



WESTERN BLOT

Yrd. Doç. Dr. Eda Becer

Yakın Doğu Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



James Alwine
George Stark

Northern Blot
(RNA)



George Stark

Western Blot
(Protein)

Eastern
Blot (??)

Southern Blot
(DNA)



Edwin
Southern

Western Blot

Western Blot testi moleküler biyolojide protein solüsyonunda aranan bir proteinin olup olmadığını ve varsa ne kadar olduğunu anlamak için kullanılan bir yöntemdir.

Western blot tekniği, antikor tespitinin özgüllüğü ile jel elektroforezinin rezolüsyonunu bir araya getiren bir yöntemdir.

Towbin H, et al (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76 (9): 4350–4354

Western Blot Nerelerde Kullanılır

- Kanser biyolojisi ve patolojisi
- Mikrobiyoloji
- İmmünoloji
- Protein biyokimyası
- Doku çalışmaları
- Antikor testlerinde



Western Blot Yönteminin Aşamaları

Örneklerin Hazırlanması



Jel Elektroforezi



Proteinlerin Membrana
Transferi



İmmunblotlama
(antikor inkübasyonu)

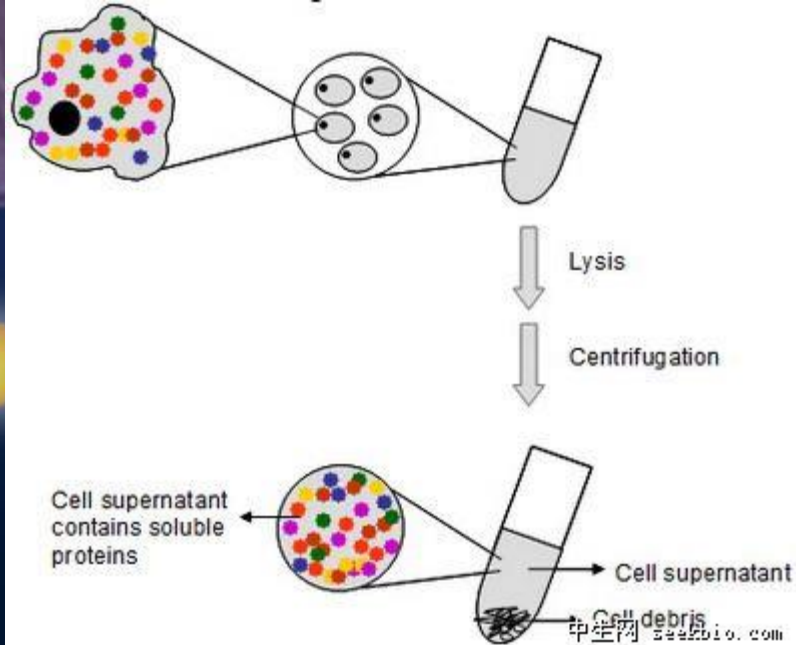


Görüntüleme ve Analiz

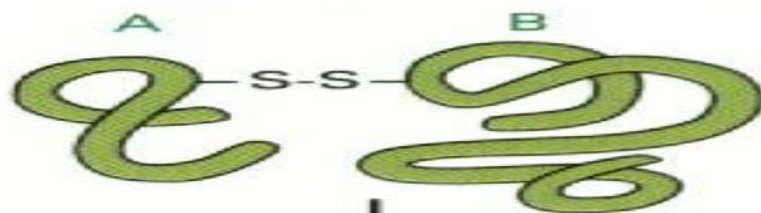


Örneklerin Hazırlanması

- 1- Doku Homojenizasyonu
- 2- Proteaz inhibitörleri
- 3- Lysis buffer (Tris-HCl çözeltisi, üre, sodyum dodesil sülfat, gliserol, β -merkaptoetanol, bromfenol mavisi)
- 4- Santrifüj
- 5- 95-100 °C'de bekletme (protein üç boyutlu yapısının kırmak için)



