

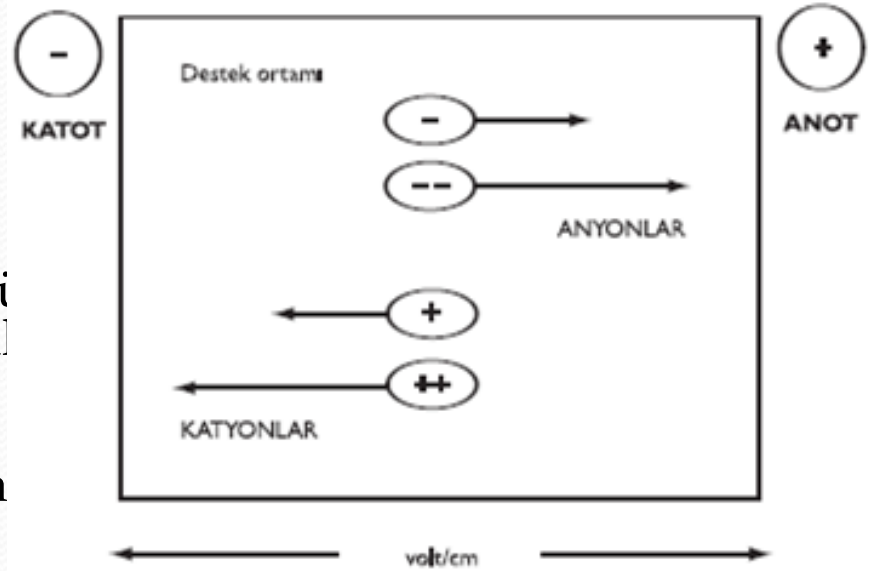
ELEKTROFOREZ

Dr. Öğr. Üyesi Akar Karakoç

Elektroforez nedir?

Elektroforez

- **elektro**(elektriksel yük) + **phoresis** [seperasyon (ayrılma)]
- Elektroforez; elektriksel alanda yüklü partiküllerin, **yüklerine** ve **molekül büyüklüğüne** göre farklı hızlarda hareket etmeleri esasına dayanarak birbirlerinden ayrılmalarını sağlayan analitik bir metottur.
- Net yüke sahip tanecikler, bir elektroforetik sistemde taşıdıkları yükün tipine göre ya katoda ya da anota doğru hareket eder.
- Elektriksel alanda **katyonlar** [(+) yüklü tanecikler], **katoda** [(-) kutba]; **anyonlar** [(-) yüklü tanecikler], **anoda** (+) kutba doğru hareket ederler.

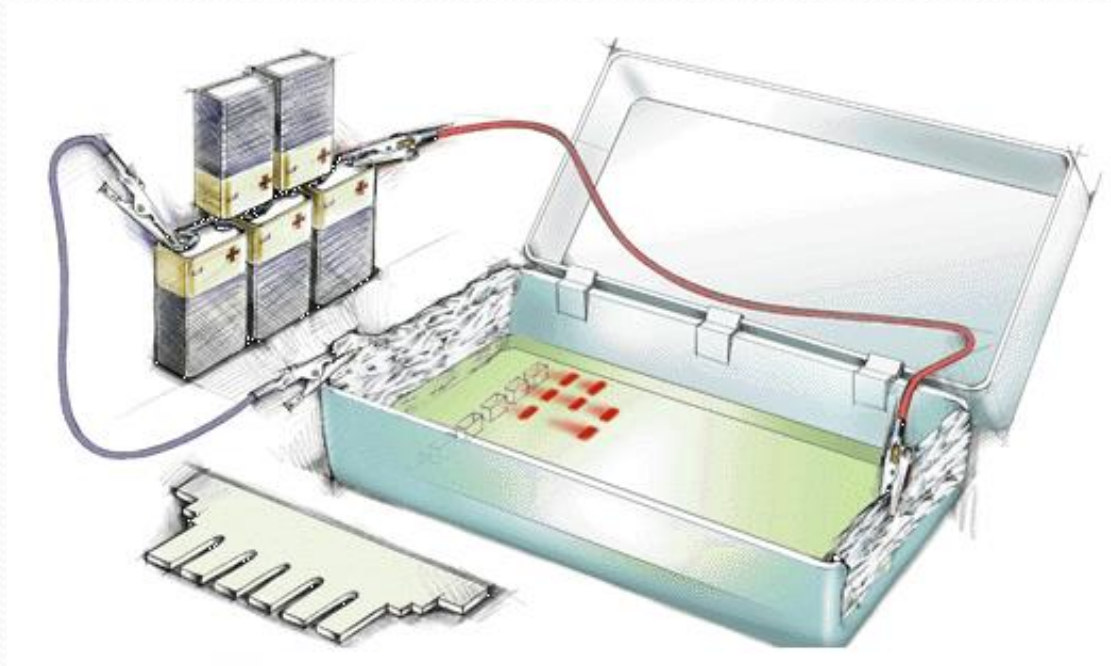


İyonoforez: Sadece küçük iyonların göçünü ifade ederken kullanılan terimdir.

Göç hızının bağlı olduğu faktörler

Elektroforez ortamında, moleküllerin hareket hızları

1. Molekülün **net** elektriksel yüküne,
2. Molekülün yapısı ve büyüklüğüne,
3. Elektriksel alanın gücüne,
4. Destek ortamının özelliklerine,
5. Uygulama ısısı gibi faktörlere bağlıdır.



