

BİYOTEKNOLOJİDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Doç. Dr. Öğünç MERAL

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez

- Elektroforez, yüklü moleküllerin bir elektriksel alandaki hareketlerinin izlendiği teknik tir.



- Çözünmüş durumdaki moleküllerin elektrik yüklerinin kitlelerine oranıyla belirlenen hızlarda elektriksel alanda göç etmeleri prensibine dayanır.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez

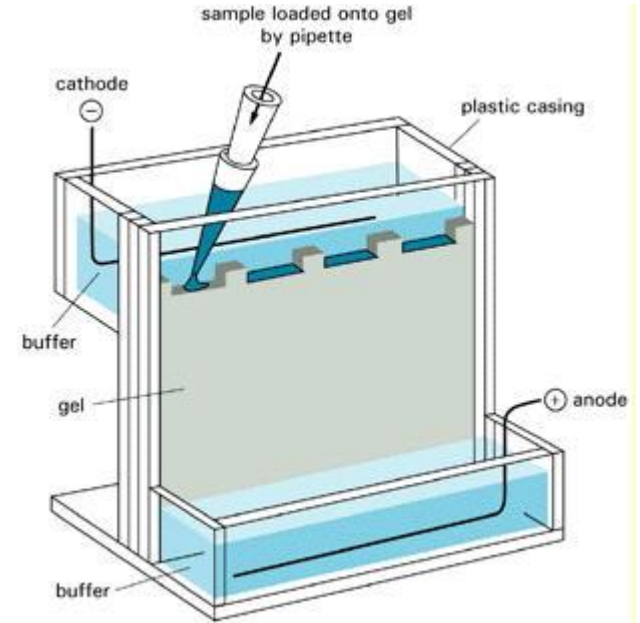
• Elektroforez için dört şeye ihtiyaç vardır:

- İyonların hareket edebileceği uygun bir ortam (*destek ortamı*).
- Elektriksel alanı oluşturmak için doğru akım sağlayacak *güç kaynağı*.
- Uygun pH'da bir *tampon çözelti*.
- Birbirinden ayrılan bantları kantitatif olarak değerlendirebilen *dansitometre*.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez

- Elektroforezde analizi yapılacak örnek bir **destek ortamına** uygulanır.
- Modern elektroforetik tekniklerde destek ortamı olarak daha çok jeller tercih edilmektedir.
- Jeller, içerisinde uygun bir tampon bulunan bir elektroforez aygıtına yerleştirilerek işlem gerçekleştirilir.
- Katı jel desteği ile ayrımı yapılacak moleküllerin hareketi, moleküllerin yüküne, boyutuna, biçimine, kimyasal içeriğine ve uygulanan elektriksel alana bağlıdır.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez

- Çoğunlukla basit elektrik devrelerin olan elektroforez aygıtlarında iki temel eşitlik önem taşır.
- **$V(\text{volt})=I(\text{akım}) \times R(\text{direnç})$**
- Voltaj uygulaması sonrası sabit akımın tüm sistemlerden geçişi sırasında bir direnç oluşur; bu da uygulanan toplam voltajda düşmeye yol açar.
- Elektroforez aygıtında oluşan direncin hemen tamamı jel tarafından ortaya konulur.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

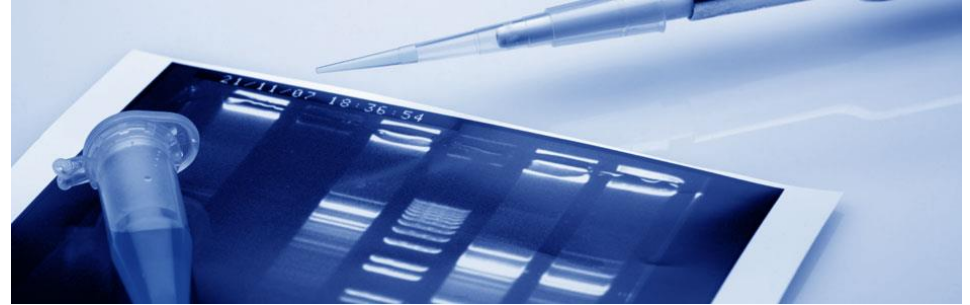
➤ Elektroforez

- Elektroforezde önemli ikinci eşitliğe göre sistemin ürettiği güç (P, Watt) direnç ile akımın karesinin çarpımına eşittir. ($P=I^2R$)
- Üretilen güç ısı şeklinde ortaya çıkar ve elektroforez aygıtı, jelin sıcaklığını arttırmaksızın ancak belli miktarda gücü dağıtabilir.
- Elektroforezde elektriksel değişkenlerden biri (akım, voltaj ya da güç) daima sabit tutulur.
- Direnç artarsa sabit akımda göç hızı düşer ısı açığa çıkar
- Sabit voltajda göç hızı düşer yeni bir ısı oluşmaz
- Güç sabit tutulursa hareket hızı yavaş ama ısı artışı olmaz



