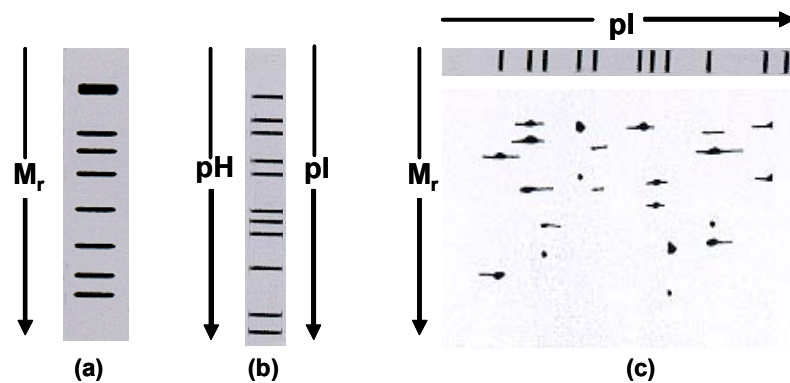
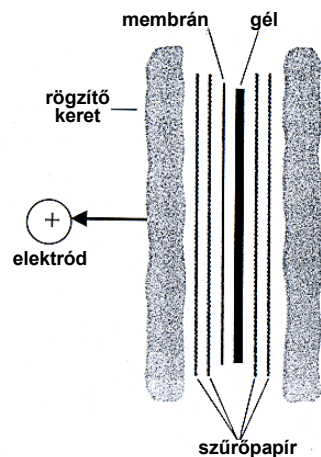


Immunoblot: fehérjék blottolása (Western blot) és kimutatása antitestekkel

Az immunoblot eljárások a fehérjék gélelektroforézissel történő elválasztásának hatékonyságát az immunazonosítás érzékenységével egyesítik. Az immunoblot az antigén számos jellemzőjének meghatározását lehetővé teszi, pl. alkalmas az antigén jelenlétének igazolására, mennyiségi meghatározására, relatív molekulatömegének és a sejtől történő extrakció hatékonyságának megállapítására. Az utóbbi immunoblot vizsgálatok különösen jelentősek azokban az esetekben, amikor az antigén rosszul oldódik, könnyen degradálódik, jelölése nehéz, ezért immunprecipitációval nehezen izolálható. Az immunoblot az immunkicsapással is kombinálható, ami viszonylag kis koncentrációban előforduló antigének kimutatását, ill. az antigének közötti kölcsönhatások (fehérje-fehérje kölcsönhatások) vizsgálatát is lehetővé teszi. Az immunoblot szintén alkalmas arra, hogy különböző mintákban lévő poliklonális antiszérumokban vizsgáljuk az antitestek jelenlétét, mennyiségét és specificitását, valamint az antitestek szérumból való affinitás tisztítását is lehetővé teszi. Az immunoblot kísérleti lépései a következők: (1) az antigént tartalmazó minta előkészítése: teljesen vagy részlegesen tisztított fehérje preparátum, gyakran azonban az antigént sejt- vagy szövetkivonat tartalmazza, ezeket az antigént tartalmazó mintákat a gél-elektroforézishez használt minta pufferben oldva forralással denaturálják; (2) a mintában lévő fehérjék elválasztása történhet SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel, izoelektromos fókuszálással, vagy az előbbi két eljárás kombinálásával, kétdimenziós gélelektroforézissel;



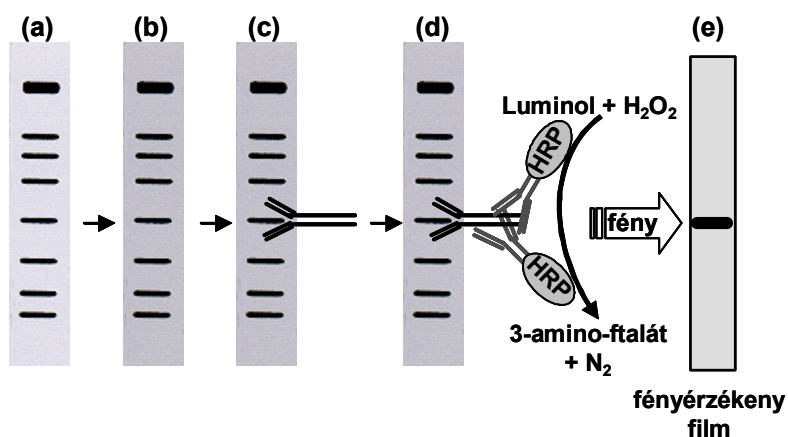
Fehérjék elválasztása immunoblothoz (Western blot): (a) a fehérjék molekulatömege (M_r) szerint SDS-poliakrilamid gél-elektroforézissel; (b) a fehérjék izoelektromos pontja (pI) szerint pH grádiens mentén; (c) izoelektromos pont szerint az első dimenzióban, majd molekulatömeg szerint a második dimenzióban, kétdimenziós gél-elektroforézissel történik;



A blottoló berendezés sémája

(3) az elválasztott fehérjék átvitele a gélről membránra (nitrocellulóz vagy polivinildifluorid alapú): ez általában a gél és a membrán direkt érintkezésével az alábbi ábrán látható transzferáló berendezésben történik, amelyet pufferbe merítve a fehérjék membránra való átjutása elektromos térerő hatására

(4) a membrán nem-specifikus kötőhelyeinek telítése indifferens fehérjével (pl. száraz turista tejpor, marhaszérum albumin) a membrán további fehérjékkel történő nem-specifikus kapcsolatának elkerülésére; (5) antitesttel történő felülretegzés, amelynek során kialakulhatnak specifikus antigén-antitest komplexek; (6) az antigén-antitest komplexek kimutatása: ez általában enzimmel jelzett második antitesttel történik, ami kemilumineszcenciát (ezért röntgenfilmen rögzíthető) vagy színváltozást (csapadékot) hoz létre az antigén-antitest komplex kialakulásának a helyén.



Az antigén-antitest kölcsönhatás kimutatása Western blottal: (a) az antigént is tartalmazó, elválasztott fehérje keverék a membránon; (b) membrán a szabad kötőhelyek inert fehérjével történő blokkolása után; (c) az antigén-antitest komplex képződése a membránon a primer antitesttel; (d) a primer antitest kötődésének kimutatása torna peroxidázzal kapcsolt szekunder antitesttel; (e) az antigén-antitest kölcsönhatás helyének lokalizációja fényérzékeny filmen a peroxidáz által katalizált reakcióban kialakuló kemilumineszcencia segítségével

Az immunoblot eljárás sikere függ az antitest antigént felismerő képességétől is. A nagy felbontású gél-elektroforézis során az antigén denaturálódhat, ezért csak az antigén denaturáció rezisztens epitópjai képesek kölcsönhatásba lépni az antitesttel. A legtöbb poliklonális antiszérumban megtalálhatók olyan antitestek, amelyek képesek a fenti keresztreakciókra, azonban előfordulhat, hogy monoklonális antitestek esetén nem minden esetben kapunk keresztreakciót.

Az immunoblot kimutatási érzékenysége a detektálási eljárás függvénye, a legtöbb módszer esetén ez a határ kb. 20 femtomol antigén mennyiség. Például egy 50 000 dalton molekulatömegű fehérjére ez megközelítőleg 1 ng fehérje mennyiséget jelent. Mivel a gélekre felvihető fehérje mennyiség általában behatárolt, az antigén nem detektálható, ha a mennyisége 1 ng alatt van.