MIRACLE
Academy

قال تعالى (يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ)

تفريغ البيوتكنو
زميلتكم نهى حسن

لجان الدُّفعات

Created with Notewise

شو الهدف من western.😶‍🌫️
انو اي بروتين بدي اعمل اعمل
expression لازم اعمل
western حتى اتأكد انه هاد نفسه
البروتين تبعنا او لأ

Western Blot

- nondenaturation
- denaturation (SDS-PAGE)
  - على درجة حراره 95

رح اشرح السلايد الجاي ال protocol تبع western اذا فهمتو الخطوات يعني خلصتو التشابتر حرفيا

Created with Notewise

1️⃣ بروح اشيل الخلايا من culture media فصفا عنا الخلايا الي تحتوي على البروتينات الي بتلاقيها داخل cytosol or human or bacterial(وهاي بتم عن طريق اعمل. Cell lysis بإضافة detergent)

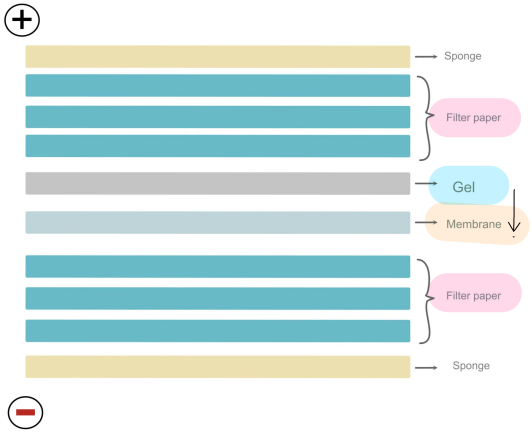
هاد عباره عن
*SDS
ويعطي البروتينات كلهم *LDS
نفس الشحنه يعني شحنه سالبة

2️⃣ هسا بعمل للخليط الي يحتوي على بروتينات بالاضافه إلى LDS, SDS وكمان في buffer و reduction agent وماء لحتى اكمل الحجم على درجه حراره 70C لمده 10 دقائق وهاد اسمه denaturation

3️⃣ في اثناء التسخين بدي اروح اجهز electrophoresis unit. بدي اجهز ال membrane وهاد ممنوع نمسكة بأيدينا عشان نخاف تنتقل بروتينات من ايدنا عليه لذلك بمسكه بالملقط وبقص هاد membrane من طرف واحد لحتى اقدر أميز الاتجاه تبعه وبحطه على الجل

نكمل لنقطه الثالثة 😤 . شكل الجهاز عنا vertical وفي عندي filter paper هغي بروح احطها داخل buffer ولازم يكون عنا current ؟؟ حتى يصير عندي انتقال من gel لل membrane يعني من تحت لفوق

Created with Notewise



يتم نقل البروتينات من الجل لل membrane

وهاد يتكون من
Nitrocellulose and/or PVDF Membrane

4 يتم نقل البروتينات من الجل (Gel) إلى الغشاء (Transfer Membrane).
هذه العملية تُسمى الـ Blotting
* الهدف من هذه الخطوة هو تثبيت البروتينات على سطح يمكن الوصول إليه لعملية الكشف المناعي اللاحقة باستخدام الأجسام المضادة.

و بهاي العمليه يتم اضافه Antioxidant

وهاي العمليه كثير بهمنا انه ما يكون عندي bubble لأنهم اصلا بحطهم طبقه فوق طبقه زي الي الرسمه على طرف لانه اذا طلع فقاعات رح يصير error بانتقال البروتينات

6 هسا بدي اعمل Block Membrane with Non-Specific Protein وهاد يتم عن طريق الحليب قليل الدسم (free fats) وهاد بذوبه ب buffer وبغط membrane فيه
طيب شو استفيد من هاي الحركه؟؟ كالآتي مش كل البروتينات رح تنتقل معي من الجل لل membrane وهاد يؤدي الي ترك كثير مساحات فاضيه على membrane لذلك يجي هاد تبع الحليب لمجفف يرتبط بالمساحات الفارغه. وهاد يمثل المثلث الاخضر

النتيجة: عندما ننتقل إلى الخطوة التالية، تكون المناطق الوحيدة المتبقية وغير المغطاة هي المواقع التي تحتوي على البروتينات الأصلية التي فصلتها

Created with Notewise

7️⃣ هسا هون رح اضيف **Antibody .1** وهاد رح يرتبط فقط مع البروتين الي يخصه فقط فقط بعدها بروح اغسل هاي العينه لمده **5** دقائق وبرجع اضيف **secondary antibody** وهاد يكون عامل **Conjugated** مع اشي اسمه **HRP** وهدول يرتبط فوق **antibody** الاول

8️⃣ اخر خطوة عندي وهي **Visualization** وهو اضافه مادة اسمها **Luminol** وهاي ترتبط مع **HRP** وتعمل الي ضوء بكتشفه عن طريق **film** زي تبع الكاميرا ويكون عامل **band** لونها غامق وواضح او ممكن تكون مشعه

وهون يتم وضع ماده ECL وهي عباره عن solution A+B يتم وضعه فوق membrane

وهاي بتم في مكان معتم لانه زي مبدأ فلم الكاميرا لما بدنا نحمض الصور بيكون بمكان معتم

طيب مهي غرفه معتمه كيف بشوفو يستخدموه IR lamp وهو ضوء احمر

Created with Notewise

Two Main Types of Westerns

1. **Denaturing** (**Most Commonly** Used)

   - SDS-PAGE

     Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis).