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez



• **Elektroforez türleri**

➤ Kağıt elektroforezi

➤ Selüloz asetat elektroforezi

➤ Jel elektroforezi

➤ Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)

➤ Agaroz jel elektroforezi

➤ Kapiller elektroforez

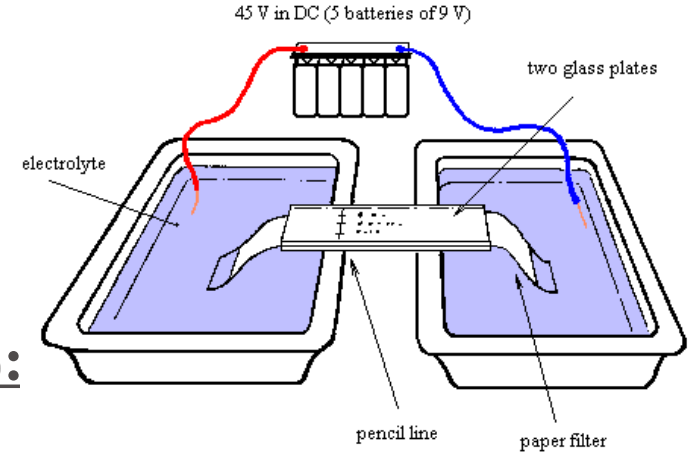
SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez

● Sellüloz Asetat Elektroforezi (CAE):

- Selüloz asetat, fiberler halinde ağsı bir yapı oluşturur. Bu ağsı yapının gözenek büyüklüğü, selülozun asetilasyon miktarıyla belirlenir. Selüloz asetat ile asetillenmemiş kısmı oluşturan selüloz nitratın oranı, bu gözenek büyüklüğünü belirler.

- Selüloz, amino asitler gibi düşük molekül ağırlıklı olan moleküller için kullanılır.



Avantajları:

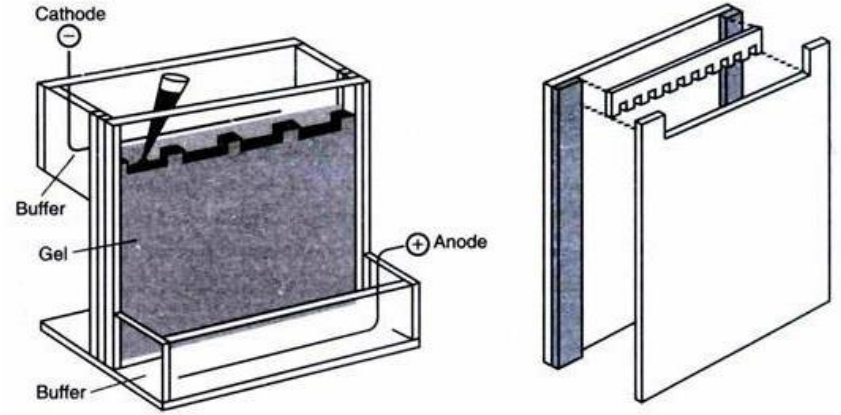
- Ucuz
- Saydam hale getirilebilir
- Hızlı
- Uzun süre saklanabilir

Dezavantajları:

- Rezolüsyon jeldeki kadar iyi değil
- Standardizasyonu iyi değil

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroferez

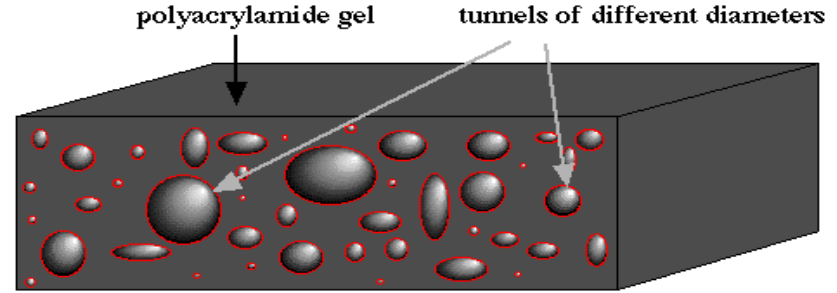


● Poliakrilamid Jel Elektroferezi (PAGE):

