

ELEKTROFOREZ

Mustafa Uzun

Bahar 2007

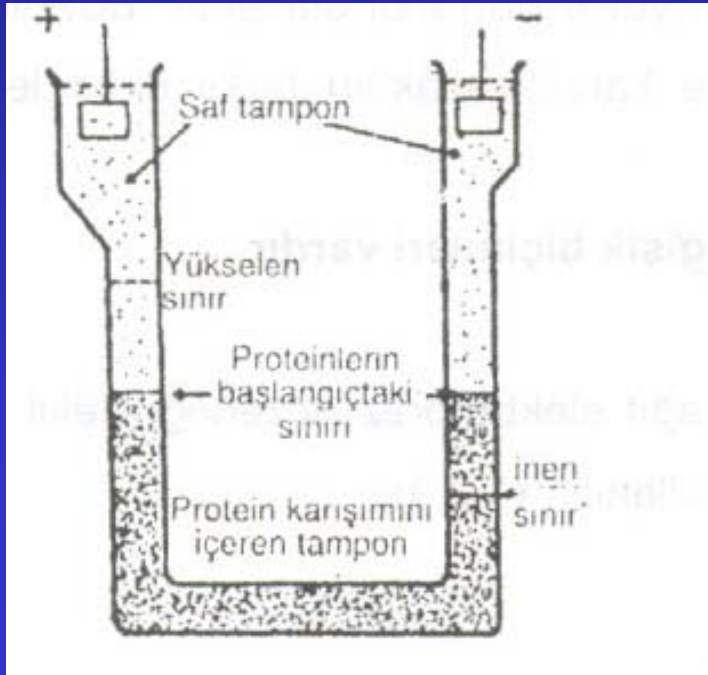
Elektroforez, bir çözeltide asılı taneciklerin, elektrik alanı etkisiyle ayrılmasıdır.





Arne Tiselius tarafından
geliştirilmiş olan
elektroforezden, özellikle
tıpta ve biyokimyada,
kandaki çeşitli protein ve
lipitlerin ayrılması,
tanınması ve miktarının
ölçülmesinde yararlanılır.
Ayrıca elektroforezden
sanayide yaygın biçimde
yararlanılmaktadır

Elektroforezin çalışma ilkesi molekül ağırlığı ve molekülde bulunan elektrik enerjisinin jel içinden bir yükten diğerine giderken kat ettiği mesafe farklılıklarını ele almaktır.



- Tiselius serbest elektroforez aygıtının şematik görünümü

Elektroforetik sistemde analizi yapılacak örnek bir destek ortamına uygulanır. Modern elektroforetik tekniklerde destek ortamı olarak daha çok jeller tercih edilmektedir. Jeller içine uygun tampon yerleştirilerek işlem gerçekleştirilir.

Analiz edilecek örnek jele bir leke ya da ince bir bant halinde uygulanır. Katı jel desteği ile ayrımı yapılacak moleküllerin hareketi, moleküllerin yüküne boyutuna, biçimine, kimyasal içeriğine ve uygulanan elektriksel alana bağlıdır.

Oldukça hızlı ve kullanışlı bir teknik olan elektroforezin bir homojenattaki molekülleri ayırma kapasitesi genellikle fazla yüksek değildir. Bu nedenle bu teknikten preparatif olarak sınırlı ölçüde yararlanılmaktadır. Buna karşılık az miktardaki protein ya da nükleik asit karışımlarını (ayrıca nükleoprotein ve polisakkarit karışımlarını) saflaştırmakta ve analiz yapmakta yaygın olarak kullanılır.

