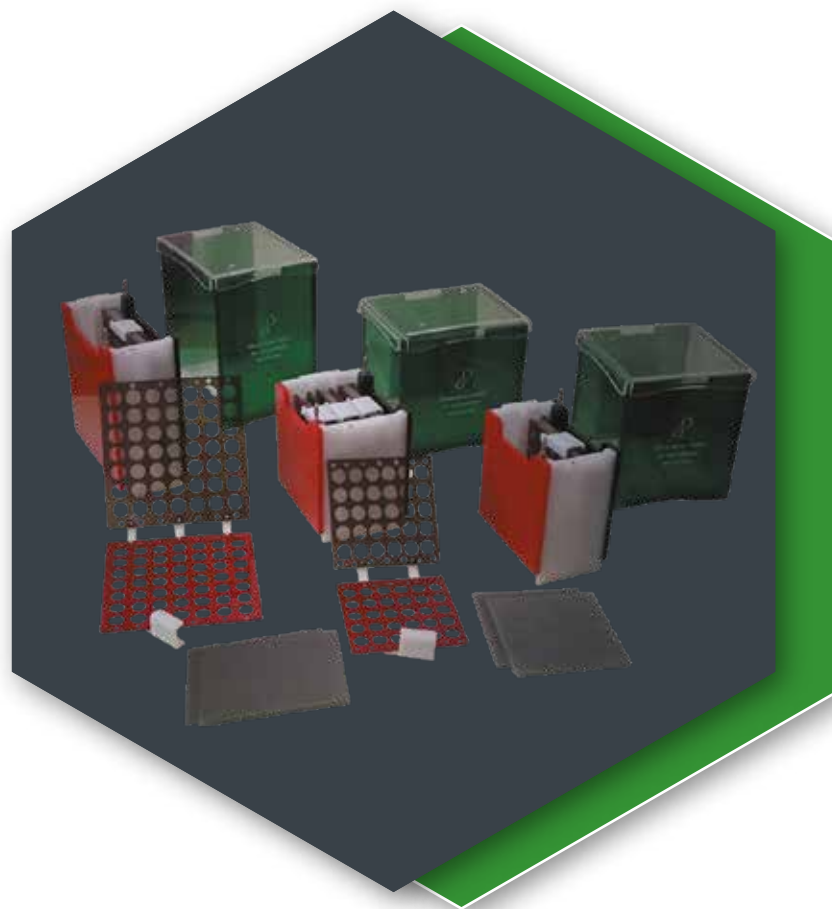


دفترچه راهنما **وسترن بلات**

شرکت دانش بنیان دناژن تجهیز
طراح و تولیدکننده تجهیزات آزمایشگاهی و بیوتکنولوژی





وسترن بلات (Western Blotting)

www.Denagene.com

”

از اینکه دستگاه و سترن بلات تجهیز را انتخاب نموده‌اید خرسندیم. این دفترچه راهنما تنها برای مشتریان شرکت دناژن تجهیز طراحی و تدوین شده است تا با استفاده بهینه از اطلاعات و راهنمایی‌های موجود در این دفترچه از دستگاه‌ها به بهترین نتایج برسید.

لطفاً قبل از شروع به کار دستورالعمل‌های لازم را بخوانید. این دستگاه فقط برای استفاده تحقیقاتی و تشخیصی مناسب است. که باید توسط پرسنل متخصص استفاده گردد.

در صورت هرگونه استفاده غیرمعمول و نیز تغییرات ایجاد شده در آن توسط افراد فاقد صلاحیت، شرکت دناژن تجهیز مسئولیت هرگونه صدمه وارد شده به دستگاه را تقبل نمی‌کند.

تمامی محتوا و اطلاعات موجود در دفترچه راهنما تحت حفاظت حقوق کپی‌رایت دناژن تجهیز می‌باشد. هرگونه استفاده غیرمجاز از این محتوا تحت پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت. استفاده از این مطالب برای مقاصد تجاری یا در دسترس افراد و شرکت‌های غیرمجاز ممنوع است.

در صورت بروز هرگونه سوال یا نیاز به پشتیبانی، با تیم پشتیبانی تماس حاصل فرمایید.

“

۱۲	رنگ آمیزی قابل برگشتن با پانسو اس
۱۲	رنگ آمیزی قابل برگشت با آمیدوبلک
۱۲	رنگ آمیزی غیرقابل بازگشت با کوماسی بلو
۱۲	رنگ آمیزی غیرقابل برگشت با آمیدوبلک
۱۳	رنگ آمیزی مارکرهای پروتئینی
۱۴	تشخیص اختصاصی پروتئین ها در غشا
۱۴	تکنیک وسترن بلاتینگ
۱۵	مرحله مسدودسازی
۱۶	تشخیص با آنتی بادی
۱۷	مواد
۱۷	روش آزمایش
۱۹	نکات مهم تکنیک وسترن بلات
۲۰	مشکلات احتمالی تکنیک وسترن بلات و راه حل

۱	مقدمه
۲	هشدار
۳	نگهداری از دستگاه
۴	مشخصات فنی
۵	ویژگی ها
۶	تکنیک بلاتینگ
۶	روش های انتقال پروتئین
۷	غشاهای مورد استفاده در بلاتینگ
۷	روش انتقال در تانک
۸	مواد لازم جهت انجام تکنیک ایموبلانت
۹	روش آزمایش
۱۰	انتخاب بافر در الکتروبلات
۱۱	رنگ آمیزی عمومی پروتئین ها در غشا

وسترن بلات

وسترن بلات (پروتئین بلائینگ یا ایمنو بلائینگ) یک روش آزمایشگاهی است که برای تشخیص مولکولهای خاص پروتئین از میان مخلوطی از پروتئین‌ها استفاده می‌شود که به طور گسترده در زیست شناسی مولکولی و ایمنی زایی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

این مخلوط می‌تواند شامل تمام پروتئین‌های مرتبط با یک بافت یا نوع سلول خاص باشد. از وسترن بلات نیز می‌توان برای ارزیابی اندازه پروتئین مورد نظر و برای اندازه گیری میزان بیان پروتئین استفاده کرد.

تانک‌های وسترن بلات شرکت دنا ژن تجهیز با مطالعه عمیق بهترین برندهای معتبر تولید کننده در دنیا و همچنین نیازهای محققین و متخصصین ارجمند، توانسته است با استفاده از مرغوب ترین مواد اولیه بهترین محصول را تولید کند.

با پیشرفت چشم گیری که علوم سلولی و مولکولی در حال تجربه کردن می باشد، نیاز کشورمان نیز به این علم و فراورده های آن روز به روز در حال افزایش می باشد.

شرکت دنا ژن تجهیز نیز توانسته است با تولید محصولاتی اساسی در این بخش، نیاز محققین میهن مان به تجهیزات و محصولات خارجی را هرچند اندک، مرتفع نمایند.

ضمن تشکر از انتخاب تانک های وسترن بلات شرکت دنا ژن تجهیز، به اطلاع می رساند تانک های وسترن بلات شرکت دنا ژن تجهیز با مطالعه عمیق بهترین برندهای معتبر تولید کننده در دنیا و همچنین نیازهای محققین و متخصصین کشور، توانسته است با استفاده از مرغوب ترین مواد اولیه بهترین محصول را در خدمت محققین و متخصصین کشورمان قرار دهد.

کلیه محصولات دنا ژن تجهیز قبل از تحویل به مشتری تحت کنترل کیفی و آزمون های سلامتی کامل قرار می گیرند. امید است با ساخت تولیدات با کیفیت، دنا ژن بتواند رضایت مشتریان خود را جلب نماید.

