



# Western-blot

Készítette: Szabó Diána

2009. 03.05



# Tartalom

- Mi is az a Western-blot?
- Western-blot technika kivitelezése
- Western-blot technika alkalmazása



# Mi is az a Western-blot?

- Immunanalitikai módszer, **fehérjék jelenlétének kimutatására**
- Immunanalitika elve= immunválasz mechanizmusa= antigén-antitest kölcsönhatáson alapszik, **minden antitest csak egy specifikus antigénnel tud kapcsolódni.**
  - Antigén= minden olyan anyag, ami az élő szervezetbe bejutva immunválaszt vált ki (idegen)
  - Antitest= ellenanyag, az antigén hatására termelődnek



# Western-blot technika kivitelezése

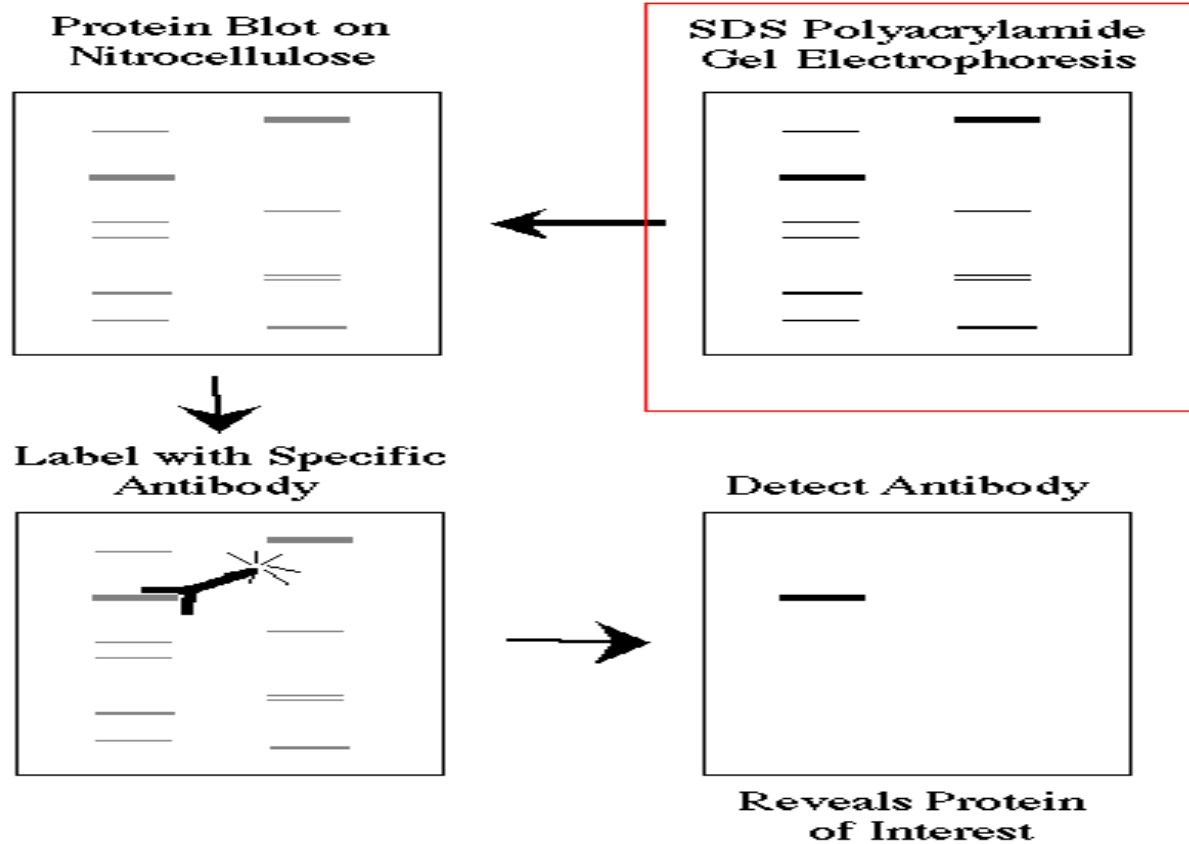
- 1. lépés: mintaelőkészítés
- 2. lépés: gélelektroforézis
- 3. lépés: transzfer (blottolás)
- 4. lépés: blokkolás
- 5. lépés: megjelölés
  - Egylépéses eljárás
  - Kétlépéses eljárás
- 6. lépés: detektálás