Elektroforez Aygıtlarında İki Temel Eşitlik Önem Taşır

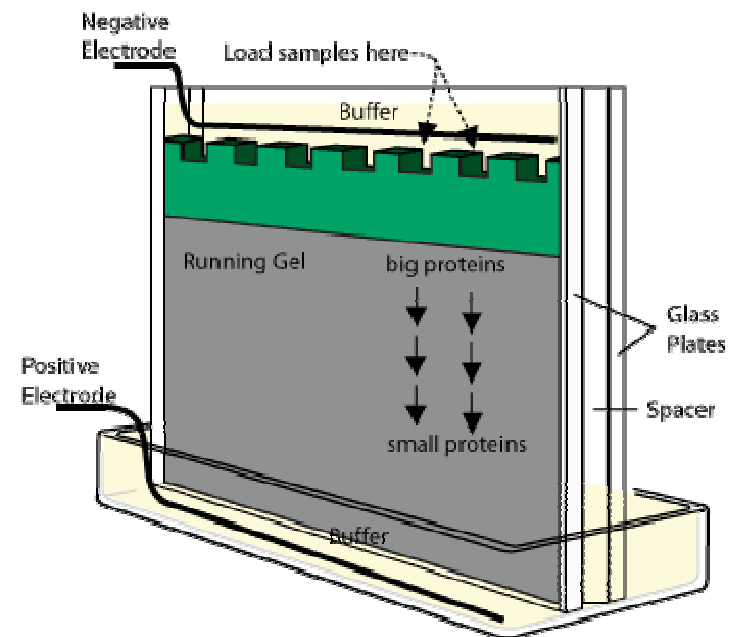
1-Ohm yasasına göre ,elektrik alanı,akım ile direncin çarpımına eşittir.Elektroforez aygıtında oluşan direncin hemen hemen tamamı jel tarafından oluşturulur.Direnç, akımın geçtiği bölgenin alanının ve kullanılan tamponun iyonik kuvveti ile ters orantılıdır.Belli bir akım için,jelin kalınlığının veya tamponun miktarının ve iyonik kuvvetinin azalması direnci arttırır;böylece jel boyunca oluşan voltaj derecelenmesi ve jele uygulanmış molekülün elektroforetik göç hızı artar.

2-Sistemin ürettiği güç direnç ile akımın karesinin çarpımına eşittir.Üretilen güç ısı şeklinde ortaya çıkar ve elektroforez aygıtı,jelin sıcaklığını artırmaksızın ancak belli miktarda gücü dağıtabilir.Bu nedenle voltajın üst sınırı genellikle elektroforez aygıtının ısıyı dağıtma yeteneğine bağlıdır.

ELEKTROFOREZ YÖNTEMLERİ

- **Poliakrilamid Jel Elektroforezi**
- **Agaroz Jel Elektroforezi**
- **Değişken Alanlı (Pulsed Field) Jel Elektroforezi**
- **İzoelektrik Odaklanma**
- **İki Boyutlu Elektroforez**
- **Kılcal (Kapiller) Elektroforez**
- **İmmünoelektroforez**

POLIAKRILAMİD JEL ELEKTROFORZİ (PAGE)



