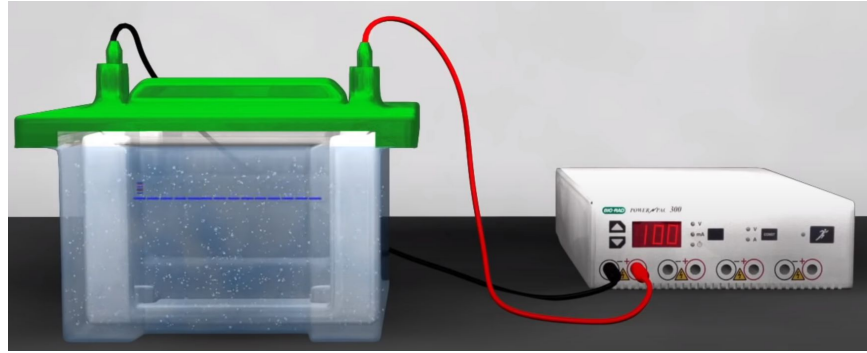
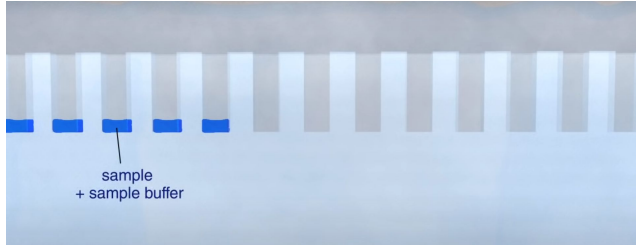


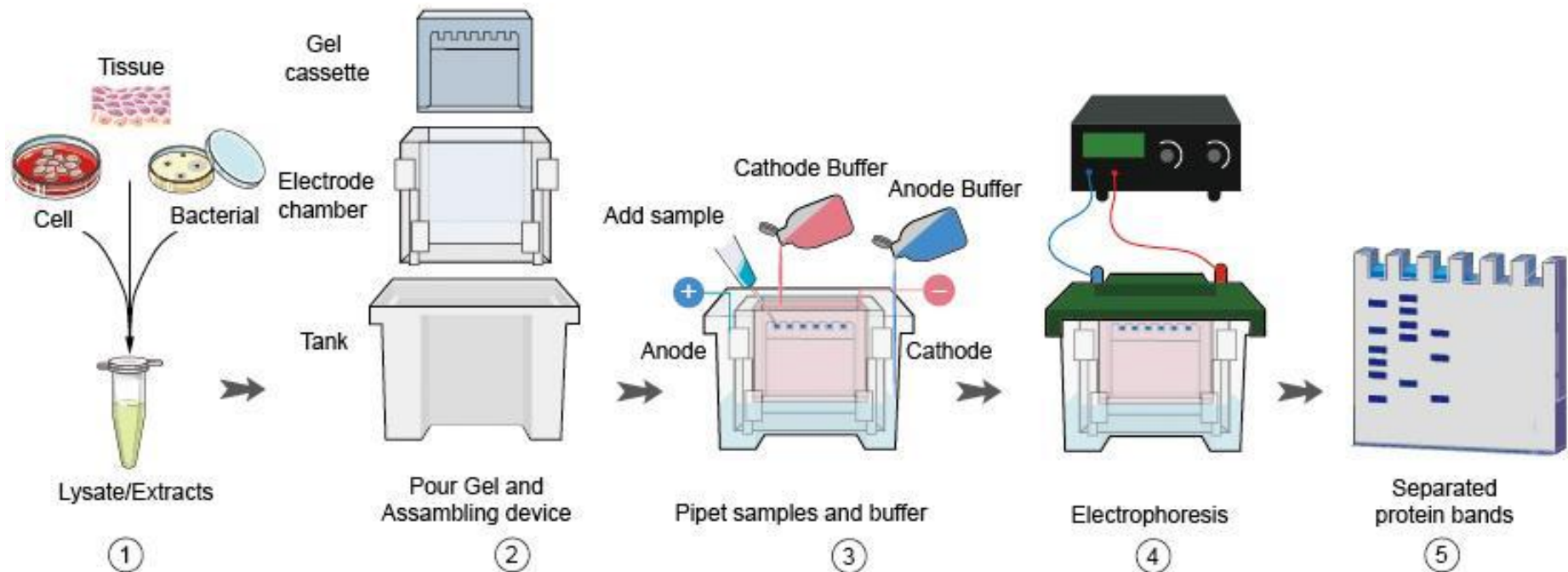
Чем меньше белок, тем быстрее он проходит  
через полиакриламидный гель





