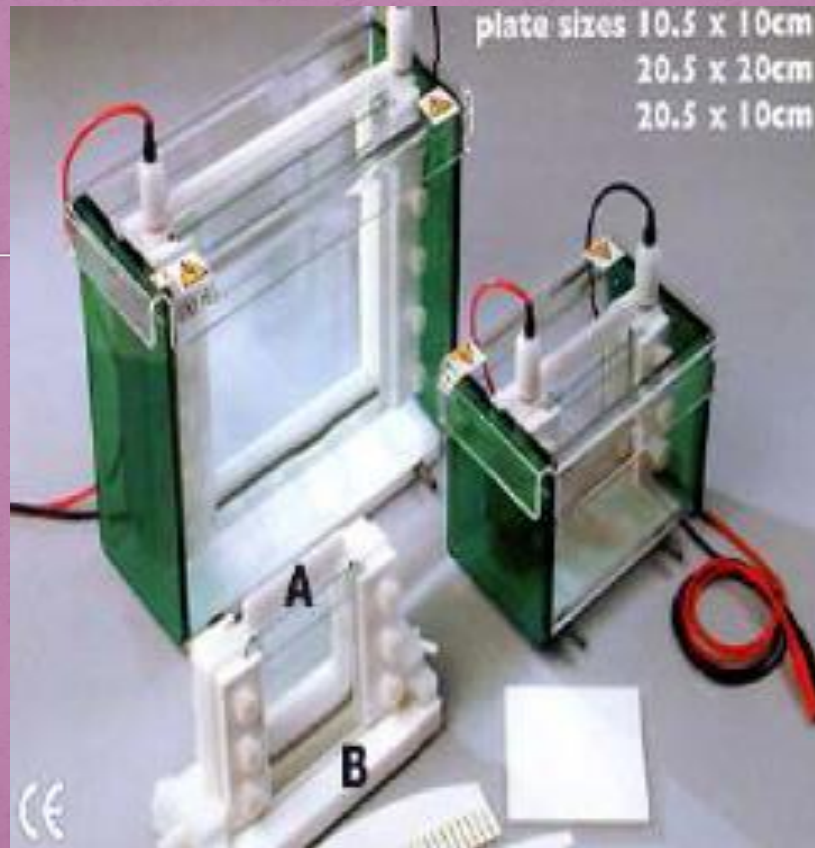
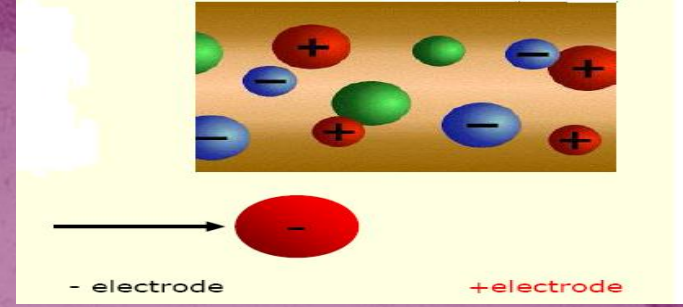


ELEKTROFORETİK YÖNTEMLER



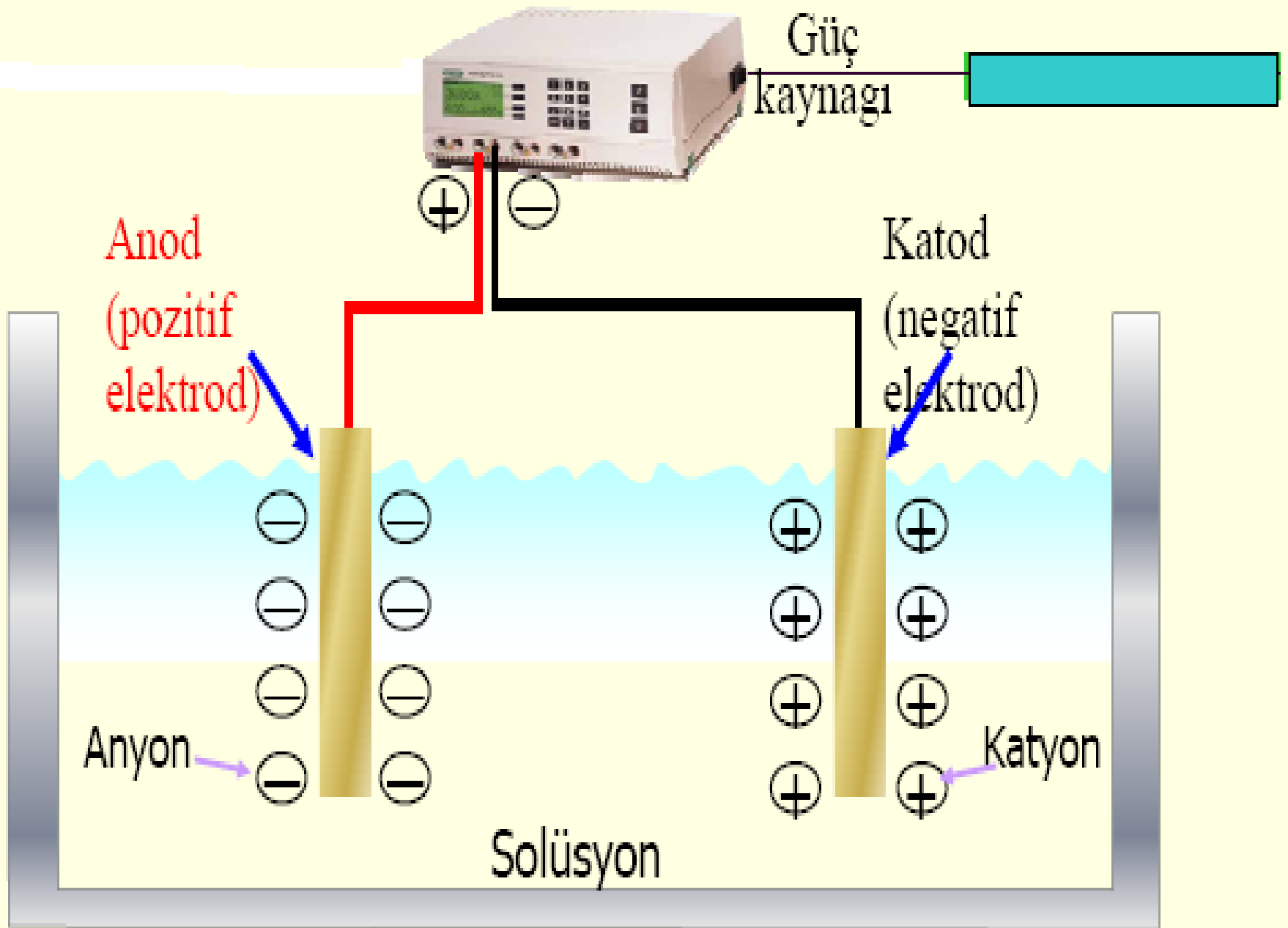
ELEKTROFOREZ NEDİR?