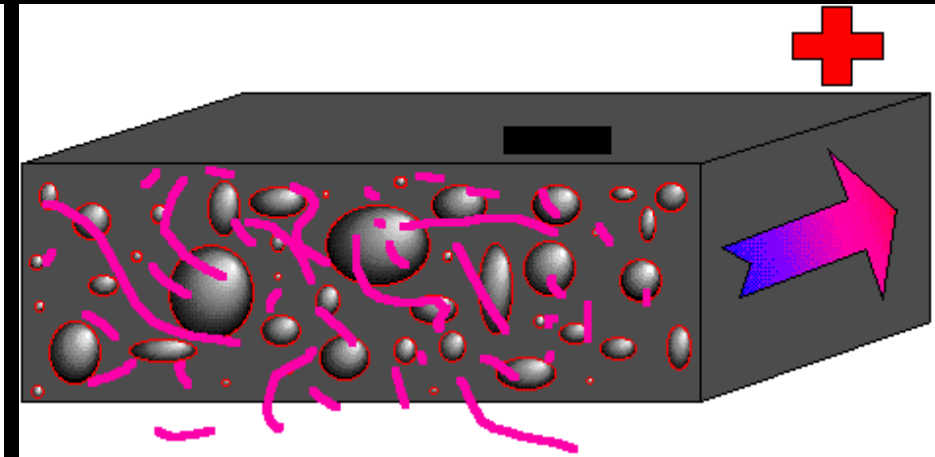
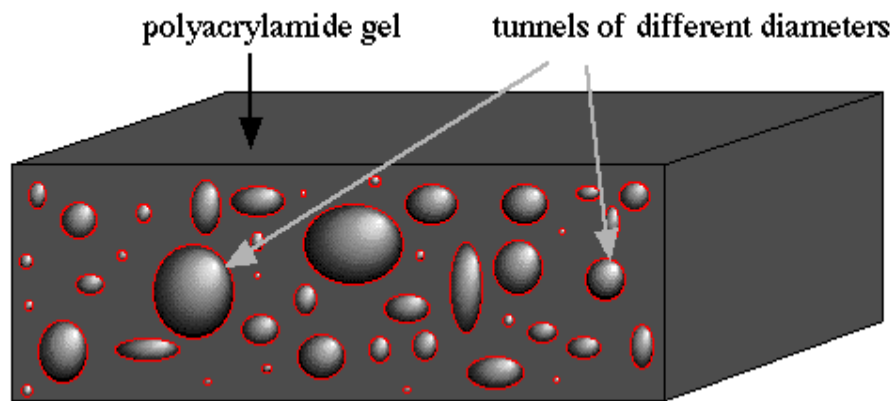
- Akrilamidin polimerizasyonu ile hazırlanan poliakrilamid jellerin elektroforetik ayırımlarında çeşitli üstünlükleri vardır.
- Küçük ya da orta boydaki (yaklaşık 1 milyon dalton kadar) nükleik asitler ve proteinler için yüksek ayırıştırma gücüne sahiptir.
- Göç eden moleküllerle destek materyali arasındaki etkileşim minimum düzeydedir. Destek materyali fiziksel olarak oldukça kararlı ve dayanıklıdır.

Poliakrilamid jellerle yapılan elektroforez örnekteki bileşenlerin daha iyi ayrışmasına yol açar çünkü ayırım hem moleküler elekleme hemde elektroforetik harekete dayanır.

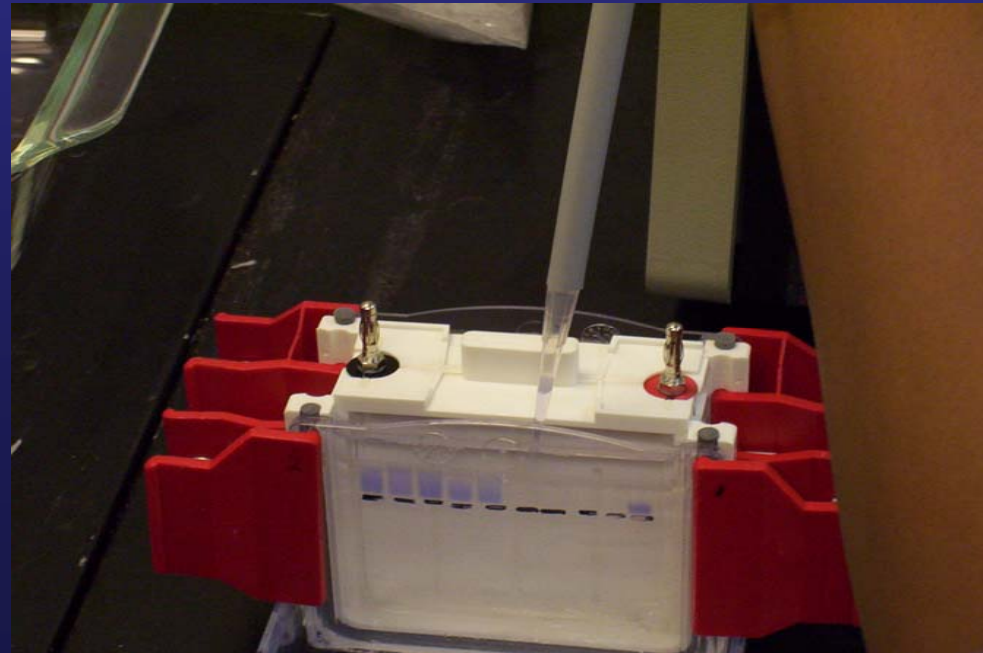
Poliakrikamid jeller akrilamid ve çapraz bağlayıcı N,N'metilen-bis akrilamidin serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlanır.Kimyasal polimerizasyon bir başlatıcı-katalizör (amonyum persülfat-TEMED) sistemi tarafından kontrol edilir.Fotokimyasal polimerizasyon,UV ışığı altında riboflavin tarafından gerçekleştirilir.

