

**Detekce aryluhlovodíkového receptoru (AhR)
v nádorových buněčných liniích HepG2, Huh-7, MCF-7 a HeLa**

OBSAH

I. TEORETICKÁ ČÁST	3
BUNĚČNÉ SYSTÉMY.....	3
JADERNÉ RECEPTORY A XENORECEPTORY.....	4
PROTEINY	5
ELEKTROFORETICKÉ METODY.....	5
II. PRAKTICKÁ ČÁST	7
ÚKOL.....	7
MATERIÁL A CHEMIKÁLIE.....	7
PRACOVNÍ POSTUP – 1. BLOK	8
1. PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO ELEKTROFORÉZU	8
2. PŘÍPRAVA GELŮ PRO SDS – PAGE	9
PRACOVNÍ POSTUP – 2. BLOK	10
3. SDS – PAGE ELEKTROFORÉZA	10
4. SEMI – DRY WESTERN BLOTTING.....	11
5. VIZUALIZACE PROTEINŮ FIXOVANÝCH NA MEMBRÁNĚ	12
6. RYCHLÁ IMUNODETEKCE NA PŘÍSTROJI SNAP I. D.	12
III. VYHODNOCENÍ.....	14

I. TEORETICKÁ ČÁST

BUNĚČNÉ SYSTÉMY

Buněčné systémy zahrnují *in vitro* modely využívané v různých oblastech výzkumu, např. v diagnostice virových onemocnění, v biotechnologii při výrobě monoklonálních protilátek, hrají významnou roli při výzkumu léčby rakoviny nebo se používají pro studium metabolismu léčiv, či testování toxicity různých látek. Buněčné systémy představují izolované orgány, tkáňové řezy, tkáňové kultury a izolované buňky, které jsou v současnosti nejvyužívanějším *in vitro* modelem pro studium řady biologických a molekulárních mechanismů.

V molekulární biologii se využívají primární buněčné kultury izolované z lidských nebo zvířecích orgánů a nádorové buněčné linie (izolované nádorové buňky). Primární buněčné kultury mají řadu výhod, avšak i mnoho limitací. Velmi blízce reprezentují *in vivo* fyziologickou situaci v organismu, mají nepozměněný fenotyp, jsou vysoce diferenciované apod. Na druhé straně se prakticky nedělí, jelikož většina takto izolovaných buněk je v G0 fázi buněčného cyklu. Pro experiment je tedy k dispozici pouze omezené množství biologického materiálu a nelze ho v rámci jedné kultury opakovat na rozdíl od nádorové buněčné linie, kterou je možné udržovat v kultuře po dobu několika týdnů.

Nádorové buněčné linie se kultivují buď adherované na povrchu, suspenzní nebo imobilizované v matrix. Buňky jsou kultivovány v médiu o definovaném složení (fetální bovinní sérum, aminokyseliny, glukóza, antibiotika pro zamezení kontaminace, růstové faktory, hormony) v plastových nádobách. Pokud se jedná o adherentní buněčné linie, kultivační plasty jsou vyrobeny ze speciálně upraveného polystyrenu s hydrofobním povrchem. Kultivační podmínky se snaží napodobit prostředí *in vivo*, proto jsou buňky umístěny v inkubátoru při 37°C v atmosféře 5% CO₂.

Po určité době buněčného růstu a dělení (obvykle po 2 – 3 dnech) je nutné buňky zpasážovat. Pod tímto pojmem se rozumí rozrušení mezibuněčných kontaktů a kontaktů buněk s kultivačním povrchem pomocí proteasy trypsinu (trypsinizace). Během pasážování je vyměněno staré médium za nové, část buněk je odstraněna a zbytek je přenesen do nové kultivační lahve. Počet pasáží je zaznamenáván, abychom určili stáří buněčné kultury.

Historicky první izolovanou lidskou nádorovou buněčnou linií byly HeLa buňky odvozené od karcinomu děložního čípku Henrietty Lacksonové v únoru 1951. Od poloviny 20. století došlo k rychlému rozvoji nádorových buněčných linií a v dnešní době je známo několik stovek lidských a zvířecích (myši, potkaní, králíci, opiči, aj.) linií odvozených od nejrozličnějších typů nádorů (od karcinomu jater, ledvin, plic, slinivky, krve, kostí aj.). Dvěma hlavními zdroji komerčně dodávaných

buněčných linií jsou organizace ECACC (European Collection of Cell Cultures) a ATCC (American Tissue and Cultures Collection), které dodávají jak nádorové tak i primární buněčné linie.

