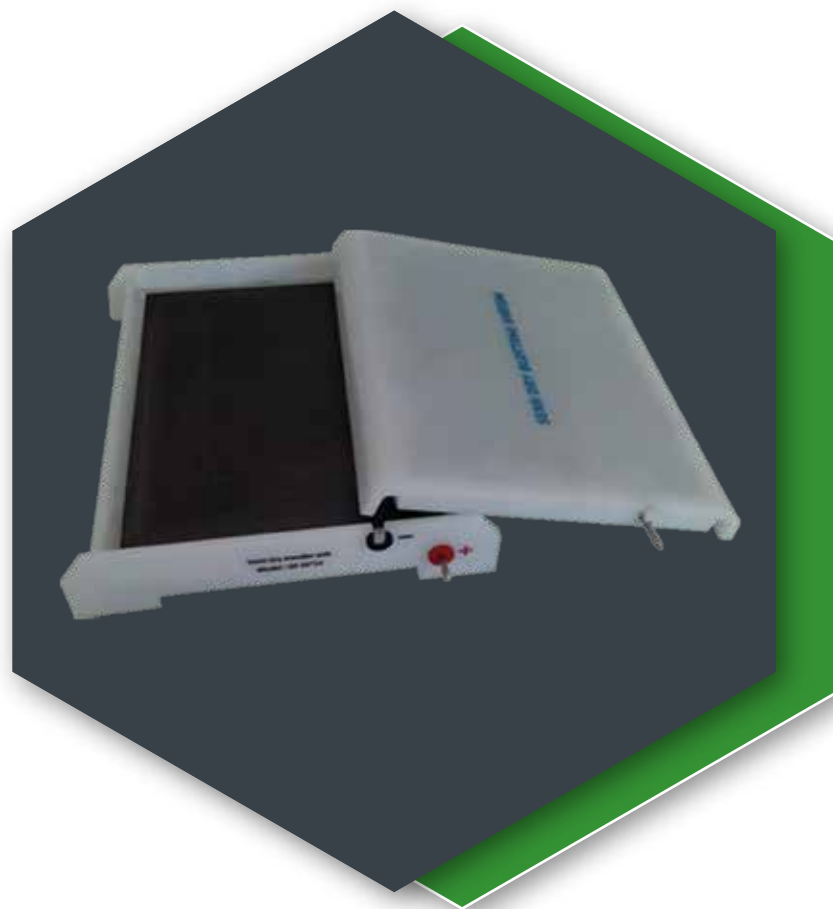


دفترچه راهنما **سمی درای (Semi-dry)**

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





سمی درای (Semi-dry)

www.Denagene.com

”

از اینکه دستگاه سمی درای 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.

“

۱	مقدمه
۲	هشدارها
۳	مشخصات فنی
۴	مراقبت و نگهداری
۶	مواد مورد استفاده در آزمایش
۶	نحوه آزمایش
۸	رنگ آمیزی
۱۱	تکنیک وسترن بلائینگ
۱۲	مرحله مسدود سازی
۱۳	تشخیص با آنتی بادی
۱۴	مواد و روش آزمایش
۱۶	راهنمای حل مشکلات احتمالی

مقدمه

برای اولین بار در سال 1984، تکنیک سمی درای توسط آندرسن مطرح شد. ابتدا تکنیک بلاتینگ به صورت افقی و با استفاده از الکترودهای پلیتی صورت می‌گرفت.

ژل و غشای نیتروسولوزی بین صفحات کاغذ صافی خیس شده با بافر ساندویچ می‌شدند. کاغذهای صافی به عنوان ذخیره‌کننده یونی و نیز جایگزین بافر در حالت تر بودند.

سیستم سمی درای بلاتینگ با سادگی بالای خود اصول اساسی تکنیک بلاتینگ نیمه خشک را حفظ نموده است و نیز از طرف دیگر با دارا بودن بعضی ویژگی‌های جدید، سادگی استفاده و set up سریع را به بار آورده است.

