

Analiza ekspresji genów na poziomie białek przy użyciu techniki western-blot

Jolanta Opiela

*Instytut Zootechniki, Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt,
32-083 Balice k. Krakowa*

Białka powstałe na matrycy mRNA są ostatecznym produktem ekspresji genów, a analiza ekspresji białek stanowi jedną z podstawowych metod biologii molekularnej. W celu przeprowadzenia analizy białek stosuje się elektroforezę, podczas której cząsteczki białka, obciążone określonym ładunkiem, migrują w polu elektrycznym. W połowie lat sześćdziesiątych ubiegłego stulecia została opracowana metoda elektroforezy w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE (ang. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), która pozwala na rozdział białek zgodnie z ich ładunkiem, wielkością i kształtem. Aby zidentyfikować określone białko, zawarte w mieszaninie innych białek, stosuje się metodę western-blot.

Hybrydyzacja western-blot, określana również jako immuno-blotting, jest procedurą, w której różne rodzaje białek są rozdzielane przy wykorzystaniu elektroforezy SDS-PAGE i przenoszone na trwałą „podstawę”, jaką jest membrana. Następnie, poprzez inkubację tej membrany ze specyficznym przeciwciałem pierwszorzędowym, następuje identyfikacja poszukiwanego białka.

Metoda ta, z uwagi na jej czułość i dokładność, znalazła szerokie zastosowanie w ilościowej analizie białek. Pozwala jednocześnie na uzyskanie informacji na temat rodzaju, wielkości białka oraz poziomu jego ekspresji - danych tych nie można uzyskać przy użyciu innych, alternatywnych technik (Wu i in., 2004).

Standardowa hybrydyzacja western-blot składa się z czterech etapów:

- rozdział białek przy wykorzystaniu elektroforezy SDS-PAGE,

- transfer białek z żelu na membranę,
- inkubacja membrany ze specyficznym przeciwciałem,
- detekcja białek na membranie.

Rozdział białek przy wykorzystaniu elektroforezy SDS-PAGE

Aby rozdzielić białka na podstawie różnic w ich ciężarze cząsteczkowym należy przeprowadzić elektroforezę w żelu poliakrylamidowym, w warunkach denaturujących, w obecności siarcznanu dodecyłu sodu (SDS) i β -merkaptotetanolu.

Siarczan dodecyłu sodu, SDS, jest silnym, anionowym detergentem zbudowanym z hydrofilowej „głowy” oraz długiego hydrofobowego „ogona” ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-SO}_4\text{-Na}^+$). Detergent SDS przyłącza się do hydrofobowych obszarów cząsteczki białka i powoduje jej „rozkręcenie” do struktury łańcucha polipeptydowego. W rezultacie, pojedyncze cząsteczki białek zawieszane są swobodnie w roztworze SDS. Ponadto, β -merkaptotanol stosowany w tej procedurze jest związkiem o silnych właściwościach redukujących, przecina on mostki dwusiarczkowe (S-S) między białkami. W trakcie elektroforezy SDS-PAGE aniony SDS nie tylko denaturują białko, ale również opłaszczają polipeptydy w proporcji 1,4 μg SDS/1 μg białka. W rezultacie, każda cząsteczka białka wiąże dużą liczbę ujemnie naładowanych cząsteczek SDS, które pokonują wynikający ze składu aminokwasowego natywny ładunek białka. Bez tego etapu elektroforeza białek nie byłaby możliwa. W polu elektrycznym ujemnie naładowane białka migrują w kierunku dodatniej elektrody.

