رهینه نعمانی، دانشگاه آزاد تهران ، واحد علوم دارویی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، گرایش سلولی مولکولی
دکتر طاهره ناجی، استادیار گروه زیست شناسی سلولی و ملکولی، دانشکده فناوری های نوین ،دانشگاه آزاد واحد علوم دارویی تهران

وسترن بلات
تکنیک، نکات راهنما و چالش های روزمره
(Trouble Shooting)

وسترن بلات یا ایمنوبلات روشی در بیولوژی مولکولی است که با استفاده از آنتی بادی، پروتیین های خاصی را در یک عصاره یا نمونه بافتی می توان جداسازی و تشخیص داد. این روش شامل دو مرحله است که درآن نخست باندهای پروتیینی جدا شده باالکتروفورز، از روی ژل SDS-PAGE به غشای دیگری که بیشتراز جنس نیتروسلولز است برده می شود. در مرحله دوم با آنتی بادی اختصاصی، پروتیین مورد نظر شناسایی می شود. کلمه بلاتینگ به روش انتقال اشاره دارد و کلمه ایمونو برای واکنش میان آنتی ژن و آنتی بادی اختصاصی، در مرحله شناسایی است. (۱و۲)

برایDNA و RNA و لیپیدها نیز، روش انتقال همسانی به کار می رود که به ترتیب SOUTHERN BLOT و NORTH-ERN BLOT و EASTERN BLOT نامیده می شود.

در این مقاله به کاربردهای روش وسترن بلات در پژوهش های علمی، روش کلی انجام تست و همچنین برخی مشکلات رایج در روش وسترن بلات (Troubleshooting) پرداخته ایم.

کاربرد وسترن بلات در پژوهش های علمی

وسترن بلات در پژوهش های علمی بیشتر برای بودن و یا نبودن و همچنین میزان بیان یک پروتیین در نمونه های بیولوژیکی استفاده می‌شود.

در باره ی پروتیین هایی که میزان نمود آن ها در نمونه بافتی یا دررده سلولی پایین است، انجام ایمنوپرسیپیتاسیون (Immunoprecipitation) که نوع ساده ای از وسترن بلات است سفارش می شود.

کاربرد های دیگر وسترن بلات در پژوهش های علمی عبارتند از:

ساخت و بررسی خصوصیات آنتی بادی ها

با استفاده از وسترن بلات می توان اختصاصی بودن آنتی بادی تولید شده را بررسی کرد.

بررسی تغییرات پس از ترجمه

با استفاده از آنتی بادی اختصاصی مربوط به اسید آمینه های فسفریله شده و یا سایر تغییرات پس ترجمه ای می توان وضعیت پروتیین های تغییر شکل یافته را تعیین کرد.

تعیین موقعیت درون سلولی یک پروتیین

پس از جدا کردن ارگانل های سلولی از یکدیگر با کمک وسترن بلات بیان پروتیین مورد نظر در هر یک از ارگانل ها بررسی می شود.

نقشه یابی اپی توپ ها

نقشه یابی اپی توپ ها شامل تعیین جایگاه های اتصال (اپی توپ ها) آنتی بادی ها روی پروتیین ها است. شناسایی این اپی توپ ها در طراحی و تولید داروها، واکسن ها و همچنین در تشخیص کاربرد زیادی دارد.(۳)

توالی یابی پروتیین ها و پپتیدها

پروتیین ها پس از انتقال به غشایPVDF به راحتی جدا شده و با استفاده از اسپکترومتری جرمی تعیین توالی می شود. این روش به خصوص برای تعیین توالی پروتیین هایی که غلظت کمی دارند (۱۰ pmol) کاربرد فراوانی دارد.(٤)

