

Elektroforez, Western Blot, Southern Blot, Northern Blot

Dr. Gaye Güler Tezel

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Patoloji Anabilim Dalı



Elektroforez

- DNA, RNA ve protein moleküllerini büyüklük, şekil ve topolojik özelliklerine göre ayıran bir yöntem


Elektroforez

- Çözünmüş durumdaki moleküllerin elektrik yüklerinin kitlelerine oranıyla belirlenen hızlarda elektriksel alanda göç etmeleri prensibine dayanır.
- Nükleik asit ya da protein karışımlarını saflaştırmakta ve analiz yapmakta geniş çapta kullanılır.



Elektroforez

- Analiz yapılacak örnek destek ortamına uygulanır.
- Selüloz aminoasitler ve karbonhidratlar gibi düşük molekül ağırlıklı olan moleküller için,
- Jeller ise nükleik asit ve proteinler gibi büyük moleküller için destek ortamı olarak kullanılır.

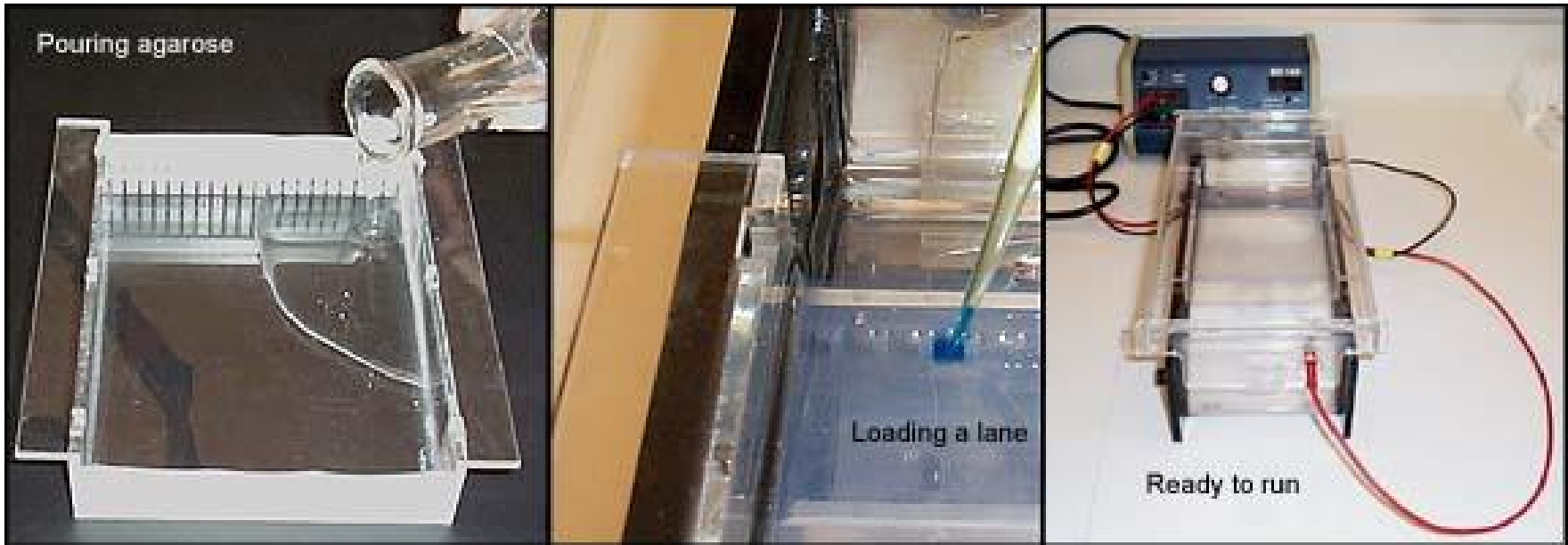
- 
-
- Jel matriksi jelöz kıvamlı, makromoleküller için elek görevi yapan porlu bir materyal
 - **Agaroz** ve **akrilamid** olarak iki tip matriks


Horizontal Agaroz Jel Elektroforezi
DNA/RNA



Vertikal poliakrilamid Jel Elektroforezi
DNA/RNA/Protein

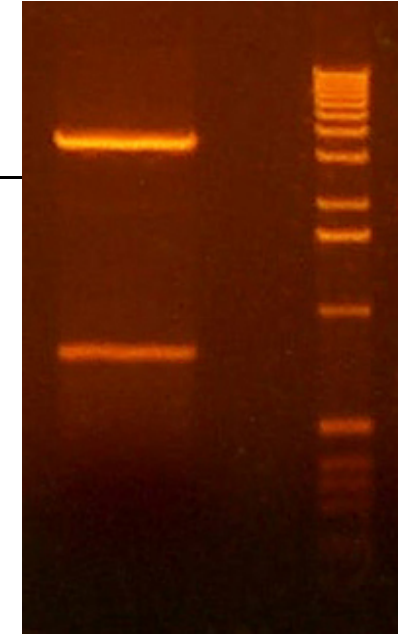




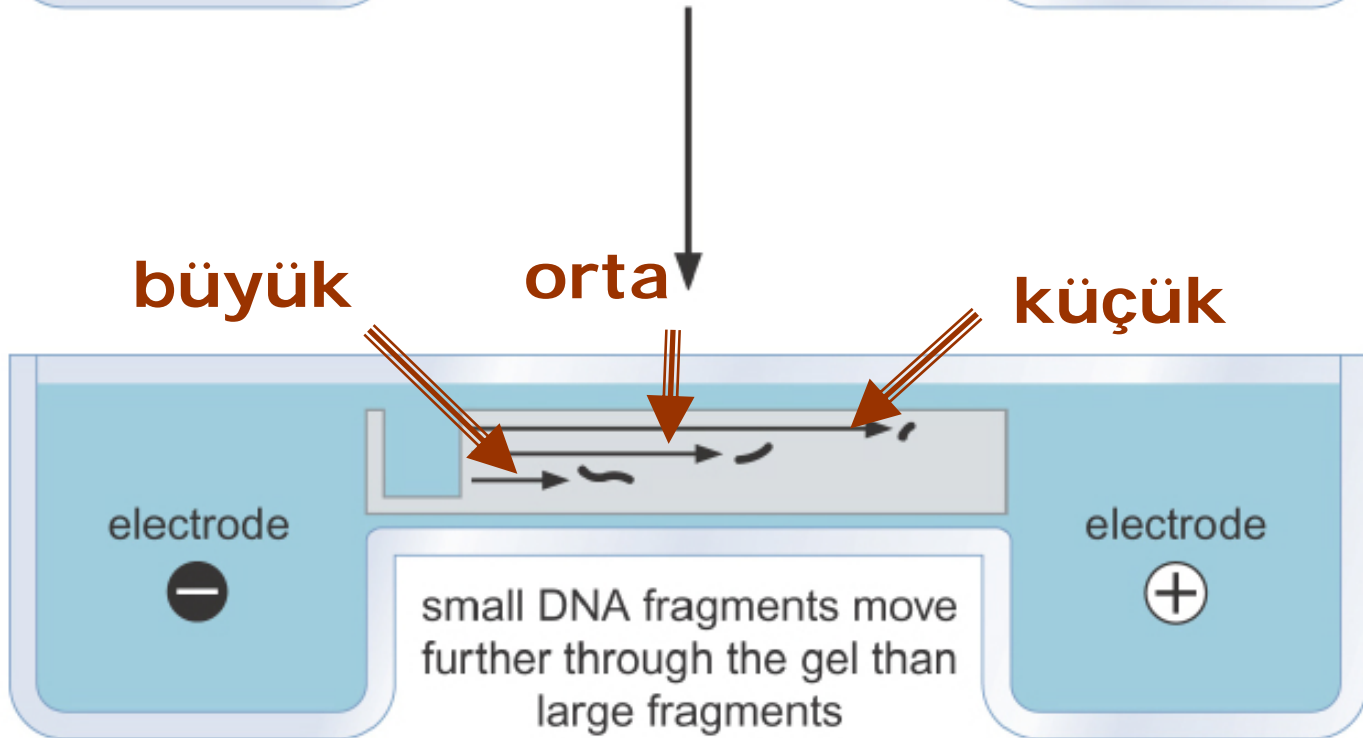
- 
-
- Jelin sahip olduğu porların çapı; jelin kimyasal özelliklerine bağlıdır.
 - Dokudan hazırlanan makromolekülün (DNA, RNA, protein) ekstreleri tank içinde jel üzerinde elektroforetik olarak kořturulur.

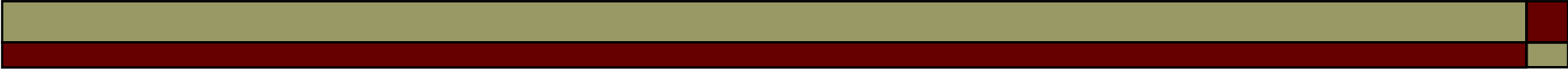
Jel elektroforezi ile DNA ayırımı

electrophoresis chamber



Elektroforez sonrası



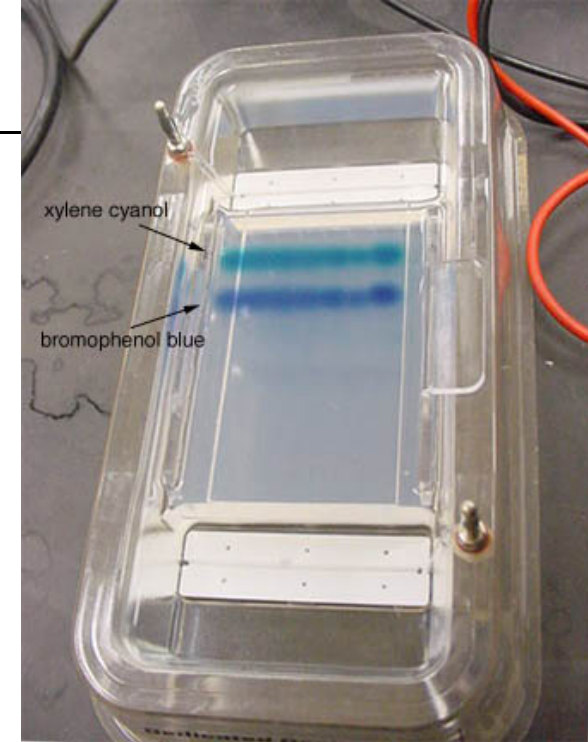
- 
-
- Büyük moleküller porlardan küçük moleküllere göre daha yavaş geçerler.
 - Bu boyuta göre ayrılmayı sağlar, buna göre büyük moleküller kuyucuklara yakın kalırken, küçükler daha uzakta yerleşir.

Farklı miktarlarda agaroz içeren jellerin ayırım gücü

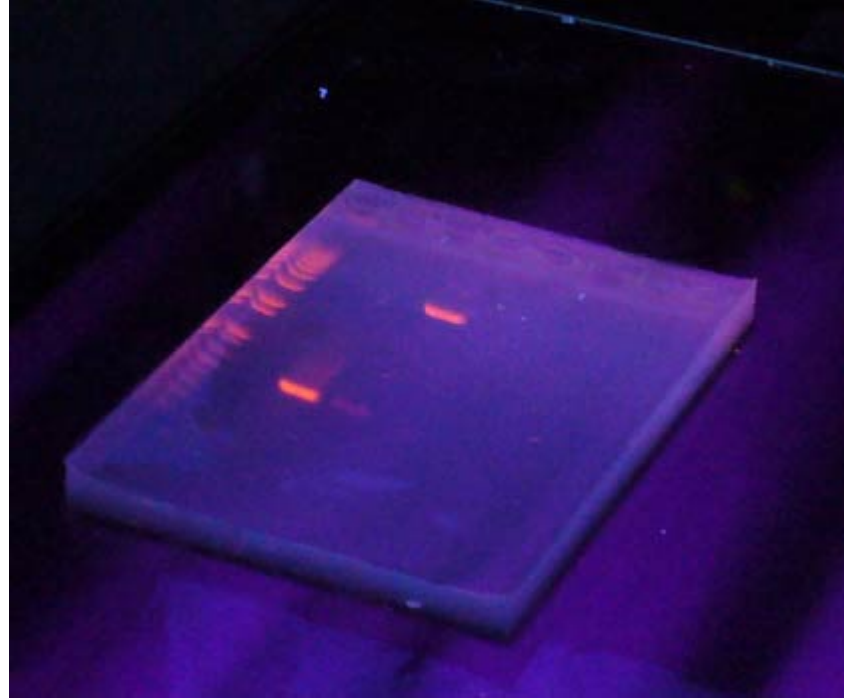
Jel içerisindeki agarozun miktarı (%, w/v)	Lineer DNA (bp) moleküllerinin etkin ayırım aralığı
0.3	5.000 - 60.000
0.6	1.000 - 20.000
0.7	800 - 10.000
0.9	500 - 7.000
1.2	400 - 6.000
1.5	200 - 3.000
2.0	100 - 2.000

Örnek yükleme boyaları ile DNA migrasyonu

Agaroz konsantrasyonu (%)	Ksilen Siyanol	Bromofenol Mavisi
0.5-1,5	4-5 kb	400-500 bp
2.0-3.0	750 bp	100 bp
4.0-5.0	125 bp	25 bp



Etidyum bromid ile boyanmıř agaroz jelin UV-transilluminator'daki görüntüsü



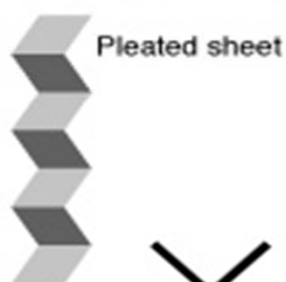
- 
-
- Proteinlerin jelde ayrımı sadece moleküler ağırlıklarına göre değil hacimlerine göre olur.



