شرکت مهندسی پزشکی

دنا ژن تجهیز

تلفن : 02166840435- 02166381730

فکس: 02166381730

موبایل:09120351457-09120757486

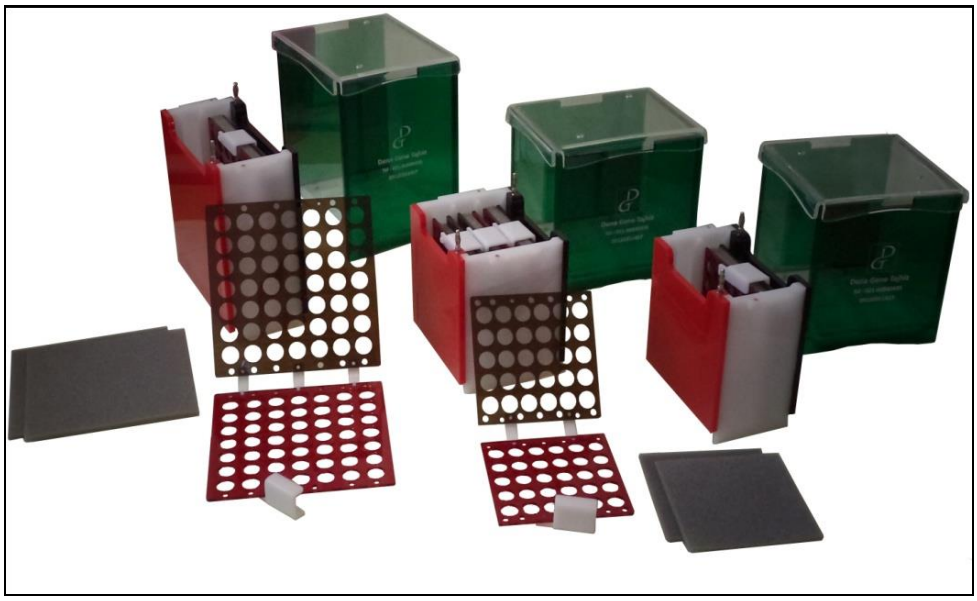
وبسایت: www.denagene.com

ایمیل: denagenetajhiz@gmail.com

آدرس شرکت: تهران- خیابان کارگر شمالی- خیابان هیئت-پلاک 15- پارک علم و فناوری دانشگاه تربیت مدرس- بخش سلامت و پزشکی

راهنمای دستگاه وسترن‌بلات

Manual for Western Blotting Unit



این راهنمای استفاده برای همه دستگاه‌های وسترن‌بلات شرکت دنا ژن تجهیز قابل استفاده می‌باشد.

فهرست

مقدمه 4
هشدارهای ایمنی 4
دستور العمل‌های نگهداری دستگاه..... 4
مشخصات فنی 5
ویژگی‌های دستگاه..... 5
تکنیک بلاتینگ 5
روش‌های انتقال پروتئین..... 6
غشاهای مورد استفاده در بلاتینگ 7
روش انتقال در تانک 7
مواد لازم جهت انجام تکنیک ایمونوبلات 8
روش آزمایش 8
انتخاب بافر در الکتروبلات 9
رنگ آمیزی عمومی پروتئین‌ها در غشا 9
رنگ آمیزی قابل برگشت با پانسو- اس 10
رنگ آمیزی قابل برگشت با آمیدوبلک 10
رنگ آمیزی غیر قابل بازگشت با کوماسی بلو 10
رنگآمیزی غیر قابل برگشت با آمیدوبلک 11
رنگ آمیزی مارکرهای پروتئینی 11
تشخیص اختصاصی پروتئین‌ها در غشا 11
تکنیک وسترن‌بلاتینگ..... 11
مرحله مسدودسازی 12
تشخیص با آنتی‌بادی 13
مواد 13
روش آزمایش 14
نکات مهم تکنیک وسترن‌بلات 14
مشکلات احتمالی تکنیک وسترن‌بلات و راه حل 15

مقدمه

با پیشرفت چشم‌گیری که علوم سلولی و مولکولی در حال تجربه‌کردن می‌باشد، نیاز کشورمان نیز به این علم و فراورده-های آن روز به روز در حال افزایش می‌باشد. شرکت دنا ژن‌تجهیز نیز توانسته است با تولید محصولاتی اساسی در این بخش، نیاز محققین میهن‌مان به تجهیزات و محصولات خارجی را هرچند اندک، مرتفع نمایند.

ضمن تشکر از انتخاب تانک‌های وسترن‌بلات شرکت دناژن‌تجهیز، به اطلاع می‌رساند تانک‌های وسترن‌بلات شرکت دنا-ژن‌تجهیز با مطالعه عمیق بهترین برندهای معتبر تولیدکننده در دنیا و همچنین نیازهای محققین و متخصصین کشور، توانسته است با استفاده از مرغوب‌ترین مواد اولیه بهترین محصول را در خدمت محققین و متخصصین کشورمان قرار دهد. کلیه محصولات دناژن‌تجهیز قبل از تحویل به مشتری تحت کنترل کیفی و آزمون‌های سلامتی کامل قرار می‌گیرند. امید است با ساخت تولیدات با کیفیت، دنا ژن بتواند رضایت مشتریان خود را جلب نماید.

هشدارهای ایمنی

- قبل از هرگونه استفاده دستگاه، دستورالعمل استفاده از آن را مطالعه کنید.
- اکریل‌آمید ماده‌ای فرار، جهش‌زا و نیز سرطان‌زا می‌باشد. در هنگام کار با آن، پوشش مناسب داشته باشید.
- ولتاژ بیشتر از حداکثر ولتاژ عملکردی دستگاه وسترن‌بلات به آن اعمال ننمایید.
- از منبع تغذیه نامناسب جهت تامین جریان و ولتاژ استفاده نشود. توصیه می‌شود از پاورسوپلای 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.

