

2.8 Gelelektrophorese

Zur Analyse des Proteinmusters von kultivierten Mikro-/Astroglia-kulturen wurde das Zellkulturmedium aus den Kulturschalen abgegossen und mit einem Schaber das Material unter Verwendung von 500 µl Phosphatpuffer (50 mM mit 0,1 % SDS) aus je 10 Kulturschalen aufgenommen. Die Proteinbestimmung (Bicinchonin Methode) erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit (Fa. Pierce, Rockford, IL, USA). Nach der Eichung mit Albumin-Standards (Fa. Pierce, Rockford, IL, USA) wurde die Extinktion (bei 562 nm) von 1:10 bis 1:20 verdünnten Homogenaten am Spektrometer Lambda 2 (Perkin Elmer, Weiterstadt) gemessen.

TBS (TRIS buffered saline)

- 20 mM TRIS (10x: 24,2 g/l)
- 0,14 mM NaCl (10x: 80 g/l)
- mit HCl auf pH 7,6 eingestellt

Gelpuffer

- 3 M TRIS (365 g/l)
- 0,3 % Natriumdodecylsulfat (3 g/l)
- in Aqua dest., mit HCl auf pH 8,5 eingestellt

Probenpuffer (Solubilizer)

- 12 % Natriumdodecylsulfat (6 g / 50 ml)
- 30 % Glycerin (15 g / 50 ml)
- 150 mM TRIS (0,9 g / 50 ml)
- 0,01 % Serva Blue G, Coomassie (5 mg / 50 ml)
- 6 % Mercaptoethanol (3 g / 50 ml)
- in Aqua dest., mit HCl auf pH 7,0 eingestellt

Trenngel für 4 Gele (Geldichte: 8 bzw. 10 % Monomere)

- 15,5 ml Protogel für 8 % Gele bzw. 19,6 ml Protogel für 10 % Gele
- 5,6 ml Glycerin
- 20 ml Gelpuffer
- ad 60 ml Aqua dest.

- Start der Polymerisation durch Zugabe von 300 µl einer 10%igen APS-Lösung und 30 µl TEMED

Sammelgel für 4 Gele (Geldichte: 4 % Monomere)

- 3,9 ml Protogel
- 2,8 ml Glycerin
- 10 ml Gelpuffer
- ad 30 ml Aqua dest.
- Start der Polymerisation durch Zugabe von 200 µl einer 10%igen APS-Lösung und 20 µl TEMED

Anodenpuffer (+)

- 0,2 M TRIS (10x: 242,2 g/l)
- mit HCl auf pH 8,9 eingestellt

Kathodenpuffer (-)

- 0,1 M TRIS (10x: 121 g/l)
- 0,1 M Tricin (10x: 179,2 g/l)
- 0,1 % Natriumdodecylsulfat (10x: 10 g/l)
- keine pH Einstellung

Die Gele wurden in den Gelgießkammern (Mighty Small Multiple Gel Caster, Fa. Hoefer, München) gegossen und nach abgeschlossener Polymerisation in die Elektrophoresekammer (Mighty Small II Gel Electrophoresis Unit, Fa. Hoefer, München) transferiert und die Wasserkühlung in Betrieb genommen. Nach dem Auftragen der Proben (40 µg in Probenpuffer, 5 min auf 90 °C erhitzen) wurde zunächst eine Spannung (Netzgerät: Consort E 452 Fa. Turnhout, Belgien) von 80 V angelegt, die auf 150 V erhöht wurde, nachdem die Proben das Sammelgel erreicht hatten und danach im Trenngel auf 100 V reduziert wurde. Die Elektrophorese lief für etwa 60 min. Als Molekulargewichtsmarker kam ein ‚Wide Range Color Marker‘ (6,5 – 205 kDa, Sigma, Deisenhofen) zum Einsatz.

