

12. WESTERN BLOT UYGULAMASI

MEMBRANA AKTARIMLA PROTEİN SAPTANMASI: WESTERN EMDİRİMİ (“BLOTTİNG”)

A. BİLGİ

Herhangi bir örnekten elde edilen ve çok sayıda protein içeren bir karışımın içinde istenen tek bir proteini özgün bir şekilde saptamak için moleküler biyolojide en yaygın olarak kullanılan yöntem Western blot yöntemidir. Bu şekilde ilgilenilen bir proteinin örnekte bulunup bulunmadığı ve bulunuyorsa göreceli olarak (yarı kantitatif) farklı gruplar arasındaki miktarı hesaplanabilir. Uygulanan protokol ve kullanılan boyaya göre değişmekle birlikte, bu yöntemle membran üzerinde bulunan 5 ng gibi az miktardaki proteinler dahi tespit edilebilir.

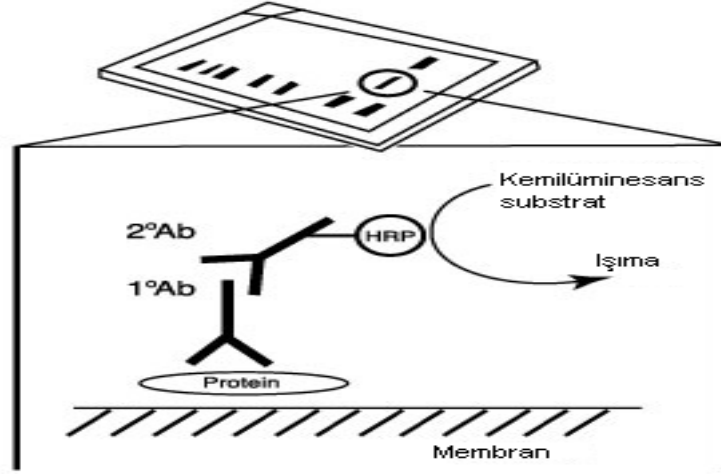
Western blot işleminden önce, örnekte karışım halinde buluna proteinler genellikle belli oranda bir ön ayırma tabi tutulur. Bu sayede elde edilen parametreler aranan proteinin tespitinde kullanılır. Bu ayırım moleküler ağırlıklarına (SDS-PAGE, elektroforez), büyüklükleri ve yüklerine (doğal PAGE), izoelektrik noktasına veya moleküler ağırlık ve izoelektrik noktasının her ikisine (2D-PAGE) göre olabilir. Ayrıca istenirse ve çalışma için gereklyse kromatografik yöntemlerle ön ayırım sağlanıp daha sonra jelle yüklenebilir.

Western blot işlemi birbirini takip edecek şekilde, (1) proteinlerin membrana aktarımı, (2) bloklama, (3) birincil antikor uygulanması, (4) ikincil antikor uygulanması ve (5) görüntüleme olmak üzere temel olarak beş basamaktan oluşur.

İlk aşamada, jelde ayrılan proteinler membrana aktarılır ve diğer tüm işlemler bu membran üzerinde gerçekleştirilir. Jel yerine membran kullanılmasının önemli avantajları vardır:

- Kullanılan antikorlar (veya diğer maddeler) membran yüzeyindeki proteinlerle çok daha kolay etkileşime girerler. Bu şekilde, jelin içine gömülü olduğu için saptanamayacak az miktardaki proteinler de, membrana aktarıldığında ince bir yüzeyin üzerinde toplanacaklarından tespit edilebilir hale gelirler.
- Yapılan işlemler jelle karşılaştırıldığında çok daha kısa sürede ve daha az madde harcanarak gerçekleştirilir.

- Membranlar jele göre daha dayanıklıdır ve uzun süre rahatlıkla saklanabilirler.



