

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

دعای مطالعه

اَللّٰهُمَّ اَخْرِجْنِيْ مِنْ ظُلُمَاتِ الْوَهْمِ وَاكْرِمْ نِيْ بِنُوْرِ الْفَهْمِ
اَللّٰهُمَّ افْتَحْ عَلَيْنَا اَبْوَابَ رَحْمَتِكَ وَاَنْشُرْ عَلَيْنَا خَزَائِنَ عُلُوْمِكَ
بِرَحْمَتِكَ يَا اَرْحَمَ الرَّاحِمِيْنَ

پروردگارا، خارج کن مرا از تاریکی های فکر و گرامی بدار به نور فهم
پروردگارا، بکشای بر مادرهای رحمت را و بکستران کنج های داشت را به امید رحمت

تو ای مهربان ترین مهربانان

بیایید به حقوق دیگران احترام بگذاریم

دوست عزیز، این کتاب حاصل دسترنج چندین ساله‌ی مؤلف، مترجم و ناشر آن است. تکثیر و فروش آن به هر شکلی بدون اجازه از پدیدآورنده کاری غیراخلاقی، غیرقانونی، غیرشرعی و کسب درآمد از دسترنج دیگران است، نتیجه‌ی این عمل نادرست، موجب رواج بی‌اعتمادی در جامعه و بروز پی‌آمدهای ناگوار در زندگی و محیط ناسالم برای خود و فرزندانمان می‌گردد.

وسترن بلات

مترجمین:

اشرف بخشی مفرد کاشانی

زهرا صفایی دلویی

شاهین بلوری حنفی

نیما محمدزاده

زیر نظر:

دکتر حسین دبیری

(دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)



سرشناسنامه	نجفاف، ایاز
عنوان و نام پدیدآور	Najafov, Ayaz
مشخصات نشر	وسترن بلات/ [ایاز نجفاف، گرتا هو جای]؛ مترجمین اشرف بخشی مفرد کاشانی ... [و دیگران]؛ زیر نظر حسین دبیری.
مشخصات ظاهری	تهران: گروه تألیفی دکتر خلیلی، ۱۳۹۷.
شابک	۸۴ص. : مصور، جدول.
وضعیت فهرست نویسی	978-600-422-398-0 :
یادداشت	فیپا :
یادداشت	عنوان اصلی: Western blotting guru, 2017.
عنوان دیگر	مترجمین اشرف بخشی مفرد کاشانی، زهرا صفایی دلویی، شاهین بلوری حنفی، نیما محمدزاده.
موضوع	راهنمای جامع وسترن بلات.
موضوع	وسترن ایمنوبلاتینگ - دستنامه های آزمایشگاهی
موضوع	Western immunoblotting – Laboratory manuals :
موضوع	زیست شناسی مولکولی
موضوع	Molecular biology :
شناسه افزوده	هو جای، گرتا
شناسه افزوده	Hoxhaj, Gerta :
شناسه افزوده	بخشی مفرد کاشانی، اشرف، ۱۳۵۷-، مترجم
رده بندی کنگره	الف ۱۳۹۷ ن ۳/و ۹/۵ QP۵۱۹
رده بندی دیویی	۵۷۲/۸۲ :
شماره کتابشناسی	۵۲۵۲۷۳۲ :

نام کتاب: وسترن بلات

مترجمین: اشرف بخشی مفرد کاشانی - زهرا صفایی دلویی - شاهین بلوری حنفی - نیما محمدزاده

ناشر: گروه تألیفی دکتر خلیلی

نوبت و سال چاپ: اول. ۱۳۹۷

شمارگان: ۱۰۰۰

چاپ: کیمیای قلم - صحافی: فردوس

مدیر فنی و هنری: مریم آرده

مدیر تولید: اقبال شرقی

بهاء: ۱۱۰۰۰

آموزشگاه دکتر خلیلی (دفتر مرکزی): ۰۲۱-۶۶۵۶۸۶۲۱

آموزشگاه دکتر خلیلی (شعبه شریعتی): ۰۲۱-۲۲۸۵۶۶۲۰

فروشگاه: تهران - خیابان انقلاب - رویه روی درب اصلی دانشگاه تهران - پاساژ فروزنده - طبقه همکف - پلاک ۳۳۱

تلفن: ۰۲۱ - ۶۶۴۸۹۳۷۵ - ۰۲۱ - ۶۶۴۸۹۳۴۹

مرکز پخش: ضلع جنوب غربی میدان انقلاب - جنب سینما پارس - مجتمع تجاری پارس - طبقه اول

مدیر فروش: ۰۵۰۸۵۸۹ - ۰۹۱۲

مرکز فروش: ۰۲۱ - ۶۶۵۶۹۲۱۶



drkhaliligroupbook



www.DKG.ir



@drkhaliligroupbook

طلیحه سخن مؤلف:

سپاس پروردگار بلند مرتبه را که در مسیر تدوین این اثر عمری دوباره یافتیم. تکنیک وسترن بلات از ابتدای پیدایش تا به امروز به عنوان یک تکنیک پیشتاز در علوم زیستی و پزشکی مطرح است، این تکنیک که اساساً بیان پروتئین‌ها را به محققان نشان می‌دهد، نسبت به تکنیک‌های اندازه‌گیری کننده بیان ژن‌ها یک قدم جلوتر بوده، مطرح است.

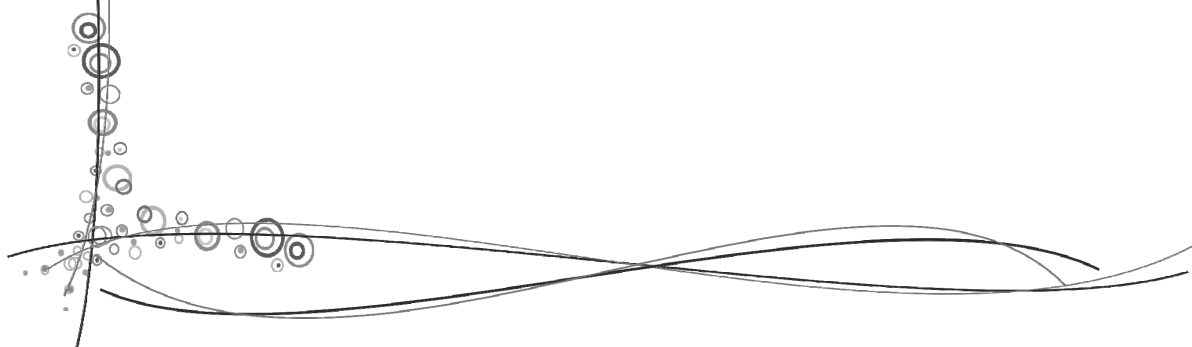
اثر پیش رو، ترجمه کتاب Western Blotting Guru چاپ سال ۲۰۱۷ است و در مسیر ترجمه تلاش تیم ترجمه بر امانت‌داری محتویات کتاب بوده است که امیدواریم محققان و علاقه‌مندان استفاده لازم را از آن ببرند.

