



**ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ
УНИВЕРСИТЕТІ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ
ФАКУЛЬТЕТІ**



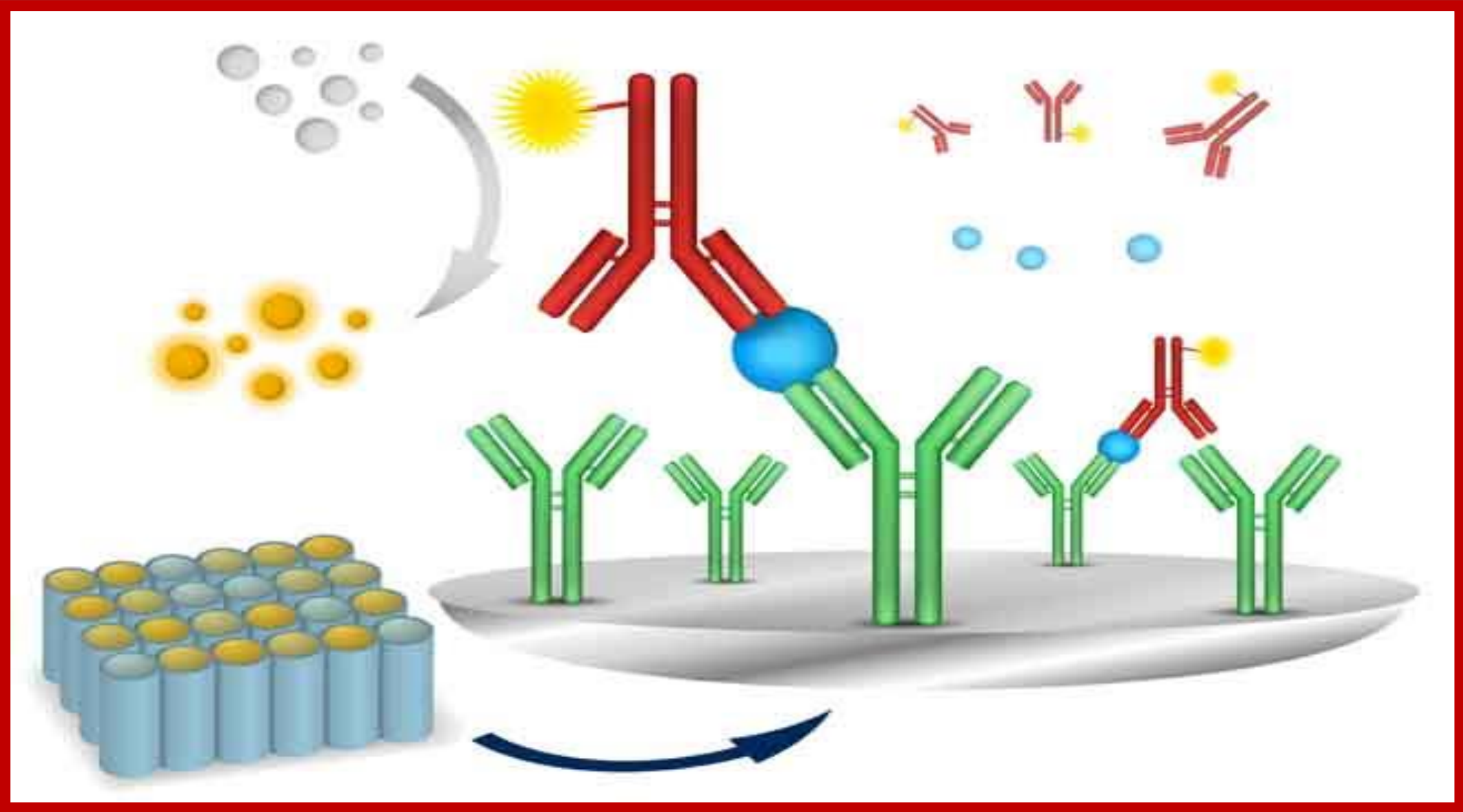
WESTERN BLOT ӘДІСІ



автор фото: Петр Шаров

**Химия ғылымдары докторы,
профессор Шоинбекова С.А.**





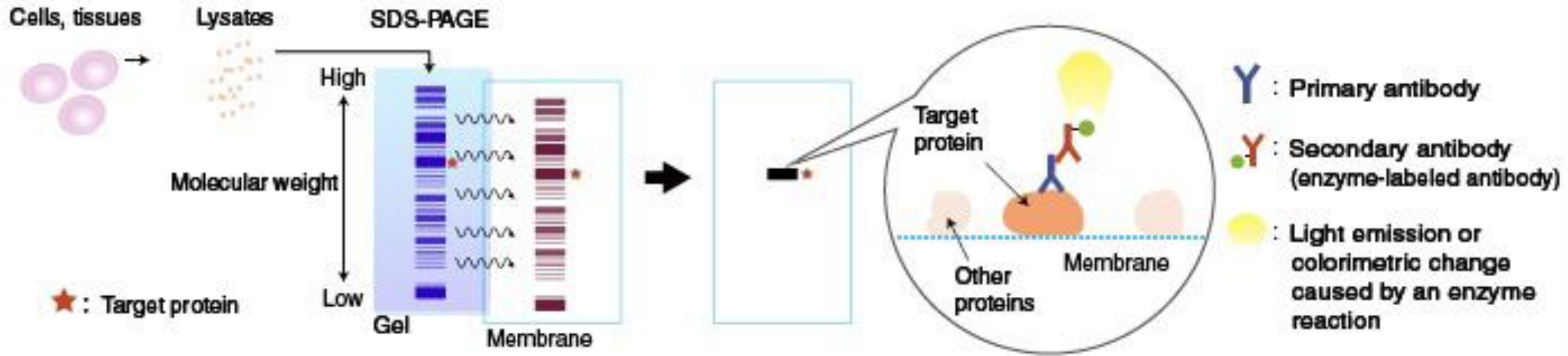
WESTERN BLOT

- *Western Blotting* (кейде ақуызды иммуноблоттау деп аталады) - гомогенат үлгісіндегі немесе тін сығындысындағы арнайы ақуыздарды анықтау үшін молекулалық биология мен иммуногенетикада кеңінен қолданылатын аналитикалық әдіс.
- Вестерн-блоттинг әдісі Стэнфорд университетінде, Джордж Старк зертханасында жасалды. Бұл әдіске 1981 жылы «Western blot» атауын берген У. Нейл Бурнет, ағылшын биологы Эдвин Саузерннің атымен аталған ДНҚ анықтау әдісі – «Southern blot»-қа ұқсатып.
- Соған аналогия: РНҚ-ны анықтау - *нозерн-блоттинг*, ал белоктардың посттрансляциялық модификациясын - *истерн-блоттинг* деп аталды.
- «*Вестерн блоттинг*» әдісі басқа мәліметтер бойынша 1979 жылы Швейцарияның Базель қаласындағы Фридрих Мишер институтындағы Гарри Таубин зертханасында пайда болған.
- 1979-2019 жылдар аралығында «ол PubMed» тізіміне енгізілген 400 000-нан астам басылымдардың тақырыптарында, аннотацияларында және кілт сөздерінде айтылды" және әлі күнге дейін ақуызды талдаудың ең көп қолданылатын әдісі болып табылады.