Western blot yönteminin temelini oluşturan antikor etkileşimlerinin şematik gösterimi (<http://www.cellsignal.com/products/7072.html>)

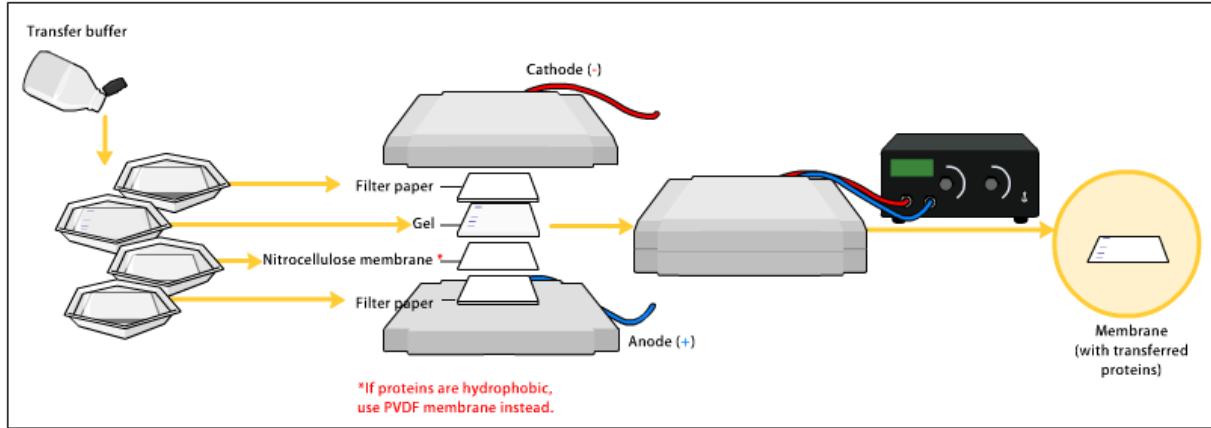
Aktarımda, farklı yük ve bağlama özelliklerinde çeşitli tipte membranlar kullanılabilir. Bunlar arasında en çok kullanılan ikisi, negatif yüklü olan nitroselüloz ve polivinilidin diflorür (PVDF) membrandır. Nitroselüloz membranda proteinlerin bağlanmasında hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler rol oynar. Kapasitesi yüksek ve maliyeti düşüktür, ancak kırılabilirliği fazladır. PVDF membranda proteinlerin bağlanmasında hidrofobik etkileşimler rol oynar. Kapasitesi ve maliyeti yüksektir ancak asitlere ve organik çözücülere daha dayanıklıdır ve dizileme ve amino asit analizleri için daha uygundur. Ayrıca membran üzerindeki antikorlar temizlenip farklı antikorlarla muamele edilerek aynı membranın birden fazla kullanılabilmesi de söz konusudur.

Proteinlerin membrana aktarımı pasif (kapiler) emdirim ve elektro-emdirim (electro-blotting) olmak üzere temelde iki yöntemden biriyle yapılabilir. Pasif emdirimde membran ile jel üst üste koyulur ve aktarma tamponuyla ıslatılmış kalın filtre kağıtları arasına yerleştirilir. Daha sonra bunların üzerine ağırlık koyularak jeldeki bantların, ıslak filtre kağıtlarındaki tamponun kılcal etkisiyle membran tarafından emilmesi sağlanır. Ancak bu işlem birkaç gün sürdüğünden genellikle daha hızlı ve etkin olan elektro-emdirim yöntemi kullanılır.

Elektro emdirim ıslak (wet blotting, tank aktarım sistemiyle) veya yarı kuru (semi-dry blotting, uygun cihazlarla) olarak yapılabilir. Islak emdirimde yine jel ve membran üst üste koyulur ve filtre kağıtlarıyla sandviç şeklinde hazırlanıp anot ve katot taraflarına dikkat ederek içinde

transfer tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirilir. Bu işlem 45 dk-1 sa gibi çok kısa bir sürede tamamlanır.

Yarı kuru emdirimde ise yine sandviç şeklinde hazırlanmış jel ve membran uygun cihazlarla yatay olarak elektrik akımı verilir. Bu yöntem de hızlıdır ve çok az transfer tamponu harcanır (sadece jeli yıkamak ve filtre kağıtlarını ıslatmak için).