2. **Non-Denaturing**

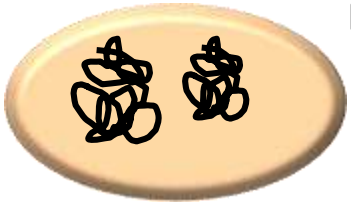
   - Native PAGE

Created with Notewise

SDS-PAGE Western Blot Method

Cells in Culture

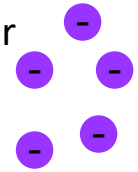
Cell Removal

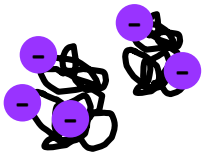


Human Cells Containing Protein

Cell Lysis by Detergents and Sonication

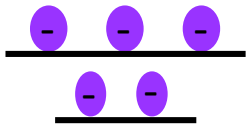
SDS or LDS

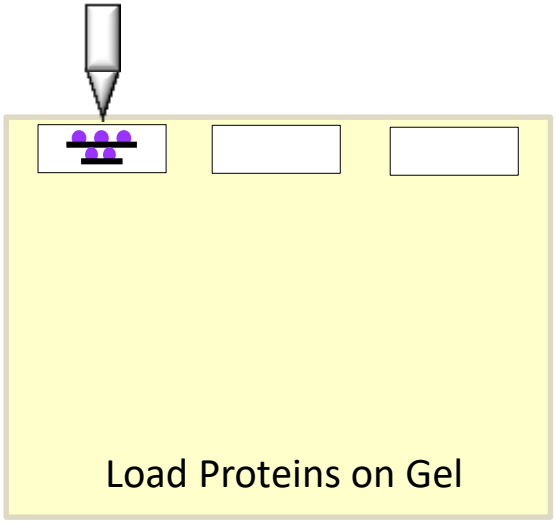




Detergents Bind Proteins

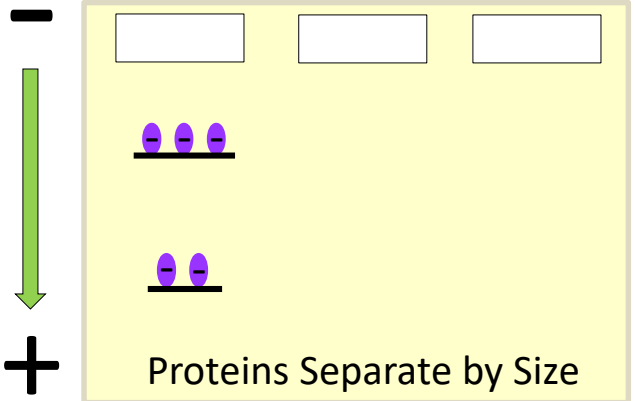
Heat Denaturation of Proteins





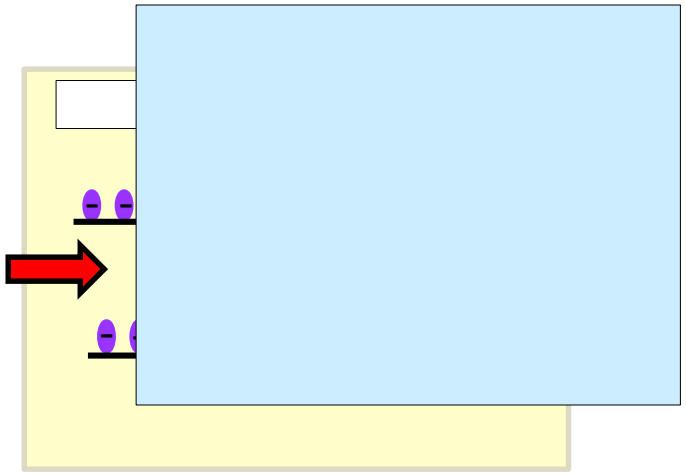
Load Proteins on Gel

Apply Electric Current

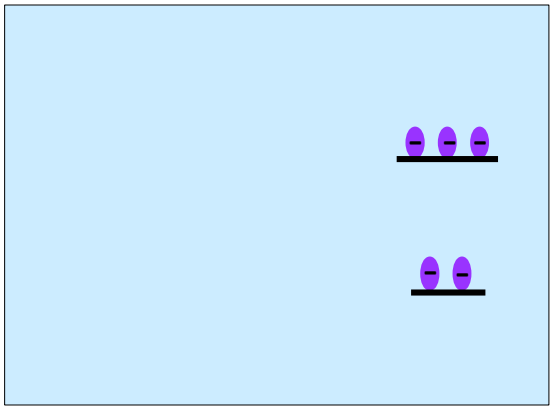


Proteins Separate by Size

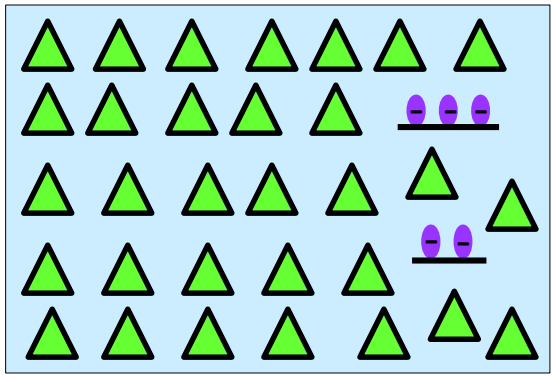
Created with Notewise



Transfer or Blot Protein from Gel to Nitrocellulose and/or PVDF Membrane



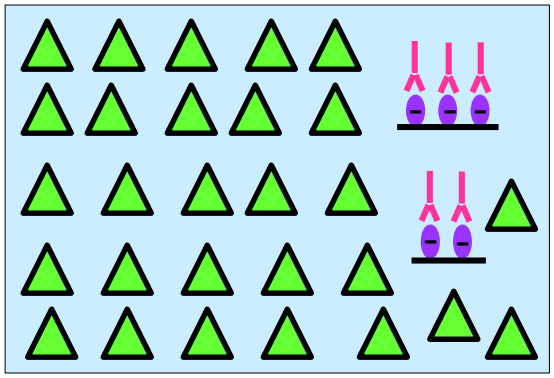
Block Membrane with Non-Specific Proteins