- Proteinlerin ayrılması için kullanılan jeller genelde %7,5 poliakrilamid içerir. Bu jeller 10.000-1000,000 Da moleküller için kullanılabilir ama en iyi çözünme 30,000-300,000 Da arasında elde edilir.
- Bir jelin ayrıştırma gücü ve molekül boyutu aralığı akrilamid ve bis akrilamid konsantrasyonuna bağlıdır. İki maddenin polimerizasyonu ile jelde porlar oluşur.

- Düşük konsantrasyonda daha büyük porlar oluşur ve yüksek molekül ağırlıklı biyolojik moleküllerin analizi yapılabilir. Yüksek konsantrasyonlarda ise küçük porlar oluşur ve düşük molekül ağırlıklı moleküllerin ayrılması yapılır



- Poliakrilamid jel elektroforezi tüp veya düzlemsel(slab) biçimde hazırlanmış jellerde gerçekleştirilir.Tabaka jeller aynı anda çok sayıda örneğin destek ortamında analiz edilebilmesine imkan verdiği için kolonlara göre daha geniş çapta kullanılırlar.

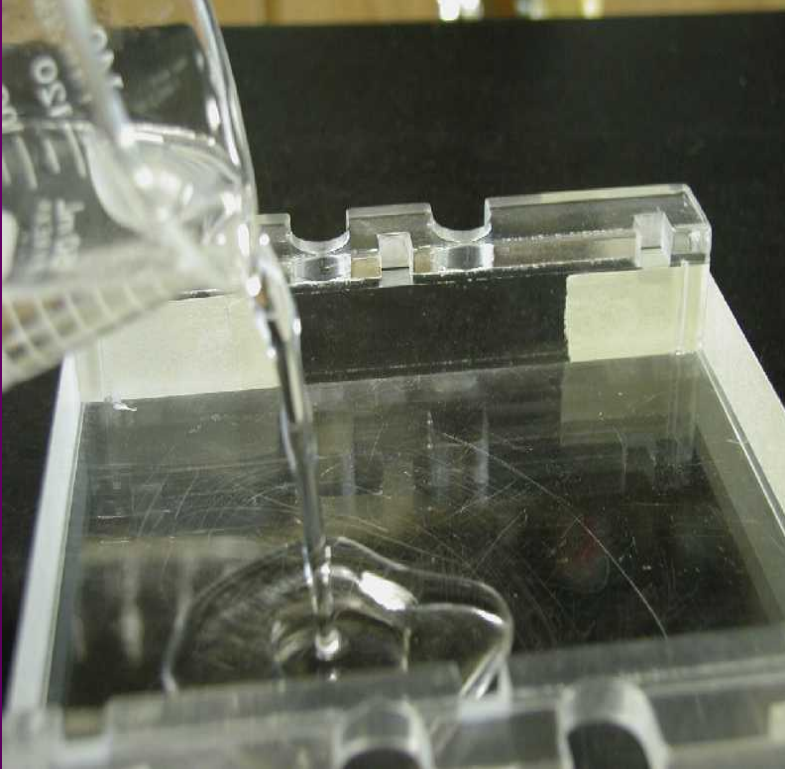


- Poliakrilamid jel birbirinden belli uzaklıkta (0,5-2,0 mm)tutulan iki cam tabaka arasında ve genelde 8-10 cm ya da 10-10 cm boyutunda hazırlanır.DNA dizileme çalışmalarında daha çok 20-40 cm boyutunda hazırlanır.
