Western Blotting Protocol and its Troubleshooting

Javad Momeni[1], Sajad Sahab Negah[1,2*]

[1]Neuroscience Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[2]Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran

Article Info:

Received: **22 Aug 2021** ***Revised:*** **12 Jan 2022** ***Accepted:*** **27 Jan 2022**

ABSTRACT

Introduction: The detection of protein expression in tissues and nerve cells is necessary for the modern neuroscience research laboratory and laboratories making diagnostic approaches. To this point, we collected a comprehensive review article on steps and troubleshooting of Western blotting (WB). WB provides good qualitative results for determining a sample containing a target protein and is particularly useful for analyzing insoluble proteins. This process basically can be divided into five steps: (I) the protein extraction, (II) electrophoresis, (III) membrane transfer, (IV) immunodetection, and (V) visualization and analysis. These processes involve the transfer of protein patterns from gel to microporous membrane. Protein transfer with subsequent immunodetection is a great tool to identify a multitude of proteins, especially those proteins that are of low abundance. The efficient transfer of proteins from a gel to a solid membrane and specific immunodetection depend greatly on different parameters. ***Conclusion:*** For reducing the troubleshooting and enhancing awareness of the new developments in WB, this review summaries a representative of methods, reagents, and devices in the WB procedure.

Keywords:

1. Neurosciences
2. Laboratories
3. Immunoblotting

Corresponding Author: Sajad Sahab Negah

Email: *sahabnegahs@mums.ac.ir*

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.23221887.1401.10.2.2.8]
[DOI: 10.61186/shefa.10.2.133]

پروتکل وسترن بلاتینگ و چالش‌های آن

جواد مومنی[۱]، سجاد سحاب نگاه[۱،۲]*

[۱]مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[۲]مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم‌الانبیاء، تهران، ایران

اطلاعات مقاله:
دریافت: ۳۱ مرداد ۱۴۰۰ اصلاحیه: ۲۲ دی ۱۴۰۰ پذیرش: ۷ بهمن ۱۴۰۰

چـــــکیده

مقدمه: تشخیص بیان پروتئین در بافت‌ها و سلول‌های عصبی برای آزمایشگاه‌های مدرن علوم اعصاب و آزمایشگاه‌هایی که رویکردهای تشخیصی را انجام می‌دهند ضروری است. بدین منظور، ما یک مقاله مروری جامع در مورد مراحل و چالش‌های وسترن بلات (WB) جمع آوری کردیم. WB نتایج کیفی خوبی برای تعیین محتوای پروتئین هدف در یک نمونه ارائه می‌دهد و به‌ویژه برای تجزیه و تحلیل پروتئین‌های نامحلول مفید است. این فرآیند را می‌توان به‌طور کلی به پنج مرحله تقسیم کرد: ۱. استخراج پروتئین، ۲. الکتروفورز، ۳. انتقال غشا، ۴. ایمونودیتکشن، و ۵. ظهور و تجزیه و تحلیل. این فرایندها شامل انتقال الگوهای پروتئینی از ژل به غشایی با منافذ ریز است. انتقال پروتئین و به‌دنبال آن ایمونودیتکشن ابزاری عالی برای شناسایی بسیاری از پروتئین‌ها است، به‌ویژه پروتئین‌هایی که فراوانی کمتری دارند. انتقال کارآمد پروتئین‌ها از یک ژل به یک غشاء جامد و ایمونودیتکشن خاص تا حد زیادی به پارامترهای مختلف بستگی دارد. **نتیجه‌گیری:** برای کاهش چالش‌ها و افزایش آگاهی نسبت به تغییرات جدید در WB، این مقاله مروری، نمایی از روش‌ها، مواد و دستگاه ها در روش WB را فراهم می‌آورد.

واژه‌های کلیدی:
۱- علوم اعصاب
۲- آزمایشگاه‌ها
۳- ایمونوبلاتینگ

***نویسنده مسئول:** سجاد سحاب نگاه

پست الکترونیک: *sahabnegahs@mums.ac.ir*

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.23221887.1401.10.2.2.8]
[DOI: 10.61186/shefa.10.2.133]

مقدمه

وسترن‌بلاتینگ[1] (WB) یا روش لکهٔ غربی که با نام‌های لکه‌گیری پروتئین[2] و ایمونوبلاتینگ[3] نیز شناخته می‌شود، یک روش مهم برای شناسایی پروتئین‌هاست، به‌ویژه پروتئین‌هایی که از لحاظ فراوانی کمتر هستند. این فرایند شامل انتقال پروتئین‌ها از ژل بر روی غشایی با منافذ بسیار ریز می‌باشد. انتقال الکتروفورتیک (پخش ذرات باردار در یک سیال برای جدا کردن مولکول‌هایی با اندازه‌های متفاوت) و غیر الکتروفورتیک پروتئین‌ها به غشا برای اولین بار در سال ۱۹۷۹ توصیف شد. این عبارت از لکه‌گیری DNA[4] (جنوبی= نام نویسنده) و لکه‌گیری RNA[5] (شمالی) تکامل یافته است (۲-۱). واژهٔ لکهٔ غربی برای توصیف روشی ایجاد شد که از روش توبین[6] و همکاران با اندکی تغییر به دست آمد و برای حفظ سنت نامگذاری جغرافیایی که توسط Southern آغاز شده بود بدین نام نامیده شد (۴-۳، ۱). به‌طور کلی، WB مبتنی بر چند مرحلهٔ اساسی است: الف- استخراج پروتئین (از بافت، سلول و غیره)؛ ب- تعیین غلظت پروتئین؛ پ- جداسازی الکتروفورتیک پروتئین‌ها در ژل؛ ت- انتقال پروتئین‌ها به یک غشا؛ ث- بلاکینگ غشا برای کاهش باندهای غیر اختصاصی؛ ج- تشخیص آنتی‌ژن، توسط آنتی‌بادی‌های اختصاصی برای پروتئین (های) مورد نظر؛ چ- انکوباسیون با یک آنتی‌بادی ثانویه مرتبط؛ ح- ظهور؛ خ- کمی سازی باندهای حاصل با استفاده از نرم‌افزار چگالی سنجی (۵) (تصویر ۱). در علوم اعصاب تجزیه و تحلیل بیان پروتئین‌های مرتبط با نورون‌ها اغلب با وسترن‌بلات انجام می‌شود، روشی که معمولاً برای اندازه‌گیری نیمه کمی بیان پروتئین‌های هدف توسط آنتی‌بادی‌های خاص استفاده می‌شود (۸-۶). داده‌های نهایی در وسترن‌بلات، ترسیم باندهای پروتئینی هدف به همراه وزن مولکولی و نمونهٔ کنترل است. مهمترین کنترل در وسترن‌بلات بارگذاری نمونهٔ کنترل است، یعنی اندازه‌گیری پروتئینی جداگانه برای اطمینان از اینکه هر باند دارای مقدار یکسانی از پروتئین کل است. به‌عنوان مثال، β-actin، پروتئینی که در تمام سلول‌های مغزی بیان می‌شود، اغلب برای اطمینان از اینکه هر باند دارای مقدار یکسانی از پروتئین است استفاده می‌شود و به پژوهشگر اجازه می‌دهد تا شدت باندها را در نمونه‌های مختلف برای تعیین مقادیر نسبی پروتئین مقایسه کند (۷).

تصویر ۱- مراحل کلی انجام وسترن‌بلاتینگ

مبانی تئوری وسترن‌بلات

الف- استخراج پروتئین

در این مرحله نمونهٔ مورد نظر از بافت یا سلول به دست می‌آید. پس از برداشت نمونه‌های بافتی، باید بلافاصله آنها را در یک بافر PH خنثی، سرد و یخزده منجمد کرد و در دمای ۸۰- درجهٔ سانتیگراد نگهداری کرد. این مراحل برای کاهش تخریب پروتئین و حفظ تغییرات پس از ترجمه[7] (PTM)، کاهش آلودگی و جلوگیری از تداخل در مراحل بعدی انجام می‌شود (۸). به‌منظور دستیابی به داده‌های قوی‌تر، نمونه‌ها باید تا زمان استفاده یخزده باقی بمانند و حداقل دستکاری روی آنها صورت گیرد. به‌عنوان مثال، یخ زدن و ذوب چندگانه و نگهداری در دمای بالاتر باعث تخریب پروتئین‌ها می‌شود (۹).