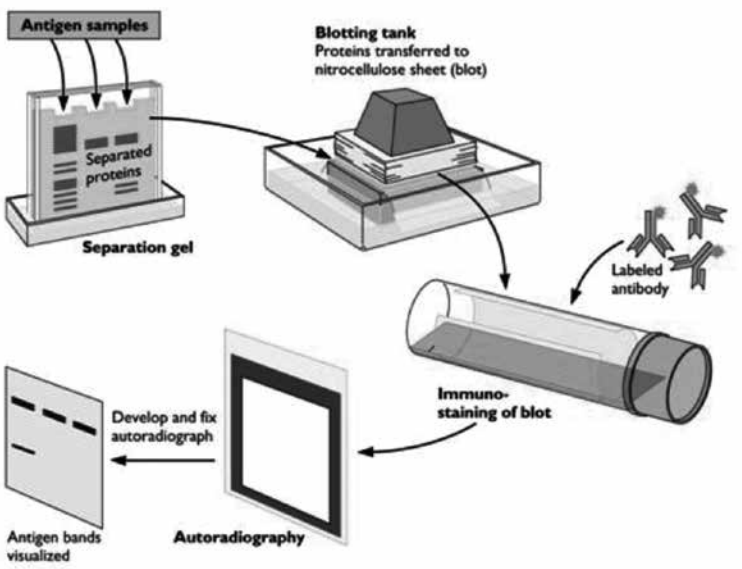
برهمکنش های پروتیین-پروتیین

وسترن بلات مرحله نهایی در Co-IP (co-immunoprecipitation) است. Co-IP یکی از روش های مهم در تأیید برهم کنش بین دو پروتیین مورد نظراست. در این روش بعد از ایمنو پرسیپیتاسیون با استفاده از وسترن بلات برهم کنش های دو پروتیین مورد بررسی قرار می گیرد.(۵و۶)

تکنیک انجام وسترن بلات

مراحل این تکنیک به ترتیب مراحل آماده سازی نمونه و لود ژل، انتقال پروتیین به ژل و سپس غشای نیتروسلولزی، اضافه کردن آنتی بادی ها و انکوباسیون و در نهایت تشخیص باندهای پروتیینی است که در دیاگرام زیر آورده شده است. (۵و۶و ۸)

نکات مربوط به انجام تکنیک در ادامه آورده شده است.



دیاگرام تکنیک وسترن بلات

نکات قابل توجه

➤ **انتخاب غشاء:**

غشاها از نظر بار الکتریکی عوامل موجود در سطح آنها به سه دسته هستند.

✓ غشای با شارژ مثبت دارای گروه آمونیوم بوده و برای پروتیین های با بار منفی و اسیدهای نوکلییک مناسب است.

✓ غشای با شارژ خنثی دارای بارهای مثبت (گروه آمین) و منفی (گروه کربوکسیل) مساوی است.

✓ غشای بدون شارژ و هیدروفوب که باز هم برای پروتیین ها به کار می رود.

تقسیم بندی بعدی غشاها بر اساس اندازه سوراخ های موجود در آنها است. سوراخ های غشاها: از ۰,۲ تا ۱,۲ میکرومتر فرق می کند. ۰,۲ برای بلات کردن پروتیین یا DNA یا RNA به کار می رود و ۱,۲ میکرومتر برای موارد خاص مثل plaque and colony lifts به کار می رود برای بلات کردن مولکول های کوچک تر از ۲۰۰۰ از غشاهای با منفذ ۱ میکرومتر به خوبی استفاده شده است با افزایش اندازه منفذ احتمال عبور مولکول های کوچک تر از عرض غشا بالا می رود. غشاهای جدیدی ارایه شده است که افینیتی بسیار بیشتر و نقاط اتصال متراکم تری نسبت به پروتیین ها دارد ولی همین افینیتی بالا موجب ایجاد رنگ زمینه (background) بسیار بالا در هنگام کار با آنها مشاهده می شود که محبوبیت آنها را کم کرده است.

می توان پس از اطمینان از محل باندها آن را با آب مقطر چندین بار شسته و مراحل بلاتینگ را ادامه داد.(۸و۹) نیتروسلولز نباید با کوماسی بلو رنگ شود در این باره از رنگ آمیدوبلک استفاده می شود (Amido black) رنگ های بسیار حساس تر از آمیدوبلاک در بازار است مانند Aurodye.

