

Jel Elektroforezi

Doç. Dr. İnci Başak Müştak

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Mikrobiyoloji ABD

Elektroforez

- *Electro*” elektrik enerjisi anlamına gelmektedir. “*Phoresis*” ise, Yunanca “*phoros*”tan türeyerek içinden taşımak anlamına gelmektedir
- Elektroforez uygulamasında moleküller uygulanan elektrik akımı sayesinde agaroz olarak adlandırılan özel bir matriks içerisinde bir yön boyunca taşınırlar

Nedir?

- Elektroforez laboratuvarında yüklü moleküllerin separasyonunda kullanılan bir tekniktir
- DNA negatif yüklü bir moleküldür
- DNA agaroz ya da poliakrilamidden matriksinden geçirilen bir elektrik akımıyla hareket ettirilir 'koşturma'
- Jel elektroforezi makromolekülleri (proteinler veya nukleik asitler) moleküler büyüklüklerine, elektrik yüklerine ve diğer fiziksel özelliklerine bağlı olarak birbirinden ayırır

Nerelerde kullanılır?

- Separasyon
- İdentifikasyon
- Purifikasyon
- Restriksiyon analizi
- Genotiplendirme (PFGE)

Restriksiyon Analizi

- Basit
- Hızlı
- Density gradient centrifugation gibi bazı tekniklerle ayırt edilemeyen DNA'ların ayrımı

DNA'nın Agaroz jellerde Koşturulması

- DNA'nın moleküler büyüklüğü
- Agaroz konsantrasyonu
- DNA'nın yapısı
- Jel ve elektroforez tamponunda EtBr'ün varlığı
- Uygulanan voltaj
- Agaroz tipi
- Elektroforez tamponu

Separasyon (Moleküllerin Ayrılması)

- Jel katılaştıktan sonra üzerinde bulunan gözlere DNA örnekleri eklenir = “yükleme”
- Elektrik akımı başlatılır
- Separasyon başlıca 2 faktöre bağlı olarak gerçekleşir
 - Molekül şekli ve büyüklüğü
 - Molekül yükü
- Elektroforez tankının bir bölgesinden uygulanan elektrik akımı molekülleri iterken diğer bölge molekülleri çeker
- Elektroforez esnasında, elektrik akımı uygulandığında moleküller porların içerisinden geçerek hareket etmeye zorlanırlar

- Moleküllerin elektriksel alan boyunca hareket oranları uygulanan akım şiddetine, moleküllerin büyüklük ve şekline bağlı olmaktadır
- Molekül büyüklüğü arttıkça molekülün porlardan geçişi azalır
- Molekül üzerindeki iyonik yük arttıkça akıma bağlı hızı artar

Agaroz

- Agaroz deniz yosunundan ekstrakte edilmiş şeker molekül zinciridir
- Kimyasal oldukça pahalı

Poliakrilamid

- Poliakrilamid deri elektrodlarında ve yumuşak kontakt lenslerde kullanılan materyal
- Her iki jel de moleküllerin içlerinden geçtiği porlar içerir
- Poliakrilamid daha sentetik bir materyal olup farklı elektroforez tiplerinde porların miktarı ve çapları kontrol edilebilmektedir

Farklılıklar

Agaroz

- Daha doğal ve
- Saf bir matriks
- Pahalı
- Evrensel por çapı

Poliakrilamid

- Sentetik
- Por çapı ve yoğunluğu ayarlanabilir
- Daha ucuz

Elektroforez

- Yüklü moleküller bir elektriksel alana konulduklarında yüklerine göre ya pozitif (anod) ya da negatif (katod) kutba hareket ederler =“göç”
- Proteinlerin net pozitif yüklü olanları ya da net negatif yüklü olanları vardır (örn. katodik veya anodik peroksidazlar)
- Nükleik asitlerin fosfatlarına bağlı olarak sabit negatif yükü bulunmaktadır
- Proteinler ve nukleik asitler bir matriks ya da jel içerisinde elektroforeze edilirler
- Çoğunlukla jel, örneklerin yüklenmesi için gözler içeren ince bir kalıptır. Bütün jel elektroforez tamponu içerisine daldırılmıştır
- Tampon içerisinde yer alan iyonlar akımı taşırlar ve pH'yı işlem boyunca sabit tutmaya çalışırlar

