

# ELEKTROFORESİS

Emre ÖZAN  
Veteriner Hekim

# Giriş

## TANIM :

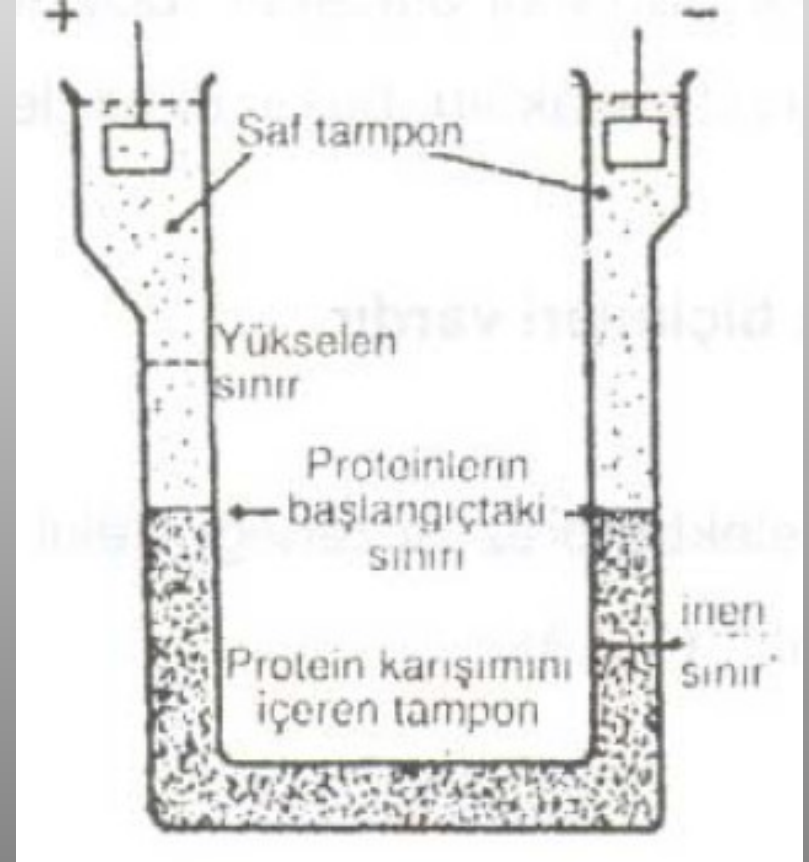
- Elektriksel bir alanın tesiri altında kolloidal dispers fazların taşıdıkları elektriksel yükün aksi kutbuna doğru göç etmeleri
- Bir elektriksel alanda yüklü partiküllerin göçüdür.
- Yunanca, elektron-elektrik
- Latince, phore-taşıyıcı

# Tarihi Süreç

- 1907 yılında Field ve Teague : Çeşitli madde karışımlarını teşkil eden kısımların elektriksel bir alanda farklı süratlere sahip oluşlarına dayanarak birbirlerinden ayrılabilceği
  - Tselius(1930) →
  - Longsworth(1945) →
  - Alberty ve ark.ca(1953) →
- Çizgi taşınması
- **Protein çalışmalarında kullanılan ilk elektroforez yöntemi :**
    - Arne Tselius(1937), solüsyon elektroforezi, frontal elektroforez veya moving boundary elektroforezidir.

# Tiselius Elektroforezi

- Bir elektrolit solüsyonunda çözülmüş olan proteinleri, protein-elektrolit solüsyonunun bulunduğu "U" şeklindeki kuartz bir borunun içinden elektrik akımı geçirerek ayırmıştır.



# Temel Prensipler

- Nötr destek matriksi
- Elektrik akımı
- Negatif yüklü moleküllerin pozitif elektroda
- Pozitif yüklü moleküllerin ise negatif elektroda doğru göç etmeleridir.

# Göçü etkileyen faktörler

- Moleküllerin net elektriksel yükü (agaroz, nişasta, selüloz asetat)
- Molekülün şekli ve büyüklüğü (PAGE)
- Elektriksel alanın gücü
- Yürütme ortamının özelliği (Por genişliği, konsantrasyon, pH)
- Yürütmenin yapıldığı sıcaklık (jelin dehidrasyonu, deformasyonu, heterojeni)

# Kullanım Alanları

- Saflaştırma
- Saflık kontrolu
- Molekül ağırlığı saptama
- Kalıtsal veya kalıtsal olmayan hastalık saptama
- Enzim izoenzimlerin saptanması(Tanısal amaçlı, populasyon çalışması için, adli tıpta)
- İmmunolojik ve moleküler biyolojidir.