protein with two subunits, A and B, joined by a disulfide bridge



single subunit protein



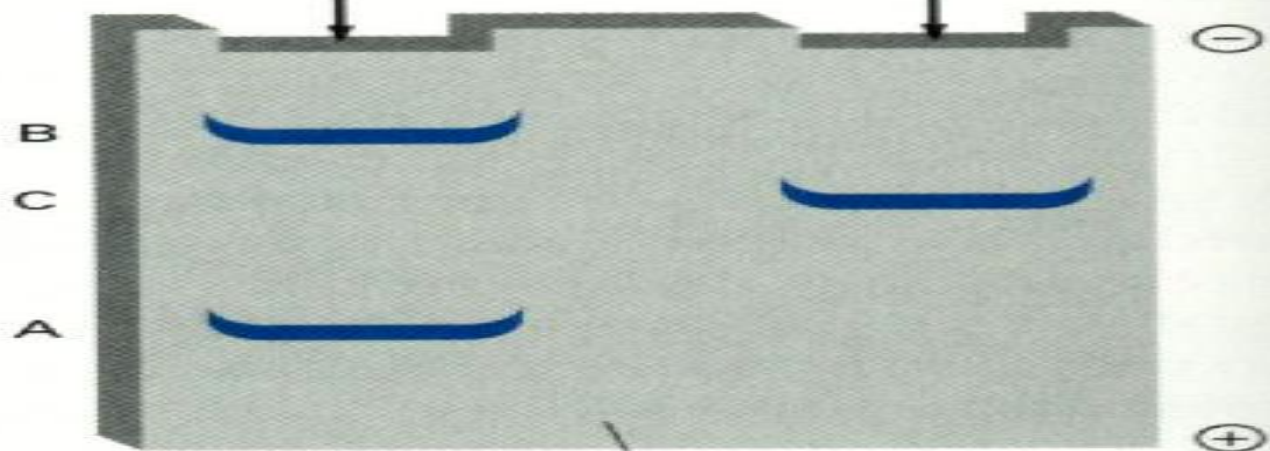
HEATED WITH SDS AND MERCAPTOETHANOL



negatively charged SDS molecules



POLYACRYLAMIDE-GEL ELECTROPHORESIS

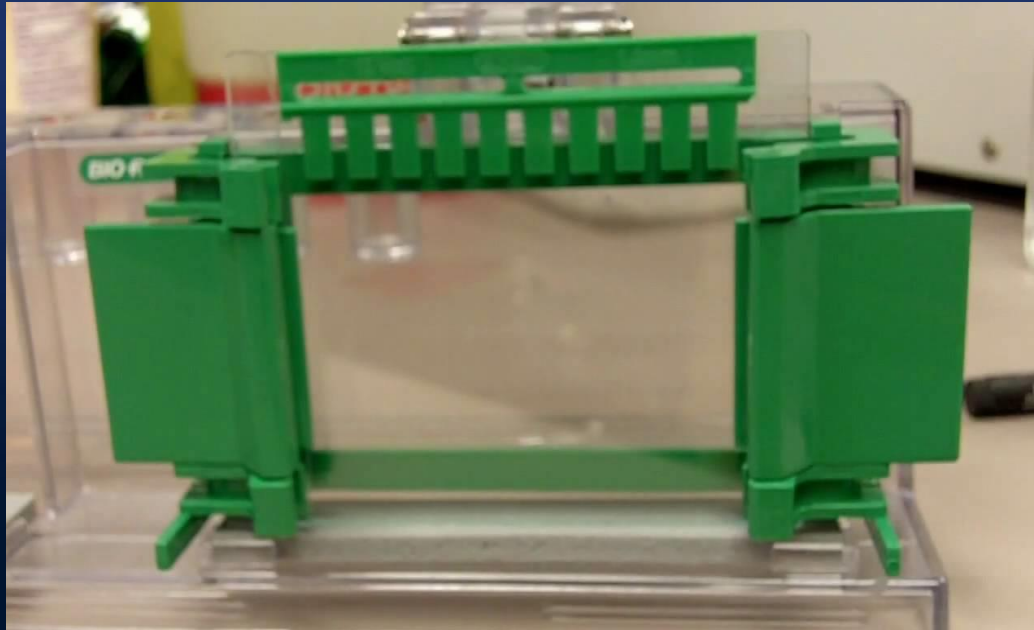


slab of polyacrylamide gel

SDS-PAGE Jel Elektroforezi (Sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektroforez)

SDS: oligomerik proteinleri altbirimlerine ayıran bir deterjandır. Bu deterjan polipeptidlere bağlanarak bir kompleks oluşturur ve bu oluşan kompleks polipeptidlerin negatif yüklü kalmalarını sağlar.

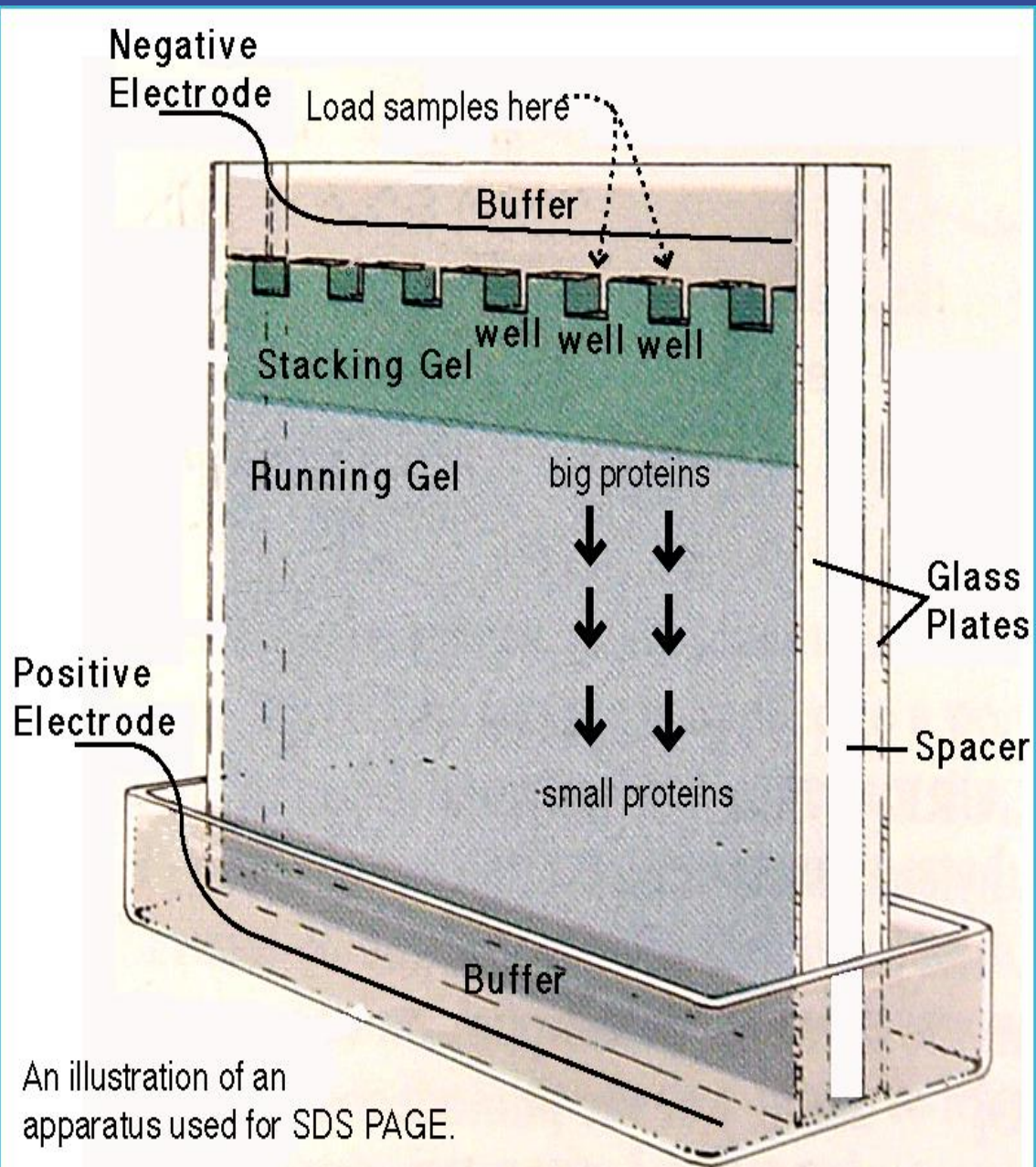
PAGE: Elektriksel çekim kuvveti kullanılarak proteinleri boyutlarına göre ayırmak için kullanılan ortama denir.





