

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## Optimalizace rychlého imunoblotingu proteinů na přístroji SNAP i.d. pro rostlinné vzorky

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	<b>Jolana Georgiadisová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Marek Petřivalský, Dr.</b>
Termín odevzdání práce:	7. 5. 2012

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 7. 5. 2012

-----  
Jolana Georgiadisová

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce Mgr. Markovi Petřivalskému, Dr. za odborné vedení během experimentální práce v laboratoři, za rady a připomínky, za poskytnutí informací, literatury a času pro zpracování této bakalářské práce.

Tímto bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za morální podporu a trpělivost během studia.

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora	Jolana Georgiadisová
Název práce	Optimalizace rychlého imunoblotingu proteinů na přístroji SNAP i.d. pro rostlinné vzorky
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2012

### **Abstrakt**

Mezi nejdůležitější metody analýzy proteinů patří elektroforéza v polyakrylamidovém gelu a blotování. Při SDS-PAGE elektroforéze dochází k rozdělení proteinů v polyakrylamidovém gelu. Z mobilní fáze (gel) jsou proteiny přebloťovány pomocí Western blotingu na pevný nosič (membrána). Důležitou roli hraje typ membrány. Přebloťovaná membrána je inkubována klasickým a zdlouhavým postupem na třepačce s příslušnou primární a sekundární protilátkou. Inkubační doba může trvat 4 hodiny a více. Proto byl vyvinut přístroj SNAP i.d., na kterém se blokování membrány a inkubace s protilátkami sníží na pouhých 30 minut. Je to velmi rychlá a účinná metoda analýzy proteinů.

Experimentální část se zabývala optimalizací metody rychlého imunoblotingu na přístroji SNAP id. na modelovém proteinu nitrovaném hovězím sérovém albuminu. Byly porovnány vhodná ředění vzorku a protilátek (primární, sekundární), různé typy membrán a metody vizualizace výsledků. Nejvhodnější membránou byla nitrocelulosa, optimální výsledky byly získány s králičí protilátkou při ředění 1:1000 a sekundární 1:5000. Značení sekundární protilátky křenovou peroxidase a následná detekce chemiluminiscence na citlivý fotopapír byla nejcitlivější metodou. Optimalizovaný postup blotingu byl aplikován na analýzu extraktů z *Arabidopsis thaliana*. Byla prokázána vhodnost optimalizované metody pro sledování a kvantifikaci nitrovaných proteinů v rostlinách.

Klíčová slova	Western blotting, rychlý imunobloting, SNAP id., nitrované proteiny
Počet stran	63
Počet příloh	0
Jazyk	Český

**Bibliographical identification:**

Autor's first name and surname	Jolana Georgiadisová
Title	Optimization of rapid protein immunoblotting on SNAP i.d. system for plant samples
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
The year of presentation	2012

## Abstract

SDS-PAGE electrophoresis belongs to the most important method of protein analysis in which proteins are separated in polyacrylamide gels. Proteins are transferred from a mobile phase (gel) by Western blotting to a solid support (membrane). The type of membrane plays an important role. Blotted membrane is incubated on a shaker by a classical and time-consuming procedure with an appropriate primary and secondary antibody. The incubation time can last four and more hours so that is why the SNAP i.d. protein detection system was developed. Time for blocking of membrane and incubation with antibodies is reduced to 30 minutes. SNAP i.d. is a very fast and effective method for protein analysis.

The practical part is focused on the optimization of method of rapid immunoblotting on a SNAP i.d. using as model protein nitrated bovine serum albumin. Different dilutions of sample and antibodies (primary, secondary), various types of membranes and methods for visualization results were compared. The nitrocellulose membrane was the most suitable; the optimal results were obtained with a rabbit antibody diluted 1:1000 and secondary antibody diluted 1:5000. The most sensitive method included the use of secondary antibody labelled with horseradish peroxidase with subsequent chemiluminescence detection on a sensitive photographic paper. The optimized process of blotting was applied to the analysis of extracts from *Arabidopsis thaliana*. The optimized method showed the suitability of the monitoring and quantification of nitrated proteins in plants.

Keywords	Western blotting, rapid immunoblotting, SNAP id., nitrated proteins
Number of pages	63
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

<b>Cíle práce</b>	- 7 -
<b>Teoretická část</b>	- 8 -
1. Blotování proteinů	- 9 -
2. Western blotting	- 10 -
2.1. Princip elektroforetické separace molekul	- 10 -
2.2. Základní postupy elektroforetických separací proteinů	- 12 -
2.2.1. Elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu (PAGE)	- 12 -
2.2.2. Elektroforéza v polyakrylamidových gelech za denaturujících podmínek	- 14 -
2.2.3. Isoelektrická fokusace (IEF)	- 15 -
2.2.4. Elektroforéza v polyakrylamidových gelech za nativních podmínek	- 15 -
2.2.5. Agarosová elektroforéza	- 15 -
2.3. Přenos proteinů z gelů na membrány elektrickým polem	- 16 -
2.4. Přenos proteinů na membrány metodou slot blot a dot blot	- 17 -
2.5. Typy používaných membrán	- 17 -
2.6. Blokovací pufry	- 18 -
3. Detekce proteinů na membránách	- 20 -
3.1. Princip interakce protilátek a proteinu - antigenu	- 20 -
3.1.1. Síly uplatňující se při vazbě protilátky - antigeny	- 20 -
3.1.2. Faktory ovlivňující interakci protilátka - antigen	- 21 -
3.2. Používané metody detekce proteinů na membráně	- 22 -
3.2.1. Barvení celkových proteinů na membráně	- 22 -
3.2.2. Specifická detekce proteinů primárními protilátkami	- 23 -
3.2.3. Fluorescenční značky	- 23 -
3.2.4. Značené sekundární protilátky	- 24 -
3.2.5. Enzymatické značky	- 24 -
3.3. Vizualizace protilátek	- 25 -
3.3.1. Chromogenní substrát	- 25 -
3.3.2. Fluorescence	- 25 -
3.3.3. Chemiluminiscence	- 26 -
3.3.4. Kvantové tečky	- 27 -
4. Vyhodnocování	- 27 -
4.1. CCD kamera	- 27 -
4.2. UV transiluminátory	- 28 -

5. Přístroj SNAP i.d.	- 28 -
5.1. Výhody systému SNAP i.d.	- 29 -
5.2. Blokovací pufr	- 30 -
6. Nitrované proteiny	- 31 -
<b>Experimentální část</b>	- 32 -
7. Materiál a přístroje	- 33 -
7.1. Použité chemikálie	- 33 -
7.2. Příprava roztoků	- 33 -
7.3. Přístroje a experimentální vybavení	- 34 -
7.4. Příprava vzorků	- 34 -
8. Metodika	- 35 -
8.1. Slot blot na přístroji BioDot SF	- 35 -
8.2. SDS – PAGE	- 36 -
8.3. Western blotting – komůrka Mini Protean (BioRad)	- 37 -
8.4. SNAP i.d. protein detection system	- 38 -
9. Výsledky	- 40 -
9.1. Analýza vzorku hrachové AMADH2	- 40 -
9.2. Analýza vzorku nitroBSA	- 41 -
9.2.1. Analýza nitroBSA s použitím PVDF membrány	- 41 -
9.2.2. Analýza nitroBSA s použitím nitrocelulosoové membrány	- 45 -
9.2.3. Porovnání použití primárních protilátek z myši a králíka	- 48 -
9.2.4. Porovnání použití připraveného a komerčního preparátu nitroBSA	- 49 -
9.2.5. Optimalizace postupu blotování po analýze vzorku nitroBSA metodou SDS-PAGE	- 50 -
9.3. Analýza nitrovaných proteinů v extraktu <i>A. thaliana</i>	- 53 -
10. Závěr	- 56 -
<b>Literatura</b>	- 58 -
<b>Seznam použitých zkratk</b>	- 62 -

## CÍLE PRÁCE

V teoretické části bylo cílem vypracovat literární rešerši shrnující principy metody blotování proteinů a jejich detekce s využitím specifických protilátek.

V experimentální části bylo cílem:

- a) zavést protokol rychlého imunoblotingu včetně recyklace použitých protilátek
- b) optimalizovat metodu na čistém standardu proteinu a následně vybraných rostlinných proteinů

## Teoretická část



# 1. Blotování proteinů

Metoda otisků (angl. blotting) je analyticko – biochemická metoda umožňující přenos molekul z mobilní fáze – roztoku v gelu (polyakrylamidový, agarosový) na pevnou fázi – polymerní membrána. Blotting se využívá především na přenos RNA, DNA, proteinů a glykoproteinů po jejich předchozím rozdělení elektroforetickou metodou či izoelektrickou fokusací na gelových nosičích (Ferenčík, 1989).

Tato metoda byla prvotně vyvinuta za účelem analýzy fragmentů DNA pro molekulární biologii a roku 1975 E. M. Southern charakterizoval postup přenosu fragmentů DNA z agarosového gelu na nitrocelulosovou membránu pomocí kapilárních sil (Southern, 1975). Metoda se nazývá *Southern blotting*. Roku 1977 byl *Southern blotting* zdokonalen použitím diazobenzylmethylovaného papíru (DBM) místo nitrocelulosové membrány J. C. Alvinem a spol (Alwine et al., 1977). Na diazobenzylmethylovaný papír lze zachytit malé fragmenty RNA a DNA molekul. Této metodě se říká *Northern blotting*. Ve *Western blottingu* W. N. Burnette roku 1981 aplikoval specifické protilátky a radioaktivně značený protein A na detekci imobilizovaných antigenů (Burnette, 1981). Techniky nemají žádnou souvislost s geografickým názvoslovím (Ferenčík, 1989).

Přenos je realizován buď užitím jednosměrného elektrického proudu (*electroblotting*), nebo klasickou difúzí položením membrány na gel (proto název *blotting*) či filtrací roztoku přes membránu na speciálních přístrojích (*dot blotting*). Molekuly přenesené na membránu se zviditelňují barevnými reakcemi, specifickými protilátkami (angl. *immunoblotting*) nebo autoradiografií (Ferenčík, 1989).

Metoda Western blottingu je rychlá, účinná a zachovává vysoké rozlišení dělení proteinového vzorku elektroforetickými metodami. Pro detekci přenesených proteinů na membráně mohou být použity různé detekční činidla, např:

- protilátky k identifikaci příslušného antigenu
- lektiny pro detekci glykoproteinů
- ligandy pro detekci složek blotovaného receptoru

Elektroforetický přenos proteinů s následnou imunodetekcí nachází široké uplatnění v oblasti biochemie a molekulární biologie. Blotované proteiny mohou být efektivně detekovány a charakterizovány i ve velmi nízkých koncentracích. Blotování proteinů se také široce využívá ve spojení s různými identifikačními technikami bílkovin, mezi ně patří hmotnostní

spektrometrie nebo stanovení sekvence bílkovin jako N-terminální Edmanova degradace, C-terminální sekvence nebo analýza aminokyselin. Síla metody blotování proteinů spočívá v jeho schopnosti poskytovat rozlišení mnohonásobných imunogenních proteinů ve vzorku. Analýza vyžaduje malé množství činidel, přenesené proteiny na membráně mohou být uloženy mnoho týdnů před jejich použitím a stejný blot může být použit pro vícenásobnou následnou analýzu (Gravel, 2008).

Imunochemické metody detekce proteinu blotovaných na membráně jsou založeny na interakci proteinu-antigenu se specifickou protilátkou *in vitro* a vzniku imunokomplexu antigen-protilátka. Detekce se provádí za pomoci postupné aplikace dvou typů protilátek. První protilátka reaguje s detekovaným proteinem za vzniku komplexu a ten je poté rozpoznáván druhou protilátkou, která je označena sondou umožňující finální detekci, např. křenová peroxidasa, alkalická fosfatasa (Gravel, 2008).

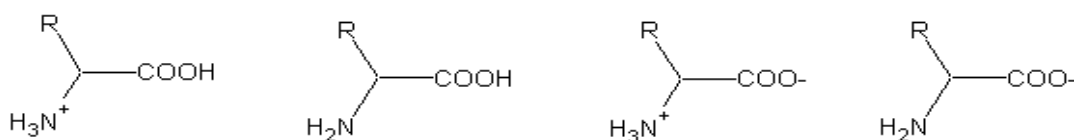
Výhodou je poměrně jednoznačná identifikace proteinu ve směsi, ale je nutné mít vhodnou primární protilátku. Po vyhodnocení může být membrána znovu omytá a inkubována s jiným vhodným substrátem (<http://www.piercenet.com/files/TR0067-Chemi-Western-guide.pdf>).

## 2. Western blotting

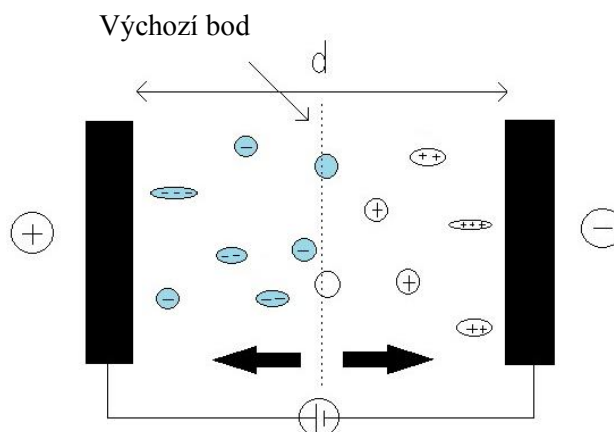
Použití klasického Western blotingu obvykle předchází separace proteinů elektroforézou nebo izoelektrickou fokusací na gelových nosičích.

### 2.1. Princip elektroforetické separace molekul

Postranní aminokyselinové řetězce proteinů, stejně jako některé skupiny přidané posttranslační modifikací (např. fosfáty) udělují proteinům charakteristické náboje (Obr. 1). Je-li hodnota pH stejná jako jejich isoelektrický bod (pI) jsou proteiny bez náboje. Ve skutečnosti je tento náboj zodpovědný za jejich rozpustnost ve vodném roztoku. Pokud budou umístěny do elektrického pole o intenzitě  $E$ , budou se volně pohybovat k elektrodě opačného náboje (Obr. 2).



Obr. 1 Různé protonační stavy aminokyselin.



Obr. 2 Fyzikální podstata elektroforézy. Molekuly se pohybují v elektrickém poli (intenzita  $E$ ), kde se stanoví jejich celkový náboj, molekulová hmotnost a tvar. Menší a více nabitě druhy se pohybují větší rychlostí, zatímco stejně nabitě proteiny jsou rozděleny na základě jejich rozdílného tvaru a velikosti (upraveno podle: Sheehan & O'Sullivan, 2008).

Gelové elektroforézy mohou poskytnout informace o molekulové hmotnosti, nábojích proteinů, podjednotkových strukturách proteinů a čistotě připravených proteinů. Použití metod je poměrně jednoduché a vysoce reprodukovatelné. Nejběžnější aplikací elektroforézy je kvantitativní analýza komplexních směsí bílkovin. Polypeptidy lišící se v molekulové hmotnosti o několik set daltonů a proteiny lišící se v jejich hodnotě izoelektrického bodu o méně než 0,1 jednotky pH, jsou běžně v elektroforetických gelech rozděleny (Garfin, 2003).

Rychlost pohybu  $v$  pro nabitou molekulu v elektrickém poli s intenzitou  $E$  lze popsat následující rovnicí (Sheehan & O'Sullivan, 2008).

$$v = (E \cdot q) / f$$

Třecí koeficient  $f$  popisuje třecí odpor působící na pohybující se molekulu v daném prostředí a závisí na faktorech jako je hmotnost proteinu ( $M_r$ ), míra kompaktnosti molekuly, pórovitost matrice a viskozita pufru. Celkový náboj  $q$  je určen počtem kladných a záporných nábojů v proteinu, který vzniká z nabitých postranních řetězců a post-translačních modifikací jako je deaminace, acylace nebo fosforylace. Z rovnice 1 vyplývá, že molekuly se pohybují rychleji při zvýšení celkového náboje, zesílení elektrického pole nebo pokud klesá hodnota  $f$  (funkce molekulové hmotnosti/tvaru). Molekuly s podobným celkovým nábojem jsou odděleny díky rozdílu v třecím koeficientu, zatímco molekuly podobné hmotnosti/tvaru se mohou navzájem lišit v celkovém náboji.

Přenos elektrického proudu mezi elektrodami je zprostředkován iontovým roztokem - pufrem, který zajišťuje konstantní pH. Nejvíce používané pufrční systémy jsou Tris-chloridové nebo Tris-glycinové. Pufry jsou naplněny v zásobnících připojených ke každé elektrodě a zajišťují tak konstantní přísun iontů během elektroforetické separace.

Znamená to, že proteiny migrují na základě poměru čistý náboj/třecí koeficient. Protože hodnota  $f$  je závislá na hmotnosti biopolymerů, které mají podobný tvar (např. globulární proteiny), rozdíly v elektroforetické mobilitě  $\mu$  jsou podobné jako rozdíly v poměru náboj/hmotnost.

V případě elektroforézy bílkovin je výše uvedený popis neúplný, neboť nezahrnuje možnou interakci proteinů s nosiči (např. gely), zachycení náboje na povrchu proteinu nebo rozdíly ve složení pufru (Sheehan & O'Sullivan, 2008).

## **2.2. Základní postupy elektroforetických separací proteinů**

Elektroforéza se původně prováděla v roztoku, ale většina moderních metod elektroforézy proteinů se provádí na gelových nosičích. Hydratované gely umožňují široké spektrum mechanicky stabilních experimentálních formátů, jako je vertikální elektroforéza na deskovitých gelech nebo elektroforéza ve zkumavkách či kapilárách. Jejich mechanická stabilita usnadňuje postelektroforetickou manipulaci pro další experimentální detekci a analýzu proteinů. Gely používané v elektroforéze jsou chemicky nereaktivní a reagují během elektroforézy s proteiny pouze minimálně s proteiny (Olsen & Wiker, 1998). Přesně kontrolovatelné postupy umožňují vznik gelů s úzkou škálou pórovitosti, které dovolují molekulám proteinů procházet do určité hodnoty molekulovou hmotností  $M_r$ . Zvýšením/ snížením velikosti těchto pórů se změní hmotnost proteinů, jenž mohou být na daném gelu separovány.

