

# ELEKTROFOREZ METOTLARI

## I.GENEL BAKIŞ

Elektroforez, elektriksel bir alanın etkisi altında likid bir ortamda yüklü solüt veya partiküllerin göçüdür. Elektroforez tüm partikül türlerinin göçünü sağladığından iyontoforez terimi özellikle küçük iyonların göçünü ifade eder.

Protein çalışmalarında kullanılan ilk elektroforez yöntemi Tiselius tarafından 1937'de tanımlanan serbest solüsyon elektroforezi, frontal elektroforez veya "moving boundary" elektroforezidir. Tiselius bir elektrolit solüsyonunda çözünmüş olan proteinleri, protein-elektrolit solüsyonunun bulunduğu "U" şeklindeki kuartz bir borunun içinden elektrik akımı geçirerek ayırmıştır. pH 7.6'da albumin,  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  olarak isimlendirilen 4 serum protein fraksiyonunu saptamış ve bu bandların sınırları arasındaki absorbans değişikliğini optik olarak ölçmüştür. Bu teknik hala elektroforetik mobilite ve protein-protein etkileşimi ile ilgili araştırmalarda kullanılmaktadır; fakat, klinik laboratuvarlarda rutin çalışmalar için kullanılmaz, kompleks bir araç gerektirir, teknik zordur ve 0.5 mL örnek gerektirir.

Zonal elektroforez terimi sellüloz kağıt, sellüloz asetat veya agaroz jel gibi porlu bir destek ortamında yüklü makromoleküllerin göçünü gösterir. Zonal elektroforez, elektroforetik destek materyali üzerinde komşu zonlardan keskin sınırlarla ayrılmış bir elektroforetogram sağlar. Katı bir destek ortamında ve pH 8.6'da  $\alpha$  fraksiyonu,  $\alpha_1$  ve  $\alpha_2$  olmak üzere iki gruba daha ayrılır. Diğer destek ortamları olarak sellüloz asetat membranı, agaroz jel, nişasta jel, poliakrilamid jel vb. kullanılmaktadır. Sellüloz asetat ve agaroz jel kullanım kolaylıkları, ucuz oluşları ve piyasadaki yaygınlıkları nedeniyle klinik laboratuvarlarda daha çok tercih edilir.

Elektroforez tamamlandıktan sonra destek ortamı bir boya ile muamele edilerek ayrılmış fraksiyonların identifikasyonu sağlanır. En yaygın kullanılan boyalar: Amido Black, Ponceau S, Fat Red 7B ve Sudan Black B'dir. Ayrılan fraksiyonların kaliteli bir profilinin elde edilmesi için dansitometri boyanmış destek ortamda gerçekleştirilir.

En yaygın elektroforez uygulamaları, serum proteinleri, hemoglobinler ve izoenzimleri içerir. İzoenzimlerden ise, CK, LDH ve ALP en yaygın olarak kullanılındır. Piyasadaki yaygın elektroforez enstrüman üreticileri Beckman Instruments, Helena Laboratories ve Sebia Laboratories'e ait olanlardır.

## II.KULLANIM ALANLARI

- 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

### **III.DANSİTOMETRİ**

Önceleri sonuçların değerlendirilmesinde; oluşan bantlar kesilip, her parçadaki boya ayrı ayrı çözülerek titrasyonla veya spektrofotometrik olarak miktarlarının saptanması yoluna gidilirken, artık daha çok doğrudan bantlardaki boya yoğunluğunu saptayan dansitometri sistemleri kullanılmaktadır.

Dansitometri temel olarak bir absorbans ölçümüdür. Bir dansitometre bir destek ortamdaki boyanın absorbansını ölçer. Bir dansitometrenin temel bileşenlerini; ışık kaynağı, monokromatör, tüm plağın taranması için hareketli bir taşıyıcı, optik sistem ve bir fotodetektör oluşturur. Fotodetektörle saptanan sinyaller örneğin konsantrasyonuyla orantılı olan destekteki boyanın absorbansıyla ilişkilidir. Destek ortamı sabit bir hızla ışık demetinden geçirilir, böylece farklı noktalarda alınan çoklu dansite okumalarının sunduğu bir grafik oluşturulabilir.

Modern dansitometrelerin eğrinin altında kalan alanı bulabilen bilgi-işlemcileri vardır, böylece, tüm fraksiyonların miktarı saptanabilir. "The Beckman Appraise", klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan dansitometrelerin bir örneğidir. Bu modelin hasta sonuçlarının rapor edilmesi ve yorumlanması için ayrıntılı bir veritabanı yönetim sistemi vardır.

