

Modul 5

Praktikum Western Blotting, Krauß / Lamparter, für Biologie 4. Semester

Sommersemester 2017

Einteilung in 2 Untergruppen, beide arbeiten parallel.

1. Tag: Gele gießen (1 h), Vorbesprechung (1 h), Proben vorbereiten (1 h), Elektrophorese (1.5 h), Coomassie (üN)

2. Tag: Elektrophorese (1,5 h), Blotten (1,5 h), Blocken (1 h) Antikörper 1 (ü.N.)

3. Tag: Waschen (1 h), Antikörper 2 (1 h), Waschen (1 h), Färben (1 h), dazwischen Bradford Proteinbestimmung

Einführung

Bei einer SDS Gelelektrophorese trennt man Proteine im elektrischen Feld auf. Die Gele stehen in der Regel vertikal und die Auftrennung erfolgt von oben nach unten (Kathode oder minus- Pol oben, Anode oder plus - Pol unten). Als Matrix wird Polyacrylamid verwendet. In Wasser gelöstes Acrylamid und Bisacrylamid bilden nach Zugabe einer Radikal-bildenden Substanz (Ammoniumpersulfat, APS) vernetzte Polymere mit einer Maschengröße, die von der Konzentration der Monomere abhängt. Das Gel befindet sich zwischen zwei Glasplatten. Oben werden Taschen "frei gelassen", in welche die Proteine pipettiert werden. Vor dem Auftrag erfolgt eine Behandlung der Proteine mit Hilfe von SDS und DTT, die dazu führt, dass alle Proteine denaturiert und langgestreckt vorliegen sowie gleichmäßig negativ geladen sind. So wird erreicht, dass die Auftrennung im Acrylamid Netz gleichmäßig nach der Größe der Proteine erfolgt. Andere Parameter (Ladung des nativen Proteins, Bindung an andere Proteine) werden unwichtig. Das Gel besteht aus zwei Teilen, dem unteren Trenngel und dem oberen Sammelgel. Damit eine optimale Auftrennung erfolgt, werden die Proteine im Sammelgel fokussiert. Nach dem Auftrag sind die Proteine einer Probe über eine Höhe von 2-4 mm verteilt, nach der Fokussierung über weniger als 1 mm. Nach dem Übergang von Sammelgel zu Trenngel erfolgt die Auftrennung nach Molekulargewicht. Das Prinzip "diskontinuierliche Elektrophorese" basiert auf der Mobilität von Glycin, Chlorid und Protein in verschiedenem pH.

Die SDS Gelelektrophorese wird vor allem analytisch eingesetzt: wie viele Proteine kann ich in meinem Extrakt unterscheiden? Was ändert sich am Protein-Muster durch eine bestimmte Behandlung? Wie gut hat meine Reinigung funktioniert? Die 2D-Elektrophorese beinhaltet in der 2. Dimension auch eine SDS Gelelektrophorese.

Proteine sind nicht sichtbar, sie absorbieren kein sichtbares Licht, nur UV-Licht mit 280 nm. Daher müssen nach erfolgter Auftrennung die Proteine angefärbt werden. Es gibt verschiedene Methoden. Silberfärbung ist am empfindlichsten (Fingerabdrücke!). Am häufigsten wird die Coomassie Färbung angewandt. Auch hier gibt es unterschiedliche Methoden und Empfindlichkeiten. Im Kurs wird eine einfache Coomassie Färbung angewandt. Nach der Anfärbung erfolgt in der Regel eine Entfärbung.

Tipps

- Bei "normalen" Gelen sollten pro Spur maximal 30 µg Protein aufgetragen werden, sofern es sich um Protein-Gemische handelt. Bei einem gereinigten Protein (1 Bande) sollten es 2 µg sein. Oder Sie tragen in eine Spur 2 µg und die nächste 10 µg auf (um Kontaminationen zu sehen). Die Konzentration des Proteins kann mit Bradford bestimmt werden, dies muss vor der Zugabe von SDS passieren.
- Es ist gut, wenn man die Proteinkonzentrationen weiß! Eine Marker-Bande hat in der Regel 1 µg. Sie können durch einen Vergleich damit abschätzen, wie viel Protein eine andere Bande enthält und dann rückrechnen, wie viel in der Probe war.

