



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ  
*επένδυση στην κοινωνία της γνώσης*

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

## ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

*«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»*

**Προγράμματα Επικαιροποίησης Γνώσεων Αποφοίτων ΑΕΙ Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**  
“Ιατρική, φαρμακευτική, βιοτεχνολογία: Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, το περιβάλλον και τη διατροφή”.

**Ενότητα 1: Βασικές βιοχημικές και βιοτεχνολογικές τεχνικές Α. Τεχνικές ανάλυσης DNA και πρωτεϊνών.**

1. Ηλεκτροφόρηση βιομορίων.
2. Αποτύπωση και στυπώματα
3. RT-PCR
4. Μικροσυστοιχίες

Νίκος Μπαλατσός

## **2. Αποτύπωση και στυπώματα**

Η αποτύπωση είναι μια μέθοδος ανάλυσης βιομορίων (DNA, RNA ή πρωτεΐνες), κατά την οποία τα βιομόρια που έχουν διαχωρισθεί μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα μεταφέρονται σε μια σταθερή επιφάνεια, συνήθως μεμβράνη, δημιουργώντας έτσι ένα αποτύπωμα (ή στύπωμα, blot). Εναλλακτικά, τα δείγματα φέρονται απευθείας στη μεμβράνη, με μορφή κηλίδων (dot blot), χωρίς να προηγηθεί ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός. Με τη μεταφορά τους στη μεμβράνη, τα μόρια ακινητοποιούνται και μπορούν να οπτικοποιηθούν με ειδικές τεχνικές χρώσης (π.χ. αργύρου για πρωτεΐνες), αυτοραδιογραφίας σημασμένων μορίων, ή με ειδική σήμανση πρωτεϊνών ή νουκλεϊκών οξέων. Η μέθοδος για την ανίχνευση ειδικών αλληλουχιών DNA είναι γνωστή ως *αποτύπωση κατά Southern*, για ανίχνευση μορίων RNA ως *αποτύπωση κατά northern*, και για την ανίχνευση πρωτεϊνών ως *αποτύπωση κατά western* ή *ανοσοαποτύπωση*.

### **2.1. Αποτύπωση κατά Southern**

Η αποτύπωση κατά Southern χρησιμοποιείται για να ανιχνευθούν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA [1]. Η μέθοδος αποτύπωσης τμημάτων αλληλουχιών DNA φέρει το όνομα αυτού που την επινόησε, του βρετανού βιολόγου Edwin Southern<sup>i</sup>, και είναι γνωστή ως Southern blotting<sup>ii</sup>. Η αποτύπωση κατά Southern συνδυάζει τη μεταφορά τμημάτων DNA από ένα πήκτωμα αγαρόζης (που έχουν διαχωρισθεί ηλεκτροφορητικά) σε μία μεμβράνη δημιουργώντας το αποτύπωμα (blot) και την ακόλουθη ανίχνευσή τους με έναν ειδικό *ιχνηθέτη* (probe). Ο *ιχνηθέτης* έχει σχεδιαστεί ώστε η αλληλουχία του να είναι συμπληρωματική με ένα υπό εξέταση τμήμα DNA, ενώ φέρει κατάλληλη σήμανση (ραδιενεργά ή φθορίζοντα μόρια). Εφόσον το τμήμα DNA υπάρχει στο υπό εξέταση δείγμα, ο *ιχνηθέτης* θα υβριδισθεί με αυτό στη μεμβράνη· η οπτικοποίηση/εμφάνιση του *ιχνηθέτη* σημαίνει την παρουσία του DNA στο δείγμα. Μια δυσκολία που έπρεπε να ξεπεραστεί είναι το μέγεθος μορίων DNA, το οποίο γενικά είναι πολύ μεγάλο για να μπορεί να διέλθει από

---

<sup>i</sup> Ο Edwin Mellor Southern ήταν Καθηγητής στο Πανεπιστήμιο του Εδιμβούργου το 1973, όταν ανακοίνωσε τη μέθοδο που φέρει το όνομά του. Δημιούργησε τη βάση για εργαστηριακές διαδικασίες μοριακής βιολογίας που εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα. Ας σημειωθεί, πως η μέθοδος δεν είχε κατοχυρωθεί με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας (σε αντίθεση με πολλές άλλες μεταγενέστερες) και είναι ελεύθερα διαθέσιμη στην επιστημονική κοινότητα. Είναι Ομότιμος Καθηγητής Βιοχημείας στο Πανεπιστήμιο της Οξφόρδης.

<sup>ii</sup> Οι όροι “Southern blotting” και “Southern blot” χρησιμοποιούνται συχνά αδιακρίτως, τόσο για τη μέθοδο/διαδικασία μεταφοράς (blotting), όσο και για τα αποτυπώματα (blots) DNA σε μεμβράνες που παράγονται από αυτή. Η μέθοδος με την οποία τμήματα DNA αναλύονται όπως επινοήθηκε από τον E. Southern θα πρέπει να καλείται Southern blotting.

