



ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ  
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ  
МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА  
КАФЕДРАСЫ

ДӘРІС 15. ГИБРИДИЗАЦИЯ ӘДІСІ АРҚЫЛЫ БИОЛОГИЯЛЫҚ  
МАКРОМОЛЕКУЛАЛАРДЫ ЗЕРТТЕУ. БЛОТТИНГ.

Лектор: PhD, қауымдастырылған  
профессор Тайпақова С.М.

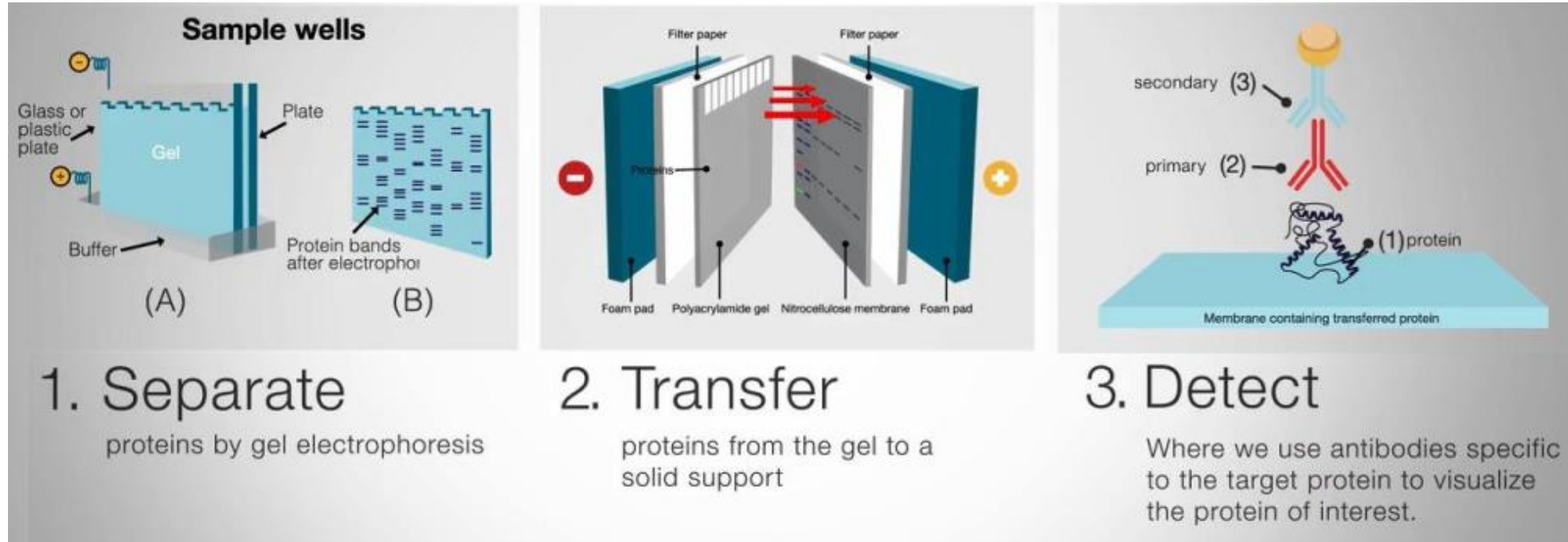
# **Дәрістің жоспары:**

- 1. Блоттинг**
- 2. Блоттинг кезеңдері**
- 3. Блоттингке үлгіні дайындау**
- 4. Гелден макромолекулаларды тасымалдау әдістері**
- 5. Мембранадағы макромолекулаларды белгілеу және анықтау**
- 6. Блоттинг түрлері:**
  - Саузерн блоттинг**
  - Нозерн блоттинг**
  - Вестерн блоттинг**

*Блоттинг* – бұл молекулалық биологияда қолданылатын әдіс. Ол белгілі бір ақуыздарды немесе нуклеин қышқылдарын: ДНК немесе РНК-ны және басқа молекулалары бар гельден немесе ерітіндіден арнайы тасымалдаушыға (нитроцеллюлозды, PVDF немесе нейлон мембранасына) көшіру әдісі.

Кейбір жағдайларда молекулалар алдын ала гель-электрофорезден өтеді, ал басқа жағдайларда олар тікелей мембранаға тасымалданады.

# Блоттинг үш негізгі кезеңнен тұрады:



- **Бөлу (separate)** — бұл ақуыздар немесе қышқылдар қоспасы полимерлі гельде электрофорез әдісімен өңделетін процесс;
- **Тасымалдау (transfer)** — бөліп алынған молекулалардың дайындалған мембраналарға, әдетте нитроцеллюлоза немесе PVDF мембраналарына ауысу процесі;
- **Детекция (detect)** — бұл үлгілерді иммуннохимиялық әдістермен, бояу немесе автордиография арқылы маркерлеу процесі

# 1. Блоттинг үшін молекулаларды бөлу әдістері:

➤ Полиакриламидті гель электрофорезі:

- Денатурация жағдайында мочевина қосу арқылы — қысқа бір тізбекті НК(нуклеин қышқылы) бөлу.
- Денатурация жағдайында натрий додецилсульфатын қосу арқылы (Лэммли бойынша электрофорез) — белоктарды молекулалық массасына қарай бөлу.
- табиғи(нативті) жағдайда белоктарды үшөлшемді құрылымға бөлу.

➤ Изоэлектірлік фокустау -изоэлектрлік нүктесіне (pI) қарай ақуыздарды бөлу;

➤ Екі өлшемді (2D) электрофорез — белоктарды изоэлектрлік нүктесіне (pI) және молекулалық массасына қарай екі бағытқа бөлу:

➤ Агарозды гель электрофорезі — нуклеин қышқылдарын бөлу:

- фрагменттердің ұзындығы бойынша;
- сақиналы молекулалардың “суперспирализациялануы” бойынша

➤ Жұқа қабатты хроматография — липидтік комплекстерден липидтерді бөлу.

# Тасымалдау әдістері:

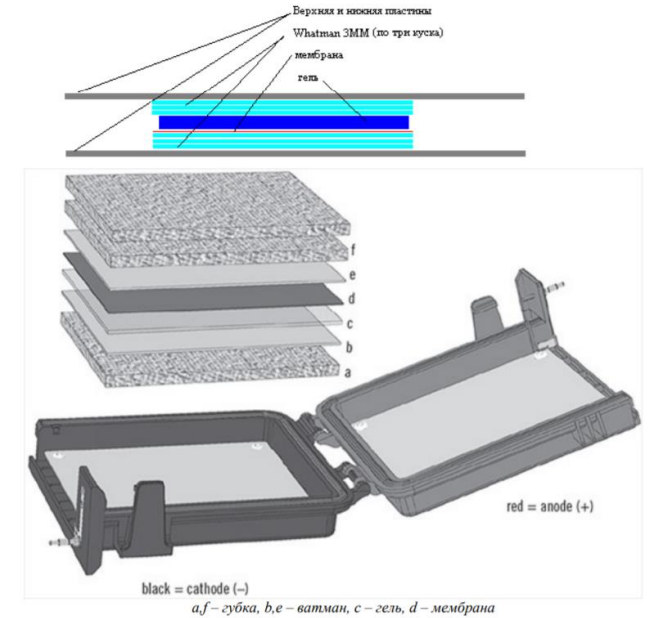
- **Молекулалардың диффузиясы** - баяу тасымалдау, көбінесе липидтерге қолданылады.
- **Капиллярлық блоттинг** - мембрана гельге жабысады, оның үстіне сүзгіш қағаздар қабаты қойылады. Тасымалдау буфері гельді ылғалдандырып, капиллярлық күштердің әсерінен көтеріліп, сүзгіш қағазды ылғалдандырады және макромолекулаларды гельден мембранаға тасымалдайды. Капиллярлық блоттинг келесі жолдармен жүзеге асырылуы мүмкін:
  - буфермен ылғалданатын камераларда - "жартылай құрғақ" тасымалдау;
  - гельді буферге батыру арқылы камераларда.
- **Вакуумды блоттинг** - капиллярлық блоттингке ұқсас, бірақ тасымалдау сүзгі қағазды ылғалдандыру арқылы жасалатын капиллярлық күштің орнына вакуумды қолдану арқылы тездетіледі.
- **Электроблоттинг** - зарядталған макромолекулалардың мембранаға электр тогының әсерімен тасымалдануы.
- **“Tігу”** - НК-ны УФ-сәулелендіру немесе қыздыру арқылы мембранаға “тігу“(пришивание) - нейлон мембраналарында соңғы бекітуді жүзеге асыру үшін.
- **Дот-блоттинг (слот-блоттинг)** - үлгіні нүкте немесе сызық түрінде тікелей мембранаға жағады, молекулаларды гельде немесе ТСХ-пластинада алдын ала бөлу қажет емес.

## Пайдаланатын мембрана типтері:

- ❖ PVDF-мембрана (поливинилиденфторидті);
- ❖ NC-мембрана (нитроцеллюлозды);
- ❖ нейлон мембранасы (НК үшін қолданылады)

# Электроблоттинг

Электроблоттинг — бұл зарядталған макромолекулалардың мембранаға электр тогының әсерімен тасымалдануы. Бұл негізінен полиакриламидті гельдерден нитроцеллюлозды (немесе басқа) мембраналарға ақуыздарды тасымалдаудың маңызды әдісі. Электроблоттинг өткізгіш электродты буфермен вертикалды резервуарларда жүргізіледі. Резервуарлардың екі жағында платина электроды орнатылады. Бұл әдісте гель мен мембрана фильтр қағаз мен кеуекті пластиналардың (пористая пластинка) арасына орналастырылады.