- Notieren Sie sich die Größen der Marker. Falls diese nicht mitgeteilt werden, fragen Sie nach. Dies ist für die Auswertung wichtig.
- Berechnen Sie die Größen der relevanten Banden anhand der Marker.
- Zum Auftragen können Sie ausgezogene Spitzen verwendet, 100er oder 20er Pipette. Bitte die Spitzen mehrmals verwenden, zwischendurch im Laufpuffer spülen.
- Nach der Coomassie Färbung und Entfärbung kann man das Gel trocknen zum Aufbewahren. Dazu Cellophan Folie verwenden. Vor dem Trocknen sollte das Gel in 20 % Methanol sein, nicht in Wasser.
- Beim Einstellen der Spannung gelten folgende Regeln: Ohmsches Gesetz: $I = U/R$, Strom = Spannung durch Widerstand. Gemeint ist der Widerstand zwischen Anode und Kathode, der sich aus Laufpuffer und Gel zusammensetzt. Der Widerstand vergrößert sich im Lauf der Elektrophorese, lässt sich aber nicht verstellen (es sei denn man gibt Salz dazu, aber dann stimmt alles nicht mehr). Am Netzgerät kann man Spannung oder Strom konstant einstellen. Versuchen Sie zu verstehen, was "konstant einstellen" in der Praxis bedeutet. Wird die Spannung konstant eingestellt, sinkt der Strom im Lauf der Zeit. Wird der Strom konstant eingestellt, steigt die Spannung im Lauf der Zeit! Da Sie den Widerstand nicht verändern können, ist es auch nicht möglich, Strom und Spannung unabhängig voneinander einzustellen. Entscheidend für die maximale Geschwindigkeit der Auftrennung ist die Leistung. Die Wärmeentwicklung ist abhängig von der Leistung. Wenn es zu heiß wird, kocht das Wasser im Gel. Bei "normalen" Gelen kann eine Leistung bis zu 5 W eingestellt werden. Wie berechnet sich die Leistung? $P = U \times I$, Leistung = Spannung mal Strom. In der Praxis: "konstant Spannung", erstmal eine Spannung von 150 V einstellen. Strom ablesen und Leistung ausrechnen. Dann abschätzen, wie weit man die Spannung ändern kann, bis etwa 5 W erreicht sind. Die Leistung steigt im Quadrat mit der Spannung (s.o.)! Nach etwa 20 min (Strom sinkt) kann man nachregeln. Was passiert mit der Leistung wenn ich konstant Strom einstelle?

Ablauf

Erstes Gel für Coomassie

Gießen des Gel:

Siehe unten

Vorbereiten der Proben:

Zunächst Protein Verdünnungen vorbereiten:

(A) Agp1-M15 (55 kDa) mit His-tag unverdünnt (ca. 1 mg/ml), (B) 1/3, (C) 1/10, (D) 1/30, (E) 1/100 verdünnt, (F) Bakterien Extrakt, (G) Bakterien Extrakt und Agp1-M15 gemischt (9+1), (H) Extrakt von UVR8 Klon. Man braucht je 50 µl oder mehr. Bitte vorher überlegen und aufschreiben, wie man vorgeht, sparsam mit Material (z.B. Pipettenspitzen) umgehen. Eppi beschriften.

Von (A) bis (H) wird 50 µl Lösung mit 25 µl Probenpuffer gemischt.

Die Proben werden 15 min bei 60° inkubiert (Heizblock). Genaue Zeit einhalten! Vorbereiteter Marker wird 5 min erhitzt.

Gel wird in Apparatur eingebaut.

Proben werden in folgender Reihenfolge aufgetragen:

5 µl Marker	10 µl A	10 µl B	10 µl C	10 µl D	10 µl E	10 µl F	10 µl G	5 µl Marker	10 µl H
----------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	----------------	---------

Bitte sorgfältig arbeiten.

Rest der Proben bei -20° aufbewahren, diese werden für das zweite Gel benötigt.