W celu wzmocnienia rozdzielania białek stosuje się żele poliakryloamidowe. Żel poliakryloamidowy (PAA) uzyskuje się poprzez wspólną polimeryzację akryloamidu i N,N'-metylenobisakryloamidu (bisakryloamidu), od ilości tego ostatniego zależy usieciowanie żelu. Mechanizm polimeryzacji katalizowany jest przez wolne rodniki, których źródłem jest nadsiarczan amonu, a ich uwalnianie przyspiesza dodatek N,N,N',N'-Tetramethylethylenediaminy (TEMED). Stężenie żelu PAA decyduje o rozdzielaniu białek. Według ogólnie przyjętej zasady, im większe białko chcemy oznaczyć, tym niższe stężenie żelu powinno być użyte. Ma to decydujące znaczenie dla odczytu ostrości prążków uzyskiwanych przy detekcji białka. W trakcie elektroforezy SDS-PAGE białka o małej masie cząsteczkowej migrują szybciej w porównaniu do białek o dużej masie cząsteczkowej. Rozdział prowadzi się w żelu składającym się z dwóch części, dolnej - tzw. żel rozdzielający i górnej - tzw. żel zagęszczający. Żele różnią się między sobą gęstością oraz odczynem pH. Białka, w buforze o niskim przewodnictwie (loading buffer) nałożone w części zagęszczającej żelu, ulegają skoncentrowaniu na skutek obustronnego kontaktu z buforami o wysokim przewodnictwie, tj. w buforze elektrodowym oraz w buforze w żelu zagęszczającym. Białka ulegają zagęszczeniu w wąskim regionie, powyżej granicy z żelem rozdzielającym. Dzięki takiemu umiejscowieniu możliwy jest następnie efektywny rozdział białek w części rozdzielającej żelu (Wu i in., 2004; Szalata i in., 2004; Kyhse-Anderson, 1984; Towbin i in., 1979).

Transfer białek z żelu na membranę

Przeniesienie białka z żelu na membranę następuje w drodze elektrotransferu. Odbywa się to w ten sposób, że ujemnie naładowane białka, migrując w kierunku dodatniej elektrody, zostają zatrzymane na membranie umieszczonej między żelem a anodą. Białka, w postaci prążków znajdujących się na różnych poziomach, są precyzyjnie przeniesione na membranę dając lustrzany obraz rozdzielonych w żelu polipeptydów.

Transfer białek z żelu na membranę można wykonać przy użyciu kilku metod. Najprostszą z nich jest dyfuzja, inne metody to transfer w warunkach próżniowych i elektrotransfer. Transfer w warunkach próżniowych (vacuum blotting) wykonywany jest przy użyciu

niskiego ciśnienia od 200 do 400 Pa. Transfer trwa maksymalnie do 1 godz., a uzyskane prążki cechują się większą ostrością oraz rozdzielczością niż przy wykorzystaniu innych technik transferu. Pomimo tych zalet blottingu próżniowego, obecnie najczęściej stosowaną techniką jest elektrotransfer. Zaletą tej formy transferu jest szybkość, co znacznie redukuje dyfuzję samych białek i pozwala na uzyskanie bardziej czytelnego obrazu po immunodetekcji. Elektrotransfer można przeprowadzić dwoma sposobami: jako elektrotransfer mokry, gdy „kanapkę transferową” zamoczymy w buforze do transferu, lub elektrotransfer półmokry, gdy „kanapka transferowa” umieszczona jest pomiędzy bibułami nasączonymi buforem (Wu i in., 2004; Kyhse-Anderson, 1984; Towbin i in., 1979).

Jako membranę w elektrotransferze najczęściej stosuje się aktywowany nylon (PVDF, polivinylidene fluoride), można stosować również nitrocelulozę. Nitroceluloza jest tania, ma jednak pewne wady: jest stosunkowo krucha, zwłaszcza gdy jest sucha, a białka nie wiążą się z nią kowalencyjnie. Natomiast PVDF ma bardzo dobrą wytrzymałość mechaniczną, umożliwia wiązanie dużej liczby białek, a sygnał uzyskany w trakcie detekcji jest mocniejszy, przy równoczesnym ograniczeniu tła (Wu i in., 2004; Kyhse-Anderson, 1984; Towbin i in., 1979).

