

Cvičení č. 1: Imunochemická detekce proteinu p53 na nitrocelulosevé membráně (dot blot)

Úvod

Protein **p53** je kódován genem *TP53* a hraje roli především jako **nádorový supresor (antionkogen)**. Díky své funkci transkripčního faktoru reguluje expresi mnoha cílových genů, zodpovědných za růst buněk a apoptózu, tím že se sekvencně specificky váže na DNA. V normálním stavu buňky se vyskytuje v malé špatně detekovatelné míře. Více než 50% tumorů je asociováno s mutací v genu *TP53*. Vzniká mutantní protein, onkogen, který je naopak v buňce akumulován a dobře pomocí protilátek detekován.

Dot blot je zjednodušenou alternativou k western blotu a slouží pro detekci a identifikaci proteinů. Na rozdíl od western blotu nedochází k elektroforetické separaci, nelze tedy určit velikost cílového proteinu, můžeme však přítomnost daného proteinu potvrdit – v našem případě p53. Kapka vzorku je nanášena přímo na nitrocelulosevou membránu, kde je následně protein zájmu imunochemicky detekován.

Princip metody

Principem imunochemické detekce je využití reakce **antigen-protilátka**. **Antigeny** jsou látky, které organismus rozpoznává jako cizorodé. Jejich přítomnost stimuluje tvorbu protilátek. Každý antigen obsahuje antigenní determinanty (**epitopy**) tvořené 5-8 aminokyselinami. Schopnost protilátek rozlišovat i malé rozdíly epitopů je základem specifity imunitních reakcí.

Protilátky patří mezi **imunoglobuliny** a jsou produkovány jako součást imunitní odpovědi. Rozlišujeme několik tříd - IgG, IgM, IgA, IgE a IgD. Protilátky jsou charakterizovány **afinitou** – síla vazby protilátky s jednou vazebnou determinantou antigenu, **aviditou** – síla vazby mezi protilátkou a celou molekulou antigenu (většina antigenů je multivalentních, tzn. má více vazebných determinant pro různé protilátky) a **specifitou** – protilátky jeví minimální interferenci s látkami, pro které není protilátka určena. Protilátky mohou být polyklonální či monoklonální.

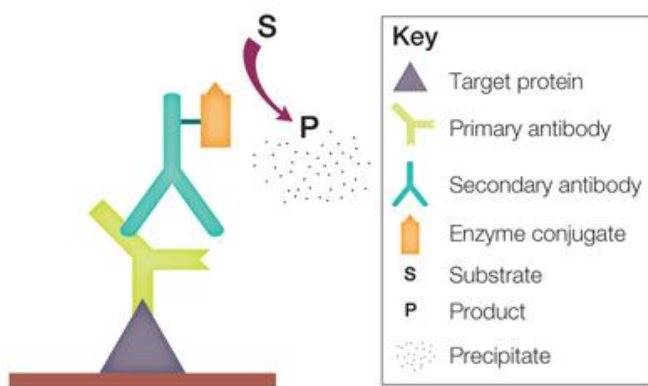
Polyklonální protilátky se připravují imunizací zvířat, kdy se zvířeti aplikuje příslušný antigen. V době imunizace (2-6 měsíců) se v krevním séru tvoří protilátky proti různým antigenním determinantám antigenu. Polyklonální protilátka může obecně reagovat s **několika antigenními determinantami**. Výhodou je vyšší citlivost a avidita. Nevýhodou je individuální imunitní odpověď a tedy i nereprodukovatelnost.

Monoklonální protilátky nejsou produkovány organismem, ale buněčnou kulturou. Myš je imunizována antigenem, následně se ze sleziny získají lymfocyty produkující protilátky. Jejich hybridizací s myelomovými buňkami dojde k fúzi obou typů buněk. Klonováním lze vybrat buňky, které produkují protilátky proti konkrétní antigenní determinantě antigenu. Takto syntetizovaná protilátka obsahuje jediný typ vazebného místa, a tedy rozeznává **jedinou antigenní determinantu**. Monoklonální protilátky se vyznačují vyšší čistotou a specifitou, jsou reprodukovatelné, mají však nižší afinitu.