ПРИНЦИПІ

Ақуыздар электрофорез арқылы бөлініп, мембранаға беріледі.

Антиденелерді зондтау және фермент реакциясы арқылы мақсатты ақуызды анықтау.



1. Белоктарды **изоэлектрлік нүкте (pI), молекулярлы массасы, электрлік заряды** бойынша бөлуге болады.
2. ПААГ-дегі электрофорезды **натрий додецилсульфаты** (ағылш. *SDS*) қатысында жүргізеді. SDS белоктарды денатурацияға ұшыратады. Акриламидтің концентрациясынан заттың бөлінуі тәуелді: ПААГ-дің концентрациясы жоғары болса, төмен молекулалы, ал концентрациясы төмен болса – жоғары молекулалы белоктар жақсы бөлінеді.
3. Қазір екі өлшемді электрофорез қолданылады (1 бағытта - белоктар **изоэлектрлік нүкте** бойынша, екінші бағытта – ММ).
4. Үлгілерді «гель қалталарына» құйып, бір жолаққа мол. салмағы белгілі белоктардың қоспасын құяды.
5. Белоктар ПААГ-де **электрофорез** көмегімен бөлінеді.
6. Кернеу берілген соң белоктар бөлінеді.

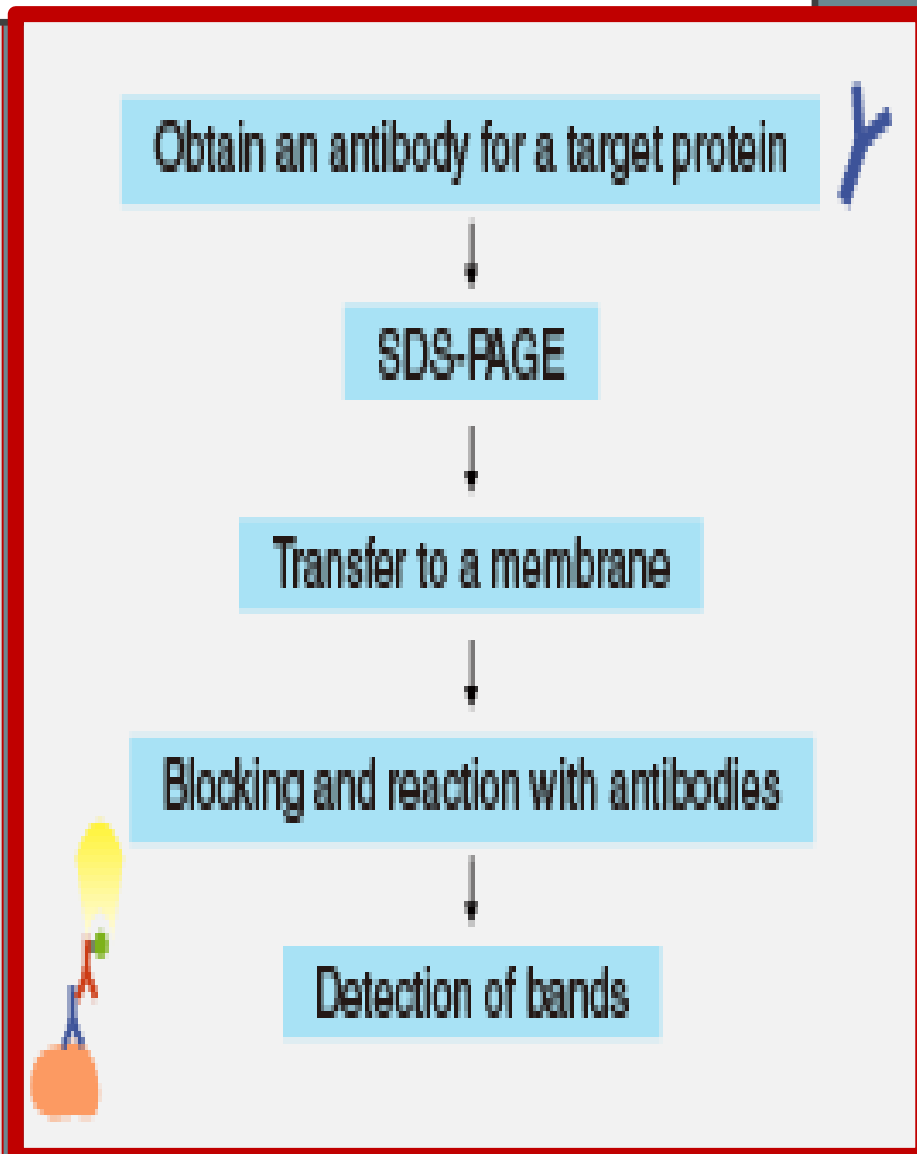
ҮЛГІНІ МЕМБРАНАҒА ТАСЫМАЛДАУ.

1. Белоктарды электрофорезден кейін ***нитроцеллюлоза немесе поливинилиденфторидтен (PVDF)*** жасалған мембранаға таңбаланады. Ол үшін мембрананы гельдің үстіне салады, оның үстіне қабатталған фильтр қағаздарын салады.
2. Барлығын ***тасымалдаушы буферге салады.*** Капилляр күшінің әсерінен белоктар мембранаға көшеді.
3. Белоктарды тасымалдайтын тағы бір әдіс - ***электроблоттинг*** деп аталады (электр тоғы қолданылады).
4. Белоктар гелден мембранаға өздерінің орнын ауыстырмай тасымалданады.
5. Ары қарай белоктар детекцияға жіберіледі. Екі мембрананың қолданылуы белоктарды спецификалық байластыру қасиетіне негізделген; белоктардың мембранамен байланысуы: ***гидрофобтық*** және электростатикалық ***әрекеттесу.*** Нитроцеллюлды мембрана поливинилиденфторидке қарағанда арзан (хрупкая и хуже выдерживает повторное нанесение меток).
6. Белоктардың мембранаға өткенін бояғыш заттардың ***Coomassie blue*** немесе ***Ponceau S.*** көмегімен анықтауға болады. ***Ponceau S.*** – суда жақсы ериді, сезімтал.

