Temat 4
Metody oparte o elektroforezę

Southern blotting

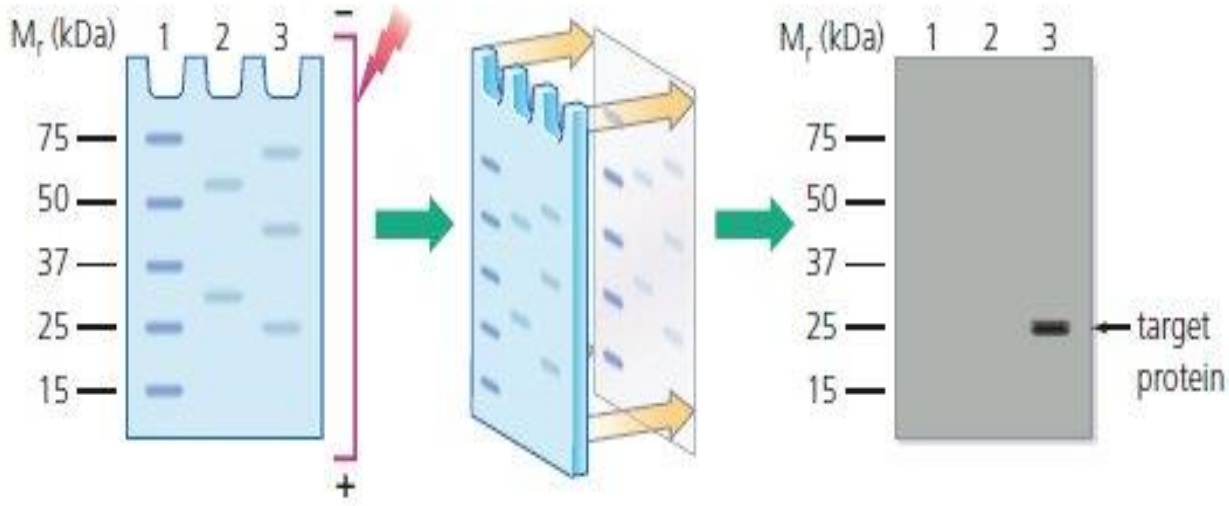
Jest najpopularniejszą metodą identyfikacji kwasów nukleinowych lub odpowiednich fragmentów polinukleotydowych. Stosuje się np. w kryminalistyce, potwierdzaniu ojcostwa lub przy poszukiwaniu specyficznych fragmentów genów w badanym materiale biologicznym kodujących wybrane białka.

- Rozdzielone w czasie elektroforezy fragmenty kwasu nukleinowego przenosi się z żelu na błonę nitrocelulozową lub nylonową w obecności roztworu ekstrakcyjnego.
- Błonę zanurza się w roztworze zawierającym znakowane substancje swoiście rozpoznające poszukiwaną sekwencją nukleotydów. Reakcja barwna lub radioaktywność ujawniają poszukiwane frakcje na błonie.