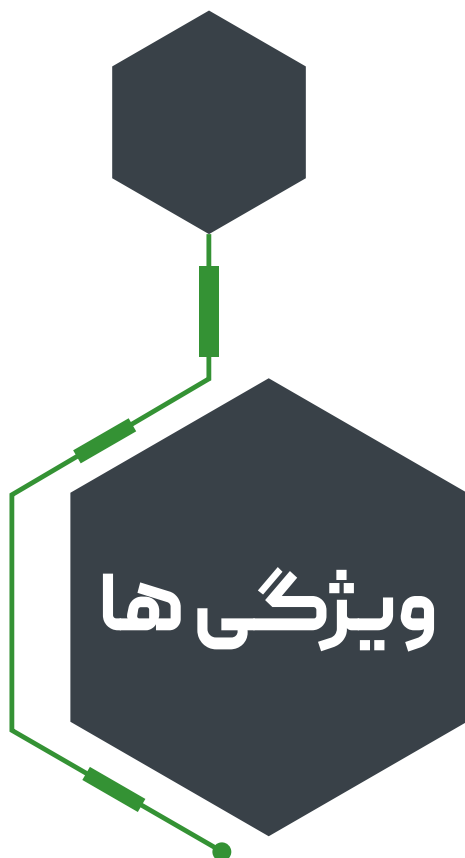
هشدار

-  قبل از هر گونه استفاده دستگاه، دستور العمل استفاده از آن را مطالعه کنید.
-  اکریل آمید ماده ای فرار، جهش زا و نیز سرطان زا می باشد. در هنگام کار با آن، پوشش مناسب داشته باشید.
-  ولتاژ بیشتر از حداکثر ولتاژ عملکردی دستگاه و سترن بلات به آن اعمال ننمایید.
-  از منبع تغذیه نامناسب جهت تامین جریان و ولتاژ استفاده نشود. توصیه می شود از پاور سپرای مدل DGT-UNIVERSAL شرکت دنا ژن تجهیز استفاده نمایید.
-  تانک را بیشتر از حداکثر ظرفیت آن با بافر پر نکنید.
-  در هنگام run کردن نمونه، تانک را جابجا نکنید.

نگهداری از دستگاه

- به منظور جداسازی safety lid، انگشت های شست را با قرار دادن بر روی گوشک های پلاستیکی به طرف پایین فشار دهید و لید را به صورت عمودی با انگشتان بلند کنید.
- قبل از استفاده دستگاه را تنها با آب مقطر تمیز و خشک نمایید.
- پلاستیک اکریلیک در مقابل ترکیبات آروماتیک، هیدروکربن های هالوژنه، کتون ها، استرها، الکل ها (بالای 25%) و اسیدها (بالای 25%) مقاوم نمی باشد؛ این مواد موجب خوردگی تانک خواهند شد. از این رو توصیه می شود از آنها جهت تمیز نمودن دستگاه استفاده نشود.
- قبل از استفاده و به صورت ماهانه، دستگاه را در محل های به هم اتصال یافته جهت هر گونه نشی چک نمایید. برای این کار دستگاه را در یک ورقه کاغذی پیچانده و سپس با آب مقطر تا محل حداکثر ظرفیت پر نمایید. هرگونه نشی بر روی کاغذ قابل مشاهده خواهد بود. در صورت وجود هرگونه نشی، سعی در تعمیر نمودن آن ننمایید و در اسرع وقت دنا ژن تجهیز را مطلع نمایید.
- محل الکترودهای پلاتینی معمولا جهت محافظت به طور نسبی پوشیده شده اند. در هنگام تمیز نمودن تانک از برآش های تمیز کننده در ناحیه الکترود استفاده ننمایید. معمولا کر دادن با آب مقطر کافی می باشد.

WD1.×1.	مدل
1.×1.	ابعاد ژل (سانتی متر)
1۲×1.×1۸	ابعاد دستگاه (سانتی متر)
1...	میزان بافر (میلی لیتر)
۳.۷/1..mA overnight	تنظیمات پاور برای حالت روتین

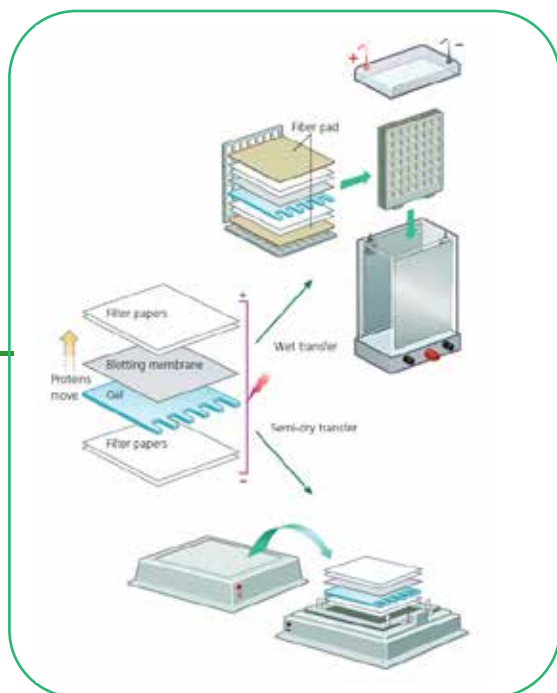


دستگاه وسترن بلات ساخت دنا ژن تجهیز با مطالعه دقیق بهترین مدل های خارجی و نیز استفاده از تکنولوژی روز دنیا طراحی و تولید شده است. با توجه به اشراف کامل شرکت در طراحی و تولید انواع مدل های مختلف، سفارشات اختصاصی نیز پذیرفته می شود.

- ترانسفر یکنواخت باندها به غشا
- انتقال سریع و بدون دگرده شده بانها
- قیمت رقابتی
- خدمات پس از فروش عالی

در اغلب موارد انتقال پروتئین از ژل به غشا با کمک نیروی الکتریکی صورت می گیرد.

این نوع انتقال به انتقال الکتروفورزی معروف است. انتقال الکتروفورزی به دو صورت انجام می شود: انتقال در تانک که به انتقال تر معروف است و انتقال به روش نیمه خشک .

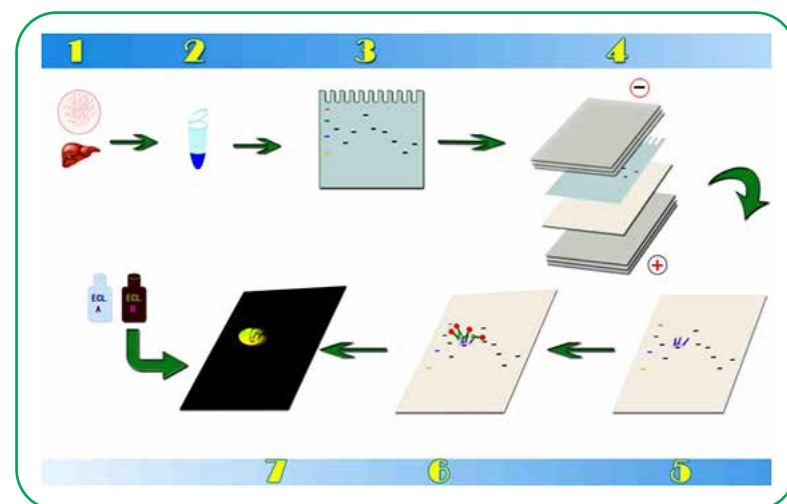


روش های اصلی انتقال پروتئین از ژل به کاغذ، البته می توان به طریق انتشار با خاصیت موینگی یا پمپ خلا نیز پروتئین ها را انتقال داد.

در این تکنیک باندهای پروتئینی از ژل به غشایی مانده نیتروسلولز که قابلیت اتصال و تثبیت پروتئین ها را دارد، منتقل می شوند.

