

Jak „chytit“ proteiny?

Připravili jsme pro Vás reportáž z Laboratoře biologie pylu, ve které se dozvíte, jak se detekují proteiny. Jedná se o analytickou techniku zvanou Western blot. Nejprve jsou proteiny rozděleny pomocí elektroforézy podle velikosti, dále jsou přeneseny z gelu na povrch membrány a následně detekovány specifickými protilátkami. Celou reportáží nás provedla Božena Klodová.





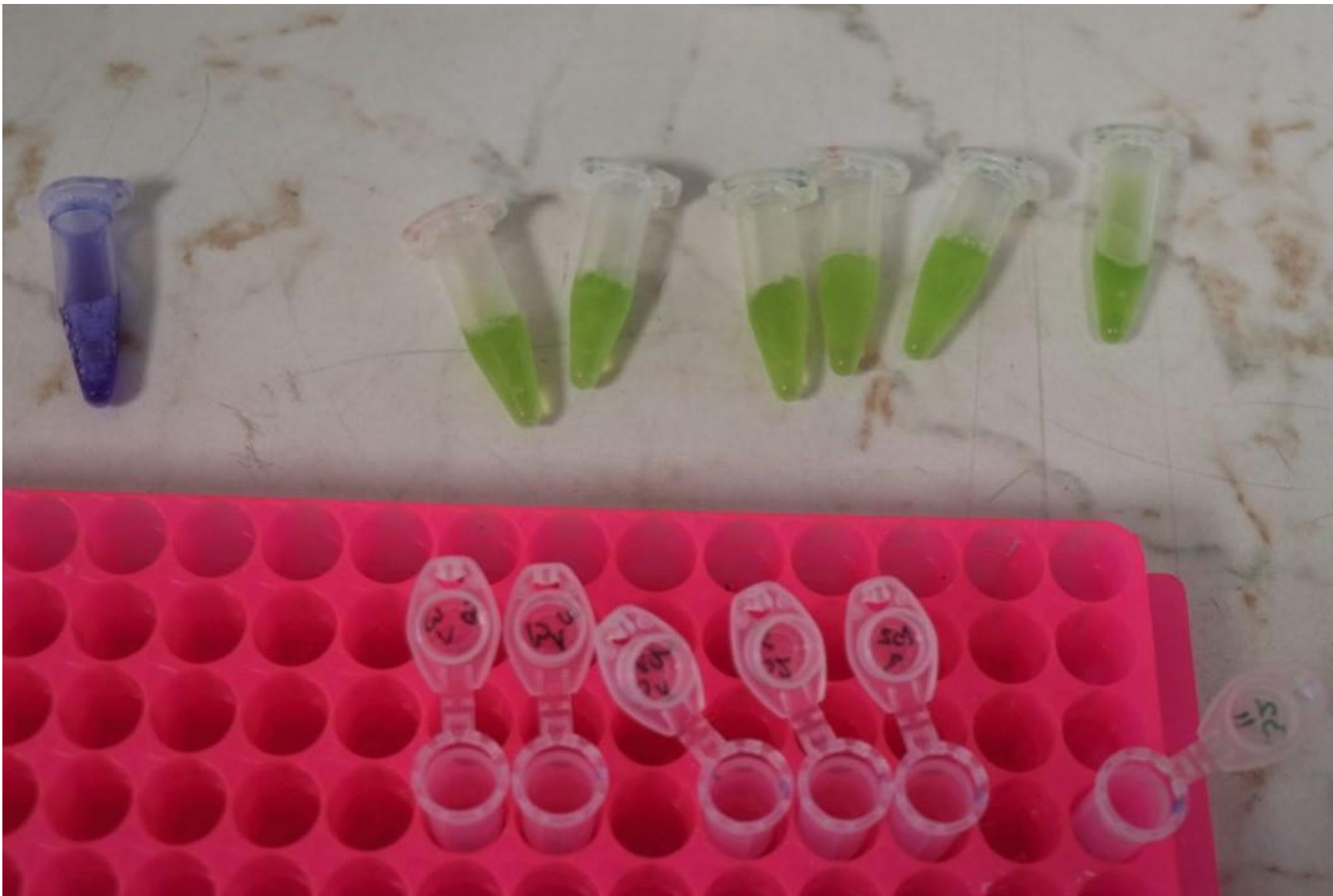
Na obrázku jsou zachyceny části SDS-PAGE elektroforézy, která v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (dodecylsírán sodný) rozděluje proteiny podle velikosti (přesněji molekulární hmotnosti).



