

SDS-PAGE ile Protein Ayrımı

Resolving Jel (%12)	
% 30 Acrylamide/bis	6 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	3.75 ml
10 % SDS	150 μ l
ddH ₂ O	5.03 ml
TEMED	7.5 μ l
10 % APS	75 μ l

Stacking Jel (%4)	
% 30 Acrylamide/bis	1.98 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	3.78 ml
10 % SDS	150 μ l
ddH ₂ O	9 ml
TEMED	15 μ l
10 % APS	75 μ l

1.5 M Tris-HCl pH 8.8 (150 ml)	<ul style="list-style-type: none">• 27.23 g Tris base (18.15 g/100 ml)• 80 ml ddH2O• 6 N HCl ile pH 8.8'e ayarlanır.• ddH2O eklenerek 150 ml'ye tamamlanır.	+4 °C'de saklanır.
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	<ul style="list-style-type: none">• 6.00 g Tris base• 60 ml ddH2O• 6 N HCl ile pH 6,87'ye ayarlanır.• ddH2O eklenerek 100 ml'ye tamamlanır.	+4 °C'de saklanır.
10% (w/v) SDS (100 ml)	<ul style="list-style-type: none">• 10.00 g SDS• 90 ml ddH2O• Yavaşça karıştırılır• ddH2O eklenerek 100 ml'ye tamamlanır.	Oda sıcaklığında saklanır.
10% (w/v) APS (TAZE HAZIRLANIR.)	<ul style="list-style-type: none">• 0.10 g Ammonium persulfate• 1 ml ddH2O	

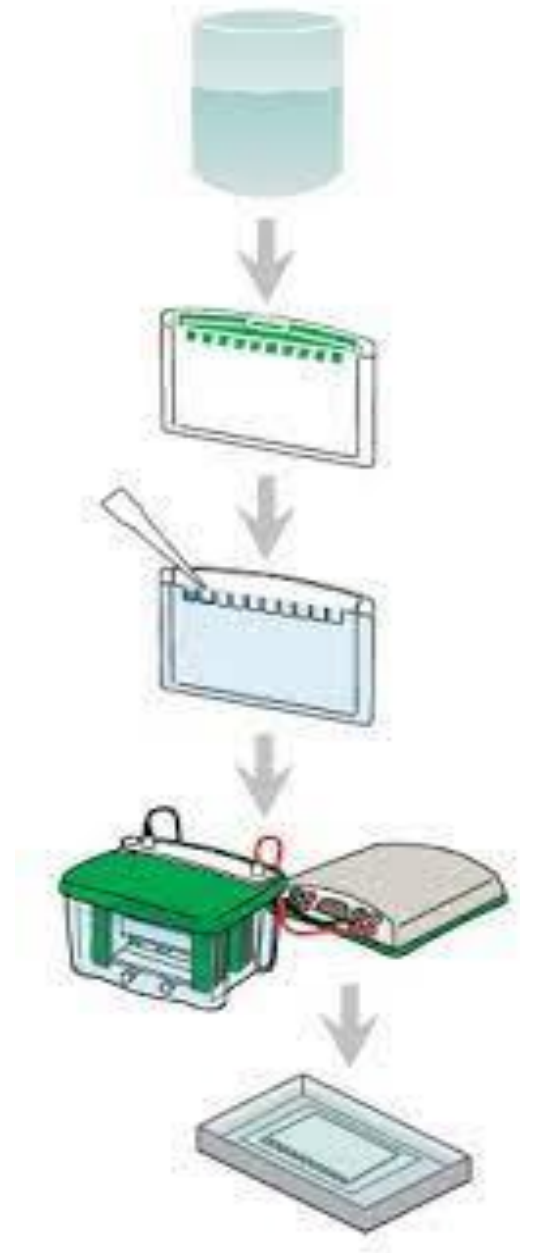
Jel Aparatının Hazırlanışı

- İnce cam ön tarafa gelecek şekilde kalın ve ince camlar üst üste yerleştirilir ve jel dökme aparatına konulur.
- Camları aparata taktıktan sonra iki cam arasında sızıntı olup olmadığı kontrol edilir.
- Sızdırmıyorsa aparatın özel tarağı iki cam arasına yerleştirilir ve taraktan 1 cm aşağısına çizik atılır.
- Bu çizik hizasına kadar resolving jel dökülür.



Jel Hazırlama

Genellikle proteinler 100 kDa'un üzerindeyse %8'lik, 40-100 kDa arasındaysa %10'luk ve 40 kDa'un altındaysa %12'lik jel hazırlanır. Proteinler büyüdükçe jel yüzdesi küçülür çünkü yüzdesi daha az olan jelde, por aralığı daha geniş olacağından büyük proteinler daha rahat hareket ederler.



Protein büyüklüğü (kDa)	Jel Yüzdesi (%)
4-40	20
12-45	15
10-70	12.5
15-100	10
25-200	8
400	

- Jel dökülürken iki katmanlı dökülür;
- Proteinlerin yürüdüğü kısım, running, resolving kısım.
- Tarakların olduğu kısım, stacking kısım.