JADERNÉ RECEPTORY A XENORECEPTORY

Jaderné receptory a xenoreceptory jsou ligandy aktivované transkripční faktory kontrolující endogenní signalizaci a regulující fyziologické pochody. Tyto receptory jsou lokalizovány v jádře (vitamin D receptor; VDR, tyroidní receptor; TR, receptor pro kyselinu retinovou; RAR a mnoho dalších) nebo v cytoplazmě (glukokortikoidní receptor; GR, aryluhlovodíkový receptor; AhR, konstitutivně aktivovaný receptor; CAR aj.) v inaktivní formě s navázanými chaperonovými proteiny. Po vazbě ligandu dojde k oddisociování stabilizačních proteinů a translokaci komplexu receptor-ligand do jádra. V jádře formují receptory homo- či heterodimery a v této podobě se vážou do specifické sekvence DNA zvané response element (RE) a spouští expresi cílových genů.

Jedním z prvně objevených xenoreceptorů je receptor pro polyaromatické uhlovodíky neboli aryluhlovodíkový receptor **AhR** (Aryl hydrocarbon Receptor). Jedná se o ligand-aktivovaný transkripční faktor s motivem helix-loop-helix. Nejvyšší expresi AhR najdeme v játrech, ale AhR je exprimovaný také v plicích, placentě, střevě aj. V inaktivní formě je lokalizován v cytoplazmě v multiproteinovém komplexu s chaperonovými proteiny. Po vazbě ligandu je translokován do jádra, tvoří heterodimer AhR-ARNT (Ahr Nuclear Translocator), váže se do dioxin response elementu (DRE) na DNA a spouští expresi cílových genů zahrnujících detoxikační enzymy (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, GST), ale i mnoho dalších (glukuronosyltransferáza; UGT, glutathiontransferáza; GST).

Mezi ligandy AhR patří endogenní látky jako indirubin, bilirubin, biliverdin a eikosanoidy. Exogenními AhR ligandy jsou léčiva (omeprazol), přírodní látky (resveratrol, flavonoidy), ale také syntetické látky a kontaminanty životního prostředí, které mají samy o sobě nebo jejich metabolity vznikající v organismu často karcinogenní a teratogenní účinky (polyaromatické sloučeniny, polychlorované a polybromované bifenylly, dioxiny a dibenzofurany). Tyto látky vznikají během průmyslové výroby, při požárech či při hoření materiálů obsahujících nejrůznější chlorované uhlovodíky. Jsou obsaženy ve výfukových plynech i v cigaretovém kouři. V posledních letech jsou také spojovány s negativními účinky na endokrinní systém, jsou považovány za tzv. endokrinní disruptory (látky interferující s endokrinním systémem zvířat a lidí). Většina těchto látek má negativní vliv na vývoj plodu, jelikož mohou procházet placentou. Jejich působení jsme vystaveni denně a jejich hladinu je potřeba monitorovat.

PROTEINY

Vysokomolekulární přírodní látky označované jako proteiny neboli bílkoviny jsou základní složkou všech živých organismů. Proteiny plní v organismu několik funkcí: jsou zdrojem energie a uhlíku, přispívají k udržení osmotického tlaku vně i uvnitř buněk, podílejí se na regulaci enzymatických reakcí (enzymy), mají funkci ochrannou (protilátky), transportní (hemoglobin), strukturní (kolagen) a mnoho dalších. Tyto univerzální makromolekuly o velikosti 5,5 až 220 kDa jsou složeny z aminokyselin (více než 100), které jsou spojené peptidovou vazbou $-NH-CO-$ do polypeptidového řetězce. Kromě proteinů existují také menší biologicky aktivní molekuly označované jako oligopeptidy obsahující 2-10 aminokyselin, např. glutathion nebo polypeptidy složené z 11-100 aminokyselin, např. insulin. Mnoho proteinů má kromě polypeptidové části také tzv. prostetickou skupinu, kterou může být kovový iont, fosfát, sacharidová či lipidová složka.

Primární strukturu proteinu udává pořadí aminokyselin, přičemž jejich pořadí je čteno od N- k C- konci. Od primární struktury je odvozená sekundární struktura, která je geometrickým uspořádáním polypeptidového řetězce. V molekule proteinu totiž dochází k otáčení rovin peptidových vazeb okolo α -uhlíků a rozeznáváme tak sekundární struktury typu α -helix nebo β -skládaný list. Obě tyto struktury jsou stabilizovány vodíkovými vazbami mezi skupinami $CO-$ a $NH-$ peptidových vazeb. Prostorové uspořádání jednotlivých sekundárních struktur udává terciární strukturu, která je stabilizována vodíkovými vazbami, elektrostatickými a hydrofóbními interakcemi a disulfidickými můstky. Sdružením polypeptidových řetězců vznikají multipodjednotkové - kvarterní struktury (homodimery, heterodimery), které jsou stabilizovány nekovalentními interakcemi.

