



Методы Саузерн-, Вестрн- и Нозерн- блоттинга.

Спецпрактикум по биохимической генетике - Лекция 10
Старший преподаватель: PhD, Сmekенов Изат Темиргалиевич
Кафедра молекулярной биологии и генетики



ЦЕЛЬ ЛЕКЦИИ

Познакомиться с методами Саузерн-, Нозерн- и Вестерн-блоттинга для анализа нуклеиновых кислот и белков.

Задачи

- ✓ Описать принципы Саузерн-блоттинга и его применение для выявления специфических последовательностей ДНК.
- ✓ Рассмотреть метод Нозерн-блоттинга для анализа РНК и оценивания экспрессии генов.
- ✓ Объяснить Вестерн-блоттинг как метод для выявления и анализа белков в образцах.
- ✓ Сравнить основные этапы и особенности этих методов для понимания их специфики и возможных областей применения.

Ключевые термины

Саузерн-блоттинг, Нозерн-блоттинг, Вестерн-блоттинг, ДНК-анализ, РНК-анализ, белок, гибридизация, Электрофорез, Перенос на мембрану, Обнаружение белков, Антитела, Экспрессия белков, Модификации белков.

1) Western blot

- ✓ Метод для обнаружения специфических белков в образце.
- ✓ Использует электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) для разделения белков по размеру.
- ✓ Белки переносятся на нитроцеллюлозную или PVDF мембрану.
- ✓ Мембрана инкубируется с антителами, специфичными к целевому белку.
- ✓ Сигнал детектируется с помощью ферментативных или флуоресцентных меток.
- ✓ Позволяет оценить наличие, количество и размер белка.

2) Southern blot

- ✓ Метод для обнаружения определённых последовательностей ДНК.
- ✓ ДНК расщепляется рестриктазами и разделяется по электрофорезу в агарозном геле.
- ✓ Фрагменты ДНК переносятся на нитроцеллюлозную или нейлоновую мембрану.
- ✓ Мембрана гибридизуется с молекулой зонда ДНК, комплементарной интересующему фрагменту.
- ✓ Позволяет определить наличие, количество и размер генетических последовательностей.

3) Northern blot

- ✓ Метод для обнаружения определённых РНК.
- ✓ РНК разделяется по размеру с помощью электрофореза в агарозном геле (обычно с денатурирующими агентами).
- ✓ РНК переносится на мембрану и гибридизуется с комплементарным ДНК или РНК зондом.
- ✓ Позволяет изучать уровень экспрессии генов и размер транскриптов.



ОСНОВНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какой тип молекул выявляет каждый блоттинг (ДНК, РНК, белок)?
2. Какие методы разделения применяются для каждой техники?
3. Какие типы зондов или антител используются для детекции?
4. Как осуществляется перенос молекул с геля на мембрану?
5. Какие преимущества и ограничения есть у каждого метода?
6. Как можно количественно оценить результаты блоттинга?
7. Чем отличаются цели Southern и Northern блоттинга от Western blot?

БЛОТТИНГ

- Блоттинг используется в молекулярной биологии для идентификации **белков** и **нуклеиновых кислот** и широко используется в диагностических целях.
- Этот метод иммобилизует интересующую молекулу на подложке, которая представляет собой **нитроцеллюлозную мембрану, PVDF (Поливинилиденфторид)** или **нейлон**.
- . Метод блоттинга представляет собой инструмент, используемый для идентификации биомолекул на разных стадиях экспрессии генов:
 - ДНК (Саузерн)
 - мРНК (Нозерн)
 - Белок (Вестерн)



- Саузерн-блоттинг был назван в честь **Эдварда М. Саузерна**, который разработал эту процедуру в Эдинбургском университете в 1970-х годах, а был введен в 1975 году как метод обнаружения специфических последовательностей ДНК в образцах ДНК.
- В случае ДНК и РНК обнаружение специфических последовательностей в мембране осуществляется путем гибридизации с мечеными нуклеиновой кислотой зондами, которые в случае белков заменяются использованием меченых зондов антител.
- Учитывая вредное воздействие радиоактивности (радиоактивные зонды), были разработаны другие виды систем маркировки, которые включают флуоресцентные и хемилюминесцентные реагенты.

Вестерн-блоттинг был разработан в лаборатории Джорджа Старка (Стенфорд, Великобритания)