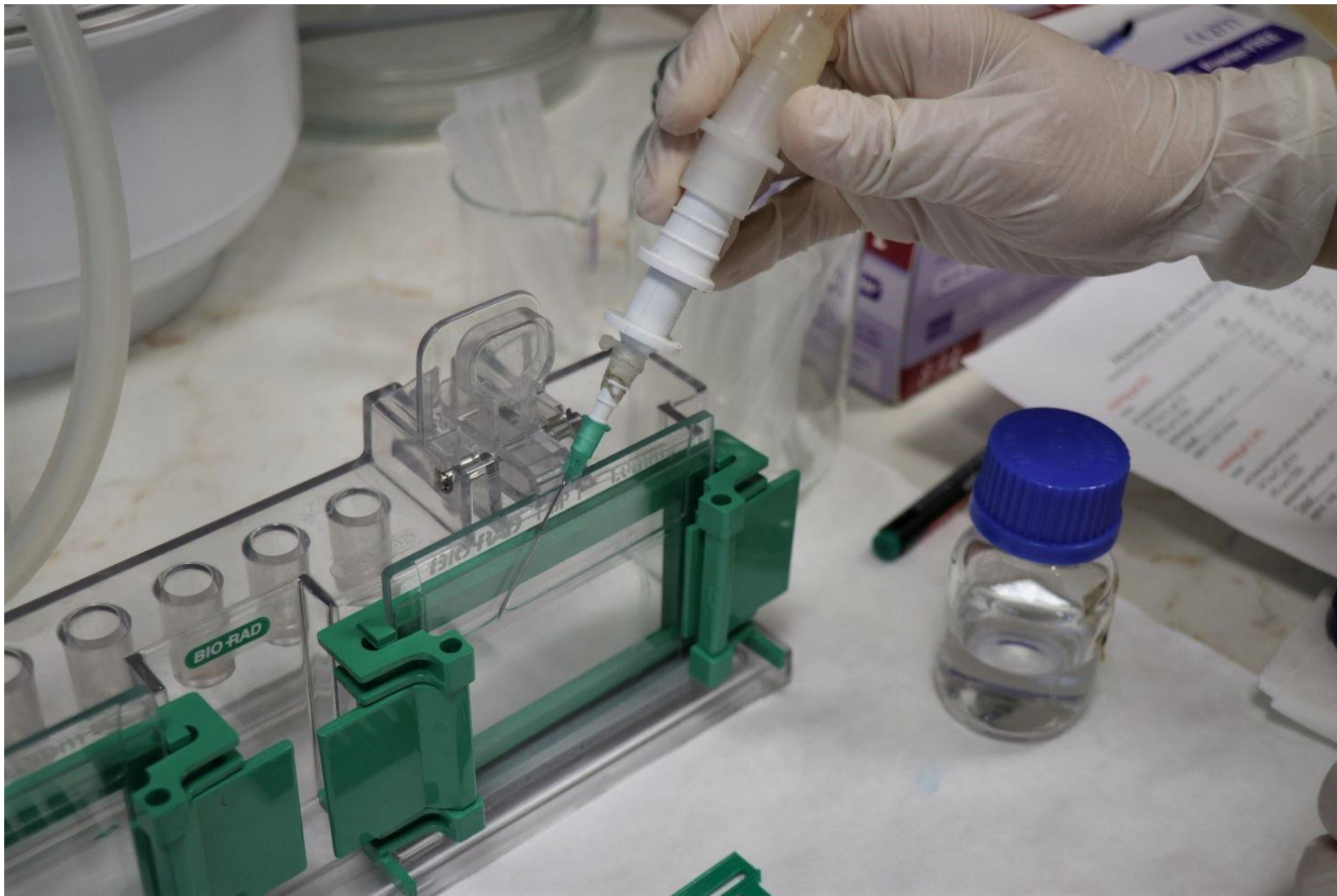
Skříčka se musí uchytit do držáku.



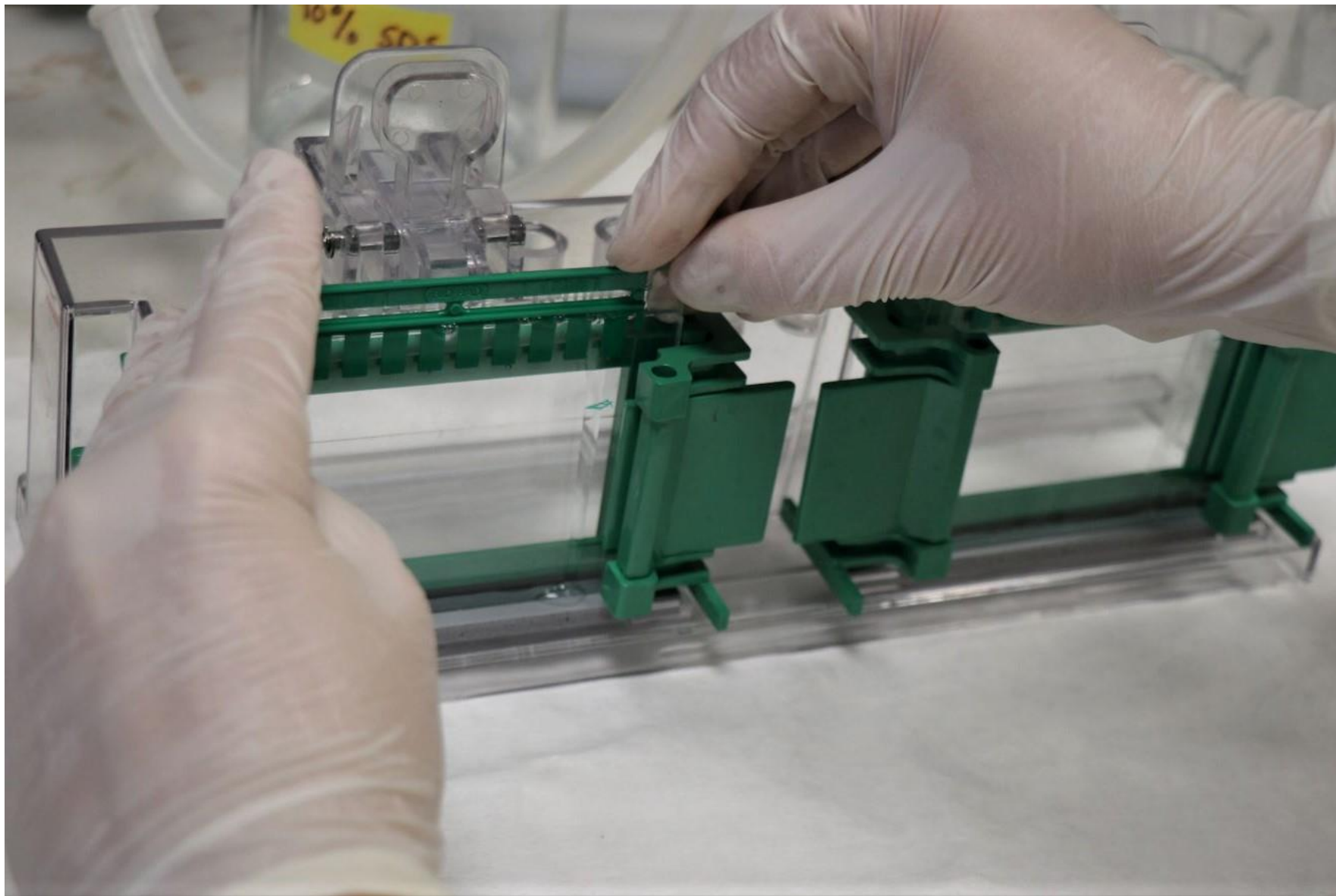
Sestavená elektroforéza se začne plnit rozdělovacím akrylamidovým gelem, který polymerizuje („tvrdne“) v prostředí bez přítomnosti kyslíku. Proto ho po nalití musíme převrstvit isobutanolem a počkat cca 20 minut, než gel ztuhne. V tomto gelu se později proteiny rozdělí podle své velikosti.



