دستورالعمل استفاده از

Najm Biotech

ECL Western Blotting Detection Kit

(۵۰ میلی لیتر)

For life science research only

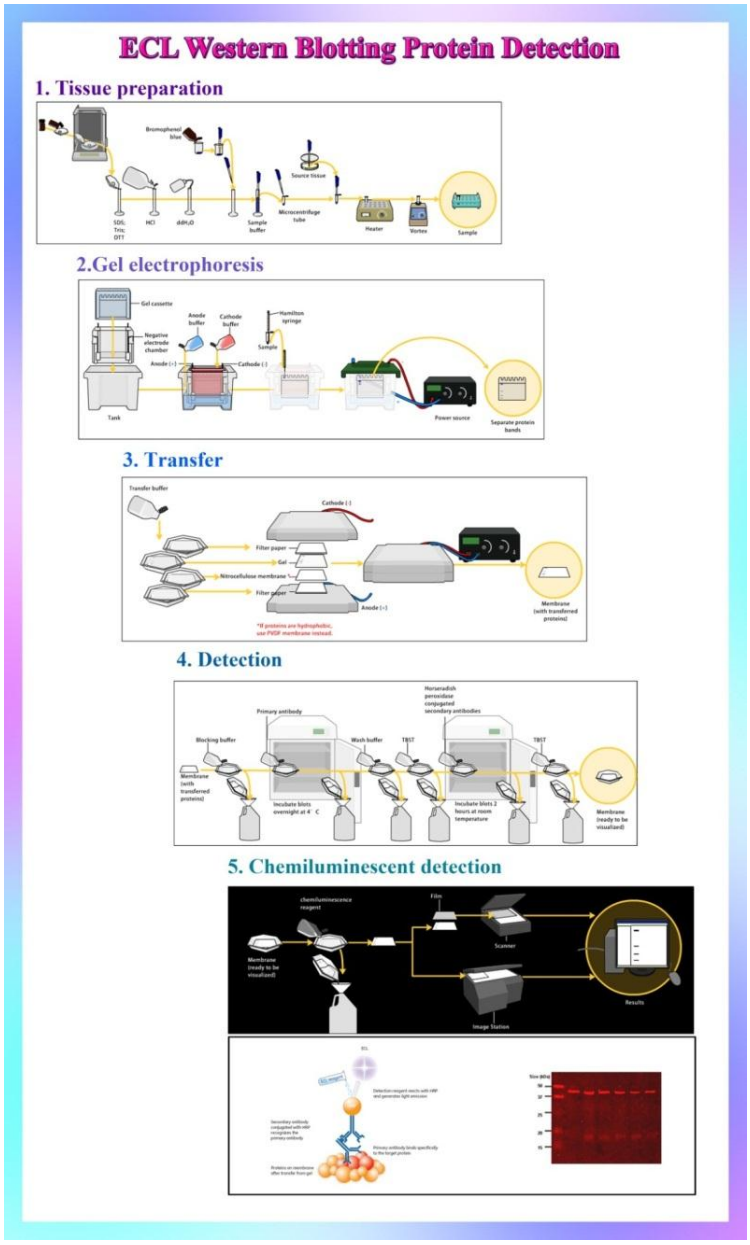
۱-معرفی :

۱-۱ وسترن بلاتینگ با استفاده از ECL

وسترن‌بلاتینگ روشی برای شناسایی پروتئین در عصاره سلول، بافت، میکروارگانیسم‌ها، سرم و سایر مایعات بافتی است. این روش آزمایشگاهی دارای ۳ مرحله کلی است. اول تفکیک پروتئین‌ها توسط الکتروفورز نمونه در ژل آکریل آمید، دوم انتقال پروتئین به غشاء نیتروسلولز و سوم شناسایی پروتئین اختصاصی. بنابراین این روش ترکیبی از الکتروفورز و انتقال پروتئین‌ها به یک فاز جامد می‌باشد. سپس پروتئین موردنظر توسط آنتی‌بادی مربوطه شناسایی می‌شود. برای مثال برای تأیید یک بیماری بعد از تفکیک پروتئین‌های سرم یا مایعات بافتی و انتقال به غشا، آنتی‌بادی اول (اولیه) علیه پروتئین یا آنتی‌بادی ساخته شده در بدن انسان به غشاء اضافه شده و سپس آنتی‌بادی دوم (ثانویه) که در حیوان دیگری برعلیه آنتی‌بادی اول تولید شده و با ماده نشاندار کونژوگه شده، به سطح غشا اضافه می شود.