# Жартылай құрғақ тасымалдау

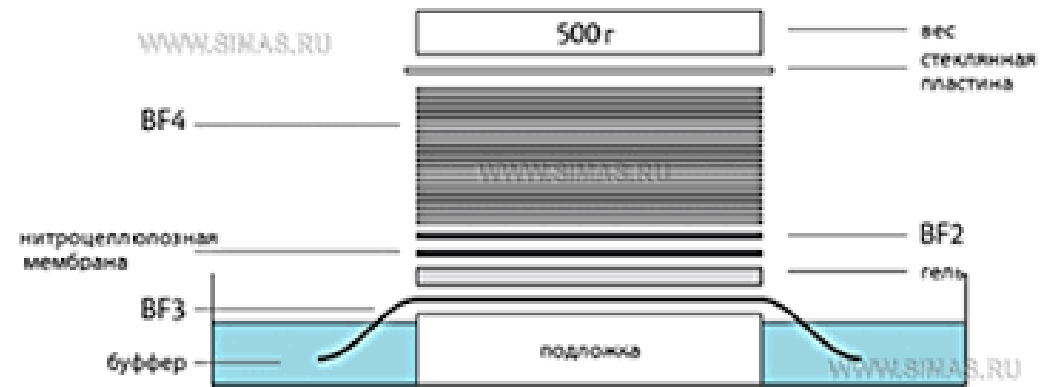
Жартылай құрғақ блоттинг екі горизонталды электродты пластинаның арасында жүргізіледі және блоттингті жылдам және бірқалыпты орындауға мүмкіндік береді. Электрлік блоттингтен айырмашылығы: жартылай құрғақ тасымалдауда буфердің аз мөлшері пайдаланылады, ал тасымалдау процесі өте жылдам, бірнеше минут ішінде жүзеге асады. Сонымен қатар, жартылай құрғақ блоттинг төмен молекулярлы ақуыздарды баяу тасымалдау үшін және молекулалық массасы кең дисперсиялы көп компонентті ақуыз қоспаларын тиімді тасымалдау үшін қолдануға болады.





# Капиллярлы блоттинг

- Тасымалдау капиллярлық күштердің әсерінен гельден мембранаға көтерілетін буфер ағынымен жүзеге асырылады.
- Нуклеин қышқылдарын тасымалдау дәстүрлі түрде капиллярлық блоттинг әдісімен жүргізіледі, бұл ұзақ уақытты талап ететін процедура (12 сағатқа дейін).
- Сондықтан қазіргі уақытта капиллярлық блоттингтің орнына вакуумдық блоттинг қолданылады. Бұл әдіс процедураның уақытын 15-60 минутқа дейін қысқартады.



капиллярлық блоттинг



вакуумды блоттинг

# Dot немесе Slot блоттинг

**Дот-блоттинг.** Дот-блоттарды дайындау үшін ДНҚ немесе РНҚ препараты тікелей фильтрге жағылады. Препараттың тамшылары фильтрде нүктелер түрінде көрінеді, бұл блоттинг түрінің атауын түсіндіреді (ағылш. \*dot\* – нүкте).

1) Геномдық ДНҚ-дан, алдын ала ультрадыбыспен өңделгеннен кейін, ұзындығы 5–10 нуклеотидтік жұпқа тең фрагменттер түзіледі.

2) ДНҚ немесе РНҚ үлгілерін зондқа қолжетімді ету үшін оларды денатурациялау қажет, яғни бір тізбекті түрге көшіру керек. Бұл 100 °С температураның әсерінен жүзеге асады.

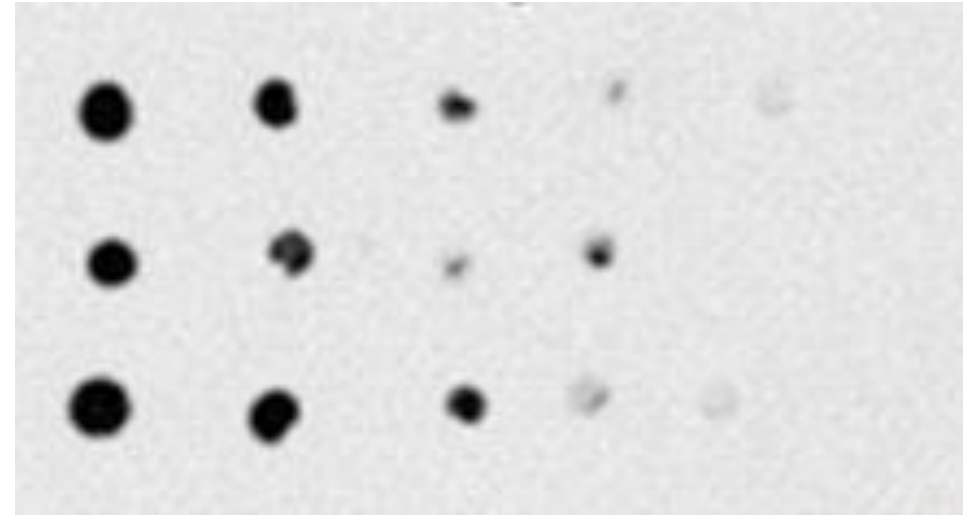
3) Денатурацияланған нуклеин қышқылдары мұзда инкубацияланады: температураны тез төмендету олардың ренатурациясын, яғни тізбектердің комплементарлы жұптасуын болдырмайды. Денатурацияланған ДНҚ немесе РНҚ тікелей фильтрге жағылады, содан кейін оны зонд бар ерітіндіде инкубациялайды.

4) Зерттеліп жатқан нуклеин қышқылының ерітіндіге өтпеуі үшін оны фильтрде (мембранада) бекіту қажет. Ол үшін екі түрлі фильтрлер қолданылады: нитроцеллюлозды және нейлонды.

Нуклеин қышқылдарын нитроцеллюлозды фильтрге иммобилизациялау үшін оларды 80 °С температурада вакуумда қыздырады, ал нейлонды фильтрде — 3-5 минут бойы УК-сәулемен өңдейді.

5) Нуклеин қышқылдары препаратының белгіленген изотопты зондпен инкубациясынан кейін арнайы кассетада радиоавтография немесе радиоактивті емес әдістермен идентификациялау жүргізіледі.

Дот-блоттинг тек бір сұраққа жауап бере алады: берілген үлгіде ізделіп отырған нуклеотидтер тізбегі бар ма.



**Дот-блот.** Қаралау бейнелер үлгімен байланысқан антиденелердің көп мөлшерін көрсетеді. Солдан оңға қарай үлгінің жойылуы арта түседі, ақырында сигналдың жоғалуына дейін жетеді.

# Мембранадағы макромолекулаларды белгілеу және анықтау тәсілдері:

- **Бояу**– бояғыштардың (күміс иондары, Кумасси, Понсо, бромды этидий) тікелей анықталатын макромолекулалармен байланысуы.
- **Иммунды-химиялық белгілеу** – макромолекулаларға арнайы байланысатын белгіленген антиденелер арқылы белгілеу жүзеге асады, ал детекция келесі әдістермен жүргізіледі:
  - Иммунды-бояу – антиденелер бояғыштармен белгіленеді, белгілі бір толқын ұзындығындағы жарықтың жұтылуы тіркеледі.
  - Иммуноферменттік– антиденелер ферментпен белгіленеді, ферментативтік реакция барысында түзілетін боялған өнімнің мөлшері тіркеледі (ИФА).
  - Хемилюминесценттік– антиденелер субстрат болған кезде жарық шығаратын репортер ферментімен белгіленеді, белгілі бір толқын ұзындығындағы жарықтың шығуы тіркеледі.
  - Флуоресценттік– антиденелер флуоресцентті белгімен белгіленеді, белгілі бір толқын ұзындығындағы жарықпен қоздырылған кезде, ұзын толқынды аймақтағы жарықтың шығуы тіркеледі.
- **Радиациялық белгілеу** – макромолекулаларға радиациялық белгілер (радиоизотоптар) енгізіледі, детекция келесі әдістермен жүзеге асады:
  - Авторентгенография (мембранаға фото пленканы қою арқылы);
  - Радиоимиджинг (радиациялық эмиссияны сандық анықтау және белгілердің өзара орналасу бейнесін құру);
- **Гибридизация** – комплементарлық құрылымы бар белгіленген олигонуклеотидтермен нуклеин қышқылдарының байланысуы, анықтау әдетте радиациялық сәулеленуді немесе флуоресценцияны тіркеу арқылы жүргізіледі.
- **Масс-спектрометрия**– липидтердің тікелей құрылымдық талдауын жүргізу үшін қолданылады.

# Блоттинг түрлерінің қабылданған атаулары:

Зерттелетін объектіге байланысты блоттингтің бірнеше түрлері ажыратылады:

**Саузерн-блоттинг** үлгідегі ДНҚ-ның белгілі бір тізбегін анықтауға мүмкіндік береді, ол ең алғашқы әдіс болған және кейінгі барлық әдістер осыған негізделген;

**Саутвестерн-блоттинг** ДНҚ-мен тікелей байланысқан белоктарды анықтау және визуализациялау үшін қолданылады;

**Нозерн-блоттинг** РНҚ-дағы белоктардың тізбегін анықтауға көмектеседі;

**Вестерн-блоттинг** үлгідегі нақты белоктардың болуын анықтауға мүмкіндік береді;

**Истерн-блоттинг** — үлгідегі ақуыздардың посттрансляциялық модификацияларын анықтау әдісі;

**Фар-истерн-блоттинг** — эффективтілігі жоғары жұқа қабатты хроматография арқылы бөлінген липидтерді талдау. Мембранаға тасымалдау әдетте диффузия арқылы жүзеге асады. Тіркеу тікелей масс-спектрометриялық құрылымдық талдау арқылы жүргізіледі.

# Саузерн-блоттинг



Сэр Эдвин Саузерн

**Саузерн-блоттинг** (ағылш. Southern blot) — молекулалық биологияда үлгідегі ДНҚ-ның белгілі бір тізбегін анықтауға арналған әдіс.