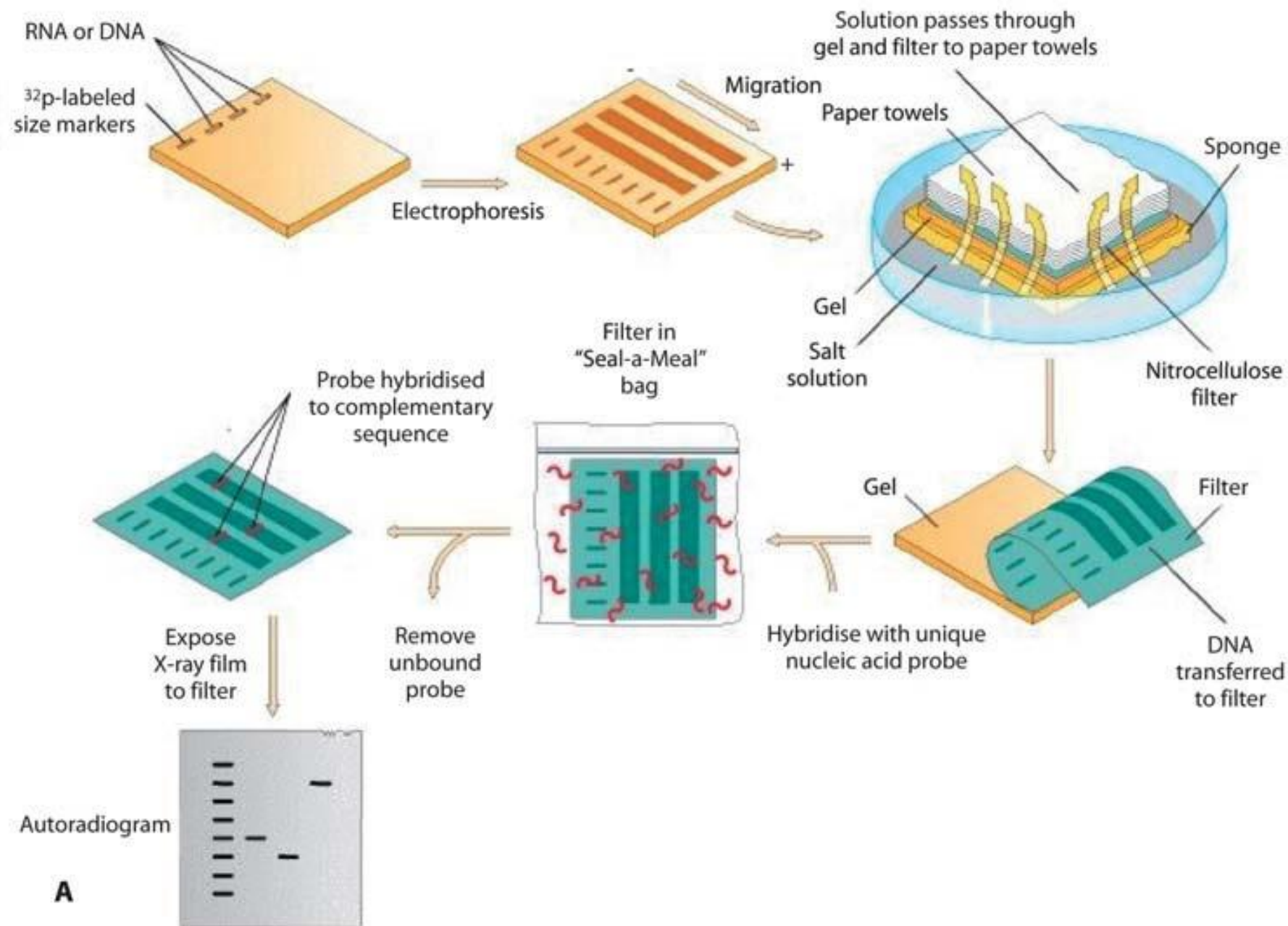
Western Blotting — метод определения белков

Саузерн блоттинг-методики определения ДНК, разработанной ранее Эдвином Саузерном (*Southern blotting*).

Аналогичный метод определения РНК называется Нозерн Блоттинг (*Nothern blotting*).

Детекция посттрансляционных модификаций белков называется Истерн Блоттингом (*Eastern blotting*).

На этой диаграмме показаны основные этапы Саузерн-блоттинга.



Общий порядок блоттинга

1. Гомогенизация образца.
2. Переваривают ДНК с помощью ферментов рестрикции на фрагменты, что не требуется для РНК (Нозерн-блоттинг).
3. Разделение представляющей интерес молекулы с помощью мембраны для электрофореза, как правило, на агарозном геле для фрагментов ДНК. В случае образцов РНК они могут быть разделены на агарозном геле в присутствии формальдегида в качестве денатурирующего агента. Это необходимо, поскольку формальдегид ограничивает вторичные структуры молекул РНК.
4. Перенос молекул (фрагментов ДНК / РНК) на нитроцеллюлозную / нейлоновую мембрану из геля.
5. Предварительная гибридизация (блокирование): промывание нейлоновой мембраны прегибридирующим или блокирующим раствором, содержащим ДНК спермы лосося, необходимо для того, чтобы блокировать неспецифические взаимодействия ДНК, а также это помогает снизить фоновый шум.
6. Для приготовления зонда готовят свежую пробу ДНК, меченную ^{32}P альфа-меченым dCTP.
7. Гибридизация или идентификация молекулы, которая достигается путем инкубации блота со специфическим меченым зондом.
8. Для обнаружения зонда и представляющей интерес последовательности ДНК / РНК пленку подвергают воздействию.