ELEKTROFORETICKÉ METODY

Stanovení kvalitativních či kvantitativních vlastností proteinů předchází jejich separace a izolace z biologických materiálů. Pro separaci proteinů se využívá různých fyzikálně-chemických metod, nejčastěji však metody elektromigrační (elektroforetické) založené na pohybu ionizovaných částic v elektrickém poli. Elektroforéza jako separační technika byla poprvé použita pro dělení proteinů Tisellem v roce 1937. Částice nesoucí náboj rozpuštěné v elektrolytu se v elektrickém poli pohybují konstantní rychlostí, která je úměrná velikosti jejich nábojů, anionty k anodě a kationty ke katodě.

Historicky nejstarším nosičem pro elektroforézu byl chromatografický papír. V klinicko-biochemické praxi se pro dělení proteinů krevního séra nejčastěji setkáváme s elektroforézou na acetátcelulózových foliích nebo na agarózovém gelu. V současné době nejpoužívanější metodou pro stanovení molekulové hmotnosti proteinů je SDS - PAGE elektroforéza. Je prováděna v polyakrylamidovém gelu (PAG) v diskontinuálním uspořádání a v přítomnosti anionogenního detergentu dodecylsulfátu sodného (SDS). SDS uděluje proteinům uniformní záporný náboj, a ty se

všechny pohybují k anodě a jsou separovány na základě jejich velikosti. Diskontinuální elektroforéza znamená, že vzorek putuje během separace přes dva gely s různou porozitou a s různými elektrolyty. Nejpožívanější je modifikace dle Laemmliho. Úkolem prvního gelu (koncentrující; stacking gel), obsahujícího velké póry, je zakoncentrování (fokusace) vzorku do úzké zóny. Takto koncentrovaný vzorek vstupuje do dělicího gelu (running gel), jehož separační účinnost je pak vysoká bez ohledu na původní objem vzorku.

Proteiny separované SDS-PAGE elektroforézou je možné okamžitě vizualizovat v gelu pomocí nespecifického barvení, např. stříbrem nebo coomassie brilliant blue. Pro imunodetekci proteinů je nutné přenést proteiny z gelu na pevnou fázi - nitrocelulosovou nebo polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu pomocí metody Western blotting (blotting = otisk molekul). Tyto membrány mají unikátní mikroporézní povrch s vysokou vazebnou kapacitou. K fixaci proteinů tak dochází adsorpčními nebo kovalentními silami. Přenos bývá nejčastěji uskutečňován pomocí jednosměrného elektrického proudu (electroblotting) nebo filtrací roztoku přes membránu (dot blotting) pomocí speciálních zařízení.

V případě elektroblotingu existují dva možné způsoby uspořádání: tankový (tank, wet) a polosuchý (semi-dry) blotting. Při tankové variantě se do speciální kazety skládá následující vrstva (sendvič): porézní houbička, filtrační papír, gel, membrána, filtrační papír, porézní houbička. Poté se kazeta vloží do blotovací komůrky naplněné přenosovým pufrem. Přenos proteinů na membránu probíhá při konstantním proudu, jehož hodnota závisí na ploše membrány ($0,8 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$).

Při uspořádání semi-dry se používají plošné grafitové elektrody. Skládání je obdobné jako u tankového uspořádání. Na elektrody se naskládá několik vrstev filtračního papíru nasyceného blotovacím pufrem, blotovací membrána, gel, opět filtrační papíry a nahoru se položí druhá elektroda. Hlavními výhodami polosuchého blottingu v porovnání s tankovým jsou - homogenní elektrické pole, možnost vyššího napěťového gradientu, menší spotřeba přenosového pufru, možnost simultánního přenosu z několika gelů. Proteiny přenesené z gelových nosičů a fixované na membráně se zviditelňují přímo po fixaci různými barevnými reakcemi, např. Ponceau S, fast Green aj., které je možné jednoduše vymýt destilovanou vodou nebo odbarvovacími roztoky.

