

# Protein izolasyonu, Miktar Tayini ve Western blot yöntemi

1. Protein izolasyon yöntemi
2. Bradford yöntemi
3. Western blot yöntemi



# PROTEİN İZOLASYONU

- **HÜCRE DEN PROTEİN İZOLASYONU**

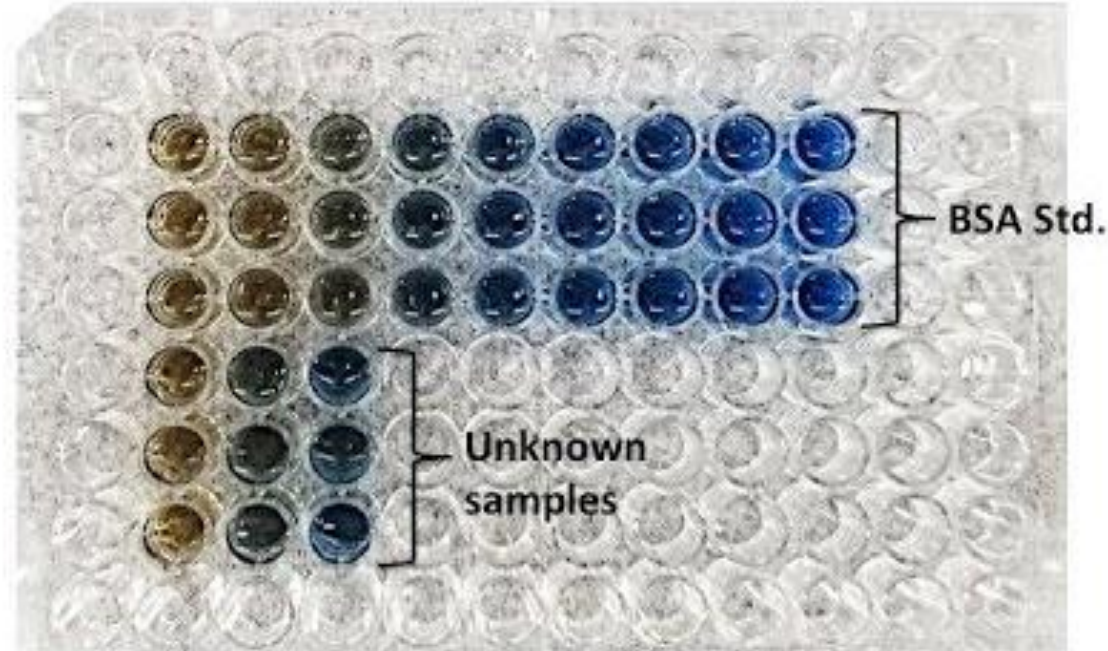
- 6'lık well plate' e 1.000.000 hücre (3.000.000'a kadar ekim yapabilirsin) ekimi yapıyorsun.
- 24 h sonra madde uyguluyorsun
- 48. h'de besiyerini çek at
- Bu aşamadan sonra **malzemeler ve örnekler hep buza saplı olsun.**
- Scraper ile kazı, lizati ependorf tüpe al (pastör pipetle çek)
- 300 g'de 5 dk santrifüj yap (santrifüj soğuk olsun)
- Süspansiyonu at, pellet dipte
- Yaklaşık 750 µl soğuk PBS ekle
- Vorteksle
- 300 g'de 5 dk santrifüj yap
- Supernatant'ı at
- Pellet üzerine 200-250-300 µl aralığında 1X cell lysis buffer+proteaz+fosfataz inhibitörü ekli çözeltiden ekle
- Pipetleme yap
- Buza sapla 30 dk
- Arada çıkarıp vorteksle
- 4°C' de 14000 g'de 10 dk santrifüj yap
- Supernatantı al kaldır.