ماده نشاندار معمولاً یک آنزیم [الکالاین فسفاتاز(alkaline phosphatase) یا پراکسیداز (HRP)] می‌باشد. در صورت وجود پروتئین مورد نظر در نمونه مورد آزمایش آنتی‌بادی اول به آن وصل شده و آنتی‌بادی دوم (کونژوگه با آنزیم) نیز به آنتی‌بادی اول متصل می‌شود. پس از شستشو و حذف آنزیم‌های متصل نشده، سوبسترا به غشاء اضافه می‌شود. محصول سوبسترا باید غیرمحلول بوده و در سطح غشاء رسوب کند تا در اثر شستشو حذف نشود.

برای بالا بردن حساسیت ردیابی پروتئین‌ها ازسوبستراهایی نظیر ECL استفاده می‌شود که با آنتی‌بادی دوم حاوی پراکسیداز (HRP) در حضور پراکسید هیدروژن (H_2O_2) واکنش می‌دهد و خاصیت لومینسسانس دارد. این ماده لومینسسانس نور از خود ساطع می‌کند که فیلم حساس به نور را سیاه می‌کند و شدت آن توسط دانسیتومتر اندازه گیری می گردد.



شکل شماتیکی از مراحل وسترن‌بلاتینگ
و آشکارسازی با استفاده از سیستم ECL

۳-۱ مراحل اصلی آزمایش:

مرحله	واکنش
۱	تفکیک پروتئین‌ها توسط الکتروفورز محلول پروتئینی بر روی ژل
۲	انتقال پروتئین‌های تفکیک شده از ژل به روی غشاء مناسب PVDF (یا نیتروسلولز)
۳	بلوکه کردن مکان‌های آزاد غشاء توسط محلول بلوکه‌کننده
٤	اضافه کردن آنتی‌بادی اولیه به غشاء
۵	اضافه کردن آنتی‌بادی ثانویه (HRP-conjugated) مناسب به غشاء (بر علیه آنتی‌بادی اولیه)
٦	اضافه کردن ECL و ردیابی نور لومینسانس ساطع شده از نمونه ناشی از واکنش با HRP با استفاده از فیلم عکاسی

۲- مشخصات:

۲-۱ کاربرد کیت Najm Biotech ECL Western Blotting:

قابلیت ردیابی و شناسایی هر نوع آنتی ژنی که بر روی کاغذ PVDF یا نیترو سلولز بلات شده و آنتی‌بادی بر علیه آن موجود می‌باشد.

۲-۲ تعداد آزمایش:

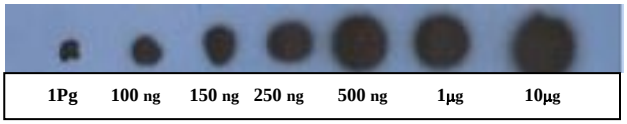
۵۰ میلی لیتر محلول ECL حاصل از ترکیب محلولهای کیت برای پوشش حداقل ۱۰۰۰ سانتی متر مربع غشاء به کار می رود.

۲-۳ پایداری محلول :

محلول‌های کیت قبل از ترکیب تا یک سال پس از تولید (تاریخ انقضاء مندرج روی کیت) پایداری دارند.

۲-٤ حساسیت کیت :

بسته به قدرت اتصال آنتی‌بادی اولیه، کیت ECL، قابلیت شناسایی مقادیر پروتئین در حد یک پیکوگرم را دارد.



