

Zastosowanie analizy białek techniką ELISA i Western blot w diagnostyce i farmacji

Application of protein analysis by ELISA and Western blot in diagnostics and pharmacy

Hanna Szaefer

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Do powszechnie stosowanych metod analizy białek wykorzystywanych w badaniach diagnostycznych i poszukiwaniu nowych leków należą test immunoenzymatyczny ELISA i technika Western blot. Obie metody są testami immunochemicznymi opartymi na wiązaniu się białka ze specyficznym przeciwciałem, służącymi do analizowania szerokiej gamy próbek. Zazwyczaj w diagnostyce różnych chorób ELISA jest testem pierwszego wyboru a Western blot służy do potwierdzenia pozytywnych wyników uzyskanych testem ELISA. Obie metody są szeroko wykorzystywane w diagnostyce chorób o podłożu wirusowym, bakteryjnym jak i nieinfekcyjnych. Artykuł przedstawia charakterystykę i porównanie tych dwóch metod oraz możliwość ich wykorzystania w diagnostyce laboratoryjnej, a także w badaniach podstawowych z zakresu farmacji. (*Farm Współ* 2023; 16: 247-254) doi: 10.53139/FW.20231636

Słowa kluczowe: ELISA, Western blot, analiza białek

Summary

Protein analysis methods commonly used in diagnostic and scientific research include the ELISA enzyme-linked immunosorbent assay and the Western blot technique. Both methods are immunochemical tests based on the binding of a protein to a specific antibody, used to analyze a wide range of samples. Typically, in the diagnosis of various diseases, ELISA is the first choice test and Western blot is used to confirm positive results obtained with the ELISA test. Both methods are widely used in the diagnosis of viral, bacterial as well as non-infectious, diseases. This paper presents the characteristics and comparison of these two methods and their possible application in diagnostics and pharmaceutical research. (*Farm Współ* 2023; 16: 247-254) doi: 10.53139/FW.20231636

Keywords: ELISA, Western blot, protein analysis

Wstęp

Oznaczanie białek w materiale biologicznym jest jednym z najbardziej podstawowych badań wykonywanych w laboratoriach diagnostycznych i naukowych. Białka stanowią podstawowy makrokomponent ustroju ludzkiego. Z tego powodu poszukiwanie metod ich identyfikacji i oceny ilościowej rozpoczęło się w momencie poznania ich roli zarówno w procesach fizjologicznych, jak i patologicznych. Pierwsze opisy analizy białek sięgają roku 1878, w którym francuski chemik Mehu przedstawił zasadę oznaczenia albumin osocza krwi. Kolejnym etapem było zastosowanie

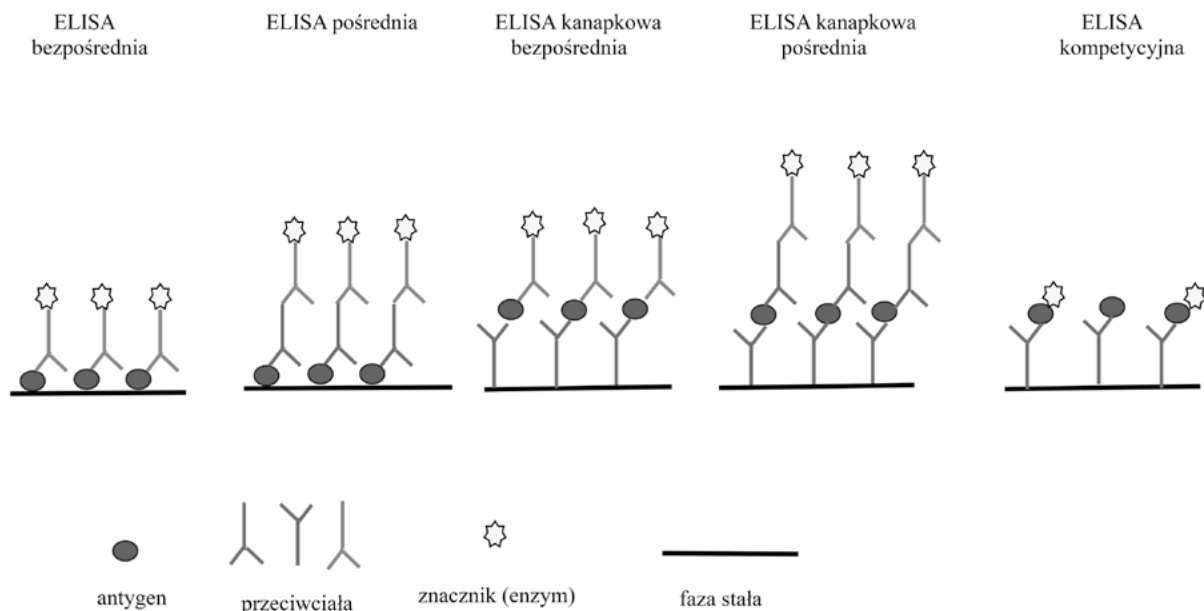
siarczanu amonu w celu oddzielenia albumin od globulin. Klasyczna technika rozdziału frakcji białkowych w polu elektrycznym została zastosowana przez Tiseliusa w roku 1930, jednak użycie płynnego podłoża i skomplikowanej aparatury uniemożliwiło wprowadzenie tej metody do badań rutynowych. Dopiero w latach 60. XX wieku elektroforeza stała się częścią oznaczeń białkowych w laboratoriach medycznych. Początkowo jako nośnik wykorzystywano bibułę, kolejno używany do dziś octan celulozy, a następnie żel agarozowy, który zyskał dużą popularność. Duże możliwości analizy białek dostarcza także elektroforeza