# Değerlendirme ve Dansitometre

- Önceden boyama sonrası bantlar kesilip, titrasyon veya spektrofotometrik yöntemlerle miktar saptanması
- Günümüzde doğrudan bantlardaki boya yoğunluğunu saptayan dansitometri sistemleri
- Dansitometri : Absorbans ölçümü
  - Destek ortamdaki boyanın absorbansını ölçer



# Elektroendosmosis

- Destek matriksteki karboksil ve sülfat gruplarına bağlı oluşan bir olgu
- Molekül göçüne olumsuz etkisi var
- Bu asidik artıklar pozitif elektroda göç oranının artmasına ve negatif yüklü moleküllerin göç hızının azalmasına hatta tersine dönmesine
- Agar yerine agaroze (iyonlarından arındırılmış agar)
- Selüloz asetat

# Elektroforez Ekipmanları

- Elektroforez tankı :
  - Tampon ve destek matriksin konduğu
  - Çevre ısısından korunma ve buharlaşmayı azaltma
- Güç Kaynağı :
- Platelere :
- Tampon solüsyonları :
  - Ana fonksiyonu elektroforez süresince oluşacak Ph değişikliklerini tamponlamak ve elektrik akımını iletmek
- Destek Matriks :
- Boyama Solüsyonları :

# Elektroforez Yöntemleri

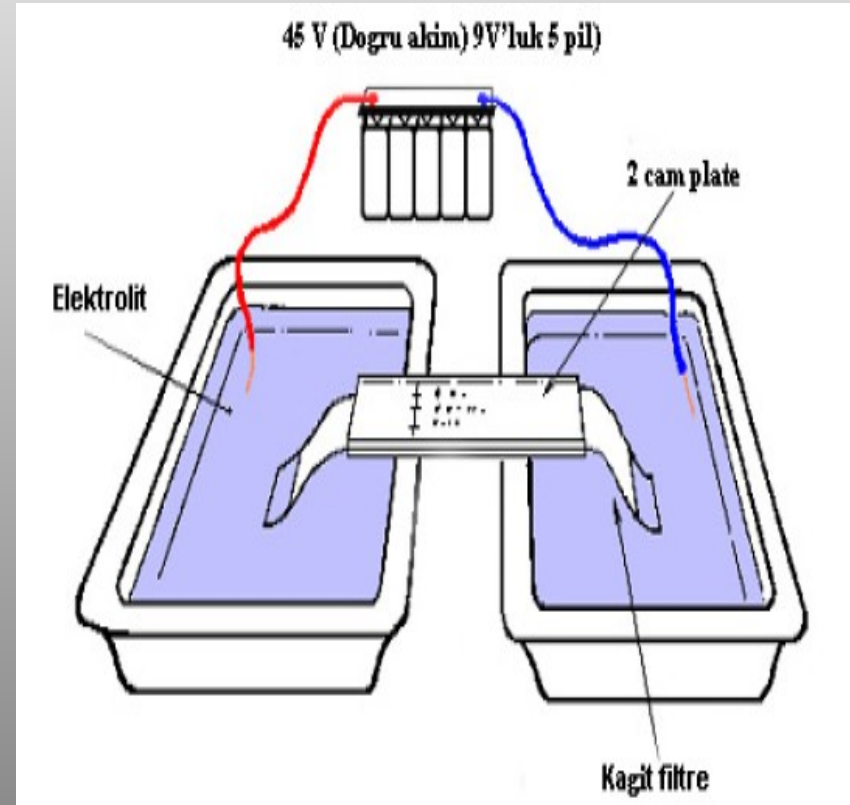
- Serbest ve Hareketli Cephe Elektroforezi
- Kağıt Elektroforez Sistemleri
- Selüloz Asetat Elektroforezi
- Agarose Jel Elektroforezi
- Nişasta Jel Elektroforezi
- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
- Kapillar Elektroforez
- İmmunoelektroforez