Primary protein structure

is sequence of a chain of amino acids

Amino Acids



Pleated sheet



Alpha helix

Secondary protein structure

occurs when the sequence of amino acids are linked by hydrogen bonds



Pleated sheet

Alpha helix


Tertiary protein structure

occurs when certain attractions are present between alpha helices and pleated sheets.

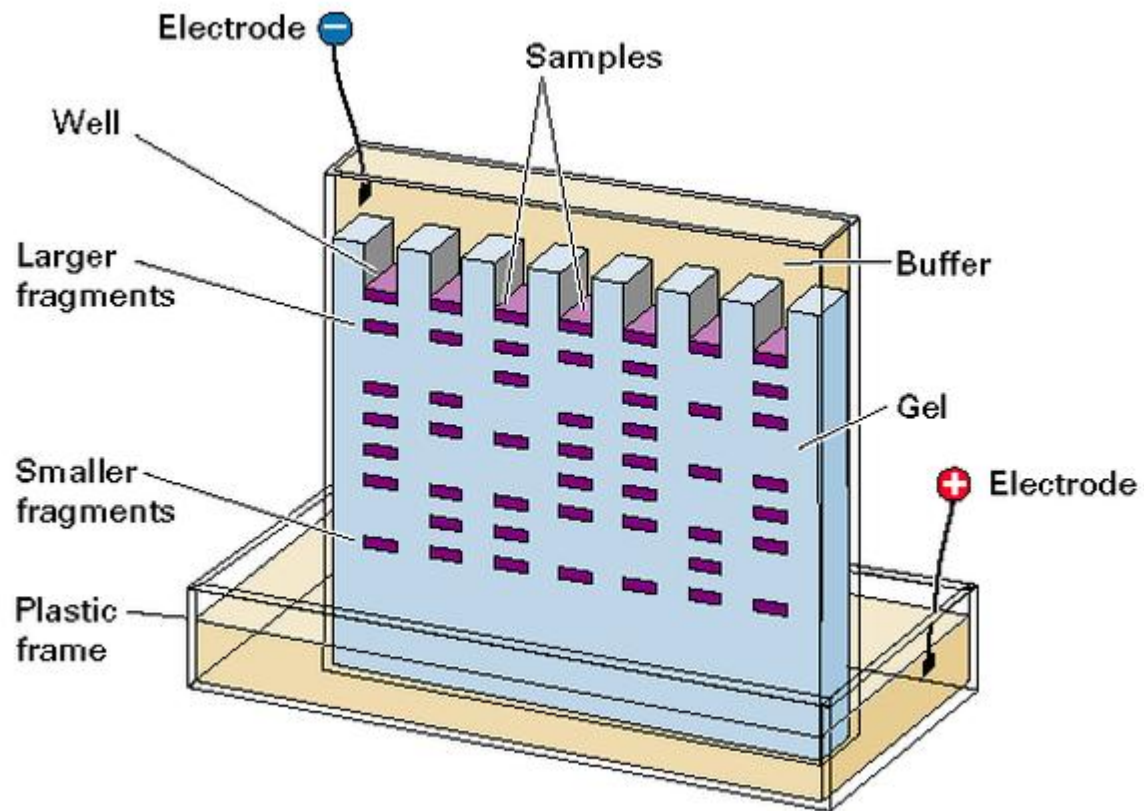


Quaternary protein structure

is a protein consisting of more than one amino acid chain.

- 
-
- Aynı molekül ağırlığına sahip molekülden biri sekonder yapıda ise primere göre daha küçük ve dolayısıyla daha hızlı olacaktır.
 - Bu nedenle jelde ayırım sekonder/tersiyer yapılar uzaklaştırıldıktan sonra primer yapı içerenler arasında yapılır.
 - Elektroforez için DNA, RNA ve protein örnekleri hazırlanırken farklı teknikler bu amaçla kullanılır.

PAGE

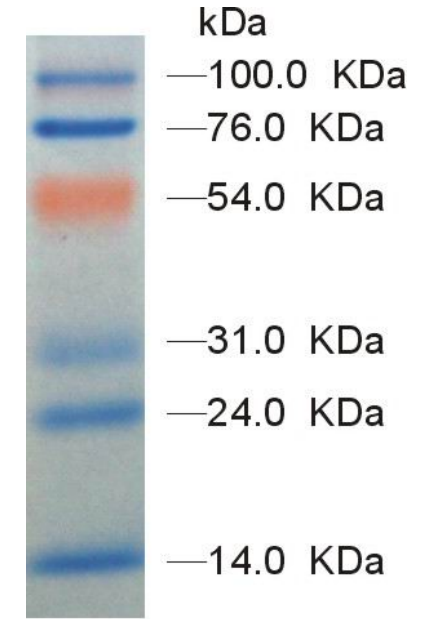


Poliakrilamid jelde **DNA** ayırımının etkin aralığı

Akrilamid (% [w/v])	Etkin ayırım aralığı (bp)	Ksilen siyanol	Bromofenol mavisi
3.5	1.000-2.000 80-	460	100
5.0	500	260	65
8.0	60-400	160	45
12.0	40-200	70	20
15.0	25-150	60	15
20.0	6-100	45	12

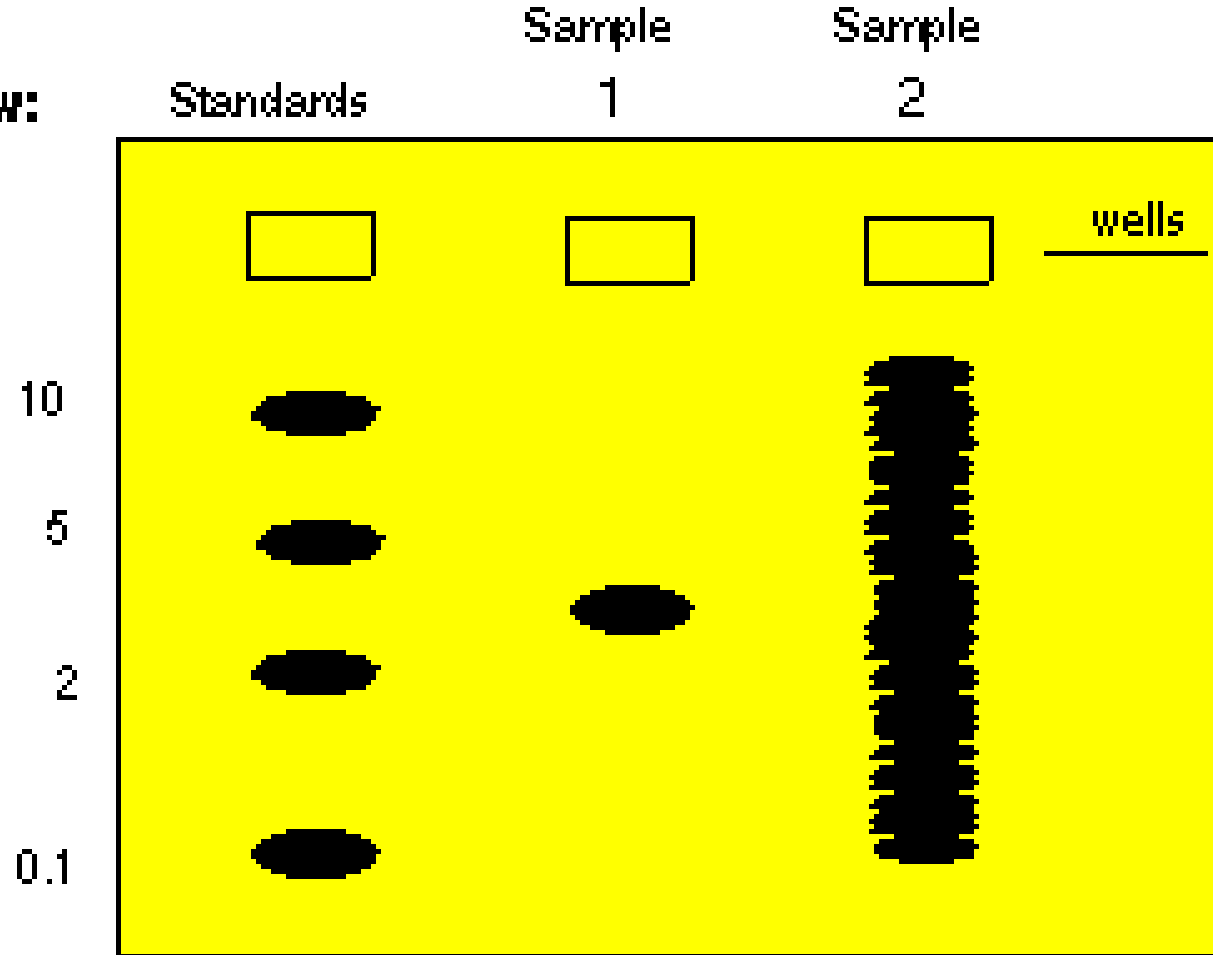
Poliakrilamid jelde **protein** ayırımının etkin aralığı

Jel (%)	Protein büyüklüğü (kDa)
5-15	20-200
5-20	10-200
8-15	10-100
8-20	8-150
10-20	6-150



15% SDS--PAGE

**Top
View:**



Örnek 1: tek bir sınıf makromolekül (plazmid, pür mRNA, pürifiye protein)
Örnek 2: restriksiyon enzimi ile kesilmiş total DNA, total RNA veya total protein)





Kullanım Alanları

- Nükleik Asit analizi
 - PCR ürünlerinin görüntülenmesi
 - Mutasyon analizi (RFLP, SSCP)
 - Dizileme
 - Southern, Northern blot
- Protein Analizi
 - Western blot
- Nükleik asit ve proteinlerin saflaştırılması

Moleküler Ağırlık

- **DNA:** Baz çifti ya da **bp**, sıklıkla kilobaz-çifti(1000bp), ya da **kbp**
- **RNA:** Nükleotid olarak ya da **nt**, sıklıkla kilonükleotid (1000nt), ya da **knt** [Bazen, baz, ya da **b** veya **kb**]
- **Protein:** Dalton ya da **Da**, veya sıklıkla kiloDalton (1000Da), ya da **kDa** olarak ifade edilirler.

- 
-
- Genellikle bir kuyucuk molekül ağırlığı bilinen bir DNA, RNA veya protein marker (belirleyici) ile yüklenir. Bu markerlar aynı zamanda kalibrasyonu sağlar.

- 
-
- Daha sonra jel belli sınıf makromolekül için spesifik ancak sequence spesifik olmayan bir boya ile boyanır (Problar sequence-bağımlıdır).



