

Blotting – Elektrophoretische Auftrennung und Nachweis von Biomolekülen C3BL



Empfehlenswerte
Lernvideos zum Einstieg



sehr einfach erklärt, zum Einstieg



aus der Laborpraxis

Als **Blotting** oder **Blotten** bezeichnet man in der Molekularbiologie Verfahren zum Nachweis von DNA, RNA oder Proteinen. Der Name leitet sich aus dem englischen "to blot" (klecksen, mit Löschpapier abtupfen) ab, was auf die Vorgehensweise der Übertragung der Biomoleküle vom Trenngel auf eine Membran anspielt. Die erste Blottingmethode heißt nach ihrem Erfinder EDWIN SOUTHERN "**SOUTHERN BLOT**". Die neueren Methoden wurden als Anspielung und zur Unterscheidung nach den anderen Himmelsrichtungen benannt. Man unterscheidet:

- ▶ **SOUTHERN BLOT:** Spez. DNA-Nachweis auf Membran
- ▶ **NORTHERN BLOT:** Spez. RNA-Nachweis auf Membran
- ▶ **WESTERN BLOT:** Spez. Proteinnachweis auf Membran
- ▶ Eastern Blot gibt es nicht wirklich

Aufgabe 1: Die Übertragung der Biomoleküle von Gelen auf Membranen vor dem eigentlichen Nachweis bringen einige Vorteile mit sich. Nennen Sie die wichtigsten!

.....

.....

.....

Gemeinsames Prinzip

Das zu untersuchende Material (Nukleinsäuren, Proteine etc.) wird mittels Gelelektrophorese getrennt und dann vom Gel auf eine Membran (meist Nitrozellulose oder PVDF - Polyvinylidenfluorid) übertragen und irreversibel fixiert. Nach diesen Trenn- und Aufarbeitungsschritten folgen die Nachweisschritte:

- a) Im Fall von DNA wird eine meist radioaktiv markierte Gensonde hinzugefügt, die nur an der gesuchten Sequenz haften bleibt. Nachdem man die ungebundenen Sonden abgewaschen hat, legt man den Filter auf einen Röntgenfilm. Dieser wird durch die radioaktiven Sonden belichtet, und man kann die Ergebnisse der Elektrophorese interpretieren
- b) Bei Proteinen wird zum Nachweis häufig die spez. Bindung zwischen Antikörpern und Antigenen benutzt, es handelt sich also um immunologische Nachweise. Es werden Enzymgekoppelte oder radioaktiv markierte AKs verwendet.

Western Blot – Spezifischer Nachweis von Proteinen aus einem Gemisch

Ein Western Blot (gekoppelt mit spezifischen Ag-AK-Reaktionen auch **Immunblot** genannt) lässt sich in drei grundlegende Arbeitsschritte einteilen

1. Auftrennung eines Proteingemisches mittels Gelelektrophorese

Zuerst wird ein Proteingemisch mit Hilfe einer Gel-Elektrophoresetechnik in einer Trägermatrix (z.B. **SDS-PAGE**, **native-PAGE**, **isoelektrische Fokussierung**, **2D-Gelelektrophorese**, usw.) entsprechend ihrer Größe, Ladung oder anderen Eigenschaften aufgetrennt.

Aufgabe 2: Was ist mit dem Begriff *native PAGE* gemeint?

.....

.....

2. Transfer der Proteine auf eine Membran (eigentlicher Blot)

Dazu steht in der englischen Wikipedia: "In order to make the proteins accessible to antibody detection, they are moved from within the gel onto a membrane made of nitrocellulose or PVDF. The membrane is placed face-to-face with the gel, and current is applied to large plates on either side. The charged proteins move from within the gel onto the membrane while maintaining the organization they had within the gel. As a result of this "blotting" process, the proteins are exposed on a thin surface layer for detection. Both varieties of membrane are chosen for their non-specific protein binding properties (i.e. binds all proteins equally well). Protein binding is based upon hydrophobic interactions, as well as charged interactions between the membrane and protein. Nitrocellulose membranes are cheaper than PVDF, but are far more fragile and do not stand up well to repeated probings."

Aufgabe 3: Geben Sie den Inhalt stichwortartig auf deutsch wieder.

.....

.....

.....

.....

