ارزیابی بیان پروتئین با روش وسترن بلات

۱- تهیه بافر لیز کننده (lysis buffer)

بمنظور تهیه ۲۰ میلی لیتر بافر لیز کننده ترکیبات تریس پایه ۵۰ میلی مولار (۰/۳ گرم)، کلرید سدیم ۱۵۰ میلی مولار (۰/۴۳ گرم)، تریتون x100 ۰/۱ درصد (۰/۰۲ میلی لیتر)، سدیم دِاوکسی کولات ۰/۲۵ درصد (۰/۰۵ گرم)، SDS ۰/۱ درصد (۰/۰۲ گرم) و EDTA[1] (۵/۸۴ گرم) در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و pH آن بر روی ۷/۴ تنظیم شد. پس از اضافه کردن مواد ذکر شده، با استفاده از آب مقطر حجم نهایی به ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. به ازای هر ۱۰ میلی لیتر از محلول یک قرص مهار کننده پروتئاز استفاده شد.

۲-تهیه هموژن بافت

۱. از نمونه های بافت فریز شده در ازت مایع یا فریزر ۷۰- جهت تهیه هموژن بافتی و آزمون وسترن بلات استفاده شد.

۲. به ازای هر ۱۰۰ میلی گرم بافت ۲۰۰ میکرو لیتر بافر لیزکننده سرد افزوده و نمونه ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۳. نمونه ها به مدت ۲ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با استفاده از دستگاه هموژنایزر(Speed ، analytikjena Mill plus، آلمان) و با دور ۲۵۰۰۰ دور در دقیقه هموژن شدند.

۴. نمونه ها با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد. پس از اندازه گیری پروتئین به روش براد فورد نمونه ها تا زمان انجام آنالیز های بعدی در دمای ۷۰- درجه نگهداری شدند.

۵. جهت انجام SDS-PAGE نمونه ها با نسبت ۱:۱ با بافر بارگذاری 2X SDS مخلوط و به مدت ۵ دقیقه جوشانده شدند.

۶. پس از جوشاندن و جهت از بین رفتن بخار هوای ایجاد شده در میکروتیوب، نمونه ها به مدت ۵ ثانیه سانتریفیوژ شدند.

۳-اندازه گیری پروتئین به روش برادفورد

بمنظور تعیین مقدار پروتئین در هموژن بافتی، از روش برادفورد استفاده شد. در این روش، آلبومین سرم گاوی BSA با غلظت mg/ml ۱ بعنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور برای تهیه معرف برادفورد ۱۰ میلی گرم کوماسی آبی G-250 در ۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد حل و به آن ۱۰ میلی لیتر اسید فسفوریک ۸۵٪ اضافه شد. سپس حجم محلول به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

[1]. Ethylenediaminetetraacetic acid

پس جهت انجام آزمون، غلظت های ۰، ۲، ۴، ۶، ۱۰ ، ۱۵ و ۲۰ میکرولیتر استاندارد BSA و ۲۰ میکرو لیتر نمونه هموژن بافتی به صورت دو بار تکرار به چاهک های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. به هر چاهک ۴۰ میکرو لیتر معرف برادفورد افزوده و پیپتینگ انجام شد. سپس به هر چاهک تا حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. جذب نمونه ها در طول موج ۵۹۵ نانو متر و با استفاده از دستگاه خوانشگر میکرو پلیت BioTek SX2 (امریکا) قرائت گردید. محاسبه غلظت نمونه ها بر اساس رسم منحنی استاندارد تغییرات جذب در مقابل غلظت نمونه های استاندارد محاسبه گردید. با ضرب عدد حاصل از عدد منحنی استاندارد در ۵۰ مقدار پروتئین در نمونه های هموژن بافتی بر حسب ug/ml بدست آمد.