2.8 Westernblot

Die Übertragung der Proteine vom Elektrophoresegel auf die Nitrozellulosemembran erfolgte durch Tankblotten entsprechend den Angaben des Herstellers (Trans-Blot Transfer Medium, Bio-Rad, München). Dabei werden die im elektrischen Feld aus dem Gel wandernden Proteine über ihre hydrophoben Anteile an die Nitrozellulosemembran gebunden.

Blotpuffer (4 fach konzentrierte Stammlösung)

- 0,77 M Glycin (57,64 g)
- 0,1 M TRIS (12,08 g)
- 4 % Natriumdodecylsulfat (4,0 g)
- ad 1000 ml Aqua dest.
- keine pH Einstellung

Gebrauchslösung

- 275 ml Stammlösung
- 125 ml Methanol
- ad 1100 ml Aqua dest.

Nach der Elektrophorese wurden das Trenngel und die in Blotpuffer eingeweichte Nitrozellulosemembran zwischen Filterpapier (Gel Blotting Papiere GB 003, Fa. Schleicher & Schuell, Dassel) eingelegt. Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten wurden sorgfältig entfernt. Der Proteintransfer erfolgte bei 80 V (200 mA) und gleichzeitiger Wasserkühlung für 90 min in einer Tankblotkammer (Hofer TE 22, Fa. Hofer, München). Die Proteine wandern bei dieser Anordnung als Anionen aus dem Gel zur Nitrozellulosemembran, so daß die Membran auf der Anodenseite plaziert wurde. Nach Beendigung des Transfers wurden zur Kontrolle das Trenngel mit Coomassie-Blau und die Nitrozellulosemembran mit Ponceau S gefärbt.

Coomassie-Blau-Färbung

Für die Standardfärbung wurde das Gel ca. 2 h Stunden in 0,02 % Coomassie-Brillant-Blue R 250 (Fluka, Deisenhofen), 50 % Methanol und 10 % Essigsäure geschwenkt. Zur Entfärbung wurde das Gel zunächst in 50 % Methanol, 10 % Essigsäure für 2,5 h, dann in 10 % Methanol, 5 % Essigsäure über Nacht geschüttelt.

Ponceau S-Färbung

Die Proteine auf der Nitrozellulosemembran konnten mittels Ponceau S-Färbung lokalisiert werden. Das Konzentrat des Färbemittels mit 2 % Ponceau S (Fluka, Deisenhofen), 30 % Essigsäure wurde in destilliertem Wasser 1 : 10 verdünnt, die Membran darin 5 min gefärbt und dann die unspezifische Färbung in destilliertem Wasser wieder herausgelöst. Die nun rotgefärbten Proteinbanden ließen sich durch mehrmaliges Wässern wieder entfärben.

Immunfärbung auf Nitrozellulosemembranen

Die Nitrozellulosemembran mit den immobilisierten Proteinen wurde zunächst für 30 min in TBS-Tween 20 (0,1 % Tween 20 in TBS) gespült. Um die freie Bindungskapazität der Membran abzusättigen, folgte eine einstündige Inkubation in 5 % Trockenmilch (in TBS-Tween 20) bei Raumtemperatur (Blocken). Nach dem Blocken wurde dreimal 10 min mit TBS-Tween 20 gewaschen. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper (in TBS-Tween mit 0,5 % Trockenmilch; Verdünnungen siehe Tabelle im Abschnitt Immunhistochemie, jedoch um den Faktor 2 höher verdünnt) inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden dann durch dreimaliges Waschen (je 10 min) in TBS-Tween 20 entfernt. Die Nitrozellulosemembran wurde über Nacht mit dem sekundären Antikörper inkubiert (in TBS-Tween mit 0,5 % Trockenmilch; Verdünnungen siehe Tabelle im Abschnitt Immunhistochemie) und anschließend dreimal in TBS-Tween 20 gewaschen (je 10 min). Die Visualisierung erfolgte für 3-10 min in einer Lösung aus 25 mg Diaminobenzidin, 50 ml TBS und 25 µl Wasserstoffperoxid. Nach dreimaligem Waschen in TBS wurde die Membran getrocknet und mittels eines Auflichtscanners (optische Auflösung 150 dpi) digitalisiert.