- Akrilamidin polimerizasyonuyla hazırlanan poliakrilamid jellerin elektroforetik ayırmalarda küçük, orta ve büyük boyuttaki moleküller için uygundur.
- Poliakrilamid jeller akrilamid ve çapraz bağlayıcı N,N'-metilen-bis-akrilamidin serbest radikal polimerizasyonuyla hazırlanır.
- Kimyasal polimerizasyon bir başlatıcı-katalizör sistemi (**amonyum persulfat-TEMED**) tarafından kontrol edilir.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroferez



● Poliakrilamid Jel Elektroferezi (PAGE):

- Bir jelin ayırıştırma gücü ve molekül boyutu aralığı akrilamidin ve bis-akrilamidin konsantrasyonuna bağlıdır.
- Düşük konsantrasyonda daha büyük porlar oluşur ve yüksek molekül ağırlıklı biyolojik moleküllerin analizi yapılabilir.
- Yüksek konsantrasyonda ise daha küçük porların oluşumu düşük molekül ağırlıklı olanların analizine izin verir.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez

• Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE):

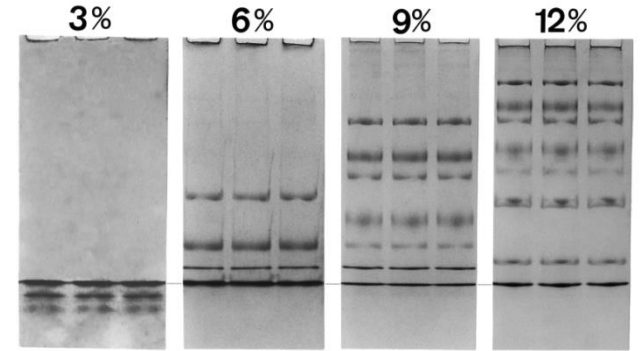
- **Jelin biçimine göre:**
 - Tüp jel elektroforezi
 - Tabaka jel elektroforezi
- **Jelin konumuna göre:**
 - Dik jel elektroforezi
 - Horizontal jel elektroforezi
- **Jelin bileşimine göre:**
 - Native (doğal) jel elektroforezi
 - SDS'li (sodyum dodesil sülfat) jel elektroforezi



- SDS-PAGE moleküler biyolojideki araştırmalar için en yaygın olarak kullanılan protein elektroforez tekniğidir.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez



● Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE):

➤ Jelin gözenek dağılımına göre

➤ Homojen (düz) jel elektroforezi

Bu elektroforezde, akımın uygulandığı iki elektrod arasındaki mesafe boyunca jel konsantrasyonu sabittir. Dolayısıyla, gözenek çapı homojendir.

➤ Gradyent jel elektroforezi

İki elektrod arasında jel konsantrasyonu giderek artar, gözenek çapı da giderek küçülür.

➤ Jelin türüne göre:

➤ Continious (devamlı) jel elektroforezi

Aynı konsantrasyon ve pH'da jel hazırlanır.

➤ Discontinious jel elektroforezi

Farklı konsantrasyon ve pH'da jel bölgeleri hazırlanarak yapılır.

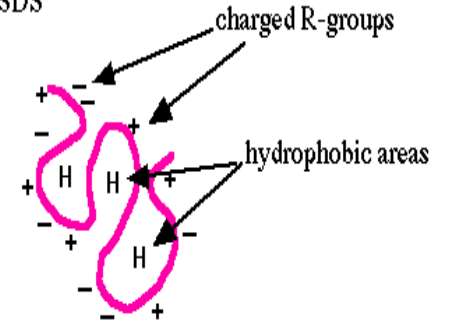
SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez

● Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE):

- SDS, örnekteki protein moleküllerinin etrafında boşluk kalmayacak şekilde bir katman oluşturur. Sonuçta, her molekül, homojen bir şekilde (-) yükle kaplanmış olur. Sonuçta ayrışma, moleküllerin kendi yükünden bağımsız olacağından, doğrudan doğruya molekül ağırlıklarına göre olur. Bu yöntem daha çok proteinlerin molekül ağırlıklarının saptanmasında kullanılır.