1. Арнайы емес байланыстыруды блоктау үшін мембрананы құрамында Tween 20 немесе Triton X-100 сияқты жуғыш заттар қосылған (аз пайыз) ақуыздың еріген ерітіндісіне (әдетте сиыр сарысуы альбумині немесе майсыз құрғақ сүт (екеуі де арзан)) салады.
2. Сұйытылған ерітіндінің ақуызы мақсатты ақуыз жабыспайтын барлық жерлерде мембранаға бекітіледі. Сондықтан, антиденелер қосылған кезде, олар бекітетін мембрананың жалғыз бос кеңістігі - белгілі бір мақсатты ақуыздар үшін байланысатын орындар.
3. Репортер ферментімен байланысқан антидене сәйкес белок «таңбаланады», ол колориметриялық реакцияға әкеледі және түс береді.

ПРИНЦИПІ

SDS-PAGE-ден кейін гельге мембрана қойылады, оған гелдегі бөлінген ақуыздар электрофоретикалық түрде тасымалданады. Содан кейін тасымалданатын ақуыздары бар мембрана бастапқы антиденемен (мақсатты ақуызға тән антидене) зондталады, жуылады және желкек пероксидазасы (HRP) сияқты ферментпен белгіленген екінші антиденемен әрекеттеседі. Байланыстырылған ферменттің белсенділігі мақсатты ақуызды анықтау үшін қолданылады және химилюминесцентті немесе хромогендік әдіспен көрінеді. Western blot процедурасының барысы оң жақтағы диаграммада көрсетілген. Келесі бөлімдер ақуыздарды мембранаға электрмен тасымалдаудан басталатын процедураны сипаттайды. Антиденелерді алу үшін қолданылатын әдістер және SDS-PAGE принципі мен әдісі туралы білу үшін төмендегі сілтемелерді орындаңыз.

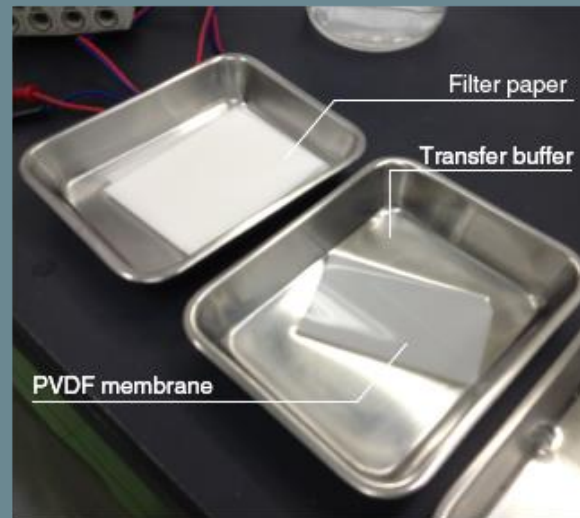


АҚУЫЗДАРДЫҢ МЕМБРАНАҒА АУЫСУЫ (ЖАРТЫЛАЙ ҚҰРҒАҚ ТИПТЕГІ ДАҚТАР ЖӘНЕ МЕМБРАНАЛАРДЫ БОЯУ) MVL-ДЕ ЖАСАЛҒАН МЫСАЛ

• Қадамдық процедура

Гельден сәл үлкенірек PVDF мембранасының бір бөлігін метанолға 1 минут жібітіңіз (алдын ала сулау), содан кейін тасымалдау буферімен теңестіріңіз. Сондай-ақ, сүзгі қағазының екі бөлігі портативті буфердегі PVDF мембранасынан сәл үлкенірек теңестіріледі.

