

# **Ia 3. Western-Blot**

- 1) Namensherkunft**
- 2) Methode**
- 3) Durchführung**
- 4) Detektionsmethoden**
- 5) Anwendung**
- 6) Vorteile / Nachteile**
- 7) Nitrocellulose (NC)**

# Namensherkunft

**1975 Edwin Southern** erfindet eine Methode für die Auftrennung und Hybridisierung von **DNA** Fragmenten, den **Southern-Blot**.

Als eine Allusion werden spätere Blotting-Techniken für **RNA Northern-Blotting** und für **Proteine Western-Blotting** genannt.

Da es in der DNA/RNA/Protein-Familie keine weiteren Vertreter gibt, gibt es auch kein Eastern-Blotting.

Blotting stammt aus dem englischen *blot* für Klecks / Fleck, bzw. dem englischen Wort für Löschpapier *blotting paper*, was etwa dem Prinzip nahe kommt.

# Methode

**Der Western-Blot wird auch Immunblot genannt, da mit ihm Antigene mit Hilfe spezieller Antikörper nachgewiesen werden können.**

**Suchobjekt ist ein Antigen oder ein Primärantikörper (HIV)**

**1. Das zu untersuchende Material (Proteine) wird mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.**

**2. Anschließend wird es auf eine Filtermembran (meist Nitrozellulose) übertragen (das eigentliche Blotting) und dort irreversibel fixiert.**

**3. Es folgt eine Behandlung der Proteinbanden mit einem spezifischen primären und einem markierten sekundären Antikörper. Antigen-Antikörper-Bindung.**

**4. Die Antikörper-markierten Antigene können durch Detektionsmethoden sichtbar gemacht werden.**

# Durchführung

## 1) **Elektrophoretische Auftrennung** des Proteingemisches durch **SDS-PAGE**.

- **Gewicht**
- **Ladung**
- **andere Eigenschaften**

## 2) **Übertragung auf eine Blotting-Membran**

(Nitrocellulose, Nylon, Polyvinylidendifluorid (PVDF)) über

- **Diffusion**
- **Kapillarwirkung**
- **Elektrophorese** (senkrecht zur Gelkammer)

- **Durch hydrophobe Wechselwirkungen bleiben die Proteinbanden auf der Membranoberfläche** -

**3) Auswaschen des angelagerten SDS** (über Detergentien enthaltende Puffer) und

**Blockierung der freien Membranoberfläche** mit, für Antikörper nicht erkennbare, Proteinen (Milchpulver, Rinderserumalbumin (BSA), Gelatine)

- Durch die SDS-Entfernung können die **Proteine renaturieren** (Sekundär- und Tertiärstruktur, nicht Quartärstruktur) -

**4) Behandlung mit Antikörperlösung:**

**Primäre Antikörper** (monoklonale/polyklonale), Bindung an das spezifische Antigen.

**5) Waschen:**

Unspezifisch gebundene Antikörper werden durch Detergentien-Puffer entfernt.

**6) Zugabe von markierten Sekundärantikörpern.**

Diese binden im Fc-Bereich des primären Antikörpers

**7) Waschen**

Ungebundene Sekundärantikörper werden entfernt.



# Detektionsmethoden

= Sichtbar machen

- **Enzym-konjugierte Sekundärantikörper:**

- a) **Sekundärantikörper tragen ein Enzym**

- (z.B. Meerrettichperoxidase HRP), dass mit bestimmten Chemikalien (z.B. Luminol → ox. Luminol) unter Farb- oder Chemilumneszenzreaktionen reagiert