# Гель-электрофорез



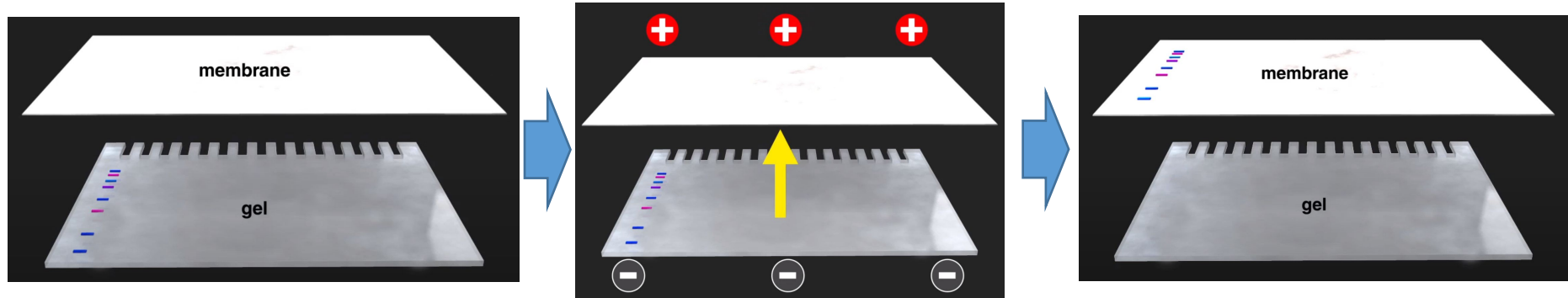


# Этап №3 Перенос

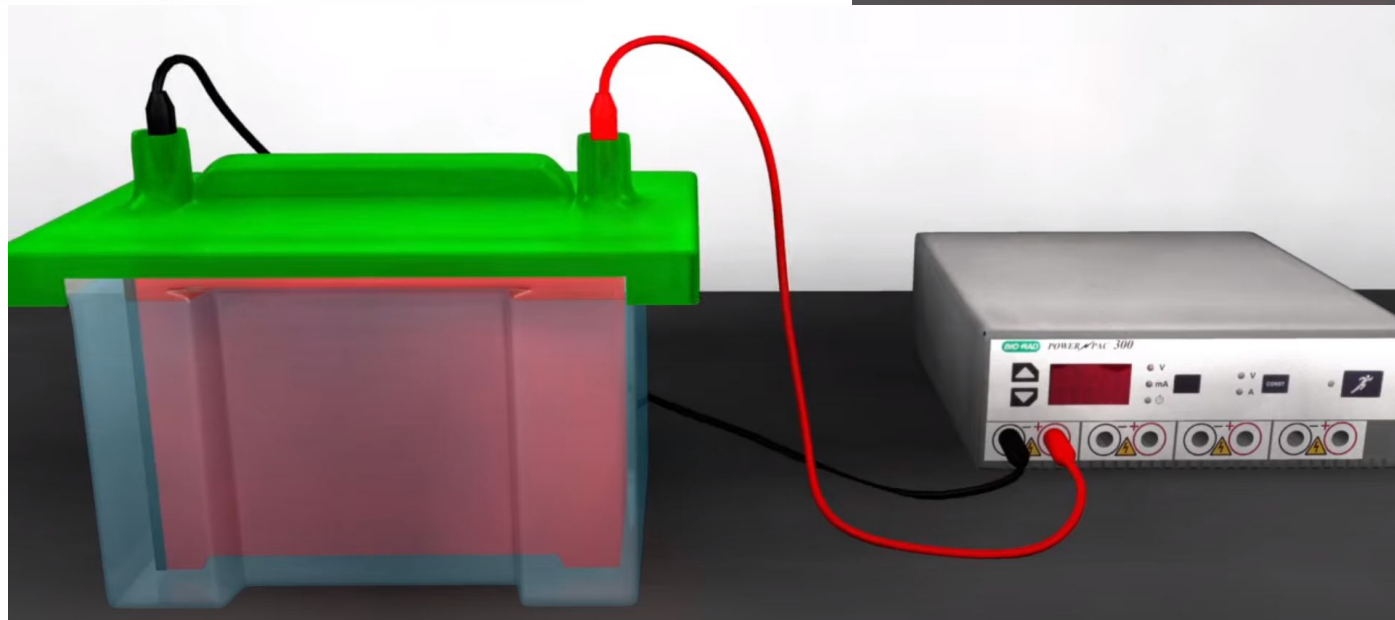
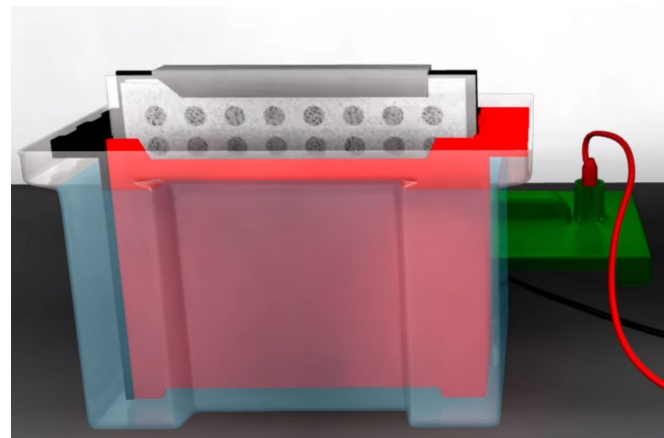
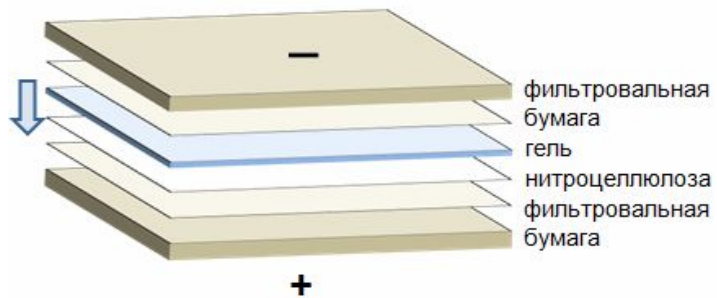