Non-Specific Proteins Bind to Unbound Regions of Membrane

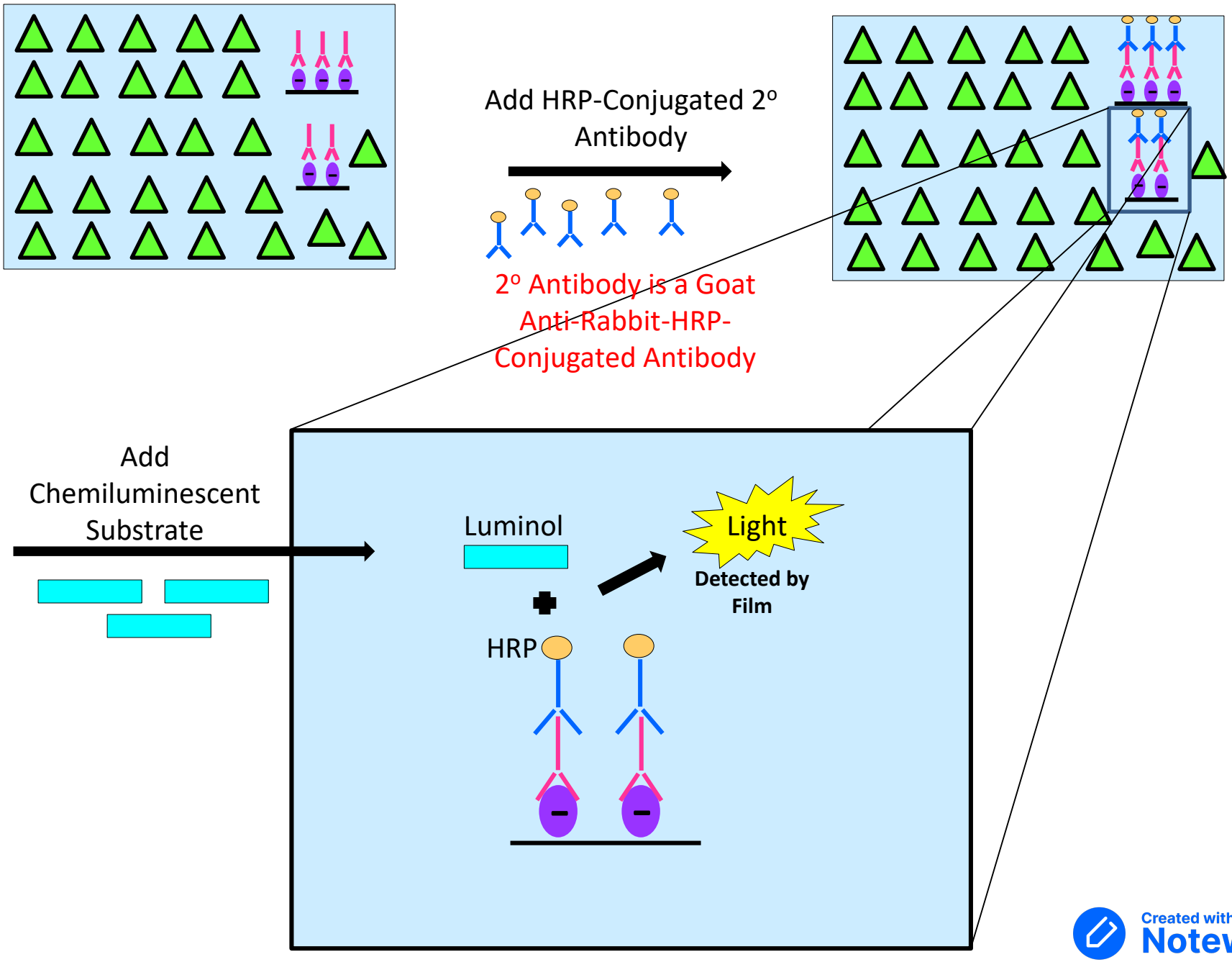
Incubate Membrane with 1° Antibody

1° Antibody is a Rabbit Anti-Human β-Actin Antibody



1° Antibody Binds Antigen (i.e. Protein of Interest)

Created with Notewise



Created with Notewise

Advantages and disadvanta
western blot

العيب (Disadvantage)	الميزة (Advantage)
العديد من الخطوات التي يمكن أن يحدث فيها خطأ.	التحقق من تعبير البروتين بحساسية ونوعية عالية.
القياس الكمي الدقيق صعب للغاية.	تحديد الكمية النسبية للبروتين في عينات مختلفة.
البروتوكول مستهلك للوقت.	تحليل تفاعلات البروتين-البروتين.
التكلفة عالية.	

Advantages:

1. Verify the expression of a protein with high sensitivity and specificity
2. Determine the relative amount of a protein present in different samples
3. Analyze protein-protein interactions

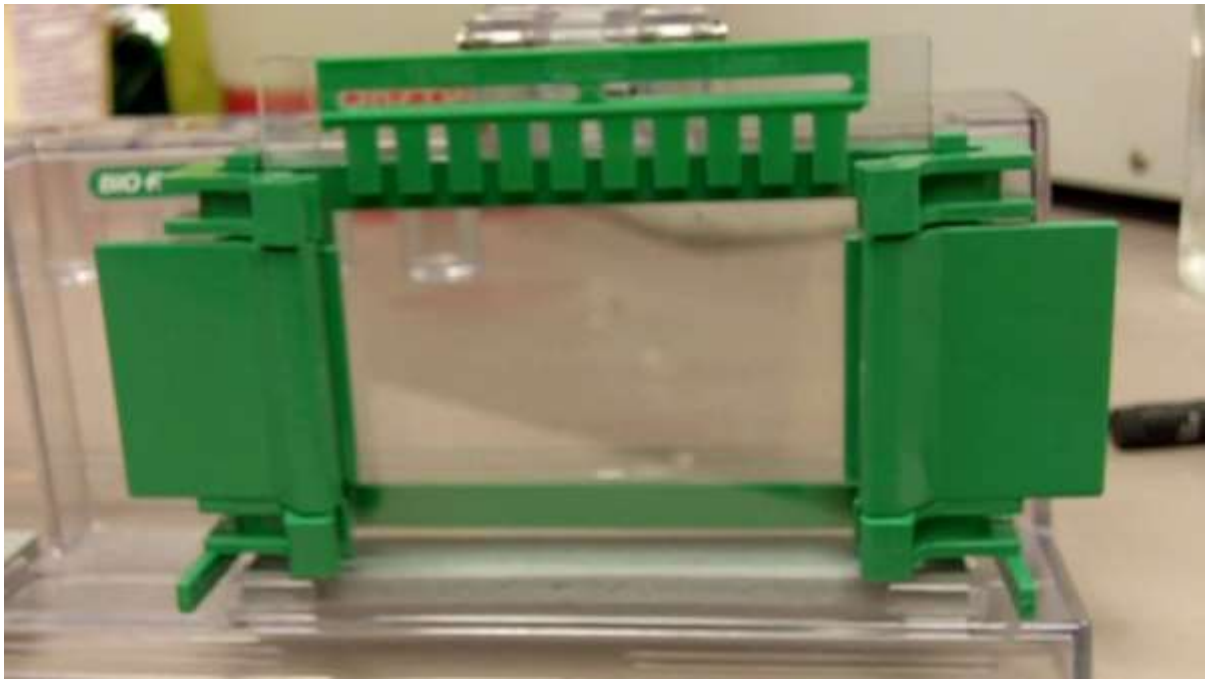
في عندي ماده بستخدم ها اسمها
glutaraldehyde وهاي تعمل fix لاي protein
protein interactions عن طريق covelent bond