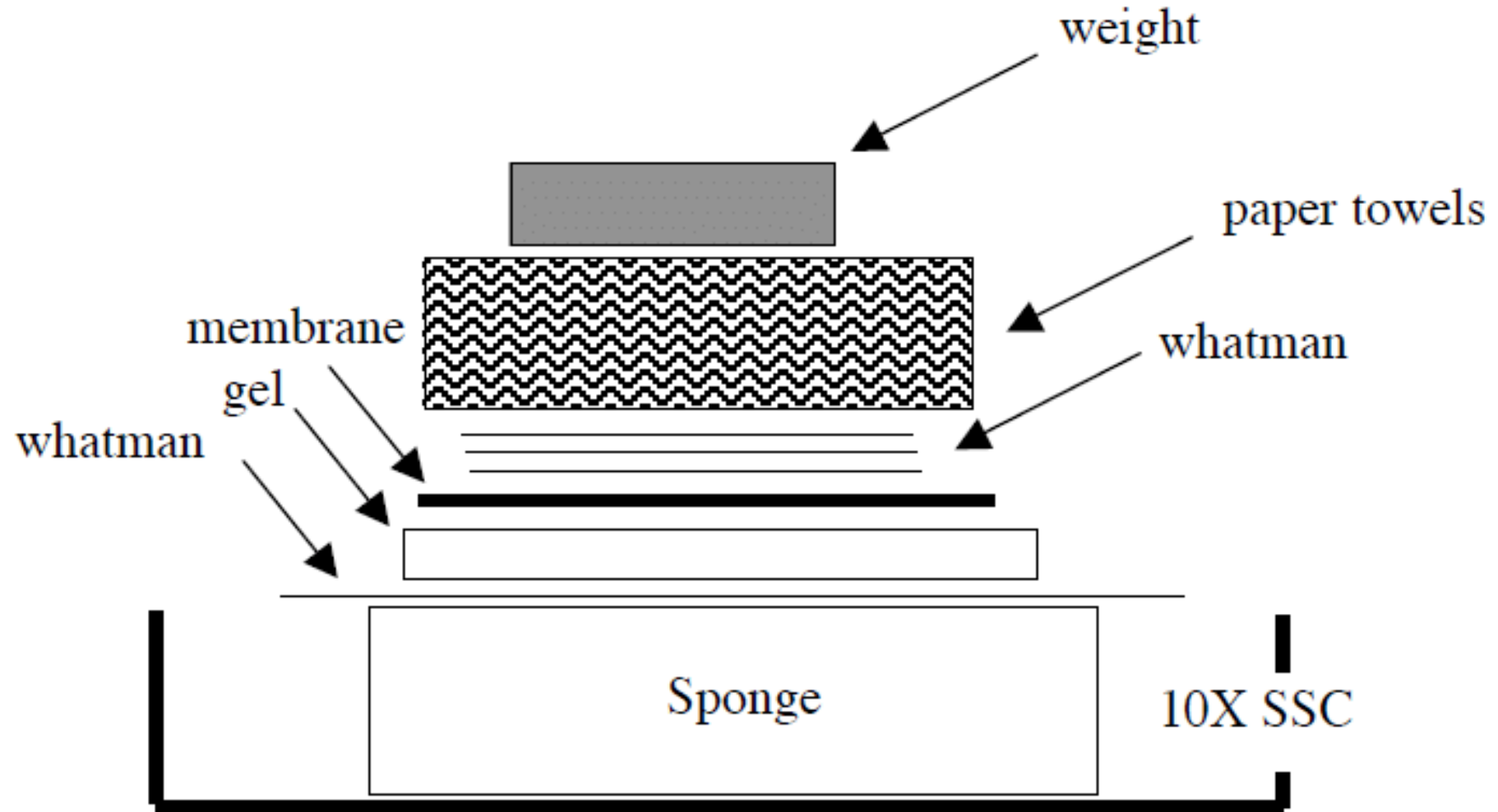
Необходимые материалы Реактивы

- Используемый буфер для электрофореза представляет собой ТАЕ, который имеет состав 40 мМ Трис, 20 мМ уксусной кислоты, 1 мМ ЭДТА с диапазоном pH 7,4–8,2, который обычно получают в виде исходной концентрации 20X или ТВЕ, состоящей из 89 мМ Трис, 2,5 мМ. ЭДТА, 89 мМ борат, обычно изготавливаемый как 10-кратный запас).
- **ТАЕ** рекомендуется быть лучшим, когда мы применяем гели в течение более короткого промежутка времени, и когда необходимо выполнить восстановление фрагментов ДНК из геля.
- **ТВЕ** считается лучшим буфером, особенно когда мы должны использовать гели в течение периода времени, превышающего 2 часа.

Процедура

- Шаг 1: очистка ДНК
- Шаг 2: Фрагментация
- Шаг 3: гель-электрофорез
- Шаг 4: денатурация
- ДНК, полученная таким образом, является двухцепочечной по своей природе. Для нашей цели гибридизации зонда нам нужна одноцепочечная ДНК. Таким образом, ДНК денатурируется в щелочном растворе. Это приводит к образованию денатурированной ДНК.
- Шаг 5: блоттинг
- Блоттинг - это перенос фрагментированной последовательности ДНК на нитроцеллюлозную или нейлоновую мембрану. Процесс осуществляется с помощью электроблоттинга или капиллярного блоттинга.
- На следующем этапе после фореа, гель полностью денатурируется путем погружения его на 15–30 мин в присутствии 1,5 М NaCl, 0,5 М NaOH в лоток, который помещается на качающуюся платформу.
- Вышеупомянутый раствор затем заменяют 0,5 М Трис HCl (pH 7) и 3 М NaCl. Затем его инкубировали в течение 15-30 минут, что приводит к нейтрализации геля. **(2X и 20X SSC (состав 20X SSC включает 3,0 М NaCl и 0,3 М цитрата натрия)**
- Далее после сборки конструкции начинается процесс переноса в течение приблизительно 3 ч.

Сборка конструкции для переноса



- Затем часть мембраны выдерживают погруженной в 2X SSC в течение приблизительно 10–20 мин, после чего подвергают выпечке при 80 ° C в течение 2 ч в вакуумной печи. Другим способом ДНК также может быть зафиксирована с помощью УФ-сшивания, опосредованного воздействием коротковолнового УФ-света в коммерческой установке.
- Когда процесс переноса завершен, необходимо провести подготовку к реакции гибридизации. Для этого этап блокировки, который обычно занимает около часа, является обязательным для устранения неспецифических реакций. Этот этап также известен как этап предварительной гибридизации.
- Вскоре после инкубации прегибридизационного раствора до 42 ° C к нему добавляют охлажденную при нагревании ДНК спермы лосося в концентрации 50 мкг / мл.
- Раствор для предварительной гибридизации, содержащий ДНК спермы, оставляют взаимодействовать с промокшей мембраной внутри камеры гибридизации в течение до 5 часов.

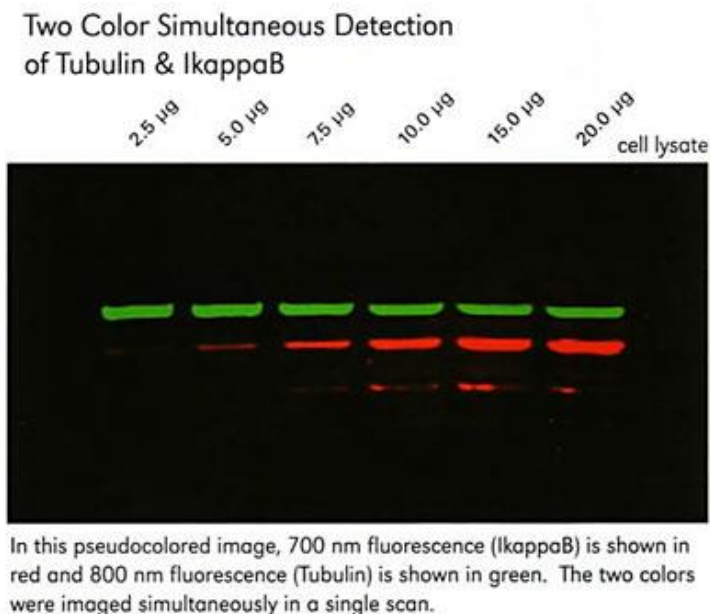
- Шаг 6: Гибридизация
- Меченый зонд добавляется к мембранному буферу и инкубируется в течение нескольких часов. Зонду требуется точное определение последовательности-мишени.
- Время, необходимое для гибридизации, обычно 1-16 ч, зависит от таких факторов, как сложность зонда и концентрация



