

İleri Araştırma Yöntemleri

56901007

2020-21 bahar


Dr. Günseli Çubukçuođlu Deniz



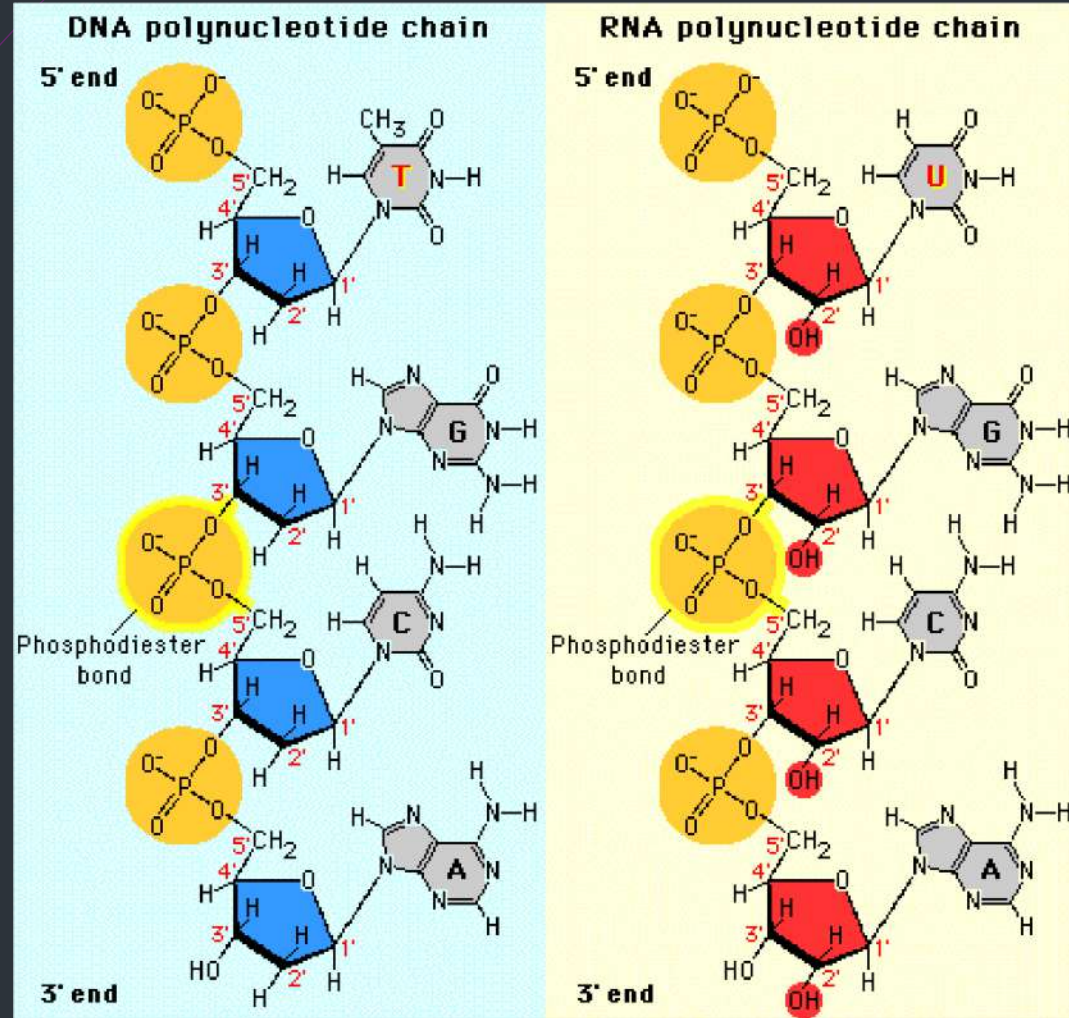
HİBRİDİZASYONA DAYALI YÖNTEMLER

(SOUTHERN BLOTLAMA, NORTHERN BLOTLAMA)

ders 10

- 
- Nükleik asitlerin komplementerliğe dayalı hibridizasyonuyla spesifik dizilerin varlığının araştırıldığı yöntemler
 - DNA-DNA, DNA-RNA, RNA-RNA hibridizasyonu ve denatürasyonunu temel alan teknikler geliştirilmiştir.
 - Southern blotlama, Northern blotlama, floresan *in situ* hibridizasyon (FISH), dot blotlama