# Serbest ve Hareketli Cephe Elektroforezi

- 1930'larda Tiselius tarafından
- U şeklinde boru
- Alt kısımda protein-tampon karışımı
- Üst kısımda saf tampon
- Negatif ve pozitif elektrodlar
- Optik ölçümle saptama
- Halen protein-protein etkileşimleri ile ilgili çalışmalarda kullanılmakta, rutinde değil

# Kağıt Elektroferez Sistemleri

- Destek ortamı filtre kağıdı
- Ucuz ve yüksek gerilime dayanabilir
- Uzun deney süresi (16-18 saat)
- Rutinde kullanılmıyor
- Düşük ve yüksek voltajlı
- Proteinlerin ve enzimlerin ayırt edilmesi
- Kağıt, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin ayırt edilmesinde en iyi ortam



# Selüloz Asetat Elektroforezi

- Destek ortamı : Selülozun hidroksil grupları asetik asit anhidr gruplarıyla tepkimeye sokularak elde edilir
- Kağıt Elektroforezi ile iyi ayrımı yapılamayan serum örneklerinde iyi sonuç
- Avantajları :
  - Pahalı olmaması
  - Ayrımın hızlı olması
  - Azmiktarda numuneye ihtiyaç duyması
- Dezavantajları :
  - Destek ortamının opak olması ve dansitometrede okutulmadan önce kimyasal işlemlere olan ihtiyacı
  - Büyük moleküllü proteinlerde kullanımı sınırlı (porların ufaklığından)

# Agarose Jel Elektroforezi :

- Destek matriks olarak agar(agaroz)
- Agar, proteinlerin adsorbsiyonuna ve elektroendosmosise neden olur
- Agaroz, agarın iyonlarından arınmış hali, yukarıdaki dezavantajlar minimal seviyede
- Kullanım alanları :
  - Serum proteinlerinin
  - Hemoglobin varyantlarının
  - Laktat dehidrogenaz izoenzimlerinin
  - Lipoprotein fraksiyonlarının
  - DNA ve RNA analizlerinde

# Agarose Jel Elektroforezi :

- Agaroz destek matriksin dezavantajları :
  - Çok yumuşak olması
  - Çabuk ufalanması
  - İşlenmesinin zor olması
- Jelden numunenin kolaylıkla ekstrakte edilmesi
- Özellikle moleküler biyolojide



# Testin Yapılışı

- Moleküler çalışmalarda agaroz DNase ve RNase'dan yoksun olmalı
- DNA'nın uzunluğuna göre optimal jel konsantrasyonu ayarlanır

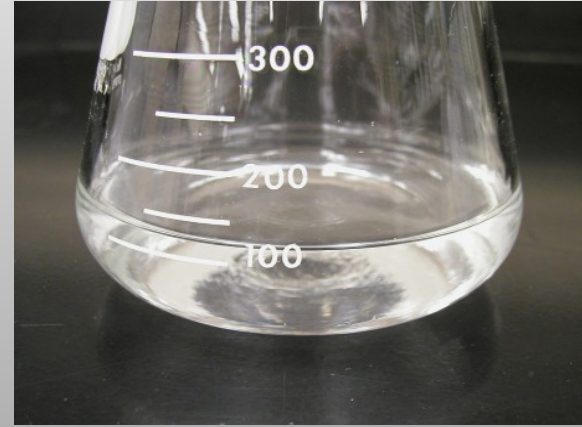
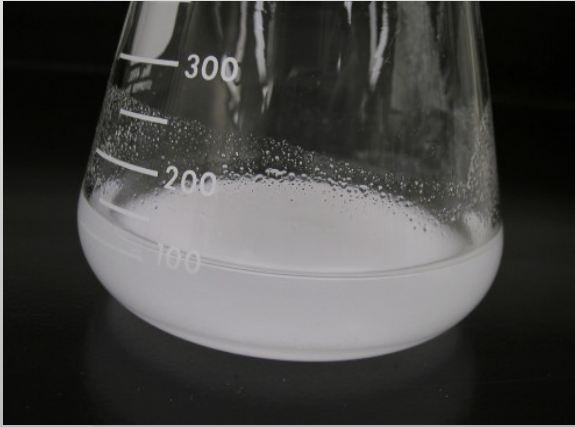
**Tablo 1. Ayrıştırılacak DNA uzunluklarına göre tercih edilmesi gereken agaroz konsantrasyonları**