- Саузерн блоттинг әдісі ДНҚ-ны фракциялауға арналған агарозды электрофорезді ДНҚ-ны ұзындығына қарай бөлу әдістерімен және мембраналық фильтрге гибридизация үшін тасымалдау әдістерімен біріктіреді.
- Бұл әдіс 1975 жылы британдық молекулалық биолог Эдвин Саузернмен ұсынылған. Әдіс оның есімімен аталған, сонымен қатар, «Southern» (ағылш. "оңтүстік") сөзінің дыбыстасуымен байланысты.
- Саузерн-блоттың атауы ғалымның атымен байланысты болғандықтан, термин бас әріппен жазылады, ал вестерн-блот және нозерн-блот терминдері кіші әріппен жазылады.

# Саузерн блоттинг әдісі

Рестрикция эндонуклеазалармен (рестриктазалармен) жоғары молекулалық ДНҚ-ны ұсақ фрагменттерге кесу үшін қолданылады.

ДНҚ фрагменттері агарозды геледе электрофорезге түседі, бұл оларды ұзындығына қарай бөлуге мүмкіндік береді.

Егер ДНҚ фрагменттері 15 мың жұп нуклеотидтен ұзын болса, тасымалдау алдында гель тұз қышқылымен өңделеді. Бұл ДНҚ фрагменттерінің депуринизациясын тудырады, оларды ұсақ бөліктерге бөледі және мембранаға кейінгі тасымалдауды жеңілдетеді.

Егер сілтілі тасымалдау әдісі қолданылса, агарозды гель сілтілі ерітіндіге батырылады. Бұл кезде ДНҚ-ның қос спиралы денатурацияланып, теріс зарядталған ДНҚ-ның оң зарядталған мембранамен байланысуы жеңілдейді. Сондай-ақ, бұл кезде РНҚ қалдықтары да бұзылады.

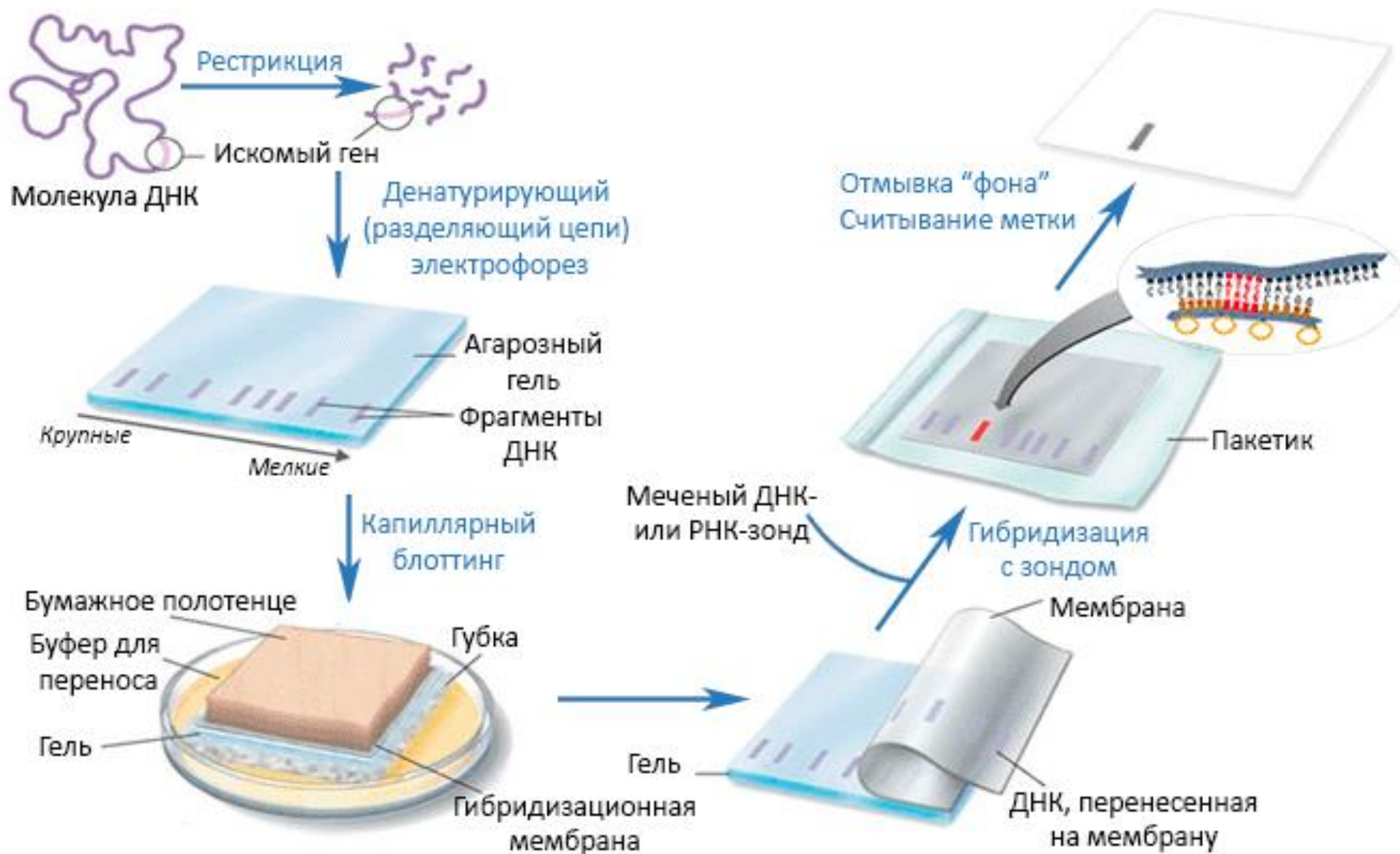
Нитроцеллюлоза (немесе нейлон) мембранасының жапырағы агарозды гельдің үстіне немесе астына орналастырылады. Қысым гелге немесе қағаз қабаттары арқылы тікелей әсер етеді. Тасымалдаудың сәтті өтуі үшін гель мен мембрана тығыз жанасуы керек. Буфер жоғары ылғалдылық аймағынан төмен ылғалдылық аймағына (мембранаға) капиллярлық күштердің әсерінен тасымалданады. Бұл кезде ДНҚ гелден мембранаға өтеді. Полианиондық ДНҚ оң зарядталған мембранамен ион алмасу күштері арқылы байланысады.

ДНҚ-ны мембранада бекіту үшін, мембрана әдеттегі немесе вакуумды пеште 80 °С температурада екі сағат бойы қыздырылады немесе ультракүлгін сәулемен өңделеді (нейлон мембраналары үшін).

Гибридизация радиоактивті (немесе флуоресцентті) ДНҚ-зондпен, алдын ала белгілі ДНҚ тізбегімен, мембранамен жүзеге асырылады.

Гибридизациядан кейін, артық ДНҚ-зонд мембранадан жуылып, гибридизацияның көрінісі рентгендік пленкада автордиография арқылы (радиоактивті зонд үшін) немесе мембрананың бояуын (хромогендік бояуды қолданғанда) бағалау арқылы визуализацияланады.

**a**



# Нозерн-блоттинг

- Нозерн-блот (ағылш. Northern blot) — гендердің экспрессиясын зерттеу әдісі, мұнда үлгілердегі РНК (мРНК) молекулалары мен олардың фрагменттері тексеріледі.
- Нозерн-блот әдісін 1977 жылы Стэнфорд университетінің қызметкерлері Джеймс Олвайн, Дэвид Кемп және Джордж Старк ұсынды.
- Нозерн-блот әдісінің Саузерн-блоттан негізгі айырмашылығы — анықталатын субстраттың ДНҚ емес, РНК болуы. Нитроцеллюлозаның орнына diazobenzyl-оксиметил-целлюлозадан жасалған сүзгі қолданылады, ал зонд ретінде комплементарлы ДНҚ молекулалары пайдаланылады.
- Авторлар әдістің принципіалды айырмашылықтарын атап көрсету үшін оны Northern blot (ағылш. "солтүстік") деп атауды шешті, бұл Саузерн-блот әдісіне қарсы ұғым болып табылады.



