المجلة الإلكترونية الشاملة متعددة التخصصات
العدد الثالث والعشرون شهر (٤) ٢٠٢٠

اللطخة الغربية (Western blot)

إعداد: إيمان عبد الله باحطاب
المركز الوطني للتقنية الحيوية، معهد أبحاث علوم الحياة والبيئة، مدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية، ص.ب ٦٠٨٦، الرياض ١١٤٤٢، المملكة العربية السعودية.
E-mail: Ebahattab@kacst.edu.sa

والطريقة تم ترجمتها من بروتوكول د. تنوير سليم ختلاني
قسم الخلايا الجذعية و الطب التجديدي، مركز الملك عبد الله العالمي للأبحاث الطبية، مدينة الملك عبد العزيز الطبية، وزارة الشؤون الصحية بالحرس الوطني، ص.ب٢٢٤٩٠، الرياض ١١٤٢٦، الرمز البريدي ١٥١٥، المملكة العربية السعودية.
E-mail: khatlanita@NGHA.MED.SA

مراجعة: د. ياسر سعيد باسماعيل
قسم الخلايا الجذعية و الطب التجديدي، مركز الملك عبد الله العالمي للأبحاث الطبية، مدينة الملك عبد العزيز الطبية، وزارة الشؤون الصحية بالحرس الوطني، ص.ب٢٢٤٩٠، الرياض ١١٤٢٦، الرمز البريدي ١٥١٥، المملكة العربية السعودية.

E-mail: basmaeily@ngha.med.sa

الملخص:

تعتمد هذه التقنية على استخلاص البروتينات من الأنسجة أو الخلايا أو إفرازات الخلايا ومن ثم فصل مزيج البروتينات اعتمادًا على الوزن الجزيئي للبروتين (طول السلسة البروتينية) عبر جريانه في الهلام الكهربائي (gel electrophoresis)، وبعدها يتم نقل هذه البروتينات من الهلام إلى غشاء، إما غشاء النيتروسليلوز أو ثنائي فلوريد متعدد الفينيليدين (PVDF). ويتم استخدام تيار كهربائي لسحب البروتينات من الهلام إلى الغشاء، فيظهر عليه شريط أو حزمة (band) لكل بروتين تسلسليًا حسب وزنها الجزيئي، ثم تتم عملية الحجب لمنع الارتباط العشوائي للجسم المضاد الأولي، وبعدها يتم تحضين هذا الغشاء مع الجسم المضاد الأولي (primary antibody) ويكون مخصص للبروتين المراد الكشف عنه ثم يتم إضافة الجسم المضاد الثانوي (secondary antibody) فيرتبط به، والجسم المضاد الثانوي يكون معلّمًا بإنزيم ثم بإضافة مادة التفاعل أو المادة الأساس (Substrate) وعند ارتباطها ستصدر لون أو ضوء ثم بحسب طريقة الكشف المستخدمة يتم التقاط الصورة باستخدام كاميرات سي سي دي CCD cameras . هذه الصورة يتم تحليلها باستخدام مقياس الكثافة الذي يحلل كمية الصبغة البروتينية النسبية ويقوم بالتحليل الكمي عن طريق الكثافة الضوئية. وبحسب كثافة وشدة اللون تكون كثافة البروتين، ويتم التعرف على البروتين عن طريق وزنه الجزيئي وذلك بمقارنته بسلم البروتين المعياري (ladder) التي تم إضافتها عند خطوة الفصل الكهربائي للعينات. وسيتم شرح الخطوات تفصيليًا ووظائف المركبات و المحاليل المستخدمة و نصائح لتفادي بعض الأخطاء أثناء العمل.

الكلمات المفتاحية: اللطخة الغربية، كشف البروتين، الفصل الكهربائي على الهلام

المجلة الإلكترونية الشاملة متعددة التخصصات
العدد الثالث والعشرون شهر (٤) ٢٠٢٠

Abstract :

In this technique a mixture of proteins is separated based on molecular weight, through gel electrophoresis. These resolved proteins are then transferred to a membranes such as nitrocellulose or Polyvinylidene Polyvinylidene Difluoride (PVDF) producing a distinct and separate band for each protein. Blocking the membrane with suitable blocking buffer is very important to avoid nonspecific band and to block the empty fields on the membrane. The transferred proteins are detected using protein specific primary antibodies, and a species specific secondary antibody labelled with an enzyme, and finally incubated with a substrate to get a colored band. Then accurate bands are observed by comparing them with the molecular weight ladder with known molecular weights. In this assay, we will illustrate various steps of western blot to be followed in detail and the function of each component/reagent used, as well as troubleshooting.

Key words: western blot, protein detection, gel electrophoresis.

المقدمة:

نُشرت اللطخة الغربية لأول مرة في عام ١٩٧٩، وأصبحت من التقنيات الأساسية لباحثي البروتين ("The western blot: A general overview," n.d.). تستخدم لفصل البروتينات المختلفة في العينة، والكشف عن بروتين معين في خليط البروتينات باستخدام أجسام مضادة أولية متخصصة لبروتين واحد (Brooks, Schumacher, Blancher, & Jones, 2003). ولهذه التقنية مميزات تجعل منها تقنية رائدة في مجال أبحاث البروتين ومنها أنه اختبار بالغ الدقة، تحليل النتائج سهل للغاية وهناك الكثير من الأجسام المضادة المتاحة تجاريًا والمتخصصة للكشف عن بروتينات محددة، وكذلك باستخدام هذه التقنية يمكن معرفة البروتين إذا ماكان نشطًا أم لا ومعرفة التغيرات في البروتينات (Brooks et al., 2003). هناك طرق مختلفة للكشف عن البروتين وهي الكشف الإشعاعي والكشف الإنزيمي: ColorimetricوChemiluminescent وكشف الفلورسنت (Karolina Szczesna, 2019). ولهذه التقنية مجالات استخدام واسعة وأهمها في الفحص الطبي لتشخيص الأمراض وفي مجال الأبحاث للكشف عن البروتينات المراد دراستها وأيضا دراسة تأثير العلاج أو مواد معينة على البروتينات المنتجة داخل الخلايا الحية. وسنتناول الخطوات تدريجيًا من فصل البروتين إلى قراءة النتائج.

مشكلة الدراسة وتساؤلاتها:

تعد تقنية اللطخة الغربية إلى الآن الرائدة في مجال الأبحاث ويواجه بعض الباحثين والطلبة مشكلات في العمل على ذلك وتثير أذهانهم الكثير من التساؤلات عند مواجهة مشاكل في العمل ومنها:

- لماذا لا تظهر نتائج لي عند قراءتها؟
- لماذا يظهر لي أكثر من شريط أو حزمة وهدفي هو بروتين واحد؟
- لماذا الغشاء خلفيته داكنة؟
- ما هو نوع وتركيز محلول الحجب المناسب؟

أهداف وأهمية الدراسة:

من أهم أهداف هذا العمل إضافة مرجع عربي علمي شامل لتقنية تعتبر من أهم التقنيات المستخدمة في الأبحاث العلمية إلى الوقت الحاضر.

منهج الدراسة:

عمل تجربة باستخدام هذه التقنية وتوضيح كيفية عملها بشكل وافٍ مبتدئين بالمواد والمحاليل اللازمة وأهمية كل محلول أو مادة ومن ثم شرح طريقة العمل بالخطوات والصور لجعلها أكثر سلاسة، وتم لفت النظر على الأخطاء التي يمكن أن يقع بها الباحثين أثناء العمل.

أدوات البحث:

المحاليل والمواد والأدوات المستخدمة:

مواد وأجهزة أساسية:

- محلول ملحي متعادل PBS.
- أنابيب مخروطية ١ مل (Eppendorf tube).
- ماء مقطر.
- مضخة وماصات بحجم ١٥ مل و٢٥ مل.
- ملقط.
- أنابيب حجم ١٥ مل و٥٠ مل.
- جهاز الطرد المركزي.
- ماصة دقيقة ورؤوس الماصة بحجم ١٠٠ و٢٠٠ و١٠٠٠ ميكرولتر (µl).
- جهاز الخلط vortex.

وسنبدأ الآن في تحضير المحاليل و المواد اللازمة للعمل مرتبةً حسب خطوات العمل:

استخلاص البروتين:

- مصدر العينة (نسيج، خلايا، إلخ..).
- محلول لتحلل الخلايا (Lysis buffer) ويكون تركيزه ١س أو يتم تحضيره من محلول مركز عن طريق تخفيفه بالماء المقطر، ويجب إضافة مثبطات إنزيمات تكسير البروتين مثل فينيل ميثيل سلفونيل فلوريد (PMSF).

مثبطات إنزيمات تكسير البروتين protease inhibitors يتم إضافتها لأن الخلايا أثناء تحللها تطلق إنزيمات تكسير البروتين التي يمكن أن تكسر البروتينات المستهدفة، فبإضافتها نمنع تحلل البروتينات بواسطة إنزيماتها.

ملاحظة: في كل ١ مل من محلول التحلل ٥ ميكرولتر من فينيل ميثيل سلفونيل فلوريد ذو التركيز ٢٠٠ مل مولار.

ويتم تحلل الخلية لاستخراج البروتين بتفكيك غشاء الخلية لتسهيل عملية استخراج البروتينات النووية والسيتوبلازمية من الخلايا، لذلك يحتوي محلول التحلل على منظفات مختلفة مثل Triton-X، Tween، SDS، CHAPS تساعد على إطلاق البروتينات القابلة للذوبان (Brooks et al., 2003; *WESTERN BLOTTING The Complete Guide To*, n.d.)