DNA UZUNLUKLARI (bp)	% (w/v) AGARUZ KONSANTRASYONU
5 000-60 000	0,3
1 000-20 000	0,6
800-10 000	0,7
500 - 7 000	0,9
400 - 6 000	1,2
200 - 3 000	1,5
100 - 2 000	2,0

# Testin Yapılışı

- Agaroz kullanılacak tamponla sulandırılır
- Tampon çeşitleri :
  - Tris-asetat(TAE)
  - Tris-fosfat(TPE)
  - Tris-borat(TBE)
  - Alkalın gibi EDTA içeren tamponlar
- Stok tampon 10X
- Kullanılan tampon 0,5X
- En çok TAE kullanılıyor
- TPE ve TBE daha dayanıklı ve hızları daha yüksek
- Agaroz-tampon süspansiyonu, mikrodalgada iyice eritilir, partikül kalmamasına dikkat edilir
- 60C ye kadar soğutulur

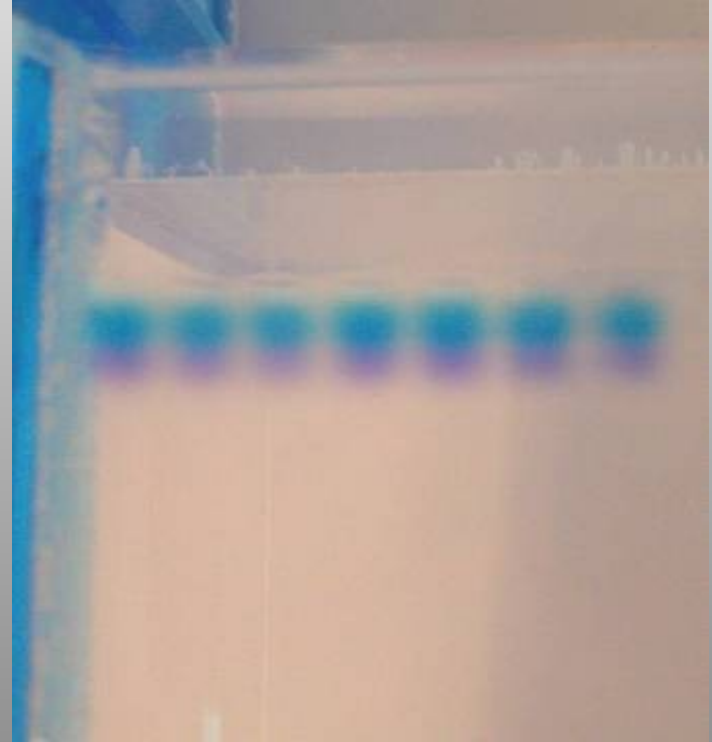
# Testin Yapılışı



- Ethidium bromide eklenir(0,5mg/ml)
- Jel plate dokülür, tarak konulur ve dondurulur
- Delikli kısım negatif elektrotta gelecek şekilde tanka konulur
- Tampon eklenir

# Testin Yapılışı

- Numuneler jele yüklenmeden önce yükleme boyası ile boyanır
  - Yoğunluklarının artırılması
  - Boyanması
  - Jeldeki ilerleme hızının görülebilmesi
- En çok kullanılan yükleme boyası, bromofenol blue ve ksilen siyanol FF içerenlerdir
  - Bromofenol jelde ksilen siyanol FF'e göre daha hızlı ilerlemekte
  - Bromofenol ~ 300 bp'de
  - Ksilen siyanol FF ~ 4000 bp'de görülür



# Testin Yapılışı

- Numunelerin ne kadar ilerlediğini görmek için markerlar kullanılır ve kontaminasyona neden olmamak için jele en son konulur
- Enzimlerle kesilen DNA
- En çok kullanılanda 500 bp ve 1000 bp daha yoğun
- Ethidium bromide kanserojen bir madde

# Nişasta Jel Elektroforezi

- Destek matriksi hidrolize edilmiř nişasta
- İlk defa Smithies kullanmış
- Smithies gn, elektriksel yüke olduğu kadar molekül byklėnede bağlı olduėunu söylemiř
- Hem vertical hemde horizontal olarak uygulanabilir