Disadvantages:

1. Many steps where errors can occur
2. Accurate quantitation is very difficult
3. Time consuming protocol
4. High cost

Created with Notewise

عملية تصنيع الجل نفسه تعتمد على **size** تبع البروتين ف اذا حجم البروتينات كبير بدي يكون تركيز الجل قليل والعكس صحيح



Created with Notewise

Volumes for 1X 1.0μm Space Resolving Gels

(5 ml total)

	7%	8%	9%	10%	12.5%	15%
30% Acrylamide	1.16 ml	1.33 ml	1.5 ml	1.66 ml	2.08 ml	2.5 ml
H2O	2.48 ml	2.32 ml	2.15 ml	1.98 ml	1.57 ml	1.15 ml
Buffer 1.5M Tris (pH 8.8)	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml
10% SDS	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
10% APS	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
TEMED	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl

هاد مهم لبداية عمليه Polymerase

هاد يشتغل ك Accelerator

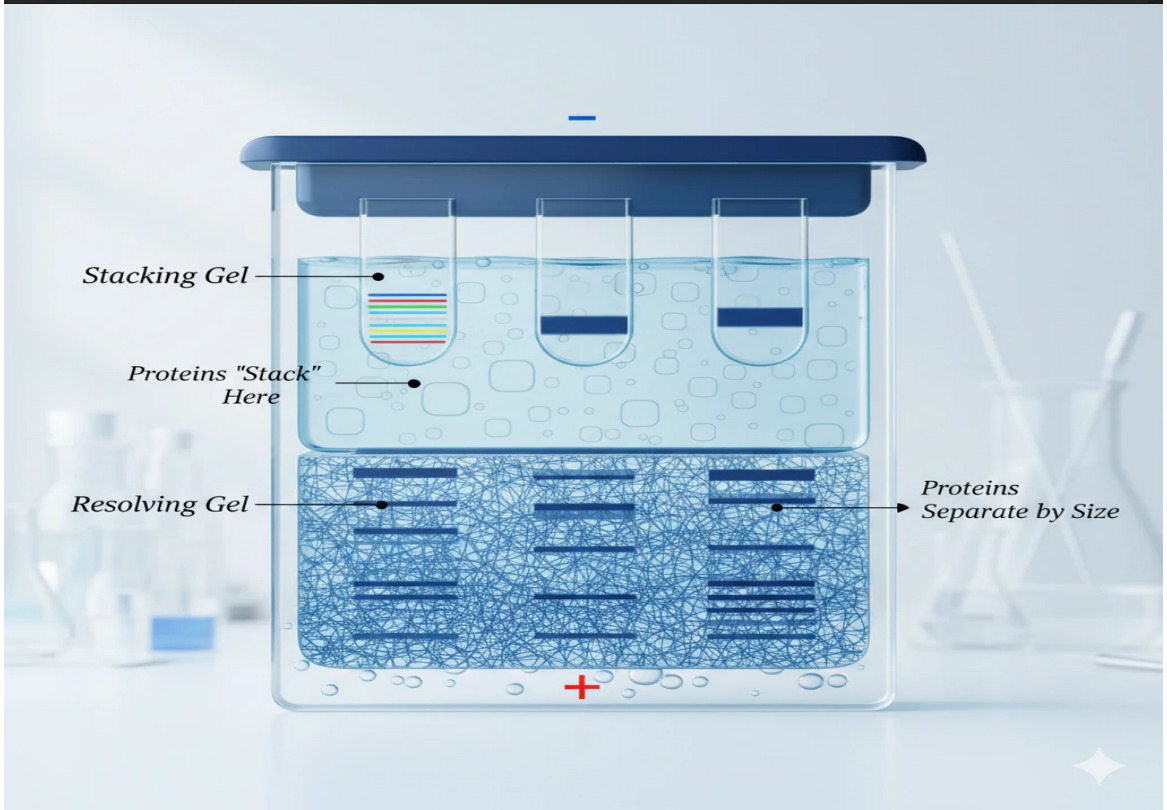
هاد الي بحط العينه فيه لانه كميته اقل

Volumes for 1.0μm Stacking (4%)

	1 Stack (2ml)	2 Stacks (4ml)	3 Stacks (6ml)	4 Stacks (8ml)
30% Acrylamide	340 μl	680 μl	1020 μl	1.36 ml
H2O	1.36 ml	2.72 ml	4.08 ml	5.44 ml
1M Tris (pH 6.8)	250 μl	500 μl	750 μl	1 ml
10% SDS	20 μl	40 μl	60 μl	80 μl
10% APS	20 μl	40 μl	60 μl	80 μl
TEMED	2 μl	4 μl	6 μl	8 μl

Created with Notewise

الجل الفاصل (Resolving Gel)	جل التكديس (Stacking Gel)
الفصل (Separation): فصل البروتينات عن بعضها البعض بناءً على حجمها الجزيئي.	التجميع (Stacking): تجميع كل البروتينات من حقل العينة الواسع في شريط ضيق ومكثف واحد.
يقع في الأسفل (Bottom).	يقع في الأعلى (Top).
عالي (عادة 7% - 15%).	منخفض (عادة 4%).
مسام صغيرة وكثيفة تعمل كـ منخل جزيئي.	مسام كبيرة تسمح للبروتينات بالتحرك بسرعة دون مقاومة، مما يدفعها للاصطفاف عند الحد الفاصل.
البروتينات الكبيرة تتباطأ، والصغيرة تتحرك أسرع، مما يؤدي إلى الفصل.	البروتينات تتحرك بسرعة للاصطفاف.



