

## ELEKTROFOREZ YÖNTEMLERİ

Doç.Dr. Abdurrahman KAYA

### ÖZET

*Bu makalenin amacı, uygulanan bir elektrik alanının etkisi ile, elektrikle yüklü parçacıkları ve özellikle kandaki proteinleri bileşenlerine ayıran elektroforez yöntemlerini özetlemektir.*

**Anahtar Kelimeler:** Elektroforez, Elektrik alan, Mobilite, Protein.

### GİRİŞ

Sulu bir çözelti içinde, süspansiyon ya da çözünmüş küçük elektrik yüklü parçacıkların, uygulanan bir elektrik alanının etkisi ile göç etmesi sürecine **elektroforez** denir. Bu küçük parçacıklar; bakteri hücreleri, virüsler, protein molekülleri veya sentetik parçacıklar olabilir. Doğal olarak bu parçacıkların çoğu elektrik yükü taşırlar (1).

Bir çözeltide bir iyon elektrik alanı etkisi altında sabit hızla hareket yapar ve bu hız elektrik alan şiddeti ile orantılıdır. Nicel olarak,

$$\vec{v} = \mu \vec{E} \quad (1,2,3,4).$$

yazarız. Burada  $v$  iyonun hızı,  $\mu$  mobilitesi (hareketlilik) ve  $E$  elektrik alan şiddetidir. Mobilite ortam ve tanecik özelliklerine bağlıdır. Farklı iyonlar için farklı değerler gösterir.

Seyreltik iyon mobiliteleri tablo 1 de gösterilmiştir. Değerler ( $m^2/volt.sn$ ) cinsinden ifade edilmiştir (2).

**Tablo 1:** Seyreltik katyonlar ve anyonların mobiliteleri

Katyon	Mobilitesi (m <sup>2</sup> /volt.sn)	Anyon	Mobilitesi (m <sup>2</sup> /volt.sn)
H <sup>+</sup>	33 x 10 <sup>-8</sup>	OH <sup>-</sup>	17,4 x 10 <sup>-8</sup>
Li <sup>+</sup>	3,3 x 10 <sup>-8</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	6,1 x 10 <sup>-8</sup>
Na <sup>+</sup>	4,3 x 10 <sup>-8</sup>	Cl <sup>-</sup>	6,5 x 10 <sup>-8</sup>
Mg <sup>++</sup>	4,5 x 10 <sup>-8</sup>	Br <sup>-</sup>	6,7 x 10 <sup>-8</sup>
Ca <sup>++</sup>	5,1 x 10 <sup>-8</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	6,8 x 10 <sup>-8</sup>
Ba <sup>++</sup>	5,5 x 10 <sup>-8</sup>	Albumin (pH = 8,6)	0,6 x 10 <sup>-8</sup>
K <sup>+</sup>	6,4 x 10 <sup>-8</sup>	Fibrinojen (pH = 8,6)	0,2 x 10 <sup>-8</sup>
		γ-Globulin (pH = 8,6)	0,1 x 10 <sup>-8</sup>

Bir iyonun bir ortam içinde sabit hızla yayılması ve yayılma hızının iyonun biçimine bağlı olması biyolojide önemli bir uygulama yeri bulmuştur. Mobiliteleri birbirinden farklı iki cins artı iyon ihtiva eden bir çözelti düşünelim. Aynı elektrik alanında aynı yönde kazandıkları hızlar birbirinden farklı olur. Hızların farklı olması belli sürelerde alınan yolların farklı olacağını ortaya koyar (2).

Yüklü makromoleküllerin elektriksel alan etkisinde göçlerinden yararlanarak, makromolekül karışımını ayırmak, özelliklerini ve konsantrasyonlarını belirlemek olanaklıdır. Protein moleküllerini ayırmak için, elektroforez yöntemi kullanılabilir. Çünkü, plazma proteinleri farklı molekül ağırlıklarına ve elektriksel özelliklere sahiptirler (3).