kapilarna, która rozwija się równoległe do istniejących technik [1]. W ramach prac badawczych są ciągle opracowywane, udoskonalane i zatwierdzone nowoczesne metody oznaczania białek. Szybki postęp w sekwencjonowaniu genomu spowodował bowiem rozwój badań nad poznaniem proteomu. Pod pojęciem proteomu rozumie się zestaw białek występujących w danym momencie w komórce, a także informacje związane ze sposobem ich modyfikacji, funkcjonowania i oddziaływania z innymi cząsteczkami. Masę cząsteczkową białek i tym samym ich tożsamość można precyzyjnie określić wykorzystując metodę spektroskopii mas np. MALDI. Metoda ta umożliwia obserwację i identyfikację potranslacyjnych modyfikacji białka a także ich sekwencjonowanie. Badania oddziaływań między białkami umożliwiając z kolei mikromacierze białkowe [2]. Metody te mimo że dostarczają wielu cennych informacji o białkach nie są dostępne we wszystkich ośrodkach zarówno leczniczych jak i badawczych. Wynika to z konieczności zakupu kosztownego sprzętu a także zatrudnienia wykwalifikowanej kadry potrafiącej zarówno przeprowadzić analizę tymi metodami jak i zinterpretować uzyskane wyniki. Dlatego użyteczność kliniczna powyższych metod w rutynowej diagnostyce pacjentów w laboratoriach medycznych

wyduje się ograniczona. Stąd aktualnie najczęściej do identyfikacji i analizy białek stosuje się różne odmiany metod immunochemicznych opartych na wiązaniu się białka ze specyficznym przeciwciałem. Należy do nich test immunoenzymatyczny ELISA i technika Western blot opisane w niniejszym artykule.

Test immunoenzymatyczny ELISA

Test immunoenzymatyczny ELISA jest powszechnie wykorzystywany w badaniach biomedycznych zarówno naukowych jak i diagnostycznych w przypadku chorób o podłożu bakteryjnym i wirusowym, ale także nieinfekcyjnych. Służy do wykrywania i ilościowego oznaczania określonych antygenów (np. białek osocza, antygenów bakteryjnych, wirusowych, pasożytniczych, hormonów i leków) lub przeciwciał w badanym materiale [2]. Do badań może być wykorzystane osocze krwi, a także inne płyny ustrojowe, mocz, medium po hodowli komórkowej, homogenaty tkankowe. Oparty jest na zasadzie tworzenia kompleksów immunologicznych między antygenem a przeciwciałem, które uwidacznia reakcja barwna zachodząca dzięki połączonym z immunoglobulinami enzymom i odpowiadającym im substratom. Powszechnie stosowanymi enzymami w tej metodzie są fosfataza alka-



Rycina 1. Rodzaje testu ELISA [na podstawie 5]
Figure 1. Types of ELISA test [based on 5]

liczna, peroksydaza chrzanowa i β -galaktozydaza [3]. Z historycznego punktu widzenia metodę po raz pierwszy opisali w 1971 roku Eva Engvall i Peter Perlmann, wykorzystując przeciwciała znakowane enzymem do ilościowego oznaczania immunoglobulin klasy IgG [4]. Do czterech podstawowych odmian testu ELISA należą: bezpośrednia (ang. *direct ELISA*), pośrednia (ang. *indirect ELISA*), kanapkowa (ang. *sandwich ELISA*) oraz kompetycyjna (ang. *competitive ELISA*). Odmiana kanapkowa może posiadać dwa warianty bezpośredni i pośredni (rycina 1).

Test bezpośredni

Jest najszybszą i najprostszą metodą, która polega na opłaszczeniu płytki antygenem i dodaniu przeciwciała pierwszorzędowego skierowanego przeciwko opłaszczonemu antygenowi połączonemu z enzymem. Po dodaniu odpowiedniego substratu enzym katalizuje reakcję barwną, której intensywność mierzy się spektrofotometrycznie. W tej odmianie testu nie używamy przeciwciał drugorzędowych. Powoduje to, że technika ta jest szybka, ale niewątpliwą wadą jest niska biodostępność na rynku przeciwciał znakowanych enzymem, swoistych dla mało popularnych antygenów. Dobrze natomiast nadaje się do ilościowego oznaczania białek wcześniej wyizolowanych z materiału biologicznego [5].