Start der Elektrophorese:

Bitte obere und untere Angaben zu Spannung und Strom beachten, zur Not Betreuer fragen. Der Verlauf kann anhand der Bromphenolblau (BPB) Bande verfolgt werden. Elektrophorese sollte so lange laufen, bis BPB in den unteren 15% des Gels befindet. Sehr kleine Proteine können schneller laufen als BPB, daher dieses nicht rauslaufen lassen.

Anfärben mit Coomassie:

Siehe unten, 1 h färben und lange entfärben und trocknen (siehe unten und oben). Für das Protokoll: wie kann man das Ergebnis beschreiben? Wo liegt die Nachweisgrenze in µg? Stellen Sie für die Marker Proteine Laufstrecke in mm gegen log (Molekulargewicht) dar.

Zweites Gel für Western Blot

Ein zweites rechtzeitig gegossenes Gel wird für Western Blot verwendet. Das Gel wird mit den bereits vorhandenen Proben beladen. Nach Einfrieren die Proben kurz (5 min) auf 60° erhitzen. Das Gel genauso beladen und die Elektrophorese genauso durchführen wie die erste. Natürlich keine Anfärbung! Während der Elektrophorese kann man die Vorbereitung für den Blot machen

Blotten auf PVDF:

Es können zwei Gruppen eine Blot-Apparatur gleichzeitig benutzen! Bereiten Sie PVDF und Filterpapier vor. PVDF muss zunächst mit Methanol benetzt werden. Wie es genau geht steht unten. Montieren Sie Filterpapier, Membran, Gel in der richtigen Reihenfolge. Auch hier wandern Proteine von - nach +. Orientierung des Gels beachten, die Reihenfolge auf der Membran sollte die gleiche sein wie auf dem Gel. Deckel schließen und Blot starten. Es dauert etwa 1 h. Nach Entfernen der oberen Filterpapiere und des Gels sollten Sie die vorgefärbten Marker auf der Membran sehen. Bitte gleich auf der Membran je eine Markierung mit Kugelschreiber an der linken unteren und an der rechten unteren Ecke machen (unterschiedliche).

Auf der rechten Seite ist rechts vom Marker noch eine Spur. Die Membran wird am Marker auseinandergeschnitten (so dass auf beiden Teilen noch was davon zu sehen ist) und die beiden Teile unterschiedlich weiter behandelt. Einmal wird Anti-MBP Antikörper verwendet, einmal Anti-Poly-His Antikörper, die sekundären Antikörper sind Anti-Rabbit-AP bzw. Anti-Mouse-AP. Es muss Ihnen aufgrund der Besprechung klar sein, welcher Teil wie und warum weiter behandelt wird. Bitte sonst nachfragen. Die Details sind unten erklärt.

Allgemeine Anleitung für SDS-Gelelektrophorese

Gele werden zwischen 2 abgedichtete, speziell angefertigte Glasplatten (durch "Spacer" getrennt) gegossen. Vor Gießen des Sammelgels wird ein Kamm eingeführt, dies führt dazu, dass sich ober mehrere Taschen bilden, worin die Proteinlösungen aufgetragen werden können.

Für die SDS Gelelektrophorese (nach Laemmli, 1970) werden folgende Stammlösungen benötigt:

- Acrylamid Stammlösung: 30% (w/v) Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid (fertig) *	ca. 300 ml
- Trenngelpuffer: 1,5 M Tris, pH 8,8 (mit HCl), 0,6% SDS *	ca. 250 ml
- Sammelgelpuffer : 0,5 M Tris, pH 6,8 (mit HCl), 0,6% SDS *	ca. 250 ml
- 10% Ammoniumpersulfat (APS) *	ca. 10 ml
- Laufpuffer: 0,025 M Tris; 0,192 M Glycin, 0,15% SDS	5 l
- 3-fach Probenpuffer: 30% Glycerin (3 ml), 0,3 M DTT (0,46 g), 6% SDS (0,6 g), 4,8 ml Sammelgelpuffer pro 10 ml, 0,01% Bromphenolblau **	10 ml

(*: aufbewahren in 4°; **: aufbewahren in -20°, sonst RT)