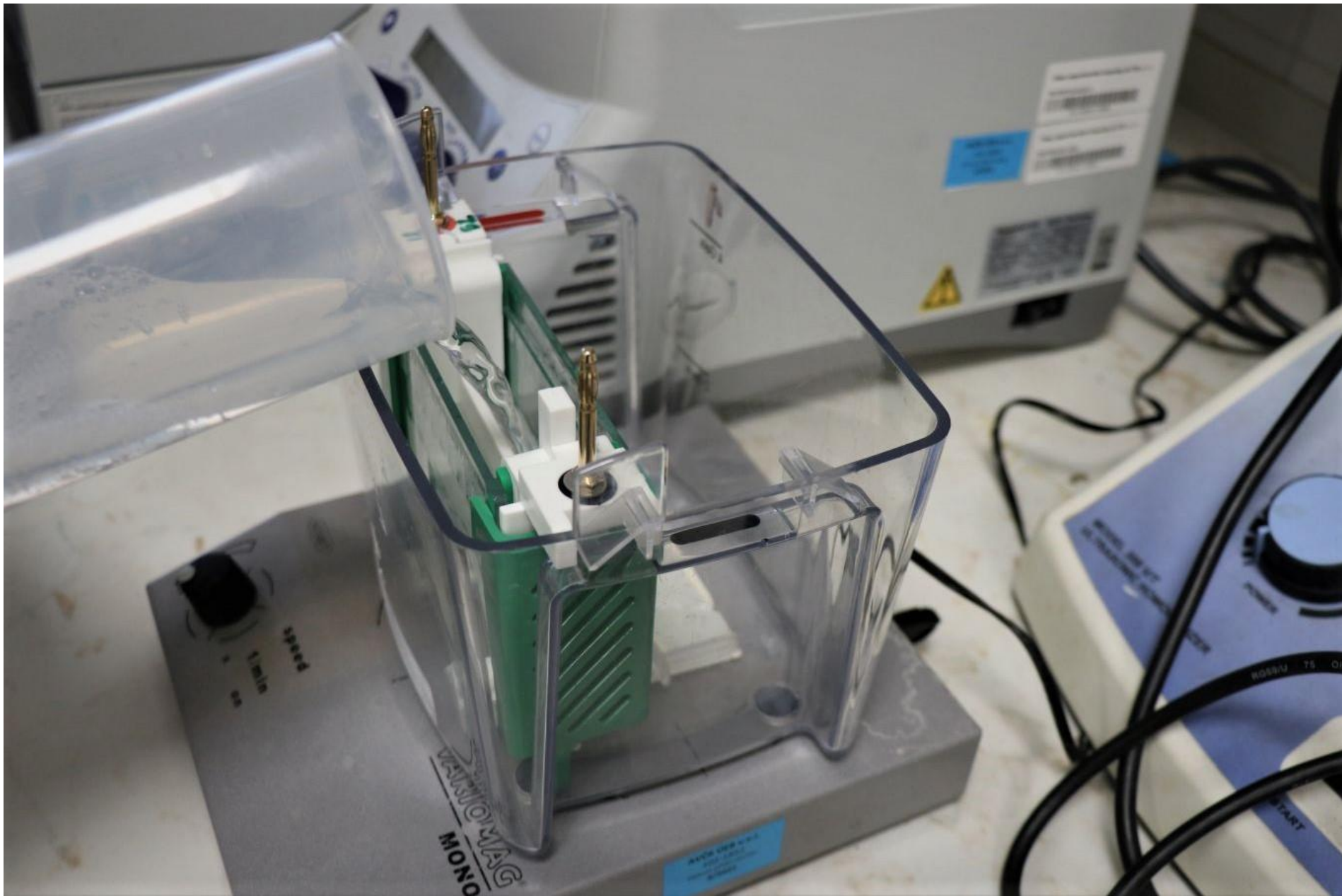
Vzorky proteinů byly získány z pupat rostlin. Nejprve byla poupata mechanicky rozdrčena a pak byly proteiny ze směsi vytaženy pomocí speciálního pufru. Protože rostlina obsahuje hodně zelených barviv, je i výsledný proteinový extrakt zelený. Extrakt se před nanesením na gel musí smíchat s SDS pufrem, který proteiny rozbalí a dodá jim záporný náboj.



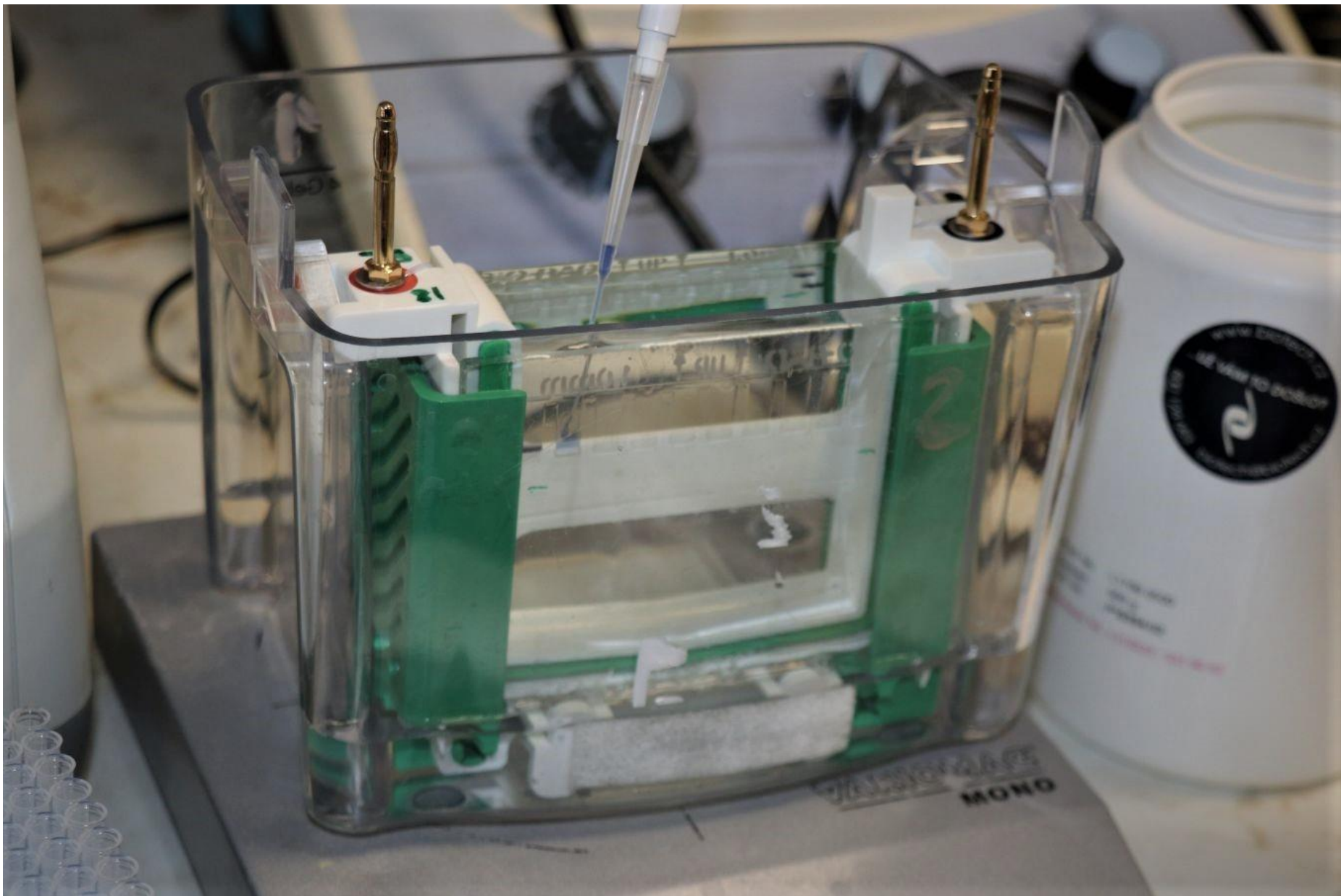
Pomocí jehly se odsaje vrstva isobutanolu, aby se rozdělovací gel mohl převrstvit gelem zaostřovacím.