Test pośredni

Pośrednie testy ELISA zostały opracowane w celu oceny obecności przeciwciał w surowicach odpornościowych [6]. W tym przypadku wykorzystuje się dwa rodzaje przeciwciał: pierwszorzędowe skierowane przeciwko badanemu antygenowi opłaszczającemu płytkę oraz drugorzędowe skoniugowane z enzymem i skierowane przeciwko pierwszorzędowemu przeciwciału. Znakowane przeciwciała nie muszą być specyficzne względem antygeny a jedynie względem pierwszorzędowego przeciwciała. Zaletą tego typu testu jest mniejszy koszt badań oraz większa czułość w stosunku do testu bezpośredniego. Jest on jednak bardziej pracochłonny a zastosowanie dwóch rodzajów przeciwciał może prowadzić do reakcji krzyżowych [5].

Test kanapkowy

W tym typie testu docelowy antygen jest wykrywany przez zakotwiczenie między dwoma przeciwciałami, które rozpoznają różne epitopy, czyli tak zwany system kanapkowy [7]. Pierwszym etapem jest opłaszczenie fazy stałej warstwą przeciwciał pierwszo-

rzędowych, następnie nakłada się próbę badaną spośród której wychwytywane są tylko te białka przeciwi którym skierowane są unieruchomione immunoglobuliny. W ten sposób eliminuje się konkurencję oznaczanego antygeny o miejsce wiążące na przeciwciałach z innymi cząsteczkami obecnymi w badanym materiale i uzyskuje się większą specyficzność tego typu testu [8,9]. W kolejnym etapie można zastosować wariant bezpośredni wykorzystując tylko przeciwciała drugorzędowe znakowane enzymem lub wariant pośredni, z dodatkowym użyciem przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciw oznaczanemu antygenowi [9]. Ten ostatni wariant jest wykorzystywany m.in. do wykrywania i ilościowego oznaczania białek z dużą ilością epitopów np. cytokin i uważany jest za najbardziej czuły i specyficzny. Nie mniej jest najbardziej czasochłonny. Natomiast bezpośredni test kanapkowy jest najczęściej stosowany przez diagnostów ze względu na jego wysoką czułość i prostotę wykonania [5].

Test kompetycyjny

Został opracowany przez Belangera w 1973 roku w celu wykrycia ludzkiej α -fetoproteiny [7]. W tym przypadku fazę stałą opłaszczą się także przeciwciałami. Różnicą w porównaniu z pozostałymi wariantami testu jest wykorzystanie znakowanych antygenów, które rywalizują o miejsca wiążące w immunoglobulinach z białkami obecnymi w próbce. Uzyskany sygnał będzie uzależniony od stosunku obu rodzajów konkurujących ze sobą cząsteczek i będzie tym większy im mniejsze będzie stężenie antygenów znajdujących się w badanym materiale. Ten rodzaj testu stosowany jest do ilościowego oznaczania małych cząsteczek i znajduje zastosowanie do pomiaru m.in. stężenia hormonów steroidowych, obecności pozostałości lub metabolitów leków, używek czy suplementów [8].

