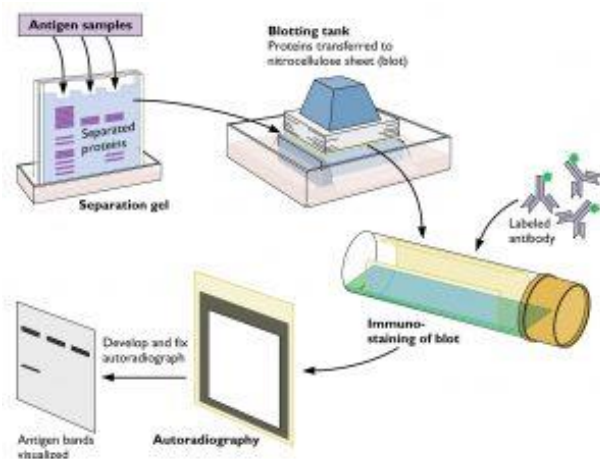


تکنیک وسترن بلائینگ

یکی از تکنیک‌های کلیدی در زیست‌شناسی سلولی و مولکولی است. و معمولاً برای شناسایی حضور پروتئین خاصی در مجموعه‌ای از پروتئین‌های سلولی بکار می‌رود. فرایند این تست، به سه فاکتور اساسی بستگی دارد:



۱- جداسازی کل پروتئین‌ها بر اساس اندازه با استفاده از الکتروفورز پروتئین در ژل

۲- انتقال کافی پروتئین‌های جدا شده به یک بستر جامد

۳- شناسایی اختصاصی پروتئین هدف با آنتی‌بادی مناسب

یکی از تکنیک‌های کلیدی در زیست‌شناسی سلولی و مولکولی است، و معمولاً برای شناسایی حضور پروتئین خاصی در مجموعه‌ای از پروتئین‌های سلولی بکار می‌رود. فرایند این تست، به سه فاکتور اساسی بستگی دارد:

- جداسازی کل پروتئین‌ها بر اساس اندازه با استفاده از الکتروفورز پروتئین در ژل
- انتقال کافی پروتئین‌های جدا شده به یک بستر جامد
- شناسایی اختصاصی پروتئین هدف با آنتی‌بادی مناسب

همان‌طور که می‌دانیم در تکنیک **ELISA** پروتئین‌ها در سطح حفرات پلیت پوشش داده می‌شوند و در انتهای آزمایش **ELISA**، از یک واکنش رنگ‌زا برای شناسایی انجام واکنش یا عدم انجام آن استفاده می‌شود. اما در وسترن بلائینگ ابتدا پروتئین توسط الکتروفورز روی ژل اکریل امید جدا شده، سپس توسط جریان الکتریکی به غشاء نیتروسلولوز انتقال داده می‌شوند. این غشاء شبیه به کاغذ معمولی است، اندازه حفرات آن کاملاً مشخص است و توانایی زیادی در اتصال به پروتئین دارد. پس از اینکه پروتئین به غشاء نیتروسلولوز انتقال داده شد، بقیه مراحل شبیه به **ELISA** طی می‌شود، با این تفاوت که مسیر حرکت هر نمونه به شکل یک نوار بریده می‌شود و درون ظرف خاصی که شیارهایی به اندازه نوار بریده شده، قرار می‌گیرد و بقیه مراحل در این ظرف انجام می‌گیرد.

در این تکنیک باندهای پروتئینی از ژل به غشایی مانده نیتروسولولز 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 های انتقال پروتئین

در اغلب موارد انتقال پروتئین از غشا به ژل 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. البته می توان به طریق انتشار با خاصیت موئینگی یا پمپ خلا نیز پروتئین ها را انتقال داد.

غشاهای مورد استفاده در بلاتینگ

در عمل بلاتینگ معمولا از غشاهای نیتروسولولزی و یا پلی وینیلیدن دی فلورید (PVDF) استفاده می کنند. این دو غشا ظرفیت خوبی در اتصال به پروتئین ها دارند. نیتروسولولز ارزان تر است ولی ظرفیت مکانیکی کمی دارد و شکننده می باشد. اندازه منافذ نیتروسولولز بین ۰/۰۵ 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 میشوند. 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 حوای 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.

