



Blotlama Yöntemleri

Blotlama

• Elektriksel ortamda jel üzerinde göç ettirilen ve fraksiyonlarına ayrılan protein veya nükleik asitlerin bir destek tabakaya aktarıldıktan sonra özgül olarak belirlenmesidir.



Tarihçe

- İlk olarak 1975'te jel transferi adıyla anılan DNA'nın transferinde kullanılan yöntem
- Geliştiren kişi E.M. Southern' a atfen Southern Blotlama adı verilmiştir
- 1979' da RNA'nın kullanıldığı yöntem bir önceki yöntemin adına gönderme yapılarak Northern Blotlama denmiştir (*J. Alvine ve G. Stark*)
- Son olarak proteinlerin belirleme metodu, Western Blotlama olarak anılmaktadır (*HT Towbin 1979, WN Burnette 1981*)

Southern Blotlama → DNA

Northern Blotlama → RNA

Western Blotlama → Protein



Blotlama Teknikleri

Nükleik asit ve protein fragmanlarının özgül olarak belirlenmelerini sağlar.

Nükleik asit

Agaroz gel

Poliakrilamid jel-yüksek rezolüsyon

Protein

SDS-PAGE-denatüre protein



Komplex bir karışımda bir fragman nasıl tesbit edilebilir ?

Makromolekül bir membrana transfer edilir.

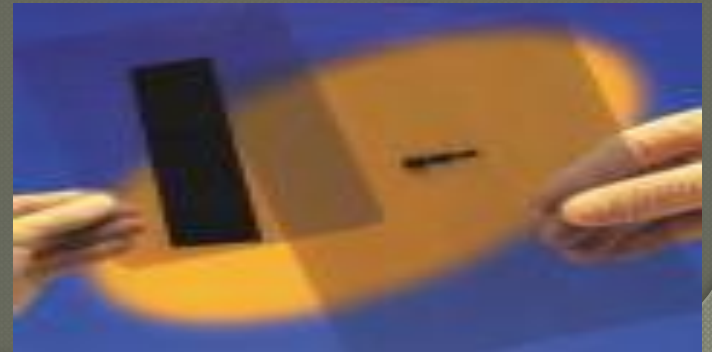
Daha sonra komplementeri bir nükleik asit yada spesifik bir proteinin antikoru ile belirlenebilir.



Blotlama Teknikleri

Southern Blot

- Özellikle gen yapısı, gen ifadesi, genom organizasyonu, haritalama ve gen aktarımı çalışmalarında (transformantların istenilen geni taşıyıp taşımadığının, kopyasayısının analizi vb) aranılan DNA dizisinin saptanması için kullanılan bir teknik
- Bir fragmanın (genin) belirlenmesi
- Fragmanların büyüklüğünün belirlenmesi
- Target ve prob arasındaki sekans benzerliği



○ Basamaklar

- Herhangibir kaynaktan DNA eldesi
- Restriksiyon enzimleri ile kesim
- Jel elektroforezi ile ayırıştırma
- Jeldeki DNA nın membrana aktarımı
- DNA fragmanlarının denatüre edilmesi
- Radioaktif probe (RNA veya ss DNA) ile hibridizasyon
- Otoradyografi ile ilgilenilen fragmanların lokalizasyonlarının belirlenmesi

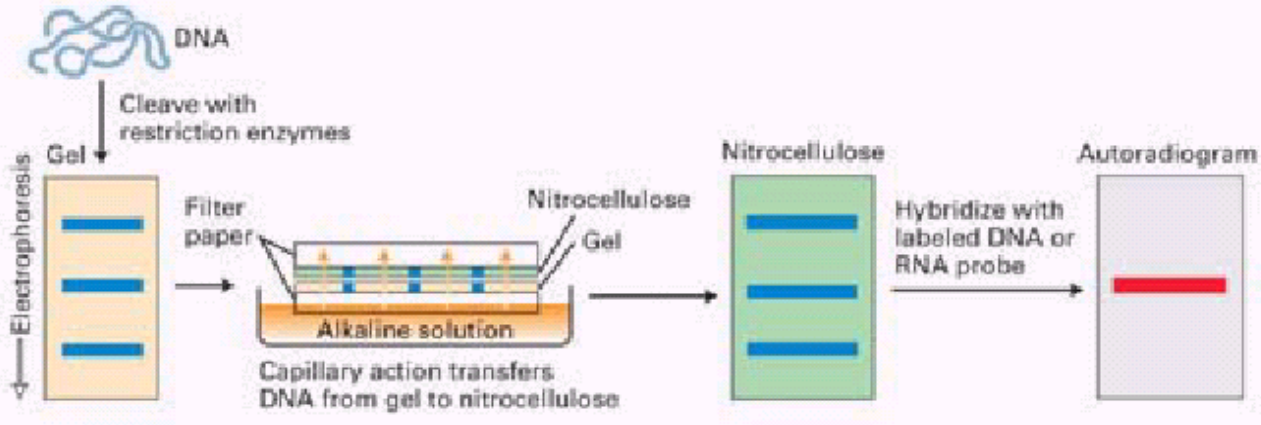
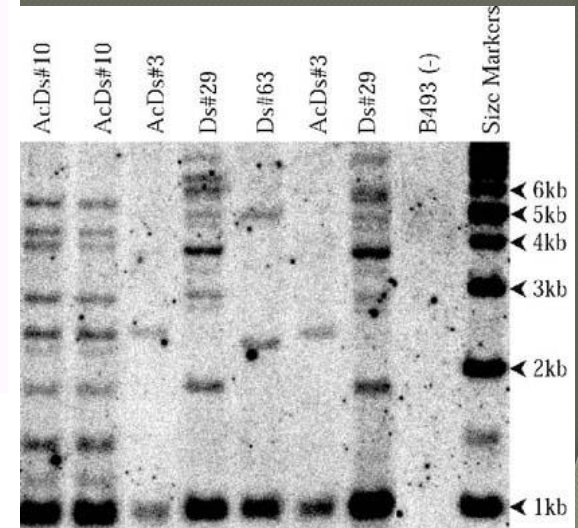
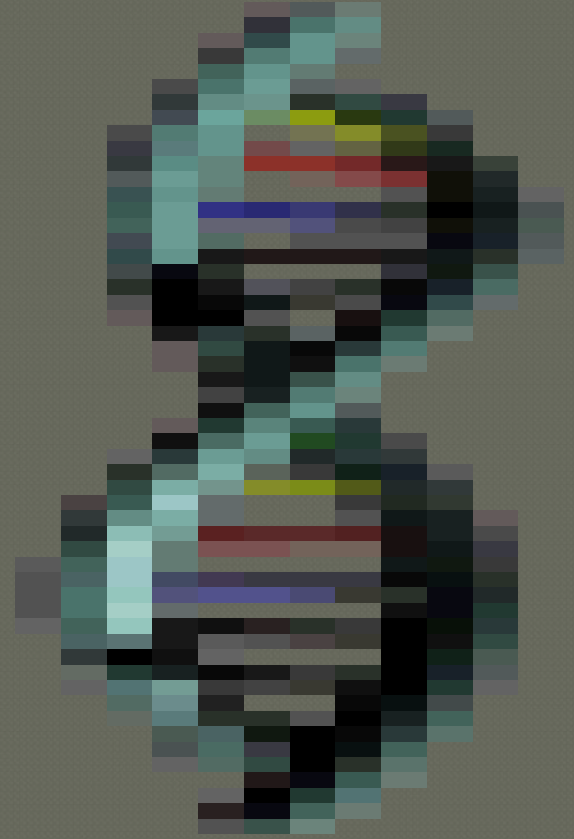


Figure 9-26 illustrates an alkaline southern blot.