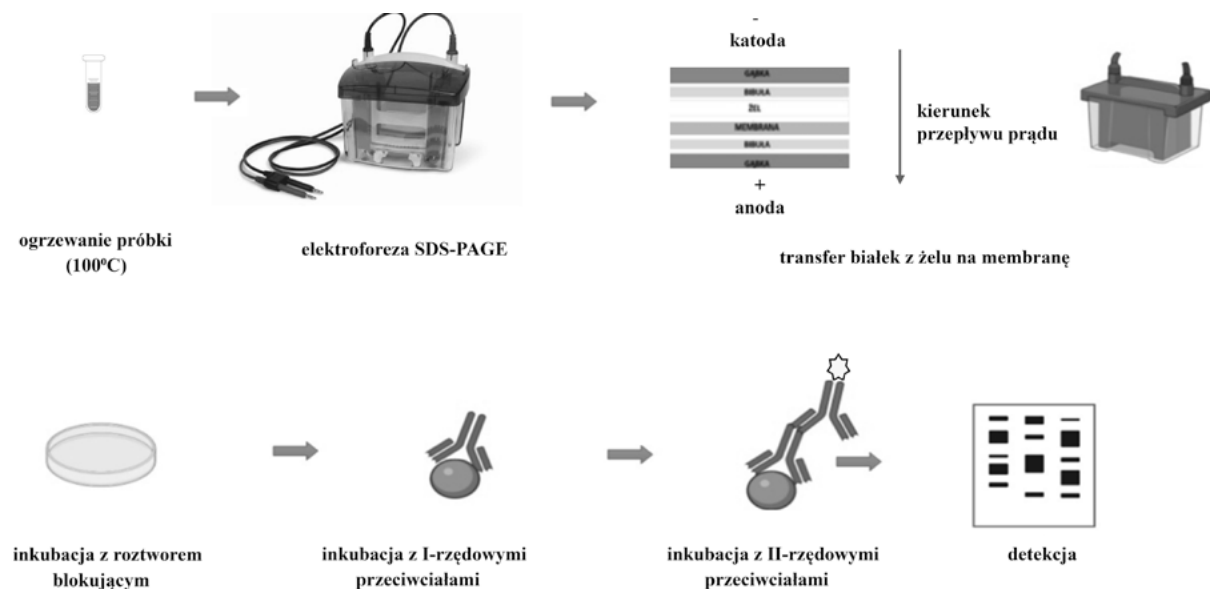
Western blot

Western blot znany również jako immunoblot jest złotym standardem wśród metod dla identyfikacji i oznaczania specyficznego białka w złożonej mieszaninie wyekstrahowanej z komórek lub lizatu tkankowego [10]. Metoda została wprowadzona przez Towbina i wsp. [11] w 1979 roku i od tamtej pory stała się powszechną techniką stosowaną w laboratoriach badawczych na całym świecie do immunodetekcji i oznaczania specyficznych białek [12].

W technice tej przed przeprowadzeniem elektroforezy na żelu poliakrylamidowym próbki należy

zagotować z buforem zawierającym siarczan dodecylu sodu (SDS) w celu denaturacji białek. Bufor zawiera także odczynniki redukujące, barwnik pozwalający na monitorowanie procesu oraz glicerol, który nadaje odpowiednią gęstość i pozwala na osadzenie się próbki na dnie studzienki. Negatywnie naładowane kompleksy białko-SDS poruszają się w kierunku anody – kompleksy o mniejszej masie cząsteczkowej migrują szybciej. Tak rozdzielone białka przenosi się z żelu na podłoże stałe (błona nitrocelulozowa, z fluorku poliwinylidenu (PVDF) lub nylonowa). Błona wykazuje większą odporność na uszkodzenia mechaniczne niż żel i umożliwia przeprowadzenie reakcji barwnych. Transfer można przeprowadzać „na sucho” bez buforu do transferu wykorzystując dwie płaskie elektrody pomiędzy którymi umieszcza się żel i błonę lub „na mokro” wykorzystując bufor do transferu. W tym celu tzw. „kanapkę” zawierającą bibułę, żel, błonę i bibułę umieszcza się pomiędzy dwoma warstwami gąbki namoczonej w buforze do transferu i zamyka w kasecie do transferu umieszczonej w aparacie wypełnionym buforem. Pod wpływem przyłożonego napięcia ujemnie naładowane białka migrują w kierunku elektrody dodatniej i zostają zatrzymane na błonie umieszczonej za żelem. Transfer zachodzi przy

stałym napięciu prądu, zazwyczaj 20-30V. Następnie błona inkubowana jest z roztworem blokującym niespecyficzne miejsca wiązania odpowiednich przeciwciał. W tym celu wykorzystuje się najczęściej roztwór odtłuszczonego mleka w proszku, rzadziej surowicy bydlęcej lub albuminy z dodatkiem detergentu np. Tweenu 20. Następnym etapem jest inkubacja błony z pierwszorzędowymi przeciwciałami skierowanymi swoiście przeciwko poszukiwanemu białku. Są one gatunkowo specyficzne i pozyskuje się je od zwierząt np. myszy, kóz, królików. Zazwyczaj te przeciwciała nie są wyznakowane enzymem i konieczne jest zastosowanie przeciwciał drugorzędowych (wyznakowanych), skierowanych przeciwko przeciwciałom pierwszorzędowym. Przeciwciała drugorzędowe są najczęściej sprzężone z enzymami np. z fosfatazą alkaliczną lub peroksydazą chrzanową. W celu wizualizacji membraną inkubuje się z układem wywołującym, który zawiera substrat dla enzymu. Enzym przekształca substrat w barwny produkt, którego intensywność oznacza się densytometrycznie [2,13]. Etapy metody Western blot obrazuje rycina 2.



Rycina 2. Etapy metody Western blot
Figure 2. Western blot technique steps

Zalety i wady testu ELISA i techniki Western blot

Mimo szerokiego zastosowania zarówno testów ELISA jak i Western blot obok niewątpliwie wielu zalet mają też mankamenty. Wśród zalet testu ELISA należy wymienić: prostą i szybką procedurę wykonania, wysoką specyficzność i czułość dzięki reakcji antygen-przeciwciała oraz łatwość wykonania – analizy mogą być wykonywane jednocześnie bez skomplikowanego wcześniejszego przygotowania próbek. Dodatkowo jest to metoda bezpieczna i ekologiczna oraz mało kosztowna. Wadami natomiast są: pracochłonne i kosztowne przygotowanie przeciwciał, wysokie prawdopodobieństwo wyników fałszywie dodatnich i ujemnych z powodu niewystarczającego blokowania unieruchomionego antygeny, co skutkuje fałszywymi wynikami oraz niestabilność przeciwciała [3]. Należy też zwrócić uwagę na brak uniwersalnego protokołu postępowania, który sprawdzałby się w badaniach materiału różnego pochodzenia. Dodatkowo wszystkie czynniki mające istotne znaczenie dla prawidłowego przebiegu testu są wysoce swoiste w stosunku do oznaczanego parametru i zależą od stosowanych reagentów, stąd wymagana jest ich optymalizacja przed każdym doświadczeniem [5].