این کتاب در ۷ فصل از مقدمه تا کوچک‌ترین جزئیات مطرح در تکنیک را شرح داده است.

با احترام

گروه مترجمین

تابستان ۱۳۹۷



فهرست مطالب

صفحه

عنوان

۷	فصل اول: مقدمه.....
۱۰	فصل دوم: روش.....
۲۴	فصل سوم: روش‌های خوب.....
۳۲	فصل چهارم: بهینه‌سازی و رفع اشکال.....
۴۶	فصل پنجم: نکات و ترفندها.....
۵۵	فصل ششم: موارد خاص.....
۶۰	فصل هفتم: تب‌های تجزیه و تحلیل، ذخیره‌سازی و بازیابی داده‌ها.....

معرفی

فقط کسانی که جرأت می‌کنند، جهان را به جلو حرکت می‌دهند.

-Cadillac, Dare Greatly

۱-۱ وسترن بلات چیست؟

وسترن بلات (یا ایمونوبلوتینگ) یک روش کاربردی وسیع برای جداسازی و تشخیص پروتئین‌ها با استفاده از پروپ‌های مبتنی بر آنتی‌بادی برای به‌دست آوردن اطلاعات خاص در مورد پروتئین‌های هدف از نمونه‌های پیچیده است. این یک روش معمول در زمینه‌های زیست‌شناسی مولکولی، بیوشیمی و زیست‌شناسی سلولی با بسیاری از برنامه‌های کاربردی است. این روش برای به‌دست آوردن اطلاعات مربوط به مقدار، وزن مولکولی و تغییرات پس از ترجمه از پروتئین‌ها می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به افینیتی بالای یک آنتی‌بادی به سمت شاخص‌های آنتی‌ژنی شان و طبیعت تقویت‌کننده وسترن بلات، یک روش حساس در حد پیکو گرم از پروتئین‌های هدف را می‌تواند جداسازی کند. بسته به نوع مواد مورد استفاده، وسترن بلات به‌صورت کمی و نیمه کمی می‌تواند باشد. (فصل ۶: نمونه‌های خاص از وسترن بلات کمی).

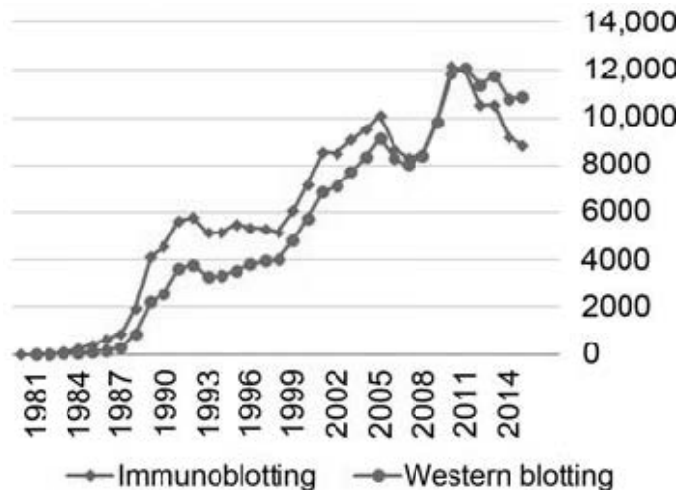
۱-۲ تاریخچه

نسخه‌های اولیه از Western blotting مدرن برای اولین بار توسط دو آزمایشگاه در سال ۱۹۷۹ توصیف شده بود: Harry Towbin و همکارانش در موسسه Basel, Friedrich Miescher. George Stark و همکارانش در دانشگاه استنفورد، کالیفرنیا / ایالات متحده آمریکا. نسخه بهبود یافته از روش توسعه یافته و نام "Western blotting" در سال ۱۹۸۱ توسط

W. Neal Burnette در مرکز تحقیقات سرطان Fred Hutchinson در واشنگتن / آمریکا ارائه شد. به دلیل این که مکان آزمایشگاه در ساحل غربی ایالات متحده آمریکا بود، به عنوان یک کلمه برای روش وسترن بلات از قبل اختراع شده برای جداسازی DNA در سال ۱۹۷۵ و روش Northern blotting برای جداسازی RNA در سال ۱۹۷۷. به گفته گوگل محقق، مقاله برجسته Towbin ذکر شده است بیش از ۵۴۰۰۰ بار در ۳۸ سال گذشته (تصویر ۱-۳ و ۱-۱)

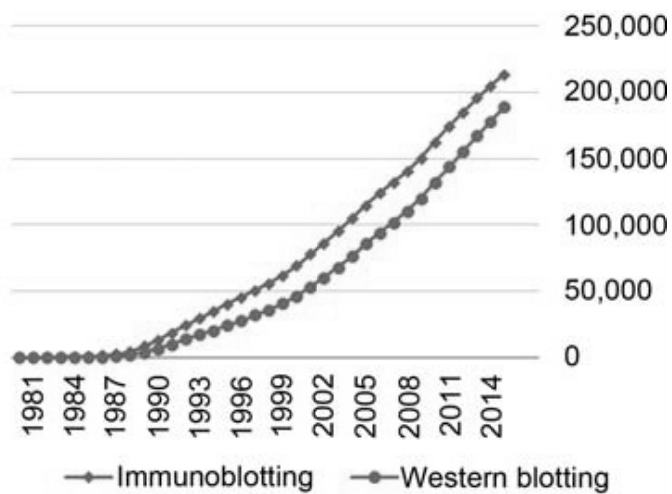


تصویر ۱-۱ مخترعین وسترن بلات از چپ به راست W. Neal Harry Towbin , George Stark Burnette.



تصویر ۱-۲ تعداد مقالاتی که در سال یافت می شوند زمانی که کلمات کلیدی مشخص شده در PubMed مورد جستجو قرار گرفتند.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)



تصویر ۱-۳ تعداد مقالات در طول سال‌ها انباشته شده است، زمانی که کلمات کلیدی مشخص شده در PubMed مورد جستجو قرار گرفتند.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)

فصل دوم

روش

جوانان به اندازه کافی محتاط نیستند به همین خاطر تلاش‌های غیرممکن می‌کنند- دستیابی به هدف در نسل بعدی اتفاق می‌افتد.