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. معمولا انتقال در تانک در بافر تریس-گلیسین انجام می گیرد. این بافر برای جداسازی انواعی از پروتئین ها که به روش SDS-PAGE جداسازی 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.

مواد لازم جهت انجام تکنیک ایمونوبلات

غشای نیتروسولولز با اندازه منافذ ۰/۴۵ میکرومتر یا غشای ایموبیلون (PVDF)

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 گرم است.

کاغذ واتمن یا کاغذ الکتروفورز

روش آزمایش

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

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 نیتروسولولز) 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 و 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.

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 ۱-۴ ساعت در شدت جریان ۲۰۰-۴۰۰ میلی آمپر الکتروفورز نمایید.

انتخاب بافر در الکتروبلات

انتخاب بافر و استفاده از متانول در بافر بستگی به نوع پروتئین های مورد مطالعه ، شرایط ژل ، نوع الکتروفورز و نوع غشا دارد. همانگونه که قبلا نیز 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 میدهد 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. بنا بر این در صورت نیاز، علاوه بر حذف متانول، می توان درصد بسیار کمی از آن را وارد بافر کرد.

انتقال در بافر CAPS 50 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 حالتی که بلاتینگ به هدف تعیین توالی اسیدهای آمینه در پروتئین ها صورت می گیرد، بافر CAPS مناسب تر است. زیر حضور گلیسین در بافر موجب اختلال در تعیین توالی پروتئین ها می شود.

بافر بورات سدیم ۱۰ میلی مولار با $\text{PH}=9.2$ را برای انتقال گلیکوپروتئین ها، پلی ساکاریدها و لیپوپلی ساکاریدها توصیه می کنند. 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 میشوند، یا پروتئین هایی که با تکنیک ایزوالکتروفوکوسینگ جدا می شوند، را می توان در محلول اسید استیک ۷/۰ درصد به غشا انتقال داد. در این شرایط پروتئین ها بار مثبت دارند و به طرف قطب منفی حرکت می کنند.

رنگ آمیزی عمومی پروتئین ها در غشا

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 نیتروسولولز 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 بزگشت باشد. پانسو-اس، 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.

نوع غشا	حساسیت (میکروگرم در باند)	ماده رنگ آمیزی
نیتروسلولوز، PVDF	5/1<	فاست گرین FG
نیتروسلولوز، PVDF	5/1<	پانسو-اس
PVDF	5/1	کوماسی آبی R-250
نیتروسلولوز، PVDF	5/1	آمیدوبلک B10
نیتروسلولوز، PVDF	1/0	جوهر هندی
نیتروسلولوز، PVDF و نایلون	03/0	آهن کلوئیدی
نیتروسلولوز، PVDF و نایلون	03/0	بیوتین و آویدین-پراکسیداز
نیتروسلولوز، PVDF	004/0	طلای کلوئیدی

جدول ۱- موادی که برای رنگ آمیزی عمومی پروتئین ها در غشا بکار می روند.

رنگ آمیزی قابل برگشت با پانسو-اس

محلول رنگ آمیزی شامل پانسو-اس ۰/۱ 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 ۵-۱۰ 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 پانسو-اس دخالتی در تشخیص باندها به روش اختصاصی (مثلا ایمونوبلاتینگ) یا در تعیین توالی اسید آمینه ها ندارد. حساسیت این روش نسبتاً پایین می باشد.

رنگ آمیزی قابل برگشت با آمیدوبلک

محلول رنگ آمیزی شامل آمیدوبلک با غلظت ۰/۰۱ 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 بیرنگ گردد. رنگ باندهای پروتئینی به تدریج ضعیف و بالاخره ناپدید می شود.