DNA ve RNA Kimyası



Riboz halkalarını bağlayan fosfat köprüleri

DNA ipliklerini birarada tutan Hidrojen bağları

Chargaff kuralı

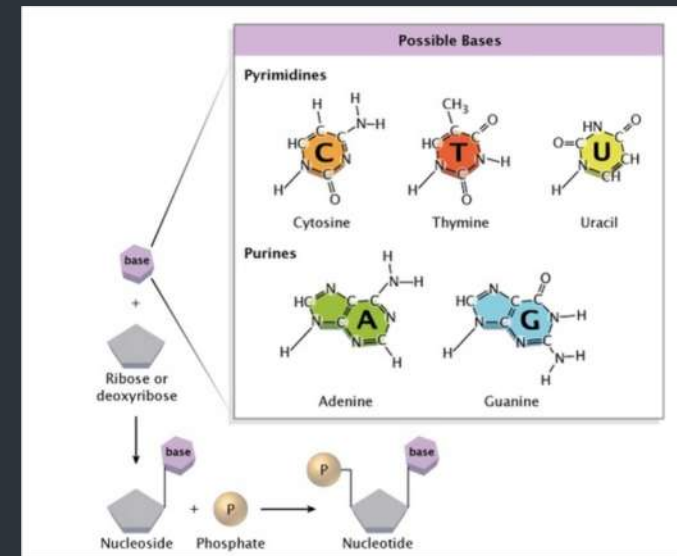
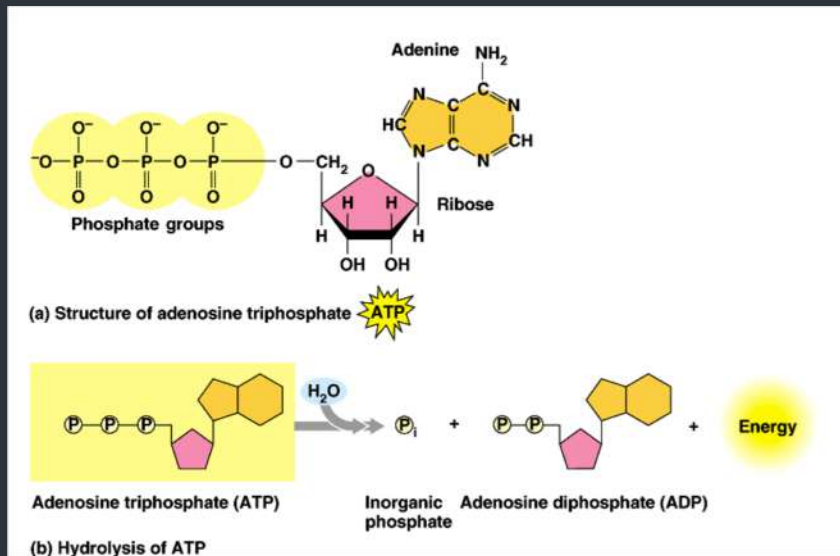
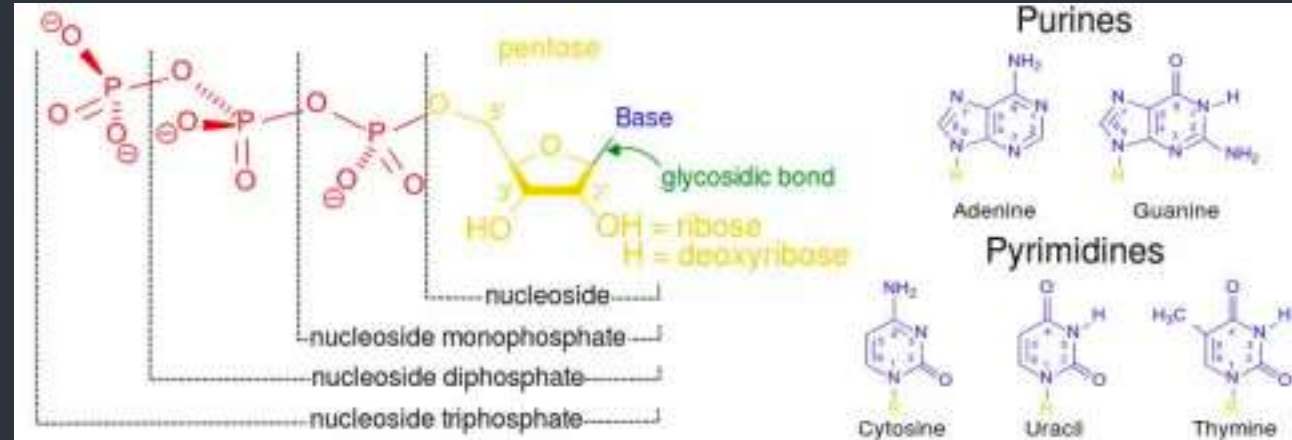
DNA çift heliksi antiparalel

Hidrofobik bazlar içerde

5' ve 3' uçlarda iki fosfodiester bağı

DNA ve RNA 3D konformasyonları birbirinden çok farklıdır

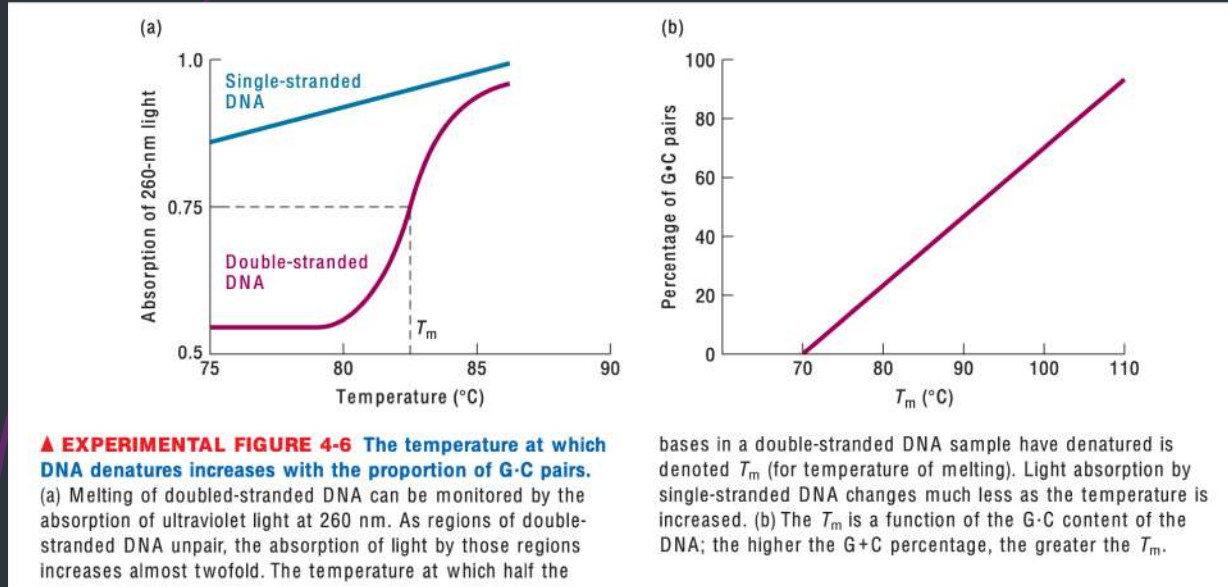
Nukleotidler



DNA Denatürasyonu ve Renatürasyonu

- ▶ Replikasyon ve transkripsiyon sırasında DNA çift sarmalının iplikleri yeni nükleotidlerin polimerize olması için doğal olarak ayrılır.
- ▶ Deneysel olarak sıcaklığın artırılmasıyla çözültideki DNA'nın denatürasyonu sağlanır. Termal enerjinin artışı DNA iplikleri arasındaki hidrojen bağlarını kırar.
- ▶ DNA renatürasyonu: Sıcaklığın düşmesi, pH nötralizasyonu, iyon konsantrasyonu artışı denatüre DNA'nın komplementer zincirlerinin birleşmesini sağlar.