قياس تركيز البروتين:

- صبغة برادفورد الكاشفة Bradford reagent dye.
- ماء مقطر.
- طبق ذو ٩٦ حجرة.
- جهاز قياس الطيف الضوئي.

تحضير العينة:

- حمام مائي أو جهاز الحرارة الجافة يتم تعيينها على درجة حرارة ١٠٠ م˚
- تحضير محلول العينة بتركيز ٢س (2x SDS Sample buffer or Laemmli Sample buffer):
  - ٤ مل من SDS كبريتات دوديسيل صوديوم W/V % 10.
  - ٢ مل من الغلسرول Glycerol.
  - ١,٢ مل من كلورايد التريس Tris-HCl ذا الأس الهيدروجيني ٦,٨ وتركيز ١ مولار.
  - ٢,٨ مل ماء مقطر.
  - إضافة أزرق البروموفينول Bromophenol blue ليكون تركيزه النهائي ٠,٠٢% (w/v) . يتم تخزينه في درجة حرارة الغرفة، قبل الاستخدام مباشرة يتم اضافة بيتا مركبتوإيثانول (٥٠ µL من بيتا مركبتوإيثانول-ß mercaptoethanol في ٩٥٠µL من محلول العينة).

عمل الهلام:

- محلول متعدد الاكريلامايد 30% acrylamide/bis-acrylamide solution.
- تريس الكلورايد (Tris-HCl) ذو الأس هيدروجيني ٨,٨ وتركيز١,٥ مولار.
- تريس الكلورايد (Tris-HCl) ذو الأس الهيدروجيني ٦,٨ وتركيز ١مولار.
- كبريتات دوديسيل صوديوم (SDS) يمكن استخدامه بتركيز١٠% - ٢٠%.
- رباعي ميثيل إيثيلينديامين TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine.
- مادة مصلبة تعرف بـ كبيريتات الأمونيوم Ammonium per sulphate، يتم تحضيرها بتركيز ١٠%.
- ألواح زجاجية لتكوّن لنا قالب سمكه ١,٥ ملم (واحدة بحواف جانبية والثانية بدون حواف وأقصر منها).
- أمشاط لتكوين حجرات بعدد ١٠ أو١٥.
- حامل الألواح.
- إطار الصب frame casting.
- قاعدة صب الهلام.
- هلام الأجاروز لمنع تسرب الهلام أثناء الصب ويوضع في قاعدة الألواح.

فصل البروتينات كهربائيًا على الهلام:

- محلول الفصل Running buffer لتحضير محلول الفصل أو محلول تريس جلايسين Tris-Glycine Buffer بتركيز ١٠ س:

اذابة ٣٠ جم من ملح التريس Tris base، ١٤٤ جم من الجلايسين، ١٠ جم من كبيريتات دودوسيل صوديوم (SDS) في ١٠٠٠ مل من الماء المقطر، وسيكون قياس الأس الهيدروجيني ٨,٣ ، لا داعي لضبطه. يحفظ في درجة حرارة الغرفة ويخفف إلى ١ س عند الاستخدام.

- محول الفصل١س: ١٠٠ مل من محلول الفصل ذا تركيز ١٠س مع ٩٠٠ مل من الماء المقطر.

سلم البروتين المعياري(Protein Ladder): وهو خليط من عدة بروتينات معروفة الوزن الجزيئي (متوفر تجارياً)، عادة ما يكون مصبوغ لكي يظهر حزم ملونة مرئية لكل بروتين حسب وزنه الجزيئي.

- سلم البروتين المعياري (Protein Ladder) شكل١(Lee, 2007).
- خزان: هو عبارة عن خزان بلاستيكي.
- حامل الألواح: يحوي قطبين موجب وسالب.
- جهاز مولد الطاقة الكهربائية.

نقل البروتين من الهلام إلى الغشاء (النقل الرطب):

- غشاء PVDF، وحدة تبريد، علب بلاستيكية، الهلام، ميثانول ٩٩%، أوراق ترشيح، إسفنج، حامل الألواح، بكرة أو اسطوانة، كما في الشكل ٢.
- محلول تريس جليسين ٢٠ س Tris-Glycine Buffer (TGB 20X) :
  - مزج ٢٤,٢ جرام من ملح التريس و١٥٠,١ جم من الجلايسين في الماء المقطر بحيث يصبح الحجم النهائي اكثر من ١ لتر. ويحفظ في درجة حرارة ٤م.
  - ولعمل محلول النقل يتم تخفيفه إلى ١س: أخذ ٥٠ مل من محلول تريس الجلايسين ٢٠س مع ٧٥٠ مل من الماء المقطر و٢٠٠ مل من الميثانول٩٩%. يمكن حفظه في درجة حرارة ٤ م وإعادة استخدامه.
- خزان وغالبًا يكون خزان بلاستيكي لتعبئته بمحلول النقل.
- أداة النقل: يحوي قطبين موجب وسالب.
- جهاز مولد الطاقة.

الحجب أو التغطية (Blocking) وإضافة الأجسام المضادة:

- تحضير ١ مولار من كلوريد الصوديوم (NaCl 1 M): إذابة ٥٨ جرام من كلوريد الصوديوم في ١ لتر من الماء المقطر.
- تحضير تريس Tris ذو الاس الهيدروجيني ٧,٦ بتركيز ٠,٥ مولار: إذابة ٦٠,٥ جم من ملح التريس في ٥٠٠ مل من الماء المقطر، يتم ضبط الأس الهيدروجني ٧,٦ بأضافة حمض الكلور ثم نضيف الماء المقطر إلى ان يصبح الحجم النهائي ١ لتر.
- تحضير محلول التريس الملحي مع التوين المنظف TBST (tris buffered saline with tween-20)
- وذلك بخلط المكونات التالية: ٤٠ مل من تريس ذو الاس الهيدروجيني ٧,٦ ذا التركيز ٠,٥ مولار+ ١٥٠ مل من كلوريد الصوديوم ذا التركيز ١ مولار + ٨١٠ مل من الماء المقطر + ١ مل من التوين tween 20.
- تحضير محلول الحجب (blocking buffer): إذابة ٥ جم من الحليب منزوع الدسم في ١٠٠ مل من محلول التريس الملحي مع التوين المنظف ويخلط جيدًا.

الهدف من عملية الحجب: تم اختيار الغشاء لقابليته على الالتصاق بالبروتينات، يجب اتخاذ إجراءات خاصة لمنع التفاعلات بين الغشاء والجسم المضاد المستخدم لاكتشاف البروتين محل الإهتمام. يتم سد البروتين الغير محدد عن طريق وضع الغشاء في محلول مخفف من بروتين عادة ما يكون هذا البروتين هو ألبومين المستخرج من مصل البقر Bovine Serum Albumin المعروف بالـ BSA أو حليب منزوع الدسم، مع مقدار صغير من منظف مثل توين ٢٠ Tween هذا البروتين يغطي البروتينات الموجودة في الغشاء، فعند إضافة الجسم المضاد المتخصص للكشف عن البرتين محل الإهتمام سيتمكن من الإلتصاق على البروتينات المستهدفة فعملية الحجب تمنع من ارتباطه في غير البروتين المحدد، و هذا يقلل "التشويش أو الارتباط العشوائي" في النتيجة النهائية، ويؤدي إلى نتائج أوضح، ويقضي على النتائج الإيجابية المزيفة (Bass et al., 2017; Mahmood & Yang, 2012).

- الجسم المضاد الأولي والجسم المضاد الثانوي ومادة التفاعل Substrate.

طريقة العمل:

حصد الخلايا واستخراج البروتين:

توظيف العديد من المنظفات والأملاح والمحاليل لتشجيع التكسر الخلوي. (المزارع الخلوية المستخدمة هنا لخلايا حقيقة النواة).

١- فحص الخلايا والأفضل تكون نسبة امتلاء الطبق أو الدورق ٩٠ %.
٢- إزالة الوسط الغذائي ونغسل الطبق بلطف مرتين محلول ملحي متوازن (PBS)، إزالة المحلول الملحي المتوازن (وذلك لإزالة بقايا السيرم وإزالة الخلايا الميتة).
٣- يتم إزالة الخلايا من الدورق بإنزيم التربسين ووظيفته تكسير الجزيئات المسؤولة عن الالتصاق (حيث نضع ٥ مل تربسين ويتم تحضينها في الحضان ٣٧ م° لمدة ٥ دقائق، ثم نضيف مصل الدم (serum) لإيقاف التفاعل، ونجمعها في أنبوب ٥٠ مل، نغسلها مرتين بالمحلول المتوازن للتأكد من جمع الخلايا بشكل كامل، يتم وضعها في جهاز الطرد المركزي بسرعة ٥٠٠ xg لمدة ١٠ دقائق، ثم نزيل الرائق ونضيف ٥ مل من المحلول المتوازن، ونضعها مرة أخرى في جهاز الطرد المركزي بنفس السرعة، نزيل الرائق، ونقوم بتفكيك الخلايا عن بعضها بالضرب على الأنبوب ضربات خفيفة متتالية أو باستخدام جهاز الفورتكس، يتم إضافة ٢٠٠-٣٠٠ ميكرولتر من محلول التحلل ويحضن لمدة ٤٥ دقيقة في الثلج، يتم خلطها جيدًا كل ١٥ دقيقة بإستخدام جهاز الفورتكس، ينقل في أنابيب ابندورف. يتم فصل البروتين باستخدام جهاز الطرد المركزي، سرعة 13 000 rpm لمدة ١٠ دقائق، يتم جمع الرائق وحفظه في-٨٠ م° أو في الثلج إذا أريد قياسه واستخدامه مباشرة. كما هو مبين في مخطط ١.