τους πόρους των διαφόρων πήκτωμάτων· όσο «αραιώνεται» το πολυμερές (ακρυλαμίδιο ή αγαρόζη), τόσο πιο μαλακό και μη χρηστικό γίνεται. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα κόβεται σε μικρότερα ευκίνητα τμήματα με τη χρήση ειδικών ενζύμων, τις ενδονουκλεάσες περιορισμού. Τα κύρια σημεία της μεθόδου είναι τα ακόλουθα και συνοψίζονται παρακάτω και στην Εικόνα 2.1:

1. Πέψη του υπό εξέταση DNA με επιλεγμένες ενδονουκλεάσες περιορισμού. Από τη διαδικασία προκύπτουν θραύσματα DNA.
2. Ηλεκτροφόρηση και διαχωρισμός των θραυσμάτων σε πήκτωμα<sup>iii</sup>.
3. Μεταφορά σε μεμβράνη. Η μεμβράνη (νιτροκυτταρίνης, PVDF<sup>iv</sup>, ή νάιλον) συνήθως τοποθετείται πάνω από το πήκτωμα και εφαρμόζεται ομοιόμορφη πίεση (Εικόνα 2.2). Η κίνηση του ρυθμιστικού διαλύματος μέσω τριχοειδών φαινομένων από την περιοχή υψηλού δυναμικού ύδατος σε μια χαμηλού δυναμικού συμπαρασύρει τα μορια DNA από το πήκτωμα στη μεμβράνη, ενώ ιοντικές αλληλεπιδράσεις εξασφαλίζουν την δέσμευση του αρνητικά φορτισμένου DNA με τη θετικά φορτισμένη μεμβράνη. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού είναι το SSC (Saline-Sodium Citrate)<sup>v</sup>
4. Μονιμοποίηση της σύνδεσης του μεταφερθέντος DNA με τη μεμβράνη. Αυτή επιτυγχάνεται με θέρμανση σε φούρνο (~80°C, 2h) ή με ακτινοβολία UV (νάιλον μεμβράνη).
5. Επώαση της μεμβράνης με κατάλληλο ιχνηθέτη. Ο ιχνηθέτης είναι ένα μικρό τμήμα DNA με συμπληρωματική αλληλουχία με μέρος του DNA, το οποίο ζητείται να προσδιοριστεί αν υπάρχει στο υπό εξέταση δείγμα. Ο ιχνηθέτης σημαίνεται ώστε να μπορεί να ανιχνευθεί, συνήθως με ενσωμάτωση ραδιενεργών ατόμων ή με την σύνδεση φθορίζουσας ή χρωμογόνου χρωστικής. Για τον περιορισμό της μη ειδικής σύνδεσης του ιχνηθέτη σε άλλες περιοχές εκτός της συμπληρωματικής του, η μεμβράνη επώαζεται με DNA (από σολωμό ή ρέγγα), απιονισμένο φορμαμίδιο και απορρυπαντικά· ο ιχνηθέτης έτσι θα αναγνωρίσει την περιοχή με τη μεγαλύτερη προς αυτόν συγγένεια, δηλαδή τη συμπληρωματική περιοχή του DNA.
6. Η περίσσεια του ιχνηθέτη ξεπλένεται από τη μεμβράνη, συνήθως με διάλυμα SCC. Το μοτίβο της υβριδοποίησης οπτικοποιείται σε φίλμ ακτίνων X με αυτοραδιογραφία (όταν χρησιμοποιείται ραδιενεργός ή φθορίζων ιχνηθέτης), ή με εμφάνιση χρώματος, αν χρησιμοποιείται χρωμογόνος μέθοδος ανίχνευσης.

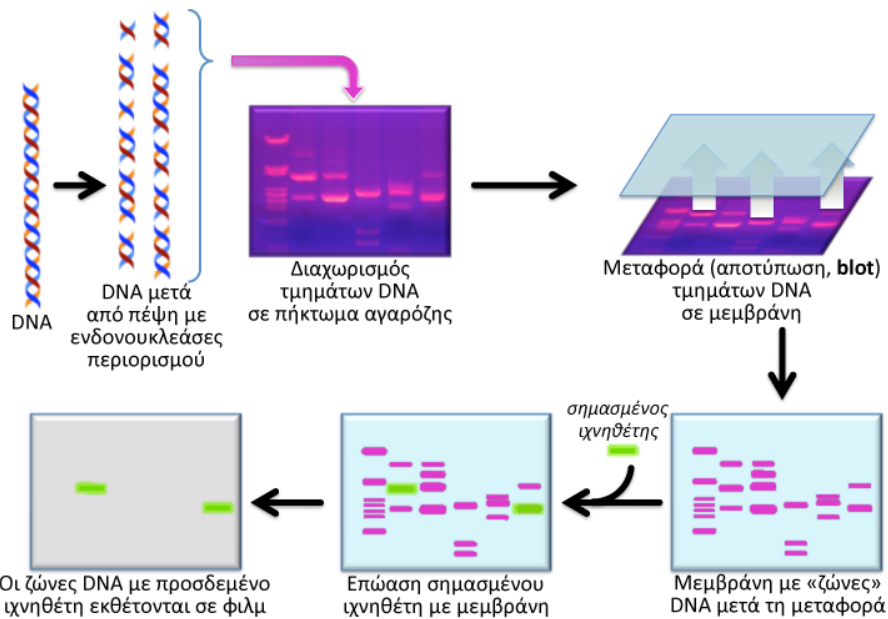
Ο υβριδισμός του ιχνηθέτη σε ένα ειδικό θραύσμα DNA στη μεμβράνη δείχνει ότι αυτό περιέχει την αλληλουχία που είναι συμπληρωματική με αυτόν.