Resolving (Running) Jel

- APS ependorf tüpte taze olarak hazırlanır.
- ddH₂O, % 30 Acrylamide/bis, 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 10 % SDS uygun miktarlarda 15 ml'lik falkon tüpe konulur.
- APS eklenir ve **en son olarak** TEMED eklenir.
- Falkon yavaşça alt üst edilir.
- Resolving jel hazır olduktan sonra jel aparatına dökülür. (TEMED eklenir eklenmez hazırlanan jel, jel aparatına vakit kaybetmeden dökülür aksi halde jel tüpte donar ve dökülmez.)
- 1 ml'lik pipetle yukarıdan aşağıya doğru ince-kalın cam arasına hazırlanan jel bırakılır.
- Jel döküldükten sonra dalgalanmalar oluşur. O dalgalanmaları ortadan kaldırmak için izopropanol alkol göz kararı jeli düzgün hale getirecek kadar pipetle gezdirilir.
- **Not:** Resolving jel üzerine ilave edilen alkol jele zarar vermeden peçeteyle emdirilir. Resolving jelin iyice donması beklenir (10-30 dk) ve resolving jel tamamen donduktan sonra artık stacking jel onun üzerine ilave edilebilir.

Stacking Jel

- ddH₂O, % 30 Acrylamide/bis, 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 10 % SDS uygun miktarlarda 15 ml'lik falkon tüpe konulur.
- APS eklenir ve **en son olarak** TEMED eklenir.
- Falkon yavaşça alt üst edilir.
- Donmuş olan resolving jelin üzerine stacking jeli hızlıca ince cama kadar olan hizaya kadar pipetle ilave edilerek tarak takılır.
- Donması beklenir.
- **Not:** Eğer jeller hemen kullanılmayacaksa, donan jeller şeffaf jel poşetlerinin içine konulup üzerine SDS Buffer eklendikten sonra +4 °C'de saklanabilir. 2. yöntem jellerden tarak çıkarılır ve her jel ayrı ayrı kağıt havlulara sarılır ve her şey dH₂O ile ıslatılır. Ardından jel plastik bir torba veya kutuya koyularak +4 °C'de saklanabilir.

- **Protein Örneklerinin SDS-PAGE'e Yüklenmesi**
- İlk önce elektroforez tankının içine Towbin Buffer (Transfer Tamponu) yarıya gelecek şekilde doldurulur. (SDS, deterjan olduğu için köpürür bu nedenle çok fazla sallamamaya özen gösterilir.)



10X Towbin Buffer (Transfer Tamponu) Stok Çözeltisi (1 litre) (pH 8.3)	<ul style="list-style-type: none">• 30.3 g Tris• 144 g Glisin• 20 ml %10 SDS• ddH2O eklenerek çözelti 1 litreye tamamlanır.	+4 °C'de saklanır.
1X Towbin Buffer (Transfer Tamponu) Çözeltisi (pH 8.3)	<ul style="list-style-type: none">• 100 ml 10X Towbin Buffer Stok çözeltisi• 200 ml %100 Metanol• 700 ml ddH2O ile 1X'e seyreltilir. <u>(Sandviç modelinde metanol protein geçişini zorlaştırabilir.)</u> <u>Bu yüzden 2. alternatif:</u>• 100 ml 10X Towbin Buffer Stok çözeltisi• 900 ml ddH2O	+4 °C'de saklanır.

- Hazırlanan jel tanka yerleştirilir.
- Jelde bulunan tarak dikkatlice çıkarılır.
- Kuyucukların içinde oluşabilen kristalleri ve hava kabarcıklarını ortadan kaldırmak için pipetaj yapılır böylece örnekler kuyucuğa rahatça yerleşir ve kolayca yürür.
- Marker ya da standart proteinler ilk kuyucuğa (3-5 μ l) yüklendikten sonra örnekler diğer kuyucuklara yüklenecektir.
- Jele ortalama 10-50 μ g arası protein yüklenir. Biz 10 μ g protein yüklüyoruz. Bradford ile miktar tayininde örneğin protein konsantrasyonumuz 653 μ g/ ml ise $M1 \times V1 = M2 \times V2$ hesabından
- 1 ml 653 μ g/ ml protein konsantrasyonumuz var ise
- x ml 'de 10 μ g protein konsantrasyonumuz olması gerekir
- x= 15 μ l örnekten çekilecek miktar olarak hesaplanır.
- Böylelikle jel kuyularına toplam 20 μ l yüklenmesi için 15 μ l protein örneği + 5 μ l yükleme tamponu olması gerekir.

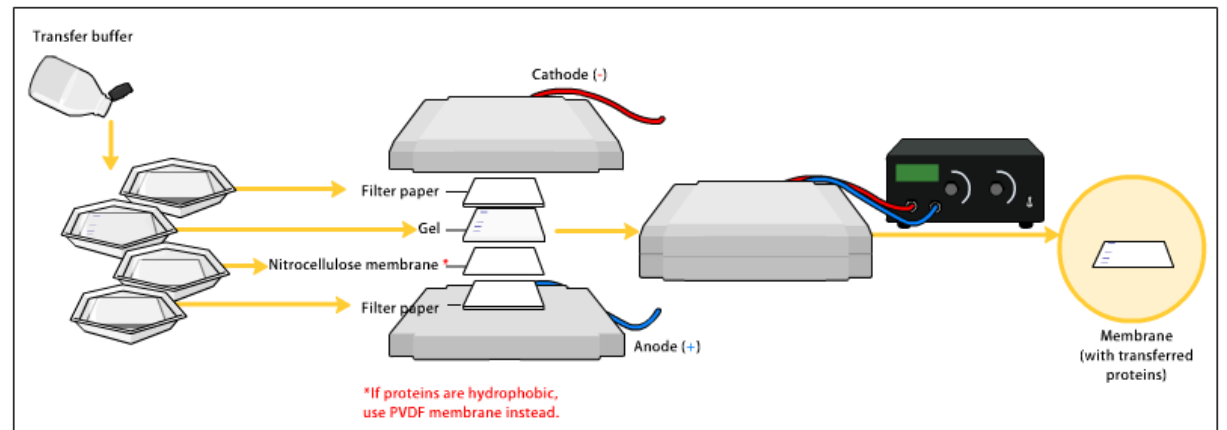
4X Örnek Tamponu (Loading sample Buffer) (10ml)	<ul style="list-style-type: none">● 2.5 ml 1 M Tris-HCl pH 6.8● 0.5 ml of ddH₂O● 1.0 g SDS● 0.8 ml 0.1% Bromophenol Blue● 4 ml 100% glycerol● 2 ml 14.3 M β-mercaptoethanol (100% stock)● ddH₂O eklenerek 10 ml'ye tamamlanır.	-20 °C'de saklanır.
---	---	---------------------