# Poliakrilamit Jel Elektroforezi

- Destek matriks, Akrilamit monomerlerinin metilenbisakrilamit ile polimerizasyonu sonucunda elde edilir.
- Konsantrasyonlarını değiştirerek jeldeki por büyüklüğü ayarlanabilir
- Düşük konsantrasyon-büyük por-yüksel molekül ağırlıklı numune
- Yüksek konsantrasyon-küçük por-düşük molekül ağırlıklı numune

# Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

- Akrilamidin polimerizasyonu için katalisit
- En basit ve güçlü riboflavin, ancak fotodekompozisyona ihtiyacı
- En çok kullanılan, TEMED (tetrametiletildiamin) ve amonyum perfülfat karışımı
- Polimerizasyon oda ısısında birkaç dakika
- Diğer katalisitler :
  - DMAPN ve amonyum persülfat karışımı
  - Riboflavin ve TEMED karışımı
  - Askorbik asit, ferroz sülfat ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> karışımları



# Poliakrilamit Jel Elektroforezi

- PAGE :
  - serum proteinlerinin
  - proteinlerin genetik varyasyonlarının
  - izoenzimlerin analizinde en iyi sonuç veren elektroforez ortamıdır
- Ayırışma hem moleküler elekleme hem de elektrostatik harekete dayalıdır
- Göç eden moleküllerle destek materyali arasındaki etkileşim minimum seviyededir

# Poliakrilamit Jel Elektroforezi

- Genellikle dikey aparat kullanılır
- Seperasyondan sonra boyama yapılır
- En çok kullanılan boya coomassie blue
- Gümüş boyama
- Amido black
- Ponceau red
- Nile red
- sypro red diğer yöntemler

# Sınıflandırma

- Jelin biçimine göre :
  - Tüp jel elektroforezi
  - Tabaka jel elektroforezi
- Jelin konumuna göre :
  - Dik jel elektroforezi
  - Horizontal jel elektroforezi
- Jelin bileşimine göre :
  - Native (doğal) jel elektroforezi
  - SDS'li(sodyum dodesil sülfat) jel elektroforezi
- Jelin gözenek dağılımına göre:
  - Homojen (düz) jel elektroforezi
  - Gradyent jel elektroforezi
- Jelin türüne göre :
  - Continious(devamlı) jel elektroforezi
  - Discontinious jel elektroforezi

# Native (Doğal) PAGE

- Doğal formda ayırım
- Proteinin yüzeyinde bulunan amino asilerin yan zincirlerindeki yüklerin oluşturduğu iyonik şiddetle bağlı olarak
- Molekük büyüklüğüde etkili
- SDS-PAGE'in aksine jel bir örnek, denatüre edici maddeler kullanılmıyor
- Enzimatik aktivite çalışmalarında da kullanılabilir

# SDS-PAGE

- Sodyum dodesil sülfat yani SDS deterjan etkisi ile polipeptitlerin katlanmış yapısını bozarken alt ünite etkileşimlerini de bozar
- SDS kaynaklı negatif yük
- Morbilitesi moleküler ağırlık değerlerine bağlı olarak gerçekleşir
- Protein örneklerinin beta merkaptanol, ditiotreitol gibi kimyasal indirgen ajanlarla ön işleme tabi tutulması ile disülfid köprülerinin indirgenmesi, polipeptitlerin arasındaki bağların koparılmasını sağlar
- SDS'in de varlığında, bu polipeptitler negatif yüklenerek, elektrik alanda pozitif elektrota doğru hareket eder

# SDS-PAGE

- SDS-PAGE için önem taşıyan bazı kimyasallar ve fonksiyonları şunlardır ;
  - SDS denatüran ajan olarak kullanılan bir tür deterjandır. Proteinlerin denatürasyonunu sağlarken aynı zamanda onların negatif yük kazanmalarını da sağlar.
  - TEMED , amonyum persülfat kaynaklı serbest radikallerin oluşumunu katalizleyerek akrilamid ve bisakrilamidin polimerizasyon reaksiyonlarını hızlandırır.
  - APS yani amonyum persülfat polimerizasyonu sağlayan serbest radikaller oluşturur. Taze kullanılmalıdır.