الهدف انه تكون كميه هلق قليه 4% هي لانه ممكن تكون البروتينات الصغيره تحت الكبيره مغطيه عليها لذلك بحطها على اشي خيف حتى تترتب صح

وبعد كل هاد يعني بضيفه على **resolve gel** بضيف **Isopropanol** حتى تكون كل العينه الي هي الجل على مستوى واحد ما بدي بعدين يطلع عندي **band** واحد طالع وواحد نازل

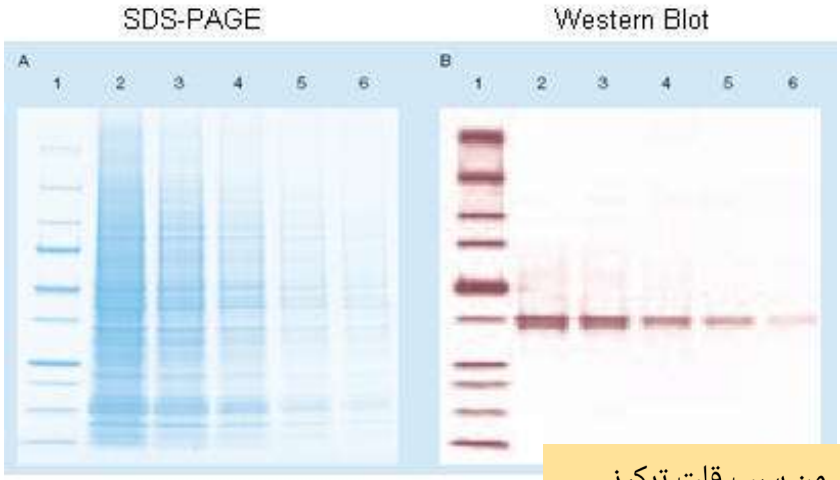
Created with Notewise

افهموها صح عشان لو اجت بالامتحان تعرفو شو تجاوبو

Western blot

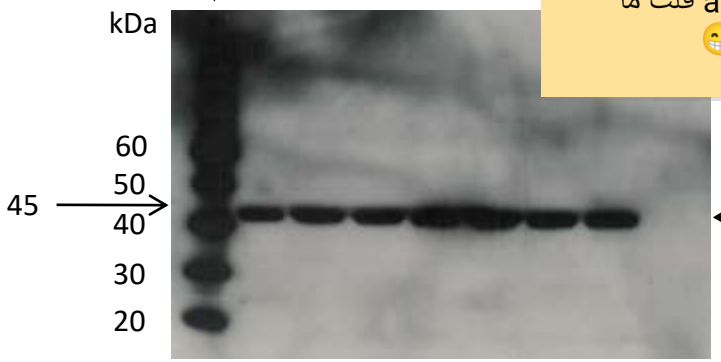
برضو بقدر استخدمه لاشوف تأثير دواء معين على بروتين معين واشوف شو تأثيره على expression تبعه

HeLa Cell Lysate



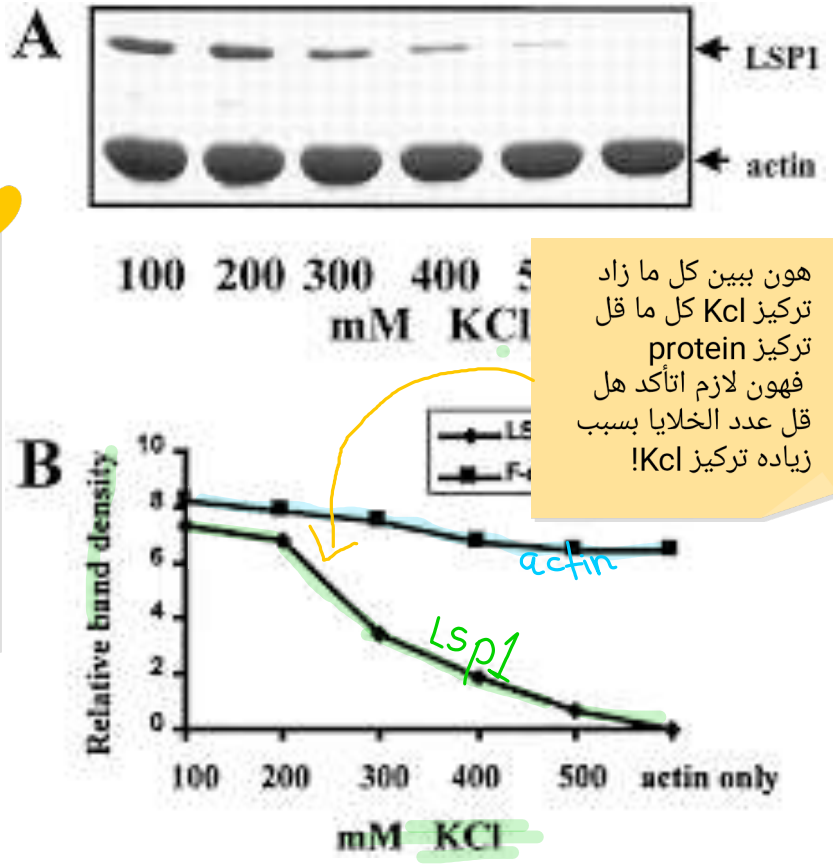
Chemiluminescent Detection
BioRad Bulletin 2032

Magic Mark XP Western Protein Standard



حتى اتأكد من سبب قلت تركيز البروتين بروح افحص B actin وبعد فحصه طلع فش فيه مشكله بدليل ظهور band غامق على طوله يعني بمعنى اخر ضل ثابت وهاد يثبت انه الخطأ بسبب زياده تركيز Kcl ومش انه كميه البروتين الي حطيتها صغيره (لو كانت كميه البروتين ال محطوط LSP1قليله كان band تبع actin قلت ما ضلت نفس ما هي) 😁

Lymphocyte specific protein 1



هون ببين كل ما زاد تركيز Kcl كل ما قل تركيز protein فهون لازم اتأكد هل قل عدد الخلايا بسبب زياده تركيز Kcl!

