

Laboratuvar Teknikleri

“Western Blott” Tekniği

1975 yılında Southern, jel elektroforezi ile ayrılmış spesifik DNA fragmentlerini nitrosetilüloz membran filtreleri kullanarak tanımladı. Bu teknik hemen kabul gördü ve Southern blotlama ismini aldı. Bu teknik moleküler biyolojide bir mihenk taşı oldu. Bundan kısa bir süre sonra, RNA molekülünün filtre matrislerinde immobilize edilerek analizini sağlayacak yeni bir teknik geliştirildi. Bu teknik de Northern blotlama ismini aldı. Jeolojik tanımlama serisine devam edilerek; 1979 yılında bulunan yeni tekniğe protein blotlama ya da birçoğumuzun bildiği yaygın ismi ile Western blotlama ismi verildi.

“Western blott” ya da “Immunoblott” tekniği, antikor tespitinin özgülüğü ile jel elektroforezinin rezolüsyonunu biraraya getiren bir yöntemdir. Blotlama tekniği, bir antijenin varlığı ve miktarı, moleküler ağırlığı ve antijen izolasyonunun etkinliği gibi protein antijenlerinin önemli özelliklerini belirlemede kullanılabilir.

1979 yılında yöntemin keşfiyle birlikte protein blotlama, araştırma laboratuvarları için rutin bir araç haline dönüştü. Geleneksel olarak kompleks bir örnek içerisinde düşük miktardaki proteinlerin bulunması ya da protein sentezi ve temizlenmesinin izlenmesi için kullanılır. En basit protein blotlama yöntemi olarak bilinen dot blott yönteminde, mikroporlu bir membran üzerine proteinin transferinde vakum filtrasyonu kullanılır. Bu metot toplam

protein sentez miktarı hakkında niteliksel bilgi sağlayabilir ve paralel birçok örnek uygulanabilir, ancak proteinin moleküler ağırlığı hakkında bilgi vermez.

Daha kompleks bir yöntem olan “Western blott”, protein karışımının jel elektroforezi ile ayrıştırıldıktan sonra uygun bir membrana transferini kapsar. Protein spesifik olarak işaretli antikor veya antijenle reaksiyona girerek tanımlanabilir (Şekil 1). Bu yöntem ile özel bir proteinin moleküler ağırlığı bilgisi ve işlenmiş ürünlerden izoformların ayırımı mümkündür. Protein uygun bir membrana transfer edildikten sonra görüntüleme için boyanabilir, N-ucundan sekanslanarak direkt olarak tanımlanabilir, kütle spektrofotometri ya da immünespit yapılabilir.

İMMÜN SAPTAMAYA ETKİ EDEN FAKTÖRLER

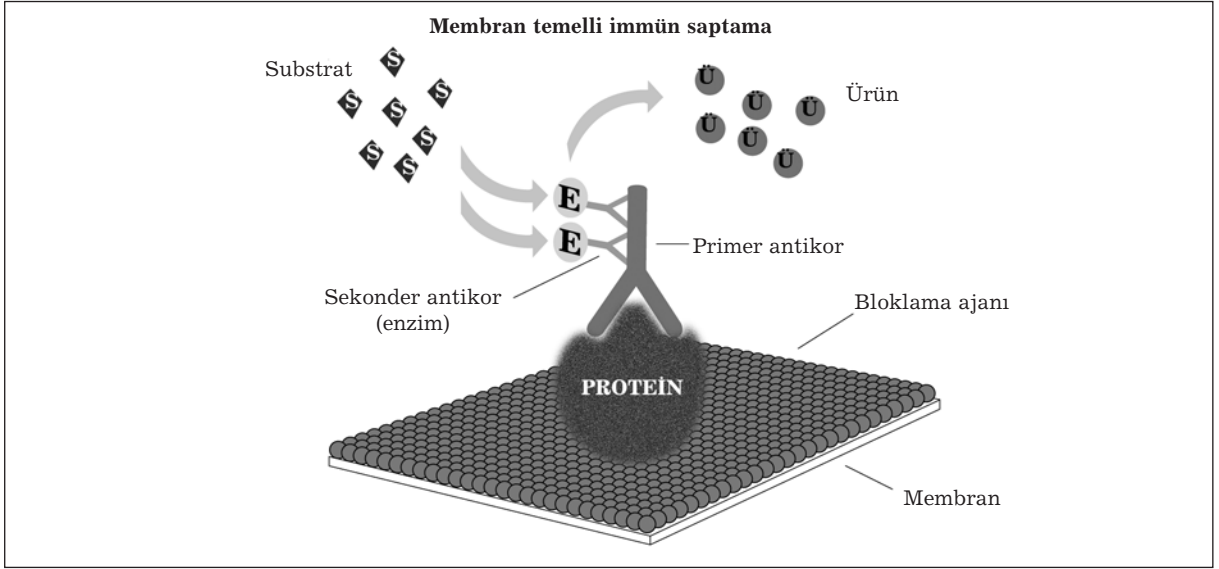
Yeni bir “Western blott” protokolü geliştirirken, bütün komponentler ve bunların etkileşimleri düşünülmelidir. Antikor konsantrasyonu, tampon içeriği, bloklama ajanları ve inkübasyon süreleri deneysel olarak test edilmeli ve en iyi şartlar belirlenmelidir.

