

## SAĞLIK HİZMETLERİ MESLEK YÜKSEKOKULU



### PATOLOJİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ

#### PLT214-MOLEKÜLER PATOLOJİ TEKNİKLERİ

Öğr. Gör. Nüket ÇALIŞKAN  
[nuket.caliskan@omu.edu.tr](mailto:nuket.caliskan@omu.edu.tr)

## Elektroforetik Yöntemler

### PLT214-MOLEKÜLER PATOLOJİ TEKNİKLERİ

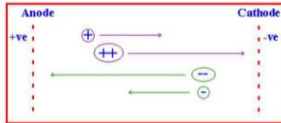
*Hafta 8*



2

## ELEKTROFOREZ NEDİR?

Yükü bir molekülün iki elektrod arasında konulduğunda yüküne göre katod yada anoda göçme işine elektroforez denir.



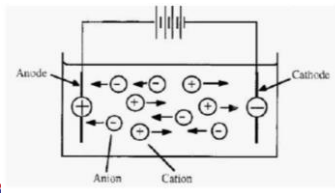
## ELEKTROFOREZ

- Elektroforez (electrophoresis) terimi yüklü partiküllerin elektrik akımı etkisi altında hareketini açıklamaktadır.
- Elektro (electro) elektriğe karşılık gelir, forez (phoresis) anlamı karşıya geçirmek /taşımak olan Yunanca bir kelimedir.
- Jel elektroforezi elektrik varlığında hareketlenen moleküllerin jel boyunca karşıya hareket ettiği bir tekniği tanımlar



## ELEKTROFOREZ

- Birçok biyolojik makromolekül (ör. Amino asitler, peptitler, proteinler, nükleotidler ve nükleik asitler) iyonlaşabilen gruplara sahiptir ve pH'a bağlı olarak çözeltide katyon (+) ya da anyon (-) biçiminde elektrik yükü taşıyan türler olarak bulunurlar.
- Elektrik alanına maruz kaldıklarında bu moleküller anyon veya katyon ağırlıkları farklarına göre birbirinden yük-kütle oranına uygun olarak ayrılırlar.

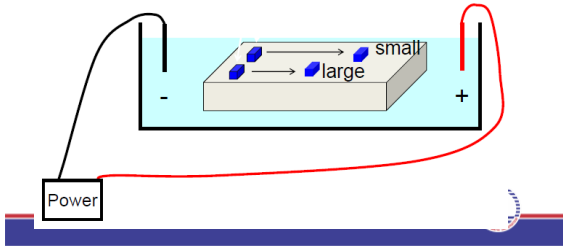


- ❖ Elektroforez, elektriksel bir alanda moleküllerin yüklerine, moleküler ağırlıklarına ve büyüklüklerine göre ayırt edildikleri bir tekniktir.
- ❖ Elektroforetik analizin temeli, moleküllerin elektriksel bir alanda jel üzerindeki göçüne dayanır.
- ❖ Bu göç hızı molekülün büyüklüğüne, yapısına, jeldeki kullanılan maddenin konsantrasyonuna, iyonik kuvvete ve uygulanan akıma bağlı olarak değişmektedir.



## Molekül Büyüklüğü!

\*Küçük molekül büyük molekülden daha hızlı hareket eder



## ELEKTROFORETİK YÖNTEMLER

- Elektroforez, bir çözeltide asılı taneciklerin, elektrik alanı etkisiyle ayrılmasıdır.
- Elektroforetik yöntemler; DNA, RNA ve protein moleküllerini büyüklük, şekil ve topolojik özelliklerine göre ayıran yöntemlerdir.

## ELEKTROFORETİK YÖNTEMLER

### • Farklı elektroforez yöntemleri

–Destek ortamının tipine göre

- Selüloz: aminoasitler, karbohidratlar, düşük moleküler ağırlıklı
- Jel: nükleik asitler ve proteinler

–Konuma göre

- Dikey
- Yatay

## ELEKTROFORETİK YÖNTEMLER

- Agaroz Jel Elektroforezi
- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
- Değişken Alanlı (Pulsed Field ) Jel Elektroforezi
- İzoelektrik Focusing
- İki Boyutlu Elektroforez
- Kılcal (Kapiller) Elektroforez
- İmmünoelektroforez