Η αποτύπωση κατά Southern δείγματος γενομικού DNA που έχει υποστεί πέψη με χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών επιτρέπει τον καθορισμό των αλληλουχιών (π.χ. αντιγράφων γονιδίων, gene copies) σε ένα γονιδίωμα. Ένας ιχνηθέτης που υβριδίζει μόνο σε ένα τμήμα DNA που δεν έχει κοπεί από περιοριστικά ένζυμα θα δώσει μόνο μια ζώνη σε ένα αποτύπωμα Southern, ενώ περισσότερες ζώνες θα εμφανιστούν, πιθανόν αν ο ιχνηθέτης υβριδίζει σε διάφορες παρόμοιες αλληλουχίες. Τροποποίηση των συνθηκών υβριδισμού (αύξηση θερμοκρασίας, μείωση συγκέντρωσης άλατος) μπορεί να αυξήσει την εξειδίκευση και να μειώσει τον υβριδισμό του ιχνηθέτη σε αλληλουχίες που δεν είναι πλήρως συμπληρωματικές με αυτόν.

<sup>iii</sup> Σε περίπτωση που υπάρχουν μεγάλα κομμάτια DNA (>15 kb), τότε πριν την αποτύπωση το πήκτωμα κατεργάζεται με οξύ (συνήθως HCl), η οποία αφαιρεί βάσεις πουρινών από το DNA και κόβει το DNA σε μικρότερα κομμάτια. Με αυτό τον τρόπο είναι πιο αποτελεσματική η μεταφορά από το πήκτωμα στη μεμβράνη.

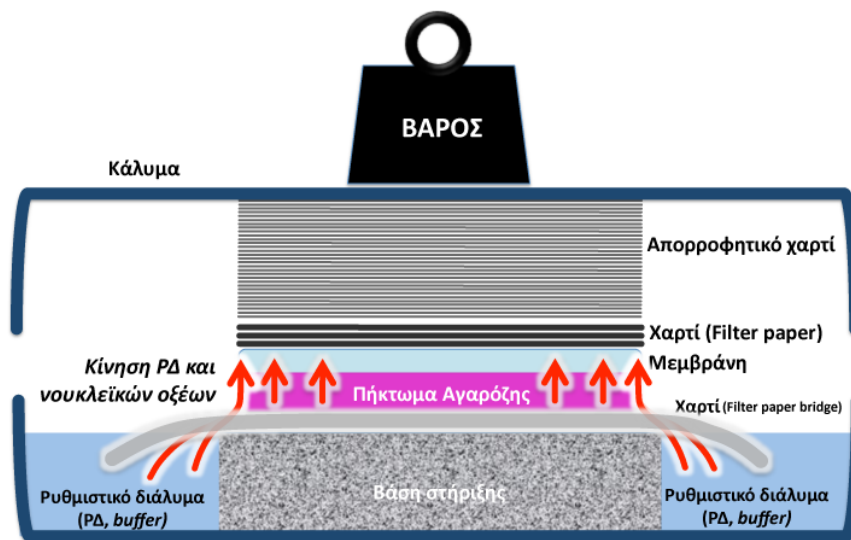
<sup>iv</sup> PVDF, PolyVinylidene DiFluoride.

<sup>v</sup> Ένα διάλυμα SSC 20x συνίσταται από 3M NaCl και 300mM Na<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (κιτρικό τρινάτριο).