Created with Notewise

هاد شكلو Vertical انتبهو

Western Blot Protocol

الجل ب western يستخدم
لمره واحده فقط على عكس
Electrophoresis

1. Sample Preparation

   A) Add 10 mg of protein to 5 ml of 4X LDS Loading Buffer plus 2.5 ml of 10X Reducing Agent. Then add purified water to a total volume of 25 ml.

For example: If your total protein concentration is 2.0 mg/ml, you would need 5 ml of total protein to equal 10 mg. So you would mix:

هاي الكميه الي
لازم تكون من
البروتين على
شكل سائل

وهاد وزنه الي لازم
استخدمه وبعدها
احوله لسائل

- 5 ml of protein
- 5 ml of 4X LDS Loading Buffer
- 2.5 ml 10X Reducing Agent
- 12.5 ml purified water.

B) Heat sample mixture at 70°C for 10 minutes.

هاد الوقت اللازم
والحراره حتى يصير
denaturation او
على درجه حراره 95
لمده 5 دقايق

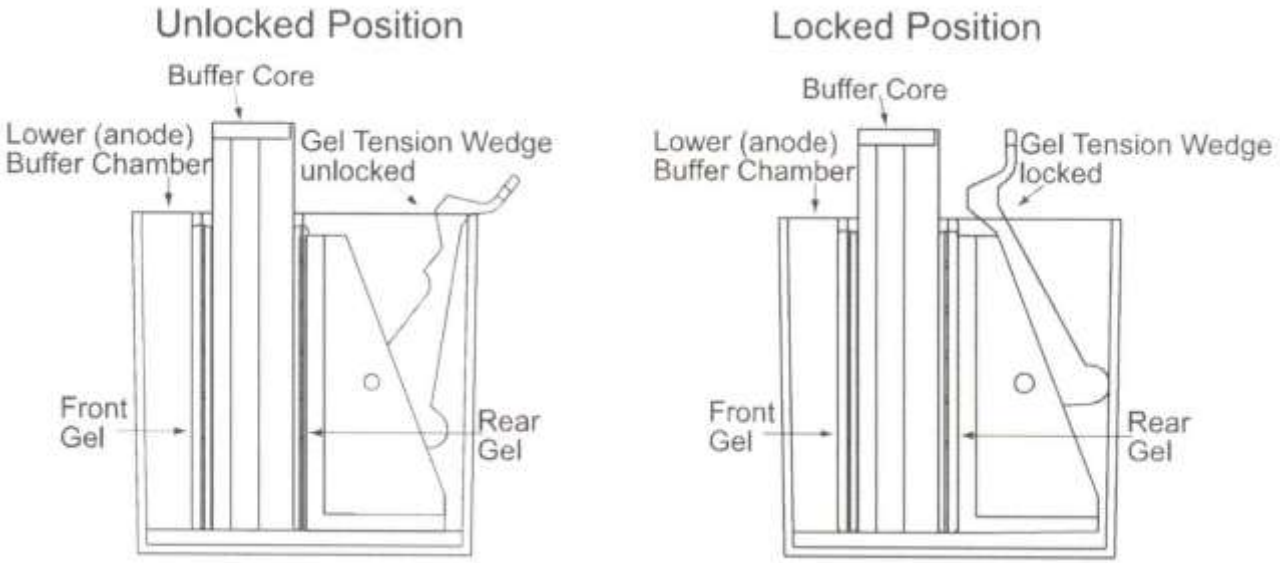
Created with Notewise

2. Electrophoresis

A) While protein samples are heating, assemble electrophoresis unit.

Demonstration

XCell *SureLock* Mini-Cell

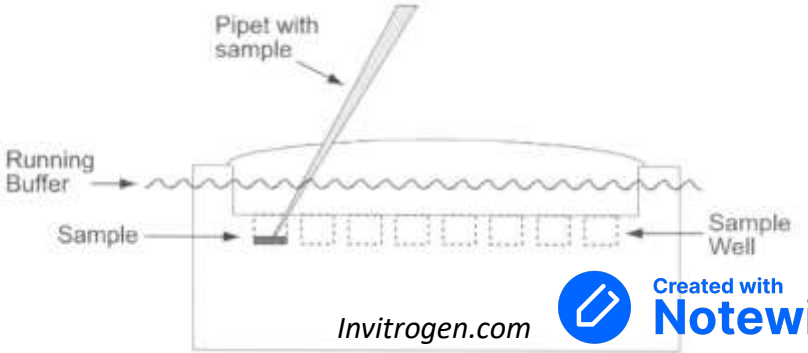


B) Load Gel

-Molecular weight marker and protein samples

Demonstration

وهون يتم استخدام اللوغاريتمات



Created with Notewise

C) Add 500 µl Antioxidant to top chamber to maintain proteins in a reduced state and ensure optimal band sharpness.

D) Run gel at 180V for 45 minutes

هاي تعتمد على Surfaces area وتعتمد على سرعه وصول العينات الي مصبوغه ب methalen blue يعني بستناها لتصل ممكن توخذ ساعه لذلك بستنى ساعه مش 45 دقيقه وممكن تكون volt عالي. يعني احتمال كبير ما توصل ل 45 دقيقه بدها اقل
لذلك هي مش ثابته ابدا انتبهو