### **IV.ELEKTROFOREZ TÜRLERİ**

1. Kağıt elektroforezi
2. Selüloz asetat elektroforezi
3. Jel elektroforezi
  - a. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)
  - b. Agaroz jel elektroforezi
4. Kapiller elektroforez

#### **Sellüloz Asetat Elektroforezi (CAE):**

Sellülozdaki hidroksil grupları asetik anhidritle etkileşirse, sellüloz, sellüloz asetat membranlarının hammaddesine dönüşmek üzere asetillenir. Sellüloz asetat, fiberler halinde ağsı bir yapı oluşturur. Bu ağsı yapının gözenek büyüklüğü, sellülozun asetilasyon miktarıyla belirlenir. Sellüloz asetat ile asetillenmemiş kısmı oluşturan sellüloz nitratin oranı, bu gözenek büyüklüğünü belirler. Serum örnekleri (0.3-2.0 µL) genellikle önceden tamponla ıslatılmış sellüloz asetat plaklarına bir "twin wire" aplikatörle uygulanır. Bu amaç için bir lamel veya mikropipet de kullanılabilir. Sellüloz asetat membranları, sellüloz asetatı çözmek için gerekli bir solvent ve bunun etkisinin gerçekleşmesi için diğer bir solvent karışımıyla muamale edilerek dansitometri için transparan hale getirilebilir. Sellüloz asetat lifleri solventin etkisiyle kısmen çözülür ve tek parça halinde birleşir. Böylece orjinal hava boşlukları elimine edilmiş olur.

Sellüloz asetat plakların avantajları vardır. Aktivite boyaması için uygundur. Ucuzdur, hazır bulunabilir. Saydam hale getirilebilir ve protein boyası ile de boyanabilir. CAE'nin diğer bir avantajı seperasyon hızı (20 dak.-1 saat) ve uzun bir süre boyunca transparan membranların saklanabilmesidir.

Ancak rezolüsyon jeldeki kadar iyi değildir. En önemli dezavantajı da standardizasyonu iyi değildir. Aynı firmaca üretilen aynı parti içinde bile farklılıklar görülebilir.

### **Jel Elektroforezi:**

Poliakrilamid jel daha çok proteinler için uygundur. Agaroz jel de nükleik asitler için iyi sonuç verir. İksinin karışımı ise izoelektrik odaklamada kullanılabilir.

### **Agaroz Jel Elektroforezi (AGE):**

Agar jel elektroforezi serum proteinleri, hemoglobin varyantları, LDH izoenzimleri, lipoprotein fraksiyonları ve diğer maddelerin analizi için başarıyla uygulanmaktadır. Gerçekte, bu jel ortamı çok yönlülüğü, uygunluğu, rutin klinik laboratuvarların taleplerini karşılama da diğer destek ortamlarına avantajları nedeniyle sellüloz asetatın yerini almıştır.

Saf agar bile en az 2 fraksiyondan oluşur. Agaropektin ve agaroz. Agaropektin, anfraksiyone agarda gözlenen endozmozis ve "background" boyanmadan sorumlu olan asit sülfat ve karboksilik asit gruplarını içerir. Temel olarak, iyonize grubu olmayan agaroz çok az endozmoz gösterir ve klinik kullanıma daha uygundur. Bu yüzden, setilpiridinyum klorür ile muamele edilerek agaropektin azaltılıp, safa yakın nötral agaroz elde edilebilmektedir. Bu şekilde hazırlanan ticari preparatlar, serum proteinlerinin LDH izozimlerinin, lipoprotein fraksiyonlarının analizinde başarıyla kullanılmaktadır. Bununla birlikte piyasadaki agarozların bazı lotları hala bazı rezidiüel grupları içermektedir.