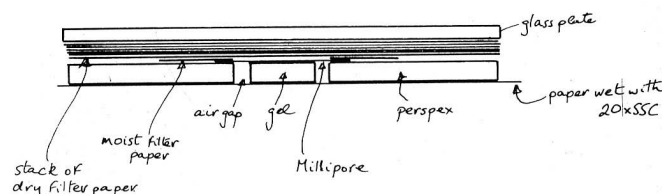


**Εικόνα 2.1. Η μέθοδος αποτύπωσης Southern.**

A



B

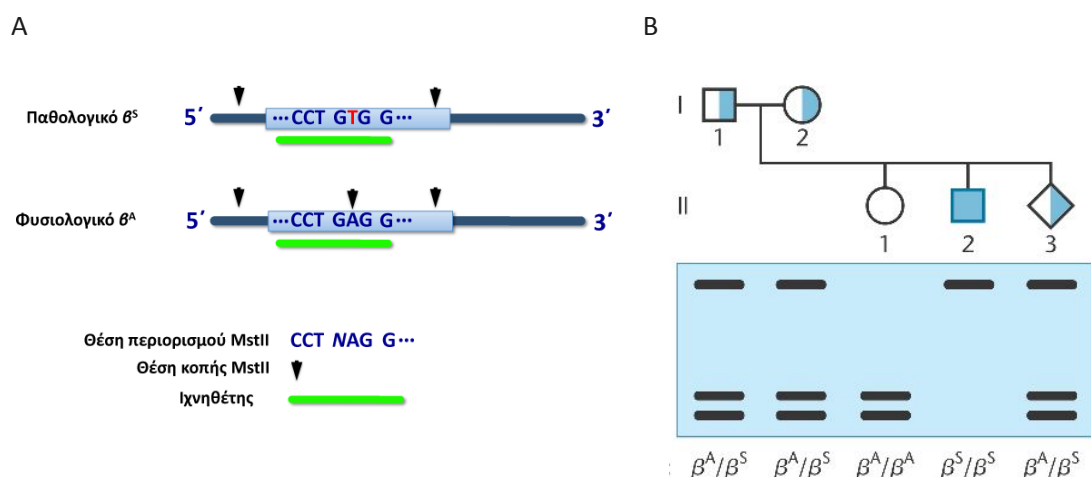


**Εικόνα 2.2. Η μεταφορά των θραυσμάτων DNA από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Α.** Διάταξη (πλάγια όψη) για τη μεταφορά των θραυσμάτων DNA σε μεμβράνη. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν τη ροή του ρυθμιστικού διαλύματος (ΡΔ) που συμπαρασύρουν το DNA. **Β.** Σχέδιο του E. Southern για τη διάταξη μεταφοράς πριν τη δημοσίευση της εργασίας της μεθόδου.

Μια διαγνωστική εφαρμογή της αποτύπωσης κατά Southern

Η δρεπανοκυτταρική αναιμία είναι μια ασθένεια που προκαλείται από μια μετάλλαξη στο γονίδιο της β σφαιρίνης. Η διαφορά μεταξύ του φυσιολογικού β<sup>A</sup> αλληλόμορφου και του παθολογικού β<sup>S</sup> είναι μια αντικατάσταση νουκλεοτιδίου στη

δεύτερη θέση του έκτου κωδικονίου του γονιδίου. Η αλληλουχία του  $\beta^A$  (CCTGAGG) συμπίπτει με τη θέση περιορισμού του ενζύμου MstII (CCTNAGG) η οποία είναι μεταλλαγμένη στο  $\beta^S$  (CCTGTGG). Το γονίδιο της  $\beta$  σφαιρίνης διαθέτει δύο θέσεις περιορισμού για το MstII. Στη γενετική δοκιμή για το  $\beta^S$  αλληλόμορφο, το υπό εξέταση DNA υφίσταται πέψη με MstII και αναλύεται με αποτύπωση κατά Southern. Το αποτύπωμα υβριδίζεται με έναν ιχνηθέτη ειδικό για το γονίδιο της  $\beta$  σφαιρίνης (Εικόνα 2.3A). Εάν υπάρχει το φυσιολογικό αλληλόμορφο  $\beta^A$ , τότε ο ιχνηθέτης υβριδίζεται στα δύο μικρά MstII θραύσματα και δίνει δύο μικρής μοριακής μάζας ζώνες. Εάν υπάρχει το αλληλόμορφο  $\beta^S$  της αναιμίας, τότε ο ιχνηθέτης υβριδίζεται στο μεγάλο θραύσμα και δίνει μια μεγαλύτερης μάζας ζώνη. Έτσι ο φυσιολογικός ομοζυγώτης  $\beta^A/\beta^A$  εμφανίζει δύο ζώνες, ο ομοζυγώτης  $\beta^A/\beta^A$  (με δρεπανοκυτταρική αναιμία) εμφανίζει μία ζώνη, και ένας ετεροζυγώτης  $\beta^A/\beta^S$  (φορέας) εμφανίζει και τις τρεις ζώνες (Εικόνα 2.3B) [2]. Σημειώνεται πως η συγκεκριμένη δοκιμή στηρίζεται στη σύμπτωση ότι η αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου που ευθύνεται για την ασθένεια συνέπεσε με τη δημιουργία ενός RFLP<sup>vi</sup>. Η απουσία της θέσης περιορισμού/κοπής του MstII δεν σημαίνει από μόνο του θα προκαλέσει αναιμία, αλλά προσφέρεται ως ένα γενετικός δείκτης του αλληλομόρφου.



**Εικόνα 2.3. Διάγνωση δρεπανοκυτταρικής αναιμίας με αποτύπωση κατά Southern.** A. Το γονίδιο της  $\beta$  σφαιρίνης, οι θέσεις περιορισμού και κοπής του MstII. B. Η αποτύπωση κατά Southern. Γονότυποι: φυσιολογικός ομοζυγώτης  $\beta^A/\beta^A$ , ομοζυγώτης  $\beta^A/\beta^A$  (με δρεπανοκυτταρική αναιμία), ετεροζυγώτης  $\beta^A/\beta^S$  (φορέας). Βάσει [2] και [3]

