

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YATAY JEL DÜZENEĞİ İLE İZLENEBİLİR PROTEİN ELEKTROFOREZİ

Buket ÖZTAŞ

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ

ANKARA

2013

Yatay Jel Düzeneği ile İzlenebilir Protein Elektroforezi

ÖZET

Yatay agaroz jel elektroforezi nükleik asit incelemeleri, dikey poliakrilamid jel elektroforezi ise protein incelemeleri için moleküler biyolojide kullanılan temel araçlardır. Bu çalışmada yatay Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi, yeni bir protein elektroforez yöntemi olarak geliştirilmiş ve dikey elektroforez ve jel dökme aygıtlarına gereksinim duymaksızın yatay poliakrilamid jel üretimi gerçekleştirilerek proteinlerin ilk defa yatay konumda elektroforetik ayrımı yapılabilmektedir. Ayrıca elektroforez sırasında protein bantlarının görüntülenebilmesi amacıyla protein ön-boyalari araştırılmıştır.

Bu tezin amacı çok parçalı aygıtlar gerektiren, pahalı ve zahmetli bir yöntem olan dikey jel elektroforezine alternatif olarak, kullanımı pratik ve ekonomik olabilecek yatay bir protein elektroforez yöntemi geliştirmek ve elektroforez sonrasında jel boyama için gereken emek ve zamandan tasarruf edebilmek amacıyla uygun ön-boyalari araştırmak, böylece yatay protein elektroforezini izlenebilir hale getirmektir.

Tez sonucunda dikey jel elektroforezinde kullanılan biriktirici jelle olan gereksinimi ortadan kaldırarak sabit derişim yatay poliakrilamid jeller üretilmiş ve bu jeller üzerinde nükleik asit elektroforezi için kullanılan yatay elektroforez aygıtlarıyla protein ayrımı gerçekleştirilebilmiştir. Protein bantları Nil kırmızısı boyası kullanılarak elektroforez sırasında görüntülenebilmiş, böylece dünyada ilk kez izlenebilir protein elektroforezi gerçekleştirilmiştir. İzlenebilir protein elektroforezinin kullanımının yaygınlaşması, protein çalışmalarını hızlandırması ve daha etkin hale getirmesi beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: SDS-PAGE, Protein elektroforezi, Yatay protein elektroforezi, izlenebilir elektroforez, Nil kırmızısı.

Observable Protein Electrophoresis with Horizontal Gel System

ABSTRACT

Horizontal agarose gel electrophoresis is a basic tool for nucleic acid separation and vertical polyacrylamide gel electrophoresis is also an essential tool for protein separation in molecular biology studies. In this study, horizontal Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) was developed as a new protein electrophoresis technique. Proteins were separated horizontally in horizontally-casted polyacrylamide gels without using vertical gel casting and electrophoresis equipment. In addition, various protein dyes were investigated for pre-staining the proteins to visualize them during electrophoresis.

The aim of this study was to develop a practical horizontal protein electrophoresis technique alternative to the vertical gel electrophoresis which is often demanding and expensive and also to realize observable protein electrophoresis by investigating suitable protein pre-stains to save time and effort required for gel staining.

As a result of this study, constant concentration horizontal polyacrylamide gels were prepared without any need for stacking gel and it was possible to separate proteins by using common horizontal nucleic acid electrophoresis equipment. It was also possible to visualize proteins during electrophoresis by Nile red stain. Thus, observable protein electrophoresis was realized for the first time in the world. It is expected that widespread use of observable protein electrophoresis will accelerate proteomics studies and increase their efficiency.

Keywords: SDS-PAGE, Protein electrophoresis, Horizontal protein electrophoresis, Observable electrophoresis, Nile red

TEŞEKKÜR

Bilimi ve sanatı teşvik ve tavsiye ederek bu çalışmanın gerçekleşmesi için altyapı hazırlayan başöğretmenim Sayın Mustafa Kemal ATATÜRK'e,

Danışmanım olmayı büyük bir incelikle kabul eden ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana her türlü araştırma olanağı sağlayan değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ'e,

Tez çalışmamın deneysel aşaması için her türlü olanağı bana sağlayan Acıbadem Üniversitesi'ne ve Acıbadem Üniversitesi laboratuvar ve kütüphane çalışanlarına,

Tez çalışmamın deneysel aşamasında teknik ve maddi destek sağlayan SALUBRİS A.Ş. yönetici ve çalışanlarına ve çalışmanın gerçekleşmesi için verdikleri destekten dolayı TİBO Ar-Ge laboratuvarı çalışanlarına,

Tez çalışmam sırasında bilgisini, önerilerini ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Deniz YÜCEL'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni teşvik eden ve yönlendiren Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Eğitim Programları Ofisi'nden Sayın Asuman ERZİNCAN' a,

Ayrıca tez çalışmam sırasında bana araştırma desteği sağlayan arkadaşlarım Filiz SARIKAYA PEKACAR, Didem AYDAN'a ve manevi destekleri için Özge LALEGÜL, Onur HACET ve Merve KOCAMAN'a,

Tezin metnini oluşturmam sırasında bana pozitif enerji vererek tezin başında sıkılmadan oturmamı sağlayan müzisyen ve müzik gruplarına ve kesintisiz müzik yayını yapan jazzradio.com'a,

Son olarak sabırla, maddi ve manevi tüm imkanlarını seferber ederek beni destekleyen annem ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Buket ÖZTAŞ

Ankara, Ocak 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	2
2.1. Elektroforezin Tarihi.....	2
2.2. Elektroforezin Prensipleri.....	3
2.3. Elektroforezde kullanılan ayırıcı ortamlar.....	3
2.3.1. Nişasta.....	3
2.3.2. Selüloz asetat.....	4
2.3.3. Agaroz.....	5
2.3.4. Poliakrilamid.....	5
2.4. Yatay ve Dikey Jel Elektroforezi.....	7
2.4.1. Yatay jel elektroforezi.....	7
2.4.1.1. Aygıtlar.....	7
2.4.1.2. Elektrik güç kaynağı.....	8
2.4.1.3. Tampon çözeltiler.....	9
2.4.2. Dikey jel elektroforezi.....	11
2.4.2.1. Aygıtlar.....	11
2.4.2.2. Elektrik güç kaynağı.....	13
2.4.2.3. Tampon çözeltiler.....	13
2.5. Nükleik Asit Elektroforez Çeşitleri.....	14
2.5.1. Agaroz jel elektroforezi.....	14
2.5.2. Değişken alanlı jel elektroforezi.....	15
2.6. Nükleik Asit Boyaları.....	17
2.6.1. Etidyum bromür (EtBr) ile görüntüleme.....	17
2.6.2. SYBR green I.....	17
2.6.3. SYBR gold.....	18
2.6.4. Akridin turuncusu.....	18

2.7. Protein Elektroferez Çeşitleri.....	19
2.7.1. Denatüre etmeyen (Native) poliakrilamit jel elektroforezi	19
2.7.2. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	20
2.7.3. İzoelektrik odaklama (Isoelectric focusing, IEF) jel elektroforezi.....	22
2.7.4. İki boyutlu (Two-dimentional, 2D) jel elektroforezi.....	23
2.8. Protein Boyama Yöntemleri.....	24
2.8.1. Coomassie mavisi ile boyama yöntemi.....	25
2.8.2. Gümüş boyama yöntemi.....	26
2.8.3. SYPRO Orange ve SYPRO Red boyama yöntemi.....	26
2.8.4. Nil kırmızısı.....	27
2.8.5. Protein etiketleme.....	28
2.8.5.1. Farklılık jel elektroforezi (Difference gel electrophoresis, DIGE) ile etiketleme yöntemi.....	29
2.8.5.2. Floresein izotiyosiyanat (FITC) ve NHS-floresein etiketleri	29
2.9. Elektroferez Sırasında ya da Sonrasında Ayrıştırılan Moleküllerin Görüntülenmesi.....	31
2.9.1. Jel görüntülenme sistemleri.....	31
2.9.2. “Karanlık Okuyucu” (DarkReader).....	32
2.9.3. İzlenebilir Elektroferez (Observeable Real Time Electrophoresis, ORTE).....	33
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	34
3.1. Materyal.....	34
3.1.1. Kimyasallar.....	34
3.1.2. Proteinler ve protein standartları.....	35
3.1.3. Jel görüntüleme aygıtları.....	35
3.1.4. Elektroferez gereçleri ve diğer gereçler.....	35
3.2. Yöntem.....	36
3.2.1. Tampon çözeltiler, jel bileşenleri ve boya çözeltilerinin hazırlanması.....	36
3.2.1.1. 10x Elektroferez tampon çözeltisi.....	36
3.2.1.2. 50x TAE tampon çözeltisi.....	36
3.2.1.3. 1,5 M Tris pH: 8,9.....	36
3.2.1.4. %10 SDS.....	36
3.2.1.5. %1 APS.....	36
3.2.1.6. %30 Akrlamit.....	37
3.2.1.7. 1x TAE-%0,1 SDS Elektroferez tamponu.....	37

3.2.1.8. 4x SDS Örnek yükleme boyası.....	37
3.2.1.9. Dimetil formamid (DMF) pH:8,86 ve DMF- Floresein sodyum karışımı.....	37
3.2.1.10. Akridin turuncusu boyası.....	38
3.2.1.11. SYPRO Orange boyası (SYPRO Orange stok çözeltisi).....	38
3.2.1.12. Coomassie boyası ve boya uzaklaştırma çözeltisi.....	38
3.2.1.13. Nil kırmızısı boyası.....	38
3.2.2. SDS'li yatay poliakrilamit jelin hazırlanması	39
3.2.2.1. Değişen agaroz derişimleri (0-200mg) ile yatay SDS-Poliakrilamit jel hazırlanması.....	39
3.2.2.2. TAE tamponu ile yatay SDS-poliakrilamit jelin hazırlanması.....	40
3.2.3. Örneklerin hazırlanması ve jele yüklenmesi.....	41
3.2.4. ORTE ile proteinlerin yatay SDS-poliakrilamit jel elektroforezi.....	41
3.2.5. Elektroforez sonrası standart boyama işlemi olarak Coomassie mavisi ile proteinlerin boyanması.....	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	44
4.1. Agarozun Yatay Poliakrilamit Jelin Polimerizasyonuna Etkisi.....	44
4.2. Jel Bileşeni Olarak TAE Tamponu Kullanılması ve APS ve TEMED Miktarının Arttırılması.....	45
4.3. Trisli Yatay SDS-Poliakrilamit Jelde (50 ml hacimli) Proteinlerin Floresein ile Elektroforez Öncesi Boyanması	48
4.4. SYPRO Orange ile Protein Bantlarının Görüntülenmesi ve Proteinlerin Elektroforez Öncesi Boyanmasının Denenmesi.....	49
4.5. Akridin Turuncusu ile Proteinlerin Elektroforez Öncesi Boyama Çalışması.....	50
4.6. Nil Kırmızısı ile Proteinlerin Elektroforez Öncesi Boyama Çalışması.....	51
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	54
6. KAYNAKLAR.....	58
7. ÖZGEÇMİŞ.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Tiselius (1937)'un elektroforez aygıtı.....	2
Şekil 1.2. Nişasta molekülünün yapısı.....	4
Şekil 1.3. Agaroz molekülünün kimyasal yapısı	5
Şekil 1.4. Poliakrilamid jel oluşumu.....	6
Şekil 1.5. Yatay jel elektroforez aygıtı	8
Şekil 1.6. Güç kaynağına bağlı bir elektroforez aygıtı.....	9
Şekil 1.7. DNA dizi incelemesinde kullanılan dikey jel elektroforez aygıtı.....	12
Şekil 1.8. Dikey mini jel elektroforez aygıtı.....	12
Şekil 1.9. Agaroz jele DNA örneklerinin yüklenmesi	15
Şekil 1.10. Etidyum bromür ile boyanmış DNA moleküllerinin agaroz jel elektroforezinden sonra mor ötesi ışığı ile alınan görüntüsü.....	15
Şekil 1.11. Değişken alanlı jel elektroforezi çeşitleri.....	16
Şekil 1.12. SYBR gold boyası ile boyanmış nükleik asit bantlarının görüntüsü.....	18
Şekil 1.13. SDS' in proteinin şekli ve yükü üzerindeki etkisi.....	20
Şekil 1.14. SDS-PAGE.....	21
Şekil 1.15. İzoelektrik odaklama jel elektroforezi.....	23
Şekil 1.16. İki boyutlu jel elektroforezinde protein noktacıkları.....	24
Şekil 1.17. Coomassie mavisi ile boyanmış bir poliakrilamid jelin fotoğrafı.....	25
Şekil 1.18. Gümüş boyama yöntemi ile boyanmış poliakrilamid jel.....	26
Şekil 1.19. FITC ve NHS-Floresan molekülleri.....	30
Şekil 1.20. Floresein sodyum molekülü.....	30
Şekil 1.21. Jel görüntüleme sistemlerine ait örnekler.....	31
Şekil 1.22. “Karanlık Okuyucu” ’nun çalışma mekanizması.....	32
Şekil 1.23. Bilgisayar, kamera, mavi led ışık ve filtreden oluşan izlenebilir elektroforez sistemi (ORTE).....	33
Şekil 2.1. Polimerleşmeye bırakılmış yatay SDS-Poliakrilamid jel.....	40
Şekil 2.2. Jel üzerinde köpükleşmenin engellenmesi amacıyla standart jel tankının uçlarına lamların sabitlenmesi	42
Şekil 2.3. Elektroforez sırasında oluşan köpüklerin lamların arkasında toplanması.....	42
Şekil 2.4. ORTE aygıtınca elektroforez sırasında alınan jel görüntüsü.....	42
Şekil 2.5. Coomassie mavisi ile boyamadan sonra alınan jel görüntüsü.....	43
Şekil 2.6. Agarozun yatay poliakrilamid jelin polimerizasyonuna etkisi.....	44

Şekil 2.7. 10ml ve 20 ml hacimli SDS-TAE-Poliakrilamit jeldeki örneklerin Coomassie mavisi ile boyamadan sonraki görüntüsü.....	46
Şekil 2.8. %5,87 Akrilamit derişimli SDS-TAE Poliakrilamit jel.....	46
Şekil 2.9. Dual Xtra ve Page Ruler molekül ağırlık standartlarının %5,87 Akrilamit derişimli SDS-TAE –Poliakrilamit jelde ayrımı.....	47
Şekil 2.10. Floresein ile elektroforez öncesi boyanmak istenen proteinlerin elektroforez sırasında ve sonrasında alınan görüntüsü	49
Şekil 2.11. SYPRO Orange ile boyama sonrası protein bantlarının görüntüsü.....	50
Şekil 2.12. Akridin turuncusuyla elektroforez öncesinde boyanması denenen proteinlerin elektroforez sırasında ve sonrasında alınan jel fotoğrafları.....	51
Şekil 2.13. Nil kırmızısı boyası ile jele yüklenen BSA örneklerinin elektroforez sırasında ORTE' de alınan fotoğrafı.....	52
Şekil 2.14. Elektroforez öncesi protein boyası olarak Nil kırmızısı kullanılmış olan jelin elektroforez sırasında ve Coomassie mavisi ile boyanma sonrası fotoğrafları.....	53
Şekil 2.15. Nil kırmızısı boyası ile elektroforez öncesinde farklı protein örneklerini boyama çalışması.....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. 50x TAE Stok çözeltisinin hazırlanması.....	10
Çizelge 1.2. Tris- Glisin- SDS tamponunun (pH:8,3) hazırlanması.....	14
Çizelge 2.1. Kimyasallar.....	34
Çizelge 2.2. Proteinler ve protein standartları.....	35
Çizelge 2.3. Jel görüntüleme aygıtları.....	35
Çizelge 2.4. Elektroforez gereçleri ve diğer gereçler.....	35
Çizelge 3.1. 4x SDS Örnek yükleme boyasının hazırlanması.....	37
Çizelge 3.2. Hacmi: 50 ml, akrilamit derişimi %6 olan agarozlu yatay SDS-Poliakrilamit jelin bileşenleri.....	39
Çizelge 3.3. Hacmi 23 ml, akrilamit derişimi % 5,87 olan, TAE tamponu ile hazırlanan yatay SDS-Poliakrilamit jelin bileşenleri.....	40
Çizelge 3.4. En iyi ayırımın elde edildiği SDS-TAE-poliakrilamit jelin bileşenleri ve miktarları.....	48

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
APS	Amonyum persülfat
BSA	Bovine serum albumin
CCD	Charge coupled device, Yüklenme-iliştirilmiş araç
DIGE	Difference gel electrophoresis, Farklılık jel elektroforezi
DMF	Dimetil formamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FITC	Floresein izotiyosiyanat
g	Gram
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
HCl	Hidroklorik asit
Kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
LED	Light emitting diode, Işık yayan diyot
Mb	Megabaz
Mg	Magnezyum
mM	Milimolar
ORTE	Observable real time electrophoresis
PAGE	Poliakrilamit jel elektroforezi
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis, Değişken alanlı jel elektroforezi
PI	İzoelektrik noktası
RNAz	Ribonükleaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi
TAE	Tris Asetik asit EDTA
TBE	Tris Borik asit EDTA
TEMED	Tetrametil etilendiamin
UV	Ultraviyole
V	Volt

1. GİRİŞ

Elektroforez elektrik yüküne sahip moleküllerin elektriksel bir alanın etkisi altında sıvı veya yarı katı bir ortamda çeşitli özelliklerine göre ayrımını ve analizini sağlayan temel bir yöntemdir. Elektroforez nükleik asitlerin uzunluğuna, proteinlerin de yüklerine ya da molekül ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. DNA dizi analizi gibi bazı çalışmalar dışında nükleik asitlerin elektroforetik ayrımı için ayırıcı ortam olarak agaroz jel, proteinlerin ayrımı için ise poliakrilamit jel rutin analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hızlı ve pratik bir şekilde yatay olarak hazırlanabilen agaroz jelin aksine poliakrilamit jeller, bileşiminde bulunan akrilamidin polimerizasyonu inhibe eden oksijen ile temasının engellenebilmesi amacıyla iki cam arasında ve sadece dikey olarak hazırlanabilmektedir. Jelin elektroforezi de dikey sistem aygıtlarıyla gerçekleştirilmektedir. Poliakrilamit jel elektroforezi (PAGE) bu nedenle pahalı sistemler gerektirmekte ve uygulama açısından yeterince pratik olmamaktadır.

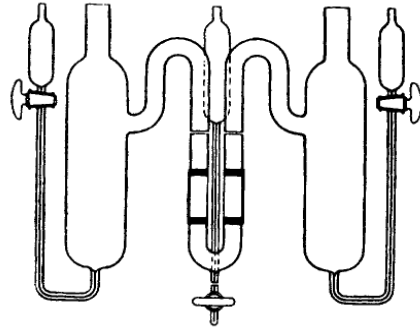
Nükleik asitleri elektroforez sonrasında görünür hale getirebilmek için çeşitli boyalar ve görüntüleme sistemleri bulunmaktadır. Son yıllarda elektroforez sırasında nükleik asitlerin eşzamanlı görüntülenebileceği görüntüleme sistemleri de geliştirilmiştir. Proteinleri görünür hale getirebilmek için ise elektroforezde ayırım yapıldıktan sonra rutin olarak kullanılan Coomassie mavisini ile boyama veya gümüş boyama yöntemleri uygulanmakta ya da Sypro orange gibi floresan jel boyaları kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin dışında elektroforez öncesinde görüntüleme amacıyla proteinler pahalı floresan işaretlerle ve uzun prosedürler kullanılarak etiketlenmektedir. Bu yöntemle elektroforez esnasında protein ayrımını izleyebilmek ve "Westernblot" analizlerinde membrana transfer etkinliğini kontrol edebilmek amacıyla boyalı protein molekül ağırlık standartları geliştirilmiştir. Ancak, rutin analizlerde incelenecek protein örneklerini elektroforez sırasında görüntüleyebilecek bir boya ve hızlı bir yöntem tanımlanmış değildir.

Bu çalışmanın amacı DNA elektroforezi için kullanılmakta olan yatay elektroforez sisteminde proteinlerin molekül ağırlığına göre ayrıştırılmasını sağlamak için kullanılacak, yatay bir Sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamit jel hazırlamak ve proteinleri elektroforez sırasında görünür hale getirebilecek bir protein boyama yöntemi geliştirmektir.

2.KURAMSAL TEMELLER

2.1. Elektroforezin Tarihi

Elektroforez, yüklü moleküllerin, bir elektriksel alan uygulandığında, sıvı içeren bir ortamda hareket hızlarının ölçüldüğü bir yöntemdir. Proteinler ve nükleik asitler elektriksel yük taşıdıkları için elektroforez ile bu moleküllerin büyüklüğü, konformasyonu ve net yükleri hakkında bilgi elde edilmektedir (Klug and Cummings 2003). Elektroforezin kompleks protein karışımlarının incelenmesinde kullanılması çalışmaları 1930’lu yıllarda Arne Tiselius tarafından yapılmıştır. Tiselius insan serumunda en çok bulunan beş proteini ayırmayı başarmış ve bu proteinlerin bazı hastalık durumlarındaki ve normal durumdaki seviyelerini ölçebilmiştir (Perrett 2010). Tiselius mekanizması hassas Schlieren optikleriyle donatılmış, dik açılı, birkaç parçadan oluşan, U şeklinde bir tüpten oluşmaktadır. (Burtis *et al.* 1986). Bu mekanizma hareket eden proteinleri segmentler halinde gözlemleyebilmek için, farklı protein içerikli çözeltilerin kırılma indisindeki değişimleri kullanmayı amaçlamıştır.



Şekil 1.1. Tiselius (1937)’un elektroforez aygıtı

Elektroforez günümüzde “planar”, “kapiller” ve “nano” ayırma olarak üç ayrı şekilde kullanılabilir. Son olarak, Stanford Üniversitesi’nde üretilen, tarihi 1975’lere dayanan, çip temelli aygıtlar ile minyatürize edilmiş aygıtlar yapılmaya başlanmıştır. Son yıllarda birçok akademik ve küçük şirket “lab-on-a-chip” konseptini geliştirmişlerdir. Elektrolit yüklemesi, voltaj kontrolü, örnek yüklemesi, ayırım ve saptamanın tek bir çip üzerinde yapılabildiği aygıtlar patentlenmiştir (Perrett 2010).