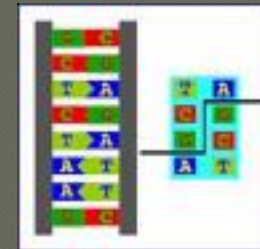
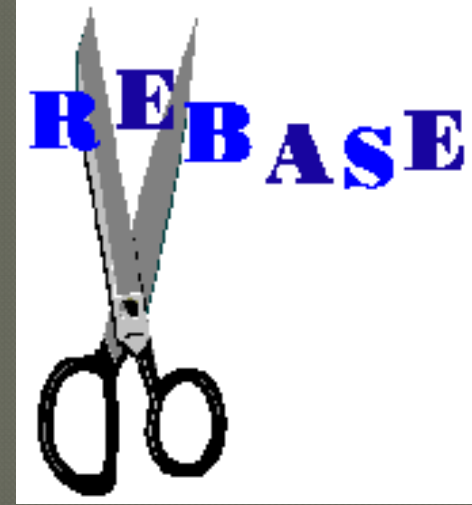
Herhangi Bir Kaynaktan Elde Edilen DNA...

- Bu amaçla periferik kan veya solid doku kullanılabilenkte
- Bu izolasyon için her laboratuvarın kendi belirlemiş olduğu standart ve yöntemler mevcuttur
- Önemli olan temiz ve saf DNA nın kullanılması



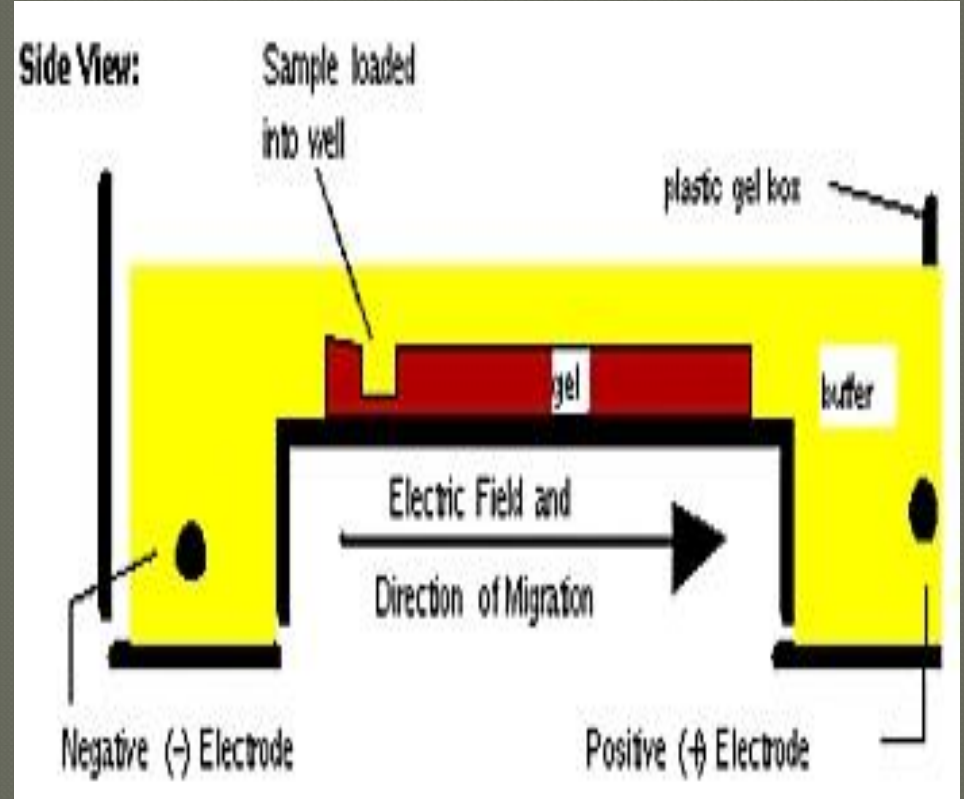
Restriksiyon Enzimleri İle Muamele...

- *Restriksiyon endonükleazlar,*
DNA yı belirli dizilerinden özgül tanıyıp kesen bakteriyel enzimlerdir
- Bir veya birden fazla örneğin bir arada kullanılması ile DNA parçalarına bölünebilmektedir



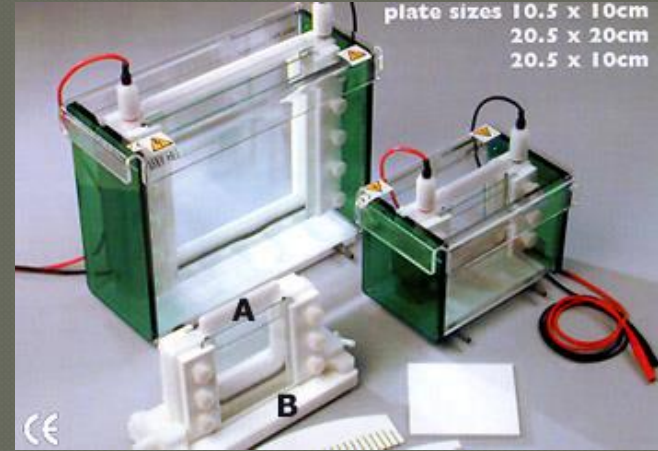
Jel Elektrofrezisi İle Ayırıştırma

- Kesilen DNA parçaları elektroforez kullanılarak fragmanlarına ayrılır
- En çok tercih edilen horizontal agaroz jel elektroforezidir



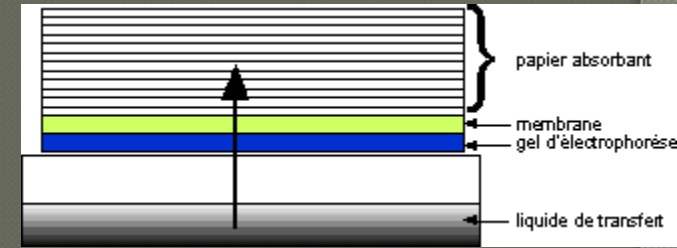
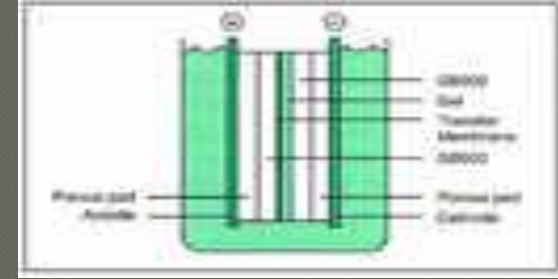
Jel Elektroferez İle Ayırıştırma