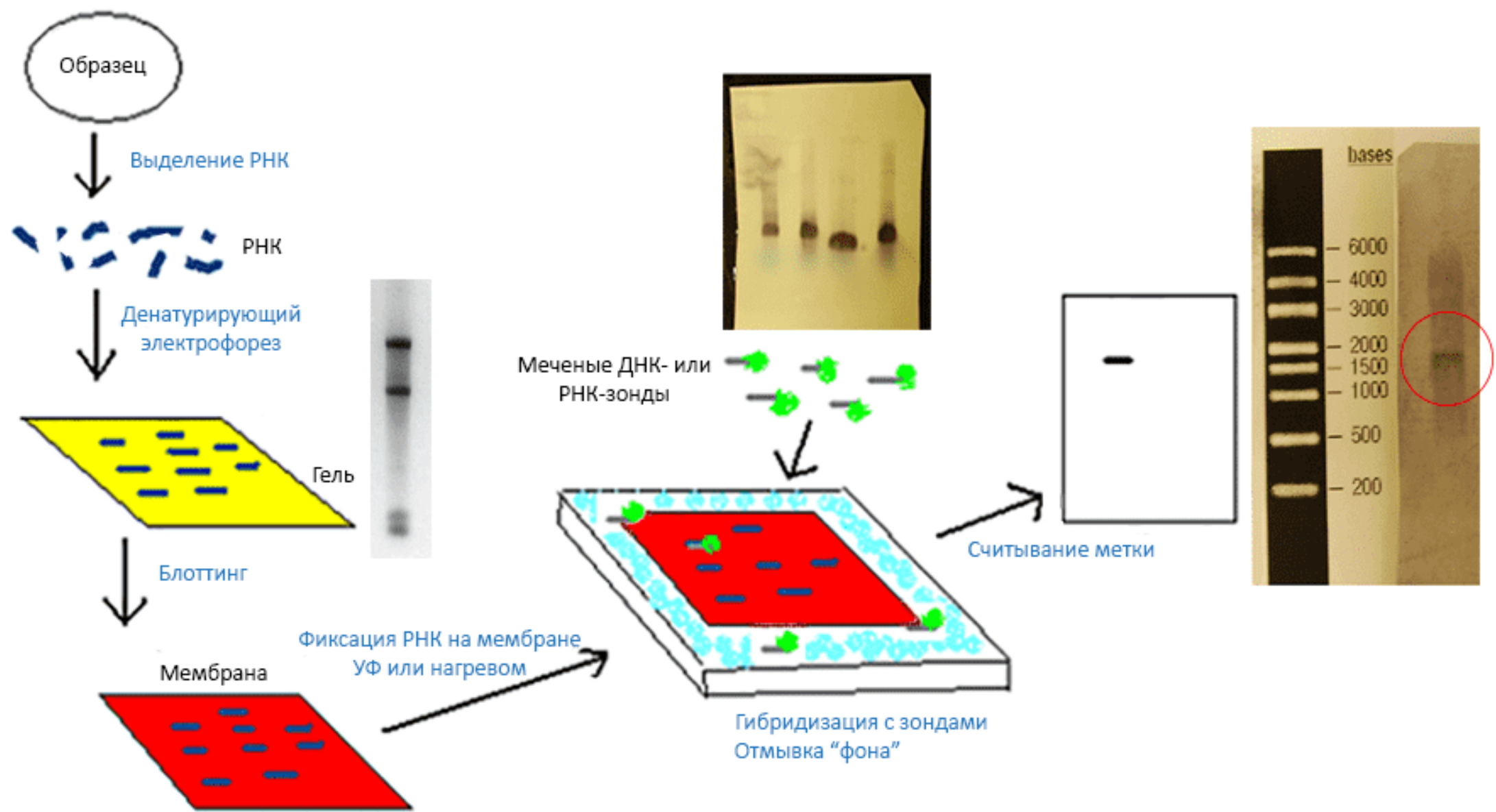
## **Нозерн-блотт анализі:**

1.РНК-ны бөлу және талдау үшін қолданылады (мысалы, белгілі бір клетка түрінде мРНК бар-жоғын анықтау үшін, яғни ген экспрессиясы бақылауға болады);

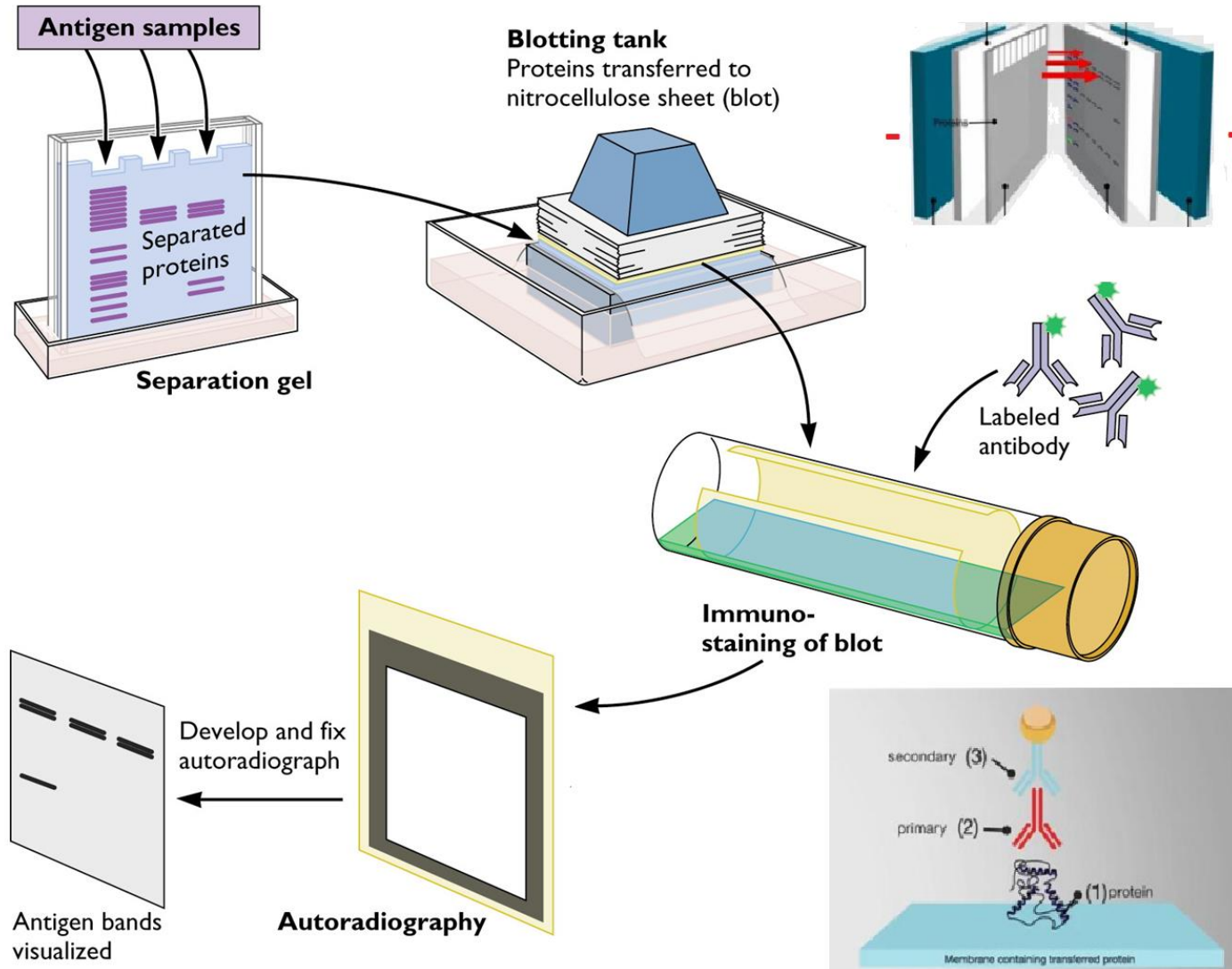
2.РНК-ның мөлшерін анықтау және оның белгілі бір клетка түрінің дамуында өзгеруін зерттеу үшін;

3.Белгілі бір геннің транскриптінің мөлшерін анықтау үшін.

4.Бұл жағдайда клеткадан бөлінген РНК молекулалары мөлшері бойынша гель-электрофорез арқылы бөлінеді, содан кейін фильтрге көшіріледі. Бір тізбекті зондпен будандастырудан кейін РНК мен зондтың будандастыру (гомология) орындары анықталады



# Вестерн блоттинг



**Вестерн блоттинг** — үлгідегі арнайы белоктарды антиденелер арқылы анықтауға негізделген **аналитикалық әдіс**.

Бұл әдіс гель-электрофорез және иммунохимиялық реакцияның «антиген/антидене (зерттелетін белок)» комбинациясына негізделген.

Белоктарды электрофорез арқылы бөлу және моноклоналды немесе поликлоналды антиденелердің спецификалықтығы арқасында ажыратымдылықтың жоғары дәрежесі ие.

Оптималды жағдайларда Вестерн-блоттинг әдісімен 1 нг-тан аз белокты анықтауға болады.

## **Вестерн-блоттинг сатылары :**

**SDS-электрофорез әдісімен ақуыздарды бөлу.** Ақуыздарды бөлу үшін ең көп қолданылатын әдіс - полиакриламидті геледе электрофорез, натрий додецилсульфаты (SDS) бар ортада. SDS-тің әсерінен зерттелетін ақуыздар бірдей теріс зарядқа ие болады, бұл олардың тек молекулалық массаға байланысты бөлінуін мүмкіндік жасайды. Денатурацияланған ақуыздар электр өрісінде акриламидті гель арқылы анодқа қарай қозғалады, мұнда кіші массаға ие ақуыздар тезірек жылжиды. Гельге маркерлер (белоктардың белгілі молекулалық массаларының қоспасы) енгізіледі. Жылжу жылдамдығының (электрофоретикалық қозғалғыштық) айырмашылықтары ақуыздардың жолақтарға бөлінуіне әкеледі.

**Гельден мембранаға ақуыздарды көшіру** (нитроцеллюлоза немесе поливинилиденфторид (PVDF) мембранасы) электр тоғының әсерімен жүзеге асырылады. Осы процестің нәтижесінде ақуыздар мембрананың жұқа беткі қабатында орналасып, гидрофобты және электростатикалық өзара әрекеттесулер арқылы мембранамен байланысады. Ақуыздар гельден мембранаға өздерінің орналасуын сақтай отырып, ауысады. Сондықтан, электрауысудан кейін нитроцеллюлозада полиакриламидті геледегідей орналасқан ақуыздармен гелдің репликациясын аламыз.

**Блоктау.** Мембранамен антиденелердің спецификалық емес байланысуын болдырмау үшін, сұйылтылған ақуыз ерітіндісінде инкубацияланады - әдетте сиыр сарысу альбумині немесе майсыздандырылған құрғақ сүт пайдаланылады. Сұйылтылған ерітіндідегі ақуыз мембранаға ақуыз жолақтары жоқ жерлерде байланысады. Нәтижесінде, антиденелер қосылған кезде, олар тек зерттелетін ақуыздардың арнайы байланысу сайттарымен байланыса алады. Блоктауды жүзеге асыруға арқылы таза фонға қол жеткізуге мүмкіндік береді және жалған оң нәтижелер алу мүмкіндігін жояды.

**Зерттелетін ақуыздың антиденелермен байланысуы.** Мембрана блокталғаннан кейін, оны буфермен (3 рет) жуып, әртүрлі антиденелермен «сэндвич» әдісімен инкубациялайды: алдымен ақуыздар бастапқы (моно- немесе поликлональды) антиденелермен байланысады, кейінірек олар ферменттермен (ренин пероксидазасы немесе сілтілік фосфатаза) конъюгацияланған екінші антиденелермен байланысады.

**Детекция.** Зерттелетін ақуыздың визуализациясы сәйкес биохимиялық реакцияны өткізу арқылы, өнімнің пайда болуымен жүзеге асырылады, ол колориметриялық, химилюминесценттік немесе флуоресценттік детекция әдістерімен анықталады. Ақуыздың мөлшері денситометрия әдісімен бағаланады.