2.2. Elektroforezin Prensibi

Taşıdığı yükün türüne bağlı olarak, bir çözeltildeki iyonlar katoda (negatif elektrot) ya da anoda (pozitif elektrot) doğru hareket etmektedirler. Bir elektrik alanında iyonların hareket oranları molekülün net yüküne, molekülün büyüklük ve şekline, elektrik alanın gücüne, ayırıcı ortamın özelliklerine ve sıcaklığa göre değişkenlik göstermektedir (Burtis *et al.* 1986).

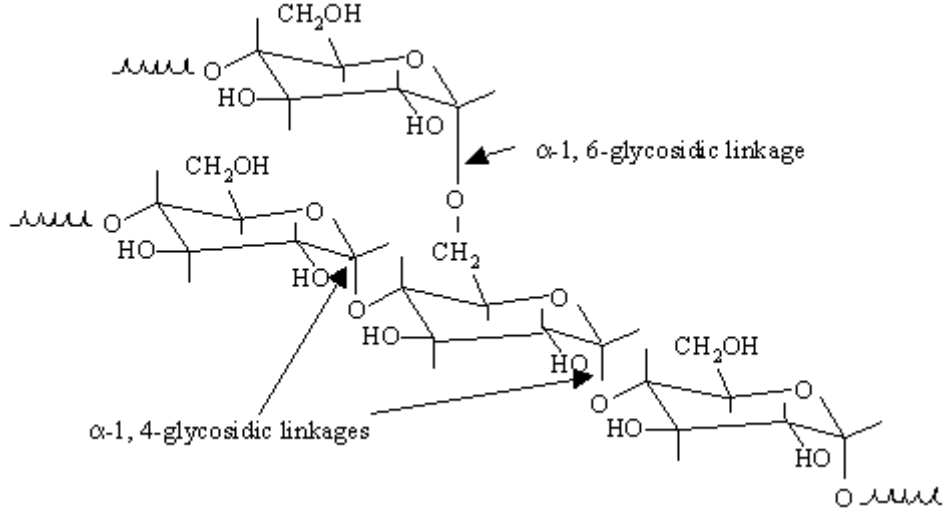
Elektroforezde moleküllerin hızı iki ana etmene bağlıdır. Birincisi, moleküllerin üzerindeki elektrik alan tarafından uygulanan, “ qE ” adı verilen, hareketi sağlayan güçtür. q : molekülün yükünü (kolomb) ve E : elektrik alanın gücünü (amper başına volt olarak) tanımlar. İkincisi ortam ile molekül arasında oluşan sürtünmeden kaynaklanan, harekete karşı olan direnç, “ f_v ” dir. “ v ”: molekülün hızı ve “ f ” molekülün büyüklüğüne ve şekline bağlı olan sürtünme katsayısıdır. Büyük ya da asimetric moleküller küçük ve kompakt olanlara göre daha fazla sürtünme direnciyle karşılaşmakta ve bu nedenle daha yüksek sürtünme katsayısına sahip olmaktadır. Güç kaynağı açıldığında oluşan elektrik alan nedeniyle, moleküller hızlanarak bu iki faktörün güçleri dengeye gelene kadar belirli bir hıza ulaşır (Mathews *et al.* 1989). Elektroforetik hareket, net yük ile doğru orantılı, molekülün büyüklüğü ve elektroforez ortamının viskozitesi ile ters orantılıdır (Burtis *et al.* 1986).

2.3. Elektroforezde Kullanılan Ayırıcı Ortamlar

2.3.1 Nişasta

Nişasta, elde edildiği bitkiye bağlı olarak, farklı yüzdelerde amiloz ve amilopektinden oluşmaktadır (Anonim 2012a). Ham şekliyle jel oluşturmayan, kısmen hidrolize olmuş doğal nişastadan, nişasta jeli hazırlanmaktadır. Nişasta jel elektroforezi (Starch gel electrophoresis, SGE) makromoleküler iyonları molekül büyüklüklerine ve kütle-yük oranı temeline göre ayırmak için kullanılmaktadır (Burtis *et al.* 1986). Denatüre edilmemiş proteinler yük ve boyutlarına göre nişasta jelinde ayrılabilen ve “Naphtal black” ya da “Amido black” boyama yöntemleri ile boyanabilmektedir. Nişasta jeldeki nişasta derişimi

%5 ila %10 arasında değişmektedir (Anonim 2012b). Nişasta jeli hazırlamak zahmetli olduğu ve tecrube gerektirdiği için bu teknik artık nadiren kullanılmaktadır (Burtis *et al.* 1986).



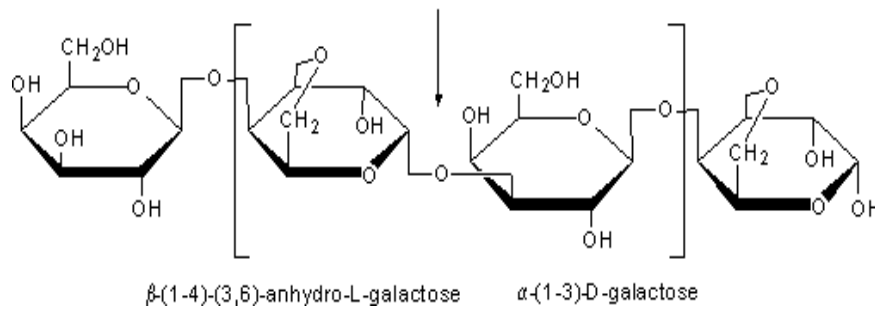
şekil 1.2. Nişasta molekülünün yapısı (Anonim 2012c)

2.3.2. Selüloz Asetat

Selüloz Asetat, hidroksil gruplarını asetillemek amacıyla selülozun asetik asitle muamele edilmesiyle yapılan bir termoplastik reçinedir. Kenetlenmiş selüloz asetat fiberlerinin içinde %80 hava boşluğu içeren selüloz asetat membranları, kolayca çatlayan, kuru, mat, kırılğan filmler halindedir. Tampona daldırıldığında, içindeki hava boşlukları sıvı ile dolan film esnek hale gelmektedir. Örnekler, önceden tampon emdirilmiş selüloz asetat bantlarına ikiz tel uygulayıcı (twin wire applicator) ya da bir lamın ucu aracılığıyla 0,3 ila 20 μ l arasında olacak şekilde uygulanmakta, elektroforez 20 ila 60 dakika arasında gerçekleştirilmektedir. Selüloz Asetat bantlarının kullanım öncesinde tampona daldırılması ve dansitometreden önce yıkanması gerektiği için selüloz asetatın yerini birçok uygulamada agaroz jel almıştır (Burtis *et al.* 1986).

2.3.3. Agaroz

Agaroz, asidik sülfat ve karboksilik yan gruplarından dolayı oldukça yüklü bir fraksiyon olan agaropektinden agarozun ayrılmasıyla elde edilen, agarın saflaştırılmış ve yüksüz bir fraksiyonudur (Burtis *et al.* 1986). Deniz yosunu cinslerinden *Gellidium* ve *Gracillaria*'dan izole edilen agaroz (Lee *et al.* 2012), D-galactose, 3,6-anhydro L-galactose moleküllerinin tekrarlayan polimeridir. Sulu ortamda kaynatılarak eritilmekte ve soğutulduğunda yarı katı bir ortam (jel) oluşturmaktadır (Kocagöz vd 2009). Jelleşme sırasında agaroz polimerleri kovalan olmayan bağlarla bir araya gelerek ağ demetleri oluşturur. Bu yapının gözenek büyüklüğü, jelin moleküler ayırma özelliğini belirlemektedir. Agaroz jel, DNA gibi büyük moleküllerin ayırımında kullanılmaktadır (Lee *et al.* 2012).

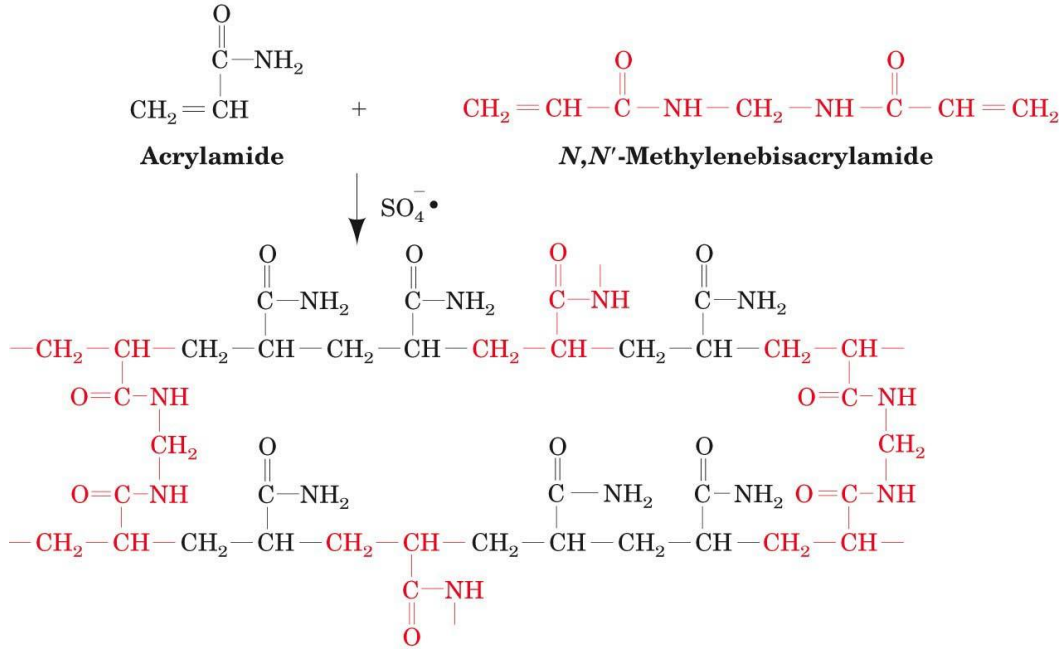


Şekil 1.3. Agaroz molekülünün kimyasal yapısı (Anonim 2012d)

2.3.4. Poliakrilamid

Poliakrilamid jeller akrilamid ve bisakrilamid'in ("bis", N-N'-metilen bisakrilamid) birlikte polimerleşmesiyle (co-polimerizasyon) oluşturulmaktadır. Tepkime serbest radikal üreten bir sistem aracılığıyla başlatılan, vinil katılımlı polimerizasyondur (Menter 2000). Poliakrilamid jel oluşumunda kimyasal sistem çoğunlukla polimerizasyon için gerekli olan serbest radikalleri oluşturan APS (Amonyum persülfat) ve TEMED'i (N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin) içermektedir. TEMED, persülfat moleküllerinin sülfat serbest radikallerine ayrışmasını hızlandırır ve bu durum polimerizasyonun başlamasını sağlar. Polimerizasyonun alkalın pH' da etkinliği en yüksektir. Düşük pH' da oluşturulacak jeller için riboflavin ve TEMED ile fotopolimerizasyon kullanılmaktadır. Oksijen

poliakrilamidin polimerizasyon oranını düşürmektedir. Polimerizasyon oranı monomer ve reaksiyon başlatıcıların derişimlerine, sıcaklığa ve kimyasalların saflığına bağlıdır (Garfin 2003). Poliakrilamidin bileşeni olan akrilamid monomerinin erime noktası 84,5°C (Lide 2000) olup, bu monomer erime noktasına doğru ısıtıldığında aniden polimerleşebilmektedir (Bretherick 1990). Akrilamid monomeri nörotoksiktir ancak polimerleştiğinde toksisitesi çok düşüktür (Habermann 2002).



Şekil 1.4. Poliakrilamid jel oluşumu (Anonim 2012e).

Poliakrilamid jeller genellikle % T ve % C değer çifti ile karakterize edilmektedir. % T, 100 mililitrede bulunan toplam monomerin (akrilamid + bisakrilamid) gram cinsinden ağırlık oranıdır. % C ise toplam monomerdeki bisakrilamidin oranıdır. Poliakrilamid jelin etkin por büyüklüğü toplam monomer derişimi (% T) ile ters fonksiyon, % C ile de bifazik fonksiyon göstermektedir. Monomerler genellikle su içinde %30 T ya da %40 T içerecek stok çözeltiler şeklinde hazırlanmaktadır. Proteinler için çapraz bağlayıcı derişimi genellikle %2,7 C'dir. % C oranı sabit tutularak % T oranı arttırılırsa zincir sayısı artmakta ve por genişliği azalmaktadır. Öte yandan % T sabit tutulup % C arttırılırsa %5 C civarında minimum por genişliğine ulaşılmaktadır. Yüksek % T ile hazırlanan jeller (örneğin %15 T) küçük proteinleri ayırmak için kullanılırken düşük %T ile hazırlanan jeller (örneğin %7,5 T) büyük proteinleri ayırmak için kullanılmaktadır (Garfin 2003). Birçok protein %5'ten

%15'e kadar akrilamit ve %0,2'den %0,5'e kadar bisakrilamit içeren poliakrilamit jellerde ayrılabilirler (Ausubel *et al.* 2003).

Poliakrilamit jeller proteinler için çok uygun olduğu gibi nükleik asit elektroforezi için de kullanılabilir (Stellwagen 1998). Poliakrilamit kimyasal olarak inert, elektriksel olarak nötr, hidrofilik ve 250nm'den büyük dalga boylarındaki ışık ile yapılan incelemelerde transparan olması nedeniyle protein ayrımları için idealdir. Ayrıca ayrımı yapılacak maddelerle etkileşime girmez ve yaygın olarak kullanılan protein boyalarına karşı düşük afinitesi vardır. Poliakrilamit jeller jel boyunca sürekli aynı derişimde akrilamit içerecek ya da jelin bir ucundan diğerine doğru bir % T gradiyenti oluşturacak şekilde (gradyent jeller) hazırlanabilir. Akrilamit derişimleri, sabit jeller için %7,5 ila %20 arasında, gradiyent jeller için genellikle %4-15 veya %10-20 arasındadır (Anonim 2012f).

2.4. Yatay ve Dikey Jel Elektroforezi

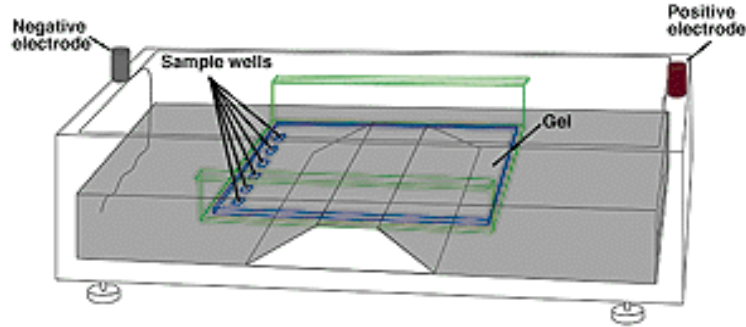
2.4.1. Yatay jel elektroforezi

Genellikle nükleik asitlerin elektroforezi için agaroz jel ile yapılan elektroforez çeşitidir.

2.4.1.1. Aygıtlar

Modern elektroforez aygıtları ve sistemleri şekil ve otomasyon açısından farklılık gösterse de bütün sistemlerde temel olan bileşenler; 1- Tamponları içeren iki adet rezervuar, 2- Güç kaynağından akımın alınmasını sağlayan platin ya da karbon elektrotlar, 3- Akımı sistem boyunca ileten tamponlar ve üzerinde elektroforetik ayrımın gerçekleştiği, iki rezervuarın arasında bulunan destek maddesinden oluşmaktadır. Sistem buharlaşmayı en aza indirmek için kapalı hale getirilmiş olup, bu şekilde hem sistemi hem de kullanıcıyı korumaktadır. Doğru akım güç kaynağı, elektrotların polaritesini belirler ve elektroforez ortamına akım sağlamaktadır (Burtis *et al.* 1986).

En basit şekliyle yatay jel elektroforez aygıtı ortada bir platform olacak şekilde iki kompartmana bölünmüş bir kutudan oluşmaktadır (Şekil 1.5.). Jel, platformun üzerine yerleştirilmekte ve tamamen içinde kalacak kadar tampon çözelti eklenmektedir. Akım, hem jel hem de jelin üzerindeki tampon çözelti boyunca geçmektedir. Soğutma tampon çözelti tarafından sağlanmaktadır. Yatay elektroforez aygıtının en önemli kısıtlılığı her iki kompartmanın da tampon çözelti ile bağlantılı olması nedeniyle, kesikli tampon çözelti sisteminin kullanılmamasıdır. Bu sistemde jeller üzeri kapalı olmayan bir tabla ile hazırlandığından dolayı yüzeyi tamamen oksijene açık olup, bu sistemde akrilamid polimerleşmemektedir. Bu nedenle genellikle sürekli tampon sistemi ile yürütülen ve oksijenden negatif etkilenmeyen agaroz jelle uygundur. (Anonim 2012k).

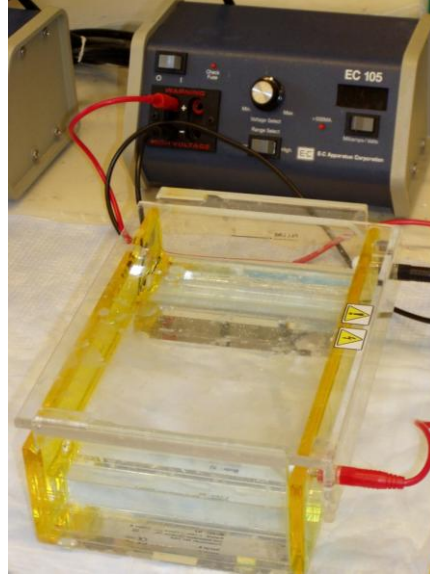


Şekil 1.5. Yatay jel elektroforez aygıtı

2.4.1.2. Elektrik güç kaynağı

Elektrik güç kaynağına bağlı bir elektroforez aygıtı Ohm kanunu ile çalışmaktadır. Voltaj = akım x direnç ya da $V=IR$. Jel bir rezistans (direnç) olarak, güç kaynağı da voltaj ve akım kaynağı olarak düşünülebilir. Çoğu güç kaynağı sabit akım ya da sabit voltaj vermektedir. Bazıları ek olarak sabit güç verebilir: Güç = voltaj x akım, ya da $P=I^2R$ (Ausubel *et al.* 2003). Elektroforezde kullanılan elektrik alan çeşitli güç kaynakları tarafından üretilmektedir. Hareket hızının ortaya çıkan ısıya oranı açısından optimum güç kaynağı, ulaşılabilecek en yüksek ısınma ile tutarlı olarak en yüksek voltaj gradiyentini üretir. Voltaj ve akım değişiklikleri, yalnızca elektroforetik sistemin direncindeki değişimleri dengelemek amacıyla taşımaktadır (Schaffer and Johnson 1973). Güç kaynağı

ortam içindeki iyonların hareketini sağlar ve akım ya da voltajda ayarlama yapma olanağını yaratır (Burtis *et al.* 1986).



Şekil 1.6. Güç kaynağına bağlı bir elektroforez aygıtı (Anonim 2012g)

2.4.1.3. Tampon çözeltiler

Tampon çözelti iyonları uygulanan akımı taşımak ve elektroforez işleminin yapıldığı pH'ı sabitlemek üzere iki türlü öneme sahiptir. Tampon çözelti iyonları, çözeltinin elektrik yükünün türünü ve iyonlaşma miktarını, dolayısıyla moleküllerin hangi elektroda doğru hareket edeceğini belirler. Tampon çözeltinin iyonik gücü, yüklü molekülü çevreleyen iyonik bulutun kalınlığını, molekülün hareket hızını ve elektroforetik alanların keskinliğini belirler. İyon derişimi arttığında iyonik bulutun kalınlığı da artar ve molekülün hareketi engellenmeye başlar (Burtis *et al.* 1986). Yatay jel elektroforezinde genellikle nükleik asitlerin ayırımında kullanılan tampon çözeltiler gereklidir. Tris Borik asit EDTA (TBE), tris bazı, borik asit ve etilendiamintetraasetikasit karışımı içeren bir tampon çözeltidir. Tris asetik asit EDTA (TAE) tampon çözeltisi de nükleik asitlerin elektroforezinde en yaygın olarak kullanılan diğer tampon çözeltidir. Tris-asit çözeltileri DNA'nın protonlarını kaybettiği ve suda çözülebildiği hafif bazik koşullarda etkili tampon çözeltilerdir. EDTA iki değerlikli katyonları, özellikle Magnezyumu (Mg^{++}) bağlar. Bu iyonlar kontaminant nükleazlar gibi birçok enzim için gerekli kofaktörler olduklarından dolayı EDTA'nın görevi nükleik asitleri enzimatik parçalanmadan korumaktır. Ancak Mg^{++} aynı zamanda restriksiyon enzimleri ve DNA polimerazlar gibi birçok yararlı DNA

modifiye edici enzimlerin de kofaktörü olduğundan, TBE veya TAE tamponlarındaki EDTA derişimi genellikle düşük (1mM civarında) tutulmaktadır (Anonim 2012h).