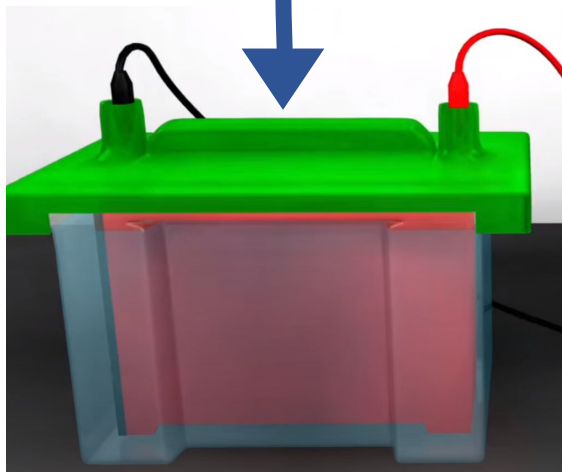
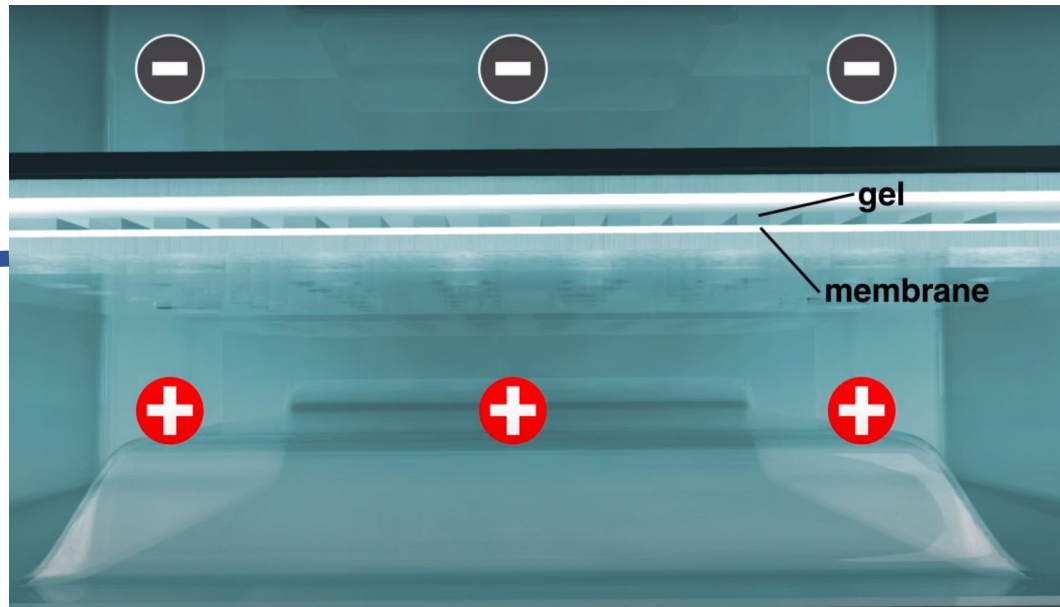
# Перенос