قياس البروتين:

باستخدام الطبق ذو ٩٦ حجرة، يتم وضع: ١٠ ميكرولتر من الماء المقطر في ٣ حجرات بدون أي بروتين.

وإضافة ٩ ميكرولتر من الماء المقطر مع ١ ميكرولتر من العينة في ٣ حجرات أخرى. كما في الشكل ٣.

وبعد ذلك يتم إضافة ٢٠٠ ميكرولترمن صبغة برادفورد في جميع الحجرات لصبغ البروتين وقياسها عند الطول الموجي ٥٩٥ نانومتر. ويتم حساب تركيز البروتين بأخذ متوسط كل عينة وطرحه من متوسط قياس الماء. ثم نوحد تركيز البروتين لكل العينات اعتمادًا على البروتين المراد الكشف عنه ويتراوح التركيز من ٢٠-٢٠٠ ميكروجرام، بإضافة محلول التحلل.
وهذه المعادلة لحساب تركيز البروتين في ١ ميكرولتر. $Concentration/\mu l = \frac{Mean\ OD \times 10}{1.18}$

ملاحظة: في صبغة برودفورد ترتبط البروتينات بصبغة كوماسي الزرقاء G-250 لتنتج مركب يقاس امتصاصه الضوئي عند الطول الموجي ٥٩٥ نانومتر وبذلك يتحول اللون من اللون الأحمر الى اللون الأزرق. يعتمد التغير في كثافة اللون مع تركيز البروتين.

تحضير العينات (تفكيكيها إلى الشكل الأولي بتكسير بعض الروابط):

بعد مزج محلول العينة ٢x-laemmli-sample-buffer مع بيتامركبتوايثانول β-merceptoethanol، يتم إضافة هذا المحلول على العينة بنسبة ١:١ ويخلط جيدًا ويتم وضعها في جهاز الطرد المركزي ثانيتين وذلك لإنزال العينة إلى الأسفل.

وضع العينات في حمام مائي درجة حرارته ١٠٠م° لمدة ٥-١٠ دقائق، لتفكيك التركيب الثلاثي للبروتين إلى حالته الأولية، مكونات محلول العينة تحافظ على حالة البروتين مفككة وتوحد شحنة البروتين إلى الشحنة السالبة وبذلك يكون الفصل خلال شبكة الأكريلامايد في الهلام بناءً على وزن البروتينات الجزيئي فقط. ولمعرفة وظيفة المركبات انظر إلى الجدول رقم ١.

تحضير الهلام:

يتم غسل الأمشاط والألواح الزجاجية بالماء المقطر، يتم تثبيت اللوحين داخل إطار الصب frame casting، وتثبت بإحكام باستخدام الملاقط الجانبية، أخذ كمية من الأجاروزالبودرة ويتم مزجه بالماء، وتسخينه في الميكروويف لمدة دقيقة حتى يصبح شفاف أي تذوب وتمتزج تمامًا، نصب قليلًا منه على قاعدة صب الهلام ونضع الألواح الزجاجية المثبتة بالحامل عليها لتفادي تسرب الهلام.

المواد اللازمة لتحضير ٢ لوح من الهلام:

- تحضير ٢٠ مل ١٠% من هلام الفصل (resolving gels):
  - ٧,٩ مل من الماء المقطر.
  - ٦,٧ مل من محلول متعدد الأكريلمايد ٣٠%.
  - ٥ مل من كلوريد التريس ذا الأس الهيدروجيني ٨,٨ وتركيز ١,٥ مولار.
  - 200 µL من دودسايل كبريتات الصوديوم ذو التركيز ٢٠%.
  - ٢٠٠ µL من المادة المصلبة بيركبريتات الأمونيوم ١٠% Ammonium persulfate (APS).
  - ٥٠ µL من TEMED (توضع بعد إزالة الماء أو الايثانول ثم يتم صبها مباشرة).

يتم صب الهلام في الألواح المخصصة للهلام بشكل هادئ وبطيء لتلافي تكوين الفقاعات الهوائية، يتم ترك مسافة ١ سم في الأعلى فارغة، يتم مساواة سطح الهلام مباشرة بإضافة الماء المقطر بلطف، أو بإضافة الإيثانول.

- تحضير ٦ مل ٥% من هلام التنظيم (stacking gel):
  - ١ .٤ مل من الماء المقطر.
  - ١ مل من بولي اكريلامايد polyacrylamide ينتج من ارتباط مادة acrylamide+bisacrylamide.
  - ٧٥٠ µL من كلوريد التريس ذا الاس الهيدروجيني6.8وتركيز ١,٥ مولار.
  - 60 µL من دودسايل كبريتات الصوديوم ذو التركيز ٢٠%.
  - 60 µL ١٠% Ammonium persulfate (APS) .
  - 40 µL من TEMED (توضع بعد إزالة الماء أو الايثانول ثم يتم صبها مباشرة).

بعد تصلب هلام الفصل يتم إزالة الماء من أعلاه وإذا تم إضافة إيثانول يتم إزالته وغسله عدة مرات بالماء المقطر، يتم صب الهلام الثاني عليه ويتم وضع الأمشاط بلطف. تترك حتى تتصلب تمامًا، حوالي ٣٠ دقيقة. الآن الهلام جاهز للاستخدام، ولمعرفة وظائف بعض المركبات المستخدمة في تحضير الهلام انظر للجدول رقم ٢.

فصل البروتينات على الهلام:

بعد أن يتماسك تمامًا، يتم إزالة المشط بشكل هادئ لتكوين حجرات (Wells) على الهلام ثم ينقل إلى الحوض بعد تثبيت الألواح في الحامل المخصص (يرجى الانتباه أن يكون اتجاه اللوحة الزجاجية الصغيرة للداخل) يملأ الحوض المستخدم للترحيل الكهربائي بمقدار مناسب من محلول الفصل (1X) يجب أن تكون الحجرات مغطاة تمامًا بالمحلول.

يتم وضع العينات والبروتين المعياري (ladder) في حجرات الهلام باستخدام الماصة الدقيقة بشكل عامودي.

يوضع الغطاء بشكل صحيح ويوصل بجهاز الطاقة على فولت ١٦٠-١٤٠ لمدة ٦٠ دقيقة لتبدأ عملية الفصل الكهربائي نلاحظ مشاهدة الفقاعات الصغيرة من الأقطاب التي تدل على عمل جهاز الطاقة، كما هو مبين في الشكل 4.

ستنتهي عملية الفصل عند مشاهدة الصبغة الزرقاء على بعد ٢ ملم من الأسفل. وبهذا تمت عملية فصل البروتينات حسب وزنها الجزيئي كما في الشكل ٥ (“The principle and method of polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE),” n.d.).

عملية نقل البروتين من الهلام إلى الغشاء:

هناك ثلاث طرق لنقل البروتينات من الهلام إلى أغشية النيتروسليلوز أو PVDF (*Protein transfer technical handbook Comprehensive protein transfer solutions designed to drive your success*, n.d.) :

•النقل الرطب بالكهرباء وهي عملية النقل التقليدية (traditional wet or tank transfer).

•عملية النقل الكهربائي شبه الجاف (semi-dry transfer).

•عملية النقل بالكهرباء الجافة (dry transfer).

من أجل جعل الوصول للبروتينات أسهل للاكتشاف بالأجسام المضادة، يتم نقلهم من الهلام إلى غشاء مصنوع من النيتروسيليوز أو الـ PVDF يتم وضع هذا الغشاء فوق الهلام، ووضع طبقة من أوراق الترشيح فوق ذلك (ثم باستخدام بكرة أو اسطوانة يتم إزالة أي فقاعات بين الغشاء والهلام ويتم التعامل مع الهلام بحذر لتفادي تمزقه).

كل من النيتروسليلوز و PVDF يرتبطان بشكل فوري بالبروتين بشكل لا رجعة فيه.

تم استخدام غشاء النيتروسليلوز أولاً ولا يزال شائعًا لأنه غالبًا ما يعطي خلفية أقل عند الكشف عن البروتين. النتروسليلوز أقل من حيث التكلفة من PVDF وهو أسهل في الاستخدام لأنه لا يتطلب خطوة تنشيط. النتروسليلوز أكثر هشاشة، فيجب توخي الحذر عند التعامل مع الغشاء (“The western blot: A general overview,” n.d.).

أغشية PVDF أكثر متانة من أغشية النيتروسليلوز وتستخدم عندما يتم نزع الجسم المضاد الأولي وإعادة استخدامه للكشف عن بروتين آخر. أغشية PVDF هي الغشاء المفضل لطرق الكشف الفلوريسنت، من عيوب PVDF أنه يجب تنشيطه عن طريق الترطيب المسبق للغشاء في الميثانول قبل الاستخدام (“The western blot: A general overview,” n.d.)