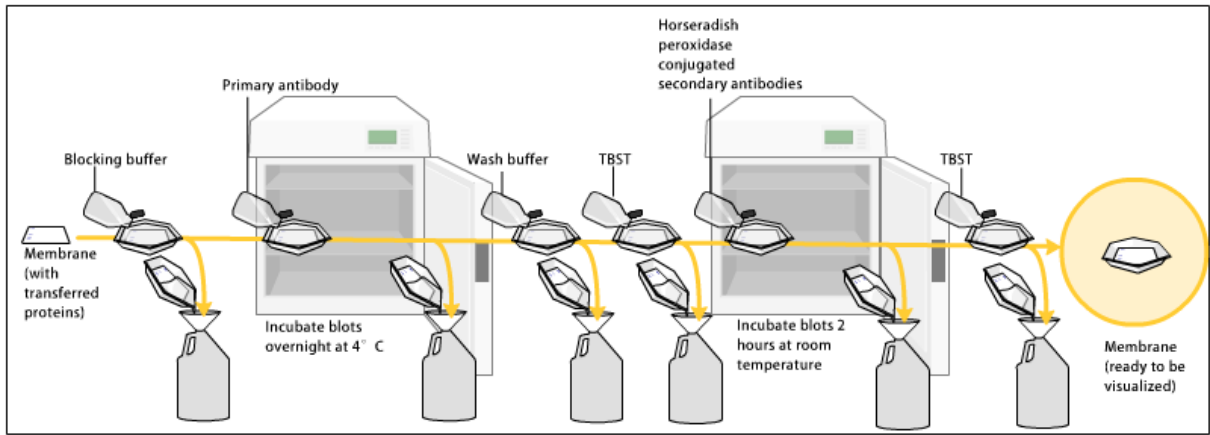
Yarı-kuru emdirim yöntemiyle proteinlerin jelden membrana aktarılması (<http://protocolsonline.com/proteomics/western-blotting/>)

Western blot yönteminde ikinci basamak olan bloklama işleminde amaç membrana aktarılan proteinlerin dışındaki boşlukların kapatılmasıdır (özellikle proteinlerin saptanmasında antikor gibi immünolojik etkileşimler kullanılacaksa). Bu sayede yine protein yapısında olan antikorların membranın boş kısımlarına bağlanması en aza indirgenmiş olur ve proteinlere bağlanma oranı da en üst seviyeye çıkarılır. Bu amaçla, kullanılan membranın özelliğine ve uygulanan protokole göre çeşitli bloklama tamponları/çözeltileri kullanılabilir. Bloklama için genellikle protein ajanlar tercih edilir. Bunlardan en çok kullanılanlar sığır serum albümini (BSA), yağsız süt tozu ve jelatindir (genelde tercih edilmez). Tween-20, NP-40 ve Triton X-100 (genelde tercih edilmez) gibi iyonik olmayan deterjanlar ve polivinilpirolidon (PVP-40) gibi bazı diğer maddeler de kullanılabilir.

Bu aşamadan sonra membran öncelikle, ilgilenilen proteine özgü birincil antikor (IgG) ile muamele edilir ve membrandaki proteinlerin antikor ile reaksiyona girmesi sağlanır. Birincil antikor seçilirken hedeflenen proteine karşı üretilmiş ve üzerinde çalışılan organizmaya uygun olmasına dikkat edilmelidir. Ancak herhangi bir organizmada üretilen bir antikor diğer