Elektroforetik Mobilite (Hareketlilik)

Elektroforetik mobilite, yüklü moleküllerin destek ortamı üzerindeki hareket yeteneğidir. Parçacık üzerine etki eden iki gücün etkisi sonucu meydana gelir:

1. Elektrik alanın iyon üzerine oluşturduğu *hareket gücü*
2. Destek ortamının sürtünme direnci sonucu oluşan hareketi *engelleyici güç*

$$\mu = \frac{\text{partikülün net yükü (Q)}}{6\pi r \eta}$$

- Q: partikülün net yükü ile  doğru orantılı
 - r: partikülün iyonik yarıçapı
 - η : tampon çözeltinin viskozitesi
- } ters orantılı

Elektroforez bileşenleri

Bir elektroforez sisteminde aşağıdaki bileşenlere ihtiyaç vardır:

1. Destek ortam
2. Tampon
3. Güç kaynağı
4. Boyalar
5. Dansitometre

Destek Ortamı

- Ayırıştırılmak istenen örneğin uygulandığı ve üzerinde veya içerisinde göç ettiği ortamdır.
- Kullanılan örneğe ve analizin amacına göre farklı fiziksel özelliklere sahip destek ortamları kullanılır. (kağıt; nişasta, agaroz, poliakrilamit jelleri ve selüloz asetat membranı).
- Elektroforez tipi çoğunlukla kullanılan destek ortamına göre isimlendirilir. (örn: Kağıt elektroforezi)

Güç Kaynağı

- Elektroforetik sistemlerde güç kaynağının görevi **elektrik gücü** sağlamaktır.
- Güç kaynakları sabit elektrik akımı, sabit voltaj veya sabit güç sağlayabilmelidir.

Tamponlar

Elektroforezde kullanılan tamponların görevi:

1. Uygulanan elektrik akımını taşımak
2. Elektroforez ortamının pH'sını sabitleyerek ayrılmak istenen partiküllerin elektrik yükünü belirlemektir.

Boyalar

- Çoğu biyolojik bileşik renkli olmadığı için destek ortamı üzerinde yerlerinin belirlenmesi ve görsel hale getirilmesi için boya kullanılır.
- Boya elektroforez ile yürütme işlemi sonrasında jelin boyanması şeklinde uygulanır ya da
- örneklerin jele tatbik edilmesi esnasında uygulanır (DNA elektroforezinde kullanılan etidyum bromür gibi)

Sıklıkla kullanılan boyalar

Ayırım yerlerini belirlemek ve görsel hale getirmek için kullanılan boyalar uygulama tiplerine göre farklılık gösterir.

- **Coomassie Brilliant Blue** serisi boyalar **PAGE- IEF**' da başarıyla kullanılır
- **Etidyum bromür** **nükleik asitleri** boyamak için kullanılır
- DNA'ya **^{32}P** bağlanırsa bantların otoradyografi ile görülmesi sağlanabilir
- **Gümüş nitrat** boyalar **protein ve polipeptitleri** 10 kattan 100 kata kadar daha duyarlı şekilde boyar

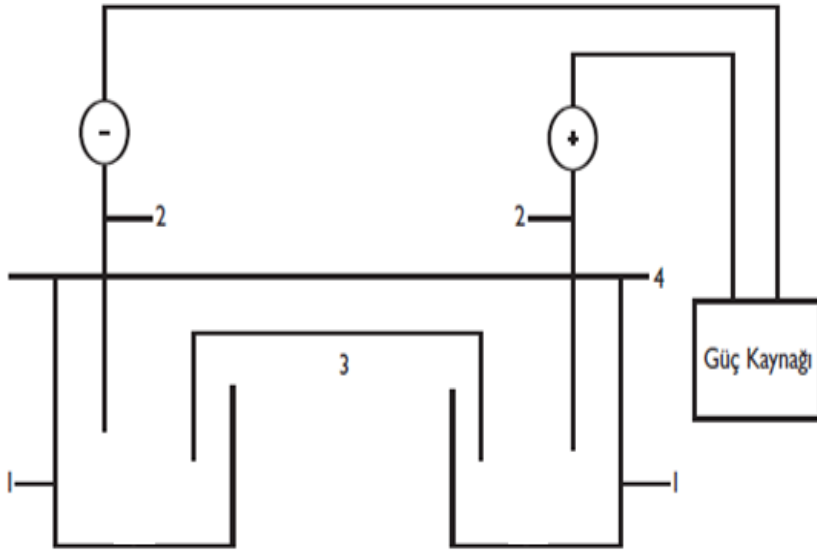
Dansitometre

- Uygulama, yürütme, boyama ve kurutma işleminden sonra bantlardaki boya yoğunluğunu (madde miktarını) saptamak için kullanılır.
- Dansitometrenin bir bileşeni olan fotodedektörde saptanan sinyaller örneğin konsantrasyonu ile orantılıdır.
- Destek ortamı sabit bir hızla ışık demetinden geçirilir, böylece farklı noktalarda alınan çoklu dansite okumaları için grafik (**elektroforetogram**) oluşturulur. Grafik yardımı ile tüm fraksiyonların miktarı hesaplanır.

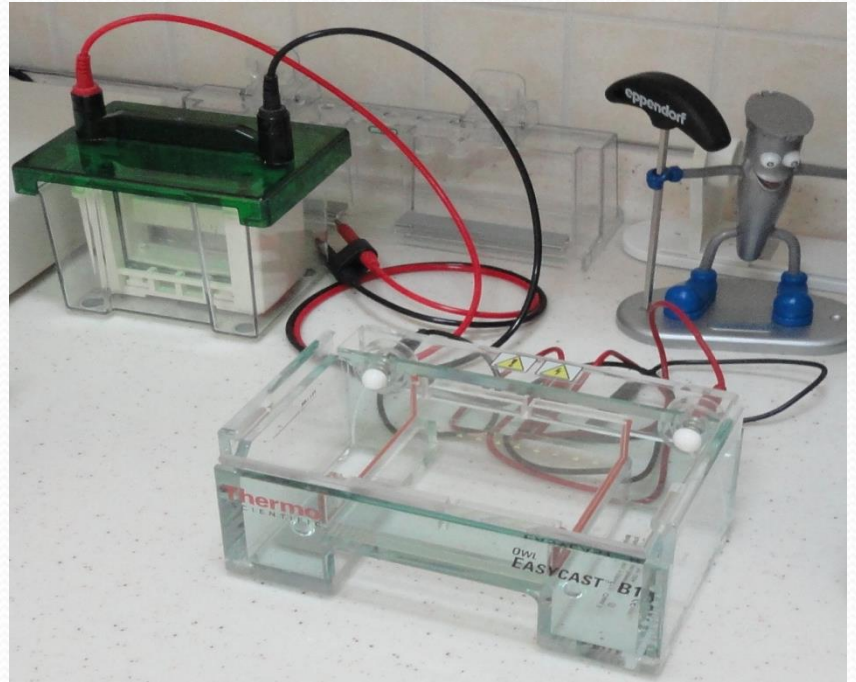
Elektroforez cihazı

- Elektroforez cihazındaki parçalar:

1. Tamponun konulduğu **tank**
2. Her bir tampon tankında **platin veya karbon elektrot** (elektrotlar güç kaynağına bağlıdır)
3. Üzerinde ayırımın gerçekleştirildiği elektroforez **destek ortamı**
4. **Kapak** (buharlaşmayı en aza indirmek ve sistemi korumak için tüm sistem bir kapakla örtülüdür.)



Elektroforez sisteminin şematik gösterimi



Elektroforetik Ayırmanın Aşamaları

1. Destek ortamın hazırlanması ve örneklerin uygulanması
2. Yürütme
3. Boyama
4. Şeffaflaştırma ve Kurutma
5. Değerlendirme (Densitometre ile)

Elektroforetik Ayırmanın Aşamaları

1. **Destek ortamın hazırlanması ve örneklerin uygulanması:** Destek ortamın fazla tamponu giderilir ve elektroforez tankına yerleştirilir. Örnekler, elektroforez tankına doldurulmuş tampon ile temas halindeki destek ortam üzerine uygulanır.

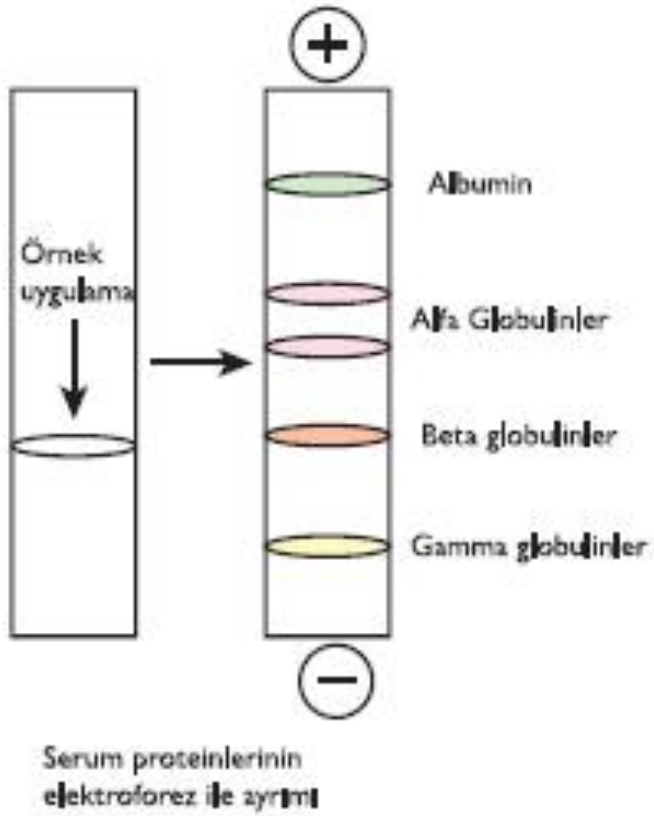


Elektroforetik Ayırmanın Aşamaları

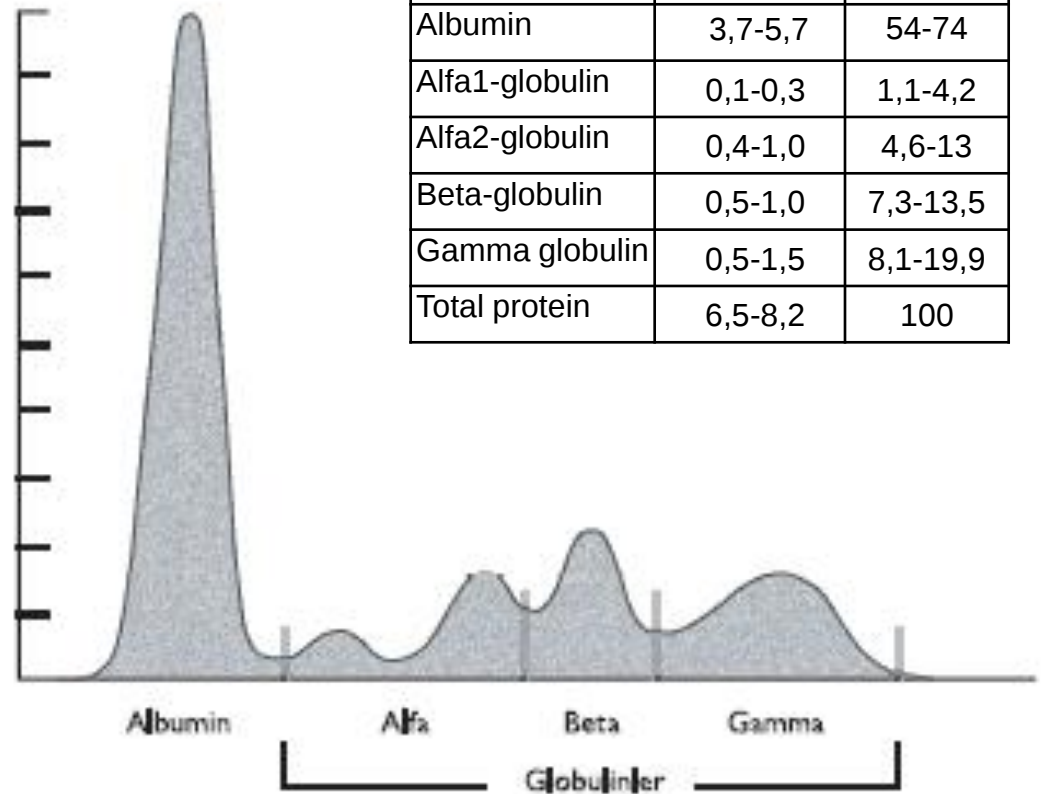
2. **Yürütme:** Elektrik akımı uygulanarak örnekler yürütülür. Yürütme bittikten sonra, destek ortam elektroforez kabından çıkartılıp kurutulur veya örnek bileşenlerinin yayılmaması için sabitleştirici çözeltiye konur.
3. **Boyama:** Her bir bileşene ait bandın yerini belirlemek ve görünür hale getirmek için boyama yapılır.
4. **Şeffaflaştırma ve Kurutma :** Fazla boya uzaklaştırılarak şeffaflaştırma ve kurutma yapılır.
5. **Değerlendirme:** Dansitometre ile elde edilen elektroforetogramdan her bir bandaki örnek miktarı yüzde(%) ve mg/dl olarak hesaplanır.