Pearl S. Buck

تصمیم‌گیری لحظه‌ای، بهترین کاری است که می‌توانید انجام دهید، کار درستی است.
بدترین کاری که می‌توانید انجام دهید این که هیچ کاری انجام ندهید.

Theodore Roosevelt

الهام معمولاً در طول کار می‌آید به جای این که قبل از آن بیاید.

Madeleine L'Engle

پنج مرحله عمده در روش Western blotting وجود دارد (تصویر ۱-۲)، و هر مرحله برای دستیابی به کیفیت بالا و تجزیه و تحلیل داده‌ها قابل اعتماد است.



تصویر ۱-۲ پنج مرحله عمده از وسترن بلات

۲-۱ آماده‌سازی نمونه

لیزات سلول یا بافت را می‌توان به روش‌های مختلفی آماده کرد که با استفاده از دناچوره کردن یا بافر لایزکننده انجام می‌گیرد.

اگر کسی علاقه مند به تحقیق برای پروتئین‌های فسفریلات‌ها باشد، بهترین روش آماده‌سازی نمونه‌های پروتئینی با استفاده از بافرلیزهای تازه در حضور مهارکننده‌های پروتئاز و فسفاتاز جهت جلوگیری از تخریب پروتئین هدف به‌وسیله پروتئاز و فسفوریلازها می‌باشد. برای به حداقل رساندن تخریب و دفسفریلاسیون نمونه‌های پروتئینی باید همیشه بر روی یخ نگهداری شوند. برای ذخیره‌سازی لیزات بومی (برای حفظ فعالیت پروتئین یا ترکیب پیچیده پروتئین) از سوکروز ۲۷٪ مولار یا نمونه‌های حاوی گلیسرول ۱۰٪ منجمد شده در نیتروژن مایع در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد استفاده می‌شود. پس از شفاف کردن لیزات با سانتریفوژ در دور ۱۶۰۰g، ۱۵ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد، غلظت پروتئین توسط آزمون پروتئین برادفورد یا آزمون اسید بیسیکونینیک (BCA) Bicinchoninic acid assay تعیین می‌شود. BCA نسبت به برادفورد تغییرات وحساسیت کم‌تری به دترجنت‌ها دارد، در حالی که روش برادفورد یک روش ساده و سریع‌تر است. بعد از این که غلظت پروتئین اندازه‌گیری شد، نمونه‌ها می‌توانند آماده شود برای قرارگیری روی ژل به‌وسیله مکمل لیزات با ۵ برابر سدیم دو دسیل سولفات-ژل پلی آکرلامید الکتروفورز (SDS-PAGE) نمونه بافر برای رسیدن به غلظت نهایی است. ضمیمه A SDS-PAGE بافر نمونه را می‌توان برای تطابق تمام پروتئین و غلظت بافر نمونه در نمونه‌ها.

غلظت نهایی پروتئین نمونه‌ها، اولین نکته مهم آماده‌سازی نمونه‌ها است. معمولاً ۵۰-۱۰ میکروگرم از کل پروتئین لایزات در هر چاهک ریخته می‌شود. به‌علاوه غلظت نمونه باید بین ۱ و ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر باشد، تا بتوانیم ۱۰ تا ۲۰ میکرولیتر در هر چاهک بریزیم. نمونه‌ها به‌طور معمول باید دارای غلظت یکسان باشند، تا حجم گذاشته شده نمونه دارای حرکت مداوم دریک ژل باشد. اگر حجم گذاشته شده بین نمونه‌ها تغییر کند، روی حرکت هر نمونه اثر خواهد گذاشت. برای مثال، یک نمونه با حجم زیاد می‌تواند با نمونه‌ای که حجمش کم است اختلال ایجاد کند. بعد از آماده‌سازی نمونه‌ها، آن‌ها باید دناچوره و رسوب داده شوند ضمیمه C. پروتئین‌های داخل بافر در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد می‌توانند ذخیره شوند.

۲-۲ ژل الکتروفورز

SDS-PAGE یک روش برای جداسازی پروتئین‌های دناچوره شده بر اساس وزن مولکولی (MW)، استفاده از یک میدان الکتریکی و ماتریکس مبتنی بر پایه آکرلامید می‌باشد. جهت آماده‌سازی پروتئین‌ها برای ژل الکتروفورز، عصاره پروتئین با SDS مخلوط می‌شود، دترجنت‌های آنیونی که اتصال یکنواخت با پروتئین دارند- معمولاً یک مولکول SDS برای هر دو تا اسید آمینه باقی مانده. علاوه بر اثر SDS دراز بین بردن ساختار سوم پروتئین‌های خطی، پروتئین‌ها را دارای بار منفی می‌کند. برای گسترش بیشتر پروتئین‌ها، گروه تیول (-SH) شامل ترکیباتی مثل بتا مرکاپتو اتانول یا دی تیوتریتول

برای کاهش پیوندهای دی سولفید موجود در بسیاری از پروتئین‌ها به کار می‌رود. جهت افزایش دناچوراسیون و یکنواختی سطح به‌وسیله SDS نمونه‌ها را تا دمای ۹۵-۷۰ درجه سانتیگراد گرم می‌کنند. تحرک هر مولکول به شارژ خالص مولکول‌ها، ولتاژ زمینه و مقاومت حلالی که در آن شناور است بستگی دارد. شارژ منفی، پروتئین‌های تیمار شده با SDS را از میان ماتریکس ژل پلی آکریلامید به سمت قطب آند حرکت می‌دهد، پروتئین‌های کوچک‌تر حرکت سریع‌تری نسبت به پروتئین‌های بزرگ‌تر دارند. آکریلامید یک انتخاب ایده‌آل برای ماتریکس ژل می‌باشد زیرا از نظر شیمیایی بی اثر، مقاوم به دما، شفاف و از همه مهم‌تر می‌تواند یک طیف گسترده از منافذ را تولید کند که به پروتئین‌های مورد علاقه اجازه به جدایی و وضوح می‌دهد. ماتریکس پلی آکریلامید قوی هست و مقاومت در برابر ولتاژ بالا را دارد، می‌تواند رنگ آمیزی‌های مختلف و برش نازک را تحت پوشش قرار دهد، همچنین برای اتورادیوگرافی خشک می‌شود.

