

Πείραμα 2^ο: Ανίχνευση της α-λακταλβουμίνης στα διάφορα στάδια της απομόνωσης της με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης- Στοιχεία θεωρίας

I. ΓΕΝΙΚΑ

Η ανοσοαποτύπωση ή immunoblotting είναι μια μέθοδος εξαιρετικά πολύτιμη για τη μοριακή βιολογία και την ανοσολογία. Η τεχνική αυτή μας επιτρέπει να ταυτοποιήσουμε και να ποσοτικοποιήσουμε μια συγκεκριμένη ουσία (πρωτεΐνη, DNA, RNA), η οποία συνήθως αποτελεί συστατικό ενός μείγματος. Υπάρχουν αρκετές τεχνικές ανοσοαποτύπωσης που είναι εργαλεία ρουτίνας σε περιπτώσεις όπως π.χ. η μελέτη του ιού του AIDS. Οι πιο διαδεδομένες είναι:

- α) το Western blot (ανίχνευση πρωτεϊνών)
- β) το Southern blot (ανίχνευση DNA)
- γ) το Northern blot (ανίχνευση RNA)

Όλες βασίζονται στην ίδια αρχή, δηλαδή αρχικά τα μόρια διαχωρίζονται σε μια πηκτή βάση του μοριακού τους βάρους ή του φορτίου τους και στη συνέχεια, με μια δεύτερη ηλεκτροφόρηση μεταφέρονται σε μια συνθετική μεμβράνη. Στο στάδιο αυτό, τα ζητούμενα μόρια μπορούν να ανιχνευτούν επώάζοντας τη μεμβράνη σε συγκεκριμένα μόρια-δείκτες. Για το Northern ή το Southern blot ο δείκτης είναι μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων ενώ για το Western blot είναι ένα αντίσωμα ειδικό για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Στο πείραμα που ακολουθεί, θα εφαρμόσουμε τη μέθοδο του Western blot για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης α-λακταλβουμίνης σε διάφορες παρασκευές.

II. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ

Μπορούμε να χωρίσουμε τη διαδικασία του Western blot σε δυο στάδια:

- i) μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη και
- ii) κατεργασία της μεμβράνης με τα αντισώματα.

Η μεταφορά των πρωτεϊνών συνήθως πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση. Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι είναι:

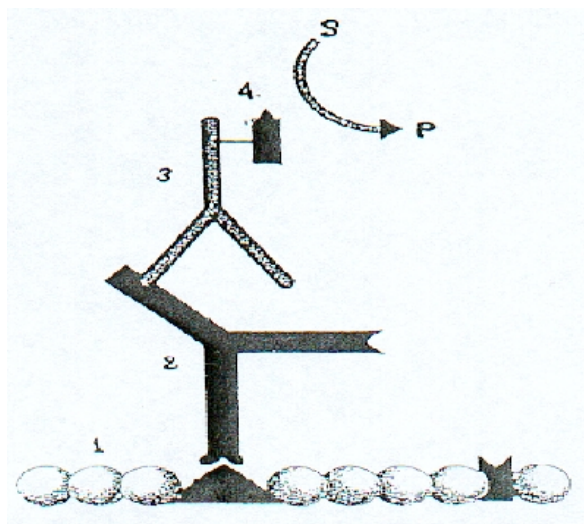
- Η ημι-στεγνή ηλεκτροφόρηση κατά την οποία η πηκτή και η μεμβράνη τοποθετούνται ανάμεσα σε κομμάτια χάρτινου φίλτρου εμποτισμένα με το ρυθμιστικό μεταφοράς και το ρεύμα εφαρμόζεται για 60 λεπτά περίπου.
- Η υγρή ηλεκτροφόρηση κατά την οποία η διάταξη πηκτής-μεμβράνης βυθίζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και η διαδικασία μπορεί να διαρκέσει από 45 λεπτά

μέχρι όλη νύχτα. Στη συγκεκριμένη άσκηση θα εφαρμοστεί η πρώτη από τις δυο μεθόδους.

Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς, ακολουθεί η ανίχνευση της πρωτεΐνης η οποία γίνεται σε δυο ή τρία στάδια.