Agaroz jelin avantajları proteinlere daha düşük afinitesi, mükemmel dansitometrik okumaya olanak sağlayan kurutulduktan sonra kalan doğal saydamlığıdır. Genellikle 0.5-1.0g. agaroz/dL'lik bir tampon istenen jel dayanıklılığını ve iyi göç özelliklerini sağlar. AGE'de muamele edilmiş serum veya ısıtılmış agarda çözülmüş serum, direkt olarak aplike edilebilir. Daha sonra geliştirilen tekniklerde agaroz jel plağının bir kısmı katılaştırılmıştır. Örnek kuyularına modifiye edilmemiş serumun uygulanması örneğin aplikasyon noktasında kalıp dansitometrede bir artifisyel pik olarak izlenmesine neden olabilir. Bazı AGE prosedürleri bundan kaçınmak için modifiye bir örnek aplikasyon tekniği uygulamaktadır. Bunun için örnek aplikasyon noktalarının karşılıklarına denk gelen küçük yarıkları içeren plastik şablonlar kullanılır. Şablon, agaroz yüzeye yerleştirilir ve 5 µL örnek her yarığa konur. Serum örneklerinin agarozda difüze olabilmesi için 5 dakika beklenir. Örneğin fazlası şablonun üzerinden kurutma kağıdına emdirilerek alınır ve şablon agarozun üzerinden yavaşça alınır. AGE tekniğinde örnek hacmi genellikle rölatif olarak küçük tutulur (0.6-3 µL) ve elektroforez süresi rölatif olarak kısadır (30-90 dakika).

Örnekler, jel içine yapılan küçük kesilerle oluşturulan kuyucuklar içerisine uygulanır, fakat bu işlem özellikle interferans oluşumuna yol açan bir artefakta izin verir. Bu problemi önlemek için ıslatılmış bir jelin orta hizasına konan bir "template" kullanılır. Jelin uçları daha sonra içine elektrodlar yerleştirilmiş ayırıcı tampon tankına daldırılır. Elektrodlar arasında bir akım oluşturan bir voltaj uygulanır. Jelden geçen bu akım genellikle 30 dakika civarında sürer ve istenen rezolüsyonu sağlar. Tamponun iyonik gücü akım miktarını ve sabit bir voltajda proteinlerin hareketini sağlar. Eğer iyonik güç azsa nispeten daha çok akım yüklü proteinler tarafından taşınır. İyonik güç fazlaysa

daha az akım daha kısa mesafeye hareket eden proteinler tarafından taşınır. Jelin iletken tamponla teması düzensizse akım elektrodlar arasında farklı olabilir, proteinler daha fazla akım olan yöne daha çok göçer. Elektroforez süresi çok uzun tutulacak olursa proteinler jelden tampon içie göçer. Elektroforez işlemi sırasında oluşan elektrik devresinde bir kesilme olursa ve hiç akım geçmezse proteinler aplikasyon noktasından hareket etmezler.

Elektroforezden sonra jel asetik asit gibi hafif bir fiksatifle muamele edilir ve proteinler göç ettikleri yerlerde çökerler. Daha sonra boyanır, jel kurutulur ve zemini açılır. Protein paternleri, anormal proteinlerin kalitatif saptamaları için gözle incelenebilirler. Dansitometrik tarayıcılar traseleri elde etmek ve her protein fraksiyonunun rölatif yüzdelerini saptamak için kullanılır. Bu yüzdeler daha sonra her fraksiyondaki protein konsantrasyonunu elde etmek üzere örnekteki total proteinle (ayrı olarak ölçülür) çarpılır.

#### Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE):

Akrilamid polimerlerinin sentetik olarak elde edilmesinden sonra, jel elektroforezinde yeni çığırılar açılmıştır. PAGE ile serum proteinlerini 20'den fazla fraksiyona ayırmak olası olmuştur.

Poliakrilamid, polimerizasyondan önce akrilamid içeriği değiştirilerek porozitesi kolaylıkla değiştirilebilen inert bir destek materyalidir. PAGE nativ proteinlerin standart seperasyonu için uygulanabilir olduğundan, SDS varlığında denatüre edilerek aynı zamanda molekül ağırlığına göre de ayrılabilir. SDS-PAGE moleküler biyolojideki araştırmalar için en yaygın olarak kullanılan protein elektroforez tekniğidir. Bununla beraber, klinik laboratuvardaki rutin kullanımdan daha farklı olarak daha iyi bir şekilde seperasyon ve çok sayıdaki subünitlerin ayrımını sağlar.