# 1. lépés: mintaelőkészítés

- Minta eredete: szövet/ sejt kultúra
- **1. mechanikai roncsolásnak** vetik alá pl., homogenizátor.
- **2. megfelelő detergens**, NaCl és puffer alkalmazása segíti a sejtek lízisét.
- **3. szeparációval** elválasztják a különböző sejtalkotókat pl., centrifugálással.
- **4. kinyerik a fehérjét**

## 2. lépés: gélelektroforézis

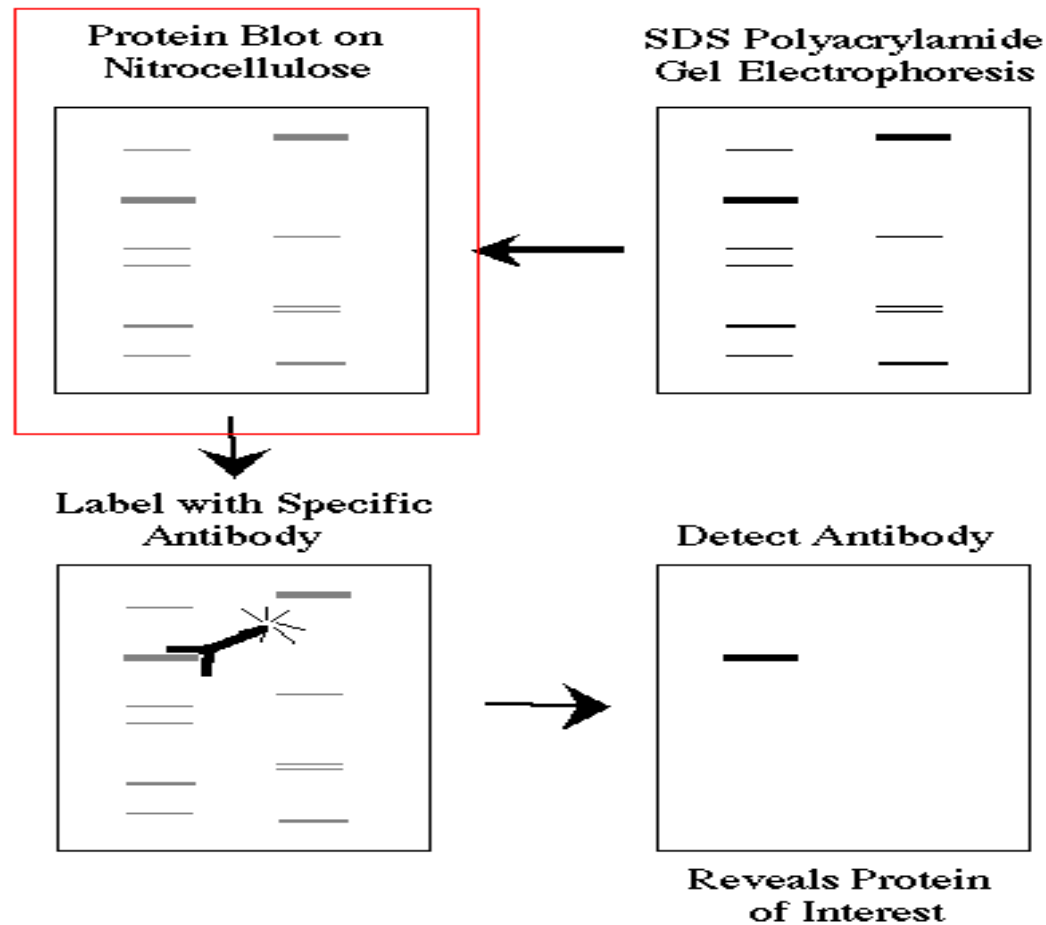




## 2. lépés: gélelektroforézis

- **A minta fehérjéit gélelektroforézisen elválasztják egymástól:**
  - 1D: molekulatömeg alapján
  - 2D: izoelektromos pont és molekulatömeg alapján (nagyobb felbontóképesség)