دستور العمل های نگهداری دستگاه

- به منظور جداسازی safety lid، انگشت‌های شست را با قراردادن بر روی گوشک‌های 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، هیدروکربن‌های هالوژنه، کتون‌ها، استرها، الکل‌ها(بالای25 ٪) و اسیدها (بالای25 ٪) مقاوم نمی‌باشد؛ این مواد موجب خوردگی تانک خواهند شد. از این رو توصیه می‌شود از آنها جهت تمیز نمودن دستگاه استفاده نشود.
- قبل از استفاده و به صورت ماهانه، دستگاه را در محل‌های به هم اتصال یافته جهت هر گونه نشتی چک نمایید. برای این کار دستگاه را در یک ورقه کاغذی پیچانده و سپس با آب مقطر تا محل حداکثر ظرفیت پرنمایید. هرگونه نشتی بر روی کاغذ قابل مشاهده خواهد بود. در صورت وجود هرگونه نشتی، سعی در تعمیر نمودن آن ننمایید و در اسرع وقت دنا-ژن‌تجهیز را مطلع نمایید.

❖ محل الکترودهای پلاتینی معمولا جهت محافظت به طور نسبی پوشیده شده‌اند. در هنگام تمیز نمودن تانک از براش‌های تمیزکننده در ناحیه الکترود استفاده ننمایید. معمولا کر دادن با آب مقطر کافی می‌باشد.

مشخصات فنی

مشخصات فنی وسترن بلاتینگ		
مدل	WD 10x10	WD 15x15
تعداد ژل	2 ژل با ابعاد 10x10 سانتیمتر	2 ژل با ابعاد 15x15 سانتیمتر
میزان بافر	1000 ml	2000 ml
تنظیمات پاور برای حالت روتین	30 V/ 100 mA overnight	30 V/ 100 mA overnight
حداکثر دما	45 °C	45 °C
حداکثر رطوبت	Up to 80 %	Up to 80 %
سیستم سیرکولاسیون	دارد	دارد

شکل 1. مشخصات فنی انواع مدل دستگاه وسترن بلات

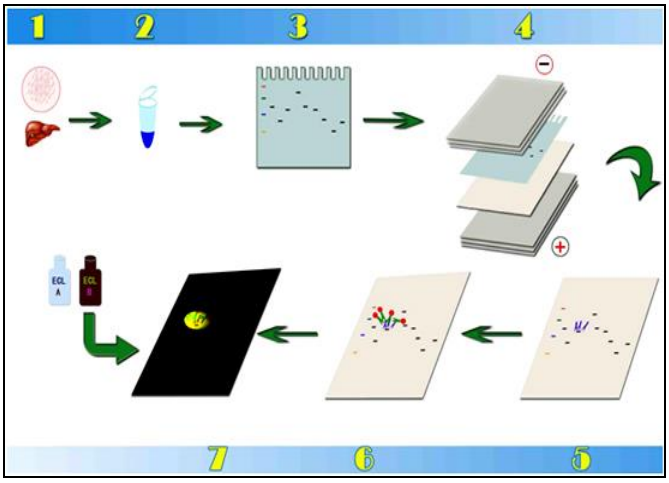
ویژگی‌های دستگاه

دستگاه وسترن بلات ساخت دناژن‌تجهیز با مطالعه دقیق بهترین مدل‌های 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 می‌شود.

تکنیک بلاتینگ

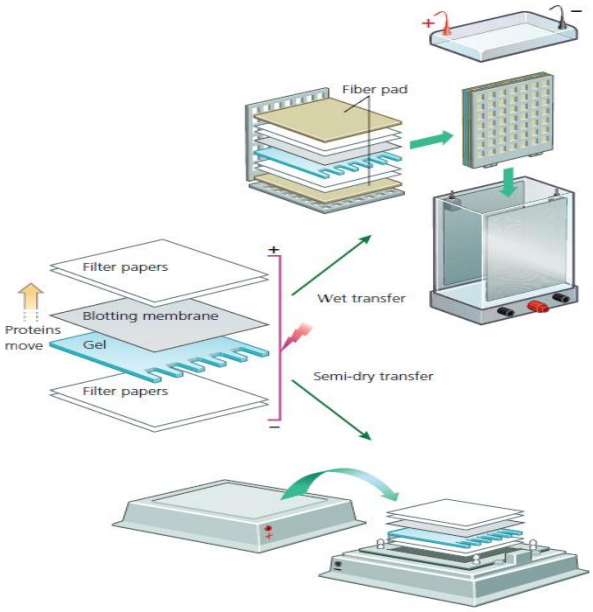
در این تکنیک باندهای پروتئینی از ژل به غشایی مانند نیتروسلولز که قابلیت اتصال و تثبیت پروتئین‌ها را دارد، منتقل می‌شوند. در عمل بلاتینگ مولکول‌های پروتئین از زمینه ژل خارج می‌شوند و در سطح غشا در همان موقعیت قرار می‌گیرند. از این رو به سادگی و با مقدار کمتری از مواد می‌توان به مطالعه آنها پرداخت، یا آنها را جدا نمود و مورد استفاده قرار داد. به منظور تشخیص پروتئین‌ها یا آنزیم‌های منتقل شده به غشا می‌توان از لیگاندهای اختصاصی یا سوبستراهای مربوطه استفاده کرد. آنتی‌بادی‌ها از متداول‌ترین موادی هستند که برای تشخیص اختصاصی پروتئین‌ها در غشا بکار می‌روند. از همین رو چنین روش‌هایی به ایمونوبلاتینگ معروفند.



شکل 2. مراحل کامل شناسایی پروتئین با استفاده از تکنیک بلاتینگ

روش‌های انتقال پروتئین

در اغلب موارد انتقال پروتئین از ژل به غشا با کمک نیـروی الکتریکـی صـورت مـی‌گیـرد. ایـن نـوع انتقـال بـه انتقـال الکتروفورزی معروف است. انتقال الکتروفورزی به دو صورت انجام می‌شود: انتقال در تانک که به انتقال تـر[1] معـروف اسـت و انتقال به روش نیمه خشک[2].



شکل 3. روش‌های اصلی انتقال پروتئین از ژل به کاغذ

البته می‌توان به طریق انتشار با خاصیت مویینگی یا پمپ خلا نیز پروتئین‌ها را انتقال داد.