➤ **برتری بلاتینگ:** پروتیین موجود در ژل در عمق وسطح است ومولکول های عمقی از دسترس سریع معرف ها دور است، اما در غشاء در سطح قرار می گیرد و بیشتر در دسترس است. در ژل SDS به ویژه با ژل گرادیانت منافذ خیلی کوچک است و مولکول های معرف به آسانی به مولکول های پروتیین دسترسی ندارد. بدین روی زمان رنگ آمیزی و رنگبری خیلی طولانی می‌شود. پروتیین ها باید روی ژل SDS فیکس شود (فیکساتورها ساختمان مولکول پروتیین را تغییر می دهد) در حالی که در روی غشا نیازی به فیکس کردن نیست چون غشا به مولکول پروتیین گرایش زیادی دارد و مانع از پخش خودبخودی آن می شود. با این حال در بهترین شرایط فقط ۹۰ درصد پروتیین موجود در باند روی SDS به غشا منتقل می شود و در مراحل شستشو نیز مقادیری از پروتیین که افینیتی پایینی به غشا دارد در اثر استفاده از دترژنت ها کنده شده و خارج می شود.(۱۰و۱۱)

➤ **زمان جابجایی (ترانسفر):**

ترانسفر از روی ژل ایزوالکتریک فوکوس مشکل است چون در ژل ایزوالکتریک فوکوسینگ پروتیین ها در محل توقف خود دارای بار الکتریکی خنثی است، لذا باید مدت زمان بیشتری ترانسفر ادامه یابد تا منجر به انتقال پروتیین ها شود. زمان برای ترانسفر به غلظت ژل آکریلامید و ضخامت ژل و سیستم بافری و اندازه و شکل پروتیین دارد اگر زمان زیادتر و یا مولکول کوچکتر باشد شاید پروتیین از غشای نیتروسلولز نیز رد شده و غیر قابل دسترس شود. البته زمان ناکافی مایه ی جاماندن بخشی از پروتیین در روی ژل شود. (۱۱و۱۲)

➤ **دمای ترانسفر:**

دمای بافر در لحظه شروع الکتروبلات باید ۸ درجه باشد و باید بین ۸ تا ۱۵ درجه حفظ شود. اگر مقدار بافر کم باشد این مساله اهمیت بیشتری پیدا می کند دستگاه هایی ارایه شده که مرتبا بافر را در مجرای بسته ای از داخل یخ عبور می دهند تا گرمای حاصل از عبور جریان خنثی شود.(۱۱و۱۲)

➤ **اثر شدت جریان:**

دمای زیاد بافر ناشی از شدت جریان زیاد به blurred و یا distorted بلات می انجامد. جریان های ضعیف نیز بلات های خوبی نمی دهد.

بلوک کردن (BSA , Non fat Milk و ...)

ضرورت استفاده از محلول بلوک کننده در واکنش های رنگ آمیزی با ایمونوگلوبولین:

آنتی بادی یک مولکول باردار است و به محل هایی با بار مخالف میتواند پیوند شود. آنتی بادی با آنتی ژن های دیگر می تواند به صورت کراس راکت پیوند شود. این پدیده برای آنتی بادی پلی کلونال بیشتر روی می دهد.

وجود آنزیم های مشابه با آنزیم به کار برده شده در سیستم رنگ آمیزی درمیان پروتیین های الکتروفورز شده، برای نمونه آنزیم پراکسیداز یا الکالن فسفاتاز موجود در نمونه که موجب مثبت شدن رنگ آمیزی به طور کاذب می شود. البته این مشکل در رنگ آمیزی بافت ها با ایمونوگلوبولین بیشتر مطرح است و محلول های خنثی کننده خاصی برای مقابله با آن ابداع شده است و فقط جهت اطلاع در اینجا بیان می شود. محلول بلوکان رقت های بالای gelatin, BSA, ovalbumin است.