- Elektroforez genel anlamda, özel bir sıvı ortamda, parçacıkların içerdikleri elektriksel yüke göre farklı hızda ve farklı yönde **hareket** etmesi sonucu, bütün bir maddenin yapısındaki farklı maddelerin ayırt edilebilmesini sağlayan bir inceleme yöntemidir.
- İlk kez 1937 yılında **Arne tselius** tarafından geliştirilmiş olan elektroforezden, özellikle **tıpta** ve **biyokimyada**, **kandaki** çeşitli **protein** ve **lipitlerin** ayrılması, tanınması ve miktarının ölçülmesinde yararlanır. Ayrıca elektroforez den sanayide yaygın biçimde yararlanılmaktadır.

ÇALIŞMA PRENSİBİ

- **Elektroforezin çalışma ilkesi;** molekül ağırlığı ve molekülde bulunan elektrik enerjisinin jel içinden bir yükten diğerine giderken kat ettiği mesafe farklılıklarını ele almaktır. Bu farklılıklara göre enzim ya da proteinin birbirinden farkı anlaşılabilir.
- Anyonlar anoda, katyonlar katoda hareket ederler. Moleküllerin elektroforezdeki hızını etkileyen çeşitli faktörlerde vardır.



Elektroforez için dört şeye ihtiyaç vardır:

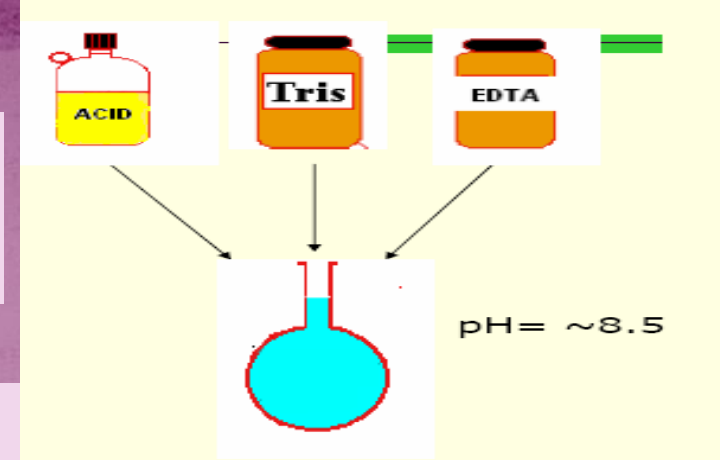
- İyonların hareket edebileceği uygun bir destek ortamı
(kağıt, selüloz asetat, nişasta, agaroz jeli ya da poliakrilamit)
- Elektriksel alanı oluşturmak için doğru akım sağlayacak güç kaynağı
- Uygun pH'da bir tampon çözelti
- Birbirinden ayrılan bantları kantitatif olarak değerlendirebilen dansitometre.

GÜÇ KAYNAĞI



- Elektrotlar arasında elektrik akımı sağlar.
- Göç hızının artması,
- Ayırt edilen moleküllerin buharlaşması,
- Su kaybı,
- İyon konsantrasyonunun artması,
- Tampon viskozitesinde azalma direncinin düşmesi,
- Bu problemleri en aza indirmek için: sabit akımlı güç kaynağı kullanılmalıdır.