□ DNA----Southern blot

□ RNA----Northern blot

□ Protein—Western blot

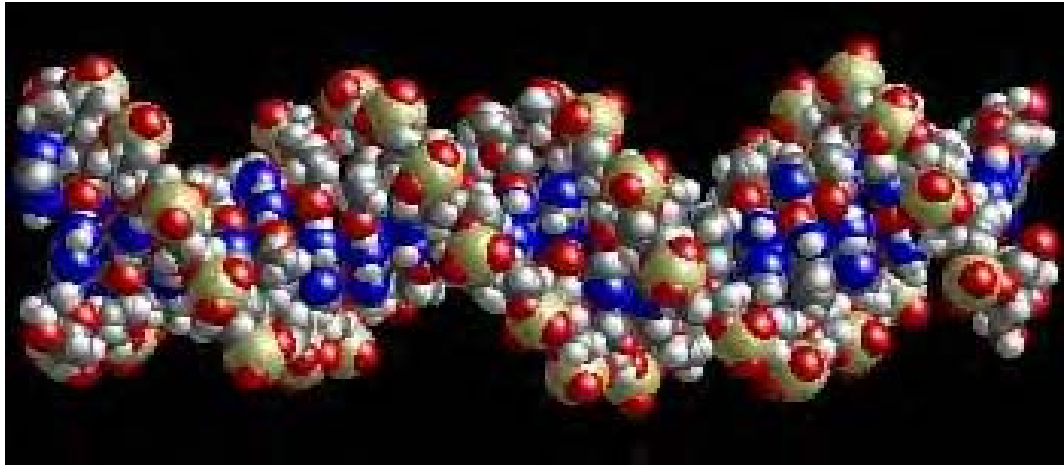


Southern Blot

- 1975 Edward Southern
- Hedef DNA'ya nükleik asit hibridizasyonu
- DNA restriksiyon enzimleriyle kesilir veya PCR
- DNA parçaları agaroz jelde ayrılır
- Prob ile hedef gen/DNA dizisi hibridize edilir
- Görüntüleme

DNA

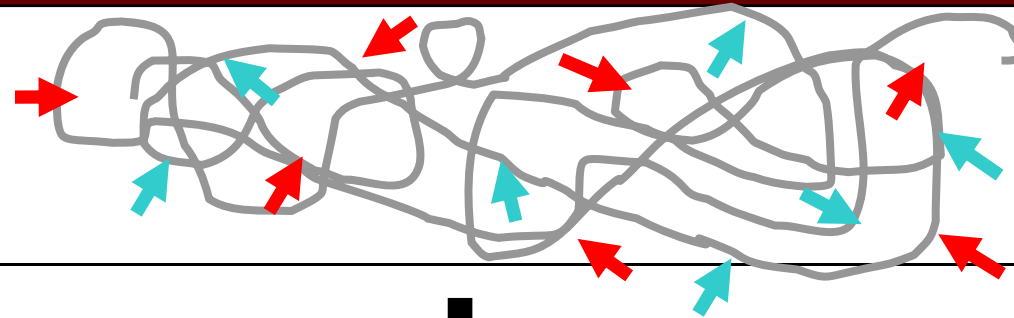
- İlk zincir **GGGTTAAACCC**
- İkinci zincir **CCCAAATTTGGG**



Baz çiftlerinin Chargaff kuralı

- **A** ile **T**: Bir pürin olan **adenin** (A) her zaman bir pirimidin olan **timin** (T) ile eşleşir
- **C** ile **G**: Bir pirimidin olan **sitozin** (C) her zaman bir pürin olan **guanin** (G) ile eşleşir

Southern Blot



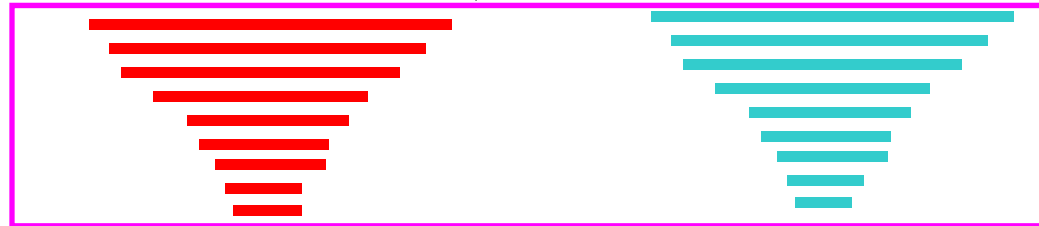
Restriksiyon enzimi



DNA fragmanları



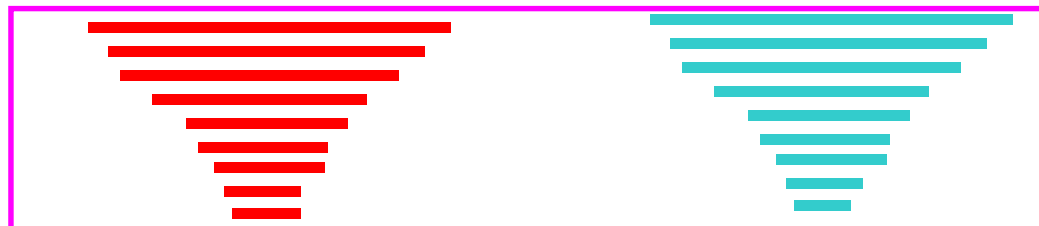
Elektroforez



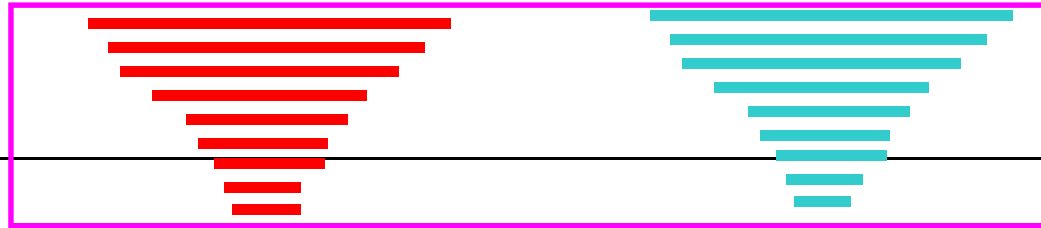
Jel



Denatürasyon - transfer



blot



blot

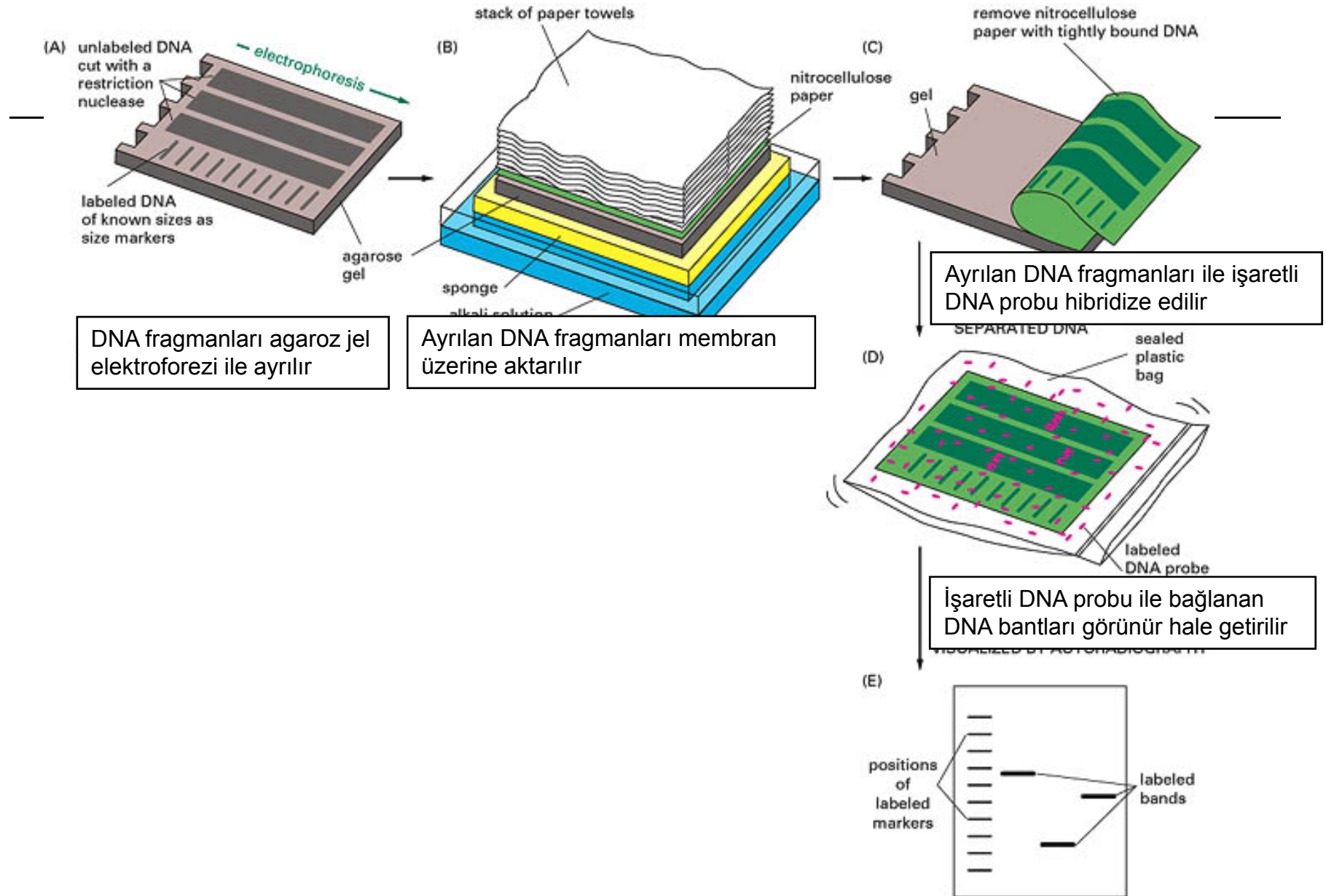
Probe ile hibridizasyon

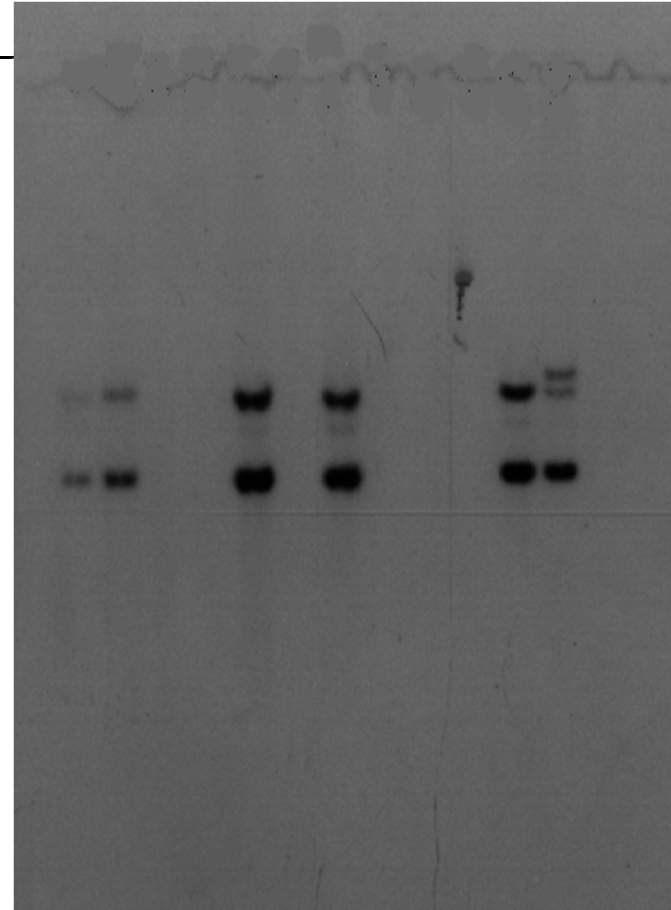
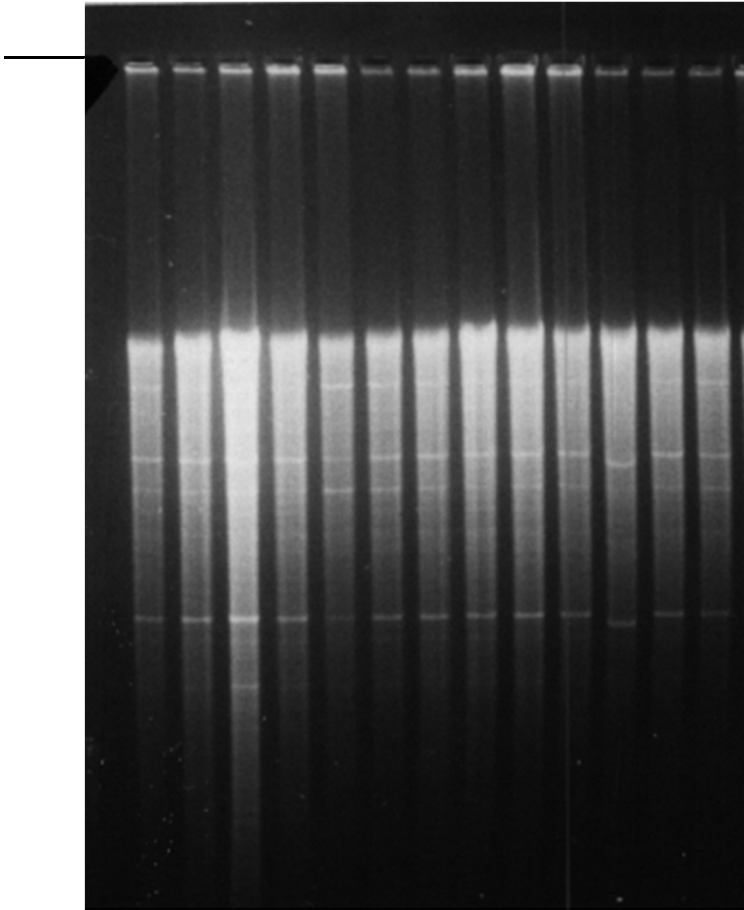