# 3. lépés: transzfer (blottolás)







## 3. lépés: transzfer (blottolás)

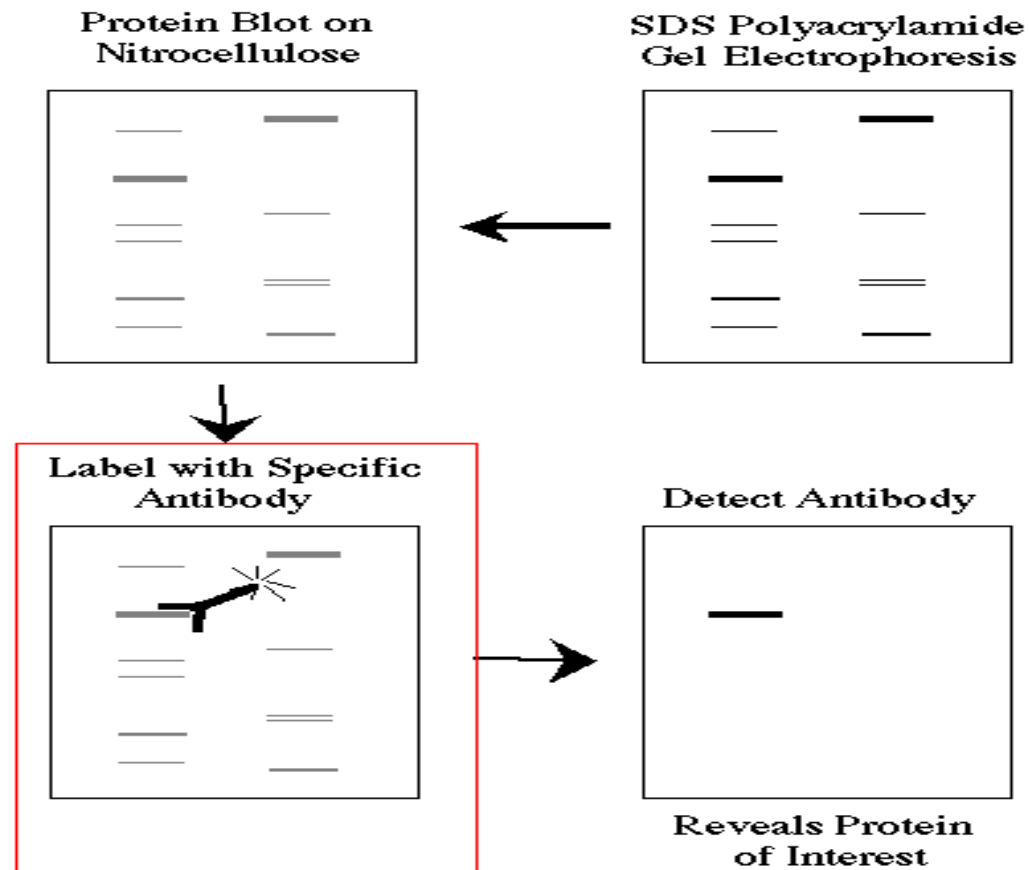
- A **szeparált fehérjéket nitrocellulóz membránra** vagy PVDF-re **viszik**.
- A membránnak fehérje kötő részei vannak, melyek **nem specifikusak**, minden fehérjét azonos valószínűséggel kötnek, hidrofób és elektromos kölcsönhatások révén.



## 4. lépés: blokkolás

- A membránt blokkolják, hogy **megakadályozzák a nem-specifikus fehérje kölcsönhatásokat a membrán és az antitest fehérjék között.**
- Ezt úgy oldják meg, hogy a **membránt blokkoló pufferbe** helyezik bele (membrán szérum albumin, detergenssek stb.)

