

GYMNÁZIUM PŘÍRODNÍ ŠKOLA, O.P.S.

Western Blotting

Srovnání dvou typů standardů

Autor práce: Veronika Šerksová

Vedoucí práce: Mgr. Anežka Koutníková

Datum odevzdání: 9. listopadu 2012

Poděkování

Největší poděkování patří firmě Exbio Praha, a.s. a jejímu řediteli Vladimíru Viklickému za umožnění provedení experimentu a poskytnutí zázemí. Dále bych ráda poděkovala Ing. Miloslavovi Suchánkovi, Ph.D. za navržení tématu celé práce. Velké poděkování patří Mgr. Anežce Koutníkové za vedení práce, konzultace a cenné připomínky. Za odborné vedení práce, konzultace a připomínky děkuji Aleně Šerksové. Za připomínkování také děkuji Ing. Petru Šerksovi. A na závěr děkuji všem, kteří mi během mé práce pomohli, poradili, vyšli vstříc a podpořili mě.

Obsah

1. Úvod.....	5
2. Cíle	6
3. Postup práce	7
3.1. Příprava buněčného extraktu	7
3.2. SDS-PAGE (systém Hoefer Mighty Small II) Elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu	7
3.3. Western Blotting (systém Hoefer TE70, semi-dry) Elektropřenos proteinů z polyakrylamidového gelu na membránu	9
3.4. Imunochemická detekce specifického antigenu na membráně.....	10
3.5. Vizualní detekce specifického antigenu po imunochemické reakci	11
4. Teorie metod	13
4.1. Příprava buněčného extraktu, SDS PAGE elektroforéza, Western Blotting a Imunochemická a vizualní detekce	13
4.2. Prestained SDS - PAGE, Low Range od firmy BIO-RAD	14
4.3. Biotinylated Protein Ladder od firmy Cell Signaling	14
5. Práce v laboratoři	15
5.1. Pravidla bezpečnostní práce v laboratoři”	15
5.2. Chemikálie a materiál	16
5.3. Pomůcky a přístroje	19
6. Experimenty.....	20
6.1. Deníky	20
Prosinec	20
Únor	22
Srpen	25
6.2. Závěry experimentů.....	28
Závěr z 1. experimentu WB dne 28. - 29. 12. 2011	28
Závěr z 2. experimentu WB dne 16. - 17. 2. 2012	29
Závěr z 3. experimentu WB dne 30. - 31. 8. 2012	30
7. Diskuse.....	31
8. Slovníček pojmů.....	31
9. Závěr	36
9.1. Doporučení firmě Exbio Praha, a.s.	36
10. Zdroje.....	38
10.1. Standardní operační postupy	38

10.2.	Prezentace	38
10.3.	Internet	38

1. Úvod

Celá práce pojednává o imunologické metodě Western Blotting (dále jen WB). Metoda je popsána jak obecně (její význam a použití), tak jsou popsány provedené experimenty.

Metoda WB se používá v rámci diagnostiky různých onemocnění k detekci specifického proteinu v biologickém materiálu pomocí vazby specifické primární protilátky vůči konkrétnímu proteinu. V laboratoři oddělení kontroly kvality (dále jen QC laboratoř, ze zkratky Quality Control) se vlastně používá k „opačnému účelu“, k ověření specifčnosti vyráběných protilátek na známém materiálu.

Hlavním cílem bylo optimalizovat metodu WB, kde bych v rámci jednoho experimentu porovnávala dva rozdílné typy standardů. Testování se týká dosud běžně používaného standardu v QC laboratoři – Prestained SDS-PAGE, Low Range od firmy BIO-RAD (dále jen STD Biorad) a nového testovaného standardu Biotinylated Protein Ladder od firmy Cell Signaling (dále jen STD Cell Signaling). Podrobněji rozepsané cíle jsou popsány dále v práci. Účelem bylo, aby práci na základě jejího přečtení pochopil i laik, který se nevyzná v základních pojmech. Tímto laikem jsem totiž i já sama. Po provedení experimentu a sepsání této zprávy bych se měla v metodě a pojmech základně orientovat.

Toto téma jsem si vybrala, protože mě daný obor zajímá. Ráda bych se tímto směrem vydala i v dalším studiu. Proto by tato práce měla prohloubit mé znalosti a orientaci v tématu. Díky této práci také získám základní návyky a praxi v laboratoři. Chtěla jsem, aby má práce byla užitečná také někomu jinému. Proto mi bylo od firmy nabídnuto toto téma, srovnání používaného a testovaného (v laboratoři zatím nepoužívaného) standardu, na jehož základě jsem napsala pro firmu doporučení. Po celou dobu provádění experimentu ve firmě Exbio Praha, a.s., jsem pracovala pod odborným vedením a dohledem.

Práce dále obsahuje cíle a postup práce. V postupu práce popisují přesný průběh metody krok za krokem, podle klasického postupu QC laboratoře. Stať práce je členěna do pěti kapitol. První kapitola vysvětluje postupy metody a popisuje rozdílné postupy práce s oběma standardy (STD Biorad, STD Cell Signaling). Druhá kapitola se zabývá prací v laboratoři. Obsahuje laboratorní řád (v bodech). Řád se netýká všech oblastí práce v laboratoři, ale přizpůsobila jsem ho mé práci, tj. sepsané body se týkají bezpečnosti práce při provádění metody WB. V této kapitole je také výčet použitých látek, chemikálií, přístrojů a pomůcek. K vybraným položkám jsem napsala stručný popis. Ve třetí kapitole jsou popsány provedené experimenty. Při každém experimentu jsem psala deník. Není psán odborně jako postup práce, ale obvykle jsem popsala každý provedený krok, na kterém je názorně vidět postup celého experimentu. Každý experiment byl samostatně vyhodnocen. Napsala jsem jejich závěry s doporučením pro další opakování experimentu. Čtvrtá kapitola má název Diskuse. V této kapitole jsou vyhodnoceny klady a zápory obou standardů. Poslední, pátá, kapitola je nazvána Slovníček pojmů. Napsala jsem seznam všech pojmů a cizích slov, kterým nemusí laik rozumět. Jejich definice by měla pomoci k pochopení metody. V rámci závěru jsem napsala doporučení pro firmu Exbio Praha, a.s.

2. Cíle

Mým hlavním cílem byla optimalizace a zpřesnění vyhodnocení metody WB pomocí standardu na základě provedených experimentů. Optimalizace spočívá v porovnání dvou standardů, zjištění jejich nevýhod a doporučení, zda se vyplatí začít používat testovaný standard. Popřípadě navrhnout i jiná řešení, která z experimentů vyplynou.

Pro naplnění hlavního cíle a lepší pochopení metody WB jsem si vytyčila další cíle:

- seznámení s laboratorní praxí a získání základních návyků v laboratoři
- teoretické zvládnutí metody WB
- vytvoření „slovníčku“, definic používaných pojmů pro snazší pochopení a orientaci v metodě pro mě i případné laiky
- praktické provedení metody
- používání firemního protokolu během experimentu
- napsání závěrečné zprávy, jejíž součástí bude i doporučení pro firmu Exbio Praha, a.s.

3. Postup práce

3.1. Příprava buněčného extraktu¹

Lyze buněk proběhla na ledu. Ostatní činnosti proběhly při laboratorní teplotě (dále jen LT) v rozmezí přibližně 18-25°C.

Při samotné lyzi byly do lyzačního pufru těsně před použitím přidány inhibitory proteáz (10 µl inhibitorů proteáz na 1 ml lyzačního činidla). K buňkám byl přidán lyzační pufr s inhibitory proteáz a to v množství přibližně 50x10⁶ buněk do 1 ml lyzačního pufru.

Buňky byly v lyzačním pufru dobře resuspendovány. Zkumavka s lyzujícími se buňkami se nechala stát 60 min na ledu. Konečný lyzát byl získán centrifugací zlyzovaných buněk po dobu 10 min při 10 000 RPM a 4°C²³. Buněčný lyzát se dále může:

- a, uchovávat při teplotě -20°C až -85°C
- b, přidat vzorkový pufr a uchovávat při teplotě -20°C až -85°C
- c, přidat vzorkový pufr a rozdělit získané proteiny pomocí elektroforézy

3.2. SDS-PAGE (systém Hoefer Mighty Small II) Elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu⁴

Činnosti proběhly při LT v rozmezí 18-25°C.

Skla a ostatní součásti elektroforetické jednotky přístroje Hoefer Mighty Small II byly dobře omyty a odmaštěny a poté sestaveny podle návodu (z uživatelské příručky k přístroji)⁵. Ze zásobního roztoku (30% akrylamid/bis) byl namíchán polyakrylamidový separační gel o vybrané koncentraci (obvykle 8% - 15% gel). Přesné složení různě koncentrovaných gelů (10 ml, tj. objem na 2 skla) ukazuje tabulka v SOP⁶.

¹ EXBIO PRAHA, a.s. *Příprava buněčného extraktu: SOP-048*. 1. vyd. Vestec, 2005.

² Příloha 2

³ Příloha 3

⁴ EXBIO PRAHA, a.s. *SDS-PAGE (systém Hoefer Mighty Small II) Elektroforéza v denaturujícím polyakryl-amidovém gel za použití systému Hoefer Mighty Small: SOP-042*. 2. vyd. Vestec, 2008.

⁵ Příloha 4

⁶ Standardní operační systém (SOP) je interní řízená dokumentace firmy.

Požadovaná koncentrace gelu	6%	8%	10%	12%	15%
H ₂ O	5,3 ml	4,63 ml	3,97 ml	3,3 ml	2,3 ml
30% AA/bisAA	2 ml	2,67 ml	3,33 ml	4 ml	5 ml
1,5M Tris (pH=8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	8 µl	6 µl	4 µl	4 µl	4 µl

Obrázek 1, složení separačního gelu

Takto namíchaná směs byla opatrně a pečlivě promíchána a nalita mezi sestavená skla. Hladina gelu dosáhla asi 2 - 3 cm pod horní okraj skla. Gel polymeroval asi 30 - 40 min. Ze zásobního roztoku (30% akrylamid/bis) bylo namícháno 5 ml zaostřovacího gelu (množství na 2 skla). Přesné složení 5% zaostřovacího gelu ukazuje tabulka v SOP.

Požadovaná koncentrace gelu	5%
H ₂ O	3,4 ml
30% AA/bisAA	850 µl
0,5M Tris (pH=6,8)	625 µl
10% SDS	50 µl
10% APS	50 µl
TEMED	5µl

Obrázek 2, složení zaostřovacího gelu

Takto namíchaná směs byla opatrně a pečlivě promíchána a nalita do zbývajících prostoru mezi skly. Do zaostřovacího gelu byly opatrně zasunuty plastové hřebeny pro vytvoření jamek pro nanášení vzorků. Při zasouvání hřebenů bylo důležité dávat pozor, aby se neutvářely vzduchové bubliny v gelu. Polymerace zaostřovacího gelu trvala přibližně 15 - 25 min. Po zpolymerování gelu byla skla umístěna do elektroforetické vany. Prostor mezi upnutými skly a vanou byl vyplněn elektrodoým pufrem. Elektrodoým pufrem byla také naplněna spodní část vany. Hřebeny byly opatrně vyjmuty a jamky zaostřovacího gelu byly propláchnuty vodou.

Do mikroskopavek („ependorfek“) byl smíchán vzorek proteinu se vzorkovým pufrem v poměru 1:1. Vzorek proteinu byl denaturován povařením ve vodě po dobu 3 - 5 min.

Vzorky a standard byly opatrně naneseny do jamek v zaostřovacím gelu⁷. Obvykle se nanáší 5 - 300 µl vzorku v závislosti na velikosti jamek a charakteru vzorku. Po nanesení vzorků bylo elektroforetické zařízení připojeno ke zdroji stejnosměrného napětí⁸. Na zdroji byly nastaveny parametry průběhu elektroforézy. Obvykle se nastavuje napětí 80 V v průběhu přes zaostřovací gel a 160 V v průběhu přes separační gel. Doba elektroforézy je 50 - 60 min (pro malá skla), v závislosti na

⁷ Příloha 5

⁸ Příloha 6

koncentraci gelu. Po ukončení elektroforézy, kdy modré čelo doputovalo ke spodnímu okraji gelu, byl vypnut zdroj napětí a gely byly opatrně uvolněny ze skel⁹.

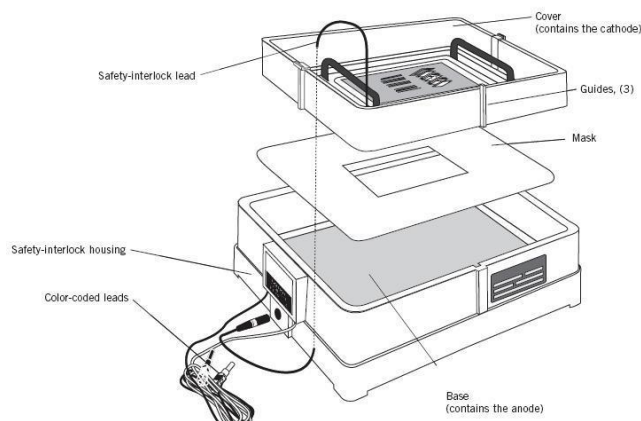
Proteiny rozdělené v polyakrylamidovém gelu mohou být následně přeneseny pomocí elektrického proudu na PVDF (polyvinylidenfluorid) nebo NC (nitrocelulóza) membránu, nebo mohou být přímo vizualizované barvením v Coomassie Blue.