رنگ آمیزی غیر قابل بازگشت با کوماسی بلو

محلول رنگ آمیزی شامل کوماسی بلو R-250 با غلظت ۰/۱ 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 محلول ها صورت می گیرد.

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 نیتروسولوز بکار نبرید. زیرا زمینه آن شدیداً رنگی می شود.

رنگ آمیزی غیر قابل برگشت با آمیدوبلک

محلول رنگ آمیزی شامل آمیدوبلک ۰/۵ 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.

رنگ آمیزی مارکرهای پروتئینی

تعیین برخی از خصوصیات پروتئین ها همچون اندازه یا نقطه ایزوالکتریک (PI) با استفاده از مارکرهای پروتئینی صورت میگیرد. برای تشخیص مارکرها در غشا می توان از روش های زیر کمک بگیرید. 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 نیتروسولوز را با آمیدوبلک رنگ کنید؛ سپس این بخش از غشا را خشک نمایید و در کنار بقیه نتایج قرار دهید. بسته به نوع برند موقعیت مارکرها و تعداد باندها متفاوت است.

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.

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 اجرا است که از این پروتئین ها به عنوان ماده مسدود کننده (inhibitor) در غشا استفاده نشود.

تشخیص اختصاصی پروتئین ها در غشا

تشخیص یا رنگ آمیزی اختصاصی باندهای پروتئینی در غشا، بر پایه واکنش آنها با لیگاندهای اختصاصی صورت می گیرد. برای انجام این کار مولکول های لیگاند را به طور مستقیم (اولیه) و یا غیر مستقیم (ثانویه) با مواد رادیواکتیو، فلورسانس، مواد رنگی یا آنزیم ها نشان دار می کنند و با کمک آنها به تشخیص اختصاصی پروتئین ها می پردازند. آنتی بادی ها از پر استفاده ترین لیگاندهای اختصاصی هستند که به اهداف مختلف تشخیص اختصاصی پروتئین ها می پردازند. آنتی بادی ها از پر استفاده ترین لیگاندهای اختصاصی هستند که به اهداف مختلف تشخیصی یا پژوهشی به کار می روند. 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 آنتی بادی-آنتی ژن می باشد. در این روش پس از بلاتینگ پروتئین ها، ابتدا مناطق آزاد غشا مسدود می شود (مرحله بلوکه کردن). سپس شرایط واکنش آنتی بادی (برای مثال سرم بیمار) با باندهای پروتئینی فراهم می گردد و به دنبال آن، با استفاده از ماکرومولکول های نشان دار (برای مثال آنتی بادی ضد ایمونوگلوبولین انسان که به آنزیم متصل است) نتیجه واکنش اولیه معلوم می گردد. امروزه وسترن بلاتینگ را به طور گسترده در تشخیص طبی و تحقیقات بکار می برند. 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

غشاهای مورد استفاده در بلاتینگ ظرفیت زیادی برای گرفتن پروتئین ها دارند (برای مثال ۱۰۰ میکروگرم در هر سانتیمتر مربع از غشای نیتروسولوز دارند). این خصوصیت اگرچه در جای خود بسیار مطلوب است ولی با اتصال غیر اختصاصی پروتئین های نشان دار در مراحل بعدی آزمایش به بروز اختلال در تشخیص منجر می شود. 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 زیر 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. توین-۲۰ معمولترین دترجنت

مورد استفاده در این کار است. باید این نکته را توجه کرد که توین -۲۰ در غلظت های بالا (بیش از نیم درصد) در پاره ای موارد از اتصال لیگاند به پروتئین نیز جلوگیری میکند.

تشخیص با آنتی بادی

پس از بلاتینگ پروتئین ها و بلوکه کردن غشا، مرحله تشخیص اختصاصی را می توان 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 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. شکل زیر نمونه ای از این نوع ایمونوبلاتینگ را نشان می دهد.