ب- تعیین غلظت پروتئین

پس از استخراج پروتئین برای هر نمونه، نیاز به استانداردسازی پروتئین نهایی مورد نیاز برای بارگذاری در هر چاهک است. تعیین غلظت پروتئین می‌تواند از طریق روش‌های رنگ‌سنجی مانند برادفورد[8] یا جذب UV در ۲۸۰ نانومتر تعیین شود (۱۱-۱۰). روش برادفورد با استفاده از تغییر رنگ کوماسی بلو جی-۲۵۰[9] هنگام اتصال به پروتئین، از ۴۶۵ نانومتر (قهوه‌ای) تا ۵۹۵ نانومتر (آبی) انجام می‌شود، به طوری که غلظت

[1] Western Blotting
[2] Protein Blotting
[3] Immunoblotting
[4] DNA (Southern) Blotting
[5] RNA (Northern) Blotting
[6] Towbin
[7] Post- Translational Modifications
[8] Bradford
[9] Coomassie Brilliant Blue G- 250

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.23221887.1401.10.2.2.8]
[DOI: 10.61186/shefa.10.2.133]

پروتئین به نسبت جذب در ۵۹۵ نانومتر با توجه به یک منحنی استاندارد از غلظت‌های شناخته شده (به طور معمول ۱۰۰-۱۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به دست می‌آید (۱۰). انجام این روش ساده است و فقط به تجهیزات اولیهٔ طیف‌سنجی نوری[10] نیاز دارد. علاوه بر این واکنش سریع است (حدود ۲ دقیقه) و برای حدود ۱ ساعت در دمای اتاق پایدار است (۱۰). نکته‌ی مهم در این مرحله این است که محلول برادفورد بعد از رقیق شدن نباید نور ببیند و مراحل باید در تاریکی انجام شود. پس از خوانش در دستگاه طیف‌سنجی نوری میزان غلظت نمونه را با استفاده از منحنی استاندارد به دست می‌آورند و مقدار غلظت به دست آمده برای بارگذاری در هر چاهک ژل محاسبه می‌شود. لازم به ذکر است حداکثر میزان پروتئین برای هر چاهک حدود ۵۰ -۲۰ میکرولیتر و میزان غلظت پروتئین مورد نیاز بین ۱۰۰ -۱۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر است. در نهایت، در آماده‌سازی نمونه‌ها نیاز به دناتوره شدن (آشکارسازی) ساختارهای ثانویه / ثالثیه در پروتئین‌ها است، که اجازه می‌دهد جداسازی بر اساس توالی اسیدآمینهٔ اولیه متناسب با وزن مولکولی پیش‌بینی شده صورت پذیرد. بدین منظور، غلظت‌های استاندارد نمونه‌ها با بافر Laemmli مخلوط می‌شوند (۱۲). بافر نمونه Laemmle برای جداسازی بهتر پروتئین‌ها در الکتروفورز ژل SDS-PAGE[11] استفاده می‌شود و نام خود را از نام پروفسور اولریش ک. لاملی[12] گرفت (۱۲). بافر Laemmli اغلب به صورت محلول ۲X یا ۴X تهیه می‌شود و با نمونه مخلوط می‌شود و ۱X می‌شود. این بافر شامل مواد مختلفی است که دارای کارکردهای خاصی هستند. افزودن یک عامل کاهنده یا احیاء کننده، به‌طور معمول β-MCE[13] (ممکن است از DTT[14] یا TCEP[15] نیز استفاده شود) باعث شکاف پیوندهای دی سولفید می‌شود که ساختار ثانویه و ثالثیه را بی‌ثبات می‌کند و پروتئین‌ها را آشکار می‌سازد (۱۳). به دلیل تبخیر بسیار سریع β-MCE، افزودن آن باید بلافاصله بعد از استفاده باشد. علاوه بر این، غلظت بالای β-MCE یا سایر عوامل دناتوراسیون (به‌عنوان مثال ، DTT) می‌توانند در سنجش پروتئین تداخل داشته باشد و بنابراین باید بعد از تعیین غلظت پروتئین به آن اضافه شود (۱۴). در پایان، برای امکان جداسازی پروتئین‌ها از طریق جریان الکتریکی، تمام گروه‌های R پروتئینی (گروه‌های آمینواسیدی کارکردی) با افزودن SDS[16] با بارهای منفی پوشانده می‌شوند. همانطور که SDS به ساختار اولیهٔ پروتئین‌ها متصل می‌شود، بار کلی پروتئین‌ها به وزن مولکولی آنها نزدیک می‌شود و این همان چیزی است که اساس جداسازی پروتئین‌ها را از طریق ژل پلی‌آکریل‌آمید[17] تشکیل می‌دهد (۱۵). به طور معمول، ۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم پروتئین سلولی در هر چاهک بارگذاری می‌شود. با این حال، این مورد توسط عوامل مختلفی تعیین می‌شود و غلظت نهایی پروتئین برای شناسایی یک آنتی‌ژن معین باید توسط پژوهشگر تعیین شود؛ این عوامل شامل ضخامت ژل، عرض چاهک و پروتئین مورد نظر هستند (۱۶). به‌منظور تفکیک پذیری مناسب و شناسایی باند (های) مورد نظر، پروتئین‌ها توسط جرم آنها (مطابق با ساختار اولیهٔ آنها/ توالی AA) از هم جدا می‌شوند. بدین ترتیب وجود استانداردهای پروتئینی[18]، حاوی مخلوطی از پروتئین‌های از پیش تعریف شده برای تأیید گروه مورد نظر ضروری است (۱۷). چنین استانداردهایی معمولاً در اولین و آخرین چاهک ژل بارگذاری می‌شوند. استانداردها ممکن است از قبل برای سهولت مشاهده جداسازی و تأیید انتقال موثر به غشاها از قبل رنگ‌آمیزی شوند (۹).

پ- الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید (PAGE)

پس از مراحل آماده‌سازی نمونه، الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید، برای جداسازی پروتئین‌های دارای بار منفی و دناتوره شده و بر اساس وزن مولکولی آنها انجام می‌شود. جداسازی نمونه‌های پروتئینی درون ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید به دلیل مقاومت اصطکاکی یک پروتئین هنگام مهاجرت از طریق منافذ تشکیل شده بین زنجیره‌های پلیمری درون ژل اتفاق می‌افتد (۱۸). با عبور جریان الکتریکی، پروتئین‌ها از طریق منافذ درون ساختار ژل حرکت می‌کنند. به همین ترتیب، تغییر غلظت بیس-آکریل‌آمید[19] اندازهٔ منافذ و در نتیجهٔ توانایی مهاجرت پروتئین‌های بزرگتر را تنظیم می‌کند. ژل‌هایی با غلظت آکریل‌آمید بالاتر (به‌عنوان مثال، ۲۰ درصد) حرکت پروتئین‌های بزرگتر را نسبت به وزن مولکولی کوچکتر سخت‌تر می‌کنند، اما وزن‌های مولکولی پایین‌تر را آسان‌تر می‌کنند (۱۹). به همین ترتیب، اگر هدف مورد نظر یک پروتئین بزرگ باشد، ممکن است برای تفکیک بهینه، ژل با غلظت کم (به‌عنوان مثال ، ۷/۵ درصد) مورد نیاز باشد. ژل‌های مدرج و دو مرحله‌ای (به‌عنوان مثال، ۱۲-۴ درصد) وضوح یکنواختی را در طیف وزن مولکولی ارائه می‌دهند و باعث جداسازی بهتر پروتئین‌ها می‌شوند (۲۰). انتخاب غلظت و ترکیب ژل عمدتاً توسط وزن مولکولی پروتئین (های) مورد نظر تعیین می‌شود. الکتروفورز اسیدهای نوکلئیک به PH ثابت بافر و ژل برای جداسازی نیاز دارد، در حالی که نمونه‌های پروتئینی به سیستم بافر ناپیوسته نیاز دارند (۲۱، ۱۸). سیستم‌های ناپیوسته از دو ژل استفاده می‌کنند که به ترتیب شامل یک ژل انباشته[20] با منافذ بزرگتر

[10] Spectrophotometry
[11] Polyacrylamide Gel Electrophoresis
[12] Ulrich K. Laemmli
[13] β-mercaptoethanol
[14] Dithiothreitol
[15] Tris (2-carboxyethyl) Phosphine
[16] Sodium Dodecyl Sulfate
[17] Polyacrylamide Gel
[18] Protein Ladder
[19] Bis-acrylamide
[20] Stacking Gel

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.23221887.1401.10.2.2.8]
[DOI: 10.61186/shefa.10.2.133]

بالای ژل حل کننده یا جدا کننده[21] با منافذ کوچکتر است. سیستم‌های ناپیوسته به‌منظور تمرکز نمونه‌های پروتئینی و اجازهٔ تفکیک پروتئین‌ها طراحی شده‌اند. در ابتدا، پروتئین‌ها از طریق منافذ بزرگ در ژل انباشته به سرعت مهاجرت می‌کنند تا زمانی که به ژل حل کننده برسند. اندازهٔ منافذ کوچکتر این ژل، مهاجرت پروتئین‌ها را کند می‌کند، و باعث می‌شود پروتئین‌ها به هم بپیوندند و در نوارهای مستقیم قرار گیرند (۱۸). اصل دوم در مهاجرت الکتروفورتیک یون‌ها و پروتئین‌ها، از یک محلول با PH مشخص استفاده می‌کند. یون‌های کلرید موجود در ژل از تحرک بالاتری برخوردار هستند و بنابراین با سرعت بیشتری نسبت به پروتئین‌های دناتوره مهاجرت می‌کنند و یک مرز یونی را ایجاد می‌کنند (۱۸). در داخل ژل انباشته Tris-HCl (PH ۶،۸)، یک مرز دنباله‌دار از یون‌های گلیسینات[22] به دلیل کاهش تحرک در PH پایین را تشکیل می‌دهند (۲۲). در نهایت، پروتئین‌ها بین دو مرز یونی قرار می‌گیرند و نمونه را در باندهای کاملاً متمرکز قرار می‌دهند، در نتیجه آنها به ژل حل کنندهٔ حاوی منافذ کوچکتر مهاجرت می‌کنند و روند حرکت پروتئین‌ها را با توجه به اندازهٔ آنها، کند می‌کنند. ژل حل کننده به طور معمول در PH ۸،۸ تشکیل می‌شوند. این PH بالاتر باعث یونیزه شدن گلیسینات انتهایی و افزایش تحرک آن می‌شود (۱۸). به طور کلی، الکتروفورز به دلیل رابطهٔ خطی انتقال پروتئین و ولتاژ، با استفاده از یک ولتاژ ثابت و نه یک جریان ثابت انجام می‌شود. از آنجا که جریان به ولتاژ و مقاومت وابسته است، یک جریان ثابت مهاجرت پروتئین را کنترل نمی‌کند زیرا تغییرات در مقاومت (به‌عنوان مثال، گرم شدن بافر) باعث نوسان ولتاژ می‌شود. بسته به دستگاه، الکتروفورز معمولاً به مدت ۶۰ دقیقه با ولتاژ ثابت ۲۰۰ ولت انجام می‌شود تا یک جداسازی مناسب از پروتئین‌ها ایجاد کند. با این حال، ممکن است زمان کمتری برای پروتئین‌های با وزن مولکولی کوچکتر مورد نیاز باشد.