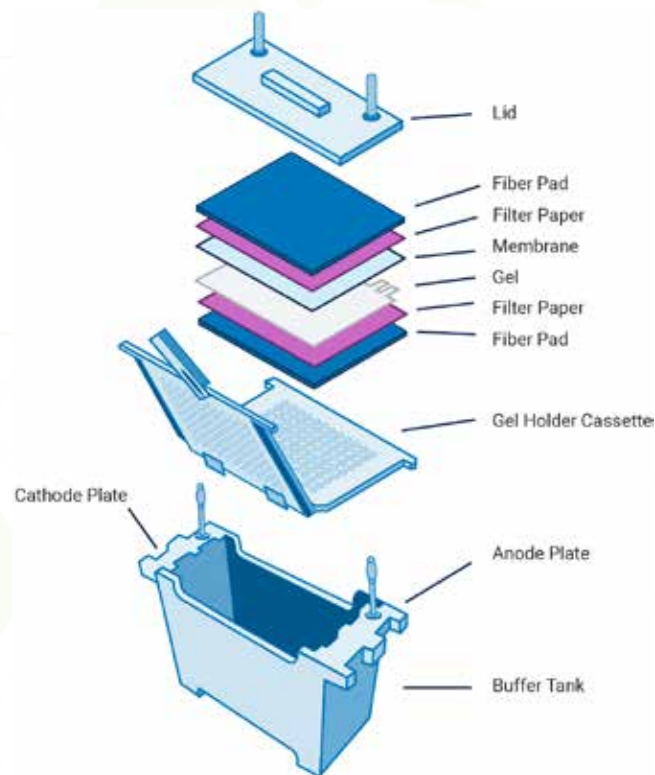
در عمل بلاتینگ مولکول های پروتئین از زمینه ژل خارج می شوند و در سطح غشا در همان موقعیت قرار می گیرند. از این رو به سادگی و با مقدار کمتری از مواد می توان به مطالعه آنها پرداخت، یا آنها را جدا نمود و مورد استفاده قرار داد.

به منظور تشخیص پروتئین ها یا آنزیم های منتقل شده به غشا می توان از لیگاندهای اختصاصی یا سوبستراهای مربوطه استفاده کرد. آنتی بادی ها از متداول ترین موادی هستند که برای تشخیص اختصاصی پروتئین ها در غشا بکار می روند. از همین رو چنین روش هایی به ایمونوبلاتینگ معروفند.



روش انتقال در تانک

روش انتقال در تانک شکل پایه ای انتقال به کمک الکتروفورز می باشد. بدین لحاظ غالبا این روش را معادل الکتروبلاتینگ می دانند. تصویر کلی این روش در شکل زیر آمده است.



غشاهای مورد استفاده در بلاتینگ

در عمل بلاتینگ معمولا از غشاهای نیتروسولوزی و یا پلی وینیلیدن دی فلورید (PVDF) استفاده می کنند. این دو غشا ظرفیت خوبی در اتصال به پروتئین ها دارند. نیتروسولوز ارزان تر است ولی ظرفیت مکانیکی کمی دارد و شکننده می باشد.

اندازه منافذ نیتروسولوز بین ۰.۵ تا ۰.۴۵ میکرون متغیر می باشند. هرچه اندازه منافذ یک غشا کوچک تر باشد سطح مخصوص و ظرفیت اتصال آن بیشتر خواهد بود. دی آزو بنزیل اکسی متیل (DBM) ، دی آزو فنیل تیواتر (DPT) و نایلون از دیگر غشاهایی هستند که در موارد خاصی از عمل بلاتینگ بکار می روند.

غشاهای نایلونی از ظرفیت و توان مکانیکی بالایی برخوردارند، اما برخلاف سایر غشاها بار مثبت دارند. از این رو اغلب رنگ های آنیونی که برای پروتئین مورد استفاده قرار می گیرند، به آنها متصل می شوند. در مواردی که جداسازی پروتئین خاصی از غشا مورد نظر باشد، استفاده از غشاهای تعویض یون برای بلاتینگ مناسب می باشد.

برای این کار قسمتی از غشا که حاوی پروتئین مورد نظر است، جدا می شود. سپس با قرار دادن قسمت جدا شده در بافر با PH یا قدرت یونی متفاوت، پروتئین آزاد می شود.

مواد لازم جهت انجام تکنیک ایمونوبلات

۱- غشای نیتروسلولز با اندازه منافذ ۰/۴۵. میکرومتر یا غشای ایموبیلون (PVDF)

۲- بافر انتقال حاوی تریس ۲۵ میلی مولار، گلیسین ۱۹۲ میلی مولار و متانول ۱۵ درصد.

برای تهیه آن ۶ گرم تریس باز و ۲۸/۸ گرم گلیسین را در حدود یک لیتر آب مقطر حل کنید. سپس ۲۰۰ میلی لیتر متانول اضافه کنید، حجم نهایی را با آب مقطر به ۲ لیتر برسانید (PH این محلول حدود ۸/۳ است و نیازی به تنظیم ندارد).

بافر را در یخچال قرار دهید تا قبل از استفاده خنک گردد، چون حل شدن متانول در آب گرم‌زاست.

۳- کاغذ واتمن یا کاغذ الکتروفورز

شماتیک کلی روش انتقال تر در تانک وسترن بلات را در صفحه ی قبل مشاهده نمودید.

کاست ژل و غشا را کنار هم نگه می دارد. کاغذ های صافی و پدهای آنها در دو طرف ژل به صورت کامل با ژل تماس دارند. نهایتاً کاست ژل به صورت عمودی در تانک قرار می گیرد.

معمولاً انتقال در تانک در بافر تریس گلیسین انجام می گیرد. این بافر برای جداسازی انواعی از پروتئین ها که به روش SDS-PAGE جدا شده اند مناسب است.

وجود متانول در این بافر برای جلوگیری از تورم ژل، جداسازی SDS از پروتئین ها و بالا بردن ظرفیت اتصال به غشا است. اما، متانول بخصوص در غلظت های بالا از عوامل بازدارنده انتقال پروتئین ها محسوب می شود. در بعضی موارد به منظور افزایش حلالیت پروتئین ها مقداری دترجنت (به عنوان مثال SDS با غلظت ۰/۰۲ درصد) به این بافر می افزایند.

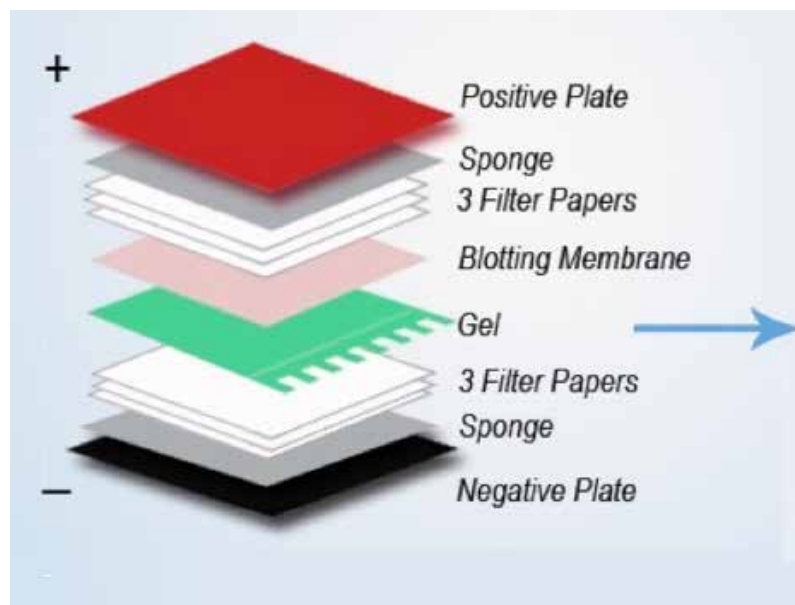
به هر حال باید توجه داشت که دترجنت ها به خصوص در غلظت های بالا از اتصال پروتئین ها به غشا جلوگیری می نمایند.

روش آزمایش

۱- مقداری از بافر تانک را در یک ظرف پلاستیکی یا شیشه ای تمیز بریزید. ژل را پس از بریدن بخش متراکم کننده آن حداقل ۱۰ دقیقه در بافر قرار دهید.

۲- با کمک پنس و قیچی تمیز، یک ورقه از غشا به اندازه ژل ببرید. از تماس دست بدون دستکش با غشا خودداری کنید. غشا را با آب مقطر (برای غشای نیتروسلولز) یا متانول (برای غشای PVDF) خیس کنید و در ظرف حاوی بافر انتقال دهید. چندین لایه کاغذ صافی متناسب با ابعاد ژل تهیه و همراه اسفنج ها در بافر خیس کنید.

