

7. İKİ BOYUTLU JEL ELEKTROFOREZİ UYGULAMALARI

PROTEİNLERİN AYRIŞTIRILMASI (İKİ YÖNLÜ JEL ELEKTROFOREZİ)

A.BİLGİ

İki yönlü jel elektroforezi, çok sayıda farklı kompleks protein içeren karışımlarının ayrılmasında önemli tekniklerden birisidir. 2D-Elektroforez binlerce proteinin tek adımda ayrılması açısından önemlidir. Bu yöntem prensipte iki ayırma tekniğinin kombinasyonudur.

1. Ayırma Tekniği: İzoelektrik Odaklama (IEF):

İzoelektrik odaklama, bir pH gradiyetinde yapılan elektroforezdir. Bunun için jelde pH gradienti oluşturmak gereklidir. pH gradienti düşük molekül ağırlıklı amfoterik maddelerin (amfolitler) yardımıyla oluşturulur. Elektrik akımı verildiğinde amfolitler hareket ederler, en asidik amfolitler katoda yakın olacak şekilde izoelektrik noktalarına göre sıralanırlar. Bunun sonucu jel içinde anottan katoda doğru azalan bir pH gradienti oluşur. Protein karışımı jelde yürütüldüğünde her protein kendi izoelektrik pH'sı bölgesine geldiğinde yüksüzleşir ve o noktada hareketsiz durur.

2. Ayırma Tekniği: SDS-PAGE: İzoelektrik noktalarına göre ayrılmış proteinlerin bulunduğu jel, ikinci bir jel üzerine konur ve molekül kütlesine bağımlı bir ayırma işlemine tabi tutulur. İki ayırma tekniğinin beraber kullanılması mükemmel yakın bir ayırma sağlar. Özellikle çok sayıda protein içeren karışımların ayrıştırılmasında bu yöntemin kullanılması zorunludur.

B. UYGULAMA

İKİ BOYUTLU JEL ELEKTROFOREZİ :

I. Rehidratasyon

1. Yüklenecek protein miktarı ve pH aralığına göre, 7cm, 11 cm,17 cm veya 24 cm IPG striplerden uygun olan seçilir.

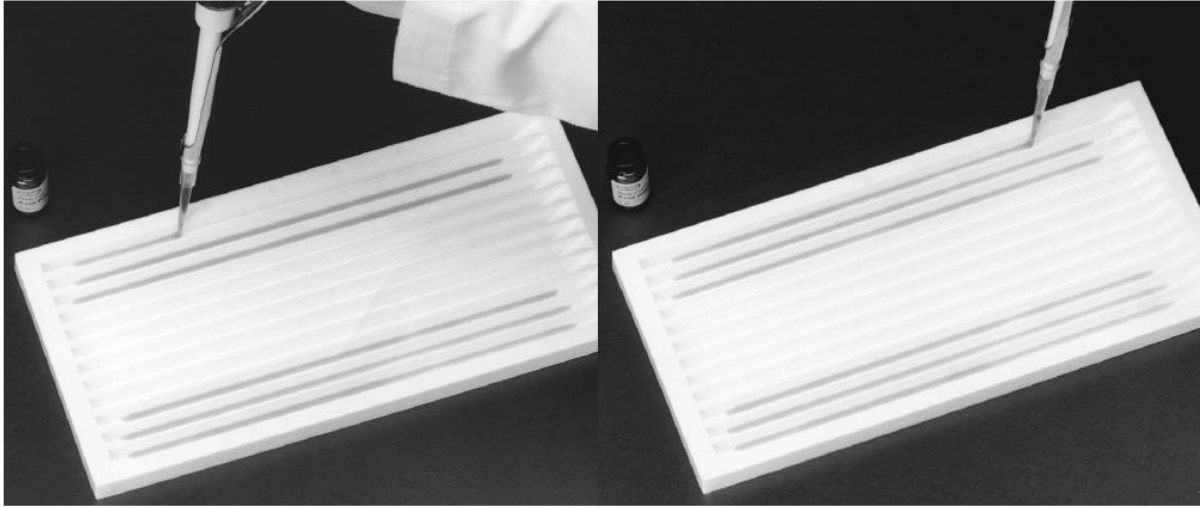
2. Protein miktar tayini sonuçlarına göre, kullanılan strip uzunluğuna göre uygun protein miktarı seçilir ve rehidratasyon tamponu (7 M üre, 2 M tiyoüre, %4 CHAPS, %1 amfolit, pH

3-10, 10 mM DTT, bromo fenol mavisi) ve protein ekstraktı gerekli oranda pipetle iyice karıştırılır.