NOT: Boya, örneklerin jele tatbik edilmesi esnasında uygulanmışsa 3. ve 4. basamaklar atlanır.

- Serum protein elektroforezinde elde edilen 5 protein bantı ve elektroforetogramı



Fraksiyon	g/dL	%
Albumin	3,7-5,7	54-74
Alfa1-globulin	0,1-0,3	1,1-4,2
Alfa2-globulin	0,4-1,0	4,6-13
Beta-globulin	0,5-1,0	7,3-13,5
Gamma globulin	0,5-1,5	8,1-19,9
Total protein	6,5-8,2	100



Elektroforez tekniğinin aşamaları ve elektroforetogram eldesi

ELEKTROFOREZ TÜRLERİ

1. Zon (bölge) elektroforezi: Destek ortamın türüne göre sınıflandırılır
 - a. Nişasta Jel elektroforezi
 - b. Selüloz asetat elektroforezi (CAE)
 - c. Agaroz jel elektroforezi (AGE)
 - d. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)
2. İzoelektrik odaklama elektroforezi (IEF, IF)
3. İki boyutlu (2D) elektroforez
4. Kapiller elektroforez (CE)
5. Blotlama teknikleri
 - a. Southern blotlama
 - b. Northern blotlama
 - c. Western blotlama
6. İmmünoelektroforez (IE)

Nişasta Jel elektroforezi

- Destek ortam olarak nişasta jel kullanılır.
- Makromoleküllerin *yüklerine ve molekül büyüklüklerine* göre ayrılmasında kullanılan ilk elektroforez destek ortamıdır
- Ancak, jelin hazırlanmasındaki zorluklar nedeniyle kullanımı sınırlıdır.

Selüloz Asetat Elektroforezi

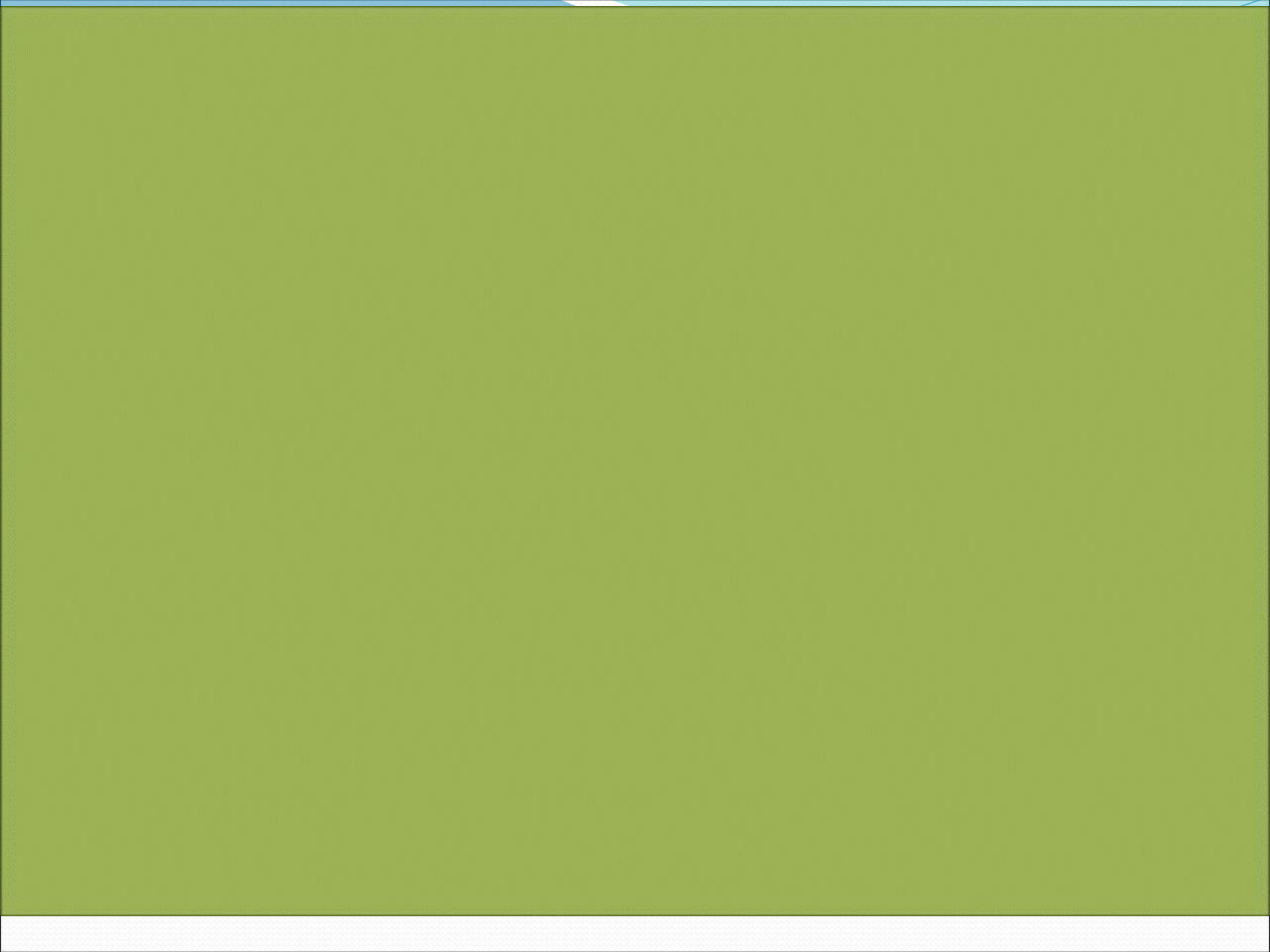
- Elektroforetik destek olarak selüloz asetat membranları kullanılır.
- Ticari olarak temin edilebilen membranlar selüloz asetat fiberleri arasında %80 oranında hava içerir; kuru, opak ve kırılğan yapıdadır
- Numune membran üzerine uygulanmadan önce membran tamponla ıslatılır (ıslatıldığında hava boşlukları sıvıyla dolar ve filmler esnek bir yapı kazanır).
- 95 kısım metanol+5 kısım glasiyel asetik asit karışımına batırılarak şeffaflaştırılır (dansitometrik ölçüm için uygun hale getirilir).
- **Avantajı**, ayırımın hızlı olması (20 dk-1 sa) ve şeffaf membranların uzun süre saklanabilmesidir.
- **Dezavantajı**, kullanımdan önce ıslatılma ve dansitometri öncesi şeffaflaştırma gereği nedeniyle birçok uygulamada yerini agaroz jel almıştır.