سپس مطابق شکل زیر اجزای گفته شده را روی هم قرار دهید. این مجموعه از پایین به بالا شامل اسفنج، چند لایه کاغذ صافی، ژل، غشا، چند لایه کاغذ صافی و لایه اسفنج می باشد. بعد از گذاشتن هر لایه، حباب های هوای احتمالی را با یک میله شیشه ای یا لوله آزمایش از حد فاصل لایه ها خارج کنید.



انتقال تر

انتقال در بافر CAPS ۵۰ میلی مولار سریعتر صورت می گیرد و با تولید گرمای کمتری همراه است. بدین لحاظ در صورت لزوم می توان از این بافر به جای تریس گلیسین استفاده کرد.

در حالاتی که بلاتینگ به هدف تعیین توالی اسیدهای آمینه در پروتئین ها صورت می گیرد، بافر CAPS مناسب تر است؛ زیرا حضور گلیسین در بافر موجب اختلال در تعیین توالی پروتئین ها می شود.

بافر بورات سدیم ۱۰ میلی مولار با $\text{pH}=9.2$ برای انتقال گلیکوپروتئین ها، پلی ساکاریدها و لیپوپلی ساکاریدها توصیه می شود.

در این بافر، بورات به واحدهای قندی مواد فوق متصل می شود و به آنها بار منفی می دهد.

پروتئین های بازی که در شرایط اسیدی الکتروفورز می شوند، یا پروتئین هایی که با تکنیک ایزو الکتروفوکوسینگ جدا می شوند را می توان در محلول اسید استیک ۷٪ در صد به غشا انتقال داد. در این شرایط پروتئین ها بار مثبت دارند و به طرف قطب منفی حرکت می کنند.

انتخاب بافر و استفاده از متانول در بافر بستگی به نوع پروتئین های مورد مطالعه، شرایط ژل، نوع الکتروفورز و نوع غشا دارد. همان گونه که قبلا ذکر شد، بافر تریس گلیسین برای انتقال اغلب پروتئین ها مناسب می باشد. پروتئین ها در این بافر معمولا بار منفی دارند و به طرف آند حرکت می کنند.

اتصال SDS به پروتئین ها (برای مثال در SDS-PAGE) نیز به تشدید بار منفی و حرکت آنها کمک می کند. با این حال در بعضی موارد تغییر شرایط بافر تریس گلیسین یا انتخاب بافر دیگر می تواند انتقال را تسهیل نماید.

به عنوان مثال، تجربه نشان می دهد که با حذف متانول در بافر تریس گلیسین انتقال گلیکوپروتئین های بزرگ به راحتی صورت می گیرد.

متانول با زدودن SDS از پروتئین ها و جمع کردن ژل باعث کاهش انتقال این مولکول ها می شود. SDS یک دترجنت آنیونی است و در انتقال پروتئین ها (خصوصا پروتئین های با بار خالص مثبت) تاثیر گذار می باشد.

بنابراین در صورت نیاز، علاوه بر حذف متانول، می توان درصد بسیار کمی از آن را وارد بافر کرد.

رنگ آمیزی عمومی پروتئین ها در غشا

نوع غشا	حساسیت (میکروگرم در باند)	ماده رنگ آمیزی
نیتروسلولز، PVDF	$>1/5$	فاست گرین FG
نیتروسلولز، PVDF	$>1/5$	پانسو-اس
PVDF	$1/5$	کوماسی آبی R-250
نیتروسلولز، PVDF	$1/5$	آمیدوبلک 1.0
نیتروسلولز، PVDF	$1/1$	جوهر هندی
نیتروسلولز، PVDF و نایلون	$1/3$	آهن کلوییدی
نیتروسلولز، PVDF و نایلون	$1/3$	بیوتین و آویدین - پراکسیداز
نیتروسلولز، PVDF	$1/4$	طلای کلوییدی

موادی که برای رنگ آمیزی عمومی پروتئین ها در غشا بکار می روند

رنگ آمیزی قابل برگشت با آمیدوبلک

محلول رنگ آمیزی شامل پانسواس ۱٪، درصد وزنی - حجمی در اسید استیک ۵ درصد حجمی - حجمی است. محلول آماده آن نیز توسط شرکت های مختلفی عرضه می شود.

برای رنگ آمیزی غشا را به مدت ۱۰-۵ دقیقه در مقدار کافی محلول رنگ قرار دهید. سپس با آب مقطر بشویید تا زمینه غشا بی رنگ گردد. باندهای پروتئینی بعد از رنگ آمیزی به رنگ قرمز در می آیند.

اگر شستشو با آب ادامه یابد، باندها نیز بی رنگ می گردند. رنگ آمیزی با پانسواس دخالتی در تشخیص باندها به روش اختصاصی (مثلا ایمونوبلاتینگ) یا در تعیین توالی اسید آمینه ها ندارد. حساسیت این روش نسبتا پایین می باشد.

رنگ آمیزی غیر قابل بازگشت با کوماسی بلو

محلول رنگ آمیزی شامل کوماسی بلو R-۲۵۰ با غلظت ۱٪، درصد وزنی حجمی در محلول اسید استیک ۷ درصد حجمی - حجمی و متانول ۵۰ درصد حجمی - حجمی در آب مقطر است.

محلول رنگ بر شامل اسید - استیک ۷ درصد و متانول ۵۰ درصد در آب مقطر است. رنگ آمیزی ژل با کوماسی بلو نیز با همین

بعد از بلاتینگ پروتئین ها لازم است اطلاعاتی در مورد کیفیت و کمیت باندهای انتقال یافته بدست آید، یا پروتئین خاصی به هدف مطالعات بعدی (مثلا تعیین توالی) مشخص گردد.

برای این کار می توان غشای نیتروسلولز یا PVDF را با مواد مختلف رنگ آمیزی نمود.

رنگ آمیزی پروتئین ها بسته به هدف آزمایش ممکن است به صورت قابل برگشت و یا غیر قابل برگشت باشد. پانسواس، جوهر هندی، آمیدوبلک و کوماسی آبی از مواد متداول برای رنگ آمیزی عمومی پروتئین ها در غشا هستند.

رنگ آمیزی ژل نیز کامل یا ناقص بودن انتقال پروتئین ها را نشان می دهد. باندهای پروتئین در ژل و غشا دقیقا هم موقعیت نمی باشند، زیرا ژل در طی متعادل سازی در محلول انتقال به دلیل وجود متانول، مقداری کوچک می شود.

رنگ آمیزی قابل برگشت با پانسواس

محلول رنگ آمیزی شامل آمیدوبلک با غلظت ۱٪، درصد وزنی - حجمی در آب مقطر می باشد. برای رنگ آمیزی، غشا را ۲۰-۳۰ دقیقه در مقدار کافی محلول رنگ قرار دهید. سپس با آب بشویید تا زمینه غشا بی رنگ گردد.

رنگ باندهای پروتئینی به تدریج ضعیف و بالاخره ناپدید می شود.

تعیین برخی از خصوصیات پروتئین ها همچون اندازه یا نقطه ایزوالکتریک (PI) با استفاده از مارکرهای پروتئینی صورت می گیرد. برای تشخیص مارکرها در غشا می توان از روش های زیر کمک بگیرید.

۱- قسمت مربوط به مارکرها را از بقیه غشا جدا نمایید و با یکی از روش های غیر قابل برگشت که در صفحات قبل به آنها اشاره شد، رنگ آمیزی نمایید (PVDF را با کوماسی و نیتروسولولز را با آمیدوبلک رنگ کنید)؛ سپس این بخش از غشا را خشک نمایید و در کنار بقیه نتایج قرار دهید.

۲- بسته به نوع برند موقعیت مارکرها و تعداد باندشان متفاوت است.

۳- می توان شکل بیوتینه شده مارکرها را تهیه کرد و یا مارکرها را در آزمایشگاه به بیوتین متصل نمود. تحت چنین شرایطی با در اختیار داشتن کونژوگه آویدین پراکسیداز یا آویدین و کونژوگه آنتی آویدین پراکسیداز می توان موقعیت مارکرها را مشخص نمود.