پروتیین مورد نظر از میان پروتیین های دیگر با آنتی بادی اختصاصی (موجود در سرم یک انسان) شناسایی شده و به آن وصل می شود. در مرحله بعد آنتی بادی دومی که در حیوان دیگری برعلیه ایمونوگلوبولین انسانی تولید شده و با ماده نشاندار کننده ای کونژوگه شده به سطح غشا اضافه می شود. ماده نشاندار بیشتر یک آنزیم (الکالن فسفاتاز یا پراکسیداز) است. سپس سوبسترای اختصاصی آنزیم اضافه می شود. در صورت وجود پروتیین مورد نظر در نمونه، آنتی بادی موجود در سرم به آن پیوند شده و آنتی بادی دوم (کونژوگه با آنزیم) نیز به آنتی بادی اول وصل می شود. پس از شستشو و حذف آنزیم های متصل نشده، سوبسترا به غشا افزوده می شود. سوبسترا در اثر آنزیم متصل شده به پروتیین، تغییر یافته و محصول رنگی تولید می کند. محصول سوبسترا باید غیر محلول بوده و در سطح غشا رسوب کند، تا در اثر شستشو حذف نشود. برای بالا بردن حساسیت ردیابی پروتیین گاهی از سوبستراهایی استفاده می شود که خاصیت کمی لومینسسانس دارد. برای ثبت و ظهور آنها از فیلم های حساس رادیولوژی استفاده می شود و سپس با دانسیتومتر شدت نور خوانش می شود(۱۱و ۱۲)

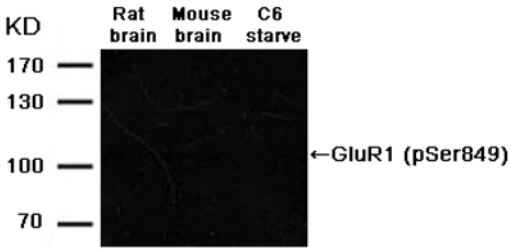
مرحله رنگ آمیزی:

منوکلونال Antibody

می‌توان آنتی بادی اول با رادیو اکتیو یا آنزیم نشان دار کرد، اما برای هر تستی و هر آنتی بادی باید آنتی بادی را خالص کرد و نشاندار نمود که کاری است دشوار. بدین روی در عمل آنتی گلوبولین نشاندار به کار برده می شود. این آنتی گلوبولین میتواند منوکلونال و یا پلی کلونال باشد. برای پایین آوردن background(پس زمینه) از آنتی بادی منوکلونال به جای Ab پلی کلونال استفاده می شود. رقیق کردن محلول آنتی بادی مصرفی نیز راه دیگری برای این منظور است. مقدار و غلظت آنتی بادی برای بلات به منشا آنتی بادی، اویدیتی آن و غلظتAg بستگی دارد. برای سنجش واکنش Ab های مختلف با نمونه پروتیینی واحد می توان نمونه را در همه Trackها ریخت الکتروفورز کرد و بعد از ترانسفر، غشا را به صورت نواری برید و با آنتی بادی های مختلف مجاور کرد.(۱۱و۱۲)

مشکلات رایج در وسترن بلات(trouble shooting

➤ عدم وجود سیگنال (باند)

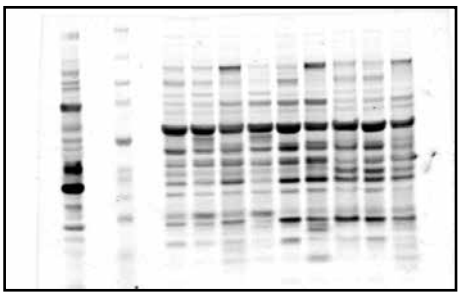


- ✓ سازگار نبودن آنتی بادی اولیه و ثانویه
- ✓ کافی نبودن آنتی بادی اولیه و ثانویه برای اتصال به پروتیین موردنظر
- ✓ وجود واکنش های تقاطعی بین فاکتورهای بلاکینگ و آنتی بادی های اولیه وثانویه
- ✓ ناچیز بودن انتقال پروتیین به سطح غشا
- ✓ استفاده بیش از حد از آنتی بادی اولیه
- ✓ محدود شدن آنتی بادی ثانویه توسط سدیم آزید
- ✓ شستشوی زیاد غشا