PAGE, farklı şekillerde sınıflandırılabilir:

1. Jelin biçimine göre:

- a) Tüp jel elektroforezi
- b) Tabaka jel elektroforezi

2. Jelin konumuna göre:

- a) Dik jel elektroforezi
- b) Horizontal jel elektroforezi

3. Jelin bileşimine göre:

- a) Native (doğal) jel elektroforezi
- b) SDS'li (sodyum dodesil sülfat) jel elektroforezi

SDS'li elektroforezde native sistemden farklı olarak, örnek hazırlama tamponuna bir miktar SDS eklenir. SDS, örnekteki protein moleküllerinin etrafında boşluk kalmayacak şekilde bir katman oluşturur. Sonuçta, her molekül, homojen bir şekilde (-) yükü kaplanmış olur. Sonuçta ayrışma, moleküllerin kendi yükünden bağımsız olacağından, doğrudan doğruya molekül ağırlıklarına göre olur. Bu yöntem daha çok proteinlerin molekül ağırlıklarının saptanmasında kullanılır. Yine, globüler proteinler ısıtılıp, dördüncül yapıları bozularak monomerlerinin ayrıştırılmasında kullanılabilir.

4. Jelin gözenek dağılımına göre:

a) Homojen (düz) jel elektroforezi:

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

b) Gradyent jel elektroforezi:

İki elektrod arasında jel konsantrasyonu giderek artar, gözenek çapı da giderek küçülür. Başlangıçtaki büyük porlardan tüm moleküller geçerken gittikçe geçirgenlik azalır. Böylece moleküller, kendi büyüklüklerine uyan gözeneklerde takılarak molekül ağırlıklarına göre ayrılırlar. Jel konsantrasyonunda aynı gradyenti sağlamak zor olduğundan tekrarlanabilirliği düşüktür.

5. Jelin türüne göre:

a) Continous (devamlı) jel elektroforezi:

Aynı konsantrasyon ve pH'da jel hazırlanır.

b) Discontinous jel elektroforezi:

Farklı konsantrasyon ve pH'da jel bölgeleri hazırlanarak yapılır. Genellikle bir istifleyici, bir seperatör jel olmak üzere iki aşamalı olarak uygulanır. PAGE'nin en yaygın kullanılan şeklidir.

Sıradan elektroforetik tekniklerle ayrılan serum protein zonları, aynı elektroforetik mobiliteye izin veren bir çok proteinden oluşmaktadır, elektroforez işlemi boyunca proteinler difüze olduğundan geniş olmaya eğilimlidirler. Disk elektroforezi bu yetersizliklerin üstesinden gelmek için 1964'de geliştirilmiştir. Bu terim, elektroforetik matriksteki düzensizlikten ve ayrılan protein zonlarının diske benzer şeklinden türemiştir. Fraksiyonlar konsantre diskler halinde iyi ayrılmış olduğundan buna "disk elektroforezi" de denmektedir. Kağıt, sellüloz asetat veya agaroz jel kullanan protein elektroforezi yalnızca 5 zon verir ve albumin,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ , ve  $\gamma$  globulin olarak adlandırılır. Poliakrilamid veya nişasta jel elektroforezi 20 veya daha fazla fraksiyon verebilir. Bu nedenle, serumdaki farklı proteinlerin araştırılmasında, özellikle de genetik varyantlar ve izoenzim çalışmalarında geniş ölçüde kullanılır.

PAGE; serum proteinlerinin, proteinlerin genetik varyasyonlarının ve izozimlerin analizinde en iyi sonuç veren elektroforez ortamıdır. En önemli avantajı, jel konsantrasyonunun kesin olarak belirlenip değiştirilebilmesi, ve böylece gözenek büyüklüğünün istenen şekilde saptanmasına olanak vermesidir. Jel konsantrasyonunun artırılması, gözenek çaplarının küçülmesiyle sonuçlanır. Böylece jel, bir moleküler elek görevi yaparak ayrıştırmayı sağlar.

### Nişasta Jel Elektroforezi

Nişasta jel elektroforezi hem yüzey yükü, hem de molekül büyüklüğüne bağlı olarak separe olan makromoleküler iyonların özelliklerinin anlaşılmasına izin verir. Doğal nişasta jelleşmediğinden kısmen hidrolize olarak kullanılır. Agaroz jelde olduğu gibi, nişasta jelde de işlem horizontal olarak gerçekleştirilebilir. Örnek jelde bir yarık oluşturularak direkt olarak veya bir kağıda emdirilerek uygulanır. Aplikasyon vertikal olarak geliştirilen tekniklerde de aynıdır. Bu nedenle sıvı örnek jeldeki yarığa bırakıldıktan sonra üstü parafinle örtülür. Parafin sıvı örneği yerinde tutarak sağlamlaştırır. Elektrik akımının uygulanması jelin yüzeyinde proteinleri

yoğunlaştırarak böylece ince üniform bir başlama zonunun oluşması sağlanır. Jelin uygun bir şekilde hazırlanması nispeten zordur ve oldukça ustalık gerektirir. Nişasta jelleri 10-16 g/dL konsantrasyonunda kullanılır. Tampon pH'sı özel uygulamalara göre değişir ve genellikle 8.6-9.0 arasında değişir, fakat 3-11 aralığında değişebilir.