- Hazırlanan örnek ve yükleme tamponu karışımı ısı bloğunda 95 ° C'de 5 dk kaynatılır. (Kaynatma işlemi yapılmazsa proteinin jelde hareketi güçleşir. Kaynatma ile proteinler arasındaki bağlar kırılır ve protein denatüre olarak düz hale gelir. SDS sayesinde ise negatif yüklenir. Beta merkaptoetanolün görevi ise proteindeki disülfid bağlarını kırmaktır.)
- Örnekler SDS-PAGE'e yüklenir ve önce 30 dk 100 V'da, sonra 50 dk 120 V'da yürütülür.

Proteinin Jelden Membrana Transfer İşlemi

- PVDF membran jelin boyutuna uygun olarak (9x6 cm) kesilir ve 1 dk %100 metanolde uygun plastik kabın içerisinde çalkalayıcı ile çalkalanır. (Çalkalama aşaması için finepcr compact rocker cr 300 cihazını kullanıyoruz.)
- Membran daha sonra 1 dk Towbin Buffer (Transfer Tamponu) ile uygun plastik kabın içerisinde çalkalayıcıda muamele edilir.
- Transfer için jel tanktan çıkarılır ve jelin işe yaramayan kısmı özel kesme aparatı ile kesilerek atılır.
- Yarı kuru transfer yöntemi için; (Yarı kuru transfer yöntemini cleaver scientific- semi-dry blotter cihazını kullanarak yapıyoruz.)

- 3 adet filtre kağıdı Towbin Buffer ile ıslatılır ve semi dry blotter cihazına yerleştirilir.
- Üzerine ıslatılan membran konulur. (Membranın ön yüzüne işaret atılır. Jeldeki proteinlerin hangi yönde membrana aktarıldığını anlamak için de membran işaretlenir.)
- Jel membranın üzerine konulur.
- 3 adet filtre kağıdı Towbin Buffer ile ıslatılır ve jelin üzerine konulur.
- Membran ile jel arasında herhangi bir boşluk kalmaması için ufak rulo silindir ile üzerinden geçilir.
- 100 V'da 1 saat transfer işlemi gerçekleştirilir. (Biz transfer işlemi PowerPac Universal (500 V, 2.5 A, 500 W) güç kaynağı ile 1.15 saat, 0.12 A, 300 W olarak ayarlayarak gerçekleştirdik.)



Antikor İnkübasyonu

- Proteinlerin transfer olduğu membran %5 BSA'lı TBST içinde (bloklama tamponu) 1.5 oda sıcaklığında uygun plastik kabın içerisinde çalkalayıcıda çalkalanır. (İstenmeyen bağlanmaların önüne geçmek için bloklama yapılır. %5'lik yağsız süt sozu veya BSA kullanılır.)

Bloklama Tamponu
(pH =7.4)

- 2.4 g yağsız süt sozu veya BSA (zelti içinde %5 olacak Şekilde)
- TBST ile 50 ml'ye tamamlanır.

+4 °C'de saklanır.

- Bloklama tamponu dökülür.
- 2 ml Bloklama tamponunun içinde (%5 BSA'lı TBST) ilgilenilen proteine özgün 'birincil antikor' (2 µl) uygun oranda seyreltilerek karıştırılır ve 2ml'lik ependorf tüplere alınır. Membran poşetlenerek bir ucundan hazırlanmış olan çözeltinin tamamı eklenir ve poşet ağzı kapama makinesi ile poşetin ağzı kapatılır. Gece boyu +4 °C'de soğuk odada bulunan dönen disk sallayıcısında çalkalanır.
- **NOT:** Antikor bilgi notuna göre (data sheet) dilüsyon oranları değişebilir.
- **NOT:** Bir gece sonra antikor alınır kesinlikle atılmaz tekrar kullanılabilir. +4 °C'de tekrar 2ml'lik ependorf tüplerde saklanır.
-
- Membran 3 kere 10 dk 1X TBST ile uygun plastik kabın içerisinde çalkalayıcıda muamele edilerek yıkanır.