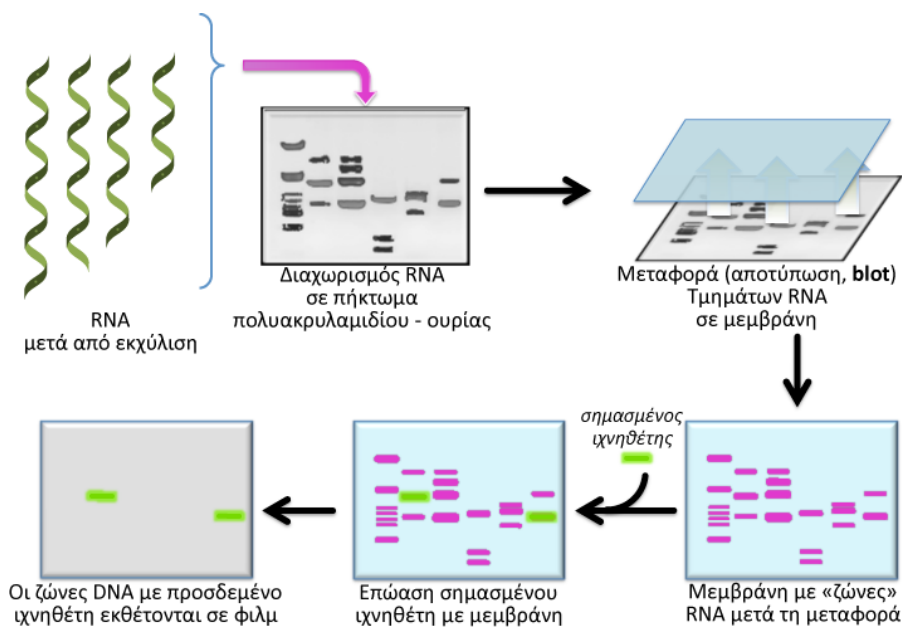
## 2.2. Αποτύπωση κατά Northern

Η αποτύπωση ή στύπωμα κατά Northern (Northern blot) είναι μια εργαστηριακή τεχνική για την ανίχνευση μορίων RNA σε ένα δείγμα [4]. Χρησιμοποιείται στην ανάλυση ενός δείγματος RNA από ένα συγκεκριμένο ιστό ή κυτταρικό τύπο, για να εξεταστεί η παρουσία συγκεκριμένων mRNA. Μπορεί έτσι να μελετηθεί η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων κατά τα διαφοροποίηση, τη μορφογένεση, καθώς και σε παθολογικές καταστάσεις [5]. Η μέθοδος διαχωρίζει ηλεκτροφορητικά RNAs με βάση το μέγεθός τους και ακολούθως ανιχνεύει συγκεκριμένα από αυτά με χρήση ιχνηθετών που υβριδίζουν σε ένα

<sup>vi</sup> RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism (προφέρεται “rif-lip”) είναι μια τεχνική για την εξέταση παραλλαγές ομόλογων αλληλουχιών DNA. Ανιχνεύει διαφορές στις αλληλουχίες ομόλογων αλληλουχιών DNA που οφείλονται σε διαφορετικές περιοχές (locations) θέσεων κοπής από περιοριστικά ένζυμα. Κατά την ανάλυση αυτή, το υπό εξέταση δείγμα υπόκειται πέψη από περιοριστικά ένζυμα και τα περιοριστικά θραύσματα που προκύπτουν διαχωρίζονται σύμφωνα με το μήκος τους (σε ζεύγη βάσεων, bp) με ηλεκτροφόρηση.

συμπληρωματικό μέρος ή και σε ολόκληρη την αλληλουχία-στόχο (RNA). Ο όρος “Northern blotting” αναφέρεται ειδικά στη μεταφορά, μέσω τριχοειδών φαινομένων, μορίων RNA από ένα πήκτωμα ηλεκτροφόρησης σε μια μεμβράνη αποτύπωσης· παρόλα αυτά, η όλη διαδικασία διαχωρισμού-μεταφοράς-ανίχνευσης είναι γνωστή ως Northern blot [6]. Η μέθοδος αναπτύχθηκε το 1977, δύο χρόνια μετά την επινόηση της αποτύπωσης κατά Southern και λόγω της ομοιότητάς με αυτή, κατά «γεωγραφική» αναλογία, ονομάστηκε αποτύπωση κατά Northern.

Το πρώτο βήμα της ανάλυσης κατά Northern είναι η αποδιάταξη και ο διαχωρισμός του RNA στο δείγμα σε μονές αλυσίδες<sup>vii</sup>, ώστε να εξασφαλισθεί ότι οι αλυσίδες θα είναι ευθυγραμμισμένες και όχι αναδιπλωμένες. Τα μόρια αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης<sup>viii</sup> και μεταφέρονται σε μεμβράνες αποτύπωσης. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα που περιέχει έναν ιχνηθέτη, δηλαδή ένα τμήμα DNA ή RNA με συμπληρωματική αλληλουχία με ένα συγκεκριμένο RNA, την ύπαρξη του οποίου εξετάζουμε στο δείγμα προς ανάλυση. Ο ιχνηθέτης είναι σημασμένος με ένα ραδιενεργό άτομο ή με μια φθορίζουσα χρωστική. Η όλη διαδικασία είναι παρόμοια με αυτή της αποτύπωσης κατά Southern και απεικονίζεται στην Εικόνα 2.4.