۴- الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید با SDS

۴-۱-بافرها و محلول‌های مورد نیاز برای SDS-PAGE

محلول آکریل آمید ۳۰ درصد: ۷/۵ گرم آکریل آمید و ۰/۲ گرم بیس آکریل آمید با یکدیگر مخلوط و حجم آن با آب مقطر به ۲۵ میلی لیتر رسانده شد. این محلول حساس به نور است و باید در ظروف شیشه ای رنگی و در دمای ۴ درجه سانتی گراد و حداکثر دو ماه نگهداری شود.

محلول بافر ژل متراکم کننده، تریس ۱ مولار: ۳ گرم تریس در ۱۵ میلی لیتر آب مقطرحل شد و با HCL دو مولار pH آن به ۶/۸ رسانده شد؛ سپس حجم نهایی با آب مقطر به ۲۵ میلی لیتر رسید.

بافر ژل جدا کننده، تریس ۱/۵ مولار: ۴/۵۴ گرم تریس در ۱۵ میلی لیتر آب مقطر حل و با HCL یک مولار pH آن به ۸/۸ رسانده شد؛ سپس حجم نهایی با آب مقطر به ۲۵ میلی لیتر رسید.

آمونیوم پر سولفات ۱۰٪درصد: ۰/۱ گرم آمونیوم پر سولفات در ۱ میلی لیتر آب مقطر حل شد. این محلول باید به صورت تازه آماده شود و دور از نور نگهداری شود.

محلول SDS ۱۰٪: مقدار ۲/۵ گرم SDS وزن گردید و با آب مقطر به حجم ۲۵میلی لیتر رسانده شد.

بافر تانک الکتروفورز (رانینگ بافر)[2]: ۳/۰۳ گرم تریس با ۱۵/۱۵ گرم گلیسین مخلوط کرده و به حجم ۹۰۰ میلی لیتر می رسانیم، سپس ۱ گرم SDS را در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و پس از حل شدن حجم آن را با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده و در نهایت به ۹۰۰ میلی لیتر محلول تریس و گلیسین از پیش تهیه شده اضافه می کنیم.

2. Running Buffer

طرز تهیه بافر نمونه[3](۲X) جهت SDS–PAGE: برای تهیه این بافر، ۴ میلی‌لیتر آب مقطر، ۲ میلی‌لیتر تریس ۰/۵ مولار با pH = ۶/۸ ، ۱ میلی‌لیتر بتا–مرکاپتواتانول، ۵ میلی گرم بروموفنول‌بلو، ۱ میلی لیتر گلیسرول و نهایتاً ۲ میلی‌لیتر SDS ده درصد با هم مخلوط گردید. ترتیب ریختن اجزاء مهم می‌باشد. مخلوط خوب ورتکس شده و جهت استفاده آماده گردید.

۴-۲-تهیه ژل جدا کننده[4]SDS-PAGE (ژل پایینی)

برای ساخت ژل جدا کننده SDS-PAGE 12 درصد از جدول زیر استفاده شد.

تهیه ژل جدا کننده[5]SDS-PAGE (ژل پایینی)

در صد ژل	آب مقطر (ml)	محلول آکریل آمید ۳۰ درصد (ml)	محلول تریس ۱/۵ مولار (ml)	10% SDS (ml)
۱۲	۱/۶	۲/۰	۱/۳	۰/۰۵

قبل از ریختن نمونه ها در قالب ها ۵۵ میکرو لیتر آمونیوم پر سولفات و ۵ میکرو لیتر TEMED اضافه شد.

۴-۳- تهیه ژل متراکم کننده[6]SDS-PAGE (ژل بالایی)

برای ساخت ژل متراکم کننده SDS-PAGE از جدول زیر استفاده شد.

تهیه ژل متراکم کننده[7]SDS-PAGE (ژل بالایی)

3. Sample Buffer
4 .Seprating Gel
5. Seprating Gel
6. Stacking Gel
7. Stacking Gel

آب مقطر (ml)	محلول آکریل آمید ۳۰ درصد (ml)	محلول تریس ۱ مولار (ml)	SDS 10% (ml)
۱/۴	۰/۳۳	۰/۲۵	۰/۰۲

قبل از ریختن نمونه ها در قالب ها ۲۰ میکرو لیتر آمونیوم پر سولفات و ۲ میکرو لیتر TEMED اضافه شد.