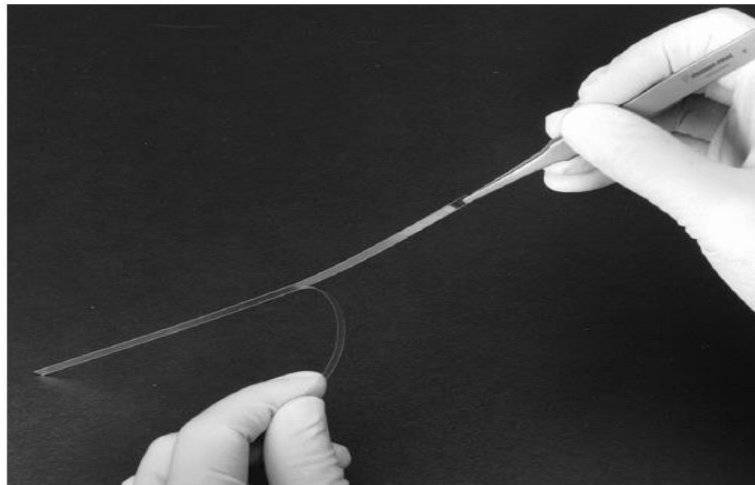
3. Rehidratasyon-equlibrasyon/IEF tepsinine karışım tek duvar boyunca ve iki uca fazla yaklaşılmadan yüklenir.

Table. Guidelines for sample loading on IPG strips.

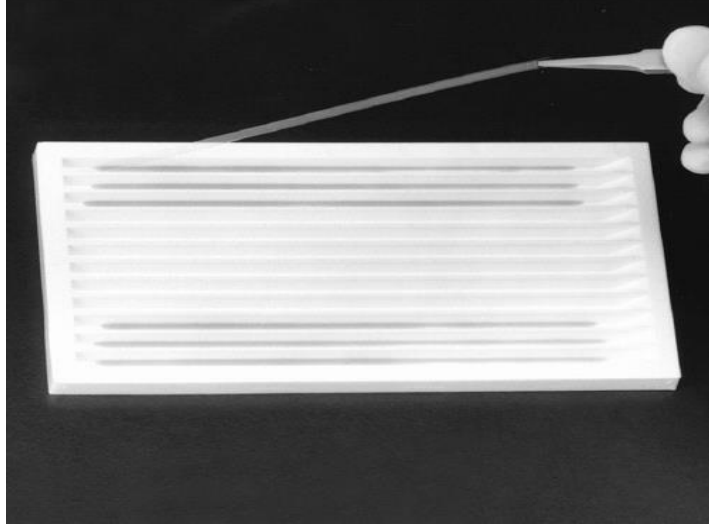
	IPG Strip Length				
	7 cm	11 cm	17 cm	18 cm	24 cm
Rehydration volume per strip	125 μ l	185 μ l	300 μ l	315 μ l	410 μ l
Protein load					
Silver stain	5-20 μ g	20-60 μ g	50-80 μ g	50-80 μ g	80-150 μ g
Coomassie G-250	50-100 μ g	100-200 μ g	200-400 μ g	200-400 μ g	400-800 μ g



4. Tüm protein rehidratasyon karışımları tepsiye yüklendikten sonra, forseps kullanarak IPG striplerin üzerindeki koruyucu bant sıyrılır.



5. Koruyucu bantı sıyrılan stripler jel yüzü aşağıya bakacak şekilde nazikçe karışımın üzerine yerleştirilir. 10-30 dakika oda ısısında bırakılır.