ت- انتقال

پس از جداسازی، پروتئین‌ها به صورت الکتروفورتیک به غشایی منتقل می‌شوند (الکتروبلاتینگ)، تا پروتئین‌های جدا شده بی حرکت شوند و امکان اقدامات بعدی با آنتی‌بادی‌ها فراهم شود و پایداری بیشتری در مقایسه با ژل‌ها ایجاد شود (۴). با استفاده از همان اصل PAGE، پروتئین‌های دارای بار منفی در ژل هنگام استفاده از جریان الکتریکی جانبی در حالی که غوطه ور در یک محلول بافر شده است، به داخل غشا منتقل می‌شوند (انتقال مرطوب[23]). غشا مستقیماً بر روی ژل قرار می‌گیرد تا اطمینان حاصل شود که تصویری آینه‌ای از پروتئین‌ها منتقل می‌شود. پروتئین‌ها معمولاً به غشاهای نیتروسلولز[24] یا پلی وینیلیدن دی فلوئور (PVDF)[25] منتقل می‌شوند (۴-۳). از آنجا که غشاهای نیتروسلولز آبگریز نیستند، برای استفاده در انتقال‌های مرطوب یا نیمه خشک به راحتی هیدراته می‌شوند. با این حال، غشای نیتروسلولز می‌تواند شکننده باشد، و لذا برای روش‌های معمول و رایج رنگ گیری[26] و آزمایش مجدد[27] پروتئین‌های جایگزین (دیگر) نامناسب است. تولید غشاهای PVDF آبگریز و با دوام‌تر، امکان رنگ‌گیری و کاوش مجدد را فراهم می‌کند، زیرا از نظر شیمیایی بی اثر و قوی‌تر هستند (۲۳). غشاهای PVDF پروتئین‌ها را از طریق فعل و انفعالات آبگریز متصل می‌کنند (۲۴) و قادر به اتصال مقادیر بیشتری پروتئین (۱۵۰ میکروگرم بر سانتی‌متر مربع) نسبت به سایر بسترها هستند (۲۵). اگرچه ممکن است استفاده از غشاهای PVDF در گرفتن مقادیر بیشتری پروتئین سودمند باشد، اما احتمال وقوع فعل و انفعالات غشا-آنتی‌بادی بیشتر است، و هنگام آشکارسازی لکه‌ها پس‌زمینه‌های بالاتری[28] ایجاد می‌شود، در نتیجه اهمیت انجام مراحل شستشوی کامل افزایش می‌یابد (۹). ماهیت آبگریز غشاهای PVDF نیاز به یک خیساندن اولیه در متانول دارد تا اجازه نفوذ بافر و اتصال پروتئین‌ها را بدهد (۲۶). همچنین توجه به این نکته ضروری است که انتقال پروتئین به غشاهای PVDF ممکن است با غلظت زیاد SDS مهار شود، بنابراین قبل از انتقال ژل‌ها باید کاملاً در آب مقطر شسته شوند (به‌عنوان مثال ، ۲ دقیقه برای ژل‌های نازک) و سپس در بافر انتقال (مثلاً ۵ دقیقه) قرار داده می‌شود تا مقدار SDS اضافی از بین برود (۲۷). روش‌های انتقال متنوع هستند. انتقال سنتی مرطوب شامل لایه‌های متناوب یک کاست، پدهای الیافی، کاغذ بلات، ژل پلی‌آکریل‌آمید، غشای انتخاب شده، کاغذ بلات و پدهای الیافی به صورت ساندویچ است و سپس بین آند و کاتد درون یک مخزن انتقال غوطه‌ور است (۲۸، ۳). مدت زمان انتقال به اندازهٔ پروتئین (های) مورد نظر بستگی دارد. اگر مدت زمان انتقال کم باشد منجر به ضعف سیگنال یا عدم نمایش سیگنال می‌شود، زیرا مقدار قابل توجهی پروتئین در ژل باقی می‌ماند. برعکس، اگر مدت زمان انتقال بیش از حد طولانی باشد باعث عبور پروتئین‌ها از ژل و غشا می‌شود و در نتیجه سیگنال ضعیفی ایجاد می‌کند. با این حال، غشاهای PVDF به طور کلی در مقایسه با نیتروسلولز منافذ کوچکتری دارند و باعث کاهش میزان پروتئین عبوری می‌شود. رنگ‌آمیزی ژل امکان ارزیابی کارایی انتقال را از طریق تصویرسازی پروتئین باقیمانده

[21] Resolving or Separating Gel
[22] Glycinate
[23] Wet Transfer
[24] Nitrocellulose
[25] Polyvinylidene Difluoride
[26] Stripping
[27] Re-probing
[28] Higher Backgrounds

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.23221887.1401.10.2.2.8]
[DOI: 10.61186/shefa.10.2.133]

در داخل ژل (به‌عنوان مثال ، استفاده از لکه‌های Coomassie/ silver/ Ponceau یا ژل‌های بدون لکه) فراهم می‌کند (۲۹). سایر تکنیک‌های انتقال مانند انتقال نیمه خشک[29] اغلب مورد استفاده قرار می‌گیرند زیرا بسته به نیازهای فردی یا محدودیت‌های زمانی می‌توانند زمان انتقال سریعتری (حدود یک ساعت) را فراهم آورند (۳۰). ترکیب بافر انتقال نیز کارایی انتقال را به‌ویژه برای پروتئین‌های دارای وزن مولکولی بالا تعیین می‌کند. به طور کلی، محلول‌های انتقال مرطوب دارای PH ۸٫۳ و حاوی تریس- بیس به همراه گلیسین هستند (۲۸). توجه به این نکته مهم است که PH بافر نباید از طریق افزودن محلول‌های اسیدی یا پایه‌ای تنظیم شود، زیرا این امر منجر به هدایت بالاتر از طریق افزایش حجم یون می‌شود، بنابراین دمای محلول افزایش می‌یابد و احتمال تداخل پس زمینه و یا انتقال ناکارآمد افزایش می‌یابد. این بافرها ممکن است به دلیل جریان زیاد و تغییر شکل غشا، برای جلوگیری از گرم شدن با بلوک‌های یخ سرد شوند. از متانول در بافرهای اصلی انتقال استفاده می‌شود، زیرا باعث افزایش توانایی غشاها در اتصال پروتئین‌ها و جلوگیری از تورم ژل می‌شود (۲۸، ۳). با این حال، گنجاندن متانول در این بافرها ممکن است باعث کاهش انتقال پروتئین‌های با وزن مولکولی بزرگتر (< ۱۰۰ کیلو دالتون) شود زیرا اندازه منافذ داخل ژل‌ها را کاهش می‌دهد، بنابراین توصیه می‌شود هنگام آزمایش پروتئین‌های بزرگتر، متانول را حذف کنید (۲۴). نکته حائز اهمیت در این مرحله این است که بارگذاری نابرابر نمونه‌ها ممکن است به‌عنوان تفاوت‌های محسوس در شدت باند (های) پروتئین/ خط (های) متعدد نمایش داده شود. در این حالت ممکن است تنوع به دلیل نابرابر بودن مقدار پروتئین نمونه، و یا ناشی از غلظت‌های مختلف نمونه و یا اشتباهات در حجم نمونه بارگیری شده باشد. غلظت پروتئین باید مجدداً تجزیه و تحلیل شود تا مشخص شود آیا این اتفاق افتاده است یا خیر. بدون انتقال کارآمد و کامل پروتئین‌ها، کمی سازی و تجزیه و تحلیل دقیق به خطر می‌افتد.

ث- بلاکینگ

اگرچه بلاکینگ یکی از ساده‌ترین مراحل برای انجام فرآیند WB است، اما فرایندی بسیار مهم است، زیرا می‌تواند از اتصال غیراختصاصی آنتی‌بادی به غشا جلوگیری کند (۳۱). از آنجا که میل غشا برای اتصال پروتئین‌ها و در نتیجه آنتی‌بادی‌ها زیاد است، بلاکینگ پس زمینه را کاهش می‌دهد. برای این مرحله از پروتکل ممکن است محلول‌های مختلفی استفاده شود که هرکدام مزایا و محدودیت‌های خاص خود را دارند. شیر خشک شده بدون چربی که در Tris Buffer Saline Tween-۲۰ (TBST) رقیق شده است ارزان و به طور گسترده در دسترس است و اغلب مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این حال، از آنجا که همهٔ شرایط بلاکینگ برای همهٔ پروتئین‌های هدف مناسب نیست، تأیید و آزمایش برای هر پروتئین مورد نظر همیشه توصیه می‌شود (۳۲). فقط انتخاب عامل بلاکینگ نیست که می تواند بر نتایج WB تأثیر بگذارد. حجم مادهٔ بلاکینگ و در واقع دورهٔ انکوباسیون برای بلاکینگ (که ممکن است از یک ساعت تا یک شب تغییر کند) نیز عوامل مهمی هستند (۳۳). عامل بلاکینگ با غلظت کم یا مدت زمان انکوباسیون خیلی کوتاه، احتمال اتصال غیراختصاصی آنتی‌بادی اولیه (Ab) به پروتئین‌های متصل به غشا را افزایش می‌دهد که می‌تواند منجر به پس زمینهٔ بیش از حد و یا کاهش نسبت سیگنال به نویز شود. برعکس، یک دورهٔ انکوباسیون بیش از حد طولانی و/ یا استفاده از عامل بلاکینگ بیش از حد ممکن است فعل‌وانفعالات آنتی‌ژن و آنتی‌بادی را قطع کند، و همچنین باعث کاهش نسبت سیگنال به نویز می‌شود (۹). مانند اکثر عوامل بلاکینگ، انکوباسیون برای مدت زمان بیش از ۱/۵ ساعت منجر به کاهش قدرت سیگنال (سیگنال به نویز)، و با مدت زمان ۳۰ دقیقه یا کمتر منجر به پس زمینه‌های غیر قابل قبول بالا می‌شود (۳۳). بنابراین، به تجربهٔ ما، بهینه‌سازی اولیه با استفاده از محلول شیر ۵ درصد در TBST به مدت ۱ ساعت انجام می‌شود، و سپس سطح پس زمینه ارزیابی می‌شود و متعاقباً غلظت/ عامل بلاکینگ تغییر می‌کند. هیچ عامل بلاکینگ منفردی برای هر روش سنجش WB ایده‌آل نیست زیرا هر جفت شدن آنتی‌ژن و آنتی‌بادی ویژگی‌های منحصر به فردی دارد. در نتیجه، استراتژی بلاکینگ انتخاب شده باید با توجه به ملاحظات فوق، برای هر برنامهٔ خاص بهینه شود.