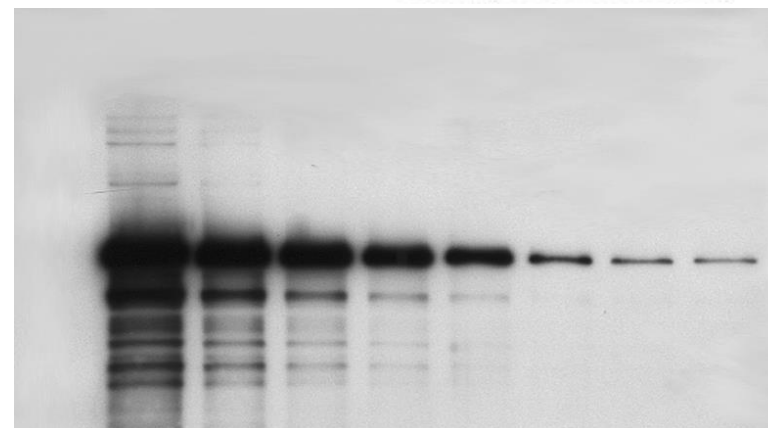
Вестерн-блоттингом можно обнаруживать антиген в количествах менее 1нг.

4. Визуализация.

- Высокая степень разрешения достигается за счет электрофоретического разделения белков и специфичности моноклональных антител.
- Визуализация исследуемого белка достигается путем проведения соответствующей биохимической реакции с образованием продукта, который определяется колориметрическим, хемилюминесцентным, флюоресцентным методами детекции.



Data courtesy of Dr. Catrin Albrecht, IUF, Germany

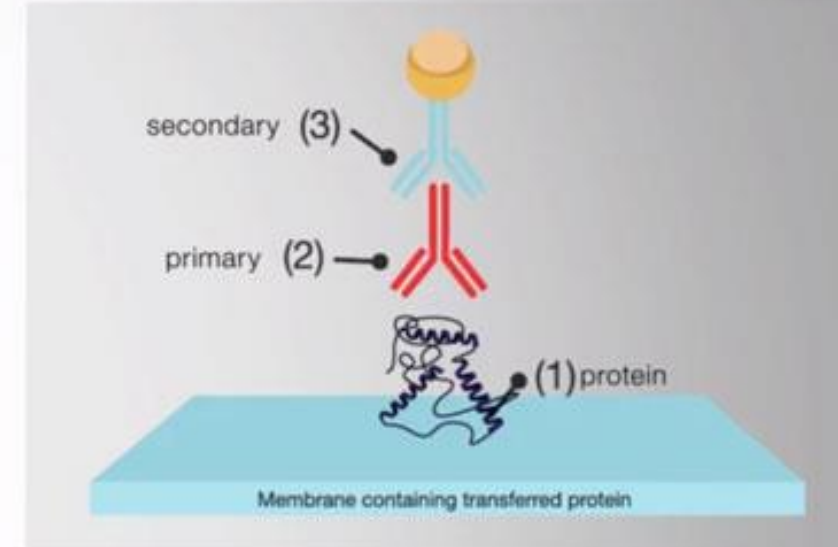
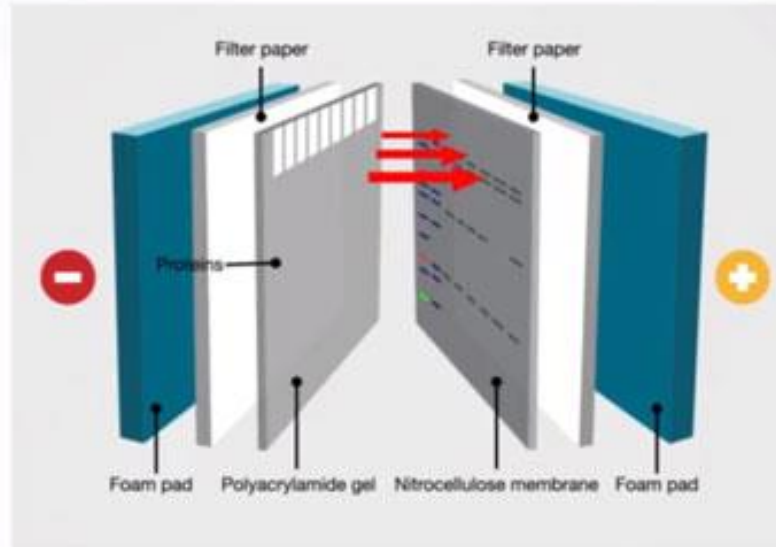
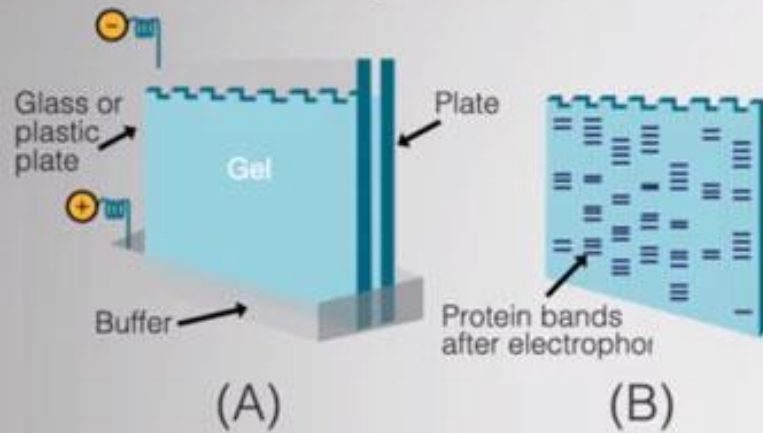


Применение:

- Саузерн-блоттинг используется в ряде приложений. Основное использование Саузерн-блоттинга заключается в идентификации конкретной ДНК в образце ДНК. В основном он используется для выявления вирусной инфекции и некоторых бактериальных инфекций.
- Саузерн-блоттинг может быть применен при изучении структуры гена или для выяснения карт рестрикционных ферментов.
- Саузерн-блоттинг, который проводят с геномной ДНК, обработанной эндонуклеазами рестрикции, может быть использован для определения *числа копий генов* в геноме.