Not: Örnek karışımının striplerin arka kısmındaki plastiğe değmemesine dikkat edilmelidir. Bu kısımlarda örnek karışımı jel materyalinden emilmez. Ayrıca strip içinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmeli. Hava kabarcığı oluştuğu takdirde forsepsi kullanarak yukarı aşağı oynatılarak yok edilir ya da tepsinin uç kısmına doğru hareket ettirilir.

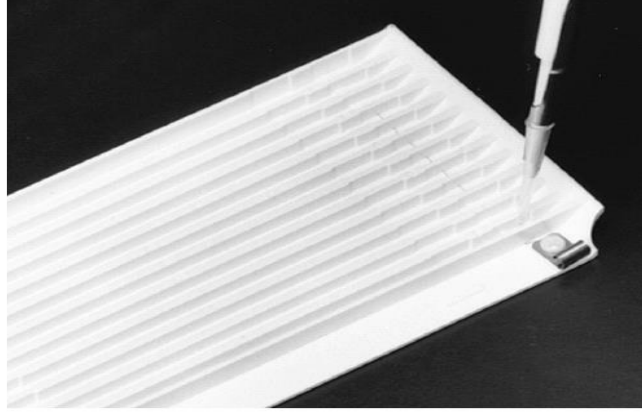
6. Striplerin üzeri yeterli miktarda mineral oil ile kaplanarak rehidratasyon süresince buharlaşma önlenir.

7. Rehidratasyon deney koşullarına göre aktif olarak 50V da 11-16 saat yada pasif olarak bench üstünde 11-16 saat rehidratasyona bırakılır.

II. İzoelektrik Fokoslama

1. Rehidrate olan IPG striplerle aynı boyutta seçilen kuru ve temiz IEF fokoslama tepsişi bench üzerine alınır.

2. Forseps kullanılarak fokoslama tepsisinin iki kenarındaki elektrotların üzerine elektrot kağıtları konulur. Kağıtların üzeri deiyonize su ile ıslatılır.



3. IPG stripler rehidratasyon-equlibrasyon tepsisinden forseps yardımıyla alınır ve üzerindeki mineral oil kurutma kağıdı üzerine uç bölgesinden değdirilmek üzere uzaklaştırılır.

4. Stripler üzerindeki + işaretli uç tepsi üzerindeki + işaretli uca gelecek ve jel yüzü aşağıya bakacak şekilde IEF tepsisine yerleştirilir.



5. Striplerin üzeri mineral oil ile kaplanır.

6. IEF elektroforezi PROTEAN IEF cell cihazında 6-8 saat yapılır.

III. Equlibrasyon (dengeleme) 1 ve Equlibrasyon (dengeleme) 2 aşamaları (İkinci boyuta hazırlık)

1. Elektroforezi tamamlanan stripler rehidratasyon-equlibrasyon tepsisine jel yüzü yukarı bakacak şekilde alınır.

2. Gerekli miktarda Equlibrasyon (dengeleme) 1 tamponu (6 M üre, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, %2 SDS, %20 gliserol, %2 DTT) striplerin üzerine eklenerek çalkalayıcıda 15 dakika nazikçe çalkalanarak inkübe edilir.

Strip Length	7 cm	11 cm	17 cm
Equilibration Buffer I	2.5 ml	4 ml	6 ml
Equilibration Buffer II	2.5 ml	4 ml	6 ml

3. İnkübasyon bitince equilibrasyon (dengeleme) 1 tamponu tepsinin kenarından sızdırılarak dökülür.

4. Striplerin üzerine equilibrasyon (dengeleme) 2 tamponu (6 M üre, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, %2 SDS, %20 gliserol, %2.5 iyodoasetamid, az miktarda bromo fenol mavisi) eklenerek çalkalayıcıda 15 dakika inkübe edilir.

5. İnkübasyon bitince equilibrasyon (dengeleme) tamponu tepsinin kenarından sızdırılarak dökülür.