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

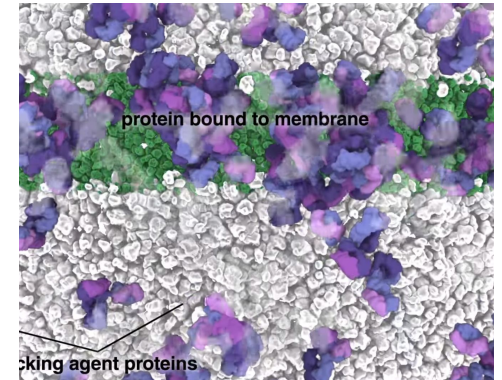
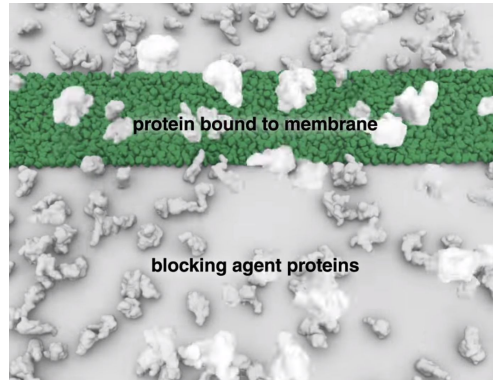
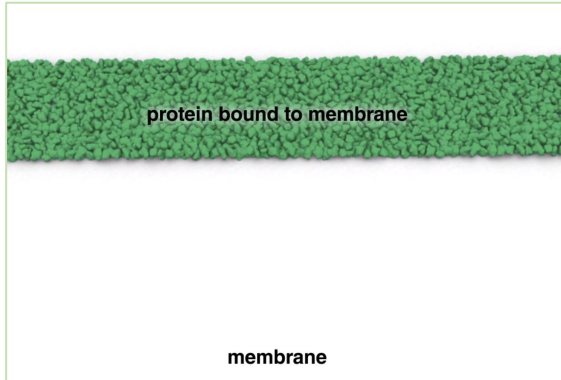
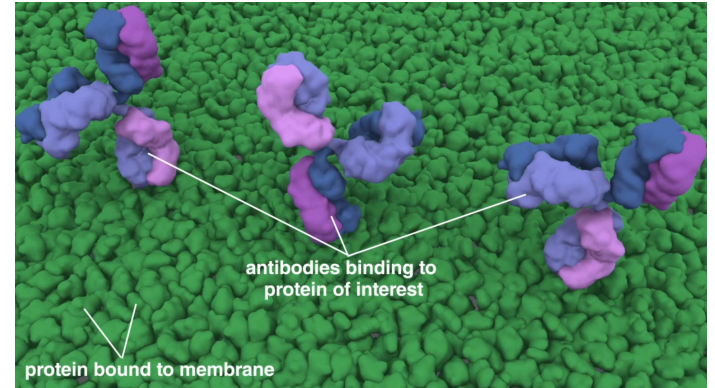
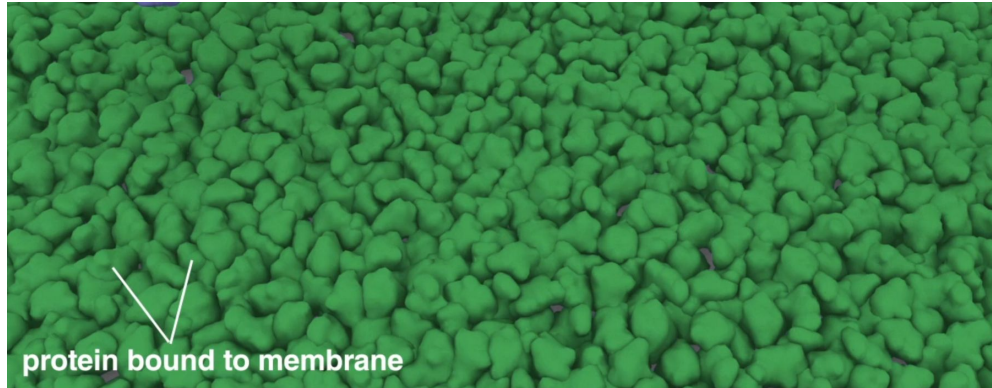


# перенос

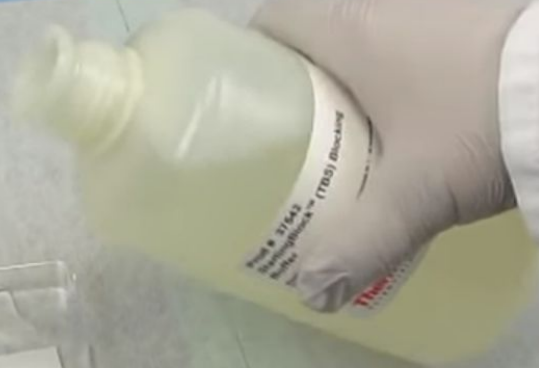






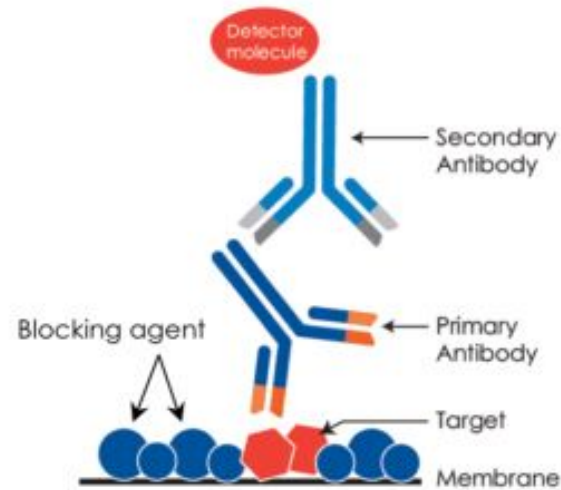
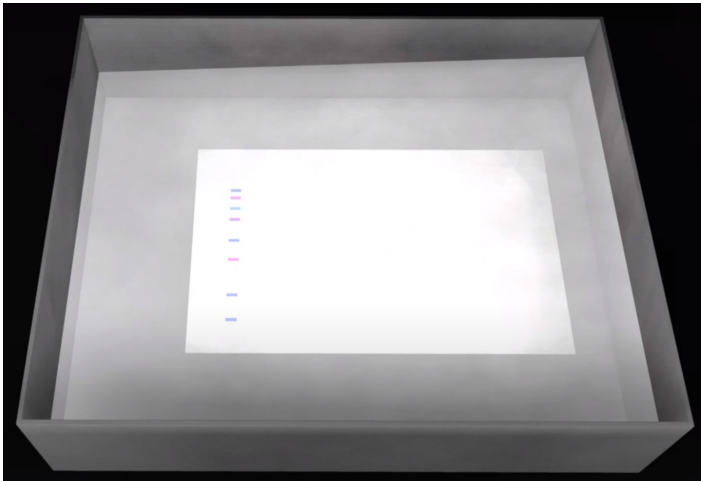