Αντισώματα

Το κλειδί στην τεχνική Western blot βρίσκεται στο πόσο εξειδικευμένα είναι τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται. Μόλις ολοκληρωθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη, οι πρωτεΐνες αντιδρούν με δυο διαφορετικά είδη αντισωμάτων. Η πρώτη αντίδραση πραγματοποιείται με επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα που περιέχει το πρωτοταγές αντίσωμα. Αυτό είναι το αντίσωμα για την πρωτεΐνη (αντιγόνο) την οποία ψάχνουμε. Μπορούμε να επιλέξουμε ένα μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο (εάν υπάρχει παρασκευασμένο) αναγνωρίζει μόνο έναν επίτοπο της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει, είναι εξαιρετικά καθαρό και συνήθως πολύ ακριβό. Η άλλη επιλογή που έχουμε είναι τα πολυκλωνικά αντισώματα. Πρόκειται για μίγμα αντισωμάτων που συλλέγεται από τον ορό του αίματος και κατά συνέπεια δεν έχουν τόσο μεγάλη εξειδίκευση αλλά είναι πιο οικονομικά (σε σύγκριση με τα μονοκλωνικά). Το πρωτοταγές αντίσωμα σημειώνεται με τον αριθμό 2 στην Εικόνα 1:



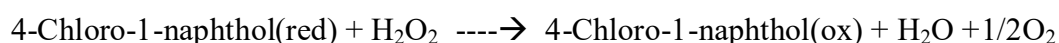
ΕΙΚΟΝΑ 1: Αντιδράσεις αντισωμάτων στο Western blot

Σε οποιοδήποτε σημείο της μεμβράνης ανιχνεύσει την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, το πρωτοταγές αντίσωμα θα προσδεθεί πάνω της. Στις περισσότερες περιπτώσεις

όμως, για να δούμε τα αποτελέσματα πρέπει να προχωρήσουμε ένα βήμα παραπέρα. Ακολουθεί λοιπόν η αντίδραση του συμπλόκου με το δευτεροταγές αντίσωμα. Πρόκειται για ένα αντίσωμα που έχει αναπτυχθεί ενάντια σε μια γενική κατηγορία πρωτοταγών αντισωμάτων. Για παράδειγμα, αν χρησιμοποιήσουμε ένα πρωτοταγές αντίσωμα ποντικού ενάντια στη λακταλβουμίνη του αγελαδινού γάλακτος, τότε το δευτεροταγές μας αντίσωμα θα μπορούσε να είναι αντίσωμα κασίκας ενάντια σε αντισώματα ποντικού. Το δευτεροταγές αντίσωμα θα αναγνωρίσει στη μεμβράνη το πρωτοταγές (που είναι ήδη συνδεδεμένο πάνω στην πρωτεΐνη) και σημειώνεται με τον αριθμό 3 στην Εικόνα 1.

Ανίχνευση

Το σύμπλοκο πρωτεΐνης/πρωτοταγούς αντισώματος/δευτεροταγούς αντισώματος δεν είναι ορατό στη μεμβράνη. Για τον λόγο αυτό τα περισσότερα δευτεροταγή αντισώματα είναι συζευγμένα με κάποιο ένζυμο. Συνηθισμένα ένζυμα στην περίπτωση αυτή είναι η αλκαλική φωσφατάση και η υπεροξειδάση από horseradish. Η “θέση” τους στην Εικόνα 1 σημειώνεται με τον αριθμό 4. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν αντιδράσεις που οδηγούν σε “ορατά” προϊόντα. Επομένως, το τελικό στάδιο στο Western blot περιλαμβάνει επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα υποστρώματος του συζευγμένου ενζύμου και στη θέση του συμπλόκου σχηματίζεται μια χρωματιστή μπάνα. Συγκεκριμένα, η υπεροξειδάση από horseradish (και κατά συνέπεια τα αντισώματα που είναι συνδεδεμένα μ’ αυτή) καταλύει την αντίδραση:



Στην παραπάνω αντίδραση, η οξειδωμένη μορφή του 4-Chloro-1-naphthol σχηματίζει ένα ιώδες ίζημα και κατά την εφαρμογή του στο Western blot οι μπάνες είναι καλοσχηματισμένες και τα αποτελέσματα ξεκάθαρα.

Σε μεμονωμένες περιπτώσεις (όπως αυτή στο πείραμα που θα ακολουθήσει), γίνεται χρήση πρωτοταγούς αντισώματος το οποίο είναι απ’ ευθείας συζευγμένο με το ένζυμο. Συνεπώς, το στάδιο της επώασης με το δευτεροταγές αντίσωμα παραλείπεται και η όλη διαδικασία απλοποιείται.