**Εικόνα 2.4. Η μέθοδος αποτύπωσης κατά northern.**

#### Εφαρμογές της μεθόδου

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την μελέτη της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, και τη σύγκριση αυτής μεταξύ διαφορετικών ιστών, οργάνων, κατά την ανάπτυξη, ή σε παθολογικές καταστάσεις. Στην τελευταία περίπτωση, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη ασθενειών. Έτσι, έχει μελετηθεί η υπερέκφραση ογκογονιδίων και η μειωμένη έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με μη παθολογικά. Επίσης, από τις κατατομές έκφρασης σε δεδομένες συνθήκες ανάπτυξης κυττάρων μπορεί να εξεταστεί η λειτουργία ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Αν, για παράδειγμα, χρησιμοποιείται ένας ειδικός ιχνηθέτης και μετά τη μεταφορά των RNAs εμφανιστούν περισσότερες από μία μορφές (οι οποίες δεν οφείλονται σε μη ειδική σύνδεση του ιχνηθέτη), αυτό θα μπορούσε να σημαίνει πως το mRNA του γονιδίου που εξετάζεται δίνει προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος [7, 8].

<sup>vii</sup> Ένα μόριο RNA μπορεί να σχηματίσει δίκλωνες περιοχές με μορφή φουρκέτας, να υβριδίζει με άλλα μόρια RNA, κ.α.

<sup>viii</sup> Τα μόρια RNA μπορούν να αναλυθούν και σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, λόγω του μικρού τους -συνήθως- μεγέθους.

## Αποτύπωση κατά western, ή ανοσοαποτύπωση.

Η αποτύπωση ή στύπωμα κατά western (western blotting), είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για την επιλεκτική ανίχνευση πρωτεϊνών σε δείγματα. Είναι επίσης γνωστή ως ανοσοαποτύπωση (immunoblotting). Ακολουθεί την αρχή της μεταφοράς των βιομορίων σε μεμβράνες. Έτσι, το δείγμα των πρωτεϊνών αναλύεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, ακολουθεί μεταφορά τους με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σε μεμβράνη (νιτροκυτταρίνης, PVDF<sup>ix</sup>) και οι αποτυπωμένες πρωτεΐνες ανιχνεύονται με την πρόσδεση σε αυτές ειδικών αντισωμάτων με κατάλληλες μεθόδους. Η μέθοδος επινοήθηκε και περιγράφηκε το 1979 στο εργαστήριο του H. Towbin [9], ενώ το όνομά της δόθηκε από τον W.N. Burnette, όπως συνέβη και στο στύπωμα κατά northern, ως λογοπαίγνιο και κατά «γεωγραφική» αναλογία με την ανάλυση κατά Southern [10].

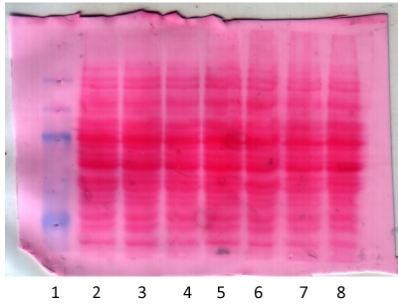
Οι πρωτεΐνες στο δείγμα διαχωρίζονται αρχικά με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα. Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος τύπος είναι τα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και χρήση του SDS. Έτσι οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται, φορτίζονται αρνητικά και διαχωρίζονται με βάση τη μοριακή τους μάζα, η οποία μετράται συνήθως σε kDa<sup>x</sup> [12]. Η πυκνότητα του πηκτώματος ακρυλαμιδίου (%T, %C) καθορίζει την επιλογή του· μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεΐνες αναλύονται σε πηκτώματα χαμηλής συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου.

Η αναγνώριση της πρωτεΐνης από το ειδικό για αυτήν αντίσωμα γίνεται πιο εύκολα όταν αυτή είναι προσδεμένη σε μια επιφάνεια από το να βρίσκεται στο εσωτερικό ενός πηκτώματος. Για το λόγο αυτό, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνες μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό τους στο πήκτωμα. Η μεταφορά γίνεται κυρίως με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται στη μεμβράνη και έτσι είναι εκτεθειμένες για να ανιχνευθούν από τα κατάλληλα αντισώματα. Η πρόσδεση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη γίνεται μέσω υδρόφοβων, καθώς και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς (πριν προχωρήσει η διαδικασία ανίχνευσης με αντισώματα) μπορεί να ελεγχθεί με χρώση της μεμβράνης με διάφορες χρωστικές που βάφουν πρωτεΐνες μη επιλεκτικά. Η χρωστική που χρησιμοποιείται περισσότερο είναι η Ponceau S, λόγω της υψηλής ευαισθησίας και της διαλυτότητάς της στο νερό (Εικόνα 2.5).

Πριν η μεμβράνη επωαστεί με το αντίσωμα για τον εντοπισμό της ζητούμενης πρωτεΐνης, προηγείται μια επώαση με διάλυμα γνωστής πρωτεΐνης (συνήθως BSA- Bovine Serum Albumin, ή απλό γάλα χωρίς λιπαρά). Ο λόγος είναι για να περιοριστεί η μη ειδική σύνδεση του αντισώματος (που ακολουθεί στη συνέχεια) σε θέσεις άλλες εκτός της πρωτεΐνης στόχου. Έτσι το αντίσωμα θα αναζητήσει κατά την επώαση μόνο το στόχο με τον οποίο έχει υψηλή συγγένεια και όχι άλλες πρωτεΐνες που είναι προσδεμένες στη μεμβράνη. Ακολουθεί η επώαση της μεμβράνης με το επιλεγμένο αντίσωμα έναντι μιας πρωτεΐνης-στόχου της οποίας την ύπαρξη θέλουμε να εξετάσουμε στο δείγμα μας.