Inkubacja membrany ze specyficznym przeciwciałem

Western-blot wymaga stosowania specyficznych przeciwciał, które służą jako sondy. Specyficzność i aktywność przeciwciał to kluczowe, lecz i niewrażliwe warunki sukcesu metody. Przeważnie stosuje się dwa rodzaje przeciwciał: monoklonalne (mysie) i poliklonalne (królicze). Częściej używana jest surowica z przeciwciałami poliklonalnymi. Zawiera ona bowiem wiele przeciwciał, które wiążąc się z różnymi epitopami antygeny generują znacznie silniejszy sygnał niż można uzyskać przy użyciu przeciwciał monoklonalnych. Jednak, użycie surowicy z przeciwciałami poliklonalnymi zwiększa ryzyko powstania dodatkowych, niespecyficznych sygnałów, gdyż do reakcji wprowadzane są również inne przeciwciała, obecne w organizmie osobnika użytego do immunizacji. Dlatego, z uwagi na specyficzność reakcji, lepiej jest stosować przeciwciała mono-

klonalne, gdyż identyfikując określony antygen przyłączają się one tylko do jednego epitopu. Niestety, posiadają również pewne wady, a mianowicie nie reagują ze zdenaturowanymi białkami, zwykle rozpoznając epitopy powstałe wskutek zwinięcia III-rzędowej struktury białka. Należy mieć też na uwadze, że przeciwciała monoklonalne mogą również powodować powstawanie niespecyficzných sygnałów poprzez oddziaływanie z podobnymi epitopami innych białek (Wu i in., 2004).

Detekcja białek na membranie

Ostatnim etapem metody western-blot jest detekcja białek na membranie.

Przy detekcji najczęściej stosuje się przeciwciała tzw. II-rzędowe, ponieważ rozpoznają one przeciwciała użyte do reakcji wiązania z antygenem. Przeciwciała użyte do reakcji z antygenem (czyli poszukiwanym białkiem) noszą nazwę przeciwciał I-rzędowych. Przeciwciała II-rzędowe mogą być znakowane radioaktywnie, najczęściej jednak skoniugowane są z enzymem, np. z peroksydazą chrzanową (HRP) lub fosfatazą alkaliczną (AP), co pozwala na przeprowadzenie reakcji barwnej.

W ostatnich latach coraz częściej stosowana jest chemiluminescencyjna metoda detekcji białek. Wykorzystuje ona I- lub II-rzędowe prze-

ciwciała skoniugowane z enzymem HRP, który w reakcji z cyklicznymi diacylohydrazdami (np. luminolem) w środowisku zasadowym emituje promieniowanie. W wyniku oksydacji luminol przechodzi w stan wzbudzenia, a powracając do stanu podstawowego emituje promieniowanie świetlne. Wynik doświadczenia zarejestrowany zostaje na kliszy wrażliwej na niebieskie światło. Metoda ta charakteryzuje się następującymi zaletami:

- wysoka czułość (10 razy czulsza w stosunku do metod wykorzystujących zwykłe barwniki oraz 2-5 razy czulsza w stosunku do metod izotopowych);
- dobra rozdzielczość;
- znaczna szybkość;
- oszczędność dzięki stosowaniu małych ilości przeciwciał;
- możliwość przeprowadzenia powtórzeń detekcji na tej samej membranie.

W badaniach realizowanych w Instytucie Zootechniki, w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, w ramach grantu promotorskiego (nr 2PO6D 00728) metoda western - blot stosowana jest do oceny ekspresji białek apoptotycznych w oocytach bydłych zróżnicowanych pod względem zawartości enzymu dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej (G6PD).

Literatura

Kyhse-Anderson J. (1984). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 10, p. 203.

Szalała M., Tobiła P., Pławski A., Kalak R., Jura J., Słomski R. (2004). Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym. W: Przykłady analiz DNA. AR Poznań, ss. 313-319.

Towbin J., Staehlin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from

polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 76, p. 4350.

Wu W., Welsh M.J., Kaufman P.B., Zhang H.H. (2004). Analysis of gene expression at the proteomic level. In: *Gene Biotechnology*; CRC Press.

Do przygotowania niniejszego opracowania wykorzystano również materiały szkoleniowe oraz informacje podawane przez producentów sprzętu do elektroforezy i transferu białek.

ANALYSIS OF GENE EXPRESSION AT THE PROTEOMIC LEVEL USING WESTERN BLOT

Summary

Western blot analysis can detect one protein in a mixture of any number of proteins while giving information about the size of the protein. However, this method is dependent on the use of a high-quality antibody directed against a desired protein. The article describes the principles of western blot hybridization.