10% Stacking gel	dd H ₂ O	3 mL
	1 M Tris-HCl	2.1 mL (pH 8.9)
	30% Acr Bis	2.8 mL
	10% SDS	80 µL
	10% APS*	56 µL
	TEMED*	6 µL
6% Separating gel	dd H ₂ O	2 mL
	1M Tris-HCl	400 µL (pH 6.7)
	30% Acr Bis	600 µL
	10% SDS*	36 µL
	10% APS*	24 µL
	TEMED	4 µL

* , APS: Ammonium Persulfate ; TEMED: Tetramethylethylenediamine;
SDS: Sodium dodecyl sulfate

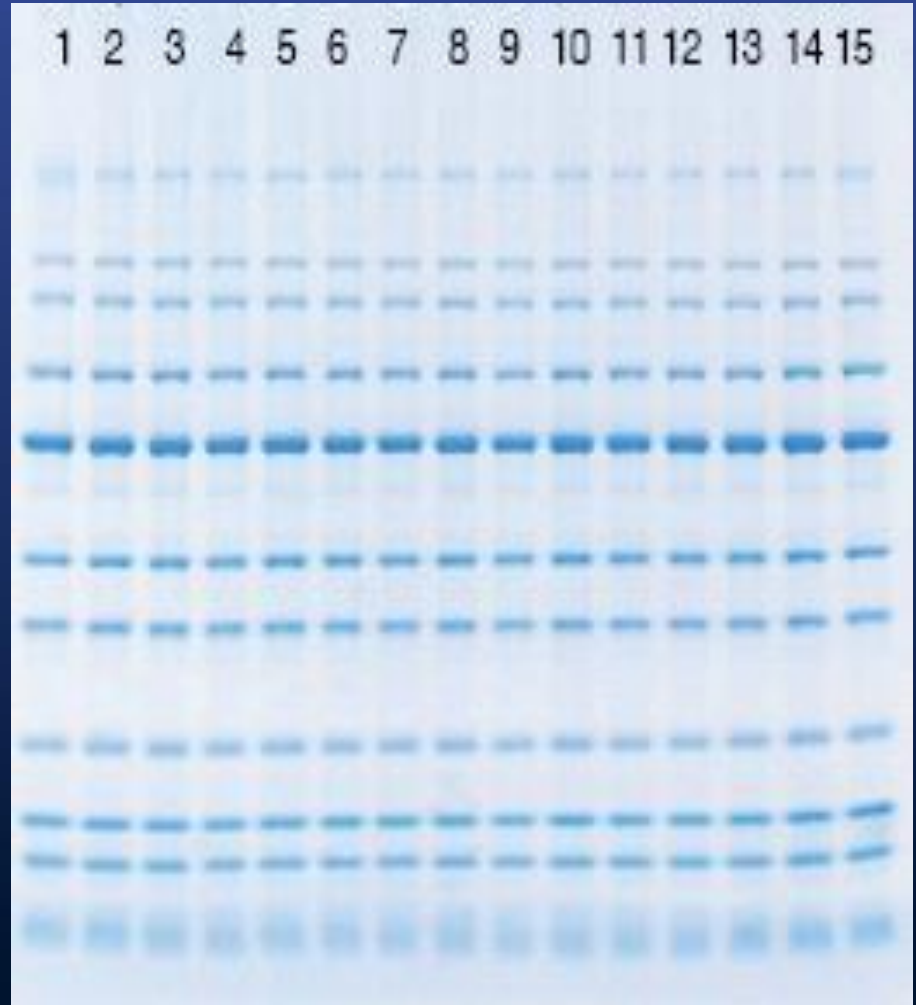


Gradient SDS-PAGE Gel



%4

%20

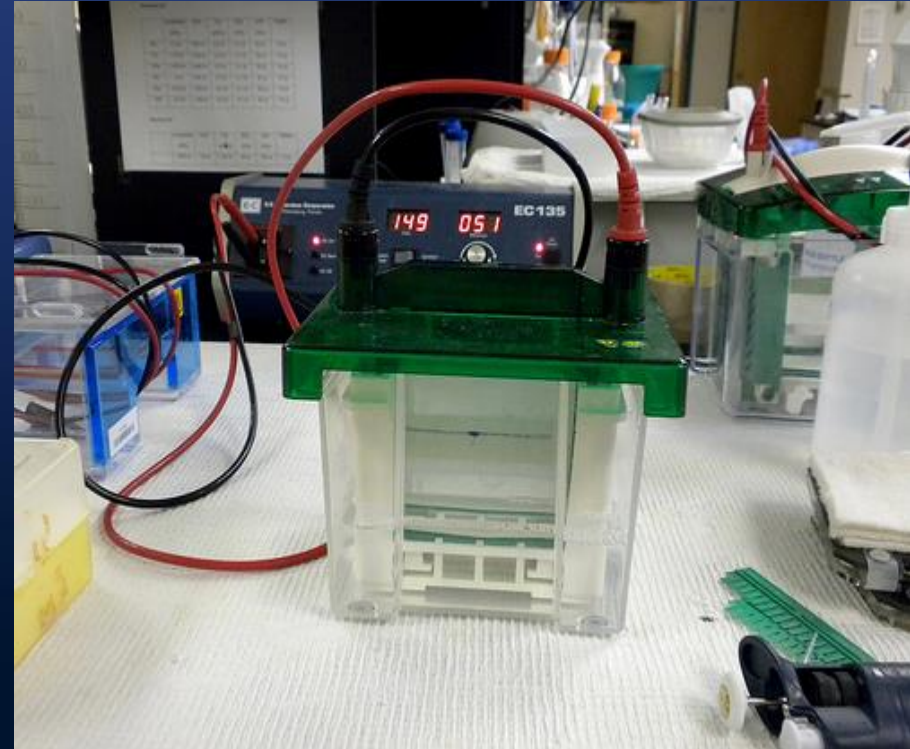


SDS-PAGE Jel Elektroforezi

Eksi yüke sahip proteinler elektrik akımı ile jelde moleküler büyüklüklerine göre ayrılır.