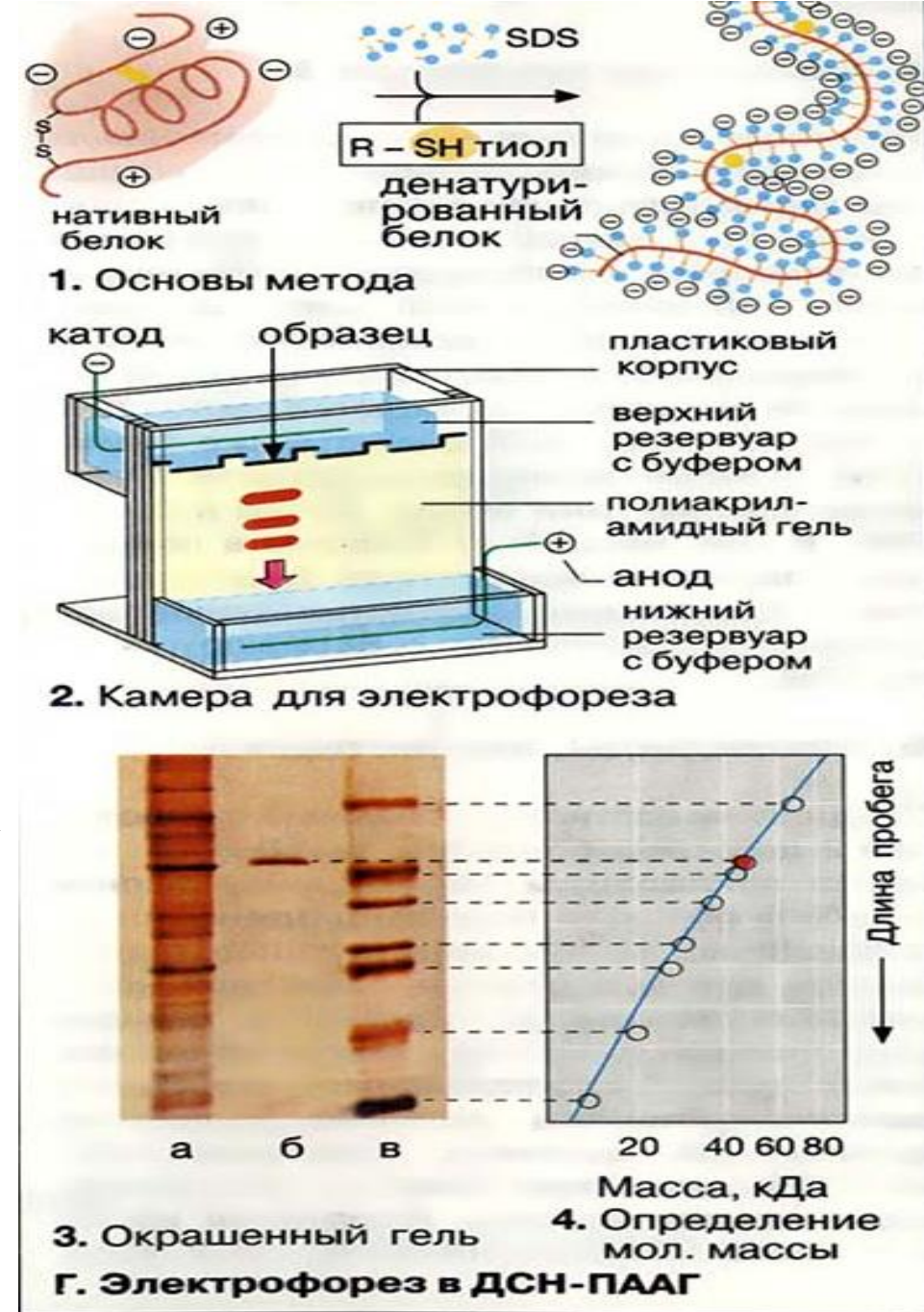
# 1 кезең. ДСН-ПААГ электрофорез

**Белоктарды SDS-электрофорезбен фракциялау.** Белоктарды тек молекулалық массасына қарай фракциялау үшін ПААГ-электрофорезі денатурацияланған жағдайда қолданылады.

Бұл жүйе У. К. Лэммлимен жасалған. Бұл әдіс ақуыз қоспасындағы полипептидтердің мөлшерін бағалауға мүмкіндік береді, сонымен қатар айқын аймақтарды бөліп көрсетеді, бірақ ферменттердің белсенділігі толығымен немесе едәуір дәрежеде жоғалуы мүмкін, себебі олар денатурацияланады.

Денатурация, үш есе артық натрий додецилсульфатымен (ДСН немесе SDS) өңдеу арқылы қол жеткізіледі. Анион SDS теріс зарядты болып табылады. SDS аниондары гидрофобты өзара әрекеттесу арқылы ақуыздарға пропорционалды түрде сіңіріледі, бұл кез келген полипептидті теріс зарядты күйге айналдырады. SDS болған кезде "көлем/заряд" қатынасы кез келген белок үшін дерлік бірдей болғандықтан, бөліну тек молекулалық массаға байланысты жүреді.

Сонымен қатар, толық денатурация үшін, S-S байланыстары бар Белоктарды SDS қолданар алдында  $\beta$ -меркаптоэтанолмен өңдеу керек, ол күшті жағымсыз иіспен таныс, сондықтан жұмыстар ағынмен жүргізіледі. Альтернативті қосылыс ретінде  $\beta$ -меркаптоэтанолға дитиотреитол ( $C_4H_{10}O_2S_2$ ,  $M_r=154,25$ ) пайдаланылады, ол екі есе аз қажет, ол аз ұшқыш және де спецификалық иісі жоқ, бірақ оның бағасы әлдеқайда қымбат.

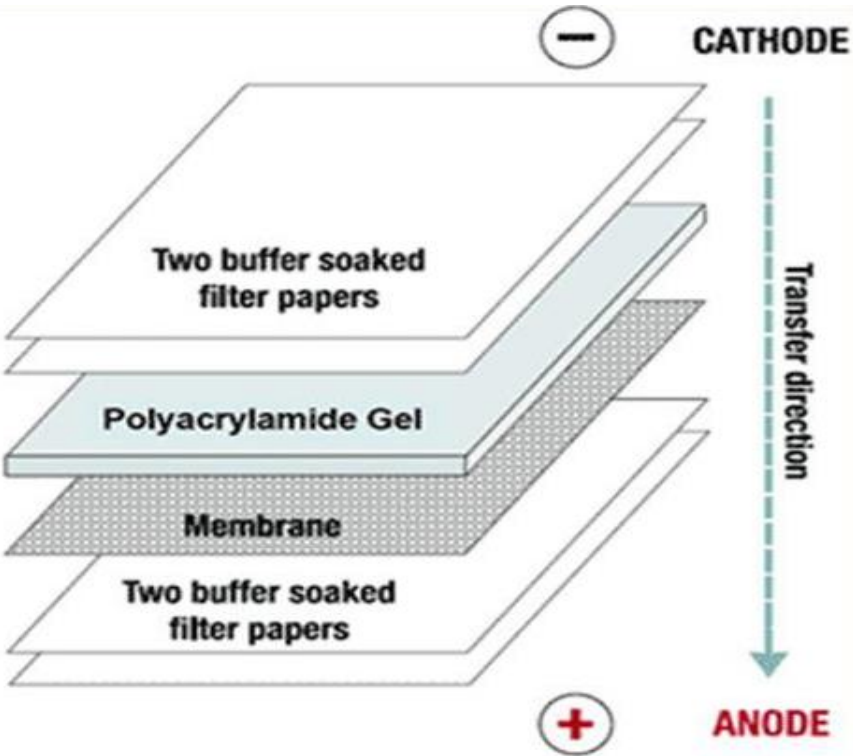


## 2 кезең. Мембранаға көшіру

Белоктарды антиденелерге және кейінгі детекцияға қолжетімді жасау үшін оларды гельдің жолағымен бірге нитроцеллюлоза немесе поливинилиденфторид (PVDF) мембранасына тасымалдайды.

Мембрана гельдің үстіне қойылып, оның үстіне фильтр қағаздың қабаты салынады. Барлық қабаттар тасымалдау буферіне орналастырылады, ол капиллярлық күштердің әсерінен қағаз арқылы жоғары көтеріледі, белктерді өзімен бірге алып кетеді. **Белоктарды** тасымалдаудың басқа әдісі электроблоттинг деп аталады, бұл әдіс электр тогын пайдаланып, **Белоктарды** гельден мембранаға тасымалдайды. **Белоктарды** гельден мембранаға орналасуын сақтай отырып, ауысады.

Осы блоттинг процесінің нәтижесінде **белоктар** мембрананың жұқа беткі қабатында ұсталады, бұл оларды детекциялауға мүмкіндік береді. Екі мембрананың да қолданылу себебі – олардың **белоктарды** спецификалық емес түрде байланыстыру қасиеті. **Белоктардың** байланысуы мембрана мен белок арасындағы гидрофобты және электростатикалық өзара әрекеттесулерге негізделген. Нитроцеллюлоза мембранасы PVDF-дан арзанырақ, бірақ әлдеқайда сынғыш және меткаларды қайта қолдануға төзімділігі нашар.