Elektrický proud v elektroforetické cele je přenášen převážně ionty, které jsou složkami elektroforetických pufrů. Proteiny se na přenosu proudu v elektroforetické cele podílí jen minimálně. V nativních systémech elektroforetické pufrů udržují pH prostředí, které je potřebné pro činnost proteinů (Garfin, 2003).

### **2.2.1. Elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu (PAGE)**

Nejčastěji používaný gel pro elektroforézu proteinů se připravuje polymerací akrylamidu, Obr. 3 (Sheehan & O'Sullivan, 2008). Chemicky vyvolaná polymerace akrylamidu propojeného methylenovými můstky *N-N'*-metylen bisakrylamidu vytváří zesíťovaný gel s vysoce kontrolovanou pórovitostí, který je mechanicky pevný a chemicky inertní (Tab. 1). Pro separaci

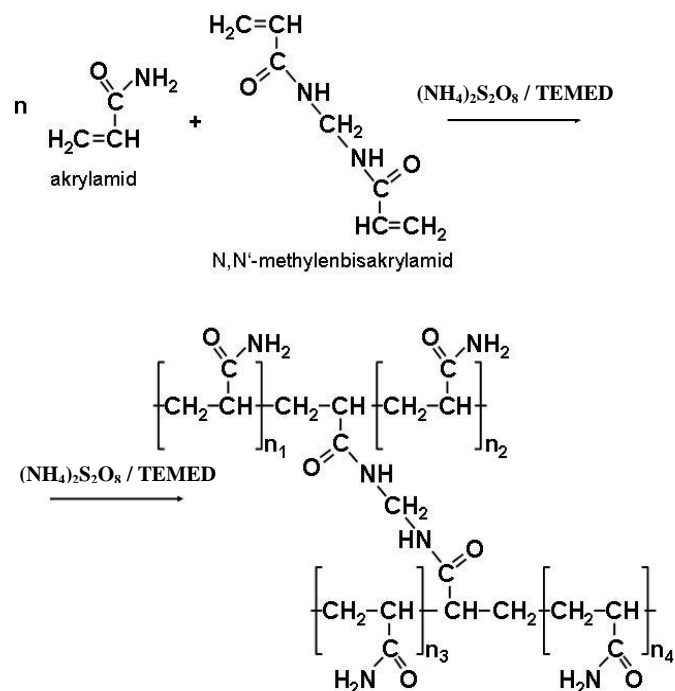
proteinů je poměr akrylamid a *N,N'*- methylen bisakrylamid obvykle 40:1 (Sheehan & O'Sullivan, 2008).

Tab. 1 Rozsah separace proteinů v polyakrylamidovém gelu s odlišnou koncentrací polyakrylamidu (Sheehan & O'Sullivan, 2008).

<b>Koncentrace akrylamidu (%)</b>	<b>Rozsah separace (kDa)</b>
5	> 1,000
8	300 – 1000
12	50 – 300
15	10 – 80
20	5 – 30

Při vzniku polyakrylamidových gelů využívá chemický systém k tvorbě volných radikálů, potřebných pro iniciaci polymerace., skládající se z persíranu amonného (APS) a *N,N,N',N'*-tetramethylethyldiaminu (TEMED). TEMED zrychluje rozklad molekul persíranu na volné sulfátové radikály, které zahajují polymeraci akrylamidových monomerů. Volná báze TEMEDu je nutná pro tuto reakci. Polymerace je nejvíce efektivní v alkalickém pH. Účinnost polymerace rychle klesá v hodnotách pH pod 6. Fotopolymerace s riboflavinem a TEMED se používá pro gely s nízkým pH (Garfin, 2003).

Rychlost polymerace závisí na čisté koncentraci monomerů a iniciátorů, teplotě a čistotě činidel. Všechny tři by měly být kontrolovány pro reprodukovatelnost. Činidla by měla být elektroforeticky kvalitní a voda by měla být důkladně deionizovaná nebo destilovaná. Pro dosažení nejvyšší kvality výsledky by měl být rozpuštěný kyslík z monomerních směsí odstraněn odplyněním, protože jeho přítomnost snižuje rychlost polymerace (Garfin, 2003).



Obr. 3 Polymerace akrylamidu s *N,N'*-metylen bisakrylamidem za vzniku polyakrylamidového gelu.

### 2.2.2. Elektroforéza v polyakrylamidových gelech za denaturujících podmínek

Denaturující polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) je nejvíce používaná technika gelové elektroforézy pro proteiny (Garfin, 2003). Metoda poskytuje snadný způsob, jak analyzovat počet polypeptidů ve vzorku a tím posoudit složitost vzorku nebo čistotu preparátu. SDS-PAGE je užitečná pro sledování frakcí získaných během chromatografie nebo jiného purifikačního postupu. Jedním z nejdůležitějších vlastností SDS-PAGE je spolehlivost metody, se kterou lze určit molekulovou hmotnost proteinů. Během postupu přípravy vzorků pro SDS-PAGE dochází k denuraci polypeptidové řetězců bílkovin, V situaci, kde je potřebné zachovat biologickou aktivitu proteinu nebo jeho antigenitu, musí být použity nedenaturující elektroforetické metody. Nedenaturující systémy podávají informace o náboji proteinových isomerů, ale tyto informace lze nejlépe získat pomocí isoelektrické fokusace, IEF (Garfin, 2003).

### **2.2.3. Isoelektrická fokusace (IEF)**

Čistý náboj molekuly proteinu se mění v závislosti na pH prostředí. Je to odraz rozdílů v aminokyselinových sekvencích a/nebo post-translačních modifikacích. Dle standardních experimentálních podmínek a v nepřítomnosti značné chemické modifikace, může být hodnota pI považováno za konstantní vlastnost proteinu. Isoelektrický bod může být určen experimentálně isoelektrickou fokusací (IEF), pro jejíž provedení je potřeba vytvoření stabilního gradientu pH v roztoku s pomocí amfolytů. Amfolyty jsou syntetické heteropolymery oligoaminokyselin a oligokarboxylových kyselin. Různé kombinace aminokyselin a karboxylových kyselin umožňuje syntézu široké škály polymerů, které mají mírné rozdíly v hodnotě pI. Když je roztok směsi amfolytů vložen do elektrického pole, každý migruje do oblasti s hodnotou pH odpovídající hodnotě pI kde působí jako lokální pufr, a tím se vytváří požadovaný pH gradient (Sheehan & O'Sullivan, 2008).

IEF často zobrazuje heterogenitu v důsledku strukturálních změn, které nejsou patrné u jiných typů elektroforéz. SDS-PAGE analýza nerozlišuje isoformy proteinů se stejnou hmotností, zatímco pomocí IEF lze analyzovat isoenzymové složení vzorků. Přesné stanovení čistoty proteinového vzorku je získáno dvourozměrnou polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (2-D PAGE), která kombinuje IEF s SDS-PAGE. Jelikož je 2-D PAGE schopna rozdělit přes 2000 bílkovin v jednom gelu, je to důležitý primární nástroj proteomického výzkumu, kde musí být rozděleno více proteinů souběžnou analýzou. Proteiny mohou být konečně identifikovány imunoblotingem, který kombinuje specifické protilátky s vysokým rozlišením gelové elektroforézy (Garfin, 2003).

### **2.2.4. Elektroforéza v polyakrylamidových gelech za nativních podmínek**

Polyakrylamid je vhodné prostředí pro elektroforetickou separaci proteinů v jejich biologicky aktivní formě. Jsou rozděleny na základě vlastního náboje skupiny, která se nachází na povrchu proteinu. Každý protein má charakteristickou pohyblivost v nenedaturujícím systému určenou kombinací velikosti náboje s fyzikálními vlastnostmi jako je  $M_r$  a tvar (Sheehan & O'Sullivan, 2008).

### **2.2.5. Agarosová elektroforéza**

Agar se získává z buněčné stěny červených řas Rhodophyta, kam patří *Gelidium* a *Gracilaria* (Fu & Kim, 2010). Agarosa je želírující polysacharid, který je tvořen opakujícím se řetězcem 1,3-β-D-galaktopyranosových a 3,6-anhydro-α-L-galaktopyranosových jednotek. Agarobiosa je základní disacharidová jednotka všech agarových polysacharidů. Agar je dělen na dvě

komponenty – agaropektin a agarosa. Molekuly agarosy vytvářejí v gelu 3D strukturu šroubovice a ve vzniklých pórech se může vyskytovat voda (Labropoulos et al., 2001).

Elektroforéza proteinů v agarosovém gelu poskytuje několik výhod. Metodu lze provádět pomocí vertikálního nebo horizontálního systému. Na rozdíl od polyakrylamidového gelu, se agarosové gely efektivně využívají k oddělení proteinů větších než 600 000 Da. Mezi výhody agarosové elektroforézy patří také oddělení vysokomolekulárních proteinů, jednoduchá příprava a zpracování, odstraněné proteiny mohou být použity k imunizaci zvířat pro tvorbu protilátek a nízká toxicita složek gelu ve srovnání s PAGE

([http://bio.lonza.com/uploads/tx\\_mwaxmarketingmaterial/Lonza\\_BenchGuides\\_SourceBook\\_Section\\_XIII\\_-\\_Protein\\_Separation\\_in\\_Agarose\\_Gels.pdf](http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_BenchGuides_SourceBook_Section_XIII_-_Protein_Separation_in_Agarose_Gels.pdf)).

Přestože je tato analytická a preparativní metoda úspěšná pro separaci velkých proteinů a proteinových komplexů, její hlavní nevýhodou je nemožnost analyzovat malé (<30 kDa) proteiny a peptidy (Wu & Kusakawa, 1998).

### **2.3. Přenos proteinů z gelů na membrány elektrickým polem**

Po elektroforéze je vhodné proteiny přenést z gelu na membránu, protože manipulace a následná detekční reakce není na gelu vhodná. Při blotování je důležité zabránit smíšení oddělených molekul.

Při přenosu biomolekul za pomoci elektroforetického pole na matrici lze získat přesnou kopii gelu, se kterou můžeme provádět různé detekční reakce. Aparatura je v poloze vertikální nebo horizontální a jsou v nich grafitové či platinové elektrody (Ferenčík, 1989).

Tzv. „wet blotting“ se obvykle provádí v nádrži (tzv. tank blotting) s velkým objemem pufru s platinovými elektrodami na dvou stranách komůrky. U této techniky je gel a blotovací membrána upevněna do rámu mezi filtrační papíry a porézní houbičku. Typický čas přenosu je přes noc (<http://www.biometra.de/24.0.html>).

Tzv. „semi-dry blotting“ se provádí mezi dvěma vodorovnými deskovými elektrodami a nabízí stejně rychlý homogenní přenos. Na rozdíl od tank blotingu je vyžadováno malé množství pufru a čas přenosu je velmi krátký, cca několik minut (<http://www.biometra.de/24.0.html>). Základem je použití originální sady pufrů, které vytvářejí stabilní rozhraní pH mezi dvěma stranami blotovací membrány. Methanol se přidává do přenosového pufru, který je na anodické straně membrány a SDS se přidává na druhou stranu, kde je gel. Asymetrické uspořádání methanolu a SDS na každé straně membrány představuje různé pH, které zůstává stabilní během elektroforetického přenosu. Za těchto podmínek proteiny



s vysokou a nízkou molekulovou hmotností jsou efektivně eluovány z SDS gelu a hromaděny na membráně (Laurière, 1993).

## **2.4. Přenos proteinů na membrány metodou slot blot a dot blot**

Při elektroforéze vlivem SDS a dithiothreitolu nebo  $\beta$ -merkптоethanolu dochází k denuraci proteinů. Slot blot a dot blot umožňují přímé nanášení vzorků na membránu, aniž by proteiny musely být elektroforeticky rozděleny. Tyto metody šetří čas, ale neposkytují informace o velikosti molekul.

Techniky slot blot a dot blot se značně používají v molekulární biologii k imobilizaci nukleových kyselin, detekci mRNA, ke studiu vazebných receptorů, detekci vzájemného působení proteinu s nukleovou kyselinou a hledání specifických proteinů pomocí aktivity nebo protilátky. Slot bloty jsou více spolehlivé a přesněji kvantifikovatelné skenovací denzitometrií, než dot bloty ([http://www.hoeferinc.com/downloads/pr648\\_manual.pdf](http://www.hoeferinc.com/downloads/pr648_manual.pdf)). Postup slot blotu je rychlý a nedenaturující. Slot blot má detekční rozsah 6,1 – 1562 ng/mL s detekčním limitem 6,1 ng/mL (Zhu et. al, 2005).

Dot blot se liší od Western blotu v tom, že proteinové vzorky nejsou odděleny elektroforeticky, ale jsou nanášeny pomocí kruhové šablony přímo na membránu nebo papírový podklad (<http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/Dot%20blot%20protocol.pdf>).

## **2.5. Typy používaných membrán**

Polyvinylidifluorid (PVDF) a nitrocelulosa jsou dva typy membrán, které se nejčastěji používají ve Western blotingu. Existuje řada výhod provádět elektroblotting na PVDF membránách oproti nitrocelulosovým membránám. PVDF membrány nabízejí lepší udržení proteinů, fyzickou pevnost a širokou chemickou kompatibilitu. Vyšší mechanická pevnost a vynikající chemická odolnost PVDF membrán je dělá ideálními pro rozmanité detekční aplikace a opakované imunodetekce. Další výhodou PVDF membrán je kopírování pruhů z jednoho gelu, které mohou být použity pro různé aplikace, jako je barvení s barvivem na bázi Coomassie Blue, následné vyříznutí proužků a N-terminální sekvencování, proteolýza/ separace peptidů/ vnitřní sekvencování a imunodetekce (<http://www.millipore.com/immunodetection/id3/membraneselection>).

Dalším typem používaných membrán jsou nylonové. Tyto membrány jsou tenké a mají hladký povrch jako nitrocelulosové, ale jsou pevnější. Nylon představuje vyšší proteinovou vazebnou kapacitu ve srovnání s nitrocelulosovou (480  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  vs. 80  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Navíc nylon nabízí výhody více shodných přenosových výsledků a výrazně zvýšenou citlivost ve srovnání s jinými

membránami. Nevýhodou vysoké vazebné kapacity těchto membrán je tvorba vysoké nespecifické vazby. Pozitivně nabitě membrány se používají na vazbu negativně nabitých DNA. Důsledku toho se více používá pro DNA blotting než pro blotting proteinů (Kurien & Scofield, 2009).

Tab. 2 Srovnání vlastností a použití PVDF a nitrocelulosové membrány (převzato z: <http://www.millipore.com/immunodetection/id3/membraneselection>).

<b>Vlastnosti / Použití</b>	<b>Nitrocelulosa</b>	<b>PVDF</b>
<b>Fyzická pevnost</b>	Špatná	Dobrá
<b>Vazební kapacita proteinů</b>	80 – 100 µg/cm <sup>2</sup>	100 – 300 µg/cm <sup>2</sup>
<b>Odolnost proti rozpouštědlům</b>	Ne	Ano
<b>Westernový přenos</b>	Ano	Ano
<b>Barvení proteinů</b>	Koloidní zlato Ponceau-S červená Amidočerň Indický inkoust Syproa blot stains	Koloidní zlato Ponceau-S červená Amidočerň Indický inkoust Coomassie blue
<b>Detekce</b>	Chromogenní Chemiluminiscenční Fluorescenční Radioaktivní	Chromogenní Chemiluminiscenční Fluorescenční Chemifluorescenční Radioaktivní
<b>Dvojitý blotting</b>	Ne	Ne
<b>Rychlá imunodetekce</b>	Ne	Ano
<b>Westernova opakovaná detekce</b>	Ano	Ano
<b>Edmanovo sekvencování</b>	Ne	Ano
<b>Analýza aminokyselin</b>	Ano	Ano
<b>Vazba v přítomnosti SDS</b>	Špatná	Dobrá
<b>Membránová digesce pro MS</b>	Ne	Ano
<b>Přímá MALDI-TOF MS analýza</b>	Ne	Ano
<b>Archivování dat</b>	Ne	Ano

## 2.6. Blokovací pufr

Po blotování je nutné zablockovat zbylá vazebná místa na membráně. Díky tomu se zabrání zablockování nespecifické vazby. Nesmí docházet k vytěsnění vzorku či jeho modifikaci.

Výběr nejvhodnějšího blokovacího pufru pro Western blottingové použití je závislé na použitém systému. Určení správného blokovacího pufru může pomoci zvýšit signál k poměru šumu. Při přechodu z primární protilátky na sekundární protilátku bude blokovací pufr vést ke

snížení signálu nebo ke zvýšení pozadí. Empirické testování různých blokovacích pufrů se systémem může přispět k dosažení nejlepších možných výsledků. Mléko, jako blokovací pufr pro bloty, které jsou založené na systému avidin/biotin, by se nemělo používat, protože mléko obsahuje různé množství biotinu. Neexistuje žádný blokovací pufr, který by byl optimální pro všechny systémy (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Některé systémy mohou využít přidání detergentu, jako Tween-20, do blokovacího roztoku. Detergent může minimalizovat barvením pozadí tím, že brání nespecifické vazbě činidla na cíl. Přidáním příliš mnoho detergentu může zabránit dostatečnému zablokování. Obvykle je použita konečná koncentrace 0,05%, ale pro dosažení nejlepších výsledků, se určuje, zda detergenty zvyšují specifický systém a při jaké koncentraci jsou optimální. Vždy se používá kvalitní detergent, který má nízký obsah škodlivin (<http://www.piercenet.com/files/TR0067-Chemi-Western-guide.pdf>).