- Polimerizasyon sırasında jelin üst kısmına yerleştirilen plastik bir tarak jelde küçük kuyucukların oluşumunu sağlar .Polimerizasyondan sonra tarak çıkarılır,kuyucuklar tuzları ve polimerize olmamış akrilamidi yok etmek üzere tamponla yıkanır.Jel kaseti iki tampon arasına yerleştirilir;kuyucuklara örnek ler konulur ve akım geçirilir.
- Elektroforez bitiminde görüntüleme için jel uygun boya ile boyanır.

PAGE de geliştirilen çeşitli teknikler (SDS-PAGE gibi) tekniğin çok yönlü kullanılabilirliğini arttırmıştır.

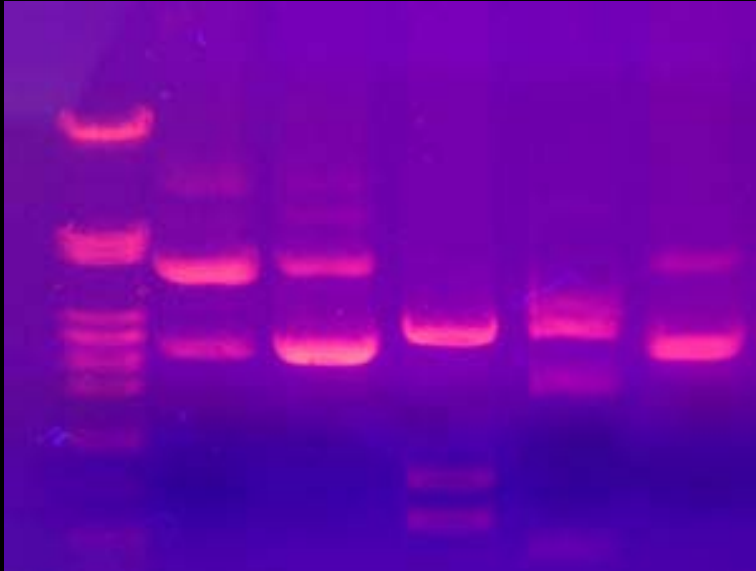
Agaroz Jel Elektroforezi

Page daha çok proteinlerin ve küçük (350.000 Da yani 500bç'e kadar) DNA parçalarının ayırımı ve analizi için kullanışlıdır. Poliakrilamid jeldeki küçük por boyutları büyük DNA molekölü parçalarının ayırımı için uygun değildir. 200-50,000 bç boyutları arasındaki DNA ve RNA moleküllerini tanımlamakta kullanılan standart yöntem agaroz elektroforezidir.