- Метод Нозерн-блот был предложен в 1977 году сотрудниками Стэнфордского университета Джеймсом Олвайном, Дэвидом Кемпом и Джорджем Старком и назван по его аналогии с Саузерн-блот.
- Образцы РНК разделяют с использованием агарозных гелей с использованием формальдегида в качестве денатурирующих агентов, но в небольших последовательностях РНК или микроРНК также можно использовать полиакриламидные последовательности с мочевиной в качестве денатурирующего агента.

Sample wells



1. Separate

proteins by gel electrophoresis

2. Transfer

proteins from the gel to a solid support

3. Detect

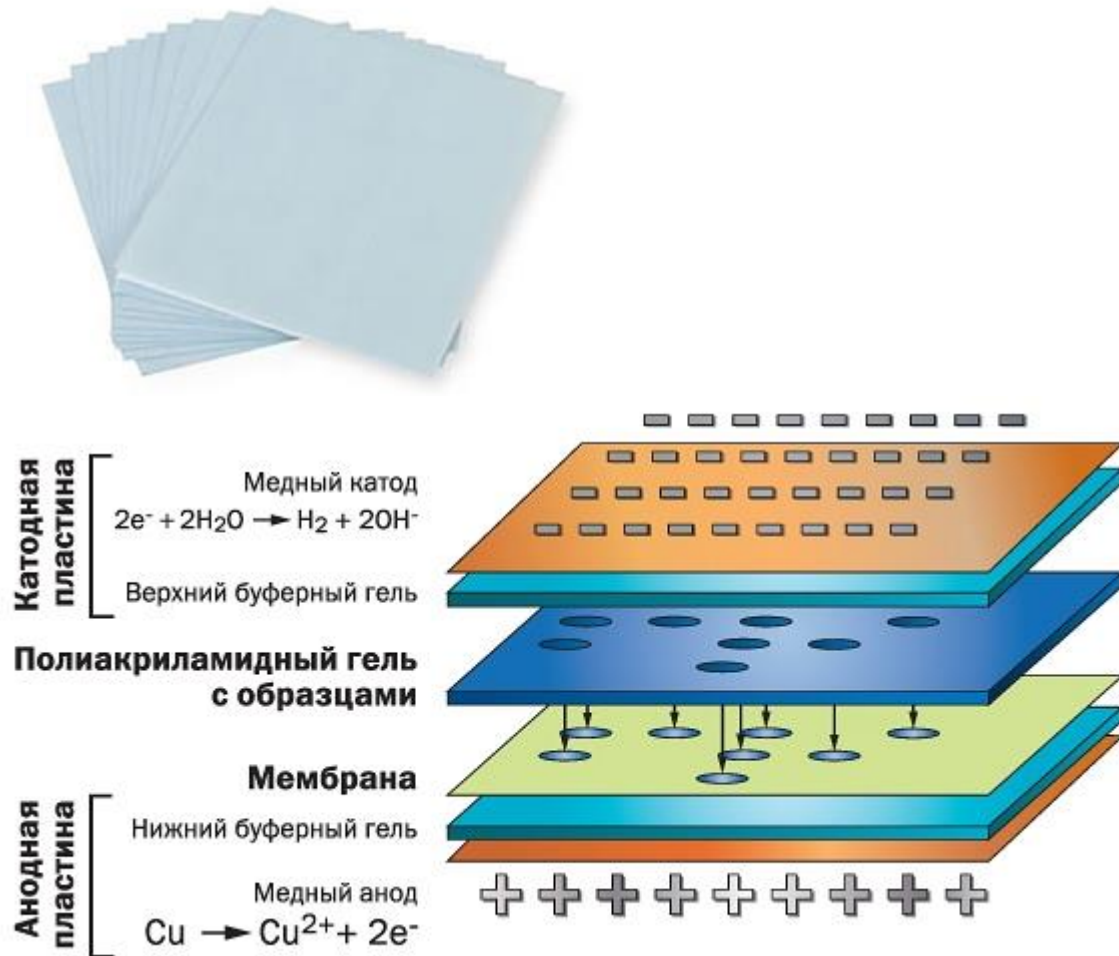
Where we use antibodies specific to the target protein to visualize the protein of interest.



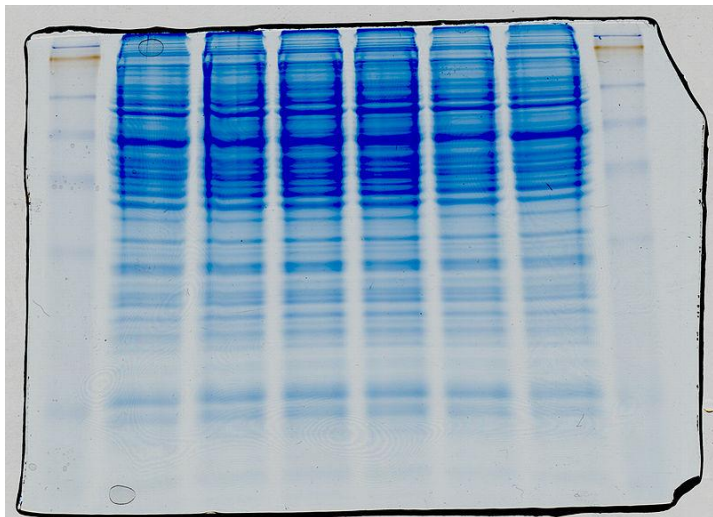
«Твердая фаза» для иммуноблота

- пористые материалы типа **нитроцеллюлозы (PVDF)** в виде наполнителей в объеме или в виде плоских листов или полосок стрипов
- (англ. strip); стрипы используют в методиках типа иммуноблота и иммунохроматографии;
- в пористых материалах существенно больше площадь, на которой сорбирован один из участников взаимодействия; другие реагенты диффундируют по порам.