در تکنیک های بلاتینگ، ابتدا در سال 1975 با انتقال DNA از ژل آگارز به غشای نیتروسولوزی، ساترن بلات انجام شد.

سپس تکنیک بلاتینگ برای مولکول RNA و پروتئین از هر دو نوع ژل آگارز و پلی اکریل آمید صورت گرفت. در مواد غشایی کاغذهای PVDF نیز مورد استفاده قرار گرفتند تا ظرفیت اتصال پروتئین بهتر صورت گیرد.

به منظور ارتقای کیفیت انتقال موئینه، در سال 1979 تاوین و همکارانش جریان الکتریکی را به منظور جداسازی پروتئین‌ها از ژل پلی اکریل آمید مورد استفاده قرار دادند. از آن زمان تاکنون، انتقال الکتروفوری برای تکنیک های بلاتینگ مورد استفاده بوده است.

هشدار

قبل از شروع عمل بلاتینگ راهنمای دستگاه را کامل مطالعه کنید. 

قطبیت دستگاه را عوض نکنید. 

ولتاژ و جریان بیش از اندازه به دستگاه اعمال نشود. با این عمل عمر مفید دستگاه پایین می آید. 

زمان انتقال طولانی برای پروتئین ها توصیه نمی شود. 

بهتر است با منبع تغذیه ساخت دنا ژن تجهیز مدل DGT-Uni-versal عمل انتقال نیمه خشک صورت گیرد. کلیه تنظیمات و کنترل کیفی با این دستگاه صورت گرفته است. 

در دمای بالاتر از 50 درجه سانتیگراد از این دستگاه استفاده نشود. 

SDTransblot 15×20 $19 \times 23 \times 5$

همه برندها

محل دستگاه

ابعاد ژل (cm)

ابعاد دستگاه (cm)

مدل منبع تغذیه

برای انتقال پروتئین ها در این روش به تانک بافر نیازی نیست و ارتباط غشا و ژل با الکترودها که به شکل صفحه هستند، از طریق چند لایه کاغذ خیس فراهم می شود. اطلاق لفظ نیمه خشک به این روش نیز به همین خاطر است.

انتقال نیمه خشک معمولا ساده تر و سریع تر از روش انتقال تر است و به مقدار بسیار کمی بافر نیاز دارد. محدودیت ذخیره بافری به نوبه خود باعث می شود که با این روش نتوان بلائینگ را بیش از ۲ ساعت طول داد. در غیر این صورت بهتر است، انتقال به روش تانک صورت گیرد.

در انتقال به روش نیمه خشک امکان بلائینگ ۶ ژل به صورت همزمان وجود دارد. در این حالت هر ساندویچ ژل با ورقه دیالیز (سلوفان) از ساندویچ بالا یا پایین جدا می گردد. در این روش نمی توان ژل های مختلف را روی هم قرار داد و به طور همزمان بلات نمود.

در حالتی که بلائینگ در یک ژل صورت می گیرد، امکان استفاده از سیستم بافری پیوسته یا ناپیوسته وجود دارد. انتخاب بافر مناسب بستگی به ماهیت پروتئین، نوع الکتروفورز، نوع غشای مورد استفاده و خصوصیات ژل دارد.

