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

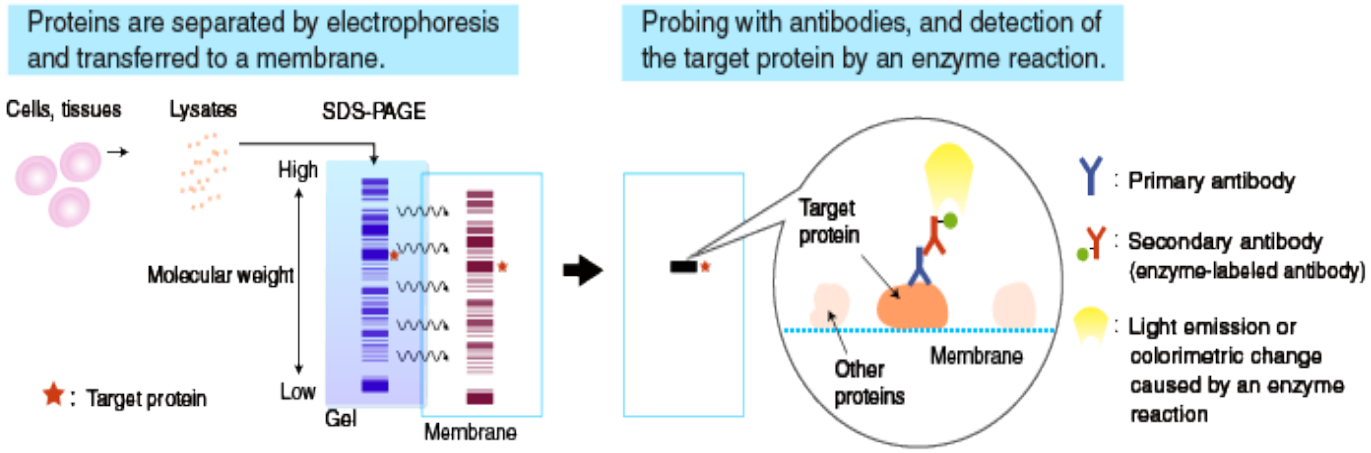
Prinzip und Methode mit MBL

MBL ist ein führendes Life Science Unternehmen mit Fokus auf hochqualitative Produkte für die biologische Forschung und klinische Diagnostik, darunter MHC-Tetramere, ein breites Sortiment an Antikörpern, rekombinante Proteine und ELISA-Kits.

Western Blot: Prinzip und Methode

Beim Western Blot (WB) werden die Zielproteine nach der SDS-PAGE auf eine hydrophobe Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Das Prinzip



Nach der SDS-PAGE wird eine Membran auf das Gel gelegt, auf die die im Gel getrennten Proteine elektrophoretisch übertragen werden. Die Membran mit den übertragenen Proteinen wird anschließend mit einem Primärantikörper (einem für das Zielprotein spezifischen Antikörper) inkubiert, gewaschen und mit einem Sekundärantikörper zur Reaktion gebracht, der mit einem Enzym wie beispielsweise Meerrettichperoxidase (HRP) markiert ist. Die Aktivität des gebundenen Enzyms wird zum Nachweis des Zielproteins genutzt und mittels eines chemilumineszenten oder chromogenen Verfahrens sichtbar gemacht.

Ablauf des Western-Blot-Verfahrens:

1. Beschaffung eines Antikörpers gegen ein Zielprotein
2. SDS-PAGE
3. Übertragung auf eine Membran
4. Blockierung und Reaktion mit Antikörpern
5. Nachweis der Banden

Übertragung auf eine Membran

Die mittels SDS-PAGE getrennten Proteine werden mithilfe eines speziellen Geräts (Blotting-Gerät) vom Polyacrylamidgel auf eine Membran „übertragen“.

Blotting-Geräte

Für die Übertragung kann ein Halbtrocken- oder ein Tanksystem verwendet werden.