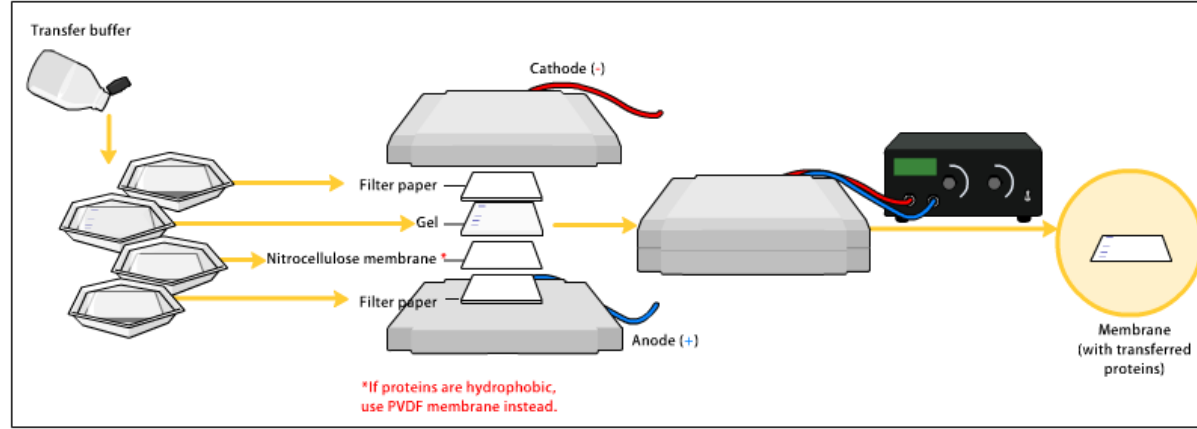
10X TBS Stok Çözeltisi (1 litre) (pH= 7.6)	<ul style="list-style-type: none">• 24.23 g Trizma-HCl• 80.06 g NaCl• ddH2O eklenerek çözelti 1 litreye tamamlanır	+4 °C'de saklanır.
TBST Çözeltisi	<ul style="list-style-type: none">• 10 ml 10X TBS stok çözeltisi• 89.95 ml ddH2O• 50 µl Tween 20(çözeltide son hacim oranı %0.05 olacak şekilde) ile 1X'e seyreltilir.	+4 °C'de saklanır.

- Membran bloklama tamponu içerisinde (%5 BSA'lı TBST) uygun oranda seyreltilerek hazırlanmış 'ikincil antikor' ile oda sıcaklığında 1 saat disk sallayıcısında çalkalanır. (1 μ l ikincil antikor+ 2000 μ l bloklama tamponu (%5 BSA'lı TBST). (ikincil antikor birincil antikor ne ise ona göre seçilir. Mouse-mouse, rabbit-rabbit, goat-goat.)
- Membran 3 kere 10 dk 1X TBST ile uygun plastik kabın içerisinde çalkalayıcı muamele edilerek yıkanır.

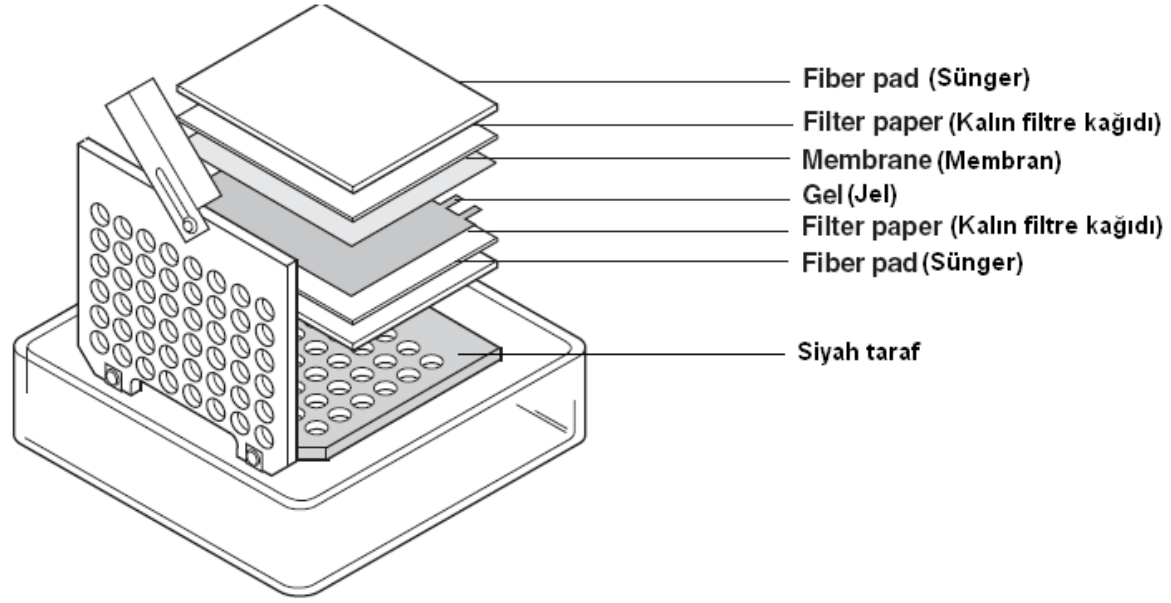
Görüntüleme

- **NOT:** Bundan sonraki aşama boya geliştirme işlemlerini içermektedir. Bu basamaklar kullanılan kite göre değişebilir. Bu nedenle kullanılan kitin kitapçığında yazan protokol dikkate alınmalıdır. Burada yazılan işlemler ThermoScientific firmasının #34095 katalog no.lu SuperSignal West Femto Maximum SensitivitySubstrate isimli kiti içindir. Kitin içinde SuperSignal West FemtoLuminol/Enhancer Solution (#1856189) ve SuperSignal West FemtoStablePeroxideBuffer (#1856190) reaktifleri mevcuttur.

- Yıkama işlemi sonrası membran görüntüleme tepsisine yerleştirilir.
- Kitin içindeki SuperSignal West FemtoLuminol/Enhancer Solution ve SuperSignal West FemtoStablePeroxide Solution reaktiflerinin 1:1 (200 µl) oranında karıştırılmasıyla “çalışma çözeltisi” elde edilir.
- Elde edilen çalışma çözeltisi görüntüleme tepsisinde bulunan membranın her yerini ıslatacak şekilde üzerine eklenir.
- 1-5 dk bekletildikten sonra LI-COR ODYSSEY görüntüleme cihazı ile görüntülenir. (Çalışma çözeltisi ışığa duyarlı olduğundan bu işlem karanlıkta gerçekleştirilmelidir.)
- Görüntüleme aşamasında Image Studio programı seçilir. Acquire seçeneğinden Chemi butonu ve 2 dk seçilir. Acquire Image’e tıklanarak bantların görüntüleri alınır.