TAE tamponu, polimeraz zincirleme tepkimesi (PZT) ile çoğaltma, DNA saflaştırma ya da DNA klonlama çalışmaları sonucunda elde edilen DNA ürünlerinin incelenmesi için yapılan agaroz jel elektroforezi işleminde en yaygın kullanılan tampon çözeltilidir. Bu çözelti düşük iyonik güç ve düşük tamponlama kapasitesine sahiptir. Büyük DNA parçalarının da (>20 kb) elektroforezi için uygundur ve uzun jel yürütme süreleri için (>4 saat) sıkça değiştirilmeli ya da elektroforez aygıtında sürekli çevrimi yapılmalıdır. (Anonim 2012i). TBE tamponu küçük DNA parçalarının elektroforezi için uygundur. TBE daha yüksek tamponlama kapasitesine sahiptir ve TAE'den daha keskin ayırım gücü sağlamaktadır. TBE, DNA ligaz enzimini inhibe ettiğinden dolayı ek DNA saflaştırma ve ligasyon basamaklarında sorunlara yol açabilmektedir (Anonim 2012j). Uzun süre ve yüksek voltaj gerektiren elektroforez işlemlerinde TAE yerine TBE kullanılmaktadır. DNA, TAE tamponu içerisinde daha yüksek hareketlilik gösterir ancak TAE çok akım taşıdığı için jelin daha fazla ısınmasına neden olmaktadır (Ausubel *et al.* 2003).

Çizelge 1.1. 50x TAE Stok çözeltilisinin hazırlanması (Cambrex Inc. 2012)
(1X= 40mM Tris baz, 40mM Asetik asit, 1mM EDTA)

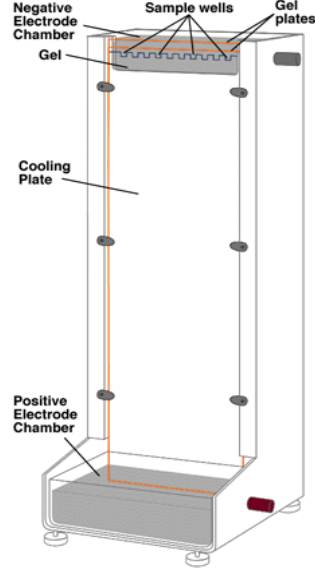
Tris baz	242 g
Glasiyal asetik asit (%100 asetik asit) (57.19 ml = 1 Mol)	57,1 ml
Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	18,61 g
Damıtık su ile tamamlanır.	1000 ml
Toplam hacim	1000 ml

2.4.2. Dikey jel elektroforezi

Sıklıkla proteinlerin elektroforezinde kullanılan poliakrilamid jellere yüklenen örnekler dikey jel elektroforezinde yere dikey olarak yürütülmektedir. Poliakrilamid çözeltisi oksijen varlığında polimerize olamadığı için çözeltinin dikey olarak konumlandırılmış iki cam tabaka arasına dökülmesi ve kuyucukların oluşması için üst kısma plastik bir tarak yerleştirilmesi ile polimerizasyon sağlanmaktadır (Izzo *et al.* 2006). Bu nedenle Poliakrilamid jel elektroforezi agaroz jel elektroforezinden farklı olarak özel dikey aygıtlara gereksinim duymaktadır. Özellikle proteinlerin poliakrilamid jel elektroforezi bu dikey sistemler kullanılarak yapılmaktadır.

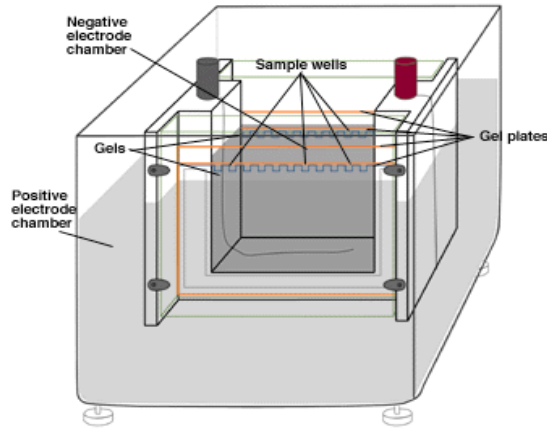
2.4.2.1. Aygıtlar

Bütün dikey jel sistemlerinde ortak olarak jel, genellikle aralık oluşturucular tarafından 0,2-2 mm kalınlık sağlayacak şekilde ayrılmış iki cam tabaka arasında hazırlanmakta ve üst kısmı negatif elektrot bölmesine, alt kısmı pozitif elektrot bölmesine temas edecek şekilde sisteme yerleştirilmektedir. Yatay sistemin aksine dikey jel elektroforezinde tampon bölmeleri arasındaki tek bağlantı jel üzerinden sağlanmaktadır. Bu durum voltaj gradiyentinin kontrolüne izin vermektedir. Jel aygıtı, alt ucu alt tampon bölümüne batacak ve üst ucu üst tampon bölümüne bir duvar oluşturacak şekilde kenetlenmektedir. Jelin arkasında bulunan metal ısı emici, ısıyı sistem boyunca hızlıca ve dengeli bir şekilde yaymaktadır. Bu tür bir aygıt yüksek voltajların (1500V) kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Şekil 1.7.). Bazı sistemlerde üst tampon bölmesi neredeyse jelin alt kısmına kadar ulaşır ve üst tampon soğutma için kullanılır. Jel boyunca göreceli olarak az miktarda akımın taşınması, tampon çözeltinin sürekli çevrimini genellikle gerekli kılmamaktadır.



Şekil 1.7. DNA dizi incelemesinde kullanılan dikey jel elektroforez aygıtı. Bu sistemde jel kutusunun arka kısmı ısıyı hızlıca dağıtan bir metal levhaya karşı tutulurken, ön kısmı hava ile temas etmektedir.

Şekil 1.8. standart “mini” jel aygıtını temsil etmektedir. Bu şekildeki jeller genellikle 10cm x10cm ya da daha küçük boyutlardadır. Hazırlama ve kullanım kolaylığı ve kısa uygulama süresi nedeniyle birçok uygulama için standart hale gelmiştir. Mini jel sisteminde jel bölmesi negatif elektrot bölümünün yan kısımlarını oluşturacak şekilde U şekilli bir çerçevenin üzerine monte edilmiştir. Bu parça tamponla doldurulmuş bir tankın içine yerleştirilir ve böylece jeller optimum soğutmayı sağlayacak şekilde elektroforez işlemi sırasında etkili bir şekilde tampona daldırılmış olmaktadır.



Şekil 1.8. Dikey mini jel elektroforez aygıtı

Dikey mini jel aygıtının üst (negatif) elektrot bölümü, ortada kenetlenmiş iki jel bölmesi tarafından oluşturulmaktadır. Bu parça aşağıdaki (pozitif) elektrot tampon çözelti bölümüne daldırılır. Tam boy dikey jel sisteminde olduğu gibi, iki bölüm arasındaki elektrik bağlantısı jeller tarafından sağlanır. Dikey jeller ara oluşturucular tarafından ayrılmış iki cam tabakadan oluşan kasetlerin içine dökülerek hazırlanmaktadır. Kasetin alt kısmı elastik conta, yapışkan bant ya da agaroz gibi geçici araçlar ile kapatılır. Jel karışımı dökülüp kuyucukları oluşturmak için jel tarağı kasetin üzerine yerleştirilir ve jel polimerizasyona bırakılır. Dikey jellere genellikle üst kısımdan, tampon çizgisinin altından itibaren örnek yüklemesi yapılır. Jeller elektroforez sırasında ön cam tabakadan izlenebilmektedir. Bu sistemlerde elektroforez işleminin sonuna kadar jelle müdahale edilememektedir. Yatay jellerde uygulanan, jeldeki örneği geri alma tekniklerinden bazıları dikey jeller için uygun değildir (Anonim 2012l).

2.4.2.2. Elektrik güç kaynağı

Poliakrilamid jel elektroforezi uygulamaları için güç kaynağı seçimi genellikle yürütülecek jelin sayısı ve boyutuna bağlı olarak yapılır (Anonim 2012m).

2.4.2.3. Tampon çözeltiler

Proteinlerin ayrımı için kullanılan dikey elektroforez sisteminde “kesikli” ve “sürekli” olmak üzere iki ayrı tamponlama sistemi kullanılmaktadır. Kesikli sistemde jellerin hazırlanmasında kullanılan tampon çözelti ile tanka eklenen tampon çözelti farklıdır. Tamponların farklılığı proteinleri oldukça dar bir alanda yoğunlaştıran iki iyon cephesi oluşturur. Sürekli tampon sistemi jel ve tank içinde aynı tamponu kullanır ve tek bir ayırma jeli içerdiği için tek bir iyon cephesi oluşturur. Bu sistem kesikli sistemden daha az kullanılmaktadır ancak çökelme özelliği olan bazı özel proteinlerin veya protein komplekslerinin ayrımı sürekli sistemi gerektirebilir. Laemmli tampon sistemi (Tris-glisin) geniş moleküler ağırlık skalasındaki proteinler için duyarlı bir çözünürlük sağlamak amacıyla kullanılan bir kesikli tampon sistemidir. Bu sistemde jel Tris-HCl tamponu ile hazırlanır ve Tris-glisin yürütme tamponu olarak kullanılır. Sonuçta proteinler ve 10-15 kDa altındaki molekül ağırlığına sahip peptitler için yüksek ayırım gücü sağlanır (Cambrex Inc. 2012).

Çizelge 1.2. Tris-glisin-SDS tamponunun (pH:8,3) hazırlanması (1X= 25mM Tris baz, 192 mM Glisin, %0.1 SDS) (Cambrex Inc. 2012)

10x stok çözeltisi olarak g/l

Tris baz	30,3 g
Glisin	144 g
SDS*	10 g
Damıtık su ile tamamlanır	1000 ml

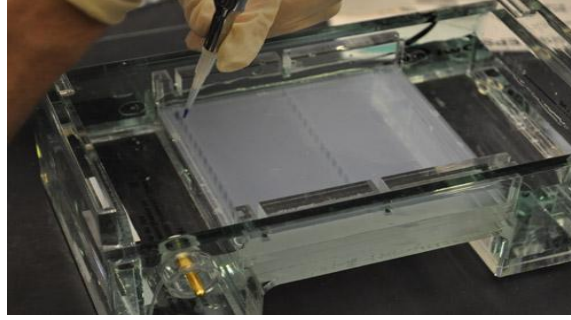
*Proteinlerin denatüre etmeyen (“native”) ayrımı yapılacaksa SDS ihmal edilir.

2.5. Nükleik Asit Elektroforez Çeşitleri

2.5.1. Agaroz jel elektroforezi

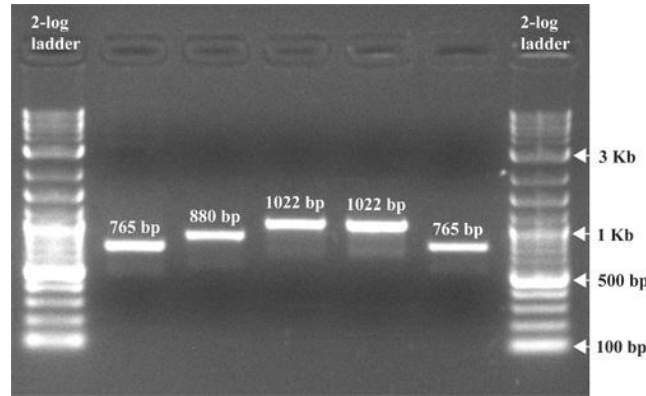
Agaroz jel elektroforezi boyutları 100 baz çiftinden (bç) 25 kilobaza (kb) kadar değişen DNA parçalarını ayırmak için kullanılan en etkili yöntemdir (Lee *et al.* 2012). Elektroforez tankını doldurmak ve jeli hazırlamak için TAE ya da TBE tamponları hazırlanır. Ayrılacak DNA örneklerinin boyutuna uygun gözenekleri oluşturacak miktarda agaroz, uygun miktardaki tampon çözeltiye eklenerek mikrodalga fırında ya da ateş üzerinde kaynatılarak eritilir ve karışım jel tabağına dökülür. Örneklerin yükleneceği kuyucukları oluşturacak tarak, jeli yerleştirilerek jel katılaşmaya bırakılır (Ausubel *et al.* 2003). DNA, jel içerisinde önceden oluşturulmuş kuyucuklara yüklenir (Şekil 1.9.) ve akım uygulanır. DNA ve RNA’ nın fosfat omurgası negatif yüklü olduğundan dolayı bir elektrik alana yerleştirildiklerinde nükleik asit parçaları pozitif yüklü olan anoda doğru hareket eder. DNA değişmeyen bir kütle/yük oranına sahip olduğu için DNA parçaları, agaroz jel içerisinde molekül ağırlıklarının logaritması ile ters orantılı bir şekilde ilerlerler. DNA’ nın jel boyunca yaptığı hareket, DNA molekülünün boyutuna, agaroz derişimine, DNA’ nın konformasyonuna, uygulanan voltaja, DNA’ ya bağlanan etidyum bromür gibi boyaların varlığına, agarozun türüne ve elektroforez tamponuna bağlıdır. Agaroz jel elektroforezinde, incelenecek örneklere yükleme tamponu eklenerek örnekler kuyucuklara yüklenir. Yükleme tamponunun üç önemli görevi vardır: Birincisi örneğe yoğunluk verir ve bu şekilde örneğin jel kuyucuğunun içerisine batmasını sağlar. İkincisi, yükleme tamponu renklidir ve yükleme işlemini kolaylaştırır. Son olarak içerdikleri boya jel

boyunca standart oranlarda hareket eder ki bu DNA parçalarının hareket etmiş oldukları uzaklığı tahmin etmeye yarar.



Şekil 1.9. Agaroz jele DNA örneklerinin yüklenmesi

Yirmibeş kilobazdan büyük DNA'ları ayırmak için Değişken alanlı jel elektroforezi (Pulsed field gel electrophoresis, PFGE) kullanılmasına gereksinim duyulur. 100 bç'den küçük DNA parçaları ise poliakrilamid jeller kullanılarak daha iyi ayrılır. Ayrımdan sonra DNA molekülleri uygun boya ile boyanıp mor ötesi (ultraviyole) ışığı ile gözlenebilir (Lee *et al.* 2012).



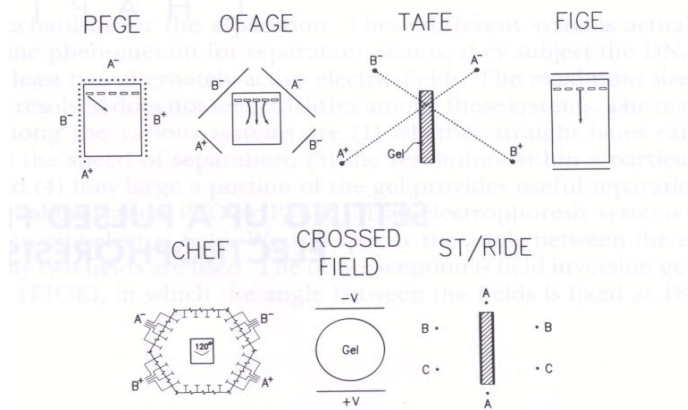
Şekil 1.10. Etidyum bromür ile boyanmış DNA moleküllerinin agaroz jel elektroforezinden sonra morötesi ışığı ile alınan görüntüsü (Lee *et al.* 2012)

2.5.2. Değişken alanlı jel elektroforezi

Geleneksel agaroz elektroforez yönteminin klasik ayırma sınırı 20kb kadardır. Daha düşük agaroz konsantrasyonları (%0,1 gibi) ve düşük voltaj uygulayarak bu sınır 50 kb' a kadar

çıkarılabilese bile daha büyük DNA parçacıkları klasik agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılamamaktadır (Kocagöz vd 2009). Bu problem 1984'te geliştirilen ve 5 Mb boyutundaki DNA parçalarını dahi ayırabilen “değişken alanlı” jel elektroforezi tekniği ile ortadan kaldırılmıştır. Bu yöntemde jele yönü değişen elektrik alanları uygulanmaktadır. DNA molekülü ne kadar büyükse elektrik alanının yönüne göre tekrar yönlenmesi o kadar uzun zaman almaktadır. Bu şekilde moleküller büyüklüklerine göre ayrılırlar. Sonuçta küçük moleküller elektriksel alan değişikliklerine daha çabuk uyum sağladıkları için daha hızlı hareket ederler. Bu sistemde dikey elektrotların yanında farklı konfigürasyonlarda elektrotlar da kullanılmaktadır. Bu yöntemle kromozomları jelde ayrı ayrı görebilmek olanaklıdır (Anonim 2012n).

Değişken alanlı elektroforezde elektrik farklı elektrot çiftleri ya da sıralarına, sırayla uygulanmaktadır. Böylece elektroforetik alan sürekli yön değiştirmektedir. Yön değişikliği 105 dereceden 180 dereceye kadar değişebilir ve hareket devam etmeden önce moleküllerin her döngü boyunca yeni elektriksel alanın yönüne uygun olarak kendilerini yeniden düzenlemeleri gerekmektedir (Burtis *et al.* 1986). Birçok değişken alan jel elektroforezi yöntemi vardır ve uygulanan tekniğe göre isimlendirilmiştir. Elektriksel alanın açıları, elektrotların yönleri, sayıları ve açılıp kapanma sıraları değiştirilerek geliştirilen bu tekniklerden bazıları “Field-Inversion Gel Electrophoresis” (FIGE), “Transverse-Alternating Field Gel Electrophoresis” (TAFE), “Contour Clamped Homogeneous Electric Fields” (CHEF), “Orthogonal-Field Alternation Gel Electrophoresis” (OFAGE), “Rotating Gel Electrophoresis” (RGE) ve “Programmable Autonomously Controlled Electrodes” (PACE)’dir (Basım ve Basım 2000).



Şekil 1.11. Değişken alanlı jel elektroforezi çeşitleri (Anonim 2012o)

2.6. Nükleik Asit Boyaları

Elektroforez sonrasında moleküllerin uygun boyalar ile boyanarak görülebilir hale getirilmesi gerekmektedir. Birçok nükleik asit ve protein boyama yöntemi bulunmaktadır. Nükleik asit boyalarından bazıları elektroforez esnasında örnek ile birlikte jele yüklenebilmektedir, bazı boyalar ise elektroforez sonrasında jelin boyanması için kullanılmaktadır. Çoğunlukla jel boyama şeklinde kullanılmak üzere, nükleik asitlere bağlanan birçok boya geliştirilmiştir. “Blue View”, metilen mavisi, etidyum bromür, “SYBR Green I”, “SYBR Green II”, pironin Y, “DAPI” ve akridin turuncusu nükleik asit boyalarından bazılarıdır (Anonim 2012p).

2.6.1. Etidyum bromür (EtBr) ile görüntüleme

EtBr nükleik asitlerin baz çiftleri arasına interkalasyon yaparak morötesi ışığı altında kırmızı-turuncu floresans veren bir boyadır. 5 nanogramdan küçük miktardaki DNA’ların saptanmasını sağlamaktadır (Ausubel *et al.* 2003). Agaroz jel elektroforezinde bazen DNA parçalarının ayrılması sırasında yürütme tamponuna eklenir. Bu şekilde DNA moleküllerinin ayrılma biçimi gözlenebilmektedir. EtBr boyasının bağlanması DNA’ nın yükü, ağırlığı, konformasyonu ve esnekliğini değiştirir (Sigmon and Larcom 1996). EtBr potansiyel mutajendir (Anonim 2012r).

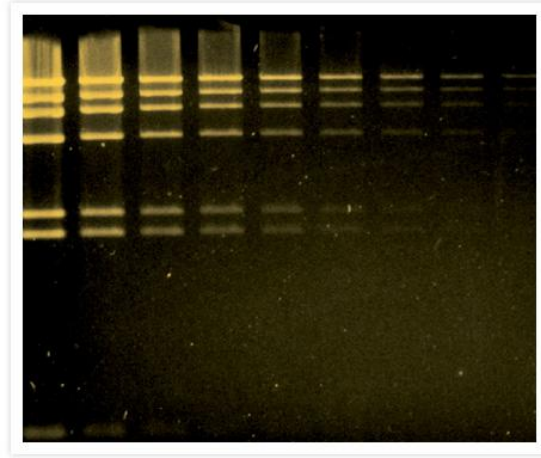
2.6.2. SYBR green I

SYBR boyaları (Molecular Probes Inc.) DNA’nın küçük oluşuna bağlanır. SYBR green I nükleik asit jel boyası agaroz ve poliakrilamid jellerde çift zincirli DNA’nın görüntülenmesi için geliştirilmiş boyalardan biridir. 300 nanometre dalga boylu ışık ile transillüminasyon sonucunda 60 pikogram kadar kısa çift zincirli DNA bantları bu boya ile görüntülenebilmektedir. Oligonükleotitler için de bu boya kullanılabilir. Tek zincirli DNA ve RNA için hassaslığı daha düşük olduğundan dolayı çift zincirli DNA’ nın görülmesi için daha uygundur. Ön boyama ve elektroforez sonrası boyama şeklinde kullanılabilirdiği gibi kapiller elektroforez sonrası ayrılmış DNA’ları boyamak için de kullanılmaktadır. En fazla 497 nanometrede uyarılır; 290 ve 380 nanometre civarlarında

ikincil uyarım tepeleri de bulunmaktadır. DNA'ya bağlandığında 520 nanometrede floresan salınım göstermektedir. Bu spektrum karakteristikleri morötesi epi- ve transillüminasyon'dan argon lazer ve civa ark lambalı jel tarayıcılarına kadar geniş yelpazedeki jel okuma araçları ile uyumluluğunu sağlamaktadır (Molecular Probes Inc. 2006a).