Tamponlar

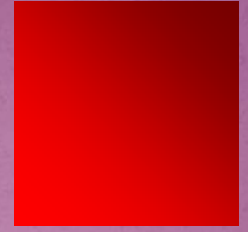
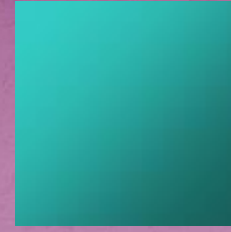
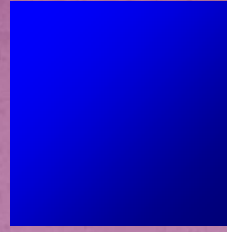
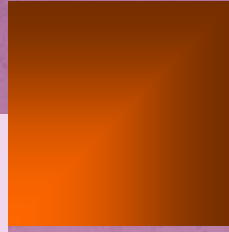


- Elektrik akımını taşımak
- Elektroforezin yürütüldüğü pH'yı belirlemek
- Yürütülen molekülün elektriksel yükünü belirlemek

Tamponun iyonik gücü ise ;

- İyonik bulutun kalınlaşması
- Migrasyon oranı
- Elektroforetik zonların daha keskin ayrılması
- Moleküllerin hareket etmesinde önemlidir.
- Barbital tamponlar & Tris-borik asid-
- EDTA tamponları en iyi bilinen tamponlardır.

BOYAMA



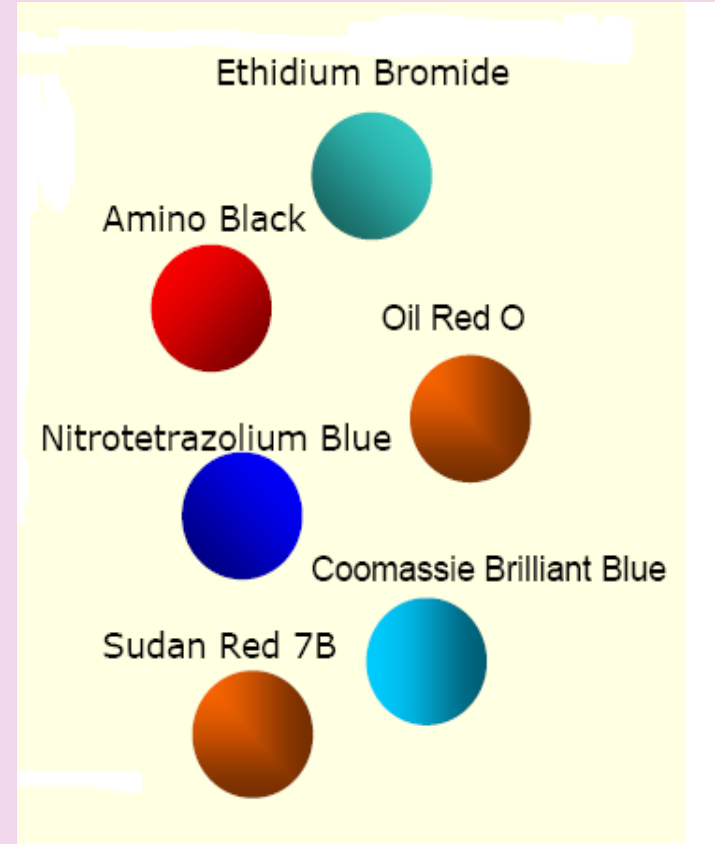
- Elektroforez tamamlandıktan sonra destek ortamı bir boya ile muamele edilerek ayrılmış fraksiyonların identifikasyonu sağlanır.

-Numune tarafından alınan boyanın miktarı ;

- proteinin tipine

- sabitleyici ajanların oluşturduğu denatürasyon derecesine bağlıdır.

En iyi bilinen boyalar ;

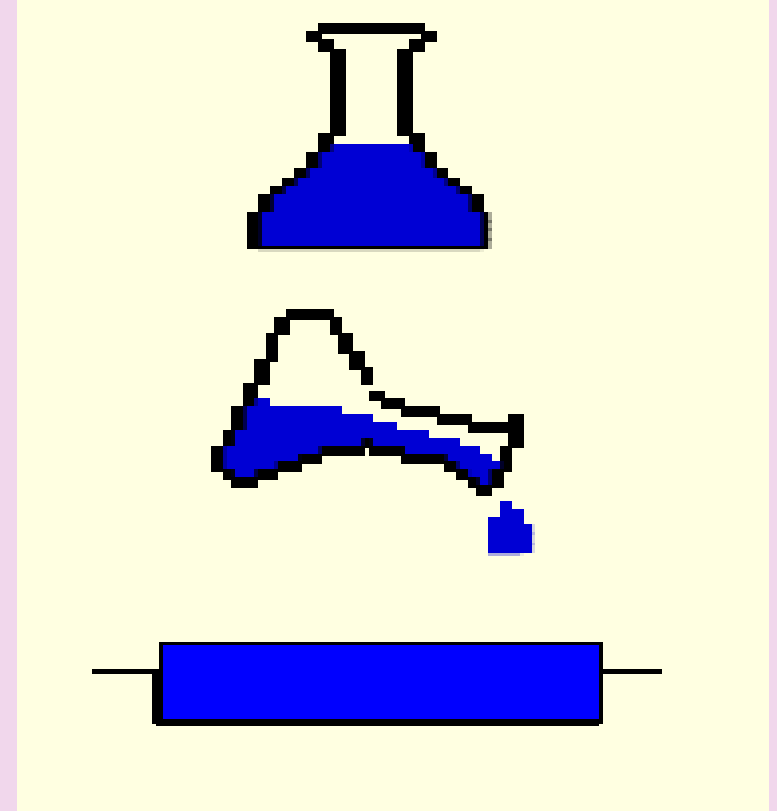


Elektroforezde Göç Hızı

- Molekülün net elektriksel yüküne
- Molekülün yapısı ve büyüklüğüne
- Elektriksel alanın gücüne
- Destek ortamın özelliğine
- Uygulama ısisına bağlıdır

Elektroforezin genel prosedürü

- a. Uygulama
- b. Yürütme
- c. Boyama
- d. Temizleme
- e. Şeffaflaştırma
- f. Değerlendirme



Uygulama ve yürütme:

Tekniğe,süreye ve analizin çeşidine göre değişebilir.

