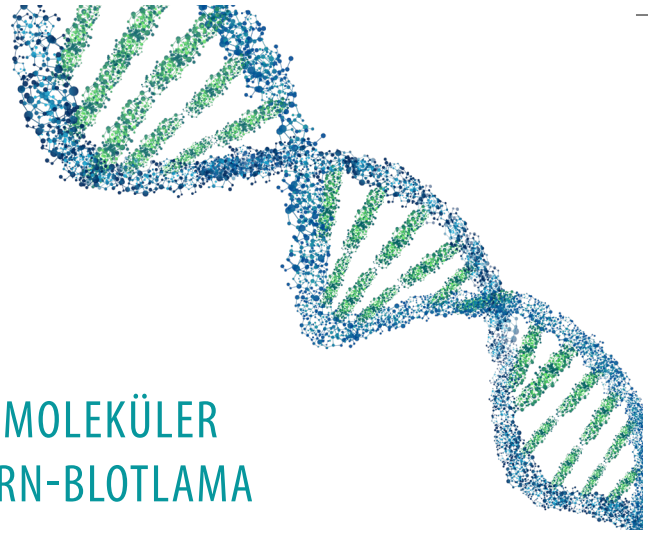


BÖLÜM 9

BLOTLAMA VE HİBRİDİZASYON TEMELLİ MOLEKÜLER YÖNTEMLER: SOUTHERN-, DOT-, WESTERN-BLOTLAMA



Banu BAYRAKTAR¹

Blotlama ve hibridizasyon temelli yöntemler temel bilimlerin birçok alanında araştırma veya tanı amaçlı kullanılagelmiş yöntemlerdir. Jel elektroforezinin tamamlayıcısı, devamı olan bu yöntemler jelde ayrıştırılan spesifik DNA, RNA ve proteinlerin saptanmasını olanaklı kılarak tanımlanmalarını sağlar.

İlk tanımlanan blotlama tekniği "Southern" blotlamadır ve DNA'nın ayrıştırılması ve saptanmasında kullanılır. Yöntem 1975 senesinde Southern tarafından tanımlanmış, kendisine ithafen Southern olarak isimlendirilmiştir¹. "Dot-blot", Southern blot tekniğinin bir modifikasyonu olup membran üzerinde yapılan konvensiyonel hibridizasyon yöntemidir². "Western Blot" yönteminde proteinlerin tanımlanması söz konusu olup, saptama aşaması nükleik asit problemleri yerine işaretli antikorlar aracılığıyla yapılır.

Southern Blot

Southern blot, DNA örneklerindeki spesifik dizileri saptamak için kullanılan bir yöntemdir. Southern Blot yöntemi (1) restriksiyon enzimleri ile DNA'nın kesilmesi, (2) jel elektroforezi ile DNA fragmentle-

rinin ayrıştırılması, (3) DNA fragmentlerinin jelden bir membrana transferi, (4) spesifik dizilerin işaretli problemlerle hibridizasyonu ve (5) görüntüleme basamaklarını içerir. Standart kullanımının dışında somatik yeniden düzenlemeye uğramış genleri tanımlamak için de Southern Blot kullanılır. DNA üzerinde (1) delesyon, (2) duplikasyon, (3) insersiyon ve (4) yeniden düzenlenmeye bağlı restriksiyon bölgeleri arasındaki uzaklık farklılaşabilir, işaretli problemlerle yapılan hibridizasyon ile bu tip dizi değişikliklerini ortaya koymak mümkün olmaktadır^{2,3}.

Orijinal Southern Blot protokolünde birinci aşama DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesidir. Bir veya daha fazla restriksiyon enzimi ile kesim sonucu oluşan DNA fragmentleri standart agaroz jel elektroforezi ile boyutlarına göre ayrıştırılır². Jel elektroforezinde DNA fragmentleri kuvvetli bir elektrik alanda büyükleri ile ters orantılı olarak göç ederler. Elektroforez aşamasında uygun DNA boyut işaretleyici (moleküler belirteç) de jele yüklenir. Elektroforez bittiğinde jel etidyum bromür veya SYBR Gold ile boyanarak yanında transparan bir cetvel yerleştirilip fotoğrafı çekilir. Böylelikle yük-

¹ Prof. Dr., Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Şişli Hamidiye Etfal Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi, banu.bayraktar@sbu.edu.tr

Hepatit B için doğrulayıcı bir test olarak uygulanması da bildirilmiştir¹⁸. WB viral olmayan, bakteriyel, parazitik ve fungal enfeksiyonların tanısında da kullanılmıştır¹⁸.