DNA Denatürasyonu ve Renatürasyonu

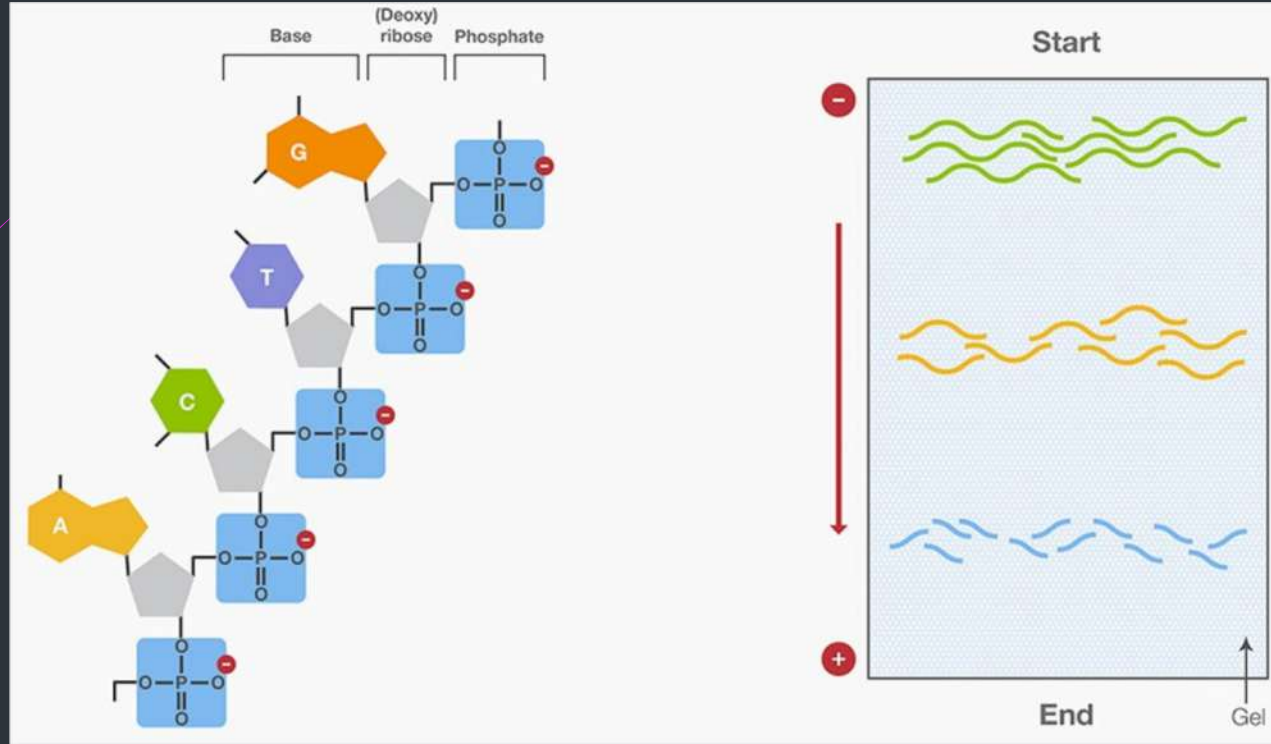


- ▶ T_m : Erime Sıcaklığı: DNA çift zincirinin %50'sinin tek zincire ayıran sıcaklık
- G-C içeriği (H bağları artarsa T_m yükselir)
- Ortam iyon konsantrasyonu (düşük iyon konsantrasyonunda fosfat gruplarının pozitif iyonlarla dengelenmesi azalır, itici güçler artar, T_m düşer)
- Formamid ve üre gibi H bağlarını destabilize eden ajanlar (T_m düşer)
- Ekstrem pH (T_m düşer). Düşük pH'ta bazlar protonlanır birbirini iter. Yüksek pH'ta bazlar proton kaybeder yine birbirini iter.

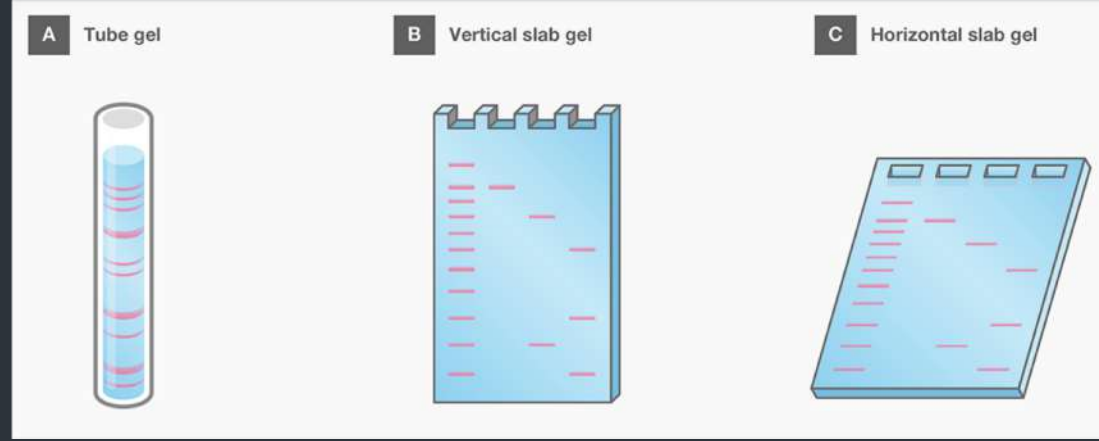
JEL ELEKTROFOREZİ

- ▶ İlk başlarda nükleik asitler yoğunluk-gradyent santrifügasyonu ile ayrılıyordu (1960lar). Elektroforez tekniği geliştirilince sedimentasyon hızı (S değerleri) ile korele olduğu bulunmuş.
- ▶ Makromoleküllerin elektriksel alanda büyüklük, yük ve fiziksel özelliklerine göre ayırma yöntemidir.
- ▶ Bir elektrik alanının molekülleri hangi hızda hareket ettireceği molekülün özelliklerine bağlıdır. Tankın iki ucunda yer alan elektrotlara uygulanan voltajla gerekli olan güç sağlanır.
- ▶ Proteinler, aminoasitler, nükleotidler, nükleik asitler gibi birçok biyolojik makromolekül iyonlaşabilen grupları sayesinde ortam asitliğine bağlı olarak çözelti içerisindeki bir jel matrisinde anyon (-) veya katyon (+) olarak bulunur. Net yüke göre anod veya katoda doğru hareket ederler.

nötral ve bazik pH ortamında DNA'nın şeker-fosfat iskeleti (-) yüklüdür. her nükleotid net bir negatif yük taşır. total nükleotid sayısı molekülün büyüklüğüyle orantılıdır. sonuç olarak jel elektroforezinde nükleik asitlerin göçü esasen büyüklüklerine bağlıdır.