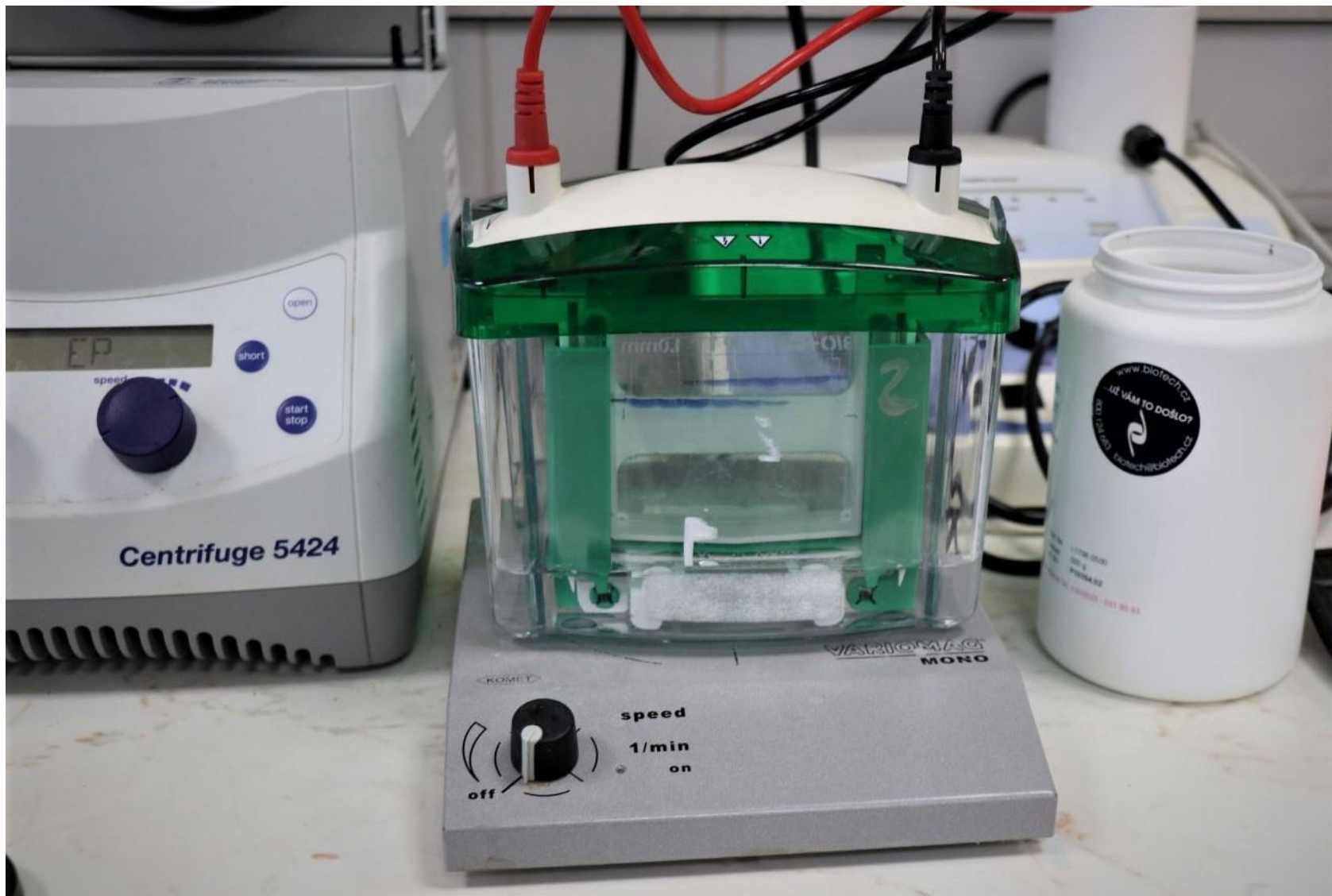
Zaostřovací gel se nanese na „ztuhlou“ vrstvu gelu rozdělovacího a umístí se do něj hřebínek, který vytvoří jamky pro vzorky. Úkolem zaostřovacího gelu je dostat všechny nanesené proteiny na jednu „startovní čáru“, aby se dostaly do rozdělovacího gelu ve stejný okamžik.



