

11. Hafta

HİBRİDİZASYON YÖNTEMLERİ

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

- Materyallerde (doku, organ, hücre kültürü, eksret, sekret, vs.) bulunan hastalık ajanlarının veya bu dokulara ait hücre DNA'larındaki spesifik genlerin işaretli problarla ortaya konması
- Prob hibridizasyon yöntemleri

1. Southern Blot Hibridizasyon
2. Northern Blot Hibridizasyon
3. Dot Blot Hibridizasyon
4. In situ Hibridizasyon

Southern Blot Hibridizasyonu

1. Genomik DNA'nın izolasyonu
2. Spesifik restriksiyon endonukleaz (RE) enzimi ile kesim
3. Fragmentlerin elektroforezi
4. Bantların membran üzerine transferi (Southern transfer)
5. Denaturasyon ve fikzasyon
6. Hibridizasyon
7. Otoradiografi

- Southern tarafından geliştirilmiş
- Teşhis materyallerinde bulunan m.o.ların izole ve daha sonra da pürifiye edilmiş DNA'larındaki spesifik sekanslar, işaretli proplar (DNA veya RNA prob) yardımı ile ortaya konulur.

1. Genomik DNA'nın izolasyonu

- Lizozim ve diğer enzimlerden faydalanılarak m.o.ların hücre duvarları ve dış membranları lize edilir.
- Ekstraksiyon solüsyonuna SDS (sodyum dodesil sülfat), proteinaz K ve Rnase'lar katılarak DNA dışındaki komponentler giderilir.
- DNA'nın endojenik nukleaz'lardan korunması için EDTA katılır.
- Ökaryotiklerde fenol kloroform ekstraksiyonu
- Polisakkaritleri gidermek için caesium chloride density gradient santrifugasyon

- DNA'nın konsantrasyonu; spektrometrik veya elektroforetik yöntemler
- Doku veya organ hücre DNA'ları uygun ekstraksiyon yöntemi
- Plasmid, faj ve virüslara ait genetik materyaller uygun yöntemlerle...

2. Spesifik RE ile kesim

- EcoRI, Hind III, BamHI gibi enzimler
- Denemede tek ya da iki veya daha fazla enzim
- 37C'de 4-6 saat kadar
- DNA belli bazlarından kesilerek, küçük küçük büyüklü çok sayıda DNA segmentleri

3. Fragmentlerin elektroforezi

- Bir gece 40-50 V'ta, agaroz jelde elektroforez
- Fragmentler büyükten küçüğe doğru sıralanır
- Jel üzerinde oluşan bantlar ethidium bromide ile boyanarak UV-ışınları altında görülebilirler

- İyi bir kesimde 20 kb'dan büyük 100'e yakın bant
- DNA'lardaki farklılıkları ortaya koymada
- Restriksiyon analizleri yapmada RFLP, RAPD teknikleri
- Agaroz jel yanısıra PAGE kullanılır

4. Bantların membran üzerine transferi (Southern transfer)

- Agaroz jel üzerinde bulunan bantların naylon veya nitrösellülöz membran üzerine transferleri
- Elektrotransfer, alkali kapillarite
- Daha çok naylon membranlar tercih edilir

5. Denatürasyon ve fikzasyon

- Naylon üzerine transfer edilen DNA bantları kurutulur
- 0.5 N NaOH ile denature edilir
- 80C'ye kadar ısıtılır, tek iplikçiklerin membran üzerine fikse edilmesi sağlanır
- Fiksasyonu sağlamlaştırmak için tespit işlemi vakum içinde yapılır

6. Hibridizasyon

- 60-65C'de 2-4 saat prehibridizasyon
- Yıkama
- İşaretli DNA prob (^{32}P veya biotin) veya RNA prob ilavesi
- Membran üzerindeki tek iplikçik ve işaretli prob, kendine komplementer olan tek iplikçik DNA segmenti ile nonkovalent bağlarla karşılıklı olarak birleşir ve çift iplikçikli DNAxDNA dubleksisi oluşur (hibridizasyon)
- Bir gece
- Yıkama

7. Otoradiografi

- Naylon membran üzerine X-ışınlarına duyarlı bir film kapatılır
- 70C'de 1 gece tutulur
- Filmin banyosu
- İşaretli problarla birleşmiş hedef DNA sekanslarının bulunduğu bölgeler siyah renkte görülür. Bu bölgeler aralarında genin lokalize olduğu yerleri ifade eder
- Biotinle işaretli problarda, avidin, peroksidaz ve kromojen madde yardımı ile oluşan renk değişimi aranılan hedef DNA segmentinin bulunduğu yeri gösterir

Northern Blot Hibridizasyon

- DNA yerine, mRNA, viral RNA veya total RNA
- RNA'nın jel üzerinde seperasyonu, filtreye transferi, spesifik proba (RNA veya DNA) hibridizasyonu ve otoradiografisi Northern Blot Hibridizasyonu...
- Genlerin transkripsiyon düzeyinde iken analizlerini yapmak, doku ve organlardaki mRNA seviyesini belirlemek ve viral RNA'lar arasındaki farkın saptanmasında kullanılır.