### **3-Pulse Field (Değişken Alan) Elektroforezi:**

Bu teknikte belli aralıklarla, akım yönü değiştirilir. Moleküller daha kolay dönerler ve molekül ağırlıklarına göre ayrışırlar.

### **4-Afinite (Roket) Elektroforezi:**

Analizi yapılacak molekül türüne özgül antikor hazırlanıp, slab jel hazırlanırken, içine homojen olarak karıştırılır. Örnekler konup elektroforez başlatılınca, molekül özgül antikoru ile birleşip çöker, diğer moleküller yollarına devam eder. Aradığımız molekülün tümü bitene kadar çökme devam eder. Antijen-antikor birleşmesine ait bantlar oluşur, bu bantlar roket şeklindedir. Bu bantların uzunluğu o molekülün örnekteki miktarı hakkında da bilgi verir. Bu sistem, örneğin  $\alpha_1$ -antitripsinin saptanmasında kullanılır.

### **5-İmmünelektroforez:**

İlk kez 1953 yılında Grabar ve Williams isimli iki bilim adamı, jel elektroforezi sonrası immün diffüzyon uygulamışlardır. Daha sonra Scheidegger yöntemi geliştirerek bugünkü kullanılan haline getirmiştir.

İmmünelektroforez ile bir çok spesifik protein gösterilebilir: Prealbumin, albumin,  $\alpha_1$ -asit glukoprotein,  $\alpha_1$ -antitripsin, tiroid bağlayan globulin,  $\alpha_1$ -kimotripsin,  $\alpha_2$ -HS glukoprotein,  $\alpha_2$ -makroglobulin, seruloplazmin, haptoglobin, antitrombin III, C<sub>1</sub> esteraz inhibitörü, hemopeksin,  $\beta$  lipoprotein, transferrin, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, properdin faktör B, plazminojen, IgA, IgM, IgG. Bu gün klinik laboratuvarlarda, immünglobulinlerin gösterilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

İmmünoglobulinlerin serumdaki anormal konsantrasyon ve kompozisyonlarını göstermede ilk adım serum protein elektroforezidir. Protein elektroforezinde beta ve gama bölgesine bakılır. Şüpheli bir durum varsa, artan immünoglobulinin tipini belirlemek için immünelektroforez uygulanır. İmmünelektroforez ile hem protein konsantrasyon değişiklikleri hem de yapı anormallikleri gösterilebilir. İmmünelektroforez için agaroz jel kullanılır. Bu yöntemin prensibi; serum proteinlerinin elektroforetik ayırımından sonra, aranan proteine karşı antiserum ekleyerek antijen-antikor presipitatlarının gösterilmesidir. Vücut sıvılarına önce elektroforez uygulanır, sonra göç yönüne paralel olarak antiserum eklenir. Jele diffüze olması sağlanır. Simültane diffüzyon sonrası antijen-antikor presipitasyon bantları oluşur. Presipitasyon bantlarının yapısı ve pozisyonu her bir protein için karakteristiktir. Kontrol serumları ile karşılaştırılır.

### **6-İzoelektrik Odaklama (IEF):**

Bu teknikte migrasyon yönünde değişen pH'sı olan stabil pH gradyentli bir ortamda migrasyona bağlı olarak proteinler gibi amfoterik bileşikler separe olurlar. Protein,

izoelektrik noktasının eşit olduğu pH'a kadar jel üzerinde hareket eder. Bu pH'ta net yük 0 olur ve migrasyon sonlanır. IEF'de bir proteinin izoelektrik noktası çok dar bir pH aralığında bulunduğundan protein zonları çok keskindir ve çünkü protein difüzyonu pI'ye eşit olan pH'a kadar yük kazanarak devam eder ve sonlanır. Daha sonra elektroforetik güçler nedeniyle bir miktar geriye doğru geçer. Bu teknikle de proteinler, izoelektrik nokta pH'larına, dolayısıyla da yüklerine göre çok duyarlı şekilde ayrıştırılabilirler. İzoelektrik nokta değerlerinde 0,02 pH'lık fark olan protein molekülleri bile ayrı bantlar şeklinde gözlelenebilirler. İzoelektrik odaklama tekniklerinin avantajı protein karışımlarını ayırma yetenekleriyle sınırlıdır.