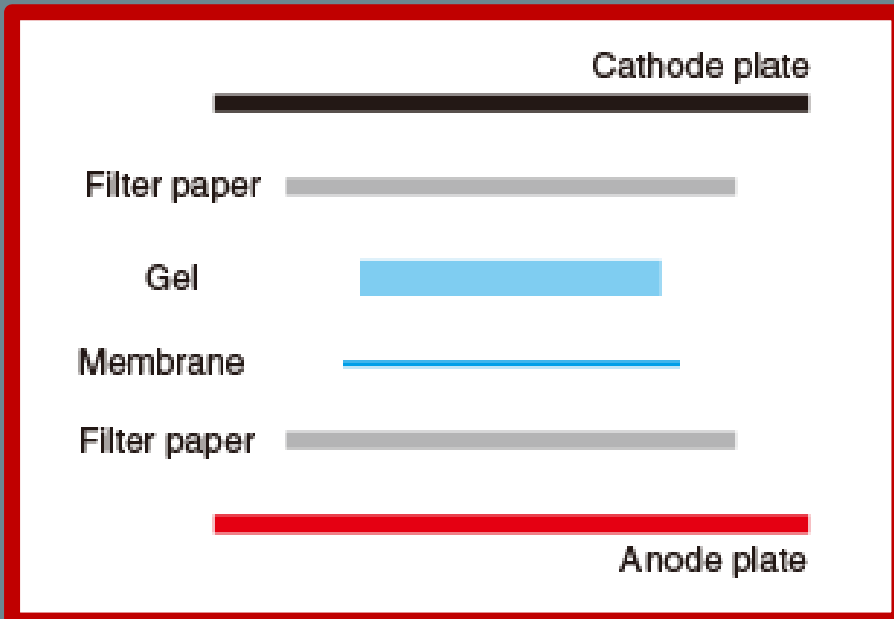
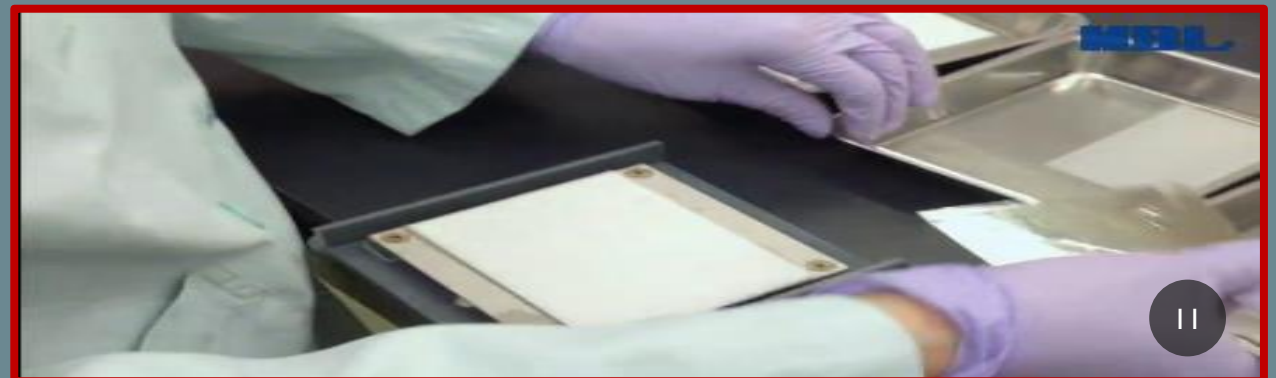
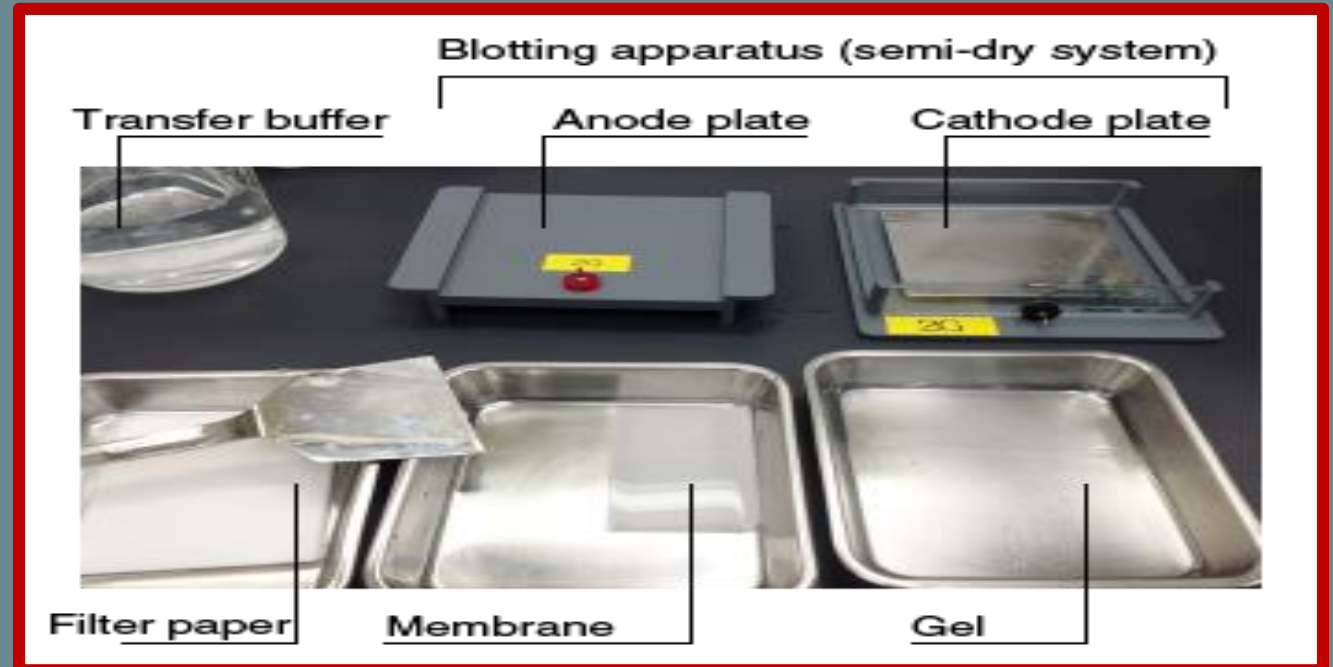
- ❖ Нитроцеллюлоза мембранасын алдын ала сулаудың қажеті жоқ. Метанолды қолданбаңыз және мембрананы тасымалдау буферімен теңестіріңіз.



Электрофорезден кейін тасымалдау буферіндегі гельді теңестіріңіз.

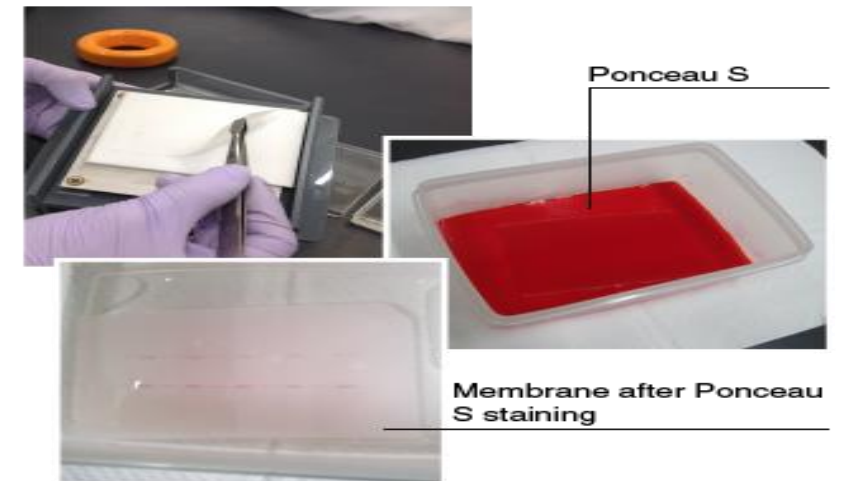
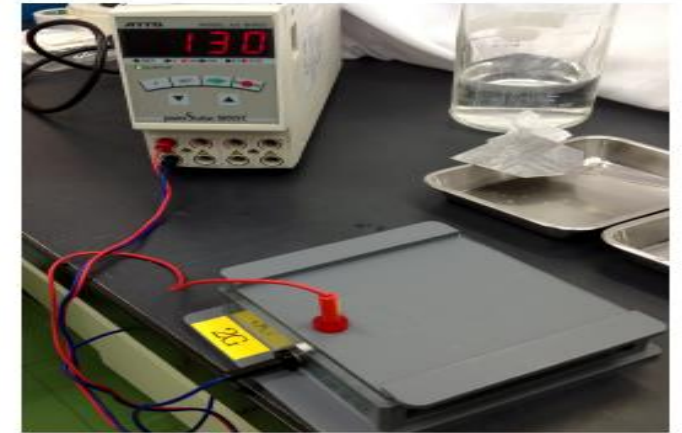
АҚУЫЗДАРДЫҢ МЕМБРАНАҒА АУЫСУЫ (ЖАРТЫЛАЙ ҚҰРҒАҚ ТИПТЕГІ ДАҚТАР ЖӘНЕ МЕМБРАНАЛАРДЫ БОЯУ) MBL-ДЕ ЖАСАЛҒАН МЫСАЛ

- Теңдестірілген сүзгі қағазының бір бөлігін анод тақтасына қойып, ауа көпіршіктері жоқ мембрананы, гельді және басқа сүзгі қағазын салыңыз.