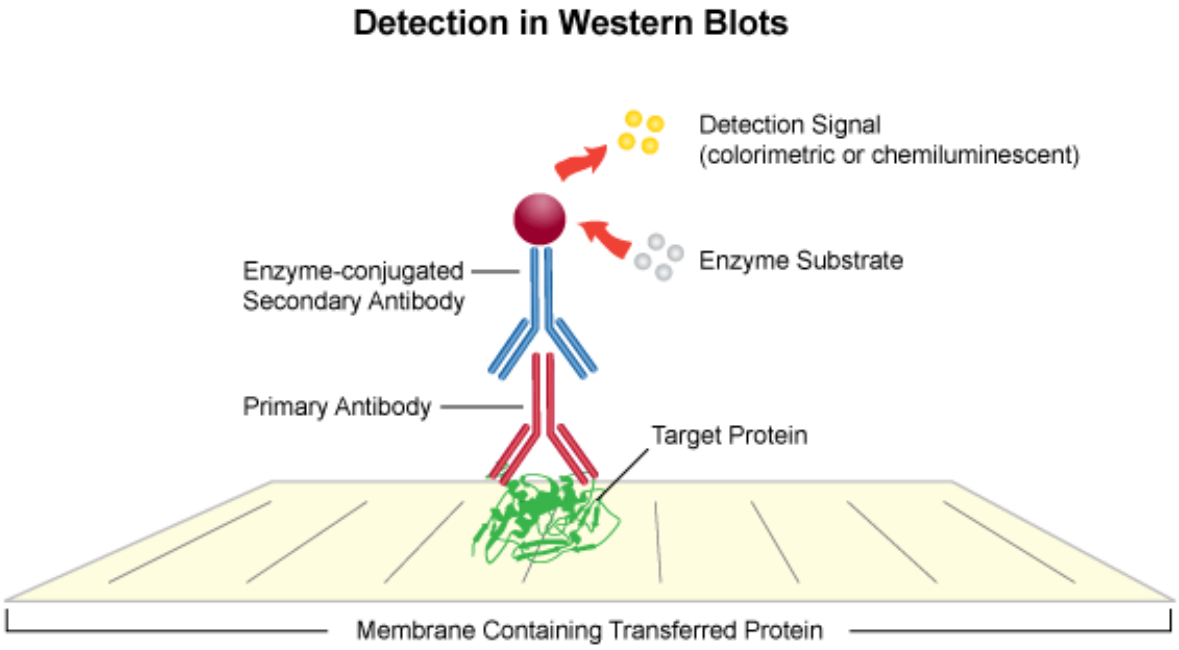
Western blotting

Metoda pozwalająca na wykrycie obecności badanego białka w materiale biologicznym w oparciu o wysoko specyficzną reakcję antygen-przeciwciało. Warunkiem jej przeprowadzenia jest posiadanie przeciwciała przeciwko badanemu białku.
Metoda wykorzystywana jest do wykrycia lub potwierdzenia obecności danego białka w badanym materiale biologicznym stanowiącym mieszaninę różnych białek bez konieczności przeprowadzania skomplikowanych procedur izolacji.
Etapy procedury obejmują:

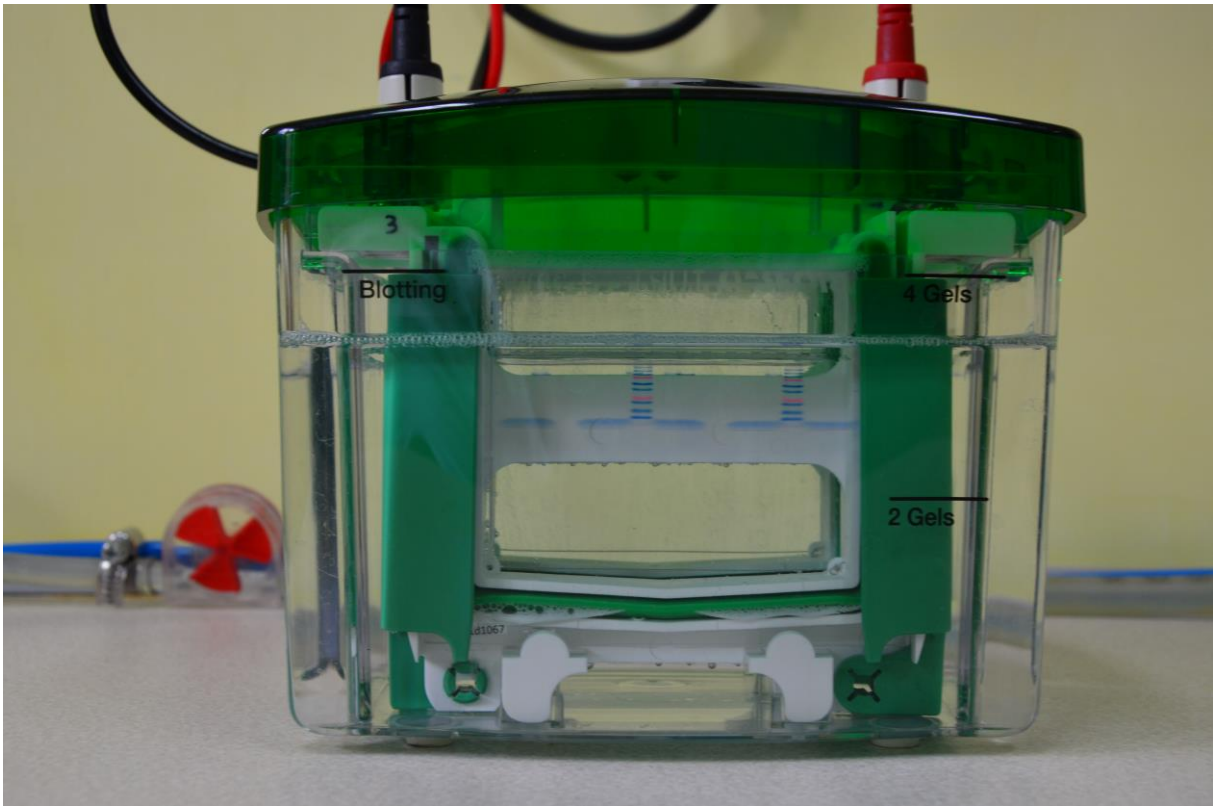
- Rozdział białek na żelu poliakrylamidowym
- Transfer białek z żelu na membranę
- Inkubacja z roztworem blokującym
- Inkubacja z przeciwciałami pierwotnymi (przeciwko badanemu białku)
- Inkubacja z przeciwciałami wtórnymi (przeciwko wytworzonemu kompleksowi)
- Identyfikacja kompleksu antygen-przeciwciało przy użyciu reakcji barwnej widocznej na membranie w miejscu gdzie znajduje się frakcja z badanym białkiem. Daje to możliwość określenia masy cząsteczkowej tego białka (poprzez porównanie ze standardami mas cząsteczkowych)