یکی از مهم‌ترین جنبه‌های ژل پلی آکریلامید اندازه منافذ که توسط مقدار کل آکریلامید (T%) و مقدار ارتباط دو آکریلامید (C%) موجود در ژل تعیین می‌شود. هر چه T% ژل بالاتر باشد منافذ کوچک‌تری خواهد داشت و برای وضوح پروتئین‌های کوچک‌تر استفاده خواهد شد. شایع‌ترین آکريل آمید مورد استفاده: نسبت بیس-آکريل آمید برای SDS_PAGE، (C52.6%) 37.5:1 می‌باشد، در حالیکه ژل (C55%) 19:1 برای دناچوراسیون ژل DNA/RNA استفاده می‌شود و ژل (C53.3%) 29:1 برای بومی گردن ژل DNA/RNA استفاده می‌شود.

ژل SDS-PAGE معمولاً دو بخش (غیرمتوالی) ژل با یک ژل انباشته در قسمت بالای ژل حلال را به کار می‌برد. ژل‌های انباشته پایین‌تر هستند (5%-4% T و ۸/۶ Ph می‌باشد، شارژ پروتئین را به حداقل رسانده، در نتیجه اجازه می‌دهد به آن‌ها که پشت سرهم قرار بگیرند، نهایتاً باند واضح‌تری را نتیجه می‌دهد. ژل حلال (15%-6% T بالاتری دارد و ۸/۸ Ph دارد. سیستم‌های ژل تجاری یک سیستم بافری متفاوت بدون ژل انباشته استفاده می‌کند. از آن‌جا که یک افزایش تدریجی T% از شانه‌ها تا انتهای ژل دارند (20%-4%) به ژل یک گرادیان طبیعی می‌دهد.

۱-۲-۲ انتخاب و آماده‌سازی ژل

برای به دست آوردن نتایج مطلوب انتخاب نوع سیستم ژل و درصد ژل بسیار مهم است. انتخاب درصد ژل به اندازه پروتئین‌های مورد نظر بستگی دارد. جدول زیر دامنه‌ای از درصد وابسته به وزن مولکولی را می‌دهد (جدول ۱-۲).

Table 2-1 Recommended Gel Concentration For Various Protein Size Ranges	
% gel (acrylamide:bis 5 37.5:1)	Recommended Size Range
6	60_250 kDa
8	50_200 kDa
10	25_100 kDa
12	15_80 kDa
15	14_60 kDa

هم ژل‌های تجاری و هم ژل‌های دست ساز می‌تواند انتخاب شود. ژل‌های دستی، علاوه بر داشتن یک محصول کم هزینه، می‌تواند بر اساس چند پارامتر مانند فرمولاسیون شیمیایی ژل، تعداد چاهک‌ها و ضخامت ژل سفارش داده شود. ژل‌های دستی بین دو پلیت شیشه‌ای ریخته می‌شود (برای جزئیات به پروتکل‌های ضمیمه‌های B و C مراجعه کنید) و یک شانه در بالای ژل جهت ایجاد چاهک‌هایی برای قرار دادن نمونه‌ها قرار داده می‌شود. تعداد و اندازه چاهک‌ها، همچنین ضخامت ژل به تعداد و حجم نمونه‌هایی که می‌خواهد در چاهک‌ها قرار گیرد بستگی دارد.

ژل‌های دستی به صورت تجاری به وسیله بسیاری از شرکت‌ها مثل (Mini-PROTEAN Bio-Rad Precast Gels) و Thermo (NuPAGE Precast Gel System) و آن‌ها نیز در اندازه‌ها، درصد و فرمول‌های مختلف ارائه می‌دهند. اگر محقق علاقه مند به تحقیق برای پروتئین‌های متعدد با تفاوت‌های عمده در MW باشد، ژل‌های گرادیان بهترین انتخاب هستند. به عبارت دیگر، ژل‌های گرادیان (۲۰٪-۴۴٪، ۱۵٪-۴۴٪، ۱۲٪-۴۴٪) برای تشخیص پروتئین‌های بزرگ و کوچک در نمونه‌های یکسان، در یک بطری پیشنهاد می‌شود.

ژل‌های کوچک ۱۵-۱۰ تا چاهک دارند. اگر تعداد نمونه‌ها بیش‌تر است، Bio-Rad ژل Criterion با فرمول ژل‌های مختلف را پیشنهاد می‌کند که ۱۸ تا ۲۶ نمونه به طور همزمان را می‌تواند انجام داد. یک ویژگی سیستم ژل دستی NuPAGE این که در فرمول ژل SDS وجود ندارد، اما شرایط دناتوراسیون به وسیله Ph اسیدی بافر و SDS در بافر در حال اجرا شبیه‌سازی شده است.

۲-۲-۲ اجرا کردن ژل

قبل از اجرای ژل‌ها، شانه‌ها به دقت برداشته می‌شوند و چاهک‌ها از باقی مانده شبه پلی آکریلامیدها شسته و آسپیره نمی‌شوند. برای بهبود بهتر نمونه‌گذاری، راهنمای نمونه گذاری ژل بلند مخصوص را می‌توان استفاده کرد. چاهک‌ها نهایتاً باید تحت نمونه گذاری قرار بگیرند، به دلیل این که سرریزی تصادفی از یک چاهک به چاهک دیگر می‌تواند نتایج را تغییر دهد، چاهک‌ها باید underloaded راه استاندارد برای اجرای ژل این است که تا زمانی که رنگ بروموفنول آبی به پایین ژل می‌رسد آن‌ها را ران کرد. به هر حال، بسته به نیاز وضوح، ژل می‌تواند مدت طولانی‌تری ران شود. در چنین مواردی، باید توجه داشته باشید که مخازن در حال اجرا را خنک نگه دارید، که می‌توان توسط نیمه غرق شدن آن‌ها در حمام آب یخ به راحتی به این منظور رسید.