Yarı-kuru emdirim yöntemiyle proteinlerin jelden membrana aktarılması (<http://protocolsonline.com/proteomics/western-blotting/>)



Şekil. Membran, jel ve filtre kağıdının sandviç yöntemiyle hazırlanması ve transfer aparatına yerleştirilmesi

KÜTLE SPEKTROMETRESİ

- MATRİKS DESTEKLİ LAZER DESORPSİYON/İYONLAŞMA KÜTLE SPEKTROMETRESİ (=MALDI MS)

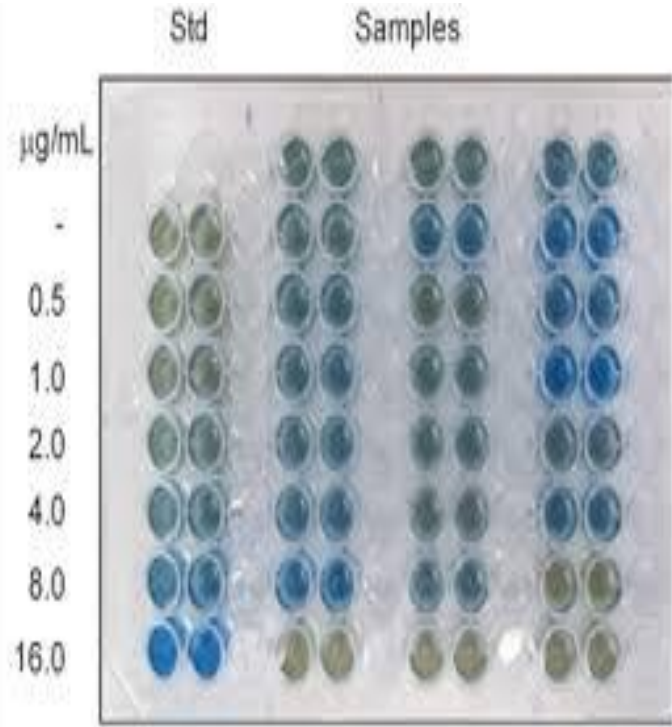
PROTEOMİK ÇALIŞMA BASAMAKLARI

1. Proteinlerin izolasyonu
2. Protein miktar tayini
3. Proteinlerin Ayrıştırılması (İki yönlü Jel Elektroforezi, kromatografik ayırım vb.)
4. Jellerin Boyanması
5. Boyanmış jellerin analizi
6. Protein kümelerinin (spotlarının) jel üzerinde alınması, tripsin ile kesilmesi ve bir kütle spektrofometresi ile kütlelerinin saptanması
7. Biyoinformatik ve protein tanımlanması



Bio-Rad Laboratories, Inc.
2006 and 2007 Award Winner
Best Image Analysis Systems

- Bu teknik sayesinde proteinler iki boyutlu olarak ayrılırlar: birinci boyut proteinleri bir pH gradienti boyunca izoelektrik noktalarına (pI) göre ayırırken, ikinci boyut SDS-PAGE ile moleküler boyutlarına göre ayırır.
- Bu iki tekniğin birleşmesiyle proteinler jel üzerinde bir nokta (spot) olacak şekilde haritalanırlar.
- Bu harita belli bir protein örneğinin parmak izi gibi düşünülebilir.
- Bir hücrenin farklı koşullarda veya safhalarında elde edilen bunun gibi iki parmak izi karşılaştırılarak ifadesi artan ve azalan proteinler ya da var iken yok olan, yok iken var olan proteinler tespit edilebilir.
- Böylece hücrenin o safhasında önem kazanan proteinler belirlenebilir ve metabolik yolların açıklanması mümkün olabilir



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								

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

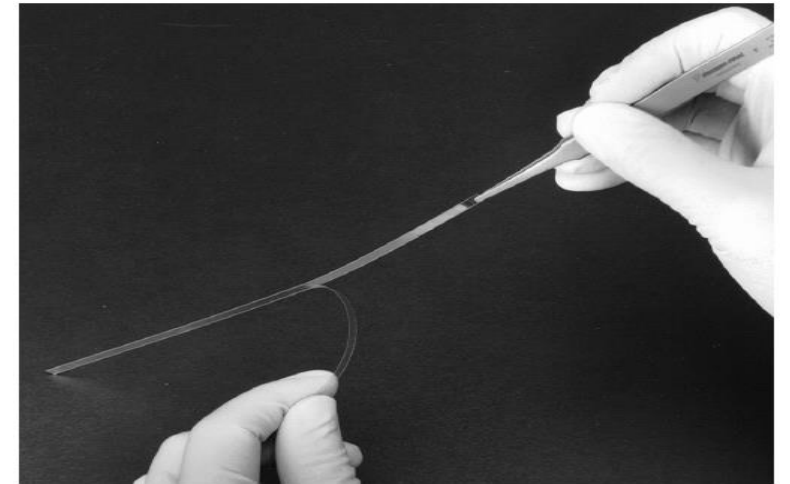
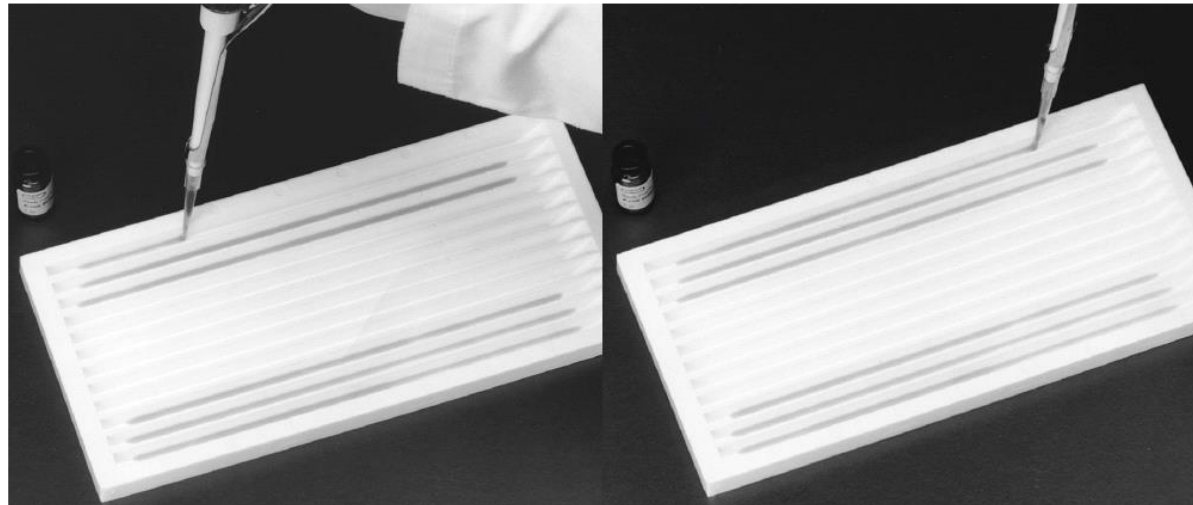
— Seri 1
— Doğrusal (Seri 1)