۲-۵ محتویات کیت :

محتویات اولیه کیت در جدول مقابل مشاهده می‌گردد.

محلول	مقدار	دمای نگهداری
A (pH = ۹-۱۰)	٤۰میلی لیتر	٤ درجه سلسیوس
C	۵ میلی لیتر	۲۰- درجه سلسیوس
D	۵ میلی لیتر	۲۰- درجه سلسیوس
H_2O_2(35%)	۲۰۰ میکرولیتر	٤ درجه سلسیوس

همچنین محلول بلوکه کننده (skimmed milk 5%) و آنتی بادی‌های ثانویه، داروی ثبوت و ظهور و فیلم رادیولوژی نیز به درخواست مشتری ارائه می‌گردد.

۳- مواد و روشها

۳-۱ مواد اضافه شده توسط مصرف کننده

قبل از شروع انجام آزمایش	وسایل مورد نیاز	فیلم حساس به نور(فیلم عکاسی)، شیکر، ظرفهای مورد نیاز انکوباسیون، کاست عکاسی،اتاق تاریک
	محلولهای مورد نیاز	آنتی‌بادی اولیه و ثانویه مناسب، TBS، TBST، آب دوبار تقطیر، محلول ثبوت و ظهور، محلول بلوکه کننده (شیر خشک)

۳-۲ آماده سازی محلول ها و معرف های اضافی مورد نیاز

محلول	روش آماده سازی محلول	میزان پایداری	نحوه ذخیره سازی
بافر TBS (10X)	(Tris-HCl ۲٤/۲۳ گرم) (NaCl ۸۰/۰٦ گرم) آب مقطر (تا ۱ لیتر) بعد از حل شدن pH روی ۷/٦ تنظیم شود.	۳ ماه	۲ تا ۸ درجه سلسیوس
TBST	۱ میلی لیتر از Tween 20 در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر بافر TBS(1X) حل گردد.	۳ ماه	۲ تا ۸ درجه سلسیوس
آنتی بادی اولیه Dilution	TBS یا PBS که دارای Triton 0.2 %, Normal Horse Serum 10%(fresh) و BSA 2% می باشد.	**تا وقتی که رسوب یا تغییر رنگ ندهد.**	٤ درجه سلسیوس
آنتی بادی ثانویه Dilution	TBS یا PBS که دارای Triton 0.2 %, Normal Horse Serum 5%(fresh) و BSA 2% می باشد.	**تا وقتی که رسوب یا تغییر رنگ ندهد.**	٤ درجه سلسیوس
محلول بلوکه کننده	۵ گرم پودر شیرخشک در ۱۰۰ میلی لیتر محلول TBST	پایدار	دمای آزمایشگاه

۳-۳ آماده‌سازی ۱ میلی لیتر محلول ECL:

۸۰۰ میکرولیتر از بافر A و ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از محلول‌های C و D به یک ویال ۱/۵ میلی لیتری استریل اضافه می گردد تا حجم به ۱ میلی لیتر برسد و در نهایت ۰/۲۵ میکرولیتر H_2O_2 به محلول اضافه می‌شود. لازم به ذکر است که pH محلول A هر چند وقت یکبار باید کنترل شود (pH =۹-۱۰) .

٤- دستورالعمل استفاده ازکیت جهت شناسایی و ردیابی

پروتئین:

این دستورالعمل برای یک بلات با اندازه ۷×۸ سانتی‌متر تعیین شده است. در صورتی که اندازه بلات تغییر نماید به همان نسبت مقادیر محلول‌های مورد استفاده تغییر می‌نماید. پس از انتقال پروتئین‌ها از ژل آکریل آمید به روی کاغذ PVDF یا نیتروسلولز، مراحل زیر را انجام دهید:

۱- قراردادن بلات در محلول بلوکه‌کننده (تا مقداری که بلات را بپوشاند) روی شیکر به مدت یک شب در دمای $٤^{\circ}C$ یا ۳ ساعت در دمای آزمایشگاه. پروتئین‌های موجود در شیر خشک، قسمت‌هایی از بلات را که فاقد پروتئین است، اشغال نموده و مانع از اتصال آنتی بادی‌ها به آن نواحی می‌گردد.