- b) **Alkalische Phosphatase (AP):**

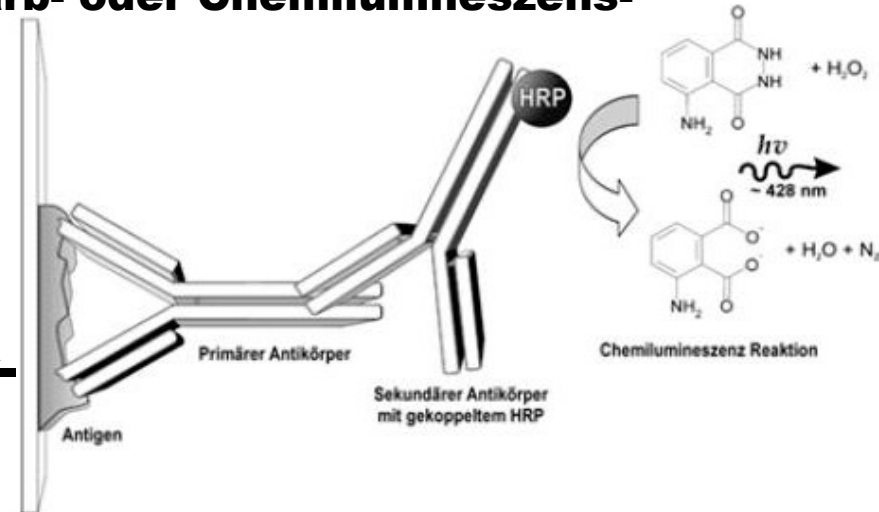
- Farbreaktion mit dem artifiziellen, chromogenen Substrat BCIP und NBT

- **radioaktiv** markierte Sekundärantikörper:

- Darstellung über Autoradiographie auf Röntgenfilm

- **Fluoreszenz-konjugierte Sekundärantikörper**

- Direkte Detektion mit Hilfe spezieller Scanner



# Anwendung

**Der Western-Blot stellt eine qualitative, bzw. semi-quantitative Nachweismethode dar.**

**Anwendung findet er**

- 1) in der Diagnostik als Nachweisverfahren pathologischer Proteinveränderungen, als Antigen/Antikörpernachweis (z.B. HIV-Antikörpernachweis) und als Zweittest zur Absicherung einer Diagnose (Suchtests, z.B. IFT / ELISA-Tests bei Borellien-Infektion).**
- 2) In der Forschung auf der Suche nach Krankheitsrelevanter Proteine (z.B. BSE- / HIV-Erreger)**

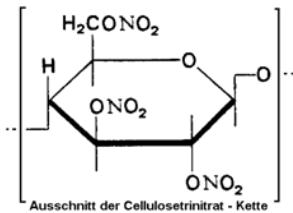
# Vor- / Nachteile

## Vorteile

- **durch die zweistufige Detektion verstärkt sich das Signal (mehrere sek.-Antikörper können an ein prim.-Antikörper andocken)**
- **die sek.-Antikörper haben eine breite Spezifität (erkennen alle primären Antikörper einer Spezies) und können universell eingesetzt werden**
- **es gibt fertige enzymgekoppelte sek.-Antikörper im Handel, die Teils aufwendige Herstellung entfällt.**

## Nachteile

- **Der Westernblot ist eine recht Zeitaufwendige Methode**
- **Da nach einer SDS-Page die Proteine nicht vollständig renaturieren (nicht Quartärstruktur) können monoklonale Antikörper z.T. das Epitop nicht finden.**



# Nitrozellulose (NC)



**Für den Western-Blot wird hauptsächlich Nitrozellulose als Blot-Membran genutzt. Diese ist im Vergleich zu anderen Alternativen recht günstig, hat aber auch einige Nachteile.**

**Nitrocellulose (oder besser Zellulosenitrat) entsteht bei der Umsetzung von Cellulose mit Nitriersäure, ist also ein Ester.**

**Es ist eine weiße faserige Substanz**

**Nicht umsonst trägt Zellulosenitrat allerdings die Namen Schießbaumwolle oder Blitzwatte. Mit einer Explosionsgeschwindigkeit von 6300m/s hat sie eine 147%-ige Explosionsstärke von TNT.**

**Mit dem Weichmacher Campher wurde aus Zellulosenitrat zu Beginn des Film-/ Kinozeitalters der thermoplastische Kunststoff Zelluloid hergestellt (hoch brennbar, selbstentzündend), einige Lagerhäuser und Kinos sind zu der Zeit in Flammen aufgegangen.**



**Heute wird Zellulosenitrat von Pyrotechnikern (N > 12,6% = explosiv) und in der Blot-Technik (N bis 12,6% = leicht entzündlich) eingesetzt.**

**Allerdings werden Tennisbälle immernoch aus Zelluloid hergestellt**