Z kolei technika Western blot niewątpliwie jest złożona i czasochłonna w porównaniu z testem immunoenzymatycznym ELISA. Niemniej w niektórych sytuacjach jest preferowaną metodą. Idealnie nadaje się do analizy złożonych mieszanin takich jak lizaty komórkowe. Jest wysoce specyficzna i czasami służy do wykluczenia wyników fałszywie dodatnich i potwierdzenia pozytywnych wyników testu ELISA w warunkach klinicznych. Niewątpliwą zaletą jest generowanie większej ilości informacji o docelowym białku. Tabela I obrazuje zalety i ograniczenia obu metod.

Przykłady zastosowań testu ELISA i techniki Western blot

Testy ELISA ze względu na swoje zalety są bardzo często wykorzystywane w diagnostyce wielu schorzeń, przede wszystkim o podłożu wirusowym (np. ludzkim wirusem upośledzenia odporności (ang. *human immunodeficiency virus*, HIV), wirusem zapalenia wątroby (WZW) typu B i C, rotawirusami, koronawirusem ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-COV-2) i bakteryjnym (np. bakterią *Helicobacter pylori*, salmonellą, gronkowcem złocistym). Są jednymi

Tabela I. Porównanie metod ELISA i Western blot

Table I. Comparison of ELISA and Western blot methods

ASPEKT	ELISA	WESTERN BLOT
Zasada	Test immunoenzymatyczny wykorzystujący specyficzne przeciwciała	Rozdział elektroforetyczny białek
Cel detekcji	Rozpuszczalne białka, antygeny i przeciwciała	Rozpuszczalne i błonowe białka
Zakres detekcji	Niskie do wysokich stężeń białka	Niskie do średnich stężeń białka
Czułość	Wysoce czuła, możliwa detekcja niskich poziomów	Umiarkowana do wysokiej czułości
Specyficzność	Wysoka specyficzność przy odpowiednim doborze przeciwciał	Wysoka specyficzność w przypadku specyficznych przeciwciał
Wielkość białka	Brak informacji o wielkości białka	Informacja o masie cząsteczkowej białka
Ocena ilościowa	Ilościowy pomiar stężenia białka	Półilościowe oznaczanie poziomów białek, problem z doбором wzorców wewnętrznych
Wymagania dotyczące próbki	Wymagane małe objętości próbki	Wymagane stosunkowo duże objętości próbki
Nakład pracy	Stosunkowo szybka i mniej pracochłonna	Czasochłonna i pracochłonna
Koszt	Opłacalna	Kosztowna
Wymagania sprzętowe	Standardowo wyposażone laboratorium	Specjalistyczne wyposażenie np. elektroforeza żelowa i aparat do Western blot

z najstarszych sposobów diagnozowania boreliozy, choroby, na którą zapada coraz więcej pacjentów. ELISA wykorzystywany jest również przy rozpoznawaniu chorób o podłożu autoimmunologicznym, np. przy reumatoidalnym zapaleniu stawów, czy niektórych nowotworach. Dzięki temu testowi możliwe jest wykrywanie przeciwciał na drożdżaki, amebozy, malarię i toksoplazmozę [14].

Western blot jako metoda bardziej specyficzna jest często wykorzystywany do weryfikacji wyników uzyskanych testem ELISA, zwłaszcza w diagnostyce chorób infekcyjnych.

Dotyczy to przede wszystkim infekcji wywołanych przez wirusy. Najczęściej wykorzystywany jest przy diagnozowaniu wirusowego zapalenia wątroby typu C, opryszczki, a po uprzednim wykonaniu testu ELISA również zakażenia wirusem HIV, a także SARS-COV-2 [15-18]. Technika Western blot pozwala na zdiagnozowanie chorób pasożytniczych, w tym węgryczy wywołanej obecnością larwy tasiemca uzbrojonego, a także niektórych chorób genetycznych [19]. Publikacje potwierdzają wykorzystanie techniki Western blot do wykrywania białka dystrofiny, którego mutacje w genie powodują dystrofię mięśniową Duchenne'a i dystrofię mięśniową Beckera [20,21]. Innym przykładem jest niedokrwistość Fanconiego, gdzie postępy w zrozumieniu patogenezы tej choroby spowodowały wykorzystanie techniki Western blot do oznaczania poziomu białek związanych z tym schorzeniem m. in. białka grupy dopełniającej D2 w niedokrwistości Fanconiego (ang. *Fanconi Anemia Complementation Group D2*, FANCD2) i innych [22]. Metodę tę wykorzystuje się także w diagnostyce hiperlizynemi spowodowanej defektem metabolizmu niezbędego aminokwasu L-lizyny. W tym przypadku oznaczamy poziom syntazy α -aminoadypinowo semialdehydowej (AASS) [23]. Jednym z najpopularniejszych zastosowań testu Western blot jest diagnostyka chorób bakteryjnych. Należą do nich przede wszystkim gruźlica i borelioza [24,25]. Wykorzystywany jest ponadto w diagnostyce zakażenia bakterią *Helicobacter pylori*, która wywołuje chorobę wrzodową żołądka oraz w diagnostyce chorób nowotworowych: m.in. krtani, wątroby czy przełyku [26]. Wykorzystując próbki pochodzące od pacjentów z nowotworem krtani za pomocą techniki Western blot wykazano nadekspresję białka profiliny 1 (PFN1) odpowiedzialnego za przerzuty tego nowotworu, tym samym uznając je za biomarker diagnostyczny i prognostyczny [27]. Technika Western blot okazała się