Je nach Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins werden Trenngele mit unterschiedlichen Acrylamid-Konzentrationen gegossen. Für das Trenn- und Sammelgel werden folgende Lösungen zusammenpipettiert:

	Trenngel				Sammelgel	
	(Höhe 7 cm, Breite 14 cm, Dicke 1 mm)				(Höhe 1,5 cm)	
	5 %	7,5 %	10 %	15 %	3 %	4 %
30 %AA	4,2 ml	6,2 ml	8,2 ml	12,3 ml	0,9 ml	1,3 ml
TreGePu	6,2 ml	6,2 ml	6,2 ml	6,2 ml		
SaGePu					2,3 ml	2,3 ml
Wasser	14,3 ml	12,3 ml	10,3 ml	6,2 ml	6,5 ml	6,2 ml
TEMED	110 µl	110 µl	110 µl	110 µl	53 µl	53 µl
APS (10%)	220 µl	220 µl	220 µl	220 µl	110 µl	110 µl

Ansätze sind für jeweils 3 Gele (Invitrogen System) ausgelegt

Nach dem Gießen des Trenngels wird dieses vorsichtig mit Wasser überschichtet, wodurch eine waagrechte, gerade Trenngelkante gewährleistet ist. Nach Auspolymerisieren des Trenngels wird das Sammelgel mit den Taschen für den Probenauftrag gegossen.

Für die Probenvorbereitung wird die Proteinlösung mit dem halben Volumen 3-fach Probenpuffer (30% Glycerin, 0,3 M DTTT, 6% SDS, 4,8 ml Sammelgelpuffer pro 10 ml, 0,01% Bromphenolblau) vermischt und 15 min bei 60 °C inkubiert. Aceton-gefällte Proteine werden in 1:1 Probenpuffer resuspendiert. Wichtig: Unlösliche Proteine müssen nach der Probenvorbereitung nochmal zentrifugiert werden (45000 g 1 h). Dann werden die Proben mit Hilfe einer Hamilton-Spritze oder einer dünnen Pipettenspitze in die Taschen des Sammelgels gegeben und die Elektrophorese gestartet. Der Lauf dauert bei 150 V etwa 1½ bis 2 Stunden. (Siehe dazu obere Anmerkung zum Ohmschen Gesetz)

Coomassie Färbung

Färbe-Lösung (500 ml): (Kann mehrmals verwendet werden, lässt in der Intensität langsam nach)

0,04 % Brilliant Blue R (Coomassie)

40 % (v/v) Methanol

10 % Essigsäure

mit Wasser auffüllen

30 min bis 4 h rühren, filtrieren

Entfärbe-Lösung: (kann mehrmals verwendet werden durch Verwendung von Aktivkohle)

40 % Methanol oder 30% Methanol und 10% Essigsäure

Das Polyacrylamid-Gel wird 1 h oder länger in der Färbelösung inkubiert (Schüttler). Danach erfolgen Waschungen in der Entfärber, bis der Hintergrund komplett durchsichtig ist.

Zum Trocknen werden die Gele mit "Einmachfolie" (und Wasser) in einem speziellen Rahmen eingespannt. Vor dem Einspannen das Gel in 20% Methanol schütteln. Das Trocknen dauert mindestens 12 Stunden. Es ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen die beiden Folien geraten.

Allgemeine Anleitung für Western-Blotting

Folien nicht mit den Händen berühren, wegen der Fingerabdrücke! Entweder mit Handschuhen arbeiten oder Pinzetten verwenden.

Folgende Puffer werden benötigt:

- "Waschpuffer": 10 mM Tris, 0,9% NaCl w/v, 0,05% Tween-20 oder Nonidet P-40, pH 7,4 mit HCl (etwa 1 Liter ansetzen)
- Puffer für alkalische Phosphatase: 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl, pH 9,0 mit HCl (etwa 200 ml ansetzen)
- Transferpuffer; dafür 4 Teile vom Laufpuffer der Elektrophorese mit 1 Teil Methanol mischen (etwa 100 ml)
- BCIP und NBT zu 50 mg/ml in DMF bzw. 70% DMF