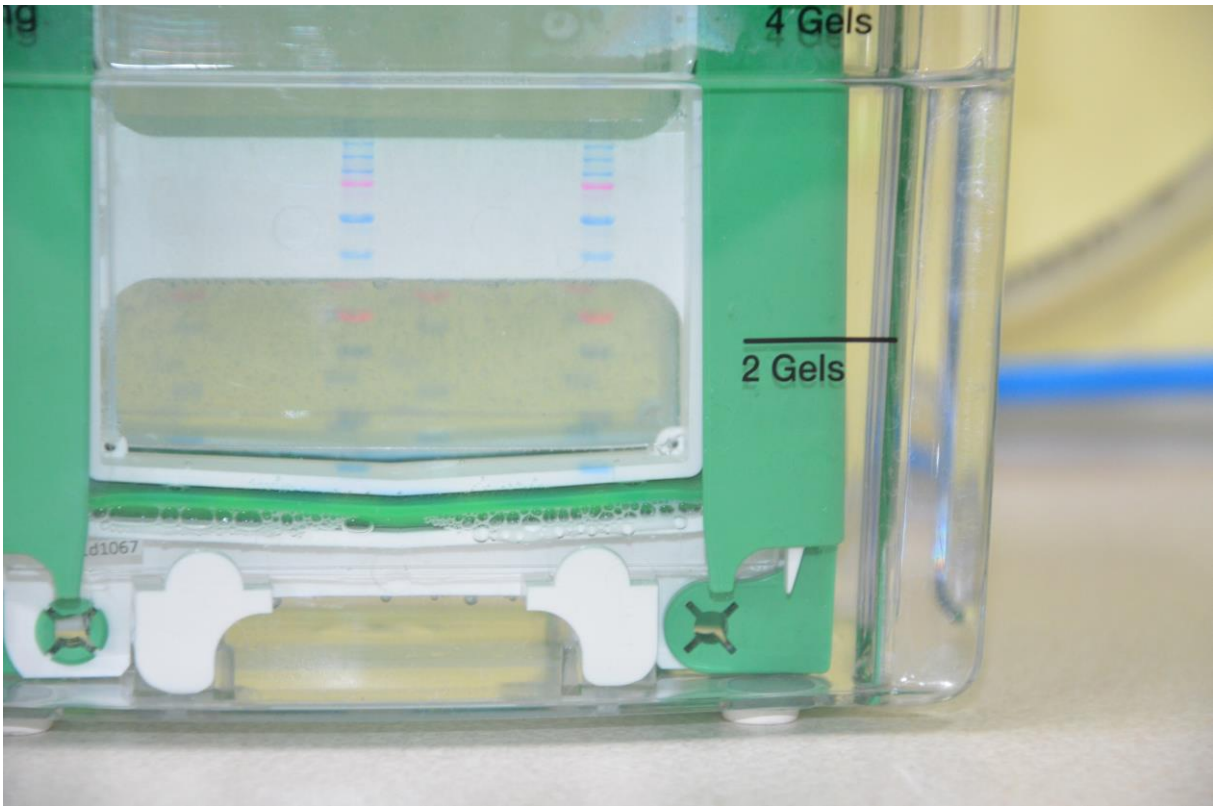
Rysunek 1. Schemat postępowania w technice Western Blotting