IV. İkinci Boyut. SDS-PAGE Jeli

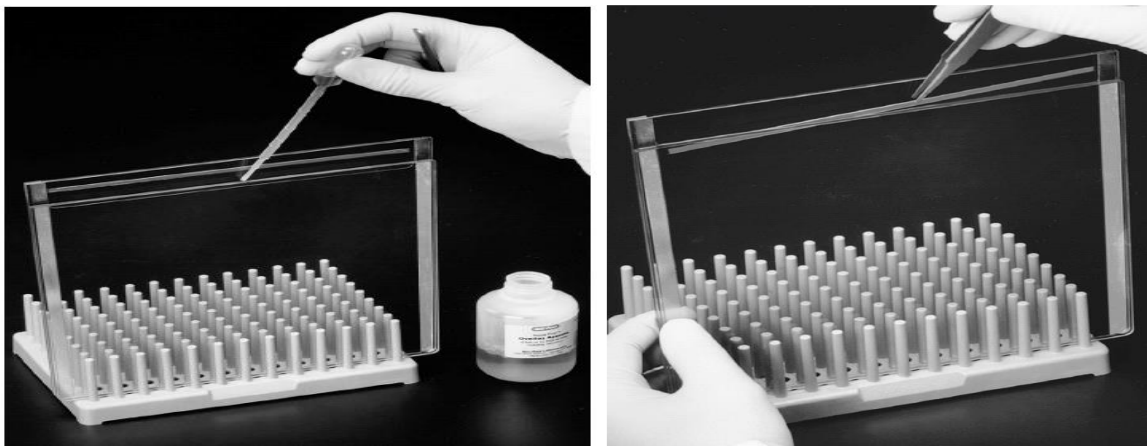
1. SDS-PAGE %12 koşturma jeli ve %4 lük yığma jeli olarak hazırlanır.

2. Kullanılacak elektroforez tankına ait camların boyutuna uygun miktarda hazırlanan koşturma jeli döküldükten sonra pastor pipeti yardımıyla tercihen %20 isopropanol jelin üzerine dökülerek oda ısında polimerize olması beklenir (15-45 dk).

3. Polimerizasyon olduktan sonra sonra %4 lük yığma jeli dökülür ve uygun tarak yerleştirilir.

4. Polimerizasyon olduktan sonra tarak çıkartılır.

5. Equilibrasyon (dengeleme) aşamaları tamamlananan IPG stripler %0.5'lik agaroz solüsyonu yardımıyla SDS-PAGE jellerine yüklenir.



6. Elektroforez tankları yeterli miktarda 1X yürütme tamponu ile doldurularak elektroforez başlatılır.

Strip Length	7 cm	11 cm	17 cm
Electrophoresis cell	Mini-PROTEAN	Criterion	PROTEAN II XL
Conditions	200 V, constant	200 V, constant	16 mA/gel for 30 min, then 24 mA/gel for ~5 hr
Approximate run time	40 min	65 min	5.5 hr

7. Agaroz solüsyonunda bulunan Bromofenol Blue izleme boyası yardımıyla elektroforezin sonlanması takip edilir.

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 0.5-1cm %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-Poliakrilamit Yürütme Jeli (Resolving)

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

SDS-Poliakrilamit Toplama Jeli (Stacking)

- 0.5 M Tris-HCl pH 6.8
- Akrilamid
- 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)

NOT: *Yükleme miktarları*
<http://proteomics.awardspace.info/Chemistry%20Calculator.html> adresinden jel yüzdesine, sayısına ve hacmine bağlı olarak belirlenir.

3. % 10 APS taze olarak hazırlanır.
4. Koşturma 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 koşturma jeline temas edilmeden camların yüzeyi ve jelin üzerinde kalan su Whatman kağıdı ile temizlenir.
7. Toplama jeline APS ve TEMED ilave edilir ve koşturma jelinin üzerine dökülür.
8. Üzerine çalışmamız için uygun tarak yerleştirilir.
9. Jel polimerize olduktan sonra strip yüklenmesi için hazırdır.

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.