Agaroz jeller

- Agaroz jellerin hazırlanması çok kolaydır: toz haldeki agaroz tampon solusyonu karıştırılır, ısı kullanılarak eritilir ve elektroforez kalıbına dökülür
- Agaroz deniz yosunundan ekstrakte edilmiştir (toksik değildir)
- Agaroz konsantrasyonu arttıkça, çözünürlük artar.
- *Low melting* agarozlar 65 C'de erir. Bu özel agarozlar çift-iplikçikli DNA'nın jelden kesilerek saflaştırılması (purifikasyon) amacıyla kullanılır

Agaroz jeller

- Agaroz jeller geniş bir separasyon oranı bulunurken göreceli olarak düşük ayırt edici güce sahiptirler. Agarozun yoğunluğu değiştirilerek 100 bp'den 50000 bp'ye kadar olan DNA fragmentleri standart teknikler kullanılarak ayrılabilirler
- **Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)** tekniğinde, elektroforez alanındaki akım yönü periyodik olarak değiştirilmektedir. Bu 50000'den x milyona bp'e değin moleküler büyüklükteki DNA parçalarının ayırımına olanak verir

Agaroz jeller

- **Voltaj;** Jele uygulanan voltaj artırılırsa büyük fragmentler küçüklere oranla daha hızlı hareket ederler. Bu nedenle, 2 kb'dan daha büyük fragmentlerin optimal çözünürlüğünü sağlamak amacıyla jelin elektrodlar arasında kalan kısmına cm başına 5 voltu geçmeyecek şekilde akım uygulanır. (cm değeri iki elektrod arasındaki mesafedir jelin boyu değildir).

Kullanılan Ekipman

- Bir elektroforez tankı ve güç kaynağı
- Jel dondurma kalıpları (farklı büyüklüklerde ve UV geçirgen plastikten)
- –Jelde örnek yükleme gözleri oluşturmak için taraklar
- Transilluminatör (bir ultraviyole ışık kaynağı)
- Fotoğraf makinası

Kimyasallar

- Electroforez tamponu, çoğunlukla Tris-acetate-EDTA (TAE) ya da Tris-borate-EDTA (TBE). İyonik güçleri farklı olup nükleik asitler için farklı göç oranları sağlarlar
- Yükleme tamponu, örneğin gözlere yerleşmesi için yoğunlaştırıcı bir bileşen (örn. sucrose) ve jelde örneklerin hareketlerini izlemek amacıyla bir ya da iki mavi renk sağlayan boyadan oluşur
- Nükleik asitlerin boyanmasında kullanılan florasan boya örn. Ethidium bromide, Safeview

Akrilamid jeller

- Akrilamid jel elektroforezinde kullanılan ekipman ve güç kaynakları da oldukça basittir.
- Bir elektroforez cihazı ve güç kaynağı
- Cam kalıplar
- Jelde örnek gözlerinin açılmasında kullanılan taraklar