چ- آنتی‌بادی اولیه

اصل WB تشخیص پروتئین‌ها از طریق اتصال و شناسایی آنتی‌بادی‌ها (Ab) به یک یا چند هدف است. این فعل و انفعال باید بسیار اختصاصی بین بخشی از آنتی‌ژن (پروتئین) به نام اپی‌توپ و مکان‌های شناسایی خاص موجود در منطقهٔ اتصال آنتی‌ژن منطقهٔ (Fab) آنتی‌بادی به نام پاراتوپ باشد (۳۴). ویژگی و عملکرد آنتی‌بادی اولیه نیز به مونوکلونال (mAb) یا پلی کلونال (pAb) بستگی دارد. آنتی‌بادی مونوکلونال فقط به یک اپی‌توپ از آنتی‌ژن وصل می‌شود در حالیکه پلی‌کلونال آنتی‌بادی می‌تواند به چندین اپی‌توپ وصل شود

[29] Semi-Dry Transfer

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.23221887.1401.10.2.2.8]
[DOI: 10.61186/shefa.10.2.133]

(۳۵). با این حال، به دلیل احتمال بیشتر اتصال غیراختصاصی، می‌تواند اختصاصیت آن را نیز به خطر اندازد (۲۴). در مقابل، مونوکلونال آنتی‌بادی اتصال بسیار مداوم و اختصاصی را به یک اپی‌توپ خاص و شناخته شده روی آنتی‌ژن ارائه می‌دهد، زیرا آنها از یک نژاد سلول تولید می‌شوند، و در برابر یک اپی‌توپ خاص به وجود می‌آیند (۳۵، ۲۴).

ح- آنتی‌بادی ثانویه

آنتی‌بادی‌های ثانویه برای تشخیص غیرمستقیم آنتی‌ژن مورد نظر متصل به آنتی‌بادی اولیه مورد نیاز است. به طور معمول آنتی‌بادی اولیه برای شناسایی به یک برچسب متصل نمی‌شود (جفت نمی‌شود)، در نتیجه نیاز به آنتی‌بادی ثانویه (به‌عنوان مثال HRP[30]، یا فلوروفورهای خاص[31]) قابل اتصال به قطعهٔ متبلور[32] (Fc) آنتی‌بادی اولیه، اجازه شناسایی بعدی توسط دوربین یا دستگاه تصویربرداری را می‌دهد. جنبهٔ مهم استفاده از آنتی‌بادی ثانویه توانایی تقویت سیگنال قابل شناسایی است، زیرا آنتی‌بادی‌های ثانویهٔ متعدد می‌توانند به آنتی‌بادی اولیهٔ واحد متصل شود، بنابراین تشخیص پروتئین‌های با فراوانی کم را تقویت می‌کند. انتخاب آنتی‌بادی ثانویه در ابتدا به ایزوتایپ آنتی‌بادی اولیه و اینکه در کدام حیوان پرورش داده شده بستگی دارد (۳۵).

خ- ظهور

اصول کلی تشخیص برای WB همانند سایر روش‌های مبتنی بر آنتی‌بادی است، مانند روش جذب کنندهٔ ایمنی متصل به آنزیم[33] (ELISA) است (۳۶). به طور کلی، آنتی‌بادی ثانویه به یک مولفهٔ برچسب خورده (به‌عنوان مثال، رادیو ایزوتوپ یا فلوروفور) یا آنزیمی که اجازهٔ تشخیص بعدی را دارد، متصل می‌شود. از نظر تاریخی، این مولفه یک ایزوتوپ رادیواکتیو یا آنزیمی در معرض فیلم اشعه X بود اما امروزه معمولا یک آنزیم یا یک فلوروفور است که توسط دوربین تشخیص داده می شود (۳۸-۳۷). دو آنزیمی که معمولاً مورد استفاده قرار می‌گیرد آلکالن فسفاتاز[34] (AP) و HRP است (۴۰، ۳۹). از هر دو روش AP و HRP می‌توان برای تشخیص رنگ‌سنجی[35] یا نورتابی شیمیایی[36] استفاده کرد. لازم به یادآوری است که هنگام استفاده از HRP، آزید سدیم[37] این آنزیم را مهار می‌کند، بنابراین محلول‌هایی مانند محلول‌هایی که برای بلاتینگ و ظهور استفاده می‌شوند، نباید حاوی آزید سدیم باشند، یا غشاها باید به اندازهٔ کافی قبل از قرار گرفتن در معرض آنزیم مورد شستشو قرار بگیرند. در تشخیص رنگ‌سنجی، یک بستر (به‌عنوان مثال ، ۳،۳'-دیامینوبنزیدین[38]) HRP اکسید می‌شود و یک محصول نامحلول قهوه‌ای تولید می‌کند (۴۱). سپس می‌توان با اسکن لکه با استفاده از یک تصویر ساز اختصاصی یا یک اسکنر اداری سنتی تصویر را به دست آورد و تجزیه و تحلیل شدت باند را با استفاده از نرم‌افزارهای رایگان و در دسترس مانند NIH Image ،کمی سازی کرد. یک عیب اساسی این شکل از تشخیص این است که واکنش شیمیایی باید متوقف شود و بنابراین، قبل از کمی سازی، لازم است شرایط واکنش بهینه (زمان واکنش ، دما و غیره) مشخص شود. با ظهور نورتابی شیمیایی، لومینول HRP در حضور پراکسید هیدروژن[39] اکسید می‌شود و تولید ۳ آمینوفتالات[40] می‌کند،که نور را در ۴۲۵ نانومتر منتشر می‌کند (۴۰). یک لکهٔ شیمیایی[41] پس از ۵-۳ دقیقه انکوباسیون با بستر به صورت بهینه تصویربرداری می‌شود و ممکن است چندین ساعت یک سیگنال تولید کند (۴۲). یک مزیت اساسی این شکل از تشخیص این است که لکه را می‌توان به طور مکرر شستشو داده و در معرض بستر[42] و لوسیفراز[43] قرار داد تا در معرض نوردهی (ظهور مجدد) قرار گیرد، که برای بهینه‌سازی پارامترهای تشخیص مفید است. بنابراین اطمینان حاصل می‌شود که لکه به مدت مورد نیاز مورد نوردهی قرار گرفته باشد. با این حال، یک نقطه ضعف احتمالی این است که لکه باید در معرض فیلم قرار گیرد، سپس باید ظهور یابد، یا در سیستم تشخیص تخصصی قرار گیرد که رایج‌ترین و دقیق‌ترین روش است. نگهداری مناسب و مدت زمان بافرها، بسترها، محلول‌های متوقف کننده و محلول‌های لوسیفراز باید به همین ترتیب در نظر گرفته شود زیرا فساد و/ یا آلودگی هر یک از این موارد می‌تواند بر روی هر یک از مراحل تأثیر بگذارد و به طور بالقوه از شناسایی جلوگیری می‌کند و یا منجر به سیگنال‌های با زمینه بسیار بالا شود. همچنین مهم است که آنتی‌بادی ثانویه به درستی نگهداری شده باشد (۸۰ - ، ۲۰- ، ۴ درجهٔ سانتیگراد) و معقولانه است که تازه باشد، زیرا آنزیم‌ها با گذشت زمان تخریب می‌شوند. اگر به درستی نگهداری شود، ممکن است آنتی‌بادی‌ها برای چندین سال دوام پذیر بمانند (۴۳). با این حال، شرکت‌های تولید کننده مدت نگهداری را برای تقریباً یک سال توصیه می‌کنند زیرا نگهداری طولانی مدت از اثربخشی آن می‌کاهد.

روش انجام وسترن بلاتینگ

مواد مورد نیاز برای اجرای پروتکل وسترن بلات

مواد مورد نیاز برای اجرای پروتکل وسترن بلات در

[30] Horseradish Peroxidase
[31] Specific Fluorophores
[32] Fragment Crystallizable (Fc)
[33] Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
[34] Alkaline Phosphatase
[35] Colorimetric
[36] Chemiluminescent
[37] sodium azide
[38] 3,3′-diaminobenzidine
[39] hydrogen peroxide
[40] 3 -aminophthalate
[41] chemiluminescent
[42] Substrate
[43] Luciferase

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.23221887.1401.10.2.2.8]
[DOI: 10.61186/shefa.10.2.133]

جداول ۱ تا ۱۲ بیان شده است. لازم به ذکر است شیوهٔ آماده‌سازی مواد با جزییات کامل در فایل ضمیمه[44] بیان شده است. در ادامه شیوهٔ اجرای پروتکل به تفصیل بیان شده است.