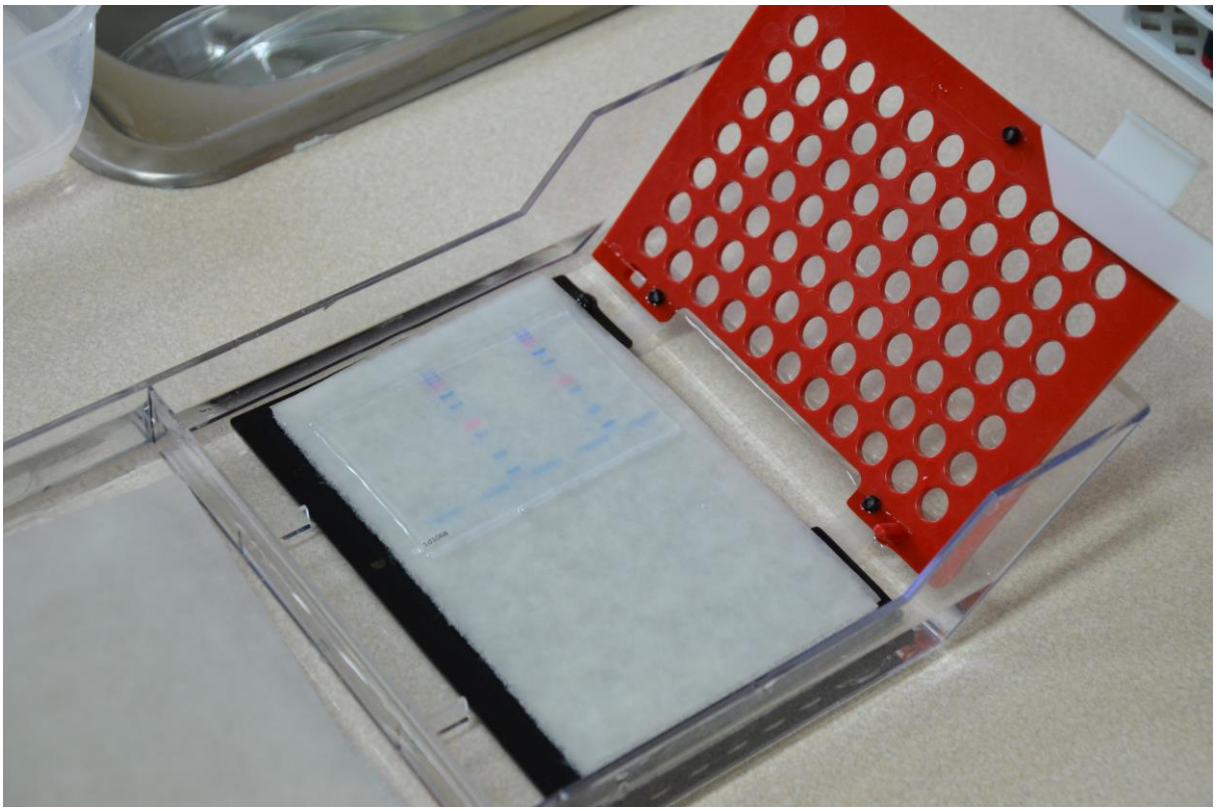
Rysunek 2. Schemat metody detekcji białek w technice Western Blotting



