

HAFTA XIV

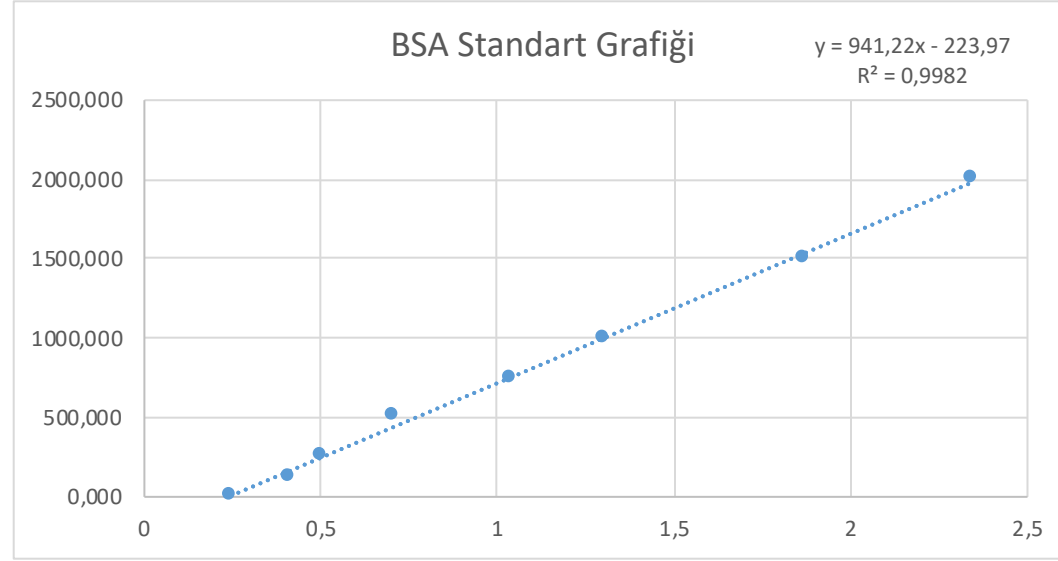
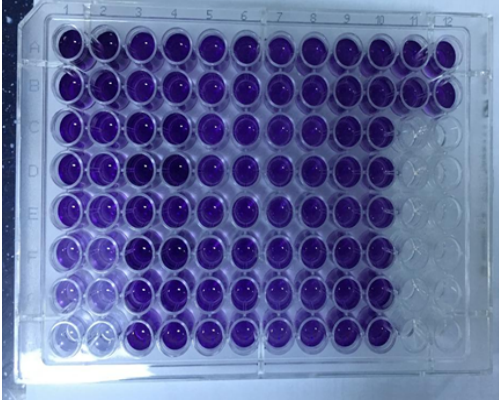
Susturulmuş Örneklerin Western Blotlama ile Doğrulanması

Hücre Lizatlarının Hazırlanışı

- Hücrelerin üzerindeki besiyerleri toplanır ve hücreler ılık PBS ile yıkanır.
- Ardından PBS çekilip hücreler platelerin içerisinde -80°C 'de dondurulur.
- -80°C ' den buz üzerine çıkarılan hücrelerin üzerine $500\ \mu\text{l}$ soğutulmuş ve proteaz inhibitörü ilave edilmiş RIPA tamponu eklenir.
- Hücre kaldırıcı (scraper) ile hücreler kaldırılır.
- Ultra sonikatör yardımıyla hücreler iyice parçalanır.
- Santrifüjün ardından süpernatant temiz bir tüpe alınır.



Toplam Protein Tayini (BCA yöntemi ile)

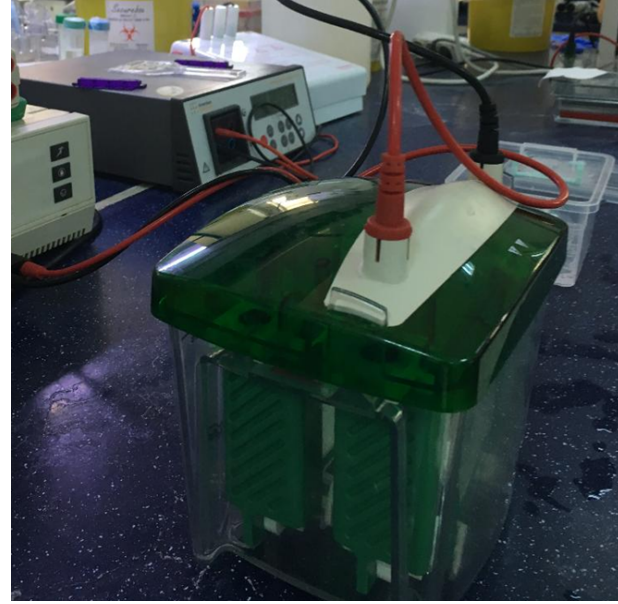


			Ortalama Absorbans	Standartlar(µg/ml)
2,365	2,386	2,326	2,345118	2000,000
1,881	1,873	1,852	1,866694	1500,000
1,310	1,313	1,295	1,302521	1000,000
1,026	1,065	1,048	1,037186	750,000
0,653	0,759	0,761	0,706786	500,000
0,502	0,505	0,495	0,498342	250,000
0,399	0,391	0,420	0,409466	125,000
0,246	0,250	0,244	0,24502	0,000