$y = mx + n$

	Örnek Ortalama OD Değeri	Grafiğin Eğimi	x Bilinmeyen Konsantrasyon Değeri	Dilüsyon	Son Konstrasyon Birim
1	1,256463192	0,000379811	2141,013537	0,443282057	1 2141,013537 µg/ml
2	1,35223315	0,000379811	2393,164957	0,443282057	1 2393,164957 µg/ml
3	1,298574692	0,000379811	2251,888331	0,443282057	1 2251,888331 µg/ml
4	1,151732626	0,000379811	1865,269855	0,443282057	1 1865,269855 µg/ml
5	1,411722922	0,000379811	2549,794787	0,443282057	1 2549,794787 µg/ml

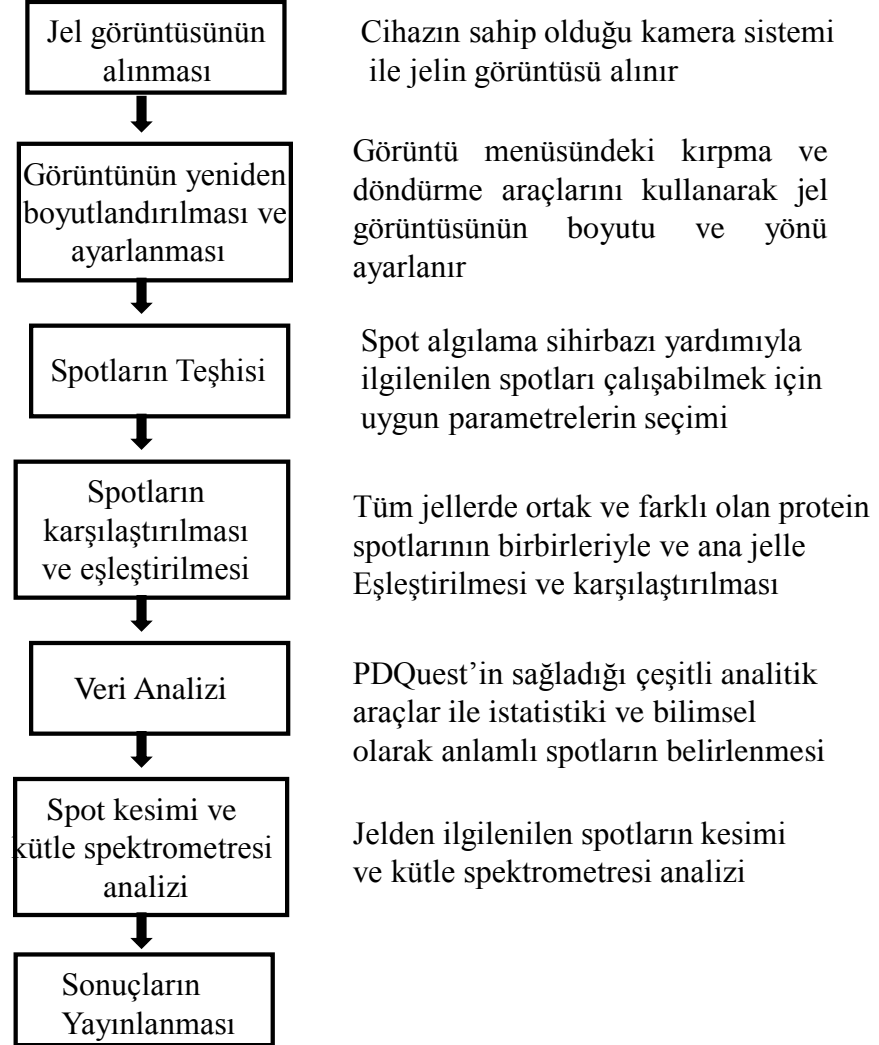
Table. Guidelines for sample loading on IPG strips.