# SDS-PAGE

- Yapılışı :

- Ayırma Jeli %12'lik, üstten 0,5 cm boşluk kalacak şekilde doldurulduktan sonra üzeri hava ile temasını kesmek için N-Bütanol ile kapatılır
- Distile su ile yıkama(N-bütanol)
- %4'lük konsantrasyon jeli (stacking gel) ve tarak1 saat süre ile jelin polimerizasyonunun tamamlanması beklenir.
- Daha sonra tarak çıkarılır, jelleri taşıyan parça elektorforez tankına yerleştirilir ve tank SDS-PAGE tamponu ile doldurulur.
- Proteinlerin denatürasyon işlemleri yapılır ve kuyulara konulur.
- Ortalam 120 Voltta 50 dakika yürütme işlemi yapılır
- Boyama yapılır(commasie blue ve gümüş boyama)

# Kapillar Elektforez

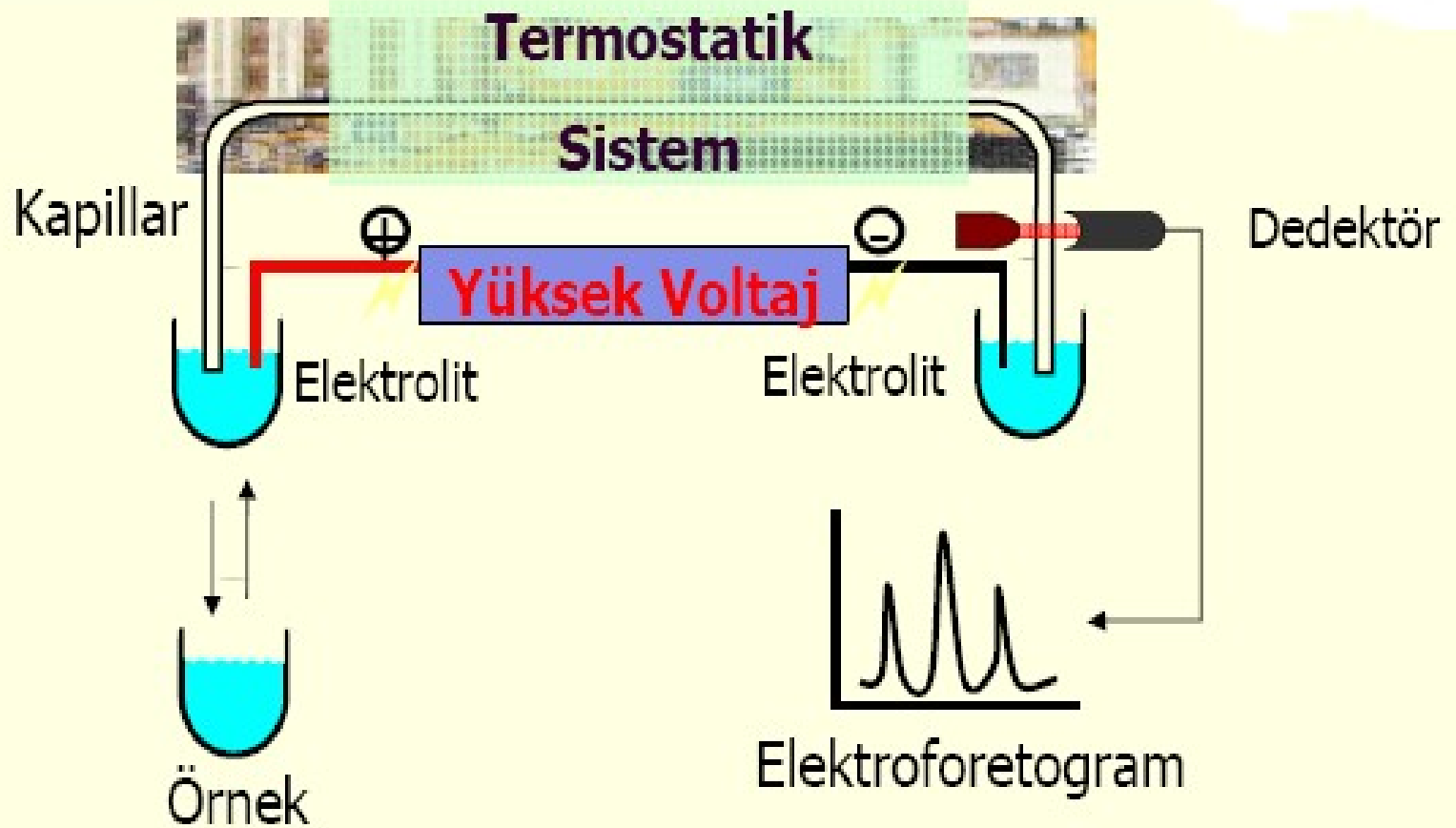
- En yeni metot
- Kimyasal bileşiklerin ayrılması ve tayininde kullanılır
- Avantajları :
  - Yüksek seçicilik
  - Hızlı ayırım
  - Kapillerlerin uzun ömürlü ve ucuz olması
  - Az miktarda numune ve reaktiflere gerek duyulması
  - Tayin sınırlarının oldukça düşük düzeylere kadar inebilmesi
  - İşlem sırasında proteinlerin denatüre olmaması
  - Otomasyona uygunluğudur