# Этап №4 Блокирование

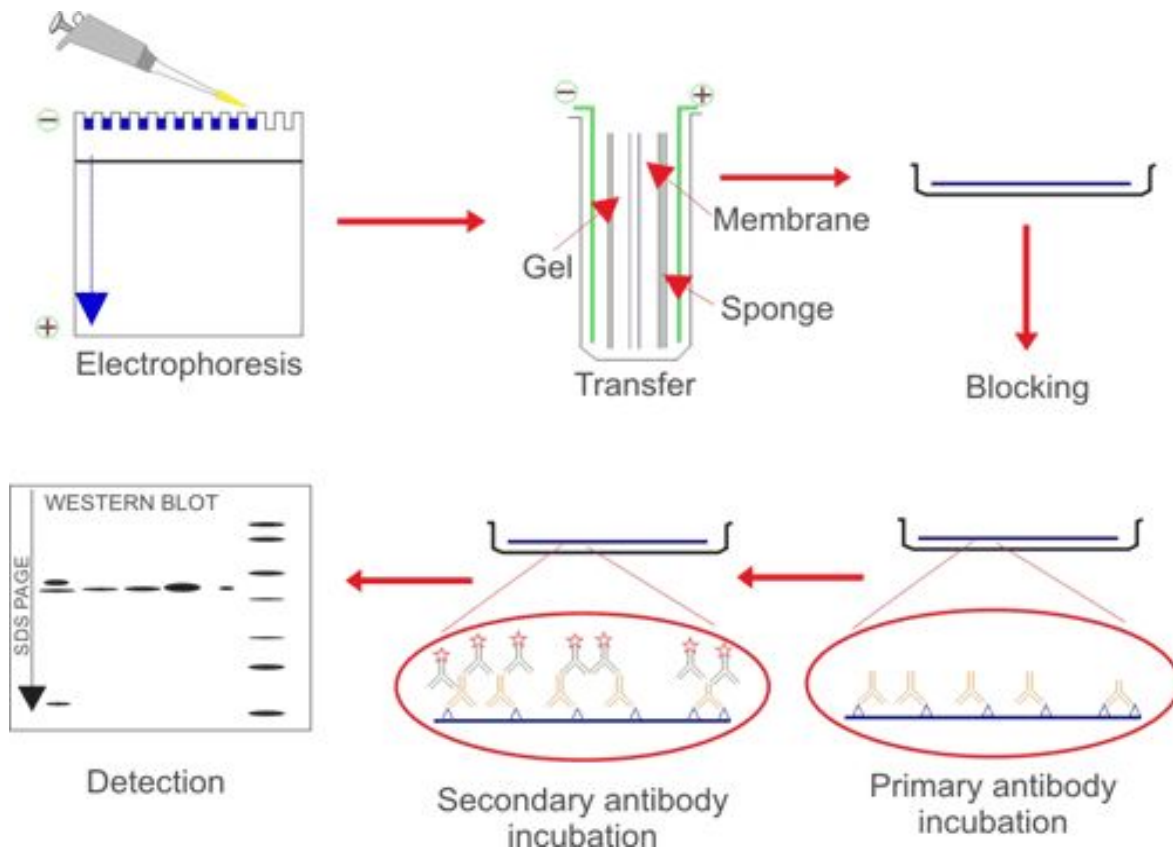


# Блокирование


- ✓ 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





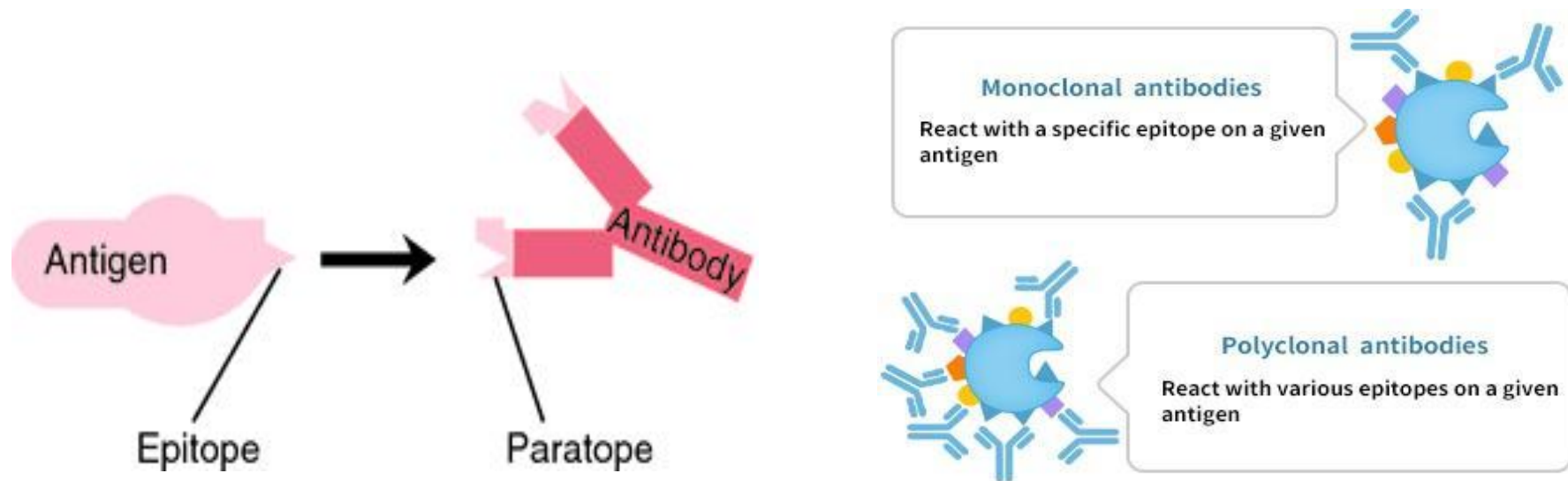
A 3D molecular model showing several antibody-antigen complexes. The antibodies are depicted as blue, Y-shaped structures with a textured surface. The antigens are shown as smaller, brownish-yellow, irregularly shaped particles. The complexes are arranged in a cluster, with some antibodies bound to antigens. The background is a dark blue gradient with small white specks, suggesting a microscopic or molecular environment.