## Proteinlerin belirlenmesinde ve miktar tayinlerinde kullanılan başlıca yöntemler

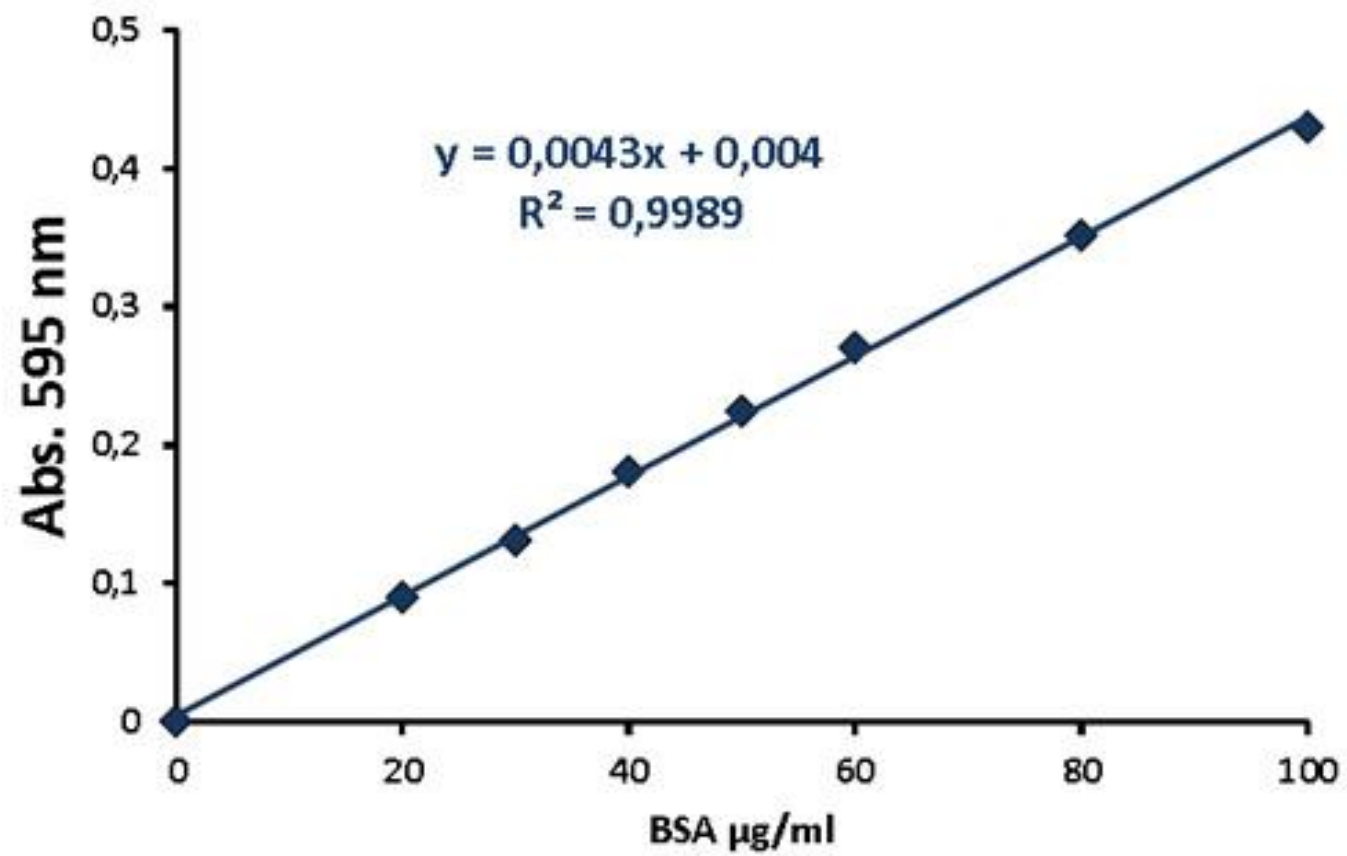
<b>Yöntem</b>	<b>Hassasiyet</b>	<b>Etki tarzı</b>	<b>Avantajları</b>	<b>Dezavantajları</b>
<b>280 nm'de absorbans (UV)</b>	0.02-3.0 mg/ml	Aromatik amino asitlerin R gruplarının 280 nm'deki absorbansına dayanır.	Kolay, hızlı, numuneye zarar vermediğinden, numune azalmaz.	Hassasiyeti düşük, değişik proteinlerin aynı konsantrasyonu farklı absorbans değerleri verir.
<b>205 nm'de absorbans (uzak UV)</b>	1.0-100µg/ml	Peptid bağları bu dalga boyunda absorpsiyon verir.	Kolay, hızlı, numuneye zarar vermediğinden, numune azalmaz.	Bütün UV-VİS spektrofotometreler bu dalga boyunda ölçemez, tamponlar da bu dalga boyunda absorbans verebilir.
<b>Ninhidrin</b>	20-50 µg	Proteinler d. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ile 100°C'de inkübe edilerek hidroliz edilir. Amino asitlerin ninhidrin ile verdikleri pembe renk 570 nm'de absorpsiyon gösterir.	Hassas, diğer aromatik bileşikler reaksiyona girmez.	Hidroliz süresi uzun ve derişik asid kullanılması tehlikeli
<b>Bisinkonik asid</b>	20-100µg/ml	Bakır ayırıcı, protein tarafından indirgenğinde bisinkonik asid ile reaksiyona girer ve 562 nm'de absorpsiyon gösteren bir bileşik verir.	Hassas ve kolay, diğer bileşikler reaksiyona girmez	Pahalı. Koşullar değiştirilirse farklı sonuçlar elde edilebilir.
<b>Biuret</b>	1-10 mg/ml	Bakır ayırıcının proteinlerle verdiği menekşe renkli bileşik 550 nm'de absorbans gösterir.	Ucuz ve kolay. Diğer bileşikler reaksiyona girmez.	Hassasiyeti düşük.
<b>Bradford</b>	150-750µg/ml	Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması esasına dayanır. Maksimum absorbans 595 nm.	Kolay ve hızlı, orta derecede hassas.	Alkali pH'taki tamponlar deneye etki eder.
<b>Lowry</b>	30-150µg/ml	Bakır/fosfomolibdik/fosfotungstik asid ayırıcı proteinle etkileşerek 750 nm'de absorbans gösteren bir bileşik verir.	Hassas.	Ayırıcıların hazırlanması uzun süreli ve biraz uğraşmalı.
<b>Gümüşle boyama</b>	150 ng-20µg/ml	Gümüş iyonlarının proteinlere bağlanması esasına dayanır.	Çok hassas.	Kelatlayıcı ajanlar, deterjanlar ve indirgen maddeler reaksiyona etki edebilir.