Κάλυψη μη ειδικών θέσεων και πλύσιμο της μεμβράνης

Η νιτροκυτταρίνη έχει υψηλή συγγένεια για όλες τις πρωτεΐνες οπότε αν η αντίδραση με το πρωτοταγές αντίσωμα γίνει αμέσως μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, το αντίσωμα θα προσδεθεί μη ειδικά σ' όλη την επιφάνεια της μεμβράνης. Είναι απαραίτητη λοιπόν η κάλυψη των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης. Αυτό γίνεται με επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα μιας μη ειδικής πρωτεΐνης η οποία συνδέεται σε όλες τις θέσεις της μεμβράνης που δεν έχουν ήδη καλυφθεί από τις πρωτεΐνες της ηλεκτροφόρησης. Συνήθως για αυτή την κατεργασία χρησιμοποιείται αποβουτυρωμένο γάλα, ζελατίνη ή BSA.

Αφού ολοκληρωθεί κάθε φορά το στάδιο της επώασης με ένα αντίσωμα ακολουθεί ένα σχολαστικό πλύσιμο της μεμβράνης για την απομάκρυνση του αντισώματος που δεν έχει προσδεθεί γερά στην πρωτεΐνη. Εάν αυτές οι πλύσεις παραληφθούν ή δε γίνουν σωστά θα αναπτυχθεί χρώμα σε όλη την επιφάνεια της μεμβράνης κατά τη διαδικασία της εμφάνισης, πράγμα που θα δυσκολέψει την παρατήρηση των δειγμάτων που μας ενδιαφέρουν.

III. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Οι τεχνικές που θα εφαρμοστούν στο πείραμα αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση σύνθετων πρωτεϊνικών μιγμάτων όπως είναι ο ορός του αίματος ανθρώπων ή ζώων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το αντίσωμα που θα χρησιμοποιηθεί έχει ως αντιγόνο την α-λακταλβουμίνη του αγελαδινού γάλακτος. Πρόκειται για πολυκλωνικό αντίσωμα οπότε πιθανόν να αντιδρά και με α-λακταλβουμίνη άλλων ειδών. Απομονώθηκε από ορό αίματος κατσίκας με χρωματογραφία συγγένειας και στη συνέχεια έγινε σύζευξη του καθαρού αντισώματος με το ένζυμο της υπεροξειδάσης από horseradish. Αυτό είναι ένα μεγάλο πλεονέκτημα αφού δεν χρειάζεται να χρησιμοποιήσουμε δευτεροταγές αντίσωμα .

Το πείραμα θα πραγματοποιηθεί σε δύο εργαστηριακές ημέρες. Με δεδομένο ότι οι πηκτές ακρυλαμιδίου θα σας δοθούν έτοιμες, το πρόγραμμα διαμορφώνεται ως εξής:

Ημέρα 1: Διαχωρισμός των πρωτεϊνών με SDS-PAGE, μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη με ημι-στεγνή (semi-dry) ηλεκτροφόρηση, επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα γάλακτος ή BSA.

Ημέρα 2: Πλύσιμο της μεμβράνης, επώαση της μεμβράνης στο πρωτοταγές αντίσωμα, πλύσιμο και επώαση στο διάλυμα του υποστρώματος.

Πείραμα 2^α: Ανίχνευση της α-λακταλβουμίνης στα διάφορα στάδια της απομόνωσης της με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης - 1^η εργαστηριακή ημέρα

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

A. SDS-Ηλεκτροφόρηση πηκτής ακρυλαμιδίου

- Αντιδραστήρια και συσκευές για SDS-PAGE (βλ. Πείραμα 1)
- Έτοιμες πηκτές SDS-πολυακρυλαμιδίου: 13% ακρυλαμίδιο, 0,75mm πάχος, 8x10cm.
- Sample buffer 5x
- Δείγματα:
 - Τυρόγαλα
 - α-λακταλβουμίνη εμπορική, 1mg/ml
 - BSA, 1mg/ml
 - Δείγματα δικά σας, από την κολώνα συγγένειας
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης
- Διάλυμα βαφής Coomassie
- Διάλυμα αποχρωματισμού

B. Western blotting

- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κομμένη στις διαστάσεις της πηκτής
- Λαβίδες για το χειρισμό της μεμβράνης
- Ρυθμιστικό μεταφοράς:
 - 15,6 mM TRIZMA base
 - 120 mM glycine σε απιονισμένο νερό. Το pH είναι μεταξύ 8,1 και 8,4 χωρίς ρύθμιση.
- Φίλτρο Whatman 3mm ή στυπόχαρτο
- TBS (Tris-buffered Saline):
 - 10 mM Tris, pH 7,5
 - 150 mM NaCl
- TBS + 3% BSA ή 5% αποβουτυρωμένο γάλα (για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων της μεμβράνης), 50ml