	IPG Strip Length				
	7 cm	11 cm	17 cm	18 cm	24 cm
Rehydration volume per strip	125 μ l	185 μ l	300 μ l	315 μ l	410 μ l
Protein load					
Silver stain	5–20 μ g	20–50 μ g	50–80 μ g	50–80 μ g	80–150 μ g
Coomassie G-250	50–100 μ g	100–200 μ g	200–400 μ g	200–400 μ g	400–800 μ g

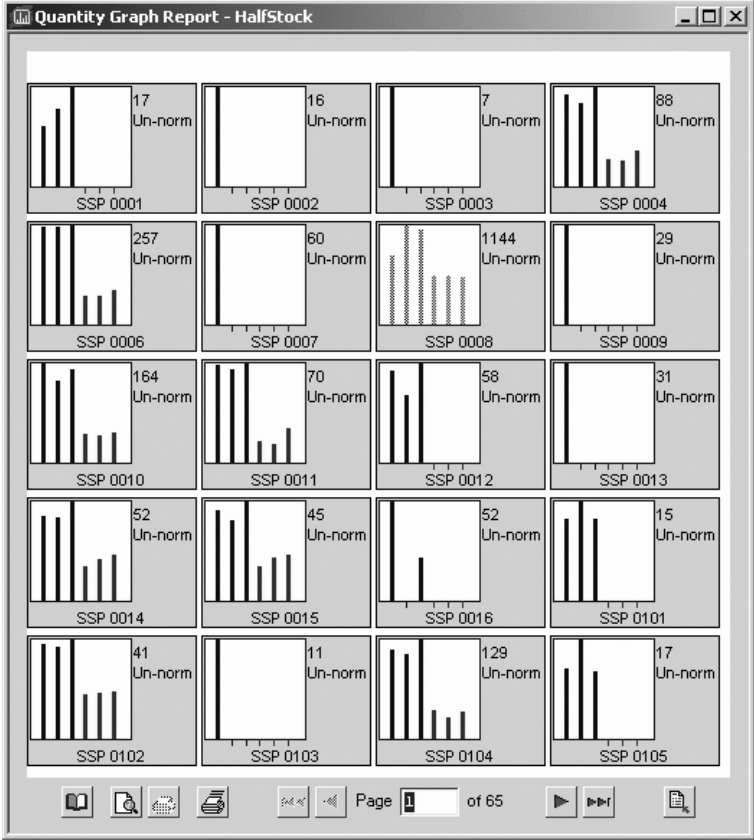
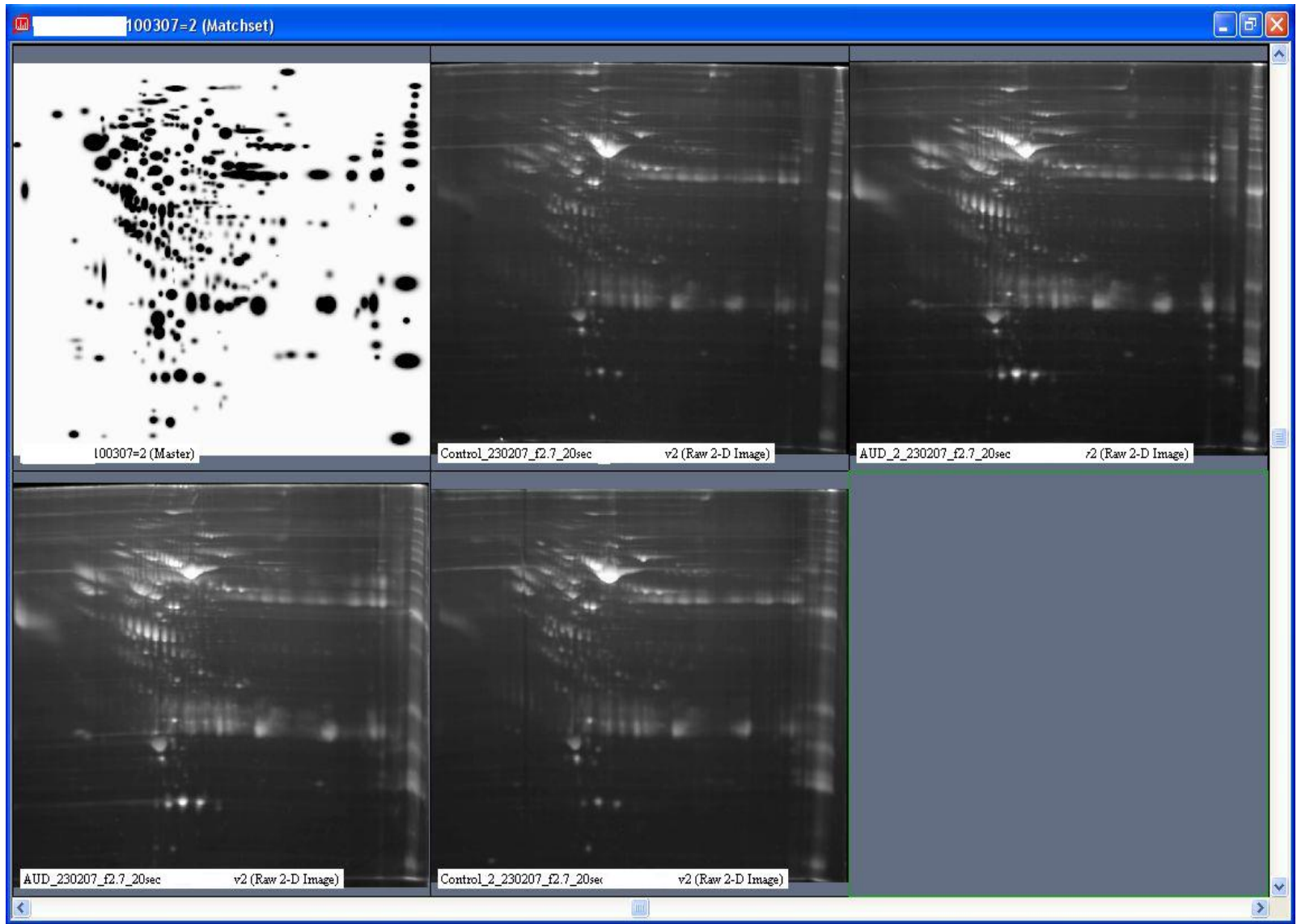