2.6.3. SYBR gold

SYBR gold (Molecular Probes Inc.) floresan boyası standart mor ötesi aydınlatma kullanılarak tek veya çift zincirli DNA ya da RNA'yı elektroforez jellerinde saptamakta kullanılan, SYBR Green boyasından daha duyarlı olan bir nükleik asit jel boyasıdır. Asimetrik bir cyanin boyasıdır ve nükleik asitlere bağlandığında floresans miktarı 1000 katına ulaşmaktadır. Boya-nükleik asit kompleksleri için salınım maksimumu görülebilir alanda 495 nanometre, UV'de ise 300 nanometredir. (Molecular Probes Inc. 2006b)



Şekil 1.12. SYBR gold boyası ile boyanmış nükleik asit bantlarının görüntüsü (Anonim 2012s)

2.6.4. Akridin turuncusu

Akridin turuncusu bakterilerin nükleik asitlerine bağlanan ve onları turuncu renge boyayan bir florokromdur. Mavi ışıkla uyarıldığında düşük pH'da (pH:3,5) insan hücrelerini yeşil, diğer organizmaları turuncuya boyayarak floresan mikroskopta görülmelerini sağlamak

amacıyla kullanılmaktadır (Mirrett 1982). Akridin turuncusu pH: 8,4 te turuncu renk veren bir floresan pH indikatörüdür ve pH: 10,4'de yeşil floresans vermektedir. DNA ve RNA'yı fiksasyon yapılmamış hücrelerin içerisinde boyamak için kullanılabilir. Akridin turuncusu-DNA kompleksi 480 nanometrede uyarılmakta ve 510 nanometrede floresans vermektedir. Akridin turuncusu - RNA kompleksi ise 440-470 nanometrede uyarılmakta ve 510 nanometrede floresan ışık yaymaktadır. Bu boya ayrıca tümör hücrelerini seçici olarak boyamaktadır. RNA ve DNA'yı poliakrilamit jellerde boyamak amacıyla kullanıldığında morötesi ışığa gerek duymadan bantlar çoğunlukla turuncu-kırmızı renkte görünür hale gelmektedir. Morötesi ışık (254nm) kullanıldığında çift zincirli nükleotitler parlak yeşil bantlar şeklinde, tek zincirli nükleotitler ise parlak kırmızımsı turuncu renkte görülmektedirler (Sigma-Aldrich Inc. 2012).

2.7. Protein Elektroforez Çeşitleri

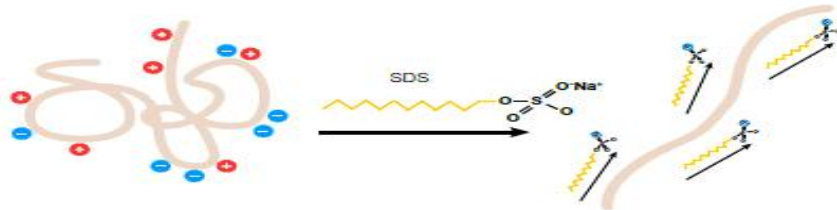
2.7.1. Denatüre etmeyen (Native) poliakrilamit jel elektroforezi

TBE tamponu kullanılarak nükleik asitlerin ayrımı için uygulanabildiği gibi (Anonim 2012t) genellikle proteinlerin elektroforezi için kullanılan bir yöntemdir. Deterjanlar ya da üre gibi denatüranların kullanılmadığı denatüre etmeyen ya da "native" elektroforez, proteinin doğal boyutu, altünite yapısı ve optimal ayrımını tespit etmek için sıklıkla başvurulan bir yöntemdir. Jeldeki hareket proteinin boyutuna, şekline ve iç yüküne bağlı olduğu için denatüre etmeyen elektroforez çoğunlukla proteinin boyutuna (ağırlığına) bağlı olan denatüre edici SDS-PAGE ve yüküne bağlı olan izoelektrik odaklama (isoelectric focusing, IEF) tekniklerinden daha farklı ayırma parametrelerine olan gereksinimi karşılamaktadır. Proteinlerin denatüre etmeyen elektroforezde ayrımında denatüre edici jeller için kullanılan aygıtların aynısı kullanılmaktadır (Ausubel *et al.* 2003). Proteinlerin doğal koşullarında elektroforezinin gerçekleştirebilmesi için en kolay yöntem Mc Lellan tarafından oluşturulmuş tampon çözelti setidir. Mc Lellan'ın tamponları her biri göreceli olarak düşük iletkenliğe sahip olan pH: 3,8 ila 10,2 arasında değişen tamponlardır (Garfin 2003). Denatüre etmeyen elektroforezde (denatürasyon olmadığı için) tüm molekül ağırlığı, izoformların sayısı ve çok birimli proteinlerin varlığı gibi özellikler saptanmaktadır. Denatüre etmeyen koşullarda elektroforezin başarısı büyük oranda proteinin çözünürlük özelliği ve izoelektrik noktasına bağlıdır. Proteinin jelin içerisinde

hareket edebilmesi için, jelin pH'ında ve iyonik gücünde çözünür olması ve ortamın pH'ında yüklü bir durumda bulunması gerekmektedir. Protein izoelektrik noktasından daha düşük pH'da bulunursa net pozitif yüke sahip olacak ve negatif elektroda doğru hareket edecektir. Bu durum SDS-PAGE tekniğinin tersidir. Protein eğer izoelektrik noktasının üzerindeki bir pH'da olursa net negatif yüklü olacak ve pozitif elektroda doğru hareket edecektir. Proteinin doğal büyüklüğünü ölçebilmek için ilk olarak nişasta jelleri için (Ferguson 1964) daha sonra poliakrilamit jeller için tanımlanmış (Hedrick and Smith, 1968) Ferguson grafikleri kullanılmaktadır. Ferguson grafikleri birkaç farklı jel derişimi kullanılarak denatüre etmeyen koşullarda proteinlerin elektroforezle ayrımı yapılarak hazırlanmaktadır (Ausubel *et al.* 2003).

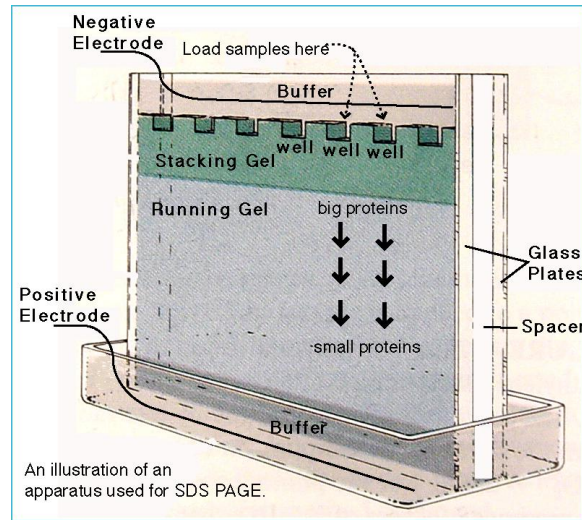
2.7.2. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) hem asidik hem alkalın çözeltilerde etkili olan anyonik bir deterjandır. Birçok uygulama alanı vardır ancak en sık protein ve yağların çözünmesinde kullanılmaktadır (Anonim 2012u). SDS protein ve polipeptit zincirlerinin moleköl ağırlıklarının ölçülmesinde yararlı bir araçtır (Shapiro and Maizel 1969). Proteinler SDS ve denatüre edici ajanların varlığında tamamen denatüre olmakta ve birbirinden ayrılmaktadırlar. SDS proteinlere kovalan olmayan bağlarla bağlanır, negatif yüklü olduğundan dolayı kendisine bağlanan proteinin iç yükünü maskeler ve protein üzerinde net negatif yük oluşturur. Proteinlerin 1 gramı başına 1,4 gram SDS (stokiyometrik olarak yaklaşık iki aminoasit başına bir SDS molekölü) bağlanarak bir karışım içerisindeki bütün proteinler için benzer kütle-yük oranı sağlamaktadır. Proteinlerin karmaşık üç boyutlu yapılarının bozularak, uzun çubuk şeklinde açılmalarını sağlamaktadır. Sonuç olarak SDS ile kaplanmış proteinlerin elektroforezdeki hareket miktarı öncelikle boyutlarına bağlıdır, bu da moleköl ağırlığının saptanmasını sağlamaktadır (Anonim 2012ü).



Şekil 1.13. SDS' in proteinin şekli ve yükü üzerindeki etkisi

Denatüre etmeyen PAGE sistemlerinin kısıtlamalarını ortadan kaldırmak amacıyla Laemmli (1970) SDS'i kesikli denatüre edici tampon sistemiyle birleştirerek protein elektroforezinin en çok kullanılan şekli olan SDS-PAGE yöntemini geliştirmiştir. Kesikli jel sistemi her protein örneğini dar bantlara yoğunlaştırmaktadır. Bu sistemde örnek ilk olarak büyük gözenekli olan biriktirici (stacking) jelin içinden geçer. Biriktirici jelin tampon çözeltisi öncü iyonlar denilen klor iyonları içerir, bu iyonların elektroforetik hareketliliği örneğin içindeki proteinin hareketliliğinden daha büyüktür. Elektroforez tampon çözeltisi ise soncu iyonlar denilen glisin iyonları içerir. Bu iyonların elektroforetik hareketliliği, örneğin içindeki proteinlerin hareketliliğinden daha azdır. Net sonuç, hızlı hareket eden iyonlar kendileri ile proteinler arasında bir alan bırakırlar. Bu alandaki yüksek voltaj gradiyenti proteinlerin daha hızlı hareket etmesine ve öncü ile soncu iyonlar arasında yığılmasını sağlar. Biriktirici jelden ayrıldıktan sonra proteinler ayırıcı jele girer. Ayırıcı jel daha küçük porlara ve daha yüksek tuz derişimine sahiptir ve biriktirici jel ile karşılaştırıldığında daha yüksek pH'a sahiptir. Ayırıcı jelde glisin iyonları proteinleri geçecek şekilde hareket eder ve proteinler denatüre edici (SDS içeren) jelde molekül ağırlığına göre ayrılırlar (Ausubel *et al.* 2003). SDS-PAGE'de üç önemli akım taşıyan anyon vardır. Birincisi biriktirici jelin üzerinde ve ayırıcı jelin altında bulunan Tris-glisin tamponu, ikincisi örnek yükleme tamponunun, biriktirici ve ayırıcı jellerin içindeki Tris-Cl tamponu ve üçüncüsü SDS/Protein miselleridir (Anonim 2012v).



Şekil 1.14. SDS-PAGE (Anonim 2012x)

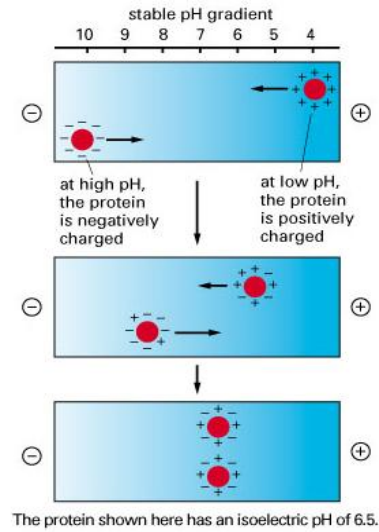
Poliakrilamit jeller, ayırıcı (resolving ya da running) jel ve üzerinde biriktirici jel olacak şekilde hazırlanır ve elektroforez aygıtı tarafından sıkıca kapatılır (Garfin, 2003). Jeller genellikle iki cam tabaka arasında, bir jel dökme kabı içinde hazırlanıp, üzerine örnek kuyucuklarını oluşturması amacıyla bir tarak yerleştirilerek polimerizasyona bırakılmaktadır. Jel polimerleştikten sonra üzerindeki tarak çıkarılarak elektroforeze hazırlanır (Anonim 2012y). Proteinler SDS ile kaynatılıp çözünür hale getirildikten sonra protein çözeltisi jel kuyucuklarına yüklenir ve proteinler elektroforetik olarak ayrılır. Genellikle 0,75 mm kalınlığındaki jellere (16 cm, 10 kuyucuk) 20 mikrolitreden daha az toplam hacim içinde bulunan 30 ila 50 mikrogram protein karışımı yüklenir (Ausubel *et al.* 2003). Proteinlerin çoğu %5 ila %15 oranında akrilamit ve %0,2 ila %0,5 oranında bisakrilamit içeren poliakrilamit jellerde ayrılabilir. Elektroforez sırasında proteini SDS ile doyurmak için katot tamponunun içindeki %0,1'lik SDS miktarı yeterli olmaktadır (Garfin, 2003). Deney amacına ve örneğin yapısına göre SDS-PAGE de kullanılan birçok farklı tampon sistemi kullanılmaktadır. Anot ve katotta kullanılacak tamponlar aynı ya da farklı olabilir (Anonim 2012y). Jelde, örnek ve elektrot haznesinde (sabit pH'daki) aynı tamponun kullanıldığı sürekli tampon sistemleri ¹ daha çok nükleik asit analizinde kullanılmakla beraber nadiren protein elektroforezinde de kullanılmaktadır (Anonim 2012ü).

2.7.3 İzoelektrik odaklama (Isoelectric focusing, IEF) jel elektroforezi

IEF, dengelenmiş bir pH gradiyenti içersinde proteinleri izoelektrik noktalarına (PI) göre ayıran bir elektroforez yöntemidir (Walker 2002). Herhangi bir proteinin net yükü bütün pozitif ve negatif yüklerinin toplamıdır. Bu yükler proteini oluşturan aminoasit ve yan grupların asidik ve bazik yan zincirleri tarafından belirlenmektedir. Bir proteindeki asidik gruplar bazik grupların sayısını aşarsa, proteinin PI'si düşük pH değerinde olmakta ve protein asidik olarak sınıflandırılmaktadır. Proteindeki bazik gruplar asidik grupların sayısını geçerse, PI yüksek olur ve protein bazik olarak sınıflandırılmaktadır. Proteinler izoelektrik noktalarından düşük pH' lardaki çözeltilerde pozitif yüklü, yüksek pH'lı çözeltilerde ise negatif yüklüdür. Bu nedenle elektroforez sırasında bir protein, izoelektrik noktasının altındaki bir pH değerinde katoda doğru, izoelektrik noktasının üstündeki pH değerinde ise anoda doğru hareket eder. İzoelektrik noktasındaki, net elektrik yükü sıfır

¹ Jel içinde ve elektrot haznesinde aynı tamponun kullanıldığı bu çalışmada sürekli tampon sistemi uygulanmıştır.

olan bir protein, elektrik alanında hareket etmez (Garfin, 2003). IEF yöntemi bir taşıyıcı amfolit karışımı (düşük molekül ağırlıklı sentetik poliamino-polikarboksilik asitler) içeren bir jel (genellikle poliakrilamid jeldir ancak agaroz jel de kullanılabilir) oluşturmayı gerektirmektedir. Poliakrilamid jel kullanılacaksa daha büyük gözenekli olması için düşük yüzdeli jel (yaklaşık %4 poliakrilamid) yapılmaktadır. Jele elektrik alan uygulandığında taşıyıcı amfolitler anottan katoda doğru yükselen pI oluşturacak şekilde düzenlenirler. En asidik olan amfolit anoda, en bazik olan da katoda doğru ilerler (Öner 2012). Her taşıyıcı amfolit kendi pI'sine karşılık gelecek şekilde yerel bir pH sağlar, böylece jel boyunca düzgün bir pH gradiyenti oluşur. Daha sonra protein örneği jelin yüzeyine, jelin içine difüze olacağı yere, uygulandığında kendi izoelektrik noktasına karşı gelen pH'ı sağlayan gradiyent bölgesine ulaşana kadar elektrik alanın etkisinde hareket eder. Bu pH'da proteinin net yükü yoktur ve o noktada protein hareketsiz kalır (Walker 2002). En son aşamada protein bantlarının gözlenmesi için boyama yapılır fakat boyamanın olması için öncelikle jelden amfolitlerin uzaklaştırılması gerekir. Çünkü amfolitler jelin tamamen boyanmasına neden olmaktadır (Öner 2012).



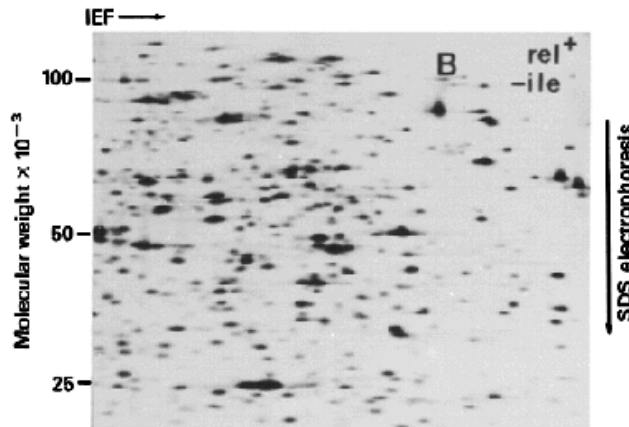
Şekil 1.15. İzoelektrik odaklama jel elektroforezi. (Anonim 2012z)

2.7.4. İki boyutlu (Two-dimensional, 2D) Jel elektroforezi

İki boyutlu jel elektroforezi proteomik çalışmalarında en çok kullanılan tekniklerden biridir (Alzate 2010). İki yüksek çözünürlüklü elektroforez işlemi, izoelektrik odaklama ve SDS-PAGE, O'farrel'in 1975'deki çalışmasıyla bir araya getirilmiştir (Ausubel *et al.* 2003).

Proteinlerin izoelektrik odaklama (IEF, ilk boyut) ile ayrılmasını SDS-PAGE izler. Bu teknik ile bir jelde 10.000 kadar ayrılmış protein noktacığının saptanabildiğinin gösterilmesiyle yüksek çözünürlüklü proteomik incelemesi gerçekleştirilebilir hale gelmiştir.

IEF jeli ya da bandı SDS ile dengelenir ve SDS-PAGE jelinin üst kısmına yerleştirilir. Bu dengeleme adımı SDS moleküllerinin proteinlerle birleşerek net negatif yüklü anyonik kompleksleri üretmesini sağladığı için gereklidir. Elektriksel itişin bir sonucu olarak proteinler IEF jelinden dışarı, molekül ağırlıklarına göre ayrılacakları SDS jelinin içine doğru hareket ederler. Birçok uygulama denatüre edici SDS-PAGE yöntemini kullansa da denatüre etmeyen koşullarda proteinleri ayırma yaklaşımları da zaman zaman kullanılabilir (Alzate 2010).



Şekil 1.16. İki boyutlu jel elektroforezinde protein noktacıkları (Anonim 2012aa)

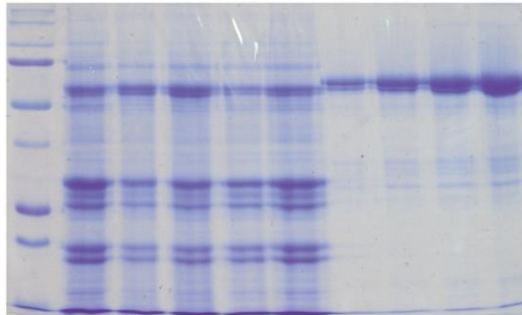
2.8. Protein Boyama Yöntemleri

Proteinlerin jeldeki konumu Coomassie mavisini ya da gümüş boyama yöntemi ile belirlenebilmektedir. Coomassie mavisini ile boyama daha kolay ve hızlıdır ancak gümüş boyama yöntemi önemli ölçüde daha duyarlıdır ve bu nedenle daha düşük miktardaki proteinleri saptamak için kullanılabilir. Floresan boyama yöntemleri geleneksel boyama yöntemlerine alternatif olarak popüler hale gelmeye başlamıştır. Bunun temel nedeni neredeyse gümüş boyama yöntemi kadar duyarlı olmalarıdır. SYPRO Orange ve SYPRO

Red, proteinleri SDS-Poliakrilamit jellerde saptamayı sağlayan floresan boyalardan bazılarıdır. Fosforillenmiş ve glikozillenmiş proteinleri gözlemek için ek floresan teknikler geliştirilmiştir (Ausubel *et al.* 2003). Bu tekniklerin dışında proteinlere lizin ve sistein aminoasitlerinin belirli grupları aracılığıyla kovalan olarak boyalar ile saptamaya dayanan teknikler de bulunmaktadır (Hawe *et al.* 2007). Proteinleri çeşitli aminoasit ve yan gruplarından etiketlemek için NHS-Rhodamine (Thermo Scientific) ve Fluorescein isothiocyanate (FITC) Protein etiketleme kitleri (Molecular Probes Inc.) gibi kitler üretilmiştir (Thermo Scientific 2008, Molecular Probes Inc 2011). Protein karakterizasyonu için bir diğer önemli boya Nil kırmızısıdır. İlk olarak hücrelerarası yağ damlacıklarının saptanmasında kısa bir süre sonra da farklı proteinlerin konformasyonel değişimlerini gözlemek için kullanılmıştır (Hawe *et al.* 2007).

2.8.1. Coomassie mavisi ile boyama yöntemi

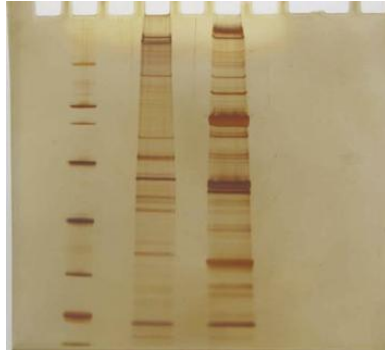
Proteinlerin jelde görüntülenmesi için en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Jelde yürütülmüş proteinlere “Coomassie brilliant blue R” boyasının özgül olmayan bir şekilde bağlanması temeline dayanmaktadır. Saptama sınırı protein bandı başına 0,3 ila 1 μg 'dır. Bu yöntemde poliakrilamit jelde ayrılmış proteinler metanol ve asetik asit içeren çözelti kullanılarak sabitlenir. Önce proteinler bütün jeli mavi renge boyayan Coomassie mavisi ile birlikte boyanır. Boyanın proteinlere bağlanmayan kısmı, metanol içeren çözeltiler ile temizlenir. Boya uzaklaştırma (destaining) işleminden sonra maviye boyanmış protein bantları görünür hale gelir. Jel asetik asit, ya da suyun içinde saklanabilir, fotoğraflanabilir ya da kalıcı bir kayıt için kurutulabilir.