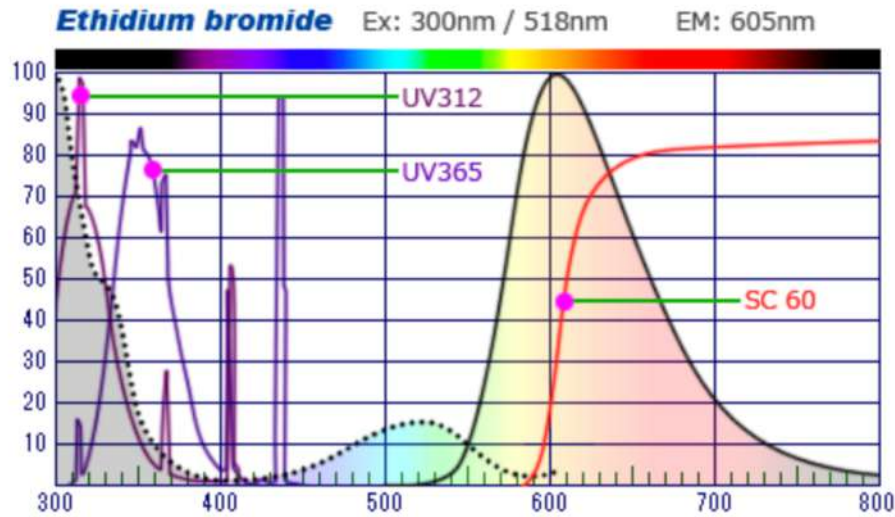
Elektriki alana maruz kalan nükleik asitler, katoddan anoda doğru en kısa fragman en hızlı olacak şekilde büyüklüklerine göre hareket ederler!



- ▶ Jel elektroforezinde nükleik asitlerin migrasyon mesafeleri tahmin edilebilir. Lineer ikili sarmal DNA fragmanları, moleküler ağırlığın logaritmasıyla ters orantılıdır.
- ▶ Marker ya da 'ladder' denilen moleküler ağırlık standartları örneklerle birlikte koşturulur.
- ▶ Jel matrisi çoğunlukla deniz yosunu ekstraktında doğal olarak bulunan lineer bir polisakkarit olan agaroz kullanılır.
- ▶ Nükleik asitlerin elektroforetik hareketliliği tamponun bileşimi, konsantrasyonu ve iyonik gücüne göre değişir.
- ▶ Tris-Borat, Tris-asetat, Tris-fosfat ve EDTA ile tampon hazırlanır.
- ▶ Jeller floresan DNA boyalarıyla (EtBr veya SYBR Green) boyanır.

EtBr floresan boyama

2. Fluorescence excitation with UV Transilluminator



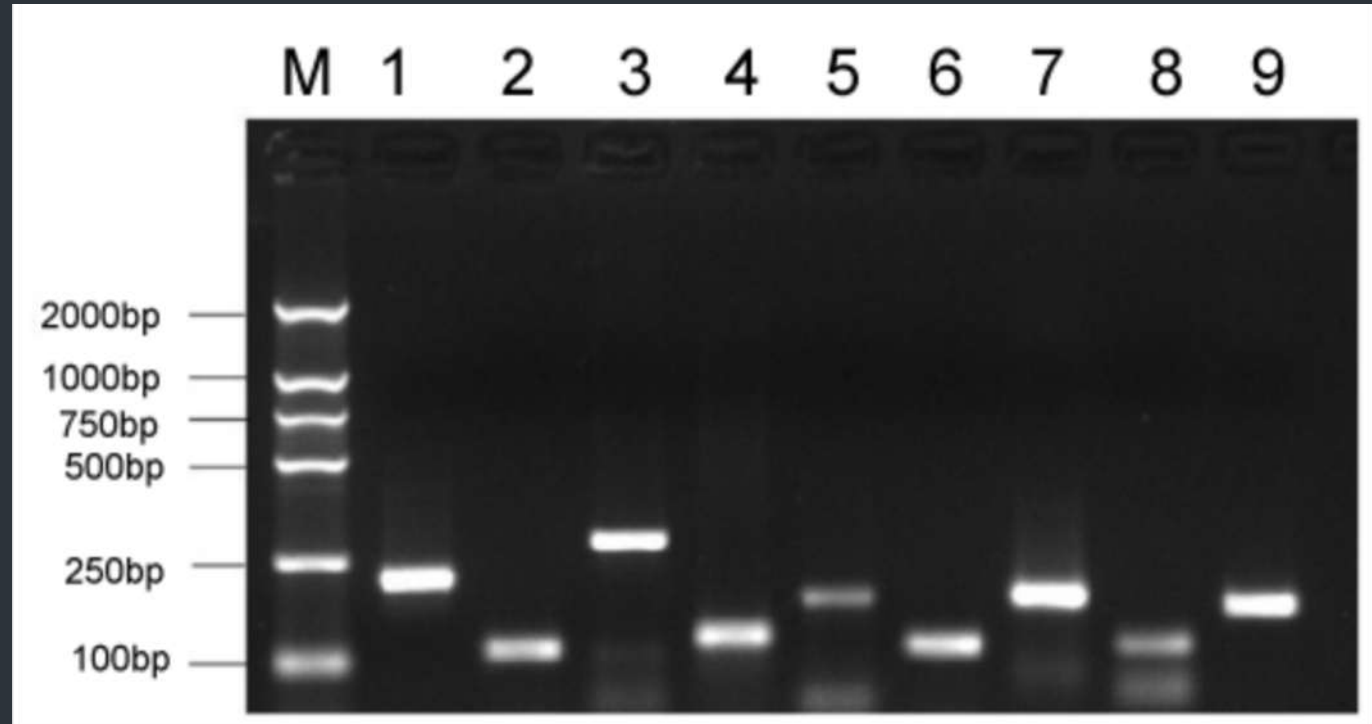
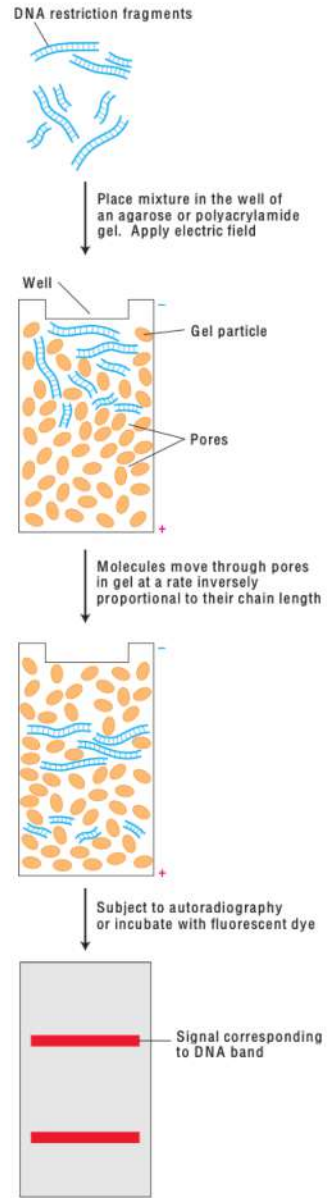
- UV transilluminator with 254, 312, 365nm have been used for EtBr in conventional practice.
- UV has high energy and distinctive Ex/Em which enable to detect band with more clarity. However, sample deterioration and harmful effects on human body can not be ignored at the same time.