PVDF Folie muss wie folgt vorbereitet werden: Folie wird zunächst genau auf die Größe des Gels zugeschnitten (zum Beispiel 5 x 8 cm). Beim Zuschneiden darauf achten, dass über und unter der Folie das Schutzpapier nicht entfernt wird (wird mitgeschnitten). Folie nicht mit den Händen berühren! Die Folie wird kurz mit 100% Methanol benetzt. Dann wird sie in H₂O geschwenkt, bis sie vollständig benetzt ist (evtl. untertauchen). Danach erfolgt eine Equilibrierung im Transferpuffer für mindestens 15 min (besser 30 min). Eine schnellere Methode: Membran in definiertem Volumen 100% Methanol benetzen, das 4-fache Volumen Laufpuffer zugeben und darin die Folie equilibrieren (damit entsteht automatisch der Transferpuffer, der auch verwendet werden kann).

Nach einem Transfer der Proteine aus einem Polyacrylamid-Gel auf Nitrozellulose (NZ) oder PVDF-Membran lassen sich einzelne Proteine mit Hilfe von Antikörpern selektiv anfärben. Genauso lassen sich biotinierte Proteine über Avidin nachweisen.

In einer "Halb-Trocken" ("semi-dry") Blotapparatur (Firma Biometra) werden die Proteine auf NZ/PVDF transferiert. Für den Transfer werden zunächst zwei Lagen Whatman 3MM Filterpapier in Transferpuffer getränkt und auf die untere Elektrode der Blotapparatur gelegt. Vor dem Auflegen eine "Pfütze" Transferpuffer (etwa 5 - 10 ml) auf die Elektrode leeren. Zum Auflegen der Filterpapiere diese links und rechts anfassen und in der Mitte einen Bauch durchhängen lassen. Die Mitte zuerst auflegen und nach außen abrollen lassen. Wieder eine Pfütze Transferpuffer. Darauf die PVDF oder NZ- Folie (Pfütze), dann das Acrylamid-Gel und dann wieder zwei Lagen Filterpapier. Eventuell eingeschlossene Luftblasen werden mit einer Glaspipette oder einem geeigneten anderen runden Gegenstand (Falcon?) ausgerollt. Danach wird die obere Elektrode aufgelegt und Spannung angeschlossen (oben negativ, unten positiv). Bei einem Strom von 5 mA pro cm² Gelfläche wird 1 Stunde geblottet. Andere Strom/Zeit Kombinationen können errechnet werden; das Produkt aus Strom und Zeit muss immer dasselbe sein.

Alle weiteren Inkubationen der Folie erfolgen in "Waschpuffer" (10 mM Tris, 0,9 % NaCl w/v, 0,05 % Tween-20, pH 7,4).

>1 h Blocken: Vor der Inkubation mit Antikörper bzw. Avidin müssen freie Proteinbindstellen abgeblockt werden. Dafür mit 0,3% BSA in Waschpuffer (ca. 20 ml) inkubieren.

>2 h primärer Antikörper: Die Folie wird mindestens 2 h lang bei Raumtemperatur in der primären Antikörperlösung geschüttelt. Etwa 10 ml einsetzen.

>1 h Waschen: Der oben angegebene Puffer wird 6-mal ausgetauscht (je etwa 50 ml). Jede einzelne Waschung geht 10 min, insgesamt also 1 h.

>2 h sekundärer Antikörper: Es wird ein Konjugate mit alkalischer Phosphatase (AP) verwendet. Antikörper/AP wird je nach Herstellerangaben verdünnt (hier vermutlich 1/7000). Wieder etwa 10 ml herstellen. Die Inkubation dauert 2 Stunden.

>1 h Waschen: Vor der Anfärbung erfolgt wieder eine Waschung mit 6-maligem Pufferwechsel (s.o.).