Şekil 1.17. Coomassie mavisi ile boyanmış bir poliakrilamit jelin fotoğrafı (Anonim 2012ab)

2.8.2. Gümüş boyama yöntemi

Gümüşün görüntü oluşturabilme özelliği 17. yüzyılın ortalarında keşfedilmiş ve fotoğrafçılığın gelişiminde etkili olmuştur. Daha sonra gümüş histolojik yöntemlerde kullanılmaya başlamıştır. Jel elektroforezi sonrasında proteinlerin saptanması için gümüş boyama ilk olarak 1979 yılında Switzer *et al.* tarafından bildirilmiştir (Walker 2002). Gümüş boyama yönteminde jel çözünür gümüş iyonlarıyla muamele edilmekte ve bu sırada gümüş iyonlarının kahverengi çökelti halindeki metalik gümüşe dönüşümünü engellemek amacıyla formaldehit kullanılmaktadır (Wenk and Fernandis 2007). Gümüş proteinlerdeki çeşitli kimyasal gruplara (sülfidril, karboksil grubu gibi) bağlanır. Saptama sınırı protein bandı başına 2 ila 5 nanogramdır. Metanol/asetik asit ve glutaraldehit kullanılarak proteinler, jel içinde görünür hale getirilir. Bu maddeler eklendikten sonra protein bantları kararmaya başlar. İstenilen oranda koyulaşma gerçekleştiğinde jel sabitlenir, fotoğraflanır ve kurutulur (Ausubel *et al.* 2003).



Şekil 1.18. Gümüş boyama yöntemi ile boyanmış poliakrilamit jel (Anonim 2012ac)

2.8.3. SYPRO Orange ve SYPRO Red boyama yöntemi

SYPRO Orange ve SYPRO Red boya ları minijel üzerindeki 4-8 nanogram protein içeren bantların saptanmasını sağlayabilmektedir. Coomassie mavisi ile boyama yönteminden daha yüksek duyarlılığa sahiptir ve birçok gümüş boyama tekniği kadar duyarlıdır. Elektroforezden sonra jel boyanır, durulanır ve fotoğraflanır. Boyanmış proteinler standart 300nm morötesi transillüminatör ya da lazer tarayıcılar yardımıyla görüntülenebilir. SYPRO Orange ve SYPRO Red boya ları jeldeki protein çevresinde oluşan SDS tabakası

ile etkileşim göstermektedir. Bu nedenle Coomassie yöntemine göre, farklı proteinler arasında daha istikrarlı boyama sağlamaktadır. Negatif boyama görülmez ve glikoproteinleri iyi boyarlar. Hücre ya da doku kaynaklı proteinlerin hazırlanması sırasında ortaya çıkan nükleik asit ya da lipopolisakkaritleri boyamadan, molekül ağırlığı 6500 daltona kadar düşük olan proteinlerin boyanmasını sağlamaktadır. SYPRO Orange ve Red boyalarının boyama özellikleri birbirine yakındır ancak SYPRO Orange boyası daha parlaktır, SYPRO Red arkaalan floresansı vermektedir. SYPRO Orange ve red boyaları blotlama membranları üzerinde protein boyamak için uygun değildir. IEF ya da 2D jellerde protein boyandığında duyarlılık önemli ölçüde düşmektedir. Yüksek duyarlılık açısından yürütme tamponunda genellikle kullanılan %0,1 lik SDS yerine %0,05 SDS kullanılması önerilmektedir. Standart SDS-poliakrilamid jellerde örnekler yürütüldükten sonra jel, asetik asit içerisinde seyreltilmiş stok SYPRO boyası içerisinde 10 ila 60 dakika altüst edilerek bekletilir. Daha sonra durulanan jel 300nm morötesi transillüminatör ya da “Karanlık Okuyucu” (Dark Reader) (Clare Chemical) gibi mavi ışık transillüminatörü yardımıyla görüntülenebilir (Molecular Probes Inc 2003).

2.8.4. Nil kırmızısı

Protein karakterizasyonu için kullanılan önemli bir boya olan Nil kırmızısı ilk olarak hücrelerarası yağ damlacıklarının saptanması için, kısa bir süre sonra da farklı proteinlerin konformasyonel değişimlerini izlemek amacıyla kullanılmıştır (Hawe *et al.* 2007). Nötral yağların ve lipoproteinlerin varlığında yüksek floresans ve yoğun mavi renk kaymaları (intense blue shifts) göstermesi nedeniyle yağ probu olarak kullanılan Nil kırmızısı (Greenspan and Fowler 1985), Daban *et al.* (1991a, 1991b) tarafından geliştirilen bir yöntem ile SDS-poliakrilamid jellerdeki proteinleri boyamak üzere kullanılmıştır. Yöntem hidrofobik bir boya olan Nil Kırmızısı'nın (9-diethylamino-5H-benzo(alfa)phenoxazine-5-one) floresan özelliklerini temel almakta ve elektroforetik ayırmadan yaklaşık 6 dakika sonra bant başına 0,1 mikrogram fikse edilmemiş proteinin saptanmasını sağlamaktadır.

Daban *et al.* (1991a) geliştirdikleri yöntem ile Nil kırmızısının SDS miselleriyle ve SDS ile kompleks oluşturmuş proteinlerle etkileşime girebilmekte olduğunu göstermişlerdir. Nil kırmızısı suda neredeyse hiç çözünmemektedir ancak polar olmayan çözücülerin içinde ve saf SDS miselleri ve SDS-protein kompleksleri varlığında çözünmekte ve floresans

yoğunluğunda yüksek bir artış göstermektedir¹. SDS miktarının, Tris-glisin tamponunun içinde oluşan kritik SDS misel konsantrasyonundan düşük olduğu durumlarda, farklı SDS-protein komplekslerinde Nil kırmızısı floresansında artış görülmektedir (Daban *et al.* 1991a). Nil kırmızısı DMSO'da çözüldüğünde çok kararlı bir yapıdadır ama bu boya sulu çözeltilerde çökelmektedir. Nil kırmızısı DMSO, etanol ve DMF içinde çözülmekte, yaklaşık 500 nanometrede uyarılmaktadır. Salınımı en çok 600 nanometre civarındadır. Dutta *et al.* (1996) Nil kırmızısının floresan ömrünün polar solventlerde azaldığını ışına yapmama sabitinin arttığını göstermişlerdir. Diğer boyama yöntemleriyle karşılaştırıldığında Nil kırmızısı ile boyama, tek adımlı hızlı bir yöntem olması dolayısıyla avantajlı durumdadır (Hawe *et al.* 2007).

2.8.5. Protein etiketleme

Bir protein ya da ona bağlanan bir molekülün saptanması ve saflaştırılmasının kolaylaştırılması amacıyla bazı araştırmalarda moleküler etiketler kullanılmaktadır. Etiketleme biyotin, haberci enzimler, floroforlar ve radyoaktif izotoplar gibi farklı moleküllerin hedef protein ya da nükleik asitlere kovalan bağlanması ile gerçekleştirilmektedir. (Anonim 2012ad). Etiketlemenin etkinliği pH, reaktiflerin derişimi, inkübasyon zamanı ve sıcaklığı, reaktiflerin saflığı ve engelleyici maddelerin varlığı ile yakından ilişkilidir. Her protein modifikasyona karşı farklı duyarlılık göstermektedir. Bunun bir nedeni proteindeki etiketlenmeye uygun lizin aminoasidi miktarı ve bu aminoasidin makromolekülün yapısı, aktivitesi ve stabilitesine etkisidir. Genellikle proteinler pH:7'de etiketlenmelidir. Etiketleme sırasında proteinin bazik grubuyla nötral biyotin grup ya da asidik floresan grup yer değiştirmekte, bu şekilde proteinin izoelektirik noktası da değişmektedir (Molecular Devices Inc. 2010). Renkli protein molekül ağırlık standartları, birden fazla renkli boya ile kovalan olarak boyanmış olan yüksek oranda saflaştırılmış rekombinant proteinlerden oluşmaktadır (Anonim 2012ae).

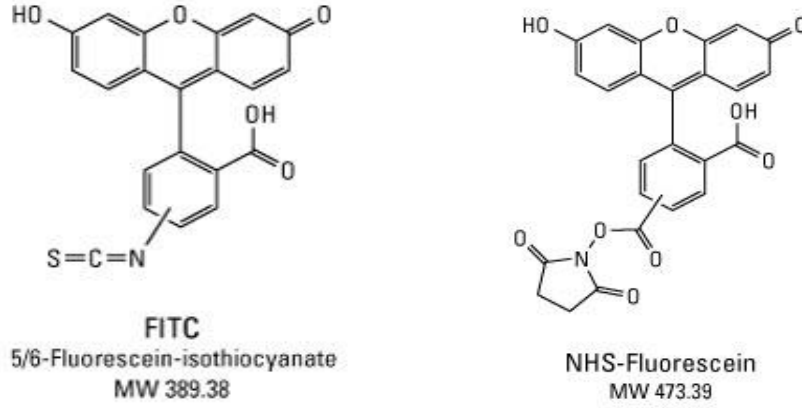
¹ Bu çalışmada Nil kırmızısı Powler and Greenspan (1985)'in çalışmalarında yer alan yöntemle hazırlanmıştır. Kurutulmuş halde elde edilen boya Daban *et al.*(1991a)'in çalışmasındaki gibi asetonda çözülerek kullanılmıştır.

2.8.5.1. Farklılık jel elektroforezi (Difference gel electrophoresis, DIGE) ile etiketleme yöntemi

Aynı jel içerisinde bulunan birçok örnek arasındaki nicel farklılıkları incelemek amacıyla proteinleri elektroforez öncesinde farklı spektral özelliklere sahip floresan boyalar ile etiketlemek için kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte birbiriyle ilişkili ancak farklı protein örneklerinin çoklu incelemesi için farklı floresan boya ile etiketli örnekler karıştırılarak, jel elektroforezine alınmaktadır. DIGE analizinde Cy5, Cy3, Cy2 gibi üç adet floresan boya ile boyanan protein örnekleri 2-D elektroforez ile ayrılmaktadır (Ausubel *et al.* 2003).

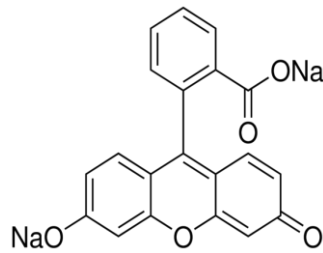
2.8.5.2 Floresein izotiyosiyanat (FITC) ve NHS-floresein etiketleri

Floresein izotiyosiyanat (FITC) ve NHS-Floresein, floresan mikroskopi, akım sitometrisinde, Western blot ve ELISA gibi immünofloresan temelli deneylerde kullanılan antikör ve prob etiketlerinde bulunan floresan boyaların amin-reaktif türevleridir. FITC yapısındaki alt zincirin üzerinde bulunan iki hidrojen atomundan biri, bir izotiyosiyanat reaktif grubuyla ($-N=C=S$) fonksiyonelleştirilmiş temel bir floresan moleküldür. Bu türev proteinler, peptitler ve diğer biyomoleküllerdeki birincil amin gruplarına karşı reaktiftir. (Anonim 2012af). FITC ile etiketlenmiş proteinlerin absorpsiyon ve emisyon maksimumları yaklaşık olarak 494 ve 518nm'dir (Molecular Probes Inc 2011). NHS-floresein ise N-hidroksi-süksinimidil ester (NHS ester) fonksiyonel grubuyla aktive edilir. FITC ile karşılaştırıldığında NHS ester türevinin diğer nükleofillerin varlığında birincil aminlere karşı daha büyük özgülüğü bulunmaktadır ve bu da etiketleme sonrasında daha kararlı bağlanmayı sağlamaktadır (Anonim 2012af).



Şekil 1.19. FITC ve NHS-Florescein molekülleri

“Molecular Devices” ’ın (2010) yönteminde immünoafinite ile saflaştırılmış keçi antikorları, saflaştırılmış fare immüoglobülin G ve BSA kullanılarak bir deney tarif edilmiştir. Bu deneyde proteinleri etiketlemek için Biotin etiket ya da Florescein etiket dimetil formamitte çözülerek proteine 20:1 oranında son molar eşleşme oranına ulaşılacak şekilde eklenmiş, daha sonra etiketlenmiş proteinler jel kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Bu çalışmada FITC türevinin elde edildiği floresan molekül içeren florescein sodyum çözeltisi belirli oranlarda dimetil formamit ile seyreltilerek doğrudan protein karışımına uygulanmış ve elektroforez sırasında proteinle etkileşimine bakılmıştır. Florescein sodyum küçük molekül yarıçapı dolayısıyla geçirgenlik ve damar perfüzyonu çalışmalarında kullanılan suda çözünebilen floresan boyadır.



Şekil.1.20. Florescein sodyum molekülü (Anonim 2012ag)

2.9. Elektroforez Sırasında ya da Sonrasında Ayrıştırılan Moleküllerin Görüntülenmesi

2.9.1. Jel görüntüleme sistemleri

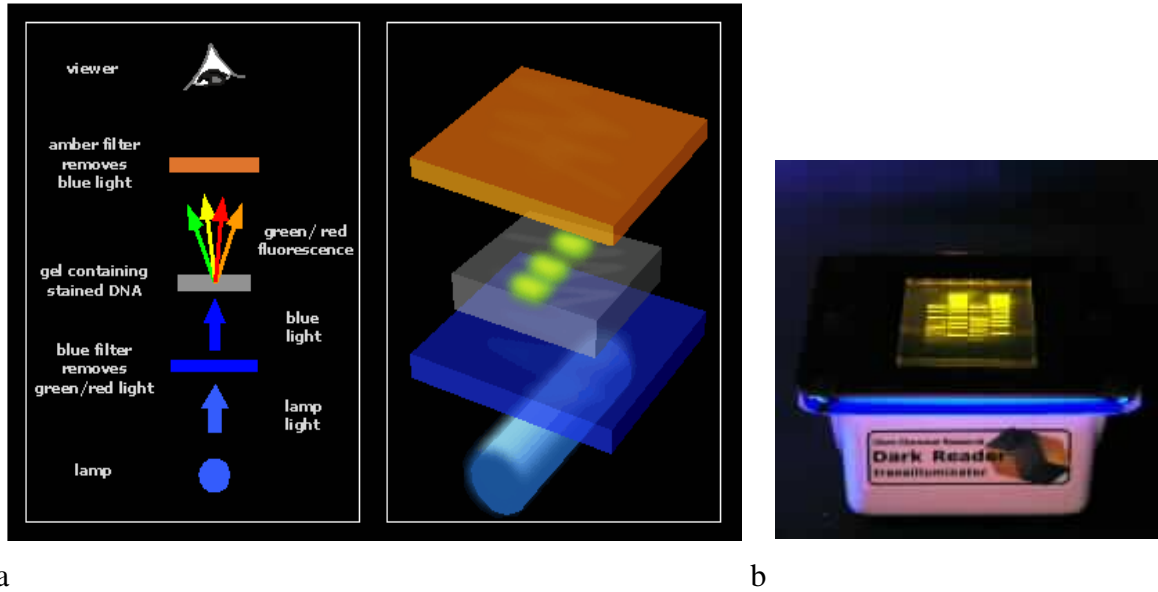
Bu sistemler çeşitli floresan ya da kovalan boylarla boyanmış protein veya nükleik asit moleküllerinin morötesi ışınlar ile ya da beyaz ışıkla uyarıldığı bir aydınlatma sistemine sahiptir. Ayrıca jelin görüntüsünün alınması amacıyla sisteme eklenen bir adet fotoğraf makinesi ya da kamera ve bantların incelendiği bir bilgisayar programı içerecek şekilde tasarlanmıştır. Elektroforez sonrasında jelin görüntülenmesini kolaylaştıran ve jellerin görüntüsünü dijital ortamda saklamaya ve belgelemeye yarayan sistemlerdir (Anonim 2012ah). Birçok biyoteknoloji şirketi tarafından geliştirilen jel görüntüleme sistemleri bulunmaktadır.



Şekil 1.21. Jel görüntüleme sistemlerine ait örnekler.

2.9.2. “Karanlık Okuyucu” (Dark Reader)

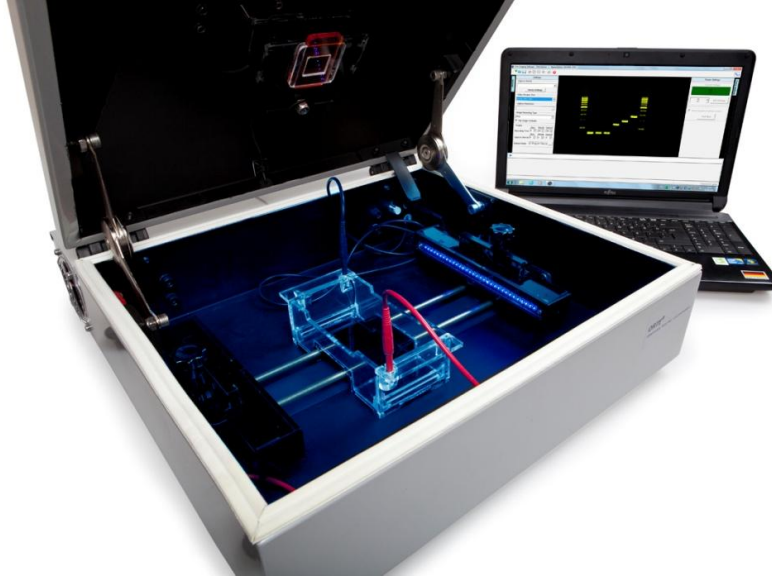
Floresan boyalı DNA, protein ve diğer biyolojik örnekleri görüntülemeye yarayan, morötesi ışıkla aydınlatmalı olmayan yeni bir patentli teknolojidir. 420-500 nanometre arasındaki floroforları uyaran, görünebilir ışığı kullanan bu aygıtla çalışabilen boyalar fluoresein, SYBR Green, SYBR Gold, AttoPhos, GelStar, Vistra Green, SYPRO Orange gibi popüler boyalar ve 500 nanometrenin üzerinde uyarılabilen rhodamin ve etidyum bromür gibi boyalardır. SYBR Gold ya da SYBR Green boyaları 75 pikogram DNA’yı çıplak gözle, 10 pikogram DNA’yı da CCD kamera kullanarak görülebilir hale getirmektedirler. “Karanlık Okuyucu” bir adet kapalı kutu içerisinde 400 ila 500 nanometre arası ışık yayan bir lamba ve kırmızı ve yeşil ışığı geçirmeyen bir filtreden oluşmaktadır (Şekil 1.22.) Sistem üzerine yerleştirilen boyanmış jel üzerindeki bantlar çeşitli filtreler kullanılarak gözle ya da fotoğraf makinesiyle yeşil ya da kırmızı renkli olarak görünmektedir (Anonim 2012aj).



Şekil 1.22. “Karanlık Okuyucu” ’nun çalışma mekanizması. Aygıt bir lamba ve kırmızı ve yeşil ışığı geçirmeyen bir filtreden oluşmaktadır (a) (Anonim 2012ak) “Karanlık Okuyucu” ile görüntülenen bir jel (b) (Anonim 2012al)

2.9.3. İzlenebilir Elektroforez (Observable Real Time Electrophoresis, ORTE)

Kocagöz ve Öktem (2009) tarafından geliştirilmiş; bilgisayar, kamera, mavi led ışık ve filtreden oluşan kapalı bir izlenebilir elektroforez sistemidir. Elektroforez işlemi sonrasında DNA moleküllerinin görüntülenmesini sağlayan etidyum bromür gibi kanserojen boyalara ve göze zararlı mor ötesi ışığına gereksinimi ortadan kaldıran bu sistemde uyarıcı ışık kaynağı olarak görünür dalga boyunda ışık veren LED lambalar ile bu dalga boyunda uyarılan floresan boyalar kullanılarak DNA bantları elektroforez sırasında görünür hale getirilmektedir (Şekil 1.23.) Bu sistem ile kaydedilen film ve jel fotoğrafları jel inceleme programları ile yorumlanabilmektedir¹.



Şekil 1.23. Bilgisayar, kamera, mavi led ışık ve filtreden oluşan izlenebilir elektroforez sistemi (ORTE)

¹ Bu çalışmada ORTE sistemi protein elektroforezinin takibinde boyalı protein standardının gözlenmesi ve proteinlerin elektroforez öncesinde floresan boyanması çalışmaları sırasında kullanılmıştır.

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar

Tezde kullanılan kimyasallar Çizelge 2.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Kimyasallar

Kimyasalın adı	Üretici firma
Tris (hidroksimetil)-aminometan	Molekula
Glasiyal asetik asit	Sigma-Aldrich
EDTA	Merck
SDS	Bio-Rad
APS	Bio-Rad
TEMED	Biomatik
Akrilamit	Biomatik
Bisakrilamit	Biomatik
Coomassie R-250	Bio-Rad
Metanol	Merck
Gliserol	Sigma Riedel-de Haen
Bromfenol Mavisi	Owl Scientific, Inc.
Agaroz	Sigma-Aldrich
Floresein Sodyum (% 10)	Alcon
Nil Mavisi	Merck
Sypro Orange	Invitrogen
Akridin Turuncusu	Merck
Dimetilformamid	Sigma-Aldrich
H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich
Aseton	Sigma-Aldrich
Ksilen	Sigma-Aldrich
HCl	Sigma-Aldrich

3.1.2. Proteinler ve protein standartları

Tezde kullanılan proteinler ve protein standartları çizelge 2.2.'de sunulmuştur.

Çizelge 2.2. Proteinler ve protein standartları

Proteinler ve protein standartları	Üretici firma
BSA	Sigma-Aldrich
RNAz A (17,500 Ünite)	QIAamp DNA Mini Kit
Dual XTRA Boyalı protein molekül ağırlık standardı	Bio-Rad
Page Ruler Boyasız protein molekül ağırlık standardı	Bio-Rad

3.1.3. Jel görüntüleme aygıtları

Tezde kullanılan jel görüntüleme aygıtları çizelge 2.3.'de sunulmuştur.

Çizelge 2.3. Jel görüntüleme aygıtları

Aygıt	Üretici firma
Fotoğraf Makinası	Kodak Easysshare C433
Transilluminator	UVP White/Ultraviolet Transilluminator
ORTE	Salubris A.Ş.

3.1.4. Elektroforez gereçleri ve diğer gereçler

Tezde kullanılan elektroforez gereçleri ve diğer gereçler çizelge 2.4.'de sunulmuştur.