Povrch nitrocelulózové membrány váže proteiny, proto je třeba po nanesení vzorku membránu **zablokovat**. Membrána se ponoří do roztoku levného proteinu, např. BSA či odtučněného sušeného mléka v PBS s přidavkem detergentu pro snížení šumu pozadí. Proteiny BSA či mléčný

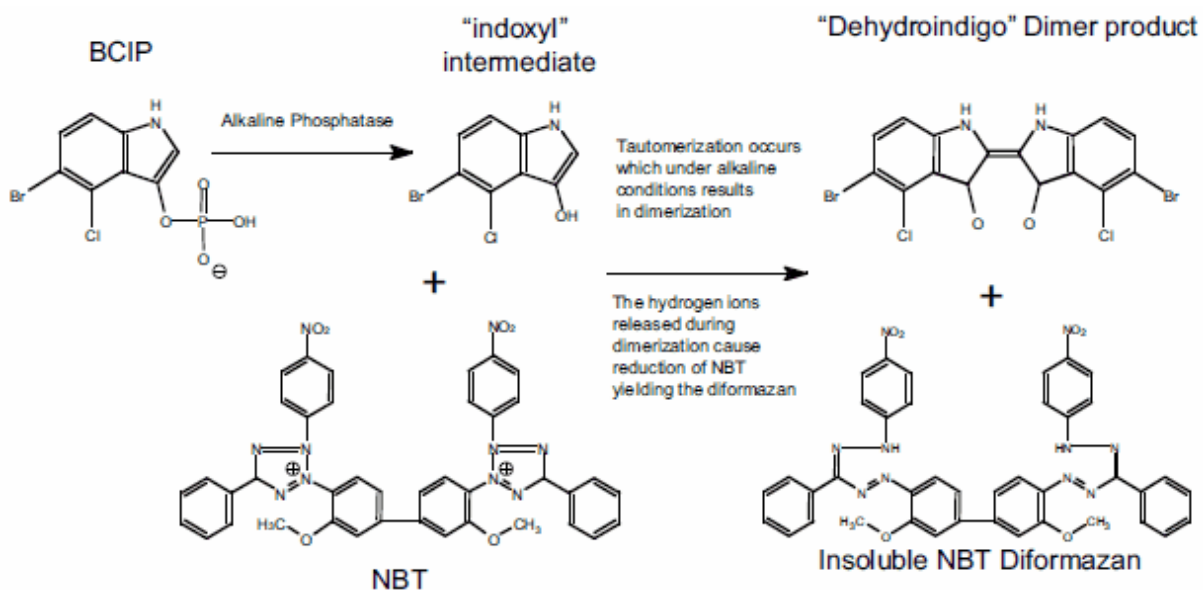
kasein se naváží na všechna místa, kam se dosud nenavázaly proteiny z našeho vzorku. Po přidání protilátky tedy nemůže dojít k její nespecifické vazbě na povrch membrány, nýbrž musí specificky hledat svůj epitop na antigenech vzorku.

Pro detekci cílového proteinu je nutné použití specifické **primární protilátky** proti tomuto proteinu a **sekundární protilátky konjugované s reportérovým enzymem**. V našem případě je primární protilátkou DO1 (aa 20-25), která specificky rozpoznává N-konec přirozené i mutantní formy proteinu p53, oblast mezi 20-25 aminokyselinou. Jedná se o **myší monoklonální protilátku** třídy IgG. Sekundární protilátka je produkována imunizací pomocí antigenů z daného organismu. Imunizace probíhá v jiném druhu hostitelského organismu, než u primární protilátky. V našem případě byla protilátka DO1 produkována myší, proto **sekundární polyklonální protilátka** (anti-mouse IgG) byla produkována kozou, které byla injikována primární protilátka. Sekundární protilátka se tedy váže na primární protilátku a je konjugována s reportérovým enzymem umožňujícím detekci, v našem případě **alkalickou fosfatázou a /nebo křenovou peroxidázou**.