- Agaroz lineer bir polimerdir
- Agarozun elektroferez için uygun olduğu kontrol edilmeli
- Kullanılan agarozun ekstra saf olanı tercih edilmeli
(polisakkarit, protein ve tuz kontaminasyonu minimum)



Blotlama

- DNA in aktarılması için çoğunlukla nitrosellüloz (NC) membran kullanılır
- DNA, NC membrana hidrofobik bağla sabitlenir: yüksek ısıdaki yıkamalarda bu bağlar kopar



Membranlar

- NC membranlar kırılmalıdır
- NC membranın por genişliğinin $0,45 \mu\text{m}$ den küçük olması durumunda 300 nükleotidden küçük DNA fragmanları içinden geçip gider: yalancı negatiflik
- 300 bp den küçük ise $0,2 \mu\text{m}$ kullanılı



Membranlar

- Son yıllarda NC membran yerine naylon membran kullanılmakta
- Bunlar nükleik asitleri irreversibl bağlar
- Çok sayıda hibridizasyon uygulanabilir
- Yırılma, kırılma olmaz

- Nylon membranların tek dezavantajı hibridizasyon sırasında fazla background vermesidir: Blocking Agent ile önlenabilir
- Modifiye edilmemiş ve charge modifiye şeklinde iki çeşit naylon membran var



Blotlama



- Transfer oranı DNA fragmanlarının büyüklüğüne bağlıdır
- 1 kb altı DNA parçaları %0.7 lik agar jelinden 1 sa içinde transfer; >15 kb için > 18 sa
- Jeldeki kalıntılar transferi etkiler: transfer öncesi jel, önce zayıf asit sonra güçlü bazik çözeltide tutulursa kalıntı azalır

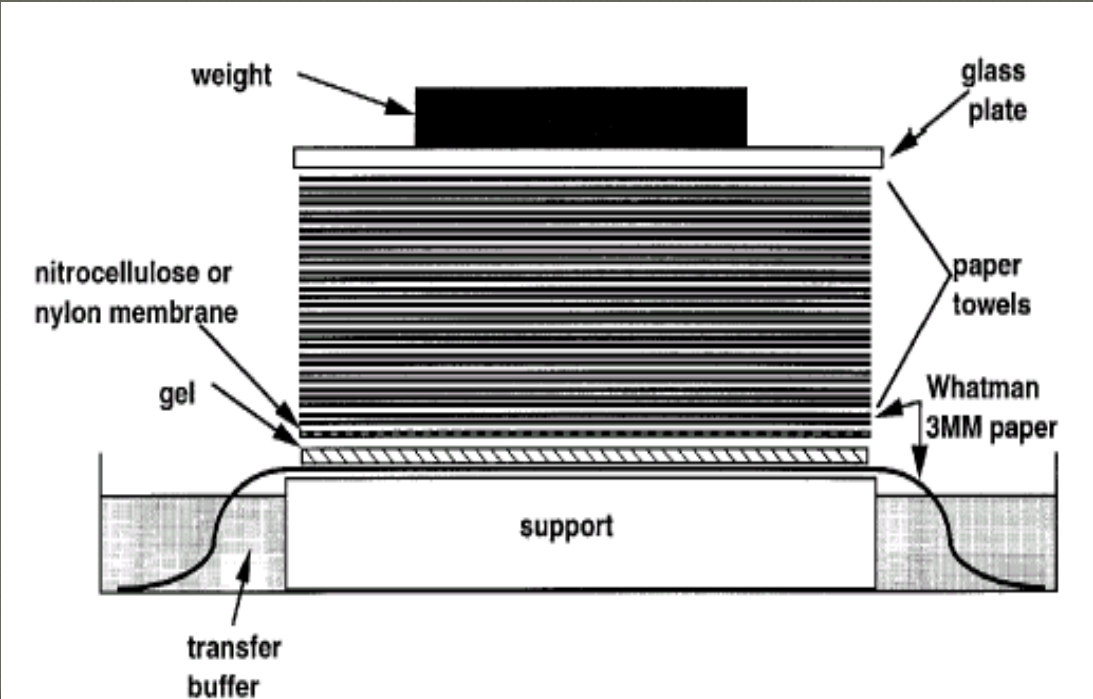
Jeldeki DNA Nın Membrana Aktarımı

- *Birden fazla yöntem var*
- Kapiller transfer
- Elektroforetik transfer
- Vakumlu transfer



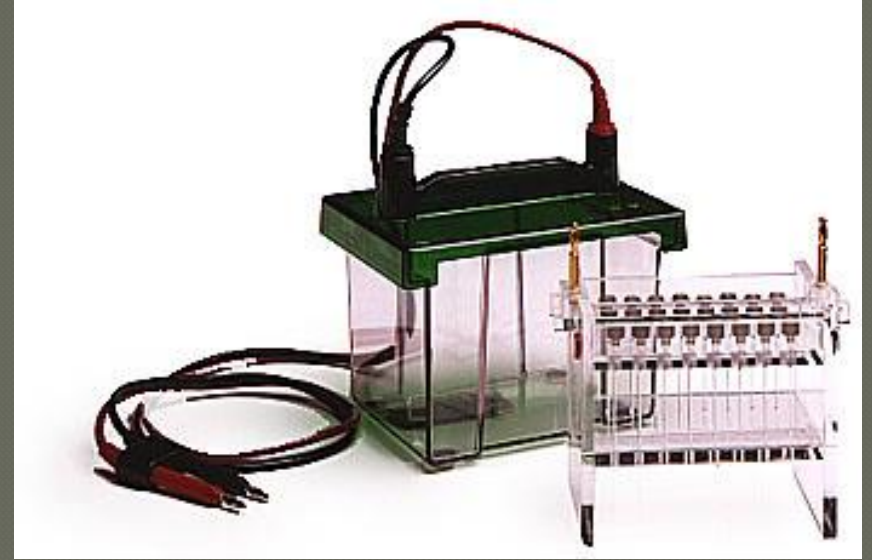
Kapiller Transfer

- Kapiller transferde, sıvı bir akımda jeldeki DNA'nın destek tabakaya geçmesi sağlanır
- Sıvı akımı, en üstteki emici kağıtlar ile sağlanmaktadır (kağıt havlu)