Specifická detekce proteinů na membráně se nejčastěji provádí imunochemicky pomocí specifických protilátek. Protein navázaný na membráně vytváří komplex s primární protilátkou, který je rozpoznán značenou sekundární protilátkou (nejčastěji alkalickou fosfatázou, křenovou peroxidázou, fluorescenčně či radioaktivně). Před inkubací membrány s primární protilátkou je nutné zablokovat volná vazebná místa na membráně (kam se nenavázaly proteiny) použitím roztoků inerteních proteinů, např. kasein, BSA, hemoglobin nebo nízkotučné mléko, aby nedocházelo k nespecifické vazbě primární protilátky na membránu. Blokování výrazně snižuje šum pozadí a odstraňuje falešné positivity.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

ÚKOL

Pomocí metod SDS – PAGE a western blottingu stanovit expresi klíčového xenoreceptoru AhR v buněčných liniích HepG2, Huh-7, MCF-7 a HeLa.

MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

Příprava vzorků:

Buněčný materiál - adherentní buněčné linie

- **HepG2** buněčná linie odvozená od hepatocelulárního karcinomu
- **Huh-7** buněčná linie odvozená od hepatocelulárního karcinomu
- **MCF-7** buněčná linie odvozená od adenokarcinomu prsu
- **HeLa** buněčná linie odvozená od nádoru děložního čípku

Lyzační pufr: 50mM Hepes, 5mM EDTA, 150mM NaCl₂, 1% triton, pH 7,5, proteázové inhibitory (1 tableta/10 ml lyz. pufru), fosfátové inhibitory (1 tableta/10 ml lyz. pufru)

Vzorkovací pufr (2x loading buffer; 2x LB): 0,125 M Tris/HCl, 4% (w/v) SDS, 20% v/v glycerol, 10% merkapt ethanol, 0,004% (w/v) bromfenolová modř, pH 6,8)

Bradfordovo činidlo

SDS – PAGE a westernblotting

10x PBS: 40 g NaCl, 1 g KCl, 16,05 g Na₂HPO₄.12H₂O, 1 g KH₂PO₄

Roztoky pro přípravu gelů

- akrylamid-N,N'-methylenbisakrylamid: 30 % (w/v) akrylamidu, 0,8 % bisakrylamidu (w/v) ve vodě
- pufr do zaostřovacího gelu (stacking gel buffer): 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
- pufr do dělicího gelu (running gel buffer): 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
- N, N, N', N'-tetrametylendiamin (TEMED)
- 10 % (w/v) persíran amonný (APS) ((NH₄)₂S₂O₈)
- 10% (w/v) SDS
- isopropanol

Migrační pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3

Barvicí roztok s Ponceau S: 0,2% (w/v) Ponceau S v 10% (v/v) kys. octové

Blotovací pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 20% (v/v) methanol, pH 8,3

- příprava: 10x blotovací pufr:methanol:voda = 1:2:7

Pracovní pufr pro imunodetekci obsahující 0,05% Tween (TTBS): 20 mM Tris , 500 mM NaCl, 0,05% Tween, pH 7,5

Imunodetekce membrány

0,1% nízkotučné mléko v TTBS

1% BSA v TTBS

Primární protilátka: myší monoklonální anti-AhR

Sekundární protilátka: anti-myší

Chemiluminiscenční substrát

- roztok A smíchat s roztokem B v poměru 1:1

Další materiál:

Kádinky, automatické pipety, eppendorfky, ledová lázeň, mikrocentrifuga, nalévací rám, nalévací stojánek, elektroforetický stojánek, elektroforetická cela, skla pro elektroforézu, mezerníky (spacers), Pasteurova pipeta, hřebínek, stříčka s destilovanou vodou, stříčka s lihem, třepačka, zdroj pro elektroforézu, blotovací aparatura, misky na barvení, nůžky, misky pro imunodetekci, pinzeta, skalpel, PVDF membrána, filtrační papír

PRACOVNÍ POSTUP – 1. BLOK

1. PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO ELEKTROFORÉZU

Příprava buněčných lyzátů

Buněčné linie HepG2, Huh-7, MCF7 a HeLa jsou vysety na 6-jamkové desce v množství $1,5 \times 10^6$ buněk/jamku 24 hod před začátkem cvičení (provede vyučující)

Veškerá manipulace s buněčnými lyzáty je prováděna na ledu

- 1) Připravíme si 8 nesterilních eppendorfek a označíme je názvy buněčných linií
- 2) Buňky v 6-jamkové desce opláchneme nesterilním roztokem 1x PBS, poté vylijeme, desku osušíme o buničinu