Boyama:

Sadece incelenecek maddeyi boyayan boyalar kullanılır.

Temizleme:

Normalde destek ortamı boya içine konduğunda tamamen boyanır.Ancak biz sadece incelenecek kısmın boyalı kalmasını isteriz. Bu nedenle de destek ortamı belli bir temizleme sıvısında bir süre tutulur. (% 5 asetik asit)

Şeffaflaştırma:

Dansitometre de okuma yapılabilmesi için destek ortamının şeffaf olması gerekir.Bunun için %30-40 dimetil sülfoksit veya diğer şeffaflaştırıcılar kullanılabilir.

Değerlendirme:

Dansitometre de yapılır.

Elektroforez çeşitleri

- Kâğıt elektroforezi
- Selüloz asetat elektroforezi
- Jel elektroforezi
- a)Agaroz jel elektroforezi
- b)Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)
- SDS-poliakrilamid jel elektroforezi
- Kapiller elektroforez
- İmmünoelektroforez
- Nişasta jeli elektroforezi

Selüloz asetat elektroforezi

Selülozun hidroksil grupları, asetik anhidrit ile reaksiyona sokulursa selüloz asetat elde edilir.

Avantajları:

Hem elektroforez süresi kısa (30-0 dk) hemde deney bittikten sonra numuneleri uzun süre korumak mümkün olduğundan rutinde sık kullanılır.

Dezavantajları:

Rezolüsyon jeldeki kadar iyi değildir. En önemli dezavantajı da standardizasyonu iyi değildir. Aynı firmaca üretilen aynı parti içinde bile farklılıklar görülebilir.



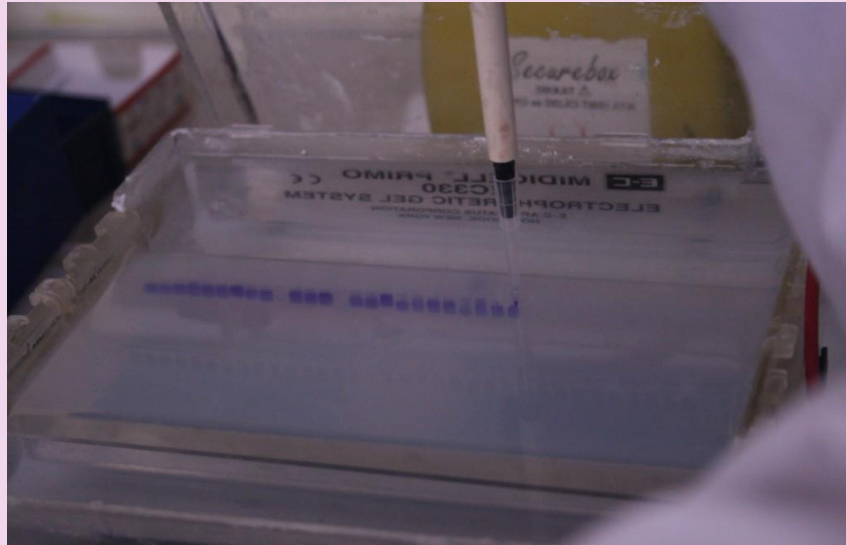
Jel elektroforezindeki aletler



Selüloz asetat elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi

- Destek maddesi olarak bir karbonhidrat polimeri olan agaroz veya agaropektin kullanılır. Bu maddelerin proteinlere affinitesi az olduğundan protein bantları birbirinden daha iyi ayrılır. Ayrıca çok iyi şeffaflaşmaları için dansitometrik değerlendirmeleri daha güvenilirdir. Bu nedenle rutin uygulamalarda sıkça kullanılmaktadır. Deney süreside oldukça kısadır (30-90 dk.)
- Serum proteinleri, nükleik asitler, hemoglobin varyantları, laktat dehidrogenaz ve kreatin kinaz izoenzimleri, lipoprotein fraksiyonları ve diğer bazı maddelerin analizlerinde başarı ile kullanılmaktadır.



DNA'NIN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ

Agaroz Jelin Hazırlanması:

- Agaroz bir alg türünden elde edilir.
- jel elektroforez tanponuna koyulmuş agarozun yuksek sıcaklıkta çözündürülmesi ile hazırlanır.
- Kaynatılmış agaroz çözeltisi 50 dereceye kadar sogutularak jel tepsilerine dökülür.
- Ayrımı yapılacak örnek taraklara oluşturulmuş kuyucuklara yuklenir ve elektriksel alanda yürütülerek ayrımı yapılır.

Jel uygun şekilde hazırlanırken ya da örnekler yüklenip elektriksel olarak ayrıldıktan sonra boyanır ve örneklerin görüntülenmesi gerçekleştirilir.