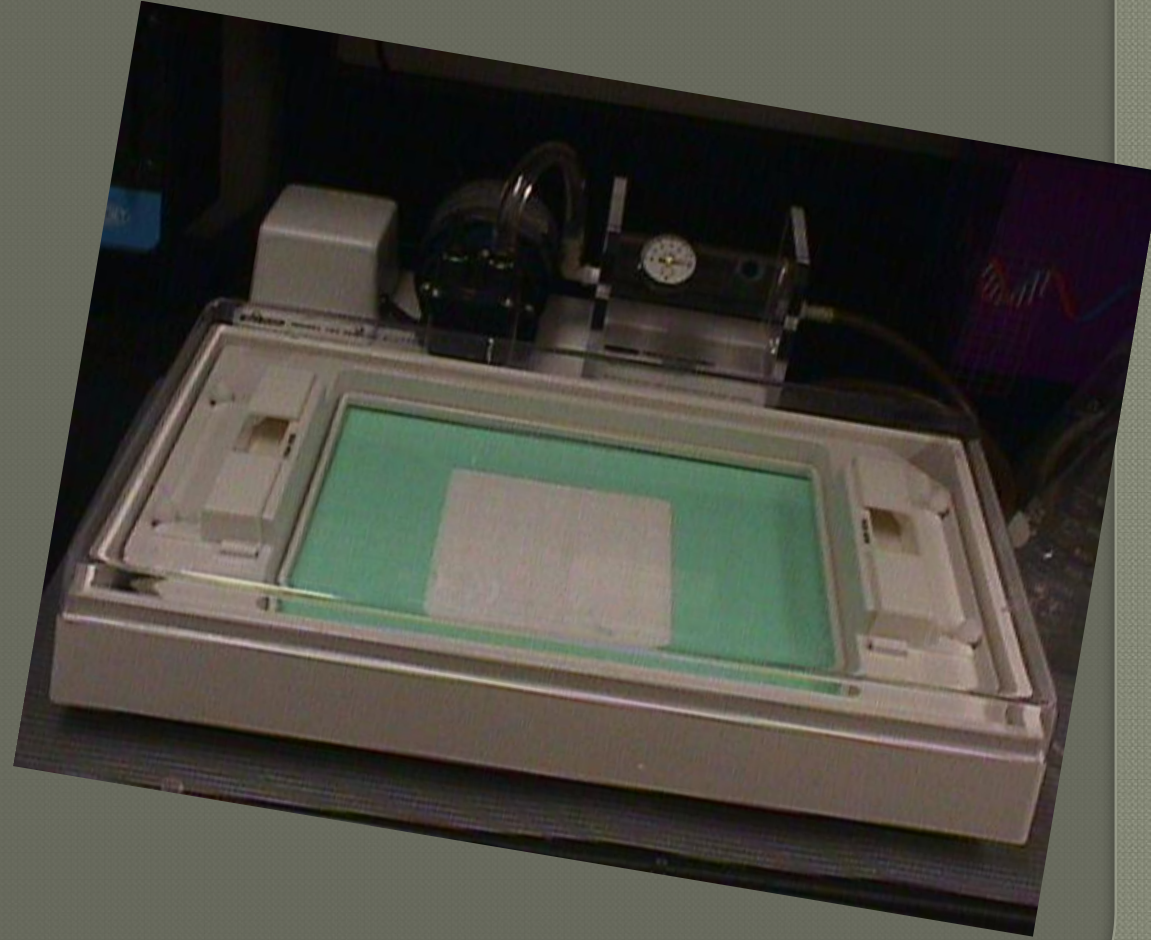
Elektroforetik Transfer

- Nükleik asitlerin tek yönlü ve hızlı olarak yüksek voltajda transferi tekniği



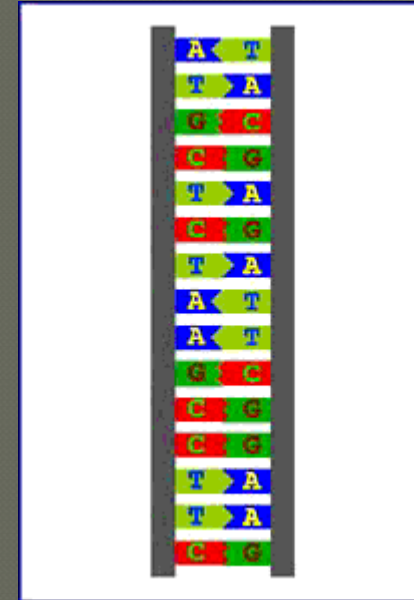
Vakum Transfer

- Vakum altında cihaz yardımı ile
- 30 dak da 4-5 mm kalınlık ve %1 altındaki jelden transfer sağlanabilir



Hibridizasyon

- Moleküler hibridizasyondur
- Bazların karşılıklı gelerek ikili sarmalı oluşturmasıdır
- Gerçekleştirildikleri ortama göre iki çeşit vardır:
- Sıvı ve Katı Faz hibridizasyon



Katı Faz Hibridizasyonu

- Blotlama işleminde kullanılan katı faz hibridizasyonudur
- Burada yakalanan nükleik asitler önce destek tabakaya sabitlenmekte ve katı faz oluşturulmaktadır

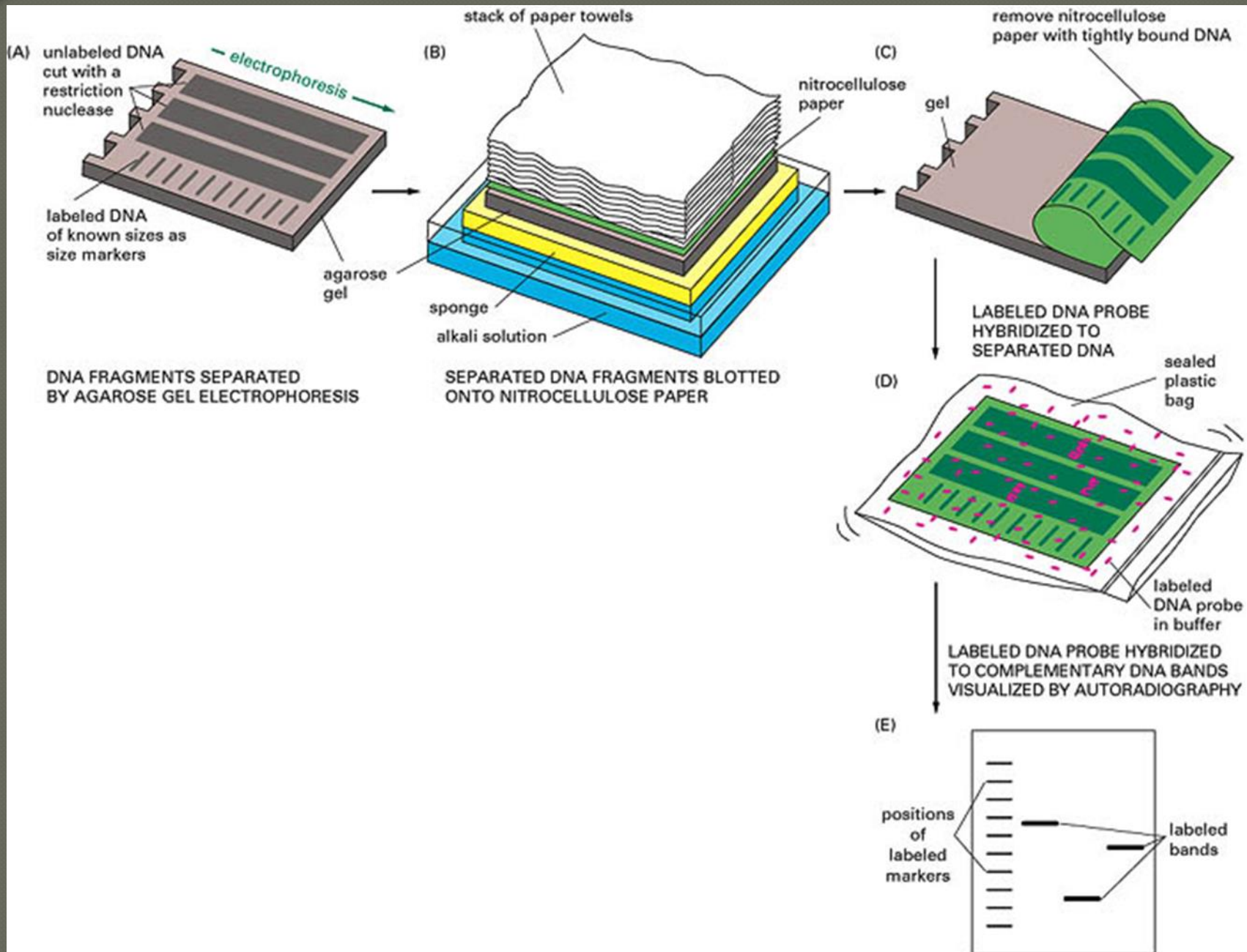
- Hibridizasyon sırasında radyoaktif probe (RNA veya ss DNA) kullanılır
- Radyoaktivite P32 ile sağlanır.
- Non radyoaktif işaretleme için ise Digoksinin kullanılabilir.