وسيتم التركيز في هذه المقالة على عملية النقل الرطب إلى غشاء PVDF حيث يتم غمر الإسفنج وورق الترشيح في محلول النقل ويتم تنشيط غشاءPVDF بغمرها في الميثانول المركز. ويكون ترتيبها كما هو موضح في الشكل ٦(LeincoTechnologies, 2013).

يتم وضعها في الكاسيت ثم إدخالها في وحدة النقل وتوضع في الوعاء، إضافة محلول النقل (transfer buffer) ١س في الوعاء ووضع وحدة تبريد، أو غمر الوعاء في الثلج. يتم وضع الغطاء بشكل صحيح، ويتم تشغيل الجهاز بجهد كهربائي ١٢٠ فولت و٤٠٠ أمبير لمدة ١٠٠ دقيقة كما هو موضح في الشكل ٧ (“Western Blot Protocols (part 2) - Electrophoresis & Protein Transfer,” n.d.)

بعد الانتهاء نلاحظ أن البروتينات الآن نُقلت من داخل الهلام إلى سطح الغشاء مع ثبات الترتيب التي كانت البروتينات عليه داخل الهلام. ويكون ناتج هذه العملية، هو عرض البروتينات على سطح رقيق للاكتشاف.

عملية الحجب (blocking):

وذلك بوضع الغشاء في وعاء بحجمه أو أكبر قليلًا وغمره في الحليب منزوع الدسم لمدة نصف ساعة في الهزاز قبل إضافة الأجسام المضادة الأولية.

إضافة الأجسام المضادة الأولية والثانوية للكشف عن بروتينات محددة:

وضع الغشاء في حاوية بحجم الغشاء أو أكبر ويتم تحضينه مع التخفيفات المناسبة من الأجسام المضادة الأولية في محلول الحجب وفقًا لتعليمات الشركة الصانعة وغالبًا ما يكون التركيز ما بين ١:١٠٠٠ إلى ١:١٠٠٠٠ في درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة واحدة في جهاز الهزاز أو من الممكن تحضين الجسم المضاد عند في درجة حرارة ٤م˚ طوال الليل.

ثم يتم التخلص من محلول الأجسام المضادة الأولية، ويغسل الغشاء ثلاث مرات بـ TBST لمدة ١٠-١٥ دقيقة مع الهز في درجة حرارة الغرفة. وبهذا يتم التخلص من الأجسام المضادة الحرة، وتبقى فقط الأجسام المضادة المرتبطة بالبروتين محل الدراسة.

ويتم إضافة الأجسام المضادة الثانوية للغشاء، وتكون موجهة نحو جزء خاص-لنوع species-specific الأجسام المضادة الأولية. ويتم إعداد الأجسام المضادة HRP الثانوية وفقا لتعليمات الشركة الصانعة وغالبًا ما تكون ١:١٠٠٠. ويتم إضافته إلى حاوية الغشاء بعد إزالة TBST بكمية كافية لتغطية الغشاء بأكمله. التحضين لمدة ساعتين في درجة حرارة الغرفة مع الهز المستمر.

التخلص من الأجسام المضادة الثانوية وغسل الغشاء ثلاث مرات في TBST لمدة ١٥ دقيقة مع الهز.

الأجسام المضادة تأتي من مصادر الحيوانات.

الأجسام المضادة الثانوية يتم تسميتها بـ"ضد-الفأر"، "ضد-العنز"، "ضد-الجرذ"، الخ.. فمثلا الجسم المضاد الثانوي ضد-الفأر سيلتصق لأي جسم مضاد أولي مصدره الفأر، وهكذا.

قراءة النتائج:

من طرق قراءة النتائج الإضاءة الكيميائية Chemiluminescence أو الكشف اللوني Colorimetric detection كما في الشكل 8 (Bhandari, 2017) تعتمد طريقة الاكتشاف هذه على احتضان الغشاء مع المادة التي تضيء عندما تتصل بالموقع الفعال على الجسم المضاد الثانوي. وعندها يتم التقاط الضوء باستخدام فيلم فوتوغرافي، ومؤخراً باستخدام كاميرات سي سي دي CCD cameras تلتقط صورة رقمية للغشاء. هذه الصورة يتم تحليلها باستخدام مقياس الكثافة الذي يحلل كمية الصبغة البروتينية النسبية ويقوم بالتحليل شبه الكمي عن طريق الكثافة الضوئية(Abhimanyu, 2018).

الغشاء جاهزللقراءة، وللكشف عن حزم البروتينات الهدف يتم وضع مادة التفاعل substrate (يوجد منه نوعان بيكو Pico وفيمتو Fimto وفي كل منهما محلولان محلول أ ومحلول ب، يمزج من محلول بيكو ١ مل من كلا المحلولين (١أ: ١ب) يتم تحضينه مع الغشاء من ١-١٠ دقائق، ثم وضعه في المكان المخصص على جهاز GelDoc/ChemiDoc) chemiluminescent detector from Biorad or Odyssey system). (إذا لم يظهر لنا حزم نأخذ من الفيمتو ١٠٠ ميكرولتر من كلا المحلولين وتمزج مع محلول البيكو السابق وتترك لمدة دقيقة على الغشاء وتتم قراءتها، اذا لم يظهر شرائط نزيد المدة او كمية محلول الفيتمو المضاف)، وفي الشكل 9 نموذج لنتيجة القراءة.

يتم أخذ تقديرات كثافة البروتين عن طريق مقارنة الحزم المكتشفة بحزم البروتين المعياري التي تم تحميلها عند خطوة الفصل الكهربائي. يتم إعادة هذه العملية لبروتين مثل الأكتين أو التيوبيولين، الذي يجب ان يكون تركيزه ثابت بين العينات. كمية البروتين المراد الكشف عنها تتم مقارنتها بالبروتين الأكتين.

ويوضح الشكل ١٠ تلخيص لما سبق (Bhandari, 2017). وفيما يلي في الشكل١١ و١٢و١٣مختصر مصور لطريقة العمل.

وفيما يلي أضع بين أيديكم جدول لعمل هلام متعدد أكريلمايد بتراكيز مختلفة ويتم تحضير الهلام بالتركيز المناسب للكشف عن البروتين الهدف حسب وزنه الجزيئي جدول ٣ و٤.

نصائح عملية :

فيما يلي بعض النصائح العملية لكل خطوة من اللطخة الغربية (*Practical Tips for Chemiluminescent Western Blots*, n.d.; *WESTERN BLOTTING The Complete Guide To*, n.d.):

تحضير العينة

- تأكد من تحلل العينات تمامًا لتحقيق أقصى استفادة من البروتينات.
- احتفظ بالعينات باردة لمنع تكسرالبروتين وبالتالي فقدانه.
- استخدام مثبطات إنزيمات تكسير البروتين أثناء تحليل الخلايا لمنع تكسر البروتينات في عملية الاستخراج وبعدها.
- تحديد تركيز البروتين لكل عينة لتحميلها على الهلام بنفس الكميات والتراكيز.
- عند تجميد العينات في -٨٠ درجة مئوية، قم بتقسيمها في أنابيب صغيرة منفصلة لمنع الذوبان والتجميد المتكرر لأن هذا سيؤثر على جودة البروتين.

الفصل الكهربائي

- تأكد من عدم وجود عيوب في الجل كالفقاعات وأنه تم ضبطه ومساواة سطح هلام الفصل بشكل صحيح .
- تسخين العينات قبل التحميل في الهلام لكسر التركيب الثانوي للبروتين.
- لا تفرط في تحميل الحجرات بالكثير من البروتين؛ لمنع تداخل العينات في الحجرات.
- قم بتشغيل الهلام بالجهد الصحيح حيث أن تشغيل الهلام بجهد مرتفع جدًا يمكن أن يسبب تكون شرائط مجعدة وضبابية واسعة أو شرائط "مبتسمة".

عملية النقل

- ارتد القفازات الخالية من البودرة عند التعامل مع الهلام لمنع ظهورعلامات على الغشاء.
- الجسيمات في القفازات التي تحوي بودرة سوف تلتصق بالأغشية وتسبب خلفية داكنة لذا تجنب استخدامها.
- اغسل القفازالذي ترتديه قبل التعامل مع الأغشية. لأن القفازات غير المبودرة يمكن أن تحتوي على كمية صغيرة من المواد الكيميائية المتبقية التي تلتصق بالأغشية وتتسبب في تشوه الخلفية.
- يوصى بالنقل الرطب للبروتينات الصغيرة أقل من ١٠ كيلودالتون.
- اغسل جميع معدات النقل قبل الإستخدام بالماء المقطر.
- تأكد من أن غشاء PVDF مرطب مسبقًا بالميثانول.
- قم بإزالة جميع فقاعات الهواء عند إعداد شطيرة النقل لمنع النقل غير الكامل أو الأشرطة غير الواضحة.
- استخدام وحدة تبريد أو غمر وعاء النقل في الثلج أثناء عملية النقل وكذلك استخدام محلول النقل البارد ويحفظ في الثلاجة بعد الاستخدام. (تم إضافة هذه النقطة من قبلي).

عملية الحجب

- تحضين الغشاء بمحلول الحجب يمكن أن يخفي بعض المستضدات ويمنع التصاق الجسم المضاد الأولي. ومن الممكن تقليل تركيز محلول الحجب إلى ١% حليب بدلاً من ٥%.أو تقليص وقت التحضين بمحلول الحجب.

التحضين وعملية غسل الغشاء

- استخدم الهزاز حتى يتم توزيع المادة المضافة بشكل متكافئ.