الف- استخراج پروتئین‌ها

در این مرحله بافت را وزن کرده و یا سلول‌ها را شمارش نمایید و هضم مکانیکی یا شیمیایی را انجام دهید. سپس بافر لایزیز[45] را (RIPA, ۱x) اضافه کنید و مهار کنندهٔ پروتئاز[46] در حدود ۱۰ درصد RIPA (جدول ۱) افزوده شود. سپس میکروتیوب محتوی بالا را ورتکس کرده و سانترفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه و دور ۱۲۰۰۰ rPM در دمای ۴ درجه انجام شود. در پایان محلول رویی برداشته شود و در ۸۰- برای طولانی مدت نگهداری شود.

ب- سنجش غلظت پروتئین

در ابتدا حجم مشخصی از محلول پروتئین به دست آمده (۵۰-۱ میکرولیتر) در مرحلهٔ قبل را با مقدار مشخصی آب استریل تزریقی رقیق نمایید. سپس برای سنجش غلظت پروتئین استاندارد BSA ۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر و محلول برادفورد را آماده کنید. سپس در ۱۰ خانه از پلیت ۹۶ خانه محلول BSA را به ترتیب از خانهٔ اول تا دهم رقیق نموده و در خانه‌های ردیف بعدی نمونه‌ها را منتقل کنید در این مرحله توجه نمایید که میزان کلی در هر خانه باید مقدار برابری (به طور مثال ۵۰ میکرولیتر) باشد. سپس در تاریکی مقدار ۲۰۰ لاندا محلول برادفورد (جدول ۲) آماده شده را در همهٔ خانه‌ها) دارای نمونه و دارای BSA) می‌ریزیم. در پایان جذب نمونه‌ها را با دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۶۳۰ بخوانید (تصویر ۲). مقدار غلظت به دست آمده در مرحلهٔ قبل را برای مقدار غلظت پروتئین مورد نظر (بین ۳۰-۷۰) برای بارگذاری در هر چاهک ژل محاسبه نمایید

پ- الکتروفورز

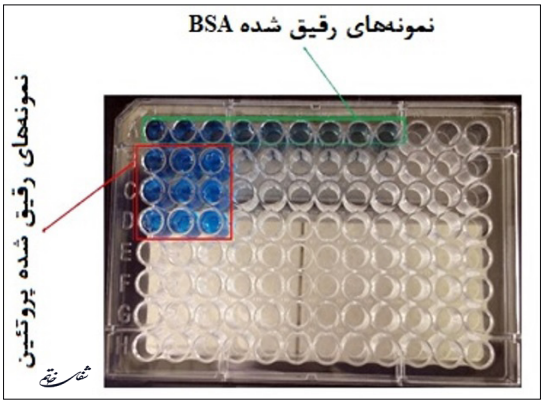
در این مرحله دو ژل وجود دارد : ژل بالا[47] و ژل پایین[48]. در ابتدا بافر ژل پایین و بافر ژل بالا طبق جدول ۳ و ۴ تهیه می‌شود، و در نهایت به ترتیب ژل پایین و ژل بالا تهیه و بارگذاری می‌شود.

جدول ۱- اجزای محلول RIPA 1x

NaCl	۱۵۰ mM
Triton x-100	۱ درصد
Sodium deoxycholate	۰/۵ درصد
SDS	۰/۱ درصد
Tris-Hcl	۵۰ mM – ۸: PH

جدول ۲- اجزای محلول برادفورد

کوماسی‌بلو G250	۵ mg
اتانول ۹۵ درصد	۲/۵ ml
فسفوریک‌اسید	۵ ml
آب مقطر	به حجم نهایی ۵۰ ml می‌رسانیم



تصویر ۲- تعیین غلظت پروتئین با استفاده از محلول برادفورد

[44] Supplementary
[45] Lysis Buffers
[46] Protease Inhibitors
[47] Stacking gel
[48] Resolving or Separating gel

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.23221887.1401.10.2.2.8]
[DOI: 10.61186/shefa.10.2.133]

ژل پایین

دستگاه وسترن دارای یک شیشهٔ ضخیم و یک شیشهٔ نازک است که بر روی هم قرار می‌گیرند (تصویر ۳-الف). ابتدا شیشه‌های ضخیم و نازک را با الکل تمیز نموده و آنها را در کاست سبز رنگ قرار دهید (تصویر ۳-ب و ج) و کاست سبز رنگ را در جایگاه مخصوص خود قرار دهید (تصویر ۳-د). توجه کنید برای اینکه ژل از پایین شیشه خارج نشود باید کاست کاملاً در محل خود قرار گیرد. در این حالت شیشه‌ها کاملاً به اسفنج زیرین می‌چسبند. پس از آماده‌سازی ژل پایین طبق جدول ۵، در آخرین مرحله TEMED را اضافه و سریعاً به بین دو شیشه منتقل نمایید. در زمان انتقال ژل بایستی دقت شود تا حباب ایجاد نگردد. در پایان روی ژل الکل ایزوپروپانول ریخته و به مدت ۴۵ دقیقه زمان دهید. پس از پایان زمان الکل را خارج کرده تا ژل بالا بارگذاری گردد.

ژل بالا

ژل بالا را طبق جدول ۶ تهیه کنید. در این مرحله نیز

جدول ۳- اجزای بافر ژل بالا

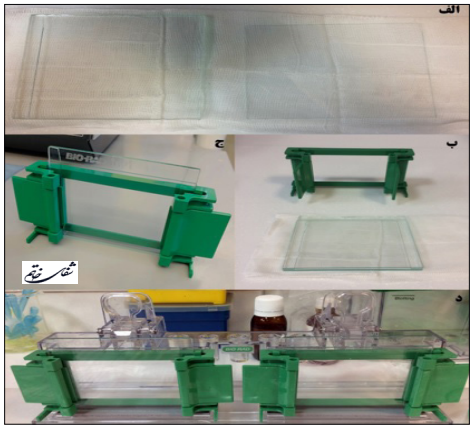
Tris	۳/۰۵ g	PH: ۶/۸
SDS	۰/۲ g	
آب مقطر	به حجم نهایی ۵۰ ml می‌رسانیم	

جدول ۴- اجزای بافر ژل پایین

Tris	۹/۱ g	PH : ۸/۸
SDS	۰/۲ g	
آب مقطر	به حجم نهایی ۵۰ ml می‌رسانیم	

جدول ۵- اجزای ژل پایین (۱۲/۵ درصد)

بافر ژل پایین	۳ ml
محلول آکریل‌آمید	۴/۹ ml
آب مقطر	۴/۱ ml
آمونیوم پرسولفات (APS) ۱۰ درصد	۶۰ µl
TEMED 100%	۷ µl



تصویر ۳- الف) شیشه‌های نازک و ضخیم؛ ب) کاست سبز رنگ؛ ج) نحوه قرارگیری شیشه‌ها در کاست د) نحوهٔ قرارگیری کاست‌ها در جایگاه مخصوص برای جایگذاری ژل بین دو شیشه.

جدول ۶- اجزای ژل بالا (۵ درصد)

بافر ژل بالا	۱/۲۵ ml
محلول آکریل‌آمید	۰/۸۱ ml
آب مقطر	۲/۹ ml
آمونیوم پرسولفات (APS) ۱۰ درصد	۶۰ µl
TEMED 100%	۵ µl

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.23221887.1401.10.2.2.8]
[DOI: 10.61186/shefa.10.2.133]

TEMED را در آخرین مرحله اضافه کرده و ژل را بین دو شیشه منتقل نمایید. سپس شانه را قرار داده و به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه زمان دهید تا ژل سفت شود.

ت- تهیه پروتئین برای لود در ژل

در این مرحله باید مقدار ۱۰۰-۱۰ میکرولیتر پروتئین در هر چاهک بارگذاری شود. بدین منظور به صورت Laemmli buffer 4x، بافر لودینگ (x پروتئین و 3x1 پروتئین‌ها را آماده کرده و به حجم مورد نظر برسانید. سپس نمونه‌ها را برای ۱۰-۵ دقیقه بر روی هات پلیت در ۱۰۰-۹۵ درجه حرارت داده و بعد از آن میکروتیوب‌ها را در حد چند ثانیه ورتکس کنید و آنها را تا زمان بارگذاری روی یخ قرار دهید. مواد مورد نیاز برای تهیه این بافر در جدول ۷ آورده شده است.

