

WESTERN-BLOT

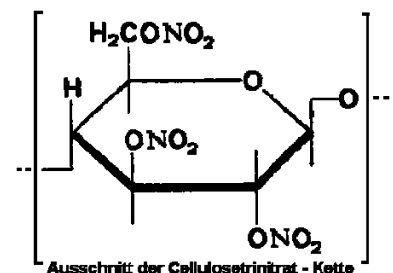
- =Immunoblot – Antikörper und Antigennachweis
- Anlehnung an Edwin Southern, Entwickler des Southern-Blot (DNA);
- Northern-Blot RNA,
- Western-Blot Proteine
- Blot = Klecks
- Blot-Methode – Übertragen elektrophoretisch (SDS-PAGE) aufgetrennter Proteine auf Blot-Membran (Nitrozellulose, Nylon, PVDF)
- hydrophobe Wechselwirkung = Fixierung
- Blockierung Membran für Antikörper durch Milchpulver, BSA (Rinderserumalbumin) Gelatine und andere Proteine.
- Renaturierung nach SDS-PAGE (Sekundär- und Tertiärstruktur, nicht Quartärstruktur – Problem das monoklonale AK z.T. Epitop nicht finden können)
- Primärer Antikörper (monoklonal oder polyklonal) Antikörper-Antigen-Bindung
- **Sekundärer AK, markiert** (Enzym konjugiert – Enzym-Substrat-Reaktion = Farb-, Chemilumneszenzreaktion); radioaktiv – Röntgenfilm (Autoradiographie); Fluoreszenz konjugiert – Scanner direkt!)
- **Dauer ca. 4,5h**
- qualitative – semi-quantitative Nachweismethode
- Nachweis path. Proteinveränderung, Antigen/Antikörpernachweis, Sicherheitstest, Proteinnachweis bei Krankheitsforschung
- Vorteile: Zweistufige Detektion – Signalverstärkung ; sek. AK breite Spezifität (alle AK einer Spezies, universell einsetzbar. Fertige enzymgekoppelte Antikörper im Handel
- Nachteil: Zeitaufwändig, Problem bei monoklonale AK (können Epitope nicht finden)

Immunoblot positiv bei **mind. 2** hochspezifischen Proteinen!!!



NITROZELLULOSE

(Zellulosenitrat)



- Meist für Western-Blot genutzt
- Aus Umsetzung von Cellulose mit Nitriersäure = Ester
- Je nach Stickstoffanteil explosiv (147% von TNT) bis leicht entzündlich
- mit Campher (Weichmacher) = Zelluloid (Filmmaterial) – leicht entzündlich!
- Pyrotechnik (N > 12,6% = explosiv)
- Blot-Technik (N bis 12,6% = leicht entzündlich)