BIOZOL

Diagnostica Vertrieb GmbH, Oehleckerring 11-13

22419 Hamburg, Germany

Telephone: +49 (0)89 3799666-6 | **Fax:** +49 (0)89 3799666-99

E-Mail: info@biozol.de

Western Blot

Blockierung mit immunisierendem Peptid

Biorbyt entwickelt und produziert hochqualitative, sorgfältig getestete Biochemikalien, Antikörper, Immunassays und weitere Produkte für den Forschungsbedarf.

Unspezifische Bindung und Blockierungspeptide

Unspezifische Bindung

Bei Western-Blots kann es gelegentlich zu einer unspezifischen Bindung eines Antikörpers an andere Proteine als das Antigen kommen. Dies äußert sich in mehreren Banden anstelle der erwarteten 1 oder 2 Banden. Im Allgemeinen tritt dies häufiger bei polyklonalen Antikörpern auf, aber manchmal ist es auch bei monoklonalen Antikörpern zu beobachten. Um herauszufinden, welches Band oder welche Färbung spezifisch für Ihr Protein ist, können Sie ein Blockierungsexperiment mit immunisierenden Peptiden durchführen.

Blocking-Peptide

Bevor Sie das Färbeprotokoll durchführen, muss der Antikörper neutralisiert werden, indem er mit einem Überschuss an Peptiden inkubiert wird, die dem vom Antikörper erkannten Epitop

entsprechen. Diese Peptide werden als Blocking-Peptide bezeichnet. Blocking-Peptide sind die Peptide, die zur Herstellung des ursprünglichen Antikörpers verwendet wurden, insbesondere bei polyklonalen Antikörpern. Der an das Blocking-Peptid gebundene Antikörper steht nicht mehr zur Verfügung, um an sein Epitop im Protein auf dem Western-Blot oder in der Zelle zu binden. Der neutralisierte Antikörper wird dann parallel zum ursprünglichen Antikörper allein unter Verwendung des ursprünglichen Protokolls eingesetzt, und die Ergebnisse werden verglichen. Durch den Vergleich der Färbung des blockierten Antikörpers mit der des ursprünglichen Antikörpers allein lässt sich feststellen, welche Färbung spezifisch ist. Färbungsmuster oder Banden des blockierten Antikörpers fehlen im Western-Blot oder bei der Immunfärbung, die mit dem neutralisierten Antikörper durchgeführt wird.

Protokoll zur Blockierung mit immunisierendem Peptid (BL) von Biorbyt

Es kann gelegentlich zu einer unspezifischen Bindung eines Antikörpers an andere Proteine als das Antigen kommen. Dies tritt in der Regel häufiger bei polyklonalen Antikörpern auf, kann aber auch bei monoklonalen Antikörpern vorkommen.

Um festzustellen, welche Bande oder Färbung spezifisch ist, kann ein Blockierungsexperiment mit einem Immunisierungspeptid durchgeführt werden. Bevor mit dem Färbeprotokoll fortgefahren wird, wird der Antikörper neutralisiert (durch Inkubation mit einem Überschuss an Peptid, das dem vom Antikörper erkannten Epitop entspricht). Der an das Blocking-Peptid gebundene Antikörper steht nun nicht mehr zur Bindung an das im Protein auf dem Western-Blot oder in der Zelle vorhandene Epitop zur Verfügung. Der neutralisierte Antikörper wird dann parallel zum Antikörper allein verwendet, und die Ergebnisse werden verglichen. Durch den Vergleich der Färbung des blockierten Antikörpers mit der des Antikörpers allein lässt sich feststellen, welche Färbung spezifisch ist: Diese Färbung fehlt auf dem Western-Blot oder bei der Immunfärbung, die mit dem neutralisierten Antikörper durchgeführt wurde.

Materialien und Reagenzien

- Blocking-Puffer (in der Regel TBST plus entweder 5 % fettfreie Trockenmilch oder 3 % BSA für den Western Blot oder PBS plus 1 % BSA für die IHC)
- Antikörper
- Blocking-Peptid (Immunisierungspeptid)
- Zwei Röhrchen

- Zwei identische Proben (z. B. ein Western Blot mit zwei identischen Spuren, in zwei Hälften geteilt; zwei Objektträger mit den zu untersuchenden Zellen; usw.)

Methode

1. Bestimmen Sie die optimale Antikörperkonzentration, die in Ihrem speziellen Protokoll durchweg ein positives Ergebnis liefert. Ermitteln Sie anhand dieser Konzentration, wie viel Antikörper Sie für zwei Experimente benötigen. Beispielsweise wird ein Antikörper im Western-Blot erfolgreich in einer Konzentration von 0,5 µg/ml eingesetzt. Sie benötigen 2 ml Antikörperlösung, um einen Streifen eines Western-Blots anzufärben. Somit würden Sie 1 µg Antikörper in 2 ml Puffer pro Streifen verwenden.
2. Verdünnen Sie die erforderliche Menge an Antikörper in Blocking-Puffer auf das für die beiden Experimente benötigte Endvolumen. Verteilen Sie diese Menge gleichmäßig auf zwei Röhrchen.
3. Geben Sie in das erste Röhrchen mit der Beschriftung „Blocked“ das Blocking-Peptid bis zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml hinzu (in diesem Beispiel insgesamt 2 µg Peptid). Geben Sie in das zweite Röhrchen mit der Beschriftung „Control“ eine entsprechende Menge Puffer hinzu.
4. Inkubieren Sie beide Röhrchen unter Schütteln 30 Minuten lang bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C.
5. Führen Sie das Färbeprotokoll an den beiden identischen Proben durch, wobei Sie für die eine den blockierten Antikörper und für die andere die Kontrolle verwenden. Achten Sie darauf, die Streifen mit dem blockierten und dem Kontroll-Antikörper nicht zu verwechseln!
6. Beobachten Sie die Färbung. Die Färbung, die bei Verwendung des blockierten Antikörpers verschwindet, ist spezifisch für diesen Antikörper. (Siehe Anmerkung)

Anmerkung

Wenn im Western-Blot aufgrund einer Peptid-/Antigen-Kompensation mehr als eine Bande verschwindet, enthalten diese Banden die antigenen Determinanten und könnten Fragmente des vollständigen Antigens oder eines das Antigen enthaltenden Komplexes sein.