Elektroforezde yürütme aşamasından sonraki işlemler de büyük titizlik gerektirir. Fiksator olarak alkol sıklıkla kullanılır. Serum protein boyamasında amido black (naftol blue black), bromofenol blue, brilliant blue G ve R, nigrosin, ponceau S kullanılabilir. İzoenzim boyamalarında nitrotetrazolyum blue kullanılırken, lipoproteinler için oil red veya sudan black gibi bir lipid boyası kullanılır.

İzoelektrik odaklama serum ACP izoenzimlerinin ölçülerinde yararlı olmuştur. Bu uygulama serebrospinal sıvıda oligoklonal immunglobulin bantları, CK izoenzimi ve serum ALP saptanmasına dek uzanmıştır.

IEF'da kullanılan taşıyıcı amfolitler genellikle yüksek konsantrasyonlarda olduğundan yüksek voltajlı (2000 V'a kadar) bir güç kaynağı gereklidir. İşlem sırasında elektroforetik matriks soğuk tutulmalıdır.

Poliakrilamid jel-izoelektrik odaklama (PAGE-IEF) analitik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Poliakrilamid jel saydam ve esnek olmalıdır. Elektroendozmoz önleyen materyaller kullanılarak IEF yöntemi AGE ve CAE'e adapte edilebilir. AGE-IEF ve CAE-IEF'in avantajları; uygulamanın daha basit oluşu ve por çapı büyük olduğu için MA'a göre seperasyon yapılmamasıdır.

## **7-Kapiller Elektroforez:**

Kaçiller elektroforez, seperasyon tekniklerinde yeni bir girişimdir. Fiziki temelleri diğer tür elektroforezlerle aynı olmasına karşın, teknik ve gerektirdiği ekipman çok farklıdır. Duyarlılığı, test maliyetinin düşüklüğü, otomasyona uygunluğu, test çeşitliliği gibi avantajlarıyla çok yaygın kullanım alanı bulacağı şüphesizdir.

Kapiller elektroforez küçük çaplı (25-75  $\mu\text{m}$ ), 100 cm. uzunluğunda 'fused' silika bir kapiller boru kullanılarak gerçekleştirilen bir yöntemdir. Tipik bir sistem ince silika kapiller bir boru, iki elektrolit tampon haznesi, bir yüksek voltaj güç kaynağı ve bir veri değerlendirme birimiyle ilişkili detektörden oluşmaktadır. Dar çaplı tüplerde çalışmanın avantajları, konvansiyonel elektroforezle kıyaslandığında artmış ısı dağılımı, azalmış örnek hacmi gerektirmesi ve otomasyona daha uygunluğudur.

Düzelmiş ısı dağılımı 25-30 kV'luk voltaj aralığında bir uygulamaya izin verir. Bu derecede yüksek bir voltaj daha kaliteli bir seperasyona, çok daha fazla sayıda fraksiyonun elde edilmesine ve azalmış seperasyon zamanına neden olur. Seperasyon süresi 1 dakikadan az olabilir. Örnek hacmi pL-nL düzeyindedir.

Kapillerin sonundan yüksek bir voltaj uygulandığında örnek moleküller, iç kapiller yüzeyde aşırı (+) iyonların katoda doğru hareketinin sonucunda oluşan bir hacim akışı olan elektroozmotik akışla ayrılır. Örnekte bulunan yüke bakmaksızın bir kapillerdeki elektro-ozmotik akış normalde tüm iyonları katoda taşıyacak kadar güçlüdür. Bu nedenle örnek kapillere anodik uçtan verilir. Net hareket katoda doğru

olduğundan seperasyon anoda doğru geri migrasyon hızlarındaki farklılıklara dayanır. Yüzey yükü yalnızca kapillerin duvarında olduğundan elektro-ozmotik akış profili bir piston gibi düzdür. Migrasyon süresince sölütler kolaylıkla geriye ve ileriye difüze olur. Termal etkilere bağlı olarak kapiller duvarı ile merkezi arasındaki viskozite farklılıkları bulunur. Her iki faktör tüm kapiller boyunca üniform migrasyona katkıda bulunur ve dolayısıyla zon genişlemesini önler.

Örnekteki (+) iyonlar, elektroozmotik akış ve iyon hareketinin aynı yönde olması nedeniyle kapiller çıkışa daha erken gelirler. Örnekteki (-) iyonlar, aynı zamanda kapiller çıkışa hareket ederler, ama hızları daha yavaştır. Örnek iyonları kapiller çıkışa doğru göçtüğünden optik, kondüktimetrik, elektrokimyasal, kitle spektroskopik veya radyoaktivite dedektörleri gibi farklı detektör tipleriyle saptanabilir.