Tab. 3 Přehled jednotlivých blokovacích pufrů (převzato z:

<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=5A414328-5056-8A76-4EA5-51555CF0015D>).

<b>Blokovací pufr</b>	<b>Popis</b>
<b>StartingBlock blokovací pufr</b>	Jeden čištěný protein, rychlé zablokování, široká použitelnost, vynikající pro odstraňování a přezkoumání aplikací Western blotingu, dostupný v PBS a TBS s nebo bez T20
<b>SuperBlock blokovací pufr</b>	Jeden čištěný glykoprotein, rychlé zablokování, široká použitelnost, stabilizuje desky potažené protilátkami k sušení, dostupný v PBS a TBS i bez T20
<b>BSA blokovací pufr</b>	Čištěný hovězí sérum albumin v PBS nebo TBS
<b>Kaseinový blokovací pufr</b>	Čištěný kasein v PBS nebo TBS
<b>BLOTTO blokovací pufr</b>	Odtučněné sušené mléčné proteiny v TBS
<b>SEA BLOCK blokovací pufr</b>	Sérum z Pstruha duhového
<b>Neproteinový blokovací pufr</b>	Neproteinová blokovací složka; dostupný v PBS a TBS s nebo bez T20

pozn. PBS= fosfátový blokovací roztok; TBS= Tris blokovací roztok; T20= Tween-20 detergent

### 3. Detekce proteinů na membránách

#### 3.1. Princip interakce protilátek a proteinu – antigenu

Protilátky (imunoglobuliny) jsou produkovány imunitním systémem obratlovců a jsou nezbytné pro obranu proti infekci způsobené patogeny, jako jsou viry. Protilátky patří do rodiny proměnných glykoproteinů, které se váží zejména na cizí molekuly (antigeny). Nejvýraznějším rysem interakce antigen-protilátka je jejich vysoká specifita a afinita. Síla vazby mezi antigenním determinantem v antigenu (epitop) a vazebným místem antigenu na protilátce (paratop) se nazývá afinita. Každá jednotka protilátky má minimálně dvě antigen-vazebná místa, a proto jsou bivalentní nebo multivalentní, k jeho antigenu (Kumagai & Tsumoto, 2010).

Vazba mezi protilátkou a antigenem se často vytváří na povrchu, tj. jeden z vazebných partnerů je imobilizován do dvojdimenzionální roviny, zatímco další je přítomen v roztoku. Toto uspořádání bylo nalezeno v mnoha fyziologických imunitních reakcích *in vivo* a je nejběžnější v imunologických testech (Glaser, 1993).

Zásadní vliv na emisi signálu má nejenom afinita primární protilátky na antigen, ale i primární a sekundární koncentrace protilátek. Minimální množství primární protilátky je výhodnější, protože podporuje cílenou specifickou vazbu a nízké pozadí (<http://www.piercenet.com/files/TR0067-Chemi-Western-guide.pdf>).

##### 3.1.1. Síly uplatňující se při vazbě protilátky – antigeny

Síly uplatňující se při tvorbě imunokomplexu protilátka – antigen jsou stejné, jako síly účastníci se při stabilizaci prostorových struktur makromolekul. Jsou to slabé nekovalentní interakce mezi funkčními skupinami antigenů a protilátek. Patří sem vodíkové vazby, hydrofobní interakce, Coulombovské síly, Van der Waalsovské síly, Londonovské disperzní síly a sterické síly. Neprosazují se zde pravé chemické vazby.

Vodíková vazba vzniká interakcí dvou funkčních skupin ve stejných nebo různých molekulách. Jedna skupina slouží jako dárce protonu (kyselá skupina) a druhá jako dárce elektronu (zásaditá skupina). Nejčastěji je proton darován karboxylovou a hydroxylovou skupinou, aminovou nebo amidovou skupinou (Pimentel & McClellan, 1960).

Dostanou-li se dva hydrofobní povrchy blízko sebe, dojde ke vzniku hydrofobní interakce. Aminokyseliny jako valin, fenylalanin, leucin a isoleucin se zapojují do těchto vazeb, protože netvoří s molekulami vody vodíkové můstky. Při vazbě protilátek s antigeny je tato interakce nejdůležitější

Přitahováním opačně elektricky nabitých skupin či molekul se vytváří Coulombovské síly. Nabité skupiny mají některé aminokyseliny jako histidin, arginin, lysin. Pokud reaguje antigen s protilátkou, jsou tyto síly nevýznamné.

Síly se vytváří vzájemným ovlivňováním elektronových oblaků polárních skupin a to má za následek vznik oscilujících dipólů. Jsou využívány při stabilizaci imunokomplexů.

Londonovské síly se vytváří vzájemným ovlivňováním elektronových oblaků nepolárních skupin. Disperzní síly jsou určeny kolísáním elektronů, a proto se uplatňují bez vzniku permanentních dipólů.

Sterické odpudivé síly se vytváří u atomů, které nejsou spojené chemickou vazbou. Dochází u nich k prolínání elektronových oblaků. Tyto síly jsou klíčem, podle kterého se protilátka váže na antigen. Nespecifické (nehomologní) antigenové determinanty nemající vazebná místa na protilátce, brání tvorbě vazby a to na základě velkých odpudivých sil. Pokud jsou vazebná místa komplementární, jsou odpudivé síly minimální a dochází ke vzniku imunspecifické vazby (Ferenčík, 1989).

### **3.1.2. Faktory ovlivňující interakci protilátka – antigen**

Interakci antigen – protilátka ovlivňuje mnoho faktorů, které mohou být vhodně rozděleny do dvou skupin podle toho, zda působí na rovnovážnou konstantu nebo ne (Tab. 4).

Tab. 4 Faktory ovlivňující reakci antigen – protilátka (Reverberi & Reverberi, 2007).

---

#### **Faktory ovlivňující rovnovážnou konstantu**

---

- Teplota

- pH

- Iontová síla

---

#### **Další faktory**

---

- Koncentrace antigenů a protilátek

- Doba inkubace

---

### 3.2. Používané metody detekce proteinů na membráně

Výběr vhodné metody je nejdůležitější pro detekci proteinů a pro kvantitativní vyhodnocení úrovně exprese těchto proteinů v biologickém vzorku. Existuje mnoho různých technik. Následující kritéria je nutné zvážit v rozhodovacím procesu:

- a) velký rozsah lineární závislosti mezi množstvím proteinu a intenzitou signálu
- b) obtížnost a rychlost provedení
- c) použití netoxických látek, šetrný k životnímu prostředí
- d) cena chemikálií.

Detekční metody využívající barvení organickými barvivy, chelátovými kovy, autoradiograficky, fluorescenčními barvivy, komplexy se stříbrem nebo předcházející označení fluoroforem. Všechny tyto metody mají různou citlivost a výrazně se liší kvantitativním stanovením.

#### 3.2.1. Barvení celkových proteinů na membráně

##### a) Barvení proteinů Ponceau S

Ponceau S (3-hydroxy-4-[2-sulfo-4-(sulfo-fenylazo)fenylazo]-2,7-naftalen disulfonová kyselina) je poměrně málo citlivé barvivo, které detekuje více jak 1 µg proteinu. Toto reverzibilní barvivo může být zcela vymyto vodou a dále se může pracovat s čistou blotovací membránou. Ponceau S je kompatibilní s nitrocelulosou i PVDF membránou. Je to rychlá cesta k vizualizaci proteinů, které byly přeneseny na membránu po SDS-PAGE, ale je z poloviny, tak citlivé jako barvivo Coomassie Blue.

##### b) Barvení proteinů amidočerní

Barvicí roztok amidočerně je navržen pro rychlé barvení proteinových proužků na nitroceluloseové membráně. Amidočerní usnadňuje vizualizaci proteinů s nízkou koncentrací a nízkým pozadím.

##### c) Barvivo Coomassie Brilliant Blue

Od jeho vzniku v roce 1963 je Coomassie Brilliant Blue (CBB) nejvíce využívanou metodou pro detekci proteinů v polyakrylamidovém gelu a na membránách. Kyselý roztok váže aminoskupiny proteinů pomocí elektrostatických a hydrofobních interakcí. CBB barviva jsou hlavně používána na akrylamidové gely, ale jsou aplikována i na PVDF membrány.

#### d) Barvení pomocí koloidního zlata

Koloidní zlato je nejcitlivější barvicí technika na proteiny navázané na membráně, detekují méně jak 1-3 ng proteinu. Po inkubaci s koloidním zlatem jsou proteinové tečky trvale zbarveny temně červeně. Koloidní roztok zlata může detekovat proteiny na nitrocelulosové a PVDF membráně, ale nedoporučuje se používat na nylonovou membránu (D'souza & Scofield, 2009).

### **3.2.2. Specifická detekce proteinů primárními protilátkami**

Po blotování jsou proteiny navázány na pevnou matici membrány a mohou být testovány pro enzymatické funkce, chemickou reaktivitu nebo sekvenci aminokyselin. Nicméně, po blotování proteinů často následuje reakce, kde se vážou proteiny s protilátkami ještě před detekcí protilátek, které jsou specificky značené (imunobloting). Další zajímavá sonda je lektin, třída sacharidových vazebných proteinů, která rozlišuje a analyzuje strukturu glykanu v glykoproteinech převedených na membránu, lektin bloting (Gravel, 2008).

Proteiny mohou být detekovány po imunoblotingu na membráně přímým použitím fluorescenčních značek (fluorescamin, kumarin), různých metod barvení pomocí stříbra a koloidních částic, jako jsou zlato, stříbro, měď, železo, nebo Indický inkoust (Gravel, 2008).

### **3.2.3. Fluorescenční značky**

Fluorescein byl první použitou značka pro imunofluorescenci v roce 1953, společně s rhodaminem (Waggoner, 2006). Fluorescein je stále široce používán i přes určité nevýhody (vysvěcování a citlivost na změny pH). Rhodaminy jsou necitlivé na změny pH a více fotostabilní, než fluorescenční analogy, ale jejich použití je horší, protože mají hydrofobní planární strukturu, která vede k nízké rozpustnosti ve vodě a nespecifické vazbě značených druhů a k uhašení fluorescence na značených proteinech, protože dimerizuje vazby rhodaminových značek. Původní reaktivní skupiny na rhodaminech a fluoresceinech byly isothiokyanáty, které reagovaly s volnými aminoskupinami na proteinech a měnily nukleové kyseliny během značícího procesu. Sulfonylchloridy lze použít také na označení aminoskupin, ale reakci je někdy obtížné kontrolovat. Sukcinimidyllové estery se staly preferovanými reaktivními skupinami pro označování aminoskupin na makromolekulách. Tyto reakce jsou snadno ovladatelné a spojují se přes peptidové vazby (Waggoner, 2006).

Nejběžnější fluorescenční sonda při analýze je fluoresceinisothiokyanát – FITC nebo tetra methylrhodaminisokyanát – TRITC. FIA je zkratka pro fluorescenční analýzu (angl. *fluorescence immuno-assay*) a její rozsah je  $10^{-9}$  až  $10^{-12}$  mol/L. Pomocí laserového světla

dochází k excitaci sond a zachycení signálu. Citlivost je velmi vysoká, ale některé proteiny málo fluoreskují a díky tomu se citlivost snižuje (Ferenčík, 1989).

### **3.2.4. Značené sekundární protilátky**

Široká škála značených sekundárních protilátek je použita pro detekci Western blot. Výběr sekundární protilátky závisí na druhu zvířete, ve kterém byla primární protilátka vytvořena (druh hostitele). Například, pokud primární protilátka je myší monoklonální protilátka, sekundární protilátka musí být anti-myší protilátka získaná z jiného hostitele, než z myši. Druh hostitele sekundární protilátky nebude mít často vliv na experiment. Sekundární protilátky jsou dostupné z mnoha druhů hostitelů, nicméně pokud sekundární protilátka je příčinou vysokého pozadí v určitém testu, může být vybrán jiný druh hostitele. Další možností, jak snížit pozadí, je použít sekundární protilátku, která byla předem adsorbována na sérovém proteinu z jiných druhů. Tento předběžný adsorpční proces odstraní protilátky, které mají potenciál se zkřížit s proteinovými séry, včetně protilátek těchto druhů (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Alternativními značkami jsou biotin, fluorofory a enzymy. Použití fluoroforů vyžaduje méně kroků a speciální zařízení pro zobrazení fluorescence. Také fotografie musí mít trvalý záznam výsledků. Enzymatické značky se používají nejčastěji a vytvářejí trvalé excelentní výsledky (Thermo Fisher Scientific Inc.).

### **3.2.5. Enzymatické značky**

Alkalická fosfatasa (AP) a křenuv peroxidasa (HRP nebo POD) jsou dva nejčastěji používané enzymy. Sada chromogenních, fluorogenních a chemiluminiscenční substrátů je dostupná pro použití s těmito enzymy.

AP je 140 kDa protein, který je zpravidla izolovaný z telecího střeva, katalyzuje hydrolyzu fosfátových skupin z molekulového substrátu, což vede k barevnému nebo fluorescenčnímu produktu nebo uvolňuje světlo jako vedlejší produkt. AP má optimální enzymatickou aktivitu v základní pH (pH 8-10) a může být inhibována kyanidy, arzeničnany, anorganickým fosfátem a dvojmocnými kationty chelátů, jako je EDTA. Pro Western blotting AP nabízí výraznou výhodu oproti jiným enzymům. Jeho reakční rychlost zůstává lineární, citlivost detekce lze zlepšit tím, že dovoluje reakci pokračovat delší dobu.

HRP je 40 kDa protein, který katalyzuje oxidaci substrátů peroxidem vodíku, což vede k barevnému nebo fluorescenčnímu produktu, nebo uvolnění světla jako vedlejšího produktu. HRP optimálně funguje v téměř neutrálním pH a může být inhibován kyanidy, sulfidy a azidy. Protilátky HRP konjugátů jsou lepší, než protilátky AP konjugátů s ohledem na specifickou



činnost obou enzymů a protilátek. Navíc, vysoký obrat, dobrá stabilita, nízká cena a široká dostupnost substrátů dělá z HRP enzymu volbu pro většinu aplikací (Thermo Fisher Scientific Inc.).

### **3.3. Vizualizace protilátek**

Po inkubaci s primární protilátkou, je vázaná protilátka vizualizovaná pomocí vhodného detekčního systému. Detekční metody mohou být přímé nebo nepřímé a mohou vytvářet fluorescenční nebo chromogenní signál. Přímá detekce zahrnuje využití primárních protilátek, které jsou přímo konjugované se značkou. Nepřímé metody detekce využívají značené sekundární protilátky, které jsou vytvořené proti primární protilátce. Nepřímé metody mohou zahrnovat zesilovací kroky, které zvyšují intenzitu signálu. Běžně používané značky pro vizualizaci interakce epitop-protilátka patří fluorofory a enzymy, které přeměňují rozpustné substráty na nerozpustné chromogenní konečné produkty. Výběr značky je ovlivněn použitou detekční metodou, osobní prioritou a typem mikroskopického zařízení, která je k dispozici ([http://www.rndsystems.com/literature\\_antibody\\_binding.aspx](http://www.rndsystems.com/literature_antibody_binding.aspx)).

#### **3.3.1. Chromogenní substrát**

Chromogenní substráty jsou široce používány a nabízí jednoduché a efektivní detekční metody. Když tyto substráty přijdou do kontaktu s enzymem, jsou přeměněny na nerozpustné, barevné produkty, které se zachytí na membráně a nevyžadují žádné speciální vybavení pro zpracování nebo detekci. Substráty, jako TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin), 4-CN (4-chlor-1-naftol) a DAB (3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochlorid) jsou dostupné pro použití s HRP. Pro použití s AP, jsou dostupné NBT (tetrazoliová modř), BCIP (5-bromo-4-chlor-3'-indolylfosfát p-toluidinová sůl) a Fast Red (naftol AS-MX fosfát + Fast Red TR Salt) (Thermo Fisher Scientific Inc.).

#### **3.3.2. Fluorescence**





Princip fluorescence spočívá v tom, že jeden nebo více elektronů v molekule se dostanou do vyššího energetického stavu. Všechny tyto excitované elektronové stavy jsou nestabilní. Později elektrony ztratí svou přebytečnou energii a spadnou zpátky do nižších energetických stavů. Tento přebytek energie může být rozptýlen různými způsoby, nejjednodušší způsob je zvýšením vibrace atomů v molekule. Některé molekuly jsou schopné emitovat část energie jako světlo – fluorescence (<http://www.berthold.com/ww/en/pub/bioanalytik/biometods/fluor.cfm>).

DyLight fluorescenční barviva představují novou skupinu fluorescenčních značek, kde detekční úroveň konjugátu fluorofor-protilátka závisí na jasu a fotostabilitě barviva, na aktivitě

protilátky, specificitě a zkřížená reaktivitě a na optimálních molech barviva k protilátce. DyLight fluorescenční barvy jsou velmi rozpustné ve vodě a zachovávají fluorescenci v širokém rozsahu pH 4 až pH 9 (<http://www.jacksonimmuno.com/technical/DyLight.asp>).

DyLight pokrývají celé spektrum viditelného světla. Každá barva má specifickou absorpční vlnovou délku od 350 nm do 777 nm (Tab. 5). Tato široká škála umožňuje testy, které jsou provedeny v blízké infračervené a infračervené oblasti. Hlavní typy imunofluorescenčního barvení jsou přímé a nepřímé. Přímá imunofluorescence se týká označování primární protilátky barvivem konjugátu a používá se jako přímý důkaz antigenu. Nepřímé barvení zahrnuje použití cíleného primárního neobarveného imunoglobulinu, na kterém je konjugovaná sekundární protilátka (<http://www.articlesbase.com/wellness-articles/using-dyLight-conjugated-antibodies-2525506.html>).

Tab. 5 Spektrální vlastnosti DyLight fluorescenčních barviv (převzato z: [https://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Product/productPDF\\_5047.pdf](https://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Product/productPDF_5047.pdf)).