Этап №5  
Обработка  
антителами



# Антитела

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

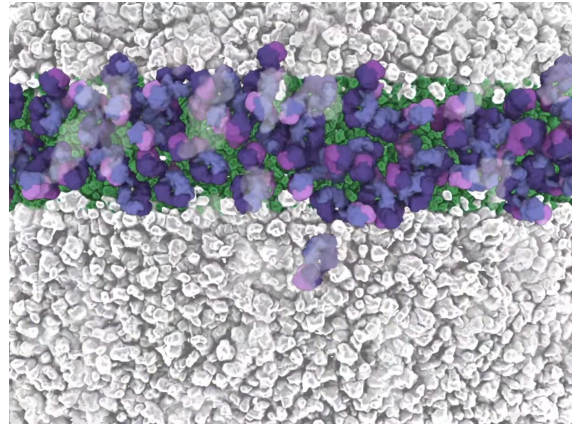
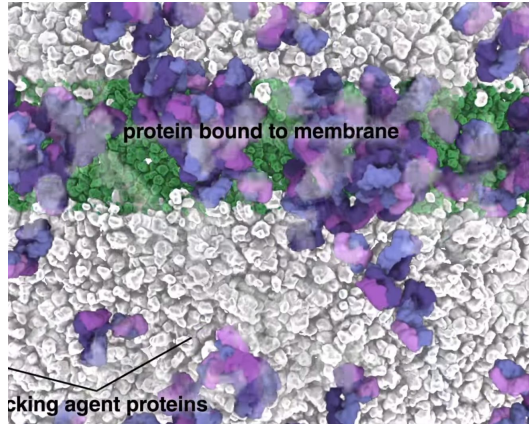
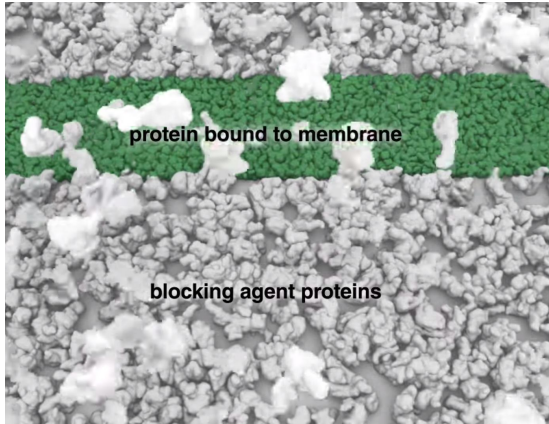
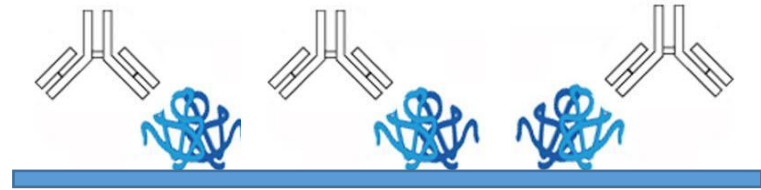