* SC60 filter transmits only emission wavelength and cutoff unwanted light leakage from the source.

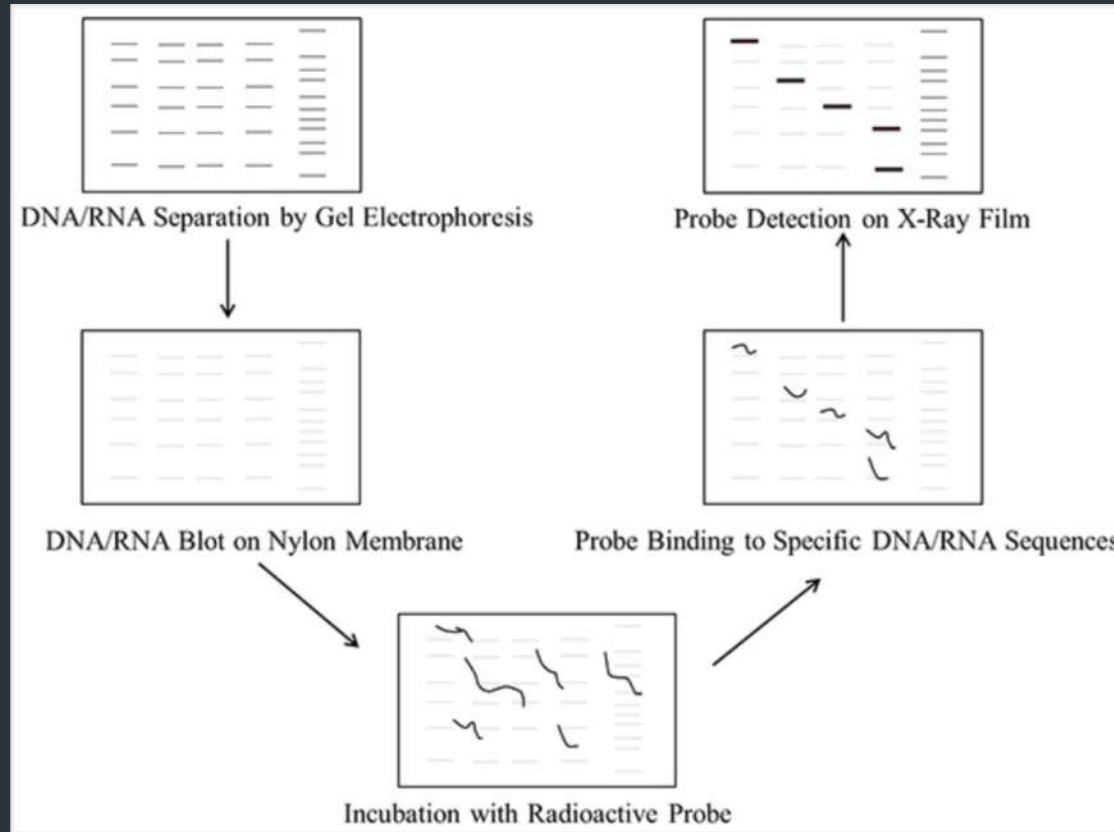
- Çoğunlukla 10 mg/mL konsantrasyonda sulu çözeltisi kullanılır.
- ssDNA veya RNA boyaması daha duyarlıdır o nedenle 10 kat fazla nükleik asit gerektirir.

Linear DNA moleküllerinin ayırımı için tavsiye edilen agaroz jel konsantrasyonları

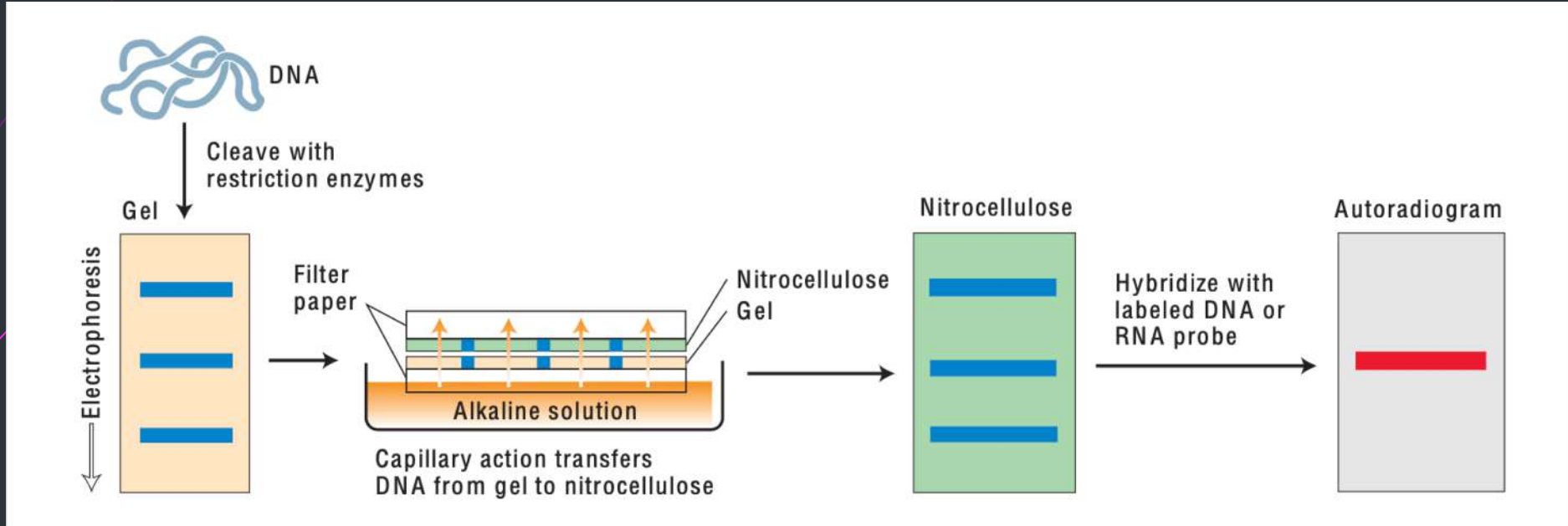
% agaroz	DNA büyüklük aralığı (bp)
0,75	10.000-15.000
1,00	500-10.000
1,25	300-5000
1,5	200-4000
2,00	100-2500
2,5	50-1000