Genellikle gözardı edilen su kalitesi tüm basamaklarda önemlidir ve küçük kirlilikler bile büyük problemlere yol açabilir. Örnek olarak, “horseradish” peroksidaz enzimi en saf sularda dahi yaygın olarak bulunan pirojenler tarafından inhibe edilir ve azid antikor solüsyonlarında koruyucu olarak kullanılır.

Yazışma Adresi: Dr. Çağatay KARAASLAN

Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Bölümü, ANKARA

e-posta: ckaraaslan@yahoo.com



Şekil 1. Membran temelli immün tespit yöntemi.

Tamponlar

İki tampon çözeltisi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar fosfat tamponu [phosphate buffered saline (PBS)] ve tris tamponu [tris buffered saline (TBS)] dir. Bu tamponların değişik konsantrasyondaki uygulamaları çeşitli makalelerde yayınlanmıştır. Burada önemli olan, tamponun antikorun biyolojik aktivitesini koruyabilecek özellikte olmasıdır.

Bloklama

Anlamli bir sonuç elde etmek için, antikorlar membranda yalnızca ilgilendiğimiz proteinlere bağlanmalıdır. Antikorların özgün olmayan bağlanmalarını azaltmak için etkileşimsiz protein ya da iyonik olmayan deterjanlar kullanılarak membranın boş kısımları bloklanır. Bloklama ajanının membrana antikordan daha yüksek afinite göstermesi gereklidir. En yaygın kullanılan bloklama ajanları sığır serum albumin (BSA, %0.2-5), yağ içermeyen süt tozu, kazein, jelatin ve Tween 20'nin dilüe solüsyonlarıdır.

Antikorlar

Bloklamadan sonra ilgilenilen proteine özgü primer antikor ile membran inkübe edilir. Bağlanmayan primer antikor yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra konjuge enzim ya da boya içeren sekonder antikor ile membran inkübe

edilerek, primer antikora bağlı sekonder antikor kompleksi oluşturulur.

Direkt olarak işaretli primer antikor kullanılabilir ise de; sekonder antikor kullanımı duyarlılığın artırılması gibi birçok avantajlara sahiptir.