BEFORE SDS



AFTER SDS

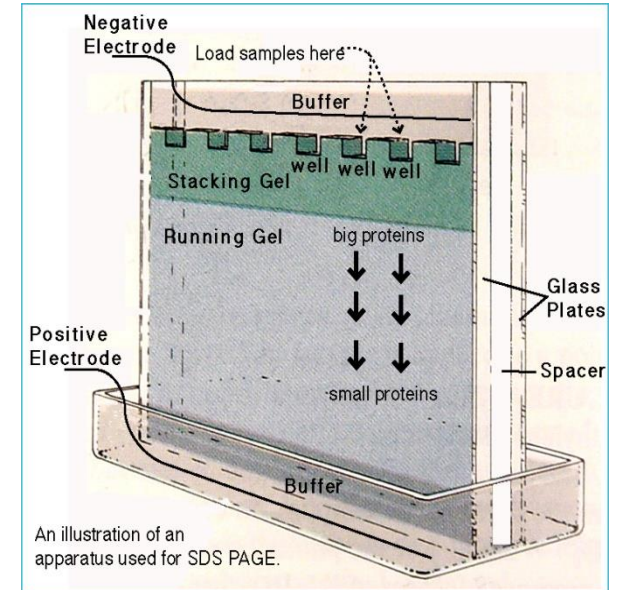


SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez

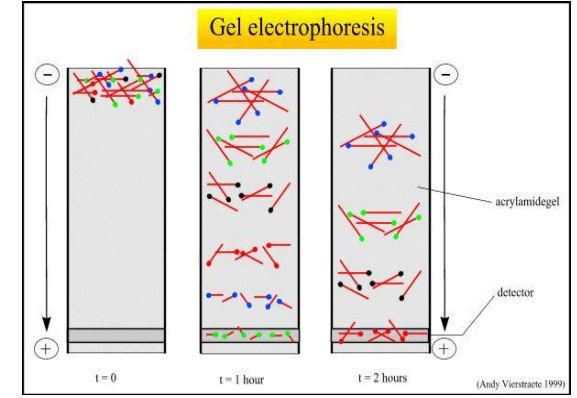
● Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE):

- Biyolojik moleküllerin çoğu negatif yüklü olduğu için anoda doğru hareket edeceklerinden, jel elektroforezi genellikle bazik pH'da gerçekleştirilir.
- Analiz edilecek örnek, bir izleme boyası ile birlikte, jelin tepesine uygulanır ve sistemden elektrik akımı geçirilir.
- Örnekteki bileşenlerden daha hızlı hareket eden izleme boyası jelin bitimine ulaştığında akım kesilir, jel çıkarılır ve boyanır.



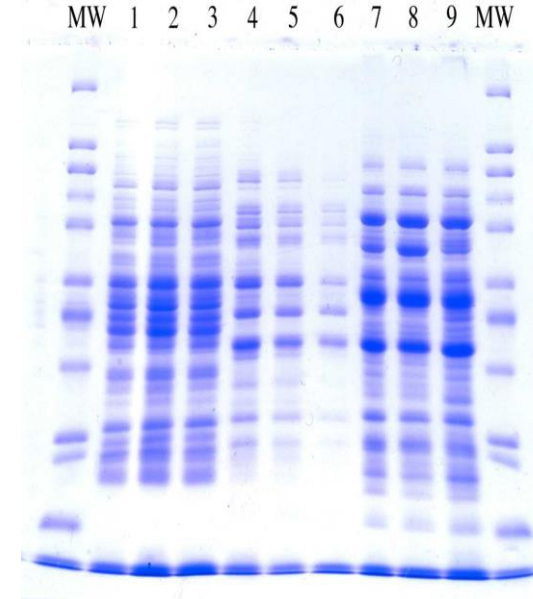
SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez



● Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE):

- Polimerizasyon sırasında jelin üst kısmına yerleştirilen bir tarak jelde küçük kuyucukların oluşumunu sağlar.
- Polimerizasyondan sonra tarak çıkarılır.
- Jel iki tampon deposu arasına yerleştirilir.
- Kuyucuklara örnekler konular ve akım geçirilir.
- Elektroforez bitiminde görüntüleme için jel genellikle uygun şekilde boyanır.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez

• Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE):

- Poliakrilamid jel elektroforezi uygulamalarında bazı zorluklar vardır;
 - Jellerin hazırlanmasında kullanılan akrilamid monomeri bir **nörotoksin**dir.
 - Katalizör olarak kullanılan diğer rekatifler kararlı olmadıkları için dikkatli çalışmayı gerektirirler.
 - Jellerin hazırlanmasındaki zorluklar.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez

- İzoelektrik odaklama:
- Proteinlerin elektroforetik analizi için geliştirilmiş etkin bir yöntem izoelektrik odaklama (isoelectric focusing, IEF) dir.
- Bu teknikte elektroforetik hareket pH'nın fonksiyonu olarak ele alınır.
- Bir proteinin net yükü pH'ya bağımlıdır.