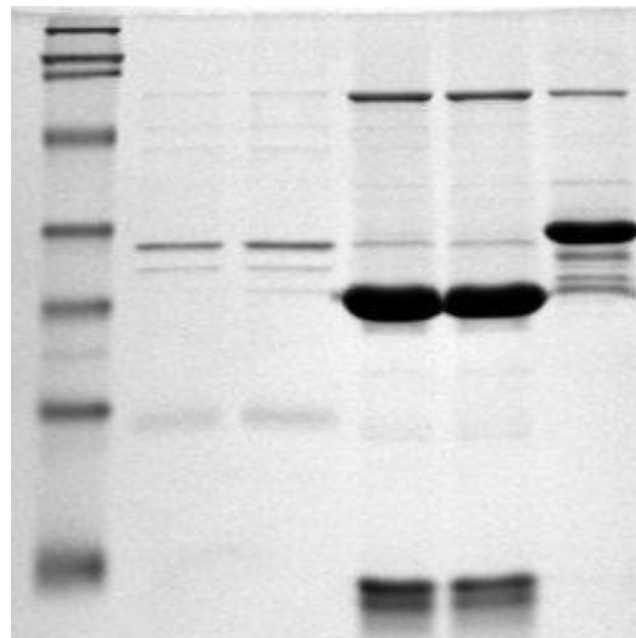
Типы твердой фазы для Вестерн блоттинга



Окрашивание гелей



Окрашивание белков в гелях красителем Кумасси

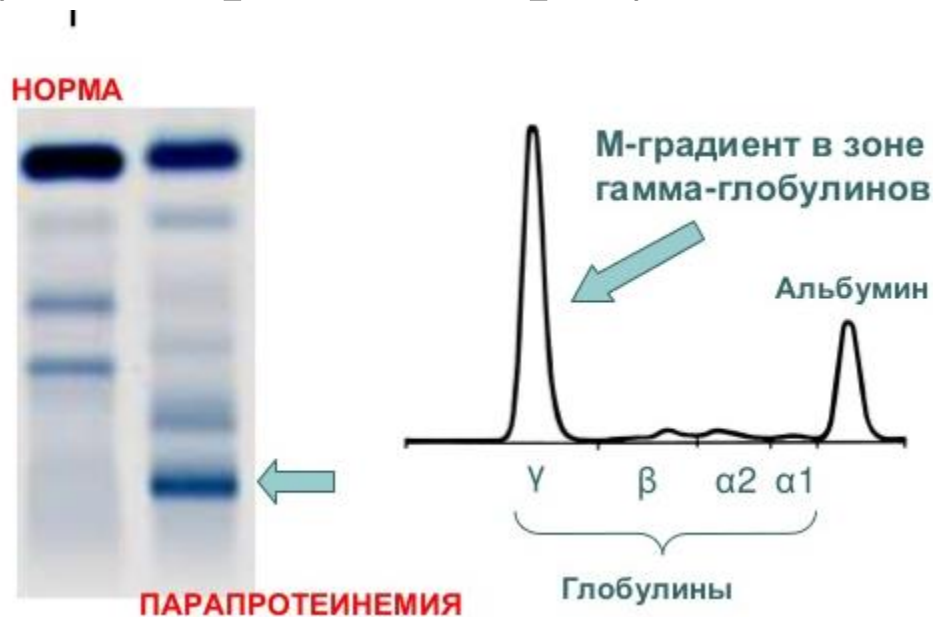


□ Окрашивание белков в гелях серебром

- Для визуализации результатов электрофореза чаще всего используют окрашивание белков в гелях красителем **Кумасси** или **серебром**

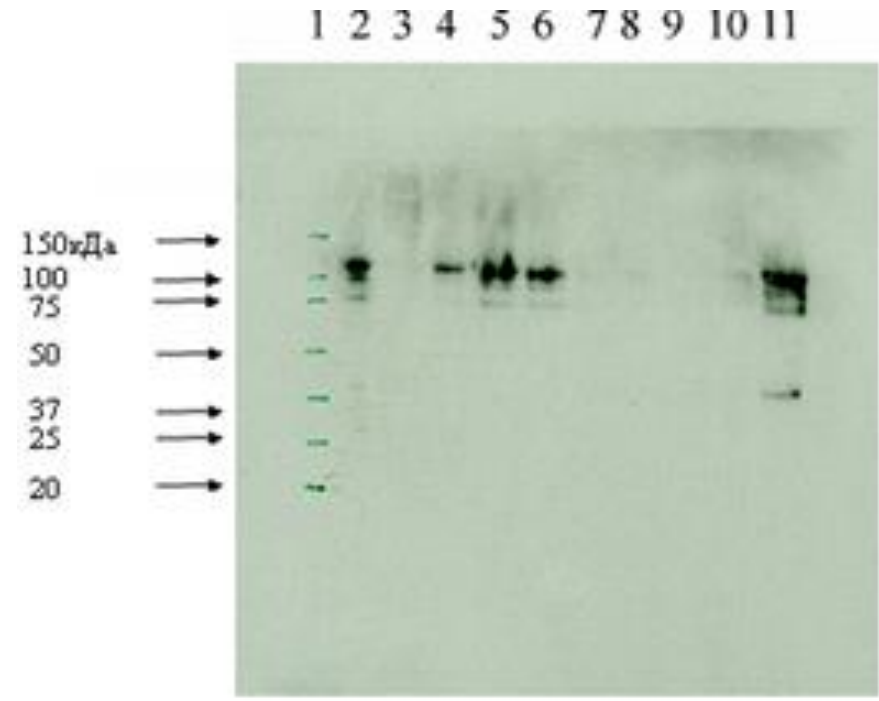
Анализ электрофоретического разделения белков

- *В большинстве случаев результаты электрофоретического разделения достаточно получить путем визуальной оценки геля.*
- Однако, с целью получения достоверных данных и надлежащего документирования результатов гель сканируют на просвет при денситометре, что позволяет надежно **е белков в геле, но и оптическую**



Анализ электрофоретического разделения белков, Блоттинг

- С помощью специального программного приложения можно определить такие параметры как **электрофоретическая подвижность белка, его чистота, количество белка в пятне** и др.
- Чаще используют систему детекции белков — использование рентгеновских пленок (Блоттинг)



Выбор % разрешающего геля.