pomocna także w diagnostyce nowotworu wątroby identyfikując białka 14-3-3 ulegające ekspresji podczas etapu progresji raka wątrobowo-komórkowego [28]. W przypadku nowotworu przełyku metoda ta pozwoliła na stwierdzenie nadekspresji S-transferazy glutaminowej omega 1 (GSTO1), która indukuje odpowiedź immunologiczną i uznanie tego białka za biomarker umożliwiający wczesną diagnostykę tego nowotworu [29]. Zastosowanie techniki Western blot obejmuje także diagnostykę chorób autoimmunologicznych: np. toczenia rumieniowatego układowego, mieszanej choroby tkanki łącznej, twardziny układowej. W diagnostyce toczenia rumieniowatego układowego związanego z deregulacją interleukiny 6 (IL-6) i procesu autofagii wykorzystuje się m.in. oznaczanie poziomu IL-6 oraz markerów autofagii: lekko łańcuchowego białka 3B II związanego z mikrotubulami (ang. *microtubule-associated protein 1 light chain 3B II*, LC3B-II) i białka p62 oraz izoformy kinazy pirogronianowej M2 (ang. *pyruvate kinase isoform M2*, PKM2) [30,31]. Jako dwa markery oznaczane przy mieszanej chorobie tkanki łącznej wymienia się przeciwciała przeciwko małej rybonukleinie (RNP) i białku szoku cieplnego hsp73 [32]. Z kolei w przypadku twardziny układowej techniką Western blot oznacza się specyficzne autoprzeciwciała przeciwko białku fibrylarynie [33]. Western blot umożliwia detekcję różnych izoform enzymów diagnostycznych np. choroba Creutzfeld-Jacoba może być zdiagnozowana przez ocenę wzoru izoform białek 14-3-3, czy różnych izoform białek w płynie mózgowo-rdzeniowym [34].

Obydwie techniki są szeroko wykorzystywane w badaniach naukowych m.in. z obszaru farmacji. Ponieważ wiele farmakologicznych punktów uchwytu stanowią białkowe elementy komórkowej sieci przekazywania sygnału, omawiane w niniejszym artykule techniki wykorzystuje się do oceny skuteczności i mechanizmu działania nowych związków o potencjale terapeutycznym lub chemoprewencyjnym. Dotyczy to m.in. dróg sygnałowych powiązanych ze stanami zapalnymi. Kluczowym elementem w indukcji, szczególnie przewlekłych stanów zapalnych leżących u podłoża wielu chorób, jest ścieżka sygnałowa prozapalnego jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Aktywacja końcowego elementu tej ścieżki prowadzi do transkrypcji białek zaangażowanych w proces zapalny takich jak cyklooksygenaza-2 (COX-2) i syntaza tlenu azotu (NOS). Aktywację NF- κ B mierzy się testem ELISA oceniając poziom jego wiązania do docelowej sekwencji DNA, natomiast indukcję kontrolowanych

przez ten czynnik enzymów techniką Western blot [35,36]. Podobne podejście znajduje zastosowanie w ocenie modulacji innych ścieżek sygnałowych takich jak Nrf2-ARE (jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2-element odpowiedzi antyoksydacyjnej, ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2-antioxidant responsive element*) czy Wnt [37-39]. Ponieważ aktywacja wielu ścieżek sygnałowych wiąże się z translokacją aktywnych białek z cytozolu do jądra komórkowego lub błony technika Western blot jest wykorzystywana do ich lokalizacji subkomórkowej. Przykładem może być translokacja kinazy białkowej C modulowana przez wiele związków m. in. roślinne fenole [40]. Technika Western blot pozwala na ocenę tego zjawiska. Ponadto Western blot umożliwia badanie interakcji białko-białko i interakcji białko-DNA, a także potranslacyjnych modyfikacji białek. Interakcja białko-białko są podstawą wielu krytycznych komórkowych procesów w tym przekazu sygnału i transportu molekularnego. Wiele badań zarówno *in vivo* jak *in vitro* zostało przeprowadzonych w celu zbadania tych interakcji [41]. W tym przypadku za pomocą Western blot sprawdzamy czy dwa białka są zdolne do wiązania się ze sobą za pomocą przeciwciał specyficznych dla obu białek. Do badania interakcji DNA-białko wykorzystujemy technikę Southwestern blot, w przypadku którego błona jest traktowana znakowanymi radioaktywnie zaprojektowanymi wcześniej oligonukleotydami DNA [42]. W badaniu potranslacyjnych modyfikacji białek

np. fosforylacji, glikozylacji stosuje się przeciwciała specyficzne dla danej modyfikacji [10].