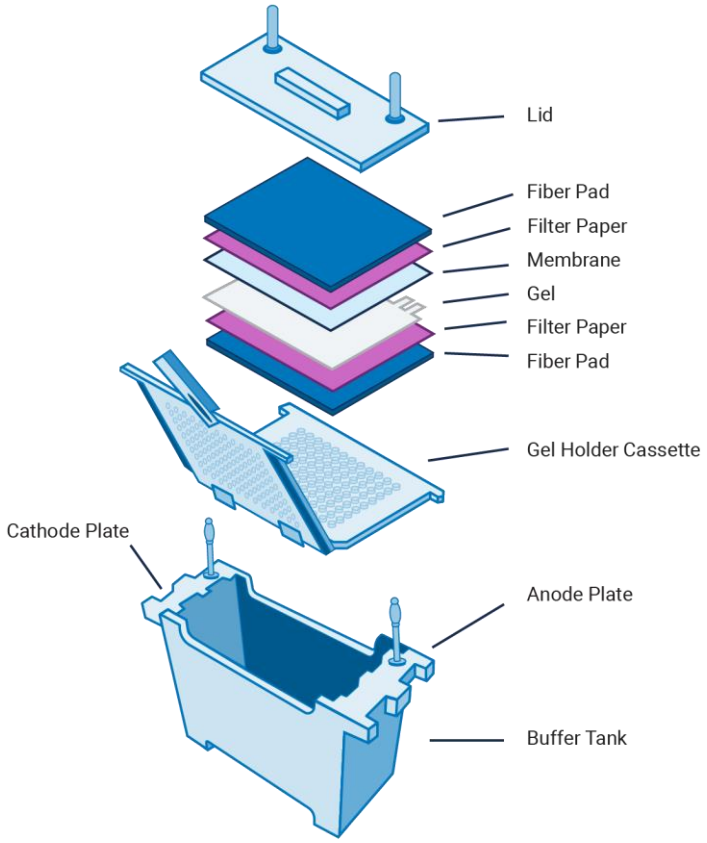
[1] Wet transfer
[2] Semi-dry transfer

غشاهای مورد استفاده در بلاتینگ

در عمل بلاتینگ معمولا از غشاهای نیتروسلولزی و یا پلی وینیلیدن دی‌فلورید (PVDF) استفاده می‌کنند. این دو غشا ظرفیت خوبی در اتصال به پروتئین‌ها دارند. نیتروسلولز ارزان‌تر است ولی ظرفیت مکانیکی کمی دارد و شکننده می‌باشد. اندازه منافذ نیتروسلولز بین 0/05 تا 0/45 میکرون متغیر می‌باشند. هرچه اندازه منافذ یک غشا کوچک‌تر 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 می‌روند. غشاهای نایلونی از ظرفیت و توان مکانیکی بالایی برخوردارند، اما بر خلاف سایر غشاها بار مثبت دارند. از این رو اغلب رنگ‌های آنیونی که برای پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرند، به آنها متصل می‌شوند. در مواردی که جداسازی پروتئین خاصی از غشا مورد نظر باشد، استفاده از غشاهای تعویض یون برای بلاتینگ مناسب می‌باشد. برای این کار قسمتی از غشا که حاوی پروتئین مورد نظر است، جدا می‌شود. سپس با قرار دادن قسمت جدا شده در بافر با PH یا قدرت یونی متفاوت، پروتئین آزاد می‌شود.

روش انتقال در تانک

روش انتقال در تانک شکل پایه‌ای انتقال به کمک الکتروفورز می‌باشد. بدین لحاظ غالبا این روش را معادل الکتروبلاتینگ می‌دانند. تصویر کلی این روش در شکل زیر آمده است.



شکل 4. شماتیک کلی روش انتقال تر در تانک وسترن بلات. کاست ژل و غشا را کنار هم نگه می‌دارد. کاغذهای صافی و پدهای آنها در دو طرف ژل به صورت کامل با ژل تماس دارند. نهایتا کاست ژل به صورت عمودی در تانک قرار می‌گیرد.

معمولا انتقال در تانک در بافر تریس-گلیسین انجام می‌گیرد. این بافر برای جداسازی انواعی از پروتئین‌ها که به روش SDS-PAGE جداشده‌اند مناسب است. وجود متانول در این بافر برای جلوگیری از تورم ژل، جداسازی SDS از پروتئین‌ها و

بالا بردن ظرفیت اتصال به غشا است. اما، متانول بخصوص در غلظت‌های بالا از عوامل بازدارنده انتقال پروتئین ها محسوب می‌شود. در بعضی موراد به منظور افزایش حلالیت پروتئین‌ها مقداری دترجنت (به عنوان مثال SDS با غلظت 0/02 درصد) به این بافر می‌افزایند. به هر حال باید توجه داشت که دترجنت‌ها به خصوص در غلظت‌های بالا از اتصال پروتئین‌ها به غشا جلوگیری می‌نمایند.

مواد لازم جهت انجام تکنیک ایمونوبلات

1- غشای نیتروسلولز با اندازه منافذ 0/45 میکرومتر یا غشای ایموبیلون (PVDF)

2- بافر انتقال حاوی تریس 25 میلی‌مولار، گلیسین 192 میلی‌مولار و متانول 15 درصد. برای تهیه آن 6 گرم تریس باز و 28/8 گرم گلیسین را در حدود یک لیتر آب مقطر حل کنید. سپس 200 میلی‌لیتر متانول اضافه کنید، حجم نهایی را با آب مقطر به 2 لیتر برسانید (PH این محلول حدود 8/3 است و نیازی به تنظیم ندارد). بافر را در یخچال قرار دهید تا قبل از استفاده خنک گردد، چون حل شدن متانول در آب گرمازاست.

3- کاغذ واتمن یا کاغذ الکتروفورز

روش آزمایش

1- مقداری از بافر تانک را در یک ظرف پلاستیکی یا شیشه‌ای تمیز بریزید. ژل را پس از بریدن بخش متراکم کننده آن حداقل 10 دقیقه در بافر قرار دهید.