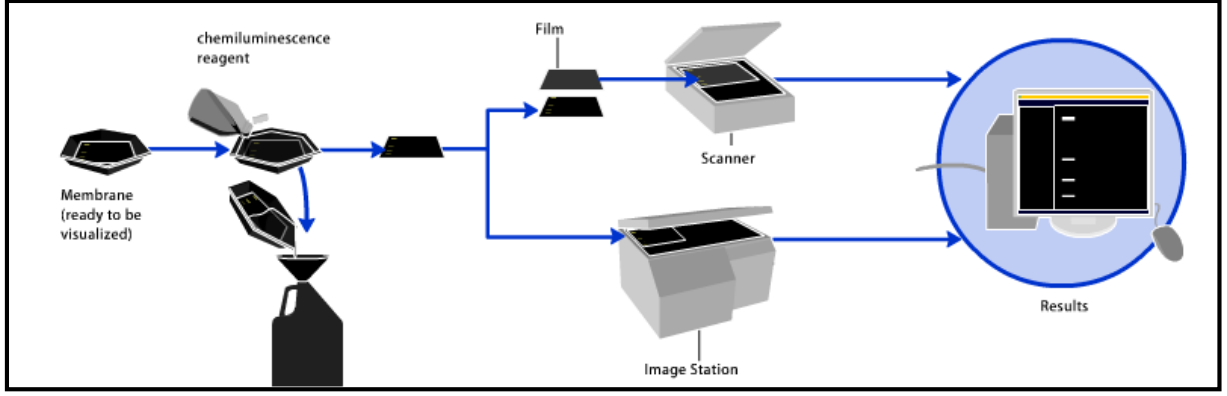
canlılarda da çapraz reaksiyon göstererek çalışabilir. Bu bilgi firmaların bilgi kağıtlarında yer almaktadır.

Daha sonra da, renkli bir ürün oluşturabilen bir enzim [alkalin fosfataz ya da yabanturpu peroksidazı (HRP)] bağlı veya radyoaktif işaretli ikincil antikor (anti-IgG) ile muamele ederek ikincil antikorun, hedef proteine bağlanmış olan birincil antikorlarla etkileşime girmesi sağlanır (Şekil 3). İkincil antikor seçilirken kullanılan birincil antikor ile uyumlu olmasına dikkat edilmelidir. Örneğin kullanılan birincil antikor tavşanda (rabbit) üretilip elde edilmişse, ikincil antikor anti-tavşan (anti-rabbit) olmalıdır. İkincilin hangi organizmada üretildiği önemli değildir, önemli olan birincil antikorun elde edildiği organizmanın IgG'leri için anti- özelliğe olmasıdır (Örneğin goat anti-rabbit olabilir. Yani keçide üretilmiştir ve antijen olarak tavşan IgG'si kullanılmıştır).



Western blot yönteminin bloklama, birincil ve ikincil antikor basamakları (<http://protocolsonline.com/proteomics/western-blotting/>)

Son olarak da membran görüntülenir ve ardından bilgisayar ortamında kaydedilir veya film olarak basılır. İkincil antikora bağlanmış enzimler için geliştirilen kemilüminesans özellikteki substratlar (luminol gibi) duyarlılığı önemli ölçüde arttırmaktadır. Saptama radyoaktif işaretleme ile de sağlanabilmektedir. Bunların dışında daha farklı saptama yöntemleri de vardır.



Membranın görüntülenmesi (<http://protocolsonline.com/proteomics/western-blotting/>)