Görüntüleme



Southern blotting

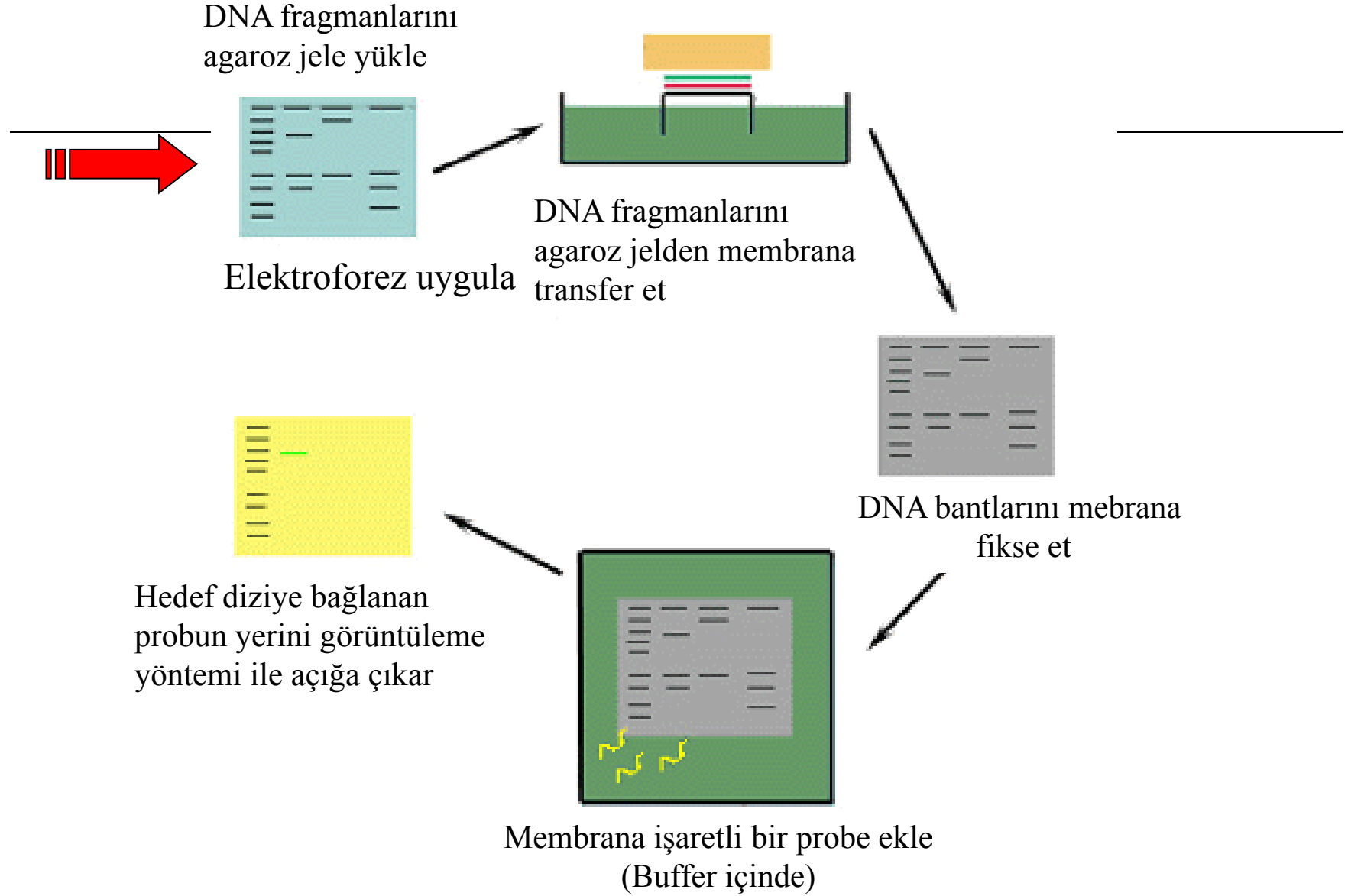




Southern Blot Uygulaması

1. DNA'nın kesimi/PCR
2. Agaroz jelde ayırım
3. DNA'nın denatürasyonu ;
0.5M NaOH ile dsDNA → ssDNA
sadece ssDNA transfer olabilir
4. Opsiyonel olarak (>15 kb) 0.2M HCl ile depürinasyon yapılır.
5. Yüksek tuz konsantrasyonunda (3M NaCl) nötralizasyon re-hibridizasyonu önlemek
6. Kapiller transfer
7. Fiksasyon (UV 254 nm veya 80°C 1-2 saat)
8. Hibridizasyon
9. Görüntüleme (Biotin/streptavidin)

Southern blotting



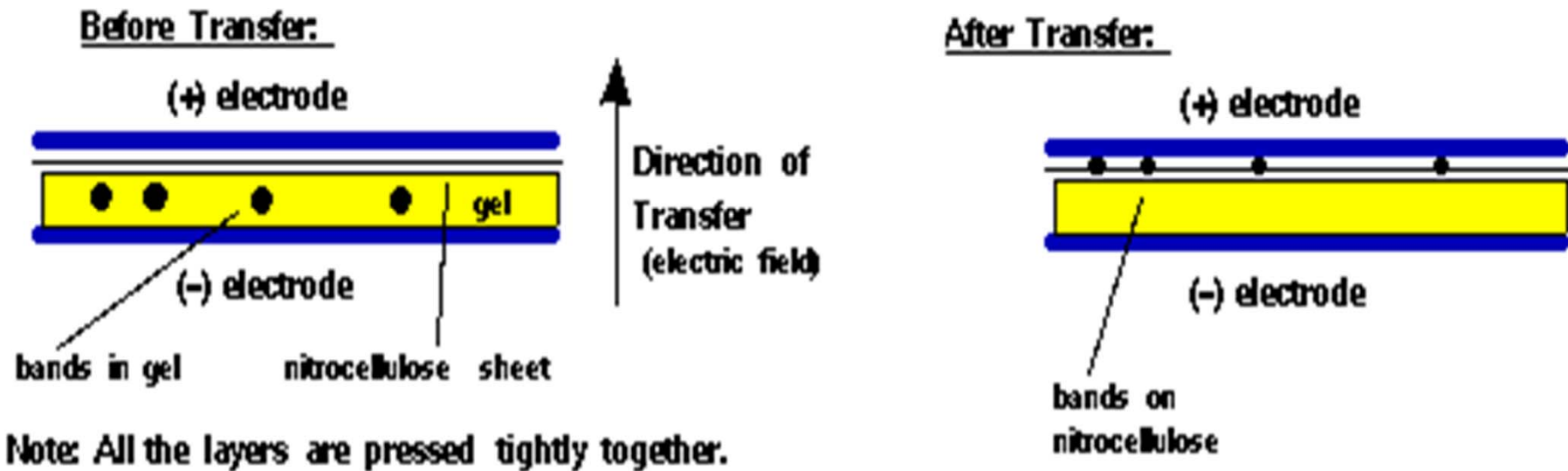
Farklı sınıf makromoleküller için farklı boyalar ve boyama prosedürleri

- DNA boyanması
 - Nükleik asitlere bağlanan **ethidium bromide** (EtBr) kullanılır, DNA-EtBr kompleksi UV ışık altında fluoresan verir.
- RNA boyanması
 - Nükleik asitlere bağlanan **ethidium bromide** (EtBr) kullanılır, RNA-EtBr kompleksi UV ışık altında fluoresan verir.
- Protein boyanması
 - Protein **Coomassie Blue** (CB) ile boyanır. Protein-CB kompleksi koyu mavidir ve normal ışıkta görülebilir.

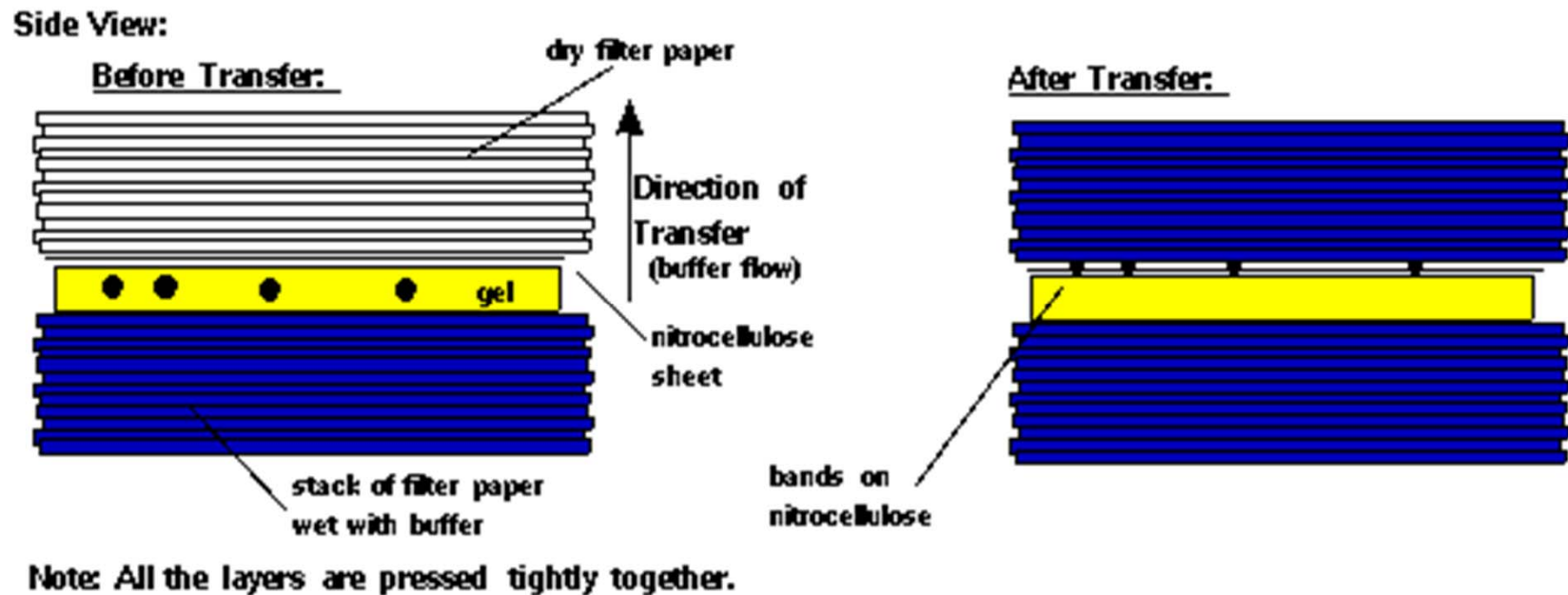
- 
-
- DNA, RNA ve Proteinin membrana bağlanmasında başlıca iki yol vardır:

1) Negatif yüklü moleküller için avantaj olan elektroforez

Side View:




2) Islak filtre kağıdından kuruya doğru buffer akımı olan kapiller blotting





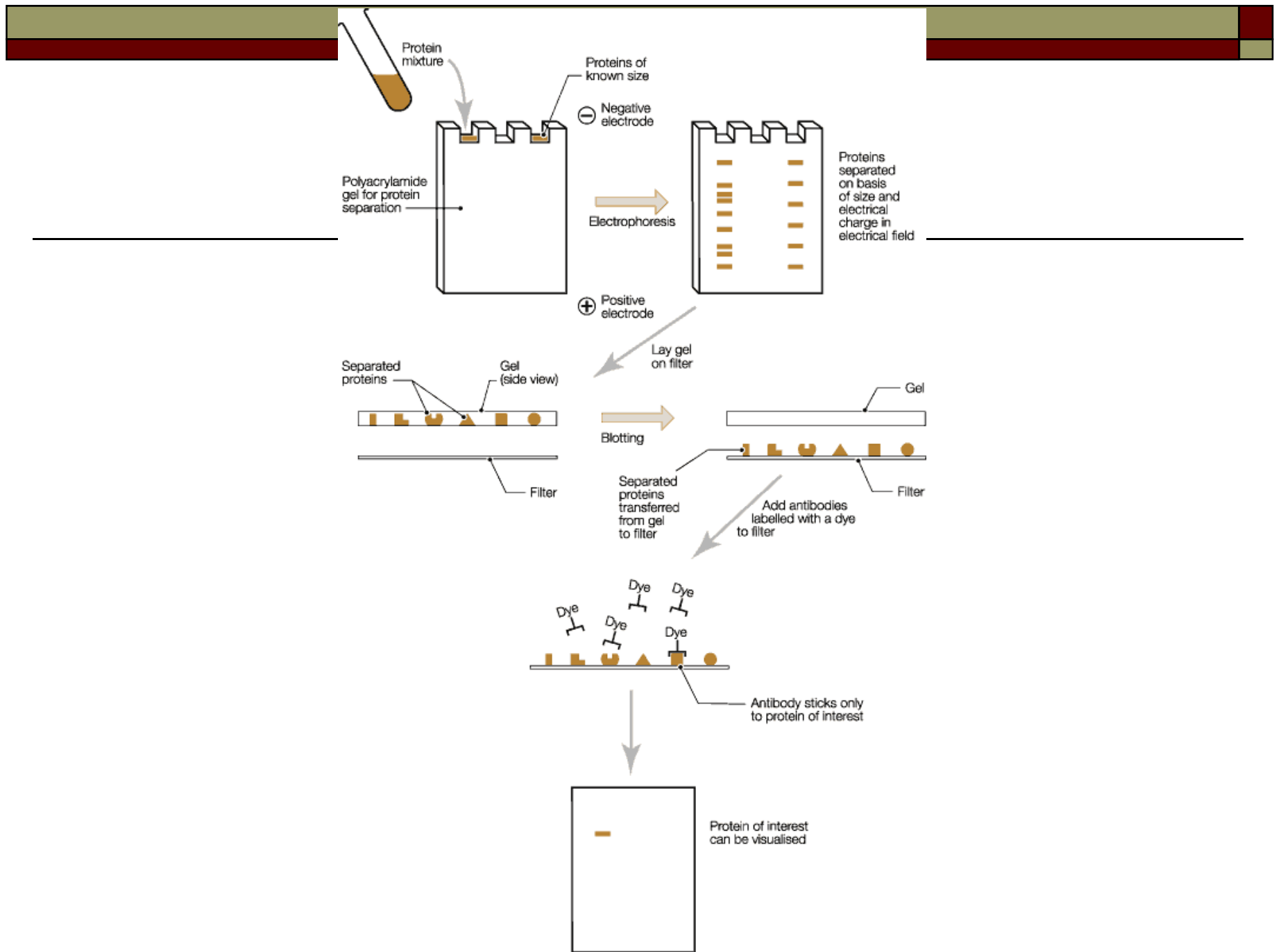
Western Blot (Immunoblotting)

- 1979 yılında Towbin tarafından tanımlanmış protein analiz yöntemi
- Jelde ayırımı yapılmış proteinlerin membrana emdirilerek ilgilenilen proteinin radyoaktif izotopla ya da başka şekilde işaretlenmiş özel antikor yardımıyla membran üzerinde belirlenmesidir.

- 
-
- Antikor spesifik antijenini tanıdığından immunoblotting olarak da isimlendirilir
 - Western blotting kompleks karışım içinden spesifik proteinin tanınması ve bu protein hakkında kalitatif ve semikantitatif veri elde edilmesinde kullanılır

Yöntem

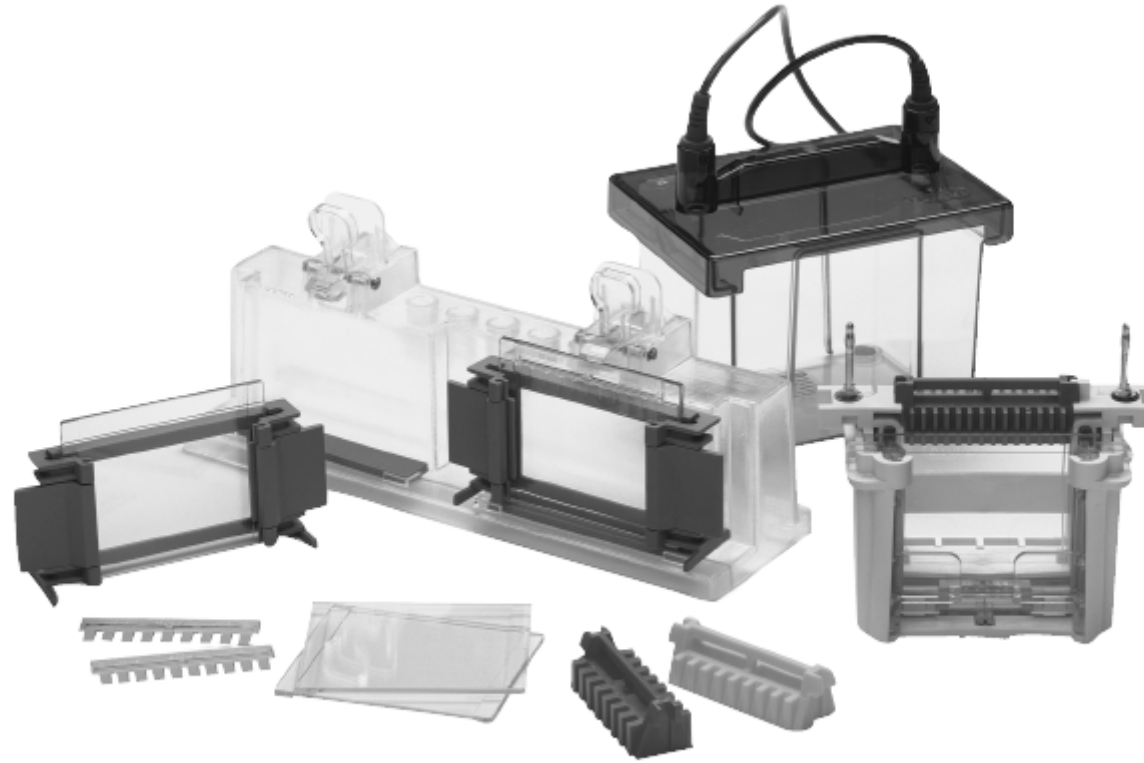
- Jel elektroforezi ile proteinlerin ayrılması
- Jelde ayrılmış proteinlerin membrana transferi-blotlama
- Nonspesifik bağlanma bölgelerinin blokajı-bloklama
- Primer ve sekonder antikor aşamaları
- İşaretleyiciye uygun substrat ile reaksiyon
- Görüntüleme

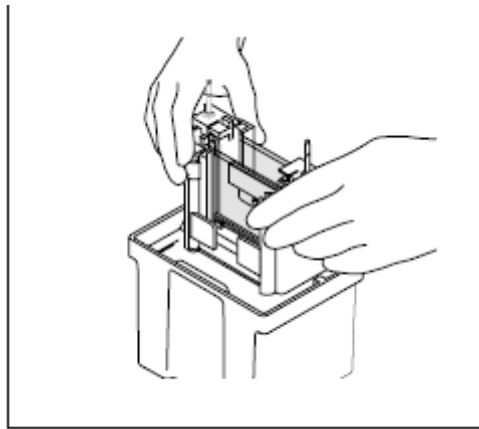
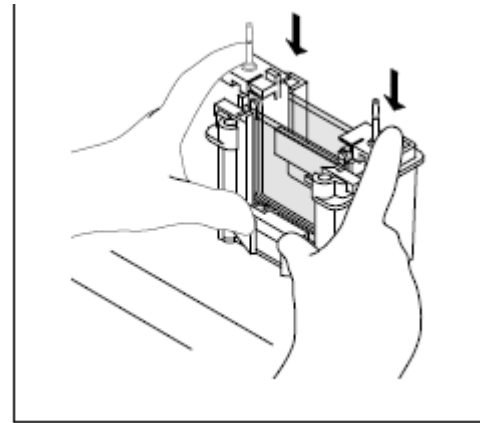
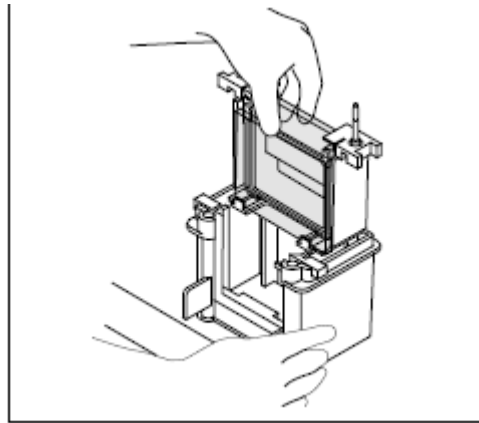
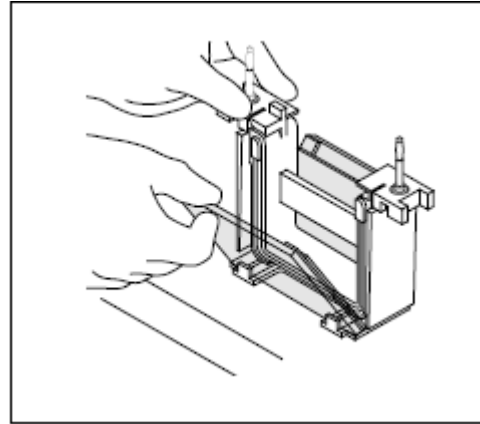
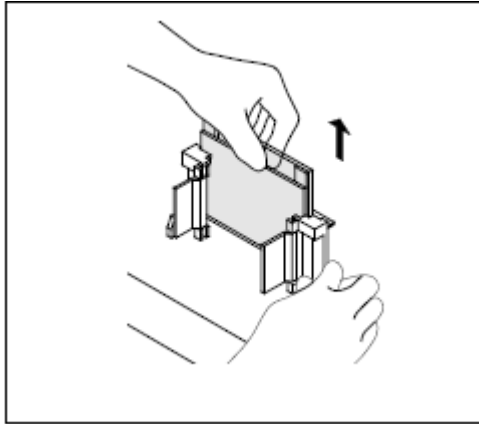