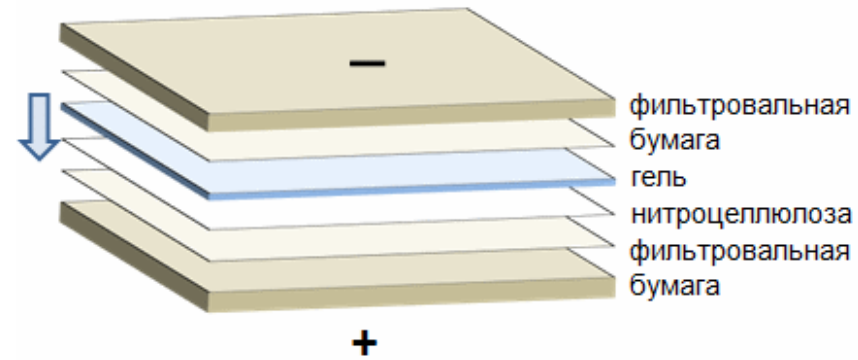
- Концентрация акриламида определяет разрешающую способность геля — чем выше концентрация акриламида, тем лучше разделение низкомолекулярных белков. Низкая концентрация акриламида улучшает разрешающую способность гель-электрофореза для высокомолекулярных белков.

<i>Размер белка, kDa</i>	<i>%AA</i>
36-205	5%
24-205	7.5%
14-205	10%
14-66	12.5%
10-45	15%

Перенос на мембрану

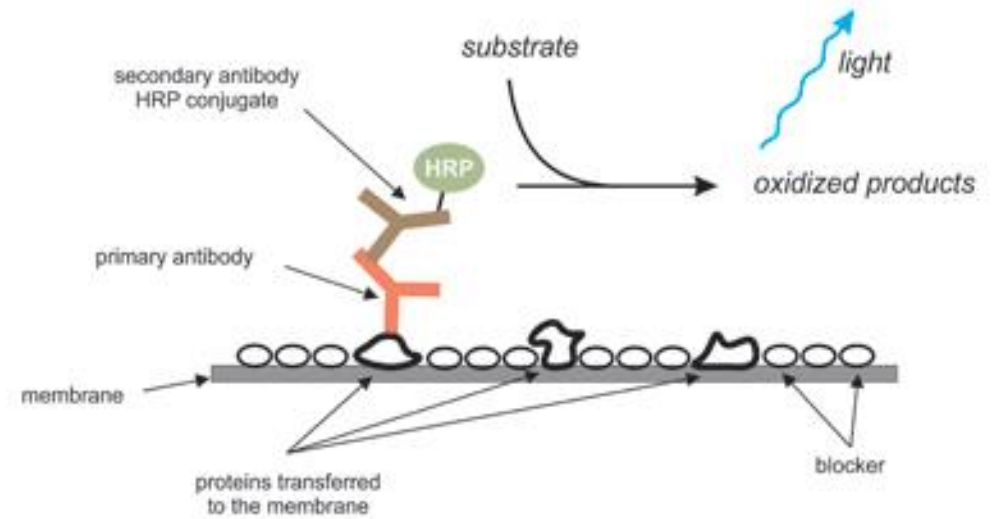
Чтобы сделать белки доступными для антител и дальнейшей детекции, их вместе с полоской геля переносят на мембрану, изготовленную из нитроцеллюлозы или *PVDF*.

- Мембрана накладывается поверх геля, а поверх неё кладут стопку фильтровальной бумаги.
- Метод переноса белков называется **электроблоттингом** и использует электрический ток, который переносит белки из геля на мембрану.
- Белки перемещаются из геля на мембрану с сохранением своего расположения. В результате этого «промакивания» (*blotting*) процесса белки удерживаются на тонком поверхностном слое мембраны для детекции.
- Оба варианта мембран используют из-за их свойства неспецифично связывать белки.
- Связывание белков основано как на гидрофобных взаимодействиях, так и на электростатических взаимодействиях между мембраной и белком.
- Нитроцеллюлозная мембрана дешевле PVDF, но гораздо более хрупкая и хуже выдерживает повторное нанесение меток.