Vergleich zwischen verschiedenen Blotting-Geräten:

	Halbtrockenes System	Tanksystem
Blotting-Dauer	Kurz	Lang
Puffervolumen	Gering	Groß
Übertragungseffizienz	Schlecht bei Proteinen mit hohem Molekulargewicht	Gut bei Proteinen mit hohem Molekulargewicht Gleichmäßige Übertragung

Membran

Häufig werden Nitrocellulose- und PVDF-Membranen verwendet. Die PVDF-Membran ist zwar teurer, aber widerstandsfähiger und weist eine hohe Absorptionskapazität für Proteine auf, wodurch sie sich für die CBB-Färbung, den Nachweis mit bestimmten Substraten für alkalische Phosphatase und das erneute Proben mit einem anderen Antikörper eignet. Die Nitrocellulose-Membran ist empfindlicher, aber kostengünstiger als PVDF und erfordert keine Vorbefeuchtung mit Methanol und verursacht weniger unspezifische Bindungen.

Erneutes Proben: Das Entfernen der Antikörper von der Membran nach dem Nachweis und das anschließende Proben mit einem anderen Antikörper.

Transferpuffer

Je nach Molekulargewicht und Art der Zielproteine werden unterschiedliche Puffer für den Transfer verwendet.

Zusammensetzung eines häufig verwendeten Transferpuffers:

25 mM Tris-HCl
192 mM Glycin
20 % MeOH

Blockierung und Detektion mit Antikörpern

Blockierung

Die Membran mit den übertragenen Proteinen wird blockiert, um eine unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran zu verhindern. Die Blockierung verhindert lediglich die unspezifische Bindung, verringert jedoch nicht die Kreuzreaktivität (spezifische Bindung von Antikörpern an Nicht-Zielproteine, die dasselbe Epitop enthalten wie das Zielprotein). Zur Blockierung werden verschiedene Lösungen verwendet.

Häufig verwendete Blockierungslösungen:

- 1–3 % BSA in PBS-T: Rinderserumalbumin (BSA) wird als Blockierungsmittel verwendet.
- 1–5 % Magermilch in PBS-T: Magermilch ist beim Blockieren wirksamer und wird häufig verwendet. Sie kann jedoch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen stören. Magermilch enthält das Phosphoprotein Kasein und ist daher für den Nachweis von Phosphoproteinen nicht geeignet.
- PBS-T (PBS-Tween 20): Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) mit 0,05 % Tween 20

Inkubation mit Antikörpern

Nach der Blockierung wird die Membran mit einem Primärantikörper und anschließend mit einem Sekundärantikörper inkubiert. Die Konzentration des Primärantikörpers ist entscheidend. Ist sie zu niedrig, kann das Zielprotein nicht nachgewiesen werden. Ist sie zu hoch, treten unspezifische Reaktionen auf, die zum Nachweis von Nicht-Zielproteinen führen.

Bestimmung einer optimalen Konzentration des Primärantikörpers

Wenn Sie einen Antikörper zum ersten Mal verwenden, wählen Sie eine Konzentration, die sich an der Literatur orientiert oder im Produktdatenblatt angegeben ist. Sollten die gewünschten Ergebnisse nicht erzielt werden, testen Sie mehrere verschiedene Verdünnungen des Primärantikörpers oder probieren Sie einen anderen Verdünnungspuffer aus.

Sekundärantikörper

Häufig werden handelsübliche HRP- oder alkalische Phosphatase (AP)-markierte Sekundärantikörper verwendet. Überprüfen Sie den Isotyp des Primärantikörpers und die Tierart, in der der Primärantikörper gewonnen wurde, und achten Sie darauf, einen geeigneten Sekundärantikörper zu verwenden.

Nachweis der Banden

Chemilumineszenzverfahren

Ein Substrat enthaltendes Reaktionsgemisch wird auf die Membran aufgetragen. Das an den Antikörper gebundene Enzym katalysiert eine Reaktion, bei der Licht emittiert wird, das mit einem Röntgenfilm oder einer gekühlten CCD-Kamera erfasst wird.