## Agaroz Jel Elektroforezi

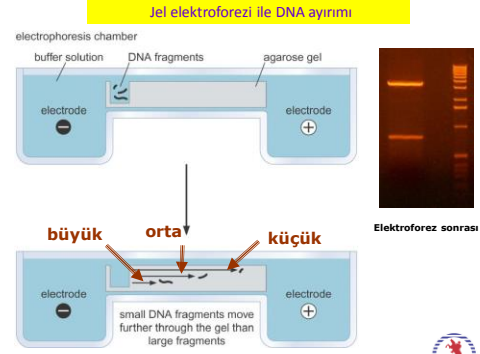
- Ayrıcı bir matris olan agaroz jel içerisinde elektriksel alana maruz bırakılan, **DNA** veya **RNA** parçalarının **büyüklüklerine** göre ayrıştırılmasına denir.
- Nükleik asit fragmentlerinin;
  - ✓ tanımlanması,
  - ✓ saflaştırılması
  - ✓ ve ayrılması için kullanılan en yaygın yöntem agaroz jel elektroforezidir.

## Agaroz Jel Elektroforezi

- Teknik -basit, hızlı ve diğer prosedürlerle ayrıştırılamayan DNA fragmanlarını çözebilme yeteneğindedir.
- Ayrıca DNA'nın jeldeki konumu, düşük konsantrasyonlarda floresan veren **Etidyum bromid** ile boyayarak görüntülemek mümkündür.

## Agaroz Jel Elektroforezi

- Agaroz jel elektroforezinin fiziksel özellikleri  
Makromoleküllerin ayrılması iki değişkene bağlıdır; **yük** ve **kütle**.
- DNA (negatif yüklü) bir tampon çözeltiye karıştırılıp jele uygulandığı zaman bu iki değişken birlikte rol oynar.
- Bir elektrottan gelen elektrik akımı, molekülleri iterken aynı anda diğer elektrot molekülleri kendine doğru çeker.  
✓ DNA (-) yüklüdür; (-) elektrot tarafından itilir, (+) elektrot tarafından çekilir.



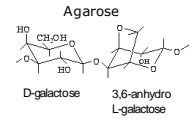
## Agaroz Jel Elektroforez Bileşenleri

1. AGARÖZ
2. TAMPON ÇÖZELTİ
3. ETİDYUM-BROMÜR
4. MARKER
5. YÜKLEME TAMPONU



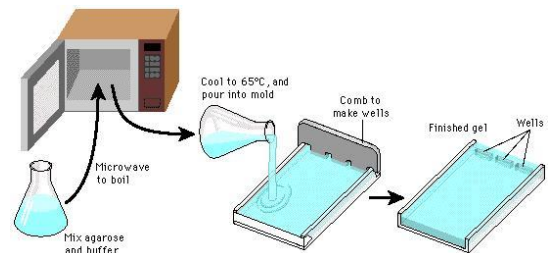
## Agaroz Jel Elektroforezi

- Agaroz:** bir kırmızı alg türü olan Agar agar'dan elde edilen doğrusal bir polisakkarit



## Agaroz:

- Büyük Por çapına sahiptir
- Çok hassastır ve elle dokunulduğunda kolayca bozulabilir.
- 200 kDa'dan daha büyük moleküllerin ayrılmasında kullanılır.
- Hazırlanışı: Agaroz jel; kuru toz halindeki agarozun, sıvı tampon içine konması ve berraklaşana kadar kaynatılması ile oluşur.



Hazırlanan jel kasete dökülür.



## Agaroz:

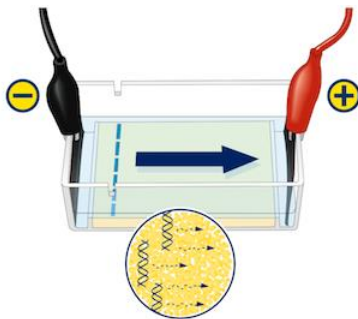
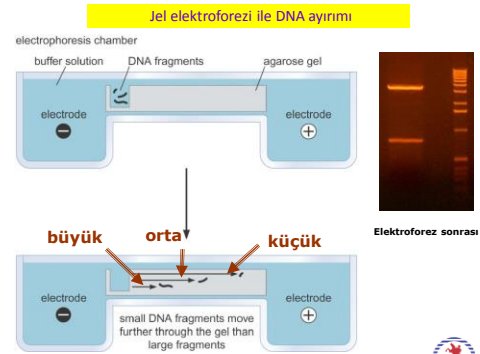
- Belirli büyüklükteki bir DNA parçası agarozun konsantrasyonuna bağlı olarak Jel içinde farklı hızlarda hareket eder.
  - ✓ Düşük agaroz konsantrasyonu=Büyük porlar, büyük DNA'ların ayrılmasını sağlar
  - ✓ Yüksek agaroz konsantrasyonu:küçük porlar, küçük DNA'ların ayrılmasını kolaylaştırır.