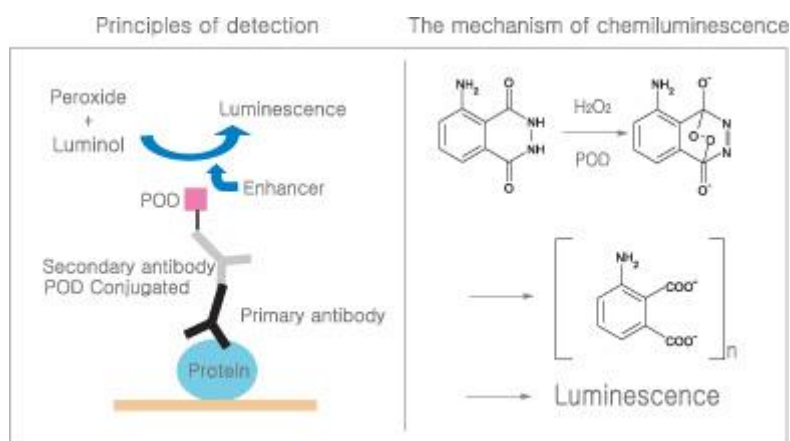
Obr. 1: Princip imunochemické detekce proteinu

A) Pro **kolorimetrickou detekci** molekul značených **alkalickou fosfatázou** se běžně používá 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát (BCIP) a nitro blue tetrazolium (NBT). Jsou-li tyto látky inkubovány s alkalickou fosfatázou, dochází k tvorbě nerozpustného **diformazanu NBT**, který se projeví fialovým zbarvením.



Obr. 2: Reakce BCIP/NBT

B) Chemiluminescence za použití protilátky značené křenovou peroxidázou



Obr. 2: Reakce ECL- POD (peroxidáza, HRP)

Pracovní postup s primární a sekundární protilátkou

1. Pracujte ve dvojici, na kousek nitrocelulóзовé membrány naneste pipetou **1μl vašeho vzorku** proteinu o různé koncentraci (1x, 100x a 1000x zředěný). Ředění vzorku 10x a 100x připravte v PBS. Membrány je třeba dotýkat se co nejméně. Membránu popište obyčejnou tužkou.
2. Membránu vložte do 2 ml plastové zkumavky (ependorfky) a přelijte 1-2 ml 5% PBS mléka. Inkubujte na termobločku 30 min.
3. Do mléka přidejte 1 μl primární protilátky a inkubujte na třepačce alespoň 30 min.
4. Mléko s protilátkou slijte do falkonky a přelijte membránu promývacím pufr 1x PBST. Po 5-ti min pufr vylijte a promytí po 5-ti min ještě 2x zopakujte.

5. Membránu přelijte 5-ti ml mléka a přidejte **2 μl sekundární protilátky anti-mouse IgG konjugovanou s alkalickou fosfatázou**. Inkubujte 30 min.
6. Zopakujte promývací krok 4.
7. Kolorimetrická detekce pro 1 ml substrátového pufru přidejte 3,3 μl BCIP a 33,0 μl NBT. Membránu v roztoku inkubujte asi 10 min, dokud nepozorujete fialové zbarvení.
8. Vylijte roztok BCIP/NBT. Reakci zastavíte opláchnutím membrány v destilované vodě.

5. Membránu přelijte 5-ti ml mléka a přidejte **2 μl sekundární protilátky anti-mouse IgG konjugovanou s křenovou peroxidázou**. Inkubujte 30 min.
6. Zopakujte promývací krok 4.
7. Pro detekci chemiluminescence umístěte membránky na eurofolii, pokryjte směsí roztoku 1+2 (100ul 1 + 100ul 2), detekujeme chemiluminescenci .

Použité chemikálie

5% PBS mléko – 5% sušeného mléka v 1% PBS

BCIP – vodný roztok 50 mg/ml

NBT – vodný roztok 10mg/ml

Substrátový pufr – 0,1 M Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5

Vyhodnocení

Otázky:

Co je to SDS-PAGE, western blot, dotblot, epitop, avidita, afinita, funkce mléka.....

Příklad:

Protein p53 (1-393 aa) se vyskytuje v buňce v několika variantách: p53A (1-363 aa), p53B (45-345 aa), která z protilátek rozpozná všechny varianty:

Seznam protilátek DO1 (20-25 aa), DO11 (120-135 aa), Pab421 (363-393 aa).

Protokol:

Název metody

Princip stanovení

Nákres obrázku

Odpovědi na otázky

Reakce katalyzované enzymy