Çizelge 2.4. Elektroforez gereçleri ve diğer gereçler

Elektroforez gereçleri ve diğer gereçler	Temin edilen yer
Elektroforez Tankı	Acıbadem Üniversitesi Laboratuvarı
Güç Kaynağı	Acıbadem Üniversitesi Laboratuvarı
Mikrodalga Fırın	Acıbadem Üniversitesi Laboratuvarı
Manyetik Karıştırıcı	Acıbadem Üniversitesi Laboratuvarı

3.2. Yöntem

3.2.1. Tampon çözeltiler, jel bileşenleri ve boya çözeltilerinin hazırlanması

3.2.1.1. 10x Elektroforez yürütme tamponu

7,575 g Tris baz, 36 g glisin ve 2,5 g SDS tartılarak deiyonize su ile 500 ml'ye tamamlanmış, manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözümleri sağlanmıştır. Çalışmalar sırasında istenen miktarlarda 1x'e seyreltilerek kullanılmıştır.

3.2.1.2. 50x TAE tampon çözeltisi

242 g Tris baz, 100 ml 0,5M Na₂ EDTA (pH :8.0), 57,1 ml Glasiyel asetik asit, damıtık su ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve 1X'e seyreltilerek deneylerde kullanılmıştır.

3.2.1.3. 1,5M Tris pH: 8,9

36,34 g Tris, 150 ml damıtık suda çözülüp, HCl ile pH: 8,9' a getirildikten sonra damıtık su ile 200 ml'ye tamamlanmıştır.

3.2.1.4. %10 SDS

2,5 g SDS, 25 ml deiyonize suda çözülerek hazırlanmıştır.

3.2.1.5. %1 APS

0,03 g toz APS tartılarak bir mikrosantrifüj tüpüne alınmış, 0,3 ml suda pipetaj yapılarak çözülmüş ve her deney öncesi taze hazırlanmıştır.

3.2.1.6 .%30 Akrilamit çözeltilisi

30 g Akrilamit ve 0,8 g bisakrilamit 100 ml suda çözülerek standart bir filtre kağıdından süzölmüştür.

3.2.1.7. 1xTAE-%0.1 SDS Elektroforez tamponu

1 gram SDS, 1000 ml 1X TAE tamponunda çözölererek hazırlanmıştır.

3.2.1.8. 4x SDS örnekleme boyası

4x SDS örnekleme boyasının içeriğı çizelge 3.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. 4x SDS Örnekleme boyasının hazırlanması

0,5 M Tris-HCl, pH:8.0:	5 ml
%50 gliserol:	8 ml
%10 SDS:	8 ml
%0,1 (w/v) Bromfenol mavisi	2ml
Damıtık su eklenerek hazırlandı	17 ml

3.2.1.9. Dimetil formamid (DMF) pH:8,86 ve DMF- Floresein sodyum karışımı

29 ml Dimetil formamit pH:13,5; 1,5 M Tris, Ph:8,9 ve 1M Tris pH:6,8 kullanılarak pH:8,86 ya getirilmiştir. Son hacim 44 ml' ye tamamlanmıştır.

9 ml DMF pH:8,86 ile 1 ml %10 Floresein sodyum karıştırılarak DMF-Floresein sodyum karışımı hazırlanmıştır.

3.2.1.10. Akridin turuncusu boyası

1ml deiyonize suyun içerisine 10 mg akridin turuncusu eklenip karıştırılarak 1 ml akridin turuncusu çözeltisi hazırlanmıştır (10 mg/ml). Hazırlanan çözelti 1/50 sulandırılarak son derişimi 0,2mg/ml olan ikinci bir akridin turuncusu çözeltisi hazırlanmış ve deneylerde kullanılmıştır.

3.2.1.11. SYPRO Orange boyası (SYPRO Orange stok çözeltisi)

200 ml %7,5 asetik asit hazırlanarak 40 µl 5000x SYPRO Orange eklenmiş ve çalkalanmıştır. Çözelti ışık almayacak şekilde +4°C'ye kaldırılmıştır. SYPRO Orange ürün bilgisi broşüründeki öneri referans alınarak, elektroforez öncesinde elektroforez tamponu (%1 SDS-1xTAE) ve boyanacak olan jel %0,1 yerine %0,05 SDS içerecek şekilde hazırlanmıştır.

3.2.1.12. Coomassie boyası ve boya uzaklaştırma çözeltisi

Boya çözeltisi:

25 ml asetik asit ve 100 ml su eklenmeden önce 0,25 g Coomassie Brilliant Blue R250 , 125 ml metanol içerisinde çözülmüştür.

Boya uzaklaştırma çözeltisi:

400 ml metanol ve 70 ml asetik asit karıştırılıp son hacim damıtık su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

3.2.1.13. Nil kırmızısı boyası

Aşağıdaki tüm işlemler çeker ocak içerisinde gerçekleştirilmiştir.

- 1) 200 mg Nil mavisi 100 ml suda çözülüp 0,5 ml H₂SO₄ eklendi. Manyetik karıştırıcıyla karıştırılarak 500 ml'lik balon joje içinde 2 saat boyunca kaynatılmıştır,
- 2) Karışım soğutulduktan sonra 5 ml ksilen karışıma eklenerek manyetik karıştırıcıda yaklaşık 10 dakika kadar karıştırıldı. Bu sırada karışımdaki boyanın bir kısmı ksilene geçerek kırmızı renk vermiştir,

- 3) Tüm karışım 100 ml' lik balon jöjeye konularak ksilen-boya karışımı pastör pipetiyle çekildi ve temiz bir tüpe aktarılmıştır,
- 4) Elde edilen 5 ml'lik karışım, (500 ml'lik) geniş bir behere konularak ısıtıcı üzerinde yavaşça ısıtıldı ve buharlaştırılarak kurutulmuştur (Bu işlem yaklaşık 15-20 dakika sürmüştür),
- 5) Ksilen buharlaşınca mor renkli bir çökelti, cama yapışmış bir vaziyette oluşmuştur,
- 6) Çökelti, toplam 15 ml aseton ile çözüldü. Beherin kuru boya içeren ağırlığı ile asetonlu boya alındıktan sonraki ağırlığının farkı hassas terazi ile ölçüldü. Yaklaşık 15 mg kuru boya elde edildiği hesaplanmıştır,
- 7) Çözme işlemi sırasında yaklaşık 5 ml aseton buharlaştı. Yaklaşık 10 ml aseton içinde 15 miligram boya olduğu ve boya derişiminin yaklaşık 1,5 mg/ml olduğu hesaplanmıştır.

3.2.2. SDS'li yatay poliakrilamit jelin hazırlanması

3.2.2.1. Değişen agaroz derişimleri (0-200mg) ile yatay SDS-Poliakrilamit jel hazırlanması

Çizelge 3.2. Hacmi: 50 ml, Akriilamit derişimi %6 olan agarozlu yatay SDS-poliakrilamit jelin bileşenleri

Jel Bileşenleri	Miktar
%30 akrilamit çözeltisi	10 ml
1,5M Tris pH: 8,9	7,5 ml
% 10 SDS	0,5 ml
% 10 APS	0,5 ml
TEMED	30 µl
Agaroz	0-200 mg
1,5 M Tris pH: 8,9 (Agarozu eritmek için)	5ml
Deiyonize su	26,5 ml

TEMED, agaroz ve su hariç diğer bileşenler tabloda belirtilen miktarlarda olmak üzere 50ml'lik bir plastik santrifüj tüpünde karıştırılmıştır. Agaroz, deiyonize suyun içinde bir sığağa dayanıklı şişede (Schott) mikrodalga fırında ısıtılarak eritilmiştir. Eriyen agarozun üzerine tüpteki karışım eklenmiştir. Oluşan yeni karışımın üzerine TEMED eklenerek,

zaman kaybetmeden karışım açık kenarları bant ile kapatılmış olan standart agaroz jel tabağına dökülmüştür. Bir saat boyunca laboratuvar ısısında ve üstü açık olarak polimerleşmeye bırakılmıştır (Şekil 2.1.). Kullanılan jel tabak ve tarakları agaroz jel üretiminde kullanılan standart tabak ve taraklardır.



Şekil 2.1. Polimerleşmeye bırakılmış yatay SDS-poliakrilamit jel

3.2.2.2. TAE tamponu ile yatay SDS-poliakrilamit jelin hazırlanması

Çizelge 3.3. Hacmi 23 ml, Akrilamit derişimi % 5,87 olan, TAE tamponu ile hazırlanan yatay SDS-Poliakrilamit jelin bileşenleri

Jel bileşenleri	Miktar
%30Akrilamid Çözeltisi	4,5 ml
%10SDS	0,23 ml
%10 APS	0,3 ml
TEMED	18 µl
1XTAE	18,5 ml
Toplam	20 ml

TEMED ve 1xTAE hariç diğer kimyasallar bir falcon tüpe eklenmiştir. 1x TAE sıcağı dayanıklı şişede (Schott) mikrodalga fırında kaynatılmıştır. Kaynamış 1x TAE'nin üzerine tüpteki karışım ve en son TEMED eklenerek şişe içinde polimerizasyona izin vermemek üzere karışım hızlıca jel tabağına dökülmüştür. Jel laboratuvar sıcaklığında üstü açık bir şekilde bir saat boyunca polimerizasyona bırakılmıştır. Polimeriazyon sonrasında ölçülen jel kalınlığı 3-4 mm olmuştur.

3.2.3. Örneklerin hazırlanması ve jele yüklenmesi

Deiyonize su ile 1mg/ml ve 10 mg/ml bovin serum albümin (BSA) örnekleri hazırlanmıştır.

4x SDS örnek yükleme boyası, boyanın karışımdaki son derişimi 1x olacak şekilde, yürütülecek protein örneği ile karıştırılmıştır.

Dual Xtra ve Page Ruler molekül ağırlık standartları 4x örnek yükleme boyası ile karıştırılmadan jele yüklenmiştir.

Protein ön boyama deneylerinde kullanılan boyalar, protein örnekleriyle birlikte bir mikrosantrifüj tüpünde ya da bir parafilm üzerine uygun hacimde damlatılıp örneklerle parafilm üzerinde karıştırıldıktan sonra jele yüklenmiştir.

Jele yükleme işlemi jel tampon içine yerleştirilmeden önce, dışarıda yapılmıştır.

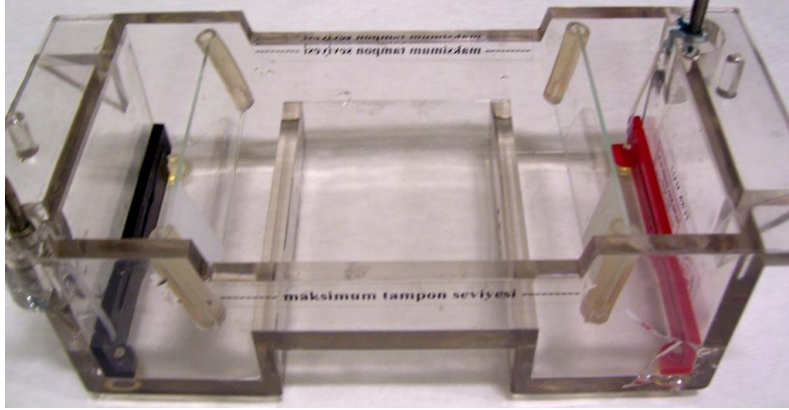
BSA örnekleri SDS ile kaynatılmadan jele uygulanmıştır.

3.2.4. ORTE ile proteinlerin yatay SDS-poliakrilamit jel elektroforezi

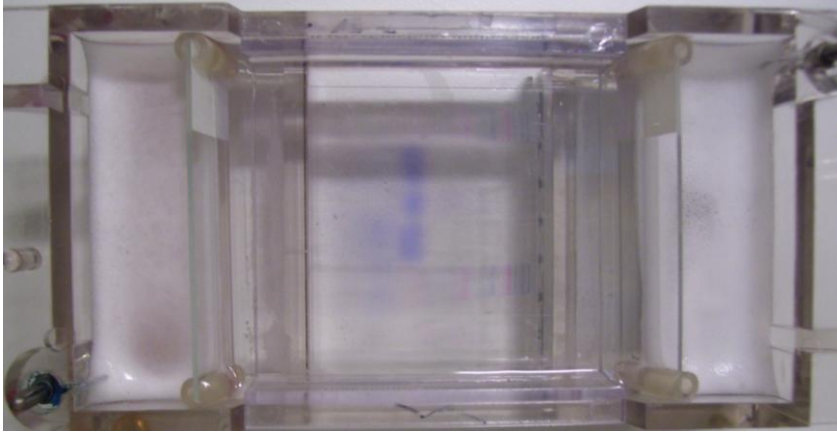
Elektroforez işlemi 100 Volta ayarlanan güç kaynağı kullanılarak ve ORTE sisteminin içinde eş zamanlı görüntü alınarak gerçekleştirilmiştir. Tris ile üretilen jeller için elektroforez tamponu olarak 1x elektroforez yürütme tamponu, TAE ile üretilen jeller için ise %0,1SDS-1xTAE tamponu kullanılmıştır. Jeller çoğunlukla tampondan daha az yoğunlukta olmaları dolayısıyla jel tabağından tampon yüzeyine doğru yükselme eğilimi gösterdikleri için elektroforez öncesinde jellerin üzerine yerleştirilen iki adet lamın ağırlıklarından yararlanılmıştır. Elektroforez işlemi 30 dakika-1 saat aralığında sürmüştür.

Elektroforez sırasında tampon içinde bulunan SDS köpürdüğü için izlenebilir sistemde görüntü almayı zorlaştırmıştır. Bu durumun önüne geçebilmek amacıyla jel tankının iki kenarına dar bir aç yapıacak şekilde iki adet lam, silikon hortum yardımı ile sabitlenmiştir.

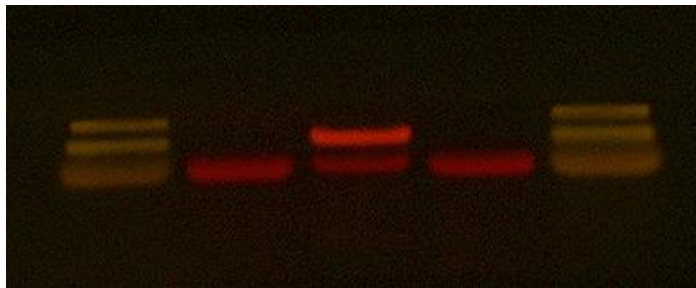
Bu şekilde köpükler lamların arkasında kalan bölgede toplanarak jelin yerleştirildiği bölgeye geçememiştir.



Şekil 2.2. Jel üzerinde köpükleşmenin engellenmesi amacıyla standart jel tankının uçlarına lamların sabitlenmesi.



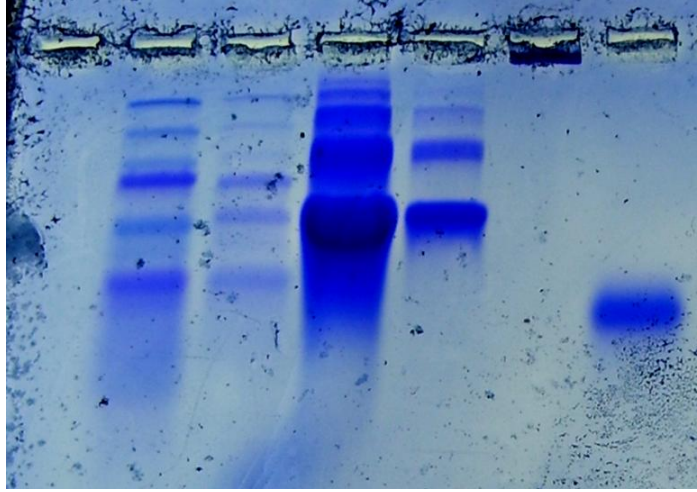
Şekil 2.3. Elektroforez sırasında oluşan köpüklerin lamların arkasında toplanması.



Şekil 2.4. ORTE aygıtınca elektroforez sırasında alınan jel görüntüsü. İlk ve son kuyucukta Dual Xtra molekül ağırlık standardı, orta kuyucuklarda incelenen protein örnekleri bulunmaktadır.

3.2.5. Elektroforez sonrası standart boyama işlemi olarak Coomassie mavisi ile proteinlerin boyanması

Elektroforez sonrasında jel uygun büyüklükte temiz bir kapaklı kaba alınarak jelin üstünü örtecek şekilde Coomassie mavisi çözeltisi eklenmiştir. Jel, 1 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde çalkalandıktan sonra jelin içinde bulunduğu boya çözeltisi dökülmüştür. Jelin üzerine boya temizleme çözeltisi eklenerek, jel yarım saat boyunca çalkalayıcıda bekletilmiştir. Kaptaki boya temizleme çözeltisi boşaltılarak temiz çözelti eklenmiş ve jel gece boyu çalkalayıcıda bekletilmiştir. Boyama sonrası jel fotoğrafları Kodak Easyshare C433 fotoğraf makinasıyla çekilmiştir.



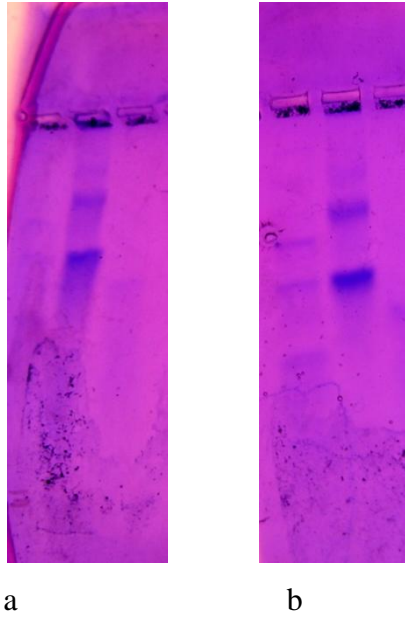
Şekil 2.5. Coomassie mavisi ile boyamadan sonra alınan jel görüntüsü

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Agarozun Yatay Poliakrilamit Jelin Polimerizasyonuna Etkisi

Agarozun poliakrilamit jel yüzeyinde katılaşıp havadaki oksijenin polimerleşme sürecindeki akrilamide ulaşmasını engelleme etkisini gözlemlemek için 0-200 mg aralığında agaroz konsantrasyonları ile poliakrilamit jeller üretilmiştir.

Biri 125 mg, diğeri 200 mg agaroz ile hazırlanmış iki adet 1,5M tris içeren 50 ml hacimli Poliakrilamit jel, elektroforez ve ardından Coomassie mavisi ile boyama sonrasında karşılaştırılmıştır. 200 mg agaroz içeren jeldeki bantlarda yayılma gözlenmiştir.



Şekil 2.6. Agarozun yatay poliakrilamit jelin polimerizasyonuna etkisi. Soldaki yarım jel (a) 200 mg, sağdaki yarım jel (b) 125 mg agaroz içermektedir. Jellerin her ikisinde de soldan ilk kuyucukta Page Ruler protein molekül ağırlık standardı, ikinci kuyucukta 1mg/ml BSA bulunmaktadır

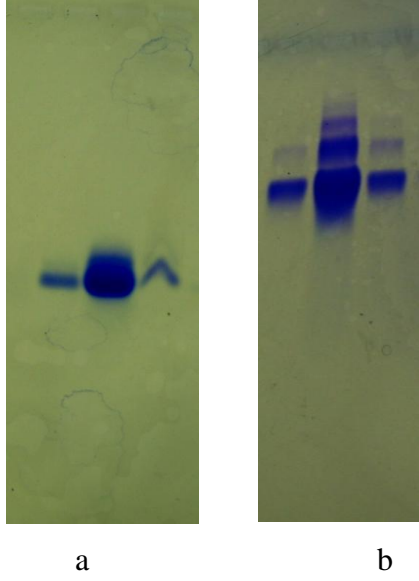
Daha sonra üretilen jellerde agaroz miktarı azaltıldığında yayılmanın da aynı oranda azaldığı ve agarozsuz jellerde bantların daha keskin olduğu gözlenmiştir. Agaroz bulunmayan jellerin de tabaklarda oksijen temasına rağmen polimerize olmasının gözlenmesi ile, agarozun jelin polimerleşme sürecine bir katkısı olmadığı, polimerizasyonun jelin ısıtılması sonucunda gerçekleştiği düşünülmüştür.

4.2. Jel Bileşeni Olarak TAE Tamponu Kullanılması ve APS ve TEMED Miktarının Arttırılması.

Tris-glisin içerikli 1x elektroforez yürütme tamponundan daha ekonomik ve hazırlaması daha kolay olması nedeniyle, DNA elektroforez çalışmaları için sıklıkla kullanılan TAE tamponu ile yatay SDS-poliakrilamit jeller hazırlanmıştır. Agaroz kullanılmaksızın kaynatılan tampona eklenen akrilamit içerikli jel bileşeninin kısa sürede katılaştığı gözlenmiştir. Ayrıca TEMED hariç diğer bileşenlerin aynı şişede kaynatılması denenmiş ve oluşan yüksek ısı nedeniyle şişe içerisinde polimerizasyon ve ani katılma gözlenmiştir. Bu çalışmada üretilen yatay SDS-poliakrilamit jellerde, oksijenin inhibe edici etkisini engellen ve hızlı polimerizasyonun gerçekleşmesini sağlayan ana etkenin kaynatılan tampon bileşik olduğu görülmüştür.

Tris ile yapılan çalışmalardaki bileşenlerin oranları aynı tutulmak suretiyle, TAE ile hazırlanan jellerde jel hacmi kademeli olarak azaltıldığında (30, 20 ve 10 ml) polimerleşmenin çok daha iyi olduğu gözlenmiş ve 1 saat polimerizasyona bırakılan 10 ve 20 ml hacimli jellerden çok daha net ve keskin bantlar elde edilmiştir. Jel hacmi azaldıkça polimerleşme süreci kısalmış, Coomassie mavisi ile boyama ve boya uzaklaştırma süresi azalmış ve aynı jel, boya uzaklaştırma süresinde arkaalan boyadan çok daha iyi arınmıştır. Ancak yatay üretilmesi nedeniyle, polimerizasyona bırakılan sıvı jel, jel tarağına düşey düzlemde daha az temas etmiş, bunun sonucunda kuyucuk hacimleri azalmıştır, dolayısıyla daha az hacimde örnek yüklenebilmesine neden olmuştur (10 ml hacimli jel için yaklaşık 6 µl, 20 ml jel için 12 µl).