Selüloz Asetat, sellülozun asetik anhidrit ile muamele edilmesi sonucu sellülozun hidroksil gruplarına asetil gruplarının ilavesi ile elde edilir.

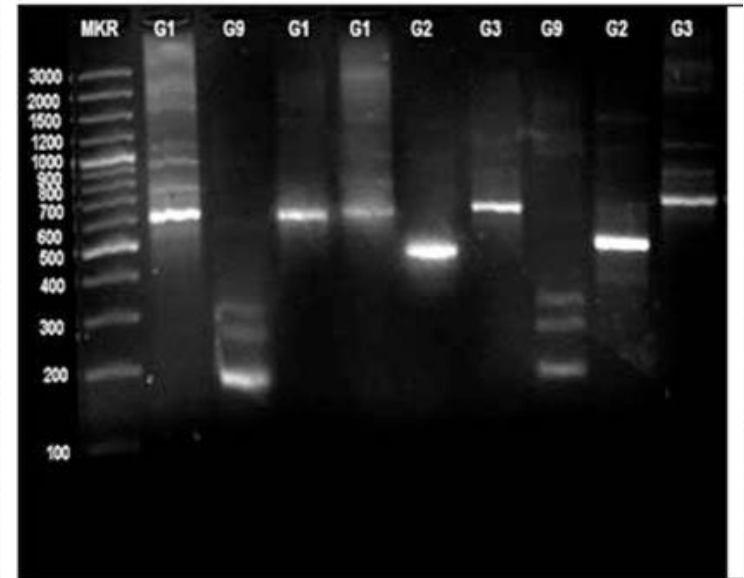
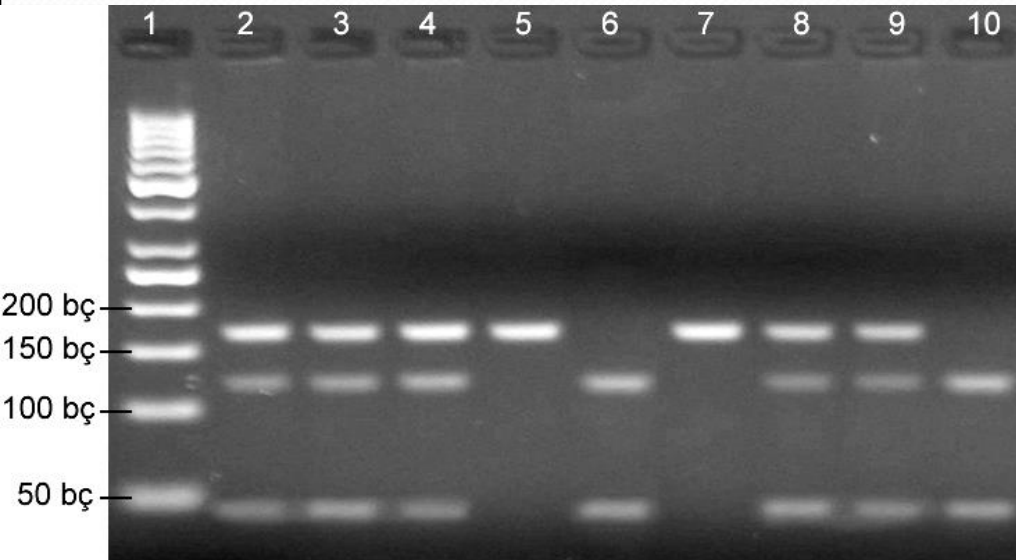
Agaroz jel elektroforezi (AGE)

- Destek ortam olarak agaroz jel kullanılır
- AGE, serum proteinleri, nükleik asitler (0.5-20 kbp), hemoglobin varyantları, laktat dehidrogenaz ve kreatin kinaz izoenzimleri, lipoprotein fraksiyonları vb. maddelerin analizinde kullanılmaktadır.
- Tipik bir AGE süresi 30-90 dakikadır.

Agaroz, agarın (sülfatlanmış galaktoz monomerleri içeren asit karakterli bir polisakkarit) sülfatlardan arınmış şeklidir.



Agaroz jelde yürütülen DNA örneklerine ait band görüntüleri



Poliakrilamit Jel Elektroforezi

(Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE)

- Bu yöntemde destek ortam poliakrilamittir.
- Araştırma çalışmalarında **en yaygın** kullanım alanı olan elektroforez tekniğidir.
- Ayırım gücü yüksektir.
- PAGE ile 20 veya daha fazla fraksiyon elde edilebilir. Özellikle, proteinlerin saflık kontrolü, fraksiyonlama, saf proteinlerin alt birimlerinin incelenmesi, molekül ağırlığı tayini, izoenzimlerin analizleri olmak üzere **protein ve nükleik asit** çalışmalarında kullanılır.