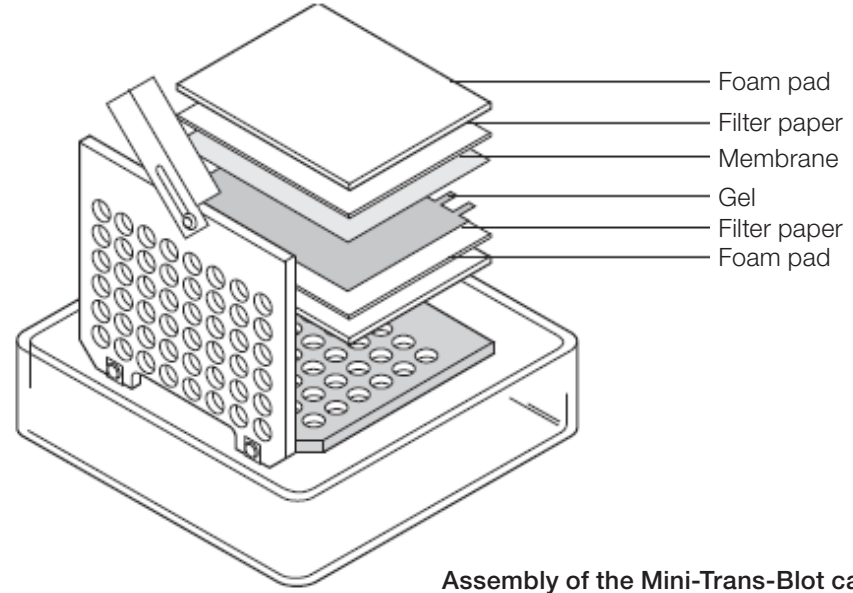
Her örnekteki toplam protein miktarı BCA yöntemiyle hesaplanır.

Western Blot

- Hücree lizatları yükleme boyası ile kaynatılır.
- Her kuyucuđa 10 μg toplam protein gelecek şekilde kuyucuklara uygun miktarda örnek yüklenir.
- Hücree lizatları gradiyent SDS poliakrilamid jelde yürütülür.
- %5 BSA ile membran 1 gece bloklanır.
- Primer antikor ve sekonder antikor inkübasyonları yapılır.
- Membranın üzeri bir miktar ECL ile kaplanıp LI-COR Fc Odyssey cihazında kemilüminesans ışımaya ile görüntü alınmıştır.

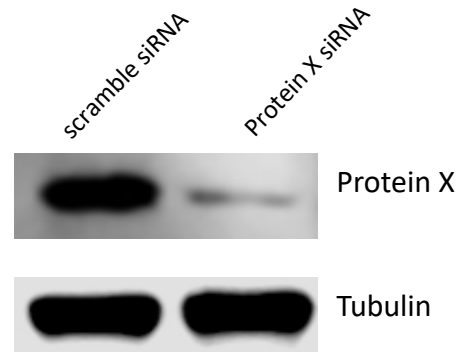


PVDF mebrana ıslak transfer sistemi aracılığıyla aktarılır.



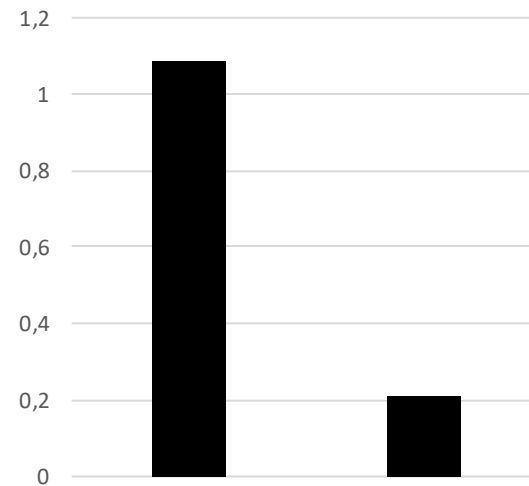
Assembly of the Mini-Trans-Blot cassette.

HEK-293 Hücrelerinde Protein X'in siRNA Aracılığıyla İfadesinin Azaltılması



HEK-293

Protein X



Western Blot Sonucundaki Protein Bant Profillerinin Image J programı ile Analizi

- Western blot sonucu görüntülenen proteinlerin bant kalınlıkları Image J programı aracılığıyla değerlendirilmiş ve sayısal değerlere dönüştürülmüştür.
- Bütün protein bantları aktin veya tübülün ile normalize edilmiştir.