Für die Anfärbung der Banden wird (für eine Fläche von 100 cm²) folgende Lösung angesetzt: In 10 ml Puffer für alkalische Phosphatase (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,0) werden 15 µl einer BCIP Stammlösung (50 mg/ml in Dimethylformamid) und 30 µl einer NBT Stammlösung (50 mg/ml in 70 % Dimethylformamid) pipettiert. Die durch die alkalische Phosphatase katalysierte Reaktion bewirkt den Niederschlag eines violetten Farbstoffs. Die Anfärbung erfolgt so lange, bis die gewünschten Banden gut sichtbar sind (in der Regel 5 bis 30 min bei Raumtemperatur, manchmal bis zu 4 Stunden). Die Reaktion wird durch intensives Waschen mit Wasser oder durch Entzug von Mg²⁺ (mit 5 mM EDTA) gestoppt.

Messung der Proteinkonzentration über Bradford

Ansetzen: 50 mg Coomassie Blue G250 (Sigma) werden in 25 ml 95% Ethanol und 50 ml 85% Phosphorsäure gelöst (>1 Stunde Rühren), mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt und die Lösung filtriert. In Lichtschutzflasche aufbewahren.

Eichkurve: Doppelte oder dreifache Ansätze !! Für die Erstellung einer Eichkurve werden folgende Konzentrationen an BSA verwendet: 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4 und 1,6 mg/ml. Davon je 10 µl (0 bis 10 µg) mit 1 ml Bradford mischen, 15 min inkubieren und messen. Für die Herstellung dieser Konzentrationsreihe zunächst eine 10 mg/ml BSA-Stammlösung herstellen. Daraus eine 2 mg/ml Lösung verdünnen. Davon 10 / 20 / 30 / 40 / 50 / 60 / 70 / 80 µl mit 90 / 80 / 70 / 60 / 50 / 40 / 30 / 20 µl Wasser mischen (ergibt dann 0,2 / 0,4 / 0,6 / 0,8 etc. mg/ml).

Messen: 10 µl einer Proteinlösung werden in Eppendorfhütchen zu 1 ml Bradford-Lösung zugegeben. Nach 15 min wird die Extinktion bei 595 nm gemessen. Eine Messung mit Wasser ohne Protein muss ebenfalls durchgeführt werden. Wichtig: Alle Messungen in derselben Plastik-Küvette, idealerweise in aufsteigender Reihenfolge der Proteinkonzentration. Es wird empfohlen, den Inhalt des Eppi in die Küvette zu kippen und nach der Messung wieder zurück zu kippen. Danach restliche Tropfen auf einem Papiertuch ausstippen, nicht mit Wasser spülen.

Das Photometer zunächst mit Bradford / Wasser auf 0 stellen bzw. diesen Wert später subtrahieren, Werte notieren und im Computer speichern.

Bitte halten Sie sich an die folgende Auswertung: Alle Werte grafisch (Excel oder mm Papier) auftragen, auf der X-Achse die eingesetzte Protein-Menge in µg. (Konzentration mal Volumen = Menge; $m=c*v$). Aus der Eichkurve grafisch ermitteln, welche Protein-Menge bei einer Extinktion von 1 zu erwarten wäre, Linearität vorausgesetzt. Das ist der Umrechnungsfaktor. Dazu kann man eine Gerade durch die Punkte zeichnen, an dieser Gerade die Proteinmenge für OD 0,5 ablesen und diesen mit 2 multiplizieren. Wenn Sie eine Ausgleichsgerade berechnen, müssen Sie beachten, dass diese durch 0/0 gehen muss und die hohen Werte evtl. von Linearität abweichen können, diese darf man dann nicht einbeziehen.

Für die Berechnung einer Proteinkonzentration: den gemessenen Wert mit dem Faktor multiplizieren. Die erhaltene Zahl durch das eingesetzte Volumen in µl (hier i.d.R. 10) dividieren, dieser Wert ist die Proteinkonzentration in µg/µl. Sie können eine Bradford Messung auch mit z.B. 2 µl oder 20 µl Protein durchführen, mit dieser Berechnungsmethode sind Sie flexibel.

Was für ein Ergebnis erhält man bei zu hohen Konzentrationen? Was gilt für zu niedrige Konzentrationen? Welche Proteinkonzentrationen können sinnvollerweise gemessen werden?

Proteinmenge in µg = E₅₉₅*Faktor

Proteinkonzentration in µg/µl = (Proteinmenge in µg) / (eingesetztes Volumen in µl)