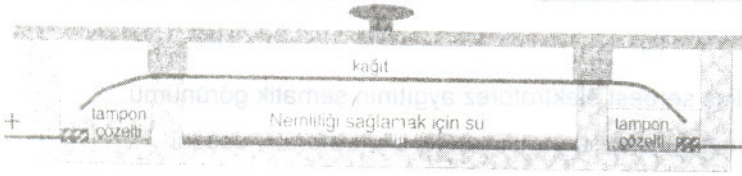
Protein, elektroforez ortamının pH sine bağlı olarak pozitif veya negatif yüklü olabilir veya hiç yük taşımayabilir. Ortamın pH si proteinin izoelektrik pH'sine eşit ise protein net bir yük taşımaz. Bu durumda protein alan içinde hareketsizdir. Ortam pH si proteinin izoelektrik pH'sinden **düşük** ise protein net bir **pozitif** yük taşır ve elektrik alanı yönünde hareket eder. Ortam pH si proteinin izoelektrik pH sinden **yüksek** olduğunda ise protein net bir **negatif** yük taşır ve elektrik alanına zıt yönde hareket eder. Böylece belli bir pH'de artı ve eksi yükler taşıyan proteinler elektrik alanındaki hareket yönlerine göre birbirinden ayrılabilirler. Diğer taraftan, aynı yönde hareket eden proteinlerin büyüklükleri ve şekilleri genellikle farklı olacağından, elektrik alanı

içinde belli bir süre sonunda aldıkları yollar da farklı olacaktır. Böylelikle aynı işaretli yükler taşıyan proteinler de ortamda karşılaşılabilecekleri farklı dirençlere bağlı olarak birbirlerinden ayrılırlar (5).

### **Elektroforez yönteminin değişik biçimleri vardır.**

#### **Kağıt elektroforez:**

Düşük gerilimle çalıştırılan kağıt elektroforez düzeneği Şekil 1 de görüldüğü gibidir. 20 V/ cm lik bir alan şiddeti kullanılır (1,2,3).

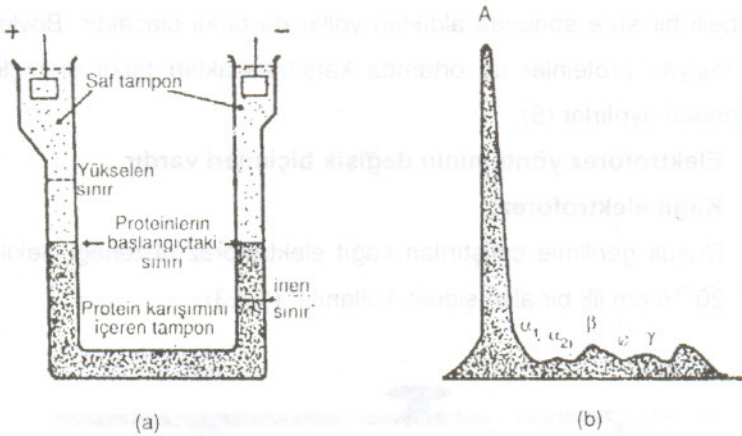


**Şekil 1 :** Düşük gerilimle çalışan bir kağıt elektroforez düzeneği.

Bu yöntem proteinler için oldukça başarılı olmasına karşılık, yükleri az, boyutları küçük olan ve bu nedenlerle difüzyonla dağılmaları kolay olan aminoasitler gibi küçük moleküller için uygun değildir. Küçük moleküller içeren karışımlarda, moleküllerin difüzyonla dağılmaları için gerekli zamanı bulamadan hızlı bir şekilde göçmelerini ve ayrılmalarını sağlamak üzere, 200 V/ cm'lik şiddetli elektriksel alanlar kullanılır. Bu sırada akımın da fazlalığı nedeniyle ısınma sorunlarını gidermek üzere bir soğutma sistemine de gereksinim vardır (3).

#### **Serbest veya hareketli cephe elektroforezi:**

Serbest elektroforez 1930 larda A. Tiselius tarafından geliştirilmiştir (Şekil 2). Serbest elektroforezde U şeklinde bir borunun alt kısmı protein karışımını içeren bir tampon çözeltisi ile doldurulur. Üst kısmı ise saf tamponla doldurulur (1,5,6).