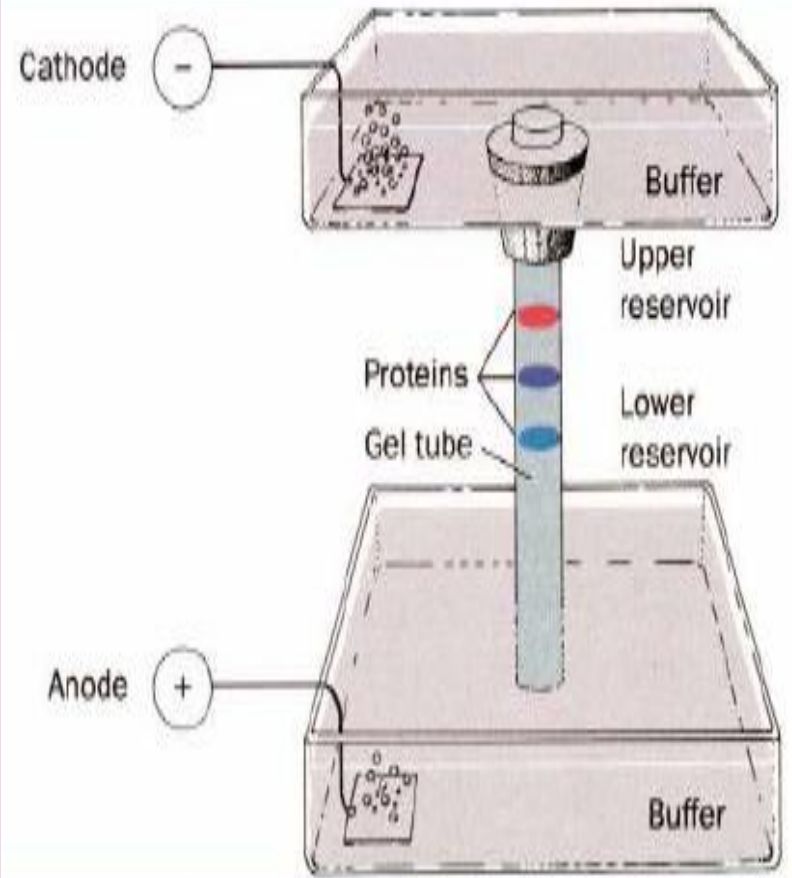
Nükleik asitlerin agaroz jeldeki hareketleri agaroz konsantrasyonu ile nükleik asit moleküllerinin boyutları ve şeklinden etkilenir. Nükleik asitlerin ayırımı için en etkin agaroz konsantrasyonları %0,3-2,0 dir. Agaroz jel elektroforezi ile özellikle değişik kaynaklı DNA ın izole edildikleri veya enzim kesim ürünlerinin moleköl ağırlıkları ve miktarları belirlenebilir. Aynı zamanda proteinlerin yüklerine göre ayrılmasında da kullanılmaktadır.

Nişasta jeli elektroforezi

- Destek materyali olarak nişasta kullanılır.
- Nişasta jel elektroforezi hem yüzey yükü, hem de molekül büyüklüğüne bağlı olarak ayırt edilen makromoleküler iyonların özelliklerinin anlaşılmasına izin verir. Doğal nişasta jelleşmediğinden kısmen hidrolize olarak kullanılır.
- Agaroz jelde olduğu gibi, nişasta jelde de işlem horizontal olarak gerçekleştirilebilir.

Poliakrilamid jeli elektroforezi

- Poliakrilamid jel elektroforezinde 20 yada daha fazla fraksiyon elde edilir.
- Bu nedenle genetik varyantlar ve izoenzim analizleri olmak üzere, protein ve nükleik asit çalışmalarında tercih edilir.
- Separasyon; moleküllerin büyüklüğüne ve yüküne bağlıdır.



-Ayrılan protein zonlarının diskoid şeklinden dolayı bu metod bazen disk elektroforezi olarak da tanımlanmaktadır.

Avantajları:

- Termostabil, saydam, kimyasal olarak inerttir.
- Geniş por büyüklüğüne sahiptir.
- Yüksüzdür.

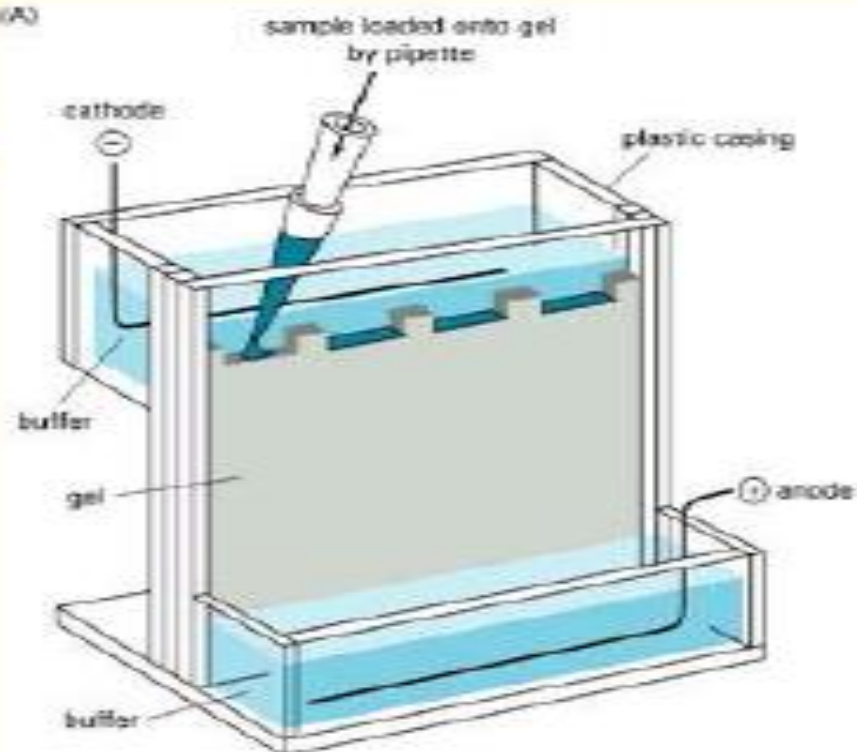
- Dezavantajı:

Kanserojeniktir.