انواع بافرهای پیوسته مورد استفاده در الکتروبلاتینگ

نام بافر	اجزای سازنده	PH	توضیحات
بافر تاوین	تریس ۲۵ میلی مولار، گلیسین ۱۹۲ میلی مولار، متانول ۲۰٪ (V/V)	۸٫۳	اولین بافری که برای الکتروبلات ارایه شد.
بافر تاوین دارای SDS	تریس ۲۵ میلی مولار، گلیسین ۱۹۲ میلی مولار، متانول ۲۰٪ (V/V)، SDS ۰٫۵ درصد وزنی حجمی	۸٫۳	SDS شدت بار منفی و حلالیت پروتئین ها را بالایی برد ولی از عوامل مزاحم در اتصال پروتئین ها به غشا است در صورت لزوم می توان از غلظت های کمتر آن استفاده کرد.
بافر تاوین رقیق شده	تریس ۱۲٫۵ میلی مولار، گلیسین ۹۶ میلی مولار، متانول ۱۰ درصد (حجمی/حجمی)	۸٫۳	به دلیل قدرت یونی کمتر، گرمای کمتری در طی انتقال تولید می شود. ظرفیت بافری آن نیز محدودتر است.
بافر تاوین تغییر یافته دارای SDS	تریس ۳۹ میلی مولار، گلیسین ۴۸ میلی مولار، متانول ۲۰ درصد (حجمی/حجمی)، SDS ۰٫۳ درصد (وزنی/حجمی)	۹٫۵	به دلیل وجود SDS و PH بالاتر، انواع پروتئین های الکتروفورز شده با SDS-PAGE و ایزوالکتریک فوکوسینگ را منتقل می نماید.
بافر اسکافر-نیلسن	تریس ۴۰ میلی مولار، گلیسین ۳۹ میلی مولار، متانول ۲۰ درصد (حجمی/حجمی)	۹٫۲	PH آن بالاتر از بافر تاوین است و قدرت یونی ضعیف تری دارد.
بافر تاوین بدون متانول	تریس ۲۵ میلی مولار، گلیسین ۱۹۲ میلی مولار	۸٫۳	در انتقال گلیکوپروتئین های بزرگ می توان از آن استفاده کرد.
بافر CAPS	CAPS ۱۰ میلی مولار، متانول ۱۰ درصد (حجمی/حجمی)	۱۱	در الکتروبلات به هدف تعیین توالی اسیدهای آمینه در پروتئین مناسب است.

بافرهای پیوسته مورد استفاده در انتقال نیمه خشک معمولا ترکیبی از تریس-گلیسین با قدرت یونی و PH متفاوت هستند که بسته به شرایط آزمایش، ممکن است حاوی غلظت بسیار کمی از SDS باشند. تعدادی از این بافرها در جدول زیر آمده است. می توان این بافرها را به روش نیمه خشک نیز استفاده کرد.

روش انجام آزمایش

مواد مورد استفاده جهت آزمایش

۱- بافر انتقال، این بافر شامل تریس ۱۲٫۵ میلی مولار، گلیسین ۹۶ میلی مولار، SDS ۰٫۳ درصد و متانول ۱۰ درصد با PH ۸٫۳ می باشد. برای تهیه آن ۱٫۵ گرم تریس باز، ۷٫۲ گرم گلیسین و ۰٫۳ گرم SDS را در حدود ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید. ۱۰۰ میلی لیتر متانول اضافه کنید، حجم نهایی محلول را با آب مقطر به ۱ لیتر برسانید. محلول هنگام استفاده باید خنک باشد.

