

WESTERN BLOT

1. Hinweise zu Membranen

- a. Nitrocellulose
- b. PVDF (alternativ)

2. Aufbau des Transfers

- a. Naßblot
- b. Semi-dry (alternativ)

3. Färben und Dokumentation

4. Inkubation mit Antikörpern

5. Blot-Regeneration

6. Lösungen und Bemerkungen

1. Hinweise zu Membran:

a) **Standard: Nitrocellulose** (Schleicher u Schuell, 0.2 µm Porenweite). Aktivierung *mit Millipore-Wasser*. Unmittelbar nach Transfer mit Ponceau S (0,5%) anfärben (1-5 min färben und in Wasser entfärben, bis Banden sichtbar) und einscannen. **NICHT** mit Coomassie Blue Spezial färben (zerstört Membran!).

b) PVDF (Immobilon-P, Millipore), **trockene Membran vor Gebrauch für 15 sec in Methanol aktivieren, dann 2 min in Millipore-Wasser waschen!** Kann mit Ponceau S (0,2%) oder Coomassie Blue Spezial (0.2% Coomassie G250, 40% Methanol, 5% Essigsäure) angefärbt werden.

2. Aufbau des Transfer:

a) **Naßblot:** Gel für 20-30 min in **1 x Towbin-Transferpuffer** unter leichtem Schütteln inkubieren. Membran auf Gelgröße zurechtschneiden und wie beschrieben (Punkt 1) behandeln. Membran ebenfalls im Transferpuffer inkubieren. Zwei Blatt dickes Filtrierpapier in Transferpuffer anfeuchten. Gel auf Filtrierpapier legen, Membran auf Gel legen. Luftblasen durch Rollen mit Pipette entfernen. Filtrierpapier auflegen. Unten und oben Schwamm auflegen. Auf Träger der Blotapparatur legen und verschließen. Dabei Verschieben vermeiden. Kammer mit eiskaltem Transferpuffer füllen, Rührfisch zugeben und Träger so einhängen, daß die **Reihenfolge negativer Pol (Kathode, schwarz) - Papier - Gel - Membran - Papier - positiver Pol (Anode rot)** eingehalten wird. Transferkammer in Eisbad auf Magnetrührer stellen.

Der Transfer erfolgt bei 300 mA für 2 h.

Nach dem Transfer wird der Blot kurz mit bidest. gewaschen. Er kann entweder gefärbt und zur Lagerung getrocknet oder gleich nach dem Färben weiterverwendet werden (siehe Punkt 1, Information zu Membranen). Mit einem für die Membran geeignetem Färbemittel anfärben und scannen.

b) Semi-dry: Gel für 20-30 min in 1 x Towbin-Transferpuffer + Methanol pH 8.8 unter leichtem Schütteln inkubieren. Membran auf Gelgröße zurechtschneiden. Membran auf Gelgröße zurechtschneiden und wie beschrieben (Punkt 1) behandeln. Membran ebenfalls im Transferpuffer inkubieren. Ein Blatt dickes Filtrierpapier, auf ~Gelgröße zurechtgeschnitten, in Transferpuffer anfeuchten. Filtrierpapier auf Metallplatte der Blotting-Kammer legen. Gel auf Filtrierpapier legen, Membran auf Gel legen. Luftblasen durch Rollen mit Pipette entfernen. Puffer-getränktes Filtrierpapier auflegen. (Achtung: Aufbau hängt von jeweiliger Blotapparatur ab). Kammer verschließen.

Der Transfer erfolgt bei 200 mA, 30 min pro Gel bis maximal 3 Gele (= 90 min).

Der Transfer erfolgt bei 400 mA für 90min (große Proteine z.B. Desmoplakin).

3. Färben und Dokumentation:

Nach dem Transfer wird die Membran kurz mit bidest. gewaschen, mit einem geeigneten Färbemittel gefärbt (siehe Punkt 1.) und eingescannt. Die Membran kann zur Lagerung getrocknet oder gleich nach dem entfärben weiterverwendet werden:

Für Publikationen entweder mit Geldokumentation fotografieren bzw. einscannen und sofort ausdrucken (S/W ok). Beschriften.

4. Inkubation mit Antikörpern:

Bei unbekanntem Antikörper Verdünnungsreihe durchführen. Wenn z.B Firmenangabe 1: 2.000, dann Verdünnungsreihe 1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000, 1:10000. Ggf. weiter optimieren.

Bis auf die Substrat-Reaktion werden alle folgenden Inkubationen auf dem Schüttler durchgeführt. Bei Raumtemperaturen über 25°C wird Arbeiten im Kühlraum empfohlen. Das Inkubationsgefäß soll der Größe des Blots angepaßt sein (geringer Antikörperbedarf, gleichzeitig gute Beweglichkeit des Blots)!

1. Membran anfeuchten.
2. **(Optional):** An mögliche Peroxidasen im Proteinlysate oder als Kontamination beim Prozessieren denken. Peroxidase kann durch HRP-Quenching eliminiert werden: Blot für 15 min in 3% H₂O₂ inkubieren und 3x kurz mit TBS waschen. Bei Verwendung von Super Signal Ultra muß die Membran unbedingt mit H₂O₂ behandelt werden, um Hintergrund zu vermeiden.

