

**11. Hafta:** Elektroforez: Elektroforez çeşitleri ve teknikleri, SDS ile molekül kütlesi tayini.

**Prof. Dr. Şule Pekyardımcı**

Ortamın pH'sına göre (+) veya (-) olarak yüklenen biyomoleküllerin, bir elektrik alanında ayrılmasını sağlayan bir tekniktir. Bu yöntemde biyomoleküller elektriksel yükleri ve büyüklüklerine göre hareket ederler. Negatif yüklü tanecikler elektriksel alanda anoda, pozitif yüklü tanecikler ise katoda gider. Bu harekette molekülün büyüklüğü, şekli ve kimyasal yapısı önemlidir. Yaygın olarak kullanılan elektroforez sistemleri basit, hızlı, oldukça etkin ve güvenli bir ayırma sağlarlar. Bu teknikle amino asitler, peptitler, proteinler, nükleik asitler gibi yüklü moleküller başarılı bir şekilde analiz edilebilir. Protein çalışmalarında kullanılan ilk elektroforez yöntemi Tiselius tarafından 1937'de kullanılmıştır.

Yüklenmiş tanecikler, yüklerine ve büyüklüklerine bağlı olarak belirli bir hızda hareket ederler. Sabit voltajda yüklenmiş moleküllerin hareketi sadece yük ve sürtünmeye bağlıdır. Lineer DNA parçaları veya küresel proteinler gibi benzer konformasyonlardaki bileşikler için yerçekimi aynı olduğu için farklılıklar yük ve kütleyle göre olur.

Elektroforezin kullanım alanları

- Saflık kontrolü
- Molekül kütlesi belirleme
- Kalıtsal veya kalıtsal olmayan hastalık belirleme
- Enzim izozimlerinin belirlenmesi

Proteinlerin amino asit dizilimleri farklı olduğu için, net yükleri, büyüklük ve şekilleri de farklıdır. Tüm bu faktörler, proteinlerin elektroforezde nasıl hareket edeceklerini belirler.

### **Elektroforez Çeşitleri**

1. Kağıt ve selüloz asetat elektroforezi
2. İnce tabaka elektroforezi
3. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)
4. Agaroz jel elektroforezi

## 5. Kapiler elektroforez

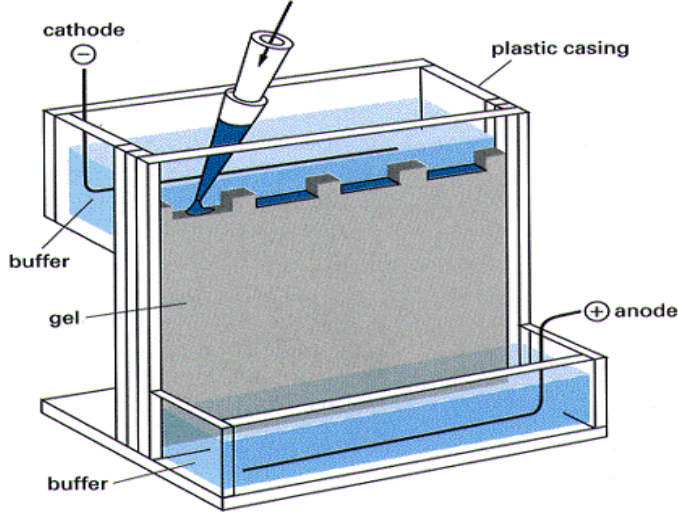
En yaygın olarak kullanılan destek matriksleri agaroz ve poliakrilamittir. Bunların yapıları birbirine benzemese de iki matriks de gözenekli jeller oluşturur. Agarozun jel gözenekleri büyük olduğu için genelde daha büyük molekül kütleli olan nükleik asitler ve proteinlerin ayrılmasında kullanılır. Poliakrilamitler ise küçük gözenekli jeller oluşturur ve birçok protein ve oligonükleotitlerin ayrılmasında kullanılır.

### **Jel Elektroforezi**

Bu elektroforetik yöntemde destek matriksi olarak poliakrilamit kullanılır. Bu akrilamit monomerlerinin çapraz bağlayıcı N,N'- metilen bisakrilamit ile kovalent bağlanmasından oluşan bir polimerdir. Polimerizasyon işlemi kimyasal veya fotokimyasal yolla oluşturulur. Oluşan oksijen serbest radikallerinin ortamdan uzaklaştırılması için tüm jel çözeltilerinin kullanılmadan önce inert bir gazla ortamdan uzaklaştırılması gerekir.

### **Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)**

Akrilamid polimerlerinin sentetik olarak elde edilmesinden sonra, jel elektroforezinde yeni çığırklar açılmıştır. PAGE ile serum proteinlerini 20'den fazla fraksiyona ayırmak mümkündür. Poliakrilamid, polimerizasyondan önce akrilamid içeriği değiştirilerek gözenekliliği kolaylıkla değiştirilebilen inert bir destek materyalidir. PAGE yöntemi nativ (doğal) proteinlerin ayrılması için uygulanabilir. Ayrıca bu teknik sodyum dodesil sülfat (SDS) varlığında proteinler denatüre edilerek molekül kütlesi tayininde de kullanılır. SDS-PAGE moleküler biyolojideki araştırmalar için yaygın olarak kullanılan protein elektroforez tekniğidir. Bu teknik aynı zamanda klinik laboratuvarlardaki rutin kullanımlara göre çok daha iyi bir ayırma sağlayarak çok sayıdaki alt ünitenin ayrımını yapar.



### **Molekül Kütlesinin Belirlenmesi**

Peptitlerin molekül kütlesinin logaritması ile jeldeki relatif göç hızları ( $R_f$  değeri) arasında doğrusal bir ilişki vardır. Jeldeki göç hızının bir fonksiyonu olan  $R_f$  değeri belirlendikten sonra standart grafikler yardımıyla molekül kütlesi belirlenir.

Bu işlemin yapılabilmesi için standart olarak kullanılacak polipeptitlerin  $R_f$  değerleri absise ve bunların molekül kütlelerinin logaritmik değerleri de ordinata yerleştirilerek standart grafik çizilir. Molekül kütlesi bilinmeyen peptide ait bant için  $R_f$  değeri bulunduktan sonra grafikte bu değere karşılık gelen noktadan bilinmeyen molekül kütlesinin değeri bulunur.