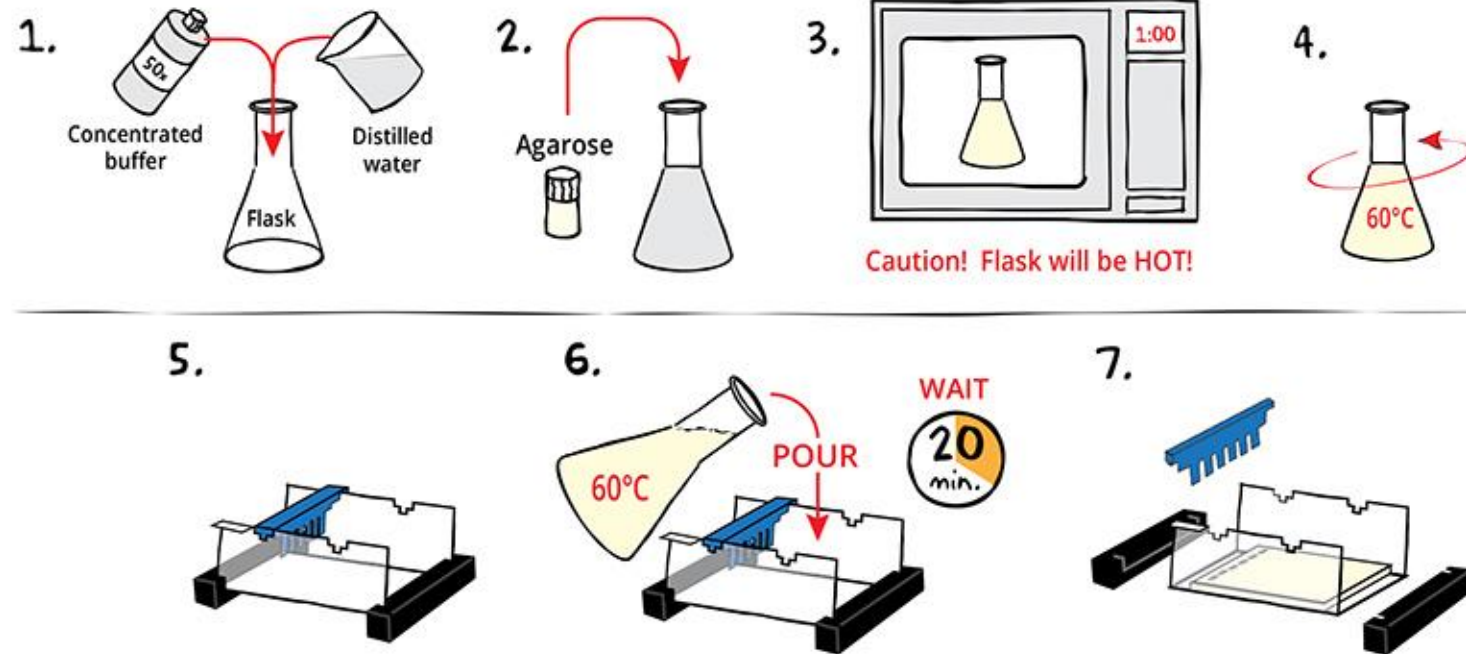
Akrilamid jeller

- Akrilamid güçlü bir neurotoksindir
- Toz halindeki akrilamid tartılırken maske takılması, akrilamid solüsyonları ile çalışılırken de eldiven giyilmesi gerekmektedir
- Poliakrilamid non-toksik olarak bilinmesine karşın serbest akrilamid içerebileceği düşünülerek eldiven giyilerek jeller tutulmalıdır
- Poliakrilamid çapraz bağlı bir akrilamid polimeridir
- Polimer zincirlerinin uzunluğu kullanılan akrilamidin yoğunluğu tarafından belirlenir (%3.5-20)
- Oksijen polimerizasyon işlemini engellediğinden bu jeller cam plakalar arasına veya silindirlere dökülür
- Poliakrilamid jellerin hazırlanması agaroz jellere göre daha zordur

Ethidium Bromid

- EtBr nukleik asitlerin bazları arasına bağlanarak DNA fragmentlerinin jelde saptanmalarını sağlayan florasan boyadır.
- Agaroz jellere önceden ya da DNA örneklerine karıştırılabileceği gibi elektroforez sonrasında bir tank içerisinde belirli yoğunlukta (0.5 ug/ml) hazırlanarak jel bu solüsyona daldırılabilir
- EtBr'nin DNA'ya bağlanması DNA'nın ağırlığı ve bütünlüğünü dolayısıyla da hareketliliğini değiştirebileceğinden bu son yöntemin uygulanması tavsiye edilmektedir

Elektroforez



Elektroforez

- <https://www.youtube.com/watch?v=MhJT9yjnl88>