Elektroforez Tamponu

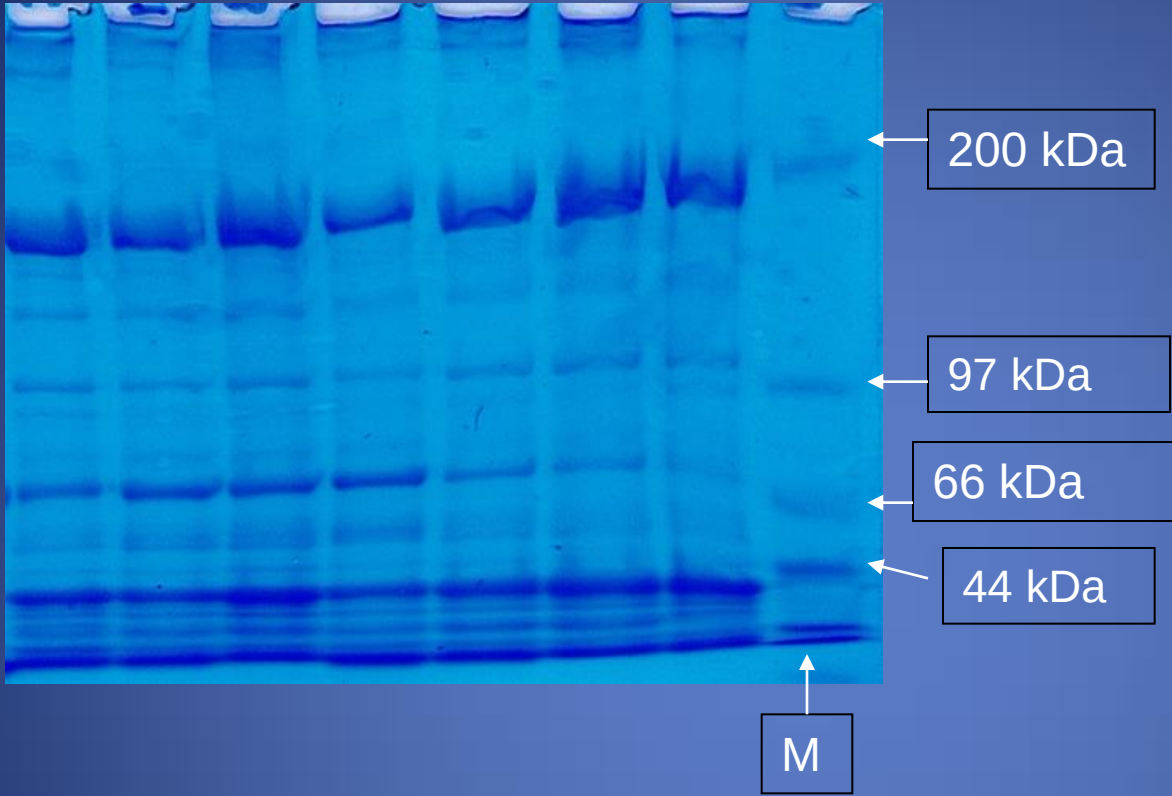
Glisin, Tris baz, SDS ve distile su



Proteinlerin Jel Üzerinde Görünür Hale Getirilmesi-Jelin Boyanması

- 1- Jelin sistem üzerinden çıkartılır.
- 2- Jel üzerindeki proteinler boyanmadan önce jel üzerine sabitlenmelidir. (fiksasyon).
- 3- Fiksatiften geçirilen jel hafif distile su ile yıkandıktan sonra boyama işlemine alınır. (%40 metanol , %10 asetik asit içeren bir çözelti)
- 4- Coomassie brilliant blue (CBB) ile boyama (etanol, asetik asit ve Coomasie parlak mavisi)



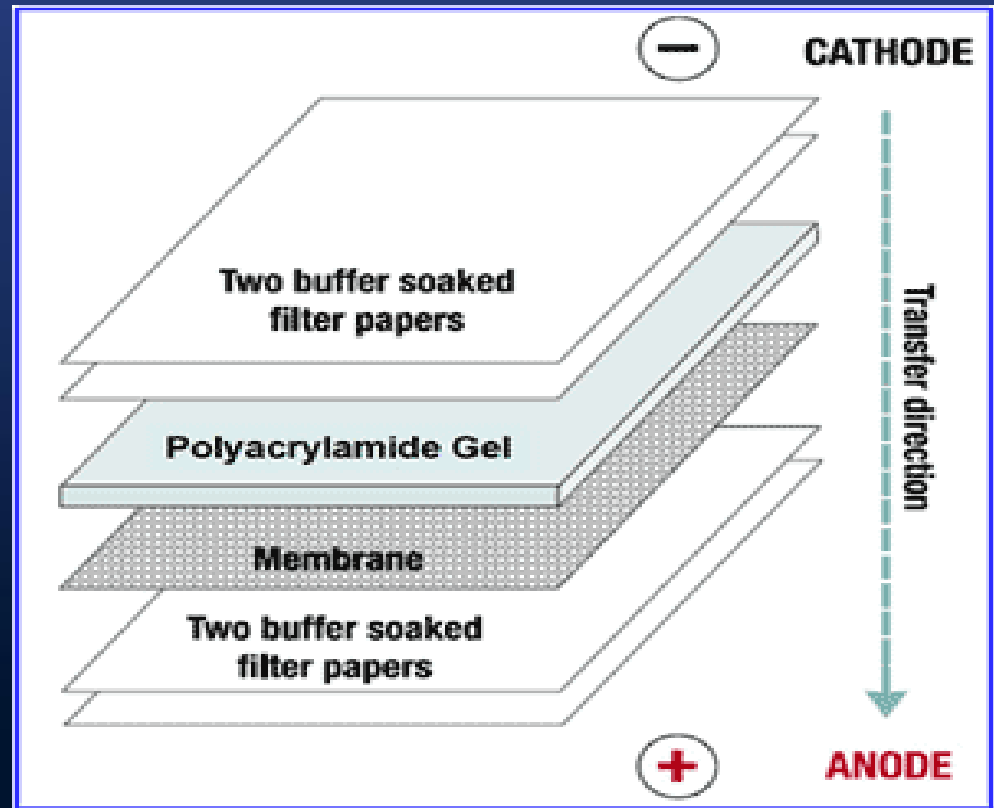


Elektroforez işlemi sonrası boyanmış SDS-poliakrilamid jel görüntüsü.

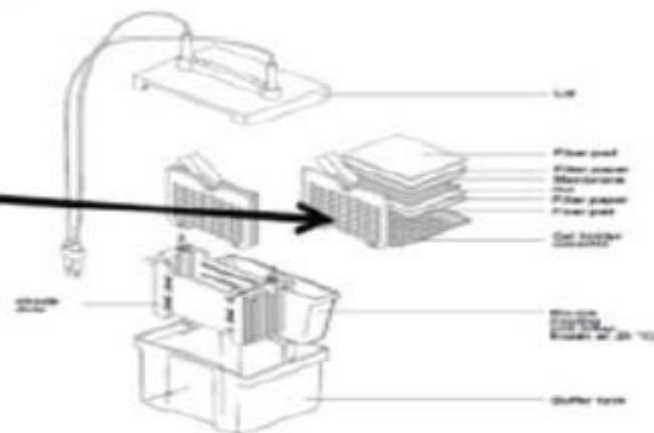
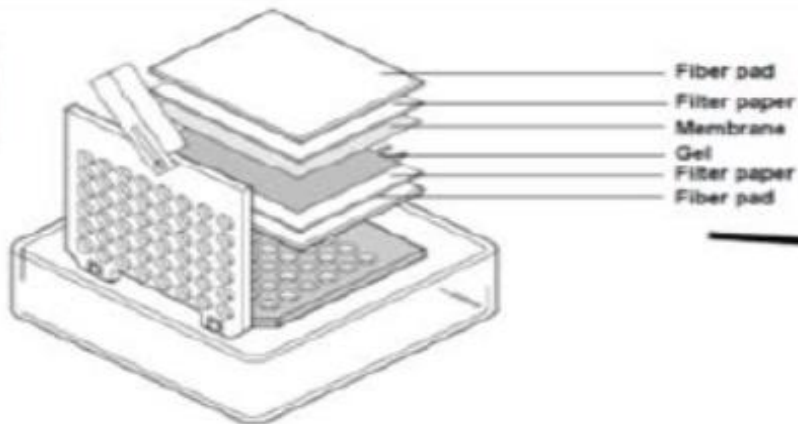
SDS-Poliakrilamid Jel Üzerindeki Proteinlerin Membrana Aktarılması