Podsumowanie

Test ELISA i technika Western blot od czasu ich opracowania są powszechnie wykorzystywane zarówno w laboratoriach badawczych jak i diagnostycznych. W odniesieniu do Western blotu ciągłym wyzwaniem jest dokładna ocena ilościowa. Stąd szczególnie w odniesieniu do tej techniki ciągle aktualne jest pytanie czy jest to metoda ilościowa czy półilościowa. Istotna jest normalizacja uzyskanych wyników. Nowe modyfikacje tych technik np. zastosowanie różnych metod detekcji (chemiluminescencji, fluorescencji) czy urządzeń do automatyzacji blotingu (np. blot cycler) mają na celu umożliwienie w pełni ilościowej analizy badanych białek.

Konflikt interesów / Conflict of interest

Brak/None

Adres do korespondencji / Correspondence address

✉ Hanna Szaefer

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

ul. Rokietnicka 3; 60-806 Poznań

☎ (+48 61) 641 84 72

✉ hszaefer@ump.edu.pl

Piśmiennictwo/References

1. Bobilewicz D. Elektroforeza w praktyce laboratoryjnej. Przegląd medycyny laboratoryjnej. 2005;2(4):3-8.
2. Szaefer H, Krajka-Kuźniak V, Ignatowicz I. Zastosowanie technik biologii molekularnej do analizy białek. W: Baer-Dubowska W, Licznerska B, Ignatowicz E. (red.). *Biologia molekularna dla farmaceutów*. Poznań: Wydawnictwo Naukowe UMP; 2012. ss. 259-273.
3. Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med*. 2018;72(1):32-42.
4. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971;8(9):871-4.
5. Kępska M, Futoma-Kołoch B. Test immunoenzymatyczny ELISA – zasada działania i optymalizacja reakcji. *Lab Med*. 2018;2:42-9.
6. Lindström P, Wäger O. IgG autoantibody to human serum albumin studied by the ELISA-technique. *Scand J Immunol*. 1978;7:419-25.
7. Belanger L, Sylvestre C, Dufour D. Enzyme-linked immunoassay for alpha-fetoprotein by competitive and sandwich procedures. *Clin Chim Acta*. 1973; 48:15-8.
8. Ferens-Sieczkowska M, Kątnik-Prastowska I. Immunoenzymatyczne testy fazy stałej. W: Kątnik-Prastowska I. (red.) *Immunochemia w biologii medycznej. Metody badawcze*. Warszawa: 2009. ss. 106-26.
9. Stanker LH, Hnasko R.M. A double-sandwich ELISA for identification of monoclonal antibodies suitable for sandwich immunoassays. W: Hnasko R.M. (red.) *ELISA. Methods and protocols*. *Methods Mol Biol*. 2015;1318:69-78.
10. Meftahi GH, Bahari Z, Mahmoudabadi AZ, et al. Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochem Mol Biol Educ*. 2021;49(4):509-17.
11. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76(9):4350-4.