# Инкубация с первичными антителами

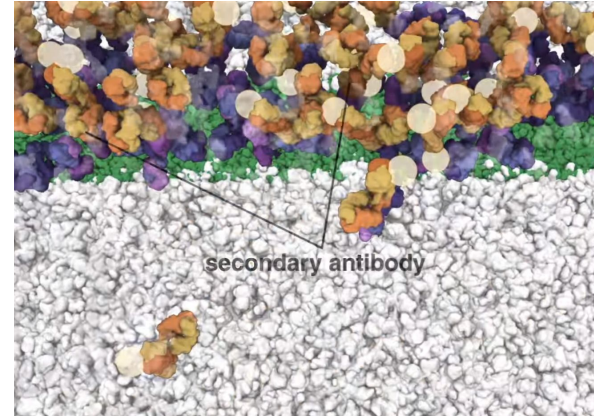
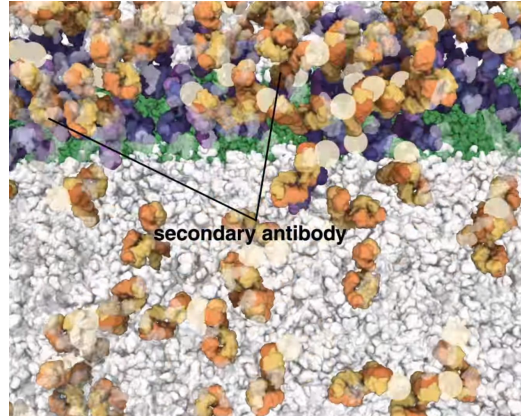
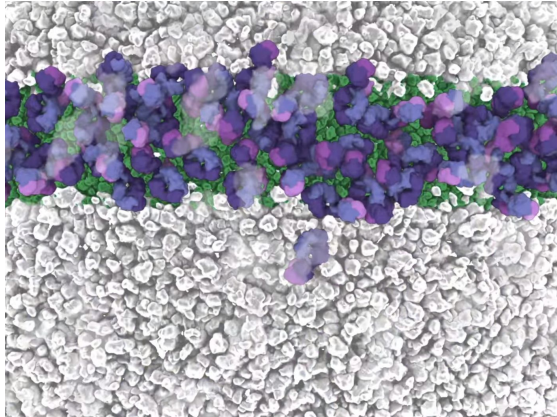
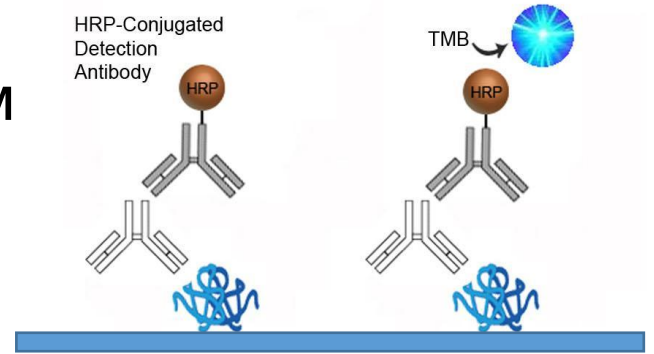
1) Инкубация мембраны с раствором первичных антител к искомому белку