ث- انتقال به تانک الکتروفورز

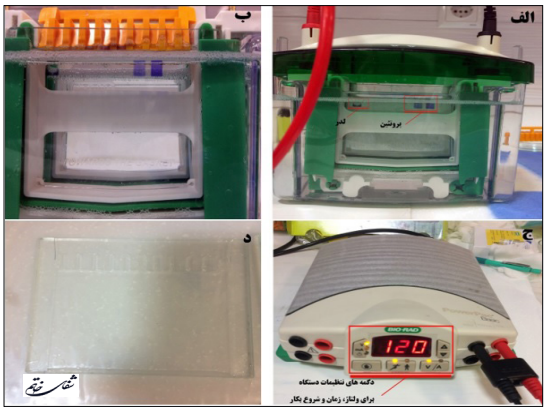
در ابتدا میکروتیوب‌ها را روی یخ گذاشته و تانک را آماده نمایید. شیشه‌ها را از داخل گیره‌ها درآورده و داخل دستگاه الکتروفورز قرار دهید. در این مرحله توجه نمایید که با توجه به رنگ روی دستگاه الکترودها و گیره در محل مناسب خود قرار گیرد. سپس تانک را از بافر الکتروفورز پر نمایید. مواد لازم برای آماده‌سازی بافر الکتروفورز در جدول ۸ آورده شده است. سپس شانه‌ها را به آرامی برداشته و بعد از اتمام ۵ دقیقه حرارت دادن نمونه‌ها، نمونه‌ها را در چاهک بارگذاری نمایید (تصویر ۴ -الف). در این مرحله برای هدایت بهتر نمونه‌ها به چاهک‌ها می‌توان از گاید نارنجی رنگ نیز استفاده کرد (تصویر ۴ - ب). در چاهک اول به طور معمول لدر[49] بارگذاری می‌شود (تصویر ۴ -الف). بعد از بارگذاری پروتئین‌ها درب دستگاه را قرار دهید. دستگاه را روشن نموده و جریان (۱۰۰-۲۰۰ ولت) و زمان (۳۰-۱۵۰) را تنظیم نموده و ران نمایید (تصویر ۴ -ج). در این مرحله پروتئین‌ها از قطب منفی به سمت قطب مثبت حرکت می‌کنند. در صورت نیاز باید وقت بیشتری بدهیم تا پروتئین‌ها کاملاً به انتهای ژل برسند. در پایان دستگاه را خاموش کرده و شیشه را بیرون آورده، دو شیشه را با کاردک مخصوص جدا کرده تا بتوانید ژل را بیرون بیاورید (تصویر ۴ - د) و سپس ژل را به محلول وسترن منتقل نمایید. توجه شود که ژل‌ها به هیچ وجه خشک نماند. مواد لازم برای آماده‌سازی بافر وسترن در جدول ۹ آورده شده است. در مرحلهٔ بعد کاغذ PVDF را با

جدول ۷- 4X SDS Sample Buffer (5ml)

Tris-HCl pH 6.5	۱ ml (۱ مولار)
2-Mercaptoethanol یا DTT (dithiothreitol)	۲ ml
SDS (sodium dodecyl sulfate)	۴۰۰ mg
bromophenol blue	۲۰ mg
glycerol	۱/۶ ml
آب مقطر	به حجم نهایی ۵ ml می‌رسانیم

جدول ۸- اجزای بافر الکتروفورز

Tris	۳ g
Glycine	۱۴/۴ g
SDS	۱ g
آب مقطر	به حجم نهایی ۱۰۰۰ ml می‌رسانیم



تصویر ۴- بارگذاری پروتئین‌ها و لدر در چاهک‌ها و تنظیم دستگاه: الف) محل بارگذاری پروتئین‌ها و لدر؛ ب) محل قرار دادن گاید نارنجی رنگ جهت بارگذاری بهتر نمونه؛ ج) دکمهٔ تنظیمات دستگاه برای ولتاژ، زمان و شروع به کار دستگاه؛ د) خارج کردن ژل از بین دو شیشه

[49] Ladder

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.23221887.1401.10.2.2.8]
[DOI: 10.61186/shefa.10.2.133]

متانول فعال کرده، سپس با آب مقطر شستشو داده و در انتها به آن بافر وسترن اضافه می‌کنیم تا خشک نشود.

چ- مرحله انتقال

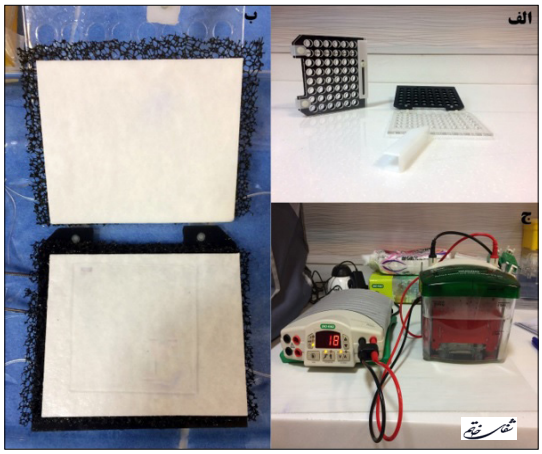
قبل از شروع این مرحله اسفنج و کاغذ فیلتر را در یک ظرف حاوی بافر وسترن قرار داده تا کاملاً خیس شود. دستگاه وسترن دارای دو کاست سوراخ دار به رنگ‌های مشکی (کاتد) و سفید (آند) می‌باشد (تصویر ۵ -الف). روی قسمت کاتد ژل را قرار داده و د ر سمت سفید کاست قرار می‌گیرد (تصویر ۵ -ب). جریان از سمت مشکی (کاتد) به سمت سفید (آند) حرکت می‌کند (تصویر ۶)، سپس کاست‌ها را در دستگاه قرار داده به صورتی که سمت مشکی آن در سمت مشکی دستگاه باشد و گیره‌ها سمت بالا باشد. در داخل دستگاه قالب یخ را قرار داده تا از دناتوره شدن پروتئین‌ها جلوگیری شود. دستگاه را روشن کرده و ولتاژ (۳۰-۱۰۰ ولت) و زمان(۳۰-۱۲۰ دقیقه) را تنظیم و ران کنید (تصویر -۵ ج).

ح) رنگ آمیزی Ponceau S اختیاری

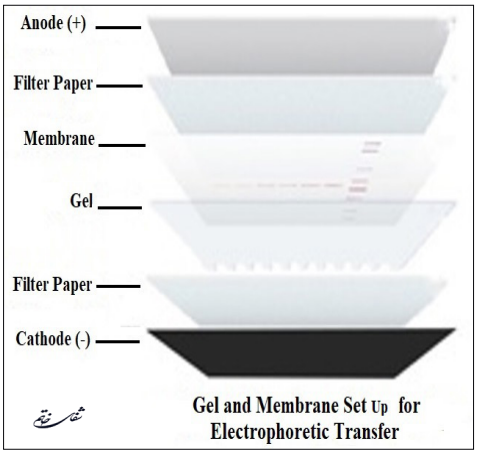
برای این که بتوان قبل از مرحلهٔ آنتی‌بادی باندهای پروتئینی را مشاهده کرد، قبل از مرحلهٔ بلاکینگ از این روش رنگ‌آمیزی استفاده می‌شود. بدین منظور ابتدا کاغذ PVDF را با محلول TBST شستشو داده، سپس کاغذ را به مدت یک ساعت در محلول Ponceau (جدول ۱۰) قرار داده تا باندهای پروتئین مشخص گردند. در پایان از آب مقطر برای حذف بک‌گراند استفاده می‌شود (تصویر ۷). پس از این مرحله ادامهٔ بلاکینگ را به روش معمول ادامه می‌دهیم.

جدول -۹ اجزای بافر تانک وسترن

Tris	۲/۴۲ g
Glycine	۱۱/۲۵ g
Methanol	۲۰۰ ml
آب مقطر	به حجم نهایی ۱۰۰۰ ml می‌رسانیم



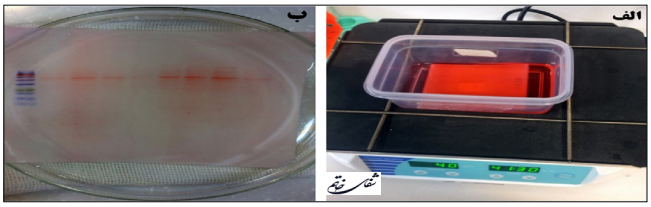
تصویر -۵ الف) کاست سوراخ‌دار جهت قرار دادن ساندویچ؛ ب) نحوه قرارگیری ساندویچ؛ ج) قرار دادن کاست ساندویچ درون تانک و شروع به کار دستگاه



تصویر-۶ اجزای مختلف ساندویچ انتقال پروتئین به غشا

جدول -۱۰ اجزای محلول Ponceau S

Ponceau	۱ g
Acetic acid	۵۰ ml
آب مقطر	۱۰۰۰ml



تصویر -۷ رنگ‌آمیزی Ponceau S: در این مرحله ابتدا کاغذ PVDF را درون ظرف حاوی Ponceau به مدت ۱ ساعت بر روی شیکر با 40 rpm قرار داده (الف)، سپس با آب مقطر شستشو دهید تا باندهای پروتئینی مشخص گردد (ب). در نهایت با شستشوی بیشتر با آب مقطر باندهای پروتئینی ناپدید می‌شوند.

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.23221887.1401.10.2.2.8]
[DOI: 10.61186/shefa.10.2.133]

خ- مرحله بلاکینگ

در این مرحله محلول بلاکینگ را طبق جدول ۱۱ و ۱۲ آماده کنید. سپس کاغذ PVDF را با پنست درون پتری دیش حاوی محلول بلاکینگ قرار دهید. در ادامه شیکر را روشن کرده (۷۵ دقیقه با دور ۵۰ rpm) و پتری دیش را روی آن قرار دهید. بعد از ۷۵ دقیقه محلول بلاکینگ را از روی PVDF بردارید.

د) آنتی بادی اولیه و ثانویه

به محض اتمام زمان بلاکینگ، آنتی‌بادی اولیه را روی کاغذ ریخته تا کاغذ PVDF را کامل بپوشاند. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه با دور ۵۰ rpm شیک گردد. در این مرحله می‌توان پتری دیش را در یک نایلون قرار داده و آن را در بشر قرار داد و بشر را وسط یک یونولیت پر از یخ گذاشت. در ضمن می‌توان شیکر را در یخچال قرار داد و پتری دیش را روی آن بگذاریم (تصویر ۸).