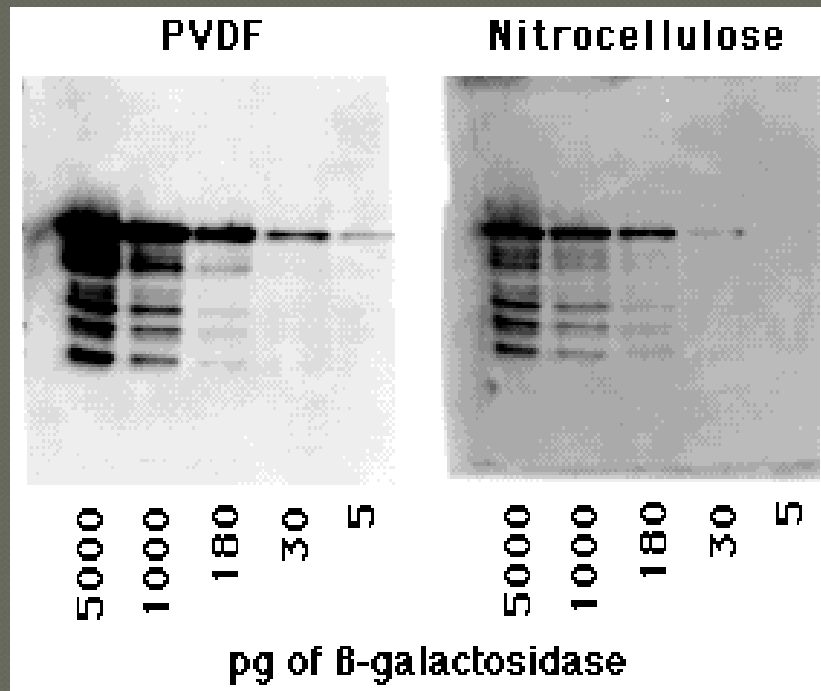
Hibridizasyon 3 temel aşaması

1. **Genomik DNA'nın izolasyonu**
2. **Spesifik RE ile sindirim**
3. **Fragmentlerin elektroforezisi**
4. **Bantların membran üzerine transferi (Southern transfer):** Agarose jel (veya PAGE) üzerinde bulunan bantların naylon veya nitroselüloz membran üzerine transferleri.
5. **Naylon üzerine transfer edilen DNA'nın denatürasyonu ve fiksasyonu:** Denatürasyondan sonra naylon membran, 80°C' ye kadar ısıtılarak, tek iplikçiklerin membran üzerine fikse edilmesi sağlanır.
6. **Hibridizasyon:** Naylon membran önce, pre hibridizasyon solüsyonu içinde 60–65°C'de 2–4 saat kadar bulundurulduktan sonra yıkanır. Membran üzerine konulan tek iplikçikli işaretli prob, kendine komplementer olan tek iplikçik hedef DNA ile non kovalent bağlarla birleşir ve çift iplikçik DNA x DNA dubleks (eğer RNA prob kullanılırsa DNA x RNA dubleks) oluşur .
7. **Otoradyografi:** Naylon membran üzerine, X-ışınlarına duyarlı bir film kapatılarak -70°C' de bir gece tutulur ve radyoaktivitenin film üzerine etkilemesi sağlanır

-
- Bu sürenin sonunda film banyo edilir. Bu film üzerinde, işaretli problarla birleşmiş hedef DNA sekanslarının bulunduğu bölgeler siyah renkte görülürler. Bu bölgeler, aranılan etkene ait spesifik genin lokalize olduğu yerleri ifade eder.



Southern blotlama



Blotlama Teknikleri

Northern Blot

- Bu teknik aynı Southern gibi yapılır. Ancak burada DNA'nın değil RNA'nın içindeki gen parçacıklarının yerinin belirlenmesi amaçlanır
- Klonlanan bir genin belli bir doku ya da hücre tipinde transkripsiyon açısından aktif olup olmadığını tespit eder
- Dokuda bulunan RNA'nın tespiti
- Ekspresyon düzeyinin belirlenmesi
- mRNA'nın büyüklüğü
- Northern Blot yöntemi çoğunlukla teşhise yönelik amaçlar için değil, genelde araştırma maksadıyla kullanılır