3. 30 min bei RT mit ausreichendem Volumen TBS-Tween plus 2,5% Magermilchpulver = TBST+MMP blockieren (oder anderes Blockierungsreagenz, MMP ist chargenabhängig und kann Antikörper binden oder Proteasen enthalten).
4. 1-2 h bei RT mit dem Primärantikörper in 25 (5) ml TBST+MMP Plastik- oder Petrischale inkubieren. Bei über Nacht Inkubation immer 4°C.
Volumen so wählen, daß der Blot nicht austrocknet! Membran in der Orientierung der Proteinseite dem Antikörper zugänglich orientieren, Gefäß mit Frischhaltefolie abdecken!
5. 3 x 5 min mit TBST + 0,25% Triton-X-100 und 1 x mit TBST waschen. (Bei Kreuzreaktionen kann 0.5-1 M NaCl zu Waschpuffer zugesetzt werden.)
6. 30 min bei RT mit dem Sekundärantikörper in TBST +MMP inkubieren (HRP-anti-Spezies)
7. 6 x 5 min mit TBST und 1 x 5 min mit TBS (pH 7,5) waschen. Nach dem letzten Waschschrift den Puffer gut ablaufen lassen.
8. **Als Standard wird das selbstgemachte Substrat verwendet!** Substrat (1 ml reicht für Mini-Blot) auf glatte Oberfläche geben und Membran mit Proteinseite nach unten auflegen. Membran **5 min** im Substrat inkubieren (nicht bewegen).
1ml Solution A (SA, im Kühlschrank)+ 0,3µl H₂O₂+100µl Solution B (RT, dunkel).
Alternativ: Super Signal West Dura Extended Duration Substrate :5 min mit frisch angesetzter Substratlösung, Peroxide : Enhancer (1:1), inkubieren (nicht bewegen). Super Signal West Dura Extended Duration Substrate 1:5 mit Wasser verdünnen!
9. Strata- Logo an mindestens zwei Ecken auf Membran aufkleben.
10. Blot zwischen zwei blitzsauberen Kopierfolien 30 sec. bis 5 min exponieren. Sollte nach 15 min. kein Signal sichtbar sein, Substrat sofort durch zweimaliges Waschen mit dest. Wasser abwaschen. Membran mit unverdünntem Super Signal West Dura Substrate neu inkubieren.
11. Der Blot kann für weitere Versuche benutzt werden. Dafür ist es wichtig, den Blot sofort nach der Exposition kurz mit Millipore-Wasser zu waschen und anschließend zu regenerieren. Danach entweder sofort benutzen oder nach kurzem Wasch in Aqua dest. trocknen.

5. Blot-Regeneration:

Membran für 3x 10 min mit **Stripping-Buffer** (0,1 M Glycin pH 2), dann 1 x mit TBST waschen.

6. Lösungen und Bemerkungen**Towbin-Puffer, pH 8.8:**

	<u>1 x Konz.</u>	<u>5 x Konz.</u>	<u>5 x</u>
Tris	25 mM	125 mM	60.57 g
Glycin	192 mM	960 mM	288.27 g
SDS	0.1%	0.5%	100 ml 20%
			4 l

pH 8.8 einstellen.

- Vor Gebrauch auf 1 x mit H₂O verdünnen, 10% Methanol (technisch).
- pH kontrollieren.

10 x TBS: 100 mM Tris- HCl pH 7.4
1.500 mM NaCl

TBS-Tween (TBST): 1 x TBS + 0.05% Tween-20 (0.5 ml in 1 l 1xTBS)

Ponceau S: 0.5 % Ponceau S, 1 % Essigsäure

Coomassie-Färbelösung für SDS-PAGE Gele:

30 % Isopropanol (technisch)	150 ml
10 % Essigsäure	50 ml
0.2 % Coomassie (Brilliant Blue, R250)	<u>1 g</u>
	500 ml

Entfärber für Gele :

30 % Isopropanol
10 % Essigsäure

Coomassie Blue Spezial: 40 % MeOH, 5 % Essigsäure, 0.2 % CBB R250 (10 %, in MeOH gelöst). Entfärber: gleiche Lösung ohne CBB.

Selbstgemachtes ECL Substrat

Solution A (SA; in Kühlschrank lagern):

200 ml 0.1 M Tris-HCl (pH8.6), 50 mg Luminol

Solution B (SB, bei RT dunkel lagern):

11 mg paraHydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO lösen.

Antikörper-Hinweise:

- Primär- und Sekundär-Antikörper vor Gebrauch immer für 5 min bei 14.000 rpm abzentrifugieren.
- Primär- Antikörper kann 3- 4 mal verwendet werden. Dazu unmittelbar nach Gebrauch auf 2 % Ovalbumin (alternativ BSA) einstellen und steril filtrieren. Wegen HRP kein Azid benutzen, sondern Thimerosal auf 0.01 % zugeben. Bei 4°C aufbewahren.
- Wenn maximale Sensitivität erforderlich ist, Super Signal West Dura unverdünnt einsetzen. Dann muß allerdings Konzentration des Primärantikörpers neu ermittelt werden. Auch der Sekundär- Antikörper muß bis zu 1:150.000 verdünnt werden.