Southern ve Northern Blotlama basamakları



Southern Blotlama



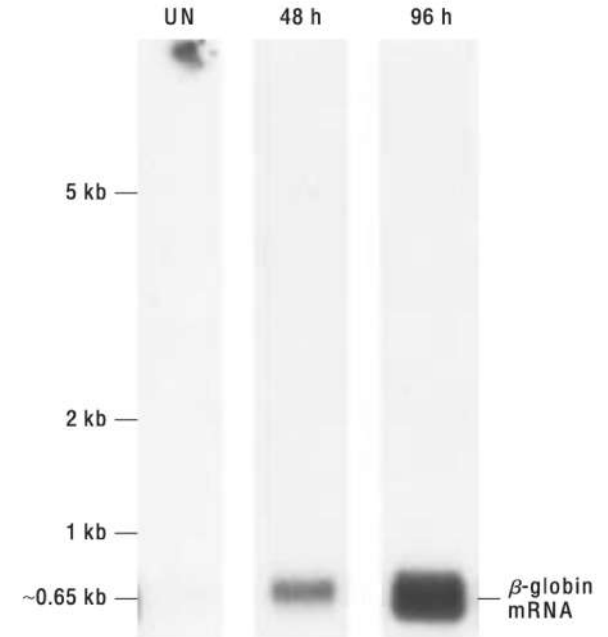
- DNA izole edilir
- Enzimatik, kimyasal ya da fiziksel bir yöntemle fragmanle edilir
- Jel elektroforeziyle DNA fragmanları ayrılır
- Alkali çözeltide DNA denatüre edilir
- ssDNA parçaları tampondaki iyonların etkisiyle naylon membrana doğru itilir
- Transfer: (+) yüklü membran DNA parçalarını kendine bağlar

Southern Blotlama

- Prehibridizasyon (Bloklama): Naylon veya nitroselüloz membran somon sperm DNA'sı içeren bir prehibridizasyon solüsyonuyla yıkanır. Geriplan gürültüsünü azaltmak için non-spesifik DNA interaksiyonları bloklanır. Çoğunlukla 'Denhardt's Solution' kullanılır.
- ^{32}P etiketli prob hazırlanır
- Hibridizasyon
- Probun otoradyografiyle tespiti

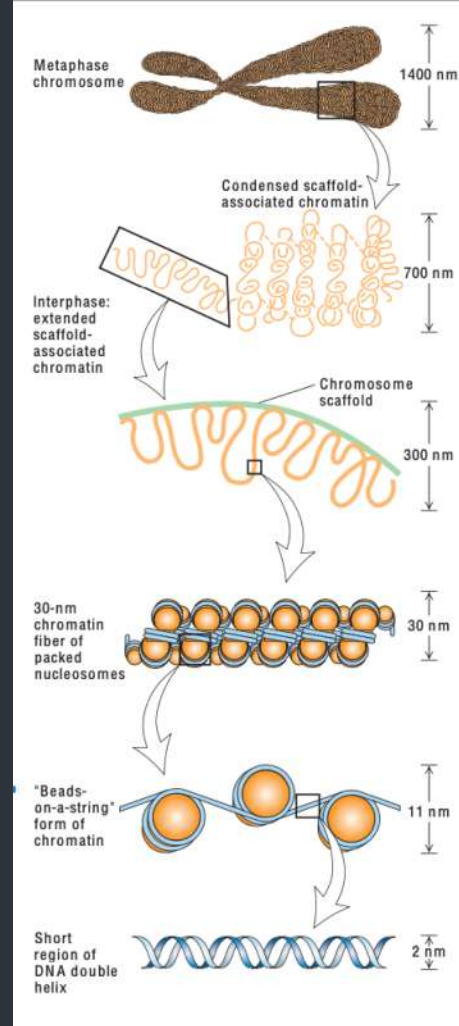
Northern Blotlama

- Spesifik mRNA tespiti
- Protokol Southern blotlamaya çok benzer. RNA'lar formaldehitle hazırlanmış denatüre edici agaroz jel elektroforezinde ayrılır.



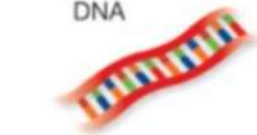
▲ EXPERIMENTAL FIGURE 9-27 Northern blot analysis reveals increased expression of β -globin mRNA in differentiated erythroleukemia cells. The total mRNA in extracts of erythroleukemia cells that were growing but uninduced and in cells induced to stop growing and allowed to differentiate for 48 hours or 96 hours was analyzed by Northern blotting for β -globin mRNA. The density of a band is proportional to the amount of mRNA present. The β -globin mRNA is barely detectable in uninduced cells (UN lane) but increases more than 1000-fold by 96 hours after differentiation is induced. [Courtesy of L. Kole.]

Floresan *In Situ* Hibridizasyon

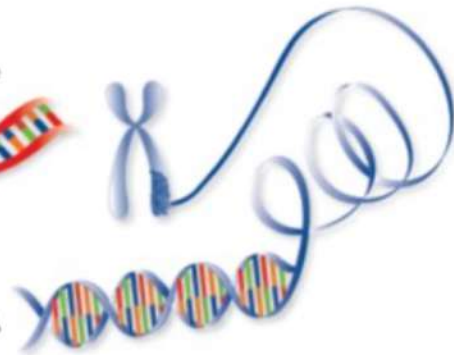


- Spesifik bir DNA sekansının varlığını ve kromozom üzerindeki lokasyonunu tespit eden moleküler sitogenetik bir tekniktir.
- Genlerin kromozomlara haritalanmasında kullanılan güçlü bir yöntem.
- Çeşitli kromozomal anomalilerin diagnozunda yaygın olarak kullanılır.
- Kromozomlardaki çok büyük değişimlerin tespit edilebildiği sitogenetik bir yöntem olan karyotiplemeye göre çok yüksek çözünürlükte veri sağlar.