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

مواد

- بافر تریس نمکی با (TBS) PH 7.5 این بافر شامل تریس ۲۰ میلی مولار و کلرید سدیم ۰/۱۵ مولار است.
- بافر تریس نمکی حاوری توین ۰/۰۵ درصد (TBS-T) به هر لیتر از بافر تریس نمکی ۰/۵ میلی لیتر توین - ۲۰ اضافه شود.
- آنتی بادی اولیه (سرم بیمار یا حیوان ایمن شده). در صورت لزوم با TBS-T رقیق می گردد.
- آنتی بادی ثانویه. این آنتی بادی ضد بخش ثابت آنتی بادی اول است و با آنزیم (پراکسیداز) کونژوگه شده است. رقت مورد نیاز از این آنتی بادی در TBS-T تهیه می شود.
- محلول سوبسترای آنزیم پراکسیداز شامل دی آمینو بنزیدین ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر و پراکسید هیدروژن ۰/۱ درصد در TBS است.

روش آزمایش

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.

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.

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 معمولاً ۵-۱۵ 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.

رفع اشکال تکنیک وسترن بلات بصورت کامل و تخصصی

انتقال ضعیف پروتئین ها در بلاتینگ

دلیل: بالا بودن درصد ژل در الکتروفورز

حل: الکتروفورز در ژل نازک تر صورت گیرد.

دلیل: احتباس حباب های هوا در حد فاصل ژل و غشا

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.

دلیل: کم بودن زمان انتقال

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

دلیل: بالا بودن درصد متانول در بافر انتقال

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

دلیل: بالا بودن غلظت دترجنت ها (مثلا SDS)

حل: غلظت SDS در بافر انتقال را کاهش دهید.

دلیل: کاهش دانسیته بار منفی در پروتئین ها

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

دلیل: ضعیف بودن قابلیت اتصال غشا

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

مشکل: رنگی شدن زمینه غشا در وسترن بلات

دلیل: عدم وجود توین -۲۰ در بافرهای رقیق کننده و شوینده

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

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

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

دلیل: نا مناسب بودن پروتئین مسدودکننده (دارای ناخالصی های آنزیمی یا واکسن با آنتی بادی ها)

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

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

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

دلیل: نا خالص بودن آنتی بادی ها و یا خراب شده کانژوگه ها

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

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

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

مشکل: لکه ها 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 می توان با دقت رفع نمود.

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

مشکل: وجود زمینه بسیار تاریک در بلات:

دلایل: 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

راه حل:

- 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

راه حل:

- 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.

مقدار آنتی بادی زیاد است

راه حل:

- 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.

مشکلات مخصوص تانک بلاتینگ

- پروتئن 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:

راه حل:

- استفاده از مواد مسدود کننده دیگر، مثلا: آلبومین، ژلاتین ، BSA، کازئین و شیر خشک بدون چربی

در هنگام استفاده از سیستم بیوتئین- آوبیدین از شیر به منظور بلاک نمودن غشا ها استفاده نکنید. زیرا شیر حاوی بیوتئین می باشد.

زمان ناکافی بین گام های انکوباسیون

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

خشک شدن غشا در زمان گام های انکوباسیون بلا تینگ

راه حل:

- مطمئن شوید غشا کاملا 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 کاملا غوطه ور است.

از بین رفتن فعالیت آنتی بادی در اثر نگهداری بلند مدت

راه حل:

- 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 سانتیگراد نگهداری کرد و آن را به بچ های خیلی کمی تقسیم نمود.
- از سیکل های فریز-دفریز آنتی بادی خودداری شود.

دمای انکوباسیون خیلی بالا

راه حل: استفاده از دمای انکوباسیون پایین تر

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

در صورتی که بافر آلوده است:

- از بافر تازه استفاده کنید.
- همه بافرها را قبل از استفاده با فیلتر ۲ میکرومتری فیلتر نمایید.

مشکل: پس زمینه لکه لکه

این مشکل می تواند 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 غوطه ور نگه داشت. باید در جابجایی دقت بیشتری شود تا از چنین آلودگی در آزمایشگاه ها جلوگیری شود.

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.

انتقال کاست های ژل بر روی بلات

دلیل مشکل:

- 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.