۲- آبکشی سریع غشاء توسط TBST و اضافه نمودن آنتی‌بادی اولیه در $٤^{\circ}C$ در طول شب

۳- جمع‌آوری آنتی‌بادی اولیه و ۳ بار شست‌وشوی ۱۰ دقیقه‌ای غشاء با TBSTدر دمای آزمایشگاه و روی شیکر

٤- اضافه نمودن آنتی‌بادی ثانویه تا مقداری که سطح بلات را بپوشاند (از این مرحله به بعد، بلات نباید در معرض نور مستقیم قرار داشته باشد):

Anti-goat IgG,HRP-Conjugated: رقیق شده به نسبت ۱:۱۰۰۰۰ در TBST، ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه و روی شیکر

Anti-rabbit IgG,HRP-Conjugated : رقیق شده به نسبت ۱:۱۰۰۰۰ در TBST، ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه و روی شیکر

Anti-mouse IgG,HRP-Conjugated : رقیق شده به نسبت ۱:۱۰۰۰۰ در TBST، ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه و روی شیکر

۵- جمع آوری آنتی‌بادی ثانویه و ۳ بار شست‌وشوی ۱۰ دقیقه‌ای با TBSTدر دمای آزمایشگاه و روی شیکر

٦- اضافه کردن محلول ECL بر روی بلات: (در اتاق تاریک)

برای این منظور در اتاق تاریک، بلات را درون یک کیسه نایلونی قرار دهید و در صورت وجود کاست، کیسه را درون کاست قرار دهید و اگر کاست عکاسی موجود نیست می توانید بر روی یک صفحه ثابت، نایلون حاوی بلات را طوری قرار دهید که ثابت شود و فیلم عکاسی که بر روی بلات قرار می-گیرد بدون حرکت باشد تا باندهای پروتئین به صورت ثابت در جای خود ظاهر شود. سپس کیسه نایلونی روی بلات را کنار زده و از محلول ECL (به اندازه ۱ میلی لیتر برای بلات ۷×۸ سانتی متر) بر روی بلات ریخته شود تا کاملا" سطح بلات آغشته به محلول ECL شود. کیسه نایلونی را دوباره بر روی بلات قرار دهید. سپس فیلم عکاسی را بعد از ۵ دقیقه در صورتی که نوری رویت شد، بر روی کیسه نایلونی در محلی که بلات وجود دارد قرار دهید.

۷- فیلم رادیولوژی (X-RAY) را برای مدت زمان ۱ ثانیه تا چند دقیقه (بسته به شدت نور ساطع شده از بلات) روی بلات قرار دهید.

۸- فیلم را درون داروی ظهور (به مدت ۱دقیقه) قرار داده و پس از ۵ دقیقه شست وشو با آب مقطر در داروی ثبوت (به مدت ۱ دقیقه) قرار دهید و پس از آن با آب شست وشو نمایید.

۵- توصیه ها

۱- به نحوه نگهداری محلول های کیت Najm Biotech ECL دقت نمایید . اجزای کیت می بایست در دمای مناسب مندرج روی آن (٤ درجه و ۲۰- درجه) نگهداری شوند. pH محلول A کنترل شود (pH:۹-۱۰)

۲- حتی الامکان از انجماد و ذوب مکرر محلول‌های کیت Najm Biotech ECL اجتناب نمایید. بدین منظور محلول را در همان استفاده اولیه در ویال‌هایی با حجم‌های مورد نیاز تقسیم نمایید. لازم به ذکر است که محلول-های C و D نباید در معرض نور قرار گیرند، بنابراین پس از تقسیم‌بندی، ویال‌های مربوطه را با فویل آلومینومی بپوشانید.