2) Промывка



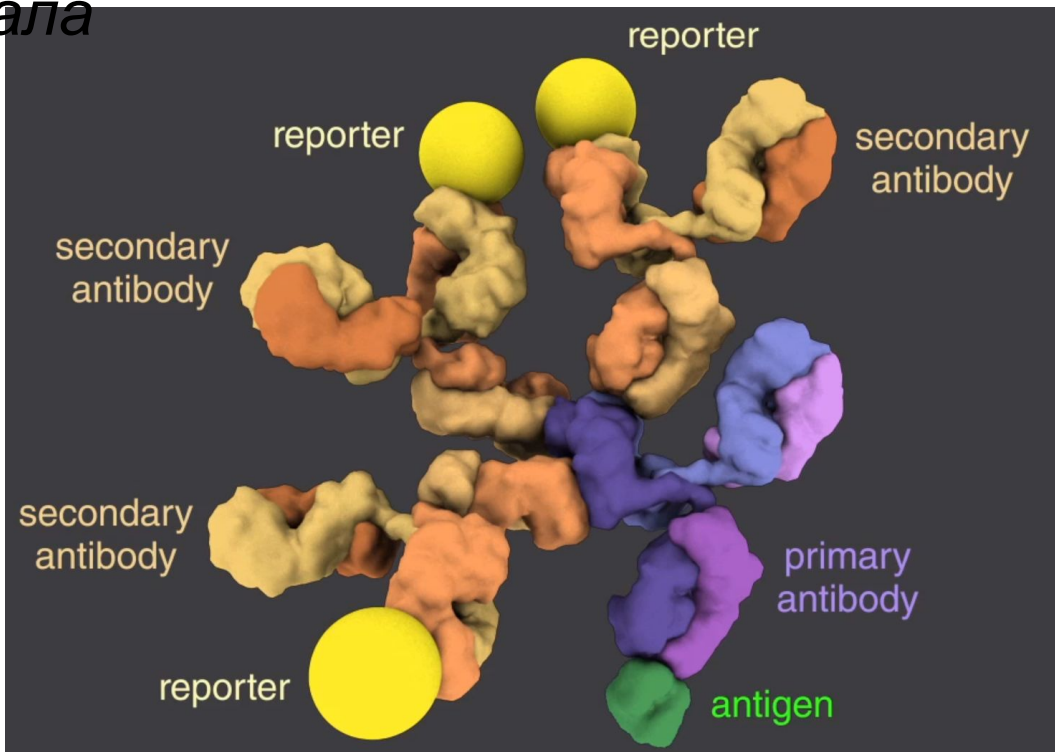
# Инкубация со вторичными антителами

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



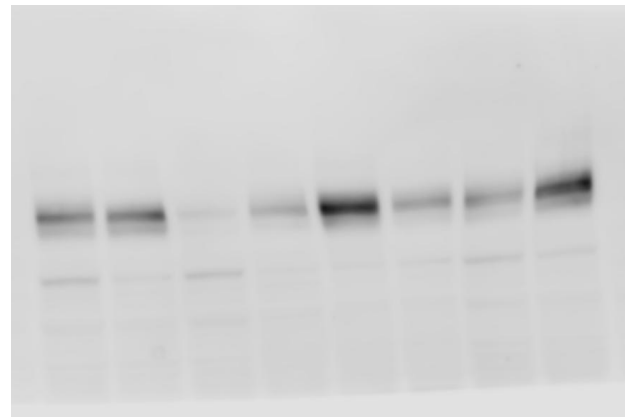
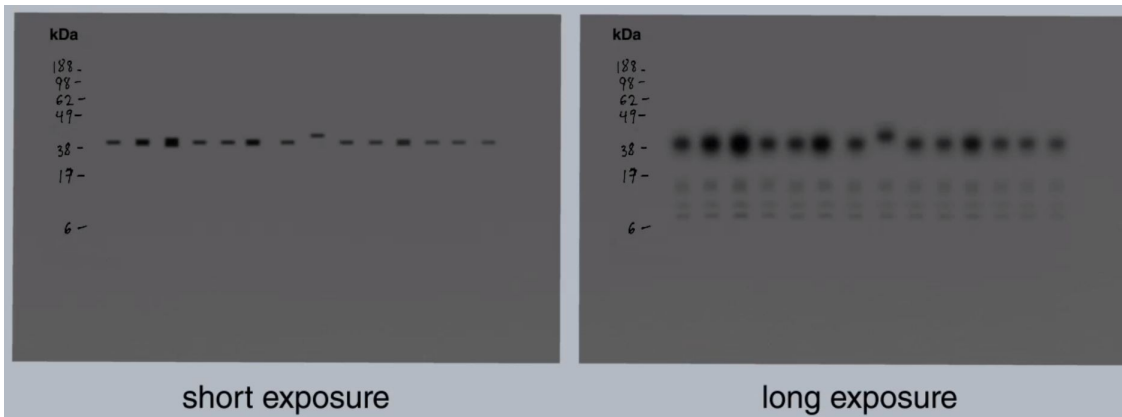
# Зачем использовать вторичные антитела?

*Усиление сигнала*



# Детекция

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

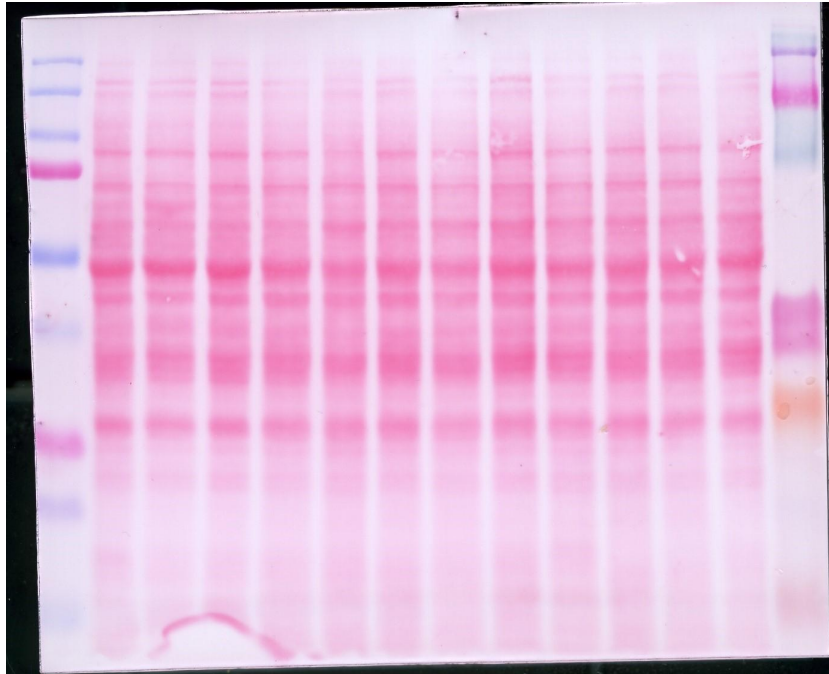




# Контроль

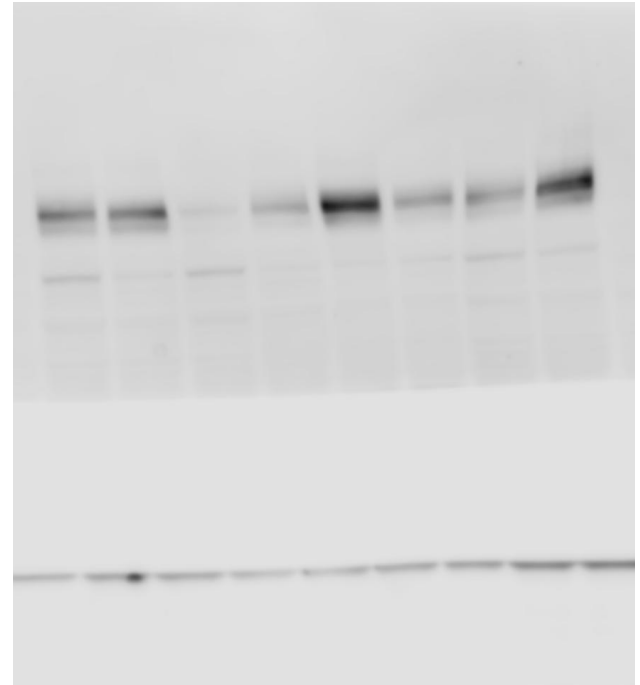
## загрузки

Ponceau S



# Housekeeping gene proteins

Белки генов «домашнего хозяйства»



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



Спасибо за  
внимание!  
До встречи!