- 3) Do každé jamky napipetujeme 250ul lyzačního pufru. Buňky seškrábneme špičkou a přepipetujeme do předem připravených eppendorfek. Buněčný lyzát v eppendorfce několikrát propipetujeme nahoru a dolů. Centrifugujeme 13 000 RPM/ 15 min/ 4°C
- 4) Po centrifugaci opatrně přeneseme supernatant do nových popsaných eppendorfek. (Přenášíme maximálně 75% objemu a dáváme pozor, abychom nenabrali pelet na dně eppendorfky, který obsahuje buněčné zbytky či DNA interferující při stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové)
- 5) Pro vizualizaci elektroforetické separace proteinů jsou vzorky na SDS-PAGE elektroforézu smíchány se vzorkovacím pufrem (2x), aby jeho finální koncentrace byla 1x (tabulka 1) a celkový objem byl 30 µl
- 6) Připravíme si sadu 0,5 ml eppendorfek a popíšeme je názvy buněčných linií
- 7) Připravené vzorky krátce zvortexujeme a 5 min inkubujeme v termobloku při 95°C
- 8) Vzorky stočíme na stolní centrifuze a uchováváme v mrazáku při -80°C

2. PŘÍPRAVA GELŮ PRO SDS – PAGE

- 1) Velké i malé (bez zářezu) sklo odmastíme lihem a přiložíme k sobě tak, aby mezi skly vznikl prostor pro nalévání gelu (1A) a vložíme do nalévacího rámu (1B) (Obrázek č.1)
- 2) Skla v nalévacím rámu pečlivě vyrovnáme vodorovně s podložkou, rám utáhneme (1C) a vložíme do stojánu (1D). Zkontrolujeme, zda gumové podložky ve stojanu těsní, aby gel nevytekl. Do skel zkusíme nalít destilovanou vodu ze stříčky pro ujištění, že skla nepodtékají a potom je vysušíme filtračním papírem
- 3) Mezi skla vložíme hřebínek a fixem uděláme 1 cm pod zuby hřebínku značku (pro hadinu nalití dělicího gelu) a poté hřebínek odstraníme
- 4) Označíme si kádinky pro přípravu zaostřovacího a dělicího gelu a napipetujeme jednotlivé složky gelů podle tabulky č.1

Pozor: APS a TEMED pipetujeme těsně před naléváním gelu, protože APS je iniciátor polymerace polyakrylamidového gelu, TEMED je katalyzátorem reakce.

- 5) Po přidavku APS a TEMED roztok dělicího gelu promícháme a okamžitě nalijeme dělicí gel mezi skla po vyznačenou rysku. Naléváme opatrně, aby nevznikly bublinky
- 6) Gel převrstvíme malým množstvím isopropanolu pro vyrovnání hladiny gelu. Necháme 20 minut tuhnout
- 7) Po ztuhnutí dělicího gelu důkladně odmyjeme isopropanol destilovanou vodou ze stříčky a vysušíme filtračním papírem

- 8) Přidáme APS a TEMED do kádinky se zaostřovacím gelem a nalijeme až po okraj skel
- 9) Ihned vložíme mezi skla hřebínek a dáváme pozor, aby se v gelu neudělaly bublinky. Počkáme 15 minut, než gel ztuhne (necháme zbylý roztok zaostřovacího gelu v kádince a pokud ztuhne v kádince, je tuhý i mezi skly)