۲- غشای نیتروسلولز با اندازه منافذ ۰٫۴۵، میکرون یا PVDF

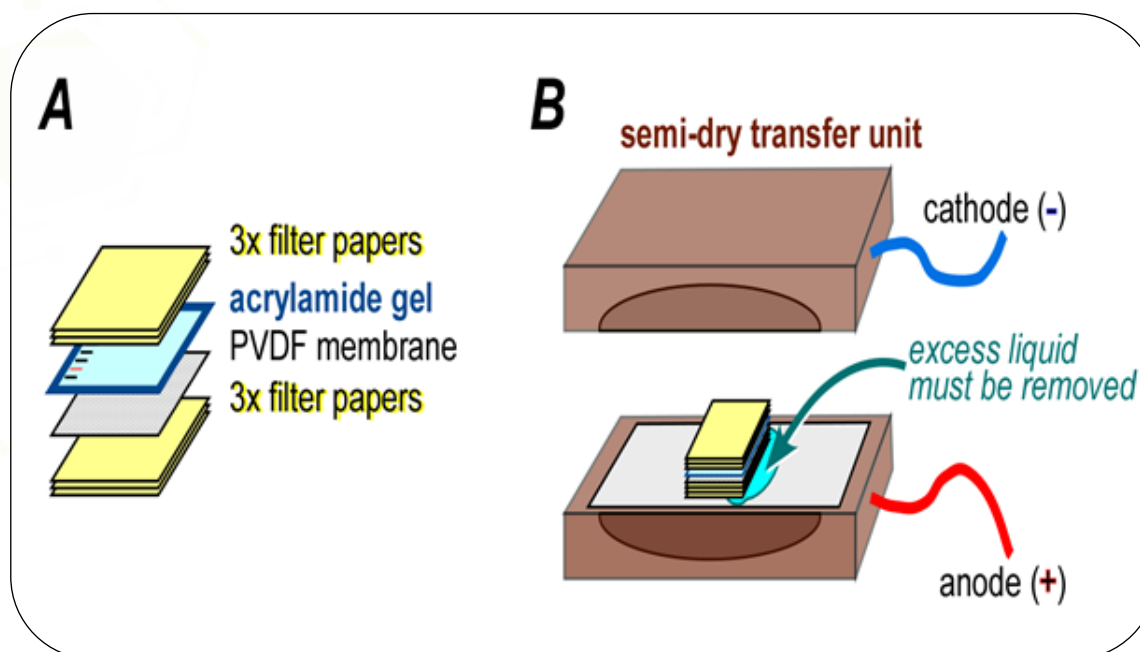
۳- کاغذ واتمن ضخیم یا کاغذ الکتروفورز

۱- مقداری بافر انتقال در یک ظرف تمیز بریزید. ژل را پس از برداشتن قسمت بالای آن (قسمت متراکم کننده) در بافر قرار دهید.

۲-۶ لایه کاغذ صافی و یک لایه غشا به اندازه ژل ببرید و در ظرف بافر خیس کنید. اگر از غشای PVDF استفاده می کنید، ابتدا آن را چند لحظه در متانول خالص خیس کنید و سپس در بافر قرار دهید. از تماس دست با اجزای بلات و محلول ها خودداری کنید.

۳- صفحه آند (با سیم قرمز) را در محل مربوطه در تانک الکتروفورز قرار دهید. ابتدا ۲-۳ لایه کاغذ خیس شده در بافر روی آند قرار دهید. سپس بقیه اجزا را مطابق شکل زیر روی هم بچینید. بعد از قرار دادن هر لایه، با پیپت یا لوله آزمایش تمیز به عنوان غلتک حباب های هوای احتمالی را خارج کنید.

۴- صفحه کاتد را روی مجموعه بلاتینگ قرار دهید. سپس ۲-۱ ساعت در ولتاژ ۲۰-۳۰ ولت الکتروفورز نمایید.



لایه های انتقالی در تکنیک سمی درای

رنگ آمیزی

ماده رنگ آمیزی	حساسیت (میکروگرم در باند)	حساسیت (میکروگرم در باند)
فاست گرین FG	$>1/5$	نیتروسلولوز، PVDF
پانسو-اس	$>1/5$	نیتروسلولوز، PVDF
کوماسی آبی R-250	$1/5$	PVDF
آمیدوبلک B	$1/5$	نیتروسلولوز، PVDF
جوهر هندی	$./1$	نیتروسلولوز، PVDF
آهن کلوییدی	$./0.3$	نیتروسلولوز، PVDF و نایلون
بیوتین و آویدین-پراکسیداز	$./0.3$	نیتروسلولوز، PVDF و نایلون
طلای کلوییدی	$./0.4$	نیتروسلولوز، PVDF

موادی که برای رنگ آمیزی عمومی پروتئین‌ها در غشا بکار می‌روند.