5 basamakta incelenebilir

Basamak I

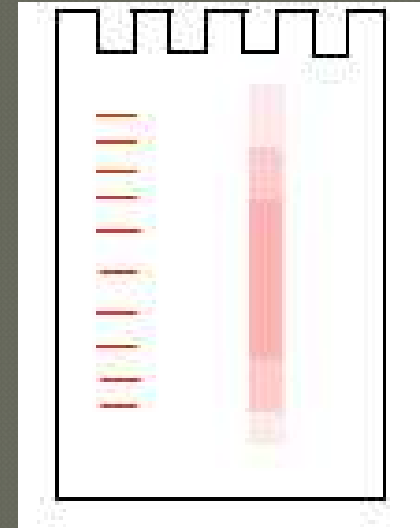
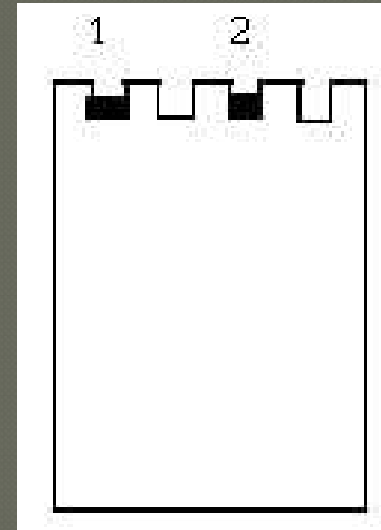
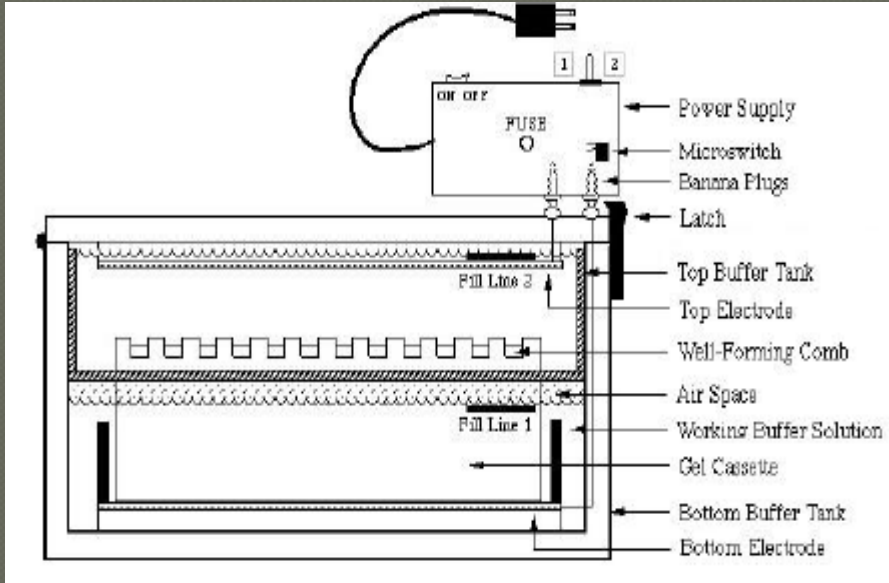
- İlgilenilen doku ya da hücre örnekleri sağlanır.
- Yüksek hızda santrifügasyon ile örnekten mRNA izolasyonu yapılır.
- Isı kullanılarak örnek denatüre edilir.

Basamak II

- mRNA, bir floresan boya olan etidyum bromür ile işaretlenir.
- Agaroz jel elektrofrezisi yapılır!

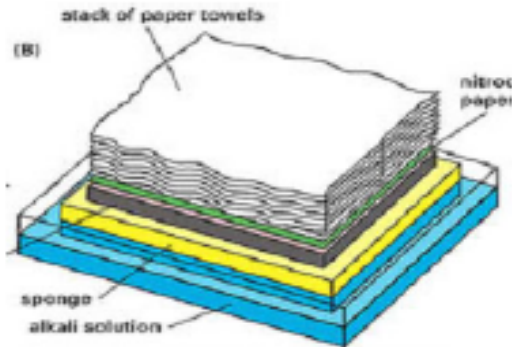
Agaroz Jel Elektroforezi

- mRNA örneği formaldehid ve gliksal içeren bir yükleme tamponu çözeltisiyle karıştırılır.
- Örnek ve ardından marker bir sütuna transfer edilir
- Örnek jel boyunca ilerler ve mRNA aşağı doğru hareket eder (negatiften pozitif)
- Daha küçük olan mRNA'lar, pozitif uca daha yakın bir yerde sonlanır çünkü daha büyük mRNA'lara göre daha hızlı hareket ederler ve daha çok yol alırlar

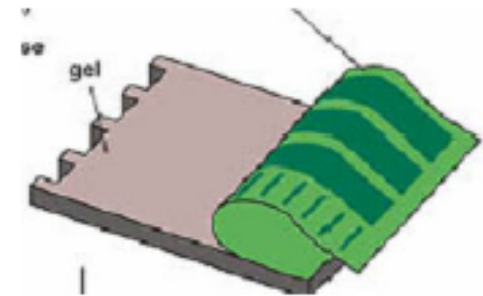


Basamak III: Blotlama

- Seçilen membran nitroseluloz, naylon ya da kimyasal olarak yüklü membranlardandır.
- Bu tip membranlar, fragmanların ölçümü için yüksek hassasiyet gösterirler ve çok iyi çalışırlar.
- Kağıt fitil, tamponu kapiller etki yönünde çeker ve örneği jelden membrana aktarır.



Remove the nylon with the mRNA bound



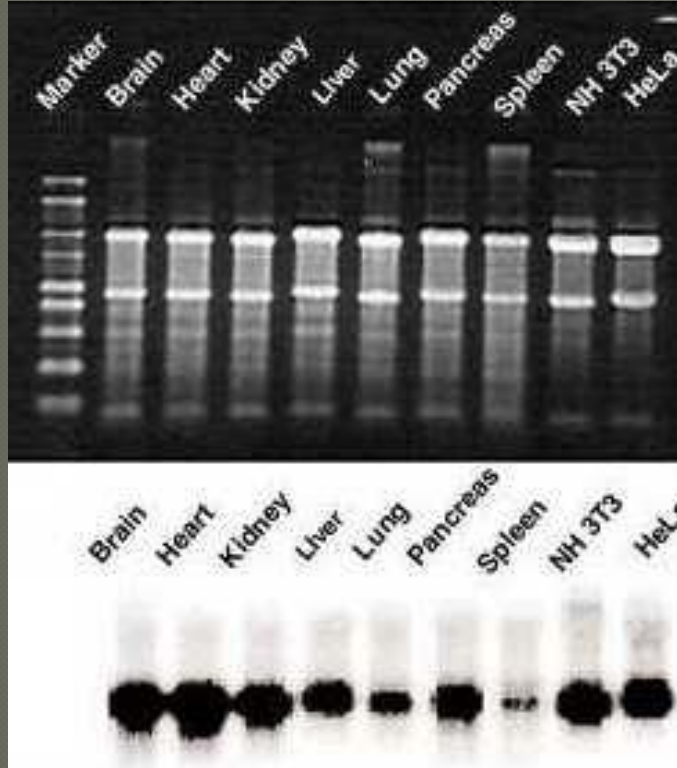
Problar

- Problar, spesifik mRNA dizilerini hedeflemek için kullanılırlar.
- Kullanılan mRNA zincirinin komplementeri olmalıdırlar.
- Radyoaktif ya da radyoaktif olmayan işaretleyicilerle işaretlenmiş olabilirler.

Basamak IV: Hibridizasyon

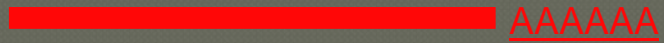
- Membran, polietilen glikol içeren solusyonla ıslatılır.
- Prob bağlanmasından sonra membran bir solusyonla yıkanır.
- Bu yıkama, bağlanmayan ya da zayıf bağlanan problemlerin ayrılmasını sağlar.