Emise	Barva	Excitace/Emise (nm)
Zelená		493/518
Žlutá		550/568
Červená		646/674
Blízká infračervená		682/715 770/794

### 3.3.3. Chemiluminiscence

Látka, které je schopná chemiluminiscence, se nazývá chemiluminofor (Ferenčík M., str. 441). Nejběžnějším substrátem je luminol, který produkuje chemiluminiscenční signál. Je to chemická reakce, při které se uvolňuje energie ve formě světla. V přítomnosti křenové peroxidasy (HPR) a peroxidového pufru luminol oxiduje a vytváří produkt v excitovaném stavu, který vyzařuje světlo při přechodu do základního stavu. Světelná emise nastává jen během reakce enzym-substrát, jakmile substrát v blízkosti enzymu je vyčerpán, signální výstup je ukončen (<http://www.piercenet.com/files/TR0067-Chemi-Western-guide.pdf>).

Chemiluminiscence má rozsáhlé použití v oblasti vědy. Je jednou z vysoce adaptovaných a účinných metod k detekci antigenů. Poskytuje mnoho výhod ve srovnání s typickým imunochemickým barvením (Dorri et al., 2009).

### **3.3.4. Kvantové tečky**

Quantum dots (QD) jsou polovodivé nanokrystaly s velikostí několika nanometrů. Vyskytují se samostatně nebo jsou uspořádány do klastrů. Excitací elektromagnetického záření přejdou QD na energeticky vyšší hladinu. Poté dojde k uvolnění energie a emisi elektromagnetického záření o delší vlnové délce než při excitaci. Shodnost excitačních a emisních spekter je dána chemickým složením a rozměry QD (Hlaváček & Skládal, 2011).

Existuje mnoho výhod oproti tradičním fluorescenčním značkám, jako je odolnost proti vysvěcování, široká absorpce a úzké emisní spektrum, což znamená, že QD různých velikostí mohou být excitovány jediným zdrojem světla a vyzařují v diskrétních, vzájemně se nepřekrývajících vlnových délkách, takže jsou ideální pro multiplexování (Rak-Raszewska et al., 2012).

Nová generace kvantových teček má významný potenciál pro studium intracelulárních procesů na molekulární úrovni s vysokým rozlišením buněčného zobrazování, dlouhodobé pozorování *in vivo* buněk, zaměřené na nádory a diagnostiku (Michalet et al, 2005).

Lepší rozlišení, citlivost, a univerzálnost fluorescenční mikroskopie, vývoj fluorescenčních senzorů a označování proteinů v živých buňkách přinesly jasnější pochopení dynamiky intracelulární sítě, přenos signálu a vzájemnou buněčnou interakci (Michalet et al, 2005).

## **4. Vyhodnocování**

Speciální chemiluminiscenční systémy umí zaznamenávat a vyhodnocovat chemiluminiscenci, fluorescenci i chemifluorescenci. Běžným vybavením jsou dokumentační boxy, vybavené integrovaným UV světlem a UV-EPI osvětlením, kolem s šesti pozicemi filtrů a bílým LED světlem. Kromě moderních digitálních přístrojů se můžou výsledky zaznamenávat na citlivý fotopapír. Práce s fotopapírem probíhá v temné komoře. Pokud je fotopapír vystaven jen malému množství světla, je znehodnocen a výsledky mohou být zkreslené.

### **4.1. CCD kamera**

Stále populárnějším zařízením pro záznam detekčního signálu je chlazená CCD kamera. CCD snímač (zkratka pro „charged-coupled device“, zařízení s vázanými náboji), zachycuje a vyhodnocuje luminiscenci vyzařovanou z blotu. Kamery jsou chlazeny, aby se při dlouhodobá

expozice zamezilo vzniku šumu. Expoziční časy se mohou lišit v rozmezí od 15 sekund až po jednu hodinu v závislosti na fotoaparátu, optice, materiálu a blotovací technice. Objektiv CCD kamery se zaměřuje na světlo čipu, který má více než milion fotodiod či pixelů. Jednotlivé fotodiody nebo pixely jsou určeny k zachycení vyzářených fotonů. Vědecké CCD čipy mají jamky obsahující mezi 10 000 a 50 000 elektronů. Když foton dobře dopadne, elektron je stimulován, přeměněn na elektrický proud a digitalizován s konkrétními hodnotami stupnice šedé. Kompletní sada všech těchto hodnot odstínů šedi je pak použita pro vytvoření digitálního obrázku (<http://www.uvp.com/pdf/fp-111.pdf>).

Digitální zobrazování pomocí CCD kamery nabízí alternativní způsob snímání obrazu nahrazující citlivé fotografické papíry, se srovnatelnou citlivostí detekce, větším dynamickým rozsahem, lepší schopností interpretací dat a často i s rychlejšími výsledky, než za použití filmových kamer. CCD kamera nabízí všestranný zobrazovací systém pro snímání různých zdrojů signálu a analýzy vzorků na různých podpůrných nosičích (Budowle et al., 2001).

## **4.2. UV transiluminátory**

Ultrafialové transiluminátory nabízí jednotný a intenzivní zdroj ultrafialového světla (záření). Střední ultrafialové záření (302 nm) poskytuje citlivou metodu pro detekci nukleových kyselin, proteinů a jejich prekurzorů, které jsou označeny fluorescenčními barvami, jako jsou ethidium bromid nebo akridinová oranž (<http://www.kirkhoustrust.org>). UV záření o vlnové délce 254 nm je agresivnější vůči vzorkům, ale zvyšuje citlivost detekce, např. SYBR Green I barvy (<http://www.biometra.com/874.0.html>).

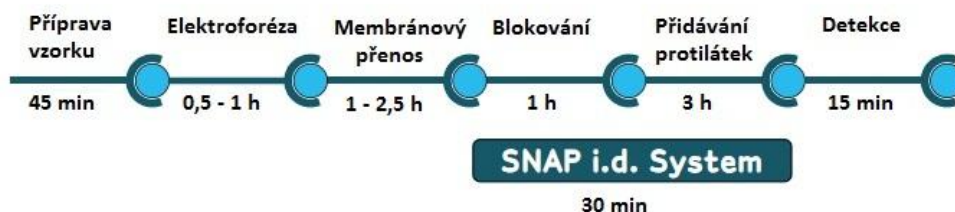
## **5. Přístroj SNAP i.d.**

SNAP i.d. proteinový detekční systém poskytuje rychlou a výhodnou metodu pro detekci imunoreaktivních proteinů. Díky tomuto jedinečnému vakuově řízenému systému se doba potřebná pro imunodetekci výrazně snížila (Obr. 4). Postup trvající 4 až 24 hodin tradičním Western blottingem (Tab. 6), nyní trvá jen 30 minut bez ztráty intenzity signálu nebo snížení kvality blotu. Na rozdíl od Western blotingu, kde primárním způsobem přenosu činidla je difúze, SNAP i.d. používá vakuum, aby se aktivně řídil přenos roztoků přes membránu. Všechny imunodetekční kroky po přenosu proteinu na membránu (tj. blokování, mytí a inkubace primární a sekundární protilátky) se provádí s využitím SNAP i.d. systému (<http://www.millipore.com>; SNAP i.d. protein detection system manual).

Tato nová metoda dovoluje optimalizovat blotovací podmínky ve velmi rychlém čase pro maximální výsledky. Systém minimalizuje přeblokování použitím nízké koncentrace blokovacích činidel. Efektivnější promývací kroky odstraňují nežádoucí nečistoty z membrány.

Se SNAP i.d. systémem lze dosáhnout velmi nízkého pozadí, vysokého odstupu signálu od šumu, reprodukovatelnosti a citlivosti, která je stejná nebo lepší než tradiční imunodetekční techniky.

Systém je kompatibilní se standardními blokovacími pufrů a vizualizačními metodami (např. chemiluminiscence, fluorescence nebo kalorimetrie) a pracuje s PVDF i nitrocelulosou membránou.



Obr. 4 SNAP i.d. systém urychluje časově náročné kroky provedení Western blotu.

### 5.1. Výhody systému SNAP i.d.

Dynamický - vakuum aktivně řídí přenos roztoků přes blotovací membránu.

Kvalitní - stejný nebo lepší odstup signálu od šumu než standardní Western blotting.

Rychlý - snižuje dobu provedení ze 4 hodin na 30 minut.

Jednoduchý - zahrnuje blokování, promývání a inkubační kroky protilátek.

Kompatibilní - pracuje se standardními velikostmi gelů a protokoly.

Efektivní - optimalizuje protokol s novými protilátkami po dobu 30 minut.

Mnoho protilátek ztrácí účinnost s časem nebo dokonce degradují v důsledku nesprávných skladovacích podmínek, proto je důležité rychle testovat možnou recyklaci primární protilátky pro opětovné použití ve stejném experimentu. SNAP i.d. systém nabízí rychlou a vhodnou metodu sbírání primárních protilátek pro další použití. Více jak 90% použité primárních protilátek může být znova použito. Aby neklesala jejich účinnost, musí se vhodně skladovat a zamezovat častému zmrazování a rozmrazování (<http://www.millipore.com>; Antibody recovery and reuse with the SNAP i.d. protein detection system).

Tab. 6 Srovnání časové náročnosti Western blotingu a systému SNAP i.d..

		<b>Standardní Western blot</b>	<b>SNAP i.d.</b>
<b>Blokovací krok</b>	Čas	1 h	20 s
	Koncentrace	5% NFDM	0,5% NFDM
	Přenos činidla	Difúze	Aktivně řízený
<b>Primární protilátka</b>	Čas	1 – 18 h	10 min
	Koncentrace	1 x	3 x 1/3 objemu
	Přenos činidla	Difúze	Aktivně řízený
<b>Promývací kroky (3x)</b>	Čas	3 x 5 min = 15 min	3 x 20 s = 1 min
	Koncentrace	1 x	1 x
	Přenos činidla	Difúze	Aktivně řízený
<b>Sekundární protilátka</b>	Čas	1 h	10 min
<b>Promývací kroky</b>	Čas	3 x 5 min = 15 min	3 x 20 s = 1 min
<b>Součet</b>	Čas	4 – 20 h	22 min

Pozn. NFDM= Non-fat dry milk (sušené odtučněné mléko)

## 5.2. Blokovací pufr

Patentované držáky blotu a vakuem aktivně řízený přenos roztoků zajišťuje, aby se póry membrány dostatečně zablokovaly. SNAP i.d. je kompatibilní s mnoha blokovacími činidly zahrnující odstředěné sušené mléko, hovězí sérový albumin (BSA) a kasein. Mnoho dalších komerčně vyráběných blokovacích roztoků je možné použít na přístroji SNAP i.d (Tab. 7).

Odtučněné sušené mléko je dostupný, levný a účinný blokovací roztok, který se běžně používá ve Western blotingu. Má vysokou blokovací kapacitu a může ohrozit signál proteinu. Koncentrace vyšší než 0,5% se nedoporučuje.

Tab. 7 Kompatibilita s blokovacími činidly (převzato a upraveno z: SNAP i.d.manual, str. 8).

<b>Blokovadlo</b>	<b>Kompatibilita</b>	<b>Doporučená koncentrace</b>
<b>Odtučněné/nízkotučné sušené mléko</b>	ano, $\leq 0,5\%$	0,5%
<b>Kasein</b>	ano, $\leq 5\%$	1%
<b>Hovězí sérový albumin (BSA)</b>	ano, $\leq 5\%$	1%
<b>PVP-40 (Polyvinylpyrrolidin)</b>	ano, $\leq 1\%$	1%
<b>Želatina</b>	nekompatibilní	nedostupná

## 6. Nitrované proteiny

Nitrace proteinových tyrosinů za vzniku 3-nitrotyrosin (3-NT) se používá jako biomarker nitrosačního stresu v biologických systémech. Tvorba 3-NT byla pozorována u onemocnění jako je Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba, Parkinsonova nemoc, amyotrofická laterální skleróza a rakovina (Hnízdová et.al, 2009). Nitrace proteinů je ireverzibilní proces, který může vyvolat konformační změny a tím i funkční úpravy postiženého proteinu. Měření 3-NT v biologických vzorcích se obvykle provádí technikami, jako je imunohistochemie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, plynová chromatografie a imunochemická detekce (Sultana & Butterfield, 2008).

V podmínkách nadměrné tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS) jako je superoxid, singletový kyslík, peroxid vodíku a další, dochází k oxidačnímu stresu a oxidačnímu poškození biomolekul. Kromě toho může nadměrná produkce oxidu dusnatého (NO) vést k tvorbě významných nitračních činidel jsou oxid dusičitý ( $\text{NO}_2$ ), peroxydusitan ( $\text{ONOO}^-$ ) a sloučeniny odvozené od dusitanu (Hnízdová et al., 2009). Nitrace tyrosinu přidáním  $\text{NO}_2$  skupiny na třetí pozici vede k vytvoření 3-nitrotyrosinu (3-NT) (Sultana a Butterfield). Nitrace proteinů je v biologických systémech citlivě regulována (Hnízdová et al., 2009).

# Experimentální část



## 7. Materiál a přístroje

### 7.1. Použité chemikálie

4-Cl-1-naftol, APS (Fluka), Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad), Bisakrylamid (Bio-Rad), Bromfenolová modř, BSA (Sigma), DTT (Sigma-Aldrich), Chlorid sodný (Lach-Ner), Glycin (Sigma), Luminol (Santa Cruz Biotechnology), NBT/BCIP (Sigma), Peroxid vodíku, 30% (Lach-Ner), Ponceau S (Merek), Primární monoklonální protilátka anti-3-nitrotyrosin – myší (Sigma), Primární monoklonální protilátka anti-3-nitrotyrosin – králičí (Sigma), SDS (Fluka), Sekundární anti-rabbit protilátka (imunizace kozy) IgG značená alkalickou fosfatasou (Sigma), Sekundární anti-rabbit protilátka (imunizace kozy) IgG značená peroxidasou (Sigma), Sekundární anti-rabbit protilátka (imunizace kozy) IgG fluorescenčně značená (Sigma), Sušené odstředěné mléko (AppliChem), TEMED (Fluka), TNM (Aldrich), Tris/HCl, pH 8,8 (Sigma-Aldrich), Tween-20 (Sigma)

### 7.2. Příprava roztoků

#### Příprava TBS pufru:

20 mM Tris, pH 7,5 + 500 mM NaCl

Navážky na 1 l dd H<sub>2</sub>O – 2,42 g Tris a 29,24 g NaCl, pH bylo upraveno na 7,5 pomocí HCl a doplněno dd H<sub>2</sub>O na objem 1 l.

#### Příprava promývacího roztoku TBST (TBS s 0,1% Tween-20):

K 1 l TBS bylo přidáno 1 ml Tween-20.

#### Příprava blokovacího roztoku pro ředění protilátek - 0,5% sušené odtučněné mléko v TBST:

Do 200 ml TBST bylo naváženo 1 g sušeného mléka, zahřáno na 37 °C a po rozpuštění byl blokovací roztok přefiltrován.

#### Příprava elektrodového pufru:

6,05 g Tris, 28,82 g glycinu a 2 g SDS bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody, pH bylo zkontrolováno na 8,3 a doplněno vodou do 2 l. Skladováno v lednici při 4 °C.

#### **Příprava blotovacího pufru:**

3,025 g Tris a 14,41 g glycinu bylo rozpuštěno ve 200 ml vody, poté bylo přidáno 200 ml methanolu. Hodnota pH musela odpovídat 8,3. Před vložením do lednice byl objem doplněn vodou na 1 l.

#### **Příprava neredukujícího vzorkovacího pufru:**

Bylo smícháno 18,5 ml destilované vody, 5 ml 0,5M Tris/HCl, 4 ml glycerolu, 8 ml 10% SDS a 2,5 ml 0,05% bromfenolové modře.

#### **Příprava barvicího roztoku 1-chlor-naftol:**

Bylo naváženo 15 mg 1-chlor-naftolu a dokonale rozpuštěno v 5 ml studeného metanolu. Po rozpuštění bylo přidáno 20 ml TBS pufru a nakonec bylo napipetováno 30  $\mu$ l 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### **Příprava barvicího roztoku Ponceau S:**

0,2% Ponceau S v 10% kyselině octové, tj. 100 ml 10% kyselina octová a 0,2 g Ponceau S. K 0,2 g Ponceau S bylo přidáno 10,1 ml 99% kyseliny octové a 89,9 ml destilované vody.

### **7.3. Přístroje a experimentální vybavení**

Blotovací aparatura pro Slot Blot BioDot SF (Bio-Rad), Elektroforetický přístroj Mini PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad), Mikrodestička Test plate 96F (TPP), Nitrocelulosaová membrána 0,45  $\mu$ m (Bio-Rad), SNAP i.d. protein detection system, Spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek Instruments), PVDF membrána (Bio-Rad), Zařízení pro tank blotting Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad)

### **7.4. Příprava vzorků**

#### **Příprava nitrovaného albuminu – nitroBSA**

##### Pufr:

50 mM TRIS, pH 8,8 (MW=121,1) – bylo naváženo 605 mg TRIS na 100 ml, upraveno pH přidávkem HCl na hodnotu 8,8 a doplněno na požadovaný objem.

##### Postup:

Bylo naváženo 100 mg albuminu a rozpuštěno v 10 ml pufru. Poté bylo přidáno 50. násobný molární nadbytek tetranitrometanu (TNM, MW= 196,04, hustota 1,62 – 75  $\mu$ mol odpovídá 14,7 mg = 10  $\mu$ l) – konečná koncentrace 500  $\mu$ M TNM. Reakce proběhla přes noc při 4 °C.

### Purifikace nitroBSA:

Odstranění TNM a reakčních produktů bylo provedeno gelovou permeační chromatografií na odsolovací kolonce (D-Salt). Před přečištěním byla kolonka promyta pufrém. Na kolonu bylo napipetováno po 1 ml roztoku nitroBSA. Zkumavky s frakcemi nitroBSA byly poté lyofilizovány a uschovány při teplotě -20 °C.