بعد از بلاتینگ پروتئین‌ها 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 می‌توان غشای نیتروسلولوز یا PVDF را با مواد مختلف رنگ آمیزی نمود. رنگ آمیزی پروتئین‌ها بسته به هدف آزمایش ممکن است به صورت قابل برگشت و یا غیر قابل برگشت باشد.

پانسو اس، جوهر هندی، آمیدوبلک و کوماسی آبی از مواد متداول برای رنگ آمیزی عمومی پروتئین‌ها در غشا هستند. رنگ آمیزی ژل نیز کامل یا ناقص بودن انتقال پروتئین‌ها را نشان می‌دهد.

باندهای پروتئین در ژل و غشا دقیقا هم موقعیت نمی‌باشند، زیرا ژل در طی متعادل سازی در محلول انتقال به دلیل وجود متانول، مقداری کوچک می‌شود.

رنگ آمیزی قابل برگشت با پانسو اس

محلول رنگ آمیزی شامل پانسو اس ۱٪، درصد وزنی- حجمی در اسید استیک ۵ درصد حجمی - حجمی است. محلول آماده آن نیز توسط شرکت‌های مختلفی عرضه می‌شود. 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 می‌آیند. اگر شستشو با آب ادامه یابد، باندها نیز بی رنگ می‌گردند. 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 می باشد.

رنگ آمیزی قابل برگشت با آمیدوبلک

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 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-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 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 قابل برگشت با پانسواس

■ 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.

رنگ آمیزی مارکهای پروتئینی

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

۱- قسمت مربوط به مارک‌ها را از بقیه غشا جدا نمایید و با یکی از روش‌های 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.

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

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

۴- آلبومین مرغی و آلبومین گاوی از پروتئین‌هایی هستند که در بسیاری از انواع مارک‌ها 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) می‌توان موقعیت آنها را در غشا تعیین ساخت. این روش زمانی قابل اجرا است که از این پروتئین‌ها به عنوان ماده مسدود کننده در غشا استفاده نشود.

تکنیک وسترن بلاتینگ

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

سپس شرایط واکنش آنتی بادی (برای مثال سرم بیمار) با باندهای پروتئینی فراهم می‌گردد و به دنبال آن، با استفاده از ماکرومولکول‌های نشان‌دار (برای مثال آنتی بادی 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.

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.

آنتی بادی‌ها از پر استفاده‌ترین لیگاندهای اختصاصی هستند که به اهداف مختلف تشخیص اختصاصی پروتئین‌ها می‌پردازند. آنتی بادی‌ها 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.

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 نیتروسلولز) دارند. این خصوصیت اگرچه در جای خود بسیار مطلوب است ولی با اتصال غیراختصاصی پروتئین های نشان دار در مراحل بعدی آزمایش به بروز اختلال در تشخیص منجر می شود.

توضیحات	ماده مسدود کننده
در غلظت ۵-۲ درصد در بافر (معمولا PBS) برای ۱-۲ 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 لکتین ها یا آنتی بادی های ضد کربوهیدرات (به عنوان مولکول های نشان دار) جلوگیری می نماید.	شیر خشک بدون چربی
در غلظت ۱ درصد بکار می رود.	آلبومین مرغ
در غلظت ۳-۰.۳٪ درصد بکار می رود. ژلاتین ماهی خصوصیات مناسب تری نسبت به ژلاتین پستانداران به عنوان ماده مسدود کننده دارد.	ژلاتین
غلظت بین ۱-۰.۵٪ 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.