3.3. Western Blotting (systém Hoefer TE70, semi-dry) Elektropřenos proteinů z polyakrylamidového gelu na membránu¹⁰

Činnosti proběhly při LT v rozmezí přibližně 18 - 25°C.

V průběhu SDS (sodium dodecylsulphate) elektroforézy byla nastříhána NC membrána o rozměrech 6 x 8 cm (8 x 8 cm na velký blot). NC membrána byla ekvilibrována v blotovacím pufru. Byly připraveny 2 pruhy chromatografického papíru o rozměrech 6,5 x 8,5 cm (8,5 x 8,5 cm pro velký blot) pro přenos proteinů z jednoho gelu.

Po ukončení SDS elektroforézy byl gel opatrně vyjmut ze skel¹¹. Blotovací zařízení bylo sestaveno podle obrázku.



Obrázek 3, blotovací zařízení

⁹ Příloha 7

¹⁰ EXBIO PRAHA, a.s. *Western Blotting (systém Hoefer TE70, semi-dry) Elektropřenos proteinů z polyakrylamidového gelu na membránu za použití systému Hoefer TE70, semi-dry system: SOP-043*. 2. vyd. Vestec, 2008

¹¹ Příloha 8

Jednotlivé součásti pro přenos (tzv. sendvič) byly poskládány v tomto pořadí¹²¹³:

1.	Chromatografický papír (namočený v blotovacím pufru)	Spodní část zařízení - anoda
2.	Membrána (namočená v blotovacím pufru)	Položit na chromatografický papír
3.	Polyakrylamidový gel (opláchnutý v blotovacím pufru)	Položit na membránu
4.	Chromatografický papír (namočený v blotovacím pufru)	Položit na polyakrylamidový gel

Tabulka 1, blotovací sendvič

Celý sendvič byl zalit 5 - 10 ml blotovacího pufru a pomocí zkumavky byly vytlačeny případné bubliny mezi jednotlivými vrstvami¹⁴. K zařízení byla připojena horní část obsahující katodu.

Kompletní zařízení bylo připojeno ke zdroji napětí a byl nastaven konstantní proud (0,8 mA/cm² gelu, tzn. 38 mA/1 gel - 55 mA na velký blot)¹⁵. Doba blottingu je 90 min.

Přeblotované proteiny na membráně je možné ihned po blokaci detegovat pomocí specifické protilátky nebo ovlhčenou membránu zabalit do PE (polyetylen) sáčku/folie a zamrazit pro pozdější využití.

3.4. Imunochemická detekce specifického antigenu na membráně¹⁶

Činnosti proběhly LT v rozmezí 18 - 25°C.

Nejprve byl připraven blokační roztok, 10% sušené mléko nebo 1% Casein¹⁷. Na 100 ml roztoku 10% sušeného mléka bylo naváženo 10 g sušeného odtučněného mléka. Navážka byla rozpuštěna přibližně v 50 ml 1xPBS/Tween. Objem byl doplněn roztokem 1xPBS/Tween na 100 ml. Na 100 ml 1% roztoku Caseinu byl navážen 1 g Caseinu. Navážka byla rozpuštěna zhruba v 80 ml 1xPBS/Tween. Objem byl doplněn roztokem 1xPBS/Tween na 100 ml.

Dále byl připraven roztok protilátky (konjugátu). Protilátka byla ředěna do ředěného blokačního roztoku o daných koncentracích¹⁸.

Byl použit konjugát s křenovou peroxidázou. Proto nesměla být protilátka naředěna v roztoku obsahujícího azid sodný (došlo by k inhibici enzymové aktivity peroxidázy).

¹² Příloha 9

¹³ Příloha 10

¹⁴ Příloha 11

¹⁵ Příloha 12

¹⁶ EXBIO PRAHA, a.s. *Imunochemická detekce specifického antigenu na membráně: SOP-020*. 1. vyd. Vestec, 2005.

¹⁷ Příloha 13

¹⁸ Příloha 14

Po celou dobu samotné imunochemické reakce bylo nutné dbát na objem roztoků aplikovaných na membránu tak, aby celý povrch na té straně membrány, kde jsou přeneseny proteiny s gelu, byl vždy v kontaktu s inkubačním roztokem a membrána nevysychala.

Po ukončení elektropřenosu byl opatrně rozebrán sendvič a membrána byla přenesena pinzetou do misky s blokačním roztokem. Blokace membrány trvá:

a, 0,5 - 2 hodiny při teplotě laboratoře na laboratorní kývačce

b, přes noc při 2 - 8°C.

Po ukončení blokace byla membrána propláchnuta 3x po 5 minutách roztokem 1xPBS/Tween. Membrána byla přenesena opatrně pomocí pinzety na nenasákavou podložku, byl přiložen hřeben, podle kterého byla skalpelem odříznuta přebytečná membrána bez naneseného materiálu nebo standardu. Poté byly nařezány jednotlivé stripy a označeny podle potřeby^{19,20}. Na membránu byla aplikována primární protilátka v optimálním ředění (1 µg/ml a 5 µg/ml). Inkubace²¹ trvá:

a, minimálně 1 hodinu při LT na laboratorní kývačce

b, přes noc při 2 - 8°C.

Po ukončení inkubace membrány s primární protilátkou byla membrána propláchnuta 3x po 5 minutách roztokem 1xPBS/Tween pro odstranění nenavázaných zbytků primární protilátky. Na membránu byla aplikována sekundární protilátka – konjugát v dostatečném ředění (ředí se nejlépe do 1xPBS/Tween) dle doporučení ředění výrobce. Byl použit konjugát s křenovou peroxidázou. Proto nesměla být protilátka naředěna v roztoku obsahujícím azid sodný (došlo by k inhibici enzymové aktivity peroxidázy). Inkubace trvá 45 - 60 min při LT na laboratorní kývačce. Po ukončení inkubace membrány se sekundární protilátkou byla membrána propláchnuta 3x po 5 minutách roztokem 1xPBS/Tween pro odstranění nenavázaných zbytků sekundární protilátky. Na membránu byl aplikován ECL substrát.

3.5. Vizuální detekce specifického antigenu po imunochemické reakci²²

Po provedení imunochemické reakce byl specifický signál vizualizován pomocí ECL substrátu v závislosti na použití konjugátu s křenovou peroxidázou.

Činnosti proběhly při LT v rozmezí přibližně 18 - 25°C.

Po ukončení inkubace membrány s konjugátem byla membrána propláchnuta 3x po 5 minutách v promývacím roztoku (1xPBS/Tween). Pinzetou byly jednotlivé stripy přeneseny na

¹⁹ Příloha 15

²⁰ Příloha 16

²¹ Příloha 17

²² EXBIO PRAHA, a.s. *Imunochemická detekce specifického antigenu na membráně: SOP-028*. 1. vyd. Vestec, 2005.

umělohmotnou podložku²³. Substráty č.1 a č.2 byly pečlivě smíchány v poměru 1:1000, a poté byly opatrně aplikovány na membránu (cca 1,5 - 2 ml na jednu membránu o velikosti 6,5 x 8,5 cm)²⁴. Substráty působily 1 min a poté byl na membránu opatrně přiložen filtrační papír či buničina a lehce byl odstraněn přebytek nalitých substrátů. Podložní deska s membránou byla zabalena do potravinářské folie a byla vyhlazena tak, aby pod folií nezůstaly na membráně bublinky.

Další kroky byly prováděny v temné komoře²⁵.

Deska s membránou byla vložena do fotografických desek a za tmy byl na membránu přiložen film citlivý k modrému světlu²⁶. Doba expozice byla určena zkusmo (dělá se pro každé experimentální uspořádání). Záviselo na množství antigenu na membráně, na použitých protilátkách, na jejich ředění, i na inkubačních dobách jednotlivých kroků v imunochemické reakci. Po uplynutí expoziční doby byl film vyjmut z fotografických desek a ponořen na 1 - 2 minuty do vývojky. Poté byl protáhnut dH₂O a ponořen na 1 - 2 minuty do ustalovače. Po vytažení z ustalovače byl film nechán propírat se 10 - 15 minut pod tekoucí vodovodní vodou. Film byl pověšen a nechán volně uschnout při LT²⁷. Výsledný signál byl porovnán s pozitivní i negativní kontrolou.

²³ Příloha 18

²⁴ Příloha 19

²⁵ Příloha 20

²⁶ Příloha 21

²⁷ Příloha 22

4. Teorie metod

4.1. Příprava buněčného extraktu, SDS PAGE elektroforéza, Western Blotting a Imunochemická a vizuální detekce

Příprava buněčného extraktu spočívá v lyzi buněk. Buňky se rozloží v důsledku rozpadu jejich vnější membrány a uvolní tak svůj obsah.

SDS PAGE (sodium dodecylsulphate - polyacrylamide gel electrophoresis) je metoda, která separuje proteiny na základě jejich molekulové hmotnosti. Metoda funguje tak, že negativně nabitě proteiny se v gelu pohybují ke kladné elektrodě. Menší proteiny se pohybují rychleji. Proteiny se rozdělují podle velikosti (molekulové hmotnosti). Velikost je měřena v daltonech (Da) či kilodaltonech (kDa). SDS²⁸ je aniontový detergent, který solubilizuje a denaturuje proteiny a dodává proteinům negativní náboj. Většina proteinů váže SDS ve stejném poměru, asi 1,4 g SDS/1 g proteinu. Pevný a inertní akrylamidový gel je ideální pro separaci proteinů. Nejprve se připraví polyakrylamidové gely²⁹ a vzorky pro SDS - PAGE. Gel se připraví tak, že k základnímu roztoku pro separační gel se přidá TEMED³⁰ a APS³¹. Ty zahájí polymeraci gelu. K připravenému roztoku pro zaostřovací gel se přidá TEMED a APS. Separační gel (s pufrům o hodnotě pH 8,8) se po zatumnutí překrývá cca 1 cm vrstvou tzv. zaostřovacího gelu s velkými póry (pufr o hodnotě pH 6,8). Hřeben vsazený navrch zaostřovacího gelu vytvoří jamky. Proteiny se tepelně denaturují ve vzorkovém pufru (vzorky se povaří při 90 - 100°C po dobu 4 – 5 min a poté se aplikují na gel). Vzorkový pufr obsahuje Tris pufr (utváří vhodné pH), SDS (detergent poskytující proteinům negativní náboj), Glycerol (má vyšší hmotnost, která zajišťuje klesnutí vzorku ke dnu jamky v gelu po nanesení) a vzorkový pufr redukující (Laemmli, obsahuje barvivo umožňující sledovat průběh elektroforézy – pohyb čela v gelu). Po denuraci se zachová pouze primární struktura proteinů. Denaturované proteiny mají vláknitý tvar a stejný záporný náboj daný vazbou SDS. Jejich pohyb v gelu při elektroforéze tedy závisí pouze na jejich molekulové hmotnosti. Následuje vlastní elektroforéza. Po zapnutí proudu putují ionty z elektrodového pufru z nádoby do zaostřovacího gelu a před nimi postupují ionty z tohoto gelu. Ionty z elektrodového pufru se setkávají s pufr, které je nižší než jejich pH a vytvářejí proto nenabitě formy, které jsou v elektrickém poli nepohyblivé. Tím je způsoben nedostatek nabitých částic a vzniká velký odpor. Velký odpor způsobí zvýšení intenzity elektrického pole. Anionty se pohybují rychleji, dokud nevstoupí do separačního gelu. Rychlost je zpomalena kvůli velkému množství iontů v pufru. Ionty proteinů vstupují do separačního gelu v podobě velmi úzkých, na sebe navrstvených proužků, seřazených dle své pohyblivosti. Ve vyšším pH separačního gelu získají proteiny opět svou nabitou formu a probíhá normální elektroforetické dělení. Proteiny s negativním nábojem se pohybují směrem ke kladně nabitě elektrodě. Elektroforéza se ukončí po doběhnutí elektroforetického čela na konec separačního gelu. Poté se proteiny přenáší na NC membránu pomocí blottingu.

²⁸ Příloha 23

²⁹ Příloha 24

³⁰ Příloha 25

³¹ Příloha 26

Pro další práci s proteiny je nutné proteiny extrahovat z gelu, který je nevhodný pro manipulaci i pro provádění detekčních chemických reakcí. Pro přenos se používá technika WB, konkrétně metoda elektroblotting, což je nejrychlejší a nejúčinnější metoda blottingu. Podle provedení se rozlišuje tzv. tankový (tank, wet) blotting a polosuchý (semi-dry) blotting. Byl proveden polosuchý (semi-dry) blotting. Jeho výhodami v porovnání s tankovým blottingem jsou homogenní elektrické pole, menší spotřeba přenosového pufru a možnost současného přenosu z několika gelů. Při blottingu se elektroforézou separované proteiny přenášejí na nitrocelulózu membránu, kde jsou uchyceny adsorpcí nebo kovalentní vazbou. Dále probíhá specifická detekce proteinů. Protože k další detekci se často využívají jiné proteiny, je nutné po vlastním přenosu blokovat zbývající vazebná místa na membráně, aby zde nedošlo k nespecifické vazbě těchto bílkovin. K blokaci se používá sušené odtučněné mléko. Detekce se provádí použitím primárních protilátek³². Vzniklý imunokomplex se vizualizuje vazbou značené sekundární protilátky (značení nejčastěji vazbou enzymu, v těchto experimentech vazbou enzymu peroxidázy). Sekundární protilátka se naváže na antigen primární protilátky. Nakonec se nanese ECL substrát, který vizualizuje specifický signál (způsobí chemiluminiscenci v důsledku reakce s peroxidázou).