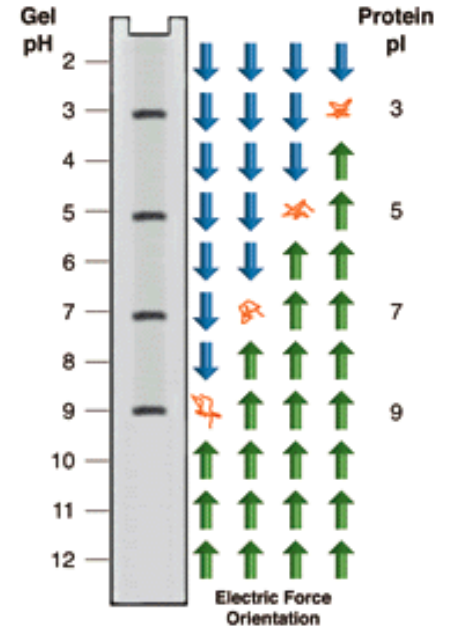


SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez

● İzoelektrik odaklama:

- Proteinler izoelektrik pH'larının (net yükü sıfır olduğu pH) altında pozitif yüklüdürler ve sabit pH'lı bir ortamda negatif yüklü elektroda (katoda) doğru göç ederler.
- İzoelektrik noktalarının üstündeki pH'da ise, protein negatif yüklü hale geçer ve pozitif yüklü elektroda (anoda) doğru göç eder.
- Eğer elektroforez ortamının pH'sı proteinin izoelektrik pH'sına eşit ise proteinin net yükü sıfır olacağından elektrodların hiçbirine doğru hareket etmez.

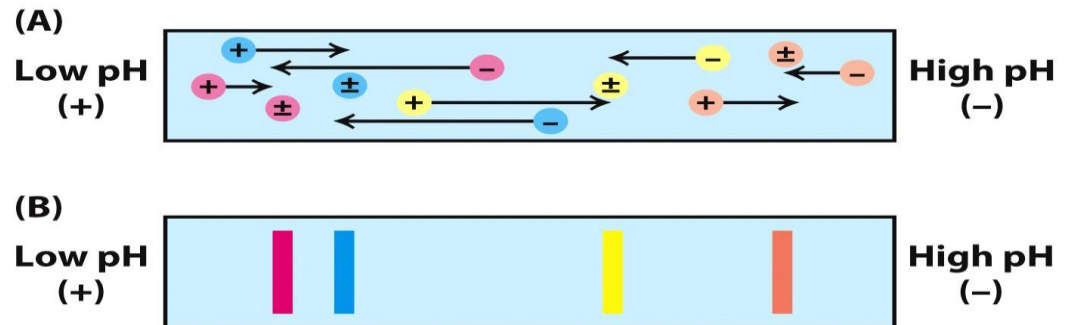
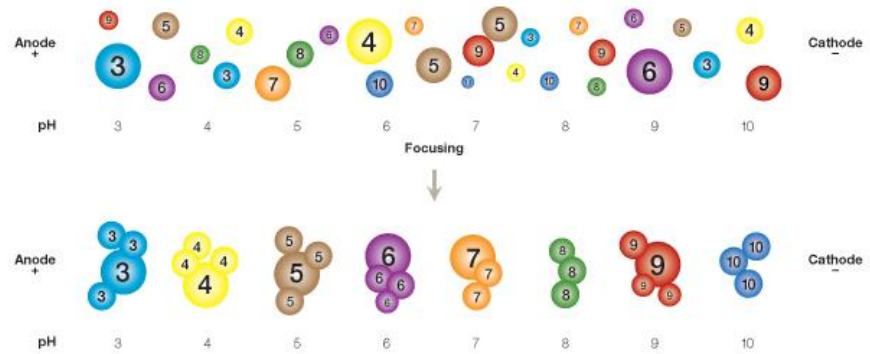


SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez

● İzoelektrik odaklama:

- Bir karışımındaki farklı protein molekülleri farklı izoelektrik pH değerlerine sahip olacaklarından bunların IEF uygulamasıyla ayrılmaları mümkündür.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez

- İzoelektrik odaklama:

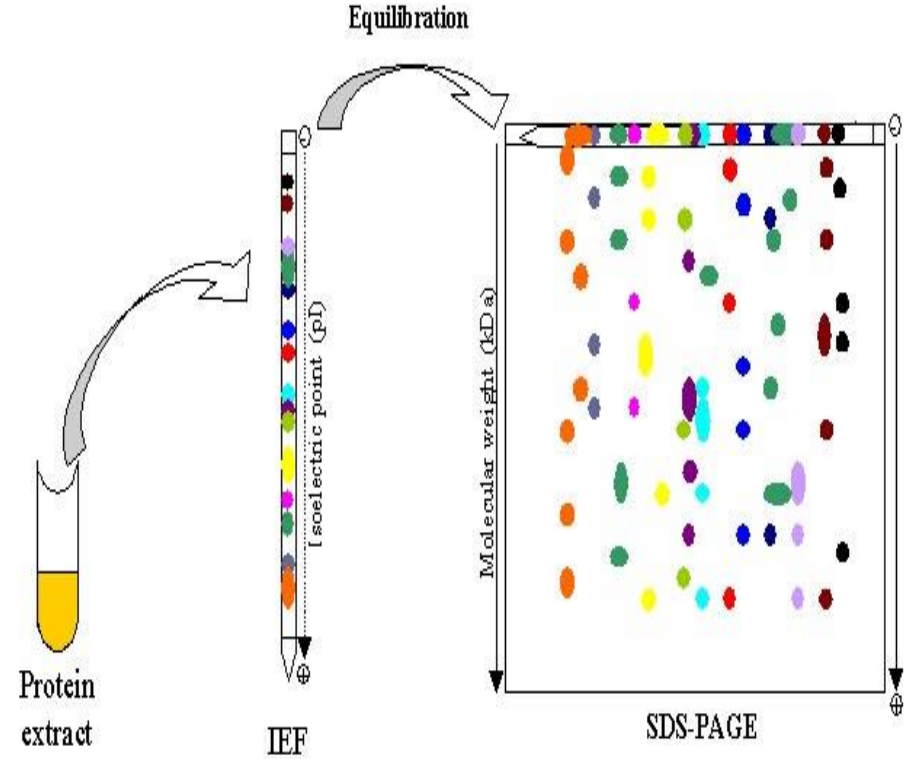


SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroferez

● İki Boyutlu Elektroferez:

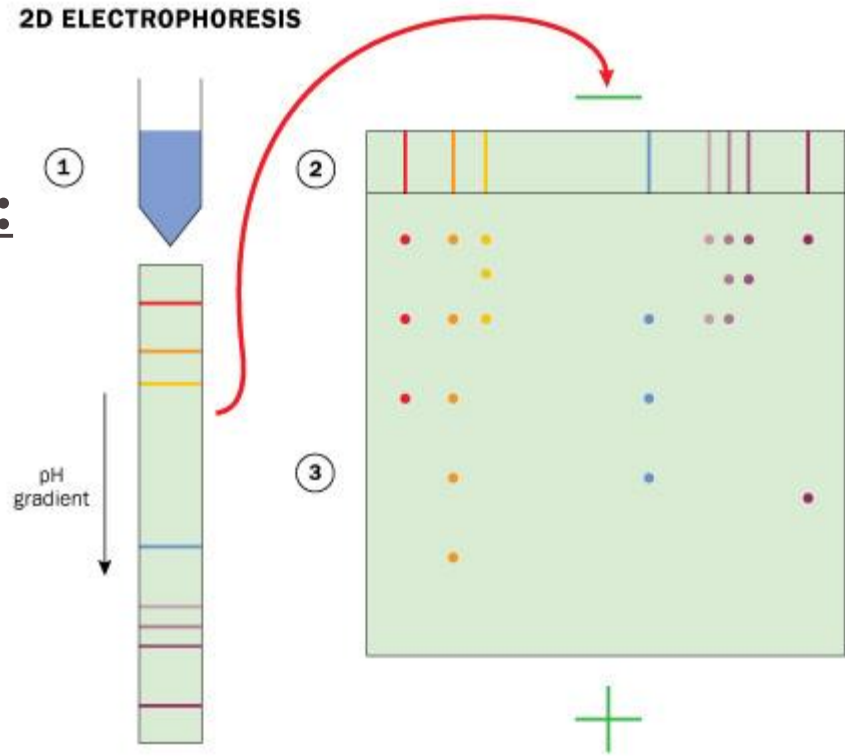
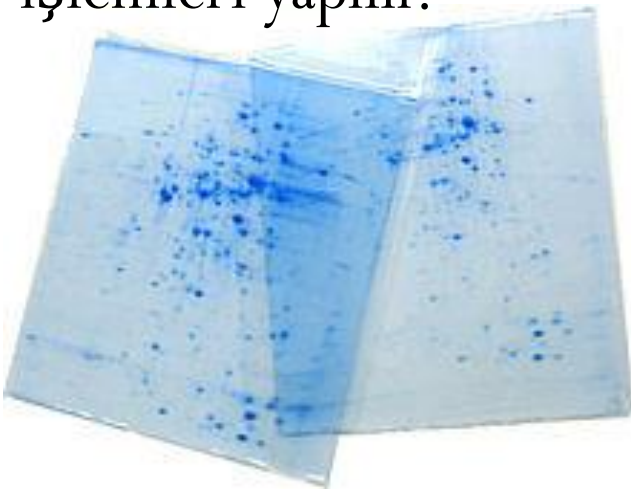
- SDS-PAGE ile proteinlerin ayrımının molekül boyutuna göre yapılmasına karşılık IEF ile ayırım yüke göre yapılır.
- Bu iki yöntemin bileşimi olan iki boyutlu (2D-) elektroferez, kompleks protein karışımlarının ayrışımında önemli ilerlemelere yol açmıştır.
- Son yıllarda etkin bir biçimde kullanılan 2D- elektroferez **proteomik çalışmalarının** da temel tekniklerinden biridir.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez

- İki Boyutlu Elektroforez:
- Önce **IEF** sonra **SDS-PAGE** işlemleri yapılır.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

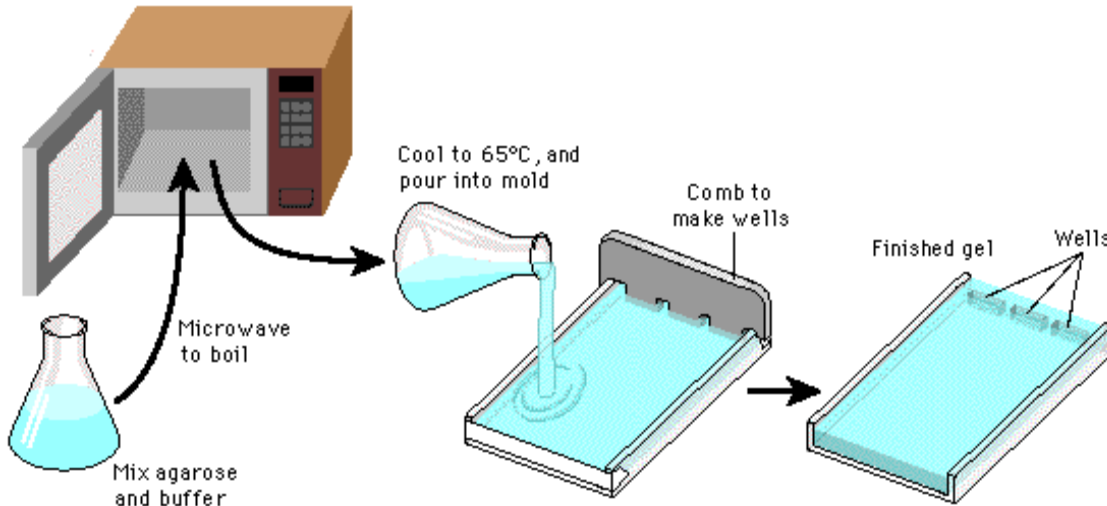
➤ Elektroforez

- Agaroz jel elektroforezi:
 - Poliakrilamid jeldeki küçük por boyutları büyük **DNA molekülü** parçalarının ayrımı için uygun değildir.
 - Destek ortamı olarak agaroz kullanılır.
 - Bir algden elde edilen agaroz galaktopiranoz türevlerinin lineer bir polimeridir.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez

• Agaroz jel elektroforezi:



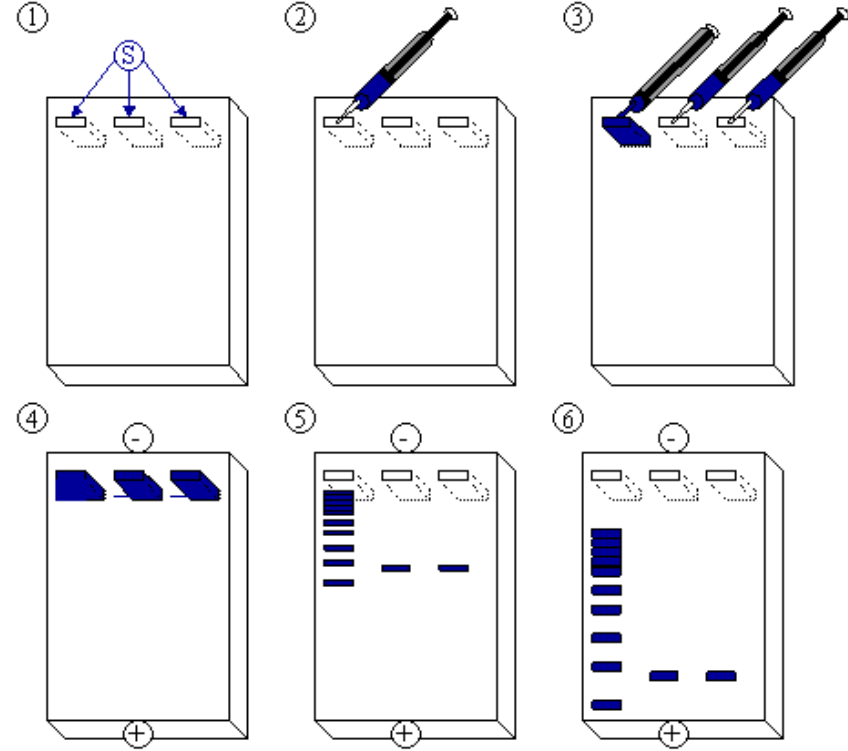
- Jel elektroferez tamponuna konulmuş agarozun yüksek sıcaklıkta çözündürülmesi ile hazırlanır.
- Agaroz çözeltisi 50°C civarına kadar soğutulduktan sonra yatay sistemde jel tepsisine dökülür.
- Ayrımı yapılacak örnek taraklarla oluşturulmuş kuyucuklara konur ve ayırım tamamlanincaya kadar elektrik akımı uygulanır.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez