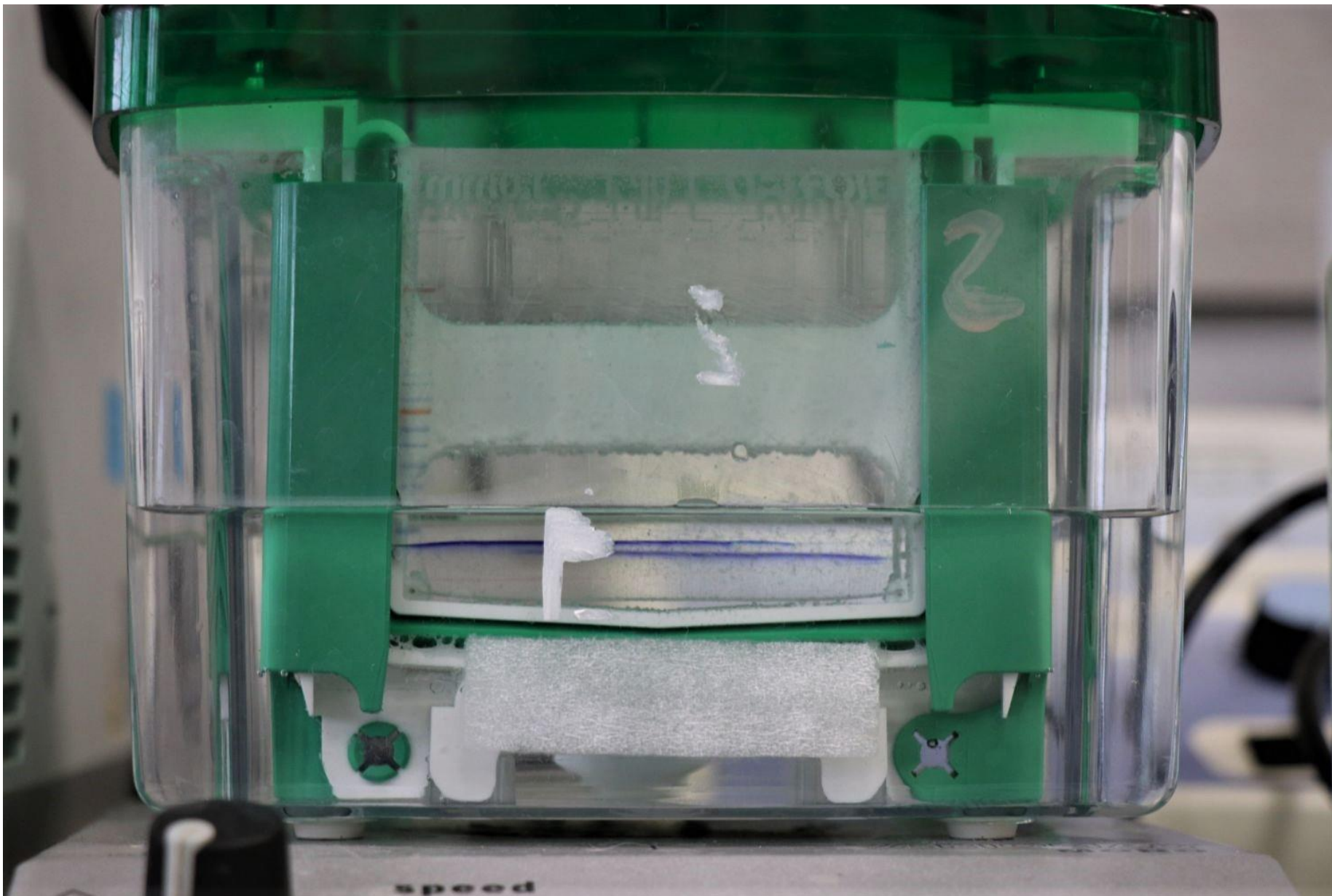
Skříčka s gelem se umístí do elektroforetické vany a zalijí se pufrem (obsahujícím Tris, glycin a SDS), který slouží jako elektrolyt.



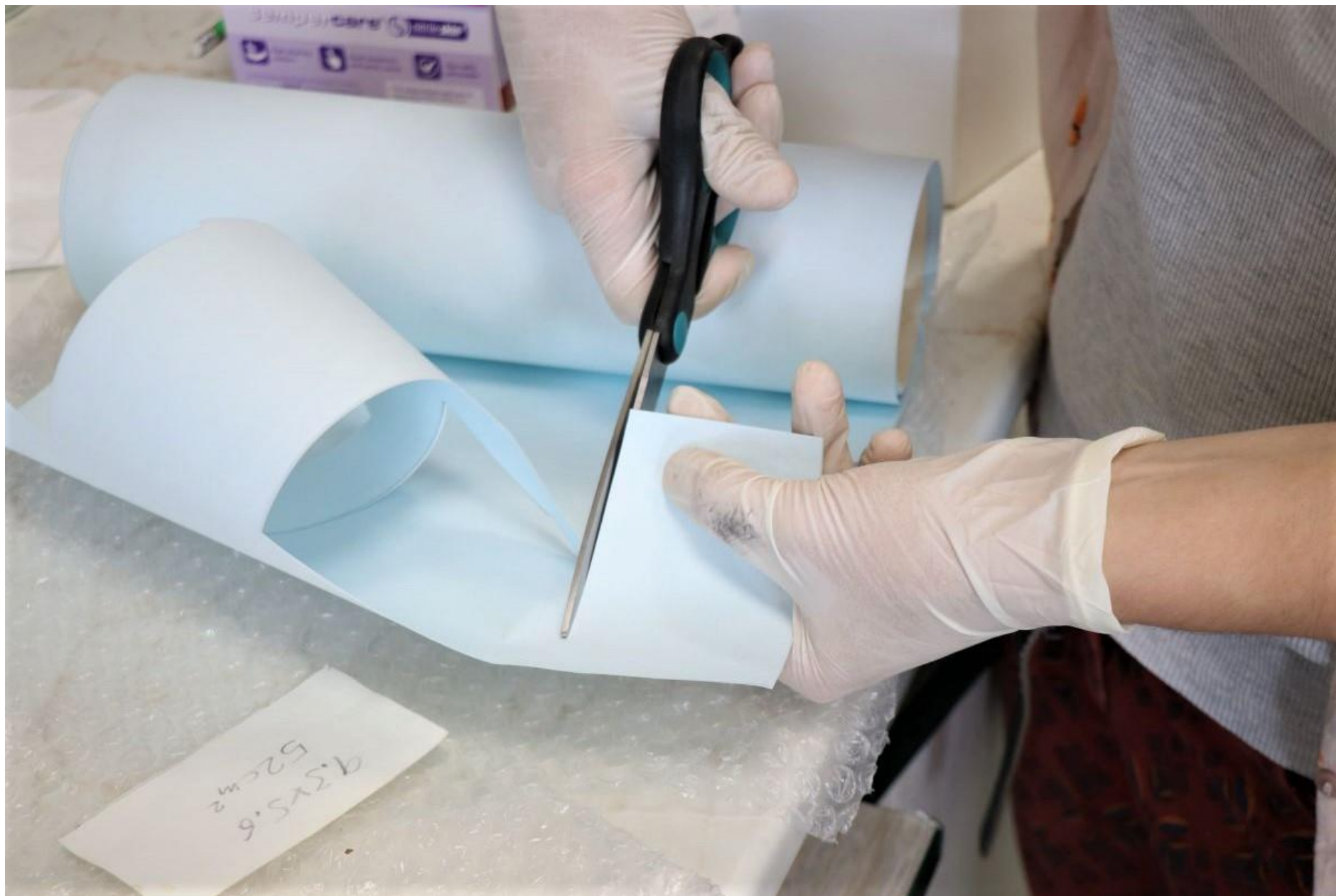
Do jamek se pomocí pipety nanesou připravené vzorky a marker. Ten nám umožní sledovat průběh elektroforézy a také určit velikosti našich izolovaných proteinů.