4.2. **Prestained SDS - PAGE, Low Range od firmy BIO-RAD**

STD Biorad se před použitím nemusí nijak upravovat. Proto se rovnou aplikuje na připravený gel do malé jamky. Během elektroforézy se vytvoří krásný modrý žebříček různě velikých, do bandů separovaných, proteinů. Po blottingu, blokaci a promytí se STD odřízne a ponoří do roztoku 1xPBS/Tween. Poté se dá na kývačku. V této fázi je práce se STD Biorad hotová. STD je třeba až k závěrečnému vyhodnocení provedeného experimentu. K vyvolanému snímku se přiloží STD, fixem se na snímek označí jednotlivé bandy ze STD a dopíše se velikost proteinů jednotlivých bandů z certifikátu k dané šarži STD.

4.3. **Biotinylated Protein Ladder od firmy Cell Signaling**

Před aplikací STD Cell Signaling je třeba smíchat 10 µl STD s 10 µl vzorkového pufru redukcího (ředění v poměru 1:1). Takto připravený STD se nechá 5 min povařit ve vodní lázni. Poté se aplikuje na ztuhnutý gel, do malé jamky. Během elektroforézy je vidět pouze putující čelo. Před blottingem je třeba na NC membránu napsat, kde se STD nachází. Po blottingu totiž není vidět. Po blottingu, blokaci a promytí se STD odřízne a ponoří do roztoku 1xPBS/Tween. Poté se dá na kývačku. Se STD se dále pracuje až při navazování sekundární protilátky na stripy. STD má na sobě navázaný protein s biotinem. Proto se na něj navazuje anti-biotin/Px (anti-biotin se ředí v roztoku 1xPBS/Tween v poměru 1:1000). Do tohoto roztoku se STD ponoří a nechá se 60 min inkubovat na kývačce, stejně jako stripy v sekundární protilátce. Další postup už je stejný s ostatními stripy, na kterých testujeme protilátky. Po inkubaci se STD celkem 3x promývá v roztoku 1xPBS/Tween. Promytý STD se i se stripy přenesou na umělohmotnou podložku, kde se na vrchu k podložce přichytí izolepou. Poté se nanese ECL substrát a 1 min se nechá působit. Nakonec se ve vyvolávací komoře vyvolají snímky. Na závěr stačí na vyvolaný snímek dopsat velikosti proteinů jednotlivých bandů STD. Díky společnému vyvolávání STD Cell Signaling se stripy, by měl být ve vyhodnocování

³² Příloha 27

přesnější než STD Biorad. Není třeba STD přikládat a odhadovat pozici stripu na snímku a STD na NC membráně.

5. Práce v laboratoři

5.1. Pravidla bezpečnostní práce v laboratoři^{33,34,35,36}

1. V laboratoři se pracuje v předepsaném pracovním ochranném oděvu. Dlouhé vlasy je nutno mít sepnuté. Při práci je důležité použít všechny nezbytné ochranné pomůcky a dodržovat bezpečnostní předpisy. Při každé práci je nutné mít rukavice.
2. V laboratoři je zakázáno jíst, pít, kouřit a jakékoli nehygienické chování.
3. Při práci musí být zachován klid a udržována maximální čistota. Pracuje se s maximální pozorností.
4. Každá láhev nebo jiný druh obalu musí mít čitelně popsany obsah.
5. S pevnými chemikáliemi se nikdy nemanipuluje rukou. Používají se čisté laboratorní lžičky a špachtle. V případě znečištění chemickou látkou se kontaminované místo ihned oplachuje proudem vody.
6. Zátky lahví se nesmějí pokládat potřísněnou plochou na desku stolu. Lahve a jiné obaly je po odebrání potřebného množství chemikálie třeba ihned uzavřít.
7. Pipetování jedovatých, leptavých, dráždivých a potenciálně infekčních (biologických) kapalin je nutno provádět bezpečnostními pipetami nebo pomocí balonku. Nikdy ne přímo ústy.
8. Při manipulaci s látkami ve zkumavkách a jiných nádobách musí ústí nádoby směřovat od vlastní osoby i od jiných pracovníků.
9. Při rozsypaní nebo rozlití škodlivé látky je nutno okamžitě zajistit její zneškodnění. Kontaminovaná plocha se řádně omyje vodou.
10. Roztoky chemikálií se vylévají do odpadu jen za současného ředění nadbytkem vody z vodovodu. Nebezpečný odpad se do odpadu nevylévá. S ohněm se musí pracovat v dobře odsávané a zapojené digestoři.

³³ Úvodní školení o bezpečnosti práce v laboratoři. In: *ÚSTAV FYZIKA A MATERIÁLOVÉHO INŽENÝRSTVÍ* [online]. Fakulta technologická, UTB ve Zlíně, 03. 05. 2009 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: http://ufmi.ft.utb.cz/texty/plazmochemie/PCH_lab_bezpecnost.pdf

³⁴ Pravidla bezpečnosti práce v laboratoři. In: *UNIVERZITA KARLOVA: 3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA* [online]. [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/praktika/bezpecnost.htm>

³⁵ Všeobecné zásady bezpečnosti práce v chemické laboratoři. In: *Ústav výpočetní techniky MU* [online]. [cit. 2012-11-07]. Dostupné z:

http://www.rect.muni.cz/nso/Chemicke_latky/html/Vseobecne_zasady_bezpecnosti_prace_v_chemicke_laboratori.php

³⁶ Bezpečnost práce a požární ochrana v chemické laboratoři. In: *Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola Hradec Králové: Analýza léčiv* [online]. [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://anl.zshk.cz/vyuka/bozp.aspx>

11. Při práci s hořlavinami se dbá na to, aby nemohlo dojít ke vznícení par od otevřeného ohně.
12. Látky s oxidačními a redukčními vlastnostmi se nesmějí spolu roztírat. Může dojít k exotermické reakci nebo nebezpečné explozi.
13. Chemické sklo a skleněné součásti chemických aparatur je třeba před prací prohlédnout. Poškozené sklo je třeba ihned vyřadit. Střepy skla i drobné střípky je nutno opatrně a pečlivě odstranit.
14. Při zahřívání s teplotou varu pod 100°C se užívají elektricky vyhřívané vodní lázně nebo plotny.
15. Ramena odstředivek musí být stejnoměrně zatížena. Odstředivky musí být během centrifugace uzavřeny, víko nesmí být otevřeno, dokud přístroj není opět v klidu. Většina centrifug je chráněna proti předčasnému otevření pojistkou.
16. Při poleptání kůže se postižené místo ihned dostatečně opláchně proudem studené vody. Při větším potřísnění se vyhledá lékařská pomoc.
17. Chemikálie se nesmí nikdy ochutnávat. Vnikne-li chemická látka do úst, je třeba zamezit jejímu spolknutí. Vyplivne se a ústa se proplachují vodou. Při požití jedovaté látky se ústa opakovaně vypláchnou vodou, po vypití asi půl litru tekutiny se vyvolá zvracení a vyhledá se lékařská pomoc.
18. Zasažené oko se ihned vypláchně proudem studené vody a ihned se vyhledá lékařská pomoc.
19. Při popálení ohněm nebo horkými předměty je třeba postižená místa ihned ochladit ledovou vodou. Části oděvu stmelené s popáleninami se zásadně neodstraňují. Při opaření je nutno co nejrychleji stáhnout nasáklý oděv. V případě nutnosti se vyhledá lékařská pomoc.
20. Při úrazu elektrickým proudem, je-li postižený pod napětím, je nutno nejprve přerušit přívod proudu. Raněného je nutné vyprostit z okruhu elektrického proudu a ihned poskytnout první pomoc. Při zástavě dechu a srdce (bezvědomí, nehmatný tep, rozšířené zornice) začneme s masáží srdce a umělým dýcháním.
21. Při vzniku řezných ran se krvácející rána omyje proudem vody a vydezinfikuje. Rána se ováže. Jsou-li v ráně cizí tělesa, musí je vyjmout lékař.
22. Použité chemické nádobí a zařízení se po použití důkladně omyje a na závěr se opláchně dH₂O.
23. Před zahájením každé činnosti je třeba se předem zamyslet, jaká hrozí rizika.

5.2. Chemikálie a materiál

- APS³⁷ (peroxodisíran amonný je velmi dobře rozpustný ve studené vodě, je silným oxidačním činidlem, do akrylamidového gelu se přidává jako zdroj volných radikálů)

³⁷ Peroxodisíran amonný. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 27. 4. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Peroxodis%C3%ADran_amonn%C3%BD

- buněčný extrakt
- buničina
- biotin (vitamín H, v experimentu je biotin navázaný na proteinech STD Cell Signaling, sekundárně se na něj navazuje anti-biotin)
- blokační roztok (roztok sušeného odtučněného mléka, který na NC membráně vyblokuje volná, lyzátem nezaplňená, vazebná místa, kam by se pak protilátka mohla nespecificky navázat)
- blotovací pufr (roztok používaný při WB pro přeblotování proteinů)
- dH₂O³⁸ (destilovaná voda, prošla destilací, která ji zbavila rozpuštěných minerálních látek)
- ECL substrát (vizualizuje specifický signál na membráně s navázanou sekundární protilátkou, způsobuje chemiluminiscenci v důsledku reakce s křenovou peroxidázou)
- elektrodotový pufr (roztok používaný při elektroforéze, v elektroforetickém zařízení)
- filtrační papír³⁹ (filtr pro oddělení pevné látky od kapaliny nebo plynu)
- chromatografický papír⁴⁰ (speciální papír používaný při chromatografii – separaci látek nebo např. při WB, kdy je nosičem elektrolytu)
- inhibitory proteáz⁴¹ (polypeptidy a bílkoviny, které s proteolytickými enzymy vytvářejí stabilní komplexy)
- promývací roztok (roztok, ve kterém probíhá promývání, např. 1xPBS/Tween)
- lyzační pufr
- nitrocelulózová membrána⁴² (nitrát celulózy, hořlavá látka vzniká esterifikací celulózy, lepkavá membrána s afinitou k aminokyselinám, užívaná při diagnostických testech, kde dochází k vazbě antigenů)
- 1xPBS/Tween

³⁸ Destilovaná voda. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 13. 7. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Destilovan%C3%A1_voda

³⁹ Filtrace. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 21. 9. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Filtrace>

⁴⁰ Chromatografie. In: *Katedra fyzikální chemie: Univerzita Palackého v Olomouci* [online]. Katedra fyzikální chemie, PřF UP, © 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/chrom/chrom_teorie.htm

⁴¹ Luskoviny. In: [online]. [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://vfu-www.vfu.cz/vegetabilie/plodiny/czech/luskoviny.htm>

⁴² Nitrocelulóza. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 4. 10. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Nitrocelul%C3%B3za>

- peroxidáza^{43,44} (označení pro jeden typ enzymů, avidin-peroxidáza je modifikovaná peroxidáza, na kterou je připojen protein avidin, získává se nejčastěji z křenu selského, používá se k vizualizaci biochemických interakcí, kdy jeden reaktant je navázaný na biotin a avidin je schopný se s ním specificky a silně navázat i s peroxidázou, ta po přidání vhodného substrátu vizualizuje interakci)
- polyakrylamidový gel (pevný, inertní, ideální pro separaci proteinů, vytvořen polymerací zahájenou volnými radikály vzniklými při rozkladu peroxodisíranu amonného)
- primární protilátka (specifická protilátka, která se navazuje na protein na povrchu membrány)
- sekundární protilátka (navazuje se na primární protilátku, má na sobě navázanou molekulu, která zajišťuje vizualizaci)
- SDS⁴⁵ (sodium dodecylsulphate, aniontový detergent, solubilizuje a denaturuje proteiny, dodává proteinům negativní náboj, většina proteinů váže SDS ve stejném poměru, asi 1,4 g SDS/g proteinu)
- STD Prestained SDS-PAGE, Low Range od firmy BIO-RAD
- STD Biotinylated Protein Ladder od firmy Cell Signaling
- TEMED (Tetramethylethylenediamine, katalyzátor, přidává se do polyakrylamidového gelu, kde spolu s APS způsobí polymeraci gelu)
- Tris 0,5 M (tris(hydroxymethyl)aminometan)
- Tris 1,5 M (tris(hydroxymethyl)aminometan)
- ustalovač⁴⁶ (vodný roztok chemických látek, fixuje obraz zviditelněný vývojkou)
- vývojka⁴⁷ (vodný roztok chemických sloučenin, zviditelňuje obraz zaznamenaný na světlocitlivou vrstvu fotografického filmu)
- vzorkový pufr redukující (za zvýšené teploty se v něm denaturují proteiny)