Tabulka č. 1: Složení dělicího a zaostřovacího gelu – 1,5 mm

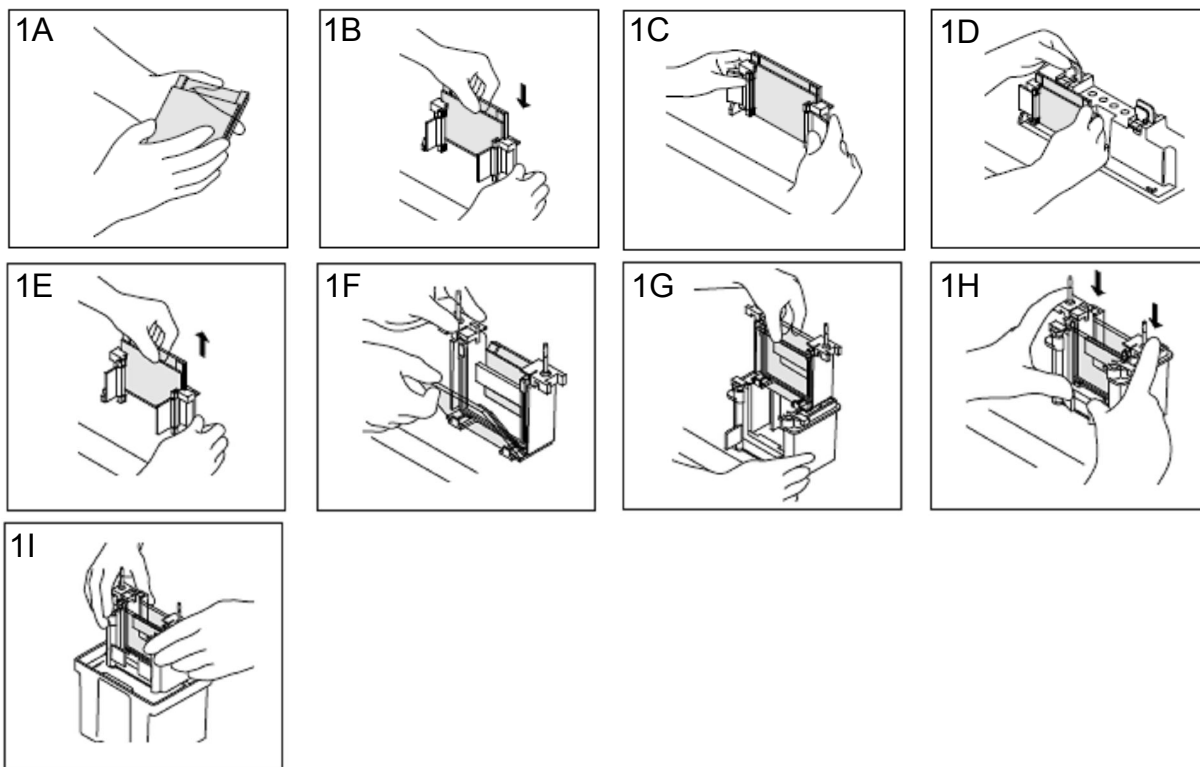
	AA/BIS	Dělicí pufr	Zaostřovací pufr	ddH ₂ O	10% SDS	10% APS	TEMED
Dělicí 10%	2,5 ml	2,5 ml	-	4,9 ml	100 µl	100 µl	10 µl
Zaostřovací 4%	0,4 ml	-	1 ml	2,56 ml	40 µl	20 µl	8 µl

PRACOVNÍ POSTUP – 2. BLOK

3. SDS – PAGE ELEKTROFORÉZA

- 1) Skla s připraveným ztuhlým gelem vyndáme ze stojánků i z nalévacích ráků (1E) a přemístíme do elektroforetického stojanu (1F). Pečlivě upevníme dvě skla proti sobě (1H)
- 2) Elektroforetické stojany umístíme do elektroforetické cely (1I) – správně podle orientace elektrod (elektrof. stojany i cela jsou po stranách označeny červeným a černým pruhem)
- 3) Opatrně odstraníme hřebínek, abychom neporušili jamky v gelu a Pasteurovou pipetou vymyjeme z jamek zbytky gelu
- 4) Mezi skla nalijeme čerstvý migrační pufr až povrch zadních skel, aby byly jamky zcela ponořené v pufru
- 5) Do elektrof. cely nalijeme po vyznačenou rysku už použitý migrační pufr
- 6) Vzorky připravené z předešlého cvičení vyndáme z mrazáku, necháme rozmraznout a poté stočíme na stolní centrifuze
- 7) Do první jamky napipetujeme 2 µl markeru molekulové hmotnosti, do dalších jamek opatrně nanášíme vzorky pomocí speciálních špiček. Dáváme pozor, abychom špičkou nepropíchl dno jamky
- 8) Po nanesení vzorků zkontrolujeme, zda migrační pufr mezi skly neprotéká a jeho hladina je stále na úrovni zadních skel
- 9) Zavřeme elektrof. celu víkem tak, aby se dotýkaly kontakty elektrod, a zapojíme ke zdroji
- 10) Pro zaostření (zakoncentrování) vzorků nastavíme proud: 1 gel => 10 mA
- 11) Po zakoncentrování vzorků (až vzorky projdou zaostřovacím gelem) zvýšíme proud: 1 gel => 30 mA.

- 12) Elektroforézu zastavíme ve chvíli, kdy čelo elektroforézy doputuje 0,5 cm od spodního okraje skla. Odstraníme víko, vylijeme migrační pufr a vyndáme gely
- 13) Pomocí plastové špachtle oddělíme skla od sebe a odřízneme zaostřovací gel (separované proteiny se nacházejí pouze v dělicím gelu)
- 14) Gel umístíme do transferového pufru a necháme ho v něm 5 minut



