

## Metoda: Western blot

Vitnerová Kateřina, 2. ročník

Školitelé: Mgr. Libuše Macháčková, Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie Nemocnice na Homolce

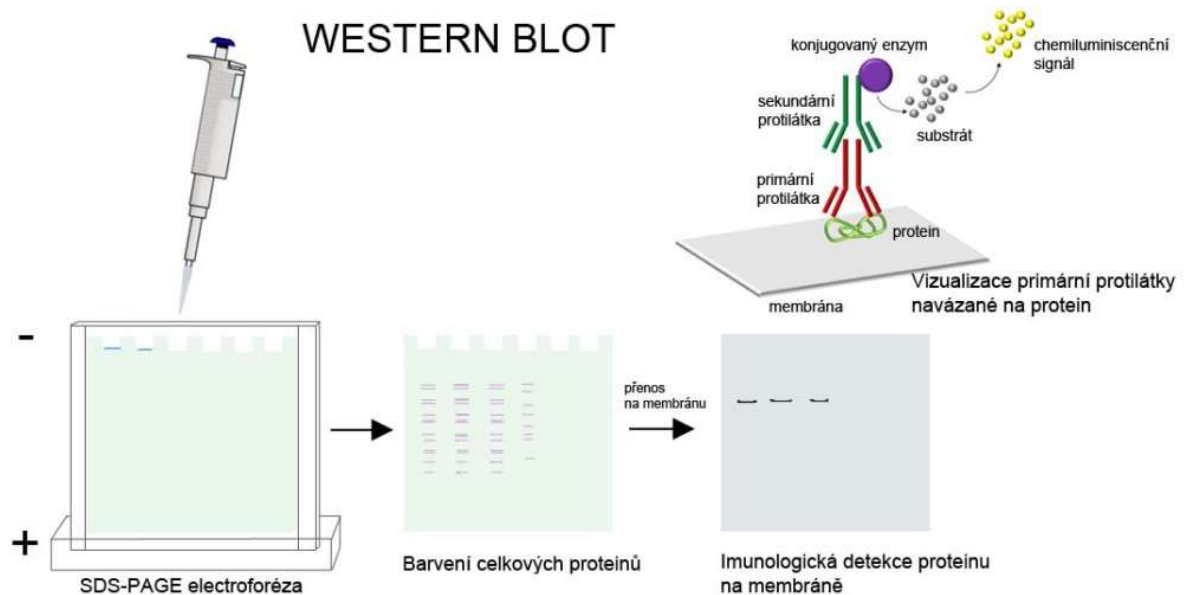
### Princip:

Pro separaci proteinů se nejčastěji využívá gelová elektroforéza, nejčastěji je to SDS-PAGE (SDS polyacrylamide gel electrophoresis). Vlivem SDS jsou proteiny denaturovány, získávají záporný náboj a cestují tak v elektrickém poli od záporného pólu ke kladnému. Při elektroforéze jsou proteiny děleny podle své hmotnosti (udává se v kDa). Malé proteiny cestují akrylamidovým gelem rychleji, proteiny o velké molekulové hmotnosti se pohybují směrem k anodě pomaleji. Někdy je využívána nativní-PAGE, kdy jsou proteiny separovány na základě svého náboje.

Separované proteiny jsou přeneseny na membránu. Přítomnost daného proteinu je na membráně detekována pomocí protilátky, tzv. primární, vůči tomuto proteinu. Primární protilátka se navazuje na protein a v dalším kroku je rozpoznávána sekundární protilátkou.

Sekundární protilátka se tedy váže na primární protilátku. Přítomnost sekundární protilátky je detekována fluorescenčně či chemiluminiscenčně, a to v závislosti na značení, které sekundární protilátka nese.

Velikost signálu je vyhodnocována srovnáním s naneseným proteinovým markerem, což je komerčně dostupná směs proteinů o známé velikosti.



Obrázek 1 Western blot

### Uplatnění metody:

Otiskové metody se používají především pro přenos molekul DNA, RNA, proteinů a glykoproteinů po jejich předcházející separaci elektroforézou nebo izoelektrickou fokusací na gelových nosičích a umožňují tak průkaz několika specifických antigenů v jednom vzorku najednou (jakousi fenotypizaci vzorku a tím i jedince, od kterého byl získán).

### Úskalí metody:

Významným omezením použití Western blotu je fakt, že se proteiny denaturují. Metoda má i další nevýhody – je časově náročná. Oproti dalším metodám spotřebuje velké množství vzorku a automatizace je složitější než v případě dalších metod. Tato metoda je i finančně náročná.

### Přístrojové vybavení: gelová elektroforéza

**Odběr a transport:** Pro odběr vzorku pro western blot se používají stejné metody jako pro serologická vyšetření. Nejčastěji vyšetřujeme krevní sérum, ale je možné použít i jiné biologické materiály (sputum, moč, sliny, likvor). Krev se odebírá do zkumavky s protisrážecím přípravkem (EDTA například). Odběr krve se provádí pomocí vakuového systému, ta ve zkumavce koaguluje. Poté následuje mechanické oddělení krevního koagula od stěny zkumavky. Tím se zvýší retrakce koagula. Nad krevním koagulem se vyloučilo krevní sérum. To se následně přeneso do čisté zkumavky.



Obrázek 2 Gelová Elektroforéza

### Zdroje:

1. Wikipedie. *Western blot*. [Online] 2021. [Citace: 29. 3 2022.] [https://cs.wikipedia.org/wiki/Western\\_blot](https://cs.wikipedia.org/wiki/Western_blot).
2. labguide. labguide. *Western blot*. [Online] 2018. [Citace: 29. 3 2022.] <https://labguide.cz/metody/western-blot/>.
3. Wikipedie. Wikipedie. *SDS-PAGE*. [Online] 2021. [Citace: 29. 3 2022.] <https://cs.wikipedia.org/wiki/SDS-PAGE>.
4. —. Wikipedie. *Gelová elektroforéza*. [Online] 2021. [Citace: 29. 3 2022.] [https://cs.wikipedia.org/wiki/Gelov%C3%A1\\_elektrofor%C3%A9za](https://cs.wikipedia.org/wiki/Gelov%C3%A1_elektrofor%C3%A9za).