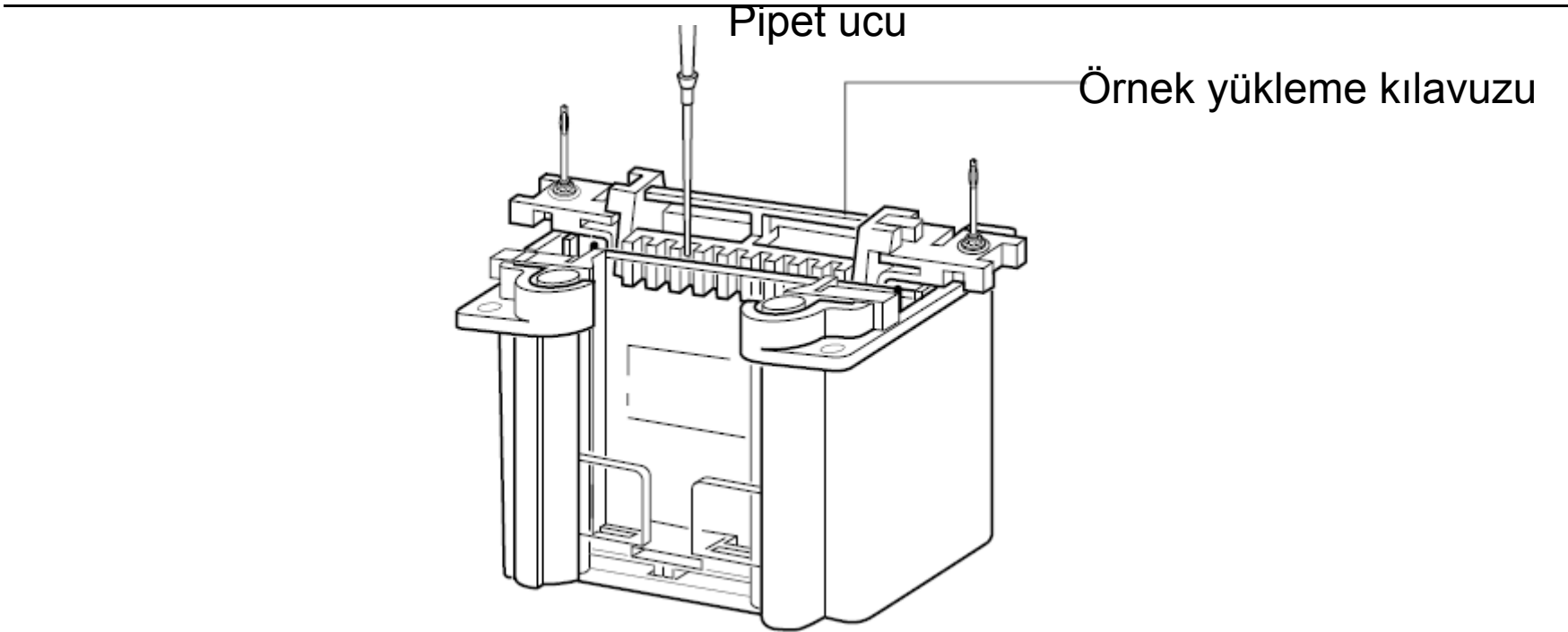
Birinci basamak

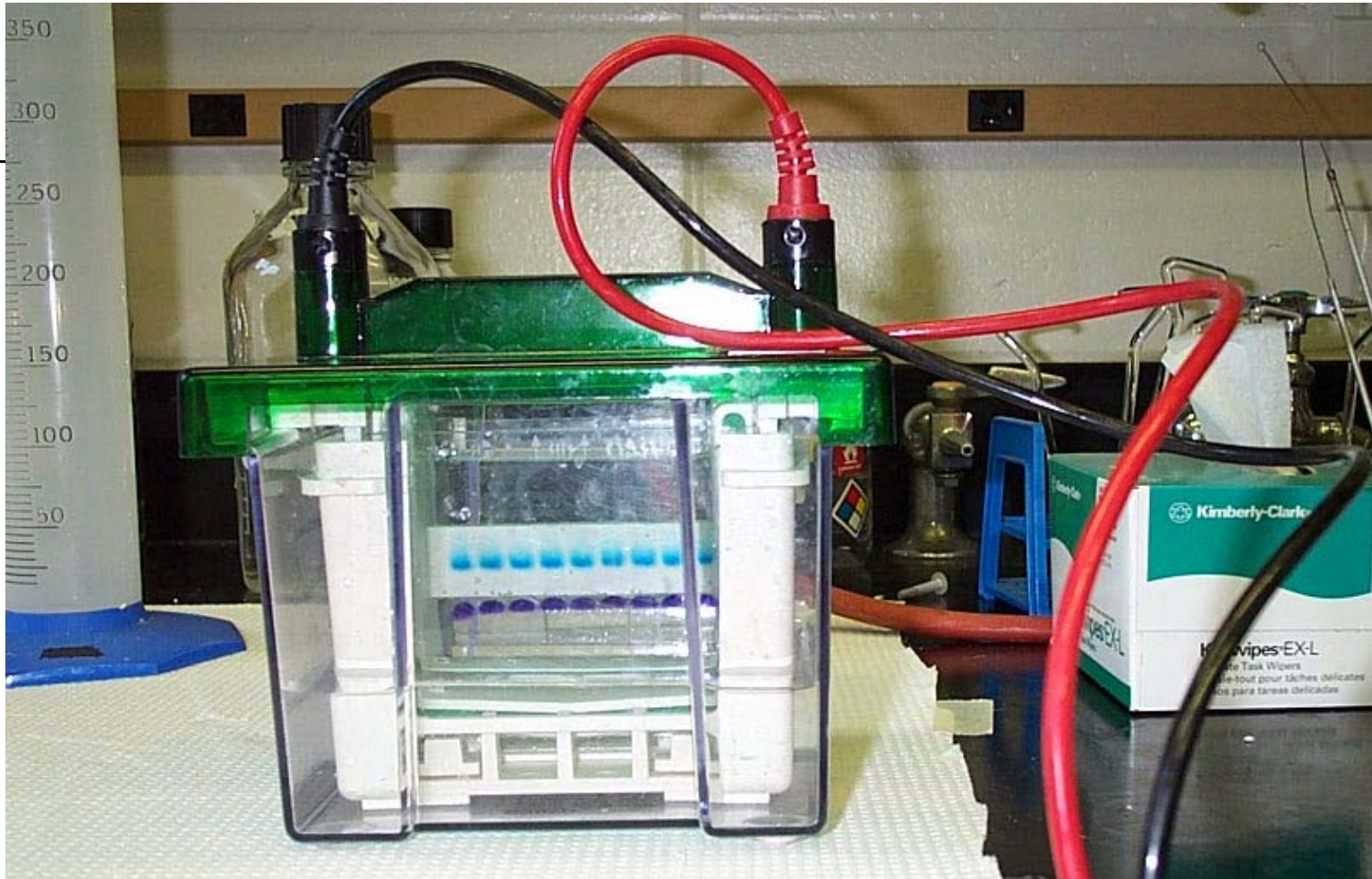
- Jel elektroforezi kullanılarak makromoleküllerin ayrılmasıdır

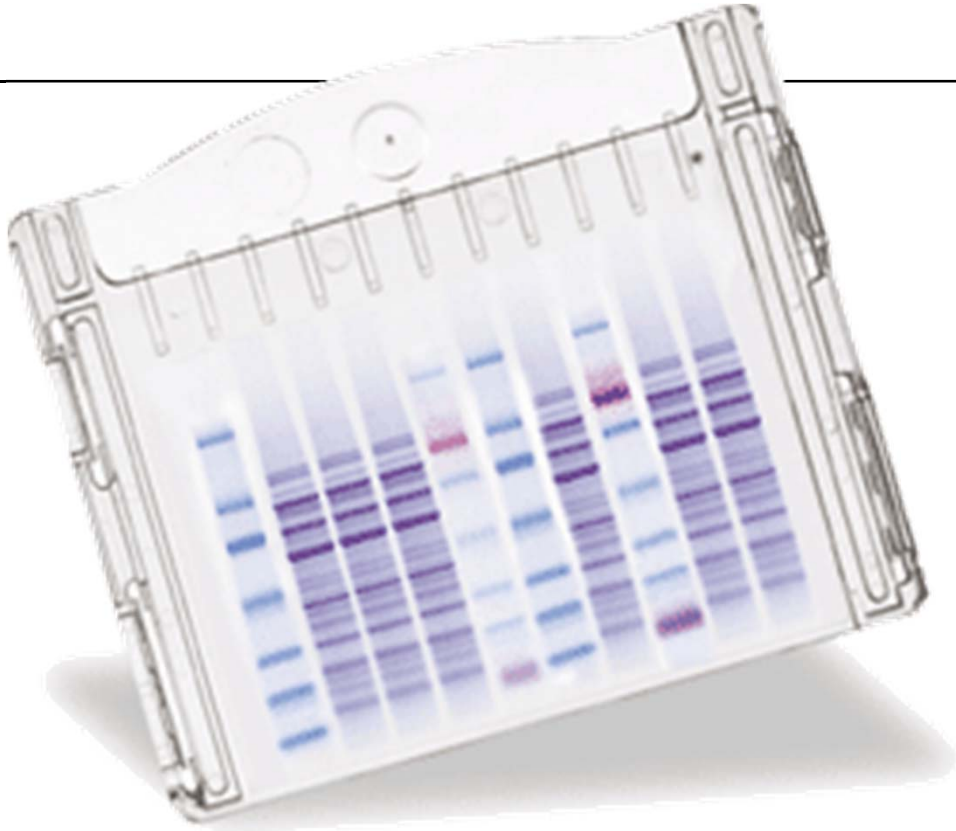
(Çözünmüş durumdaki moleküllerin elektrik yüklerinin kitlelerine oranıyla belirlenen hızlarda elektriksel alanda göç etmeleri prensibine dayanır)













İkinci basamak

- Ayrılmış moleküllerin ikinci bir matrikse (genelde nitroselüloz ya da polivinilidin difluorid-PVDF membrana) transferi ya da blotlanmasıdır



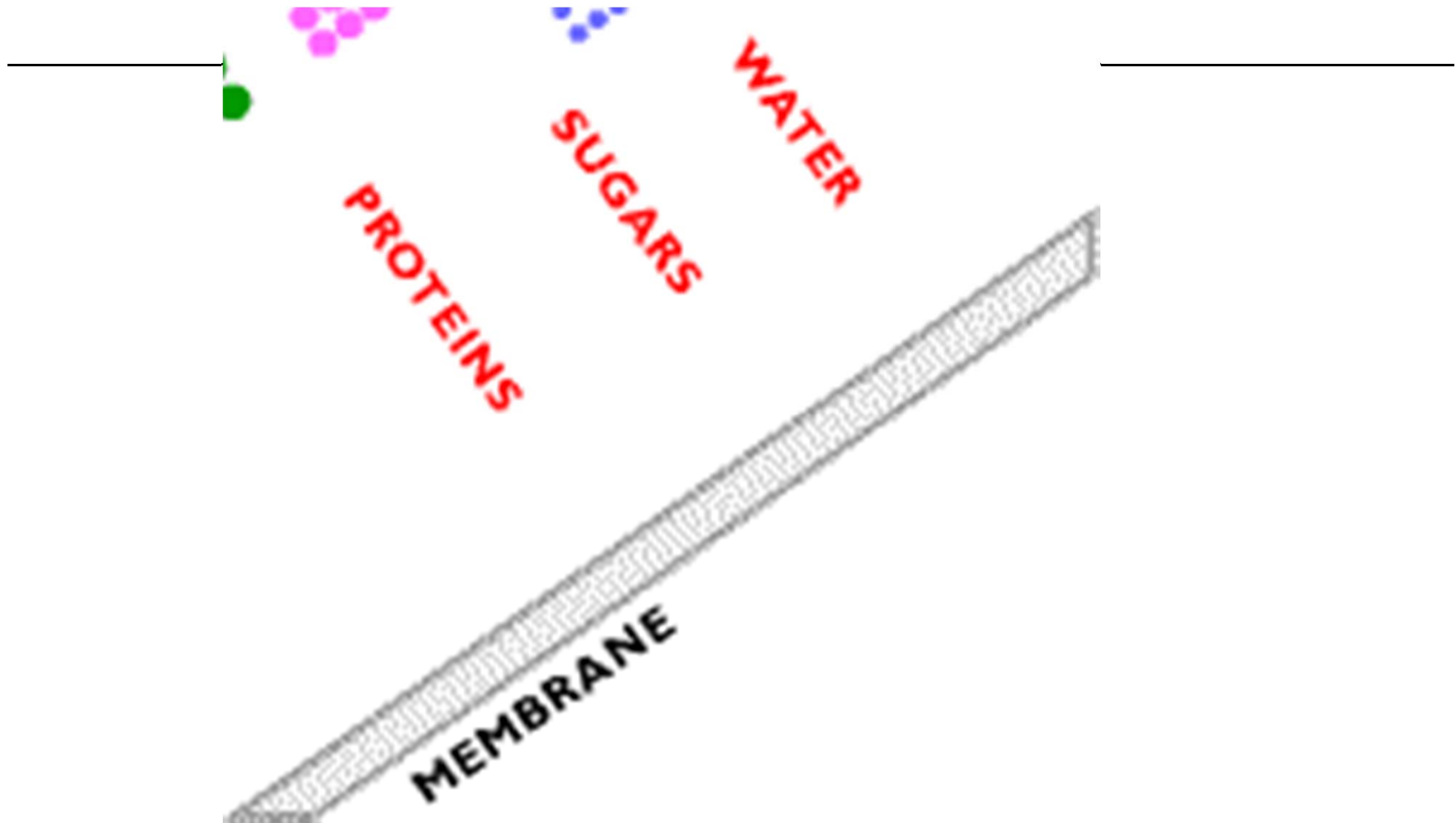
Proteinin Membrana Transferi

- Jelden matrikse elektroforetik transfer (blotting) protein içeren poliakrilamid jel ile nitroselüloz ya da protein bağlayıcı başka bir desteğe direkt teması ve sandwich modeli şeklinde gerçekleşir
- DNA, RNA, veya protein membrana sequence-bağımsız olarak yapışır.




Membran filtreler

- Çok küçük gözenekleri olan polimer yapıdaki filtrelerdir.
 1. Eylemsiz (inert)
 2. Saf selüloz esterleri



Ultrafiltrasyon

- Moleküller boyut, biçim ve yüklerine göre ayrılabilir.
- Por çapları 1-20nm arasındadır.
- Kullanılacak zarın por çapı çalışılan molekülün geçmesine izin vermeyecek şekilde olmalıdır.
- **NMWC** (Nominal Molecular Weight Cut Off) değeri zardan geçemeyen molekülün ağırlığına eşdeğerdir.

- 
-
- Bu amaçla kullanılan filtreler genelde iki tabakalıdır. Birinci tabaka selüloz asetat, naylon veya polivinilidinden yapılmış zar, ikinci tabaka daha kalın inert destek tabanıdır.
 - Selüloz nitrat ve polivinilidin florid filtreleri özellikle protein ve nükleik asit bağlama kapasitesine sahiptir.