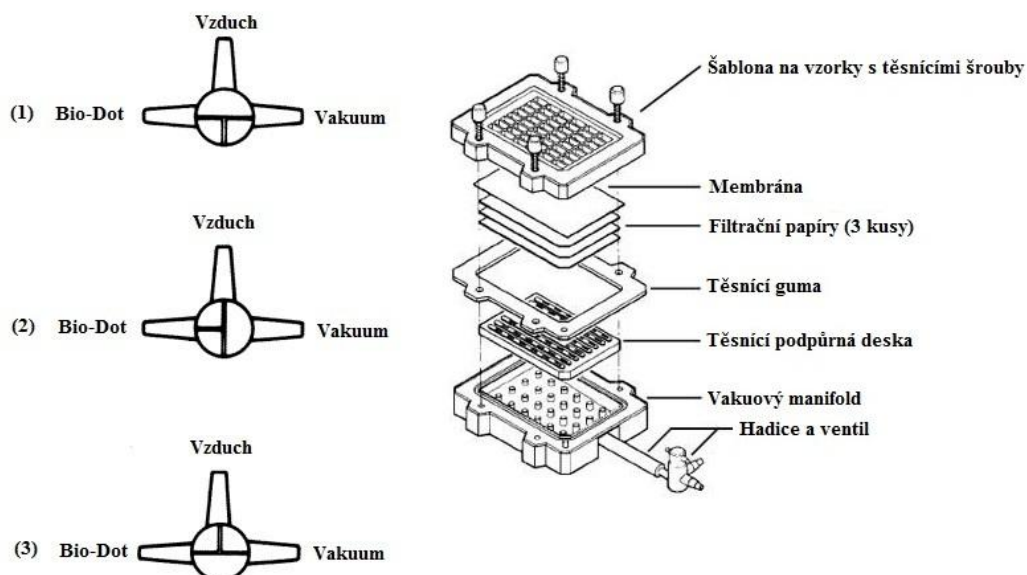
### **Příprava extraktu z rostliny *Arabidopsis thaliana*:**

Na přípravu extraktu z *Arabidopsis thaliana* byly použity listy. Materiál byl homogenizován ve třecí misce s dvojnásobným množstvím 0,2 M K-fosfátového pufru, pH 7,0 a malým množstvím mořského písku. Extrakt byl odebrán do ependorfek. Centrifugace probíhala 10 minut při 6000 otáčkách a 4 °C. Supernatant byl rozpipetován do menších zkumavek po 100 µl.

## **8. Metodika**

### **8.1. Slot blot na přístroji BioDot SF**

Aparatura slouží k nanášení vzorků na membránu pomocí vakuové vývěvy. Není nutná separace vzorků pomocí elektroforézy. Nitrocelulosová membrána byla předem navlhčena v TBS pufru (pokud byla použita PVDF membrána, tak byla ponořena na 5 minut do methanolu a opláchnuta v destilované vodě), nechala se okapat a byla vložena do přístroje na tři vlhčené filtrační papíry. Pomocí válečku byly odstraněny vzduchové bubliny mezi filtračními papíry a membránou. Poté byla umístěna horní část pro nanášení vzorků. Důležité bylo správné utáhnutí šroubu, aby nedošlo k rozlití vzorků do sousedních pozic. Mezi zdroj vakua a aparaturu byla umístěna odsávací láhev. Spustila se vakuová vývěva, znova se dotáhly šrouby a otočil se trojcestný ventil do polohy „vzduch“ – 2 (Obr. 5). Za použití osmi-kanálové pipety bylo nanášeno 100 µl pufru, aby membrána byla znova navlhčena. Pootočením ventilku do polohy „jemné vakuum“ (3) byl pufr jemně odsán. Po otočení ventilku do polohy (2) bylo do jamek nanášeno 200 µl vzorku. Nanášené vzorky byly odsány otočením ventilu do polohy (3). Pomalé odsání je zárukou kvantitativní vazby vzorku na membránu. Každá jamka byla dvakrát promyta 200 µl TBS pufrém. Než došlo k odpojení zdroje vakua, musely se povolit šrouby, odstranit horní část aparatury a vyjmout membránu. Nakonec se vypnul zdroj vakua.



Obr. 5 Nastavení trojcestného ventilu a jednotlivé části přístroje BioDot SF  
(zdroj: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1706542C.pdf>).

## 8.2. SDS – PAGE

### Příprava vzorků pro SDS – PAGE

K 30  $\mu$ l vhodně naředěného vzorku proteinu bylo přidáno 30  $\mu$ l 10 % SDS a 30  $\mu$ l vzorkovacího pufru. Směs byla dobře promíchána a 5 minut povařena. Po ochlazení v ledové lázni vzorek byl centrifugován 5 minut při 6000 g.

### SDS – PAGE elektroforéza

Skleněné desky byly důkladně odmaštěny lihem a připraveny k nalévání gelů do držáků. Mezi skla byl vložen hřebínek a na sklo byla popisovačem označena vzdálenost jednoho cm od konce hřebínku. Poté byl hřebínek odstraněn. Do dvou kádinek byl připraven 10 % dělicí gel a 4 % zaostřovací gel (viz. Tab. 9).

Tab. 9 Složení dělicího a zaostřovacího gelu. Objemy jsou uvedeny v ml.

Typ gelu	AA/BIS	Tris HCl	Tris HCl	H <sub>2</sub> O	SDS	TEMED	start APS
	30%/0,8%	1,5 M, pH 8,8	0,5 M, pH 6,8				
dělicí 10%	3,4	2,5	-	3,8	0,1	0,01	0,07
zaostřovací 4%	1,3	-	2,5	5,9	0,2	0,02	0,12

Přídavkem APS do kádinky, která obsahovala složky dělicího gelu, byla zahájena polymerace gelu. Směs byla rychle promíchána a přenesena pomocí pipety mezi nachystaná skla. Při nalévání gelu nesmí vzniknout vzduchové bubliny. Gel byl naléván až po rysku na skle. Poté byl převrstven *n*-butanolem. Po 15 minutách polymerace byl *n*-butanol odstraněn, prostor mezi skly propláchnut destilovanou vodou a vysušen filtračním papírem.

Přídavkem APS do kádinky s komponenty na zaostřovací gel byla zahájena polymerace. Směs byla opět promíchána a pipetou nanášena na ztuhlý dělicí gel až po okraj skel. Do gelu byl vložen hřebínek, pod kterým se nesměly objevit vzduchové bubliny. Skla s gely se ponechala 30 minut stát při laboratorní teplotě.

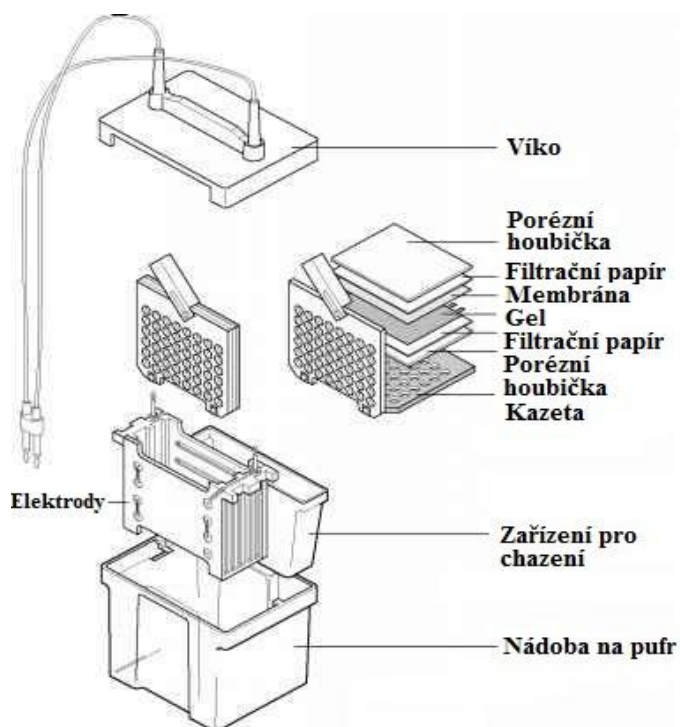
Po uplynutí doby byla skla vyjmuta z držáků a vložena do elektroforetické komůrky. Popisovačem byly vyznačeny zuby hřebínku, který byl potom opatrně vyjmut. Do komůrky byl nalit elektrodový pufr. Do jamek bylo nanášeno Hamiltonovou pipetou 5  $\mu$ l vzorku. Krajní jamky se nevyužívají. Před zavřením aparatury byly pipetou odstraněny vzduchové bubliny na spodní straně desek.

Elektrodová nádoba byla uzavřena víkem, připojena ke zdroji (100 V). Když bromfenolová modř doputovala na rozhraní obou gelů, byl zdroj zvýšen na 200 V. Jakmile bromfenolová modř byla na spodním okraji desek, byl vypnut zdroj, odstraněno víko a vylit elektrodový pufr. Pomocí plastové špachtle byla skla od sebe oddělena, gel položen na vhodnou podložku a jeho levý dolní roh byl odkrojen (nutné pro orientaci vzorků).

### **8.3. Western blotting – komůrka Mini Protean (BioRad)**

#### Western blotting v uspořádání „tank-blotting“

Nejdříve byla připravena blotovací membrána o velikosti gelu. Membrána, gel, filtrační papíry a porézní houbičky byly ponořeny do blotovacího pufru na 15 až 60 minut. Potom do blotovací kazety byly vloženy následovně tyto vrstvy: černá deska kazety: porézní houbička – filtrační papír – gel – membrána – filtrační papír – porézní houbička: průsvitná strana kazety. Kazeta byla uzavřena a vložena do komůrky. Černá strana směřuje vždy k černé straně blotovací komůrky. Celá komora byla vložena do ledničky, byl přidán blotovací pufr a vše uzavřeno víkem. Podle velikosti membrány byl spočítán proud (0,8 mA/cm<sup>2</sup>). Po jedné hodině bylo blotování ukončeno, pufr byl odstraněn a kazety vyjmuty.



Obr. 6 Popis komůrky Mini Protean a jeho jednotlivé díly.

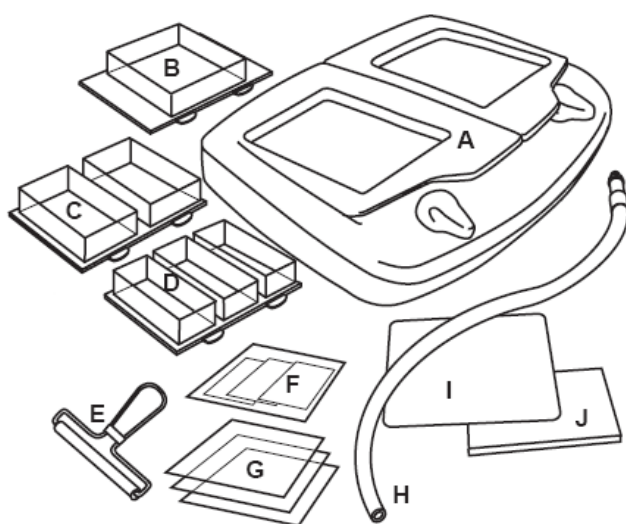
#### 8.4. SNAP i.d. protein detection system

SNAP i.d. system byl připojen přes odsávací láhev k vakuové vývěvě. Držáky blotu byly otevřeny a bílý vnitřní povrch navlhčen destilovanou vodou. Přebytečná voda byla zbavena pomocí válečku. Navlhčená membrána se vzorky byla položena do držáku stranou s proteiny směrem dolů. Jemným přejetím válečkem byly odstraněny vzduchové bubliny. Na membránu byl položen spacer a znovu byl použit váleček pro dokonalý kontakt spaceru s membránou. Držák byl uzavřen, vložen do komory přístroje a víko přístroje bylo zaklapnuto.

Do komůrky bylo nanášeno příslušné množství blokovacího roztoku (dle pokynů v Tab. 10). Ihned byl otevřen přívod vakua pomocí přepínače na přístroji. Po vyprázdnění komůrky bylo vakuum vypnuto a nanášeno příslušné množství primární protilátky. Roztok musí pokrýt celý povrch komůrky. S vypnutým vakuem byla protilátka inkubována s membránou 10 minut. Po uplynutí doby bylo vakuum zapnuto a dokonale odstraněna primární protilátka. Se zapnutým vakuem byl držák promyt třikrát 20 ml promývacím roztokem. Po ukončení vakua byla nanášena sekundární protilátka, která byla inkubována 10 minut. Po daném čase bylo zapnuto vakuum, protilátka byla odsána a komůrka promyta třikrát 20 ml promývacím roztokem. Nakonec držák blotu byl vyjmut z přístroje, položen na pracovní plochu komůrkou dolů a víko otevřeno. Pinzetou byl opatrně odstraněn spacer a membrána.

Tab. 10 Objemy použitých roztoků na přístroji SNAP i.d..

Počet membrán	1	2	3
Objem blokovacího pufru	30 ml/jamku	16 ml/jamku	10 ml/jamku
Objem protilátky	3 ml/jamku	1,5 ml/jamku	1 ml/jamku
Objem promývacího pufru	30 ml/jamku	15 ml/jamku	10 ml/jamku



Obr. 7 Popis částí a příslušenství přístroje SNAP i.d.

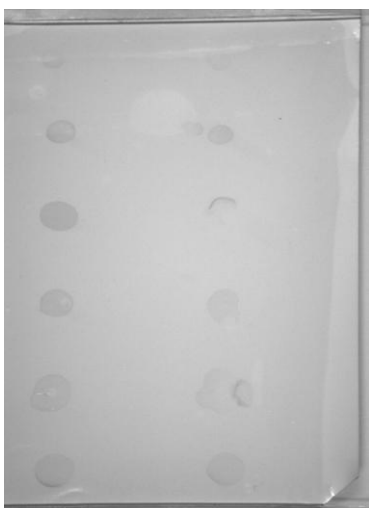
- A Tělo přístroje SNAP i.d.
- B, C, D Držák pro jednu (B), dvě (C) nebo tři (D) membrány
- E Blotovací váleček pro odstranění vzduchových bublin
- F Blotovací membrána
- G Spacer
- H Hadice pro přívod vakua
- I Instruktažní návod
- J Uživatelský manuál

## 9. Výsledky

### 9.1. Analýza vzorku hrachové AMADH2

Byl použit vzorek purifikované PsAMADH2 (enzym získán od Dr. Martiny Tylichové), který byl nanesen na nitroceluloseovou membránu metodou dot blotu. Množství naneseného vzorku 2, 3, 4, 5, 6 a 7  $\mu\text{l}$  do dvou stejných sloupců. Poté byla membrána vložena do přístroje SNAP i.d., kde byla inkubována s primární Ab (ředění 1:2000; anti-AMADH2) a sekundární Ab (ředění 1:5000; anti-rabbit IgG/Px). Na vizualizaci byl použit roztok 1-chlornaftolu.

Bandy proteinů byly obarveny. Na modelovém proteinu byla vyzkoušena inkubace na přístroji SNAP i.d.



Obr. 8 Detekce PsAMADH2 na nitroceluloseové membráně metodou dot blot. Byla použita sekundární protilátka značená peroxidásoou a vizualizace roztokem 1-chlornaftolu.

V navazujícím experimentu byl použit opět vzorek PsAMADH2, který byl nejprve analyzován elektroforetickou metodou SDS-PAGE s následným Western blottingem s použitím nitroceluloseové membrány. Poté byla porovnána účinnost inkubace s protilátkami v provedení na třepačce a na přístroji SNAP i.d.

Množství vzorku bylo 30  $\mu\text{l}$  PsAMADH2 s 30  $\mu\text{l}$  10% SDS a 30  $\mu\text{l}$  vzorkovacího pufru. Do jamek připraveného gelu bylo napipetováno po 5  $\mu\text{l}$  vzorku. Primární Ab byla ředěna 1:2000 (AMADH2) a sekundární 1:5000 (anti-rabbit IgG/Px). K vizualizaci byl použit barvicí roztok na proteiny Bio-Safe a 1-chlornaftol.

Výsledkem barvení gelu po blotování barvivem Bio-Safe bylo, že proteiny zůstaly na gelu (Obr. 9). Důkazem byl nedostatečný čas pro přeblotování všech proteinů na membránu. Jedna část membrány byla inkubována s protilátkami na SNAP i.d.. Po barvení s 1-chlornaftolem



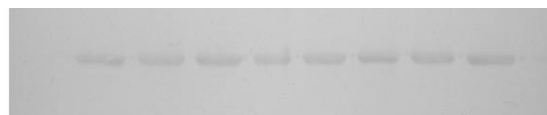
žádné bandy nebyly obarveny. Druhá část membrány byla inkubována na třepačce a barvena 1-chlornaftolem.

Bandy byly velmi slabě viditelné, zřejmě to bylo způsobeno nedostatečným přebloťováním všech proteinů na membránu.

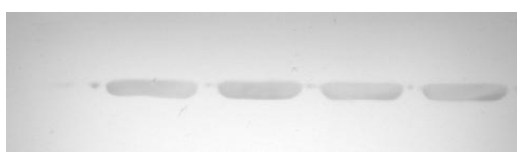
Detekce PsAMADH2 metodou Western blotting v provedení na třepačce:



Obr. 9 Gel bez blotování.



Obr. 10 Gel po blotování.



Obr. 11 Membrána inkubována na třepačce.

## 9.2. Analýza vzorku nitroBSA

### 9.2.1. Analýza nitroBSA s použitím PVDF membrány

Zásobní vzorek nitroBSA (20 mg/1ml) byl ředěn 40x (tj. 250  $\mu$ l vzorku + 9750  $\mu$ l TBS pufru) a nanesen metodou slot blotu na PVDF membránu. Poté byla membrána inkubována na třepačce s primární protilátkou (ředění 1:2500, 1:5000, 1:10 000; anti-NT mouse) a sekundární protilátkou (ředění 1:5000, 1:10 000, anti-mouse IgG/Px).