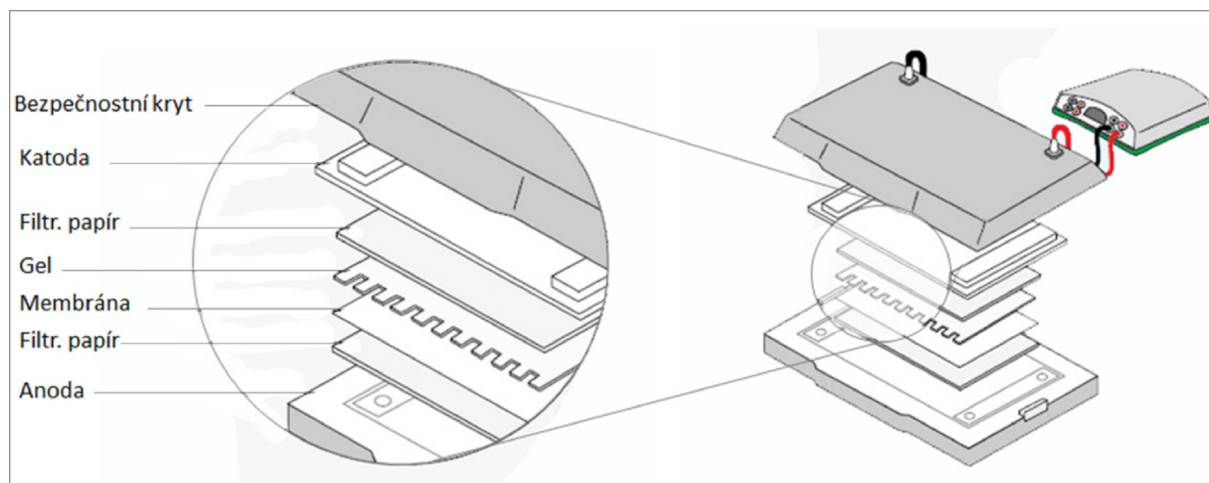
Obrázek č. 1: Manipulace se skly a elektroforetickou celou

4. SEMI – DRY WESTERN BLOTTING

Membrány a filtrační papíry si připravíme v průběhu elektroforézy.

- 1) PVDF membrány hydratujeme v methanolu a následně promyjeme 2x 5 min v destilované vodě na třepačce
- 2) Poté ponoříme membrány do blotovacím pufru a ponecháme na třepačce
- 3) Filtrační papíry navlhčíme v blotovacím pufru těsně před použitím, aby se nerozmočily
- 4) Na spodní elektrodu (anodu) položíme 4 filtrační papíry, na ně přiložíme membránu a poté gel, který překryjeme 4 filtrační papíry a poválíme válečkem, abychom odstranili bubliny mezi gelem a membránou
- 5) Spodní elektrodu důkladně osušíme buničinou, aby transferový pufr nevytékal v průběhu western blottingu

- 6) Překryjeme druhou elektrodou (katodou) a zapojíme ke zdroji. Nastavíme proud 500 mA a zatížíme víko
- 7) Po 1 hodině ukončíme semi - dry western blotting. Odpojíme elektrody od zdroje a vypneme ho



Obrázek č. 2: Skládání blotovací kazety

5. VIZUALIZACE PROTEINŮ FIXOVANÝCH NA MEMBRÁNĚ

- 1) Po ukončení semi-dry western blottingu promyjeme membránu v destilované vodě
- 2) Pro ověření přenosu proteinů z gelu na membránu inkubujeme membránu s barvivem Ponceau S 5 - 10 min na třepačce
- 3) Membránu odbarvíme v destilované vodě tak, abychom odstranili pozadí a zvýraznili jednotlivé pruhy přenesených proteinů
- 4) Membránu necháme vyschnout na filtračním papíře

6. RYCHLÁ IMUNODETEKCE NA PŘÍSTROJI SNAP I. D.

Přístroj SNAP i. d. umožňuje imunodetekci proteinů na membráně. Oproti standardnímu postupu, který trvá několik hodin, systém SNAP využívá podtlak vakua, čímž se výrazně sníží doba inkubace a proteiny je možné detekovat již po 30 minutách.