2- 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 اسفنج‌ها 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 می‌باشد. بعد از گذاشتن هر لایه، حباب‌های هوای احتمالی را با یک میله شیشه‌ای یا لوله آزمایش از حد فاصل لایه‌ها خارج کنید.

شکل 5. انتقال به روش تر

3- مجموعه بلات را در قاب پلاستیکی مربوطه محکم کنید و در تانک بلات که تا ارتفاع مناسب با بافر پر شده است، قرار دهید. سپس به مدت 1-4 ساعت در شدت جریان 200-400 میلی آمپر الکتروفورز نمایید.

انتخاب بافر در الکتروبلات

انتخاب بافر و استفاده از متانول در بافر بستگی به نوع پروتئین‌های مورد مطالعه، شرایط ژل، نوع الکتروفورز و نوع غشا دارد. همان‌گونه که قبلا ذکر شد، بافر تریس-گلیسین برای انتقال اغلب پروتئین‌ها مناسب می‌باشد. پروتئین‌ها در این بافر معمولا بار منفی دارند و به طرف آند حرکت می‌کنند. اتصال SDS به پروتئین‌ها (برای مثال در SDS-PAGE) نیز به تشدید بار منفی و حرکت آنها کمک می‌کند. با این حال در بعضی موارد تغییر شرایط بافر تریس-گلیسین یا انتخاب بافر دیگر می‌تواند انتقال را تسهیل نماید. به عنوان مثال، تجربه نشان می‌دهد که با حذف متانول در بافر تریس-گلیسین انتقال گلیکوپروتئین‌های بزرگ به راحتی صورت می‌گیرد. متانول با زدودن SDS از پروتئین‌ها و جمع‌کردن ژل باعث کاهش انتقال این مولکول‌ها می‌شود. SDS یک دترجنت آنیونی است و در انتقال پروتئین‌ها (خصوصا پروتئین‌های با بار خالص مثبت) تاثیرگذار می‌باشد. بنابراین در صورت نیاز، علاوه بر حذف متانول، می‌توان درصد بسیار کمی از آن را وارد بافر کرد.

انتقال در بافر CAPS[3] 50 میلی مولار سریعتر صورت می‌گیرد و با تولید گرمای کمتری همراه است. بدین لحاظ در صورت لزوم می‌توان از این بافر به جای تریس-گلیسین استفاده کرد. در حالاتی که بلاتینگ به هدف تعیین توالی اسیدهای آمینه در پروتئین‌ها صورت می‌گیرد، بافر CAPS مناسب‌تر است؛ زیرا حضور گلیسین در بافر موجب اختلال در تعیین توالی پروتئین‌ها می‌شود.

بافر بورات سدیم 10 میلی‌مولار با PH=9.2 برای انتقال گلیکوپروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و لیپوپلی‌ساکاریدها توصیه می‌شود. در این بافر، بورات به واحدهای قندی مواد فوق متصل می‌شود و به آنها بار منفی می‌دهد.

پروتئین‌های بازی که در شرایط اسیدی الکتروفورز می‌شوند، یا پروتئین‌هایی که با تکنیک ایزوالکتروفوکوسینگ جدا می‌شوند، را می‌توان در محلول اسیداستیک 0/7 درصد به غشا انتقال داد. در این شرایط پروتئین‌ها بار مثبت دارند و به طرف قطب منفی حرکت می‌کنند.

رنگ آمیزی عمومی پروتئین‌ها در غشا

ماده رنگ آمیزی	حساسیت (میکروگرم در باند)	نوع غشا
فاست گرین FG	>1/5	نیتروسلولز، PVDF
پانسو-اس	>1/5	نیتروسلولز، PVDF
کوماسی آبی R-250	1/5	PVDF
آمیدوبلک 10B	1/5	نیتروسلولز، PVDF
جوهر هندی	0/1	نیتروسلولز، PVDF
آهن کلوئیدی	0/03	نیتروسلولز، PVDF و نایلون
بیوتین و آویدین- پراکسیداز	0/03	نیتروسلولز، PVDF و نایلون
طلای کلوئیدی	0/004	نیتروسلولز، PVDF

شکل 6. موادی که برای رنگ‌آمیزی عمومی پروتئین‌ها در غشا بکار می‌روند.

[3] Cyclohexylamine) -1-propane sulfonic acid

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

برای این کار می‌توان غشای نیتروسلولز یا PVDF را با مواد مختلف رنگ‌آمیزی نمود. رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها بسته به هدف آزمایش ممکن است به صورت قابل برگشت و یا غیر قابل برگشت باشد. پانسو-اس، جوهرهندی، آمیدوبلک و کوماسی آبی از مواد متداول برای رنگ‌آمیزی عمومی پروتئین‌ها در غشا هستند. رنگ‌آمیزی ژل نیز کامل یا ناقص‌بودن انتقال پروتئین‌ها را نشان می‌دهد. باندهای پروتئین در ژل و غشا دقیقا هم موقعیت نمی‌باشند، زیرا ژل در طی متعادل‌سازی در محلول انتقال به دلیل وجود متانول، مقداری کوچک می‌شود.

رنگ آمیزی قابل برگشت با پانسو- اس

محلول رنگ‌آمیزی شامل پانسو-اس 0/1 درصد وزنی- حجمی در اسید استیک 5 درصد حجمی -حجمی است. محلول آماده آن نیز توسط شرکت‌های مختلفی عرضه می‌شود. برای رنگ آمیزی غشا را به مدت 5-10 دقیقه در مقدار کافی محلول رنگ قرار دهید. سپس با آب مقطر بشویید تا زمینه غشا بی‌رنگ گردد.

باندهای پروتئینی بعد از رنگ آمیزی به رنگ قرمز در می‌آیند. اگر شستشو با آب ادامه یابد، باندها نیز بی رنگ می-گردند. رنگ آمیزی با پانسو-اس دخالتی در تشخیص باندها به روش اختصاصی (مثلا ایمونوبلاتینگ) یا در تعیین توالی اسیدآمینه ها ندارد. حساسیت این روش نسبتا پایین می‌باشد.