Bei diesem Vorgang wird das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen. Daher können die Proteine **renaturieren** und teilweise (!) ihre Tertiärstruktur wieder einnehmen (**Renaturierung**), nicht aber ihre Quartärstruktur. Für diesen elektrophoretischen Transfer werden zwei unterschiedliche Systeme verwendet, der **Wet-Blot** oder der **Semi-Dry-Blot**. Bei beiden ist die prinzipielle Orientierung der Lagen in der Transferanordnung (= *transfer stack*) identisch (vgl. Abb. 2). Der Semi-Dry-Blot wird mit nass durchtränkten Filterpapieren und Schwämmen in horizontaler Lage durchgeführt. Beim Wet-Blot liegen die Schichten untergetaucht in vertikaler Lage in einem Tank, der mit Puffer geflutet ist. (vgl. Abb. 3).

Transfer Stack

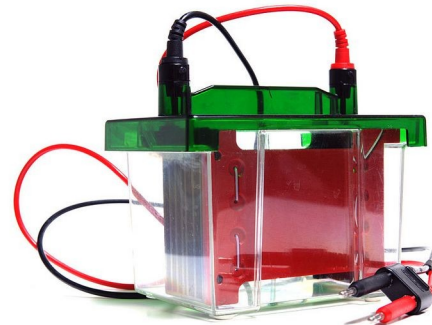
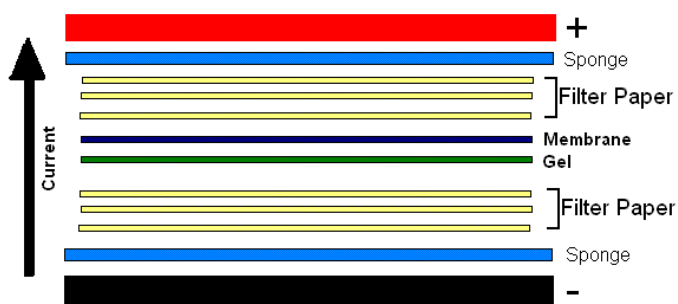


Abb. 2: Semi-dry-Blot. (Quelle: wikipedia.org, Stichwort: electroblotting)

Abb. 3: Blotting-Tank des wet blot. Der Blotting-Prozess findet untergetaucht statt. (Quelle: wikimedia.de. Autor: Lilly_M)

Aufgabe 4: Erklären Sie die Lage/Orientierung der Membran

.....

.....

.....

In der Praxis führt man die Blots mit Stromstärken von 0,05 – 1,00 Ampere durch. Damit diese Stromstärken erzielt werden können sind, je nach elektrischem Widerstand des Systems, Spannungen von 20 – 200 Volt nötig. Bei Wet-Blot-Systemen dauert der Vorgang länger, z.B. 1-2 h, so dass es zu einer starken Erwärmung des Blottingpuffers kommen kann. Deshalb wird hier in der Regel während des Laufs gekühlt. Beim Semi-Dry-Blotting sind die Transferzeiten kürzer (z.B. 10 min). Es staut sich in dieser kurzen Zeitspanne nicht so viel Wärme an und auf eine Kühlung wird deshalb häufig verzichtet.

3. Nachweis/Visualisierung/Detektion

Die Proteinbanden können nun auf der Membran mit Hilfe von spezifischen Antikörpern identifiziert werden. Spezifische Antikörper (monoklonal oder polyklonal) binden an die passende Proteinbande auf der Membran. Unspezifisch gebundene Antikörper werden aufgrund von Waschschritten mit Puffern, die **Detergentien** enthalten wieder entfernt. Weil die beim Blotten evtl. eintretende Renaturierung nicht vollständig ist, können bei Verwendung monoklonaler Antikörper, die spezifisch nur ein Epitop am nativen Protein erkennen, Probleme auftreten.

Die Proteine können aber auch über alternative Methoden detektiert werden. Über bestimmte Farbstoffe wie Coomassie, Ponceau S, Tusche etc. werden alle Proteine unspezifisch markiert. Andere Farbstoffe sind in der Lage, alle phosphorylierten Proteine zu markieren. Je nach Versuchsaufbau können einzelne Proteine auch direkt visualisiert werden, z.B. radioaktiv markierte Proteine (z.B. durch den Einbau von Isotopen bei der Proteinsynthese oder Phosphorylierung) oder bei Enzymen durch umsetzen des entsprechenden Substrats.

Aufgabe 5: Erklären Sie den Unterschied zwischen spezifischer und unspezifischer Markierung.