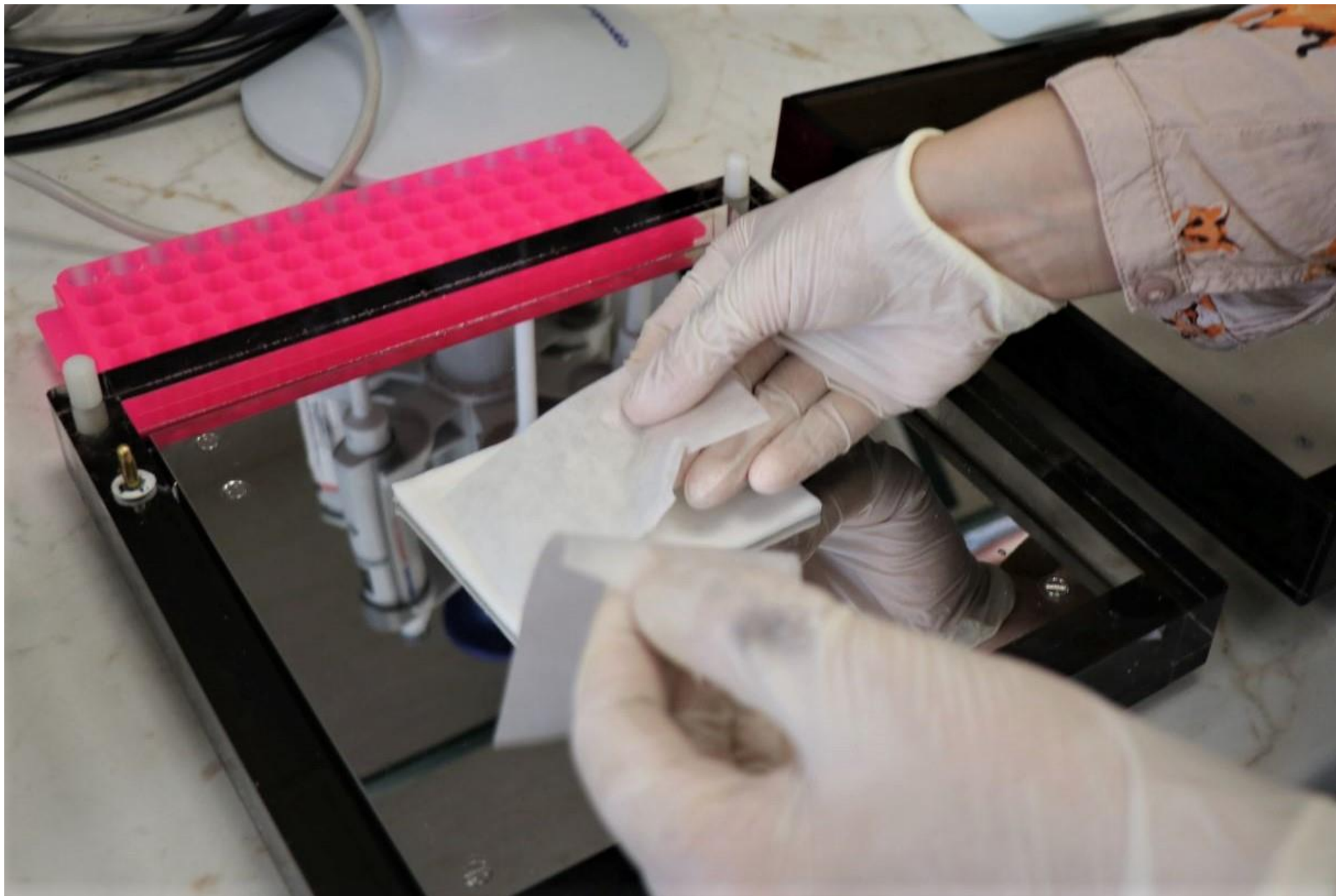
Po nanesení vzorků se elektroforéza zapojí ke zdroji elektrického napětí, díky kterému putují proteiny (záporně nabitě pomocí SDS) směrem dolů (ke kladně nabitě anodě). Nejprve se dostanou na jednu linii v zaostřovacím gelu a pak, na základě své velikosti, se proteiny v rozdělovacím gelu pohybují různě rychle, menší proteiny pronikají v gelu snadněji (dostanou se nejvíce dolů).



Zhruba po hodině se proteiny rozdělí. Na obrázku vlevo na gelu můžete vidět marker, který se rozdělil podle velikostí svých proteinů.



Na snímku je zachycena nitrocelulósová membrána, na ktorou budú pomocí blotovacího zařízení přeneseny proteiny z gelu.