Nitroselüloz membran

- Protein blottingi için en popüler matrikslerden biridir
- Çoğu protein 0.45 μm pore büyüklüğüne sahip membran kullanılarak başarıyla blotlanabilir
- Düşük molekül ağırlıklı proteinler ya da peptidler için 0.2 μm pore büyüklüğü tavsiye edilir



PVDF Membran

- PVDF membranların por büyüklükleri 0.2 ya da 0.45 μm
- Bu membranlar proteinler ve nükleik asitler için yüksek bağlanma afinitesine sahiptir ve Western, Southern, Northern ve dot blot çalışmaları için uygundur



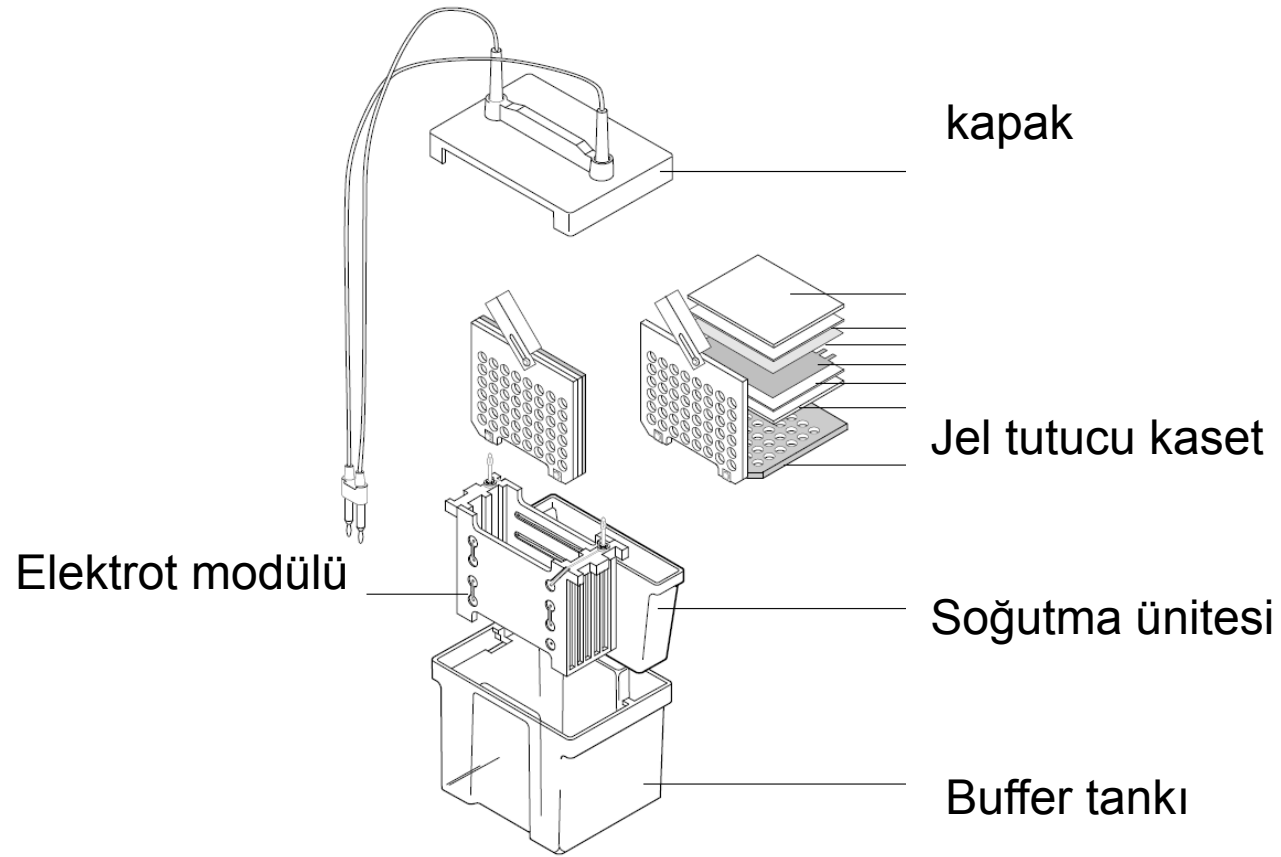


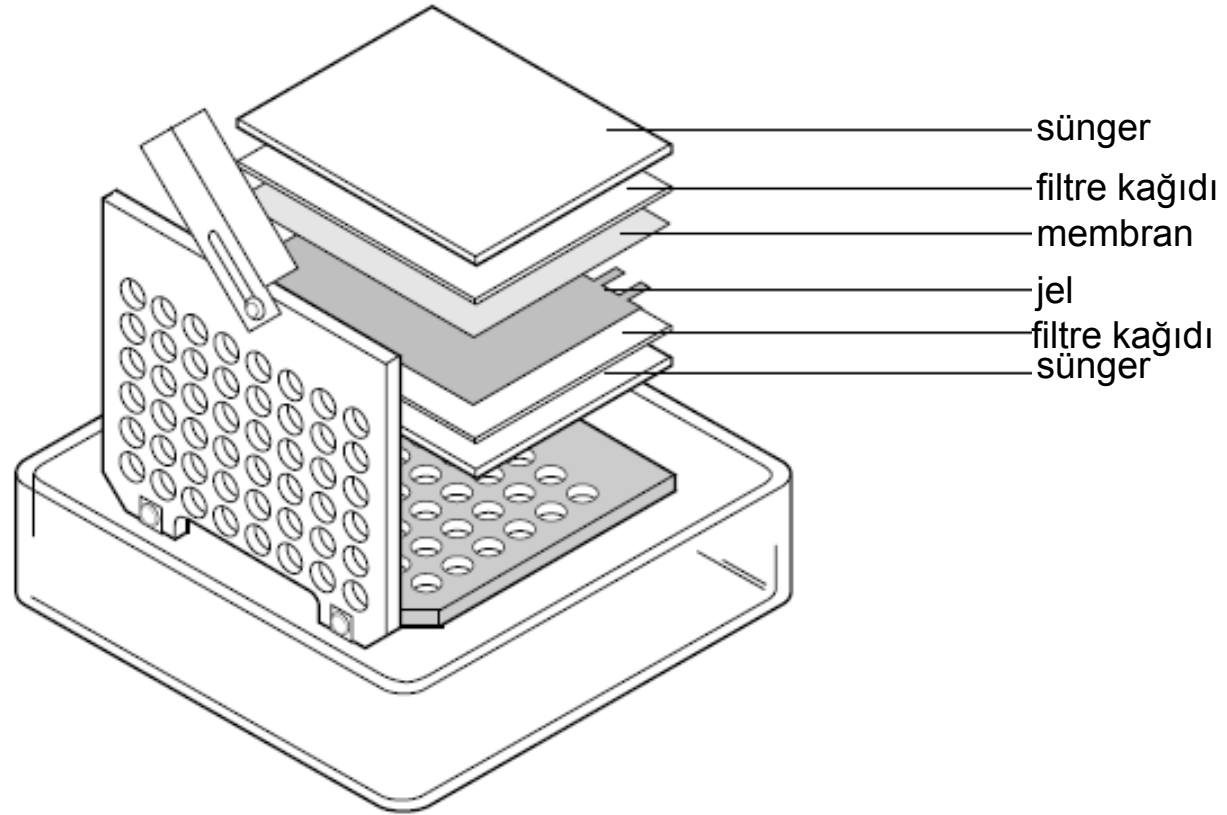
Filtre kağıdı

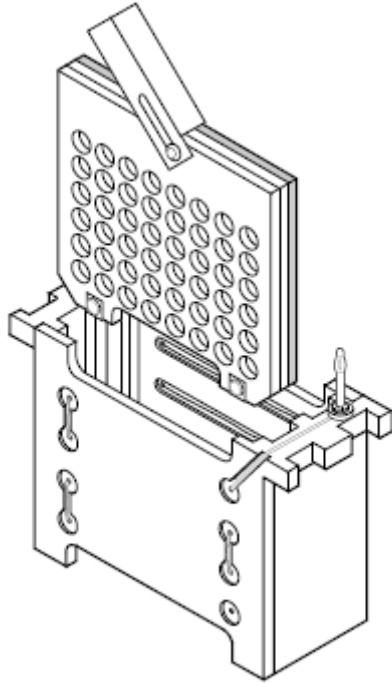
- Elektroforez jelinden membrana proteinlerin hızlı ve etkili transferi için kullanılır
- Protein içeren poliakrilamid jel membran ile filtre kağıdı arasında direkt temasta olacak şekilde yerleştirilir ve en dışta sünger destekler kalır.