۴- آلبومین مرغی و آلبومین گاوی از پروتئین هایی هستند که در بسیاری از انواع مارکرها وجود دارند. با در اختیار داشتن آنتی بادی ضد این دو پروتئین به صورت کانژوگه با آنزیم (یا آنتی بادی ضد آنها و آنتی بادی ثانویه کانژوگه) می توان موقعیت آنها را در غشا تعیین ساخت. این روش زمانی قابل اجراست که از این پروتئین ها به عنوان ماده مسدود کننده در غشا استفاده نشود.

غشا را ۱۵ دقیقه در مقدار کافی محلول رنگ قرار دهید. محلول رنگ را تخلیه کرده، غشا را در محلول رنگ بر بشویید تا زمینه آبی آن بی رنگ گردد. سپس غشا را در آب مقطر بشویید.

کوماسی بلو برای رنگ آمیزی پروتئین ها در PVDF مناسب است. این نوع رنگ را برای رنگ آمیزی نیتروسولولز بکار نبرید. زیرا زمینه آن شدیداً رنگی می شود.

محلول رنگ آمیزی شامل آمیدوبلک آمیدوبلک ۵٪. درصد وزنی حجمی، اسید استیک ۵ درصد حجمی- حجمی و متانول ۵۰ درصد حجمی- حجمی در آب مقطر است.

محلول رنگ بر شامل اسید استیک ۵ درصد و متانول ۵۰ درصد در آب مقطر است.

غشا را ۵ دقیقه در محلول رنگ بر قرار دهید. محلول رنگ آمیزی را تخلیه کنید و غشا را با محلول رنگ بر بشویید تا زمینه آبی رنگ شود.

تشخیص اختصاصی پروتئین‌ها در غشا

تشخیص یا رنگ آمیزی اختصاصی باندهای پروتئینی در غشا، بر پایه واکنش آنها با لیگاندهای اختصاصی صورت می‌گیرد. برای انجام این کار مولکول‌های لیگاند را به طور مستقیم (اولیه) و یا غیر مستقیم (ثانویه) با مواد رادیواکتیو، فلورسانس، مواد رنگی یا آنزیم‌ها نشان‌دار می‌کنند و با کمک آنها به تشخیص اختصاصی پروتئین‌ها می‌پردازند.

آنتی‌بادی‌ها از پر استفاده‌ترین لیگاندهای اختصاصی هستند که به اهداف مختلف تشخیص اختصاصی پروتئین‌ها می‌پردازند. آنتی‌بادی‌ها از پر استفاده‌ترین لیگاندهای اختصاصی هستند که به اهداف مختلف تشخیصی یا پژوهشی به کار می‌روند.

اساس روش ایمونوبلاتینگ که اهمیت آن بر محققین علوم زیستی آشکار است، موید چنین ادعایی است.

تکنیک وسترن بلاتینگ

این روش که به ایمونوبلات نیز معروف است بر پایه واکنش اولیه آنتی‌بادی آنتی ژن می‌باشد. در این روش پس از بلاتینگ پروتئین‌ها، ابتدا مناطق آزاد غشا مسدود می‌شود (مرحله بلوکه کردن).

سپس شرایط واکنش آنتی‌بادی (برای مثال سرم بیمار) با باندهای پروتئینی فراهم می‌گردد و به دنبال آن، با استفاده از ماکرومولکول‌های نشان‌دار (برای مثال آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبولین انسان که به آنزیم متصل است) نتیجه واکنش اولیه معلوم می‌گردد.

امروزه وسترن بلاتینگ را به طور گسترده در تشخیص طبی و تحقیقات بکار می‌برند. اگرچه انجام این روش تابع یک سری اصول کلی است، با این حال شرایط و جزئیات آن وابسته به هدف آزمایش است.

مرحله مسدود سازی

توضیحات	ماده مسدود کننده
در غلظت ۵-۲ درصد در بافر (معمولا PBS) برای ۲-۱ ساعت بکار می رود. برای مسدود کردن نایلون غلظت ۱۰ درصد آن به مدت ۱۶-۱۲ ساعت لازم است.	آلبومین سرم گاو
در غلظت ۳ درصد بکار می رود. بسیار ارزان است. بدلیل محتوای قندی زیاد از اتصال لکترین ها یا آنتی بادی های ضد گریهیدرات (به عنوان مولکول های نشان دار) جلوگیری می نماید.	شیر خشک بدون چربی
در غلظت ۱ درصد بکار می رود.	آلبومین مرغ
در غلظت ۳-۳/۰ درصد بکار می رود. ژلاتین ماهی خصوصیات مناسب تری نسبت به ژلاتین پستانداران به عنوان ماده مسدود کننده دارد.	ژلاتین
غلظت بین ۱/۰-۰/۵ درصد آن کافی است. راحت و کم هزینه است. از واکنش های غیر اختصاصی بین پروتئین ها نیز جلوگیری می کند.	دترجنت (توین-۲۰)

از این رو باید مناطق آزاد غشا قبل از مراحل تشخیص مسدود گردد. بهترین راه مسدود کردن این مناطق آزاد استفاده از پروتئین هایی است که خود با مواد نشان دار (مثل آنتی بادی) واکنش نمی دهد. کم هزینه بودن و سهولت تهیه از معیارهای اصلی انتخاب پروتئین مسدود کننده است. در جدول بالا نام و غلظت کاری تعدادی از پروتئین های مسدود کننده آمده است.

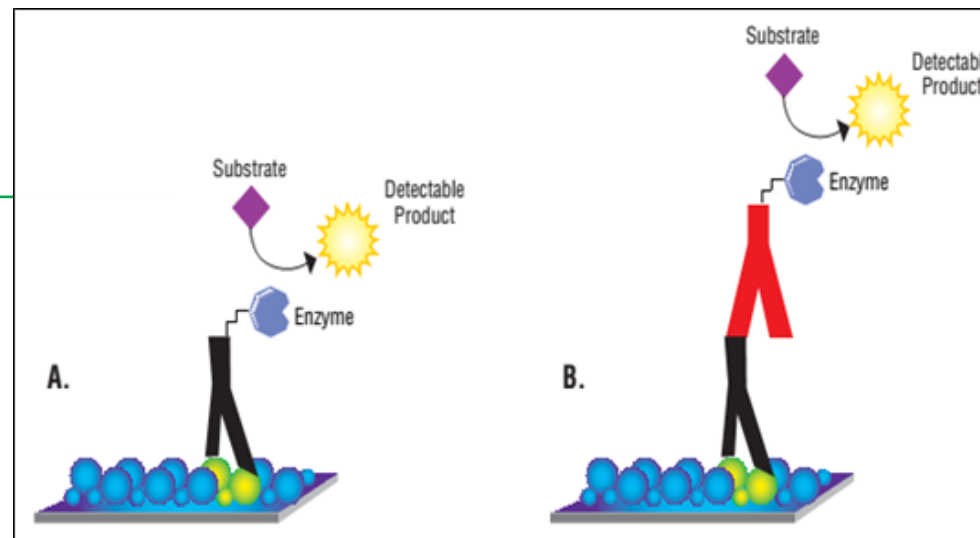
دترجنت ها نیز می توانند از اتصال پروتئین ها به غشا جلوگیری کنند. توئین ۲۰ معمول ترین دترجنت مورد استفاده در این کار است. باید این نکته را توجه کرد که توئین ۲۰ در غلظت های بالا (بیش از نیم درصد) در پاره ای موارد از اتصال لیگاند به پروتئین نیز جلوگیری میکند.

پس از بلا تینگ پروتئین ها و بلوکه کردن غشا، مرحله تشخیص اختصاصی را می توان انجام داد. همان گونه که قبلا نیز گفته شد ایمونوبلا تینگ در بسیاری از موارد به هدف تشخیص طبی است.