Poliakrilamit, akrilamidin çeşitli katalizörlerle birlikte ısıtılmasıyla oluşan polimeridir.

- *PAGE, farklı şekillerde uygulanabilmektedir. Örneğin: SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat- PAGE) SDS-PAGE moleküler biyolojideki araştırmalar için en yaygın olarak kullanılan protein elektroforez tekniğidir.*
- SDS anyonik bir deterjan olup protein moleküllerini oluşturan **alt birimleri birbirinden ayırır**. Ayrıca (-) yük taşıdığından peptitlerde yüksek oranda (-) **yük** kazandırır. Böylece **elektrik yükü açısından** karışım içerisindeki bütün protein molekülleri **eşit duruma** getirilir.
- *SDS-PAGE ile proteinler, net yük ve şekillerine göre değil, sadece **molekül büyüklüklerine** göre, birbirinden ayrılırlar*

İzoelektrik odaklama elektroforezi

- İzoelektrik odaklamada (fokuslama) proteinler **izoelektrik pH'larının** farklı oluşundan (pI) yararlanılarak ayrıştırılabilmektedir.
- Bu teknikte elektroforetik hareket pH'nın fonksiyonu olarak ele alınır ve destek ortamı olan jelde kararlı bir pH gradiyenti oluşturulur.
- Bir protein karışımı jele uygulanınca protein izoelektrik noktasına eşit pH'a gelinceye kadar göç eder. Bu pH'da **elektriksel yükü sıfır olur ve göç durur**. Böylece proteinler **pI noktalarına göre ayrılırlar**.

İzoelektrik pH (pI): Amfolit bir molekülün net yükünün **sıfır** olduğu pH'dır. Bir molekül izoelektrik pH'sının altındaki pH'larda pozitif yüklü olup katoda; izoelektrik pH'sının üstündeki pH'larda negatif yüklü olup anota hareket eder.

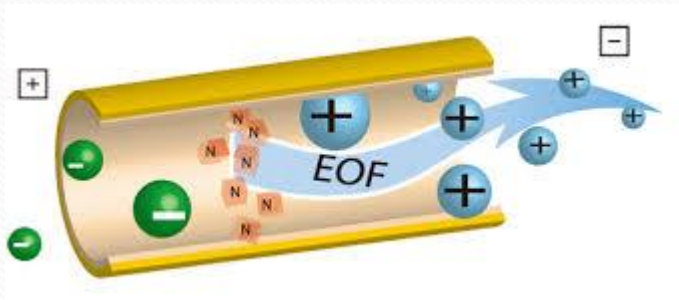
Amfolit: Hem pozitif hem de negatif yüklü gruplar taşıyan molekül (zwitter iyon).

Kapiller elektroforez

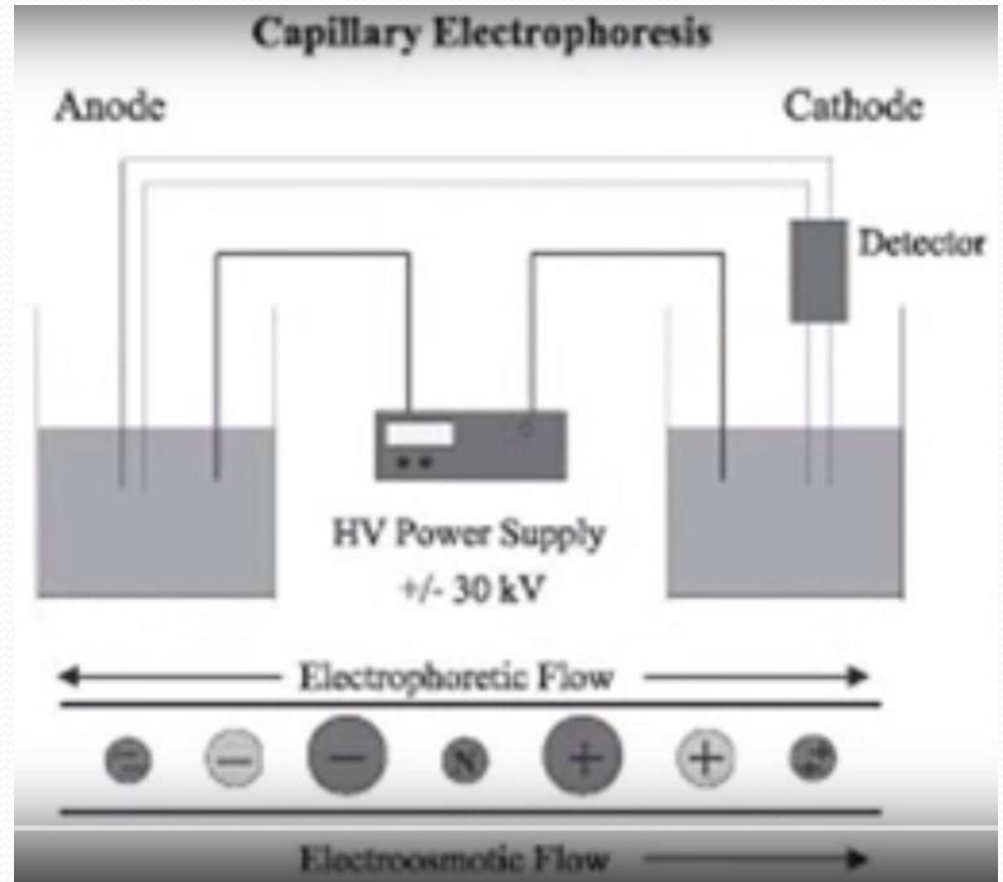
- Kapiller elektroforezde içi silika ile kaplanmış 20-200 cm uzunluktaki küçük çaplı (10-100 μm) kapiller tüplerde klasik elektroforez yöntemleri uygulanır.
- Kapiller elektroforetik sistem,
 - **Kapiller bir boru,**
 - Bu borunun iki ucunda iki **tampon haznesi,**
 - Bu hazneye bağlı bir **güç kaynağı,**
 - **Dedektör** ve
 - Dedektöre bağlı bir **bilgisayardan** oluşur.
- Güç kaynağının iki ucu arasındaki bağlantıyı kapiller boruyu dolduran tampon sağlar