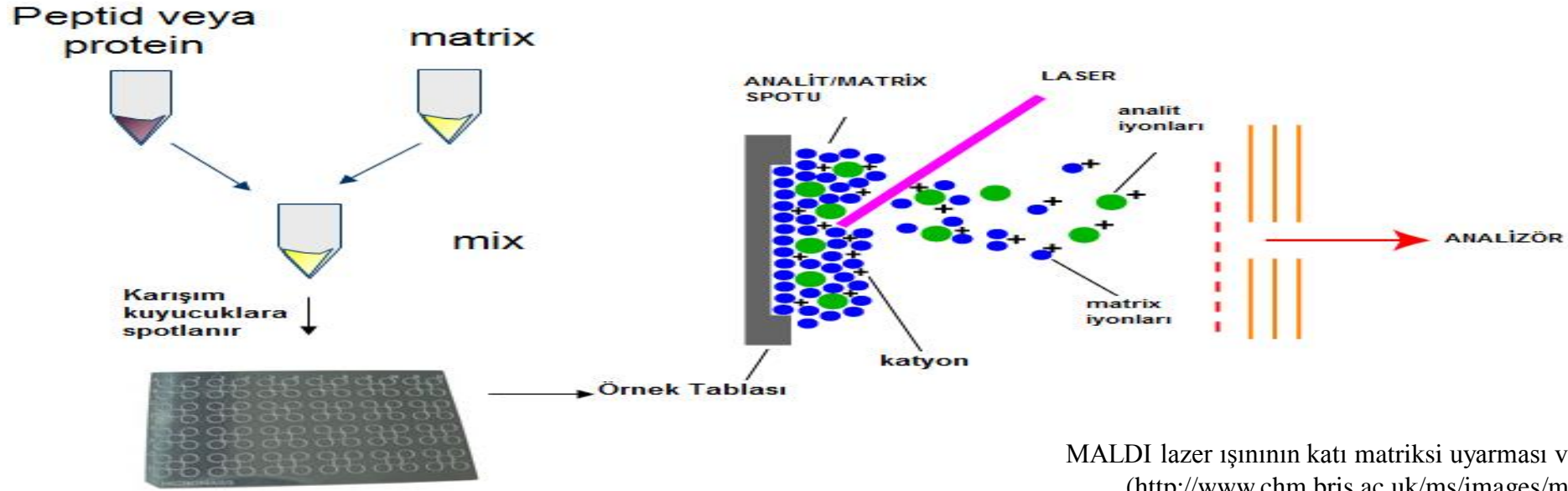


Bio-Rad Laboratories, Inc.
2006 and 2007 Award Winner
Best Image Analysis Systems

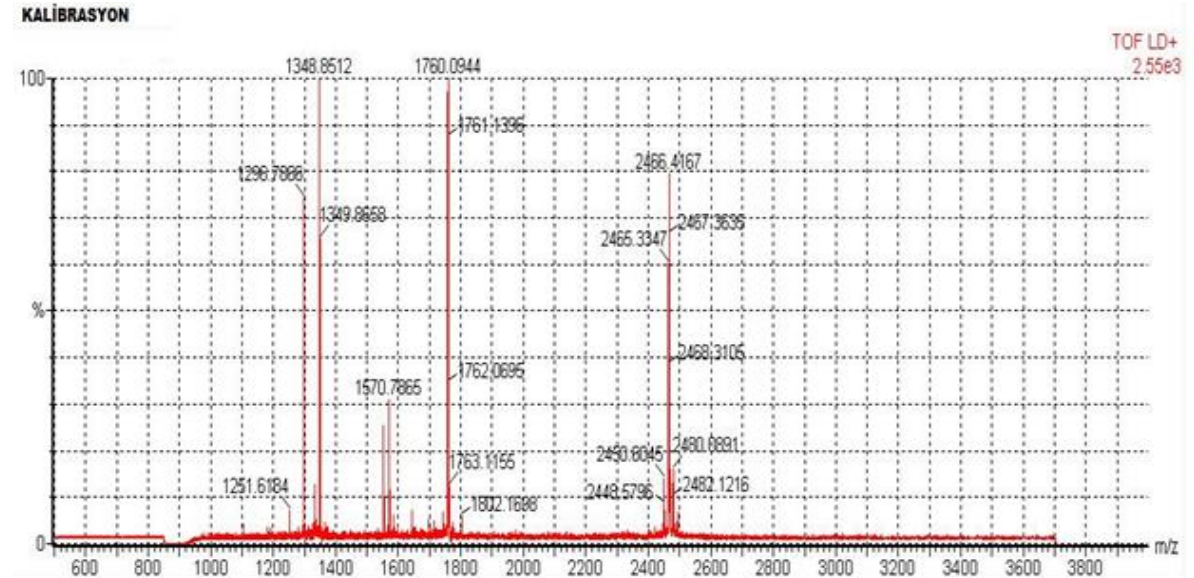


PDQuest çalışma basamakları akış şeması





MALDI lazer ışınının katı matriksi uyarması ve analitleri iyonize etmesi
<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/images/maldi-mechanism.gif>



MALDI-TOF kalibrasyon spektrumu