الأجسام المضادة

- تأكد من أن الأجسام المضادة الأساسية يمكنها اكتشاف البروتين محل الاهتمام في ظل الظروف المستخدمة (أي أن بعض الأجسام المضادة تتعرف فقط على الهياكل الثلاثية في البروتينات الأصلية).
- لتقليل الشرائط المتعددة غير المستهدفة (non specific bands)، قم بتخفيف الجسم المضاد الأساسي أكثر.
- اختيار وقت التحضين الأمثل للأجسام المضادة الأولية. التحضين لمدة ساعة واحدة في درجة حرارة الغرفة تعمل بشكل جيد لمعظم الأجسام المضادة، تتطلب بعض الأجسام المضادة حضانة طوال الليل عند ٤ درجات مئوية للحصول على الأداء الأمثل.
- احذر من أن يجف الغشاء في أي خطوة من خطوات الأجسام المضادة.

الكشف

- إذا تم تبريد مادة التفاعل، قم بإخراجها لتصبح في درجة حرارة الغرفة قبل استخدامها للحصول على نشاط الإنزيم الأمثل.
- تأكد من التخلص من كل محلول الغسيل TBST من الغشاء قبل تحضينه مع مادة التفاعل؛ لأن الرقم الهيدروجيني لمادة التفاعل يختلف عن الرقم الهيدروجيني لمحلول الغسيل؛ فيمكن أن يؤدي تغيير درجة الحموضة إلى تقصير مدة الإشارة.
- قم دائمًا بتغطية الغشاء بشكل تام مع مادة التفاعل.
- إذا كان شريط البروتين الهدف ضعيفا ربما تحتاج إلى زيادة تركيز البروتين.
- إذا ظهر لك شرائط غير بروتينات الهدف non-specific bands ربما تكسر البروتين أثناء التحضير، تأكد من استخدام التركيز المنخفض للهلام للكشف عن البروتينات الكبيرة والعكس، إضافة تركيز عالي من البروتين ربما يؤدي إلى انتشار شرائط البروتين وكذلك تسخين العينات لفترة أكثر من ٥ دقائق.

هناك مشكلة وجود الخلفية الداكنة و البقع ما سببه وكيف أتخلص منه؟

هناك أسباب عدة لظهور الخلفية الداكنة و منها: التلوث، تفاعل الجسم المضاد مع الحليب، تقليل وقت الغسيل، زيادة تركيز الأجسام المضادة، زيادة تركيز الحليب بالإضافة إلى وجود تكتلات في المحلول يسبب البقع. وهذه جملة من النصائح لتفادي حدوث ذلك:

- حافظ على جميع الحاويات والمحاليل خالية من الأوساخ لمنع الخلفية على الغشاء.
- غطِ الأوعية عند احتضانها أو غسلها لمنع سقوط الجسيمات على الغشاء.
- زيادة وقت الغسيل لتقليل الخلفية الداكنة على أن لا تزيد عن ربع ساعة في كل غسلة؛ لأن الغسل المبالغ فيه سيؤدي إلى ضعف الإشارة أثناء القراءة.
- لتقليل الخلفية، قم بتخفيف الجسم المضاد الثانوي أكثر.
- ضع الأجسام المضادة في الطرد المركزي لتجنب التجمع الذي يمكن أن يسبب بقع على الغشاء.
- جرب عوامل حجب مختلفة لتقليل الخلفية حيث أنه يمكن للأجسام المضادة الأولية التفاعل مع مكونات محلول الحجب التي تسبب خلفية داكنة.
- استخدم عامل حجب خال من البروتين مثل استخدام محلول TBS عند الكشف عن البروتينات المفسفرة.
- لا تستخدم محلول حجب الحليب أو الكازين إذا كنت تخطط لاستخدام أي جسم مضاد للبيوتينيل biotinylated antibody والكاشف الستربتافيدين streptavidin detectors. يحتوي الحليب على البيوتين biotin وسيسبب خلفية داكنة عند دمجه مع هذه الكواشف.
- قم بإعداد محلول حجب جديد قبل الاستخدام لمنع التلوث.
- قم بعملية الفلترة للمحلول لمنع التكتلات التي ستلتصق بالغشاء.
- تذويب مكونات محلول الحجب تمامًا قبل استخدامه .

الخاتمة:

وفي خاتمة بحثنا هذا عن اللطخة الغربية و كيفية عملها للكشف عن البروتين ولقد حاولت جاهدة أن تشمل المقالة التساؤلات التي يمكن أن تطرأ في أذهان الطلبة لمعرفة تفاصيل العمل و أهمية المواد المستخدمة في ذلك، انتهى بحثنا عند هذا الحد وبالتأكيد هناك باحثون قادرون على عمل أكثر عمقًا و شمولًا فجميعنا يدًا واحدة في سبيل رفع المستوى العلمي لمن هم في بداية الطريق. تم هذا العمل بفضل الله تعالى. أرجو أن يكون محتواه ماتعًا ومفيدًا للطلبة والباحثين وأعضاء هيئة التدريس.

هذا العمل المتواضع إهداء للدكتور البروفيسور محمد أبو مرعي رحمه الله وأحسن مثواه الذي فتح لي باب مختبره للبحث والعمل .

المراجع:

Abhimanyu. (2018). Western Blot Transfer Sandwich. Retrieved from http://www.penanghotelreviews.com/western-blot-transfer-sandwich/

Al dahmoshi, H. (2017). Gel Eletrophoresis. Retrieved from http://science.uobabylon.edu.iq/lecture.aspx?fid=5&lcid=64576

Bass, J. J., Wilkinson, D. J., Rankin, D., Phillips, B. E., Szewczyk, N. J., Smith, K., & Atherton, P. J. (2017). An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*. https://doi.org/10.1111/sms.12702

Bhandari, B. (2017). Western Blot Technique: Principle, Procedures and Uses. Retrieved from https://microbeonline.com/western-blot-technique-principle-procedures-advantages-and-disadvantages/

Brooks, S. A., Schumacher, U., Blancher, C., & Jones, A. (2003). SDS-PAGE and Western Blotting Techniques. *Metastasis Research Protocols*, *57*, 145–162. https://doi.org/10.1385/1-59259-136-1:145

Karolina Szczesna, S. P. M. (2019). *How To Choose the Right Western Blot Detection Method*. Retrieved from https://www.technologynetworks.com/analysis/how-to-guides/how-to-choose-the-right-western-blot-detection-method-323714

Lee, C. (2007). Western blotting. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 362). https://doi.org/10.1385/1-59745-257-2:391

LeincoTechnologies. (2013). General Western Blot Protocol. *Abcam*, 7.

Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998

Practical Tips for Chemiluminescent Western Blots. (n.d.). Retrieved from https://advansta.com/wikis/practical-tips-for-chemiluminescent-western-blots/

Protein transfer technical handbook Comprehensive protein transfer solutions designed to drive your success. (n.d.). Retrieved from https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/protein-transfer-technical-handbook.pdf

SDS Page Gel Electrophoresis. (2001). Retrieved from https://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/course_Information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.html

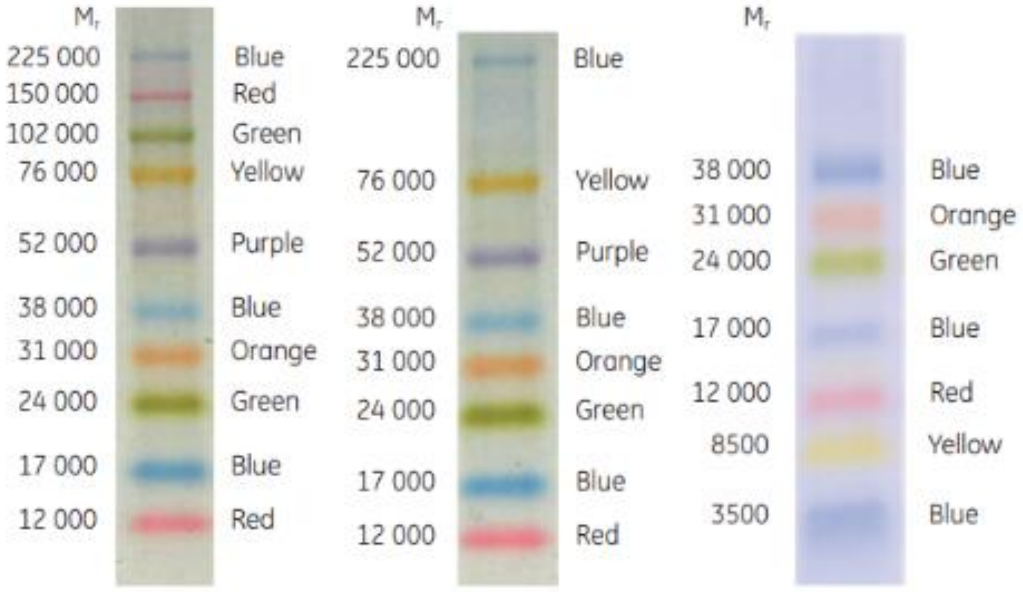
The principle and method of polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). (n.d.). Retrieved from https://www.mblbio.com/bio/g/support/method/sds-page.html

The western blot: A general overview. (n.d.). Retrieved from https://advansta.com/wikis/the-western-blot/