➤ **پر رنگ بودن زمینه**

- ✓ کم بودن دوره انکوباسیون
- ✓ زیاد بودن بیش از حد غلظت آنتی بادی اولیه
- ✓ دمای بیش از حد انکوباسیون
- ✓ واکنش یا پیوند غیر اختصاصی آنتی بادی ثانویه با فاکتورهای بلاکینگ
- ✓ وجود واکنشهای تقاطعی بین فاکتورهای بلاکینگ و آنتی بادی های اولیه وثانویه
- ✓ کافی نبودن شستشوی آنتی بادیهایی که در پیوندها دخیل نبودند.
- ✓ مناسب نبودن انتخاب غشا
- ✓ خشک شدن غشا درزمان انکوباسیون

➤ **باندهای متعدد**

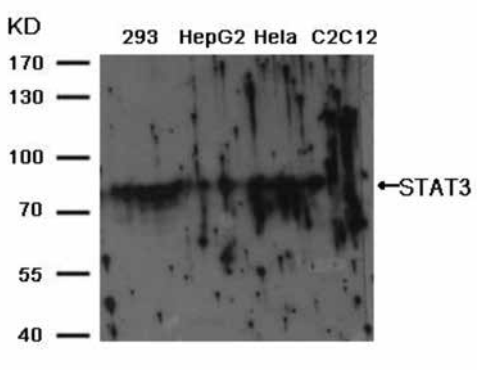


- ✓ تغییر فرم پروتیین در in vivo مانند استیلاسیون، متیلاسیون، فسفریلاسیون و غیره
- ✓ تجزیه شدن پروتیین هدف در نمونه
- ✓ غلظت بیش از حد انتی بادی اولیه
- ✓ خالص نبودن آنتی بادی
- ✓ غیر اختصاصی بودن باندها
- ✓ مولتیمر بودن پروتیین هدف

➤ نقاط سفید غیرعادی در بلات

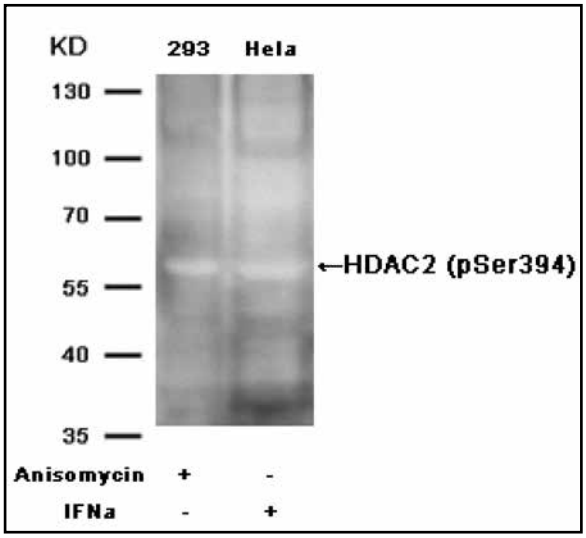
- ✓ گیرافتادن حباب هوا در غشا طی انتقال یا منتشر نشدن آنتی بادی روی غشا

➤ نقاط سیاه روی بلات



- ✓ پیوند آنتی بادی ها با فاکتورهای بلاکینگ که با فیلتر کردن فاکتورهای بلاکینگ رفع می شود.