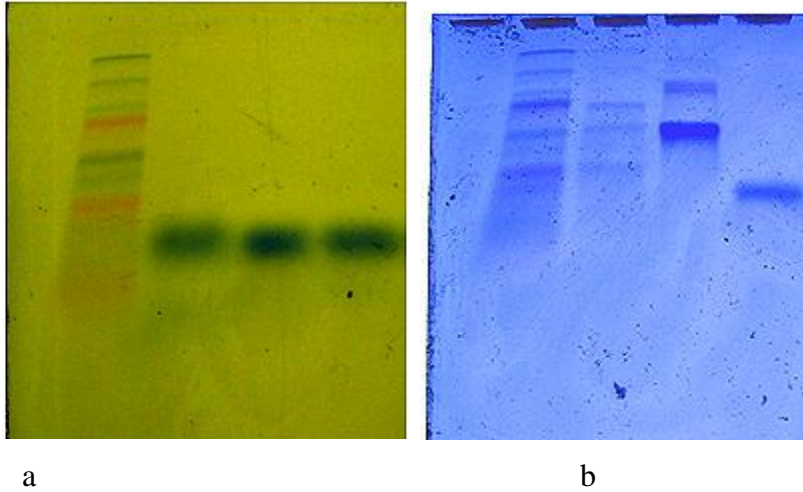
Şekil 2.7.'de 10ml (a) ve 20 ml (b) hacimli SDS-TAE-poliakrilamit jeldeki örneklerin Coomassie mavisi ile boyamadan sonraki görüntüsü verilmiştir. 20 ml hacimli jelin APS ve TEMED miktarları 10 ml hacimli jel yöntemindeki bileşime göre sırasıyla %50 ve %25 artırılmıştır. Artan APS ve TEMED in ayırım gücünü yükselterek bantların görünürlüğünü ve keskinliğini arttırdığı gözlenmiştir.



Şekil 2.7. 10ml ve 20 ml hacimli SDS-TAE-poliakrilamit jeldeki örneklerin Coomassie mavisi ile boyamadan sonraki görüntüsü. 10 ml hacimli jel (a), 20 ml hacimli jel (b). Örnekler soldan sağa 1mg/ml BSA, 10mg/ml BSA, 1mg/ml BSA olarak yüklenmiştir

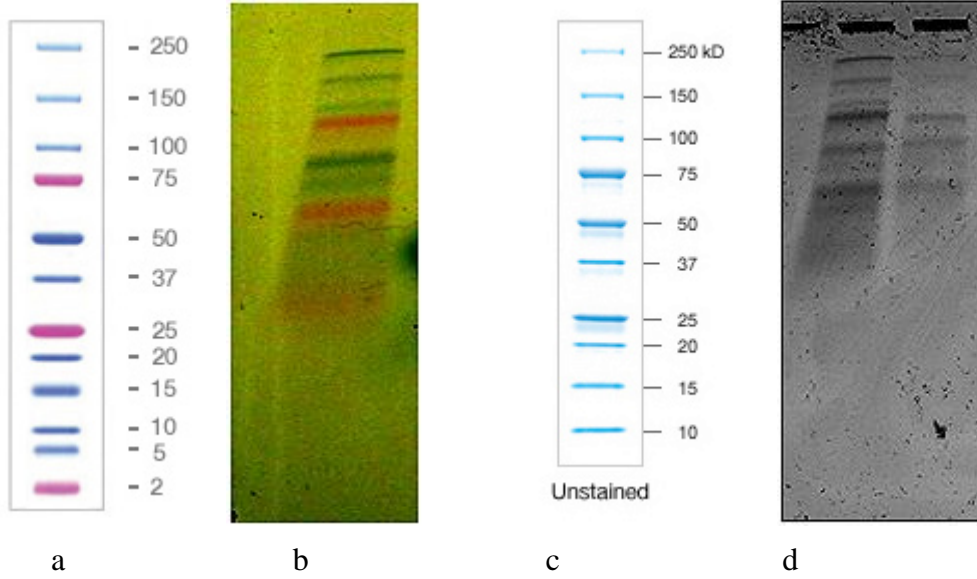
Ayrıca çalışmalar sırasında daha yüksek akrilamit derişimli jeller üretilmiş ve keskinlik artırılmıştır. En iyi görüntü % 5,87 akrilamit derişimli, 23 ml hacimli jellerde alınmıştır.

Şekil 2.8'de %5,87 akrilamit derişimli SDS-TAE Poliakrilamit jelin elektroforez sonrasında normal ışıktaki fotoğrafı (a) ve aynı jelin Coomassie mavisi ile boyamadan sonraki fotoğrafı (b) görülmektedir. Jele yüklenen örnekler soldan sağa sırasıyla: Dual Xtra ve Page Ruler moleköl ağırlık standartları, 1mg/ml BSA ve RNaz dır.



Şekil 2.8. %5,87 Akrilamit derişimli SDS-TAE-poliakrilamit jel. Jelin elektroforez sonrasında beyaz ışıktaki görüntüsü (a), Coomassie ile boyama sonrasında alınan görüntüsü (b)

%5,87 Akrilamit derişimli jellerde Dual Xtra ve Page Ruler molekül ağırlık standartlarının ayırımı Şekil 2.9’da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Dual Xtra ve Page Ruler molekül ağırlık standartlarının %5,87 Akrilamit derişimli SDS-TAE-poliakrilamit jelde ayırımı. Dual Xtra molekü ağırlık standardının % 4-20 Tris-HCl jelde ayırımına dair çizelge (a), Dual Xtra molekül ağırlık standardının 5,87 Akrilamit derişimli SDS-TAE-poliakrilamit jeldeki ayırımı (b), Page Ruler molekül ağırlık standardının % 4-20 Tris-HCl jelde ayırımına dair çizelge (c), Page Ruler molekül ağırlık standardının %5,87 Akrilamit derişimli SDS-TAE-poliakrilamit jelde ayırımı* (d)

* Karşılaştırma yapabilmek için soldaki kuyucukta Dual Xtra molekül ağırlık standardı yürütülmüştür

Çalışma sırasında tris ile hazırlanan farklı hacimlerdeki yatay SDS-poliakrilamit jellerin TAE ile hazırlananlara göre daha uzun polimerizasyon süresine gereksinim duydukları ve örneklerin yürümesi için en az iki katı daha uzun elektroforez süresi gerektirdiği gözlenmiştir. Ayrıca tris ile yapılan jellerin ayırım gücünün TAE tamponu ile hazırlanan jellerden daha düşük olduğu gözlemlenmiştir.

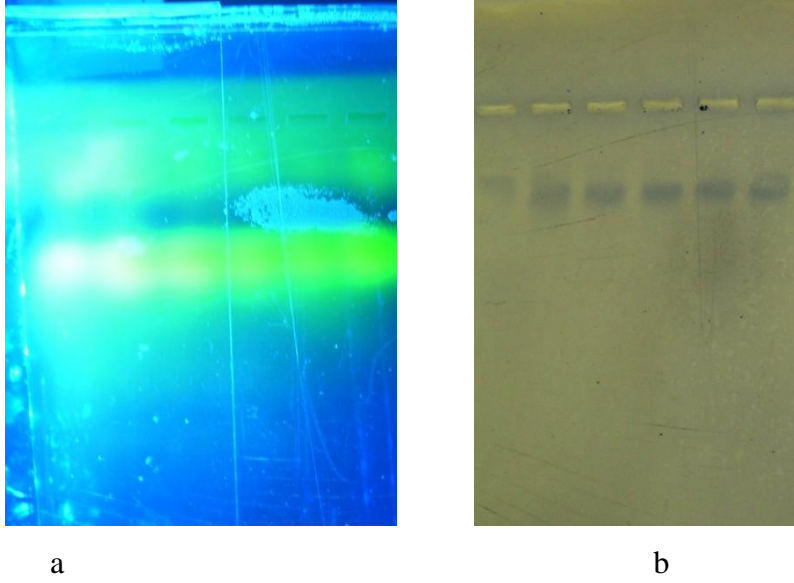
En iyi ayırım agaroz eklenmeden TAE tamponu ile hazırlanan ve 1xTAE-%0,1SDS tamponu ile yürütülen, %5,87 akrilamit derişimli SDS-TAE-poliakrilamit jellerde gözlenmiştir. Çizelge 3.4.’de en iyi ayırımın elde edildiği jelin bileşenleri ve miktarları bulunmaktadır.

Çizelge 3.4. En iyi ayrımın elde edildiği SDS-TAE-poliakrilamit jelin bileşenleri ve miktarları

Jel bileşenleri	Miktar
%30Akrilamit çözeltisi	4,5 ml
%10SDS	0,23 ml
%10 APS	0,3 ml
TEMED	18 µl
1XTAE	18,5 ml
Toplam hacim	23 ml

4.3. Trisli Yatay SDS-Poliakrilamit Jelde (50 ml hacimli) Proteinlerin Floresein ile Elektroforez Öncesi Boyanması

Proteinleri etiketlemek için floresein etiketin dimetilformamitte çözüldüğü bilgisinden (Molecular Devices Inc. 2010) yola çıkarak DMF’de çözülen sodyum floresein, protein ön boyama denemelerinde kullanılmıştır. 20 mikrolitre incelenecek örnek için, DMF–Floresein sodyum çözeltisinden 2 mikrolitre kullanılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Protein ile boyanın etkileşime girmesi için incelenecek örnekler 2 şer mikrolitre boya eklenerek bir mikrosantrifüj tüpünde 15-120 dakika arasında oda sıcaklığında bekletilmiştir. Şekil 2.10.’da floresein ile elektroforez öncesi boyanmak istenen proteinlerin elektroforez sırasında jeldeki görüntüsü (filtre kullanılmadan, mavi ışık ile aydınlatılarak alınmıştır) (a) ve aynı jelin Coomassie mavisi ile boyandıktan sonraki görüntüsü (b) verilmiştir. Kuyucukların hepsinde 20 mikrolitre 1mg/ml BSA bulunmaktadır. Kuyucuklardaki örneklerin soldan sağa doğru bekleme süresi: 120, 90, 60, 45, 30 ve 15 dakikadır.



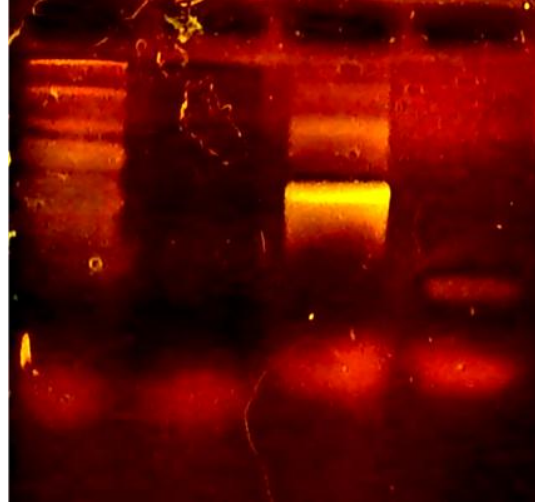
Şekil 2.10. Floresein ile elektroforez öncesi boyanmak istenen proteinlerin elektroforez sırasında ve sonrasında alınan görüntüsü. Elektroforez sırasında mavi ışıkla aydınlatılmış jelin görüntüsü (a) ve aynı jelin Coomassie mavisi ile boyandıktan sonraki görüntüsü (b)

Floresan ön boyama denemesi sonucunda, elektroforez sırasında geriden yürüyen bantlar halinde bulutlanmalar görülmüş olsa da Coomassie mavisi ile boyama sonrasında alınan görüntüyle karşılaştırıldığında floresein çözeltisinin büyük miktarının elektroforez sırasında örneklerden bağımsız olarak önden yürüdüğü ve örneklerle belirgin bir etkileşime girmedığı gözlenmiştir.

4.4. SYPRO Orange ile Protein Bantlarının Görüntülenmesi ve Proteinlerin Elektroforez Öncesi Boyanmasının Denenmesi

SYPRO Orange etkinliği birçok gümüş boyama tekniği kadar duyarlı ve Coomassie mavisi ile boyamadan daha yüksek olan, protein bandı başına 4-8 nanogram proteini elektroforez sonrasında görünür hale getirebilen bir protein boyasıdır. (Molecular Probes Inc. 2003) Bu çalışmada SYPRO Orange 5000x stok boyası deiyonize su ile çeşitli oranlarda seyreltilerek yatay SDS-TAE-poliakrilamid jelde elektroforez sırasında protein bantlarını görüntülemek amacıyla kullanılmıştır. Elektroforez sırasında protein bantları SYPRO Orange ile görünür hale gelmemiştir. Sonraki çalışmada elektroforez sonrasında SYPRO Orange boyası uygulanmış ve ardından jel ORTE aygıtı içine yerleştirilerek protein bantları görüntülenmiştir. Şekil 2.11.'de SYPRO Orange ile boyama sonrası protein bantları görülmektedir. Örnekler soldan sağa doğru: PAGE Ruler ve Dual Xtra molekül ağırlık

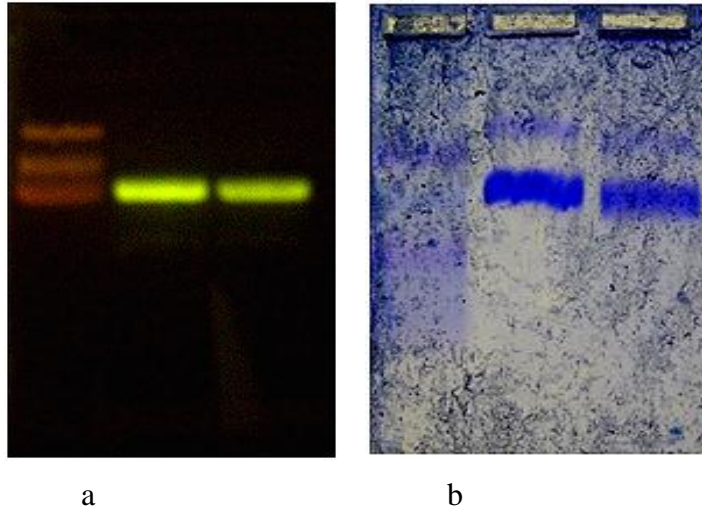
standartları, 1mg/ml BSA ve RNAz A'dır. Dual Xtra bantlarının boyama sonrası ışımaya göstermemesinin nedeninin, Molecular Probes Inc (2003)'un önerdiği bilgiyle uyumlu olarak, boyalı proteinlerdeki boyaların SYPRO Orange'ın bağlanmasını engellemesi olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 2.11. SYPRO Orange ile boyama sonrası protein bantlarının görüntüsü.

4.5. Akridin Turuncusu ile Proteinlerin Elektroforez Öncesi Boyama Çalışması

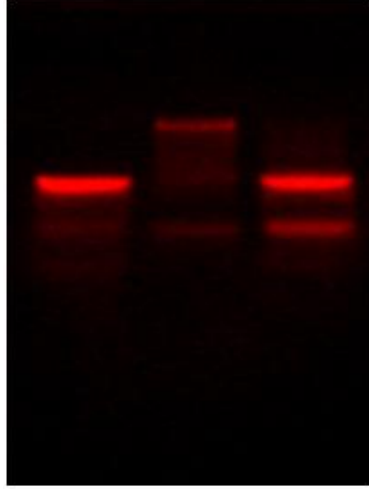
Akridin turuncusu boyasının, proteinlerin bazı yan gruplarına bağlanması halinde floresan ışımaya yapabileceği düşünülerek, bu çalışmada proteinlerin elektroforez öncesi boyanması amacıyla denenmiştir. 20 µl, 1mg/ml BSA için 2 µl Akridin turuncusu (0,2mg/ml) boyası kullanılarak yatay SDS-TAE-poliakrilamid jelde izlenebilir elektroforez gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.12'de Akridin turuncusuyla elektroforez öncesinde boyanması denenen proteinlerin elektroforez sırasında ve sonrasında alınan jel fotoğrafları görülmektedir. Mavi ışıkta yeşil floresans vermiş olan akridin turuncusu boyasının tek bir bant halinde kendi başına yürüdüğü ve protein ile etkileşime girmediği gözlenmiştir.



Şekil 2.12. Akridin turuncusuyla elektroforez öncesinde boyanması denenen proteinlerin elektroforez sırasında ve sonrasında alınan jel fotoğrafları. Elektroforez sırasında jelin görüntüsü (a). Jele soldan sağa doğru Dual Xtra molekül ağırlık standartı, 10mg/ml BSA, 1mg/ml BSA örnekleri yüklenmiştir. Aynı jelin Coomassie mavisi ile boyandıktan sonraki fotoğrafı (b)

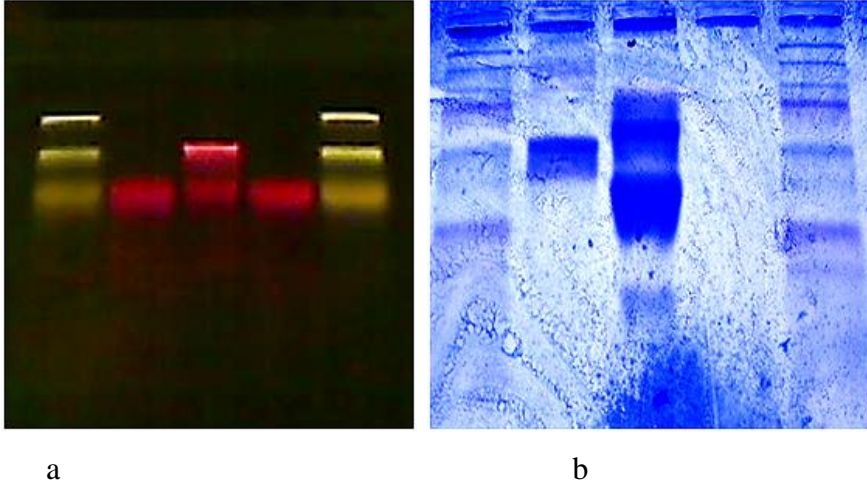
4.6. Nil Kırmızısı ile Proteinlerin Elektroforez Öncesi Boyama Çalışması

Daban *et al.* (1991b) elektroforez sonrasında poliakrilamit jelde proteinleri Nil kırmızısı ile boyama yöntemi geliştirmişlerdir. Araştırmacıların çalışmada belirttiği üzere, Nil kırmızısı hem SDS miselleriyle hem de protein-SDS kompleksleriyle etkileşime girebilir. SDS, 1 gram protein başına 1,4 gram olacak şekilde proteinlerle kompleks oluşturabilmektedir. Bu çalışmada Nil mavisinden elde edilen Nil kırmızısı aseton içerisinde çözülerek kullanılmıştır. Kuyucuklara incelenecek örneklerle birlikte yüklenen Nil kırmızısı, ORTE sisteminin içinde bulunan mavi led ışıklar ile uyarılmıştır. 20 µl, 1mg/ml BSA örneklerine 4 µl Nil kırmızısı boyası eklenmiştir. Şekil 2.13.'de Nil kırmızısı boyası ile jele yüklenen BSA örneklerinin elektroforez sırasında ORTE' de alınan fotoğrafı görülmektedir. Elektroforez sırasında floresan yoğunlukları birbirinden farklı birden fazla sayıda bantlar gözlenmiştir. Ortadaki kuyucuktaki, örnek yükleme boyası olmadan, SDS'in bulunmadığı koşulda ısıtılan BSA örneğinin dimer oluşturmuş ve daha büyük bir bant görülmesini sağlamış olabileceği düşünülmüştür.



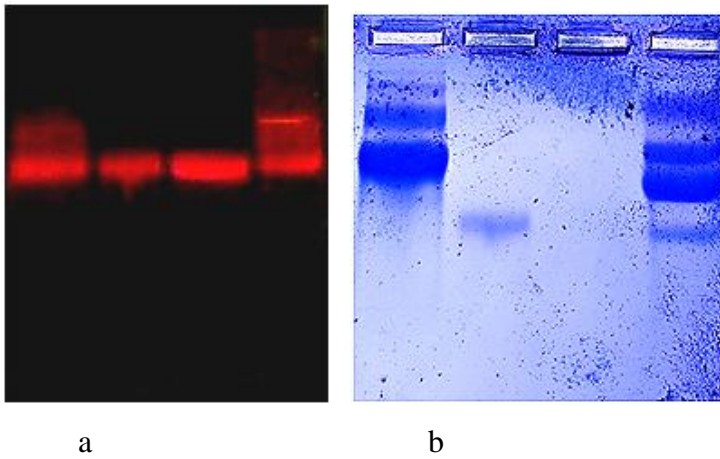
Şekil 2.13. Nil kırmızısı boyası ile jele yüklenen BSA örneklerinin elektroforez sırasında ORTE' de alınan fotoğrafı. Soldan birinci kuyucuktaki örnek BSA (20 µl, 1mg/ml), Nil kırmızısı (4 µl) ve örnek yükleme boyası karışımının aynı tüp içerisinde yükleme öncesi, kaynar su banyosunda 5 dakika muamele edilmiş olduğu örnektir. Orta kuyucuktaki örnek, yükleme öncesi yalnızca BSA ve Nil kırmızısı boyası karışımının kaynar su banyosunda 5 dakika muamele edilmiş olduğu örnektir. Sondaki örnek ise oda sıcaklığında BSA, Nil kırmızısı boyası ve yükleme boyasının karıştırıldığı örnektir.