زمانی که یک ژل دستی را ران می‌کنید، معمولاً ژل در ابتدا در ولتاژ کم (۷۰-۸۰ V) ران می‌شود بنابراین پروتئین‌ها حداقل گسترش باندرا داخل ژل خواهند داشت. به عنوان یک قاعده کلی ۱۰-۱۵ V/cm ژل باید برای ژل حلال مورد استفاده قرار گیرد، که معمولاً حدود ۱۰۰ وات برای ژل است. زمانی که نمونه‌ها ویسکوزیته زیادی دارند یا غلیظ هستند، ژل باید آهسته ران شود، به عبارت دیگر جریان و تغییر تصویر باندها جلوگیری کنیم. به هر حال با توجه به طرح‌های تانک جدید، تانک‌های تجاری اجازه می‌دهد تا ژل‌ها از آغاز اجرا تا ولتاژ ۲۰۰ ولت برسد. e.g. Mini-PROTEAN® Tetra (cell) from Bio-Rad

۲-۳-۲ نشانگرهای وزن مولکولی

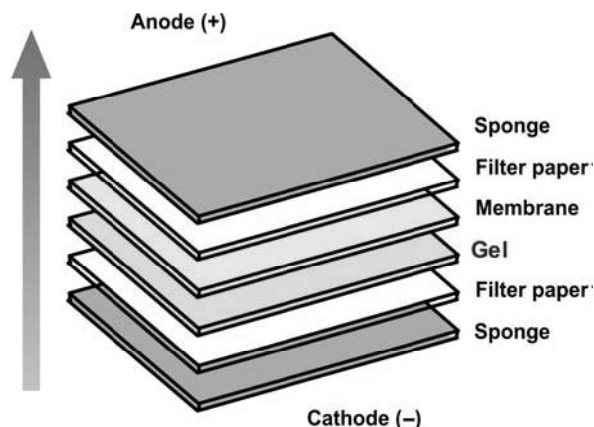
نشانگرهای وزن مولکولی پروتئین، مخلوطی از پروتئین بسیار خالص است که به عنوان باند لدر واضح بین ۱۰ و ۲۵۰ کیلو دالتون قابل شناسایی هستند. دو نوع مارکر MW در دسترس هستند. مزیت مارکر MW نگهدار در ژل real time بدون نیاز به رنگ آمیزی با Ponceau S تعیین بازدهی انتقال نظارت بر وضوح پروتئین می باشد، اما آن ها گران قیمت هستند و بعضی وقت ها نمی توان یک برآورد بسیار دقیق و استوار از وزن مولکولی داشته باشیم. مارکر MW ناتمام ارزانتر هستند و می توان به وسیله رنگ آمیزی Ponceau S برآورد دقیقی از وزن مولکولی کرد و با قلم / مداد بر روی غشا مشخص شده است. معمولاً نشانگرهای دو رنگی حفظ شده بهترین انتخاب هستند، برای شناسایی آسان تر است که باند نشان دهنده MW است.

۲-۳-۲ انتقال پروتئین

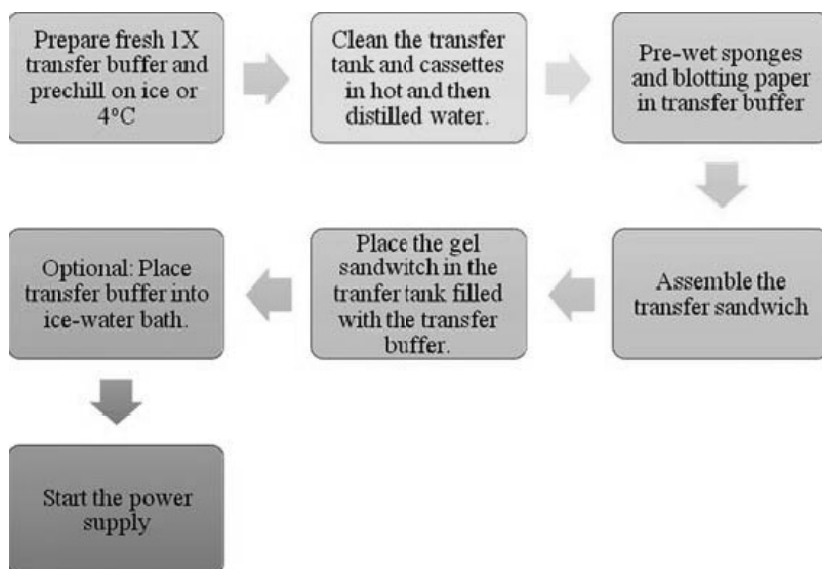
۲-۳-۱ راه اندازی انتقال

پروتئین ها باید بر روی نیتروسولوز یا پلی وینیلیدنس غشای دیفلوئید (PVDF) منتقل شوند، به عبارت دیگر نیرومندی ماتریکس پروتئین حامل (غشا قوی تر از ژل است)، ساده کردن فرایند دستی و فراهم آوردن دسترسی به اپیتوپ های بیش تر آنتی بادی (غشاء نازک تر از ژل هستند) افزایش می دهد. نوع انتقال اولین تصمیمی است که باید انجام شود: رطوبت در مقابل نیمه خشک. اگر چه انتقال نیمه خشک سریع تر از انتقال مرطوب است و نیاز به حجم کم تر از بافر انتقال دارد، در نتیجه بازده انتقال بهتر (به ویژه برای پروتئین های بزرگ)، همچنین کیفیت انتقال بالاتر و پایدار را ارائه می دهد. به علاوه، پایان فصل به طور کلی به نوع انتقال مرطوب مربوط خواهد شد، در حالی که جزئیات برای پروتکل انتقال نیمه خشک می تواند بین دستگاه انتقال مختلف متفاوت باشد و بنابراین باید از کتابچه های خود را دریافت کنید.

برای انتقال پروتئین، اسفنجی معمولی-کاغذی-ژل-غشایی-کاغذی-اسفنج انتقال ساندویچ مونتاژ شده است (تصویر ۲-۲). توجه باید داشته باشید که پس از اضافه کردن غشاء در بالای ژل اطمینان حاصل شود هیچ حباب هوایی وجود ندارد. ژل می تواند برای اولین بار در انتقال بافر غوطه ور شود، و پس از اضافه کردن غشاء در بالای ژل، حباب های هوای به دام افتاده باید به وسیله یک غلتک یا یک پیپت سرولوژیک خارج شوند. ساندویچ باید با دقت به وسیله کاست ضخیم بسته و جمع شود، اطمینان حاصل شود که اجزاء ساندویچ تغییر نمی کند. سپس ساندویچ داخل بافر انتقال فرو می رود. پروتئین ها به علت شارژ منفی شان در SDS در حال اجرا باقی مانده و زمانی که میدان الکتریکی به کار بیافتد از قطب کاتد به طرف قطب آند حرکت خواهند کرد. (تصویر ۲-۳)