- 1- Islak Sistem Transfer
- 2- Yarı Kuru Sistem Transfer
- 3- Kuru Sistem Transfer

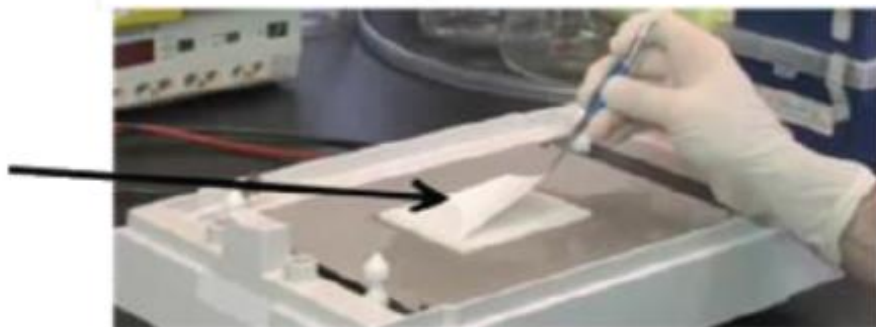
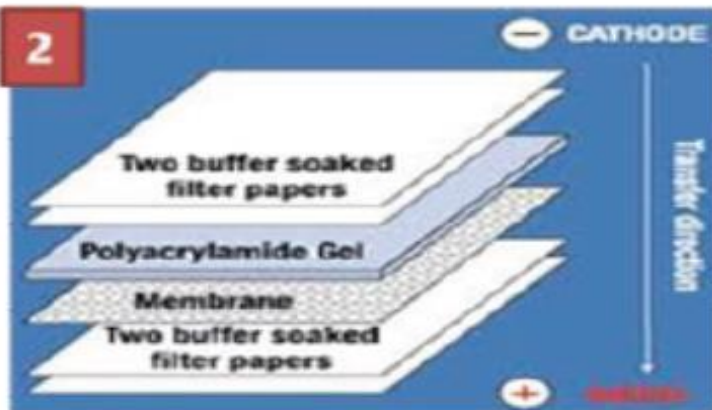
Nitroselüloz veya poli-viniliden florür (PVDF) membran