رنگ آمیزی قابل برگشت با آمیدوبلک

محلول رنگ آمیزی شامل آمیدوبلک با غلظت 0/01 درصد وزنی –حجمی در آب مقطر می‌باشد. برای رنگ‌آمیزی، غشا را 20-30 دقیقه در مقدار کافی محلول رنگ قرار دهید. سپس با آب بشویید تا زمینه غشا بی‌رنگ گردد. رنگ باندهای پروتئینی به تدریج ضعیف و بالاخره ناپدید می‌شود.

رنگ آمیزی غیر قابل بازگشت با کوماسی بلو

محلول رنگ‌آمیزی شامل کوماسی بلو R-250 با غلظت 0/1 درصد وزنی حجمی در محلول اسید استیک 7 درصد حجمی-حجمی و متانول 50 درصد حجمی-حجمی در آب مقطر است.

محلول رنگ بر شامل اسیداستیک 7 درصد و متانول 50 درصد در آب مقطر است. رنگ آمیزی ژل با کوماسی بلو نیز با همین محلول‌ها صورت می‌گیرد.

غشا را 15 دقیقه در مقدار کافی محلول رنگ قرار دهید. محلول رنگ را تخلیه کرده، غشا را در محلول رنگ بر بشویید تا زمینه آبی آن بی‌رنگ گردد. سپس غشا را در آب مقطر بشویید.

کوماسی بلو برای رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها در PVDF مناسب است. این نوع رنگ را برای رنگ آمیزی نیتروسلولز بکار نبرید. زیرا زمینه آن شدیدا رنگی می‌شود.

رنگ‌آمیزی غیر قابل برگشت با آمیدوبلک

محلول رنگ‌آمیزی شامل آمیدوبلک آمیدوبلک 0/5 درصد وزنی حجمی، اسید استیک 5 درصد حجمی-حجمی و متانول 50 درصد حجمی-حجمی در آب مقطر است.

محلول رنگ‌بر شامل اسید استیک 5 درصد و متانول 50 درصد در آب مقطر است.

غشا را 5 دقیقه در محلول رنگ بر قرار دهید. محلول رنگ‌آمیزی را تخلیه کنید و غشا را با محلول رنگ‌بر بشویید تا زمینه آبی رنگ شود.

رنگ آمیزی مارکرهای پروتئینی

تعیین برخی از خصوصیات پروتئین‌ها همچون اندازه یا نقطه ایزوالکتریک (PI) با استفاده از مارکرهای پروتئینی صورت می‌گیرد. برای تشخیص مارکرها در غشا می‌توان از روش‌های زیر کمک بگیرید.

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

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

3- می‌توان 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 آنتی‌آویدین-پراکسیداز می‌توان موقعیت مارکرها را مشخص نمود.

4- آلبومین مرغی و آلبومین گاوی از پروتئین‌هایی هستند که در بسیاری از انواع مارکرها وجود دارند. با در اختیار داشتن آنتی‌بادی ضد این دو پروتئین به صورت کانژوگه با آنزیم (یا آنتی‌بادی ضد آنها و آنتی‌بادی ثانویه کانژوگه) می‌توان موقعیت آنها را در غشا تعیین ساخت. این روش زمانی قابل اجرا است که از این پروتئین‌ها به عنوان ماده مسدودکننده در غشا استفاده نشود.

تشخیص اختصاصی پروتئین‌ها در غشا

تشخیص یا رنگ‌آمیزی اختصاصی باندهای پروتئینی در غشا، بر پایه واکنش آنها با لیگاندهای اختصاصی صورت می-گیرد. برای انجام این کار مولکول‌های لیگاند را به طور مستقیم (اولیه) و یا غیرمستقیم (ثانویه) با مواد رادیواکتیو، فلورسانس، مواد رنگی یا آنزیم‌ها نشان دار 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. اساس روش ایمونوبلاتینگ که اهمیت آن بر محققین علوم زیستی آشکار است، موید چنین ادعایی است.

تکنیک وسترن‌بلاتینگ

این روش که به ایمونوبلات نیز معروف است بر پایه واکنش اولیه آنتی‌بادی-آنتی‌ژن می‌باشد. در این روش پس از بلاتینگ پروتئین‌ها، ابتدا مناطق آزاد غشا مسدود می‌شود (مرحله بلوکه کردن). سپس شرایط واکنش‌آنتی‌بادی (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 وسترن‌بلاتینگ 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 مسدودسازی

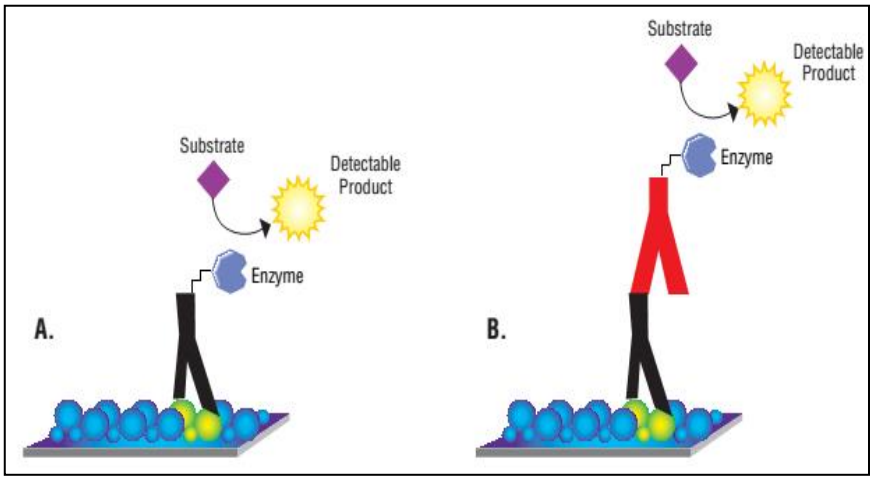
غشاهای مورد استفاده در بلاتینگ ظرفیت زیادی برای گرفتن پروتئین‌ها دارند (برای مثال 100 میکروگرم در هر سانتی‌متر مربع از غشای نیتروسلولز) دارند. این خصوصیت اگرچه در جای خود بسیار مطلوب است ولی با اتصال غیر اختصاصی پروتئین‌های نشان‌دار در مراحل بعدی آزمایش به بروز اختلال در تشخیص منجر می‌شود. از این رو باید مناطق آزاد غشا قبل از مراحل تشخیص مسدود گردد. بهترین راه مسدودکردن این مناطق آزاد استفاده از پروتئین‌هایی است که خود با مواد نشان‌دار (مثل آنتی‌بادی) واکنش نمی‌دهد. کم هزینه بودن و سهولت تهیه از معیارهای اصلی انتخاب پروتئین مسدود کننده است. در جدول زیر نام و غلظت کاری تعدادی از پروتئین‌های مسدودکننده آمده است. دترجنت‌ها نیز می‌توانند از اتصال پروتئین‌ها به غشا جلوگیری کنند. توین-20 معمول‌ترین دترجنت مورد استفاده در این کار است. باید این نکته را توجه کرد که توین -20 در غلظت‌های بالا (بیش از نیم درصد) در پاره‌ای موارد از اتصال لیگاند به پروتئین نیز جلوگیری می‌کند.