Byla testována možnost vizualizace s chromogenním substrátem 1-chlornaftolem. Bylo pozorováno, že bandy na PVDF membráně byly lehce obarveny. Membrána není vhodná pro použití metodou slot blot, protože při odsávání vzorků pomocí vakua se rychle vysušuje. Zřejmě nedošlo k dokonalé vazbě proteinu na membránu (Obr. 12).



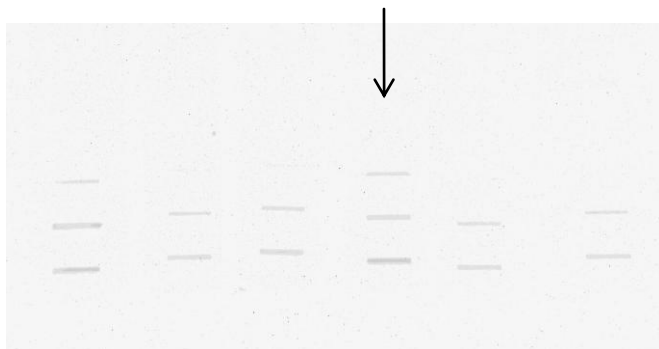
Obr. 12 Analýza nitroBSA metodou slot blot na PVDF membráně po barvení v 1-chlornaftolu. Dolní index na membráně označuje ředění primární protilátky (1:2500 ●, 1:5000 ●●, 1:10 000 ●●●) a horní index ředění sekundární protilátky (1:5000 ●, 1:10 000 ●●).

V obdobném pokusu bylo proto ověřena možnost detekce chemiluminiscence s použitím substrátu luminolu. 15 mg nitroBSA bylo rozpuštěno v 750  $\mu$ l destilované vody, nanášeno na PVDF membránu slot blotu dle níže uvedené tabulky a inkubováno na třepače:

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8
množství proteinu ( $\mu$ g)	0	2	5	10	20	50	100	200

Primární Ab byla ředěna 1:2500, 1:5000 a 1:10 000 (anti-NT mouse). Sekundární byla ředěna 1:5000 a 1:10 000 (anti-mouse IgG/Px).

Chemiluminiscence byla viditelná po 5 minutách expozice. Nejvíce viditelné bandy byly při ředění primární protilátky 1:2500 a sekundární protilátky 1: 5000, tj. čtvrtý sloupec zleva (Obr. 13). Nejvhodnější ředění protilátek, tj. primární Ab 1:2500, sekundární Ab 1:5000, bylo vybráno pro další pokus, kde byl pouze rozdíl v inkubaci protilátek, která probíhala na přístroji SNAP i.d. Po nanášení luminolu nebyla chemiluminiscence detekována.

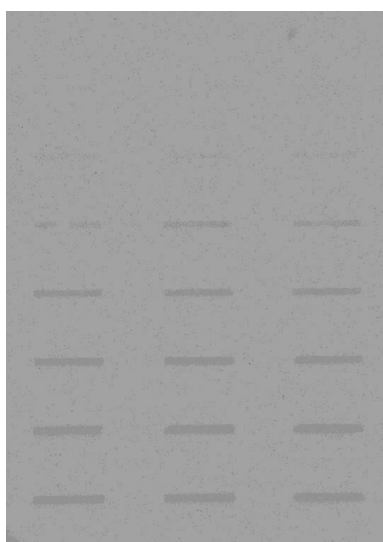


Obr. 13 Analýza nitroBSA metodou slot blot na PVDF membráně s chemiluminiscenční detekcí po 5 minutách expozice. Nejvíce viditelné bandy byly při ředění primární Ab 1:2500 a sekundární Ab 1: 5000 (vyznačeno šipkou).

Proto bylo v navazujícím pokusu použito také nižší ředění primární protilátky. Vzorek nitroBSA byl nanesen na PVDF membránu pomocí slot blotu a inkubován na SNAP i.d. Bylo změněno ředění primární Ab na 1:500 a 1:2500 (anti-NT mouse). Sekundární Ab byla ponechána 1:5000 (anti-mouse IgG/Px). Nakonec byl nanesen luminol.

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8
množství proteinu ( $\mu\text{g}$ )	0	2	5	10	20	50	100	200

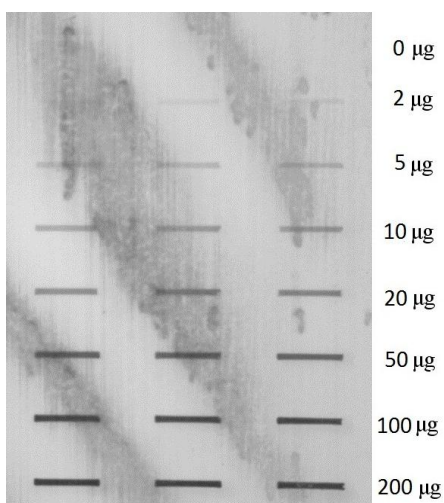
Bylo potvrzeno, že při použití ředění primární Ab 1:2500 a sekundární Ab 1:2500 nebyl detekován chemiluminiscenční signál. Při použití ředění primární protilátky 1:500 (pozn. na SNAP i.d. byla použita sběrná nádobka pro recyklaci protilátky) a sekundární 1:5000 byly signály proteinů detekovány po 10 minutách expozice (Obr. 14).



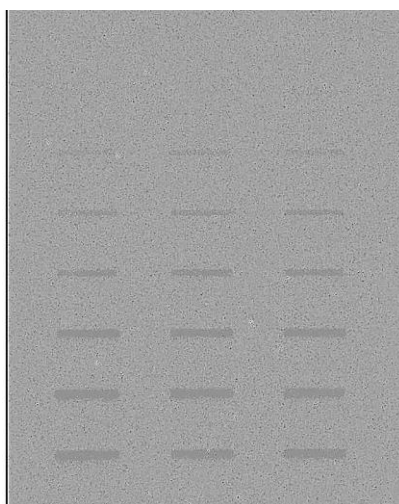
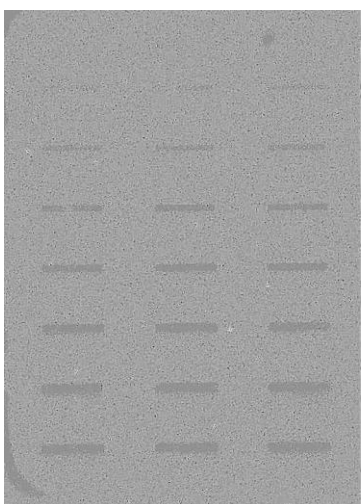
Obr. 14 Analýza nitroBSA metodou slot blot na PVDF membráně s chemiluminiscenční detekcí po 10 min. expozice. Použité ředění protilátek primární Ab 1:500 a sekundární Ab 1:5000.

U dalšího pokusu bylo nejdříve s použitím barvy Ponceau S kontrolován přenos proteinů na membránu před inkubací s protilátkami. Bylo zvoleno ředění primární Ab 1:500 (anti-NT mouse; recyklovaná) a sekundární ředěna 1:5000 (anti-mouse IgG/Px).

Před inkubací se proteiny obarvily pomocí Ponceau S, aby se zjistilo, zda došlo k navázání proteinů na membránu (Obr. 15). PVDF membrána velmi rychle uschla a vytvořila nevzhledné mapy, proto nebylo vhodné s ní nadále pracovat. Jedna část membrány inkubována na SNAP i.d. (Obr. 16) a druhá část na třepačce za použití recyklované primární protilátky (Obr. 17). Po 5 minutové inkubaci s luminolem byla chemiluminiscence opět velmi slabá.



Obr. 15 Analýza nitroBSA metodou slot blot na PVDF membráně - barvení proteinů pomocí Ponceau S.



Analýza nitroBSA metodou slot blot na PVDF membráně s chemiluminiscenční detekcí.

Obr. 16 Inkubace na SNAP i.d.

Obr. 17 Inkubace na třepačce.

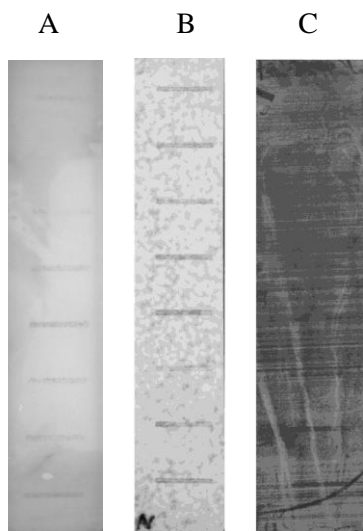
### 9.2.2. Analýza nitroBSA s použitím nitrocelulosové membrány

Pro porovnání vhodnosti zvolené membrány byl vzorek nitroBSA byl nanesen na oba typy membrán pomocí slot blotu a inkubován na SNAP i.d.

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8
množství proteinu (μg)	0	2	5	10	20	50	100	200

Primární Ab ředěna 1:500 (anti-NT mouse) a sekundární 1:5000 (anti-mouse IgG/Px; anti-mouse IgG/AP). K vizualizaci byl použit luminol na chemiluminiscenci a BCIP/NBT.

Obě membrány, se sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidasou, po nanesení luminolu nevykazovaly žádnou chemiluminiscenci. Při barvení PVDF a nitrocelulosové membrány pomocí BCIP/NBT se bandy obarvily. PVDF membrána zřejmě interaguje s roztokem BCIP/NBT, jelikož změnila barvu (Obr. 18).



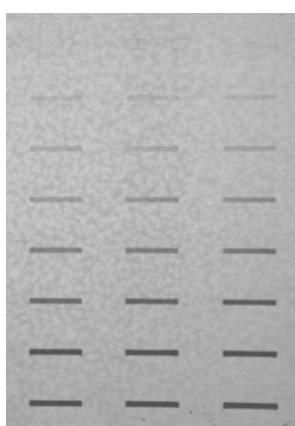
Obr. 18 Analýza nitroBSA metodou slot blot – srovnání PVDF a nitrocelulosové membrány. Byla použita sekundární protilátka značená Px a chemiluminiscenční detekce (A - PVDF membrána), nebo sekundární protilátka značená AP a vizualizace roztokem BCIP/NBT (B - nitrocelulosová a C - PVDF membrána).

V dalších pokusech bylo optimalizováno použití nitrocelulosové membrány. Naředěný vzorek nitroBSA byl na nitrocelulosovou membránu nanesen pomocí slot blotu a inkubován na třepačce.

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8
množství proteinu (μg)	0	2	5	10	20	50	100	200

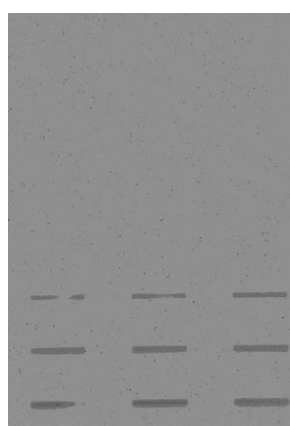
Ředění primární Ab bylo 1:500 (anti-NT mouse; recyklovaná) a sekundární 1:5000 (anti-mouse IgG/Px). Byla použita barva Ponceau S pro barvení proteinů před inkubací a luminol na chemiluminiscenci.

Před inkubací s protilátkami se proteiny obarvily pomocí Ponceau S, aby se zjistilo, zda došlo k navázání proteinů na membránu (Obr. 19). Nitrocelulosová membrána neusychá tak rychle, jako PVDF. Bylo vidět, že nitrocelulosová membrána je mnohem vhodnější. Jedna část membrány inkubována na SNAP i.d. a druhá část na třepačce (Obr. 20). Chemiluminiscence byla viditelná na membráně, která byla inkubována na třepačce. Na membráně inkubované na SNAP i.d. nebylo nic detekováno.



Obr. 19 Barvení proteinů pomocí Ponceau S.

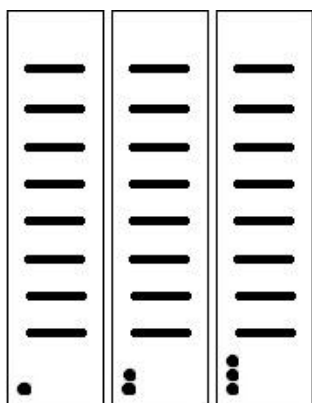
0  $\mu\text{g}$   
2  $\mu\text{g}$   
5  $\mu\text{g}$   
10  $\mu\text{g}$   
20  $\mu\text{g}$   
50  $\mu\text{g}$   
100  $\mu\text{g}$   
200  $\mu\text{g}$



Obr. 20 Analýza nitroBSA - blotování na třepačce.

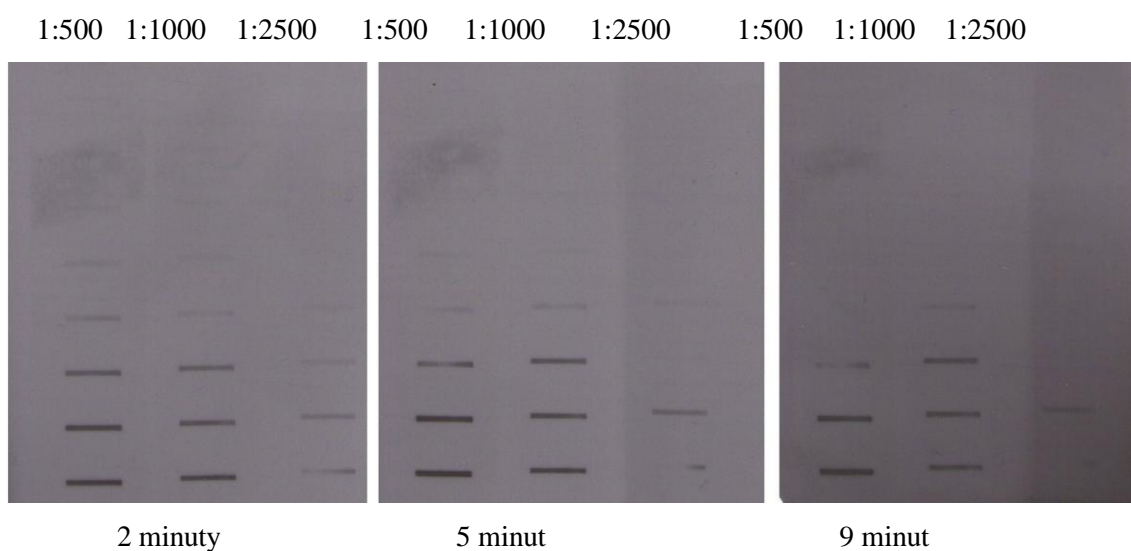
V navazujícím pokusu bylo testováno více variant ředění sekundární protilátky. NitroBSA byl nanesen na nitrocelulosovou membránu a inkubován na třepačce. Primární Ab ředěna 1:500 (anti-NT mouse), ale u sekundární protilátky bylo uděláno více ředění 1:500, 1:1000, 1:2500 (anti-mouse IgG/Px). K vizualizaci byl použit luminol a chemiluminiscence byla zachycena na fotopapír ve fotokomoře.

Bylo potvrzeno, že detekce na fotopapír je mnohem citlivější metoda ve srovnání s detekcí chemiluminiscence v dokumentačním boxu UVP. Bylo zachyceno více bandů, než při focení CCD kamerou. Doba expozice byla 2 min., 5 min. a 9 minut. Nejlepší čas expozice, při kterém bylo zachyceno nejvíce bandů, je 5 minut. Nejlepší ředění primární protilátky je 1:500 a sekundární protilátky je 1:1000 (Obr. 22). Pomocí densitometrické metody byl ukázán vliv jednotlivých ředění sekundární Ab a expoziční doby na intenzitu signálu (Graf 1; 2; 3).

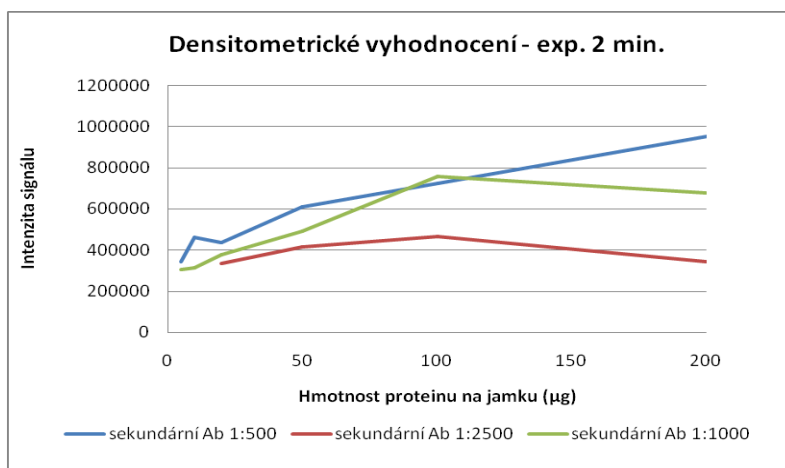


Obr. 21 Analýza nitroBSA metodou slot blot – optimalizace řešení sekundární protilátky. Uspořádání membrán před detekcí na fotopapír. Ředění sekundární protilátky 1:500 ●, 1:1000 ●●, 1:2500 ●●●.