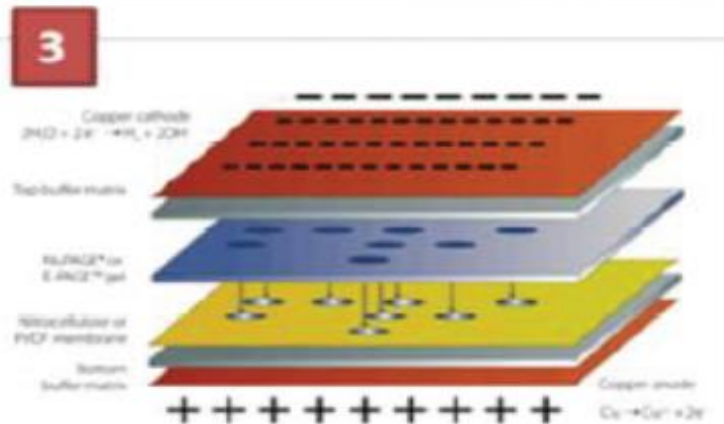
1



2



3



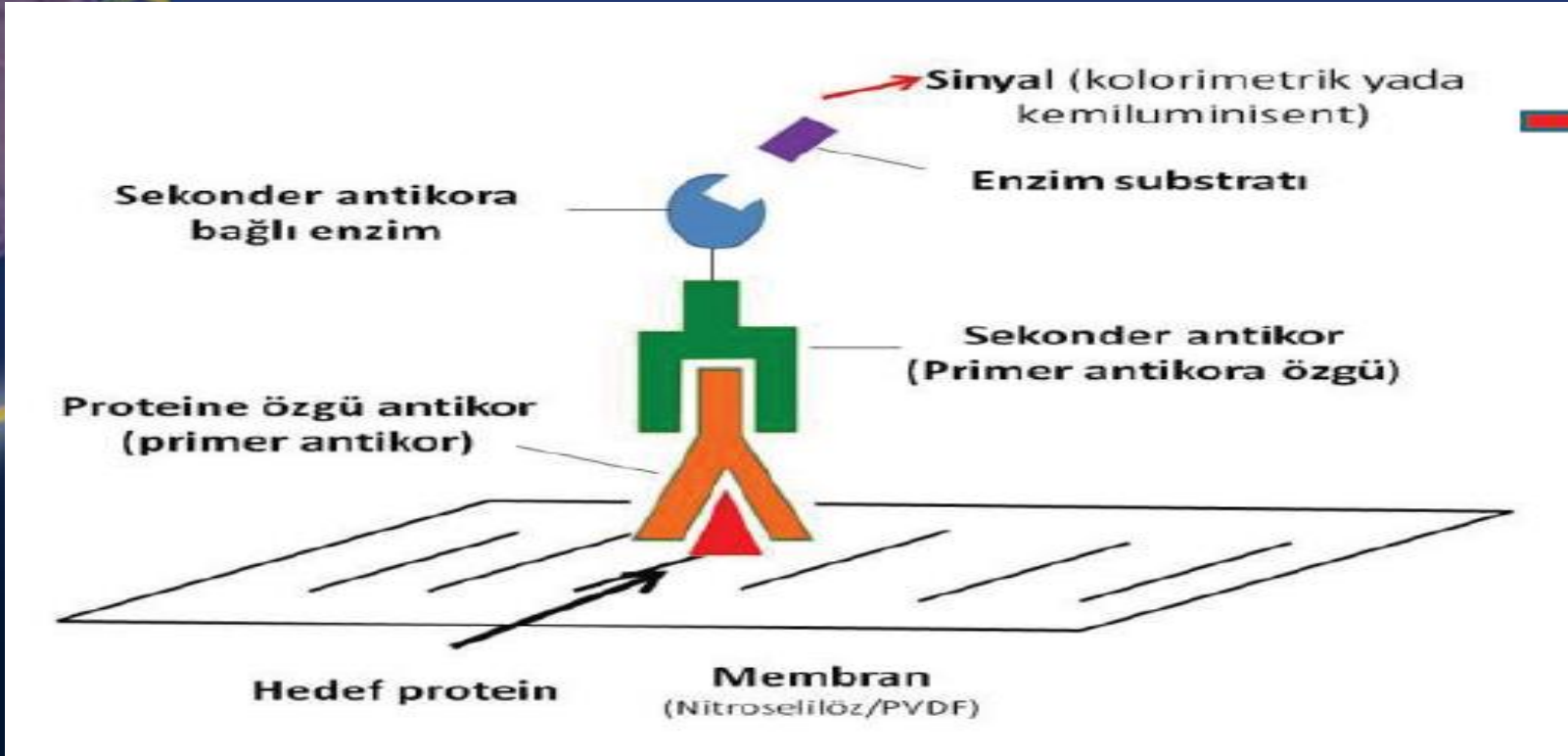
Bloklama

Transfer sonrası proteinleri bağlanmış olan membran Tris-HCl, yağsız süt tozu, Tween 20 içeren (bloklama çözeltisi) içinde çalkalamaya bırakılır.



Antikor İnkübasyonu

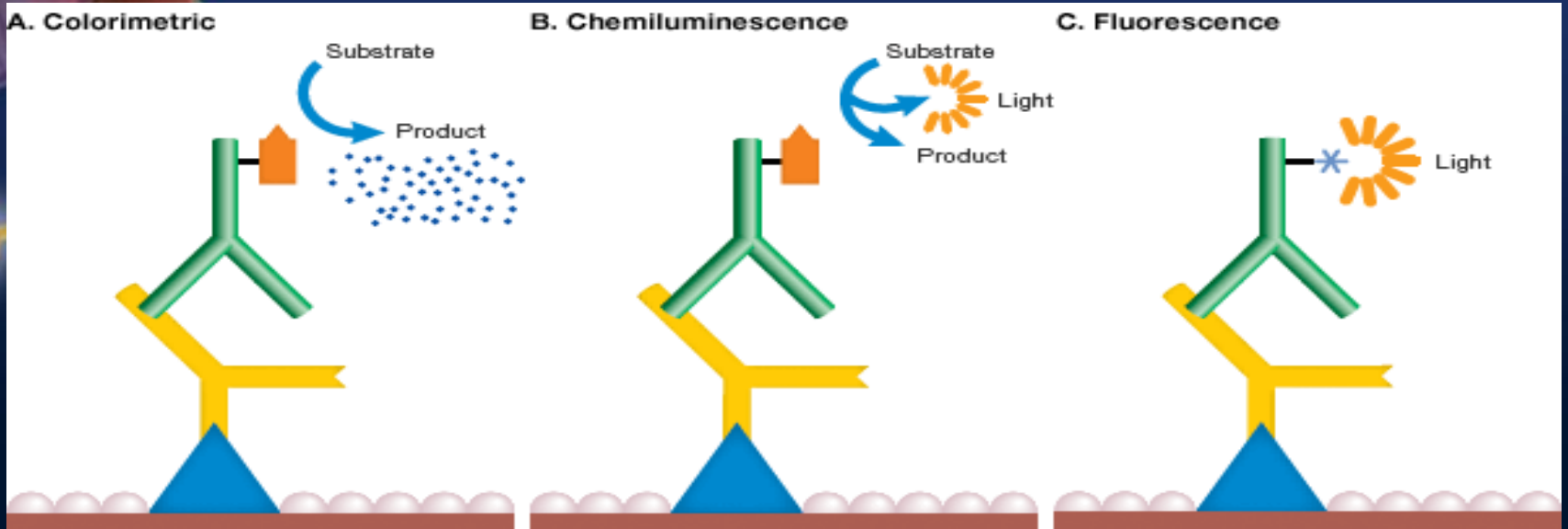
Bloklamadan sonra ilgilenilen proteine özgü primer antikor ile membran inkübe edilir. Bağlanmayan primer antikor yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra konjuge enzim ya da boya içeren sekonder antikor ile membran inkübe edilerek, primer antikora bağlı sekonder antikor kompleksi oluşturulur.