⁴³ Peroxidáza. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 1. 4. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Peroxid%C3%A1za>

⁴⁴ Avidin-peroxidáza. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 31. 3. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Avidin-peroxid%C3%A1za#K.C5.99enov.C3.A1_peroxid.C3.A1za

⁴⁵ *SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immuno-blotting (Western-blottingé* [online]. [cit. 7. 11. 2012]. Dostupné z: http://tierhygiene.vetmed.uni-leipzig.de/files/uni/artikel/anlagen/240_1.pdf

⁴⁶ Ustalovač. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 10. 2. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Ustalova%C4%8D>

⁴⁷ Vývojka. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 13. 9. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/V%C3%BDvojka>

5.3. Pomůcky a přístroje

- automatické pipety⁴⁸ (slouží k přesnému odměřování objemů kapalin, umožňují odměření rozdílných objemů kapalin, kapalina se nasává do jednorázové plastové špičky)
- budík
- centrifuga⁴⁹ (odstředivka, zařízení, které při rotaci působí na vložený materiál odstředivou silou, používá se především pro oddělení různě těžkých kapalin a plynů nebo pro jejich oddělení od pevných látek)
- drtička ledu
- film citlivý na modré světlo
- fotografické desky (nepropustí dovnitř světlo, vkládají se do nich fotografický film a podložka s NC membránou, na které se díky luminiscenci vizualizují proteiny)
- kývačka⁵⁰ (laboratorní zařízení umožňující neustálé promíchávání díky svému stálému kývání)
- laboratorní lžička
- petriho miska⁵¹ (mělká, skleněná, kruhová miska s volně přiléhajícím víčkem)
- pinzeta
- plastové vaničky
- plastový hřeben
- polystyrenová krabička
- potravinářská fólie
- skalpel
- stříčka⁵² (slouží k vytlačování kapaliny, která je v plastové nádobce, po stlačení kapalina proudí trubičkou ven)

⁴⁸ Pipeta. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 29. 5. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Pipeta>

⁴⁹ Odstředivka. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 10. 2. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Odst%C5%99edivka>

⁵⁰ Třepačka. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 2. 12. 2010 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/T%C5%99epa%C4%8Dka>

⁵¹ Petriho miska. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 13. 7. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Petriho_miska

⁵² Laboratorní sklo a jiné pomůcky. In: *Nanimata* [online]. 30. 6. 2009 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://www.nanimata.wu.cz/skloapomucky.php>

- systém Hoefer Mighty Small II (zařízení umožňující provedení proteinové elektroforézy)
- systém Hoefer TE70, semi-dry (zařízení umožňující provedení metody elektroblotting)
- špičky
- třepačka (laboratorní zařízení umožňující neustálé protřepávání)
- umělohmotná podložka
- vodní vývěva⁵³ (zařízení sloužící k odčerpávání kapaliny, trubicí 1 rychle proudí kapalina, vzniká tak nižší tlak než v místě pomalejšího proudění kapaliny, rozdíl tlaků nasává plyn, případně i kapalinu z trubice 2, která je napojená na trubicí 1)
- vortex (zařízení sloužící k intenzivnímu promíchání obsahu jedné zkumavky)
- zkumavky

6. Experimenty

6.1. Deníky

Prosinec

28. 12. 2012

Prvním krokem mé práce v laboratoři je připravit si buněčný extrakt. Jeho příprava musí probíhat na ledu. Proto jsem nadrtla led a dala ho do polystyrenové krabičky. K 10 µl inhibitoru proteáz jsem přimíchala 1 ml již hotového lyzačního pufru (laurylmaltosid, 1% roztok). Celý tento roztok jsem pak přimíchala k peletce buněk, při tomto experimentu byly použity buňky Jurkat (buňky byly zamražené tzv. „na sucho“). Jedná se o množství přibližně 50x10⁶ buněk. Vše jsem promíchala pomocí pipety a dala na 60 min na kývačku (v polystyrenové krabičce s ledem). Pak jsem na 10 min, při 4°C a 10 000 RPM centrifugovala lyzát. Díky tomu se mi roztok rozdělil na supernatant a zbytky membrán apod. Supernatant jsem odebrala a dala ho na led.

Nyní jsem si začala připravovat věci na elektroforézu. Řádně jsem si očistila skla a elektroforetické zařízení a sestavila elektroforetickou jednotku. Pak jsem mohla začít s přípravou gelů. Podle množství z tabulky v SOP jsem na separační gel smíchala H₂O, 30% akrylamid/bis, Tris a APS tak, aby mi vznikl 10% roztok. Připravila jsem množství pro dvě skla a gel jsem promíchala. Pipetou jsem gel nalila mezi sestavená skla, 2 cm pod okraj, který jsem označila fixem. Pak gel 45 min polymeroval. Dále jsem si připravila zaostřovací gel. Opět jsem do zkumavky namíchala množství podle tabulky v SOP a připravila 5% roztok pro dvě skla. Roztok jsem v ruce promíchala (párkrát jsem otočila zkumavku dnem vzhůru) a nalila ho na ztuhnutý separační gel. Do gelu jsem pak

⁵³ Vývěva. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 22. 9. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/V%C3%BDv%C4%9Bva>

zasunula plastový hřeben, aby se mi vytvořily potřebné jamky. Musela jsem dávat pozor, aby nevznikly vzduchové bublinky, a jamky jsem na skle označila fixem. Zaostřovací gel tuhnul 20 min.

Do mikroskopické zkušební buňky jsem odebrala 300 μ l lyzátu (odebraného supernatantu) a přidala do něj 300 μ l vzorkového pufru redukujícího (Laemmli). Směs jsem 4 min povařila ve vodní lázni. 200 μ l povařeného lyzátu Jurkatů jsem pipetou aplikovala do větší jamky. Z jedné strany elektroforetického zařízení jsem dala do malé jamky 8 μ l STD Biorad, z druhé strany jsem aplikovala stejné množství STD Cell Signaling. Do celého elektroforetického zařízení jsem nalila elektrolyt. Takto připravené zařízení jsem mohla připojit k proudu. Přes zaostřovací gel jsem nastavila napětí 80 V a proud 400 mA. Doba elektroforézy přes zaostřovací gel byla 25 min. U separačního gelu jsem nastavila napětí 160 V a proud 400 mA. Viděla jsem čelo elektroforézy, modrou linku, která putovala gelem. U STD Biorad byl vidět krásný žebříček rozdělených proteinů. U STD Cell Signaling nebyly vidět proteiny, ale jen putující čelo. Doba elektroforézy přes separační gel byla 55 min.

Během elektroforézy jsem si nastříhala 2 NC membrány o rozměrech 7 x 9 cm. Jednalo se o malé blot. Membrány jsem ponořila do blotovacího pufru. Na 1 membránu jsou potřeba 2 chromatografické papíry, také o rozměrech 7 x 9 cm. Celkem jsem si tedy připravila 4 a těsně před vložením do sendviče jsem je ponořila do blotovacího pufru. Po ukončení elektroforézy jsem musela pomocí stříčky velmi opatrně vyjmout gel ze skel. Zaostřovací gel jsem odstranila. Podle návodu jsem sestavila blotovací zařízení a připravila do něj takzvaný sendvič. Sendvič se skládal v pořadí: chromatografický papír, membrána, polyakrylamidový gel a chromatografický papír. Ve spodu se nacházela anoda, nahoře pak katoda. Pro lepší orientaci po blottingu jsem si na NC membránu popsala, kde je jaký STD. Při blottingu totiž STD Cell Signaling vizuálně zmizí a není pak poznat, kde se na NC membráně nachází. Vše jsem ještě lehce polila blotovacím pufrem a pomocí zkušební buňky jsem vytlačila bublinky vzduchu. Zařízení jsem uzavřela a připojila k proudu. Pro jeden gel je potřebný proud 30 mA, takže jsem pro mé 2 gely nastavila 60 mA. Napětí bylo 300 V a celkový čas blottingu byl 80 min.

Během blottingu jsem si připravila blokační roztok. Potřebovala jsem 10% sušené mléko. Proto jsem navázila 5 g sušeného odtučněného mléka a naředila do 50 ml roztoku 1xPBS/Tween. Zkušební buňku jsem pečlivě uzavřela a nechala po dobu blottingu promíchávat na třepačce. Po ukončení blottingu jsem zařízení rozebrala a opatrně vyjmula membrány. Ponořila jsem je do blokačního roztoku - 10% mléka a dala je na 1 hodinu na kývačku. Blokaci membrán jsem nechala probíhat přes noc při 2 - 8°C.

29. 12. 2012

Druhý den experimentu jsem začala přípravou primární protilátky. Smíchala jsem 1 ml ředěného blokačního roztoku (0,5 g mléka + 50 ml 1xPBS/Tween) s požadovaným objemem protilátky (koncentrace jsem si zjistila z pipetovacího protokolu⁵⁴). Celkem jsem si připravila 4 protilátky o různých koncentracích a blank. Potřebovala jsem celkem 16 očíslovaných zkušebek, 8 pro membránu se STD Biorad a 8 pro membránu se STD Cell Signaling. Všechny zkušebky jsem

⁵⁴ Příloha 28

promíchala na vortexu. Takto promíchanou protilátku jsem pak pipetou aplikovala do vaniček. Vaničky jsem si také očíslovala, tak, že roztok 1 ze zkumavky 1 byl ve vaničce označené číslem 1.

Membránu jsem promyla v roztoku 1xPBS/Tween a dala ji na chvíli na kývačku. Poté jsem ji dala na očištěnou pracovní plochu. Nejdříve jsem membránu ořízla dle přiloženého hřebínku použitého při elektroforéze a pak jsem ji rozřezala na stripy. Membránu jsem musela udržovat stále vlhkou, jinak by popraskala. Stripy jsem si také očíslovala tužkou a podle čísla jsem je rozřadila do vaniček. Při vkládání stripů do jamek vaničky bylo důležité dávat pozor, abych si jednotlivé roztoky navzájem nekontaminovala. STD Biorad jsem dala do vaničky s roztokem 1xPBS/Tween a ho odložila na kývačku. S ním jsem dál už nic nedělala. Se STD Cell Signaling jsem pracovala dál, vyvolává se stejně jako NC membrána. STD Cell Signaling a stripy ve vaničkách jsem dala na kývačku a nechala jsem je 60 min inkubovat. Následovalo propláchnutí membrán. Nejprve jsem vývěvou odsála roztok z jamičky (u každého stripu byla potřeba nová špička kvůli vyvarování se kontaminaci, stripů jsem se nesměla dotknout). Pak jsem do vaniček stříčkou aplikovala promývací roztok 1xPBS/Tween a dala na 5 min promýt na kývačku. Promytí proběhlo celkem 3x.

Pak jsem si připravila sekundární protilátku. Konjugát s křenovou peroxidázou jsem naředila v roztoku 1xPBS/Tween v poměru 1:5000 (2 μ l protilátky + 10 ml 1xPBS/Tween). Do každé vaničky jsem aplikovala 1 ml roztoku se sekundární protilátkou. Na kývačce pak probíhala po dobu 60 min. inkubace. Propláchnutí membrán po inkubaci bylo stejné jako u primární protilátky. Také proběhlo celkem 3x.

Na proteinech STD Cell Signaling byl navázaný biotin. Proto jsem na něj navázala anti-biotin s křenovou peroxidázou v ředění 1:1000 (10 μ l anti-biotinu, 10 ml PBS). Dále jsem se STD postupovala stejně jako se stripy (60 min. inkubace, promytí 3x 5 min v roztoku 1xPBS/Tween).

Stripy jsem pinzetou přenesla na omytou a očištěnou umělohmotnou podložku (i se STD Cell Signaling). Seřazené očíslované stripy jsem na vrchu přichytila izolepou.

Pak jsem si připravila ECL substrát. Smíchala jsem jednotlivé složky ECL substrátu, roztok č.1 a roztok č.2, v poměru 1:1000 (4 μ l+4000 μ l), čímž vznikl ECL substrát. Pipetovala jsem do zkumavky zabalené v alobalu, aby na roztok nepůsobilo světlo. Substrát jsem pipetou nanesla na membrány (2 ml/membrána) a nechala ho 1 min působit. Poté jsem přiložila buničinu a odsála přebytečný substrát. Vše jsem zakryla potravinářskou fólií a vzniklé bublinky jsem vyhladila. Podložku jsem vložila do fotografických desek a rychle jsem šla do připravené vyvolávací komory. Do desek jsem vložila film citlivý k modrému světlu postupně na expoziční dobu 10 min, 2 min, 1 min, 3 min. Po uplynutí expoziční doby jsem film dala na 1 - 2 min do vývojky, poté jsem film protáhla dH₂O a dala na 1 - 2 min do ustalovače. Nakonec jsem ho opláchla ve vodě a nechala uschnout.