تصویر ۲-۲. نمودار مراحل انتقال ساندویچ در یک وسترن بلات خاص



تصویر ۲-۳. مراحل انتقال پروتئین در وسترن بلات

۲-۳-۲. انتخاب غشاء درست

دو نوع غشای رایج برای انتقال پروتئین‌ها عبارتند از: نیترو سلولز و PVDF. زیرا آن‌ها دارای ظرفیت اتصال بالایی برای پروتئین‌ها هستند. یکی از ویژگی‌های مهم غشاء، اندازه منافذ است که معمولاً ۱٪ تا ۲٪ یا ۴۵٪ میکرومتر است. سایزهای کوچک برای پروتئین‌هایی با وزن مولکولی پایین توصیه می‌شود (کمتر از ۲۰ کیلودالتون)، در حالیکه برای بیش‌تر پروتئین‌های منافذ ۴۵٪ می‌توان استفاده کرد. وقتی مقدار پروتئین بسیار مهم است، غشاهای با منافذ کوچک باید انتخاب شوند. ظرفیت اتصال غشاهای نیترو

سلولز و PVDF، به ترتیب ۸۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر سانتی متر مربع و ۱۷۰ تا ۲۰۰ میکروگرم بر سانتی متر مربع می‌باشد. بنابراین برای پروتئین‌های با فراوانی کم و آنتی‌بادی‌های با افینیتی پایین، برای افزایش حساسیت PVDF بهترین انتخاب است، غشاهای نیتروسلولوز دارای زمینه پایین‌تری نسبت به غشاهای PVDF می‌باشد.

غشاهای PVDF بسیار هیدروفوبیک هستند و لازم است قبل از مرطوب شدن با بافر انتقال در متانول ۱۰۰ درصد یا اتانول غوطه‌ور شوند. غشاهای PVDF بهترین انتخاب برای جداسازی پروتئین‌های هیدروفوبیک هستند. به طور مثال لیپید (e.g., LC3) یا پروتئین‌های ترانس ممبران (e.g., receptors). غشاهای PVDF شکنندگی کم‌تری نسبت به غشاهای نیتروسلولوز دارند و آن‌ها می‌توانند بدون از دست دادن حساسیت به راحتی خرد شده و دوباره بازسازی شوند.

غشاهای PVDF نمی‌تواند به وسیله Ponceau S رنگ شود در عوض به وسیله عبور اشعه UV پروتئین‌ها را بعد از انتقال می‌تواند به تصویر بکشد. غشاهای PVDF معمولاً دارای اتوفلورسانس بالا هستند و اگر با استفاده از آنتی‌بادی‌های -کنژوگه شده با فلوروفور استفاده شود، باید از PVDF اختصاصی استفاده کرد.

غشاهای نیتروسلولوز برای قابل رویت شدن پروتئین‌های انتقالی به راحتی توسط Ponceau S رنگ می‌شوند و آن‌ها باید قبل از استفاده در بافر انتقالی غوطه‌ور شوند (بدون نیاز به درمان متانول). همچنین نیتروسلولوز برای اتصال گلیکوپروتئین‌ها و جداسازی با استفاده از آنتی‌بادی‌های کونژوگه شده با فلوروفور بهترین انتخاب است.

۳-۳-۲ کاغذ بلاتینگ

برای جلوگیری از تشکیل حباب هوا در طول انتقال کاغذ بلاتینگ باید قبل از راه اندازی ساندویچ انتقال داخل بافر انتقال به طور کامل خیس بخورد. شناورسازی کاغذ بلاتینگ در سطح بافر انتقالی به صورت تک تک تضمین می‌کند که هوای داخل کاغذ زمان کافی برای فرار از کاغذ را دارد. کاغذ بلاتینگ یکی از اجزای مهم سیستم انتقال است زیرا به حرکت بافر انتقالی درون ژل، تسهیل حرکت پروتئین‌ها از خارج به داخل ژل کمک می‌کند. کاغذ بلاتینگ بسیار ضخیم (یا ورقه‌های بسیار زیاد از کاغذ بلاتینگ) می‌تواند منجر به بیش از حد فشرده شدن ژل و غشا و اختلال در باندها شود. کاغذ بلاتینگ کمی نازک به خاطر کمبود تماس کامل بین غشاها و ژل‌ها منجر به انتقال ناقص و غیریکنواخت می‌شود.

۴-۳-۲ بافر انتقالی

عموماً فرمول بافر انتقالی ۲۵ میکرومول Tris_HCl، Ph= 8.3، ۱۹۲ میکرومول گلايسين، متانول یا اتانول ۲۰ درصد می‌باشد. با توجه به این که متانول ارزانتر اتانول است و همچنین سرطان‌زا است. SDS همراه با بافر انتقالی نیست، حضور SDS در پروتئین برای حرکت آن‌ها در غشا کافی است. حضور SDS در بافر انتقالی می‌تواند عامل فوران باشد، شرایطی که پروتئین به غشا باند نمی‌شود ولی در عوض از میان آن عبور می‌کند. حضور متانول یا اتانول در بافر انتقالی به افزایش اتصال پروتئین به غشا کمک می‌کند، همان‌طور که SDS را از پروتئین‌ها جدا می‌کند.

۲-۳-۵ تنظیمات قدرت انتقالی

بسته به وزن مولکولی پروتئین، درصد ژل، دستگاه انتقال و سیستم بافر استفاده شده، ممکن است تنظیمات قدرت مختلف مورد نیاز باشد. تنظیم خاص برای انتقال ولتاژ ۱۰۰ برای یک ساعت ثابت است. برای پروتئین‌های با وزن مولکولی بالا، انتقال‌های طولانی، تانک‌های بزرگ و خاص، ثابت ۰/۴ (واحد) برای ۲ ساعت باید به کار گرفته شود همراه با غوطه وری از مخزن به حمام آب یخ حداقل تا وسط ارتفاع مخزن. انتقال را می‌توان با یک تایمر (به عنوان مثال، برای ۲ ساعت) تنظیم کرد و با گذشت یک شب در RT تا روز بعد ادامه می‌یابد.

۲-۳-۶ تجسم پروتئین پس از انتقال

برای نظارت بر کیفیت و کارایی انتقال، با انکوباسیون غشاء در حلال رنگ Ponceau S [۱/۰ درصد (w/v) در اسید استیک ۵ درصد] پروتئین‌ها را می‌توان به آسانی و به طور خلاصه تجسم کرد (۳۰ تا ۶۰ ثانیه). زمینه از طریق چندین شستشوی پی در پی با آب مقطر از بین می‌رود. رنگ‌آمیزی Ponceau S نیز کمک خوبی برای برش / ترمیم دقیق غشاء است. رنگ با شستشوی مختصری با Tris-Buffered Saline Tween 20 (TBST) به طور کامل حذف می‌شود. اگر غشاهای PVDF متصل نشده به Ponceau S به خوبی استفاده شوند، اشعه UV برای قابل رویت شدن پروتئین‌ها بعد از انتقال به کار می‌رود.