● Agaroz jel elektroforezi:

- Proteinler gibi nükleik asitlerde molekül ağırlıklarının logaritmasıyla ters orantılı hızda göç ederler.
- Bu nedenle analiz edilen moleküllerin ağırlıkları bilinen standart nükleik asit parçalarının da yürütülmesiyle tayin edilebilir.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez

• Kılcal (kapiler) elektroforez:

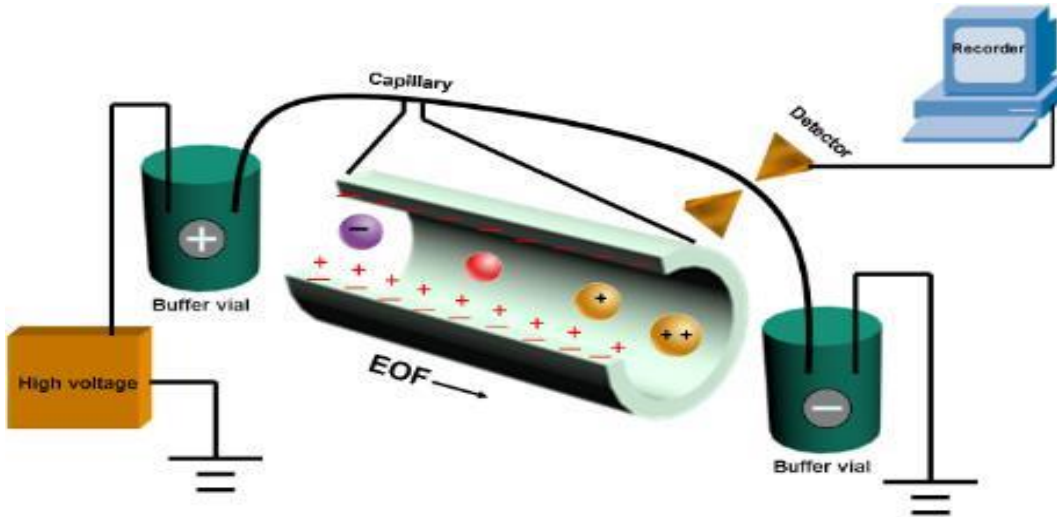
- Kapiller elektroforez küçük çaplı (25-75 μm), 100 cm. uzunluğunda 'fused' silika bir kapiller boru kullanılarak gerçekleştirilen bir yöntemdir.
- Tipik bir sistem
 - ince silika kapiller bir boru,
 - iki elektrolit tampon haznesi,
 - yüksek voltaj güç kaynağı
 - veri değerlendirme birimiyle ilişkili detektör



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez

• Kılcal (kapiler) elektroforez:



- Kapiler boruya yüksek voltaj uygulanır ve az miktarda örnek solüsyon kapiler tüpün bir ucundan injeksiyonla uygulanır.

- Solüsyon içindeki moleküller elektrik alanının etkisi altında kapiler boru boyunca hareket ederler.

- Tüpün diğer ucundan dışarı çıkan moleküller saptanır.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Elektroforez

● Kullanım alanları

➤ Saflaştırma

➤ Saflık kontrolü

➤ Molekül ağırlığı saptama

➤ Kalıtsal veya kalıtsal olmayan hastalık saptama

➤ Enzim izozimlerinin saptanması (tanısal amaçlı, populasyon çalışması için, adli tıpta)

➤ İmmünolojik ve moleküler biyoloji