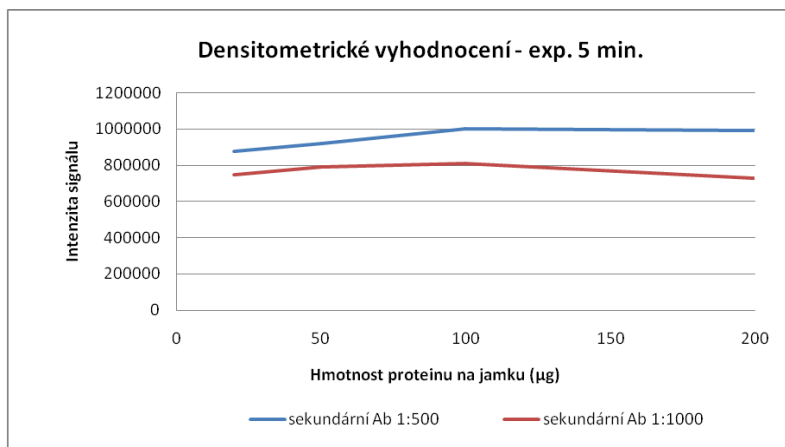
Sek. Ab:



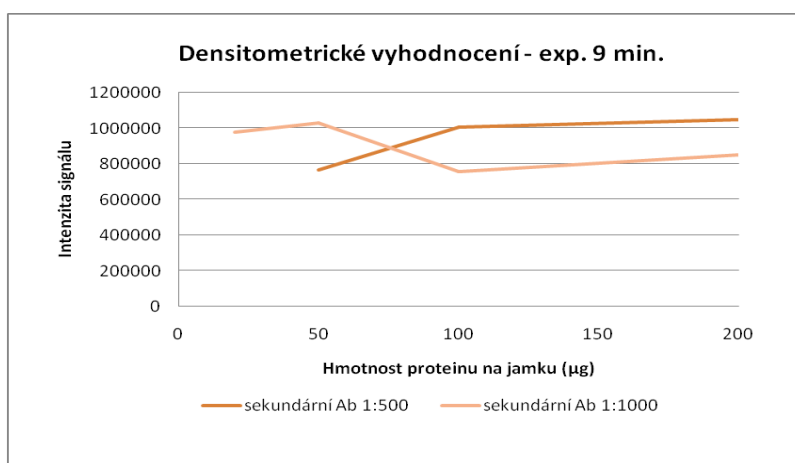
Obr. 22 Jednotlivé expoziční časy chemiluminiscence na fotopapíře.



Graf 1 Analýza nitroBSA metodou slot blot - vliv různého ředění sekundární Ab při expoziční době 2 minuty.



Graf 2 Analýza nitroBSA metodou slot blot - vliv různého ředění sekundární Ab při expoziční době 5 minut.



Graf 3 Analýza nitroBSA metodou slot blot - vliv různého ředění sekundární Ab při expoziční době 9 minut.

### 9.2.3. Porovnání použití primárních protilátek z myši a králíka

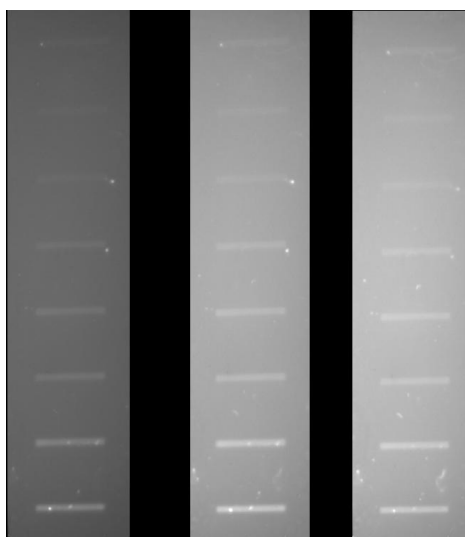
Vzhledem k velmi slabým výsledkům předchozích pokusů s použitím myší monoklonální protilátky na nitroBSA byla testována polyklonální králičí protilátka od stejného výrobce. Současně bylo testováno použití sekundární protilátky značené fluorescenční značkou. Vzorek nitroBSA, nanesený na nitrocelulosovou membránu byl inkubován s primární protilátkou (1:500; anti-NT rabbit) a sekundární protilátkou (1:1000; anti-rabbit IgG/fluorescenční značka – DyLight 548). Inkubace probíhala na SNAP i.d. K vizualizaci byla použita CCD kamera s řadou dostupných filtrů pro detekci fluorescence.

Při použití filtru ethidium bromid, kde rozsah detekce vlnových délek je 580 – 630 nm, byla fluorescence slabší, než při použití filtru SYBR Green a Gold. Tyto filtry zachycují rozsah



vlnových délek 513 – 557 nm. Proto nejlepší výsledky byly pozorovány filtry SYBR Green nebo SYBR Gold (Obr. 23). Použití králičích protilátek je vhodnější, než použití protilátek myších. Jejich chemiluminiscenci a fluorescenci lze lépe detekovat. Králičí protilátky byly použity pro další experimenty.

Ethidium  
bromid      SYBR  
Gold      SYBR  
Green



Obr. 23 Analýza nitroBSA metodou slot blot. Byla použita sekundární protilátka značená fluorescenční značkou DyLight 548 a pro vizualizaci fluorescence filtry ethidium bromid, SYBR Gold a SYBR Green.

#### 9.2.4. Porovnání použití připraveného a komerčního preparátu nitroBSA

Vzorek nitroBSA nanesen na nitrocelulosovou membránu pomocí slot blotu. V osmé jamce byl nanesen zakoupený komerční nitroBSA, aby se porovnala účinnost našeho připraveného nitroBSA a komerčního produktu. Inkubace probíhala na SNAP i.d.

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8
množství proteinu (μg)	0	5	10	20	50	100	200	160

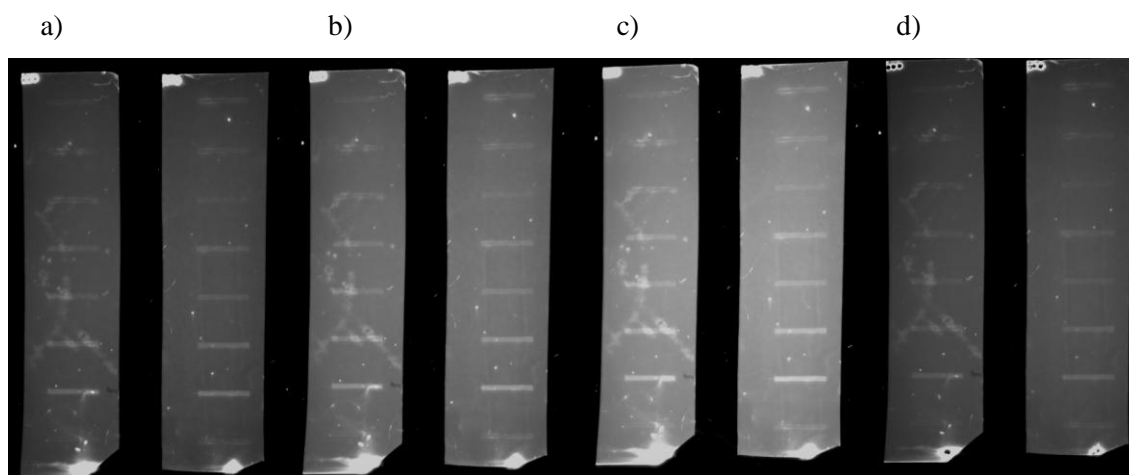
Primární Ab ředěna 1:500, 1:1000 (Ab NT rabbit) a sekundární ředěna 1:1000 (anti rabbit IgG/Px; AP; fluorescenční značka – DyLight 548).

Vizualizace křenové peroxidasy byla detekována pomocí luminolu, alkalická fosfatasa pomocí BCIP/NBT a fluorescenční značka CCD kamerou s fluorescenčními filtry.

Posledním bandem na membráně byl komerční nitroBSA. Chemiluminiscence byla u toho vzorku velmi malá. Při barvení pomocí BCIP/NBT byly bandy obarvené (Obr. 24), jen u komerčního vzorku barevná reakce nebyla tak viditelná. Při detekci fluorescenční značky byly všechny bandy viditelné (Obr. 25). Byly použity různé expoziční časy a filtr SYBR Green.



Obr. 24 Analýza nitroBSA metodou slot blot – porovnání připraveného a komerčního vzorku nitroBSA (vyznačeno šípkou). Byla použita sekundární protilátka značená AP (ředění 1:1000) a vizualizace BCIP/NBT. Dolní index označuje ředění primární Ab (1:500 ●, 1:1000 ●●).



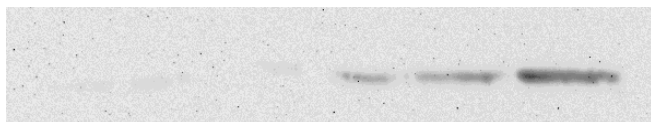
Obr. 25 Analýza nitroBSA metodou slot blot – detekce fluorescenční značky DyLight 548, použitý filtr SYBR Green. Expoziční časy: a) 1 s, b) 4 s, c) 5 s, d) 7 s.

### 9.2.5. Optimalizace postupu blotování po analýze vzorku nitroBSA metodou SDS-PAGE

Vzorek nitroBSA byl analyzován SDS-PAGE elektroforézou, přebloťován na nitrocelulosoovou membránu Western blottingem a inkubován na SNAP i.d. Primární protilátka

ředěna 1:1000 (anti-NT rabbit) a sekundární 1:2500 (anti-rabbit IgG/Px). Po inkubaci byl na 5 minut nanesen luminol.

Po přeblování proteinů byla membrána barvena v Ponceau S. Posledních 5 bandů s nejvyšší koncentrací bylo obarveno. Ponceau S byl vymyt destilovanou vodou, nanesen luminol a po 5 minutách působení byla chemiluminiscence detekována u posledních 3 bandů (Obr. 26).



Obr. 26 Analýza nitroBSA na přístroji SNAP i.d. – chemiluminiscenční detekce, expoziční čas 5 minut.

Byl testován vliv složení vzorkovacího pufru pro SDS-PAGE na citlivost detekce nitroBSA. Čtyři nejvyšší hmotnosti nitroBSA (20  $\mu\text{g}$ ; 50  $\mu\text{g}$ ; 100  $\mu\text{g}$ ; 200  $\mu\text{g}$ ) byly připraveny s dvěma vzorkovacími pufrů – neredukujícím (I) a redukujícím (II). Poté byly vzorky naneseny a rozděleny SDS-PAGE elektroforézou. Dále proběhl Western blotting a na inkubaci byl použit SNAP i.d. s ředěním primární Ab 1:500 a 1:1000 (anti-NT rabbit) a sekundární Ab 1:2500 a 1:5000 (anti-rabbit IgG/Px). K vizualizaci byl použit luminol a CCD kamera.

Při detekci chemiluminiscence, kde byl použit neredukující vzorkovací pufr I, nebyl pozorován žádný chemiluminiscenční signál. U redukujícího vzorkovacího pufru II byly viděny pouze bandy, kde byla použita primární protilátka ředěna 1:1000 a sekundární protilátka 1:2500.

Obdobný pokus byl proveden s volbou zachycení chemiluminiscence na citlivý fotografický papír. Příprava vzorku na SDS-PAGE: 20  $\mu\text{l}$  nitroBSA + 20  $\mu\text{l}$  10% SDS + 20  $\mu\text{l}$  vzorkovacího pufru. Do každé jamky napipetováno po 20  $\mu\text{l}$  připraveného vzorku.

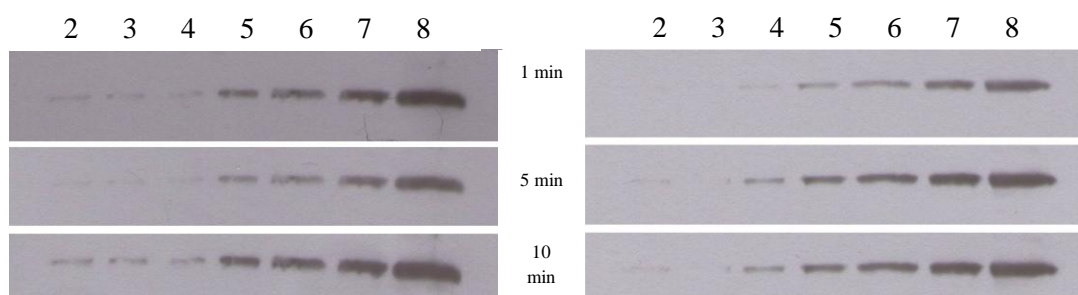
jamka	1	2	3	4	5	6	7	8
množství proteinu ( $\mu\text{g}$ )	0	2	5	10	20	50	100	200

Primární Ab byla ředěna 1:1000 (anti-NT rabbit) a sekundární 1:2500, 1:5000 (anti-rabbit IgG/Px). Detekce chemiluminiscence byla provedena ve fotokomoře na fotopapír a následně byla vyhodnocena densitometricky.

Při barvení gelu pomocí Bio-Safe byly viditelné poslední 4 bandy nejvyšších koncentrací nitroBSA (Obr. 27). Po nanesení luminolu a vyvolání na fotopapír ve fotokomoře, byly viditelné všechny bandy. Bylo vidět, že tato detekce je mnohem citlivější a výsledky jsou mnohem lepší (Obr. 28). Pomocí densitometrické metody byl ukázán vliv jednotlivých ředění sekundární Ab a expoziční doby na intenzitu signálu (Graf 4; 5).



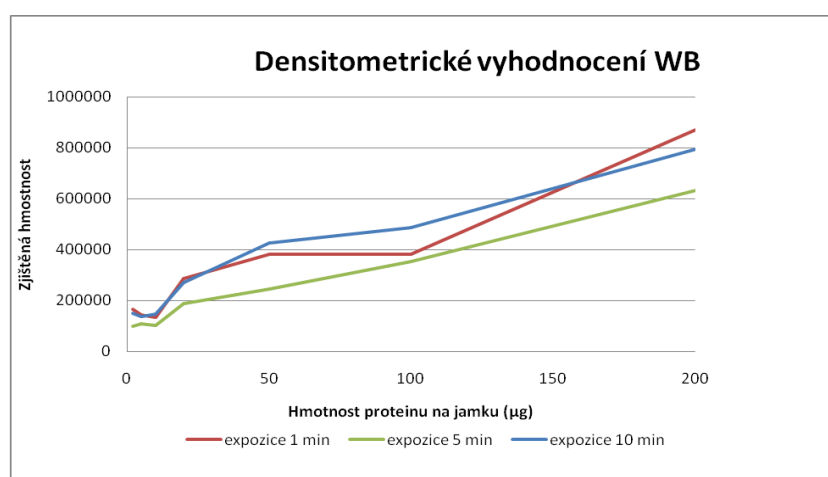
Obr. 27 Analýza nitroBSA - gel po obarvení Bio-Safe.



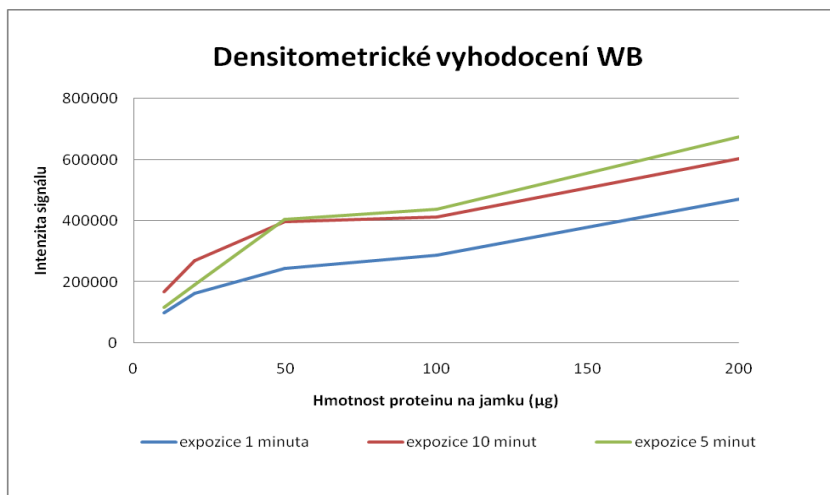
Ředění sekundární protilátky 1:2500.

Ředění sekundární protilátky 1:5000.

Obr. 28 Analýza nitroBSA – chemiluminiscenční signál při expozičních časech 1;5 a 10 min.



Graf 4 Analýza nitroBSA na přístroji SNAP i.d. - různé doby expozice při ředění primární Ab 1:1000 a sekundární Ab 1:2500.



Graf 5 Analýza nitroBSA na přístroji SNAP i.d. - různé doby expozice při ředění primární Ab 1:1000 a sekundární Ab 1:5000.

### 9.3. Analýza nitrovaných proteinů v extraktu *A. thaliana*

Vzorky nitroBSA a extraktu z rostliny *A. thaliana* byly připraveny pro analýzu SDS-PAGE následovně:

- a) 50 µl supernatantu + 50 µl 10% SDS + 50 µl vzorkovacího pufru
- b) 50 µl nitroBSA + 50 µl 10% SDS + 50 µl vzorkovacího pufru

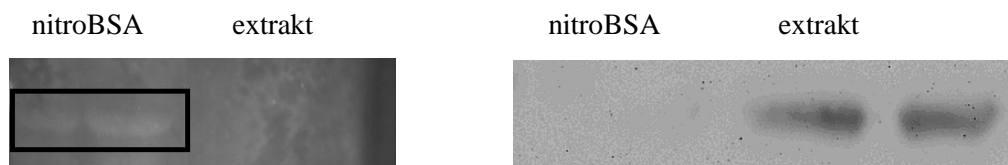
Tab. 12 Schéma nanesení vzorků do jamek připraveného gelu

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
množství	-	10µl	20µl	-	20µl	20µl	10µl	20µl	10µl	20µl
typ vzorku	-	extrakty		-	nitroBSA		extrakty		nitroBSA	

Vzorky byly rozděleny SDS-PAGE elektroforézou, poté následoval Western blot na nitrocelulosovou membránu a inkubace na SNAP i.d. Primární Ab byla ředěna 1:1000 (anti-NT rabbit) a sekundární Ab 1:2500 (anti-rabbit IgG/Px; fluorescenční značka – DyLight 548).

Při použití sekundární protilátky s fluorescenční značkou nebyl u extraktu *A. thaliana* pozorován žádný signál, zatímco u nitroBSA byla fluorescence viditelná (Obr. 29). Při

chemiluminiscenci reakci vykazovaly extrakty rostliny (Obr. 30). Nejvhodnější expoziční čas byl 5 minut. Po 10 minutách se ztrácela intenzita signálu.