Created with Notewise

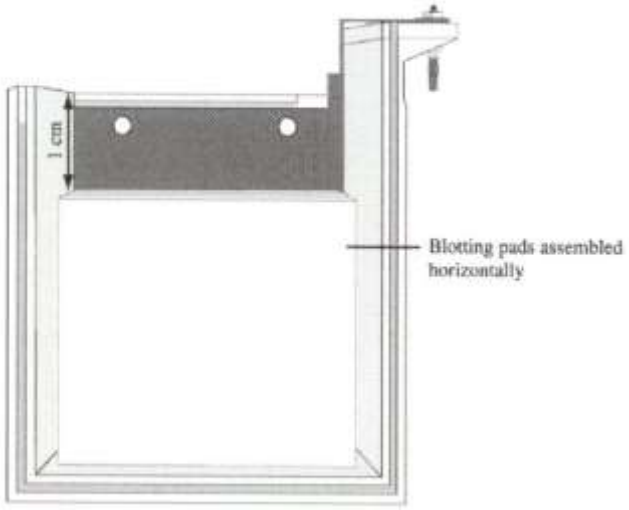
3. Transfer

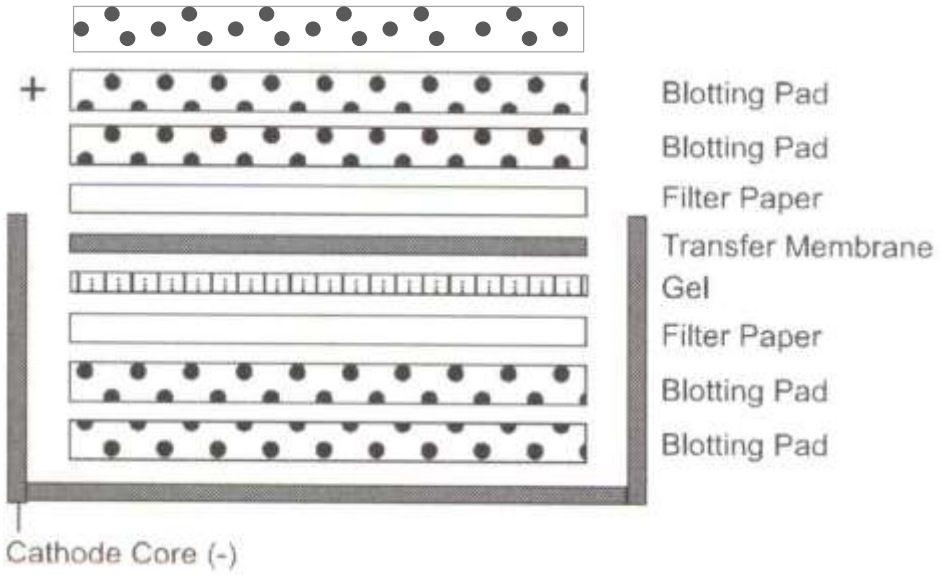
A) Soak marked (for orientation) nitrocellulose (or PVDF) membrane in transfer buffer containing 10% Methanol at least 10 minutes prior to transfer.

B) When gel run is complete, turn off power source, remove gel from pre-cast plates, place transfer buffer-soaked filter paper sheet on top of gel, remove gel from plate, and place on top of membrane blotting pads that have been removed of bubbles.

C) Place membrane on top of gel and cover with another transfer buffer-soaked filter paper sheet and blotting pads to fill the transfer chamber.

Demonstration





D) Add 500 µl Antioxidant and run transfer at 30V for 1 hour.

Created with Notewise

4. Blocking

A) Remove membrane from transfer chamber and incubate in 5% Blotto [5% powdered milk in TBS-Tw (1X TBS, 0.1% Tween 20)] at room temperature for 30 minutes with slow shaking.

buffer هاد

Fill up the space on the membrane to prevent non-specific antibody binding

Recommended to block for >1 hour

Milk	BSA
Strong blocking agent	High signal
Less signal	High background!
Not-recommended for phospho-proteins	
Cheap!	

Diluted in same Buffer use for washing (PBST/TBST)

Created with Notewise

5. Primary Antibody Incubation

A) Prepare a 1:1000 dilution of primary antibody (Rabbit Anti-Human b-Actin) in 5% Blotto.

B) Incubate membrane in primary antibody solution overnight at 4°C with gentle rocking.

Created with Notewise

6. Membrane Washing

Buffer

A) Wash membrane 3 x 5 minutes each in TBS-Tw with gentle shaking at room temperature.

7. Secondary Antibody Incubation

A) Prepare a 1:5000 dilution of secondary antibody (Goat Anti-Rabbit IgG-HRP) in 5% Blotto.

B) Incubate membrane in secondary antibody solution for 30 minutes at room temperature with gentle shaking.

8. Repeat Membrane Washing

Created with Notewise

9. Visualization of Protein of Interest

A) Place membrane protein side up on saran wrap on a flat surface.

B) Quickly add 50 ml of ECL solution B to 2 ml of ECL solution A, mix, and add directly to membrane.

C) Incubate in the dark for 3-5 minutes, remove excess solution, and place membrane protein side down onto a new piece of saran wrap.

D) Close saran wrap around membrane, tape to film cassette and expose film in the dark room for 30 seconds to 1 minute.

E) Develop film & identify protein of interest.

Created with Notewise

Detection

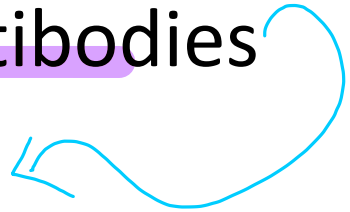
- Colorimetric – less sensitive
- Radioactive label
- Fluorescently labelled secondary antibody – highly quantitative
- Chemiluminescent – HRP or AP labelled secondary antibody - very sensitive!

هاي المستخدمه
والي استخدمناها

Created with Notewise

- Rabbit primary antibodies
  - Natural diversity
  - High affinity and specificity
  - Novel epitope recognition