<sup>ix</sup> Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, αν και οικονομικότερες από τις PVDF, δεν προτιμούνται καθόσον είναι πολύ πιο εύθραυστες. Επίσης, οι PVDF είναι ανθεκτικές σε κατεργασία με διαλύτες· τα αρχικά αντισώματα μπορούν να απομακρυνθούν με κατάλληλη κατεργασία και η μεμβράνη μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί με άλλα αντισώματα για έλεγχο παρουσίας και άλλων πρωτεϊνών στο υπό εξέταση δείγμα.

<sup>x</sup> Ένα Dalton (Da) ή ενιαία μονάδα ατομικής μάζας (unified atomic mass unit, amu ή u), είναι η μονάδα μέτρησης μαζών σε ατομική ή μοριακή κλίμακα και είναι ίση με το 1/12 της μάζας του ελεύθερου ατόμου του άνθρακα 12 (<sup>12</sup>C). Ένα Da είναι περίπου η μάζα ενός νουκλεονίου (πρωτονίου ή νετρονίου) και ισούται με 1g/mol. 1 Da = 1.7 × 10<sup>-27</sup> kg. Χρησιμοποιείται με προθέματα του Διεθνούς Συστήματος (SI) για να εκφράσει μάζες μεγαλύτερων μορίων, όπως kiloDa (1 kDa = 10<sup>3</sup> Da), megaDa (1 MDa = 10<sup>6</sup> Da), αλλά και να για μικρές διαφορές μαζών ατόμων ή μορίων σε nanoDa (nDa) ή και picoDa (pDa) 11. [http://www.springerimages.com/Images/LifeSciences/5-10.1186\\_1471-2164-10-84-1](http://www.springerimages.com/Images/LifeSciences/5-10.1186_1471-2164-10-84-1).



**Εικόνα 2.5. Έλεγχος μεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη.**

Το δείγμα πρωτεϊνών έχει αναλυθεί με ηλεκτροφόρηση σε κατάλληλο πήκτωμα (διαδρομές 2 – 8) και ακολούθησε μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνη και χρώση της με Ponceau S. Στη διαδρομή 1 οι ζώνες με κυανό χρώμα δηλώνουν τη θέση πρωτεϊνών γνωστής μοριακής μάζας και χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των μαζών στις υπόλοιπες διαδρομές.

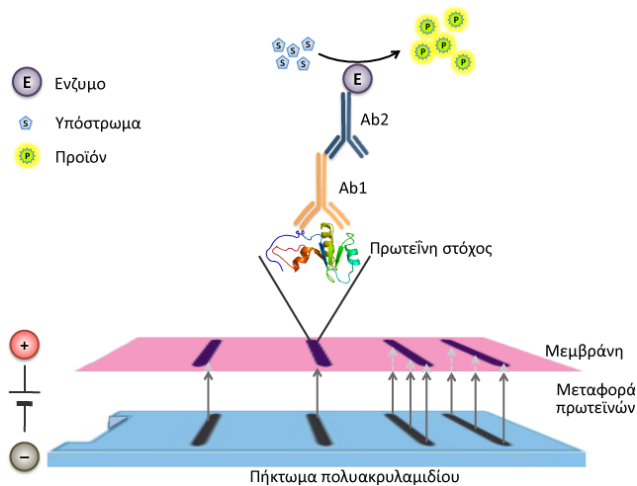
<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ec/PonceauMembrane.png>