- 1) SNAP i. d. položíme na rovnou plochu pracovního stolu. Připojíme hadici přívodu vakua k zadní části přístroje. Druhý konec hadice připojíme ke zdroji vakua, použijeme odsávací láhev a filtr pro ochranu zdroje vakua před kapalinami a kontaminací

- 2) Podle pokynů vyučujícího ořízneme membránu v místě, kde očekáváme protein AhR (90 kDa) a připravíme potřebné roztoky a protilátky podle tabulky č. 2

Tabulka č. 2: Roztoky potřebné pro imunodetekci membrány

Roztok	Objem v mL
Blokovací roztok - 0,1% Nízkoúčinné mléko v TTBS	15
Promývací roztok - TTBS	15
Primární protilátka proti AhR v 1% BSA TTBS (1:250)	1,5
Sekundární protilátka v 0,1% Mléku TTBS (1:1000)	1,5

- 3) Membránu hydratujeme v metanolu a poté promyjeme v destilované vodě
- 4) Zbytkové červené zbarvení na membráně odmyjeme v přenosovém pufru
- 5) Otevřeme víko komůrky blotu, nedotýkáme se bílého vnitřního povrchu. Navlhčíme bílý vnitřní povrch držáku deionizovanou vodou. Vložíme navlhčenou membránu na střed s proteiny směrem dolů
- 6) Pomocí válečku odstraníme veškeré vzduchové bubliny mezi blotovací membránou a povrchem komůrky držáku. Na membránu položíme podložku (není třeba vlhčit) tak, aby kompletně pokrýval celou blokovací membránu, a znovu jemným pohybem přejedeme válečkem
- 7) Uzavřeme víko (uslyšíme cvaknutí). Otevřeme víko přístroje a vložíme do něj držák komůrkou směrem vzhůru tak, aby držák zapadl v těle přístroje. Zavřeme víko přístroje
- 8) Do každé komůrky pro dvě membrány nalijeme vždy 15 ml 0,1% roztoku nízkoúčinného mléka v TTBS a ihned zapneme přívod vakua otočením přepínače vakua příslušného držáku. Po úplném vyprázdnění komůrky držáku (10-20 sekund) vypneme zdroj vakua otočením přepínače
- 9) Do každé komůrky aplikujeme 2 mL primární monoklonální myší anti-hAhR protilátky ředěné 1:250 v 1% BSA s TTBS. Roztok protilátky musí rovnoměrně pokrýt celý povrch komůrky!
- 10) Inkubujeme 10 minut při laboratorní teplotě (přívod vakua musí být vypnutý!)
- 11) Po uplynutí 10 min zapojíme zdroj vakua a vyčkáme 10-20 sekund pro dokonalé odstranění roztoku protilátky z komůrky držáku
- 12) Promyjeme každou komůrku 3x 15 ml promývacího roztoku Tween-20 v TBS. Po posledním promývání a úplném odsátí promývací roztoku odpojíme zdroj vakua
- 13) Aplikujeme 2 mL sekundární anti-myší protilátky v 0,1% mléku s TTBS ředěné 1:1000.
- 14) Se zdrojem vakua stále odpojeným, inkubujeme 10 min při laboratorní teplotě. Po uplynutí 10 min zapojíme zdroj vakua a vyčkáme 10-20 sekund pro dokonalé odstranění roztoku protilátky z komůrky

- 15) Promyjeme každou komůrku 3x 15 ml promývacího roztoku Tween-20 v TBS. Po posledním promývání a úplném odsátí promývací roztoku odpojíme zdroj vakua
- 16) Vyjmeme držák blotu z přístroje, položíme na pracovní plochu komůrkou a otevřeme víko držáku. Pinzetou opatrně vyjmeme membránu a pokračujeme v postupu vizualizace proteinů zvolenou metodou. Držák blotu a přístroj opláchneme destilovanou vodou a necháme osušit
- 17) Sekundární protilátka je značená křenovou peroxidasou, proto pro detekci použijeme chemiluminiscenční substrát
- 18) Přeneseme membránu na skleněnou desku a připravíme si roztok komerčního luminolu smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 1:1 (množství sdělí vyučující). **Pozor, pro každý roztok použijeme čistou špičku, aby nedošlo ke kontaminaci a možnému znehodnocení roztoku!**
- 19) Připraveným roztokem lehce převrstvíme membránu a inkubujeme 2 minuty
- 20) Po ukončení inkubace odsajeme nadbytečný roztok luminolu a spustíme expozici na film (detaily vysvětlí vyučující)

III. VYHODNOCENÍ

Pomocí markeru molekulových hmotností odhadneme velikost detekovaných proteinů a určíme, který z bandů odpovídá studovanému proteinu AhR (90 kDa). Následně porovnáme, zda je AhR přítomen ve všech použitých buněčných liniích.

Ze získaných výsledků vypracujeme protokol obsahující princip použitých metod, pracovní postup, vyhodnocení výsledků a závěr.

Návod ke cvičení byl zpracován v rámci projektu FRVŠ 10/2012/G3 - Studium exprese proteinů v in vitro modelech lidských nádorových buněčných linií

Vypracovala: Mgr. Aneta Vávrová (Dořičáková), Mgr. Aneta Novotná