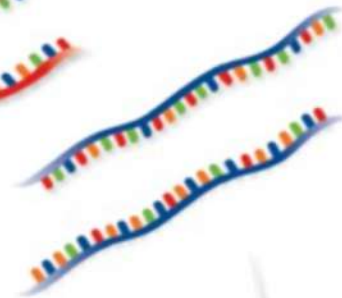
Fluorescently
Labelled Probe
DNA



Target DNA



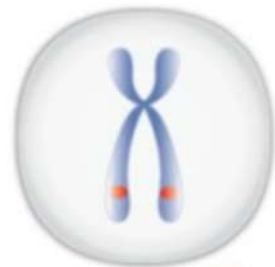
Denature
to separate DNA strands and
allow probe access to target DNA.



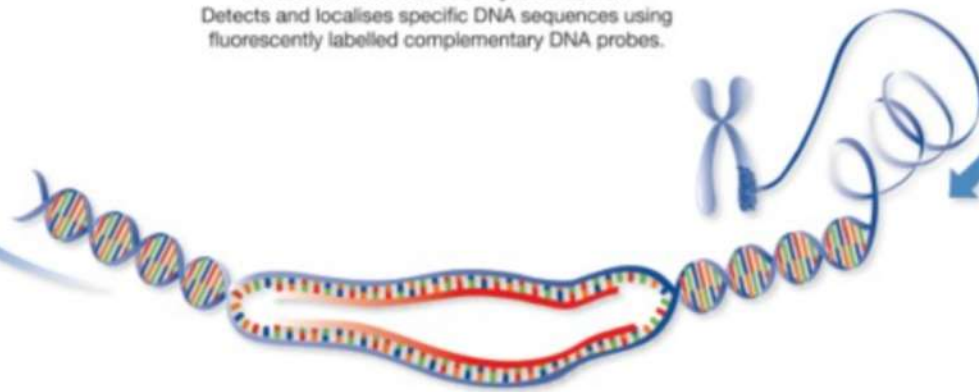
Hybridise
together to bind
probe to target
DNA.

What is FISH?

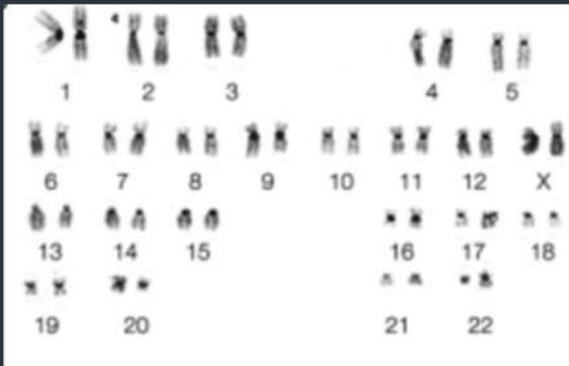
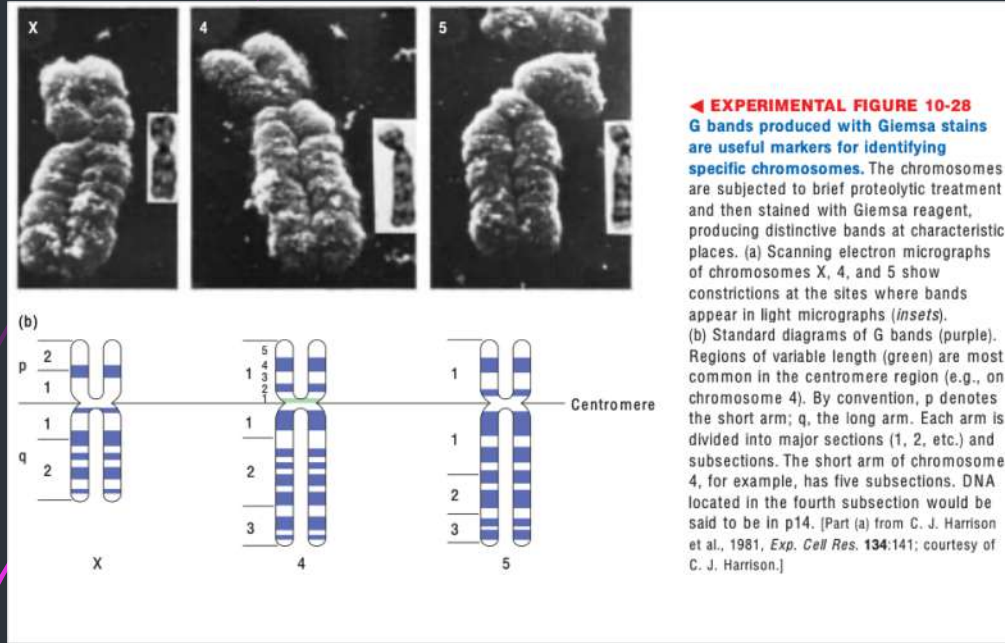
Fluorescence *In Situ* Hybridisation
Detects and localises specific DNA sequences using
fluorescently labelled complementary DNA probes.