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη συνήθως γίνεται με μια διαδικασία που συνήθως περιλαμβάνει δύο βήματα. Το πρώτο βήμα<sup>xi</sup> αφορά στη επώαση της μεμβράνης με το αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης στόχου. Το αντίσωμα αυτό ονομάζεται συνήθως «πρώτο αντίσωμα» (primary antibody). Το διάλυμα επώασης, εκτός από το αντίσωμα, περιέχει συνήθως και BSA ώστε να μειωθεί ακόμη περαιτέρω η σύνδεση του πρώτου αντισώματος σε μη ειδικές θέσεις. Μετά την επώαση της μεμβράνης για καθορισμένο χρόνο, ακολουθούν εκπλύσεις ώστε να απομακρυνθεί όσο αντίσωμα δεν έχει προσδεθεί. Στο δεύτερο βήμα, η μεμβράνη επωάζεται με ένα άλλο αντίσωμα, γνωστό ως «δεύτερο αντίσωμα» (secondary antibody), που έχει αναπτυχθεί έναντι του πρώτου αντισώματος με βάση τον οργανισμό στον οποίο παράχθηκε (το πρώτο αντίσωμα)<sup>xii</sup>. Το δεύτερο αντίσωμα φέρει συνήθως ένα ένζυμο (συνήθως αλκαλική φωσφατάση ή μια υπεροξειδάση – *horseradish peroxidase*). Στην περίπτωση της υπεροξειδάσης, η μεμβράνη επωάζεται με κατάλληλο υπόστρωμα για το ένζυμο. Το προϊόν της αντίδρασης εκλύει φως (είναι μια αντίδραση χημειοφωταύγειας), η ένταση του οποίου είναι ανάλογη με την ποσότητα της πρωτεΐνης στη μεμβράνη, και αποτυπώνεται σε ειδικό φωτογραφικό φιλμ. Σε μια άλλη μέθοδο η μεμβράνη επωάζεται σε ένα διάλυμα με μια υδατοδιαλυτή χρωστική, την οποία το ένζυμο τη μετατρέπει σε δυσδιάλυτο προϊόν, το οποίο κατακρημνίζεται δίπλα στο ένζυμο και με αυτό τον τρόπο χρωματίζεται η μεμβράνη στην περιοχή όπου έχει προσδεθεί η πρωτεΐνη-στόχος (και πάνω σε αυτή τα δύο αντισώματα). Άλλες μέθοδοι εμφάνισης περιλαμβάνουν τη χρήση ραδιοενεργών ή φθορίζοντων ιχνηθετών. Η όλη διαδικασία μεταφοράς των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη, πρόσδεσης αντισωμάτων και ανίχνευσης δείχνεται σχηματικά στην Εικόνα 2.6. Εναλλακτικά η ανίχνευση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη μπορεί να γίνει σε ένα βήμα. Η διεργασία προϋποθέτει τη χρήση ενός αντισώματος που αναγνωρίζει ειδικά την πρωτεΐνη-στόχο και ταυτόχρονα φέρει κατάλληλη σήμανση (π.χ. ένα προσδεμένο ένζυμο, βλ. παρακάτω) για την ανίχνευσή του.

<sup>xi</sup> Η ανίχνευση σε δύο βήματα, παρόλο που προσθέτει ένα επιπλέον βήμα στη διαδικασία, προτιμάται διότι δίνει μεγάλη ευελιξία. Είναι ευκολότερη η παραγωγή πρώτων και δεύτερων αντισωμάτων χωριστά και το κόστος είναι χαμηλότερο. Θα κόστιζε σημαντικά περισσότερο, αν αναπτύσσονταν ένα αντίσωμα έναντι μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης και ταυτόχρονα, στο αντίσωμα αυτό θα έπρεπε να προσδεθεί και ένα ένζυμο για την ανίχνευση. Το δεύτερο αντίσωμα μπορεί να αναπτυχθεί μαζικά έναντι των αντισωμάτων, αρκεί αυτά να προέρχονται από ένα συγκεκριμένο οργανισμό.

<sup>xii</sup> Αν, για παράδειγμα, το πρώτο αντίσωμα έχει αναπτυχθεί σε ποντικό, το δεύτερο αντίσωμα θα είναι έναντι αντισωμάτων ποντικού (anti-mouse secondary antibody) και θα αναγνωρίζει αντισώματα που έχουν αναπτυχθεί σε ποντικό, εν προκειμένω το πρώτο αντίσωμα.





**Εικόνα 2.6. Ανοσοαποτύπωση, ή στύπωμα κατά western.** Οι πρωτεΐνες έχουν αναλυθεί σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και μεταφέρονται με εφαρμογή ρεύματος σε μεμβράνη. Η πρωτεΐνη στόχος αναγνωρίζεται από ένα πρώτο ειδικό αντίσωμα (Ab1), και αυτό από ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο φέρει συνδεδεμένο ένα ένζυμο (E). Η αντίδραση που καταλύει το ένζυμο για το υπόστρωμά του (S) παράγει έγχρωμο προϊόν (P) ή φως (χημειοφωταύγεια). Έτσι αποκαλύπτεται η παρουσία της πρωτεΐνης στη μεμβράνη και άρα στο αρχικό δείγμα.

## Βιβλιογραφία

1. Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517
2. Sheldon E *et al* (1987) Nonisotopic M13 probes for detecting the beta-globin gene: application to diagnosis of sickle cell anemia. *Clin Chem* 33: 1368-1371
3. [http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch22/sickle-cell\\_anemia.html](http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch22/sickle-cell_anemia.html)
4. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzoyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5350-5354
5. Schlamp K, Weinmann A, Krupp M, Maass T, Galle P, Teufel A (2008) BlotBase: a northern blot database. *Gene* 427: 47-50
6. Trayhurn P (1996) Northern Blotting. *Pro Nutrition Soc* 55: 583-589
7. Freeman LA (2013) Northern analysis of gene expression. *Methods Mol Biol* 1027: 85-121
8. Durand GM, Zukin RS (1993) Developmental regulation of mRNAs encoding rat brain kainate/AMPA receptors: a northern analysis study. *J Neurochem* 61: 2239-2246
9. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354
10. Burnette WN (1981) "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* 112: 195-203
11. [http://www.springerimages.com/Images/LifeSciences/5-10.1186\\_1471-2164-10-84-1](http://www.springerimages.com/Images/LifeSciences/5-10.1186_1471-2164-10-84-1)
12. [http://www.bipm.org/utils/common/pdf/si\\_brochure\\_8\\_en.pdf](http://www.bipm.org/utils/common/pdf/si_brochure_8_en.pdf)