Am häufigsten werden Proteine über eine **Immundetektion** visualisiert. Dabei bindet ein antigenspezifischer Primär-Antikörper an Epitope des gesuchten Proteins. An den primären Antikörper bindet wiederum ein sekundärer Antikörper, über welchen die Detektion erfolgt. Das Verfahren erfolgt gewöhnlich in mehreren Schritten:

➤ Blocken

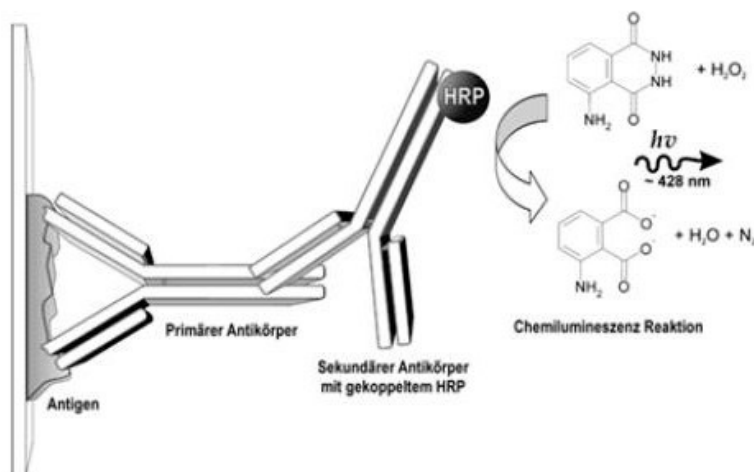
Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran müssen zuerst die noch freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden, da sich hier sonst Antikörper anheften und einen spezifischen Nachweis von Antigenen vortäuschen können. Das **Blockieren (Blocken)** der freien Bindungsstellen erfolgt mit Proteinen oder Polymeren die keine spezifischen Bindungsstellen für die Antikörper verfügen. Dafür eignen sich Lösungen von Milchpulver, **BSA (Bovines Serumalbumin)**, Gelatine und andere Proteine.

Inkubation mit AK und Waschvorgänge

Die Membran wird nun mit einer Antikörper-haltigen Lösung behandelt, wobei die AK spezifisch gegen das Protein auf der Membran gerichtet sind, das nachgewiesen werden soll (**Primärantikörper**). Einige Waschschriffe entfernen schwächer haftende, unspezifisch gebundene AK von der Membran.

Eine zweite Antikörperlösung (mit dem **Sekundär-Antikörper**) wird auf die Membran gegeben, deren Antikörper spezifisch gegen bestimmte Bereiche des ersten Antikörpers gerichtet sind und bindet an diesen (vgl. Abb. 1).

Visualisierung



Nach weiteren Waschschriffen erfolgt nun je nach Detektionsmethode die Visualisierung. Bei Enzym-Antikörper-Konjugaten wird durch das Enzym eine Farb- oder **Chemilumineszenzreaktion** katalysiert. Ein häufig an sekundäre Antikörper gekoppeltes Enzym ist beispielsweise die HRP („horseradish peroxidase“, also Meerrettichperoxidase). Diese HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol (bzw. je nach Hersteller Derivate dessen) in seine oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz detektiert werden kann.

Abb. 3: HRP-markierten Immunokomplex (wikipedia.de, Autor: Jan_R)

Bei radioaktiv markierten Zweitantikörpern erfolgt der Nachweis durch die Radioaktivität (**Autoradiographie, AURA**). Hierzu existieren spezielle Röntgenfilmen die sich im Einfluss radioaktiver Strahlung schwärzen. Weiterhin existieren auch Sekundär-Antikörper mit Fluoreszenzkonjugaten, die an speziellen Scannern direkt detektiert werden können. Hierbei können dann auch Doppelmarkierungen auf der selben Membran durchgeführt werden, wenn zwei unterschiedliche Primär-Antikörper (z.B. aus der Maus und der Ziege) unterschiedlicher Spezifität mit den entsprechenden Sekundär-Antikörper (z.B. Anti-Maus IgG und Anti-Ziege IgG) mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen eingesetzt werden.

Vorteile dieser zweistufigen Detektion:

- Dadurch dass mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können, kommt es zu einer Signalverstärkung.
- Der Sekundärantikörper ist meist ein Antikörper breiterer Spezifität, der alle Primär-Antikörper einer Spezies erkennt (z.B. alle Antikörper, die aus Mäusen stammen), dadurch ist er universeller einsetzbar.
- Der Sekundär-AK kann bereits an ein Enzym gekoppelt sein, derartige Antikörperkonjugate sind käuflich zu erwerben.

