

6. TEK BOYUTLU JEL ELEKTROFOREZİ UYGULAMALARI

A.BİLGİ

Elektroforez

Elektroforez elektrik akımı kullanılarak iyonlaştırılmış moleküllerin belirli bölgelere göç ettirilmesi tekniğidir. Moleküllerin bu göçü, elektrik akımının şiddetine, molekülün yüküne, büyüklüğüne, solüsyonun iyonik gücüne bağlı olarak değişir. Bileşiklerin iyonlaşması, elektroforezin temelini oluşturur. İyonik bileşikler zıt yükteki elektrotlara doğru molekül büyüklüklerine ve yüklerine bağlı olarak farklı hızlarda hareket eder elektriksel alanda birbirlerinden ayrılırlar.

Elektroforez çeşitleri kullanılan ayırma ortamına göre isimlendirilmektedir. Kağıt elektroforezi, selüloz asetat elektroforezi, agar jel elektroforezi, nişasta jel elektroforezi, poliakrilamid elektroforezi .

Günümüzde proteinlerin ayrıştırılmasında en yaygın olarak poliakrilamid jel kullanılmaktadır.

Poliakrilamid jel elektroforezi

Poliakrilamidin bis akrilamid ile polimerize edilmesi ile oluşur. Bu iki maddenin konsantrasyonları değiştirilerek istenilen özellikte jeller hazırlanabilmektedir. Böylece Jellerdeki porların büyüklüğü yürütülecek olan proteinlerin moleküler yapısı ve ağırlığına göre ayarlanabilmektedir.

Poliakrilamid jel elektroforezi:

1. SDS PAGE (denatüre edici page)
2. ND-PAGE(non denatüre edici page) olarak ikiye ayrılır.

ND PAGE (non denature edici page): Proteinlerin doğal yapılarını bozucu ajanlar kullanmadan yapılan PAGE yöntemidir. Daha çok jel üzerinde enzim aktivitelerinin tayininde kullanılır.

SDS PAGE (denatüre edici page): SDS (Sodyum dodesil sülfat) anyonik bir deterjan olup protein zincirlerinin birbirinden ayrılmasını sağlar. Ayrıca moleküllere (-) yük kazandırır ve moleküllerin sadece ağırlıklarına göre hareket etmesini sağlar.

B. UYGULAMA

SDS-PAGE Jeli

SDS PAGE Jel Hazırlanması

- ✓ SDS_PAGE jellerinin hazırlanacağı camların yüzeyinde örneklerin yürütmesinde problem oluşturabilecek kalıntı veya lekelerin bulunmaması gerekmektedir.
- ✓ Uygulamanın yapıldığı zeminin düzgünlüğü su tartısı ile kontrol edilmelidir.
- ✓ SDS_PAGE jellerinin hazırlanması esnasında kullanılacak APS çözeltisinin taze hazırlanması gerekmektedir.
- ✓ Jellerin polimerize olmasında APS başlatıcı, TEMED ise hızlandırıcı maddelerdir. Bu nedenle bu maddeler en son ilave edilmelidir ve hemen jel dökülmelidir.
- ✓ Hazırlanan polimerize olmamış jel vortekslenmemeli tüp hafifçe birkaç kez baş aşağı edilmelidir.
- ✓ Yürütme jelin döküldükten hemen sonra üst kısma yaklaşık 0.5-1 cm %20'li izopropanol dökülmelidir. İzopropanol jelin üst kısmının hava ile temasının önlenmesi, yüzeyinin kavisli (adhezyon, kohezyon kuvvetleri sebebi ile) olmaması ve hava kabarcıklarının üste çıkmasını sağlar. Polimerizasyon sonrası izopropanol dökülmeli ve distile su ile yıkanmalıdır. Yıkamanın ardından yüzeyde kalan su Whatman kağıtları ile koşturma jeline temas etmeden temizlenmelidir.
- ✓ Yürütme ve toplama jelleri taze olarak hazırlanmalıdır. Hazırlanan polimerize olmuş jeller 24 saat içerisinde kullanılmalıdır. Hemen kullanılmayacak ise saklama koşulu +4°C' dir.
- ✓ Protein molekül ağırlığı belirteci (marker) farklı uygulamalar gerektirebilmektedir. Farklı ticari ürünlerin uygulamaları ürün kataloğunda bulunmaktadır. Uygulama öncesi seçilen belirtecin kataloğu dikkatle incelenmelidir.
- ✓ Elektroforez sisteminde yürütme esnasında yürütme tankı kar içerisine gömülmeli ve elektrotların anot ve katot kısımlarının doğru şekilde bağlandığından emin olunmalıdır.

SDS-Poliakrilamid Yürütme Jeli (Resolving)

- 1.5 M Tris-HCl pH 8.8
- Akrlamid
- SDS %10
- Ultra Saf Su
- APS % 10
- TEMED

SDS-Poliakrilamid Toplama Jeli (Stacking)

- 0.5 M Tris-HCl pH 6.8
- Akrlamid

- SDS %10
- Ultra Saf Su
- APS % 10
- TEMED

SDS-PAGE Yürütme Tamponu 10X

1L

- Tris 30,3g
- Glisin 144g
- SDS 10g

PROTOKOL

1. SDS-Poliakrilamit jellerin hazırlanacağı camlar alkol ile temizlenir.
2. Yürütme ve toplama jelleri hazırlanır. (TEMED ve APS ilave edilmez)
3. % 10 APS taze olarak hazırlanır.
4. Koşurma jeli APS ve TEMED ilave edildikten sonra hafifçe karıştırılıp uygun şekilde yerleştirilmiş camların arasına dökülür ve üzeri % 20 izopropanol ile kapatılır.
5. Jel polimerize olduktan sonra izopropanol dökülür.
6. Distile su ile yıkanır ve koşurma jeline temas edilmeden camların yüzeyi ve jelin üzerinde kalan su Whatman kağıdı ile temizlenir.
7. Toplama jeline APS ve TEMED ilave edilir ve koşurma jelinin üzerine dökülür.
8. Üzerine çalışmamız için uygun tarak yerleştirilir.

Kaynaklar

Özel Duygu Demiralp, İğci Naşit, Peker Selen, Ayhan Beycan, 2014, Temel Proteomik Stratejiler, Ankara Üniversitesi Yayınevi, ISBN: 978-605-136-148-2, 2014

Özel Duygu Demiralp, İğci Naşit, Peker Selen, Ayhan Beycan, 2013, Temel Proteomik Stratejiler, Ankara Üniversitesi Yayınevi, ISBN: 978-605-136-117-8, 2013.