۲-۴ مسدود کردن غشاها

به دنبال انتقال، رنگ‌آمیزی Ponceau S و برش / ترمیم، غشاها باید مسدود شوند، به عبارت دیگر اتصال غیراختصاصی آنتی‌بادی‌های اولیه / ثانویه کاهش داد. بافر تثبیت‌کننده حاوی پروتئین‌هایی که به سایت‌های "چسبنده" غشاء مرتبط هستند، به علاوه جلوگیری از اتصال آنتی‌بادی غیراختصاصی به آن سایت‌ها و در نتیجه پس زمینه / سر و صدا کاهش می‌دهد.

مهم‌ترین محلول‌های مسدودکننده حاوی ۵٪ و ۱۰٪ شیر غیرچرب یا ۳ تا ۵ BSA (بخش V) در TBST حل شده است. اگرچه شیرارزانتر است، این یک راه حل پیچیده است و ممکن است بهترین انتخاب برای بعضی آنتی‌بادی‌های اصلی نباشد. به عنوان مثال شیر شامل فسفو کازئین است که ممکن است با برخی از آنتی‌بادی‌های فسفواختصاصی تداخل کند، بنابراین، پس زمینه / نویز افزایش می‌یابد و / یا سیگنال کاهش می‌یابد. به ویژه شیر نباید هنگام تشخیص استرپتاویدین-بیوتین استفاده شود، شیر حاوی بیوتین است و در تشخیص تداخل ایجاد می‌کند.

BSA یک عامل مسدودکننده ایمن برای اکثر آنتی‌بادی‌های فسفو خاص است. یکی از معایب BSA این است که آن را نمی‌توان برای پروب‌های لکتین استفاده کرد زیرا BSA حاوی کربوهیدرات است. برای دلایل غیرآشکار آنتی‌بادی‌ها ممکن است بهتر باشد از یک محلول مسدودکننده در برابر آن عمل کنند دیگر و بنابراین، مهم است که مهم است که از توصیه‌های تولیدکننده آنتی‌بادی پیروی کنید.

اتصال غیر ویژه آنتی‌بادی‌های اولیه/ثانویه. محلول‌های بلاکینگ حاوی پروتئین‌هایی هستند که به محل‌های "چسبناک" بر روی غشاها متصل می‌شوند و به این ترتیب مانع از این می‌شوند که آنتی‌بادی‌ها به تصویر غیرویزه به این مکان‌ها بچسبند و بنابراین نویز/پس‌زمینه را کاهش می‌دهند.

محبوب‌ترین محلول‌های بلاکینگ، شیر بدون چربی $10\% - 5\%$ یا BSA $3\% - 5\%$ (بخش V) حل شده در TBST است. اگرچه شیر، ارزان‌تر است اما محلول پیچیده‌ای است و شاید بهترین انتخاب برای برخی آنتی‌بادی‌های خاص نباشد. مثلاً شیر حاوی فسفوکازئین است که ممکن است با آنتی‌بادی‌های خاص فسفو^۱ ویژه‌ای تداخل داشته باشد و به همین دلیل پس از زمین/نویز را افزایش دهد یا سیگنال را کاهش دهد. به خصوص وقتی از روش تشخیص استرپتاویدین-بیوتین^۲ استفاده می‌شود نباید از شیر استفاده کرد زیرا شیر حاوی بیوتین است و با تشخیص تداخل پیدا می‌کند.

BSA یک عامل بلاکینگ امن برای آنتی‌بادی‌های خاص فسفو است. یکی از نقص‌های BSA آن است که هنگامی که پروب‌های لکتین به کار برده می‌شوند نمی‌توان از آن استفاده کرد زیرا BSA حاوی کربوهیدرات است. به دلایلی که هنوز به درستی از آن آگاه نیستیم، ممکن است آنتی‌بادی‌ها در یک محلول بلاکینگ در قیاس با محلول دیگر، عملکرد بهتری داشته باشند و بنابراین مهم است که توصیه‌های تولیدکننده آنتی‌بادی را دنبال کنیم. زمان انکوباسیون برای بلاکینگ معمولاً یک ساعت در RT بر روی شیکر است و پس از آن شستشو با TBST با هدف حذف محلول بلاکینگ مازاد قبل از انکوباسیون با محلول آنتی‌بادی انجام می‌شود. در اکثر آنتی‌بادی‌ها می‌توان این زمان را به ۳۰ دقیقه کاهش داد و بلاکینگ را تا ۲ ساعت طولانی کرد و این کار نباید اثری منفی بر نتایج داشته باشد. چند غشا (تا ۶-۳ غشا بسته به اندازه) را می‌توان در یک جعبه تحت بلاکینگ قرار داد.

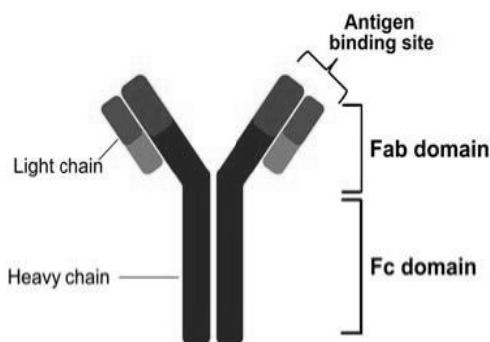
۵-۲ آنتی‌بادی‌های اصلی

آنتی‌بادی‌هایی که به نام ایمونوگلوبولین‌ها (Ig) شناخته می‌شوند به طور طبیعی توسط سیستم ایمنی در واکنش به آنتی‌ژن‌هایی همچون میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. آنتی‌بادی‌های اصلی و سترن بلاتینگ اغلب در میزبان‌های حیوانی مثل خرگوش، موش، خنثی صحرایی، بز و گوسفند و گه‌گاه در لاما و کوسه‌ها تولید می‌شوند. آنتی‌بادی‌های اصلی را می‌توان نه تنها برای تشخیص پروتئین بلکه برای اصلاح‌های ویژه‌ای مثل فسفوریلاسیون، استیللاسیون، گلیکولاسیون و متیلاسیون تهیه کرد.