АҚУЫЗДАРДЫҢ МЕМБРАНАҒА АУЫСУЫ (ЖАРТЫЛАЙ ҚҰРҒАҚ ТИПТЕГІ ДАҚТАР ЖӘНЕ МЕМБРАНАЛАРДЫ БОЯУ) MVL-ДЕ ЖАСАЛҒАН МЫСАЛ

- Оң электродты анод тақтасына жалғаңыз және теріс электродты катод тақтасына қосыңыз. Қуат көзін қосыңыз және 50 мА (бір гель үшін) * кезінде 1 сағат ішінде жіберіңіз. * Тасымалдау шарттары эксперимент шарттарына байланысты өзгереді.
- Қуат көзін өшіріңіз, мембрананы алыңыз және тасымалдау тиімділігін тексеру және олардың орнын растау үшін молекулалық масса маркерлерін визуализациялау үшін уақытша бояңыз. Ponceau s әдетте осы мақсатта қолданылады, өйткені мембрана оңай бұзылады және антиденелердің кейінгі зондтауына кедергі келтірмейді.



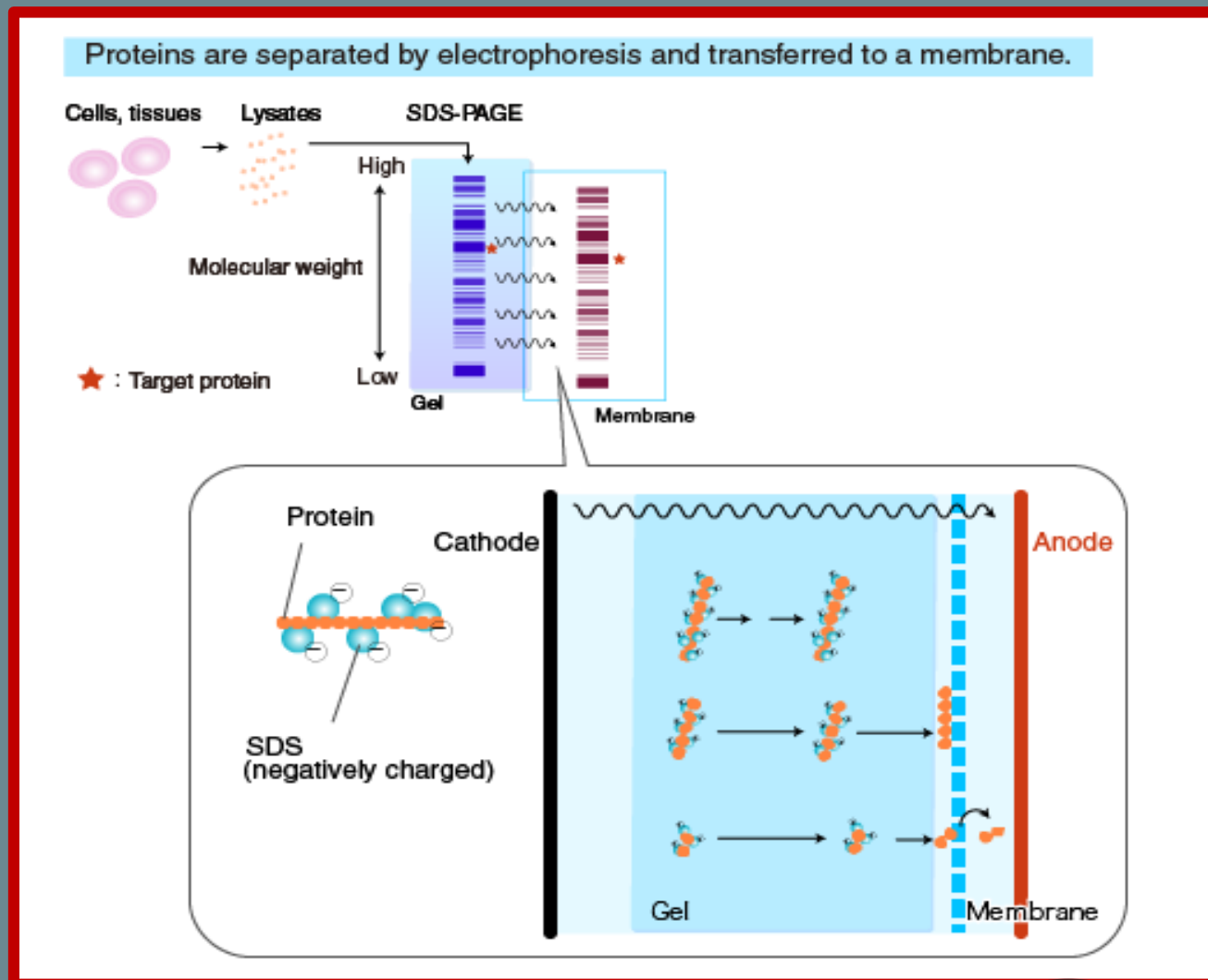


ТАСЫМАЛДАУ БУФЕРІ

- Тасымалдау үшін мақсатты ақуыздардың молекулалық салмағы мен табиғатына байланысты әртүрлі буферлер қолданылады. Әдетте қолданылатын тасымалдау буферінің құрамы төменде көрсетілген.
- Тасымалдау буферінің құрамы (әдетте қолданылады)