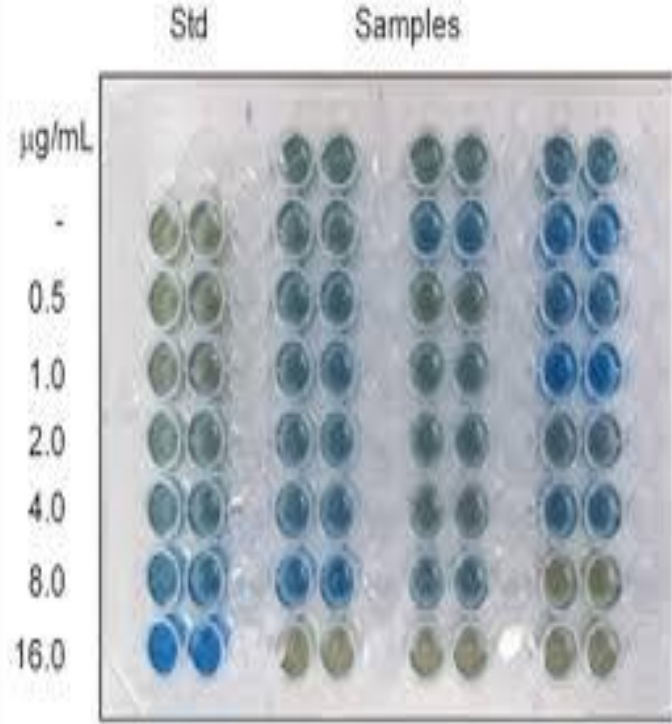
## Bradford yöntemi ile protein miktar tayini

- -20°C de tutulan proteinler buzun üstüne alınarak proteinlerin erimeleri sağlanır.
- Protein örneğinden 5 µl protein bir kuyucuğa eklenir. Her bir örnek için 3 tekrar yapılır.



- Protein içeren kuyuların her birine 245  $\mu$ l Bradford eklenir. (Bradford solüsyonu +4°C de alüminyum folyo ile sarılı olarak bulunmaktadır. Bradford solüsyonu kullanılmadan önce çok köpürtmeden birkaç kez çalkalanmalıdır.)
- Kontrol olarak bir kuyucuğa 5  $\mu$ l üreli lizis buffer eklenir ve üzerine 245  $\mu$ l Bradford eklenir.
- 595 nm'de plate okuyucu ile ölçüm alınır. (Infinite M Plex from Tecan plate okuyucu cihazı ile ölçüm alınır.)





32 : X ✓ fx =STDSAPMA(D2,E2)/F2\*100

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
	Bradford Standartları (µg/ml)	OD Değeri 1. Tekrar	OD Değeri 2. Tekr	OD Değeri 3. Tekrar	Ortalama	Cv Değeri								
	100	0,69572	0,81853	0,82045	0,819492271	0,168081415								
	50	0,59711	0,61280	0,64688	0,629840948	3,825518509								
	25	0,55848	0,55418	0,53988	0,556321868	1,789158315								
	10	0,50216	0,48165	0,48443	0,483040725	2,302835838								
	5	0,47609	0,48032	0,47145	0,473771952	0,936808015								
Lizis buffer	0	0,39719	0,44055	0,44414	0,418888052	6,239304309								
Örnek	1	1,25649	1,25644	1,28276	1,256463192	1,208173401								
Örnek	2	1,35529	1,34918	1,33948	1,35223315	0,589377191								
Örnek	3	1,29976	1,33421	1,29738	1,298574692	1,588847684								
Örnek	4	1,15452	1,16547	1,14894	1,151732626	0,729847368								
Örnek	5	1,41491	1,35957	1,40854	1,411722922	2,14487211								

$y = 0,0038x + 0,4433$   
 $R^2 = 0,9897$

— Seri 1  
— Doğrusal (Seri 1)

$y = mx + n$

	m	n
Örnek Ortalama OD Değeri	Grafiğin Eğimi	x Bilinmeyen Konsantrasyon Değeri
1	0,000379811	2141,013537
2	0,000379811	2393,164957
3	0,000379811	2251,888331
4	0,000379811	1865,269855
5	0,000379811	2549,794787

Dilüsyon	Son Konstrasyon Birim
1	2141,013537 µg/ml
1	2393,164957 µg/ml
1	2251,888331 µg/ml
1	1865,269855 µg/ml
1	2549,794787 µg/ml