Kapiller elektroforezin konvansiyonel elektroforez ve HPLC'ye üstünlükleri; kısa analitik zaman, seperasyon gücü, düşük reaktif (sadece tampon) sarfiyatı ve mikroörnek volümleridir. nL düzeylerinde örnek kullanılarak, moleküllerin kompleks karışımları teorik olarak 1 milyona yakın fraksiyona ayrılabilir. Seperasyonlar çok yüksek uygulanabilen voltajla 10 dakikadan az bir sürede tamamlanabilir. Yüksek voltajın uygulanması kapiller duvar boyunca verimli ısı değişimine izin veren kapillerin yüksek yüzey/hacim oranıyla olasıdır. Günümüzde protein, hemoglobin elektroforezleri ile immünostraction esasına dayanan IFE uygulamaları rutin kullanıma girmiştir.

Kapiller elektroforezin enstrümental avantajları; otomasyonda kolaylık sağlaması ve detektör kullanımında çeşitliliğe izin vermesidir. Işık absorpsiyonu, floresans, elektrokimyasal, radyometrik ve kütle spektrometrik tekniklere dayalı metotlar geliştirilmiştir ve  $10^{-20}$  kadar küçük madde miktarlarının bile saptamak olası olmaktadır.

### **8-Denatüre Edici Gradyent Jel Elektroforezi:**

DGGE, DNA moleküllerini separe eder, tek bir baz değişikliğini ayırmsar, mutasyon olup olmadığını, varsa nerede lokalize olduğunu tanımlar.

### **9-İki-Boyutlu Elektroforez:**

Klinik uygulamalar için 2 boyutlu elektroforez umut vericidir. 2 boyutlu elektroforez sonuçları belki de saptanması olası yüzlerce protein piklerinden önemli tanısal bilginin elde edilmesini olası kılar.

1975'ten beri büyük gelişme gösteren bir yöntemdir, genellikle araştırma laboratuvarlarında sınırlı kalmıştır. Günümüzde bazı rutin laboratuvarlarda da kullanılmaktadır. Bu metotta 1. boyutta yüke bağlı IEF ve 2. boyutta MA'a bağlı elektroforez kullanılır. İlk basamak agaroz veya poliakrilamid jel gibi büyük porlu bir ortamda gerçekleştirilir. Bir pH gradyenti elde etmek için amfolitler eklenir. 2. boyut için lineer veya gradyent şekilli bir poliakrilamid sıklıkla kullanılır.

O'Farrell'in 2 boyutlu elektroforez metodu 1. boyut için 130 X 2.5 mm'lik tüplerde PAGE-IEF kullanır ve 3-10 birimlik pH'taki amfolitleri içerir. Anodal bölge 10 mmol/L'lik fosforik asitle katodal kompartman ise 20 mmol/L'lik NaOH'le temastadır. Elektroforez işleminden sonra jel tüpünden çıkarılarak sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren ince bir poliakrilamid gradyent jel plağıyla temas haline getirilir. İşlemin sonunda polipeptidler birçok farklı metottan birisiyle saptanır. O'Farrell E. coli



üzerindeki bir çalışmada teorik olarak 7000 polipeptid lekesi tanımlanabileceğini ileri sürmüştür; ancak, metottaki bazı sınırlamalar nedeniyle otoradyografi kullanılarak 1100 leke saptanır. Coomassie boyası kullanılarak yaklaşık 400 polipeptid saptanabilir.

O'Farrell metodunda 1. boyut için  $\beta$ -merkaptotanol, 2. boyut için ise SDS kullanılır. Diğer yazarlar her iki boyut için de SDS kullanmaktadır. Merkaptotanol ve SDS'nin kullanımı disülfid bağlarının indirgenmesiyle ve polimerize edici proteinler tarafından proteinlerin polipeptidlere denatürasyonunu sağlar. Enzimler gibi nativ proteinlerin amaçlandığı çalışmalarda denatüre edici örnek muamelesi CE elektroforez şartları gerekmez.