۴-۴- مراحل انجام کار

قالب های شیشه ای مخصوص SDS-PAGE ، ابتدا بطور مناسب شستشو و با اتانول چربی زدایی شدند. قبل از تهیه ژل و ریختن آن در قالب شیشه ای ابتدا دو طرف قالب های شیشه ای توسط گیره هایی ثابت شده و جهت عایق سازی پایین قالب و جلوگیری از نشت ژل به خارج از اغشته کردن لبه های جدا کننده ها به پارافین استفاده شد. پس از تنظیم صفحات شیشه ای و ساختن ژل جدا کننده پایینی، آمونیوم پر سولفات و TEMED اضافه و پس از مخلوط نمودن به آرامی به فضای بین صفحات شیشه ای ریخته شد. بلافاصله به منظور جلوگیری از نفوذ هوا در زمان پلیمریزه شدن ژل و نیز صاف شدن سطح آن، ۲ میلی لیتر بوتانول به آرامی بر روی سطح ژل ریخته شد. پس از پلیمریزه شدن ژل، بوتانول روی سطح ژل با استفاده از آب مقطر شستشو داده شد. قبل از ریختن ژل متراکم کننده بالایی، آمونیوم پر سولفات و TEMED اضافه و پس از مخلوط نمودن به آرامی به فضای بین صفحات شیشه ای ریخته شد. سپس شانه‌های جداکننده در بین دوشیشه قرار داده شد.

قبل از انجام الکتروفورز، نمونه‌های پروتئینی با بافر نمونه (Loading Buffer) 2x با نسبت یک به یک بر اساس غلظت های به دست آمده در روش برادفورد مخلوط و به مدت ۵ دقیقه جوشانده شدند. در این وضعیت، پروتئین ها حالت خطی پیدا می کنند. سپس برای از بین رفتن بخار ایجاد شده، ۵ ثانیه سانتریفیوژ سریع انجام داده و درون یخ قرار دادیم. این کار سبب می شود تا بخارات پایین بیایند و و محلول یکدست شود. پس از ریختن نمونه ها در چاهک‌های الکتروفورز، جریان الکتریسیته ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه با ولتاژ ۶۰V و سپس به مدت یک ساعت باولتاژ ۱۰۰ برقرار شد. در هر ران الکتروفروز، یک چاهک به پروتئین مارکر (Lader) اختصاص داشت(شکل ۳-۷).

۵- بلاتینگ، مسدود سازی، انکوباسیون و ظهور

۵-۱- محلولهای مورد نیاز

طرز تهیه بافر انتقال دهنده (ترانسفر بافر): ۳/۰۳ گرم تریس با ۱۵/۱۵ گرم گلیسین مخلوط کرده و به حجم ۹۰۰ میلی لیتر می رسانیم، سپس ۱۰۰ میلی لیتر متانول به آن اضافه گردید.

طرز تهیه بافر نمکی فسفات (PBS): بافر نمکی فسفات (PBS) یا بافر شستشو، محلول ۱۳۷ میلی‌مولار نمک طعام، ۲/۷ میلی مولار کلرید پتاسیم، ۴/۳ میلی‌مولار فسفات دی سدیک و ۱/۴ میلی‌مولار پتاسیم دی هیدروژن فسفات با همدیگر است. جهت تهیه‌ی آن، ۸ گرم نمک طعام (MW=۵۸/۴۴g/mol)، ۰/۲ گرم کلرید پتاسیم (MW=۷۴/۵۶g/mol)، ۰/۶۱ گرم فسفات دی سدیک (MW=۱۴۱/۹۶g/mol) و ۰/۱۹ گرم پتاسم دی هیدروژن فسفات (MW=۱۳۶/۰۹g/mol)، به مقداری آب اضافه و پس از تنظیم Ph=۷/۴ حجم نهایی به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد. این محلول در دمای ۴°C نگهداری می‌گردید.