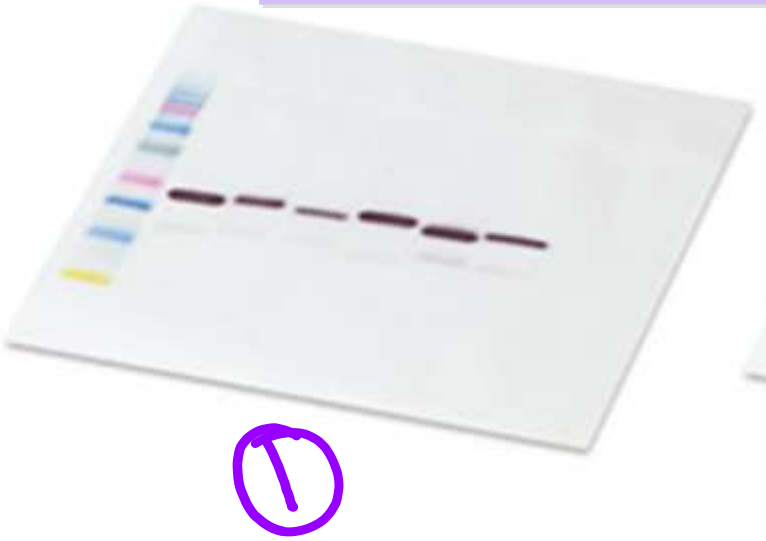
- Why goat anti-rabbit secondary antibodies
  - To increase the intensity of the signal



Created with Notewise

Result of Western Blot

هون فعليا الصوره الأولى أظهرت لنا البروتين بشكل واضح لحاله وهو الي ارتبط مع primary and secondary
اما الصوره الثانيه تم صبغها كلها بصبغه لونها ازرق وهاي بينت عندي كل البروتينات الموجوده سواء ارتبطت او لا



Blot from unstained Gel

Blot from stained Gel

Created with Notewise

Confirm HIV virus

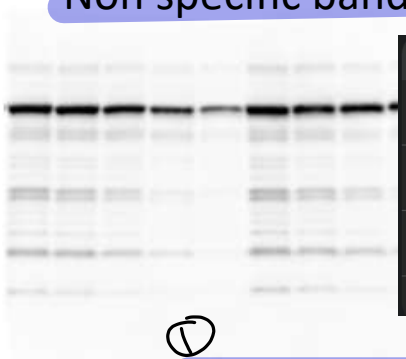
- The confirmatory HIV test employs a western blot to detect anti-HIV antibody in a human serum sample.
- Proteins from known HIV-infected cells are separated and blotted on a membrane as above.
- Then, the serum to be tested is applied in the primary antibody incubation step; free antibody is washed away, and a secondary anti-human antibody linked to an enzyme signal is added.
- The stained bands then indicate the proteins to which the patient's serum contains antibody.
- Western blot can also be used as a confirmatory test for Hepatitis B

Band = تأكيد وجود الأجسام المضادة لفيروس HIV في عينة المريض. يعني هو مصاب

Created with Notewise

Common problems

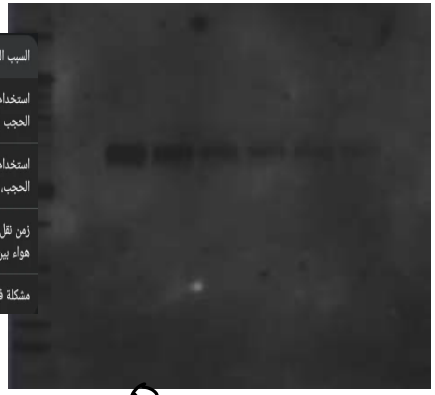
Non specific bands



المشكلة الظاهرة	السبب المحتمل
Non-specific bands (حزم غير نوعية)	استخدام كمية كبيرة جداً من الجسم المضاد أو عدم كفاية خطوة الحجب (Blocking).
High background (خلفية عالية)	استخدام كمية كبيرة جداً من الجسم المضاد، أو عدم كفاية الحجب، أو عدم كفاية الغسل.
Incomplete transfer (نقل غير مكتمل)	زمن نقل قصير جداً، أو تيار نقل منخفض جداً، أو وجود فقاعات هواء بين الهلام والغشاء.
Blotchy transfer (نقل مبقع)	مشكلة في النقل، مثل فقاعات الهواء.

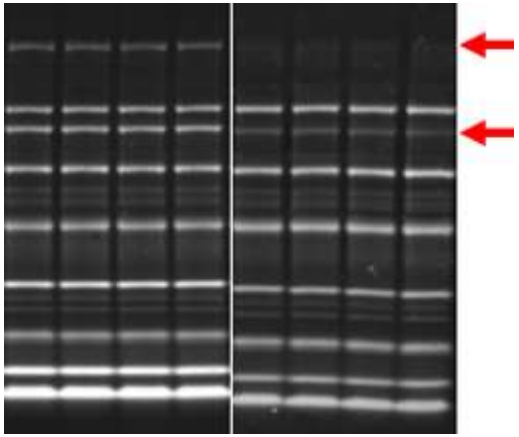
1. Probably too much antibody
2. Or insufficient blocking

High background



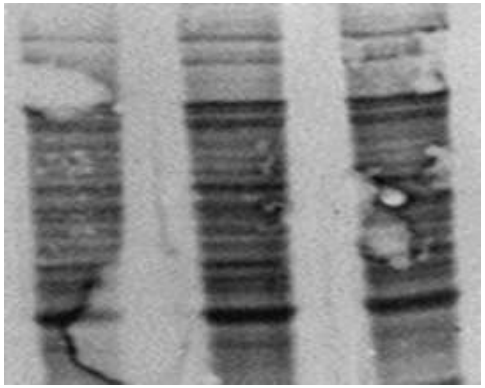
1. Probably too much antibody
2. Or insufficient blocking
3. Or insufficient washing

Incomplete transfer



1. Transfer time too short
2. Transfer current too low

Blotchy transfer



Air bubbles between gel and membrane

Created with Notewise

Other types of blotting

- Southern blotting is used to detect specific sequences of DNA in DNA samples.
- Northern blotting for RNA
- Eastern for post-translational protein modifications
- South-western for DNA-protein interactions blotting.

نوع التقنية	الجزيء المستهدف	باختصار (ماذا تكشف؟)
Western Blot	البروتين	الكشف عن بروتين معين في العينة.
Southern Blotting	DNA	الكشف عن تتابعات DNA محددة.
Northern Blotting	RNA	الكشف عن جزيئات RNA (النسخ).
Eastern Blotting	تعديلات البروتين (ما بعد الترجمة)	الكشف عن تعديلات البروتين (مثل الفسفرة أو الجلكزة).
South-western Blotting	تفاعلات DNA-البروتين	الكشف عن البروتينات التي ترتبط بالـ DNA.

Created with Notewise