

Η ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΤΑ ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΒΡΙΣΚΟΝΤΑΙ ΣΤΟ 1^ο ΜΕΡΟΣ

Πείραμα 2^ο: Ανίχνευση της α-λακταλβουμίνης στα διάφορα στάδια της απομόνωσής της με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης - 2^η εργαστηριακή ημέρα

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Αναδευτήρας-Shaker
- TBS διάλυμα (20ml για το πρωτοταγές αντίσωμα και περίπου 20-30 mL για κάθε πλύση της μεμβράνης)
- Bovine a-lactalbumin antibody HRP conjugated (BETHYL Laboratories, INC) σε αραιώση 1: 1000 σε TBS (ενδέχεται ανάλογα με τις οδηγίες που δίνονται για τη μεμβράνη η αραιώση του αντισώματος να διαφοροποιηθεί)
- Διάλυμα υποστρώματος για το συζευγμένο ένζυμο (horseradish peroxidase):
 - 1 ml διαλύματος chloronaphthol (30mg/ml σε μεθανόλη)
 - 10ml μεθανόλης
 - Προσθέστε TBS (Θ δωματίου) μέχρι 50ml.
 - 26μl υπεροξειδίου του υδρογόνου 35%.
- Petri πιάτα διαμέτρου 9cm

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Πλύνετε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με απιονισμένο νερό και κατόπιν με διάλυμα TBS (τρεις αλλαγές, 10' κάθε φορά).
- Τοποθετήστε τη μεμβράνη στο διάλυμα του πρωτοταγούς αντισώματος (αραιώση αντισώματος 1:1000 ή διαφορετική σε 20ml TBS,) και επώαστε υπό ανάδευση για 90' περίπου.
- Πλύνετε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με διάλυμα TBS (τρεις αλλαγές, 10 λεπτά κάθε φορά, υπό ανάδευση).
- Μεταφέρετε τη μεμβράνη στο διάλυμα του υποστρώματος για την υπεροξειδάση. Οι ενεργές περιοχές χρωματίζονται μέσα σε 15 λεπτά το πολύ, αλλά η αντίδραση συνεχίζεται για 4 ώρες ακόμα.
- Όταν οι μπάντες έχουν αποκτήσει την επιθυμητή ένταση χρώματος σταματήστε την αντίδραση βουτώντας τη μεμβράνη σε απιονισμένο νερό. Μπορείτε να στεγνώσετε τη

μεμβράνη σε χαρτί και να τη φυλάξετε μακριά από το φως. Οι μπάντες όμως θα ξεθωριάσουν με το πέρασμα του χρόνου.

- Συγκρίνετε τη μεμβράνη με το gel που βάψατε με Coomassie.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

W. Burnette, **Anal. Biochem.** **112**, 195-203 (1981). ‘ Western Blotting’.

B. Dunbar, **Protein Blotting, A Practical Approach** (1994), IRL Press (Oxford). Complete and up – to – date book on blotting.

B. Hames and D. Rickwood, Editors, **Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach**, 2nd ed. (1990), IRL Press (Oxford). An excellent book for starters.

C. Mathews, K. van Holde, and K. Ahern, **Biochemistry**, 3rd ed. (2000), Benjamin/Cummings (San Francisco), pp. 253-254. An introduction to Western blotting.

L. Stryer, **Biochemistry**, 4th ed. (1995), W. H. Freeman (New York), p.62. An introduction to Western blotting.