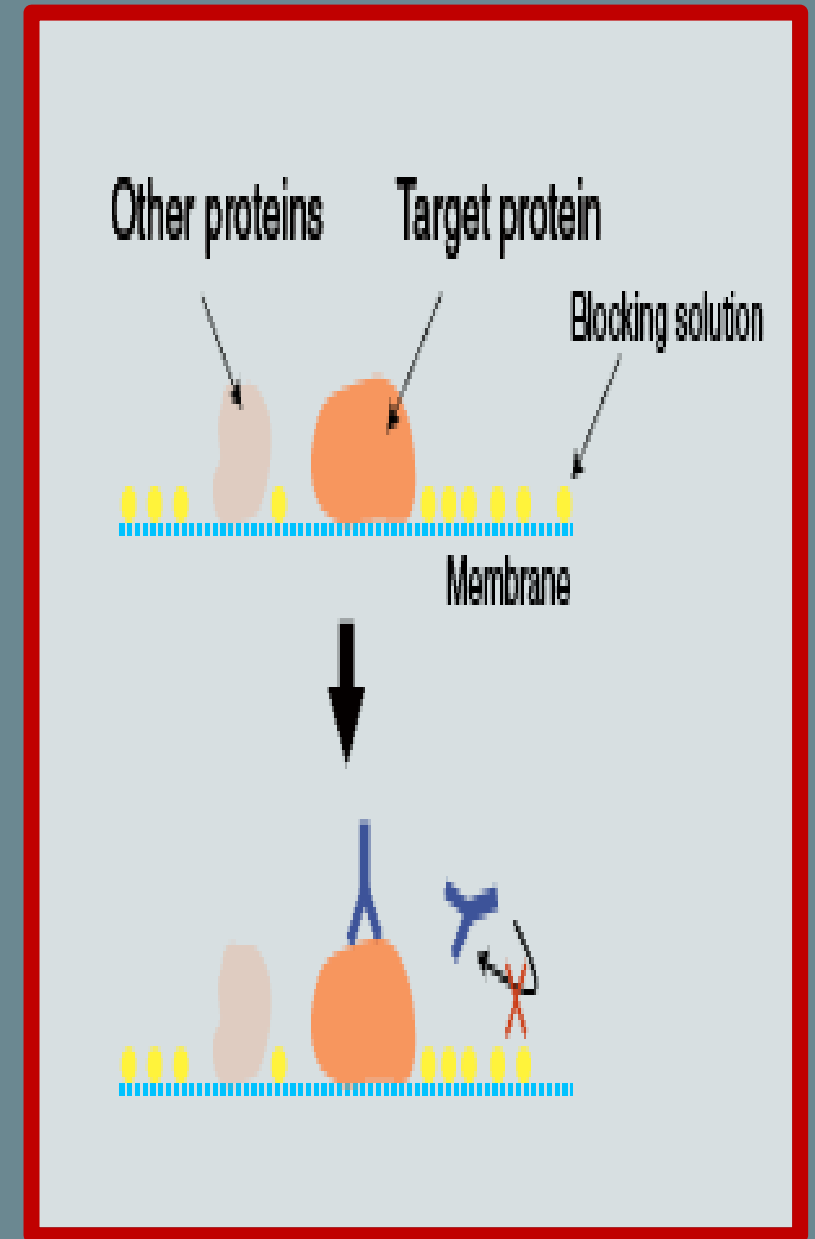
✓ **25 mM Tris-HCl**
192 mM glycine
20% MeOH

Метанол гельді тұрақтандырады және оның ісінуіне жол бермейді. Жоғары молекулалы ақуыздарды тасымалдау кезінде метанол концентрациясын азайтыңыз, осылайша гель аздап ісінеді, бұл ақуызды тасымалдауды жеңілдетеді.



БҰҒАТТАУ

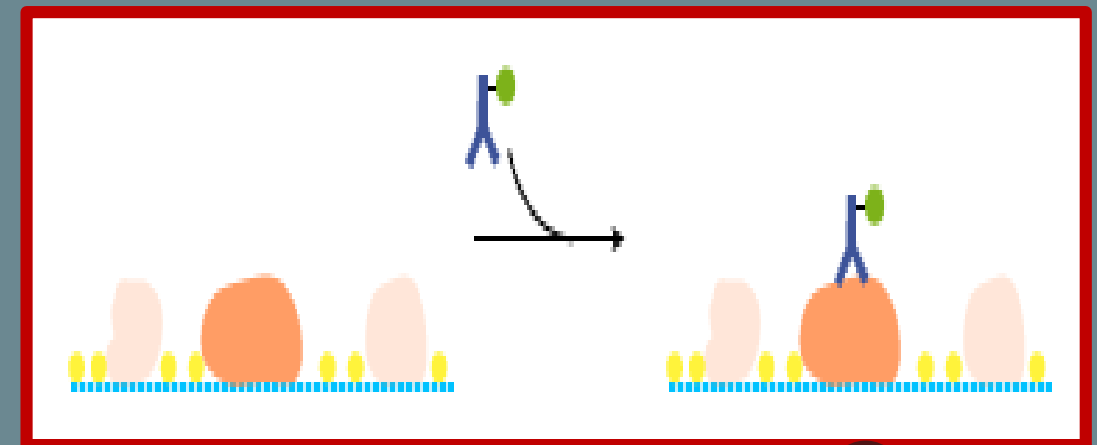
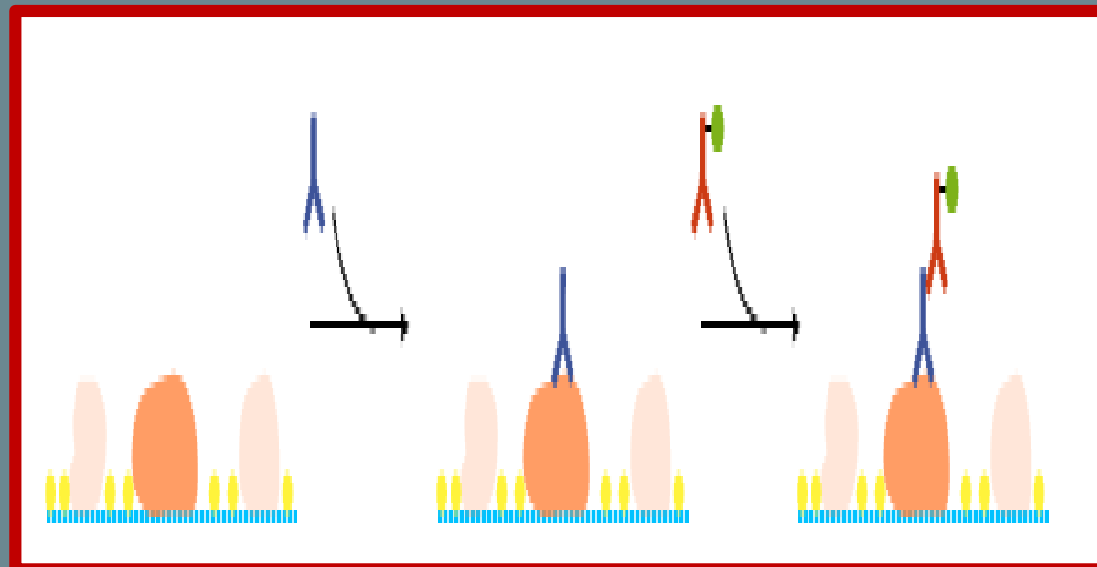
- Протеиндері бар Мембрана антиденелердің мембранамен спецификалық емес байланысуын болдырмау үшін блокталады.
- Блоктау тек спецификалық емес байланыстың алдын алады және Кросс-реактивтілікті төмендетпейді (антиденелердің ақуыздармен спецификалық байланысы-мақсатты ақуызмен бірдей эпитопы бар мақсатты емес заттар).
- Бұғаттау үшін әртүрлі шешімдер қолданылады. Әдетте қолданылатын блоктау шешімдері төменде сипатталған.
- **PBS-T-де 1-3% BSA**
- Бұқа сарысуы альбумині (BSA) блокатор ретінде қолданылады.
- **PBS-T-де 1-5% майсыз сүт.** Майсыз сүт блоктауда тиімдірек және жиі қолданылады. Алайда, бұл антиген-антидененің ерекше реакцияларына әсер етуі мүмкін. Майсыз сүтте казеин фосфопротеині бар, сондықтан фосфопротеиндерді анықтауға жарамайды.
- ※ PBS-T (PBS-Tween 20) Құрамында 0,05% егіз 20 бар фосфат буферлі тұзды ерітінді (PBS)