## Farklı miktarlarda agaroz içeren jellerin ayırım gücü

Jel içerisindeki agarozun miktarı (% w/v)	Lineer DNA (bp) moleküllerinin etkin ayırım aralığı
0.3	5.000 - 60.000
0.6	1.000 - 20.000
0.7	800 - 10.000
0.9	500 - 7.000
1.2	400 - 6.000
1.5	200 - 3.000
2.0	100 - 2.000

## Agaroz:

- Büyük moleküller porlardan küçük moleküllere göre daha yavaş geçerler.
- Bu boyuta göre ayrılmayı sağlar, buna göre büyük moleküller kuyucuklara yakın kalırken, küçükler daha uzakta yerleşir.



## Tampon Çözelti:

- DNA'nın elektroforetik hareketliliğini sağlar, bu hareketlilik tamponun kompozisyonuna ve iyonik gücüne göre değişir.
- Tris-borat-EDTA Elektroforez Tamponu

## Etidyum-bromür:

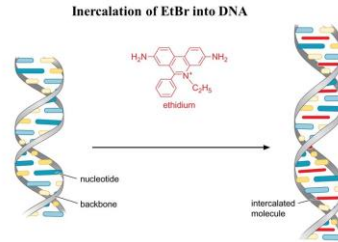
- DNA sarmal yapısına bağlanarak jelde yürüyen DNA'nın görüntülenmesini sağlar
- EtBr bir interkalasyon ajandır.
- DNA'nın içine kendini çok küçük bir çizgi halinde yerleştirir orda kalır.
- UV ışığının altında parlak bir bant halinde görülmesini sağlar.

**NOT:** Etidyum bromid güçlü bir mutajen/karsinojendir ve orta düzeyde toksiktir. Etidyum bromid içeren jellere ve solüsyonlara elle dokunurken mutlaka eldiven giyilmelidir



## Etidyum-bromür:

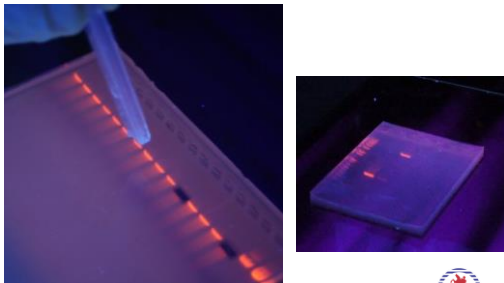
Figure 4.28



© 2014 Pearson Education, Inc.

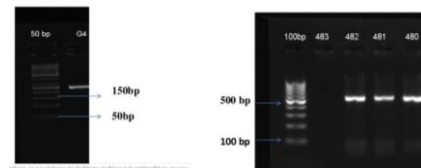


Etidyum bromür ile boyanmış agaroz jelin UV-transilluminator'daki görüntüsü



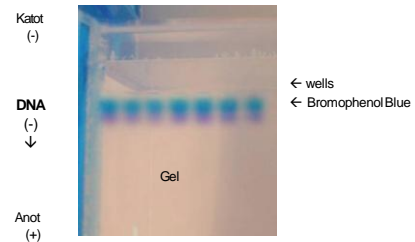
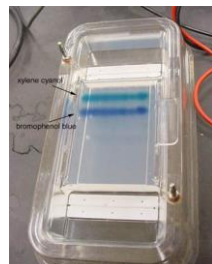
## Marker (DNA standardı ):

- Boyutu ve yoğunluğu bilinen DNA fragmanlarıdır. Moleküler belirteç olarak kullanılır
- DNA'ların büyüklüğünü saptamayı kolaylaştırır.
- 100Bp
- 50Bp