در این موارد باندهای انتقال یافته شامل همه یا بخشی از پروتئین های پیکره میکروب (باکتری، ویروس یا قارچ) است که وجود یا عدم وجود آنتی بادی ضد سرم آنها در سرم انسان یا حیوان بررسی می گردد. شناسایی با استفاده از آنتی بادی ها مانند تکنیک الیزا به دو روش صورت می گیرد:

مستقیم و غیر مستقیم. در تکنیک مستقیم آنتی بادی اولیه که جهت تشخیص آنتی ژن مورد استفاده قرار می گیرد، با استفاده از یک آنزیم و یا رنگ فلوئورسنت نشان دار شده است. اما در تکنیک غیرمستقیم، ابتدا یک آنتی بادی اولیه به منظور اتصال به آنتی ژن افزوده می شود. سپس آنتی بادی ثانویه که به صورت نشان دار شده است، افزوده می شود.

مولکول بیوتین جهت اتصال استفاده می شود و پروب های فلوئورسنتی مانند فلوئورسئین و یا رود آمین و کانژوگه های آنزیمی مانند HRP یا آلکالین فسفاتاز برای شناسایی و تولید سیگنال مورد استفاده قرار می گیرند. شکل زیر اصول کلی این دو نوع تکنیک ایمونوبلا تینگ را نشان می دهد.



روش های مختلف شناسایی با استفاده از آنتی بادی
در قسمت A به صورت مستقیم پروتئین هدف تشخیص داده می شود
در قسمت B به صورت غیرمستقیم مولکول هدف شناسایی می شود

روش آزمایش

۱- پس از مرحله مسدودسازی، غشا را ۳ بار، هر بار ۵ دقیقه در TBS-T بشویید. سپس ۱-۲ ساعت در آنتی بادی اول قرار دهید.

۲- غشا را ۴ بار هر بار ۵ دقیقه در TBS-T بشویید. سپس ۱-۲ ساعت در آنتی بادی ثانویه (آنتی بادی کانژوگه با پراکسیداز) قرار دهید.

۳- غشا را ۴ بار هر بار ۵ دقیقه در TBS-T بشویید. سپس آن را در معرض مقدار کافی از محلول سوبسترا قرار دهید. ظهور باندها معمولا ۱۵-۵ دقیقه طول می کشد. پس از ظهور باندها غشا را در آب مقطر زیاد بشویید. غشا را خشک کرده، در محل تاریک قرار دهید.

توجه شود که دی آمینوبنزیدین یک ماده بسیار سمی است. از تماس با آن خودداری کنید و در استفاده از آن دقت نمایید.

۱- بافر تریس نمکی با PH ۷,۵ (TBS). این بافر شامل تریس ۲۰ میلی مولار و کلرید سدیم ۱۵۰/۱۵۰ میلی مولار است.

۲- بافر تریس نمکی حاوی توئین ۰,۵٪. درصد (TBS-T). به هر لیتر از بافر تریس نمکی ۵/۵ میلی لیتر توئین - ۲۰ اضافه شود.

۳- آنتی بادی اولیه (سرم بیمار یا حیوان ایمن شده). در صورت لزوم با TBS-T رقیق می گردد.

۴- آنتی بادی ثانویه. این آنتی بادی ضد بخش ثابت آنتی بادی اول است و با آنزیم (پراکسیداز) کانژوگه شده است. رقت مورد نیاز از این آنتی بادی در TBS-T تهیه می شود.

۵- محلول سوبسترای آنزیم پراکسیداز شامل دی آمینوبنزیدین ۵/۵ میلی گرم در میلی لیتر و پراکسید هیدروژن ۱/۱۰ درصد در TBS است.

مواد آزمایش

مراحل کلی فرایند وسترن بلات

انتقال

مسدود نمودن نواحی متصل نشده بر روی غشا

انکوباسیون با آنتی بادی اولیه

شستشو

انکوباسیون با آنتی بادی ثانویه کانژوگه شده یا لیگاند

شستشو

ایجاد سیگنال بر اساس رنگ یا خاصیت لومینسانس

مشاهده و عکس برداری با ژل داکيومنت و آنالیز نتایج

نکات مهم تکنیک وسترن بلات

۱- اگر می خواهید تعداد زیادی از نمونه های سرم را بررسی کنید. برای صرفه جویی در زمان و مواد می توانید غشای نیتروسلولز یا PVDF را به صورت نوارهای طولی به عرض ۵/ سانتیمتر ببرید و هر نوار را برای بررسی یک نمونه سرم در لوله آزمایش جداگانه ای قرار دهید. برای انجام چنین کاری باید در هنگام الکتروفورز، نمونه گذاری در تمام عرض ژل متراکم کننده صورت گیرد.

بدان معنی که ژل متراکم کننده بدون قرار دادن شانه منعقد می شود و در سرتاسر سطح آن نمونه گذاری صورت می گیرد. نتیجه الکتروفورز در چنین حالتی وجود باندهای پیوسته پروتئین در تمام عرض ژل می باشد.

۲- تیتراکتی بادی های کانژوگه به عواملی همچون خلوص آنتی بادی و آنزیم، روش کانژوگه نمودن و خالص سازی و غلظت کانژوگه بستگی دارد. آنتی بادی کانژوگه را معمولا ۱۰۰۰-۱۰۰ بار رقیق می کنند و مورد استفاده قرار می دهند. رقت مناسب رقتی است که کنترل مثبت را به وضوح مشخص می سازد و حداقل واکنش با زمینه غشا داشته باشد.

۳- پراکسیداز پر استفاده ترین آنزیم در تهیه کانژوگه آنزیمی است. آلکالین فسفاتاز، گلوکز اکسیداز، اوره آز و پنیسیلیناز از دیگر آنزیم هایی هستند که با این هدف بکار می روند.

بالا بودن درصد ژل در الکتروفورز

راه حل: الکتروفورز در ژل نازک تر صورت گیرد.

احتباس حباب های هوا در حد فاصل ژل و غشا

راه حل: اجزای بلات کاملاً در بافر انتقال به تعادل برسند. بعد از افزودن هر لایه از مجموعه بلات حباب های هوا با لوله آزمایش (به عنوان وردنه) خارج گردد.

کم بودن زمان انتقال

راه حل: انتقال در ولتاژ پایین تر در طول شب انجام گیرد.

بالا بودن درصد متانول در بافر انتقال

راه حل: درصد متانول را به ۵-۱۰ درصد کاهش دهید.

بالا بودن غلظت دترجنت ها (مثلاً SDS)

راه حل: غلظت SDS در بافر انتقال را کاهش دهید.

کاهش دانسیته بار منفی در پروتئین ها

راه حل: بافر با PH بالاتر انتخاب گردد. مقدار کمی SDS نیز به آن اضافه گردد.

ضعیف بودن قابلیت اتصال غشا

راه حل: از غشای تعویض کننده یون یا غشای نایلون استفاده شود.

عدم وجود توین -۲۰ در بافرهای رقیق کننده و شوینده

راه حل: توین -۲۰ در غلظت ۰/۱-۰/۵ درصد به بافر اضافه گردد.

مسدودسازی ناقص (غلظت کم ماده مسدود کننده و یا زمان مسدودسازی)

راه حل: درصد ماده مسدود کننده و یا زمان مسدودسازی افزایش یابد.

نامناسب بودن پروتئین مسدودکننده (دارای ناخالصی های آنزیمی یا واکسن با آنتی بادی ها)

راه حل: نوع پروتئین مسدود کننده تغییر یابد یا از دترجنت ها استفاده شود.

بالا بودن غلظت اولیه آنتی بادی اولیه و یا ثانویه (کانژوگه)

راه حل: آنتی بادی ها در رقت های بالاتر مورد استفاده قرار می گیرند.

ناخالص بودن آنتی بادی ها و یا خراب شده کانژوگه ها

راه حل: از انواع خالص تر آنتی بادی استفاده شود. کانژوگه تازه تهیه گردد.

ناکافی بودن مراحل شستشو و یا طولانی نشدن مدت انکوباسیون غشا در سوبسترای آنزیم

راه حل: مراحل شستشو و بطور کامل و به دقت صورت گیرد. مرحله انکوباسیون غشا در سوبسترای آنزیم به مدت ۲۰-۵ دقیقه کافی است.