Kolorimetrisches Verfahren

Als Nachweisreagenz wird ein chromogenes Substrat verwendet. Diaminobenzidin (DAB) oder TMB werden üblicherweise als Substrate für HRP verwendet, während eine Mischung aus BCIP und NBT als Substrat für alkalische Phosphatase (AP) dient.

Prozedur

Übertragung von Proteinen auf eine Membran (Halbtrocken-Blotting und Membranfärbung) – ein Beispiel, durchgeführt bei MBL

Schritt-für-Schritt-Anleitung:

1. Weichen Sie ein Stück PVDF-Membran, das etwas größer als das Gel ist, 1 Minute lang in Methanol ein (Vorbefeuchtung) und lassen Sie es anschließend im Transferpuffer equilibrieren. Equilibrieren Sie ebenfalls zwei Stück Filterpapier, die etwas größer als die PVDF-Membran sind, im Transferpuffer. Bei einer Nitrocellulosemembran ist keine Vorbefeuchtung erforderlich. Überspringen Sie den Schritt mit Methanol und lassen Sie die Membran im Transferpuffer equilibrieren.
2. Lassen Sie das Gel nach der Elektrophorese im Transferpuffer equilibrieren.
3. Legen Sie ein Stück ausgeglichenes Filterpapier auf die Anodenplatte und legen Sie die Membran, das Gel und ein weiteres Stück Filterpapier ohne Luftblasen darauf.
4. Schließen Sie die Plus-Elektrode an die Anodenplatte und die Minus-Elektrode an die Kathodenplatte an. Schalten Sie das Netzteil ein und führen Sie den Transfer 1 Stunde lang bei 50 mA durch (für ein Gel). Die Transferbedingungen variieren je nach Versuchsbedingungen.

5. Schalten Sie das Netzteil aus, entfernen Sie die Membran und führen Sie eine vorläufige Färbung durch, um die Effizienz des Transfers zu überprüfen und die Molekulargewichtsmarker sichtbar zu machen, um deren Positionen zu bestätigen. Zu diesem Zweck wird üblicherweise Ponceau S verwendet, da sich die Membran leicht entfärben lässt und es die anschließende Untersuchung mit Antikörpern nicht beeinträchtigt.

Inkubation mit Antikörpern und Nachweis der Banden (Blockierung und Nachweis des Antigens durch HRP-Reaktion) – ein Beispiel, durchgeführt bei MBL

Schritt-für-Schritt-Anleitung:

1. Legen Sie die Membran in den Blocking-Puffer und inkubieren Sie sie unter Schütteln 1 Stunde lang bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4 °C).
2. Waschen Sie die Membran dreimal mit Waschpuffer (jeweils 5 Minuten).
3. Legen Sie die Membran in die in 1 % BSA in Tween-PBS (pH 7,2) verdünnte Primärantikörperlösung und inkubieren Sie sie unter Schütteln 1 Stunde lang bei Raumtemperatur.
4. Waschen Sie die Membran dreimal mit Waschpuffer (jeweils 10 Minuten).
5. Legen Sie die Membran in den in 1 % BSA in Tween-PBS (pH 7,2) verdünnten Sekundärantikörper und inkubieren Sie sie 1 Stunde lang bei Raumtemperatur unter Schütteln.
6. Waschen Sie die Membran dreimal mit Waschpuffer (jeweils 10 Minuten).
7. Chemilumineszenz-Methode: Bereiten Sie das Chemilumineszenz-Detektionsreagenz gemäß der Gebrauchsanweisung vor. Legen Sie die Membran auf ein Stück Frischhaltefolie und geben Sie das Reagenz auf die Membran. Lassen Sie es 1 Minute stehen und entfernen Sie das Reagenz anschließend mit einer Pipette. Wickeln Sie die Membran in ein Stück Frischhaltefolie ein, entfernen Sie eventuelle Luftblasen und legen Sie sie zur Betrachtung unter ein Chemilumineszenz-Detektionsgerät (z. B. eine CCD-Kamera).