Western Blot Setup

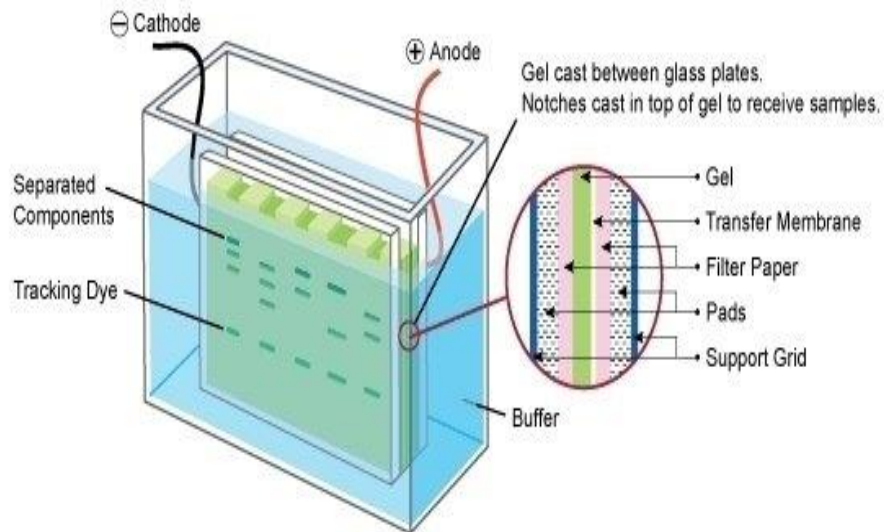
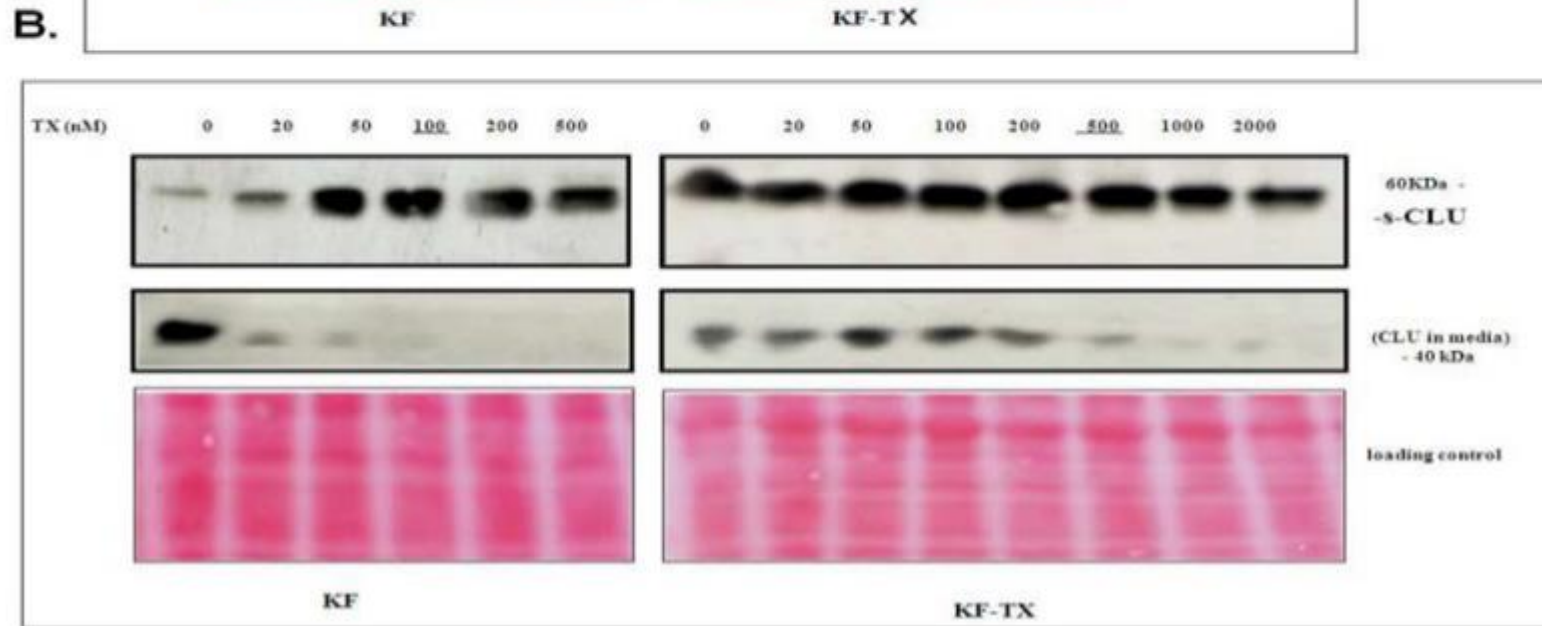
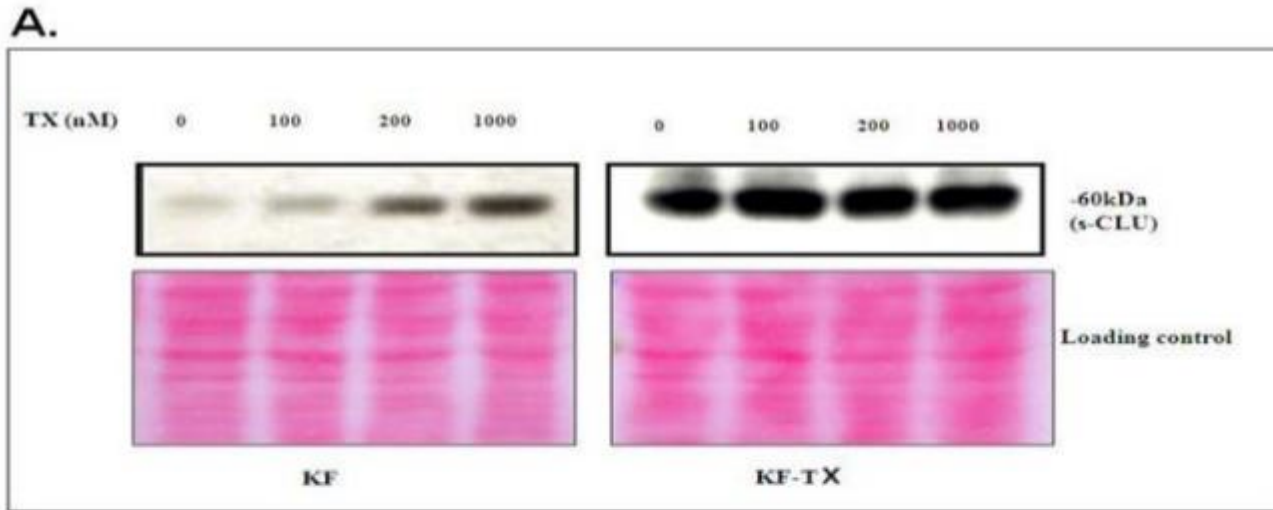


Diagram 1: Illustration of Western Blot Setup

# Белоктардың фильтрге тасымалдауын растау (Ponceus бояуы арқылы)



Гельден мембранаға **белоктарды** тасымалдаудың біркелкілігі мен жалпы тиімділігін **Coomassie blue** немесе **Ponceau S** бояуларымен бояу арқылы тексеруге болады.

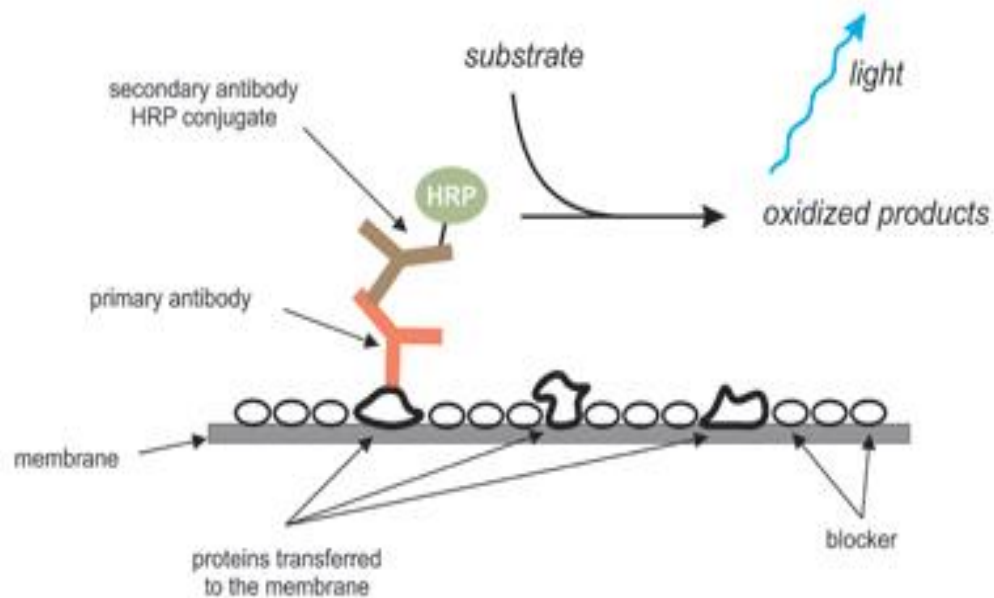
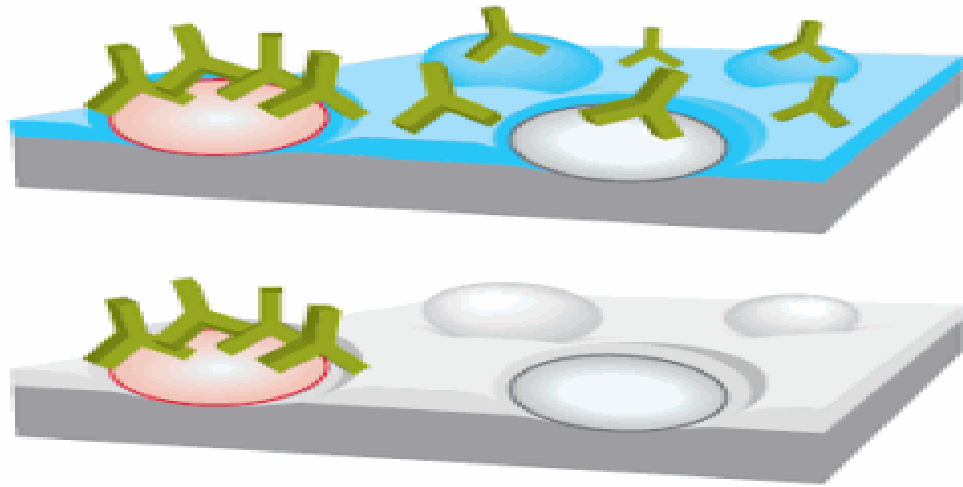
- Coomassie екеуінің ішіндегі ең көп таралғаны,
- Ponceau S бояуы сезімталдығы жоғары және суда жақсы ериді, бұл мембрананы кейінгі жуу мен белгілеуді жеңілдетеді.