Únor

16. 2. 2012

Nejprve jsem si v drtičce ledu nadrtila led a lopatkou ho přendala do polystyrenové krabičky. Pro tento experiment jsem použila buňky Hela a MCF-7 (buňky zamražené „na sucho“,

50x10⁶ buněk). Ty jsem si našla v mrazáku a dala je na připravený led. V laboratoři jsem smíchala 1 ml laurylmaltosidu (1% roztok) s 10 µl inhibitoru proteáz. Takto připravený, na vortexu promíchaný, roztok jsem opatrně přimíchala k peletce buněk Hela a MCF-7. Vše jsem promíchala pomocí pipety. Zkumavku jsem dala na led a nechala 60 min na kývačce lyzovat. Po hodině jsem lyzát centrifugovala po dobu 10 min při 4°C a 10 000 RPM. Lyzát se mi rozdělil na supernatant a zbytky membrán apod. Supernatant jsem opatrně odebrala pipetou do eppendorfy a dala ho na led.

Dále jsem si očistila elektroforetická skla (teplou vodou, jarem a nakonec dH₂O) a následně sestavila elektroforetickou jednotku. Protože budu provádět velký blot, vzala jsem velká skla. Pro přípravu separačního gelu jsem do zkumavky smíchala H₂O, 30% akrylamid/bis, Tris, SDS a APS tak, aby mi vznikl 10% roztok. Připravila jsem gel pro 2 skla. Přesné množství reagensů jsem zjistila ze SOP. Zkumavku jsem promíchala v ruce a gel pak nalila mezi sestavená skla a to 2 cm pod okraj. Fixem jsem na skle označila, kam až gel sahá. Gel jsem nechala polymerovat (tuhnout) 45 min.

Následně jsem připravila 5% roztok zaostřovacího gelu (přesné množství reagensů jsem si opět zjistila v SOP), promíchala ho a pipetou aplikovala na ztuhnutý separační gel. Do gelu jsem zasunula důkladně omytý plastový hřeben pro dvoulyzační jamku. Hřeben jsem zasouvala pomalu a opatrně, případně vzniklé bublinky jsem vyhladila špičkou filtračního papíru. Fixem jsem na skle označila vytvořené jamky a nechala gel tuhnout 20 min.

Poté jsem k 300 µl lyzátu (odebraného supernatantu) přidala 300 µl vzorkového pufru redukujícího (Laemmli). Směs jsem po dobu 4 min povařila ve vodní lázni. Opatrně jsem z gelu vysunula plastové hřebeny a do jamek pipetou aplikovala nanášky. Na jeden gel jsem do jamky aplikovala 200 µl lyzátu buněk Hela, do druhé jamky 100 µl lyzátu buněk MCF-7. Do malé jamky jsem aplikovala 10 µl STD Biorad. Na druhý gel jsem aplikovala 20 µl STD Cell Signalling.

Do sestaveného elektroforetického zařízení s přiloženými skly s gely jsem nalila elektrolyt, přiklopila ho víčkem a připojila k proudu. Po dobu 20 min, kdy proteiny putovaly přes zaostřovací gel, jsem nastavila napětí 80 V a proud 400 mA. Přes separační gel putovaly proteiny po dobu 60 min pod napětím 160 V a pod proudem 400 mA. Čím větší je napětí, tím rychleji putuje čelo proteinů. U STD Biorad se mi postupně vytvořil krásný žebříček velikostně separovaných proteinů. U STD Cell Signaling jsem viděla jen putující linku čela, ale ne jednotlivé proteiny.

Při průběhu elektroforézy jsem si začala připravovat materiál na WB. Nastříhala jsem si 2 NC membrány o rozměrech 8,5 x 9 cm (pro velký blot) a ponořila je do petriho misky s blotovacím pufrem. Na jednu membránu jsou potřeba 2 chromatografické papíry. Proto jsem si připravila 4 o rozměrech 8,5 x 9 cm a také je těsně před blottingem ponořila do blotovacího pufru. Po skončení elektroforézy jsem z jednotky vyndala skla, ze kterých jsem gely pomocí stříčky s dH₂O odlepila od skla. Odstranila jsem již nepotřebný zaostřovací gel a separační gel s proteiny jsem přenesla na NC membránu. Připravila jsem si blotovací zařízení a sestavila tzv. sendvič (chromatografický papír, NC membrána, gel, chromatografický papír). U STD Cell Signaling jsem na NC membránu tužkou označila, kde se STD nachází. Po blottingu totiž zmizí. Sestavené sendviče jsem ještě lehce polila blotovacím pufrem a pomocí zkumavky vytlačila případně vzniklé bublinky. Zařízení jsem přiklopila a připojila k proudu 70 mA (35 mA pro jeden velký blot) a napětí 300 V po dobu 80 min.

Během blottingu jsem si připravila blokační roztok – 10% odtučněné sušené mléko. Mléko jsem ředila do roztoku 1xPBS/Tween. Navážila jsem 5 g mléka a doplnila jsem objem zkumavky do 50 ml roztokem 1xPBS/Tween. Roztok jsem nechala po dobu blottingu promíchávat na třepačce. Po ukončení blottingu jsem rozebrala zařízení, vyjmula membrány, ponořila je do blokačního roztoku v petriho misce a dala na kývačku. Blokaci jsem pak nechala probíhat přes noc v ledničce při teplotě 2 - 8°C.

17. 2. 2012

Jako první jsem si připravila ředěný blokační roztok (0,5 g odtučněného sušeného mléka jsem doplnila roztokem 1xPBS/Tween na objem 50 ml) a dala ho promíchat na třepačku. Dále jsem si připravila a očíslovala 6 zkumavek od 1 do 6 (5 protilátek a blank). Postupně jsem pak do každé zkumavky pipetovala 1 ml ředěného blokačního roztoku a požadovaný objem primární protilátky (objem a koncentrace jsem si zjistila v pipetovacím protokolu⁵⁵). Zkumavky s roztoky jsem postupně promíchala na vortexu. Roztoky jsem pak pipetou aplikovala do inkubačních vaniček, které jsem také fixem popsala čísly od 1 do 6 (zkumavka 1 s roztokem 1 do vaničky 1).

NC membrány jsem vyndala z lednice, přenesla do roztoku 1xPBS/Tween a nechala je promývat na kývačce. Mezitím jsem si připravila pracovní plochu (umyla ji, vyklidila a připravila si pomůcky). Membrány jsem přendala na čistou desku a ořízla je. Ořezávání probíhalo tak, že jsem k membráně přindala plastový hřeben. Na straně, kde je STD, jsem odřízla přebývající okraj, aby mi zbyla membrána jen s naneseným materiálem. Z takto oříznuté membrány jsem nejprve odřízla STD a zbytek jsem rozřezala na 6 stripů. Dohromady mi tak vzniklo 24 stripů (2 STD, u každého 2 typy buněk). Stripy jsem tužkou očíslovala od 1 do 24. Membrána musí být po celou dobu práce vlhká (průběžně jsem ji vlhčila roztokem 1xPBS/Tween ze stříčky), jinak by popraskala. Stripy jsem podle čísel rozřadila do očíslovaných vaniček s roztoky protilátek (v jedné vaničce byly 4 stripy – navazovala jsem stejnou protilátku 4x, 2 STD, u každého 2 typy buněk). STD Biorad jsem přendala do vaničky s roztokem 1xPBS/Tween a dala ho na kývačku. Bude potřeba jen k závěrečnému vyhodnocení. Se STD Cell Signaling budu později pracovat dál stejně jako se stripy. Zatím jsem ho také dala do 1xPBS/Tween. Stripy ve vaničkách jsem nechala 60 min inkubovat na kývačce. Po uplynulé hodině jsem membrány promyla. Nejprve jsem odsála roztok v jednotlivých jamičkách, přičemž jsem pro každou jamičku použila novou špičku (kvůli zabránění kontaminaci). Do jamiček jsem pomocí stříčky dala dostatečné množství roztoku 1xPBS/Tween a vaničky jsem dala na 5 min. na kývačku. Celé promývání proběhlo celkem 3x.

Sekundární protilátku jsem připravovala těsně před její aplikací. Konjugát GAM/Px (sekundární protilátka s navázanou křenovou peroxidázou) jsem naředila v 1xPBS/Tween v ředění 1:5000 (10 ml PBS/Tween + 2 µl protilátky). Do každé, po vymývání odsáté jamičky, jsem pipetovala 1 ml roztoku sekundární protilátky. Vaničky jsem nechala 60 min inkubovat na kývačce. Promytí stripů bylo po inkubaci stejné jako u primární protilátky.

⁵⁵ Příloha 29

STD Cell Signaling má na sobě navázaný protein biotin, který není vidět. Proto na něj navážu anti-biotin s Px (ředění roztokem 1xPBS/Tween 1:1000 – 10 µl anti-biotinu, 10 ml 1xPBS/Tween). Dále se STD Cell Signaling postupují stejně jako se stripy. Inkubace 60 min, promývání, atd.

Promyté stripy a STD Cell Signaling jsem pinzetou přenesla na omytou a očištěnou umělohmotnou podložku. Stripy jsem seřadila podle čísel, aby vypadaly jako původní nerozřezaná NC membrána. Na vrchu jsem stripy a STD Cell Signaling přichytila izolepou. Při případném vysychání membrány je potřeba ji vlhčit roztokem 1xPBS/Tween.

ECL substrát jsem si připravila smícháním roztoku 1 a 2 v poměru 1:1000 (4 µl + 4000 µl) do zkumavky zabalené v alobalu, aby na ni nepůsobilo světlo. Substrát jsem pipetou nanasla na membrány (2 ml/membrána) a nechala ho 1 min působit. Poté jsem buničinou odsála přebytečný substrát. Desky s membránami jsem přikryla potravinářskou fólií a uhladila jsem ji rukou. Desku jsem vložila do fotografických desek a rychle jsem šla do připravené vyvolávací komory. Do desek jsem vložila film citlivý na modré světlo po zvolenou expoziční dobu. Ta může být různá, záleží na protilátce a materiálu. Já jsem zvolila následující expoziční doby: 3 min, 10 s, 2 s, a po 15 min vysvícení ještě 20 s, 5 min. Po uplynutí expoziční doby jsem film dala na 1 - 2 min. do vývojky, poté jsem ho protáhla dH₂O, dále na 1 - 2 min. do ustalovače a na závěr jsem film opláchla ve vodě. Filmu jsem ještě před expozicí ohnula pravý dolní roh pro pozdější lepší orientaci. Film jsem pověsila a nechala uschnout.

Srpen

30. 8. 2012

Stejně jako v předešlých experimentech jsem si nejprve v drtičce ledu nadrtila led. Ten jsem pomocí lopatky přendala do polystyrenové krabičky. V mrazáku jsem dohledala buňky RAJI (byly zamražené „na sucho“, 50x106 buněk) a ihned je dala na led. V laboratoři jsem smíchala 300 µl hotového lyzačního pufru (laurylmaltosid, 1% roztok) a 3 µl inhibitorů proteáz. Jelikož inhibitorů proteáz jsem potřebovala velmi malé množství, pipetovala jsem opatrně, ode dna zkumavky, abych pipetou nasála potřebný materiál. Vzniklý roztok jsem pomocí pipety promíchala. Takto promíchaný roztok jsem aplikovala k peletce buněk RAJI. Lyzát jsem promíchala pomocí pipety. Zkumavku jsem dala na led a nechala 60 min na kývačce. Dále následovala centrifugace lyzátu. Proto jsem 15 min před sundáním lyzátu z kývačky dala chladit centrifugu. Centrifugace probíhala po dobu 10 min, při teplotě 4°C a 10 000 RPM. Je důležité dát pozor, aby centrifuga byla vyvážená. Lyzát se rozdělil na supernatant a zbytky membrán apod. Pipetou jsem odebrala supernatant a dala ho na led.

Teplou vodou, jarem a na závěr dH₂O jsem očistila a poté sestavila elektroforetické zařízení. Separační gel jsem připravila smícháním H₂O, 30% akrylamid/bis, Tris, SDS a APS tak, aby mi vznikl 10% roztok pro dvě velká skla. Přesné množství jsem zjistila z tabulek v SOP. Gel jsem lehce zamíchala v ruce a pipetou aplikovala 3,5 cm pod okraj skel. Okraj gelu jsem označila fixem na sklo. Gel jsem nechala polymerovat (tuhnout) 30 min.

Podle tabulky v SOP jsem připravila 5% zaostřovací gel, opatrně jsem ho promíchala v ruce a nalila na ztuhnutý separační gel. Do zaostřovacího gelu jsem zasunula plastový hřeben, aby se

vytvořily potřebné jamky. Špičkou filtračního papíru jsem odstranila případně vzniklé bublinky a gel jsem takto nechala tuhnout 20 min. Na sklo jsem fixem označila jamičky v hřebenu, aby po jeho vyndání bylo vidět, kam aplikovat lyzát a STD.

Ke 200 μ l lyzátu RAJI (odebraný supernatant po centrifugaci) jsem přidala 200 μ l vzorkového pufru redukujícího (Laemmli, míchání v poměru 1:1). Směs jsem 5 min povařila ve vodní lázni. 200 μ l povařeného lyzátu RAJI jsem aplikovala do větší jamky na gel. Do malé jamky jednoho skla jsem aplikovala 5-10 μ l STD Biorad. Pipetovala jsem takové množství, aby byla jamka plná.

Před aplikací STD Cell Signaling bylo potřeba smíchat 10 μ l STD Cell Signaling s 10 μ l vzorkového pufru redukujícího (míchání v poměru 1:1). Povařila jsem ho 5 min ve vodní lázni. STD Cell Signaling jsem nanesla stejně jako do malé jamky druhého skla.