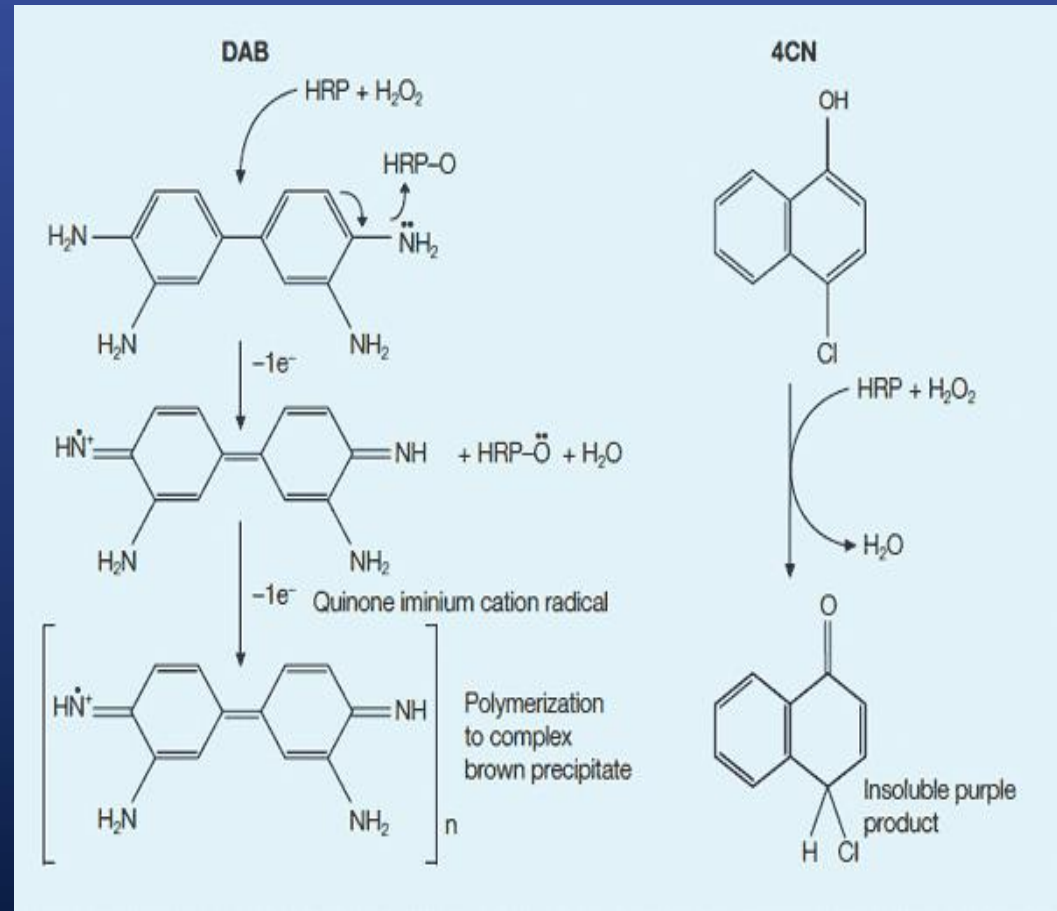
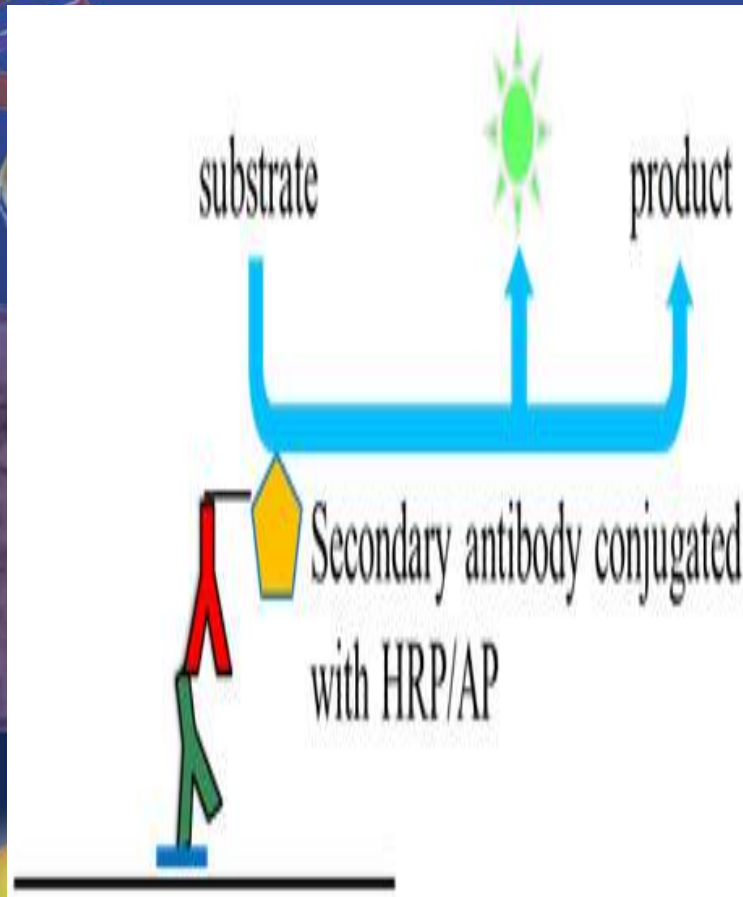
Protein Tanımlanması

Membran üzerinde özgül bağlamaları tespit etmek için sekonder antikora konjuge enzimle reaksiyona girerek sinyal oluşturacak substratlar kullanılmaktadır.

- 1- Kolorimetrik Tanımlama
- 2- Kemilüminesan Tanımlama
- 3- Floresan Tanımlama



1- Kolorimetrik Tanımlama

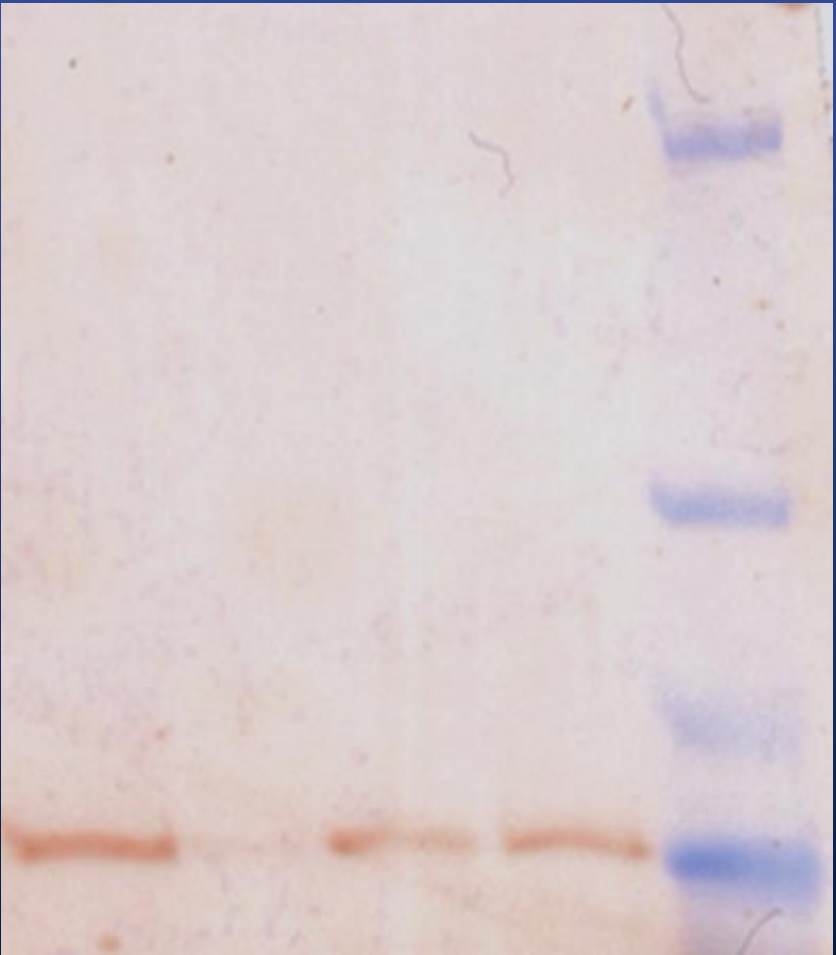


HRP: Yanbantarpu peroksidazı (Horseradish peroxidase)