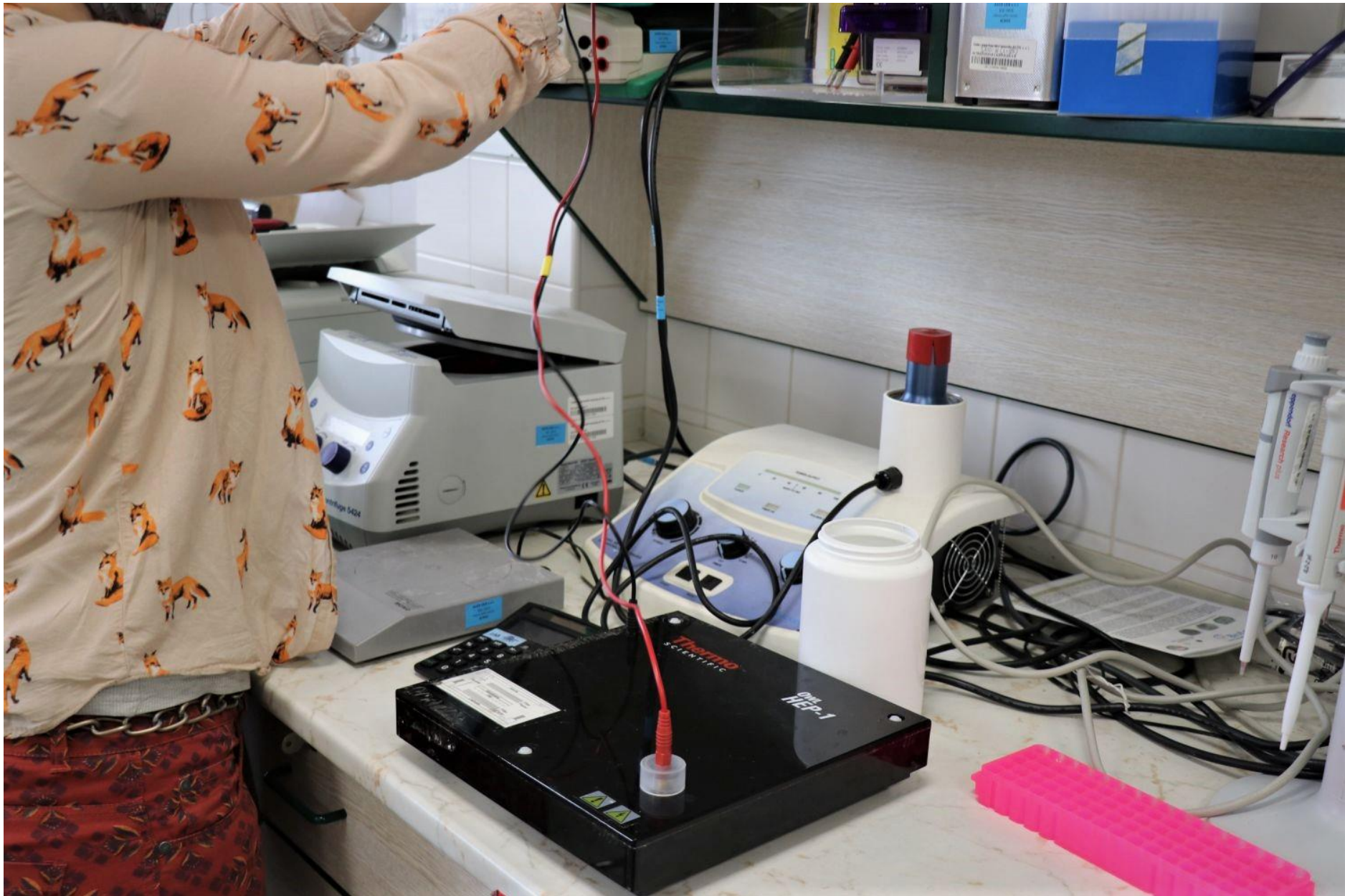
Na snímku je zachycené blotovací zařízení, na které je třeba nejprve naskládat kousky filtračního papíru namočeného v transferovém pufru. Ten je na bázi methanolu, který pomáhá přestupu proteinů na membránu a také brání kroucení gelu.



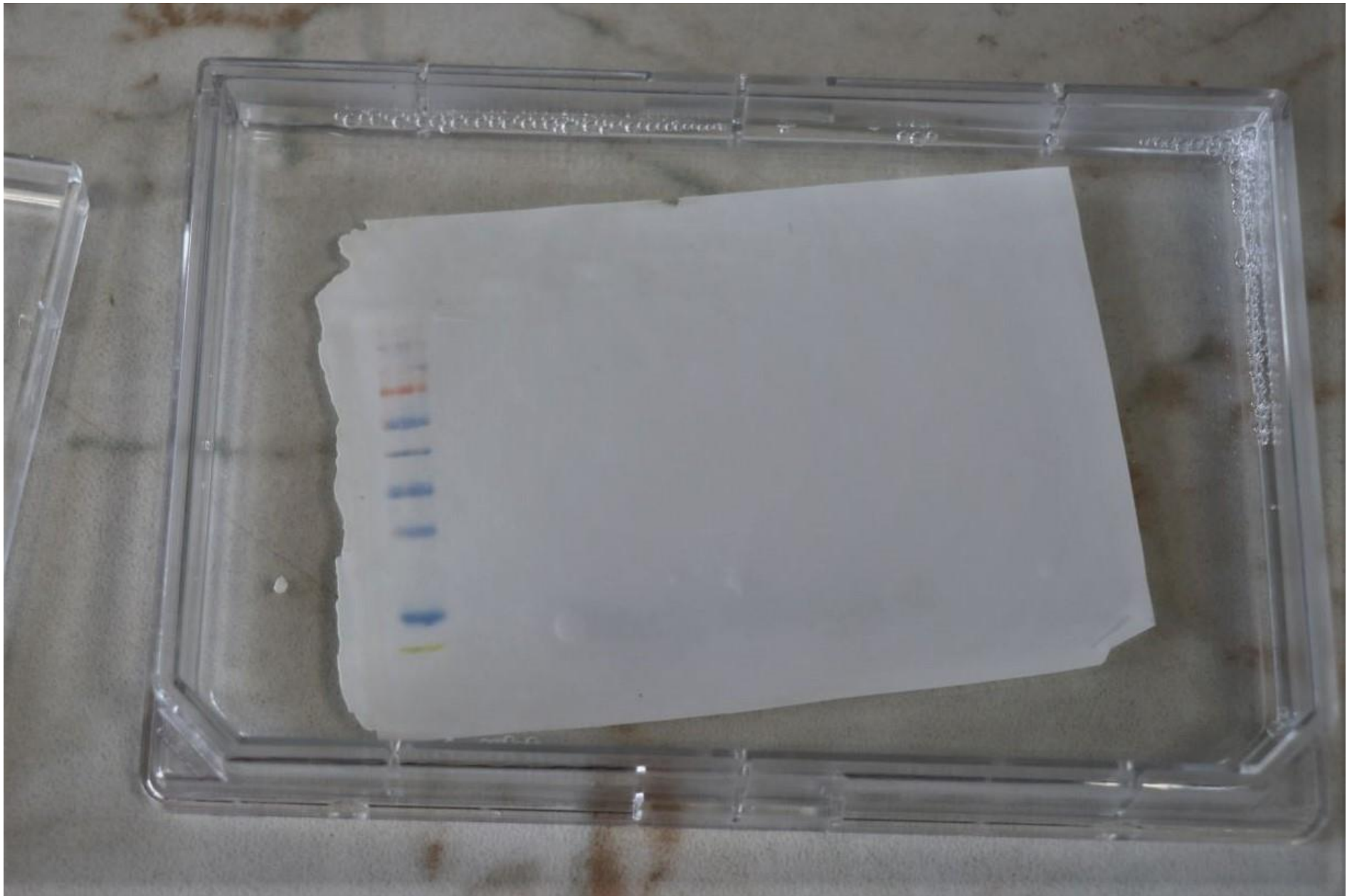
Na namočené filtrační papíry se položí gel se vzorky a membrána.