Strippen im Labor: Trennung von Antikörpern und Proteinen

Braucht man die identifizierten Proteine für weitere Anwendungen, so muss man die anhängenden Antikörpern wieder entfernen. Dieses Entfernen von Antikörpern wird im Laborjargon als **Stripping** oder **Strippen** bezeichnet. Auch die Entfernung spezifischer Sonden beim DNA oder RNA-Nachweis (Northern-Blot, Southern Blot) wird so bezeichnet. Zur Abtrennung werden die Membranen beim Western-Blot mit Strippingpuffer inkubiert, die unter anderem Detergenzien wie SDS enthalten. DTT oder Marcaptoethanol zerstört die natürliche Konformation der Antikörper durch Aufspaltung der Disulfidgruppen zwischen Cysteinresten, was mit einer Abspaltung der Antikörper von den Proteinen einhergeht. Diese Methoden sind zeitkritisch, weil die Strippingpuffer auch die Proteine auf der Membran angreifen können.

Beschreibung eines Stripping-Versuch mit dem Protein β -Lactoglobulin

- Inkubation einer β -Lactoglobulin-Bande mit spezifischen Primär-AK (anti Actin IgG) und anschließend mit markierten Sekundär-AK (anti IgG, Nachweis-AK).
- Die gleiche Bande wurde einem Stripping-Prozess unterworfen. Anschließend wurde sie ausschließlich mit markiertem Sekundär-AK behandelt, also ohne Primär-AK.
- Nach Spülvorgängen wurde dieselbe Bande wieder zuerst mit Primär-AK und dann mit markiertem Sekundär-AK inkubiert.

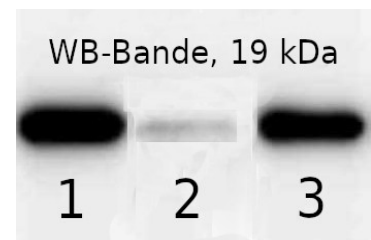


Abb. 4: Schematisches Ergebnis des Stripping-Versuchs. (Abb. e.W)

Aufgabe 6: Interpretieren Sie das Versuchsergebnis (siehe Beschreibung + Abb. 4) und was genau mit Schritt 1, Schritt 2 und mit Schritt 3 gezeigt/bewiesen wurde.

.....

.....

.....

Vergleich zwischen Western Blot und ELISA

Während mit dem ELISA auf einen Analyten getestet wird (z.B. Quantifizierung eines Proteins oder eines Antikörpers), kann mit dem Western Blot gleichzeitig auf mehrere Analyte getestet werden. Hat man auf einer Membran z.B. mehrere unterschiedliche Antigene, etwa Virushüllproteine, fixiert, so kann man man bei Inkubation mit der Probe (hier: aufgearbeitetes Patientenserum prüfen), ob spezifische Antikörper vorhanden sind. Der Western Blot erweitert den ELISA gewissermaßen um die Dimension der elektrophoretischen Auftrennung. Weiterhin kann man beim Western Blot durch Strippen ein und dieselbe Bande mit vielen Nachweisantikörpern testen.

Anwendungen des Western Blots und des Line Blots

Im Bereich der Proteinbiochemie dient der Western Blot zum Nachweis von bestimmten Proteinen und Protein-Veränderungen, z.B. Phosphorylierung. Es kann auch eine semiquantitative Analyse durchgeführt werden (Probe A enthält mehr Protein X als Probe B)

Im Bereich der Medizin dient das Blotting dem Nachweis diagnostisch interessanter Proteine, so zum Beispiel von Antikörpern im Serum, welche für das Vorliegen bestimmter Infektionskrankheiten typisch sein können. In der Praxis haben sich solche Testbestecke durchgesetzt, bei denen die charakteristische Virusproteine beim Kauf schon auf dem Teststreifen nebeneinander fixiert vorliegen und unspezifische Bindungsstellen abgeblockt wurden. Neben der elektrophoretischen Trennung und anschließendem Blotting (= „Western Blot“), kann die Aufbringung der Antigene durch den Hersteller auch durch **industrielle Druckverfahren** erfolgen, dann spricht man von einem **Line Blot**. Ein Überbegriff für immunologische Nachweise auf Teststreifen/Membranen ist **Immunblot**. Zur Kontrolle der Funktionsfähigkeit und der korrekten Durchführung können auf Immunblots spezielle Kontrollantigene aufgetragen sein, die in jedem Fall eine Färbung ergeben sollten. Auf den Streifen können sich auch Antigene ganz verschiedener Erreger befinden, die damit einen gleichzeitigen Nachweis von Kontakten mit verschiedenen Erregern ermöglichen (**Multiplex-Verfahren**).