Basamak V: Otoradyografi

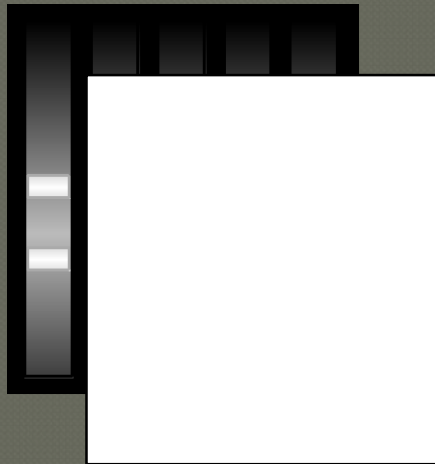


- Blotun fotoğrafi çekilip, x-ray filmi üzerinden mRNA bantlarına eklenen probu görme imkanı sağlanır

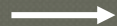
RNA isolation



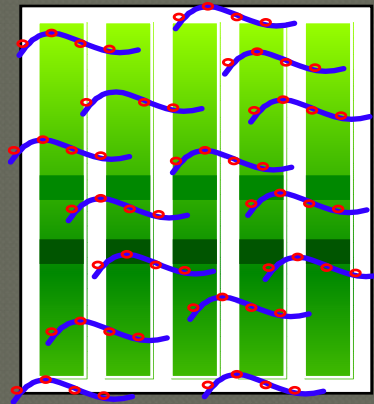
Gel electrophoresis



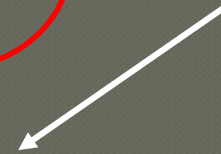
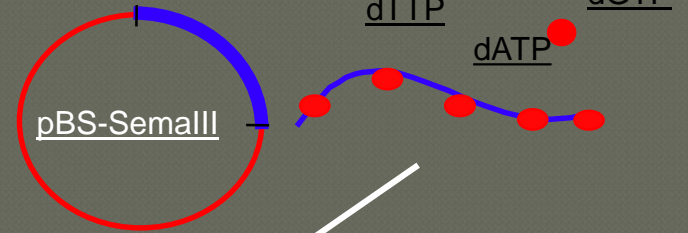
slotting



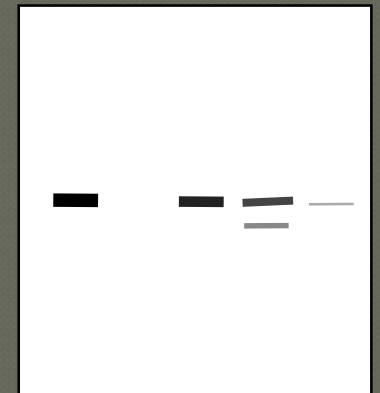
Hybridization

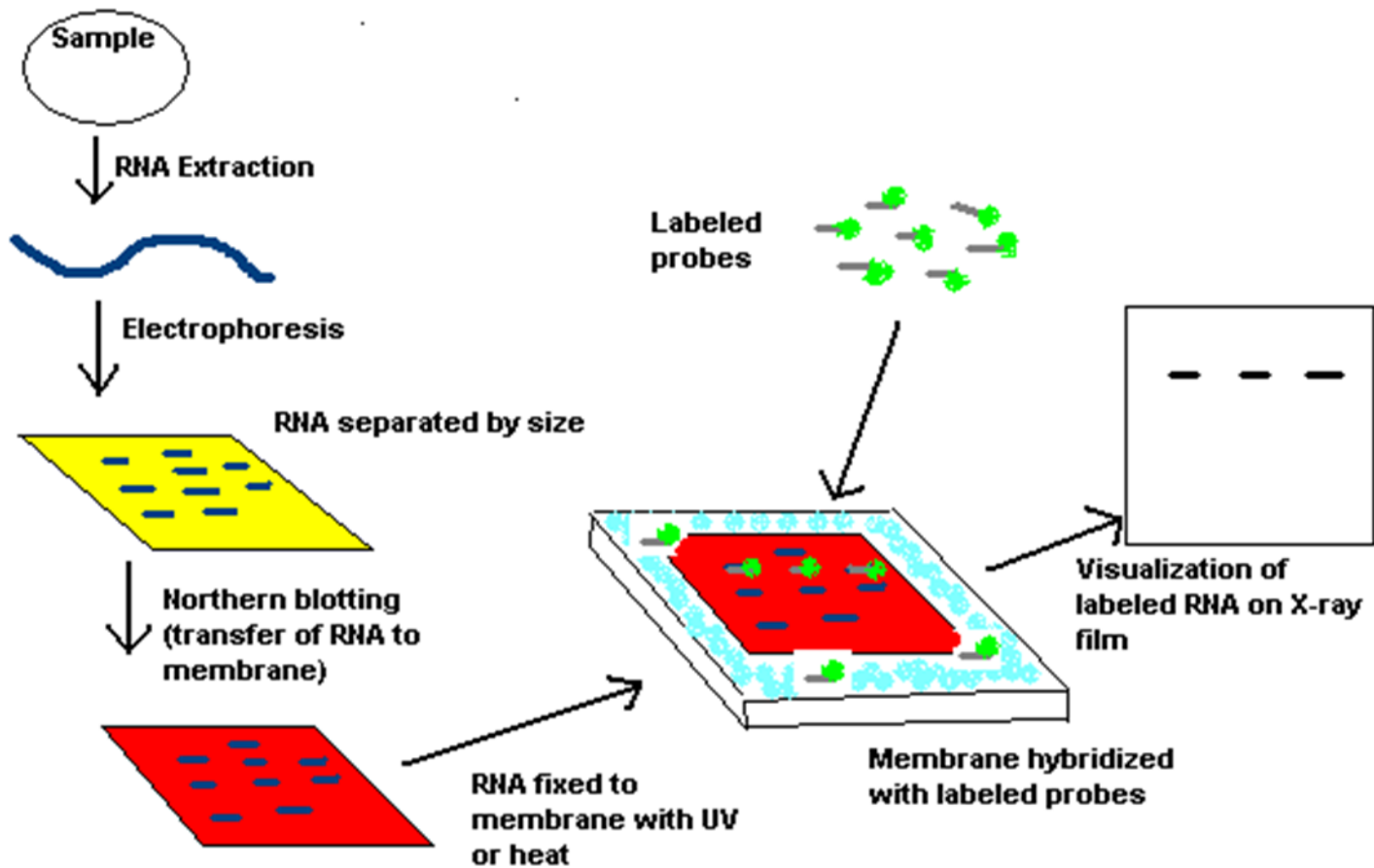


Probe labeling



Autoradiography





Blot bize ne anlatır?

- Blot, eşleşme bandı içeriyorsa “ilgilendiğimiz gen, bu doku ya da hücrede mRNA üretiliyor” sonucuna varırız!
- Blot, eşleşme bandı içermiyorsa ilgilendiğimiz gen eksprese olmamıştır!