وجود زمینه بسیار تاریک در بلات

- بلاک شدن ناقص غشا
- افزودن غلظت مسدود کننده
- افزودن مدت زمان مرحله مسدود کردن
- افزایش دمای مرحله مسدود کردن
- استفاده از ماده مسدود کننده دیگر

آلودگی محلول مسدود کننده

- استفاده از یک پروتئین خالص مانند BSA یا کازئین به عنوان بلاک کننده
- از بافرهای بلاک کننده استفاده نکنید.

انکوباسیون با سوبسترا به مدت طولانی

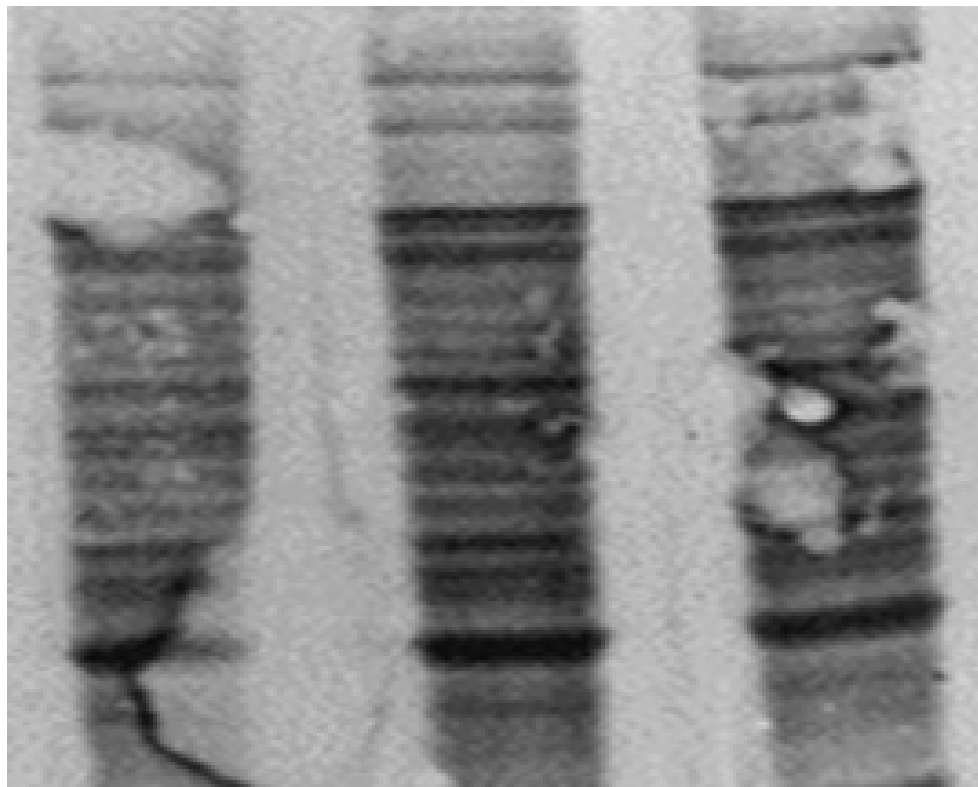
- مدت زمان انکوباسیون با سوبسترای تشخیصی کم شود.
- در صورتی که از ماده رنگ دار استفاده می شود، هنگامی که سطح نويز به سیگنال قابل قبول است بلات را از محلول سوبسترا بیرون آورده و در آب دیونیزه قرار دهید.

انکوباسیون با سوبسترا به مدت طولانی

- غلظت آنتی بادی اولیه و یا ثانویه را کاهش و یا تعدیل نمایید.
- از یک تست آزمایشی دات بلات استفاده نمایید تا غلظت های آنتی بادی بهینه گردد.
- مدت زمان انکوباسیون را کم نمایید.

لکه های نواحی سفید در بلاتینگ

لکه ها یا نواحی سفید در بلاتینگ ممکن است در اثر گیر افتادن حباب و یا نواحی خیس نشده غشا باشند که پروتئین به آنها متصل نخواهد شد. هر دو مورد را می توان با دقت رفع نمود



لکه های سفید در بلاتینگ

سرهم نمودن ناصحیح ساندویچ و سترن و یا گیر افتادن حباب هوا در آن

خشک شدن غشا در زمان گام های انکوباسیون بلاتینگ

- مطمئن شوید غشا کاملاً در هنگام شروع فرایند خیس شده است و نیز مطمئن شوید که بلات در هر مرحله خشک نمی شود.
- مطمئن شوید که غشا در زمان انکوباسیون و شستشو با بافرها کاملاً غوطه ور است.

اتصال آنتی بادی به پروتئین ها در بافر مسدود کننده

- استفاده از آنتی بادی تازه که در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شده است.

- در صورتی که قرار است برای مدت زمان خیلی طولانی از آنتی بادی استفاده شود، بهتر است که آن را در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگه داری کرد و آن را به بچ های خیلی کمی تقسیم نمود.

- از سیکل های فریز دفریز آنتی بادی خودداری شود.

پروتئین بیش از اندازه بارگیری شده است

- مقدار پروتئین بر روی ژل را کاهش دهید.
- غلظت SDS در بافر انتقالی را کاهش دهید.
- یک غشای دیگر اضافه کنید تا پروتئین اضافی به آن متصل گردد.

اتصال آنتی بادی به پروتئین ها در بافر مسدود کننده

- استفاده از مواد مسدود کننده دیگر، مثلاً: آلبومین، ژلاتین، BSA، کازئین و شیر خشک بدون چربی در هنگام استفاده از سیستم بیوتین آویدین از شیر به منظور بلاک نمودن غشاها استفاده نکنید. زیرا شیر حاوی بیوتین می باشد.

زمان ناکافی بین گام های انکوباسیون

- افزایش مدت زمان و تعداد گام های شستشو (حداقل ۵x۵ دقیقه)
- از مقادیر بیشتر بافر شستشو استفاده کنید.

دمای انکوباسیون خیلی بالا

استفاده از دمای انکوباسیون پایین تر

در صورتی که کاغذ PVDF دارای پس زمینه بیشتری نسبت به نیتروسلولز است، از نیتروسلولز استفاده کنید.