# 5. lépés: megjelölés



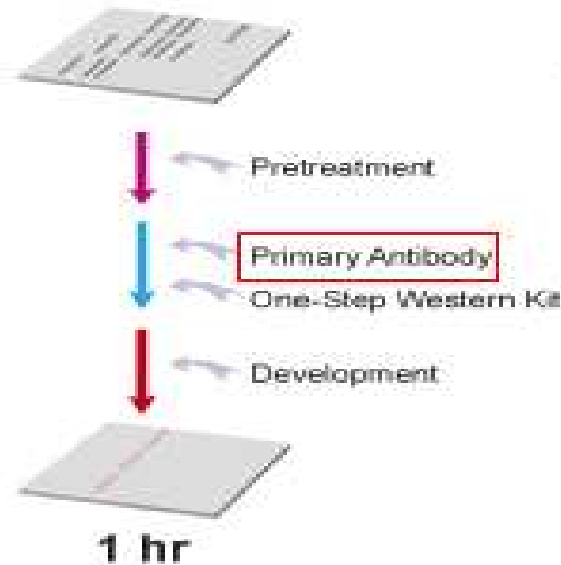


# 5. lépés: megjelölés

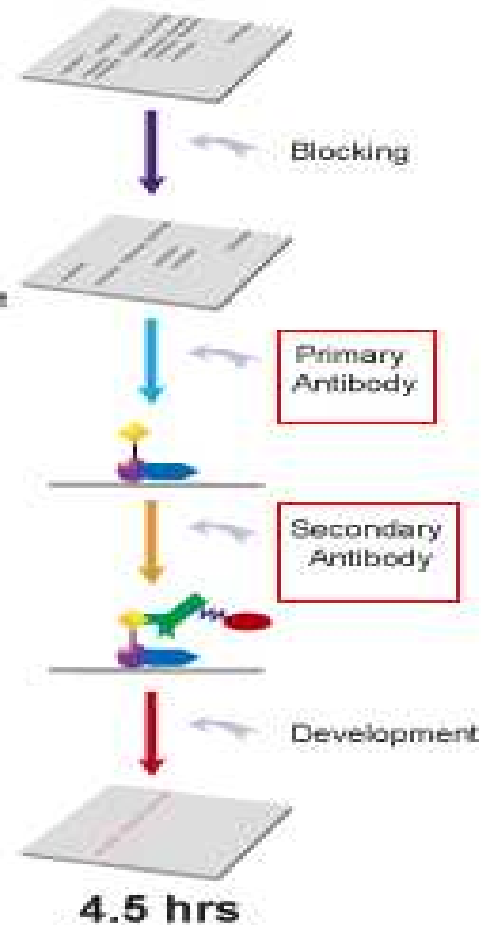
- Jelölés történhet egy illetve két lépésben:
  - **Kétlépéses eljárás:** egy elsődleges és egy másodlagos antitestre van szükség.
    - Elsődleges antitestekkel való inkubálás, amely felismeri a vizsgált fehérjét a membránon és köt hozzá.
    - Mosás –nem kötődötték eltávolítása-.
    - Jelzett másodlagos antitesttel való inkubálás, amely kötődik az elsődleges antitesthez.
  - **Egylépéses eljárás:** előzőhöz hasonló, annyi eltéréssel, hogy csak egy antitestre van szükség, mely felismeri a vizsgálandó fehérjét és tartalmaz detektálható részt is.

# 5. lépés: megjelölés

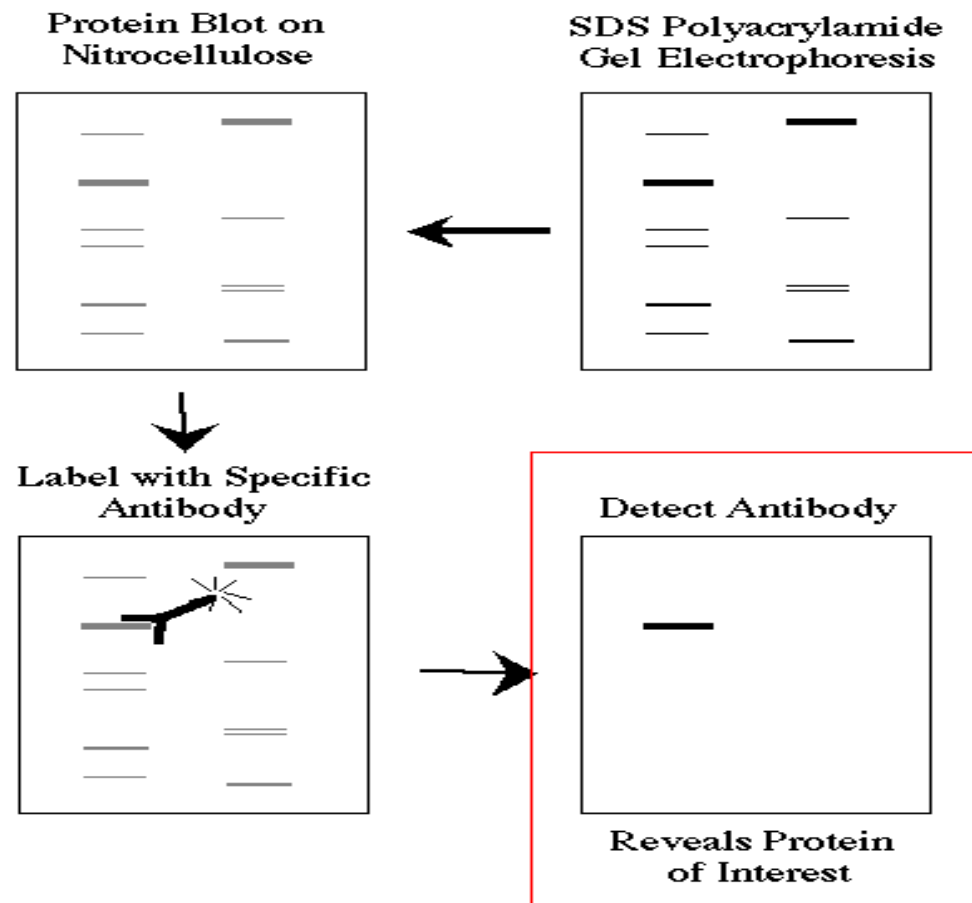
## GenScript One-Step™ Western Blot Detection