➤ Beispiel: HIV-Bestätigungstest

Zu Beginn wird ein Teststreifen benötigt, auf dem die Virus-Proteine von HI-Viren fixiert wurden. Entweder wurde dieser Teststreifen durch eine Elektrophorese hergestellt (Western Blot) oder durch Aufdruck (Line Blot).

Der Streifen wird nun in eine verdünnte Serumprobe eingelegt. Wenn Antikörper gegen HIV vorhanden sind, heften sich diese an die Virusproteine. Der Nachweis erfolgt dann mit (zumeist enzymatisch) markierten Sekundärantikörpern. Sobald gegen mehrere Virusproteine AK nachgewiesen werden konnten, wird der Test als positiv gewertet, werden keine AK nachgewiesen, handelt es sich um ein negatives Testergebnis. Sind z.B. nur gegen ein Virusprotein AK nachgewiesen worden, so kann keine endgültige Aussage getroffen werden.

Aufgabe 7: Vgl. Abb. 5: Ergebnisse eines HIV-Bestätigungstests (Western Blot). Für was stehen „PC“ und „NC“? Diskutieren Sie, bei welchem Patient ein positives, ein negatives oder ein indifferentes Testergebnis vorliegt.

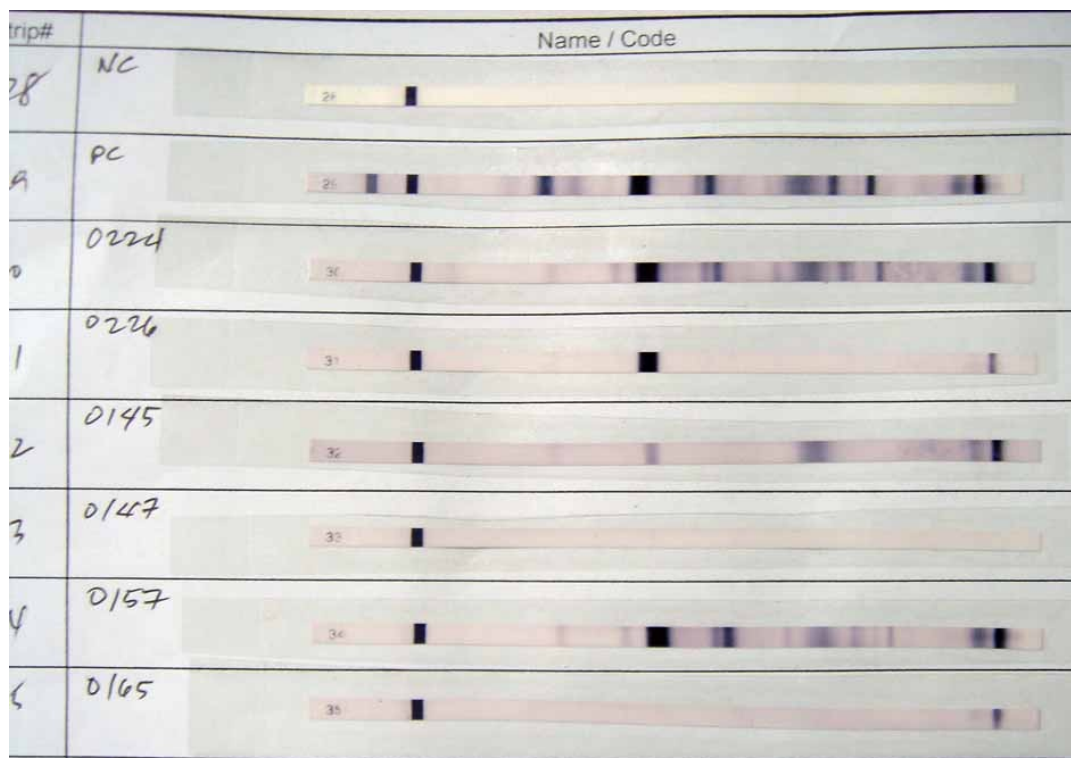


Abb. 5: Ergebnis eines Western-Blot-Bestätigungstest für HIV. (Quelle: <https://commons.wikimedia.org>. Autor: Rigurat)

Aufgabe 8: Auf allen Teststreifen in Abb. 5 gibt es eine intensiv schwarz gefärbte Bande. Welches Protein könnte hier auf der Membran liegen oder fixiert sein?