ماده مسدود کننده	توضیحات
آلبومین سرم گاو	در غلظت 2-5 درصد در بافر (معمولا PBS) برای 1-2 ساعت بکار می‌رود. برای مسدود کردن نایلون غلظت 10 درصد آن به مدت 12-16 ساعت لازم است.
شیر خشک بدون چربی	در غلظت 3 درصد بکار می‌رود. بسیار ارزان است. بدلیل محتوای قندی زیاد از اتصال لکتین‌ها یا آنتی بادی‌های ضد کربوهیدرات (به عنوان مولکول های نشان دار) جلوگیری می‌نماید
آلبومین مرغ	در غلظت 1 درصد بکار می‌رود.
ژلاتین	در غلظت 0/3-3 درصد بکار می‌رود. ژلاتین ماهی خصوصیات مناسب‌تری نسبت به ژلاتین پستانداران به عنوان ماده مسدودکننده دارد.
دترجنت (توین-20)	غلظت بین 0/05-0/1 درصد آن کافی است. راحت و کم هزینه است. از واکنش‌های غیراختصاصی بین پروتئین‌ها نیز جلوگیری می‌کند.

شکل 7. انواع مسدودکننده مورد استفاده در بلاتینگ

تشخیص با آنتی‌بادی

پس از بلاتینگ پروتئین‌ها و بلوکه کردن غشا، مرحله تشخیص اختصاصی را می‌توان انجام داد. همان‌گونه که قبلا نیز گفته شد ایمونوبلاتینگ در بسیاری از موارد به هدف تشخیص طبی است. در این موارد باندهای انتقال یافته شامل همه یا بخشی از پروتئین‌های پیکره میکروب (باکتری، ویروس یا قارچ) است که وجود یا عدم وجود آنتی‌بادی ضد سرم آنها در سرم انسان یا حیوان بررسی می‌گردد. شناسایی با استفاده از آنتی‌بادی‌ها مانند تکنیک الایزا به دو روش صورت می‌گیرد: مستقیم و غیر مستقیم. در تکنیک مستقیم آنتی‌بادی اولیه که جهت تشخیص آنتی‌ژن مورد استفاده قرار می‌گیرد، با استفاده از یک آنزیم و یا رنگ فلوئورسنت نشان‌دار شده است. اما در تکنیک غیرمستقیم، ابتدا یک آنتی‌بادی اولیه به منظور اتصال به آنتی-ژن افزوده می‌شود. سپس آنتی‌بادی ثانویه که به صورت نشان‌دار شده است، افزوده می‌شود. مولکول بیوتین جهت اتصال استفاده می‌شود و پروب‌های فلوئورسنتی مانند فلوئورسئین و یا رودآمین و کانژوگه‌های آنزیمی مانند HRP یا آلکالین فسفاتاز برای شناسایی و تولید سیگنال مورد استفاده قرار می‌گیرند. شکل زیر اصول کلی این دو نوع تکنیک ایمونوبلاتینگ را نشان می‌دهد.



شکل 8. روش‌های مختلف شناسایی با استفاده از آنتی‌بادی. در قسمت A به صورت مستقیم پروتئین هدف تشخیص داده می‌شود. در قسمت B به صورت غیر مستقیم مولکول هدف شناسایی می‌شود.

مواد

1- بافر تریس نمکی با PH 7.5 (TBS). این بافر شامل تریس 20 میلی‌مولار و کلریدسدیم 0/15 مولار است.

2- بافر تریس نمکی حاوی توین 0/05 درصد (TBS-T). به هر لیتر از بافر تریس نمکی 0/5 میلی‌لیتر توین- 20 اضافه شود.

3- آنتی‌بادی اولیه (سرم بیمار یا حیوان ایمن شده). در صورت لزوم با TBS-T رقیق می‌گردد.

4- آنتی‌بادی ثانویه . این آنتی‌بادی ضد بخش ثابت آنتی‌بادی اول است و با آنزیم (پراکسیداز) کونژوگه شده است. رقت مورد نیاز از این آنتی‌بادی در TBS-T تهیه می‌شود.

5- محلول سوبسترای آنزیم پراکسیداز شامل دی آمینو بنزیدین 0/5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر و پراکسید هیدروژن 0/1 درصد در TBS است.

روش آزمایش

1- پس از مرحله مسدودسازی، غشا را 3 بار، هربار 5 دقیقه در TBS-T بشویید. سپس 1-2 ساعت در آنتی‌بادی اول قرار دهید.

2- غشا را 4 بار هر بار 5 دقیقه در TBS-T بشویید. سپس 1-2 ساعت در آنتی‌بادی ثانویه (آنتی بادی کانژوگه با پراکسیداز) قرار دهید.

3- غشا را 4 بار هر بار 5 دقیقه در TBS-T بشویید. سپس آن را در معرض مقدار کافی از محلول سوبسترا قرار دهید. ظهور باندها معمولا 5-15 دقیقه طول می‌کشد. 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.