Bir sonraki deneyde %9,6 akrilamit derişimi içeren 25 ml hacimli SDS-TAE-poliakrilamit jel hazırlanmış ve örnekler oda sıcaklığında, herhangi bir işleme tabi tutulmadan 10 µl protein örneğine 2 µl Nil kırmızısı boyası eklenecek şekilde jele yüklenmiştir. Farklı protein kaynağı olarak 1/10 oranında sulandırılmış doğal yumurta akı kullanılmıştır. Kontrol için deiyonize su-Nil kırmızısı karışımı kullanılmıştır. Şekil 2.14.'de Nil kırmızısı'nın elektroforez öncesi protein boyası olarak kullanıldığı jelin görüntüsü ve aynı jelin Coomassie mavisi ile boyamadan sonraki görüntüsü verilmiştir. Nil kırmızısı boyasının yumurta albüminine ait olabilecek bir bandı görünür hale getirdiği gözlenmiştir.



Şekil 2.14. Elektroferez öncesi protein boyası olarak Nil kırmızısı kullanılmış olan jelin elektroferez sırasında (a) ve Coomassie mavisi ile boyanma sonrası (b) fotoğrafları. Kuyucuklara soldan sağa doğru Dual Xtra moleköl ağırlık standartı, BSA (1mg/ml, 10 µl), 1/10 sulandırılmış yumurta akı (10 µl), Damıtık su (Kontrol), Dual Xtra moleköl ağırlık standartı yüklenmiştir.

Bir sonraki deneyde RNAz A proteini de kullanılmıştır. BSA ve yumurta akı örneklerinde birden fazla bant görölmüş ve RNAz örneğinin bulunduğu jel kısmında Coomassie mavisi ile boyama sonrasında da aynı yerde aynı şekilde bant olduğu gözlenmiştir. Nil kırmızısının jelde yürüme hızının yaklaşık olarak RNAzA'ya eşit olabileceği düşünölmüştür. Şekil 2.15.'de Nil kırmızısı boyası ile elektroferez öncesinde farklı protein örneklerini boyama çalışmasına ait jel fotoğrafları verilmiştir.



Şekil2.15. Nil kırmızısı boyası ile elektroferez öncesinde farklı protein örneklerini boyama çalışması. Jelin elektroferez sırasında (a) ve Coomassie mavisi ile boyama sonrasında (b) görüntüsü verilmiştir. Jele yüklenen örnekler soldan sağa doğru: 10mg/ml BSA, RNAz A, Kontrol, Yumurta akıdır.

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Elektroforez moleküler biyolojide en çok kullanılan araştırma yöntemlerinden biridir. Elektroforezi pratikleştirip kolaylaştırmak, yöntemlerin gerektirdiği zamandan artırımda bulunmak, daha az kimyasal madde ve daha küçük aygıtlar kullanarak elektroforezi daha ekonomik hale getirebilmek için pek çok çalışma yapılmaktadır. Elektroforezde ayrılmış moleküllerin saptanmasının daha etkin hale getirilebilmesi için de araştırma çalışmaları sürdürülmektedir.

Proteinlerin denatüre edilerek molekül ağırlıklarına göre ayrıldığı SDS-PAGE yönteminde kullanılan poliakrilamid jeller günümüzde dikey elektroforez aygıtlarında yapılmaktadır. Elektroforez jeli hazırlanırken, polimerizasyonu engelleyen oksijenin jele ulaşmaması amacıyla jel iki cam arasına dökülmekte ve elektroforetik ayırım dikey konumda, bu özel aygıtlar yardımıyla gerçekleştirilmektedir. Protein örnekleri poliakrilamid jele dikey konumda yüklendiği için proteinler aynı anda jelin içerisine girememektedirler. Bu nedenle bu yöntem proteinleri dar bantlar halinde yoğunlaştıracak iki farklı derişimde jele gereksinim duymaktadır. Nükleik asitlerin ayırımında kullanılan, oksijenden negatif etkilenmeyen agaroz jel ile yapılan yatay jel elektroforezi bu dikey, çok parçalı aygıtlara gereksinim duymadığı için daha pratik ve ekonomiktir. Dikey jellerin üretiminde çeşitli zorluklarla karşılaşmaktadır. Genellikle 0,75 mm kalınlığında hazırlanan poliakrilamid jeller, sıvı haldeyken aygıttan sızabilmekte ve bu ince jellerin elektroforez sonrası işlemler için yırtılmadan aygıttan çıkarılması deneyim gerektirmektedir.

Bu çalışmada poliakrilamid jel üretimi için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Dikey düzenekler kullanılmadan yatay jel tabağında, jelin yüzeyi hava ile temas etmesine rağmen polimerizasyon sağlanmıştır. Akrilamid polimerizasyonu oksijen tarafından engellenmektedir. Bizim geliştirdiğimiz yöntemde oksijen varlığına rağmen polimerizasyonun sağlanması, erime noktası 84,5°C olan (Lide 2000) ve erime noktasına doğru ısıtıldığında aniden polimerleşebilen (Bretherick 1990) akrilamidin kaynatılmış tampon çözeltisinin sıcaklığına bağlı olarak daha hızlı polimerleşmesi yoluyla olabilir. Poliakrilamid jeller ilk aşamalarda oksijen girişini engellemek amacı ile agaroz karıştırılarak üretilmiştir. Ancak sonraki denemelerde poliakrilamid çözeltisinin

ısıtıldığında agaroz olmadan, oksijen varlığında da polimerize olduğu görülmüş ve yatay jel tabağında akrilamid jeller, ısıtılarak hazırlanabilmiştir.

TAE tamponu nükleik asit elektroforezinde sıklıkla kullanılan elektroforez tamponudur. Bu çalışmada SDS-PAGE’de kullanılan Tris-glisin tamponu yerine, daha ekonomik ve hazırlaması daha kolay olması dolayısıyla TAE tamponunun protein elektroforez tamponu olarak kullanılabilirliği denenmiş ve denatüre edici deterjan olan SDS bu tampona eklenerek protein elektroforezi gerçekleştirilmiştir. 2-250 kDA boyutlarında bantlar içeren boyasız ve boyalı protein molekül ağırlık standartları, BSA, RNAzA ve yumurta albümini, TAE tamponuyla üretilmiş poliakrilamid jellerde, SDS-TAE elektroforez tamponu ile ayrılabilmiş ve ardından Coomassie mavisi ile boyama yöntemiyle bantlar halinde görüntülenebilmiştir. TAE tamponu ile üretilen bu poliakrilamid jeller üzerinde optimizasyon çalışması yapılarak değişik akrilamid derişimlerine sahip (%5,87-%9,6 T), kalınlığı 3-4 mm, hacmi yaklaşık 20 ml olan, kuyucuk hacmi ve sayısı kullanılan tarağın boyutlarına göre ayarlanabilen, dikey jellere kıyasla kolay yırtılmayan ve elde tutulabilen, yatay poliakrilamid jeller üretilmiştir. Dikey jeldekilerin aksine elektroforez düzlemine paralel olan kuyucuklar biriktirici jelle olan gereksinimi ortadan kaldırarak jel dökme ve elektroforez işlemini kolaylaştırmıştır. Üretilen bu jeller ile Western blotlama yapılarak jel üzerindeki proteinlerin transfer etkinliği ve güvenilirliğinin saptanacağı ileri çalışmalar gerekmektedir.

Izzo *et al.* (2006) bir pleksiglas aparat kullanarak yatay poliakrilamid jel üretimi gerçekleştirmiş ve TBE tamponu kullanarak yatay SDS-PAGE yöntemi geliştirmiştir. Ancak bu yöntemde de jel yapımında oksijeni engellemek için cam kullanılmış ve farklı aygıtlara gereksinim duyulmuştur. Pleksiglas aygıtın içine dökülen jel çözeltisi, aygıtın üzerine eklenen, silan ile kaplanmış bir cam ile kapatılmış, bu şekilde oksijenin jelle ulaşması engellenmiştir.

Nükleik asitlerin elektroforez sırasında veya sonrasında kısa sürede görünür hale getirilebilmesi için çeşitli floresan boyalar, “Karanlık Okuyucu” ve ORTE gibi görüntüleme sistemleri geliştirilmiştir. Ancak proteinler halen sadece elektroforez sonrasında görüntülenebilmekte ve bunun için genellikle rutin olarak Coomassie ile boyama yöntemi ya da gümüş boyama yöntemi kullanılmaktadır. (Ausubel *et al.* 2003) Bu

boyama yöntemleri için hızlandırılmış prosedürler de geliştirilmiştir ancak daha hızlı sonuç almayı sağlayacak ve rutin analizlerde kullanılacak protein boyaları ve boyama yöntemleri günümüzde bir çok araştırmacı ve biyoteknoloji şirketi tarafından araştırılmaya ve geliştirilmeye devam etmektedir.

Elektroforez sırasında protein bantlarının görüntülenemediği klasik yöntemler zaman kaybı yaratmaktadır. Bu zaman kaybının önüne geçebilmek amacıyla bu çalışmada, protein bantlarının ORTE sisteminde elektroforez sırasında görüntülenebilmesi amaçlanarak, proteinler için ön boya olarak kullanılacak çeşitli boya molekülleri denenmiştir. Floresein sodyum ve Akridin turuncusu boyalarının, çalışmada denenilen yöntemler ile uygun protein ön boyaları olmadıkları görülmüştür. Floresein sodyum molekülü yerine FITC molekülü ile ön-boyama ya da etiketleme çalışmaları yapılabilir. SYPRO orange boyası elektroforez sonrasında protein bantlarını görünür hale getirebilmiştir, ancak protein ön-boyası olarak kullanıldığında bantlar görünür hale gelmemiştir. Ayrıca önceden başka boyalar ile boyanmış proteinler, elektroforez sonrasında bu boya ile görüntülenememiştir. Bu boyaların SYPRO orange boyasının proteinlere bağlanmasını engellediği düşünülebilir.

Daha önceleri yağ boyası olarak kullanılan Nil kırmızısı, Daban *et al.* tarafından protein-SDS komplekslerinin hidrofobik özelliklerinin ölçüldüğü bir floresan prob olarak (1991a) ve daha sonra SDS-poliakrilamit jellerde protein bantlarının elektroforez sonrası görüntülenmesi amacıyla (1991b) kullanılmıştır. Pahalı bir boya olan Nil kırmızısı bu çalışma kapsamında Nil mavisi kimyasalından üretilerek, elektroforez öncesi protein boyası olarak kullanılmıştır. Nil kırmızısı ile BSA, RNAz A ve yumurta albüminine ait olan protein bantları elektroforez sırasında görünür hale getirilebilmiş ve bantların hareketi elektroforez ile eş zamanlı izlenip fotoğraflanabilmiştir. Nil kırmızısı boyasının SDS ile kaplanmış proteinlerle elektroforez sırasındaki ilişkisi ve protein ön-boyası olarak etkinliği üzerine ileri çalışmalar gerekmektedir.

Bu çalışmada geliştirilen yöntem ile üretilen, kullanımı ve üretimi dikey sistemlerden daha pratik ve ekonomik olan yatay poliakrilamit jeller gelecekte moleküler biyoloji çalışmalarında yaygın olarak kullanılabilir. Nil kırmızısı elektroforez öncesinde proteinlere bağlanarak elektroforez sırasında bantların görüntülenebilmesini sağlamış, dünyada ilk kez izlenebilir protein elektroforezi yapılmasına olanak vermiştir. Nil kırmızısının proteinleri

saptamadaki duyarlılığı konusunda ileri çalışmalar yapılmalıdır. Yine proteinlerin izlenebilir elektroforezine olanak sağlayacak başka boyalar da araştırılmalıdır. İzlenebilir protein elektroforezi, elektroforez sonrası jel boyama işlemine gereksinimi ortadan kaldıracak, elektroforez sırasında protein bantlarının en iyi ayrıldığı ideal zamanlarda fotoğraflanmasını sağlayacak, araştırmalara önemli zaman kazandıracak, emek artırımını sağlayacaktır. Sonuç olarak izlenebilir protein elektroforezi protein araştırmalarını hızlandıracak ve daha etkin hale getirecektir.

KAYNAKLAR

- Alzate, O. 2010. Neuroproteomics. CRC Press
- Anonim 2012a <http://en.wikipedia.org/wiki/Starch>
- Anonim 2012b http://en.wikipedia.org/wiki/Gel_electrophoresis#Starch
- Anonim 2012c <http://www.nrel.gov/biomass/glossary.html>
- Anonim 2012d <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis.html>
- Anonim 2012e http://www.siumed.edu/~bbartholomew/course_material/protein_methods.htm
- Anonim 2012f http://www.bio-rad.com/evportal/en/TR/evolutionPortal.portal?_nfpb=true&_pageLabel=SolutionsLandingPage&catID=LUSPBRM5B
- Anonim 2012g <http://www.learnnc.org/lp/multimedia/18920>
- Anonim 2012h http://en.wikipedia.org/wiki/TBE_buffer
- Anonim 2012i <http://biotech.about.com/od/buffersandmedia/ht/TAE.htm>
- Anonim 2012j <http://biotech.about.com/od/buffersandmedia/ht/MakeTBE.htm>
- Anonim 2012k <https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/horizontal-and-vertical-gel-systems-horizontal-gel-system>
- Anonim 2012l <https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/horizontal-and-vertical-gel-systems-vertical-slab-gel-system>
- Anonim 2012m. A guide to polyacrylamide gel electrophoresis and detection , Bio-Rad Inc.http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040A.pdf
- Anonim 2012n http://www.bio.davidson.edu/Courses/genomics/method/pulse_field.html
- Anonim 2012o <http://www.bio.davidson.edu/courses/molbio/molstudents/spring2003/cobain/method.html>
- Anonim 2012p <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/nucleic-acid-electrophoresis/dyes-and-stains.html>
- Anonim 2012r <http://www.ed.ac.uk/schools-departments/health-safety/guidance/hazardous-substances/ethidium-bromide>
- Anonim 2012s <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Image-Gallery/Image-Detail.2216.html>
- Anonim 2012t <http://www.molecularinfo.com/MTM/C/C1/C1-1/C1-1-4.html>
- Anonim 2012u <http://openwetware.org/wiki/SDS>
- Anonim 2012ü http://www.biorad.com/evportal/en/TR/evolutionPortal.portal?_nfpb=true&_pageLabel=SolutionsLandingPage&catID=LUSOW4GRI
- Anonim 2012 v <http://sdspage.homestead.com/>
- Anonim 2012x http://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse_Information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.html
- Anonim 2012y <http://en.wikipedia.org/wiki/SDS-PAGE>
- Anonim 2012z http://www.channelwolf.com/lvv/sem6/index_files/Page1942.htm
- Anonim 2012aa <http://www.sci.sdsu.edu/TFrey/Chem365/Proteins/ProteinsChem365.html>
- Anonim 2012ab <http://www.pnas.org/content/suppl/2007/01/18/0609997104.DC1>
- Anonim 2012ac http://www.nature.com/nprot/journal/v2/n5/fig_tab/nprot.2007.172_F2.html
- Anonim 2012ad <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=4DDCADD2-5056-8A76-4E7E-2E00843BE346>
- Anonim 2012ae <http://www.bio-rad.com/prd/en/TR/adirect/biorad?ts=1&cmd=BRCatgProductDetail&vertical=LSR&catID=a7b0f9ce-e080-4b51-ab99-4cded66497c1>

- Anonim 2012af <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=B3D952BB-8404-460C-B6F3-410E23D78308>
- Anonim 2012ag <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/f6377?lang=en®ion=TR>
- Anonim 2012ah http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2972G.pdf
- Anonim 2012ai <http://images.the-scientist.com/content/figures/0890-3670-050926-28-1-1.jpg>
- Anonim 2012aj <http://www.clarechemical.com/downloads/DR-handbook.pdf>
- Anonim 2012ak <http://www.clarechemical.com/howitworks.htm>
- Anonim 2012al http://fransmartonline.com/wp-content/uploads/2010/11/transilluminator_shut-crop1.jpg
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl, K. (eds) 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Willey & Sons, Inc. 4410 sayfa
- Basım, E., Basım, H. 2000. PFGE Technique and its use in molecular biology. *Turk J Biol* 25 (2001) 405-418
- Burtis, C. A., Ashwood, E. R. Bruns, D. E. 1986. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry And Molecular Diagnostics*. Elsevier Saunders Press, United States Of America,
- Bretherick, L. 1990. *Handbook of Reactive Chemical Hazards*. 4th ed. p.368 USA
- Cambrex Inc, 2012, *The Sourcebook: A Handbook for Gel Electrophoresis*, Cambrex Bio Science Rockland, Inc.
- Daban, J. R., Samsó, M., Bartolomé, S. 1991a. Use of Nile Red as a Fluorescent Probe for the Study of the Hydrophobic Properties of Protein-Sodium Dodecyl Sulfate Complexes in Solution. *Analytical Biochemistry*. 199(2); 162-168
- Daban, J.R., Bartolomé, S. Samsó, M. 1991b. Use of the hydrophobic probe Nile red for the fluorescent staining of protein bands in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal. Biochem*. 199(2); 169-74
- Dutta, A., Kamada, K. Ohta, K. 1996 Spectroscopic studies on Nile red in organic solvents and polymers. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem* 93:57-64
- Fowler, S. D., Greenspan, P. 1985. Application of Nile Red, a Fluorescent Probe, for the Detection of Neutral Tissue Sections: Comparison with Oil Red O. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 33(8); 833-836
- Garfin, D. E. 2003. *Essential Cell Biology*. Oxford University Press. Vol1. pp197-268, Oxford UK.
- Greenspan, P., Fowler, S. D., 1985. Spectrofluorometric Studies of the Lipid Probe, Nile Red. *Journal of Lipid Research* Vol:26, pp: 781-789
- Habermann, C. E. 2002. Acrylamide. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*.
- Hawe, A., Sutter, M., Jiskoot, W. 2007. Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization. *Pharmaceutical Research*. 25 (7); 1487-1499
- Izzo, V., Costa, M. A., Fiore, R. D., Duro, G., Bellavia, D., Cascone, E., Colombo, P., Gioviale, M. C., Barbieri, R., 2006. Electrophoresis of proteins and DNA on horizontal sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Immunity & Ageing*, Vol.3
- Klug, W. S., Cummings, M. R., 2003. *Genetik Kavramlar* 6. Baskıdan çeviri Palme Yayıncılık, 816 s., Ankara
- Kocagöz, T., Sancak, B., Saraçlı, M. A., Şınık, G., Öktem, S., AYTEKİN, N. 2009. 24. ANKEM Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi Elektroferez Kursu Kitapçığı, Elektroferezin Temelleri ve Uygulama Alanları
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 – 685

- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*. (62), e3923, (JoVE)
- Lide, D.R. 2000. Handbook of Chemistry and Physics. 81st Edition. CRC Press. USA
- Mathews, C. K., van Holde, K. E., Ahern, K. G. 1989. Biochemistry. Adisson-Wesley press, England
- Menter, P. 2000. Acrylamide Polymerization- A Practical Approach. Bio- Rad Laboratories Inc. Tech note 1156
- Mirrett, S. 1982. Acridine Orange Stain. *Infection Control* vol3. No.3. pp 250-252
- Molecular Devices. 2010. Optimizing the labeling of proteins. Molecular Devices Inc. <http://www.moleculardevices.com/Documents/general-documents/mkt-appnotes/threshold-appnotes/Optimizing%20the%20labelling%20of%20proteins.pdf>
- Molecular Probes Inc. 2003. Product information. SYPRO Orange and SYPRO Red protein gel stains http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/PAGE_SDS/Protein_Staining/INVITROGEN_SYPROOrange.pdf
- Molecular Probes Inc. 2006b. SYBR Gold nucleic acid gel stain. Molecular Probes Inc. <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/S11494?ICID=search-producthttp://www.google.com.tr/>
- Molecular Probes Inc. 2006a. SYBR Green I nucleic acid gel stain. Molecular Probes Inc.
- Molecular Probes Inc. 2011. FluoReporter FITC Protein Labeling Kit. Life Technologies Corporation.
- Öktem, S. 2009. Observeable Real Time Electrophoresis. Yüksek Lisans Tezi. Yeditepe Üniversitesi.
- Öner, R. 2012 (erişim tarihi). Hacettepe Üniversitesi Deneysel Biyokimya II Laboratuvar Notları . <http://yunus.hacettepe.edu.tr/~roner/denbi.htm>
- Perrett, D. 2010. 200 years of Electrophoresis. *Chromatography Today*, 3(4); 4-7.
- Schaffer, H. E, Johnson F.M. 1973. Constant (optimum) power electrophoresis, *Analytical Biochemistry* Volume 51, Issue 2, Pages 577–583
- Shapiro, A. Maizel. J. R. 1969. Molecular weight estimation of polypeptides by SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis: Further data concerning Resolving Power and general considerations. *Anal.Biochem.* 29 (3);505-514
- Sigma-Aldrich.Inc. 2012. Product Information. Acridine orange hemi (zinc chloride) salt. http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a6014pis.Par.0001.File.tmp/a6014pis.pdf
- Sigmon, J. Larcom, L. L., 1996. The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 17(10); 1524-1527
- Stellwagen, N. C. 1998. Apparent pore size of polyacrylamide gels: comparison of gels cast and run in Tris-Acetate-EDTA and Tris-borate-EDTA buffers. *Electrophoresis.* 19(10);1542-7
- Switzer, R.C., 3rd, Merrill, C.R., Shifrin, S. (1979). A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 98(1), 231-7.
- Thermo Scientific. 2008. Instructions. NHS-Rhodamine. Thermo Fisher Scientific. Inc. USA.
- Tiselius, A. 1937. *Trans. Faraday Soc.*, 33;524-531
- Vesterberg, O. 1989. History of electrophoretic methods. *Journal of Chromatography.* 480(1989)3-1
- Walker, J. M. 2002. Protein Handbook. Humana Press.Inc. 1139 sayfa. New Jersey
- Wenk, M. R., Fernandis, A. Z., 2007. A Manual for Biochemistry Protocols. World Scientific, 127 sayfa

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Buket Öztaş

Doğum Yeri : Kadıköy

Doğum Tarihi : 31.08.1988

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce, İtalyanca

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Eryaman Lisesi, 2004

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, 2009

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, 2013

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Tanısal İnovatif Biyoteknoloji Organizasyonu (TİBO),
2011

Yayınları (SCI ve diğer):