آنتی‌بادی‌ها نوعی از مولکول‌های Y تصویر هستند و از دو کپی از زنجیره‌های سنگین برابر و دو کپی از زنجیره‌های سبک برابر تشکیل می‌شوند (تصویر ۴-۲). زنجیره‌ها توسط ترکیبات دی سولفید (—S—S—) و عامل‌های احیاکننده‌ای مثل β مرکاپتو اتانول^۳ یا دی تیتريتول^۴ متصل می‌شوند که برای واسرشت^۱

1 phospho-specific
2 streptavidin-biotin
3 β -mercaptoethanol
4 dithiothreitol

کامل آنتی‌بادی‌ها لازم هستند. بخش بالائی Y تصویر آنتی‌بادی از دو تکه متصل شونده به آنتی‌ژن یا نواحی F(ab) تشکیل می‌شود و بخش پایینی ناحیه "قابل تبلور" یا "ثابت" (ناحیه FC) نامیده می‌شود. آنتی‌بادی‌های اصلی می‌توانند به صورت کووالانسی با پروب‌های متنوعی مثل بیوتین متعلق به دیجوکسیجنین^۲ (DIG)، رنگ‌های فلورسنت، آنزیم‌ها و همینطور آگاروز یا سفاروز^۳ از طریق هم‌یوگی (کونژگاسیون)^۴ با پروتئین‌های باکتریایی متصل شونده به FC به نام پروتئین A و پروتئین G، هم‌یوگ شوند (ضمیمه K را ببینید).



تصویر ۴-۲ نمودار یک ساختار آنتی‌بادی IgG

آنتی‌بادی‌های تک‌تیره‌ای^۵، ابزاری ایده‌آل برای وسترن بلاتینگ هستند زیرا در حین فرایند تولید آنتی‌بادی معمولاً کلون‌های به شدت خاص و با میل پیوندی^۶ بالا انتخاب می‌شوند. به علاوه آن‌ها نسبتاً به سادگی در مقادیر بالا تولید می‌شوند و منبع مطمئنی از معرف با کیفیت بالای ثابت با تغییرپذیری اندک یا بدون تغییرپذیری در بین دسته^۷ محسوب می‌شوند. با این حال تولید آنتی‌بادی‌های تک‌تیره‌ای یک فرایند پرزحمت است.

آنتی‌بادی‌های چند تیره‌ای^۸ ارزان‌تر هستند و تولید آن‌ها ساده‌تر و سریع‌تر است. به علاوه آن‌ها یک مرحله تقویت سیگنال اضافه را نیز تامین می‌کنند زیرا بیش از یک مولکول آنتی‌بادی از یک منبع چند تیره‌ای به هر پروتئین متصل خواهد شد. این ویژگی باعث می‌شود تا حساسیت روش وسترن بلاتینگ بهبود پیدا کند. به علاوه آنتی‌بادی‌های چند تیره‌ای، معرف‌های بهتری از نظر رسوب ایمنی^۹ هستند. با

1 denaturation

2 digoxigenin

3 Sepharose

4 conjugation

5 Monoclonal

6 affinity

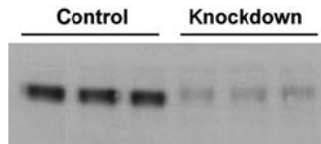
7 batch

8 Polyclonal

9 immunoprecipitation

این حال نه تنها هر حیوان میزبان حاوی یک دسته آنتی‌بادی چند تیره‌ای با کیفیت متفاوت است بلکه خون‌های متعلق به سرم متفاوت گرفته شده از میزبان مشابه نیز سطح متغیری از کیفیت را به نمایش می‌گذارند. نقص آنتی‌بادی‌های چند تیره‌ای این است که فقط مقدار محدودی را می‌توان از هر دسته به‌دست آورد و تغییرپذیری از دسته‌ای به دسته‌ای دیگر کاملاً قابل توجهی مشابه می‌شود.

اگرچه آنتی‌بادی‌ها، ابزار با ارزشی هستند اما قبل از استفاده باید آن‌ها را بهینه‌سازی و تایید کرد و این کار توسط تولیدکننده آنتی‌بادی انجام می‌شود. با این حال همیشه مهم است که مطمئن شویم که سیگنال به‌دست آمده، یک سیگنال ویژه است. بهترین روش برای این کار، اقدام به ناک‌دان^۱ یا ناک‌اوت^۲ ناک‌اوت^۲ کردن پروتئین هدف و اجرای کنترل منفی لیزات‌ها در هر ژل است (تصویر ۵-۲). اگر با یک آنتی‌بادی خاص فسفو که یک جهش‌یافته غیرقابل فسفریلاسیون است (مثلاً Ser/Ala، Thr/Ala یا Tyr/Phe) سر و کار داشته باشید باید از آن به‌صورت یک کنترل منفی استفاده کنید.



تصویر ۵-۲ مثالی از تایید آنتی‌بادی کلی توسط ناک‌دان

غشاها با آنتی‌بادی‌های اولیه به‌صورت یک شبه در دمای 4°C یا به مدت ۱-۲ ساعت در RT تحت انکوباسیون قرار می‌گیرند و این بستگی به میل پیوندی آنتی‌بادی به پروتئین هدف و فراوانی پروتئین هدف دارد. در هنگام استفاده از آنتی‌بادی‌های چند تیره‌ای، چند آنتی‌بادی اولیه به هر پروتئین هدف متصل می‌شود و یک مرحله تقویت سیگنال حیاتی را ایجاد می‌کند که در حساسیت و سترن بلاتینگ سهم دارد.

غلظت کاری پایانی آنتی‌بادی‌ها باید به همان صورتی که توسط تولیدکننده مشخص شده است، باشد با این حال بارها پیش می‌آید که حتی غلظت‌های ۲-۳ برابر کم‌تر نیز کارآمد باشند زیرا غلظت بهینه آنتی‌بادی بستگی به نوع سلول و مقدار پروتئین بارگذاری شده دارد. غلظت بیش از حد بالای آنتی‌بادی می‌تواند منجر به یک پس زمینه بالا شود و غلظت بسیار اندک آنتی‌بادی ممکن است باعث تضعیف باندها شود. اگر اطلاعات رقت یک آنتی‌بادی در دسترس نباشد باید کار را با غلظت $1 - 0.5 \mu\text{g/mL}$ شروع کرد سپس اقدام به رقیق‌سازی (در صورت لزوم) برای بهینه‌سازی سیگنال کرد.

انکوباسیون آنتی‌بادی‌ها در 4°C می‌تواند اتصال خاص آنتی‌بادی به پروتئین هدف را افزایش دهد و نویز پس زمینه را کاهش دهد در حالی که انکوباسیون در دمای 37°C باعث کوتاه شدن زمان انکوباسیون لازم تا ۳۰ دقیقه برای کل آنتی‌بادی‌ها می‌شود.

1 knockdown
2 knockout