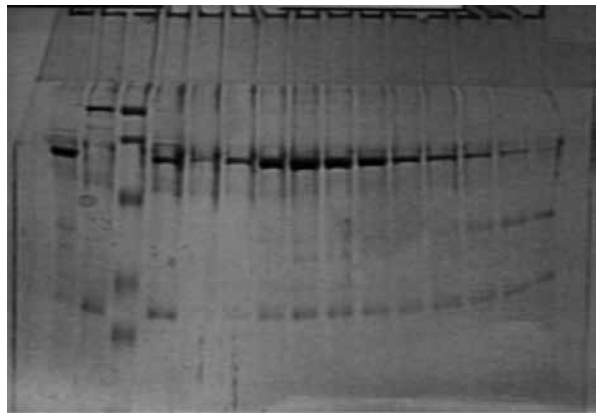
➤ باندهای سفید روی بلات سیاه



✓ استفاده بیش از حد از آنتی بادی اولیه یا ثانویه

➤ باندهای خیلی پر رنگ یا کم رنگ روی بلات
✓ کافی نبودن جداسازی

➤ تغییر شکل باندها به صورت محدب (smile effect)



✓ سریع بودن انتقال، که با کاهش ولتاژ طی run نمودن روی ژل مرتفع خواهد شد.
✓ دمای زیاد هنگام انتقال روی ژل

➤ رنگ غیرعادی ژل
✓ آلودگی باکتریایی
✓ کافی نبودن حجم آنتی بادی(۱۳و ۱٤)

منابع:

1. K. McDonald, "Increase Western blot throughput with multiplex fluorescent detection: advice and tips on how to quickly generate reliable and reproducible results," Pharma, 2010.
2. S. C. Taylor, T. Berkelman, G. Yadav, and M. Hammond, "A defined methodology for reliable quantification of Western blot data," Molecular Biotechnology, vol. 55, no. 3, pp. 217–226, 2013.
3. A. Guertler, N. Kunz, M. Gomolka, et al., "Stain-free technology as normalization tool in western blot analysis," Analytical Biochemistry, vol. 433, no. 2, pp. 105–111, 2013.
4. Renart J, Reiser J, Stark GR (1979). "Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure". Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 76 (7): 3116–20 .doi:10.1073/pnas.76.7.3116. PMC 383774. PMID 91164.
5. "Western blot antibody". exactantigen.com. Retrieved 2009-01-29.
6. Burnette WN. (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate—polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A". Analytical Biochemistry. 112 (2): 195–203.doi:10.1016/0003-2697(81)90281-5. ISSN 0003-2697.PMID 6266278.
7. Corley RB. (2005). A Guide to Methods in the Biomedical Sciences. Springer. p. 11. ISBN 978-0-387-22844-0.
8. "Imaging Systems for Westerns: Chemiluminescence vs. Infrared Detection, 2009 - , Methods in Molecular Biology, Protein Blotting and Detection, vol. 536" (PDF). Humana Press. Retrieved 2010-02-26.
9. Gilda, J. E.; Gomes, A. V. (2013). "Stain-Free total protein staining is a superior loading control to β-actin for Western blots". Analytical Biochemistry. 440 (2): 186–8. doi:10.1016/j.ab.2013.05.027.PMC 3809032 . PMID 23747530.
10. Dechend R, Homuth V, Wallukat G, Muller DN, Krause M, Dudenhausen J, Haller H, Luft FC. Agonistic antibodies directed at the angiotensin II, AT1 receptor in preeclampsia. J Soc Gynecol Investig. 2006;13(2):79- 86.
11. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975; 98: 503–17.
12. D. Penque, "Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry for biomarker discovery," Proteomics—Clinical Applications ,vol.3,no.2,pp.155–172,2009
13. J.P.Mollica,J.S.Oakhill,G.D.Lamb,andR.M.Murphy, "Are genuine changes in protein expression being overlooked? ReassessingWesternblotting," Analytical Biochemistry ,vol.386, no. 2, pp. 270–275, 2009
14. M.Hammond,J.Kohn,K.Oh,P.Piatti,andN.Liu,"A Method for Greater Reliability in Western Blot Loading Controls— Stain-Free Total Protein Quantitation," Bio-Rad Bulletin: 6360,2013 .