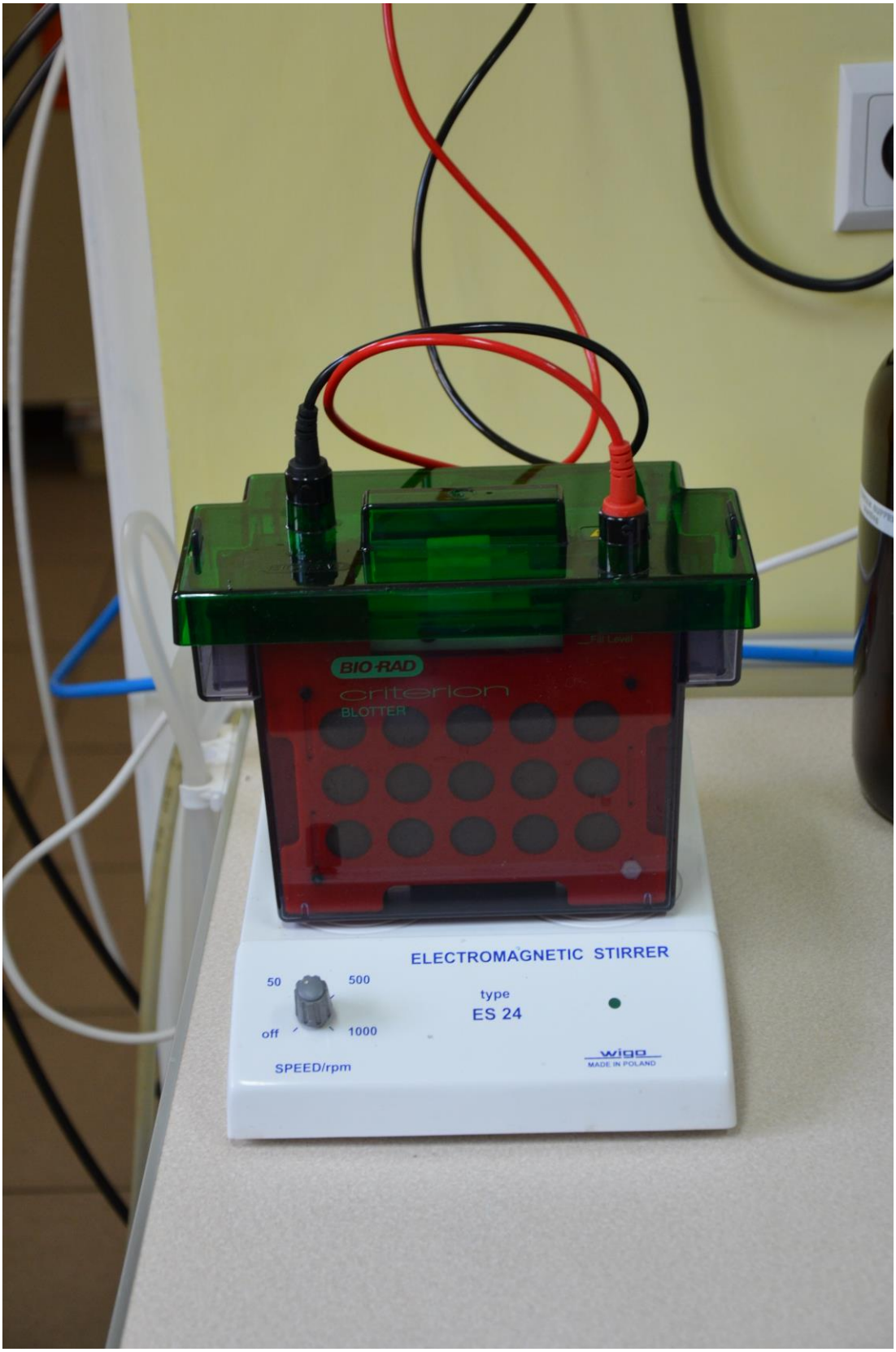
Rysunek 3. Przykład rozdziału elektroforetycznego białek (widoczne kolorowe markery mas cząsteczkowych).