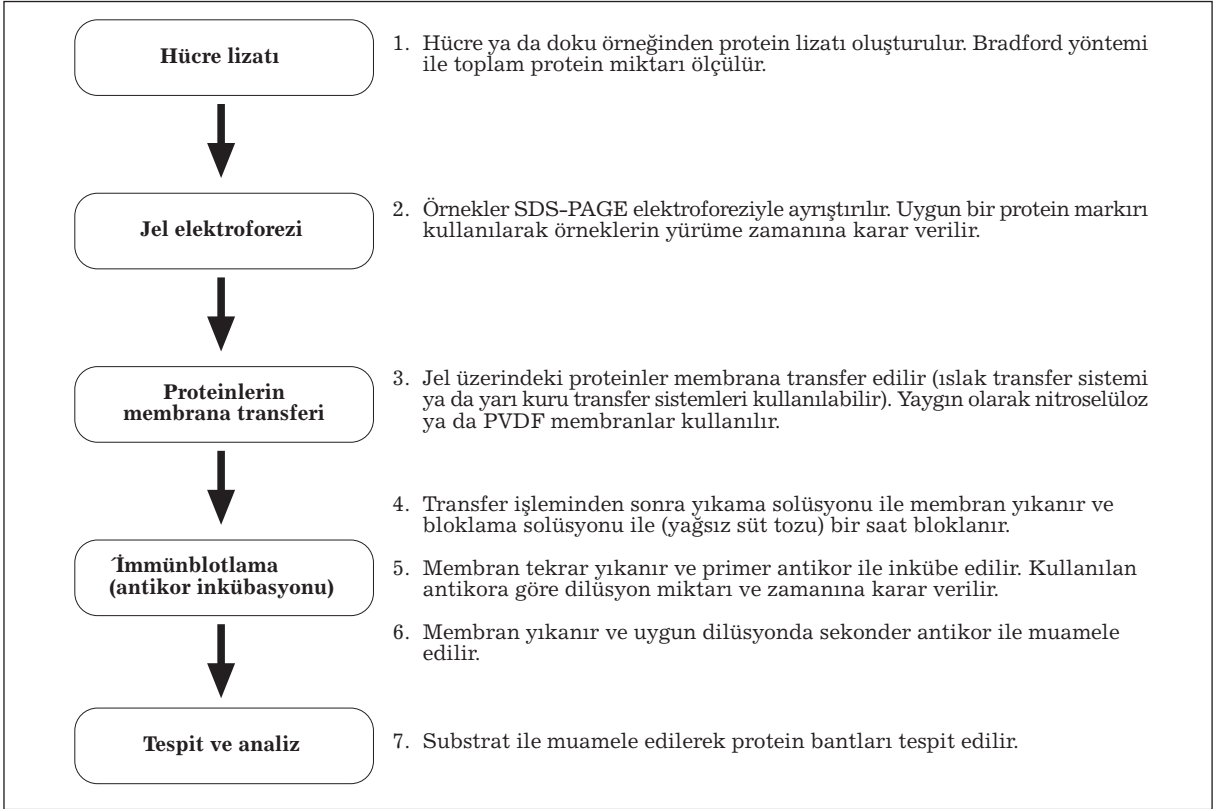
Yıkama

Ortamda bağlanmadan kalan ve yüksek oranda özgül olmayan sinyal veya düşük oranda özgül sinyal verilmesine neden olan antikorların ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla TBS-Tween 20 (TBST) ya da PBS-Tween 20 (PBST) solüsyonları kullanılır.

Saptama Solüsyonları

Membran üzerinde özgül bağlamaları tespit etmek için sekonder antikora konjuge enzim (horseradish peroksidaz ya da alkalen fosfat) reaksiyona girerek sinyal oluşturacak substratların kullanılması gerekmektedir. Üç tip substrat yaygın olarak kullanılır. Bunlar kromojenik, kemilüminisans ve kemifloresans substratlarıdır.

Aşağıda şekil üzerinde verilen Western blotlama yöntemi araştırmacının ilgilendiği proteinin hücrede ya da dokuda bulunduğu miktara, fizyolojik koşullarına, kullanılacak antikorun çeşidine göre çeşitli modifikasyonlar gerektirebilmektedir.



KAYNAKLAR

1. Burnette WN. "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem 1981;112: 195-203.
2. Immunodetection: Application and Product Guide. 2007 Millipore.
3. Protein Blotting: A Practical Approach. Dunbar BS (ed). IRL Press, at Oxford University Press, 1994.
4. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979;76:4350-4.

5. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Immunoblotting in the clinical laboratory. J Clin Chem Clin Biochem 1989;27:495-501.

Ç. KARAASLAN*

* Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji Bölümü
ANKARA