Aufgabe 9: Interpretieren Sie die Abb. 6: Skalierung im Verlauf, Zuordnung zu Strukturen durch Vergleich mit HIV.

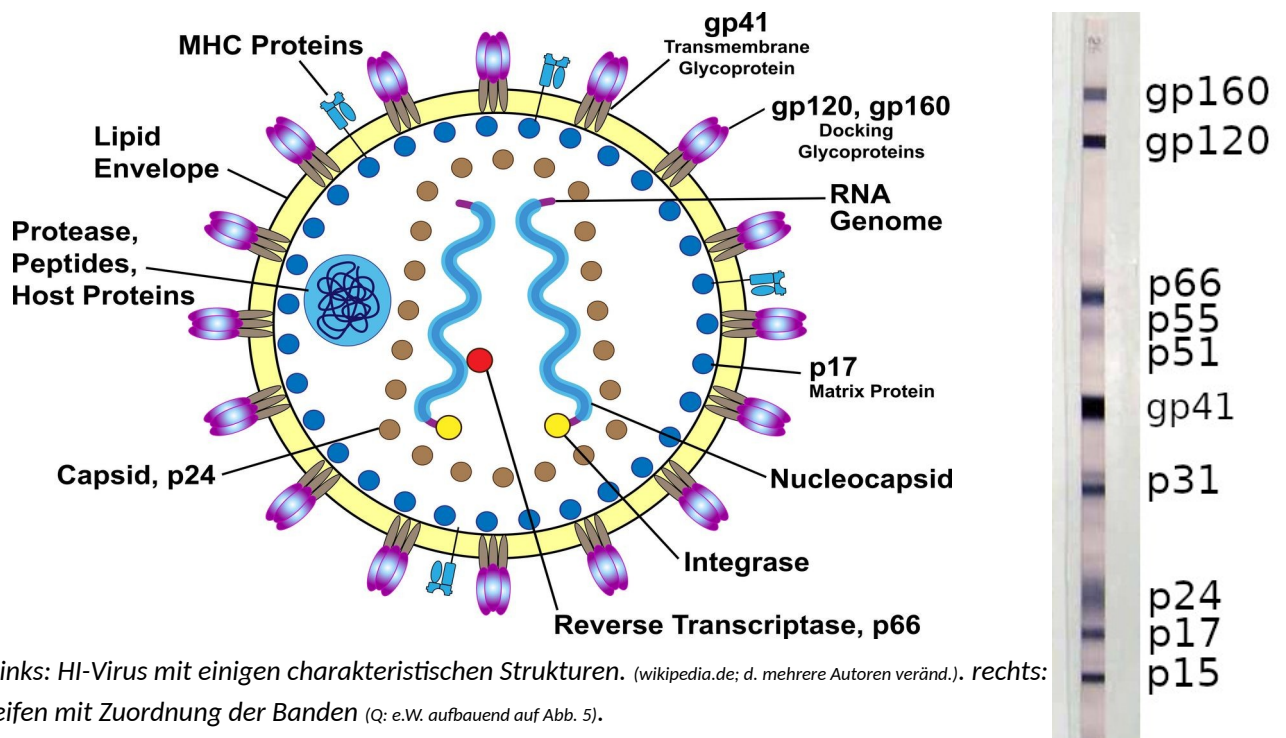


Abb. 6 links: HI-Virus mit einigen charakteristischen Strukturen. (wikipedia.de; d. mehrere Autoren veränd.). **rechts:** WB-Streifen mit Zuordnung der Banden (Q: e.W. aufbauend auf Abb. 5).

Möglichkeit ohne Antikörper

Ist ein Protein noch nicht identifiziert und sind keine AK zum Nachweis vorhanden, so kann man es aus der Bande heraus ansequenzieren, d.h. beispielsweise die ersten 5-10 N-terminale AS zu bestimmen. Mithilfe von Datenbankabgleichen kann man dann *in silico* (im Gegensatz zu *in vivo* oder *in vitro*) überprüfen, ob diese AS-Sequenz in den schon bekannten und sequenzierten Proteinen vorhanden ist. Hier ist auch hilfreich, wenn man aus der Elektrophorese die ungefähre Molekülmasse des zu identifizierenden Proteins kennt.