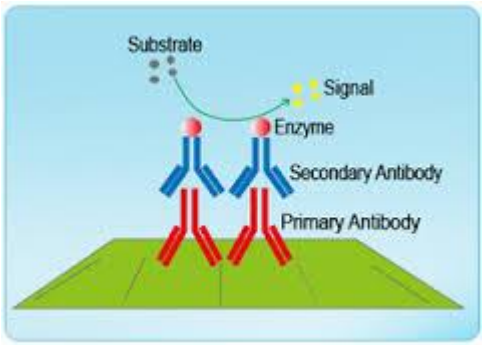
مروری بر روش وسترن بلات



همان طورکه می دانیم در تکنیک ELISA پروئین ها در سطح حفرات پلیت پوشش داده می شوند و در انتهای آزمایشELISA ،از یک واکنش رنگ زا برای شناسایی انجام واکنش یا عدم انجام آن استفاده می شود.

اما در وسترن بلات ابتدا پروتئین توسط الکتروفورز روی ژل اکریل امید جدا شده، سپس توسط جریان الکتریکی به غشاء نیترو سلولوز انتقال داده می شوند. این غشا شبیه به کاغذ معمولی است، اندازه حفرات آن کاملا مشخص است و توانایی زیادی در اتصال به پروتئین دارد پس از اینکه پروتئین به غشاء نیتروسلولوز انتقال داده شد بقیه مراحل شبیه به ELISA طی می شود با این تفاوت که مسیر حرکت هر نمونه به شکل یک نوار بریده می شود و درون ظرف خاصی که شیار هایی به اندازه نوار بریده شده، قرار می گیرد و بقیه مراحل در این ظرف انجام میگیرد.

به این ترتیب به طور مثال اگر نمونه کشت ویروس HIV در اختیار داشته باشیم، باید ابتدا انرا الکتروفورز نماییم. پس از الکتروفورز باندهای پروتئینی را بهgp ۴۱ وgp ۱۲۰ هر یک بنا به اندازه مولکول آن ها ، روی ژل تفکیک می شوند .اکنون باندهای پروتئین را به غشای نیترو سلولز انتقال داده تا مراحل بعدی به راحتی صورت گیرد.

پس از اینکه پروتئین ها به غشای نیترو سلولوز منتقل شدند، مرحله بعدی میتواند به دو گونه طراحی شود:

الف) بعضی از مواقع هدف شناسایی پروتئین خاص درپروتئین های الکتروفورز شده است. این حالت بیشتر در تحقیقات کاربرد دارد.

ب) در برخی موارد نیز مخلوط پروتینی ماهیت مشخصی دارد و حتی وزن مولکولی پروتئین های این مخلوط و موقعیت آن ها پس از الکترو فورز مشخص می باشند. در این موارد می توان حضور آنتی بادی علیه پروتئین های را در سرم مورد آزمایش بررسی نمود. در اکثر موارد تشخیص از این روش استفاده می شود.

به طور مثال پروتئین های ویروس HIV الکتروفورز شده، سپس به غشای نیتروسلولوز منتقل می شود. اکنون پس از مجاورت با سرم انسانی هدف آزمایش بررسی وجود آنتی بادی علیه پروتئین غشایی یا مرکزی HIV است. در این مواقع علاوه بر حضور یا عدم حضور آنتی بادی اختصاصی می توانیم مشخص سازیم که آنتی فرد علیه چه جزئی از عامل بیماری زا است.

به این ترتیب موارد مثبت کاذب مشاهده شده در آزمون ELISA در اینجا حذف می شود و به طور اختصاصی واکنش دهی آنتی بادی ،مورد آزمون قرار می گیرد.

در بسیاری مواقع که چندین بار (۲ تا ۳ بار) تست ELISA یک عامل عفونی خطرناک برای یک بیمار مثبت می گردد، جهت تایید تست الایزا از تست وسترن بلات استفاده می شود نظیر عفونت هایHIV ، HTLVوHSV . البته امروزه برای بسیاری از عفونت های ویروسی و باکتریایی تست تایید وسترن بلات موجود است. به لحاظ تکنیکی در مواردی که هدف ارزیابی حضور آنتی بادی خاص در یک سرم باشد، مراحل ذیل دنبال می شود تا اینکه در انتها از طریق واکنش رنگ زایی رسوبی، اتصال آنتی بادی به آنتی ژن مشخص گردد. از انجا که جایگاه حرکت و قرار گیری آنتی ژن روی نوار نیترو سلولز مشخص است، می توانیم مشاهده واکنش رنگی را دلیل بر اتصال آنتی بادی اختصاصی به آن آنتی ژن بدانیم.

منبع : مجله اینترنتی آزمایشگاه آمثبت