## Classical Western Blot Detection



# 6. lépés: detektálás





## 6. lépés: detektálás

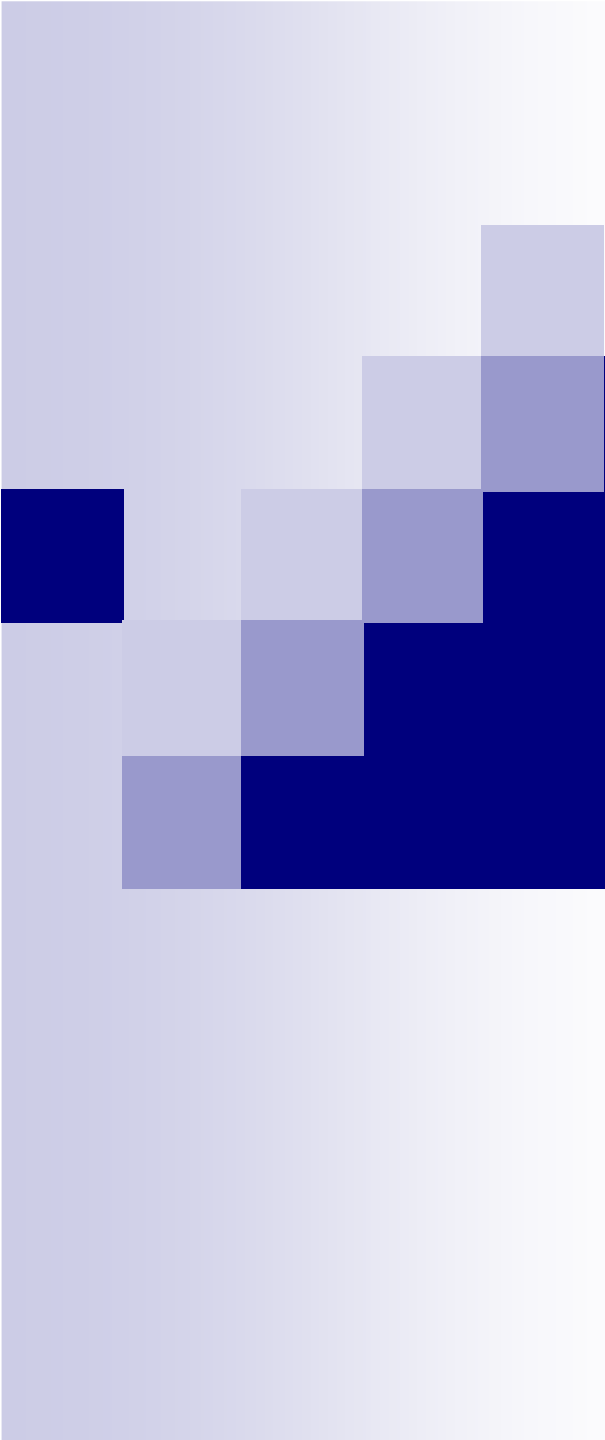
- Miután a nem kötött antitestek kimosódtak, a **Western-blot azon fehérjéi, melyek a jelölt antitestekhez kötődtek, kimutathatók.**
- Módjá: jelölés függő
  - radioaktívan jelölt: röntgen-filmet közvetlenül a Western blotra helyezve, azon sötét helyeket képez, amelyek tökéletesen egybeesnek a vizsgált fehérje sávjaival
  - fluoreszcensen jelölt: antitestet fénnel gerjeszteni lehet, és az emisszió detektálható



# Western-blot technika alkalmazása

- fehérje expressziójának mérése
- minőségi ellenőrzés
- orvosdiagnosztika (HIV tesztek, Kerge marha kór, Lyme-kór)
- kutatás





Köszönöm a  
figyelmet!