Do sestaveného elektroforetického zařízení jsem přiložila skla s gely. Do celého zařízení jsem nalila elektrolyt (gel musí být stále vlhký). Takto připravené zařízení jsem připojila k proudu. Přeš zaostřovací gel jsem nastavila proud 400 mA, napětí 80 V. Čelo proteinů prošlo přes zaostřovací gel po 30 minutách. Přeš separační gel proteiny putovaly pod proudem 400 mA, při napětí 160 V po dobu 90 min. Viděla jsem putovat modré čelo proteinů (při vyšším napětí putuje rychleji). U STD Biorad se postupně vytvářel krásný žebříček různě velkých, do bandů separovaných proteinů. U STD Cell Signaling jsem pozorovala jen putující čelo, které se oddělilo od čela lyzátu.

Připravila jsem si 10% blokační roztok. Navážila jsem 5 g sušeného odtučněného mléka a dolila do 50 ml roztokem 1xPBS/Tween. Zkumavku jsem dala na třepačku a nechala promíchat.

Dále jsem si začala připravovat materiál pro WB. Nastříhala jsem si dvě NC membrány pro velký blot o rozměrech 8,5 x 8,5 cm a ponořila je do blotovacího pufru v petriho misce. Na jednu NC membránu jsou potřeba dva chromatografické papíry. Proto jsem si nastříhala čtyři o rozměrech 8,5 x 8,5 cm a těsně před blottingem jsem je ponořila do blotovacího pufru. Po ukončení elektroforézy jsem gel pomocí stříčky s dH₂O uvolnila ze skel a odstranila nepotřebný zaostřovací gel. Do připraveného blotovacího zařízení jsem naskládala tzv. sendvič v pořadí: chromatografický papír, NC membrána, gel, chromatografický papír. U STD Cell Signaling je před blottingem potřeba popsat na NC membránu, kde se STD nachází, protože po blottingu zmizí a není vidět. Vše jsem ještě polila trochou blotovacího pufru a zkumavkou jsem vytlačila vzduchové bublinky. Celé zařízení jsem připojila k proudu 70 mA, napětí 300 V po dobu 80 min. Po ukončení blottingu jsem rozebrala zařízení a vyjmula NC membrány. Ostatní, již nepotřebný, materiál jsem vyhodila. Blokační roztok jsem vylila do petriho misky a ponořila do něj NC membrány. Blokaci jsem nechala probíhat přes noc v lednici při teplotě 2 - 8°C.

31. 8. 2012

Druhý den jsem začala s přípravou ředěného blokačního roztoku. Do zkumavky jsem k naváženému 0,5 g sušeného odtučněného mléka dolila do 50 ml 1xPBS/Tween. K 1 ml ředěného blokačního roztoku jsem přimíchala požadovaný objem protilátky (dle pipetovacího protokolu⁵⁶) tak, aby mi vznikla požadovaná koncentrace. Celkem jsem připravila 19 vzorků (použila jsem 8 protilátek,

⁵⁶ Příloha 30

z nichž byla každá ve dvou ředěních, 2 kontroly a 1 blank, který obsahoval čistý 1xPBS/Tween). Některá ředění byla tak malá, že by nešla nepipetovat. Proto jsem připravila větší objem, než byl požadovaný (10x větší ředění), a pak jsem z tohoto dobře promíchaného vzorku odebrala 1 ml, požadovaný objem. Roztoky jsem aplikovala do zkumavek očíslovaných podle počtu protilátek (+ 2 kontroly a 1 blank). Všechny roztoky jsem promíchala na vortexu. Připravila jsem si vaničky s jamkami. Také jednotlivé vaničky jsem si očíslovala od 1 do 19. Roztok 1 ze zkumavky 1 jsem pak aplikovala do jamky 1.

NC membrány jsem přendala z blokačního roztoku do roztoku 1xPBS/Tween v petriho misce a nechala je chvíli promývat na kývačce. Mezitím jsem si omyla, vyklidila a roztokem 1xPBS/Tween polila pracovní desku (membrány musí být stále vlhké, jinak praskají). Po promytí NC membrán jsem je dala na pracovní desku a ořízla je. K membráně jsem přiložila plastový hřeben tak, jak původně byl na gelu, a skalpelem jsem odřízla přebytečné okraje. Zbyla mi tak membrána pouze s naneseným materiálem. Poté jsem odřízla STD s dostatečnými okraji a zbylou membránu s proteiny jsem rozřezala na 19 stripů. Stripy jsem tužkou očíslovala (stripy od STD Biorad čísla 1-19, stripy STD Cell Signaling čísla 20-38). Při řezání jsem membrány stále vlhčila ze stříčky roztokem 1xPBS/Tween. Stripy jsem rozřadila podle čísel do jamiček. V každé jamičce byly 2 stripy (v jamičce 1 byl strip Biorad 1 a strip Cell Signaling 20). STD Biorad jsem dala do roztoku 1xPBS/Tween a dala ho na kývačku. Takto je hotový a je potřeba až při závěrečném vyhodnocení. Se STD Cell Signaling budu pracovat až při navazování sekundární protilátky na stripy. Zatím jsem ho také dala do roztoku 1xPBS/Tween a poté na kývačku. Vaničky se stripy v nařaděných protilátkách jsem dala na kývačku a nechala 60 min inkubovat. Po inkubaci jsem stripy celkem 3x promyla. Nejprve jsem vodní vývěvou odsála roztok (pro každou jamičku jsem si vzala novou špičku kvůli kontaminaci). Stříčkou jsem do každé jamky přidala dostatek roztoku 1xPBS/Tween a nechala 5 min. promývat na kývačce.

STD Cell Signaling má na sobě navázaný protein s biotinem (není vidět). Proto jsem na něj navázala anti-biotin s Px (ředění v 1xPBS/Tween v poměru 1:1000). K 10 ml roztoku 1xPBS/Tween jsem přidala 10 μ l anti-biotinu/Px. STD Cell Signaling jsem dala do vaničky a přidala jsem tolik roztoku anti-biotinu/Px, aby byl STD Cell Signaling ponořený. Poté jsem ho nechala 60 min inkubovat na kývačce.

Sekundární protilátku jsem připravila těsně před její aplikací. Konjugát GAM/Px (sekundární protilátka s navázanou křenovou peroxidázou) jsem naředila v roztoku 1xPBS/Tween v ředění 1:5000 (2 μ l GAM/Px + 10 ml 1xPBS/Tween). Do každé jamičky jsem aplikovala 1 ml sekundární protilátky. A nechala jsem je spolu se STD Cell Signaling inkubovat 60 min. Během inkubace jsem si připravila vyvolávací komoru. Na dveřích jsem rozsvítila červené světlo na upozornění ostatních, že se vyvolává. Připravila jsem 3 vaničky. Do první jsem už za tmy, jen při rozsvíceném červeném světle, nalila vývojku, do druhé dH₂O a do třetí ustalovač. Do kádinky jsem si napustila studenou vodu. Po inkubaci jsem membrány i STD Cell Signaling 3x promyla, stejně jako po primární protilátce. Bylo důležité si roztoky vzájemně nekontaminovat (měnění špiček, vystříknutí roztoku, nedotknout se roztoku stříčkou).

Promyté stripy a STD Cell Signaling jsem pinzetou přenesla na omytou a očištěnou umělohmotnou podložku. Stripy jsem seřadila podle čísel a na vrchu je izolepou přichytila k podložce.

ECL substrát jsem si připravila smícháním roztoku 1 a 2 v poměru 1:1000 (4 μ l+4000 μ l) do alobalu zabalené zkumavky, aby na ni nepůsobilo světlo. Substrát jsem pipetou nanasla na membrány (2 ml/membrána). Substrát jsem nechala působit 1 min (naváže se na peroxidázu a způsobí potřebnou luminiscenci). Po minutě jsem přiložila buničinu a odsála přebytečný substrát. Celé desky jsem přikryla potravinářskou fólií a vyhladila rukou. Desky jsem vložila do fotografických desek a šla do připravené vyvolávací komory. Tam jsem do desek vložila film citlivý na modré světlo po zvolenou expoziční dobu (liší se podle použité protilátky a materiálu). Mé expoziční doby byly: 2 min, 1 min, 30 s, 15 s, 30 s, 5 min. Po uplynutí expoziční doby jsem film ponořila na 1 - 2 min do vývojky, protáhla jsem ho dH₂O, dala jsem ho na 1 - 2 min do ustalovače a na závěr jsem film opláchla ve studené vodě a nechala ho uschnout. Filmu jsem ještě před expozicí zahla pravý dolní roh pro lepší pozdější orientaci na snímku. Dodatečně jsem film v laboratoři fixem popsala (datum, expoziční doba a popis snímku – čísla stripů, velikosti proteinů jednotlivých bandů u STD). Při popisu bandů jsem u STD Biorad musela STD přiložit ke snímku a fixem zaznačit i samotné bandy. U STD Cell Signaling stačilo k vyvolaným bandům dopsat velikost proteinů.

6.2. Závěry experimentů

Závěr z 1. experimentu WB dne 28. - 29. 12. 201157

Byl proveden test WB na materiálu lyzát buněčné linie Jurkat. Testování mělo být provedeno pomocí protilátek TU-01, Bcl-2/10 a mN1A. Jako negativní kontrola byla použita izotypová kontrola IgG1 MOPC-21 a Blank.

Byly připraveny dva stejné gely, lišilo se pouze použitím standardů - velikostních markerů. Byl použit dosud běžně používaný standard v QC laboratoři – Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range od firmy BIO-RAD a nový testovaný standard Biotinylated Protein Ladder od firmy Cell Signaling.

Bohužel test protilátek byl neprůkazný, nebyl zobrazen ani jediný band. Vzhledem k tomu, že nevyšla ani pozitivní kontrola, byla velmi pravděpodobně špatná peleta buněk Jurkat, která byla použita pro lyzy a pro samotný test WB.

Nicméně WB jako takový proběhl dobře. Detekce biotinovaného standardu proběhla bez problémů, což svědčí o dobře provedené metodě a bohužel jen o problému v testovacím materiálu.

Testovaný standard má velké množství rozpětí obsažených proteinů (10 ks, 9 – 200 kDa), oproti dosud používanému SDS PAGE standardu Low Range (6 ks, 18 – 101 kDa). Vzhledem k tomu nedošlo u testovaného standardu k plnému rozdělení jednotlivých proteinů. U používaného standardu došlo k rozdělení všech 6 bandů a toto bylo patrné i při samotné SDS PAGE metodě, vzhledem k tomu, že standard je barvený a během elektroforézy lze regulovat její délku dle rozdělení jednotlivých bandů. To bohužel u testovaného standardu vzhledem k bezbarvé povaze roztoku nelze.

Pro příští test bude vhodné použít větší (delší) rozměr gelu, aby mohlo být provedeno lepší rozdělení jednotlivých bandů na testovaném standardu. A dále je potřeba přesně oříznout membránu dle velikosti gelu a po blottingu tužkou přesně označit pozici standardu a lyzátu, vzhledem k tomu, že po samotném blottingu již nelze barevně odlišit, co se kde na membráně nachází vzhledem k bezbarvému standardu i bezbarvému lyzátu. U barveného standardu přeputují označené barevné bandy standardu na membránu a podle toho lze přesně určit i pozici materiálu na membráně. Toto se jeví již jako několik nevýhod pro nově testovaný biotinovaný standard.

Závěr z 2. experimentu WB dne 16. - 17. 2. 2012⁵⁸

Byl proveden test WB na materiálu lyzát buněčné linie HELA a MCF-7. Testování bylo provedeno pomocí protilátek C-04, C-11, A53-B/A2 a pozitivní kontroly TU-01. Jako negativní kontrola byla použita izotypová kontrola IgG1 MOPC-21 a Blank.

Byly připraveny dva stejné gely, lišilo se pouze použitím standardů - velikostních markerů. Byl použit dosud běžně používaný standard v QC laboratoři – Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range od firmy BIO-RAD a nový testovaný standard Biotinylated Protein Ladder od firmy Cell Signaling. Na rozdíl od prvního experimentu byly použity dlouhé gely na SDS-PAGE elektroforézu, aby došlo k lepšímu rozdělení jednotlivých bandů Cell Signaling standardu. A dále jsme použili dvoulyžační jamku, pro použití dvou různých lyzátů v rámci jednoho gelu i standardu.

Test protilátek byl tentokrát průkazný a reakce specifity jednotlivých protilátek velmi silná. První expozice byly silně přesvícené. Pro lepší vyhodnocení jsme detekované membrány museli nechat několik minut vysvítit či dělat velmi krátké (vteřinové) expozice. Negativní izotypová kontrola správně nereagovala ani na jednom materiálu. Pozitivní kontrola TU-01 se správně navázala na alpha-tubulin (50 kDa). Lyzát buněčné linie MCF-7 byl silnější než lyzát HELA. Protilátka C-04 reagovala s Cytokeratinem 18 (45 kDa), protilátka C-11 reaguje s Cytokeratiny 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18 (proto je na vyvolaném snímku v rámci jednoho stripu více bandů) a správně se několikrát navázala v rozmezí 40 - 68 kDa a protilátka A53-B/A2 reagovala s Cytokeratinem 19 (40 kDa). Protilátky reagovaly dobře a specificky.