Lyme hastalığı (*Borrelia burgdorferi*) tanısında WB doğrulama testi olarak kullanılır¹⁸. IgG avidite WB testi ile hastalığın evresi hakkında bilgi sahibi olunabileceği de gösterilmiştir²⁰. Melioidozlu (*Burkholderia pseudomallei*) hastaların serum örneklerinin analizi ile hastalığa neden olan bakteri proteinleri tanımlanabilir¹⁹. *Mycobacterium tuberculosis*'in karakteristik antijenlerini tanımlayarak akciğer tüberkülozunun tanısını doğrulamak için kullanılmıştır¹⁸. Ayrıca tüberküloz menenjitisi tanısı için WB ile ELISA karşılaştırıldığında, WB'in spesifikliğinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir²¹. Aseptomatik çocukların örneklerinde konjenital sifilizin saptanmasında yüksek duyarlılığa sahiptir. Ayrıca *Helicobacter pylori*'nin de tanısında kullanılmıştır¹⁹.

Paraziter hastalık tanısında ise, WB ile, visceral Layşmanyazisde parazit proteinlerinin tanımlanabileceği gösterilmiştir. Konjenital toksoplazmoz tanısında, toksoplazma parazite karşı immün yanıtta yer alan proteinlerin tanımlanmasına olanak sağlar²². Son zamanlarda %100'lük yüksek duyarlılık ile *Echinococcus granulosus*'un neden olduğu kist hidatiği saptamak için cerrahi öncesi ve sonrası tanı testi olarak kullanılmaktadır¹⁹.

WB, bir prion hastalığı olan deli dana hastalığının saptanmasında da yararlıdır¹⁷.

b. Enfeksiyöz olmayan hastalıklar için WB

WB yöntemi, sistemik lupus eritematozus, Sjögren sendromu, sistemik sklerozis, paraneoplastik nörolojik sendromlar, miks konnektif doku hastalığı ve miyozitlerde oluşan otoantikörlerin gösterilmesinde kullanılabilir¹⁸.

Kaynaklar

1. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975;98(3): 503-17.
2. Tsongalis GJ, Wittwer CT. Nucleic Acid Techniques, pp: 907.e1- 907.e36. In: Rifai N, Chiu R WK, Burnham CD, Wittwer CT. Tietz Textbook of Laboratory Medicine. 2022, 7th

- ed. Elsevier, St. Louis, Missouri.
3. Southern blotting. Chapter 10:Unit 10.6A. In Coligan, John E, Kruisbeek Ada M, Margulies David H, Shevach Ethan M, Strober Warren. Current Protocols in Immunology. 2001.
4. Green MR, Sambrook J. Southern Blotting. Cold Spring Harb Protoc 2021;2021(7).
5. Green MR, Sambrook J. Analysis of DNA by Southern Blotting. Cold Spring Harb Protoc 2021;2021(7).
6. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Southern-Blot>, erişim 13 Ağustos.2022
7. Cheng Y, Wang N, Ren Z, Xu C. Development of fluorescence-based nucleic acid blot hybridization method using Cy5.5 labeled DNA probes. J Microbiol Methods 2022;197: 106479.
8. Southern E. Southern blotting. Nat Protoc 2006;1(2): 518-25.
9. Zavala AG, Kulkarni AS, Fortunato EA. A dual color Southern blot to visualize two genomes or genic regions simultaneously. J Virol Methods 2014;198: 64-8.
10. Zhang H, Tu T. Approaches to quantifying hepatitis B virus covalently closed circular DNA. Clin Mol Hepatol 2022;28(2): 135-149.
11. Cai D, Nie H, Yan R, Guo JT, Block TM, Guo H. A southern blot assay for detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA from cell cultures. Methods Mol Biol 2013;1030: 151-61.
12. Brown T. Dot and slot blotting of DNA. Curr Protoc Mol Biol 2001; Chapter 2:Unit2.9B.
13. Begum H, Murugesan P, Tangutur AD. Western blotting: a powerful staple in scientific and biomedical research. Biotechniques 2022;73(1): 58-69.
14. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A 1979;76(9): 4350-4.
15. Pillai-Kastoori L, Schutz-Geschwender AR, Harford JA. A systematic approach to quantitative Western blot analysis. Anal Biochem 2020;593: 113608.
16. 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(2): 195-203.
17. Gavini K, Parameshwaran K. Western Blot. 2022 Apr 28. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.
18. Meftahi GH, Bahari Z, Zarei Mahmoudabadi A, Iman M, Jangravi Z. Applications of western blot technique: From bench to bedside. Biochem Mol Biol Educ 2021;49(4): 509-517.
19. Martínez-Flores K, Salazar-Anzures ÁT, Fernández-Torres J, Pineda C, Aguilar-González CA., López-Reyes A. Western blot: a tool in the biomedical field. Investigación en Discapacidad 2017;6(3): 128-137.
20. Mavin S, Evans R, Cornulier T, Bowman AS. The development of an IgG avidity Western blot with potential to differentiate patients with active Lyme borreliosis from those with past infection. J Microbiol Methods 2018;146: 71-76.
21. Patil SA, Gourie-Devi M, Chaudhuri JR, Chandramuki A. Identification of antibody responses to Mycobacterium tuberculosis antigens in the CSF of tuberculous meningitis patients by Western blotting. Clin Immunol Immunopathol 1996;81(1): 35-40.
22. Magi B, Migliorini L. Western blotting for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. New Microbiol 2011;34(1): 93-5.