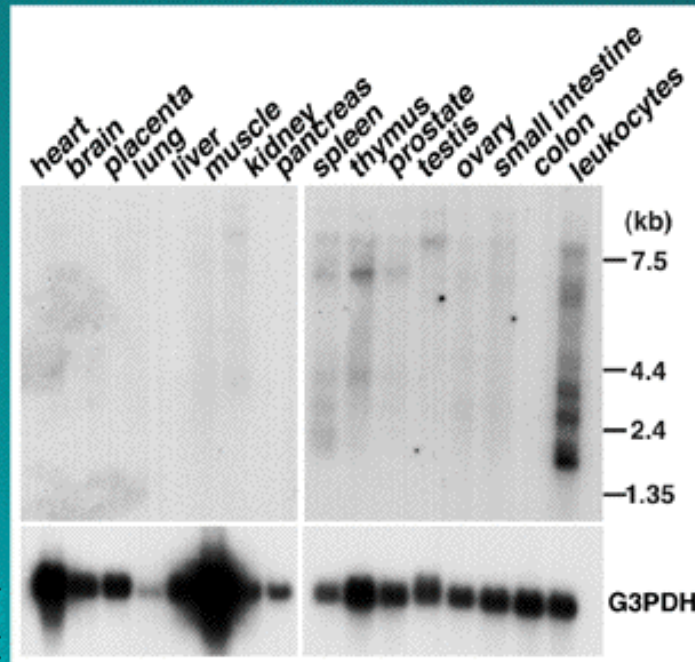
Northern Blotlamanın Sınırlamaları

- RNA kesinlikle bozulmamış ve tam olmalıdır
- RNA örneği minimum 10-30 mikrogram olmalıdır
- Çoklu proplar, bir örnekte birden fazla diziyi belirlemek için kullanılmaz
- Blot gen üzerinde ilgilendiğimiz dizinin nerede olduğunu belirtemez

Northern Blotlamanın Avantajları

- ◉ Doğru ekipman ve solusyonlarla yapıldığında çok kolay bir uygulamadır.
- ◉ mRNA örneğinin güvenilirliği ve membrana transferin verimliliği değerlendirilebilir.
- ◉ Radyoaktif ve non-radyoaktif probların her ikisi de uygundur.
- ◉ Bir çok kez yeniden kullanılabilen, çok kontrollü bir uygulamadır.
- ◉ Bir çok doku çeşidini inceleme imkanı vardır.
- ◉ Farklı örneklerden olsa bile farklı dokular blotta kıyaslanabilir.

Northern blotting of human tissues



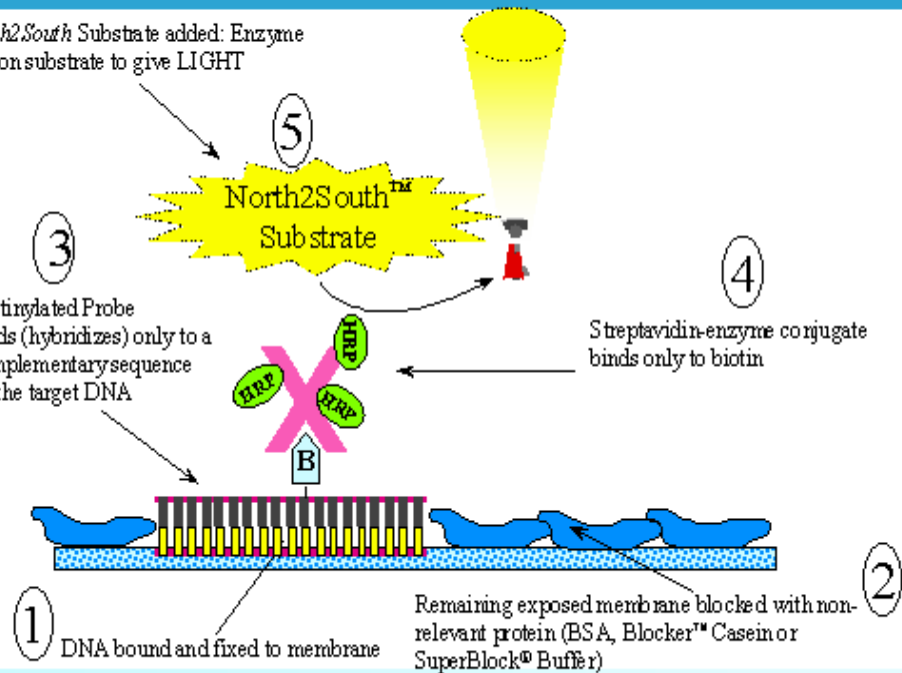
Yokomizo 1997

Northern Blotting

Southern & Northern Blotting

Typical Southern Blot Using Biotinylated Probe

North2South Substrate added: Enzyme acts on substrate to give LIGHT



North2South™, Blocker™ and SuperBlock® are trademarks of Pierce Chemical Company.



Blotlama Teknikleri

Western Blot

- Bir protein solüsyonunda, aranan bir proteinin olup olmadığını ve varsa ne kadar olduğunu anlamak için kullanılan bir yöntemdir
- Dokudaki proteinin tespiti
- Ekspresyon düzeyi
- Proteinin büyüklüğü



Western Blot'un Kullanıldığı Alanlar...

- Bir karışımdaki protein veya epitop tespiti
- Az bulunan antijenlerin nicel analizi
- Epitop haritalama
- Protein yapısındaki bazı bölümlerin analizi
- Liganda bağlanma testleri
- **Epitop=belirten grup = determinant grup** ;Antijenlerin yüzeyinde bulunan ve kendi özgül antikoları ile birleşmeyi sağlayan, böylece antijenin özgüllüğünü belirleyen kimyasal uç yapılar

Basamaklar

- **1.Örneklerin Hazırlanması:** Hücreler veya kültür hücreleri parçalanarak proteinleri içeren kısım diğer kısımlardan ayrıştırılır.
- **2.Elektroforez ve Transfer:** Öncelikle proteinler denatüre edilip, elektroforez yöntemiyle moleküler ağırlıklarına göre bantlar halinde ayrıştırılırlar ve sonrasında bir membran üzerine aktarılırlar (transfer). Bu basamağın amacı antikorlarla işaretlenebilecek bir yapı elde etmektir .
 - 2 tür transfer membranı vardır
 - •Nitroselüloz membran
 - •PVDF (Poli-viniliden florür)
- **3.İlgili Proteinin İşaretlenmesi ve Boyanması:** Blokaj (membranla antikorlar arasındaki nonspesifik bağlanmaları en aza indirmek için uygulanır ve membran bir dilue protein çözeltisi içinde (BSA-Bovin Serum Albumin veya Yağsız Süttozu-TBST karışımı) oda sıcaklığında 1 saat tutularak gerçekleştirilir.), birincil antikör, yıkama, ikincil antikör (Bu antikörlerin tespit edilmesiyle proteinin olup olmadığı, çıkan bantların kalınlığının kontrol bantlarıyla karşılaştırılmasıyla da ne kadar olduğu anlaşılır) yıkama ve boyama kısımlarından oluşur.
- **4.Görüntüleme ve Analiz:** Analog olarak bir filme veya dijital olarak CCD chip üzerine yapılabilir. Bantlar görülebilir ve analiz edilebilir hale getirilir.