**Şekil 2 :** Tiselius serbest elektroforez aygıtının şematik görünümü

(a). İnsan kanındaki plazma proteinlerinin elektroforetik deseni

(b). (A=serum albumini, Ø=fibrinojen,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$ = çeşitli globulinler)

U borusunun ağızlarına bir akım kaynağının pozitif ve negatif kutuplarına bağlanmış elektrodlar yerleştirilir (Şekil 2a). Elektrodalara gerilim uygulandığında negatif yüklü proteinler anoda, pozitif yüklü proteinlerde katoda doğru hareket etmeye başlarlar. Karışımdaki proteinlerin tümünü veya çoğunu ayırabilmek için tampon pH si genellikle proteinlerin tümünün veya çoğunun aynı işaretten yükler taşıyacağı bir değere ayarlanır. Örneğin, tampon pH sinde bütün proteinler negatif yüklü iseler akım uygulandığında bu proteinler proteinsiz tampon içine doğru "hatlar" halinde göç etmeye başlarlar. Bu olay borunun proteinsiz tampon bölgesinde kırılma indeksi değişikliklerine yol açarak **Schlieren** desenleri adı verilen görüntüler oluşmasına neden olur. Belli başlı proteinlerin birbirlerine göre hareket hızları ve yönleri de boru boyunca yapılacak optik ölçümlerden saptanabilir (Şekil 2b, böyle bir ölçümün sonuçlarını göstermektedir). Şekildeki tepeler insan kanı plazmasındaki çeşitli protein hatlarının elektroforez borusu üzerinde aldıkları konumları göstermektedir (5).

### **Kuşak (zone) elektroforezi:**

Günümüzde serbest elektroforez yönteminin yerini büyük çapta, **kuşak elektroforezi** adı verilen ve değişik tipleri geliştirilmiş bulunan başka bir yöntem almıştır. Kuşak elektroforezi daha yüksek bir ayırma gücüne sahiptir, daha az örnek gerektirir ve daha basit bir yöntemdir. Bu yöntemde proteinin sudaki çözeltisi gözenekli katı bir destek ortamında hareketsiz hale getirilmiştir. Destek ortamı olarak

filtre kağıdı veya selüloz asetat gibi protein molekülleri ile etkileşmeyen veya onların hareketlerini kısıtlamayan maddeler kullanılır. Elektroforez işlemi belli başlı proteinlerin ortam doğrultusunda keskin sınırlarla belirli farklı konumlara (kuşaklar) yerleşmelerine kadar sürdürülür. Protein kuşaklarının konumları ve konsantrasyonları, ortama proteinlere bağlanan bir boya uygulandıktan sonra boya yoğunluğu ölçen bir densitometre ile taranarak saptanabilir. Klinikte kan plazmasındaki başlıca proteinlerin konsantrasyonlarını ölçmek için bu yöntem kullanılır (5).

Kuşak elektroforezinde destek ortamı olarak patates nişastası ve poliakrilamid gel kullanılır. Yüklerin içinde hareket ettiği ortam olarak jel kullanıldığında, muhtemelen jel ağının difüzyonu indirgemesi ile elektroforezin ayırıcılığı (çözme gücü) artmaktadır. Jel elektroforezi, özellikle çeşitli yöntemlerle belirli yerlerinden parçalanmış DNA moleküllerinin parçalarının ayrıştırılmasında çok başarılı olmuştur (ana iskeletindeki fosfatlar nedeni ile DNA parçaları negatif yüklüdürler). Kan plazması proteinleri serbest elektroforez veya kuşak elektroforezi ile sadece 5 veya 6 bileşene ayrılabilirdiği halde, gel elektroforezi ile 15 veya daha çok sayıda bileşene ayrılabilir (5).

#### **Disc elektroforezi:**

Kuşak elektroforezinin bir başka tipi de **disc elektroforezi** dir. Bu yöntemde Proteinleri yavaşlatan destek ortamı pH leri ve gözenekleri farklı iki ayrı gelden oluşur. Gel matrisi sürekli olmadığı için bu yöntemin adına İngilizce süreksiz (**Discontinuous**) sözcüğünü anımsatan **disc** sözü eklenmiştir. Ayrıca, gözlenen protein kuşakları da birer diski andırırlar. Disc elektroforezinde karışımdaki proteinler çok gözenekli gelden az gözenekli gele geçerler. Bunun sonucu her protein ince ve keskin sınırlı birer kuşakta yoğunlaşır ve bu nedenle sürekli bir tamponla mümkün olandan çok daha yüksek bir ayırma gücü (resolution) elde edilir (5).