Rysunek 4. Przykład rozdziału elektroforetycznego białek (widoczne kolorowe markery mas cząsteczkowych)



Rysunek 5. Widok żelu po rozdziale elektroforetycznym (widoczne kolorowe markery mas cząsteczkowych) przygotowanych do transferu na membranę w technice Western Blotting



Rysunek 6. Aparat do transferu białek z żelu poliakrylamidowego na membranę stosowany w technice Western Blotting

Rysunek 7. Przykładowy wyniki analizy Western Blotting.

Zymografia

Charakteryzuje się dodaniem do żelu przed polimeryzacją substratu dla badanego tą metodą enzymu. Po wykonaniu rozdziału elektroforetycznego żele są inkubowane w buforze. W trakcie inkubacji zachodzi reakcja enzymatyczna w miejscu gdzie znajduje się frakcja zawierająca badany enzym. W kolejnym etapie zatrzymuje się reakcje enzymatyczną a żel barwi na obecność:
- substratu (uzyskujemy zabarwienie całego żelu poza miejscem działania enzymu gdzie substrat został rozłożony)
- produktu (uzyskujemy zabarwienie frakcji gdzie znajduje się enzym)

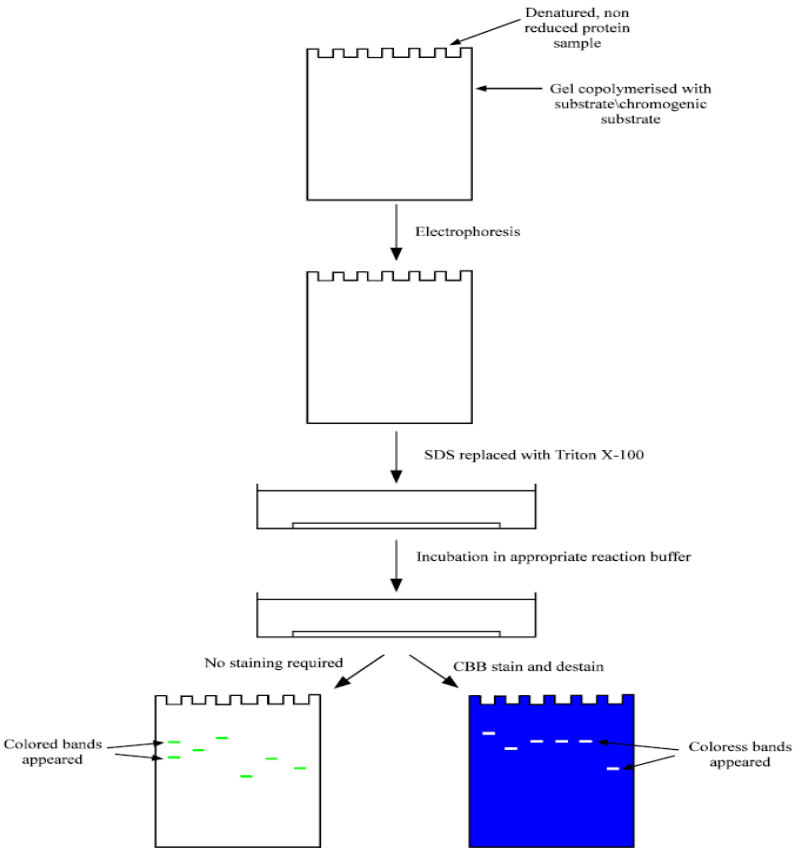


Fig. 1: Zymography and chromogenic substrate autography

Rysunek 8. Schemat wykonania zymografii