شکل 9. مراحل کلی فرایند وسترن بلات

نکات مهم تکنیک وسترن‌بلات

1- اگر می‌خواهید تعداد زیادی از نمونه های سرم را بررسی کنید. برای صرفه‌جویی در زمان و مواد می‌توانید غشای نیتروسلولز یا PVDF را به صورت نوارهای طولی به عرض 0/5 سانتیمتر ببرید و هر نواری را برای بررسی یک نمونه سرم در لوله آزمایش جداگانه‌ای قرار دهید. برای انجام چنین کاری باید در هنگام الکتروفورز، نمونه‌گذاری در تمام عرض ژل متراکم-کننده صورت گیرد. بدان معنی که ژل متراکم کننده بدون قرار دادن شانه منعقد می‌شود و در سرتاسر سطح آن نمونه گذاری صورت می‌گیرد. نتیجه الکتروفورز در چنین حالتی وجود باندهای پیوسته پروتئین در تمام عرض ژل می‌باشد.

2- تیتر آنتی‌بادی‌های کانژوگه به عواملی همچون خلوص آنتی‌بادی و آنزیم، روش کانژوگه نمودن و خالص‌سازی و غلظت کانژوگه بستگی دارد. آنتی‌بادی کانژوگه را معمولا 1000-10000 بار رقیق می‌کنند و مورد استفاده قرار می‌دهند. رقت مناسب رقتی است که کنترل مثبت را به وضوح مشخص می‌سازد و حداقل واکنش با زمینه غشا داشته باشد.

3- پراکسیداز پر استفاده‌ترین آنزیم در تهیه کانژوگه آنزیمی است. آلکالین فسفاتاز، گلوکز اکسیداز، اوره آز و پنیسیلیناز از دیگر آنزیم‌هایی هستند که با این هدف بکار می‌روند.

مشکلات احتمالی تکنیک وسترن‌بلات و راه حل

مشکل: انتقال ضعیف پروتئین‌ها در بلاتینگ

دلیل: بالا بودن درصد ژل در الکتروفورز

راه‌حل: الکتروفورز در ژل نازک تر صورت گیرد.

دلیل: احتباس حباب‌های هوا در حد فاصل ژل و غشا

راه‌حل: اجزای بلات کاملا در بافر انتقال به تعادل برسند. بعد از افزودن هر لایه از مجموعه بلات حباب‌های هوا با لوله آزمایش (به عنوان وردنه) خارج گردد.

دلیل: کم بودن زمان انتقال

راه‌حل: انتقال در ولتاژ پایین‌تر در طول شب انجام گیرد.

دلیل: بالا بودن درصد متانول در بافر انتقال

راه‌حل: درصد متانول را به 5-10 درصد کاهش دهید.

دلیل: بالا بودن غلظت دترجنت‌ها (مثلا SDS)

راه‌حل: غلظت SDS در بافر انتقال را کاهش دهید.

دلیل: کاهش دانسیته بار منفی در پروتئین‌ها

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

دلیل: ضعیف بودن قابلیت اتصال غشا

راه‌حل: از غشای تعویض‌کننده یون یا غشای نایلون استفاده شود.

مشکل: رنگی شدن زمینه غشا در وسترن بلات

دلیل: عدم وجود توین -20 در بافرهای رقیق کننده و شوینده

راه‌حل: توین-20 در غلظت 0/1-0/05 درصد به بافر اضافه گردد.

دلیل: مسدودسازی ناقص (غلظت کم ماده مسدودکننده و یا زمان مسدودسازی)

راه‌حل: درصد ماده مسدودکننده و یا زمان مسدودسازی افزایش یابد.

دلیل: نامناسب بودن پروتئین مسدودکننده (دارای ناخالصی‌های آنزیمی یا واکسن با آنتی‌بادی‌ها)

راه‌حل: نوع پروتئین مسدودکننده تغییر یابد یا از دترجنت‌ها استفاده شود.

دلیل: بالا بودن غلظت اولیه آنتی‌بادی اولیه و یا ثانویه (کانژوگه)

راه‌حل: آنتی‌بادی‌ها در رقت‌های بالاتر مورد استفاده قرار می‌گیرند.

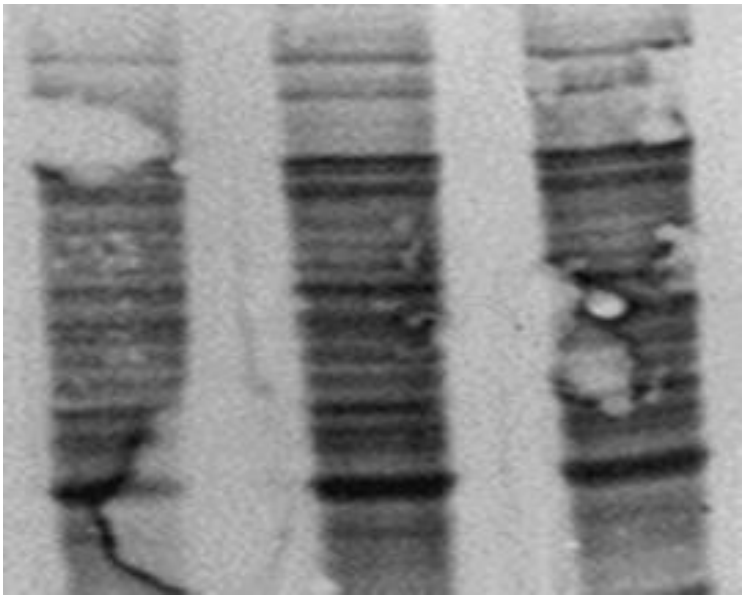
دلیل: ناخالص بودن آنتی‌بادی‌ها و یا خراب شده کانژوگه‌ها

راه‌حل: از انواع خالص‌تر آنتی‌بادی استفاده شود. کانژوگه تازه تهیه گردد.

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

راه‌حل: مراحل شستشو و بطور کامل و به دقت صورت گیرد. مرحله انکوباسیون غشا در سوبسترای آنزیم به مدت 20-5 دقیقه کافی است.