# Белоктарды фильтрде бояу

Бояу әдісі	Сезімталдық, ақуыз мөлшері	Нитроцеллюлоза	Нейлон	PVDF	Бояу
Ponceau S	1-2 мкг	+	-	+	кері
Amido Black	1.5 мкг	+	-	+	тұрақты, төмен фон
Comassie blue	1.5 мкг	+	-	+	тұрақты, жоғары фон
India ink	100 нг	+	-	+	тұрақты
Biotin-avidin	30 нг	+	+	+	тұрақты, уақыт өте түссізденеді(бледнеет)
Colloidal gold	3 нг	+	-	+	тұрақты

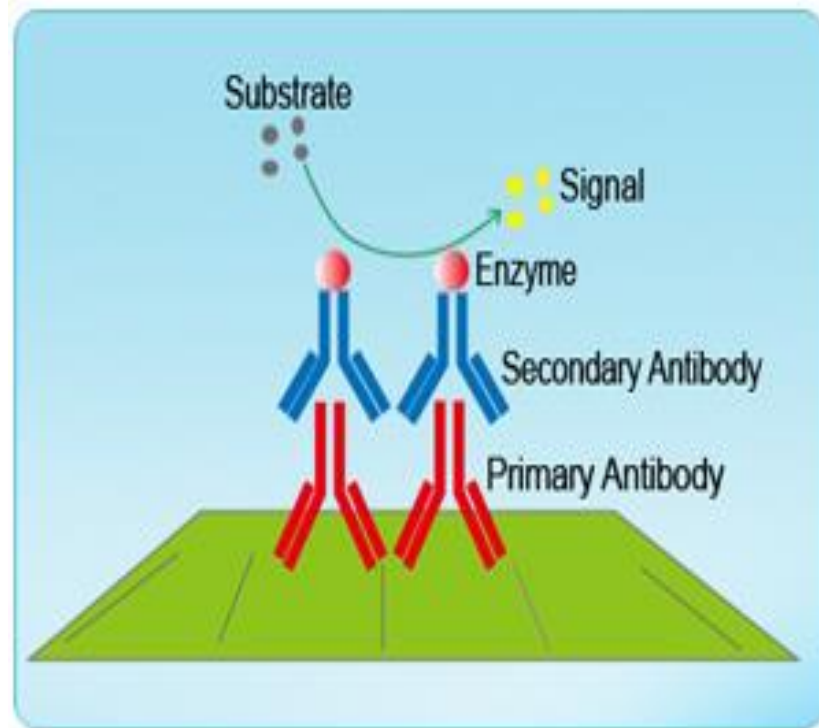


### 3 кезең. Блоктау



Мембрананы, ақуыздарды байланыстыру қабілетіне негізделе және антиденелер мен мақсатты ақуыз таңдалғаннан кейін, мембрана мен мақсатты ақуызды анықтау үшін қолданылатын антиденелер арасындағы өзара әрекеттесуді болдырмау үшін шаралар қабылдануы қажет (өйткені антиденелердің табиғаты да ақуыз). Спецификалық емес байланыстарды блоктау сұйытылған ақуыз ерітіндісіне, әдетте сиыр сарысу альбумині немесе майсыздандырылған құрғақ сүт (екеуі де арзан) және Tween 20 немесе Triton X-100 сияқты детергенттердің аз пайызын қосу арқылы жүзеге асырылады. Сұйытылған ерітіндідегі ақуыз мембранаға мақсатты ақуыз байланыспаған барлық ауданда бойынша бекітіледі. Сондықтан антиденелер қосылған кезде мембранада байланыса лаатын жалғыз бос орын — бұл мақсатты ақуыздардағы спецификалық байланысу сайттары. Вестерн-блоттың соңғы өніміндегі бұл фондық «шу», таза нәтижелерге және жалған оң нәтижелердің пайда болуынан сақтайды.

## 4 кезең. Гибридизация



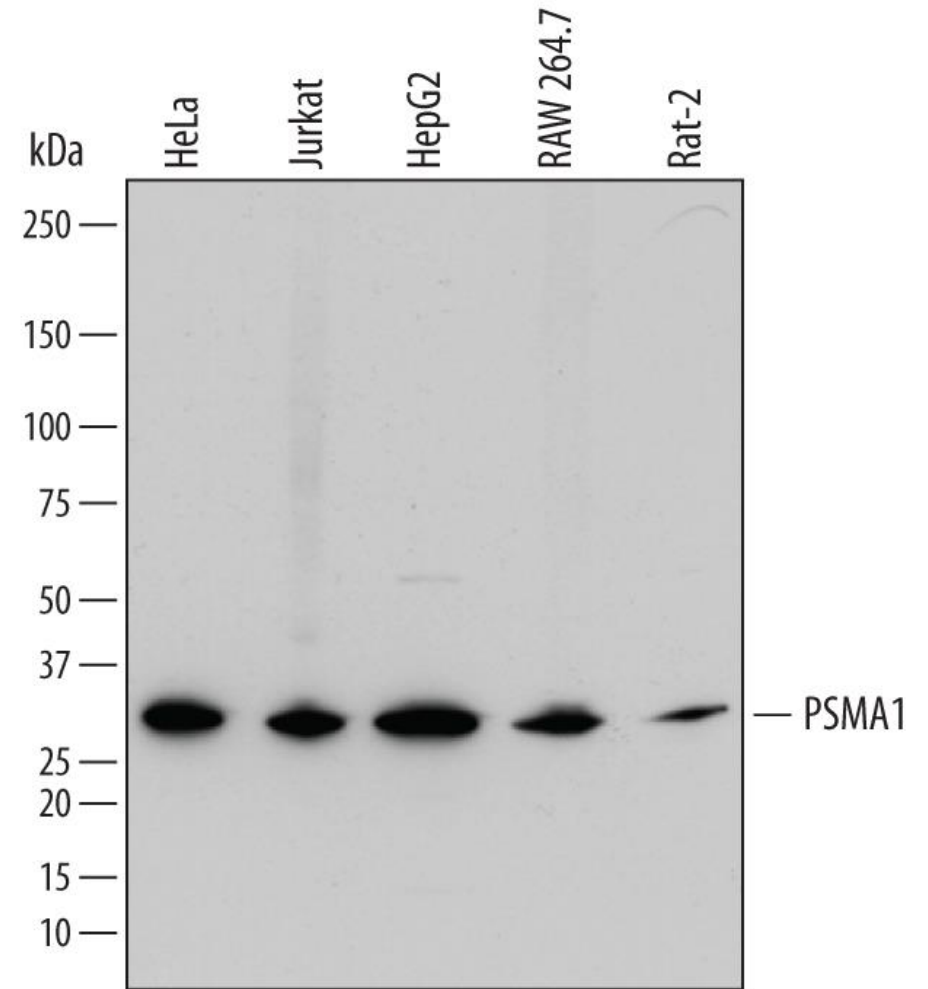
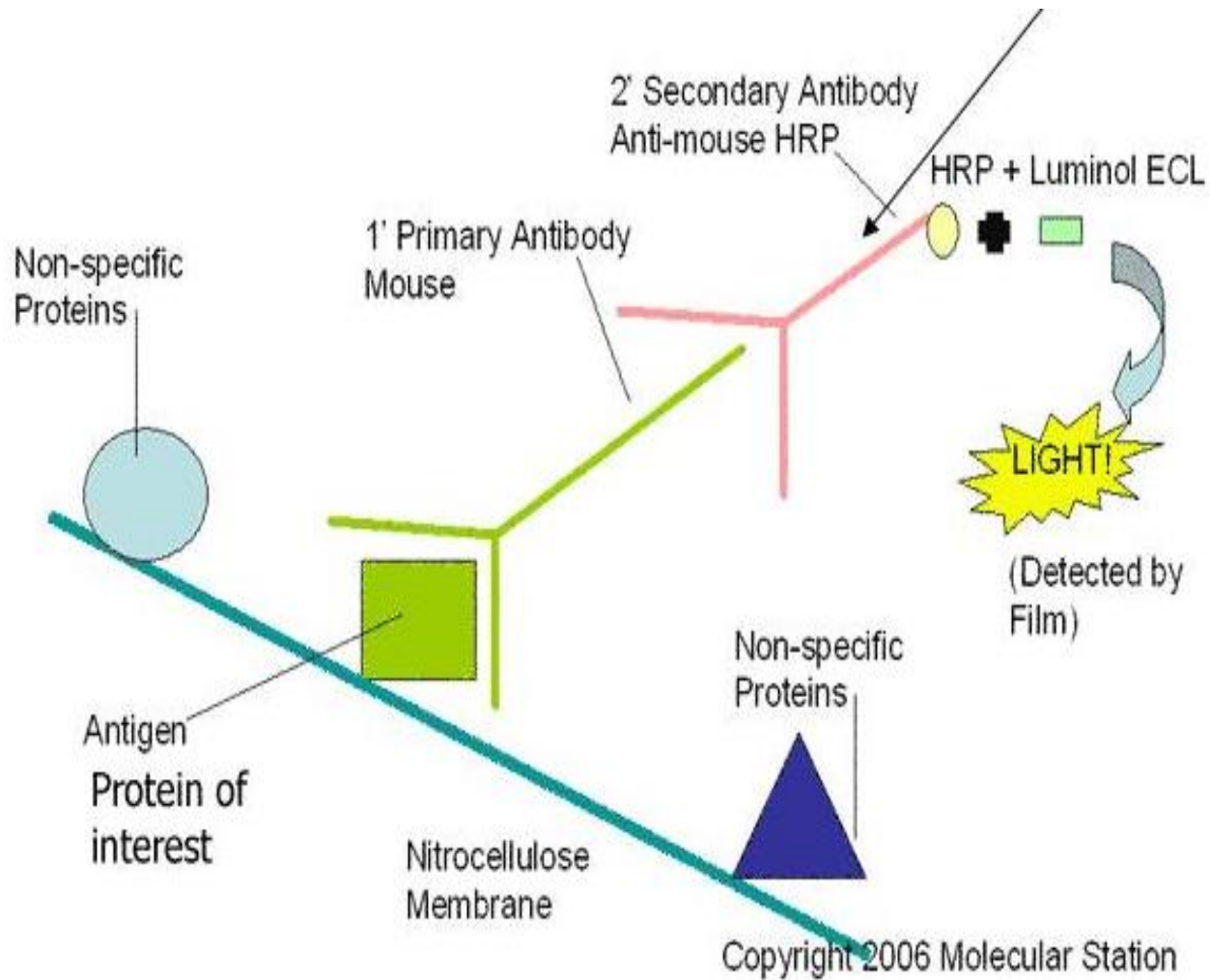
Блоктаудан кейін блотты бір немесе бірнеше антиденелермен инкубациялайды. **Біріншілік** антидене мақсатты ақуызбен байланысады, ал екінші антидене **біріншілік** байланысады. Екінші антидене ферментпен немесе бояғышпен конъюгатталады, ол ақуыздың орналасуын көрсету үшін пайдаланылады. Алғашқы антидене тікелей белгіленуі мүмкін, бірақ екінші антидене енгізудің белгілі бір артықшылықтары бар.