Saptama metotları; Amido Black 10B'den 3 kez daha sensitif olan Coomassie boyaları, Coomassie boyasından 100 kez daha sensitif olan gümüş boyama, radyografi (izotopik olarak işaretli polipeptidlerin emisyonunun fotoğraf filmlerinde gösterimi) ve florografik analizi (Sintilatör varlığında trityum işaretli polipeptidlerin röntgen filminde gösterilmesi) içerir. Radyografik ve florografik analiz en büyük analitik sensitiviteyi sağlar (Coomassie boyasından 100-1000 kez daha sensitif).

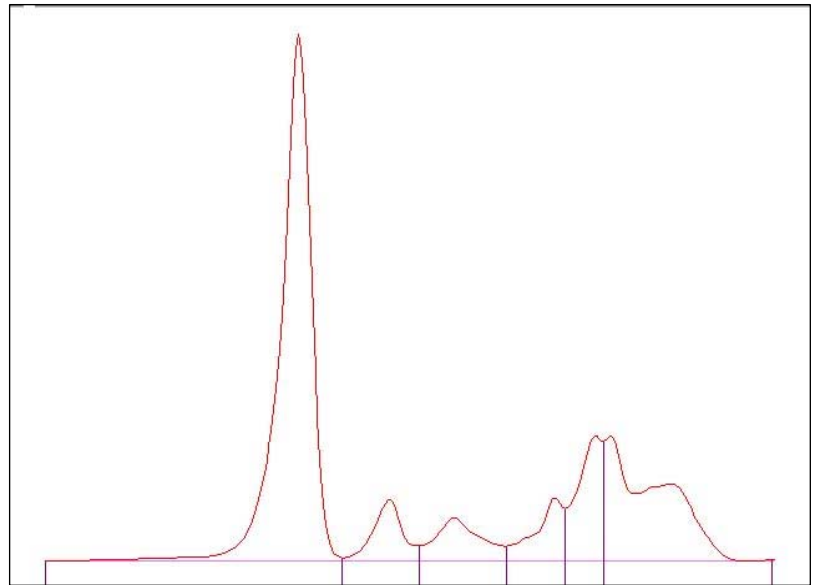
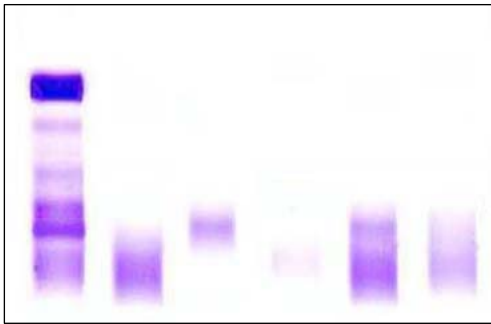
Anderson 2 boyutlu elektroforez için yeni bir terim önermiştir: ISO-DALT (izoelektrik odaklama için ISO ve molekül ağırlığı için DALT).

## SERUM PROTEİN ELEKTROFOREZİ

Serum elektroforez paterninin oluşmasına katkıda bulunan proteinler, serum konsantrasyonlarına göre major ve minor proteinler olarak sınıflandırılabilir. Major proteinlerin serum konsantrasyonlarındaki değişiklikler, elektroforez paterninde kolaylıkla farkedilebilen değişikliklere neden olduğu halde, minor proteinlerden birinde meydana gelen değişikliklerin elektroforezde görülebilmesi genellikle mümkün olmaz. Ancak belirli patolojik paternlerin oluşmasında bu proteinlerin kolektif bir rolü olmaktadır. SPE fraksiyonlarını oluşturan proteinler tabloda toplu halde gösterilmektedir. Tabloda, SPE fraksiyonlarında yer alan major proteinler koyu karakterler, minor proteinler normal karakterler kullanılarak gösterilmiştir.

<b>Albumin</b>	<b>Alfa-1</b>	<b>Alfa-2</b>	<b>Beta</b>	<b>Gamma</b>
Albumin	Alfa-1 lipoprotein (HDL)	Alfa-2 makroglobulin	Transferrin	IgA
Prealbumin	Alfa-1 antitripsin	Haptoglobulin	C3 (Kompleman)	IgG
	Alfa-1 antikomotripsin	Beta-lipoprotein (LDL)	Properdin factor B	IgM
	Orosomukoid (Alfa-1 asitglikoprotein)	Hemopeksin	Kompleman (C1S)	IgD
		Antitrombin III	Kompleman (C4)	IgE
		C-1 esteraz inhibitor	Kompleman (C5)	C-reaktif protein
		A2-HS glikoprotein	Beta-2 mikroglobulin	Muramidaz (lizozim)

## IgA kappa gammapatisi



## IgA lambda gammapatisi