- Kapiller borunun çapı çok küçük olduğundan işlem sırasında içinden katoda doğru 'elektroozmotik akış' denilen bir sıvı akışı olur.
- Önce katyonlar (en yüksek yük/kütle oranına sahip olandan başlayarak), sonra nötr moleküller (en küçük kütleli olandan başlayarak), en sonunda da anoda gitmek isteyip de ozmotik akışa kapılıp zıt yönde hareket eden anyonlar (en küçük yük/kütle oranına sahip olandan başlayarak) dedektöre ulaşırlar.
- Uygulama alanı geniştir. Düşük molekül ağırlıklı iyonların, proteinlerin ve diğer makromoleküllerin ayrılması gerçekleştirilir. Ayrıca, inorganik iyonlar, aminoasitler, organik asitler, ilaçlar, vitaminler, porfirinler, karbonhidratlar ve DNA parçacıklarının ayrılmasında da kullanılmaktadır.

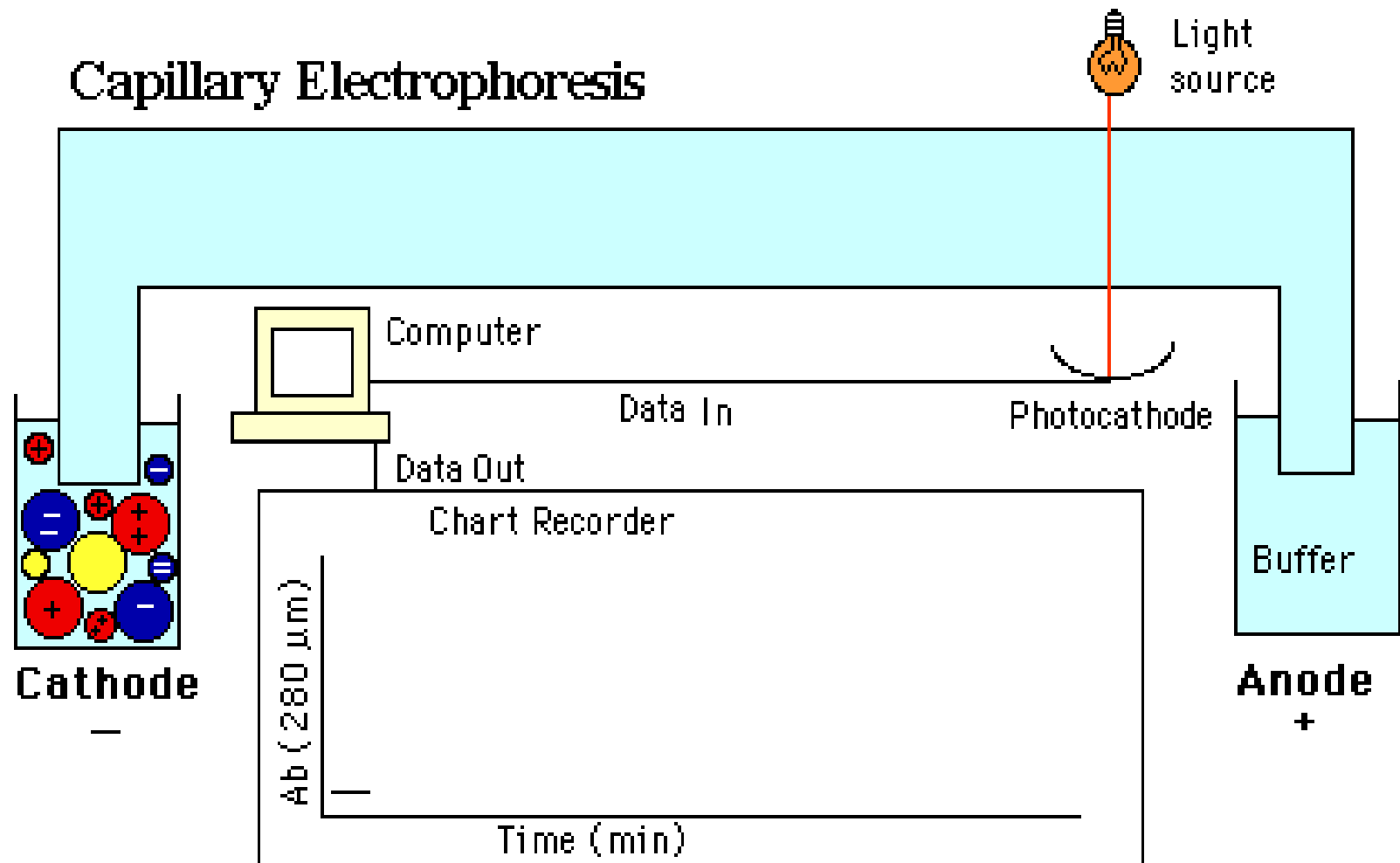
Elektroozmoz: Herhangi bir yükün destek ortam üzerine seçici bir şekilde bağlanmasına bağlı olarak, sıvının destek ortam üzerinde bir yöne doğru hareket etmesi.