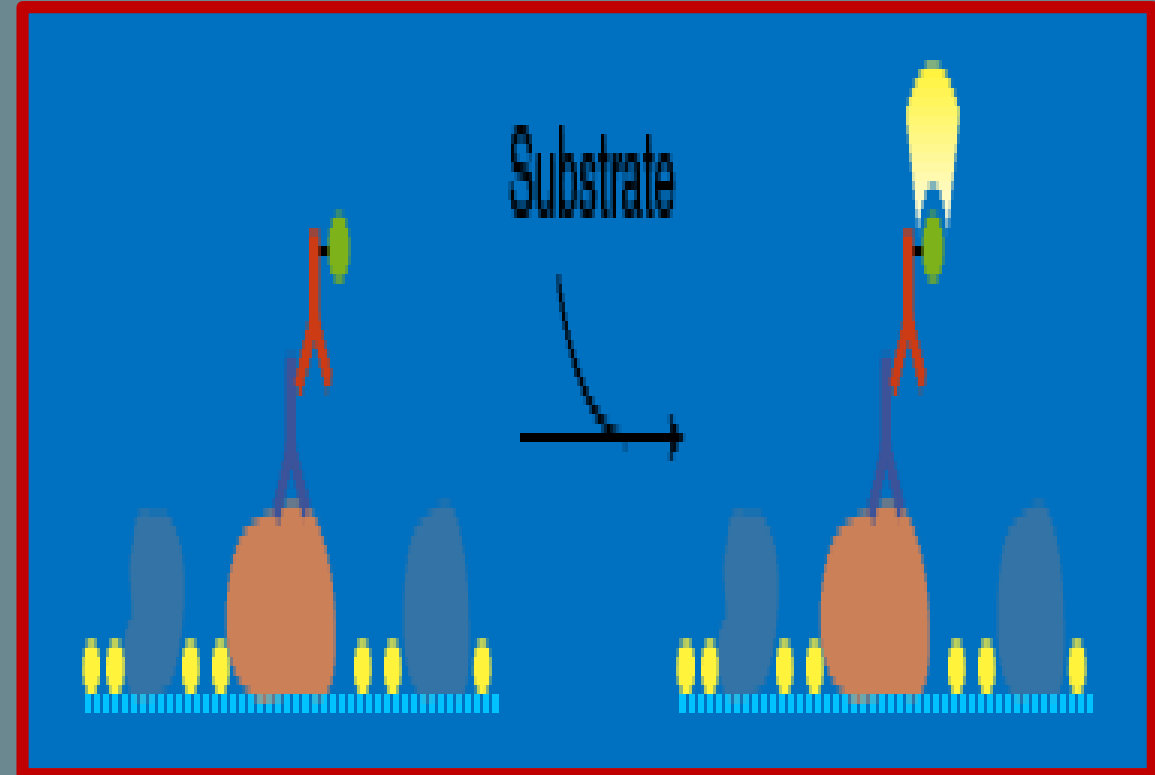
АНТИДЕНЕЛЕРДІ ЗОНДТАУ

- Блокталғаннан кейін мембрана бастапқы антиденемен, содан кейін екіншілік антиденемен тексеріледі. Бастапқы антидененің концентрациясы өте маңызды. Егер ол тым төмен болса, мақсатты ақуызды анықтау мүмкін емес. Егер ол тым жоғары болса, спецификалық емес реакциялар орын алады, нәтижесінде мақсатты емес ақуыздар анықталады.
- Өңдеу уақытын қысқарту үшін екіншілік (қайталама) антидененің орнына HRP таңбаланған бастапқы антиденені пайдалануға болады. Ол сондай-ақ спецификалық емес екінші антидененің байланысуынан туындаған спецификалық емес сигналдарды жояды.



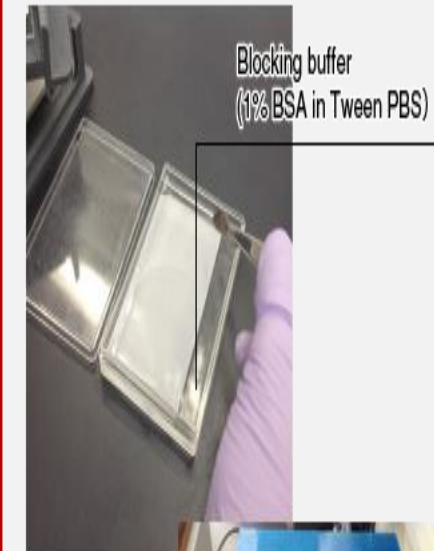
ЖОЛАҚТЫ АНЫҚТАУ (ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ӘДІСІ)

- Мембранаға субстрат бар реакция қоспасы қосылады. Антиденеге қосылған Фермент рентген пленкасы немесе салқындатылған CCD камерасы арқылы анықталатын жарық шығаратын реакцияны катализдейді.
- ❖ **Колориметриялық әдіс**
- Детекторлық реагент ретінде хромогендік субстрат қолданылады.
- Диаминобензидин (DAB) немесе TMB әдетте HRP субстраттары ретінде пайдаланылады, ал bсiр және NBT қоспасы сiлтiлi фосфатаза (AP) субстраты ретiнде қолданылады.