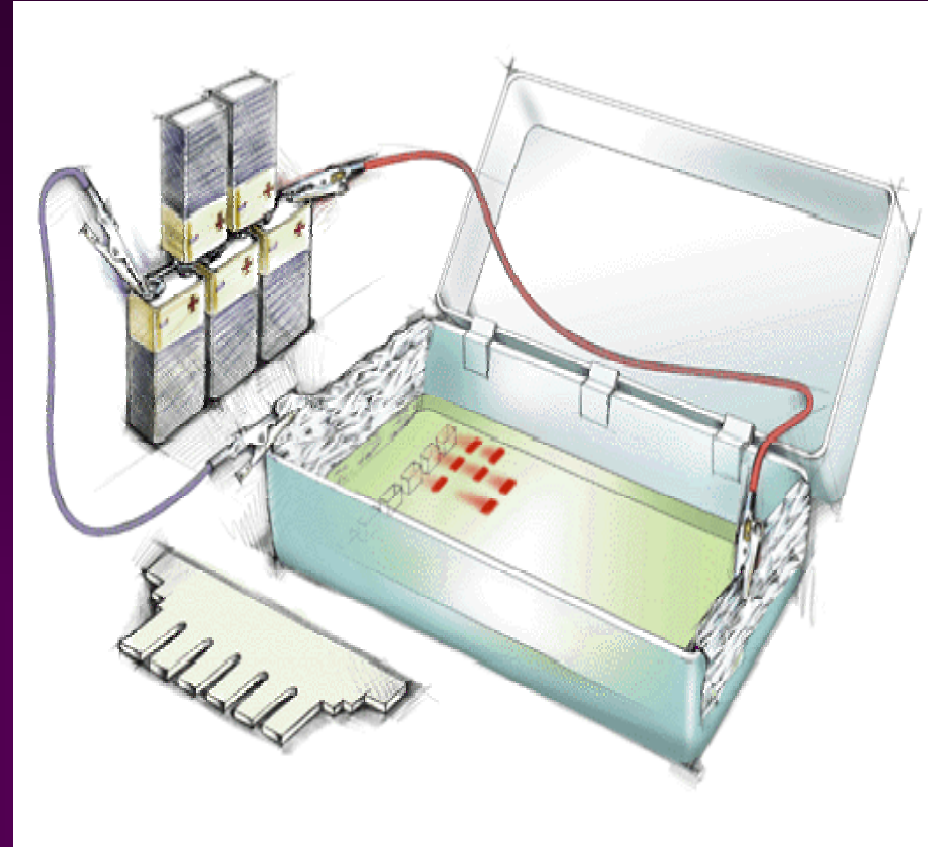
Agaroz bir alg türünden elde edilir.jel elektroforez tanponuna koyulmuş agarozun yüksek sıcaklıkta çözündürülmesi ile hazırlanır.Kaynatılmış agaroz çözeltisi 50 dereceye kadar soğutularak jel tepsilerine dökülür.ayırımı yapılacak örnek taraklarla oluşturulmuş kuyucuklara yüklenir ve elektriksel alanda yürütülerek ayırımı 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 etkülenir. 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 molekül ağırlıkları ve miktarları belirlenebilir. Aynı zamanda proteinlerin yüklerine göre ayrılmasında da kullanılmaktadır.



Değişken Alanlı (Pulsed Field) Jel Elektroforezi

- Yaklaşık 1 megabazdan daha büyük doğrusal çift iplikli DNA molekülleri agaroz jelde aynı hızda göç eder. Bunun nedeni jelin por büyüklüğünün doğrusal DNA'nın jelde göç edebilmesi için yeterli olmamasıdır. Por büyüklüğü, konsantrasyonu %0,1 olan agaroz kullanılarak arttırılabilir.
- Bu durumda jel çok kırılgan ve dayanıksız olacaktır. Bu problem 1984'te geliştirilen ve 5 Mb boyutundaki DNA fragmentlerini de ayırabilen “pulse field” jel elektroforezi tekniği ile ortadan kaldırılmıştır.

- Bu yöntemde jele vuruşlu, dalgalı ve dikey elektrik alanları uygulanır. DNA molekülü ne kadar büyükse tekrar yönlenmesi o kadar uzun zaman alır. Bu şekilde büyüklüklerine göre ayrılırlar.
- Sonuçta küçük moleküller elektriksel alan değişikliklerine daha çabuk uyum sağladıkları için daha hızlı hareket ederler.
- Bu sistemde dikey elektrodların yanında farklı konfigürasyonlarda elektrodlar da kullanılmaktadır.

http://www.bio.davidson.edu/Courses/genomics/method/pulse_field.html

- Bu yöntemle kromozomları jelde ayrı ayrı görebilmek mümkündür.