EOF=electro-osmotic flow
=elektro-ozmotik akış



Capillary Electrophoresis



İki Yönlü (boyutlu) (2D) Elektroforez

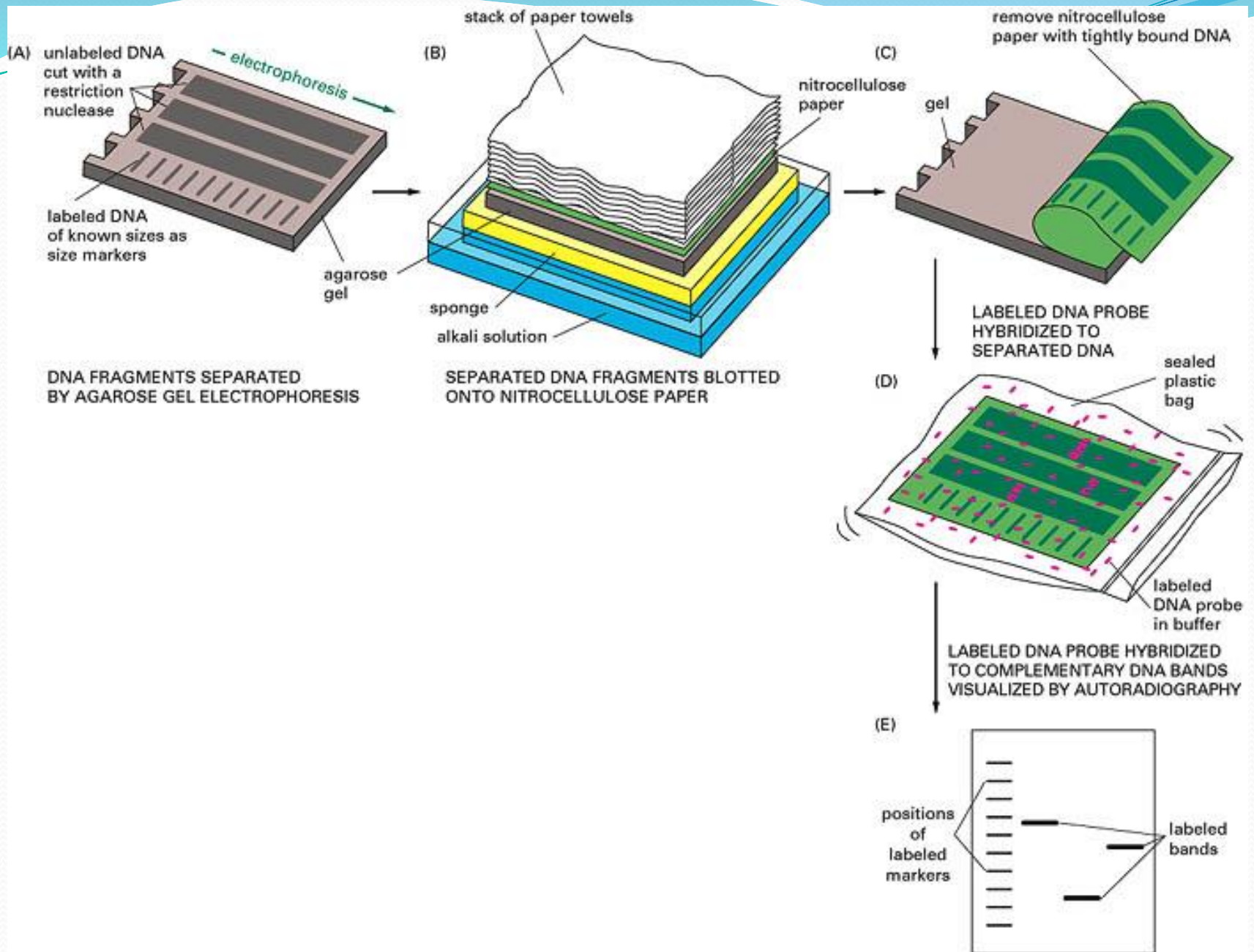
- İki yönde uygulanan elektroforez yöntemidir. SDS-PAGE ve IEF in iki boyutlu jellerde birleştirilmesi ile uygulanır.
- Birinci yönde yüke, ve ikinci yönde molekül ağırlığına (MA) bağlı elektroforez kullanılmaktadır
- SDS-PAGE molekül büyüklüğü, IEF yük esasına göre ayırım yapar
- 2D elektroforez, SDS-PAGE ve IEF'in her birinden daha fazla duyarlılığa sahiptir.
- pI farklı, MA yakın olan veya MA farklı, yakın pI olan proteinlerin ayırımında kullanılır.

Blotlama Teknikleri (Transfer etme)

- Southern blotlama tekniği, 1975'te Edward **Southern** tarafından DNA ayırımı ve belirlenmesi için geliştirilmiştir. Daha sonraları RNA ve protein analizi için geliştirilen **Northern** ve **Western** tekniklerinin isimleri Southern kelimesinden esinlenerek konulmuştur.
1. **Southern Blotlama** —————> **DNA**
 2. **Northern Blotlama** —————> **RNA**
 3. **Western Blotlama** —————> **Protein**

SOUTHERN BLOTLAMA

- DNA ve DNA parçacıklarının ayrılması ve tanınması için kullanılmaktadır. Bu teknikte:
- DNA ve DNA parçaları, önce AGE ile ayrılır
- Daha sonra jel üzerine nitroselüloz membran filmi yerleştirilir
- DNA ve DNA parçaları **lekeleme** ile membran üzerine transfer edilir (**blotlanır**)
- Daha sonra **işaretli komplementer nükleik asit probları** ile hibridize edilerek saptama ve tanımlama yapılır.



• **NORTHERN BLOTLAMA**

- **RNA ve RNA parçacıklarının** ayrılması ve tanınması için kullanılmaktadır.
- RNA ve RNA parçacıkları, Southern tekniğindeki gibi ayrılır ve blotlanır, **işaretli nükleik asit problrarı** ile hibritlenerek saptama ve tanımlama yapılır.

• **WESTERN BLOTLAMA**

- Kompleks bir karışımdaki bir veya daha fazla **proteinin** ayrılması, saptanması ve tanımlanması için kullanılan bir yöntemdir.
- Bu teknik de Southern tekniğine benzer şekilde uygulanır. Ancak ayırım için AGE değil **SDS- PAGE** kullanılır ve tanımlama **aranan proteine özgü işaretli antikor** ile gerçekleştirilir.

İmmünelektroforez (IE)

- *Antijen-antikor (Ag-Ab) etkileşimine dayanan elektroforez tekniğidir.*