# Kapillar Elektroferez

- Kapiller elektroferez küçük çaplı (25-75  $\mu\text{m}$ ), 100 cm uzunluğunda 'fused' silika bir kapiller boru kullanarak gerçekleştirilen bir yöntemdir
- Mikrolitre düzeylerinde örnek-1 milyona yakın fraksiyona ayrılabilir
- Diğer yöntemlerden iki farkı :
  - Seperasyon (+) elektrottan (-) e dogru olur
  - Elektroozmotik hareketlilik: Yüksek voltaj uygulaması sonucu (+) iyonların (-) elektroda göçü sırasında oluşan akış
- Numune yükü önemszenmeden elektroozmotik akış örnekleri,(-) elektroda doğru ilerletir
- Seperasyon (+) elektroda doğru geri migrasyon hızları farklılığına bağlı
- (+) iyonlar, hem elektroozmotik akış hemde iyon hareketleri aynı yönde olduğu için erken çıkar, (-) iyonlar yavaştır

# Kapillar Elektroz



# İmmunoelektroforez

- İlk kez 1953 yılında Grabar ve Williams
- jel elektroforezi sonrası immün difüzyon
- Scheidegger yöntemi geliştirerek bugünkü kullanılan haline getirmiştir
- Kullanım alanları :
  - Bir çok spesifik protein gösterilmesinde
  - Klinik laboratuvarlarda, immünglobulinlerin gösterilmesinde
  - Proteinlerin konsantrasyon değişikliklerinin gösterilmesinde
  - Yapı anormallikleri gösterilmesinde
  - Virus teşhisi içinde kullanılabilir(örneğin hepatit B)

# İmmunoelektroforez

- Agaroz jel kullanılır
- Prensibi, serum proteinlerinin elektroforetik ayırımından sonra, aranan proteine karşı antiserum ekleyerek antijen-antikor presipitatlarının gösterilmesidir
- Önce agaroz jel elektroforezi
- Göç yönüne paralel simültane immun difüzyon testi
- Antijen-antikor presitasyon bantları

# İmmunoelektroforez çeşitleri

## Counter immunoelektroforezi

- Virusların teşhisinde
- Vertikal aparat kullanılır
- Destek matriks agaroz jel
- İmmun difüzyondan 10 kat daha duyarlı
- Agaroz jel barbitürik asit-tris tamponunda hazırlanır
- Üzerine delikler açılır
- Antijenler pozitif elektroda, uygun antikolar ise negatif elektroda yakın gözeneklere
- Yürütme yapılır
- Boyamayı takiben presipitatlar görülür
- Negatif yüklü antijenlerin alkalen ortamda (pH:8,6) elektroforezle negatif elektroda göç etmesi, buna karşılık antikoların endosmotik göç nedeniyle pozitif elektroda yayılması

# İmmunoelektroforez çeşitleri

## Standart immunoelektroforez

- İki testin kombinasyonu
  - Agaroz jel elektroforezi
  - İmmun difüzyon
- Agaroz jel elektroforezi takiben göç yollarına paralel çukur açılır ve uygun antiserum konur
- İmmun difüzyon

## Komperatif immunoelektroforez

## Radioimmunoelektroforez

## Kantitatif immunoelektroforez

## Çapraz immunoelektroforez

## Elektroimmunoassay, rocket IE

## Çapraz ve Elektroimmunoassay IE modifikasyonları

# BOYALAR

Numune türüne göre değişir

- Protein boyaları
  - Lightgreen
  - Amido black
  - Coomassie blue
- Lipit boyaları
  - Sudan black B
  - Oil red O
- Polisakarit boyaları

# TESEKWIURER