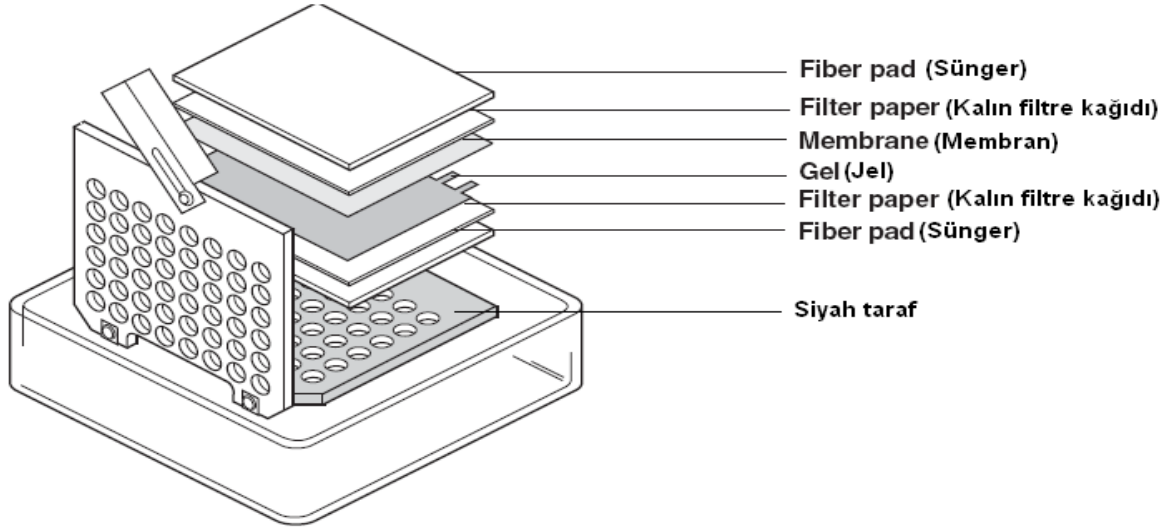
B. UYGULAMA

WESTERN BLOT PROTOKOLÜ

1. Öncelikle kullanılacak örnekten uygun olan bir yöntemle protein saflaştırması yapılır.
2. Kullanılacak olan örneklerin protein miktar tayini yapılarak (ör: Bradford yöntemi ile) protein konsantrasyonları belirlenir.
3. Örnekler **aynı miktarlarda protein içerecek şekilde** SDS poliakrilamid jele yüklenir ve yürütülür.

NOT: *Marker* olarak “prestained” kullanılarak transferin olup olmadığı kontrol edilebilir.

4. PVDF membran jelin boyutuna uygun olarak kesilir ve 10 dak. %100 methanolle çalkalayıcıda muamele edilir.
5. Membran ve yürümesi tamamlanan jel 15 dak. 1X Towbin transfer tamponuyla çalkalayıcıda muamele edilir.
6. Membran ve jel sandviç yöntemiyle western blot transfer aparatına (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, 170-3930, 170-3935, Bio-Rad) yerleştirilir. Bu işlem için sünger 1X Towbin transfer tamponuyla ıslatılır. Üzerine bir adet kalın transfer kağıdı transfer tamponuyla ıslatılıp koyulur. Onun üzerine jel koyulur. Jelin üzerine membran düzgün bir şekilde yerleştirilir ve yine sırasıyla transfer tamponuyla ıslatılmış kağıt ve sünger koyulur. Hava kabarcığı kalmaması için silindirik bir malzemeye üstünden bastırılır. **Daha sonra sıkıştırma aparatına jel tarafı siyah tarafa gelecek şekilde koyulur ve sıkıştırılır.** Transfer aparatına yine siyah taraf siyah tarafa gelecek şekilde yerleştirilir.



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

7. 1X Towbin transfer tamponuyla 100 V'de 1 saat transfer işlemi gerçekleştirilir. Transfer buz üstünde yapılır, ayrıca tankın içine de buz aküsü koyulur.
8. Proteinlerin transfer olduğu membran %5 BSA'lı (w/v) TBST içinde (bloklama tamponu) 1,5 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bloklanır.
9. Bloklama tamponu dökülür ve membran 3 kere 10'ar dakika TBST ile yıkanır (Her seferinde bir önceki dökülür).
10. **Bloklama tamponunun içinde** ilgilenilen proteine özgün "primary antibody" (birincil antikor) uygun oranda seyreltilerek 12-16 saat çalkalayıcıda +4°C'de çalkalanır.

NOT: En uygun seyreltme oranı için birincil antikorun bilgi kağıdına bakılmalıdır (ör: Cell Signaling Technology firmasının #4967 katalog numaralı β -aktin birincil antikoruna için bu seyreltme 1:1000 olarak belirtilmiştir. Birincil antikor, ilgilenilen protein neyse ona özgün olarak sipariş edilmelidir.