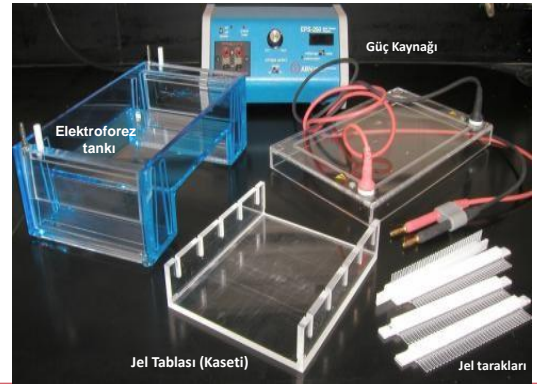
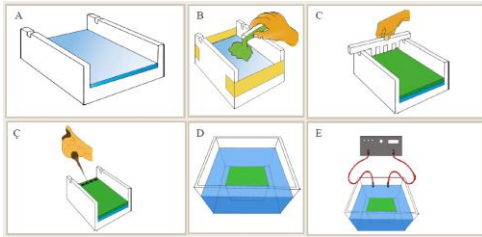


## Yükleme Tamponu:

- Bromofenol mavi kullanıyoruz.
- Jel yükleme boyası da denir.
- Yürütme tamponunun üç görev vardır;
  - ✓ Örneğin yoğunluğunu artırarak DNA'nın kuyuya eşit bir şekilde dağılmasını sağlar
  - ✓ Örneğe renk katar ve yükleme işlemini kolaylaştırır
  - ✓ Elektrik alanında tahmin edilebilir bir hızda anoda doğru hareket eden örneğe renk vermek

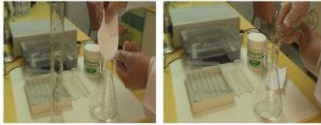


## AGARoz JEL ELEKTROFOREZ AŞAMALARI

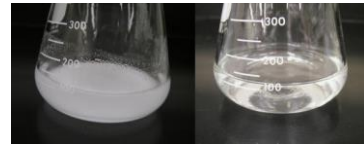


### Agaroz jel hazırlanması

a. %0.8'lik agaroz jel hazırlamak için 0.4 gram agaroz tartılarak 50 ml 1X TAE veya 1X TBE içerisine konulur.



b. Mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyene kadar kaynatılır.



c. Elle dokunulabilir sıcaklığa gelinceye kadar soğutulur ve içerisine son konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklenir.

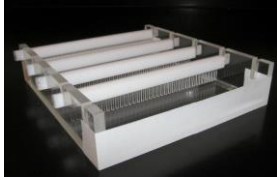
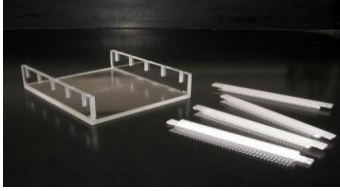


d. Kabarcıkların oluşmasına dikkat ederek karıştırılır.

2. Jel dökme standının hazırlanması.



a. Jel tarakları elektroforez tankında uygun yerlere yerleştirilir.



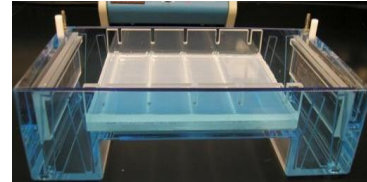
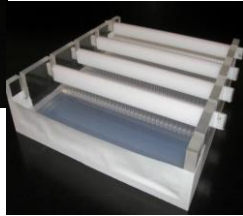
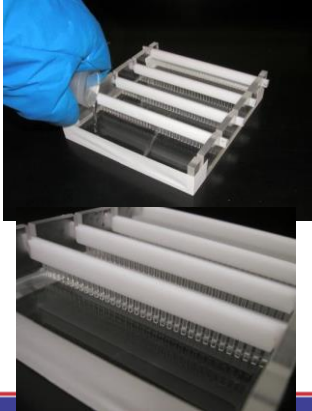
b. 3-5 mm kalınlığında bir jel dokulur.



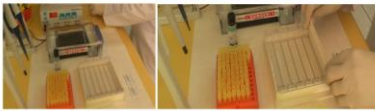
c. Jelde hava kabarcığı olmamasına dikkat edilir. Eğer hava kabarcığı varsa mikropipet ucu ile uzaklaştırılır

d. Tamamen donduktan sonra taraklar kuyucukların bozulmamasına özen gösterilerek çıkartılır ve jel içerisinde 1X TAE veya 1X TBE bulunan tanka aktarılır.

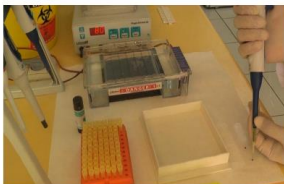
e. Tampon çözeltisinin agaroz jeli 1mm geçmesi yeterlidir.