**Біріншіден, біріншілік** антидененің бір молекуласымен бірнеше екіншілік антиденелер байланыса алады, бұл сигналдың күшеюіне алып келеді. **Екіншіден,** белгіленген екіншілік антидене (фермент-антидене конъюгаты) әртүрлі спецификалықтығы бар көптеген алғашқы антиденелер үшін қолданылуы мүмкін, осылайша көптеген **біріншілік** антиденелерді белгілеу қажеттілігін жояды.

**Поликлоналдық және моноклоналдық біріншілік антиденелер ретінде қолданылады.** Поликлоналдық антиденелер әдетте антисерум немесе аффинді тазартылған антидене түрінде болады. Моноклоналдық антиденелер қуыс сұйықтық немесе сұйық тін мәдениеті түрінде шығарылуы мүмкін және оларды тікелей немесе аффинді тазартылған препарат ретінде пайдалануға болады.

**Иммунохимиялық детекция үшін** зерттелетін ақуызға арналған антиденелер, әдетте, тек тізбектеле орналасқан аймақтарға ерекше моно- немесе поликлоналдық антиделер ретінде қолданылады. Конформациялық эпитоптарға (немесе суббірліктер арасындағы байланыстарды қамтитын аймақтарға) ерекше антиделер, әдетте, Western blotting үшін жарамсыз. Пайдаланылатын антиденелер зерттелетін ақуызға тән, тек сол ақуызға тән аминқышқылдарының тізбегіне ерекше болуы керек. Пайдаланылатын антиденелердің аффинитеті жоғары болған сайын, ақуыз жолақтары соғұрлым жарқын және анық боялады, әдістің сезімталдығы да жоғары болады. Жоғары аффинитетті антиденелерді қолдану арқылы сезімталдығы 1 нг-қа дейін және одан да жоғары болуы мүмкін.

# 5 кезең. Детекция



Қазіргі заманғы иммунодетекция әдістері ферменттік қосылыстарды анықтауға негізделген, мұнда екінші реттік антиденелер пероксидаза хрена (HRP) немесе сілтілі фосфатаза (ALP) сияқты ферменттермен ковалентті түрде байланысады. Конъюгацияланған фермент арнайы субстраттардың ыдырауын катализдейді, нәтижесінде сигнал қалыптасады. Әдетте үш типті субстраттар пайдаланылады: хромогендік, хемилюминесценттік және хемифлуоресценттік, сондай-ақ флуороформен таңбаланған екінші реттік антиденелер арқылы анықтау.

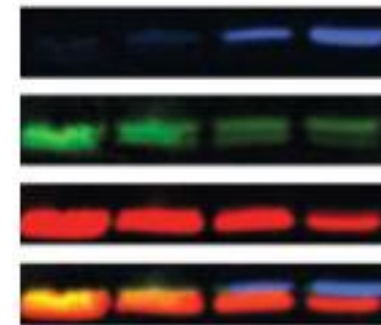
**Хромогендік детекция.** Хромогендік детекцияда конъюгацияланған ферменттер реакцияны катализдеу үшін пайдаланылады, нәтижесінде ерімейтін түсті тұнба пайда болады; мысалы, 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфаты (BCIP) мен нитрокөк тетразолий тұзы (NBT) әрекеттескенде көк түсті ерімейтін қосылыс түзіледі (Leary және басқалар, 1983). Бұл әдісті орындау үшін қарапайым және талдау үшін арнайы жабдықты қажет етпейді.



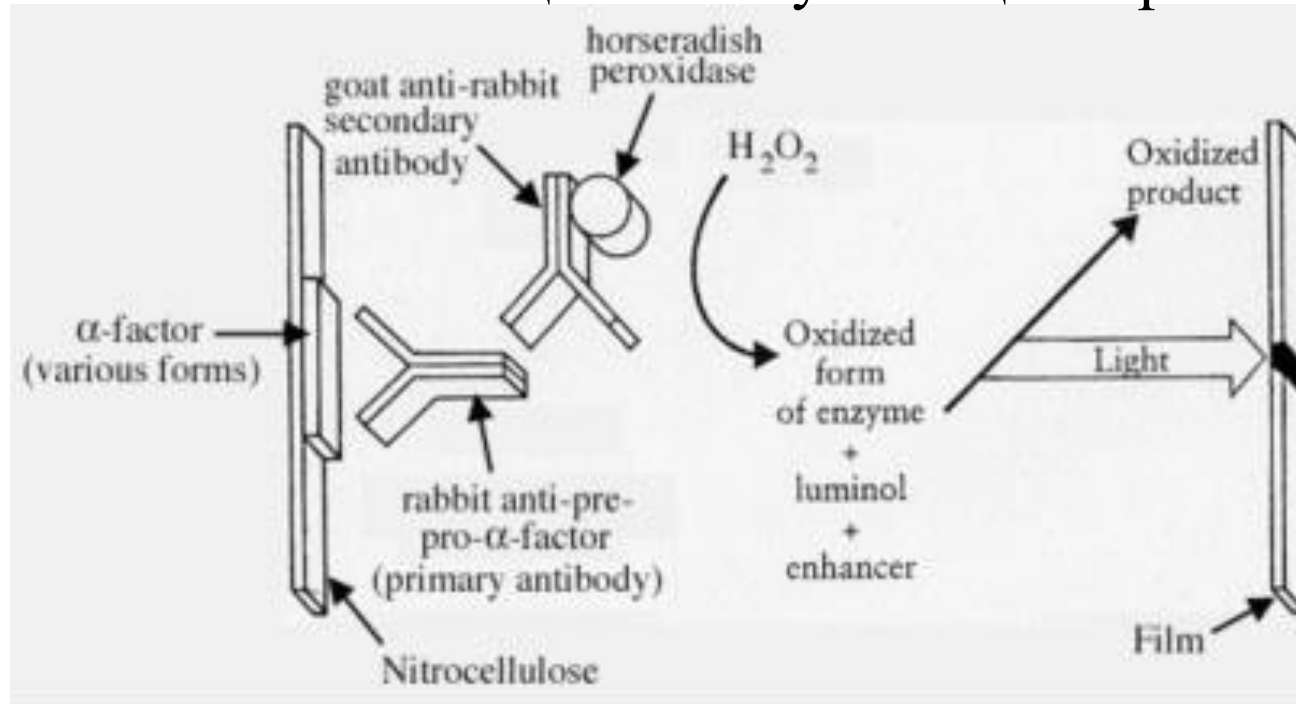
**Хемилюминесценттік детекция.** Хемилюминесценттік детекцияда конъюгацияланған ферменттер реакцияны катализдеу үшін пайдаланылады, ол көзге көрінетін жарықтың пайда болуына әкеледі. Кейбір хемилюминесценттік жүйелер пероксидаза хрена арқылы пероксидтер түзілетініне негізделеді; басқа жүйелер 1,2-диоксетан субстраттарын және сілтілі фосфатазаны пайдаланады (Cortese, 2002). Бұл әдіс хромогендік детекция әдісімен салыстырғанда жылдамдық пен сенімділікті қамтамасыз етеді, сезімталдық деңгейі радиоизотоптық детекциямен салыстырылатын.



**Флуоресценттік детекция.** Флуоресценттік детекцияда флуороформен конъюгирленген антитела мен фермент активтігінде флуоресценттік сигнал шығаратын флуорогендік субстраттар пайдаланылады (хемифлуоресценция). Бұл әдістің артықшылықтарының бірі - флуоресценттік сигналдың ұзақ уақыт бойы тұрақты болуы, сондай-ақ блоттарды сақтау және қайта фотосуретке түсіру мүмкіндігі. Сонымен қатар, әртүрлі флуорофорлар бірнеше мақсатты белоктарды бір үлгіде бір уақытта анықтауға мүмкіндік береді (мультиплекс анықтау). Соңғы кезге дейін флуоресценттік детекцияны вестерн-блоттингте қолдану шектелген болатын.



Ең жиі қолданылатын хемилюминесцентті детекция әдісі – хемилюминесцентті визуализация жүйесі.



Пероксидаза хрені люминолдың 3-аминофталатқа дейін тотығуын катализдейді, бұл процесс бірнеше аралық өнімдер арқылы жүзеге асады.

Бұл реакция 428 нм ұзындықтағы толқынмен төмен интенсивті жарықтың шығуымен жүреді. Кейбір заттардың қатысуында жарықты мың есе күшейту мүмкіндігі бар.

Жарықтың күшеюі құбылысын хемилюминесценцияны күшейту (ағылш. enhanced chemiluminescence, ECL) деп атайды.

# Визуализациялау.

Визуализациялау гельді құжаттау жүйелерін немесе сандық камераны қолдану арқылы жүзеге асырылады.