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Τοποθετήστε το gel στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Αναμείξτε κάθε δείγμα με sample buffer 5x (20μl δείγμα + 5μl sample buffer) και επωάστε τα δείγματα για 5' σε θερμοκρασία δωματίου.
- “Φορτώστε” τα δείγματα στις 10 θέσεις της πηκτής με την παρακάτω σειρά:
 - Θέσεις 1,6: BSA (1 mg/ml), 5μl/θέση
 - Θέσεις 2,7: α-λακταλβουμίνη (SIGMA) (1mg/ml), 10μl/θέση
 - Θέσεις 3,8: τυρόγαλα, 10 μl/θέση
 - Θέσεις 4,9: κλάσμα από κολώνα συγγένειας με α-λακταλβουμίνη, 15 μl δείγμα/θέση.
- Συνδέστε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης στο τροφοδοτικό και ρυθμίστε το ρεύμα στα 25-30 mA.
- Όταν η χρωστική φτάσει 1 cm περίπου πριν τη βάση της πηκτής ΚΛΕΙΣΤΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΧΗ ΡΕΥΜΑΤΟΣ και ελευθερώστε την πηκτή.
- Κόψτε προσεκτικά την πηκτή στη μέση (κατά μήκος) ώστε να έχετε δυο κομμάτια με 5 δείγματα (θέσεις) το καθένα. Κόψτε ένα μικρό κομμάτι από τις άκρες του κάθε gel ώστε να γνωρίζετε τον προσανατολισμό των δειγμάτων.
- Βάλτε το ένα κομμάτι σε ένα δοχείο με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και αφήστε το να ανακινείται.
- Το άλλο τοποθετήστε το σε διάλυμα βαφής Coomassie (υπό ανάδευση). Μετά μην ξεχάσετε να το τοποθετήσετε σε διάλυμα αποχρωματισμού ώστε να έχετε ένα σημείο αναφοράς (control) για το Western blot.

Προετοιμάστε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης:

- Φορώντας πάντα γάντια, κόψτε με το ψαλίδι ένα κομμάτι μεμβράνης περίπου στις διαστάσεις της πηκτής. Για την ενεργοποίηση της, βουτήξτε τη μεμβράνη για 10-15 δευτερόλεπτα σε μεθανόλη ή νερό ανάλογα με τις οδηγίες που θα σας δοθούν. Στη συνέχεια επωάστε τη μεμβράνη υπό ανάδευση σε ρυθμιστικό μεταφοράς για 5 λεπτά περίπου.

Προετοιμάστε τη συσκευή για το Western blot:

- Αφαιρέστε το καπάκι και την πάνω πλάκα της συσκευής.
- Κόψτε 12 φύλλα χαρτιού Whatman 3mm μεγαλύτερα από τις διαστάσεις της μεμβράνης.
- Μουσκέψτε καλά ένα ένα φύλλο ξεχωριστά σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και τοποθετήστε 6 από αυτά, το ένα πάνω στο άλλο, στην κάτω πλάκα (+ πόλος) της

συσκευής. (Σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής πρέπει να πιέζετε ΕΛΑΦΡΑ την επιφάνεια κάθε στρώσης με μια γυάλινη ράβδο. Γιατί;)

- Τοποθετήστε τη μεμβράνη πάνω στα φύλλα και πάνω σε αυτή το gel (κάντε ένα μικρό σημάδι με μολύβι πάνω στη μεμβράνη, στη γωνία που έχετε αφαιρέσει το κομμάτι της πηκτής). ΜΗΝ μετακινήσετε το gel στην επιφάνεια της μεμβράνης.

- Με έναν χάρακα, μετρήστε ακριβώς τις διαστάσεις της πηκτής (η ηλεκτροφόρηση θα πραγματοποιηθεί με εφαρμογή $1,2\text{mA}/\text{cm}^2$ επιφάνειας gel).

- Τοποθετήστε τα υπόλοιπα 6 φύλλα φίλτρου πάνω στο gel, όπως προηγουμένως.

- Τοποθετήστε τη δεύτερη πλάκα (- πόλος) πάνω στη διάταξη και σκεπάστε τη συσκευή με το κάλυμμα.

- Εφαρμόστε το ρεύμα που έχετε υπολογίσει για μια ώρα περίπου. Στη συνέχεια, αφού ΔΙΑΚΟΨΕΤΕ την παροχή του ρεύματος, αποσυναρμολογήστε τη διάταξη.

- Τοποθετήστε τη μεμβράνη σε ένα δοχείο με το διάλυμα TBS - BSA (ή γάλα) και τοποθετήσετε το δοχείο στο ψυγείο (4°C).

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.