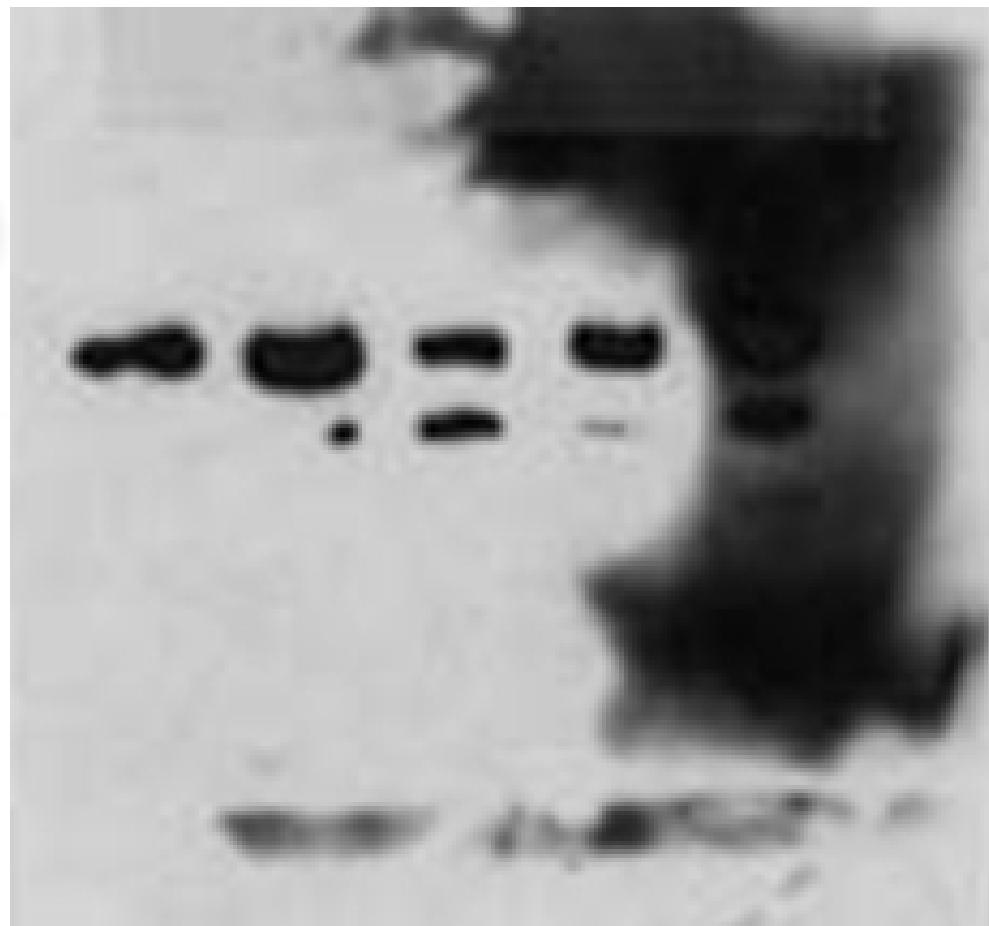
پس زمینه لکه لکه

این مشکل می تواند ناشی از غشای خشک و یا شست شوی ناکافی باشد. هر دو مساله به راحتی قابل حل هستند اگر بلات را کاملا و در تمام مدت غوطه ور نگه داشت. باید در جابجایی دقت بیشتری شود تا از چنین آلودگی در آزمایشگاه ها جلوگیری شود.

در صورتی که بافر آلوده است

■ از بافر تازه استفاده کنید .

■ همه بافرها را قبل از استفاده با فیلتر ۰.۲ میکرومتری فیلتر نمایید.



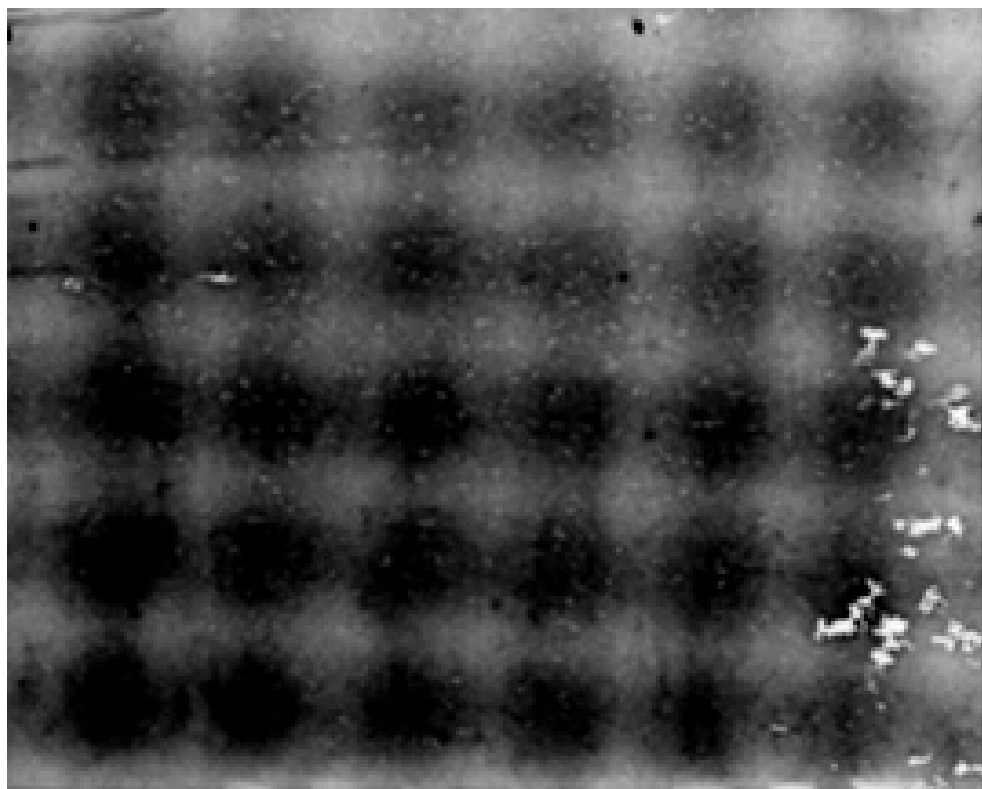
پس زمینه لکه لکه

انتقال کاست های ژل بر روی بلات

■ استفاده از پدهای فیبری باریک و یا آلوده

■ مقادیر اضافی از پروتئین بر روی ژل بارگیری شدند و یا SDS خیلی زیادی در بافر Loading استفاده شده است.

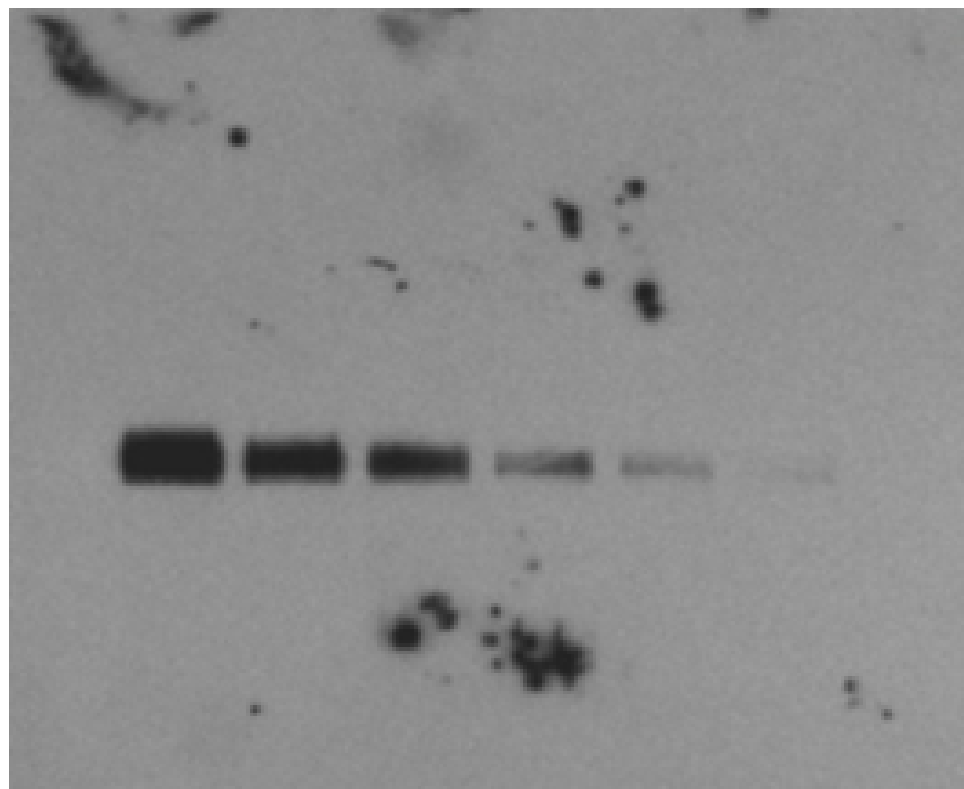
■ بافر انتقال آلوده است.



انتقال شکل کاست ها بر روی بلات

نقاط ناهموار بر روی بلات و یا پس زمینه خالدار

پس زمینه خالدار و لکه ای می تواند به دلیل اتصال یک جسم خارجی به غشا، تجمع آنتی بادی، اسکنر کثیف و یا سطوح کثیف کاست های وسترن بلات باشد.



نقاط ناهموار بر روی بلات

برای دریافت آخرین خدمات و اطلاعات پشتیبانی، به آدرس اینترنتی زیر مراجعه کنید

ویدیوهای آموزشی

پشتیبانی فنی

سؤالات متداول

فکس



اسکن کنید

www.Denagene.com

خدمات فروش

شماره تماس