АНТИДЕНЕЛЕРДІ ЗОНДТАУ ЖӘНЕ ЖОЛАҚТЫ АНЫҚТАУ (БЛОКТАУ ЖӘНЕ АНЫҚТАУ НRP РЕАКЦИЯСЫ АРҚЫЛЫ АНТИГЕНДІ ҚОЛДАНУ) - MBL-ДЕ ЖАСАЛҒАН МЫСАЛ

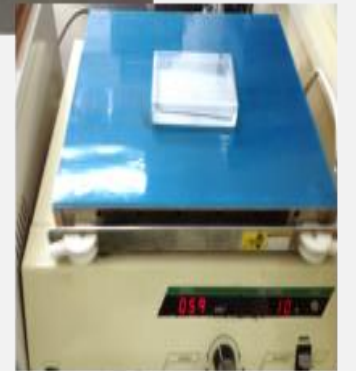
- Мембрананы блокатор буферіне салыңыз да, бөлме температурасында 1 сағат бойы (немесе түнде 4°C температурада) шайқаңыз.
- Мембрананы шаю буферімен 3 рет шайыңыз (әр 5 минут).
- Мембрананы Tween PBS, PH 7,2-де 1% BSA сұйылтылған бастапқы антидене ерітіндісіне салыңыз және шайқау кезінде бөлме температурасында 1 сағат инкубациялаңыз.
- Мембрананы шаю буферімен 3 рет шайыңыз (әр 10 минут).



With shaking ▶

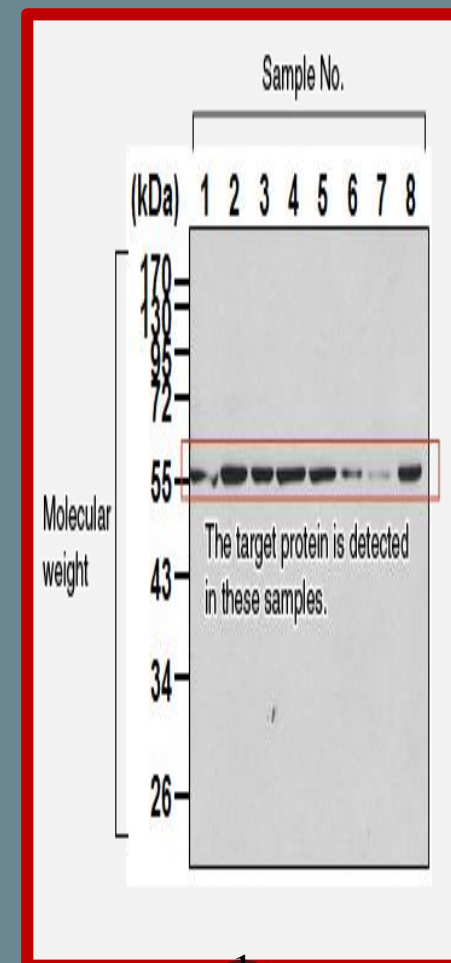


With shaking ▶



АНТИДЕНЕЛЕРДІ ЗОНДТАУ ЖӘНЕ ЖОЛАҚТЫ АНЫҚТАУ (БЛОКТАУ ЖӘНЕ АНЫҚТАУ HRP РЕАКЦИЯСЫ АРҚЫЛЫ АНТИГЕНДІ ҚОЛДАНУ) - MBL-ДЕ ЖАСАЛҒАН МЫСАЛ

- Мембрананы tween PBS, PH 7,2-де 1% BSA-да сұйылтылған екінші антиденеге салыңыз және шайқау кезінде бөлме температурасында 1 сағат инкубациялаңыз.
- Мембрананы шаю буферімен 3 рет шайыңыз (әр жолы 10 минут).
- ❖ **Хемилюминесценция әдісі**
- Пайдалану нұсқауларына сәйкес химилюминесценцияны анықтау үшін реагентті дайындаңыз. Мембрананы полиэтилен пленкасының үстіне қойып, мембранаға реагент қосыңыз. Оны 1 минут қайнатыңыз және реагентті тамшуырмен алыңыз. Мембрананы полиэтилен пленкасына орап, барлық ауа көпіршіктерін алып тастаңыз және оны көру үшін хемилюминесценцияны анықтайтын құрылғының (мысалы, CCD камерасы) астына қойыңыз



SB SinoBiological

All | Search

Reagents Search | Google Search | Download: New Products Release | Influenza Antigens | SARS-CoV-2 Variants

Products | Custom Services | Platforms | Resources | Activities | Distributors | About Us

Home | Products | Antibodies | Western Blotting Antibodies | Western Blotting in Medical Diagnosis Applications

Western Blot Applications for Medical Diagnosis

In recent medical field, Western Blot has a wide range of applications in medical diagnosis, such as the application of medical diagnosis for HIV (Human Immunodeficiency Virus) infection, BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy, also known as "mad cow disease"), FIV (Feline Immunodeficiency Virus), HBV (Hepatitis B Virus) infection, and so on.

Usually, Western Blot is used as a confirmatory test for these diseases, following a high sensitivity ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) test with positive results.

Western Blot medical diagnosis for different diseases

- Western Blot application: as a confirmatory test for Lyme disease

Lyme disease is a multi-organ animal-borne disease, caused by spirochetes of *Borrelia burgdorferi* (Bb), which typically affect the skin, nervous system, musculoskeletal system and heart. A history of confirmed exposure to tick bites, typical signs and symptoms of Lyme borreliosis and positive tests for anti-Bb antibodies, are the basis of a diagnosis.

The U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) recommends a two-tier protocol using an enzyme-linked immunosorbent assay or Immunofluorescence Assay (IFA) initially, followed by the more specific Western blot

<https://www.sinobiological.com/category/wb-procedures>

Western Blot

- Western Blot Procedures (Step by Step)
- Western Blot Protocols
- Western Blot Troubleshooting Guide
- Western Blot FAQs
- What is Western Blot

You may also interested

Western Blot Antibody

WESTERN BLOT APPLICATIONS FOR MEDICAL DIAGNOSIS

[HTTPS://WWW.SINOBIOLOGICAL.COM/CATEGORY/WB-MEDICAL-DIAGNOSIS](https://www.sinobiological.com/category/wb-medical-diagnosis)

ҚОРЫТЫНДЫ

Блотинг - бұл арнайы ДНҚ, РНҚ немесе ақуызды анықтауға арналған арнайы әдіс.

Вестерндік блотинг – постгеномдық технологияларда, клиникалық медицинада кең қолданылатын әдістің біреуі.

Western blotting адамның (жануарлардың) сұйықтықтарындағы антивирустық антиденелерді анықтауға, ауруды диагностикалауда, емдеу процесін қадағалауда пайдасы зор.

Пайдаланылған әдебиет:

<https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/westernblotting.html>