Nakonec vznikne na blotovacím zařízení „sendvič“, kde uprostřed je gel s membránou a na krajích jsou namočené filtrační papíry.



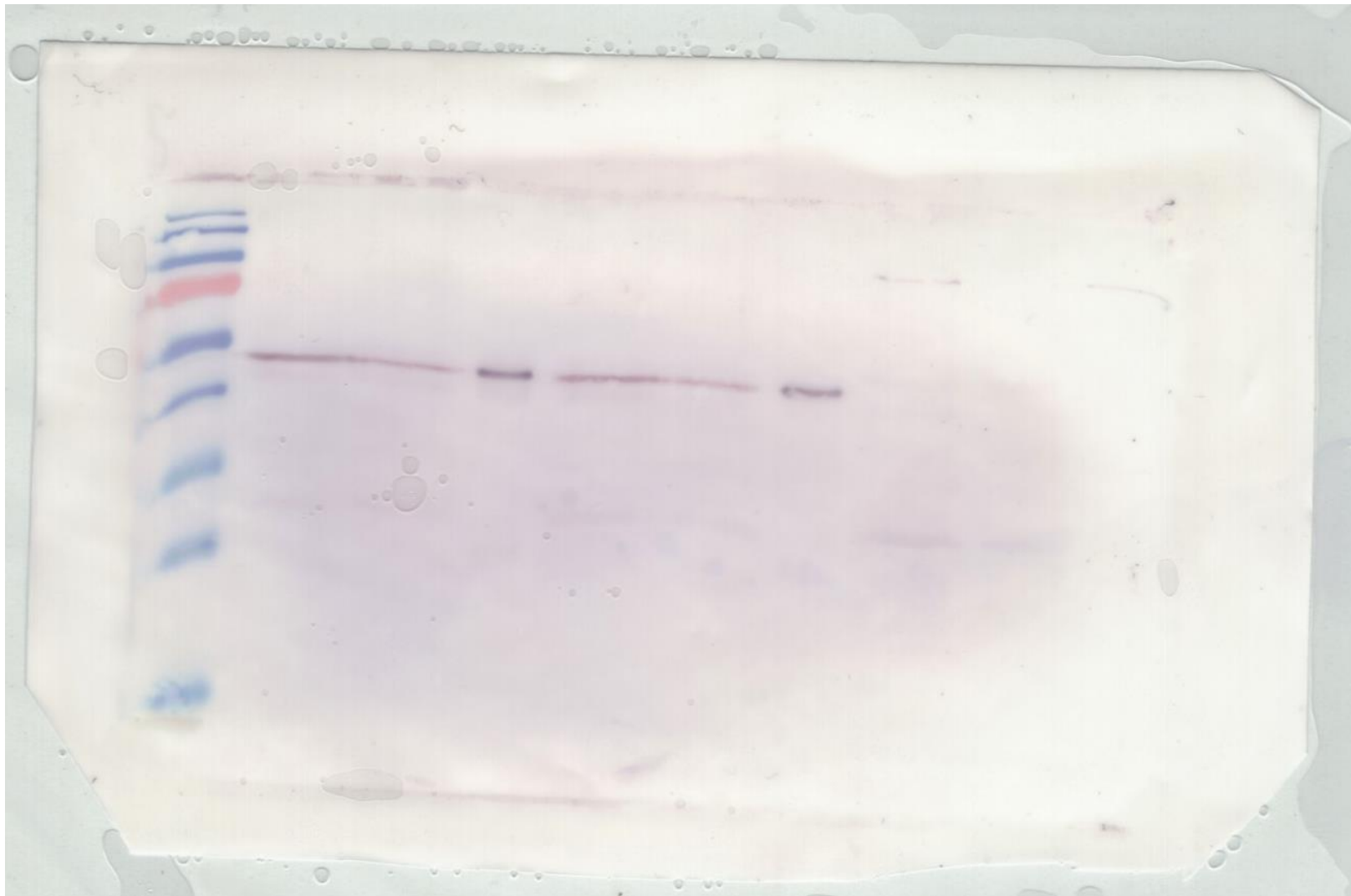
Blotovací zařízení se zapojí a pomocí elektrického proudu dojde k přenosu proteinů z gelu na membránu.



Membrána, na kterou byly úspěšně přeneseny proteiny i marker z gelu. Marker opět vidíte vlevo.



Nakonec je třeba detekovat vybraný protein pomocí specifické protilátky. Aby se zabránilo nespecifickému vázání protilátky, zalévá se nejprve membrána odtučněným mlékem, které také obsahuje proteiny (především kasein). Mléko se naváže na všechna nespecifická místa a tím je zablokuje. Poté se protilátka váže specificky na protein, který má rozpoznávat.



Navázaná protilátka na zkoumaném proteinu se detekuje několika způsoby. V našem případě jsme použili chemickou reakci, po které se protilátka navázaná na protein zbarví do tmavě modré/hnědé. Tenký proužek tedy dokazuje přítomnost našeho vybraného proteinu v poupatech experimentálních rostlin. Když ho porovnáme s proteinovým markerem, zjistíme, že jeho velikost je cca 55 kDa. Touto metodou dokážeme detekovat jakýkoliv protein nejen z rostlinných pletiv, ale třeba i z lidských tkání.