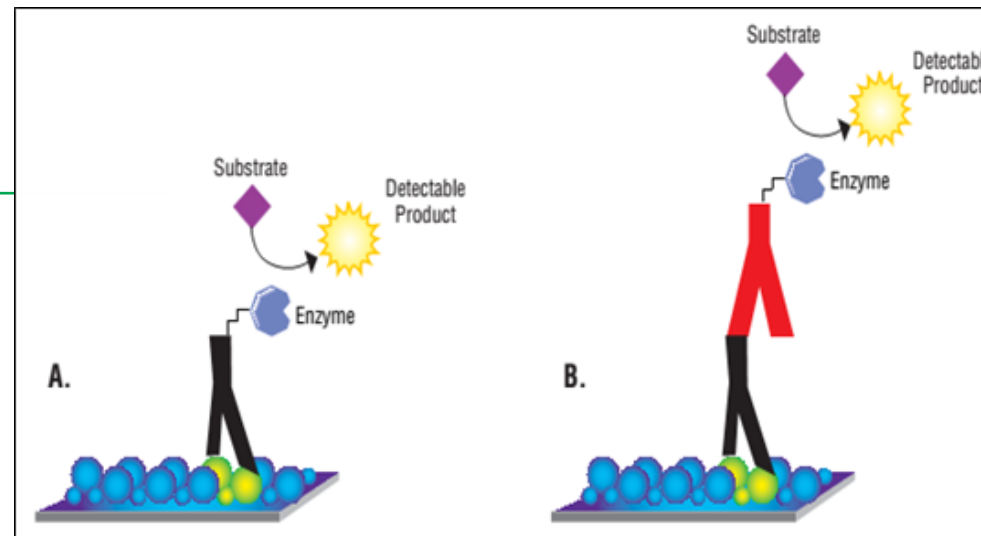
تشخیص با آنتی بادی

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 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. شناسایی با استفاده از آنتی بادی ها مانند تکنیک الایزا 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 رودآمین 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 ایمونوبلاتینگ 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 ۰,۵ 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 ۱/۱ 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

■ زمان انتقال کم می باشد. بهتر است که زمان انتقال را زیاد کرد.

■ نسبت بار به جرم غلط می باشد. پروتئین ها نزدیک به نقطه ایزوالکتریک خود در PH بافر دارای انتقال ضعیف می باشند. برای رفع این موضوع بهتر است به منظور افزایش انتقال پروتئین ها از بافر دارای خواص اسیدی و یا قلیایی قوی تر استفاده کرد.

■ کاغذ صافی بسیار خشک می باشد. یا کاغذ در بافر کم و ناکافی خیس خورده است. یا در همان ابتدای عمل انتقال بافر خشک شده است. بهتر است که قبل از عمل انتقال کاغذ صافی کاملاً در بافر خیسانده شود. تعداد صفحات کاغذ صافی را افزایش دهید، و یا از یک کاغذ صافی ضخیم تر استفاده کنید.

■ جریان پاور افت می کند. فیوزهای آن را بررسی نمایید.

■ درصد ژل خیلی زیاد می باشد. T (جمع مونومرها) و یا C (کراس لینکرها) را کاهش دهید. در C به مقدار ۵٪ کوچکترین اندازه منافذ تولید می شود. با کاهش از این مقدار، اندازه منافذ بزرگ تر خواهد شد و کیفیت انتقال بهتر خواهد شد.

■ متانول موجود در بافر، موجب محدودیت عمل شستشوی پروتئین ها از ژل می شود. خارج نمودن متانول کیفیت انتقال بهتر خواهد شد، اما این عمل همچنین سبب کاهش اتصال به نیتروسلولز خواهد شد. از PVDF استفاده کنید.

▪ پروتئین در ژل رسوب کرده است، سعی کنید از SDS در بافر انتقالی استفاده کنید. SDS می تواند کیفیت انتقال را بهتر کند، اما می تواند کیفیت اتصال به نیتروسولوز را کاهش دهد و نیز واکنش پذیری بعضی پروتئین ها با آنتی بادی ها را کم کند.

▪ تماس بین غشای بلات و ژل ضعیف می باشد. حباب های هوا یا رطوبت اضافه بین بلات و ژل قرار می گیرد. با استفاده از پیپت با دقت آن را روی کاغذ صافی به دو جهت غلط دهید تا رطوبت اضافه و حباب های هوا بین ژل و غشا بیرون بروند و تماس کامل حاصل شود. از یک کاغذ صافی ضخیم تر در ساندویچ ژل / غشا استفاده کنید. مطمئن شوید که هیچ گونه حبابی بین کاغذ صافی و ژل موجود نمی باشد.