۳- با توجه به قابلیت کیت Najm Biotech ECL در شناسایی پروتئین با مقادیر کمتر آنتی‌بادی ثانویه، بهینه سازی غلظت آنتی بادی‌ها برای رسیدن به غلظتی که بهترین نتیجه را حاصل می‌نماید، توصیه می‌گردد.

٦- رفع اشکلات احتمالی

مشکل	دلیل احتمالی	توصیه
نبود سیگنال یا سیگنال ضعیف	انتقال ناکارآمد پروتئین	شرایط انتقال پروتئین را تغییر دهید
	آنتی‌بادی اولیه پروتئین را شناسایی نکرده است	یک کنترل مثبت که از جواب آن مطمئن هستید را به صورت موازی انجام دهید. اگر آنتی-بادی اولیه فقط به پروتئین طبیعی وصل می‌شود، سعی کنید از سیستم ژل غیر دناتوره (فاقد SDS و مرکاپتواتانول) استفاده کنید.
	میل ترکیبی آنتی‌بادی اولیه کم است	بهینه سازی غلظت آنتی بادی، انکوبه کردن بلات با آنتی بادی اولیه به مدت یک شب در دمای ٤ درجه، زمان شست وشوی کوتاه
	غلظت کم آنتی‌بادی اولیه و ثانویه	بهینه سازی غلظت آنتی بادی
	کاهش فعالیت آنتی‌بادی ثانویه	آنتی بادی ثانویه را به طور مستقیم با ECL تست کنید، اگر سیگنال نداد از آنتی بادی ثانویه تازه استفاده کنید
	مقدار کم پروتیئنی که بر روی ژل برده شده است	مقدار پروتئین را افزایش دهید
	فعالیت کم محلول ECL	درست ذخیره شدن محلول ها را چک کنید. مطمئن شوید محلول ECL تازه تهیه شده است.
	زمان انکوبه‌شدن در معرف ECL کم بوده است	زمان انکوبه شدن را افزایش دهید.
سیگنال شدید یا پس زمینه پر رنگ	آنتی‌بادی ثانویه (HRP-conjugated) زیادی در سیستم	آنتی بادی ثانویه (HRP-conjugated) را حداقل ۱۰ برابر رقیق کنید.
	بلوکه‌کردن نامناسب و ناکافی	شرایط بلوکه کردن را بهینه کنید.
	Blocking Reagent نامناسب و ناکافی	از یک Blocking reagent متفاوت استفاده کنید.
	شست‌وشوی نادرست و کم	تعداد، مدت زمان و حجم شست وشو را افزایش دهید.
	غلظت بالای آنتی ژن و آنتی‌بادی	کم کردن غلظت آنتی بادی
	اختصاصیت کم آنتی‌بادی	از آنتی بادی با اختصاصیت بالا استفاده کنید.
	فیلم به مدت طولانی در معرض نور قرار گرفته	مدت زمان را کاهش دهید.

٧- مزایای کیت

١. قیمت پایین تر نسبت به کیت های مشابه خارجی با وجود کیفیت مشابه
٢. دسترسی آسان و تحویل سریع
٣. خدمات مشاوره‌ای پس از فروش و پاسخ به سؤالات علمی مصرف کنندگان
٤. تولید داخلی با استفاده از دانش پژوهشگران کشور

٨- تماس با ما

این محصول در شرکت زیست فناوران نجم مستقر در مرکز رشد پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تولید و توزیع می‌گردد. جهت کسب اطلاعات بیشتر با ما تماس بگیرید و یا به سایت شرکت مراجعه فرمایید.

تلفن تماس شرکت: ٠٢١٤٤٥٨٠٤٣٨، ٠٩١٢٦٨٠٢٩٨٨

تلفن تماس جهت سؤالات فنی: ٠٩١٦٩٦٠٤٦٧٢

آدرس: تهران، انتهای بزرگراه همت (غرب)، بلوار پژوهش، مرکز رشد زیست فناوری. شرکت زیست فناوران نجم