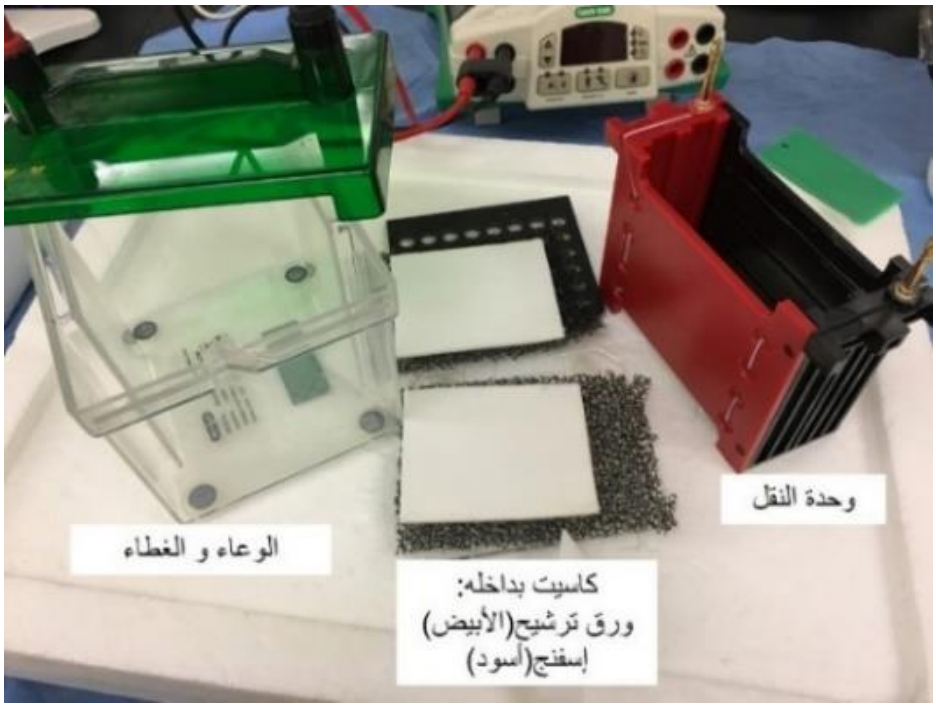
Western Blot Protocols (part 2) - Electrophoresis & Protein Transfer. (n.d.). Retrieved from https://www.creative-diagnostics.com/Electrophoresis-Protein-Transfer.htm

WESTERN BLOTTING The Complete Guide To. (n.d.). Retrieved from https://www.ptglab.com/media/3479/western-blot-collection.pdf

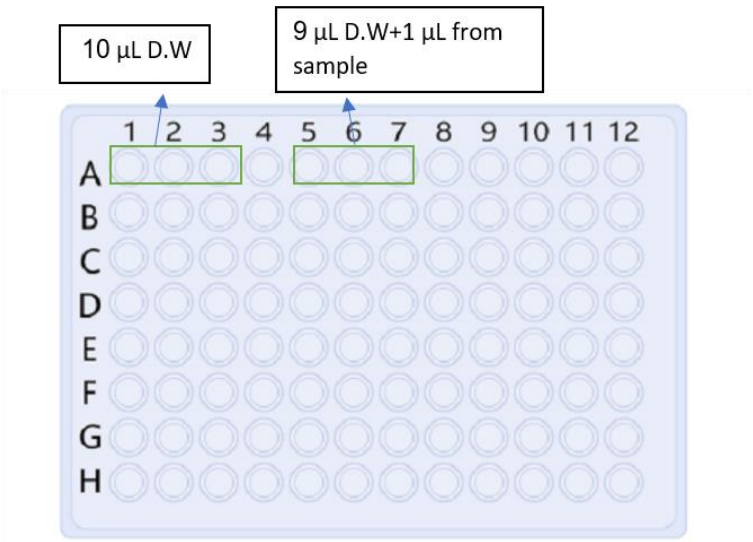
الملحقات:



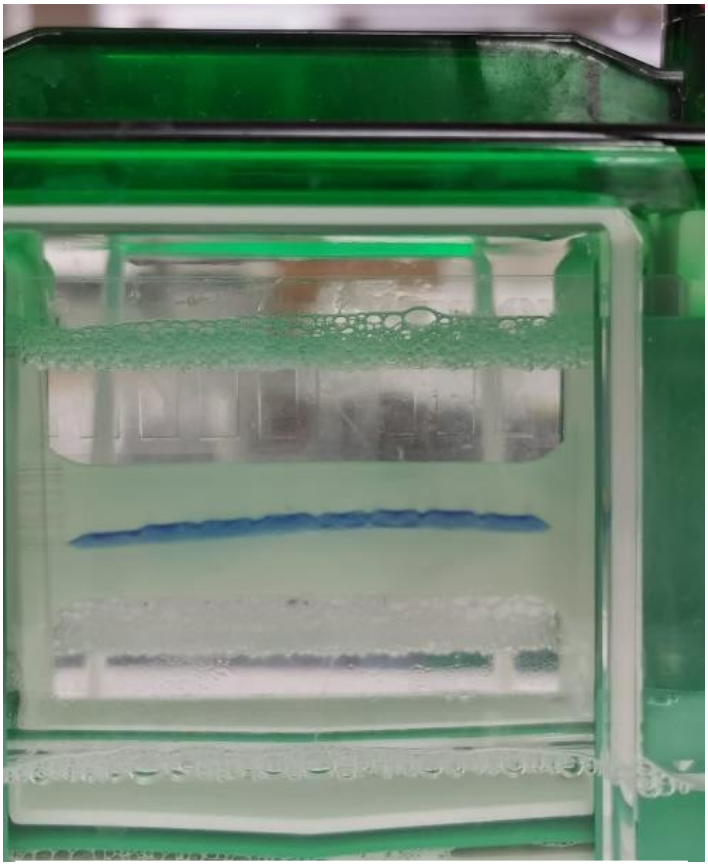
الشكل ١: مثال على السلم المعياري.



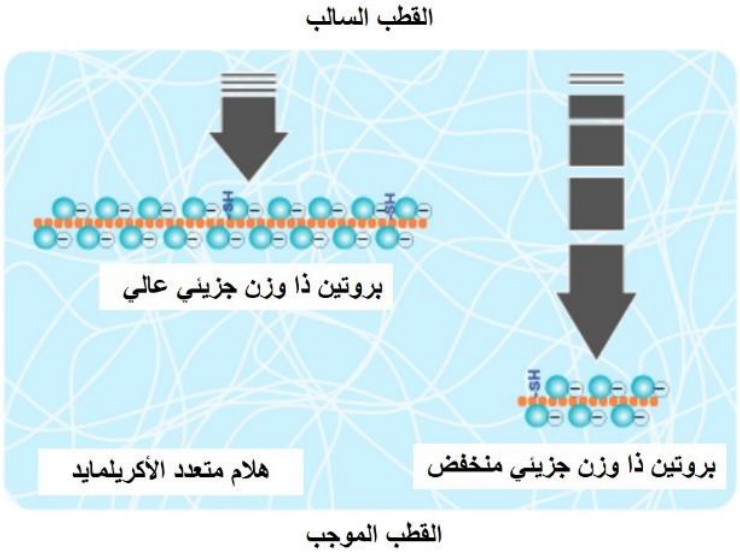
الشكل ٢: بعض الأدوات المستخدمة في نقل البروتينات من الهلام إلى الغشاء.



الشكل٣: تجهيز عينات البروبتين للقياس في جهاز الطيف الضوئي

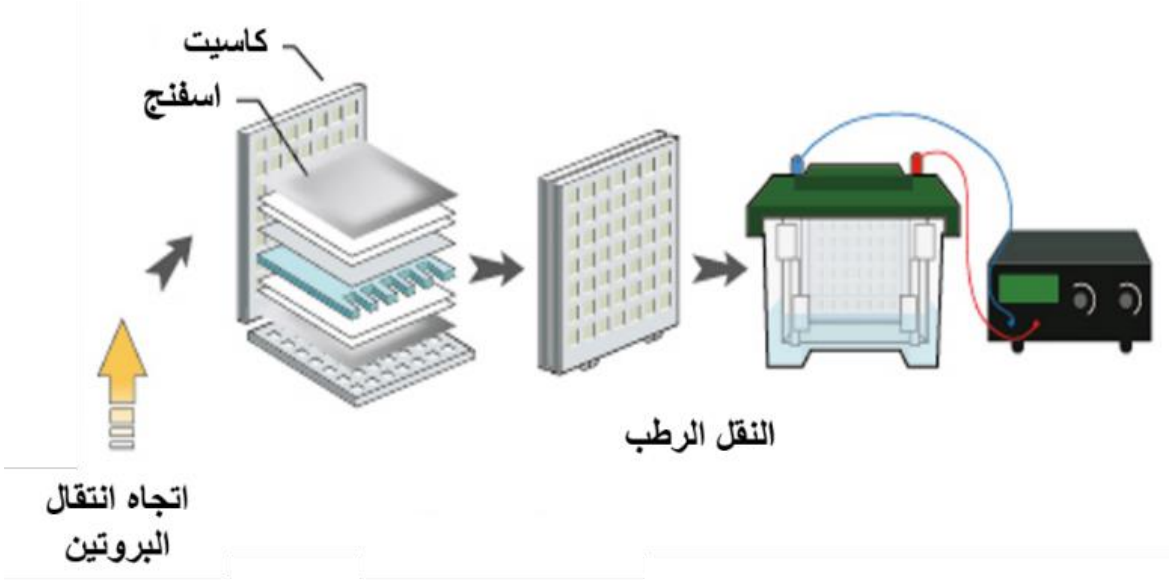


الشكل 4: سريان عينة البروتين والبروتين المعياري في الهلام .