طرز تهیه بافر بلاک کننده[8] ۵٪ Skim Milk: برای تهیه بافر بلاک کننده ۵ درصد، ۰/۵ گرم Skim Milk را با ۱۰ سی سی آب مقطر مخلوط کرده و بر روی شیکر قرار می دهیم تا کاملاً حل شود.

۵-۲- مراحل انجام کار

پس از الکتروفورز پروتئینها با استفاده از روش SDS-PAGE، بترتیب بر اساس مراحل زیر اقدام شد.

۱. ژل به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه در بافر انتقال قرار داده شد.

۲. ساندویچی متشکل از ۵ لایه شامل دو لایه اسفنج، دو لایه کاغذ واتمن در دو طرف، یک لایه کاغذ نیترو سلولز و یک لایه ژل تهیه شدند. کلیه ترکیبات زیر قبل از آماده سازی بمدت ۱۵ دقیقه در بافر انتقال غوطه ور شده بودند.

۳. پس از اطمینان از عدم وجود حباب در ژل، ساندویچ بهمراه پایه کاست در تانک بلاتینگ که از قبل با بافر انتقال پر شده بود قرار داده شد بطوریکه کاغذ بلات در سمت کاتد و ژل در سمت آند قرار گرفت.

۴. انتقال با ولتاژ ۶۰ و به مدت ۱۰۵ دقیقه انجام شد.

۵. پس از عمل انتقال کاغذ سه مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو داده شد.

۶. عمل مسدود سازی توسط بافر بلاک کننده بمدت یک شب در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد(شکل ۹-۳).

۷. پس از عمل مسدود سازی کاغذ نیترو سلولز سه مرتبه و هر مرتبه به مدت ۵ دقیقه با PBSشستشو داده شد.

8. Blocking buffer

۸. کاغذ نیترو سلولز پس از مسدود نمودن، با آنتی بادی های اولیه تهیه شده با رقت ۱/۲۰۰۰ تا ۱/۵۰۰۰ در بافر PBS به مدت یک ساعت در دمای محیط و بر روی شیکر با rpm ۶۵ انکوبه گردید. در مورد هر ژن عمل بلاتینگ به تفکیک انجام گردید.

۹. پس از انکوباسیون کاغذ سه مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو داده شد.

۱۰. انکوباسیون برای آنتی بادی های ثانویه تهیه شده با رقت ۱/۲۰۰۰ در بافر PBS به مدت ۱ ساعت انجام شد.

۱۱. پس از انکوباسیون کاغذ نیترو سلولز سه مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو داده شد.

۱۲. دو محلول کیت ECL (abcam، ۱۳۳۴۰۸، آمریکا)را با نسبت یک به یک به مقدار ۲۵۰ میکرو لیتر ترکیب کرده و به کمک سمپلر ۱۰۰۰ بر روی کاغذ نیترو سلولز ریخته و به مدت ۱ دقیقه کاغذ را با آن آغشته می‌کنیم. کلیه فرآیندها در اتاق تاریک در زیر نور قرمز انجام می شود. پس از خروج از محلول ظهور، کاغذ ها در محیط خشک می شوند. سپس کاغذها درون کاست محافظ پلاستیکی حاوی فیلم حساس قرار داده می شوند و در دستگاه پردازشگر X-RAY (LD-14، چین) ظهور باندها انجام می شود.

۱۳. کاغذ های حساس به نور با استفاده از دستگاه اسکنر JS 2000 (BonninTech، چین) اسکن و دانسیته باندها محاسبه گردید.

۱۴. برای کمی سازی باندها دانسیته هر پروتئین نسبت به پروتئین کالیبراتور در گروه های مورد مطالعه نسبت به دانسیته پروتئین هدف نسبت به پروتئین کالیبراتور در گروه کنترل توسط نرم افزار دستگاه JS 2000 مورد بررسی قرار گرفت.