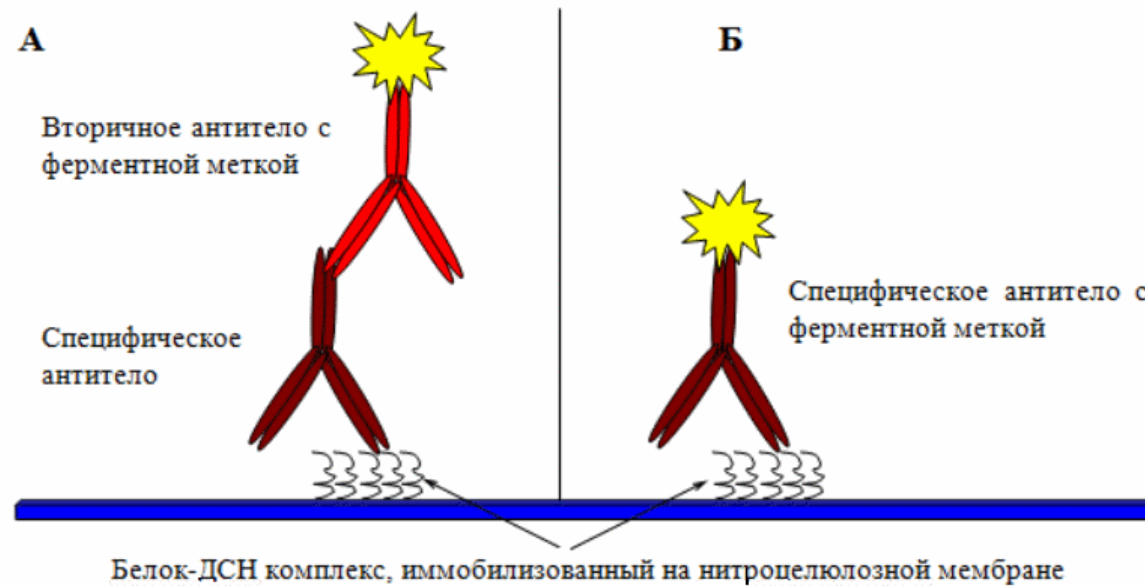


Механизм блокирования

Белок из разбавленного раствора прикрепляется к мембране во всех местах, где не прикрепился целевой белок. Поэтому, при добавлении антител, им (антителам) нет свободного места на мембране, куда бы они могли прикрепиться, кроме сайтов связывания на специфичных целевых белках. Этот фоновый «шум» в окончательном продукте вестерн блота приводит к чистым результатам и исключению ложно-положительных.



Детекция. Непрямой и прямой WB



преимущества

- Вторичное антитело усиливает сигнал (несколько вторичных антител могут связываться с одним первичным)
- Имеется широкий выбор вторичных антител
- Одно вторичное антитело может быть использовано для детекции различных специфичных антител
- связывание с ферментативной меткой вторичного антитела не влияет на иммунореактивность первичного антитела
- Замена вторичного антитела может способствовать изменению метода детекции

недостатки

- Вторичные антитела способствуют образованию сайтов неспецифичного связывания
- Дополнительные этапы работы

преимущества

- необходимость использовать только первичные антитела, что ускоряет процесс
- возможность использовать первичные антитела с разными метками

Недостатки

- связывание с ферментативной меткой может снижать иммунореактивность первичного антитела
- высокая стоимость первичных антител
- проблема выбора антитела и низкий сигнал

Антитела для вестерн блоттинга. Механизм детекции.

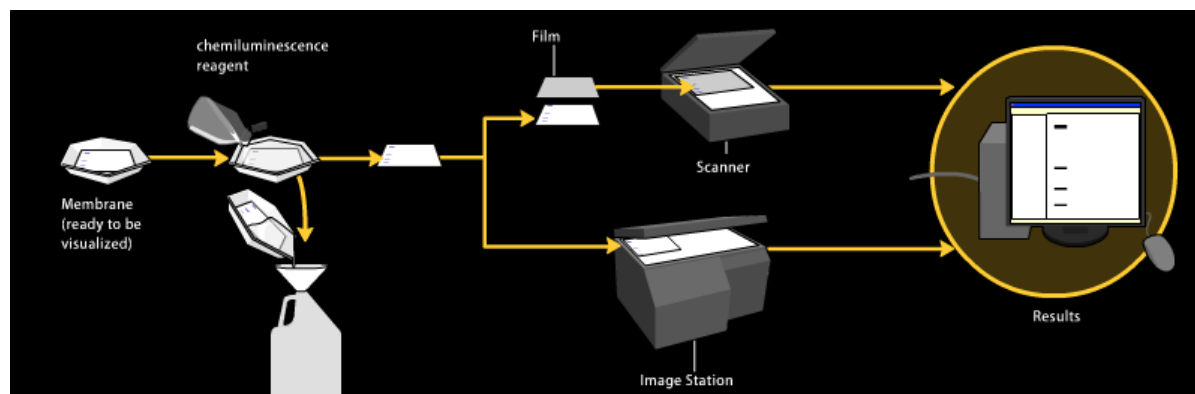
- Антитела получают из животного источника и связываются с большинством первичных антител. Вторичные антитела обычно связывают щелочной фосфатазой или пероксидазой хрена.
- Наиболее распространенные, связанные с пероксидазой хрена вторичные антитела используются для разрезания хемилюминесцентного агента, и продукт реакции производит люминесцентное излучение пропорционально количеству белка.



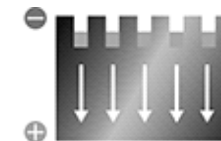
- Лист светочувствительной фотографической пленки помещается напротив мембраны и подвергается действию излучения реакции, создавая изображение полос антител на блоте.
- Более дешевый, но менее чувствительный подход с использованием 4-хлорнафтольного окрашивания в смеси с 1 % перекисью водорода, что дает темно-коричневое окрашивание, которое регистрируется без использования специальной фотографической пленки.

Полный протокол

- 1. электрофорез
- 2. перенос
- 3. блокирование
- 4. инкубация с первичным антителом
- 5.отмывка
- 6.инкубация со вторичным антителом
- 7. отмывка
- 8. обработка хемилюминесцентной системой детекции
- 9. детекция с помощью рентгеновской пленки
- 10. анализ



Step 1
Perform
electrophoresis



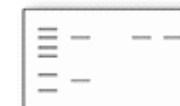
Step 2
Transfer



Step 3
Block with ScanLater
5X Blocking Buffer



Step 4
Incubate with
primary antibodies



Step 5
Wash with
ScanLater Wash Buffer



Step 6
Incubate with ScanLater
Secondary Antibody



Step 7
Wash with ScanLater
Wash Buffer



ЛИТЕРАТУРА

- 1. Гиббонс, Джанэй. «Вестерн-блот: обзор переноса белка». Североамериканский журнал медицинских наук. Medknow Publications & Media Pvt Ltd, март 2014 г.
- 2. Браун Т. «Южное блоттинг». Современные протоколы в иммунологии. Национальная медицинская библиотека США, май 2001 г.
- 3. Он, Шан Л. «Северное пятно». Методы энзимологии. Национальная медицинская библиотека США, 2013.
- 4. Маниатис Т., Фрих Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984.