Obr. 29 Fluoresceční signál nitroBSA, expozice 5 sekund.

Obr. 30 Analýza nitrovaných proteinů - chemiluminiscenční detekce extraktu, expozice 5 minut.

Pokus byl dále proveden s použitím více variant ředění sekundární protilátky. Vzorky byly připraveny na SDS-PAGE následovně:

- a) 50  $\mu$ l supernatantu + 50  $\mu$ l 10% SDS + 50  $\mu$ l vzorkovacího pufru
- b) 50  $\mu$ l nitroBSA + 50  $\mu$ l 10% SDS + 50  $\mu$ l vzorkovacího pufru

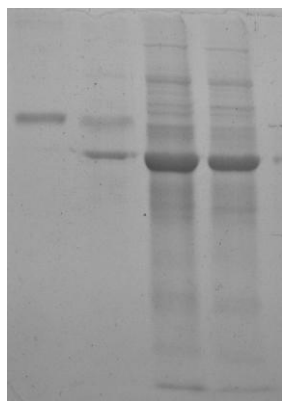
Byly použity 2 vzorky z rostliny *A. thaliana*. Vzorek 1 byl extrakt z listů, které byly ve vegetativním období. Vzorek 2 byl extrakt z listů, kde rostlina byla v senescenčním období.

Tab. 13 Schéma nanesení vzorků do jamek připraveného gelu.

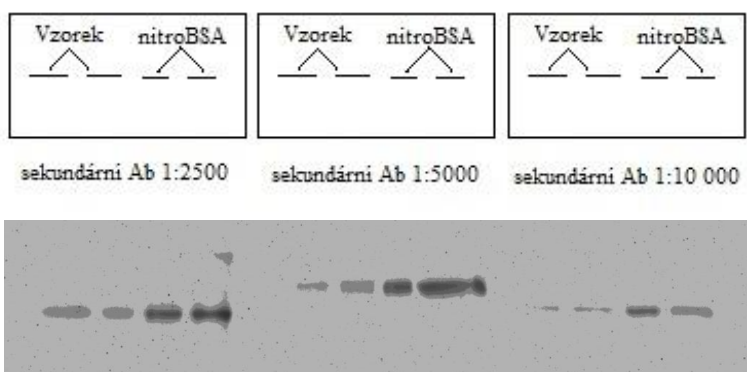
<b>jamky</b>	1	2	3	4
<b>množství vzorku</b>	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l
<b>typ vzorku</b>	vzorek 1	vzorek 2	nitroBSA (ředění 1000)	

Primární Ab ředěna 1:1000 (anti-NT rabbit) a sekundární ředěna 1:2500, 1:5000, 1:10 000 (anti-rabbit IgG/Px).

Gel po elektroforéze byl obarven roztokem Bio-Safe (Obr. 31). Jednotlivé membrány po Western blotingu, který běžel přes noc, byly inkubovány na SNAP i.d. s různými koncentracemi sekundární protilátky. Při chemiluminiscenci bylo zřejmé, že neoptimálnější ředění primární Ab je 1:1000 a sekundární Ab 1:5000 (Obr. 32).



Obr. 31 Analýza nitrovaných proteinů - gel barven Bio-Safem.



Obr. 32 Analýza nitrovaných proteinů - chemiluminiscenční detekce při různých ředěních sekundární Ab.

Dále byl porovnán vliv použití redukujícího vzorkovacího na signál nitrovaných proteinů v rostlinném extraktu. Příprava vzorků na SDS-PAGE byla provedena takto:

- a) 70  $\mu$ l supernatantu + 70  $\mu$ l 10% SDS + 70  $\mu$ l vzorkovacího pufru
- b) 70  $\mu$ l nitroBSA + 70  $\mu$ l 10% SDS + 70  $\mu$ l vzorkovacího pufru
- c) marker + 20  $\mu$ l vody
- d) 10 mM DTT

Tab. 13 Schéma nanesení vzorků do jamek připraveného gelu

<b>jamka</b>	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>množství</b>	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l
<b>typ vzorku</b>	marker	vzorek 1	vzorek 2	albumin	vzorek 1	vzorek 2	albumin	albumin + DTT
<b>vzorkovací pufr</b>		vzorkovací pufr II			neredukující vzorkovací pufr I		vzork. pufr II	

Byly použity 2 druhy vzorkovacích pufrů – neredukující vzorkovací pufr a redukující vzorkovací pufr. Po skončení SDS-PAGE byly proteiny přebíleny na nitrocelulosembránu a inkubovány na přístroji SNAP i.d., kde primární Ab byla ředěna 1:1000 (anti-NT rabbit) a sekundární 1:5000 (anti-rabbit IgG/Px). Pro vizualizaci byl použit luminol na chemiluminiscenci a CCD kamera.

Gel byl opět barven v roztoku Bio-Safe (Obr. 33). Chemiluminiscence byla viditelná u nitroBSA, kde byl použit vzorkovací pufr II a neredukující vzorkovací pufr I a u nitroBSA s 10 mM DTT (Obr. 34). U vzorků extraktu z *A. thaliana* nebyl detekován chemiluminiscenční signál.



Obr. 33 Analýza nitrovaných proteinů v extraktu *A. thaliana* na přístroji SNAP i.d. Gel barven roztokem Bio-Safe; 1) marker, 2) vzorek 1, 3) vzorek 2, 4) nitroBSA, 5) vzorek 1, 6) vzorek 2, 7) nitroBSA, 8) nitroBSA s DTT.



Obr. 34 Analýza nitrovaných proteinů v extraktu *A. thaliana* na přístroji SNAP i.d. Chemiluminiscenční detekce. 1) marker, 2) vzorek 1, 3) vzorek 2, 4) nitroBSA, 5) vzorek 1, 6) vzorek 2, 7) nitroBSA, 8) nitroBSA s DTT.

## 10. Závěr

Cílem bakalářské práce bylo porovnat metody analýz proteinů. Srovnání klasického postupu, který zahrnoval ředění a přípravu vzorku na SDS-PAGE elektroforézu, samotný elektroforetický průběh, poté následoval Western blotting v uspořádání „tank blotting“, kde došlo k přenesení proteinu z gelu na membránu až po inkubaci na třepačce. Tento postup byl velmi zdoluhavý. Další metodou bylo přímé nanášení ředěného vzorku na membránu pomocí slot blotu, který zajišťoval pevnou vazbu proteinu na membránu. Blokování a inkubace s protilátkami byla provedena na třepačce nebo na přístroji SNAP i.d..

Nejprve byla použita myší protilátka, ale chemiluminiscence byla velmi slabá (inkubace na třepačce) až žádná (inkubace na SNAP i.d.). Při použití chromogenního substrátu 1-chlor-naftolu



také nebyl detekován žádný signál. Přešlo se na protilátky králičí, které fungovaly lépe. Detekce sekundární králičí protilátky značena křenovou peroxidasou je lepší, než detekce fluorescence pomocí filtru SYBR Green nebo SYBR Gold. V rámci vybavení byly vyhodnoceny lepší výsledky na fotopapír. Nejvhodnějším ředěním primární protilátky bylo 1:1000 a sekundární 1:5000.

Při SDS-PAGE elektroforéze byly porovnány dva vzorkovací pufrů – redukující a neredukující. Vyšší chemiluminiscenční signál byl pozorován u vzorku nitroBSA připraveném v redukujícím vzorkovacím pufru.

Byly porovnány dva typy membrán – nitrocelulosa a PVDF. PVDF nebyla vhodná, protože během odsávání na slot blotu se rychle vysušovala. Při barvení pomocí BCIP/NBT se membrána obarvila a bandy nebyly viditelné. Proto byla zvolena nitrocelulosa membrána.

Vhodně zvolené ředění vzorku, protilátek a typ membrány bylo aplikováno na extrakt z rostliny *Arabidopsis thaliana*. Extrakty vykazovaly chemiluminiscenční signál při ředění primární Ab 1:1000 a sekundární Ab 1:5000 při použití redukujícího vzorkovacího pufru. Při porovnávání vzorkovacích pufrů nebyla chemiluminiscence detekována.

Pro analýzu nitrovaných proteinů byl zvolen výsledný optimální protokol:

- SDS-PAGE elektroforéza: dělicí gel 10%, zaostřovací gel 4%
- Western blotting: nitrocelulosa membrána
- SNAP i.d.: králičí protilátky – primární ředěna 1:1000 a sekundární ředěna 1:5000
- detekce chemiluminiscence na fotopapír pomocí luminolu.

## LITERATURA

Abcam, Dot blot protocol, <http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/Dot%20blot%20protocol.pdf>

Alwine J. C., Kemp D. J., Stark G. R. (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5350 – 5354.

Budowle B., Hudlow W. R., Lee S. B., Klevan L. (2001) Using a CCD camera imaging system as a recording device to quantify human DNA by slot blot hybridization. *Biotechniques* **30**, 680 – 685.

Burnette W. N. (1981) „Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195 – 203.

Dharavath H. N., Hahn K. (2009) Green Printing: Colorimetric and densitometric analysis of solvent-based and vegetable oil-based inks of multicolor offset printing. *J. Technol. Stud.* **35**, 36 – 46.

Dorri Y., Khalili A. W., Scofield R. H. (2009) *Protein Blotting and Detection - Methods and Protocols*, pp. 418, Humana Press, New York, USA.

D'souza A., Scofield R. H. (2009) *Protein Blotting and Detection - Methods and Protocols*, pp. 433 – 435, Humana Press, New York, USA.

Ferenčík M. (1989) *Imunochémia*, pp. 346 – 348, 404 – 405, 434, Alfa, Bratislava, Slovensko.

Fu X. T., Kim S. M. (2010) Agarase: Review of major sources, purification method, enzyme characteristics and application. *Mar. Drugs* **8**, 200 – 218.

Garfin D. E. (2003) *Essential Cell Biology*, pp. 197 – 203, Oxford University Press, Oxford, UK.

Glaser R. W. (1993) Antigen – antibody binding and mass transport by convection and diffusion to a surface: A two – dimensional computer model of binding and dissociation kinetics. *Anal. Biochem.* **213**, 152 – 161.

Gravel P. (2008) *Molecular Biomethods Handbook*, pp. 365, 368, Humana Press, Tatowa, USA.

Hlaváček A., Skládal P. (2011) Kvantové tečky: Příprava, konjugace a využití v bioanalytické chemii a biologii. *Chem. Listy* **105**, 611 – 615.

Hoefer, Inc., Hoefer PR 648 slot blot manifold – user manual blotting, [http://www.hoeferinc.com/downloads/pr648\\_manual.pdf](http://www.hoeferinc.com/downloads/pr648_manual.pdf)

Kochko de A., Qu R., Marmey P., Rance I., Fauquet C., Beachy R. N. (1994) Protein slot blotting: An easy, rapid and reliable technique to identify the expression of a protein in transgenic plants. *Plant. Mol. Biol. Rep.* **12**, 274-278.

Kumagai I., Tsumoto K. (2010) Encyclopedia of life science: Antigen – antibody binding. (<http://immuneweb.xxmu.edu.cn/reading/adative/12.pdf>).

Kurien B. J., Scofield R. H. (2009) Protein Blotting and Detection - Methods and Protocols, pp. 14, Humana Press, New York, USA.

Labropoulos K. C., Niesz D. E., Danforth S. C., Kevrekidis P. G. (2002) Dynamic rheology of agar gels: theory and experiments. Part I. Development of a rheological model. *Carbohydr. Polym.* **50**, 393 – 406.

Laurière M. (1993) A semidry electroblotting system efficiently transfers both high- and low-molecular-weight proteins separated by SDS-PAGE. *Anal. Biochem.* **212**, 206 – 211.

Lonza , Protein Separation in Agarose Gels, [http://bio.lonza.com/uploads/tx\\_mwaxmarketingmaterial/Lonza\\_BenchGuides\\_SourceBook\\_Section\\_XIII\\_-\\_Protein\\_Separation\\_in\\_Agarose\\_Gels.pdf](http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_BenchGuides_SourceBook_Section_XIII_-_Protein_Separation_in_Agarose_Gels.pdf).

Michalet X., Pinaud F. F., Bentolila L. A., Tsay J. M., Doose S., Li J. J., Sundaresan G., Wu A. M., Gambhir S. S., Weiss S. (2005) Quantum dots for live cell, *in vivo* imaging and diagnostics. *Science* **307**, 538 – 544.

Olsen I., Wiker H. G. (1998) Diffusion blotting for rapid production of multiple identical imprints from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis on a solid support. *J. Immunol. Methods* **220**, 77 – 84.

Pimentel G. C., McClellan A. L. (1960) The hydrogen bond, pp 5, W. H. Freeman and company San Francisco and London, USA

Rak-Raszewska A., Marcello M., Kenny S., Edgar D., Sée V., Murray P. (2012) Quantum dots do not affect the behaviour of mouse embryonic stem cells and kidney stem cell and are suitable for short – term cracking. *Plos One* **7**, e32650

Reverberi R., Reverberi L. (2007) Factors affecting the antigen – antibody reaction. *Blood Transf.* **5**, 227 – 240.

Sheehan D., O'Sullivan S. (2008) *Molecular Biomethods Handbook*, pp. 351 – 357, Humana Press, Tatowa, USA.

Southern M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separand by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503 – 517.

Sultana R., Butterfield D. A. (2008) Slot – blot analysis of 3-nitrotyrosine-modified brain proteins. *Method. Enzymol.* **440**, 309 – 316.

The Merck Millipore, Membrane Selection for Western Blotting, <http://www.millipore.com/immunodetection/id3/membraneselection>.

Thermo Fisher Scientific Inc. (2009) Chemiluminescent Western blotting technical guide and protocols, <http://www.piercenet.com/files/TR0067-Chemi-Western-guide.pdf>.

Thermo Fisher Scientific Inc. (2007) *Western Blotting Handbook and troubleshooting guide*, pp 13,18,41. [https://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Product/productPDF\\_5047.pdf](https://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Product/productPDF_5047.pdf)

Waggoner A. (2006) Fluorescent labels for proteomics and genomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 62 – 66.

Wu M., Kusakawa N. (1998) SDS agarose gels for analysis of proteins. *Biotechniques*, **24**, 676 – 678.

Zhu D., Saul A. J., Miles A. P. (2005) A quantitative slot blot assay for host cell protein impurities in recombinant proteins expressed in *E. coli*. *J. Immunol. Methods.* **306**, 40 – 50.

<http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/Dot%20blot%20protocol.pdf>

<http://www.articlesbase.com/wellness-articles/using-dylight-conjugated-antibodies-2525506.html>

<http://www.berthold.com/ww/en/pub/bioanalytik/biomethods/fluor.cfm>

[http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/emorr/16\\_S-nitrosoglutathionreduktasa.pdf](http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/emorr/16_S-nitrosoglutathionreduktasa.pdf)

[http://bio.lonza.com/uploads/tx\\_mwaxmarketingmaterial/Lonza\\_BenchGuides\\_SourceBook\\_Section\\_XIII\\_-\\_Protein\\_Separation\\_in\\_Agarose\\_Gels.pdf](http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_BenchGuides_SourceBook_Section_XIII_-_Protein_Separation_in_Agarose_Gels.pdf)

<http://www.biometra.de/24.0.html>

<http://www.biometra.com/874.0.html>

[http://www.hoeferinc.com/downloads/pr648\\_manual.pdf](http://www.hoeferinc.com/downloads/pr648_manual.pdf)

<http://www.jacksonimmuno.com/technical/DyLight.asp>

[http://www.kirkhoustrust.org/Docs/transilluminator\\_instructions.pdf](http://www.kirkhoustrust.org/Docs/transilluminator_instructions.pdf)

<http://www.millipore.com/immunodetection/id3/membraneselection>

[http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/d6a241f31de7103b8525742c0006082e/\\$FILE/AN1879EN00.pdf](http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/d6a241f31de7103b8525742c0006082e/$FILE/AN1879EN00.pdf)

[http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/fe2faae7d10058168525742b007846d2/\\$FILE/PB1017EN00.pdf](http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/fe2faae7d10058168525742b007846d2/$FILE/PB1017EN00.pdf)

<http://www.piercenet.com/files/TR0067-Chemi-Western-guide.pdf>

[http://www.rndsystems.com/literature\\_antibody\\_binding.aspx](http://www.rndsystems.com/literature_antibody_binding.aspx)

<http://www.uvp.com/pdf/fp-111.pdf>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA/BIS	Akrylamid- <i>N,N'</i> -bisakrylamid
Ab	Protilátka
AMADH 2	Aminoaldehyddehydrogenasa 2
Anti-mouse IgG / Px	Anti-myší imunoglobulin G značený křenovou peroxidasou
Anti-rabbit IgG / Px	Anti-králičí imunoglobulin G značený křenovou peroxidasou
AP	Alkalická fosfatasa
APS	Persíran amonný
BCIP	5-bromo-4-chloro-3'-indolyl-fosfát p-toluidinová sůl
BSA	Hovězí sérový albumin
DBM	Diazobenzylmetyl
DTT	Dithiotreitol
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FITC	Fluoresceinisothiokyanát
HRP	Křenová peroxidasa
NBT	Nitrotetrazoliová modř
nitroBSA	Nitrovaný hovězí sérový albumin
PBS	Fosfátový fyziologický roztok s 0,15M NaCl
PsAMADH2	<i>Pisum sativum</i> aminoaldehyddehydrogenasa (hrách setý)
PVDF	Polyvinylidifluorid
RNA	Ribonukleová kyselina
SDS	Dodecylsulfát sodný
T20	Tween-20

TBS	Fyziologický roztok pufrovaný Tris
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl-ethan-1,2-diamin
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidín
TNM	Tetranitromethan
TMRITC	Tetramethylrhodaminisokyanát