Detekce biotinovaného standardu proběhla bez problémů, rozdělení bandů je pěkné, zvláště při krátké expozici či po vysvícení. Nicméně vyhodnocení testovaného standardu je opět komplikovanější, vzhledem k tomu, že dle instrukcí dodavatele má mít standard celkem 10 bandů o různé velikosti. Detekovat se nám však podařilo naprosto jednoznačně pouze 9 bandů, s tím, že není jednoznačně možné říci, který nám chybí a proč.

U používaného standardu Biorad došlo k rozdělení všech 6 bandů a toto bylo patrné i při samotné SDS-PAGE metodě, vzhledem k tomu, že standard je barvený a během elektroforézy lze regulovat její délku dle rozdělení jednotlivých bandů. To bohužel u testovaného standardu vzhledem k bezbarvé povaze roztoku nelze.

Opět se nám potvrdilo, že je potřeba velice přesně oříznout membránu dle velikosti gelu a po blottingu tužkou přesně označit pozici standardu a lyzátu na membránu, vzhledem k tomu, že po

⁵⁸ Příloha 32, 33

samotném blottingu, již nelze barevně odlišit, co se kde na membráně nachází vzhledem k bezbarvému standardu i bezbarvému lyzátu. U barveného standardu přeputují označené barevné bandy standardu na membránu a podle toho lze přesně určit i pozici testovaného materiálu na membráně. Toto se jeví již jako několik nevýhod pro nově testovaný biotinovaný standard. Též použití dlouhého gelu je časově náročnější vzhledem k potřebě delší doby pro SDS-PAGE elektroforézu. Další z nevýhod je jiná délka expozice pro standard i pro testovanou protilátku.

Závěr z 3. experimentu WB dne 30. - 31. 8. 2012⁵⁹

Byl proveden test WB na materiálu lyzát buněčné linie RAJI. Testování bylo provedeno pomocí protilátek TU-30, TU-32, MEM-267, MEM-255, NAP-03, NAP-07, SOS-01, H-RAS-03. Jako negativní kontrola byla použita izotypová kontrola IgG1 Mopc-21a Blank, jako pozitivní kontrola TU-01.

Opět byly připraveny dva stejné dlouhé gely, lišilo se pouze použitím standardů - velikostních markerů. Byl použit dosud běžně používaný standard v QC laboratoři – Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range od firmy BIO-RAD a nový testovaný standard Biotinylated Protein Ladder od firmy Cell Signaling. Stejně jako v druhém experimentu byly použity dlouhé gely na SDS-PAGE elektroforézu, aby došlo k lepšímu rozdělení jednotlivých bandů Cell Signaling standardu.

Test většiny protilátek byl průkazný a správný. Správně proběhla i negativní izotypová kontrola. Protilátka pozitivní kontroly TU-01 se však v tomto testu nenavázala. V dalším, již vlastním, experimentu QC laboratoře tato kontrola také nevyšla, což potvrdilo nefunkčnost této šarže protilátky. Protilátka TU-32 se správně navázala na gamma-tubulin (48 kDa). Protilátka MEM-267 vytvořila krásný band okolo 30 kDa (antigen HLA-DR1), správně by měla být mezi 26 - 28 kDa. Tento malý rozdíl je sice zanedbatelný, ale poukazuje na malou nepřesnost používaného standardu. Dále se na antigen PAG/Cbp správně navázala protilátka MEM-255 (80 kDa). U zbylých protilátek nebyly zaznamenány žádné signály. Tento experiment využila QC laboratoř i jako otestování sporných vzorků, kde šlo o hledání vhodného pozitivního materiálu pro tyto protilátky. Dopředu tudíž nebyl jasný výsledek. Ukázalo se, že se nejednalo o vhodný pozitivní materiál pro tyto protilátky.

Detekce biotinovaného standardu proběhla bez problémů, rozdělení bandů je pěkné, zvláště při krátké expozici či po vysvícení. Vyhodnocení testovaného standardu je stejně jako v předchozích experimentech komplikovanější. Podle instrukcí dodavatele má mít standard celkem 10 bandů o různé velikosti. Detekovat se nám však podařilo naprosto jednoznačně pouze 9 bandů, stejně jako v druhém experimentu, s tím, že není jednoznačně možné říci, který nám chybí a proč.

S používaným standardem Biorad nebyly při rozdělování bandů žádné problémy. Potvrdily se poznatky z předchozích experimentů.

Ověřily se nevýhody standardu Cell Signaling zjištěné při druhém experimentu.

⁵⁹ Příloha 34, 35

7. Diskuse

Testovaný STD Cell Signaling má velké množství rozpětí obsažených proteinů (během elektroforézy by se měl rozdělit na 10 bandů, 9 - 200 kDa) oproti STD Biorad (jen 6 bandů, 18 - 101 kDa). Větší rozpětí by jistě znamenalo klad pro STD Cell Signaling, kdyby ovšem došlo k plnému rozdělení jednotlivých proteinů. STD Cell Signaling se nerozdělil do deseti bandů ani u jednoho ze tří provedených experimentů a nedalo se jednoznačně určit, který band chybí a proč. U používaného STD došlo k rozdělení všech šesti bandů pokaždé. Rozdělení jednotlivých bandů STD Biorad bylo patrné už při samotné SDS-PAGE elektroforéze, vzhledem k tomu, že STD je barevný. Díky tomu se dá během elektroforézy regulovat její průběh. To bohužel u testovaného STD nelze, jelikož je roztok bezbarvý.

K přehlednému rozdělení bandů STD Biorad stačí kratší gel. U STD Cell Signaling je třeba použít gel delší. Použití delšího gelu je ovšem časově náročnější (potřeba delší doby pro SDS-PAGE elektroforézu). I přes použití delšího gelu, nedošlo k rozdělení všech deseti bandů ani v jednom experimentu.

Další důležitou věcí je potřeba přesného oříznutí membrány podle velikosti gelu a po blottingu tužkou označit pozici lyzátu i STD Cell Signaling na NC membránu. Po samotném blottingu již nelze barevně odlišit, co se kde na membráně nachází vzhledem k bezbarvému testovanému STD i lyzátu. U barveného STD Biorad přeputují označené barevné bandy STD na membránu a lze přesně určit pozici STD i testovaného materiálu na membráně. Toto je již několik nevýhod pro nově testovaný STD Cell Signaling.

Další z nevýhod testovaného STD je jiná délka expozice pro STD a testovanou látku.

Naopak výhodou je, že se STD Cell Signaling vyvolává na jeden snímek spolu s testovanou látkou, což usnadňuje závěrečné vyhodnocení metody, kdy stačí popsat pouze velikost proteinů jednotlivých bandů z certifikátu dané šarže STD. Závěrečné vyhodnocení metody za použití STD Biorad je oproti testovanému STD méně přesné. K vyvolanému snímku se musí přiložit STD Biorad s bandy rozdělenými na NC membráně. Na snímek se musí bandy nejprve fixem označit, což může způsobit jistou nepřesnost. Občas se těžko odhaduje začátek a konec stripů na snímku, kdy jsou vidět hlavně signály testovaných protilátek a pozitivních kontrol. Pouze u silně přsvícených snímků jsou vidět i pozice stripů na snímku.

8. Slovníček pojmů

Antigen^{60,61}

Látka, kterou imunitní systém (IS) organismu rozpoznává jako tělu cizí a reaguje na něj. Je schopný

⁶⁰ Antigen. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 31. 3. 2012 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Antigen>

vyvolat specifickou imunitní reakci, např. tvorbu protilátek. Jedná se o proteiny, polysacharidy, nukleové kyseliny atd.

Band

Zóny proteinů vytvořené v gelu během elektroforézy.

Blotting

Přenesení např. nukleové kyseliny na membránu. Southern blotting přenáší DNA (zakladatel Southern), Northern blotting přenáší RNA a Western blotting přenáší proteiny.

Buněčný lyzát

Je to uvolněný obsah buněk mikroorganismů následkem rozrušení buněčných stěn a membrán.

Centrifugace

Při centrifugaci je lyzát rozdělen na supernatant a sediment (zbytky membrán apod.)

Dalton⁶²

Atomová hmotnostní jednotka. Značí se u, ale tato jednotka se také nazývá dalton (Da).

Denaturace⁶³

Změna prostorového uspořádání molekuly biopolymeru (bílkoviny, nukleové kyseliny, polysacharidy), při níž dochází ke ztrátě jeho biologických funkcí. Denaturačně působí např. detergent (např. SDS), ale i vyšší teplota.

Detergent

Chemická látka snižující povrchové napětí.

Elektroforéza^{64,65,66}

Metoda využívaná k separaci látek, např. proteinů. Nabitě částice se v homogenním elektrickém poli pohybují odlišnými rychlostmi, které závisí na velikosti náboje částic a na velikosti molekuly. Nabitě molekuly (ionty) se tak separují.

Expoziční doba⁶⁷

Čas, po který dopadá na světlo-citlivý materiál obraz z objektivu.

⁶¹ Pojem antigen. In: *ABZ: slovník cizích slov* [online]. © 2005-2006 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://slovník-cizich-slov.abz.cz/web.php/slovo/antigen>

⁶² Dalton. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 29. 5. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Dalton>

⁶³ Denaturace. In: *VYDAVATELSTVÍ: VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE* [online]. [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/denaturace.html

⁶⁴ Elektroforéza. In: *Biochemical web* [online]. 2004 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm>

⁶⁵ Elektroforéza DNA, blotting. In: *BIOLOGIE v kostce* [online]. [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://biologie-v-kostce.blogspot.cz/2011/05/72-elektroforeza-dna-blotting.html>

⁶⁶ Elektroforéza. In: *Český lékopis 1997* [online]. © 2002-3 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_31.htm

⁶⁷ Expoziční doba. In: *SkyFly* [online]. © 2009-2012 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://www.skyfly.cz/pristroj/slovník/expozicnidoba.htm>

Chemiluminiscence⁶⁸

Emise světla (luminiscence) jako výsledek chemické reakce.

Imunodetekce⁶⁹

Fáze metody WB, kdy se detekují protilátkou konkrétní vybrané proteiny.

Imunokomplex⁷⁰

Imunitní komplex protilátky vázané na specifický antigen.

Imunologie⁷¹

Věda, která se zabývá zkoumáním imunitního systému a jeho reakcemi.

Inkubace⁷²

Slovo pochází z latinského *incubare*, v překladu ležet. Inkubace má různé významy. V této práci inkubace znamená nechat látku po určitou dobu ležet. Během inkubační doby probíhají potřebné reakce.

Izotypová kontrola

Negativní kontrola, protilátka, která má stejný izotyp a formát jako testovaná protilátka, ale je nereaktivní k materiálu. Během inkubace by se neměla navázat na materiál.

Konjugát

Protilátka, na kterou je navázaný enzym nebo fluorescenční barva.

Lyze⁷³⁷⁴

Rozklad buněk v důsledku rozpadu jejich vnější membrány.

Polymerace⁷⁵

Chemická reakce, při které z jednoduchých molekul (monomerů) vznikají makromolekuly (polymery).

Primární protilátka

Specifická protilátka, která se navazuje na konkrétní protein (např. při detekci WB). Není značená, proto je potřeba ji detekovat sekundární protilátkou.

⁶⁸ Chemiluminescence. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 23 July 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Chemiluminescence>

⁶⁹ Detekce konkrétních proteinů. In: *Lékařská fakulta UK v Hradci Králové* [online]. © 2007 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/Proteiny.htm>

⁷⁰ Imunokomplexy. In: *Co Je Co: Vaše Encyklopedie* [online]. ©1999-2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: http://www.cojeco.cz/index.php?id_desc=38221&s_lang=2&detail=1&title=imunokomplexy

⁷¹ Imunologie. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 4. 11. 2012 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Imunologie>

⁷² Inkubace. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 15. 3. 2012 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Inkubace>

⁷³ Význam buněčného lyzátu. In: *LYSATEC: LYSATEC TECHNOLOGY* [online]. copyright 2003-2006 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z:

http://lysatec.com/right_c.php?PHPSESSID=cf4ab47c121b957a8133468173082783&jist=8562&lang=cz&cont=va&ident=10

⁷⁴ Lýza. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 19. 8. 2012 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Lyze>

⁷⁵ Polymerace. In: *Slovník-cizích-slov.info* [online]. © 2011 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://slovník-cizich-slov.info/polymerace>

Protein⁷⁶

Proteiny (bílkoviny) jsou makromolekulární přírodní látky složené z aminokyselin.

Proteinový marker

Standard, směs proteinů o známě molekulové hmotnosti.

Protilátka (imunoglobulin, Ig)

Protein, který je schopný se navázat na specifický antigen. Pomáhá imunitnímu systému identifikovat a zneškodnit cizí objekty (bakterie, viry).

Pufr⁷⁷

Tlumivý roztok, který je schopný udržovat poměrně stabilní pH i po přidání silné kyseliny či zásady.

Resuspendování

Resuspendovat, tj. rozmíchat, naředit.

Sekundární protilátka

Specifická protilátka vůči zvířeti, z kterého je primární protilátka připravena.