Northern Blot Hibridizasyonu

1. RNA'nın izolasyonu
2. RNA'nın elektroforez ile seperasyonu
3. RNA'nın naylon membran üzerine transferi (Northern transfer)
4. İşaretli DNA veya RNA problemlarla hibridizasyon
5. Otoradiografi ile görüntüleme

- RNA'lar DNA'dan selektif olarak lithium chloride veya sodium acetate ile presipitasyon yöntemiyle çöktürülerek ayrılır.
- RNA moleküllerinin agaroz jelde separasyonundan önce RE ile kesime gerek yoktur
- İstenirse mRNA veya viral RNA, reverse transkriptaz enzimi ile cDNA'ya çevrilerek Southern blotting yapılabilir.

3. Dot Blot Hibridizasyon

- Patolojik materyallerden etkene ait nukleik asitler ekstre edilerek çıkarılır ve konsantre edilir.
- Örnekler x2 veya x5 dilue edilir
- Her bir dilusyondan naylon veya nitrosellülöz membran üzerine bir damla damlatılır
- Denatürasyonla membran üzerine fikse edilir
- ^{32}P ile işaretli spesifik tek iplikçik prob ilave edilir
- Sonraki işlemler Southern Blot'taki gibidir
- Film üzerindeki koyu lekeler hibridizasyon bölgesini gösterir

4. In Situ Hibridizasyon

- İnfekte doku kültürleri, biyopsi materyalleri, doku süspansiyonları, periferal kandan bir damla lam üzerine alınır.
- Denaturasyondan sonra işaretli (^{32}P , biotin-avidin) cDNA prob eklenerek hibridizasyon sağlanır.
- M.o.ların DNA'larının bulunduğu yer kolayca belirlenir.

IMMUNOJENİK SUBSTANSLARIN SAPTANMASI

- Hastalık etkenlerinin, bunlardan elde edilen antijenik substansların (protein, glikoprotein, vs.) ortaya konmasında biyoteknolojik yöntemelerden yararlanır.
 1. Immuno (Western) Blotting
 2. Protein Dot Blot Deneyi
 3. In Situ Immunoperoksidaz Deneyi
 4. Monoklonal Antikorların Kullanılması

Immuno (Western) Blotting

- Etkenlere ait proteinler saf olarak elde edilip, SDS ile muamele edildikten sonra SDS-poliakrilamid jel elektroforezis'i ile moleküler ağırlıklarına göre separe edilir.
- Elektrotransfer ile nitrösellülöz kağıtlarına aktarılır ve havada kurutulur
- Kağıt şeritler poliklonal veya monoklonal antikorlarla muamele edilerek, antikorların proteinlerle (antijenle) birleşmesi sağlanır.

- Yıkama
- Yıkanan kağıt şeritler üzerine birinci antikörlara karşı hazırlanmış ve işaretenmiş (32P, biotin) keçi anti-IgG spesifik antikörları konur.
- Eğer 32P işaretili ab'ler kullanılmışsa sonuç otoradiografi ile, biotinli ab kullanılmışsa avidin-peroksidaz konjugatı 4-chloro-1-naphtol substratı ilave edilerek renk değişikliğine göre değerlendirme yapılır.

Protein Dot Blot Deneyi

- Hedef etkene karşı spesifik monoklonal ab'lar nitrosellülöz kağıtlarına konur ve 10-15 dk. kurutulur
- İnfekte dokulardan hazırlanan mikroorganizmalara ait süspansiyonların (protein antijen) supernatantları, filtre kağıdında kurutulmuş olan antikörlerin üzerine damlatılır.
- 2 saat bekleme (ab-ag konjugatı)
- Filtre yıkanır, etkene karşı hazırlanmış ve biotinle işaretli antiserum, konjugat üzerine damlatılır ve 2 saat inkube edilir ve yıkanır.
- Avidin enzim konjugatı ve substratı eklenir.

In Situ Immunoperoksidaz Deneyi

- Formalinle fikse edilmiş infekte doku kesitlerinde poliklonal veya monoklonal antikolar kullanılarak, bakteriyel veya viral proteinler saptanır. Kesitler spesifik ab'lar ile inkube edilir, substrat olarak amino ethyl-carbazole katılır. Dokularda bulunan mikrobial proteinler renk değişikliğine göre saptanır.

Monoklonal Antikorların Kullanılması

- Dokularda, doku kültürlerinde, embriyolu yumurtalarda üremiş olan m.o.ların saptanmasında, fluorescein, peroksidaz-antiperoksidaz, biotin-avidin, radioizotop, enzimler, vs. ile işaretlenmiş monoklonal antikorlar başarı ile kullanılırlar.