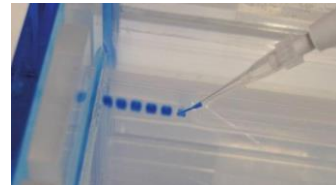
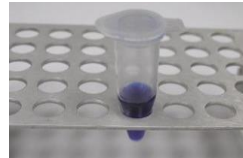
### 3. Örneklerin agaroz jel kuyularına yüklenmesi



a. İlk kuyuya DNA standartı yüklenir.

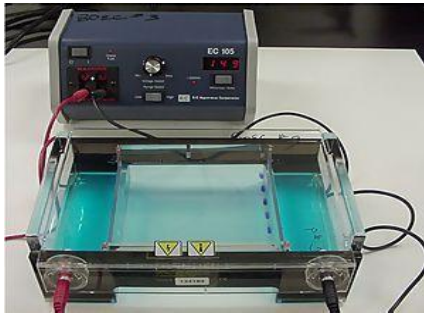
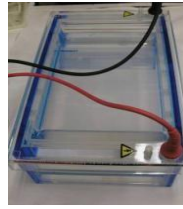


b. Diğer kuyulara örnekler yüklenir boyası ile karıştırılarak yüklenir.

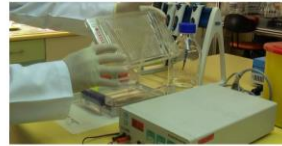




4. Elektrotların uçları doğru şekilde yerleştirilir. Voltaj 1-5 V/cm olacak şekilde hesaplanır.



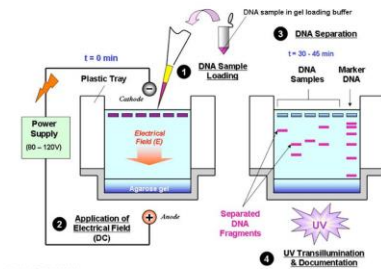
5. Yükleme banyosu jel 2/3'ü kadar yürüdüğünde yürütme durdurulur.



6. Jel transilluminatör cihazı açılarak UV ışığında yürütülen DNA gözlemlenir.



## DNA Görüntüleme: Agaroz Jel Elektroforezi



Copyright © Elsevier 2001



## Agaroz Jel Elektroforezi ile DNA Kalitesi

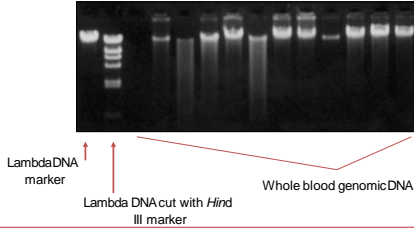
- Yüksek moleküler ağırlıklı bant (>48.5 kb)
- Sürüklenme, DNA degradasyonunu gösterir (ya da çok fazla DNA yüklenmiş olmasını).





## Agaroz Jel Elektroforezi ile DNA Kalitesi

İnsan tam kan DNA'sı

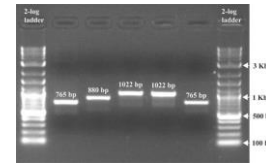
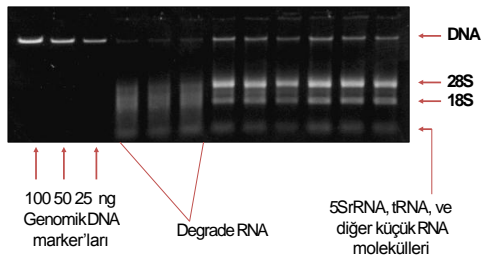


## Agaroz Jel Elektroforezi ile RNA Boyutu ve Kalitesi

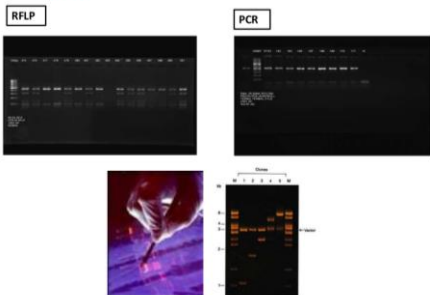
- Boyut: mRNA, ribosomal RNA'dan (rRNA) küçük veya daha büyük olabilir.
- Kalite: yüksek kalitede RNA'nın özellikleri;
  - ✓ 28S rRNA bandı : 18S rRNA bandı = 2:1 yoğunluk
  - ✓ Az olan veya hiç olmayan genomik DNA (yüksek MW band)