۲۴ ساعت بعد ابتدا به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق دور ۵۰ rpm شیک انجام می‌شود. بعد از آن به طور کامل آنتی‌بادی‌ها را از روی پتری دیش جمع کرده و با TBST سه بار هر بار به مدت ۱۵ دقیقه شستشو دهید. سپس آنتی‌بادی ثانویه را روی کاغذ ریخته و به مدت ۱/۵ ساعت دور ۵۰ rpm روی شیکر قرار دهید. در پایان، آنتی‌بادی ثانویه را از روی کاغذ جمع کرده بعد از آن ۳ بار هر بار ۵ دقیقه روی شیکر با TBST کاغذ را شستشو دهید.

ذ) ظهور

در مرحلهٔ ظهور از کیت ECL استفاده می‌شود. در این کیت (ECL Western Blotting Substrate Kit) دو محلول A و B وجود دارد (تصویر ۹) که از هر یک حدود ۲۰۰ میکرو لیتر برداشته، آن‌ها را با هم میکس کرده و پس از برداشتن TBST روی کاغذ ریخته و خوب تکان می‌دهیم (حدود ۲ الی ۲/۵ دقیقه). در پایان جهت ظهور در دستگاه مربوطه قرار دهید.

چالش‌های احتمالی در طول اجرای پروتکل وسترن بلات[50]

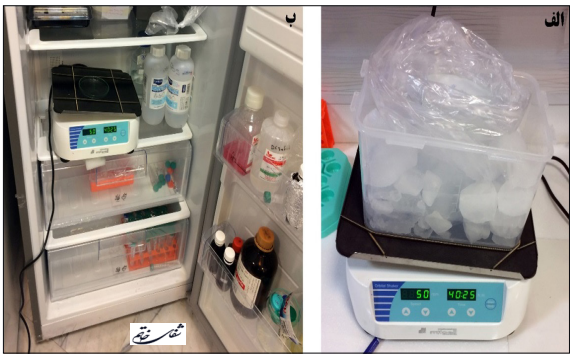
چالش‌های احتمالی که در مسیر انجام پروتکل وسترن بلات ممکن است به وجود آید در ۴ حوزهٔ کلی قرار می‌گیرد: ۱- باندهای پروتئینی مشاهده نمی‌شود، ۲- باندهای پروتئینی مشاهده می‌شود اما در اندازه و محل مناسب خود قرار ندارند، ۳- پس زمینهٔ باندهای پروتئینی بسیار روشن یا بسیار تاریک است، و ۴- مشکلات تکنیکی مربوط به تهیهٔ ژل و بافرها. برای

جدول ۱۱- اجزای محلول TBS

Tris	۲/۱۲ g
NaCl	۵/۸ g
آب مقطر	۱۰۰۰ ml
Tween 20	۱ ml

جدول ۱۲- اجزای محلول بلاکینگ ۲ درصد

شیر خشک	۲g
TBST	۱۰۰ ml
و یا به صورت زیر	
شیر خشک	۰/۴ g
TBST	۲۰ ml



تصویر ۸- سیستم‌های خنک نگه داشتن آنتی‌بادی اولیه: (الف) یونولیت یخ: می‌توان پتری دیش را در یک نایلون قرار داده و آن را در بشر قرار داد و بشر را وسط یک یونولیت پر از یخ گذاشت، ب) قرار دادن در یخچال: می‌توان شیکر را در یخچال قرار داد و پتری دیش را روی آن بگذاریم و درب یخچال را ببندیم

تصویر ۹- کیت ECL: این کیت شامل دو محلول A و B می‌باشد. این سوبسترا یک لایهٔ بسیار حساس، غیر رادیواکتیو و تقویت شده بر پایهٔ لومینول برای تشخیص آسان HRP در ایمونوبلات است و باعث افزایش سیگنال و پس زمینهٔ واضح می‌شود.

[50] Western Blot Troubleshooting

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.23221887.1401.10.2.2.8]
[DOI: 10.61186/shefa.10.2.133]

هر یک از این حوزه‌ها علل و راه حل‌های مختلفی وجود دارد که در جدول ۱۳ به تفکیک بیان شده است.

نتیجه‌گیری

در علوم اعصاب، روش وسترن‌بلات به طور گسترده‌ای برای مطالعهٔ بیان نسبی پروتئین‌های هدف مرتبط با نورون‌ها با آنتی‌بادی‌های خاص مورد استفاده قرار می‌گیرد. به طور کلی این تکنیک شامل سه مرحلهٔ اصلی است، که شامل ابتدا SDS-PAGE، سپس بلاکینگ نمونه‌ها و در نهایت آزمایش ایمونولوژی می‌باشد. با توجه به حساسیت روش و مواد فراوان، برای اجرای پروتکل می‌تواند با مشکلات فراوانی روبرو گردد که نتایج را زیر سوال می‌برد. لذا مقالهٔ مروری حاضر با هدف معرفی و تبیین این پروتکل و رفع مشکلات احتمالی به زبان فارسی انجام شده است.

جدول ۱۳- لیست چالش‌های احتمالی در طول اجرای پروتکل وسترن‌بلات و راه حل‌های آن

مشکل	علت	راه حل
ژل نمی‌بندد.	در اضافه کردن TEMED و AP نقص وجود دارد	دوباره TEMED و AP را اضافه کنید
	محلول AP فقط چند روز در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد پایدار است	AP را به صورت تازه آماده کنید
	اکسیژن از پلیمریزاسیون ژل (بستن) جلوگیری می‌کند	ژل را با لایه‌ای از ایزوپروپانول بپوشانید
ژل خیلی آهسته می‌بندد.	میزان TEMED/ AP ناکافی است	میزان TEMED/ AP را افزایش دهید.
	محلول AP خاصیت خود را از دست داده است.	AP را به صورت تازه تهیه نمایید.
ژل خیلی سریع می‌بندد.	میزان TEMED/ AP بیش از اندازه است	میزان TEMED/ AP را کاهش دهید.
زمان ران شدن بطور نامعمول بالاست.	Running buffer خیلی غلیظ است.	بررسی پروتکل؛ در صورت لزوم بافر را رقیق کنید
	جریان ناکافی است	ولتاژ را افزایش دهید
زمان ران شدن بطور نامعمول پایین است.	Running buffer خیلی رقیق است.	بررسی پروتکل؛ در صورت لزوم بافر را غلیظ کنید
انتقال		
آماده‌سازی نمونه		
باند پروتئین مورد نظر قابل مشاهده نیست	استخراج ناکافی است	روش را تغییر دهید، از کنترل مثبت در ژل استفاده کنید
	پروتئین در سطح پایینی در بافت یا سلول بیان شده است	پروتئین بیشتری را بر روی ژل بارگذاری کنید
	پروتئین در طول استخراج تخریب شده است	از مهارکننده‌های پروتئاز در بافر لایزیز استفاده کنید
الکتروفورز		
ژل نمی‌بندد.	در اضافه کردن TEMED و AP نقص وجود دارد	دوباره TEMED و AP را اضافه کنید
	محلول AP فقط چند روز در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد پایدار است	AP را به صورت تازه آماده کنید
	اکسیژن از پلیمریزاسیون ژل (بستن) جلوگیری می‌کند	ژل را با لایه‌ای از ایزوپروپانول بپوشانید
ژل خیلی آهسته می‌بندد.	میزان TEMED/AP ناکافی است	میزان TEMED/AP را افزایش دهید.
	محلول AP خاصیت خود را از دست داده است.	AP را به صورت تازه تهیه نمایید.
ژل خیلی سریع می‌بندد.	میزان TEMED/AP بیش از اندازه است	میزان TEMED/AP را کاهش دهید.
زمان ران شدن بطور نامعمول بالاست.	Running buffer خیلی غلیظ است.	بررسی پروتکل؛ در صورت لزوم بافر را رقیق کنید
	جریان ناکافی است	ولتاژ را افزایش دهید
زمان ران شدن بطور نامعمول پایین است.	Running buffer خیلی رقیق است.	بررسی پروتکل؛ در صورت لزوم بافر را غلیظ کنید
انتقال		
عدم انتقال پروتئین	پروتئین‌ها از PVDF عبور می‌کنند	میزان ولتاژ را کاهش دهید.
	پروتئین‌های بزرگتر ممکن است به زمان/ جریان بیشتری نیاز داشته باشند	کار را با زمان طولانی‌تر/ ولتاژ بالاتر انجام دهید
	تماس ناکافی بین ژل و غشا وجود دارد	ضخامت پد فیبر را بررسی کنید. اگر خیلی نازک است آن را جایگزین کنید
	ساندویچ ژل/PVDF به صورت نادرست جایگذاری شده است.	ساندویچ ژل/PVDF را به صورت صحیح جایگذاری کنید.
	غلظت متانول در بافر انتقال در حد بهینه نیست.	اطمینان حاصل کنید که بافر حاوی مقدار مناسب متانول است– به طور معمول ۲۰ درصد برای اتصال پروتئین بهینه است.