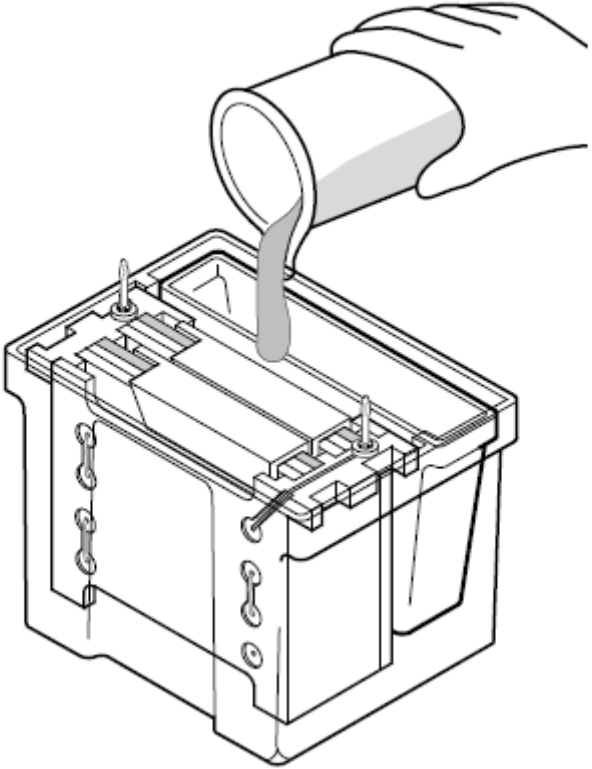
Blotting Ünitesi

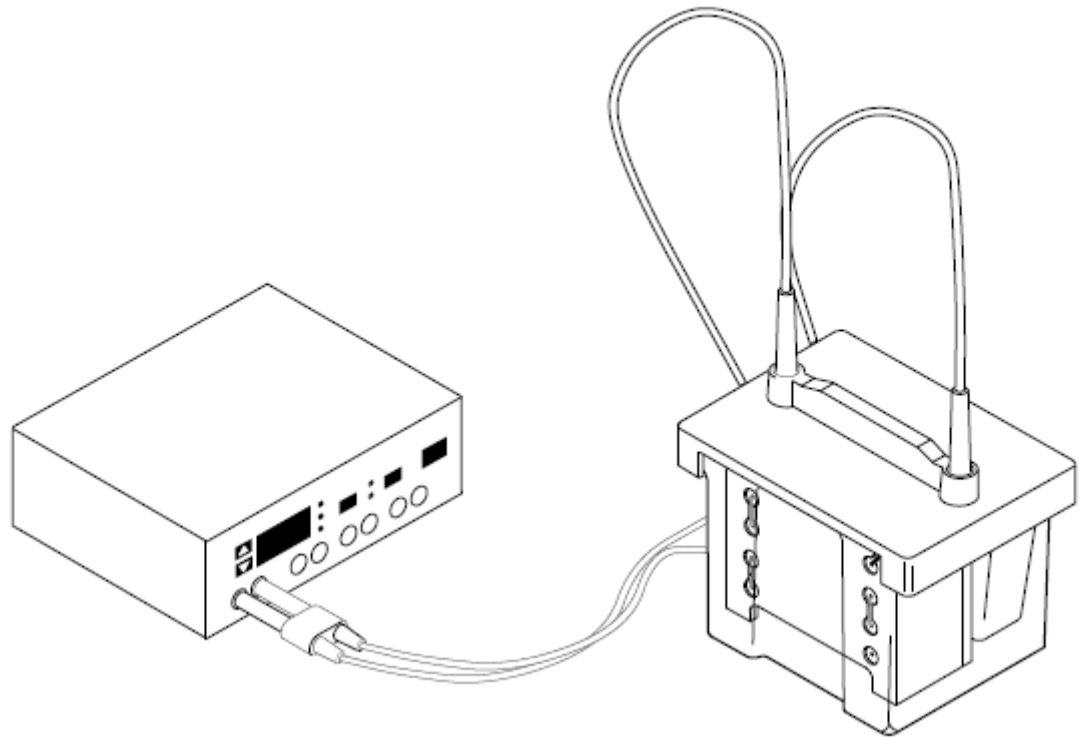







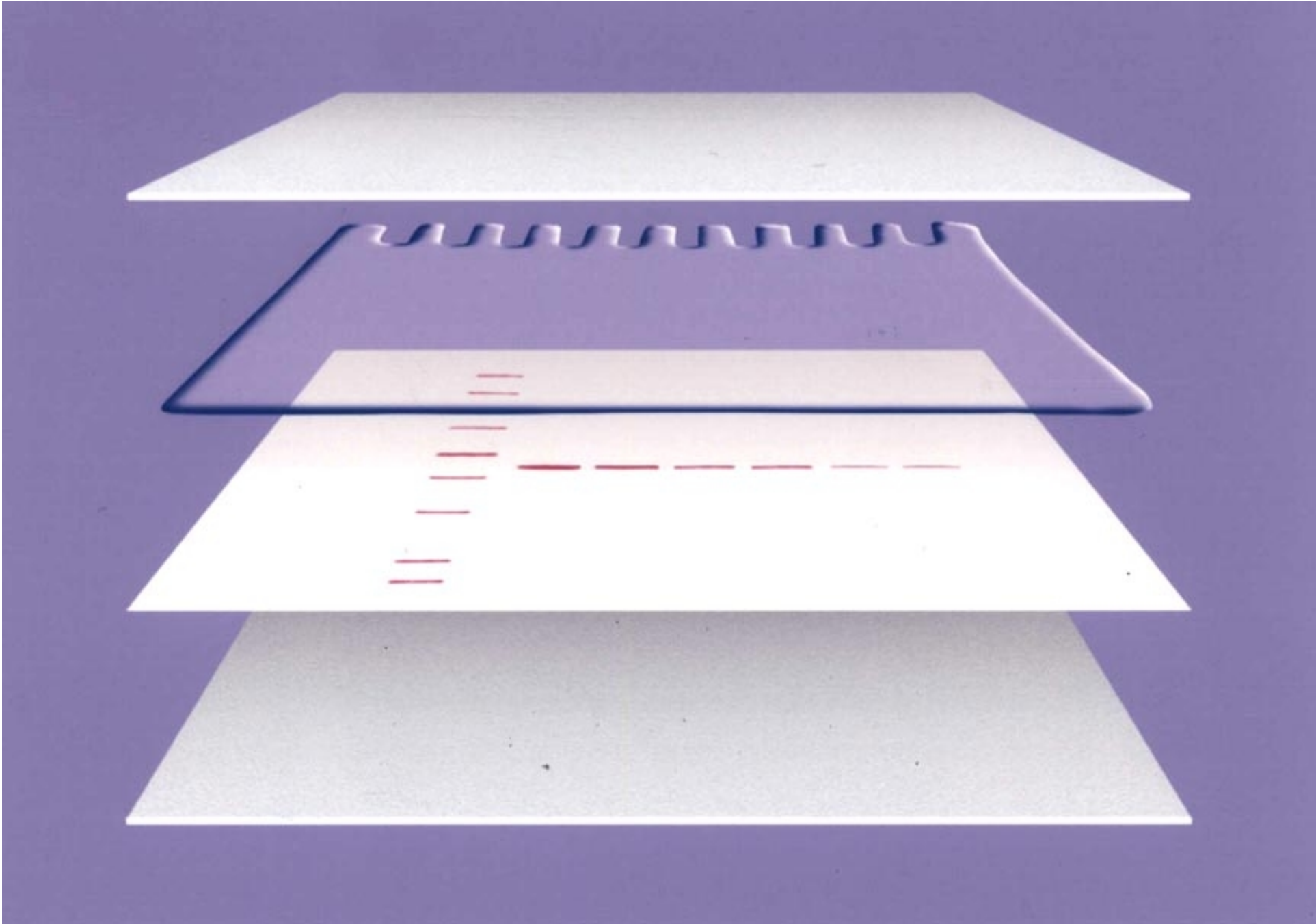







- 
-
- Elektrik uygulandığında proteinler poliakrilamid jelden sıkıca bağlandıkları membran yüzeyine hareket ederler

 - Membranda jeldeki protein paterninin aynen kopyası olur



- 
-
- Transfer etkinliği proteinin jelden migrasyon yeteneği, membrana bağlanma özelliği, jel ve membranın komplet teması, elektrotların pozisyonu, transfer süresi, proteinlerin büyüklüğü, alan direnci ve deterjanların varlığına bağlıdır
 - Optimal transfer düşük-iyon dirençli bufferlar ve düşük elektrik direncinde olur

Üçüncü basamak-Bloklama

- Membran üzerindeki nonspesifik bağlanma bölgelerinin bloke edilmesi gerekmektedir
- Bu amaçla süt veya normal serum kullanılabilir
- Hangi bloklama ajanının kullanılacağı antijen ve enzim konjugata bağlıdır
- Alkalin fosfataz kullanıldığında buffer olarak tris-buffered salin seçilmelidir



Bloklama

- Süt değişen oranlarda biotin içerdiğinden avidin-biotin sisteminde bloklama amaçlı süt kullanılmaz
- Her sistem için optimal tek bir bloklama ajanı yok.



Dördüncü basamak

- Primer ve sekonder antikor ile reaksiyon
- Transfer edilmiş protein enzim-işaretli antikor ile kompleks oluşturur
- Enzim için uygun substrat eklenir, böylece membran üzerinde kromojenik ya da fluorojenik presipitat oluşur





Primer ve Sekonder Antikorlar

- Primer antikor seçimi tanınacak antijene bağlıdır
- Poliklonal antikorlar daha ucuz, üretimi kolay, antijen için yüksek afiniteye sahiptir
- Monoklonal antikorlar yüksek spesifite ve saflığa sahiptir

Membranın yıkanması


- Bağlanmamış ajanların elimine edilmesi için gerekli bir basamaktır
- Yetersiz yıkama yüksek zemin etkisine, çok yıkama ise antikor veya antijenin blottan kaybına neden olabilir
- Yıkama için TBS ya da PBS bufferları, sıklıkla %0.05 Tween 20 gibi bir deterjan eklenerek kullanılır

- 
-
- Sekonder antikörün seçimi primer antikörün geliştirildiği canlıya bağlıdır
 - Optimal dilüsyon denenerek saptanır

- 
-
- Biotin, fluoresan, rodamin, horseradish peroksidaz, alkalen fosfataz işaretleyicileri kullanılabilir

Kromojenik Substratlar

- Seçilecek olan substrat istenen sensitivite, tanıma metodu, sinyalin şekline ve kullanılan enzim işaretleyicisine göre değişiklik gösterir
- Basit ve etkili bir yol
- Bu substratlar uygun enzim ile biraraya geldiğinde membran üzerinde çözünmeyen renkli presipitatlar oluşturur ve ek görüntülemeye ihtiyaç duymazlar

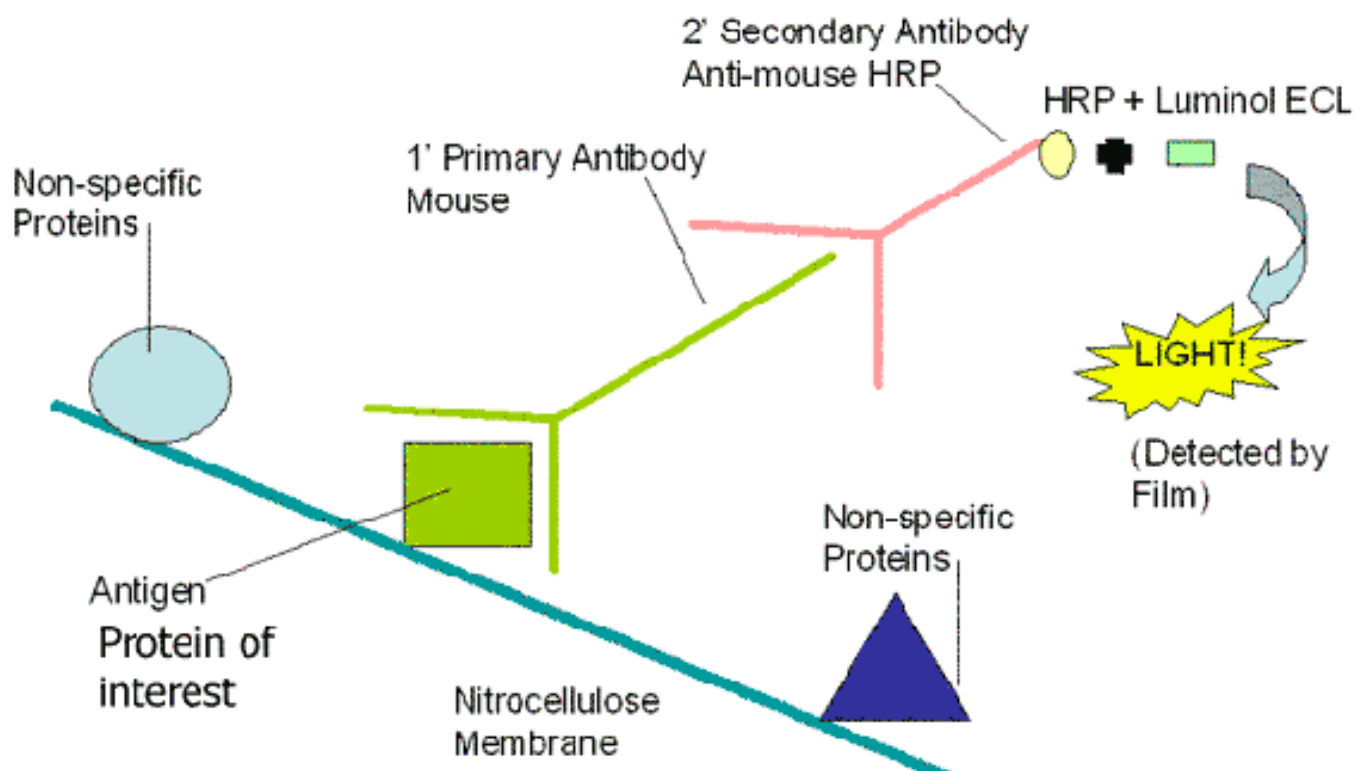
- 
-
- TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin), 4-CN (4-kloro-1-naftol) ve DAB (3,3',-diaminobenzidintetrahidroklorid) HRP ile NBT (nitro-blue tetrazolium klorid) ve BCIP (5-bromo-4-kloro-3'indolilfosfat p-toluidin tuzu) ise AP ile kullanılabilecek kromojenik substratlardır

- 
-
- HRP ile yapılacak kolorimetrik deteksiyon için substrata peroksid eklenmelidir



Kemiluminesan Substratlar

- Kemiluminesan substrat kullanımını en duyarlı saptama metodudur
- Enzim ile kombine olduğunda kimyasal reaksiyon ışık verir
- Film banyosu sonrası siyah renkte spotlar (bant) izlenir



Avantajları

- En iyi imaj yakalanana kadar film süresi denenebilir
- Tüm blot “stripping” buffer ile uzaklaştırılabilir, aynı membrana başka problara reaksiyona izin verir
- Herşeyden önemlisi herhangi bir deteksiyon yönteminden daha fazla sensitiviteye sahiptir

Olası Aksaklıklar ve Nedenleri-1

- Uniform olarak dağılmış yüksek zemin etkisi
 1. Yüksek antikor konsantrasyonları
 2. Yetersiz veya uygunsuz blokaj
 3. Yetersiz yıkama
 4. Film süresinin uzun olması
 5. Membranın kurumması

Olası Aksaklıklar ve Nedenleri-2

- Leke şeklinde yüksek zemin etkisi
 1. Yüksek antikor konsantrasyonları
 2. HRP da agregat formasyonu
 3. Yanlış bloklama bufferınının kullanımı
 4. Membranın uygun olmayan ıslaklığı

Olası Aksaklıklar ve Nedenleri-3

- *Zayıf sinyal veya sinyalin yokluğu*
 1. Proteinlerin membrana başarısız transferi
 2. Membrana yetersiz bağlanma
 3. Yetersiz antikor miktarı
 4. Yetersiz antijen miktarı
 5. Bloklama bufferının antijeni baskılaması
 6. Koruyucu olarak azidin kullanılması (HRP inhibe olur)
 7. İnkübasyon sürelerinin ve film süresinin kısa olması



Olası Aksaklıklar ve Nedenleri-4

- Nonspesifik veya diffüz bantlar
 1. Yüksek antikor konsantrasyonları
 2. Jele çok fazla protein yüklenmesi

- Siyah bölgeler
 1. Jelden inkomplet transfer (transfer sırasında jel ve membran arasında hava kalmamalı)