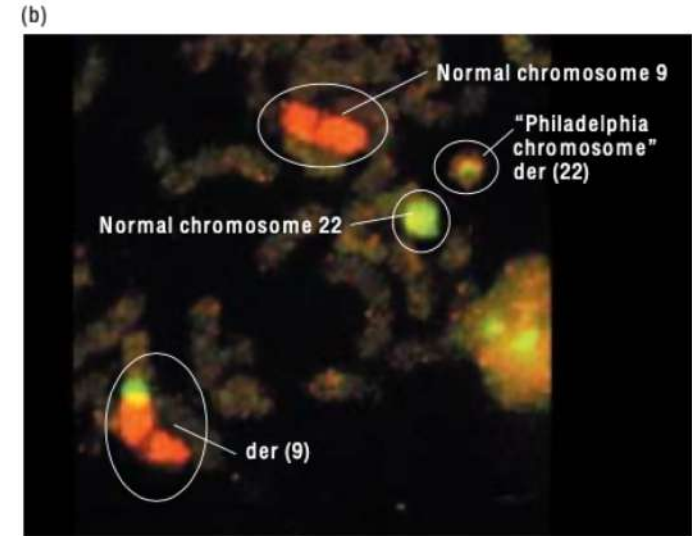
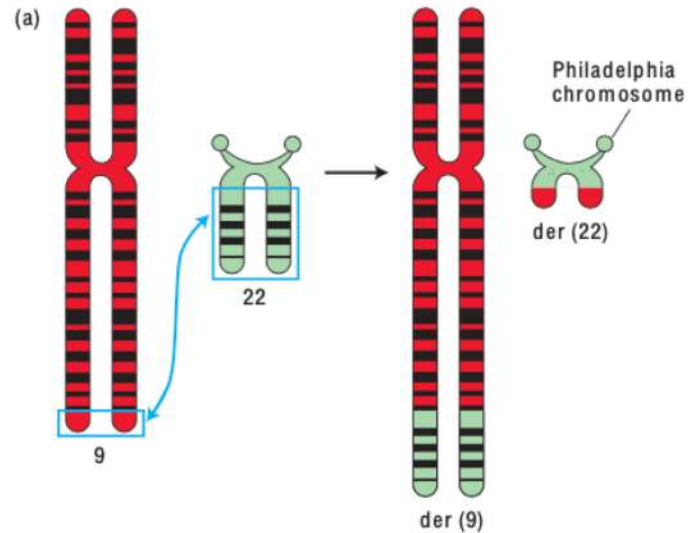
Analyse
probe signals using a
fluorescent microscope.



Karyotipleme

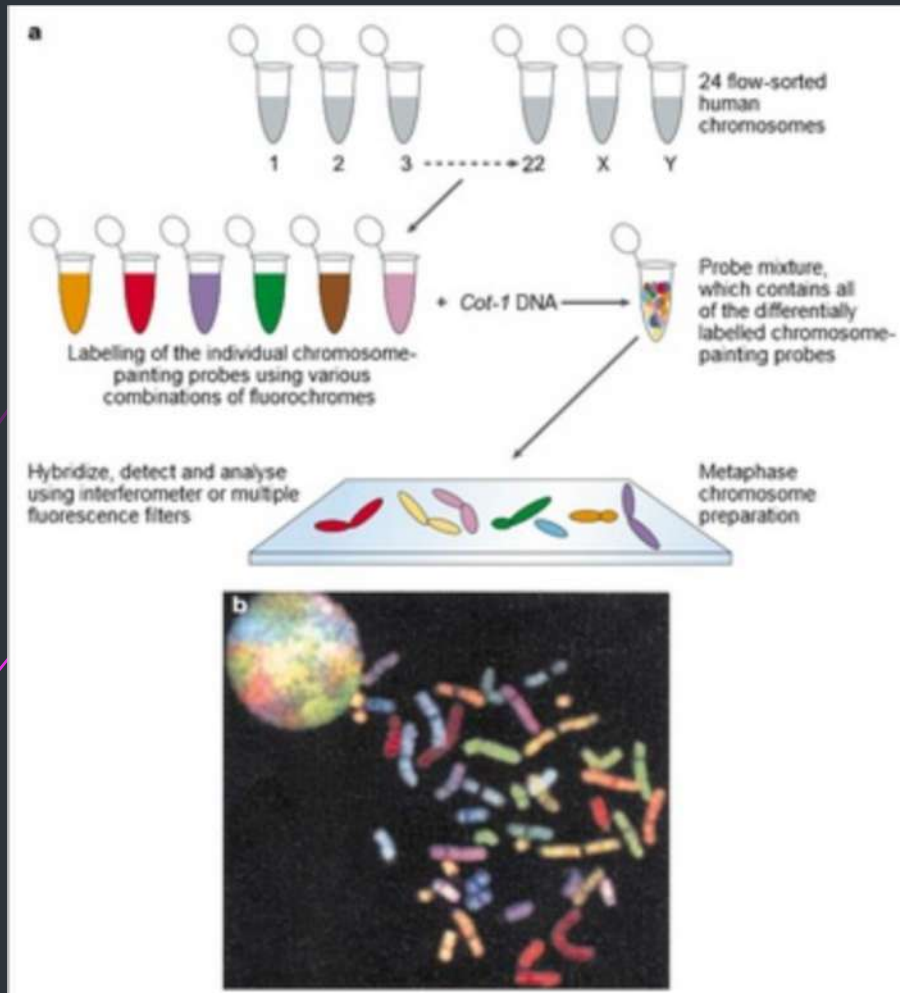



- Bir bireyin genomunun tüm kromozomlarının analizi
- Klinik sitogenetik insan karyotiplerindeki gros değişiklikleri tespit eder. Birkaç megabazlık veya daha fazla DNA değişimleri. (delesyonlar, duplikasyonlar, translokasyonlar, inversiyonlar)
- Mitotik hücrelerin karyotipleri kromozomların en kondens konformasyonları metafaz veya prometafaz sırasında yakalanıyor. Kanseri teşhisinde tümör biyopsileri veya kemik iliği örnekleri, prenatal teşhisde amniyon sıvısı veya koryonik villus örnekleri, diğer taramalarda periferik kan veya deri biyopsileri DNA kaynağı olarak kullanılır.
- Giemsa boyaması (G-bantlama)



▲ EXPERIMENTAL FIGURE 10-29 Chromosomal translocations can be analyzed using banding patterns and multicolor FISH. Characteristic chromosomal translocations are associated with certain genetic disorders and specific types of cancers. For example, in nearly all patients with chronic myelogenous leukemia, the leukemic cells contain the Philadelphia chromosome, a shortened chromosome 22 [der

(22)], and an abnormally long chromosome 9 [der (9)]. These result from a translocation between normal chromosomes 9 and 22. This translocation can be detected by classical banding analysis (a) and by multicolor FISH (b). [Part (a) from J. Kuby, 1997, *Immunology*, 3d ed., W. H. Freeman and Company, p. 578; part (b) courtesy of J. Rowley and R. Espinosa.]



 **Figure 3: Spectral karyotyping and multicolor-FISH paint each human chromosome in one of 24 colors.** Cytogenetic localization of DNA sequences with fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