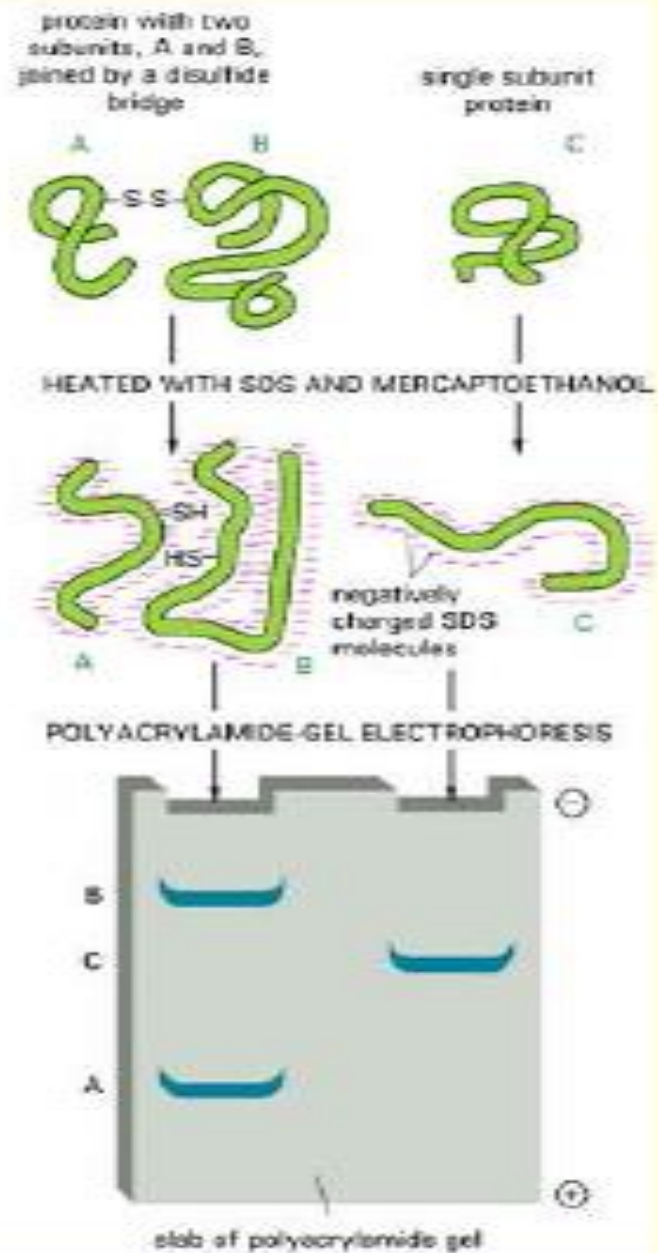
SDS-poliakrilamid jel elektroforezi

- Bu elektroforez tipinde β -mercaptoethanol kullanılır amaç disulfid köprülerini indirgemektir.
- β -mercaptoethanol & SDS, numune ile 5 dakika kaynatılır.
- SDS: Kuvvetli deterjan etki ile proteinleri denatüre eder. SDS proteinlerin yüzeyini kaplar ve proteinlerin hidrofobik bölgelerine bağlanır .
- Separasyon moleküler büyüklüğe göre gerçekleşir.
- Genellikle proteinlerin molekül ağırlığı ve proteinlerin saflık tayininde kullanılır.

(A)



(B)



Kapiller elektroforez

- Sistem ters çevrilmiş 'U' şeklinde duran ve uçları tampon dolu tüplere batmış durumda iken yüksek gerilim uygulanan bir borudan oluşur.
- Dış yüzeyi; ya bir sıvı kılıfı yada soğuk hava akımı ile soğutulularak ısınma sorunu ortadan tamamen kalkar.
- Çok kırılğan olan bu kapillerin kırılmasını önlemek için üzeri poliimid tabakası ile kaplanmıştır.
- Poliimid tabakasının detektör önüne gelen kısmı ya soyularak yada yakılarak bir pencere açılır.
- Bu pencere, spektrofotometre kuveti görevi görür.
- Elektroforezle ayrılan moleküller bu pencereden geçerken ışığı absorbe ederler.
- Absorbe edilen ışık detektör tarafından saptanır.
- Bilgisayar sistemi aracılığı ile absorpsiyon pikleri ekrana verilir .