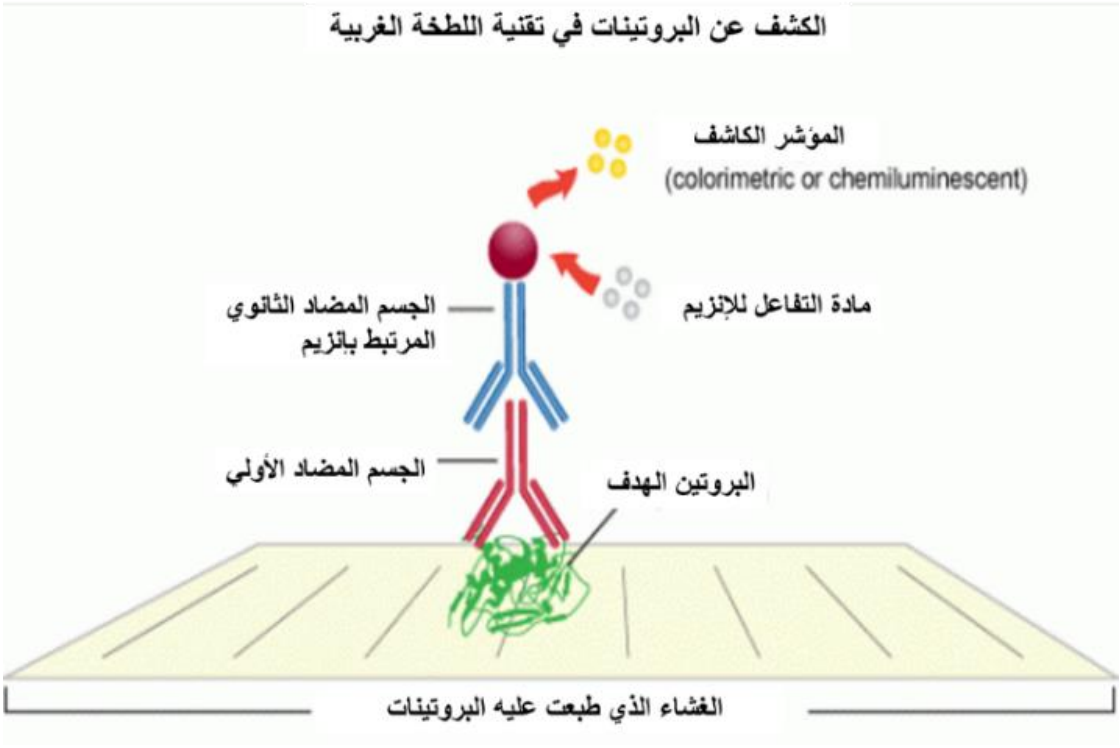


الشكل 5: توضح سريان البروتينات ذات الأوزان الجزيئية المنخفضة بشكل أسرع من ذات الأوزان الجزيئية المرتفعة.

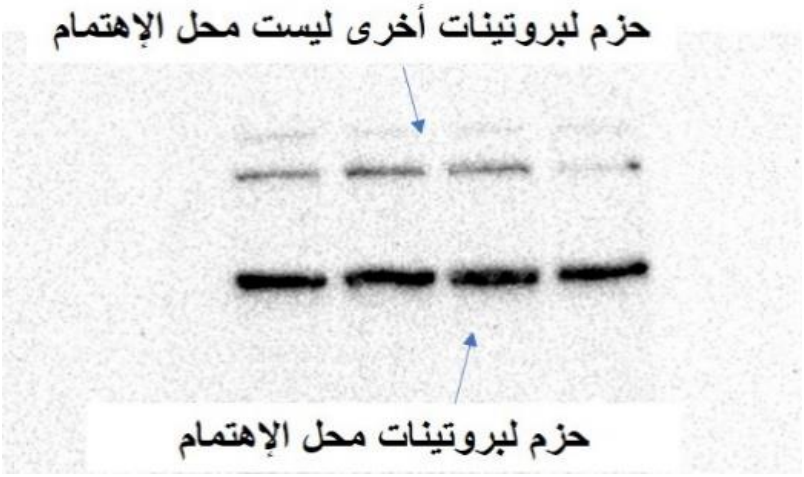
الشكل 6: توضح كيفية ترتيب الطبقات لعملية نقل البروتين من الهلام الى الغشاء



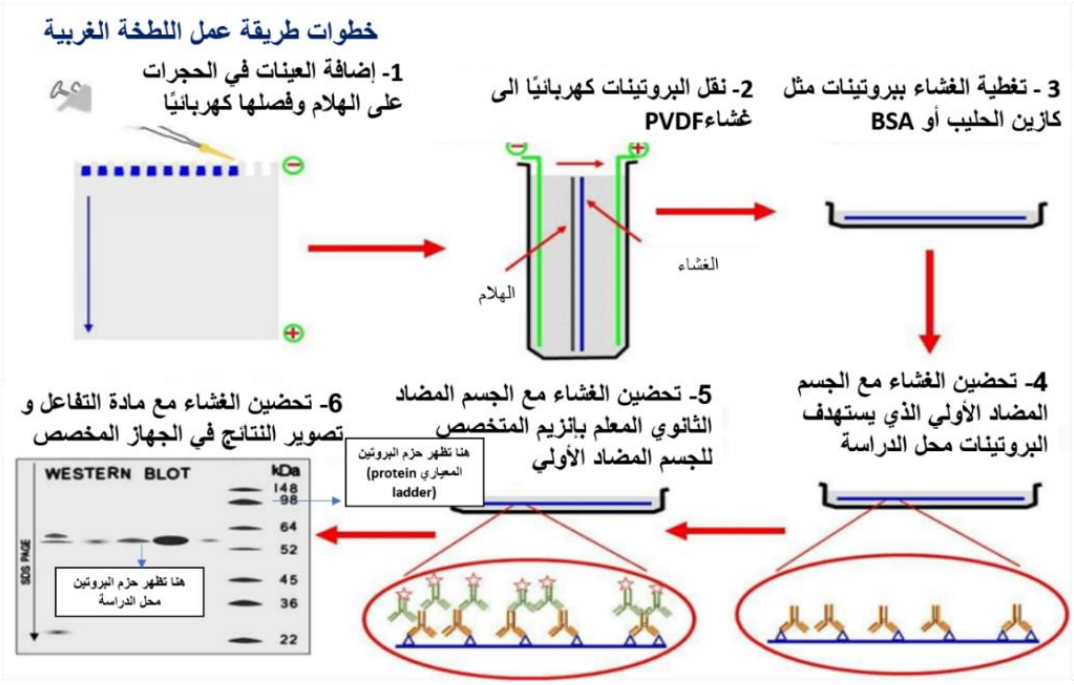
شكل 7: يوضح خطوات عملية نقل البروتين من الهلام الى الغشاء



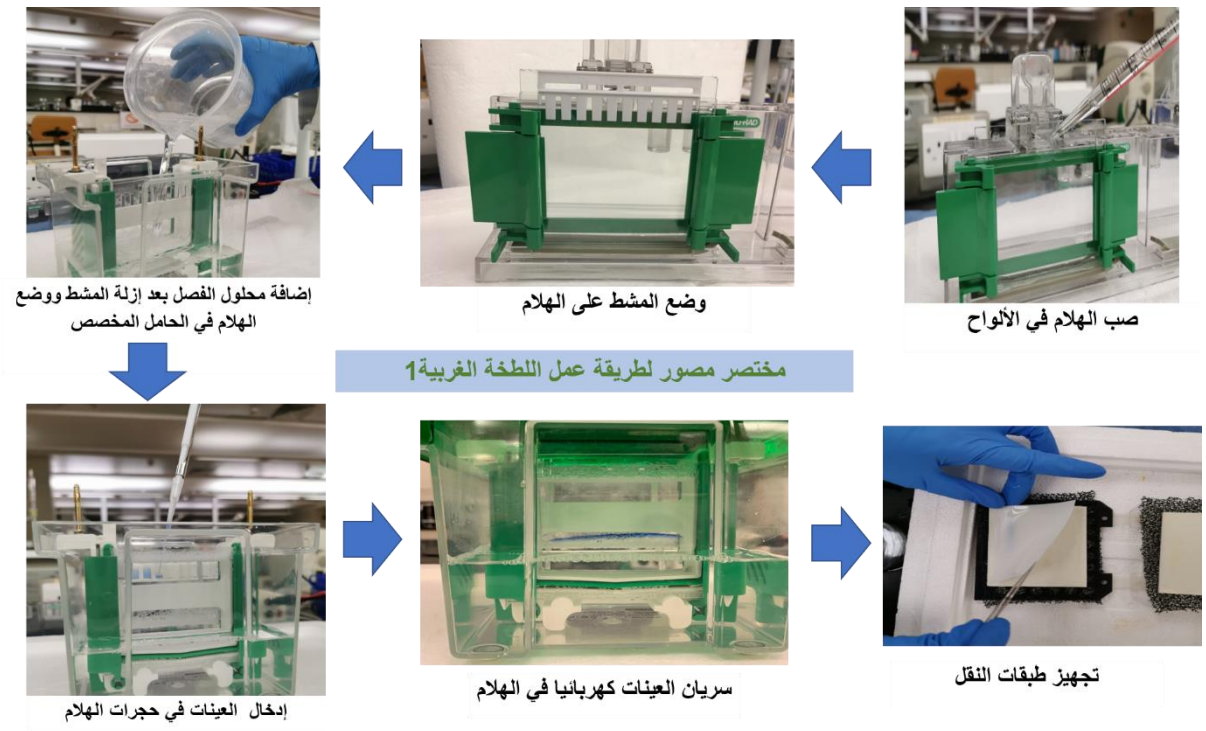
الشكل٨: شرح مبدأ الكشف عن البروتين الهدف



الشكل ٩: صورة توضح نتيجة قراءة الغشاء ، وتضهر فيه بروتينات أخرى ليست محل الإهتمام و يتم معرفة ذلك بمطابقة الحزم مع البروتين المعياري (الذي تم إضافته مسبقا أثناء فصل البروتين) حيث أن لكل بروتين وزن جزيئي مختلف و محدد.