11. **Bloklama tamponunda seyreltmesi yapılan birincil antikor solüsyonu atılmaz, tekrar kullanım için ayrı bir tüpe alınarak +4°C'de saklanır.**

12. Membran 5'er dakika 4 kere TBST ile çalkalayıcıda muamele edilir.

13. Membran, **bloklama tamponu içinde** uygun oranda seyreltilerek hazırlanmış "secondary antibody" (ikincil antikor) ile oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1 saat muamele edilir.

NOT: İkincil antikor için uygun seyreltme yine ürünün bilgi kâğıdına bakılarak belirlenebilir.

14. Membran 5'er dakika 4 kere TBST ile çalkalayıcıda muamele edilir (Her seferinde bir önceki dökülür).

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 Thermo Scientific firmasının #34095 katalog no.lu SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate isimli kiti içindir. Kitin içinde SuperSignal West Femto Luminol/Enhancer Solution (#1856189) ve SuperSignal West Femto Stable Peroxide Buffer (#1856190) reaktifleri mevcuttur.

15. Kitin içindeki SuperSignal West Femto Luminol/Enhancer Solution ve SuperSignal West Femto Stable Peroxide Solution reaktiflerinin 1:1 oranında karıştırılmasıyla "çalışma çözeltisi elde edilir. Elde edilen "çalışma çözeltisi" içinde membran 5 dak. oda sıcaklığında çalkalayıcıda muamele edilir ve görüntülenir. Çalışma çözeltisi ışığa duyarlı olduğundan bu işlem karanlıkta gerçekleştirilmelidir.

"STRIPPING" İŞLEMİ

(Primer ve sekonder antibadileri membrandan temizleyip yeni antibadi uygulanması)

16. Membran 2 sefer 5 dk. TBST ile yıkanır.

17. Çalkalayıcı su banyosunda 50°C'de 30 dk. çalkalanır.

18. 3 sefer 5'er dk. TBST ile yıkanır.

19. Bloklama aşamasından (8. basamak) itibaren protokol aynı şekilde uygulanır.

Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

10X Towbin Transfer Tamponu Stok Çözeltisi (1 litre için) (+4°C'de saklanır)

- 30.3 g Tris
- 144 g Glycine
- 20 ml %10 SDS

1X Towbin Transfer Tamponu Kullanım Çözeltisi (+4°C'de saklanır)

10X'lik stok kullanılırken aşağıdaki şekilde 1X'e seyreltilir:

100 ml 10X stok + 200 ml %100 methanol + 700 ml ultra saf su

TEKRAR KULLANILABİLİR

10X TBS stok (1 litre için) (+4°C'de saklanır)

- 24.23 g Trizma-HCl
- 80.06 g NaCl

Çözeltinin pH'ı 7.6 civarı olmaktadır.

TBST (+4°C'de saklanır)

10X'lik TBS stoğu 1X'e seyreltilir ve içine son hacim oranı %0.05 (v/v) olacak şekilde Tween 20 koyulur (Ör: 10 ml 10X stok + 89.95 ml ultra saf su + 50 µl Tween 20).

Bloklama Tamponu

TBST içine %5 (w/v) oranında BSA koyulur (Ör: 5 g BSA tartılıp 100 ml'ye TBST ile tamamlanır).

Stripping Tamponu (100 ml için) (Oda sıcaklığında saklanır)

- 750 mg Tris
- 2 g SDS
- 700 µl 2-merkaptoetanol

pH 6.8 civarı olmalı.

Kaynaklar

Özel Duygu Demiralp, İğci Naşit, Peker Selen, Ayhan Beycan, 2014, Temel Proteomik Stratejiler, Ankara Üniversitesi Yayınevi, ISBN: 978-605-136-148-2, 2014

Özel Duygu Demiralp, İğci Naşit, Peker Selen, Ayhan Beycan, 2013, Temel Proteomik Stratejiler, Ankara Üniversitesi Yayınevi, ISBN: 978-605-136-117-8, 2013.