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.23221887.1401.10.2.2.8]
[DOI: 10.61186/shefa.10.2.133]

	PVDF کاملاً خیس نشده است.	PVDF را کاملاً خیس نمایید.
پروتئین کوچکتر از حد انتظار	پروتئولایز، انجماد/ ذوب چندباره نمونه‌ها	از بازدارنده‌های پروتئاز/ نمونه‌های تازه استفاده کنید
پروتئین بزرگتر از حد انتظار و/ یا باندهای متعدد	تغییرات طبیعی پروتئین (گلیکوزیلاسیون، فسفوریلاسیون، استیلاسیون و غیره)	برای یافتن مواد افزودنی برای از بین بردن گروه‌های شیمیایی منابع را مطالعه کنید
پروتئین بیش از اندازه بزرگ	پروتئین‌ها جمع شده‌اند، پیوندهای دی‌سولفید دست نخورده باقی مانده	از DTT در نمونهٔ بافر استفاده کنید. قبل از بارگذاری نمونه‌ها، آن‌ها را تکان دهید.
باند اضافی	اتصال غیر اختصاصی آنتی‌بادی اولیه یا ثانویه	غلظت‌ها را کاهش دهید.
باند در بلات بسیار زیاد یا کم به نظر می‌رسد	درصد ژل بهینه نیست	درصد ژل را برای پروتئین‌های کوچکتر افزایش و برای پروتئین‌های بزرگتر کاهش دهید.
باندهای پراکنده	مهاجرت آهسته	ولتاژ را افزایش دهید، از آماده‌سازی مناسب بافر اطمینان یابید
	نمونه‌ها به درستی حرارت ندیده‌اند	اطمینان یابید که نمونه‌ها قبل از لود شدن برای ۲ دقیقه در دمای ۱۰۰ -۹۰ درجه حرارت دیده‌اند.
	SDS در Sample buffer خیلی قدیمی است.	sample buffer را با SDS تازه آماده کنید.
باندهای ناکامل	ایجاد حباب بین ژل و غشا	با استفاده از پیپت، روی ساندویچ ژل/ غشا حرکت دهید تا حباب‌های هوا را خارج کنید
پخش شدن باندها به طرفین	خارج شدن نمونه‌ها از چاهک‌ها هنگام بارگذاری	زمان بارگذاری را کاهش دهید.
انحراف باندها	ژل نتوانسته به طور کامل در اطراف چاهک‌های نمونه بسته شود.	TEMED/ AP را افزایش دهید.
	ذرات معلق در ژل	قبل از تهیهٔ ژل، مواد ژل را فیلتر و مخلوط کنید.
	حرارت دادن بیش از اندازه و نامتعارف ژل	ولتاژ را کاهش دهید/ خنک کننده فراهم کنید
	حباب در ژل به دلیل کثیف شدن صفحات	هنگام دست زدن به صفحات از دستکش استفاده کنید
	هنگام بارگذاری در ژل حباب ایجاد شده است	دوباره بارگذاری کنید
	حباب‌های زیر شانه	شانه را با زاویه قرار دهید و قبل از جامد شدن ژل، محل آن را تغییر دهید
بلاکینگ		
وجود زمینهٔ بسیار تاریک در بلات	بلاکینگ ناقص غشا	غلظت مواد/ مدت زمان بلاکینگ را افزایش دهید. مواد بلاکینگ را تغییر دهید
	آلودگی محلول بلاکینگ	استفاده از یک پروتئین خالص مانند BSA، محلول بلاکینگ را تعویض کنید
	انکوباسیون به مدت طولانی	مدت انکوباسیون را کاهش دهید

منابع

1. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol. 1975; 98(3): 503-17.

2. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977; 74(12): 5350-4.

3. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem. 1981; 112(2): 195-203.

4. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1979; 76(9): 4350-4.

5. Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, et al. An overview of technical considerations for Western blotting applications

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.23221887.1401.10.2.2.8]
[DOI: 10.61186/shefa.10.2.133]

to physiological research. Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports. 2017; 27(1): 4-25.

6. Jalali Kondori B, Asadi MH, Azemati F. Subcloning of NGF Gene into pSecTag2/Hygro Secretory Vector and Expression in PC12 Cell Line. The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam. 2015; 3(1): 21-8.

7. Mehrabi A, Gaeini A, Nouri R, Daryanoosh F. The Effect of Six-Week HIIT Swimming Exercise and Resveratrol Supplementation on the Level of SIRT3 in Frontal Lobe of Aged Rats. The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam. 2021; 9(2): 48-59.

8. Najmi Z, Ghasemi S, Ghalandari R, Sotoudehnejad Nematalahi F. Production and Evaluation of Anti-Mouse Polyclonal Antibody Against Enterotoxin B of Staphylococcus Aurous. The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam. 2020; 8(2): 82-92.

9. Li R, Shen Y. An old method facing a new challenge: re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. Life Sci. 2013; 92(13): 747-51.

10. Carter M, Shieh JC. Chapter 14 - Biochemical Assays and Intracellular Signaling. In: Carter M, Shieh JC, editors. Guide to Research Techniques in Neuroscience. New York: Academic Press; 2010. p. 297-329.

11. Doumas BT, Bayse DD, Carter RJ, Peters T, Jr., Schaffer R. A candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and validation. Clin Chem. 1981; 27(10): 1642-50.

12. Mahmood T, Yang P-C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. N Am J Med Sci. 2012; 4(9): 429-34.

13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-54.

14. Desjardins P, Hansen JB, Allen M. Microvolume protein concentration determination using the NanoDrop 2000c spectrophotometer. JoVE (Journal of Visualized Experiments). 2009; (33): e1610.

15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227(5259): 680-5.

16. Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. Science. 1973; 181(4096): 223-30.

17. Krieg RC, Dong Y, Schwamborn K, Knuechel R. Protein quantification and its tolerance for different interfering reagents using the BCA-method with regard to 2D SDS PAGE. J Biochem Biophys Methods. 2005; 65(1): 13-9.

18. Smith BJ. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. Methods Mol Biol. 1984; 1: 41-55.

19. Taylor SC, Posch A. The design of a quantitative western blot experiment. Biomed Res Int. 2014; 2014: 361590.

20. Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J Biol Chem. 1969; 244(16): 4406-12.

21. Ornstein L. DISC ELECTROPHORESIS. I. BACKGROUND AND THEORY. Ann N Y Acad Sci. 1964; 121: 321-49.

22. Chrambach A, Rodbard D. Polyacrylamide gel electrophoresis. Science. 1971; 172(3982): 440-51.

23. Rath A, Cunningham F, Deber CM. Acrylamide concentration determines the direction and magnitude of helical membrane protein gel shifts. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013; 110(39): 15668-73.

24. Warren CM, Krzesinski PR, Greaser ML. Vertical agarose gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight proteins. Electrophoresis. 2003; 24(11): 1695-702.

25. Walker JM. Gradient SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. Methods Mol Biol. 1994; 32: 35-8.

26. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. Methods. 2006; 38(4): 283-93.

27. MacPhee DJ. Methodological considerations for improving Western blot analysis. J Pharmacol Toxicol Methods. 2010; 61(2): 171-7.

28. Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. J Biol Chem. 1987; 262(21): 10035-8.

29. Mansfield MA. Rapid immunodetection on polyvinylidene fluoride membrane blots without blocking. Anal Biochem. 1995; 229(1): 140-3.

30. Mozdzanowski J, Hembach P, Speicher DW. High yield electroblotting onto polyvinylidene difluoride membranes from polyacrylamide gels. Electrophoresis. 1992; 13(1-2): 59-64.

31. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.23221887.1401.10.2.2.8]
[DOI: 10.61186/shefa.10.2.133]

Proc Natl Acad Sci U S A. 1979; 76(9): 4350-4.

32. Colella AD, Chegenii N, Tea MN, Gibbins IL, Williams KA, Chataway TK. Comparison of Stain-Free gels with traditional immunoblot loading control methodology. Anal Biochem. 2012; 430(2): 108-10.

33. Kurien BT, Danda D, Bachmann MP, Scofield RH. SDS-PAGE to Immunoblot in One Hour. Methods Mol Biol. 2015; 1312: 449-54.

34. Jensen EC. The basics of western blotting. The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology. 2012; 295(3): 369-71.

35. Spinola SM, Cannon JG. Different blocking agents cause variation in the immunologic detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. Journal of immunological methods. 1985; 81(1): 161-5.

36. Gershoni JM, Palade GE. Protein blotting: principles and applications. Analytical biochemistry. 1983; 131(1): 1-15.

37. Kurien BT, Dorri Y, Dillon S, Dsouza A, Scofield RH. An overview of Western blotting for determining antibody specificities for immunohistochemistry. Signal Transduction Immunohistochemistry. 2011: 55-67.

38. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. ILAR journal. 2005; 46(3): 258-68.

39. Voller A, Bartlett A, Bidwell D. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. Journal of clinical pathology. 1978; 31(6): 507-20.

40. Miura T, Suzuki W, Ishihara E, Arai I, Ishida H, Seino Y, et al. Impairment of insulin-stimulated GLUT4 translocation in skeletal muscle and adipose tissue in the Tsumura Suzuki obese diabetic mouse: a new genetic animal model of type 2 diabetes. European journal of endocrinology. 2001; 145(6): 785-90.

41. Crossland H, Kazi AA, Lang CH, Timmons JA, Pierre P, Wilkinson DJ, et al. Focal adhesion kinase is required for IGF-I-mediated growth of skeletal muscle cells via a TSC2/mTOR/S6K1-associated pathway. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2013.

42. Bronstein I, Voyta J, Thorpe G, Kricka L, Armstrong G. Chemiluminescent assay of alkaline phosphatase applied in an ultrasensitive enzyme immunoassay of thyrotropin. Clinical chemistry. 1989; 35(7): 1441-6.

43. Kricka LJ. Chemiluminescent and bioluminescent techniques. Clinical chemistry. 1991; 37(9): 1472-81.

44. Babson AL, Greeley SJ, Coleman CM, Phillips GE. Phenolphthalein monophosphate as a substrate for serum alkaline phosphatase. Clinical chemistry. 1966; 12(8): 482-90.

45. Alegria-Schaffer A, Lodge A, Vattem K. Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection. Methods in enzymology. 2009; 463: 573-99.

46. Argentieri MC, Pilla D, Vanzati A, Lonardi S, Facchetti F, Doglioni C, et al. Antibodies are forever: a study using 12-26-year-old expired antibodies. Histopathology. 2013; 63(6): 869-76.

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.23221887.1401.10.2.2.8]
[DOI: 10.61186/shefa.10.2.133]