Doppelblotting

R. Westermeier
Freising, Deutschland

Englischer Begriff double blotting

Definition Blottransfer von Antigenen aus komplexen Proben mit nachfolgendem Blottransfer der Primärantikörper auf eine zweite Membran zur Verhinderung unspezifischer Reaktionen mit Sekundärantikörpern.

Physikalisch-chemisches Prinzip Erst wird eine isoelektrische Fokussierung unter denaturierenden Bedingungen oder eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese durchgeführt. Darauf folgt der Transfer der Proteine auf eine Blotmembran entweder durch Elektro- oder Pressblotting, die Blockierung der unbesetzten Bindungsstellen und Inkubation mit einem Antikörper, z. B. gegen humanes Erythropoietin. Nachdem die Membran kurz in einen sauren Stripping-Puffer (25 M Glycin-HCl pH 2 mit 1 % Tween 20 und 1 % SDS) getaucht wurde, legt man sie auf eine zweite Blotmembran und führt einen Elektrotransfer in Richtung Kathode durch. Auf diese Weise werden die Primärantikörper wieder von den Antigenen desorbiert und wandern zu der zweiten Blotmembran. Die Antigene und die störenden Proteine bleiben auf der ersten Membran haften. Die zweite Membran wird blockiert und mit den Sekundärantikörpern inkubiert. Die Detektion erfolgt meistens mit über Chemilumineszenz.

Einsatzgebiet Antidoping-Kontrolle im Humanurin: Wenn beim Western Blotting sehr komplexer Proben, wie z. B. Humanurin, sehr starke unspezifische Wechselwirkungen von Sekun-

därantikörpern mit einigen Probenproteinen, z. B. Urinproteinen, auftreten, wird ein zweiter Transferschritt durchgeführt.

Untersuchungsmaterial Meist Humanurin.

Instrumentalisierung Ausrüstung für isoelektrische Fokussierung im Polyacrylamidgel bestehend aus Horizontal- oder Minivertikalkammer, Stromversorger, Umlaufthermostat und Blotting-Apparatur (entweder für Elektrotransfer oder für Pressblotting); Chemilumineszenz-CCD-Kamerasystem.

Spezifität Sehr hoch, weil Sekundärreaktionen von Begleitproteinen ausgeschalten werden.

Sensitivität Je nach verwendetem Chemilumineszenzsubstrat im niedrigen Picogramm- bis hohen Femtogrammbereich.

Fehlermöglichkeit Fehler bei der Elektrophorese können bei Verwendung von Fertiggelel minimiert werden. Für den Elektrotransfer bei Western Blotting können fertige Pufferkits eingesetzt werden.

Praktikabilität – Automatisierung – Kosten Relativ aufwendige mehrschrittige Methode.

Bewertung – Methodenhierarchie (allg.) Doppelblotting ist eine Methode für biochemisch arbeitende Labors.

Literatur

Lasne F (2001) Double-blotting: a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures. *J Immunol Methods* 253:125–131