Sendvič

Využívá se při WB. Vytvoří se přiložením gelu s proteiny na membránu. Sendvič se poté umístí do elektrického pole.

Separační gel

Využívá se při elektroforéze. Menší proteiny se v něm pohybují rychleji (prochází póry gelu lépe než větší proteiny, které jsou zpomalovány). Proto umožňuje rozdělení proteinů podle velikosti (molekulové hmotnosti).

Solubilizace⁷⁸

Nepravé rozpouštění látek v kapalině, ve které je látka téměř nerozpustná. Využívá se k tomu vhodných detergentů (tenzidů).

Standard⁷⁹

Soubor proteinů o známých velikostech. Proteiny se během elektroforézy rozdělí do bandů. Standard umožňuje ověření správnosti navázání protilátek na specifické proteiny.

Strip

Proužek membrány, na kterou byly přebíleny proteiny.

⁷⁶ Bílkovina. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 23. 10. 2012 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/B%C3%ADlkovina>

⁷⁷ Pufr. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 9. 7. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Pufr>

⁷⁸ Solubilizace: Leczyklopaedia. In: *Leccos* [online]. [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://leccos.com/index.php/clanky/solubilizace>

⁷⁹ What is a marker protein?. In: *Answers* [online]. © 2012 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: http://wiki.answers.com/Q/What_is_a_marker_protein

Vizualizace⁸⁰

Znázornění, zobrazování skutečnosti. Znázorněné výsledky vnímáme pomocí zraku.

Western blotting (imunoblot)⁸¹

Imunochemická metoda využívaná k detekci specifického proteinu. Využívá gelovou elektroforézu, poté jsou proteiny přeneseny z gelu na membránu. Na povrchu membrány jsou proteiny detekovány specifickými protilátkami.

Zaostřovací gel

Má velké póry, které nezpomalují migraci proteinů. Během elektroforézy způsobuje, že se proteiny koncentrují do úzkých zón a takto vstupují do separačního gelu.

⁸⁰ Vizualizace. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 27. 8. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Vizualizace>

⁸¹ Western blot. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 1. 11. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Western_blot

9. Závěr⁸²

Podarilo se mi optimalizovat metodu Western Blotting a splnit všechny ostatní vytyčené cíle. Metodu jsem prakticky provedla a průběh experimentu jsem zaznamenala do firemních protokolů. Metodu jsem teoreticky pochopila (pro lepší orientaci jsem vytvořila slovníček pojmů). Seznámila jsem se s chodem v laboratoři a vyzkoušela si základní práci v ní. Celou práci jsem shrnula do závěrečné zprávy. Zjištěné výsledky a srovnání jsem shrnula v doporučení pro firmu Exbio Praha, a.s.

Na základě tří provedených experimentů metody Western Blotting za použití standardu Prestained SDS-PAGE, Low Range od firmy BIO-RAD a testovaného standardu Biotinylated Protein Ladder od firmy Cell Signaling, jsem došla k závěru, že se firmě Exbio Praha, a.s. nevyplatí začít pro tuto metodu používat testovaný standard. Problém se standardem od firmy Cell Signaling by mohlo vyřešit otestování standardu s užším rozpětím velikosti proteinů a tudíž menším počtem bandů (jako má standard od firmy Biorad). To je ovšem návrh nejen na nový experiment, ale i na investici do nového standardu, přičemž výsledek není stoprocentně jistý.

Tato práce je určena firmě Exbio Praha, a.s. Dále je práce určena všem, kteří se v tématu tolik neorientují, laikům, kteří by po přečtení této zprávy měli metodě a základním pojmům porozumět. Nakonec to byla velmi dobrá zkušenost pro mě samotnou, pro člověka, který se chce v oboru dále vzdělávat.

9.1. Doporučení firmě Exbio Praha, a.s.

V rámci tří provedených experimentů metody Western Blotting byl otestován standard Biotinylated Protein Ladder od firmy Cell Signaling. Při prvním experimentu byl použit krátký gel, při druhém a třetím byl použit gel dlouhý. Na základě diskuse, jsem došla k závěru, že by firma Exbio Praha, a.s. měla pro metodu Western Blotting i nadále používat standard Prestained SDS-PAGE, Low Range od firmy BIO-RAD. I když standard od firmy Cell Signaling umožňuje větší přesnost při vyhodnocení metody, objevilo se během testování hned několik nevýhod pro testovaný standard.

Pro přehlednější rozdělení bandů je třeba použít delší gel, což je časově náročnější. Ani v jednom ze tří experimentů se nepovedlo rozdělení všech deseti bandů (i přes použití delšího gelu), jak uvádí firma Cell Signaling a nedalo se jednoznačně určit, který band chybí a proč. Jelikož je roztok testovaného standardu bezbarvý, nedá se během elektroforézy regulovat její průběh. Po blottingu je nutné tužkou přesně označit pozici testovaného standardu na NC membránu. Po samotném blottingu totiž nelze barevně odlišit, co se kde na membráně nachází vzhledem k bezbarvému testovanému standardu i lyzátu. Testovaný standard má jinou expoziční dobu než testovaná látka, což ztěžuje vyvolávání a vyhodnocení metody (standard je přesvícený, když jsou bandy testovaného materiálu vidět optimálně a naopak, pokud je standard vidět optimálně, tak jsou bandy testovaného materiálu vidět slabě apod.).

⁸² Příloha 36, 37, 38

Problém se standardem od firmy Cell Signaling by mohlo vyřešit otestování standardu s užším rozpětím velikosti proteinů a tudíž i menším počtem bandů (jako má např. standard od firmy Biorad).

10. Zdroje

10.1. Standardní operační postupy

EXBIO PRAHA, a.s. *Příprava buněčného extraktu: SOP-048*. 1. vyd. Vestec, 2005.

EXBIO PRAHA, a.s. *SDS-PAGE (systém Hoefler Mighty Small II) Elektroforéza v denaturujícím polyakryl-amidovém gelu za použití systému Hoefler Mighty Small: SOP-042*. 2. vyd. Vestec, 2008.

EXBIO PRAHA, a.s. *Western Blotting (systém Hoefler TE70, semi-dry) Elektropřenos proteinů z polyakrylamidového gelu na membránu za použití systému Hoefler TE70, semi-dry system: SOP-043*. 2. vyd. Vestec, 2008.

EXBIO PRAHA, a.s. *Imunochemická detekce specifického antigenu na membráně: SOP-020*. 1. vyd. Vestec, 2005.

EXBIO PRAHA, a.s. *Imunochemická detekce specifického antigenu na membráně: SOP-028*. 1. vyd. Vestec, 2005.

10.2. Prezentace

ÚSTAV PATOLOGICKÉ FYZIOLOGIE LF MU. *Analýza proteinů SDS PAGE elektroforézou* [online]. [cit. 7. 11. 2012]. Dostupné z: http://www.med.muni.cz/patfyz/tmbg/PAGE_MM.pdf

SMÍŠEK, Jan. *Sérologie: Prezentace pro obor: Všeobecné lékařství*. ÚLM 3. LF UK, © 2007. Dostupné z: <http://mikrobiologie.unas.cz/soubory/serologie.pdf>

5. SEPARACE A DETEKCE PROTEINŮ II. In: *Docstoc: Documents and Resources for Small Businesses and Professionals* [online]. © 2011 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: http://www.docstoc.com/docs/114537950/51_sds-page

10.3. Internet

ZACHOVÁ, Jana, Eva URBÁNKOVÁ, Roman CHALOUPKA, Marek PROCHÁZKA a Kateřina HOFBAUEROVÁ. *Turnusové praktikum z biochemie* [online]. [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://alma.karlov.mff.cuni.cz/biofyzika/english/vyuka/TPzB-manual.pdf>. Praktikum. ÚF UK

Identifikace proteinů. In: BÍLKOVÁ, Zuzana. *WEBCAST: Škola molekulárních biotechnologií - Profession* [online]. [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://webcast.skola-profession.cz/Contexts/profession/Documents/bilkova.pdf>

SDS-PAGE. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 19 October 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/SDS-PAGE>

Antigen. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 31. 3. 2012 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Antigen>

Pojem antigen. In: *ABZ: slovník cizích slov* [online]. © 2005-2006 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://slovník-cizich-slov.abz.cz/web.php/slovo/antigen>

Elektroforéza. In: *Biochemical web* [online]. 2004 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm>

Elektroforéza DNA, blotting. In: *BIOLOGIE v kostce* [online]. [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://biologie-v-kostce.blogspot.cz/2011/05/72-elektroforeza-dna-blotting.html>

Denaturace. In: *VYDAVATELSTVÍ: VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE* [online]. [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/denaturace.html

Expoziční doba. In: *SkyFly* [online]. © 2009-2012 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://www.skyfly.cz/pristroj/slovník/expozicnidoba.htm>

Detekce konkrétních proteinů. In: *Lékařská fakulta UK v Hradci Králové* [online]. © 2007 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/Proteiny.htm>

Imunologie. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 4. 11. 2012 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Imunologie>

Inkubace. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 15. 3. 2012 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Inkubace>

Význam buněčného lyzátu. In: *LYSATEC: LYSATEC TECHNOLOGY* [online]. copyright 2003-2006 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: http://lysatec.com/right_c.php?PHPSESSID=cf4ab47c121b957a8133468173082783&jist=8562&lang=cz&cont=va&ident=10

Lýza. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 19. 8. 2012 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Lyze>

Polymerace. In: *Slovník-cizich-slov.info* [online]. © 2011 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://slovník-cizich-slov.info/polymerace>

Bílkovina. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 23. 10. 2012 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/B%C3%ADlkovina>

What is a marker protein?. In: *Answers* [online]. © 2012 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: http://wiki.answers.com/Q/What_is_a_marker_protein

Solubilizace: Lencyklopaedia. In: *Leccos* [online]. [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://leccos.com/index.php/clanky/solubilizace>

Western blot. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 1. 11. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Western_blot

Elektroforéza. In: *Český lékopis 1997* [online]. © 2002-3 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_31.htm

Dalton. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 29. 5. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Dalton>

Imunokomplexy. In: *Co Je Co: Vaše Encyklopedie* [online]. ©1999-2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: http://www.cojeco.cz/index.php?id_desc=38221&s_lang=2&detail=1&title=imunokomplexy

Vizualizace. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 27. 8. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Vizualizace>

Chemiluminescence. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 23 July 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Chemiluminescence>

Pufr. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 9. 7. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Pufr>

Peroxodisíran amonný. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 27. 4. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Peroxodis%C3%ADran_amonn%C3%BD

Destilovaná voda. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 13. 7. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Destilovan%C3%A1_voda

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immuno-blotting (Western-blottingé [online]. [cit. 7. 11. 2012]. Dostupné z: http://tierhygiene.vetmed.uni-leipzig.de/files/uni/artikel/anlagen/240_1.pdf

Filtrace. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 21. 9. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Filtrace>

Chromatografie. In: *Katedra fyzikální chemie: Univerzita Palackého v Olomouci* [online]. Katedra fyzikální chemie, PřF UP, © 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/chrom/chrom_teorie.htm

Luskoviny. In: [online]. [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://vfwww.vfu.cz/vegetabilie/plodiny/czech/luskoviny.htm>

Peroxidáza. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 1. 4. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Peroxid%C3%A1za>

Avidin-peroxidáza. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 31. 3. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Avidin-peroxid%C3%A1za#K.C5.99enov.C3.A1_peroxid.C3.A1za

Nitrocelulóza. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 4. 10. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Nitrocelul%C3%B3za>

Ustalovač. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 10. 2. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Ustalova%C4%8D>

Vývojka. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 13. 9. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/V%C3%BDvojka>

Pipeta. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 29. 5. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Pipeta>

Odstředivka. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 10. 2. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Odst%C5%99edivka>

Třepačka. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 2. 12. 2010 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/T%C5%99epa%C4%8Dka>

Petriho miska. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 13. 7. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Petriho_miska

Laboratorní sklo a jiné pomůcky. In: *Nanimata* [online]. 30. 6. 2009 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://www.nanimata.wu.cz/skloapomucky.php>

Vývěva. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 22. 9. 2012 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/V%C3%BDv%C4%9Bva>

Úvodní školení o bezpečnosti práce v laboratoři. In: *ÚSTAV FYZIKA A MATERIÁLOVÉHO INŽENÝRSTVÍ* [online]. Fakulta technologická, UTB ve Zlíně, 03. 05. 2009 [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: http://ufmi.ft.utb.cz/texty/plazmochemie/PCH_lab_bezpecnost.pdf

Pravidla bezpečnosti práce v laboratoři. In: *UNIVERZITA KARLOVA: 3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA* [online]. [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/praktika/bezpecnost.htm>

Všeobecné zásady bezpečnosti práce v chemické laboratoři. In: *Ústav výpočetní techniky MU* [online]. [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: http://www.rect.muni.cz/nso/Chemicke_latky/html/Vseobecne_zasady_bezpecnosti_prace_v_chemicke_laboratori.php

Bezpečnost práce a požární ochrana v chemické laboratoři. In: *Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola Hradec Králové: Analýza léčiv* [online]. [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <http://anl.zshk.cz/vyuka/bozp.aspx>