12. Taylor SC, Posch A. The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int.* 2014;2014:361590.
13. Mahmood T, Yang P-Ch. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 2012;4(9):429-34.
14. Hayrapetyan H, Tran T, Tellez-Corrales E, et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and Applications. *Methods Mol Biol.* 2023;2612:1-17.
15. Tsopanomalou M, Ergazaki M, Spandidos DA. Evaluation of western blot in routine diagnosis of hepatitis C virus. *Int J Biol Markers.* 1997;12(1):35-41.
16. Garcia-Cisneros S, Á Sánchez-Alemán M, Conde-Glez CJ, et al. Performance of ELISA and Western blot to detect antibodies against HSV-2 using dried blood spots. *J Infect Public Health.* 2019;12(2):224-8.
17. Alexander TS. Human Immunodeficiency Virus Diagnostic Testing: 30 Years of Evolution. *Clin Vaccine Immunol.* 2016;23(4):249-53.
18. Edouard S, Faafar R, Orain N, et al. Automated Western immunoblotting detection of anti-SARS-CoV-2 serum antibodies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021;40(6):1309-17.
19. Rodriguez S, Wilkins P, Dorny P. Immunological and molecular diagnosis of cysticercosis. *Pathog Glob Health.* 2012;106(5):286-98.
20. Voit T, Stuetzgen P, Cremer M, et al. Dystrophin as a diagnostic marker in Duchenne and Becker muscular dystrophy. Correlation of immunofluorescence and western blot. *Neuropediatrics.* 1991;22(3):152-62.
21. Chesshyre M, Ridout D, Hashimoto Y, et al. Investigating the role of dystrophin isoform deficiency in motor function in Duchenne muscular dystrophy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2022;13(2):1360-72.
22. Pilonetto DV, Pereira NF, Bitencourt MA, et al. FANCD2 Western blot as a diagnostic tool for Brazilian patients with Fanconi anemia Braz. *J Med Biol Res.* 2009;42(3):237-43.
23. Houten SM, Brinke HT, Denis S, et al. Genetic basis of hyperlysinemia. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8:57.
24. Patil S, Giribhattanavar P, Patil M, et al. Immunoconfirmation of central nervous system tuberculosis by blotting: A study of 300 cases. *Int J Mycobacteriol.* 2015;4:124-30.
25. Mavin S, Evans R, Cornulier T, et al. The development of an IgG avidity Western blot with potential to differentiate patients with active Lyme borreliosis from those with past infection. *J Microbiol Methods.* 2018;146:71-6.
26. Monteiro L, Bergey B, Gras N, et al. Evaluation of the performance of the Helico Blot 2.1 as a tool to investigate the virulence properties of *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8(10):676-9.
27. Li L, Zhang Z, Wang C, et al. Quantitative proteomics approach to screening of potential diagnostic and therapeutic targets for laryngeal carcinoma. *PLoS One.* 2014; 9(2):e90181.
28. Liu M, Liu X, Ren P, et al. A cancer-related protein 14-3-3 ζ is a potential immunodiagnosis of hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol.* 2014;35(5):4247-56.
29. Li Y, Zhang Q, Penq B, et al. Identification of glutathione S-transferase omega 1 (GSTO1) protein as a novel tumor-associated antigen and its autoantibody in human esophageal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol.* 2014;35(11):10871-7.
30. Hsu H-C, Chen Y-H, Lin T-S, et al. Systemic lupus erythematosus is associated with impaired autophagic degradation via interleukin-6 in macrophages. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2021;1867(2):166027.
31. Lu L, Wang H, Liu X, et al. Pyruvate kinase isoform M2 impairs cognition in systemic lupus erythematosus by promoting microglial synaptic pruning via the β -catenin signaling pathway. *J Neuroinflammation.* 2021;18(1):229.
32. Appelboom T, Kahn ME, Mairesse N. Antibodies to small ribonucleoprotein and to 73-kD heat shock protein: two distinct markers of mixed connective tissue disease. *Clin Exp Immunol.* 1995;100(3):486-8.
33. Garcia JH, Osuna MD, Castrejon FM, et al. Methods to detect antifibrillar antibodies in patients with systemic sclerosis (SSc): a comparison. *J Clin Lab Anal.* 2004;18(1):19-26.
34. Wiltfang J, Otto M, Baxter HC, et al. Isoform pattern of 14-3-3 proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurochem.* 1999;73(6):2485-90.
35. Szafer H, Cichocki M, Krajka-Kuźniak V, et al. The effect of resveratrol and its methylthio-derivatives on NF- κ B and AP-1 signaling pathways in HaCaT keratinocytes. *Pharmacol Rep.* 2014;66(5):732-40.
36. Krajka-Kuźniak V, Bednarczyk-Cwynar B, Paluszczak J, et al. Oleanolic acid oxime derivatives and their conjugates with aspirin modulate the NF- κ B-mediated transcription in HepG2 hepatoma cells. *Bioorg Chem.* 2019;93:103326.
37. Narożna M, Krajka-Kuźniak V, Bednarczyk-Cwynar B, et al. The Effect of Novel Oleanolic Acid Oximes Conjugated with Indomethacin on the Nrf2-ARE And NF- κ B Signaling Pathways in Normal Hepatocytes and Human Hepatocellular Cancer Cells *Pharmaceuticals (Basel).* 2020;14(1):32.
38. Papierska K, Krajka-Kuźniak V, Paluszczak J, et al. Lichen-Derived Depsides and Depsidones Modulate the Nrf2, NF- κ B and STAT3 Signaling Pathways in Colorectal Cancer Cells. *Molecules.* 2021;26(16):4787.
39. Cykowiak M, Krajka-Kuźniak V, Kleszcz R, et al. Comparison of the Impact of Xanthohumol and Phenethyl Isothiocyanate and Their Combination on Nrf2 and NF- κ B Pathways in HepG2 Cells In Vitro and Tumor Burden In Vivo. *Nutrients.* 2021;13(9):3000.
40. Szafer H, Kaczmarek J, Rybczyńska M, et al. The effect of plant phenols on the expression and activity of phorbol ester-induced PKC in mouse epidermis *Toxicology.* 2007;230(1):1-10.
41. Miura K. An Overview of Current Methods to Confirm Protein-Protein Interactions *Protein Pept Lett.* 2018;25(8):728-33.
42. Jia Y, Nagore L, Jarrett H. Southwestern Blotting Assay. *Methods Mol Biol.* 2015;1334:85-99.