Termostatik

Sistem

Kapillar



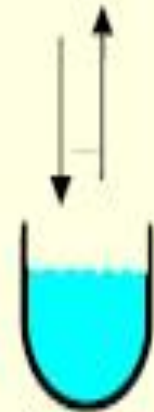
Yüksek Voltaj



Dedektör

Elektrolit

Elektrolit



Örnek



Elektroforetogram

İmmünoelektroforez

- İlk kez 1953 yılında Grabar ve Williams isimli iki bilim adamı, jel elektroforezi sonrası immün diffüzyon uygulamışlardır.
- İmmünelektroforez ile bir çok spesifik protein gösterilebilir:
- Prealbumin, albumin, α 1- asit glukoprotein, α 1-antitripsin, tiroid bağlayan globulin, α 1-kimotripsin, α 2-HS glukoprotein, α 2-makroglobulin, seruloplazmin, haptoglobin, antitrombin III, C1 esteraz inhibitörü, hemopeksin, β lipoprotein, transferrin, C3, C4, C5, properdin faktör B, plazminojen, IgA, IgM, IgG.
- Bu yöntem bu gün klinik laboratuvarlarda, immünglobulinlerin gösterilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.
- İmmunelektroforez için agaroz jel kullanılır.
- Bu yöntemin prensibi; serum proteinlerinin elektroforetik ayrımından sonra, aranan proteine karşı antiserum ekleyerek antijen-antikor presipitatlarının gösterilmesidir.

Diğer elektroforez yöntemleri

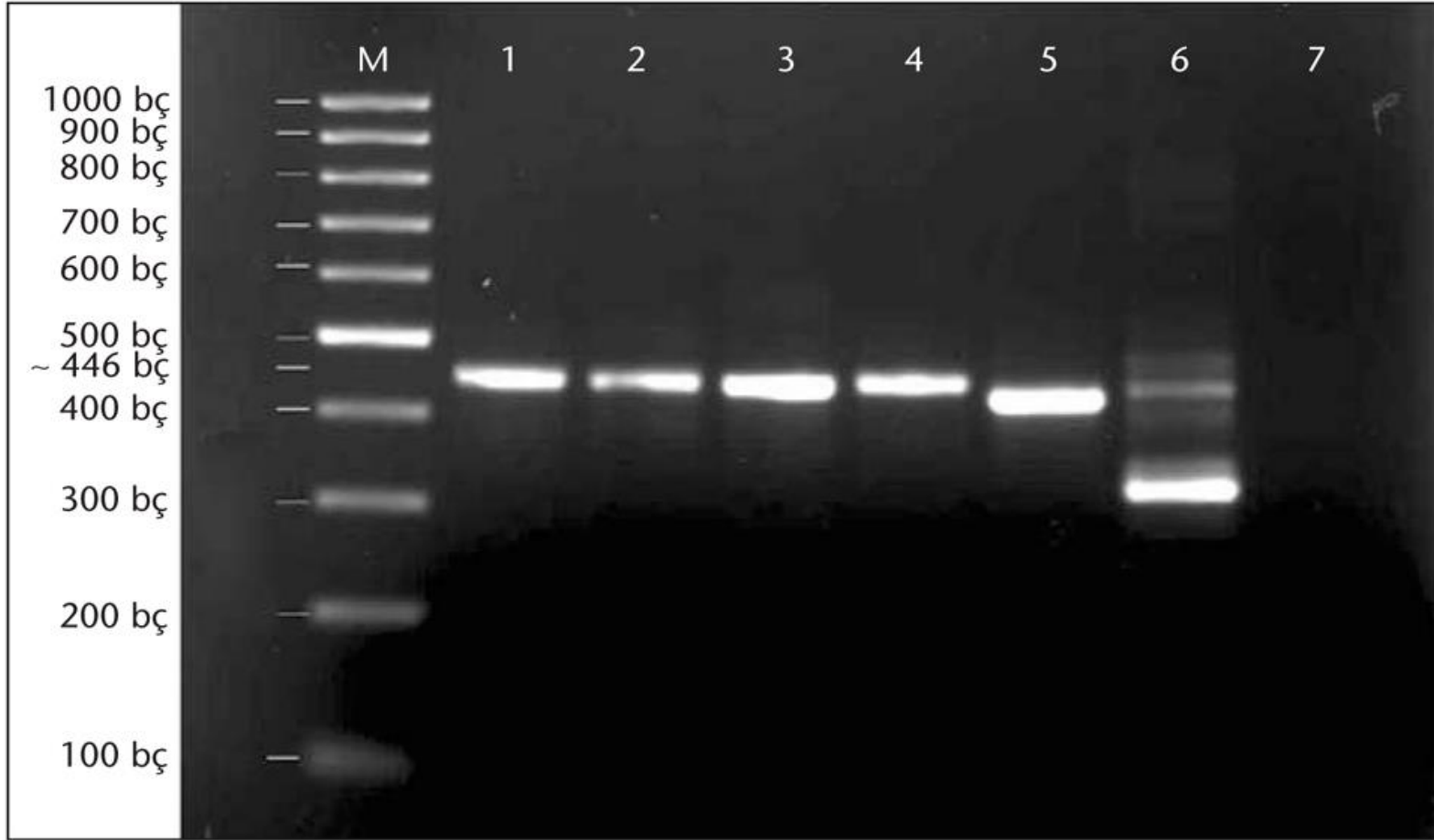
- iki yönlü Jel Elektroforez
- İzoelektrik Odaklanma
- O'Farrell Metodu
- Pulse Field Jel Elektroforez (PFGE)
- Preparative Gel elektroforezi
- Protein Elektroforezi
- Serum Protein Elektroforez
- Hemoglobin Elektroforezi
- Lipoprotein Elektroforezi