▪ ژل کاملاً در بافر انتقالی به تعادل نرسیده است. ژل باید در بافر انتقالی کاملاً شسته شود تا از چروکیده شدن یا تورم آن در زمان انتقال جلوگیری شود. مدت زمان شستشو و یا تعداد دفعات شستشو را افزایش دهید.

▪ اگر چندین ژل همزمان در حال انتقال می باشند، ممکن است آلودگی متقاطع رخ دهد. برای رفع این مشکل از کیسه دیالیز دارای منافذ کوچکتر استفاده شود تا ساندویچ های ژل / غشا را از هم جدا کند. یا از کاغذ PVDF استفاده کنید تا با کیفیت بالاتری به قطعات کوچک متصل شوند.

▪ توان اعمال شده به سیستم انتقالی بالا می باشد. ولتاژ را کاهش دهید. هدایت پذیری بافر را بررسی نمایید. بافری که بدرستی تهیه نشده است موجب اعمال توان اضافی به سیستم انتقالی می شود.

اتصال ضعیف به غشای نیتروسلولز

■ جهت انتقال در شرایط بهینه اتصال، پروتئین های جدا شده توسط SDS-PAGE نیازمند متانول ۲۰٪ هستند. مطمئن شوید که بافر حاوی میزان کافی از متانول می باشد.

■ پروتئین های بزرگتر از ۱۵ کیلودالتون ممکن است به طور ضعیفی به نیتروسلولز ۴۵، میکرونی متصل شوند و یا در هنگام آزمون از غشا شسته شوند. بهتر است در اینجا از غشای نیتروسلولزی ۲، میکرون استفاده شود. می توان جهت بهبود اتصال، پروتئین ها را با گلوآلدهید کراس لینک داد.

■ پروتئین ها را می توان با SDS، NP-۴۰ و چندین دترجنت دیگر از غشای نیتروسلولز جدا کرد. از دترجنت توئین ۲۰ در شستشو و مراحل انکوبه نمودن با آنتی بادی استفاده شود. دترجنت ها را در بافر کامل خارج نمایید و یا میزان شان را کم نمایید. از فیکساسیون با گلوآلدهید استفاده شود.

■ SDS موجود در بافرهای انتقالی موجب کاهش کیفیت اتصال پروتئین ها می شود. از متانول ۲۰٪ در بافر انتقالی استفاده شود و قبل از انتقال ژل را در بافر متانول به تعادل برسانید.

حساسیت کم تشخیص و یا واکنش پذیری کم

■ راهنمای استفاده کیت بررسی شود.

■ اتصال آنتی ژن ناقص است.

■ زمان های واکنش آنتی بادی کافی نمی باشند. زمان های واکنش افزایش یابند.

■ بارگیری نمونه کافی نیست. غلظت پروتئین برده شده بر روی ژل را افزایش دهید.

■ ممکن است به منظور جلوگیری از دناتوره شدن در زمان انتقال، آنتی ژن نیازمند تنظیمات دمایی خاصی باشد. دستگاه های انتقالی تر ساخت دنا ژن تجهیز دارای سیرکولاتور می باشند، بنابراین بهتر است از این نوع انتقال استفاده شود.

■ آنتی بادی های مونوکلونال ممکن است آنتی ژن دناتوره شده را شناسایی نکنند. اتصال آنتی بادی های مونوکلونال و یا پلی کلونال دیگر را بررسی نمایید. پروتئین های نیتو را بلات نمایید.

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

ویدیوهای آموزشی

پشتیبانی فنی

سوالات متداول

فکس


اسکن کنید
www.Denagene.com

خدمات فروش

شماره تماس