**Not:** Eğer 18S rRNA, 28S rRNA'dan daha yoğun ise veya her iki bant da sürüklenmişse, RNA degradasyonu muhtemeldir.

## Kültür hücrelerinde RNA



## ANALİZ



Horizontal Agaroz Jel Elektroforezi  
DNA/RNA



Vertikal poliakrilamid Jel Elektroforezi  
DNA/RNA/Protein



## Poliakrilamid Jel Elektroforezi

- Akrilamidin polimerizasyonu ile hazırlanan poliakrilamid jellerin elektroforetik ayrımlarında çeşitli üstünlükleri vardır.
- Küçük ya da orta boydaki nükleik asitler ve proteinler için yüksek ayrıştırma gücüne sahiptir.



## Poliakrilamid Jel Elektroforezi

- Küçük veya orta boydaki nükleik asitler ve proteinler için yüksek ayrıştırma gücü
- küçük DNA parçalarının ayrılması ve analizi
- (350.000 Da yani 500 bp'ye kadar)
- Jeldeki küçük por boyutları büyük DNA moleküllerinin analizi için uygun değil
- proteinlerin ayrılması ve analizi



## Poliakrilamid Jel Elektroforezi

- Jelin ayrıştırma gücü ve molekül boyutu aralığı, akrilamidin ve bis-akrilamidin konsantrasyonuna bağlı
- Düşük konsantrasyonda büyük porlar – yüksek MW molekül.
- Yüksek konsantrasyonda küçük porlar – düşük MW molekül.



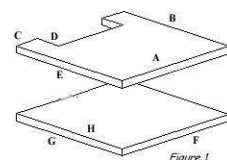
## Poliakrilamid Jel Elektroforezi

- Akrilamid, bir nörotoksindir ve kanser oluşturma tehlikesi vardır. Bu sebeple çalışırken eldiven kullanılması zorunludur.



## Poliakrilamid Jel Elektroforezi

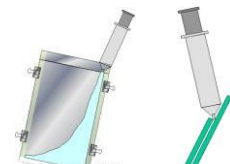
1. Çubuk (tüp) biçimde hazırlanan jeller
  - Cam tüpler jel ile doldurulur.
  - DNA örneği jelin tepesine uygulanır, elektroforeze tabi tutulur.
  - Jel tüpten çıkarılır ve görünürleştirilir.
2. Düzlemsel (slab) biçimde hazırlanan jeller
  - İki cam tabakası (jel kaseti) arasında hazırlanır.
  - Tarak ile kuyucuklar oluşturulur.
  - DNA örnekleri yüklenerek elektroforeze tabi tutulur.
  - Uygun boyama ile görünürleştirilir.



Poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan camlar

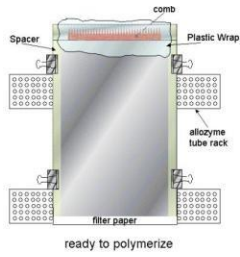


Poliakrilamid jel için kullanılan taraklar ve ayraçlar (spacer'lar)

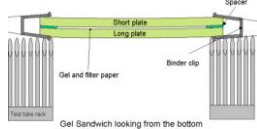


Jelin camlar arasında dökülmesi



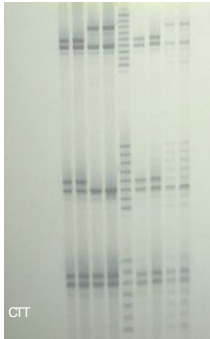
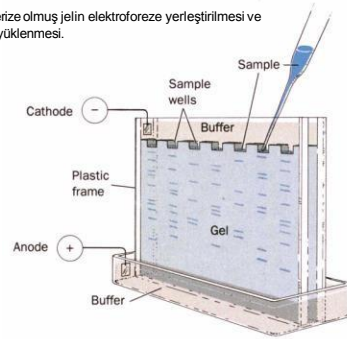


Camlar arasına dökülmüş  
jelin polimerize olması için  
yatay olarak bırakılması  
(Üstten  
görünüş).



Camlar arasına dökülmüş  
jelin polimerize olması  
için yatay olarak  
bırakılması (Yandan  
görünüş).

Polimerize olmuş jelin elektroforez yerleştirilmesi ve  
örnek yüklenmesi.



Poliakrilamid jelin elektroforezinden sonra gümüş boyama ile  
görünürleştirilen STR lokusları (Promega GenePrint STR Sistemleri)