Kullanım yerleri

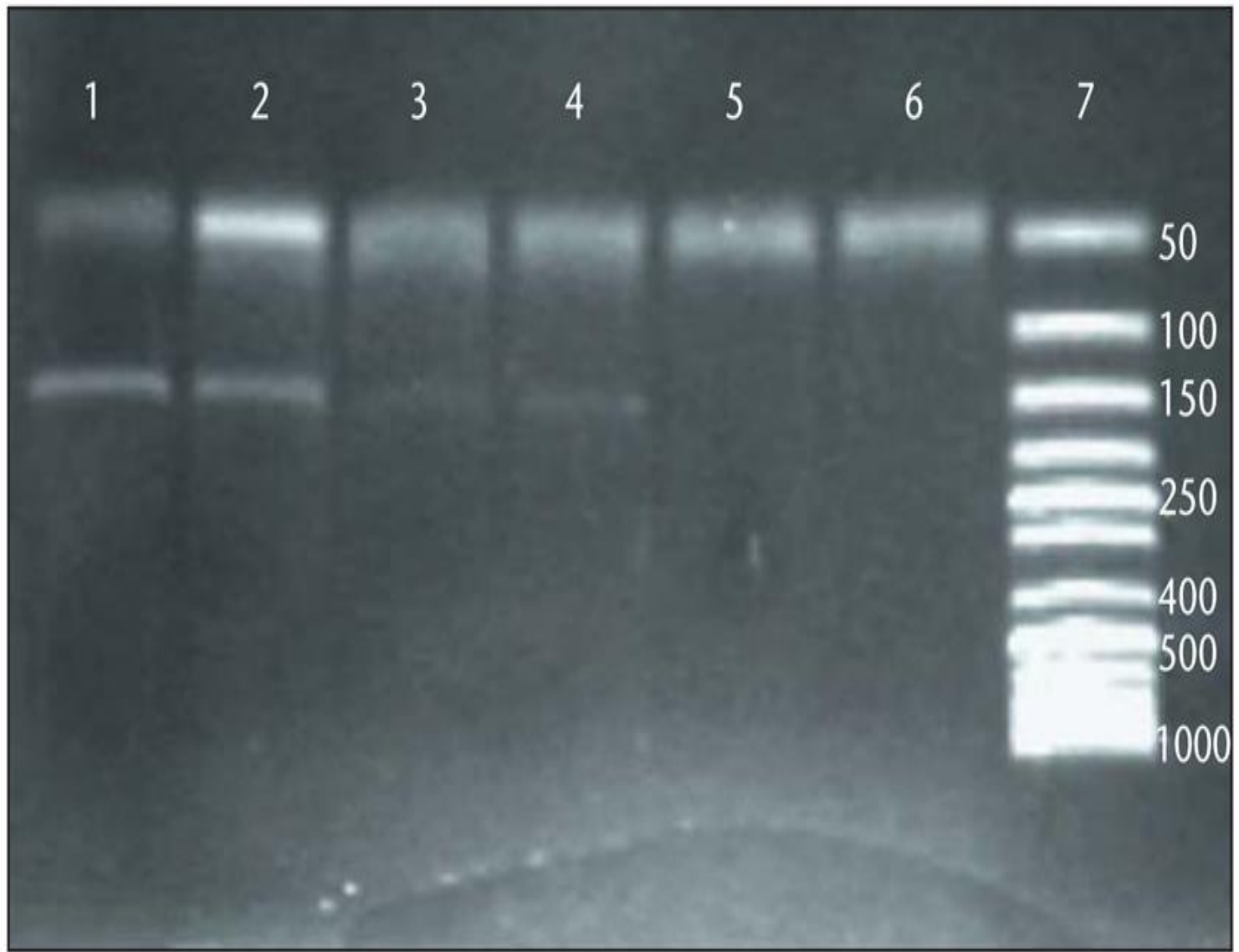


- Saflaştırma
- Saflık kontrolü
- Molekül ağırlığı saptama
- Kalıtsal veya kalıtsal olmayan hastalıkların belirlenmesi
- Enzim izozimlerinin saptanması (tanısal amaçlı, populasyon çalışması için, adli tıpta)
- İmmünolojik ve moleküler biyoloji

ELEKTROFOREZ DE GÖRÜNTÜLEME



Resim 1. Pre-S gen bölgesinin ~446 bç ve 300 bç hizasındaki PCR amplifikasyon ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü [Kolon M: Moleküler ağırlık standardı (100 bç); Kolon 1-5: ~446 bç uzunluğundaki pre-S ürünleri; Kolon 6: ~300 bç uzunluğunda pre-S ürünü; Kolon 7: HBV DNA negatif kontrol].



Resim 1. *Jel kuyucuklarında 1'den 6'ya sırasıyla 3162, 316, 31.6, 3.16, 0.31 ve 0.03 PFU/ml konsantrasyonlarda hedef genom içeren pozitif kontrol örnekleri ile yapılan gerçek zamanlı RT-PCR reaksiyon ürünleri (7 no'lu kuyucukta DNA ağırlık belirteci bulunmaktadır).*

KAYNAKÇALAR

VİKİPEDİ

<http://elektroforez.nedir.com>

<http://tr.wikipedia.org>

**DİNLEDİĞİNİZ İÇİN
TEŞEKKÜRLER**