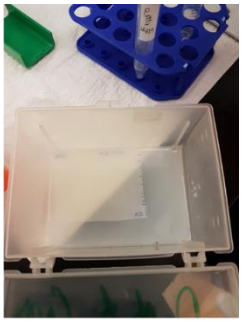


الشكل ١٠: خطوات طريقة اللطخة الغربية.

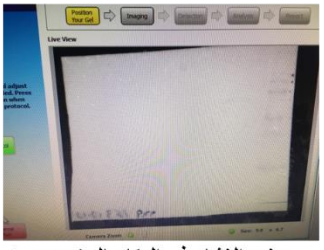


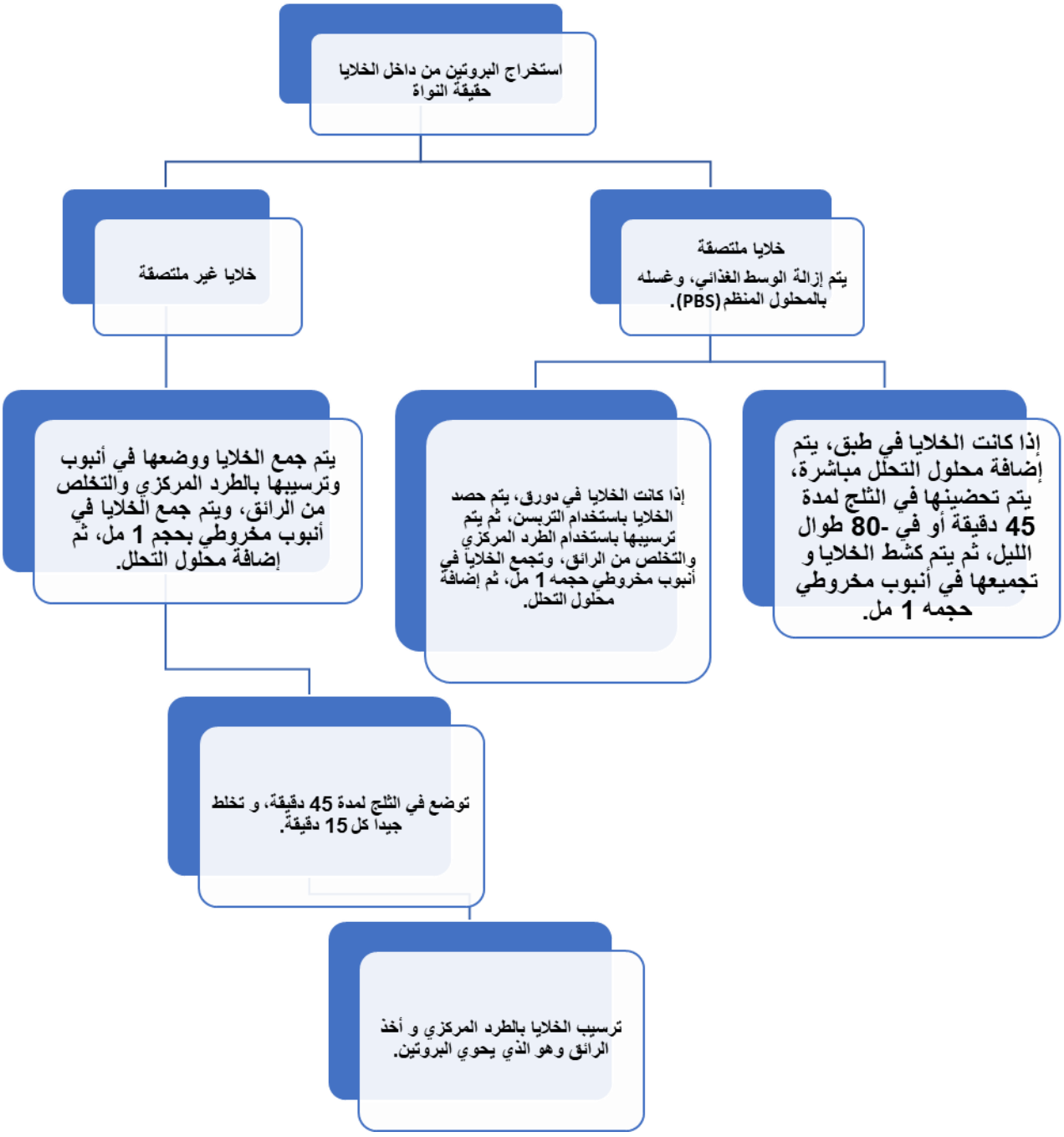
الشكل ١١: خطوات مصورة طريقة اللطخة الغربية ١.

الشكل ١٢: خطوات مصورة طريقة اللطخة الغربية ٢



الشكل ١٣: خطوات مصورة طريقة اللطخة الغربية ٣





مخطط ١: الطريقة المتبعة لاستخراج البروتينات من الخلايا حقيقة النواة.

جدول ١ : يبين المركبات المستخدمة في تحضير العينة للفصل ووظيفة كل منها.

المركب	وظيفته
كبريتات دوديسيل الصوديوم	يعمل على تكسير الروابط غير التساهمية للبروتين ويقوم بتغطية البروتينات بشحنات سالبة بعد تفككها للشكل الأولي.
بيتامركبتوإيثانول	تكسير روابط ثنائي الكبريت S-S إلى SH وSH وارتفاع الحرارة يكسر الروابط التساهمية.
البروموفينول الأزرق	بمثابة صبغة تتبع البروتين.
الجلسرين	يعمل على زيادة لزوجة العينة قليلاً وجعل العينة أكثر كثافة للبقاء في الحجرات.

جدول ٢ :وظائف بعض المواد المستخدمة في تحضير الهلام

المركب	وظيفته
متعدد الاكريلمايد Polyacrylamide	الأكريلمايد يشكل سلاسل خطية، وبزاكريلمايد يساعد على ربط هذه السلاسل، فيعمل على تكوين شبكة معقده ذات مسام صغيرة، أصغر من تلك الموجودة في هلام الأجاروز. يتم تحديد "حجم المسام" بنسبة الأكريلاميد إلى بزاكريلاميد، وكذلك تركيز الأكريلمايد، كلما كان التركيز عالي ساهم في انخفاض حركة النقل الكهربائي مما يؤدي إلى فصل البروتينات بكفاءة عالية، لأن الثقوب في الهلام تكون أصغر، مما يتيح الفرصة للبروتينات ذات الأوزان الجزيئية الصغيرة بالانفصال (Al dahmoshi, 2017; "SDS Page Gel Electrophoresis," 2001). يستخدم في فصل جزيئات الـ DNA الأصغر من 500 bp تكون العينة أكثر وضوحا من الأجاروز ويستخدم أيضا في فصل البروتينات والإنزيمات، وتعتبر ماده الأكريلاميد مادة سامة للأعصاب (Al dahmoshi, 2017).
بيركبريتات الأمونيوم (APS)	هو المسؤول عن بلمرة (تصلّب) الهلام بإعطاء الجذور الحرة ("SDS Page Gel Electrophoresis," 2001).
TEMED	يحفز بيركبريتات الأمونيوم لإعطاء الجذور الحرة بشكل أسرع ("SDS Page Gel Electrophoresis," 2001).

جدول ٣ :تحضير هلام الفصل بكميات وتراكيز مختلفة(Brooks et al., 2003)

Solution components	Component volumes (mL) per gel mold volume of							
	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	40 mL	50 mL
6%								
H_2O	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30% Acrylamide mix	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
1.5 *M* Tris, pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8%								
H_2O	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
30% Acrylamide mix	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
1.5 *M* Tris, pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10%								
H_2O	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30% Acrylamide mix	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
1.5 *M* Tris, pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12%								
H_2O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30% Acrylamide mix	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
1.5 *M* Tris, pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%								
H_2O	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30% Acrylamide mix	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
1.5 *M* Tris, pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

جدول ٤: تحضير هلام التنظيم بتركيز ٥% بكميات مختلفة(Brooks et al., 2003):

Solution components 5% Stacking gels	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL	8 mL	10 mL
H_2O	0.56	1.1	1.7	2.2	2.8	3.4	4.5	5.6
30% Acrylamide mix	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
0.5 *M* Tris, pH 6.8	0.25	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5	2.0	2.5
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10% APS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

Modified from Sambrook et al., 1989 ***(8)***.