AP: Alkalen fosfotaz

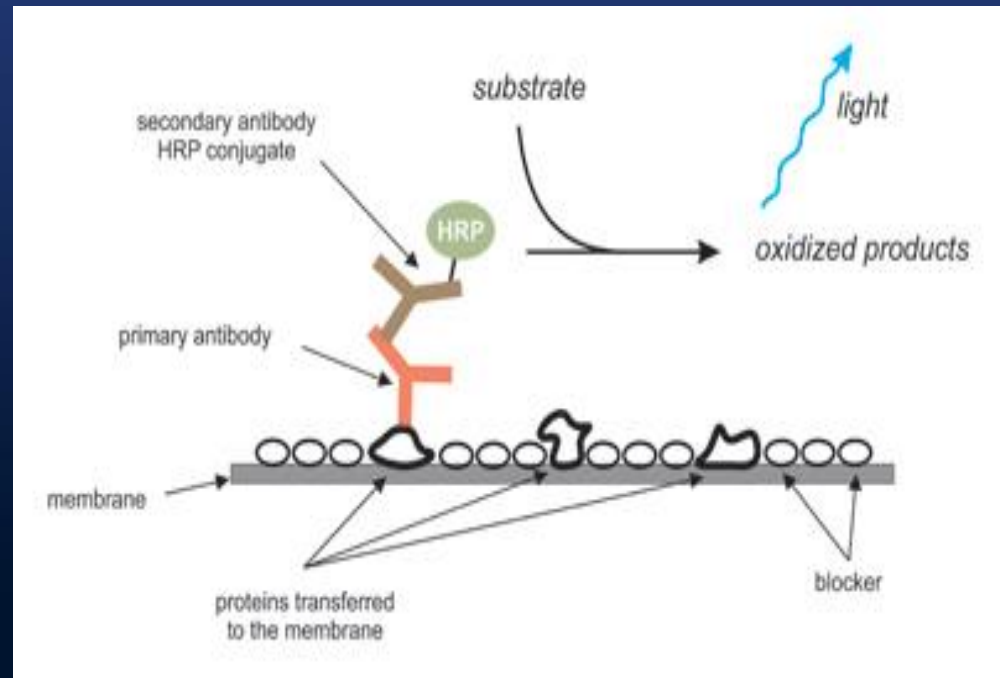
DAB: Diaminobenzidin

4CN: 4-Chloro-1-naphthol



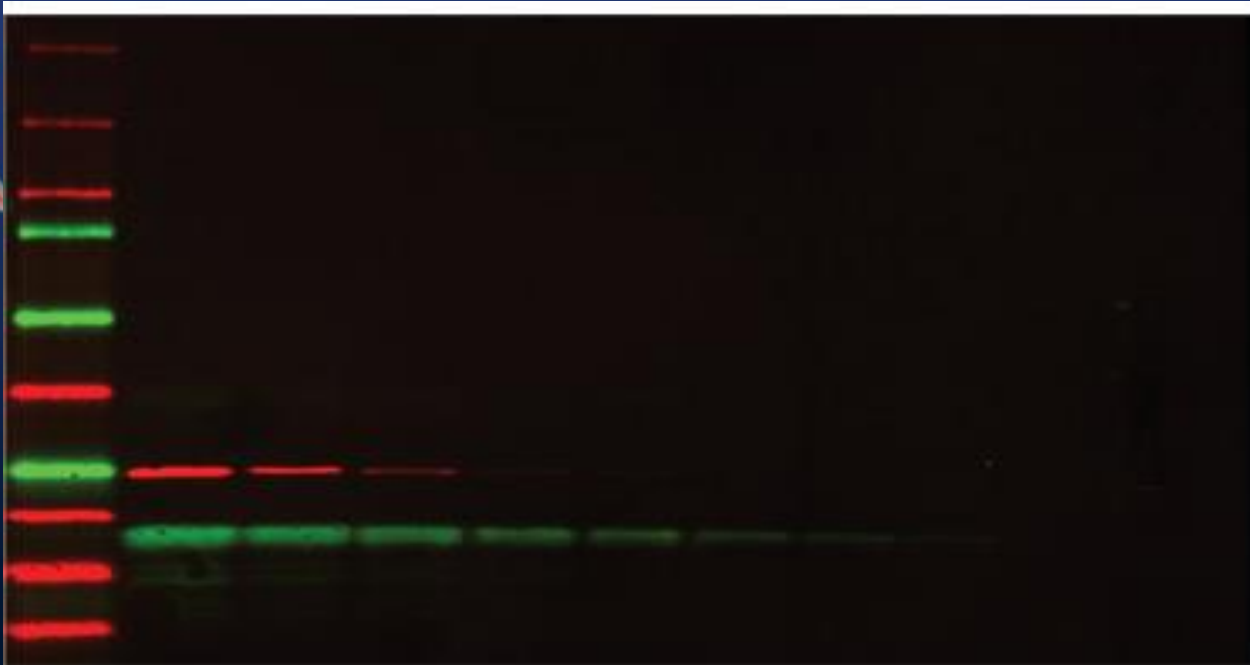
2- Kemilüminesan Tanımlama

Kemilüminesans ya da kimyasal ışıldama, madde içinde gerçekleşen kimyasal reaksiyon sonucu çok az miktarda ısı ışıma ve ışık ışıması durumudur. Western Blot'da ikincil antikora bağlı olan enzime özgü substrat ortama konulduu zaman ışıma meydana gelir. Bu aşama karanlık ortamda gerçekleştirilir ve X-ray film kullanılır.



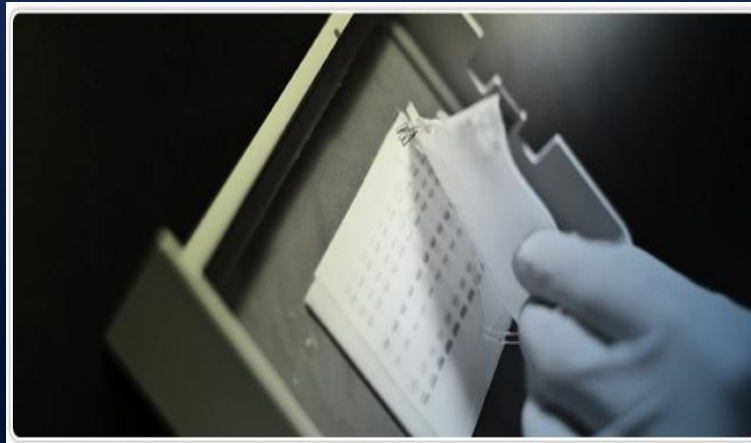
3- Floresan Tanımlama

Floresan tanımlama yönteminde ikincil antikor flurescein, texas red, phycoerythrin gibi floresan bir marker ile bağlanmıştır. Bu yöntemde floresan ışımının tanımlanması için ek bir görüntüleme sistemine ihtiyaç duyulmaktadır.



Western Blot'ın Avantajları ve Dezavantajları

- Birden fazla protein görüntülenebilir.
- Western Blot testi yüksek özgüllüğe sahiptir.
- Protein büyüklüğü hakkında bilgi verir.
- Yanlış lekeleme, çarpık soluk , hatta birden bantlar yöntemin dezavantajlarıdır.
- Maliyet, etiketli antikörler, yetenekli analistler ve laboratuvar ekipmanı için harcamalar gerekmektedir.
- Uzun süre



TEŞEKKÜRLER