#### **İzoelektrik odaklama:**

Elektroforez yöntemleri içinde en çarpıcı ve etkili olanı H. Svensson tarafından İsveç'te geliştirilen, **izoelektrik odaklama** (electrofocusing) yöntemidir. Bu yöntemde gel ortamı bir pH gradyanı ile hazırlanır. Yani gel kolonu boyunca pH sürekli artar (veya azalır). Karışımdaki her protein ortam pH sinin kendi izoelektrik pH sine eşit olduğu gel bölgesinde toplanarak bu bölgeye odaklanır. Böylece her protein kendine özgü keskin ve sabit bir bant oluşturur. Sonuç olarak çok yüksek bir ayırma

gücü elde edilir. Bu yöntemle insan kanı plazmasındaki proteinler 40 veya daha çok sayıda bileşene ayrılabilir (1,5).

Bazı klinik uygulamalarda elektroforez başka yöntemlerle birleştirilerek tanıda kullanılmaktadır. Örneğin, **immün elektroforez** de immün reaksiyonlarla elektroforez prensiplerinden birlikte yararlanır (5).

### **SDS-gel elektroforezi:**

Kuşak elektroforezinin daha değişik bir tipi birden fazla polipeptid zinciri içeren (oligomerik) proteinlerin kaç alt birimden oluştuklarını ve alt birimlerden her birinin molekül ağırlığını saptamak amacı ile uygulanır. **SDS-gel elektroforezi** adı verilen bu yöntemde protein önce **sodyum dodesil sülfat** (SDS) deterjanı ile muamele edilerek alt birimlerine ayrılır. Bu işlem sonunda doğal konformasyonları bozulan alt birimler SDS ile kompleksler oluşturarak çubuk şeklinde uzun düz zincirlere dönüşürler. Kompleksler de, deterjan polipeptide hidrofobik zincirleri ile sıkıca bağlanarak polipeptid yüzeyini bir deterjan tabakası ile kaplar. Deterjanın yüklü sülfat grupları ise sulu ortamla etkileşim halindedir.

SDS-polipeptid kompleksi, SDS ile hazırlanmış bir gele konduğunda, ortamdaki hızını belirleyen temel etken molekül kütesidir. Elektrik alanı sadece, filtrasyon olayının itici gücü görevini yapar. Bu yolla molekül ağırlığı saptanırken aynı koşullardaki paralel bir sistemde de molekül ağırlığı bilinen bir protein elektroforeze tabi tutulur. Daha sonra da bilinen ve bilinmeyen proteinlerin kendi gel kolonlarındaki konumları karşılaştırılarak bilinmeyen proteinin molekül ağırlığı saptanır (5).

Sonuç olarak, elektroforez olayından tıpta, özellikle serum proteinleri incelenerek teşhis ve araştırmada yararlanılmaktadır. Belli bir pH değerli elektrolitik ortamda farklı proteinlerin farklı mobilitelere sahip olması nedeni ile proteinlerin birbirinden ayrılabilmesi ve ayrıca biyokimyasal yöntemlerle nitel ve nicel analizlemenin yapılması mümkün olmaktadır (2).

## **SUMMARY**

### **ELECTROPHORETIC METHODS**

The purpose of this article is to summarize electrophoretic methods, which are using in separation of charged molecules such as proteins etc. in blood by means of electrical field.

**Keywords:** Electrophoresis, electrical field, mobility, protein.

**KAYNAKLAR**

1. Yıldırım, H.: Biyofizik. Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir, 431-433, 1985.
2. Güner, Z.: Fizik 1. Ankara Üniversitesi Basımevi, 2. Baskı, Ankara, 271-274, 1979.
3. Pehlivan, F.: Biyofizik. Hacettepe- Taş Kitapçılık, 2. Baskı, Ankara, 365-366, 1997.
4. Karadeniz, M.C.: Biyofiziğe Giriş. Çağlayan Kitapevi, 1.Baskı, İstanbul, 87-89,1982.
5. Çelebi, G.: Biyofizik. Fakülteler Kitapevi, 2.Baskı, İzmir, 64-67, 2000.
6. Yenson, M. : İnsan Biyokimyası. Çeliker Matbaacılık, 4. Baskı, İstanbul, 368-370 1981.