مشکل: لکه‌ها یا نواحی سفید در بلاتینگ ممکن است در اثر گیرافتادن حباب و یا نواحی خیس نشده غشا باشند که پروتئین به آنها متصل نخواهد شد. هر دو مورد را می‌توان با دقت رفع نمود.



شکل 10. لکه‌های سفید در بلاتینگ

دلیل: سر هم نمودن ناصحیح ساندویچ وسترن و یا گیر افتادن حباب هوا در آن

مشکل: وجود زمینه بسیار تاریک در بلات

دلیل: بلاک شدن ناقص غشا

راه‌حل:

- افزودن غلظت مسدودکننده
- افزودن مدت زمان مرحله مسدودکردن
- افزایش دمای مرحله مسدودکردن
- استفاده از ماده مسدودکننده دیگر

مشکل: آلودگی محلول مسدودکننده

راه‌حل:

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

مشکل: انکوباسیون با سوبسترا به مدت طولانی

راه‌حل:

- مدت زمان انکوباسیون با سوبسترای تشخیصی کم شود.

در صورتی که از ماده رنگ‌دار استفاده می‌شود، هنگامی که سطح نویز به سیگنال قابل قبول است بلات را از محلول سوبسترا بیرون آورده و در آب دیونیزه قرار دهید.

مشکل: مقدار آنتی‌بادی زیاد است

راه حل:

- غلظت آنتی‌بادی اولیه و یا ثانویه را کاهش و یا تعدیل نمایید.
- از یک تست آزمایشی دات‌بلات استفاده نمایید تا غلظت‌های آنتی‌بادی بهینه گردد.
- مدت زمان انکوباسیون را کم نمایید.

مشکلات مخصوص تانک بلاتینگ

مشکل: پروتئن بیش از اندازه بارگیری شده است.

راه‌حل‌ها:

- 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.

مشکل: اتصال آنتی‌بادی به پروتئین‌ها در بافر مسدودکننده

راه‌حل:

- استفاده از مواد مسدودکننده دیگر، مثلا: 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 می‌باشد.

مشکل: زمان ناکافی بین گام های انکوباسیون

- افزایش مدت زمان و تعداد گام‌های شستشو (حداقل 5x5 دقیقه)
- از مقادیر بیشتر بافر شستشو استفاده کنید.

مشکل: خشک شدن غشا در زمان گام‌های انکوباسیون بلاتینگ

راه‌حل:

- مطمئن شوید غشا کاملا در هنگام شروع فرایند خیس شده است و نیز مطمئن شوید که بلات در هر مرحله خشک نمی‌شود.
- مطمئن شوید که غشا در زمان انکوباسیون و شستشو با بافرها کاملا غوطه‌ور است.

مشکل: از بین رفتن فعالیت آنتی‌بادی در اثر نگه‌داری بلند مدت

راه‌حل:

- استفاده از آنتی‌بادی تازه که در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری شده است.
- در صورتی که قرار است برای مدت زمان خیلی طولانی از آنتی‌بادی استفاده شود، بهتر است که آن را در دمای 80- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری کرد و آن را به بچ‌های خیلی کمی تقسیم نمود.
- از سیکل‌های فریز- دفریز آنتی‌بادی خودداری شود.

مشکل: دمای انکوباسیون خیلی بالا

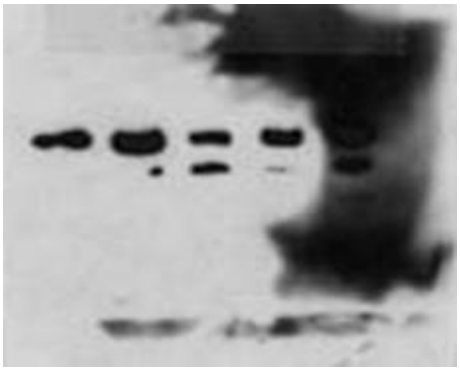
راه‌حل: استفاده از دمای انکوباسیون پایین‌تر

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

مشکل: در صورتی که بافر آلوده است

- از بافر تازه استفاده کنید .
- همه بافرها را قبل از استفاده با فیلتر 0.2 میکرومتری فیلتر نمایید.

مشکل: پس زمینه لکه لکه

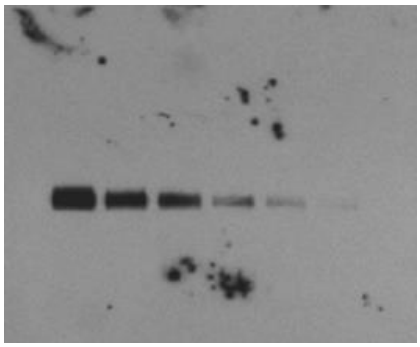


شکل 11. پس زمینه لکه لکه

راه‌حل: این مشکل می‌تواند ناشی از غشای خشک و یا شست‌شوی ناکافی باشد. هر دو مساله به راحتی قابل حل هستند اگر بلات را کاملا و در تمام مدت غوطه‌ور نگه داشت. باید در جابجایی دقت بیشتری شود تا از چنین آلودگی در آزمایشگاه‌ها جلوگیری شود.

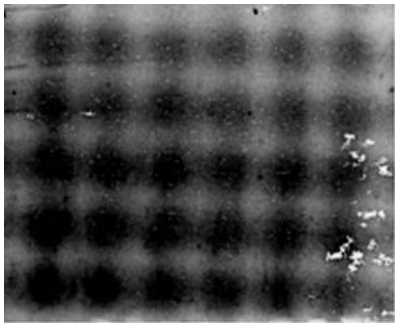
مشکل: نقاط ناهموار بر روی بلات و یا پس‌زمینه خالدار

علت: پس‌زمینه خالدار و لکه‌ای می‌تواند به دلیل اتصال یک جسم خارجی به غشا، تجمع آنتی‌بادی، اسکنر کثیف و یا سطوح کثیف کاست‌های وسترن‌بلات باشد.



شکل 12. نقاط ناهموار بر روی بلات

مشکل: انتقال کاست‌های ژل بر روی بلات



شکل 13. انتقال شکل کاست‌ها بر روی بلات

علت:

- 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.